

表13 LAMP法における自家調製試薬(simplex反応系)および市販キット(simplex反応系)での食品中での検出感度の検討

食品	自家調製試薬						キット	
	65°C反応			63°C反応			65°C反応	
	026	0103	0111	0121	0145	0157	0157	0157
牛レバー	3*	4	3	4	4	ND	4	4
牛挽肉	3	4	3	3	4	4	3	3
豚スライス	4	4	3	3	4	4	3	3
チーズ	3	4	3	4	4	4	4	4
レタス	3	4	3	3	2	4	3	3
カイワレダイコン	3	4	4	4	4	5	4	4
トマト	3	3	3	3	3	4	3	3
ハウレンソウ	4	4	4	3	4	5	4	4

ND：陰性

* 検出感度：2反応共に検出された最小菌濃度（対数 cfu/ml）

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

多血清群での増菌培養および分離培養の検討

研究要旨

腸管出血性大腸菌の食品での検査法は、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実施されており、日本でも主要な血清群である 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 の 6 血清群について食品での検査法を確立する必要がある。このため、本研究では日本で通知されている血清群 026、0111 および 0157 の試験法を参照し、それら 3 血清群に次いで日本での主要な血清群である 0103、0121 および 0145 が、026、0111 および 0157 と同一の増菌培養法（mEC 培地での 42℃培養）によって十分に増殖することを確認した。また、昨年度に予備検討した選択分離培地でのコロニー形成を多数の菌株を供試して検討し、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単色または複数色で鑑別・分離が可能であることが示された。さらに、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。

研究協力者

齊藤志保子

磯部順子

古川一郎

権平文夫

佐々木美智子、長尾清香

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での検査法は、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実施されており、日本でも独自に主

要な血清群を決定し、食品での検査法を確立する必要がある。このため、本研究では日本で通知されている血清群 026、0111 および 0157 の試験法を参照し、それら 3 血清群に次いで日本での主要な血清群である 0103、0121 および 0145 の増菌培養の同一の方法での増殖性を確認した。さらに、酵素基質培地は多種の細菌の選択分離用に開発されており、腸管出血性大腸菌でも 026、0111 および 0157 の食品での検査の通知法では、それぞれについて酵素基質培地が設定されていることから昨年度に予備検討し、今年度は多数の菌株を供試して分離性を検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

研究室に保存されていた志賀毒素産生性 (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) (表 1) を mEC 培地 (日水製薬) 中での低菌数接種 (約 10 cfu/10 ml) における増殖の確認に供試した。また、これらの株に加えて 64 株の大腸菌 (計 154 株) (表 2) 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。

なお、本協力研究報告書では、志賀毒素産生性大腸菌の中のヒトへの病原性を有することが明らかな血清群を腸管出血性大腸菌と考え、本研究で用いた多様な血清群の株は志賀毒素産生性大腸菌として記載する。

2. 増菌培養法

上記の供試菌株 90 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 中で 37°C にて 18 時間培養し、その培養した各菌液 (約 10^9 cfu/ml) 0.1 ml を、PBS (ダルベッコ PBS (-)、日水製薬) 0.9 ml で 10 倍階

段希釈して 10^{-7} 希釈菌液 (約 10^2 cfu/ml) を調製した。この 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、接種菌液の菌濃度測定のために、 10^{-7} および 10^{-6} 希釈菌液 0.1 ml を各 2 枚のトリプトソイ寒天培地 (TSA、ベクトン・ディッキンソン) 培地に塗抹し 37°C にて 18-24 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。

3. 分離培地

上記の供試菌株 154 株を TSB10 ml 中で 37°C にて 18 時間培養し、その培養液を昨年度の研究結果を踏まえて以下の 10 種類の酵素基質培地 (表 3) 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。なお、10 種類の酵素基質培地は弱選択性の培地と強選択性の培地に区別した。

[弱選択性の培地]

- ・クロモアガー-STECC 培地 (サプリメント非添加) (自家調製、クロモアガー社)
- ・クロモアガー-0157 培地 (自家調製、クロモアガー社)
- ・クロモアガー-026/0157 培地 (自家調製、クロモアガー社)
- ・BCM0157 寒天培地 (自家調製、栄研化学)
- ・レインボーアガー-0157 培地 (自家調製、バイオログ社)
- ・Vi RX026 寒天培地 (生培地、栄研化学)

[強選択性の培地]

- ・セフィキシム・亜テルル酸 (CT) 加クロモアガー-STECC 培地 (自家調製、クロモアガー社)
- ・CIX 寒天培地 (生培地、極東製薬)

- ・ Vi EHEC 寒天培地 (生培地、栄研化学)
- ・ XM-EHEC 寒天培地 (生培地、日水製薬)

これらの培地の特性については表 2 に示す。

4. 免疫磁気ビーズ法

新規に開発された血清群 0103、0121、0145 に対する免疫磁気ビーズ (試作品、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 の免疫磁気ビーズと ならべて検討した。各血清群 1 株の TSB 培養液を、牛挽肉の mEC 培地中での 42°C (22 時間) 培養液にて 10^{-3} 希釈した。また、PBS にて 10^{-3} 希釈した菌液も作製した。これら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。食品培養液での 10^{-3} 希釈菌液のビーズ濃縮液に関しては 10^{-4} まで 10 倍階段希釈をした。PBS 10^{-3} 希釈菌液のビーズ濃縮液に関しては、ビーズ濃縮液の 10^{-3} - 10^{-5} 希釈液をそれぞれ TSA 寒天培地 1 枚に 0.1 ml を接種し、コンラージ棒で塗抹した。食品培養液 10^{-3} 希釈菌液のビーズ濃縮液に関しては、ビーズ濃縮液の 10^{-3} および 10^{-4} 希釈液をそれぞれ CT-クロモアガー-STEC 寒天培地 1 枚に 0.1 ml を接種し塗抹し、37°C で 18-24 時間培養した。生育したコロニーを観察し、各血清群と思われるコロニーを各平板から 2、3 個釣菌し、ラテックス凝集試薬または免疫血清 (デンカ生研またはデンマーク国立血清研究所) を用いて O 血清型別試験を行った。凝集反応が陽性だったコロニーと同様の形状のコロニー数を計測し、各平板上のコロニー数を算出した。これを 2 回繰り返す、平均値を得た。

C. 研究結果

1. 増菌培養

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。また、0103 株の平均で 11.3 (最小 6、最大 23) cfu、0121 株の平均で 10.8 (最小 5、最大 18) cfu、0145 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 株全株が、0145 では 17 株中 16 株が強く増殖した (表 4)。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 028、048 および OUT でやや弱い増殖を示したものの多くの株が強い増殖を示した。

2. 分離培養

各酵素基質培地での各血清群のコロニーの発色性および生育性について観察した (表 5)。

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。

クロモアガー-STEC では、供試した大腸菌の全株が藤色であった。

クロモアガー-0157 では、開発の目的である 0157 が藤色であり、098、0128、0151 も同様の藤色を示した。026、0111、0103、0121、0145 など他血清群の大腸菌は青色 (一部、藤灰青色や薄青色) であった。

クロモアガー-026/0157 では、開発の目的である 0157 は赤色 (一部、薄ピンク色混在)、026 は緑色 (VT 陰性の 1 株が紫色) であった。多くの 0111 (1 株が緑色、1 株が濃ピンク色、1 株が青~赤紫色)、0103 (2 株が薄ピンク色、1 株が赤色)、0121 (1 株が紫色と緑色のコロニーの混合)、0145 (1 株が緑色) は赤紫色で

あった。また、他血清群の大腸菌も多くが赤紫色であった。

Vi RX026 では、開発の目的である 026 は紺色 (VT 陰性株は緑色) であった。0121 は半数以上が白色であった以外、大腸菌のほとんどは緑色を呈した。

BCM0157 では、開発の目的である 0157 が紺色であった。また、063 および半数の株の 091 も紺色であった。他の大腸菌は BCM0157 と同様の傾向であり、0121 は半数以上が白色であった以外、大腸菌のほとんどは緑色を呈した。

レインボーアガー-0157 では、開発の目的である 0157 が灰～濃灰色であった。026 は赤紫色であった。0103、0111、0121、0145 は赤紫色、灰色、藤色、灰紫色など多様な色を示し、同一血清群の中でも色調は多様であった。

強選択性の 4 種類の培地では、主要な 6 血清群以外の大腸菌の多くは生育が抑制された。

CT-クロモアガー-STEC では、6 血清群の株はほとんどが藤色に生育し、ごく一部が非生育であった。

CIX では、開発の目的である 0111 および 026 は濃紫色、0157 は緑色であった。また、0145 は多くが濃紫色、0121 は多くがピンク色であったが、6 血清群以外の大腸菌で生育したものにも濃紫色、緑色、ピンク色を示した。

Vi EHEC では、開発の目的である 0111 はえんじ色、0157 は無色透明 (中心部褐色)、026 は緑色であった。0103、0121、0145 では紫色や緑色のコロニーが多かったが、同一血清群の中でも色調は多様であった。

XM-EHEC では、開発の目的である 0111 および 0157 は赤紫色、026 は青紫色を呈した。しかし、0103、0121、0145 では青色、青紫色、赤紫色など同一血清群の中でも色調は多様で

あり、単一株でも多様な色調のコロニーが生育する場合もあり複雑であった。

3. 免疫磁気ビーズ法

ビーズ法による回収率は、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%であった (表 6)。PBS と牛挽肉培養液での各血清群の回収率は総じて同等に近い結果であった。

D. 考察

腸管出血性大腸菌の食品からの検出では、増菌培養が重要なステップであり、食品中の競合する細菌叢の増殖を抑制し、腸管出血性大腸菌が強く増殖することが求められる。これまでの血清群 026、0111、0157 を対象とした腸管出血性大腸菌の通知では、血清群による選択増菌培地での増殖性、食品中の競合する細菌叢の増殖抑制の性能などを鑑み mEC 培地での 42°C 培養が設定されている。今回の血清群 0103、0121、0145 を追加した試験法の検討においても、これまでの手法を用いることを優先し mEC 培地での 42°C 培養について検討した。その結果、いずれの血清群の志賀毒素産生性大腸菌においても増殖が抑制されることが判明した。菌濃度は、判定基準として設定した ++ (TSB での増殖と同等) ではおおよそ 10^9 cfu/ml、+ (TSB での増殖より弱いが増殖) ではおおよそ 10^7 cfu/ml と推察される。0121 では、他血清群に比べて増殖がやや弱い傾向が認められ 21 株中 19 株が + の判定であったが、食品成分での選択剤の効果の減少など 0121 の増殖強化を加味すると食品中で十分に増殖すると考えられ、今後、食品中での増殖性についての検討が必要であると考えられた。0145 の 17 株中 1 株が増殖しなかったが、

再現性の確認とともに今回の接種菌数よりも菌数を高めた場合の増殖試験を行う必要がある。

これらの結果から、mEC 培地での 42℃培養下にておおむね目的の 6 血清群の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。

分離培養は、食品の増菌培養液中で増殖した腸管出血性大腸菌を同様に増殖した競合菌から区別し選択的に平板培地上で増殖させて視覚的に他の菌と鑑別できることが必要である。そのような条件を兼ね備えた培地が国内外にて多数の菌種について販売されている。腸管出血性大腸菌の食品からの検出に有用な酵素基質培地は、近年多数開発されている。古くは米国で開発されたレインボーアガー 0157 が知られている。また、フランスで開発されたクロモアガー 0157、国内で開発された BCM0157 など 0157 分離を目的にした培地であった。米国 USDA 法では 1 種類の酵素基質培地（ノボピオシン・セフィキシム・亜テルル酸加レインボーアガー 0157）が 7 血清群（026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157）の分離に用いられている。これは、選択剤としてノボピオシン（5.0 mg/L）、セフィキシム 3 水和物（0.05 mg/L）および亜テルル酸カリウム（0.15 mg/L）を添加して競合菌の生育を抑制し、対象菌の分離性を向上させたものである。しかし、改良レインボーアガー 0157 上のコロニーの発色性は多様であり、灰色、薄紫色、藤色、紫色など同一の血清群でも様々な色調が掲載されている。ヨーロッパでは、0104 の試験に酵素基質培地（クロモアガー

STEC、クロモアガー 026/0157 または選択剤添加クロモアガー STEC など）の使用が推奨されているが、市販品は少ない。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ている。発色性はそれぞれの培地ごとに特徴が異なる。本研究ではこれら酵素基質培地を日本で重要な 6 血清群（0157、026、0111、0103、0121、0145）の分離に応用することを検討した。また、他多数の血清群についても比較のためにあわせて試験した。

強選択性の培地（CT-クロモアガー STEC、CIX、Vi EHEC、XM-EHEC）では、いずれも 6 血清群以外の腸管出血性大腸菌の生育は抑制される傾向にあった（表 5）。CT-クロモアガー STEC では、藤色一色であったため個別の血清群の判別はできないが、指標が単色という単純性が利便ということも考えられた。CIX では、0157 は青緑色、0121 は多くがピンク色、026、0103、0111、0145 は濃紫色であり、主要な血清群を色調である程度鑑別できることが示された。Vi EHEC では、0111 はえんじ色、026 は緑色、0157 は無色透明であり、これら 3 血清群を色調である程度鑑別できることが示された。しかし、0103、0121 および 0145 では紫色、緑色など多様な色調を示し代表的な色を決めることが難しかった。XM-EHEC では、0111 は赤紫色、026 は青紫色、0157 は赤紫色であり、これら 3 血清群を色調である程度鑑別できることが示された。しかし、0103、0121 および 0145 では青紫色、青色、赤紫など多様な色調を呈し、同一株の中でも多様なコロニーの生育が認められた。このように目的に合わせて、単純な色を指標にして分離し血清群をその後確認することや 026、0111、0157 など血清

群を決めて効率的に分離することが、これら分離培地を用いることによって可能であると思われた。

弱選択性の培地（クロモアガーSTEC、クロモアガー0157、Vi RX026、BCM0157、クロモアガー026/0157 およびレインボーアガー0157）では、2、3の代表的な色を呈するものと多様な色を呈するものに分かれた（表5）。2、3の代表的な色を呈するもの（クロモアガーSTEC、クロモアガー0157、Vi RX026、BCM0157）では、適切な添加剤を添加することによって6血清群を2、3の色を指標として分離できることが考えられた。クロモアガーSTECにCTを添加することによって6血清群以外の腸管出血性大腸菌を抑制していることから、同様のことが期待される。クロモアガー026/0157では、026および0157については特徴的な色を示したが、同一血清群内で複数の色を示す傾向があった。また、レインボーアガー0157では、6血清群のいずれの血清群においても同一血清群内での色のバリエーションが多く、血清群の指標となる色は明確ではなかった。

0165は重症化率も高く主要な6血清群に次いで患者から分離される重要な血清群であるが、昨年度と同様に今年度の結果でも0165は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。

以上の結果から、酵素基質培地での発色性を利用した分離の方法として、①CT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考えられた。

新たに開発された0103、0121および0145の免疫磁気ビーズでの回収率は、牛挽肉培養液中でも30%以上の回収率を示し、既に市販されている026、0111および0157のビーズと比べても同等の回収率であった。このことから、0103、0121および0145の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。

E. 結論

腸管出血性大腸菌026、0103、0111、0121、0145および0157について食品での検査法を確立する必要がある。このため、本研究では、適切な増菌培養法および選択分離培地を検討した。その結果、mEC培地での42℃培養による増菌培養によってそれら血清群が共通して増殖すること、選択剤を添加した酵素基質培地にて血清群全体または個々の血清群に特徴を有する発色性をもつ分離培地の使用が有用であること、新たに作製された0103、0121および0145の免疫磁気ビーズにおいても濃縮による検出率上昇が期待されると考えられた。これら結果は日本での主要な血清群に対応した分離法の確立に貢献すると考えられた。

F. 健康被害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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. 日本食品微生物学会雑誌. 日本食品微生物学会雑誌. 30, 89-92, 2013.

2. 学会発表

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 平成25年11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

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 0157 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

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 増菌培養の確認に供試した菌株

O血清群	株番号	VT産生性	O血清群	株番号	VT産生性
01	K23	1	0121	K9	2
05	K24	1		K10	2
08	T15	2		K17	2
028ae	K27	2		K18	2
048 : H45	A29	2		K19	2
055	K26	1		T4	2
063	T16	2		T5	2
	T17	-		T6	2
	T18	2		T7	2
	T19	2f		T8	2
	T20	-		T9	2
074 : H52	A27	1	0124	K25	1&2
091	A20	1	0128	T14	2 f
	A21	1		T24	1&2
	K28	1		T29	2f (MUG-)
	T21	1		T30	2f (MUG-)
098	T22	1	0145 : NM	A15	2
0103	A1	1&2		A16	1
	A2	1	0145	A17	1
	A3	1		A18	1
	A4	1		A19	1
	A5	1		K11	2
	A6	1		K12	2
	A7	1		K13	1&2
	K1	1		K14	2
	K2	1		K15	1
	K3	1		K20	2
	K4	1		K21	2
	K5	1		K22	2
	T1	1		T10	2
	T2	1		T11	2
	T3	1		T12	2
	K16	1		T13	-
0112ac : H2	A24	1&2	0146	A25	2
0119	T23	1		A26	1
0121	A8	2	0148	A28	2
	A9	2	0156:H25	A30	1
	A10	2	0159	T25	2
	A11	2	0165	A22	1&2
	A12	2		T26	2
	A13	2	0168	T27	2
	A14	2	0170	T28	2
	K6	2	0174	A23	2
	K7	2	OUT	K29	2
	K8	2		K30	2

計90株

表2 酵素基質培地での生育性試験に供試した菌株

血清群	由来別株数			計	VT陰性株
	ヒト	食品	他		
腸管出血性大腸菌					
0157	3	5	2	10	
026	8	1	1	10	1
0111	10			10	
0103	24		2	26	
0121	23			23	1
0145	27			27	
0165	2		2	4	
045	1		1	2	
01	1			1	
05	1			1	
08	2		1	3	1
028ae	1			1	
048	1			1	
055	1			1	
063	5		1	6	2
074	1			1	
091	8			8	
098	1			1	
0112ac	1			1	
0119	1			1	
0124	1			1	
0128	4			4	
0146	2			2	
0148	1			1	
0156	1			1	
0159	1			1	
0168	0		1	1	
0170	1			1	
0174	1			1	
OUT	2			2	
0151	0		1	1	1
合計				154	

表3 供試した酵素基質培地

培地名	製品対象血清群の発色	その他の細菌の発色 など	製品
弱選択性の培地			
クロモアガーSTEC (サプリメント非添加)	026、0111、0121、0157 などの一部血清群の大腸菌は藤色		粉末
クロモアガー0157培地	0157 (藤)	他の大腸菌 (青)	粉末、 生培地
クロモアガー026/0157	026 (緑) 0157 (赤)	他の大腸菌 (赤紫～ 紫)	粉末、 生培地
Vi RX 026寒天培地	026 (青紫～黒)	他の大腸菌 (黄緑～ 青緑) 大腸菌以外の腸内細菌 (緑、黄、赤) 腸内細菌以外の菌 (非発育)	粉末、 生培地
BCM 0157寒天培地	0157 (黒～濃緑)		粉末、 生培地
レインボーアガー0157	0157 (黒～灰)		粉末
強選択性の培地			
CIX寒天培地	0111 (群青～濃紫) 026 (群青～濃紫) 0157 (青～青緑)		生培地
XM-EHEC寒天培地	0111 (白濁した赤紫～ 紫) 026 (青紫) 0157 (赤紫～紫)		生培地
Vi EHEC寒天培地	0111 (えんじ) 026 (緑) 0157 (無色透明中心部 褐色)		生培地
CT-クロモアガーSTEC	026、0111、0121、0157 などの一部血清群の大腸菌は藤色		粉末

表4 mEC培地での42℃22時間培養での増殖性

O血清群	株数	増殖の有無*		
		++	+	-
0103	16	16	0	0
0121	21	2	19	0
0145	17	16	0	1
01	1	1	0	0
05	1	1	0	0
08	1	1	0	0
028ac	1	0	1	0
048	1	0	1	0
055	1	1	0	0
063	5	5	0	0
074	1	1	0	0
091	4	4	0	0
098	1	1	0	0
0112ac	1	1	0	0
0119	1	1	0	0
0124	1	1	0	0
0128	4	4	0	0
0146	2	2	0	0
0148	1	1	0	0
0156	1	1	0	0
0159	1	1	0	0
0165	2	2	0	0
0168	1	1	0	0
0170	1	1	0	0
0174	1	1	0	0
OUT	2	1	1	0

* ++ : 強く増殖 (TSB培地での増殖と同等)

+ : やや弱い増殖 (TSB培地での増殖より弱いが増殖あり)

- : 増殖なし

表5 培地による生育性のまとめ

培地名	主要血清群の指標色	主要血清群以外の大腸菌の発育
弱選択性の培地		
クロモアガー0157培地	藤、青	発育
クロモアガー026/0157	緑、赤、赤紫、紫、濃いピンク、青、薄ピンクなど多様	発育
クロモアガーSTEC	藤	発育
Vi RX 026寒天培地	緑、紺、白	発育
BCM 0157寒天培地	紺、緑、白	発育
レインボーアガー0157	灰、濃灰、赤紫、藤、薄青、白など多様	発育
強選択性の培地		
CT-クロモアガーSTEC	藤	多くは不発育
CIX寒天培地	青緑、濃紫、ピンク	多くは不発育
XM-EHEC寒天培地	赤紫、青紫、青、紫など多様	多くは不発育
Vi EHEC寒天培地	無色透明、緑、えんじ、紫、青、青紫、赤紫など多様	多くは不発育

表6 ビーズ濃縮法による菌の回収率

O血清群	回収率(平均、%)	
	牛挽肉培養液	PBS
026	34.3	52.3
0103	43.0	37.3
0111	59.9	53.6
0121	34.4	47.3
0145	53.6	38.4
0157	21.0	100.5

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

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

研究要旨

諸外国では食品または牛肉での腸管出血性大腸菌の試験が各国に適した方法によって実施されており、日本でも独自に食品での検査法を確立する必要がある。このため、本研究では腸管出血性大腸菌の日本での主要な血清群である O26、O111、O103、O121、O145 および O157 の食品での検査法を確立することを目的に、増菌培養法、遺伝子検出法、免疫磁気ビーズ法、分離培養法について多角的に検討した結果を総合し、優れた方法を組み合わせた試験法について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。これによって統括的な試験法が確立されると考えられる。

研究協力者

岩手県環境保健研究センター	岩淵香織
福島県衛生研究所	菊地理慧
埼玉県衛生研究所	大塚佳代子
東京都健康安全研究センター	小西典子
杉並区衛生試験所	山崎匠子
財団法人 東京顕微鏡院	森 哲也
株式会社 BML フード・サイエンス	中川 弘
静岡市環境保健研究所	富田敦子
富山県衛生研究所	磯部順子
三重県保健環境研究所	楠原 一
神戸検疫所輸入食品検疫検査センター	原田 誠
広島県立総合技術研究所保健環境センター	山田裕子
国立医薬品食品衛生研究所	長尾清香

A. 研究目的

諸外国では食品または牛肉での腸管出血性大腸菌の試験が各国に適した方法によって実施されており、日本でも独自に

食品での検査法を確立する必要がある。

食中毒および感染症に関係する腸管出血性大腸菌の主要な血清群は国によって異なり、日本での主要な血清群は O26、O111、

0103、0121、0145 および 0157 と考えられた。これら血清群の食品での検査法を確立することを目的に、本分担研究課題の他協力研究課題によって増菌培養法、遺伝子検出法、免疫磁気ビーズ法、分離培養法について検討が行われている。それらの多角的に検討した結果から、各々の優れた方法を総合し、それらを組み合わせた試験法について多機関によるコラボレイティブ・スタディによる評価を行うことにした。今年度は、コラボレイティブ・スタディを立案し一部を実施した。

B. 研究方法

本分担研究課題の他協力研究課題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

コラボレイティブ・スタディの方法は以下のように立案された。

1. 試験実施回数および参加機関

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とした。試験に用いるリアルタイム PCR 機器の統一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。

2. 試験食品検体

牛ひき肉およびカイワレダイコンとし、1 機関、各血清につき計 13 検体 (計 26 検体) とした。事前に VT 遺伝子および試験対象とする 0 抗原の特異的遺伝子が陰性であることを確認して供試した。接種菌数は、低菌数

(5 cfu/25 g) および高菌数 (25 cfu/25 g) を設定した。なお、非接種の検体も合わせて設定した。

3. 増菌培養

検体入りのストマッカー袋にあらかじめ室温 (20°C 位) 以上に温めた mEC 培地 225ml を加え、1 分間のストマッカー処理を行い、42±1°C、22±2 時間培養した。

4. リアルタイム PCR 法

培養液 0.1 ml をマイクロチューブに移し、アルカリ熱抽出にて DNA 抽出液を得て、これをリアルタイム PCR 法に供試した。Stx/インターナル・コントロール検出系および 0 抗原遺伝子検出系の 2 系を行った。なお、使用する機器は機種 ABI PRISM 7500 または 7500fast とした。

5. 免疫磁気ビーズ法

1.0 ml 培養液にビーズ液 25 µl を加え、マニュアル (デンカ生研) に従い免疫磁気ビーズによる濃縮を行った。最終浮遊液は 0.1 ml とし、20 µl ずつ以下の分離培地各 2 枚に接種し画線し、37±1°C にて 18-24 時間培養した。

- ・セフィキシム・亜テルル酸 (CT) 加ソルビトールマッコンキー寒天培地 (CT-SMAC、自家調製、オキシイド社)
- ・CT-クロモアガー-STECC 培地 (自家調製、クロモアガー社)

6. 分離菌の確認

各平板を観察し、各種類の平板 (2 枚) から疑われるコロニー 3 個を釣菌し、普通寒天培地等に接種し 37±1°C にて 18-24 時間培養した。生育した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。

7. 血清群 026 および 0157 を対象としたコラボレイティブ・スタディの結果

接種菌数はおおよそ両血清群ともに低菌数で 5 cfu/25 g、高菌数で 25 cfu/25 g であった（表 1）。試験結果は現在集計中である。

D. 考察

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、欧州食品安全機関（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 種類のうちのいずれかが接種（40 CFU）されたハウレンソウ 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、0103、0111、0121、0145 を対象としたコラボレイ

ティブ・スタディを行う予定である。

E. 結論

諸外国では食品または牛肉での腸管出血性大腸菌の試験が各国に適した方法によって実施されており、日本でも独自に食品での検査法を確立する必要がある。このため、本研究では腸管出血性大腸菌の日本での主要な血清群である 026、0111、0103、0121、0145 および 0157 の食品での検査法を確立することを目的に、増菌培養法、遺伝子検出法、免疫磁気ビーズ法、分離培養法について多角的に検討した結果を総合し、優れた方法を組み合わせた試験法について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。これによって統括的な試験法が確立されると考えられる。

F. 健康被害情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

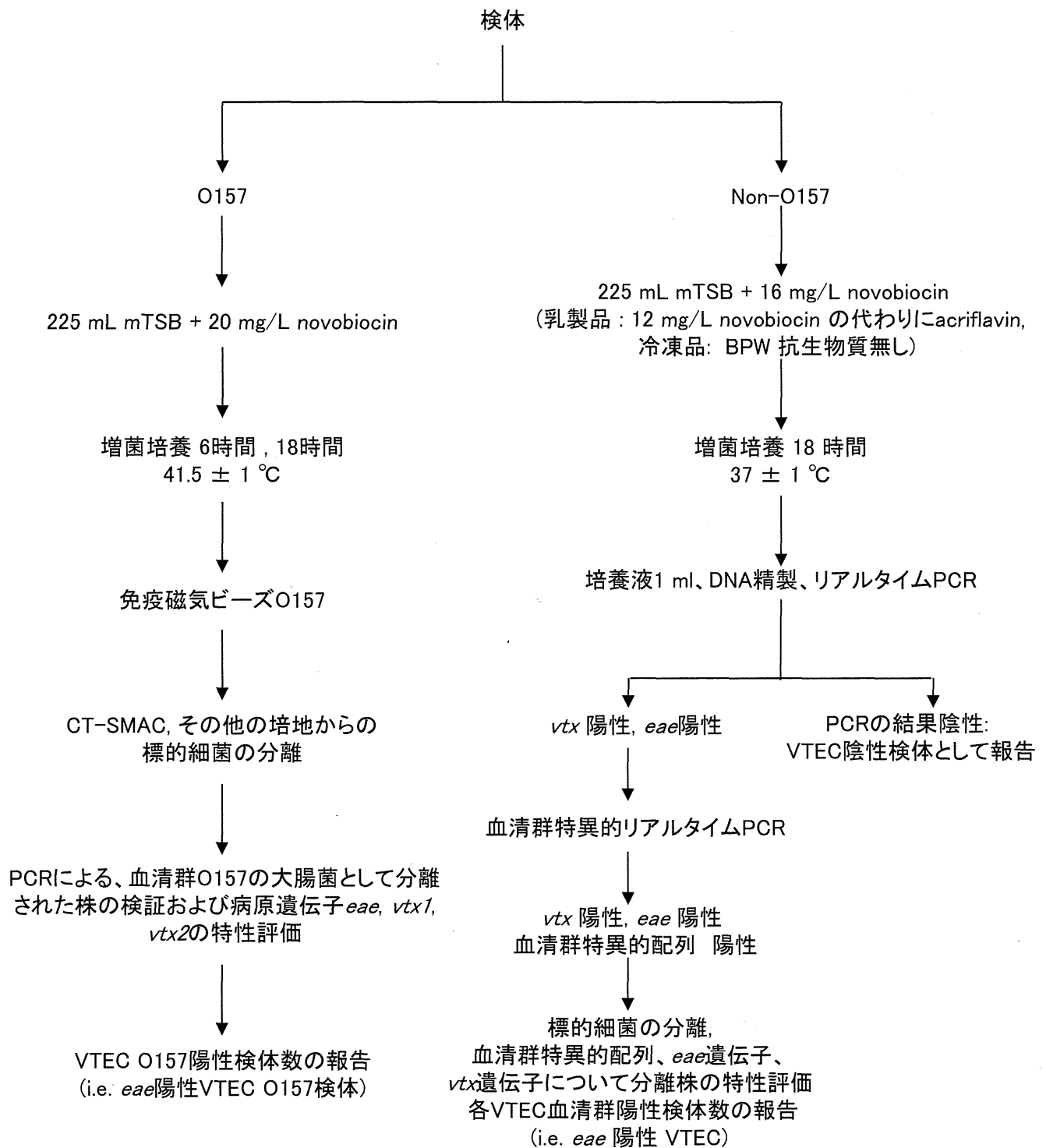


図1 EFSAの食品での腸管出血性大腸菌O26、O103、O111、O145およびO157の試験法

表1 試験検体における接種菌数

	コロニー数／平板*					平均	低菌数接種	高菌数接種
O157の接種 菌数確認	4	4	2	7	1	4.5	4.5 cfu/25 g	22.5 cfu/25 g
	1	11	6	4	4			
	6	1	1	5	4			
	4	5	4	5	4			
	4	7	5	6	3			
	6	7	1	9	6			
	2	2	5	6	2			
	5	4	2	9	4			
	8	5	3	3	5			
	8	4	4	3	5			
4	3							
O26の接種菌 数確認	8	1	4	6	5	4.7	4.7 cfu/25 g	23.5 cfu/25 g
	4	4	6	5	3			
	4	6	4	3	3			
	6	6	4	8	4			
	6	5	3	7	7			
	6	4	7	4	2			
	6	3	6	4	2			
	2	6	4	6	3			
	7	3	7	4	4			
	4	4	7	4	4			
3	4							

* 1件体当たりの接種菌液と同量を平板に接種

分 担 研 究 報 告 書

病原大腸菌の分布および病原性解析

西川 禎一

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

病原大腸菌の分布および病原性解析

研究分担者 西川禎一 大阪市立大学大学院生活科学研究科

研究要旨

下痢原性大腸菌の網羅的な調査に有用であることを実証できたマルチプレックス・リアルタイムPCR法を適用し、昨年度に続けて調査した。今年度は特に家禽とブタ検体数の増加に勤めたところ、下痢原性大腸菌のなかでも腸管病原性大腸菌は、腸管出血性大腸菌／志賀毒素産生性大腸菌の検出率（～46%）よりも高い率で家畜（～75%）から家禽（～55%）に分布することが判明した。昨年度の分子疫学解析は、ウシ由来の腸管病原性大腸菌株と患者由来株の相関を示す一方で、ブタや健康者の分離株は下痢原性が低い可能性を示唆したが、今回高率に検出された家禽由来株の病因学的意義は来年度の分子疫学解析で結論を出す予定である。

健康者からは腸管毒素原性大腸菌は検出されなかったが、ブタ（～19%）のみならず食用鶏が予期したよりも高い率（～7.5%）で保菌している実態が明らかとなった。これら家畜家禽がヒトの汚染源となっているのかどうか、次年度に予定している動物由来株と患者由来株との分子疫学解析で結論を出す予定である。腸管凝集接着性大腸菌耐熱性腸管毒素（EAST1）遺伝子保有大腸菌の検出率は食用鶏では97%に達し、ウシで95%、ブタでも～80%に及んだ。ヒトの保菌率も症状の有無を問わず高く（～25%）、家畜家禽の高い保菌を反映したものと推察されるが、本菌が下痢症の原因となることを示唆する結果は得られなかった。

腸管侵入性大腸菌はこれまで同様に全く検出されず、目下のところ我が国でのリスクは低いと判断される。家畜や家禽における腸管凝集接着性大腸菌や分散接着性大腸菌の検出率は極めて低かったこと、一方ヒトにおいては各々1.8%および19%に及ぶ検出率を示したことから、これら下痢原性大腸菌の汚染源はもっぱらヒトと考えられる。

研究協力者

張 少博	大阪市立大学大学院生活科学研究科
王 麗麗	大阪市立大学大学院生活科学研究科
坂 瑛里香	大阪市立大学大学院生活科学研究科
松崎壮宏	大阪市立大学大学院生活科学研究科
藤原佐美	独) 国立病院機構 大阪南医療センター
若林明世	兵庫県食肉衛生検査センター
長谷 篤	大阪市立環境科学研究所
小笠原準	大阪市立環境科学研究所
中村寛海	大阪市立環境科学研究所
前原智史	大阪市食肉衛生検査所