

表5 8食品種におけるリアルタイムPCRでのVT遺伝子検出結果

検出試薬	機種	解析	VT1陽性菌接種菌数 (cfu/ml)				VT2陽性菌接種菌数 (cfu/ml)			
			10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
TaKaRa CycleavePCR 0-157 (VT gene) Screening Kit Ver.2.0	ABI PRISM 7500	Auto	1/8*	3/8	2/8	0/8	2/8	2/8	2/8	0/8
		Manual	8/8	8/8	8/8	3/8	8/8	8/8	7/8	4/8
	ABI PRISM 7900	Auto	5/8	5/8	5(4)/8	3(2)/8	5/8	5/8	5/8	5(4)/8
		Manual	8/8	8/8	7/8	2/8	8/8	8/8	8/8	5/8
	ABI PRISM 7500fast	Auto	5/8	5/8	5/8	5(4)/8	5/8	5/8	5/8	3/8
		Manual	8/8	8/8	7/8	5/8	8/8	8/8	8/8	5/8
LightCycler 480	Auto	8/8	8/8	7/8	2/8	8/8	8/8	7/8	3/8	
Thermal Cycler Dice Real Time System II	Auto	8/8	8/8	7/8	3/8	8/8	8/8	8/8	4/8	
Nielsenらの 方法	ABI PRISM 7500	Auto	8/8	8/8	7/8	3(2)/8	8/8	8/8	7/8	2/8
		Manual	8/8	8/8	8/8	2/8	8/8	8/8	7/8	0/8
	ABI PRISM 7900	Auto	8/8	8/8	6/8	3(2)/8	7/8	8/8	7(6)/8	4(3)/8
		Manual	8/8	8/8	6/8	3/8	8/8	8/8	6/8	3/8
	ABI PRISM 7500fast	Auto	8/8	8/8	7/8	6/8	8/8	8/8	8/8	6/8
		Manual	8/8	8/8	7/8	5/8	8/8	8/8	8/8	4/8
	LightCycler 480	Auto	8/8	8/8	6/8	3/8	8/8	8/8	5/8	3/8
		Manual	8/8	8/8	7/8	3/8	8/8	8/8	7/8	4/8
LightCycler nano	Auto	8/8	8/8	8/8	0/8	8/8	8/8	4/8	0/8	
Thermal Cycler Dice Real Time System II	Auto	8/8	8/8	7/8	5/8	8/8	8/8	8/8	5/8	

*陽性食品種数 (各検体につき2回測定した結果が両方とも陽性であった食品種数) / 8 供試食品

()内は偽陽性を含まない陽性食品種数

表6 牛レバーにおけるリアルタイムPCRでのVT遺伝子検出結果

食品	検出試薬	機種	解析	VT1陽性菌接種菌数 (cfu/ml)				VT2陽性菌接種菌数 (cfu/ml)				
				10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	
牛レバー	TaKaRa CycleavePCR O-157 (VT gene) Screening Kit Ver. 2.0	ABI PRISM 7500	Auto	2/2*	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	1/2	
			Manual	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	0/2	
		ABI PRISM 7900	Auto	2/2	2/2	1+1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2
		ABI PRISM 7500fast	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
	LightCycler 480	Auto	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	
	Thermal Cycler Dice Real Time System II	Auto	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	
	Nielsenらの 方法	ABI PRISM 7500	Auto	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2
		ABI PRISM 7900	Auto	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2
		ABI PRISM 7500fast	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
LightCycler 480		Auto	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	
		Manual	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	
LightCycler nano	Auto	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	1/2	2/2	0/2		
Thermal Cycler Dice Real Time System II	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2		

*陽性反応数/総反応数

アンダーバーは偽陽性の反応数

表7 牛挽肉におけるリアルタイムPCRでのVT遺伝子検出結果

食品	検出試薬	機種	解析	VT1陽性菌接種菌数 (cfu/ml)				VT2陽性菌接種菌数 (cfu/ml)			
				10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
牛挽肉	TaKaRa CycleavePCR 0-157 (VT gene) Screening Kit Ver.2.0	ABI PRISM 7500	Auto	0/2*	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
		ABI PRISM 7900	Auto	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2
		ABI PRISM 7500fast	Auto	2/2	2/2	2/2	<u>2/2</u>	2/2	2/2	2/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2
	LightCycler 480	Auto	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	1/2	
	Thermal Cycler Dice Real Time System II	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
	Nielsenらの 方法	ABI PRISM 7500	Auto	2/2	2/2	2/2	1+ <u>1/2</u>	2/2	2/2	2/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	1/2
		ABI PRISM 7900	Auto	2/2	2/2	2/2	1/2	1/2	2/2	2/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2
		ABI PRISM 7500fast	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2
LightCycler 480	Auto	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	0/2		
	Manual	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2		
LightCycler nano	Auto	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2		
Thermal Cycler Dice Real Time System II	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2		

*陽性反応数/総反応数

アンダーバーは偽陽性の反応数

表8 豚スライス肉におけるリアルタイムPCRでのVT遺伝子検出結果

食品	検出試薬	機種	解析	VT1陽性菌接種菌数 (cfu/ml)				VT2陽性菌接種菌数 (cfu/ml)			
				10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
豚スライス肉	TaKaRa CycleavePCR O-157 (VT gene) Screening Kit Ver. 2.0	ABI PRISM 7500	Auto	1/2*	2/2	1/2	1/2	1/2	1/2	2/2	1/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2
		ABI PRISM 7900	Auto	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	0/2
		ABI PRISM 7500fast	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2
	LightCycler 480	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	
	Thermal Cycler Dice Real Time System II	Auto	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	1/2	
	Nielsenらの 方法	ABI PRISM 7500	Auto	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	1/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	1/2
		ABI PRISM 7900	Auto	2/2	2/2	2/2	1+ <u>1</u> /2	2/2	2/2	1/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	1/2	0/2
		ABI PRISM 7500fast	Auto	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	1/2
		LightCycler 480	Auto	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	0/2
LightCycler nano	Auto	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	0/2		
Thermal Cycler Dice Real Time System II	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2		

*陽性反応数/総反応数

アンダーバーは偽陽性の反応数

表9 チーズにおけるリアルタイムPCRでのVT遺伝子検出結果

食品	検出試薬	機種	解析	VT1陽性菌接種菌数 (cfu/ml)				VT2陽性菌接種菌数 (cfu/ml)			
				10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
チーズ	TaKaRa CycleavePCR 0-157 (VT gene) Screening Kit Ver.2.0	ABI PRISM 7500	Auto	0/2*	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2
		ABI PRISM 7900	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
		ABI PRISM 7500fast	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
	LightCycler 480	Auto	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
	Thermal Cycler Dice Real Time System II	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
	Nielsenらの 方法	ABI PRISM 7500	Auto	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	1/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	1/2
		ABI PRISM 7900	Auto	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2
		ABI PRISM 7500fast	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2
LightCycler 480		Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
	Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2		
LightCycler nano	Auto	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	0/2	0/2		
Thermal Cycler Dice Real Time System II	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2		

*陽性反応数/総反応数

表10 レタスにおけるリアルタイムPCRでのVT遺伝子検出結果

食品	検出試薬	機種	解析	VT1陽性菌接種菌数 (cfu/ml)				VT2陽性菌接種菌数 (cfu/ml)			
				10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
レタス	TaKaRa CycleavePCR 0-157 (VT gene) Screening Kit Ver. 2.0	ABI PRISM 7500	Auto	0/2*	0/2	1/2	1/2	1/2	0/2	1/2	1/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	1/2
		ABI PRISM 7900	Auto	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2
		ABI PRISM 7500fast	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2
	LightCycler 480	Auto	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	1/2	
	Thermal Cycler Dice Real Time System II	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	
	Nielsenらの 方法	ABI PRISM 7500	Auto	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	0/2
		ABI PRISM 7900	Auto	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	0/2
		ABI PRISM 7500fast	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
LightCycler 480		Auto	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	1/2	0/2	
		Manual	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	0/2	
LightCycler nano	Auto	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	0/2		
Thermal Cycler Dice Real Time System II	Auto	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2		

*陽性反応数/総反応数

表11 カイワレダイコンにおけるリアルタイムPCRでのVT遺伝子検出結果

食品	検出試薬	機種	解析	VT1陽性菌接種菌数 (cfu/ml)				VT2陽性菌接種菌数 (cfu/ml)			
				10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
カイワレダイコン	TaKaRa CycleavePCR 0-157 (VT gene) Screening Kit Ver. 2.0	ABI PRISM 7500	Auto	0/2*	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
		ABI PRISM 7900	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
		ABI PRISM 7500fast	Auto	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
	LightCycler 480	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
	Thermal Cycler Dice Real Time System II	Auto	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
	Nielsenらの 方法	ABI PRISM 7500	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2
		ABI PRISM 7900	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
		ABI PRISM 7500fast	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
LightCycler 480		Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
	Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2		
LightCycler nano	Auto	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	0/2		
Thermal Cycler Dice Real Time System II	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2		

*陽性反応数/総反応数

表12 トマトにおけるリアルタイムPCRでのVT遺伝子検出結果

食品	検出試薬	機種	解析	VT1陽性菌接種菌数 (cfu/ml)				VT2陽性菌接種菌数 (cfu/ml)			
				10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
トマト	TaKaRa CycleavePCR O-157 (VT gene) Screening Kit Ver. 2.0	ABI PRISM 7500	Auto	1/2*	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	1/2	1/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2
		ABI PRISM 7900	Auto	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	0/2
		ABI PRISM 7500fast	Auto	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	2/2	0/2
	LightCycler 480	Auto	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	1/2	0/2	
	Thermal Cycler Dice Real Time System II	Auto	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	2/2	0/2	
	Nielsenらの 方法	ABI PRISM 7500	Auto	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	1/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2
		ABI PRISM 7900	Auto	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	2/2	<u>2/2</u>	<u>2/2</u>
			Manual	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2
		ABI PRISM 7500fast	Auto	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	2/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	2/2	0/2
LightCycler 480		Auto	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2	
		Manual	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2	
LightCycler nano	Auto	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2		
Thermal Cycler Dice Real Time System II	Auto	2/2	2/2	1/2	1/2	2/2	2/2	2/2	0/2		

*陽性反応数/総反応数

アンダーバーは偽陽性の反応数

表13 ホウレンソウにおけるリアルタイムPCRでのVT遺伝子検出結果

食品	検出試薬	機種	解析	VT1陽性菌接種菌数 (cfu/ml)				VT2陽性菌接種菌数 (cfu/ml)			
				10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
ホウレンソウ	TaKaRa CycleavePCR 0-157 (VT gene) Screening Kit Ver. 2.0	ABI PRISM 7500	Auto	0/2*	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2
		ABI PRISM 7900	Auto	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2
		ABI PRISM 7500fast	Auto	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2
	LightCycler 480	Auto	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
	Thermal Cycler Dice Real Time System II	Auto	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
	Nielsenらの 方法	ABI PRISM 7500	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2
		ABI PRISM 7900	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
		ABI PRISM 7500fast	Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
			Manual	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2
LightCycler 480		Auto	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
		Manual	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
LightCycler nano	Auto	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	0/2		
Thermal Cycler Dice Real Time System II	Auto	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2		

*陽性反応数/総反応数

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

多血清群でのO抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

研究要旨

腸管出血性大腸菌の多様なO血清群に対応した食品検査法を確立するために、O血清群特異的遺伝子を対象に検出法を検討した。諸外国の公的機関で設定されている方法を参照し、日本での使用に適応する機器および蛍光試薬に一部変更して、定性での検出および感度を確認した結果、米国農務省(USDA)参照法および欧州食品安全機関(EFSA)参照法ともに、供試した7血清群(O26、O45、O103、O111、O121、O145およびO157)全ての菌液および菌接種食品培養液において定性での検出が確認された。感度においては、USDA参照法およびEFSA参照法ともに、供試した7血清群計10菌株全ての菌液において、アルカリ熱抽出法でDNA抽出を行った場合には約 10^2 /mlでの検出が確認された。また、菌接種食品培養液においてもアルカリ熱抽出したDNAを用いて両参照方法を検討したところ、供試した7血清群の全てにおいて約 10^3 /mlでの検出が確認された。以上の事から、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、これら方法を基礎とすることが可能であると考えられた。

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

腸管出血性大腸菌感染症では血清群 0157 が主要であるが、他の多様な血清群による患者の発生が知られており、汚染食品の調査や汚染の制御が日本を含め世界的に重要な課題となっている。日本での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。腸管出血性大腸菌の重要な病原因子である VT 遺伝子および対象血清が保有する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、陽性であった検体について、対象 0 血清群を遺伝子検出法によってさらにスクリーニングする手法が諸外国では採られている。VT 遺伝子のスクリーニングについては、各国の検査法に先駆け、既に日本では平成 17 年に通知された腸管出血性大腸菌 026 および 0157 の検出法において取り入れられたが、対象とする主要な血清群の効率的な検出法が必要とされている。また、*eae* が対象血清群のほとんど

の株で陽性であれば、これを対象にした遺伝子スクリーニングを行う事によって、より効率的に対象血清群の腸管出血性大腸菌を検出できるため、諸外国と同様に取り入れていくことが効率的である。このため、本研究では、諸外国での方法を参照し、日本での通知法策定の基礎となる遺伝子検査について検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 の 7 種類の 0 血清群をそれぞれ 14、2、12、15、2、8 および 15 株、合計 68 株を供試した (表 1)。また、それらはヒト、ウシおよび食品由来株、また菌株分譲機関株であった。

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。検体は購入後、試験に使用するまで冷蔵保存した。

3. 菌液の培養

供試菌株を tryptic soy broth (TSB、BD) 10 ml に接種して 37°C、18 時間培養した。

4. 食品培養液の調製

ストマッカー袋に検体 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。

5. 菌接種食品培養液の調製

3 で培養した各 0 血清群から 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。

6. DNA 抽出液の調製

1) 菌液からの DNA 抽出法

3 で培養した菌液から熱抽出法を行った。まず、菌液 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超純水を 0.3 ml 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、 $10,000\times g$ 、10 分間遠心して上清を DNA 抽出原液とした。また、3 で培養した O26、O111、O145 および O157 の 4 血清群の各 1 株の菌液について、アルカリ熱抽出法にて DNA の抽出を行った。まず、菌液 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 255 μl 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 1M Tris-HCl (pH 7.0) 45 μl を加えて中和した。それを $10,000\times g$ 、10 分間遠心し、上清を DNA 抽出原液とした。

これらの DNA 抽出原液は氷上で保存し、抽出当日に検出試験に使用した場合は試

験後に、検出試験が翌日以降の場合は抽出後試験に使用するまで、DNA 抽出液を冷凍 (-80°C) にて保存した。定性での検出では供試菌株全ての DNA 抽出原液 (約 10^9 cfu/ml)、感度の確認では各 O 血清群につき 2 株の DNA 抽出原液およびその滅菌超純水での 10 倍階段希釈段液 (約 10^9-10^2 cfu/ml) を試験に供試した。

2) 菌接種食品培養液からの DNA 抽出法

5 で調製した各菌接種食品培養液 0.3 ml から前述と同様にアルカリ熱抽出法を行った。また、5 で供試した接種菌液からも同様にアルカリ熱抽出法を行い、陽性コントロールとした。

これらの DNA 抽出原液は氷上で保存し、抽出当日に検出試験に使用した場合は試験後に、検出試験が翌日以降の場合は抽出後試験に使用するまで、DNA 抽出液を冷凍 (-80°C) にて保存した。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 抽出原液を試験に供試した。

7. O 抗原特異的遺伝子検出法

各 DNA 抽出液を用いて、リアルタイム PCR 法で各 O 抗原特異的遺伝子を検出した。検出には、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。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後、DNA 抽出液 5 μl を加えた (プライマーおよびプローブの配列は表 3 参照)。なお、陰性

コントロールには滅菌超純水を使用した。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 45 サイクルの条件で ABI PRISM 7500 (アプライド・バイオシステムズ ジャパン) を用いて行われた。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 10⁴ cfu/ml での Ct 値を作成した検量線から算出した。

8. *eae* 検出法

0 抗原特異的遺伝子の検出とともに、USDA 法および EFSA 法では *eae* を対象とした遺伝子検出法が採用されている。このため、一部菌株を用いて予備的に *eae* 検出を確認した。0111 および 0157 の各 1 株の菌液からの DNA 抽出液を USDA 参照法および EFSA 参照法の 2 種類のリアルタイム PCR 法に供試した。表 4 に従って反応液を調製して反応プレートに分注した後、DNA 抽出液 5 μ l を加えた。なお、陰性コントロールには滅菌超純水を使用した。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 45 サイクルの条件で ABI PRISM 7500 を用いて行われた。測定後、Auto 解析にて Ct 値を算出した。

C. 研究結果

菌液からの 0 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 (表 5、6)。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 (表 5)。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 (表 6)。

菌液からの 0 抗原特異的遺伝子の検出について、感度を確認した。USDA 参照法での最大陽性菌数は、熱抽出した DNA を供試した場合には、血清群 026 で 10⁴ cfu/ml、血清群 045 の 2 株ともに 10³ および 10⁴ cfu/ml、血清群 0103 の 2 株ともに 10⁴ cfu/ml、血清群 0111 で 10⁴ cfu/ml、血清群 0121 の 2 株ともに 10⁴ cfu/ml、血清群 0145 で 10³ cfu/ml であった。アルカリ熱抽出した DNA を供試した場合には、血清群 026 で 10² cfu/ml、血清群 0111 で 10² cfu/ml、血清群 0145 で 10² cfu/ml であった (表 7)。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 (図 1 ~ 6)。菌数が 10⁴ cfu/ml での Ct 値は、血清群 026 (図 1) では、熱抽出した DNA で 37.2、アルカリ熱抽出した DNA で 32.7、血清群 045 (図 2) では、熱抽出した DNA で 35.8 および 36.8、血清群 0103 (図 3) では、熱抽出した DNA で 37.5 および 37.0、血清群 0111 (図 4) では、熱抽出した DNA で 38.2、アルカリ熱抽出した DNA で 34.5、血清群 0121 (図 5) で

は、熱抽出した DNA を 37.8 および 37.3、血清群 0145 (図 6) では、熱抽出した DNA で 38.8、アルカリ熱抽出した DNA で 34.4 を示した。全ての 0 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。EFSA 参照法での最大陽性菌数は、熱抽出した DNA を供試した場合には、血清群 026 で 10^3 cfu/ml、血清群 0103 の 2 株ともに 10^3 および 10^4 cfu/ml、血清群 0111 で 10^4 cfu/ml、血清群 0145 で 10^4 cfu/ml、血清群 0157 で 10^4 cfu/ml であった。アルカリ熱抽出した DNA を供試した場合には、血清群 026 で 10^2 cfu/ml、血清群 0111 で 10^2 cfu/ml、血清群 0145 で 10^2 cfu/ml、血清群 0157 で 10^2 cfu/ml であった (表 8)。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 (図 7~11)。菌数が 10^4 cfu/ml での Ct 値は、血清群 026 (図 7) では、熱抽出した DNA で 37.7、アルカリ熱抽出した DNA で 32.3 を、血清群 0103 (図 8) では、熱抽出した DNA で 35.5 および 36.2 を、血清群 0111 (図 9) では、熱抽出した DNA で 35.3、アルカリ熱抽出した DNA で 33.0 を、血清群 0145 (図 10) では、熱抽出した DNA で 39.7、アルカリ熱抽出した DNA で 33.8 を、血清群 0157 (図 11) では、熱抽出した DNA で 36.5、アルカリ熱抽出した DNA で 30.9 を示した。全ての 0 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。また、045、0103 および 0121 の熱抽出法での検量線は、各血清群 2 株間でほとんど差がなく、再現性が高い結果であった。しかし、供試した 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 の 7 血清群間では、0145 の EFSA 参照法で最も検量線が上方にあり検出性が劣っていた。一方で、0111 の EFSA 参照法で最も検量線が下方にあり、アルカリ熱抽出法よりは検出性が悪いものの熱抽出法の中では最も検出性が優れていた。

食品培養液からの 0 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 (表 9 および 10)。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 (表 9)。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 (表 10)。

菌接種食品培養液からの 0 抗原特異的遺伝子の検出について感度を確認した。USDA 参照法での最大陽性菌数は、牛挽肉培養液では、血清群 026 で 10^2 cfu/ml、血清群 045 で 10^2 cfu/ml、血清群 0103 で 10^3 cfu/ml、血清群 0111 で 10^2 cfu/ml、血清群 0121 で 10^2 cfu/ml、血清群 0145 で 10^2 cfu/ml であった (表 11)。また、

カイワレダイコン培養液では、血清群 026 で 10^3 cfu/ml、血清群 045 で 10^2 cfu/ml、血清群 0103 で 10^2 cfu/ml、血清群 0111 で 10^3 cfu/ml、血清群 0121 で 10^2 cfu/ml、血清群 0145 で 10^2 cfu/ml であった (表 11)。全ての 0 血清群について両食品培養液から 10^3 cfu/ml で検出された。それらのデータから菌数を横軸に Ct 値を縦軸として検量線を作成した (図 12~17)。菌数が 10^4 cfu/ml での Ct 値は、血清群 026 (図 12) では、牛挽肉培養液で 35.8、カイワレダイコン培養液で 36.2、血清群 045 (図 13) では、牛挽肉培養液で 33.8、カイワレダイコン培養液で 33.2、血清群 0103 (図 14) では、牛挽肉培養液で 35.6、カイワレダイコン培養液で Ct 値は 35.9、血清群 0111 (図 15) では、牛挽肉培養液で 34.4、カイワレダイコン培養液で 35.0、血清群 0121 (図 16) では、牛挽肉培養液で 35.4、カイワレダイコン培養液で 36.1、血清群 0145 (図 17) では、牛挽肉培養液で 35.2、カイワレダイコン培養液で 34.8 を示した。このように、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。

EFSA 参照法での最大陽性菌数は、牛挽肉培養液では、血清群 026 で 10^2 cfu/ml、血清群 0103 で 10^2 cfu/ml、血清群 0111 で 10^2 cfu/ml、血清群 0145 で 10^2 cfu/ml、血清群 0157 で 10^2 cfu/ml であった (表 12)。また、カイワレダイコン培養液では、血清群 026 で 10^2 cfu/ml、血清群 0103 で 10^3 cfu/ml、血清群 0111 で 10^2 cfu/ml、

血清群 0145 で 10^3 cfu/ml、血清群 0157 で 10^2 cfu/ml であった (表 12)。全ての 0 血清群について両食品培養液から 10^3 cfu/ml で検出された。それらのデータから菌数を横軸に Ct 値を縦軸として検量線を作成した (図 18~22)。菌数が 10^4 cfu/ml での Ct 値は、血清群 026 (図 18) では、牛挽肉培養液で 34.3、カイワレダイコン培養液で 34.1、血清群 0103 (図 19) では、牛挽肉培養液で 34.0、カイワレダイコン培養液で 33.9、血清群 0111 (図 20) では、牛挽肉培養液で 33.7、カイワレダイコン培養液で 33.9、血清群 0145 (図 21) では、牛挽肉培養液で 34.4、カイワレダイコン培養液で 34.7、血清群 0157 (図 22) では、牛挽肉培養液で 34.5、カイワレダイコン培養液で 35.0 を示した。牛挽肉および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 (詳細略)。

D. 考察

本研究では、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。検出方法にはリアルタイム PCR 法を用いた USDA の検査法 (図 23) および EFSA の検査法 (図 24) を参照した。ただし、USDA 法では 026、

045、0103、0111、0121 および 0145 の 6 血清群 (0157 は別途検査法が設定されている)、EFSA 法では 026、0103、0111、0145 および 0157 の 5 血清群を対象にしており、各国での重要な血清群に違いがあることがわかる。日本においての対象血清群の選択を行い、それらに特異性および感度の優れる方法を検討する必要があると思われる。

USDA および EFSA の検査法では、独自に開発または公表されているプライマー、プローブ等から成る反応系を用いている。O 抗原特異的遺伝子は、USDA 法では 0111 が wbdI である以外は wzx を対象遺伝子として使用している。EFSA では、026 および 0103 が wzx、0111 が wbdI、0145 が ihp1、0157 が rfbE を対象遺伝子としている。また、機器や試薬の設定は、USDA 法では使用機器を 1 機種に特定し、その機器に適した DNA 増幅酵素や蛍光色素を詳細に設定して検出法を確立している。一方、EFSA 法では、USDA 法のような詳細な設定はなく、各機関で使用方法の設定を行う。対照的な検査法の設定であるが、USDA 法は一国の一機関で使用方法であることから、機器等の統一性も図りやすく、一定レベルの技術を想定して特定の方法に限定することが可能であると考えられる。このため、大変に詳細なプロトコルが作成されており、使用者の作業ミスは少ないものと思われる。EFSA 法については、加盟国の多様な状況を考慮すると特定の機種や試薬に限定する事が難しいものと

思われ、各国や各機関での状況によって詳細な検査法が各自で決められるように設定されているのではないかとと思われる。検査法実施の際の条件の詳細な設定については検証が必要となるため、USDA 法のように詳細が示されている方が応用性には限度があるが検証は最小限にとどめる事が可能とも言える。日本での腸管出血性大腸菌の食品での検査の通知法は、これまでに汎用性の高い機器を複数含めて、比較的安価に準備することのできる公表されているプライマー・プローブを自家調製した試薬や、製造者による製品管理を行っている市販キットを設定している。O 抗原特異的遺伝子を対象とした検出法でも、汎用性の高い機種を複数、また自家調製および市販キットを含めた複数の方法を含む検出法や、代表的手法をひとつ決めて、それと同様な手法を各機関で応用し検証して使用することが可能な検出法など、方向性が考えられる。また、これまでに VT 遺伝子検出市販キットの製造や検出に使用する汎用機器の製造実績のある企業による、O 抗原遺伝子検出法への対応の可能性についても検討が必要と考えられる。

本研究での定性検出では、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、両方法での著しい差は、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、両方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。

熱抽出法とアルカリ熱抽出法について、026、0111、0145 および 0157 菌液からの DNA 抽出効率を検量線を作成して比較した結果、両抽出法の Ct 値の差は、026 では USDA 参照法で約 5.4、EFSA 参照法で約 6.6、0111 では USDA 参照法で約 2.5、EFSA 参照法で約 4.8、0145 では USDA 参照法で約 2.7、EFSA 参照法で約 6.1、0157 では EFSA 参照法で約 8.2 と大きくアルカリ熱抽出法で効率が良い事が示された。その差は総じて約 3～8 であった。菌接種食品培養液からはアルカリ熱抽出法でのみ DNA を抽出しているが、検体である牛挽肉およびカイワレダイコンの検体種間で検量線にほとんど差がなく、食品種による違いが大きい可能性が示されたが、今後さらに検討する必要もある。また、菌接種食品培養液からアルカリ熱抽出法した検量線については、菌液からの DNA 抽出が熱抽出法のみであった血清群 045、0103 および 0121 では、この熱抽出法での検量線とほとんど差がなく同じ程度の検出性であった。また、菌液からの DNA 抽出が熱抽出法とアルカリ熱抽出法であった 026、0111、0145 および 0157 でも、菌液での熱抽出法した検量線とほとんど差がなく同様の検出性であった。アルカリ

熱抽出法は熱抽出法に比べて DNA 抽出効率が高いが、食品培養液からの抽出では抽出阻害が起こることが検量線作成において示された。食品培養液の熱抽出法では、Ct 値にして約 3～8 の差が認められると思われる。これらの結果では、ほとんどの血清群および両参照法において、アルカリ熱抽出で 10^3 cfu/ml まで検出でき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。今後、本研究によって、日本での主要な血清群の試験法の開発、腸管出血性大腸菌食中毒の原因食品の探索、輸入検疫や国内流通食品調査などでの本菌の検査法に結びつく試験法の策定に貢献できるものと考えられる。

E. 結論

腸管出血性大腸菌の食品からの血清群 0157 検査法に加え、感染の多い血清群 4～6 種類を対象にした食品での検査法が

世界的に行われ始めており、日本でも多様な O 血清群に対応した食品検査法を確立する必要がある。このため、O 血清群特異的遺伝子を対象に検出法を検討した。まず、諸外国の公的機関で設定されている方法を参照し、日本での使用に適応する機器および蛍光試薬に一部変更して定性での検出および感度を確認した。その結果、米国農務省 (USDA) 参照法および欧州食品安全機関 (EFSA) 参照法ともに、供試した 7 血清群 (O26、O45、O103、O111、O121、O145 および O157) 計 68 菌株全ての菌液において定性での検出が確認された。また、菌接種食品培養液においても、両参照方法について供試した 7 血清群各 1 株の全てで検出された。感度においては、USDA 参照法および EFSA 参照法ともに、供試した 7 血清群計 10 菌株全ての菌液において約 10^4 /ml での検出が確認され、特にアルカリ熱抽出法で DNA 抽出を行った場合には約 10^2 /ml での検出が確認された。また、菌接種食品培養液においてもアルカリ熱抽出法した DNA を用いて両参照方法を検討したところ、供試した 7 血清群各 1 株の全てにおいて約 10^3 /ml での検出が確認された。以上の事から、日本での多血清群での O 抗原遺伝子を対象した検出法の確立には、これら方法を基礎とすることが可能であると考えられた。

F. 健康被害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

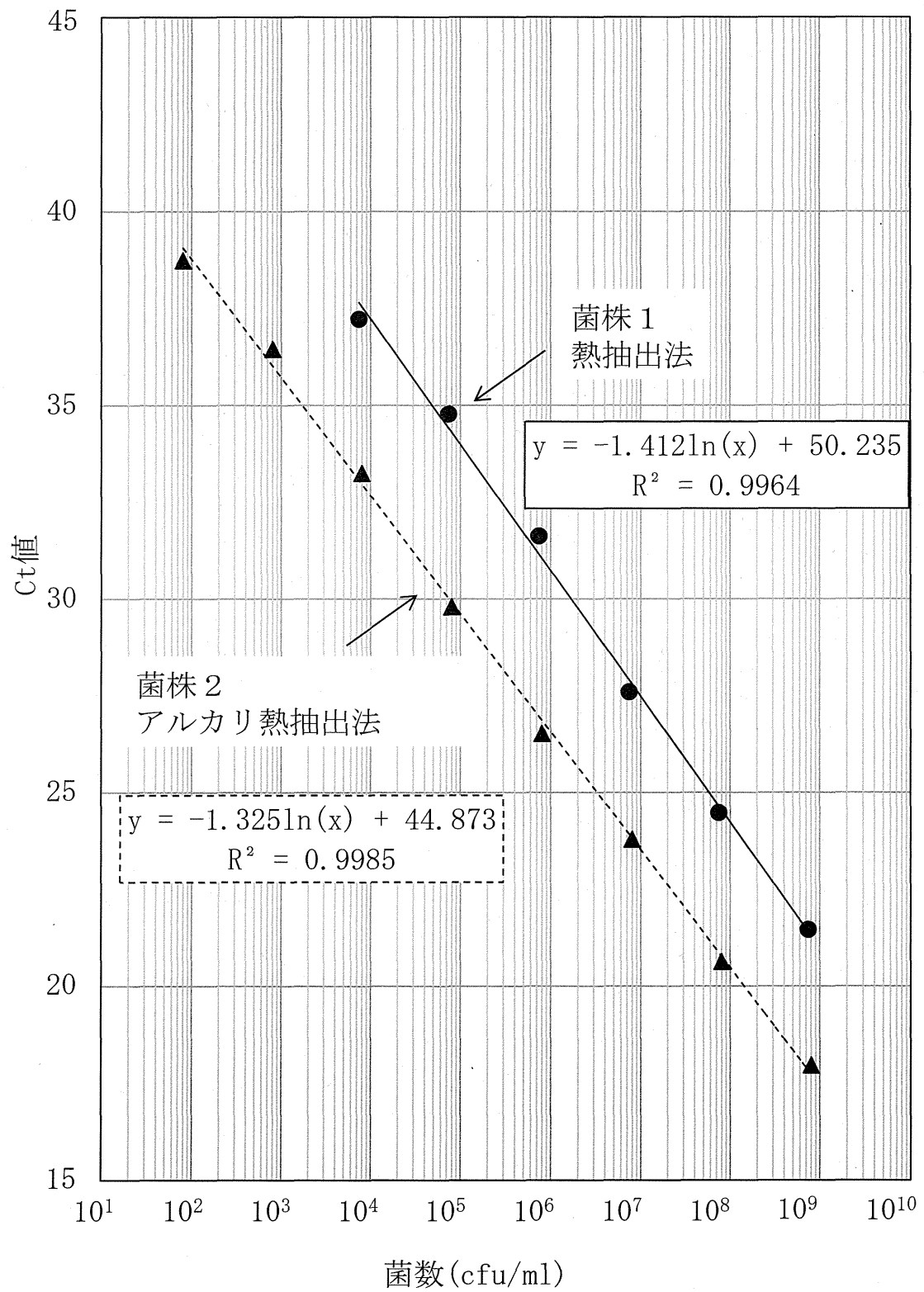


図1 菌液での026抗原特異的遺伝子検出 (USDA参照法) の検量線

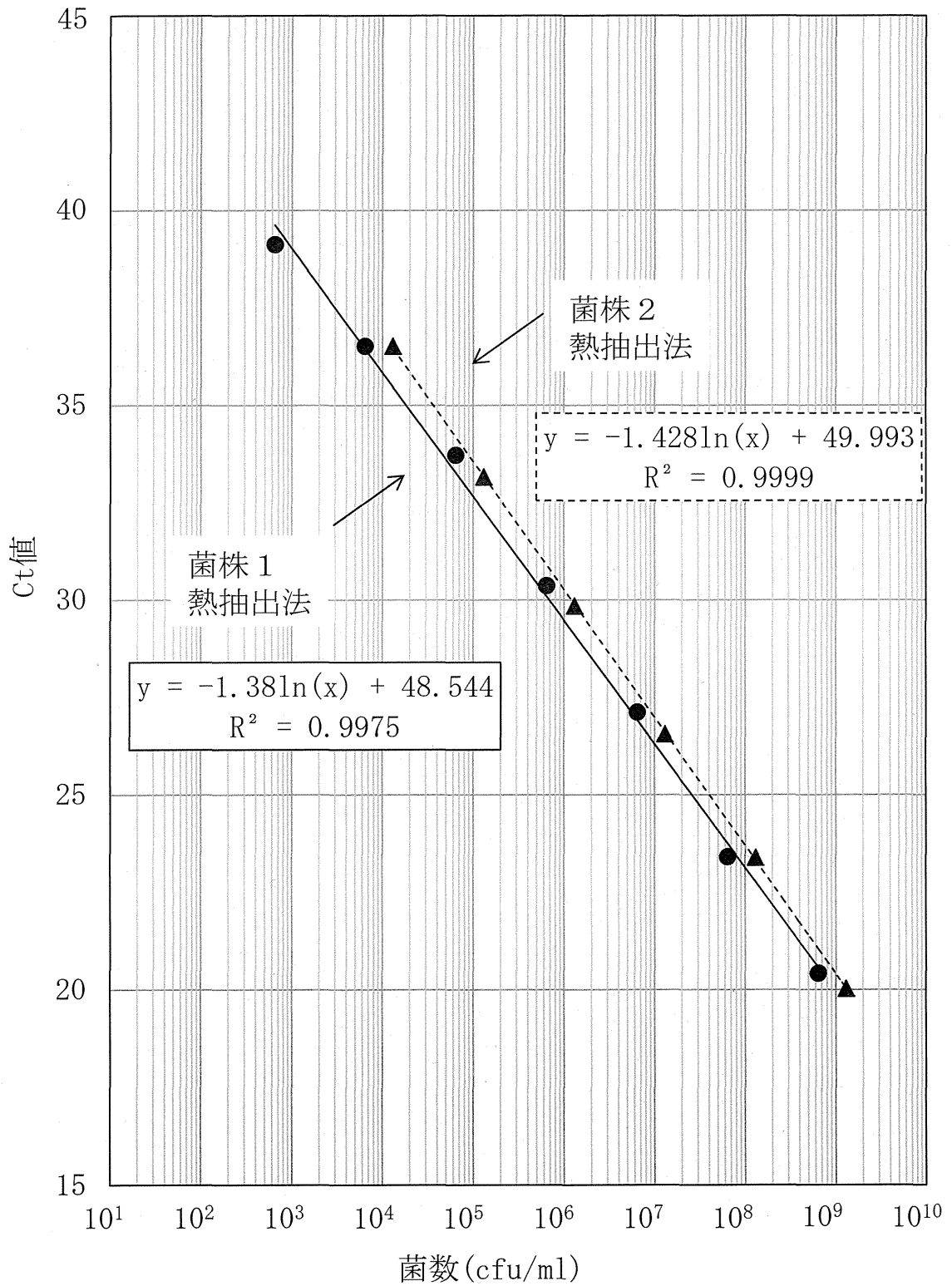


図2 菌液での045抗原特異的遺伝子検出 (USDA参照法) の検量線