

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 (21.5-29.0 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O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O121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O103のO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O103のVT遺伝子およびO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O121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O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

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℃培養を検討したところ、25gあたり85cfu以上の汚染菌数であれば、mECで42℃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℃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。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

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、平成9年にO157を対象として通知されたが、それ以降も必要に応じて他血清群を対

象に通知されている。近年は諸外国において、5～7種類の血清群を対象にした検査が行われており、日本においても主要な血清群を対象にして食品の検査を行う必要がある。このため、本研究では以下の研究を行った。

(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を検討し、自家調製法の反応系の縮小化、試薬および機器の組み合わせによる高い検出感度の検討、試薬調製による増幅ベースラインの安定化を行った。この成果は通知法の策定に取り入れた。また、食品培養液から VT 遺伝子検出によるスクリーニング法について、リアルタイム PCR 法、LAMP 法、コンベンショナル PCR 法についてインターナル・コントロールを含む優れた系を確立した。(2) 腸管出血性大腸菌多血清群での 0 抗原特異的遺伝子対象検出法を検討し、日本での多血清群での 0 抗原遺伝子を対象にした検出法の確立には、諸外国の政府機関の検査法を参照した。そして、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。(3) 腸管出血性大腸菌多血清群での増菌培養および分離培養の検討し、mEC での 42°C 培養が適すること、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。(4) 多機関によるコラボレイティブ・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。それによって腸管出血性大腸菌の検査法を策定した。(5) 腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討によって、本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

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.

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.

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.
- 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.
- 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. (株) エヌ・ティー・エス 東京.
- 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. シンポジウム. 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.
- 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., 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. Amsterdam.
- 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. Istanbul.
- 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.
- 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.
- 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., 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. Chicago, USA.
- 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 O157 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.
- 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.
- 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。食品からのペ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。
- 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。
- 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

総合研究分担研究
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)
分担研究報告書

課題名「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」
主任研究者 工藤由起子

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

分担研究 西川禎一 大阪市立大学大学院生活科学研究科

3) 病原大腸菌の分布および病原性解析

(1) 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

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、3年間調査した。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

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

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(Enteraggative *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、健常者の 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・ダイリューター (GSI クレオス) を用いて BHI を 10 倍希釈量加えた。マステイケーター (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・ダイリューターを用いて等量のトリプトン・フォスフェート・ブイオンを加え、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 一晩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・ブイオンに接種して 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 (Gentra 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、ピペッ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晩静置し、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 サイクル行なった。

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 を拭い、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、生じたコロニーを釣菌して純培養を得た。これを再度 PCR して目的の遺伝子を保有しているかどうか確認した。

C. 結果

平成 26 年度に食肉衛生検査所で採取されたブタ検便(兵庫県食肉衛生検査センター80 検体、大阪市食肉衛生検

査所 240 検体)、食用鶏の盲腸便 60 検体(全て兵庫県食肉衛生検査センター)、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 75 検体(平成 24 年度 300 検体、平成 25 年度 295 検体)、大阪市立環境科学研究所から提供された健康者便 50 検体(平成 24 年度 213 検体、平成 25 年度 100 検体)についてマルチプレックス・リアルタイム PCR 法による DEC のための網羅的スクリーニングを実施した。24 年度からの 3 年間で総計 1723 検体を調べた。

EPEC は、先に報告した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。人の保菌率は当研究室の先行調査と大きな違いは無く、家畜家禽に比べると 1/10 以下であった。また、健康者と下痢症患者の間で検出率に大差ない点もこれまでと同様であった。

STEC は 24-26 年度の健康者便からは検出されなかったが、患者では 2 検体が陽性となった。これら 2 検体は *eae* 陰性であり、O157 などの定型的な腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC) とは異なっていた。

ETEC はブタからの検出率が高く、各年度ともに ST 遺伝子 (*est*) が LT 遺伝子 (*elt*) よりも 2 倍近い検出率であった(表 5)。25 年度にはニワトリ検体の 7% から *elt* が検出され、ニワトリの ETEC 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。今後はトリ検体と鶏肉

の両方について ETEC の汚染実態を同時に調べ、ニワトリの ETEC 汚染を問題視するべきか否か結論を得たい。

ETEC 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 ETEC の毒素遺伝子と EPEC の *eae* が同時に陽性となっていた。ヒト健康者から ETEC 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。

耐熱性エンテロトキシンの可能性が疑われている EAST1 の遺伝子 (*astA*) は家畜家禽ともに極めて高かった。ヒトの保菌率は動物に比べて低かったが、他の DEC に比べるとヒトにおいても検出率の高い遺伝子であった。患者よりもむしろ健康者において検出率が高かったことから、本菌に特段注意する必要は当面ないと考える。

以上の 4 タイプの DEC とは異なり、EAEC の指標である *aggR* と DAEC の *afaB* 両遺伝子は動物の検便において検出は希であり、もっぱらヒトから検出された。*afaB* の検出率は *aggR* の検出率よりも高かったが、患者よりも健康者の方が高い検出率を示した。患者の 2 検体は ETEC の毒素遺伝子と EAEC の *aggR* 両方ともに陽性であった。

D. 考察

従来、DEC は人から人へ感染

すると考えられていた(5)。しかしながら、ウシなどの反芻獣が STEC を高率に保菌することが腸管出血性大腸菌 O157 などの調査を通じて明らかにされてきた(6, 7)。本調査結果は、EPEC や ETEC そして EAST1EC についても家畜が高率に保菌することを示している。STEC のみならず、これらの DEC に関しても家畜が汚染源として重要な役割を果たしている可能性がありそうだ。

今回の調査では特にこれまで手薄となっていたニワトリを調査対象に含めた。ニワトリに *eae* 陽性大腸菌が感染することは実験的にも自然症例としても報告があり、保菌鶏の調査報告もある(8-11)(12, 13)。野鳥の DEC 保菌調査もあるが(14)、わが国の食鳥にどれくらい広がっているのかこれまで知られていない。本調査は、ウシやブタのみならず食用のニワトリも高率に EPEC に汚染されていることを示唆している。

eae を保有する大腸菌は、EPEC として分類されるが、近年分離される EPEC は集束線毛(BFP)や付着に関わる EAF プラスミドを保有しない非定型 EPEC がほとんどである(15)。我々が先に行った調査でも今回の調査でも、これらの EPEC については患者と健康者の間で分離率に有意な差が出ず、下痢原

性の確証を得られなかった(16).

当研究室の Wang らは, 食品, 家畜, 健康者, 下痢患者から多数分離された EPEC 株について分子疫学手法による解析を試みた(4). その結果, 系統発生群 B1, 病原性プロフィーラ Ia 型, インチミン型 β 1 と γ 1 型の株が患者由来株に多く, ウシ由来株と一致する傾向が示された. 一方, 健康者やブタ由来株は病原性が低いとされる病原性プロフィーラ II 型に多く見られたが, その系統発生群はブタ由来株が A 群を主としたのに対し, 健康者由来株は B2 群であり異なっていた. また, 健康者由来株のインチミン型は多様性が高く特定の型に偏っていなかった. すなわち, 患者由来株は健康者やブタ由来株とは異なるクラスターに属しており, ウシ由来株と同じクラスターに属していた. 以上の結果は, ヒトに病原性を示す EPEC がウシに由来することを示唆している(4). 一方, 健康者に見られる EPEC 株の多くは, ヒトに下痢原性を示さない常在菌の一種である可能性もあると考えられる. 今回の調査で得られたニワトリ由来の EPEC がウシや患者由来株と類似のタイプに分類されるのか, 今後の解析が期待される.

ETEC はヒトのみならずブタやウシの下痢症原因ともなる. そのエンテロトキシン LT と ST の毒性は家畜とヒトに共通のものが多く, しかし, 腸粘膜への定着因子が異なるため, 家畜の

ETEC は家畜の間で, ヒトの ETEC はヒトの間だけで感染を循環させており相互の行き来はないとされている. 今回健康なブタから比較的高率に検出された ETEC 遺伝子陽性検体が, ブタのみに感染する ETEC に由来するものか, あるいはヒトの汚染源となる可能性があるのか否か, 今後検討する必要がある.

以前からニワトリに下痢症を起こす ETEC があることは報告されていたが(13, 17, 18), 今回の調査において健康な食鳥の盲腸便から予期したよりも高い率で ETEC 遺伝子が検出された. トリの検体で LT 遺伝子が単独で検出される率が高かったことも先行研究と関連する可能性がある(19, 20). また, ニワトリの ETEC は変異型 LT 遺伝子を保有しているとの報告もある(21). 今後はこれら陽性検体から ETEC の分離を試みる予定だが, ニワトリに病原性を示すタイプの ETEC のみが分離されるのか, ヒトと共通して感染しうる菌が見つかるのか興味あるところである. これまでニワトリとヒトの間で共通の大腸菌が病原性を示すという認識は強くなかったが, 尿路病原性大腸菌などトリに由来すると推定された人症例も報告が出ており予断を許さない(22).

EHEC, EPEC, ETEC, 以上 3

タイプの DEC と異なり，EAEC の検出率は全体的に極めて低かったが，由来別にみるとヒトの保菌率が高かった．したがって，ヒトの DEC はヒトに由来するという従来の定説は，EAEC については矛盾ないようだ．EAEC が希に集団発生を起こしていることからすると(23)，保菌者検索により集団発生を防ぐ対象としては DEC の中で EAEC こそがもっとも相応しい検査対象と言えるかもしれない．

DAEC も EAEC と同様に動物の保菌は低くヒトが汚染源となっていると判断される．しかしながら，DAEC の病原性については未だ不明な点が多く(24)，対策の優先度は低いと判断して良いであろう．EAST1EC は家畜の保菌率が極めて高く，ヒトの保菌が他の DEC で多い一因と考えられる．本菌についてもその病原性は不明な点が多く，現時点では問題となる可能性は低い(25)．しかしながら，EAST1EC の O166:H15 については複数の集団事例において関与が報告されており未だ完全に無視することは難しいようだ(26, 27)．本菌の動物における検出率から推察すると，EAST1 は盲腸の発達した動物に大腸菌が定着する上で何らかの役割を果たしているのかもしれない．

26 年度はわずかに 3 検体では

あるが virB が健康者便 1 検体，ブタ 2 検体から検出されたが，EIEC として菌株が得られるかは今後の問題であり，本邦で問題となる可能性は目下のところ極めて低いであろう(28, 29)．

E. 結論

DEC の網羅的な調査に有用であることを実証できたマルチプレックス・リアルタイム PCR 法を適用し，昨年度に続けて調査した．今年度は特に家禽とブタ検体数の増加に勤めたところ，DEC のなかでも EPEC は EHEC 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た．EPEC 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．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．

健康者では ETEC の保菌は見つからず，25 年度の調査ではブタのみならず食鳥が想定以上に高い率で ETEC 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，動物由来株と患者由来株との分子疫学解析によって今後結論を出す予定である．EIEC は検出されずわが国でのリスクは低いこと，EAEC や DAEC 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。

F. 文献

1. 光岡知足 (1990): 腸内菌叢の形成, 推移, 分布. p. 87-107. *In* 光岡知足, (ed.), 腸内細菌学. 朝倉書店, 東京.
2. Hidaka, A., Hokyo, T., Arikawa, K., et al. (2009): Multiplex real-time PCR for exhaustive detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.*, 106, 410-420.
3. Wang, L., Wakushima, M., Kamata, Y., et al. (2011): Exhaustive isolation of diarrhoeagenic *Escherichia coli* by a colony hybridization method using hydrophobic grid-membrane filters in combination with multiplex real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.*, 53, 264-270.
4. Wang, L., Wakushima, M., Aota, T., et al. (2013): 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79,
5. 甲斐明美 (2009): ETEC (腸管毒素原性大腸菌). p. 269-280. *In* 仲西寿男, 丸山務, (ed.), 食品由来感染症と食品微生物. 中央法規, 東京.
6. 勢戸和子 (2009): STEC (志賀毒素産生性大腸菌). p. 281-296. *In* 仲西寿男, 丸山務, (ed.), 食品由来感染症と食品微生物. 中央法規, 東京.
7. 西川禎一 and 麗麗, 王. (2012): 志賀毒素産生性大腸菌の疫学. *日本食品微生物学会雑誌*, 29, 141-154.
8. Sueyoshi, M. and Nakazawa, M. (1994): Experimental infection of young chicks with attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 62, 4066-4071.
9. Fukui, H., Sueyoshi, M., Haritani, M., et al. (1995): Natural infection with attaching and effacing *Escherichia coli* (O 103:H-) in chicks. *Avian Dis*, 39, 912-918.
10. La Ragione, R. M., McLaren, I. M., Foster, G., et al. (2002): Phenotypic and genotypic characterization of avian *Escherichia coli* O86:K61 isolates possessing a gamma-like intimin. *Appl Environ Microbiol*, 68, 4932-4942.
11. Pakpinyo, S., Ley, D. H., Barnes, H. J., et al. (2002): Prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* in naturally occurring cases of poult enteritis-mortality syndrome. *Avian Dis*, 46, 360-369.
12. Oh, J. Y., Kang, M. S., An, B. K., et al. (2012): Prevalence and characteristics of intimin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy chickens in Korea. *Poult. Sci.*, 91, 2438-2443.
13. Kariuki, S., Gilks, C., Kimari, J., et al. (2002): Carriage of potentially pathogenic *Escherichia coli* in chickens. *Avian Dis*, 46, 721-724.
14. Chandran, A. and Mazumder, A. (2014): Occurrence of Diarrheagenic Virulence Genes and Genetic Diversity in *Escherichia coli* Isolates

- from Fecal Material of Various Avian Hosts: British Columbia, Canada. *Appl Environ Microbiol*,
15. 伊藤健一郎 (2009): EPEC (腸管病原性大腸菌) . p. 252-262. *In* 仲西寿男, 丸山務, (ed.), 食品由来感染症と食品微生物. 中央法規, 東京.
 16. Fujihara, S., Arikawa, K., Aota, T., et al. (2009): Prevalence and properties of diarrheagenic *Escherichia coli* among healthy individuals in Osaka City, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 62, 318-323.
 17. Joya, J. E., Tsuji, T., Jacalne, A. V., et al. (1990): Demonstration of enterotoxigenic *Escherichia coli* in diarrheic broiler chicks. *Eur J Epidemiol*, 6, 88-90.
 18. Akashi, N., Hitotsubashi, S., Yamanaka, H., et al. (1993): Production of heat-stable enterotoxin II by chicken clinical isolates of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 109, 311-315.
 19. Tsuji, T., Joya, J. E., Honda, T., et al. (1990): A heat-labile enterotoxin (LT) purified from chicken enterotoxigenic *Escherichia coli* is identical to porcine LT. *FEMS Microbiol Lett*, 55, 329-332.
 20. Inoue, T., Tsuji, T., Koto, M., et al. (1993): Amino acid sequence of heat-labile enterotoxin from chicken enterotoxigenic *Escherichia coli* is identical to that of human strain H 10407. *FEMS Microbiol Lett*, 108, 157-161.
 21. Nawar, H. F., King-Lyons, N. D., Hu, J. C., et al. (2010): LT-IIc, a new member of the type II heat-labile enterotoxin family encoded by an *Escherichia coli* strain obtained from a nonmammalian host. *Infect Immun*, 78, 4705-4713.
 22. Bergeron, C. R., Prussing, C., Boerlin, P., et al. (2012): Chicken as Reservoir for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Humans, Canada. *Emerg Infect Dis*, 18, 415-421.
 23. 伊藤健一郎 (2009): EAegEC (EAEC) (腸管凝集付着性大腸菌) . p. 297-305. *In* 仲西寿男, 丸山務, (ed.), 食品由来感染症と食品微生物. 中央法規, 東京.
 24. 有川健太郎 and 西川禎一 (2011): 非定型下痢病原性大腸菌について 2 —不均一菌群からなる分散接着性大腸菌 (DAEC) の下痢病原性について—. *生活衛生*, 55, 15-22.
 25. 涌嶋三津子, 麗麗, 王., 日高あゆみ, et al. (2010): 非定型下痢病原性大腸菌について 1 —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—. *生活衛生*, 54, 271-284.
 26. Nishikawa, Y., Ogasawara, J., Helander, A., et al. (1999): An outbreak of gastroenteritis in Japan due to *Escherichia coli* O166. *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 300.
 27. Ishiguro, F., Kyota, Y., Mochizuki, M., et al. (2005): An outbreak of diarrhea caused by *Escherichia coli* serogroup O169:HNM harboring a coding gene for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (astA) in Fukui Prefecture. *Jpn J Infect Dis*, 58, 119-120.

28. 荒川英二 (2009): EIEC (腸管侵入性大腸菌) . p. 263-268. *In* 仲西寿男, 丸山務, (ed.), 食品由来感染症と食品微生物. 中央法規, 東京.
29. Nishikawa, Y., Zhou, Z., Hase, A., et al. (2002): Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: prevalence of enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E. coli*. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 55, 183-190.
- G. 健康危険情報
なし
- H. 研究発表
1. 論文発表
- Kashima, N., Fujikura, Y., Komura, T., Fujiwara, S., Sakamoto, M., Terao, K., and Nishikawa, Y. (2012) Development of a method for oral administration of hydrophobic substances to *Caenorhabditis elegans*: pro-longevity effects of oral supplementation with lipid-soluble antioxidants. *Biogerontology* 13(3): 337-344.
- Wani, S. A., Hussain, I., Rather, M. A., Kabli, Z. A., Nagamani, K., Nishikawa, Y., Qureshi, S. D., and Khan, I. (2012) Putative virulence genes and biofilm production among typical enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic children in Kashmir and Andhra Pradesh. *Indian J. Microbiol.* 52(4): 587-592
- Nakashima, R., Kamata, Y., and Nishikawa, Y. (2013) Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and guanylin on the barrier integrity of intestinal epithelial T84 cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 152 (1,2) : 78-81.
- Tanimoto, Y., Arikawa, K., and Nishikawa, Y. (2013) Effect of diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeal patients and healthy carriers on IL-8 secretion and tight junction barrier integrity of Caco-2 cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 152(1,2) : 183-188.
- Wang, L., Wakushima, M., Aota, T., Yoshida, Y., Kita, T., Maehara, T., Ogasawara, J., Choi, C., Kamata, Y., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y. (2013) 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(4):1232-1240.
- Komura, T., Ikeda, T., Yasui, C., Saeki, S., and Nishikawa, Y. (2013) Mechanism underlying prolongevity induced by bifidobacteria in *Caenorhabditis elegans*. *Biogerontology* 14: 73-87.
- Nakamura, H., Takakura, K., Sone, Y., Itano, Y., and Nishikawa, Y. (2013) Biofilm formation and resistance to