

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 13)。

7) 検出感度と特異性

血清群 0103 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 14)。

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。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。

特異性は、牛挽肉では VT 遺伝子は 0.792(threshold; auto)、0103 抗原遺伝子は 0.958、免疫磁気ビーズ法は 0.875 であった。カイワレダイコンでは VT 遺伝子は 0.833、0103 抗原遺伝子 (threshold; auto) が 0.917 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

0103 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。

(3) 血清群 0111

1) 検体

供試した検体の一般生菌数は、牛挽肉で 1.2×10^5 cfu/g、カイワレダイコンでは 2.4×10^7 cfu/g であった。大腸菌群数は、牛挽肉で 1.0×10^3 cfu/g、カイワレダイコンでは 2.4×10^5 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 5.8 cfu/25 g であった (表 15)。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 29.0 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 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°C から 10°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°C から 42.0°C 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 200–8,700 cfu であった (表 16)。いずれの機関においても、直接塗抹法、

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 5 機関で 2 検体中 1 または 2 検体が陰性であった(表 17)。陽性検体の多くで Ct 値は 16-22 くらいであった。菌非接種検体では、5 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 18)。

5) 0111 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 4 機関で 2 検体中 1 検体が陰性であった(表 19)。陽性検体の多くで Ct 値は 16-22 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 5 機関で 2 検体中 1 または 2 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

38-42 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 12 機関中 6 機関あった(詳細略)。牛挽肉の非接種検体で 0103 が検出された機関はなかった。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体では大きな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-STECS 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 20)。

7) 検出感度と特異性

血清群 0111 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 21)。

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。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、高菌数で 1.0 であったが、低菌数では 0.708 であった。

特異性は、牛挽肉で VT 遺伝子が 0.833、0111 抗原遺伝子が 0.917、カイワレダイコンで VT 遺伝子が 0.750、0111 抗原遺伝子が 0.875 であり、IC は両食品ともに 1.0 であった。免疫磁気ビーズ法でカイワレダイコンでは 1.0、牛挽肉で 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 0111 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。

(4) 血清群 0121

1) 検体

供試した検体の一般生菌数は、牛挽肉で 1.5×10^5 cfu/g、カイワレダイコンでは 3.5×10^7 cfu/g であった。大腸菌群数は、牛挽肉で 1.0×10^3 cfu/g、カイワレダイコンでは 4.3×10^5 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 22)。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 10°C 程度に下がり、その後徐々に低下し、輸送時の温度は 4°C から 8°C に保たれて

各機関に配送された (図 4)。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 41.5°C であったが、機関 8 では 37°C 前後であった。このため、試験結果には機関 8 の結果を含めずに集計した。

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 670-38,800 cfu であり、機関による差が大きかった (表 23)。後述の通り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 5 機関で 2 検体中 1 または 2 検体が陰性であった (表 24)。陽性検体の多くで Ct 値は 18-26 くらいであった。菌非接種検体では、3 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 25）。

5) 0121 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 5 機関で 2 検体中 1 または 2 検体が陰性であった（表 26）。陽性検体の多くで Ct 値は 20-25 くらいであった。菌非接種検体では、2 機関で牛挽肉およびカイワレダイコン、または牛挽肉のみで 2 検体中 1 検体が陽性であった。それら陽性検体のほとんどは Ct 値が 39-42 と大きく、また、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、高菌数接種の 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 0121 が検出された機関が 1 機関あった。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 27）。

7) 検出感度と特異性

血清群 0121 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 28）。

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。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 CT-SMAC とは 0.455、CT-クロモアガー STEC は 0.545 であった。

特異性は、牛挽肉で VT 遺伝子が 0.864、0121 抗原遺伝子が 0.909、カイワレダイコンで VT 遺伝子が 0.864、0121 抗原遺伝子が 0.955 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、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（詳細略）。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（詳細略）。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

1) 検体

供試した検体の一般生菌数は、牛挽肉で 1.5×10^5 cfu/g、カイワレダイコンでは 3.5×10^7 cfu/g であった。大腸菌群数は、牛挽肉で 1.0×10^3 cfu/g、カイワレダイコンでは 4.3×10^5 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 5.6 cfu/25 g であった(表 29)。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 28.0 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 10°C 程度に下がり、その後徐々に低下し、輸送時の温度は 4°C から 8°C に保たれて各機関に配送された(図 4)。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 41.5°C であったが、機関 8 では 37°C 前後であった。このため、試験結果には機関 8 の結果を含めないことにした。

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

690-14, 100 cfu であった(表 30)。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 3 機関で 2 検体中 1 検体が陰性であった(表 31)。陽性検体の多くで Ct 値は 16-25 くらいであった。菌非接種検体では、7 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 32)。

5) 0145 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 3 機関で 2 検体中 1 検体が陰性であった(表 33)。陽性検体の多くで Ct 値は 17-25 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で 2 検体中 1 または 2 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 37-41 と大きく、それ

らの多くの検体が VT 遺伝子も陽性であった。ただし、0145 遺伝子陰性にもかかわらず VT 遺伝子陽性の非接種検体が 7 検体あった。

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 5 機関あった (詳細略)。また、高菌数接種の 2 検体中 1 または 2 検体が検出されない機関が 4 機関あった。牛挽肉の非接種検体で 0145 が検出された機関が 1 機関あった。

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 34)。

7) 検出感度と特異性

血清群 0145 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 35)。

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。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、高菌数で 1.0 であったが、低菌数では 0.818 であった。

特異性は、牛挽肉で VT 遺伝子が 0.727、0145 抗原遺伝子が 0.955、カイワレダイコンで VT 遺伝子が 0.727、0145 抗原遺伝子が 0.773 であり、IC は両食品ともに 1.0 であった。免疫磁気ビーズ法でカイワレダイコンでは 1.0、牛挽肉で 0.909 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 0145 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。

(6) 血清群 0157

牛挽肉検体については血清群 026 と同時に配布した検体の結果を記載するが、カイワレダイコン検体については 0157 接種検体調製の不良のため追試を実施したので、その結果を記載する。

1) 検体

供試した検体の一般生菌数は、牛挽肉で 5.6×10^5 cfu/g、カイワレダイコンでは 3.0×10^7 cfu/g であった。大腸菌群数は、牛挽肉で 1.8×10^3 cfu/g、カイワレダイコンでは 3.0×10^7 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、牛挽肉では低菌数接種が 4.5 cfu/25 g、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 22.5 cfu/25 g であった (表 36)。カイワレダイコンでは低菌数接種が 4.8 cfu/25 g、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 24.0 cfu/25 g であった (表 36)。

2) 検体の輸送および増菌培養での温度

牛挽肉検体試験時では、全機関について梱包後に温度は速やかに 10℃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℃から 8℃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℃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℃に到達した。

カイワレダイコン検体試験時では、全機関について梱包後に温度は速やかに 10℃程度に下がり、その後徐々に低下し、輸送時の温度はほぼ 2℃から 10℃に保たれて各機関に配送された (図 5)。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 29 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

牛挽肉検体試験時では、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 700-13,000 cfu であった (表 37)。カイワレダイコン検体試験時では、陽性用検体 (牛挽肉) への接種菌数は検体あたり 40-23,000 cfu であった (表 38)。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 4 機関で 2 検体中 1 検体が陰性であった (表 39)。陽性検体の多くで Ct 値は 18-22 くらいであった。菌非接種検体では、牛挽肉検体で 5 機関、カイワレダイコン検体で 4 機関で 2 検体中 1 または 2 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 であり、一部、34 くらいのもも認められた。

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 40)。

5) O157 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、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 4 機関で 2 検体中 1 検

体が陰性であった（表 41）。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 17-24 くらいであった。菌非接種検体では、牛挽肉検体で 2 機関、カイワレダイコン検体で 1 機関で 2 検体中 1 または 2 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、1 機関で低菌数の 2 検体中 1 検体で CT-SMAC で陰性であった（詳細略）。カイワレダイコン検体では高菌数では全機関で全検体とも陽性であったが、低菌数では 4 機関で 2 検体中 1 検体が検出されなかった。菌非接種検体では、牛挽肉の 2 検体中 1 検体で CT-SMAC で陽性を示した。カイワレダイコンでは、全検体とも陰性であった。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 42）。

7) 検出感度と特異性

血清群 0145 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 43）。

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

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。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、高菌数で 1.0 であったが、低菌数では 0.818 であった。

特異性は、牛挽肉で VT 遺伝子が 0.727、0145 抗原遺伝子が 0.955、カイワレダイコンで VT 遺伝子が 0.727、0145 抗原遺伝子が 0.773 であり、IC は両食品ともに 1.0 であった。免疫磁気ビーズ法でカイワレダイコンでは 1.0、牛挽肉で 0.909 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 0157 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。

D. 考察

腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 の 6 血清群を対象とした食品での検査法の確立のために、13 試験検査機関（試験集計機関数としては、血清群 0121 および 0145 については 11、他血清群については 12）によるコラボレイティブ・スタディを行った。これまでの食品からの腸管出血性大腸菌の検査法の通知を参考にして効果

的かつ効率的な検査法とすることとした。これまでの通知法は、平成24年12月に通知されたもので、血清群026、0111および0157を対象としている。大規模な食中毒発生の多い血清群0157に加え、近年、血清群026および0111の感染者数の割合の増加や野菜など食肉以外の食品での事例の重要性が高まっていることを考慮し、血清群0157と同等に他2血清群も検出が行えること、食肉と同等に野菜なども検出が行える平均的な検出法であることを考慮したものである。今回は、検査対象をこれら3血清群に加えて、さらに感染の多い0103、0121、0145の3血清群を加えた6血清群としている。本コラボレイティブ・スタディでの試験法は、既に欧州および米国で確立されている5または7血清群を対象とした食品での試験法の手順を参照しているが、日本でのこれまでの試験法も鑑みて決定したものである。また、9試験研究機関での先行研究にて食肉や野菜などの多数の食品種に菌を接種して検討して得られた優れた方法を採用した。mEC培地中での42°Cでの増菌培養、免疫磁気ビーズ法と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で構成された。食品検体には食肉として牛挽肉および野菜として芽野菜であるカイワレダイコンを使用した。

その結果、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。

なお、免疫磁気ビーズ法で検出された検体は遺伝子検出法でも検出されたものがほとんどであったが、遺伝子検出法で検出されても免疫磁気ビーズ法で検出されない検体はカイワレダイコンで026が1検体、0111が1検体、0121が2検体、0145が1検体、牛挽肉で0103が2検体あった。いずれも低菌数接種検体であった。逆に、免疫磁気ビーズ法で検出されても遺伝子検出法で検出されないものも、カイワレダイコンの低菌数接種検体で026が1検体あった。これらの結果から、遺伝子検出法のほうが免疫磁気ビーズ法よりも検出性が優れ、遺伝子検出法をスクリーニングに使用し、陽性であった検体を免疫磁気ビーズ法に供することで効率的な試験が行えるものと考えられた。

第3回血清群0121、0145の試験の際、1

機関が 37°C で増菌培養を行ったため、集計に加えることができなかったが、42°C 培養の他機関の結果を比較すると、免疫磁気ビーズ法では両血清群ともカイワレダイコンで 0121 は全く検出されず、0145 もほとんど検出されず、42°C と比べて優れなかった。遺伝子検出法では、両血清群ともいずれの食品種も 42°C の結果と大きく変わらなかったため、血清群 0121、0145 をカイワレダイコンなどから検出する際、37°C で mEC 培地にて増菌すると遺伝子検出では検出されるが分離されない可能性が考えられた。生菌数の高いカイワレダイコンでは 37°C では夾雑菌の増殖が抑制されず、血清群 0121 および 0145 の mEC 中での増殖が抑制され、寒天平板培地上でのコロニー形成が優れないことが考えられた。

免疫磁気ビーズ法と遺伝子検出法の検出性の比較のために、免疫磁気ビーズ法で陽性であった検体の遺伝子検出法での検出およびその Ct 値を確認した (図 6)。免疫磁気ビーズ法で陽性であった検体で VT 遺伝子検出の遺伝子検出法で検出されなかった検体はなく、その Ct 値の最大値は 35.7 であった。0 抗原遺伝子検出の遺伝子検出法では、026 血清群で 1 検体が陰性を示したが、他血清群では認められなかった (ただし、2 反応中 1 反応が陰性を示すものが 0157 で 1 検体あった)。このように、免疫磁気ビーズ法で陽性であった検体ではほとんどが検出された。その Ct 値の最大値は、026 が 37.6、0103 が 38.3、0111 が 42.0、0121 が 32.3、0145 が 34.7、0157 が 29.8 であったことから、遺伝子検出法の反応サイクル数が 45 であることは、免疫磁気ビーズ法で陽性である検体の検出に必要であることが示された。

全体的に遺伝子検出法よりも免疫磁気ビ

ーズ法のほうが検出率の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。

非接種検体で遺伝子検出法および免疫磁気ビーズ法の両方またはいずれかで試験対象血清群が陽性になることが認められた。1 検体当たり遺伝子検出法では 2 反応、免疫磁気ビーズ法では濃縮液を 2 種類の寒天培地に塗抹しているが、遺伝子検出法では 2 反応のうちの 1 反応が大きな Ct 値を示して陽性になることが多く、免疫磁気ビーズ法では両寒天培地が陽性になることがほとんどであった。事前に検体が試験対象血清群に自然汚染されていないか確認はしているが、汚染の偏りが考えられるため検体採取部の違いによる結果の違いはあり得る。このため、自然汚染の対象菌を検出した可能性は否定できないが、試験操作における微量の交差汚染や検体の取り違いも発生したものと考えられる。一部検体で、保管していた DNA 抽出物を遺伝子検出法で再度試験したところ、2 反応ともに小さい Ct 値を示した結果が、陰性に転じたものもあった。これらはコラボレイティブ・スタディにおいて常に結果の解釈に含まれる要素と考えられる。

本コラボレイティブ・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。

E. 結論

6血清群の対象を試験するための効率的な手順を、海外で採用されている方法を参照し検討した結果、まず食品の増菌培養液がVT遺伝子検出で陽性になった場合に6血清群0抗原遺伝子検出を行い、いずれかが陽性になった場合はその0血清群の免疫磁気ビーズ法を行い分離培地に塗抹して最終的に腸管出血性大腸菌6血清群のいずれかが分離されることが試験陽性と判定するには必要と考えられた。本コラボレイティブ・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。

F. 健康被害情報

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. mEC、酵素基質、ビーズ. 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の検討. stx IC 0 抗原. 検量線. リアルタイム PCR、LAMP、PCR. 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 0 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、岩渕香織、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ラボ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、岩渕香織、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ラボ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、岩渕香織、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 試験法のコラボ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

試験対象血清群組み合わせ：026/0157、0103/0111、0121/0145

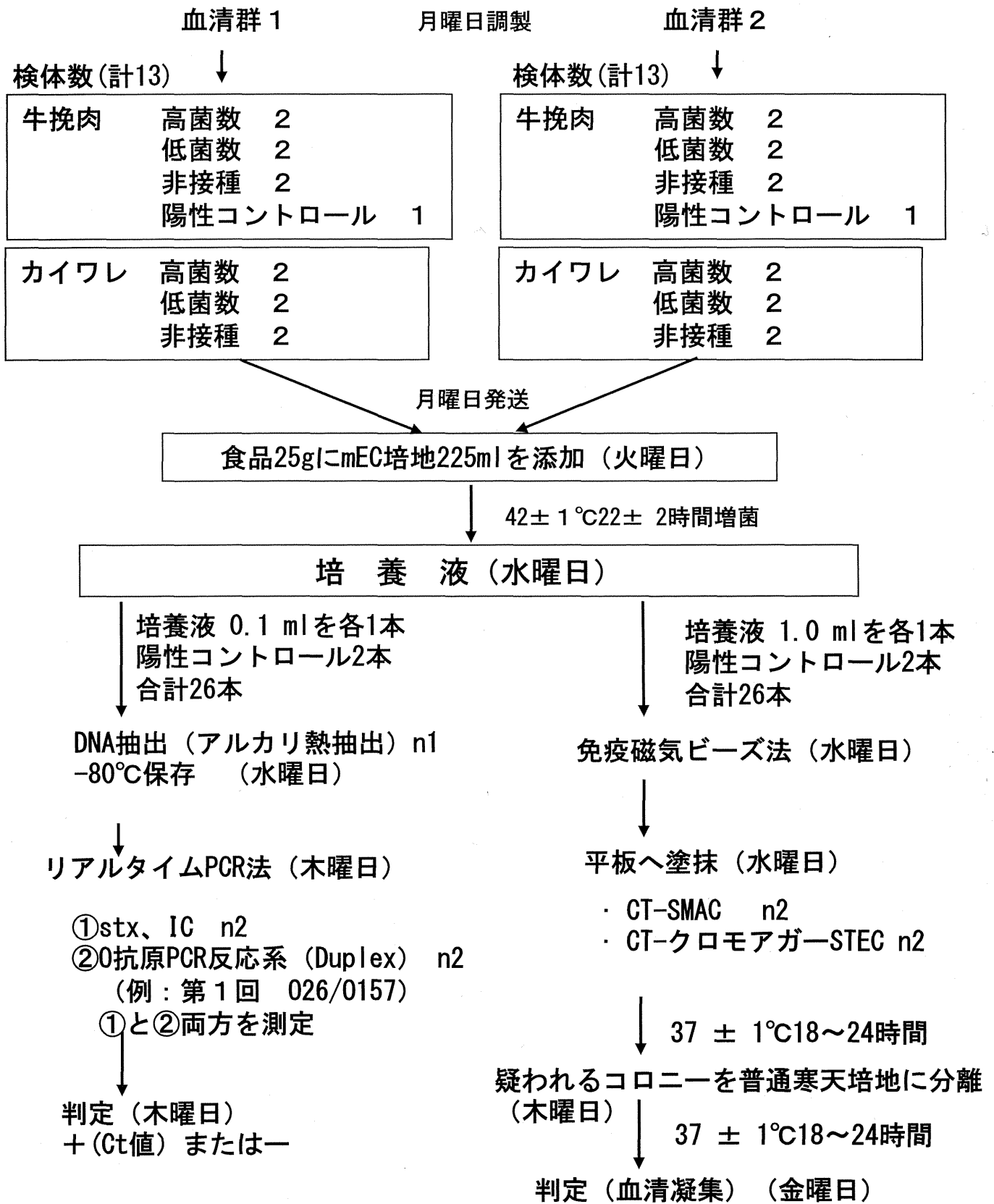


図1 腸管出血性大腸菌026、0103、0111、0121、0145、0157の検査法の
コラボレイティブ・スタディ

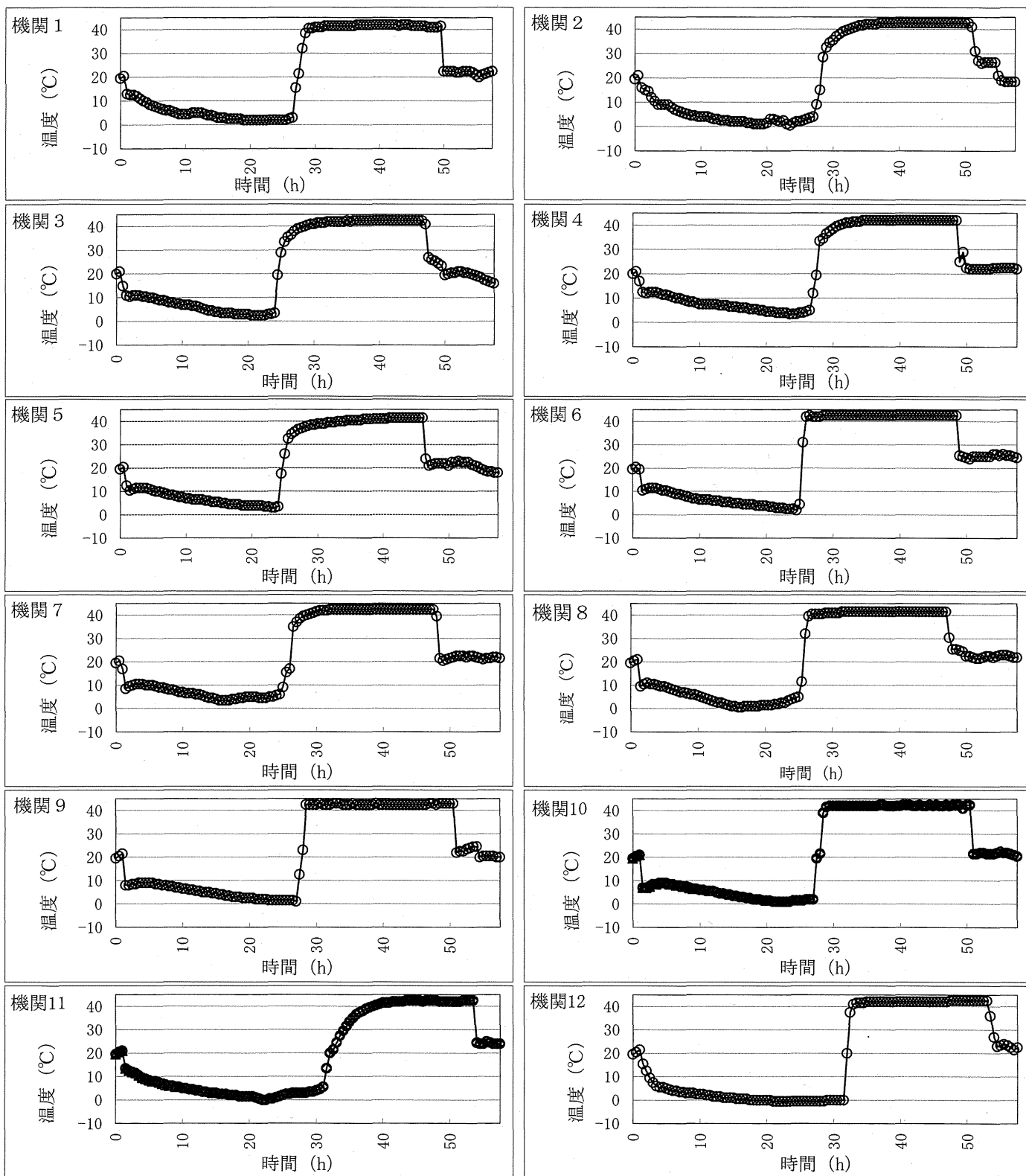


図2 血清群026・0157（牛挽肉）接種検体の輸送及び増菌培養における温度変化

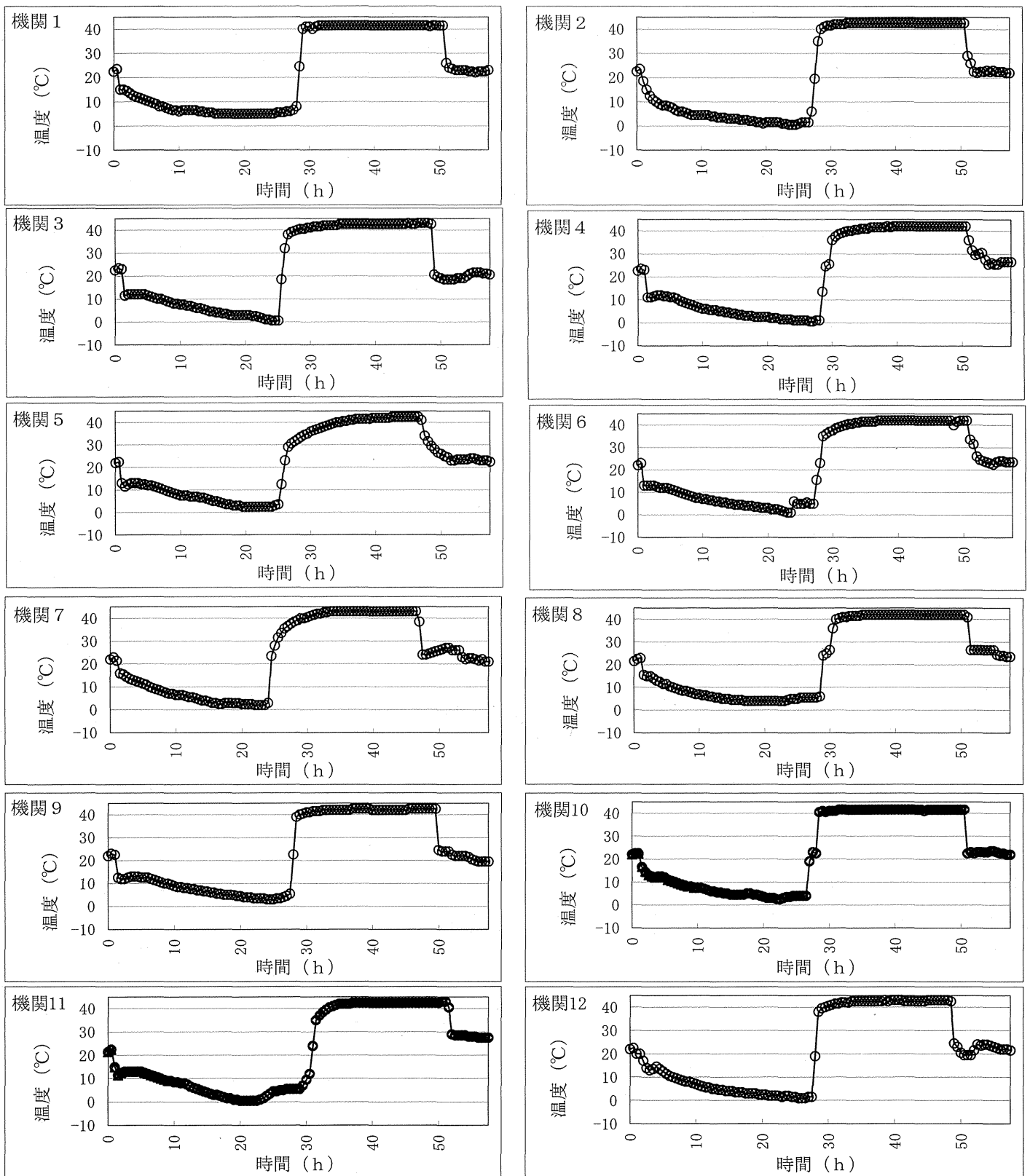


図3 血清群0103・0111接種検体の輸送及び増菌培養における温度変化

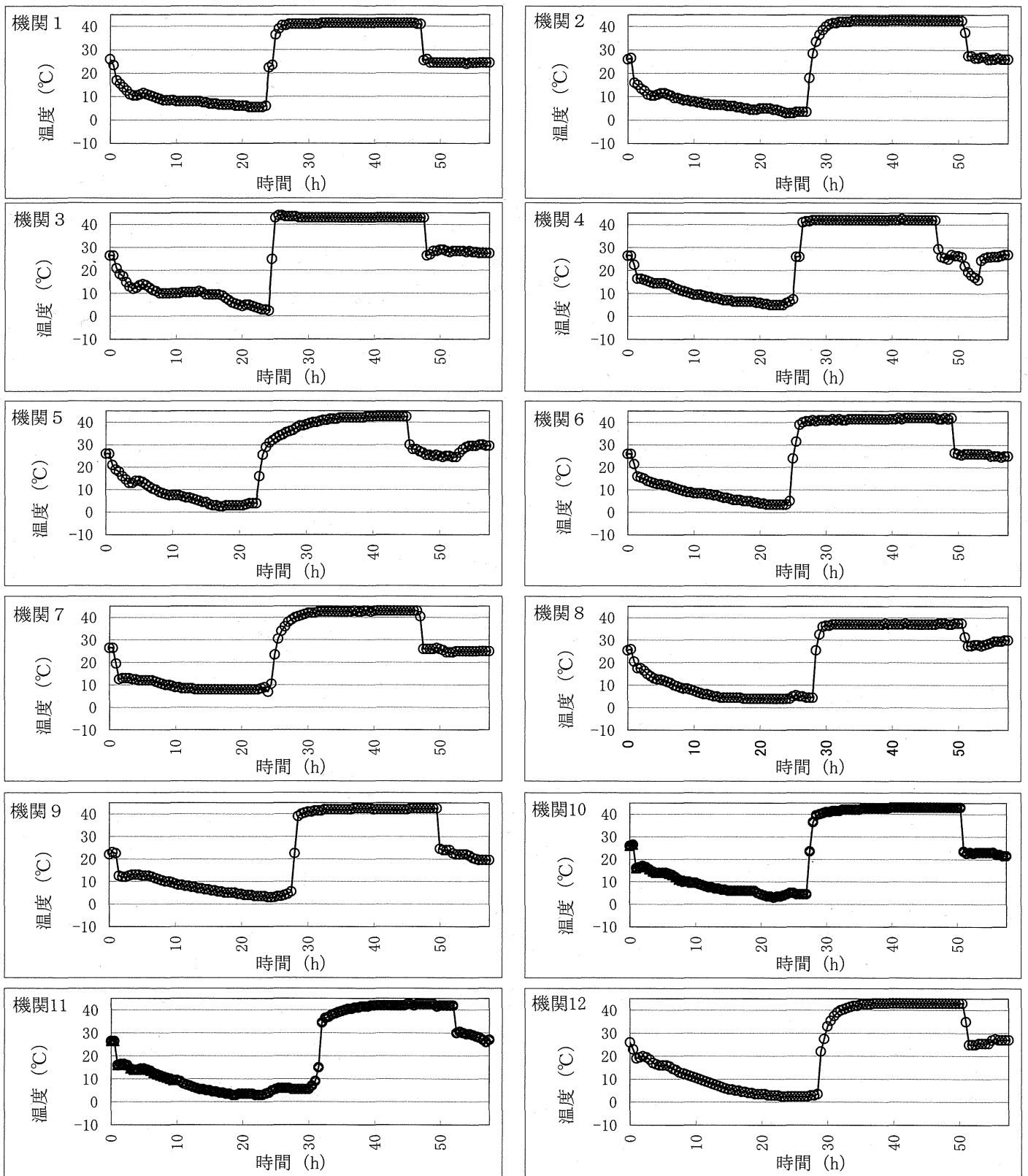


図4 血清群0121・0145接種検体の輸送及び増菌培養における温度変化

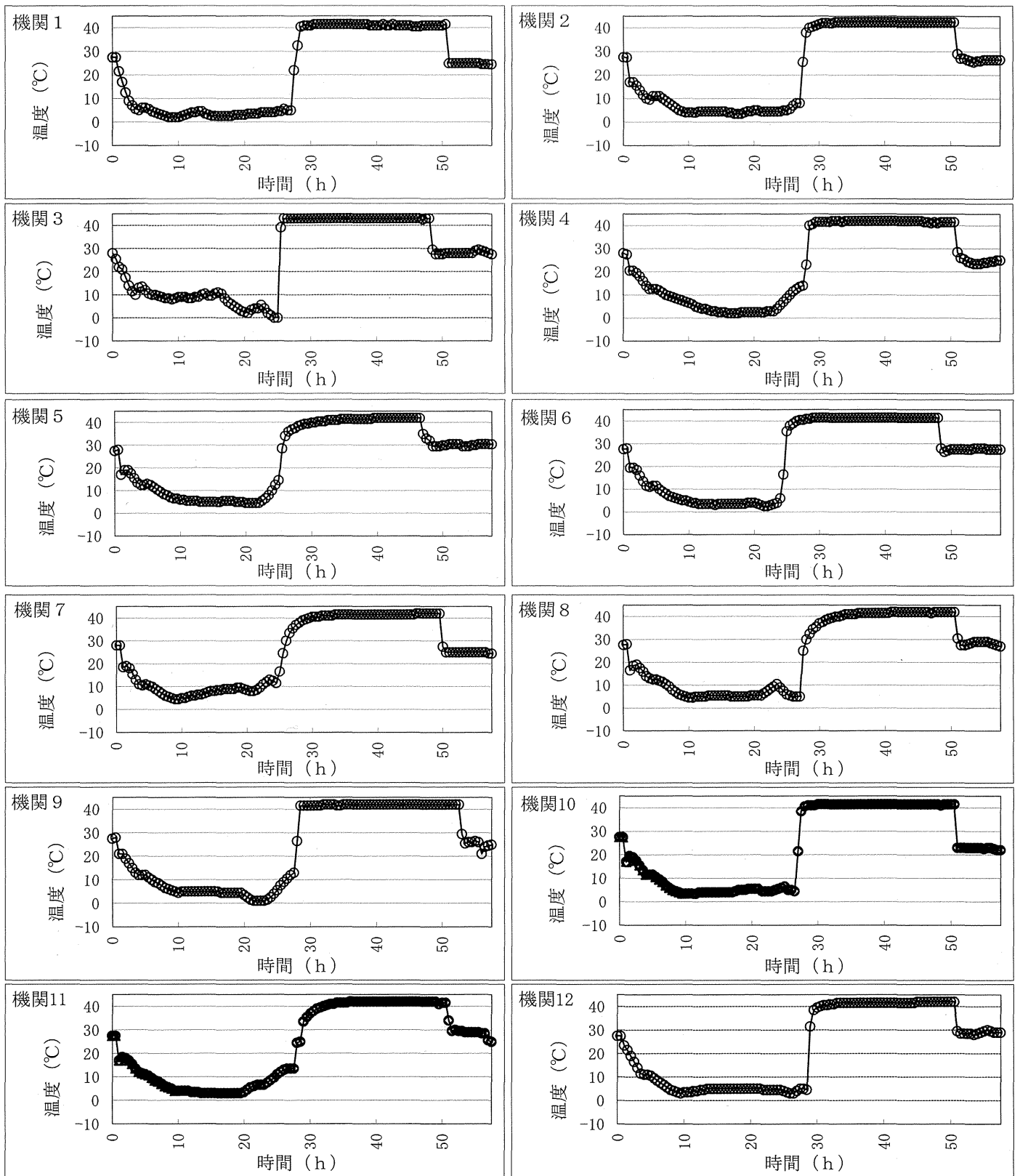


図5 血清群0157接種検体（カイワレダイコン）の輸送及び増菌培養における温度変化

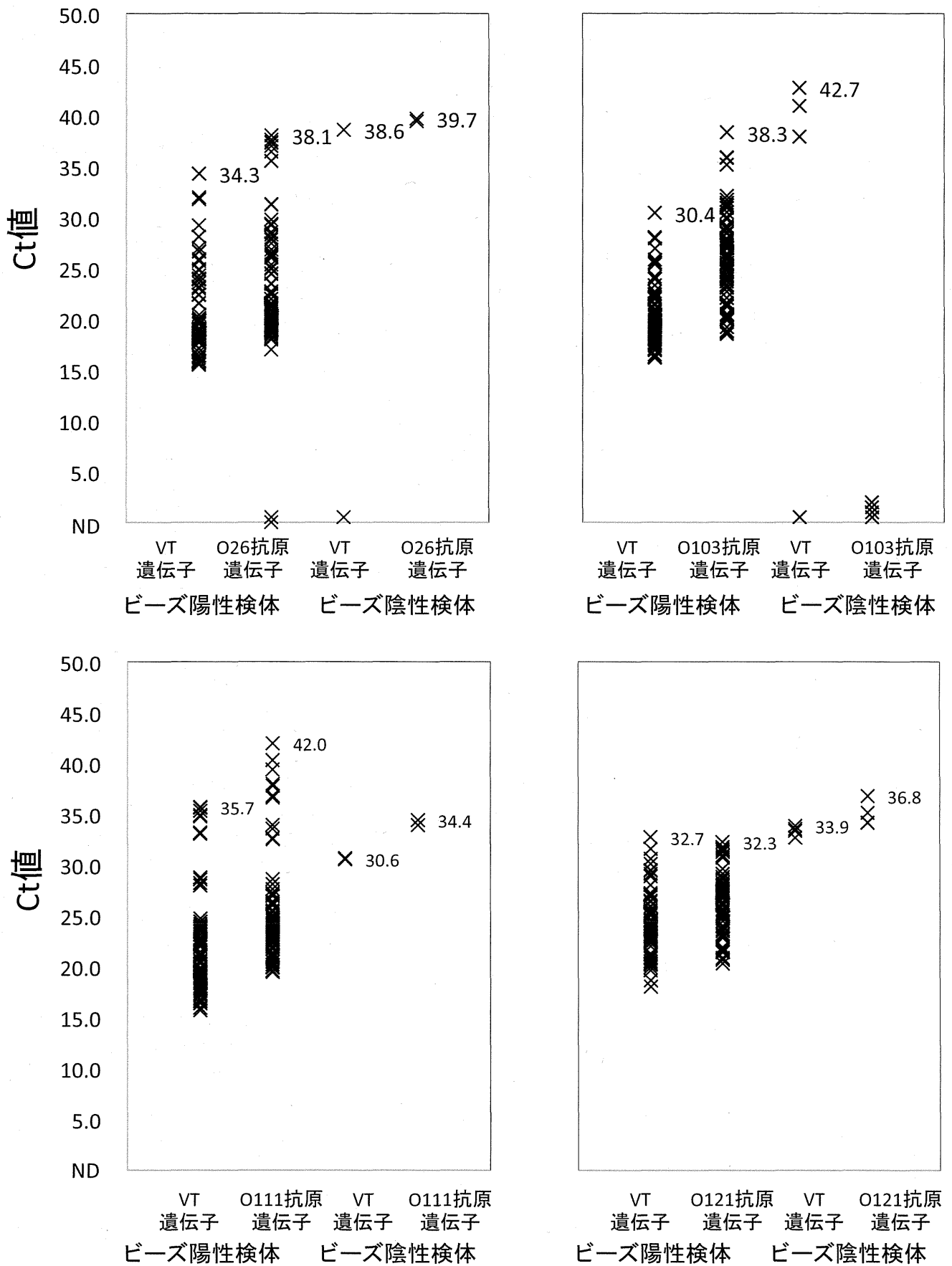


図6-1 免疫磁気ビーズ法での分離結果と遺伝子検出法でのCt値
(血清群O26、O103、O111、O121)

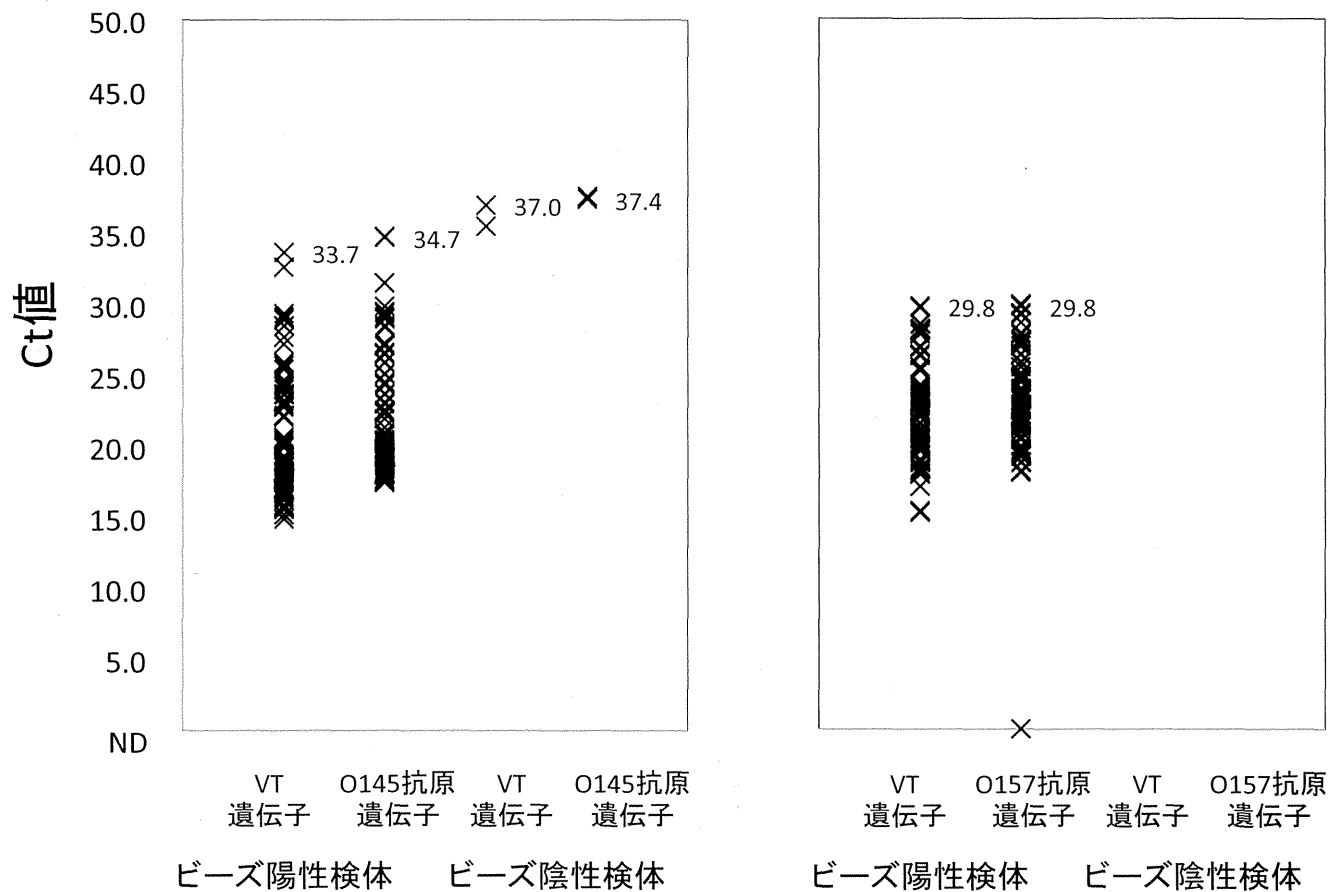


図6-2 免疫磁気ビーズ法での分離結果と遺伝子検出法でのCt値
(血清群O145、O157)

表 1 試験検体における血清群026接種菌数

	8	4	6	6	4	4
	1	6	5	5	8	2
	4	4	3	3	4	4
	6	3	7	6	7	4
平板培地あたりの コロニー数*	5	3	7	3	3	6
	6	2	4	6	7	3
	4	6	4	4	4	6
	7	4	7	2	4	6
	4	4	3	4		
平均 低菌数	4.7					
高菌数	4.7 cfu/25g					
	23.5 cfu/25g					

* 低菌数用接種菌液

表 2 陽性用検体への血清群026接種菌数

機関番号	1	2	3	4	5	6
	6	4	89	17	32	7
	9	8	118	20	29	9
	9	4	102	16	47	14
	5	4	94	15	25	16
平板あたりのコロニー数	6	5	70	14	29	17
	4	5	98	22	43	18
	7	1	81	18	38	19
	9	4	55	16	43	19
	6	4	100	11	36	20
	7	7	111	17	39	20
平均	6.8	4.6	91.8	16.6	36.1	15.9
接種菌数 (cfu/25g)	680	460	918	1700	3600	1600

機関番号	7	8	9	10	11	12
	9	7	85	380	13	66
	10	9	85	337	7	86
	10	9	98	364	6	71
	9	9	84	326	11	88
平板あたりのコロニー数	7	10	85	362	5	81
	13	10	82	403	7	108
	7	10	83	369	7	78
	8	10	93	412	12	82
	8	12	96	418	6	100
	7	14	93	433	9	92
平均	8.8	10.0	88.4	380	8.3	85.2
接種菌数 (cfu/25g)	880	1000	8800	38000	830	8500