

令和元年度厚生労働科学研究補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

品由来が疑われる有症事案に係る調査（食中毒調査）の迅速化・高度化に関する研究  
（H29-食品—一般-001）

迅速化に向けた簡易法の開発-2（EHEC-POT 法）

研究分担者 鈴木 匡弘 藤田医科大学医学部准教授

研究協力者

愛知県衛生研究所 生物学部 山田和弘

秋田県健康環境センター 保健衛生部 檜尾 拓子

東京都健康安全研究センター 微生物部 食品微生物科 小西 典子

千葉県環境保健研究所 健康科学課 吉原 純子

川崎市健康安全研究所 小嶋 由香

富山県衛生研究所 細菌部 木全 恵子

石川県保健環境センター 細菌・飲料水グループ 木村 恵梨子

福井県衛生環境研究センター 保健衛生部 東方 美保

岐阜県保健環境研究所 保健科学部 野田 万希子

岐阜市衛生試験所 微生物検査係 信田 充弘

三重県保健環境研究所 衛生研究室 微生物研究課 永井 佑樹

大阪健康安全基盤研究所 微生物部細菌課 梅川 奈央

神戸市環境保健研究所 感染症部 野本 竜平

島根県保健環境科学研究所 保健科学部 川瀬 遵

福岡県保健環境研究所 保健科学部 江藤 良樹

研究要旨

近年 O157 等主要な腸管出血性大腸菌（EHEC）に加え、O103 等かつては希であった血清型の EHEC による感染事例が増加し、分子疫学解析法を対応させる必要が生じた。従来 of EHEC 分子疫学解析法は O157 等主要な血清型に特化しているため、他の血清型では菌株識別能が不足する傾向にあった。本研究では菌株毎の ORF 保有パターンを multiplex-PCR で検出し、遺伝子型を決定する PCR-based ORF typing 法（POT 法）を EHEC 用に開発することを目的とした。

O103 等 6 血清型のゲノムデータから、POT 法で検出する ORF を選択し、12-plex PCR 2 反応系からなる EHEC-POT 法を開発した。O121

及び O157 以外の多様な血清型において  $D$  index 0.997 (O111) ~0.961 (O145) と良好な菌株識別能力を実現した。全国の地方衛生研究所で実施可能としていくことで、希な血清型の EHEC 感染症監視に貢献できると期待される。

#### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) は、食品を介して伝播することが多く、患者の発生が多地域にまたがることもある。このような diffuse outbreak においては分子疫学解析を行うことで発生を早期に捕捉し、対策を取ることが重要である。原因となる EHEC の血清型としては O157、O26、O111 が代表的なものであり、IS-printing や multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) が普及し、迅速な分子疫学解析が可能となっている。ところが近年、検出される EHEC の血清型として上記以外にも O91、O103、O121、O145、O165 等が増加し、従来の IS-printing や MLVA では菌株識別能力の不足傾向が見られた。そのため、分子疫学解析法を多様な血清型に対応させる必要が生じてきた。

本研究では菌株毎の ORF 保有パターンを multiplex-PCR で検出し、遺伝子型を決定する PCR-based ORF typing 法 (POT 法) を EHEC に対応させることを目的とした。POT 法はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌や緑膿菌等で実用化され、院内感染対策に利用されている分子疫学解析法である。マルチプレックス PCR による ORF の有無を検出する分子疫学解析法であることから、短時間で実施可能かつ遺伝子型の比較やデータベース化が容易である特徴を持つ。大腸菌用の POT 法も開発されているが、薬剤耐性大腸菌が対象であり、EHEC に対する

菌株識別能はきわめて低い。そこで EHEC O26、O111、O91、O103、O121、O145、O165 等を汎用的に識別可能な EHEC-POT 法開発を目指した。

#### B. 研究方法

検出候補 ORF の抽出と EHEC-POT 法における検出 ORF の決定

H29 年度に、NCBI データベースからダウンロードした 412 株の EHEC ゲノムデータ (O26 115 株、O91 39 株、O103 88 株、O111 86 株、O121 47 株、O145 37 株、) を、検出候補 ORF 選別用データとして用いた。各ゲノムデータは ORF 単位に分割し、相互比較することで、EHEC の遺伝子型決定に用いる検出候補 ORF の選定を行った。

H29~H30 年度にかけて、81 個の検出候補 ORF を選択し、PCR によって 48 株の EHEC (O26 25 株、O103 8 株、O111 7 株、O121 3 株、O145 3 株、O165 2 株) における検出候補 ORF の保有状態調査を行った。さらに、R1 年度には愛知県衛生研究所に保存された 291 株の EHEC (O91 1 株、O103 14 株、O111 10 株、O121 8 株、O145 8 株、O165 1 株、O166 1 株、O26 46 株、O157 202 株) 及び、国立感染症研究所から提供された 110 株の EHEC (O91 10 株、O103 20 株、O111 20 株、O121 20 株、O145 20 株、O165 20 株) から抽出した DNA を用い、各血清

型において十分な菌株識別能力が得られ、なおかつ集団感染事例で同一遺伝子型となるよう、検出 ORF の組み合わせを精査した。

#### EHEC-POT 法

EHEC-POT 法の Taq としては Qiagen Multiplex PCR kit を Q solution 10% 添加条件で用いた。プライマーはあらかじめ反応系毎に混合し、終濃度各  $0.2 \mu\text{M}$  の条件で用いた。PCR 反応産物は 4% アガロースゲルで電気泳動し、検出 ORF の有無を泳動パターンから読み取った。遺伝子型の数値化には PCR 反応系毎に検出バンドの有無を 1、0 に置き換え  $2^n$  からなる係数をかけ、足し算することで検出パターンを数値化し、POT 型とした。

#### 地方衛生研究所における EHEC-POT 法の評価

R1 年度には全国 14 カ所の地方衛生研究所（秋田県健康環境センター、東京都健康安全研究センター、千葉市環境保健研究所、川崎市健康安全研究所、富山県衛生研究所、石川県保健環境センター、福井県衛生環境研究センター、岐阜県保健環境研究所、岐阜市役所健康部、三重県保健環境研究所、大阪健康安全基盤研究所、神戸市環境保健研究所、島根県保健環境科学研究所、福岡県保健環境研究所）にプライマー、Taq ポリメラーゼ、陽性コントロール DNA を送付し、各地方衛生研究所における保存株を用いた EHEC-POT 法の評価を行った。

（倫理面への配慮）

本研究においては患者情報から切り離された菌株のみを扱うため、倫理上の問題は

発生しない。

#### C. 研究結果

検討した全ての血清型で汎用的に菌株識別できると予測された ORF は見つからなかったが、2-4 血清型で菌株識別に利用可能と予測される ORF が 81 個見つかった。この 81 個の ORF の保有パターンによって、in silico においては検討で用いたゲノムデータ株の多くが識別可能であった。

分離株による 81 個の ORF の保有状態調査の結果、81 個すべては菌株により保有状態は異なっていたが、その中から EHEC-POT 法の菌株識別能力向上に寄与するものを選別することで、従来分けられなかった株の多くが識別可能となった。

検出 ORF 選別の結果、検出候補 ORF のうち 21 個の ORF を検出することで、O121 及び O157 を除く各血清型で汎用的に利用可能かつ、十分な菌株識別能力が得られることが判明した。EHEC-POT 法は上記 21 個の ORF に加え、*eae* 遺伝子及び大腸菌のマーカーを加えた 12-plex PCR、2 反応系からなる、検出系となった。

愛知県衛生研究所保有株および感染症研究所提供株 DNA 並びに各地方衛生研究所から O26 46(44)株、O91 34(31)株、O103 113(102)株、O111 30(27)株、O121 72(58)株、O145 97(79)株、O157 202(202)株、O165 39(35)株、その他 45(40)株の合計 678(618)株のデータが得られた（かつこ内は集団事例を除いた株数）。集団感染事例を除いた菌株を用いた各血清型の POT 型の数、及び *D* index は表 1 のとおりである。O26、O111、O103、O165 では *D* index 0.997~0.978 と高い菌株識別

能となった。また、その他の希な血清型では O152 の 1 株のみ ORF が全く検出されずタイプング不能であったが、その他の 39 株における  $D$  index は 0.993 と、十分な菌株識別能力を示し、EHEC-POT 法の開発に関与しなかった分離株においても菌株識別能力は確保されていた。また、O157 及び O121 を除き、ほとんどの血清型において、特定の POT 型への極度な偏りは見られなかった。その一方、O157 では特定の 3 遺伝子型が全体の 31.7% (202 株中 64 株) を占めており、菌株識別能力の低下に繋がった。また、O121 においては特定の 2 遺伝子型に全体の約 8 割 (58 株中 45 株) が集中した。EHEC-POT 法によって、O121、O157 を除く血清型の EHEC を汎用的にタイプングすることができた。

集団事例 (21 事例) 由来の 60 株については、20 事例由来の 57 株では同一集団内で同一 POT 型となった。しかし O121 による 1 事例については、3 株中 1 株が異なる POT 型となった。

表 1 各血清型における菌株識別能力  
(同一事例由来株を除く)

血清型	株数	POT 型数	$D$ index
O26	44	36	0.992
O91	31	21	0.968
O103	102	58	0.983
O111	27	26	0.997
O121	58	11	0.702
O145	79	40	0.961
O157	202	66	0.957
O165	35	25	0.978

その他	40	35	0.993
-----	----	----	-------

#### D. 考察

O157、O121 を除き多様な血清型の EHEC を EHEC-POT 法を用いてタイプングすることができた。EHEC-POT 法は特定の血清型に特化せず、多くの EHEC 分離株に適用することができると考えられる。

その一方、O157 及び O121 による分子疫学調査はできないと考えられた。この研究では O157 を対象血清としなかったため菌株識別能の確保が十分に行われていない。O157 に関しては MLVA や IS-printing が普及しているため、新たな手法の必要性は低いと考えられる。O121 についてはきわめて多様性の少ないグループであり、POT 法の原理では十分な菌株識別能を実現することはできないと考えられた。MLVA 等、POT 法以外の手法でタイプングする必要がある。

全国 14 カ所の地方衛生研究所にプライマーセット及び Taq ポリメラーゼを送付し、検討した結果全ての施設で良好な PCR 反応結果が得られている。また、ほとんど (21 事例中 20 事例) の集団事例において、同一事例の POT 型は同一となり、遺伝子型が安定して得られることも確認できた。このことから EHEC-POT 法は多くの施設で実施可能であり、大部分の EHEC 血清型のタイプングと遺伝子型共有に有効であることが示された。MLVA が普及している血清型 (O157、O26、O111) 以外の diffuse outbreak 監視に EHEC-POT 法は有効と考えられる。メーカーによるキット販売あるいは改良 EHEC-POT 法のプロトコル開示

によって、全国の地方衛生研究所で実施可能としていくことで、マイナーな血清型の EHEC 感染症監視に貢献できると期待される。

#### E. 結論

EHEC-POT 法によって、O121 と O157 を除くほとんど全ての血清型の EHEC を、実用上問題の無い菌株識別能力で、汎用的に分子疫学解析できる。全国の地方衛生研究所で実施可能としていくことで、マイナーな血清型の EHEC 感染症監視に貢献できると期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

第 23 回腸管出血性大腸菌感染症研究会  
「腸管出血性大腸菌 PCR-based ORF Typing (POT) 法の改良とその評価」 2019 年 11 月 14 日、15 日（発表日 15 日） 愛媛県松山市

第 93 回日本細菌学会総会 「EHEC-POT 法と MLVA 法の菌株識別能力の比較」  
2020 年 2 月 19～21 日（発表日 20 日） 愛知県名古屋市

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし