

201426010B

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

平成24～26年度 総合研究報告書

研究代表者 工藤 由起子

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成27(2015)年3月

目 次

I. 総合研究報告書

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 . . . 3

工藤 由起子

II. 総合研究分担研究報告書

1. 腸管出血性大腸菌の血清群解析および検査法への応用の検討 23

大西 真

2. 病原大腸菌の統括的検査法の開発 35

工藤 由起子

3. 病原大腸菌の分布および病原性解析 53

西川 禎一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 71

I. 総 合 研 究 報 告 書

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

工藤 由起子

平成24～26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

総合研究報告書

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所・細菌第一部

西川禎一 大阪市立大学大学院生活科学研究科

研究要旨

食品中の病原大腸菌（下痢原性大腸菌）の検査法を開発するために、（1）腸管出血性大腸菌の血清群解析および検査法への応用の検討、（2）病原大腸菌の統括的検査法の開発、（3）病原大腸菌の分布および病原性解析、を行った。

（1）腸管出血性大腸菌の血清群解析および検査法への応用の検討を行った結果、国内でヒトから分離された株は、分離頻度の高い順に0157、026、0145、0103、0121、0111、091、0165であり、重症者由来株としては、上記の8血清群のうち091を除く7血清群であったため、それらについてのマルチプレックスPCR検出系を開発した。患者便からの検出を検討した結果、少なくとも0157、0165の抗原遺伝子、*stx2*、*eae*について応用可能であることが明らかとなった。主要7血清群以外についても0抗原遺伝子が同定できれば、特異的な免疫磁気ビーズを用いた菌分離が可能であり、実際に*stx2*、*eae*陽性の076のHUS症例が検出された。（2）病原大腸菌の統括的検査法の開発の研究を行った結果、日本での主要な血清群である0157、026、0111、0103、0145および0121の6血清群を流通食品や食中毒等原因食品調査の試験の対象にすることが国内の食品での効果的な検査になるものと思われた。また、重症者の発生の割合の多い血清群0165を国内での食中毒対応の対象として、海外（特に、米国）での患者発生の多い血清群045を輸入食品検疫の対象として試験を行うことも有用と考えられた。また、VT遺伝子検査法の本研究での検討結果をもとに通知法にあるVT遺伝子スクリーニングを改訂に貢献した（平成24年12月17日食安監発1217第1号「腸管出血性大腸菌026、0111及び0157の検査法について」）した。さらに、血清群026、0103、0111、0121、0145および0157特異的遺伝子を対象とした食品での検出法の具体的な条件を明らかにした。また、多血清群株を試し、選択剤を添加した複数種類の酵素基質培地にて特徴を有する発色性によって対象血清群を一括または鑑別した分離が可能であること、新規に開発された0103、0121、0145に対する免疫磁気ビーズの回収率を検討し優れた濃縮効果が明らかになった。最終的に、多機関によるコラボレイティブ・スタディによる評価を実施し食品での検査法の通知に貢献した（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026、0103、0111、0121、0145及び0157」）。また、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℃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。（3）病原大腸菌の分布および病原性解析の研究を行った結果、腸管病原性大腸菌は腸管出血性大腸菌よりもはるかに高い率で家畜から家禽にいたるまで分布することが判明し、腸管毒素原性大腸菌の分子疫学指標はウシ由来株と患者由来株の関連を示しており、ブタや健康者の分離株は下痢原性が低い可能性が示唆された。

研究協力者

伊豫田 淳	国立感染症研究所・細菌第一部
井口 純	宮崎大学・IR 推進機構
張 少博	大阪市立大学大学院生活科学研究科
鄭 冬明	大阪市立大学大学院生活科学研究科
李 茂	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
岡畑一幸	兵庫県食肉衛生検査センター
鈴木雅和	兵庫県食肉衛生検査センター
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
佐伯厚記	大阪市食肉衛生検査所
前原智史	大阪市食肉衛生検査所
木太雅俊	大阪市食肉衛生検査所
齊藤志保子	秋田県健康環境センター
岩渕香織	岩手県環境保健研究センター
菊地理慧	福島県衛生研究所
大塚佳代子	埼玉県衛生研究所
小西典子	東京都健康安全研究センター
甲斐明美	東京都健康安全研究センター
牧島満利子	杉並区衛生試験所
山崎匠子	杉並区衛生試験所
古川一郎	神奈川県衛生研究所
榎原広里	静岡県環境保健研究所
鈴木史恵	静岡県環境保健研究所
富田敦子	静岡県環境保健研究所
金谷潤一	富山県衛生研究所
磯部順子	富山県衛生研究所
永井佑樹	三重県保健環境研究所
楠原 一	三重県保健環境研究所
増田加奈子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
山田裕子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
坂本 綾	広島市衛生研究所
田内敦子	広島市衛生研究所
林 昭宏	横浜検疫所 輸入食品・検疫検査センター
上田泰史	神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター
稲垣俊一	神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター
原田 誠	神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター

森 哲也
中川 弘
権平文夫
高田 薫
長尾清香
佐々木美智子
小林直樹

財団法人 東京顕微鏡院
株式会社 BML フード・サイエンス
デンカ生研株式会社
国立医薬品食品衛生研究所
国立医薬品食品衛生研究所
国立医薬品食品衛生研究所
国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌はヒトへの病原性が強く、重症者や死者の発生も珍しくない。日本も含め世界で食中毒が発生し、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。世界的機関でも微生物学的リスクアセスメントとして牛肉などとの組み合わせについて解析が行われるなど、対応が急がれている。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 O157 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 O 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。日本でも O157 以外の感染が多数あり、独自に主要な血清群を決定し、食品検査法を確立する必要がある。このため本研究では、日本での腸管出血性大腸菌の重要な血清群の解析を行い、食品を対象に

した検査法を開発することを目的に、(1) 腸管出血性大腸菌の血清群解析および検査法への応用の検討 (大西 真) (2) 病原大腸菌の統括的検査法の開発 (工藤由起子) の分担研究を行った。また、腸管出血性大腸菌や毒素原性大腸菌など病原大腸菌には病原性に基づいて 5 種類以上があるが、ヒト、家畜、食肉等から各種病原大腸菌の網羅的検出を試み、高効率に病原大腸菌を検出分離できるか否か実際の検体を用いて検証すること、および調査結果に基づいて下痢原性大腸菌の汚染源を推定することを目的に、(3) 病原大腸菌の分布および病原性解析 (西川禎一) の分担研究を行った。

B. 研究方法

(1) 腸管出血性大腸菌の血清群解析および検査法への応用の検討

血便および (または) HUS を発症している患者を重症者と定義し、これらの患者由来の腸管出血性大腸菌株の O 血清群について集計を行うことにした。また、O157、O26、O111、O103 の抗原遺伝子と *stx1* および *stx2* および インチミン遺伝子 (*eae*) のプライマー配列は既知のものを使用し、O121, O145, O165 は本研究で新たにデザインしたものを使用してマルチプレックス PCR 法を開発した。次に、HUS 患者血清における抗大腸菌抗体価解析を

行った。さらに、0165 および 076 の免疫磁気ビーズを調製し、増菌培養液に混合して各 0 群の大腸菌を濃縮した。

(2) 病原大腸菌の統括的検査法の開発

1. 食品培養液での VT 遺伝子検出スクリーニング法の改定

反応系の縮小化、試薬および機器の組み合わせの検討を行った。VT 遺伝子検出感度を検討するために、牛レバー、牛挽肉、豚スライス肉、チーズ（ヤギナチュラルチーズ）、レタス、カイワレダイコン、トマトおよびホウレンソウの mEC 中培養液に VT1 陽性の腸管出血性大腸菌 026 および VT2 陽性の腸管出血性大腸菌 0157 の 4 株ずつ計 8 株の培養液および希釈液を接種して、それらからアルカリ熱抽出法によって DNA 抽出を行ない CycleavePCR 0-157 (VT gene) Screening Kit Ver. 2.0 および Nielsen らの方法にて VT 遺伝子をリアルタイム PCR 法で検出した。また、自家調製試薬では、リアルタイム PCR 法の *stx1* および *stx2* は Nielsen らの方法を、*eae* および 16SrRNA は米国農務省 (USDA) 法を参照し、コンベンショナル PCR 法の *stx1*、*stx2* および *eae* については欧州食品安全機関 (EFSA) 法を、16SrRNA については USDA 法を参照した。リアルタイム PCR 法、コンベンショナル PCR 法および loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法の各種試作キットについても検討した。

2. 多血清群での 0 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

牛挽肉およびカイワレダイコンの mEC 中培養液に 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 の 7 種類の 0 血清群の培養液および希釈液を接種して、それらからアルカリ

熱抽出法によって DNA 抽出を行ない、0 抗原特異的遺伝子検出法（米国農務省 (United States Department of Agriculture、USDA) 参照法および欧州食品安全機関 (European Food Safety Authority、EFSA) 参照法) に供試した。

2. 多血清群での 0 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

菌液での検討では血清群 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 の各 2 株、食品での検討では血清群 0157 の 5 株を試験に供試した。食品検体は、前述の 1. 食品培養液での VT 遺伝子検出スクリーニング法の改定、と同様に培養した。自家調製試薬では、リアルタイム PCR 法は、0157 については EFSA 法を、0157 以外の 5 血清群については USDA 法を参照した。LAMP 法は、Wang らの方法を参照し、また市販キットについても検討した。

3. 多血清群での増菌培養および分離培養の検討

VT 産生性 (87 株) および非産生性 (3 株) 大腸菌の計 90 株 (25 種類の 0 血清群と OUT) を mEC 培地中での 42°C で 22 時間培養後の増殖の確認に、これらに加えて 64 株 (計 154 株) を 10 種類の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。また、新規に開発された血清群 0103、0121、0145 に対する試作免疫磁気ビーズの回収率を検討した。

4. 腸管出血性大腸菌の試験法のコラボレイティブ・スタディによる検討

13 試験検査機関において試験対象 6 血清群を 3 回に分けて実施された。腸管出血性大腸菌接種の牛挽肉、カイワレダイコンを検体とした。mEC 培地を加え 42°C にて 22±2 時間培

養し、培養液をアルカリ熱抽出法に供した。得られた DNA 液をリアルタイム PCR (VT 遺伝子、IC および O 抗原遺伝子を検出) に用いた。また、培養液を免疫磁気ビーズ法に供し、濃縮液を 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。培養後、生育したコロニーを観察し免疫血清またはラテックス凝集試薬にて凝集反応を確認した。結果は集計され、検出方法間の有意差検定 (χ^2 乗検定) にて解析された。

5. 腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討

毒素原生大腸菌を、牛挽肉、カイワレダイコン 25 g に接種した。その後、mEC 225 mL を加え、42°C にて 22 時間培養した。検体培養液を SMAC、CT-SMAC 各 1 枚に画線し、37°C にて培養し、生育した大腸菌と思われるコロニーから DNA を抽出し ST 遺伝子および LT 遺伝子の PCR 法に供した。また、食品培養液からの DNA 液を ST 遺伝子および LT 遺伝子の PCR 法に供した。

(3) 病原大腸菌の分布および病原性解析

各種食品、家畜糞便 (ウシおよびブタ)、健康者便、下痢症患者便の総計 1,148 検体を供試した。食品の増菌培養には基本的に FDA の二段培養法 (ブレインハートインヒュージョン・ブイヨンおよびトリプトン・フォスフェート・ブイヨン)、糞便検体はブレインハートインヒュージョン・ブイヨンにて増菌培養した。各増菌培養液からの DNA 抽出物を用いて、各種リアルタイム PCR 法 (*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) を行なった。これによって、病原大腸菌陽性と判定された増菌培養液からコロニー・ハイブリダイゼーション法にて病原大腸菌の分離を行った。また、分離された腸管病原性大腸菌について、Clermont らの方法での系統発生群解析、Afset らの方法に準じた病原性プロフィール、Blanco らの方法での *eae* の型別の 3 つの分子疫学的解析を行った。

C. 研究結果

(1) 腸管出血性大腸菌の血清群解析および検査法への応用の検討

日本国内でヒトから分離された腸管出血性大腸菌を解析したところ、分離頻度の高い O 血清群は順に O157、O26、O111、O103、O121、O145、O91、O165 であり、O91 を除く上記 7 つの O 血清群は、重症者由来株の 95% 以上を占めることが明らかとなった。また、HUS 患者便検体からの増菌液を用いた解析において、マルチプレックス PCR 検出系は患者便からの検出法として、少なくとも O157、O165 の抗原遺伝子、*stx2*、*eae* について応用可能であることが明らかとなった。さらに、病院の検査室において腸管出血性大腸菌が不分離の散発 HUS 患者検体の解析において、主要 7 血清群以外についても O 抗原遺伝子が同定できれば、特異的な免疫磁気ビーズを用いた菌分離が可能であり、実際に *stx2*、*eae* 陽性の O76 の HUS 症例が検出された。

(2) 病原大腸菌の統括的検査法の開発

1. 食品培養液での VT 遺伝子検出スクリーニング法の改定

反応系の縮小化では、Nielsen らの方法での総反応液量が 50 および 30 μ l において、50 μ l 反応系よりも 30 μ l 反応系の方が検出

性の高い結果であった。試薬および機器の組み合わせによる VT 遺伝子検出感度の検討では、CycleavePCR 0-157 Screening Kit Ver. 2.0 では、auto 解析によって LC480 および Dice では 10^4 cfu/ml まで VT1 および VT2 遺伝子ともに 8 食品種全てで検出されたが、ABI7500、ABI7900 および ABI7500fast では、manual 解析を行うことで妥当な結果が得られた。Nielsen らの方法の反応結果では、auto 解析および manual 解析ともに ABI7500、ABI7900、ABI7500fast、LC480 で、auto 解析 (manual 解析設定のない) LCnano および Dice で適切な解析結果が得られた。

自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法における duplex 反応系の各種機器による検出感度の検討では、*stx* および 16SrRNA とともにいずれの食品でも、またいずれの機器でもおおむね高い検出感度であった。試作キットでの LAMP 法におけるインターナル・コントロールの検出および duplex 反応系試作キットでのコンベンショナル PCR 法における *stx* も良好に検出された。

2. 多血清群での O 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

菌液での検討で得られた優秀な条件をもとに食品培養液中での検討を行った。リアルタイム PCR 法の duplex 反応系における各種機器での検討では、8 種類のいずれの食品においても、また検討した 5 機種の内いずれにおいても、3 種類の duplex 反応系のいずれも 10^4 cfu/ml 以上の感度であることが確認された。また、LAMP 法における自家調製試薬および市販キットでの適切な反応温度が判明した。

3. 多血清群での増菌培養および分離培養の

検討

増菌培地の検討では、mEC 培地中で O103、O121 および O145 は十分に増殖することが確認された。分離培養の検討では、弱選択性の 6 種類の培地では、クロモアガー STEC、クロモアガー 0157、Vi RX026 および BCM0157 はそれぞれ 2、3 種類の色に分かれたが、クロモアガー 026/0157 および レインボーアガー 0157 では多様な色を呈した。強選択性の 4 種類の培地では、いずれの培地も主要な 6 血清群以外多くの大腸菌の生育は抑制され、6 血清群が効率的に分離されることが期待できた。免疫磁気ビーズ法の検討では、6 血清群ともに牛挽肉培養液中で約 21 から 60% とビーズ法による回収率としては優れていた。4 腸管出血性大腸菌の試験法のコロレイトイプ・スタディによる検討

血清群 O157・O26 では、牛挽肉での低・高菌数接種、カイワレダイコンでの高菌数接種の検出感度は、VT 遺伝子、O 抗原遺伝子および免疫磁気ビーズ法で 1.00、カイワレダイコンでの低菌数接種は各検出法において 0.86 以上であった。血清群 O103・O111 では、牛挽肉での低菌数接種は、O103 の O 抗原遺伝子で 0.91、免疫磁気ビーズ法で 0.96、その他各検出法は 1.00、高菌数接種ではいずれの検出法も 1.00、カイワレダイコンでの低菌数接種は、各検出法 0.64 以上、高菌数接種ではいずれの検出法も 1.00 であった。血清群 O121・O145 では、牛挽肉での低・高菌数接種はいずれの検出法も 1.00、カイワレダイコンでの低菌数接種は、O121 のビーズ法で 0.55、その他各検出法は 0.73 以上、高菌数接種では O121 の免疫磁気ビーズ法で 0.86、その他各検出法は 1.00 であった。統計解析を行っ

た結果、血清群 026、0103、0111、0145 および 0157 については、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。血清群 0121 については、汚染菌数が低い検体で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. 腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討

牛挽肉およびカイワレダイコンともに mEC 培地での増菌培養で十分に腸管毒素原性大腸菌が増殖したと考えられた。牛挽肉では、SMAC での分離が優れていたが、カイワレダイコンでは SMAC および CT-SMAC では分離が難しいことが明らかになった。

(3) 病原大腸菌の分布および病原性解析

腸管病原性大腸菌は、ウシやブタと同程度の高い頻度で食用鶏の盲腸便から検出された。腸管毒素原性大腸菌はブタからの検出率が高く、各年度ともに *est* が *elt* よりも 2 倍近い検出率であった。ニワトリの腸管毒素原性大腸菌保菌に注目しながら 26 年度も調査を進めたが、今年度は検出されなかった。腸管毒素原性大腸菌の毒素遺伝子 3 種類の内訳を見たところ、ST2 種に LT の遺伝子を合わせて 3 種全てがブタの 5 検体から、ST2 種が 8 検体から、ST1 種または LT がそれぞれ 16 検体から検出された。ブタの 6 検体は腸管毒素原性大腸菌の毒素遺伝子と腸管病原性大腸菌の *eae* が同時に陽性となっていた。ヒト健康者から腸管毒素原性大腸菌は全く検出されず、低率ではあるが下痢症患者からのみ検出された。

D. 考察

(1) 腸管出血性大腸菌の血清群解析および検査法への応用の検討

本研究から、日本国内でヒトから分離された EHEC のうち、分離頻度の高い EHEC は血清群 0157、026、0145、0103、0121、0111、091、0165 であることが明らかとなった。このうち、重症例由来株が 5 株以上あった主要な 7 つの O 血清群 (0157、026、0111、0103、0121、0145、0165) が引き続き今後の食品検査に重要な EHEC の O 血清群と考えられる。

また、本研究で構築したマルチプレックス PCR 検出系は、他の細菌種が混在していると考えられる患者便からの増菌液においても十分使用可能であることが、少なくとも 0157、0165 の抗原遺伝子、*stx1*、*stx2*、*eae* の病原性遺伝子の検出について明らかとなった。今後とも継続して同様な検体におけるマルチプレックス PCR 検出系の評価を行う必要がある。

さらに、今年度は HUS 症例の 1 つから、EHEC 076 を検出した。主要 7 血清群のみならず、O 抗原遺伝子が検出されれば、当該抗大腸菌 O 血清を用いて免疫磁気ビーズによる濃縮培養が可能となることから、今回 076 を分離した同様な手法で菌の分離が可能になるものと考えられる。

(2) 病原大腸菌の統括的検査法の開発

1. 食品培養液での VT 遺伝子検出スクリーニング法の改定

リアルタイム PCR 法での自家調製試薬は市販キットと比べて経済的であるため使用する場合が多い。反応系を 30 μ l にすることによってさらに経済性を高められることが判明した。また、リアルタイム PCR 法の改良された市販キットおよび自家調製の試薬と汎

用性の高い複数の機器の組み合わせによる使用について検討したところ、多くの食品で 10^3 cfu/ml まで高感度であることが示された。しかし、一部食品では食品成分が DNA 抽出や PCR 反応を阻害することが考えられた。さらに経済性を高めることを考え、現通知法における *stx*&2 検出用プローブ濃度を半減することが可能であることが明らかになった。また、インターナル・コントロールを設定した自家調製試薬またはキットのリアルタイム PCR 法、LAMP 法およびコンベンショナル PCR 法を検討し、優れた検出感度の方法が設定された。

2. 多血清群での 0 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

諸外国の政府機関で使用されている試験法を参照し、日本での主要な血清群についての 0 抗原特異的遺伝子対象 PCR 法を定性での検出および検出感度を検討した。日本での腸管出血性大腸菌の主要な血清群に対応した食品での検査法の確立には、026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 を対象とした諸外国の政府機関で使用されている試験法を参照した。Duplex リアルタイム PCR 法は、対象遺伝子の組み合わせによって検出性が劣る場合もあり、これは遺伝子増幅の組み合わせに原因があるとも考えられた。また、機器によって使用する蛍光試薬を考慮した方が高い蛍光強度やベースラインの安定が認められる場合も示された。さらに、食品によっては、duplex リアルタイム PCR 法のいくつかの反応系において検出感度が複数の機器で 10^4 cfu/ml であるものもあった。複数機関で食品または機器を分担して実施しており、DNA 抽出や反応が同時でない場合もあるため、

市販キットの使用も試験の試薬調製や反応手順などを簡易化する上で重要である。

3. 多血清群での増菌培養および分離培養の検討

mEC 培地での 42°C 培養下にて概ね腸管出血性大腸菌が増殖をすることが明らかになった。また、酵素基質培地での発色性を利用した分離法として、① CT などの選択剤を加えて選択性を強めた培地が有用であることが示された。また、② 血清群を鑑別せずに単色または 2、3 の指標となる色によって分離した後に血清群を確認する方法、ある程度は血清群を鑑別する培地を使用して分離する方法のふたつの方向性が示された。さらに、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良好であり、食品からの検出において効果的であることが期待される。

4. 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

検出感度については、高菌数接種 ($21.5\text{--}29.0$ 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 ($4.3\text{--}5.8$ 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。

本コラボレイティブ・スタディで使用されたmEC培地（42℃）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。

5. 腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討

今後、mECで42℃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。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。

（3）病原大腸菌の分布および病原性解析

腸管毒素原性大腸菌の分子疫学指標はウシ由来株と患者由来株の関連を示しており、ブタや健康者の分離株は下痢原性が低い可能性が示唆された。健

康者では腸管毒素原性大腸菌の保菌は見つからず、ブタのみならず食鳥が想定以上に高い率で腸管毒素原性大腸菌を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、分子疫学解析によって今後結論を出す予定である。腸管侵入性大腸菌は検出されずわが国でのリスクは低いこと、腸管凝集接着性大腸菌や分散接着性大腸菌も汚染源はもっぱらヒトであり家畜が関与している可能性は低いことが示された。

E. 結論

（1）腸管出血性大腸菌の血清群解析および検査法への応用の検討を行った結果、国内でヒトから分離された株は、分離頻度の高い順に0157、026、0145、0103、0121、0111、091、0165であり、重症者由来株としては、上記の8血清群のうち091を除く7血清群であったため、それらについてのマルチプレックスPCR検出系を開発した。患者便からの検出を検討した結果、少なくとも0157、0165の抗原遺伝子、*stx2*、*eae*について応用可能であることが明らかとなった。主要7血清群以外についても0抗原遺伝子が同定できれば、特異的な免疫磁気ビーズを用いた菌分離が可能であり、実際に*stx2*、*eae*陽性の076のHUS症例が検出された。

（2）病原大腸菌の統括的検査法の開発、の研究を行った結果、日本での主要な6血清群である0157、026、0111、0103、0145および0121を流通食品や食中毒等原因食品調査の試験の対象にすることが国内の食品での効果的な検査になるものと思われた。また、重

症者の発生の割合の多い血清群 0165 を国内での食中毒対応の対象として、海外（特に、米国）での患者発生の多い血清群 045 を輸入食品検疫の対象として試験を行うことも有用と考えられた。また、VT 遺伝子検査法の本研究での検討結果をもとに通知法にある VT 遺伝子スクリーニングを改訂に貢献した（平成 24 年 12 月 17 日食安監発 1217 第 1 号「腸管出血性大腸菌 026、0111 及び 0157 の検査法について」）した。さらに、血清群 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 特異的遺伝子を対象とした食品での検出法の具体的な条件を明らかにした。また、多血清群株を供試し、選択剤を添加した複数種類の酵素基質培地にて特徴を有する発色性によって対象血清群を一括または鑑別した分離が可能であること、新規に開発された 0103、0121、0145 に対する免疫磁気ビーズの回収率を検討し優れた濃縮効果が明らかになった。最終的に、多機関によるコラボレイティブ・スタディによる評価を実施し食品での検査法の通知に貢献した（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 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157」）。

また、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。

（3）病原大腸菌の分布および病原性解析の研究を行った結果、腸管病原性大腸菌は腸管出血性大腸菌よりもはるかに高い率で家畜から家禽にいたるまで分布することが判明し、腸管毒素原性大腸菌

の分子疫学指標はウシ由来株と患者由来株の関連を示しており、ブタや健康者の分離株は下痢原性が低い可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Iguchi, A., Iyoda, S., Ohnishi, M.

Molecular characterization reveals three distinct clonal groups among clinical Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of serogroup O103. *J. Clin. Microbiol.* 50:2894-2900, 2012.

Hara-Kudo, Y., Kumagai, S., Konuma, H., Miwa, N., Masuda, T., Ozawa, K., Nishina, T. Decontamination of *Vibrio parahaemolyticus* in fish by washing with hygienic seawater and impacts of the high level contamination in the gills and viscera, *J. Vet. Med. Sci.* 75:589-596. 2013.

Hara-Kudo, Y., Konuma, H., Kamata, K., Miyahara, M., Takatori, K., Onoue, Y., Sugita-Konishi, Y., Ohnishi, T. Prevalence of main foodborne pathogens in retail food under the National Food Surveillance System in Japan. *Food Addit. Contam. Part A, Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 30(8): 1450-1458, 2013.

Hasegawa, A., Hara-Kudo, Y., Ogata, K.,

- Saito, S., Sugita-Konishi, Y. and Kumagai, S. Differences in the stress tolerances of *Vibrio parahaemolyticus* strains due to their source and harboring of virulence genes. *J. Food Prot.* 76:1456-62, 2013.
- Kobayashi, N., Lee, K., Yamazaki, A., Saito, S., Furukawa, I., Kono, T., Maeda, E., Isobe, J., Sugita-Konishi, Y. and Hara-Kudo, Y. Virulence gene profiles and population genetic analysis for exploration of pathogenic serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 51: 4022-4028, 2013.
- Jones, J. L., Benner, R. A., DePaola, A. and Hara-Kudo, Y. *Vibrio* densities in the intestinal contents of finfish from coastal Alabama. *Agriculture, Food and Analytical Bacteriology.* 3: 186-194, 2013.
- 工藤由起子、小田みどり. 第2節 生肉のリスク 原因菌と食中毒事件. 第3章 生食のリスクとは. 一色賢司 監修 生食のおいしさとリスク.p. 329-337. 2013. (株) エヌ・ティイー・エス.
- 工藤由起子. 食品の腸管出血性大腸菌検査法の変遷と今後. *食品衛生研究.* Vol. 63, p25-34, 2013.
- 工藤由起子. 食品での腸管出血性大腸菌検査法の最新の動向について. *日本食品微生物学会雑誌.* 日本食品微生物学会雑誌. Vol. 30, 89-92, 2013.
- 小林直樹、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌の分子生物学的研究と食品での検査法の発展. *日本食品微生物学会雑誌.* 30(3):147-155, 2013年.
- Komura, T., Ikeda, T., Yasui, C., Saeki, S., and Nishikawa, Y. Mechanism underlying prolongevity induced by bifidobacteria in *Caenorhabditis elegans*. *Biogerontology* 14: 73-87, 2013.
- Nakamura, H., Takakura, K., Sone, Y., Itanol, Y., and Nishikawa, Y. Biofilm formation and resistance to benzalkonium chloride in *Listeria monocytogenes* isolated from a fish processing plant. *J. Food Prot.* 76(7) : 1179-1186, 2013.
- 菊田英明、涌嶋三津子、西川禎一. 小児の散发性下痢症から分離され、O 群血清型分類が可能であった大腸菌の病原遺伝子保有率の評価. *小児感染免疫* 25 (4) : 413-419, 2013.
- Ohnishi, T., Goto, K., Kanda, T., Kanazawa, Y., Ozawa, K., Sugiyama, K., Watanabe, M., Konuma, H., Hara-Kudo, Y. Microbial contamination by procedures of consumption and the growth in beverage. *J. Environ. Sci. Health, Part A.* 48:781-790, 2013.
- Wang, L. Wakushima, M., Aota, T., Yoshida, Y., Kita, T., Maehara, T., Ogasawara, J., Choi, C., Kamata, Y., Hara-Kudo, Y. and Nishikawa, Y. Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal patients: comparison between strains from foods, and fecal specimens from

- cattle, swine and healthy carriers in Osaka City, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:1232-1240, 2013.
- 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.
- Isobe, J., Shima, T., Kanatani, J. I., Kimata, K., Shimizu, M., Kobayashi, N., Tanaka, T., Iyoda, S., Ohnishi, M., Sata, T., Watahiki, M. Serodiagnosis using microagglutination assay during the food-poisoning outbreak in Japan caused by consumption of raw beef contaminated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 and O157. *J. Clin. Microbiol.* 52:1112-8, 2014.
- Yaguchi, Y., Komura, T., Kashima, N., Tamura, M., Kage-Nakadai, E., Saeki, S., Terao, K., Nishikawa, Y. Influence of oral supplementation with sesamin on longevity of *Caenorhabditis elegans* and the host defense. *Eur. J. Nut.* 53 (8):1659-1668, 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., Konishi, N., Kai, A., Ohtsuka, K. DNA extraction and molecular detection methods for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. VTEC 2012, May 3-7, 2012.
- Hara-Kudo, Y., Hiroi, M., Iizuka, S., Taga, K., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y., Ohtsuka, K. Detection methods for

- Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 in food. FoodMicro 2012, September 3-6, 2012.
- 工藤由起子. 食品での腸管出血性大腸菌の検査法の最新の動向について. 第 33 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 24 年 10 月.
- 曾我部祐介、塚原めぐみ、丸山弓美、飯塚 太由、荒木恵美子、小西良子、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 O26、O111 および O157 一斉試験法のための増菌培養法の基礎検討. 第 33 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 24 年 10 月.
- 小西典子、齊木 大、大塚佳代子、森 哲也、中川 弘、飯塚信二、多賀賢一郎、甲斐明美、小西良子、工藤由起子. 複数機関で実施した腸管出血性大腸菌 O26、O111 および O157 一斉試験法のための増菌培養法の検討. 第 33 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 24 年 10 月.
- 山本祐嗣、林 昭宏、飯塚信二、多賀賢一郎、大塚佳代子、小西典子、森 哲也、中川 弘、齊藤志保子、磯部順子、廣井みどり、神吉政史、右田雄二、小西良子、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 O26、O111 および O157 の一斉試験法のコラボレイティブスタディによる評価 (1). 第 33 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 24 年 10 月.
- 大塚佳代子、門脇奈津子、森 哲也、高見明代、中川 弘、林昭宏、上田泰史、小西典子、甲斐明美、右田雄二、神吉政史、廣井みどり、磯部順子、齊藤志保子、小西良子、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 O26、O111 および O157 の一斉試験法のコラボレイティブスタディによる評価 (2). 第 33 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 24 年 10 月.
- 工藤由起子、齊藤志保子、大塚佳代子、山崎省吾、八尋俊輔、岩出義人、西尾智裕、杉山寛治、大友良光、小沼博隆、田中廣行、中川 弘、小西良子、熊谷進. 近年の腸炎ビブリオ食中毒の減少と魚介類の汚染状況の解析. 第 46 回腸炎ビブリオシンポジウム. 平成 24 年 11 月.
- Wang, L., Wakushima, M., Aota, T., Yoshida, Y., Kita, T., Maehara, T., Ogasawara, J., Choi, C., Kamata, Y., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y. (2012) Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal patients: comparison with the strains from foods and fecal specimens of cattle, pigs, healthy carriers in Osaka City, Japan. US-Japan Cooperative Medical Science Program Cholera and Other Bacterial Enteric Infections 47th Conference.
- Hara-Kudo, Y., Ohtsuka, K., Konishi, N., Mori, T., Nakagawa, H., Iizuka, S., Taga, K., Kai, A. Universal enrichment followed by real-time PCR assay and plating for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 in food. 127th AOAC Annual meeting and exposition. Aug. 25-28, 2013.
- 小林直樹、齊藤志保子、古川一郎、河野智美、青木佳代、前田詠里子、江藤良樹、堀川和美、小西良子、工藤由起子. 腸管出血性大

- 腸菌の病原因子保有パターンと臨床症状の対応についての解析. 第 105 回日本食品衛生学会. 平成 25 年 5 月.
- 小林直樹、前田詠里子、河野智美、齊藤志保子、古川一郎、青木佳代、江藤良樹、堀川和美、小西良子、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌の高病原性の指標となる病原因子についての解析. 第 17 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 平成 25 年 7 月.
- 李 謙一、N. P. French、工藤由起子、伊豫田淳、小林秀樹、小西良子、局 博一、熊谷 進. 多変量解析によるヒトまたはウシ由来志賀毒素産生性大腸菌 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.
- Ban, E., Yoshida, Y., Wada, T., Ichikawa, N., Hamabata, T., Wajima, T., and Nishikawa, Y. (2013) DNA sequence and analysis of virulence plasmid of enterotoxigenic *Escherichia coli* O169:H41 that adhere to HEp-2 cells in unique aggregative manner. Federation of European Microbiological Societies (FEMS) 2013: 5th Congress of European Microbiologists, Leipzig, Germany, Abstract: 124. 2013/7/21-25.
- Matsuzaki, T., Tanimoto, Y., and Nishikawa Y. (2013) IL-8 secretion induced by flagellin in HEK-293 cells and the inhibition by diffuse adherent *Escherichia coli*. Federation of European Microbiological Societies (FEMS) 2013: 5th Congress of European Microbiologists, Leipzig, Germany, Abstract: 298. 2013/7/21-25.
- 小林直樹、李謙一、小西良子、工藤由起子. 集団解析により明らかになった腸管出血性大腸菌の高病原性 genotype. 第 15 回日本進化学会 平成 25 年 8 月.
- 森哲也、市川希美、難波豊彦、吉成知也、工藤由起子. ゼリー状飲料の細菌試験における課題. 第 34 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 25 年 10 月.
- 小西典子、森哲也、中川弘、大塚佳代子、小林直樹、長尾清香、甲斐明美、工藤由起子. 複数のリアルタイムPCR機器を用いた食品培養液中VT遺伝子検出感度の検討. 第34回日本食品微生物学会学術総会. 平成25年10月.
- 長尾清香、小林直樹、工藤由起子. 大腸菌のO抗原特異的遺伝子を対象としたマルチプレックス・リアルタイムPCR法の検討. 第34回日本食品微生物学会学術総会. 平成25年10月.
- 坂 瑛里香、吉田優香、和田崇之、市川直樹、濱端 崇、輪島丈明、西川禎一. HEp-2細胞に対して特異な凝集接着を示す腸管毒素原性大腸菌O169:H41の病原性プラスミドのDNAシーケンス. 第34回日本食品微生物学会学術総会. 平成25年10月.
- 矢口由紀恵、小村智美、加嶋倫子、田村美帆、寺尾啓二、西川禎一. 線虫 (*Caenorhabditis elegans*) におけるセサミンの寿命延長機構に関する研究. 日本栄養・食糧学会第52回近畿支部大会. 平成25年10月.
- 田村美帆、小村智美、加嶋倫子、矢口由紀恵、西川禎一. 抗酸化物質が線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の酸化ストレスに与える影響. 日本栄養・食糧学会第52

- 回近畿支部大会、平成25年10月。
- 藤原翔吾、鍋島明日香、寺尾啓二、西川禎一。線虫 (*Caenorhabditis elegans*) におけるアスタキサンチンの寿命延長効果、日本栄養・食糧学会第52回近畿支部大会、平成25年10月。
- 工藤由起子、長尾清香、小林直樹。多血清群の腸管出血性大腸菌の病原因子遺伝子およびO抗原特異的遺伝子検出法の検討。第106回日本食品衛生学会学術講演会。平成25年11月。
- 小林直樹、江藤良樹、前田詠里子、齊藤志保子、古川一郎、工藤由起子。臨床症状の異なる腸管出血性大腸菌株間での病原性と遺伝型の解析。第106回日本食品衛生学会。平成25年11月。
- 大塚佳代子、中川弘、森哲也、小西典子、甲斐明美、小林直樹、長尾清香、工藤由起子。食品からのベロ毒素遺伝子検出に使用するリアルタイムPCR機器及び試薬の組み合わせと反応条件の検討。第106回日本食品衛生学会学術講演会。平成25年11月。
- 齊藤志保子、古川一郎、磯部順子、長尾清香、小林直樹、工藤由起子。各種血清群の腸管出血性大腸菌の酵素基質培地における生育性およびコロニーの特徴的形態の検討。第106回日本食品衛生学会学術講演会。平成25年11月。
- 工藤由起子。多血清群の腸管出血性大腸菌試験法の検討。食品衛生登録検査機関協会平成25年度微生物研修会。平成25年12月。
- Hara-Kudo, Y., Furukawa, I., Isobe, J., Nagao, S., Sasaki, M., Saito, S. Characteristics morphologies of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 026, 0103, 0111, 0121, 0145 and 0157 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。
- 張少博、王麗麗、鄭冬明、藤原佐美、若林明世、中村寛海、前原智史、工藤由起子、西川禎一。網羅的検出手法による下痢原性大腸菌の汚染源調査。第35回日本食品微生物学会学術総会。平成26年9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.
- 加藤舞子、小村智美、中臺枝里子、西川禎一. 宮入菌給餌が線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の寿命と各種ストレス耐性に及ぼす影響. 日本栄養食糧学会第 53 回近畿支部大会. 平成 26 年 10 月.
- 坂 瑛里香、吉田優香、和田崇之、輪島文明、濱端 崇、市川直樹、堀口安彦、中臺枝里子、西川禎一. HEp-2 細胞に対して特異な凝集接着を示す腸管毒素原性大腸菌 0169:H41 の接着因子. 第 67 回日本細菌学会関西支部学術集会. 平成 26 年 11 月.
- 小村智美、水野靖子、池田高紀、安井智佳子、佐伯 茂、西川禎一. *Caenorhabditis elegans* (線虫) におけるビフィズス菌の長寿効果とその機構. 第 67 回日本細菌学会関西支部学術集会. 平成 26 年 11 月.
- 松崎壮宏、能重 匠、玉井沙也加、中臺枝里子、西川禎一. 培養上皮細胞におけるべん毛による IL-8 産生誘導に対する健康者由来分散接着性大腸菌の抑制効果. 第 67 回日本細菌学会関西支部学術集会. 平成 26 年 11 月.
- 加藤舞子、小村智美、中臺枝里子、西川禎一. *Caenorhabditis elegans* (線虫) の寿命と各種ストレス耐性に及ぼす宮入菌給餌の影響. 第 67 回日本細菌学会関西支部学術集会. 平成 26 年 11 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

Ⅱ. 総 合 研 究 分 担 研 究
報 告 書