

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

ゲノム情報を基盤とした国内外で流行する
病原大腸菌のデータベース化と
検査態勢の整備に関する研究

平成 **27**～**28** 年度 総合研究報告書

研究代表者 井口 純

平成 **29** (**2017**) 年 **3** 月

目次

I. 総合研究報告	
ゲノム情報を基盤とした国内外で流行する病原大腸菌の データベース化と検査態勢の整備に関する研究	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	29

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）
平成 27～28 年度 総合研究報告書

ゲノム情報を基盤とした国内外で流行する病原大腸菌の
データベース化と検査態勢の整備に関する研究

研究代表者 井口 純

（宮崎大学農学部畜産草地科学科・准教授）

研究要旨

海外からの食品の輸入や旅行者の往来が頻繁な昨今において、国際的な流行状況にも注意を払いながら、我が国における病原大腸菌の侵入や汚染実態を監視し、食の安全を確保する必要がある。本研究では、世界で流行する毒素原性大腸菌（ETEC）に注目し、世界流行株と国内分離株の細菌学的または遺伝学的な解析を行い、国際的な流行状況下における国内の動向を把握することを目的とした。1995年から2015年の間に大阪府立公衆衛生研究所または大阪市立環境科学研究所で、下痢症患者から分離された ETEC 263 株を用いて詳細な解析をおこなった。輸入事例と国内事例に区分し、さらに輸入株を旅行地域毎に細分類して解析することで、感染地域と O 群などの関連が明らかとなった。国内事例株の傾向は中国へ旅行した帰国者から分離される ETEC の傾向と共通していることが明らかとなった。系統解析の結果、同一または複数の O 群からなるいくつかの主要な系統グループの存在が明らかとなり、エンテロトキシン型や分離年との関連性も明らかとなった。海外分離株のゲノム情報を用いて解析を行い、新規 10 種類の O 血清群遺伝子型 (Og 型) を見出した。その一つである OgN5 は世界で流行する ETEC の主要 Og 型の一つであった。ETEC の新たな検査法として、3 種類の新規 Og 型 (OgN5、OgN3、OgSB16) を特異的に判定出来る PCR 法を開発した。さらに、国内事例で最優勢である O159 を標的とした免疫磁気ビーズを作製し、その実用性を評価した。以上の成果により、世界的に流行する ETEC の動向と、国内で流行する ETEC の傾向、そしてそれぞれの表現型や遺伝子型の特徴が明らかとなり、ETEC の検査態勢を整備する上での有用な情報基盤が構築できた。

研究分担者

・勢戸 和子

（大阪府立公衆衛生研究所・主任研究員）

研究協力者

・中村 寛海

（大阪市立環境科学研究所・研究主任）

- ・原田 哲也
(大阪府立公衆衛生研究所・主任研究員)
- ・西井 啓修
(宮崎大学・農学部・学生)

A. 研究目的

海外からの食品の輸入や旅行者の往来が頻繁な昨今において、国際的な流行状況にも注意を払いながら、我が国における病原微生物の侵入や汚染実態を監視し、食の安全を確保する必要がある。

腸管毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*: ETEC) は発展途上国を中心に世界中に広く感染事例が報告されている下痢原性大腸菌である¹。ETEC の特徴はエンテロトキシンの産生と定着因子抗原 (colonization factor antigen: CFA) であり、一般的にはそのどちらもが可動的遺伝因子であるプラスミド上にコードされている。エンテロトキシンは、粘膜上皮細胞に傷害を与えることなく水分と電解質の漏出をもたらす毒素で、60 30 分の加熱で活性を失う易熱性毒素 (heat labile enterotoxin: LT) と、100 15 分の加熱に耐える耐熱性毒素 (heat stable enterotoxin: ST) の 2 種があり、ETEC はこの両方または片方を産生して下痢を引き起こす²。ST は塩基配列の違いによって、ブタ由来株で発見された *stp* (実際には、ヒトやウシなどから分離される ETEC にもみられる) と、ヒト由来株にみられる *sth* に分けられる²。ETEC の感染には粘膜上皮細胞への接着が必要で、線毛型または非線毛型の CFA がそれを担っている。CFA は現在のところ、少なくとも 25 種類が確認されている^{3,4}。

発展途上国では乳幼児や小児における感染

で重症例がみられ、コレラと同様に脱水症状に陥ることもある。2010 年の報告によると、発展途上国において年間 157,000 人の乳幼児が ETEC を原因として死亡していると推計されており、これは下痢症を原因とする死亡者の 9%に相当し、28 日齢から 3 歳齢の死亡要因の約 1%を占める⁵。ETEC は先進国からの旅行者が流行地域で感染する下痢症原因菌としても有名であり、特に上下水道が整備されていない地域への旅行者が、生水やサラダ、果物などの汚染食品を喫食したことによって感染すると考えられている。

我が国での ETEC による重症化事例は稀である。主な症状は水様性下痢であり、一部に嘔吐を伴うこともある。現在、感染症法において ETEC 感染症は「感染性胃腸炎 (5 類感染症)」に該当し、小児科定点医療機関 (全国約 3,000 力所の小児科医療機関) による届け出が必要となっている。国立感染症研究所においては「VTEC を除く病原大腸菌」としてその報告数が集計されており、2000 年から 2014 年の 15 年間に地方衛生研究所および保健所から報告された ETEC の検出数は約 2400 件であり、そのうちの約 350 件は海外旅行からの帰国者から分離されたものであった⁶。海外旅行者に関連しない国内事例では 100 名を超える大規模な集団食中毒事例も散発しており、2012 年には ETEC O148 (ST+) による 500 名以上の感染者を出す事例が発生した⁷。本事例は単独の会社が営業する複数の給食施設を原因とし、7 自治体にまたがる広域集団食中毒事例となった。

東京都では ETEC の調査・研究が継続して行われており、1966 年から 2005 年に都内で発生した ETEC 集団下痢症は 121 事例にのぼる⁸。そのうち ST 単独産生菌によるものが最も多く

97 事例、次に LT と ST 両毒素産生菌によるものが 39 事例、LT 単独産生菌によるものが 12 事例となっている。血清型としては O6:H16/NM (LT+, ST+) によるものが 35 事例を占め、次いで O169:H41/HNM (ST+) が 31 事例、O27:H7/H20/HNM (ST+) が 23 事例、O148:H28 (ST+) が 17 事例、O25:HNM (ST+ または LT+) が 12 事例、O159:H20/H34/HNM (ST+) が 10 事例となっている。O169 および O25 の ETEC は 1990 年以降に認められるようになり、2000 年以降では O169 が最優勢の血清群であった。ETEC による集団事例の中には、複数の血清型・毒素型を示す菌株が分離されることもあり^{9,10}、雑多な ETEC に汚染した食品や飲料水の摂取が原因と推測されるケースも多い。

世界で流行する ETEC については、特に発展途上国で分離される ETEC の各国における特徴などが報告されている。また、2015 年には研究代表者(井口)も参加した国際ゲノムプロジェクトにおいて、1980 年から 2011 年にかけて世界 20 カ国で分離された ETEC 362 株のゲノム情報と菌株の分離年・分離地などに基づく解析が行われ、ETEC の時空間的な変遷とゲノム進化の概要が報告された⁴。その中で、主要な系統群と、それぞれのエンテロトキシン型および CFA が関連していることから (O6/ST2353/*lt+**sth*/CS1+CS3 、 O25/ST1312/*lt* or *sth*/CS6+CS8 、 O27/ST398/*stp*/CS6 など) それぞれの系統に ETEC の病原遺伝子を含むプラスミドが比較的高度に保存されていることが明らかとなった。

国内で分離される ETEC (国内分離株)の中には、国外旅行先で感染して帰国後に分離され

るケース(輸入事例)と、海外旅行に関連しない国内で感染したと思われるケース(国内事例)が含まれるが、それらの関係性や傾向について詳細に比較した報告は、上述した東京都の調査を含めてこれまでに無く、それら国内分離株と世界的に流行する ETEC との共通点や相違点も不明である。わが国における ETEC 感染症対策を考える上で、まずは上記で述べたそれぞれの特徴を明らかにすることが必要である。そこで本研究では、ゲノム情報を有効に利用し、国内外で分離される ETEC の特徴と傾向を明らかにするとともに、ETEC の検査や監視の強化に資する分離法や細分類法の開発を目指した。

B. 研究方法

1. ETEC 供試菌株(国内分離株)

1995 年から 2015 年の間に大阪府立公衆衛生研究所または大阪市立環境科学研究所で、下痢症患者から分離された ETEC 263 株を用いた。

2. DNA の調整など

PCR などの遺伝学的な試験には、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。すべての PCR では KAPATaq EXtra PCR キット (日本ジェネティクス)を使用した。

3. エンテロトキシン遺伝子の判定

エンテロトキシン遺伝子の保有は分離時に各検査室で確認されているが、本研究で使用するにあたり再確認を行った。Sjöling ら¹¹の開発したマルチプレックス PCR 法を用いてエンテロトキシン遺伝子の保有とそのタイ

ブ (*lt*, *stp*, *sth*) を確認した。

4. 血清型の判定

病原大腸菌免疫血清「生研」(O 血清群 50 種類、H 型 22 種類)(デンカ生研)を用いて凝集試験により O 群および H 型を判定した。判定出来ない(凝集反応が見られない)菌株については、デンマーク国立血清研究所(SSI)製の抗血清または自家抗血清を用いて判定した。上記手法で判定出来ない O 血清群は OUT (untypeable) と判定した。運動性が見られない菌株は HNM (non-motility) と判定し、運動性はあるが上記手法では判定出来ない H 型は HUT (untypeable) と判定した。

5. O 血清群遺伝子型 (Og 型) の判定

研究代表者ら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マルチプレックス PCR 法 (*E. coli* O-genotyping PCR システム)¹²を用いて、大腸菌 O 血清群の遺伝子型 (Og 型:162 種類)を判定した。

6. CFA タイプの判定

CFA の判定は、Rodas ら¹³が報告したプライマーを用いて主要な 19 種類の CFA (CFA/I, CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS6, CS7, CS8, CS12, CS13, CS14, CS15, CS17, CS18, CS17/19, CS20, CS21, CS22) を 4 つのマルチプレックス PCR で判定した。

7. 病原性関連遺伝子の判定

腸管出血性大腸菌の病原性遺伝子である *stx1* (志賀毒素 1 型)、*stx2* (志賀毒素 2 型)、腸管病原性大腸菌および一部の腸管出血性大腸菌で保有がみられる *eae* (α型分泌系接着因子インチミン)、腸管付着凝集性大腸菌で見出され、その他の病原性大腸菌でも保有が確認されている *astA* (EAEC 耐熱毒素) の保有を PCR 法により確認した。

8. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は CLSI の提唱する基準に従い、寒天ディスク拡散法により判定した¹⁴。薬剤はアンピシリン (ABPC)、クロラムフェニコール (CP)、ストレプトマイシン (SM)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、テトラサイクリン (TC)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST)、ホスホマイシン (FOX)、ナリジクス酸 (NA)、シプロフロキサシン (CPFX)、セフトキシム (CTX)、セフトドキシム (CPDX)、イミペネム (IMP)、メロペネム (MEM)、アミカシン (AMK)、スルフィソキサゾール (Su) の 16 種類を使用した。

9. 進化系統解析

染色体上の 7 つの housekeeping 遺伝子 (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *perC*, *recA*) の塩基配列を決定し、Web ツール (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>) により Sequence Type (ST) を決定した (Multilocus sequence typing; MLST)¹⁵。さらに上記 7 遺伝子の配列情報を用いて、MEGA6.06 ソフトによる Neighbor-joining 法

で系統樹を作成した。Bootstrap value は 1000 に設定し、Tamura-Nei モデルを使用した。

10. ETEC のゲノム解析 (海外分離株)

von Mentzer ら⁴が 2015 年に報告した、1980 年から 2011 年にかけて世界 20 カ国で分離された ETEC 362 株(16 株の日本分離株を含む)の菌株情報およびゲノム情報を用いた。Og 型は、大腸菌全 O 血清群標準株(O1-O187)の O 抗原合成遺伝子領域から抽出した *wzx/wzy* および *wzm/wzt* 遺伝子の配列セットを用い¹⁶、BLASTN による相同性検索により判定した。次世代シーケンサーにより得られた配列情報のアセンブリングには Velvet を用いた。遺伝子予測には IMC (インシリコクローニング)を用い、DNA データベースへの BLASTN または BLASTP による相同性検索によりアノテーションを行った。

11. 家畜・野生動物の糞便検体

大阪市食肉市場でと畜された家畜牛から収集した糞便 48 検体、家畜豚から収集した糞便 9 検体、宮崎県内の猟友会の協力により野生のニホンジカから収集した糞便 114 検体、イノシシから収集した糞便 7 検体を用いた。検体は収集後、本研究に使用するまで 4℃ で輸送・保存した。

12. ETEC スクリーニング試験

糞便検体を同量の生理食塩水で懸濁後、懸濁液約 20 μ l を DHL 寒天平板培地に塗抹して培養した。培地上に生育した菌床をかき集めて生理食塩水 1ml に懸濁し、その懸濁液を用いてアルカリ熱抽出法により DNA を調製し

た。ETEC のマーカーとなるエンテロトキシンを標的とした マルチプレックス PCR 法により ETEC 存在の有無を確認した(コロニースweep PCR 法)。さらにスクリーニング試験で ETEC 陽性となった検体については、残しておいた菌床をかき集めた懸濁液を段階希釈して別の DHL 寒天平板培地に塗抹して培養し、生育した単コロニー(95-190 コロニー)についてエンテロトキシン毒素遺伝子を検出する PCR を行い、ETEC であるか否かの確認を行った。単離された ETEC はエンテロトキシン型¹¹および O-genotyping PCR により Og 型¹²を判定した。

13. 免疫磁気ビーズ法

デンカ生研で販売されている O159 抗血清と Dynabeads M-280(ダイナル社)を用いて、抗 O159 免疫磁気ビーズを作製した。詳細については、腸管出血性大腸菌(EHEC)検査・診断マニュアル(2017 年 2 月改訂)に記載の手順に従った¹⁷。O159(O 血清群標準株)の純培養液を用いた評価では、LB ブロスで一晩培養した菌液 1ml と作製した免疫磁気ビーズ 25 μ l を混和後、10 分おきに転倒混和して 30 分間室温で反応させた。その後マグネット板でビーズを間壁に接着させて上清を除去し、生理食塩水 1ml に再懸濁した。この操作を 2 回行った後に、菌液を段階希釈して LB 寒天平板培地に塗抹した。培養液(原液)も段階希釈して LB 寒天平板培地に塗抹した。それぞれの菌液の生育コロニー数を比較することで、免疫磁気ビーズ法による回収率を評価した。糞便検体の場合は、検体 2g を TSB 培地 18ml で 6 時間 37℃ で培養後、その上清 1ml と免疫磁気ビーズを混和し、その後は上記と

同じ手順で操作した。ただし寒天平板培地には DHL 培地を用いた。

(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. 結果

1. 国内分離株の特徴

(1) 代表株の選抜

国内で分離された ETEC 263 株について、エンテロトキシン型と O 血清群の結果を基に、散発事例由来株について、同一患者由来株が複数含まれる場合 (10 患者由来 21 株) エンテロトキシン型および O 血清群が同一であるときは代表株一株を選抜し (9 患者由来 9 株) エンテロトキシン型および O 血清群が異なるときはそれぞれ一株を選抜した (1 患者由来 2 株)。一患者由来一株の場合 (90 株) は、すべてを代表株とした。集団事例由来株について、同一事例由来株が複数含まれる場合 (19 事例由来 144 株) エンテロトキシン型および O 血清群が同一であるときは代表株一株を選抜し (11 事例由来 11 株) エンテロトキシン型および O 血清群が異なるときはそれぞれのタイプおよび群から一株を代表株として選抜した (8 事例由来 29 株)。同一事例由来株が一株のみの場合 (5 事例由来 5 株) は、すべてを代表株とした。以上の結果、散発事例由来株では 100 事例由来 101 株、集団事例由来株では 24 事例由来 45 株の計 146 株 (表 1、表 2) を代表株として、以下の試験に用いた。

(2) 毒素遺伝子の分布

各エンテロトキシン型の保有分布では *sth*

(62%) が最も多く、続いて *It* (42%)、*stp* (19%) であった (図 1A)。株ごとの保有パターンは、*sth* 単独 (41%) が最も多く、続いて *It+sth* (21%)、*It* 単独 (20%)、*stp* 単独 (17%)、*It+stp* (1%) となった (図 1B)。また *astA* は全体の 58% で陽性となった。

(3) O 血清群の分布

O 血清群は O6 と O25 (ともに 19%) が最も多く、O159 (12%)、O169 (11%)、O126 (10%)、O128 (5%)、O27 (4%)、O167 と O148 (ともに 3%)、O8、O64、O153、O15、O115 (いずれも 2%)、O152、O68、O178、O20、O9 (いずれも 1%) となり全部で 19 種類が確認された (図 2)。OUT は全体の 3% (4 株) で見られた (図 2)。O 群の血清型が判定不能となった株では Og 型も判定不能であった (表 1)。

(4) CFA の分布

各 CFA 別に保有分布を見てみると CS21 (58%) が最も多く、続いて CS6 (27%)、CS3 (14%)、CFA/I (12%)、CS1 と CS2 (ともに 10%)、CS4 と CS17 (ともに 2%)、CS12、CS5、CS14 (いずれも 1%) と全部で 11 種類の CFA が確認された (図 3A)。CS7、CS8、CS13、CS15、CS18、CS20、CS22 については、1 株も保有していなかった。株ごとの保有パターンは CS21 単独と CS21+CS6 (ともに 14%) が最も多く、続いて CS21+CFA/I (12%)、CS6 単独 (10%)、CS3+CS21+CS2、CS1+CS3+CS21、CS1+CS21 (いずれも 5%)、CS3+CS2 (4%)、CS17 単独と CS4+CS21+CS6 (ともに 3%)、CS2 単独 (2%)、CS21+CS4、CS12 単独、CS1 単独、

CFA/I 単独、CS3+CS21、CS5+CS6 (いずれも 1%) と全部で 17 パターン確認された (図 3B)。また CFA が検出されない株は、全体の 23% で見られた (図 3B)。

(5) 薬剤耐性の分布

各薬剤に対する菌株の耐性分布では、TC (36%) に耐性を示す株が最も多く、続いて NA (33%)、Su (30%)、SM (25%)、ABPC (23%)、ST (21%)、CP (8%)、FOM、CTX、CPDX、CPFY (いずれも 1%) と 11 種類の薬剤で耐性を示す株が確認された (図 4A)。KM、GM、IMP、MEM、AMK に耐性を示す株は 1 株も見られなかった。薬剤耐性を示した株ごとにみると、1 薬剤に耐性を示す株 (26%) が最も多く、続いて 5 薬剤に耐性を示す株 (12%)、4 薬剤に耐性を示す株 (10%)、2 薬剤に耐性を示す株と 3 薬剤に耐性を示す株 (ともに 3%) であった (図 4B)。6 薬剤に耐性を示す株 (3%)、7 または 8 薬剤に耐性を示す株 (それぞれ 1%) も確認された (図 4B)。すべての薬剤に感受性を示した株は、全体の 36% で見られた (図 4B)。薬剤耐性のパターンを図 4C に示す。

(6) 輸入事例株と国内事例株の特徴

代表株 146 株を患者の旅行歴を基に区分すると (表 2)、輸入事例株は 84 事例由来 97 株、国内事例株は 40 事例由来 49 株であった。散发事例株のうち輸入事例株が 78 事例由来 79 株、国内事例株が 22 事例由来 22 株であった。集団事例株のうち輸入事例株が 6 事例由来 18 株、国内事例株が 18 事例由来 27 株であった。分離年別でみると、1995-2006 年に分離されたものが 97 事例由来 109 株、2007-2015 年

に分離された株が 27 事例由来 37 株であった。

輸入事例株 97 株の患者渡航先は、東南アジア 48 株 (インドネシア 21 株、シンガポール 1 株、タイ 15 株、フィリピン 2 株、ベトナム 5 株、マレーシア 2 株、ベトナムとカンボジア 2 株)、中国 (香港を含む) 21 株、南アジア 21 株 (インド 17 株、ネパール 3 株、バングラディシュ 1 株)、アフリカ 6 株 (エジプト 5 株、タンザニア 1 株)、イタリア 1 株であった (表 1)。

輸入事例株と国内事例株別に O 血清群分布を調べたところ、輸入事例株の上位 3 血清群は O6 (25%)、O25 (20%)、O126 (15%) であり、国内事例株は O159 (24%)、O25 (18%)、O169 (16%) であった。輸入事例株で 15% を占めていた O126 は、国内事例株には 1 株も含まれていなかった。輸入事例株で 25% を占めた O6 は、国内事例株では 8% しか含まれていなかった。対照的に、輸入事例株で 6% しか含まれていなかった O159 は、国内事例株では 24% を占めた (図 5)。

輸入事例株を 4 つの渡航地域別 [中国 (n=21)、東南アジア (n=48)、南アジア (n=21)、アフリカ (n=6)] に区分して O 血清群分布を調べると、それぞれの最優勢 O 血清群は、中国では O25、東南アジアでは O126、南アジアでは O6、アフリカでは O153 であった (図 6)。

(7) 系統群と O 血清群の関係

7 遺伝子の配列情報 (計 3423 bp) を基にした系統解析の結果、3 株以上で形成される相同性 100% の系統群は 12 種類確認され、それぞれ既報の ST に該当した (ST4、10、94、173、182、218、316、443、1312、1491、

2353、3931)(図7)。O6のST2353とST4のように同一血清群の中で近縁ではあるが異なるSTに分かれるものや、O25のST1312、ST1491、ST3931から成る系統群とST1201のように同一O血清群であるが系統的に明らかに異なるグループに属しているものも確認された。またO167とO115が含まれるST443や、O126とO128が含まれるST173のように同一ST内に複数のO血清群を含むものも確認された。

(8) 系統群とエンテロトキシン型の関係

系統群とエンテロトキシン型の関係を図7で示す。O6/ST4に属するすべての株は*lt*と*sth*の両方が陽性であり、O6/ST4と近縁なO6/ST2353に属する株でも、1株(*lt*単独陽性)を除くすべての株で*lt*と*sth*の両方が陽性であった。O25/ST1312に属する株の14株中13株(93%)は、*sth*単独陽性であった。O25/ST1491およびST3931に属する株はO25/ST1312と同じ血清群であるにもかかわらず、すべて*lt*単独陽性であった。その他、O159/ST218に属するすべての株が*sth*単独陽性、O27/ST316に属するすべての株が*stp*単独陽性、O169およびO167/ST182に属する14株中13株(93%)が*stp*単独陽性(93%)、O126およびO128/ST173に属するすべての株が*sth*陽性であった。以上の結果より、STとエンテロトキシン型にはある程度の関連性が確認された。

(9) 系統群とCFAの関係

系統群とCFAの関係を図7で示す。O6/ST2353に属する株はすべてCS1を保有しており、10株中9株(90%)はCS21も保

有していた。O25/ST1312およびST1491に属するすべての株がCS21を保有しており、O25/ST1491に属するすべての株はCS6も保有していた。O25/ST1201に属する株はすべてCS4を保有していた。O169およびO167/ST182に属する株の14株中11株(78%)がCS6を保有していた。O126およびO128/ST173に属する株の17株中13株(76%)がCFA/Iを保有しており、17株中16株(94%)はCS21を保有していた。O159/ST218に属するすべての株はCFAが検出されなかった。以上の結果より、CS1、CS4、CS6、CS21、CFA/Iは特定の系統群に集中して分布していることが確認された。

(10) 系統群と薬剤感受性の関係

系統群と薬剤感受性の関係を図7で示す。O159/ST218に属するすべての株はNAに耐性を示した。O169およびO167/ST182に属するすべての株はTCに耐性を示した。O126およびO128/ST173に属する株の17株中13株(76%)がSMに耐性を示し、14株(82%)がTCに耐性を示し、13株(76%)がSuに耐性を示した。以上の結果より、薬剤の耐性は各系統群でまばらであるが、TC、NA、Suなど一部で特定系統群との関連性が確認された。

(11) 系統群と分離年の関係

系統群と分離年の関係を図7で示す。O126およびO128/ST173に属する株はすべて2000年以前に分離された株であった。O6/ST2353に属するすべての株は2000年以前に分離されているのに対し、O6/ST4に属する株は2000年以前の分離株と2007年以降の

分離株が含まれていた。O25の近縁な3つのST(ST1312、ST1491、ST3931)では、ST3931に属する株はすべて2000年以前に分離されているのに対し、ST1312に属する株は2000年以前の株と2001年以降の分離株が含まれており、ST1491に属する株においてはすべてが2007年以降の分離株であった。O159/ST218に属する株の9株中7株(78%)は2007年以降に分離されて株であった。以上の結果より、O25/ST1491とO159/ST218は特に近年流行しているSTであることが確認された。

2. 海外分離株から見出した新規Og型

(1) O抗原合成遺伝子群の解析

主に海外で分離されたETEC 362株のゲノム情報に対して、既知のO抗原合成遺伝子情報を用いた*in silico*での相同性検索を行ったところ55株でOg型が判定出来なかった(表3)。これら判定不能であった全株のドラフトゲノムからO抗原合成遺伝子領域を抽出して解析したところ、10種類のO抗原合成遺伝子領域にまとめられた(図8)。*wzx/wzy*を抽出して既知の*wzx/wzy*セット(Og型を判定する遺伝子マーカー)と比較したところ、相同性は低く(70%以下)(図9)、9種類が新規Og型であることが確認された(OgN2、OgN3、OgN4、OgN5、OgN13、OgN14、OgN15、OgN16、OgN17)。さらに1種類は*Shigella boydii* type 10のO抗原構成遺伝子領域と高い相同性(97%以上)を示し、OgSB16と名付けた。

(2) 新規Og型の分布

全362株のうち、最優勢であるO6(38株、

10.5%)に続き、OgN5は29株(8%)を占めた(図10)。OgN5に属するETECの分離地は、グアテマラ(12株)、アルゼンチン(5株)、メキシコ(4株)、エジプト(5株)、インドネシア(4株)であった(表2)。さらにOgN3は8株〔グアテマラ(2株)、アルゼンチン(2株)、メキシコ(2株)、エジプト(1株)、バングラディッシュ(1株)〕、OgSB16は8株〔グアテマラ(4株)、アルゼンチン(3株)、エジプト(1株)〕(いずれも2.2%)であった(表2)。その他、OgN13は3株〔インドネシア(2株)、グアテマラ(1株)〕、OgN15は2株〔グアテマラ(2株)〕、OgN2〔インドネシア(1株)〕、OgN4〔ボリビア(1株)〕、OgN14〔日本(1株)〕、OgN16〔インドネシア(1株)〕、OgN17〔インドネシア(1株)〕であった(表3)。

3. 検査法の開発

(1) 新規O血清群判定PCR法の開発

3種類のO血清群(OgN5、OgN3、OgSB16)を対象に、それぞれを特異的に検出できるPCR法の開発を行った。それぞれの*wzy*上にプライマーセットをデザインし(表4)、[94 °C-30秒、58 °C-30秒、72 °C-1分]×25サイクルの反応条件で、参考株(OgN5 ; EHOUT43、OgN3 ; OT-37、OgSB16 ; EH-OSB16)で増幅するとともに(整合性の確認)(図11)、大腸菌全O血清群標準株(O1-O188)および対象外の参考株では増幅しないことを確認した(特異性の確認)。本法を用いて国内分離株でPCRを実施したところ、2000年にエジプトからの帰国者から分離された2株(いずれもO群ではO153と判定)がOgN3と判定された(表1)。

(2) 抗 O159 免疫磁気ビーズ法

国内分離株の最優性 O 血清群である O159 を特異的かつ効率的に検出できる手法として、抗 O159 免疫磁気ビーズを作製した。O159 株を用いて免疫磁気ビーズを介した培養液からの回収率を評価したところ、6 回実施した独立試験の平均回収率は 36%であった(26%~46%)。本手法を用いて牛糞便 6 検体、豚糞便 9 検体、野生シカ糞便 6 検体で O159 の分離を試みた。免疫磁気ビーズで処理後、DHL 寒天平板上に塗抹して生育した 94 コロニーについて、O159 に特異的な PCR で確認したところ、豚由来 1 検体(19 コロニー)、野生シカ由来 5 検体(19、93、1、24、43 コロニー)で O159 が分離された。しかし、エンテロトキシン遺伝子を検出する PCR で確認したところ、いずれも陰性であり ETEC では無かった。

4. 家畜・野生動物における ETEC の調査

コロニースイープ PCR 法による陽性検体数および陽性検体からの分離数を表 5 に示す。牛 48 検体のうち、*sth* 陽性が 18 検体(38%)、豚 9 検体のうち、*lt* 陽性が 1 検体(11%)、*sth* 陽性が 3 検体(27%)であった。シカ 114 検体では *sth* 陽性が 1 検体(1%)、*stp* 陽性が 10 検体(9%)であった。分離できた ETEC については、現在 Og 型や CFA の判定を実施中である。

D. 考察

Konishi ら¹⁸は、1966-2009 年に東京都で分離された ETEC 159 株を解析し O6、O25、O27、O148、O159、O169 が主要な O 血清群であると報告している。本研究で解析した、主に大阪

府内で分離された ETEC の主な O 血清群は O6、O25、O159、O169 であり、O27(4%)と O148(3%)も含まれた。以上の結果より、東京都と大阪府で分離される ETEC の O 血清群の傾向は同じであり、特に O6、O25、O159、O169 が国内で分離される ETEC の主要な O 血清群であると考えられた。また本研究において、エンテロトキシンタイプは STh 単独または STp 単独で保有するものが 58%を占め、LT 単独で保有するものが 20%、STh と LT または STp と LT を保有するものが 22%であった(図 1B)。Konishi ら(12)の研究では、STh 単独または STp 単独で保有するものが 60.4%、LT 単独で保有するものが 2.5%、STh と LT または STp と LT を保有するものが 23.3%であった。このことから、わが国で分離される ETEC は STh または STp の単独陽性株が主要であることが分かった。本研究では輸入事例株と国内事例株に分けて解析したことで、海外渡航者から分離される O 血清群と国内で流行する O 血清群の傾向と特徴が明らかとなった。Wolf ら¹⁹は、エジプト、タイ、ブラジル、サウジアラビアなどの国々を含む世界 17 地域で集められた ETEC のデータ(988 株)を解析し、上位 O 血清群は O6(16.8%)、O78(11.7%)、O8(10.7%)、O128(7.6%)、O25(6.7%)であると報告している。また国別での調査結果を見てみると、東南アジアに位置するタイでは 1996-2000 年に 12 歳未満の下痢症患者から集められた 78 株の ETEC を調査し、上位 O 血清群は O6(13%)、O25(9%)、O169(8%)、O126(5%)であると報告している²⁰。南アジアに位置するバングラディッシュではヒト患者から集められた 99 株の ETEC を調査し、O6(28%)、O115 と O128(ともに 22%)が主要な O 血清群である

と報告している²¹。アフリカに位置するエジプトでは 3 歳未満の下痢症患者から集められた 915 株の ETEC を調査し、O78 (5.6 %)、O6 (5.5 %)、O8 (4.8 %)、O128 (4.7 %) が主要な O 血清群であると報告している²²。中国では 2009-2012 年にヒト患者から集められた 62 株の ETEC を調査し、上位 O 血清群は O6 (18%)、O148 (15%)、O159 (11%)、O25 (10%) であると報告している²³。本研究において、O6 と O25 は東南アジア、南アジア、中国およびアフリカへの渡航者からの分離株に含まれていた (図 6)。また O128 は南アジア (インド 5 株、ネパール 1 株) とアフリカ (エジプト 1 株)、O159 は中国 (香港を含む) (5 株)、O126 は東南アジア (タイ 1 株、ベトナムまたはカンボジア 1 株、インドネシア 13 株) への渡航者から分離されており (図 6) 上記の地域や国で報告された主要な O 血清群と一致していることから、海外渡航者がそれぞれの国を訪れた際に各国で流行する主要な ETEC に感染したものと推測された。また本研究における国内事例株の上位 O 血清群は O159 (24%)、O25 (18%)、O169 (16%) であった (図 5)。国内事例株の主要な O 血清群に含まれる O159 と O25 は、Chen ら²⁰ が報告した中国の主要な O 血清群に含まれており、さらに国内事例で多く分離された O159/ST218 と O25/ST1491 は中国のヒト患者からも確認されている^{23,24}。このことから、中国で流行する ETEC と同一 O 血清群かつ同一系統の株が、わが国でも流行している可能性が示唆された。

ETEC は子豚や子牛などの家畜に下痢症を引き起こす原因菌としても分離される。Katsuda ら²⁵ は日本で 2001 年から 2003 年に下痢症の子豚から分離された 83 株の大腸菌か

ら 76 株の ETEC を同定し、O 血清群は O149 (43.4 %)、O141 (18.4 %)、O20 (17.1 %)、O8 (11 %)、O9 (9.2 %)、O64 (1.3 %) であると報告している。Matayoshi ら²⁶ は日本の沖縄で 1989 年から 1998 年に下痢症の子豚から分離した 79 株の ETEC を解析し、O 血清群は O149 (72.1 %)、O8 (10.1 %)、O20 (8.8 %)、O9 (3.8 %)、O141 (3.8 %)、O64 (1.3 %) であると報告している。また大橋ら²⁷ は日本で 1987 年から 1988 年に下痢症の子牛から分離された 270 株の大腸菌から 33 株の ETEC を同定し、O 血清群は O101 (54.5 %)、O9 (42.4 %)、O8 (3.0 %) であると報告している。ヒト患者から分離される ETEC と下痢症の家畜から分離される ETEC の O 血清群の傾向は異なっており、それぞれ異なる系統群が原因になっていると予想された。しかしヒト患者由来株の中には O8 (1.4 %)、O9 (0.7 %)、O20 (0.7 %)、O64 (1.4 %) など下痢症の家畜由来株と共通する O 血清群が存在することも確認された。上記の報告では ST などを判定しておらず両者の詳細な関連性は不明であるが、人獣共通感染症の原因となる ETEC の存在も疑われたことから、その関係を明らかとするために MLST などを用いたさらなる解析が必要であると考えられた。

海外分離株のゲノム解析から 10 種類の新規 Og 型を見出し、さらに主要な 3 種類の新規 Og 型 (OgN5、OgN3、OgSB16) を判定出来る PCR 法を開発した。本手法は ETEC の O 血清群を細分類する上で有用な手法になると考えられた。今後は残る新規 Og 型を判定出来る PCR 法も開発していきたい。

食品や患者から ETEC を効率的に分離する手法として選択培地などの分離法が必要とな

るが、EPEC における分離手法はまだ確立されておらず、その開発が求められる。前年度の本研究において EPEC の薬剤感受性試験を行ったところ、選択培地への添加剤として有効な抗菌薬は見出せなかった。そこで、O 血清群の判定結果を基に、国内事例で最優勢である O159 を標的とした免疫磁気ビーズを作製し、その評価と実用試験を行った。評価においては回収率が 26%以上を維持したことから、検体中に低濃度で含まれる O159 を効率的に回収できることが期待された。免疫磁気ビーズを用いた家畜と野生動物の糞便検体からの分離試験では、残念ながら EPEC は分離できなかったが、特にシカ検体から O159 が高率に分離できたことから、その実用性が期待された。今後の課題として、EPEC にみられる複数の O 血清群を標的としたマルチプレックス免疫磁気ビーズが、EPEC を標的としたより実用的な手法になるのではないかと考えられた。

E. 結論

国内で分離された EPEC の輸入事例株と国内事例株の特徴が明らかとなり、国内事例株の傾向は中国へ旅行した帰国者から分離される EPEC の傾向と共通していた。さらに海外で分離される EPEC の特徴も明らかとなり、10 種類の新規 Og 型を見出した。EPEC 検査法として、主要な 3 種類の Og 型を判定出来る PCR 法を開発した。さらに国内事例で主要な O159 を標的とした免疫磁気ビーズを作製してその実用性を評価した。以上の成果は EPEC の検査や監視を強化する上で重要な基盤情報になると考えられた。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

西井啓修、勢戸和子、原田哲也、中村寛海、加藤結子、井口純、国内で分離された腸管毒素原性大腸菌の特徴解析、日本細菌学会九州支部総会、2016 年 9 月 1-2 日、宮崎市

西井啓修、勢戸和子、原田哲也、中村寛海、加藤結子、井口純、国内で分離された腸管毒素原性大腸菌の特徴解析、日本食品微生物学会学術総会、2016 年 9 月 14-16 日、東京

井口純、秋吉充子、三澤尚明、野生シカから高頻度に分離される腸管出血性大腸菌 O146、日本食品微生物学会学術総会、2016 年 9 月 14-16 日、東京

H. 知的財産権の出願

なし

参考文献

1. World Health Organization. Diarrhoeal Diseases (Updated February 2009) (World Health Organization, Geneva, 2009).
2. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clin Microbiol Rev 18:

- 465–483 (2005).
3. Gaastra W & Svennerholm AM. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol* 4: 444–452 (1996).
 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. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. *Nat Genet* 46: 1321–1326 (2014)
 5. Initiative for Vaccine Research (IVR) Diarrhoeal Diseases (Updated February 2009): Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): World Health Organization; 2009. Available: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index4.html.
 6. 国立感染症研究所 IASR 集計
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/230-iasr/iasr-data/3037-iasr-table-b-pm.html>
 7. 病原微生物検出情報月報 (IASR) 腸管毒素原性大腸菌 O148 の大規模広域食中毒事例の概要 33(1): 9-12 (2012)
 8. 東京都健康安全研究センター 東京都微生物検査情報 (月報) 東京都における毒素原性大腸菌集団下痢症、第 27 巻 4 号 (2006)
 9. 財津修一、椿本亮、池田嘉子、栗原淑子、小田隆弘、4 種類の毒素原性大腸菌が分類された海外渡航者下痢症例、福岡市保環研報 22: 115-118 (1997,8)
 10. 小西典子、尾畑浩魅、下島優香子、門間千枝、甲斐明美、辻孝雄、6 種類の毒素原性大腸菌が検出された仕出し弁当を原因とする集団食中毒事例と Colony-sweep PCR 法を応用した検査法について、感染症学雑誌 83(5): 490-495 (2009)
 11. Sjöling A, Wiklund G, Savarino SJ, Cohen DI, Svennerholm AM Comparative analyses of phenotypic and genotypic methods for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins and colonization factors. *J Clin Microbiol.* 45: 3295-3301 (2007)
 12. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M; Pathogenic *E. coli* working group in Japan. *Escherichia coli* O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping *J Clin Microbiol.* 53: 2427-2432 (2015)
 13. Rodas C, Iniguez V, Qadri F, Wiklund G, Svennerholm AM, Sjöling A. Development of multiplex PCR assays for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factors and toxins. *J Clin Microbiol.* 47:1218-1220 (2009)
 14. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. (CLSI)
 15. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol.* 60:1136-1151 (2006)
 16. 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 Res* 22:101-107 (2015)
17. 腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル (2017年2月改訂) 伊豫田淳ら . <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/EHEC20170215.pdf#search=%27%E8%85%B8%E7%AE%A1%E5%87%BA%E8%A1%80%E6%80%A7%E5%A4%A7%E8%85%B8%E8%8F%8C+%E3%83%9E%E3%83%8B%E3%83%A5%E3%82%A2%E3%83%AB+%E6%A4%9C%E6%9F%BB%27>
 18. Konishi N, Obata H, Monma C, Nakama A, Kai A, Tsuji T. Bacteriological and epidemiological characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in Tokyo, Japan, between 1966 and 2009. *J Clin Microbiol.* 49:3348-3351 (2011)
 19. Wolf MK. b Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 10:569-84 (1997)
 20. Ratchtrachenchai OA, Subpasu S, Hayashi H, Ba-Thein W. Prevalence of childhood diarrhoea-associated *Escherichia coli* in Thailand. *J Med Microbiol.* 53:237-243 (2004)
 21. Ansaruzzaman M, Bhuiyan NA, Begum YA, Kühn I, Nair GB, Sack DA, Svennerholm AM, Qadri F. Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* from diarrhoeal patients in Bangladesh using phenotyping and genetic profiling. *J Med Microbiol.* 56:217-222 (2007)
 22. Shaheen HI, Khalil SB, Rao MR, Abu Elyazeed R, Wierzba TF, Peruski LF Jr, Putnam S, Navarro A, Morsy BZ, Cravioto A, Clemens JD, Svennerholm AM, Savarino SJ. Phenotypic profiles of enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with early childhood diarrhea in rural Egypt. *J Clin Microbiol.* 42:5588-5595 (2004)
 23. Chen Y, Chen X, Zheng S, Yu F, Kong H, Yang Q, Cui D, Chen N, Lou B, Li X, Tian L, Yang X, Xie G, Dong Y, Qin Z, Han D, Wang Y, Zhang W, Tang YW, Li L. Serotypes, genotypes and antimicrobial resistance patterns of human diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolates circulating in southeastern China. *Clin Microbiol Infect.* 20:52-58 (2014)
 24. Pan H, Zhang J, Kuang D, Yang X, Ju W, Huang Z, Guo J, Li Y, Zhang P, Shi W, Jin H, Shi X, Xu X, Meng J. Molecular analysis and antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic *Escherichia coli* from diarrheal patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 81:126-131 (2015)
 25. Katsuda K, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. *J Vet Diagn Invest.* 18:350-354 (2006)
 26. 又吉正直、貝賀眞俊、大城聡、中澤宗生、沖縄県で分離された子豚下痢由来腸管毒素

原性大腸菌(ETEC)の 細菌学的性状と病原
遺伝子保有状況、日本獣医学会誌
54:595-600 (2001)

27. 大橋秀一, 山田裕, 芝文彦, 芳賀嘉久, 味戸

忠春、わが国における子牛下痢からの毒素
原性大腸菌検出状況、東北家畜臨床研究会
誌 15:1-4 (1992)

表1．国内で分離された ETEC（選抜後）のリスト

菌株名	分離年	事例 1	事例 2	渡航先	O 群	Og 型	H 型	<i>lt</i>	<i>stp</i>	<i>sth</i>	CFA
ETS-001	2008	輸入	集団 08a	中国	169	169	NM	-	+	-	CS6
ETS-002	2008	輸入	集団 08a	中国	25	25	NM	-	-	+	CS21
ETS-004	2008	輸入	集団 08a	中国	20	UT	UT	+	-	+	CS21 14
ETS-005	2008	輸入	集団 08a	中国	6	6	NM	+	-	+	CS3 2
ETS-006	2008	輸入	集団 08a	中国	159	159	34	-	-	+	-
ETS-014	2008	国内	散発		6	6	16	+	-	+	CS3 2
ETS-015	2009	国内	散発		148	148	28	-	-	+	CS21 6
ETS-016	2009	輸入	散発	ベトナム・カンボジア	178	Gp11	19	+	-	-	-
ETS-018	2009	国内	集団 09a		25	25	NM	+	-	-	CS21 6
ETS-024	2010	輸入	集団 10a	中国	25	25	NM	-	-	+	CS21
ETS-025	2010	輸入	集団 10a	中国	167	167	41	-	+	-	CS6
ETS-026	2010	輸入	集団 10a	中国	25	25	NM	+	-	-	CS21 6
ETS-027	2010	輸入	集団 10a	中国	6	6	UT	+	-	+	CS3 21 2
ETS-029	2010	輸入	集団 10a	中国	169	169	NM	-	+	-	CS21 6
ETS-031	2010	国内	集団 10b		9	9		+	-	-	-
ETS-032	2010	国内	集団 10b		159	159		-	+	-	CS21 6
ETS-033	2010	輸入	散発	ベトナム	UT	UT	NM	+	-	-	-
ETS-034	2010	国内	散発		25	25	NM	+	-	-	CS21 6
ETS-035	2011	輸入	散発	中国	169	169	41	-	+	-	CS6
ETS-036	2011	輸入	集団 11a	中国	148	148	28	-	-	+	CS21 6
ETS-037	2011	輸入	集団 11a	中国	25	25	NM	+	+	-	CS4 21 6
ETS-038	2011	国内	散発		6	6	NM	+	-	+	CS3 2
ETS-039	2011	国内	散発		169	169	41	-	+	-	CS21 6
ETS-040	2012	国内	集団 12a		169	169	41	-	+	-	CS6
ETS-062	2012	国内	散発		167	167	41	-	+	-	-
ETS-063	2013	輸入	散発	ベトナム	UT	UT	14	+	-	-	-
ETS-065	2013	国内	集団 13a		159	159	34	-	-	+	-
ETS-086	2013	国内	集団 13b		159	159		-	-	+	-
ETS-095	2014	国内	集団 14a		25	25	NM	+	-	-	CS21 6
ETS-098	2014	国内	集団 14b		159	159	34	-	-	+	-
ETS-100	2014	国内	散発		159	159	34	-	-	+	-
ETS-101	2000	輸入	散発	ベトナム	25	25	NM	-	-	+	CS21
ETS-103	2000	輸入	散発	インドネシア	25	25	NM	-	-	+	CS21
ETS-104	2000	輸入	散発	イタリア	6	6	16	+	-	+	CS1 3 21
ETS-105	2000	輸入	散発	マレーシア	169	169	41	-	+	-	CS6
ETS-106	2000	輸入	散発	エジプト	25	25&128	12	+	-	-	CS21
ETS-107	2000	輸入	散発	エジプト	128	128	12	-	-	+	CS21 CFA/I
ETS-108	2000	輸入	散発	インド	25	25	42	-	-	+	CS4 21 6

菌株名	分離年	事例 1	事例 2	渡航先	O 群	Og 型	H 型	lt	stp	sth	CFA
ETS-109	2000	輸入	散発	タイ	UT	UT	20	+	+	-	CS12
ETS-110	2000	輸入	散発	インド	128	128	UT	-	-	+	CS21 CFA/I
ETS-111	2000	輸入	散発	インドネシア	126	126	UT	-	-	+	CS21 CFA/I
ETS-116	2000	輸入	散発	タイ	27	27	7	-	+	-	CS6
ETS-117	2000	輸入	散発	インドネシア	6	6	NM	+	-	+	CS1 21
ETS-118	2000	輸入	散発	インド	6	6	16	+	-	+	CS1 21
ETS-119	2000	輸入	散発	インド	6	6	16	+	-	+	CS1 21
ETS-120	2000	輸入	散発	タイ	25	25	NM	-	-	+	CS21
ETS-122	2001	国内	散発		169	169	41	-	+	-	CS21 6
ETS-123	2003	輸入	散発	中国	25	25	NM	-	-	+	CS21
ETS-124	2004	国内	集団 04a		169	169	41	-	+	-	CS21 6
ETS-128	2004	国内	散発		169	169	41	+	-	-	-
ETS-129	2004	輸入	散発	エジプト	148	148	28	-	-	+	CS21
ETS-131	2004	輸入	散発	中国	159	159	43	-	-	+	-
ETS-132	2004	輸入	集団 04b	タイ	UT	UT	21	+	-	-	-
ETS-133	2004	輸入	集団 04b	タイ	169	169	14	+	-	-	-
ETS-141	2005	国内	集団 05a		159	159	20	-	-	+	-
ETS-149	2005	輸入	集団 05b	香港	25	25	NM	+	-	-	CS21 6
ETS-150	2005	輸入	集団 05b	香港	159	159	34	-	-	+	-
ETS-151	2005	輸入	集団 05b	香港	159	159	34	-	+	-	CS21 6
ETS-152	2005	輸入	散発	中国	159	159	34	-	-	+	-
ETS-153	2006	国内	集団 06a		152	UT	23/10	-	-	+	-
ETS-155	2006	輸入	集団 06b	インド	167	167	UT	+	-	-	CS17
ETS-157	2006	輸入	散発	ベトナム	169	169	41	-	+	-	CS21 6
ETS-158	2006	国内	集団 06c		159	159	27	+	-	-	-
ETS-159	2006	国内	集団 06c		8	8&40	19	-	-	+	CS21
ETS-161	2006	国内	集団 06c		27	27	7	-	+	-	CS6
ETS-162	2006	国内	集団 06c		148	148	28	-	-	+	CS21 6
ETS-163	2006	国内	集団 06c		15	15	11	-	-	+	-
ETS-180	2006	国内	集団 06c		25	25	NM	-	-	+	CS21
ETS-181	2006	国内	集団 06c		64	64	21	+	-	-	-
ETS-191	2006	国内	集団 06c		68	Gp14	12	+	-	-	-
ETS-197	1995	国内	散発		25	25	NM	-	-	+	CS21
ETS-198	1996	国内	散発		6	6	16	+	-	+	CS3 21 2
ETS-199	1996	国内	散発		169	169	41	-	+	-	-
ETS-200	1997	国内	散発		27	27	27	-	+	-	-
ETS-203	1997	輸入	散発	インド	169	169	41	-	+	-	CS21 6
ETS-204	1997	輸入	散発	インドネシア	25	25	42	-	-	+	CS4 21 6
ETS-205	1997	輸入	散発	インド	6	6	16	+	-	+	CS1 3 21

菌株名	分離年	事例 1	事例 2	渡航先	O 群	Og 型	H 型	lt	stp	sth	CFA
ETS-207	1997	輸入	散発	タンザニア	6	6	16	+	-	+	CS1 3 21
ETS-210	1997	国内	散発		115	115	UT	-	-	+	-
ETS-212	1997	輸入	散発	インド	128	128	12	+	-	-	-
ETS-215	1997	輸入	散発	インドネシア	126	126	12	-	-	+	CFA/I
ETS-218	1998	国内	散発		128	128	UT	-	-	+	CS21 CFA/I
ETS-219	1998	国内	散発		27	27	7	-	+	-	CS6
ETS-220	1998	輸入	散発	インドネシア	126	126	NM	-	-	+	CS21 CFA/I
ETS-222	1998	輸入	散発	タイ	6	6	UT	+	-	+	CS1
ETS-223	1998	輸入	散発	インドネシア	25	25	NM	-	-	+	CS21
ETS-224	1998	輸入	散発	インド	128	128	12	-	-	+	-
ETS-225	1998	輸入	散発	インド	169	169		-	+	-	CS6
ETS-226	1998	国内	散発		6	6	16	+	-	+	CS3 2
ETS-227	1998	輸入	散発	インドネシア	126	126	12	-	-	+	CS21 CFA/I
ETS-228	1998	輸入	散発	マレーシア	159	159	UT	+	-	-	CS6
ETS-230	1998	輸入	散発	タイ	126	126	12	-	-	+	CS21
ETS-231	1998	輸入	散発	タイ	25	25	NM	+	-	-	CS6(薄い)
ETS-233	1998	輸入	散発	インドネシア	126	126	12	-	-	+	CS21 CFA/I
ETS-235	1998	輸入	散発	タイ	6	6	NM	+	-	+	CS3 21 2
ETS-237	1998	輸入	散発	タイ	128	128	12	-	-	+	CS21
ETS-238	1998	輸入	散発	インド	25	25	NM	+	-	-	-
ETS-239	1998	輸入	散発	ネパール	128	128	12	+	-	+	CS21 CFA/I
ETS-240	1998	輸入	散発	インド	6	6	16	+	-	+	CS2
ETS-243	1999	輸入	散発	タイ	6	6	16	+	-	+	CS1 21
ETS-246	1999	輸入	散発	インドネシア	126	126	12	-	-	+	CS21
ETS-248	1999	輸入	散発	インドネシア	6	6	16	+	-	+	CS3 2
ETS-250	1999	輸入	散発	インド	128	128	12	+	-	+	CS21 CFA/I
ETS-252	1999	国内	散発		159	159	UT	+	-	-	CS6
ETS-253	1999	輸入	散発	タイ	25	25	NM	+	-	-	CS6
ETS-254	1999	輸入	散発	タイ	25	25	NM	+	-	-	CS6
ETS-255	1999	輸入	散発	インドネシア	126	126		-	-	+	CS21 CFA/I
ETS-256	1999	輸入	散発	シンガポール	25	25	NM	+	-	-	CS6
ETS-257	1999	輸入	散発	バングラデシュ	6	6		+	-	+	CS3 21 2
ETS-258	1999	輸入	散発	インドネシア	6	6	16	+	-	+	CS1 3 21
ETS-259	1999	輸入	散発	ベトナム・カンボジア	126	126	12	-	-	+	CS21 CFA/I
ETS-260	1999	輸入	散発	タイ	6	6	16	+	-	+	CS1 21
ETS-261	2000	輸入	散発	インドネシア	126	126	12	-	-	+	CS21 CFA/I
ETS-262	2000	輸入	散発	フィリピン	6	6	16	+	-	+	CS1 3 21
ETS-263	2000	輸入	散発	インドネシア	126	126	12	-	-	+	CS21
ETS-264	2000	国内	散発		25	25	NM	-	-	+	CS21

菌株名	分離年	事例 1	事例 2	渡航先	O 群	Og 型	H 型	<i>lt</i>	<i>stp</i>	<i>sth</i>	CFA
ETS-267	2000	輸入	散発	インドネシア	126	126	UT	-	-	+	CS21 CFA/I
ETS-269	2000	輸入	散発	インドネシア	126	126	UT	-	-	+	CS21
ETS-270	2000	輸入	散発	インド	167	167	UT	+	-	-	CS17
ETS-271	2000	輸入	散発	インド	6	6	16	+	-	+	CS3 21 2
ETS-272	2000	輸入	散発	インド	167	167	UT	+	-	-	CS17
ETS-273	2000	輸入	散発	エジプト	153	N3	UT	-	-	+	CS21 CFA/I
ETS-274	2000	輸入	散発	エジプト	153	N3	45	-	-	+	CS21 CFA/I
ETS-276	2000	輸入	散発	インドネシア	126	126	UT	-	-	+	CS21 CFA/I
ETS-277	2000	輸入	散発	フィリピン	6	6	16	+	-	+	CS1 21
ETS-278	2000	輸入	散発	ベトナム	6	6	16	+	-	+	CS3 21 2
ETS-280	2000	輸入	散発	ネパール	6	6	16	+	-	+	CS1 3 21
ETS-282	2000	輸入	散発	タイ	27	27	7	-	+	-	-
ETS-283	2000	輸入	散発	インドネシア	126	126	UT	-	-	+	CS21 CFA/I
ETS-285	2000	輸入	散発	ネパール	6	6	16	+	-	-	CS1 21
ETS-287	2015	輸入	散発	インドネシア	15	15	11	-	-	+	-
ETS-288	2015	国内	集団 15a		159	159	34	-	-	+	-
ETS-292	2012	国内	散発		148	148	18	-	+	-	CS2
ETS-501	1996	国内	集団		25	25		-	-	+	CS21
ETS-502	1996	輸入	散発	インド	8	8		-	-	+	CS3 21
ETS-503	1997	国内	集団		115	115		-	-	+	CS5 6
ETS-504	1997	国内	集団		25	25		-	-	+	CS21
ETS-505	1997	国内	集団		27	27	7	-	+	-	CS21 6
ETS-506	1997	国内	散発		169	169	41	-	+	-	CS21 6
ETS-507	1997	輸入	散発	香港	6	6	16	+	-	+	CS3 21 2
ETS-508	1997	輸入	散発	インドネシア	6	6	16	+	-	+	CS1 3 21
ETS-509	1997	輸入	散発	中国	25	25		-	-	+	CS21
ETS-510	2011	国内	散発		159	159		-	-	+	-
ETS-511	2000	国内	集団		169	169		-	+	-	CS21 6
ETS-512	2014	国内	集団		25	25		+	-	-	CS21 6
ETS-513	2015	国内	集団		159	159	34	-	-	+	-

OgGp11 : O153 と O178 からなる Og グループ型

OgGp14 : O62 と O68 からなる Og グループ型

表 2 . 国内分離 ETEC 株の代表 146 株の概要

	散発/集団	輸入事例	国内事例	計	
株数(事例数)	計	97(84)	49(40)	146(124)	
	散発	79(78)	22(22)	101(100)	
	集団	18(6)	27(18)	45(24)	
分離年別株数(事例数) 1995-2006年	散発	74(73)	13(13)	87(86)	109 (97)
	集団	6(3)	16(8)	22(11)	
分離年別株数(事例数) 2007-2015年	散発	5(5)	9(9)	14(14)	37 (27)
	集団	12(3)	11(10)	23(13)	

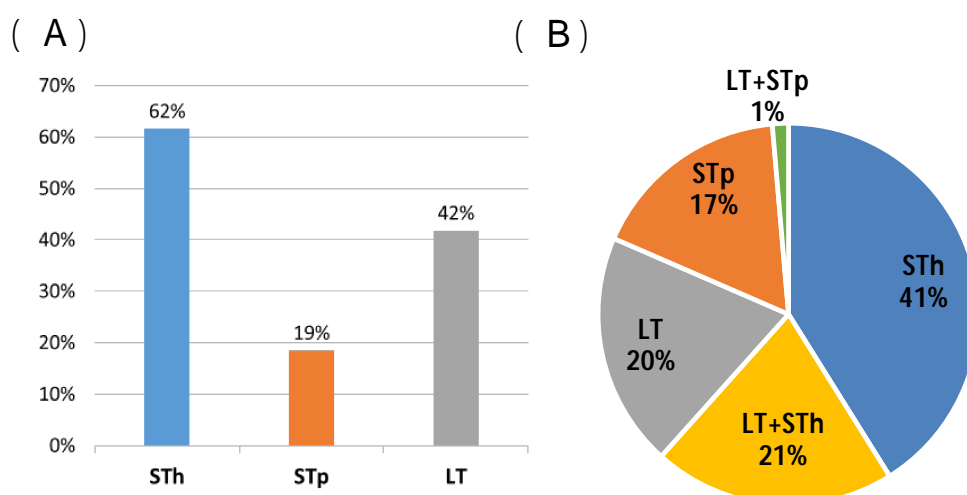


図 1. 国内分離 ETEC 株のエンテロトキシン型の特徴

(A) 各遺伝子の分布割合、(B) 各株の遺伝子保有パターンとその分布割合

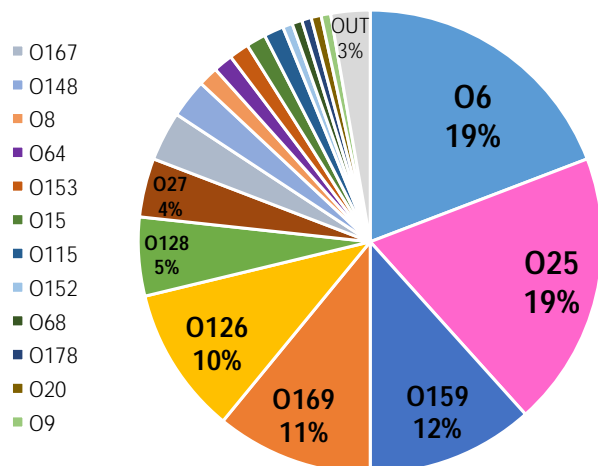
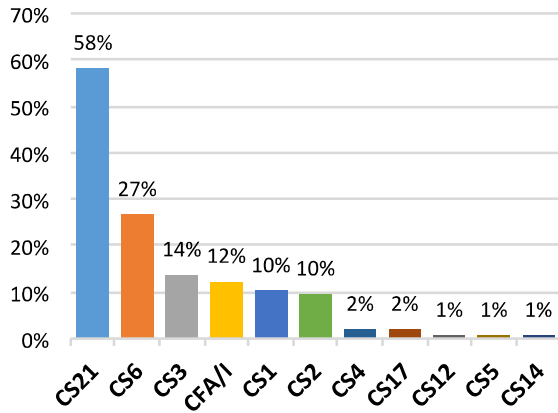


図 2. 国内分離 ETEC 株の O 血清群の特徴

(A)



(B)

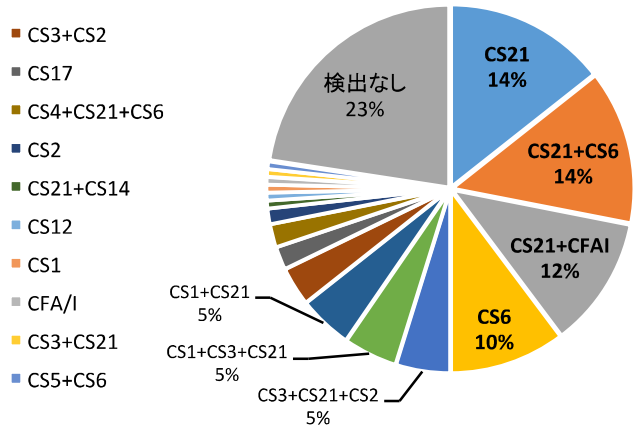
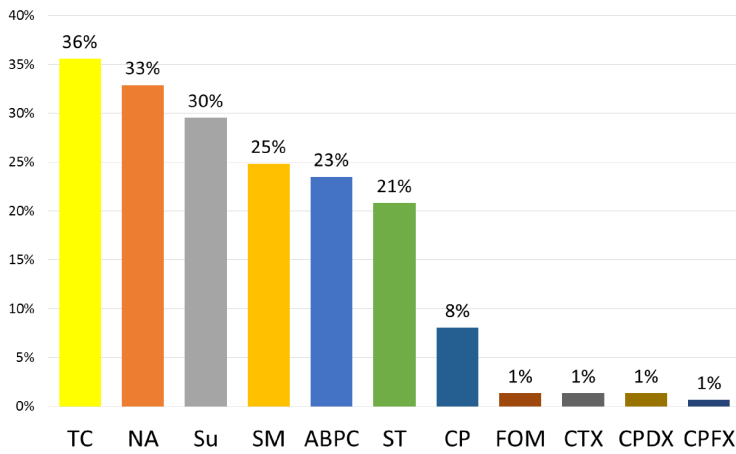


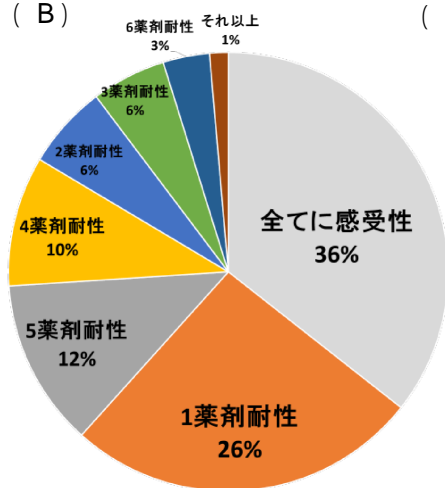
図 3. 国内分離 ETEC 株の CFA の特徴

(A) 各 CFA の分布割合、(B) 各株の CFA 保有パターンとその分布割合

(A)



(B)



(C)

耐性	株数	A	B	C	O	S	T	F	O	M	C	P	F	S	G	P	S	u
		P	P	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
1薬剤	9																	
	1																	
	28																	
2薬剤	3																	
	2																	
	2																	
	1																	
3薬剤	1																	
	1																	
	1																	
4薬剤	1																	
	1																	
	6																	
	2																	
	1																	
5薬剤	1																	
	2																	
	9																	
	3																	
	2																	
	1																	
6薬剤	2																	
	3																	
7薬剤	1																	
8薬剤	1																	

図 4. 国内分離 ETEC 株の薬剤耐性の特徴

(A) 各薬剤の耐性割合、(B) 耐性薬剤数の分布、(C) 耐性薬剤のパターン

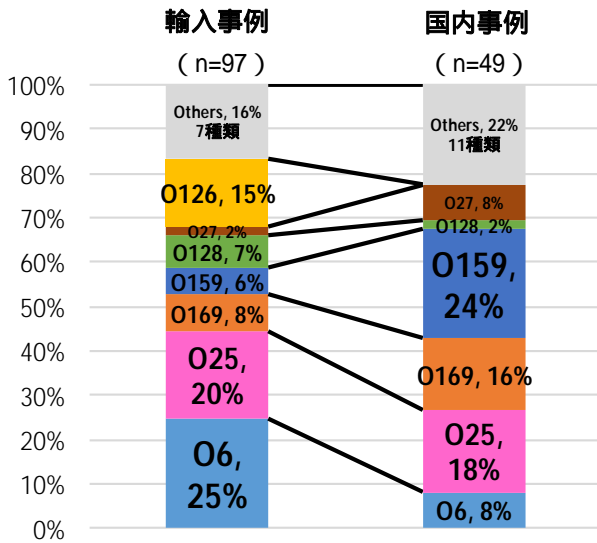


図 5 . 国内分離株の輸入事例と国内事例別にみた O 血清群の分布

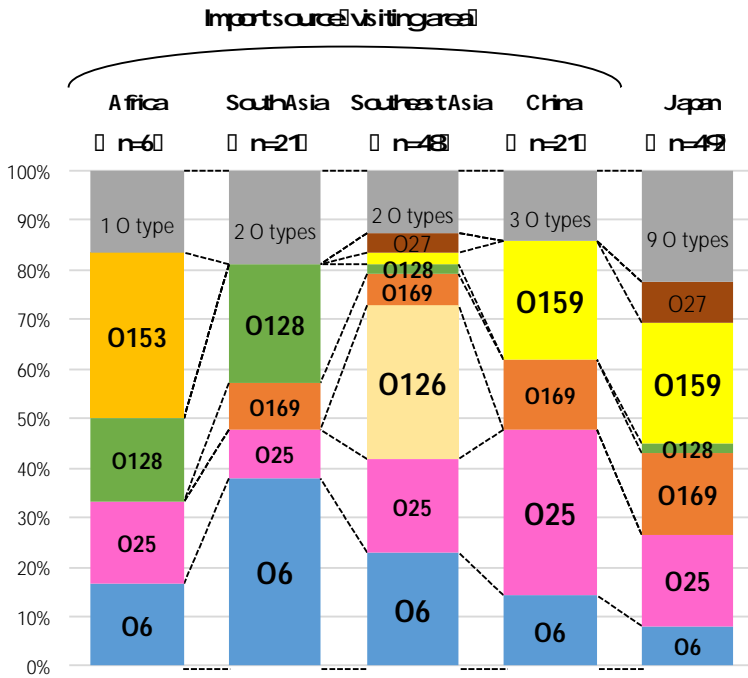


図 6 . 輸入事例株の 4 地域別にみた O 血清群の分布

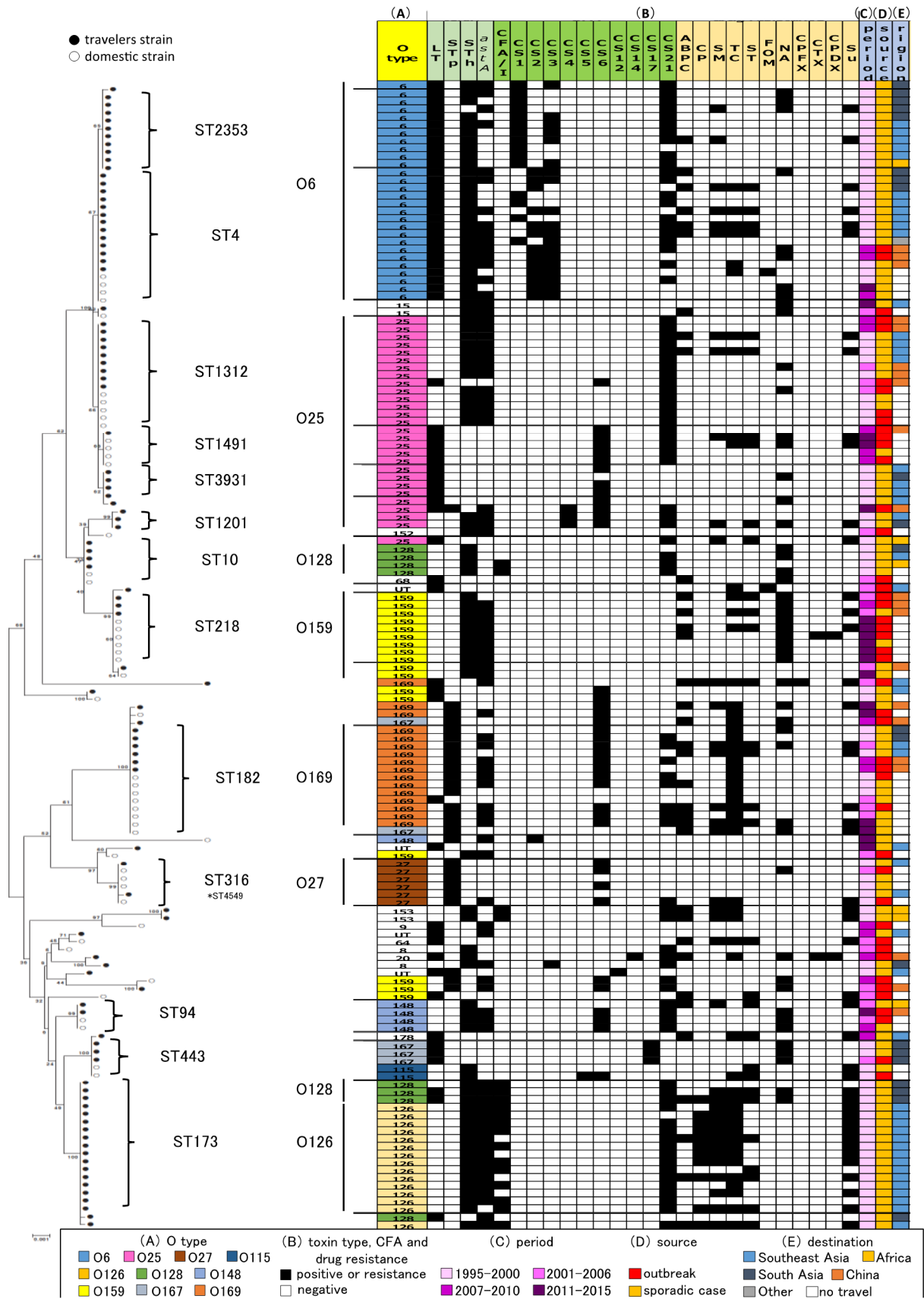


図 7 . ETEC の系統樹 (MLSA) と表現型や遺伝子型の特徴

表 3 . 既知の Og 型に分類されない主に海外で分離された ETEC 55 株のリスト

Strain	O genotype	Origin (Country)	Year of isolation	Toxin profile
E1542	OgN5	Argentina	1989	lt
E1594	OgN5	Argentina	1989	ST
E1526	OgN5	Argentina	1989	ST
E1534	OgN5	Argentina	1989	ST
E1599	OgN5	Argentina	1989	ST
E1193	OgN5	Egypt	2001	ST
E1102	OgN5	Egypt	2000	ST
E998	OgN5	Egypt	1997	ST
E1282	OgN5	Egypt	2001	ST
E620	OgN5	Guatemala	2000	ST
E626	OgN5	Guatemala	2000	ST
E704	OgN5	Guatemala	2001	ST
E705	OgN5	Guatemala	2001	ST
E811sc	OgN5	Guatemala	2002	ST
E828	OgN5	Guatemala	2002	ST
E618	OgN5	Guatemala	2000	ST
E703	OgN5	Guatemala	2001	ST
E621sc	OgN5	Guatemala	2000	ST
E710sc	OgN5	Guatemala	2001	ST
E390	OgN5	Guatemala	1999	ST
E890	OgN5	Guatemala	2003	ST
E1623	OgN5	Indonesia	1990	ST
E1637	OgN5	Indonesia	1990	ST
E1674	OgN5	Indonesia	1990	ST
E1638	OgN5	Indonesia	1990	ST
E354	OgN5	Mexico	1998	ST
E356	OgN5	Mexico	1998	ST
E513	OgN5	Mexico	2000	ST
E509sc	OgN5	Mexico	2000	ST
E1548	OgN3	Argentina	1989	sth
E1604	OgN3	Argentina	1989	sth
E562	OgN3	Mexico	2000	sth
E563	OgN3	Mexico	2000	sth
E636	OgN3	Guatemala	2000	sth
E897	OgN3	Guatemala	2003	sth
E956	OgN3	Egypt	1997	lt
E2981sc	OgN3	Bangladesh	2010	lt
E1525	OgSB16	Argentina	1989	lt+sth

Strain	O genotype	Origin (Country)	Year of isolation	Toxin profile
E1574	OgSB16	Argentina	1989	lt
E1581	OgSB16	Argentina	1989	lt
E604	OgSB16	Guatemala	2000	lt+stp
E616	OgSB16	Guatemala	2000	lt+stp
E628	OgSB16	Guatemala	2000	lt+stp
E855	OgSB16	Guatemala	2003	lt
E949	OgSB16	Egypt	1997	lt
E1650	OgN13	Indonesia	1990	lt
E1682	OgN13	Indonesia	1990	lt
E645	OgN13	Guatemala	2000	lt
E167	OgN14	Japan	1983	lt
E819	OgN15	Guatemala	2002	lt
E821	OgN15	Guatemala	2002	lt
E1642	OgN16	Indonesia	1990	lt+stp
E1647	OgN17	Indonesia	1990	lt
E1657	OgN2	Indonesia	1997	lt+stp
E2348	OgN4	Bolivia	2007	lt+ST

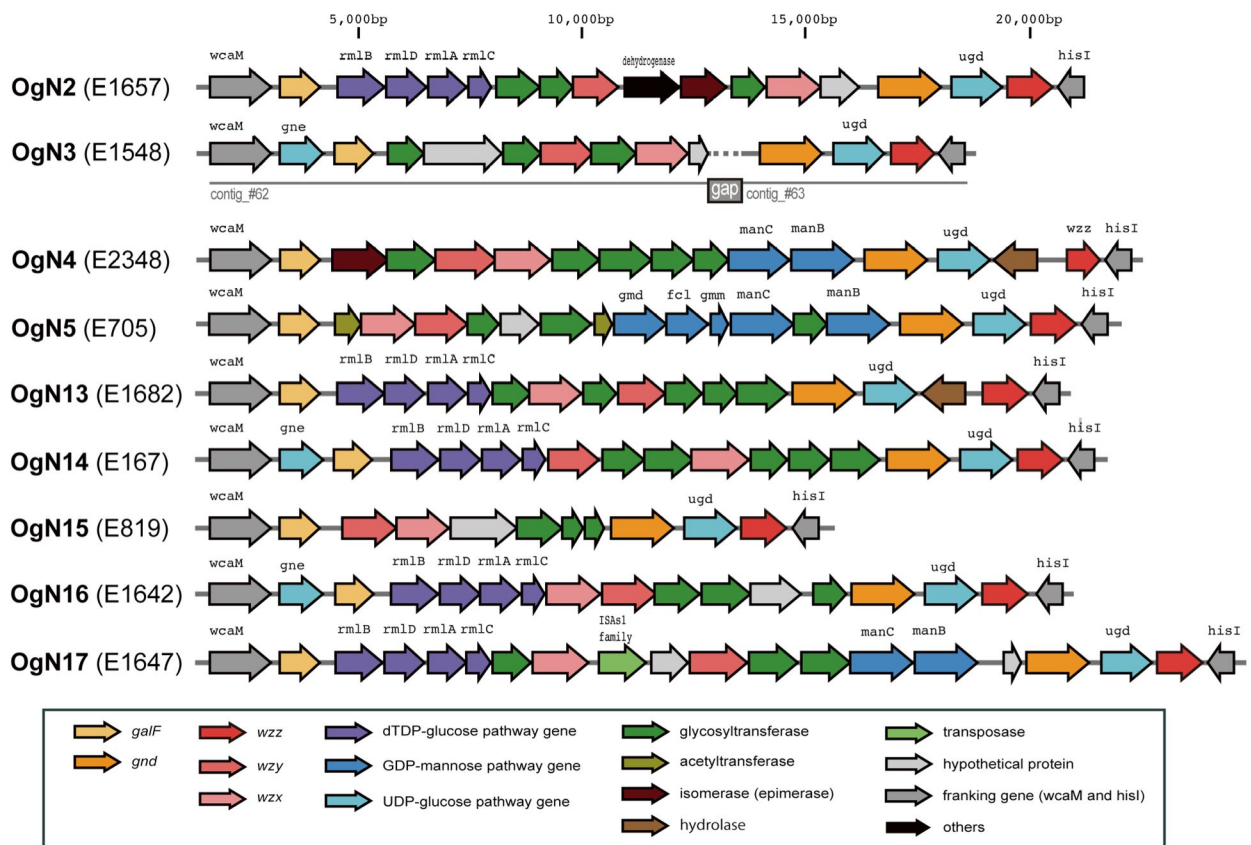


図 8 . 9 種類の新規 Og 型の O 抗原合成遺伝子領域

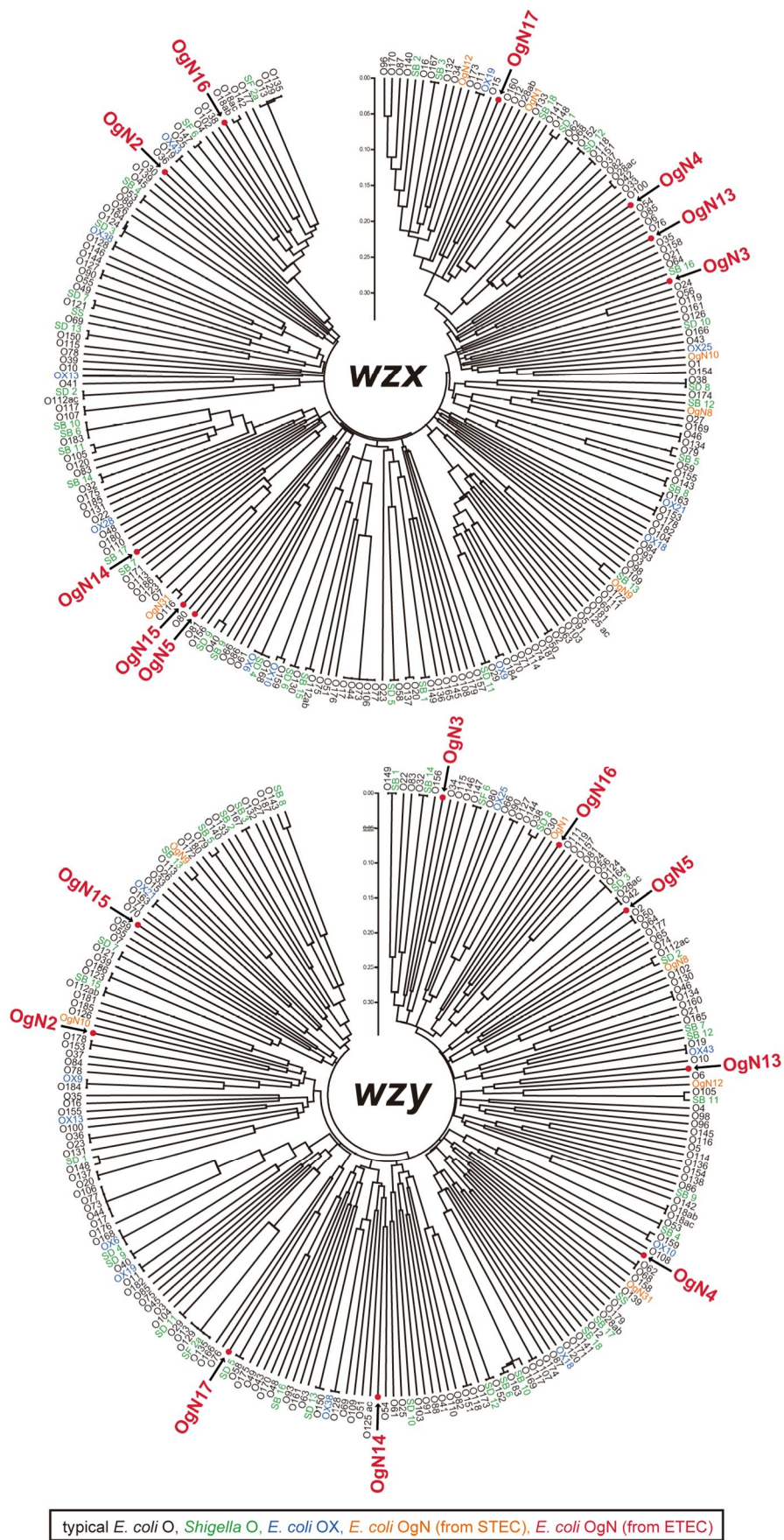


図9 . Og 型の遺伝子マーカーとなる *wzx* および *wzy* の比較

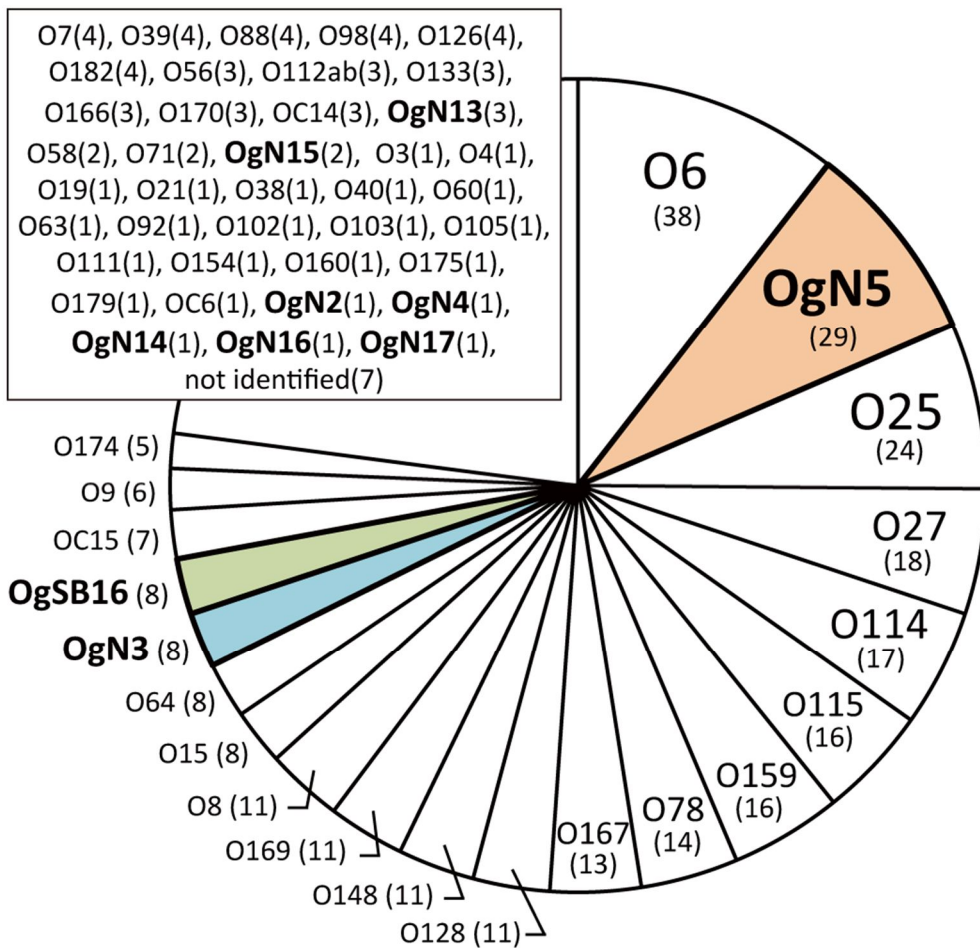


図 10. 海外分離株の新規 Og 型を踏まえた分布

表 4. 3 種類の新規 Og 型を判定する PCR プライマーセット

O genotype	Primer name	Sequence (5'-3')	Target gene	Size (bp)
OgN3	OgN3_PCR_F	GCTTGGCATCGTTGGGGATA	wzy	189
	OgN3_PCR_R	TGCTACCAATCAGGCCGCTA		
OgN5	OgN5_PCR_F	GGTTTAAGCGACCCGTATCG	wzy	650
	OgN5_PCR_R	CCAATTCCAGCCAGTGATGAG		
OSB16	OgSB16_PCR_F	AACCGCAGTGGAAACTGCA	wzy	717
	OgSB16_PCR_R	AATTCCACATCAATCCACGGA		

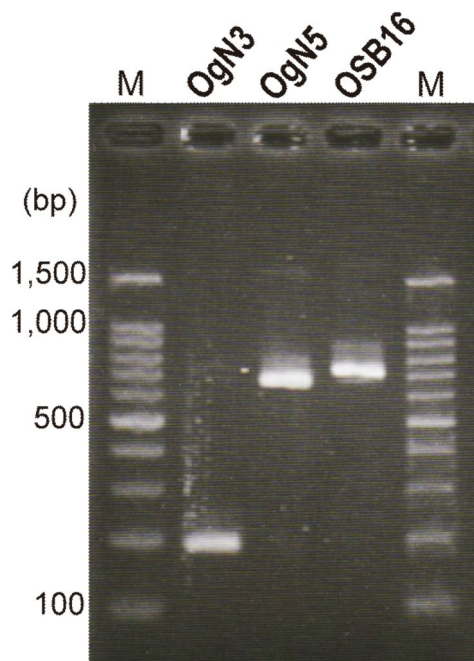


図 11. 3 種類の新規 Og 型を判定する PCR 法の産物泳動像

表 5. 家畜および野生動物における ETEC 保菌調査

種類	検体数	陽性数 (コロニースweep PCR 法)			分離数		
		<i>lt</i>	<i>sth</i>	<i>stp</i>	<i>lt</i>	<i>sth</i>	<i>stp</i>
イノシシ	7	0	0	0	NT	NT	NT
シカ	114	6	1	10	1	1	7
牛	48	0	18	0	NT	7	NT
豚	9	1	3	0	0	2	NT

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当無し							

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
該当無し					