

- 品培養液からの DNA 抽出法の検討.
第 27 回日本食品微生物学会学術総
会. 平成 18 年 9 月. 大阪.
- 日高あゆみ、渡部裕美、河村麻紀、高鳥
浩介、西川禎一. レタスの腸管出血性
大腸菌 0157 汚染に対する各種殺菌料
の効果と適用方法の検討 第 26 回日本
食品微生物学会学術総会 平成 17 年 11
月 金沢
- 金子通治、浅井良夫、森田幸雄、大塚
佳代子、金子誠二、古川一郎、野田
裕之、工藤由起子、高鳥浩介.
輸入魚介類におけるサルモネラ汚
染に関する研究. 第 27 回日本食品
微生物学会学術総会. 平成 18 年 9
月. 大阪.
- 右井淳子、近藤和雄、工藤由起子.
穀物加工品および原料におけ
るサルモネラおよび黄色ブド
ウ球菌のカテキンによる増殖
および生残抑制効果. 第 92 回
日本食品衛生学会学術講演会. 平
成 18 年 10 月. 愛知.
- 神尾暁、八尋俊輔、宮坂次郎、瀬川優
子、工藤由起子、小沼博隆. 環境
海水中の *Vibrio vulnificus* の分
離における増菌及び分離培養法
の問題点について. 腸炎ピブリオシ
ンポジウム. 平成 18 年 11 月.
東京.
- 宮坂次郎、八尋俊輔、中島龍一、工藤
由起子. 水鳥糞便中の *Vibrio*
vulnificus と *Vibrio*
parahaemolyticus の検索. 日本獸
医公衆衛生学会 (九州), 平成 18
年 10 月, 熊本.
- 山崎省吾、中村まき子、右田雄二、原
健志、工藤由起子、三澤尚明、岡
本嘉六、高瀬公三: 海水における
Vibrio vulnificus の季節消長と環
境因子, 日本獸医公衆衛生学会 (九
州), 平成 18 年 10 月, 熊本.
- 清家一生、福田雅史、小笠原邦敏、本
藤良、植田富貴子. *Listeria*
monocytogenes 汚染の分子疫学
に関する基礎的研究、7. *Listeria*
monocytogenes 輸入株における分
子進化学的解析 (2). 第 142 回日
本獸医学会学術集会、2006.
- 樋口 篤、仲真晶子、小西典子、下島
優香子、尾畑浩魅、門間千枝、矢
野一好、甲斐明美、福山正文、山
田澄夫. チーズからの *Listeria*
monocytogenes 検出法の比較検討.
第 27 回食品微生物学会学術集会.
平成 18 年 9 月. 大阪.
- 仲真晶子、小西典子、下島優香子、石
崎直人、尾畑浩魅、門間千枝、矢
野一好、甲斐明美、五十君静信、
諸角 聖、山田澄夫. *Listeria* の
ヒト糞便からの検出状況. 第 27
回日本食品微生物学会学術総会.
平成 18 年 9 月. 大阪.
- Okada Y, Makino S-I, Okada N,
Asakura H, Yamamoto S and Igimi
S. Identification and analysis

of the osmotolerance associated genes in *Listeria monocytogenes*.
10th International Symposium on Toxic Microorganisms.
Washington DC USA. November 8, 2006.

五十君静信。食品媒介感染症としてのリステリア症の現状。ILSI Japan 食品汚染微生物 シンポジウム。2006.12.7

五十君静信。国内のリステリア症の現状。リステリア菌髄膜炎の11ヶ月の乳児例に関する指定発言。第546回日本小児科学会東京都地方会談話会 2007.3.10。帝京大学。東京
岡田由美子、石和玲子、高谷幸、山本茂貴、五十君静信。未殺菌乳を原料とするチーズ製造工程における *Listeria monocytogenes* の消長。日本細菌学会 2007.3.26。大阪

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

H18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

主要な食中毒菌に対する日本独自のリスクアセスメントモデルを策定してリスク管理措置を検討し、食中毒発生防止を測る必要がある。このため、我が国において主要な食中毒の原因となっている病原細菌と食品について汚染実態調査等を実施し、リスクアセスメントに必要な基礎データの収集を行う。本研究では、腸管出血性大腸菌、サルモネラを対象に実施する。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。

- (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
 2. 低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討
- (2) 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
マルチプレックス定量PCR法を用いた下痢原性大腸菌検出
- (3) 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究
- (4) 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	大塚佳代子 埼玉衛生研究所
平松礼司 愛知県衛生研究所	小沼博隆 東海大学海洋学部
小西典子、甲斐明美 宮城県保健環境センター	東京都健康安全研究センター 静岡市衛生研究所
大分県衛生環境研究センター	奈良県福祉部健康安全局
土屋 禎、田中廣行	日本食品分析センター
新妻 淳、三浦彰子、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、後藤郁夫、池田 健	神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター
野田裕之、金子通治	山梨県衛生公害研究所

A. 研究目的

細菌性食中毒の予防対策には近年世

界的に普及しているリスクアセスメン

トの手法を用いた科学的な知見が求め

られている。日本においても取り組みが進みつつあり、日本の現状に即した知見が必要である。現在の日本での主要な細菌性食中毒は腸炎ビブリオ、サルモネラ、カンピロバクター、腸管出血性大腸菌などを原因菌としており、その原因食品として生食用食品が注目されている。腸炎ビブリオ食中毒は日本の特徴的な食中毒であり国内で汚染実態の研究が求められる。サルモネラ食中毒は家庭内の食中毒も多くサルモネラ制御についてさらに研究が求められている。近年世界的にも国内でも感染者の増えているカンピロバクターは鶏肉を原因としているが国内での調査がほとんど行われていない。腸管出血性大腸菌食中毒は持続的に発生しており重篤な症状にいたることから実態を把握する必要がある。加えて、国内でも重症例の発生が明らかになったリステリアについては、国内の食品媒介感染症としてのリステリア症の発生状況を把握し、そのヒトへの危害について科学的に分析を行い、リスクアセスメントに必要な科学的根拠を提供する。危害の想定される特定の非加熱喫食食品については、リスクアセスメントを行い、具体的なリスクマネジメントの方法に関する情報を提供する。これにより、リステリアによるリスクが明かとなり、食品を介したヒトのリステリア症の発生を未然に防止できることが期待される。

さらに、日本で問題になっている主要

な食中毒原因菌と食品について汚染実態を把握し、さらに実際の食中毒事例を調査し発症菌量を明確にする。これらの研究から得られた結果を基日本独自のリスクアセスメントを試みる。本研究によって、食品のリスクを明かにし、その制御方法に関する科学的根拠を提供し、食中毒の発生を未然に防止できることが期待される。

B. 研究方法

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

(1) 供試検体

輸入牛肉 439 検体を供試した。原産国は7カ国であった。

(2) 増菌培養方法

16 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た。ノボピオシン加 mEC 培地による 42℃18 時間培養を基本とした。ノボピ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ピオシンおよび胆汁酸を加えてノボピオシン加 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 法を用いて行った。

(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。

（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℃にて 20 時間培養した。また、各 10 倍階段希釈液 $50 \cdot 1$ 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。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。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℃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 法にて VT 1 および VT2 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 VT1 および VT2 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。

２）低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討

（１）各種 DNA 抽出法の検討

各種 DNA 抽出方法の比較を行った。血清型 0157（No. 212：VT1& 2 産生）、血清型 026（No. BFR 26015：VT1& 2 産生）及び血清型 0111（No. ESC4：VT1& 2 産生）の複数株を TSB にて 37℃18 時間培養し、これを PBS で 10^{-7} まで 10 段階希釈した。各種食品をノボビオシン加 mEC 培地（NmEC）での 42℃増菌液 900 μ l に添加し、これをサンプルとした。

（２）血清型による増菌培養条件の比較

検体には牛挽肉、カイワレ大根およびアルファルファを使用した。0157（No. 212）、026（No. 26015）、0111（No. 97353）の各菌株を 35-37℃18 時間培養し、PBS または生理食塩水で 10^{-6} 希釈（約 500cfu/ml）及び 10^{-7} 希釈（約 50cfu/ml）した。

検体に NmEC 培地（Merck）または mEC 培地（BD）225ml を加え、1 分間のストマッカー処理を行い、 42 ± 1 ℃または 37 ± 1 ℃にて 20 時間培養した。

培養液 0.05ml をネジロマイクロチューブに移し、LAMP 法に供した。また、1ml ずつ 2 本のマイクロチューブに移し、1

本は免疫磁気ビーズ、1本は直接塗抹用に供した。

直接分離法では、 10^{-1} を上記各平板1枚に画線した。

菌株の確認のため、各平板につき疑わしい集落を5個以上釣菌（もし、全て陰性ならさらに10個（最大15コロニー以上）した。血清（0157, 026, 0111）にて凝集反応を確認した。

2. 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

マルチプレックス定量PCR法を用いた下痢原性大腸菌検出

1) 使用菌株

各病原遺伝子陽性株として、以下の菌株を使用した。[]内は標的病原遺伝子。EPEC E2348/69 [*eae*]、EHEC 99-140-A [*stx1*, *eae*]、EHEC V-831 [*stx2*, *eae*]、STEC EC7225 [*stx1*]、STEC EC8212 [*stx2*]、ETEC 97-245-244 [*est* (STp)]、ETEC E7476 [*est* (STh)]、ETEC E5798 [*elt*]、EAggEC E59152 [*aggR*]、EIEC E35990 [*virB*]、DAEC V-64 [*afaB*]、EAST1EC 96-127-23 [*astA*]

2) 培地

供試菌株の培養にはトリプトソーヤブイヨン、トリプトソーヤ寒天平板を使用した。

3) 通常のPCR法

4種の遺伝子 (*invE*・*stx*・*est*・*elt*) を同時検出するテトラプレックスPCR、2種の遺伝子 (*afaC*・*astA*) あるいは (*eae*・*aggR*) を同時検出するデュプレックスPCR

法を実施した。

PCRに供したテンプレートは、TSB培地で37℃18時間培養後の培養液を、マイクロチューブにとり、間遠心した。上清を捨て、滅菌蒸留水を加え、混和した。培養菌液は段階希釈後スパイラルプレート法でTSAに塗抹し、生菌数を算出した。

(1) *invE*・*stx*・*est*・*elt*テトラプレックスPCR

4遺伝子を同時検出するテトラプレックスPCRは伊藤らの方法を改変し実施した。PCR試薬はTaKaRa Ex Taq (タカラバイオ株式会社、滋賀)を用いた。反応液は計25 μ lとし、Takara Ex Taq (5U/ μ l)を0.3 μ l (1.5U)、10 \times Ex Taq Buffer (20 mM Mg²⁺)を2.5 μ l (Mg²⁺最終濃度2mM)、dNTP Mixture (2.5mM)を2.0 μ l (最終濃度200 μ M)、プライマーEC mix 1.3 μ l混合し、テンプレートDNAは2 μ l加えた。

(2) *afaC*・*astA*デュプレックスPCR

PCR試薬はTaKaRa Ex Taq (タカラバイオ)を用いた。反応液は計25 μ lとし、Takara Ex Taq (5U/ μ l)を0.1 μ l (0.5U)、10 \times Ex Taq Buffer (Mg²⁺ Free)を2.5 μ l、dNTP Mixture (2.5mM)を2.0 μ l (最終濃度200 μ M)、MgCl₂ (25mM)を2.5 μ l (最終濃度2.5mM)、プライマーは50 μ MになるようTEに溶解したものを*afa-f*、*afa-r*は各0.1 μ l、EAST11a、EAST11bは各0.15 μ l混合し、テンプレートDNAは2 μ l加えた。

(3) *eae*・*aggR*デュプレックスPCR

PCR試薬はTaKaRa Ex Taq (タカラバイオ)

オ)を用いた。反応液は計 25 μ l とし、(2)と同量の試薬を混合し、プライマーは 50 μ M の eaeAF, eaeAR を各 0.1 μ l, eaggRF, eaggRR を各 0.2 μ l 添加した。テンプレート DNA は 2 μ l 加えた。

(4) アガロースゲル電気泳動

PCR産物 10 μ l はゲルローディングバッファー 2 μ l と混合し、2.5%アガロースゲルを用いて TBE 緩衝液中、100V で泳動した。泳動後、染色し、紫外線照射下で PCR 産物の有無とサイズを観察した。

4) プライマーとプローブの設計

リアルタイム PCR に使用したプライマーおよびプローブは、Primer Express ver. 2.0 (ABI) を用いて、添付のガイドラインに従い設計した。遺伝子にいくつかの変異型がある場合は、塩基配列のホモロジー比較を GENETYX- WIN ver. 4.0.3 を用いて行い、プライマー設計箇所を特定して設計を行なった。プライマーおよびプローブ、アンプリコンは NCBI BLAST の Nucleotide- nucleotide BLAST (blastn) で、標的遺伝子への特異性を確認した。

TaqMan プローブおよび TaqMan MGB プローブは 5' 末端を FAM または VIC の蛍光物質にて修飾した。合成されたプライマーは 50 μ M になるよう TE に溶解した。プローブ (ABI) は 10mM Tris- HCl [pH7.5] で 2 μ M に希釈した。

5) DNA 抽出

リアルタイム PCR 用は定量検出を目的とするため、そのテンプレート DNA は安定的に抽出させ、抽出した DNA は、GeneQuant

pro “S” RNA/DNA Calculator により吸光度を測定し、純度の指標として吸光度比 260/280 を用いた。

6) リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR は *stx* (Stx1・Stx2)・*eae* トリプレックス、*stx1*・*stx2* デュプレックス、*est* (STp・STh)・*elt* トリプレックス、*est* (STp)・*est* (STh) デュプレックス、*aggR*・*astA* デュプレックス、*virB*・*afaB* デュプレックスの組み合わせで行なった。

7) プライマーおよびプローブの有用性と特異性の検討

設計したプライマー・プローブについてリアルタイム PCR における有効性を、 T_m 値、増幅産物サイズ、Ct 値などから検討した。

8) リアルタイム PCR の感度

マルチプレックス・リアルタイム PCR の感度を検討した。

3. 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究

1) 接種菌株

インドネシア産ブラックタイガーから分離された *Salmonella* Weltevreden (以下 SW と略す) および一昨年度の野菜・香辛料におけるサルモネラ汚染に関する研究においてタイ産チリペッパーから分離された *Salmonella* Senftenberg (以下 SS と略す) を使用した。

2) 接種検体

インドネシア産ブラックタイガーを購入した。サルモネラの汚染を測定した。サルモネラの定性試験は 25g を

BPW(OXOID)を 225ml 加えて 2 分間混和し、培養した。BPW 培養液を Rappaport-Vassiliadis Enrichment Broth 10 ml に 0.1 ml、Tetrathionate Broth 10 ml に 1 ml をそれぞれに接種し、培養した。RV、TT 培養液をボルテックス後、XLD(OXOID)に画線し、35℃24 時間培養し、サルモネラの汚染の有無を確認した。

3) 菌液の作製

TBS で 24 時間培養した菌液を PBS で 100 倍希釈し、それを接種菌液(約 7.0 log CFU/ml)とした。菌数の測定方法は、接種菌液をさらに 10⁵ 希釈し、その 0.1ml を Trypticase soy agar に塗抹し 37℃にて 18 時間培養し生育したコロニー数から算出した。

4) 菌の接種方法

冷凍されたエビを 20℃の温浴中で短時間に解凍し、体表と体内の 2 通りの方法で接種した。

5) 冷凍保存温度および保存期間

保存温度は- 10℃、- 20℃、- 30℃の 3 温度、保存期間は 1、2、4、8、12 週間の 5 期間とした。

6) 菌数測定

1 検体は接種部位・保存温度・保存期間ごとに 3 匹を使用した。検体を 20℃の温浴で短時間に解凍し、検体の 9 倍量の PBS を加えた。検体原液を PBS で 10 倍および 100 倍希釈し、原液、10 倍希釈液、100 倍希釈液の 0.1 ml を XLD に 2 枚ずつコンラージで塗抹し、35℃で 20~24 時間培養後、出現した黒色のコロニー数を測定した。

4. 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菌の菌数測定を全国の地方自治体に依頼した。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

439 検体中 9 検体について 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。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。

2) 低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討

(1) 各種 DNA 抽出法の検討

17 年度の結果から熱抽出法は優れないことが明らかになったため、アルカリ試薬およびキット等を用いた抽出方法を検討した。

牛挽肉、カイワレ大根、30%牛脂加牛挽肉、牛レバー、卵、チーズ、キュウリの

浅漬けおよびの NmEC 増菌液に 026 を接種し、アルカリ抽出法、PrepMan 法または DNeasy 法で DNA 抽出を行い、LAMP 法、TaqMan PCR 法、LightCycler 法および SmartCycler 法によって VT 遺伝子検出を行ったところ、検出可能であった。総じて、どの食品でも今回実施した VT 遺伝子検出法のいずれも 10^3 cfu/ml 以上の腸管出血性大腸菌を含む食品培養液から確実に検出できることが明らかになった。チーズでは再現性が優れない場合があり、種類によって異なる可能性もあることからさらに検討が必要と考えられた。

(2) 血清型による増菌培養条件の比較

血清型 0157 については、アルファルファにおいて 3 菌株とも mEC での 37 および 42℃ 培養、NmEC での 42℃ 培養の遺伝子検出法および培養法のいずれでも検出された。血清型 0111 については、牛挽肉において 1 菌株が mEC での 37℃ 培養での培養法では陰性の塗抹方法もあった。カイワレ大根について牛挽肉で検出が優れなかった一株とは異なる株で、mEC での 37℃ 培養で培養法では陰性の塗抹方法があり、さらに NmEC での 42℃ 培養では LAMP 法および培養法で陰性であり増殖性が著しく優れなかった。

2. 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

マルチプレックス定量 PCR 法を用いた下痢原性大腸菌検出

1) プライマーおよびプローブの有用性と特異性の検討

リアルタイム PCR を行い、通常の PCR の結果と比較した。 *stx1* 陽性 16 株 (*Shigella dysenteriae* 1 株を含む)、 *stx2* 陽性 20 株、 *eae* 陽性 35 株、 *est* (STp) 陽性 4 株、 *est* (STh) 陽性 6 株、 *elt* 陽性 5 株、 *aggR* 陽性 14 株、 *astA* 陽性 23 株、 *afaB* 陽性 6 株、 *virB* 陽性 2 株については PCR 結果と一致した。また、 *elt* と塩基配列が似ているとされるコレラ毒素遺伝子 *ctx* 陽性株 (*Vibrio cholerae*) 2 株はリアルタイム PCR では検出されないことを確認した。

2) リアルタイム PCR の感度

マルチプレックス・リアルタイム PCR の至適条件を検討し、確定した (表 6)。各マルチプレックス・リアルタイム PCR の検量線は、すべての遺伝子において決定係数 (R^2) 0.99 以上となった。増幅効率は 78-108% であった。

3. 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究

1) 接種検体の生菌数と大腸菌数

一般生菌数 (log CFU/g) は、殻付きのもの 5.77、殻を取ったもの 5.78、大腸菌群数は、殻付きのもの 2.40、殻を取ったもの 2.30 であった。

2) 接種菌量

接種した 50 μ l の菌数 (log CFU/匹) は、SW が平均 5.43、SS が平均 5.49 であった。

3) サルモネラ菌数の変化

3 検体の平均値から得られた 1 匹あたりのサルモネラ菌数 (log CFU/匹) の変化による接種直後の菌数は、SW・体表が

5.78、SW・体内が6.17、SS・体表が5.65、SS・体内6.18であった。

4. 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

発症菌数を把握することを目的に調査を行っているが、サルモネラにおいてはこれまで Enteritidis や Typhimurium については比較的知見が多く昨年までも結果が得られているが、異なる血清型による3事例の事例が報告された。少数の感染菌数であることが報告された。

D. 考察

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

本研究での結果腸管出血性大腸菌が検出された。オーストラリアおよびアメリカ以外の原産国由来の114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。

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9検体中7検体から分離された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。

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。

2) 低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討

(1) 各種DNA抽出法の検討

熱抽出法は優れないことが明らかになったため、アルカリ試薬およびキット等を用いた抽出方法を検討した。どの食品でも今回実施したVT遺伝子検出法のいずれも 10^3 cfu/ml以上の腸管出血性大腸菌を含む食品培養液から確実に検出できることが明らかになった。しかし、チーズでは再現性が優れない場合があり、種類によって異なる可能性もあることからさらに検討が必要と考えられた。

(2) 血清型による増菌培養条件の比較

3血清型を網羅する増菌培養法として、mECでの42℃培養が優れていたが、検体数や菌株数をさらに増やして検討する必要がある。また、いずれの条件を採用するのが最善かは対象食品や対象血清型など目的を踏まえて選択することも有用と考えられる。

2. 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

マルチプレックス定量PCR法を用いた下痢原性大腸菌検出

純培養菌液から抽出を行なったテンプレートDNAを用いたマルチプレックス・リアルタイムPCR法では、すべての組み合わせにおいて高い特異性と検出感度が

示された。

これらのプライマーおよびプローブを用いたマルチプレックス・リアルタイム PCR では、単一遺伝子の増幅あるいは複数遺伝子の同時増幅など、いずれの場合においても定量が可能であった。食品や糞便を検体とするとき、複数の標的となる菌がそれぞれ異なる数存在している可能性は十分に考えられ、それらをともに検出できる方法が重要であると考えられる。その意味からも、今回開発したリアルタイム PCR 条件は、実用性の高いものと期待できる。

以上、7 グループの下痢原性大腸菌を同時に網羅的に検出するリアルタイム PCR 法を確立した。今後は、本法を用いて食品や家畜あるいは環境の汚染実態調査を行い、その汚染源を探る予定である。

3. 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究

日本は世界有数のエビ輸入国であり、そのほとんどは東南アジアから冷凍されてわが国に輸入されている。エビを汚染したサルモネラが冷凍保存中にどのような消長を示すかを確認することは、エビの冷凍流通や解凍時における衛生管理を考える上で有用である。そこで、レッドペッパー（タイ産）から分離された Senftenberg の 2 血清型のサルモネラを使用して、エビにサルモネラを接種し、接種部位、冷凍保存温度、保存期間の違いによるサルモネラの消長を検討した。

SW はベトナムにおいてエビ、さらにウシ、ブタからも高率に分離されると報告

されている。今回の実験では SW より SS の方が冷凍後の残存菌数が多い傾向がみられたが、血清型本来の冷凍保存に対する抵抗性の違いか、今後さらに例数を増やしての検討が必要である。

4. 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

発症菌数を把握することを目的に調査を行っているが、サルモネラにおいてはこれまで Enteritidis や Typhimurium については比較的知見が多く昨年までも結果が得られているが、今年度は異なる血清型による 3 事例の事例が報告された。少数の感染菌数であることが報告された。

本事業は、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てきたが、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 3 年目である今年度も例年とほぼ同様に 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、さらに継続的な事業による重要性の広い理解とデータの蓄積が必要ではないか考える。

E. 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

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ペロ毒素を検出することによるより適切な検出ができ、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。

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。血清型 0157、026 に加え 0111 を検査対象に含める場合は mEC での 42℃増菌培養が優れていた。腸管出血性大腸菌 0157 および 026 の検出法として迅速で高感度な方法が示された。

2. 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

マルチプレックス定量PCR法を用いた下痢原性大腸菌検出

志賀毒素産生性大腸菌・腸管毒素原性大腸菌・腸管病原性大腸菌・腸管侵入性大腸菌・腸管凝集接着性大腸菌・分散接着性大腸菌・EAST1 遺伝子保有大腸菌の 8 種類の病原遺伝子を標的として、リアルタイム・マルチプレックス PCR 法の応用を試みた。本手法は DEC の網羅的スクリーニングに極めて有効な手段になると期待される。

3. 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究

エビでのサルモネラ接種冷凍保存実験の結果、サルモネラはエビで冷凍保存された場合、とくに-30℃では菌数が長期間維持されることが確認できた。

4. 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数の測定を全国の地方自治体に依頼したところ 101 自治体から承諾を得たが、実際に測定結果を得られた事例はサルモネラ 5 件、腸管出血性大腸菌 1 件の計 6 件であった。

食中毒事例の原因食品中の菌数について得られた調査データには限りがあるが、リスクアセスメントに貴重なものである。今後もさらに蓄積する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hara-Kudo, Y., Niizuma, J., Goto, I., Iizuka, S., Kamakura, K., Kaji, Y., Suzuki, S. and Takatori, K. Procedures for isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, which is independent of serotype, from beef naturally contaminated with the pathogen. 投稿中.

Hara-Kudo, Y., Konishi, N., Otsuka, K., Hiramatsu, R., Tanaka, H., Tsuchiya, T., Konuma, H. and Takatori, K. Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 and 026 in food by means of

immunomagnetic separation methods in combination with a molecular method: a collaborative study. Int. J. Food Microbiol. 投稿中.

Hara-Kudo, Y., Nemoto, J., Ohtsuka, K., Segawa, Y., Takatori, K. Kojima T., Ikedo, M. Sensitive and rapid detection of Vero toxin-producing *Escherichia coli* using Loop-mediated isothermal amplification. J. Med. Microbiol. J. Med. Microbiol. 56: 398-406, 2007.

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。日本食品衛生学会誌。47, 119-126, 2006.

Hara-Kudo, Y., Ohtsuka, K., Onoue, Y., Otomo, Y., Furukawa, I., Yamaji, A., Segawa, Y. and Takatori, K. *Salmonella* prevalence, total microbial and spore populations in imported spices to Japan. J. Food Prot. 69:2519-2523, 2006.

Otomo, Y., Abe, K., Odagiri, K., Shiroto, A., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y. Detection of *Salmonella* in spent hens and eggs associated with food-borne infections. Avian Diseases. In press.

2. 学会発表

工藤由起子. 食品における腸管出

血性大腸菌 0157 および 026 の検査法に関する通知法への取り組みについて. 第 27 回日本食品微生物学会. 平成 18 年 9 月、大阪.

工藤由起子、瀬川優子、大塚佳代子、小西典子、平松礼司、田中廣行、小沼博隆、高鳥浩介. 食品からの腸管出血性大腸菌検出のための各種ベロ毒素遺伝子検出方法の比較. 第 27 回日本食品微生物学会. 平成 18 年 9 月、大阪.

工藤由起子. 腸管出血性大腸菌食中毒における畜産食品の重要性と食品の新しい公定検査法の策定. 平成 18 年度農林水産省家畜衛生研修会. 平成 18 年 10 月、つくば.

工藤由起子. 食品からの腸管出血性大腸菌の検出法について最近の話題. 第 4 回食の安全を確保するための微生物検査協議会. 平成 18 年 12 月、東京.

工藤由起子. 腸管出血性大腸菌の最近の傾向と新しい検査法について. 平成 18 年度厚生労働省食肉衛生技術研修会. 平成 19 年 1 月、東京.

工藤由起子. 「食品からの腸管出血性大腸菌 0157 及び 026 の検査法」の背景について. 平成 18 年度食品衛生登録検査協会微生物研修会. 平成 19 年 1 月、東京.

工藤由起子. 食品からの腸管出血性大腸菌検出のための新しい公定法. 平成 18

年度地域保健総合推進事業地方衛生研究所と東海北陸ブロック微生物部門研修会、平成19年1月、愛知。

平松礼司、土屋 禎、小西典子、大塚佳代子、田中廣行、小沼博隆、工藤由起子、高鳥浩介。食品からの腸管出血性大腸菌 0157 及び 026 の検査法の策定におけるコラボレイティブ・スタディによる評価。第10回 腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム。平成18年9月。東京。

大塚佳代子、小西典子、平松礼司、土屋 禎、田中廣行、工藤由起子、高鳥浩介。食品からの腸管出血性大腸菌検出に係わるベロ毒素遺伝子検出法の検討。第10回 腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム。平成18年9月。東京。

小西典子、下島優香子、尾畑浩魅、門間千枝、仲真晶子、工藤由起子、甲斐明美、山田澄夫。食品を対象とした腸管出血性大腸菌 0157 および 026 の増菌培養法の比較検討。第10回 腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム。平成18年9月。東京。

土屋 禎、小西典子、森本 洋、畠山 敬、磯部順子、横山栄二、浅井良夫、川森文彦、塚本定三、田中 忍、小沼博隆、工藤由起子、高鳥浩介。食品からの腸管出血性大腸菌血清型 0157 及び 026 の検出法に関するコラボレイティブ・スタディの実施概要について。第27回日本食品

微生物学会学術総会。平成18年9月。大阪。

平松礼司、大塚佳代子、竹田義弘、田中真弓、濱崎光宏、山崎省吾、八尋俊輔、新妻 淳、鎌倉和政、有馬和英、小澤一弘、工藤由起子、高鳥浩介。食品からの腸管出血性大腸菌血清型 0157 及び 026 の検出法に関するコラボレイティブ・スタディの結果について。第27回日本食品微生物学会学術総会。平成18年9月。大阪。

小西典子、大塚佳代子、田中廣行、平松礼司、矢野一好、小沼博隆、工藤由起子、高鳥浩介。血清型および対象食品の違いによる腸管出血性大腸菌の検出方法に関する検討。第27回日本食品微生物学会学術総会。平成18年9月。大阪。

大塚佳代子、小西典子、平松礼司、田中廣行、土屋 禎、小沼博隆、工藤由起子、高鳥浩介。腸管出血性大腸菌の遺伝子検査法における検出感度の確保を目的とした食品培養液からのDNA抽出法の検討。第27回日本食品微生物学会学術総会。平成18年9月。大阪。

日・あゆみ、渡部裕美、河村麻紀、高鳥浩介、西川禎一。レタスの腸管出血性大腸菌0157汚染に対する各種殺菌料の効果と適用方法の検討 第26回日本食品微生物学会学術総会 平成17年11月 金沢
金子通治、浅井良夫、森田幸雄、大塚佳

代子、金子誠二、古川一郎、野田裕之、
工藤由起子、高鳥浩介．輸入魚介類
におけるサルモネラ汚染に関する研
究．第 27 回日本食品微生物学会学術
総会．平成 18 年 9 月．大阪．

右井淳子、近藤和雄、工藤由起子．
穀物加工品および原料における
サルモネラおよび黄色ブドウ球
菌のカテキンによる増殖および
生残抑制効果．第 92 回日本食品衛
生学会学術講演会．平成 18 年 10 月．
愛知．

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

平成 18 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、16 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、439 検体中 9 検体 (2.1%) 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、253 検体中 8 検体 (3.2%) から検出された。次いで検体数が多かったアメリカでは、72 検体中 1 検体 (1.4%) から検出された。分離株については、9 検体中 2 検体が VT1 産生、6 検体が VT2 産生、1 検体が VT1&2 産生であった。また、9 検体中 7 検体が血清型 OUT であり、その他 08:H19 および 0128 がそれぞれ 1 検体ずつ分離された。血清型 OUT の腸管出血性大腸菌の患者は国内でも報告されている。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

新妻 淳、三浦彰子、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、後藤郁夫、池田 健

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。また、その他の血清型または 0 血清型 Untypable (OUT) も報告さ

れてる。原因食品は、血清型 0157 につ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。16 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 18 年 4 月から平成 18 年 12 月に国内で入手した輸入牛肉 439 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アメリカであった。

2. 増菌培養方法

増菌方法として、16 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°C18 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°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、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 0.1 ml 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階およびその 10 倍希釈段階を塗抹した 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 0.1 ml 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 439 検体中 9 検体 (オーストラリアおよびアメリカ産) 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、9 検体から腸管出血性大腸菌が分離された。分離された菌株は 7 検体が血清型 OUT であり、その他は 08:H19 および

0128 であった。また、6 検体が VT2、2 検体が VT1、1 検体が VT1&2 産生であった(表 2)。以下に、検出の詳細を示す。

1. 検体番号 Y5

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 寒天培地で生育したうちの 15 コロニーを選択したところ 15 コロニーが LAMP 陽性であった。この分離株は VT2 陽性、VT1 陰性、血清型 08:H19 であった。

2. 検体番号 Y6

増菌培養液の 10^{-2} 希釈液は LAMP 法による VT 検出結果が陽性であり、 10^{-3} 希釈液を塗抹し培養した RX-026 寒天培地の 6 / 27 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^{-7} 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^{-3} 希釈液を塗抹し培養した RX-026 寒天培地の 5 / 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^{-6} まで 10 階段希釈し培養した。 10^{-5} 希釈液を塗抹し培養した RX-026 寒天培地の 10 / 15 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。陽性だった 10 分画から 30 コロニーを選択したところ 6 コロニーが LAMP 陽性であった。これらの分離株は VT1 陽性、VT2 陰性、血清型 OUT であった。

3. 検体番号 Y7

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 寒天培地で生育し

たうちの 7 コロニーを選択したところ 5 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。

4. 検体番号 Y8

増菌培養液の 10^{-1} 希釈液は LAMP 法による VT 検出結果が陽性であり、 10^{-2} 希釈液を塗抹し培養した RX-026 寒天培地の 1 / 18 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 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^{-5} 希釈液を塗抹し培養した RX-026 寒天培地の 2 / 14 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^{-5} まで 10 階段希釈し培養した。 10^{-5} 希釈液を塗抹し培養した RX-026 寒天培地の 4 / 10 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。このうちの 1 分画から 4 コロニーを選択したところ 1 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 Y9

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 寒天培地で生育したうちの 4 コロニーを選択したところ 4 コロニーが LAMP 陽性であった。この分離株は VT2 陽性、VT1 陰性、血清型 OUT であった。

6. 検体番号 K2

増菌培養液を CT-SMAC、クロモアガー 0157、BCM0157 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