

. 分 担 研 究 報 告 書

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 28 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、腸管毒素原性大腸菌食中毒発生状況の解析から決定した主要血清群 O6、O25、O27、O148、O153、O159、O169 を対象として食品での効率的な試験法を確立することを目的とする。本年度は、(1)平成 27 年度検討した 6 血清群に加え血清群 O153 について、mEC 培地での 42 培養で本菌が十分に増殖すること、また、本菌エンテロトキシンの 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、優れた検出感度にて検出されることが確認された。(2)別のリアルタイム PCR 法についても食品培養液中での腸管毒素原性大腸菌の検出を検討した結果、検出感度が優れ（検出限界： 10^3 cfu/ml）相関性の高い検量線が作製されたことから定量性にも優れることが示された。(3)主要 7 血清群を対象とした免疫磁気ビーズの作製方法を確立し、集菌効果が期待されることが示された。(4)食品、特に野菜からの分離培養での免疫磁気ビーズ法による腸管毒素原性大腸菌分離の向上効果を検討した。また、腸管毒素原性大腸菌の選択分離培地の開発を目指して、これまでの研究成果から有用と考えられた抗生物質を添加したソルビトールマッコンキー寒天培地にて分離性を検討した。その結果、免疫磁気ビーズ法および抗生物質を加えた分離培地を使用することによって、効率的な腸管毒素原性大腸菌の分離培養法が確立されることが考えられた。本研究から、腸管出血性大腸菌と同一の条件で増菌培養した後に、リアルタイム PCR 法での腸管毒素原性大腸菌エンテロトキシンの遺伝子の検出、免疫磁気ビーズ法を組み合わせた選択分離培養を行うことが本菌の検出法として優れる方法であると考えられた。

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、大阪美紗
東京都健康安全研究センター	小西典子、尾畑浩魅、平井昭彦
東京医科大学	甲斐明美

藤沢市保健所	佐藤 健
倉敷市保健所	杉村一彦
大分県衛生環境研究センター	成松浩志
国立医薬品食品衛生研究所	都丸亜希子、寺嶋 淳

A. 研究目的

平成 24 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が、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、国内外ともあまり検討されておらず、早急な確立が求められている。腸管毒素原性大腸菌（EPEC）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だけでなく、諸外国からも参照される方法を確立することを目的とする。平成 27 年度には、EPEC 食中毒発生状況の解析から主要血清群を O6、O25、O27、O148、O153、O159、O169 の 7 血清群に決定した。血清群 O153 以外の 6 血清群を対象に増菌培養法を検討し、培地、培養温度および培養時間については、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 O26、O103、O111、O121、O145 および O157 の検査法について」、平成 27 年 3 月 24 日事務連絡）と共通して使用できることを明らかにし、血清群 O153 については今年度（平成 28 年度）に検討することにした。また、EPEC の病原

因子である耐熱性エンテロトキシン（ST）および易熱性エンテロトキシン（LT）のリアルタイム PCR 法による遺伝子検出系について、平成 27 年度検討して良好な検出感度を有することが示された系に加えて新たな系も検討することにした。さらに、今年度は、食品からの腸管出血性大腸菌（STEC）などの食中毒細菌の試験において、効率的な検査法のひとつとして用いられている免疫磁気ビーズ法を応用することを検討することとし、EPEC 7 血清群の免疫磁気ビーズを自家作製した。食品培養液からの EPEC 検出感度を確認することにしたが、免疫磁気ビーズ法でのビーズ濃縮液を EPEC 選択性に優れる分離培地に塗抹することによって分離効率の向上を目指すことを考えた。平成 27 年度に得られた選択性に優れる抗生物質を添加した分離培地および STEC の分離培地として開発・販売されている酵素基質培地を供試して、食品からの分離を検討することにした。

B. 研究方法

（1）EPEC O153 の増菌培養法および選択分離培地の検討

平成 27 年度に EPEC 主要 7 血清群のう

ちの 0153 以外の 6 血清群で実施した、STEC 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、0153 について検討した。

1) 増菌培養条件の検討

食中毒事例に由来する血清群 0153 計 4 株を modified EC 培地(mEC)に接種し 36 および 42 での 18 時間培養の増殖を試験した。

2) 選択分離培地の検討

上記の 4 株をソルビトールマッコンキ-寒天培地 (SMAC)、DHL 寒天培地、ドリガルスキー改良培地に画線塗抹し 37、20 時間培養した。

(2) 新たな ST および LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法の検討

1) 菌接種食品培養液での ST および LT 遺伝子検出法の検出感度試験

平成 27 年度に検討した Hidaka らの報告している ST および LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法 (J. Appl. Microbiol., 106, 410- 420) に加え、新たに他のリアルタイム PCR 法の系を検討した。系の選定としては、West らが報告した STp 遺伝子および LT 遺伝子を標的としたプライマー・プローブ (Veterinary Microbiology, 2007, 122, 323-331) また、共同研究者の小西らが選定した STh 遺伝子を標的としたプライマー・プローブを組合せたマルチプレックス反応にて行った。反応試薬は TaqMan Enviromental MasterMix2.0 を使用し反応液を調製した。リアルタイ

ム PCR 機器は ABI ViiA7 を使用し、50 2 分、95 10 分の熱変性ののち、95 15 秒 - 60 1 分で 40 サイクルの増幅反応後、Auto 又は Manual 設定にて解析し Ct 値を得た。また、菌接種食品培養液からの分離培養は、DHL 寒天培地などにて行った。

供試菌株には、平成 27 年度と同様に 06:HNM、0148:H28、0169:H41 の 3 血清群の各 1 株、食品はミニトマト、大根の漬物、根深ネギ、生ワカメとした。食品を mEC 培地にて 42、20 時間培養した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。

2) 接種食品での ETEC 検査法の検討

供試菌株および供試食品は、上述の 1) と同一とした。菌株のトリプティケース・ソイ・ブロス (TSB) 培養液をリン酸緩衝希釈水で 10^{-5} 希釈し、接種菌液 (想定菌濃度 10^4 cfu/ml) とし、食品 25g に接種菌液 250 μ l を添加後 (想定菌濃度 10^2 cfu/g) 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。各食品の mEC 培養液をアルカリ熱抽出し、遠心上清をテンプレートとした。リアルタイム PCR は上述の 1) と同一のマルチプレックス反応で行い、Ct 値を得た。1) で調製した希釈菌液を接種した食品培養液のアルカリ熱抽出試料を用い、n3 にて検量線を作成し、42、20 時間培

養後の mEC 培養液中の菌数を算出した。

(3) 免疫磁気ビーズの自家調製

予備試験として赤痢菌を用いて磁気ビーズに感作させる血清量および反応時間を検討した。市販の免疫血清 1~100 μ l を磁気ビーズである Dynabeads M-280 に加え、2 時間、室温で反応した。また、磁気ビーズ 250 μ l に対し血清量 10 μ l 加え、室温で感作時間を 15 分~120 分として反応した。それぞれの条件で作製した免疫磁気ビーズを用い、ソルネ赤痢菌の TSB、37 培養液を滅菌リン酸緩衝液 (PBS) で段階希釈した菌液 (菌数 $10^5 \sim 10^1$ cfu/ml) から菌の検出を試み、吸着性を評価した。次に、これらの結果から得られた適切な血清量 (20 μ l) および反応時間 (2 時間) を考慮して、毒素原性大腸菌の血清群 06、025、027、0148、0153、0159、0169 の計 7 血清群について免疫磁気ビーズを作製した。市販の病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研) の 4 ロットと供試菌株 (生菌) をスライド凝集法で反応させ、最も短時間で強い凝集が認められた血清のロットを原液のまま免疫磁気ビーズ作製用に使用した。大腸菌自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果の検証については、各血清群の大腸菌の TSB 培養液を PBS にて 10 段階希釈し $10^4 \sim 10^1$ cfu/ml の希釈菌液 1 ml を対象に自家調製免疫磁気ビーズを用いて集菌を行った。集菌したビーズの懸濁液 (0.1 ml) を平板培地 (SMAC、抗生物質加 SMAC、クロモアガー STEC 基礎培地、

DHL 寒天) に各 10 μ l ずつ塗抹し、37 で 18~20 時間培養後、各平板に発育した集落数を計測した。

(4) ETEC 主要 7 血清群の免疫磁気ビーズの感度試験

06 (STh、LT 陽性株)、025 (STh 陽性株)、027 (STp 陽性株)、0148 (STh 陽性株)、0153 (STh 陽性株)、0159 (STp 陽性株)、0169 (STp 陽性株) の 7 血清群各 1 株の ETEC を用いた。供試した食品 (生ワカメ、キュウリ、根深ネギ、オオバ、コネギ) 25 g に mEC 培地 225 ml をそれぞれに加え、42 で 20~24 時間培養した。各菌株を TSB にて培養し、その $10^{-4} \sim 10^{-7}$ 希釈菌液 (約 $10^4 \sim 10^2$ cfu/ml) 0.1 ml をそれぞれ食品培養液 0.9 ml に接種して $10^{-6} \sim 10^{-8}$ 菌液接種食品培養液 (約 $10^3 \sim 10^1$ cfu/ml) を作製した。それら 1 ml に対して、免疫磁気ビーズ 20 μ l ずつをマイクロチューブに加え、常法にて免疫磁気ビーズ濃縮液 (0.1 ml) を得た。それを SMAC、抗生物質加 SMAC およびクロモアガー STEC 基礎培地に 10 μ l ずつ画線した (免疫磁気ビーズ塗抹法、IMS 塗抹法)。また、SMAC に直接塗抹法にて画線した。寒天培地は 2 枚ずつ画線し、1 枚ずつ 37 および 42 で 18~24 時間培養した。ETEC と疑われるコロニーを培地から釣菌し、血清凝集反応試験を行った。

C. 研究結果

(1) ETEC 0153 の増菌培養法および選択

分離培地の検討

供試した4菌株すべてがmEC培地36および42の両温度にて $10^7 \sim 10^8$ cfu/mlに増殖した。また、いずれの分離平板培地における発育状況に差が認められなかった。

(2) 新たなSTおよびLT遺伝子検出リアルタイムPCR法の検討

1) 菌接種食品培養液でのSTおよびLT遺伝子検出法の検出感度試験

各濃度に希釈した菌液を接種した食品培養液からのST遺伝子およびLT遺伝子検出における検出感度は、試験した4食品すべて、また供試菌株3株すべてにおいて 10^3 cfu以上/mlで両遺伝子が検出された。

2) 接種食品でのEPEC検査法の検討

食品に接種された3菌株は、mEC培養液のリアルタイムPCR検査にて、全食品からSTおよびLT遺伝子が検出された。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、ミニトマトに接種した06株は約 10^8 cfu/ml、0148株は約 10^8 cfu/ml、0169株は約 10^8 cfu/mlであった。漬物に接種した06株は約 $10^8 \sim 10^9$ cfu/ml、0148株は約 10^8 cfu/ml、0169株は約 10^8 cfu/mlであった。根深ネギに接種した06株は約 10^8 cfu/ml、0148株は約 10^8 cfu/ml、0169株は約 10^8 cfu/mlであった。生食用ボイルワカメに接種した06株は約 10^8 cfu/ml、0148株は約 10^8

cfu/ml、0169株は約 10^8 cfu/mlであった。

(3) 免疫磁気ビーズの自家調製

予備試験の結果、磁気ビーズに感作させる血清量が5~100 μ lでは 10^1 cfu/mlまで検出できたが、1~2 μ lでは 10^3 cfu/mlまでしか検出できなかった。反応時間については、15分では 10^2 cfu/mlまでの検出であったが、30分以上感作させた場合には 10^1 cfu/mlまで検出することが可能であった。反応性の強い血清を選択するために行ったロット間の比較では、0148、0153、0159、0169は2種類の血清のいずれにも強い凝集が認められた。025と027は血清のロットによって凝集の強さに差が認められた。06については全ての血清と凝集が認められた。これらの結果を考慮し、使用する血清を選定し免疫磁気ビーズを作製し、集菌効果を評価した。その結果、027、0148、0159は 10^0 cfu/mlまで、025、0153、0169は 10^1 cfu/mlまで検出可能であった。しかし、06は 10^3 cfu/mlまでの検出であり、集菌効果は低かった。

(4) EPEC主要7血清群の免疫磁気ビーズの感度試験

供試菌株はいずれも、SMAC上で赤色およびクロモアガーSTEC基礎培地上で藤色のコロニーを形成することを事前に確認された。

キュウリ培養液では、塗抹した各種寒天培地を37で培養した場合には、検出された血清群の数は、IMS塗抹法での抗生

物質加 SMAC では全 7 血清群、SMAC では 3 血清群、クロモアガー-STECC 基礎培地では 2 血清群、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 4 血清群であった。42 培養では、IMS 塗抹法でいずれの培地でも検出された血清群は 37 より少なかったが、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では多かった（6 血清群）。

生ワカメ培養液では、塗抹した各種寒天培地を 37 で培養した場合では、検出された血清群の数は、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では全 7 血清群、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地では 3 血清群から分離されたが、IMS 塗抹法で供試した SMAC ではいずれの血清群も分離されなかった。42 培養では、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC およびクロモアガー-STECC 基礎培地、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 5 血清群であったが、IMS 塗抹法で供試した SMAC では 1 血清群のみであった。

根深ネギでは、塗抹した各種寒天培地を 37 で培養した場合では、検出された血清群の数は、IMS 塗抹法で供試した SMAC および抗生物質加 SMAC では全 7 血清群、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地および直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 6 血清群であった。42 培養では、IMS 塗抹法で供試した SMAC およびクロモアガー-STECC 基礎培地では全 7 血清群、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC では 4 血清群、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 3

血清群であった。

オオバ培養液では、塗抹した各種寒天培地を 37 で培養した場合では、検出された血清群の数は、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC では全 7 血清群、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 6 血清群、IMS 塗抹法の SMAC では 3 血清群であり、クロモアガー-STECC 基礎培地からは分離されなかった。42 培養では、検出された血清群の数は、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地では 6 血清群、IMS 塗抹法の SMAC および直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 4 血清群であり、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地からは分離されなかった。

コネギ培養液では、塗抹した各種寒天培地を 37 で培養した場合では、検出された血清群の数は、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地では全 7 血清群、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC では 6 血清群、IMS 塗抹法の SMAC では 3 血清群であり、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC からは分離されなかった。42 培養では、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では全 7 血清群、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地では 5 血清群、IMS 塗抹法の SMAC および抗生物質加 SMAC では 3 血清群であった。

D. 考察

平成 27 年度の研究において、日本における腸管毒素原性大腸菌の主要な血清群

は 06、025、027、0148、0153、0159、0169 の 7 種類であることが明らかとなった。このため、これら 7 血清群を対象として平成 27 年度および平成 28 年度に研究を行い、これら血清群は、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で、同一の培養温度である。そのため、汚染食品の排除や食中毒発生の未然防止を図るために実施される市販流通食品の汚染実態調査において、病原機構の異なる腸管出血性大腸菌や腸管毒素原性大腸菌という重要な 2 種類の病原大腸菌検査を同じ培養条件で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。

平成 27 年度の研究で検討したりアルタイム PCR とは異なる、新たに構築した反応系による ST および LT 遺伝子検出を評価した。その検出感度は、マルチプレックス反応で標的の遺伝子を菌濃度 10^3 cfu 以上 / 食品培養液 ml で検出でき、平成 27 年度に報告した Hidaka らのリアルタイム PCR の検出感度と一致する結果が得られた。これら 2 種類の反応系を策定できたことは、食品の腸管毒素原性大腸菌遺伝子スクリーニング検査において、使用可能な検出機器および試薬の選択肢が広がるものと期待する。

また、喫食前に加熱工程を要しない食品であるミニトマト、漬物、根深ネギ、

生食用ボイルワカメに腸管毒素原性大腸菌を食品 1g 当たり 100 cfu 接種し、mEC 培地で 42 培養後、新リアルタイム PCR により ST 遺伝子および LT 遺伝子が検出された。一般細菌数および大腸菌群数が 10^3 cfu/g 以下の食品では腸管毒素原性大腸菌は mEC 培地 42 培養で 20 時間後に 10^8 cfu/ml まで増殖することが検量線から推定された。過去に東京都で発生した腸管毒素原性大腸菌食中毒において、「ほうれん草のピーナツあえ」、「野菜のあえもの」、「キムチ」等が原因食品と特定されたことを踏まえ、次年度の研究では野菜やその加工品、また夾雑菌の多い食品を供試食品とし、10 cfu/g 程度の少ない菌数汚染を想定した食品からの検査法について検討する必要がある。

食品培養液から目的とする菌を検出するには、免疫磁気ビーズ法で集菌する方法が最も効率がよいことが知られており、本研究においても開発を行った。まず、磁気ビーズに感作させる血清量を検討したところ、磁気ビーズ 250 μ l に対し、最低 5 μ l の市販血清を反応させれば 10^1 cfu/ml まで検出できることが明らかとなった。5 μ l 以上であれば 100 μ l まで血清量を増やしても、集菌効果に差は認められなかった。次に、血清と磁気ビーズの感作時間の検討を行った。反応時間 15 分では 10^2 cfu/ml までの集菌であったが、反応時間 30 分以降は 10^1 cfu/ml まで検出することが可能であった。これら検討結

果から、毒素原性大腸菌免疫磁気ビーズの作製は、磁気ビーズ 250 μ l 当たり血清 20 μ l、室温で 2 時間反応させる方法とした。なお、血清群 06 は他 6 血清群と比して、検出感度が弱い結果が示されたが、本研究で供試した菌株は加熱菌体での凝集反応ではいずれも凝集が認められることから、今回用いた 06 は K 抗原がリッチな株であった可能性が示唆された。今後、作製した免疫磁気ビーズがいつまで保存可能であるか、またより簡便な集菌効果の確認方法（感度試験）を検討する必要がある。

免疫磁気ビーズ法による ETEC 分離率の向上効果を確認するために、抗生物質加 SMAC に塗抹し、37 および 42 にて培養し確認したところ、両培養温度ともに IMS 塗抹法のほうが直接塗抹法よりも検出性が優れる食品が多かった。特に、37 培養においては全ての血清群および食品において検出された。これらのことから、免疫磁気ビーズ法を行い、抗生物質加 SMAC に塗抹して 37 で培養することによって、食品培養液中の ETEC が約 10^4 cfu/ml の濃度以上であれば、ETEC を分離することが可能であることが示された。なお、血清群 06 では、37 において直接塗抹法にても ETEC が十分に分離され、IMS 塗抹法によってむしろ検出性が低下する傾向もみられた。この理由として、夾雑菌の生育が抗生物質加 SMAC 上で抑制されることに加え、血清群 06 がこの培地上での生

育に優れるため直接塗抹法でも十分に検出できることが考えられた。加えて、免疫磁気ビーズに使用した抗 06 抗体の血清群 06 菌体との吸着が芳しくないことが考えられた。また、これまでの研究から、本来は STEC の選択分離のための酵素基質培地であるクロモアガー STEC 基礎培地上で、ETEC 7 血清群はいずれも STEC と同様に藤色のコロニーとして生育することから、ETEC の選択分離培地として大変に有用と思われる結果を得ていた。このため、IMS 塗抹法にてクロモアガー STEC 基礎培地、SMAC および抗生物質加 SMAC を比較したところ、クロモアガー STEC 基礎培地は抗生物質加 SMAC よりも食品の夾雑菌を抑制する選択性に乏しいこと示され、選択性を強めることを検討することによって、優れた選択分離培地となることが考えられた。以上のことから、血清群および食品を総合的に考えると、免疫磁気ビーズ法を行い抗生物質加 SMAC に塗抹し、37 で培養する方法が ETEC の分離に優れており、血清群 06 では直接塗抹法によっても優れた結果が得られることが期待される。

E. 結論

本年度は、(1) 平成 27 年度検討した 6 血清群に加え血清群 0153 について、mEC 培地での 42 培養で本菌が十分に増殖すること、また、本菌エンテロトキシンの 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、優れた検出感度にて検出されることが確認された。(2) 検討したリアルタイム PCR 法に加えて、別のリアルタイム PCR 法についても食品培養液中での ETEC の検出を検討した結果、検出感度が優れ(検出限界: 10^3 cfu/ml) 相関性の高い検量線が作製されたことから定量性にも優れることが示された。(3) 主要 7 血清群を対象とした免疫磁気ビーズの作製方法を確立し、集菌効果が期待されることが示された。(4) 食品、特に野菜からの分離培養での免疫磁気ビーズ法による ETEC 分離の向上効果を検討した。また、ETEC の選択分離培地の開発を目指して、これまでの研究成果から有用と考えられた抗生物質を添加した SMAC にて分離性を検討した。その結果、免疫磁気ビーズ法および抗生物質を加えた分離培地を使用することによって、効率的な ETEC の分離培養法が確立されることが考えられた。本研究から、腸管出血性大腸菌と同一の条件で増菌培養した後に、リアルタイム PCR 法での ETEC エンテロトキシンの遺伝子の検出、免疫磁気ビーズ法を組み合わせた選択分離培養を行うことが本菌の検出法として優れる方法であると考えられた。これらの方法について、今後、複数機関での検証が必要である。

F. 健康被害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hara-Kudo, Y., Konishi, N., Otsuka, K., Iwabuchi, K., Kikuchi, R., Isobe, J., Yamazaki, T., Suzuki, F., Nagai, Y., Yamada, Y., Tanouchi, A., Mori, T., Nakagawa, H., Ueda, Y., and Terajima, J. An interlaboratory study on efficient detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O103, O111, O121, O145, and O157 in food using real-time PCR assay and chromogenic agar. *Int. J. Food Microbiol.* 230:81-88, 2016.

2. 学会発表

森 哲也、長尾清香、岸野かなえ、難波豊彦、伊藤武、工藤由起子. 食品からの腸管出血性大腸菌検出における DNA 抽出と遺伝子検出法の検討. 第 111 回日本食品衛生学会学術講演会. 平成 28 年 5 月 19、20 日. 東京.

尾畑浩魅、高橋正樹、河村真保、山本浩平、山梨敬子、小西典子、平井昭彦、甲斐明美、貞升健志: 自家調製免疫磁気ビーズ作製法の検討とその応用, 第 37 回日本食品微生物学会学術講演会, 2016 年 9 月, 東京

大阪美紗、大塚佳代子、星野 梢、門脇奈津子、榊田 希、小西典子、甲斐明美、寺嶋 淳、工藤由起子. 食品での腸管毒素原性大腸菌検査法を確立するための基礎検討. 第 112 回日本食品衛生学会.

平成 28 年 10 月 27-28 日．函館．

小西典子、尾畑浩魅、平井昭彦、甲斐明美、大塚佳代子、寺嶋 淳、工藤由起子．毒素原性大腸菌による集団および散発下痢症の特性解析．第 112 回日本食品衛生学会．平成 28 年 10 月 27-28 日．函館．

Lee, K., Kobayashi, N., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y., Tsubone, H., Kumagai, S. and Hara-Kudo, Y. 2016. Spread and change in stress resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 0157 on food-related fungal colonies, International Symposium of Mycotoxicology 2016, Tokyo, Japan.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし