

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

食品での新たな病原大腸菌の
リスク管理に関する研究

平成 27～29 年度 総合研究報告書

研究代表者 工藤 由起子

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成 30 (2018) 年

目 次

・総合研究報告書

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究	1
------------------------------------	---

工藤 由起子

・総合研究分担研究報告書

1 . 食中毒・感染症事例由来株の特性解析	18
---------------------------------	----

小西 典子

2 . 食品での統一的検査法の開発	25
-----------------------------	----

工藤 由起子

3 . ヒトの感染に関与する家畜の探索	38
-------------------------------	----

西川 禎一

・研究成果の刊行に関する一覧表	54
---------------------------	----

. 総 合 研 究 報 告 書

食品での新たな病原大腸菌の リスク管理に関する研究

工藤 由起子

平成27～29年度 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）

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

総合研究報告書

研究分担者 小西典子 東京都健康安全研究センター

西川禎一 大阪市立大学大学院生活科学研究科

研究要旨

食品中の病原大腸菌（下痢原性大腸菌）の検査法を開発するために、分担研究（1）食中毒・感染症事例由来株の特性解析（2）食品での統一的検査法の開発、（3）ヒトの感染に關与する家畜の探索、を実施した。（1）の研究において、東京都で発生した腸管毒素原性大腸菌（EPEC）下痢症では血清群 06、025、027、0148、0159、0169 が主要であること、散発下痢症患者の多くはインド、インドネシア、中国等海外渡航の關連が考えられること、食品での検査に免疫磁気ビーズ法が有用なこと、原因食品として野菜を使用した食品が多いこと、が明らかになった。また、（2）の研究において、EPEC 食中毒発生状況を解析し、上位7血清群の06、025、027、0148、0153、0159、0169 が本菌の主要血清群であり、東京都の主要血清群の全てが含まれていること、腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通である mEC 培地での42 培養が優れることが判明し、また、検出率を向上させる選択性のある分離平板培地が開発されたこと、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法について、国内で広く使用されている5種類の検出機器及び2種類のクエンチャーを用いたマルチプレックス反応条件にてEPECの標的遺伝子ST（STp、STh）およびLTが最小菌濃度 10^3 cfu以上/mlで検出され、検出感度に優れた毒素遺伝子検出法であることが判明したこと、コロボレイティブ・スタディでは、EPECが総じて比較的高率に検出され、食品の増菌培養液がリアルタイムPCR法でSTまたはLT遺伝子陽性になった場合、培養液を選択分離培地に塗抹するか、主要0血清群（7種）の免疫磁気ビーズ法を行い、濃縮液を分離培地に塗抹し培養してEPECを分離することが、食品の試験法として優れると考えられたこと、が明らかになった。さらに、（3）の研究において、食中毒の原因食品として食肉の重要性を検討するために家畜から分離株について解析をした。EPEC 0169の定着因子K88-like 遺伝子で組み換えた株はヒトのみならずブタとウシの腸粘膜上皮細胞にも強い接着性を示した。本プラスミドは多様な宿主への感染力を0169に提供することで、野外では保持されている可能性が示された。

研究協力者

大塚佳代子、門脇奈津子、星野 梢、 埼玉県衛生研究所

榊田 希、大阪美紗

尾畑浩魅、平井昭彦

東京都健康安全研究センター

岩淵香織

岩手県環境保健研究センター

土屋彰彦	さいたま市健康科学研究センター
山崎匠子	杉並区衛生検査センター
和田裕久	静岡県環境保健研究所
磯部順子	富山県衛生研究所
永井祐樹	三重県保健環境研究所
吉田孝子	奈良県保健研究センター
平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
森 哲也	一般財団法人 東京顕微鏡院
甲斐明美	公益社団法人 日本食品衛生協会
稲垣俊一	横浜検疫所 輸入食品検疫検査センター
白石祥吾	神戸検疫所 輸入食品検疫検査センター
佐藤 健	藤沢市保健所
杉村一彦	倉敷市保健所
成松浩志	大分県衛生環境研究センター
王 麗麗	大連理工大学・大阪市立大学 大学院生活科学研究科
中村寛海	大阪健康安全基盤研究所
坂 瑛里香、中台（鹿毛）枝里子、	大阪市立大学大学院生活科学研究科
鄭 冬明、大森裕子、涌嶋美津子、	
市川直樹	
吉田優香	大阪市立大学生活科学部
輪島文明	東京薬科大学薬学部
濱端 崇	国立国際医療センター研究所
安倍博之、堀口安彦	大阪大学微生物病研究所
山本太郎、和田崇之	長崎大学熱帯医学研究所
麻生 久	東北大学大学院農学研究科教授
Weiping Zhan	カンザス州立大学獣医学研究科
都丸亜希子、阪田理沙、高田 薫、	国立医薬品食品衛生研究所
寺嶋 淳	

A. 研究目的

2012年に感染症報告数集計において、下痢原性大腸菌（食中毒統計の病原大腸菌）の分類が新たな分類に改訂された。この新たな病原大腸菌の分類は、その判定のための病原

因子またはマーカーが明示され、患者から分離された大腸菌株の病原大腸菌としての同定・判定が行いやすくなった。このため、食中毒事例での原因食品や汚染食品の調査に有用な方法が必要とされる。しかし、腸管出

血性大腸菌以外の病原大腸菌についての食品での検査法は、これまで、国内外ともあまり検討されておらず、早急な確立が求められている。

食中毒統計における病因物質「その他の病原大腸菌」のうちの腸管毒素原性大腸菌（EPEC）による食中毒の発生は、年間の事例数は数件程度であることが多いが、多くの集団事例が報告され、患者数の多い事例が発生することが少なくないことが知られている。しかし、食品での検査法が確定されていないため、原因食品の調査や流通食品の汚染調査などにおいて有用な方法が求められている。なお、腸管出血性大腸菌については、既に食品での検査法（食安監発 1120 第 1 号 平成 26 年 11 月 20 日発「腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157 の検査法について」、平成 27 年 3 月 24 日事務連絡）が通知されており、試験手順や培地などの一部が、この検査法と共通であれば効率的で効果的な検査法と考えられる。EPEC はその病原性が明確であり、新たな病原大腸菌の判断基準に沿った食品での検査法を確立し、国の試験法の策定に貢献する。また、諸外国から参照される方法を確立したい。また、検査の対象として重要と考えられるヒトの感染に関与する家畜・食品群についても、ヒトと家畜での共通の病原因子を明らかにすることによって解明したい。

研究組織としては、（１）食中毒・感染症事例由来株の特性解析（小西典子、平成 27 年度のみ）（２）食品での統一的検査法の開発（工藤由起子）（３）ヒトの感染に関与する家畜の探索（西川禎一）の 3 つの分担研

究とした。

（１）小西は、厚生労働省食中毒統計や詳細な事例解析を行っている東京都の疫学データなどから EPEC による食中毒および下痢症発生状況を解析し、本菌の主要血清群を考察した。また、（２）工藤は、腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮し、増菌培養法および選択分離培地、本菌の病原因子であるエンテロトキシン（易熱性エンテロトキシン；LT、耐熱性エンテロトキシン；ST）の遺伝子を対象としたリアルタイム PCR 法を検討した。また、免疫磁気ビーズや優れる選択分離培地の開発を検討した。さらに、食品での検査法を確立するために各種手法の優れた方法を組み合わせて多機関によるコラボレイティブ・スタディを実施し評価した。（３）西川は、血清群 0169 の菌株について、病原プラスミドの全塩基配列を決定し異なる宿主に対応できる定着因子に関して検討した。

B. 研究方法

（１）食中毒・感染症事例由来株の特性解析
東京都における EPEC による集団下痢症の発生状況（1966 年から 2014 年）および分離株の特徴を解析した。また、散発下痢症患者（2012 年から 2014 年）から分離された大腸菌 1,063 株について毒素産生性、血清型などの特徴を解析した。さらに、EPEC 食中毒事例での食品を対象とした本菌の検出状況について解析した。加えて、過去に発生した集団下痢症事例で食品から EPEC が検出された事例について解析した。

（２）食品での統一的検査法の開発

1) ETEC 食中毒における主要血清群および関連する食品群の解析

食中毒統計、食中毒事件詳報や病原微生物検出情報 (IASR) による情報から ETEC の主要血清群や関連する食品群を解析した。また、食中毒事件詳報の一部不明な点は各自治体に問い合わせた情報収集を行った。

2) 増菌培養法および選択分離培地の検討

腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮した増菌培養法および選択分離培地を検討した。増菌培養として、modified EC 培地 (mEC、OXOID) 中での 36 および 42 で培養した。また、分離培地としてソルビトールマッコスキー寒天培地 (SMAC、OXOID) DHL 寒天培地 (栄研化学) ドリガルスキー改良培地 (栄研化学) クロモアガー STEC 培地 (関東化学) を検討した。また、選択剤として有用な物質を検挙して新たな選択分離培地の選定を行った。

3) ST および LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法の検討

食品での ST および LT 遺伝子検出法の検出感度を試験した。検体 (ミニトマト、大根の漬物、長ネギ、生わかめ) の mEC 培地中での培養液に ETEC を接種した (ETEC 10^8 ~ 10^2 cfu/ml 食品培養液)。これらからアルカリ熱抽出にて DNA 抽出を行った。ST 遺伝子 (est STp、est STh) および LT 遺伝子 (elt) を標的としたリアルタイム PCR 法を Hidaka ら (マルチプレックス反応、J. Appl. Microbiol., 2009, Vol. 106, p410-420) または Frydendahl ら (STp 遺

伝子、Mol. Cell. Probes, 2001, Vol. 15, p151-160) 共同研究者の小西ら (STh 遺伝子) West ら (LT 遺伝子、Vet. Microbiol., 2007, Vol. 122, p323-331) の方法を参照してシンプレックス反応およびマルチプレックス反応にて行った。各種クエンチャーおよび各種機器において検討した。また、ETEC を食品 25 g に接種 (想定菌濃度 10^2 cfu/g) し、mEC 培地中にて 42、20 時間培養した。培養液 20 μ l を、クロモアガー STEC 培地、SMAC、DHL 寒天培地、ドリガルスキー改良培地に画線塗抹し、培養し、菌を分離した。さらに、検出感度試験で作製した 10 倍階段希釈菌液接種の食品培養液のアルカリ熱抽出試料を用い、各 3 回の測定にて検量線を作成し、42、20 時間培養した mEC 培養液中の菌数を算出した。

4) 免疫磁気ビーズの自家調製

市販の免疫血清 (大腸菌 06、025、027、0148、0153、0159、0169) 20 μ l を磁気ビーズである Dynabeads M-280 (250 μ l) に加え、2 時間、室温で反応した。大腸菌自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果の検証を 10^4 ~ 10^1 cfu/ml の希釈菌液を用いて検討した。また、菌液接種食品培養液 (約 10^3 ~ 10^1 cfu/ml) を供試した検討も行った。

5) 食品での ETEC の検査法のコラボレイティブ・スタディ

13 試験検査機関によって、2 回 (第 1 回; 血清群 0159 STh 陽性、第 2 回; 0148 STp< 陽性) 実施し、試験食品検体をキュウリおよび長ネギとした。高菌数接種 (25 cfu/25 g) 検体、低菌数接種 (5 cfu/25 g) 検体、非接種用検体および陽性用検体

(長ネギのみ設定)を小型温度記録計を挟んでバイオセーフティー対応容器に入れ、冷蔵にて送付した。コラボレイティブ・スタディの試験実施手順は、1日目に、検体入りのストマッカー袋に、mEC培地を加え、 42 ± 1 、 22 ± 2 時間培養した。2日目に、培養液を分離培地(SMAC、クロモアガーSTEC、抗生物質加SMAC、抗生物質加クロモアガーSTEC)に接種し画線し、培養した。免疫磁気ビーズ濃縮法を行い分離培地(抗生物質加SMAC、抗生物質加クロモアガーSTEC)に画線し培養した。また、培養液0.1 mlをアルカリ熱抽出法にてDNAを抽出し、ST・LT遺伝子検出リアルタイムPCR法(インターナルコントロール:ICを含む)に供試した。3日目に、直接塗抹法および免疫磁気ビーズ法について、各種類の平板培地から疑われるコロニー3個を釣菌し、普通寒天培地にて培養した。4日目に、普通寒天培地等に生育したコロニーを免疫血清(0148および0159)にて凝集反応を確認した。試験終了後に、結果表に記入した試験結果およびリアルタイムPCRのランファイル(sds形式またはeds形式)各検体に添付された小型温度記録計および検体送付缶を返送した。試験結果を集計後、Outlier機関の検定および検出方法間の有意差検定を行った。

(3) ヒトの感染に關与する家畜の探索

下痢症患者の便から独自に分離した ETEC 0169:H41 の YN10 株と ETEC 0159 の IND 株 を実験に供した。いずれの株も毒素遺伝子である est (STp) を保持していた。

ヒト結腸癌由来の上皮細胞である Caco-2

および喉頭ガン由来の HEp-2 細胞、ブタ小腸由来の上皮細胞である IPEC-1 およびブタ空腸由来の上皮細胞である IPEC-J2、ウシ腸粘膜上皮細胞である BIE について、各細胞指定の組織培養液を用いて実験に供した。接着性試験では、培養細胞に供試菌株を接種し 3 時間培養した。細胞をメタノール固定後、10% ギムザ液で細胞を染色し、鏡検した。

ETEC 0169 YN10 株の培養液からプラスミドを抽出し、アガロースゲル電気泳動によって染色体 DNA と分離した。クロラムフェニコール耐性遺伝子のベクターである pSV28(Cm^r) は形質転換した実験室株から抽出した。プラスミドのシーケンス解析は、タカラバイオに委託し、シーケンサー (FLX System; 454 Life Sciences、Roche Applied Science、Branford、CT) を用いた解析により 150 のコンティグ(塩基配列断片群) 情報として得た。

YN10 株の CS6 の前後 1500 bp を含んだ領域および CS8(CFA/III) の前後 1000 bp を含んだ領域、K88(F4)-like の前後 1000 bp を含んだ領域についてプライマーを設計し増幅し、ベクターとした。標的遺伝子領域の PCR 産物を用いて TOP10 の形質転換を行った。Cm 耐性を獲得して生育したコロニーを採り、PCR とその産物のシーケンスにより目的の遺伝子が含まれているか確認した。

タンパク質コード配列 (Cording sequence ; CDS) の抽出はアノテーション用パイプライン Microbial Genome Annotation Pipeline (MiGAP) を用いて行った。すべての塩基配列とアノテーション結果を DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した (Accession No. AP014654)。

塩基配列から推定されたアミノ酸配列の類似度は、EMBOSS needle program をウェブサイト EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>) で用いることで比較した。Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 6.06.41 を使用した 500 レプリケーションブートストラップ分析 (500 replicate bootstrap analysis) および近隣結合法 (Neighbor-Joining method with a poisson) を使用して系統樹を作成した。

モノクローナル抗体の作製のために、遺伝子 *faeG1* と *faeG2* の合成ペプチドをラットに接種し、約 3 週間後に細胞融合し、ハイブリドーマを作製した。抗原と反応する抗体を産生する細胞を選別した。モノクローナル抗体が作製されていることを確認し、以降の実験で利用した。

免疫電顕での観察のために、親水化処理した炭素膜グリッドに菌懸濁液 (0169 および 0169cured、Top10、K88-like 組込み株) をのせて吸着させた後、1 次抗体および金コロイドで標識した抗ラット 2 次抗体と反応させ、2% モリブデン酸アンモニウムで染色し、乾燥後、電子顕微鏡で観察した。ウエスタンブロットでの解析のために、供試菌を超音波処理破碎しタンパクを回収し、SDS-PAGE (12.5%) を行った。1 次抗体として作製したモノクローナル抗体、2 次抗体として HRP 標識された抗ラット IgG 抗体を用いた。凝集反応試験は、96 ウェルプレートにモノクローナル抗体を段階希釈し、1%ホルムアルデヒド添加生理食塩水で処理した死菌懸濁液を加え、室温で一晩静置して行った。

C. 研究結果

(1) 食中毒・感染症事例由来株の特性解析

東京都における ETEC による集団下痢症は、1991～2000 年には非常に多く発生しているが、2001 年以降はやや減少傾向であった。06、025、027、0148、0159、および 0169 の 6 血清群で全体の 86.3% を占めていた。患者の多くはインド、インドネシア、中国等海外渡航の関連が考えられた。食中毒事例での保存検体を mEC 培地での 37 および 42 での 2 段階増菌法に、また、毒素遺伝子検出や自家調製 0148 免疫磁気ビーズでの濃縮法に供した結果、ネギまたはネギが使用された食品から ETEC0148 (ST 産生) が分離された。

東京都における ETEC 食中毒の原因食品は野菜関連が 4 事例、1 事例は杏仁豆腐であった。

(2) 食品での統一的検査法の開発

1) ETEC 食中毒における主要血清群および関連する食品群の解析

全国の食中毒では患者数が 300 人または 500 人を超える事例の報告も珍しくなかった。また、ETEC の血清群を解析した結果、0148、06、0159、0169、025、0153、027 が上位 7 血清群であり、これらが主要血清群と考えられた。さらに、ETEC 食中毒では、原因食品は野菜が最も多く、半数以上を占め、次に水が多かった。

2) 増菌培養法および選択分離培地の検討

供試した株すべて、mEC 培地にて 37 および 42 で増殖した。

供試した株はすべて、SMAC、DHL 寒天培地、ドリガルスキー改良培地に生育し、培地間での発育状況の優劣は認められな

った。また、選択剤として有用な物質の候補が見出された。

3) ST および LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法の検討

供試したいずれの食品、菌株においても、いずれのリアルタイム PCR 系(クエンチャーの種類を含む)においても、 10^3 cfu 以上/ml の検出感度で ST および LT 遺伝子が検出された。また、各食品のリアルタイム PCR 検量線を基に、菌を接種した食品を mEC 中にて 42 で 20 時間培養した培養液中の菌数を算出した結果、 $2.1 \times 10^8 \sim 1.1 \times 10^9$ cfu/ml であった。

4) 免疫磁気ビーズの自家調製

免疫磁気ビーズを作製し、集菌効果を評価した結果、027、0148、0159 は 10^0 cfu/ml まで、025、0153、0169 は 10^1 cfu/ml まで検出可能であった。しかし、06 は 10^3 cfu/ml までの検出であり、集菌効果は低かった。また、いずれの食品でも、免疫磁気ビーズ法によって分離率が向上した。

5) 食品での ETEC の検査法のコラボレイティブ・スタディ

血清群 0159 の結果では、低菌数接種が 7.4 cfu/25 g、高菌数接種は 37.0 cfu/25 g であった。検出感度は、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)では、高菌数接種においては、キュウリおよび長ネギのいずれの検体でも Auto 解析およびマニュアル解析ともに 1.000 であった。低菌数接種においては、いずれの検体でも 0.974 であった。直接塗抹法では、高菌数接種においては、キュウリ検体では、分離に用いた 4 種類いずれの寒天培地でも

1.000 であった。長ネギ検体では、SMAC 以外の 3 種類の培地で 1.000、SMAC で 0.897 であった。低菌数接種においては、キュウリ検体では、SMAC 以外の 3 種類の培地で 0.974、SMAC で 0.949 であった。長ネギ検体では、SMAC 以外の 3 種類の培地で 0.974、SMAC で 0.846 であった。免疫磁気ビーズ法では、高菌数および低菌数接種においては、いずれの検体でも、分離に用いた 2 種類の寒天培地で 0.974 以上であった。統計解析を行った結果、キュウリ検体では、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)の Auto 解析は、直接塗抹法のクロモアガー STEC および抗生物質加 SMAC、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のマニュアル解析よりも検出率が有意に低かった。長ネギ検体では、直接塗抹法の SMAC および ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)の Auto 解析は、直接塗抹法の SMAC 以外の寒天培地、免疫磁気ビーズ法の両寒天培地、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のマニュアル解析よりも検出率が有意に低かった。

血清群 0148 の結果では、低菌数接種が 4.1 cfu/25 g、高菌数接種は 20.5 cfu/25 g であった。検出感度は、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)では、高菌数接種においては、キュウリ検体では、Auto 解析およびマニュアル解析ともに 1.000 であったが、長ネギ検体では、いずれの解析においても 0.769 であった。低菌数接種においては、キュウリ検体では、いずれの解析においても 0.923 であり、長ネ

ギ検体では、いずれの解析においても 0.590 であった。直接塗抹法では、高菌数接種においては、キュウリ検体では、SMAC で 0.615、SMAC 以外の 3 種類の寒天培地において 1.000 であった。長ネギ検体では、抗生物質加 SMAC で 0.641、抗生物質加クロモアガー-STEPC で 0.513、クロモアガー-STEPC で 0.462、SMAC で 0.231 であった。低菌数接種においては、キュウリ検体では、SMAC で 0.641、SMAC 以外の 3 種類の培地において 0.872 以上であった。長ネギ検体では、抗生物質加 SMAC で 0.333、抗生物質加クロモアガー-STEPC で 0.308、SMAC で 0.179、クロモアガー-STEPC で 0.154 であった。免疫磁気ビーズ法では、高菌数接種においては、キュウリ検体では、両寒天培地で 1.000 であり、長ネギ検体では、両寒天培地で 0.744 であった。低菌数接種においては、キュウリ検体では、両寒天培地で 0.872、長ネギ検体では、0.385 であった。統計解析を行った結果、キュウリ検体では、直接塗抹法の SMAC は、直接塗抹法の SMAC 以外の寒天培地、免疫磁気ビーズ法の両寒天培地、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のいずれの解析よりも検出率が有意に低かった。長ネギ検体では、直接塗抹法の SMAC は、免疫磁気ビーズ法の両寒天培地および ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のいずれの解析よりも検出率が有意に低く、直接塗抹法のクロモアガー-STEPC は、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のマニュアル解析よりも検出率が有意に低かった。

(3) ヒトの感染に関与する家畜の探索

1) pEntYN10 の全塩基配列解析

pEntYN10 は、全長 145,082 bp で、GC 含量は、46.15 %であった。本プラスミドには、incFII グループの *repA1* と *repA2* 複製遺伝子がコードされており、pEntYN10 プラスミドは、RepFII プラスミドファミリーに属することが分かった。

2) pEntYN10 上の定着因子遺伝子

pEntYN10 は、推定定着因子として、CS6、CS8(CFA/III)-like、K88(F4)-like の 3 遺伝子群を保有していた。CS6 の構造サブユニットの 1 つである *CssA* は、既知のものと比較して 5 つのアミノ酸変異を持っていた。CS8 の主要構造サブユニットと 73.2%の相同性を有していた。

K88(F4)-like 遺伝子は、主要構造サブユニットとされる、*faeG* が 2 つコードされていた。*faeG* の配列の系統発生樹では、これらの 2 つの *faeG* は、他の大腸菌株よりも *Salmonella* *Infantis* のものと近かった。

3) 0159 IND 株の定着因子の検討

アノテーションにより pEntYN10 は、3 つの推定定着因子、CS6、CS8 (CFA/III) および K88 (F4)-like を保有することが分かった。0159 IND も pEntYN10 と同じ CS8-like および K88-like 遺伝子を保有し、K88-like は pEntYN10 の K88-like と 99% 一致していることがわかった。

4) ヒト、ブタ、ウシ由来の腸粘膜上皮細胞に対する接着性

光学顕微鏡観察だけではなく、接着している菌を回収し培養法で菌数を算定した

定量試験でも接着性が再確認された。すなわち、0169 野生株と K88-like 遺伝子を含む領域を組み込んだ pSV28K88-like で形質転換された TOP10K88-like 株は、付着試験後のヒト由来 HEp-2 細胞、ブタ由来 IPEC-1 細胞、ウシ由来 BIE 細胞から 10^7 前後の菌が回収された。一方、病原プラスミド pEntYN10 が脱落した 0169cured 株、実験室株の TOP10、CS6 遺伝子や CS8-like の遺伝子領域で形質転換された株は 1-2 桁低い菌数にとどまった。

5) モノクローナル抗体の作製

ELISA 法による抗体産生チェックにより、抗 FaeG1 として 29 個、抗 FaeG2 として 25 個の陽性サンプルが確認された。

TOP10K88-like を抗原としてこれらの凝集反応試験を行ったところ、それぞれ 2 個ずつの陽性が確認された。これら 4 サンプルを限界希釈し、FaeG1 で 1 クローン、FaeG2 で 2 クローンのモノクローナル抗体産生細胞を得ることができた。

6) モノクローナル抗体の特異性

免疫電顕、ウエスタンブロッティングおよび凝集試験に適用したところ、特異的な反応はみられなかった。

D. 考察

(1) 食中毒・感染症事例由来株の特性解析

東京都で発生した集団および散発下痢症事例では、ETEC の血清群 06、025、027、0148、0159、0169 が多く、食品を対象とした検査法の検討は、これらを対象とすることが妥当であると考えられた。また、散発患者の多くは下痢の発症前にインド、インドネシア、中国

等への海外渡航が認められ、これらの国では生水や加熱されていない食品の摂取には注意が必要である。また、これらの地域から輸入される食品も、本菌に汚染されている可能性が考えられる。ETEC を検出した事例の原因食品をみると、野菜を使用した食品が多いことから、輸入野菜について特に注視が必要と思われる。食中毒事例での原因食品（カットネギ等）の究明では、増菌培養液を PCR 法で ST 毒素遺伝子をスクリーニングし、培養液から 0148 の分離を行うことができた。また、免疫磁気ビーズ法によって、検出が可能となった検体もあり、今後の検査法の参考になると考えられた。

(2) 食品での統一的検査法の開発

過去の国内における食中毒では、O 血清群 06、025、027、0148、0153、0159、0169 による事件の発生が多いこと、食中毒原因食品として野菜・その加工品や水が重要であり、それらの汚染経路として人、環境・水、調理場での二次汚染が考えられた。これらのことは (1) の研究での東京都内の解析結果とほぼ一致していた。また、海外渡航での感染事例も国内での発生事例での血清群と重なることから、海外渡航者が患者または健康保菌者として国内での汚染経路の一端となっていることも、考えられた。さらに、ETEC の感染が発生している地域で生産された農産物など輸入食品が汚染経路の一端となっていることも推察される。

本菌の主要血清群の増菌培養について検討し、mEC 培地、42℃ で発育することが判明した。本培養条件は、すでに通知で示されている食品からの腸管出血性大腸菌検査法と

同一な増菌培地で、同一の培養温度である。そのため、市販食品の汚染調査において、病原機構の異なる複数の病原大腸菌検査を並行して行うことができ、検査の効率性を高め、また検査費用の削減にもなる。また、STおよびLT遺伝子検出のためのリアルタイムPCR法として、Hidakaらのプライマー・プローブ(クエンチャーMGB)、Frydendahlら・小西ら・Westらのプライマー・プローブ(クエンチャーTAMRA)、Frydendahlら・小西ら・Westらのプライマー・プローブ(クエンチャーBHQ)、Frydendahlら・小西ら・Westらのプライマー・プローブ(クエンチャーQSY)、ICを付加したマルチプレックス反応、といった複数の反応系を検討し、いずれも標的遺伝子を最少菌濃度 10^3 cfu以上/mlで検出された。これら各種の反応系や各種の検出機器を用いた方法による検出法を提示できたことは、使用可能な検出機器および試薬の選択肢が広がり、食品のETEC遺伝子スクリーニング検査の実用性が高まるものと期待する。さらに、対象血清群の免疫磁気ビーズ自家調整法を確立した。感作される抗体量が均一な自家調製免疫磁気ビーズが作製され、0148および0159のいずれの血清群も 10^0 cfu/mlまで検出された。免疫磁気ビーズを自家調製後、保存性を検討した結果、1年間程度は使用できるものと考えられた。なお、血清群06は他6血清群と比して、検出感度が弱い結果が示され、今回用いた06はK抗原がリッチな株であった可能性が示唆された。分離培地については、ETECの選分離培地の開発を行い、適した抗生物質と添加量を見出した。菌接種食品培養液を用いて検討した

ところ免疫磁気ビーズ法を行い、抗生物質加SMACおよびクロモアガー-STECに塗抹して37℃で培養することによって、食品培養液中のETECが約 10^4 cfu/mlの濃度以上であれば、ETECを分離することが可能であることが示された。最終的にETEC 06、025、027、0148、0153、0159および0169の計7血清群を対象とした食品での検査法の確立のために、13試験検査機関によるコラボレイティブ・スタディを代表血清群として0148および0159を対象として行った。本コラボレイティブ・スタディでの試験法は、mEC培地中での42℃での増菌培養法、免疫磁気ビーズ法と各選択分離培地の組み合わせによる分離培養法および遺伝子検出法で構成された。試験の結果、菌数が一桁のレベルであっても高率に検出されることが判明した。ST・LT遺伝子検出リアルタイムPCR法をスクリーニングに使用し、陽性であった検体を免疫磁気ビーズ法に供することで効率的な試験が行えるものと考えられた。また、試験の際には、釣菌するコロニー数も重要であると思われた。

(3) ヒトの感染に関与する家畜の探索

ETECは宿主の腸粘膜上皮細胞への接着と局所での増殖を果たしながらエンテロトキシンを産生して下痢症を引き起こす。これまでに、下痢症患者から分離されたETEC 0169:H41の病原プラスミドpEntYN10にはCS6、CS8-like、K88-likeの3種類の腸管定着因子がコードされていることを明らかにした。ヒトの感染にはCS6やCS8が定着因子として働くことが知られているが、K88はもともとブタETECの定着因子でありヒトETECからは検出されない。また、ブタETECの定

着因子である K88 が線毛を形成するのに対し、0169 の電子顕微鏡観察では K88 様の線毛は観察されておらず、しかも K88-like 遺伝子群はヒト由来 *Salmonella* 株の *faeG* と相同性が高い配列を 2 つ保する前例のないものであった。このことから、pEntYN10 の K88-like がヒトへの感染のために働いている可能性が考えられ、実際に今回の組み換え実験によって K88-like が in vitro における 0169 の特異な接着像を創り出していることが明らかになった。3 種の定着因子遺伝子を使い分けることによって 0169 が多様な宿主に感染する能力を得ている可能性が考えられる。

E. 結論

食品中の病原大腸菌（下痢原性大腸菌）の検査法を開発するために、分担研究（1）食中毒・感染症事例由来株の特性解析（2）食品での統一的検査法の開発、（3）ヒトの感染に關与する家畜の探索、を実施した。（1）の研究において、東京都で発生した ETEC 下痢症では血清群 06、025、027、0148、0159、0169 が主要であること、散発下痢症患者の多くはインド、インドネシア、中国等海外渡航の關連が考えられること、食品での検査に免疫磁気ビーズ法が有用なこと、原因食品として野菜を使用した食品が多いこと、が明らかになった。また、（2）の研究において、ETEC 食中毒発生状況を解析し、上位 7 血清群の 06、025、027、0148、0153、0159、0169 が本菌の主要血清群であり、東京都の主要血清群の全てが含まれていること、腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通である mEC 培地での 42 培養が優れることが判

明し、また、検出率を向上させる選択性のある分離平板培地が開発されたこと、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法について、国内で広く使用されている 5 種類の検出機器及び 2 種類のクエンチャーを用いたマルチプレックス反応条件にて ETEC の標的遺伝子 ST (STp、STh) および LT が最小菌濃度 10^3 cfu 以上/ml で検出され、検出感度に優れた毒素遺伝子検出法であることが判明したこと、コラボレイティブ・スタディでは、ETEC が総じて比較的高率に検出され、食品の増菌培養液がリアルタイム PCR 法で ST または LT 遺伝子陽性になった場合、培養液を選択分離培地に塗抹するか、主要 O 血清群（7 種）の免疫磁気ビーズ法を行い、濃縮液を分離培地に塗抹し培養して ETEC を分離することが、食品の試験法として優れると考えられたこと、が明らかになった。さらに、（3）の研究において、食中毒の原因食品として食肉の重要性を検討するために家畜から分離株について解析した。ETEC 0169 の定着因子 K88-like 遺伝子で組み換えた株はヒトのみならずブタとウシの腸粘膜上皮細胞にも強い接着性を示した。本プラスミドは多様な宿主への感染力を 0169 に提供することで、野外では保持されている可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi, N., Maeda, E., Saito, S., Furukawa, I., Ohnishi, T., Watanabe, M.,

- Terajima, J. and Hara-Kudo, Y. Association of cell-adhesion activities with virulence in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2. *Biocontrol Science*. 21:57-61, 2016.
- Ban, E., Yoshida, Y., Wakushima, M., Wajima, T., Hamabata, T., Ichikawa, N., Abe, H., Horiguchi, Y., Hara-Kudo, Y., Kage-Nakadai, E., Yamamoto, T., Wada, T. and Nishikawa, Y. Characterization of unstable pEntYN10 from enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) O169:H41. *Virulence* 6:735-744, 2015.
- Hara-Kudo, Y., Konishi, N., Otsuka, K., Iwabuchi, K., Kikuchi, R., Isobe, J., Yamazaki, T., Suzuki, F., Nagai, Y., Yamada, Y., Tanouchi, A., Mori, T., Nakagawa, H., Ueda, Y. and Terajima, J. An interlaboratory study on efficient detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O103, O111, O121, O145, and O157 in food using real-time PCR assay and chromogenic agar. *Int. J. Food Microbiol.* 230:81-88, 2016.
- Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y. and Nishikawa, Y. Comparison by multi-locus variable-number tandem repeat analysis and antimicrobial resistance among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from foods and human and animal faecal specimens. *J. Appl. Microbiol.* 122:268-278, 2017.
- Seo, D., Choi, S., Jeon, S., Jeong, S., Park, H., Lee, B., Kim, G., Yang, S., Nishikawa, Y. and Choi, C. Comparative sequence analysis of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 identified in Korean and Japanese *Escherichia coli* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 243:1-8, 2017.
- 工藤由起子. 腸管出血性大腸菌による食中毒発生と食肉汚染状況について. *感染と消毒*. Vol. 24(1), 72-76, 2017.
- Terajima, J., Izumiya, H., Hara-Kudo, Y. and Ohnishi, M. Shiga toxin (verotoxin)-producing *E. coli* and foodborne disease: A Review. *Food Safety*. Vol. 5(2), 35-53, 2017.
- 工藤由起子、寺嶋 淳. 冷凍メンチカツの加熱調理による腸管出血性大腸菌の殺菌条件の検討. *食品衛生研究*. 67:7-13, 2017.
- Wang, L., Zhang, S., Zheng, D., Fujihara, S., Wakabayashi, A., Okahata, K., Suzuki, M., Saeki, A., Nakamura, H., Hara-Kudo, Y., Kage-Nakadai, E. and Nishikawa, Y. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in foods and fecal specimens obtained from cattle, pigs, chickens, asymptomatic carriers, and patients in Osaka and Hyogo, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 70:464-469, 2017.
- Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y. and Nishikawa, Y. Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated

from different retail foods. Int. J. Food Microbiol. 249:44-52, 2017.

2 . 学会発表

星野 梢、鈴木史恵、山崎匠子、小西典子、菊地理慧、岩淵香織、永井佑樹、磯部順子、山田裕子、坂本 綾、上田泰史、森 哲也、中川 弘、大塚佳代子、工藤由起子. 食品における腸管出血性大腸菌 6 血清群試験法のコラボレイティブスタディによる評価. 第 19 回腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症研究会. 平成 27 年 7 月.

森 哲也、長尾清香、岸野かなえ、難波豊彦、高田 薫、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌の食品からの検出における DNA 抽出法および遺伝子検出法の検討. 日本防菌防黴学会第 42 回年次大会. 平成 27 年 9 月.

石川暢子、齋藤明美、吉田信一郎、市川希美、森 哲也、伊藤 武、池本尚人、加藤一郎、林 伸之、工藤由起子. ゼリー飲料および固形化成分を含有する粉末清涼飲料の細菌試験法の問題点とその改善法の検討. 第 36 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 27 年 11 月.

大塚佳代子、森 哲也、上田泰史、中川 弘、清水大輔、甲斐明美、小西典子、長尾清香、寺嶋 淳、工藤由起子. 食品の腸管出血性大腸菌検査における VT 遺伝子検出機器及び試薬の検討. 第 36 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 27 年 11 月.

Noju, T., Matsuzaki, T., Tamai, S., Tanimoto, Y., Kage-Nakadai, E. and Nishikawa, Y. Diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC) strains

isolated from healthy carriers inhibit IL-8 secretion of HEK293 cells stimulated by inflammatory substances. *E. coli* and the Mucosal Immune System, July, 2015. Ghent, Belgium.

Ban, E., Yoshida, Y., Ikezaki, S., Zheng, D., Kage-Nakadai, E., Wada, T., Wajima, T., Hamabata, T., Horiguchi, Y., Ichikawa, N., Hara-Kudo, Y. and Nishikawa, Y. Complete DNA sequence of the virulence plasmid of enterotoxigenic *Escherichia coli* O169:H41 and characterization of a novel adherence factor. *E. coli* and the Mucosal Immune System, July, 2015. Ghent, Belgium.

Mamun, Md. M., Parvej, Md. S., Hassan, J., Nazir, KHM N. H., Nishikawa, Y. and Rahman, Md. T. Detection of Shigatoxigenic *Escherichia coli* in healthy broiler chicken and their public health significance. Applied and Environmental Microbiology Gordon Research Conference, July, 2015. Boston, USA.

Tamai, S., Noju, T., Tanimoto, Y., Matsuzaki, T., Kage-Nakadai, E., Yamaguchi, Y., Kodama, T., Nakamura, S., Motooka, D., Iida, T. and Nishikawa, Y. Inhibitory effects of diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from healthy carriers on cytokine secretions of epithelial cells stimulated by inflammatory substances.

- The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September, 2015. Japan.
- Nakatani, Y., Yaguchi, Y., Kashima, N., Komura, T., Kage-Nakadai, E., Terao, K. and Nishikawa, Y. Sesamin prolongs lifespan of *Caenorhabditis elegans* through regulation of genes related to caloric restriction. The 3rd International Conference on Model Hosts, September, 2015. Crete, Greece.
- 中村寛海、田口真澄、井口 純、西川禎一 . 食品製造施設における自由生活性アメーバおよび *Listeria monocytogenes* の分布. 第 88 回日本細菌学会総会. 平成 27 年 3 月.
- 中谷裕美子、西川禎一 . セサミンによる *Caenorhabditis elegans* (線虫) の寿命延長メカニズムの解明. 日本食品免疫学会 第 11 回学術大会. 平成 27 年 10 月.
- 西川禎一 . *Caenorhabditis elegans* (線虫) における乳酸菌の抗老化効果. 日本食品免疫学会 第 11 回学術大会. 平成 27 年 10 月.
- 森 哲也、長尾清香、岸野かなえ、難波豊彦、伊藤武、工藤由起子 . 食品からの腸管出血性大腸菌検出における DNA 抽出と遺伝子検出法の検討. 第 111 回 日本食品衛生学会学術講演会. 平成 28 年 5 月.
- 尾畑浩魅、高橋正樹、河村真保、山本浩平、山梨敬子、小西典子、平井昭彦、甲斐明美、貞升健志 . 自家調製免疫磁気ビーズ作製法の検討とその応用. 第 37 回日本食品微生物学会学術講演会 . 平成 28 年 9 月 .
- 大阪美紗、大塚佳代子、星野 梢、門脇奈津子、榊田 希、小西典子、甲斐明美、寺嶋 淳、工藤由起子 . 食品での腸管毒素原性大腸菌検査法を確立するための基礎検討. 第 112 回日本食品衛生学会. 平成 28 年 10 月.
- 小西典子、尾畑浩魅、平井昭彦、甲斐明美、大塚佳代子、寺嶋 淳、工藤由起子 . 毒素原性大腸菌による集団および散発下痢症の特性解析. 第 112 回日本食品衛生学会. 平成 28 年 10 月.
- Lee, K., Kobayashi, N., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y., Tsubone, H., Kumagai, S. and Hara-Kudo, Y. Spread and change in stress resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 on food-related fungal colonies. International Symposium of Mycotoxicology, 2016. Japan.
- 鄭 冬明、坂 瑛里香、池崎 沙耶加、中臺枝里子、和田崇之、輪島丈明、濱端 崇、堀口安彦、西川禎一 . Complete DNA sequence of the ETEC O169:H41 virulence plasmid and the novel colonization factor. 第89回日本細菌学会総会. 平成 28年3月.
- 玉井 沙也加、能重 匠、谷本佳彦、松崎壮宏、中臺枝里子、山口良弘、児玉年央、飯田哲也、西川禎一 . Inhibitory effects of diffusely adherent *Escherichia coli* strains on cytokine secretions of epithelial cells. 第89回日本細菌学会総会. 平成28年3月.
- 鄭 冬明、坂 瑛里香、大森裕子、中臺枝里子、山口良弘、和田崇之、西川禎一 . 上

- 皮細胞に対する腸管毒素原性大腸菌
0169 : H41の特異な接着性に寄与する新規
付着因子. 第37回日本食品微生物学会学
術総会. 平成28年9月.
- 玉井 沙也加、能重 匠、谷本佳彦、松崎壮
宏、中臺枝里子、山口良弘、児玉年央、飯
田哲也、西川禎一. 培養細胞の炎症性サ
イトカイン分泌に対する健康者由来分散
接着性大腸菌の抑制機構. 第37回日本食
品微生物学会学術総会. 平成28年9月
- 鄭 冬明、坂 瑛里香、大森裕子、中臺枝里
子、山口良弘、和田崇之、工藤由起子、西
川禎一. 上皮細胞に対する腸管毒素原性
大腸菌0169 : H41の特異な接着性に寄与す
る新規付着因子. 日本栄養食糧学会第55
回近畿支部大会. 平成28年10月
- 玉井 沙也加、能重 匠、谷本佳彦、松崎壮
宏、中臺枝里子、山口良弘、児玉年央、飯
田哲也、西川禎一. 培養細胞の炎症性サ
イトカイン分泌における健康者由来分散
接着性大腸菌の抑制機構. 日本栄養食糧
学会第55回近畿支部大会. 平成28年10月.
- 玉井沙也加、能重匠、谷本佳彦、松崎壮宏、
中臺枝里子、山口良弘、児玉年央、中村昇
太、元岡大祐、飯田哲也、西川禎一. 培
養細胞の炎症性サイトカイン分泌に対す
る分散接着性大腸菌の抑制機構. 第69回
日本細菌学会関西支部学術集会. 平成28
年11月.
- 鄭冬明、坂 瑛里香、大森裕子、中臺枝里子、
和田崇之、工藤由起子、西川禎一. 腸管
毒素原性大腸菌0169 : H41の特異な細胞接
着性に寄与する新規付着因子. 第69回日
本細菌学会関西支部学術集会. 平成28年
11月.
- 大阪美紗、大塚佳代子、門脇奈津子、榊田希、
小西典子、小俣浩魅、甲斐明美、寺嶋淳、
工藤由起子. 食品からの腸管毒素原性大
腸菌検出におけるリアルタイム PCR 法の検
討. 第 38 回日本食品微生物学会. 平成 29
年 10 月 .
- 工藤由起子、田中恵美、都丸亜希子、寺嶋 淳.
冷凍メンチカツを原因とする腸管出血性
大腸菌 0157 食中毒発生とその要因である
加熱調理方法での菌数減少の検証. 第 113
回日本食品衛生学会学術講演会. 平成 29
年 11 月.
- Parvej, M. S., Kage-Nakadai, E. and
Nishikawa, Y. Molecular characteristics
of diarrheagenic Escherichia coli (DEC)
isolates from poultry. The 16th Awaji
International Forum on Infection and
Immunity, September, 2017. Japan.
- Takeuchi, N., Tanimoto, Y., Tamai, S.,
Yanagida, S., Yamaguchi, Y.,
Kage-Nakadai, E. and Nishikawa, Y.
Diffusely adherent Escherichia coli
(DAEC) strains isolated from healthy
carriers inhibit IL-8 secretion of
epithelial cells by the type VI
secretion system (T6SS). The 16th
Awaji International Forum on Infection
and Immunity, September, 2017. Japan.
- Omori, Y., Zheng, D., Ban, E.,
Kage-Nakadai, E., Tachibana, T., Wada,
T., Hara-Kudo, Y. and Nishikawa, Y.
Adhesion of human enterotoxigenic
Escherichia coli (ETEC) 0169:H41 to

porcine intestinal epithelial cells by the novel colonization factor. Vaccines for Enteric Diseases, October, 2017. Albufeira, Portugal.

柳田 咲、玉井 沙也加、能重 匠、谷本佳彦、松崎壮宏、中臺枝里子、山口良弘、児玉年央、飯田哲也、西川禎一．上皮細胞からのサイトカイン分泌における分散接着性大腸菌の抑制効果．第90回日本細菌学会総会．平成29年3月．[優秀発表賞受賞]．

鄭 冬明、坂 瑛里香、大森裕子、池崎沙耶加、中臺(鹿毛)枝里子、和田崇之、工藤由起子、西川禎一．上皮細胞に対する腸管毒素原性大腸菌 0169:H41 の特異な接着性に寄与する新規付着因子．第71回日本栄養・食糧学会大会．平成29年5月．

柳田 咲、玉井 沙也加、能重 匠、谷本佳彦、松崎壮宏、竹内成美、中臺枝里子、山口良弘、児玉年央、飯田哲也、西川禎一．培養細胞からの炎症性サイトカイン分泌に対する分散接着性大腸菌の抑制機構．第71回日本栄養・食糧学会大会．平成29年5月．

谷本佳彦、竹内成美、玉井沙也加、柳田 咲、中台枝里子、山口良弘、西川禎一．上皮細胞からのサイトカイン分泌に対する分散接着性大腸菌の抑制効果に關与する因子の探索．第38回日本食品微生物学会学術総会．平成29年10月．

谷本佳彦、竹内成美、玉井沙也加、柳田 咲、中台(鹿毛)枝里子、山口良弘、西川禎一．

健康者由来の分散接着性大腸菌は VI 型分泌装置によって上皮細胞からの IL-8 分泌を抑制する．第70回日本細菌学会関西支部学術集会．平成29年11月．

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

**. 總 合 研 究 分 担 研 究
報 告 書**

**総合研究分担研究
報告書**

食中毒・感染症事例由来株の特性解析

小西 典子

平成 27～29 年度 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)
食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究
研究者代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書
食中毒・感染症事例由来株の特性解析

研究要旨

東京都で発生した毒素原性大腸菌 (EPEC) による集団下痢症発生状況を年代別にみると 1991 年～2000 年の 10 年間は非常に多く発生しているが、2001 年以降はやや減少傾向であった。集団および散発下痢症事例から検出された EPEC の血清群を調べた結果、いずれも O6, O25, O27, O148, O159, O169 が多く検出されていることが明らかとなった。食品を対象とした検査法を確立するためには、まずはこの 6 血清群を対象とするのが妥当であろうと考えられた。分離株の毒素型をみると、LT・ST 両毒素産生株、LT 単独および ST 単独産生株の 3 種類の毒素型が確認された。全体的には LT 産生株よりも ST 産生株の方が多かった。散発下痢症患者の多くは発症前に海外渡航が認められた。国内感染が明らかであったのは、77 株中 3 株 (3.9%) のみであった。渡航先で多かったのはインド、インドネシア、中国等であった。実際の食品から EPEC を検出する方法は、培養液から毒素遺伝子でスクリーニング試験を行い、遺伝子検査で陽性となった検体から菌の分離を試みる方法が、非常に効率的であることが確認された。今後、増菌培地の種類や培養温度について詳細に検討する必要がある。またこれまでに EPEC を検出した原因食品をみると、野菜を使用した食品が多いことが明らかとなった。

研究分担者 東京都健康安全研究センター 小西 典子
研究協力者 東京都健康安全研究センター 甲斐 明美
東京都健康安全研究センター 尾畑 浩魅
東京都健康安全研究センター 平井 昭彦

A. 研究目的

ヒトに下痢症を引き起こす大腸菌は、主に病原血清型大腸菌 (EPEC)、腸管出血性大腸菌 (EHEC)、毒素原性大腸菌 (EPEC)、組織侵入性大腸菌 (EIEC)、腸管凝集付着性大腸菌 (EAggEC)、その他の下痢原性大

腸菌に分類されている。このうち EPEC による食中毒は、全国で毎年数事例発生し、患者数が 500 名を超える大規模事例も報告されている。これら食中毒の感染源・原因食品を解明するためには、食品から EPEC を検出することが必要である。しか

し食品にはEPEC以外の大腸菌や他の種類の細菌が付着している場合が多く、またEPECが付着していたとしても非常に少量であるため、その検出は非常に困難である。そのため食品からEPECを効率的に検出可能な検査法の確立が急務となっている。そこで、食品を対象としたEPEC検査法の確立のための基礎資料とするために、これまでに東京都で発生したEPECによる集団下痢症・食中毒の発生状況と原因食品および原因菌の特徴についてまとめた。また、散発下痢症患者から分離されたEPECの特徴について解析を行った。更に、実際の食中毒事例からEPECが検出された事例について詳細に解析を行った。

B. 研究方法

1. 東京都におけるEPECによる集団下痢症の発生状況および分離株の特徴

1966年から2014年に東京都で発生したEPECによる集団下痢症事例133事例を対象とした。今回対象とした事例は、患者2名以上から同一血清型・毒素型のEPECを検出した事例であり、食中毒と決定されていない事例も含んでいる。各事例で分離されたEPECの血清型および産生する毒素型を調べまとめた。

2. 散発下痢症患者から分離されたEPECの特徴

1) 供試菌株

2012年から2014年までに東京都立病院および公社病院で分離され、東京都健康安全研究センターで毒素検査を実施した大腸菌1,063株(2012年:367株,2013年:360株,2014年:336株)を供試した。

2) LTの検出

供試菌株をリンコマイシン加CAYE培地

に接種し、37℃、18~20時間振とう培養した。培養液1mlに20,000単位のポリミキシン液を0.1ml添加し37℃で1時間培養後、12,000rpmで遠心分離を行った。遠心上清を試料とし、市販のラテックス試薬(VTE-RPLA, デンカ生研)を用いてLTの検出を行った。ラテックス凝集反応で陽性となった検体については、Westら(Veterinary Microbiol.122,323-332,2007)のプライマーを用いたreal-time PCR法でLT遺伝子の検出も行った。

3) STの検出

供試菌株をCAYE培地に接種し37℃、18~20時間振とう培養した。培養液1mlに20,000単位のポリミキシン液を0.1ml添加し37℃で1時間培養後、12,000rpmで遠心分離を行った。遠心上清を試料とし、ELISA法(コリストEIA, デンカ生研)でSTの検出を行った。ELISA法で陽性となった検体については、real-time PCR法を用いて、SThは著者らの方法(未発表)、STpはWestら(Veterinary Microbiol.122,323-332,2007)の方法で各遺伝子の検出を行った。

4) EPECの血清型別試験

散発患者から検出されたEPECについて市販の免疫血清(病原大腸菌免疫血清「生研」, デンカ生研)を用いたO群の血清型別試験およびH型別試験を実施した。

3. ネギを原因としたEPEC食中毒事例の概要と食品を対象としたEPECの検出

2011年9月に東京都を中心とした7自治体でEPEC O148:H28(ST産生)を原因とする食中毒が発生した。この事例では、収去した食品からEPECの検出を試み、複数検体からO148を検出することができた。この事例の概要と食品を対象とした検査

について詳細に解析する。

C. 研究結果

1. 東京都における ETEC による集団下痢症の発生状況および分離菌株の特徴

1) 年代別発生状況

ETEC による集団下痢症発生状況を年代別にみると 1966～1970 年の 5 年間には 5 事例、71 年～80 年の 10 年間には 26 事例、81 年～90 年は 30 事例、91 年～2000 年は 42 事例、2001 年～2010 年は 29 事例、2011 年～2014 年の 4 年間には 1 事例であった。1991 年～2000 年の 10 年間には非常に多く発生しているが、2001 年以降はやや減少傾向であった。

2) 集団下痢症事例由来 ETEC の血清型と毒素型

133 事例由来 161 株の血清群は 14 種類に分類された。最も多かったのは 06 で 37 株、次いで 0169 が 32 株、027 が 25 株、0148 が 18 株、025 が 14 株、0159 が 13 株であった。その他 011、015、017、020、070、078、085、OUT (血清型不能) であった。06、025、027、0148、0159、および 0169 の 6 血清群で全体の 86.3% を占めていた。主な 6 血清群の毒素産生性をみると、06 は LT+ST 両毒素産生株であったが、027、0148、0159、0169 は ST 単独産生、025 は LT 単独産生株と ST 単独産生株の両タイプがあった。

2. 散発下痢症患者から分離された ETEC の特徴

1) ETEC 検出率

2012 年から 2014 年に搬入された散発下痢症由来大腸菌 1,063 株について、LT および ST 産生性を調べた。その結果、77 株 (7.2%) が LT、ST のいずれか一方あ

るいは両毒素産生菌であった。

2) 分離された ETEC の血清群と毒素型

散発下痢症患者から分離された ETEC の血清群で最も多く分離されたのは 06 で 14 株 (18.2%)、次いで 025 が 12 株 (12.6%)、027、0159 が各 9 株 (11.7%)、0169 が 8 株 (10.4%)、0148 が 7 株 (9.1%)、0128 が 3 株、015、0167 が各 2 株、01、08、020、091、0114、0115、0153 が各 1 株、血清型別不能 (OUT) が 4 株であった。

ST 単独産株は 54 株、LT・ST 両毒素産生株は 13 株、LT 産生株は 10 株であった。

3. ネギを原因とした ETEC 食中毒事例

1) 事例概要

2011 年 9 月上旬、複数の自治体で給食施設を原因とする食中毒が発生した。これらは同一の給食事業者が運営する給食施設で提供された給食が原因であった。当初、東京都内に患者は認められなかった。しかしこの給食事業者は、東京都内の複数の事業所で給食を提供し、セントラルキッチン方式で食材を各事業所へ提供していたため共通に使用されている食材が複数あること等が判明し、検食として保管してあった食品の検査を実施した。その結果、食品 (ネギ) から ETEC 0148 が検出された。そのため改めて喫食者の聞き取り調査が行われた結果、都内にも患者が確認された。最終的に都内 3 事業所の社員食堂で 504 名以上が喫食し、患者は 62 名となった。

2) 食品を対象とした ETEC 0148 の検査法

保存されていた食品が非常に少ない検体もあったことから、検体量に応じて 10～15g をサンプリングした。サンプリング後、希釈液を等量加え 2 倍乳剤を作製し、試料とした。直接分離培養に用いた培地

は、DHL 寒天、CT-SMAC 寒天、XM-G 寒天である。増菌培養は、mEC 培地を用い 37 18 時間培養した。培養液から DNA 抽出を行い、リアルタイム PCR 法で ST 遺伝子のスクリーニングを行った。そして遺伝子陽性検体から ETEC の分離を試みた。0148 以外の大腸菌や、その他の細菌が多い検体については、mEC 培養液から更に mEC 培地に接種（二次増菌培養）し、42 で 18 時間培養後に分離平板へ塗抹したのから釣菌を行った。また、0148 を効果的に集菌するために 0148 に対する免疫磁気ビーズを自家調製し用いた。

3) ETEC 0148 が検出された食品

合計 12 検体から ETEC 0148（ST 産生）が検出された。これらの検体は 5 事業所から収去した食品で、洗浄前の原材料や検食であった。内訳は、ネギ、カットネギ、カットキャベツ、鯖のからあげ、冷奴（ネギ）等で、ネギそのものあるいはネギが使用された食品であった。

4) 食品中の ETEC 0148 の菌数

検体量が十分に残されていた検体を用いて食品中の 0148 菌数の測定を試みた。供試した 3 検体の 0148 菌数は、いずれも 1g あたり 0.3 個以下で非常に少量であった。

4. 過去に発生した集団下痢症事例で食品から ETEC が検出された事例

食中毒の原因菌が、残されていた食品から検出される事例は非常に少ない。しかし東京都では、これまでに発生した食中毒事例 5 事例 5 食品から ETEC を検出している。

食品は野菜を使用しているものが 4 事例、1 事例は杏仁豆腐であった。検出した ETEC の血清型は 0169 : H41 が 3 検体、

0148 : H28 が 2 検体であった。

D. 考察

1966 年から 2014 年に東京都で発生した ETEC による集団下痢症事例 133 事例について、血清型および毒素型の特徴についてまとめた。133 事例由来 161 株の血清群をみると 06, 025, 027, 0148, 0159, 0169 の 6 血清群で全体の 86.2% を占めていた。また、2012 年から 2014 年に分離された散発患者由来 77 株の血清群をみても、集団事例由来株と同様の 6 血清群で 76.6% を占めていた。食品を対象とした検査法を確立するためには、まず対象とする血清群を決めることが必要である。集団および散発事例由来株のいずれも 06, 025, 027, 0148, 0159, 0169 が多く検出されていることが明らかとなったことから、まずは上位 6 血清群を対象とするのが妥当であると考えられた。

分離株の毒素型をみると、06 は LT・ST 両毒素産生株、LT 単独および ST 単独産生株の 3 種類の毒素型が確認された。また 025 は LT 単独あるいは ST 単独と、どちらか一方の毒素を産生する株が多いことが明らかとなった。全体的には LT 単独産生株よりも ST 単独産生株の方が多かった。

散発患者の多くは下痢の発症前に海外渡航が認められ、国内感染が明らかであったのは、77 株中 3 株（3.9%）のみであった。渡航先で多かったのはインド、インドネシア、中国等であった。これらの国では水や食品、環境中に ETEC が多く存在することが推定されるため、生水や加熱されていない食品の接種には注意が必要である。また、これらの地域から輸入される食品も、本菌に汚染されている可

能性が考えられる。

東京都で発生した食中毒事例のうち、2011年に発生した給食施設を原因とした事例では、複数の食品（カットネギ等）から原因菌を検出することができた。腸管出血性大腸菌の検査法を参考に、増菌培養はmECで行い、培養液からST毒素遺伝子をPCR法でスクリーニングする方法で実施した。ST遺伝子陽性検体から0148の分離を試みたが、mEC培養液中には0148以外の大腸菌やその他の細菌が非常に多く、分離が困難であった。そこでmEC培地から更にmEC培地へ接種し、培養温度を42℃に上げることで、他の菌の発育を抑えることが可能であった。二次（二段階）増菌培養でも分離が困難であった検体については、自家調製した免疫磁気ビーズを用いて集菌することで、検出が可能となった。今後は、適切な増菌培地や培養温度についても検討する必要があると考えられた。

1993年以降に東京都で発生したEPEC食中毒事例のうち、食品から原因食品が検出できた事例は本事例を含めて5事例であった。その内訳をみると、「ほうれん草のピーナツあえ」「野菜のあえもの」や「キムチ」等であった。腸管出血性大腸菌食中毒の原因食品の多くは、牛肉を中心とした肉類であるが、EPECは野菜を使用した食品が原因となることが多いことが明らかとなった。

E. 結論

集団および散発下痢症事例から検出されたEPECの血清群を調べた結果、いずれも06, 025, 027, 0148, 0159, 0169が多く検出されていることが明らかとなった。

食品を対象とした検査法を確立するためには、まずはこの6血清群を対象とするのが妥当であろうと考えられた。

分離株の毒素型をみると、LT・ST両毒素産生株、LT単独およびST単独産生株の3種類の毒素型が確認されたが、全体的にはST単独産生株が多かった。

散発下痢症患者の多くは、発症前に海外渡航が認められた。国内感染が明らかであったのは、77株中3株（3.9%）のみであった。渡航先で多かったのはインド、インドネシア、中国等であった。

実際の食品からEPECを検出する方法は、培養液から毒素遺伝子でスクリーニング試験を行い、遺伝子検査で陽性となった検体から菌の分離を試みる方法が、非常に効率的であることが確認された。今後、増菌培地の種類や培養温度について詳細に検討する必要がある。

これまでにEPECを検出した原因食品をみると、野菜を使用した食品が多いことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

EPECが検出された散発下痢症患者の渡航歴を遡り調査すると、東南アジア地域への旅行が多かった。これらの地域へ旅行をする際は、生水や加熱していない食品の摂取に注意すべきである。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

総合研究分担研究
報告書

食品での統一的検査法の開発

工藤 由起子

平成 27 ~ 29 年度 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）

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

食品での統一的検査法の開発

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

本研究では、(1) 腸管毒素原性大腸菌 (EPEC) 食中毒発生状況を解析し、上位 7 血清群の 06、025、027、0148、0153、0159、0169 が本菌の主要血清群と考えられた。本菌の食中毒には野菜・その加工品や水が重要であり、人、環境・水、調理場での二次汚染、海外渡航感染者や輸入食品が汚染経路の一端となっていることも推察された。また、(2) 腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮し、増菌培養法および選択分離培地を検討し、mEC 培地での 42 培養で EPEC が十分に増殖することが確認された。また、EPEC の選択分離培地の開発を目指して、これまでの研究成果から有用と考えられた抗生物質を添加した SMAC にて分離性を検討した。その結果、免疫磁気ビーズ法および抗生物質を加えた分離培地を使用することによって、効率的な EPEC の分離培養法が確立されることが考えられた。(3) EPEC の耐熱性エンテロトキシン (ST)・易熱性エンテロトキシン (LT) 遺伝子検出リアルタイム PCR 法について、汎用性を考慮し多種のリアルタイム PCR の系を検討した。国内で広く使用されている 5 種類の検出機器および 3 種類のクエンチャーを用いたリアルタイム PCR では、インターナルコントロール (IC) を含むマルチプレックス反応条件にて ST (ST_p、ST_h) および LT が最小菌濃度 10³ cfu 以上/ml で検出された。(4) 主要 7 血清群を対象とした免疫磁気ビーズの作製方法を確立し、集菌効果が期待されることが示された。食品、特に野菜からの分離培養での免疫磁気ビーズ法による EPEC 分離の向上効果を検討した。(5) コラボレイティブ・スタディにて、EPEC が総じて比較的高率に検出される試験法が確認された。食品の増菌培養液がリアルタイム PCR 法で ST または LT 遺伝子陽性になった場合、培養液を選択分離培地に塗抹するか、主要 0 血清群 (7 種) の免疫磁気ビーズ法を行い、濃縮液を分離培地に塗抹し培養して EPEC を分離することが、食品の試験法として優れると考えられた。

研究協力者

小西典子、尾畑浩魅、平井昭彦
佐藤 健

東京都健康安全研究センター
藤沢市保健所

杉村一彦
成松浩志
岩渕香織
土屋彰彦
山崎匠子
大塚佳代子、門脇奈津子、星野 梢、
榊田 希、大阪美紗
和田裕久
磯部順子
永井祐樹
吉田孝子
平塚貴大
森 哲也
甲斐明美
稲垣俊一
白石祥吾
都丸亜希子、阪田理沙、高田 薫、
寺嶋 淳

倉敷市保健所
大分県衛生環境研究センター
岩手県環境保健研究センター
さいたま市健康科学研究センター
杉並区衛生検査センター
埼玉県衛生研究所

静岡市環境保健研究所
富山県衛生研究所
三重県保健環境研究所
奈良県保健研究センター
広島県立総合技術研究所保健環境センター
一般財団法人 東京顕微鏡院
公益社団法人 日本食品衛生協会
横浜検疫所 輸入食品検疫検査センター
神戸検疫所 輸入食品検疫検査センター
国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

2012 年に感染症報告数集計において、下痢原性大腸菌（食中毒統計の病原大腸菌）の分類が新たな分類に改訂された。この新たな病原大腸菌の分類では、その判定のための病原因子またはマーカーが明示され、患者から分離された大腸菌株の病原大腸菌としての同定・判定が行いやすくなった。このため、食中毒事例での原因食品や汚染食品の調査に有用な方法が必要とされる。しかし、腸管出血性大腸菌以外の病原大腸菌についての食品での検査法は、これまで、国内外ともにあまり検討されておらず、早急な確立が求められている。

食中毒統計における病因物質「その他

の病原大腸菌」のうちの腸管毒素原性大腸菌（EPEC）による食中毒の発生は、年間の事例数は数件程度であることが多いが、多くの集団事例が報告され、患者数の多い事例が発生することが少なくないことが知られている。しかし、食品での検査法が確定されていないため、原因食品の調査や流通食品の汚染調査などにおいて有用な方法が求められている。なお、腸管出血性大腸菌については、既に食品での検査法（食安監発 1120 第 1 号 平成 26 年 11 月 20 日発 「腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 の検査法について」、平成 27 年 3 月 24 日事務連絡）が通知されており、試験手順や培地などの一部が、この検査法と共通

であれば効率的で効果的な検査法と考えられる。ETEC は、その病原性が明確であり、新たな病原大腸菌の判断基準に沿った食品での検査法を確立することは可能であると考えられる。本研究では、国の試験法の策定に貢献し、また、諸外国から参照される方法を確立することを目的とする。

具体的には、(1) 食中毒統計など疫学データから ETEC 食中毒発生状況を解析し、本菌の主要血清群を考察、(2) 腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮し、増菌培養法および選択分離培地を検討、(3) 本菌の病原因子であるエンテロトキシン(耐熱性エンテロトキシン; ST、易熱性エンテロトキシン; LT) の遺伝子を対象としたリアルタイム PCR 法の食品検体での応用を検討、(4) ETEC 7 血清群の免疫磁気ビーズ作製、(5) ETEC の食品からの検出法の確立を目指し、増菌培養法、免疫磁気ビーズ法、分離培養法、遺伝子検出法等を組み合わせて、一連の試験法としてコラボレイティブ・スタディを実施した。

B. 研究方法

(1) ETEC 食中毒における主要血清群および関連する食品群の解析

厚生労働省が公表する食中毒発生状況および食中毒発生事例など食中毒統計、食中毒事件詳報や国立感染症研究所・感染情報センターが公表する病原微生物検出情報 (IASR) による情報から ETEC の主要血清群や関連する食品群を解析した。また、食中毒事件詳報の一部不明な点は各自治体に問い合わせて情報収集を行っ

た。

(2) 増菌培養法および選択分離培地の検討

腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮した増菌培養法および選択分離培地を検討した。

食中毒由来の 6 種の O 血清群 12 株の ETEC を modified EC 培地 (mEC、OXOID) に接種し 36 および 42 での 18 時間培養の増殖を試験した。また、他 5 株については 42 のみにて培養した。

また、上記の 12 株の ETEC をソルビトールマッコンキー寒天培地 (SMAC、OXOID)、DHL 寒天培地 (栄研化学)、ドリガルスキー改良培地 (栄研化学)、クロモアガー STEC 培地 (関東化学) に画線塗抹し 37、20 時間培養した。また、新たな選択分離培地の選定のため、ETEC 5 株および食品由来細菌 3 株 (*Enterobacter cloacae*、*Enterobacter* sp.、*Klebsiella pneumoniae* 各 1 株) を供試し、選択剤として有用な物質をフェノタイプマイクロアレイ (オムニログシステム、バイオログ社) にて検討した。

(3) ST および LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法の検討

食品での ST および LT 遺伝子検出法の検出感度を試験した。

検体 (ミニトマト、大根の漬物、長ネギ、生わかめ) の mEC 培地中での培養液に ETEC を接種した (ETEC $10^8 \sim 10^2$ cfu/ml 食品培養液)。これらからアルカリ熱抽出にて DNA 抽出を行った。ST 遺伝子 (est STp、est STh) および LT 遺伝子 (elt) を標的としたリアルタイム PCR 法を Hidaka ら (マルチプレックス反応、J. Appl.

Microbiol., 2009, Vol. 106, p410-420)、
または Frydendahl ら (STp 遺伝子、Mol.
Cell. Probes, 2001, Vol. 15, p151-160)、
共同研究者の小西ら (STh 遺伝子)、West
ら (LT 遺伝子、Vet. Microbiol., 2007,
Vol. 122, p323-331) の方法を参照して
シンプレックス反応およびマルチプレッ
クス反応にて行った。反応試薬は TaqMan
Enviromental MasterMix 2.0 を使用し、
プライマー終濃度 0.16~0.2 μM 、プロ
ブ終濃度 0.06~0.1 μM となるよう調製し
た。

検出機器は ABI ViiA7、7500、LC480、
Takara Dice および Dice を使用し、
50 2分、95 10分の熱変性のうち、95
15秒 - 60 1分で 40 サイクルの増幅反
応後、Auto または Manual 設定にて解析し
Ct 値 (LC480 の場合は Cp 値) を得た。

クエンチャーとして TAMRA、BHQ または
QSY を比較検討した。また、EPEC を食品
25 g に接種 (想定菌濃度 10^2 cfu/g) し、
mEC 培地 225 ml を加えて 1 分間ストマッ
カー処理し、42、20 時間培養した。培
養液 20 μl を、4 種類の分離平板培地、(ク
ロモアガー-STEC 培地、SMAC、DHL 寒天培
地、ドリガルスキー改良培地) の各 2 枚
に画線塗抹し、37 および 42 で 18~24
時間培養し、菌を分離した。さらに、検
出感度試験で作製した 10 倍階段希釈菌液
接種の食品培養液のアルカリ熱抽出試料
を用い、各 3 回の測定にて検量線を作成
し、42 20 時間培養した mEC 培養液中の
菌数を算出した。

(4) 免疫磁気ビーズの自家調製

市販の免疫血清 (大腸菌 06、025、027、
0148、0153、0159、0169) 20 μl を磁気ビ

ーズである Dynabeads M-280 (250 μl) に
加え、2 時間、室温で反応した。なお、供
試血清については、4 ロットから優れる
ものを選択した。大腸菌自家調製免疫磁
気ビーズの集菌効果の検証を $10^4 \sim 10^1$
cfu/ml の希釈菌液を用いて検討した。ま
た、菌液接種食品培養液 (約 $10^3 \sim 10^1$
cfu/ml) を供試した検討も行った。

(5) 食品での EPEC の検査法のコラボレ イティブ・スタディ

参加機関数：13 試験検査機関、実施回
数：2 回 (第 1 回；血清群 0159 STh 陽性、
第 2 回；0148 STp< 陽性)、試験食品検
体 (キュウリ、長ネギ) とした。

1 機関につき、各回 1 食品あたり、高
菌数接種 (25 cfu/25 g) 検体 3 検体、低
菌数接種 (5 cfu/25 g) 検体 3 検体、非
接種用検体 3 検体 (計 9 検体)、すなわち
2 食品あたり計 18 検体、加えて、陽性用
検体 1 検体 (長ネギのみ設定) の計 19 検
体とし、小型温度記録計 (サーモマネジ
ャー) を挟んでバイオセーフティー対応
容器に入れ、冷蔵にて送付した。

コラボレイティブ・スタディの試験実
施手順は、

[1 日目]

検体入りのストマッカー袋に、mEC 培地
225 ml を加え、1 分間のストマッカー処
理を行い、 42 ± 1 、 22 ± 2 時間培養した。

[2 日目]

10 μl ずつ分離培地 (SMAC、クロモアガ
ー-STEC、抗生物質加 SMAC、抗生物質加ク
ロモアガー-STEC) の各 2 枚に接種し画線
し、 37 ± 1 にて 18~24 時間培養した。

免疫磁気ビーズ液 25 μl に 1.0 ml 培養
液を加え、デンカ生研を参照した以下の

方法に従い免疫磁気ビーズ濃縮法を行った。最終浮遊液は 0.1 ml とした。10 μ l ずつ分離培地（抗生物質加 SMAC、抗生物質加クロモアガー-STECC）各 2 枚に接種し画線し 37 \pm 1 にて 18~24 時間培養した。

培養液 0.1 ml をアルカリ熱抽出法にて DNA を抽出した。

ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法（インターナルコントロール:IC を含む）の反応試薬組成は計 25 μ l とし（詳細略）、DNA 抽出液 5 μ l を加えた。反応条件:50 \times 2 分、95 \times 10 分とし、95 \times 15 秒、60 \times 1 分を 40 サイクル 使用機器:ABI7500（7500fast を使用時は standard chemistry に設定する）判定:リアルタイム PCR の解析を行い、Ct 値が得られている場合を陽性とした。なお、解析は機器のオート設定およびマニュアル設定（Threshold Line;0.25、baseline;Auto）の 2 種類で Ct 値を解析した。1 検体につき 2 反応を行った。

[3 日目]

直接塗抹法および免疫磁気ビーズ法について、各種類の平板培地（2 枚）から疑われるコロニー 3 個を釣菌した。また、必要に応じて追加で釣菌した。それらを普通寒天培地等に接種し 37 \pm 1 にて 18~24 時間培養した。

[4 日目]

普通寒天培地等に生育したコロニーを免疫血清（0148 および 0159）にて凝集反応を確認した。

試験終了後に、結果表に記入した試験結果およびリアルタイム PCR のランファイル（sds 形式または eds 形式）各検体

に添付された小型温度記録計（サーモマネジャー）および検体送付缶（梱包付属品も含む）を返送した。

試験結果を集計後、Outlier 機関の検定および検出方法間の有意差検定を行った。いずれの検定においても、一元配置分散分析を行い、事後解析として、多重比較である Tukey-Kramer 法で解析を行った。いずれの検定も有意水準は両側 5%とした。

C. 研究結果

（1）ETEC 食中毒における主要血清群および関連する食品群の解析

食中毒事件詳報などを参考にして、「その他の病原大腸菌」の中の「腸管毒素原性大腸菌」について平成 20 年から平成 27 年の事例を整理した結果、年間数件前後で推移していた。患者数については、80 人くらいから 1,000 人を越える年もあった。300 人または 500 人を越える事例の報告も珍しくなかった。また、平成 20 年から平成 27 年の事例から ETEC の血清群を解析した結果、0148、06、0159、0169、025、0153、027 が上位 7 血清群であり、これらが主要血清群と思われた。

さらに、平成 12 年から平成 27 年で原因食品が明らかになった（推定も含む）ETEC 食中毒 20 件では、原因食品は野菜が最も多く、半数以上を占め、次に水が多かった。

（2）増菌培養法および選択分離培地の検討

供試した ETEC 17 株はすべて、mEC 培地にて 42 で増殖した。またそのうちの 12 株については 36 でも検討し、同様に増

殖が認められた。

供試した ETEC 12 株はすべて、SMAC、DHL 寒天培地、ドリガルスキー改良培地に生育し、培地間での発育状況の優劣は認められなかった。また、新たな選択分離培地の選定のため、選択剤として有用な物質をフェノタイプマイクロアレイにて検討したところ、夾雑菌が非生育であり ETEC が生育したと考えられた選択剤が 8 種類あったが、ETEC の菌株による生育性の差異も認められた。比較的菌株間での差異が少ないものが 2 種類あった。

(3) ST および LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法の検討

供試したいずれの食品、菌株においても、いずれのリアルタイム PCR 系（クエンチャーの種類を含む）においても、 10^3 cfu 以上/ml の検出感度で ST および LT 遺伝子が検出された。また、各食品のリアルタイム PCR 検量線を基に、菌を接種した食品を mEC 中にて 42℃ で 20 時間培養した培養液中の菌数を算出した結果、 $2.1 \times 10^8 \sim 1.1 \times 10^9$ cfu/ml であった。

(4) 免疫磁気ビーズの自家調製

使用する血清を選定し免疫磁気ビーズを作製し、集菌効果を評価した結果、027、0148、0159 は 10^0 cfu/ml まで、025、0153、0169 は 10^1 cfu/ml まで検出可能であった。しかし、06 は 10^3 cfu/ml までの検出であり、集菌効果は低かった。また、いずれの食品でも、免疫磁気ビーズ法によって分離率が向上した。

(5) 食品での ETEC の検査法のコラボレイティブ・スタディ

1) 血清群 0159 の結果

低菌数接種が 7.4 cfu/25 g、高菌数接

種は 37.0 cfu/25 g であった。

全機関について、ほぼ 0.5 から 5.0 に保たれて各機関に配送された。増菌温度は、おおよそ 41 から 43 であった。

検出感度は、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)では、高菌数接種においては、キュウリおよび長ネギのいずれの検体でも Auto 解析およびマニュアル解析ともに 1.000 であった。低菌数接種においては、いずれの検体でも 0.974 であった。

直接塗抹法では、高菌数接種においては、キュウリ検体では、分離に用いた 4 種類いずれの寒天培地でも 1.000 であった。長ネギ検体では、SMAC 以外の 3 種類の培地で 1.000、SMAC で 0.897 であった。低菌数接種においては、キュウリ検体では、SMAC 以外の 3 種類の培地で 0.974、SMAC で 0.949 であった。長ネギ検体では、SMAC 以外の 3 種類の培地で 0.974、SMAC で 0.846 であった。

免疫磁気ビーズ法では、高菌数および低菌数接種においては、いずれの検体でも、分離に用いた 2 種類の寒天培地で 0.974 以上であった。

統計解析を行った結果、キュウリ検体では、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)の Auto 解析は、直接塗抹法のクロモアガー STEC および抗生物質加 SMAC、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のマニュアル解析よりも検出率が有意に低かった。長ネギ検体では、直接塗抹法の SMAC および ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)の Auto 解析は、直接塗抹法の SMAC 以外の寒天培地、免疫磁気ビーズ法の両寒天

培地、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のマニュアル解析よりも検出率が有意に低かった。

2) 血清群 0148 の結果

低菌数接種が 4.1 cfu/25 g、高菌数接種は 20.5 cfu/25 g であった。

全機関について、ほぼ 0 から 8.0 に保たれて各機関に配送された。増菌温度は、おおよそ 41 から 43 であった。

検出感度は、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)では、高菌数接種においては、キュウリ検体では、Auto 解析およびマニュアル解析ともに 1.000 であったが、長ネギ検体では、いずれの解析においても 0.769 であった。低菌数接種においては、キュウリ検体では、いずれの解析においても 0.923 であり、長ネギ検体では、いずれの解析においても 0.590 であった。

直接塗抹法では、高菌数接種においては、キュウリ検体では、SMAC で 0.615、SMAC 以外の 3 種類の寒天培地において 1.000 であった。長ネギ検体では、抗生物質加 SMAC で 0.641、抗生物質加クロモアガー STEC で 0.513、クロモアガー STEC で 0.462、SMAC で 0.231 であった。低菌数接種においては、キュウリ検体では、SMAC で 0.641、SMAC 以外の 3 種類の培地において 0.872 以上であった。長ネギ検体では、抗生物質加 SMAC で 0.333、抗生物質加クロモアガー STEC で 0.308、SMAC で 0.179、クロモアガー STEC で 0.154 であった。

免疫磁気ビーズ法では、高菌数接種においては、キュウリ検体では、両寒天培地で 1.000 であり、長ネギ検体では、両

寒天培地で 0.744 であった。低菌数接種においては、キュウリ検体では、両寒天培地で 0.872、長ネギ検体では、0.385 であった。

統計解析を行った結果、キュウリ検体では、直接塗抹法の SMAC は、直接塗抹法の SMAC 以外の寒天培地、免疫磁気ビーズ法の両寒天培地、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のいずれの解析よりも検出率が有意に低かった。長ネギ検体では、直接塗抹法の SMAC は、免疫磁気ビーズ法の両寒天培地および ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のいずれの解析よりも検出率が有意に低く、直接塗抹法のクロモアガー STEC は、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のマニュアル解析よりも検出率が有意に低かった。

D. 考察

EPEC の食中毒は、近年減少傾向であるが、患者数が 300 人または 500 人を越える大規模な食中毒が平成 20 年以降 4 件発生している。また、患者数が 100~200 人の中規模なものや多数の自治体に渡って発生した事例もあり、重要な食中毒原因菌と考えられる。

過去の国内における食中毒発生状況資料を検索し、日本における EPEC の主要な血清群は 06、025、027、0148、0153、0159、0169 の 7 種類であることが明らかとなった。また、食中毒原因食品を解析したところ、EPEC の食中毒原因食品として野菜・その加工品や水が重要であり、それらの汚染経路として人、環境・水、家畜、調理場での二次汚染が考えられた。また、

海外渡航での感染者が帰国し国内で発症し食中毒として報告される例があるが、これらの食中毒での血清群は国内での発生事例での血清群と重なることから、海外渡航者が患者または健康保菌者として国内での汚染経路の一端となっていることも、これまでの感染事例から考えられる。さらに、EPEC の感染が発生している地域で生産された農産物など輸入食品が汚染経路の一端となっていることも推察される。これらの情報は、今後の食品での試験法の確立において、対象とする血清群を設定し、試験対象食品も考慮して検討するにあたって、有用な情報である。

血清群 06、025、027、0148、0153、0159、0169 の増菌培養について検討し、mEC 培地、42 で発育することが判明した。本培養条件は、すでに通知で示されている食品からの腸管出血性大腸菌検査法と同一の増菌培地および培養温度である。そのため、市販食品の汚染調査において、病原機構の異なる複数の病原大腸菌検査を並行して行うことができ、検査の効率性を高め、また検査費用の削減にもなる。

食品の接種試験では、喫食前に加熱工程を要しない食品などに EPEC を接種し、mEC 培地 42 培養後、リアルタイム PCR による ST 遺伝子および LT 遺伝子検出並びに、分離平板培地による菌の検出を行った。その結果、複数のリアルタイム PCR の系にて食品培養液から標的の遺伝子が高感度 (10^3 cfu/ml 以上) に検出され、用いたリアルタイム PCR 法は有用なスクリーニング検査法であることが明らかとなった。

EPEC による食中毒の原因食品は、特定

されることが殆どなく、汚染菌量も不明である。汚染菌数が少数の場合には夾雑菌の影響を受け菌分離が難しくなることは十分に考えられる。また、食品からの菌分離には、腸管出血性大腸菌検査法と同様、免疫磁気ビーズによる集菌や選択性のある分離平板培地の開発が必須である。このため、食品培養液から目的とする菌を検出するために最も効率がよいことが知られている免疫磁気ビーズ法を開発した。磁気ビーズに感作させる血清量、血清と磁気ビーズの感作時間の検討を行い、磁気ビーズ 250 μ l 当たり血清 20 μ l、室温で 2 時間反応させる方法とした。この作製方法のマニュアルを作成した。また、集菌効率を検討したところ、ほぼ 10^1 cfu/ml まで検出された。加えて、血清群 06 は他 6 血清群と比して、検出感度が弱い結果が示されたが、本研究で供試した菌株は加熱菌体での凝集反応ではいずれも凝集が認められることから、今回用いた 06 は K 抗原がリッチな株であった可能性が示唆された。なお、免疫磁気ビーズは自家調製から、1 年間程度は使用できるものと考えられた。免疫磁気ビーズ法による EPEC 分離率の向上効果を確認するために、抗生物質加 SMAC に塗抹し、37 にて培養し確認したところ、免疫磁気ビーズ塗抹法のほうが直接塗抹法よりも検出性が優れる食品が多かった。

これらのことから、免疫磁気ビーズ法を行い、抗生物質加 SMAC に塗抹して 37 で培養することによって、食品培養液中の EPEC が約 10^4 cfu/ml の濃度以上であれば、EPEC を分離することが可能であることが示された。なお、血清群 06 では、37

において直接塗抹法にても ETEC が十分に分離され、免疫磁気ビーズ塗抹法によってむしろ検出性が低下する傾向もみられた。この理由として、夾雑菌の生育が抗生物質加 SMAC 上で抑制されることに加え、血清群 06 がこの培地上での生育に優れるため直接塗抹法でも十分に検出できることが考えられた。加えて、免疫磁気ビーズに使用した抗 06 抗体の血清群 06 菌体との吸着が芳しくないことが考えられた。

リアルタイム PCR の精度を確保するために、16SrRNA を標的とした IC を加えたマルチプレックス反応による遺伝子検出法を検討した。国内で汎用されている主要な検出機器を使用したリアルタイム PCR は、BHQ および QSY のいずれのクエンチャーとの相性が良く、ETEC を接種した食品培養液中の最少菌検出濃度は 10^3 cfu 以上/ml であり、検出感度に優れた。また、IC もすべての反応で検出され、本試験で設定したプライマー、プローブ、反応条件は、食品の ETEC 検査法におけるスクリーニング検査として有用であることが確認された。

これまでの3か年の研究では、リアルタイム PCR による ETEC 検出において Hidaka らのプライマー・プローブ(クエンチャー MGB)、Frydendahl & 小西 & West らのプライマー・プローブ(クエンチャー TAMRA)、Frydendahl & 小西 & West らのプライマー・プローブ(クエンチャー BHQ)、Frydendahl & 小西 & West らのプライマー・プローブ(クエンチャー QSY) IC を付加したマルチプレックス反応、といった複数の反応系を検討し、いずれも標的遺伝子を最少菌濃度 10^3 cfu

以上/ml で検出できた。これら各種の反応系や各種の検出機器を用いた方法による検出法を提示できたことは、使用可能な検出機器および試薬の選択肢が広がり、食品の ETEC 遺伝子スクリーニング検査の実用性が高まるものと期待する。

最終的に、ETEC 06、025、027、0148、0153、0159 および 0169 の計 7 血清群を対象とした食品での検査法の確立のために、13 試験検査機関によるコラボレイティブ・スタディを行った。3 試験研究機関で実施した先行研究にて、主要 7 血清群のうち本コラボレイティブ・スタディに供試しなかった 5 血清群についても野菜などの多種の食品に菌を接種して各種検出法を検討した。その結果、優れることが判明した検査法を採用してコラボレイティブ・スタディの試験を構成した。

検出感度は、高菌数接種(20.5~37.0 cfu/25 g)では、キュウリでの血清群 0148 では直接塗抹法の SMAC 以外の全ての方法、血清群 0159 では全ての検出方法で 1.000 であった。長ネギでの血清群 0159 では直接塗抹法の SMAC 以外の全ての方法で 1.000 であった。本研究での高菌数接種レベルの菌数であれば高率に ETEC が検出されることが判明した。しかし、長ネギでの血清群 0148 では、最も高い感度が ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)の 0.69 であった。低菌数接種(4.1~7.4 cfu/25 g)では、キュウリでの血清群 0148 では ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)で 0.923、直接塗抹法の SMAC で 0.641、それ以外の培地で 0.872 以上、免疫磁気ビーズ法で 0.872、血清群 0159 ではいずれの方法でも 0.949

以上であった。長ネギでの血清群 0148 では ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) で 0.590、免疫磁気ビーズで 0.385、直接塗抹法で 0.154~0.333 であった。血清群 0159 で ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) で 0.974、免疫磁気ビーズ法は 0.974 以上、直接塗抹法の SMAC では 0.846、それ以外の培地で 0.974 であった。これらのことから、菌数が一桁のレベルであっても高率に検出されることが判明した。

全体的に ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) よりも直接塗抹法および免疫磁気ビーズ法のほうが検出率の低い傾向にあることから、遺伝子検出によって陽性であった検体について、直接塗抹法および免疫磁気ビーズ法を行い、より多くのコロニーを釣菌することで、効率的に検出されることが考えられた。

本コラボレイティブ・スタディでは、mEC 培地 (42) での増菌培養法、免疫磁気ビーズ法、選択分離培地の組み合わせによる分離培養法および遺伝子検出法によって ETEC の比較的高率な検出が認められた。

E. 結論

本研究では、(1) 腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) 食中毒発生状況を解析し、上位 7 血清群の 06、025、027、0148、0153、0159、0169 が本菌の主要血清群と考えられた。本菌の食中毒には野菜・その加工品や水が重要であり、人、環境・水、調理場での二次汚染、海外渡航感染者や輸入食品が汚染経路の一端となっていることも推察された。また、(2) 腸管出血性大腸菌

の食品での検査法との共通性を考慮し、増菌培養法および選択分離培地を検討し、mEC 培地での 42 培養で ETEC が十分に増殖することが確認された。また、ETEC の選択分離培地の開発を目指して、これまでの研究成果から有用と考えられた抗生物質を添加した SMAC にて分離性を検討した。その結果、免疫磁気ビーズ法および抗生物質を加えた分離培地を使用することによって、効率的な ETEC の分離培養法が確立されることが考えられた。(3) ETEC の耐熱性エンテロトキシン (ST)・易熱性エンテロトキシン (LT) 遺伝子検出リアルタイム PCR 法について、汎用性を考慮し多種のリアルタイム PCR の系を検討した。国内で広く使用されている 5 種類の検出機器および 3 種類のクエンチャーを用いたリアルタイム PCR では、インターナルコントロール (IC) を含むマルチプレックス反応条件にて ST (ST p、ST h) および LT が最小菌濃度 10^3 cfu 以上/ml で検出された。(4) 主要 7 血清群を対象とした免疫磁気ビーズの作製方法を確立し、集菌効果が期待されることが示された。食品、特に野菜からの分離培養での免疫磁気ビーズ法による ETEC 分離の向上効果を検討した。(5) コラボレイティブ・スタディにて、ETEC が総じて比較的高率に検出される試験法が確認された。食品の増菌培養液がリアルタイム PCR 法で ST または LT 遺伝子陽性になった場合、培養液を選択分離培地に塗抹するか、主要 0 血清群 (7 種) の免疫磁気ビーズ法を行い、濃縮液を分離培地に塗抹し培養して ETEC を分離することが、食品の試験法として優れると考えられた。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi, N., Maeda, E., Saito, S., Furukawa, I., Ohnishi, T., Watanabe, M., Terajima, J. and Hara-Kudo, Y. Association of cell-adhesion activities with virulence in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2. *Biocontrol Science*. 21: 57-61, 2016

Hara-Kudo, Y., Konishi, N., Otsuka, K., Iwabuchi, K., Kikuchi, R., Isobe, J., Yamazaki, T., Suzuki, F., Nagai, Y., Yamada, Y., Tanouchi, A., Mori, T., Nakagawa, H., Ueda, Y., and Terajima, J. An interlaboratory study on efficient detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O103, O111, O121, O145, and O157 in food using real-time PCR assay and chromogenic agar. *Int. J. Food Microbiol.* 230:81-88, 2016.

工藤由起子. 腸管出血性大腸菌による食中毒発生と食肉汚染状況について. *感染と消毒*. Vol. 24, No. 1, p72-76, 2017. 2017年5月発行.

Terajima, J., Izumiya, H., Hara-Kudo, Y., Ohnishi, M. Shiga toxin (verotoxin)-producing *E. coli* and foodborne disease: A Review. *Food Safety*. Vol. 5, No. 2, 35-53, 2017.

工藤由起子、寺嶋 淳. 冷凍メンチカツ

の加熱調理による腸管出血性大腸菌の殺菌条件の検討. *食品衛生研究*. 67(9) : 7-13, 2017年9月号.

2. 学会発表

星野 梢、鈴木史恵、山崎匠子、小西典子、菊地理慧、岩淵香織、永井佑樹、磯部順子、山田裕子、坂本 綾、上田泰史、森 哲也、中川 弘、大塚佳代子、工藤由起子. 食品における腸管出血性大腸菌6血清群試験法のコラボレイティブスタディによる評価. 第19回腸管出血性大腸菌(EHEC)感染症研究会. 平成27年7月. 東京.

森 哲也、長尾清香、岸野かなえ、難波豊彦、高田 薫、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌の食品からの検出におけるDNA抽出法および遺伝子検出法の検討. 日本防菌防黴学会第42回年次大会. 平成27年9月. 大阪.

石川暢子、齋藤明美、吉田信一郎、市川希美、森 哲也、伊藤 武、池本尚人、加藤一郎、林 伸之、工藤由起子. ゼリー飲料および固形化成分を含有する粉末清涼飲料の細菌試験法の問題点とその改善法の検討. 第36回日本食品微生物学会学術総会. 平成27年11月. 川崎.

大塚佳代子、森 哲也、上田泰史、中川弘、清水大輔、甲斐明美、小西典子、長尾清香、寺嶋 淳、工藤由起子. 食品の腸管出血性大腸菌検査におけるVT遺伝子検出機器及び試薬の検討. 第36回日本食品微生物学会学術総会. 平成27年11月. 川崎.

森 哲也、長尾清香、岸野かなえ、難波豊

彦、伊藤武、工藤由起子. 食品からの腸管出血性大腸菌検出における DNA 抽出と遺伝子検出法の検討. 第 111 回 日本食品衛生学会学術講演会. 平成 28 年 5 月. 東京.

尾畑浩魅、高橋正樹、河村真保、山本浩平、山梨敬子、小西典子、平井昭彦、甲斐明美、貞升健志. 自家調製免疫磁気ビーズ作製法の検討とその応用. 第 37 回日本食品微生物学会学術講演会. 平成 28 年 9 月. 東京

大阪美紗、大塚佳代子、星野 梢、門脇奈津子、榊田 希、小西典子、甲斐明美、寺嶋 淳、工藤由起子. 食品での腸管毒素原性大腸菌検査法を確立するための基礎検討. 第 112 回日本食品衛生学会. 平成 28 年 10 月. 函館.

小西典子、尾畑浩魅、平井昭彦、甲斐明美、大塚佳代子、寺嶋 淳、工藤由起子. 毒素原性大腸菌による集団および散発下痢症の特性解析. 第 112 回日本食品衛生学会. 平成 28 年 10 月. 函館.

Lee, K., Kobayashi, N., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y., Tsubone, H., Kumagai, S. and Hara-Kudo, Y. 2016. Spread and change in stress resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 0157 on food-related fungal colonies, International Symposium of Mycotoxicology 2016, Tokyo, Japan.

大阪美紗、大塚佳代子、門脇奈津子、榊田希、小西典子、小俣浩魅、甲斐明美、寺嶋淳、工藤由起子. 食品からの腸管毒素原性大腸菌検出におけるリアルタ

イム PCR 法の検討. 第 38 回日本食品微生物学会. 平成 29 年 10 月. 徳島.

工藤由起子、田中恵美、都丸亜希子、寺嶋 淳. 冷凍メンチカツを原因とする腸管出血性大腸菌 0157 食中毒発生とその要因である加熱調理方法での菌数減少の検証. 第 113 回日本食品衛生学会学術講演会. 平成 29 年 11 月. 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

総合研究分担研究
報告書

ヒトの感染に関する家畜の探索

西川 禎一

平成 27 ~ 29 年度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)

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究
研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

ヒトの感染に關与する家畜の探索

研究分担者 西川禎一 大阪市立大学大学院生活科学研究科

腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) の宿主特異性を探るため , ETEC の主要な血清型である O169:H41 (以下 O169) の病原プラスミドの全塩基配列を決定した . 全長 145,082 bp で , GC 含量は , 46.15 % であった . 182 のタンパク質コード配列がアノテーションにより推定された . 本プラスミドは RepFII プラスミドファミリーに属するが , 他の RepFII ファミリーのヒト ETEC プラスミドと比べてサイズが大きく , 挿入配列の割合が高いこと , プラスミドの安定性に関する遺伝子が少ないこと , が明らかになった . 本菌が *in vitro* で容易にプラスミドを喪失する原因と考えられる . しかしながら , O169 は四半世紀に渡り主要な ETEC の地位を占めており , 病原プラスミドを落とさない選択圧が野外では働いている . 本菌には CS6 , CS8-like , K88-like , 以上 3 種類の腸管定着因子がコードされていることが明らかとなった . 極めて不安定で脱落しやすいプラスミドであるにもかかわらず *in vivo* ではよく維持されている理由として , 異なる宿主に対応できる定着因子をコードし , O169 の感染適応力を増強する上で本プラスミドが大きく寄与しているためと推察される . 3 種の定着因子遺伝子を用いて組み換え用菌株 TOP10 を形質転換し , 腸粘膜上皮細胞に対する付着性と宿主特異性をヒト , ブタ , ウシの培養細胞を用いて検討した . その結果 , 定着因子 K88-like 遺伝子で組み換えた株はこれら 3 種の細胞に強い接着性を示した . 本プラスミドは多様な宿主への感染力を O169 に提供することで , 野外では保持されているようだ . O169 のみならず , ETEC 対策には One Health も考慮した検討が必要と考えられる .

研究協力者

坂 瑛里香	大阪市立大学 大学院生活科学研究科
吉田優香	大阪市立大学 生活科学部
大森裕子	大阪市立大学 大学院生活科学研究科
鄭 冬明	大阪市立大学大学院 生活科学研究科
涌嶋美津子	大阪市立大学 大学院生活科学研究科
中台 (鹿毛) 枝里子	大阪市立大学 大学院生活科学研究科
市川直樹	大阪市立大学 大学院生活科学研究科

王 麗麗	大連理工大学・大阪市立大学 大学院生活科学研究科
輪島文明	東京薬科大学薬学部
濱端 崇	国立国際医療センター研究所
和田崇之	長崎大学 熱帯医学研究所
中村寛海	大阪健康安全基盤研究所
安倍博之	大阪大学 微生物病研究所
堀口安彦	大阪大学 微生物病研究所
麻生 久	東北大学大学院 農学研究科
Weiping Zhan	カンザス州立大学 獣医学研究科

A. 目的

大腸菌(*Escherichia coli*) は、恒温動物の腸内に広く分布しており、ヒトにおいても出生と同時に腸管内へと急速に広がり常在菌として定着する(1)。しかしながら、大腸菌の一部には特殊な病原因子によって人に下痢症を起こすものがあり、行政的には病原大腸菌、学術的には下痢原性大腸菌 (Diarrheagenic *E. coli*, 以後 DEC と略す) と呼ばれる。

DEC は、その病原機構に基づいて 腸管病原性大腸菌 (Enteropathogenic *E. coli*, EPEC), 腸管毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), 志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*; STEC), 腸管侵入性大腸菌 (Enteroinvasive *E. coli*, EIEC), 以上4群に長らく大別されてきたが、2012年1月からは 腸管凝集接着性大腸菌 (Enterocoagulative *E. coli*, EAEC), も DEC に認定された。他にも分散接着性大腸菌 (Diffusely adherent *E. coli*, DAEC), 細胞膨化致死毒素産生性大腸菌 (CTEC), 腸管凝集接着性大腸菌耐熱性腸管毒素 (EAST1) 遺伝子保有大腸菌 (EAST1EC), 細胞剥脱性大腸菌 (CDEC) など、新たな DEC の候補とされるサブグループが複数存在する。

食中毒事件の調査に際しては、これら

すべてを調査対象に含めることが望ましいとされるが、DEC と常在大腸菌を識別することは極めて難しく、培養法を中心とする日常的な検査業務では看過されがちである。我々は、これら DEC の多くを網羅的に検出する方法として、マルチプレックス・リアルタイム PCR 法を適用した増菌培養液のスクリーニング手法と(2)、スクリーニングで陽性と判定された検体から DEC を的確に釣菌分離する手法として疎水性格子膜 (HGMP) を用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法 (HGMP-CH 法) を開発した(3)。

平成 24~26 年度に実施した食品の安全確保推進事業では、上記の手法を用いてヒト、家畜、食肉等における各種病原大腸菌の汚染実態を調査し以下の結論を得た(4-7)。検出分離される EPEC のほとんどが非定型 EPEC (atypical EPEC: aEPEC) であり、これらは EHEC よりもはるかに高い率で家畜から家禽にいたるまで分布する、aEPEC の分子疫学指標はウシ由来株と患者由来株の関連を示しており、ブタや健康者の分離株はヒトへの下痢原性が低いと推察される、家禽由来 aEPEC の病因学的意義は今後の課題、EIEC は検出されずわが国でのリスクは低い、EAEC や DAEC の汚染源はもっぱらヒトであり家畜が関与している可能性は低い、健康者では ETEC の保

菌は見つからずブタや食鳥が想定以上に高い率で ETEC を保菌しておりヒトの汚染源となり得るか否か、動物由来株と患者由来株との分子疫学解析が必要。

本研究は、上記 について検討することを目的に行った。ETEC O169:H41 (以後 O169 と略す) は 1991 年に日本で初めて発見されたが(8, 9)、以後、O169 感染の報告が日米で相次ぎ(10-14)、1990 年代には ETEC による集団感染の多くが本血清型菌によるものとなった(15)。O169 は他の ETEC では見られない HEp-2 細胞への強い凝集接着性を示すことが発見当初から報告されており(10)、その細胞接着像は EA_ggEC の HEp-2 細胞への接着像に酷似しているが、EA_ggEC の凝集接着に關与する線毛の発現を制御する遺伝子 *aggR* を保有していない。このことから、本菌が未知の定着因子を保有する可能性が示唆された(10)。

ETEC には厳密な宿主特異性があるが、ブタやウシの ETEC はブタやウシのみに感染し、ヒトの ETEC はヒトのみに感染すると一般に考えられている。しかしながら、O169 が特異な接着像を示したことから、また 1991 年以降急激に広がったことから、その腸管定着因子が従来の定説とは異なる宿主特異性を有する可能性も否定できない。そこで ETEC が人獣共通感染症を起こす可能性を検討する材料として O169 を取り上げ、その病原プラスミド (pEntYN10) の全塩基配列を決定し、本菌の接着因子をコードする遺伝子の解析から O169 の急激な流行の理由や宿主特異性を探った。

B. 方法

1. 使用菌株

下痢症患者の便から独自に分離した

ETEC O169:H41 の YN10 株と ETEC O159 の IND 株 を実験に供した。いずれの株も毒素遺伝子である *est* (STp) を保持していた。大腸菌の実験室株として One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Life technologies)、Competent-high DH5α (TOYOBO, 大阪) および JM109 (TOYOBO, 大阪) を実験に供した。

2. 培養細胞

ヒト結腸癌由来の上皮細胞である Caco-2 (16) および喉頭ガン由来の HEp-2 細胞 (17)、ブタ小腸由来の上皮細胞である IPEC-1 (18) およびブタ空腸由来の上皮細胞である IPEC-J2 (19, 20)、ウシ腸粘膜上皮細胞である BIE (21) について、各細胞指定の組織培養液を用いて実験に供した。

3. プラスミド DNA の抽出

O169 YN10 株を LB ブイヨンに接種し 37°C で振盪培養した。Plasmid DNA Purification KIT BAC 100 (タカラ) を用いて回収した菌体からプラスミドを抽出し、アガロースゲル電気泳動によって染色体 DNA と分離した。クロラムフェニコール耐性遺伝子のベクターである pSV28 (Cm^r) は形質転換した実験室株を LB ブイヨンに接種し 37°C で振盪培養して菌体を回収後に QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。

4. プラスミドのシーケンス解析

塩基配列の解析はタカラバイオに委託し、シーケンサー (FLX System; 454 Life Sciences, Roche Applied Science, Branford, CT) を用いた解析により 150 のコンティグ (塩基配列断片群) 情報として得た。各コンティグのつながりは、GS De Novo

Assembler (ver. 2.5.3)を用いて調べるとともに、隣接するコンティグを跨ぐ PCR を実施して、その産物のシーケンスを学内の解析サービスまたは FASMAC に委託して検証した。

PCR 産物で依頼する場合は、増幅産物をアガロースゲルから Wizar® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA)を用いて切り出し、プロトコルに従って精製した。サンプルの濃度などの調整は各委託先の定めに従った。

コンティグの繋がり方が不明になっている個所については、両コンティグに特異的なプライマーを設定し、PCR を用いて連結の有無を検討した。プライマーの設計には GenoFinisher (東北大学大学院生命科学研究科遺伝情報動態研究室: GenomeMatcher プロジェクト)を使用した .contig_link ファイルの情報をもとに、隣接していると考えられるコンティグのプライマーを一つずつ用いて、プラスミドをテンプレートに PCR を行った。その後、アガロースゲルで電気泳動を行い、予想通りのサイズの PCR 産物が得られれば、二つのコンティグが連続していると判断した。

一部のコンティグでは、コンティグの塩基配列が酷似していてアSEMBラーが 1 種類のコンティグと認識してしまっているが実際には別のコンティグで数か所の塩基が異なる、いわゆるバリエーション問題が存在したり、他のコンティグの配列と相同性が高かったりして特異的なプライマーを設計できず、隣接するコンティグ間で PCR をできなかった。その場合は、そのコンティグをまたぐ形で 3 つのコンティグの間で PCR を行い、PCR 産物をテンプレートにシーケンスで塩基配列を確認した。

5 . アノテーション

タンパク質コード配列 (Cording sequence ; CDS) の抽出はアノテーション用パイプライン Microbial Genome Annotation Pipeline (MiGAP)を用いて行った。推定された CDS は、BLASTP を用いて GenBank 内に類似のアミノ酸配列を持つタンパクを探索することで確認した。同一塩基が連続する領域でシーケンサー 454 FLX が読み取りミスを起こし、結果としてフレームシフトによる誤ってアノテーションされるのを避けるために、それらの領域について Sanger 法で塩基配列を決めた。すべての塩基配列とアノテーション結果を DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した (Accession No. AP014654)。

6 . ペアワイズアライメント

塩基配列から推定されたアミノ酸配列の類似度は、EMBOSS needle program をウェブサイト EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>)で用いることで比較した。

7 . 系統樹の作成

アミノ酸配列に基づいた系統発生樹は、Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 6.06.41 を使用した 500 レプリケーションブートストラップ分析 (500 replicate bootstrap analysis)および近隣結合法 (Neighbor-Joining method with a poisson)を使用して作成した(12)。ブートストラップコンセンサス系統樹 (Bootstrap consensus trees) には、平均ブートストラップバリューを記入した。

8 . In-fusion クローニング

接着因子の安定的な発現には、プロモーターより上流の領域も必要なのではな

いかと考え、先行研究(22)にならい、YN10のCS6の前後1500bpを含んだ領域を挟み込むプライマーを設計しiProof High Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad, USA)を用いて増幅した。さらに、CS8(CFA/III)の前後1000bpを含んだ領域、K88(F4)-likeの前後1000bpを含んだ領域についても同様にプライマーを設計し増幅した。

pSV28を制限酵素EcoR I-HF® (NEB)とBamH I-HF® (NEB)で処理し、1%アガロースゲル(SeaKem® Gold Agarose, LONZA, USA)で泳動してから切り出しIllustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)を用いて精製しベクターとした。

前記の直鎖状ベクターと、同様にアガロースゲルから切り出し精製した標的遺伝子領域のPCR産物を混合してIn-Fusion® HD Cloning Kit (TAKARA, 滋賀)を用いてTOP10の形質転換を行った。Cm耐性を獲得して生育したコロニーを採り、PCRとその産物のシーケンスにより目的の遺伝子が含まれているか確認した。

9. 接着性試験

10%ウシ胎児血清加イーグルMEM培地(EMEM, 日水製薬)を用いて25cm²のフラスコに細胞がフルシートになるまで培養した。フルシート後はPBSで洗浄し、トリプシン処理した後3倍に希釈して継代した。トリプシン処理したフルシートのHEp-2細胞をEMEM 12mlで懸濁し、24穴プレートの各ウェルに0.5mlずつ分注し、CO₂インキュベータで48時間培養した。その後上清を除き、メチル α -D-マンノピラシド(和光純薬)を0.5%含むEMEMを0.5ml加えた。供試菌株を培養したLBブイオンを10 μ lずつ

接種し(50倍希釈)、3時間培養した。細胞をメタノール固定後、10%ギムザ液で細胞を染色し、鏡検した{Nishikawa, 1995 #102}。

10. モノクローナル抗体の作製

K88-likeの特異的な接着性に関与すると推察される遺伝子*faeG1*と*faeG2*の塩基配列に基づきアミノ酸9個分の合成ペプチドを抗原としてラットの後足裏に接種し、約3週間飼育後に腸骨リンパ節を取り出した。細胞融合により、ハイブリドーマを作製した。96ウェルプレートで培養し、抗原と反応する抗体を産生する細胞をELISA法と凝集反応試験により選別した。スクリーニングにより、抗体の産生が確認された細胞群を限界希釈、シングルコロニーとなるまで培養し、ELISA法でモノクローナル抗体が作製されていることを確認し、以降の実験で利用した。

11. 免疫電顕

供試菌は、O169およびO169cured, Top10, K88-like組込み株を使用した。親水化処理した炭素膜グリッドに菌懸濁液をのせて吸着させた後、1% TritonX-100で菌体の中身を抜いた。2% BSAで10倍希釈した1次抗体および金コロイドで標識した抗ラット2次抗体と1時間反応させ、2% モリブデン酸アンモニウムで染色し、乾燥後、電子顕微鏡で観察した。

12. ウェスタンブロット

供試菌はBuffered Peptone Waterで16時間培養後、超音波処理破碎によりタンパクを回収し、SDS-PAGE(12.5%)を行った。1次抗体として作製したモノクローナル抗体、2次抗体としてHRP標識された抗ラットIgG抗体を用いた。検出に

は ECL Prime Western Blotting Detection Reagent を用いた。

1.3. 凝集反応試験

供試菌は Luria Broth で 16 時間培養後、1%ホルムアルデヒド添加生理食塩水で処理し、実験に供する際にはホルムアルデヒド添加生理食塩水を除き、生理食塩水で再懸濁した。96 ウェルプレートにモノクローナル抗体を段階希釈し、死菌懸濁液を加え、室温で一晩静置した。

C. 結果

pEntYN10 の全塩基配列解析

pEntYN10 は、全長 145,082 bp で、GC 含量は、46.15 % であった。本プラスミドには、incFII グループの *repA1* と *repA2* 複製遺伝子がコードされており、pEntYN10 プラスミドは、RepFII プラスミドファミリーに属することが分かった。

他の RepFII ファミリーのヒト ETEC プラスミドと比較して、pEntYN10 プラスミドは、サイズが大きいこと、IS の割合が高いこと、プラスミドの安定性に関する遺伝子が少ないこと、が分かった。

pEntYN10 上の定着因子遺伝子

pEntYN10 は、推定定着因子として、CS6, CS8(CFA/III)-like, K88(F4)-like の 3 遺伝子群を保有していた。

CS6 の構造サブユニットの 1 つである C_{ss}A は、既知のものと比較して 5 つのアミノ酸変異を持っていた。サブユニット C_{ss}B は既知のものと 100% 一致した。

pEntYN10 の CS8-like は、以前に報告された CS8 の配列との相同性は低かったが、CS8 の主要構造サブユニットである CofA のアミノ酸配列を比較すると 73.2% の相同性を有していた。

YN10 の K88(F4)-like 遺伝子は、主要構造サブユニットとされる、*faeG* が 2 つコードされていた。*faeG* の配列の系統発生樹では、これらの 2 つの *faeG* は、他の大腸菌株よりも *Salmonella Infantis* のものと近かった。

O159 IND 株の定着因子の検討

アノテーションにより pEntYN10 は、3 つの推定定着因子、CS6, CS8 (CFA/III) および K88 (F4)-like を保有することが分かった。O159 IND の CS6 も、pEntYN10 と同じ位置に 5 つのアミノ酸変異を持つことが当研究室の涌嶋によってすでに報告されている(13)。そこで、pEntYN10 の CS8, K88(F4)-like 上に設計されたプライマーを用いて、PCR を行ったところ、O159 IND も pEntYN10 と同じ CS8-like および K88-like 遺伝子を保有することが示された。K88-like についてシーケンスを行った結果、pEntYN10 の K88-like と 99% 一致していることがわかった。

ヒト由来の HEp-2 に対する細胞接着性

実験室株 TOP10 に CS6 遺伝子を含む領域を組み込んだ pSV28CS6 を導入して形質転換した TOP10CS6 株も、CS8-like の遺伝子領域を組み込んだ pSV28CS8-like で形質転換した TOP10CS8-like 株も、弱い分散接着像を示すにとどまり、野生株のような接着性は見られなかった。しかしながら、K88-like 遺伝子を含む領域を組み込んだ pSV28K88-like で形質転換された TOP10K88-like 株は O169 野生株と同様の凝集接着像を示した。

ブタ由来の IPEC-1 および IPEC-J2 に対する細胞接着性

O169 野生株は、HEp-2 細胞に比べると

弱いものの、IPEC-1 および IPEC-J2 細胞に対しても凝集接着性を示したのに対し、実験室株の TOP10、病原プラスミド pEntYN10 が脱落した O169cured 株、CS6 遺伝子で形質転換された TOP10CS6 株、CS8-like 遺伝子領域で形質転換された TOP10CS8-like 株、いずれも全く接着性を示さなかった。しかしながら、K88-like 遺伝子で形質転換された TOP10K88-like 株は O169 野生株に類似した接着像を示した。

ウシ由来の BIE に対する細胞接着性

O169 野生株は、HEp-2 細胞に比べると弱いものの、BIE 細胞に対しても凝集接着性を示した。一方、CS6 遺伝子や CS8-like の遺伝子領域で形質転換された菌株は接着しなかったが、K88-like 遺伝子を含む領域で形質転換された TOP10K88-like 株は O169 野生株と同等の凝集接着像を示した。

ヒト、ブタ、ウシ由来の腸粘膜上皮細胞に対する接着性

光学顕微鏡観察だけではなく、接着している菌を回収し培養法で菌数を算定した定量試験でも接着性が再確認された。すなわち、O169 野生株と K88-like 遺伝子を含む領域を組み込んだ pSV28K88-like で形質転換された TOP10K88-like 株は、付着試験後のヒト由来 HEp-2 細胞、ブタ由来 IPEC-1 細胞、ウシ由来 BIE 細胞から 10^7 前後の菌が回収された。一方、病原プラスミド pEntYN10 が脱落した O169cured 株、実験室株の TOP10、CS6 遺伝子や CS8-like の遺伝子領域で形質転換された株は 1-2 桁低い菌数にとどまった。

モノクローナル抗体の作製

ELISA 法による抗体産生チェックにより、抗 FaeG1 として 29 個、抗 FaeG2 として 25 個の陽性サンプルが確認された。TOP10K88-like を抗原としてこれらの凝集反応試験を行ったところ、それぞれ 2 個ずつの陽性が確認された。これら 4 サンプルを限界希釈し、FaeG1 で 1 クローン、FaeG2 で 2 クローンのモノクローナル抗体産生細胞を得ることができた。

モノクローナル抗体の特異性

免疫電顕に用いてみたが、菌体間で金コロイド数に有意な差は見られず、抗 K88-like 抗体が強く反応している様子は見られなかった。

ウエスタンブロッティングに適用したところ、抗 K88-like モノクローナル抗体の 3 クローンはいずれも明瞭なバンドを生じさせなかった。陽性対象として抗 CS6 抗体を 1 次抗体とした試験を行い TOP10CS6 で有効なバンドを確認できたので、実験手技や定着因子の発現に問題はなかった。

96 穴プレートを用いた凝集試験を試みた。3 種のモノクローナル抗体いずれも TOP10K88-like を凝集したが、本来陽性と期待される O169 では確認できなかった。ネガティブコントロールであるべき Top10 に対して陽性反応を示した。今回作製したモノクローナル抗体は K88 様定着因子と特異的に反応するものではないことが明らかとなった。

D. 考察

EPEC は宿主の腸粘膜への定着、すなわち上皮細胞への接着と局所での増殖、を果たしながらエンテロトキシンを産生して下痢症を引き起こす。EPEC はヒトのみならずブタやウシそしてニワトリの

下痢症原因ともなるが(22-24), そのエンテロトキシンLTとSTの毒性は家畜とヒトに共通のものが多く(25-28). しかし, 腸粘膜への接着因子が異なるため, 家畜のETECは家畜の間で, ヒトのETECはヒトの間だけで感染を循環させており相互の行き来はないとされている(29). しかしながら, 先行して行われた「食品の安全確保推進事業」において健康なブタから比較的高率にETEC遺伝子陽性検体が検出され(6), このような家畜に由来するETECがヒトの汚染源となる可能性を検討する必要があった.

ETECの宿主特異性や感染の成否に接着因子は極めて重要な病原因子であるが, Caco-2細胞が使われるようになる前は, *in vitro*での接着試験に有用な培養細胞はなく(16), 赤血球凝集試験(30)や菌体疎水性試験(31)などが接着性の指標として使われていた. そのような時代にHEp-2細胞に凝集接着するETECとして出現したO169は異色の存在であった(10).

今回の解析により, O169のプラスミドpEntYN10がCS6, CS8, K88(F4)-likeの3種の定着因子候補遺伝子群を保有することが明らかになった(32). 既知のヒト腸管定着因子であるCS6は, *cssA* および *cssB* の2つの構造タンパクから構成されている. アミノ酸配列の違いにより, *cssA* はAI, AII, AIIIの3種に, *cssB* はBI, BIIの2種に型別できる(33). pEntYN10のCS6の*cssA*はAIIタイプと似ているが5つのアミノ酸変異を持つ新規サブタイプであった. *cssB*はBIIタイプと100%一致した. 本来, BIIは, *in vitro*試験で弱い接着性を示すタイプと報告されており, O169の強い凝集接着性と合致しない. CS6領域を組み込んだTOP10CS6株がO169より弱い接着性を示したことから, O169の特異な接着力はCS6以外の定着

因子による.

CS8(CFA/III)は, ETEC表面に線毛を形作り, ヒトの腸細胞に特異的に付着すると報告されている(34, 35). CS8の主要構造タンパク質であるCofAは, *V. cholerae*の主要線毛構成要素であるTcpAと高い構造相同性を有している(36). pEntYN10のCofAのアミノ酸配列は, ETEC 260-1株のプラスミドであるpSH1134がコードするCofAと73.2%の相同性を有していた. 近年, TcpAタンパク質のうち, ある5つの残基が, 線維状の構造を構築するために高度に保存されているという報告があり(36, 37), pEntYN10のCofAにもこれらの残基が保存されていることが分かった. したがってCS8としての機能も保持されていると考えられる. しかし, CS8抗体を用いたドットプロットテストでは陰性であった(10). アミノ酸配列の違いから抗体が反応しなかった可能性が考えられるが, 電子顕微鏡観察でもCS8様の線毛は観察されておらず(10), O169はCS8を発現していない可能性もある.

pEntYN10のK88-like遺伝子群は, 主要線毛サブユニットをコードする*faeG*と相同性のある配列が2つ保有されていた. *faeG*配列の系統発生樹によると, 2つの*faeG*遺伝子は, ブタから分離された大腸菌の*faeG*よりも, ヒトから分離された*Salmonella enterica* serovar *Infantis*の*faeG*と近いことが分かった. ブタETECの定着因子であるK88(別名F4)は線毛を形成するが, O169の電子顕微鏡観察ではK88様の線毛は観察されておらず, pEntYN10のK88-likeが非線毛性の接着因子としてヒトへの感染のために働いている可能性も考えられる.

O169の特異な付着に関係する定着因子を解明するため上記3つの遺伝子のク

ローニングを行い、組換え体を作製した。その結果、K88-like を組み込んだプラスミドで形質転換した TOP10K88-like が凝集接着性示し、in vitro における O169 の特異な接着性が本遺伝子によることが明らかになった。

O169 は容易にプラスミドを落とす(10, 32)。pEntYN10 プラスミドのアノテーションを行った結果、そのサイズの大きさの割にプラスミドの維持に関係する遺伝子は少なく、外部からの挿入配列が全体の 45.6% を占めていた。pEntYN10 の属する RepFII プラスミドは、一般的に *stbAB* および *psiAB* を保有しているが、pEntYN10 からは *stbAB* オペロンが欠落していた。*hok/mok/sok* システムや *sopAB* のようなプラスミドの維持に関する遺伝子もコードされていなかった。O169 が容易にプラスミドを落とす原因と考える。

しかしながら、pEntYN10 のように in vitro では脱落しやすいプラスミドが O169 に保たれていると言う事実は、本菌が常に効率よく感染を繰り返し in vivo で保たれていることを示唆する。本プラスミド上にコードされた 3 種の定着因子遺伝子を使い分けることによって O169 が多様な宿主に感染する能力を得ているとすれば、脱落しやすいプラスミドが保持され続けるのも理解できる。K88 はもともとブタ ETEC の定着因子であり、ヒトに感染するための CS6 や CS8 などと宿主に合わせた使い分けを O169 がしているとすれば、ETEC 感染症対策について考えを改める必要も生じる。ヒト ETEC の汚染源が本当にヒトだけなのか、新しい視点で調べ直す必要がある。

そこで、K88-like 抗原を簡便に検出したり、その菌体における局在や宿主細胞との結合に重要なエピトープを決定したりする目的でモノクローナル抗体の作製

を試みた。しかしながら、免疫電顕でもウェスタン・ブロッティングでも明瞭な反応が出ず、凝集試験によって K88-like で組み替えた菌体のみならず TOP10 自体とも反応していることが判明した。抗原として作製した合成ペプチドと同様の抗原を TOP10 が保有している可能性を予想せず、合成ペプチドを用いた ELISA と TOP10K88-like の凝集試験でクローンの選別を進め、陰性対照として TOP10 を凝集試験に置いていなかったことが失敗の原因である。基本に立ち返り、再度挑戦する予定である。

E. 結論

ETEC の中でも検出頻度が高い O169 について、その特異な凝集接着性に寄与する因子を探ったところ、既知のヒト腸管定着因子である CS6 とは別に新規接着因子を 2 つ保有していること、その一つである K88-like 遺伝子が O169 に特異な接着性を付与していること、K88-like 接着因子はヒトのみならずブタやウシ由来の腸粘膜上皮細胞に対しても強い接着性を有すること、が明らかとなった。また、ETEC としてもう一つの主要な血清型である O159 も O169 と同じ 3 種の接着因子を保有していた。ETEC がこれらの接着因子を使い分けることで複数の種類の宿主に感染し人獣共通感染症を起こしている可能性が考えられる。

F. 文献

1. 光岡知足. 腸内菌叢の形成、推移、分布. In: 光岡知足, editor. 腸内細菌学. 東京: 朝倉書店; 1990. p. 87-107.
2. Hidaka, A., et al. (2009) Multiplex real-time PCR for

- exhaustive detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli*. J. Appl. Microbiol. 106: 410-420.
3. Wang, L., et al. (2011) Exhaustive isolation of diarrhoeagenic *Escherichia coli* by a colony-hybridization method using hydrophobic grid-membrane filters in combination with multiplex real-time PCR. Lett. Appl. Microbiol. 53: 264-270.
 4. Wang, L., et al. (2013) Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal patients: comparison with the strains from foods and fecal specimens of cattle, pigs, healthy carriers in Osaka City, Japan. Appl. Environ. Microbiol. 79: 1232-1240.
 5. Wang, L., et al. (2017) Comparison by multi-locus variable-number tandem repeat analysis and antimicrobial resistance among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from foods and human and animal faecal specimens. J. Appl. Microbiol. 122: 268-278.
 6. Wang, L., et al. (2017) Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in foods and fecal specimens obtained from cattle, pigs, chickens, asymptomatic carriers, and patients in Osaka and Hyogo, Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 70: 464-469.
 7. Wang, L., et al. (2017) Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods. Int. J. Food Microbiol. 249: 44-52.
 8. 安藤 佳代子 他 (1993) : 毒素原性大腸菌O169:H41による集団食中毒の細菌学的・疫学的検討 . 食品と微生物 10 , 77-81.
 9. Nishikawa, Y., et al. (1995): Heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* O169:H41 in Japan. Emerg. Infect. Dis. 1: 61.
 10. Nishikawa, Y., et al. (1998): Epidemiology and properties of heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O169:H41. Epidemiol Infect 121: 31-42.
 11. Hamada, K., et al. (2000) Outbreaks of heat stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* O169 in the Kinki district in Japan: Genotypic comparison by pulsed-field gel electrophoresis of isolates from two outbreaks in 2000 with isolates from four outbreaks in 1997-1998. Jpn. J. Infect. Dis. 53: 174-176.
 12. Beatty, M. E., et al. (2004) Enterotoxin-producing *Escherichia coli* O169:H41, United States. Emerg. Infect. Dis. 10: 518-21.
 13. 9. Devasia, R. A., et al. (2006): Endemically acquired foodborne outbreak of enterotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O169:H41. Am J Med 119: 168

- e7-10.
14. Harada, T., et al. (2013) A foodborne outbreak of gastrointestinal illness caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O169:H41 in Osaka, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66: 530-533.
 15. 西川禎一 (2006) : 食生活をおびやかす食中毒と感染症 pp. 117-136. In 山口英昌, (ed.), 食環境科学入門 食の安全を環境問題の視点から, ミネルヴァ書房
 16. Darfeuille-Michaud, A., et al. (1990) Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to the human colon-carcinoma cell-line Caco-2 in culture. *Infect. Immun.* 58: 893-902.
 17. Cravioto, A., et al. (1991) Association of *Escherichia coli* HEP-2 adherence patterns with type and duration of diarrhea. *Lancet* 337: 262-264.
 18. Lu, S. et al. (2006) Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid secretion in IPEC-1 cells by increasing chylomicron size. *J. Biol. Chem.* 281: 3473-3483.
 19. Fekete, P. Z., et al. (2013) Both enzymatic and non-enzymatic properties of heat-labile enterotoxin are responsible for LT-enhanced adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli* to porcine IPEC-J2 cells. *Vet. Microbiol.* 164: 330-335.
 20. Zakrzewski, S. S., et al. (2013) Improved cell line IPEC-J2, characterized as a model for porcine jejunal epithelium. *PLoS One* 8: e79643
 21. Miyazawa, K., et al. (2010) Characterization of newly established bovine intestinal epithelial cell line. *Histochem. Cell Biol.* 133: 125-134.
 22. Joya, J. E., et al. (1990) Demonstration of enterotoxigenic *Escherichia coli* in diarrheic broiler chicks. *Eur. J. Epidemiol.* 6: 88-90.
 23. Kariuki, S., et al. (2002) Carriage of potentially pathogenic *Escherichia coli* in chickens. *Avian Dis.* 46: 721-724.
 24. Chandran, A., and Mazumder, A. (2014) Occurrence of diarrheagenic virulence genes and genetic diversity in *Escherichia coli* isolates from fecal material of various avian hosts in British Columbia, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:1933-1940.
 25. Tsuji, T., et al. (1990) A heat-labile enterotoxin (LY) purified from chicken enterotoxigenic *Escherichia coli* is identical to porcine LT. *FEMS Microbiol. Lett.* 67: 329-332.
 26. Inoue, T., et al. (1993) Amino acid sequence of heat-labile enterotoxin from chicken enterotoxigenic *Escherichia coli* is identical to that of human strains H10407. *FEMS Microbiol. Lett.* 108: 157-161.
 27. Akashi, N., et al. (1993) Production of heat-stable enterotoxin-II by chicken clinical isolates of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 109: 311-315.
 28. Nawar, H. F., et al. (2010) LT-IIc, a new member of the

- type II heat-labile enterotoxin family encoded by an *Escherichia coli* strain obtained from a nonmammalian host. *Infect. Immun.* 78: 4705-4713.
29. 甲斐明美 (2009) : ETEC (腸管毒素原性大腸菌) pp. 269-280. In 仲西寿男、丸山務, (ed.), 食品由来感染症と食品微生物, 中央法規出版
30. Tavendale, A., and Old, D. C. (1985) Hemagglutinins and adhesion of *Escherichia coli* to HEp-2 epithelial cells. *J. Med. Microbiol.* 20: 345-353.
31. Lindahl, M., et al. (1981) A new test based on salting out to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 677: 471-476.
32. Ban, E., et al. (2015) Characterization of unstable pEntYN10 from enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) O169:H41. *Virulence* 6: 735-744.
33. Sabui, S., et al. (2010) Allelic variation in colonization factor CS6 of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with acute diarrhoea and controls. *J. Med. Microbiol.* 59: 770-779.
34. Honda, T., Arita, M., and Miwatani, T. (1984) Characterization of new hydrophobic pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli* a possible new colonization factor. *Infect. Immun.* 43: 959-965.
35. Shinagawa, H., et al. (1993) Cloning of the genes that control formation of the fimbrial colonization factor antigen-III (CFA/III) from an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol. Immunol.* 37: 689-694.
36. Fukakusa, S., et al. (2012) Structure of the CFA/III major pilin subunit CofA from human enterotoxigenic *Escherichia coli* determined at 0.90 Å resolution by sulfur-SAD phasing. *Acta Crystallograph. D Biol. Crystallography* 68: 1418-1429.
37. Li, J., et al. (2008) *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus structure analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Structure* 16: 137-148.
- G. 健康危険情報
なし
- H. 研究発表
1. 論文発表
- Ban, E., Yoshida, Y., Wakushima, M., Wajima, T., Hamabata, T., Ichikawa, N., Abe, H., Horiguchi, Y., Hara-Kudo, Y., Kage-Nakadai, E., Yamamoto, T., Wada, T., and Nishikawa, Y. (2015) Characterization of unstable pEntYN10 from enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) O169:H41. *Virulence* 6(8):735-744.
- Mamun, M. M., Parvej, M. S., Ahamed, S., Hassan, J., Nazir, K. H. M. N. H., Nishikawa, Y., and Rahman, M. T. (2016) Prevalence and characterization of shigatoxigenic *Escherichia coli* in

- broiler birds in Mymensingh. *Bangl. J. Vet. Med.* 14 (1): 5-8.
- Seo, D., Choi, S., Jeon, S., Jeong, S., Park, H., Lee, B., Kim, G., Yang, S., Nishikawa, Y., and Choi, C. (2017) Comparative sequence analysis of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 identified in Korean and Japanese *Escherichia coli* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 243: 1-8.
- Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y. (2017) Comparison by multi-locus variable-number tandem repeat analysis and antimicrobial resistance among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from foods and human and animal faecal specimens. *J. Appl. Microbiol.* 122 (1):268-278.
- Wang, L., Zhang, S., Zheng, D., Fujihara, S., Wakabayashi, A., Okahata, K., Suzuki, M., Saeki, A., Nakamura, H., Hara-Kudo, Y., Kage-Nakadai, E., and Nishikawa, Y. (2017) Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in foods and fecal specimens obtained from cattle, pigs, chickens, asymptomatic carriers, and patients in Osaka and Hyogo, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 70: 464-469.
- Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y. (2017) Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods. *Int. J. Food Microbiol.* 249: 44-52.
- ## 2. 学会発表
- Noju, T., Matsuzaki, T., Tamai, S., Tanimoto, Y., Kage-Nakadai, E., and Nishikawa, Y. Diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC) strains isolated from healthy carriers inhibit IL-8 secretion of HEK293 cells stimulated by inflammatory substances. *E. coli and the Mucosal Immune System*, Ghent, Belgium, Abstract: 29 2015/7/10-13
- Ban, E., Yoshida, Y., Ikezaki, S., Zheng, D., Kage-Nakadai, E., Wada, T., Wajima, T., Hamabata, T., Horiguchi, Y., Ichikawa, N., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y. Complete DNA sequence of the virulence plasmid of enterotoxigenic *Escherichia coli* O169:H41 and characterization of a novel adherence factor. *E. coli and the Mucosal Immune System*, Ghent, Belgium, Abstract: 47 2015/7/10-13
- Md. Montasir Mamun, Md. Shafiullah Parvej, Jayedul Hassan, KHM Nazmul Hussain Nazir, Yoshikazu Nishikawa and Md. Tanvir Rahman. Detection of Shigatoxigenic *Escherichia coli* in healthy broiler chicken and their public health significance. *Applied and Environmental Microbiology Gordon Research Conference*, Boston, USA 2015/7/11-17
- Parvej, M. S., Kage-Nakadai, E., and Nishikawa, Y. Molecular characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) isolates from poultry. The 16th Awaji

- International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, Japan, Abstract: 68. 2017/9/5-8
- Takeuchi, N., Tanimoto, Y., Tamai, S., Yanagida, S., Yamaguchi, Y., Kage-Nakadai, E., and Nishikawa, Y. (2017) Diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC) strains isolated from healthy carriers inhibit IL-8 secretion of epithelial cells by the type VI secretion system (T6SS). The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, Japan, Abstract: 71. 2017/9/5-8
- Omori, Y., Zheng, D., Ban, E., Kage-Nakadai, E., Tachibana, T., Wada, T., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y. Adhesion of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) O169:H41 to porcine intestinal epithelial cells by the novel colonization factor. Vaccines for Enteric Diseases, AAU Sao Rafael Atlantico Hotel, Albufeira, Portugal, Abstract; Poster A128. 2017/10/9-11
- 鄭 冬明, 坂 瑛里香, 池崎 沙耶加, 中臺枝里子, 和田崇之, 輪島文明, 濱端 崇, 堀口安彦, 西川 禎一. Complete DNA sequence of the EPEC O169:H41 virulence plasmid and the novel colonization factor. 第89回日本細菌学会総会, 平成28年3月23-25日 大阪大学微生物病研究所 大阪国際交流センター 一般演題P2-045
- 鄭 冬明, 坂 瑛里香, 大森裕子, 中臺枝里子, 山口良弘, 和田崇之, 西川禎一. 上皮細胞に対する腸管毒素原性大腸菌O169:H41の特異な接着性に寄与する新規付着因子, 第37回日本食品微生物学会学術総会, 平成28年9月15-16日 麻布大学 タワーホール船堀 p.58
- 鄭 冬明, 坂 瑛里香, 大森裕子, 中臺枝里子, 山口良弘, 和田崇之, 工藤由起子, 西川禎一. 上皮細胞に対する腸管毒素原性大腸菌O169:H41の特異な接着性に寄与する新規付着因子, 日本栄養食糧学会第55回近畿支部大会, 平成28年10月22日 帝塚山学院大学 p.52
- 鄭 冬明, 坂 瑛里香, 大森裕子, 中臺枝里子, 和田崇之, 工藤由起子, 西川禎一. 腸管毒素原性大腸菌O169:H41の特異な細胞接着性に寄与する新規付着因子, 第69回日本細菌学会関西支部学術集会, 平成28年11月19日 大阪市立大学 p.45
- 柳田 咲, 玉井 沙也加, 能重 匠, 谷本佳彦, 松崎壮宏, 中臺枝里子, 山口良弘, 児玉年央, 飯田哲也, 西川禎一. 上皮細胞からのサイトカイン分泌における分散接着性大腸菌の抑制効果, 第90回日本細菌学会総会, 平成29年3月19-21日 仙台国際センター WS4-4 (P-216) 優秀発表賞受賞
- 鄭 冬明, 坂 瑛里香, 大森裕子, 池崎沙耶加, 中臺(鹿毛)枝里子, 和田崇之, 工藤由起子, 西川禎一. 上皮細胞に対する腸管毒素原性大腸菌O169:H41の特異な接着性に寄与する新規付着因子, 第71回日本栄養・食糧学

会大会，平成29年5月19-21日
沖縄コンベンションセンター
2A-E52(p.243)

柳田 咲,玉井 沙也加,能重 匠,
谷本佳彦,松崎壮宏,竹内成美,
中臺枝里子,山口良弘,児玉年
央,飯田哲也,西川禎一.培養
細胞からの炎症性サイトカイン
分泌に対する分散接着性大腸菌
の抑制機構,第71回日本栄養・
食糧学会大会,平成29年5月
19-21日 沖縄コンベンション
センター 2A-E53(p.244)

谷本佳彦,竹内成美,玉井沙也加,
柳田 咲,中台枝里子,山口良
弘,西川禎一.上皮細胞からの
サイトカイン分泌に対する分散
接着性大腸菌の抑制効果に関与
する因子の探索,第38回日本食
品微生物学会学術総会,平成29
年10月5-6日 あわぎんホール
1C02 (p.51)

谷本佳彦,竹内成美,玉井沙也加,
柳田 咲,中臺(鹿毛)枝里子,
山口良弘,西川禎一.健康者由
来の分散接着性大腸菌はVI型分
泌装置によって上皮細胞からの
IL-8分泌を抑制する,第70回日
本細菌学会関西支部学術集会,
平成29年11月25日 大阪府立大
学 I-siteなんば 若手-14

. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ban, E., Yoshida, Y., Wakushima, M., Wajima, T., Hamabata, T., Ichikawa, N., Abe, H., Horiguchi, Y., Hara-Kudo, Y., Kage-Nakadai, E., Yamamoto, T., Wada, T., and Nishikawa, Y.	Characterization of unstable pEntYN10 from enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (EPEC) 0169:H41.	Virulence	6 (8)	735-744	2015
Kobayashi, N., Maeda, E., Saito, S., Furukawa, I., Ohnishi, T., Watanabe, M., Terajima, J. and Hara-Kudo, Y.	Association of cell-adhesion activities with virulence in Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> 0103:H2.	Biocontrol Science.	21 (1)	57-61	2016
Hara-Kudo, Y., Konishi, N., Otsuka, K., Iwabuchi, K., Kikuchi, R., Isobe, J., Yamazaki, T., Suzuki, F., Nagai, Y., Yamada, Y., Tanouchi, A., Mori, T., Nakagawa, H., Ueda, Y., and Terajima, J.	An interlaboratory study on efficient detection of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> 026, 0103, 0111, 0121, 0145, and 0157 in food using real-time PCR assay and chromogenic agar.	Int. J. Food Microbiol.	230	81-88	2016

Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y.	Comparison by multi-locus variable-number tandem repeat analysis and antimicrobial resistance among atypical enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> strains isolated from foods and human and animal faecal specimens.	J. Appl. Microbiol.	122 (1)	268-278	2017
Seo, D., Choi, S., Jeon, S., Jeong, S., Park, H., Lee, B., Kim, G., Yang, S., Nishikawa, Y., and Choi, C.	Comparative sequence analysis of enteroaggregative <i>Escherichia coli</i> heat-stable enterotoxin 1 identified in Korean and Japanese <i>Escherichia coli</i> strains.	Int. J. Food Microbiol.	243	1-8	2017
工藤由起子	腸管出血性大腸菌による食中毒発生と食肉汚染状況について	感染と消毒	24 (1)	72-76	2017
工藤由起子、寺嶋淳	冷凍メンチカツの加熱調理による腸管出血性大腸菌の殺菌条件の検討	食品衛生研究	67 (9)	7-13	2017
Wang, L., Zhang, S., Zheng, D., Fujihara, S., Wakabayashi, A., Okahata, K., Suzuki, M., Saeki, A., Nakamura, H., Hara-Kudo, Y., Kage-Nakadai, E., and Nishikawa, Y.	Prevalence of diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> in foods and fecal specimens obtained from cattle, pigs, chickens, asymptomatic carriers, and patients in Osaka and Hyogo, Japan.	Jpn.J. Infect. Dis.	70 (4)	464-469	2017

<p>Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y.</p>	<p>Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> isolated from different retail foods.</p>	<p>Int. J. Food Microbiol.</p>	<p>249</p>	<p>44-52</p>	<p>2017</p>
---	---	--------------------------------	------------	--------------	-------------