=原 著=

さまざまなO血清群に属する志賀毒素産生性大腸菌の 市販選択培地上での生育特性

秋吉 充子^{*1}・中村 寛海^{*2}・伊豫田 淳^{*3}・
石原 朋子^{*3}・加藤 結子^{*1}・井口 純^{*1,†}

(^{*1}宮崎大学農学部畜産草地科学科衛生微生物学分野,

^{*2}大阪市立環境科学研究所調査研究課微生物保健グループ,

^{*3}国立感染症研究所細菌第一部)

(受付: 平成27年6月23日)

(受理: 平成27年9月10日)

Growth Characteristics of Various O-Serogroups Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* on Selective Agar Media

Atsuko AKIYOSHI^{*1}, Hiromi NAKAMURA^{*2}, Sunao IYODA^{*3},
Tomoko ISHIHARA^{*3}, Yuiko KATO^{*1} and Atsushi IGUCHI^{*1,†}

(^{*1} Department of Animal and Grassland Sciences, Faculty of Agriculture,
University of Miyazaki, Miyazaki 889-2192;

^{*2} Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health
and Environmental Sciences, Osaka 543-0026;

^{*3} Department of Bacteriology I, National Institute of
Infectious Diseases, Tokyo 162-8640;

† Corresponding author)

Selective plate media supplemented with potassium tellurite, such as sorbitol MacConkey agar with cefixime and potassium tellurite (CT-SMAC) are widely used for isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), especially in major O serogroups including O157, O111, O26, O103, O121 and O145. However, there is little information in effectiveness of these plates for minor O-serogroup STEC strains. Here, we evaluated four types of commercial STEC selective plates (CT-SMAC, CHROMagar STEC, XM-EHEC and “KBM” EHEC Chromogenic Medium) using 152 various O-serogroups STEC strains, except for major O serogroups. As a result, 36 strains belonging to 16 O serogroups grew on all four types of plates, and PCR screening showed that all 36 carried the *terA* associated with tellurite resistance. Of these strains, 27 were *eae*-positive, and other 9 were *eae*-negative STEC. The STEC characteristics about the resistance to tellurite as well as the prevalence of the *ter* operon based on their O serogroups (or O genotypes) reported here may help to choose a suitable selective media on the investigation and the surveillance of STEC.

Key words: STEC, selective media, CT-SMAC, tellurite resistance, *ter* operon

† 連絡先 iguchi@med.miyazaki-u.ac.jp

^{*1} ☎ 889-2192 宮城県宮崎市学園木花台西1-1

^{*2} ☎ 543-0026 大阪市天王寺区東上町8-34

^{*3} ☎ 162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1

緒 言

志賀毒素産生性大腸菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; STEC)はヒトに対して下痢症や腹痛、出血性大腸炎などを引き起こし、患者の一部は溶血性尿毒症症候群(HUS)や脳症を併発して死に至ることから、最も注意が必要な食中毒原因細菌の一つとして挙げられる。わが国におけるここ数年間の傾向としてはSTECに関連性の高いO血清群としてO157, O26, O111, O103, O121, O145が挙げられる(主要なO血清群)。病原微生物検出情報によると、2014年には4,153例のSTEC感染者報告(無症状保菌者を含む)があり、地方衛生研究所から報告された例についてみると、O157 (59%), O26 (22%), O145 (4.1%), O103 (4.1%), O111 (3.4%), O121 (2.9%)となっている¹⁴⁾。この状況に対応して、食品からのSTEC検出にも主要なO血清群を対象とした検査方法「腸管出血性大腸菌O26, O103, O111, O121, O145およびO157の検査法について」が通知されている¹⁰⁾。主要なO血清群に属するSTECの多くは亜テルル酸塩に対して耐性を示すことから、亜テルル酸塩を添加した選択平板培地が食品や患者糞便からのSTEC分離に頻用されている。一方で、主要なO血清群には属さないSTECによる集団・散発事例も複数報告されており、2012年から2014年にかけてはO76, O115, O165, O174, O183によるHUS事例が報告されているが^{12~14)}、それぞれのO血

清群株の分離に適した選択培地の情報は少ない。これらさまざまなO血清群STECについてSTEC選択平板培地での生育特性を確認しておくことは、検査現場で適当な培地を選ぶうえで有用な情報となる。

そこで本研究では主要なO血清群を除くさまざまなO血清群に属する152株のSTECについて、市販STEC選択平板培地での生育特性を調べた。さらに亜テルル酸塩への耐性に関与する*terA*遺伝子⁹⁾を検出するPCR法を開発して保有分布を調べたので報告する。

材料および方法

1. 供試菌株

2007年以降に全国の地方衛生研究所または検査機関において分離されたSTEC 152株(ヒト由来: 145株, 食品由来: 2株, ウシ糞便由来: 3株, 分離源不明: 2株)を用いた(Table 1および2)。*stxI*および*stx2*の保有はCebulaらのPCR法¹⁾により確認し、上記手法では検出できない*stx2f*の保有はGarcía-Aljaroらの方法²⁾により確認した。また*eae*の保有はOswaldらのPCR法⁸⁾で確認した。大腸菌O血清群の判定にはStatens Serum Institutが提供するPoolおよびSingle抗血清を用いた。大腸菌O血清群遺伝子型(O genotype)の判定は、われわれの研究グループが開発したPCR判定法(*E. coli* O-genotyping PCR)⁴⁾を用いた。それぞれのPCRにはWizard Genomic DNA Purification Kit(プロメガ)に

Table 1. Growth of *eae*-positive STEC strains on selection agar plates

O serogroup	O genotype	No. of strain	Source ^d				Growth on STEC selection agar plates		<i>terA</i> (+)
			H/B	D	A	Other	CT-SMAC ^e	Other ^h	
O5	Og5	5	2		3		5 (R)	5	5
O15	Og15	1	1				0	0	0
O45	Og45	2	1		1		2 (R)	2	2
O55	Og55	1		1			0	0	0
O63	Og63	1		1			0	0	0
O98	Og98	1			1		1 (R)	1	1
O105	Og105	1			1		0	0	0
O109	Og109, Og182	3		1	2		2 (R)	2	2
O117	OgGp8 ^a	1		1			1 (R)	1	1
O118	OgGp3 ^b	5	2	2	1		5 (R)	5	5
O128	Og128	1		1			0	0	0
O156	Og156	5		1	4		5 (R/W) ^f	5	5
O165	Og165	11	9	2			0	0	0
O177	Og177	1	1				1 (W)	1	1
O182	Og182	1	1				1 (R)	1	1
O186	OgGp5 ^c	1		1			1 (R)	1	1
OUT	Og177, Og182	5	1		2	2	3 (R/W) ^g	3	3

^a: OgGp8 represents O serogroups O107 and O117.

^b: OgGp3 represents O serogroups O118 and O151.

^c: OgGp5 represents O serogroups O123 and O186.

^d: H/B: HUS and/or bloody diarrhea, D: diarrhea, A: asymptomatic carrier, "Other" contains food, animal and no data etc.

^e: "R" and "W" in brackets indicate red and white colors of colonies grown on CT-SMAC, respectively.

^f: Three strains showed red color colonies and other two showed white color colonies.

^g: Two strains showed red color colonies and one other showed white color colonies.

^h: Results of three types of plates; CHROMagar STEC, XM-EHEC and "KBM" EHEC Chromogenic Medium.

Table 2. Growth of *eae*-negative STEC strains on selection agar plates

O serogroup	O genotype	No. of strains	Source ^d				Growth on STEC selection agar plates		<i>terA</i> (+)
			H/B	D	A	Other	CT-SMAC ^e	Other ^f	
O15	Og15	1			1		0	0	0
O18	OgGp12 ^a	1			1		0	0	0
O28ac	OgGp2 ^b	3	1		2		0	0	0
O29	Og29	1				1	0	0	0
O55	Og55	2			2		0	0	0
O76	Og76	3		1	2		0	0	0
O86	Og86	1			1		0	0	0
O88	Og88	1	1				0	0	0
O91	Og91	12	1	2	9		0	0	0
O98	Og98	1			1		1 (R)	1	1
O100	Og100	2		1		1	0	0	0
O110	Og110	2			2		0	0	0
O112ab	Og112ab	1			1		0	0	0
O112ac	Og112ac	1			1		0	0	0
O113	Og113	4			4		0	0	0
O115	Og115	5	2		2	1	0	0	0
O119	Og119	4	1		3		3 (R)	0	0
O128	Og128	4		2	2		1 (R)	1	1
O130	Og130	2			1	1	1 (R)	1	1
O136	Og136	2			1	1	1 (R)	1	1
O146	Og146	5		1	4		2 (W)	2	2
O148	Og148	2			2		0	0	0
O149	Og149	1			1		0	0	0
O150	Og150	3			2	1	0	0	0
O159	Og159	2			2		0	0	0
O163	Og163	3	1		2		0	0	0
O166	Og166	2			2		0	0	0
O168	Og168	2			2		0	0	0
O169	Og169	2			2		0	0	0
O174	Og174	4	1	1	2		2 (R)	2	2
O179	Og179	1			1		0	0	0
O183	Og183	8	1	1	6		2 (R)	1	1
O185	Og185	1			1		0	0	0
O186	OgGp5 ^c	3			3		0	0	0
OUT	Og24, Og76, Og91, Og112ab, Og113, Og115, Og128, Og130, Og150, Og171	14		3	11		0	0	0

^a: OgGp2 represents O serogroups O28ac and O42.^b: OgGp5 represents O serogroups O123 and O186.^c: OgGp12 represents O serogroups O18ab and O18ac.^d: H/B: HUS and/or bloody diarrhea, D: diarrhea, A: asymptomatic carrier, "Other" contains food, animal and no data *etc.*^e: "R" and "W" in brackets indicate red and white colors of colonies grown on CT-SMAC, respectively.^f: Results of three types of plates; CHROMagar STEC, XM-EHEC and "KBM" EHEC Chromogenic Medium

より精製した菌株DNA(10 ng/μl)を使用した。

2. STEC選択平板培地での生育評価

以下に示す4種類の市販STEC選択培地, (1) セフィキシム・亜テルル酸カリウム添加 (それぞれ0.05 mg/L および2.5 mg/L) ソルビトールマッコンキー寒天培地(CT-SMAC) (栄研化学), (2) クロモアガー STEC (関東化学), (3) XM-EHEC (生培地) (日水製薬), (4) "KBM" EHEC 発色基質培地 (生培地) (コージンバイオ) を用いた。生育の判定は以下のとおりに行った (Fig. 1)。トリプトソーヤブイオン (日水製薬) を用いて37℃で一晩振とう培養した菌液10 μlを各選択培地に滴下し,

白金耳で培地全面に塗抹した。37℃で18~22時間培養した後に生育を確認した。培地全面に明瞭な生育が確認されたものを陽性と判定し, 全く生育しなかった, 接種箇所になんとも (10個以下) のコロニーしか生育しなかった, または生育はしたがコロニーサイズが微小であったもの (最大でも0.5 mm程度) はすべて陰性と判定した。生育したコロニーについてはその色も観察した。

3. *ter*オペロン保有の判定

亜テルル酸塩に対する耐性については, *terA* から *terF* および *terZ* の7遺伝子からなる亜テルル酸塩耐性遺伝子オペロン (*ter*オペロン) が関与していることが知られ

ている⁹⁾ (Fig. 2). 本研究では *ter* オペロンを保有する STEC O157, O26, O111, O103 のゲノム情報を基に^{3, 6)}, *terA* の保存配列上に特異的 PCR プライマー (*terA*_F: AAGCAGCCTTAATTCTGGGGG, *terA*_R: TCTGGC

AATGGCGCACAAT, 産物サイズ: 671 bp) をデザインし, 以下の PCR 条件により *terA* の有無を判定した. KAPATaq EXtra PCR キット (日本ジェネティクス) を用い, 反応液は 5×KAPA Extra Buffer 6 μ l, MgCl₂ (25 mM) 3 μ l, dNTP mix (10 mM each dNTP) 0.9 μ l, プライマー (10 μ M) 各 1.6 μ l, KAPA Taq DNA polymerase 0.15 μ l, テンプレート DNA (10 ng/ μ l) 2 μ l に, PCR grade water を加えて 30 μ l に調整した. 反応条件は 94°C-20 秒, 58°C-20 秒, 72°C-30 秒を 25 サイクル行い, 1.5% アガロースゲルにて泳動後, エチジウムブロマイドで染色してトランスイルミネーター上で増幅産物を確認した.

結 果

本研究で使用了 STEC 152 株は 45 種類の O 血清群 (または 47 種類の O genotype) に分類された. *eae* の保有に基づいて区分すると, *eae* 陽性株 46 株は 16 種類の O 血清群 (または 16 種類の O genotype) に, *eae* 陰性株 106 株は 34 種類の O 血清群 (または 36 種類の O genotype) に分類された. 5 種類の O 血清群および O genotype (O15/Og15, O55/Og55, O98/Og98, O128/Og128, O186/OgGp5) は *eae* 陽性株と *eae* 陰性株の両方で確認された. それぞれの STEC 選択培地での生育特性を, STEC が分離された患者の症状の情報と併せて, *eae* 陽性株を Table 1 に, *eae* 陰性株を Table 2 に示す.

1. *eae* 陽性 STEC の生育特性

eae 陽性 STEC 46 株のうち CT-SMAC には 27 株 (59%) が生育した (Table 1). 生育した菌株の O 血清群は 10 種類であった (OUT を除く). 重症化事例が複数報告され

Fig. 1. Culture condition and criteria for judgment

Fig. 2. The *ter* operon of *E. coli* O157:H7 strain Sakai. Arrows indicate the location of the forward and reverse primers for the *terA*-specific PCR.

Table 3. Color of colonies on three STEC selection agar plates

O serogroup (O genotype)	No. of strains	<i>eae</i>	CH-STEC ^{a, b}	XM-EHEC ^{a, b, c}	KBM ^{a, b}
O5	5	+	M	P(1), B-P(4)	B-G
O45	2	+	M	P	B-G
O109	2	+	M	B-P	B-G
O117	1	+	M	R-P	B-G
O118	5	+	M	P(3), B-P(2)	B-G
O156	5	+	M	B-P	B-G
O177	1	+	M	B-P	W
O182	1	+	M	B-P	B-G
O186	2	+	M	B-P	B-G
OUT (Og177)	1	+	M	B-P	W
OUT (Og182)	1	+	M	B-P	B-G
O98	2	+ / -	M	P	B-G
O128	1	-	M	B-P	B-G
O130	1	-	M	B-P	B-G
O136	1	-	M	B-P	B-G
O146	2	-	M	B-P	B-G
O174	2	-	M	B-P	B-G
O183	1	-	M	B-P	B-G

^a: CH-STEC: CHROMagar STEC, KBM: "KBM" EHEC Chromogenic Medium

^b: M: mauve, P: purple, B-P: blue-purple, R-P: red-purple, B-G: blue-green, W: white

^c: The numbers in brackets indicate the number of strains.

ているO165は11株すべてが生育しなかった。O156の2株とO177の1株、そしてOUT (Og177)の1株はCT-SMAC上で白色コロニーを示した。CT-SMACに生育した菌株のすべてが、3種類のSTEC分離用酵素基質培地でも生育した。それぞれの酵素基質培地上でのコロニー色をO血清群別にTable 3にまとめた。クロモアガーSTECではすべてが藤色のコロニーを示し、XM-EHECではO117が赤紫色を、O5の1株、O45、O98、O118の3株では紫色を示した。その他は青紫色を示した。“KBM”EHEC発色基質培地ではO177とOUT (Og177)が白色のコロニーを示し、その他は青緑色を示した。

2. *eae*陰性STECの生育特性

*eae*陰性STEC 106株のうちCT-SMACには13株(12%)が生育した(Table 2)。生育した菌株のO血清群は8種類であった。O146の2株はCT-SMAC上で白色コロニーを示した。CT-SMACで生育した菌株のうち、O119の3株とO183の1株を除くすべてが3種類のSTEC分離用酵素基質培地でも生育した。クロモアガーSTECではすべてが藤色、XM-EHECではO98(紫色)を除くすべてが青紫色のコロニーを示し、“KBM”EHEC発色基質培地ではすべてが青緑色のコロニーを示した(Table 3)。

3. 生育特性と*ter*オペロンの関係

4種類の選択培地で生育した菌株のすべてが*terA*を保有し、CT-SMACのみで生育したO119とO183の計4株と、いずれの選択培地にも生育しなかったすべての株で*terA*の保有は確認されなかった(Table 1および2)。

考 察

市販STEC選択培地におけるさまざまなO血清群に属するSTECの生育特性が明らかとなった。O血清群に基づく今回の結果は、分離標的とされるSTECのO血清群が明らかな場合に、培地を選ぶうえで有用な情報になると考えられた。*E. coli* O-genotyping PCRは、O血清群が判定できない菌株〔OUT (O untypeable: 型別不能)、例えば既知のO血清群であるにもかかわらずO抗原を発現しなくなった菌株や、交差反応により判定が困難な菌株〕に対しても明瞭な判定が行えることから、大腸菌の細分類において有効な手法であることが示された。さらに、われわれの研究グループではHUS患者の糞便を用いて*E. coli* O-genotyping PCRを行い、原因となったSTECのO genotype (およびO血清群)を特定することに成功している¹¹⁾。STEC汚染検体からのO genotypeの予測とO genotypeと関連づけられた垂テルル酸塩耐性に関する蓄積データを組み合わせることにより、さまざまなO血清群STECの効率的な分離が可能になると期待された。

多くの大腸菌はソルビトールを分解することからCT-SMAC上で赤色コロニーを示すのに対し、STEC O157はソルビトール非分解 (または遅分解) であることから、白色コロニーを示す。O146、O156、O177および

OUT (Og177)においてはO157と同様にソルビトール非分解を示す白色コロニーを呈することが確認された。XM-EHECの説明書によると、培地上でO157は(赤)紫色、O111は白濁した(赤)紫色、O26は青紫色のコロニーを形成すると説明されている。本研究で使用した菌株のほとんどがXM-EHEC上では紫色または青紫色のコロニーを示したが、O117の1株はO157に似た赤紫色のコロニーを示した。また、“KBM”EHEC発色基質培地の説明書によると、培地上でSTECは青色から青緑色のコロニーを示し、STEC以外の大腸菌は生育を抑制され、大腸菌以外の菌では生育が抑制されるか、生育した場合には白色コロニーを示すと説明されている。今回使用した菌株の中で2株〔O177とOUT (Og177)〕が“KBM”EHEC発色基質培地上で白色のコロニーを示すことが確認された。

CT-SMACのみで生育したO119とO183の4株を除いては、選択培地での生育と*terA*の保有は完全に一致したことから、STECに見られる垂テルル酸塩に対する耐性は*ter*オペロンに依存していることが強く示唆された。Orthら⁷⁾は主要なO血清群を含むSTEC 202株について垂テルル酸塩への耐性と*ter*オペロンの保有を調べており、O157、O111、O26、O103、O145に加え、10種類のO血清群に属する*ter*オペロン保有・垂テルル酸塩耐性STEC 22株を特定している。このうち本研究で使用した菌株と共通するO血清群は4種類 (O5、O146、O163、O177) 含まれ、そのうちの3種類 (O5、O146、O177) は本稿においても*terA*保有株であった。残る1種類 (O163)は*terA*を保有しておらず、いずれのSTEC選択培地にも生育しなかった。O157 Sakai株のゲノムにおいて、*ter*オペロンはSpLE1と呼ばれる外来性領域上に位置する³⁾。同じくSpLE1領域に含まれるIEE (IS excision enhancer) 遺伝子は複数の系統に広く分布していることが報告されている⁵⁾。一方で*ter*オペロンはプラスミドにも存在することが知られており⁹⁾、*ter*オペロンは可動性領域の水平伝播により大腸菌内で広く拡散していると予想された。同一O血清群内での垂テルル酸塩に対する耐性のばらつきは、*ter*オペロンを含むDNA領域の挿入または一度挿入した後欠落したことが原因であると推測された。それぞれの市販STEC選択培地にはグラム陽性菌などの雑多な細菌の生育抑制や、発色基質などによるコロニー色の識別において工夫が施されており、それぞれの特徴を有するが、*ter*オペロンに依存した垂テルル酸塩に対する大腸菌内での選択性においては、培地間で大きな違いは見られなかった。一方で、O119とO183に属するSTECの一部はCT-SMACのみで生育し、再試験においても同様の結果が得られた。CT-SMACのみで生育した原因については今後の研究で明らかにしていきたい。また、O165を含めた垂テルル酸塩に感受性のあるSTECの効率的な選択培地は現在のところ考案されていないが、ゲノム解析によって各株の薬

剤耐性能や代謝経路が明らかとなれば、そこから新たな培地の開発につながるのではないかと期待される。

要 約

STECの主要なO血清群(O157, O111, O26, O103, O121, O145)の選択分離には、CT-SMACなどの垂テル酸塩が添加された寒天平板培地が広く用いられている。しかし、主要なO血清群を除くさまざまなO血清群STECに対しては、STEC選択培地の有用性はあまり評価されていない。本研究ではCT-SMACを含む4種類の市販STEC選択培地(クロモアガーSTEC, XM-EHEC, “KBM” EHEC発色基質培地)を用いて、さまざまなO血清群に属するSTEC 152株の生育特性を調べた。その結果、16種類のO血清群に属する36株は4種類すべての選択培地で生育し、それらすべてが垂テル酸塩耐性に関与する*terA*を保有していることがPCRで確認された。そのうち27株は*eae*陽性STECであり、残る9株は*eae*陰性STECであった。本研究で明らかとなったO血清群(またはO genotype)に基づく垂テル酸塩添加選択培地での生育特性と*ter*オペロンの保有分布は、分離標的とされるSTECのO血清群が明らかな場合に、培地を選ぶうえで有用な情報になると考えられた。

謝 辞

本研究で用いた菌株を提供してくださいました北海道立衛生研究所(森本 洋, 長瀬敏之, 小川恵子, 池田徹也, 清水俊一), 岩手県環境保健研究センター, 宮城県保健環境センター(畠山 敬), 仙台市衛生研究所, 山形県衛生研究所(瀬戸順次), 千葉県衛生研究所(平井晋一郎, 横山栄二), 千葉市環境保健研究所(北橋智子), 埼玉県衛生研究所(倉園貴至), 横浜市衛生研究所(松本裕子, 小川敦子), 静岡県環境衛生科学研究所, 岡崎市保健所(中根邦彦), 新潟県保健環境科学研究所(川瀬雅雄), 富山県衛生研究所(木全恵子, 磯部順子), 石川県保健環境センター(北川恵美子, 川上慶子), 福井県衛生環境研究センター(永田暁洋, 石畝 史), 長野県環境保全研究所(関口真紀, 笠原ひとみ), 岐阜県保健環境研究所(野田万希子, 白木 豊), 大阪府立公衆衛生研究所(勢戸和子), 神戸市環境保健研究所(濱夏樹), 姫路市環境衛生研究所(川西伸也), 岡山県環境保健センター(中嶋 洋, 河合央博, 大島律子), 広島県立総合技術研究所保健環境センター(竹田義弘, 山田裕子, 増田加奈子), 山口県環境保健センター(矢端順子, 富永 潔, 亀山光博), 徳島県立保健製薬環境センター(石田弘子), 香川県環境保健研究センター(福田千恵美, 岩下陽子, 有塚真弓, 内田順子), 福岡県保健環境研究所(江藤良樹, 前田詠里子, 世良暢之), 福岡市保健環境研究所(麻生嶋七美), 佐賀県衛生薬業センター(吉武俊一), 大分県衛生環境研究センター(緒方

喜久代, 成松浩志, 佐々木麻里), 長崎県環境保健研究センター(西村隼人), 宮崎県衛生環境研究所(吉野修司, 河野喜美子, 黒木真理子), 熊本県保健環境科学研究所(原田誠也), 鹿児島県環境保健センター, 沖縄県衛生環境研究所(久高 潤)および日本微生物研究所のみなさまに深く御礼申し上げます。本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金の食品の安全確保推進研究事業および国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)の新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業の支援により行いました。

文 献

- 1) Cebula, T. A., Payne, W. L. and 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.*, **33**, 248-250 (1995).
- 2) García-Aljaro, C., Muniesa, M., Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J., Jofre, J. and Blanch, A. R.: Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *FEMS Microbiol. Lett.*, **246**, 55-65 (2005).
- 3) Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., *et al.*: Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.*, **8**, 11-22 (2001).
- 4) Iguchi, A., Iyoda, S., Seto, K., Morita-Ishihara, T., Scheut, 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. *J. Clin. Microbiol.*, **53**, 2427-2432 (2015).
- 5) Kusumoto, M., Fukamizu, D., Ogura, Y., Yoshida, E., Yamamoto, F., Iwata, T., Ooka, T., Akiba, M. and Hayashi, T.: Lineage-specific distribution of insertion sequence excision enhancer in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from swine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 1394-1402 (2014).
- 6) Ogura, Y., Ooka, T., Iguchi, A., Toh, H., Asadulghani, M., *et al.*: Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 17939-17944 (2009).
- 7) Orth, D., Grif, K., Dierich, M. P. and Würzner, R.: Variability in tellurite resistance and the *ter* gene cluster among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans, animals and food. *Res. Microbiol.*, **158**, 105-111 (2007).
- 8) Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marchès, O. and Caprioli, A.: Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect. Immun.*, **68**, 64-71 (2000).
- 9) Whelan, K. F., Colleran, E. and Taylor, D. E.: Phage inhibition, colicin resistance, and tellurite resistance are

- encoded by a single cluster of genes on the *IncHI2* plasmid R478. J. Bacteriol., **177**, 5016-5027 (1995).
- 10) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長：腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145 及び O157 の検査法について。平成 26 年 11 月 20 日食安監発 1120 第 1 号 (2014).
 - 11) 国立感染症研究所：国立感染症研究所年報 平成 25 年度細菌第一部 EHEC O76 感染による HUS 症例の同定 (2014).
 - 12) 国立感染症研究所感染症情報センター：腸管出血性大腸菌感染症 2013 年 4 月現在, **34**, 123-124 (2013).
 - 13) 国立感染症研究所感染症情報センター：腸管出血性大腸菌感染症 2014 年 4 月現在, **35**, 117-118 (2014).
 - 14) 国立感染症研究所感染症情報センター：腸管出血性大腸菌感染症 2015 年 4 月現在, **36**, 84-86 (2015).