

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

**流行の恐れがある病原大腸菌の遺伝学的調査と
その食中毒予防・迅速対応に資する
情報ネットワーク基盤構築に関する研究**

平成 25 年度～26 年度 総合研究報告書

研究代表者 井口 純

平成 27 (2015) 年 3 月

目次

I. 総合研究報告	
流行の恐れがある病原大腸菌の遺伝学的調査と その食中毒予防・迅速対応に資する 情報ネットワーク基盤構築に関する研究	1
(資料1) MP-1+ (プラス) 詳細プロトコール	
(資料2) <i>E. coli</i> O-genotyping PCR 詳細プロトコール	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	38
III. 研究成果の刊行物・別刷	39

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

（総合）研究報告書

流行の恐れがある病原大腸菌の遺伝学的調査と その食中毒予防・迅速対応に資する情報ネットワーク基盤構築に関する研究

研究代表者 井口 純 宮崎大学農学部・准教授
研究協力者 勢戸 和子 大阪府立公衆衛生研究所・主任研究員
中村 寛海 大阪市立環境科学研究所・研究主任

研究要旨

稀な遺伝子型や稀な血清型の病原大腸菌による突発的な事例の発生にも対応可能な検査体制を整えておくことは、感染拡大を防ぐ為の迅速な対応を取る上で必要である。また稀なタイプの病原大腸菌の出現や侵入を含めた動向をモニタリングすることは、我が国における食の安全を確保する上で重要である。本研究では現在のところ事例発生件数は少ないものの、今後流行の恐れがある病原大腸菌に注目し、その遺伝学的特徴の解析と検査体制の整備に向けた研究を行った。地方衛生研究所などの協力により全国各地で家畜、食品、ヒトなどから分離された non-O157, O26, O111 腸管出血性大腸菌(非典型的 EHEC)、腸管病原性大腸菌、腸管凝集付着性大腸菌 計 817 株について、O 血清群の遺伝子タイプ(O-genotype) および病原関連遺伝子の保有パターンを確認した。726 株の非典型的 EHEC から 98 種類の O-genotype が確認されたことにより、その多様性が認められた。一方で、重症者由来株と動物由来株間で同じ病原関連遺伝子保有パターンを示す 10 種類の O-genotype が確認された。これらはそれぞれ同一クローンである可能性があり、広く動物-ヒト間で分布(伝播)している可能性が示唆された。さらに、従来の手法では O-genotype が決定しなかった非典型的 EHEC の O 抗原合成遺伝子領域の解析を行い、5 種類の新規 O-genotype を特定した。それぞれを特異的に判定する PCR 法を開発し、新規 O-genotype 株の汚染実態も明らかとなった。以上の結果は、我が国における EHEC の汚染状況や動向を把握する上での重要な基盤データになる。O-genotype の判定は、菌株間のクローン性(系統的関連性)の推測に有効であり、上述した基盤データと分離菌株の判定結果を基に、その病原因子や分離履歴を推測・照合することが可能となる。さらに事例発生時には原因細菌の汚染源や汚染範囲を特定する為の有効な検査手法になる。本研究では検査体制の整備と継続的な情報収集を目指し、*E. coli* O-genotyping PCR などの遺伝学的検査法を広く公開し、複数機関で実施できる体制を整備した。

A. 研究目的

2011年に腸管出血性大腸菌(EHEC) O104による大規模な集団食中毒事例がドイツを中心として発生し、旅行者を含む4,000名以上の感染者と50名以上の死者を出した。発生当時、輸入食品や海外渡航者などを介したEHEC O104の日本への侵入が懸念されたが、O104はマイナーなO血清群であることから抗血清判定試薬もごく一部の機関でしか保有しておらず、遺伝学的な検出法も確立されていなかったことから、国内検査機関の多くはO104を特定する術が無い状況であった。結果として我が国への侵入は確認されなかったが、稀なタイプの病原大腸菌による突発的な事例発生にも対応可能な体制を整えておく必要であると考えられた。

EHECの主要なO血清群はO157、O26、O111(=典型的EHEC)である。これら典型的EHECについては、食品や臨床検体からの効果的な検出・分離法が開発・実用化されており、家畜や食品における汚染実態や分離菌株の遺伝学的特徴についても多くの研究成果が報告されている。一方で、上記以外のO血清群に属するEHEC(=非典型的EHEC)による感染事例も数多く報告されている。重症化事例が比較的多いことから、次に注目されるO血清群としてはO103、O121、O145、O165が挙げられる。さらに上記以外にも80種類を超えるO血清群に属するEHECが我が国で確認されており、その一部は血便やHUSといった重症化事例からも分離されている。このような非典型的EHECの汚染実態やその遺伝学的特徴については研究や調査が一部では進んでいるものの情報が少ない状況にある。上述したドイツでの

集団事例の経験も踏まえ、稀なタイプのEHECであっても汚染実態や事例発生状況を正しく把握し、予防や迅速な対応を行うための検査態勢を整備しておくことは我が国における食の安全や国民の健康を守る上で必要であると考えられる。

本研究では、事例報告数は少ないものの散发事例や食品汚染が報告されている非典型的EHECに注目し、食品や家畜、ヒトなどのフードチェーンに関わる横断的なサンプルから分離された菌株について、『病原因子』と『血清型』の遺伝学的特徴を網羅的に解析し、その情報をデータベース化するとともに、検査現場で実用可能な遺伝学的検査法の整備を行った。志賀毒素産生性の獲得により重症化株への変貌が懸念される腸管病原性大腸菌(EPEC)と腸管凝集付着性大腸菌(EAEC)についても菌株を収集して同様の解析を行い、包括的な病原大腸菌の食中毒予防・迅速対応に資する情報共有ネットワーク基盤の構築を目指した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

本研究では2006年以降に国内で家畜・野生動物糞便、食品、ヒト糞便(下痢症などの有症患者および無症状保菌者を含む)から分離された非典型的EHEC(726株)、EPEC(14株)、EAEC(77株)の計817株を用いた(表1)。分与元は下記に示す。基本的に一集団事例からは代表株1株(同一集団または同一検体から異なるO-genotype株が分離されている場合は、各タイプ1株)を使用した。非典型的EHECを由来別に見ると、ヒト由来380株、ウシ由来307株、ウシ以外の動物由来18株、食品由

来 13 株、由来源不明 8 株であった。分与元：大阪府立公衆衛生研究所、沖縄県衛生環境研究所、神奈川県衛生研究所、北九州市環境科学研究所、さいたま市健康科学研究センター、愛媛県立衛生環境研究所、横浜市衛生研究所、岡崎市保健所、岡山県環境保健センター、岩手県環境保健研究センター、岐阜県保健環境研究所、宮崎県衛生環境研究所、宮城県保健環境センター、熊本県保健環境科学研究所、熊本市環境総合センター、広島県立総合技術研究所保健環境センター、香川県環境保健研究センター、佐賀県衛生薬業センター、埼玉県衛生研究所、三重県保健環境研究所、山口県環境保健センター、滋賀県衛生科学センター、鹿児島県環境保健センター、新潟県保健環境科学研究所、新潟市衛生環境研究所、神戸市環境保健研究所、青森県環境保健センター、静岡県環境衛生科学研究所、静岡市環境保健研究所、石川県保健環境センター、仙台市衛生研究所、千葉県衛生研究所、千葉市環境保健研究所、川崎市健康安全研究所、相模原市衛生試験所、大阪市立環境科学研究所、大分県衛生環境研究センター、長崎県環境保健研究センター、長野県環境保全研究所、島根県保健環境科学研究所、東大阪市環境衛生検査センター、徳島県立保健製薬環境センター、奈良県保健研究センター、姫路市環境衛生研究所、富山県衛生研究所、福井県衛生環境研究センター、福岡県保健環境研究所、福岡市保健環境研究所、福島県衛生研究所、北海道立衛生研究所、和歌山県環境衛生研究センター、川崎市立井田病院、日本微生物研究所、以上 53 機関。

下記の遺伝学的な試験は、Wizard Genomic DNA Purification Kit (プロメガ) により精製した菌株 DNA (10ng/μl) を使用した。

2. 既知病原関連遺伝子の分布解析

全株について、大腸菌でこれまでに報告されている 21 種類の病原関連遺伝子：*stx1* (志賀毒素 1 型)、*stx2* (志賀毒素 2 型、4 種類の亜型：*stx2c*、*stx2d*、*stx2e*、*stx2f*)、*eae* (型分泌系接着因子インチミン)、*aggR* (凝集性付着線毛転写活性因子)、*ehxA* (EHEC ヘモリジン)、*elt* (易熱性エンテロトキシン)、*est* (耐熱性エンテロトキシン)、*cdtV* (細胞膨化致死毒素)、*subAB* (サブチラーゼ様細胞毒素)、*astA* (EAEC 耐熱性毒素)、*ipaH* (組織侵入性因子)、*bfpA* (束状線毛アドヘジン)、*saa* (STEC 自己凝集性アドヘジン)、*iha* (IrgA 類似アドヘジン)、*neuC* (K1 莢膜合成酵素)、*papC* (P 線毛)、*fimA* (I 型線毛) について、遺伝子の保有を PCR により調べた。

本研究で実施した PCR のプライマー配列および反応条件などは表 2 に示す。PCR には KAPATaq EXtra PCR キット (日本ジェネティクス) を使用した。反応液組成は表 3 に示す。

3. O-genotype の判定

大腸菌 O 血清群の遺伝学的な判定 (O-genotype) には、我々のグループが厚生労働科学研究費補助金 (新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業) 重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原性因子及び診療の標準化に関する研究 (H24-26、研究代表者：大西真 国立感染症研究所 細菌第一部・部長) で開発した、ほぼ全ての O 血清群を遺伝学的に判定出来る PCR 法 (*E. coli* O-genotyping PCR システム) を用いた。本法は 162 種類のプライマーセットを含む 20 種類のマルチプレックス PCR キットからなっており (表 4-7)、デンマーク国立血清研究所由来の大腸菌全 O 血清群参考株を

用いてその妥当性と特異性が確認されている。PCR による増幅産物は QIAXCEL DNA Screening Kit(キアゲン)またはゲル電気泳動により確認した。増幅が確認された反応液については SSI 参考株を用いた陽性コントロール PCR 産物と並べて再泳動し、増幅サイズを確認した。

(倫理への配慮)

ヒト由来株については、既に連結不可能匿名化されている情報のみを用いて研究を行った。

C. 研究結果

1. 非典型的 EHEC のプロファイル

(1) 概要

stx1・*stx2*・*eae* の保有パターンを表 8 に示す。ヒト由来株で主要なパターンは *stx1* 単独 (30%)、*stx2* 単独 (28%)、*stx1+eae* (23%) であるのに対し、ウシ由来株では *stx2* 単独が全体の 68% を占めた。*eae* 保有率はヒト由来株で 41% (157 株)、ウシ由来株で 30% (91 株) であった。*bfpA*、*aggR*、*elt*、*est*、*ipaH* を保有する菌株は、*elt* 保有の 1 株 (無症状保菌者由来株) を除いて認められなかった。*E. coli* O-genotyping PCR により 98 種類 O-genotype が確認された。また 145 株では O-genotype が判定出来なかった (OgUT: PCR 産物が得られなかった)。

(2) 重症者由来株の特徴

有症者由来 135 株から 42 種類の O-genotype が確認された (表 9)。そのうち血便または溶血性尿毒症症候群を呈した患者 (重症者) 由来 63 株からは 26 種類の O-genotype が確認された。重症者由来株と同じ O-genotype がウシ由来株から 16 種類 (O5、O28ac/O42、O45、O84、O88、O91、O103、O107/O117、O109、O113、

O115、O163、O172、O174、O177、O182) その他の動物から 3 種類 [ブタ由来株から 1 種類 (O177)、シカ由来株から 2 種類 (O5 および O141)] 確認された (表 9)。食品由来株 (O9、O22、O130、O130、O150) から有症者由来株と共通する O-genotype は確認されなかった。

10 種類の O-genotype では、重症者由来株と同じ病原関連遺伝子保有パターンを示すウシ由来株が確認された (O103、O113、O163、O177、O182、O45、O5、O84、O88、O28ac/O42) (表 10)。そのうち 6 種類 (O103、O177、O182、O45、O5、O84) では *eae* が陽性であった。残る 4 種類 (O113、O163、O88、O28ac/O42) では *eae* が陰性である一方で *saa* が陽性であった。

2. EPEC および EAEC のプロファイル

EPEC では 10 種類の O-genotype (O49、O56、O108、O109、O125、O128、O145、O177、O156、O184) が確認され、OgUT は 3 株であった。一方 EAEC では 22 種類の O-genotype が確認され (O25、O39、O44、O86、O92、O99、O104、O11、O111、O114、O125、O126、O127、O128、O130、O131、O154、O175、O176、O181、O90/O127、O17/O44/O73/O77/O106)、OgUT は 6 株であった。EPEC と EAEC では *astA* がそれぞれ 4 株 (29%) と 17 株 (22%) で、*iha* がそれぞれ 3 株 (21%) と 22 株 (29%) で保有が確認された。EPEC の 3 株で *ehx* の保有が確認された。その他 *stx*、*ipaH*、*cdtV*、*subAB*、*saa*、*papC* は EPEC と EAEC の全てで陰性であった。

3. 検査キットの開発と実用化

(1) MP-1 + (プラス)

EHEC における主要 7 種類の O 血清群 (O157、O26、O111 に加え、O103、O121、O145、O165) と 3 種類の病原遺伝子 (*stx1*、*stx2*、*eae*) を 1 本のチューブで反応・検出できる PCR キットを開発した。さらに、全 O 血清群参考株および対象 O 血清群に属する野生株 (各 10 株) を用いて特異性の確認を行った。本キットは各機関で自家調整できるように、国立感染症研究所が発表している「EHEC 検査・診断マニュアル」の次回改訂版に掲載する予定である (資料 1)。さらにプライマー配列や反応液組成などを調整し、上記手法の特異性や検出感度を改良した市販 PCR キット「EHEC (O antigens) PCR Typing Kit」(タカラバイオ、RR133A) の開発に協力した。

(2) *E. coli* O-genotyping PCR

E. coli O-genotyping PCR により得られる O-genotype の同一性は、分離菌株間の系統的関連性をスクリーニングする手法として有効である。

本手法の詳細 (資料 2) については供試菌株の分与元機関と共有すると同時に、研究室ホームページでも広く公開した (http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/iguchi/iguchi_lab/O-genotyping.html)。さらに、国立感染症研究所・細菌第一部、大阪府公衆衛生研究所・感染症部、動物衛生研究所・細菌・寄生虫研究領域の 3 機関には *E. coli* O-genotyping PCR を行う為の全プライマーセットおよび全 O 血清群参考株の陽性コントロール DNA を配布し、それぞれの機関で行われている家畜や食品、ヒト患者から分離される病原大腸菌の調査・研究での試験的実用を開始した。

4. 新規 O-genotype の発見と PCR 検査法の開

発

重症者から分離された非典型的 EHEC で、O-genotype が判定不能だった 5 株について、O 抗原合成遺伝子領域の塩基配列を決定して解析した。その結果、それぞれの O 血清群に対して特異性が高いとされる *wzx* (O 抗原ユニット輸送タンパク) および *wzy* (O 抗原合成タンパク) 遺伝子の塩基配列相同性が既知のものに対して 50% 以下であり、それぞれが新規の O-genotype として判断された (ON3、ON6、ON8、ON10、ON31)。新規 O-genotype を特異的に検出できる PCR 法を開発し、O-genotype が判定不能だった 145 株について確認したところ、ON3 が 11 株、ON6 が 8 株、ON8 が 28 株、ON10 が 6 株、ON31 が 4 株確認された。(新規 O-genotype の配列情報および PCR プライマー配列は未発表のため、本報告では省略する)。そのうち 4 種類の O-genotype (ON3、ON6、ON8、ON10) ではウシ糞便由来株を含んでいた。中でも ON8 はウシ由来株の中で O113 (55 株) の次に多いタイプとなった。

D. 考察

本研究では家畜・野生動物、食品およびヒトより分離された非典型的 EHEC、EAEC、EPEC からなる計 800 株以上の O-genotype およびその病原関連遺伝子プロファイルが明らかとなった。合計 113 種類の O-genotype が確認されたことにより、その多様性が認められた一方で、同一 O-genotype 株の分布とそれぞれが保有する病原遺伝子のパターンも明らかとなった。非典型的 EHEC においては、重症者由来株と同じ O-genotype がウシやその他動物由来株から 17 種類が確認された。さらにそれぞれの

O-genotype 内で重症者由来株と同一遺伝子プロファイルを示すウシやその他動物由来株が 10 種類の O-genotype で確認された。これらはそれぞれ同一クローンである可能性があり、広く動物-ヒト間で分布(伝播)している可能性が示唆された。重症者から分離された O-genotype 株については、その保菌動物や食品への汚染状況について特に注意する必要があると考えられた。株間の詳細な系統関係を明らかにする為には multilocus sequence typing (MLST) やパルスフィールドゲル電気泳動パターン解析が必要であると考えられた。

本研究で使用した菌株の中に 2011 年のドイツ集団事例でみられた EHEC と EAEC のハイブリッドタイプは認められなかったが、*stx2*、*eae* そして *elt* を併せ持つ EHEC と ETEC のハイブリッドタイプ株 (O166: 無症状保菌者由来) が確認された。

E. coli O-genotyping PCR の判定結果と従来の血清学的手法による判定結果との対応については現在評価を進めており、一部を除いて合致することが確認されている。判定の簡便性や迅速性そして分類能を考えると、O-genotyping による分類は病原大腸菌の追跡や調査を行う際のスクリーニング的手法として有効であると考えられた。

OgUT 株については重症者由来株を中心に O 抗原合成遺伝子領域の解析を行い、5 種類の新規 O-genotype を確認した。その配列情報を基にそれぞれの O-genotype を識別する PCR 法を開発し、その汚染実態も明らかとなった。中でも ON8 はウシ糞便や食品から広く分離されており、広く動物-ヒト間で分布(伝播)している可能性が示唆された。残る OgUT 株についても O 抗原合成遺伝子領域の解析を進め、新規

O-genotype であった場合にはその判定法を順次開発する予定である。

本研究により、非典型的 EHEC を中心とする病原大腸菌の遺伝学的特徴が明らかとなった。これら情報は我が国における EHEC の汚染状況や動向を把握する上での基盤データセットになると考えられた。

E. 結論

家畜・野生動物、食品、ヒトより分離された病原大腸菌の遺伝学的特徴とその汚染状況を明らかにした。さらに大腸菌の O 血清群を遺伝学的に判定出来る手法 (*E. coli* O-genotyping PCR など) を整備し、広く情報を公開した。以上の成果は、流行の恐れがある病原大腸菌の汚染状況を把握すると共に、事例発生時の迅速な対応をサポートする有効な手法になると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Iguchi A**, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, and Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan. *Escherichia coli* O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O-serogrouping. *Journal of Clinical Microbiology* (in press)
- 2) **Iguchi A**, Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, Hayashi T, Thomson NR. (2015) A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Research* 22(1):101-7
- 3) Mekata H, **Iguchi A**, Kawano K, Kirino Y, Kobayashi I, Misawa N. (2014) Identification of O-serotypes, -genotypes and virulotypes of Shiga

toxin-producing *Escherichia coli* isolates including non-O157 from beef cattle in Japan. *Journal of food protection* 8: 1269-1274

4) von Mentzer A, Connor T, Wieler LH, Semmler T, **Iguchi A**, Thomson NR, Rasko DA, Joffre E, Corander J, Pickard D, Wiklund G, Svennerholm A, Sjöling A, Dougan G. (2014) Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with significant long-term global distribution. *Nature Genetics* 46(12):1321-1326

学会発表

- 1) **井口純**, 同種内の細分類に利用されるゲノム多型、第 88 回日本細菌学会総会、2015. 3. 26-28 (岐阜市)
- 2) 秋吉充子、**井口純**, *E. coli* と *Shigella* 間で見られる O 抗原合成遺伝子領域の共通性、第 88 回日本細菌学会総会、2015. 3. 26-28 (岐阜市)
- 3) 伊豫田淳、**井口純**, 斉藤剛仁、勢戸和子、磯部順子、石原朋子、石島希、EHEC Working Group、大西真、血清診断法と *E. coli* O-genotyping PCR 法による HUS 患者由来 EHEC O76:H7 の分離、第 88 回日本細菌学会総会、2015. 3. 26-28 (岐阜市)
- 4) 石原朋子、伊豫田淳、**井口純**, 大西真、日本における健常者由来腸管出血性大腸菌の解析、第 88 回日本細菌学会総会、2015. 3. 26-28 (岐阜市)
- 5) **Iguchi A**, A complete view of the genetic diversity of the *E. coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. International Workshop on Emerging Approaches for Typing, Detection, and Characterization of *Escherichia coli*. 2015 3. 9-10 (アメリカ・ペンシルベニア州立

大学)

- 6) **井口純**, 細菌ゲノム研究のフロンティア、第 7 回日本暖地畜産学会、2014. 10. 26 (宮崎市)
- 7) **井口純**, 秋吉充子、吉崎美和、EHEC 検出・分類マルチプレックス PCR キットの開発と評価、第 35 回日本食品微生物学会学術総会、2014. 9. 18-19 (堺市)
- 8) 秋吉充子、加藤結子、中村寛海、**井口純**, O 血清群別に見た STEC の選択培地上での生育傾向、第 35 回日本食品微生物学会学術総会、2014. 9. 18-19 (堺市)
- 9) 加藤結子、大畠律子、河合央博、西本清仁、佐々木麻里、成松浩志、秋吉充子、中嶋洋、緒方喜久代、伊豫田淳、石原朋子、大西真、**井口純**, ウシ由来 STEC の O-genotype を含めた遺伝学的特徴解析、第 35 回日本食品微生物学会学術総会、2014. 9. 18-19 (堺市)
- 10) **井口純**, 中村寛海、O 血清群別に見た STEC の選択培地上での生育傾向、第 18 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2014. 7. 15-16 (京都市)
- 11) **井口純** 大腸菌 O 抗原コード領域を標的とした分類手法 "E. coli O-genotyping" 第 87 回日本細菌学会総会、2014. 3. 26-28 (東京)
- 12) **井口純** *in vitro* および *in silico* による大腸菌 O 血清群の遺伝学的判定法開発の試み 第 25 回日本臨床微生物学会総会、2014. 2. 1-2 (名古屋)
- 13) 秋吉充子、**井口純**, 伊豫田淳, 勢戸和子、大西真 "E. coli O-genotyping" の実用性評価 第 34 回日本食品微生物学会学術総会、2013. 10. 3-4 (東京)
- 14) 中村寛海、**井口純**, 藤原敦史、伊豫田淳、長谷篤、小笠原準 ウシ由来 STEC の遺伝学的特徴と系統的關係について 第 34 回日本食品

微生物学会学術総会、2013. 10. 3-4 (東京)

15) 井口純、秋吉充子、伊豫田淳、勢戸和子、大西真 *E. coli* O-genotyping PCR により判定できなかった STEC 株の O 抗原コード領域の解析 第 34 回日本食品微生物学会学術総会、2013. 10. 3-4 (東京)

16) 井口純、伊豫田淳、勢戸和子、大西真 “*E. coli* O-genotyping PCR” の実用化に向けて 第 17 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2013. 7. 25-26 (つくば)

17) 大岡唯祐、勢戸和子、河野喜美子、小林秀樹、井口純、他 14 名 新興病原体 *Escherichia albertii* のゲノム及びゲノム比較解析 第 17 回

腸管出血性大腸菌感染症研究会、2013. 7. 25-26 (つくば)

18) Iguchi A., Iyoda S, Ohnishi M Development of a DNA-based system for the identification of almost all recognized *E. coli* O serogroups Applied Bioinformatics and Public Health Microbiology 2013, 2013. 5. 15-17 (イギリス・ケンブリッジ)

G. 知的財産権の出願

なし

表 1. 供試菌株の種類

分離源	EHEC	EPEC	EAEC
ヒト	380	9	77
ウシ	307	4	0
ウシ以外の動物	18	1	0
食品	13	0	0
不明	8	0	0
Total	726	14	77

表 2. 大腸菌病原関連遺伝子の判定に用いたプライマー配列および反応条件

Target Gene	Primer	Sequence (5'-3')	size (bp)	PCR ^c	Reference
<i>stx1^a</i>	LP30	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG	348	58-30s	Cebula et al (1996) J. Clin. Microbiol. 33: 248-250
	LP31	CACCAGACAATGTAACCGCTG			
<i>stx2^b</i>	LP43	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG	584		Cebula et al (1996) J. Clin. Microbiol. 33: 248-250
	LP44	GCGTCATCGTATACACAGGAGC			
<i>stx2c</i>	stx2c_F	GCGGTTTTATTTGCATTAGT	124	53-30s	Osek et al (2003) J Appl Microbiol 95, 1217-1225.
	stx2c_R	AGTACTCTTTTCCGGCCACT			
<i>stx2d</i>	stx2d-F	GGTAAAATTGAGTTCTCTAAGTAT	175	53-30s	Osek et al (2003) J Appl Microbiol 95, 1217-1225.
	stx2d-R	CAGCAAATCCTGAACCTGACG			
<i>stx2e</i>	stx2e_F	ATGAAGAAGATGTTTATAGCG	267	53-30s	Osek et al (2003) J Appl Microbiol 95, 1217-1225.
	stx2e_R	TCAGTTAAACTTCACCTGGGC			
<i>stx2f</i>	stx2f_F	AGATTGGGCGTCATTCCTGGTTG	428	53-30s	Osek et al (2003) J Appl Microbiol 95, 1217-1225.
	stx2f_R	TACTTTAATGGCCGCCCTGTCTCC			
<i>ehxA</i>	hlyAF	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534	53-30s	Paton and Paton (1998) J. Clin. Microbiol. 36: 598-602
	hlyAR	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT			
<i>eae</i>	SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	881	53-30s	Oswald et al (2000) Infec. Immun. 68: 64-71
	SK2	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG			
<i>elt (lt)</i>	TW20	GCGGACAGATTATACCGTGC	450	53-30s	Stacy-Phipps et al. (1995) J. Clin. Microbiol. 33: 1054-1059
	JW11	CGGTCTCTATATCCCTGTT			
<i>est (st)</i>	JW14	ATTTTTMTTCTGTATTRCTT	190	53-30s	Stacy-Phipps et al. (1995) J. Clin. Microbiol. 33: 1054-1059
	JW7	CACCCGGTACARGCAGGATT			
<i>cdtV</i>	cdtV_F	TTCATTGTTGCGCTCCTG	755	53-1m	Cergole-Novella MC et al. (2007), FEMS Microbiol. Lett. 274:329-334
	cdtV_R	TTTATAAGCTGGTATCCTG			
<i>subAB</i>	subAB_F	GTGTACAGGACTCATGG	783	55-1m	Newton HJ et al. (2009) Emerg. Infect. Dis. 15: 372-380
	subAB_R	ATCACCAGTCCACTCAG			
<i>astA</i>	EAST11a	CCATCAACACAGTATATCCGA	111	55-30s	Yamamoto and Echeverria. (1996). Infec. Immun. 64: 1441-1445
	EAST11b	GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT			
<i>ipaH</i>	ipalII	GTTCCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	600	55-30s	Sethabutr et al. (2000). Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 37: 11-16.
	ipalV	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC			

<i>bfpA</i>	EP1	AATGGTGCTTGGCGCTTGCTGC	326	55-30s	Gunzburg et al. (1995) J. Clin. Microbiol. 33: 1375-1377
	EP2	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA			
<i>aggR</i>	aggR_F	CTAATTGTACAATCGATGTA	308	42-30s	Czeczulin et al. (1999). Infec. Immun. 67: 2692-2699
	aggR_R	ATGAAGTAATTCTTGAAT			
<i>saa</i>	SAAD_F	CGTGATGAACAGGCTATTGC	119	55-30s	Adrienne W. Paton et al, (2002), J. Clin. Microbiol. 40:271-274
	SAAD_R	ATGGACATGCCTGTGGCAAC			
<i>iha</i>	iha-I	CAGTTCAGTTTCGCATTACCC	1,305	55-1m	Schmidt et al (2001) IAI 69: 6863-6873
	iha-II	GTATGGCTCTGATGCGATG			
<i>neuC</i>	neu1	AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	676	60-30s	Moulin-Schouleur et al (2007) J. Clin. Microbiol. 45: 3360-3376
	neu2	GGTGGTACATCCCGGGATGTC			
<i>papC</i>	pap1	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	328	60-30s	Moulin-Schouleur et al (2007) J. Clin. Microbiol. 45: 3360-3376
	pap2	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA			
<i>fimA</i>	fimA1	CGGCTCTGTCCCTSAGT	500	52-30s	Moulin-Schouleur et al (2007) J. Clin. Microbiol. 45: 3360-3376
	fimA2	GTCGCATCCGCATTAGC			

^a 亜型の検出範囲は *stx1a* および *stx1c* (*stx1d* は検出不可)

^b 亜型の検出範囲は *stx2a*, *2b*, *2c*, *2d*, *2e*, *2g* (*stx2f* は検出不可)

^c アニーリングにおける温度 () と時間 (s : 秒、m : 分) を示す。PCR は (94 -30 秒、アニーリング、72 -1 分) を 25 サイクル行った。

表 3. 大腸菌病原関連遺伝子 PCR の反応液組成

	組成 (μ l)	最終濃度
PCR grade water	7.475	
5x KAPA Extra Buffer (without Mg ²⁺)	3	
MgCl ₂ (25mM)	1.5	2.5mM
dNTP mix (10mM each dNTP)	0.45	0.3mM
primer F (10 μ M)	0.8	0.5 μ M
primer R (10 μ M)	0.8	0.5 μ M
KAPA Taq DNA polymerase (5U/ μ l)	0.075	0.4U
Template DNA	1	
total	15 μ l	

表 4. *E. coli* O-genotyping PCR に用いたプライマーの配列など

O-genotype	関連する O 血清群	標的遺伝 子	プライマー名	プライマー配列 (5'-3')	サイズ (bp)	参照
Og1	O1	<i>wzx</i>	Og1-PCR_F	GTGAGCAAAAGTGAATAAGGAACG	1098	Li D. et al.
			Og1-PCR_R	CGCTGATACGAATACCATCCTAC		J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og3	O3	<i>wzy</i>	Og3-PCR_F	GAATGAGTGCCACAATGGCTA	571	Iguchi A. et al.
			Og3-PCR_R	GCAGAAAGAATGGACACGCAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og4	O4	<i>wzx</i>	Og4-PCR_F	TTGTTGCGATAATGTGCATGTTCC	664	Li D. et al.
			Og4-PCR_R	AATAATTTGCTATACCCACACCCCTC		J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og5	O5	<i>wzy</i>	Og5-PCR_F	AGGGCAATCTTCCGTAATGA	566	Iguchi A. et al.
			Og5-PCR_R	CCTCTGGGCTATAAACCAACC		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og6	O6	<i>wzy</i>	Og6-PCR_F	GGATGACGATGTGATTTGGCTAAC	783	Li D. et al.
			Og6-PCR_R	TCTGGGTTTGTGTGTATGAGGC		J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og7	O7	<i>wzx</i>	Og7-PCR_F	CTATCAAAATACCTCTGCTGGAATC	610	Li D. et al.
			Og7-PCR_R	TGGCTTCGAGATTAACCTATTCT		J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og8	O8	<i>orf469</i>	Og8-PCR_F	CCAGAGGCATAATCAGAAATAACAG	448	Li D. et al.
			Og8-PCR_R	GCAGAGTTAGTCAACAAAAGGTCAG		J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og9	O9	<i>wzt</i>	Og9-PCR_F	CGTCGGCAAGCGTATAAATA	1235	Iguchi A. et al.
			Og9-PCR_R	CCCAGAAATCCATGCTC		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og10	O10	<i>wzy</i>	Og10-PCR_F	GCTGGAGTTGCAGGTGCTATA	546	Iguchi A. et al.
			Og10-PCR_R	AAGGGGCAGGAATGGAAGTA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og11	O11	<i>wzy</i>	Og11-PCR_F	ATTAATGGGGCCAGATGGAGT	509	Iguchi A. et al.
			Og11-PCR_R	ATTGCGCTGGGATGAATACA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og12	O12	<i>wzy</i>	Og12-PCR_F	CAATGGGGTTGTCGTATCAAA	885	Iguchi A. et al.
			Og12-PCR_R	AAAAATGCCCATAGGACCA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og15	O15	<i>wzy</i>	Og15-PCR_F	TGGCAATGGATTGGTATCT	608	Iguchi A. et al.
			Og15-PCR_R	AGGGAAGAACCCTCTCTAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og16	O16	<i>wzx</i>	Og16-PCR_F	GGTTTCAATCTCACAGCAACTCAG	302	Li D. et al.
			Og16-PCR_R	GTTAGAGGATAATAGCCAAGCGG		J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og19	O19	<i>wzy</i>	Og19-PCR_F	ATAAGCGCGAGCTTAGCTCTT	389	Iguchi A. et al.
			Og19-PCR_R	CACAACACGGCGCTAAGTAAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og21	O21	<i>wzx</i>	Og21-PCR_F	CTGCTGATGTCGCTATTATTGCTG	209	Li D. et al.
			Og21-PCR_R	TGAAAAAAGGGAAACAGAAGAGCC		J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og22	O22	<i>wzx</i>	Og22-PCR_F	TGTCGCCACTACTTTCCGCGTTTA	458	Fratamico PM. et al.
			Og22-PCR_R	AGCCCATGACATTACTACGGCACT		Food Analytical Methods. 2009 2:169-179
Og23	O23	<i>wzy</i>	Og23-PCR_F	TCGTGGTAATGGAGGAGATG	427	Iguchi A. et al.
			Og23-PCR_R	TGCCTTCTCGGCTCTGTATA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og24	O24	<i>wzx</i>	Og24-PCR_F	TGGGATTTATGCGGTTGCTT	233	Iguchi A. et al.
			Og24-PCR_R	TGCGAGAAGAGGAGTAGTCGA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og25	O25	<i>wzy</i>	Og25-PCR_F	AGAGATCCGTCTTTTATTTGTTCCG	230	Li D. et al.
			Og25-PCR_R	GTTCTGGATACCTAACGCAATACCC		J Microbiol Methods. 2010 82:71-7

Og26	O26	wzx	Og26-PCR_F	GGGGTGGGTACTATATTGG	241	Paddock Z. et al.
			Og26-PCR_R	AGCGCCTATTTTCAGCAAAGA		Vet Microbiol. 2012 156:381-8
Og27	O27	wzy	Og27-PCR_F	AACCTATGGGAAGCTCTGGA	382	Iguchi A. et al.
			Og27-PCR_R	ACACACAGGCAACAACATCGA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og28ab	O28ab	wzy	Og28ab-PCR_F	AAGCGCAGTGGATCTCGTT	446	Iguchi A. et al.
			Og28ab-PCR_R	ACCACCATGCGCATAGTAAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og29	O29	wzy	Og29-PCR_F	TGCTCCCTGCTGGTGGTTATA	260	Iguchi A. et al.
			Og29-PCR_R	TAGTCAAGCCTGGTCTAAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og30	O30	wzy	Og30-PCR_F	GAATGGGAGGGATATCAGAA	894	Iguchi A. et al.
			Og30-PCR_R	TTGCGCTACCCTGAATAGCAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og32	O32	wzy	Og32-PCR_F	TCCCAACCTGTTGCTTTAA	452	Iguchi A. et al.
			Og32-PCR_R	CAGCCAGACCAGTAGAGGAAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og33	O33	wzy	Og33-PCR_F	GGGGCGTGGTGTGTTATTAT	783	Iguchi A. et al.
			Og33-PCR_R	TCACCTACGACCAATGCAGAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og34	O34	wzy	Og34-PCR_F	TGCTTCTGTGGGGAGTTTA	247	Iguchi A. et al.
			Og34-PCR_R	AATGGCATATTCGTGCCATC		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og35	O35	wzy	Og35-PCR_F	TGCAGGTGCTCAATTGGTT	303	Iguchi A. et al.
			Og35-PCR_R	CCATCCAAATACGGAGCAATT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og36	O36	wzy	Og36-PCR_F	AATCCCAGGGATGGTTATCA	292	Iguchi A. et al.
			Og36-PCR_R	TATAGAGAATGGCACACGCTG		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og37	O37	wzy	Og37-PCR_F	TTCGCCCTGAAGGAGAATT	683	Iguchi A. et al.
			Og37-PCR_R	TTATGCGCTCCCATCCAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og38	O38	wzy	Og38-PCR_F	TCGCCATTGTTACCCAGT	822	Iguchi A. et al.
			Og38-PCR_R	ATTCGAAAGTGCTGGAAAG		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og39	O39	wzy	Og39-PCR_F	GGATGGAGCGGAATACTGATT	667	Iguchi A. et al.
			Og39-PCR_R	CAAACCAACCGGCATAATA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og40	O40	wzy	Og40-PCR_F	ACGGTAATAGCTTAGGGCAA	1082	Iguchi A. et al.
			Og40-PCR_R	CGAGCTACCCAATATGCTGCT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og41	O41	wzx	Og41-PCR_F	TGGATCGCTGTTATTGG	942	Iguchi A. et al.
			Og41-PCR_R	CGCCACCCCTTGTATATAAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og43	O43	wzy	Og43-PCR_F	TTTTGGTGCAACTTGCAT	1041	Iguchi A. et al.
			Og43-PCR_R	GCTTTACCCATTGTAGCGAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og45	O45	wzy	Og45-PCR_F	GTCCCCAGGGTTGTGTATG	916	Iguchi A. et al.
			Og45-PCR_R	AATAAGGGAGCCCGCAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og48	O48	wzy	Og48-PCR_F	TATGGTGCTGCTTTCTCCAA	793	Iguchi A. et al.
			Og48-PCR_R	AGGAATTGCAGTTGTTCCGA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og49	O49	wzy	Og49-PCR_F	AGTTGCCTTTCTTGGGTGA	789	Iguchi A. et al.
			Og49-PCR_R	TCGTATCCAATTAAGCCAGCC		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og51	O51	wzy	Og51-PCR_F	CCATGAGGGAAACAATGTTG	583	Iguchi A. et al.
			Og51-PCR_R	TTTTCCCTTGCTCTCGATA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og52	O52	wzm	Og52-PCR_F	TTTGGTCGACGTTAGT	543	Feng L. et al.

			Og52-PCR_R	CAACTCGTGGGAAGATGA		J Bacteriol. 2004 186:4510-9.
Og53	O53	wzy	Og53-PCR_F	AAGCTCAAGGGGCATGTTTT	806	Iguchi A. et al.
			Og53-PCR_R	TTCCCCTAACCCCTGCACATA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og54	O54	wzy	Og54-PCR_F	TGGCAATATATGCGTTTGTGA	351	Iguchi A. et al.
			Og54-PCR_R	TGTGGACCACGTCCAACCTC		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og55	O55	wzy	Og55-PCR_F	TCCTTATTTGTGCGGGGG	207	Iguchi A. et al.
			Og55-PCR_R	CCAGGAAAGCTGCCAATTATC		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og56	O56	wzx	Og56-PCR_F	CTTGGGGTTTGAAGTTGGAT	250	Iguchi A. et al.
			Og56-PCR_R	TGCTAATAACAATGCGCCTG		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og58	O58	wzy	Og58-PCR_F	TAGGTGCAAGTCCTATGTGGG	1046	Iguchi A. et al.
			Og58-PCR_R	TAGCCTGGCAGCACAGAGTTT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og59	O59	wzy	Og59-PCR_F	TGATCCAGCGGGTGAATATT	783	Iguchi A. et al.
			Og59-PCR_R	ACACCTGGGTTGAACCTCTCCA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og60	O60	wzm	Og60-PCR_F	TAGGTGCGGCATGGCTAATAT	443	Iguchi A. et al.
			Og60-PCR_R	GAATTGGCCAACATCACGAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og61	O61	wzy	Og61-PCR_F	ATCTCAGACCGTCCGGATATT	487	Iguchi A. et al.
			Og61-PCR_R	GCATCGAACCGGGGCTATA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og63	O63	wzy	Og63-PCR_F	ATTCGGTGCTGCTGGAATTA	995	Iguchi A. et al.
			Og63-PCR_R	TGAACATTATGCCACCGATG		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og64	O64	wzy	Og64-PCR_F	TGGCAATACAAGTCTGATGC	727	Iguchi A. et al.
			Og64-PCR_R	AGGGCGTTACCGGATAGAAAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og65	O65	wzy	Og65-PCR_F	TGTTGGCGCTGGTTTTATGTT	381	Iguchi A. et al.
			Og65-PCR_R	CCCATAATTGCACCCGATAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og66	O66	wzy	Og66-PCR_F	CGAGCAAATTAATCCAC	301	Cheng J. et al.
			Og66-PCR_R	TCAACACTAAACGAAACG		J Microbiol. 2007 45:69-74.
Og69	O69	wzy	Og69-PCR_F	ACCTGGCTTTGGAGTTGATGA	653	Iguchi A. et al.
			Og69-PCR_R	TAGCCAATGGTAGTCGACCAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og70	O70	wzy	Og70-PCR_F	CTTGCAAAGGCACAAATCT	393	Iguchi A. et al.
			Og70-PCR_R	CCTTCCGTCTGCCAATAAAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og71	O71	wzx	Og71-PCR_F	GCATTATTAGCCACTCAA	344	Hu B. et al.
			Og71-PCR_R	AGCCGTATCATTAGAGCAGA		FEMS Immunol Med Microbiol. 2010 59:161-9
Og74	O74	wzy	Og74-PCR_F	TCCAAAGGTGATATGTTGGCA	289	Iguchi A. et al.
			Og74-PCR_R	TATGCGCAGGAAAGTCAATG		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og75	O75	wzy	Og75-PCR_F	GAGATATACATGGGAGGTAGGCT	511	Li D. et al.
			Og75-PCR_R	ACCCGATAATCATATTCTTCCCAAC		J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og76	O76	wzy	Og76-PCR_F	TGGCTTTTATGGGATATGTG	457	Iguchi A. et al.
			Og76-PCR_R	TTGTGAGTATAAGCCCCCAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og78	O78	wzx	Og78-PCR_F	GGTATGGGTTTGGTGGTA	992	Liu B. et al.
			Og78-PCR_R	AGAATCACAACTCTCGGCA		Vet Microbiol. 2010 142:373-8
Og79	O79	wzy	Og79-PCR_F	AAATGGTCGTGACGCGAAA	333	Iguchi A. et al.
			Og79-PCR_R	TTGTCTGTACGCCCTGAAAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted

Og80	O80	<i>wzy</i>	Og80-PCR_F	TGGTGTGATTCCACTAGCGT	285	Iguchi A. et al.
			Og80-PCR_R	CGAGAGTACCTGGTTCCCAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og81	O81	<i>wzy</i>	Og81-PCR_F	TGGTAGGTTTGGTGGTGAAT	329	Iguchi A. et al.
			Og81-PCR_R	GGACGGATGACAAATGCGATA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og82	O82	<i>wzx</i>	Og82-PCR_F	TCCCTATTTAACCGGGTCT	538	Iguchi A. et al.
			Og82-PCR_R	TGAATCCCTAAAACCTCGGCTT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og83	O83	<i>wzx</i>	Og83-PCR_F	GTACACCAGGCAAACCTCGAAAG	362	Li D. et al.
			Og83-PCR_R	TTCTGTAAGCTAATGAATAGGCACC		J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og84	O84	<i>wzx</i>	Og84-PCR_F	GTTGGCATATCAATTGGGGTT	775	Iguchi A. et al.
			Og84-PCR_R	CGTTCCAAGAAGCACTCCAGT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og85	O85	<i>wzy</i>	Og85-PCR_F	TTCGGAGGAGATCTCGATGT	388	Iguchi A. et al.
			Og85-PCR_R	TTCCATCATTCCCAGCTTGT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og86	O86	<i>wzy</i>	Og86-PCR_F	GAGTTATTTGGTTCACCTT	731	Liu B. et al.
			Og86-PCR_R	TAGCCCACCTATGAATAGAGC		Vet Microbiol. 2010 142:373-8
Og87	O87	<i>wzy</i>	Og87-PCR_F	GGATGAATGGGGAAAAGCAA	167	Iguchi A. et al.
			Og87-PCR_R	TCACGCGTAAATCTTCAATCC		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og88	O88	<i>wzy</i>	Og88-PCR_F	CTGCGCTTGGAGCATTCTAT	781	Iguchi A. et al.
			Og88-PCR_R	GGCGGAAACTTTCATATGC		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og91	O91	<i>wzy</i>	Og91-PCR_F	GCCTGCGATACCAGTATCCTT	953	Iguchi A. et al.
			Og91-PCR_R	CCCCATAATTGGGATCATAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og92	O92	<i>wzt</i>	Og92-PCR_F	TATTCGCGTGAATGCTCTT	233	Iguchi A. et al.
			Og92-PCR_R	CAACGGGCTCTTCCATAAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og93	O93	<i>wzy</i>	Og93-PCR_F	AAAGTGCCGATATGCGAA	229	Iguchi A. et al.
			Og93-PCR_R	CCACATAAGCTTGAGTTGCGT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og95	O95	<i>wzt</i>	Og95-PCR_F	ATGCTCCATTCTTGTCTGC	272	Iguchi A. et al.
			Og95-PCR_R	AACAGCCAAAGCTTCGTCGAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og96	O96	<i>wzy</i>	Og96-PCR_F	TTAGGAGGTTTCAAAGCGG	938	Iguchi A. et al.
			Og96-PCR_R	TGGTATCGGAATGCATTGCT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og97	O97	<i>wzt</i>	Og97-PCR_F	AGGCAGATCGTCCACAGTCA	184	Iguchi A. et al.
			Og97-PCR_R	ACAGGATAAATGCCAGCCAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og98	O98	<i>wzy</i>	Og98-PCR_F	TCCAGGCAAATGCAAGTCTT	1139	Iguchi A. et al.
			Og98-PCR_R	TGCTGTTGTCTTGGAGGATA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og99	O99	<i>wzt</i>	Og99-PCR_F	TATCGTCCCGCATTCTTA	226	Iguchi A. et al.
			Og99-PCR_R	ATAGCGGCGATCTAAAGGGAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og100	O100	<i>wzy</i>	Og100-PCR_F	TATGGGGGGCGAATTAGGTAT	1006	Iguchi A. et al.
			Og100-PCR_R	ACCTGCCAGGACGAAAGAAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og102	O102	<i>wzy</i>	Og102-PCR_F	TCCGGTAAGTATCTTACGGCA	1025	Iguchi A. et al.
			Og102-PCR_R	GCACCAAATAGCGAAATACCA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og103	O103	<i>wzx</i>	Og103-PCR_F	TAAGTACGGGGTGCTTTTTT	716	Paddack Z. et al.
			Og103-PCR_R	AAGCTCCCAGCAGCTATAA		Vet Microbiol. 2012 156:381-8
Og104	O104	<i>wzx</i>	Og104-PCR_F	AAGGCAGTAGCACGTTTAGCC	993	Iguchi A. et al.

			Og104-PCR_R	AATAGCTGCGCCTAAAGCTGA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og105	O105	wzy	Og105-PCR_F	GCTGTTGGTATTGCTTTTTGG	246	Iguchi A. et al.
			Og105-PCR_R	TGGCTGCCACTTAAATCAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og108	O108	wzy	Og108-PCR_F	AGCTTCCTGTCTACGGTTGA	647	Iguchi A. et al.
			Og108-PCR_R	CCATCCCATCACCAAATTGA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og109	O109	wzy	Og109-PCR_F	GGATAATGGGGTGGTTTTT	409	Iguchi A. et al.
			Og109-PCR_R	GCTTCCCATCCTTGCAGATAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og110	O110	wzy	Og110-PCR_F	CCTGGATAGGAGCGTTTAT	493	Iguchi A. et al.
			Og110-PCR_R	ACAACCAAAGCCGTTATCA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og111	O111	wzx	Og111-PCR_F	CAAGAGTGCTCTGGGCTTCT	451	Paddack Z. et al.
			Og111-PCR_R	AACGCAAGACAAGGCAAAAC		Vet Microbiol. 2012 156:381-8
Og112ab	O112ab	wzy	Og112ab-PCR_F	CGGGTTAACAGCCCATTTTT	241	Iguchi A. et al.
			Og112ab-PCR_R	CAGCCCCCATTTACCAGTAAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og112ac	O112ac	wzx	Og112ac-PCR_F	CTGTCCTTTTGGCGAATTA	1180	Iguchi A. et al.
			Og112ac-PCR_R	AAATCCCAGAGCAAGGGTAGA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og113	O113	wzy	Og113-PCR_F	GCATGTATGATGCATAGCTTCGCC	419	DebRoy C. et al.
			Og113-PCR_R	TGATATCGTTGCTAACCACCCA		Appl Environ Microbiol. 2004 70:1830-2
Og114	O114	wzy	Og114-PCR_F	TCCAAGCCATTATATTTGG	553	Iguchi A. et al.
			Og114-PCR_R	TCTGATGCTGGCATCACACTC		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og115	O115	wzy	Og115-PCR_F	CGTCGTGATGTGCATTGTTT	327	Wang Q. et al.
			Og115-PCR_R	GCAACTAAACGCCTCTTT		Mol Cell Probes. 2010 24:286-90.
Og116	O116	wzx	Og116-PCR_F	TCCTGCAATGACACTGACGAA	156	Iguchi A. et al.
			Og116-PCR_R	ATAATCCAATACCGCCAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og119	O119	wzx	Og119-PCR_F	GTTAACAATCAGCTCGATAAAC	650	Liu B. et al.
			Og119-PCR_R	TTTGCAAGTAAACACCCTAAAC		Vet Microbiol. 2010 142:373-8
Og120	O120	wzx	Og120-PCR_F	TATGGGAGTGGGGTTATGCA	329	Iguchi A. et al.
			Og120-PCR_R	ATGGCGTCCAAGAGGATAGAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og121	O121	wzy	Og121-PCR_F	CAAATGGGCGTTAATACAGCC	193	Iguchi A. et al.
			Og121-PCR_R	TTCCACCCATCCAACCTCTAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og125	O125	wzy	Og125-PCR_F	TGAATGCTTTGGCGAAAGT	210	Iguchi A. et al.
			Og125-PCR_R	CTCGTCTTGAACCTACCAGCA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og126	O126	wzy	Og126-PCR_F	ATGGACCTGATAAAGCATCG	645	Wang Q. et al.
			Og126-PCR_R	AACTTAATACGACCGGAAA		Mol Cell Probes. 2010 24:286-90.
Og128	O128	wzy	Og128-PCR_F	ATGATTCTTACGGAGTGC	782	Li Y. et al.
			Og128-PCR_R	CTCTAACCTAATCCCTCCC		J Clin Microbiol. 2006 44:4376-83.
Og130	O130	wzy	Og130-PCR_F	TAGCCCGTCAATCCAACTTA	944	Iguchi A. et al.
			Og130-PCR_R	CGCCAACAAATATAGGAACCC		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og131	O131	wzy	Og131-PCR_F	AAATTGGATTGCCTGCCCT	238	Iguchi A. et al.
			Og131-PCR_R	AAAGATGCAACCGCCTGTC		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og132	O132	wzy	Og132-PCR_F	GGCGTGAGAACCACTTCAATA	215	Iguchi A. et al.
			Og132-PCR_R	AAACCAGTTCCACCCAACAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted

Og133	O133	<i>wzy</i>	Og133-PCR_F	TCTGCGTTATGGCAACTGTCA	1017	Iguchi A. et al.
			Og133-PCR_R	CACTCGCAAACGCTCACATT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og136	O136	<i>wzy</i>	Og136-PCR_F	TGTTGAAGGTGGCGTAATAGC	210	Iguchi A. et al.
			Og136-PCR_R	AAATACACGCCCATCAATG		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og138	O138	<i>wzy</i>	Og138-PCR_F	CTGCATGGTTCCTTTCTGTCA	267	Iguchi A. et al.
			Og138-PCR_R	CGGACAAAATGGCCAATACG		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og139	O139	<i>wzy</i>	Og139-PCR_F	TACGCATTCGTGAACGAGGAT	287	Iguchi A. et al.
			Og139-PCR_R	CATCCCACCATAAAAAGAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og140	O140	<i>wzy</i>	Og140-PCR_F	CTGCGCATGCAATTTCTTTG	409	Iguchi A. et al.
			Og140-PCR_R	AAACCGATCCTAGCCGGAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og141	O141	<i>wzy</i>	Og141-PCR_F	TTCGGGTGCTTATAGTTGGG	745	Iguchi A. et al.
			Og141-PCR_R	CGAAAATCGGTAAGCTATGGA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og142	O142	<i>wzy</i>	Og142-PCR_F	TGGCCCTGCATCATTTTTTC	538	Iguchi A. et al.
			Og142-PCR_R	GGGCACGTTGACGTAATCTAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og143	O143	<i>wzy</i>	Og143-PCR_F	TGGCTGCATGCTCTTTTT	500	Iguchi A. et al.
			Og143-PCR_R	ATATACCCCTCCGAGGACAAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og144	O144	<i>wzx</i>	Og144-PCR_F	CGATGCAGATTAATTCAGCCT	406	Iguchi A. et al.
			Og144-PCR_R	AACTGTGGCTCATGCCAATA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og145	O145	<i>wzy</i>	Og145-PCR_F	TTCGCGCACAGCATGGTTAT	132	Iguchi A. et al.
			Og145-PCR_R	TACAATGCACCCGAAACAGT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og146	O146	<i>wzx</i>	Og146-PCR_F	CGCCACAATTACCATGGGA	801	Iguchi A. et al.
			Og146-PCR_R	CCCCCTCCAGGCAAAATTACA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og147	O147	<i>wzy</i>	Og147-PCR_F	TGGAAATGCTCTCATTCCATTTGCCT	399	DebRoy et al.
			Og147-PCR_R	GATGACATTACCCAAACCAGAACC		Foodborne Pathog Dis. 2010 7:1407-1414
Og148	O148	<i>wzx</i>	Og148-PCR_F	TGGCAACCATTTGTCTTGCA	865	Iguchi A. et al.
			Og148-PCR_R	CCCCAAGCCCATATAATAGTAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og149	O149	<i>wzy</i>	Og149-PCR_F	TTTGGTGCAGATACTCAGA	709	Han W. et al.
			Og149-PCR_R	GAACAATAGATGCGATACAA		Appl Environ Microbiol. 2007 73:4082-8
Og150	O150	<i>wzx</i>	Og150-PCR_F	ACCACCGGGATATGAACATGA	1089	Iguchi A. et al.
			Og150-PCR_R	AGTCCAAAGCAACCAACCAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og152	O152	<i>wzy</i>	Og152-PCR_F	AGGCGCTGATTACTTCCGATA	568	Iguchi A. et al.
			Og152-PCR_R	ACCTACCCCACTTCCGATTTT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og154	O154	<i>wzx</i>	Og154-PCR_F	TCCGACACAGTTAGGTGCGTA	299	Iguchi A. et al.
			Og154-PCR_R	TAATCACCCGACAATAAGCC		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og155	O155	<i>wzy</i>	Og155-PCR_F	ATGCCATAGGGCAATTTGATT	671	Iguchi A. et al.
			Og155-PCR_R	GAGCATCGTGACCTGATA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og156	O156	<i>wzy</i>	Og156-PCR_F	GGAAAATGGAACATTTAGCGG	236	Iguchi A. et al.
			Og156-PCR_R	TCGGAGTGCCAACCAAAATA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og157	O157	<i>rfbE</i>	Og157-PCR_F	CAGGTGAAGGTGGAATGGTTGTC	296	Bertrand R. and Roig B.
			Og157-PCR_R	TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG		Water Res. 2007 41:1280-6
Og158	O158	<i>wzy</i>	Og158-PCR_F	CTGCGGTATTACCCAGAACAA	693	Iguchi A. et al.

			Og158-PCR_R	ACGCATTTCGATGCATTTCT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og159	O159	wzy	Og159-PCR_F	TGTGTATGTTAGCGGGGTAA	298	Iguchi A. et al.
			Og159-PCR_R	AGTCGGTTCATTTGTTGCA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og160	O160	wzx	Og160-PCR_F	TGTTTCAGGGGCTTGAAAAG	333	Iguchi A. et al.
			Og160-PCR_R	CAACTTGATACGTTGTCCCA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og161	O161	wzx	Og161-PCR_F	TATGTTGGCGGATATTCGGT	349	Iguchi A. et al.
			Og161-PCR_R	AGGCAACGGATGGAATTGAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og163	O163	wzy	Og163-PCR_F	GCAATCTTGAAGCCAGAACCT	342	Iguchi A. et al.
			Og163-PCR_R	AAGATGTTCCACTCCCTGCAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og165	O165	wzx	Og165-PCR_F	GGCGTAAATAAAATATGGGGG	1042	Iguchi A. et al.
			Og165-PCR_R	GCCCTCTAACAAACGAATTGT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og166	O166	wzy	Og166-PCR_F	TTCATAGCTGGCCTCCTTGTT	462	Iguchi A. et al.
			Og166-PCR_R	TCTATTGCGCGAATCCTTTCT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og167	O167	wzy	Og167-PCR_F	TCAGGGCAATTACAATCCTT	403	Iguchi A. et al.
			Og167-PCR_R	TCGCGCATAGAATAGCATGTC		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og168	O168	wzy	Og168-PCR_F	AGTGAGCCTGCTGCATTATGT	282	Iguchi A. et al.
			Og168-PCR_R	ACGCTGCTGGATACTATCCGA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og169	O169	wzx	Og169-PCR_F	GCCGGTCAACAATCGTAAT	221	Iguchi A. et al.
			Og169-PCR_R	GCCGCTTAAACAATTGCTTTC		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og170	O170	wzy	Og170-PCR_F	TTGCGTTCGGAATTGTTACTC	271	Iguchi A. et al.
			Og170-PCR_R	AATCCAACACCCGCATTTTG		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og171	O171	wzy	Og171-PCR_F	AGCGGTGTGGTCTGTCTTTT	212	Iguchi A. et al.
			Og171-PCR_R	TGAATCCGAGGGGTATCAAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og172	O172	wzx	Og172-PCR_F	TGGGGGTGTGGTATGTTTTT	1108	Iguchi A. et al.
			Og172-PCR_R	AATGCTCCCTGAATCCTGTT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og173	O173	wzy	Og173-PCR_F	TTCAAAGTCTCTGGAGGGA	606	Wang Q. et al.
			Og173-PCR_R	TGGCTGAGACTTGACTATTTT		Mol Cell Probes. 2010 24:286-90.
Og174	O174	wzy	Og174-PCR_F	CGGAAGTCGGACTGCTATTTT	541	Iguchi A. et al.
			Og174-PCR_R	TATGTGACCTAGCACACCCAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og175	O175	wzy	Og175-PCR_F	TTCGAAGTACCTGCTTT	690	Iguchi A. et al.
			Og175-PCR_R	TGTATCCCCCAAACCATCAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og176	O176	wzy	Og176-PCR_F	TTGGCGTGCCAGGTATATATC	809	Iguchi A. et al.
			Og176-PCR_R	TGACAGAGCTATCCCCTTGA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og177	O177	wzy	Og177-PCR_F	CCGATACACCGGATGGATTAT	427	Iguchi A. et al.
			Og177-PCR_R	AAGCCAGTACCCAGAACAGGA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og179	O179	wzy	Og179-PCR_F	ACGGGCTGATTATTTGTCTCT	608	Iguchi A. et al.
			Og179-PCR_R	AAACAAGACCCCTTGCCATA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og180	O180	wzy	Og180-PCR_F	TGGCATCAACGAATGATGCA	744	Iguchi A. et al.
			Og180-PCR_R	TTGCCATGCTTCAACAATA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og181	O181	wzy	Og181-PCR_F	AGGACTCCGATTTACTACCGC	261	Iguchi A. et al.
			Og181-PCR_R	ACAGCGAATGCAACAATTGG		J Clin Microbiol. 2015 accepted

Og182	O182	wzy	Og182-PCR_F	CGGTGATGGTTCTATTCTTGG	510	Iguchi A. et al.
			Og182-PCR_R	TGCTTGACCAACTGTGTTA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og183	O183	wzx	Og183-PCR_F	CGTGGTAACCAATTCGCAA	666	Iguchi A. et al.
			Og183-PCR_R	GGGAATAACGAACGGTTTACA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og184	O184	wzy	Og184-PCR_F	TTCTGGTCACCAGAGCTTGAT	964	Iguchi A. et al.
			Og184-PCR_R	TCCTGCCCTCACAATGGATAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og185	O185	wzy	Og185-PCR_F	TGGTCGGTTGCCTGTTTTT	254	Iguchi A. et al.
			Og185-PCR_R	CTGACCGATAAAAGCCAACA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
Og187	O187	wzy	Og187-PCR_F	CTTCTGTTGGTCTGCTTTGT	828	Iguchi A. et al.
			Og187-PCR_R	AAAATGAACCGGTCTCGCTA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
OgGp1	O20, O137	wzy	Og137-PCR_F	GGGATAGGTTTATTGTTGCA	1007	Wang Q. et al.
			Og137-PCR_R	GTTAGCCATCCACCAAGGTA		Mol Cell Probes. 2010 24:286-90.
OgGp2	O28ac, O42	wzx	Og28ac-PCR_F	GGTAATACACTTGCTGTGGTGGGT	218	Fratamico PM. et al.
			Og28ac-PCR_R	ATGATTGACCATCCCAGCCGTAT		Can J Microbiol. 2010 56:308-16
OgGp3	O118, O151	wzy	Og118-PCR_F	GTGGGAGTCTGAATCAAGTTGCGA	344	Liu Y et al.
			Og118-PCR_R	AGCAACCTTACCCAATCCTAAGGG		Foodborne Pathog Dis. 2008 5:449-457
OgGp4	O90, O127	wzy	Og127-PCR_F	TTCATCTCCGCTGGGAATACA	451	Iguchi A. et al.
			Og127-PCR_R	AATTGGTGACGCTGGAATGA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
OgGp5	O123, O186	wzy	Og186-PCR_F	TTTCAACAGGTTCGAATGCC	362	Iguchi A. et al.
			Og186-PCR_R	CCCACCAATACCACTGGAATA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
OgGp6	O46, O134	wzy	Og46-PCR_F	TTAACTGGTTCAAGGACGGG	445	Iguchi A. et al.
			Og46-PCR_R	TGACCGTTATTGCAAGCGAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
OgGp7	O2, O50	wzx	Og2-PCR_F	TGGCCTTGTTGATATACTGCGGA	813	Fratamico PM. et al.
			Og2-PCR_R	TCACGAGCTGAGCGAACTGTTCA		Can J Microbiol. 2010 56:308-16
OgGp8	O107, O117	wzy	Og117-PCR_F	TGTTCTCCACTGCGATCATAGGT	518	Liu Y et al.
			Og117-PCR_R	ACATAGAGTACCCGACACCATCAC		Mol Cell Probes. 2007 21:295-302.
OgGp9	O17, O44, O73, O77, O106	wzy	Og44-PCR_F	GAGGGGCGGATACATTTGTA	849	Iguchi A. et al.
			Og44-PCR_R	ATACCACAGCGGGATGAAGTT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
OgGp10	O13, O129, O135	wzy	Og13-PCR_F	TGGTGGTGGAAAGATTACTGGA	774	Iguchi A. et al.
			Og13-PCR_R	CCAACAAGAACGTCGCTAAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
OgGp11	O153, O178	wzy	Og153-PCR_F	TCGGTAACGGCTTTGCATTA	703	Iguchi A. et al.
			Og153-PCR_R	AACCCAGCCAATAGCAAAA		J Clin Microbiol. 2015 accepted
OgGp12	O18ab, O18ac	wzx	Og18ab-PCR_F	GTTGCGTGGTTGGATTACAGTTAG	551	Li D. et al.
			Og18ab-PCR_R	CTACTATCATCCTCACTGACCACG		J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
OgGp13	O124, O164	wzx	Og124-PCR_F	AGTCACCGCATGAATGATT	270	Iguchi A. et al.
			Og124-PCR_R	GCATTAAGTGCGTCTGAATT		J Clin Microbiol. 2015 accepted
OgGp14	O62, O68	wzy	Og62-PCR_F	TCATGGTGGTCATCAAGCTTT	548	Iguchi A. et al.
			Og62-PCR_R	ACAATGCTGGATGAAATGCC		J Clin Microbiol. 2015 accepted
OgGp15	O89, O101, O162	wzt	Og89-PCR_F	TCTGTTGGACATCGCTCTAGG	198	Iguchi A. et al.
			Og89-PCR_R	AATGCTAATCTCACGCGCAT		J Clin Microbiol. 2015 accepted

表 5. *E. coli* O-genotyping PCR における各マルチプレックス PCR キットのプライマー組み合わせ

マルチ プレッ クス PCR	プライマー名	関連する O 血清群	O-genotype	サイズ (bp)	混和するプライマー(100 μM) の組成 forward/reverse (μl)
MP-1	Og165_PCR	O165	Og165	1042	160/160
	Og103-PCR	O103	Og103	716	80/80
	Og111-PCR	O111	Og111	451	80/80
	Og157-PCR	O157	Og157	296	160/160
	Og26-PCR	O26	Og26	241	80/80
	Og121_PCR	O121	Og121	193	80/80
	Og145_PCR	O145	Og145	132	80/80
			TE		2080
			Total		3520
MP-2	Og112ac_PCR	O112ac	Og112ac	1180	80/80
	Og148_PCR	O148	Og148	865	80/80
	Og158_PCR	O158	Og158	693	80/80
	Og114_PCR	O114	Og114	553	80/80
	Og144_PCR	O144	Og144	406	80/80
	Og159_PCR	O159	Og159	298	80/80
	Og169_PCR	O169	Og169	221	80/80
			TE		2400
			Total		3520
MP-3	Og1_PCR	O1	Og1	1098	80/80
	Og146_PCR	O146	Og146	801	80/80
	Og119_PCR	O119	Og119	650	80/80
	Og142_PCR	O142	Og142	538	80/80
	Og167_PCR	O167	Og167	403	80/80
	Og74_PCR	O74	Og74	289	80/80
	Og125_PCR	O125	Og125	210	80/80
			TE		2400
			Total		3520
MP-4	Og63_PCR	O63	Og63	995	80/80
	Og6_PCR	O6	Og6	783	80/80
	Og126_PCR	O126	Og126	645	80/80
	Og143_PCR	O143	Og143	500	80/80
	Og27_PCR	O27	Og27	382	80/80
	Og168_PCR	O168	Og168	282	80/80
	Og136_PCR	O136	Og136	210	80/80
			TE		2400

				Total	3520
	Og78_PCR	O78	Og78	992	80/80
	Og128_PCR	O128	Og128	782	80/80
	Og15_PCR	O15	Og15	608	80/80
	Og166_PCR	O166	Og166	462	80/80
MP-5	Og161_PCR	O161	Og161	349	80/80
	Og29_PCR	O29	Og29	260	80/80
	Og55_PCR	O55	Og55	207	80/80
				TE	2400
				Total	3520
	Og91_PCR	O91	Og91	953	80/80
	Og86_PCR	O86	Og86	731	80/80
	Og152_PCR	O152	Og152	568	80/80
MP-6	Og8_PCR	O8	Og8	448	80/80
	Og115_PCR	O115	Og115	327	80/80
	Og25_PCR	O25	Og25	230	80/80
				TE	2560
				Total	3520
	Og137_PCR	O20, O137	OgGp1	1007	80/80
	Og44_PCR	O17, O44, O73, O77, O106	OgGp9	849	80/80
	Og153_PCR	O153, O178	OgGp11	703	80/80
	Og18ab_PCR	O18ab, O18ac	OgGp12	551	80/80
MP-7	Og127_PCR	O90, O127	OgGp4	451	160/160
	Og118_PCR	O118, O151	OgGp3	344	80/80
	Og124_PCR	O124, O164	OgGp13	270	80/80
	Og28ac_PCR	O28ac, O42	OgGp2	218	80/80
				TE	2080
				Total	3520
	Og9_PCR	O9	Og9	1235	80/80
	Og41_PCR	O41	Og41	942	80/80
	Og33_PCR	O33	Og33	783	80/80
	Og108_PCR	O108	Og108	647	80/80
	Og174_PCR	O174	Og174	541	80/80
MP-8	Og60_PCR	O60	Og60	443	80/80
	Og54_PCR	O54	Og54	351	80/80
	Og80_PCR	O80	Og80	285	80/80
	Og92_PCR	O92	Og92	233	80/80
				TE	2080
				Total	3520
MP-9	Og98_PCR	O98	Og98	1139	160/160

	Og96_PCR	O96	Og96	938	80/80
	Og59_PCR	O59	Og59	783	80/80
	Og69_PCR	O69	Og69	653	80/80
	Og82_PCR	O82	Og82	538	80/80
	Og177_PCR	O177	Og177	427	80/80
	Og71_PCR	O71	Og71	344	160/160
	Og95_PCR	O95	Og95	272	80/80
	Og93_PCR	O93	Og93	229	80/80
			TE		1760
			Total		3520
	Og172_PCR	O172	Og172	1108	80/80
	Og88_PCR	O88	Og88	781	80/80
	Og37_PCR	O37	Og37	683	80/80
	Og117_PCR	O107, O117	OgGp8	518	80/80
	Og23_PCR	O23	Og23	427	80/80
MP-10	Og163_PCR	O163	Og163	342	80/80
	Og170_PCR	O170	Og170	271	80/80
	Og99_PCR	O99	Og99	226	80/80
	Og116_PCR	O116	Og116	156	80/80
			TE		2080
			Total		3520
	Og150_PCR	O150	Og150	1089	80/80
	Og30_PCR	O30	Og30	894	80/80
	Og84_PCR	O84	Og84	775	80/80
	Og183_PCR	O183	Og183	666	80/80
	Og75_PCR	O75	Og75	511	80/80
MP-11	Og113_PCR	O113	Og113	419	80/80
	Og160_PCR	O160	Og160	333	80/80
	Og138_PCR	O138	Og138	267	80/80
	Og132_PCR	O132	Og132	215	80/80
			TE		2080
			Total		3520
	Og40_PCR	O40	Og40	1082	80/80
	Og45_PCR	O45	Og45	916	80/80
	Og13_PCR	O13, O129, O135	OgGp10	774	80/80
	Og7_PCR	O7	Og7	610	80/80
MP-12	Og182_PCR	O182	Og182	510	80/80
	Og109_PCR	O109	Og109	409	80/80
	Og79_PCR	O79	Og79	333	80/80
	Og181_PCR	O181	Og181	261	80/80

	Og171_PCR	O171	Og171	212	80/80
				TE	2080
				Total	3520
	Og58_PCR	O58	Og58	1046	80/80
	Og12_PCR	O12	Og12	885	80/80
	Og141_PCR	O141	Og141	745	80/80
	Og179_PCR	O179	Og179	608	80/80
	Og11_PCR	O11	Og11	509	80/80
MP-13	Og140_PCR	O140	Og140	409	80/80
	Og81_PCR	O81	Og81	329	80/80
	Og56_PCR	O56	Og56	250	80/80
	Og21_PCR	O21	Og21	209	80/80
				TE	2080
				Total	3520
	Og43_PCR	O43	Og43	1041	80/80
	Og187_PCR	O187	Og187	828	80/80
	Og180_PCR	O180	Og180	744	80/80
	Og173_PCR	O173	Og173	606	80/80
	Og110_PCR	O110	Og110	493	80/80
MP-14	Og147_PCR	O147	Og147	399	80/80
	Og120_PCR	O120	Og120	329	80/80
	Og185_PCR	O185	Og185	254	80/80
	Og89_PCR	O89, O101, O162	OgGp15	198	80/80
				TE	2080
				Total	3520
	Og102_PCR	O102	Og102	1025	80/80
	Og38_PCR	O38	Og38	822	80/80
	Og64_PCR	O64	Og64	727	80/80
	Og51_PCR	O51	Og51	583	80/80
	Og61_PCR	O61	Og61	487	80/80
MP-15	Og70_PCR	O70	Og70	393	80/80
	Og35_PCR	O35	Og35	303	80/80
	Og34_PCR	O34	Og34	247	80/80
	Og97_PCR	O97	Og97	184	80/80
				TE	2080
				Total	3520
	Og133_PCR	O133	Og133	1017	80/80
MP-16	Og2_PCR	O2, O50	OgGp7	813	80/80
	Og149_PCR	O149	Og149	709	80/80
	Og5_PCR	O5	Og5	566	80/80

	Og22_PCR	O22	Og22	458	80/80
	Og19_PCR	O19	Og19	389	80/80
	Og16_PCR	O16	Og16	302	80/80
	Og105_PCR	O105	Og105	246	80/80
	Og87_PCR	O87	Og87	167	80/80
				TE	2080
			Total		3520
MP-17	Og100_PCR	O100	Og100	1006	80/80
	Og176_PCR	O176	Og176	809	80/80
	Og175_PCR	O175	Og175	690	80/80
	Og3_PCR	O3	Og3	571	80/80
	Og76_PCR	O76	Og76	457	80/80
	Og85_PCR	O85	Og85	388	80/80
	Og66_PCR	O66	Og66	301	160/160
	Og112ab_PCR	O112ab	Og112ab	241	80/80
				TE	2080
			Total		3520
MP-18	Og104_PCR	O104	Og104	993	80/80
	Og53_PCR	O53	Og53	806	80/80
	Og155_PCR	O155	Og155	671	80/80
	Og62_PCR	O62, O68	OgGp14	548	80/80
	Og32_PCR	O32	Og32	452	80/80
	Og65_PCR	O65	Og65	381	80/80
	Og154_PCR	O154	Og154	299	80/80
	Og131_PCR	O131	Og131	238	80/80
				TE	2240
			Total		3520
MP-19	Og184_PCR	O184	Og184	964	80/80
	Og48_PCR	O48	Og48	793	80/80
	Og39_PCR	O39	Og39	667	80/80
	Og10_PCR	O10	Og10	546	80/80
	Og28ab_PCR	O28ab	Og28ab	446	80/80
	Og186_PCR	O123, O186	OgGp5	362	160/160
	Og36_PCR	O36	Og36	292	80/80
	Og156_PCR	O156	Og156	236	80/80
				TE	2080
			Total		3520
MP-20	Og130_PCR	O130	Og130	944	80/80
	Og49_PCR	O49	Og49	789	80/80
	Og4_PCR	O4	Og4	664	80/80

Og52_PCR	O52	Og52	543	80/80
Og46_PCR	O46, O134	OgGp6	445	80/80
Og83_PCR	O83	Og83	362	80/80
Og139_PCR	O139	Og139	287	80/80
Og24_PCR	O24	Og24	233	80/80
			TE	2240
		Total		3520

表 6. マルチプレックス PCR の反応液組成

PCR grade water	14.42
5x KAPA Extra Buffer (without Mg2+)	6
MgCl ₂ (25 mM)	3
dNTP mix (10 mM each dNTP)	0.9
multiplex primer mix (表 5 参照)	3.52
KAPA Taq DNA polymerase (5 U/μl)	0.16
Template DNA	2
total	30 μl

表 7. マルチプレックス PCR の反応条件

1. Initial Denaturation	94°C	1 min	25 cycles
2. Denaturation	94°C	30 sec	
3. Annealing	58°C	30 sec	
4. Extension	72°C	1 min	
5. Final Extension	72°C	2 min	

表 8. 非典型的 EHEC の *stx1*・*stx2*・*eae* 保有パターン

分離源	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1+stx2</i>	<i>stx1</i> + <i>eae</i>	<i>stx2</i> + <i>eae</i>	<i>stx1+stx2</i> + <i>eae</i>	total
ヒト	114	106	31	86	37	6	380
ウシ	8	208	47	28	16	0	307
ウシ以外の動物	2	15	0	1	0	0	18
食品	0	11	1	0	1	0	13
不明	3	2	1	0	2	0	8

表 9. 有症者由来 EHEC 株に見られた O-genotype とその分布

	ヒト-重症	ヒト-有症者	無症状保菌者	ウシ	その他動物
O103	13	10	1	4	0
O165	9	2	0	0	0
O121	5	3	1	0	0
O28ac/O42	3	0	3	2	0

O177	2	0	1	4	1
O107/O117	2	0	1	1	0
O115	2	1	3	1	0
O5	2	3	0	2	1
O118/151	2	3	1	0	0
O145	2	8	0	0	0
O163	1	0	3	12	0
O84	1	0	11	3	0
O88	1	0	0	2	0
O45	1	0	2	1	0
O141	1	0	0	0	1
O119	1	0	3	0	0
O15	1	0	2	0	0
O109	1	1	4	16	0
O174	1	1	3	16	0
O172	1	1	0	1	0
O123/186	1	1	5	0	0
O55	1	1	3	0	0
O113	1	2	6	55	0
O182	1	2	2	6	0
O183	1	2	9	0	0
O91	1	4	16	1	0
O128	0	3	5	0	0
O8	0	2	5	17	1
O156	0	2	7	11	0
O63	0	2	0	0	0
O2/50	0	1	1	3	0
O100	0	1	0	2	0
O146	0	1	4	1	3
O98	0	1	2	1	0
O108	0	1	1	0	0
O126	0	1	0	0	0
O112ab	0	1	1	0	0
O24	0	1	0	0	0
O66	0	1	0	0	0
O69	0	1	3	0	0
O76	0	1	3	0	0
O89/O101/O162	0	1	3	0	0

表 10. 重症者由来 EHEC 株と同じ遺伝学的特徴を持つウシまたはシカ由来株

strain ID	O-genotype	stx1	stx2	eae	stx2c	ehx	cdtV	subAB	saa	iha	fimA	Origin	Symptom
EHO-11	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ヒト	重症
EH23-22	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ヒト	重症
EH23-4	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ヒト	重症
EH23-35	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ヒト	重症
EH23-33	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ヒト	重症
EH23-16	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ヒト	重症
EH23-17	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ヒト	重症
EH23-26	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ヒト	重症
A140318	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ウシ	-
A0022	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ウシ	-
A0103	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ウシ	-
A0121	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ウシ	-
strain ID	O-genotype	stx1	stx2	eae	stx2c	ehx	cdtV	subAB	saa	iha	fimA	Origin	Symptom
OT-310	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ヒト	重症
A140250	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140259	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140269	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140273	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140277	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140290	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140292	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140293	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140296	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140302	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140311	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140316	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140323	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140338	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140340	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A0013	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A0017	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A0061	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A0062	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A0064	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A0128	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A0133	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A0134	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-

OT-291	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
OT-292	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140166	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140181	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140190	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140191	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140192	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140193	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140223	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140245	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
strain ID	O-genotype	six1	six2	eae	sic2c	ehx	cdtV	subAB	saa	iha	fimA	Origin	Symptom	
EHO-28	O163	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	ヒト	重症	
A140253	O163	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	ウシ	-	
A140260	O163	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	ウシ	-	
A0025	O163	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	ウシ	-	
A0036	O163	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	ウシ	-	
A0041	O163	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	ウシ	-	
A0066	O163	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	ウシ	-	
strain ID	O-genotype	six1	six2	eae	sic2c	ehx	cdtV	subAB	saa	iha	fimA	Origin	Symptom	
EHO-13	O177	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ヒト	重症	
EHOUT19	O177	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ヒト	重症	
A0110	O177	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ウシ	-	
strain ID	O-genotype	six1	six2	eae	sic2c	ehx	cdtV	subAB	saa	iha	fimA	Origin	Symptom	
EHO-34	O182	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ヒト	重症	
OC-32	O182	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ウシ	-	
OC-35	O182	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ウシ	-	
A0111	O182	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ウシ	-	
OT-295	O182	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ウシ	-	
A140227	O182	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ウシ	-	
strain ID	O-genotype	six1	six2	eae	sic2c	ehx	cdtV	subAB	saa	iha	fimA	Origin	Symptom	
EHOUT41	O45	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ヒト	重症	
A140312	O45	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ウシ	-	
strain ID	O-genotype	six1	six2	eae	sic2c	ehx	cdtV	subAB	saa	iha	fimA	Origin	Symptom	
EHO-74	O5	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ヒト	重症	
EHOUT01	O5	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ヒト	重症	

A0120	O5	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ウシ	-
A140237	O5	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ウシ	-
EOG34-7	O5	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	シカ	-
strain ID	O-genotype	stx1	stx2	eae	stc2c	ehx	cdtV	subAB	saa	iha	fimA	Origin	Symptom
EHOUT46	O84	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ヒト	重症
A140297	O84	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ウシ	-
EHOUT31	O84	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ウシ	-
A0002	O84	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ウシ	-
strain ID	O-genotype	stx1	stx2	eae	stc2c	ehx	cdtV	subAB	saa	iha	fimA	Origin	Symptom
OT-116	O88	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	ヒト	重症
A140288	O88	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	ウシ	-
strain ID	O-genotype	stx1	stx2	eae	stc2c	ehx	cdtV	subAB	saa	iha	fimA	Origin	Symptom
OT-4	O28ac/O42	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	ヒト	重症
A140230	O28ac/O42	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	ウシ	-
A140231	O28ac/O42	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	ウシ	-

表 11 . EHEC における新規 O-genotype の分布

	ヒト-重症	ヒト-有症者	無症状保菌者	ウシ	その他動物	食品
ON3	1	1	2	7	0	0
ON6	1	1	1	4	1	0
ON8	1	0	8	19	0	1
ON10	1	1	2	2	0	0
ON31	1	1	2	0	0	0

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Iguchi A</u> , Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, and Pathogenic <i>E. coli</i> Working Group in Japan	<i>Escherichia coli</i> O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O-serogrouping	Journal of Clinical Microbiology	In press		
<u>Iguchi A</u> , Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, Hayashi T, Thomson NR	A complete view of the genetic diversity of the <i>Escherichia coli</i> O-antigen biosynthesis gene cluster	DNA Research	22	101-107	2015
Mekata H, <u>Iguchi A</u> , Kawano K, Kirino Y, Kobayashi I, Misawa N	Identification of O-serotypes, -genotypes and virulotypes of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> isolates including non-O157 from beef cattle in Japan	Journal of Food Protection	8	1269-1274	2014
von Mentzer A, Connor T, Wieler LH, Semmler T, <u>Iguchi A</u> , Thomson NR, Rasko DA, Joffre E, Corander J, Pickard D, Wiklund G, Svennerholm A, Sjöling A, Dougan G	Identification of enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (EPEC) clades with significant long-term global distribution	Nature Genetics	46	1321-1326	2014

資料 1

EHEC 検査・診断マニュアル 原稿 (案)

7大0血清群+*stx1/stx2/eae*のマルチプレックスPCR検査法【MP-1+(プラス)】

EHECの主要7種類0血清群(0157、026、0111、0103、0121、0145、0165)の判定にはマルチプレックスPCR法が利用できる。本法は3種類のEHEC病原遺伝子(*stx1*、*stx2*、*eae*)の保有も同時に判定できる。

プライマー配列

0血清群	標的遺伝子	プライマー配列(F)	プライマー配列(R)	PCR産物のサイズ	参考文献
0165	<i>wzx_0165</i>	GGCGTAAATAAAATATGGGGG	GCCCTCTAACAAACGAATTGT	1042 bp	1)
0103	<i>wzx_0103</i>	TAAGTACGGGGTGCTTTTT	AAGCTCCCAGCACGTATAA	716 bp	2)
0111	<i>wzx_0111</i>	CAAGAGTGCTCTGGGCTTCT	AACGCAAGACAAGGCAAAAC	451 bp	2)
0157	<i>rfbE</i>	CAGGTGAAGGTGGAATGGTTGTC	TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG	296 bp	3)
026	<i>wzx_026</i>	GGGGTGGGTACTATATTGG	AGCGCCTATTTTCAGCAAAGA	241 bp	2)
0121	<i>wzy_0121</i>	CAAATGGGCGTTAATACAGCC	TTCCACCCATCCAACCTCTAA	193 bp	1)
0145	<i>wzy_0145</i>	TTCGCGCACAGCATGGTTAT	TACAATGCACCGCAAACAGT	132 bp	1)
	<i>eae</i>	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	881 bp	4)
	<i>stx2</i>	ATCCTATTCCGGGAGTTTACG	GCATCATCGTATACACAGGAGC	584 bp	5)
	<i>stx1</i>	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG	CACCAGACAATGTAACCGCTG	348 bp	5)

反応液組成

1) TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) を使用した場合 (Total 30 μl)

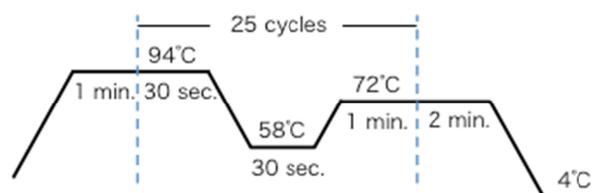
試薬など	組成 (μl)
10 × Ex Taq Buffer	3
dNTP Mixture (2.5mM each)	3
Primer (0157 と 0165)	(最終濃度 : 0.53 μM)
Primer (<i>stx1</i> と <i>stx2</i>)	(最終濃度 : 0.13 μM)
Primer (その他すべて)	(最終濃度 : 0.27 μM)
TaKaRa Ex Taq (5units/μl)	0.2
Template DNA (精製DNAの場合は10 ng/μl)	2
PCR grade Water	(up to 30 μl)

2) KAPATaq EXtra (日本ジェネティクス) を使用した場合 (Total 30 μl)

試薬など	組成 (μl)
5 × KAPATaq EXtra Buffer (Mg ²⁺ free)	6
25mM MgCl ₂	3
dNTP Mix (10mM each)	0.9
Primer (0157 と 0165)	(最終濃度 : 0.53 μM)

Primer (<i>stx1</i> と <i>stx2</i>)	(最終濃度 : 0.13 μM)
Primer (その他すべて)	(最終濃度 : 0.27 μM)
KAPA Taq Extra DNA ポリメラーゼ (5U/μl)	0.16
Template DNA (精製 DNA の場合は 10 ng/μl)	2
PCR grade Water	(up to 30 μl)

反応条件

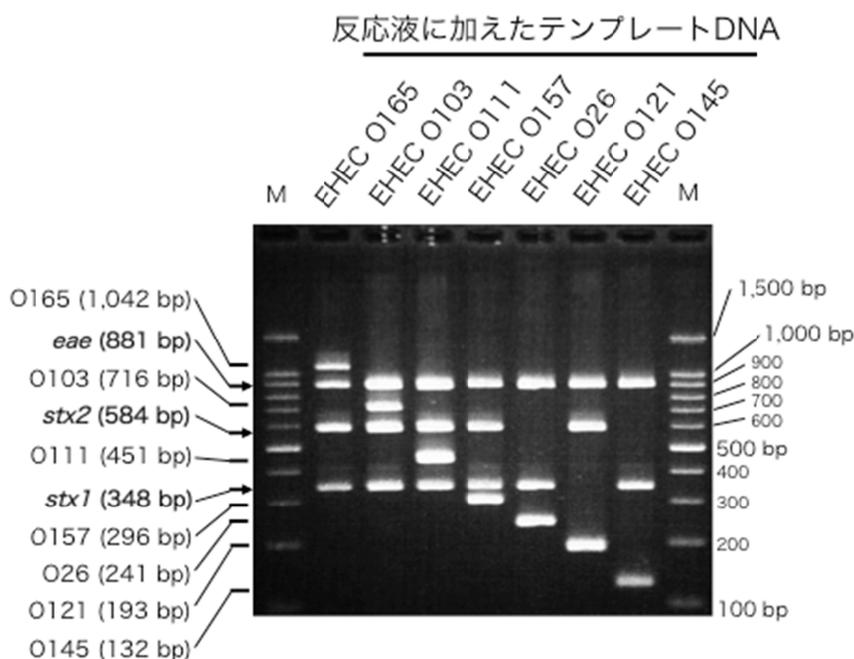


電気泳動

増幅産物をゲル上で十分に展開して確認する。一例として、0.5 × TBE buffer / 2% Agarose L03 (TaKaRa) / Mupid-2plus (100V) であれば、35～45 分間泳動する。

泳動像

(PCR 反応液 2 μl をローディングバッファーと混和して泳動)



その他

- 1) 単離菌株のテンプレート DNA についてはキット等により精製した DNA に加え、アルカリポイル法、ポイル法 (10 分間) 菌体の直接添加 (コロニー-PCR) でも判定できる。
- 2) 糞便や食品検体に含まれる EHEC も高濃度であれば本法で検出できるが、検体によっては非特異的バンドが出現するので注意が必要である。
- 3) *stx* サブタイプの検出能については、本編の表 3 (Cebula ら) を参考のこと。

- 4) 本手法の特異性や検出感度を改良したキット「EHEC (O antigens) PCR Typing Kit (RR133A)」がタカラバイオから販売されている。

〔文献〕

- 1) 井口純、秋吉充子、吉崎美和．EHEC 検出・分類マルチプレックス PCR キットの開発と評価．第 35 回日本食品微生物学会学術総会要旨 p.65
- 2) Paddock Z, Shi X, Bai J, Nagaraja TG. Applicability of a multiplex PCR to detect O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 serogroups of *Escherichia coli* in cattle feces. *Vet Microbiol.* 2012 156:381-8
- 3) Bertrand R, Roig B. Evaluation of enrichment-free PCR-based detection on the *rfbE* gene of *Escherichia coli* O157-application to municipal wastewater. *Water Res.* 2007 41:1280-6
- 4) Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marchès O, Caprioli A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun.* 2000 68:64-71
- 5) Cebula TA, Payne WL, Feng P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 1995 33:248-50

E. coli O-genotyping PCR

大腸菌 O 血清群 PCR 検査法-フルスクリーニング用

宮崎大学 農学部 畜産草地科学科 衛生微生物学分野 准教授 井口純

(2015.2.26 版)

はじめに

大腸菌の血清学的な分類は、分離菌株間の系統的関連性やその系統集団に関連した病原因子を予測する上で重要な手掛かりとなる。特に事例発生時の初動調査において、分離菌株間の O 血清群同一性の確認は、原因細菌の感染範囲や感染経路を特定する上で有用な情報となり、重要な検査項目の一つとなっている。大腸菌の O 血清群はデンマーク国立血清学研究所 (Statens Serum Institut: SSI) (兼 WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Escherichia* and *Klebsiella*) により現在のところ O1 から O188 までが定められており、3 種類の亜型 (O18ab/ac、O28ab/ac、O112ab/ac) と 6 種類の欠番 (O31、O47、O67、O72、O94、O122) が認められている。ヒト患者から分離される腸管出血性大腸菌 (EHEC) の O 血清群は O157、O26、O111、O103、O145、O121、O165 などが大半を占めるが、稀な O 血清群に属する EHEC の分離も報告されている。国立感染症研究所の調べによると 2007 年から 2011 年の間に少なくとも 90 種類の O 血清群が確認されており、血便や溶血性尿毒症症候群を呈した重症患者から稀な O 血清群が分離される事例も複数報告されている。また 2011 年にはドイツを中心に、過去に事例報告例がほとんど無い EHEC O104 による大規模な集団事例が発生した。このような状況において、検査現場では稀な O 血清群にも対応した検査法を備え、事例発生時に早期対応できる態勢を整えておくことが望まれる。しかし、SSI から販売されている O 血清群完全判定用抗血清試薬のセットは高価であるために地方衛生研究所などの検査現場で揃えることは経済的に難しい。国内メーカーからも抗血清試薬は販売されているが主要な 50 種類に限られている。また血清学的な凝集反応試験は、菌株によって交差反応や非特異的凝集、不凝集などが起こることも知られており、その不鮮明さや煩雑性の解消が課題となっている。

O 抗原の合成に関わる遺伝子 (10 から 20 個程度) は染色体上の特定遺伝子座にクラスター (O 抗原合成遺伝子領域) を形成している (図 1)。この領域における比較解析から、O 血清群の違いにより糖転移や糖鎖輸送に関わる遺伝子の相同性がオースログ間で大きく異なることが知られている。近年ではこれら塩基配列の多様性を利用した、それぞれの O 血清群を特異的に判定できる遺伝学的手法 (PCR 法、リアルタイム PCR 法、ハイブリダイゼーション法など) が開発されている。しかしそれら手法の多くは病原大腸菌に関連性の高い一部の O 血清群のみを標的としたものであり、稀な O 血清群をカバーした網羅的な判定手法は存在しなかった。

宮崎大学・農学部・井口研究室のグループは、大腸菌 O 抗原合成遺伝子領域の網羅的な比較解析結果を基に (図 2、図 3) ほぼ全ての大腸菌 O 血清群を遺伝学的に判定出来る PCR 検査法 (*E. coli* O-genotyping PCR) を開発した。本法は 162 種類のプライマーセットを含む 20 種類のマルチプレックス PCR キットで構成されており (図 4) O 血清群全参考株を用いた評価によってその特異性と妥当性が確認された。本法は分離菌株の O 血清群を低コストで迅速かつ正確に判定することができ、事例発生時の分離菌株の検査や、継続的な病原大腸菌の動向調査において有用であると考えられる。

材料と方法

試薬など（井口研で使用しているもの）

- ・ プライマー：北海道システムサイエンス、簡易カラム精製（TE バッファーで希釈）
- ・ PCR 反応試薬：KAPA *Taq* Extra PCR Kit（KK3009、日本ジェネティクス）
- ・ DNA 精製キット：Wizard Genomic DNA purification kit（プロメガ）
- ・ サーマルサイクラー：GeneAmp PCR システム 9700（アプライドバイオシステムズ）または TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice *Touch*（タカラバイオ）
- ・ 電気泳動槽：Mupid-exu
- ・ 泳動用ゲル：agarose L03（5003、タカラバイオ）
- ・ ローディングバッファー：10× Loading Buffer（9157、タカラバイオ）
- ・ サイズマーカー：GeneDirex 100bp DNA Ladder RTU（GeneDirex 社）

テンプレート DNA の準備

- ・ キットによる精製 DNA の場合、10ng/μl に調整したものを使用（長期保存する場合には精製した DNA が望ましい。-20℃ で保存）
- ・ アルカリ熱抽出で準備した DNA でも良好な結果が得られる。

アルカリ熱抽出

LB プロス培養液（o/n）200 μl を 10,000g -10min 遠心、上清除去
50mM NaOH 170μl を添加
100℃ -10min 加熱
1M Tris-HCl（pH7.0）30μl を加え、3-4 回タッピング
10,000g-10min 遠心
上清をテンプレート DNA として使用

- ・ 熱抽出で準備した DNA でも良好な結果が得られる（長期保存には適していない）

熱抽出

LB プロス培養液（o/n）1,000 μl を 10,000g -10min 遠心、上清除去
TE バッファー250 μl を添加
100℃ -10min 加熱
10,000g-10min 遠心
上清をテンプレート DNA として使用

プライマー

表 1 および表 2 参照

反応液組成

	X1	X22
PCR grade water	14.42	317.24
5x KAPA Extra Buffer (without Mg ²⁺)	6	132
MgCl ₂ (25 mM)	3	66
dNTP mix (10 mM each dNTP)	0.9	19.8
multiplex primer mix (表 2 参照)	3.52	(各 3.52)
KAPA Taq DNA polymerase (5 U/μl)	0.16	3.52

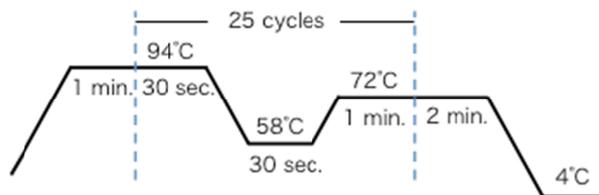
Template DNA	2	44
Total	30 μ l	30 μ l

*フルスクリーニング (MP-1~MP-20 + gyrB + ネガコン、計 22 反応チューブを使用) を行う場合は、プライマーを除く反応液 (X22) を調整し、PCR 反応チューブに 26.48 μ l ずつ分注後、プライマーミックス 3.52 μ l を加える。

*gyrB プライマーも 3.53 μ l / 反応チューブに調整済み

反応条件

図 5、全反応に対して統一した反応条件



電気泳動

- 0.5 \times TBE buffer / 2% アガロースで、35~45 分間泳動する。
(増幅産物がゲル上で十分に展開できれば、他の方法でも問題無い)
- PCR 反応液 2 μ l をローディングバッファーと混和して泳動する。

増副産物の確認

エチジウムブロマイド (1 μ g/ml) 200ml で染色 (10 分間)、水洗 (10 分間) 後、UV トランスイルミネーター上で確認する。PCR 産物サイズと Og タイプの対応は表 2 参照。

その他

- 十分に単離された菌株を使用する。
- 判定結果は Og タイプ (OgXX) で表記する。
- OgXX と O 血清群の対応は 1 対 1。OgGpXX と O 血清群の対応は表 1 参照。
- プライマーは 96 穴プレートに 100 μ l 程度小分けしたものを準備しておくこと効率よく反応液の調整が行える。乾燥やコンタミには注意。井口研での操作手順は下図の通り。

図 6

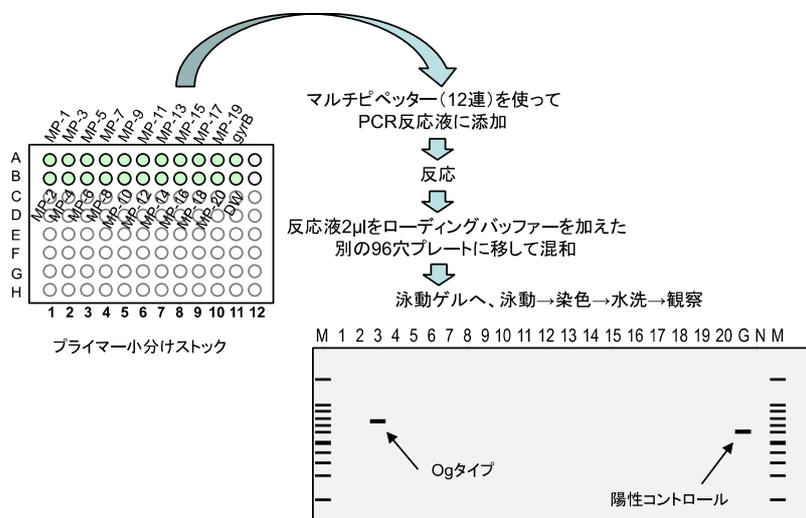
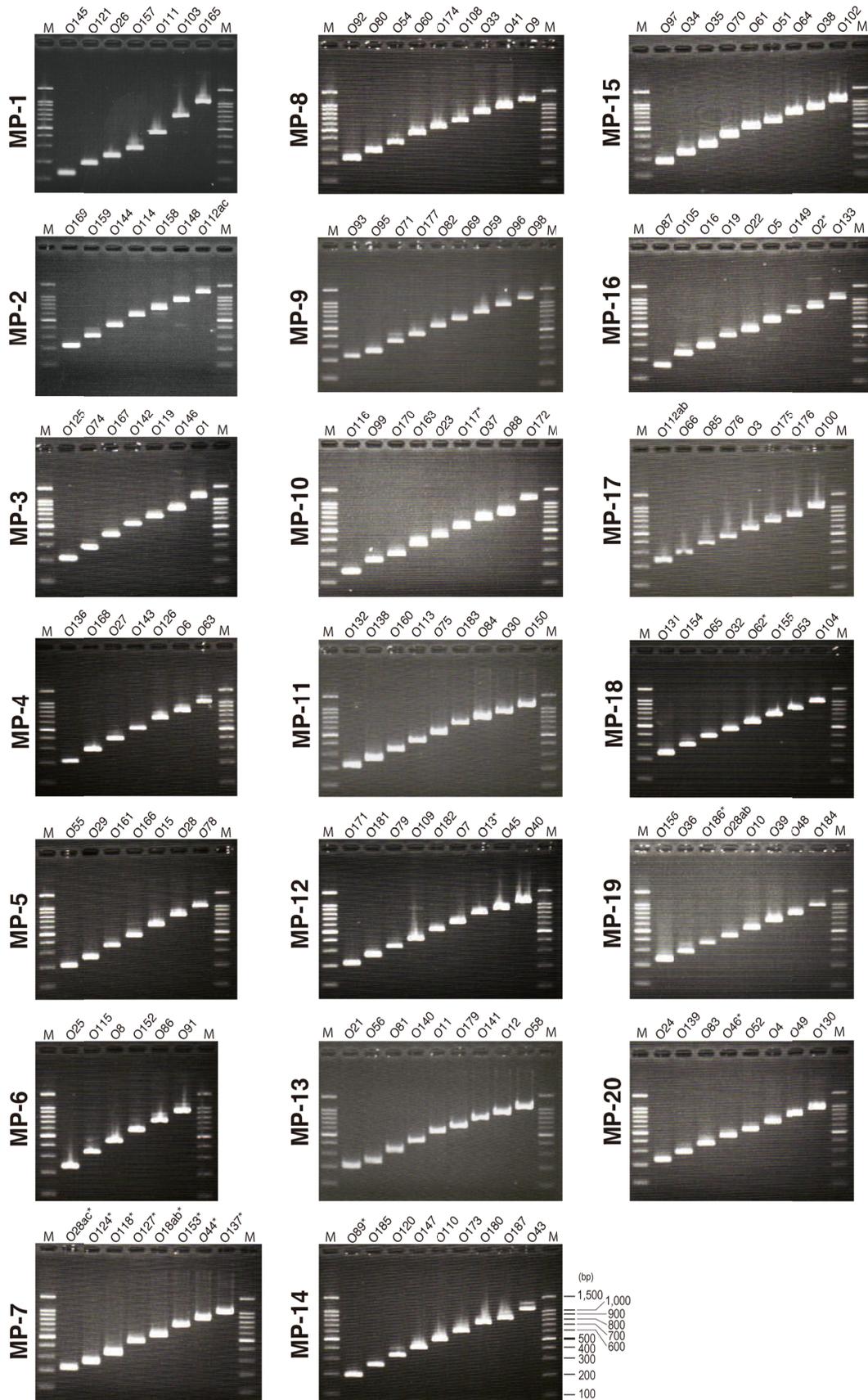


図7、MP-1 から MP-20 の泳動パターン



参考文献

Iguchi A, Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, Hayashi T, Thomson NR. **A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster.** DNA Research 22(1):101-7 (2015)

Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, and Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan. ***Escherichia coli* O-genotyping PCR; a comprehensive and practical platform for molecular O-serogrouping.** Journal of Clinical Microbiology (Accepted)