

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

平成 28 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 工藤 由起子

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成 29 (2017) 年

目 次

・総括研究報告書

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究	1
--------------------------	---

工藤 由起子

・分担研究報告書

1 . 食品での統一的検査法の開発	13
-------------------	----

工藤 由起子

(1) 腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討 3	24
----------------------------	----

(2) 食品を対象とした毒素原性大腸菌検出に用いる 免疫磁気ビーズ作製方法の検討	38
-----------------------------------------------	----

(3) 食品での腸管毒素原性大腸菌の分離培養法の検討	46
------------------------------	----

2 . ヒトの感染に關与する家畜の探索	70
---------------------	----

西川 禎一

・研究成果の刊行に関する一覧表	89
-----------------	----

. 総 括 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 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

総括研究報告書

研究分担者 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）食品での統一的検査法の開発、（2）ヒトの感染に関与する家畜の探索、を実施した。平成 27 年度に腸管毒素原性大腸菌の主要血清群は 06、025、027、0148、0153、0159、0169 の 7 種類であることが明らかになったため、これら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した。また、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。（1）の研究結果から、腸管出血性大腸菌の食品での検査法と共通の mEC 培養液を試験に用いることが可能であり、食品培養液からの易熱性エンテロトキシン遺伝子・耐熱性エンテロトキシン遺伝子を対象とした遺伝子スクリーニングの有用性であることが明らかになった。また、主要 7 血清群を対象とした免疫磁気ビーズを開発し、食品、特に野菜からの分離培養での分離の向上効果が認められた。加えて、腸管毒素原性大腸菌の選択性に優れる抗生物質を加えた分離培地を使用することが重要であることも示された。（2）の研究において、研究対象とした腸管毒素原性大腸菌 0169:H41 の保有する CS6、CS8-like および K88-like の 3 種類の腸管定着因子の、ヒト、ブタ、ウシの腸粘膜上皮細胞に対する付着性と宿主特異性を検討した結果、K88-like 遺伝子で組み換えた株はヒトおよびブタの細胞に強い接着性を示し、ヒトとブタ両方への感染力を保有する可能性が示された。

研究協力者

坂 瑛里香	大阪市立大学大学院生活科学研究科修士課程
鄭 冬明	大阪市立大学大学院生活科学研究科修士課程
大森裕子	大阪市立大学大学院生活科学研究科修士課程
中臺枝里子	大阪市立大学大学院生活科学研究科准教授
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教授
小西典子	東京都健康安全研究センター
尾畑浩魅	東京都健康安全研究センター
平井昭彦	東京都健康安全研究センター
甲斐明美	東京医科大学
大塚佳代子	埼玉県衛生研究所
門脇奈津子	埼玉県衛生研究所
星野 梢	埼玉県衛生研究所
大阪美紗	埼玉県衛生研究所
都丸亜希子	国立医薬品食品衛生研究所
寺嶋 淳	国立医薬品食品衛生研究所

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。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、国内外ともにあまり検討されておらず、早急な確立が求められている。

平成 27 年度には、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腸管毒素原性大腸菌（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 06、025、027、0148、0153、0159、0169 の 7 血清群に決定した。これら血清群を対象にした検査法を確立することにした。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）が確立されている腸管出血性大腸菌と、試験手順や培地などの一部が、共通であれば効率的で効果的な検査法と考えられ、検討した結果、食品の増菌培養については共通で行えることが判明している。ETEC の遺伝子検出法、免疫磁気ビーズや優れた選択分離培地の開発が必要であるため、平成 28 年にはこれらを検討した。本研究によって、食品での ETEC の国の試験法の策定に貢献し、諸外国から参照される方法を確立したい。

また、平成 27 年度には、食中毒の原因食品として野菜や水が多いことが明らかになった。しかし、食肉の重要性について家畜の ETEC の保有株を解析することによって検討することにした。食中毒と検査の対象として重要と考えられるヒトの感染に關与する家畜・食品群について、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) 食品での統一的検査法の開発 (工藤由起子) (2) ヒトの感染に關与する家畜の探索 (西川禎一) の 2 つの分担研究とした。

B . 研究方法

(1) 食品での統一的検査法の開発

1) ETEC 0153 の増菌培養法および選択分離培地の検討

平成 28 年度に ETEC 主要 7 血清群のうち 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。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。また、ソルビトールマッコンキー寒天培地 (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

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 (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、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) を検討とした。検出感度の検討として、ETEC の主な血清群の菌株培養液の希釈菌液をミニトマト、大根の漬物、根深ネギ、生ワカメなどの食品培養液に加えた試料を使って検討した。また、食品での検出性の検討として、ミニトマト、大根の漬物、根深ネギ、生ワカメに 25 g に菌を接種 (約 10^2 cfu/g) し、増菌培養、遺伝子スクリーニング法、分離培養法の一連の検査法による本菌の検出を検討した。

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。次に、これらの結果から得られた適切な血清量 (250 μ l 磁気ビーズ Dynabeads M-280 に対して 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。なお、供試菌株 (生菌) と最も短時間で強い凝集が認められた市販病原大腸菌免疫血清のロットを選定し、原液のまま免疫磁気ビーズ作製用に使用した。各血清群の大腸菌の 10^4 から 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い、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-STECC 基礎培地、DHL 寒天) に各 10 µl ずつ塗抹し、37 °C で 18 ~ 20 時間培養後、各平板培地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

食品 (生ワカメ、キュウリ、根深ネギ、オオバ、コネギ) の mEC 培養液 0.9 ml に、7 血清群の菌株の TSB 培養液を希釈して作製した 10^{-4} ~ 10^{-7} 希釈菌液 (約 10^4 cfu/ml ~ 10^2 cfu/ml) 0.1 ml を接種して 10^{-6} ~ 10^{-8} 菌液接種食品培養液 (約 10^3 cfu/ml ~ 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 µl ずつ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-STECC 基礎培地に 10 µl 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。平板培地は 2 枚ずつ画線し、1 枚ずつ 37 °C および 42 °C 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。

(2) ヒトの感染に関与する家畜の探索

1) 菌株のアミノ酸配列解析

ETEC0169:H41 (下痢症患者由来、YN10 株) など各菌株からプラスミド DNA を抽出し、シーケンス解析にて 150 のコンテイング (塩基配列断片群) 情報として得た。アミノ酸配列に基づいた系統発生樹を作成した。

2) 菌株の付着性試験

ヒト結腸癌由来の上皮細胞である Caco-2(15) および喉頭ガン由来の HEp-2 細胞(16)、ブタ小腸由来の上皮細胞である IPEC-1(17) およびブタ空腸由来の上皮細胞である IPEC-J2(18-20)、ウシ腸粘膜上皮細胞である BIE(21) について、各細胞指定の組織培養液に供試菌株の培養液を接種し、3 時間培養後に、細胞をギムザ染色した。

C. 研究結果

(1) 食品での統一的検査法の開発

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 °C および 42 °C の両温度にて 10^7 から 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、差は認められなかった。

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

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、 10^3 cfu 以上/ml で両遺伝子が検出された。また、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 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 °C 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、いずれの食品でも、いずれの菌株でも約 10^8 ~ 約 10^9 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、集菌効果は低かった。

4) ETEC 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-STE C 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。

キュウリ培養液およびオオバ培養液では、検出された血清群の数は、塗抹した各種寒天培地を 37 で培養した場合に、IMS 塗抹法での抗生物質加 SMAC で全 7 血清群と最も多かった。生ワカメ培養液では、塗抹した各種寒天培地を 37 で培養

した場合に、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 で全 7 血清群と最も多かった。根深ネギでは、塗抹した各種寒天培地を 37 で培養した場合に、IMS 塗抹法で供試した SMAC および抗生物質加 SMAC で全 7 血清群、42 培養では、IMS 塗抹法で供試した SMAC およびクロモアガー-STE C 基礎培地で全 7 血清群と最も多かった。コネギ培養液では、塗抹した各種寒天培地を 37 で培養した場合に、IMS 塗抹法のクロモアガー-STE C 基礎培地では全 7 血清群と最も多かった。

(2) ヒトの感染に關与する家畜の探索

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、ヒト由来の HEp-2、ブタ由来の IPEC-1 および IPEC-J2 に対する細胞接着性を示し、0169 野生株と同様の凝集接着像を示した。ウシ由来の BIE に対する細胞接着性には病原プラスミドは関係なかった。0169 野生株は BIE に対しては弱い接着性を示すにとどまり、CS6 遺伝子を含む領域を組み込んだ pSV28CS6 で形質転換された TOP10CS6 株も、CS8-like の遺伝子領域を組み込んだ pSV28CS8-like で形質転換された TOP10CS8-like 株も同様に弱い接着性を示した。しかしながら、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 0169 野生株以上の凝集接着像を示した。実験室株の TOP10、病原プラスミド pEntYN10 が脱落した 0169cured 株は全く

接着性を示さなかった。

D. 考察

(1) 食品での統一的検査法の開発

平成 27 年度の研究において、日本における ETEC 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、食品からの腸管出血性大腸菌検査法と同一の増菌方法(mEC 培地、42)で発育することが判明した。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と思われる。また、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による ST および LT 遺伝子検出を評価し、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 ETEC 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。さらに、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、生ワカメに ETEC 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、ETEC が 10^8 cfu/ml まで増殖することが検量線から推

定された。今後、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。加えて、食品培養液から目的の菌の効率的な検出には免疫磁気ビーズ法で集菌する方法が知られており、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および感作時間の検討を行ない、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、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の保存法や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と考えられた。この開発された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。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、EPEC 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、EPEC 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 EPEC 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。

(2) ヒトの感染に關与する家畜の探索

EPEC 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 EPEC 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 EPEC の定着因子でありヒト EPEC からは検出されない。また、ブタ EPEC 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)食品での統一的検査法の開発、(2)ヒトの感染に關与する家畜の探索、を実施した。平成27年度に EPEC の主要血清群は 06、025、027、0148、0153、0159、0169 の7種類であることが明らかになったため、これら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した。また、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。(1)の研究結果から、腸管出血性大腸菌の食品での検査法と共通の mEC 培養液を試験に用いることが可能であり、食品培養液からの易熱性エンテロトキシン遺伝子・耐熱性エンテロトキシン遺伝子を対象とした遺伝子スクリーニングの有用性であることが明らかに

なった。また、主要7血清群を対象とした免疫磁気ビーズを開発し、食品、特に野菜からの分離培養での分離の向上効果が認められた。加えて、EPECの選択性に優れる抗生物質を加えた分離培地を使用することが重要であることも示された。(2)の研究において、研究対象とした腸管毒素原性大腸菌 O169:H41 の保有するCS6、CS8-like および K88-like の3種類の腸管定着因子の、ヒト、ブタ、ウシの腸粘膜上皮細胞に対する付着性と宿主特異性を検討した結果、K88-like 遺伝子で組み換えた株はヒトおよびブタの細胞に強い接着性を示し、ヒトとブタ両方への感染力を保有する可能性が示された。本研究では、今後、食品での検査法の確立をめざす。また、食中毒に重要な家畜・食肉についてさらに検討を進める。

F. 健康危険情報

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.

Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y. (2017) 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 (1):268-278.

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. (2017) 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.* (in press)

Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y. (2017) 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. (in press)

Seo, D., Choi, S., Jeon, S., Jeong, S., Park, H., Lee, B., Kim, G., Yang, S., Nishikawa, Y., and Choi, C. (2017) 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

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* O157 on food-related fungal colonies, International Symposium of Mycotoxicology 2016, Tokyo, Japan.

鄭 冬明、坂 瑛里香、池崎 沙耶加、中臺枝里子、和田崇之、輪島文明、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23-25日 大阪大学微生物病研究所 大阪国際交流センター 一般演題P2-045

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 23-25日 大阪大学微生物病研究所 大阪国際交流センター 一般演題 P2-153

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O169: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15-16日 麻布大学 タワーホール船堀 p.58

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15-16日 麻布大学 タワーホール船堀 p.59

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22日 帝塚山学院大学 p.52

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22日 帝塚山学院大学 p.52

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19日 大阪市立

大学 p.44

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19日 大阪市立大学 p.45

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

. 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-STE C 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-STE C 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-STE C 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-STE C 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-STE C 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-STE C 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-STE C 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-STE C 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-STE C 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-STE C 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

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細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。生食用ボ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、生食用ボイルわかめに腸管毒素原性大腸菌を食品 1g 当たりに 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、10cfu/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

表 1 プライマー及びプローブの塩基配列と反応液調製

標的遺伝子プライマー等	塩基配列 (5' -3')	容量 (μL)
<i>STh</i> プライマー (10p)	aaagtggctcctgaaagcatgaatag	0.5
プライマー (10p)	cacccggtacaagcaggatt	0.5
プローブ (5p)	FAM-Agcaattactgctgtgaattgtgtt-TAMRA	0.33
<i>STp</i> プライマー	gcaaaatccggtttaactaatctcaaa	0.5
プライマー (10p)	acagaaataaaaaatgccaacattagc	0.5
プローブ (5p)	FAM-ttacctcccgtcatgtgtttcacggat-TAMRA	0.33
<i>Lt</i> プライマー (10p)	ccggcagaggatggttacag	0.5
プライマー (10p)	gaatccagggtcttctctcaa	0.5
プローブ (5p)	FAM-ttacctcccgtcatgtgtttcacggat-TAMRA	0.33
2 × Enviromental Mastermix		12.5
蒸留水		5.51
鋳型 DNA		3

表2 供試菌株の性状及びmEC培地における増殖結果

菌株 No.	毒素産生性		分離平板培地での発育								mEC 培地中の菌数 (log cfu/mL)	
	コンベンショナル PCR ^{*1} (Oneshot STp/STh/LT)	リアルタイム PCR ^{*2}	SMAC 寒天培地		DHL 寒天培地		トリガリスキ- 改良培地		クモアガ - STEC 基礎培地		mEC 培養温度	
			mEC 培養温度		mEC 培養温度		mEC 培養温度		mEC 培養温度		36	42
			36	42	36	42	36	42	36	42		
05	STh	ST	+	+	+	+	+	+	+	+	> 8.0	> 8.0
K1	STh	ST	+	+	+	+	+	+	+	+	> 8.0	> 7.0
K2	STh	ST	+	+	+	+	+	+	+	+	> 8.0	> 7.0
F1	STh	ST	+	+	+	+	+	+	+	+	> 8.0	> 7.0

*1 コンベンショナル PCR は、各エンテロトキシンの検出を個別の増幅反応で行う。

*2 リアルタイム PCR は、各耐熱性エンテロトキシン (ST) の検出に同じ蛍光色素 FAM を使用しているため、マルチプレクス反応系では区別ができない。

表3 リアルタイム PCR による食品培養液の毒素産生性遺伝子検出感度

食品	血清型 (菌株 No.)	検出感度 (log cfu/mL)	
		ST	LT
ミニトマト	0169 (T5)	約 2.0	-
	06 (T6)	約 2.0	約 2.0
大根の漬物	0148 (T11)	約 2.0	-
	0169 (T5)	約 2.0	-
	06 (T6)	約 2.0	約 2.0
根深ネギ	0148 (T11)	約 2.0	-
	0169 (T5)	約 3.0	-
	06 (T6)	約 2.0	約 2.0
生食用ボイルわかめ	0148 (T11)	約 2.0	-
	0169 (T5)	約 2.0	-
	06 (T6)	約 2.0	約 2.0
	0148 (T11)	約 2.0	-

*T5 (ST 遺伝子保有株)、T6 (LT、ST 遺伝子保有株)、T11 (ST 遺伝子保有株)

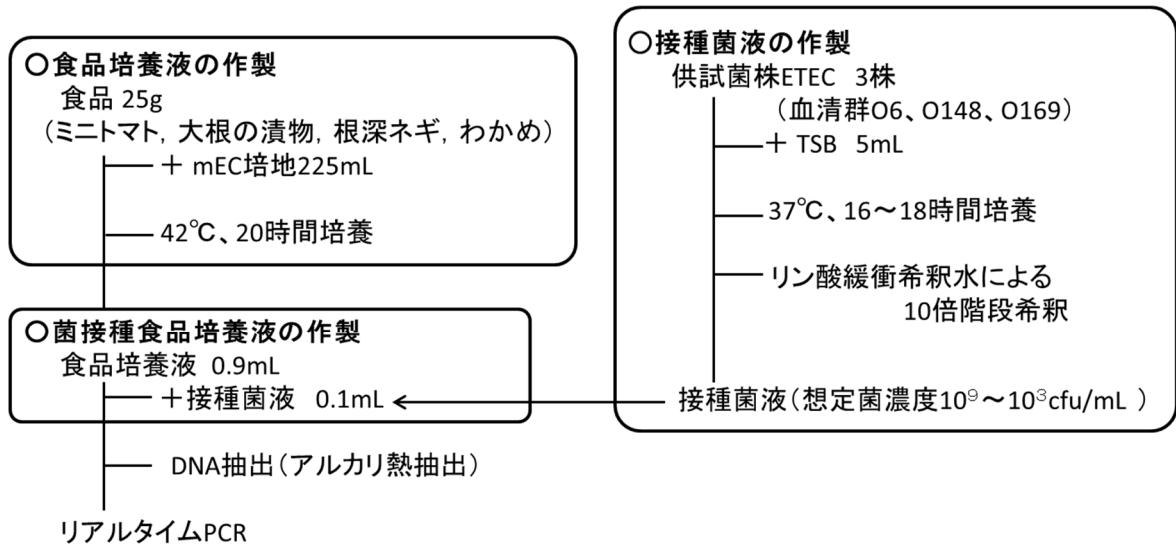


図1 ST及びLT遺伝子検出法の検出感度試験

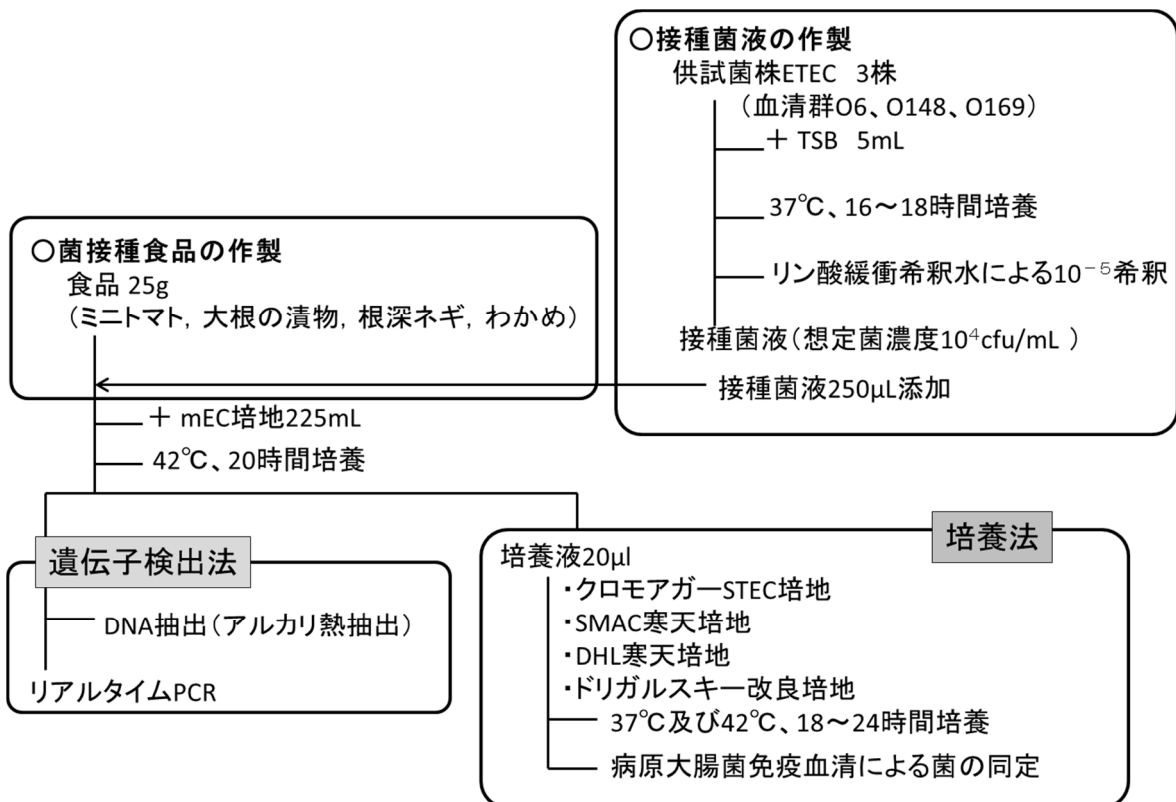


図2 食品からの培養法及び毒素遺伝子スクリーニング検出による毒素原性大腸菌検査法の検討

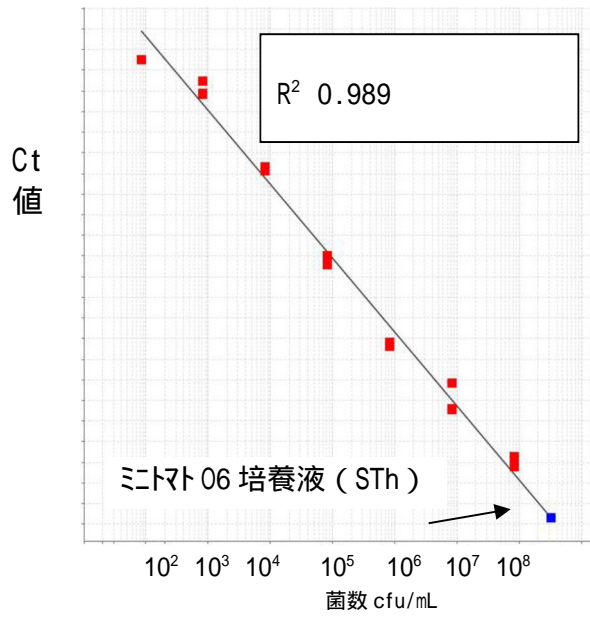


図3 ミトマト 06 による検量線 (ST)

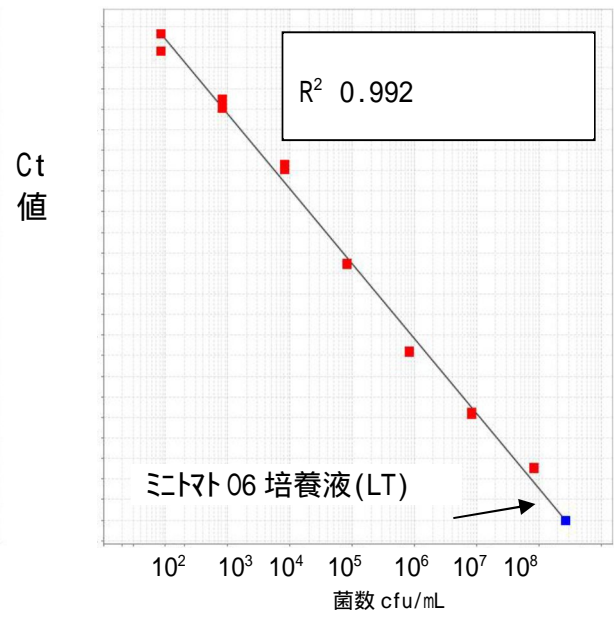


図4 ミトマト 06 による検量線 (LT)

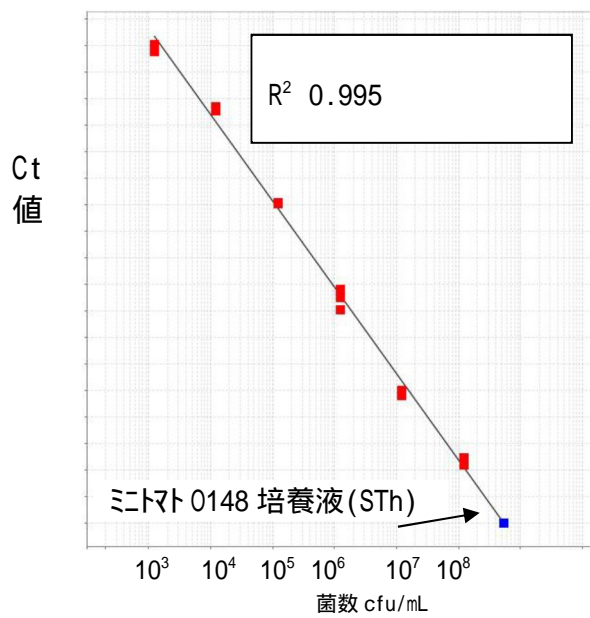


図5 ミトマト 0148 による検量線 (ST)

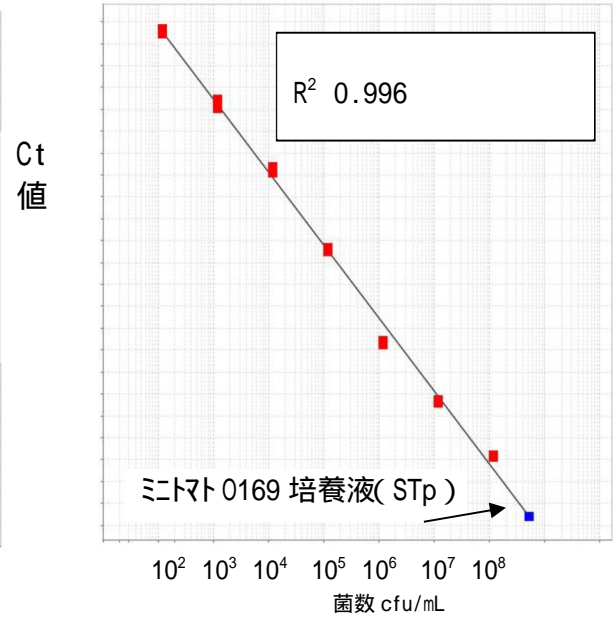


図6 ミトマト 0169 による検量線 (ST)

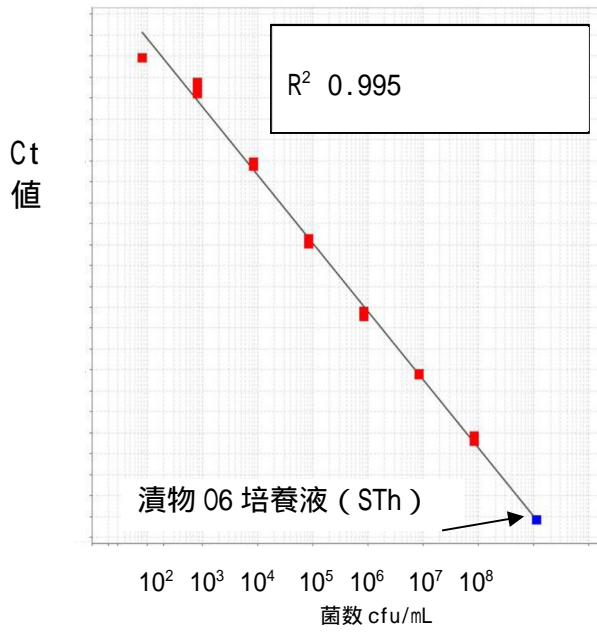


図 7 大根漬物 06 による検量線 (ST)

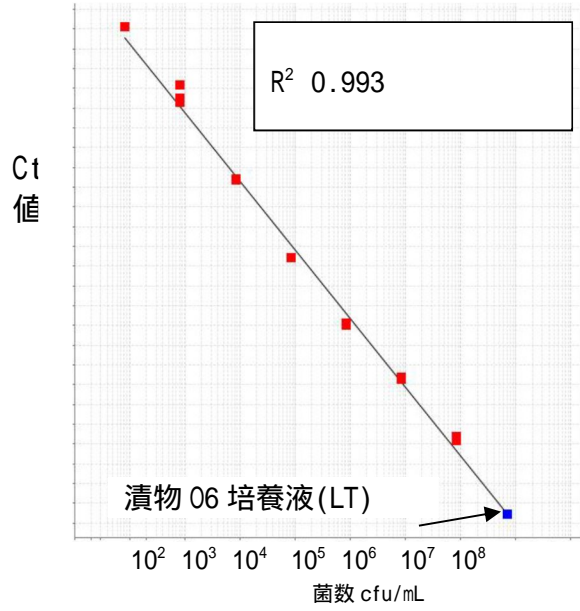


図 8 大根漬物 06 による検量線 (LT)

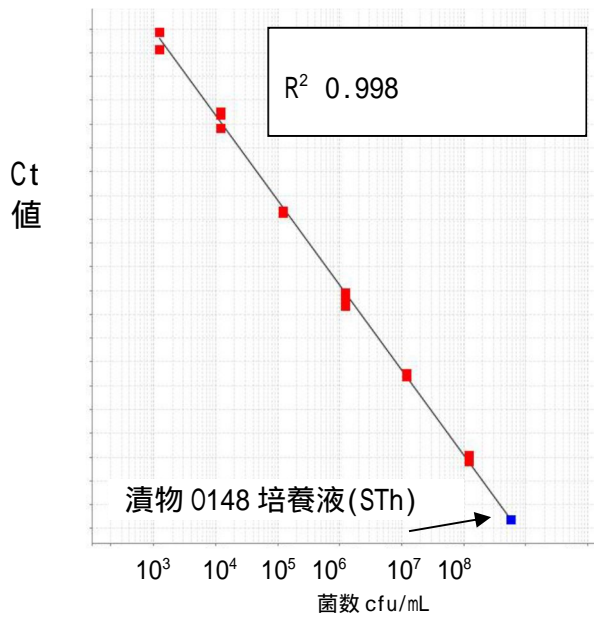


図 9 大根漬物 0148 による検量線 (ST)

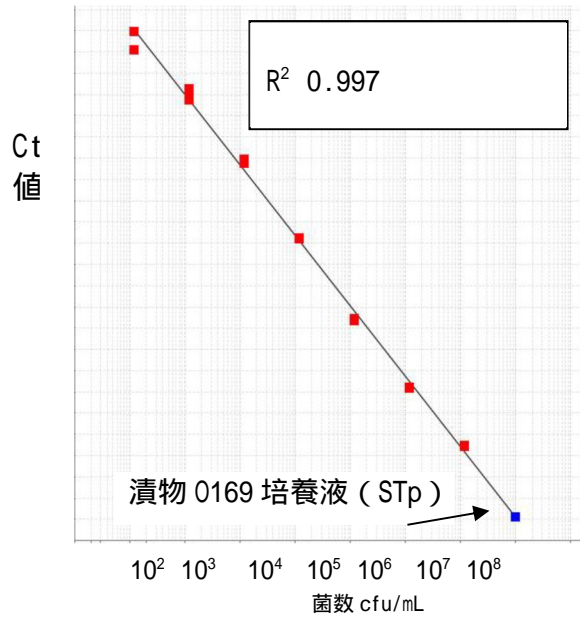


図 10 大根漬物 0169 による検量線 (ST)

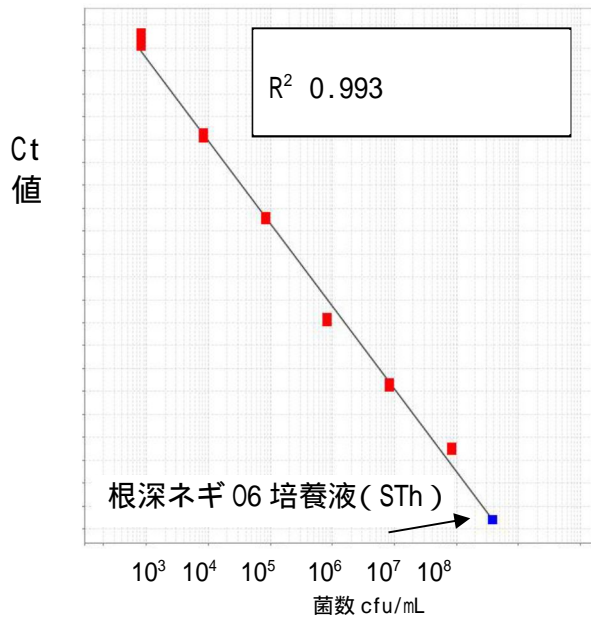


図 11 根深ネギ 06 による検量線 (ST)

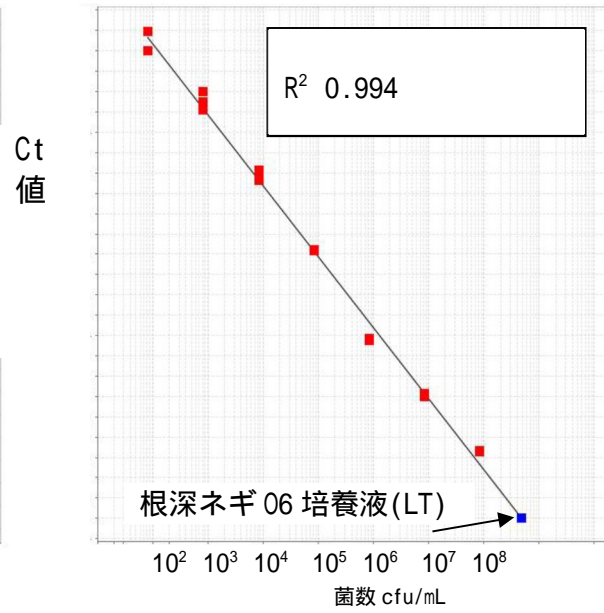


図 12 根深ネギ 06 による検量線 (LT)

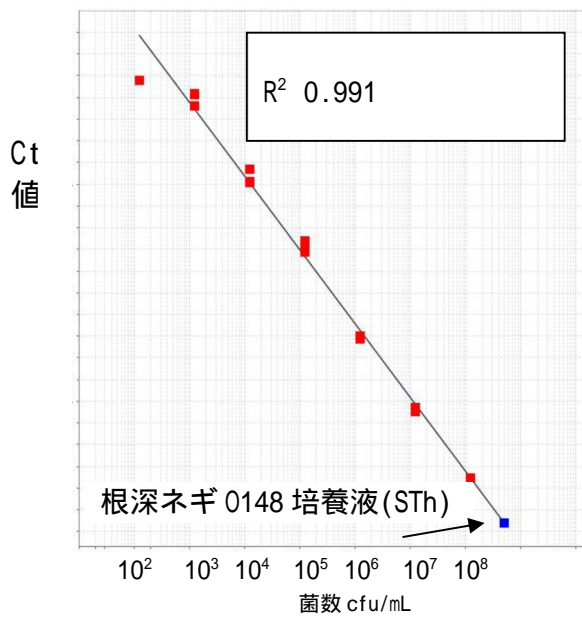


図 13 根深ネギ 0148 による検量線 (ST)

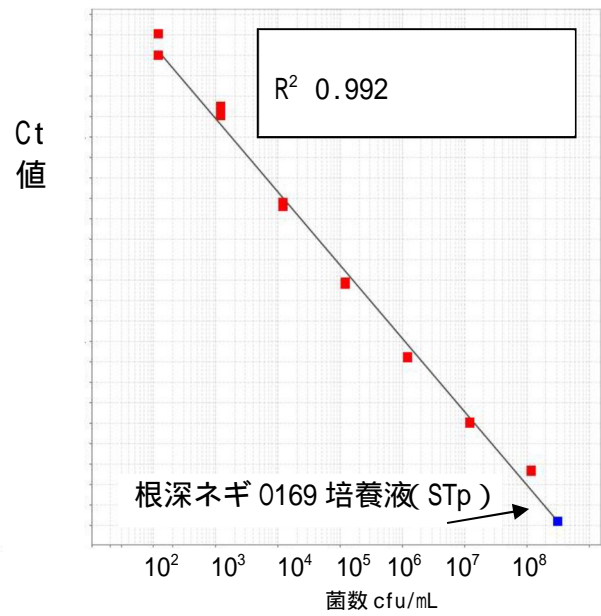


図 14 根深ネギ 0169 による検量線 (ST)

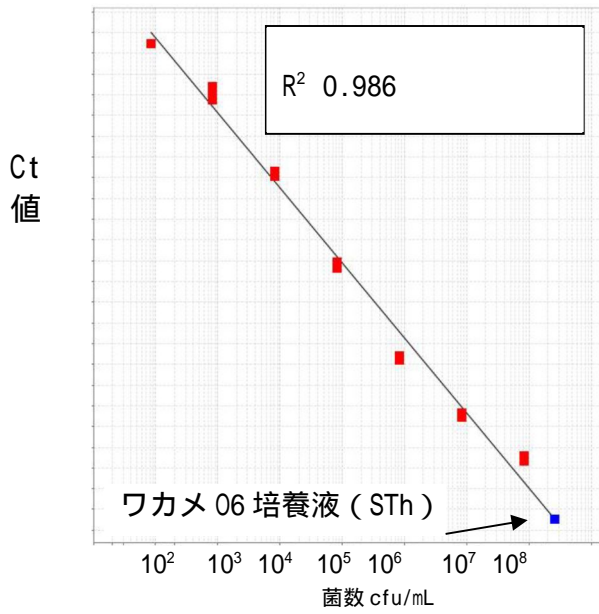


図 15 ワカメ 06 による検量線 (ST)

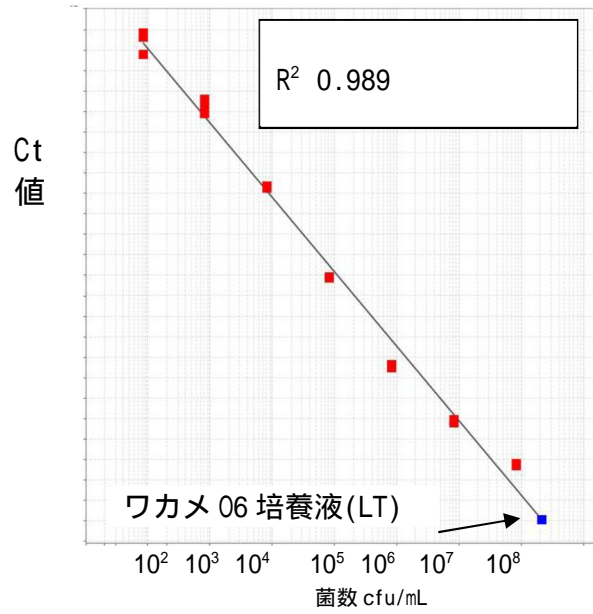


図 16 ワカメ 06 による検量線 (LT)

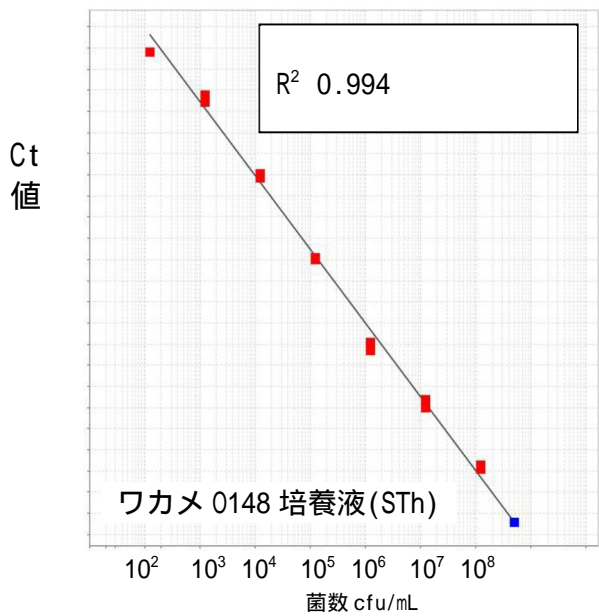


図 17 ワカメ 0148 による検量線 (ST)

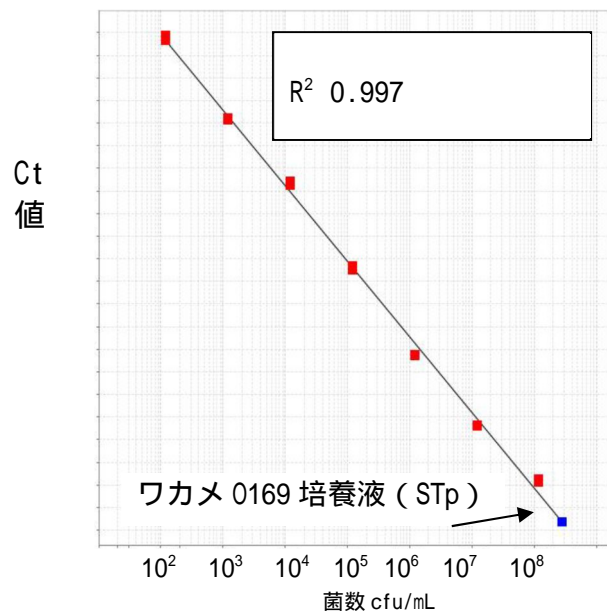


図 18 ワカメ 0169 による検量線 (ST)

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

食品を対象とした毒素原性大腸菌（ETEC）検出に用いる免疫磁気ビーズ作製方法の検討

研究協力者 東京都健康安全研究センター 小西 典子
東京都健康安全研究センター 尾畑 浩魅
東京都健康安全研究センター 平井 昭彦
東京医科大学 甲斐 明美

研究要旨：食品を対象とした ETEC 検査法は未だ確立されておらず，その検査法の確立が急務となっている。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の良い方法であると考えられる。しかし最も検出頻度の高い毒素原性大腸菌 7 血清群に対する免疫磁気ビーズは市販されていないため，これらは自家調製する必要がある。そこでこれら大腸菌の検査に用いるための自家調製免疫磁気ビーズ作製方法について検討した。使用する血清量および反応時間について検討した結果，磁気ビーズ 250 μ l あたり血清量は最低 5 μ l，反応時間は室温で 30 分以上であれば，検査に使用できる免疫磁気ビーズが得られることが明らかとなった。

作製した免疫磁気ビーズを用いて集菌効果を確認したところ，O27，O148 は 10^0 cfu/ml まで，O25，O153，O159，O169 は 10^1 cfu/ml まで検出することが可能であった。O6 については 10^3 cfu/ml と集菌効果は低かった。

今回の検討から明らかとなった課題は，使用する血清のロットによって凝集反応の強さが異なることがあること，菌株によっては生菌で凝集が認められない場合のあることである。生菌で凝集が認められない血清を用いて免疫磁気ビーズを作製しても，集菌効果は低いことが明らかとなった。今後，作製した免疫磁気ビーズの保存可能な期間，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。

A. 研究目的

ヒトに下痢症を引き起こす大腸菌は，病原因子別に少なくとも，病原血清型大腸菌（EPEC），腸管出血性大腸菌（EHEC），毒素原性大腸菌（ETEC），組織侵入性大腸菌（EIEC），腸管凝集付着性大腸菌（EAEC）

の 5 種類と特定の病原因子を保有する「その他の下痢原性大腸菌」に分類されている。このうち ETEC による食中毒は全国で毎年数事例発生しており，事例数も EHEC に次いで多く報告されている。これら食中毒の感染源や原因食品を解明するためには，食

品から ETEC を検出することが重要である。しかし食品を対象とした ETEC 検査法は未だ確立されておらず、その検査法の確立が急務となっている。昨年までの本研究で、ETEC 食中毒の原因菌は O6, O25, O27, O148, O153, O159, O169 の 7 血清群が多く占めていること、原因食品としては野菜や飲用水が関与している事例が多いことが明らかとなった。

汚染菌量が少なく、目的菌以外の雑菌が多い食品から上記 7 血清群の ETEC を検出するためには免疫磁気ビーズ法により目的菌を集菌することが有効であると考えられる。しかし、7 血清群に対する免疫磁気ビーズは市販されていないため、当面は自家調製する必要がある。そこで今回、免疫磁気ビーズの作製方法について検討した。更に大腸菌 7 血清群に対する免疫磁気ビーズを作製し、その集菌効果の検討を行った。

B. 研究方法

1. 免疫磁気ビーズの作製方法に関する検討

1) 磁気ビーズに感作させる血清量の検討

供試菌株は赤痢菌 (ソネ) である。市販の磁気ビーズ (Dynabeads® M-280 Sheepanti-Rabbit IgG : ThermoFisher SCIENTIFIC 社製, ベリタス社販売) 250 μ l に対し市販の赤痢菌免疫血清「生研」ソネ赤痢菌 相 (デンカ生研) を 1 μ l, 2 μ l, 5 μ l, 10 μ l, 20 μ l, 50 μ l, 100 μ l 加えて免疫磁気ビーズを作製した。反応時間は 2 時間、反応温度は室温である。作製した免疫磁気ビーズを用い、ソネ赤痢菌の TSB, 37 培養液を PBS で階段希釈した菌液 (菌数 $10^5 \sim 10^1$ cfu/ml) から菌の検

出を試みた。

2) 血清と磁気ビーズの感作時間の検討

磁気ビーズに付属の説明書では、血清と磁気ビーズの感作時間は 4 ~ 18 時間となっているが、現場でより迅速に反応させることが可能であるかを検討した。磁気ビーズ 250 μ l に対し血清量 10 μ l 加え、感作時間を 15 分, 30 分, 60 分, 90 分, 120 分として免疫磁気ビーズを作製した。反応温度は室温である。作製した免疫磁気ビーズを用い、各濃度に階段希釈した菌液 (菌数 $10^5 \sim 10^1$ cfu/ml) から当該菌の検出を試みた。

2. 毒素原性大腸菌検出法に用いる免疫磁気ビーズ作製方法の検討

1) 供試菌株

食中毒患者および散発下痢症患者から分離された毒素原性大腸菌 O6 群 (LT & ST 産生), O25 群 (ST 産生), O27 群 (ST 産生), O148 群 (ST 産生), O153 群 (ST 産生), O159 群 (ST 産生), O169 群 (ST 産生) 各 1 株を供試した。

2) 血清の選択

血清は市販の病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いた。使用した血清のロット番号は A~D の 4 種類である。これら 4 ロット血清と供試菌株 (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を免疫磁気ビーズ作製用に使用した。

3) 免疫磁気ビーズの作製方法

磁気ビーズは Dynabeads® M-280 Sheepanti-Rabbit IgG (ThermoFisher

SCIENTIFIC 社製,ペリタス社販売)を使用した。血清は上記検討で選んだロットの血清を希釈することなく原液のまま用いた。血清を磁気ビーズへ感作させる方法の詳細は別紙 1 のとおりである。

3. 大腸菌自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果の検証

各血清群の大腸菌を TSB に接種し,37℃, 18~20 時間培養を行った。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。想定菌数は 10^4 cfu/ml から 10^1 cfu/ml である。希釈した菌液 1ml を対象に自家調製免疫磁気ビーズを用いて集菌を行い,集菌したビーズを 10mM PBS 0.1ml に懸濁した。懸濁液を寒天平板 (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) に各 $10\mu\text{l}$ ずつ接種し,塗抹培養後,37℃ で 18~20 時間培養し,各平板に発育した集落数を計測した。

C. 研究結果

1. 免疫磁気ビーズ作製方法に関する検討

1) 磁気ビーズに感作させる血清量の検討

磁気ビーズに感作させた血清量と集菌効果について検討を行った。血清量が 5, 10, 20, 50, $100\mu\text{l}$ では 10^1 cfu/ml まで検出することができた。平板上に出現した集落数は,いずれの血清量でも 10^1 cfu/ml 菌液を用いた場合が数集落, 10^2 cfu/ml では 10~99 集落, 10^3 cfu/ml 菌液では 100 集落以上であった。一方,血清量が 1~ $2\mu\text{l}$ では 10^3 cfu/ml までしか検出できなかった。

2) 血清と磁気ビーズの感作時間の検討

磁気ビーズ $250\mu\text{l}$ に血清 $10\mu\text{l}$ を用い,反応時間を 15 分,30 分,60 分,90 分,120 分の 5 段階について免疫磁気ビーズの感作時間の検討を行った。作製した免疫磁気ビーズを用いて感度試験を実施した結果,感作時間 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。

2. 毒素原性大腸菌検出に用いる免疫磁気ビーズ作製方法の検討

1) 血清の選択

市販の病原大腸菌免疫血清 (4 ロット) と各血清群の ETEC との凝集反応性をスライド凝集法で確認した。ETEC O148, O153, O159, O169 は 2 種類の血清 (A, B) に,いずれにも強い凝集が認められた。O25 と O27 は血清のロットによって凝集の強さに差が認められた。すなわち O25 ではロット番号 A では凝集が認められたが, B では凝集が認められなかった。また, O27 はロット番号 A, B とは凝集せず, D とは弱い凝集であったが, C では強い凝集であった。また O25 ではロット番号 A では凝集が認められたが, B では凝集が認められなかった。O6 については全ての血清と凝集が認められなかった。これらの結果から自家調製免疫磁気ビーズを作製するための血清はロット番号 B (O6, O148, O153, O159, O169), A (O25), および C (O27) を選択した (表 1)。

3. 大腸菌自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果の検証

1) 血清群別検出感度

作製した免疫磁気ビーズの集菌効果の結果を表 4 に示した。O27, O148, O159 は 10^0 cfu/ml まで, O25, O153, O169 は 10^1 cfu/ml まで検出可能であった。しかし O6 は 10^3 cfu/ml までの検出で, 集菌効果は低かった。

2) 分離平板別発育状況

分離平板ごとに検出数をみると, 抗生物質加 SMAC 寒天では他の分離平板と比べてやや菌の発育に抑制が認められた。特に O148, O153 では他の分離平板と比較して検出感度が低かった。(表 3)

D. 考察

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良いと考えられる。厚労省からの通知法である「腸管出血性大腸菌の検査法」では, 培養液を PCR 法でスクリーニングしたのち, 陽性となった培養液について免疫磁気ビーズで集菌する方法が記載されている。したがって, 毒素原性大腸菌の検査法を構築する上で免疫磁気ビーズ法を用いた集菌は必須である。しかし, 今回検査対象とした ETEC の 7 血清群に対する免疫磁気ビーズは市販されていないため, これらは自家調製する必要がある。そこで ETEC の検査に用いるための自家調製免疫磁気ビーズ作製方法について検討した。

免疫磁気ビーズの取扱い説明書および国立感染症研究編集のマニュアルでは血清と磁気ビーズの反応温度と感作時間は 4-18 時間とされている。以前行った検討で, 反応温度は室温で問題がないことから, 今回は室温で反応を行った。

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。反応時間を 15 分, 30 分, 60 分, 90 分, 120 分と変えて免疫磁気ビーズを作製し, 感度試験を行った結果, 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。

市販免疫血清は加熱菌を検査対象としているが, 磁気ビーズ法での集菌は生菌が対象となっている。そこで生菌を用いて血清凝集反応を行い, 最も短時間で強い凝集が認められる血清を用いて免疫磁気ビーズを作製した。今回, 4 ロットの血清を用いて凝集試験を行ったところ, O25 と O27 はロットによって凝集の強弱が認められた。O6 についてはいずれの血清でも凝集は認められなかった。このように血清のロットによって凝集に強弱が認められ, 中には生菌では凝集が認められないものがあった。O6 は加熱菌を用いた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 O6 は K 抗原がリッチな株であった可能性が示唆された。今回作製した免疫磁気ビーズを用いて感度試験を行ったところ, O6 以外は 10^0 ~ 10^1 cfu/ml まで検出することが可能であった。

今回の検討から明らかとなった課題は,

使用する血清によって凝集の強さが異なることがあること、菌株によっては生菌で凝集が認められない場合のあることである。更に作製した免疫磁気ビーズの保存可能な期間、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。

E. 結論

自家調製免疫磁気ビーズを作製するために使用する血清量および反応時間について検討した。その結果、磁気ビーズ 250 μ l あたり血清量は最低 5 μ l、反応時間は室温で 30 分以上であれば、検査に使用できる免疫磁気ビーズが得られることが明らかとなった。

作製した免疫磁気ビーズを用いて集菌効果を確認したところ、O27、O148 は 10^0 cfu/ml まで、O25、O153、O159、O169 は 10^1 cfu/ml まで検出することが可能であった。しかし、O6 については 10^3 cfu/ml と集菌効果は低かった。

今回の検討から明らかとなった課題は、使用する血清のロットによって凝集反応の強さが異なることがあること、菌株によっては生菌で凝集が認められない場合があることである。生菌で凝集が認められない血清を用いて免疫磁気ビーズを作製しても、集菌効果は低い。今後、作製した免疫磁気ビーズの保存可能な期間、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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

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
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学術講演会，2016 年 10 月，函館

試薬

- ・ 病原大腸菌免疫血清(デンカ生研)
- ・ 磁気ビーズ: Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG
(TermoFisher SCIENTIFIC社製, ベリタス社販売)
- ・ 0.1%BSA加PBS
- ・ 10mMPBS(pH7.4)

器具

- ・ 1.5ml マイクロチューブ
- ・ 磁気ビーズ集菌用スタンド

方法

1. 1.5mlチューブを用意する。
2. 磁気ビーズをよく混和し, 上記チューブに250 μ l分注する。
3. 0.1%BSA加PBSを1ml加え洗浄する(洗浄1回目)。
4. 磁石を用いて磁気ビーズを集めた後, 上清を取り除く。
5. 0.1%BSA加PBSを1ml加え軽く混和する(洗浄2回目)。
6. 磁石を用いて磁気ビーズを集めた後, 上清を取り除く。
7. 0.1%BSA加PBSを980 μ l加え, 磁気ビーズを再浮遊させる。
8. 病原大腸菌免疫血清を20 μ l加える。
9. 室温で2時間, 転倒混和させながら磁気ビーズと抗体を反応させる。
10. 磁石を用いて磁気ビーズを集め, 上清を取り除く。
11. 10mM PBS(pH7.4)を250 μ l加え, 再浮遊させる。
12. 4°Cで保管

表1. 市販血清の凝集反応性

血清群	血清のロット(デンカ生研)			
	A	B	C	D
O6	-	-	-	-
O25	++	-	ND	ND
O27	-	-	+++	+
O148	+++	+++	ND	ND
O153	+++	+++	ND	ND
O159	+++	+++	ND	ND
O169	+++	+++	ND	ND

血清凝集反応は生菌を用い、スライド凝集法で行った。

表2. 自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果

血清群	試料液中の菌数(cfu/ml)					未接種
	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	
O6	ND	1+	-	-	-	-
O25	≥3+	2+	2+	1+	ND	-
O27	ND	≥3+	3+	2+	1+	-
O148	ND	≥3+	2+	1+	1+	-
O153	≥3+	3+	2+	1+	ND	-
O159	ND	≥3+	2+	1+	1+	-
O169	≥3+	2+	1+	1+	ND	-

SMAC寒天, 抗生物質加SMAC寒天, クロモアガーSTEC基礎培地,
DHL寒天平板上に発育した集落の平均値

1+: 1~9個, 2+: 10~99個, 3+: 100~999個

表3. 自家調製磁気免疫ビーズを用いた毒素原性大腸菌の検出

血清群	最少検出菌数(cfu/ml)			
	SMAC	抗生物質加 SMAC	クロモアガー STEC(基礎培地)	DHL
O6	10 ³	10 ³	10 ³	10 ²
O25	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ²
O27	10 ⁰	10 ⁰	10 ⁰	10 ⁰
O148	10 ⁰	10 ²	10 ¹	10 ⁰
O153	10 ¹	10 ²	10 ¹	10 ¹
O159	10 ⁰	10 ¹	10 ¹	10 ⁰
O169	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹

各血清群菌の階段希釈PBS菌液を試料とした

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

食品での腸管毒素原性大腸菌の分離培養法の検討

工藤由起子

研究要旨

本研究では、(1)腸管毒素原性大腸菌の上位 7 血清群の 06、025、027、0148、0153、0159、0169 を対象として、食品、特に野菜からの分離培養における免疫磁気ビーズ法の効果を検討した。また、(2)腸管毒素原性大腸菌の選択分離培地の開発を目指して、平成 27 年度の研究成果から有用と考えられた抗生物質を寒天培地に添加し菌の検出性を検討した。加えて、寒天平板培地の培養温度を 42 に高めることでの選択性の向上効果を検討した。その結果、7 血清群の免疫磁気ビーズの有用性が確認され、特に、腸管毒素原性大腸菌の選択性が高い抗生物質を加えた SMAC を組み合わせることで格段に効率的な腸管毒素原性大腸菌の分離が行えることが期待された。また、42 での選択培地の培養は腸管毒素原性大腸菌の生育に抑制的であり、一般的には 37 での培養が良いと考えられた。本研究から、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。

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

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（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、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 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）と共通して使用できることが明らかになった。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 ETEC に応用することを検討することとした。また、免疫磁気ビーズ法の実施とともにビーズ濃縮液を ETEC 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が考えられるため、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。

本研究で使用する ETEC7 血清群を対象とした免疫磁気ビーズは、東京都健康安全研究センターで自家作製されたものを使用した。本免疫磁気ビーズの作製については、別途、報告する（小西典子ら、協力研究報告「食品を対象とした毒素原性大腸菌検出に用いる免疫磁気ビーズ作製方法の検討」）。

B. 研究方法

(1) 各種寒天培地の 36 および 42 培養での ETEC コロニー形態の特徴

1) 供試菌株

供試菌株として、06(4 株)、025(2 株)、027(2 株)、0148(2 株)、0153(32 株)、0159(3 株)、0169(3 株)の 7 血清群、計 49 株の ETEC を用いた(表 1)。

2) 培養

室温下でカジトン培地に保存していた菌株を、ソルビトールマッコンキー(SMAC, オキシソイド)寒天培地 2 枚、クロモアガー-STEC 基礎培地(クロモアガー社)2 枚に画線した。1 枚は 37℃、1 枚は 42℃にて 24 時間培養し、コロニーを観察した。

(2) ETEC 主要 7 血清群の免疫磁気ビーズの感度試験

検出感度を確認するための ETEC は、平成 27 年度(2015 年度)食中毒事件詳報や国立感染症研究所・感染情報センター

が公表する病原微生物検出情報（IASR、<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr.html>）から解析して決定した主要 7 血清群を対象とした。以下に方法を示す。また、そのフローを図 1 に示す。

1) 供試菌株

供試菌株として、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 血清群を用いた（表 2）。

2) 供試菌株の培養

室温下でカジトン培地に保存していた供試菌 7 株を、それぞれトリプティケース・ソイ・ブロス(TSB、オキシド) 10 ml に 1 エーゼ接種し、37 で 18 時間培養（約 1.0×10^9 cfu/ml）した。

供試菌株の計数には、各血清群の培養液（約 10^9 cfu/ml）0.1 ml をリン酸緩衝生理食塩水（ダルベッコ PBS(-)、日水製薬）0.9 ml にてそれぞれ 10 倍階段希釈して 10^{-6} （約 10^3 cfu/ml）希釈菌液を作製した。この希釈菌液 0.1 ml を 10 枚のトリプティケース・ソイ・アガー培地(TSA、オキシド)に塗抹し、37 で 18~24 時間培養し、コロニー数を計測した。

3) 供試食品

供試食品は、東京都および埼玉県内のスーパーマーケットなど小売店で購入した生ワカメ（宮城県産）、キュウリ（高知県産および宮城県産）、根深ネギ（埼玉県産）、オオバ（茨城県産）、コネギ（大分

県産）を用いた。

各食品の一般生菌数および大腸菌群数の測定をするために、各食品を洗わず、滅菌したハサミおよびピンセットを用いて、食品の表面、内部など全体から採取した。そのうちの 10 g をストマッカー袋に秤量し、PBS 90 ml を加え 1 分間ストマッカー処理したもの（ 10^{-1} 希釈液）を PBS で $10^{-2} \sim 10^{-6}$ に 10 倍階段希釈した。一般生菌数については、各希釈液 0.1 ml を標準寒天培地(オキシド)に塗抹し、 36 ± 1 で 24~48 時間培養し、コロニー数を計測した。大腸菌群数については、各希釈液 1 ml をシャーレに分注しデソキシコレート寒天培地（日水製薬）で混釈し、 36 ± 1 で 24~48 時間培養し、コロニー数を計測した。

4) 食品培養液の作製

3) と同様に食品の全体から採取した 25 g をストマッカー袋に秤量し、室温程度の mEC 培地(日水製薬) 225 ml をそれぞれに加え、ストマッカー処理を 1 分間行った後、 42 ± 1 で 20~24 時間培養した。

5) 試験に用いる ETEC 接種食品培養液の調整

2) の各血清群の ETEC 培養液（約 10^9 cfu/ml）0.1 ml を PBS 0.9 ml でそれぞれ 10^{-7} まで 10 倍階段希釈した。各血清群の ETEC について、 10^{-4} 希釈菌液（約 10^5 cfu/ml）0.1 ml を、食品培養液 0.9 ml（合計 1 ml）に接種し 10^{-5} 菌液接種食品

培養液（約 10^4 cfu/ml）を作製した。同様に、各血清群の $10^{-5} \sim 10^{-7}$ 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。

6) 免疫磁気ビーズ法

ETEC 接種食品培養液中の各血清群を東京都健康安全研究センターで作製した免疫磁気ビーズで濃縮した。なお、ビーズ作製の詳細については小西典子らの協力研究報告「食品を対象とした毒素原性大腸菌検出に用いる免疫磁気ビーズ作製方法の検討」に、別途記載する。

まず、食品培養液または ETEC 接種食品培養液（ $10^{-6} \sim 10^{-8}$ 菌液接種食品培養液、約 $10^4 \sim 10^1$ cfu/ml）の各 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、転倒混和を 2~3 回行い、10 分間室温で反応させた。これを 10 分間隔で 30 分間反応させた。つぎに、磁気スタンドにマイクロチューブをセットし、5 分間静置した。この間、チューブ内壁の 1 点に磁気ビーズが集まるように、磁気スタンドごと数回穏やかに転倒混和した。スタンドに置いたまま培地を短いトランファーパーペットで取り除き、新しいトランファーパーペットで PBS を 1 ml を加え、懸濁した。この PBS で洗う作業は 2 回繰り返す。0.1 ml の PBS に懸濁し、これを免疫磁気ビーズ濃縮液とした。

7) ETEC 接種食品培養液および免疫磁気

ビーズ濃縮液の選択寒天培地への塗抹・培養

ETEC 接種食品培養液を抗生物質加 SMAC 寒天培地 2 枚に 10 μ l ずつ画線した（直接塗抹法）。また、免疫磁気ビーズ濃縮液を SMAC 寒天培地 2 枚、抗生物質加 SMAC 寒天培地 2 枚およびクロモアガー STEC 基礎培地 2 枚の合計 6 枚に 10 μ l ずつ画線した（免疫磁気ビーズ塗抹法、IMS 塗抹法）。これら画線した 2 枚の培地のうち、1 枚は 37 で、もう 1 枚は 42 で 18~24 時間培養した。

8) 血清凝集試験

各寒天培地に生育したコロニーを観察し、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。ただし、血清群 06 と 0169 については、ETEC と疑われるコロニーを普通寒天培地や TSA など非選択培地に植菌し、37 で 18~24 時間培養した。培養後、コロニーを 50 μ l の PBS に懸濁し、121 で 1 時間、オートクレーブで加熱処理を行った。冷却後、5,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を除去し、20 μ l の PBS に再懸濁した。これを加熱菌体浮遊液として血清凝集試験を行った。血清には、病原大腸菌免疫血清「生研」（デンカ生研株式会社）の 06、025、027、0148、0153、0159、0169 を用いた。

C. 研究結果

(1) 各種寒天培地の 36 および 42 培

養での ETEC コロニー形態の特徴

SMAC およびクロモアガー-STE C 基礎培地に各供試菌 49 株を画線し、36 および 42 にて 24 時間培養した結果を表 1 に示す。両培地、両温度条件において、供試菌株の生育については、1 株を除き良好であった。

(2) ETEC 主要 7 血清群の免疫磁気ビーズの感度試験

1) キュウリ培養液

塗抹した各種寒天培地を 37 で培養した場合は、血清群 027 および 0153 では IMS 塗抹法に供試した全 3 寒天培地および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 4 寒天培地から分離され、血清群 06 および 025 では IMS 塗抹法での抗生物質加 SMAC および直接塗抹法での抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から、血清群 0148 では IMS 塗抹法での SMAC および IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から分離され、血清群 0159 および 0169 では IMS 塗抹法での抗生物質加 SMAC のみから分離された(表 3)。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、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 4 血清群(06、025、027、0153)、IMS 塗抹法での SMAC では 3 血清群(027、0148、0153)、IMS 塗抹法でのクロモアガー-STE C 基礎培地では 2 血清群(027、0153)であった(表 3)。

塗抹した各種寒天培地を 42 で培養した場合は、血清群 027 では IMS 塗抹

法に供試した抗生物質加 SMAC、IMS 塗抹法のクロモアガー-STE C 基礎培地および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 3 寒天培地から、血清群 0153 では IMS 塗抹法の SMAC、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 3 寒天培地から分離され、血清群 06 および 0159 では IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から分離され、血清群 025 では IMS 塗抹法の SMAC のみ、血清群 0148 および 0169 では直接塗抹法の抗生物質加 SMAC からのみ分離された(表 3)。検出された血清群の数は、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 6 血清群(06、027、0148、0153、0159、0169)、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC では 4 血清群(06、027、0153、0159)、IMS 塗抹法の SMAC では 2 血清群(025、0153)、IMS 塗抹法のクロモアガー-STE C 基礎培地では 1 血清群(027)のみであった(表 3)。

各条件下での寒天培地上の夾雑菌の生育は、37 の培養温度条件では、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC で抑制された。42 の培養温度条件では、37 より抗生物質による夾雑菌の増殖は抑制されていた。特に、42 の培養温度条件での IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC の 025、0148 および 0169 では、夾雑菌および ETEC、いずれのコロニーも検出されなかった。

2) 生ワカメ培養液

塗抹した各種寒天培地を 37 で培養

した場合には、血清群 027、0153 および 0169 では IMS 塗抹法に供試した抗生物質加 SMAC、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地および直接塗抹法の 3 寒天培地から分離され、血清群 06、025、0148 および 0159 では IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から分離された(表 4)。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(027、0153、0169)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(表 4)。

塗抹した各種寒天培地を 42 で培養した場合には、血清群 027 および 0153 では IMS 塗抹法に供試した抗生物質加 SMAC、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 3 寒天培地から分離され、血清群 06 では IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から、血清群 025 および 0148 では IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および IMS 塗抹法クロモアガー-STECC 基礎培地の 2 寒天培地から、血清群 0159 では IMS 塗抹法の SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から、血清群 0169 では IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地および直接塗抹法の 2 寒天培地から分離された

(表 4)。検出された血清群の数は、IMS 塗抹法で供試した SMAC では 1 血清群(0159)のみであり、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC では 5 血清群(06、025、027、0148、0153)、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地では 5 血清群(025、027、0148、0153、0169)、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 5 血清群(06、027、0148、0153、0159、0169)であった(表 4)。

各条件下での寒天培地上の夾雑菌の生育は、37 および 42 の両培養温度条件で抗生物質による夾雑菌の増殖は抑制されていた。特に、42 の培養温度条件での IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC では 2 血清群(0159、0169)で、夾雑菌および ETEC、いずれのコロニーも検出されなかった。

3) 根深ネギ培養液

塗抹した各種寒天培地を 37 で培養した場合には、血清群 025、027、0148、0153 および 0169 では IMS 塗抹法で供試した全 3 寒天培地および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 4 寒天培地から分離され、血清群 06 では IMS 塗抹法で供試した SMAC、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 3 寒天培地から、血清群 0159 では IMS 塗抹法で供試した全 3 寒天培地から分離された(表 5)。検出された血清群の数は、IMS 塗抹法で供試した SMAC および IMS 塗抹法の抗生物質加 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 6 血清群

(025、027、0148、0153、0159、0169) が分離され、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では6血清群(06、025、027、0148、0153、0169)であった(表5)。

塗抹した各種寒天培地を 42 で培養した場合には、血清群 06、027 および 0153 では IMS 塗抹法で供試した全 3 寒天培地および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 4 寒天培地から分離され、血清群 025 では IMS 塗抹法の全 3 寒天培地から、血清群 0148、0159 および 0169 では IMS 塗抹法の SMAC および IMS 塗抹法のクロモアガー STEC 基礎培地の 2 寒天培地から分離された(表5)。検出された血清群の数は、IMS 塗抹法で供試した SMAC および IMS 塗抹法のクロモアガー STEC 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(06、025、027、0153)、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 3 血清群(06、027、0153)であった(表5)。

各条件下での寒天培地上の雑菌の生育は、37 および 42 の両培養温度条件ともに夾雑菌数が少なかった。特に、37 の培養温度条件での IMS 塗抹法のクロモアガー STEC 基礎培地では 1 血清群(06)、直接塗抹法の抗生物質加 SMAC では 2 血清群(0153、0159)で、42 の培養温度条件での IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC では 3 血清群(0148、0159、0169)、直接塗抹法の抗生物質加 SMAC では 4 血清群(025、0148、0159、0169)で、夾雑菌および ETEC、いずれのコロニーも検出されなかった。

4) オオバ培養液

塗抹した各種寒天培地を 37 で培養した場合には、血清群 027 および 0148 では IMS 塗抹法で供試した SMAC、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 3 寒天培地から、血清群 06、025、0159 および 0169 では IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から、血清群 0153 では IMS 塗抹法の SMAC および IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から分離された(表6)。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(06、025、027、0148、0159、0169)、IMS 塗抹法の SMAC では 3 血清群(027、0148、0153)であり、IMS 塗抹法のクロモアガー STEC 基礎培地からは分離されなかった(表6)。

塗抹した各種寒天培地を 42 で培養した場合には、血清群 027 および 0159 では IMS 塗抹法の SMAC、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 3 寒天培地から、血清群 06 および 0169 では IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から、血清群 0148 および 0153 では IMS 塗抹法の SMAC および IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から分離されたが、血清群 025 は全ての寒天培地からは分離されなかった(表6)。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(06、027、0148、0153、0159、0169)、IMS 塗抹法の SMAC では 4 血清群 (027、0148、0153、0159)、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 4 血清群 (06、027、0159、0169) 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 (表 6)。

各条件下での寒天培地上の夾雑菌の生育は、37 および 42 の両培養温度条件で抗生物質による夾雑菌の増殖は抑制されていた。特に、42 の培養温度条件での直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 2 血清群 (025、0148) で、夾雑菌および ETEC、いずれのコロニーも検出されなかった。

5) コネギ培養液

塗抹した各種寒天培地を 37 で培養した場合は、血清群 025 および 0153 では IMS 塗抹法で供試した全 3 寒天培地から分離され、血清群 06 では IMS 塗抹法の SMAC および IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地の 2 寒天培地から、血清群 027、0148、0159 および 0169 では IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地の 2 寒天培地から分離された (表 7)。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 (025、027、0148、0153、0159、0169)、IMS 塗抹法の SMAC では 3 血清群 (06、025、0153)

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。

塗抹した各種寒天培地を 42 で培養した場合は、血清群 027 および 0153 では IMS 塗抹法の SMAC、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 3 寒天培地から、血清群 0148 では IMS 塗抹法の SMAC、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 3 寒天培地から、血清群 0159 では IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 3 寒天培地から分離され、血清群 025 および 0169 では IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から分離され、血清群 06 では直接塗抹法の抗生物質加 SMAC からのみ分離された (表 7)。検出された血清群の数は、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 (025、0148、0153、0159、0169)、IMS 塗抹法の SMAC では 3 血清群 (027、0148、0153)、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC では 3 血清群 (027、0153、0159) であった (表 7)。

各条件下での寒天培地上の夾雑菌の生育は、37 および 42 の両培養温度条件で抗生物質による夾雑菌の増殖は抑制される傾向であった。特に、42 の培養温度条件での IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC

では4血清群(06、025、0148、0169)で、夾雑菌およびETEC、いずれのコロニーも検出されなかった。

6) 食品培養液中の夾雑菌の生育

抗生物質加SMACではSMACおよびクロモアガー-STECC基礎培地と比較して、37℃培養で生ワカメ、オオバで夾雑菌の生育の抑制が認められ、42℃培養では夾雑菌の生育していなかった根深ネギを除いて、全ての食品で夾雑菌の生育の抑制が認められた(表8)。37℃と42℃培養を比較すると、SMACおよびクロモアガー-STECC基礎培地では夾雑菌の生育の差が認められないが、抗生物質加SMACでは、キュウリ、オオバ、コネギで夾雑菌の生育が42℃培養で抑制され、抗生物質に加え温度の効果が認められた(表8)。

D. 考察

IMSによるETEC分離率の向上効果を確認するために、IMS塗抹法と直接塗抹法の両方に使用した寒天培地である抗生物質加SMACの結果について、血清群ごとに、また、培養温度ごとに集計し表9に示した。血清群06では、37℃においても、両塗抹法とも非検出であったコネギ以外の4食品で直接塗抹法のほうが優れており、42℃培養においても、いずれの食品でも直接塗抹法にてETECが回収され、IMS塗抹法によってむしろ検出性が低下し、IMSによる分離率向上の効果は認められなかった。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。他の血清群では、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。全血清群を総合すると、IMS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。

また、クロモアガー-STECC基礎培地はIMS塗抹法において使用されたため、IMS塗抹法に使用された他の2種類の寒天培地であるSMACおよび抗生物質加SMACと比較することとし、血清群ごとに、また、培養温度ごとに集計した(表10-1および表10-2)。37℃培養においては、クロモアガー-STECC基礎培地でND(ETECと思われるコロニーがなかったため非分離であったもの)の場合が多く見られ、抗生物質加SMACのほうがETEC分離に優れていた。その理由として、クロモアガー-STECC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が考えられた。一方、42℃培養においては、37℃培養に比べて検出が多少向上す

る傾向が認められたが、抗生物質加 SMAC に比べると 37 培養と同様に劣っていた。42 培養による ETEC の選択分離は期待されなかった。なお、SMAC との比較においては、クロモアガー STEC 基礎培地のほうが血清群 0169 において検出性が優れていたが、他血清群では食品によって結果は異なり総合すると同等程度と考えられた。全体的に ETEC の選択分離に有用とは考えられなかった。今後、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。

また、抗生物質を SMAC に加えることでの選択性向上の効果を確認するために、SMAC と抗生物質加 SMAC の結果を、血清群ごとに、また、培養温度ごとに集計した(表 11-1 および表 11-2)。血清群 0169 以外の血清群では、両培養温度ともに抗生物質を加えることで SMAC に比べてどの血清群においても検出性が向上する食品が多く認められた。37 培養において、その傾向は強かった。特に、SMAC では ND (ETEC と思われるコロニーがなかったため非分離であったもの)であったものが抗生物質加 SMAC では分離される場合が多数認められ、本研究で供試された抗生物質が ETEC 分離に優れた選択性を有することが示された。

以上のことから、血清群および食品を総合的に考えて方法を比較したところ(表 12-1 および表 12-2) 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

本研究では、(1) ETEC の上位 7 血清群の 06、025、027、0148、0153、0159、0169 を対象として、食品、特に野菜からの分離培養における免疫磁気ビーズ法の効果を検討した。また、(2) ETEC の選択分離培地の開発を目指して、平成 27 年度の研究成果から有用と考えられた抗生物質を寒天培地に添加し菌の検出性を検討した。加えて、寒天平板培地の培養温度を 42 に高めることでの選択性の向上効果を検討した。その結果、7 血清群の免疫磁気ビーズの有用性が確認され、特に、ETEC の選択性が高い抗生物質を加えた SMAC を組み合わせることで格段に効率的な ETEC の分離が行えることが期待された。また、42 での選択培地の培養は ETEC の生育に抑制的であり、一般的には 37 での培養が良いと考えられた。本研究から、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。

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.

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* O157 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

表1. 各種寒天培地の36°Cおよび42°C培養でのETECコロニー形態の特徴

血清群	菌株数 (ESC No.)	36°C				42°C			
		クロモアガー-STEC		SMAC		クロモアガー-STEC		SMAC	
		生育性	株数/ 全株数	生育性	株数/ 全株数	生育性	株数/ 全株数	生育性	株数/ 全株数
O6	4 (609, 612, 627, 630)	+	3/4	+	3/4	+	4/4	+	2/4
		w	1/4	w	1/4			+	1/4
								w	1/4
O25	2 (624, 631)	+	2/2	+	2/2	+	1/2	+	1/2
						+	1/2	+	1/2
O27	2 (625, 629)	+	2/2	+	2/2	+	2/2	+	1/2
								+	1/2
O148	2 (622, 632)	+	2/2	+	2/2	+	2/2	+	1/2
								+	1/2
O153	32 (638 - 669)	+	32/32	+	32/32	+	32/32	+	32/32
O159	3 (613, 628, 633)	+	3/3	+	1/3	+	1/3	+	2/3
				+	2/3	+	2/3	+	1/3
O169	3 (608, 623, 626)	+	1/3	+	1/3	+	1/3	+	2/3
		+	2/3	+	2/3	+	2/3	+	1/3

+: 生育良好、W:少数コロニー生育

S:スムーズ型、R:ラフ型

表3. ETEC接種キュウリ培養液での各種選択分離培地・培養温度の
組み合わせ条件下における免疫磁気ビーズ法の検出感度の検討結果

血清群	37°C				42°C			
	IMS		直接法		IMS		直接法	
	クロモ アガー STEC	SMAC	抗生物 質加 SMAC	抗生物 質加 SMAC	クロモ アガー STEC	SMAC	抗生物 質加 SMAC	抗生物 質加 SMAC
O6	ND	ND	+	+	ND	ND	+	+
O25	ND	ND	+	+	ND	+	ND	ND
O27	+	+	+	+	+	ND	+	+
O148	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	+
O153	+	+	+	+	ND	+	+	+
O159	ND	ND	+	ND	ND	ND	+	+
O169	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	+

ND: ETECと疑われるコロニーがなかったため非分離

IMS: 免疫磁気ビーズ塗抹法

直接法: 直接塗抹法

菌非接種食品培養液からはいずれの血清群も分離されていない

表4. ETEC接種生ワカメ培養液での各種選択分離培地・培養温度の
組み合わせ条件下における免疫磁気ビーズ法の検出感度の検討結果

血清群	37°C				42°C			
	IMS		直接法		IMS		直接法	
	クロモ アガー STEC	SMAC	抗生物 質加 SMAC	抗生物 質加 SMAC	クロモ アガー STEC	SMAC	抗生物 質加 SMAC	抗生物 質加 SMAC
O6	ND	ND	+	+	ND	ND	+	+
O25	ND	ND	+	+	+	ND	+	ND
O27	+	ND	+	+	+	ND	+	+
O148	ND	ND	+	+	+	ND	+	ND
O153	+	ND	+	+	+	ND	+	+
O159	ND	ND	+	+	ND	+	ND	+
O169	+	ND	+	+	+	ND	ND	+

ND: ETECと疑われるコロニーがなかったため非分離

IMS: 免疫磁気ビーズ塗抹法

直接法: 直接塗抹法

菌非接種食品培養液からはいずれの血清群も分離されていない

表5. ETEC接種根深ネギ培養液での各種選択分離培地・培養温度の
組み合わせ条件下における免疫磁気ビーズ法の検出感度の検討結果

血清群	37°C				42°C			
	IMS		直接法		IMS		直接法	
	クロモ アガー STEC	SMAC	抗生物 質加 SMAC	抗生物 質加 SMAC	クロモ アガー STEC	SMAC	抗生物 質加 SMAC	抗生物 質加 SMAC
O6	ND	+	+	+	+	+	+	+
O25	+	+	+	+	+	+	+	ND
O27	+	+	+	+	+	+	+	+
O148	+	+	+	+	+	+	ND	ND
O153	+	+	+	+	+	+	+	+
O159	+	+	+	ND	+	+	ND	ND
O169	+	+	+	+	+	+	ND	ND

ND: ETECと疑われるコロニーがなかったため非分離

IMS: 免疫磁気ビーズ塗抹法

直接法: 直接塗抹法

菌非接種食品培養液からはいずれの血清群も分離されていない

表6. ETEC接種オオバ培養液での各種選択分離培地・培養温度の
組み合わせ条件下における免疫磁気ビーズ法の検出感度の検討結果

血清群	37°C				42°C			
	IMS			直接法	IMS			直接法
	クロモ アガー STEC	SMAC	抗生物 質加 SMAC	抗生物 質加 SMAC	クロモ アガー STEC	SMAC	抗生物 質加 SMAC	抗生物 質加 SMAC
O6	ND	ND	+	+	ND	ND	+	+
O25	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	ND
O27	ND	+	+	+	ND	+	+	+
O148	ND	+	+	+	ND	+	+	ND
O153	ND	+	+	ND	ND	+	+	ND
O159	ND	ND	+	+	ND	+	+	+
O169	ND	ND	+	+	ND	ND	+	+

ND: ETECと疑われるコロニーがなかったため非分離

IMS: 免疫磁気ビーズ塗抹法

直接法: 直接塗抹法

菌非接種食品培養液からはいずれの血清群も分離されていない

表7. ETEC接種コネギ培養液での各種選択分離培地・培養温度の
組み合わせ条件下における免疫磁気ビーズ法の検出感度の検討結果

血清群	37°C				42°C			
	IMS		直接法		IMS		直接法	
	クロモ アガー STEC	SMAC	抗生物 質加 SMAC	抗生物 質加 SMAC	クロモ アガー STEC	SMAC	抗生物 質加 SMAC	抗生物 質加 SMAC
O6	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	+
O25	+	+	+	ND	+	ND	ND	+
O27	+	ND	+	ND	ND	+	+	+
O148	+	ND	+	ND	+	+	ND	+
O153	+	+	+	ND	+	+	+	+
O159	+	ND	+	ND	+	ND	+	+
O169	+	ND	+	ND	+	ND	ND	+

ND: ETECと疑われるコロニーがなかったため、非分離

IMS: 免疫磁気ビーズ塗抹法

直接法: 直接塗抹法

菌非接種食品培養液からはいずれの血清群も分離されていない

表9. ETEC接種各食品培養液での抗生物質加SMACIにおける免疫磁気ビーズ法と直接法の検出感度の比較

血清群	食品	37°C		42°C		血清群	食品	37°C		42°C	
		IMS	直接法	IMS	直接法			IMS	直接法	IMS	直接法
O6	キュウリ	+	+	+	+	O153	キュウリ	+	+	+	+
	生ワカメ	+	+	+	+		生ワカメ	+	+	+	+
	根深ネギ	+	+	+	+		根深ネギ	+	+	+	+
	オオバ	+	+	+	+		オオバ	+	ND	+	ND
	コネギ	ND	ND	ND	+		コネギ	+	ND	+	+
O25	キュウリ	+	+	ND	ND	O159	キュウリ	+	ND	+	+
	生ワカメ	+	+	+	ND		生ワカメ	+	+	ND	+
	根深ネギ	+	+	+	ND		根深ネギ	+	ND	ND	ND
	オオバ	+	+	ND	ND		オオバ	+	+	+	+
	コネギ	+	ND	ND	+		コネギ	+	ND	+	+
O27	キュウリ	+	+	+	+	O169	キュウリ	+	ND	ND	+
	生ワカメ	+	+	+	+		生ワカメ	+	+	ND	+
	根深ネギ	+	+	+	+		根深ネギ	+	+	ND	ND
	オオバ	+	+	+	+		オオバ	+	+	+	+
	コネギ	+	ND	+	+		コネギ	+	ND	ND	+
O148	キュウリ	+	ND	ND	+	IMS: 免疫磁気ビーズ塗抹法					
	生ワカメ	+	+	+	ND	直接法: 直接塗抹法					
	根深ネギ	+	+	ND	ND	ND: ETECと疑われるコロニーがなかったため非分離					
	オオバ	+	+	+	ND	*: ETEC接種食品(オオバ)培養液の10階段希釈液での					
	コネギ	+	ND	ND	+	菌が分離された最大希釈段、-5は10 ⁻⁵ を示す					

表10-1. ETEC接種各食品培養液での各種選択分離培地・培養温度の組み合わせ条件下における免疫磁気ビーズ法の検出感度の検討結果

血清群	食品	37°C			42°C		
		クロモア ガー STEC	SMAC	抗生物質 加SMAC	クロモア ガーSTEC	SMAC	抗生物質 加SMAC
O6	キュウリ	ND	ND	+	ND	ND	+
	生ワカメ	ND	ND	+	ND	ND	+
	根深ネギ	ND	+	+	+	+	+
	オオバ	ND	ND	+	ND	ND	+
	コネギ	+	+	ND	ND	ND	ND
O25	キュウリ	ND	ND	+	ND	+	ND
	生ワカメ	ND	ND	+	+	ND	+
	根深ネギ	+	+	+	+	+	+
	オオバ	ND	ND	+	ND	ND	ND
	コネギ	+	+	+	+	ND	ND
O27	キュウリ	+	+	+	+	ND	+
	生ワカメ	+	ND	+	+	ND	+
	根深ネギ	+	+	+	+	+	+
	オオバ	ND	+	+	ND	+	+
	コネギ	+	ND	+	ND	+	+
O148	キュウリ	ND	+	+	ND	ND	ND
	生ワカメ	ND	ND	+	+	ND	+
	根深ネギ	+	+	+	+	+	ND
	オオバ	ND	+	+	ND	+	+
	コネギ	+	ND	+	+	+	ND

IMS: 免疫磁気ビーズ塗抹法

直接法: 直接塗抹法

*: ETEC接種各食品培養液の10階段希釈液での菌が分離された最大希釈段、

-6は 10^{-6} を示す

菌非接種食品培養液からはいずれの血清群も分離されていない

表10-2. ETEC接種各食品培養液での各種選択分離培地・培養温度の組み合わせ条件下における免疫磁気ビーズ法の検出感度の検討結果

血清群	食品	37°C			42°C		
		クロモア ガー STEC	SMAC	抗生物質 加SMAC	クロモア ガー STEC	SMAC	抗生物質 加SMAC
O153	キュウリ	+	+	+	ND	+	+
	生ワカメ	+	ND	+	+	ND	+
	根深ネギ	+	+	+	+	+	+
	オオバ	ND	+	+	ND	+	+
	コネギ	+	+	+	+	+	+
O159	キュウリ	ND	ND	+	ND	ND	+
	生ワカメ	ND	ND	+	ND	+	ND
	根深ネギ	+	+	+	+	+	ND
	オオバ	ND	ND	+	ND	+	+
	コネギ	+	ND	+	+	ND	+
O169	キュウリ	ND	ND	+	ND	ND	ND
	生ワカメ	+	ND	+	+	ND	ND
	根深ネギ	+	+	+	+	+	ND
	オオバ	ND	ND	+	ND	ND	+
	コネギ	+	ND	+	+	ND	ND

IMS: 免疫磁気ビーズ塗抹法

直接法: 直接塗抹法

*: ETEC接種各食品培養液の10階段希釈液での菌が分離された最大希釈段、
-5は 10^{-5} を示す

菌非接種食品培養液からはいずれの血清群も分離されていない

表11-1. ETEC接種各食品培養液での各種選択分離培地・培養温度の組み合わせ条件下における免疫磁気ビーズ法の検出感度の検討結果

血清群	食品	37℃		42℃	
		SMAC	抗生物質加 SMAC	SMAC	抗生物質加 SMAC
O6	キュウリ	ND	+	ND	+
	生ワカメ	ND	+	ND	+
	根深ネギ	+	+	+	+
	オオバ	ND	+	ND	+
	コネギ	+	ND	ND	ND
O25	キュウリ	ND	+	+	ND
	生ワカメ	ND	+	ND	+
	根深ネギ	+	+	+	+
	オオバ	ND	+	ND	ND
	コネギ	+	+	ND	ND
O27	キュウリ	+	+	ND	+
	生ワカメ	ND	+	ND	+
	根深ネギ	+	+	+	+
	オオバ	+	+	+	+
	コネギ	ND	+	+	+
O148	キュウリ	+	+	ND	ND
	生ワカメ	ND	+	ND	+
	根深ネギ	+	+	+	ND
	オオバ	+	+	+	+
	コネギ	ND	+	+	ND

IMS: 免疫磁気ビーズ塗抹法

直接法: 直接塗抹法

*: ETEC接種各食品培養液の10階段希釈液での菌が分離された最大希釈段、
-6は 10^{-6} を示す

菌非接種食品培養液からはいずれの血清群も分離されていない

表11-2. ETEC接種各食品培養液での各種選択分離培地・培養温度の組み合わせ条件下における免疫磁気ビーズ法の検出感度の検討結果

血清群	食品	37°C		42°C	
		SMAC	抗生物質加SMAC	SMAC	抗生物質加SMAC
O153	キュウリ	+	+	+	+
	生ワカメ	ND	+	ND	+
	根深ネギ	+	+	+	+
	オオバ	+	+	+	+
	コネギ	+	+	+	+
O159	キュウリ	ND	+	ND	+
	生ワカメ	ND	+	+	ND
	根深ネギ	+	+	+	ND
	オオバ	ND	+	+	+
	コネギ	ND	+	ND	+
O169	キュウリ	ND	+	ND	ND
	生ワカメ	ND	+	ND	ND
	根深ネギ	+	+	+	ND
	オオバ	ND	+	ND	+
	コネギ	ND	+	ND	ND

IMS: 免疫磁気ビーズ塗抹法

直接法: 直接塗抹法

*: ETEC接種各食品培養液の10階段希釈液での菌が分離された最大希釈段、-5は 10^{-5} を示す

菌非接種食品培養液からはいずれの血清群も分離されていない

表12-1. ETEC接種各食品培養液での各種選択分離培地・培養温度の組み合わせ条件下における免疫磁気ビーズ法の検出感度の検討結果

血清群	食品	37°C				42°C			
		IMS		直接法		IMS		直接法	
		クロモアガー STEC	SMAC	抗生物質加 SMAC	抗生物質加 SMAC	クロモアガー STEC	SMAC	抗生物質加 SMAC	抗生物質加 SMAC
O6	キュウリ	ND	ND	+	+	ND	ND	+	+
	生ワカメ	ND	ND	+	+	ND	ND	+	+
	根深ネギ	ND	+	+	+	+	+	+	+
	オオバ	ND	ND	+	+	ND	ND	+	+
	コネギ	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	+
O25	キュウリ	ND	ND	+	+	ND	+	ND	ND
	生ワカメ	ND	ND	+	+	+	ND	+	ND
	根深ネギ	+	+	+	+	+	+	+	ND
	オオバ	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	ND
	コネギ	+	+	+	ND	+	ND	ND	+
O27	キュウリ	+	+	+	+	+	ND	+	+
	生ワカメ	+	ND	+	+	+	ND	+	+
	根深ネギ	+	+	+	+	+	+	+	+
	オオバ	ND	+	+	+	ND	+	+	+
	コネギ	+	ND	+	ND	ND	+	+	+
O148	キュウリ	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	+
	生ワカメ	ND	ND	+	+	+	ND	+	ND
	根深ネギ	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	オオバ	ND	+	+	+	ND	+	+	ND
	コネギ	+	ND	+	ND	+	+	ND	+

IMS: 免疫磁気ビーズ塗抹法

直接法: 直接塗抹法

*: ETEC接種各食品培養液の10階段希釈液での菌が分離された最大希釈段、-6は 10^{-6} を示す

菌非接種食品培養液からはいずれの血清群も分離されていない

表12-2. ETEC接種各食品培養液での各種選択分離培地・培養温度の組み合わせ条件下における免疫磁気ビーズ法の検出感度の検討結果

血清群	食品	37°C				42°C			
		IMS		直接法		IMS		直接法	
		クロモアガー STEC	SMAC	抗生物質加 SMAC	抗生物質加 SMAC	クロモアガー STEC	SMAC	抗生物質加 SMAC	抗生物質加 SMAC
O153	キュウリ	+	+	+	+	ND	+	+	+
	生ワカメ	+	ND	+	+	+	ND	+	+
	根深ネギ	+	+	+	+	+	+	+	+
	オオバ	ND	+	+	ND	ND	+	+	ND
	コネギ	+	+	+	ND	+	+	+	+
O159	キュウリ	ND	ND	+	ND	ND	ND	+	+
	生ワカメ	ND	ND	+	+	ND	+	ND	+
	根深ネギ	+	+	+	ND	+	+	ND	ND
	オオバ	ND	ND	+	+	ND	+	+	+
	コネギ	+	ND	+	ND	+	ND	+	+
O169	キュウリ	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	+
	生ワカメ	+	ND	+	+	+	ND	ND	+
	根深ネギ	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	オオバ	ND	ND	+	+	ND	ND	+	+
	コネギ	+	ND	+	ND	+	ND	ND	+

IMS: 免疫磁気ビーズ塗抹法

直接法: 直接塗抹法

*: ETEC接種各食品培養液の10階段希釈液での菌が分離された最大希釈段、-5は10⁻⁵を示す

菌非接種食品培養液からはいずれの血清群も分離されていない

分 担 研 究 報 告 書

ヒトの感染に關与する家畜の探索

西川 禎一

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

研究者代表 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

ヒトの感染に關与する家畜の探索

研究分担者 西川禎一 大阪市立大学大学院生活科学研究科

研究要旨

平成27年度にETEC 0169:H41の病原プラスミドの全塩基配列を決定した。その結果、本プラスミドはRepFIIプラスミドファミリーに属するが、他のRepFIIファミリーのETECプラスミドと比較してサイズが大きく、挿入配列の割合が高くプラスミドの安定性に関する遺伝子が少ないことが明らかになった。このような特性は、本プラスミドがin vitroで容易に0169から脱落する原因になっていると推察される。しかし、0169は四半世紀に渡り主要なETECの地位を占めており、病原プラスミドを落とさない選択圧が野外では働いている。本プラスミドには、CS6、CS8-like、K88-like、以上3種類の腸管定着因子がコードされている。極めて不安定で脱落しやすいプラスミドであるにもかかわらずin vivoではよく維持されている理由として、異なる宿主に対応できる定着因子をコードし、0169の感染適応力の増強に本プラスミドが大きく寄与しているためとの仮説を立てた。3種の定着因子遺伝子を用いて組み換え用菌株TOP10を形質転換し、腸粘膜上皮細胞に対する付着性と宿主特異性をヒト、ブタ、ウシの培養細胞を用いて検討した。その結果、定着因子K88-like遺伝子で組み換えた株はヒトおよびブタの細胞に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ようだ。ETEC対策にはOne Healthも考慮した検討が必要と考えられる。

研究協力者

坂 瑛里香	大阪市立大学大学院生活科学研究科	修士課程
鄭 冬明	大阪市立大学大学院生活科学研究科	修士課程
大森裕子	大阪市立大学大学院生活科学研究科	修士課程
中臺枝里子	大阪市立大学大学院生活科学研究科	准教授
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	教授

A. 目的

大腸菌(*Escherichia coli*) は、恒温動物の腸内に広く分布しており、ヒトにおいても出生と同時に腸管内へと急速に広がり常在菌として定着する(1)。しかしながら、大腸菌の一部には特殊な病原因子によって人に下痢症を起こすものがあり、行政的には病原大腸菌、学術的には下痢原性大腸菌(Diarrheagenic *E. coli*、以後 DEC と略す)と呼ばれる。

DEC は、その病原機構に基づいて 腸管病原性大腸菌(Enteropathogenic *E. coli*、EPEC)、腸管毒素原性大腸菌(Enterotoxigenic *E. coli*、ETEC)、志賀毒素産生性大腸菌(Shiga toxin-producing *E. coli*; STEC)、腸管侵入性大腸菌(Enteroinvasive *E. coli*、EIEC) 以上4群に長らく大別されてきたが、2012年1月からは腸管凝集接着性大腸菌(Enteraggative *E. coli*、EAEC)もDECに認定された。他にも分散接着性大腸菌(Diffusely adherent *E. coli*、DAEC)、細胞膨化致死毒素産生性大腸菌(CTEC)、腸管凝集接着性大腸菌耐熱性腸管毒素(EAST1)遺伝子保有大腸菌(EAST1EC)、細胞剥脱性大腸菌(CDEC)など、新たなDECの候補とされるサブグループが複数存在する。

このうちETECは、大腸菌によるヒト下

痢症の最も一般的な原因菌である(2)。

その主な感染経路は、汚染された水や食べ物を体内に摂取することであり、1~3日の潜伏期間を経て水様性下痢を主徴とする症状を発症する(2)。下痢は菌が産生するエンテロトキシンの作用によるもので、胃腸炎症状は原則として見られない(3)。しかしながら、水分や電解質の喪失による脱水症を引き起こし、死亡する場合もある(4)。ETECは特に発展途上国において頻発し、EPECやロタウイルスそしてクリプトスポリジウムとならぶ主要な下痢症原因菌である(5)。これらは5歳未満で死亡した下痢症患者の半数以上を占めており、ETECだけでも年間2万人から7万6千人の乳幼児が死亡する(6)。これらの国を訪れる旅行者や軍人にも下痢症を引き起こすため、いわゆる旅行者下痢症の原因菌としても知られている。

ETECの0169:H41(以後0169と略す)は1991年に日本で初めて発見されたが(7)、以後、0169感染の報告が日米で相次ぎ(8-10)、1990年代にはETECによる集団感染の多くが本血清型菌によるものとなった(11)。0169はエンテロトキシンSTpを産生し、腸管定着因子CS6を保有する。また、巨大なプラスミドを有し、STpもこのプラスミドにコードされてい

ることが確認された (12)。さらに、0169 は既知の付着因子 CS6 を有しているが、他の ETEC では見られない HEp-2 細胞への強い凝集接着性を示すことが報告された。その細胞付着像は EAggEC の HEp-2 細胞への付着像に酷似しているが、EAggEC の凝集接着に参与する線毛の発現を制御する遺伝子 *aggR* を保有していない (12)。0169 が 1991 年以降急激に広がったことから、その腸管定着因子が従来の定説とは異なる宿主特異性を有する可能性も否定できない。また、この付着性もプラスミドの脱落により喪失することから、付着因子をコードする遺伝子もプラスミド上にあり、本菌が未知の定着因子を保有する可能性が示唆された (12)。

0169 を試験管内で培養すると、その病原プラスミドは極めて容易に脱落し、0169 は細胞付着性も毒素産生性も喪失する (13)。しかし、0169 は既に四半世紀以上に渡り主要な ETEC として数多くの集団発生を起こしており、野外においてはプラスミドを喪失させない選択圧が働いていると考えられる。一般に、ETEC には厳密な宿主特異性があり、ブタやウシの ETEC はブタやウシのみに感染し、ヒトの ETEC はヒトのみに感染すると考えられている。しかしながら、昨年度報告した 0169 の病原プラスミド (pEntYN10)

全塩基配列の解析では、CS6 以外に 2 種の接着因子候補 (CS8-like と K88-like) の遺伝子が新たに発見された。K88-like の遺伝子はブタ ETEC の腸管定着因子である K88 と一部相同性を有していた (13)。そこで、本プラスミドが自身を維持する遺伝子が少なく *in vitro* では脱落しやすいにもかかわらず野外で保持されている理由として、これら 3 種の接着因子が 0169 の宿主特異性を広げて感染の連鎖を保たれやすくすることでプラスミドを保持する 0169 が優勢を保てるようにし、ETEC 0169 の急激な流行を支えている、との仮説を立てた (13、14)。

本研究の目的は、組み換え実験用の大腸菌株に 3 種の付着因子候補遺伝子それぞれを組み込み、その細胞接着性と宿主特異性を検討することで、前記の仮説を検証することにある。

B. 方法

1. 使用菌株

下痢症患者の便から独自に分離した ETEC 0169:H41 の YN10 株、大腸菌の実験室株として One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Life technologies)、Competent-high DH5 (TOYOBO、大阪) および JM109 (TOYOBO、大阪) を実験に供した。

2 . 培養細胞

ヒト結腸癌由来の上皮細胞である

Caco-2(15)および喉頭ガン由来の HEp-2 細胞(16)、ブタ小腸由来の上皮細胞である IPEC-1(17)およびブタ空腸由来の上皮細胞である IPEC-J2(18-20)、ウシ腸粘膜上皮細胞である BIE(21)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。

3 . プラスミド DNA の抽出

0169 の病原プラスミド pEntYN10 は Plasmid DNA Purification KIT BAC 100 (タカラ)を用いて 0169 から抽出回収した。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を LB ブイヨンに接種し 37 で振盪培養して菌体を回収後に QIAprep®Spin Miniprep Kit (QIAGEN)を用いて抽出した。

4 . In-fusion クローニング

接着因子の安定的な発現には、プロモーターより上流の領域も必要なのではないかと考え、先行研究(22)にならい、YN10 の CS6 の前後 1500 bp を含んだ領域を挟み込むプライマーを設計し iProof High Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad、USA)を用いて増幅した。さらに、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

だ領域についても同様にプライマーを設計し増幅した。

pSV28 を制限酵素 EcoR I-HF® (NEB) と BamH I-HF® (NEB)で処理し、1%アガロースゲル(SeaKem® Gold Agarose、LONZA、USA)で泳動してから切り出し Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)を用いて精製しベクターとした。

前記の直鎖状ベクターと、同様にアガロースゲルから切り出し精製した標的遺伝子領域の PCR 産物を混合して In-Fusion® HD Cloning Kit (TAKARA、滋賀)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。

5 . 付着性試験

10% ウシ胎児血清加イーグル MEM 培地 (EMEM、日水製薬)を用いて 25 cm² のフラスコに細胞がフルシートになるまで培養した。フルシート後は PBS で洗浄し、トリプシン処理した後 3 倍に希釈して継代した。トリプシン処理したフルシートの HEp-2 細胞を EMEM 12 ml で懸濁し、24 穴プレートの各ウェルに 0.5 ml ずつ分注し、CO₂ インキュベータで 48 時間培養した。その後上清を除き、メチル -

D - マンノピラシド(和光純薬)を 0.5%含む EMEM を 0.5 ml 加えた。供試菌株を培養した LB ブイヨン を 10 μ l ずつ接種し (50 倍希釈)、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 (23)。

C. 結果

1 . ヒト由来の HEp-2 に対する細胞接着性

0169 野生株が HEp-2 細胞に凝集接着のような強い接着性を示したのに対し、病原プラスミド pEntYN10 が脱落した 0169cured 株、実験室株の TOP10 は全く接着性を示さなかった (Fig. 1)。CS6 遺伝子を含む領域を組み込んだ pSV28CS6 で形質転換された TOP10CS6 株も、CS8-like の遺伝子領域を組み込んだ pSV28CS8-like で形質転換された TOP10CS8-like 株も、弱い分散接着像を示すにとどまり、野生株のような接着性は見られなかった。しかしながら、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 0169 野生株と同様の凝集接着像を示した。

2 . ブタ由来の IPEC-1 および IPEC-J2 に対する細胞接着性

0169 野生株は、HEp-2 細胞に比べると

弱いものの、IPEC-1 および IPEC-J2 細胞に対しても凝集接着性を示したのに対し、実験室株の TOP10、病原プラスミド pEntYN10 が脱落した 0169cured 株、CS6 遺伝子を含む領域を組み込んだ pSV28CS6 で形質転換された TOP10CS6 株、CS8-like の遺伝子領域を組み込んだ pSV28CS8-like で形質転換された TOP10CS8-like 株、いずれも全く接着性を示さなかった。しかしながら、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 0169 野生株に類似した接着像を示した (Fig. 2)。

3 . ウシ由来の BIE に対する細胞接着性

0169 野生株は BIE に対しては弱い接着性を示すにとどまり、CS6 遺伝子を含む領域を組み込んだ pSV28CS6 で形質転換された TOP10CS6 株も、CS8-like の遺伝子領域を組み込んだ pSV28CS8-like で形質転換された TOP10CS8-like 株も同様に弱い接着性を示した。しかしながら、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 0169 野生株以上の凝集接着像を示した (Fig. 3)。実験室株の TOP10、病原プラスミド pEntYN10 が脱落した 0169cured 株は全く接着性を示さなかった。ただし、BIE を用いた接着性試

験は1回だけの結果であり、再現性を今後確認する必要がある。

D. 考察

ETECは宿主の腸粘膜への定着、すなわち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。したがって、接着因子は極めて重要な病原因子であるが、Caco-2細胞が使われるようになる前は、*in vitro*での接着試験に有用な培養細胞はなく(15)、赤血球凝集試験(24)や菌体疎水性試験(25)などが接着性の指標として使われていた。そのような時代にHEp-2細胞に凝集接着するETECとして出現した0169は異色の存在であった(12)。

0169の病原プラスミドpEntYN10の全塩基配列を解析したところ、CS6、CS8-like、K88-likeの3種の定着因子候補遺伝子群を認めた(13)。ブタETECの定着因子であるK88(別名F4)は線毛を形成するが、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(12)、しかもpEntYN10のK88-like遺伝子群には主要線毛サブユニットを

コードする*faeG*と相同性のある配列が2つ保有される前例のないものであった。*faeG*配列の系統発生樹によると、2つの*faeG*遺伝子は、ブタから分離された大腸菌の*faeG*よりも、ヒトから分離された*Salmonella enterica* serovar *Infantis*の*faeG*と近いことが分かった(13)。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。

ETECはヒトのみならずブタやウシの下痢症原因ともなる。そのエンテロトキシンLTとSTの毒性は家畜とヒトに共通のものが多い。しかし、腸粘膜への定着因子が異なるため、家畜のETECは家畜の間で、ヒトのETECはヒトの間だけで感染を循環させており相互の行き来はないとされてきた(3)。しかしながら、pEntYN10のように*in vitro*では脱落しやすいプラスミドが0169に保たれているという事実は、本菌が常に効率よく感染を

繰り返し *in vivo* に保たれていることを示唆する。本プラスミド上にコードされた 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とすれば、脱落しやすいプラスミドが保持され続けるのも理解できる。K88 はもともとブタ ETEC の定着因子であり、ヒトに感染するための CS6 や CS8 などと宿主に合わせた使い分けを 0169 がしているとすれば、ETEC 感染症対策について考えを改める必要も生じる。ヒト ETEC の汚染源が本当にヒトだけなのか、新しい視点で調べ直す必要もありそうだ。

CS6 は、ヒト腸粘膜への定着因子として有名で ETEC における保有率も高い。この非線毛性接着因子は *cssA* および *cssB* の 2 つの構造タンパクから構成されている。アミノ酸配列の違いにより、*cssA* は AI、AII、AIII の 3 種に、*cssB* は BI、BII の 2 種に型別できる (26)。CS6pEntYN10 の CS6 の *cssA* は AII タイプと似ているが 5 つのアミノ酸変異を持つ新規サブタイプであった。*cssB* は BII タイプと 100%一致した。本来、BII は、付着性の

弱いタイプと報告されており、本菌の強い凝集接着性と合致しない。しかしながら、0169 には線毛が確認できなかったため、非線毛性定着因子の代表ともいえる CS6 をコードする *cssA* の変異により特異な細胞接着性が賦与されている可能性もあると考えていた。しかしながら、TOP10CS6 株は 0169 と同様の接着性を *in vitro* 試験では示さなかった。

CS8 (別名 CFA/III) も ETEC の代表的な定着因子であり、線毛を形成してヒトの腸細胞に特異的に付着すると報告されている (27、28)。CS8 の主要構造タンパク質である CofA は、コレラ菌の主要線毛構成要素である TcpA と高い構造相同性を有している (29)。pEntYN10 の CofA のアミノ酸配列は、ETEC 260-1 株のプラスミドである pSH1134 がコードする CofA と 73.2% の相同性を有していた (13)。近年、TcpA タンパク質のうち、ある 5 つの残基が、線維状の構造を構築するために高度に保存されているという報告があり (29、30)、pEntYN10 の CofA 遺伝子にもこれらの残基が保存されていることが分かった (13)。したがって CS8 と

しての機能も保持されていると考えられる。しかし、CS8抗体を用いたドットプロットテストでは陰性であった(12)。アミノ酸配列の違いから抗体が反応しなかった可能性が考えられるが、電子顕微鏡観察でもCS8様の線毛は観察されおらず(12)、0169のCS8-like遺伝子は発現していないか、あるいは非線毛性の形態をとっているのであろう。RT-PCRなどによりmRNAの転写が起きているのか今後検討すべきと考える。

E. 結論

ETEC 0169:H41の病原プラスミドの全塩基配列を決定したところ、本菌にはCS6、CS8-like、K88-like、以上3種類の腸管定着因子がコードされていることが明らかとなった。極めて不安定で脱落しやすいプラスミドであるにもかかわらず維持されている理由として、異なる宿主に対応できる定着因子をコードし、0169の適応力増強に本プラスミドが寄与しているためかもしれない。今回、in vitroではあるが、K88-like遺伝子がヒトとブタ両方の腸粘膜上皮細胞への附着

性に寄与することが明らかになった。ETECの宿主特異性について固定観念を取り払って考え直す価値がありそうだ。

F. 文献

1. 光岡知足. 腸内菌叢の形成、推移、分布. In: 光岡知足、editor. 腸内細菌学. 東京: 朝倉書店; 1990. p. 87-107.
2. Gastra W, Svennerholm AM. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Trends Microbiol. 1996;4(11):444-52.
3. 甲斐明美. ETEC (腸管毒素原性大腸菌). In: 仲西寿男、丸山務、editors. 食品由来感染症と食品微生物. 東京: 中央法規; 2009. p. 269-80.
4. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clin Microbiol

- Rev. 2005;18(3):465-83.
5. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*. 2013;382(9888):209-22. PMID: 23680352. PubMed 6736(13)60844-2.
 6. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One*. 2013;8(9):e72788.
 7. Nishikawa Y, Hanaoka M, Ogasawara J, Moyer NP, Kimura T. Heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* O169:H41 in Japan. *Emerg Infect Dis*. 1995;1(2):61.
 8. Ando K, Itaya T, Aoki A, Saito A, Masaki H, Tokumaru Y. An outbreak of food poisoning caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* O169:H41. *Jpn J Food Microbiol*. 1993;10:77-81.
 9. Beatty ME, Bopp CA, Wells JG, Greene KD, Puhr ND, Mintz ED. Enterotoxin-producing *Escherichia coli* O169:H41, United States. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(3):518-21.
 10. Devasia RA, Jones TF, Ward J, Stafford L, Hardin H, Bopp C, et al. Endemically acquired foodborne outbreak of enterotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O169:H41. *Am J Med*. 2006;119(2):168 e7-10.
 11. 西川 禎一. 食生活をおびやかす食中毒と感染症. In: 山口 英昌、 editor. 食環境科学入門 食の安全を環境問題の視点から: ミネルヴァ書房; 2006. p. 117-36.
 12. Nishikawa Y, Helander A, Ogasawara J, Moyer NP,

- Hanaoka M, Hase A, et al. Epidemiology and properties of heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O169:H41. *Epidemiol Infect.* 1998;121(1):31-42.
13. Ban E, Yoshida Y, Wakushima M, Wajima T, Hamabata T, Ichikawa N, et al. Characterization of unstable pEntYN10 from enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) O169:H41. Virulence. 2015;6(8):735-44.
14. Gonzales-Siles L, Sjolting A. The different ecological niches of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Environ Microbiol.* 2016;18(3):741-51.
15. Darfeuille Michaud A, Aubel D, Chauviere G, Rich C, Bourges M, Servin A, et al. Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Infect Immun.* 1990;58(4):893-902.
16. Cravioto A, Tello A, Navarro A, Ruiz J, Villafan H, Uribe F, et al. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet.* 1991;337(8736):262-4.
17. Lu S, Yao Y, Cheng XY, Mitchell S, Leng SY, Meng SM, et al. Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid secretion in IPEC-1 cells by increasing chylomicron size. *J Biol Chem.* 2006;281(6):3473-83.
18. Fekete PZ, Mateo KS, Zhang WP, Moxley RA, Kaushik RS, Francis DH. Both enzymatic and non-enzymatic properties of heat-labile enterotoxin are responsible for LT-enhanced adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli* to porcine IPEC-J2 cells. *Vet Microbiol.* 2013;164(3-4):330-5.
19. Gonzalez-Ortiz G, Hermes RG,

- Jimenez-Diaz R, Perez JF, Martin-Orue SM. Screening of extracts from natural feed ingredients for their ability to reduce enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) 1038 adhesion to porcine intestinal epithelial cell-line IPEC-J2. *Vet Microbiol.* 2013;167(3-4):494-9.
20. Zakrzewski SS, Richter JF, Krug SM, Jebautzke B, Lee I-FM, Rieger J, et al. Improved cell line IPEC-J2, characterized as a model for porcine jejunal epithelium. *Plos One.* 2013;8(11):e79643.
21. Miyazawa K, Hondo T, Kanaya T, Tanaka S, Takakura I, Itani W, et al. Characterization of newly established bovine intestinal epithelial cell line. *Histochemistry and Cell Biology.* 2010;133(1):125-34.
22. Wajima T, Sabui S, Fukumoto M, Kano S, Ramamurthy T, Chatterjee NS, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* CS6 gene products and their roles in CS6 structural protein assembly and cellular adherence. *Microb Pathog.* 2011;51(4):243-9.
23. Nishikawa Y, Scotland SM, Smith HR, Willshaw GA, Rowe B. Catabolite repression of the adhesion of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* of serogroups O157 and O111. *Microb Pathog.* 1995;18(3):223-9.
24. Old DC. Haemagglutination methods in the study of *Escherichia coli*. In: Sussman M, editor. *The virulence of Escherichia coli*. London: Academic Press; 1985. p. 287-313.
25. Lindahl M, Faris A, Wadstrom T, Hjerten S. A new test based on 'salting out' to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1981;677(3-4):471-6.

26. Sabui S, Ghosa A, Dutta S, Ghosh A, Ramamurthy T, Nataro JP, et al. Allelic variation in colonization factor CS6 of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with acute diarrhoea and controls. *J Med Microbiol.* 2010;59(7):770-9.
27. Honda T, Arita M, Miwatani T. Characterization of new hydrophobic pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli*: a possible new colonization factor. *Infect Immun.* 1984;43(3):959-65.
28. Shinagawa H, Taniguchi T, Yamaguchi O, Yamamoto K, Honda T. Cloning of the genes that control formation of the fimbrial colonization factor antigen III (CFA/III) from an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol.* 1993;37(9):689-94.
29. Fukakusa S, Kawahara K, Nakamura S, Iwashita T, Baba S, Nishimura M, et al. Structure of the CFA/III major pilin subunit CofA from human enterotoxigenic *Escherichia coli* determined at 0.90 Å resolution by sulfur-SAD phasing. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2012;68(Pt 10):1418-29.
30. Li J, Lim MS, Li S, Brock M, Pique ME, Woods VL, Jr., et al. Vibrio cholerae toxin-coregulated pilus structure analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Structure.* 2008;16(1):137-48.
- G. 健康危険情報
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし
- I. 研究発表
1. 論文発表
Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y. (2017) Comparison by multi-locus

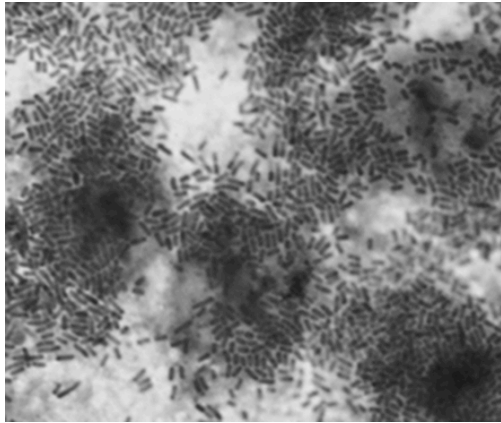
- variable-number tandem repeat analysis and antimicrobial resistance among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from foods and human and animal faecal specimens. *J. Appl. Microbiol.* 122 (1):268-278. DOI: 10.1111/jam.13322
- Wang, L., Zhang, S., Zheng, D., Fujihara, S., Wakabayashi, A., Okahata, K., Suzuki, M., Saeki, A., Nakamura, H., Hara-Kudo, Y., Kage-Nakadai, E., and Nishikawa, Y. (2017) 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.* (in press)
- Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y. (2017) 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.* (in press)
- Seo, D., Choi, S., Jeon, S., Jeong, S., Park, H., Lee, B., Kim, G., Yang, S., Nishikawa, Y., and Choi, C. (2017) 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
DOI information: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.017
2. 学会発表
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 0169: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23-25日 大阪大学微生物病
研究所 大阪国際交流センター
一般演題P2-045
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
23-25日 大阪大学微生物病研
究所 大阪国際交流センター
一般演題P2-153
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
15-16日 麻布大学 タワーホ
ール船堀 p.58
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

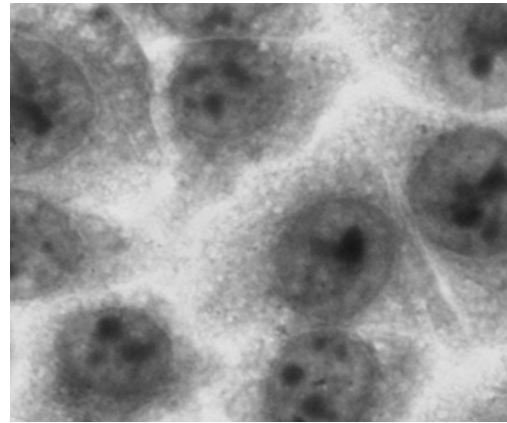
来分散接着性大腸菌の抑制機構、
第37回日本食品微生物学会学術
総会、平成28年9月15-16日 麻
布大学 タワーホール船堀
p.59
鄭 冬明、坂 瑛里香、大森裕子、
中臺枝里子、山口良弘、和田崇
之、工藤由起子、西川禎一. 上
皮細胞に対する腸管毒素原性大
腸菌0169:H41の特異な接着性に
寄与する新規付着因子、日本栄
養食糧学会第55回近畿支部大会、
平成28年10月22日 帝塚山学院
大学 p.52
玉井 沙也加、能重 匠、谷本佳彦、
松崎壮宏、中臺枝里子、山口良
弘、児玉年央、飯田哲也、西川
禎一. 培養細胞の炎症性サイ
トカイン分泌における健康者由
来分散接着性大腸菌の抑制機構、
日本栄養食糧学会第55回近畿支
部大会、平成28年10月22日 帝
塚山学院大学 p.52
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19日 大阪市立大学 p.44

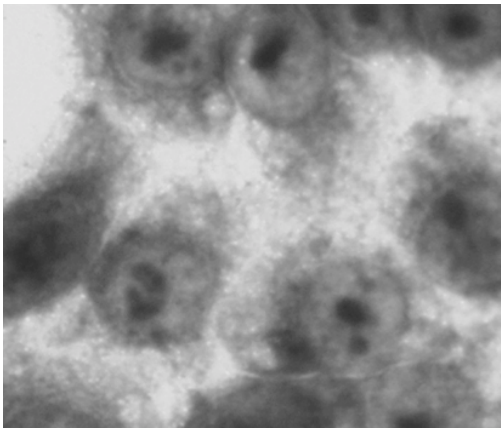
鄭冬明、坂 瑛里香、大森裕子、
中臺枝里子、和田崇之、工藤由
起子、西川禎一 . 腸管毒素原性
大腸菌0169:H41の特異な細胞接
着性に寄与する新規付着因子、
第69回日本細菌学会関西支部学
術集会、平成28年11月19日 大
阪市立大学 p.45



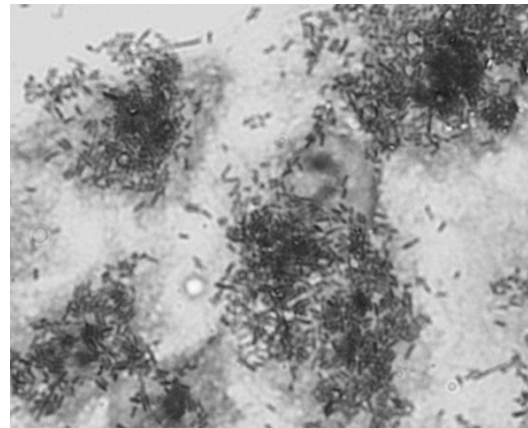
O169 plasmid+



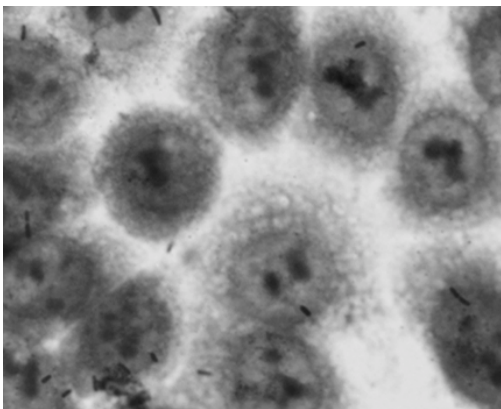
O169 plasmid-



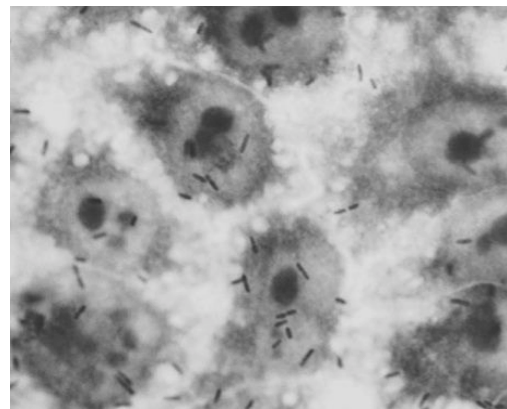
TOP10



TOP10K88-like

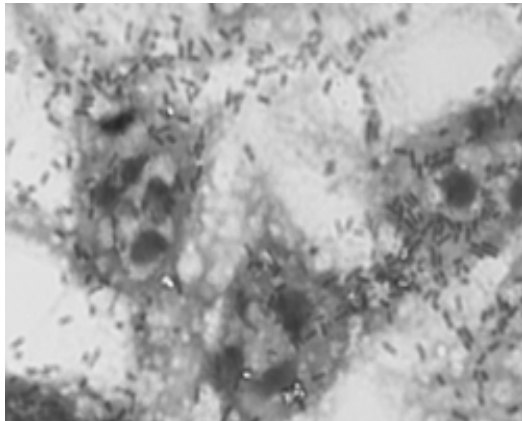


TOP10CS6

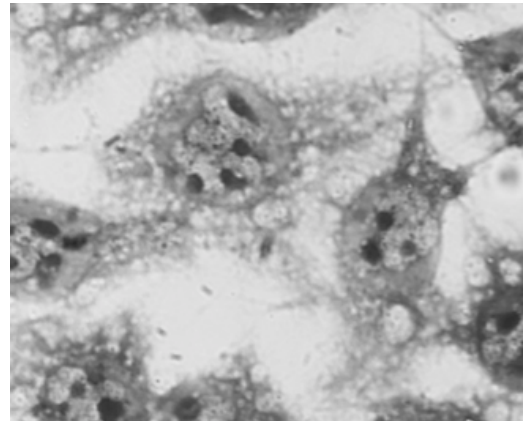


TOP10CS8-like

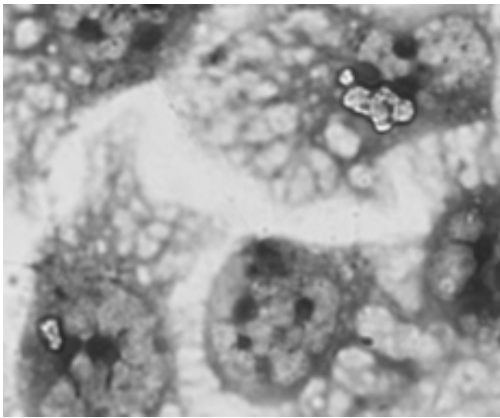
Fig. 1. HEp-2細胞(ヒト喉頭ガン由来)に対する細胞接着性: O169野生株(O169 plasmid+), 病原プラスミド脱落株(O169 plasmid-), 実験室株TOP10、K88-like遺伝子で形質転換された株(TOP10+K88-like), CS6遺伝子で形質転換された株(TOP10CS6), およびCS8-likeの遺伝子で形質転換された株(TOP10CS8-like)。



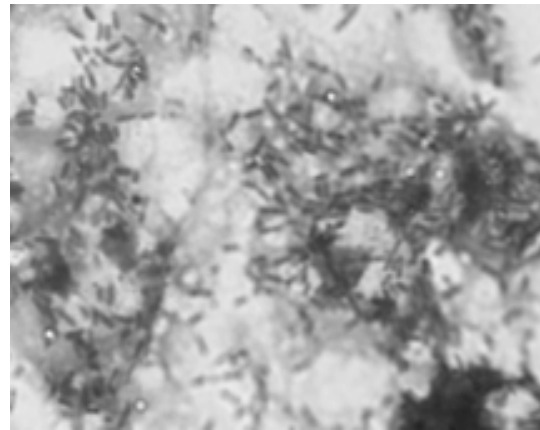
O169 plasmid+



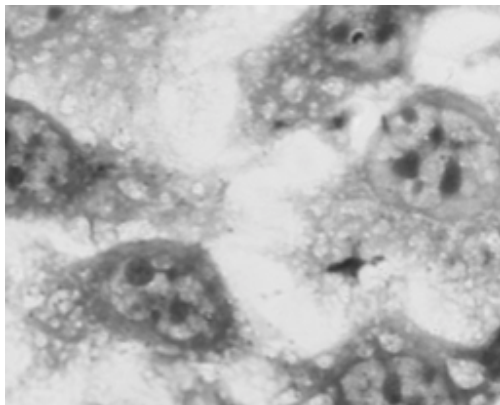
O169 plasmid-



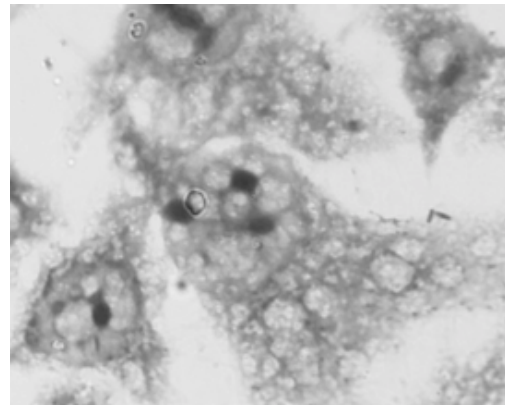
TOP10



TOP10K88-like

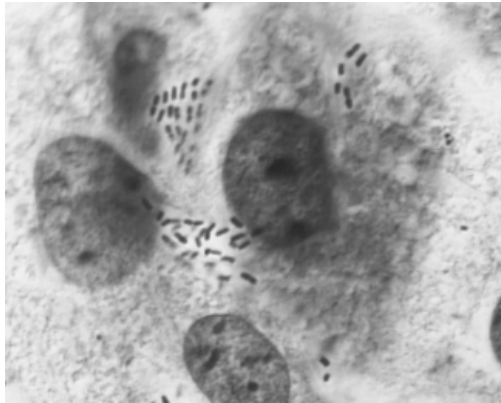


TOP10CS6

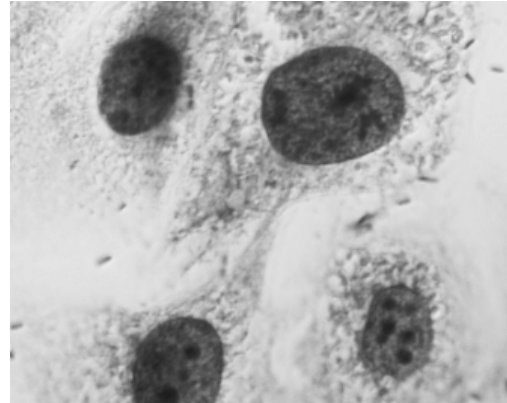


TOP10CS8-like

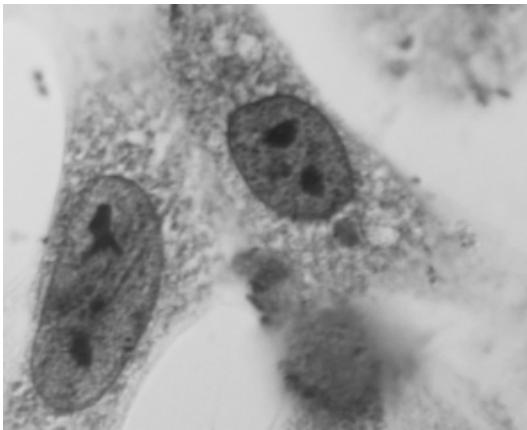
Fig. 2. IPEC-1細胞(ブタ小腸粘膜上皮由来)に対する細胞接着性: O169野生株(O169 plasmid+), 病原プラスミド脱落株(O169 plasmid-), 実験室株TOP10、K88-like遺伝子で形質転換された株(TOP10+K88-like), CS6遺伝子で形質転換された株(TOP10CS6), およびCS8-likeの遺伝子で形質転換された株(TOP10CS8-like)。



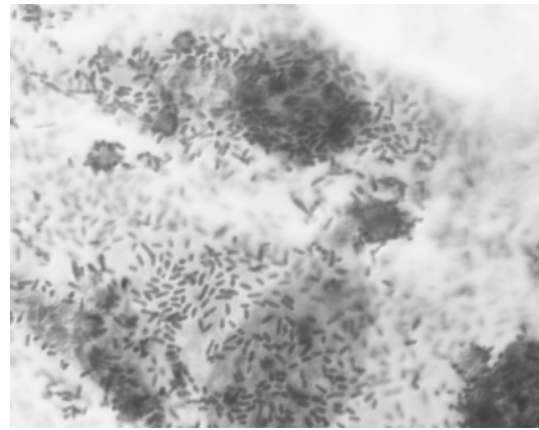
O169 plasmid+



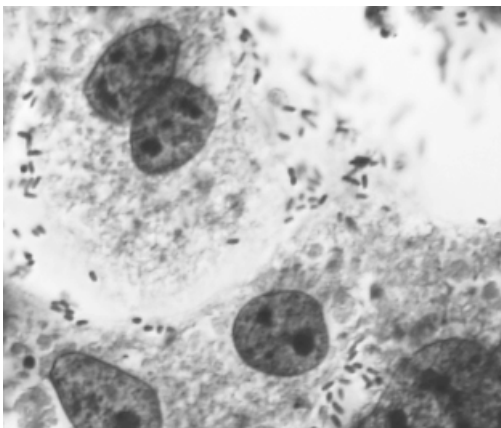
O169 plasmid-



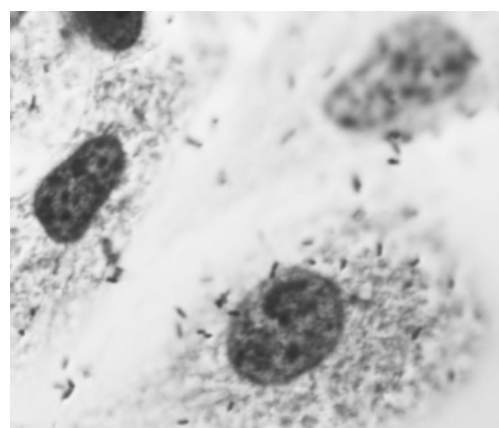
TOP10



TOP10K88-like



TOP10CS6



TOP10CS8-like

Fig. 3. BIE細胞(ウシ胎仔十二指腸粘膜上皮由来)に対する細胞接着性: O169野生株(O169 plasmid+)、病原プラスミド脱落株(O169 plasmid-)、実験室株TOP10、K88-like遺伝子で形質転換された株(TOP10+K88-like)、CS6遺伝子で形質転換された株(TOP10CS6)、およびCS8-likeの遺伝子で形質転換された株(TOP10CS8-like)。

・ 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 <i>Escherichia coli</i> 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 <i>Escherichia coli</i> strains isolated from foods and human and animal faecal specimens.	J. Appl. Microbiol.	122 (1)	268-278	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 <i>Escherichia coli</i> in foods and fecal specimens obtained from cattle, pigs, chickens, asymptomatic carriers, and patients in Osaka and Hyogo, Japan.	Jpn.J. Infect. Dis.			In press

<p>Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y.</p>	<p>Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> isolated from different retail foods.</p>	<p>Int. J. Food Microbiol.</p>			<p>In press</p>
<p>Seo, D., Choi, S., Jeon, S., Jeong, S., Park, H., Lee, B., Kim, G., Yang, S., Nishikawa, Y., and Choi, C.</p>	<p>Comparative sequence analysis of enteroaggregative <i>Escherichia coli</i> heat-stable enterotoxin 1 identified in Korean and Japanese <i>Escherichia coli</i> strains.</p>	<p>Int. J. Food Microbiol.</p>	<p>243</p>	<p>1-8</p>	<p>2017</p>