

. 総 合 研 究 報 告 書

食品での新たな病原大腸菌の リスク管理に関する研究

工藤 由起子

平成27～29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

総合研究報告書

研究分担者 小西典子 東京都健康安全研究センター

西川禎一 大阪市立大学大学院生活科学研究科

研究要旨

食品中の病原大腸菌（下痢原性大腸菌）の検査法を開発するために、分担研究（1）食中毒・感染症事例由来株の特性解析（2）食品での統一的検査法の開発、（3）ヒトの感染に關与する家畜の探索、を実施した。（1）の研究において、東京都で発生した腸管毒素原性大腸菌（EPEC）下痢症では血清群 06、025、027、0148、0159、0169 が主要であること、散発下痢症患者の多くはインド、インドネシア、中国等海外渡航の關連が考えられること、食品での検査に免疫磁気ビーズ法が有用なこと、原因食品として野菜を使用した食品が多いこと、が明らかになった。また、（2）の研究において、EPEC 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であり、東京都の主要血清群の全てが含まれていること、腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通である mEC 培地での42 培養が優れることが判明し、また、検出率を向上させる選択性のある分離平板培地が開発されたこと、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法について、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マルチプレックス反応条件にてEPECの標的遺伝子ST（STp、STh）およびLTが最小菌濃度 10^3 cfu以上/mlで検出され、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こと、コロボレイティブ・スタディでは、EPECが総じて比較的高率に検出され、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EPEC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こと、が明らかになった。さらに、（3）の研究において、食中毒の原因食品として食肉の重要性を検討するために家畜から分離株について解析をした。EPEC 0169の定着因子K88-like 遺伝子で組み換えた株はヒトのみならずブタとウシの腸粘膜上皮細胞にも強い接着性を示した。本プラスミドは多様な宿主への感染力を0169に提供することで、野外では保持されている可能性が示された。

研究協力者

大塚佳代子、門脇奈津子、星野 梢、 埼玉県衛生研究所

榊田 希、大阪美紗

尾畑浩魅、平井昭彦

東京都健康安全研究センター

岩淵香織

岩手県環境保健研究センター

土屋彰彦	さいたま市健康科学研究センター
山崎匠子	杉並区衛生検査センター
和田裕久	静岡県環境保健研究所
磯部順子	富山県衛生研究所
永井祐樹	三重県保健環境研究所
吉田孝子	奈良県保健研究センター
平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
森 哲也	一般財団法人 東京顕微鏡院
甲斐明美	公益社団法人 日本食品衛生協会
稲垣俊一	横浜検疫所 輸入食品検疫検査センター
白石祥吾	神戸検疫所 輸入食品検疫検査センター
佐藤 健	藤沢市保健所
杉村一彦	倉敷市保健所
成松浩志	大分県衛生環境研究センター
王 麗麗	大連理工大学・大阪市立大学 大学院生活科学研究科
中村寛海	大阪健康安全基盤研究所
坂 瑛里香、中台（鹿毛）枝里子、	大阪市立大学大学院生活科学研究科
鄭 冬明、大森裕子、涌嶋美津子、	
市川直樹	
吉田優香	大阪市立大学生活科学部
輪島文明	東京薬科大学薬学部
濱端 崇	国立国際医療センター研究所
安倍博之、堀口安彦	大阪大学微生物病研究所
山本太郎、和田崇之	長崎大学熱帯医学研究所
麻生 久	東北大学大学院農学研究科教授
Weiping Zhan	カンザス州立大学獣医学研究科
都丸亜希子、阪田理沙、高田 薫、	国立医薬品食品衛生研究所
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（ETEC）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。ETEC 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。また、検査の対象として重要と考えられるヒトの感染に関与する家畜・食品群についても、ヒトと家畜での共通の病原因子を明らかにすることによって解明したい。

研究組織としては、（１）食中毒・感染症事例由来株の特性解析（小西典子、平成 27 年度のみ）（２）食品での統一的検査法の開発（工藤由起子）（３）ヒトの感染に関与する家畜の探索（西川禎一）の 3 つの分担研

究とした。

（１）小西は、厚生労働省食中毒統計や詳細な事例解析を行っている東京都の疫学データなどから ETEC による食中毒および下痢症発生状況を解析し、本菌の主要血清群を考察した。また、（２）工藤は、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、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 法を検討した。また、免疫磁気ビーズや優れた選択分離培地の開発を検討した。さらに、食品での検査法を確立するために各種手法の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した。（３）西川は、血清群 0169 の菌株について、病原プラスミドの全塩基配列を決定し異なる宿主に対応できる定着因子に関して検討した。

B. 研究方法

（１）食中毒・感染症事例由来株の特性解析
東京都における ETEC による集団下痢症の発生状況（1966 年から 2014 年）および分離株の特徴を解析した。また、散発下痢症患者（2012 年から 2014 年）から分離された大腸菌 1,063 株について毒素産生性、血清型などの特徴を解析した。さらに、ETEC 食中毒事例での食品を対象とした本菌の検出状況について解析した。加えて、過去に発生した集団下痢症事例で食品から ETEC が検出された事例について解析した。

（２）食品での統一的検査法の開発

1) ETEC 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

食中毒統計、食中毒事件詳報や病原微生物検出情報 (IASR) による情報から ETEC 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た情報収集を行った。

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。増菌培養として、modified EC 培地 (mEC、OXOID) 中での 36 および 42 で培養した。また、分離培地としてソルビトールマッコスキー寒天培地 (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) クロモアガー STEC 培地 (関東化学) を検討した。また、選択剤として有用な物質を検挙して新たな選択分離培地の選定を行った。

3) ST および LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法の検討

食品での ST および LT 遺伝子検出法の検出感度を試験した。検体 (ミニトマト、大根の漬物、長ネギ、生わかめ) の mEC 培地中での培養液に ETEC を接種した (ETEC 10^8 ~ 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。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 Hidaka ら (マルチプレックス反応、J. Appl. Microbiol., 2009, Vol. 106, p410-420) または Frydendahl ら (STp 遺

伝子、Mol. Cell. Probes, 2001, Vol. 15, p151-160) 共同研究者の小西ら (STh 遺伝子) West ら (LT 遺伝子、Vet. Microbiol., 2007, Vol. 122, p323-331) の方法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。各種クエンチャーおよび各種機器において検討した。また、ETEC を食品 25 g に接種 (想定菌濃度 10^2 cfu/g) し、mEC 培地中にて 42、20 時間培養した。培養液 20 μ l を、クロモアガー STEC 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、培養し、菌を分離した。さらに、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。

4) 免疫磁気ビーズの自家調製

市販の免疫血清 (大腸菌 06、025、027、0148、0153、0159、0169) 20 μ l を磁気ビーズである Dynabeads M-280 (250 μ l) に加え、2 時間、室温で反応した。大腸菌自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果の検証を 10^4 ~ 10^1 cfu/ml の希釈菌液を用いて検討した。また、菌液接種食品培養液 (約 10^3 ~ 10^1 cfu/ml) を供試した検討も行った。

5) 食品での ETEC の検査法のコラボレイティブ・スタディ

13 試験検査機関によって、2 回 (第 1 回; 血清群 0159 STh 陽性、第 2 回; 0148 STp< 陽性) 実施し、試験食品検体をキュウリおよび長ネギとした。高菌数接種 (25 cfu/25 g) 検体、低菌数接種 (5 cfu/25 g) 検体、非接種用検体および陽性用検体

(長ネギのみ設定)を小型温度記録計を挟んでバイオセーフティー対応容器に入れ、冷蔵にて送付した。コラボレイティブ・スタディの試験実施手順は、1日目に、検体入りのストマッカー袋に、mEC培地を加え、 42 ± 1 、 22 ± 2 時間培養した。2日目に、培養液を分離培地(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)に接種し画線し、培養した。免疫磁気ビーズ濃縮法を行い分離培地(抗生物質加SMAC、抗生物質加クロモアガーSTEC)に画線し培養した。また、培養液0.1 mlをアルカリ熱抽出法にてDNAを抽出し、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)に供試した。3日目に、直接塗抹法および免疫磁気ビーズ法について、各種類の平板培地から疑われるコロニー3個を釣菌し、普通寒天培地にて培養した。4日目に、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。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および検体送付缶を返送した。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。

(3) ヒトの感染に關与する家畜の探索

下痢症患者の便から独自に分離した ETEC 0169:H41 の YN10 株と ETEC 0159 の IND 株 を実験に供した。いずれの株も毒素遺伝子である est (STp) を保持していた。

ヒト結腸癌由来の上皮細胞である Caco-2

および喉頭ガン由来の HEp-2 細胞、ブタ小腸由来の上皮細胞である IPEC-1 およびブタ空腸由来の上皮細胞である IPEC-J2、ウシ腸粘膜上皮細胞である BIE について、各細胞指定の組織培養液を用いて実験に供した。接着性試験では、培養細胞に供試菌株を接種し 3 時間培養した。細胞をメタノール固定後、10% ギムザ液で細胞を染色し、鏡検した。

ETEC 0169 YN10 株の培養液からプラスミドを抽出し、アガロースゲル電気泳動によって染色体 DNA と分離した。クロラムフェニコール耐性遺伝子のベクターである pSV28(Cm^r) は形質転換した実験室株から抽出した。プラスミドのシーケンス解析は、タカラバイオに委託し、シーケンサー (FLX System; 454 Life Sciences、Roche Applied Science、Branford、CT) を用いた解析により 150 のコンティグ(塩基配列断片群) 情報として得た。

YN10 株の CS6 の前後 1500 bp を含んだ領域および CS8(CFA/III) の前後 1000 bp を含んだ領域、K88(F4)-like の前後 1000 bp を含んだ領域についてプライマーを設計し増幅し、ベクターとした。標的遺伝子領域の PCR 産物を用いて TOP10 の形質転換を行った。Cm 耐性を獲得して生育したコロニーを採り、PCR とその産物のシーケンスにより目的の遺伝子が含まれているか確認した。

タンパク質コード配列 (Cording sequence ; CDS) の抽出はアノテーション用パイプライン Microbial Genome Annotation Pipeline (MiGAP) を用いて行った。すべての塩基配列とアノテーション結果を DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した (Accession No. AP014654)。

塩基配列から推定されたアミノ酸配列の類似度は、EMBOSS needle program をウェブサイト EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>) で用いることで比較した。Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 6.06.41 を使用した 500 レプリケーションブートストラップ分析 (500 replicate bootstrap analysis) および近隣結合法 (Neighbor-Joining method with a poisson) を使用して系統樹を作成した。

モノクローナル抗体の作製のために、遺伝子 *faeG1* と *faeG2* の合成ペプチドをラットに接種し、約 3 週間後に細胞融合し、ハイブリドーマを作製した。抗原と反応する抗体を産生する細胞を選別した。モノクローナル抗体が作製されていることを確認し、以降の実験で利用した。

免疫電顕での観察のために、親水化処理した炭素膜グリッドに菌懸濁液 (0169 および 0169cured、Top10、K88-like 組込み株) をのせて吸着させた後、1 次抗体および金コロイドで標識した抗ラット 2 次抗体と反応させ、2% モリブデン酸アンモニウムで染色し、乾燥後、電子顕微鏡で観察した。ウエスタンブロットでの解析のために、供試菌を超音波処理破碎しタンパクを回収し、SDS-PAGE (12.5%) を行った。1 次抗体として作製したモノクローナル抗体、2 次抗体として HRP 標識された抗ラット IgG 抗体を用いた。凝集反応試験は、96 ウェルプレートにモノクローナル抗体を段階希釈し、1%ホルムアルデヒド添加生理食塩水で処理した死菌懸濁液を加え、室温で一晩静置して行った。

C. 研究結果

(1) 食中毒・感染症事例由来株の特性解析

東京都における ETEC による集団下痢症は、1991 ~ 2000 年には非常に多く発生しているが、2001 年以降はやや減少傾向であった。06、025、027、0148、0159、および 0169 の 6 血清群で全体の 86.3% を占めていた。患者の多くはインド、インドネシア、中国等海外渡航の関連が考えられた。食中毒事例での保存検体を mEC 培地での 37 および 42 での 2 段階増菌法に、また、毒素遺伝子検出や自家調製 0148 免疫磁気ビーズでの濃縮法に供した結果、ネギまたはネギが使用された食品から ETEC0148 (ST 産生) が分離された。

東京都における ETEC 食中毒の原因食品は野菜関連が 4 事例、1 事例は杏仁豆腐であった。

(2) 食品での統一的検査法の開発

1) ETEC 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

全国の食中毒では患者数が 300 人または 500 人を超える事例の報告も珍しくなかった。また、ETEC 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考えられた。さらに、ETEC 食中毒では、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。

2) 増菌培養法および選択分離培地の検討

供試した株すべて、mEC 培地にて 37 および 42 で増殖した。

供試した株はすべて、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

った。また、選択剤として有用な物質の候補が見出された。

3) ST および LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法の検討

供試したいずれの食品、菌株においても、いずれのリアルタイム PCR 系(クエンチャーの種類を含む)においても、 10^3 cfu 以上/ml の検出感度で ST および LT 遺伝子が検出された。また、各食品のリアルタイム PCR 検量線を基に、菌を接種した食品を mEC 中にて 42 で 20 時間培養した培養液中の菌数を算出した結果、 $2.1 \times 10^8 \sim 1.1 \times 10^9$ cfu/ml であった。

4) 免疫磁気ビーズの自家調製

免疫磁気ビーズを作製し、集菌効果を評価した結果、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。また、いずれの食品でも、免疫磁気ビーズ法によって分離率が向上した。

5) 食品での ETEC の検査法のコラボレイティブ・スタディ

血清群 0159 の結果では、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。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-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 以外の寒天培地、免疫磁気ビーズ法の両寒天培地、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。

血清群 0148 の結果では、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。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-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、両寒天培地で 1.000 であり、長ネギ検体では、両寒天培地で 0.744 であった。低菌数接種においては、キュウリ検体では、両寒天培地で 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 以外の寒天培地、免疫磁気ビーズ法の両寒天培地、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寒天培地および 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。

(3) ヒトの感染に關与する家畜の探索

1) pEntYN10 の全塩基配列解析

pEntYN10 は、全長 145,082 bp で、GC 含量は、46.15 % であった。本プラスミドには、incFII グループの *repA1* と *repA2* 複製遺伝子がコードされており、pEntYN10 プラスミドは、RepFII プラスミドファミリーに属することが分かった。

2) pEntYN10 上の定着因子遺伝子

pEntYN10 は、推定定着因子として、CS6、CS8(CFA/III)-like、K88(F4)-like の 3 遺伝子群を保有していた。CS6 の構造サブユニットの 1 つである *CssA* は、既知のものと比較して 5 つのアミノ酸変異を持っていた。CS8 の主要構造サブユニットと 73.2% の相同性を有していた。

K88(F4)-like 遺伝子は、主要構造サブユニットとされる、*faeG* が 2 つコードされていた。*faeG* の配列の系統発生樹では、これらの 2 つの *faeG* は、他の大腸菌株よりも *Salmonella* *Infantis* のものと近かった。

3) 0159 IND 株の定着因子の検討

アノテーションにより pEntYN10 は、3 つの推定定着因子、CS6、CS8 (CFA/III) および K88 (F4)-like を保有することが分かった。0159 IND も pEntYN10 と同じ CS8-like および K88-like 遺伝子を保有し、K88-like は pEntYN10 の K88-like と 99% 一致していることがわかった。

4) ヒト、ブタ、ウシ由来の腸粘膜上皮細胞に対する接着性

光学顕微鏡観察だけではなく、接着している菌を回収し培養法で菌数を算定した

定量試験でも接着性が再確認された。すなわち、0169 野生株と K88-like 遺伝子を含む領域を組み込んだ pSV28K88-like で形質転換された TOP10K88-like 株は、付着試験後のヒト由来 HEp-2 細胞、ブタ由来 IPEC-1 細胞、ウシ由来 BIE 細胞から 10^7 前後の菌が回収された。一方、病原プラスミド pEntYN10 が脱落した 0169cured 株、実験室株の TOP10、CS6 遺伝子や CS8-like の遺伝子領域で形質転換された株は 1-2 桁低い菌数にとどまった。

5) モノクローナル抗体の作製

ELISA 法による抗体産生チェックにより、抗 FaeG1 として 29 個、抗 FaeG2 として 25 個の陽性サンプルが確認された。

TOP10K88-like を抗原としてこれらの凝集反応試験を行ったところ、それぞれ 2 個ずつの陽性が確認された。これら 4 サンプルを限界希釈し、FaeG1 で 1 クローン、FaeG2 で 2 クローンのモノクローナル抗体産生細胞を得ることができた。

6) モノクローナル抗体の特異性

免疫電顕、ウエスタンブロッティングおよび凝集試験に適用したところ、特異的な反応はみられなかった。

D. 考察

(1) 食中毒・感染症事例由来株の特性解析

東京都で発生した集団および散発下痢症事例では、ETEC の血清群 06、025、027、0148、0159、0169 が多く、食品を対象とした検査法の検討は、これらを対象とすることが妥当であると考えられた。また、散発患者の多くは下痢の発症前にインド、インドネシア、中国

等への海外渡航が認められ、これらの国では生水や加熱されていない食品の摂取には注意が必要である。また、これらの地域から輸入される食品も、本菌に汚染されている可能性が考えられる。ETEC を検出した事例の原因食品をみると、野菜を使用した食品が多いことから、輸入野菜について特に注視が必要と思われる。食中毒事例での原因食品（カットネギ等）の究明では、増菌培養液を PCR 法で ST 毒素遺伝子をスクリーニングし、培養液から 0148 の分離を行うことができた。また、免疫磁気ビーズ法によって、検出が可能となった検体もあり、今後の検査法の参考になると考えられた。

(2) 食品での統一的検査法の開発

過去の国内における食中毒では、O 血清群 06、025、027、0148、0153、0159、0169 による事件の発生が多いこと、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、調理場での二次汚染が考えられた。これらのことは (1) の研究での東京都内の解析結果とほぼ一致していた。また、海外渡航での感染事例も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、考えられた。さらに、ETEC 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。

本菌の主要血清群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

同一な増菌培地で、同一の培養温度である。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。また、STおよびLT遺伝子検出のためのリアルタイムPCR法として、Hidakaらのプライマー・プローブ(クエンチャーMGB)、Frydendahlら・小西ら・Westらのプライマー・プローブ(クエンチャーTAMRA)、Frydendahlら・小西ら・Westらのプライマー・プローブ(クエンチャーBHQ)、Frydendahlら・小西ら・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で検出された。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。さらに、対象血清群の免疫磁気ビーズ自家調整法を確立した。感作される抗体量が均一な自家調製免疫磁気ビーズが作製され、0148および0159のいずれの血清群も 10^0 cfu/mlまで検出された。免疫磁気ビーズを自家調製後、保存性を検討した結果、1年間程度は使用できるものと考えられた。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、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。分離培地については、ETECの選分離培地の開発を行い、適した抗生物質と添加量を見出した。菌接種食品培養液を用いて検討した

ところ免疫磁気ビーズ法を行い、抗生物質加SMACおよびクロモアガー-STEC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。最終的に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・スタディを代表血清群として0148および0159を対象として行った。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。試験の結果、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。ST・LT遺伝子検出リアルタイム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。また、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た。

(3) ヒトの感染に関与する家畜の探索

ETECは宿主の腸粘膜上皮細胞への接着と局所での増殖を果たしながらエンテロトキシンを産生して下痢症を引き起こす。これまでに、下痢症患者から分離されたETEC 0169:H41の病原プラスミドpEntYN10にはCS6、CS8-like、K88-likeの3種類の腸管定着因子がコードされていることを明らかにした。ヒトの感染にはCS6やCS8が定着因子として働くことが知られているが、K88はもともとブタETECの定着因子でありヒトETECからは検出されない。また、ブタETECの定

着因子である K88 が線毛を形成するのに対し、0169 の電子顕微鏡観察では K88 様の線毛は観察されておらず、しかも K88-like 遺伝子群はヒト由来 *Salmonella* 株の *faeG* と相同性が高い配列を 2 つ保する前例のないものであった。このことから、pEntYN10 の K88-like がヒトへの感染のために働いている可能性が考えられ、実際に今回の組み換え実験によって K88-like が in vitro における 0169 の特異な接着像を創り出していることが明らかになった。3 種の定着因子遺伝子を使い分けることによって 0169 が多様な宿主に感染する能力を得ている可能性が考えられる。

E. 結論

食品中の病原大腸菌（下痢原性大腸菌）の検査法を開発するために、分担研究（1）食中毒・感染症事例由来株の特性解析（2）食品での統一的検査法の開発、（3）ヒトの感染に關与する家畜の探索、を実施した。（1）の研究において、東京都で発生した ETEC 下痢症では血清群 06、025、027、0148、0159、0169 が主要であること、散発下痢症患者の多くはインド、インドネシア、中国等海外渡航の關連が考えられること、食品での検査に免疫磁気ビーズ法が有用なこと、原因食品として野菜を使用した食品が多いこと、が明らかになった。また、（2）の研究において、ETEC 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であり、東京都の主要血清群の全てが含まれていること、腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通である mEC 培地での 42 培養が優れることが判

明し、また、検出率を向上させる選択性のある分離平板培地が開発されたこと、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法について、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マルチプレックス反応条件にて ETEC の標的遺伝子 ST (STp、STh) および LT が最小菌濃度 10^3 cfu 以上/ml で検出され、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こと、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、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 O 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こと、が明らかになった。さらに、（3）の研究において、食中毒の原因食品として食肉の重要性を検討するために家畜から分離株について解析した。ETEC 0169 の定着因子 K88-like 遺伝子で組み換えた株はヒトのみならずブタとウシの腸粘膜上皮細胞にも強い接着性を示した。本プラスミドは多様な宿主への感染力を 0169 に提供することで、野外では保持されている可能性が示された。

F. 健康危険情報

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* O103:H2. *Biocontrol Science*. 21:57-61, 2016.
- Ban, E., Yoshida, Y., Wakushima, M., Wajima, T., Hamabata, T., Ichikawa, N., Abe, H., Horiguchi, Y., Hara-Kudo, Y., Kage-Nakadai, E., Yamamoto, T., Wada, T. and Nishikawa, Y. Characterization of unstable pEntYN10 from enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) O169:H41. *Virulence* 6:735-744, 2015.
- 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.
- Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y. and Nishikawa, Y. Comparison by multi-locus variable-number tandem repeat analysis and antimicrobial resistance among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from foods and human and animal faecal specimens. *J. Appl. Microbiol.* 122:268-278, 2017.
- Seo, D., Choi, S., Jeon, S., Jeong, S., Park, H., Lee, B., Kim, G., Yang, S., Nishikawa, Y. and Choi, C. Comparative sequence analysis of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 identified in Korean and Japanese *Escherichia coli* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 243:1-8, 2017.
- 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(1), 72-76, 2017.
- Terajima, J., Izumiya, H., Hara-Kudo, Y. and Ohnishi, M. Shiga toxin (verotoxin)-producing *E. coli* and foodborne disease: A Review. *Food Safety*. Vol. 5(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*. 67:7-13, 2017.
- Wang, L., Zhang, S., Zheng, D., Fujihara, S., Wakabayashi, A., Okahata, K., Suzuki, M., Saeki, A., Nakamura, H., Hara-Kudo, Y., Kage-Nakadai, E. and Nishikawa, Y. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in foods and fecal specimens obtained from cattle, pigs, chickens, asymptomatic carriers, and patients in Osaka and Hyogo, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 70:464-469, 2017.
- Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y. and Nishikawa, Y. Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated

from different retail foods. Int. J. Food Microbiol. 249:44-52, 2017.

2 . 学会発表

星野 梢、鈴木史恵、山崎匠子、小西典子、菊地理慧、岩淵香織、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.

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.

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.

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.

Noju, T., Matsuzaki, T., Tamai, S., Tanimoto, Y., Kage-Nakadai, E. and Nishikawa, Y. Diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC) strains

isolated from healthy carriers inhibit IL-8 secretion of HEK293 cells stimulated by inflammatory substances. *E. coli* and the Mucosal Immune System, July, 2015. Ghent, Belgium.

Ban, E., Yoshida, Y., Ikezaki, S., Zheng, D., Kage-Nakadai, E., Wada, T., Wajima, T., Hamabata, T., Horiguchi, Y., Ichikawa, N., Hara-Kudo, Y. and Nishikawa, Y. Complete DNA sequence of the virulence plasmid of enterotoxigenic *Escherichia coli* O169:H41 and characterization of a novel adherence factor. *E. coli* and the Mucosal Immune System, July, 2015. Ghent, Belgium.

Mamun, Md. M., Parvej, Md. S., Hassan, J., Nazir, KHM N. H., Nishikawa, Y. and Rahman, Md. T. Detection of Shigatoxigenic *Escherichia coli* in healthy broiler chicken and their public health significance. Applied and Environmental Microbiology Gordon Research Conference, July, 2015. Boston, USA.

Tamai, S., Noju, T., Tanimoto, Y., Matsuzaki, T., Kage-Nakadai, E., Yamaguchi, Y., Kodama, T., Nakamura, S., Motooka, D., Iida, T. and Nishikawa, Y. Inhibitory effects of diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from healthy carriers on cytokine secretions of epithelial cells stimulated by inflammatory substances.

- The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September, 2015. Japan.
- Nakatani, Y., Yaguchi, Y., Kashima, N., Komura, T., Kage-Nakadai, E., Terao, K. and Nishikawa, Y. Sesamin prolongs lifespan of *Caenorhabditis elegans* through regulation of genes related to caloric restriction. The 3rd International Conference on Model Hosts, September, 2015. Crete, Greece.
- 中村寛海、田口真澄、井口 純、西川禎一 . 食品製造施設における自由生活性アメーバおよび *Listeria monocytogenes* の分布. 第 88 回日本細菌学会総会. 平成 27 年 3 月.
- 中谷裕美子、西川禎一 . セサミンによる *Caenorhabditis elegans* (線虫) の寿命延長メカニズムの解明. 日本食品免疫学会 第 11 回学術大会. 平成 27 年 10 月.
- 西川禎一 . *Caenorhabditis elegans* (線虫) における乳酸菌の抗老化効果. 日本食品免疫学会 第 11 回学術大会. 平成 27 年 10 月.
- 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.
- 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 . 平成 28 年 9 月 .
- 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 .
- 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 .
- Lee, K., Kobayashi, N., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y., Tsubone, H., Kumagai, S. and Hara-Kudo, Y. Spread and change in stress resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 on food-related fungal colonies. International Symposium of Mycotoxicology, 2016. Japan.
- 鄭 冬明、坂 瑛里香、池崎 沙耶加、中臺枝里子、和田崇之、輪島丈明、濱端 崇、堀口安彦、西川禎一 . Complete DNA sequence of the ETEC O169:H41 virulence plasmid and the novel colonization factor. 第89回日本細菌学会総会. 平成 28年3月.
- 玉井 沙也加、能重 匠、谷本佳彦、松崎壮宏、中臺枝里子、山口良弘、児玉年央、飯田哲也、西川禎一 . Inhibitory effects of diffusely adherent *Escherichia coli* strains on cytokine secretions of epithelial cells. 第89回日本細菌学会総会. 平成28年3月.
- 鄭 冬明、坂 瑛里香、大森裕子、中臺枝里子、山口良弘、和田崇之、西川禎一 . 上

- 皮細胞に対する腸管毒素原性大腸菌
0169 : H41の特異な接着性に寄与する新規
付着因子. 第37回日本食品微生物学会学
術総会. 平成28年9月.
- 玉井 沙也加、能重 匠、谷本佳彦、松崎壮
宏、中臺枝里子、山口良弘、児玉年央、飯
田哲也、西川禎一. 培養細胞の炎症性サ
イトカイン分泌に対する健康者由来分散
接着性大腸菌の抑制機構. 第37回日本食
品微生物学会学術総会. 平成28年9月
- 鄭 冬明、坂 瑛里香、大森裕子、中臺枝里
子、山口良弘、和田崇之、工藤由起子、西
川禎一. 上皮細胞に対する腸管毒素原性
大腸菌0169 : H41の特異な接着性に寄与す
る新規付着因子. 日本栄養食糧学会第55
回近畿支部大会. 平成28年10月
- 玉井 沙也加、能重 匠、谷本佳彦、松崎壮
宏、中臺枝里子、山口良弘、児玉年央、飯
田哲也、西川禎一. 培養細胞の炎症性サ
イトカイン分泌における健康者由来分散
接着性大腸菌の抑制機構. 日本栄養食糧
学会第55回近畿支部大会. 平成28年10月.
- 玉井沙也加、能重匠、谷本佳彦、松崎壮宏、
中臺枝里子、山口良弘、児玉年央、中村昇
太、元岡大祐、飯田哲也、西川禎一. 培
養細胞の炎症性サイトカイン分泌に対す
る分散接着性大腸菌の抑制機構. 第69回
日本細菌学会関西支部学術集会. 平成28
年11月.
- 鄭冬明、坂 瑛里香、大森裕子、中臺枝里子、
和田崇之、工藤由起子、西川禎一. 腸管
毒素原性大腸菌0169 : H41の特異な細胞接
着性に寄与する新規付着因子. 第69回日
本細菌学会関西支部学術集会. 平成28年
11月.
- 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 .
- 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.
- Parvej, M. S., Kage-Nakadai, E. and
Nishikawa, Y. Molecular characteristics
of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC)
isolates from poultry. The 16th Awaji
International Forum on Infection and
Immunity, September, 2017. Japan.
- Takeuchi, N., Tanimoto, Y., Tamai, S.,
Yanagida, S., Yamaguchi, Y.,
Kage-Nakadai, E. and Nishikawa, Y.
Diffusely adherent *Escherichia coli*
(DAEC) strains isolated from healthy
carriers inhibit IL-8 secretion of
epithelial cells by the type VI
secretion system (T6SS). The 16th
Awaji International Forum on Infection
and Immunity, September, 2017. Japan.
- Omori, Y., Zheng, D., Ban, E.,
Kage-Nakadai, E., Tachibana, T., Wada,
T., Hara-Kudo, Y. and Nishikawa, Y.
Adhesion of human enterotoxigenic
Escherichia coli (ETEC) 0169:H41 to

porcine intestinal epithelial cells by the novel colonization factor. Vaccines for Enteric Diseases, October, 2017. Albufeira, Portugal.

柳田 咲、玉井 沙也加、能重 匠、谷本佳彦、松崎壮宏、中臺枝里子、山口良弘、児玉年央、飯田哲也、西川禎一．上皮細胞からのサイトカイン分泌における分散接着性大腸菌の抑制効果．第90回日本細菌学会総会．平成29年3月．[優秀発表賞受賞]．

鄭 冬明、坂 瑛里香、大森裕子、池崎沙耶加、中臺(鹿毛)枝里子、和田崇之、工藤由起子、西川禎一．上皮細胞に対する腸管毒素原性大腸菌 0169:H41 の特異な接着性に寄与する新規付着因子．第71回日本栄養・食糧学会大会．平成29年5月．

柳田 咲、玉井 沙也加、能重 匠、谷本佳彦、松崎壮宏、竹内成美、中臺枝里子、山口良弘、児玉年央、飯田哲也、西川禎一．培養細胞からの炎症性サイトカイン分泌に対する分散接着性大腸菌の抑制機構．第71回日本栄養・食糧学会大会．平成29年5月．

谷本佳彦、竹内成美、玉井沙也加、柳田 咲、中台枝里子、山口良弘、西川禎一．上皮細胞からのサイトカイン分泌に対する分散接着性大腸菌の抑制効果に關与する因子の探索．第38回日本食品微生物学会学術総会．平成29年10月．

谷本佳彦、竹内成美、玉井沙也加、柳田 咲、中台(鹿毛)枝里子、山口良弘、西川禎一．

健康者由来の分散接着性大腸菌は VI 型分泌装置によって上皮細胞からの IL-8 分泌を抑制する．第70回日本細菌学会関西支部学術集会．平成29年11月．

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし