

表 31 血清型0145検体でのリアルタイムPCR法によるVT遺伝子の検出結果 (Threshold Line; Auto解析)

機関番号	1			2			3			4			5			6				
検体	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05		
牛挽肉	B1	①	-	-	B1	①	-	-	B1	①	-	-	B1	①	+	+	B1	①	-	-
		②	-	-		②	-	-		②	-	-		②	-	-		②	-	-
	B2	①	+	+	B2	①	+	+	B2	①	+	+	B2	①	+	+	B2	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B3	①	+	+	B3	①	+	+	B3	①	+	+	B3	①	+	+	B3	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
B4	①	-	-	B4	①	+	+	B4	①	-	-	B4	①	-	-	B4	①	-	-	
	②	-	-		②	+	+		②	-	-		②	+	+		②	-	-	②
B5	①	+	+	B5	①	+	+	B5	①	+	+	B5	①	+	+	B5	①	+	+	
	②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+	②
B6	①	+	+	B6	①	+	+	B6	①	+	+	B6	①	+	+	B6	①	+	+	
	②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+	②
カイワレダイコン	B7	①	-	-	B7	①	-	-	B7	①	-	-	B7	①	-	-	B7	①	+	+
		②	-	-		②	-	-		②	-	-		②	+	+		②	+	+
	B8	①	+	+	B8	①	+	+	B8	①	+	+	B8	①	+	+	B8	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B9	①	+	+	B9	①	+	+	B9	①	+	+	B9	①	+	+	B9	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
B10	①	+	+	B10	①	+	+	B10	①	+	+	B10	①	+	+	B10	①	+	+	
	②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+	②
B11	①	+	+	B11	①	+	+	B11	①	+	+	B11	①	+	+	B11	①	+	+	
	②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+	②
B12	①	-	-	B12	①	-	-	B12	①	-	-	B12	①	+	+	B12	①	-	-	
	②	-	-		②	-	-		②	-	-		②	+	+		②	-	-	②
陽性コントロール	①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+		
	②	+	+		②	+		+	②		+	+		②	+		+	②	+	+

機関番号	7			8			9			10			11			12				
検体	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05		
牛挽肉	B1	①	-	-	B1	①			B1	①	-	-	B1	①	-	-	B1	①	-	-
		②	-	-		②				②	-	-		②	-	-		②	+	-
	B2	①	+	+	B2	①			B2	①	+	+	B2	①	+	+	B2	①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B3	①	+	+	B3	①			B3	①	+	+	B3	①	+	+	B3	①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
B4	①	-	-	B4	①			B4	①	-	-	B4	①	-	-	B4	①	-	-	
	②	-	-		②				②	+	+		②	-	-		②	-	-	②
B5	①	+	+	B5	①			B5	①	+	+	B5	①	+	+	B5	①	+	+	
	②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+	②
B6	①	+	+	B6	①			B6	①	+	+	B6	①	+	+	B6	①	+	+	
	②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+	②
カイワレダイコン	B7	①	-	-	B7	①			B7	①	-	-	B7	①	+	+	B7	①	-	-
		②	-	-		②				②	+	+		②	+	+		②	-	-
	B8	①	+	+	B8	①			B8	①	+	+	B8	①	+	+	B8	①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B9	①	+	+	B9	①			B9	①	-	-	B9	①	+	+	B9	①	+	+
		②	+	+		②				②	-	-		②	+	+		②	+	+
B10	①	+	+	B10	①			B10	①	+	+	B10	①	+	+	B10	①	+	+	
	②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+	②
B11	①	+	+	B11	①			B11	①	+	+	B11	①	+	+	B11	①	+	+	
	②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+	②
B12	①	-	-	B12	①			B12	①	+	+	B12	①	-	-	B12	①	-	-	
	②	-	-		②				②	+	+		②	-	-		②	-	-	②
陽性コントロール	①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+		
	②	+	+		②	+		+	②		+	+		②	+		+	②	+	+

高菌数接種
 低菌数接種
 非接種 (ただし、陽性コントロールは除く)

+: 陽性、 -: 陰性 Ct値: 検出サイクル数 ND: 検出されない

表 32 血清型O145検体でのリアルタイムPCR法によるIC遺伝子の検出結果 (Threshold Line; Auto解析)

機関 番号	1			2			3			4			5			6				
	検体 番号	Auto	0.05	検体 番号	Auto	0.05	検体 番号	Auto	0.05	検体 番号	Auto	0.05	検体 番号	Auto	0.05	検体 番号	Auto	0.05		
牛挽肉	B1	①	+	+	B1	①	+	+	B1	①	+	+	B1	①	+	+	B1	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B2	①	+	+	B2	①	+	+	B2	①	+	+	B2	①	+	+	B2	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B3	①	+	+	B3	①	+	+	B3	①	+	+	B3	①	+	+	B3	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B4	①	+	+	B4	①	+	+	B4	①	+	+	B4	①	+	+	B4	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B5	①	+	+	B5	①	+	+	B5	①	+	+	B5	①	+	+	B5	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B6	①	+	+	B6	①	+	+	B6	①	+	+	B6	①	+	+	B6	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
カイワレダイコン	B7	①	+	+	B7	①	+	+	B7	①	+	+	B7	①	+	+	B7	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B8	①	+	+	B8	①	+	+	B8	①	+	+	B8	①	+	+	B8	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B9	①	+	+	B9	①	+	+	B9	①	+	+	B9	①	+	+	B9	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B10	①	+	+	B10	①	+	+	B10	①	+	+	B10	①	+	+	B10	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B11	①	+	+	B11	①	+	+	B11	①	+	+	B11	①	+	+	B11	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B12	①	+	+	B12	①	+	+	B12	①	+	+	B12	①	+	+	B12	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
陽性 コント ロール	①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+		
	②	+	+	②	+	+	②	+	+	②	+	+	②	+	+	②	+	+		

機関 番号	7			8			9			10			11			12				
	検体 番号	Auto	0.05	検体 番号	Auto	0.05	検体 番号	Auto	0.05	検体 番号	Auto	0.05	検体 番号	Auto	0.05	検体 番号	Auto	0.05		
牛挽肉	B1	①	+	+	B1	①			B1	①	+	+	B1	①	+	+	B1	①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B2	①	+	+	B2	①			B2	①	+	+	B2	①	+	+	B2	①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B3	①	+	+	B3	①			B3	①	+	+	B3	①	+	+	B3	①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B4	①	+	+	B4	①			B4	①	+	+	B4	①	+	+	B4	①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B5	①	+	+	B5	①			B5	①	+	+	B5	①	+	+	B5	①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B6	①	+	+	B6	①			B6	①	+	+	B6	①	+	+	B6	①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
カイワレダイコン	B7	①	+	+	B7	①			B7	①	+	+	B7	①	+	+	B7	①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B8	①	+	+	B8	①			B8	①	+	+	B8	①	+	+	B8	①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B9	①	+	+	B9	①			B9	①	+	+	B9	①	+	+	B9	①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B10	①	+	+	B10	①			B10	①	+	+	B10	①	+	+	B10	①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B11	①	+	+	B11	①			B11	①	+	+	B11	①	+	+	B11	①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B12	①	+	+	B12	①			B12	①	+	+	B12	①	+	+	B12	①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
陽性 コント ロール	①	+	+	①			①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+		
	②	+	+	②			②	+	+	②	+	+	②	+	+	②	+	+		

高菌数接種
 低菌数接種
 非接種 (ただし、陽性コントロールは除)

+: 陽性、 -: 陰性 Ct値: 検出サイクル数 ND: 検出されない

表 33 血清型0145検体でのリアルタイムPCR法による0145遺伝子の検出結果 (Threshold Line: Auto解析)

機関番号	1			2			3			4			5			6				
	検体	検体番号	Auto 0.05	検体番号	Auto 0.05	検体番号	Auto 0.05	検体番号	Auto 0.05	検体番号	Auto 0.05	検体番号	Auto 0.05	検体番号	Auto 0.05	検体番号	Auto 0.05			
牛挽肉	B1	①	-	-	B1	①	-	-	B1	①	-	-	B1	①	-	-	B1	①	-	-
		②	-	-		②	-	-		②	-	-		②	-	-		②	-	-
	B2	①	+	+	B2	①	+	+	B2	①	+	+	B2	①	+	+	B2	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B3	①	+	+	B3	①	+	+	B3	①	+	+	B3	①	+	+	B3	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
B4	①	-	-	B4	①	+	+	B4	①	-	-	B4	①	-	-	B4	①	-	-	
	②	-	-		②	+	+		②	-	-		②	-	-		②	-	-	
B5	①	+	+	B5	①	+	+	B5	①	+	+	B5	①	+	+	B5	①	+	+	
	②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+	
B6	①	+	+	B6	①	+	+	B6	①	+	+	B6	①	+	+	B6	①	+	+	
	②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+	
カイワレダイコン	B7	①	-	-	B7	①	-	-	B7	①	+	+	B7	①	-	-	B7	①	-	-
		②	-	-		②	-	-		②	-	-		②	-	-		②	-	-
	B8	①	+	+	B8	①	+	+	B8	①	+	+	B8	①	+	+	B8	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B9	①	+	+	B9	①	+	+	B9	①	+	+	B9	①	+	+	B9	①	-	-
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	-	-
B10	①	+	+	B10	①	+	+	B10	①	+	+	B10	①	+	+	B10	①	+	+	
	②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+	
B11	①	+	+	B11	①	+	+	B11	①	+	+	B11	①	+	+	B11	①	+	+	
	②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+	
B12	①	-	-	B12	①	-	-	B12	①	-	-	B12	①	+	+	B12	①	-	-	
	②	+	+		②	-	-		②	-	-		②	-	-		②	-	-	
陽性コントロール		①	+	+		①	+	+		①	+	+		①	+	+		①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+

機関番号	7			8			9			10			11			12				
	検体	検体番号	Auto 0.05	検体番号	Auto 0.05	検体番号	Auto 0.05	検体番号	Auto 0.05	検体番号	Auto 0.05	検体番号	Auto 0.05	検体番号	Auto 0.05	検体番号	Auto 0.05			
牛挽肉	B1	①	-	-	B1	①			B1	①	-	-	B1	①	-	-	B1	①	-	-
		②	-	-		②				②	-	-		②	-	-		②	-	-
	B2	①	+	+	B2	①			B2	①	+	+	B2	①	+	+	B2	①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B3	①	+	+	B3	①			B3	①	+	+	B3	①	+	+	B3	①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
B4	①	-	-	B4	①			B4	①	-	-	B4	①	-	-	B4	①	-	-	
	②	-	-		②				②	-	-		②	-	-		②	-	-	
B5	①	+	+	B5	①			B5	①	+	+	B5	①	+	+	B5	①	+	+	
	②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+	
B6	①	+	+	B6	①			B6	①	+	+	B6	①	+	+	B6	①	+	+	
	②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+	
カイワレダイコン	B7	①	-	-	B7	①			B7	①	+	+	B7	①	-	-	B7	①	-	-
		②	-	-		②				②	-	-		②	+	+		②	-	-
	B8	①	+	+	B8	①			B8	①	+	+	B8	①	+	+	B8	①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
	B9	①	+	+	B9	①			B9	①	-	-	B9	①	+	+	B9	①	-	-
		②	+	+		②				②	-	-		②	+	+		②	-	-
B10	①	+	+	B10	①			B10	①	+	+	B10	①	+	+	B10	①	+	+	
	②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+	
B11	①	+	+	B11	①			B11	①	+	+	B11	①	+	+	B11	①	+	+	
	②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+	
B12	①	-	-	B12	①			B12	①	-	-	B12	①	-	-	B12	①	-	-	
	②	-	-		②				②	-	-		②	-	-		②	-	-	
陽性コントロール		①	+	+		①				①	+	+		①	+	+		①	+	+
		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+

高菌数接種
 低菌数接種
 非接種 (ただし、陽性コントロールは除く)

+: 陽性、 -: 陰性 Ct値: 検出サイクル数 ND: 検出されない

表34 血清群0145免疫磁気ビーズ法によるコロニー分離結果の合計

		CT-SMAC	CT-クロモアガー-STECC
牛挽肉	接種：低菌数	64/66	66/66
	：高菌数	66/66	66/66
	非接種	4/72	6/34
カイワレダイコン	接種：低菌数	38/72	51/57
	：高菌数	46/66	66/66
	非接種	0/71	0/24

陽性コロニー数／釣菌したコロニー数

表 35 0145の感度と特異性

方法	感度				特異性	
	牛挽肉		カイワレダイコン		牛挽肉	カイワレダイコン
	低菌数 ^a	高菌数 ^a	低菌数	高菌数		
Real-time PCR						
VT遺伝子						
(Threshold ; auto)	1.000 ^b	1.000	0.864	1.000	0.727	0.727
(Threshold ; 0.05)	1.000	1.000	0.864	1.000	0.727	0.727
IC						
(Threshold ; auto)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
(Threshold ; 0.05)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
0145抗原遺伝子						
(Threshold ; auto)	1.000	1.000	0.864	1.000	0.955	0.773
(Threshold ; 0.05)	1.000	1.000	0.864	1.000	0.955	0.773
免疫磁気ビーズ法						
CT-SMAC	1.000	1.000	0.682	0.773	0.909	1.000
CT-クロモアガー-STECC	1.000	1.000	0.818	1.000	0.909	1.000
総合	1.000	1.000	0.818	1.000	0.909	1.000

a 低菌数：5.6 CFU/25g、高菌数：28.0 CFU/25g

b 総検体数に対する陽性検体数の率

表 36 試験検体における血清群0157接種菌数

	牛挽肉		カイワレダイコン		
平板培地あたりの コロニー数*	4	6	4	6	3
	4	1	7	6	7
	2	1	5	5	2
	7	5	6	8	8
	1	4	3	9	6
	6	5	8	3	4
	7	4	4	4	
	1	2	4	9	
	9	9	3	4	
	6	4	5	5	
	1	4	4	7	
	11	5	3	2	
	6	4		1	
	4	5		7	
	4	4		5	
	2	8		3	
	2	5		3	
	5	3		3	
	6	3		1	
	2	5		3	
平均	4.5		4.8		
低菌数	4.5 cfu/25g		4.8 cfu/25g		
高菌数	22.5 cfu/25g		24.0 cfu/25g		

* 低菌数用接種菌液

表 37 陽性用検体への血清群0157接種菌数

牛挽肉						
機関番号	1	2	3	4	5	6
平板あたりのコロニー数	11	4	7	14	15	8
	13	6	4	9	23	8
	7	6	10	18	19	9
	9	7	9	16	11	9
	16	6	7	12	8	9
	9	12	15	13	17	9
	5	10	10	12	15	10
	6	9	16	8	16	12
	7	10	12	13	19	12
8	2	13	14	12	13	
平均	9.1	7.2	10.3	12.9	15.5	9.9
接種菌数 (cfu/25g)	910	720	1030	1300	1600	990
機関番号	7	8	9	10	11	12
平板あたりのコロニー数	8	9	98	73	6	117
	7	10	106	83	8	93
	7	10	98	64	5	110
	10	15	102	47	11	142
	8	16	102	63	5	106
	12	17	102	77	6	126
	8	19	109	76	7	175
	7	19	104	69	4	101
	7	20	100	83	8	152
	10	20	92	65	10	140
平均	8.4	15.5	101.3	70	7	126.2
接種菌数 (cfu/25g)	840	1600	10000	7000	700	13000

カイワレダイコン						
機関番号	1	2	3	4	5	6
平板あたりのコロニー数	6	1	10	31	23	2
	10	0	13	29	20	2
	11	1	10	18	11	2
	5	0	8	30	16	4
	14	0	10	26	18	5
	15	0	11	15	19	5
	12	0	9	30	11	6
	6	1	4	23	24	6
	11	0	3	25	11	8
	12	1	3	18	17	10
平均	10.2	0.4	8.1	24.5	17	5
接種菌数 (cfu/25g)	1000	40	810	2500	1700	500
機関番号	7	8	9	10	11	12
平板あたりのコロニー数	6	12	81	229	6	194
	6	13	88	258	7	204
	7	12	73	263	9	209
	8	20	76	198	6	215
	10	8	87	246	6	220
	9	14	77	256	8	223
	7	16	74	187	8	227
	7	6	73	241	7	227
	7	15	85	195	6	229
	6	19	48	248	7	234
平均	7.3	13.5	76.2	232.1	7	218.2
接種菌数 (cfu/25g)	730	1400	7600	23000	700	22000

表 38 血清型0157検体でのリアルタイムPCR法によるVT遺伝子の検出結果 (Threshold Line; Auto解析)

機関番号	1				2				3				4				5				6				
検体	検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05		
カワレダイコン	A7	①	+	+		A7	①	+	+		A7	①	+	+		A7	①	+	+		A7	①	+	+	
		②	+	+		A7	②	+	+		A7	②	+	+		A7	②	+	+		A7	②	+	+	
	A8	①	+	+		A8	①	+	+		A8	①	+	+		A8	①	+	+		A8	①	+	+	
		②	+	+		A8	②	+	+		A8	②	+	+		A8	②	+	+		A8	②	+	+	
	A9	①	+	+		A9	①	+	+		A9	①	-	-		A9	①	+	+		A9	①	+	+	
		②	+	+		A9	②	+	+		A9	②	-	-		A9	②	+	+		A9	②	+	+	
	A10	①	+	+		A10	①	+	+		A10	①	+	+		A10	①	+	+		A10	①	+	+	
		②	+	+		A10	②	+	+		A10	②	+	+		A10	②	+	+		A10	②	+	+	
	A11	①	+	+		A11	①	-	-		A11	①	-	-		A11	①	+	+		A11	①	-	-	
		②	+	+		A11	②	-	-		A11	②	-	-		A11	②	+	+		A11	②	-	-	
	A12	①	-	-		A12	①	-	-		A12	①	-	-		A12	①	+	+		A12	①	-	-	
		②	-	-		A12	②	-	-		A12	②	-	-		A12	②	+	+		A12	②	-	-	
陽性コントロール	①	+	+			①	+	+			①	+	+			①	+	+			①	+	+		
	②	+	+			②	+	+			②	+	+			②	+	+			②	+	+		

機関番号	7				8				9				10				11				12				
検体	検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05		
カワレダイコン	A7	①	+	+		A7	①	+	+		A7	①				A7	①	+	+		A7	①	+	+	
		②	+	+		A7	②	+	+		A7	②				A7	②	+	+		A7	②	+	+	
	A8	①	+	+		A8	①	+	+		A8	①				A8	①	-	-		A8	①	+	+	
		②	+	+		A8	②	+	+		A8	②				A8	②	-	-		A8	②	+	+	
	A9	①	+	+		A9	①	+	+		A9	①				A9	①	+	+		A9	①	+	+	
		②	+	+		A9	②	+	+		A9	②				A9	②	+	+		A9	②	+	+	
	A10	①	+	+		A10	①	+	+		A10	①				A10	①	+	+		A10	①	+	+	
		②	+	+		A10	②	+	+		A10	②				A10	②	+	+		A10	②	+	+	
	A11	①	-	-		A11	①	-	-		A11	①				A11	①	-	-		A11	①	-	-	
		②	-	-		A11	②	-	-		A11	②				A11	②	-	-		A11	②	-	-	
	A12	①	+	+		A12	①	-	-		A12	①				A12	①	-	-		A12	①	-	-	
		②	-	-		A12	②	-	-		A12	②				A12	②	-	-		A12	②	-	-	
陽性コントロール	①	+	+			①	+	+			①					①	+	+			①	+	+		
	②	+	+			②	+	+			②					②	+	+			②	+	+		

高菌数接種
 低菌数接種
 非接種 (ただし、陽性コントロールは除)

+: 陽性、 -: 陰性 Ct値: 検出サイクル数 ND: 検出されない

表 39 血清型0157検体でのリアルタイムPCR法によるIC遺伝子の検出結果 (Threshold Line; Auto解析)

機関番号	1			2			3			4			5			6				
検体	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05		
カイワレダイコン	A7	①	+	+	A7	①	+	+	A7	①	+	+	A7	①	+	+	A7	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	A8	①	+	+	A8	①	+	+	A8	①	+	+	A8	①	+	+	A8	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	A9	①	+	+	A9	①	+	+	A9	①	+	+	A9	①	+	+	A9	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	A10	①	+	+	A10	①	+	+	A10	①	+	+	A10	①	+	+	A10	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	A11	①	+	+	A11	①	+	+	A11	①	+	+	A11	①	+	+	A11	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	A12	①	+	+	A12	①	+	+	A12	①	+	+	A12	①	+	+	A12	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
陽性コントロール	①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+		
	②	+	+	②	+	+	②	+	+	②	+	+	②	+	+	②	+	+		

機関番号	7			8			9			10			11			12				
検体	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05	検体番号	Auto	0.05		
カイワレダイコン	A7	①	+	+	A7	①	+	+	A7	①			A7	①	+	+	A7	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+
	A8	①	+	+	A8	①	+	+	A8	①			A8	①	+	+	A8	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+
	A9	①	+	+	A9	①	+	+	A9	①			A9	①	+	+	A9	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+
	A10	①	+	+	A10	①	+	+	A10	①			A10	①	+	+	A10	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+
	A11	①	+	+	A11	①	+	+	A11	①			A11	①	+	+	A11	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+
	A12	①	+	+	A12	①	+	+	A12	①			A12	①	+	+	A12	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+
陽性コントロール	①	+	+	①	+	+	①			①	+	+	①	+	+	①	+	+		
	②	+	+	②	+	+	②			②	+	+	②	+	+	②	+	+		

高菌数接種
 低菌数接種
 非接種 (ただし、陽性コントロールは除)

+: 陽性、 -: 陰性 Ct値: 検出サイクル数 ND: 検出されない

表 40 血清型0157検体でのリアルタイムPCR法による0157遺伝子の検出結果 (Threshold Line; Auto解析)

機関番号	1				2				3				4				5				6			
検体	検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05	
カワレダイコン	A7	①	+	+	A7	①	+	+	A7	①	+	+	A7	①	+	+	A7	①	+	+	A7	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	A8	①	+	+	A8	①	+	+	A8	①	+	+	A8	①	+	+	A8	①	+	+	A8	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	A9	①	+	+	A9	①	+	+	A9	①	-	-	A9	①	+	+	A9	①	-	-	A9	①	-	-
		②	+	+		②	+	+		②	-	-		②	+	+		②	+	+		②	-	-
	A10	①	+	+	A10	①	+	+	A10	①	+	+	A10	①	+	+	A10	①	+	+	A10	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+		②	+	+
	A11	①	-	-	A11	①	-	-	A11	①	-	-	A11	①	+	+	A11	①	-	-	A11	①	-	-
		②	-	-		②	-	-		②	-	-		②	+	+		②	-	-		②	-	-
	A12	①	-	-	A12	①	-	-	A12	①	-	-	A12	①	-	-	A12	①	-	-	A12	①	-	-
		②	-	-		②	-	-		②	-	-		②	+	+		②	-	-		②	-	-
陽性コントロール	①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+
	②	+	+	②	+	+	②	+	+	②	+	+	②	+	+	②	+	+	②	+	+	②	+	+

機関番号	7				8				9				10				11				12			
検体	検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05		検体番号	Auto	0.05	
カワレダイコン	A7	①	+	+	A7	①	+	+	A7	①			A7	①	+	+	A7	①	+	+	A7	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
	A8	①	+	+	A8	①	+	+	A8	①			A8	①	-	-	A8	①	+	+	A8	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②				②	-	-		②	+	+		②	+	+
	A9	①	+	+	A9	①	+	+	A9	①			A9	①	+	+	A9	①	+	+	A9	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
	A10	①	+	+	A10	①	+	+	A10	①			A10	①	+	+	A10	①	+	+	A10	①	+	+
		②	+	+		②	+	+		②				②	+	+		②	+	+		②	+	+
	A11	①	-	-	A11	①	-	-	A11	①			A11	①	-	-	A11	①	-	-	A11	①	-	-
		②	-	-		②	-	-		②				②	-	-		②	-	-		②	-	-
	A12	①	-	-	A12	①	-	-	A12	①			A12	①	-	-	A12	①	-	-	A12	①	-	-
		②	-	-		②	-	-		②				②	-	-		②	-	-		②	-	-
陽性コントロール	①	+	+	①	+	+	①			①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+	①	+	+
	②	+	+	②	+	+	②			②	+	+	②	+	+	②	+	+	②	+	+	②	+	+

高菌数接種
 低菌数接種
 非接種 (ただし、陽性コントロールは除)

+: 陽性、 -: 陰性 Ct値: 検出サイクル数 ND: 検出されない

表 41 血清群0157免疫磁気ビーズ法によるコロニー分離結果の合計

		CT-SMAC	CT-クロモアガー-STECC
牛挽肉	接種：低菌数	70/74	68/74
	：高菌数	74/74	72/74
	非接種	2/42	0/27
カイワレダイコン	接種：低菌数	58/63	59/63
	：高菌数	71/72	72/72
	非接種	0/36	0/18

陽性コロニー数/釣菌したコロニー数

表 42 0157の感度と特異性

方法	感度				特異性 カイワレダイコン
	牛挽肉		カイワレダイコン		
	低菌数 ^a	高菌数 ^a	低菌数	高菌数	
Real-time PCR					
VT遺伝子					
(Threshold ; auto)	1.000 ^b	1.000	0.833 ^b	1.000	0.792
(Threshold ; 0.05)	1.000	1.000	0.833	1.000	0.792
IC					
(Threshold ; auto)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
(Threshold ; 0.05)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
0157抗原遺伝子					
(Threshold ; auto)	1.000	1.000	0.833	1.000	0.875
(Threshold ; 0.05)	1.000	1.000	0.833	1.000	0.875
免疫磁気ビーズ法					
CT-SMAC	0.958	1.000	0.833	1.000	1.000
CT-クロモアガー-STECC	1.000	1.000	0.833	1.000	1.000
総合	1.000	1.000	0.833	1.000	1.000

a 牛挽肉は低菌数：4.5 CFU/25g、高菌数：22.5 CFU/25g、
カイワレダイコンは低菌数：4.8 CFU/25g、高菌数：24 CFU/25g

b 総検体数に対する陽性検体数の率

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

腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討

研究要旨

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、増菌レベルを確認することが重要である。また、遺伝子スクリーニングとして本研究での PCR 法は優れていたが、今後、検出感度を明確にする必要がある。さらに、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。分離培地に付いては、CT 添加の培地では分離が難しいことが示され、腸管毒素原性大腸菌の分離に優れる選択剤を明らかにすることが求められる。今後、これらの点を多数の株を用いて検討することが必要である。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所 高田 薫

A. 研究目的

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が少な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（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 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157」）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

毒素原生大腸菌を接種した食品を供試して検出性を検討した。

1. 接種菌液

毒素原生大腸菌株（ESC 68）をトリプティック・ソイ・ブロス（TSB、オキシイド）10 mL にて 37°C にて 18 時間培養した（約 1.0×10^9 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。接種

菌数測定のために、 10^{-6} 菌液 0.1 mL を 10 枚のトリプティック・ソイ・アガー培地 (TSA) に塗抹した後に、 37°C にて 18~24 時間培養し、コロニー数を計測した。

2. 検体への菌接種

供試検体として、牛挽肉 (国産品)、カイワレダイコン (国産品) 25 g をストマッカー袋に入れ、接種菌液 0.1 mL (10^{-5} : 1000 cfu、 10^{-6} : 100 cfu、 10^{-7} : 10 cfu) を接種した。食品検体への接種は、牛挽肉 3 検体 (10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 接種菌液の接種)、カイワレダイコン 3 検体 (10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 接種菌液の接種) の合計 6 検体とした。菌を接種した後、ストマッカー袋の外側から手でなじませ、modified EC 培地 (mEC、日水) 225 mL を加え、ストマッカー処理を 1 分間行った後、 42°C にて 22 時間培養した。

3. 菌の分離と DNA 抽出

検体培養液をソルビトールマッコニキー培地 (SMAC, オキシイド)、セフィキシム・亜テルル酸加 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を精製水に浮遊させ、 100°C で 10 分間加熱し冷却後、遠心し上清 ($10,000\times g$ 、10 分間) を ST 遺伝子および LT 遺伝子の PCR 法に供した。

4. 食品培養液からのアルカリ熱抽出法による DNA 抽出

培養液 0.1 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 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 ($10,000\times g$ 、10 分間) し、ST 遺伝子および LT 遺伝子の PCR 法に供した。

5. ST 遺伝子および LT 遺伝子の PCR 法

Stacy-Phipps らの方法 (J Clin Microbiol. 1995. 33:1054-1059) を参照して PCR を実施した。

ST 遺伝子 PCR 反応組成 (1 反応あたり) :

10 \times ExTaq buffer 5 μl 、dNTP mixture 4 μl 、Primer ST1 (10 pmol/ μl) 1 μl 、Primer ST2 (10 pmol/ μl) 1 μl 、Ex Taq 0.3 μl 、D. W. 33.7 μl

LT 遺伝子 PCR 反応組成 (1 反応あたり) :

10 \times ExTaq buffer 5 μl 、dNTP mixture 4 μl 、Primer LT1 (10 pmol/ μl) 1 μl 、Primer LT2 (10 pmol/ μl) 1 μl 、Ex Taq 0.3 μl 、D. W. 33.7 μl

PCR 反応系 (両遺伝子共通) : 50°C 2 min、 95°C 5 min、[95°C 45 sec、 50°C 1 min、 72°C 1 min] 40 cycles、 72°C 7 min

ST 遺伝子増幅産物 (190 bp) および LT 遺伝子増幅産物 (450 bp) を 3% アガロースゲル (NuSieve 3:1) での電気泳動法にて確認した。

C. 研究結果

1. 接種菌液の菌数

接種菌液である 10^{-6} 菌液 0.1 mL を 10 枚の TSA に塗抹し培養した際のコロニー数は 67、101、81、77、82、97、97、81、85、85 であり、その平均は 85.3 であった。接種菌液の原液の菌濃度は 8.5×10^8 cfu/ml と算出され、 10^{-5} 菌液 0.1 mL 接種では 850 cfu、 10^{-6} 菌液 0.1 mL 接種では 85 cfu、 10^{-7} 菌液 0.1 mL 接種では 8.5 cfu が 1 検体に接種されたことと算出された。

2. 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

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(図1、表2)。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(図1、表2)。 10^{-6} 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。

3. 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(表1)。ただし、最も接種菌数の少ない 10^{-7} 菌液では両遺伝子ともに大腸菌と思われる3コロニーのうち1コロニーのみで検出された。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

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(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026、0103、0111、0121、0145及び0157」)とあわせることを考え、mECでの42°C培養を検討した。また、その増菌培養液を遺伝子スクリーニングすることによって菌の分離を行うべき検体を限定することによる試験の効率性を考えた。なお、遺伝子スクリーニングの対象には、腸管毒素原性大腸菌の病原因子である ST と LT の遺伝子とした。牛挽肉検体25gに8.5、85および850 cfu の腸管毒素原性大腸菌を接種して mEC で42°C

にて培養したところ、いずれも場合も増菌培養液から ST 遺伝子および LT 遺伝子が検出され、本増菌培養法が適切であることが示された。カイワレダイコン検体での同試験では、8.5 cfu の接種検体では両遺伝子とも検出されなかった。85 および 850 cfu の接種検体では両遺伝子が検出されたが、85 cfu 接種の ST 遺伝子では増幅産物が不明瞭であった。しかし、両食品種において25g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 10^4 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。

予備実験にて、本研究で用いた腸管毒素原性大腸菌は CT に感受性があることを確認していたが、食品由来の夾雑菌が多い中では CT 添加の培地でも本菌が生育する可能性を考えて大腸菌の弱選択培地である SMAC およびそれに CT を添加した強選択培地である CT-SMAC を用いて、増菌培地からの菌の分離を検討した。その結果、牛挽肉については8.5、85 および 850 cfu 接種のいずれにおいても SMAC において腸管毒素原性大腸菌が検出された。CT-SMAC では ST 遺伝子を指標とした場合は検出されておらず、LT 遺伝子についても不明瞭な増幅産物の傾向であり、分離培地としては SMAC の方が適切と考えられた。しか

し、カイワレダイコンではいずれの接種菌数でも SMAC および CT-SMAC とともに検出されなかった。増菌培養液での PCR の結果から、85 および 850 cfu 接種では腸管毒素原性大腸菌が増殖していることが分かっており、分離できないことは SMAC 上での夾雑菌の生育が牛挽肉よりも旺盛であるためであることが推察される。今後、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

本研究の結果から、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、増菌レベルを確認することが重要である。また、遺伝子スクリーニングとして本研究での PCR 法は優れていたが、今後、検出感度を明確にする必要がある。

さらに、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。分離培地に付いては、CT 添加の培地では分離が難しいことが示され、腸管毒素原性大腸菌の分離に優れる選択剤を明らかにすることが求められる。今後、これらの点を多数の株を用いて検討することが必要である。

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

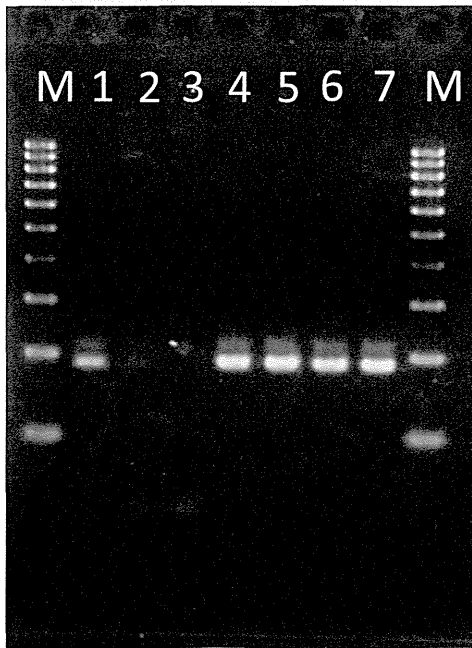
表 1 ST 遺伝子および LT 遺伝子の PCR 法による検出結果

検体名	接種菌液希釈段	接種菌数 (cfu/25g)	食品培養液		分離コロニー			
			ST 遺伝子	LT 遺伝子	SMAC		CT-SMAC	
					ST 遺伝子	LT 遺伝子	ST 遺伝子	LT 遺伝子
牛挽肉	10 ⁻⁷	8.5	+	+	1/3	1/3	0/3	1/3
	10 ⁻⁶	85	+	+	3/3	3/3	0/3	3/3 ^{※1}
	10 ⁻⁵	850	+	+	3/3	3/3	0/3	2/3 ^{※1}
カイワレダイコン	10 ⁻⁷	8.5	- ^{※1}	-	0/3	0/3	0/3	0/3
	10 ⁻⁶	85	+ ^{※1,2}	+	0/3	0/3	0/3	0/3
	10 ⁻⁵	850	+	+	0/3	0/3	0/3	0/3

※1: バンドが明確でなかったため、再試験を行い、その結果を記入した。

※2: バンドが薄かった。

ST遺伝子



M: マーカー(100 bpラダー)

1: カイワレ大根 10^{-5} 接種菌液(850 cfu接種)

2: カイワレ大根 10^{-6} 接種菌液(85 cfu接種)

3: カイワレ大根 10^{-7} 接種菌液(8.5 cfu接種)

4: 牛挽肉 10^{-5} 接種菌液(850 cfu接種)

5: 牛挽肉 10^{-6} 接種菌液(85 cfu接種)

6: 牛挽肉 10^{-7} 接種菌液(8.5 cfu接種)

7: コントロール株(ESC68)

M: マーカー(100 bpラダー)

LT遺伝子

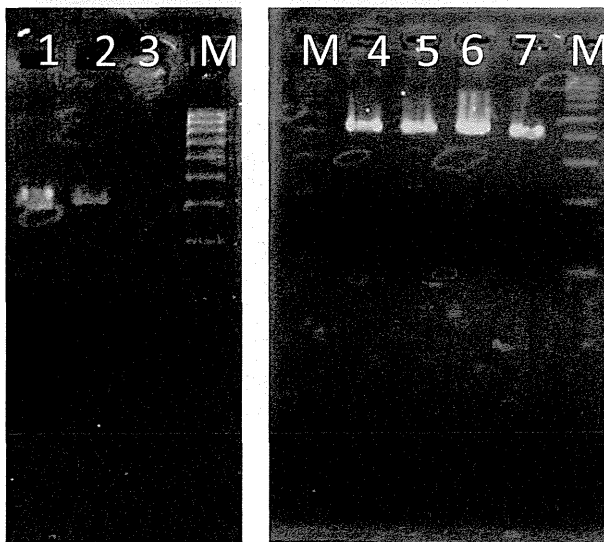


図1 食品培養液からのST遺伝子およびLT遺伝子の検出結果

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からの病原微生物検査の開発に関する研究
研究者代表 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

（病原大腸菌の網羅的検出手法の検証および同手法による汚染源調査）

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

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、24・25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（～73%）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%）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100%に達し、ウシで95%、ブタでも～83%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	岡畑一幸 兵庫県食肉衛生検査センター
張 少博 大阪市立大学大学院生活科学研究科	鈴木雅和 兵庫県食肉衛生検査センター
鄭 冬明 大阪市立大学大学院生活科学研究科	若林明世 兵庫県食肉衛生検査センター
李 茂 大阪市立大学大学院生活科学研究科	長谷 篤 大阪市立環境科学研究所
王 麗麗 大阪市立大学大学院生活科学研究科	小笠原準 大阪市立環境科学研究所
坂 瑛里香 大阪市立大学大学院生活科学研究科	中村寛海 大阪市立環境科学研究所
松崎壮宏 大阪市立大学大学院生活科学研究科	佐伯厚記 大阪市食肉衛生検査所
藤原佐美（独）国立病院機構大阪南医療センター	前原智史 大阪市食肉衛生検査所

A. 目的

大腸菌(*Escherichia coli*)は、恒温動物の腸内に広く分布しており、ヒトにおいても出生と同時に腸管内へと急速に広がり常在菌として定着する(1)。しかしながら、大腸菌の一部には特殊な病原因子によって人に下痢症を起こすものがあり、行政的には病原大腸菌、学術的には下痢原性大腸菌(Diarrheagenic *E. coli*, 以後 DEC と略す)と呼ばれる。

DECは、その病原機構に基づいて①腸管病原性大腸菌(Enteropathogenic *E. coli*, EPEC)、②腸管毒素原性大腸菌(Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)、③志賀毒素産生性大腸菌(Shiga toxin-producing *E. coli*; STEC)、④腸管侵入性大腸菌(Enteroinvasive *E. coli*, EIEC)、以上4群に長らく大別されてきたが、2012年1月からは⑤腸管凝集接着性大腸菌(Enterocoagulative *E. coli*, EAEC)、も DEC に認定された。他にも分散接着性大腸菌(Diffusely adherent *E. coli*, DAEC)、細胞膨化致死毒素産生性大腸菌(CTEC)、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(EAST1EC)、細胞剥脱性大腸菌(CDEC)など、新たな DEC の候補とされるサブグループが複数存在する。

食中毒事件の調査に際しては、これらすべてを調査対象に含めることが望ましいとされるが、DEC と常在大腸菌を識別することは極めて難しく、培養法を中心とする日常的な検査業務では看過されがちである。我々は、これら DEC の多くを網羅的に検出する方法として、マルチプレックス・リアルタイム PCR 法を適用した増菌培養液のスクリーニング手法(2)と、スクリーニングで陽性と判定された検体から DEC を的確に釣菌分離する手法として疎水性格子膜(HGMF)を用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法(HGMF-CH法)を開発した(3)。

本研究は、上記の手法を用いてヒト、家畜、食肉等における各種病原大腸菌の汚染実態

を調査し、ヒト病原大腸菌の汚染源を推定することで効率的かつ的確な予防措置に資する情報提供を目的とする。

昨年度は、上記のマルチプレックス・リアルタイム PCR 法を適用した増菌培養液のスクリーニング手法と、スクリーニングで陽性と判定された検体から DEC を的確に釣菌分離する HGMF-CH 法の併用が、ヒト、家畜、食肉等から各種 DEC を網羅的に検出する上で有用であることを報告し、検出された EPEC 株の分子疫学解析を実施した。その結果、ヒト下痢症患者から分離される EPEC は主としてウシに由来し、健康者の EPEC はヒトからヒトへと広がっている可能性を示唆することができた。

今年度は、これまでデータの少なかった食用鶏の DEC 保菌実態を調査するとともに、ヒト ETEC の汚染源としての家畜の役割を分子疫学的に検討することを第一目的として、患者、健康者、そして以前に当研究室が実施した調査で ETEC 保菌率の高かったブタを中心にできるだけ多くの試料を収集しリアルタイム PCR によるスクリーニングを試みた。陽性と判定された検体からの菌分離には HGMF-CH 法を用いた。

B. 方法

1. 供試検体

平成 24~26 両年度にわたり国立病院機構大阪南医療センターから搬入された下痢症患者便 670 検体、大阪市立環境科学研究所から提出された健康者便 363 検体、平成 25 年度から提供開始された兵庫県食肉衛生検査センターの食用鶏の盲腸便 260 検体とブタの便 140 検体、および大阪市食肉衛生検査所から提供されたブタ便 290 検体、合計 1723 検体を検査に供した。

解析にあたっては、本調査研究に先立って大阪市内の食品店から購入、あるいは大阪市中央卸売市場食品衛生検査所から提供され

ていた各種食品検体 333 件、大阪市食肉衛生検査所から提供された家畜糞便 227 検体（ウシ 109 頭、ブタ 118 匹）、および大阪市立環境科学研究所から提供された健康者便 119 検体、合計 679 検体(4)の調査結果を合わせた。総計 2402 検体である。

2. 増菌培養法

BGLB ブイヨンあるいは EC ブイヨンで増菌された後に提供された検体も調査の対象として加えたが、食品の増菌培養には基本的に FDA の二段培養法を用い、以下の手順で実施した。

滅菌ストマフィルター（GSI クレオス、東京）に検体を無菌的に約 10 g とり、システム・ダイリユーター（GSI クレオス）を用いて BHI を 10 倍希釈量加えた。マスティケーター（GSI クレオス）を用いて 90 秒間よく混和させ、37°C 3 時間静置した。培養後、フィルターを通して残渣を除きながら別の滅菌ストマフィルター（GSI クレオス）に移し、再びシステム・ダイリユーターを用いて等量のトリプトン・フォスフェート・ブイヨンを加え、混和させてから 44°C の水浴で 20 時間培養した。培養後のサンプル液は、トリコロール寒天平板に画線塗抹し、37°C 一晚培養して大腸菌および大腸菌群の有無を調べた。

糞便検体はブレインハートインヒュージョン・ブイヨンに接種して 42°C で 20 時間増菌培養したものを試料とした。

3. DNA 抽出

増菌済みの培養液から菌体を回収、PUREGENE Cell and Tissue DNA Isolation kit（Genra Systems, Minnesota, USA）を用いて以下の手順で DNA を抽出した。

1) 500 μ l の菌懸濁液（TSB, 37°C 18 時間培養, 約 109cfu/ml）を 1.5ml マイクロチューブにとり、15,000 \times g で 5 分間遠心し、上清を取り除いた。

2) 300 μ l の Cell Lysis Solution を加え、ピペティングして沈殿とよく混合し 80°C 5 分インキュベートした。

3) さらに、ときどき転倒混和しながら 37°C で 30 分インキュベートした。1 分間氷上に置き室温に戻し、軽く遠心して壁に付着した試薬等を落とした。

4) 100 μ l の Protein Precipitation Solution を加え、ボルテックスでハイスピード 20 秒間激しく混和した。

5) タンパク質の沈殿を強固なペレットにするため、15,000 \times g で 4 分間遠心した。

6) 上清を 300 μ l の 100%イソプロパノール(2-Propanol；和光純薬工業)が入った新しい 1.5ml チューブに移し、穏やかに 50 回転倒混和した。

7) 15,000 \times g で 1 分間遠心し、ペーパーの上に上清を捨て、300 μ l の 70%エタノール(v/v)を加えて数回転倒させ DNA を洗浄した。

8) さらに 15,000 \times g で 1 分間遠心し、エタノールを注意深く捨て、ペーパーの上にチューブを伏せてペレットを乾燥した。

9) 50 μ l の DNA Hydration Solution を加え、65°C 1 分間インキュベートまたは室温で一晚静置し、途中数回タッピングを行った。DNA は -20°C で保存した。10 target enterovirulence genes (*eae*, *stx1*, *stx2*, *elt*, *est* for STh, *est* for STp, *virB*, *aggR*, *astA*, and *afaB*) using our multiplex real-time PCR method (2)

4. リアルタイム PCR によるスクリーニング

リアルタイム PCR は *stx* (Stx1・Stx2)・*eae* トリプレックス、*stx1*・*stx2* デュプレックス、*est* (STp・STh)・*elt* トリプレックス、*est* (STp)・*est* (STh)デュプレックス、*aggR*・*astA* デュプレックス、*virB*・*afaB* デュプレックスの組み合わせで行なった。リアルタイム PCR で使用した *afaB* プライマーおよびプローブは、Afa/Dr+の DAEC が持つ *afaB* のみを標的とする。

単一のプライマーを使用する際は Realtime PCR Master Mix (東洋紡)を, マルチプレックスの場合は QuantiTect Multiplex PCR kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)を使用した. 用いたプライマーやプローブの詳細は先に報告したとおりである(2).

PCR 反応液は 96 ウェルプレート (B-96-AB-RT; イナ・オプティカ, 大阪) に分注し, テンプレート DNA 2 μ l を添加した. プレートは ThermalSeal RT film (50 μ m-thick; EXCEL Scientific, California, USA) でシールし, Optical Adhesive Cover (ABI) で覆った. PCR 条件は, Realtime PCR Master Mix (東洋紡) の場合は, 95°C 1 分の熱変性ステップの後, 95°C 15 秒, 60°C 1 分を 40 サイクル行い, QuantiTect Multiplex PCR kit (Qiagen GmbH) の場合は, 始めの熱変性を 95°C 15 分行い, 95°C 1 分, 60°C 1 分を 40 サイクル行った.

リアルタイム PCR 装置は ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (ABI) を使用し, 添付のプロトコールに従い PCR およびデータ解析を行なった.

5. HGMF-CH 法

リアルタイム PCR によるスクリーニングによって DEC 陽性と判定された増菌培養液には先に報告済みの HGMF-CH 法(3)を適用し DEC の分離を試みた.

1) HGMF Spreadfilter (Filtaflex Ltd., Almonte, Canada) にセットした Iso-Grid HGMF (QA Lifesciences Inc., San Diego, CA, USA) 上に PCR で陽性と判定された増菌培養液 1 ml を載せ, 全面に広げ, その後 HGMF Spreadfilter を用いてろ過した. HGMF をマッコンキー寒天培地もしくはトリプトソーヤ寒天培地上に置き 37°C で一夜培養した.

2) 培養後の HGMF を原本とし, 生じたコロニーを Microbial Colony Replicator (Filtaflex Ltd.) を用いて新しい HGMF に必要枚数転写し培養することでコピーを作製した.

3) 前処理液 (5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 [pH 6.0], 100 mM 重炭酸ナトリウム, 0.0066% ポリエチレンイミン) を含ませたワットマン 3MM ろ紙 (GE ヘルスケア, 東京) の上に複製培養した HGMF を置き, 室温で 30 分反応させた.

4) 余剰の液を除き 10 分間乾燥させてから, 溶菌液 (70% エタノール水溶液に水酸化ナトリウムを 150 mM 溶解) を HGMF 1 枚あたり 3 ml 含ませたワットマンろ紙上に置き, 電子レンジで 30 秒間加熱した.

5) 加熱処理後の HGMF を Proteinase-K (和光純薬) を 0.01%, SDS を 0.1% 加えた 20 ml の 2 \times SSC に浸し最低 1 時間 37°C の温浴中で反応させた. その後, 0.1% SDS 加 2 \times SSC で 5 分間洗浄, さらに 2 \times SSC (50 ml/HGMF) で 5 分間洗浄した. キムワイプで HGMF を拭き, 分解された菌体の残渣を除去した.

6) HGMF をペーパータオル上に置き 30 分間自然乾燥させた. その後, クロスリンカーを用いて 120 mJ の UV 照射により DNA を HGMF に固定した.

7) 非特異的な反応を抑えるためにハイブリダイゼーション・バッグ (Roche Diagnostics) に HGMF と 6 ml DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics) を入れ, 39°C で 1 時間 振盪してから, 10 μ l の DIG-probe を加えた新しい DIG Easy Hyb 6 ml に置換した. その後, 39°C で 24 時間 振盪した.

8) DIG-probe の結合を可視化するために DIG Wash and Block Buffer Set で HGMF を処理した. その後, 抗 DIG 抗体溶液と, BCIP (375 μ g/ml) および NBT (188 μ g/ml) を溶かした検出液 (Roche Diagnostics) を用いて酵素抗体法の原理に基づき発色させた.

9) HGMF 上の 1600 の升目の中で, 抗 DIG 抗体に反応して発色した枡を調べ, これに該当する HGMF 原本上の枡のコロニーをマッコンキーに画線培養し, 生じたコロニーを鈹菌して純培養を得た. これを再度 PCR して目