

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

協力研究報告書

食品での腸管毒素原性大腸菌の検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

#### 研究要旨

腸管毒素原性大腸菌の食品での検査法を確立するために、13 試験研究機関の参加のもとコラボレイティブ・スタディを実施した。高菌数接種検体（20.5-37.0 cfu/25g）では、血清群 0159 を接種したキュウリおよび長ネギ、また血清群 0148 を接種したキュウリにおいては、直接塗抹法での SMAC 以外のいずれの方法でもほぼ全検体から接種菌が検出された。低菌数接種検体（4.1-7.4 cfu/25g）では、血清群 0159 を接種したキュウリおよび長ネギ、また血清群 0148 を接種したキュウリにおいては、SMAC 以外のいずれの方法でもほぼ 9 割の検体から接種菌が検出された。血清群 0148 を接種した長ネギにおいては、遺伝子検出法で約 6 割の検体から対象毒素遺伝子が検出され、直接塗抹法で抗生物質添加の分離培地においては約 2 割、抗生物質非添加の分離培地においては約 2 割での検出であったが、免疫磁気ビーズ法を行った場合は約 4 割に改善された。これらのことから、抗生物質添加の分離培地または免疫磁気ビーズ法を使用することによって分離率が向上することが示された。また、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)では、分離培養法よりも概ね検出率が高い結果が得られ、スクリーニング法として優れていることが示された。

#### 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
東京都健康安全研究センター	小西典子
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
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

## 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方法の検討を行い、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。先行研究にて、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、それらは mEC 培地中で 42 にて良好に増殖する

ことが確認されている。本研究では、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った。また、保有する病原因子には耐熱性エンテロトキシン（ST：ヒト由来株から発見された ST<sub>h</sub> およびブタ由来株から発見された ST<sub>p</sub>）および易熱性エンテロトキシン（LT）があり、それらの遺伝子を遺伝子検出の対象としてリアルタイム PCR 法を検討し決定した。ただし、LT のみを保有する菌株は少ないため本研究では ST<sub>h</sub> 保有株および ST<sub>p</sub>&LT 保有株を供試した。

## B. 研究方法

## (1) コラボレイティブ・スタディの概要

## 1. 参加機関数：13 試験検査機関

岩手県環境保健研究センター、さいたま市健康科学研究センター、埼玉県衛生研究所、東京都健康安全研究センター、杉並区衛生試験所、財団法人 東京顕微鏡院、静岡県環境保健研究所、富山県衛生研究所、三重県保健環境研究所、奈良県保健研究センター、広島県立総合技術研究所保健環境センター、横浜検疫所輸入食品検疫検査センター、神戸検疫所輸入食品検疫検査センター

## 2. 実施回数：2 回

試験対象血清群：第 1 回；血清群 O159 ST<sub>h</sub> 陽性（平成 29 年 7 月 24 日 月曜日 検体着）、第 2 回；O148 ST<sub>p</sub>&LT 陽性（8 月 29 日 火曜日 検体着）

## 3. 試験食品検体：キュウリ、長ネギ

1 機関につき、血清群ごとにキュウリ 9 検体（高菌数接種 3 検体、低菌数接種 3 検体、非接種 3 検体）、長ネギ 9 検体

(高菌数接種3検体、低菌数接種3検体、非接種3検体)、長ネギの陽性1検体の計19検体とした。

#### 4. 試薬等の事前配布と準備

##### 1) 各機関で必要な機器および器具等

恒温器(42±1、37±1)

ABIリアルタイムPCR(機種ABI PRISM 7500または7500fast)

免疫磁気ビーズ法に必要なマグネットスタンド

マイクロチューブ(遺伝子抽出用、免疫磁気ビーズ法)

スライドグラス(血清凝集確認用)

普通寒天培地、トリプティケース・ソイ・アガー(TSA)など釣菌用の非選択培地

シャーレ(各回につき、SMAC培地用38枚、クロモアガーSTEC基礎培地用38枚、抗生物質加SMAC培地用76枚、抗生物質加クロモアガーSTEC培地用76枚を自家調製)

チップ

ネジロチューブ(増菌液-80保存用)  
検体配布用のバイオセーフティー容器を国立医薬品食品衛生研究所(国立衛研)に送付

##### 2) 配付試薬等

国立衛研から各機関担当者に送付した。到着後、直ちに試薬配付リスト(mEC、SMAC、クロモアガーSTEC基礎培地、抗生物質水溶液、アルカリ熱抽出用試薬、リアルタイムPCR用試薬)と照合し、試薬の配送状態の不備や不足等の有無を連絡した。

##### 3) 事前の試薬調製

mEC培地を作製した。また、抗生物質加SMAC培地、抗生物質加クロモアガーSTEC培地(通常販売時にクロモアガーSTECに添付されるサプリメントは本研究では不使用)の作製では52くらいに冷却した後に1Lあたり室温に戻した各培地用の抗生物質水溶液(1ml)を添加した。十分に攪拌後、シャーレ1枚あたり18~20mlを分注した。なお、抗生物質水溶液は国衛研から配布し、調製説明書に従って培地に添加して、各培地を作製した。そのほかにクロモアガーSTEC基礎培地、SMAC寒天培地を作製した。

##### 4) 事前の確認事項

ABIリアルタイムPCR(機種ABI PRISM 7500または7500fast)の稼働、操作方法の確認を行った。なお、Threshold Lineを各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。

機器設定: 蛍光検出のtargetは、FAM-BHQラベル(STh、STp、LT)については「FAM-none」、HEX-BHQについては「HEX-none」に設定した。

##### 5) 陽性コントロールについて

陽性用検体にはあらかじめ100cfu/gの濃度で、各回の検体に接種されたETEC株を接種した。

#### (2) コラボレイティブ・スタディ用検体の作製

##### 1. 検体

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。各回に使用する菌株につき、1食品あたり、高菌数接種用検体 39 検体、低菌数接種用検体 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)を準備(計 247 検体)した。

## 2. 接種菌液の調製

室温下でカジトン培地に保存した菌株(第1回は 0159、第2回は 0148)を TSB 10 ml に 1 白金耳植菌し、37 で 18 時間培養した(7月22日(土)15:00 または 8月27日(日)14:00 開始)。7月23日(日)9:00 または 8月28日(月)8:00 に希釈を開始した。100 ml 容の三角フラスコに PBS を 54 ml 採り、培養液を 6 ml 加えてスターラーで 1 分間混和した。同様に  $10^{-7}$  まで 10 倍階段希釈した。ただし、株によってさらに希釈し、調製した。その後、低菌数用に 10 ml、高菌数用に 40 ml 分取した。低菌数接種検体(0159 は 7.4 cfu/25 g、0148 は 4.1 cfu/25 g)には接種菌液 0.1 ml、高菌数接種検体(0159 は 37 cfu/25 g、0148 は 20.5 cfu/25 g)には接種菌液 0.5 ml ずつ菌液を接種して食品に馴染ませた。接種菌数を確認するために、接種菌液を TSA 78 枚に 0.1 ml ずつ塗抹し、37 で 24 時間培養した。

陽性用検体には  $10^{-4}$  希釈液を 0.1 ml 接種した(0159 は 12,300 cfu/25 g、0148 は 4,440 cfu/25 g)

## 3. 検体の調製

菌液接種前日(第1回 7月22日(土)、第2回 8月27日(日))にストマッカー袋に試験検体を 25 g 採り、4 で保存した。菌非接種の検体については空気を抜いてストマッカー袋上部をヒートシールし、4 で保存した。上記に記載の菌接種の際も、できるだけクーラーボックス内で取り扱った。菌液接種は袋の口を広げて検体に接種菌液を 0.1 ml または 0.5 ml を接種し、空気を抜いて上部をヒートシールした。

## 4. 検体の送付

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 次容器および 3 次容器に入れた。3 次容器とジュラルミンケースの間に保冷剤を 3 個入れ、これらをゆうパック(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(図1)

### 1 日目

1 回目は月曜、2 回目は火曜に検体着検体に添付の小型温度記録計(サーモマネジャー)は常に検体とともに取り扱った。

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 225 ml を加え、1 分間のストマッカー処理を行い、 $42 \pm 1$ 、 $22 \pm 2$  時間培養した。

### 2 日目

フィルターがないため食品片が多少入ることはやむを得ないが、できるだけ混入しないように培養液の食品片が少ないところから採取した。培養液 10 ml 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 0.1 ml を 1 本、直接培養法用に 1.0 ml、免疫磁気ビーズ法に 1.0 ml を 1 本ずつ測り取った。残りは冷蔵保管し、当日使用の予備とした。また、別のディスポチューブ（ポリプロピレン製など）に培養液 10 ml を取り直ちに冷凍保存（-80℃）し、翌日以降の予備培養液とした。小型温度記録計（サーモマネジャー）はこの段階で室温に置き、容器返送時に返送した。予備培養液（10 ml）は別途連絡があるまで保存した。

#### 1. 直接塗抹法：

10 µl 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。

#### 2. 免疫磁気ビーズ法：

免疫磁気ビーズ液 25 µl に 1.0 ml 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。

各チューブの洗いは 1.0 ml の洗浄液（PBS または滅菌生理食塩水）を用いた。最終浮遊液は 0.1 ml とした。10 µl 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。

#### [デンカ生研操作法を参照]

1) 25 µl をマイクロ遠心チューブに滴加した。

2) 検体 1 ml をマイクロ遠心チューブに採取した。

3) マイクロ遠心チューブの蓋を閉め数回転倒混和した後、室温にて約 10 分ごとに数回転倒混和を繰り返しながら 30 分間反応した。

4) 磁石スタンドにマイクロ遠心チューブを挿入して 5 分間静置し、マイクロ遠心チューブの内壁に磁気ビーズを集めた。この間、マイクロ遠心チューブを挿入したままスタンドを数回穏やかに転倒し、マイクロ遠心チューブ内壁の 1 点に磁気ビーズが集中するようにした。

5) マイクロ遠心チューブを磁石スタンドに挿入したまま蓋を開け、ピペットを用いて上清を注意深く取り除いた。この時、磁気ビーズを吸入しないように注意した。

6) マイクロ遠心チューブを磁石スタンドから外した後、滅菌リン酸塩緩衝塩化ナトリウム液又は滅菌生理食塩液 1 ml をマイクロ遠心チューブに滴加し、磁気ビーズを懸濁した。

7) 上記 4)～6)の操作を再度繰り返して磁気ビーズを洗浄した。

8) マイクロ遠心チューブをスタンドから外した後、滅菌リン酸塩緩衝塩化ナトリウム液又は滅菌生理食塩液 0.1 ml をマイクロ遠心チューブに滴加した。磁気ビーズを懸濁して菌濃縮液とし、

分離培地に画線した。

3. DNA 抽出および 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):

培養液 0.1 ml 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。抽出作業を始めたら、中断することなく速やかに行った。

[アルカリ熱抽出法]

培養液 0.1 ml を 10,000Xg、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  $\mu$ l 添加して再浮遊させ、100 °C で 10 分間加熱し冷却後、滅菌した 1 M Tris-HCl (pH 7.0) 15  $\mu$ l で中和した。それを遠心 (10,000Xg、10 分間) し上清を検体とした。アルカリ存在下では DNA が分解しやすいため、抽出後は氷上で静置し速やかに中和した。直ちに使用しない場合には 0~4 °C で保存し、4 時間以内に使用した。時間内にリアルタイム PCR を行えない場合は、-80 °C にて保存し、翌日以降にリアルタイム PCR に使用した。使用后、残ったアルカリ熱抽出物を国立衛研より連絡があるまで -80 °C にて保存した。

[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)]

反応試薬組成は以下の計 25  $\mu$ l とし、DNA 抽出液 5  $\mu$ l を加えた。

・ 2 × Master Mix (Environmental Mastermix) 12.5  $\mu$ l

・ プライマー

STh-F (10  $\mu$ M)、STh-R (10  $\mu$ M)、STp-F (10  $\mu$ M)、STp-R (10  $\mu$ M)、LT-F (10  $\mu$ M)、

LT-R (10  $\mu$ M) を 各 0.5  $\mu$ l

16SRna-F (20  $\mu$ M)、16SRna-R (20  $\mu$ M) 各 0.2  $\mu$ l

[配列]

STh-F: 5' - aaa gtg gtc ctg aaa gca tga ata g-3'

STh-R: 5' - cac ccg gta caa gca gga tt-3'

STp-F: 5' - gca aaa tcc gtt taa cta atc tca aa-3'

STp-R: 5' - aca gaa ata aaa att gcc aac att agc-3'

LT-F: 5' - ccg gca gag gat ggt tac ag-3'

LT-R: 5' - gaa tcc agg gtt ctt ctc tcc aa-3'

16SrRNA-F: 5' -cct ctt gcc atc gga tgt g-3'

16SrRNA-R: 5' -ggc tgg tca tcc tct cag acc-3'

・ プローブ

STh-P (5  $\mu$ M) FAM-BHQ ラベル、STp-P (5  $\mu$ M) FAM-BHQ ラベル、LT-P (5  $\mu$ M) FAM-BHQ ラベルを 各 0.3  $\mu$ l

16SrRNA-P (5  $\mu$ M) VIC-BHQ ラベル 0.5  $\mu$ l

[配列]

STh-P: 5' -FAM- agc aat tac tgc tgt gaa ttg tgt t-BHQ1-3'

STp-P: 5' -FAM- tta cct ccc gtc atg ttg ttt cac gga t-BHQ1-3'

LT-P: 5' -FAM- tag cag gtt tcc cac cgg atc acc-BHQ1-3'

16SrRNA-P: 5' -HEX-gtg ggg taa cgg ctc acc tag gcg ac-BHQ1-3'

・ D.W. 2.7  $\mu$ l

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 O159 (STh 陽性)、第2回では O148  
(STp&LT 陽性) を使用した。

### 3日目

分離菌の確認:

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  $37 \pm 1$  にて 18  
~24 時間培養した。選択培地上のコロ  
ニーから直接に血清試験は行わなかつ  
た。

前日に実施されなかったリアルタイ  
ム PCR はこの日に実施した。

### 4日目

分離菌の確認:

普通寒天培地等に生育したコロニー  
を免疫血清 (O148 および O159) 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。

結果記入表には、疑われるコロニーが  
なく凝集試験をしなかった場合は「NT」  
と記載した。

前々日に実施されなかったリアルタ  
イム PCR はこの日に実施した。

試験終了後:

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) を、事務連絡担当者  
にメールにて返送した。また、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) を試験終了後、着払い (クロネ  
コヤマト) にて返送した。予備培養液お  
よびアルカリ熱抽出物を再試験の依頼  
や事務連絡担当者への送付に備え、廃棄  
の依頼が届くまで保管した。

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) 血清群 0159

### 1) 検体

供試した検体の一般生菌数は、長ネギで  $1.3 \times 10^7$  cfu/g、キュウリでは  $9.3 \times 10^6$  cfu/g であった。大腸菌群数は、長ネギで  $3.4 \times 10^4$  cfu/g、キュウリでは  $1.0 \times 10^3$  cfu/g であった。大腸菌は、長ネギおよびキュウリともに検出されなかった ( $< 10$  cfu/g)。

検体への接種菌液の菌数測定のために低菌数用菌液を TSA に塗抹した結果、低菌数接種が 7.4 cfu/25 g であった(表 1)。この 5 倍量を高菌数用菌液としたことから、高菌数接種は 37.0 cfu/25 g であった。

### 2) 検体の輸送および増菌培養での温度

全機関について梱包後に温度は速やかに 10 程度に下がり、その後徐々に低下し、輸送時の温度はほぼ 0.5 から 5.0 に保たれて各機関に配送された(図 2)。到着後、梱包されたまま試験開始まで保管され、梱包から約 28.5 時間後までに開梱し増菌培養された。増菌温度は全機関でおおよそ 41 から 43 であった。

### 3) 陽性用検体への菌の接種

陽性用検体(長ネギ)の接種菌数は検体あたり  $4.4 \times 10^3$  cfu/25 g であった。いずれの機関においても、直接塗抹法、免疫磁気ビーズ法および ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のいずれの解析においても陽性であった。

### 4) ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)での検出結果

Auto 解析の結果、キュウリ検体にお

いては、高菌数接種では、全機関で 3 検体全てが陽性であった。低菌数接種では、13 機関中 1 機関で 3 検体中 1 検体から検出されなかったが、他機関では 3 検体全てが陽性であった。陽性用検体の Ct 値は、約 14~18 であった。菌非接種では、5 機関で 3 検体中 1~3 検体が陽性であり、Ct 値は約 36~39 であった。

長ネギ検体においては、高菌数接種では、全機関で 3 検体全てが陽性であった。低菌数接種では、13 機関中 1 機関で 3 検体中 1 検体から検出されなかったが、他機関では 3 検体全てが陽性であった。陽性用検体の Ct 値は、約 15~22 であった。菌非接種では、8 機関で 3 検体中 1~3 検体が陽性であり、Ct 値は 36~39 であった。

マニュアル解析(threshold line 0.25 設定)では(表 2)、菌接種検体の判定結果は Auto 解析の結果と変わらなかった。菌非接種では、全機関で全検体が陰性であった。

なお、同時に測定した IC では、Auto 解析(表 3)では、全機関で全検体とも陽性であったが、マニュアル解析(threshold line 0.25 設定)では、全機関で全検体とも陰性であった。

### 5) 直接塗抹法での検出結果

キュウリ検体においては、高菌数接種では、全機関で 4 種類の全ての培地(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)で 3 検体全てから検出された(表 4)。低菌数接種では、13 機関中 2 機関で 4 種類の全ての培地または SMAC のみで、3



検体中 1 検体から検出されなかったが、他機関では 4 種類の全ての培地において 3 検体全てから検出された。非接種では、全機関で検出されなかった。

長ネギ検体においては、高菌数接種では、13 機関中 2 機関において SMAC で 3 検体中 2 検体から検出されなかった(表 4)。低菌数接種では、3 機関において SMAC で 3 検体中 1 検体から検出されず、1 機関において SMAC で 3 検体全てから検出されず、クロモアガー-STEC、抗生物質加 SMAC および抗生物質加クロモアガー-STEC で 1 検体から検出されなかった。非接種では、全機関で検出されなかった。

#### 6) 免疫磁気ビーズ法での分離結果

キュウリ検体においては、高菌数接種では、全機関で 2 種類のいずれの培地(抗生物質加 SMAC と抗生物質加クロモアガー-STEC)で 3 検体全てから検出された(表 4)。低菌数接種では、13 機関中 1 機関において 2 種類のいずれの培地で 3 検体中 1 検体から検出されなかった(表 4)。非接種では、1 機関において抗生物質加 SMAC で 3 検体中 1 検体から検出され、3 機関において抗生物質加クロモアガー-STEC で 3 検体中 1 ~ 2 検体から検出された。2 機関において抗生物質加クロモアガー-STEC で 3 検体中 1 検体から検出され、1 機関において抗生物質加クロモアガー-STEC で 3 検体中 2 検体から検出された。

長ネギ検体においては、高菌数接種では、全機関で、2 種類のいずれの培地で 3 検体全てから検出された(表 4)。低菌数接種では、1 機関において抗生物質

加 SMAC で 3 検体中 1 検体から検出されなかった。非接種では、1 機関において抗生物質加クロモアガー-STEC で 3 検体中 1 検体から検出された。

直接塗抹法・免疫磁気ビーズ法と分離培地の組み合わせを比較すると、キュウリ検体および長ネギ検体のいずれの検体においても、直接塗抹法の SMAC では、それ以外の組み合わせに比べて釣菌したコロニー数に対する陽性コロニー数の割合が低かった(表 4)。

#### 7) 検出感度と特異性

血清群 0159 の結果を検出方法別に感度および特異性を算出した(表 5)。

各方法の感度は、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。なお、IC は、両菌ともに両解析において全検体が 1.000 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(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)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(抗生物質加SMACと抗生物質加クロモアガーSTEC)のいずれも1.000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0.974であり、長ネギ検体では、抗生物質加クロモアガーSTECで1.000、抗生物質加SMACで0.974であった。

特異性は、ST・LT遺伝子検出リアルタイムPCR法(ICを含む)において、キュウリ検体では、マニュアル解析で1.000であり、Auto解析で0.923であった。長ネギ検体では、マニュアル解析で0.974、Auto解析で0.667であった。なお、ICは、いずれの検体でも1.000であった。直接塗抹法において、キュウリ検体では、抗生物質加クロモアガーSTEC以外の3種類の培地で1.000であったが、抗生物質加クロモアガーSTECで0.974であり、長ネギ検体では、全4種類の培地で1.000であった。免疫磁気ビーズ法において、キュウリ検体では、抗生物質加SMACで0.974あり、抗生物質加クロモアガーSTECで0.897であった。長ネギ検体では、抗生物質加SMACで1.000あり、抗生物質加クロモアガーSTECで0.974であった。

統計解析を行った結果、Outlierの機関はなかったため、全機関のデータを用いて検出方法間の有意差検定を行った。ただし、ST・LT遺伝子検出リアルタイムPCR法(ICを含む)のIC検出については、STおよびLTが陰性の場合にICが

陽性であれば反応系としては正しく実施されたことがわかり、真の陰性(偽陰性ではない)ことが確認できるために設定しているため、統計解析には含めなかった。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STEC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

### 1) 検体

供試した検体の一般生菌数は、長ネギで $3.0 \times 10^7$  cfu/g、キュウリでは $1.0 \times 10^7$  cfu/gであった。大腸菌群数は、長ネギで $8.2 \times 10^3$  cfu/g、キュウリでは $7.8 \times 10^3$  cfu/gであった。大腸菌は、長ネギおよびキュウリともに検出されなかった( $< 10$  cfu/g)。

検体への接種菌液の菌数測定のために低菌数用菌液をTSAに塗抹した結果、低菌数接種が4.1 cfu/25gであった(表6)。この5倍量を高菌数用菌液としたことから、高菌数接種は20.5 cfu/25gであった。

### 2) 検体の輸送および増菌培養での温度

全機関について梱包後に温度は速やかに 10 程度に下がり、その後徐々に低下し、輸送時の温度はほぼ 0 から 8.0 に保たれて各機関に配送された(図 3)。到着後、梱包されたまま試験開始まで保管され、梱包から約 28.5 時間後までに開梱し増菌培養された。増菌温度はほとんどの機関で 41 から 43 であった。

### 3) 陽性用検体への菌の接種

陽性用検体(長ネギ)の接種菌数は検体あたり  $1.2 \times 10^4$  cfu/25 g であった。いずれの機関においても、直接塗抹法、免疫磁気ビーズ法および ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のいずれの解析においても陽性であった。

### 4) ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)での検出結果

Auto 解析の結果、キュウリ検体においては、高菌数接種では、全機関で 3 検体全てが陽性であった。低菌数接種では、13 機関中 3 機関で 3 検体中 1 検体から検出されなかったが、他機関では 3 検体全てが陽性であった。陽性用検体の Ct 値は、約 13~22 であった。菌非接種では、6 機関で 3 検体中 1~3 検体が陽性であり、Ct 値は約 28~39 であった。長ネギ検体においては、高菌数接種では、13 機関中 6 機関で 3 検体中 1~3 検体から検出されなかったが、他機関では 3 検体全てが陽性であった。低菌数接種では、13 機関中 9 機関で 3 検体中 1~3 検体から検出されなかったが、他機関では 3 検体全てが陽性であった。陽性用検体の Ct 値は、約 14~37 であった。菌非

接種では、6 機関で 3 検体中 1~3 検体が陽性であり、Ct 値は約 33~39 であった。

マニュアル解析(threshold line 0.25 設定)の結果(表 7)、キュウリ検体においては、高菌数接種では、Auto 解析と同様に全機関で 3 検体全てが陽性であった。低菌数接種では、13 機関中 4 機関(Auto 解析では 3 機関)で 3 検体中 1 検体が陰性であったが、他機関では 3 検体全てが陽性であった。陽性用検体の Ct 値は、約 13.6~19.1 であった。菌非接種では、2 機関で 3 検体中 2~3 検体が陽性であり、Ct 値は約 32~37 であった。長ネギ検体においては、高菌数接種では、Auto 解析と同様に 13 機関中 6 機関で 3 検体中 1~3 検体が陰性であったが、他機関では 3 検体全てが陽性であった。低菌数接種では、13 機関中 10 機関(Auto 解析では 9 機関)で 3 検体中 1~2 検体が陰性であったが、他機関では 3 検体全てが陽性であった。陽性用検体の Ct 値は、約 17~39 であった。菌非接種では、3 機関で 3 検体中 1 検体が陽性であり、Ct 値は約 37~40 であった。

なお、同時に測定した IC では、血清群 0159 と同様に、Auto 解析(表 8)では、全機関で全検体とも陽性であったが、マニュアル解析(threshold line 0.25 設定)では、全機関で全検体とも陰性であった。

### 5) 直接塗抹法での検出結果

キュウリ検体においては、高菌数接種では、13 機関中 7 機関において SMAC

で3検体中1～3検体から検出されなかった(表9)。低菌数接種では、8機関においてSMACで3検体中1～3検体から、5機関においてクロモアガーSTECで3検体中1検体から、5機関において抗生物質加SMACで3検体中1検体から、5機関において抗生物質加クロモアガーSTECで3検体中1検体から検出されなかった。非接種では、全機関で検出されなかった。

長ネギ検体においては、高菌数接種では、13機関中12機関においてSMACで3検体中1～3検体から、10機関においてクロモアガーSTECで3検体中1～3検体から、8機関において抗生物質加SMACで3検体中1～3検体から、9機関において抗生物質加クロモアガーSTECで3検体中1～3検体から検出されなかった(表9)。低菌数接種では、12機関においてSMACで3検体中1～3検体から、13機関においてクロモアガーSTECで3検体中1～3検体から、11機関において抗生物質加SMACで3検体中1～3検体から、12機関において抗生物質加クロモアガーSTECで3検体中1～3検体から検出されなかった(表9)。非接種では、全機関で検出されなかった。

#### 6) 免疫磁気ビーズ法での分離結果

キュウリ検体においては、高菌数接種では、全機関で2種類のいずれの培地(抗生物質加SMACと抗生物質加クロモアガーSTEC)で3検体全てから検出された(表17)。低菌数接種では、13機関中5機関において2種類のいずれの培地

で3検体中1検体から検出されなかった(表9)。非接種では、全機関で検出されなかった。

長ネギ検体においては、高菌数接種では、13機関中6機関において抗生物質加SMACで3検体中1～3検体から、6機関において抗生物質加クロモアガーSTECで3検体中1～3検体から検出されなかった(表9)。低菌数接種では、11機関において抗生物質加SMACで3検体1～3検体から、11機関において抗生物質加クロモアガーSTECで3検体中1～3検体から検出されなかった。非接種では、1機関において抗生物質加SMACで3検体中1検体から検出された。

直接塗抹法・免疫磁気ビーズ法と分離培地の組み合わせを比較すると、キュウリ検体および長ネギ検体のいずれの検体においても、直接塗抹法のSMACでは、それ以外の組み合わせに比べて釣菌したコロニー数に対する陽性コロニー数の割合が低かった(表9)。

#### 7) 検出感度と特異性

血清群0148の結果を検出方法別に感度および特異性を算出した(表10)。

各方法の感度は、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。なお、IC

は、両菌ともに両解析において全検体が 1.000 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（クロモアガー-STEPC、抗生物質加 SMAC、抗生物質加クロモアガー-STEPC）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-STEPC で 0.513、クロモアガー-STEPC 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-STEPC で 0.308、SMAC で 0.179、クロモアガー-STEPC 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-STEPC 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。

特異性は、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)において、キュウリ検体では、マニュアル解析で 0.897 であり、Auto 解析で 0.769 であった。長ネギ検体では、マニュアル解析で 0.923、Auto 解析で 0.744 であった。なお、IC は、いずれの検体でも 1.000 であった。直接塗抹法において、いずれの

検体、いずれの培地でも 1.000 であった。免疫磁気ビーズ法において、キュウリ検体では、2 種類いずれの培地でも 1.000 であったが、長ネギ検体では、抗生物質加クロモアガー-STEPC で 1.000 あり、抗生物質加 SMAC で 0.974 であった。

統計解析を行った結果、Outlier の機関はなかったため、全機関のデータを用いて検出方法間の有意差検定を行った。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-STEPC 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

EPEC 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。EPEC 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。

その結果、検出感度(表5、10)は、高菌数接種(20.5~37.0 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(4.1~7.4 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。

しかし、長ネギでの血清群0148接種では、キュウリまたは長ネギの0159接種と比べて、検出感度が低い結果であった。この理由として、菌の死滅や増菌培地中での増殖が抑制されたことが考えられた。長ネギの白い部分には、抗菌作用が知られているアリシンが多く含まれることが知られており、裁断した長ネギに菌液を接種し保管・輸送を経て試験開始まで24時間以上が経過したため、長時間にわたりアリシンに菌が曝された状態となった。このため、接種した少量の菌がアリシンの影響を受けて死滅した可能性がある。しかし、本コラボレイティブ・スタディの約3か月後に長ネギでの血清群0148の死滅について検証したが、本コラボレイティブ・スタディと同程度の菌数でも十分に増殖し、再現性は認められなかった。長ネギの生産地や季節が異なるため、アリシンの含有量が異なる可能性も考えられた。

ST・LT遺伝子検出リアルタイムPCR法(ICを含む)で検出されたが、免疫磁気ビーズ法で検出されない検体は、血清群0159では、

長ネギ検体の低菌数接種において1機関で抗生物質加 SMAC での3検体中1検体(表2、4)、血清群 0148 では、キュウリ検体の低菌数接種において1機関で2種類いずれの培地でも3検体中1検体、長ネギ検体の低菌数接種の1機関で2種類いずれの培地でも3検体中2検体、計4検体であった(表7、9)。逆に、免疫磁気ビーズ法で検出されても ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)で検出されないものは、血清群 0159 では、長ネギ検体の低菌数接種において1機関で ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)で3検体中1検体であった(表2、4)。血清群 0148 では該当する検体はなかった。これらの結果から、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。ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)で検出され、直接塗抹法および免疫磁気ビーズ法で検出されない検体では、増菌培地中で増殖はしているにもかかわらず分離されないということから、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た。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。なお、リアルタイム PCR 法のマニュアル解析は、Auto 解析よりも有意に検出感度が高かったことから、ここではマニュアル解析での結果について考察した。また、0148 接種検体に

ついては、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)が陽性であった検体の DNA 抽出液について、STp および LT 遺伝子の各遺伝子のみを対象にしたリアルタイム PCR 検出系を後日実施し、両遺伝子が増幅していることが確認された(詳細略)。

ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)での、解析方法による Ct 値を比較した。血清群 0159 の Auto 解析での Ct 値は低菌数接種および高菌数接種を総合して、キュウリ検体で 14~16 であり、長ネギ検体で 15~20 であり、マニュアル解析での Ct 値(表2)は、キュウリ検体で 18~21、長ネギ検体で 19~23 であった。血清群 0148 の Auto 解析での Ct 値は、キュウリ検体で 14~19、長ネギ検体で 15~30 であり、マニュアル解析での Ct 値(表7)は、キュウリ検体で 16~18 であり、長ネギ検体で 18~36 であった。長ネギ検体の Ct 値の幅はキュウリに比べて大きい両血清群、いずれの解析においても Ct 値は低菌数接種および高菌数接種で差はなかった。このことから、本研究で設定した増菌培養によって、接種菌は十分に増殖したことが示された。

ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)の特異性については、血清群 0159 の非接種での偽陽性の検体(表2)は、マニュアル解析では、キュウリ検体および長ネギ検体ではいずれも検出されなかったが、Auto 解析では、キュウリ検体で 8 検体、長ネギ検体で 13 検体であった。血清群 0148 の非接種での偽陽性の検体(表7)は、マニュアル解析では、キュウリ検体で 5 検体、長ネギ検体で 3 検体であり、Auto 解析では、キュウリ検体で 9 検体、長ネギ検体で 10 検体であっ

た。両血清群および両解析法いずれにおいても、マニュアル解析のほうが Auto 解析より偽陽性の検出数が少なかった。このことから、マニュアル解析のほうが特異性の高いことが示され、また統計解析の結果からもマニュアル解析のほうが有意に特異性の高いことが示された(表 10)。

血清群 0159 および 0148 の ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)の IC は、蛍光値 Rn が 0.25 以上にならない試薬組成の設定であるため、マニュアル解析 (Threshold line: 0.25) では全て検出されなかったが、Auto 解析では適切に解析されていた(表 3、8)。ST・LT の検出についてはマニュアル解析 (Threshold line: 0.25) で判定し、陰性の場合 IC が検出されていることを Auto 解析にて行う必要がある。

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。

非接種検体で遺伝子検出法および免疫磁気ビーズ法の両方またはいずれかで試験対象血清群が陽性になる検体が認められた。その場合、遺伝子検出法では 2 反応のうちの 1 反応が大きな Ct 値を示して陽性になることが多く、免疫磁気ビーズ法では濃縮液を塗抹した 2 種類の寒天培地の両方が陽性になることがほとんどであった。検体作製前に食品が試験対象血清群に自然汚染されていないことを確認したが、食品での自然汚染には偏

りが考えられるため検体採取部の違いによる結果の違いはあり得る。このため、自然汚染の対象菌を検出した可能性は否定できないが、試験操作における微量の交差汚染や検体の取り違いも発生したものと考えられる。

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

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