

表1. 東京都で発生した毒素原性大腸菌
による集団下痢症事例

期間	発生事例数
1966～1970年	5
1971～1980年	26
1981～1990年	30
1991～2000年	42
2001～2010年	29
2011～2014年	1
合計	133

表2. 集団下痢症事例由来毒素原性大腸菌の
主な血清群と産生毒素型

血清群	供試数	事例数		
		LT+ST	ST単独	LT単独
O6	37	37		
O25	14		10	4
O27	25		25	
O148	18		18	
O159	13		13	
O169	32		32	
合計	139	37	98	4
(%)	(100)	(26.6)	(70.5)	(2.9)

表3. 散発下痢症患者から分離された毒素原性大腸菌(2012年～2014年)

血清群	毒素型	分離数	渡航先
O1	LT+ST	1	インド
O6	LT+ST	9	タイ, 中国(4), トルコ, カンボジア, インド, 不明
O6	ST	3	インド, 中国, 不明
O6	LT	2	インド(2)
O8	ST	1	ケニア
O15	ST	2	ミャンマー, モルジブ
O20	ST	1	中国
O25	LT	6	インド, インドネシア(3), バリ島, 不明
O25	ST	6	香港, インド(3), インドネシア, 不明
O27	ST	9	タイ, ベトナム, 不明, エジプト, ウズベキスタン, インド(2), インドネシア, タイ
O91	LT+ST	1	国内
O114	LT+ST	1	エジプト
O115	LT+ST	1	インド
O128	ST	3	インド(3)
O148	ST	7	インドネシア(3), ベトナム, インド(2), 国内
O153	ST	1	中国
O159	ST	9	インドネシア, インド, 中国(2), 国内, タイ, カンボジア, 韓国, ミャンマー
O167	ST	2	パキスタン他, ベトナム
O169	ST	8	タイ, カンボジア, インドネシア(2), インド, フィリピン, 香港, 不明
OUT	LT	2	パキスタン他, インド
OUT	ST	2	フィリピン, アフリカ
合計		77	

表4. 毒素原性大腸菌O148が検出された食品

No.	事業所名	検出食品	提供日
1	A	ネギ*	9月5日 洗浄前
2	B	カットネギ	9月5日 検食
3	B	カットキャベツ	9月5日 検食
4	B	ネギ	9月3日 検食
5	B	鰯のから揚げ*	9月5日 検食
6	C	長ネギ*	9月6日 原材料
7	C	長ネギ	9月7日 原材料
8	D	冷奴(ネギ)	9月6日 検食
9	D	冷奴(ネギ)	9月7日 検食
10	E	ネギ	9月5日 原材料
11	E	ネギ	9月6日 原材料
12	F	カットネギ	9月5日 検食

* 食品中のO148菌数：＜0.3個/g

表5. 毒素原性大腸菌による集団下痢症の内、
原因菌が検出された食品(東京都)

発生年	食品	検出血清型
1999	ほうれん草のピーナツあえ	O169:H41
2000	野菜のあえもの (なすのチリソースかけ)	O148:H28
2001	杏仁豆腐	O169:H41
2007	キムチ	O169:H41
2011	ネギ等	O148:H28

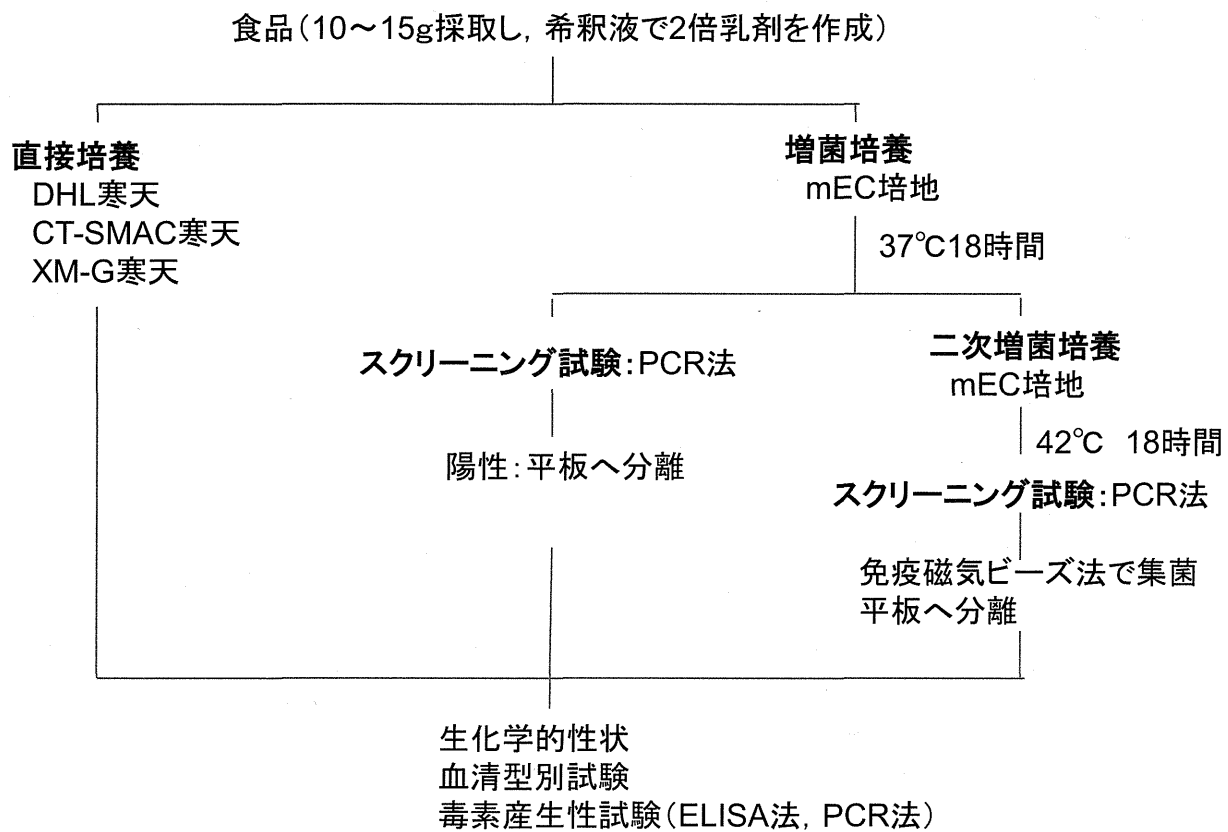


図 食品検体を対象とした大腸菌O148の検査方法

分 担 研 究 報 告 書

食品での統一的検査法の開発

工藤 由起子

平成27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）

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究

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

食品での統一的検査法の開発

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

本研究では、(1)腸管毒素原性大腸菌食中毒発生状況を解析し、上位7血清群の06、025、027、0148、0153、0159、0169が本菌の主要血清群と考えられた。本菌の食中毒には野菜・その加工品や水が重要であり、人、環境・水、調理場での二次汚染、海外渡航感染者や輸入食品が汚染経路の一端となっていることが推察された。また、(2)腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮し、増菌培養法および選択分離培地を検討し、mEC培地での42℃培養で腸管毒素原性大腸菌が十分に増殖することが確認された。分離培養には改善が必要であり、検出率を向上させる選択性のある分離平板培地や免疫磁気ビーズの開発が課題であると考えられた。一部検討によって、腸管毒素原性大腸菌の選択分離培地の開発に有用な選択剤の可能性が明らかになったので、今後、食品での検討が必要である。さらに、(3)本菌の病原因子であるエンテロトキシンLT遺伝子、ST遺伝子を対象としたリアルタイムPCR法の食品検体での応用を検討し、検討したリアルタイムPCR法は検出感度に優れた毒素遺伝子検出法であることが判明した。今後さらに、他の食品群も用いて検査法を検討する必要がある。

研究協力者

埼玉県衛生研究所 大塚佳代子、門脇奈津子、星野 梢、榊田 希、大阪美紗
国立医薬品食品衛生研究所 阪田理沙、高田 薫、都丸亜希子、寺嶋 淳

A. 研究目的

2012年に感染症報告数集計において、下痢原性大腸菌（食中毒統計の病原大腸菌）の分類が新たな分類に改訂された。この新たな病原大腸菌の分類は、その判定のための病原因子またはマーカーが明示され、患者から分離された大腸菌株の

病原大腸菌としての同定・判定が行いやすくなった。このため、食中毒事例での原因食品や汚染食品の調査に有用な方法が必要とされる。しかし、腸管出血性大腸菌以外の病原大腸菌についての食品での検査法は、これまで、国内外ともにあまり検討されておらず、早急な確立が求

められている。

食中毒統計における病因物質「その他の病原大腸菌」のうちの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、多くの集団事例が報告され、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。なお、腸管出血性大腸菌については、既に食品での検査法（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 および 0157 の検査法について」、平成 27 年 3 月 24 日事務連絡）が通知されており、試験手順や培地などの一部が、この検査法と共通であれば効率的で効果的な検査法と考えられる。腸管毒素原性大腸菌はその病原性が明確であり、新たな病原大腸菌の判断基準に沿った食品での検査法を確立し、国の試験法の策定に貢献する。また、諸外国から参照される方法を確立したい。

本研究では、最初に（１）食中毒統計など疫学データから腸管毒素原性大腸菌食中毒発生状況を解析し、本菌の主要血清群を考察した。また、（２）腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮し、増菌培養法および選択分離培地を検討した。さらに、（３）本菌の病原因子であるエンテロトキシン（易熱性エンテロトキシン；LT、耐熱性エンテロトキシン；ST）の遺伝子を対象としたリアルタイム PCR 法の食品検体での応用を検討し

た。なお、本研究は、埼玉県衛生研究所および国立医薬品食品衛生研究所の協力によって実施された。

B. 研究方法

（１）腸管毒素原性大腸菌食中毒における主要血清群および関連する食品群の解析

厚生労働省が公表する食中毒発生状況および食中毒発生事例など食中毒統計、食中毒事件詳報や国立感染症研究所・感染情報センターが公表する病原微生物検出情報（IASR）による情報から腸管毒素原性大腸菌の主要血清群や関連する食品群を解析した。また、食中毒事件詳報の一部不明な点は各自治体に問い合わせて情報収集を行った。

（２）増菌培養法および選択分離培地の検討

腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮した増菌培養法および選択分離培地を検討した。

１）腸管毒素原性大腸菌の増菌培養条件の検討

食中毒由来の 6 種の O 血清群 12 株を modified EC 培地（mEC、OXOID）に接種し 36℃および 42℃での 18 時間培養の増殖を試験した。また、他 5 株については 42℃のみにて培養した。

２）選択分離培地の検討

食中毒由来の 6 種の O 血清群 12 株をソルビトールマッコンキー寒天培地（SMAC、OXOID）、DHL 寒天培地（栄研化学）、ドリガルスキー改良培地（栄研化学）に画線塗抹し 37℃、20 時間培養

した。また、新たな選択分離培地の選定のため、選択剤として有用な物質をフェノタイプマイクロアレイ（オムニログシステム、バイオログ社）にて検討した。腸管毒素原性大腸菌 5 株および食品由来細菌 3 株（*Enterobacter cloacae*、*Enterobacter* sp.、*Klebsiella pneumoniae* 各 1 株）を供試した。

（3）ST および LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法の検討

1）食品での ST および LT 遺伝子検出法の検出感度試験

上述の増菌培養条件の検討において、供試菌株間に大きな差異がなかったことから、食中毒事件で発生件数の上位を占める 0 血清群である 06:HNM、0148:H28、0169:H41 などを供試して食品での検討を行った。検体（ミニトマト、大根の漬物、長ネギ、生わかめ）を 25 g ずつ採取し、mEC 培地 225 mL にて、42℃、20 時間培養した。各食品培養液に希釈菌液を接種または食品培養液にて菌を希釈して菌液を作製した（想定 $10^8 \sim 10^2$ cfu/mL 食品培養液）。これらからアルカリ熱抽出にて DNA 抽出を行った。遺伝子検出は Hidaka らが報告した

（J. Appl. Microbiol., 106, 410-420）

ST 遺伝子（*est* STp、*est* STh）および LT 遺伝子（*elt*）を標的としたリアルタイム PCR 法を参照して行った。分離培養は、クロモアガーSTEC 培地、DHL 寒天培地およびドリガルスキー改良培地にて行った。

2）食品からの培養法および毒素遺伝子スクリーニング検出法による毒素原性大腸菌検査法の検討

上記のうちの一部菌株を食品 25 g に接種（想定菌濃度 10^2 cfu/g）し、mEC 培地 225 mL を加えて 1 分間ストマッカー処理し、42℃、20 時間培養した。培養液 20 μ L は、4 種類の分離平板培地、クロモアガーSTEC 培地（関東化学）、SMAC、DHL 寒天培地、ドリガルスキー改良培地、各 2 枚に画線塗抹し、37℃および 42℃で 18～24 時間培養した。生育コロニーを性状試験、病原大腸菌免疫血清 06、0148、0169 との凝集反応にて添加菌であるか確認した。また、各食品の mEC 培養液からのアルカリ熱抽出液を使用し、上述と同一のリアルタイム PCR は方法を実施した。一部検体では腸管出血性大腸菌のスクリーニングで用いられる TaqMan Environmental Master Mix を使用して系を設定し実施した。また、検出感度試験で作製した 10 倍階段希釈菌液接種の食品培養液のアルカリ熱抽出試料を用い、各 3 回の測定にて検量線を作成し、42℃20 時間培養した mEC 培養液中の菌数を算出した。

C. 研究結果

（1）腸管毒素原性大腸菌食中毒における主要血清群および関連する食品群の解析

食中毒事件詳報などを参考にして、「その他の病原大腸菌」の中の「腸管毒素原

性大腸菌」について平成 20 年から平成 27 年の事例を整理した結果、年間数件前後で推移している。患者数については、80 人くらいから 1,000 人を越える年もある。300 人または 500 人を越える事例の報告も珍しくない。また、平成 20 年から平成 27 年の事例から腸管毒素原性大腸菌の血清群を解析した結果、0148、06、0159、0169、025、0153、027 が上位 7 血清群であり、これらが主要血清群と思われた。さらに、平成 12 年から平成 27 年で原因食品が明らかになった（推定も含む）腸管毒素原性大腸菌食中毒 20 件では、原因食品は野菜が最も多く、半数以上を占め、次に水が多かった。また、IASR の報告で、2000 年以降に 2 件の海外渡航中の食事による食中毒が報告されている。①2004 年 7 月に血清型 06:H16、0159:HUT、018（ST 産生性株）による香港旅行での食中毒、②2001 年 8 月に血清型 06:HUT、025:HUT、027:H7、0126:HUT、0153:HUT、OUT:H11、OUT:H14（LT&ST 産生株）による中国北京旅行での食中毒

（2）増菌培養法および選択分離培地の検討

1）腸管毒素原性大腸菌の増菌培養条件の検討

供試した 17 株はすべて、mEC 培地にて 42℃で増殖した。またそのうちの 12 株については 36℃でも検討し、同様に増殖が認められた。

2）選択分離培地の検討

供試した 12 株はすべて、SMAC、DHL 寒天培地、ドリガルスキー改良培地に生育し、培地間での発育状況の優劣は

認められなかった。また、新たな選択分離培地の選定のため、選択剤として有用な物質をフェノタイプマイクロアレイにて検討したところ、夾雑菌が非生育であり腸管毒素原性大腸菌が生育したと考えられた選択剤が 8 種類あったが、腸管毒素原性大腸菌の菌株による生育性の差異も認められた。比較的菌株間での差異が少ないものが 2 種類あった。

（3）ST および LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法の検討

1）食品での ST および LT 遺伝子検出法の検出感度試験

ミニトマト、大根の漬物、長ネギ、生わかめの食品培養液からの ST 遺伝子および LT 遺伝子検出の検出感度は、試験した 4 食品すべて、また供試菌株 3 株すべて、 10^3 cfu 以上/mL で両遺伝子を検出できた。

2）食品からの培養法および毒素遺伝子スクリーニング検出法による毒素原性大腸菌検査法の検討

ミニトマト、大根の漬物、長ネギ、生食用ボイルわかめに接種した 3 菌株はすべて、37℃および 42℃で培養した 4 種類の分離平板培地にて分離することができた。ただし、生食用ボイルわかめでは、釣菌したコロニーが腸管毒素原性大腸菌でない率が高く、鑑別は効率的ではなかった。全食品の mEC 培養液から ST および LT 遺伝子を検出することができた。一部検体では TaqMan Environmental Master Mix を使用して検出したが、良好な結果が得られた。

各食品のリアルタイム PCR 検量線を基に、42℃で 20 時間培養した後の mEC 培養液中の菌数を算出した結果、 $2.1 \times 10^8 \sim 6.9 \times 10^8$ cfu/mL であった。

D. 考察

腸管毒素原性大腸菌の食中毒は、近年減少傾向であるが、患者数が 300 人または 500 人を越える大規模な食中毒が平成 20 年以降 4 件発生している。また、患者数が 100～200 人の中規模なものや多数の自治体に渡って発生した事例もあり、重要な食中毒原因菌と考えられる。

過去の国内における食中毒発生状況資料を検索し、毒素原性大腸菌を病因物質とするものでは O 血清群 06、025、027、0148、0153、0159、0169 による事件の発生が多いことが明らかとなった。また、食中毒原因食品を解析したところ、腸管毒素原性大腸菌の食中毒原因食品として野菜・その加工品や水が重要であり、それらの汚染経路として人、環境・水、家畜、調理場での二次汚染が考えられた。また、海外渡航での感染者が帰国し国内で発症し食中毒として報告される例があるが、これらの食中毒での血清群は国内での発生事例での血清群と重なることから、海外渡航者が患者または健康保菌者として国内での汚染経路の一端となっていることも、これまでの感染事例から考えられる。さらに、腸管毒素原性大腸菌の感染が発生している地域で生産された農産物など輸入食品が汚染経路の一端となっていることも推察される。これらの情報は、今後の食品での試験法の確立において、対象とする血清群を設定し、試

験対象食品も考慮して検討するにあたって、有用な情報となる。

血清群 06、025、027、0148、0153、0159、0169 の増菌培養について検討し、mEC 培地、42℃で発育することが判明した。本培養条件は、すでに通知で示されている食品からの腸管出血性大腸菌検査法と同一の増菌培地および培養温度である。そのため、市販食品の汚染調査において、病原機構の異なる複数の病原大腸菌検査を並行して行うことができ、検査の効率性を高め、また検査費用の削減にもなる。

食品の接種試験では、喫食前に加熱工程を要しない食品などに毒素原性大腸菌を接種し、mEC 培地 42℃培養後、リアルタイム PCR による ST 遺伝子および LT 遺伝子検出並びに、分離平板培地による菌検出を行った。全食品からリアルタイム PCR にて標的の遺伝子を検出でき、用いたマルチプレックスリアルタイム PCR は有用なスクリーニング検査法であることが明らかとなった。今後は、一般細菌数や大腸菌群数が多い、食肉などの加熱調理を必要とする食材についてもリアルタイム PCR 検出系の評価を行う必要がある。本研究では参照した Hidaka らの方法とは異なるマスターミックスである TaqMan Environmental MasterMix 2.0 を用いたリアルタイム PCR 法にて実施している。本研究の結果から、腸管出血性大腸菌の食品での通知法で使用されているマスターミックスのひとつである TaqMan Environmental MasterMix 2.0 を用いて LT 遺伝子、STh 遺伝子および STp 遺伝子の反応系が確立できることがわかった。

また、供試した菌株はすべて、分離培養法で全食品から菌検出できた。しかし、生食用ボイルわかめは、mEC 培地 42℃20 時間培養後に 10^8 cfu/mL の菌数に増殖したと検量線から推定されるが、分離培養法では効率的な菌検出ができなかった。生食用ボイルわかめの加工工程で付加された夾雑菌のため、目的菌の分離が阻害されたと考えられる。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た。

腸管毒素原性大腸菌による食中毒の原因食品は、特定されることが殆どなく、汚染菌量も不明である。今回の本菌の検査法の検討では、接種菌数 100 cfu/g としたが、汚染菌数が少数の場合には夾雑菌の影響を受け菌分離が難しくなることは十分に考えられ、今後 10 cfu 程度の少ない菌数接種での検討も必要である。また、食品からの菌分離には、腸管出血性大腸菌検査法と同様、免疫磁気ビーズによる集菌や選択性のある分離平板培地の開発が必須である。

E. 結論

本研究では、(1) 腸管毒素原性大腸菌食中毒発生状況を解析し、上位 7 血清群の 06、025、027、0148、0153、0159、0169 が本菌の主要血清群と考えられた。本菌の食中毒には野菜・その加工品や水が重要であり、人、環境・水、調理場での二次汚染、海外渡航感染者や輸入食品が汚染経路の一端となっていることも推察された。また、(2) 腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮し、増菌

培養法および選択分離培地を検討し、mEC 培地での 42℃培養で腸管毒素原性大腸菌が十分に増殖することが確認された。分離培養には改善が必要であり、検出率を向上させる選択性のある分離平板培地や免疫磁気ビーズの開発が課題であると考えられた。一部検討によって、腸管毒素原性大腸菌の選択分離培地の開発に有用な選択剤の可能性が明らかになったので、今後、食品での検討が必要である。さらに、(3) 本菌の病原因子であるエンテロトキシン LT 遺伝子、ST 遺伝子を対象としたリアルタイム PCR 法の食品検体での応用を検討し、検討したリアルタイム PCR 法は検出感度に優れた毒素遺伝子検出法であることが判明した。今後さらに、他の食品群も用いて検査法を検討する必要がある。

F. 健康被害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi, N., Maeda, E., Saito, S., Furukawa, I., Ohnishi, T., Watanabe, M., Terajima, J. and Hara-Kudo, Y. Association of cell-adhesion activities with virulence in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 0103:H2. *Biocontrol Science*. 21: 57-61, 2016

2. 学会発表

星野 梢、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、大塚佳代子、工藤由起子。食品における腸管出血性大腸菌 6 血清群試験法のコラボレイティブスタディによる評価。第 19 回腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症研究会。平成 27 年 7 月。東京。

森 哲也、長尾清香、岸野かなえ、難波豊彦、高田 薫、工藤由起子。腸管出血性大腸菌の食品からの検出における DNA 抽出法および遺伝子検出法の検討。日本防菌防黴学会第 42 回年次大会。平成 27 年 9 月。大阪。

石川暢子、齋藤明美、吉田信一郎、市川希美、森 哲也、伊藤 武、池本尚人、加藤一郎、林 伸之、工藤由起子。ゼリー飲料および固形化成分を含有する粉末清涼飲料の細菌試験法の問題点とその改善法の検討。第 36 回日本食品微生物学会学術総会。平成 27 年 11 月。川崎。

大塚佳代子、森 哲也、上田泰史、中川弘、清水大輔、甲斐明美、小西典子、長尾清香、寺嶋 淳、工藤由起子。食品の腸管出血性大腸菌検査における VT 遺伝子検出機器及び試薬の検討。第 36 回日本食品微生物学会学術総会。平成 27 年 11 月。川崎。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 27 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）

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究

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

食品での統一的検査法の開発

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 1

研究要旨

本研究では、（１）腸管毒素原性大腸菌食中毒発生状況を解析し、上位 7 血清群の 06、025、027、0148、0153、0159、0169 が本菌の主要血清群と考えられた。本菌の食中毒には野菜・その加工品や水が重要であり、人、環境・水、調理場での二次汚染、海外渡航感染者や輸入食品が汚染経路の一端となっていることも推察された。また、（２）腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮し、増菌培養法および選択分離培地を検討し、mEC 培地での 42℃培養で腸管毒素原性大腸菌が十分に増殖することが確認された。また、腸管毒素原性大腸菌の選択分離培地の開発に有用な選択剤の可能性が明らかになった。さらに、（３）本菌の病原因子であるエンテロトキシン LT 遺伝子、ST 遺伝子を対象としたリアルタイム PCR 法の食品検体での応用を検討し、食品中でも約 10^3 cfu/mL 以上の検出感度であることが明らかになった。今後さらに、他の食品群も用いて検査法を検討する必要がある。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所 阪田理沙、高田 薫、都丸亜希子、寺嶋 淳

A. 研究目的

2012 年に感染症報告数集計において、下痢原性大腸菌（食中毒統計の病原大腸菌）の分類が新たな分類に改訂された。この新たな病原大腸菌の分類は、その判定のため

の病原因子またはマーカーが明示され、患者から分離された大腸菌株の病原大腸菌としての同定・判定が行いやすくなった。このため、食中毒事例での原因食品や汚染食品の調査に有用な方法が必要とされる。

しかし、腸管出血性大腸菌以外の病原大腸菌についての食品での検査法は、これまで、国内外ともにあまり検討されておらず、早急な確立が求められている。

食中毒統計における病因物質「その他の病原大腸菌」のうちの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、多くの集団事例が報告され、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。なお、腸管出血性大腸菌については、既に食品での検査法（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 の検査法について」、平成 27 年 3 月 24 日事務連絡）が通知されており、試験手順や培地などの一部が、この検査法と共通であれば効率的で効果的な検査法と考えられる。腸管毒素原性大腸菌はその病原性が明確であり、新たな病原大腸菌の判断基準に沿った食品での検査法を確立し、国の試験法の策定に貢献する。また、諸外国から参照される方法を確立したい。

本研究では、初めに（１）食中毒統計など疫学データから腸管毒素原性大腸菌食中毒発生状況を解析し、本菌の主要血清群を考察した。また、（２）腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮

し、増菌培養法および選択分離培地を検討した。さらに、（３）本菌の病原因子であるエンテロトキシン（易熱性エンテロトキシン；LT、耐熱性エンテロトキシン；ST）の遺伝子を対象としたリアルタイム PCR 法の食品検体での応用を検討した。なお、②と③については研究協力者（研究協力報告書参照）の実施条件と異なる条件にて実施した。

B. 研究方法

（１）腸管毒素原性大腸菌食中毒における主要血清群および関連する食品群の解析

厚生労働省が公表する食中毒発生状況および食中毒発生事例など食中毒統計（http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuchu/04.html）、食中毒事件詳報や国立感染症研究所・感染情報センターが公表する病原微生物検出情報（IASR、<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr.html>）による情報から腸管毒素原性大腸菌の主要血清群や関連する食品群を解析した。また、食中毒事件詳報の一部不明な点は各自治体に問い合わせて情報収集を行った。

（２）増菌培養法および選択分離培地の検討

腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮した増菌培養法および選択分離培地を検討した。

1) 菌株の mEC 培地中での増殖

腸管出血性大腸菌 6 血清群の通知法

と共通に使用できる増菌培養を腸管毒素原性大腸菌の試験にも用いることが最も現実的で効率が良いと考え、研究協力者（研究協力報告書参照）と同様に本研究室においても、modified EC 培地 (mEC、日水製薬) 中で 42℃ 18～24 時間培養での増殖性を確認した。まず、室温下保存していた腸管毒素原性大腸菌 17 株 (表 1) を mEC 培地 10 mL に 1 ユーゼ接種して 42℃ にて 18 時間培養した。培養後に肉眼にて増殖の有無を観察した。

2) 食肉と野菜に菌を接種した場合での mEC 培地での増殖性、寒天培地での分離、PCR 法での検出性

腸管毒素原性大腸菌 2 株 (ESC68 LT&ST 陽性, ESC608 ST 陽性 0169:H41) をトリプティケース・ソイ・ブロス (TSB、オキシド) 10 mL にて 37℃ にて 18 時間培養した (約 10^9 cfu/mL)。その菌液をリン酸緩衝生理食塩水 (ダルベッコ PBS (-)、日水製薬) 9 mL で 10 倍階段希釈して 10^{-6} (10^3 cfu/mL)、 10^{-7} (10^2 cfu/mL) 希釈液を調製し 2 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 枚のトリプティケース・ソイ・アガー培地 (TSA) に塗抹した後に、37℃ にて 18～24 時間培養し、コロニー数を計測した。

また、東京都内の小売店で購入した牛挽肉 (国産品)、およびキュウリ (国産品) 25 g をストマッカー袋に入れ、接種

菌液 0.1 mL (10^{-6} : 100 cfu、 10^{-7} : 10 cfu) を接種した。食品検体への接種は、株ごとに牛挽肉 2 検体 (10^{-6} 、 10^{-7} 接種菌液の接種)、キュウリ 2 検体 (10^{-6} 、 10^{-7} 接種菌液の接種) の合計 4 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、mEC 培地 225 mL を加え、ストマッカー処理を 1 分間行った後、42℃ にて 22 時間培養した。なお、接種菌数測定のために 10^{-6} 菌液 0.1 mL を 10 枚の TSA 培地に塗抹し、37℃ にて 18～24 時間培養して、生育コロニー数を計測し接種菌数を算出した。

食品培養液を腸管出血性大腸菌で使用する分離培地であるソルビトールマッコンキー培地 (SMAC, オキシド)、セフィキシム・亜テルル酸加 SMAC (CT-SMAC) 各 1 枚に画線し、37℃ 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℃ 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。

食品培養液からのアルカリ熱抽出法による DNA 抽出は、次のように実施した。食品培養液 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 μ L 添加して再浮遊させ、100℃ で 10 分間加熱し冷却後、滅菌した 1M Tris-HCl (pH 7.0) 15 μ L で中和した。それを遠心し上清

(10,000×g、10 分間) し、ST 遺伝子および LT 遺伝子の PCR 法に供した。ST 遺伝子および LT 遺伝子の PCR 法は、Stacy-Phipps らの方法 (J Clin Microbiol. 1995. 33:1054-1059) を参照して実施された。

- ・ ST 遺伝子 PCR 反応組成 (1 反応あたり) : 10× 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× 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) で電気泳動法にて確認した。

3) 選択分離培地に有用な選択剤の検討

選択分離培地の選定のため、選択剤として有用な物質をフェノタイプマイクロアレイ (オムニログシステム、バイオログ社) にて検討した。腸管毒素

原性大腸菌 5 株および食品培養液を SMAC に塗抹した際に生育した夾雑菌 3 株 (*Enterobacter cloacae*、*Enterobacter* sp.、*Klebsiella pneumoniae* 各 1 株) について約 200 種類の抗生物質などの薬剤の入ったマイクロプレートに一定の濁度に合わせた希釈菌液を接種して、37°C にて 72 時間まで培養した。各プレートの 96 穴ウェルに充填されたテトラゾリウム酸化還元染料にて菌の代謝による酸化還元を発色によって測定して各薬剤に対する耐性を確認した。その結果から有用と思われる薬剤については数種類の濃度となるように液体培地および SMAC に添加し、増殖性および生育性を確認した。

(3) リアルタイム PCR 法の食品検体での応用

食品増菌培養液からの優れた遺伝子スクリーニング法を選定するために、研究分担者の西川が先行して確立した本菌の病原因子であるエンテロトキシン (易熱性エンテロトキシン; LT、耐熱性エンテロトキシン; ST) の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 (Hidaka ら J. Appl. Microbiol., 106, 410-420, 2009) を参照し、検出特異性と検出感度を確認することにした。オリゴ合成によるプライマーおよびプローブおよび腸管出血性大腸菌のスクリーニングで用いられる TaqMan Environmental Master Mix を使用して系を設定した。検出感度については、PBS お

および食品培養液での検討を行った。

検出特異性は菌株の DNA 抽出液を用いて確認した。まず、腸管毒素原大腸菌 17 株 (表 1) を TSB10 mL にて 37°C で 18 時間培養した (約 10^9 cfu/mL)。菌数の測定のために、PBS にて 10 倍段階希釈して作製した 10^{-6} 希釈菌液 (約 10^3 cfu/mL) 0.1 mL を 5 枚の TSA に塗抹した。37°C で 18~24 時間培養し、生育したコロニー数を計測し、菌数を算出した。DNA 抽出はアルカリ熱抽出法によって行った。まず、上記の菌培養液 0.1 mL をマイクロチューブに採り、 $10,000\times g$ 、10 分間遠心し、上清を取り除いた沈渣に滅菌した 50 mM NaOH 85 μ L を添加して再浮遊させ、100°C で 10 分間加熱した。冷却後、滅菌した 1M Tris-HCl (pH 7.0) 15 μ L を添加して中和し、 $10,000\times g$ 、10 分間遠心した上清約 0.1 mL を新たなチューブに移し、これを DNA 液とした。

また、検出感度を確認するための食品培養液の作製のために、長ネギ (千葉県産) 25 g をストマッカー袋に秤量し mEC 培地 225 mL を加えた。ストマッカー処理を 1 分間行った後、 $42\pm 1^\circ\text{C}$ で 20~24 時間培養した。上記の菌培養液のうち ESC625 (STp)、ESC626 (STp)、ESC627 (LT、STh)、ESC628 (STp) の 4 株を PBS にて、ESC625 (STp)、ESC626 (STp)、ESC627 (LT、STh)、ESC628 (STp)、ESC630 (LT、STh)、ESC632 (STh) の 6 株を食品培養液にて、希釈菌液を作製した。各菌培養液 0.1 mL を PBS または食品培養液 0.9 mL にて 10 倍段階希釈して、

10^{-8} 希釈菌液まで調製した。これらの希釈菌液を上述したアルカリ熱抽出法にて DNA を抽出した。

リアルタイム PCR 法は、LT 遺伝子 (elt) および ST 遺伝子 (est-h STh、est-p STp) を標的とし、Hidaka ら (J. Appl. Microbiol., 106, 410-420, 2009) が報告した方法を参照して、simplex 反応系として行った。反応系に用いた プライマーおよびプローブは表 2 に示す。反応液は、TaqMan Environmental MasterMix 2.0 (アプライドバイオシステムズ) を用い、表 3 に従って反応液を調製して反応プレートに分注し、鋳型 DNA 液 5 μ L を加えて合計 30 μ L とした。増幅反応は、50°C 2 分、95°C 10 分、95°C 15 秒・60°C 1 分 45 サイクルに設定し、7500 リアルタイム PCR システム (アプライドバイオシステムズ) にて測定した。測定時、FAM は FAM-MBG、HEX は VIC-MBG の蛍光ラベルの設定で行い、結果解析時には、Auto または Manual 設定にて解析し Ct 値を得た。

C. 研究結果

(1) 腸管毒素原性大腸菌食中毒における主要血清群および関連する食品群の解析

腸管毒素原性大腸菌の食中毒は、食中毒統計上は「その他の病原大腸菌」(腸管出血性大腸菌以外の病原大腸菌)に含まれる。「その他の病原大腸菌」の 1999 年 (平成 11 年) 以降の食中毒統計の原因物質別の食中毒発生件数および患者数 (全体) を

みると、件数は2002年（平成14年）には約100件でありその前年までの半数以下に減少し、2007年以降は10件未満と現在までに大きく減少した状況である（図1）。また、患者数は、2001年は2500人を越えていたが、それ以後に減少がはじまり年間数10人から1,000人くらいで推移している。

食中毒事件詳報などを参考にして、「その他の病原大腸菌」の中の「腸管毒素原性大腸菌」について平成20年から平成27年の事例を整理した（表4）。その結果、平成20年から平成27年では事件数は平成23年に長ネギ小口切りが使用された事例が各地で同時期に報告されたため21件と多かったが、年間数件前後で推移している（表5）。患者数については、80人くらいから1,000人を越える年もある。300人または500人を越える事例の報告も珍しくない（表5）。ちなみに、腸管毒素原性大腸菌以外の「その他の病原大腸菌」食中毒の件数は平成22年以降減少傾向であり、患者数は100を越える年もあるが、件数および患者数のいずれも腸管毒素原性大腸菌より少ない（表5）。

また、平成20年から平成27年の事例から腸管毒素原性大腸菌の血清群を解析した結果、0148が最も多かった（表6）。しかし、平成23年に長ネギ小口切りが使用された事例が0148を原因としていたため、19件のうち13件は同一食品由来と考えると7件が0148を原因とする事例数と

推察された。次に多い血清群は、06および0159の各9件であった。それらに続いて0169、025、0153、027があげられ、これら上位7血清群が主要血清群と思われた。

さらに、平成12年から平成27年の「その他の病原大腸菌」のうち原因食品が明らかになった（推定も含む）事例38件を整理し、そのうちの腸管毒素原性大腸菌食中毒20件について表7に、腸管毒素原性大腸菌以外の「その他の病原大腸菌」食中毒18件について表8に示した。原因食品を食品群に分類して集計した結果（表9）、腸管毒素原性大腸菌では野菜が最も多く、半数以上を占め、次に水が多かった。腸管毒素原性大腸菌以外の「その他の病原大腸菌」では水が最も多く、2/3を占めた、次に肉魚が多い結果であった。

IASRの報告の中に、2000年以降に以下の2件の海外渡航中の食事による食中毒が報告されている。

事例1：2004年7月、福岡市にて香港旅行ホテル朝食を原因食品とした血清型06:H16、0159:HUT、018（ST産生性株）腸管毒素原性大腸菌による患者数36人の食中毒が発生（「香港旅行におけるST産生性毒素原性大腸菌による食中毒事例－福岡市」IASR Vol. 25 p262:2004年10月号）

事例2：2001年8月、佐賀市にて中国北京旅行中の食事原因食品とした血清型06:HUT、025:HUT、027:H7、0126:HUT、0153:HUT、OUT:H11、OUT:H14（LT&ST産生

株) 腸管毒素原性大腸菌による患者数 139 人の食中毒が発生(「中国旅行者(修学旅行の高校生)に発生した毒素原性大腸菌による集団下痢症—佐賀県」IASR Vol. 23 p17 : 2002 年 1 月号)

(2) 増菌培養法および選択分離培地の検討

1) 菌株の mEC 培地中での増殖

供試した腸管毒素原性大腸菌 17 菌株全てが、mEC 培地中で 42℃培養にて増殖した(表 10)。若干、沈殿が認められるものもあった。

2) 食肉と野菜に菌を接種した場合での mEC 培地での増殖性、寒天培地での分離、PCR 法での検出性

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(cfu)は、ESC68 では 110、83、127、111、120、108、102、105、96、108 であり、ESC608 では 120、117、121、118、101、133、113、107、83、114 であり、その平均はそれぞれ 107 および 112.7 であった。接種菌液の原液の菌濃度は両菌株ともに 1.1×10^9 cfu/mL と算出され、 10^{-6} 菌液 0.1 mL 接種では ESC68 約 107 cfu、ESC608 約 113 cfu、 10^{-7} 希釈菌液接種では両菌株とも約 11 cfu が 1 検体に接種されたと算出された。

食品培養液からの ST 遺伝子の検出結果は、牛挽肉検体では、いずれの菌接種レベルにおいても容易に増幅産物像が確認された(表 11)。しかし、キュウ

りでは、10 cfu/25 g レベルでは、ST 遺伝子は両菌株とも検出されなかった。また、LT 遺伝子の検出結果は、本遺伝子を保有する ESC68 では両食品ともに 10 cfu/25 g レベルでも検出された(表 11)。しかし、LT 遺伝子を保有しない牛挽肉で ESC608 株において、牛挽肉の 10^2 cfu/25 g レベルで LT 遺伝子が検出されていた。

分離平板培地上のコロニーの ST 遺伝子および LT 遺伝子の検出結果は、CT-SMAC では、いずれの菌接種レベルにおいても両遺伝子ともに検出されなかった。SMAC では、いずれの遺伝子も 10 cfu/25 g レベルで 2 コロニーのうちの 1 コロニーで検出される場合が認められたが、 10^2 cfu/25 g レベルでは検出されなかった。しかし、不明瞭な泳動像であるものもあった(表 11)。

3) 選択分離培地に有用な選択剤の検討

選択分離培地の選定のため、選択剤として有用な物質をフェノタイプマイクロアレイにて検討したところ、夾雑菌が非生育であり腸管毒素原性大腸菌が生育したと考えられた選択剤が 8 種類あったが、腸管毒素原性大腸菌の菌株による生育性の差異も認められた(表 12)。比較的菌株間での差異が少ないものが 2 種類(D および G) あった。今後、それらを添加した液体培地および SMAC など寒天培地を作製し、そこに菌を接種して夾雑菌が非生育であり腸

管毒素原性大腸菌が生育する濃度を確
認することが必要である。

(3)リアルタイムPCR法の食品検体での
応用

LT 遺伝子、STh 遺伝子および STp 遺伝
子を標的としたリアルタイム PCR 法の特
異性を確認するために、腸管毒素原大腸菌
17 株の DNA 抽出液を用いて実施したとこ
ろ、いずれの菌株に付いてもについて菌株
の分与元機関からの情報と一致した結果
が得られた (表 1)。

PBS および食品培養液の影響に供試し
た菌培養液の菌数(cfu/mL)は $2.8 \times 10^8 \sim$
 8.9×10^8 cfu/mL であり、菌株間で比較し
て 10 倍以上増殖性が異なる株はなかった
(表 13)。これら菌数を使用して、PBS お
よび食品培養液での菌の希釈菌液での菌
数と Ct 値での相関関係を確認した。

PBS による希釈菌液の結果では、用いた
4 株全てにおいて、LT 遺伝子、STh 遺伝子
および STp 遺伝子の各リアルタイム PCR
法のいずれも、菌数と Ct 値の間に高い相
関が認められた (図 2)。LT 遺伝子のリア
ルタイム PCR 法では、 $7.9 \sim 7.9 \times 10^8$
cfu/mL の範囲で Ct 値が得られた。しかし、
陰性コントロールが Ct 値 36.52 であり、
この検量線から生菌数を算出すると
21.39 cfu/mL であった。STh 遺伝子のリア
ルタイム PCR 法では、 $7.9 \times 10^3 \sim 7.9 \times$
 10^8 cfu/mL の範囲で検出された ($7.9 \sim$
 7.9×10^2 cfu/mL で不検出)。陰性コント
ロールでは検出されなかった。STp 遺伝子の

リアルタイムPCR法では、ESC626 と ESC628
では、それぞれ $8.9 \sim 8.9 \times 10^8$ cfu/mL
と $7.9 \sim 7.9 \times 10^8$ cfu/mL の範囲で、
ESC625 では $8.2 \times 10^2 \sim 8.2 \times 10^8$ cfu/mL
の範囲で検出された (8.2 と 8.2×10^1
cfu/mL で不検出)。検量線は、ESC626 と
ESC628 に比べて ESC625 が上方になった。
陰性コントロールでは検出されなかった。
また、全ての Ct 値が得られた $7.9 \times 10^2 \sim$
 8.9×10^2 cfu/mL から $7.9 \times 10^8 \sim 8.9 \times$
 10^8 cfu/mL の範囲で、Ct 値の差が最も大
きかったのは 10^2 cfu/mL レベルの 3.22 で
あり、最高値は ESC625 の 37.25、最低値
は ESC626 の 34.03 であった。差が最も小
さかったのは 10^3 cfu/mL レベルの 1.59 で
あり、最高値は ESC625 の 33.19、最低値
は ESC626 の 31.60 であった。 10^3 cfu/mL
の Ct 値は、それぞれ 17.88、16.02、15.29
であり、最高値の ESC625 と最低値の
ESC628 の差は 2.59 あった。

食品培養液による希釈菌液の結果でも、
用いた 6 株全てにおいて、LT 遺伝子、STh
遺伝子および STp 遺伝子の各リアルタイ
ム PCR 法のいずれも、菌数と Ct 値の間に
高い相関が認められた (図 3)。LT 遺伝子
のリアルタイムPCR法では、用いた ESC627
と ESC630 で、それぞれ $4.9 \sim 4.9 \times 10^8$
cfu/mL と $2.8 \sim 2.8 \times 10^8$ cfu/mL の範囲
で Ct 値が検出された。PBS による希釈菌
液の結果と同様に、陰性コントロールで検
出され、Ct 値が ESC627 と ESC630 でそれ
ぞれ 36.24 と 36.32 であり、この検量線か