

のものについては H (べん毛) 型が特定のものほとんどであり、血清型としてはほとんどが O157:H7/H-, O26:H11/H-, O111:H-, O103:H2/H-, O145:H-, O121:H19/H-, または O165:H- のいずれかである。しかし、ヒト以外の動物や環境中から分離されるこれらの O 血清群の EHEC またはそれ以外の大腸菌には他の H 型を保有する株が存在することが報告されており、その分布状況については不明な点が多い。ヒト以外の動物や環境中の EHEC についてはこれら O 血清群の分布状況についても解析を進め、分布状況を明らかにしておく必要がある。今年度構築したマルチプレックス PCR 系を改良した系を用いた解析によってそれらが明らかになることが期待される。

E. 結論

・2007 年から 2011 年に国内でヒトから分離された EHEC は、頻度の高い順に O157 (69.3%), O26 (15.5%), O111 (3.3%), O103 (2%), O145 (1.8%), O121 (1.7%), O91 (1.2%), O165 (0.4%) であることが判明した。

・2007 年から 2011 年までに重症者（血便または HUS 発症者）由来の EHEC として分離数が 10 以上の血清群は、上記の 8 血清群のうち O91 を除く 7 血清群であることが判明した。食品からの EHEC の検出にはこれら 7 血清群を標的とすることが望ましいと考えられる。

・上記の 7 血清群と *stx1*, *stx2* および *eae* のマルチプレックス PCR 系を改良し、O165 抗原遺伝子の検出効率が上昇した。

・マルチプレックス PCR 検出系は患者便からの検出法として、少なくとも O157, O26, O121, O165 の抗原遺伝子, *stx2*, *eae* について応用可能であることが明らかとなった。

・今年度構築したマルチプレックス PCR 系

は、O157 の増幅産物のサイズ等で改良が必要であると共に、特異性および感度についてはさらに詳細な検討が必要である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

Isobe J, Shima T, Kanatani JI, Kimata K, Shimizu M, Kobayashi N, Tanaka T, Iyoda S, Ohnishi M, Sata T, Watahiki M.
Serodiagnosis using microagglutination assay during the food-poisoning outbreak in Japan caused by consumption of raw beef contaminated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 and O157. *J. Clin. Microbiol.* In press

資料1. ヒト由来EHECのO群(2012年-2013年11月) と重症者(血便またはHUS発症者)由来株数

O group	Total number	BD or HUS
O157	3,405	1,413
O26	1,135	153
O121	189	61
O111	322	43
O145	179	35
O103	241	31
O165	24	11
O55	8	3
O91	53	2
OUT	52	3
others	182	14
total	5,790	1,769

HUS:
hemolytic
uremic
syndrome

BD:
bloody
diarrhea

資料2. PCRプライマー(O165を改良)

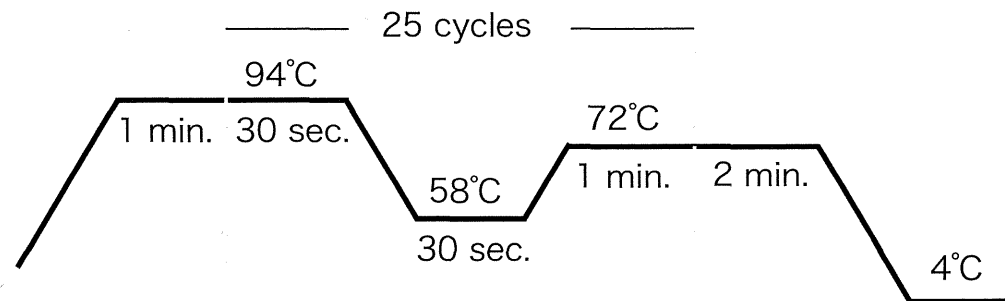
O血清群	標的遺伝子	プライマー配列	PCR産物のサイズ(bp)	参考文献
O157	<i>rfbE</i> (perosamine synthetase)	CAGGTGAAGGTGGAATGGTTGTC TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG	296	Bertrand R. and Roig B. Water Res. 2007 41:1280-6
O26	<i>wzx</i> (O-polysaccharide export protein)	GGGGTGGGTACTATATTGG AGCGCCTATTTTCAGCAAAGA	241	Paddock Z. et al. Vet Microbiol. 2012 156:381-8
O111	<i>wzx</i> (O-polysaccharide export protein)	CAAGAGTGCTCTGGGCTTCT AACGCAAGACAAGGCAAAAC	451	Paddock Z. et al. Vet Microbiol. 2012 156:381-8
O103	<i>wzx</i> (O-polysaccharide export protein)	TAAGTACGGGGTGCTTTTT AAGCTCCCAGCACGTATAA	716	Paddock Z. et al. Vet Microbiol. 2012 156:381-8
O121	<i>wzy</i> (O-polysaccharide polymerase)	Unpublished data	193	in this study
O145	<i>wzy</i> (O-polysaccharide polymerase)	Unpublished data	132	in this study
O165	<i>wcnU</i> (glycosyltransferase)	Unpublished data	1042	in this study
病原性遺伝子	標的遺伝子			
Stx1	<i>stx1</i>	LP30: CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG LP31: CACCAGACAATGTAACCGCTG	348	Cebula T. et al. J Clin Microbiol. 1995 33:248-250
Stx2	<i>stx2</i>	LP43: ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG LP44: GCGTCATCGTATACACAGGAGC	584	Cebula T. et al. J Clin Microbiol. 1995 33:248-250
intimin	<i>eae</i>	SK1: CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC SK2: CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	881	Oswald E. et al. J Clin Microbiol. 2000 68:64-71

資料3. 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, ExTaq)

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 x 4 (0.64)
primer(<i>stx1</i> と <i>stx2</i>) (100μM)	0.04 x 4 (0.16)
primer(その他) (100μM)	0.08 x 12 (0.96)
KAPA Taq Extra	0.16
Template DNA (10ng/μl)	1
total	30 μl

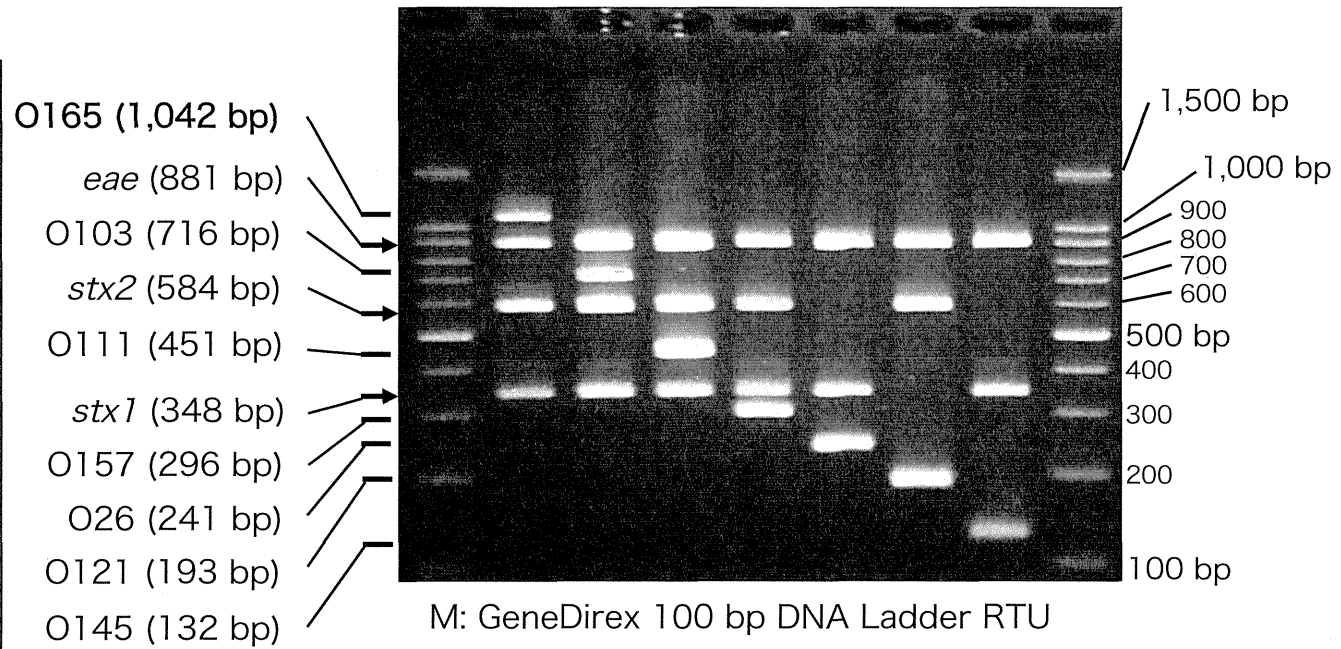
反応条件



資料4. EHEC One-shot PCRの泳動像(新バージョン)

反応液に加えたテンプレートDNA

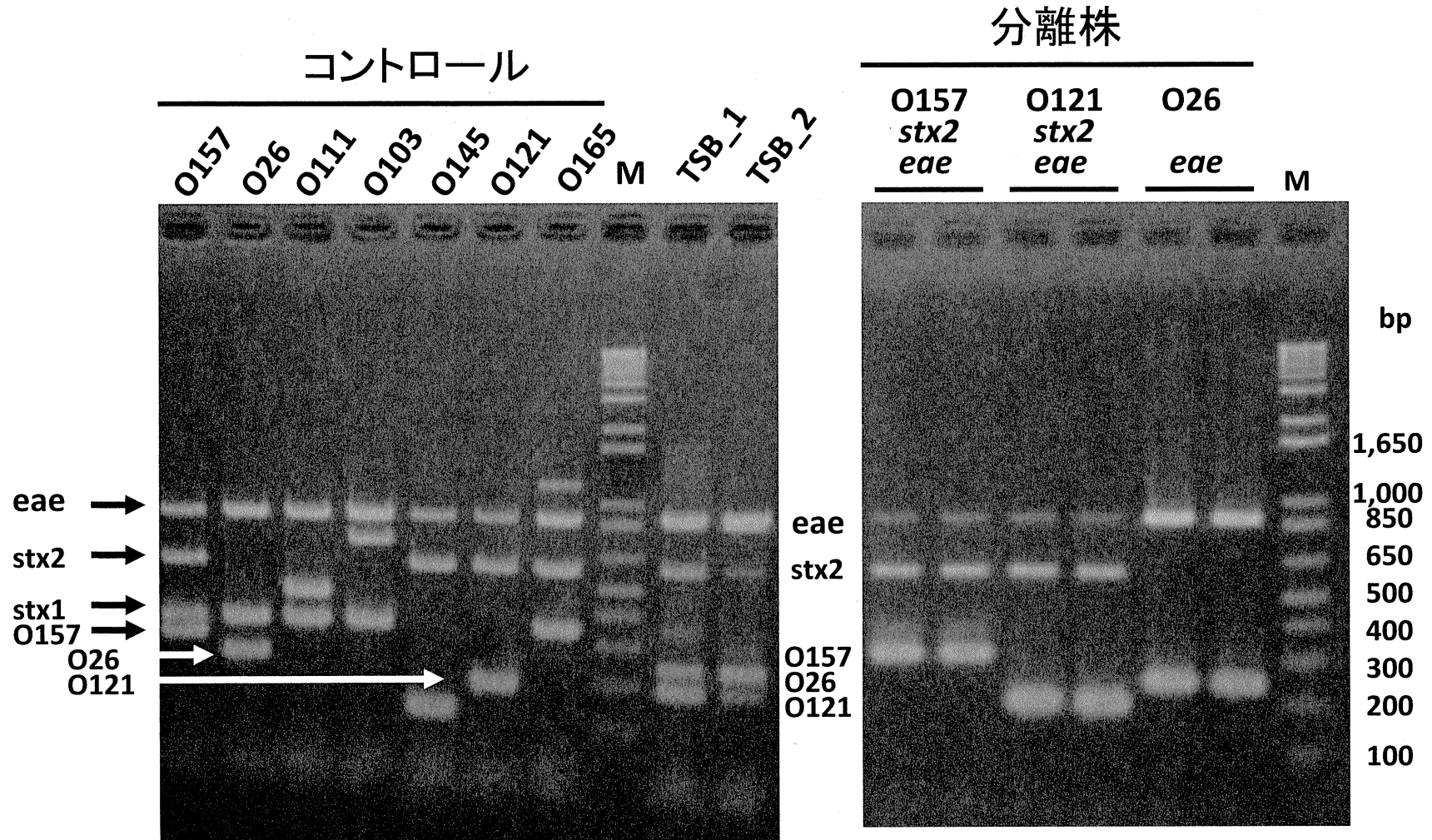
M EHEC O165 EHEC O103 EHEC O111 EHEC O157 EHEC O26 EHEC O121 EHEC O145 M



M: GeneDirex 100 bp DNA Ladder RTU
2 % agarose gel, 0.5 x TBE buffer

反応液に含まれる
プライマーセット

資料5. マルチプレックスPCR法の応用 (便検体からの分離)



TSB_1, TSB_2; 便増菌液(同一サンプル由来)

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25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、昨年度に Vero toxin (VT) 遺伝子（または志賀毒素遺伝子 *stx*）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い、「腸管出血性大腸菌 026、0111 及び 0157 の検査法について」食安監発 1217 第 1 号が通知された。今年度は、日本での主要な血清群を血清群 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 とし、以下の 4 課題に取り組んだ。（1）食品培養液からの VT 遺伝子検出によるスクリーニング法について、リアルタイム PCR 法、loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法、コンベンショナル PCR 法についてインターナル・コントロールを含む優れた系を確立した。（2）血清群 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 特異的遺伝子を対象とした食品での検出法の具体的な条件を明らかにした。（3）多血清群株を供試し、選択剤を添加した複数種類の酵素基質培地にて特徴を有する発色性によって対象血清群を一括または鑑別した分離が可能であること、新規に開発された 0103、0121、0145 に対する免疫磁気ビーズの回収率を検討し優れた濃縮効果が明らかになった。（4）多機関によるコラボレイティブ・スタディによる評価を計画し一部を実施した。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法、多血清群に対応した分離培養法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

上田泰史、原田 誠

神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター

岩渕香織

岩手県環境保健研究センター

菊地理慧

福島県衛生研究所

山崎匠子
富田敦子
楠原 一
山田裕子
齊藤志保子
磯部順子
古川一郎
権平文夫
佐々木美智子、小林直樹、長尾清香

杉並区衛生試験所
静岡市環境保健研究所
三重県保健環境研究所
広島県立総合技術研究所保健環境センター
秋田県健康環境センター
富山県衛生研究所
神奈川県衛生研究所
デンカ生研株式会社
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。食中毒事例では原因食品確定が不可欠であるが、食品での検査法は、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。そこで、昨年度の研究にて日本での食品検査法の対象を血清群 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 と決定した。日本および諸外国の腸管出血性大腸菌検査法では、まず本菌の重要な病原因子である VT 遺伝子（または志賀毒素遺伝子 *stx*）の有無を食品培養液から検出することによって本菌の汚染の有無のスクリーニングが行

われている。加えて、諸外国では 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 0 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。これは、効率的な検査法の流れであり、該当した血清群について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に塗抹し分離する。

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）多血清群での増菌培養および分離培養の検討、（4）腸管出血性大腸菌の試験法のコラボレイティブ・スタディによる検討を行った。

なお、本報告書ではこれまでの報告や試薬名の表現に従い、VT 遺伝子または *stx* の両方の表現を使用している。

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. 菌液および食品培養液

菌液での検討では血清群 026 および 0111

の各 2 株、0157 の 1 株を、食品での検討では血清群 0157 の 5 株を試験に供試した。菌株をトリプトソイ・ブロス (TSB、ベクトン・ディッキンソン) 10 ml にて 37°C で 18 時間培養して適宜希釈して用いた。また、小売店で購入した食品検体 (牛挽肉、牛レバー、豚スライス、ヤギ・ナチュラルチーズ、レタス、カイワレダイコン、トマト、ホウレンソウ) と 9 倍量の mEC 培地 (日水製薬) を 42 ± 1 °C で 22 ± 2 時間培養した。菌液および食品培養液での 10 倍階段希釈液からアルカリ熱抽出法にて DNA 液を調製した。

2. 反応試薬

自家調製試薬では、リアルタイム PCR 法の *stx1* および *stx2* は Nielsen らの方法 (Clin. Microbiol. 41:2884-93, 2003) を、主要な血清群が共通して保有する腸粘膜接着因子 Intimin の遺伝子 (*eae*) およびインターナルコントロールとしての 16SrRNA は米国農務省 (United States Department of Agriculture, USDA) の方法を参照し、コンベンショナル PCR 法の *stx1*、*stx2* および *eae* については欧州食品安全機関 (European Food Safety Authority, EFSA) の方法を、16SrRNA については USDA の方法を参照した。リアルタイム PCR 法、コンベンショナル PCR 法および LAMP 法の各種試作キットについても検討した。

3. 感度の検討での反応試薬濃度および反応条件

菌液を用いた検討では、自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法における simplex 反応系の検出感度の確認、自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法における triplex 反応系の各種試薬濃度での検出感度の検討、simplex およ

び duplex 反応系試作キットでのリアルタイム PCR 法における各種機器による検出感度の検討、自家調製試薬でのコンベンショナル PCR 法における simplex 反応系の反応条件での検出感度の検討、自家調製試薬でのコンベンショナル PCR 法における triplex 反応系での反応条件での検出感度の検討を行った。食品を用いた検討では、リアルタイム PCR 法では自家調製試薬および試作キット (タカラバイオ)、loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法ではインターナル・コントロール検出についてのみの試作キット、コンベンショナル PCR 法では自家調製試薬および試作キットについて検出感度の検討を行った。なお、各種機器と試薬の組み合わせを設定し、かつ解析方法も併せて検討した。

(2) 多血清群での 0 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

1. 菌液および食品培養液

菌液での検討では血清群 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 の各 2 株、食品での検討では血清群 0157 の 5 株を試験に供試した。菌株を TSB 10 ml にて 37°C で 18 時間培養して適宜希釈して用いた。小売店で購入した食品検体 (牛挽肉、牛レバー、豚スライス、ヤギ・ナチュラルチーズ、レタス、カイワレダイコン、トマト、ホウレンソウ) と 9 倍量の mEC 培地 (日水製薬) を 42 ± 1 °C で 22 ± 2 時間培養した。菌液および食品培養液での 10 倍階段希釈液からアルカリ熱抽出法にて DNA 液を調製した。

2. 反応試薬

自家調製試薬では、リアルタイム PCR 法は、

0157 については EFSA の方法を、0157 以外の 5 血清群については USDA の方法を参照した。LAMP 法は、Wang らの方法 (Appl. Environ. Microbiol. 78:2727-36, 2012) を参照した。また、市販キットについても検討した。

3. 感度の検討での反応試薬濃度および反応条件

菌液を用いた検討では、自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法における duplex 反応系の組み合わせの検討、自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法における duplex 反応系の反応条件および検出感度の検討、自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法における triplex 反応系の組み合わせの検討、リアルタイム PCR の triplex 反応系の検出感度の検討を行った。食品を用いた検討では、リアルタイム PCR 法では自家調製試薬、LAMP 法では各 0 抗原対象自家調製プライマーセットと DNA 増幅試薬キット (栄研化学) を用いた自家調製試薬および大腸菌 0157 検出試薬キット (栄研化学) について検出感度の検討を行った。なお、各種機器と試薬の組み合わせを設定し、かつ解析方法も併せて検討した。

(3) 多血清群での増菌培養および分離培養の検討

1. 菌株

VT 産生性 (87 株) および非産生性 (3 株) 大腸菌の計 90 株 (25 種類の O 血清群と OUT) を mEC 培地 (日水製薬) 中での増殖の確認に、これらに加えて 64 株 (計 154 株) を各種酵素基質培地でのコロニー形態および生育性の確認に供試した。

2. 増菌培養および分離培養

菌株培養液 10^{-7} 希釈菌液 0.1 ml を mEC 培

地 10 ml に接種して 42°C にて 22 時間培養し、培養後の mEC 培地の混濁を目視にて判定した (++) : 強い増殖、+ : やや弱い増殖、- : 増殖なし)。また、菌株培養液を弱選択性および強選択性の 10 種類の酵素基質培地に画線した。 37°C にて 24 時間培養し、生育したコロニーの発色、大きさなどを観察した。

3. 免疫磁気ビーズ法

新規に開発された血清群 0103、0121、0145 に対する試作免疫磁気ビーズ (デンカ生研) の回収率を、参照に市販 (デンカ生研) の血清群 026、0111、0157 のビーズとならべて検討した。各血清群 1 株の TSB 培養液を PBS または牛挽肉の mEC 中での 42°C (22 時間) 培養液にて 10^{-3} 希釈し、これを免疫磁気ビーズ法に供試した。濃縮法は市販の説明書を参照した。 10^{-3} - 10^{-5} 希釈菌液のビーズ濃縮液をセフィキシム・亜テルル酸 (CT) 加クロモアガー STEC 寒天培地 (クロモアガー社) に塗抹し、培養後に生育したコロニーを観察し、陽性と思われるコロニーをラテックス凝集反応試験または免疫血清を用いて血清型別試験を行った。各平板上のコロニー数を算出した。

(4) 多機関によるコラボレイティブ・スタディによる評価

本分担研究の他協力研究において検討されている増菌培養法、遺伝子検出法、免疫磁気ビーズ法、分離培養法の結果を鑑みてコラボレイティブ・スタディの方法の各項目を検討した。

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

はじめに菌液を供試して、リアルタイム PCR 法およびコンベンショナル PCR 法を検討した。自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法における triplex 反応系の各種試薬濃度での検出感度の検討では、*stx* 2 プローブ濃度は 100 nM で十分な検出感度が得られることが判明した。また、duplex 反応系試作キットでのリアルタイム PCR 法は各種機器で感度良く使用できることが判明した。自家調製試薬でのコンベンショナル PCR 法における triplex 反応系では、DNA ポリメラーゼに Tks Gflex DNA Polymerase (タカラバイオ) を使用することによって良好な感度が得られた。

stx および *eae* の市販食品での検出率は、37 検体中 3 検体が *stx* 陽性、6 検体が *eae* 陽性であり、そのうち 1 検体が両方とも陽性であった。このことから両方を測定する効果が低いことが判明し、食品での検討では *eae* を含めない系で検討した。

菌液での検討で得られた優秀な条件をもとに食品培養液中での検討を行った。自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法における duplex 反応系の各種機器による検出感度の検討では、*stx* および 16SrRNA とともにいずれの食品でも、またいずれの機器でも 10^2 または 10^3 cfu/ml で検出された。試作キットでの LAMP 法におけるインターナル・コントロールの検出も良好であった。自家調製試薬でのコンベンショナル PCR 法における duplex 反応系での検出感度は劣っていた。一方、duplex 反応系試作キットでのコンベンショナル PCR 法では良好に検出された。

(2) 多血清群での O 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

はじめに菌液を供試して、リアルタイム PCR 法および LAMP 法を検討した。自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法における duplex 反応系の組み合わせでは、8 つの組み合わせのうち 3 つが比較的優れており、このうちのひとつについて反応条件 (各種濃度試薬) を検討した。HEX および VIC の適正濃度を決定し、複数の機種での良好な感度を確認した。自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法における triplex 反応系の組み合わせについても、良好な感度を示す方法を明らかにした。

菌液での検討で得られた優秀な条件をもとに食品培養液中での検討を行った。リアルタイム PCR 法の duplex 反応系における各種機器での検討では、8 種類のいずれの食品においても、また検討した 5 機種のいずれにおいても、026 および 0157、0103 および 0111、0121 および 0145 の 3 種類の duplex 反応系のいずれも 10^4 cfu/ml 以上の感度であることが確認された。また、LAMP 法における自家調製試薬および市販キットでの検討では、自家調製試薬での反応は 026、0103、0111、0121 および 0145 では 65°C 反応で、0157 のみ 63°C で良好な結果であった。また、市販の 0157 検出キットでは反応条件が 65°C であり自家調製試薬と同等の検出感度であった。

(3) 多血清群での増菌培養および分離培養の検討

増菌培地の検討では、mEC 培地 (10 ml) への接種菌数は、全株の平均で 10.8 (最小 5、最大 28) cfu であった。主要血清群の一部である 0103、0121 および 0145 の mEC 培地での増殖は、0103 では 16 株中全株が、0145 では 17 株中 16 株が強く増殖した。しかし、0121

では 21 株中 2 株が強い増殖を示したが 19 株がやや弱い増殖であり、0145 では 1 株が増殖しなかった。他血清群では多くの株が強い増殖を示した。

分離培養の検討では、弱選択性の 6 種類の培地では、クロモアガーSTEC、クロモアガー 0157、Vi RX026 および BCM0157 はそれぞれ 2、3 種類の色に分かれたが、クロモアガー 026/0157 およびレインボーアガー-0157 では多様な色を呈した。強選択性の 4 種類の培地では、いずれの培地も主要な 6 血清群以外の大腸菌の生育は多くの血清群で抑制され、6 血清群の効率的な分離が期待できた。

免疫磁気ビーズ法の検討では、6 血清群ともに PBS では約 37 から 100%、牛挽肉培養液では約 21 から 60%とビーズ法による回収率としては優れていた。PBS と牛挽肉培養液での回収率の差は一概に傾向を表すことができず、総じて同等に近い結果であった。

(4) 多機関によるコラボレイティブ・スタディによる評価

コラボレイティブ・スタディを以下のように計画した。各回 2 血清群を対象として 6 血清群を 3 回にわけて試験を実施することにした。試験に用いるリアルタイム PCR 機器の統一のために汎用機種を設定し、保有する地方自治体、検疫所、財団法人、民間機関等の 12 試験研究機関とした。牛ひき肉およびカイワレダイコンを試験食品検体とし、低菌数 (5 cfu/25 g) および高菌数 (25 cfu/25 g) を設定した。試験方法は、検体に mEC 培地 225ml を加え、 $42 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養し、リアルタイム PCR 法による *stx*/インターナル・コントロール検出および 0 抗原遺伝子検出、免

疫磁気ビーズ法後に CT 加ソルビトールマッコンキー寒天培地 (自家調製) および CT-クロモアガーSTEC 培地に塗抹した。培養後に、疑われるコロニーを免疫血清またはラテックス試薬にて凝集反応を確認した。

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

腸管出血性大腸菌の食品での通知法における VT 遺伝子検出によるスクリーニング法は、PCR 法、LAMP 法およびリアルタイム PCR 法が設定されている。昨年度は通知法での VT 遺伝子スクリーニング法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。今年度では、経済性をさらに高めることを考え、現通知法における *stx*1&2 検出用プローブ濃度を半減し経済性を高めることが可能であることが明らかになった。また、諸外国ではインターナル・コントロールが設定されており、食品成分による PCR 反応阻害の発生による *stx* 陰性でないことを確認することができ、試験結果の判定に重要となる。本研究では、インターナル・コントロールを設定した自家調製試薬またはキットのリアルタイム PCR 法、LAMP 法およびコンベンショナル PCR 法を検討し、優れた検出感度の方法が設定された。しかし、自家調製試薬でのコンベンショナル PCR 法では食品培養液において感度に優れず、設定できなかった。

本研究での *stx* および *eae* の市販食品での検出率と同様に、研究分担者 (西川禎一教授) の調査結果でも *eae* 陽性率が *stx* 陽性率よりも高かった。検出対象の血清群を菌の性質か

ら考えると、*stx* および *eae* が食品培養液での遺伝子スクリーニング法に含まれている方が検出効率の良いように思えるが、食品中に *stx* および *eae* の一方だけ陽性の菌も含まれることがあり、合わさって両遺伝子が陽性になる場合も考えられる。2 次スクリーニングで 2 検体が余分に試験されるか、37 検体が *eae* の試験をするかとの判断をすると、1 次スクリーニングの対象遺伝子がひとつ多いことによる機器の限定、反応試薬のコストの上昇などを鑑みると、*eae* を含まない方が合理的であると考えられた。

(2) 多血清群での O 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

Duplex リアルタイム PCR 法の組み合わせの検討では、対象遺伝子の組み合わせによって検出性が劣る場合もあり、これは蛍光色素の組み合わせのためではなく遺伝子増幅の組み合わせに原因があるとも考えられた。また、プローブの蛍光ラベルに使用する HEX および VIC の両者ともにどの機器でも使用はできるものの、ABI の機器では VIC を使用すること、Dice ではそれぞれの蛍光試薬のフィルターに設定することによって、高い蛍光強度やベースラインの安定が認められた。機器による組み合わせも考慮した方が良い場合も示された。さらに、食品によっては、duplex リアルタイム PCR 法のいくつかの反応系において検出感度が複数の機器で 10^4 cfu/ml であるものもあった。これらの検討は、複数機関で食品または機器を分担して実施している。このため、DNA 抽出や反応が同時でない場合もあるため、さらに試験回数を増やすなどの検討も重要であると考えられる。本研究では、

リアルタイム PCR 法については自家調製試薬を中心に多様な機種を含めて経済性および汎用性も考慮した上で、食品での検出感度の優れる反応系を検討した。一方で、市販キットの使用も試験の試薬調製や反応手順などを簡易化する上で重要であるため、今後の開発が待たれる。

(3) 多血清群での増菌培養および分離培養の検討

mEC 培地での 42°C 培養下にて概ね腸管出血性大腸菌が増殖をすることが明らかになった。しかし、目的の 6 血清群の腸管出血性大腸菌を選択的に増殖させることは期待できないことが示された。また、酵素基質培地での発色性を利用した分離の方法として、① CT などの選択剤を加えて選択性を強めた培地が有用であることが示された。また、② 血清群を鑑別せずに単色または 2、3 の指標となる色によって分離した後に血清群を確認する方法、ある程度は血清群を鑑別する培地を使用して分離する方法のふたつの方向性が示された。O165 は重症化率も高く 6 血清群に次いで患者からの分離の多い重要な血清群ではあるが、CT に感受性が高く他の選択分離培地においても生育が弱いことから食品からの分離には新たな培地の開発必要であると考えられた。さらに、新たに開発された O103、O121 および O145 の免疫磁気ビーズでの回収率は良好であり、食品からの検出において効果的であることが期待される。

(4) 多機関によるコラボレイティブ・スタディによる評価

既に通知されている日本および諸外国での腸管出血性大腸菌の食品での試験法は、増

菌培養法、遺伝子検出法、免疫磁気ビーズ法、分離培養法などの方法から構成される。これらの各段階において優れた方法を選択することは重要であるが、それらの方法が一連の試験法として成り立つことの確認は不可欠である。

これまでに、EFSA では腸管出血性大腸菌の検査法を図1のように設定している。これに関連して参加国の代表機関によるコラボレイティブ・スタディを実施している。血清群 026、0103、0111、0145 および 0157 を主要な5血清群とし、増菌培養法、リアルタイムPCR法、免疫磁気ビーズ法、分離培養法によるそれらの血清群の検出をEU加盟国およびその周辺国の21カ国30機関の参加のもとに評価している。各機関につき菌接種検体2検体および非接種検体1検体の計3検体であり各機関の試験数は少ない。また、菌接種検体は5血清群のうちの2種類がそれぞれ接種されたハウレンソウ(40 CFU)2検体を設定している。

本研究では、12機関ではあるが食肉と野菜について実検体での汚染が想定される菌数レベルを鑑み低菌数および高菌数レベルの2段階を設定した。各血清群について各機関での試験検体数を12検体とし、感度および特異性を検討することとした。今後、6血清群全てについてのコラボレイティブ・スタディを行う予定である。

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、昨年度に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い、「腸管出血性大腸菌 026、0111 及び 0157 の検査法について」食安監発 1217 第1号が通知された。今年度は、日本での主要な血清群を血清群 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 とし、以下の4課題に取り組んだ。(1) 食品培養液からVT遺伝子検出によるスクリーニング法について、リアルタイムPCR法、LAMP法、コンベンショナルPCR法についてインターナル・コントロールを含む優れた系を確立した。(2) 血清群 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 特異的遺伝子を対象とした食品での検出法の具体的な条件を明らかにした。(3) 多血清群株を供試し、選択剤を添加した複数種類の酵素基質培地にて特徴を有する発色性によって対象血清群を一括または鑑別した分離が可能であること、新規に開発された0103、0121、0145 に対する免疫磁気ビーズの回収率を検討し優れた濃縮効果が明らかになった。(4) 多機関によるコラボレイティブ・スタディによる評価を計画し一部を実施した。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法、多血清群に対応した分離培養法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

Kobayashi, N., Lee, K., Yamazaki, A.,

- Saito, S., Furukawa, I., Kono, T., Maeda, E., Isobe, J., Sugita-Konishi, Y. and Hara-Kudo, Y. Virulence gene profiles and population genetic analysis for exploration of pathogenic serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 51: 4022-4028, 2013.
- 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
- Hara-Kudo, Y., Konuma, H., Kamata, K., Miyahara, M., Takatori, K., Onoue, Y., Sugita-Konishi, Y., Ohnishi, T. Prevalence of main foodborne pathogens in retail food under the National Food Surveillance System in Japan. *Food Addit. Contam. Part A, Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 30(8): 1450-1458, 2013.
- Hasegawa, A., Hara-Kudo, Y., Ogata, K., Saito, S., Sugita-Konishi, Y. and Kumagai, S. Differences in the stress tolerances of *Vibrio parahaemolyticus* strains due to their source and harboring of virulence genes. *J. Food Prot.* 76:1456-62, 2013.
- Jones, J.L., Benner, R.A., DePaola, A. and Hara-Kudo, Y. *Vibrio* densities in the intestinal contents of finfish from coastal Alabama. *Agriculture, Food and Analytical Bacteriology.* 3: 186-194, 2013.
- 工藤由起子、小田みどり. 第2節 生肉のリスク 原因菌と食中毒事件. 第3章 生食のリスクとは. 一色賢司 監修 生食のおいしさとリスク.p. 329-337. (株) エヌ・ティー・エス 東京.
- 工藤由起子. 食品の腸管出血性大腸菌検査法の変遷と今後. *食品衛生研究.* Vol. 63, p25-34, 2013.
- 工藤由起子. 食品での腸管出血性大腸菌検査法の最新の動向について. シンポジウム. 日本食品微生物学会雑誌. 日本食品微生物学会雑誌. Vol. 30, 89-92, 2013.
- 小林直樹、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌の分子生物学的研究と食品での検査法の発展. *日本食品微生物学会雑誌.* 30(3):147-155. 2013年.
2. 学会発表
- 工藤由起子、長尾清香、小林直樹. 多血清群の腸管出血性大腸菌の病原因子遺伝子およびO抗原特異的遺伝子検出法の検討. 第106回日本食品衛生学会学術講演会. 平成25年11月.
- 工藤由起子. 多血清群の腸管出血性大腸菌試験法の検討. 食品衛生登録検査機関協会平成25年度微生物研修会. 平成25年12月.
- Hara-Kudo, Y., Ohtsuka, K., Konishi, N., Mori, T., Nakagawa, H., Iizuka, S., Taga, K., Kai, A. Universal enrichment followed by real-time PCR assay and

plating for Shiga toxin-producing Escherichia coli O26, O111 and O157 in food. 127th AOAC Annual meeting and exposition. Aug. 25-28, 2013. Chicago, USA.

小林直樹、齊藤志保子、古川一郎、河野智美、青木佳代、前田詠里子、江藤良樹、堀川和美、小西良子、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌の病原因子保有パターンと臨床症状の対応についての解析. 第 105 回日本食品衛生学会. 平成 25 年 5 月.

小林直樹、前田詠里子、河野智美、齊藤志保子、古川一郎、青木佳代、江藤良樹、堀川和美、小西良子、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌の高病原性の指標となる病原因子についての解析. 第 17 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 平成 25 年 7 月.

李 謙一、N. P. French、工藤由起子、伊豫田淳、小林秀樹、小西良子、局 博一、熊谷 進. 多変量解析によるヒトまたはウシ由来志賀毒素産生性大腸菌 O157 の遺伝的差異の究明. 第 17 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 平成 25 年 7 月.

小林直樹、李謙一、小西良子、工藤由起子. 集団解析により明らかになった腸管出血性大腸菌の高病原性 genotype. 第 15 回日本進化学会 平成 25 年 8 月.

森哲也、市川希美、難波豊彦、吉成知也、工藤由起子. ゼリー状飲料の細菌試験における課題. 第 34 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 25 年 10 月.

小西典子、森哲也、中川弘、大塚佳代子、小林直樹、長尾清香、甲斐明美、工藤由起子. 複数のリアルタイムPCR機器を用いた食品

培養液中VT遺伝子検出感度の検討. 第34回日本食品微生物学会学術総会. 平成25年10月.

長尾清香、小林直樹、工藤由起子. 大腸菌のO抗原特異的遺伝子を対象としたマルチプレックス・リアルタイムPCR法の検討. 第34回日本食品微生物学会学術総会. 平成25年10月.

小林直樹、江藤良樹、前田詠里子、齊藤志保子、古川一郎、工藤由起子. 臨床症状の異なる腸管出血性大腸菌株間での病原性と遺伝型の解析. 第 106 回日本食品衛生学会. 平成 25 年 11 月.

大塚佳代子、中川弘、森哲也、小西典子、甲斐明美、小林直樹、長尾清香、工藤由起子. 食品からのベロ毒素遺伝子検出に使用するリアルタイムPCR機器及び試薬の組み合わせと反応条件の検討. 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会. 平成 25 年 11 月.

齊藤志保子、古川一郎、磯部順子、長尾清香、小林直樹、工藤由起子. 各種血清群の腸管出血性大腸菌の酵素基質培地における生育性およびコロニーの特徴的形態の検討. 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会. 平成 25 年 11 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

平成25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（または志賀毒素遺伝子 *stx*）検出によるスクリーニング法が有効でありこれまでの通知法に含まれているが、検出系の改善が必要とされている。このため、昨年度には VT 遺伝子スクリーニング法の改定の基礎となる検出系や試薬調製等の検討を行い、「腸管出血性大腸菌 026、0111 及び 0157 の検査法について」食安監発 1217 第 1 号が通知された。今年度は、インターナル・コントロールを含め正常な試験反応の確認が行える系を検討して確立した。自家調製試薬および試作キットでのリアルタイム PCR 法およびコンベンショナル PCR 法、試作キットでの LAMP 法における反応条件（DNA ポリメラーゼ種類、反応温度や時間など）、使用機器での検出感度の検討を行った。はじめに菌液を、次いで食品培養液を供試して試験した。その結果、自家調製試薬および試作キットでのリアルタイム PCR 法における duplex 反応系、試作キットでの LAMP 法、試作キットでのコンベンショナル PCR 法における duplex 反応系において食品での検出感度の良好な条件が明らかになった。

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

上田泰史、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。食中毒事例では原因食品確定が不可欠であるが、食品での検査法は、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。そこで、昨年度の研究にて日本での食品検査法の対象を血清群 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 と決定した。日本および諸外国の腸管出血性大腸菌検査法では、まず本菌の重要な病原因子である Vero toxin (VT) 遺伝子 (または志賀毒素遺伝子 *stx*) の有無を食品培養液から検出することによって本菌の汚染の有無のスクリーニングが行われている。加えて、諸外国では主要な血清群が共通して保有する腸粘膜接着因子 Intimin の遺伝子 (*eae*) も同時に検出し、主要な血清群に汚染されている食品のスクリーニングを行うことが設定されている。さらに、インターナル・コントロールを含め正常な試験反応の確認が行える系が設定されている。本研究では、昨年度に検討して選定したリアルタイム PCR 法を中心に、loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法およびコンベンショナル PCR 法の感度の良好な検出系を検討した。自家調製試薬および試作キットでのリアルタイム PCR 法およびコンベンショナル PCR 法、試作キットでの LAMP 法における反応条件 (DNA ポリメラーゼ種類、反応温度や時間など)、使用機器での検出感度の検討を行った。はじめに菌液を、次いで食品培養液を供試して試験した。

なお、本報告書ではこれまでの報告や試薬名の表現に従い、VT 遺伝子または *stx* の両方の表現を使用している。

B. 研究方法

1. 菌株および培養

菌液を用いた検討では、血清群 026 (VT1 陽性株) 2 株、0111 (VT1&2 陽性株) 2 株および 0157 (VT2 陽性株) 1 株を試験に供試した。食品を用いた検討では、血清群 0157 (VT 陽性株) 5 株を試験に供試した。

菌株をトリプトソイ・ブロス (TSB、ベクトン・ディッキンソン) 10 ml にて 37°C で 18 時間培養し (約 10^9 cfu/mL)、試験に用いた。接種菌液の菌濃度測定のために、PBS (ダルベッコ PBS(-)、日水製薬) にて 10 倍階段希釈して作製した 10^{-6} 希釈菌液 (約 10^3 cfu/ml) 0.1 ml を 5 枚のトリプトソイ寒天培地 (TSA、ベクトン・ディッキンソン) に塗抹し、37°C で 18 - 24 時間培養後に生育したコロニー数から接種菌数を算出した。

2. 食品検体および増菌培養

1) 食品検体および増菌培養

小売店で購入した検体 (牛挽肉、牛レバー、豚スライス、ヤギ・ナチュラルチーズ、レタス、カイワレダイコン、トマト、ハウレンソウ) 25 g をストマッカー袋に入れ、室温程度の mEC 培地 (日水製薬) 225 ml をそれぞれ加え、1 分間のストマッカー処理を行い、 42 ± 1 °C で 22 ± 2 時間培養した。

2) 食品検体の一般生菌数および大腸菌群数の計測

検体の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} 希釈液を調製した。各希釈液 0.1 ml を標準寒天培地 (日水製薬) に塗抹し、 36 ± 1 °C で 24 - 48 時間培養した。同時に各希釈液 1 ml 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）で混積、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で24–48時間した。培養後の標準寒天培地およびデソキシコレート寒天培地のコロニー数を計測し、検体1gあたりの生菌数および大腸菌群数を算出した。

3) 食品検体培養液の0抗原特異的遺伝子の陰性確認

検体培養液0.1 mlからアルカリ熱抽出（プロトコルは後述）を実施し、VT遺伝子陰性およびインターナル・コントロール陽性であることを確認した。

3. 菌接種食品培養液の作製

1の菌液0.1 mlを、PBS 0.9 ml（菌液1 mlとPSB 9 mlでも可）で 10^{-6} まで10倍階段希釈した（約 10^3 cfu/ml）。これらの希釈菌液のうち、 10^{-3} – 10^{-6} 段（約 10^6 – 10^3 cfu/ml）の合計4本の希釈菌液0.1 mlをそれぞれ検体培養液0.9 mlに接種し（約 10^2 – 10^5 cfu/ml）、アルカリ熱抽出法に供試した。

4. アルカリ熱抽出法とDNA液の調製

菌液を用いた検討では1の菌液から、食品を用いた検討では3で調製した菌接種食品培養液から、DNAを次のアルカリ熱抽出法にて抽出した。まず、各菌液または菌接種食品培養液0.1 mlをマイクロチューブに採り、 $10,000 \times g$ 10分間遠心し、上清を取り除いた沈渣に滅菌した50 mM NaOH 85 μl を添加して再浮遊させ、 100°C で10分間加熱した。冷却後、滅菌した1M Tris-HCl (pH 7.0) 15 μl を添加して中和し、 $10,000 \times g$ 10分間遠心した上清約0.1 mlを新たなチューブに移しDNA液とした。ただし、LAMP法では、50 mM NaOHの代わりに、キット付属（栄研化学、試作品）のインターナル・コントロール用のDNAを添加した50 mM NaOH (ExF)を用いてアルカリ熱抽出法を行った。

5. 自家調製試薬でのリアルタイムPCR法およびコンベンショナルPCR法におけるプライマーおよびプローブ

リアルタイムPCR法の*stx1*および*stx2*はNielsenらの方法（Clin. Microbiol. 41:2884–93、2003）を、*eae*およびインターナル・コントロールとしての16SrRNAは米国農務省（United States Department of Agriculture, USDA）のリアルタイムPCR法を参照した（表1）。プローブの蛍光ラベルについては後述した。コンベンショナルPCR法の*stx1*、*stx2*および*eae*については欧州食品安全機関（European Food Safety Authority, EFSA）のコンベンショナルPCR法を、16SrRNAについてはUSDAのリアルタイムPCR法を参照した（表2）。

6. 感度の検討での反応試薬濃度および反応条件

1) 菌液を用いた検討

本検討では、4で抽出したDNA液を滅菌精製水（D.W.）にて 10^{-7} まで10倍階段希釈したうちの、 10^{-4} – 10^{-7} 希釈DNA液を用いた。各検討では基本的には繰り返し測定数1にて測定した。

(1) 自家調製試薬でのリアルタイムPCR法におけるsimplex反応系の検出感度の確認

各検出試薬について、TaqMan Environmental MasterMix 2.0（アプライドバイオシステムズ ジャパン）を用い、下表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、 10^{-4} – 10^{-7} 希釈DNA液5 μl を加えて合計30 μl とした。増幅反応は、 50°C 2分、 95°C 10分、 95°C 15秒・ 60°C 1分45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。蛍光ラベルの設定は、FAMはFAM-None、HEXおよびVICはVIC-Noneとした。