

- 瀬川優子、工藤由起子、木村邦夫. 三次元微細セル構造磁器質光触媒フィルターによるノリ加工廃水の浄化. 日本防菌防黴学会. 平成 17 年 5 月. 大阪.
- 田久保好慶、後藤元樹、工藤由起子、小沼博隆. リアルタイム PCR 法を用いた魚介類における腸炎ビブリオの部位別分布とその定量. 第 141 回日本獣医学会学術集会、平成 18 年 3 月、つくば.
- 山崎省吾、宮坂次郎、三輪憲永、岩出義人、八柳潤、高橋肇、工藤由起子. 魚介類からの *Vibrio vulnificus* の定量検出方法の検討. 日本食品衛生学会第 91 回学術講演会. 平成 17 年 10 月. 埼玉.
- 工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 O157 と腸炎ビブリオの食品汚染と制御について. 平成 17 年度食品衛生監視員等研修会. 平成 17 年 6 月. さいたま市.
- 高橋肇、小沼博隆、工藤由起子. 生菌数の定量 PCR. 第 25 回日本食品微生物学会. 平成 17 年 11 月. 金沢.
- 小林愛子、近藤和雄、小西良子、工藤由起子. 香草や薬味等に用いる植物葉等の抗菌作用について. 日本食品衛生学会第 89 回学術講演会. 平成 17 年 5 月. 東京.
- 山_ 学、山本茂貴、五十君静信. カンピロバクターの酸素ストレスに対する応答性. 第 26 回日本食品微生物学会学術総会, 2005 年 11 月 10-11 日. 金沢.
- Yamasaki, M., Amano, F., Kim, T.W., Yamamoto, S., and Igimi, S. Aerobic stress responses of *Campylobacter jejuni* precultured under anaerobic condition. The 13th International Workshop on *Campylobacter, Helicobacter* and Related Organisms (CHRO 2005). Gold Coast, Australia. September 2005.
- 山_ 学, 天野富美夫, 山本茂貴, 五十君静信. *Campylobacter jejuni* の coccoid 化における酸素の影響. 第 78 回日本細菌学会総会, 2005 年 4 月 4-6 日. 東京.
- 馬場愛, 樋脇弘, 宮本敬久, 瓜生佳世, 江渕寿美, 武田昭: 辛子明太子製造過程における *Listeria monocytogenes* の消長. 第 26 回日本食品微生物学会学術総会. 2005 年 11 月. 金沢
- 仲真晶子. 食品媒介リステリア症. 日本防菌防黴学会第 32 回年次大会. 平成 17 年 5 月. 大阪.
- 仲真晶子. 食品の *Listeria* 汚染実態. 第 26 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 17 年 11 月. 金沢.
- 関本容子、清家一生、植田富貴子、山田文也、小笠原邦敏、望月眞理子、本藤良. *Listeria monocytogenes* 汚染の分子疫学に関する基礎研究 5, *Listeria monocytogenes* 分離株の分子進化的解析. 第 139 回日本獣医学会学術集会. (2005)
- 高橋知子、松館宏樹、長谷川和弘、高橋雅輝、大窪富士子、瀬川俊夫、落合由嗣、植田富貴子、本藤良. と場に搬入された牛におけるリステリア菌

- の保有状況と *L. m* 分離株のゲノム構造の特性. 第 140 回日本獣医学会学術集会. (2005)
- 小笠原邦敏、植田富貴子、望月真理子、山田文也、青木英雄、木田中、中野恵、本藤良. *Listeria monocytogenes* 汚染の分子疫学に関する基礎研究 6, *Listeria monocytogenes* 輸入株における分子進化的解析. 第 140 回日本獣医学会学術集会. (2005)
- 五十君静信. 国内外における食中毒の動向とその制御. 微生物制御システム研究部会公開講演会 “リステリア菌の汚染の動向と制御～欧米での最新情報から検査・制御まで～”. 日本防菌防黴学会. (2005)
- 岡田由美子、牧野壮一、岡田信彦、朝倉宏、山本茂貴、五十君静信. *Listeria monocytogenes* の σ 因子の食塩耐性における役割. 日本細菌学会総会 (2005)
- 朝倉宏、川本恵子、度合雅久、五十君静信、塚本定三、山本茂貴、牧野壮一. モルヒネによる *Listeria monocytogenes* 及び *Brucella abortus* 感染に対する感受性変化についての検討. 日本細菌学会総会 (2005)
- 五十君静信. 食品媒介リステリア感染症の現状とその制御に向けて. 第 89 回日本食品衛生学会学術講演会 (2005)
- Okada Y, Okada N, Makino SI, Asakura H, Yamamoto S, Igimi S. SigmaL contributes the osmotolerance of *Listeria monocytogenes*. The XI International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. (2005)
- 岡田由美子、朝倉宏、岡田信彦、牧野壮一、山本茂貴、五十君静信: *Listeria monocytogenes* rpoN 欠失変異株の高食塩濃度下でのプロテオーム解析. 第 79 回日本細菌学会総会 (2006)
- 五十君静信. 国内のリステリア症の現状とその制御に向けて. 第 26 回日本食品微生物学会学術総会 (2005)
- 五十君静信. 国内のリステリア症の現状とその制御の方向性. 食の安全を確保するための微生物検査協議会講演会 (2005)
- 岡田由美子、朝倉宏、岡田信彦、牧野壮一、山本茂貴、五十君静信. *Listeria monocytogenes* rpoN 欠失変異株の高食塩濃度下でのプロテオーム解析. 第 79 回日本細菌学会総会. (2006)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む)
特になし

分 担 研 究 報 告 書

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

高 鳥 浩 介

平成 17 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

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）

分担研究報告書

生食用の食肉及び野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌及び
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）

研究要旨

日本の細菌性食中毒の予防のために、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について昨年度の結果を基礎にさらに検討した。サルモネラについては、輸入の香辛料や魚介類における汚染とその菌株の解析を行った。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。これらについて以下の 6 つの研究課題を実施した。

- (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
 1. 自然汚染食肉検体での検出
 2. 低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討
- (2) 志賀毒素産生性大腸菌及び腸管毒素原性大腸菌による食材汚染のスクリーニングにおける PCR 法の適用
- (3) 食品及び人における *Salmonella* Senftenberg と *Salmonella* Weltevreden の分布と細菌学的解析
- (4) 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究
- (5) 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

研究協力者

工藤由起子	国立医薬品食品衛生研究所	飯塚 信二	横浜検疫所
加地 祥文	横浜検疫所	鎌倉 和政	神戸検疫所
鈴木 壮介	神戸検疫所	仁科 徳啓	東海大学短期大学部
小澤 一弘	中部衛生検査センター	大塚佳代子	埼玉衛生研究所
平松 礼司	愛知県衛生研究所	矢野 一好	東京都健康安全研究センター
小西 典子	東京都健康安全研究センター	田中 廣行	日本食品分析センター
土屋 禎	日本食品分析センター	小沼 博隆	東海大学海洋学部
福岡県	保健環境研究所	静岡県	健康福祉部、中部保健所
千葉市	保健福祉局健康部、環境保健研究所	横須賀市	健康福祉部、健康安全科学センター
西川 禎一	大阪市立大学	森田 幸雄	群馬県衛生環境研究所
金子 誠二	東京都健康安全研究センター	浅井 良夫	神奈川県衛生研究所
古川 一郎	神奈川県衛生研究所	金子 通治	山梨県衛生公害研究所
野田 裕之	山梨県衛生公害研究所		

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。このため昨年度適切な方法を開発した。今年度は自然汚染検体で試験し、さらに応用方法を加えることを検討した。

また、以前から野菜・香辛料や魚介類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、昨年度に香辛料・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調査し本年度は株の解析を行った。さらに魚介類についても汚染調査を行い株の解析を行った。

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

(1) 自然汚染食肉検体での検出

国内で入手した輸入牛肉 324 検体を供試した。mEC 基礎培地で短時間培養し、その後ノボビオシン及び胆汁酸を加えてノボビオシン加 mEC 培地として 42℃18 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これを採用した。増菌培養液の VT スクリーニングを LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法を用いて、また免疫磁気ビーズ(血清型 O157、O26 及び O111)を用いた分離培養を行った。さらに、LAMP 法で陽性の検体における VT 陽性菌の検出を行った。

(2) 低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討

牛ひき肉に菌接種または非接種とし各血清型 (O157、O26 及び O111) 菌を、約 10—50 cfu を接種した。N-mEC 培地 225ml を加え 42±1℃、18~24 時間培養し LAMP 法及び分離培養に供した。また、食品増菌液に腸管出血性大腸菌の各種希釈菌液を接種し、培養法及び遺伝子検出法の各種遺伝子検出法の限界を比較検討した。遺伝子検出のための DNA 抽出法は熱抽出法及び PrepMan 抽出法を行った。遺伝子検出法としては、LAMP 法、Taq Man プローブ法、サイクリング・プローブ法、ハイブリダイゼーションプローブ法の計 4 種類を使用した。さらに、菌濃度 10⁵~10² cfu/ml について 6 種類の DNA 抽出

法の比較を行った。

2. 志賀毒素産生性大腸菌及び腸管毒素原性大腸菌による食材汚染のスクリーニングにおけるPCR法の適用

EPEC、EPEC及びEIEC各1株、計13株を陽性対照として試験に供した。動物性食材55品、植物性食材60品を購入し検体とした。FDAの二段培養法で増菌した。増菌液についてマルチプレックス遺伝子増幅法（PCR）による下痢原性大腸菌病原遺伝子の検出を行ない、PCR法の検出感度試験や増菌培養液中の食品微生物による阻害を検討した。

3. 食品及び人における *S. Senftenberg* と *S. Weltevreden* の分布と細菌学的解析

ヒト由来の菌株は、協力の得られた埼玉県内の病院を受診した下痢症者等から過去10年間に分離され、埼玉県衛生研究所に分与された株を集計した。また、市販の鶏肉及び香辛料から分離した *Senftenberg* 及び *Weltevreden* について、ヒト由来の同血清型株とPFGE法（制限酵素：*Bln I*）による遺伝子解析による相同性を比較した。

4. 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究

エビ212件、イカ63件等計353件（原産国：中国、インド、インドネシア、ベトナム、タイが68.8%）について調査を行った。サルモネラ定性及び定量試験（MPN3本法）には、一次増菌（BPW）後にRV Broth、TT Brothにて2次増菌及びクロモアガーサルモネラ

での分離を行った。また、増菌培養液はPCRにて *invA* 遺伝子を検出した。サルモネラ分離株はPFGE法による遺伝子解析（*Bln I*）を行った。

5. 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

2005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106自治体から承諾を得た。依頼項目として、原因物質名、患者数（人）原因食品中の菌数、原因食品の推定摂取量、病原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. 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

（1）自然汚染食肉検体での検出

供試した324検体中5検体の増菌培養液にLAMP法VT遺伝子検出スクリーニングによって陽性反応が認められた。しかし、血清型0157、026及び0111を対象とした免疫磁気ビーズ法による検出では陰性であり、それら以外の血清型の腸管出血性大腸菌が含まれることが明らかになった。次に血清型に係らず検出する方法を試み、5検体のいずれからも血清型OUTのVT1&2またはVT2産生腸管出血性大腸菌が分離された。

(2) 低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討

本研究で用いた増菌方法は O157 の検出には優れていることが再確認された。また、O157、O26 及び O111 の検出に LAMP 法及び Real-time PCR 法が遺伝子検出法として使用可能であることが確認された。さらに、その際には DNA 抽出をアルカリ抽出法や各種 DNA 抽出キットを使用することが必要であることが明らかになった。

2. 志賀毒素産生性大腸菌及び腸管毒素原性大腸菌による食材汚染のスクリーニングにおける PCR 法の適用

FDA 二段培養法が BPW-STG 法より高い大腸菌群検出率を示した。肉類は 80% 近い陽性率を示した。標的となる下痢原性大腸菌が単独で存在する場合、その種類により差はあるものの生菌数で $10^5 \sim 10^6$ /m^l 程度以上の菌数があればほぼ検出可能であった。

3. 食品及び人における *S. Senftenberg* と *S. Weltevreden* の分布と細菌学的解析

食品及びヒト由来 SS 7 株と SW 8 株の PFGE パターンを比較し、両者の相同性を検討したところ、食品由来の SS 2 株はヒト由来株と同一の PFGE パターンではなかった。しかしながら、鶏肉由来の SS 1 株のパターンはヒト由来の 2 株と近似し、香辛料の SW 1 株はヒト由来の 2 株と近似していた。

4. 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究

エビ 212 検体のうちインドネシア産及びベトナム産のブラックタイガー各 1 検体計 2 検体から *S. Weltevreden* を分離した。各検体の定量値は 40 MPN/100g 及び 30 MPN 未満/100g であった。この他、PCR 試験ではブラックタイガー 1 件 (タイ産)、ホワイトエビ 2 件 (インド、インドネシア産) の計 3 検体から *invA* 遺伝子を検出した。 H_2S 産生性及び遅産生性の 2 種類のサルモネラ株を分離し、これらの PFGE パターンは異なっていた。

5. 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

106 の協力自治体から実際に測定結果の得られた事例は 5 件であった。内訳はサルモネラ 3 件、毒素原性大腸菌 1 件、カンピロバクター 1 件であった。病原物質の推定摂取量は、サルモネラにおいては 288 MPN、400 MPN 及び 10^{10} cfu、毒素原性大腸菌においては約 25 MPN、カンピロバクターについては 360MPN が推定された。

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

(1) 自然汚染食肉検体での検出

国内の輸入牛肉 324 検体中 5 検体 (1.5%) (オーストラリア産 195 検体中 4 検体、ニュージーランド産 93 検体中 1 検体) から腸管出血性大腸菌が検出された。2 カ国に日本の牛肉の輸入が両国に偏っており他原産国由来の 35 検体からは

検出されなかったが、今後のデータの蓄積が必要と思われる。

(2) 低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討

腸管出血性大腸菌の検出法として迅速で高感度な方法の開発が示された。増菌培養については、血清型によって適切な方法が異なることが考えられるため、さらに検討し妥当な方法を確認することが望まれる。

2. 志賀毒素産生性大腸菌及び腸管毒素原性大腸菌による食材汚染のスクリーニングにおけるPCR法の適用

菌を分離できていないことや、PCRの陽性判定を増幅されたDNA産物のサイズのみによって判定しているため、偽陽性の可能性を否定できないが、PCRを用いたスクリーニングによって、市販食材が種々の下痢原性大腸菌によって汚染されている可能性が示唆された。

3. 食品及び人における *S. Senftenberg* と *S. Weltevreden* の分布と細菌学的解析

香辛料由来株に近似するサルモネラが分離されたヒトは海外渡航歴がなく当該菌に汚染された食品を国内で摂取した可能性は否定できない。タイや沖縄県でSWを起因菌とする事例少なくないため今後関連性を検討する価値があると考えられる。

4. 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究

サルモネラはエビからのみ検出されH₂S産生性の違いや異なるPFGEパターンを示

したことから、潜在的な病原菌が混在してエビを汚染している可能性が疑われた。今後、食中毒患者から分離した *S. Weltevreden* のPFGEパターンと比較することにより汚染源の特定の可能性が示唆された。

5. 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

5件（サルモネラ3件、病原性大腸菌（毒素原性大腸菌）1件、カンピロバクター1件）の解析であったが、この結果から、ほとんどの事例において発症菌数は一人当たり100-1,000 MPNであることがわかった。

D. 結論

1. 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

(1) 自然汚染食肉検体での検出

昨年度に確立した方法を応用し国内の輸入牛肉を対象に検出を試み、国内でも患者が報告されている血清型OUT株を分離した。今後さらに、日本での流通牛肉全体の汚染率や菌株の解析等の汚染調査をする必要があると考えられる。

(2) 低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討

血清型0157だけではなく日本での主要な血清型である026及び0111を対象を含め検討し、迅速で高感度な方法の開発が示された。増菌培養については、血清型によって適切な方法が異なることが考え

られ今後妥当な方法の開発が望まれる。

2. 志賀毒素産生性大腸菌及び腸管毒素原性大腸菌による食材汚染のスクリーニングにおけるPCR法の適用

市販食材が種々の下痢原性大腸菌によって汚染されている可能性が示唆された。今後、本格的なスクリーニングの必要性を示したものと理解される。

3. 食品及び人における *S. Senftenberg* と *S. Weltevreden* の分布と細菌学的解析

両血清型株について食品及びヒト由来株の一部は遺伝学的に近似することが示されたが、ヒトの感染源は不明であり、また両血清型は海外や沖縄での分離頻度が高いこと、日本は輸入食品への依存度が高いなどの理由から、引き続きヒト及び市販食品のサルモネラ汚染状況を監視していく必要がある。

4. 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究

サルモネラの輸入魚介類においてエビから多く検出した。菌株の血清型はいずれも *Weltevreden* であった。今後も輸入魚介類の調査を行い国内の食中毒との関連性を調べる必要があると考えられる。

5. 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

食中毒事例の原因食品中の菌数について、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*. 133:1043-8, 2005.

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.

Koujitani, E., Horisaka, T., Nomura, Y., Hara-Kudo, Y., Okatani, T. A., Kumagai, S., Iwata, T. and Hayashidani, H. Immuno-magnetic separation and agar layer methods for the Isolation of freeze-injured *Yersinia enterocolitica* O:8 from water. *J. Vet. Med. Sci.* 68: 195-199, 2006.

Hara-Kudo, Y. and Sugita-Konishi, Y. Antibacterial action on pathogenic bacteria by green tea catechins.

- Proceedings, The 8th International Symposium on Green Tea, 41-52, 2005.
- 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.* 85:2354-2361, 2005.
- Hara-Kudo, Y., Yoshino, M., Kojima, T., Ikedo, M. Loop-Mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. *FEMS Microbiology Letters.* 253:155-161, 2005.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology.* 71: 6730-6735, 2005.
- 工藤由起子、尾上洋一、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。印刷中。
- Hara-Kudo, Y., Ohtsuka, K., Onoue, Y., Otomo, Y., Furukawa, I., Yamaji, A., and Takatori, K. Incidence of *Salmonella* in imported spices in Japan. *J. Food Prot.* In press.
- Daisuke Nakajima, Ruri Ishii, shiho Kageyama, Yoshiki Onji, Shigeru Mineki, Nobuhisa Morooka, Kosuke Takatori and Sumio Goto : Genotoxicity of microbial volatile organic compounds. *Journal of Health Science,* 52(2), 148-153 (2006).
- 高鳥浩介 : 細菌毒, 真菌毒, 自然毒. *臨床と微生物* 33(3), 269-274 (2006).
- D. H. Lee, D.-W. Han, B. J. Park, H. S. Baek, K. Takatori, M. Aihara, K. Tsubaki and J.-C. Park : The Influences of α -Glucan Associated with BMP-7 on MC3T3-E1 Proliferation and Osteogenic Differentiation. *Key Engineering Materials Vols.,* 228-289, 241-244 (2005)
- B. J. Park, S. C. Kim, D. H. Lee, H. J. Son, K. C. Nam, K. Takatori, M. Aihara and J.-C. Park : Computer-Assisted Image Processing Techniques for Quantitative Analysis of Cell Migrations on Collagen-Coated Glass. *Key Engineering Materials Vols.,* 288-289, 503-506 (2005).
- T. HASEGAWA, Y. YOSHIDA, J. KOSUGE, T. HAGA, Y. GOTO, T. SHINJO; K. UCHIDA, R. YAMAGUCHI, S. TAKEYAMA, K.TAKATORI:Subcutaneous granuloma associated with *Macrophomina* species infection in a cat. *The Veterinary Record,* 156, 23-24 (2005)
2. 学会発表

工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 O157 と腸炎ビブリオの食品汚染と制御について. 平成 17 年度食品衛生監視員等研修会. 平成 17 年 6 月 28 日. さいたま市.

小林愛子、近藤和雄、小西良子、工藤由起子. 香草や薬味等に用いる植物葉等の抗菌作用について. 日本食品衛生学会第 89 回学術講演会. 平成 17 年 5 月. 東京.

佐々木美穂、近藤和雄、大久保勉、小西良子、工藤由起子. 緑茶カテキンの芽胞形成菌に対する抗菌活性. 日本防菌防黴学会. 平成 17 年 5 月. 大阪.

後藤元樹、高橋肇、Jagannath、林谷秀樹、高鳥浩介、工藤由起子. 黄色ブドウ球菌の定量 PCR. 第 25 回日本食品微生物学会. 平成 17 年 11 月. 金沢.

谷口裕之、工藤由起子、熊谷進. 絶食絶食ストレス下のウズラにおけるサルモネラ経口感染. 日本防菌防黴学会. 平成 17 年 5 月. 大阪.

飯渕るり子、工藤由起子、熊谷進. 乾燥環境におけるサルモネラの生存. 日本防菌防黴学会. 平成 17 年 5 月. 大阪.

飯渕るり子、工藤由起子、熊谷進. サルモネラのバイオフィルム形成性と乾燥環境下における生残. 第 140 回日本獣医学会学術集会. 平成 17 年 9 月. 鹿児島.

山路史子、大塚佳代子、古川一郎、尾上洋一、大友良光、工藤由起子. 香

辛料、ハーブ等におけるサルモネラ汚染. 日本食品衛生学会第 91 回学術講演会. 平成 17 年 10 月. 埼玉.

右井淳子、近藤和雄、澤田拓士、工藤由起子. シリアル、ドライフルーツ及びシード類におけるサルモネラ及び黄色ブドウ球菌の生残に関する研究. 日本食品衛生学会第 91 回学術講演会. 平成 17 年 10 月. 埼玉.

大塚佳代子、倉園貴之、柳川敬子、工藤由起子、高鳥浩介. 食品及び人における *Salmonella* Senftenberg と Weltevreden の分布と細菌学的解析. 第 25 回日本食品微生物学会. 平成 17 年 11 月. 金沢.

工藤由起子. 卵でのサルモネラ汚染とその食中毒について. 静岡県平成 17 年度食中毒処理研修会. 平成 17 年 11 月 16 日. 静岡市.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む)

特になし

平成 17 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

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

(1) 自然汚染食肉検体での検出

要旨

腸管出血性大腸菌の迅速で検出感度の高い検査方法については、血清型に関わらず病原因子であるペ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。今年度は、昨年度に確立した方法を応用し国内の輸入牛肉を対象に検出を試みた。その結果、324 検体中 5 検体（1.5%）から腸管出血性大腸菌が検出された。検体数が最も多かった原産国はオーストラリアであり、195 検体中 4 検体（2.1%）から検出された。次いで検体数が多かったニュージーランドでは、93 検体中 1 検体（1.1%）から検出された。分離株はすべて血清型 OUT であったが、国内でも OUT の腸管出血性大腸菌の患者が報告されている。今後さらに、日本での流通牛肉全体の汚染率や菌株の解析等の汚染調査をする事によって食中毒防止に役立てられると考えられる。

研究協力者

工藤由起子	国立医薬品食品衛生研究所
飯塚 信二、加地 祥文	横浜検疫所 輸入食品・検疫検査センター
鎌倉 和政、鈴木 壮介	神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター
仁科 徳啓	東海大学短期大学部
小澤 一弘	中部衛生検査センター

A. 研究目的 報告されている。また、その他の血清型
腸管出血性大腸菌による食中毒は血清 または 0 血清型 Untypable (OUT) も報告
型 0157 によるものが多いが、日本では毎 されてる。原因食品は、血清型 0157 につ
年血清型 026 及び 0111 による患者も多く いては牛肉や牛レバーなど牛に関連する

食品や野菜、果物などが挙げられる。しかし、他血清型では牛からの検出は多く報告されているが、食品からの検出はあまり多くない。食中毒事例においても原因食品が明らかになったものは少ない。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 や 0111 など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。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。しかし、分離培養には時間を要し検体が多数の場合は非常に多くの労力を必要とする。遺伝子検出法は、迅速で感度が比較的高いことから応用が進んでおり、近年多くの病原微生物の検出に必須となっている。腸管出血性大腸菌においては、その特徴であるベ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。昨年度に、本研究ではそれぞれの特性を利用して組み合わせて食品検査や食中毒調査において血清型 0157、026 及び 0111 の感度と特異性に優れた検査方法を確立した。今年度はそれを応用した

方法を考案し、国内の輸入牛肉から血清型を問わず腸管出血性大腸菌の検出を行い汚染率や血清型を明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

1. 供試検体

平成 17 年 8 月から平成 18 年 3 月に国内で入手した輸入牛肉 324 検体（表 1）を供試した。原産国は 7 カ国であったが、そのほとんどがオーストラリアおよびニュージーランドであった。

2. 増菌培養方法

増菌方法として、昨年度に確立した血清型 0157 以外の血清型も含めた腸管出血性大腸菌を迅速に効率よく検出する方法を応用し、図 1 に示す方法によって行った。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。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。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。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°C 18 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、これを採用した。

3. 遺伝子検出方法

増菌培養液の VT スクリーニングを LAMP（Loop-Mediated Isothermal Amplification）法を用いて行った。腸管

出血性大腸菌 VT スクリーニングキット (栄研化学) の使用方法に従い DNA 抽出を行い、得られた DNA 抽出液を Reaction Mix に加え 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。

4. 免疫磁気ビーズ (IMS) 法

増菌培養液 1 ml について血清型 0157、026 および 0111 の各々の免疫磁気ビーズ (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 を下記の分離平板培地に画線した。

5. 分離培養法

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) を用いた。血清型 0111 用に Vi RX 026 培地および CT-SMAC を用いた。

6. LAMP 法で陽性の検体における VT 陽性菌の検出方法

増菌培養液をリン酸生理食塩水にて 10^{-6} まで 10 倍階段希釈した。この各希釈液 0.1ml を RX 026 寒天培地 (セフィキシムおよび亜テルル酸ナトリウム不添加) (栄研化学) 2 枚ずつに塗抹し 35°C にて 20 時間培養した。また、各 10 倍階段希釈液 50 μ l を Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット (栄研化学) を用いて VT 遺伝子の検出を行い、VT 遺伝子陽性菌の含まれる希釈段階の確定を行った。この結果を踏まえ、RX 026 寒天培地からの VT 遺伝子陽性株の分離のための希釈段階を選定し

た。すなわち、Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キットにおいて陽性を示した最大希釈段およびその 10 倍希釈段を塗抹した RX 026 寒天培地に生育したコロニーを観察した。大腸菌と疑われる濃緑色〜緑色の光沢のないコロニーを PBS 0.1ml に浮遊し、そのうち 50 μ l を Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キットに供試した。その結果、陽性となったコロニー浮遊液の残液を RX 026 寒天培地に画線し 35°C にて 18~20 時間培養した。単離を確認した後、各株を PCR 法 (Takara, 0-157 ベロ毒素 1 型、2 型遺伝子 PCR typing set) およびリアルタイム PCR 法 (ABI7500, Nielsen et al. J. Clin. Microbiol. 41:2884-93, 2003) にて VT 1 および VT 2 遺伝子の検出を行った。さらに、一部菌株を供試し逆受身ラテックス凝集反応キット (VTEC-RPLA) (デンカ生研) にて VT 1 および VT 2 産生性を確認した。また、全株の O 抗原血清凝集試験を病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用いて行った。

C. 研究結果

供試した 324 検体中 5 検体 (オーストラリアおよびニュージーランド産) について LAMP 法 VT 遺伝子検出スクリーニングによって増菌培養液に陽性反応が認められた (表 1)。しかし、血清型 0157、026 および 0111 を対象とした免疫磁気ビーズ法による検出では陰性であり、それら以外の血清型の腸管出血性大腸菌が含まれることが明らかになった。次に血清型に係らず検出する方法を試み、5 検体のいずれからでも血清型 OUT の VT1&2 または VT2

産生腸管出血性大腸菌が分離された（表2）。以下に、検出の詳細を示す。

1. 検体番号 Y1

増菌培養液の 10^{-6} 希釈液は LAMP 法による VT 検出結果が陽性であり、同希釈液を塗抹し培養した RX-026 寒天培地の 1/6 分画の生育コロニー浮遊液で LAMP 法による VT 検出結果が陽性であった。このため、さらにこの分画を 12 分画し生育コロニー浮遊液を試験したところ 3 分画で LAMP 法による VT 検出結果が陽性であった。このうち LAMP 反応の立ち上がりの早い浮遊液について 10^{-6} まで 10 階段希釈し、各希釈液を RX-026 寒天培地に塗抹したところ、 10^{-4} 希釈の段階で生育した 18 コロニー中 1 コロニーが LAMP 陽性であった。この分離株は VT1&2 陽性、血清型 OUT であった。

2. 検体番号 Y2

増菌培養液の 10^{-4} 希釈液は LAMP 法による VT 検出結果が陽性であり、同希釈液を塗抹し培養した RX-026 寒天培地の 3/9 分画の生育コロニー浮遊液で LAMP 法による VT 検出結果が陽性であった。このため、さらにこの分画を 10 分画し生育コロニー浮遊液を試験したところ 4 分画で LAMP 法による VT 検出結果が陽性であった。このうち LAMP 反応の立ち上がりの早い 2 つの浮遊液について 10^{-6} まで 10 階段希釈し、各希釈液を RX-026 寒天培地に塗抹したところ、 10^{-4} 希釈の段階で生育した 4 コロニー中 2 コロニーが LAMP 陽性であった。これらの分離株は VT2 陽性、VT1 陰性、血清型 OUT であった。

3. 検体番号 Y3

増菌培養液の 10^{-5} 希釈液は LAMP 法による VT 検出結果が陽性であり、同希釈液を塗抹し培養した RX-026 寒天培地の 2/12 分画の生育コロニー浮遊液で LAMP 法による VT 検出結果が陽性であった。このため、さらにこれらの分画を合計 9 分画し生育コロニー浮遊液を試験したところ 2 分画で LAMP 法による VT 検出結果が陽性であった。このうちの 1 分画を希釈し RX-026 寒天培地に画線し培養した。生育したコロニーのうちの 11 コロニーを選択したところ 2 コロニーが LAMP 陽性であった。これらの分離株は VT2 陽性、VT1 陰性、血清型 OUT であった。

4. 検体番号 Y4

増菌培養液の 10^{-4} 希釈液は LAMP 法による VT 検出結果が陽性であり、同希釈液を塗抹し培養した RX-026 寒天培地の 6/24 分画の生育コロニー浮遊液で LAMP 法による VT 検出結果が陽性であった。このため、このうちの 1 分画を 10^{-6} まで 10 階段希釈し、各希釈液を RX-026 寒天培地に塗抹した。 10^{-6} 希釈液を塗抹し培養した RX-026 寒天培地の 1/39 分画の生育コロニー浮遊液で LAMP 法による VT 検出結果が陽性であった。この浮遊液をさらに 10^{-7} まで 10 階段希釈し培養した。 10^{-7} 希釈液を塗抹し培養した RX-026 寒天培地で生育した 38 コロニー中 5 コロニーが LAMP 陽性であった。これらの分離株は VT2 陽性、VT1 陰性、血清型 OUT であった。

5. 検体番号 K1

本検体は他 4 検体と異なり増菌培養液を BCM に画線した。培養後、大腸菌と思われるコロニーが多く出現し、そのうち

の2株は VT2 陽性、VT1 陰性、血清型 OUT であった。

D. 考察

本研究での結果、国内の輸入牛肉 324 検体中 5 検体 (1.5%) から腸管出血性大腸菌が検出された。検体数が最も多かった原産国はオーストラリアであり、195 検体中 4 検体 (2.1%) から検出された。次いで検体数が多かったニュージーランドでは、93 検体中 1 検体 (1.1%) から検出された。この 2 国由来の牛肉が検体の主であるが、日本の牛肉の輸入が両国に偏っているため必然的であった。オーストラリアおよびニュージーランド以外の原産国由来の 35 検体からは検出されなかったが、いずれも試験検体数が少ないため検出に至らなかったことが考えられ、今後のデータの蓄積が必要と思われる。

オーストラリアでの牛における腸管出血性大腸菌の調査において、血清型 05、08、026、0113、0157、OUT などが主な血清型であり、汚染率は 2002 年に 2.1% であったことが示されている。しかし、オーストラリアが特に牛の保菌率が高いのではなく、世界的に牛の保菌が知られて日本でも 37.5% の保菌の報告がある。このため、日本での流通牛肉全体の汚染率や菌株の解析等の汚染調査が必要である。また、国内の腸管出血性大腸菌による感染の主要は 0157、026、0111 であるが、今回陽性であった 5 検体全てから分離された OUT による感染も毎年報告されている。このため、牛肉を汚染している OUT が感染を引き起こしている可能性が

考えられる。これまで血清型 0157 については食品からの検出方法が確立され行われているが、026、0111 も含め他血清型については効果的な方法が確立されていない。本研究で用いたような方法 (図 1) によって、確実に検出できれば汚染率や主要な血清型など汚染実態が把握でき衛生管理の必要な対象を効果的に明らかにできるものと思われる。

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。今年度は、昨年度に確立した方法を応用し国内の輸入牛肉を対象に検出を試みた。その結果、324 検体中 5 検体 (1.5%) から腸管出血性大腸菌が検出された。検体数が最も多かった原産国はオーストラリアであり、195 検体中 4 検体 (2.1%) から検出された。次いで検体数が多かったニュージーランドでは、93 検体中 1 検体 (1.1%) から検出された。分離株はすべて血清型 OUT であったが、国内でも OUT の腸管出血性大腸菌の患者が報告されている。今後さらに、日本での流通牛肉全体の汚染率や菌株の解析等の汚染調査をする事によって食中毒防止に役立てられると考えられる。

F. 研究発表

型で2検体のいずれもが陽性を示した。また、牛挽肉の方が比較的検出率が悪く菌体からの DNA 抽出効率が芽野菜よりも難しいことが示された。これは牛挽肉中の脂肪分や血液成分が菌体からの DNA 抽出を阻害していることや DNA 増幅反応の阻害物質が除去されるためであることが考えられた。また、アルファルファにおいて High pure (Roche) 及び QIAamp (Qiagen) の DNA 抽出方法は、いずれの血清型でも 10^2 cfu/ml まで2検体の両方が陽性であった。これは、これらの DNA 抽出方法がほかのものと異なりカラムを使った DNA 精製段階も含むためより効率的な DNA 抽出が行えたものと考えられる。

D. 結論

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 及び 0111 を対象に含め検討した。昨年度の結果から、ノボビオシン加 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。本年度は、各種遺伝子検出法の応用及び検体からの効果的な DNA 抽出方法の検討を中心に行った。その結果、0157、026 及び 0111 の検出に LAMP 法及び Real-time PCR 法が遺伝子検出法として使用可能であることが確認された。また、その際には DNA 抽出をアルカリ抽出法や各種 DNA 抽出キットを使用すること

が必要であることが明らかになった。以上から、腸管出血性大腸菌の検出法として迅速で高感度な方法の開発が示された。増菌培養については、血清型によって適切な方法が異なることが考えられるため、さらに検討し妥当な方法を確認することが望まれる。

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*. 133:1043-8, 2005.

Hara-Kudo, Y. and Sugita-Konishi, Y. Antibacterial action on pathogenic bacteria by green tea catechins. *Proceedings, The 8th International Symposium on Green Tea*, 41-52, 2005.

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.* 85:2354-2361, 2005.

Daisuke Nakajima, Ruri Ishii, shiho Kageyama, Yoshiki Onji, Shigeru Mineki, Nobuhisa Morooka, Kosuke Takatori and Sumio Goto : Genotoxicity of microbial volatile organic compounds. *Journal of Health Science*, 52(2), 148-153 (2006).

高鳥浩介：細菌毒，真菌毒，自然毒。臨

床と微生物 33(3), 269-274 (2006).

D. H. Lee, D.-W. Han, B. J. Park, H. S. Baek, K. Takatori, M. Aihara, K. Tsubaki and J.-C. Park : The Influences of α -Glucan Associated with BMP-7 on MC3T3-E1 Proliferation and Osteogenic Differentiation. Key Engineering Materials Vols., 228-289, 241-244 (2005)

B. J. Park, S. C. Kim, D. H. Lee, H. J. Son, K. C. Nam, K. Takatori, M. Aihara and J.-C. Park : Computer-Assisted Image Processing Techniques for Quantitative Analysis of Cell Migrations on Collagen-Coated Glass. Key Engineering Materials Vols., 288-289, 503-506 (2005).

T. HASEGAWA, Y. YOSHIDA, J. KOSUGE, T. HAGA, Y. GOTO, T. SHINJO, K. UCHIDA, R. YAMAGUCHI, S. TAKEYAMA, K. TAKATORI : Subcutaneous granuloma associated with *Macrophomina* species infection in a cat. The Veterinary Record, 156, 23-24 (2005)

2. 学会発表

工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 O157 と腸炎ビブリオの食品汚染と制御について. 平成17年度食品衛生監視員等研修会. 平成17年6月28日. さいたま市.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

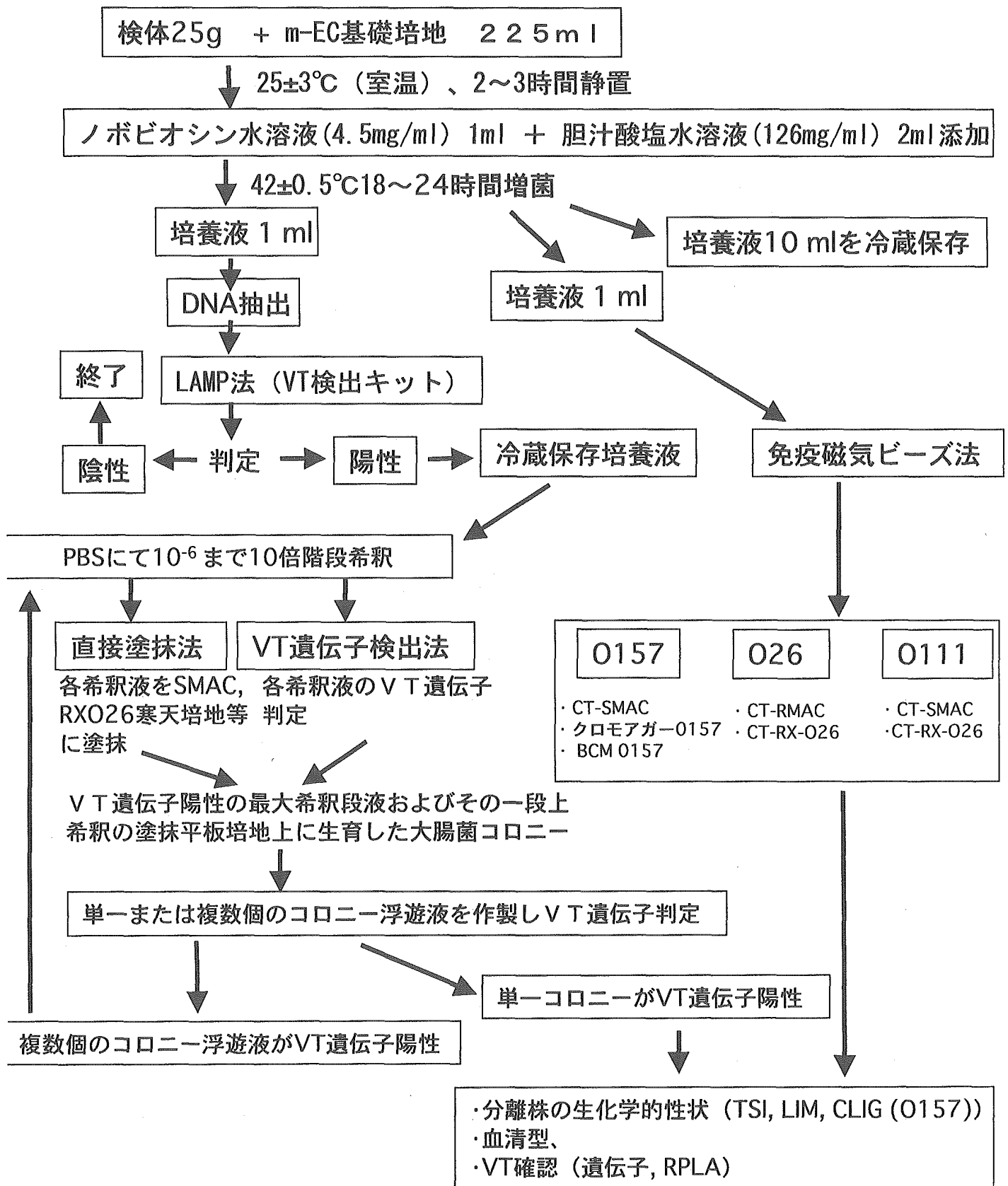


図1 食肉における腸管出血性大腸菌の検出法

表1. 供試検体における検出結果

原産国	試験検体数	VT 陽性検体数 (%)
オーストラリア	195	4 (2.1%)
ニュージーランド	93	1 (1.1%)
アメリカ合衆国	30	0
カナダ	2	0
中国	1	0
メキシコ	1	0
ヴァヌアツ	1	0
合計	324	5 (1.5%)

表2. 分離株の血清型およびVT 産生性

検体番号	原産国	血清型	VT 型
Y1	オーストラリア	OUT	VT1& VT2
Y2	ニュージーランド	OUT	VT2
Y3	オーストラリア	OUT	VT2
Y4	オーストラリア	OUT	VT2
K1	オーストラリア	OUT	VT2