

## A. 研究目的

日本で発症の多い細菌性食中毒の予防を目的として、主要な原因物質である腸管出血性大腸菌およびサルモネラについて以下の研究を行った。

腸管出血性大腸菌による食中毒は血清型 O157 によるものが多いが、日本では毎年血清型 O26 及び O111 による患者も多く報告されている。血清型 O157 については検査法の開発が進んでいるが、一方、血清型 O26 及び O111 については適切な方法が開発されておらず、食品検査、食中毒調査などにおいて適切な行政措置をとることが難しい。このため、食品検査や食中毒調査において迅速かつ感度と特異性に優れた検査方法を示す必要があり、本研究において検討した。

また、以前から野菜・香辛料等についてサルモネラ等の食中毒菌の汚染等があることが報告されている。このため、本研究では香辛料・ハーブ等について国内で販売されている香辛料・ハーブ等についてサルモネラを対象として汚染状況を中心に検討した。

さらに、近年世界的に普及しているリスクアセスメントにおいて日本で発症している細菌性食中毒の原因物質に関する定量的なリスク評価が求められる。そこで、本研究では、日本で問題になっている主要な食中毒原因菌による食中毒事例を調査し摂食状況や発症菌量を明確にすることを目的として各自治体の協力により事業を進めることとした。

## B. 研究方法

### 1. O157 以外の血清型を含む腸管出血性大腸菌の食品からの検出方法に関する研究

腸管出血性大腸菌の血清型 O157、O26 および O111 の各菌株を実験に供試した。増菌培地は血清型 O157 と同一の条件で行えることが最も効率的と考え、ノボビオシン加 mEC 培地による 42°C 18 時間培養を基本とした。分離平板培地は血清型 O157 および血清型 O26 それぞれの酵素基質培地およびセフィキシム・亜テルル酸加ソルビトールマッコンキー培地、またはセフィキシム・亜テルル酸加ラムノースマッコンキー培地を用いた。また、免疫磁気ビーズ (IMS) 法を用いて濃縮を行った。遺伝子検出方法としてペロ毒素を検出対象にした PCR 法および LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法を用いた。食品での添加回収実験および検出感度の検討を行った。

### 2. 食品および牛枝肉の腸管出血性大腸菌 O157 検査における LAMP 法の評価

LAMP 法に着目し牛生レバー、ゴボウのゴマ和えおよびブロッコリーの芽の食品検体での添加回収実験を行った。novobiocin 加 mEC にて増菌培養し、LAMP 法および分離培養法によって検出を行った。また、埼玉県内のと畜場できつ・解体された牛枝肉ふきとり 230 検体について、培養法および LAMP 法による STEC O157 の検出成績を比較した。nmEC で増菌培養し、免疫磁気ビーズ法を組み合わせ分選培養を行った。また、増菌液を LAMP 法に供試した。

3. 腸管出血性大腸菌および腸管毒素原性大腸菌に関する研究 一大腸菌群に汚染された食材から志賀毒素産生性大腸菌および腸管毒素原性大腸菌O169を適確に釣菌する手法の検討一

下痢原性大腸菌を食品から適確に検出・釣菌する方法を確立する目的で、コロニープレート法の応用を試みた。O169については、選択分離培地上のコロニーをニトロセルロース膜に転写し、抗O169免疫血清を利用した酵素抗体法を実施した。腸管出血性大腸菌については、O157のみならず志賀毒素(Stx)産生菌の網羅的な捕捉を目標とした。毒素産生を高めるために、ブレインハートインフュージョン寒天培地にTrimethoprimとSulfamethoxazoleを添加し、ニトロセルロース膜上でコロニーを形成させた。ポリミキシンを用いて膜上で溶菌させ、膜への毒素の吸着を図った。抗Stx抗体を用いたアビジン-ビオチン法により、吸着毒素を発色させた。

4. 野菜・香辛料におけるサルモネラ汚染に関する研究

国際的なサルモネラ汚染食品の把握を行うとともに、国内のブラックペッパー類、レッドペッパー類、クミン、カレーパウダー等の計271件の香辛料について、サルモネラ汚染状況を調べた。サンプルを2段階増菌培養後、免疫磁気分離法を組み合わせ濃縮し選択分離培地に塗抹し培養した。典型コロニーを釣菌し性状試験を行った。また、PCR法によって増菌培養液か*invA*遺伝子を検出した。この、定性試験によって検出された検体につい

てはMPN法によって定量試験を行った。

5. 乾燥条件下におけるサルモネラの生存に関する研究

食中毒患者や環境から分離した430菌株について、クリスタルバイオレット染色法によるバイオフィーム形成能のスクリーニングを行なった。形成能の比較的高い菌株と低い菌株を合計22株選択し、それら菌株について、Calcoflour含LB寒天培地上で形成されたコロニーの360nm紫外線照射下での蛍光強度およびcongo redとbriliant blueを含むLB寒天平板上で形成されたコロニーの色と形状をそれぞれ肉眼的に調べた。

6. 食中毒事例における原因食品中の汚染菌数に関する研究

2004年度の食中毒事例における原因食品中の食中毒菌の菌数測定を全国の地方自治体に依頼したところ92自治体から承諾を得た。依頼項目として、原因物質名、発生年月日、患者数(人)、摂食者数(人)、原因食品名、原因食品中の菌数、原因食品の推定摂食量、病因物質の推定摂取量、検査までの検体の保管状況、検査方法などについて指定した報告方法に沿って詳細な情報を取りまとめた。

C. 研究結果

1. O157以外の血清型を含む腸管出血性大腸菌の食品からの検出方法に関する研究

供試した選択分離培地は、血清型O157

および血清型 O26 用のそれぞれについて特異的に検出できた。しかし、O111 についてはいずれの培地においても一般の大腸菌と同様の形態を示し、特に優位な特徴によって区別されることはなかった。菌の食品での添加回収実験において、検体 25g 当たり 1.5 cfu ではいずれの方法でも 2 検体中 1 検体から検出された（表 1）。4.6 cfu では培養法および LAMP 法で 12 検体中全検体から検出された。しかし、7.4 cfu では IMS 法および LAMP 法では 2 検体中両検体から検出され、直接法では 1 検体から検出されなかった。15 cfu 以上ではいずれの方法でも 2 検体中両検体から検出された。また、PCR 法と LAMP 法について検出感度の比較を行った結果、PCR 法よりも LAMP 法では高い感度が認められた。

## 2. 食品および牛枝肉の腸管出血性大腸菌 O157 検査における LAMP 法の評価

供試した Stx 産生性の STEC O157 株 53 株において、LAMP 法の特異性が示された。添加回収実験において、LAMP 法は、牛生レバーでは検出率 50% と低かったが、その他の食品ではほぼ 100% の検出率であった。一方、培養法はゴマ和え 100%、牛生レバー 35%、ブロッコリーの芽 5% の検出率であった。培養法で検出された検体はすべて LAMP 法で陽性反応を示した。牛枝肉ふきとり検体では培養法陽性は 12 検体、LAMP 法陽性は 16 検体であった。培養法陰性で LAMP 法のみ陽性は 4 検体であり、これらの検体はすべて、Stx 遺伝子を標的とした PCR 法でも陽性を示

し STEC の存在が示唆された。

## 3. 腸管出血性大腸菌および腸管毒素原性大腸菌に関する研究 一大腸菌群に汚染された食材から志賀毒素産生性大腸菌および腸管毒素原性大腸菌 O169 を適確に釣菌する手法の検討一

O169 については、選択分離培地上のコロニーをニトロセルロース膜に転写し、抗 O169 免疫血清を利用した酵素抗体法を実施することにより、多数の集落中に混在する同菌を確実に識別釣菌できた。腸管出血性大腸菌については、O157 のみならず志賀毒素 (Stx) 産生菌の網羅的な捕捉を目標としニトロセルロース膜上でコロニーを形成させ、膜への毒素の吸着を図った後に抗 Stx 抗体を用いたアビジン-ビオチン法により、吸着毒素を発色させたところ、Stx 産生コロニーの呈色を確認できた。特に Stx 2 産生菌の反応は明瞭であった。

## 4. 野菜・香辛料におけるサルモネラ汚染に関する研究

昨年、EU 諸国では香辛料・ハーブ等のサルモネラ汚染に関する警告または通知が 52 件あり、少なくない結果であった。国内における香辛料・ハーブ等からのサルモネラの検出はブラックペッパー 1 件およびレッドペッパー類 1 件から検出され、その血清型はそれぞれ S. Weltevreden および S. Senftenberg であった。また、検体残量のあったチリペッパーについて MPN 法によりサルモネラ菌数を測定した結果、その汚染菌数は 30/100g 未満であった。汚染一般細菌数はカレーパウダーが最も高く 5.89 log CFU/g であった。サ

ルモネラが検出された 2 検体の細菌数は総検体の平均値を 100 倍上回る値であり、高い細菌汚染が認められたものであった。芽胞数汚染はカレーパウダー、コリアンダーがともに最も高かった。

#### 5. 乾燥条件下におけるサルモネラの生存に関する研究

クリスタルバイオレット染色法によるスクリーニングにより、バイオフィーム形成能は菌株間で大きな差が認められた。これら株のうち、形成能の高い菌株と低い菌株を選び、congo red／briliant blue 含有寒天培地と Calcoflour 含有寒天培地上での形態と蛍光発色を調べた。クリスタルバイオレットに対する染色性が比較的高い菌株は、Calcoflour による蛍光が強く、コロニーが rdar 形態を示すことが認められた。また、これら菌株の Calcoflour による蛍光とコロニーの形態との間には相関があることが認められた。

#### 6. 食中毒事例における原因食品中の汚染菌数に関する研究

食中毒事例における原因食品中の食中毒細菌の菌数測定を全国の地方自治体に依頼したところ 92 自治体から承諾を得たが、実際に測定結果の得られた事例は 6 件（腸管出血性大腸菌 2 件、サルモネラ 3 件、腸炎ビブリオ 1 件）であった。その結果から、病原物質の推定摂取量は、サルモネラにおいては患者一人当たり血清型 Enteritidis において 3,510,000 cfu および血清型 Cerro において 1,560 MPN、腸管出血性大腸菌においては 216 MPN で

あり、さらに 腸炎ビブリオについては 12,000 MPN（総腸炎ビブリオ数）の摂取が推定された。残りの 2 件は原因食品の推定摂取量が不明のため、病因物質の推定摂取量が把握できなかった。

#### D. 考察

##### 1. O157 以外の血清型を含む腸管出血性大腸菌の食品からの検出方法に関する研究

本研究での結果および既知の情報から、迅速で感度の高い腸管出血性大腸菌検査法を考察した。例として、冷凍食肉からの腸管出血性大腸菌 血清型 O157, O26, O111 の検出法について遺伝子検出を取り入れて迅速で高感度な方法が提案できると考えた。

##### 2. 食品および牛枝肉の腸管出血性大腸菌 O157 検査における LAMP 法の評価

今回検討した LAMP 法は、培養法よりも検出率が高く、また検査日数の観点から見ても、培養法に要する日数が 4 日であるのに対し、LAMP 法は 2 日で判定することが可能であった。STEC は重篤な健康被害を与える。このため、患者発生時には原因食品の特定（推定）に迅速性が求められ、日ごろからのリスクの高い食品を推定することが食中毒予防に有効である。今回検討した LAMP 法に期待が持たれる。

##### 3. 腸管出血性大腸菌および腸管毒素原性大腸菌に関する研究 一大腸菌群に汚染された食材から志賀毒素産生性大

腸菌および腸管毒素原性大腸菌 O169 を適確に釣菌する手法の検討—

志賀毒素 (Stx) 産生菌の網羅的な捕捉を目標としたところ、特にStx2産生菌の反応は明瞭であったが、今後はStx2型バリエーションに対する抗体の併用も検討する。コロニーブロットリング法は、これまで分離株の毒素産生性をチェックする手段として利用される傾向にあったが、増菌後のスクリーニングで陽性を示した検体について本法を実施すれば、疫学調査や食中毒事例の調査時に原因菌の分離率が改善されるものと期待できる。

#### 4. 野菜・香辛料におけるサルモネラ汚染に関する研究

海外でも、香辛料・ハーブ等でのサルモネラ汚染の警告・通知があり、日本においても国内の香辛料・ハーブ等からのサルモネラの検出割合は 0.7% (2/271) と低い結果であったが、汚染品が国内で販売されていることが判明した。このため、加熱不十分の調理法によって使用され、さらに調理過程から人が食するまでにサルモネラが増殖できる段階が含まれる場合、食中毒を発生させる可能性が考えられる。さらに、他の腸内細菌系の食中毒細菌が分離されても矛盾しないと考えるため、今後の検討が必要である。ブラックペッパーにおいては細菌数と芽胞数の相関の図において大きく 2 群に分かれたが、香辛料・ハーブ等の細菌除去が業者によって行われたために菌数が低くなることがひとつの理由として考えられた。しかし、細菌除去や微生物検査など

は行われていない香辛料・ハーブ等においては特に調理時の取り扱いが重要であると考えられる。

#### 5. 乾燥条件下におけるサルモネラの生存に関する研究

野外分離株のスクリーニング結果は、バイオフィーム形成能に関して、大きな菌株差が存在することを示唆している。食中毒患者から分離された菌株が比較的高いバイオフィーム形成能を示す傾向が認められたことから、バイオフィーム形成能が病原性に関与している可能性が考えられる。サルモネラについては、バイオフィームによって塩素に対する耐性が増加すること、酸耐性には影響しないことが報告されている。今後、この方法で確認したバイオフィーム生成能の高い菌株と低い菌株を用いて、乾燥条件に対する耐性を比較検討する必要がある。

#### 6. 食中毒事例における原因食品中の汚染菌数に関する研究

この事業は、食中毒発生現場に最も近い地方自治体の協力のもとで実施し、各自治体の積極的な参加ではあったが、実際細菌性食中毒事例として調査できたのは6件にすぎなかった。食中毒発生予防のためには、病因物質の解析に限らず病因物質の推定摂取量の把握も重要な要因であり、さらに自治体の協力により本事業を推進していきたく考えている。

#### E. 結論

主要な原因物質である腸管出血性大腸

菌については食品からの効果的な検出方法の検討を行い、血清型に関わらず病原因子であるペロ毒素を検出する方法を考察した。これにより適切な検出ができると考えられ、腸管出血性大腸菌食中毒防止の推進に役立つものと思われた。今後、検体を用いてこの方法を試行し問題点には改良を行うことが重要である。

サルモネラについては国内販売の香辛料・ハーブ等からサルモネラが低頻度・低汚染菌数であったが分離された。また、細菌数や芽胞数が高いものも多くみられた。このため香辛料・ハーブ等を使用した食品の調理方法、調理後の保存について注意が必要であると考えられた。

また、食中毒細菌の感染菌量の把握を目的に全国の地方自治体に食中毒事例における原因食品中の食中毒細菌数測定について調査依頼を行った。6 事例での報告があったが、次年度も継続して調査を行い、データを蓄積する必要があると思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Hara-Kudo, Y. Watanabe, H. and Konuma, H. Differences in Survival of *Escherichia coli* O157:H7 under Various Conditions that Reenacts the Cooking of Lunches Implicated in an Outbreak of Hemorrhagic Diarrhea. *Epidemiology and Infection* (in press).

田中啓子、本井博文、工藤由起子. 麺および野菜からの腸管出血性大腸菌

O157 損傷菌の検出に関する検討. 日本食品衛生学会誌. 45: 113-119, 2004.

Kobayashi, K., Hattori M., Hara-Kudo, Y., Okubo, T., Yamamoto, S., Sugita-Konishi, Y. Glycopeptide derived from hen egg ovomucin has the ability to bind enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J., Agri. Food Chem.* 52:5740-5746, 2004.

Hara-Kudo, Y. and Sugita-Konishi, Y. Antibacterial action on pathogenic bacteria by green tea catechins. *Proceedings, p41-52. The 8th International Symposium on Green Tea.*

Ohtsuka, K., Yanagawa, K., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Salmonella* in unpasteurized liquid egg and typing of the isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* (in press)

Hara-Kudo, Y., Yamasaki, A., Sasaki, M., Okubo, T., Minai, Y., Haga, M., Kondo, K., and Sugita-Konishi, Y. Antibacterial activity of green tea catechin for bacterial spore. *J. Sci. Food Agri.* (in press)

Hara-Kudo, Y., Kobayashi, A., Sugita-Konishi, Y., Kondo, K. Antibacterial activity of plants used in cooking for aroma and taste. *J. Food Protection.* 67: 2820-2824, 2004.

田中啓子、本井博文、工藤由起子、惣菜中のセレウス芽胞制御における加熱処理の効果. 食品衛生学雑誌. 46: 1-7, 2005.

Hayashidani, H., Hara-Kudo, Y., Kinoshita, S., Saeki, K., Okatani, A. T., Nomura, Y. and Kumagai, S. Differences in heat resistance among pathogenic *Yersinia enterocolitica* depended on growth temperature and serotype. J. Food Prot. 68: 1081-1082, 2005.

## 2. 学会発表

工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 O157 の発芽野菜における研究. 第 25 回日本食品微生物学会. 平成 16 年 9 月、東京.

大塚佳代子、田中成幸、柳川敬子、工藤由起子、高鳥浩介. 食品および牛枝肉の腸管出血性大腸菌 O157 検査における LAMP 法の評価. 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会. 平成 16 年 11 月、広島.

工藤由起子. 液卵等によるサルモネラ食中毒について. 平成 16 年度食品安全行政講習会. 平成 16 年 6 月、東京.

工藤由起子、高鳥浩介. 流通液卵の細菌学的解析と液卵に関連するサルモネラ食中毒について. 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会. 平成 16 年 11 月、広島

工藤由起子. 卵および液卵のサルモネラ汚染について. 広島食品微生物研究会第 5 回衛生管理技術情報研修会. 平成

17 年 3 月. 広島.

大塚佳代子、柳川敬子、高鳥浩介、工藤由起子. LAMP 法による液卵からのサルモネラ検出および分離菌株の細菌学的解析. 第 24 回日本食品微生物学会. 平成 16 年 9 月、東京.

尾上洋一、工藤由起子、中川 弘、高橋淳子、高鳥浩介. 小規模液卵製造工程のモニタリングによる微生物学的問題点とその改善について. 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会. 平成 16 年 11 月、広島.

古川一郎、尾上洋一、工藤由起子、高鳥浩介. 液卵による製造および加工施設内汚染を想定した *Salmonella* Enteritidis の生残性. 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会. 平成 16 年 11 月、広島.

杉山明、矢野拓弥、中野陽子、赤地重宏、岩出義人、山内昭則、巽俊彰、伊藤英雄、工藤由起子、高鳥浩介. 養鶏場、食鳥処理場の施設及び鶏、卵等の *Salmonella* sp. 汚染状況. 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会. 平成 16 年 11 月、広島

Hara-Kudo, Y. and Sugita-Konishi, Y. Antibacterial action on pathogenic bacteria by green tea catechins The 8th International Symposium on Green Tea. May 2005, Soul.

## F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

平成 16 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進事業）

細菌性食中毒の予防に関する研究

主任研究者 高鳥 浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究

生食用の食肉および野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌および

サルモネラ食中毒の予防に関する研究

分担研究者 高鳥 浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

協力研究報告書

0157 以外の血清型を含む腸管出血性大腸菌の食品からの検出方法に関する研究

要旨

腸管出血性大腸菌の検出法について、血清型 0157 だけではなく 0157 に次ぎ日本での主要な血清型である 026 および 0111 を対象に含め検討した。培養法を基礎にし、迅速性および感度等に優れた遺伝子検出方法を組み合わせることを考えた。検出方法について既知の結果も参考にし、また新たな方法については食品を用いた基礎研究を行った。その結果、ノボピオシン mEC 培地での選択増菌培養後に培養液中のベロ毒素遺伝子を遺伝子検出方法で 1～2 時間以内に検出し、陽性検体では各血清型に応じた免疫磁気ビーズ濃縮法を行い選択分離培養することが迅速で感度の良い方法であると考えられた。これによって効率的に検出が行えるものと思われる。今後、検体を用いてこの方法を試し問題点には改良を行うことが重要である。

研究協力者

工藤 由起子	国立医薬品食品衛生研究所
加地 祥文	横浜検疫所 輸入食品・検疫検査センター
飯塚 信二	横浜検疫所 輸入食品・検疫検査センター
鈴木 荘介	神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター
鎌倉 和政	神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌による食中毒は血清型 0157 によるものが多いが、日本では毎年血清型 026 及び 0111 による患者も多く報告されている。血清型 0157 については

世界的にも患者が多く検査法の開発が進み複数機関で有効であることが評価された方法が示されている。しかし、血清型 026 及び 0111 については適切な方法が開発されておらず、食品検査、食中毒調査



などにおいて適切な行政措置をとることが難しい。このため、食品検査や食中毒調査において感度と特異性に優れた検査方法を開発する必要がある。本研究での検討対象方法は、増菌培養法、分離培養法、遺伝子検出法、酵素免疫検出法などとした。増菌は、食品から極少量の食中毒細菌の検出を行うためには不可欠なものであり、食品や環境中で損傷した細菌を回復させることも重要な手法である。分離培養は、食中毒の解析を行うに当たり非常に有益な手がかりとなる菌株を採取するためには必須である。酵素免疫検出法は、感度は劣るが特別な器具や施設が必要なく簡易に検出できる方法である。遺伝子検出法は、特に迅速で感度が比較的高いことから応用が進んでいる。腸管出血性大腸菌においては、その特徴であるペロ毒素を検出対象にする事が多い。手法としてはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法が主であるが、近年より簡易で迅速な LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法も食中毒原因物質について応用され始めている。本研究では、それぞれの特性を利用して組み合わせて迅速で簡易な優れた検出システムを構築することを旨として検討した。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

腸管出血性大腸菌の血清型 0157、026 および 0111 の各菌株について下記の分離平板培地にて培養し集落の形態を確認した上で実験に供試した。

### 2. 培養方法

増菌方法として、血清型 0157 以外の血清型の腸管出血性大腸菌を迅速に効率よく検出する方法を確立する事を目的とした。まず、増菌培地は血清型 0157 と同一の条件で行えることが最も効率的と考え、ノボビオシン加 mEC を採用した<sup>1</sup>。ノボビオシン加 mEC 培地による 42°C18 時間培養を基本とした<sup>2, 3</sup>。しかし、凍結や低温での保存食品からの検出には損傷菌を考慮する必要がある<sup>4</sup>。ノボビオシンおよび胆汁酸を含まない mEC 基礎培地で短時間培養しその後ノボビオシンおよび胆汁酸を加えてノボビオシン加 mEC 培地として 42°C18 時間培養を行うことが損傷菌の回復を含む選択増菌培養として効果的であることが報告されているので<sup>5</sup>、これを採用した。分離平板培地は血清型 0157 用に BCM0157 培地、クロモアガー-0157 培地およびセフィキシム・亜テルル酸加ソルビトールマッコンキー培地 (CT-SMAC)、血清型 026 用に Vi RX 026 培地<sup>6</sup>およびセフィキシム・亜テルル酸加ラムノースマッコンキー培地 (CT-RMAC)<sup>7</sup>を用いた。

### 3. 免疫磁気ビーズ (IMS) 法

血清型 0157 (ダイナル) および血清型 026 の各々について免疫磁気ビーズ (デンカ生研) を用いて濃縮を行った。最終的に 0.05 ml に浮遊させ 0.01 ml を上記の分離平板培地に画線した。

### 4. 遺伝子検出方法

PCR 法は、腸管出血性大腸菌ペロ毒素検出 primer を用い酵素は Ex Taq polymerase を用いて反応を行った。

LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法は腸管出血性大腸菌 VT

スクリーニングキット（栄研化学）を用いた。Loopamp リアルタイム濁度測定装置にて65°Cで60分間反応を行った。

#### 5. 食品での添加回収実験

腸管出血性大腸菌の血清型 0157 (No. 212 株) を Tryptic soy broth 10 ml にて37°Cで18時間培養し、その培養液をPBSで希釈し 15, 46, 74, 150 および 740 cfu/ml の菌液を作製した。その 0.1ml を牛挽肉 25g に接種し上記の方法であるノボビオシン mEC 培地にて増菌培養し培養液を直接および IMS 法にて分離培地に画線し培養した。

#### 6. 遺伝子検出における検出感度の検討

腸管出血性大腸菌の血清型 0157 (No. 212 株) および血清型 026 (No. 26001 株) を Tryptic soy broth 10 ml にて37°Cで18時間培養し、その培養液をPBSで $10^{-7}$ まで10段階希釈した。各希釈菌液をPCRおよびLAMP法に供試した。

### C. 研究結果

供試した選択分離培地は、血清型 0157 および血清型 026 用のそれぞれについて特異的に検出できた。しかし、0111 についてはいずれの培地においても一般の大腸菌と同様の形態を示し、特に優位な特徴によって区別されることはなかった（詳細略）。

菌の食品での添加回収実験において、検体 25g 当たり 1.5 cfu ではいずれの方法でも2検体中1検体から検出された（表1）。4.6 cfu では培養法およびLAMP法で12検体中全検体から検出された。しかし、7.4 cfu ではIMS法およびLAMP法で

は2検体中両検体から検出され、直接法では1検体から検出されなかった。15 cfu 以上ではいずれの方法でも2検体中両検体から検出された。

また、PCR法とLAMP法について検出感度の比較を行った結果、PCRチューブ中の菌数が5 cfu であっても検出できなかったことから、計算すると増菌培養液中の菌数が少なくとも10,000 cfu/ml 以上でも検出できない事が示された（表2）。このことから、通常のPCR法の検出感度が優れないことが明らかになり、より感度の高い方法が必要であると思われた。一方、LAMP法では増菌培養液中の菌数として約400 cfu/ml が検出限界であった。

### D. 考察

本研究での結果および既知の情報から、迅速で感度の高い腸管出血性大腸菌検査法を考察した。例として、食肉からの腸管出血性大腸菌 血清型 0157, 026, 0111 の検出法を以下のように提案できると考えた（図1）。

検体 25g に m-EC 基礎培地 225ml を加え1分間ストマッカー処理を行い25±0.5°Cにて2~3時間静置する。その後、ノボビオシン水溶液(4.5mg/ml) 1ml + 胆汁酸塩水溶液(126mg/ml) 2ml を加え、42±0.5°Cで18~24時間培養する。この培養液をLAMP法に供する。また、培養液10mlを15mlチューブに冷蔵保存（培養液A）する。VT検出用のLAMP法を行い、陰性で合った場合は検査を終了する。陽性であった場合は培養液Aを冷蔵から取り出し、当日中に免疫磁気ビーズ法および分

間培養後、0157、026、0111 各々について、疑わしい集落を 5 個以上釣菌する。0157 凝集反応陽性の場合には 1%ノボオス添加 LIG 寒天培地に接種し 35~37°C で 18~24 時間培養する。斜面部赤変・高層部黄変 インドール (+)、オキシダーゼ (-) UV(365nm) 下で蛍光示さないものは大腸菌 0157 とし、ベロ毒素産生性試験・PCR によるベロ毒素遺伝子検査または RPLA によるベロ毒素産生試験を行う。026 または 0111 凝集反応陽性の場合には、TSI 斜面培地、LIM 培地 (その他の培地) などに接種し 35~37°C で 18~24 時間培養し大腸菌の性状を確認する。さらに、ベロ毒素産生性試験・PCR によるベロ毒素遺伝子検査または RPLA によるベロ毒素産生試験いずれの血清にも陰性の場合には、他すべての集落について VT 遺伝子および大腸菌の性状を確認・同定する。特異性や感度において基礎的な検討を行ったところ、培養法や PCR 法に劣ることがなかったため検出方法の今後の新しい試験検査方法の検討対象に十分なりえると考えられた。

#### E. 結論

迅速で検出感度の高い検査方法が多く、の試験で求められているが、腸管出血性大腸菌の検出法については、血清型に関わらず病原因子であるベロ毒素を検出することによるより適切な検出ができると考えられ、腸管出血性大腸菌食中毒防止の推進に役立つものと思われる。本研究の結果、ノボオシン mEC 培地での選択増菌培養後に培養液中のベロ毒素遺伝子を遺伝子検出方法で 1~2 時間以内に検

出し、陽性検体では各血清型に応じた免疫磁気ビーズ濃縮法を行い選択分離培養することが迅速で感度の良い方法であると考えられた。今後、検体を用いてこの方法を試行し問題点には改良を行うことが重要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hara-Kudo, Y. Watanabe, H. and Konuma, H. Differences in Survival of *Escherichia coli* O157:H7 under Various Conditions that Reenacts the Cooking of Lunches Implicated in an Outbreak of Hemorrhagic Diarrhea. *Epidemiology and Infection* (in press) 2005.

田中啓子、本井博文、工藤由起子. 麺および野菜からの腸管出血性大腸菌 O157 損傷菌の検出に関する検討. *日本食品衛生学会誌*. 45: 113-119, 2004.

Kobayashi, K., Hattori M., Hara-Kudo, Y., Okubo, T., Yamamoto, S., Sugita-Konishi, Y. Glycopeptide derived from hen egg ovomucin has the ability to bind enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Agri. Food Chem.* 52:5740-5746, 2004.

楠博文、笹井和美、馬場栄一郎、深田恒夫、高鳥浩介、植村興. 腸管出血性大腸菌 O157 : H7 犬腸管内における挙動. *日本獣医師会雑誌* 57(5):326-329 (2004)

## 2. 学会発表

工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 0157 の発芽野菜における研究. 第 25 回日本食品微生物学会. 平成 16 年 9 月、東京.

大塚佳代子、田中成幸、柳川敬子、工藤由起子、高鳥浩介. 食品および牛枝肉の腸管出血性大腸菌 0157 検査における LAMP 法の評価. 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会. 平成 16 年 11 月、広島.

## G. 参考文献

1. Hara-Kudo Y., Konuma H., Nakagawa H. and Kumagai S. *Escherichia coli* O26 isolation from foods using enrichment procedure and immunomagnetic separation method. *Letter in Applied Microbiology*. 30: 151-154, 2000.
2. Okrend, A. J. G., B. E. Rose, and B. Bennett. 1990. A screening method for the isolation of *Escherichia coli* 0157:H7 from ground beef. *J. Food Prot.* 53: 249-252.
3. Hara-Kudo Y., Onoue Y., Konuma H., Nakagawa H. and Kumagai S. Comparison of enrichment conditions for *Escherichia coli* 0157:H7 isolation from ground beef and radish sprouts. *International Journal of Food Microbiology*. 50: 211-214, 1999.
4. Rocelle, M., S. Clavero, and L. R. Beuchat. 1995. Suitability of selective plating media for recovering heat- or freeze-stressed *Escherichia coli* 0157:H7 from tryptic soy broth and ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3268-3273.
5. Hara-Kudo Y., Ikedo M., Kodaka H., Nakagawa H. Goto K., Masuda T., Konuma H., Kojima T., Kumagai S. Selective Enrichment with Resuscitation Step for Isolation of Freeze-injured *Escherichia coli* 0157:H7 from Foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2866-2872, 2000.
6. 池戸正成、小松 理、工藤由起子、山本茂貴、熊谷 進. 発色酵素基質を用いた腸管出血性大腸菌 026 の選択分離培地に関する検討. *感染症学雑誌*. 75: 291-299, 2001.
7. 平松礼司、松本昌門、三浦良雄、齋藤 眞、八柳 潤、内藤真佐子、小林一寛、田中 博、堀川和美、森 良一、宮崎 豊: 腸管出血性大腸菌 026 の生化学的性状及びその選択分離培地に関する検討. *感染症誌*、73, 407-413 (1999).

## F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

離培養を行う。培養液および血清型 0157、026 および 0111 を対象とした各々の免疫磁気ビーズ法によって培養液中の菌を濃縮した液を CT-SMAC、026 用酵素基質培地である Vi RX 026、0157 用酵素基質培地である BCM0157 またはクロモアガー 0157 に塗抹した。35~37°C で 18~24 時間培養後、0157、026、0111 各々について、疑わしい集落を 5 個以上釣菌する。0157 凝集反応陽性の場合には 1%吐ホース添加 LIM 寒天培地に接種し 35~37°C で 18~24 時間培養する。斜面部赤変・高層部黄変 インドール (+)、オキシダーゼ (-) UV(365nm) 下で蛍光示さないものは大腸菌 0157 とし、ベロ毒素産生性試験・PCR によるベロ毒素遺伝子検査または RPLA によるベロ毒素産生試験を行う。026 または 0111 凝集反応陽性の場合には、TSI 斜面培地、LIM 培地 (その他の培地) などに接種し 35~37°C で 18~24 時間培養し大腸菌の性状を確認する。さらに、ベロ毒素産生性試験・PCR によるベロ毒素遺伝子検査または RPLA によるベロ毒素産生試験いずれの血清にも陰性の場合には、他すべての集落について VT 遺伝子および大腸菌の性状を確認・同定する。特異性や感度において基礎的な検討を行ったところ、培養法や PCR 法に劣ることがなかったため検出方法の今後の新しい試験検査方法の検討対象に十分なりえると考えられた。

#### E. 結論

迅速で検出感度の高い検査方法が多く試験で求められているが、腸管出血性大腸菌の検出法については、血清型に関

わらず病原因子であるベロ毒素を検出することによるより適切な検出ができると考えられ、腸管出血性大腸菌食中毒防止の推進に役立つものと思われる。本研究の結果、ノボビオシン mEC 培地での選択増菌培養後に培養液中のベロ毒素遺伝子を遺伝子検出方法で 1~2 時間以内に検出し、陽性検体では各血清型に応じた免疫磁気ビーズ濃縮法を行い選択分離培養することが迅速で感度の良い方法であると考えられた。今後、検体を用いてこの方法を試行し問題点には改良を行うことが重要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hara-Kudo, Y. Watanabe, H. and Konuma, H. Differences in Survival of *Escherichia coli* 0157:H7 under Various Conditions that Reenacts the Cooking of Lunches Implicated in an Outbreak of Hemorrhagic Diarrhea. *Epidemiology and Infection* (in press) 2005.

田中啓子、本井博文、工藤由起子. 麺および野菜からの腸管出血性大腸菌 0157 損傷菌の検出に関する検討. *日本食品衛生学会誌*. 45: 113-119, 2004.

Kobayashi, K., Hattori M., Hara-Kudo, Y., Okubo, T., Yamamoto, S., Sugita-Konishi, Y. Glycopeptide derived from hen egg ovomucin has the ability to bind enterohemorrhagic *Escherichia coli*

0157:H7. J., Agri. Food Chem. 52:5740-5746, 2004.

楠博文、笹井和美、馬場栄一郎、深田恒夫、高鳥浩介、植村興. 腸管出血性大腸菌 O157 : H7 犬腸管内における挙動. 日本獣医師会雑誌 57(5):326-329 (2004)

## 2. 学会発表

工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 O157 の発芽野菜における研究. 第 25 回日本食品微生物学会. 平成 16 年 9 月、東京.

大塚佳代子、田中成幸、柳川敬子、工藤由起子、高鳥浩介. 食品および牛枝肉の腸管出血性大腸菌 O157 検査における LAMP 法の評価. 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会. 平成 16 年 11 月、広島.

## G. 参考文献

1. Hara-Kudo Y., Konuma H., Nakagawa H. and Kumagai S. *Escherichia coli* O26 isolation from foods using enrichment procedure and immunomagnetic separation method. Letter in Applied Microbiology. 30: 151-154, 2000.
2. Okrend, A. J. G., B. E. Rose, and B. Bennett. 1990. A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. J. Food Prot. 53: 249-252.
3. Hara-Kudo Y., Onoue Y., Konuma H., Nakagawa H. and Kumagai S. Comparison of enrichment conditions for *Escherichia coli* O157:H7 isolation from ground beef and

radish sprouts. International Journal of Food Microbiology. 50: 211-214, 1999.

4. Rocelle, M., S. Clavero, and L. R. Beuchat. 1995. Suitability of selective plating media for recovering heat- or freeze-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3268-3273.
5. Hara-Kudo Y., Ikedo M., Kodaka H., Nakagawa H. Goto K., Masuda T., Konuma H., Kojima T., Kumagai S. Selective Enrichment with Resuscitation Step for Isolation of Freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 from Foods. Applied and Environmental Microbiology. 66: 2866-2872, 2000.
6. 池戸正成、小松 理、工藤由起子、山本茂貴、熊谷 進. 発色酵素基質を用いた腸管出血性大腸菌 O26 の選択分離培地に関する検討. 感染症学雑誌. 75: 291-299, 2001.
7. 平松礼司、松本昌門、三浦良雄、齋藤 眞、八柳 潤、内藤真佐子、小林一寛、田中 博、堀川和美、森 良一、宮崎 豊: 腸管出血性大腸菌 O26 の生化学的性状及びその選択分離培地に関する検討. 感染症誌、73, 407-413 (1999).

## F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

表 1 血清型 O157 接種牛挽肉からの分離培養法および LAMP 法による菌の検出

菌の接種量		陽性検体数		
		分離培養法		LAMP 法
(cfu/25g)	総検体数	直接法	IMS 法	
1.5	2	1	1	1
4.6	12	12	12	12
7.4	2	1	2	2
15	2	2	2	2
74	2	2	2	2
0	7	0	0	0

表2 LAMP法およびPCR法の検出感度に関する比較検討

菌株番号	血清型 (VT産生性)		結果			
212	0157 (VT1, VT2)	Cell number in test tube	5.1	2.1	1	0.2
		LAMP	+	+	+	-
		PCR	-	-	-	-
43890	0157 (VT1)	Cell number in test tube	6.5	2.6	1.3	0.3
		LAMP	+	+	+	-
		PCR	-	-	-	-
120	0157 (VT2)	Cell number in test tube	9.4	3.8	1.9	0.2
		LAMP	+	+	+	-
		PCR	-	-	-	-
26015	026 (VT1, VT2)	Cell number in test tube	7.3	3.6	1.5	0.4
		LAMP	+	+	+	-
		PCR	-	-	-	-
97353	0111 (VT1)	Cell number in test tube	5.5	2.8	1.3	0.6
		LAMP	+	+	+	-
		PCR	-	-	-	-



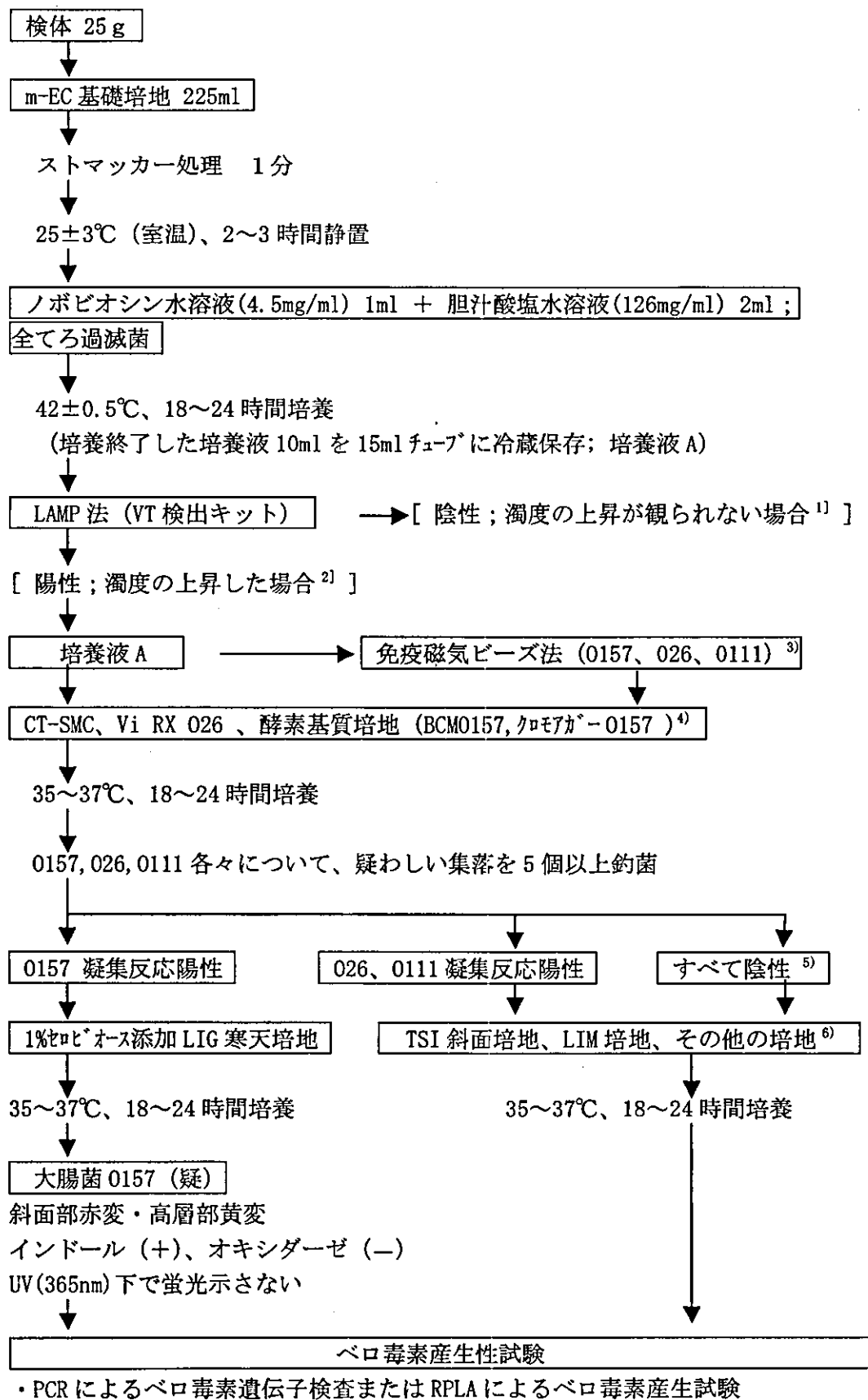


図 1. EHEC 血清型 0157, 026, 0111 の食肉からの検出法フロー

[図1 脚註]

- 1) 陰性の場合、検査を終了する。
- 2) 陽性の場合、当日中に免疫磁気ビーズ法および分離培養を行う。
- 3) ビーズ液を混合すると各菌種の分離効率が低下するため、各ビーズ液を別々の 1.5ml チューブに 20 $\mu$ l ずつ入れ、各々に培養液 A を 1ml ずつ加え濃縮すること。
- 4) ①直接分離には、CT-SMAC 寒天培地と Vi RX 026 寒天培地を必ず使用し、酵素基質培地は BCM0157、クロモアガー0157 を使うこと。  
②免疫磁気ビーズ法の 0157 ビーズ液の分離には、CT-SMC 寒天培地を必ず使用し、酵素基質培地は BCM0157、クロモアガー0157 を使うこと。  
③026 および 0111 ビーズ液の分離には、Vi RX 026 寒天培地を各々 1 枚以上使うこと。  
④各種ビーズは 0.05%Tween20 加 PBS(-) ; PBST での最終洗浄後、100 $\mu$ l の PBST に懸濁し、各々10 $\mu$ l 程度を各種培地に画線塗抹すること。  
⑤CT-SMC 寒天培地では、0157 はソルビット非分解集落なので無色透明集落を、ソルビット分解集落は赤色集落を形成する。  
⑥Vi RX 026 寒天培地では、026 は濃緑～紺色集落を形成する。その他の血清型の大腸菌は黄緑～緑色を、また、大腸菌以外の腸内細菌は黄色～赤色集落を形成し、ブドウ球菌などの腸内細菌以外は発育しない。血清型 0111 については優れた鑑別培地がないため、これを利用する。  
⑦BCM0157 寒天培地では、0157 は黒～濃緑色集落を形成する。  
⑧クロモアガー0157 寒天培地では、0157 は藤色集落を形成する。
- 5) 疑ったすべての集落における当該 3 種類の血清凝集反応が陰性の場合には、選択した集落以外の集落をさらに 5 個以上（できるだけ多く）釣菌し当該血清凝集反応を行う。それでもすべて陰性の場合には、培養液 A および凝集反応に供したすべての集落について、再度、LAMP 法（VT 検査キット）による VT 遺伝子の確認を行う。結果、培養液 A の VT 遺伝子が陽性であり、かつ、1 個以上の集落の VT 遺伝子が陽性、若しくは、培養液 A の VT 遺伝子が陽性であり、かつ、分離した集落の VT 遺伝子が陰性の場合には他すべての集落を確認・同定する。なお、当該集落すべてについては、引き続き生化学的性状およびペロ毒素産生性試験までを実施する。
- 6) TSI および LIM 培地に加え、その他の生化学的性状培地や簡易同定キットなどを併用して大腸菌の生化学的性状であることを確認しても差し支えない。この場合、培養時間は数日を要することもある。

平成 16 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進事業）

細菌性食中毒の予防に関する研究

主任研究者 高鳥 浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究

生食用の食肉および野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌および

サルモネラ食中毒の予防に関する研究

分担研究者 高鳥 浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

協力研究報告書

食品および牛枝肉の腸管出血性大腸菌 O157 検査における LAMP 法の評価

#### 研究要旨

腸管出血性大腸菌（STEC）は、食中毒細菌のなかでも高齢者や乳幼児等が罹患した場合に、重篤な転帰をとることが多く、食中毒の予防対策が不可欠である。対策を行うにあっては、国内に流通し、消費される食品についてリスクが高い食品を把握することが基本となる。次いで、得られた情報をもとに、対策を取るべき優先順位を決定し、効果的な対策が取られるよう微生物学的リスクアセスメントを行うことが重要である。そこで、リスクアセスメントや汚染実態調査を行うに先立ち、近年微生物検査に広く利用される遺伝子検査法の一つである LAMP 法を用いた STEC 検査方法の有用性を検討した。LAMP 法による STEC 検査法は、STEC 以外の病原細菌に対して陰性反応を、Stx を産生する STEC O157 に陽性反応を呈し、特異性に優れた検査手法であることが確認された。

実験的に STEC O157 を添加した食品を用いて、LAMP 法による検出感度を培養法と比較検討した結果、共存細菌の多少に関わらず、LAMP 法の検出限界は食品 25g あたり十数個であった。一方、共存細菌の多い食品に十数個の STEC O157 を添加した条件下において、培養法ではほとんど STEC O157 を検出できなかった。

牛枝肉ふきとりの STEC O157 検査において、LAMP 法および培養法を比較検討した結果、培養法で菌が検出されなかった検体は、Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キットおよび PCR 法で *stx* 遺伝子が検出され、検体中に菌の存在が示唆された。

以上の結果から、LAMP 法は培養法よりも検出感度が高く、また検査日数が 2 日と短く、市販食品の汚染実態を把握するには、有用な STEC 検査方法である。

協力研究者

大塚佳代子 埼玉県衛生研究所

## A. 研究目的

細菌性食中毒の予防対策を検討するためには、微生物学的リスクアセスメントを行うことが重要である。そのためには、原因物質別の発生状況の特徴と原因食品を把握しなければならない。

腸管出血性大腸菌 (STEC) は、食中毒細菌のなかでも高齢者や乳幼児等が罹患した場合に、重篤な転帰をとることが多い。欧米では、本菌による食中毒の原因食品が、ハンバーグ、アップルジュースなどであるのに対し、日本での患者発生は牛レバーや食肉の生食との関連が指摘され、国々によって異なっている。従って、国内に流通し、消費される食品の中で、STEC のリスクが高い食品を把握するためには汚染実態調査を行う必要がある。

そこで、本研究では、汚染実態調査に用いる検査方法として、遺伝子検査法の一つである LAMP 法を用いた腸管出血性大腸菌検査方法を評価した。

## B. 研究方法

### 1. 特異性試験

供試菌株は食品由来、と畜場由来および人由来の STEC O157、53 株とその他の病原細菌 15 株を使用した。各菌株は

Trypticase Soy Broth で 18 時間培養した後、滅菌生理食塩水で  $10^4 \sim 10^6$  個/ml となるよう段階希釈した。

LAMP 鑄型は、希釈菌液を 95°C、10 分加熱抽出して調製した。

LAMP 反応試薬は、Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット (STEC 検出試薬キット、栄研化学) および大腸菌 O157 検出試薬キット (O157 検出試薬キット、栄研化学) を使用し、取扱説明書に従った。

LAMP 反応および結果判定は、Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA-200 (栄研化学) を用い、65°C の一定温度に、60 分間保持し、生成された副産物であるピロリン酸による濁度の変化を測定して判定した。

### 2. 食品培養液による LAMP 法の検出感度

供試菌株は幼稚園井戸水事例由来、高齢者施設浅漬け事例由来、学校給食事例由来および牛枝肉ふきとり由来の各 STEC O157 株を牛生レバー、ゴボウのゴマ和えおよびブロッコリーの芽各々 25g 当たり 1 ~ 19 個、実験的に添加した。食品は novobiocin 加 mEC (nmEC、栄研化学) を加えて 42°C、20 時間培養した。LAMP 鑄型は、食品培養液に、LAMP 試薬キットに付属する Extraction Solution for Foods 試薬を等量加えて調製した。

LAMP 反応および結果判定は、前述の特異性試験に準じた。