

PCR primers for multiplex PCR

O血清群	標的遺伝子	プライマー配列	PCR産物のサイズ	参考文献
O157	<i>rfbE</i> (perosamine synthetase)	CAGGTGAAGGTGGAATGGTTGTC TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG	296 bp	Bertrand R. and Roig B. Water Res. 2007 41:1280-6
O26	<i>wzx</i> (O-polysaccharide export protein)	GGGGTGGGTTACTATATTGG AGCGCCTATTTTCAGCAAAGA	241 bp	Paddock Z. et al. Vet Microbiol. 2012 156:381-8
O111	<i>wzx</i> (O-polysaccharide export protein)	CAAGAGTGCTCTGGGCTTCT AACGCAAGACAAGGCAAAC	451 bp	Paddock Z. et al. Vet Microbiol. 2012 156:381-8
O103	<i>wzx</i> (O-polysaccharide export protein)	TAAGTACGGGGTGCTTTTT AAGCTCCCGAGCACGTATAA	716 bp	Paddock Z. et al. Vet Microbiol. 2012 156:381-8
O121	<i>wzy</i> (O-polysaccharide polymerase)	Unpublished data	193 bp	in this study
O145	<i>wzy</i> (O-polysaccharide polymerase)	Unpublished data	132 bp	in this study
O165	<i>wcnU</i> (glycosyltransferase)	Unpublished data	1160 bp	in this study
病原性遺伝子	標的遺伝子			
Stx1	<i>stx1</i>	LP30: CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG LP31: CACCAGACAATGTAACCGCTG	348 bp	Cebula T. et al. J Clin Microbiol. 1995 33:248-250
Stx2	<i>stx2</i>	LP43: ATCCTATTCCTGGGAGTTTACG LP44: GCGTCATCGTATACACAGGAGC	584 bp	Cebula T. et al. J Clin Microbiol. 1995 33:248-250
intimin	<i>eae</i>	SK1: CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC SK2: CCCGATCCGTCTCGCCAGTATTCC	881 bp	Oswald E. et al. J Clin Microbiol. 2000 68:64-71

図1

Top 8 EHEC O groups isolated from human during 2007-2011 (total number = 14,376)

O group	Total number	BD or HUS
O157	9966	4058
O26	2228	380
O111	479	84
O103	289	40
O121	247	91
O145	265	73
O91	158	3
O165	56	29

HUS: hemolytic uremic syndrome
BD: bloody diarrhea

マルチプレックスPCR法の反応液組成と反応条件

反応液組成 (KAPATaq Extra)

試薬など	組成(μl)
D. W.	17.18
5x KAPA Extra Buffer	6
MgCl ₂ (25mM)	3
dNTP mix (10mM)	0.9
primer(O157とO165) (100μM)	0.16 × 4 (0.64)
primer(<i>stx1</i> と <i>stx2</i>) (100μM)	0.04 × 4 (0.16)
primer(その他) (100μM)	0.08 × 12 (0.96)
KAPA Taq Extra	0.16
Template DNA (10ng/μl)	1
total	30 μl

反応条件

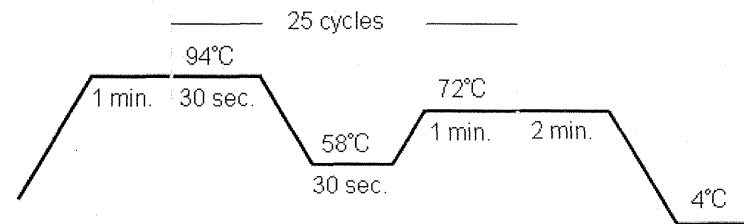


図3

One-shot multiplex PCR to detect O157, O26, O111, O121, O103, O145, O165, *stx1*, *stx2* and *eae*

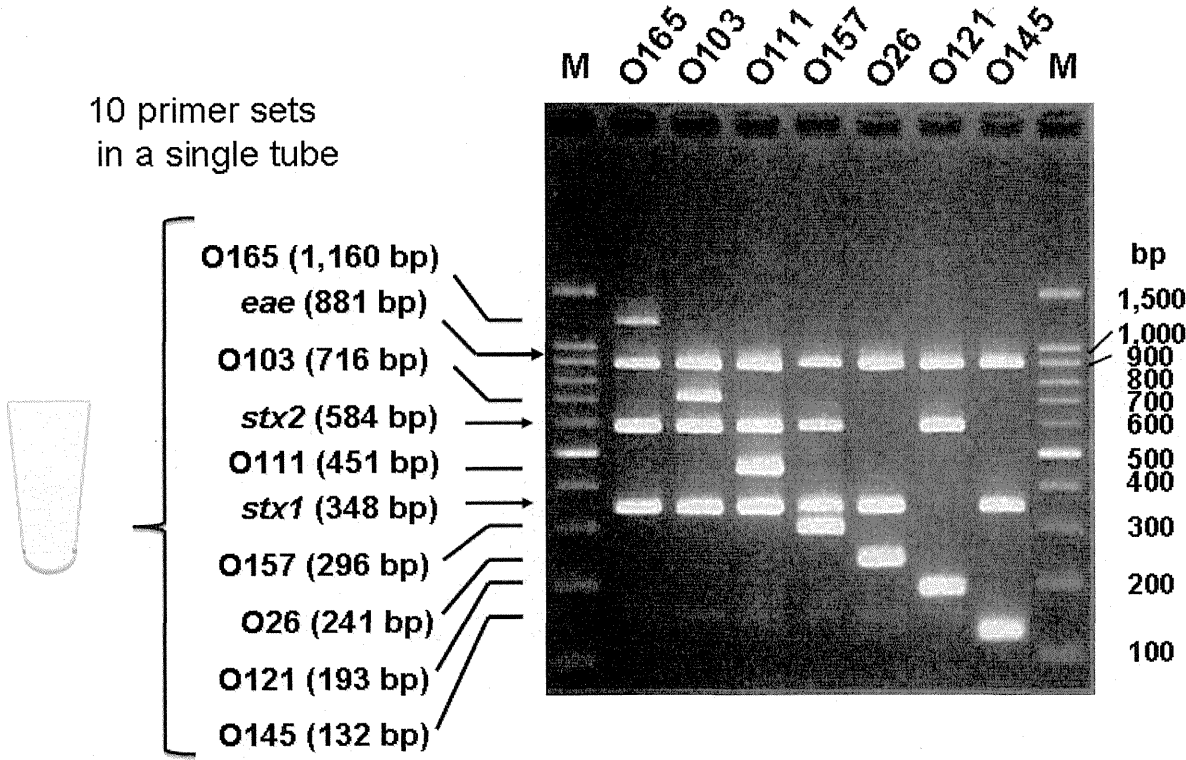


图4

分 担 研 究 報 告 書

病原大腸菌の統括的検査法の開発

工藤 由起子

平成24年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食中毒調査における食品中の病原大腸菌の統括的検査法の開発に関する研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

病原大腸菌の統括的検査法の開発

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

腸管出血性大腸菌はヒトへの病原性が強く、重症者や死者が発生する食中毒事例が社会的に問題になっており、食中毒事例では原因食品確定が不可欠である。食品での検査法は、平成9年にO157を対象として通知されたが、それ以降も必要に応じて他血清群を対象に通知されている。近年は諸外国において、5～7種類の血清群を対象にした検査が行われており、日本においても主要な血清群を対象にして食品の検査を行う必要がある。このため、本研究では以下の3課題に取り組んだ。(1) 食品培養液でのVT遺伝子検出スクリーニング法の改定を検討し、自家調製法の反応系の縮小化、試薬および機器の組み合わせによる高い検出感度の検討、試薬調製による増幅ベースラインの安定化を行った。この成果は通知法の策定に取り入れた。(2) 多血清群でのO抗原特異的遺伝子対象検出法を検討し、日本での多血清群でのO抗原遺伝子を対象にした検出法の確立には、諸外国の政府機関の検査法を参照し基礎とすることが可能であると考えられた。(3) 多血清群での分離培地を検討し、選択剤を添加した複数種類の酵素基質培地にて、血清群に特徴を有する発色性によって鑑別分離が可能である事が示された。今後、日本での主要な血清群でのO抗原遺伝子を対象にしたスクリーニングの確立、インチミン遺伝子(*eae*)のスクリーニング対象への追加、多血清に対応した分離培地の確立などによって、より効率的な腸管出血性大腸菌の検査法を策定したい。

研究協力者

大塚佳代子

埼玉県衛生研究所

小西典子、甲斐明美

東京都健康安全研究センター

森 哲也

財団法人 東京顕微鏡院

中川 弘

株式会社 BML フード・サイエンス

林 昭宏

横浜検疫所 輸入食品・検疫検査センター

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌はヒトへの病原性が強く、重症者や死者の発生も珍しくない。日本も含め世界で食中毒が発生しており、各国でも食中毒の発生の抑制が重要な課題になっており、汚染食品の調査や汚染制御に取り組んでいる。世界的機関でも微生物学的リスクアセスメントとして牛肉などとの組み合わせについて解析が行われるなど、対応が急がれている。食中毒事例では原因食品確定が不可欠であり、食品からの検査法は、日本および米国やEUなど諸外国の政府機関で策定されている。日本および諸外国の検査法では、血清群の検出の前に、腸管出血性大腸菌の重要な病原因子である Vero toxin (VT) 遺伝子の有無を食品培養液から検出することによって、腸管出血性大腸菌の汚染の有無のスクリーニングが行われている。日本では、平成 17 年に通知された腸管出血性大腸菌 O26 および O157 の検出法において各国に先駆け取り入れられたが、その後の通知法の改正では培養等の部分が主であり、VT 遺伝子のスクリーニング法については改正されていない。近年、遺伝子検査法の試薬や機器などが大きく改良されており、それらを取り入れていく必要がある。また、腸管出血性大腸菌では血清群 O26、O103、O104、O111 および O157 について日本では個別に通知されて

いるものの、対象食品の限定もあり、統括的な検査法が必要とされている。また、諸外国では血清群 O157 に加え、感染の多い血清群 4～6 種類を対象にした食品または牛肉からの検査法が確立されており、日本でも独自に主要な血清群を決定し、食品検査法を確立する必要がある。VT 遺伝子スクリーニングで陽性になった検体について、主要な O 血清群を対象に遺伝子検出を 2 次スクリーニングとして行うことは、効率的な検査法の流れであり、スクリーニングをせずに直に食品培養液から対象血清群の免疫磁気ビーズ法などを行い分離培地から分離を行うことは、労力的にまた経済的にも難しいと思われる。海外での検査対象の血清群では、腸管出血性大腸菌の重要な病原因子のひとつとしてみなされている腸管上皮細胞接着因子の遺伝子であるインチミン遺伝子 (*eae*) の有無を食品培養液から VT 遺伝子とともに検出することによって、腸管出血性大腸菌の汚染の有無をスクリーニングしている。日本でも対象とする血清群のほとんどが *eae* 陽性であるならば、スクリーニング対象に取り入れるる事によって、より効率的な検査が行えるものと思われる。さらに、検査の最終的な結果は、対象血清群の腸管出血性大腸菌が分離されることによって陽性に判定されることから、多血清群の鑑別に有用な選択分離

培地が必要である。

以上のことから本研究では、(1) 食品培養液での VT 遺伝子検出スクリーニング法の改定、(2) 多血清群での 0 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討、(3) 多血清群での分離培地の検討を行った。

B. 研究方法

(1) 食品培養液での VT 遺伝子検出スクリーニング法の改定

1. 反応系の縮小化

ストマッカー袋に牛挽肉およびカイワレダイコン 25 g を採取し、mEC 培地 (日水製薬) 225 ml を加えた。ストマッカー処理を 1 分間行った後、42°C にて 20 時間培養して食品培養液を作製した。VT1 および VT2 陽性腸管出血性大腸菌 0111:H- の培養液 (約 10^9 cfu/ml) をそれぞれ PBS (ダルベッコ PBS(-)、日水製薬) で 10 倍階段希釈して 10^{-7} 希釈菌液まで調製した。このうち、 10^0 – 10^6 (約 10^0 – 10^3 cfu/ml) の合計 7 本の希釈菌液 0.1 ml をそれぞれ食品培養液 0.9 ml に接種して菌接種食品培養液 (約 10^8 – 10^2 cfu/ml) を作製した。これらからアルカリ熱抽出法を行って DNA 抽出原液とし、リアルタイム PCR 法にて VT 遺伝子を検出した。接種菌液の菌数測定のために、 10^{-7} 希釈菌液を 5 枚の tryptic soy agar (TSA、BD) に 0.1 ml ずつ塗抹して 37°C にて 18~24 時間培養し、コロニー数から接種菌液の菌数を算出した。

2. 試薬および機器の組み合わせによ

る検出感度

牛レバー、牛挽肉、豚スライス肉、チーズ (ヤギナチュラルチーズ)、レタス、カイワレダイコン、トマトおよびホウレンソウの 25 g をストマッカー袋に入れ、これに mEC 培地 225 ml を加えた。ストマッカー処理を 1 分間行った後、 42 ± 1 °C にて 20~24 時間培養して食品培養液とした。VT1 陽性腸管出血性大腸菌 026 および VT2 陽性腸管出血性大腸菌 0157 の 4 株ずつ計 8 株の培養液 (約 10^9 cfu/ml) をそれぞれ PBS で 10^{-7} 希釈菌液まで 10 倍階段希釈した。希釈菌液のうち、約 10^6 – 10^3 cfu/ml の合計 4 本の希釈菌液 0.1 ml をそれぞれ食品培養液 0.9 ml に接種して菌接種食品培養液 (約 10^5 – 10^2 cfu/ml) とした。これらの一部容量からアルカリ熱抽出法にて DNA 抽出原液を得た。各 DNA 抽出原液を CycleavePCR 0-157 (VT gene) Screening Kit Ver. 2.0 (CycleavePCR 0-157 Kit Ver. 2.0、タカラバイオ) および Nielsen らの方法の 2 種類のリアルタイム PCR 法にて VT 遺伝子を検出した。リアルタイム PCR 機器として、ABI シリーズの ABI7500、ABI7900 および ABI7500fast (アプライド・バイオシステムズ ジャパン)、LightCycler 480 (LC480、ロシュ・ダイアグノスティックス) および Thermal Cycler Dice Real Time System II (Dice、タカラバイオ) を使用した。また、2 回繰り返し測定した。機種によって auto 解析および manual 解析の設定にて解析した。接種菌液の菌数測定のために、 10^{-7} 希釈菌

液を 5 枚の TSA に 0.1 ml ずつ塗抹して 37°C にて 18~24 時間培養し、コロニー数から接種菌液の菌数を算出した。

3. 試薬調製による増幅ベースラインの安定化

上記 2 で調製した VT2 陽性菌接種豚スライス肉培養液および VT2 陽性菌液の DNA 抽出原液を供試し、Nielsen らの方法に従って調製した反応液に DNA 抽出原液を添加して、10 回タッピングしてスピンドウンしたものとタッピングしないものを LC480 にて測定した。測定結果は auto 解析 (Abs quant/2nd derivative max) を実施し、Ct 値を算出した。

(2) 多血清群での 0 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 の 7 種類の 0 血清群のそれぞれ 14、2、12、15、2、8 および 15 株、合計 68 株の培養液を作製した。また、ストマッカー袋に牛挽肉およびカイワレダイコン 25 g を入れ、mEC 培地 (日水製薬) 225 ml を加えた。ストマッカー処理を 1 分間行った後、42°C にて 22 時間培養して食品培養液を作製した。各 0 血清群のそれぞれ 1 株ずつの菌液 (約 10^9 cfu/ml) をそれぞれ PBS (ダルベッコ PBS(-)、日水製薬) で 10^{-7} 希釈菌液まで 10 倍階段希釈した。このうち、 10^0-10^{-6} (約 10^9-10^3 cfu/ml) の各希釈菌液 0.1 ml を 4 で培養した食品培養液 0.9 ml に接種して菌接種食品培養液 (約 10^8-10^2 cfu/ml) を作製した。接種菌液の菌数測定のために、 10^{-7}

希釈菌液を 5 枚の tryptic soy agar (TSA、BD) に 0.1 ml ずつ塗抹して 37°C にて 24 時間培養し、生育したコロニー数から接種菌液の菌数を算出した。DNA 抽出は、68 株の菌培養液から熱抽出法にて、菌接種食品培養液からアルカリ熱抽出法に行った。定性での検出では約 10^8 cfu/ml、感度の確認では約 10^8-10^2 cfu/ml の菌接種食品培養液からの DNA 抽出原液を、0 抗原特異的遺伝子検出法および *eae* 検出法に供試した。0 抗原特異的遺伝子検出法には、米国農務省 (United States Department of Agriculture、USDA) 参照法および欧州食品安全機関 (European Food Safety Authority、EFSA) 参照法の 2 種類を用いた。測定後、Auto 解析にて Ct 値を算出し、その Ct 値から検量線を作成した。また、通知法で求められている最低検出感度である 10^4 cfu/ml での Ct 値を作成した検量線から算出した。また、*eae* 検出を USDA 参照法および EFSA 参照法の 2 種類のリアルタイム PCR 法にて行った。測定後、Auto 解析にて Ct 値を算出した。

(3) 多血清群での分離培地の検討

国内外で分離され研究室に保存されていた以下の大腸菌 (VT 陽性株 60 株および陰性株 4 株の計 64 株) を供試した：血清群 026:10 株 (1 株 VT 陰性)、血清群 0111:10 株、血清群 0157:10 株、血清群 0145:10 株、血清群 045:2 株、血清群 0121:2 株、血清群 0103:10 株、血清群 0165:2 株、血清群 08:2 株 (VT 陰性)、血清群 063:1 株、血清群 091:4 株、血清群

0151: 1株 (VT 陰性)。供試菌株をトリプチケース・ソイ・ブロス中で 37°Cにて 18 時間培養し、その培養液を以下の酵素基質培地に画線し、37°Cにて 24 時間培養し、生育したコロニーの発色を観察した: クロモアガー-0157 培地 (クロモアガー社)、クロモアガー-026/0157 培地 (クロモアガー社)、クロモアガー-STEC 培地 (クロモアガー社)、Vi RX026 寒天培地 (栄研化学)、Vi EHEC 寒天培地 (栄研化学)、CIX 寒天培地 (極東製薬)、BCM0157 寒天培地 (栄研化学)、XM-EHEC 寒天培地 (日水製薬)、レインボーアガー-0157 培地 (バイオログ社)。ただし、セフィキシム・亜テルル酸 (CT) の感受性を確認するためにクロモアガー-STEC 培地に添加したものを供試した。

C. 研究結果

(1) 食品培養液での VT 遺伝子検出スクリーニング法の改定

1. 反応系の縮小化

Nielsen らの方法での総反応液量が 50 および 30 μl において、希釈菌液を接種した牛挽肉およびカイワレダイコン検体から抽出した DNA 溶液を用いて検出した結果、牛挽肉について 50 μl 反応系で auto 解析の場合の 10^2cfu/ml での 1 反応およびカイワレダイコンについて 50 μl 反応系で manual 解析の場合の 10^2cfu/ml での 1 反応で検出されなかったが、それ以外の菌接種食品培養液 (約 10^8-10^2cfu/ml) では 2 反応の両方で検出された。このよ

うに、50 μl 反応系よりも 30 μl 反応系の方が検出性の高い結果であった。

2. 試薬および機器の組み合わせによる検出感度

供試食品種の総合での VT 遺伝子検出結果について、検出試薬、機種および解析方法ごとに試験した 8 食品種のうち、各食品種数中の繰り返し 2 反応での測定結果が両方とも陽性だった食品種の数を集計した。CycleavePCR 0-157 Kit Ver. 2.0 の反応結果を ABI7500、ABI7900、ABI7500fast、LC480 および Dice の 5 機種において auto 解析したところ、LC480 および Dice においては 10^4cfu/ml で VT1 および VT2 遺伝子検出ともに 8 食品種全てで検出されたが、LC480 および Dice 以外においては 8 食品種中 5 食品種以下の検出であり、得られた増幅曲線では不安定なベースラインが散見され、妥当な解析結果が得られなかった。特に増幅曲線が上昇していないにもかかわらず陽性の判定になり、誤った判定がなされる場合もあった。次に、ABI7500、ABI7900 および ABI7500fast の 3 機種において manual 解析したところ、 10^4cfu/ml で VT1 および VT2 遺伝子検出ともに 8 食品種全てで検出され、適切な解析結果が得られた。

Nielsen らの方法の反応結果を、ABI7500、ABI7900、ABI7500fast、LC480、LCnano および Dice の 6 機種において auto 解析したところ、 10^4cfu/ml では VT1 および VT2 遺伝子検出ともに 8 食品種全てで検出され、適切な解析結果が得られ

た。次に、ABI7500、ABI7900、ABI7500fast および LC480 の 4 機種において manual 解析したところ、適切な解析結果が得られた。

3. 試薬調製による増幅ベースラインの安定化

Nielsen らの方法において、試薬調製時の反応液の混合操作の有無の結果への影響を検討した結果、混和操作をしなかった場合には、全てのサンプルにおいて最初の 3 サイクルで蛍光値の上昇が測定され、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml は陽性判定であったが、 10^2 cfu/ml は陰性判定であった。しかし、混和操作を行った場合には、反応初期の蛍光値の上昇は認められず、 10^5 、 10^4 、 10^3 および 10^2 cfu/ml 全てで陽性判定であった。

(2) 多血清群での O 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

菌液からの O 抗原特異的遺伝子の検出について定性での検出を行った。血清群 026 の 14 株全て、血清群 0103 の 12 株全て、血清群 0111 の 15 株全ておよび血清群 0145 の 8 株全ては、USDA 参照法および EFSA 参照法の両方法によって検出された。また、USDA 参照法でのみ試験された血清群 045 の 2 株全ておよび血清群 0121 の 2 株全てで検出された。さらに、EFSA 参照法でのみ試験された血清群 0157 の 15 株全てで検出された。

菌液からの O 抗原特異的遺伝子の検出について感度を確認した。USDA 参照法および EFSA 参照法ともに、最大陽性菌数は、

熱抽出した DNA を供試した場合には、 $10^3 - 10^4$ cfu/ml で陽性あった。アルカリ熱抽出した DNA を供試した場合には、 10^2 cfu/ml で陽性であった。それらのデータから菌数を横軸に Ct 値を縦軸として、熱抽出法とアルカリ熱抽出法での検量線を作成した。菌数が 10^4 cfu/ml での Ct 値は、全ての O 抗原特異的遺伝子検出リアルタイム PCR 法において、熱抽出よりもアルカリ熱抽出した DNA で菌数 10^4 cfu/ml の Ct 値が低かった。

食品培養液からの O 抗原特異的遺伝子の定性での検出を行った。食品培養液への接種菌液原液の菌数はいずれの血清群についても約 10^8 cfu/ml であった。USDA 参照法での検出結果は、牛挽肉培養液およびカイワレダイコン培養液の両方において血清群 026、045、0103、0111、0121 および 0145 全てで検出された。EFSA 参照法での検出結果は、牛挽肉培養液およびカイワレダイコン培養液の両方において血清群 026、0103、0111、0145 および 0157 全てで検出された。

菌接種食品培養液からの O 抗原特異的遺伝子の検出について感度を確認した。USDA 参照法および EFSA 参照法での最大陽性菌数は、全ての O 血清群について両食品培養液で 10^3 cfu/ml であった。また、牛挽肉とカイワレダイコン培養液の Ct 値には顕著な差は認められなかった。

菌液からの *eae* 検出について定性での検出を行った結果、0111 および 0157 の両菌株ともに USDA 参照法および EFSA 参照

法の両方法で検出された。

(3) 多血清群での分離培地の検討

クロモアガー-0157 では、0157 および 0151 が藤色、それ以外はほとんどが青色であった。クロモアガー-026/0157 では、0157 は赤色、026 は緑色（1株が紫色（VT 陰性））であった。0111 は多くが赤紫色であり、0103 も多くが赤紫色（2株が薄ピンク色）、0145 は全株赤紫色であった。ただし、063 および 091 も赤紫であった。0121（一部、緑色）、045（一部、赤紫色）および 08 は紫色であった。0151 は濃いピンクであった。クロモアガー-STEC では、供試した株全てが藤色であった。Vi RX026 では、026（VT 陰性株は非生育）は紺色、それ以外は緑色であった。Vi EHEC では、0157 は無色透明（中心部褐色）、0111 はえんじ色、026 は緑色（VT 陰性株は非生育）であった。026 と同じく緑色であったのは、0121 および半数の株の 0103 であった。0145 および 045（1株非生育）は紫色であったが、0103 でも一部紫色であった。さらに 0145 では緑、青～青紫または赤紫色が見られた。0151 はえんじ色であった。0165、08、063 および 091 は非生育であった。CIX では、0157 および一部の 0145 は青緑色、026（VT 陰性株は非生育）、0111、0103、0145、045 および 063 は紺色であった。0121 はピンク色であった。0165 および 08 は非生育であった。0151、一部の 0103 および半数の株の 091 は緑色（残り非生育）であった。BCM0157 では、0157 および 063 が紺色であった。0121 は白色

であった。他の血清群は緑色であった。XM-EHEC では、0157、0111 および 0151 が赤紫色であった。026 および多くの 0103 は青紫色であった。045 では赤紫、薄紫または青色、0121 および 0145 は青から青紫または赤紫色であり、これらの鑑別は難しかった。0165、08、063 および 091 は非生育であった。レインボーアガーでは、全 0157 および 026 は灰～濃灰または灰紫色であった。0121 および一部の 091 は藤色であった。0103、0145、045、0165、063（藤色も混在）および 091 は赤紫色であった。VT 陰性の 08 および 0151 は白色であった。クロモアガー-STEC に CT を添加した CT-クロモアガー-STEC では、0157、026（VT 陰性株は非生育）、0111、0103（1株生育）、0121、0145、045（1株生育）および 0151 は藤色であった。0165、08、063 および 091 は非生育であった。

D. 考察

(1) 食品培養液での VT 遺伝子検出スクリーニング法の改定

リアルタイム PCR 法での自家調製試薬は、販キットと比べて経済的であるため使用する場合が多い。しかし、さらに経済性を高めることを目的として反応系の縮小化を食品培養液を使用して検討ところ、反応系を 30 μ l にすることによって経済性を高められることが判明した。

リアルタイム PCR 法の市販キットで、専用機器を必要としない汎用性の高い試薬が通知法に含まれているが、近年、改

良された製品が市販されている。また、改良された機器や経済性に優れる機器も市販されており、市販キットおよび上記の自家調製の試薬と汎用性の高い複数の機器の組み合わせによる使用について検討が必要であった。このため、試薬と機器の組み合わせにより適切な解析を行った結果について食品種で比較したところ、牛挽肉、豚スライス肉、チーズ、レタス、カイワレダイコンおよびホウレンソウについては、 10^3 cfu/ml まで 2 反応の両方で検出され、高感度であることが示された。しかし、牛レバーおよびトマトについては、 10^4 cfu/ml までは 2 反応の両方で検出されたが、 10^3 cfu/ml では 2 反応の両方で検出されないものが多かった。このため、牛レバーとトマトにおいては、DNA 抽出や PCR 反応を阻害する成分等が含まれている可能性が考えられた。牛レバーでは血液の成分が DNA 抽出や PCR 反応を阻害することが考えられる。本研究ではアルカリ熱抽出法を使用した。通知法に記載されている他の DNA 抽出法の中で精製操作も含まれる手法を使うことで、検出率が改善される可能性が考えられる。また、トマトについては pH が低いことの影響が DNA 抽出や PCR 反応にあるかもしれないが、果肉の粒子など物理的な要因も考えられるため、今後、要因の解明と改善方法の検討が必要である。

自家調製で用いる試薬の混和が不十分な場合に、使用する機種との組み合わせによっては増幅ベースラインが反応初期

で乱れが生じる場合がある。このため、安定化を検討した結果、試薬の混和を確実に行えば容易に改善できることが判明した。これによって適切なベースラインが設定され auto 解析によっても妥当な結果を判定できることが示された。

(2) 多血清群での 0 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

諸外国の政府機関で使用されている試験法を参照し、日本での主要な血清群についての 0 抗原特異的遺伝子対象 PCR 法について、定性での検出および感度を検討した。定性検出では、USDA 参照法において 026、045、0103、0111、0121 および 0145 の 6 血清群の供試した全株について、菌液および菌接種食品培養液から検出された。また、EFSA 参照法において 026、0103、0111、0145 および 0157 の 5 血清群の供試した全株について検出された。感度についても、両参照法での著しい差は、供試した全株について、菌液および菌接種食品培養液ともに認められなかった。このため、両参照法のどちらを使用しても、同様に優れた検出結果が得られると考えられた。また、感度を検討した結果では、両参照法によって、食品培養液からのアルカリ熱抽出で、 10^3 cfu/ml までほとんどの血清群が検出されることが明らかになった。

菌液での試験において、USDA 参照法および EFSA 参照法で *eae* 検出が確認されたことから、今後さらに食品培養液での検討を行い、効率的な腸管出血性大腸菌の

検査法の策定の為にVT遺伝子と合わせて *eae* をスクリーニング対象とすることを考慮する必要があると考えられた。

以上のことから、日本での腸管出血性大腸菌の主要な血清群に対応した食品での検査法の確立には、026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 を対象とした諸外国の政府機関で使用されている試験法を参照することが可能であることが示された。

(3) 多血清群での分離培地の検討

酵素基質培地は、近年ではその有用性から多数の食中毒菌や臨床細菌の分離培地として利用されている。腸管出血性大腸菌においても、1990年代から0157を対象として酵素基質培地が利用されている。また、多様な血清群でも食中毒が発生しているため、0157以外の血清群についても、特異的発色性を示す鑑別が容易な酵素基質培地が検討開発され市販されている。米国USDA法では1種類の酵素基質培地が7血清群の分離に用いられている。日本では、特に0157、026および0111を対象として開発が進んでおり、複数社からの市販品として普及し使用されている。発色性はそれぞれの培地ごとに個性が異なるが有益である。本研究ではこれら酵素基質培地を日本で重要な血清群8種類(0157、026、0111、0103、0121、0145、045 および 0165)の分離に応用することを検討した。また、CTは腸管出血性大腸菌の選択分離培地に使用される事が多いため、培地に添加して検討した。その結

果、酵素基質培地での発色性を利用した鑑別分離の方法として、CTなど選択剤を加えて選択性を高めたCIX寒天培地にて、0157は青緑、0121はピンク、026、0111、0103、0145 および 045は濃紫として鑑別分離すること、CTなど選択剤を加えて選択性を高めたクロモアガ—026/0157培地にて0157は赤、026は緑、0121 および 045は紫、0111、0103 および 0145は赤紫として鑑別分離すること、などが考えられた。今後、多数の菌株での発色性の検討や適切な選択剤の検索など、さらなる検討が必要と考えられた。

E. 結論

腸管出血性大腸菌はヒトへの病原性が強く、重症者や死者が発生する食中毒事例が社会的に問題になっており、食中毒事例では原因食品確定が不可欠である。食品での検査法は、平成9年に0157を対象として通知されたが、それ以降も必要に応じて他血清群を対象に通知されている。近年は諸外国において、5～7種類の血清群を対象にした検査が行われており、日本においても主要な血清群を対象にして食品の検査を行う必要がある。このため、本研究では以下の3課題に取り組んだ。(1)食品培養液でのVT遺伝子検出スクリーニング法の改定を検討し、自家調製法の反応系の縮小化、試薬および機器の組み合わせによる高い検出感度の検討、試薬調製による増幅ベースラインの安定化を行った。この成果は通知法

の策定に取り入れた。(2) 多血清群での O 抗原特異的遺伝子対象検出法を検討し、日本での多血清群での O 抗原遺伝子を対象にした検出法の確立には、諸外国の政府機関の検査法を参照し基礎とすることが可能であると考えられた。(3) 多血清群での分離培地を検討し、選択剤を添加した複数種類の酵素基質培地にて、血清群に特徴を有する発色性によって鑑別分離が可能である事が示された。今後、日本での主要な血清群での O 抗原遺伝子を対象にしたスクリーニングの確立、*eae* のスクリーニング対象への追加、多血清に対応した分離培地の確立などによって、より効率的な腸管出血性大腸菌の検査法を策定したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hara-Kudo, Y., Kumagai, S., Konuma, H., Miwa, N., Masuda, T., Ozawa, K., Nishina, T. Decontamination of *Vibrio parahaemolyticus* in fish by washing with hygienic seawater and impacts of the high level contamination in the gills and viscera. J. Vet. Med. Sci. 75:589-596, 2013.

Ohnishi, T., Goto, K., Kanda, T., Kanazawa, Y., Ozawa, K., Sugiyama,

K., Watanabe, M., Konuma, H., Hara-Kudo, Y. Microbial contamination by procedures of consumption and the growth in beverage. J. Environ. Sci. Health, Part A. 48:781-790, 2013.

2. 学会発表

Hara-Kudo, Y., Konishi, N., Kai, A., Ohtsuka, K. DNA extraction and molecular detection methods for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. VTEC 2012, May 3-7, 2012. Amsterdam.

Hara-Kudo, Y., Hiroi, M., Iizuka, S., Taga, K., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y., Ohtsuka, K. Detection methods for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 in food. FoodMicro 2012, September 3-6, 2012. Istanbul.

工藤由起子. 食品での腸管出血性大腸菌の検査法の最新の動向について. 第33回日本食品微生物学会学術総会. 平成24年10月 福岡.

工藤由起子、斉藤志保子、大塚佳代子、山崎省吾、八尋俊輔、岩出義人、西尾智裕、杉山寛治、大友良光、小沼博隆、田中廣行、中川 弘、小西良子、熊谷進. 近年の腸炎ビブリオ食中毒の減少と魚介類の汚染状況の解析. 第46回腸炎ビブリオシンポジウム. 平成24年11月 大分

曾我部祐介、塚原めぐみ、丸山弓美、飯

塚 太由、荒木恵美子、小西良子、
工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 026、
0111 および 0157 一斉試験法のため
の増菌培養法の基礎検討. 第 33 回
日本食品微生物学会学術総会. 平
成 24 年 10 月 福岡.

小西典子、齊木 大、大塚佳代子、
森 哲也、中川 弘、飯塚信
二、多賀賢一郎、甲斐明美、
小西良子、工藤由起子. 複数機関で
実施した腸管出血性大腸菌 026、
0111 および 0157 一斉試験法のため
の増菌培養法の検討. 第 33 回日本
食品微生物学会学術総会. 平成 24
年 10 月 福岡.

山本祐嗣、林 昭宏、飯塚信二、多賀
賢一郎、大塚佳代子、小西典子、
森 哲也、中川 弘、齊藤志保
子、磯部順子、廣井みどり、神吉政
史、右田雄二、小西良子、工藤由起
子. 腸管出血性大腸菌 026、0111 お
よび 0157 の一斉試験法のコラボレ
イティブスタディによる評価(1).
第 33 回日本食品微生物学会学術総
会. 平成 24 年 10 月 福岡.

大塚佳代子、門脇奈津子、森 哲也、
高見明代、中川 弘、林昭宏、
上田泰史、小西典子、甲斐明美、
右田雄二、神吉政史、廣井みどり、
磯部順子、齊藤志保子、小西良子、
工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 026、
0111 および 0157 の一斉試験法のコ
ラボレイティブスタディによる評

価(2). 第 33 回日本食品微生物
学会学術総会. 平成 24 年 10 月 福
岡.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

平成24年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食中毒調査における食品中の病原大腸菌の統括的検査法の開発に関する研究
研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

病原大腸菌の統括的検査法の開発

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究報告書

食品培養液での VT 遺伝子検出スクリーニング法の改定

研究要旨

腸管出血性大腸菌はヒトへの病原性が強く、重症者や死者が発生する食中毒事例が社会的に問題になっており、食中毒事例では原因食品確定が不可欠である。腸管出血性大腸菌の食品からの検出には、食品培養液からの Vero toxin (VT) 遺伝子検出によるスクリーニング法が有効であり通知法に含まれているが、検出系の効率化等の改善が必要とされている。このため、本研究では通知法での VT 遺伝子スクリーニングの改定の基礎となる検出系や試薬調製等の検討を行った。特に、自家調製法の反応系の縮小化の検討、試薬および機器の組み合わせでの検出感度の検討、試薬調製による増幅ベースラインの安定化の検討を行った。その成果をもとに、自家調製法の改定、市販試薬キットおよび機器の改定などを含む検査法（食安監発 1217 第 1 号「腸管出血性大腸菌 026、0111 及び 0157 の検査法について」）が通知された。

研究協力者

大塚佳代子	埼玉県衛生研究所
小西典子、甲斐明美	東京都健康安全研究センター
森 哲也	財団法人 東京顕微鏡院
中川 弘	株式会社 BML フード・サイエンス
林 昭宏	横浜検疫所 輸入食品・検疫検査センター
原田 誠	神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター
小林直樹、長尾清香	国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌はヒトへの病原性が強く、重症者や死者の発生も珍しくない。日本も含め世界で食中毒が発生しており、各国でも食中毒の発生の抑制が重要な課題になっており、汚染食品の調査や汚染制御に取り組んでいる。世界的機関でも微生物学的リスクアセスメントとして牛肉などとの組み合わせについて解析が行われるなど、対応が急がれている。食中毒事例では原因食品確定が不可欠であるが、食品からの検査法は、腸管出血性大腸菌では血清群 026、0103、0104、0111 および 0157 について日本では個別に通知されているものの、対象食品の限定もあり、統括的な検査法が必要とされている。また、諸外国では血清群 0157 に加え、感染の多い血清群 4～6 種類を対象にした食品または牛肉からの検査法が確立されており、日本でも独自に主要な血清群を決定し、食品検査法を確立する必要がある。日本および諸外国の検査法では、血清群の検出の前に腸管出血性大腸菌の重要な病原因子である Vero toxin (VT) 遺伝子の有無を食品培養液から検出することによって腸管出血性大腸菌の汚染の有無のスクリーニングが行われている。日本では平成 17 年に通知された腸管出血性大腸菌 026 および 0157 の検出法において各国に先駆け取り入れられたが、その後の通知法の改正では培養等の部分が主であり、VT 遺伝子のスクリーニング法については改正されていない。近年、遺伝子検

査法の試薬や機器などが大きく改良されており、それらを取り入れていく必要がある。このため、汎用の機器や比較的簡易な機器を含め、特異性・感度の高い方法を取り入れるための検討を、特に、現在市販の VT 遺伝子検出キットでの検出感度、自家調製法 (Nielsen らの方法) での反応系の縮小を主として行った。

B. 研究方法

1. 反応系の縮小化

1) 供試菌株

VT1 および VT2 陽性腸管出血性大腸菌 0111:H- の 1 株を供試した。

2) 供試検体

東京都内のスーパーマーケットなどの小売店で購入した牛挽肉およびカイワレダイコンを用いた。

3) 食品培養液の調製

ストマッカー袋に検体 25 g を採取し、mEC 培地 (日水製薬) 225 ml を加えた。ストマッカー処理を 1 分間行った後、42°C にて 20 時間培養して食品培養液を作製した。また、事前に検体が VT 遺伝子陰性であることを確認した。

4) 菌接種食品培養液の調製と DNA 抽出

供試菌株を tryptic soy broth (TSB、BD) 10 ml に接種し、37°C にて 18 時間培養した (約 10^9 cfu/ml)。培養した菌液をそれぞれ PBS (ダルベッコ PBS(-)、日水製薬) で 10 倍階段希釈して 10^{-7} 希釈菌液まで調製した。このうち、 10^0 – 10^{-6} (約 10^9 – 10^3 cfu/ml) の合計 7 本の希釈菌液

0.1 ml をそれぞれ食品培養液 0.9 ml に接種して菌接種食品培養液（約 10^8-10^2 cfu/ml）を作製した。これら各 0.3 ml から以下のアルカリ熱抽出法を行って DNA 抽出原液とした。また、陽性コントロールとして利用するために、接種菌液の原液 0.3 ml からアルカリ熱抽出法によって DNA を抽出した。接種菌液の菌数測定のために、 10^{-7} 希釈菌液を 5 枚の tryptic soy agar (TSA、BD) に 0.1 ml ずつ塗抹して 37°C にて 18~24 時間培養し、コロニー数から接種菌液の菌数を算出した。

[アルカリ熱抽出法]

培養液 0.3 ml を $10,000\times g$ 、10 分間遠心し、上清を取り除いた沈渣に滅菌した 50 mM NaOH を 85 μ l（または 255 μ l）添加して再浮遊させた。100°C で 10 分間加熱して冷却した後、滅菌した 1 M Tris-HCl (pH 7.0) 15 μ l（または 45 μ l）で中和した。それを $10,000\times g$ 、10 分間遠心し、上清を DNA 抽出原液とし、検出試験に使用するまで氷上で保存した。使用後残った DNA 抽出液は冷凍（-80°C）にて保存した。

5) VT 遺伝子検出法

各 DNA 抽出原液を使用して、リアルタイム PCR 法にて VT 遺伝子を検出した。表 1 に従って反応液を調製して反応プレートに分注したのち、DNA 抽出原液 5 μ l を加えた。なお、陰性コントロールとして滅菌超純水を使用した。また、2 回繰り返し測定した。増幅反応は、50°C で 2 分、95°C で 10 分を 1 サイクル、次いで 95°C で

15 秒、60°C で 1 分を 40 サイクルに設定し、ABI PRISM 7500 (ABI7500、アプライド・バイオシステムズ ジャパン) にて測定した。測定結果は、auto 解析および manual 解析 (threshold line ; 0.2 設定) の 2 種類にて Ct 値を算出し、得られた Ct 値を用いて検量線を作成した。また、通知法で求められている最低検出感度である 10^4 cfu/ml での Ct 値を作成した検量線から算出した。

2. 試薬および機器の組み合わせによる検出感度

1) 供試菌株

VT1 陽性腸管出血性大腸菌 026 および VT2 陽性腸管出血性大腸菌 0157 の 4 株ずつ計 8 株を供試した。

2) 供試検体

東京都および埼玉県内のスーパーマーケットなどの小売店で購入した、牛レバー、牛挽肉、豚スライス肉、チーズ（ヤギナチュラルチーズ）、レタス、カイワレダイコン、トマトおよびホウレンソウを用いた。検体は購入後、試験に使用するまで冷蔵保存した。牛レバーおよびトマトは切断し、他の食品はそのまま検体とし、25 g をストマッカー袋に入れ、試験検体とした。また、一般生菌数および大腸菌群数を計測するために、検体 10 g をストマッカー袋に入れ、PBS 90 ml を加え 1 分間ストマッカー処理したもの（ 10^{-1} 希釈液）を PBS 9 ml または 4.5 ml で 10 倍希釈して $10^{-2}-10^{-6}$ 希釈液を調製する。各希釈液 0.1 ml を標準寒天培地（日水製

薬)に塗抹し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で24~48時間培養する。同時に各希釈液1mlをシャーレに分注し、デソキシコレート寒天培地(パールコア デスオキシコレート寒天培地、栄研化学)で混釈、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で24~48時間培養する。培養した後にコロニー数を計測し、検体1gあたりの一般生菌数および大腸菌群数を算出した。また、事前に検体がVT遺伝子陰性であることを、後述のVT遺伝子検出法またはLoopamp腸管出血性大腸菌検出試薬キット(栄研化学)にて確認した。

3) 食品培養液の調製

ストマッカー袋中の検体25gに、mEC培地225mlを加えた。ストマッカー処理を1分間行った後、 $42 \pm 1^\circ\text{C}$ にて20~24時間培養して食品培養液とした。

4) 菌接種食品培養液の調製とDNA抽出

供試菌株をTSB 10mlに接種し、 37°C にて18~20時間培養した(約 10^9 cfu/ml)。培養した菌液をそれぞれPBSで 10^{-7} 希釈菌液まで10倍階段希釈した。希釈菌液のうち、約 10^6 ~ 10^3 cfu/mlの合計4本の希釈菌液0.1mlを、それぞれ食品培養液0.9mlに接種して菌接種食品培養液(約 10^5 ~ 10^2 cfu/ml)とし、各0.1mlから前述を参照してアルカリ熱抽出法を行ない、DNA抽出原液を得た。また、接種菌液の原液0.1mlからもアルカリ熱抽出法にてDNA抽出原液を得て、陽性コントロールとした。接種菌液の菌数測定のために、 10^{-7} 希釈菌液を5枚のTSAに0.1mlずつ塗抹して 37°C にて18~24時間培養し、コロニ

一数から接種菌液の菌数を算出した。

5) VT遺伝子検出法

各DNA抽出原液を利用して、CycleavePCR 0-157 (VT gene) Screening Kit Ver. 2.0 (CycleavePCR 0-157 Kit Ver. 2.0、タカラバイオ)およびNielsenらの方法の2種類のリアルタイムPCR法にてVT遺伝子を検出した。また、2回繰り返し測定した。

(1) CycleavePCR 0-157 Kit Ver. 2.0

表2に従って反応液を調製して反応プレートに分注したのち、DNA抽出原液5 μ lを加えた。なお、陰性コントロールとして滅菌超純水を使用した。増幅反応は、ABI7500では 95°C で10秒を1サイクル、次いで 95°C で5秒、 55°C で10秒、 72°C で34秒を45サイクル、ABI PRISM 7900(ABI7900、アプライド・バイオシステムズ ジャパン)では 95°C で10秒を1サイクル、次いで 95°C で5秒、 55°C で10秒、 72°C で34秒を30サイクル、ABI PRISM 7500fast(ABI7500fast、アプライド・バイオシステムズ ジャパン)では 95°C で10秒を1サイクル、次いで 95°C で5秒、 55°C で10秒、 72°C で25秒を45サイクル、LightCycler 480(LC480、ロシュ・ダイアグノスティックス)およびThermal Cycler Dice Real Time System II (Dice、タカラバイオ)では 95°C で10秒を1サイクル、次いで 95°C で5秒、 55°C で10秒、 72°C で20秒を45サイクルに設定して測定した。リアルタイムPCR測定結果の解析は、ABI7500、ABI7900および