

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

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 3

研究要旨

腸管毒素原性大腸菌は、食中毒の病因物質のひとつであり、腸管出血性大腸菌と並び、事件発生の頻度や事件当たりの患者数が多いものの、食品からの検査法は未だ確立されていない。本研究では、腸管毒素原性大腸菌の病原因子である毒素遺伝子の検出系を利用した、食品からの本菌検出を目指す。H28年度は、腸管毒素原性大腸菌の主要な血清群のひとつである O153 の培養条件、及び H27 年度に検討した遺伝子検出系とは異なる新たに構築した検出系について基礎データの収集を行った。

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

A. 研究目的

日本では、年間 1,000 件ほどの食中毒事件が発生し、患者約 2 万人が食中毒の被害に遭っている。食中毒の病因物質のひとつである病原大腸菌は、その病原機構に基づき少なくとも 5 つ以上のグループに分類されている。また、大腸菌はヒトの常在菌として腸内に定着しており、下痢等を引き起こす病原性のある大腸菌と鑑別する

ことは難しい。

病原大腸菌のひとつである「腸管出血性大腸菌」は、ヒトに重篤な危害を与えた学校給食による食中毒事例を契機に、平成 9 年に食品からの腸管出血性大腸菌検査法が厚生労働省通知として発出された。その後、近年の患者発生状況を踏まえ、病原機構を利用した遺伝子スクリーニング検出法を取り入れ、検出感度・精度を向上さ

せた検査法へと改良を行い、原因食品の特定や汚染食品の調査に用いられている。一方、「腸管毒素原性大腸菌」は、「腸管出血性大腸菌」と並び食中毒の発生頻度の多い病原大腸菌であるが、食品からの検査法は未だ確立されていない。

本研究では、腸管毒素原性大腸菌の病原因子である耐熱性エンテロトキシン(ST)及び易熱性エンテロトキシン(LT)の遺伝子検出系を利用した、食品からの本菌検出法の確立を目指し、食品の培養条件、遺伝子検出系の構築に係る基礎データの収集を行った。

B. 研究方法

1. 腸管毒素原性大腸菌 O153:H12 の増菌培養条件の検討

大分県等で発生した食中毒事例に由来する菌株番号 O5、菌株番号 K1、菌株番号 K2、菌株番号 F1 の計 4 株を供試菌株とし、mEC 培地 (OXOID) における 36 及び 42 での動態を試験した。増殖の有無の確認は、各菌株を mEC 培地に接種し 18 時間培養後、培養液 20 μ L をソルビトールマッコニー寒天培地 (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)、クロモアガー-STE C 基礎培地 (関東化学) に画線塗抹し 37、20 時間培養した。

また、培養後の菌数を測定するため、mEC 培養液はリン酸緩衝希釈水 ((株) LSI メディエンス) で 10 倍階段希釈し、 10^{-4} 及び 10^{-5} 希釈液 100 μ L を Trypticase Soy Agar (TSA、BD) 各 2 枚に塗抹し、37、

20 時間培養後、平板上に発育したコロニーを計測した。

供試菌株は、検討にあたり、ST 及び LT 遺伝子の保有状況をコンベンショナル PCR 及びリアルタイム PCR にて確認した。

コンベンショナル PCR は、毒素原性大腸菌 (STh gene) One Shot PCR Kit (Takara, 製品コード RR104A)、毒素原性大腸菌 (STp gene) One Shot PCR Kit (Takara, 製品コード RR108A)、毒素原性大腸菌 (LT gene) One Shot PCR Kit (Takara, 製品コード RR109A) を使用した。キット説明書に従い増幅反応を行った後、ゲル電気泳動にて各々 123bp、131bp、263bp の増幅産物を確認した。リアルタイム PCR は Hidaka らが報告した

(J. Appl. Microbiol., 106, 410-420) S 遺伝子 (*est* STp、*est* STh) 及び LT 遺伝子 (*elt*) を標的とし、マルチプレックス反応で行った。反応試薬は QuantiTect Multiplex PCR Kit (QIAGEN) を使用し、プライマー終濃度 0.1~0.5 μ M、プローブ終濃度 0.1~0.12 μ M に反応液を調製した。リアルタイム PCR 機器は ABI ViiA7 (ライフテクノロジーズジャパン) を使用し、95 15 分の熱変性の後、95 1 分、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。

2. ST 及び LT 遺伝子検出法の検出感度試験

試験の方法を図 1 に示した。

H27 年度の研究結果では、主要な O 血清

群間では培養条件による増殖の差異が認められなかったことから、06:HNM(菌株番号 T6,LT 及び ST 産生)、0148:H28(菌株番号 T11, ST 産生)、0169:H41(菌株番号 T5, ST 産生)を供試菌株とした。菌株は Trypticase Soy Broth(TSB, BD) 5mL にて 37℃、16~18 時間培養後、リン酸緩衝希釈水で 10^{-1} ~ 10^{-6} 希釈菌液まで 10 倍段階希釈し、原液とともに接種菌液(想定菌濃度 10^9 ~ 10^3 cfu/mL)とした。

接種菌液の菌数測定には、 10^{-6} 希釈菌液及び 10^{-7} 希釈菌液 100 μ L を TSA 各 2 枚に塗抹し、37℃、18~22 時間培養後、平板上に発育したコロニーを計測した。

非加熱で摂取される食品であるミニトマト、大根の漬物、根深ネギ、生わかめを供試食品とした。食品は滅菌ストマッカー袋に 25g ずつ採取し、mEC 培地 225mL を加えて 1 分間ストマッカー処理し、42℃、20 時間培養して食品培養液を作製した。各食品培養液 0.9mL に接種菌液 0.1mL を接種して菌接種食品培養液(想定 10^8 ~ 10^2 cfu/mL 食品培養液)を調製した。

DNA 抽出はアルカリ熱抽出にて行った。菌接種食品培養液 100 μ L は遠心し、沈渣に 50mM NaOH を 85 μ L 加え混和後、100℃ 10 分間加熱した。冷却後、1M Tris-HCl(pH7.0)を 15 μ L 加え、その遠心上清をリアルタイム PCR のテンプレートとした。

リアルタイム PCR は、West らが報告した Stp 遺伝子及び 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 Environmental MasterMix2.0(ライフテクノロジーズジャパン)を使用し、表 1 に従い反応液を調製した。リアルタイム PCR 機器は ABI ViiA7(ライフテクノロジーズジャパン)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。

3. 食品からの毒素遺伝子スクリーニング検出法の検討

検討の方法を図 2 に示した。

供試菌株及び供試食品は、上述の 2. 検出感度試験と同一とした。

菌株は TSB 5mL にて 37℃、16~18 時間培養後、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)とした。

食品はストマッカー袋に 25g ずつ採取し、接種菌液 250 μ L を添加後(想定菌濃度 10^2 cfu/g) mEC 培地 225mL 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 2. と同一のマルチプレックス反応で行い、Ct 値を得た。

2. の検出感度試験で調製した 10 倍段階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、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。

食品の一般細菌数及び大腸菌群数測定には、食品25gにリン酸緩衝希釈水225mLを加え1分間ストマッカー処理し 10^{-1} 乳剤を作製後、 10^{-5} まで希釈した。各10倍段階希釈液1mLは2枚ずつ標準寒天培地で混釈し、35、48時間培養した。また 10^{-1} 乳剤1mLは2枚ずつデスオキシコーレイト培地で混釈・重層し、35、20時間培養後、平板に発育したコロニーを計測した。

C. 研究結果

1. 腸管毒素原性大腸菌血清群0153の増菌培養条件の検討

供試した4菌株の増殖結果を表2に示した。

4菌株はすべて、mEC培地36及び42の両温度にて7乗から8乗のオーダーに増殖した。

4種類の分離平板培地における発育状況は、差が認められなかった(表2)。

2. ST及び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遺伝子及び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、 10^3 cfu以上/mLで両遺伝子を検出できた(表3)。

3. 食品からの毒素遺伝子スクリーニング検出による腸管毒素原性大腸菌検出

試験法の検討

使用した食品の一般生菌数及び大腸菌群数は、ミニトマト 2.6×10^3 cfu/g及び 1.7×10^3 cfu/g、大根の漬物 1.4×10^2 cfu/g及び0cfu/g、根深ネギ 2.5×10^2 cfu/g及び0cfu/g、生食用ポイルわかめ 7.4×10^2 cfu/g及び 1.9×10^2 cfu/gであった。

供試した0169(菌株番号T5)、06(菌株番号T6)、0148(菌株番号T11)の3菌株は、食品g当たり各々 1.2×10^2 cfu、 8.3×10 cfu、 1.2×10^2 cfu接種された。

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及びLT遺伝子を検出することができた。

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(ST検量線による算出)、約 10^8 cfu/mL(LT検量線による算出)に増殖し、0148株は約 10^8 cfu/mL(ST検量線による算出)、0169株は約 10^8 cfu/mL(ST検量線による算出)であった。漬物に接種した06株は約 10^9 cfu/mL(ST検量線による算出)、約 10^8 cfu/mL(LT検量線による算出)、0148株は約 10^8 cfu/mL(ST検量線による算出)、0169株は約 10^8 cfu/mL(ST検量線による算出)に増殖した。根深ネギに接種した06株は約 10^8 cfu/mL(ST検量線による算出)、約 10^8 cfu/mL(LT検量線による算出)、0148株は約 10^8 cfu/mL(ST検量線による算出)、0169株は約 10^8 cfu/mL(ST検量線

による算出)に増殖した。生食用ポイルわかめに接種した 06 株は約 10^8 cfu/mL (ST 検量線による算出)、約 10^8 cfu/mL (LT 検量線による算出)、0148 株は約 10^8 cfu/mL (ST 検量線による算出)、0169 株は約 10^8 cfu/mL (ST 検量線による算出)に増殖した(図 3~図 18)。

D. 考察

H27 年度の研究では、日本における食中毒発生状況資料(厚生労働省 NESFD)を検索した結果、腸管毒素原性大腸菌を病因物質とする事例において、発生件数の多い主要な血清群は 06、025、027、0148、0153、0159、0169 の 7 種類であることが明らかとなった。H27 年度及び H28 年度の研究により、これら 7 種類の血清群は、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な増菌培地で、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リアルタイム PCR とは異なる、新たに構築した反応系(以後、新リアルタイム PCR)による ST 及び LT 遺伝子検出を評価した。新リアル

タイム PCR 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及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、生食用ポイルわかめに腸管毒素原性大腸菌を食品 1g 当たり 100cfu 接種し、mEC 培地で 42 培養後、新リアルタイム PCR により ST 遺伝子及び LT 遺伝子を検出することができた。

一般細菌数及び大腸菌群数が 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、 10^3 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。

E. 結論

腸管毒素原性大腸菌は、腸管出血性大腸

菌と並び、食中毒の事件発生頻度や事件当たりの患者数が多い、重要な食中毒の病因物質である。

日本で食中毒の原因となる主要な7種類のO血清群について増菌培養条件を検討した結果、腸管出血性大腸菌と同一な条件で増殖することが確認され、mEC培地42培養は病原大腸菌を網羅的に検出する有用な増菌培養方法であること、検討したリアルタイムPCR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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

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.

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし