

. 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 29 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

病原大腸菌（下痢原性大腸菌）の一種である腸管毒素原性大腸菌（EPEC）は、東南アジアなどに海外渡航し、本邦への帰国時または帰国後に下痢を発症する海外渡航下痢症の原因として知られている。本菌は、主に不衛生な水や非加熱の野菜などの摂取によって食中毒を引き起こす。また、渡航歴のない患者も報告されており、国内での集団食中毒も例年発生している。このため、汚染食品の調査や汚染制御を行う必要があるが、EPEC の食品での検査法は日本および米国や EU など諸外国でも本菌特異的な検出法は策定されていない。そのため、本研究では EPEC の食品での検査法を確立することをために、昨年から継続している（１）免疫磁気ビーズ試薬作製法の検討、また、（２）各種 ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法の検討、さらに（３）最終的確認試験としての多数の試験研究機関の参加によるコラボレイティブ・スタディの実施を行った。その結果、作製した免疫磁気ビーズ試薬が優れた回収率を示し、検討した ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法が感度に優れることが明らかになった。また、EPEC の食品での各種検査法を一連の試験法として構成したコラボレイティブ・スタディでは、優れた試験法が確立されたことが示された。

研究協力者

岩手県環境保健研究センター

岩淵香織

さいたま市健康科学研究センター

土屋彰彦

埼玉県衛生研究所

大塚佳代子、大阪美紗、門脇奈津子

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

杉並区衛生検査センター

山崎匠子

静岡市環境保健研究所

和田裕久

富山県衛生研究所	磯部順子
三重県保健環境研究所	永井祐樹
奈良県保健研究センター	吉田孝子
広島県立総合技術研究所保健環境センター	平塚貴大
一般財団法人 東京顕微鏡院	森 哲也
公益社団法人 日本食品衛生協会	甲斐明美
横浜検疫所 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	白石祥吾
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

病原大腸菌（下痢原性大腸菌）の一種である腸管毒素原性大腸菌（EPEC）は、東南アジアなどに海外渡航し、本邦への帰国時または帰国後に下痢を発症する海外渡航下痢症の原因として知られている。本菌は、主に不衛生な水や非加熱の野菜などの摂取によって食中毒を引き起こす。また、渡航歴のない患者も報告されており、国内での集団食中毒も例年発生している。このため、汚染食品の調査や汚染制御を行う必要があるが、EPEC の食品での検査法は日本および米国や EU など諸外国でも本菌特異的な検出法は策定されていない。病原大腸菌の一種で最も重篤化する腸管出血性大腸菌では、日本および諸外国において検査法が設定されており、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、感染の多い O 血清群 4 ～ 6 種類を対象にしており、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。この方法を参考にして、EPEC での主要な O 血清群を決定し、それらを対象とした食品での検査法を確立するために各種手法の検討を行い、優れた方法を組み合わせて多機関によるコラボレイティブ・スタディを実施し評価することとした。昨年までの研究で、EPEC の主要 O 血清群は、O6、O25、O27、O148、O153、O159 および O169 の計 7 血清群であり、そのうちの O148 および O159 を代表的血清群に選定して試験を行うこととした。そこで、大容量の免疫磁気ビーズを作製し、作製方法の詳細なマニュアルを作成した。また、免疫磁気ビーズの使用期限を検証した。さらに、EPEC 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、各

種機器や試薬を組み合わせ、高感度の検出系を広く検討した。これらの方法を含め、ETEC の食品からの検出法の確立を目指し、増菌培養法、免疫磁気ビーズ法、分離培養法、遺伝子検出法等を組み合わせ、一連の試験法としてコロボレイティブ・スタディを実施した。

B. 研究方法

(1) ETEC の免疫磁気ビーズ作製方法の検討と食品での有効性の検討

1) 免疫磁気ビーズの作製

コロボレイティブ・スタディで用いる ETEC の血清群である 0148 と 0159 の血清を用いた。血清は市販の病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を使用した。より抗体価の高い血清を選択するために、2 種類の異なるロット番号の血清(31-5126、28-4021)を用い、供試菌株(血清群 0148 (ST 産生)および 0159 (ST 産生)を各 1 株)と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を免疫磁気ビーズ作製用に使用した。

磁気ビーズは Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG (ThermoFisher SCIENTIFIC 社製、ベリタス社販売)を使用した。血清は上記検討で選んだロットの血清を原液のまま用いた。

各血清群あたり 10 ml の免疫磁気ビーズを作製した。抗体の感作方法は「免疫磁気ビーズ作製マニュアル」に従って実

施した。

コロボレイティブ・スタディに使用するために必要な免疫磁気ビーズは合計 10ml であった。一度に大量の免疫磁気ビーズを作製すると、磁気ビーズと抗体が均一にならず、ビーズ 1 個あたりに感作される抗体量に差が生じることが懸念された。そこで Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG を 1.5 ml マイクロチューブに 250 μ l ずつ 40 本に分注し、それぞれに血清を加えて感作させる方法で作製した。磁気ビーズに抗体を感作し、PBS に再浮遊させた自家調製免疫磁気ビーズは、最終的に 1 本にまとめ、良く混和して均一化してから集菌効果の検討に用いた。

大腸菌 0148 および 0159 を TSB に接種し、37、18~20 時間培養した。この培養液を滅菌したリン酸緩衝液(PBS)で 10^{-5} ~ 10^{-8} まで 10 倍階段希釈を行い、菌液の調製を行った。希釈した菌液 1 ml を対象に自家調製免疫磁気ビーズを用いて集菌操作を行い、最終的に 10 mM PBS 0.1 ml に懸濁後、懸濁液 10 μ l ずつを 2 枚の普通寒天平板に滴下し、塗抹分離を行った。37 で 18~20 時間培養後、各平板に発育した集落数を計測し、集菌効果を確認した。

2) 自家調製免疫磁気ビーズの保存性に関する検討

自家調製した免疫磁気ビーズの使用期限を検証するために、作製した免疫磁気

ビーズを4の冷蔵下で約1年間保存した後、集菌効果を調べた。

06、025、027、0148、0153、0159、0169の7血清群に対する免疫磁気ビーズを「免疫磁気ビーズ作製マニュアル」に従って作製した。その後、4の冷蔵庫に1年間保存した。

1年間冷蔵保存後の自家調製免疫磁気ビーズを用いて集菌効果を確認した。使用した分離平板は、SMAC寒天、抗生物質加SMAC寒天、クロモアガーSTEC（基礎培地）DHL寒天である。

(2) ETECの検査法の基礎検討

遺伝子スクリーニング検出において、内部コントロール(IC)の追加、クエンチャーの比較、国内で広く使用されている検出機器の比較を主眼に検討した。

1) リアルタイムPCR試料の調製

食中毒事例に由来する06:HNM(LTおよびSTh産生)、0148:H28(STh産生)、0169:H41(STp産生)の計3株を供試し、接種菌液(想定菌濃度 $10^6 \sim 10^3$ cfu/ml)を作製した。

供試食品は、非加熱で接種されるミニトマト、大根の漬物、長ネギ、生わかめとし、滅菌ストマッカー袋に25gずつ採取したのち、mEC培地225 mlを加えて1分間ストマッカー処理し、42℃、20時間培養して食品培養液を作製した。食品培養液0.9 mlに接種菌液0.1 mlを接種して菌接種食品培養液(想定 $10^5 \sim 10^2$ 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い、リアルタイムPCRのテンプレートとした。

2) リアルタイムPCRの反応条件および解析

リアルタイムPCRは、Frydendahlらが報告したSTp遺伝子(Mol. Cell. Probes, 2001, 15, 151-160)、共同研究者の小西らが選定したSTh遺伝子、およびWestらが報告したLT遺伝子(Vet. Microbiol., 2007, 122, 323-331)を標的とした各プライマー・プローブを参照してシンプレックス反応およびマルチプレックス反応にて行った。反応試薬はTaqMan Environmental MasterMix 2.0を使用し、プライマー終濃度 $0.16 \sim 0.2 \mu\text{M}$ 、プローブ終濃度 $0.06 \sim 0.1 \mu\text{M}$ となるよう調製した。

検出機器はABI ViiA7、7500、LC480、Takara Dice および Dice 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 または Manual 設定にて解析しCt値(LC480の場合はCp値)を得た。

3) クエンチャー(TAMRAおよびBHQ)の比較

各種の標的毒素遺伝子(STp、STh、LT)検出用の蛍光標識プローブには、5'末端(蛍光ラベル)はFAMを3'末端(クエンチャー)はTAMRAまたはBHQとした。

使用した検出機器は、ABI ViiA7、7500、LC480の3機器とし、菌接種ミニトマト等4食品培養液についてシンプレックス反

応試験により最少検出菌濃度（検出感度）の算出および検量線を作成した。

4) IC を加えたマルチプレックス反応試験

各種の標的毒素遺伝子検出用の蛍光標識プローブには、5'末端（蛍光ラベル）はFAMを、3'末端（クエンチャー）はQSYまたはBHQとした。このQSYはTaqManのクエンチャーのひとつとして新たに開発されたものであり、その適合性についてBHQクエンチャーの検出感度との比較により評価した。なお、前述の「3)クエンチャーの比較」において、クエンチャー（TAMRA、BHQ）の種類による検出感度に差が認められなかったことから、本試験での対照クエンチャーはBHQのみとした。また、菌接種食品培養液についても、前述の「3)クエンチャーの比較」において4種類の食品に差がなかったことから、過去に食中毒事件の原因食品であった「長ネギ」に限定し、新たに菌接種食品培養液を調製後、そのアルカリ熱抽出試料はリアルタイムPCRのテンプレートに供した。

使用した検出機器は、ABI ViiA7、7500、LC480、Dice およびDice の5機器とし、シンプレックス反応試験で得られたデータにより最少検出菌濃度（検出感度）の算出および検量線を作成した。また、平成26年11月20日付け食安監発1120第3号の厚生労働省通知「腸管出血性大腸菌026、0103、0111、0121、0145 及び 0157

の検査法」に示された16SrRNA遺伝子を検出するICを加え、マルチプレックス反応で菌接種長ネギ培養液について検出感度の算出を行った。

(3) 食品でのETECの検査法のコラボレイティブ・スタディ

1) コラボレイティブ・スタディの概要

参加機関数：13試験検査機関、実施回数：2回（第1回；血清群0159STh陽性、第2回；0148STp<陽性）試験食品検体（キュウリ、長ネギ）とした。

2) コラボレイティブ・スタディ用検体の作製

国立衛研にて市販のキュウリ（国産）および長ネギ（国産）を購入し、検体として使用した。事前にST遺伝子およびLT遺伝子陰性であることを試験し確認した。

食品を冷蔵保存し、検体が試験に使用される日に標準寒天にて一般生菌数を、クロモアガーECCにて大腸菌群数、大腸菌数を測定した。各回につき、1食品あたり、高菌数接種（25cfu/25g）検体39検体、低菌数接種（5cfu/25g）検体39検体、非接種用検体39検体（計117検体）すなわち2食品あたり計234検体、加えて、陽性用検体13検体（長ネギのみ設定）の計247検体を作製した。

各機関につき、検体19袋の間に小型温度記録計（サーモマネジャー）を挟んでバイオセーフティー対応2次容器に入れ、冷蔵にて送付した。

3) コラボレイティブ・スタディの試験

実施手順

1日目

検体入りのストマッカー袋にあらかじめ室温（20℃位）以上に温めたmEC培地225mlを加え、1分間のストマッカー処理を行い、 42 ± 1 、 22 ± 2 時間培養した。

2日目

培養液10mlをディスポチューブに取り、そこからリアルタイムPCR用に0.1mlを1本、直接培養法用に1.0ml、免疫磁気ビーズ法に1.0mlを1本ずつ測り取った。

10 μ lずつ各分離培地（SMAC、クロモアガーSTEC、抗生物質加SMAC、抗生物質加クロモアガーSTEC）2枚に接種し画線した。コロニーが多く出現するように画線した。その後、 37 ± 1 にて18～24時間培養した。

免疫磁気ビーズ液25 μ lに1.0ml培養液を加え、デンカ生研を参照した以下の方法に従い免疫磁気ビーズ濃縮法を行った。最終浮遊液は0.1mlとした。10 μ lずつ各分離培地2枚に接種し画線した。コロニーが多く出現するように画線した。その後、 37 ± 1 にて18～24時間培養した。

培養液0.1mlをマイクロチューブに移し、以下のアルカリ熱抽出法にてDNAを抽出した。抽出作業を始めたなら、中断することなく速やかに行った。

ST・LT遺伝子検出リアルタイムPCR

法（インターナルコントロール：ICを含む）の反応試薬組成は計25 μ lとし（詳細略）DNA抽出液5 μ lを加えた。

反応条件:50℃2分、95℃10分とし、95℃15秒、60℃1分を40サイクル
使用機器:ABI7500（7500fastを使用時はstandard chemistryに設定する）
判定:リアルタイムPCRの解析を行い、Ct値が得られている場合を陽性とした。なお、解析は機器のオート設定およびマニュアル設定（Threshold Line；0.25、baseline；Auto）の2種類でCt値を解析した。

1検体につき2反応行った。反応時にはアルカリ熱抽出物の代わりに滅菌蒸留水などを用いて陰性コントロールを設定した。Positive controlは、第1回では0159（STh陽性）、第2回では0148（STp<陽性）を使用した。

3日目

直接塗抹法および免疫磁気ビーズ法について、各平板培地を観察し、各種類の平板培地（2枚）から疑われるコロニー3個を釣菌した。

各平板培地上での典型的コロニーの色は、SMACでは、一般的大腸菌と同様に赤色のコロニーを形成し、クロモアガーSTECでは、腸管出血性大腸菌と同様の藤色のコロニーを形成した。また、必要に応じて追加で釣菌し

た。それらを普通寒天培地等に接種し
37 ± 1 にて 18~24 時間培養した。

4 日目

普通寒天培地等に生育したコロニーを免疫血清 (0148 および 0159) にて凝集反応を確認した。加熱菌体での凝集試験が望ましいが、今回は生菌での特異的凝集 (自己凝集しない) が判定できた場合は加熱菌体での凝集を確認しなくても良いとした。

試験終了後に、結果表に記入した試験結果およびリアルタイム PCR のランファイル (sds 形式または eds 形式) 各検体に添付された小型温度記録計 (サーモマネジャー) および検体送付缶 (梱包付属品も含む) を返送した。

国立衛研にて試験結果を集計後、Outlier 機関の検定および検出方法間の有意差検定を行った。いずれの検定においても、一元配置分散分析を行い、事後解析として、多重比較である Tukey-Kramer 法で解析を行った。いずれの検定も有意水準は両側 5% とした。

C. 研究結果

(1) ETEC の免疫磁気ビーズ作製方法の検討と食品での有効性の検討

1) 免疫磁気ビーズの作製

大腸菌 0148 および 0159 の診断用免疫血清 (デンカ生研) の各 2 ロットのいずれの血清も短時間に強い凝集が認められ、

凝集反応性に差は認められなかった。今回はロット番号 31-5126 血清を用いて免疫磁気ビーズの調製を行った。

作製した自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果、0148 および 0159 はともに 10^0 cfu/ml まで検出可能であった。以前に検討した結果と同等の成績であったことから、作製した自家調製免疫磁気ビーズは性能に問題がないことが確認できた。

2) 自家製免疫磁気ビーズの保存性に関する検討

作製した免疫磁気ビーズの使用期限を検証するために、1 年間保存した免疫磁気ビーズを用いて集菌効果を検討した。保存後では血清群 06 は 10^4 cfu/ml までの検出であったが、025 および 0159 は 10^2 cfu/ml まで、027、0148、0153、0169 は 10^1 cfu/ml まで検出が可能であった (表 3 および表 4)。

1 年間冷蔵保存した免疫磁気ビーズを用いて集菌操作を行い、各分離平板上に出現した菌の発育状況を調べた。分離平板別に最小検出菌数を比較した結果、供試した各血清群の大腸菌は、いずれの分離平板でも発育は良好であった。分離平板ごとに発育した菌数を比較すると、025、0153、0159 では抗生物質の入っていない SMAC 寒天、クロモアガー STEC (基礎培地)、DHL 寒天のいずれ平板でも同じような発育状況 (菌数) であったが、抗生物質の入っている SMAC 寒天では 1 オーダー程度低い菌数であった。全体的にも抗生物質

の入っている SMAC 寒天培地での発育は、やや抑制傾向であった。

(2) ETEC の検査法の基礎検討

1) クエンチャー (TAMRA および BHQ) の比較

各濃度に希釈した菌液を接種した食品培養液からの ST (STp および STh) 遺伝子および LT 遺伝子検出における最少検出菌濃度は、4 種類の全食品で試験した 3 種の検出機器および供試菌 3 株すべて、いずれのクエンチャー (TAMRA、BHQ) でも 10^3 cfu 以上/ml であった。

2) IC を加えたマルチプレックス反応試験

IC を加えたマルチプレックス反応試験では、長ネギ培養液からの ST (STp および STh) 遺伝子および LT 遺伝子検出における最少検出菌濃度は、5 種の検出機器および供試菌 3 株すべて、いずれのクエンチャー (BHQ、QSY) でも 10^3 cfu 以上/ml であった。IC もすべての反応において検出された。

リアルタイム PCR で得られた Ct 値と長ネギ培養液中の菌濃度を基に、クエンチャー別並びに検出機器別および菌株別に検量線を作成した。

(3) 食品での ETEC の検査法のコラボレイティブ・スタディ

1) 血清群 O159 の結果

低菌数接種が 7.4 cfu/25 g、高菌数接種は 37.0 cfu/25 g であった。

全機関について、ほぼ 0.5 から 5.0

に保たれて各機関に配送された。増菌温度は、おおよそ 41 から 43 であった。

検出感度は、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)では、高菌数接種においては、キュウリおよび長ネギのいずれの検体でも Auto 解析およびマニュアル解析ともに 1.000 であった。低菌数接種においては、いずれの検体でも 0.974 であった。

直接塗抹法では、高菌数接種においては、キュウリ検体では、分離に用いた 4 種類いずれの寒天培地でも 1.000 であった。長ネギ検体では、SMAC 以外の 3 種類の培地で 1.000、SMAC で 0.897 であった。低菌数接種においては、キュウリ検体では、SMAC 以外の 3 種類の培地で 0.974、SMAC で 0.949 であった。長ネギ検体では、SMAC 以外の 3 種類の培地で 0.974、SMAC で 0.846 であった。

免疫磁気ビーズ法では、高菌数および低菌数接種においては、いずれの検体でも、分離に用いた 2 種類の寒天培地で 0.974 以上であった。

統計解析を行った結果、キュウリ検体では、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)の Auto 解析は、直接塗抹法のクロモアガー-STEPC および抗生物質加 SMAC、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) のマニュアル解析よりも検出率が有意に低かった。長ネギ検体では、直接塗抹法の SMAC および ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)

の Auto 解析は、直接塗抹法の SMAC 以外の培地、免疫磁気ビーズ法の両培地、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のマニュアル解析よりも検出率が有意に低かった。

2) 血清群 0148 の結果

低菌数接種が 4.1 cfu/25 g、高菌数接種は 20.5 cfu/25 g であった。

全機関について、ほぼ 0 から 8.0 に保たれて各機関に配送された。増菌温度は、おおよそ 41 から 43 であった。

検出感度は、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)では、高菌数接種においては、キュウリ検体では、Auto 解析およびマニュアル解析ともに 1.000 であったが、長ネギ検体では、いずれの解析においても 0.769 であった。低菌数接種においては、キュウリ検体では、いずれの解析においても 0.923 であり、長ネギ検体では、いずれの解析においても 0.590 であった。

直接塗抹法では、高菌数接種においては、キュウリ検体では、SMAC で 0.615、SMAC 以外の 3 種類の寒天培地において 1.000 であった。長ネギ検体では、抗生物質加 SMAC で 0.641、抗生物質加クロモアガー-STECC で 0.513、クロモアガー-STECC で 0.462、SMAC で 0.231 であった。低菌数接種においては、キュウリ検体では、SMAC で 0.641、SMAC 以外の 3 種類の培地において 0.872 以上であった。長ネギ検体では、抗生物質加 SMAC で 0.333、抗生物質加クロ

モアガー-STECC で 0.308、SMAC で 0.179、クロモアガー-STECC で 0.154 であった。

免疫磁気ビーズ法では、高菌数接種においては、キュウリ検体では、抗生物質加 SMAC と抗生物質加クロモアガー-STECC とともに 1.000 であり、長ネギ検体では、2 種類の寒天培地のいずれも 0.744 であった。低菌数接種においては、キュウリ検体では、2 種類の寒天培地のいずれも 0.872、長ネギ検体では、0.385 であった。

統計解析を行った結果、キュウリ検体では、直接塗抹法の SMAC は、直接塗抹法の SMAC 以外の培地、免疫磁気ビーズ法の両培地、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のいずれの解析よりも検出率が有意に低かった。長ネギ検体では、直接塗抹法の SMAC は、免疫磁気ビーズ法の両培地および ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のいずれの解析よりも検出率が有意に低く、直接塗抹法のクロモアガー-STECC は、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のマニュアル解析よりも検出率が有意に低かった。

D. 考察

(1) ETEC の免疫磁気ビーズ作製方法の検討と食品での有効性の検討

現在、EHEC の検査に用いる免疫磁気ビーズは、複数種類が市販されているが、ETEC の血清群(06、025、027、0148、0153、0159、0169)を検出するための免疫磁気

ビーズは、市販されていない。そこで複数機関で一斉検出するコラボレイティブ・スタディに提供するために免疫磁気ビーズの作製および集菌効果の検討を行った。そこで 250 μ l ずつ小分けして作製し、最終的に 1 つにまとめて良く攪拌することで、感作される抗体量が均一である自家調製免疫磁気ビーズを作製することができた。調製した免疫磁気ビーズの性能を評価するために、菌液を用いた集菌を行い集菌効果の検証を行った結果、0148、0159 のいずれの血清群も 10^0 cfu/ml まで検出できたことから、作製した自家調製免疫磁気ビーズは問題がないことが確認できた。

作製した自家調製免疫磁気ビーズの保存性を検討するために、作製後 4 の冷蔵庫で 1 年間保管した自家調製免疫磁気ビーズを用いて、集菌効果の検証を行った。作製直後のデータと比較すると、いずれの血清群も 1 オーダー程度検出率が落ちている成績であった。しかし、リアルタイム PCR 法の検出感度を 10^3 cfu/ml としており、いずれも 10^3 cfu/ml 菌液を用いた場合は集菌効果が認められることから、免疫磁気ビーズを自家調製後、1 年間程度は使用できるものと考えられた。

分離平板ごとに菌株の発育状況を比較すると、抗生物質が入っていない培地と比較して抗生物質を添加した培地では 1 オーダー程度発育した菌数が少なかった。食品由来の夾雑菌を抑制するには非常に

有効であるが、同時に目的菌も多少の抑制がかかることが明らかとなった。汚染菌量が少ない場合や損傷菌等を考慮すると、抗生物質を添加している培地としていない培地を必ず併用する必要があると考えられた。

(2) ETEC の検査法の基礎検討

リアルタイム PCR の精度を確保するために、16SrRNA を標的とした IC を加えたマルチプレックス反応による遺伝子検出法を検討した。国内で汎用されている主要な検出機器を使用したリアルタイム PCR は、BHQ および QSY のいずれのクエンチャーとの相性が良く、ETEC を接種した食品培養液中の最少菌検出濃度は 10^3 cfu 以上/ml であり、検出感度に優れた。また、IC もすべての反応で検出され、本試験で設定したプライマー、プローブ、反応条件は、食品の ETEC 検査法におけるスクリーニング検査として有用であることが確認された。

これまでの 3 か年の研究では、リアルタイム PCR による ETEC 検出において Hidaka らのプライマー・プローブ (クエンチャー MGB)、Frydendahl & 小西 & West らのプライマー・プローブ (クエンチャー TAMRA)、Frydendahl & 小西 & West らのプライマー・プローブ (クエンチャー BHQ)、Frydendahl & 小西 & West らのプライマー・プローブ (クエンチャー QSY)、IC を付加したマルチプレックス反応、といった複数の反応系を検討し、

いずれも標的遺伝子を最少菌濃度 10^3 cfu 以上/ml で検出できた。これら各種の反応系や各種の検出機器を用いた方法による検出法を提示できたことは、使用可能な検出機器および試薬の選択肢が広がり、食品の ETEC 遺伝子スクリーニング検査の実用性が高まるものと期待する。

(3) 食品での ETEC の検査法のコラボレイティブ・スタディ

ETEC 06、025、027、0148、0153、0159 および 0169 の計 7 血清群を対象とした食品での検査法の確立のために、13 試験検査機関によるコラボレイティブ・スタディを行った。ETEC と同じく病原大腸菌の一種である腸管出血性大腸菌を参照し、既に確立され通知されている食品での腸管出血性大腸菌の検査法の通知（「食品からの腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157 の検査法」平成 26 年 11 月 20 日付け食安監発 1120 第 1 号）を参考にして同様の増菌培養法および分離培養法を利用し、また、遺伝子スクリーニングの考え方も取り入れて、効果的かつ効率的な検査法とすることとした。本コラボレイティブ・スタディでの試験法は、mEC 培地中での 42 での増菌培養法、免疫磁気ビーズ法と各選択分離培地の組み合わせによる分離培養法および遺伝子検出法で構成された。食品検体には、ETEC の食中毒の原因食品として野菜や水が多いことがいわれていることから、ETEC の食中毒の原因食品であった長ネギ、

また、腸管出血性大腸菌の食中毒の原因食品として報告があるキュウリを選定した。また、3 試験研究機関で実施した先行研究にて、主要 7 血清群のうち本コラボレイティブ・スタディに供試しなかった 5 血清群についても野菜などの多種の食品に菌を接種して各種検出法を検討した。その結果、優れることが判明した検査法を採用してコラボレイティブ・スタディの試験を構成した。

検出感度は、高菌数接種（ $20.5\sim 37.0$ cfu/25 g）では、キュウリでの血清群 0148 では直接塗抹法の SMAC 以外の全ての方法、血清群 0159 では全ての検出方法で 1.000 であった。長ネギでの血清群 0159 では直接塗抹法の SMAC 以外の全ての方法で 1.000 であった。本研究での高菌数接種レベルの菌数であれば高率に ETEC が検出されることが判明した。しかし、長ネギでの血清群 0148 では、最も高い感度が ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)の 0.69 であった。低菌数接種（ $4.1\sim 7.4$ cfu/25 g）では、キュウリでの血清群 0148 では ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)で 0.923、直接塗抹法の SMAC で 0.641、それ以外の培地で 0.872 以上、免疫磁気ビーズ法で 0.872、血清群 0159 ではいずれの方法でも 0.949 以上であった。長ネギでの血清群 0148 では ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)で 0.590、免疫磁気ビーズ法で 0.385、直接塗抹法で 0.154~0.333 で

あった。血清群 0159 で ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)で 0.974、免疫磁気ビーズ法は 0.974 以上、直接塗抹法の SMAC では 0.846、それ以外の培地で 0.974 であった。これらのことから、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。また、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のほうが免疫磁気ビーズ法よりも検出性が優れていることが示され、リアルタイム PCR 法をスクリーニングに使用し、陽性であった検体を免疫磁気ビーズ法に供することで効率的な試験が行えるものと考えられた。さらに、本コラボレイティブ・スタディで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直接塗抹法および免疫磁気ビーズ法の検出感度が向上する可能性が考えられ、試験の際には、釣菌するコロニー数も重要であると思われる。

全体的に ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)よりも直接塗抹法および免疫磁気ビーズ法のほうが検出率の低い傾向にあることから、遺伝子検出によって陽性であった検体について、直接塗抹法および免疫磁気ビーズ法を行い、より多くのコロニーを釣菌することで、効率的に検出されることが考えられた。

本コラボレイティブ・スタディでは、mEC 培地(42)での増菌培養法、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法および遺伝子検出法に

よって ETEC の比較的高率な検出が認められた。

E. 結論

本年度は、(1)免疫磁気ビーズを小分けして作製し、最終的に 1 本にまとめることで、感作される抗体量が均一な回収率に優れる大量の免疫磁気ビーズが作製された。また、作製した免疫磁気ビーズの保存性を検討し、1 年間程度は使用できるものと考えられた。(2)ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法について、検出機器、プローブ 3'末端に付加するクエンチャーおよび IC との適合性を検討した。国内で広く使用されている 5 種類の検出機器及び 2 種類のクエンチャーを用いたリアルタイム PCR では、IC を含むマルチプレックス反応条件にて ETEC の標的遺伝子 ST(ST_p、ST_h)および LT が最小菌濃度 10³cfu 以上/ml で検出された。(3)コラボレイティブ・スタディでは、ETEC が総じて比較的高率に検出されることが確認された。食品の増菌培養液がリアルタイム PCR 法で ST または LT 遺伝子陽性になった場合、培養液を選択分離培地に塗抹するか、主要 0 血清群(7 種)の免疫磁気ビーズ法を行い、濃縮液を分離培地に塗抹し培養して ETEC を分離することが、食品の試験法として優れると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

工藤由起子. 腸管出血性大腸菌による食中毒発生と食肉汚染状況について. 感染と消毒. Vol. 24, No. 1, p72-76, 2017. 2017年5月発行 幸書房.

Terajima, J., Izumiya, H., Hara-Kudo, Y., Ohnishi, M. Shiga toxin (verotoxin)-producing E. coli and foodborne disease: A Review. Food Safety. Vol. 5, No. 2, 35-53, 2017.

工藤由起子、寺嶋 淳. 冷凍メンチカツの加熱調理による腸管出血性大腸菌の殺菌条件の検討. 食品衛生研究. 67(9) : 7-13, 2017年9月号.

2. 学会発表

大阪美紗、大塚佳代子、門脇奈津子、榊田希、小西典子、小俣浩魅、甲斐明美、寺嶋淳、工藤由起子. 食品からの腸管毒素原性大腸菌検出におけるリアルタイム PCR 法の検討. 第 38 回日本食品微生物学会. 平成 29 年 10 月 5、6 日. 徳島.

工藤由起子、田中恵美、都丸亜希子、寺嶋 淳. 冷凍メンチカツを原因とする腸管出血性大腸菌 0157 食中毒発生とその要因である加熱調理方法での菌数減少の検証. 第 113 回日本食品衛生学会学術講演会. 平成 29 年 11 月 9、10 日. 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし