

腸管出血性大腸菌（E H E C） 検査・診断マニュアル

2024年8月改訂

（赤字：追記部分）

目 次

1.	概要	3
2.	EHEC の分離と同定	3
	(1)検体の採取と保存	4
	(2)糞便からの EHEC 分離	4
	(3)EHEC の同定	7
	(4)血清型別	16
3.	血清学的診断法	17
	(1)抗原液の作製と保存	18
	(2)血清の非働化	19
	(3)抗体価測定法	19
	(4)判定	20
4.	EHEC の陰性確認方法	21
5.	参考文献	23
6.	参考資料	24
	(1)免疫磁気ビーズの作製方法	24
	(2) PCR 法による大腸菌血清型判定法	25
7.	検査依頼先	38
8.	執筆者一覧	38
9.	謝辞	40
10.	別表 <PCR 法による大腸菌血清型判定法> リンク		40

1. 概要

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC）は産生する毒素の性状から、ベロ毒素（VT）産生性大腸菌（Vero toxin-producing *E. coli*: VTEC）あるいは志賀毒素産生性大腸菌（Shiga toxin-producing *E. coli*: STEC）とも呼ばれる。我が国の行政上では菌の名称として EHEC が用いられ、EHEC は「VT を産生または VT 遺伝子を保有する大腸菌」と定義されている。EHEC 感染症は三類感染症として菌の分離・同定と VT の確認により全数届出が義務付けられており、溶血性尿毒症症候群（Hemolytic uremic syndrome: HUS）発症例に限り、便からの VT 検出あるいは患者血清における O 抗原凝集抗体等の検出によって診断した場合も届出が必要である。EHEC 感染症では HUS や脳症などの重症合併症を併発する危険があることから、早期の高感度な確定診断が求められている。

2. EHEC の分離と同定

EHEC 感染症の診断は症状の有無にかかわらず、糞便から大腸菌を分離し、分離株のベロ毒素産生性の確認またはベロ毒素遺伝子の検出による（図 1）。血清型別や毒素型の判定は求められていないが、O 群や毒素型がわかれば接触者検便の実施に有用である。

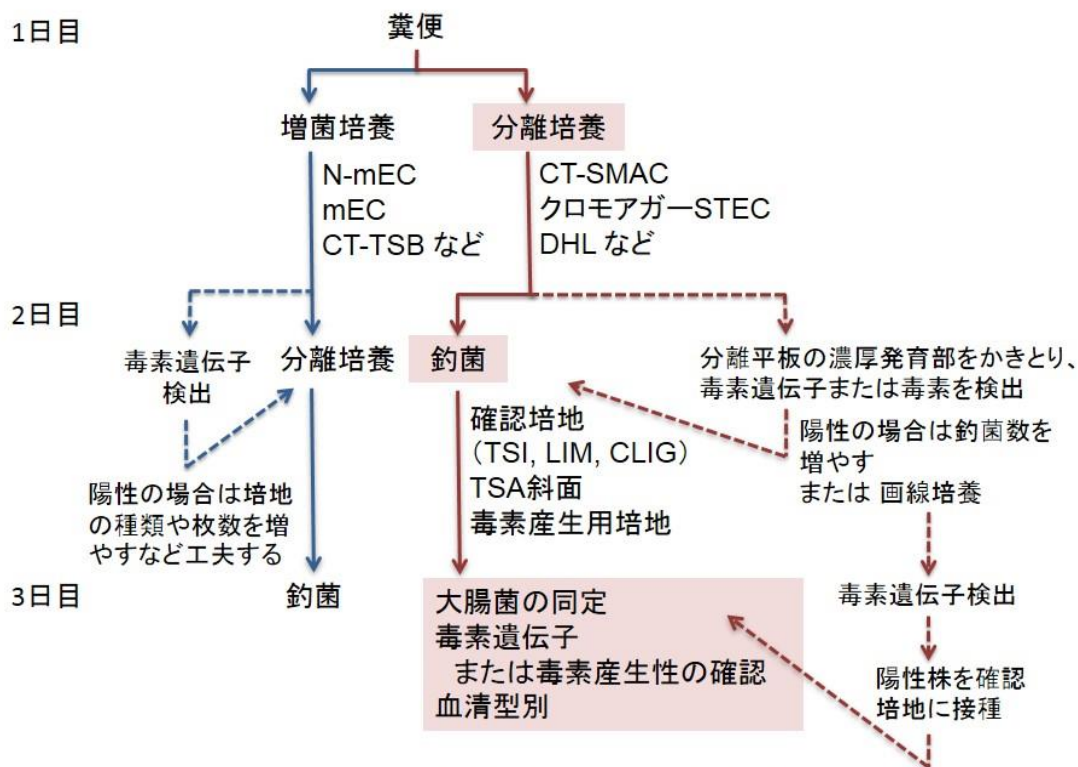


図1 糞便からのEHEC分離の手順

(1) 検体の採取と保存

EHEC 分離のための糞便検体は自然排泄便が望ましいが、採取できない場合は直腸粘液をスワブで採取する。採取後直ちに検査できない場合は、Cary-Blair 培地等に保存して輸送する。

激しい下痢を呈して液体状の検体となっている場合は遠心し（2,500-3,500 ×g で数分間程度）、沈渣（または沈渣と上清）を検査に供する。

(2) 糞便からの EHEC 分離

a) 分離培養

日本で分離されることの多いO群については、その特徴的性状を利用した分離培地が多数市販されている。

すなわち、O157、O26、O111 はそれぞれソルビトール、ラムノース、ソルボース非発酵（または遅発酵）であることから、マッコンキー基礎寒天培地（MAC）に鑑別糖を加えて CT 選択剤（セフィキシム 0.05 mg/L および亜テルル酸カリウム 2.5 mg/L）を加えた CT 加ソルビトール MAC（CT-SMAC）、CT 加ラムノース MAC（CT-RMAC）、CT 加ソルボース

MAC (CT-SBMAC) を使用し、白色（糖分解陰性）のコロニーを釣菌する。β-グルクロニダーゼや β-ガラクトシダーゼに特異的な発色基質を利用する合成基質培地も便利であるが、コロニーの密集した部分では説明書どおりの色調を示さないことがある（図 2）。また、どの培地においても特徴的な色調のコロニーがすべて EHEC であるとは限らない。

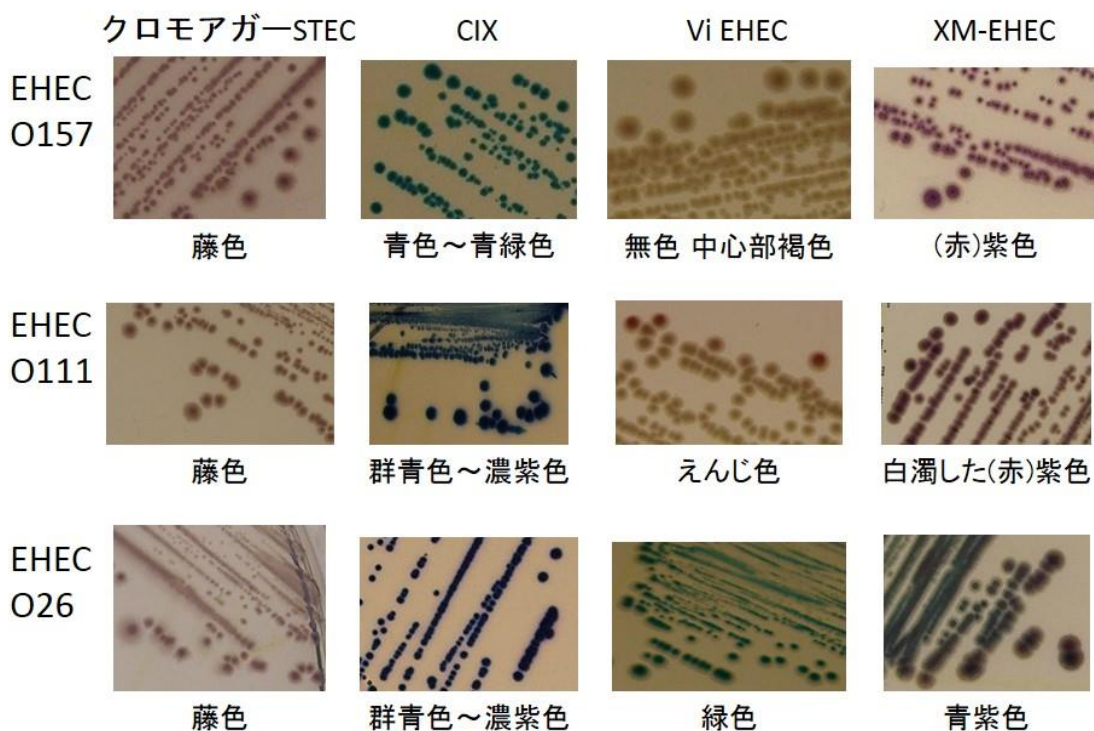


図2 合成基質培地上のEHECコロニー

集団事例などで検出対象となる EHEC が特定されている場合は、その株に適した分離培地を使用するが、日常検査では EHEC 分離用の培地を数種類準備することは困難であり、最も分離頻度の高い O157 検出用培地と一般的な大腸菌分離培地の併用が現実的である。CT 選択剤を加えた培地と合成基質培地は概ね同程度の選択性を示し、O157、O26、O111のほか O103や O121、O145の多くは発育することから、O157 検出用培地の濃厚発育部位をかき取って VT 遺伝子または VT を調べ、陽性の場合には O157 疑いコロニー以外にも釣菌する。O91 や O165 などでは、選択性の高い培地に発育しない株もあるため、EHEC 感染が疑われる場合は、DHL 寒天培地などの一般的な大腸菌分離培地から多数のコロニーを釣菌または画線培養して、VT 遺伝子または VT 産生性を調べる。なお、EHEC のスクリーニングに EHEC hemolysin (Ehly) 産生性をみるエンテロヘモリシン培地が使用されるこ

とがあるが、あくまでも Ehly 産生性は指標であり、VT 産生性と一致しない。

b) 増菌培養

急性期の患者便では増菌培養は必要ないが、すでに抗菌剤が使用されている場合や、下痢が激しく糞便が希釈されているときには、増菌培養を実施する。増菌培地には、modified EC 培地 (mEC) や CT 選択剤を添加したトリプトソイブロス (TSB) が使用される。O157 検出にはノボジオシンを最終濃度 20 mg/L に加えた mEC を用いることが多いが、増菌培養における選択剤の適否や最適培養条件 (温度、時間) についての検討の多くは O157 の検出を目的としたもので、その他の O 群についても有用であるかどうかは不明である。

目的とする EHEC の O 群が明らかな場合は、免疫磁気ビーズを用いて増菌培養液から集菌し、分離培地に塗抹することも可能である。免疫磁気ビーズは O157、O26、O111、O103、O121、O145 が市販されており、これ以外の O 群については各種抗体結合用磁気ビーズ (例えばウサギ IgG 抗体結合用磁気ビーズ) と目的とする O 群の免疫血清 (ウサギ血清) を用いて自家調整できる (参考資料 (1))。

EHEC の耐酸性を利用し、TSB 増菌液を塩酸処理 (等量の 0.125 N 塩酸加 0.5% 食塩水と混合) してから分離培地に接種する方法が報告されているが (Fukushima ら, 1999)、分離培地には選択性の低い培地を併用することが望ましく、塩酸加食塩水の混合量も検体によって変更する方が良い。また、pH 3 に調整した TSB に糞便を加えて 30 分間静置した後、TYTP (酵母エキス 12 g/L, TRIS 12.5 g/L, ピルビン酸ナトリウム 1 g/L を加えた TSB, pH 8.7) を等量加えて 42°C で増菌する方法も報告されている (Grant, 2008)。

c) 確認培養

EHEC が疑われるコロニーを TSI 寒天培地、LIM 培地、CLIG 寒天培地、トリプトソイ寒天斜面培地 (普通寒天斜面培地) などに釣菌する。他の大腸菌と同様に EHEC の多くは乳糖分解性で、リジン脱炭酸酵素陽性、運動性陽性、インドール陽性を示すが、O111 や O165 はリジン脱炭酸酵素陰性、運動性陰性が多い (表 1)。

表1 主なEHECの鑑別性状

O群	TSI寒天培地				LIM培地			GUD ^{b)}	糖分解 ^{c)}		CT加平板 での発育	EHEC hemolysin ^{d)}
	斜面	高層	H ₂ S	ガス	リジン	IND ^{a)}	運動性		SOR	RHAM		
O157	+ ^{e)}	+	-	+	+	+	(+)	-	-	d	+	+
O26	+	+	-	+	+	+	(+)	+	+	-	+	+
O111	+	+	-	+	-	+	(-)	+	+	+	+	+
O103	+	+	-	+	+	+	+	+	+	d	d	+
O121	(+) ^{f)}	+	-	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+
O145	+	+	-	+	+	+	(-)	+	+	+	+	+
O165	+	+	-	-	-	+	(-)	+	(+)	-	-	d

a) インドール

b) β-グルクロニダーゼ

c) 48時間培養での成績、SOR:ソルビトール、RHAM:ラムノース

d) 10mM塩化カルシウム加洗浄羊赤血球寒天培地での溶血活性

e) +:陽性、(+):殆どの株は陽性、-:陰性、(-):殆どの株は陰性、d:株によって異なる

f) 乳糖非分解性株であっても培養中に乳糖分解性株が出現する

大腸菌の95%はβ-グルクロニダーゼ陽性であるが、EHEC O157はβ-グルクロニダーゼ陰性である。しかし、ドイツなどで分離されるEHEC O157:HNMはソルビトール陽性およびβ-グルクロニダーゼ陽性を示すことが多く、日本でもβ-グルクロニダーゼ陽性のEHEC O157が分離されている。

(3) EHECの同定

下記に示すVT遺伝子検出またはVT産生性によって決定する。継代培養によってVT遺伝子を運ぶファージが欠落する株が存在することが頻繁に報告されており、検出は出来るだけ早い段階で行うのが望ましい。

a) VT遺伝子検出法

1) ScheutzらのPCR法

ベロ毒素は免疫学的に異なる2種類の毒素(VT1 [Stx1]とVT2 [Stx2])に大別され、これらをコードする遺伝子にはいくつかの亜型(サブタイプ)がそれぞれ存在する。本稿ではScheutzらのPCR法について述べた後、それ以外のプライマーセットについて概説する。なお、サブタイプを表記する必要のない場合や調べていない場合は、VT1 (Stx1)、VT2

(Stx2) との記載が良い。なお、英文のオリジナルプロトコールは Scheutz ら（参考文献）の通りである。

・本手法で分類可能なサブタイプ

Scheutz らの PCR 法では次のサブタイプの検出が可能である：*stx1a*, *stx1c*, *stx1d*, *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*。

① Template DNA の作製（アルカリボイル法）

- ・チップ等の先端でコロニーを極微量掻き取って 25 mM NaOH 溶液 50 μ L に懸濁する。
- ・95°C で 5 分以上加熱し、10,000 \times g で 1 分間遠心した上清に 4 μ L の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) を加えて使用する（精製 DNA を用いても可能）。
- ・コントロール DNA：*stx* 陽性株（各サブタイプの陽性コントロール株は国立感染症研究所・細菌第一部から分与可能である）

② Primers

Scheutz ら（参考文献）を参照のこと。

③ PCR 反応液の組成

2.5	μ L	滅菌脱イオン水（ミリ Q 水）
		（プライマーの組み合わせによって反応液量が 20 μ L となるように変更する）
10	μ L	master mix (HotStarTaq Master Mix Kit [Qiagen], または GoTaq Master Mix [Promega])
2.5	μ L	5 μ M primer mix
5	μ L	鋳型 DNA
<hr/>		
20	μ L	total

ただし、*stx1* のサブタイプ検出には以下の組成を用いる。

5	μL	滅菌脱イオン水 (ミリQ水)
12	μL	master mix (HotStarTaq Master Mix Kit [Qiagen], または GoTaq Master Mix [Promega])
1	μL	5 μM primer mix (<i>stx1c</i> および <i>stx1d</i> の 4 種類)
2	μL	5 μM primer mix (<i>stx1a</i> の 2 種類)
5	μL	鋳型 DNA
<hr/>		
25	μL	total

④ 反応条件

stx1 および *stx2* (共通プライマー) の検出用反応条件

- Step1 : 95°C, 15 min
- Step2 : 94°C, 50 sec
- Step3 : 56°C, 40 sec
- Step4 : 72°C, 60 sec
- Step5 : go to step 2 (total 35 cycles)
- Step6 : 72°C, 3 min
- Step7 : 4°C保存

ただし、Step 1 は使用キットによって変更可能 (HotStarTaq Plus Master Mix Kit [Qiagen]の場合は 95°C, 5 min に短縮可能)

stx1 サブタイプおよび *stx2* サブタイプ検出用反応条件

- Step1 : 95°C, 15 min
- Step2 : 94°C, 50 sec
- Step3 : 64°C, 40 sec

(使用する機器や試薬等との組み合わせにより, *stx1* サブタイプは 62-64°C, *stx2*

サブタイプは 64-66℃で調整が必要)

Step4 : 72℃, 60 sec

Step5 : go to step 2 (total 35 cycles)

Step6 : 72℃, 3 min

Step7 : 4℃保存

ただし、Step 1 は使用キットによって変更可能 (HotStarTaq Plus Master Mix Kit [Qiagen]の場合は 95℃, 5 min に短縮可能)

⑤ 電気泳動

通常のアガロース (1% TaKaRa LO3 in TAE など) ゲル電気泳動で当該サイズの増幅産物を確認する。

2) その他の PCR プロトコール

Lin ら (参考文献)、Cebula ら (参考文献) のプライマーおよび Takara から販売されているものが使用可能である。それらのプライマーによるサブタイプ検出能については下記の表 2 を参照のこと。重症例由来 EHEC の主要な 7 種類の O 抗原遺伝子と志賀毒素遺伝子を同時検出する方法として、5. 参考資料 (2) に記載のマルチプレックス PCR 法がある。

表2 各種PCR法及びLAMP法によるstxサブタイプ検出能の比較

stx subtyp e	Real-time PCR				Conventional PCR								LAMP c)
	TaKaRa ^{a)}		Harada ^ら		Scheutz ^ら b)		Lin ^ら	Karch ^ら	Cebula ^ら		TaKaRa		
	stx	stx1	stx2	stx2f	stx1	stx2	up/down	MK1/2	LP30/31	LP43/44	EVT1/2	EVS1/2	
1a	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
1c	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
1d	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
2a	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
2b	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
2c	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
2d	+	-	+	-	-	+	(+) ^{d)}	+	-	+	-	+	+
2e	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
2f	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
2g	+	-	+	-	-	+	(+) ^{d)}	+	-	+	-	+	(+) ^{d)}

a) Cycleave PCR O-157 (VT gene) Screening Kit Ver.2.0

b) stx2は4種類のプライマーセットを使用

c) Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キットおよびLoopampペロ毒素(VT)タイピングキット

d) (+); 検出感度が低い

各PCRの詳細は4. 参考文献の項を参照のこと

3) Loop mediated isothermal amplification (LAMP) 法

PCR と異なり反応終了後に電気泳動を行う必要がないため簡便な遺伝子検出法である。

以下のキットが利用できる。

- ・Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット（栄研化学）
- ・Loopamp ペロ毒素（VT）タイピングキット（栄研化学）：VT1 と VT2 を区別できる（各サブタイプの検出については表2の通り）。

対応機種：リアルタイム濁度測定装置（LoopampEXIA：栄研化学）。その他、同等の機能を有する機器が使用できる。

また、LAMP 法のキットを蛍光・目視検出試薬（栄研化学）と併用すれば、紫外線照射により遺伝子の増幅を確認できるため、Thermal cycler を用いても LAMP 法を行える。

なお、LAMP 法による遺伝子増幅量は極めて大きいため、反応チューブ廃棄時にはキャップが開かないよう十分に注意が必要である。いずれのキットで陰性となった場合も、検出できないあるいは検出感度が低いサブタイプがあることに注意する（表2）。

4) stx1a, stx1c, stx1d の共通領域, stx2a, stx2b, stx2c, stx2d, stx2e, stx2g の

共通領域および *stx2f* を標的としたマルチプレックスリアルタイム PCR 法（オリジナルプロトコールは Harada らおよび Tzschoppe らの参考文献を参照のこと。）

① Template DNA の作製（アルカリボイル法）

- ・チップ等の先端でコロニーを極微量掻き取って 25 mM NaOH 溶液 50 μ L に懸濁する。
- ・95°C で 5 分以上加熱し, 10,000 \times g で 1 分間遠心した上清に 4 μ L の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) を加えて使用する（精製 DNA を用いても可能）。
- ・コントロール DNA : *stx* 陽性株（各サブタイプの陽性コントロール株は国立感染症研究所・細菌第一部から分与可能である）

② Primer および Probe

標的	Primers および probes	配列 (5' to 3')
<i>stx1a</i> , <i>stx1c</i> , <i>stx1d</i> の共通領域	<i>stx1</i> forward primer	GGTTACATTGTCTGGTGACAGTAGCT
	<i>stx1</i> reverse primer	GCATCCCCGTACGACTGATC
	<i>stx1</i> probe	[NED]-ACGTTACAGCGTGTTC[MGB] ^a
<i>stx2a</i> , <i>stx2b</i> , <i>stx2c</i> , <i>stx2d</i> , <i>stx2e</i> , <i>stx2g</i> の共通領域	<i>stx2</i> forward primer	GAACGTTCCGGAATGCAAAT
	<i>stx2</i> reverse primer	CTCCATTAACGCCAGATATGATGA
	<i>stx2</i> probe	[VIC]-AGTCGTCACACTCACTGGT[MGB] ^a
<i>stx2f</i>	<i>stx2f</i> -815F	GTTCCGTGAGCCAAAAACAG
	<i>stx2f</i> -904R	TATTCGCTTCCCACAAAACA
	<i>stx2f</i> -Pr850	[FAM]-ATTGTTGGAGACAGGGCGGCCATT[IBFQ] ^b

^a TaqMan[®] minor groove binder (MGB)-probes (Applied Biosystems)

^b The fluorescence-labeled probes (Integrated DNA Technologies)

③ 反応液の組成

滅菌水 (PCR グレード)	7.6 μ l
Premix EX Taq TM (Perfect Real Time または Probe qPCR) [タカラバイオ]	12.5 μ l
<i>stx1</i> forward primer [25 μ M]	0.2 μ l
<i>stx1</i> reverse primer [25 μ M]	0.2 μ l

<i>stx</i> ₂ forward primer [25μM]	0.2 μl
<i>stx</i> ₂ reverse primer [25μM]	0.2 μl
<i>stx</i> ₂ f-815F [25μM]	0.2 μl
<i>stx</i> ₂ f-904R [25μM]	0.2 μl
<i>stx</i> ₂ f-Pr850 [25μM]	0.2 μl
<i>stx</i> ₁ probe [10μM]	0.5 μl
<i>stx</i> ₂ probe [10μM]	0.5 μl
ROX-I	0.5 μl
計	23 μl

反応液 23 μl に Template DNA 2 μl を加える。

④ 反応条件

Step1 : 95°C, 30 sec

Step2 : 95°C, 5 sec

Step3 : 60°C, 31 sec

Step4 : go to step 2 (total 30-35 cycles)

対応機種 : Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies) (その他の機種を使用する場合は、事前に妥当性評価を実施すること。)

5) その他のリアルタイム PCR プロトコール

リアルタイム PCR 法

市販の VT 遺伝子検出キットまたは公表されている Primer 及び Probe を各試験検査機関で合成・調製し市販の Master Mix にて反応を行う。これについて下記のもので利用できる。

- CycleavePCR O-157(VT gene) Screening Kit Ver. 2.0 (タカラバイオ)

対応機種 : Thermal Cycler Dice Real Time System II (タカラバイオ) 、

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies) 、 StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies) 、その他、同等の機能を有する機器が使用できる。

- ・CycleavePCR O-157(VT1/VT2) Detection Kit Ver. 2.0 (タカラバイオ) : VT1とVT2 を型別することが出来る。

b) VT 検出法

免疫学的に VT を検出する方法には、イムノクロマト (IC) 法、逆受身ラテックス凝集反応 (RPLA) 法、酵素抗体 (EIA) 法があり、それぞれ Duopath Verotoxins (Merck) 、キャピリアVT (タウンズ) 、NHイムノクロマトVT1/VT2 (日本ハム) 、VTEC-RPLA (デンカ生研) 、オーソ VT1/VT2 (オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス) が市販されている (表 3) 。

表3 VT検出法の比較

測定原理 ^{a)}	商品名 (メーカー)	検出毒素	主な操作と判定方法	所要時間 ^{b)}	必要な器具
IC	キャピリアVT (タウンズ)	VT ^{c)}	被検液100 μ Lを滴下する ラインの有無で判定	15分	
	Duopath Verotoxins (Merck)	VT1, VT2	被検液160 μ Lを滴下する ラインの有無で判定	20分	
	NHイムノクロマト VT1/VT2 ^{d)} (日本ハム)	VT1, VT2	被検液100 μ Lを滴下する ラインの有無で判定	15分	
RPLA	VTEC-RPLA (デンカ生研)	VT1, VT2	階段希釈した被検液 25 μ Lを試薬と混合する 凝集価1:4以上で陽性	16時間 (4-5時間で 推定的判定 は可能)	V型96穴プ レートが必要
EIA	オーソVT1/VT2 (オーソ・クリニカ ル・ダイアグノス ティックス)	VT ^{c)}	被検液, 一次抗体, 二次抗 体, 基質液を順次反応さ せる(各反応ごとに洗浄操 作が必要) 測定波長450nm, 対照波 長630nmで吸光度を測定 し0.150以上で陽性	3時間	2波長測定可 能なマイクロ プレートリー ダーが必要

a) IC: イムノクロマト法, RPLA: 逆受身ラテックス凝集反応, EIA: 酵素抗体法

b) 被検液調製に必要な時間は含まない

c) VT1とVT2の型別はできない

d) 食品検査用試薬

感染症法ではVTを産生する大腸菌をEHECとしており、毒素型の決定までは求めているが、上記製品のうちVTEC-RPLA、Duopath Verotoxins、NHイムノクロマトVT1/VT2はVT1、VT2の型別が可能である。

IC法は、試料滴下部に100または160 μ Lの被検液を滴下後15-20分後に判定できることから、迅速で簡便な方法として優れているが、検出感度はRPLA法に比べ4倍程度低い。また、IC法はキット間によっても検出感度及び特異性に差があることが報告されている。RPLA法は安価な上、検出感度は約1 ng/mLと高いが、被検液と試薬を混合後判定までに16時間以上静置する必要がある。EIA法はRPLA法と同程度かやや高い感度を有し約

3時間で判定できる。測定波長（450 nm）と対照波長（630 nm）で測定可能なマイクロプレートリーダーが必要であるが、多検体処理能力に優れている。

いずれの製品も被検液の調整には、BHI や SMAC などの寒天培地に発育したコロニーをポリミキシン B 溶液や検体希釈液に懸濁する方法と、CAYE 培地などの液体培地を用いる方法があり、製品によって菌量や培養条件が多少異なっている。菌株によっては、調整方法によってベロ毒素の検出感度に差が見られることがある。また、IC法やEIA法では、菌の濃度が極端に濃い場合や糞便からの直接毒素検出では偽陽性を示す場合がある。

VT2 サブタイプのうち、O157 に多い VT2c は VT2 に比べ RPLA 法の検出感度がやや低く、IC 法や EIA 法では検出されないことがある。ソルビトール非発酵性およびβ-グルクロニダーゼ陰性の典型的な性状を示す O157 で VT 陰性の場合には VT 遺伝子を確認することが望ましい。このほかのサブタイプについては、ヒト由来株での分離頻度は不明であるが、免疫学的に検出できないことも多い（表 4）。

表4 VT検出法によるstxサブタイプ検出能の比較

Subtype	EIA ^{a)}			RPLA ^{b)}			Duopath Verotoxins ^{c)}			NH-VT ^{d)}		
	被検株数	陽性	陰性 ^{e)}	被検株数	陽性	陰性 ^{e)}	被検株数	陽性	陰性 ^{e)}	被検株数	陽性	陰性 ^{e)}
1a	3	3		8	8		4	4		4	4	
1c	1	1		3	3		3	3		3	3	
1d	5	3	2	3	3		3	3		3	3	
2a	3	3		9	9		4	4		4	4	
2b	2		2	8	6	2	8		8	6		6
2c	10	4	6	13	12	1	12	7	5	10	1	9
2d	6	6		6	6		6	3	3	6	1	5
2e	7		7	10		10	6		6	6		6
2f	12		12	12	11	1	12		12	12	3	9
2g	2		2	2	1	1	2	1	1	1		1
Total	51	20	31	74	59	15	60	25	35	55	19	36

a) オートVT1/VT2を使用。TSB発育菌50μLを検体希釈液200μLに加えて混和後100μLを被検液とした。

b) VTE-RPLAを使用。CAYE培養液をポリミキシンB処理して被検液とした。

c) CAYE培養液をポリミキシンB処理して被検液とした。

d) NHイムノクロマトVT1/VT2を使用。CAYE培養液をポリミキシンB処理して被検液とした。

e) 実施ごとに判定が異なる場合は陰性とした。

(4) 血清型別

現在、大腸菌の O 抗原は O1-O188 まで（このうち O31, O47, O67, O72, O94, O122 は欠番となっており, O18ab, O18ac, O28ab, O28ac, O112ab, O112ac が存在するため合計 185 種類）定義されており、H 抗原は H1-H56 まで（このうち H13, H22,

H50 は欠番となっているため合計 53 種類) 定義されている。これらのフルセットの抗血清は SSI Diagnostica (国内代理店: ベリタス) から購入可能である。一方、デンカ生研から販売されている大腸菌免疫血清は O 血清が 50 種類、H 血清は 22 種類のみである。大腸菌の O 抗原は互いに免疫学的に交差する可能性があるため、稀な O 群の場合はフルセットを用いた確認または定量凝集反応法による O 群参照株との比較が必要である。

a) 菌体抗原 (O 抗原)

血液や糖を含まない培地で培養した純培養菌を生理食塩水に懸濁して 100℃で 60 分または 121℃で 15-60 分加熱処理を行った死菌液を抗原とし、スライド凝集反応で実施する。ただし、周辺が Rough 様のコロニーを用いて検査を行うと非特異的な凝集反応を起こす場合があるため、周辺が Smooth 様のコロニーを用いて検査するのが望ましい (コロニーの選択については、3. 血清学的診断法, (1) 抗原液の作製と保存の項を参照のこと)。

EHEC の代表的な O 群である O157 については、ラテックスに抗 O157 抗体を感作させた大腸菌 O157 検出キット UNI (OXOID) や E.coli O157-AD 「生研」(デンカ生研) が使用可能である。しかし、O157 抗原は *Salmonella* O30 および一部の *Citrobacter freundii* と血清学的に一致することから、分離培地上のコロニーから実施した場合は、大腸菌の分離・同定が必須である。

b) ベン毛抗原 (H 抗原)

クレイギー管を入れた半流動培地 (SIM 培地なども使える) で 3-5 回継代培養し、運動性を増強した菌を TSB などの液体培地に接種して静置培養後、等量の 1%ホルマリン加生理食塩水を加えて抗原液とする。凝集反応は試験管法で実施し、50℃の恒温水槽で 60 分反応させて凝集を観察する。

3. 血清学的診断法

EHEC が分離されない HUS 発症例においては、血清中の O 抗原凝集抗体の検出によって診断された場合も届出の対象となっている。O 抗原凝集抗体価は下痢発症後 5-6 日目に上昇することがわかっており (図 3)、発症直後と数日後のペア血清で抗体価の上昇を確認することが望ましい。HUS 発症後でも複数の血清について測定した方が良い。HUS と診断される前に採血される症例は少ないので、発症日は重要な情報となる。

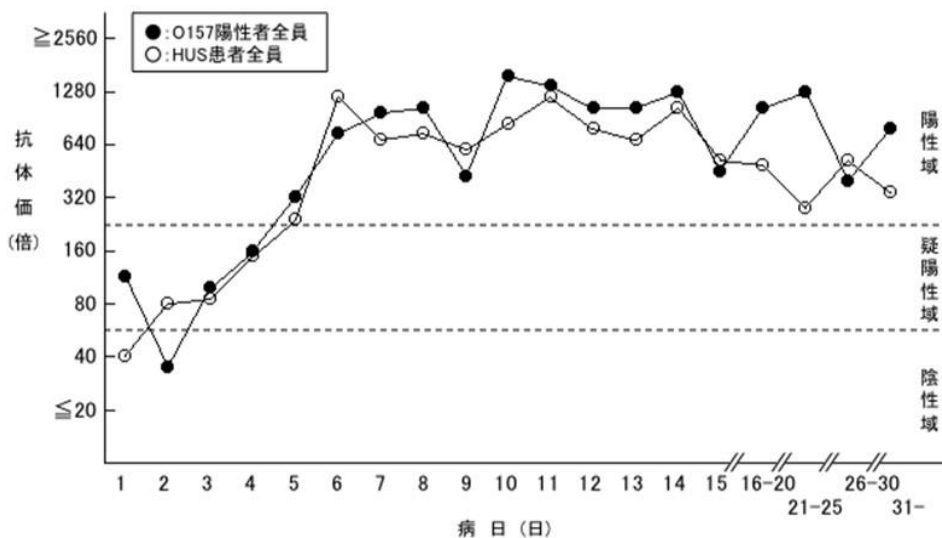


図3. 病日によるO157抗体価の変動(試験管法による判定)

EHEC O157陽性者およびHUS患者で、採血病日がわかっている検体について、病日ごとの抗体価の変動をグラフにしたところ、発症から4病日までは陰性—疑陽性域であるが、5—6病日には陽性域に達し、40—45日程度持続することが確認された小林ら。

O157LPS 抗体については、O157 チェック「LPS 抗体」(LSI メディエンス) が市販されており、ラテックス・スライド凝集反応により簡便に検出できる。本方法は民間の検査機関でも実施しているところがある。自家調整した加熱死菌液を抗原に用いた定量菌体凝集反応による抗体価測定法を以下に示す。

(1) 抗原液の作製と保存

- 1) EHEC 感染が疑われる HUS 患者から分離される EHEC のうち、国内で起因菌として分離頻度が高い7種類の大腸菌 O 群の分離株 (O157, O111, O26, O103, O121, O145, O165) を用いる^注。用いる菌株は、0.5% (W/V) アクリフラビンに非凝集性 (もしくは 100℃ 30 分加熱で非沈殿性)、または 1 mg/L の TTC (2, 3, 5-triphenyltetrazoliumchloride) を含む Antibiotic Medium No. 3 平板培地で Smooth 様集落 (実体顕微鏡観察で表面に凹凸が少なく、TTC の色素でよく染まっているもの) を選択するのが望ましい。
- 2) 深型シャーレに 1 cm 以上の厚さに作製したトリプトソイ寒天 (TSA) 培地 (または中試験管 [φ19 mm× 160 mm 程度の大きさのもの] に 10 mL の TSA を加えて斜面培地にしたもの) に菌を全面塗布して 37℃ 一夜培養する。

- 3) 2-5 mL の生理食塩水（生食水）または PBS に TSA 発育菌を全て掻き取って濃厚に懸濁し、121℃で 1 時間オートクレーブする。
 - 4) 遠心分離（スイングローター等で 1,500-2,000 ×g, 15 分間）後、上清を捨て再度 2-5 mL 程度の生食水または PBS に懸濁する。遠心洗浄をさらに 1-2 回繰り返す、最後に 200 ×g, 5 分間遠心し、上清に 2%ホルマリン加生食水（PBS）を等量加え、37℃で 1 時間静置したものを抗原とする。作製した抗原は 4℃で数ヶ月は保存可能である。
- 抗原液の標準化：抗原液は、あらかじめ市販の大腸菌免疫血清を用いて、凝集価を測定しておく。新しく抗原液を作製した場合は、同一ロットの抗血清で同じ凝集価を示すことを確認してから使用する。
- 5) 使用に際しては生食水または PBS で遠心洗浄し、濁度を McFarland No.3.0 となるように調整し、抗原液とする。

(2) 血清の非働化

HUS 患者血清は 56℃ 30 分で非働化し、10,000 ×g で 1 分間程度遠心した後の上清を使用する。

(3) 抗体価測定法

a) 試験管法

- 1) ガラス試験管（12 mm × 90 mm）を、使用する抗原数（ここでは 3 種類） × 8 列並べ、1 列の 1 本目に生食水 1,080 μL を、1 列の 2-8 本目に生食水 600 μL を分注する。
- 2) 1 列の 1 本目に血清 120 μL を加えて 10 倍希釈液とし、よく混合した後 600 μL を 2 本目へ移し、2-8 本目まで 2 倍階段希釈する。
- 3) 1 列目の希釈液を 200 μL ずつ 2 列目と 3 列目に移す。
- 4) 各列に、濃度を調整した抗原液を各 200 μL 加える（血清の最終希釈濃度は 20 倍から 2,560 倍までとなる）。別の試験管に生食水 200 μL と抗原液 200 μL を加え、抗原液だけの対照とする。
- 5) 試験管立てごと軽く揺すって混合し、50℃の恒温水槽で一夜静置する。
- 6) 凝集の有無を観察し、凝集を示した血清の最終希釈倍数を抗体価とする。

b) 96 穴プレート法

- 1) 血清の希釈は試験管法と同様に 10 倍希釈から 1,280 倍希釈まで行う（容量は血清量または検査する抗原の種類によって適宜変更する）。
- 2) U 底または V 底の 96 穴プレート（ふた付き、コーティングなし）に抗原 25 μ L と希釈血清 25 μ L を加え、プレートミキサー等で十分混和する（血清の最終希釈濃度は 20 倍から 2,560 倍までとなる）。
- 3) 50°C で 1 時間静置する。
- 4) 室温に戻して 1 – 2 時間後に凝集の有無を観察し、血清の最終希釈倍数を抗体価とする。最終判定は室温で一夜放置後、翌日に行う。陽性コントロールとしてデンカ生研の大腸菌免疫血清に各抗原液を混合したもの、陰性コントロールとして生食水または PBS に各抗原液を混合したものをそれぞれ使用し、凝集の有無を確認する。

(4) 判定

- ・ 判定は以下の通り行う。

試験管法：抗体価陽性域は最終希釈倍率が 320 倍以上、80-160 倍は疑陽性域、40 倍以下は陰性域と判定する。

96 穴プレート法：抗体価陽性域は最終希釈倍率が 160 倍以上、40-80 倍は疑陽性域、20 倍以下は陰性域と判定する。

- ・ 疑陽性域の場合は、採血日の異なる血清で再検査をすることが望ましい。（図 3 照）
- ・ 陽性コントロール、陰性コントロールの結果を確認する。
- ・ 特定の O 抗原に凝集が見られることを確認する（ただし、2 種類以上の O 抗原に対して凝集が見られる血清も存在する）。
- ・ RPLA 法と同じく「地帯現象」により、血清濃度の高いところで陰性に見える場合があるので、希釈倍率の高いウエルもよく観察する。

注：状況に応じて使用する抗原の種類を決定する。集団発生等ですでに特定の O 群の EHEC が分離されている場合などは、当該 O 群と代表的な O 群（O157, O26, O111 など）に絞る。国内の HUS 事例のおよそ 80% は O157 の EHEC が原因となっており、O26 と O111 を併せた 3 種類の EHEC で全体のおよそ 85% を占める。使用する分離株には指

定はないが、検査ごとに陽性コントロール（デンカ生研の大腸菌免疫血清による凝集あり）および陰性コントロール（生食水または PBS による凝集なし）の結果を確認する。

4. EHEC の陰性確認方法

EHEC の陰性確認法については、厚労省通知「感染症の病原体を保有していないことの確認方法について」（平成 11 年 3 月 30 日健医感発第 43 号）で、

- ・ 患者については、24 時間以上の間隔を置いた連続 2 回（抗菌剤を投与した場合は服薬中と服薬中止後 48 時間以上経過した時点での連続 2 回）の検便によって、いずれも病原体が検出されなければ病原体を保有していないものと考えてよい。
- ・ 無症状病原体保有者については、1 回の検便によって菌陰性が確認できれば病原体を保有していないものと考えてよい。

とされているが、病原体の検出法については記載がない。本マニュアルでは、病原体の検出法として適宜 PCR 法または LAMP 法を取り入れることを以下の通り提案したい。

（1）地衛研での陰性確認実施状況について

2021 年 8-9 月に全国 79 施設の地方衛生研究所または保健所へ EHEC の陰性確認についてのアンケート調査を依頼し、57 施設から回答を得た。その結果、EHEC の分離確認法として、*stx* の保有確認を PCR 法または LAMP 法で実施している、あるいは実施すべきまたは実施可能と回答したのが計 39 施設、実施すべきでないと回答したのが 4 施設あった。すでに実施していると回答した施設のうち、3 施設では便からの増菌培養液からアルカリポイル抽出した DNA を鋳型にした PCR 法のみで陰性確認を実施していると回答があった。PCR 法または LAMP 法による分離確認を実施している多くの施設では、選択分離培地上のコロニースライプ法を実施していると回答があった。

（2）陰性確認法の提案

以上のアンケート調査結果を元に、以下の通り PCR 法または LAMP 法を用いた陰性確認方法を提案したい。

1) 先行分離株の性状確認

便からの陰性確認にあたっては、先行して分離されている EHEC が存在すると考えられるため、分離されている EHEC 株の性状をよく見極めることが重要である。分離 EHEC 株の O 群毎に

選択分離培地の使用を検討し、これらが利用可能である場合には培養法（2. (2) a) 参照）のみでの確認も可能とする。

2) PCR 法または LAMP 法の導入段階について

先行して分離されている EHEC 株の O 群等の情報から、増菌培養後の PCR 法または LAMP 法のみで陰性確認が可能であると判断される場合には、便からの増菌培養後の PCR または LAMP による確認のみ（あるいは選択分離培地上のコロニースweep PCR または LAMP 法）で陰性確認が可能であるものと考えられる。ただし、増菌培養液を用いた PCR が陽性となった場合には、死菌を検出している可能性があるため、これに加えて選択分離培地上のコロニースweep PCR または LAMP 法での陰性確認を必要とする。

3) 培地および PCR の手法等について

便からの増菌培養および選択分離として用いる培地の種類についてはケース・バイ・ケースとするが、感染研・細菌第一部で HUS 症例の患者便等から EHEC を分離する場合には以下の方法を実施しているので参考にされたい。なお、PCR の手法（コンベンショナル、リアルタイム）等については各施設でこれまで実績のある手法の中から選択可能とする。

①増菌培養

ノビオシンを最終濃度 20 mg/L に加えた mEC、BPW（緩衝ペプトン水）、TSB 等を用い、これらの培養液からアルカリボイル法によって抽出した DNA を鋳型に PCR を実施して EHEC の有無を確認する。

②平板培地

EHEC 用各種選択分離培地、マッコンキー寒天培地、DHL、SS、XM-G 等のプレートに便を直接塗抹し、得られたコロニーを用いて PCR 法を実施する。増菌液で PCR 陽性となり、便からの直接塗抹プレート上で陽性のコロニーが分離できない場合は、増菌液をこれらの平板培地上へ接種して得られるコロニーについて再度 PCR 等で分離確認を実施する。

上記の陰性確認方法については最終版ではありません。ご意見等ありましたら、下記宛てにご連絡下さい。

連絡先：感染研・細菌第一部・伊豫田 淳 email: siyoda@niid.go.jp

5. 参考文献

Fukushima H, Gomyoda M. An effective, rapid and simple method for isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from faeces and food samples. Zentralbl. Bacteriol. 1999, 289: 415-428.

Grant MA. Comparison of *Escherichia coli* O157:H7 enrichment in spiked produce samples. J. Food Prot. 2008, 71: 139-145.

Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton-Celsa AR, Sanchez M, Persson S, O'Brien AD. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. J Clin Microbiol. 2012, 50: 2951-2963.

Lin Z, Kurazono H, Yamasaki S, Takeda Y. Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. Microbiol Immunol. 1993, 37: 543-548.

Cebula TA, Payne WL, Feng P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. J Clin Microbiol. 1995, 33: 248-250.

Harada T, Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y. Multiplex Real-Time PCR Assays for Screening of Shiga Toxin 1 and 2 Genes, Including All Known Subtypes, and *Escherichia coli* O26-, O111-, and O157-Specific Genes in Beef and Sprout Enrichment Cultures. J Food Prot. 2015, 78: 1800-1811.

Karch H, Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct

Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1989, 27: 2751-2757.

Tzschoppe M, Martin A, Beutin L. A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145, and O157 strains and the aggregative EHEC O104: H4 strain from ready-to-eat vegetables. Int. J. Food Microbiol. 2012, 152: 19-30.

小林一寛, 田口真澄, 勢戸和子, 吉矢邦彦, 村上城子.
下痢患者におけるペロ毒素産生性大腸菌血清学的診断法について.
感染症学雑誌 1996, 70: 80-88.

6. 参考資料

(1) 免疫磁気ビーズの作製方法

ここでは、大腸菌 O 群に対応する免疫磁気ビーズをダイナル社の二次抗体結合ビーズ処理マニュアルに従って作製する。

a) 準備するもの

Dynabeads M-280

10 mL 洗浄液

(組成)

NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.18 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.98 g
NaCl	8.10 g
H ₂ O	1,000 mL
FCS (ウシ胎児血清)	1.00% (56℃で 30 分間非動化してから使用)
NaN ₃	0.02%

免疫磁気ビーズ保存液

洗浄液と同じ組成であるが、FCS の濃度を 0.1%とする。

大腸菌 O 群免疫血清 (デンカ生研)

分離培地

b) ビーズの感作方法

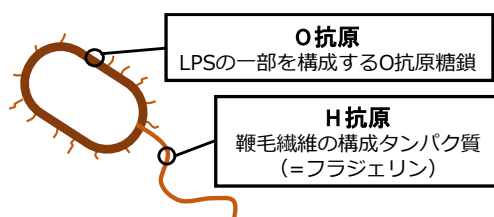
- ① Dynabeads M-280 500 μL をマイクロチューブに入れ、磁石で集め、浮遊液をマイクロピペットで除去し、洗浄液を 500 μL 入れて再浮遊させる。これを 3 回繰り返す。
- ② このビーズ浮遊液に対象とする大腸菌 O 群の免疫血清 10 μL を加える。加える免疫血清量の目安は 2 μg antibody/ 10^7 ビーズである。(正常家兎全血清中の IgG 量が約 20 mg/mL であることから、ビーズ浮遊原液 1 mL (10^8 ビーズ/mL に対して免疫血清 1 μL で十分と考えられる)
- ③ 4°C 18 時間の条件で穏やかに振とうする。
- ④ 免疫磁気ビーズを磁石で集め、①と同様の操作で、洗浄液で 5-6 回洗浄する。
- ⑤ 最後に磁石で集めたビーズを保存液に浮遊させ、4°C で保管する。
- ⑥ 作製したビーズが対象とした O 群の大腸菌を回収できるか、添加回収試験等で検証する。
- ⑦ 保管期限は明らかではないため、実際に使用する際には、必ず陽性コントロールをたてる。陽性コントロールには、同一の O 群大腸菌株を使用する(VT 遺伝子を保有しない株があればそれを使用する)。

(2) PCR 法による O 血清群と H 型の判定法

大腸菌の O 血清群 (以下、O 群と略す) と H 型は、それぞれに特有な遺伝子または塩基配列を標的とした PCR 法により型別することができる。本稿の前半 (a~e) では血清型と PCR 法の概要を、後半 (f~k) では判定原理や応用法などの詳細を解説する。

a) 血清型の種類

大腸菌の血清型 (serotype) は、O 群 (O-serogroup) と H 型 (H-type) を組み合わせた「O : H」により表される。O 群と H 型は、それぞれ菌体表層に発現する LPS の一部を構成する O 抗原糖鎖 (O 抗原) と、運動器官である鞭毛の繊維部分を構成するタンパク質・フラジリン (H 抗原) の構造的な多様性を免疫学的に識別したときの分類である (図 A)。



図A. O抗原とH抗原

大腸菌の血清型は、現在のところデンマーク国立血清学研究所（Statens Serum Institute : SSI）により、O1 から O188 までの O 群（185 種類）と、H1 から H56 までの H 型（53 種類）が国際的に定められており、その組み合わせは計算上 9,800 パターンを超える（表 A）。本法は大腸菌を種内で細かく分類できることから、疫学的に関連性のある分離株間で血清型が同じであった場合は、同一起源から分岐して間もないクローン株であると推測できる。また、疫学的な関連性の無い場合でも同じ血清型であった場合は、共通祖先から分岐した（共通するゲノム構造や病原性を保持する）近縁株であると予想できる。このような背景から、血清型別（または O 群分類）は病原性大腸菌の集団感染事例や流行型の調査、分離株の整理などに用いられ、報告書や論文においても分離株の特徴として血清型別の結果を付けることが一般化している。

表A. O群とH型の種類

血清型分類	標的抗原	種類	備考
O群	O抗原	O1 - O188 (185種類)	亜型 : O18ab/ac, O28ab/ac, O112ab/ac 欠番 : O31, O47, O67, O72, O94, O122
H型	H抗原	H1 - H56 (53種類)	欠番 : H13, H22, H50

ただし、SSI が提供する完全タイピング用の抗血清をそれぞれの検査室や研究機関で揃えることは経済的に難しく、分離株の詳細な血清型を判定できない場合がある。近年、血清型別の代替法として利用できる PCR 法が開発されており、比較的安価で広域な型別が可能となっている。本マニュアルでは、大腸菌の血清型を型別できる PCR 法について解説する。

b) *E. coli* Og-typing PCR の概要

それぞれの O 群に特有な塩基配列を標的としたプライマーにより、O 群に対応した遺伝子型 (O-genotype = Og 型) を PCR 法 (*E. coli* Og-typing PCR) で判定できる。現在、O1 から O187 に対応した 162 種類の定型 Og 型と、上記以外の 42 種類の非定型 Og 型を判定できるプライマーペア (全 204 種類)、さらに、それらを組み合わせた 27 種類のプライマーミックス (MP-1 から 27) によるマルチプレックス PCR 法が利用できる (図 B)。

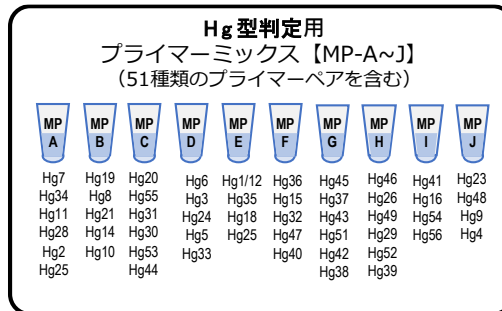


図B. *E. coli* Og-typing PCRのマルチプレックスPCR用プライマーミックスの組み合わせ

プライマー配列と産物サイズ、プライマーミックスの組み合わせと調整方法等を別表 (40 ページ参照) に示す。EHECに関連する主要 7 種類の Og 型 (Og26、Og103、Og111、Og121、Og145、Og157、Og165) の判定プライマーは MP-1 に集約している (図 B)。

c) *E. coli* Hg-typing PCR の概要

それぞれの H 型に特有な塩基配列を標的としたプライマーにより、H 型に対応した遺伝子型 (H-genotype = Hg 型) を PCR 法 (*E. coli* Hg-typing PCR) で判定できる。現在、H1 から H56 に対応した 51 種類の Hg 型を判定できるプライマー、さらに、それらを組み合わせた 10 種類のプライマーミックス (MP-A から J) が利用できる (図 C)。



図C. *E. coli* Hg-typing PCRのマルチプレックスPCR用プライマーミックスの組み合わせ

プライマー配列と産物サイズ、プライマーミックスの組み合わせと調整方法等を別表（40 ページ参照）に示す。EHEC では運動性が無く H-と判定される菌株も多いが、標的配列がゲノム上に残っていれば本来のH型に相応なHg型が判定できる（詳細は後述する）。EHEC に関連する主要な11種類のHg型（Hg2、Hg7、Hg8、Hg10、Hg11、Hg14、Hg19、Hg21、Hg25、Hg28、Hg34）の判定プライマーは、MP-AとBに集約している（図Cおよび表B）。

表B. EHECの主なO群とそれぞれに関連するH型/Hg型

O群	関連する 主なH型/Hg型	これまでに報告のある 他のH型/Hg型
O157	H7/Hg7	
O26	H11/Hg11	
O111	H8/Hg8	H11/Hg11, H21/Hg21
O103	H2/Hg2	H11/Hg11, H25/Hg25
O121	H19/Hg19	
O145	H28/Hg28	H25/Hg25, H34/Hg34
O165	H25/Hg25	
O45	H2/Hg2	
O91	H14/Hg14	H21/Hg21
O178	H19/Hg19	

d) PCRの実施方法 (*E. coli* Og-/Hg-typing PCR 共通)

①テンプレートDNA

市販キットなどにより精製して調整したDNA（1~10 ng/μL）やアルカリ熱抽出法により準備したDNAを用いることができる。また、純培養液や寒天平板培地上のコロニーを反応液に直接加えることでも判定できる。ただし、マルチプレックスPCR法ではDNA濃度が高い場合や菌量が多い場合は非特異的バンドの出現に繋がるので、調整が必要となる。

②PCR 試薬

単独およびマルチプレックス PCR には、各社から販売されている標準的な PCR 試薬が利用できる。これまでに、DreamTaq Green DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific)、KAPATaq EXtra PCR Kit (日本ジェネティクス)、TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ)、GoTaq Hot Start Polymerase (プロメガ) などでの実用報告がある。

③単独 PCR 法

分離株が予想される Og 型や Hg 型であるか否かを判定するには、単独プライマーペアを用いた PCR 法 (単独 PCR 法) が利用できる。確認のために、陽性コントロールとして対象 Og 型または Hg 型の DNA を加えて実施することが望ましい。反応液組成および反応温度の例を表 C に示す。

表C. 単独PCRの反応液組成の例
(DreamTaq Green DNA Polymeraseを用いた場合)

反応試薬など	1反応 (μL)	備考
PCR grade water	10	
DreamTaq Master mix (2x)	15	
F-primer (10 μM)	1.5	最終濃度は0.5 μM
R-primer (10 μM)	1.5	最終濃度は0.5 μM
Template DNA	2	精製DNAの場合は1-10 ng/μLが適当
Total	30	

反応条件の例 (全ての単独 PCR に共通)

[94°C-20 秒 + 58°C-20 秒 + 72°C-1 分] × 25 サイクル

*サイクル前の変性 (94°C) とサイクル後の伸長 (72°C) は必要としない

④マルチプレックス PCR 法

分離株の Og 型や Hg 型が不明な場合は、広域かつ効率的な型別が可能なマルチプレックス PCR が有効である (図 B)。反応液組成および反応温度の例を表 D に示す。加えるプライマーミックスは別表 (40 ページ参照) の通りに事前調整して使用すると効率が良い。増幅産物のサイズの読み間違いが起こらないように、サイズマーカーとともに 100 から 1,000 bp が十分に展開するように電気泳動する (図 C)。マルチプレックス PCR の性質上、100 bp 以下または 1,500 bp 以上に非特異的な増幅が観察されることもあるが、Og 型および Hg

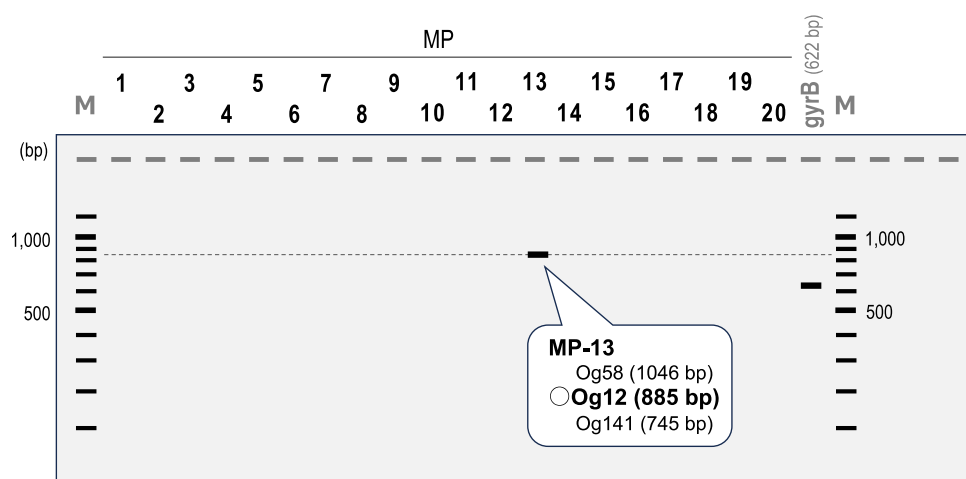
型の判定には影響しないので無視してよい。

表D. マルチプレックスPCRの反応液組成の例
(DreamTaq Green DNA Polymeraseを用いた場合)

反応試薬など	1反応 (μL)	備考
PCR grade water	10	
DreamTaq Master mix (2x)	15	
調整済みプライマーミックス	3	それぞれのプライマーの最終濃度は0.2 μM (一部は0.4μM)
Template DNA	2	精製DNAの場合は1-10 ng/μLが適当
Total	30	

反応条件の例 (全てのマルチプレックス PCR に共通)

94℃-1分 + [94℃-30秒 + 58℃-30秒 + 72℃-1分] × 25 サイクル + 72℃-2分



図D. *E. coli* Og-typing PCR プライマーミックスMP-1~20 (+*gyrB*) を用いた際の電気泳動像のイメージ

⑤大腸菌特異的 *gyrB* プライマーの使い方

DNA ジャイレースのβサブユニットをコードする *gyrB* は、全ての細菌に保存されている。別表 (40 ページ参照) に示す *gyrB* プライマーは、*gyrB* 上の大腸菌に特異的な塩基配列を標的としており、*E. albertii* や *E. harmanii* では増幅せず (または、わずかにしか増幅せず)、*Escherichia* 属以外でも増幅しない。マルチプレックス PCR を行う際には、大腸菌であることを確認するとともに、テンプレート DNA の濃度や品質に問題がないか、PCR 反応が良好に行われたかを確認するために、*gyrB* プライマーを追加して反応から泳動確認までを同時に実施することが望ましい (図 D)。

e) PCR 法によって得られた結果の表し方

菌株の血清型に関する正しい情報を共有するためには、表現型と遺伝子型の結果を区別して表記する必要がある。例えば、O 抗原を発現していない rough 型株や鞭毛を発現していない非運動性株は、Orough や HNM (non-motile) または H-と表されるが、PCR 法の標的となる遺伝子が保存されている場合は、本来の O 群または H 型に対応した Og 型または Hg 型が判定できる。つまり、表現型と遺伝子型が不一致となるケースもあることから、表現型と遺伝子型を区別して表記することが望ましい。また、PCR 法によって判定できなかった（いずれのマルチプレックス PCR を用いても増幅が確認できなかった）場合は、OgUT または HgUT (untypeable) と表現する（Og の場合は使用した MP の範囲を明示する）。未実施の場合は OgNT または HgNT (not tested) と表現する。

表E. 血清型と遺伝子型の表記例

O群	H型	血清型	Og型	Hg型	遺伝子型	まとめた表記
O1	H7	O1:H7	Og1	Hg7	Og1:Hg7	O1/Og1:H7/Hg7
OUT	HNT	OUT(:HNT)	OgN34	Hg45	OgN34:Hg45	OUT/OgN34:Hg45
O165	H-	O165:H-	Og165	Hg25	Og165:Hg25	O165/Og165:H-/Hg25
OUT	H21	OUT:H21	Og188	HgNT	Og188(:HgNT)	OUT/Og188:H21

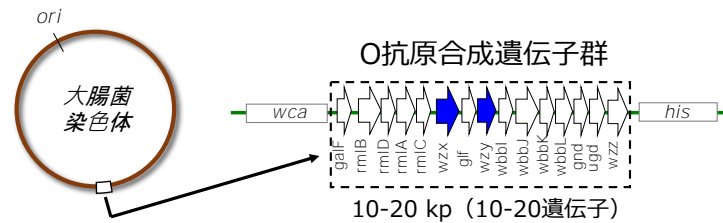
*カッコ内の結果は表記しなくても良い

後述するように、2種類のOg型およびHg型が確認される場合がある。その時の結果は2種類の遺伝子型を「+（プラス）」で繋いで併記する（例：Og8+Og156、Hg3+Hg21）。2種類の遺伝子型が確認された場合は培養液またはテンプレートDNAのコンタミネーションも疑われるので、場合によっては再培養して生育した単一コロニーを用いて確認を行う。

f) *E. coli* Og-typing PCR 標的遺伝子の特徴

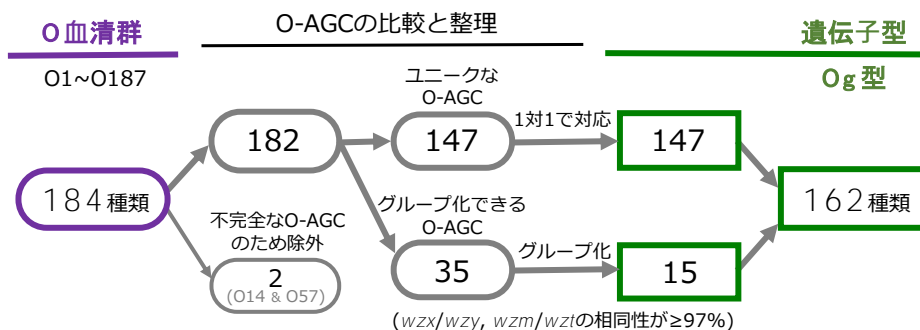
O 抗原の合成には 10-20 個程度の遺伝子が関与し、その多くは染色体上の決まった位置に O 抗原合成遺伝子群 (O-antigen biosynthesis gene cluster, O-AGC) として存在する (図 D)。O-AGC には糖鎖ユニットの輸送と連結に関わる 2 種類の遺伝子ペア [wzx/wzy (O-antigen flippase/O-antigen polymerase) または wzm/wzt

(ABC transporter) のどちらか一方が必ず含まれる。wzx/wzyとwzm/wztの大半は、異なるO群間では塩基配列が大きく異なり、後述する一部の例外を除いては、最も似ている組み合わせであってもDNAの相同性は70%を下回る。このような特徴から、wzx/wzyとwzm/wztは、O群を識別するマーカー遺伝子として用いられる。



図D. O抗原合成遺伝子群のイメージ

O1からO187（184種類）のO-AGCを比較すると、図Eおよび表Fのように整理できる。O14とO57のO-AGCは大部分が欠失しているため、識別できるマーカー遺伝子が存在しない。上記2種類はO抗原を発現しておらず（いわゆるrough型）、おそらくLPSのRコア部分が抗原となり識別されている。残る182種類のうち、147種類のO-AGCはユニークで、35種類は他のO群と相同または近似したO-AGCを共有し、表Fに示す15種類（Gp1からGp15）にグループ化できる。グループ内のwzx/wzyまたはwzm/wztの塩基配列の相同性は、それぞれ97~100%と非常に高く、マーカー遺伝子だけでO群を区別するのは難しい。以上の結果をまとめると、O14とO57を除く182種類のO群は、162種類のOg型と紐付けて整理できる。



図E. O群（O1~187）とOg型の関係

表F. 遺伝学的にグループ化された15種類のOg型

Og型	グループ名	O-AGC (wzx/wzyまたはwzm/wzt) が 相同または近似するO群
OgGp1	Og1	O20, O137
OgGp2	Og2	O28ac, O42
OgGp3	Og3	O118, O151
OgGp4	Og4	O90, O127
OgGp5	Og5	O123, O186
OgGp6	Og6	O46, O134
OgGp7	Og7	O2, O50
OgGp8	Og8	O107, O117
OgGp9	Og9	O17, O44, O73, O77, O106
OgGp10	Og10	O13, O129, O135
OgGp11	Og11	O153, O178
OgGp12	Og12	O18ab, O18ac
OgGp13	Og13	O124, O164
OgGp14	Og14	O62, O68
OgGp15	Og15	O89, O101, O162

g) 定型 Og 型と非定型 Og 型

O1 から O187 の O-AGC より整理された 162 種類の Og 型を「定型 Og 型」とし、それら以外の Og 型を「非定型 Og 型」として区別している。基本的には、定型 Og 型の wxz/wzy または wzm/wzt との塩基配列の相同性が 70%未満の O-AGC に対して新規 Og 型名が付与されている。ゲノム解析などから、これまでに 60 種類以上の非定型 Og 型が見つかっており、それらの多くは O1 から O187 とは異なる構造の O 抗原を発現していると予想され、SSI が提供する完全タイピング用の抗血清を用いた凝集試験でも型別できない場合が多い（一部に型別できるものもある）。つまり、非定型 Og 型の多くには対応する O 群が存在しないため（O 抗原は発現しているが、O 群として規定されていない）、ゲノム解析や遺伝子検査によってのみ型別できる。SSI において O189 以降の新規 O 群の追加は現在のところ予定されていない。

E. coli Og-typing PCR では、これまでに 42 種類の非定型 Og 型に対する判定プライマーがデザインされており、マルチプレックス PCR 用のプライマーミックス MP-21 から 27 に組み込まれている。この 42 種類には、2015 年に追加された O188（ボイド赤痢菌 type 16 と相同）、後述する赤痢菌にユニークな Og 型、Og48 および OgN16 のバリエーション（それぞれ Og48va および OgN16va。プロトタイプとの塩基配列の相同性は 70%以上-90%未満）を検出するプライマー、および Og70 判定用の新規プライマー（MP-15 内の Og70 プライマー）

ーでは、一部の Og70 を検出できないことが判明したため、すべての Og70 を判定できるプライマーをデザインして MP-24 に追加) が含まれる。

井口らのグループでは新規 Og 型に対して「OgN+番号」を付与しているが、他のグループが先行して新規 O-AGC を発表している場合は、彼らが命名した名称または対象株名を Og 型名に使用している。

h) 大腸菌の O 群と赤痢菌の血清型

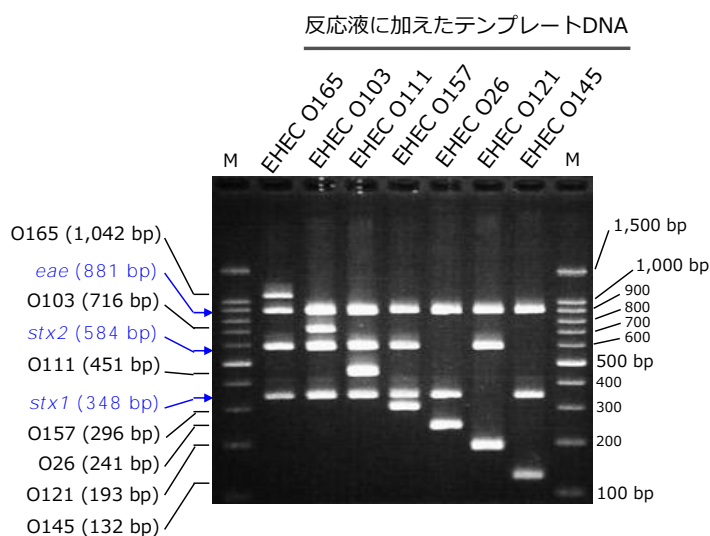
赤痢菌は、志賀赤痢菌 (*Shigella dysenteriae* : SD)、ボイド赤痢菌 (*Shigella boydii* : SB)、フレクスナー赤痢菌 (*Shigella flexneri* : SF)、ソンネ赤痢菌 (*Shigella sonnei* : S) の 4 菌種から成り、少なくとも 44 種類 (SD で 14 種類、SB で 17 種類、SF で 12 種類、SS で 1 種類) の血清型が認められている。赤痢菌は運動性が無く、赤痢菌の菌体抗原を標的とする「血清型」は大腸菌の「O 群」に相当する。赤痢菌と大腸菌は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列では区別できず、これまでのゲノム解析等により、赤痢菌は大腸菌の内部に存在するいくつかの特定系統群であることがわかっている。大腸菌と赤痢菌の間では O-AGC や O 抗原糖鎖の構造も重複することが知られている。O1 から O188 の大腸菌 O 群と 44 種類の赤痢菌血清型を比較すると、34 種類の O-AGC が重複し、その多くで免疫血清も交差して凝集する。上記 44 種類の赤痢菌血清型の O-AGC を整理すると 34 種類の Og 型が認められ、これらのすべてを定型 Og 型 (23 種類) と非定型 Og 型 (11 種類) の判定プライマーで判定できる (別表 : 40 ページ参照)。つまり、*E. coli* Og-typing PCR 法は大腸菌と赤痢菌に横断した包括的な Og 型判定法としても利用できる。

i) 2 種類の O-AGC を保有する大腸菌

稀ではあるが、1 株が 2 種類の O-AGC を保有する場合がある。*E. coli* Og-typing PCR により Og8 と OgSB17 の 2 種類が検出された大腸菌のゲノム解析を行ったところ、染色体上の通常の遺伝子座に 2 つの完全な O-AGC がタンデムに挿入していた。2 種類の Og 型が検出される場合、Og8 との組み合わせを見かけることが多い (Og8+OgSB17 に加え、Og8+Og27 や Og8+Og32 など)。他に、Og100+Og154 や Og102+Og120 などの組み合わせも見つかっている。凝集試験においては、いずれかの Og 型に対応した O 群に判定されることが多い。

j) EHEC のワンショット PCR

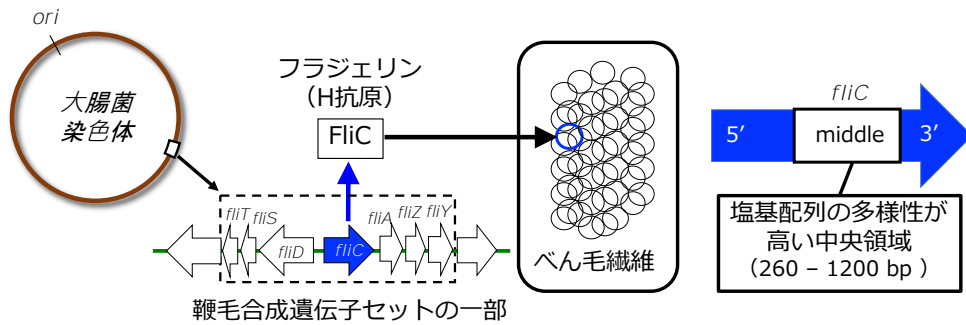
EHECに関連する主要7種類のO群（O157、O26、O111、O103、O121、O145、O165）と3種類の病原遺伝子（*stx1*、*stx2*、*eae*）を1本の反応チューブで検査できる反応系（MP-1 plus）が利用できる。具体的には、*E. coli* Og-typing PCRのMP-1に、*stx1*、*stx2*、*eae*の検出プライマーを加えたマルチプレックスPCR法となる（図F）。調整方法等を別表（40ページ参照）に示す。



図F. MP-1 plusを用いた電気泳動像

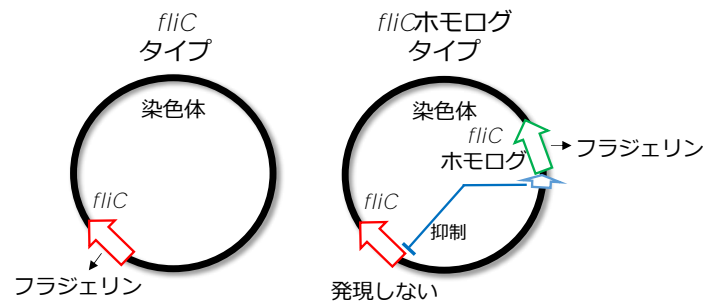
k) *E. coli* Hg-typing PCR 標的遺伝子の特徴

運動器官である鞭毛は、基部、フック、繊維の3つの構造からなる。プロペラの役割を果たす鞭毛繊維は、*fliC*（またはそのホモログ）によってコードされるフラジリンと呼ばれるタンパク質がらせん状に積み重なった構造をとる（図G）。繊維の表面に露出した部分のアミノ酸配列は多様性に富んでおり、この構造的な違いがH型の多様性を生み出している。多様性領域は*fliC*の中央部分にあり、異なるH型間では最も似ている組み合わせであっても相同性90%を下回るものがほとんどである。このような特徴から、*fliC*の中央領域はHg型を判定するPCR法の標的配列として用いることができる。ただし、H1とH12の*fliC*は塩基配列の相同性が98%以上あり、PCR法での区別は難しいため、Hg1/12にまとめられた。



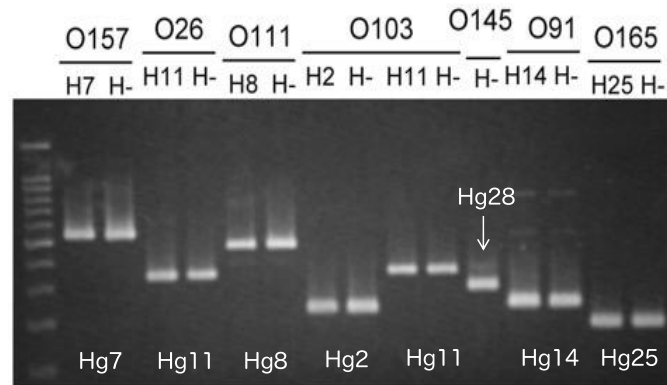
図G. 鞭毛繊維コード遺伝子 (*fliC*) の特徴

9 種類の H 型では、*fliC* とは異なる遺伝子座に挿入した *fliC* ホモログ (*flkA* など) によってフラジェリンがコードされている (*flkA* : H3、H35、H36、H47、H53、*fliA* : H44、H55、*flnA* : H17、*flmA* : H54)。*fliC* ホモログはプロファージなどの外来性領域に含まれ、*fliC* ホモログを獲得した菌株はその染色体上に *fliC* も保有する (図 H)。*fliC* と *fliC* ホモログが共存する場合、通常は *fliC* の発現は抑えられ、*fliC* ホモログがフラジェリンを発現する。つまり、H 型 (表現型) は *fliC* ホモログの遺伝子型と一致することになる。



図H. *fliC* と *fliC* ホモログの関係

鞭毛の合成には 40 種類以上の遺伝子が関与する。そのいずれかが欠失や変異によって発現なくなると、鞭毛は合成されず運動性を失うため H 型を判定できない。しかし、このような場合であっても PCR 法の標的となる *fliC* 遺伝子は完全に保存されていることが多く、本来の H 型に対応した Hg 型を判定できる。図 I では、主要な O 群に属する EHEC の Hg 型判定の結果を示す。



図I. 運動性の無い菌株 (H-) のHg型判定の結果

I) 参考文献

- 1) Iguchi A, Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, Hayashi T, Thomson NR. A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Research* 22(1):101-107 (2015)
- 2) Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, and Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan. *Escherichia coli* O-genotyping PCR; a comprehensive and practical platform for molecular O-serogrouping. *Journal of Clinical Microbiology* 53(8):2427-2432 (2015)
- 3) 井口純、秋吉充子、伊豫田淳、大西真、腸管出血性大腸菌の主要な O 血清群と病原性遺伝子を判定する One-shot マルチプレックス PCR 法の開発と評価、日本食品微生物学会雑誌 32(4):215-218 (2015)
- 4) Banjo M, Iguchi A, Seto K, Kikuchi T, Harada T, Scheutz F, Iyoda S; Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan. *Escherichia coli* H-genotyping PCR; a complete and practical platform for molecular H-typing. *J Clin Microbiol.* pii: JCM.00190-18 (2018)
- 5) Iguchi A, Nishii H, Seto K, Mitobe J, Lee K, Konishi N, Obata H, Kikuchi T, Iyoda S. Additional Og-typing PCR techniques targeting *Escherichia coli*-novel and *Shigella*-unique O-antigen biosynthesis gene clusters. *J*

7. 検査依頼先

各都道府県の地方衛生研究所・保健所等を対象とする。

8. 執筆者一覧

2024年8月改訂版著者（所属）

井口 純（宮崎大学）
齊藤 里美（岩手県環境保健研究センター）
岩渕 香織（岩手県環境保健研究センター）
窪村 亜希子（国立感染症研究所）
原田 哲也（大阪健康安全基盤研究所）
李 謙一（国立感染症研究所）
勢戸 和子（国立感染症研究所）
伊豫田 淳（国立感染症研究所）

2022年10月改訂版著者（所属）：

原田 哲也（大阪健康安全基盤研究所）
井口 純（宮崎大学）
勢戸 和子（国立感染症研究所）
伊豫田 淳（国立感染症研究所）

2022年5月改訂版著者（所属）：

原田 哲也（大阪健康安全基盤研究所）
井口 純（宮崎大学）
勢戸 和子（国立感染症研究所）
伊豫田 淳（国立感染症研究所）

2021年9月改訂版著者（所属）：

原田 哲也（大阪健康安全基盤研究所）

井口 純（宮崎大学）
勢戸 和子（国立感染症研究所）
伊豫田 淳（国立感染症研究所）

2019年9月改訂版著者（一部当時の所属を含む）：

勢戸 和子（大阪健康安全基盤研究所）
井口 純（宮崎大学）
伊豫田 淳（国立感染症研究所）

2017年2月改訂版著者（一部当時の所属を含む）：

勢戸 和子（大阪府立公衆衛生研究所）
井口 純（宮崎大学）
磯部 順子（富山県衛生研究所）
原田 哲也（大阪府立公衆衛生研究所）
平井 晋一郎（千葉県衛生研究所）
横山 栄二（千葉県衛生研究所）
小西 典子（東京都健康安全研究センター）
甲斐 明美（東京医科大学）
緒方 喜久代（大分県薬剤師会検査センター）
伊豫田 淳（国立感染症研究所）

2012年6月改訂版著者（一部当時の所属を含む）：

八柳 潤（秋田県横手保健所）
横山 栄二（千葉県衛生研究所）
小西 典子（東京都健康安全研究センター）
松本 昌門（愛知県衛生研究所）
磯部 順子（富山県衛生研究所）
勢戸 和子（大阪府立公衆衛生研究所）
横田 正春（堺市衛生研究所）
田内 敦子（広島市衛生研究所）

堀川 和美（福岡県保健環境研究所）

伊豫田 淳（国立感染症研究所）

寺嶋 淳（国立医薬品食品衛生研究所）

9. 謝辞

本マニュアルは次の研究資金の支援によって作成されています：厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業；国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業；文部科学研究費助成事業。

10. 別表

<PCR 法による大腸菌血清型判定法の別表>リンク

https://www.niid.go.jp/niid/images/bac1/2024EHECmanual_appendix.xls

からエクセルファイルをダウンロードすることができます。