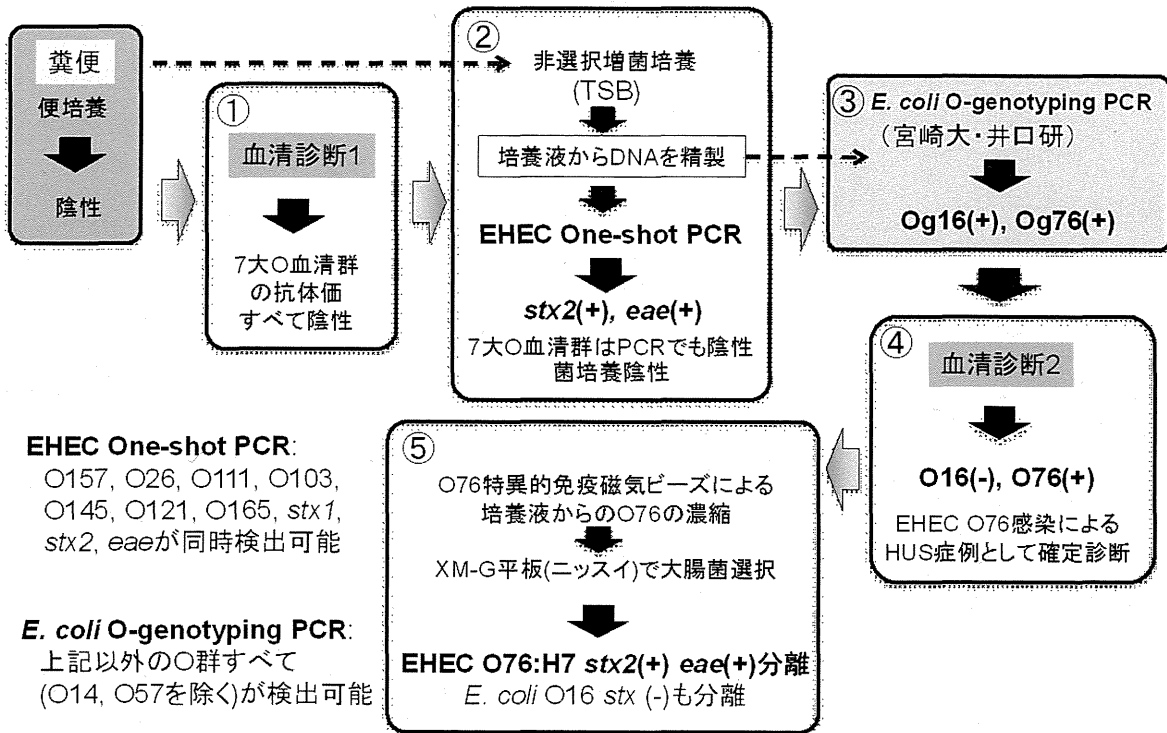


### 資料3. HUS症例からのEHEC O76 分離例

菌不分離HUS症例として血清診断依頼



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26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、昨年度までに日本での主要な血清群を血清群 O26、O103、O111、O121、O145 および O157 とし、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の確立、O 抗原特異的遺伝子検出によるスクリーニング法の確立、多血清群株の酵素基質培地の有用性の検討、免疫磁気ビーズの回収率の検討を行った。得られた成果から、今年度はそれら結果を総合し一試験法として（1）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実施した。これによって効率的な腸管出血性大腸菌の検査法を策定に貢献した（食安監発 1120 第 1 号 平成 26 年 11 月 20 日発「腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157」）。また、腸管毒素原性大腸菌の食での検査法の確立を目的に（2）腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討を行った。まず、腸管出血性大腸菌の検査法の手順および培地を参照し、今後の検討項目を明らかにした。

研究協力者

岩手県環境保健研究センター

福島県衛生研究所

埼玉県衛生研究所

東京都健康安全研究センター

杉並区衛生試験所

静岡県環境保健研究所

富山県衛生研究所

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

広島市衛生研究所

神戸検疫所輸入食品検疫検査センター

財団法人 東京顕微鏡院

株式会社 BML フード・サイエンス

国立医薬品食品衛生研究所

岩渕香織

菊地理慧

大塚佳代子

小西典子、甲斐明美

牧島満利子、山崎匠子

榎原広里、鈴木史恵

金谷潤一、磯部順子

永井佑樹

増田加奈子、山田裕子

坂本 綾、田内敦子

上田泰史、稲垣俊一

森 哲也

中川 弘

高田 薫、長尾清香

## 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、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、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 (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。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、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っている。このため、日本での主要な血清群を決定し、それらを対象とした食品での検査法を確立するために各種方法の検討を行い、優れた方法を組み合わせ多機関によるコラボレイティブ・スタディを実施し評価することとした。

また、腸管毒素原性大腸菌による食中毒の発生は、年間の事例数は数件程度であることが多いが、患者数の多い事例が発生すること少くないことが知られている。しかし、食品での検査法が確定されていないため、原因食品の調査や流通食品の汚染調査などにおいて有用な方法が求められている。本研究では、腸管出血性大腸菌の食品での検査法と試

験手順や培地などをできるだけあわせることも考え、効率的で効果的な試験法の基礎を検討した。

## B. 研究方法

### (1) 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

1. 参加機関数：13 試験検査機関

2. 実施回数：3 回

試験対象血清群：第 1 回；血清群 026、0157、第 2 回；血清群 0103、0111、第 3 回；血清群 0121、0145。

3. 試験食品検体：牛挽肉、カイワレダイコン

高菌数接種 2 検体、低菌数接種 2 検体、非接種 2 検体。

4. 試験実施手順

検体入りのストマッカー袋にあらかじめ室温 (20℃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℃、22±2 時間培養した。培養液 0.1 ml からアルカリ熱抽出にて DNA を抽出しリアルタイム PCR (VT 遺伝子、IC および 0 抗原遺伝子を検出) に用いた。また、免疫磁気ビーズ法をマニュアル (デンカ生研) に従い行った。最終浮遊液を CT-SMAC 寒天培地および CT-クロモアガー STEC 寒天培地に画線した。37±1℃にて 18~24 時間培養した。各種類の平板から疑われるコロニー 3 個を普通寒天平板培地等に接種し培養した。生育したコロニーを免疫血清 (血清群 026、0103、0121、0145、0157) およびラテックス凝集試薬 (血清群 0111) にて凝集反応を確認した。国立衛研

で試験結果を集計後、outlier (外れ機関)を除いた機関の結果での検出方法間の有意差検定 ( $\chi^2$  乗検定) を行った。

## (2) 腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討

### 1. 接種菌液

毒素原性大腸菌株を TSB 10 mL にて 37°C にて 18 時間培養した (約  $1.0 \times 10^9$  cfu/mL)。その菌液を PBS 9 mL で 10 倍階段希釈して  $10^{-5}$  ( $10^4$  cfu/ml)、 $10^{-6}$  ( $10^3$  cfu/ml)、 $10^{-7}$  ( $10^2$  cfu/ml) 希釈液を調製し 3 レベルの菌数の接種菌液を作製した。

### 2. 検体への菌接種

牛挽肉、カイワレダイコン 25 g に接種菌液 0.1 mL ( $10^{-5}$ : 1000 cfu、 $10^{-6}$ : 100 cfu、 $10^{-7}$ : 10 cfu) を接種した。その後、mEC 225 mL を加え、42°C にて 22 時間培養した。

### 3. 菌の分離と DNA 抽出

検体培養液を SMAC、CT-SMAC 各 1 枚に画線し、37°C にて 18~24 時間培養した。生育した大腸菌と思われるコロニーから熱抽出法で DNA を抽出し ST 遺伝子および LT 遺伝子の PCR 法に供した。

### 4. ST 遺伝子および LT 遺伝子の PCR 法

食品培養液からのアルカリ熱抽出法により DNA を抽出した。Stacy-Phipps らの方法 (J Clin Microbiol. 1995. 33:1054-1059) を参照して PCR を実施した。

## C. 研究結果

### (1) 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

#### 1. 血清群 026

検出感度は、リアルタイム PCR 法にお

いて、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに VT 遺伝子および 026 抗原遺伝子で 1.0 であったが、カイワレダイコンでは高菌数で 1.0 であったものの低菌数では両遺伝子とも 0.917 であった。免疫磁気ビーズ法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに両寒天培地ともに 1.0 であった。カイワレダイコンでは、低菌数で両寒天培地ともに 0.875 であったが、高菌数では CT-クロモアガー-STEPC で 1.0 であった。統計解析を行った結果、いずれの検出法も同等の検出率が期待できることが示唆された。

#### 2. 血清群 0103

検出感度は、リアルタイム PCR 法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに VT 遺伝子で 1.0 であったが、0103 抗原遺伝子では 0.917 であった。カイワレダイコンでは高菌数では 1.0 であったものの低菌数では両遺伝子とも 0.667 であった。免疫磁気ビーズ法において、牛挽肉では高菌数は両寒天培地ともに 1.0 であったが、低菌数は両寒天培地ともに 0.917 であった。カイワレダイコンでは、高菌数は両寒天培地ともに 1.0 であったが、低菌数は両寒天培地ともに 0.667 であった。統計解析を行った結果、いずれの検出法も同等の検出率が期待できることが示唆された。

#### 3. 血清群 0111

検出感度は、リアルタイム PCR 法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに VT 遺伝子および 0111 抗原遺伝子の検出検出は 1.0 であったが、カイワレダイコンでは高菌数では両遺伝子は 1.0 であったものの低菌数では両遺伝子とも 0.750 であ

った。免疫磁気ビーズ法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに両寒天培地ともに1.0であった。カイワレダイコンでは、高菌数で1.0であったが、低菌数では0.708であった。統計解析を行った結果、いずれの検出法も同等の検出率が期待できることが示唆された。

#### 4. 血清群 0121

検出感度は、リアルタイム PCR 法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに VT 遺伝子および 0121 抗原遺伝子の検出感度は 1.0 であったが、カイワレダイコンでは高菌数では 1.0 であったものの低菌数では両遺伝子とも 0.727 であった。免疫磁気ビーズ法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに両寒天培地ともに 1.0 であった。カイワレダイコンでは、低菌数で CT-SMAC は 0.455、CT-クロモアガー-STEC は 0.545 であった。統計解析を行った結果、カイワレダイコンの低菌数接種検体について、VT 遺伝子および 0121 遺伝子の検出率は免疫磁気ビーズ法の CT-SMAC での分離と比べて有意に高かった。牛挽肉およびカイワレダイコンの高菌数接種検体については、いずれの検出法間でも有意差は認められなかった。これらの結果から、血清群 0121 の検出方法については、汚染菌数が低い検体においては、遺伝子検出法が培養法よりも検出性が優れる場合があることが示された。しかし、比較的汚染菌数が高い場合は、どの検出法についても同等の検出率が期待できることが示された。

#### 5. 血清群 0145

検出感度は、リアルタイム PCR 法におい

て、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに VT 遺伝子および 0145 抗原遺伝子の検出感度は 1.0 であったが、カイワレダイコンでは高菌数では 1.0 であったものの低菌数では両遺伝子とも 0.864 であった。免疫磁気ビーズ法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに両寒天培地ともに 1.0 であった。カイワレダイコンでは、高菌数で 1.0 であったが、低菌数では 0.818 であった。統計解析を行った結果、いずれの検出法も同等の検出率が期待できることが示唆された。

#### 6. 血清群 0157

検出感度は、リアルタイム PCR 法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに VT 遺伝子および 01145 抗原遺伝子の検出感度は 1.0 であったが、カイワレダイコンでは高菌数では 1.0 であったものの低菌数では両遺伝子とも 0.833 であった。免疫磁気ビーズ法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに両寒天培地ともに 1.0 であった。カイワレダイコンでは、高菌数で 1.0 であったが、低菌数では 0.818 であった。統計解析を行った結果、いずれの検出法も同等の検出率が期待できることが示唆された。

#### (2) 腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討

食品培養液からの ST 遺伝子および LT 遺伝子の検出結果、牛挽肉検体では、いずれの菌接種レベルにおいても両遺伝子とも容易に増幅産物像が確認された。しかし、カイワレダイコンでは、 $10^{-7}$  菌液では、両遺伝子ともに検出されなかった。また、 $10^{-6}$  菌液の場合には、LT 遺伝子は明瞭に観察された



が、ST 遺伝子では不明瞭であった。10<sup>6</sup> 菌液の場合には、LT 遺伝子は明瞭に、ST 遺伝子は若干不明瞭であった。

分離平板培地上のコロニーの ST 遺伝子および LT 遺伝子の検出結果、牛挽肉検体では、SMAC においていずれの菌接種レベルにおいても両遺伝子とも検出された。しかし、CT-SMAC では、いずれの菌接種レベルにおいても ST 遺伝子は検出されず、LT 遺伝子はいずれの菌接種レベルにおいても増幅産物像が不明瞭または 3 コロニーのうち 1 コロニーのみで検出される結果であった。

#### D. 考察

##### (1) 腸管出血性大腸菌の試験法のコロボレイティブ・スタディによる検討

検出感度については、高菌数接種 (21.5-29.0 cfu/25 g) では牛挽肉において 6 血清群ともに VT 遺伝子および 0 抗原遺伝子検出リアルタイム PCR 法、免疫磁気ビーズ法で 1.0 であった。また、カイワレダイコンにおいて血清群 0121 の免疫磁気ビーズ法 (0.864) 以外の血清群と検出法の組み合わせで 1.0 であり、本研究での高菌数接種レベルの菌数であれば高率に検出されることが判明した。低菌数接種 (4.3-5.8 cfu/25 g) では、牛挽肉において血清群 0103 の 0 抗原遺伝子検出リアルタイム PCR 法、免疫磁気ビーズ法で 0.917 であったが、他の血清群と検出法の組み合わせで 1.0 であり、菌数が一桁のレベルであっても高率に検出されることが判明した。しかし、カイワレダイコンにおいていずれの検出法も 0.917 以下であり、0.7 以下を示す、すなわち検出率が 7 割に満たないものが血清群 0103 の VT 遺伝子および 0 抗

原遺伝子検出リアルタイム PCR 法、免疫磁気ビーズ法 (いずれも 0.667)、血清群 0121 の免疫磁気ビーズ法 (0.545) であった。このことから、これら血清群では特に VT 遺伝子および 0 抗原遺伝子検出リアルタイム PCR 法にて陽性になった検体については本研究での設定した釣菌するコロニー数 (3 コロニー) 以上に釣菌することによって検出性を向上させる必要があることが考えられた。

本コロボレイティブ・スタディで使用された mEC 培地 (42°C) での増菌培養、免疫磁気ビーズ法、各選択分離培地の組み合わせによる分離培養および遺伝子検出によって 6 血清群全ての比較的高率な検出が認められた。

##### (2) 腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討

本研究では、試験の第一段階である増菌培養を腸管出血性大腸菌の食品での検査法とあわせることを考え、mEC での 42°C 培養を検討したところ、25 g あたり 85 cfu 以上の汚染菌数であれば、mEC で 42°C 培養によって腸管毒素原性大腸菌が一定以上増殖することが明らかになった。今後、mEC で 42°C 培養によってどの程度の菌数レベルになっているのか確認を行い、本研究で用いた PCR 法の検出感度を明確にする必要がある。もし、検出感度が腸管出血性大腸菌の食品での検査法で示されている 10<sup>4</sup> cfu/ml よりも劣る場合は他の PCR 法で優れる方法を設定することが必要である。また、より正確にスクリーニングするためにプローブを含むリアルタイム PCR 法の設定が望まれる。また、腸管毒素原性大腸菌に適した選択性を保有する分離培地の開発が必要と考えられる。

## E. 結論

コロボレイティブ・スタディにて、増菌培養、免疫磁気ビーズ法、選択分離培地の組み合わせによる分離培養および遺伝子検出によって腸管出血性大腸菌 6 血清群が総じて比較的高率に検出されることが確認された。

腸管毒素原性大腸菌の増菌培養には腸管出血性大腸菌の試験法と同じく増菌培養は mEC での 42°C 培養が優れることが示された。今後、より正確なスクリーニング法（リアルタイム PCR 法など）や優れる選択培地の開発が求められる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Lee, K., Kobayashi, N., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y., Tsubone, H., Kumagai, S. and Hara-Kudo, Y. Spread and change in stress resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 on mould colonies. *Microbial Biotechnology*. 7:621-629, 2014.

Hara-Kudo, Y. and Kumagai, S. Impact of seafood regulations for *Vibrio parahaemolyticus* infection and the verification by analyses of the seafood contamination and infection. *Epidemiology and Infection*. 142:2237-2247, 2014.

小林直樹、工藤由起子、寺嶋淳. 腸管出血性大腸菌感染症. 話題の新興・再興感染症.

臨床と微生物. 近代出版. Vol. 41(1), 27-31, 2014.

Watanabe, M., Ohnishi, T., Araki, E., Kanda, T., Tomita, A., Ozawa, K., Goto, K., Sugiyama, K., Konuma, H. and Hara-Kudo, Y. Characteristics of bacterial and fungal growth in plastic bottled beverages under a consuming condition model. *J. Environ. Sci. Health, Part A*. 49:819-826, 2014.

Saito, S., Iwade, Y., Tokuoka, E., Nishio, T., Otomo, Y., Araki, E., Konuma, H., Nakagawa, H., Tanaka, H., Sugiyama, K., Hasegawa, A., Sugita-Konishi, Y. and Hara-Kudo, Y. Epidemiological Evidence of lesser role of thermostable direct hemolysin (TDH)-related hemolysin than TDH on *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity. *Foodborne Pathogens and Disease*. 12:131-138, 2015.

工藤由起子. 食品の腸管出血性大腸菌検査法の改正 主要 6 血清群に対応した検査法. *食品衛生研究*. 65 巻 3 号、13-20, 2015.

### 2. 学会発表

Hara-Kudo, Y., Furukawa, I., Isobe, J., Nagao, S., Sasaki, M., Saito, S. Characteristics morphologies of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O103, O111, O121, O145 and O157 on chromogenic agars for efficient isolation from food. *Food Micro*, September, 2014.

工藤由起子. なぜ日本の腸炎ビブリオ食中毒は減少したのか. 第 42 回日本食品微生物



学会学術セミナー。H26年7月。

磯部順子、齊藤志保子、古川一郎、権平文夫、長尾清香、佐々木美智子、工藤由起子。腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 検出のための培養法の検討。第 35 回日本食品微生物学会学術総会。平成 26 年 9 月。

小西典子、大塚佳代子、森 哲也、上田泰史、清水大輔、原田 誠、中川 弘、甲斐明美、長尾清香、寺嶋 淳、工藤由起子。食品における志賀毒素遺伝子の検出感度の検討。第 35 回日本食品微生物学会学術総会。平成 26 年 9 月。

長尾清香、森 哲也、清水大輔、上田泰史、小西典子、大塚佳代子、中川 弘、原田 誠、甲斐明美、寺嶋 淳、工藤由起子。食品における O 抗原遺伝子検出法の検出感度の検討。第 35 回日本食品微生物学会学術総会。平成 26 年 9 月。

清水大輔、岩淵香織、菊地理慧、大塚佳代子、小西典子、山崎匠子、鈴木史恵、磯部順子、永井佑樹、山田裕子、坂本 綾、上田泰史、森 哲也、工藤由起子。腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 の食品での試験法のコロバレイティブスタディによる評価（1）。第 35 回日本食品微生物学会学術総会。平成 26 年 9 月。

上田泰史、永井佑樹、磯部順子、鈴木史恵、山崎匠子、小西典子、大塚佳代子、菊地理慧、岩淵香織、山田裕子、田内敦子、森 哲也、中川 弘、工藤由起子。腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 の食品での試験法のコロバレイティブスタディによる評価（2）。第 35 回日

本食品微生物学会学術総会。平成 26 年 9 月。

工藤由起子。腸管出血性大腸菌主要 6 血清群の検査法。厚生労働省食品衛生検査施設信頼性確保部門責任者等研修会。平成 26 年 10 月。

工藤由起子。多血清群の腸管出血性大腸菌試験法。食品衛生登録検査機関協会。平成 26 年度微生物研修会。平成 26 年 11 月。

大塚佳代子、鈴木史恵、山崎匠子、小西典子、菊地理慧、岩淵香織、永井佑樹、磯部順子、山田裕子、坂本 綾、上田泰史、森 哲也、中川 弘、工藤由起子。食品における腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 試験法のコロバレイティブスタディ。第 108 回日本食品衛生学会金沢。平成 26 年 12 月。

工藤由起子。食品検査における腸管出血性大腸菌の公定法変更について。地方衛生研究所全国協議会・関東甲信静支部細菌研究部会。平成 27 年 2 月。

### 3. 講習会

工藤由起子、大塚佳代子、小西典子、門脇奈津子、榊田 希、尾畑浩魅、高田 薫、甲斐明美。腸管出血性大腸菌（6 血清群）の検査法実習。日本食品衛生協会。平成 27 年 3 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

平成26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

腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 の食品での検査法を確立するために、13 試験研究機関の参加のもとコラボレイティブ・スタディを実施した。高菌数接種検体（21.5-29.0 cfu/25 g）では牛挽肉およびカイワレダイコンの両食品種で6血清群ともにいずれの方法でもほぼ全検体から検出された。低菌数接種検体（4.3-5.8 cfu/25 g）では、牛挽肉では6血清群ともにいずれの方法でもほぼ全検体から検出されたが、カイワレダイコンでは検出率が5-7割の方法が血清群 0103 および 0121 で認められた。これらのことから、菌数が一件体当たり 20 cfu 以上の汚染レベルでは全血清群において高率に検出され、約 5 cfu の汚染レベルでは5割以上の検出率で検出されることが判明した。また、遺伝子検出法よりも免疫磁気ビーズ法のほうが検出率が低い傾向があることから、遺伝子検出で陽性になった検体では分離平板培地から釣菌するコロニー数を増やすことによって検出率を向上させることが必要であると考えられた。

研究協力者

岩手県環境保健研究センター

福島県衛生研究所

埼玉県衛生研究所

東京都健康安全研究センター

杉並区衛生試験所

静岡市環境保健研究所

富山県衛生研究所

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

広島市衛生研究所

神戸検疫所輸入食品検疫検査センター

財団法人 東京顕微鏡院

株式会社 BML フード・サイエンス

国立医薬品食品衛生研究所

岩渕香織

菊地理慧

大塚佳代子

小西典子、甲斐明美

牧島満利子、山崎匠子

榎原広里、鈴木史恵

金谷潤一、磯部順子

永井佑樹

増田加奈子、山田裕子

坂本 綾、田内敦子

上田泰史、稲垣俊一

森 哲也

中川 弘

長尾清香

## 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、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、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 (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。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、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っている。このため、日本での主要な血清群を決定し、それらを対象とした食品での検査法を確立するために各種方法の検討を行い、優れた方法を組み合わせ、多機関によるコラボレイティブ・スタディを実施し評価することとした。なお、3 回実施したうちの第 1 回 (平成 26 年 2 月 18 日から試験開始) は昨年度の報告書に方法を簡略に記載したが、今年度はその結果を含め 3 回分をまとめて報告する。

## B. 研究方法

### (1) コラボレイティブ・スタディの概要

#### 1. 参加機関数：13 試験検査機関

岩手県環境保健研究センター、福島県衛生研究所、埼玉県衛生研究所、東京都

健康安全研究センター、杉並区衛生試験所、財団法人 東京顕微鏡院、株式会社 BML フード・サイエンス、静岡市環境保健研究所、富山県衛生研究所、三重県保健環境研究所、神戸検疫所輸入食品・検疫検査センター、広島県立総合技術研究所保健環境センター (第 1 回および第 2 回)、広島市衛生研究所 (第 3 回)

#### 2. 実施回数：3 回

試験対象血清群：第 1 回；血清群 026、0157 (平成 26 年 2 月 18 日火曜日検体着)、第 2 回；血清群 0103、0111 (4 月 22 日火曜日)、第 3 回；血清群 0121、0145 (5 月 27 日火曜日検体着)

ただし、血清群 0157 接種カイワレダイコンについては検体を再送して追試 (平成 26 年 7 月 1 日火曜日検体着)、血清群 0103 および 0111 については 0103/0111 遺伝子リアルタイム PCR 法を変更して保存 DNA 抽出液にて再試験 (平成 26 年 7 月第 1 週) を実施した。

#### 3. 試験食品検体：牛挽肉、カイワレダイコン

1 機関につき、血清群ごとに牛挽肉 6 検体 (高菌数接種 2 検体、低菌数接種 2 検体、非接種 2 検体)、カイワレダイコン 6 検体 (高菌数接種 2 検体、低菌数接種 2 検体、非接種 2 検体)、各機関調製陽性コントロール用牛挽肉 1 検体の計 13 検体とした。各回につき 2 血清群を実施するため、計 26 検体を試験した。

#### 4. 試薬等の事前配布と準備

##### 1) 各機関で必要な機器及び器具等

恒温器 (42±1℃、37±1℃)

ABI リアルタイム PCR (機種 ABI PRISM 7500 または 7500fast)

免疫磁気ビーズ法に必要なマグネット  
スタンド

マイクロチューブ（遺伝子抽出用、免  
疫磁気ビーズ法）

普通寒天培地、標準寒天培地、トリプ  
ティック・ソイ培地（TSA）またはトリ  
プティック・ソイ・ブロス（TSB）（陽性  
コントロール接種菌数の確認やコロニ  
ーの釣菌用）

スライドグラス（血清凝集確認用）

シャーレ（セフイキシム・亜テルル酸  
加ソルビトールマッコンキー培地  
（CT-SMAC）用 60 枚、CT-クロモアガー  
STEC 培地用 60 枚）各回につき約 120  
枚

コンラージ棒、チップ

## 2) 配付試薬等

国立衛研、試薬納品業者または試薬  
メーカーから各機関担当者に送付した。  
到着後、直ちに試薬配付リストと照合  
し、試薬の配送状態の不備や不足等の  
有無を連絡した。

## 3) 事前の試薬調製

mEC 培地を作製した。また、CT-SMAC  
寒天平板培地、CT-クロモアガーSTEC  
寒天平板培地の作製では 1L あたり CT  
添加液（5 ml）を添加した。（1 枚あた  
り 18~20 ml を分注。）

## 4) 事前の確認事項

ABI リアルタイム PCR（機種 ABI  
PRISM 7500 または 7500fast）の稼働、  
操作方法の確認をした。なお、  
threshold line を各機器のオート設定  
およびマニュアル設定（threshold  
line ; 0.05、baseline ; Auto）の 2 種  
類で Ct 値を解析した。

## 5) 陽性コントロールについて

下記の手順で陽性コントロール用  
の菌液を作製したが、事前にトリプト  
ソイ斜面培地や普通寒天斜面培地など  
を用いて菌液の調製を練習した。

各血清型菌株を検査開始の金曜日  
にトリプトソイ斜面培地に塗抹し 35  
~37℃にて 18~20 時間培養を行った。  
検査開始当日に斜面から菌を白金線先  
端でごく微量（軽く接触する程度）取  
り、直ちに、生理食塩水 1 ml に浮遊し  
た（約  $10^5 \sim 10^6$  cfu/ml）。これを生理  
食塩水にて 10 倍から 100 倍希釈し陽性  
検体用接種菌液（約  $10^4$  cfu/ml）とし  
た。

また、以下の方法で陽性コントロー  
ル菌液を作製することも可とした。各  
血清型菌株を検査開始前日（月曜日）  
に TSB 10 ml に 1 白金耳植菌し、37℃  
で 18 時間培養した（約  $10^9$  cfu/ml、各  
自確認のこと）。検査開始当日（火曜日）  
に、生理食塩水または PBS 9 ml を用い  
て  $10^{-5}$  倍希釈し（各自確認のこと）、陽  
性検体用接種菌液（約  $10^4$  cfu/ml）と  
した。

実際の接種菌数の確認のため接種  
菌液をさらに 100 倍希釈しその 0.1 ml  
を 10 枚の普通寒天培地、標準寒天培地  
または TSA 培地に塗抹した。各菌数を  
記載し、その平均値から接種菌数を算  
出した。これらの操作は陽性検体用接  
種菌液の濃度が約  $10^4$  cfu/ml になるよ  
うにしたものであり、各自の手技にあ  
わせて希釈倍率は調製した。

(2) コラボレイティブ・スタディ用検体  
の作製

## 1. 検体

国立医薬品食品衛生研究所（国立衛研）にて市販の牛挽肉（国産、非凍結品）およびカイワレダイコン（国産）を購入し、検体として使用した。事前に VT 遺伝子および 0 抗原遺伝子陰性であることをリアルタイム PCR 法または LAMP 法にて試験し確認した。残った牛肉を冷蔵保存し、検体が試験に使用される日に一般生菌数を標準寒天培地にて、大腸菌群数および大腸菌数をクロモカルトコリフォームアガー-ES 培地にて常法にて測定した。牛挽肉では、各血清群につき、高菌数接種用検体 26 検体、低菌数接種用検体 26 検体、非接種用検体 26 検体及び各機関で接種する陽性用検体 13 検体を準備する（計 91 検体）とした。カイワレダイコンは、各血清群につき、高菌数接種用検体 26 検体、低菌数接種用検体 26 検体、非接種用検体 26 検体を準備する（計 78 検体）とした。1 機関につき各接種菌数レベルの検体を 2 検体ずつ試験した。

## 2. 接種菌液の調製

室温下でカジトン培地に保存した 2 血清群の株（第 1 回は 026、0157、第 2 回は 0103、0111、第 3 回は 0121、0145）を TSB 10 ml に 1 白金耳植菌し、37°C で 18 時間培養した（日曜日 15:00 開始）。月曜日に 100 ml 容の三角フラスコに PBS を 54 ml 採り、培養液を 6 ml 加えてスターラーで 1 分間混和した。同様に  $10^{-7}$  まで 10 倍階段希釈した。ただし、株によってさらに希釈し、調製した。その後、低菌数用に 10 ml、高菌数用に 40 ml 分取した。また、菌数測定用に 10 ml 分取

した。低菌数用（5 cfu/25 g 予定）には 0.1 ml、高菌数用（25 cfu/25 g 予定）には 0.5 ml ずつ添加して混和した。接種菌数を確認するために、血清群ごとに接種菌液を TSA 52 枚に 0.1 ml ずつ塗抹し、37°C で 24 時間培養した。

## 3. 検体の調製

菌液接種前日（第 1 回（026、0157）2 月 18 日、第 2 回（0103、0111）4 月 22 日、第 3 回（0121、0145）5 月 27 日）にストマッカー袋に検体を 25 g 採り、4°C で保存した。菌液非接種の検体については空気を抜いてストマッカー袋上部をヒートシールし、4°C で保存した。菌を接種する際も、できるだけクーラーボックス内で取り扱った。菌液接種は袋の口を広げて検体に菌液を 0.1 ml または 0.5 ml を接種し、空気を抜いて上部をヒートシールした。

## 4. 検体の送付

検体 26 袋の間に小型温度記録計（トムプローブ）を挟んでバイオセーフティ一対応送付容器に入れた。検体の上に保冷剤を 2 個入れた。この時、保冷剤が検体に直接触れないように梱包剤を入れた。蓋をしてダンボールに入れ、さらにジュラルミンケースに入れてゆうパック（冷蔵）にて送付した。

(3) コラボレイティブ・スタディの試験実施手順（図 1）

### 金 曜 日

陽性コントロール用の株（各回につき 2 血清型、各 1 株）をトリプトソイ斜面培地に塗抹し 35~37°C にて 18~20 時間培養を行った。プログラム培養で冷蔵または室温（20~25°C 程度）で保管可能。

**(翌週) 月 曜 日**

トリプトソイ斜面培地に菌が生育したことを確認し、室温 (20~25°C程度) で保存した。

**(翌週) 火 曜 日**

検体に添付の小型温度記録計 (トムプローブ) は常に検体とともに取り扱った。

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 225 ml 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。

トリプトソイ斜面培地に生育した陽性コントロール株を白金線の先端でごく微量とり、生理食塩水 1 ml に浮遊した。これを生理食塩水にて 10 倍から 100 倍希釈し陽性検体用接種菌液 (約 10<sup>4</sup> cfu/ml) とした。実際の接種菌数の確認のため接種菌液をさらに 100 倍希釈しその 0.1 ml を 10 枚の普通寒天培地、標準寒天培地または TSA 培地に塗抹した。35~37°Cにて 18~24 時間培養を行った。各菌数を記載し、その平均値から接種菌数を算出した。

陽性検体用接種菌液 0.1 ml を陽性用牛挽肉検体 (各血清型につき 1 検体) に接種した (10<sup>3</sup> ~10<sup>4</sup> cfu/25 g)。菌液が検体になじむようにストマッカー袋の外側から手で揉んだ。これを上記検体と同様に mEC 培地 225 ml にて増菌培養した。

**(翌週) 水 曜 日**

できるだけ食品片が混入しないように培養液の肉片が少ないところから採取した培養液をリアルタイム PCR 法に

0.1 ml を 1 本、免疫磁気ビーズ法に 1.0 ml を 1 本測り取った。また、培養液 10 ml をディスポチューブに取り予備培養液とし直ちに冷凍保存 (-80°C) した。これを予備培養液とし、別途連絡があるまで冷凍保存した。小型温度記録計 (トムプローブ) はこの段階で室温に置いた。

1. リアルタイム PCR (VT 遺伝子、IC および 0 抗原遺伝子を検出) :

培養液 0.1 ml をマイクロチューブに移し、以下のアルカリ熱抽出操作後、中和を必ず行った。抽出作業を始めたから、中断することなく速やかに行き、以下の VT 遺伝子および 0 抗原遺伝子リアルタイム PCR 法に供した。当日にリアルタイム PCR を行えなかった場合は、-80°Cにアルカリ熱抽出物を保存し、翌日にリアクションした。残りのアルカリ熱抽出物は-80°Cに保存した。

**[アルカリ熱抽出法]**

培養液 0.1 ml を 10,000Xg、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 µl 添加して再浮遊させ、100°Cで 10 分間加熱し冷却後、滅菌した 1 M Tris-HCl (pH 7.0) 15 µl で中和した。それを遠心し上清 (10,000Xg、10 分間) を検体とした。アルカリ存在下では DNA が分解しやすいため、抽出後は氷上で静置し直ちに (60 分以内) VT 遺伝子および 0 抗原遺伝子リアルタイム PCR 法に使用した。直ちに使用しなかった場合には 0~4°Cで保存し、4 時間以内に使用した。抽出日当日にリアルタイム PCR を行えなかった場合



は、-80°Cにて保存した。使用後残ったアルカリ熱抽出物は、-80°Cにて保存した。

[VT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法]

反応試薬組成は以下の計 25  $\mu$ l とし、DNA 抽出液 5  $\mu$ l を加えた。

・ 2×Master Mix (Environmental Mastermix) 15  $\mu$ l

・ プライマー

VT1-F (50  $\mu$ M)、VT1-R (50  $\mu$ M)、VT2-F (50  $\mu$ M)、VT2-R (50  $\mu$ M) 各 0.36  $\mu$ l  
16SRna-F (20  $\mu$ M)、16SRna-R (20  $\mu$ M) 各 0.24  $\mu$ l

[配列]

VT1-F: 5'-GGA TAA TTT GTT TGC AGT TGA TGT C-3'

VT1-R: 5'-CAA ATC CTG TCA CAT ATA AAT TAT TTC GT-3'

VT2-F: 5'-GGG CAG TTA TTT TGC TGT GGA-3'

VT2-R: 5'-GAA AGT ATT TGT TGC CGT ATT AAC GA-3'

16SrRNA-F: 5'-CCT CTT GCC ATC GGA TGT G-3'

16SrRNA-R: 5'-GGC TGG TCA TCC TCT CAG ACC-3'

・ プローブ

VT1-P (5  $\mu$ M) FAM-None ラベル、VT2-P (5  $\mu$ M) FAM-None ラベル、16SrRNA-P (5  $\mu$ M) VIC-None ラベル 各 0.6  $\mu$ l

[配列]

VT1-P: 5'-FAM-CCG TAG ATT ATT AAA CCG CCC TTC CTC TGG A-BHQ1-3'

VT2-P: 5'-FAM-ATG TCT ATC AGG CGC GTT TTG ACC ATC TT-BHQ1-3'

16SrRNA-P: 5'-HEX-GTG GGG TAA CGG CTC

ACC TAG GCG AC-BHQ1-3'

・ D.W. 6.28  $\mu$ l

反応条件:50°C 2分、95°C 10分とし、95°C 15秒、60°C 1分を 45 サイクル

使用機器:ABI7500 (7500fast を使用時は standard chemistry に設定する)

判定:リアルタイム PCR の解析を行い、Ct 値が得られている場合を陽性とした。なお、解析は機器のオート設定およびマニュアル設定 (Threshold Line ; 0.05、baseline ; Auto) の 2 種類で Ct 値を解析した。

[026・0157 抗原遺伝子検出リアルタイム PCR 法]

反応試薬組成は以下の計 25  $\mu$ l とし、DNA 抽出液 5  $\mu$ l を加えた。

・ 2×Master Mix (Environmental Mastermix) 15  $\mu$ l

・ プライマー

Wzx-026-F (20  $\mu$ M)、Wzx-026-R (20  $\mu$ M)、RfbE-0157-F (20  $\mu$ M)、RfbE-0157-R (20  $\mu$ M) 各 0.3  $\mu$ l

[配列]

Wzx-026-F: 5'-GTA TCG CTG AAA TTA GAA GCG C-3'

Wzx-026-R: 5'-AGT TGA AAC ACC CGT AAT GGC-3'

RfbE-0157-F: 5'-TTT CAC ACT TAT TGG ATG GTC TCA A-3'

RfbE-0157-R: 5'-CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT-3'

・ プローブ

Wzx-026-P (5  $\mu$ M) VIC-None ラベル 0.6  $\mu$ l

RfbE-0157-R (5  $\mu$ M) FAM-None ラベル 0.3  $\mu$ l

[配列]

Wzx-026-P: 5'-HEX-TGG TTC GGT TGG ATT  
GTC CAT AAG AGG G-BHQ1-3'

RfbE-0157-P: 5'-FAM-AGG ACC GCA GAG  
GAA AGA GAG GAA TTA AGG-BHQ1-3'

• D.W. 7.9  $\mu$ l

反応条件、使用機器、判定は VT 遺伝子  
検出リアルタイム PCR 法と同様

[0103・0111 抗原遺伝子検出リアルタ  
イム PCR 法]

反応試薬組成は以下の計 25  $\mu$ l とし、  
DNA 抽出液 5  $\mu$ l を加えた。

• 2×Master Mix (Environmental  
Mastermix) 15  $\mu$ l

• プライマー Wzx-0103-F (20  $\mu$ M)、  
Wzx-0103-R (20  $\mu$ M)、WbdI-0111-F (20  
 $\mu$ M)、WbdI-0111-R (20  $\mu$ M) 各 0.3  $\mu$ l

[配列]

Wzx-0103-F: 5'-TTG GAG CGT TAA CTG  
GAC CT-3'

Wzx-0103-R: 5'-ATA TTC GCT ATA TCT  
TCT TGC GGC-3'

WbdI-0111-F: 5'-CGA GGC AAC ACA TTA  
TAT AGT GCT TT -3'

WbdI-0111-R: 5'-TTT TTG AAT AGT TAT  
GAA CAT CTT GTT TAG C -3'

• プローブ

Wzx-0103-P (5  $\mu$ M) FAM-None ラベル 0.3  
 $\mu$ l

WbdI-0111-P (5  $\mu$ M) VIC-None ラベル  
0.6  $\mu$ l

[配列]

Wzx-0103-P: 5'-FAM-AGG CTT ATC TGG  
CTG TTC TTA CTA CGG C-BHQ1-3'

WbdI-0111-P: 5'-HEX- TTG AAT CTC CCA  
GAT GAT CAA CAT CGT GAA -BHQ1-3'

• D.W. 7.9  $\mu$ l

反応条件、使用機器、判定は VT 遺伝子  
検出リアルタイム PCR 法と同様

[0121・0145 抗原遺伝子検出リアルタ  
イム PCR 法]

反応試薬組成は以下の計 25  $\mu$ l とし、  
DNA 抽出液 5  $\mu$ l を加えた。

• 2×Master Mix (Environmental  
Mastermix) 15  $\mu$ l

• プライマー

Wzx-0121-F (20  $\mu$ M)、Wzx-0121-R (20  
 $\mu$ M)、Wzx-0145-F (20  $\mu$ M)、Wzx-0145-R  
(20  $\mu$ M) 各 0.3  $\mu$ l

[配列]

Wzx-0121-F: 5'-AGG CGC TGT TTG GTC  
TCT TAG A-3'

Wzx-0121-R: 5'-GAA CCG AAA TGA TGG  
GTG CT-3'

Wzx-0145-F: 5'-AAA CTG GGA TTG GAC  
GTG G-3'

Wzx-0145-R: 5'-CCC AAA ACT TCT AGG  
CCC G-3'

• プローブ

Wzx-0121-P (5  $\mu$ M) FAM-None ラベル 0.3  
 $\mu$ l

Wzx-0145-P (5  $\mu$ M) VIC-None ラベル 0.6  
 $\mu$ l

[配列]

Wzx-0121-P: 5'-FAM-CGC TAT CAT GGC  
GGG ACA ATG ACA GTG C-BHQ1-3'

Wzx-0145-P: 5'-HEX-TGC TAA TTG CAG  
CCC TTG CAC TAC GAG GC-BHQ1-3'

• D.W. 7.9  $\mu$ l

反応条件、使用機器、判定は VT 遺伝子  
検出リアルタイム PCR 法と同様

2. 免疫磁気ビーズ法:

1.0 ml 培養液に試験対象の O 血清群のビーズ液 25  $\mu$ l を加えたものを用意し、マニュアル（デンカ生研）に従い免疫磁気ビーズ濃縮を行った。各チューブの洗いは 1.0 ml の洗浄液（PBS または滅菌生理食塩水）を用いた。最終浮遊液は 0.1 ml とした。20  $\mu$ l ずつ CT-SMAC 寒天培地および CT-クロモアガーSTEC 寒天培地の各 2 枚に接種し画線した。コロニーが多く出現するように画線した。その後、 $37 \pm 1$   $^{\circ}$ C にて 18~24 時間培養した。

(翌週) 木曜日

分離菌の確認：

免疫磁気ビーズ法について、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 個を釣菌した。また、必要に応じて追加で釣菌した。それらを普通寒天平板培地等に接種し  $37 \pm 1$   $^{\circ}$ C にて 18~24 時間培養した。雑菌の密集部に生育した疑わしいコロニーを釣菌する場合は、選択分離培地にて単コロニーを生育させることも考慮した。ただし、選択培地上のコロニーから直接に血清試験を行わなかった。

各平板培地上での典型的コロニーの色は、CT-SMAC 寒天培地では血清群 0157 が無色透明、それ以外の 5 血清群はピンク色であった。CT-クロモアガーSTEC 寒天培地ではいずれの血清群も藤色であった。

(翌週) 金曜日

分離菌の確認：

普通寒天平板培地等に生育したコロニーを免疫血清（血清群 026、0103、0121、0145、0157）及びラテックス凝集試薬（血清群 0111）にて凝集反応を確認した。

なお、加熱菌体での凝集試験が望ましいが、今回は生菌での凝集で判定できた場合は加熱菌体での凝集を確認しなくても良いとした。

ラテックス凝集試薬および免疫血清の 3-5  $\mu$ l をマイクロピペットで反応用プレートに落として、爪楊枝で取った少量コロニーと凝集を確認した。

結果記入表には、疑われるコロニーがなく凝集試験をしなかった場合は「NT」と記載した。

リアルタイム PCR で陰性の検体から血清に凝集を起こすコロニーが分離された場合は、単離コロニーの生理食塩水浮遊液を加熱抽出して得た DNA 液を用いて、VT および対象の O 抗原遺伝子の有無を試験した。

試験終了後：

結果表（別添）に記入した試験結果およびリアルタイム PCR のランファイル（sds 形式または eds 形式）を、国立衛研の連絡担当者にメールにて返送した。また、各検体に添付する小型温度記録計（トムプローブ）及び検体送付缶（梱包付属品も含む）を試験終了後、着払い（ゆうパック）にて返却した。予備培養液およびアルカリ熱抽出物は、再試験の依頼や連絡担当者への送付に備え保管し、廃棄の依頼が届くまで保管した。

国立衛研で試験結果を集計後、outlier（外れ機関）を除いた機関の結果での検出方法間の有意差検定（ $\chi^2$  乗検定）を行った。

## C. 研究結果

### (1) 血清群 026

### 1) 検体

供試した検体の一般生菌数は、牛挽肉で  $5.6 \times 10^5$  cfu/g、カイワレダイコンでは  $2.9 \times 10^7$  cfu/g であった。大腸菌群数は、牛挽肉で  $1.8 \times 10^3$  cfu/g、カイワレダイコンでは  $5.7 \times 10^5$  cfu/g であった。大腸菌は、牛挽肉およびカイワレダイコンともに検出されなかった (< 10 cfu/g)。

検体への接種菌液の菌数測定のために低菌数用菌液を TSA に塗抹した結果、低菌数接種が 4.7 cfu/25 g であった(表 1)。この 5 倍量を高菌数用菌液としたことから、高菌数接種は 23.5 cfu/25 g であった。

### 2) 検体の輸送および増菌培養での温度

全機関について梱包後に温度は速やかに 10°C 程度に下がり、その後徐々に低下し、輸送時の温度はほぼ 0°C から 8°C に保たれて各機関に配送された(図 2)。到着後、梱包されたまま試験開始まで保管され、梱包から約 32 時間後までに開梱し増菌培養された。増菌温度はほとんどの機関で 41.0 から 42.5°C であったが、機関 11 では他機関に比べゆるやかに上昇し、少なくとも培養開始から 8 時間後には 41°C に到達した。

### 3) 陽性用検体への菌の接種

機関ごとに準備した陽性検体または事前に配布した菌株を培養し試験当日に陽性用検体(牛挽肉)への接種菌液を自家調製した。接種菌数は検体あたり 460-38,000 cfu であった(表 2)。いずれの機関においても、免疫磁気ビーズ法およびリアルタイム PCR 法において陽性であった。

### 4) VT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(インターナルコントロール含む)での検出結果

Auto 解析の結果、菌接種検体ではほとんどの機関で 2 検体ともに陽性であったが、カイワレダイコンの低菌数接種において 2 機関で 2 検体中 1 検体が陰性であった(表 3)。陽性検体の多くで Ct 値は 17-24 くらいであった。菌非接種検体では、5 機関で牛挽肉またはカイワレダイコンの 2 検体中 1 検体で陽性であった。それら陽性検体のほとんどは Ct 値が 38-40 であった。

判定結果はマニュアル解析(threshold line 0.05 設定)においても変わらなかった(詳細略)。

同時に測定したインターナルコントロールは全機関でいずれの検体でも陽性であった(表 4)。

### 5) 026 遺伝子検出リアルタイム PCR 法での検出結果

Auto 解析の結果、菌接種検体の検出率はほとんどの機関で 2 検体ともに陽性であったが、カイワレダイコンの低菌数接種において 2 機関で 2 検体中 1 検体が陰性であった(表 5)。この陰性検体は VT 遺伝子陰性の検体と同一であった。陽性検体の多くで Ct 値は 17-26 くらいであった。Ct 値の大きさは VT 遺伝子の結果と傾向が似ていた。菌非接種検体では、4 機関で牛挽肉またはカイワレダイコンの 2 検体中 1 検体で陽性であった。それら陽性検体のほとんどは Ct 値が 41-42 であった。それら検体は VT 遺伝子で陽性となった検体と同一であった。

判定結果はマニュアル解析 (threshold line 0.05 設定) においても変わらなかった (詳細略)。

#### 6) 免疫磁気ビーズ法での分離結果

牛挽肉検体については、低菌数および高菌数ともに全機関で全検体ともに陽性であったが、カイワレダイコン検体では低菌数および高菌数の2検体中1検体が検出されない機関が12機関中4機関あった (詳細略)。分離に用いた2種類の寒天培地については、牛挽肉検体およびカイワレダイコン検体のどちらにおいても菌接種検体では差異なく接種菌が分離されたが、非接種検体ではCT-クロモアガー-STECでは釣菌コロニー数が少ないにも関わらずCT-SMACで多いことが多数認められた (表6)。

#### 7) 検出感度と特異性

血清群 026 の結果を検出方法別に検出感度及び特異性を算出した (表7)。

検出感度は、リアルタイム PCR 法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに VT 遺伝子および 026 抗原遺伝子で 1.0 であったが、カイワレダイコンでは高菌数では 1.0 であったものの低菌数では両遺伝子とも 0.917 であった。IC は、いずれの食品においても 1.0 であった。免疫磁気ビーズ法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに両寒天培地ともに 1.0 であった。カイワレダイコンでは、低菌数で両寒天培地ともに 0.875 であったが、高菌数では CT-クロモアガー-STEC で 1.0 であった。

特異性は、牛挽肉で VT 遺伝子および 026 抗原遺伝子ともに 0.875、カイワレダイコンで VT 遺伝子が 0.917、026 抗原

遺伝子が 0.958 であり、免疫磁気ビーズ法および IC は両食品ともに 1.0 であった。

統計解析を行った結果、Outlier の機関はなく、全機関での検出方法間の有意差検定を行ったところ、牛挽肉およびカイワレダイコンの両方について、いずれの検出法でも有意差は認められなかった (詳細略)。これらの結果から、血清群 026 の検出方法については、いずれの検出法についても同等の検出率が期待できることが示唆された。

#### (2) 血清群 0103

##### 1) 検体

供試した検体の一般生菌数は、牛挽肉で  $1.2 \times 10^5$  cfu/g、カイワレダイコンでは  $2.4 \times 10^7$  cfu/g であった。大腸菌群数は、牛挽肉で  $1.0 \times 10^3$  cfu/g、カイワレダイコンでは  $2.4 \times 10^5$  cfu/g であった。大腸菌は、牛挽肉およびカイワレダイコンともに検出されなかった ( $< 10$  cfu/g)。

検体への接種菌液の菌数測定のために低菌数用菌液を TSA に塗抹した結果、低菌数接種が 4.3 cfu/25 g であった (表8)。この5倍量を高菌数用菌液としたことから、高菌数接種は 21.5 cfu/25 g であった。

##### 2) 検体の輸送および増菌培養での温度

全機関について梱包後に温度は速やかに  $10^\circ\text{C}$  前後に下がり、その後徐々に低下し、輸送時の温度はほぼ  $2^\circ\text{C}$  から  $10^\circ\text{C}$  に保たれて各機関に配送された (図3)。到着後、梱包されたまま試験開始まで保管され、梱包から約 30 時間後までに開梱し増菌培養された。増菌温度はほ

とんどの機関で 41.0℃から 42.0℃であった。

### 3) 陽性用検体への菌の接種

機関ごとに準備した陽性検体または事前に配布した菌株を培養し試験当日に陽性用検体(牛挽肉)への接種菌液を自家調製した。接種菌数は検体あたり 250-11,000 cfu であった(表 9)。いずれの機関においても、免疫磁気ビーズ法およびリアルタイム PCR 法において陽性であった。

### 4) VT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(インターナルコントロール含む)での検出結果

Auto 解析の結果、牛挽肉検体およびカイワレダイコンの高菌数接種において全機関で菌接種検体の 2 検体ともに陽性であったが、カイワレダイコンの低菌数接種において 7 機関で 2 検体中 1 または 2 検体が陰性であった(表 10)。陽性検体の多くで Ct 値は 18-23 くらいであった。菌非接種検体では、6 機関で牛挽肉およびカイワレダイコン、またはそのどちらかで 2 検体中 1 または 2 検体が陽性であった。それら陽性検体の半数は Ct 値が 38-40 であった。

判定結果はマニュアル解析(threshold line 0.05 設定)においても変わらなかった(詳細略)。

同時に測定したインターナルコントロールは全機関でいずれの検体でも陽性であった(表 11)。

### 5) O103 遺伝子検出リアルタイム PCR 法での検出結果

Auto 解析の結果、牛挽肉検体およびカイワレダイコンの高菌

数接種において全機関で菌接種検体の 2 検体ともに陽性であったが、カイワレダイコンの低菌数接種において 7 機関で 2 検体中 1 または 2 検体が陰性であった(表 12)。陽性検体の多くで Ct 値は 19-26 くらいであった。菌非接種検体では、牛挽肉検体で 1 機関、カイワレダイコン検体で 2 機関が 2 検体中 1 検体で陽性であった。それら陽性検体のほとんどは Ct 値が 36-40 であった。

判定結果はマニュアル解析(threshold line 0.05 設定)においても変わらなかった(詳細略)。

### 6) 免疫磁気ビーズ法での分離結果

牛挽肉検体およびカイワレダイコン検体の高菌数接種は全機関で全検体ともに陽性であったが、カイワレダイコン検体の低菌数接種の 2 検体中 1 または 2 検体が検出されない機関が 11 機関中 7 機関あった(詳細略)。また、牛挽肉の低菌数接種の 2 検体中 1 検体が検出されない機関が 2 機関あった。

牛挽肉の非接種検体で O103 が検出された機関が 3 機関あった。このうち 2 機関では CT-クロモアガーSTEC でのみ検出され、1 機関は CT-SMAC と CT-クロモアガーSTEC の両方で検出された。CT-クロモアガーSTEC でのみ検出された検体は VT 遺伝子陽性でもあったが、O103 抗原遺伝子は陰性であった。一方、CT-SMAC と CT-クロモアガーSTEC の両方で検出された検体は VT 遺伝子および O103 抗原遺伝子ともに陽性であった。

分離に用いた 2 種類の寒天培地については、牛挽肉検体およびカイワレダイコン検体のどちらにおいても菌接種検