

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 29 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 30 (2018) 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 4	27
----------------------------	----

(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 方法の検討と作製した免疫磁気ビーズの有効性の検討	48
--	----

(3) 食品での腸管毒素原性大腸菌の検査法の コラボレイティブ・スタディによる評価	59
--	----

2 . ヒトの感染に関する家畜の探索	105
--------------------	-----

西川 禎一

・研究成果の刊行に関する一覧表	125
-----------------	-----

. 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 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）ヒトの感染に關与する家畜の探索、を実施した。平成 28 年度までに、腸管毒素原性大腸菌（EPEC）の主要血清群 06、025、027、0148、0153、0159、0169 の 7 種類であること、これらを対象とした食品での効率的な試験法を確立するために増菌培養法、免疫磁気ビーズ法、分離培養法、遺伝子検査法について優れた方法を検討し、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をしてきた。（１）の研究結果から、前年度から継続して免疫磁気ビーズ試薬作製法、各種 ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法、の応用性を検討し幅広い条件が設定された。また、最終的確認試験としての多数の試験研究機関の参加によるコラボレイティブ・スタディの実施し、食品での EPEC の優れた検査法が確立された。（２）の研究において、EPEC 0169 の定着因子遺伝子をヒト、ブタ、ウシの培養細胞を用いて検討した結果、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

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
中台（鹿毛）枝里子	大阪市立大学大学院生活科学研究科
和田崇之	長崎大学

麻生 久	東北大学大学院農学研究科
Weiping Zhan	カンザス州立大学獣医学研究科
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
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
大阪美紗	埼玉県衛生研究所
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
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
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 28 年度までに、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、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、これらを検討した。H29 年度は、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することとした。昨年までの研究で、ETEC の主要 O 血清群は、06、025、027、0148、0153、0159 および 0169 の計 7 血清群であり、そのうちの 0148 および 0159 を代表的血清群に選定して試験を行うこととした。そこで、大容量の免疫磁気ビーズを作製し、作製方法の詳細なマニュアルを作成した。また、免疫磁気ビーズの使用期限を検証した。さらに、ETEC の病原因子である耐熱性エンテロトキシン（ST）及び易熱性エンテロトキシン（LT）の遺伝子検出系を、各種機器や試薬を組み合わせ、高感度の検出系を広く検討した。これらの方法を含め、

ETEC の食品からの検出法の確立を目指し、増菌培養法、免疫磁気ビーズ法、分離培養法、遺伝子検出法等を組み合わせ、一連の試験法としてコラボレイティブ・スタディを実施した。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。H28 年度までに ETEC 0169 の各種動物由来の腸管上皮細胞への接着因子の研究を進めてきたが、今年度は、これまでの試験で強い付着像を示した接着因子 K88-like に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。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関与する家畜・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。

B. 研究方法

（1）食品での統一的検査法の開発

1）ETEC の免疫磁気ビーズ作製方法の検討と食品での有効性の検討

コラボレイティブ・スタディに使用するために必要な血清群 0148 および 0159 について各 10 ml の免疫磁気ビーズを作製した。大腸菌 0148 および 0159 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、これを用

いて自家調製免疫磁気ビーズの回収性を確認した。また、4 の冷蔵下で約1年間保存し、集菌効果を確認した。分離平板培地として、SMAC寒天、抗生物質加SMAC寒天、クロモアガーSTEC(基礎培地)、DHL寒天を使用した。

2) ST および LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法の検討

DNA抽出はアルカリ熱抽出にて行い、リアルタイムPCRのテンプレートとした。リアルタイムPCRは、Frydendahlら(STp遺伝子)、共同研究者の小西らが(STh遺伝子)、およびWestら(LT遺伝子)の各プライマー・プローブを参照してシンプル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。また、インターナル・コントロール(IC)を加えたマルチプレックス反応も行った。蛍光標識プローブには、5'末端(蛍光ラベル)はFAMを、3'末端(クエンチャー)はTAMRA、QSYまたはBHQとした。検出機器には、ABI ViiA7、7500、LC480、Takara Dice およびDiceを使用した。06:HNM、0148:H28、0169:H41の計3株を供試し、接種菌液(想定菌濃度 $10^6 \sim 10^3$ cfu/ml)を作製した。非加熱で接種されるミニトマト、大根の漬物、長ネギ、生わかめのmEC培地での食品培養液0.9 mlに接種菌液0.1 mlを接種して菌接種食品培養液(想定 $10^5 \sim 10^2$ cfu/ml食品培養液)を調製した。

3) 食品でのETECの検査法のコラボレイティブ・スタディ

13試験検査機関において、試験対象2血清群(第1回;血清群0159STh陽性、

第2回;0148STp<陽性)を2回に分けて実施された。ETEC接種のキュウリ、長ネギを検体とした。mEC培地を加え42にて 22 ± 2 時間培養し、培養液をアルカリ熱抽出法に供した。得られたDNA液をリアルタイムPCR(ST遺伝子およびLT遺伝子を検出)に用いた。また、培養液を免疫磁気ビーズ法に供し、濃縮液を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に画線した。培養後、生育したコロニーを観察し免疫血清またはラテックス凝集試薬にて凝集反応を確認した。結果は集計され、検出方法間の有意差検定(Tukey-Kramer法で解析)にて解析された。

(2) ヒトの感染に關与する家畜の探索

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にETEC0169:H41(下痢症患者由来、YN10株)の培養液を接種し、細胞をギムザ染色した。細胞を溶解させ、接着していた生菌の数を算定した。また、K88-likeの特異的な付着性に關与すると推察される遺伝子faeG1とfaeG2の塩基配列に基づきアミノ酸9個分の合成ペプチドを抗原としてモノクローナル抗体を作製し、免疫電顕、ウエスタンブロット、凝集反応試験を行った。

C. 研究結果

(1) 食品での統一的検査法の開発

1) ETEC の免疫磁気ビーズ作製方法の検討と食品での有効性の検討

作製した自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果、0148 および 0159 はともに 10^0 cfu/ml まで検出可能であった。1 年間冷蔵保存した免疫磁気ビーズでも保存後では血清群 06 は 10^4 cfu/ml までの検出であったが、025 および 0159 は 10^2 cfu/ml まで、027、0148、0153、0169 は 10^1 cfu/ml まで検出が可能であった。

2) 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 (STp および STh) 遺伝子および LT 遺伝子検出における最少検出菌濃度は、4 種類の全食品で試験した 3 種の検出機器および供試菌 3 株すべて、いずれのクエンチャー (TAMRA、BHQ) でも 10^3 cfu 以上/ml であった。また、IC を加えたマルチプレックス反応試験では、長ネギ培養液からの ST (STp および STh) 遺伝子および LT 遺伝子検出における最少検出菌濃度は、5 種の検出機器および供試菌 3 株すべて、いずれのクエンチャー (BHQ、QSY) でも 10^3 cfu 以上/ml であった。IC もすべての反応において検出された。

3) 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 では、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 0.897 以上、低菌数接種においては、0.846 以上であった。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、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、他の多くの方法より有意に検出率が低かった。

血清群 0148 では、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、1.000、長ネギ検体では、0.769 であった。低菌数接種においては、キュウリ検体では、0.923 であり、長ネギ検体では、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、それ以外で 1.000 であった。長ネギ検体では、SMAC で 0.231、それ以外で 0.462 以上であった。低菌数接種においては、キュウリ検体では、SMAC で 0.641、それ以外で 0.872 以上であった。長ネギ検体では、0.154~0.333 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 1.000、長ネギ検体では 0.744 であった。低菌数接種においては、キュウリ検体では 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、直接塗抹法の SMAC は、他の多くの方法より有意に検出率が低かった。

(2) ヒトの感染に關与する家畜の探索
ヒト、ブタ、ウシ由来の腸粘膜上皮細胞に対する接着性を試験した結果、顕微鏡観察では 28 年度に報告したのと同様に 0169 と TOP10K88-like 株のみが強い附着像を示した。TOP10K88-like を抗原としてモノクローナル抗体を作製し、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。しかし、抗体を使った免疫電顕、ウエスタンブロット、凝集反応試験では、今回作製したモノクローナル抗体は K88 様定着因子と特異的に反応するものではないことが示唆された。

D. 考察

(1) 食品での統一的検査法の開発

1) ETEC の免疫磁気ビーズ作製方法の検討と食品での有効性の検討

大量の免疫磁気ビーズの作製および集菌効果の検討を行ったところ、小分けして作製し、最終的に 1 つにまとめて良く攪拌することで、感作される抗体量が均一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、いずれの血清群も 1 オーダー程度検出率が落ちている成績であり、1 年間程度は使用できるものと考えられた。

2) ST および LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法の検討

リアルタイム PCR の精度を確保するために、16SrRNA を標的とした IC を加えた

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

これまでの 3 か年の研究では、リアルタイム PCR による ETEC 検出において Hidaka らのプライマー・プローブ (クエンチャー MGB)、Frydendahl 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 で検出できた。これら各種の反応系や各種の検出機器を用いた方法による検出法を提示できたことは、使用可能な検出機器および試薬の選択肢が広がり、食品の ETEC 遺伝子スクリーニング検査の実用性が高まるものと期待する。

3) 食品での ETEC の検査法のコラボレイティブ・スタディ

ETEC 06、025、027、0148、0153、0159

および 0169 の計 7 血清群を対象とした食品での検査法の確立のために、13 試験検査機関によるコラボレイティブ・スタディを行った。本コラボレイティブ・スタディでの試験法は、mEC 培地中での 42 での増菌培養法、免疫磁気ビーズ法と各選択分離培地の組み合わせによる分離培養法および遺伝子検出法で構成された。食品検体には、EPEC の食中毒の原因食品として野菜や水が多いことがいわれていることから、EPEC の食中毒の原因食品であった長ネギ、また、腸管出血性大腸菌の食中毒の原因食品として報告があるキュウリを選定した。また、3 試験研究機関で実施した先行研究にて、主要 7 血清群のうち本コラボレイティブ・スタディに供試しなかった 5 血清群についても野菜などの多種の食品に菌を接種して各種検出法を検討した。その結果、優れることが判明した検査法を採用してコラボレイティブ・スタディの試験を構成した。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。また、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のほうが免疫磁気ビーズ法よりも検出性が優れていることが示され、リアルタイム PCR 法をスクリーニングに使用し、陽性であった検体を免疫磁気ビーズ法に供することで効率的な試験が行えるものと考えられた。さらに、本コラボレイティブ・スタディで設定した釣菌するコロニー数(3 コロニー)以上に釣菌することによって直接塗抹法および免疫磁気ビーズ法の検出感度が向上

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

本コラボレイティブ・スタディでは、mEC 培地(42)での増菌培養法、免疫磁気ビーズ法、選択分離培地の組み合わせによる分離培養法および遺伝子検出法によって EPEC の比較的高率な検出が認められた。

(2) ヒトの感染に關与する家畜の探索

EPEC 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く、しかし、腸粘膜への定着因子が異なるため、家畜の EPEC は家畜の間で、ヒトの EPEC 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。しかし、pEntYN10 のように in vitro では脱落しやすいプラスミド上にコードされた CS6、CS8-like、K88-like の 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ことも考えられる。

K88-like 抗原を簡便に検出したり、その菌体における局在や宿主細胞との結合に重要なエピトープを決定したりする目

的で今回はモノクローナル抗体の作製を試みた。しかしながら、免疫電顕でもウェスタン・ブロッティングでも明瞭な反応が出ず、凝集試験によって K88-like で組み替えた菌体のみならず TOP10 自体とも反応していることが判明した。抗原として作製した合成ペプチドと同様の抗原を TOP10 が保有している可能性を予想せず、合成ペプチドを用いた ELISA と TOP10K88-like の凝集試験でクローンの選別を進め、陰性対照として TOP10 を凝集試験に置いていなかったことが失敗の原因である。基本に立ち返り、再度挑戦する予定である。

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)ヒトの感染に関する家畜の探索、を実施した。平成 28 年度までに、腸管毒素原性大腸菌(ETEC)の主要血清群 06、025、027、0148、0153、0159、0169 の 7 種類であること、これらを対象とした食品での効率的な試験法を確立するために増菌培養法、免疫磁気ビーズ法、分離培養法、遺伝子検査法について優れた方法を検討し、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をしてきた。(1)の研究において、免疫磁気ビーズを小分けして作製し、最終的に 1 本にまとめることで、感作される抗体量が均一な回収率に優れた大量の免疫磁気ビーズが作製された。ま

た、作製した免疫磁気ビーズの保存性を検討し、1 年間程度は使用できるものと考えられた。ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法について、検出機器、プローブ 3'末端に付加するクエンチャーおよび IC との適合性を検討した。国内で広く使用されている 5 種類の検出機器及び 2 種類のクエンチャーを用いたリアルタイム PCR では、IC を含むマルチプレックス反応条件にて ETEC の標的遺伝子 ST (STp、STh) および LT が最小菌濃度 10^3 cfu 以上/ml で検出された。コラボレイティブ・スタディでは、ETEC が総じて比較的高率に検出されることが確認された。食品の増菌培養液がリアルタイム PCR 法で ST または LT 遺伝子陽性になった場合、培養液を選択分離培地に塗抹するか、主要 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。(2)の研究において、ETEC 0169 の定着因子遺伝子をヒト、ブタ、ウシの培養細胞を用いて検討した結果、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

- 工藤由起子. 腸管出血性大腸菌による食中毒発生と食肉汚染状況について. 感染と消毒. Vol. 24, No. 1, p72-76, 2017. 2017年5月発行 幸書房.
- Terajima, J., Izumiya, H., Hara-Kudo, Y., Ohnishi, M. Shiga toxin (verotoxin)-producing *E. coli* and foodborne disease: A Review. Food Safety. Vol. 5, No. 2, 35-53, 2017.
- 工藤由起子、寺嶋 淳. 冷凍メンチカツの加熱調理による腸管出血性大腸菌の殺菌条件の検討. 食品衛生研究. 67(9): 7-13, 2017年9月号.
- 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. 70:464-9.
- 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. 249:44-52.

2. 学会発表

- 大阪美紗、大塚佳代子、門脇奈津子、榊田希、小西典子、小俣浩魅、甲斐明美、寺嶋淳、工藤由起子. 食品からの腸管毒素原性大腸菌検出におけるリアルタイム PCR 法の検討. 第 38 回日本食品微生物学会. 平成 29 年 10 月 5、6 日. 徳島.
- 工藤由起子、田中恵美、都丸亜希子、寺嶋 淳. 冷凍メンチカツを原因とする腸管出血性大腸菌 0157 食中毒発生とその要因である加熱調理方法での菌数減少の検証. 第 113 回日本食品衛生学会学術講演会. 平成 29 年 11 月 9、10 日. 東京.
- Parvej, M. S., Kage-Nakadai, E., and Nishikawa, Y. (2017) Molecular characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) isolates from poultry. The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, Japan, Abstract: 68. 2017/9/5-8.
- Takeuchi, N., Tanimoto, Y., Tamai, S., Yanagida, S., Yamaguchi, Y., Kage-Nakadai, E., and Nishikawa, Y. (2017) 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, Awaji Yumebutai International Conference Center, Japan, Abstract: 71. 2017/9/5-8.
- 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, AAU Sao Rafael Atlantico Hotel, Albufeira, Portugal, Abstract; Poster A128. 2017/10/9-11.
- 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19-21日 仙台国際センター WS4-4 (P-216) [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19-21日 沖縄コンベンションセンター 2A-E52(p.243).
- 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、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19-21日 沖縄コンベンションセンター 2A-E53(p.244).
- 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関する因子の探索、第38回日本食品微生物学会学術総会、平成29年10月5-6日 あわぎんホール 1C02 (p.51).
- 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25日 大阪府立大学 I-site なんば 若手-14.
- 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 29 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

食品での統一的検査法の開発

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

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

研究協力者

岩手県環境保健研究センター

岩淵香織

さいたま市健康科学研究センター

土屋彰彦

埼玉県衛生研究所

大塚佳代子、大阪美紗、門脇奈津子

東京都健康安全研究センター

小西典子、尾畑浩魅、平井昭彦

杉並区衛生検査センター

山崎匠子

静岡市環境保健研究所

和田裕久

富山県衛生研究所	磯部順子
三重県保健環境研究所	永井祐樹
奈良県保健研究センター	吉田孝子
広島県立総合技術研究所保健環境センター	平塚貴大
一般財団法人 東京顕微鏡院	森 哲也
公益社団法人 日本食品衛生協会	甲斐明美
横浜検疫所 輸入食品検疫検査センター	稲垣俊一
神戸検疫所 輸入食品検疫検査センター	白石祥吾
国立医薬品食品衛生研究所	都丸亜希子、寺嶋 淳

A. 研究目的

病原大腸菌（下痢原性大腸菌）の一種である腸管毒素原性大腸菌（EPEC）は、東南アジアなどに海外渡航し、本邦への帰国時または帰国後に下痢を発症する海外渡航下痢症の原因として知られている。本菌は、主に不衛生な水や非加熱の野菜などの摂取によって食中毒を引き起こす。また、渡航歴のない患者も報告されており、国内での集団食中毒も例年発生している。このため、汚染食品の調査や汚染制御を行う必要があるが、EPEC の食品での検査法は日本および米国や EU など諸外国でも本菌特異的な検出法は策定されていない。病原大腸菌の一種で最も重篤化する腸管出血性大腸菌では、日本および諸外国において検査法が設定されており、腸管出血性大腸菌の重要な病原因子である Vero toxin (VT) 遺伝子（または志賀毒素遺伝子、stx）の有無を食品培養液から検出することによって腸管出血性大腸菌の汚染の有無のスクリーニングが行われ

ている。また、感染の多い O 血清群 4 ～ 6 種類を対象にしており、VT 遺伝子スクリーニングで陽性になった検体について主要な O 血清群を対象に遺伝子検出を 2 次スクリーニングとして行っている。この方法を参考にして、EPEC での主要な O 血清群を決定し、それらを対象とした食品での検査法を確立するために各種手法の検討を行い、優れた方法を組み合わせて多機関によるコラボレイティブ・スタディを実施し評価することとした。昨年までの研究で、EPEC の主要 O 血清群は、O6、O25、O27、O148、O153、O159 および O169 の計 7 血清群であり、そのうちの O148 および O159 を代表的血清群に選定して試験を行うこととした。そこで、大容量の免疫磁気ビーズを作製し、作製方法の詳細なマニュアルを作成した。また、免疫磁気ビーズの使用期限を検証した。さらに、EPEC の病原因子である耐熱性エンテロトキシン（ST）及び易熱性エンテロトキシン（LT）の遺伝子検出系を、各

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

B. 研究方法

(1) ETEC の免疫磁気ビーズ作製方法の検討と食品での有効性の検討

1) 免疫磁気ビーズの作製

コロボレイティブ・スタディで用いる ETEC の血清群である 0148 と 0159 の血清を用いた。血清は市販の病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を使用した。より抗体価の高い血清を選択するために、2 種類の異なるロット番号の血清(31-5126、28-4021)を用い、供試菌株(血清群 0148 (ST 産生)および 0159 (ST 産生)を各 1 株)とスライド凝集法で反応させ、最も短時間で強い凝集が認められた血清を免疫磁気ビーズ作製用に使用した。

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

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

施した。

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

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

2) 自家調製免疫磁気ビーズの保存性に関する検討

自家調製した免疫磁気ビーズの使用期限を検証するために、作製した免疫磁気

ビーズを4の冷蔵下で約1年間保存した後、集菌効果を調べた。

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

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

(2) ETECの検査法の基礎検討

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

1) リアルタイムPCR試料の調製

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

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

食品培養液)を調製した。

DNA抽出はアルカリ熱抽出にて行い、リアルタイムPCRのテンプレートとした。

2) リアルタイムPCRの反応条件および解析

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

検出機器はABI ViiA7、7500、LC480、Takara Dice および Dice を使用し、50℃ 2分、95℃ 10分の熱変性ののち、95℃ 15秒 - 60℃ 1分で40サイクルの増幅反応後、Auto または Manual 設定にて解析しCt値(LC480の場合はCp値)を得た。

3) クエンチャー(TAMRAおよびBHQ)の比較

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

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

応試験により最少検出菌濃度（検出感度）の算出および検量線を作成した。

4) IC を加えたマルチプレックス反応試験

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

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

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

(3) 食品でのETECの検査法のコラボレイティブ・スタディ

1) コラボレイティブ・スタディの概要

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

2) コラボレイティブ・スタディ用検体の作製

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

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

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

3) コラボレイティブ・スタディの試験

実施手順

1日目

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

2日目

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

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

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

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

ST・LT遺伝子検出リアルタイムPCR

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

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

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

3日目

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

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

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

4 日目

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

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

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

C. 研究結果

(1) ETEC の免疫磁気ビーズ作製方法の検討と食品での有効性の検討

1) 免疫磁気ビーズの作製

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

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

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

2) 自家製免疫磁気ビーズの保存性に関する検討

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

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

の入っている SMAC 寒天培地での発育は、やや抑制傾向であった。

(2) ETEC の検査法の基礎検討

1) クエンチャー (TAMRA および BHQ) の比較

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

2) IC を加えたマルチプレックス反応試験

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

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

(3) 食品での ETEC の検査法のコラボレイティブ・スタディ

1) 血清群 O159 の結果

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

全機関について、ほぼ 0.5 から 5.0

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

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

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

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

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

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

2) 血清群 0148 の結果

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

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

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

直接塗抹法では、高菌数接種においては、キュウリ検体では、SMAC で 0.615、SMAC 以外の 3 種類の寒天培地において 1.000 であった。長ネギ検体では、抗生物質加 SMAC で 0.641、抗生物質加クロモアガー-STE C で 0.513、クロモアガー-STE C 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-STE C で 0.308、SMAC で 0.179、クロモアガー-STE C で 0.154 であった。

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

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

D. 考察

(1) ETEC の免疫磁気ビーズ作製方法の検討と食品での有効性の検討

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

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

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

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

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

(2) ETEC の検査法の基礎検討

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

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

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

(3) 食品での ETEC の検査法のコラボレイティブ・スタディ

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

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

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

あった。血清群 0159 で ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)で 0.974、免疫磁気ビーズ法は 0.974 以上、直接塗抹法の SMAC では 0.846、それ以外の培地で 0.974 であった。これらのことから、菌数が一桁のレベルであっても高率に検出されることが判明した。また、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のほうが免疫磁気ビーズ法よりも検出性が優れていることが示され、リアルタイム PCR 法をスクリーニングに使用し、陽性であった検体を免疫磁気ビーズ法に供することで効率的な試験が行えるものと考えられた。さらに、本コラボレイティブ・スタディで設定した釣菌するコロニー数(3コロニー)以上に釣菌することによって直接塗抹法および免疫磁気ビーズ法の検出感度が向上する可能性が考えられ、試験の際には、釣菌するコロニー数も重要であると思われる。

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

本コラボレイティブ・スタディでは、mEC 培地(42)での増菌培養法、免疫磁気ビーズ法、選択分離培地の組み合わせによる分離培養法および遺伝子検出法に

よって ETEC の比較的高率な検出が認められた。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

2. 学会発表

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成29年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

食品での統一的検査法の開発

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究報告書

腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討 4

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。H29年度は、これまでに構築した遺伝子検出系においてクエンチャーの種類及び国内で汎用される検出機器の種類について、その検出感度を比較すると共に、内因性コントロール(IC)を追加し精度を高めた実用性のある試験法へと展開した。

研究協力者

埼玉県衛生研究所 大塚佳代子、大阪美紗、門脇奈津子

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

平成 29 年度は、遺伝子スクリーニング検出において、内部コントロール(IC)の追加、クエンチャーの比較、国内で広く使用されている検出機器の比較を主眼に検討した。

1. リアルタイム PCR 試料の調製

食中毒事例に由来する 06:HNM (菌株番号 T6, LT 及び STh 産生) 0148:H28 (菌株番号 T11, STh 産生) 0169:H41 (菌株番号 T5, STp 産生) の計 3 株を供試菌株とした。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^{-3} から 10^{-6} 希釈菌液まで 10 倍階段希釈し、接種菌液 (想定菌濃度 $10^6 \sim 10^3$ 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。

供試食品は、非加熱で接種されるミニトマト、大根の漬物、長ネギ、生わかめとし、滅菌ストマッカー袋に 25g ずつ採取したのち、mEC 培地 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。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 $10^5 \sim 10^2$ cfu/mL 食品培養液) を調製した (図 1)。

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。

2. リアルタイム PCR の反応条件及び解析

リアルタイム PCR は、Frydendahl らが報告した STp 遺伝子 (Mol. Cell. Probes, 2001, 15, 151-160) 共同研究者の小西らが選定した STh 遺伝子、及び West らが報告した LT 遺伝子 (Veterinary Microbiology, 2007, 122, 323-331) を標的とした各プライマー・プローブを参照してシンプレックス反応及びマルチプレックス反応にて行った。反応試薬は TaqMan Environmental MasterMix2.0 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用し、プライマー終濃度 0.16~0.2 μ M、プローブ終濃度 0.06

~0.1 μ M となるよう表1及び表2に従い調製した。

検出機器はABI ViiA7 (サーモフィッシュサーモフィッシャーサイエンティフィック) 7500 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) LC480 (ロシュ・ダイアグノスティックス) Dice (タカラバイオ) 及び Dice (タカラバイオ) 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 (LC480 の場合は Cp 値) を得た。

3. クエンチャー (TAMRA 及び BHQ) の比較

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

使用した検出機器は、ABI ViiA7、7500、LC480 の3機器とし、菌接種ミニトマト等4食品培養液についてシンプレックス反応試験により最少検出菌濃度 (検出感度) の算出及び検量線を作成した。

4. IC を加えたマルチプレックス反応試験

各種の標的毒素遺伝子検出用の蛍光標識プローブには、5' 末端 (蛍光ラベル) は FAM を、3' 末端 (クエンチャー) は QSY 又は BHQ とした。この QSY は TaqMan のクエンチャーのひとつとして新たに開発さ

れたものであり、その適合性について BHQ クエンチャーの検出感度との比較により評価した。なお、前述の「1. クエンチャーの比較」において、クエンチャー (TAMRA、BHQ) の種類による検出感度に差が認められなかったことから、本試験での対照クエンチャーは BHQ のみとした。また、菌接種食品培養液についても、前述の「1. クエンチャーの比較」において4種類の食品に差がなかったことから、過去に食中毒事件の原因食品であった「長ネギ」に限定し、新たに菌接種食品培養液を調製後、そのアルカリ熱抽出試料はリアルタイム PCR のテンプレートに供した。

使用した検出機器は、ABI ViiA7、7500、LC480、Dice 及び Dice の5機器とし、シンプレックス反応試験で得られたデータにより最少検出菌濃度 (検出感度) の算出及び検量線を作成した。また、平成26年11月20日付け食安監発1120第3号の厚生労働省通知「腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157 の検査法」に示された 16SrRNA 遺伝子を検出する IC を加え、マルチプレックス反応で菌接種長ネギ培養液について検出感度の算出を行った。

C. 研究結果

1. クエンチャー (TAMRA 及び BHQ) の比較

各濃度に希釈した菌液を接種した食品培養液からの ST (STp 及び STh) 遺伝子及び

LT 遺伝子検出における最少検出菌濃度は、4 種類の全食品で試験した 3 種の検出機器及び供試菌 3 株すべて、いずれのクエンチャー (TAMRA、BHQ) でも 10^3 cfu 以上/mL であった。(表 3、表 4)

2. IC を加えたマルチプレックス反応試験

IC を加えたマルチプレックス反応試験では、長ネギ培養液からの ST (STp 及び STh) 遺伝子及び LT 遺伝子検出における最少検出菌濃度は、5 種の検出機器及び供試菌 3 株すべて、いずれのクエンチャー (BHQ、QSY) でも 10^3 cfu 以上/mL であった。IC もすべての反応において検出された(表 6)。

リアルタイム PCR で得られた Ct 値と長ネギ培養液中の菌濃度を基に、クエンチャー別並びに検出機器別及び菌株別に検量線を作成した(表 5、図 2 - 図 33)。

D. 考察

過去の食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究において、日本における食中毒発生状況資料(厚生労働省 NESFD、平成 20 年~27 年)を分析した結果、腸管毒素原性大腸菌(以下、ETEC)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 種類であることを報告した。また、これらの血清群を対象とした食品からの効率的な試験法を策定する目的で、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培地及び同一の培養温度で ETEC が発育することも明らかにした。また、腸管出血性大腸菌検査法で導入されている検査手法と同様に、遺伝子スクリーニング検査の有用性や免疫磁気ビーズ検査による菌分離の向上も確認できた。

平成 29 年度は、リアルタイム PCR の精度を確保するために、16SrRNA を標的とした IC を加えたマルチプレックス反応による遺伝子検出法を検討した。国内で汎用されている主要な検出機器を使用したリアルタイム PCR は、BHQ 及び QSY のいずれのクエンチャーとの相性が良く、ETEC を接種した食品培養液中の最少菌検出濃度は 10^3 cfu 以上/mL であり、検出感度に優れた。また、IC もすべての反応で検出され、本試験で設定したプライマー、プローブ、反応条件は、食品の ETEC 検査法におけるスクリーニング検査として有用であることが確認できた。

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

伝子を最少菌濃度 10^3 cfu 以上/mL で検出できた。これら各種の反応系や各種の検出機器を用いた方法による検出法を提示できたことは、使用可能な検出機器及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。

E. 結論

平成 29 年度は、検出機器、プローブ 3' 末端に付加するクエンチャー及び IC との適合性を調べた。国内で広く使用されている 5 種類の検出機器及び 2 種類のクエンチャーを用いたリアルタイム PCR は、IC を含むマルチプレックス反応条件にて ETEC の標的遺伝子 ST (ST p、ST h) 及び LT を最小菌濃度 10^3 cfu 以上/mL で検出できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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

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（シンプレックス反応）

標的遺伝子プライマー等	塩基配列（5' -3'）	容量（ μ L）
<i>STh</i> プライマー（10p）	aaagtggctctgaaagcatgaatag	0.5
プライマー（10p）	cacccggtacaagcaggatt	0.5
プローブ（5p）	FAM-agcaattactgctgtgaattgtgtt-TAMRA 又は BHQ	0.33
<i>STp</i> プライマー（10p）	gcaaaatccgtttaactaatctcaaa	0.5
プライマー（10p）	acagaaataaaaatgccaacattagc	0.5
プローブ（5p）	FAM-ttacctcccgtcatgtgtttcacggat-TAMRA 又は BHQ	0.33
<i>Lt</i> プライマー（10p）	ccggcagaggatggttacag	0.5
プライマー（10p）	gaatccagggttcttctctccaa	0.5
プローブ（5p）	FAM-tagcagggttccccaccggatcacc-TAMRA 又は BHQ	0.33
2×Environmental Mastermix		12.5
蒸留水		6.17
鋳型 DNA		5

表2 プライマー及びプローブの塩基配列と反応液調製（マルチプレックス反応）

標的遺伝子プライマー等	塩基配列（5' -3'）	容量（ μ L）
<i>STh</i> プライマー（10p）	aaagtggctctgaaagcatgaatag	0.5
プライマー（10p）	cacccggtacaagcaggatt	0.5
プローブ（5p）	FAM-agcaattactgctgtgaattgtgtt-BHQ 又は QSY	0.3
<i>STp</i> プライマー（10p）	gcaaaatccgtttaactaatctcaaa	0.5
プライマー（10p）	acagaaataaaaatgccaacattagc	0.5
プローブ（5p）	FAM-ttacctcccgtcatgtgtttcacggat- BHQ 又は QSY	0.3
<i>Lt</i> プライマー（10p）	ccggcagaggatggttacag	0.5
プライマー（10p）	gaatccagggttcttctctccaa	0.5
プローブ（5p）	FAM-tagcagggttccccaccggatcacc- BHQ 又は QSY	0.3
16SrRNA プライマー（20p）	cctcttgccatcggatgtg	0.2
プライマー（20p）	ggctggtcatcctctcagacc	0.2
プローブ（5p）	HEX-gtggggtaacggctcacctaggcgac- BHQ 又は QSY	0.5
2×Environmental Mastermix		12.5
蒸留水		2.7
鋳型 DNA		5

表 3 各種食品培養液を対象としたシンプレックス反応におけるリアルタイム PCR の検量線 (TAMRA)

食品の種類	検出機器	供試菌株	標的遺伝子	R ²	検量線式	最小検出菌濃度 (log cfu/mL)	
ミニトマト	7500	06	STh	0.988	$y = -3.355x + 45.5$	1.9	
		0148	STh	0.996	$y = -3.276x + 44.262$	2.1	
		0169	STp	0.996	$y = -3.427x + 43.414$	2.1	
		06	LT	0.990	$y = -3.334x + 45.245$	1.9	
	ViiA7	06	STh	0.989	$y = -3.5715x + 47.7554$	1.9	
		0148	STh	0.995	$y = -3.2501x + 46.3798$	3.1	
		0169	STp	0.996	$y = -3.3363x + 43.4822$	2.1	
		06	LT	0.992	$y = -3.6379x + 45.6422$	1.9	
	LC480	06	STh	0.987	$y = -3.0963x + 43.885$	2.9	
		0148	STh	0.997	$y = -3.3443x + 45.639$	2.1	
		0169	STp	0.993	$y = -3.374x + 43.638$	2.1	
		06	LT	0.994	$y = -3.1973x + 44.282$	1.9	
	大根の漬物	7500	06	STh	0.990	$y = -3.258x + 44.256$	1.9
			0148	STh	0.992	$y = -3.276x + 45.045$	2.1
			0169	STp	0.998	$y = -3.349x + 43.648$	2.1
			06	LT	0.985	$y = -3.237x + 44.799$	1.9
ViiA7		06	STh	0.995	$y = -3.2687x + 46.4139$	1.9	
		0148	STh	0.993	$y = -3.4778x + 45.2446$	3.1	
		0169	STp	0.998	$y = -3.5559x + 48.5651$	2.1	
		06	LT	0.997	$y = -3.3151x + 43.9481$	1.9	
LC480		06	STh	0.990	$y = -3.0607x + 43.717$	1.9	
		0148	STh	0.999	$y = -3.3493x + 45.864$	2.1	
		0169	STp	0.998	$y = -3.3945x + 44.087$	2.1	
		06	LT	0.993	$y = -3.1417x + 43.848$	1.9	

長ネギ	7500	06	STh	0.990	$y=-3.308x+45.138$	1.9	
		0148	STh	0.994	$y=-3.351x+45.837$	2.1	
		0169	STp	0.988	$y=-3.553x+44.1$	2.1	
		06	LT	0.992	$y=-3.319x+43.974$	1.9	
	ViiA7	06	STh	0.993	$y=-3.3613x+48.4168$	2.9	
		0148	STh	0.991	$y=-3.4002x+47.9661$	2.1	
		0169	STp	0.992	$y=-3.5817x+45.6304$	2.1	
		06	LT	0.994	$y=-3.4970x+45.3990$	1.9	
	LC480	06	STh	0.984	$y=-3.234x+46.042$	1.9	
		0148	STh	0.999	$y=-3.3887x+46.175$	2.1	
		0169	STp	0.991	$y=-3.2413x+43.069$	2.1	
		06	LT	0.990	$y=-3.554x+46.456$	1.9	
	生わかめ	7500	06	STh	0.988	$y=-3.494x+45.877$	1.9
			0148	STh	0.993	$y=-3.415x+45.307$	2.1
			0169	STp	0.996	$y=-3.369x+43.701$	2.1
			06	LT	0.992	$y=-3.302x+45.875$	1.9
ViiA7		06	STh	0.986	$y=-3.6125x+46.9418$	1.9	
		0148	STh	0.994	$y=-3.4884x+47.9141$	2.1	
		0169	STp	0.997	$y=-3.3449x+43.6169$	2.1	
		06	LT	0.989	$y=-3.6262x+45.2728$	1.9	
LC480		06	STh	0.982	$y=-3.5103x+45.371$	1.9	
		0148	STh	0.994	$y=-3.2997x+45.061$	2.1	
		0169	STp	0.994	$y=-3.369x+43.887$	2.1	
		06	LT	0.984	$y=-3.341x+45.445$	1.9	

表4 各種食品培養液を対象としたシンプレックス反応におけるリアルタイム PCR の検量線(BHQ)

食品の種類	検出機器	供試菌株	標的遺伝子	R ²	検量線式	最小検出菌濃度 (log cfu/mL)
ミニトマト	7500	06	STh	0.988	$y = -3.355x + 45.5$	1.9
		0148	STh	0.996	$y = -3.276x + 44.262$	2.1
		0169	STp	0.996	$y = -3.427x + 43.414$	2.1
		06	LT	0.990	$y = -3.334x + 45.245$	1.9
	ViiA7	06	STh	0.988	$y = -3.447x + 45.8199$	1.9
		0148	STh	0.996	$y = -3.2593x + 46.0564$	2.1
		0169	STp	0.991	$y = -3.3023x + 44.225$	2.1
		06	LT	0.988	$y = -3.6105x + 45.0849$	1.9
	LC480	06	STh	0.986	$y = -3.4869x + 45.204$	1.9
		0148	STh	0.997	$y = -3.2227x + 44.032$	2.1
		0169	STp	0.998	$y = -3.3283x + 43.26$	2.1
		06	LT	0.989	$y = -3.0927x + 43.739$	1.9
大根の漬物	7500	06	STh	0.990	$y = -3.258x + 44.256$	1.9
		0148	STh	0.992	$y = -3.276x + 45.045$	2.1
		0169	STp	0.998	$y = -3.349x + 43.648$	2.1
		06	LT	0.985	$y = -3.237x + 44.799$	2.9
	ViiA7	06	STh	0.996	$y = -3.2839x + 45.9949$	1.9
		0148	STh	0.996	$y = -3.4186x + 44.6491$	2.1
		0169	STp	0.994	$y = -3.3453x + 46.7089$	2.1
		06	LT	0.998	$y = -3.3767x + 44.4755$	1.9
	LC480	06	STh	0.998	$y = -3.153x + 43.622$	1.9
		0148	STh	0.997	$y = -3.4313x + 45.712$	2.1
		0169	STp	0.997	$y = -3.4002x + 44.165$	2.1
		06	LT	0.993	$y = -3.0207x + 43.099$	2.9

長ネギ	7500	06	STh	0.990	$y = -3.308x + 45.138$	1.9	
		0148	STh	0.994	$y = -3.351x + 45.837$	2.1	
		0169	STp	0.988	$y = -3.553x + 44.1$	2.1	
		06	LT	0.992	$y = -3.319x + 43.974$	1.9	
	ViiA7	06	STh	0.988	$y = -3.3798x + 46.5772$	1.9	
		0148	STh	0.989	$y = -3.3503x + 47.3936$	2.1	
		0169	STp	0.992	$y = -3.5248x + 45.3049$	3.1	
		06	LT	0.994	$y = -3.4985x + 45.0365$	1.9	
	LC480	06	STh	0.992	$y = -3.402x + 46.055$	1.9	
		0148	STh	0.999	$y = -3.4043x + 45.938$	2.1	
		0169	STp	0.992	$y = -3.2617x + 43.277$	2.1	
		06	LT	0.989	$y = -3.4343x + 44.923$	1.9	
	生わかめ	7500	06	STh	0.988	$y = -3.494x + 45.877$	1.9
			0148	STh	0.993	$y = -3.415x + 45.307$	2.1
			0169	STp	0.996	$y = -3.369x + 43.701$	2.1
			06	LT	0.992	$y = -3.302x + 45.875$	1.9
ViiA7		06	STh	0.986	$y = -3.5022x + 46.6068$	1.9	
		0148	STh	0.992	$y = -3.3767x + 46.843$	2.1	
		0169	STp	0.991	$y = -3.359x + 43.784$	2.1	
		06	LT	0.986	$y = -3.6175x + 45.3449$	1.9	
LC480		06	STh	0.984	$y = -3.2437x + 44.934$	1.9	
		0148	STh	0.991	$y = -3.3253x + 44.767$	2.1	
		0169	STp	0.994	$y = -3.3313x + 43.773$	2.1	
		06	LT	0.969	$y = -3.0463x + 41.772$	1.9	

表5 長ネギ培養液を対象としたシンプレックス反応におけるリアルタイム PCR の検量線

クエンチャーの種類	検出機器	供試菌株	標的遺伝子	R ²	検量線式
BHQ	7500	06	STh	0.996	$y = -3.419x + 45.838$
		0148	STh	0.972	$y = -3.304x + 45.346$
		0169	STp	0.996	$y = -3.448x + 44.186$
		06	LT	0.995	$y = -3.385x + 43.578$
	ViiA7	06	STh	0.998	$y = -3.402x + 46.377$
		0148	STh	0.997	$y = -2.973x + 45.458$
		0169	STp	0.991	$y = -3.221x + 43.420$
		06	LT	0.972	$y = -3.059x + 42.884$
	LC480	06	STh	0.995	$y = -3.210x + 44.768$
		0148	STh	0.999	$y = -2.640x + 43.179$
		0169	STp	0.982	$y = -3.437x + 43.937$
		06	LT	0.999	$y = -3.480x + 44.939$
	Dice	06	STh	0.988	$y = -3.225x + 44.85$
		0148	STh	0.962	$y = -2.922x + 44.51$
		0169	STp	0.985	$y = -3.170x + 43.78$
		06	LT	0.995	$y = -3.037x + 43.09$
	Dice	06	STh	0.981	$y = -2.635x + 43.05$
		0148	STh	0.975	$y = -3.071x + 46.55$
		0169	STp	0.984	$y = -3.098x + 43.62$
		06	LT	0.968	$y = -2.994x + 43.39$
QSY	7500	06	STh	0.978	$y = -3.032x + 43.362$
		0148	STh	0.978	$y = -2.777x + 42.734$
		0169	STp	0.990	$y = -3.296x + 44.044$
		06	LT	0.974	$y = -3.137x + 44.049$
	ViiA7	06	STh	0.996	$y = -3.115x + 44.436$
		0148	STh	0.995	$y = -3.237x + 45.888$
		0169	STp	0.983	$y = -3.248x + 42.598$
		06	LT	0.989	$y = -3.198x + 43.879$
	LC480	06	STh	0.995	$y = -3.610x + 46.862$
		0148	STh	0.998	$y = -2.705x + 43.647$
		0169	STp	0.996	$y = -3.270x + 43.330$
		06	LT	0.998	$y = -3.370x + 44.489$
	Dice	06	STh	0.995	$y = -2.928x + 44.00$
		0148	STh	0.994	$y = -3.188x + 46.39$
		0169	STp	0.989	$y = -3.212x + 44.16$
		06	LT	0.980	$y = -2.995x + 43.31$
	Dice	06	STh	0.989	$y = -3.250x + 45.70$
		0148	STh	0.994	$y = -2.859x + 45.31$
		0169	STp	0.965	$y = -3.066x + 43.84$
		06	LT	0.990	$y = -2.633x + 42.01$

表6 長ネギ培養液を対象とした IC 含有マルチプレックス反応における検出感度

クエンチャーの種類	検出機器	供試菌株	標的遺伝子	最少検出菌濃度 (log cfu/mL)
BHQ	7500	06	STh/LT	2.0
		0148	STh	3.2
		0169	STp	2.0
	ViiA7	06	STh/LT	2.0
		0148	STh	2.2
		0169	STp	2.0
	LC480	06	STh/LT	2.0
		0148	STh	2.2
		0169	STp	2.0
	Dice	06	STh/LT	2.0
		0148	STh	2.2
		0169	STp	2.0
	Dice	06	STh/LT	2.0
		0148	STh	2.2
		0169	STp	2.0
QSY	7500	06	STh/LT	2.0
		0148	STh	2.2
		0169	STp	2.0
	ViiA7	06	STh/LT	2.0
		0148	STh	2.2
		0169	STp	2.0
	LC480	06	STh/LT	2.0
		0148	STh	2.2
		0169	STp	2.0
	Dice	06	STh/LT	2.0
		0148	STh	2.2
		0169	STp	2.0
	Dice	06	STh/LT	2.0
		0148	STh	2.2
		0169	STp	2.0

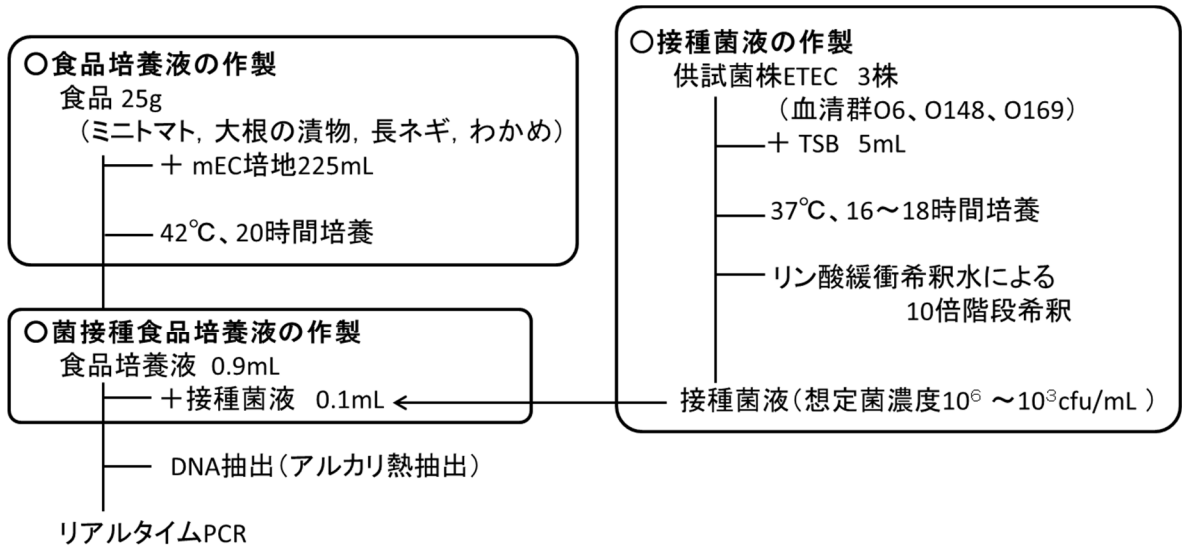


図1 ST及びLT遺伝子検出法の検出感度試験

BHQ (7500 : ABI)

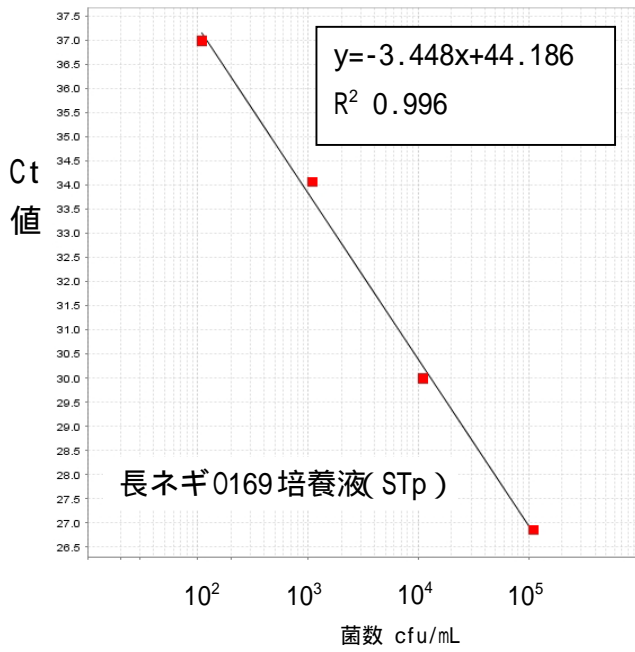


図2 長ネギ 0169 による検量線 (ST)

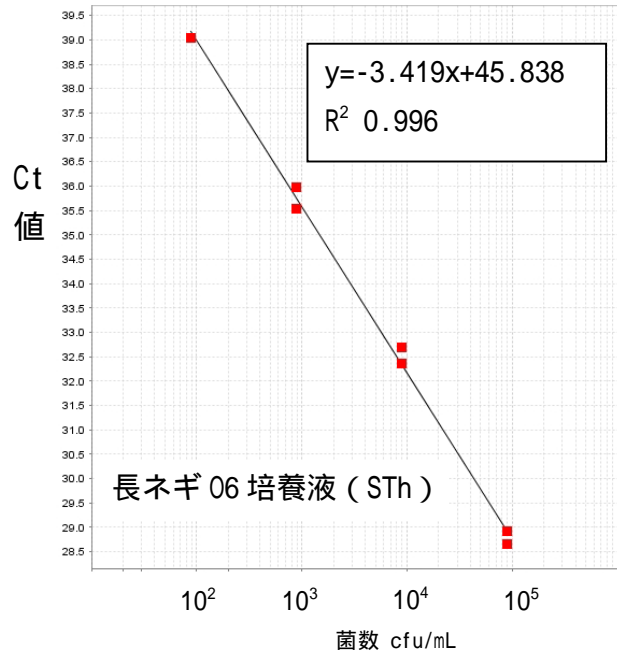


図3 長ネギ 06 による検量線 (ST)

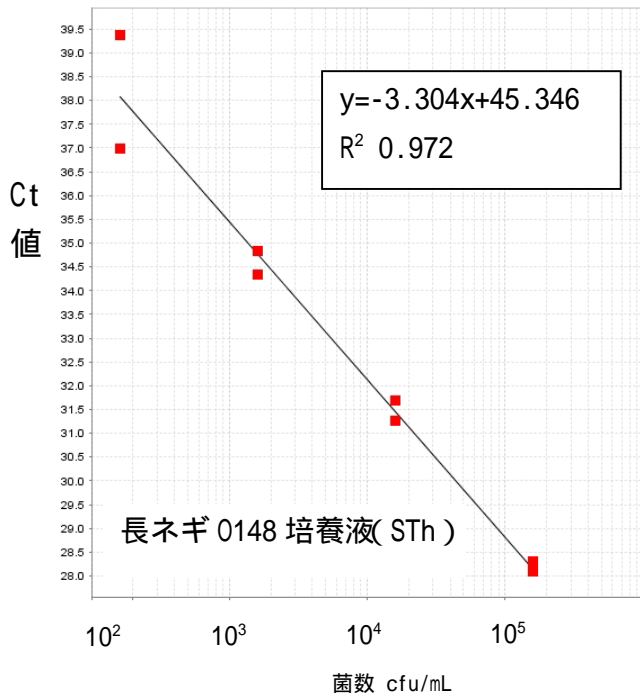


図4 長ネギ 0148 による検量線 (ST)

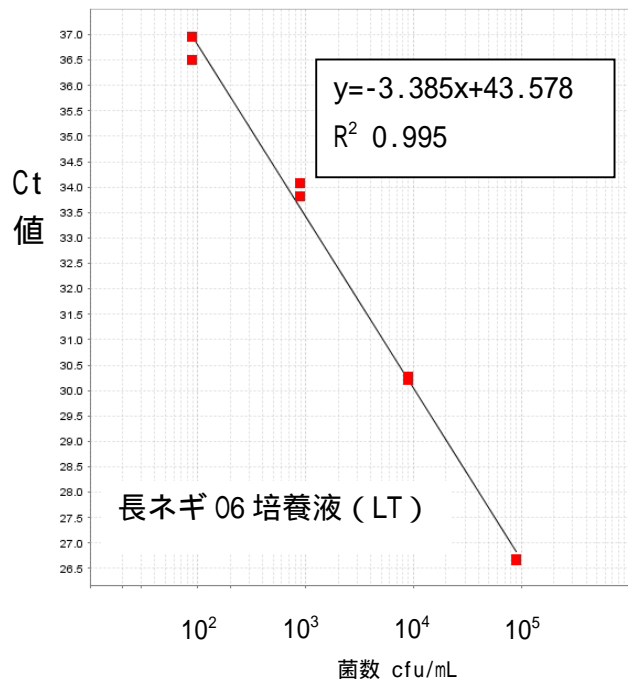


図5 長ネギ 06 による検量線 (LT)

BHQ (ViiA7 : ABI)

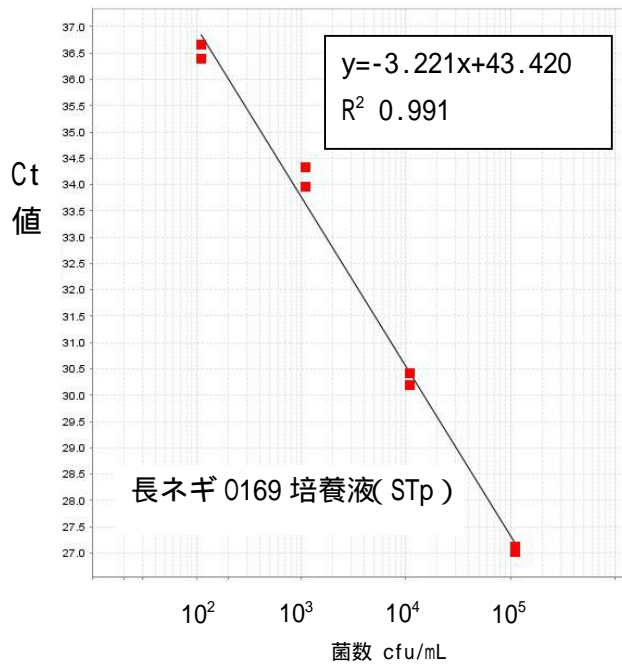


図 6 長ネギ 0169 による検量線 (ST)

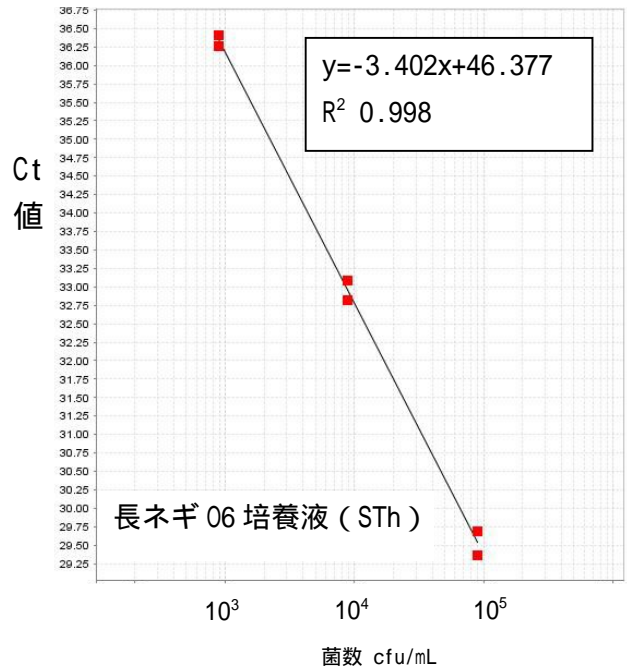


図 7 長ネギ 06 による検量線 (ST)

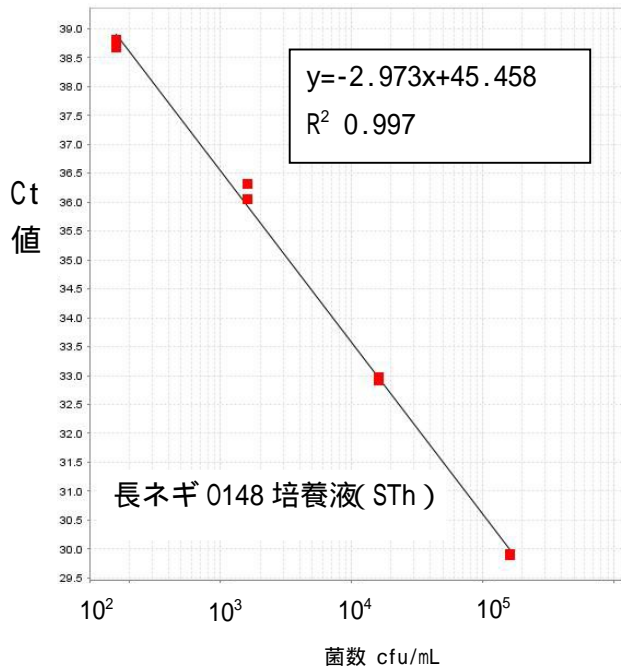


図 8 長ネギ 0148 による検量線 (ST)

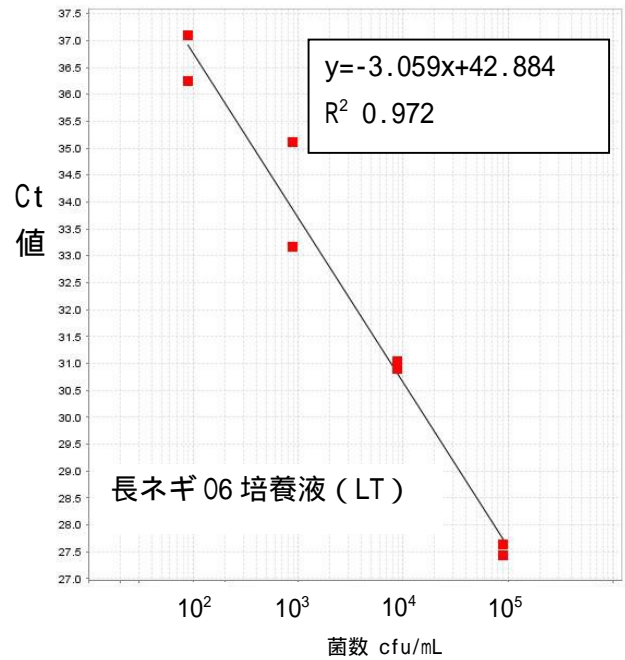


図 9 長ネギ 06 による検量線 (LT)

BHQ (Dice : TAKARA)

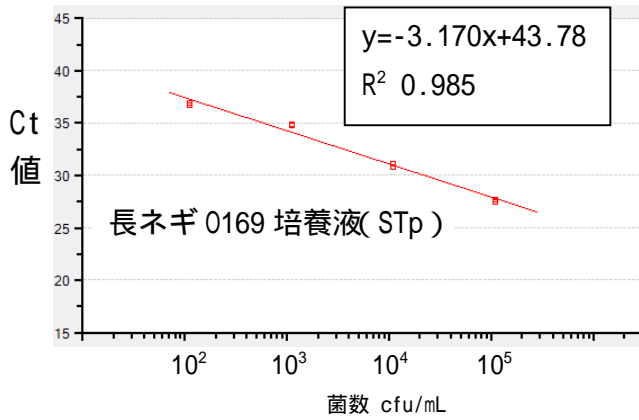


図 10 長ネギ 0169 による検量線 (ST)

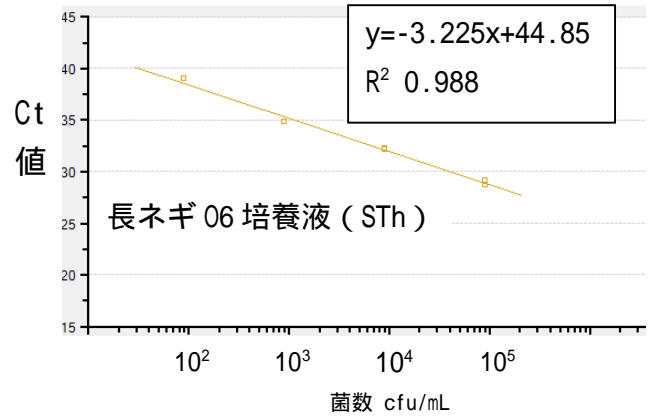


図 11 長ネギ 06 による検量線 (ST)

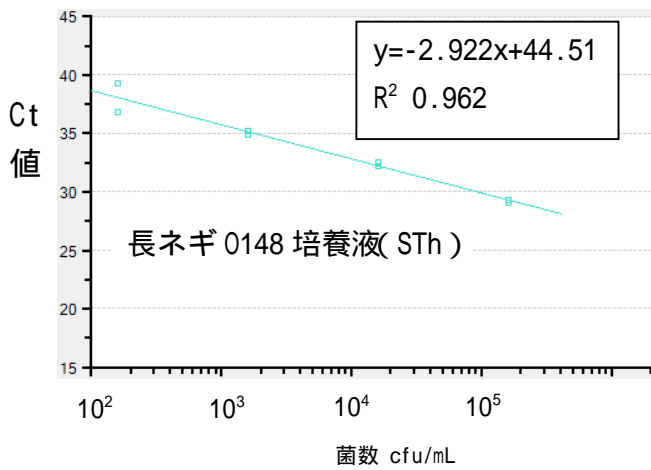


図 12 長ネギ 0146 による検量線 (ST)

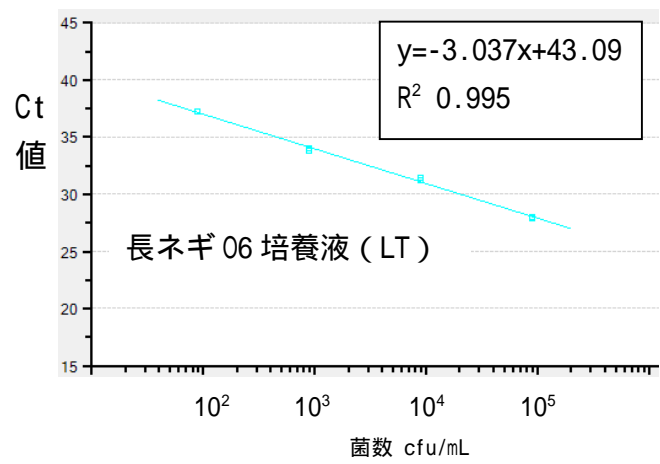


図 13 長ネギ 06 による検量線 (LT)

BHQ (Dice : TAKARA)

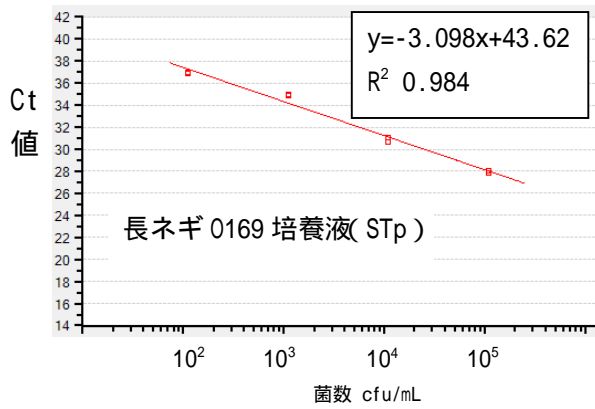


図 14 長ネギ 0169 による検量線 (ST)

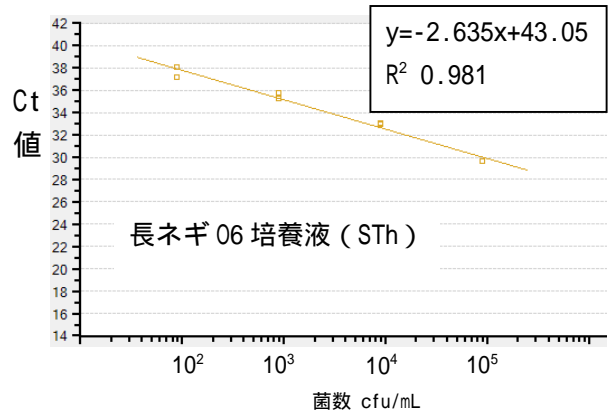


図 15 長ネギ 06 による検量線 (ST)

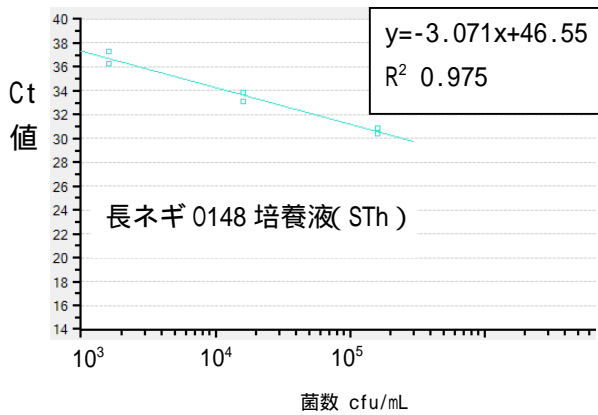


図 16 長ネギ 0148 による検量線 (ST)

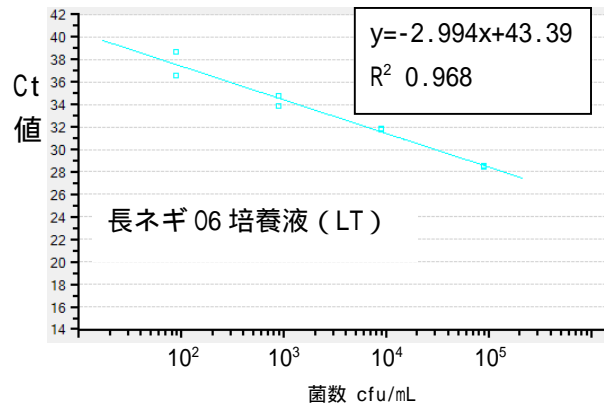


図 17 長ネギ 06 による検量線 (LT)

QSY (7500 : ABI)

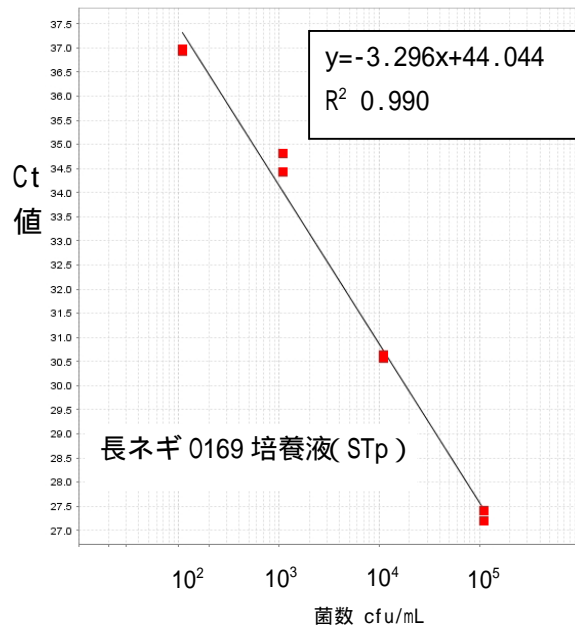


図 18 長ネギ 0169 による検量線 (ST)

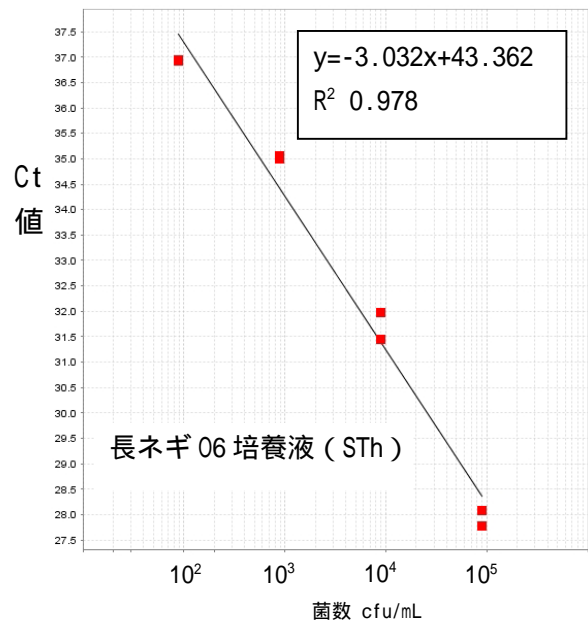


図 19 長ネギ 06 による検量線 (ST)

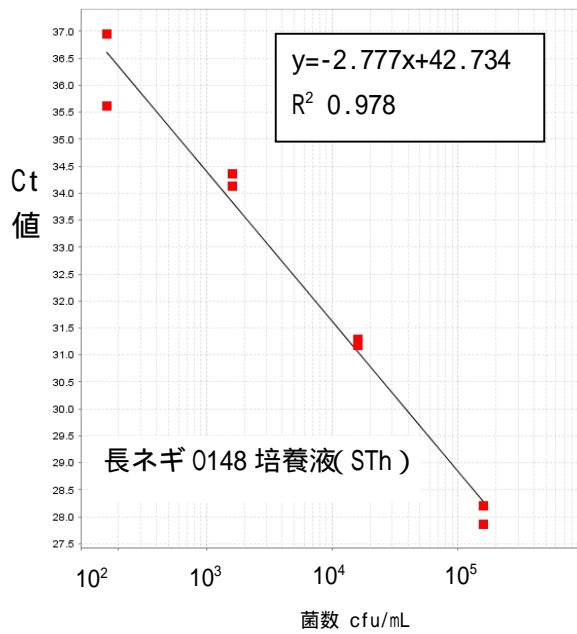


図 20 長ネギ 0148 による検量線 (ST)

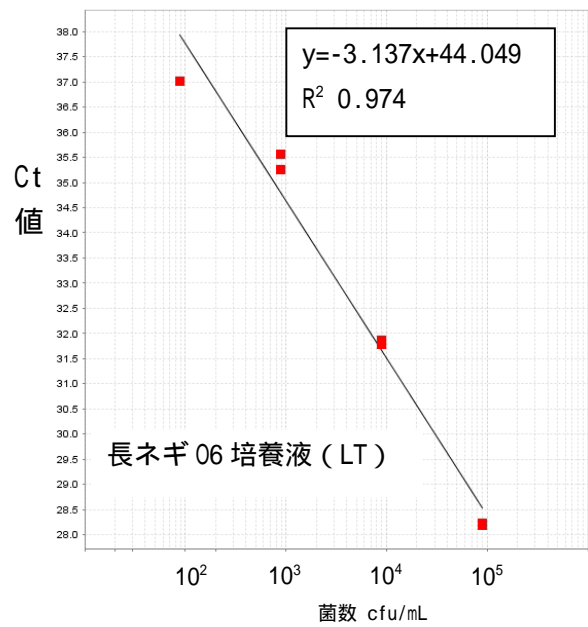


図 21 長ネギ 06 による検量線 (LT)

QSY (ViiA7 : ABI)

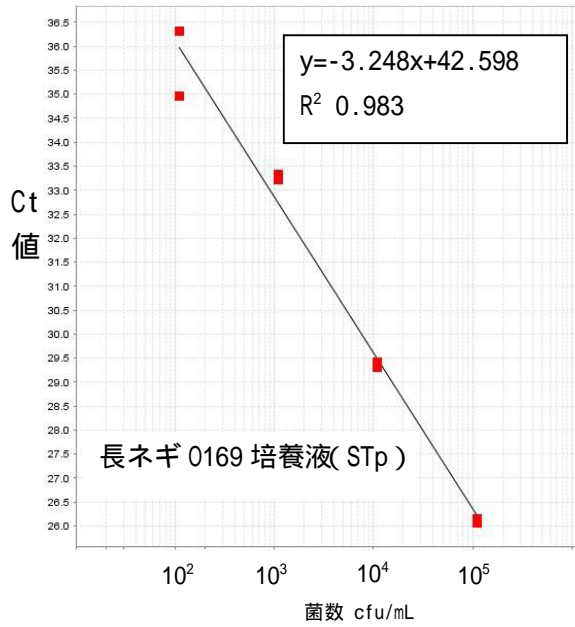


図 22 長ネギ 0169 による検量線 (ST)

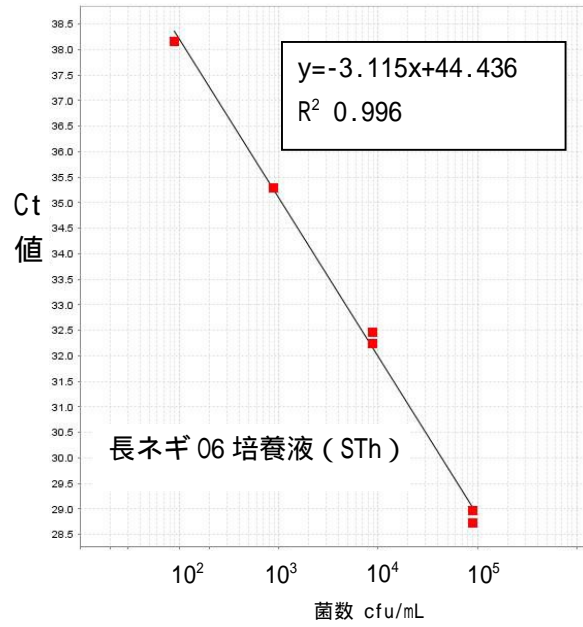


図 23 長ネギ 06 による検量線 (ST)

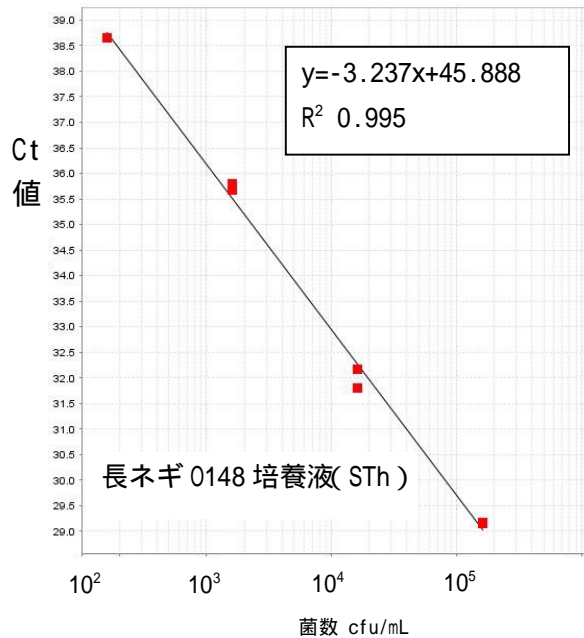


図 24 長ネギ 0148 による検量線 (ST)

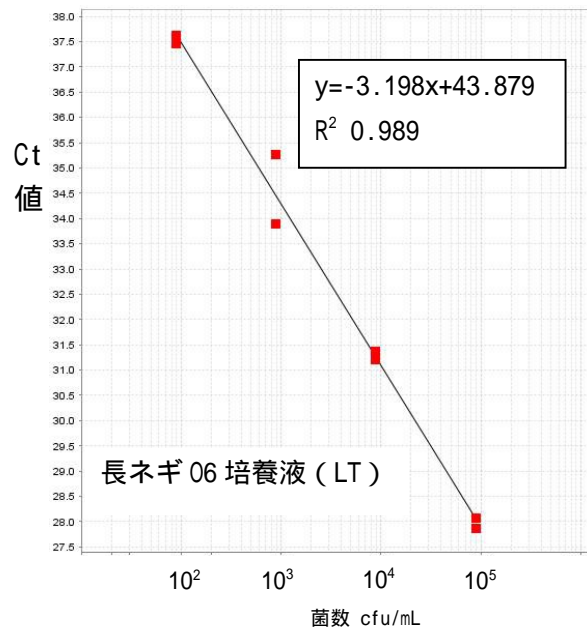


図 25 長ネギ 06 による検量線 (LT)

QSY (Dice : TAKARA)

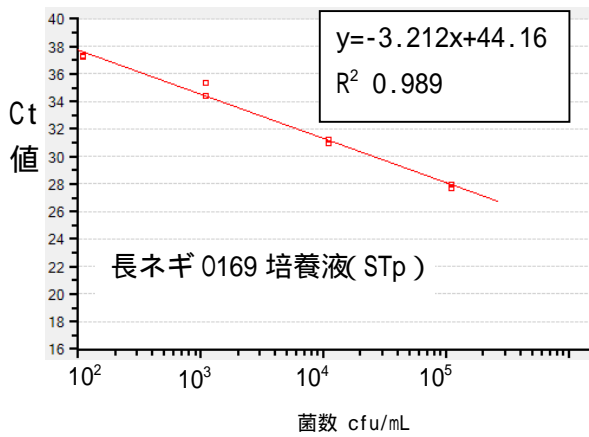


図 26 長ネギ 0169 による検量線 (ST)

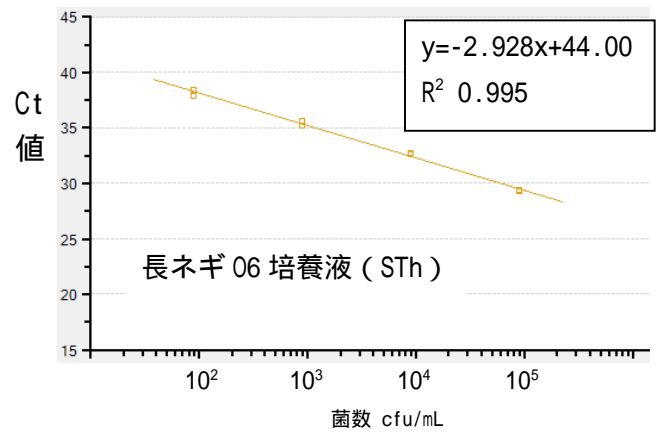


図 27 長ネギ 06 による検量線 (ST)

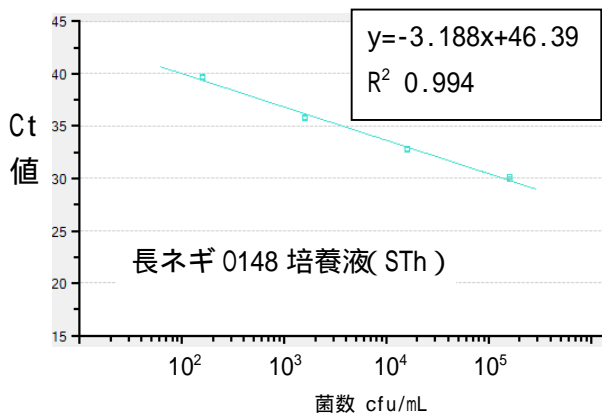


図 28 長ネギ 0148 による検量線 (ST)

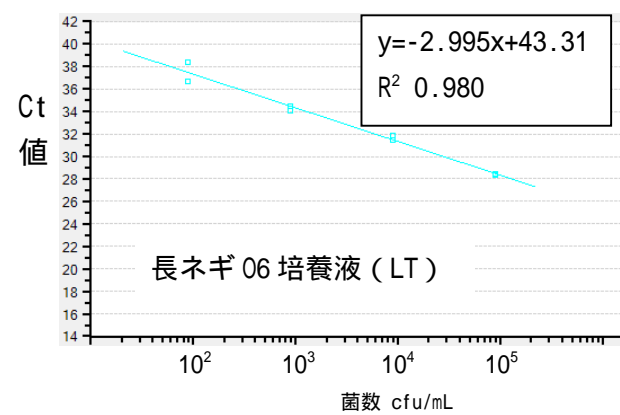


図 29 長ネギ 06 による検量線 (LT)

QSY (Dice : TAKARA)

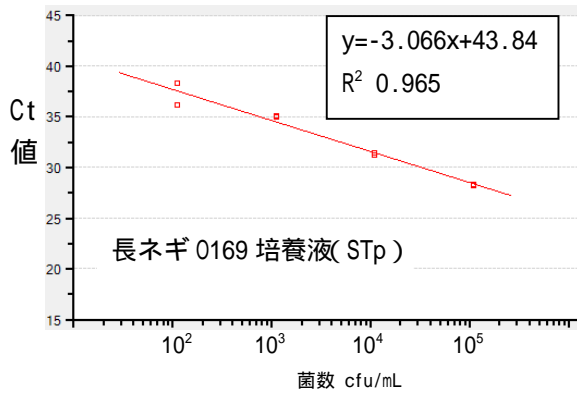


図 30 長ネギ 0169 による検量線 (ST)

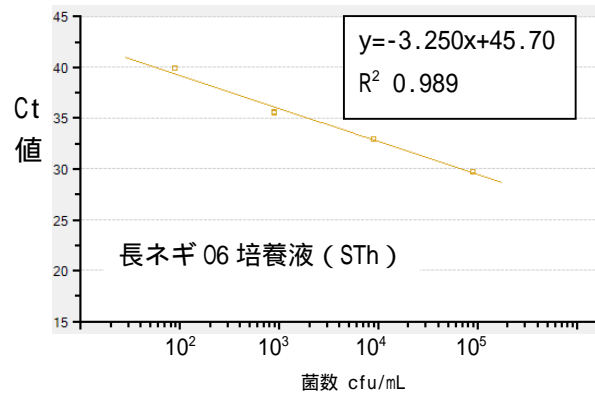


図 31 長ネギ 06 による検量線 (ST)

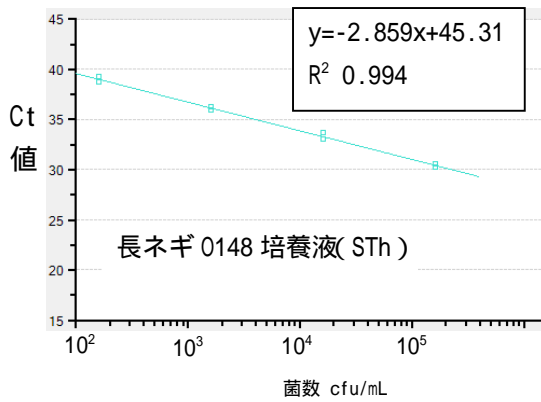


図 32 長ネギ 0148 による検量線 (ST)

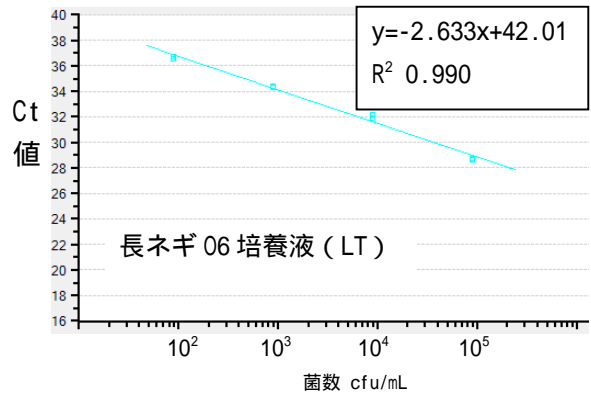


図 33 長ネギ 06 による検量線 (LT)

平成 29 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

食品での統一的検査法の開発

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究報告書

食品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と作製した免疫磁気ビーズの有効性の検討

研究要旨

食品を対象とした ETEC 検査法の有効性を確認するために、複数の施設で一斉に検出を試みるコラボレイティブスタディを実施することになった。そこでコラボレイティブスタディに用いる免疫磁気ビーズ作製方法を検討し、集菌効果の検証を行った。大量の免疫磁気ビーズを作製する時は、一度にまとめて作製すると磁気ビーズと血清(抗体)が均一にならず、磁気ビーズ 1 個あたりに感作される抗体量に差が生じることが懸念されたことから、250 μ l ずつ小分けして作製し、最終的に 1 本にまとめて良く攪拌することで、感作される抗体量が均一である自家調製免疫磁気ビーズを作製することができた。作製した自家調製免疫磁気ビーズは、O148 および O159 いずれの血清群の大腸菌も 10^0 cfu/ml まで検出できたことから、作製した自家調製免疫磁気ビーズは問題がないことが確認でき、コラボレイティブスタディ参加 13 機関に 700 μ l ずつ配布した。

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

研究協力者

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
公益社団法人日本食品衛生協会 甲斐明美

A. 研究目的

ヒトに下痢症を引き起こす大腸菌は、主に5種類に分類されている。すなわち、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)および腸管凝集付着性大腸菌(EAggEC)である。更に、特定の病原因子(*afa*, *astA*, CDT など)を保有するが、上記5種類に分類されない「その他の下痢原性大腸菌」も分類されている。全国で発生する食中毒のうち、下痢原性大腸菌による事例は毎年20~50事例程度である。

一方、厚生労働省による食中毒統計では「腸管出血性大腸菌」と「その他の病原大腸菌」として統計がとられているため、全国で発生するEHEC食中毒の状況を把握することは容易であるが、ETECによる食中毒発生数は、「その他の病原大腸菌」として統計がとられているため、正確に把握することは難しい。

昨年までの本研究で、全国および東京都で発生したETECによる食中毒・集団および散発下痢症事例について詳細な解析を行った。その結果、ETEC食中毒の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、原因となった大腸菌の血清群はO6, O25, O27, O148, O153, O159, O169の7血清群が多く占めていることが明らかとなった。

これら食中毒の感染源や原因食品を

さらに解明するためには、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の課題となっている。

今回、食品を対象としたETEC検査法の有効性を確認するために、複数の施設で一斉に検出を試みるコラボレイティブスタディを実施することになった。そこでコラボレイティブスタディに用いる免疫磁気ビーズ作製方法を検討し、集菌効果の検証を行った。更に作製した免疫磁気ビーズの使用期限を検証するために、作製後4週で約1年間保存した自家調製免疫磁気ビーズを用いて集菌し、作製直後の集菌効果と比較した。

またこれまでの検討で得られた知見を基に、自家製免疫磁気ビーズの作製方法について、詳細なマニュアルを作製した。

B. 研究方法

1. コラボレイティブスタディに使用する免疫磁気ビーズの作製

1) 供試菌株

O148群(ST産生)およびO159群(ST産生)を各1株ずつ用いた。

2) 血清の選択

コラボレイティブスタディで用いるETECの血清群であるO148とO159の血清を用いた。血清は市販の病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を使用

した。より抗体価の高い血清を選択するために、2種類の異なるロット番号の血清(31-5126, 28-4021)を用い、供試菌株(生菌)とスライド凝集法で反応させ、最も短時間で強い凝集が認められた血清を免疫磁気ビーズ作製用に使用した。

3) 免疫磁気ビーズの作製方法

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

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

4) 自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果の検討

大腸菌 O148 および O159 を TSB に接種し、37℃, 18~20 時間培養した。この培養液を滅菌したリン酸緩衝液(PBS)で 10^{-5} ~ 10^{-8} まで 10 倍階段希釈を行い、菌液の調製を行った。希釈した菌液 1ml を対象に自家調製免疫磁気ビーズを用いて集菌操作を行い、最終的に 10mM PBS 0.1ml に懸濁後、懸濁液 10 μ l ずつを 2 枚の普通寒天平板に滴下し、塗抹分離を行った。37℃ で 18~20 時間培養後、各平板に発育した集落数を計測し、集菌効果を確認した。

2. 自家調製免疫磁気ビーズの保存性に関する検討

自家調製した免疫磁気ビーズの使用

期限を検証するために、作製した免疫磁気ビーズを 4℃ の冷蔵下で約 1 年間保存した後、集菌効果を調べた。

1) 各血清群に対する免疫磁気ビーズの作製と保存

O6, O25, O27, O148, O153, O159, O169 の 7 血清群に対する免疫磁気ビーズを別添の「免疫磁気ビーズ作製マニュアル」に従って作製した。その後、4℃ の冷蔵庫に 1 年間保存した。

2) 保存後の自家調製免疫磁気ビーズを用いた集菌効果の検証

1 年間冷蔵保存後の自家調製免疫磁気ビーズを用いて 1-4) と同様の方法で集菌効果を確認した。使用した分離平板は、SMAC 寒天、抗生物質加 SMAC 寒天、クロモアガー-STECC (基礎培地)、DHL 寒天である。

C. 研究結果

1. コラボレイティブスタディに使用する免疫磁気ビーズの作製

1) 血清の選択

大腸菌 O148 および O159 の診断用免疫血清(デンカ生研)の各 2 ロットについて、生菌を用いたスライド凝集反応を行った成績を表 1 に示した。いずれの血清も短時間で強い凝集が認められ、凝集反応性に差は認められなかった。今回はロット番号 31-5126 血清を用いて免疫磁気ビーズの調製を行った。

2) 免疫磁気ビーズの作製方法

コラボレイティブスタディに使用す

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

3) 作製した免疫磁気ビーズの集菌効果の検証

作製した自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果の結果を表 2 に示した。O148 および O159 はともに 10^0 cfu/ml まで検出可能であった。以前に検討した結果と同等の成績であったことから、作製した自家調製免疫磁気ビーズは性能に問題がないことが確認できた。

2. 自家製免疫磁気ビーズの保存性に関する検討

1) 冷蔵保存した自家調製免疫磁気ビーズを用いた集菌効果

作製した免疫磁気ビーズの使用期限を検証するために、1 年間保存した免疫磁気ビーズを用いて集菌効果を検討した。免疫磁気ビーズを作製直後に実施した集菌結果を表 3 に、免疫磁気ビーズを 4 の冷蔵下で約 1 年間保存した後行っ

た集菌結果を表 4 に示した。保存後では血清群 O6 は 10^4 cfu/ml までの検出であったが、O25 および O159 は 10^2 cfu/ml まで、O27、O148、O153、O169 は 10^1 cfu/ml まで検出が可能であった(表 3、および表 4)。

2) 分離平板別発育状況

1 年間冷蔵保存した免疫磁気ビーズを用いて集菌操作を行い、各分離平板上に出現した菌の発育状況を調べた。分離平板別に最小検出菌数を比較した結果、供試した各血清群の大腸菌は、いずれの分離平板でも発育は良好であった(表 5)。分離平板ごとに発育した菌数を比較すると、O25、O153、O159 では抗生物質の入っていない SMAC 寒天、クロモアガー-STEPC (基礎培地)、DHL 寒天のいずれの平板でも同じような発育状況(菌数)であったが、抗生物質の入っている SMAC 寒天では 1 オーダー程度低い菌数であった。全体的にも抗生物質の入っている SMAC 寒天での発育は、やや抑制傾向であった。

D. 考察

食品培養液から ETEC を検出するためには、リアルタイム PCR 法を用いて毒素遺伝子をスクリーニングし、陽性となった検体を対象に免疫磁気ビーズを用いて集菌する方法が最も効率が良い方法である。現在、EHEC の検査に用いる免疫磁気ビーズは、複数種類が市販されているが、ETEC の血清群(O6、O25、O27、O148、O153、O159、O169)を検出するための免疫磁気ビーズは、市販

されていない。そこで複数機関で一斉検出するコラボレイティブスタディに提供するために免疫磁気ビーズの作製および集菌効果の検討を行った。1 血清群あたり 10ml と大量の自家調製免疫磁気ビーズを作製する必要があったが、まとめて一度に大量の免疫磁気ビーズを作製すると、磁気ビーズと血清が均一にならず、磁気ビーズ 1 個あたりに感作される抗体量に差が生じることが懸念された。そこで 250 μ l ずつ小分けして作製し、最終的に 1 つにまとめて良く攪拌することで、感作される抗体量が均一である自家調製免疫磁気ビーズを作製することができた。調製した免疫磁気ビーズの性能を評価するために、菌液を用いた集菌を行い集菌効果の検証を行った結果、O148、O159 のいずれの血清群も 10^0 cfu/ml まで検出できたことから、作製した自家調製免疫磁気ビーズは問題がないことが確認できた。コラボレイティブスタディでは各機関に 700 μ l ずつ 13 か所に配布した。

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

えられた。

分離平板ごとに菌株の発育状況を比較すると、抗生物質が入っていない培地と比較して抗生物質を添加した培地では 1 オーダー程度発育した菌数が少なかった。食品由来の夾雑菌を抑制するには非常に有効であるが、同時に目的菌も多少の抑制がかかることが明らかとなった。汚染菌量が少ない場合や損傷菌等を考慮すると、抗生物質を添加している培地としていない培地を必ず併用する必要があると考えられた。

E. 結論

大量の免疫磁気ビーズを作製する時は、一度にまとめて作製すると磁気ビーズと血清（抗体）が均一にならず、磁気ビーズ 1 個あたりに感作される抗体量に差が生じることが懸念された。そこで、250 μ l ずつ小分けして作製し、最終的に 1 本にまとめて良く攪拌することで、感作される抗体量が均一である自家調製免疫磁気ビーズを作製することができた。作製した自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果を検討した結果、O148、O159 いずれの血清群も 10^0 cfu/ml まで検出できたことから、作製した自家調製免疫磁気ビーズは問題がないことが確認できた。コラボレイティブスタディでは各機関に 700 μ l ずつ 13 か所に配布した。

作製した自家調製免疫磁気ビーズの保存性を検討するために、作製後 4 の冷蔵庫で 1 年間保管した自家調製免疫磁気ビーズを用いて、集菌効果の検証を行

った。作製直後のデータと比較すると、いずれの血清群も1オーダー程度検出率が落ちている成績であったが、いずれも 10^3 cfu/ml 菌液を用いた場合は集菌効果が認められることから、免疫磁気ビーズを自家調製後、1年間程度は使用できるものと考えられた。

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

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
準備中

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1. 市販血清の大腸菌(生菌)に対する凝集反応性

血清群	血清のロット(デンカ生研)	
	31-5126	28-4021
O148	3+*	3+
O159	3+	3+

* スライド凝集法で実施

表2. コラボレイティブスタディに用いるための
自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果

血清群	PBS中の各血清群菌の菌数(cfu/ml)			
	10^3	10^2	10^1	10^0
O148	$\geq 3+*$	2+	1+	1+
O159	$\geq 3+$	3+	2+	1+

* 2枚の普通寒天平板上に発育した集落数の平均
1+:1~9個, 2+:10~99個, 3+:100~999個

表3. 調製直後の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	NT	1+*	-	-	-	-
O25	≥3+	3+	2+	1+	NT	-
O27	NT	≥3+	3+	2+	1+	-
O148	NT	≥3+	2+	2+	1+	-
O153	≥3+	3+	1+	1+	NT	-
O159	NT	≥3+	2+	1+	1+	-
O169	≥3+	3+	2+	1+	NT	-

* SMAC寒天上に発育した集落数

1+:1~9個, 2+:10~99個, 3+:100~999個

NT:実施せず

表4. 調製後1年間保存した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	1+*	-	-	-	NT	-
O25	≥3+	2+	1+	-	NT	-
O27	≥3+	3+	2+	1+	NT	-
O148	≥3+	2+	1+	1+	NT	-
O153	≥3+	3+	2+	1+	NT	-
O159	≥3+	2+	1+	-	NT	-
O169	≥3+	2+	2+	1+	NT	-

* SMAC寒天平板上に発育した集落数

1+:1~9個, 2+:10~99個, 3+:100~999個

NT:実施せず

表5. 各分離平板上の発育状況

血清群	最小検出菌数(cfu/ml)			
	SMAC	抗生物質加 SMAC	クロモアガー STEC(基礎培地)	DHL
O6	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ³
O25	10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ²
O27	10 ¹	10 ²	10 ²	10 ¹
O148	10 ¹	10 ³	10 ²	10 ¹
O153	10 ¹	10 ²	10 ¹	10 ¹
O159	10 ²	10 ³	10 ²	10 ²
O169	10 ¹	10 ²	10 ²	10 ¹

免疫磁気ビーズ作製マニュアル

試薬

- ・血清：病原大腸菌免疫血清（デンカ生研）あるいは同等品
- ・磁気ビーズ：Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG
(ThermoFisher SCIENTIFIC 社製，ベリタス社販売)
 - #DB11203 Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG (2ml)
 - #DB11204 Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG (10ml)

- ・0.1% BSA 加 PBS

PBS の作製

NaH₂PO₄ · H₂O 0.157 g

Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.98g

NaCl 8.1 g

D.W. 900ml に溶解させオートクレーブ滅菌する。

1%BSA 溶液の作製

BSA (SIGMA® ALBUMIN, BOBINE #A-2153, あるいは同等品) 1g

D.W. 100ml に溶解させる。

このとき，無理に溶かすと泡立ってしまうので，一晩冷蔵庫内に放置してゆっくり溶かす。溶解後ろ過滅菌する。

と を合わせる。

- ・10mM PBS (pH7.4)

Phosphate Buffered Saline tablet (Sigma #P4417-100TAB, あるいは同等品)

器具

- ・1.5ml マイクロチューブ
- ・磁気ビーズ分離用磁石
DynaMag-2 (ThermoFisher SCIENTIFIC 社製，ベリタス社販売) #DB12321
マグネチックスタンド (デンカ生研) #240125
その他同様の機器
- ・攪拌器 (チューブローターなど)

作製方法

1. 1.5ml マイクロチューブを用意する。
2. Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG をよく混和し，1.5ml マイクロチューブに 250 μ l 分注する。
3. 0.1% BSA 加 PBS を 1ml 加え軽く転倒混和する（洗浄 1 回目）。
4. 磁気ビーズ分離用磁石を用いて磁気ビーズを集めた後，上清を取り除く。
磁気ビーズを吸い取らないように注意する。
5. 磁気ビーズ分離用磁石から外し，0.1% BSA 加 PBS を 1ml 加え軽く転倒混和する（洗浄 2 回目）。
6. 磁気ビーズ分離用磁石を用いて磁気ビーズを集めた後，上清を取り除く。
磁気ビーズを吸い取らないように注意する。
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. 攪拌器（ローターなど）を用いて，室温で 2 時間，転倒混和させながら磁気ビーズと血清（抗体）を反応させる。
10. 磁気ビーズ分離用磁石を用いて磁気ビーズを集め，上清を完全に取り除く。
11. 10mM PBS（pH7.4）を 250 μ l 加え，磁気ビーズを再浮遊させる。
12. 4℃ で保管する。

平成29年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

食品での統一的検査法の開発

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究報告書

食品での腸管毒素原性大腸菌の検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

研究要旨

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

研究協力者

岩手県環境保健研究センター	岩淵香織
さいたま市健康科学研究センター	土屋彰彦
埼玉県衛生研究所	大塚佳代子
東京都健康安全研究センター	小西典子
杉並区衛生検査センター	山崎匠子
静岡市環境保健研究所	和田裕久
富山県衛生研究所	磯部順子
三重県保健環境研究所	永井祐樹
奈良県保健研究センター	吉田孝子
広島県立総合技術研究所保健環境センター	平塚貴大
一般財団法人 東京顕微鏡院	森 哲也
横浜検疫所 輸入食品検疫検査センター	稲垣俊一
神戸検疫所 輸入食品検疫検査センター	白石祥吾

A. 研究目的

病原大腸菌（下痢原性大腸菌）の一種である腸管毒素原性大腸菌（EPEC）は、東南アジアなどに海外渡航し、本邦への帰国時または帰国後に下痢を発症する海外渡航下痢症の原因として知られている。本菌は、主に不衛生な水や非加熱の野菜などの摂取によって食中毒を引き起こす。また、渡航歴のない患者も報告されており、国内での集団食中毒も例年発生している。このため、汚染食品の調査や汚染制御を行う必要があるが、EPECの食品での検査法は日本および米国やEUなど諸外国でも本菌特異的な検出法は策定されていない。病原大腸菌の一種で最も重篤化する腸管出血性大腸菌では、日本および諸外国において検査法が設定されており、腸管出血性大腸菌の重要な病原因子である Vero toxin (VT) 遺伝子（または志賀毒素遺伝子、stx）の有無を食品培養液から検出することによって腸管出血性大腸菌の汚染の有無のスクリーニングが行われている。また、感染の多い O 血清群 4～6 種類を対象にしており、VT 遺伝子スクリーニングで陽性になった検体について主要な O 血清群を対象に遺伝子検出を 2 次スクリーニングとして行っている。この方法を参考にして、EPEC での主要な O 血清群を決定し、それらを対象とした食品での検査法を確立するために各種方法の検討を行い、優れた方法を組み合わせる多機関によるコラボレイティブ・スタディを実施し評価することとした。先行研究にて、主要 O 血清群は、O6、O25、O27、O148、O153、O159 および O169 の計 7 血清群であり、それらは mEC 培地中で 42 にて良好に増殖する

ことが確認されている。本研究では、そのうちの O148 および O159 を代表的血清群に選定して試験を行った。また、保有する病原因子には耐熱性エンテロトキシン（ST：ヒト由来株から発見された ST_h およびブタ由来株から発見された ST_p）および易熱性エンテロトキシン（LT）があり、それらの遺伝子を遺伝子検出の対象としてリアルタイム PCR 法を検討し決定した。ただし、LT のみを保有する菌株は少ないため本研究では ST_h 保有株および ST_p< 保有株を供試した。

B. 研究方法

(1) コラボレイティブ・スタディの概要

1. 参加機関数：13 試験検査機関

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

2. 実施回数：2 回

試験対象血清群：第 1 回；血清群 O159 ST_h 陽性（平成 29 年 7 月 24 日 月曜日 検体着）、第 2 回；O148 ST_p< 陽性（8 月 29 日 火曜日 検体着）

3. 試験食品検体：キュウリ、長ネギ

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

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

4. 試薬等の事前配布と準備

1) 各機関で必要な機器および器具等

恒温器(42±1、37±1)

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

免疫磁気ビーズ法に必要なマグネットスタンド

マイクロチューブ(遺伝子抽出用、免疫磁気ビーズ法)

スライドグラス(血清凝集確認用)

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

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

チップ

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

2) 配付試薬等

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

3) 事前の試薬調製

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

4) 事前の確認事項

ABIリアルタイムPCR(機種ABI PRISM 7500または7500fast)の稼働、操作方法の確認を行った。なお、Threshold Lineを各機器のオート設定およびマニュアル設定(Threshold Line; 0.25、baseline; Auto)の2種類でCt値を解析した。

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

5) 陽性コントロールについて

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

(2) コラボレイティブ・スタディ用検体の作製

1. 検体

国立衛研にて市販のキュウリ(国産)および長ネギ(国産)を購入し、検体と

して使用した。事前に ST 遺伝子および LT 遺伝子陰性であることを試験し確認した。

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

2. 接種菌液の調製

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

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

3. 検体の調製

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

4. 検体の送付

検体 19 袋の間に小型温度記録計(サーモマネジャー)を挟んでバイオセーフティー対応 2 次容器および 3 次容器に入れた。3 次容器とジュラルミンケースの間に保冷剤を 3 個入れ、これらをゆうパック(冷蔵)にて送付した。

(3) コラボレイティブ・スタディの試験実施手順(図 1)

1 日目

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

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

2 日目

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

1. 直接塗抹法：

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

2. 免疫磁気ビーズ法：

免疫磁気ビーズ液 25 µl に 1.0 ml 培養液を加え、デンカ生研を参照した以下の方法に従い免疫磁気ビーズ濃縮法を行った。

各チューブの洗いは 1.0 ml の洗浄液（PBS または滅菌生理食塩水）を用いた。最終浮遊液は 0.1 ml とした。10 µl ずつ各分離培地 2 枚に接種し画線した。コロニーが多く出現するように画線した。その後、37 ± 1℃にて 18～24 時間

培養した。

[デンカ生研操作法を参照]

1) 25 µl をマイクロ遠心チューブに滴加した。

2) 検体 1 ml をマイクロ遠心チューブに採取した。

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

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

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

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

7) 上記 4)～6)の操作を再度繰り返して磁気ビーズを洗浄した。

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

分離培地に画線した。

3. DNA 抽出および ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(インターナルコントロール: IC を含む):

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

[アルカリ熱抽出法]

培養液 0.1 ml を 10,000Xg、10 分間遠心し、上清を取り除いた沈渣に滅菌した 50 mM NaOH を 85 μ l 添加して再浮遊させ、100 °C で 10 分間加熱し冷却後、滅菌した 1 M Tris-HCl (pH 7.0) 15 μ l で中和した。それを遠心 (10,000Xg、10 分間) し上清を検体とした。アルカリ存在下では DNA が分解しやすいため、抽出後は氷上で静置し速やかに中和した。直ちに使用しない場合には 0~4 °C で保存し、4 時間以内に使用した。時間内にリアルタイム PCR を行えない場合は、-80 °C にて保存し、翌日以降にリアルタイム PCR に使用した。使用后、残ったアルカリ熱抽出物を国立衛研より連絡があるまで -80 °C にて保存した。

[ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(インターナルコントロール: IC を含む)]

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

・ 2 × Master Mix (Environmental Mastermix) 12.5 μ l

・ プライマー

STh-F (10 μ M)、STh-R (10 μ M)、STp-F (10 μ M)、STp-R (10 μ M)、LT-F (10 μ M)、

LT-R (10 μ M) を 各 0.5 μ l

16SRna-F (20 μ M)、16SRna-R (20 μ M) 各 0.2 μ l

[配列]

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

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

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

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

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

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

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

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

・ プローブ

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

16SrRNA-P (5 μ M) VIC-BHQ ラベル 0.5 μ l

[配列]

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

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

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

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

・ D.W. 2.7 μ l

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

1 検体につき2反応行った。反応時に
はアルカリ熱抽出物の代わりに滅菌蒸
留水などを用いて陰性コントロールを
設定した。Positive control は、第1
回では O159(STh 陽性)、第2回では O148
(STp< 陽性) を使用した。

3日目

分離菌の確認:

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

各平板培地上での典型的コロニーの
色は、SMAC では、一般的大腸菌と同様
に赤色のコロニーを形成し、クロモアガ
ーSTEC では、腸管出血性大腸菌と同様
の藤色のコロニーを形成した。また、必
要に応じて追加で釣菌した。それらを普
通寒天培地等に接種し 37 ± 1 にて 18
~24 時間培養した。選択培地上のコロ
ニーから直接に血清試験は行わなかつ
た。

前日に実施されなかったリアルタイ
ム PCR はこの日に実施した。

4日目

分離菌の確認:

普通寒天培地等に生育したコロニー
を免疫血清 (O148 および O159) にて凝
集反応を確認した。加熱菌体での凝集試
験が望ましいが、今回は生菌での特異的
凝集 (自己凝集しない) が判定できた場
合は加熱菌体での凝集を確認しなくて
も良いとした。

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

前々日に実施されなかったリアルタ
イム PCR はこの日に実施した。

試験終了後:

結果表に記入した試験結果およびリ
アルタイム PCR のランファイル (sds 形
式または eds 形式) を、事務連絡担当者
にメールにて返送した。また、各検体に
添付された小型温度記録計 (サーモマネ
ジャー) および検体送付缶 (梱包付属品
も含む) を試験終了後、着払い (クロネ
コヤマト) にて返送した。予備培養液お
よびアルカリ熱抽出物を再試験の依頼
や事務連絡担当者への送付に備え、廃棄
の依頼が届くまで保管した。

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

C. 研究結果

(1) 血清群 0159

1) 検体

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

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

2) 検体の輸送および増菌培養での温度

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

3) 陽性用検体への菌の接種

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

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

Auto 解析の結果、キュウリ検体にお

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

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

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

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

5) 直接塗抹法での検出結果

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

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

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

6) 免疫磁気ビーズ法での分離結果

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

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

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

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

7) 検出感度と特異性

血清群 O159 の結果を検出方法別に感度および特異性を算出した(表 5)。

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

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

免疫磁気ビーズ法では、高菌数接種においては、いずれの検体でも、分離に用いた2種類の寒天培地(抗生物質加SMACと抗生物質加クロモアガーSTEC)のいずれも1.000であった。低菌数接種においては、キュウリ検体では、2種類の寒天培地のいずれも0.974であり、長ネギ検体では、抗生物質加クロモアガーSTECで1.000、抗生物質加SMACで0.974であった。

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

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

陽性であれば反応系としては正しく実施されたことがわかり、真の陰性(偽陰性ではない)ことが確認できるために設定しているため、統計解析には含めなかった。キュウリ検体では、ST・LT遺伝子検出リアルタイムPCR法(ICを含む)のAuto解析は、直接塗抹法のクロモアガーSTECおよび抗生物質加SMAC、ST・LT遺伝子検出リアルタイムPCR法(ICを含む)のマニュアル解析よりも検出率が有意に低かった。長ネギ検体では、直接塗抹法のSMACおよびST・LT遺伝子検出リアルタイムPCR法(ICを含む)のAuto解析は、直接塗抹法のSMAC以外の培地、免疫磁気ビーズ法の両培地、ST・LT遺伝子検出リアルタイムPCR法(ICを含む)のマニュアル解析よりも検出率が有意に低かった。

(2) 血清群 0148

1) 検体

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

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

2) 検体の輸送および増菌培養での温度

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

3) 陽性用検体への菌の接種

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

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

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

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

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

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

5) 直接塗抹法での検出結果

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

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

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

6) 免疫磁気ビーズ法での分離結果

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

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

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

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

7) 検出感度と特異性

血清群0148の結果を検出方法別に感度および特異性を算出した(表10)。

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

は、両菌ともに両解析において全検体が 1.000 であった。

直接塗抹法では、高菌数接種においては、キュウリ検体では、SMAC で 0.615、SMAC 以外の 3 種類の寒天培地（クロモアガー-STEPC、抗生物質加 SMAC、抗生物質加クロモアガー-STEPC）において 1.000 であった。長ネギ検体では、抗生物質加 SMAC で 0.641、抗生物質加クロモアガー-STEPC で 0.513、クロモアガー-STEPC で 0.462、SMAC で 0.231 であった。低菌数接種においては、キュウリ検体では、SMAC で 0.641、SMAC 以外の 3 種類の培地において 0.872 以上であった。長ネギ検体では、抗生物質加 SMAC で 0.333、抗生物質加クロモアガー-STEPC で 0.308、SMAC で 0.179、クロモアガー-STEPC で 0.154 であった。

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

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

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

統計解析を行った結果、Outlier の機関はなかったため、全機関のデータを用いて検出方法間の有意差検定を行った。キュウリ検体では、直接塗抹法の SMAC は、直接塗抹法の SMAC 以外の培地、免疫磁気ビーズ法の両培地、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のいずれの解析よりも検出率が有意に低かった。長ネギ検体では、直接塗抹法の SMAC は、免疫磁気ビーズ法の両培地および ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のいずれの解析よりも検出率が有意に低く、直接塗抹法のクロモアガー-STEPC は、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)のマニュアル解析よりも検出率が有意に低かった。

D. 考察

EPEC 06、025、027、0148、0153、0159 および 0169 の計 7 血清群を対象とした食品での検査法の確立のために、13 試験検査機関によるコラボレイティブ・スタディを行った。EPEC と同じく病原大腸菌の一種である腸管出血性大腸菌を参照し、既に確立され通知されている食品での腸管出血性大腸菌の検査法の通知(「食品からの腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157 の検査法」平成 26 年 11 月 20 日付け食安監発 1120 第 1

号)を参考にして同様の増菌培養法および分離培養法を利用し、また、遺伝子スクリーニングの考え方も取り入れて、効果的かつ効率的な検査法とすることとした。本コラボレイティブ・スタディでの試験法は、mEC 培地中での 42 での増菌培養法、免疫磁気ビーズ法と各選択分離培地の組み合わせによる分離培養法および遺伝子検出法で構成された。食品検体には、ETEC の食中毒の原因食品として野菜や水が多いことがいわれていることから、ETEC の食中毒の原因食品であった長ネギ、また、腸管出血性大腸菌の食中毒の原因食品として報告があるキュウリを選定した。また、3 試験研究機関で実施した先行研究にて、主要 7 血清群のうち本コラボレイティブ・スタディに供試しなかった 5 血清群についても野菜などの多種の食品に菌を接種して各種検出法を検討した。その結果、優れることが判明した検査法を採用してコラボレイティブ・スタディの試験を構成した。

その結果、検出感度(表 5、10)は、高菌数接種(20.5~37.0 cfu/25 g)では、キュウリでの血清群 0148 では直接塗抹法の SMAC 以外の全ての方法、血清群 0159 では全ての検出方法で 1.000 であった。長ネギでの血清群 0159 では直接塗抹法の SMAC 以外の全ての方法で 1.000 であった。本研究での高菌数接種レベルの菌数であれば高率に ETEC が検出されることが判明した。しかし、長ネギでの血清群 0148 では、最も高い感度が ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)の 0.69 であった。低菌数接種(4.1~7.4 cfu/25 g)では、キュウリでの血清群 0148 では ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)で 0.923、直接塗抹法の SMAC で

0.641、それ以外の培地で 0.872 以上、免疫磁気ビーズ法で 0.872、血清群 0159 ではいずれの方法でも 0.949 以上であった。長ネギでの血清群 0148 では ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)で 0.590、免疫磁気ビーズ法で 0.385、直接塗抹法で 0.154~0.333 であった。血清群 0159 で ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(IC を含む)で 0.974、免疫磁気ビーズ法は 0.974 以上、直接塗抹法の SMAC では 0.846、それ以外の培地で 0.974 であった。これらのことから、菌数が一桁のレベルであっても高率に検出されることが判明した。

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

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

長ネギ検体の低菌数接種において1機関で抗生物質加 SMAC での3検体中1検体(表2、4)、血清群 0148 では、キュウリ検体の低菌数接種において1機関で2種類いずれの培地でも3検体中1検体、長ネギ検体の低菌数接種の1機関で2種類いずれの培地でも3検体中2検体、計4検体であった(表7、9)。逆に、免疫磁気ビーズ法で検出されても ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)で検出されないものは、血清群 0159 では、長ネギ検体の低菌数接種において1機関で ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)で3検体中1検体であった(表2、4)。血清群 0148 では該当する検体はなかった。これらの結果から、ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)のほうが免疫磁気ビーズ法よりも検出性が優れていることが示され、リアルタイム PCR 法をスクリーニングに使用し、陽性であった検体を免疫磁気ビーズ法に供することで効率的な試験が行えるものと考えられた。ST・LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)で検出され、直接塗抹法および免疫磁気ビーズ法で検出されない検体では、増菌培地中で増殖はしているにもかかわらず分離されないということから、本コラボレイティブ・スタディで設定した釣菌するコロニー数(3コロニー)以上に釣菌することによって直接塗抹法および免疫磁気ビーズ法の検出感度が向上する可能性が考えられた。試験の際には、釣菌するコロニー数も重要であると思われる。なお、リアルタイム PCR 法のマニュアル解析は、Auto 解析よりも有意に検出感度が高かったことから、ここではマニュアル解析での結果について考察した。また、0148 接種検体に

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

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

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

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

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

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

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

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

本コラボレイティブ・スタディで使用された mEC 培地(42)での増菌培養法、免疫磁気ビーズ法、選択分離培地の組み合わせによる分離培養法および遺伝子検出法によって ETEC の比較的高率な検出が認められた。

E. 結論

本コラボレイティブ・スタディでは、ETEC が総じて比較的高率に検出されることが確認された。食品の増菌培養液がリアルタイム PCR 法で ST または LT 遺伝子陽性になった場合、培養液を選択分離培地に塗抹するか、主要 0 血清群(7種)の免疫磁気ビーズ法を行い、濃縮液を分離培地に塗抹し培養して ETEC を分離することが、食品の試験法として優れると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

Terajima, J., Izumiya, H., Hara-Kudo, Y., Ohnishi, M. Shiga toxin (verotoxin)-producing *E. coli* and foodborne disease: A Review. Food

Safety. Vol. 5, No. 2, 35-53, 2017.

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

2 . 学会発表

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

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

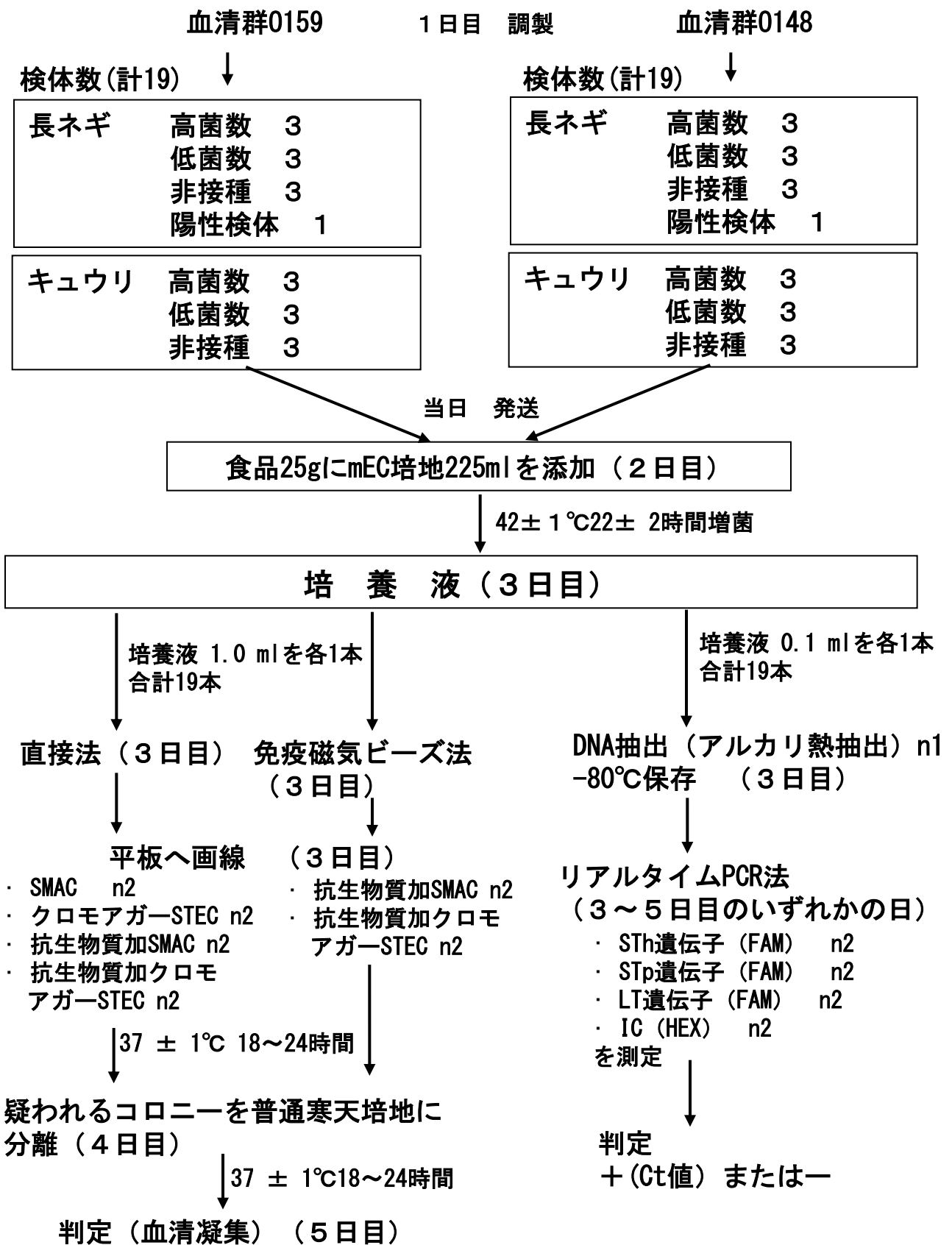


図1 腸管毒素原性大腸菌0159、0148の検査法のコラボレイティブ・スタディ

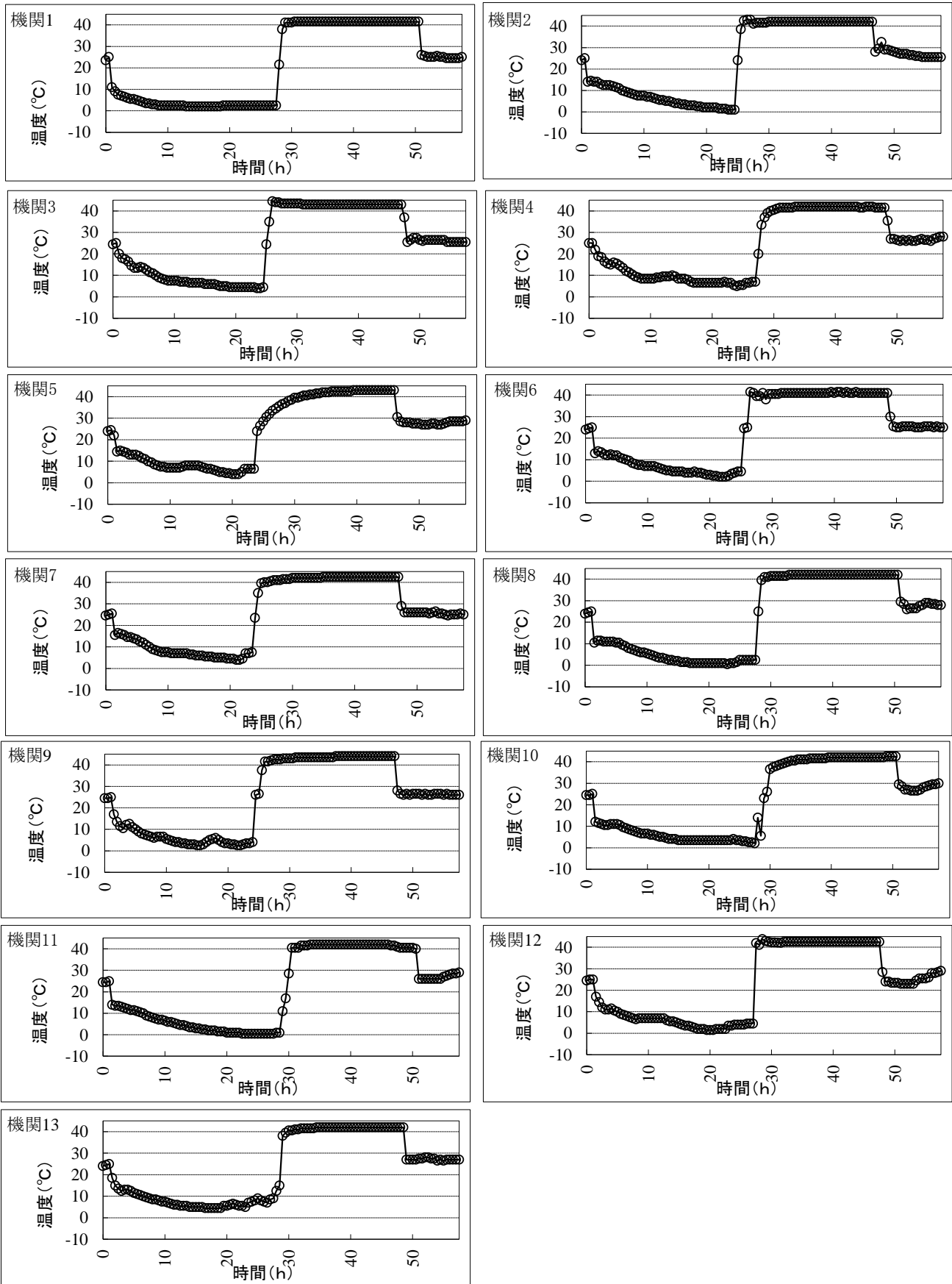


図2 血清群0159 接種検体（キュウリ、長ネギ）の輸送及び増菌培養における温度変化

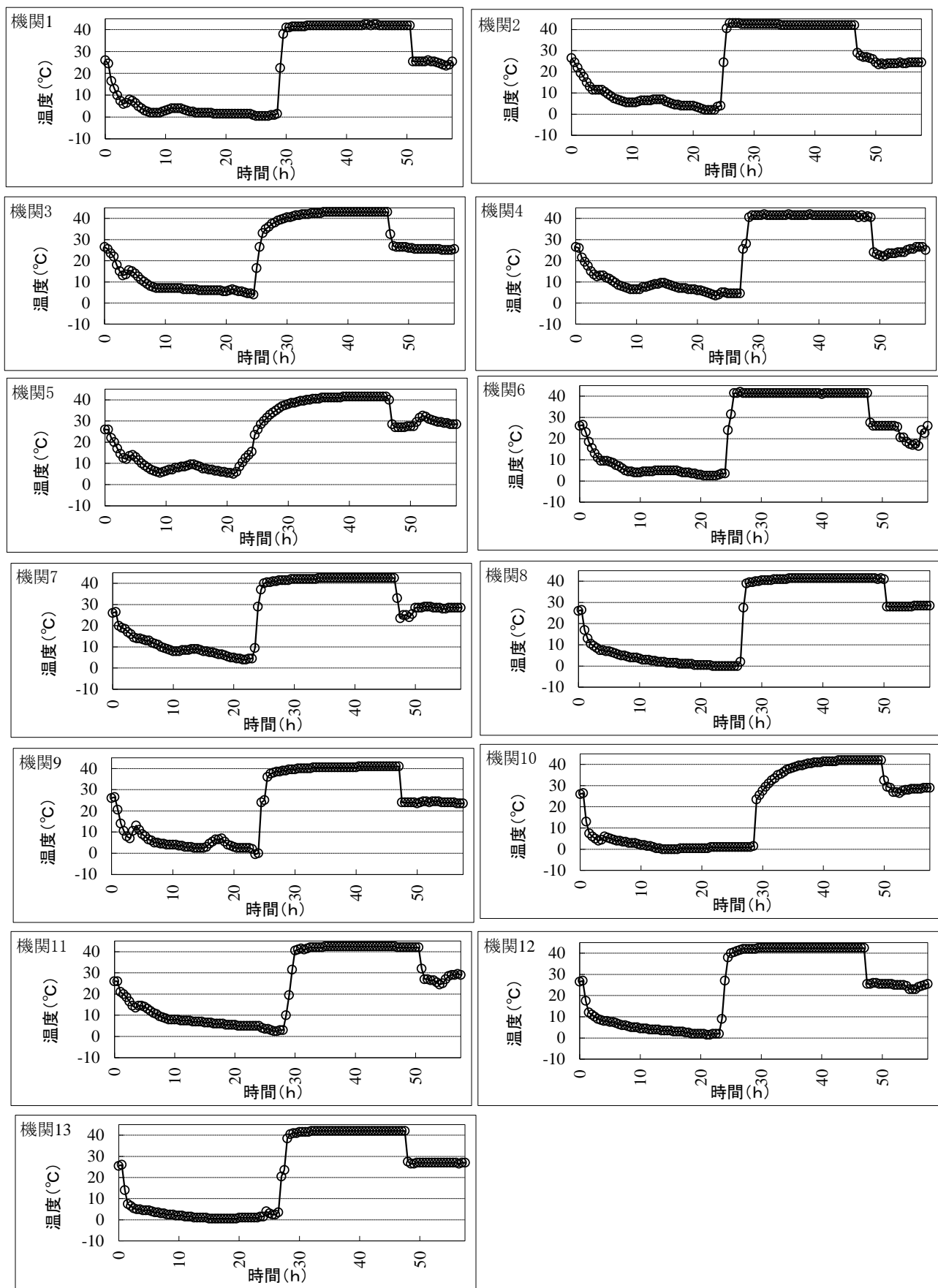


図3 血清群0148 接種検体（キュウリ、長ネギ）の輸送及び増菌培養における温度変化

表 1 試験検体における血清群0159接種菌数

	7	6	9	7	5
	7	10	11	3	4
	10	6	10	12	6
	6	9	5	3	6
	6	5	9	10	
	3	6	9	7	
	8	3	9	8	
	7	9	11	10	
	9	11	6	6	
平板培地あたりのコロニー数*	7	11	8	6	
	8	10	7	8	
	7	7	1	8	
	9	8	7	3	
	8	4	9	6	
	5	10	4	10	
	8	10	5	6	
	4	12	4	4	
	7	11	9	8	
	6	11	9	7	
	11	7	11	9	
平均			7.4		
低菌数			7.4 cfu/25g		
高菌数			37.0 cfu/25g		

* 低菌数用接種菌液

表 2 血清群0159検体でのリアルタイムPCR法によるST・LT遺伝子の検出結果 (Threshold Line; Manual)

機関番号	1			2			3					
検体	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値			
キュウリ	キ-1	①	-	ND	キ-1	①	+	13.7	キ-1	①	+	14.5
		②	-	ND		②	+	14.3		②	+	14.5
	キ-2	①	+	16.4	キ-2	①	-	ND	キ-2	①	+	14.8
		②	+	16.5		②	-	ND		②	+	14.7
	キ-3	3/3	+	17.0	キ-3	①	-	ND	キ-3	①	+	14.6
		②	+	17.2		②	-	ND		②	+	14.5
	キ-4	①	-	ND	キ-4	①	-	ND	キ-4	①	-	ND
		②	-	ND		②	-	ND		②	-	ND
	キ-5	①	-	ND	キ-5	①	+	14.4	キ-5	①	+	15.7
		②	-	ND		②	+	14.6		②	+	15.8
	キ-6	①	+	16.5	キ-6	①	+	14.1	キ-6	①	-	ND
		②	+	16.3		②	+	15.1		②	-	ND
	キ-7	①	+	15.6	キ-7	①	-	ND	キ-7	①	-	ND
		②	+	16.0		②	-	ND		②	-	ND
	キ-8	①	+	17.3	キ-8	①	+	14.7	キ-8	①	+	15.5
		②	+	17.4		②	+	14.5		②	+	15.5
	キ-9	①	+	15.8	キ-9	①	+	14.7	キ-9	①	+	15.4
		②	+	15.9		②	+	14.7		②	+	15.0
長ネギ	ネ-1	①	+	17.8	ネ-1	①	+	16.2	ネ-1	①	+	15.6
		②	+	17.6		②	+	15.9		②	+	15.5
	ネ-2	①	+	17.2	ネ-2	①	+	15.5	ネ-2	①	+	15.1
		②	+	17.4		②	+	15.8		②	+	15.3
	ネ-3	①	+	17.3	ネ-3	①	+	16.5	ネ-3	①	+	17.4
		②	+	17.3		②	+	16.8		②	+	17.5
	ネ-4	①	-	ND	ネ-4	①	-	ND	ネ-4	①	+	16.5
		②	-	ND		②	-	ND		②	+	16.5
	ネ-5	①	-	ND	ネ-5	①	-	ND	ネ-5	①	-	ND
		②	-	ND		②	-	ND		②	-	ND
	ネ-6	①	+	17.0	ネ-6	①	+	16.0	ネ-6	①	-	ND
		②	+	17.3		②	+	16.5		②	-	ND
	ネ-7	①	-	ND	ネ-7	①	+	16.3	ネ-7	①	-	16.5
		②	-	ND		②	+	15.9		②	+	16.6
	ネ-8	①	+	17.6	ネ-8	①	-	ND	ネ-8	①	-	ND
		②	+	17.6		②	-	ND		②	-	ND
	ネ-9	①	+	17.2	ネ-9	①	+	16.0	ネ-9	①	-	15.8
		②	+	17.0		②	+	16.0		②	+	16.2
陽性コントロール		①	+	18.0		①	+	15.2		①	+	14.9
		②	+	17.8		②	+	14.8		②	+	14.9



高菌数接種



低菌数接種



非接種 (ただし、陽性コントロールは除く)

+: 陽性、 -: 陰性

Ct値: 検出サイクル数

ND: 検出されない

機関番号	4				5				6			
検体	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値			
キュウリ	キ-1	①	+	14.4	キ-1	①	+	14.9	キ-1	①	+	15.5
		②	+	14.3		②	+	15.1		②	+	15.5
	キ-2	①	-	ND	キ-2	①	+	15.4	キ-2	①	-	ND
		②	-	ND		②	+	15.5		②	-	ND
	キ-3	①	+	14.4	キ-3	①	-	ND	キ-3	①	+	14.7
		②	+	14.3		②	-	ND		②	+	14.5
	キ-4	①	-	ND	キ-4	①	-	ND	キ-4	①	+	15.8
		②	+	38.0		②	-	ND		②	+	15.7
	キ-5	①	+	38.1	キ-5	①	+	16.6	キ-5	①	+	14.6
		②	-	ND		②	+	16.7		②	+	14.6
	キ-6	①	+	15.6	キ-6	①	-	ND	キ-6	①	+	15.6
		②	+	15.8		②	-	ND		②	+	15.4
	キ-7	①	+	15.2	キ-7	①	+	15.4	キ-7	①	+	15.3
		②	+	15.1		②	+	15.5		②	+	14.9
	キ-8	①	+	14.8	キ-8	①	+	15.4	キ-8	①	-	ND
		②	+	14.5		②	+	15.6		②	-	ND
	キ-9	①	+	14.6	キ-9	①	+	15.3	キ-9	①	-	ND
		②	+	14.5		②	+	15.4		②	-	ND
長ネギ	ネ-1	①	+	15.9	ネ-1	①	+	16.5	ネ-1	①	-	ND
		②	+	15.8		②	+	16.6		②	-	ND
	ネ-2	①	-	ND	ネ-2	①	-	ND	ネ-2	①	+	16.3
		②	-	ND		②	-	ND		②	+	16.0
	ネ-3	①	+	15.7	ネ-3	①	+	17.3	ネ-3	①	+	15.8
		②	+	15.6		②	+	17.2		②	+	16.0
	ネ-4	①	+	16.5	ネ-4	①	+	17.4	ネ-4	①	+	15.5
		②	+	16.2		②	+	17.4		②	+	15.8
	ネ-5	①	+	15.5	ネ-5	①	+	17.3	ネ-5	①	-	ND
		②	+	15.6		②	+	17.1		②	-	ND
	ネ-6	①	+	17.5	ネ-6	①	+	17.2	ネ-6	①	-	ND
		②	+	17.4		②	+	16.9		②	-	ND
	ネ-7	①	+	16.4	ネ-7	①	+	16.6	ネ-7	①	+	15.4
		②	+	16.4		②	+	17.0		②	+	15.6
	ネ-8	①	-	ND	ネ-8	①	-	ND	ネ-8	①	+	15.6
		②	-	ND		②	-	ND		②	+	16.0
	ネ-9	①	-	ND	ネ-9	①	-	ND	ネ-9	①	+	16.2
		②	-	ND		②	-	ND		②	+	16.3
陽性コントロール		①	+	15.9		①	+	15.7		①	+	16.0
		②	+	15.9		②	+	15.6		②	+	16.3



高菌数接種



低菌数接種



非接種（ただし、陽性コントロールは除く）

+：陽性、 -：陰性

Ct値： 検出サイクル数

ND： 検出されない

機関番号	7				8				9			
検体	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値			
キュウリ	キ-1	①	+	16.0	キ-1	①	+	16.4	キ-1	①	+	15.9
		②	+	16.1		②	+	16.5		②	+	16.0
	キ-2	①	+	15.2	キ-2	①	+	15.9	キ-2	①	-	ND
		②	+	15.3		②	+	16.2		②	-	ND
	キ-3	①	-	ND	キ-3	①	-	ND	キ-3	①	-	ND
		②	-	ND		②	-	ND		②	-	ND
	キ-4	①	+	15.7	キ-4	①	+	16.7	キ-4	①	-	ND
		②	+	16.1		②	+	16.6		②	-	ND
	キ-5	①	+	16.0	キ-5	①	+	16.1	キ-5	①	+	15.7
		②	+	15.9		②	+	16.4		②	+	15.6
	キ-6	①	-	ND	キ-6	①	+	15.9	キ-6	①	+	15.8
		②	-	ND		②	+	16.2		②	+	15.1
	キ-7	①	-	ND	キ-7	①	+	15.9	キ-7	①	+	17.3
		②	-	ND		②	+	16.1		②	+	17.8
	キ-8	①	+	15.4	キ-8	①	-	ND	キ-8	①	+	16.5
		②	+	15.4		②	-	ND		②	+	16.3
	キ-9	①	+	15.8	キ-9	①	-	ND	キ-9	①	+	17.0
		②	+	15.7		②	-	ND		②	+	17.0
長ネギ	ネ-1	①	+	16.5	ネ-1	①	+	16.3	ネ-1	①	+	16.8
		②	+	16.6		②	+	16.2		②	+	17.0
	ネ-2	①	+	16.2	ネ-2	①	-	ND	ネ-2	①	+	17.2
		②	+	16.2		②	-	ND		②	+	17.0
	ネ-3	①	+	16.7	ネ-3	①	-	ND	ネ-3	①	+	16.5
		②	+	16.6		②	-	ND		②	+	16.5
	ネ-4	①	+	16.1	ネ-4	①	+	15.9	ネ-4	①	+	16.6
		②	+	16.3		②	+	15.9		②	+	16.9
	ネ-5	①	-	ND	ネ-5	①	+	16.4	ネ-5	①	+	16.7
		②	-	ND		②	+	16.3		②	+	16.6
	ネ-6	①	+	15.9	ネ-6	①	+	16.7	ネ-6	①	-	ND
		②	+	16.2		②	+	16.3		②	-	ND
	ネ-7	①	+	16.4	ネ-7	①	+	16.5	ネ-7	①	+	17.0
		②	+	16.3		②	+	16.4		②	+	16.9
	ネ-8	①	-	ND	ネ-8	①	+	16.4	ネ-8	①	-	ND
		②	-	ND		②	+	16.3		②	-	ND
	ネ-9	①	-	ND	ネ-9	①	-	ND	ネ-9	①	-	ND
		②	-	ND		②	-	ND		②	-	ND
陽性コントロール		①	+	15.2		①	+	16.5		①	+	15.3
		②	+	15.2		②	+	16.4		②	+	15.9



高菌数接種



低菌数接種



非接種（ただし、陽性コントロールは除く）

+：陽性、 -：陰性

Ct値： 検出サイクル数

ND： 検出されない

機関番号	10				11				12			
検体	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値			
キュウリ	キ-1	①	+	17.1	キ-1	①	+	16.0	キ-1	①	-	ND
		②	+	15.3		②	+	14.7		②	-	ND
	キ-2	①	+	16.4	キ-2	①	+	14.6	キ-2	①	-	ND
		②	+	16.2		②	+	14.8		②	-	ND
	キ-3	①	-	ND	キ-3	①	+	14.7	キ-3	①	+	15.9
		②	-	ND		②	+	14.6		②	+	16.5
	キ-4	①	+	15.3	キ-4	①	-	ND	キ-4	①	+	16.7
		②	+	15.8		②	-	ND		②	+	17.3
	キ-5	①	+	15.0	キ-5	①	-	ND	キ-5	①	+	16.2
		②	+	15.3		②	-	ND		②	+	17.0
	キ-6	①	-	ND	キ-6	①	+	15.0	キ-6	①	-	ND
		②	-	ND		②	+	14.9		②	-	ND
	キ-7	①	-	ND	キ-7	①	+	15.5	キ-7	①	+	16.2
		②	-	ND		②	+	15.3		②	+	16.9
	キ-8	①	+	15.8	キ-8	①	-	ND	キ-8	①	+	17.7
		②	+	15.9		②	-	ND		②	+	18.1
	キ-9	①	+	15.4	キ-9	①	+	15.5	キ-9	①	+	18.0
		②	+	15.1		②	+	15.4		②	+	17.0
長ネギ	ネ-1	①	+	16.5	ネ-1	①	-	ND	ネ-1	①	+	21.0
		②	+	16.3		②	-	ND		②	+	21.5
	ネ-2	①	+	15.7	ネ-2	①	+	15.8	ネ-2	①	+	18.0
		②	+	15.3		②	+	15.6		②	+	18.4
	ネ-3	①	+	16.0	ネ-3	①	+	16.6	ネ-3	①	+	20.9
		②	+	15.5		②	+	16.7		②	+	21.0
	ネ-4	①	+	15.7	ネ-4	①	+	16.3	ネ-4	①	-	ND
		②	+	15.3		②	+	16.2		②	-	ND
	ネ-5	①	-	ND	ネ-5	①	-	ND	ネ-5	①	+	19.2
		②	-	ND		②	-	ND		②	+	19.5
	ネ-6	①	-	ND	ネ-6	①	+	16.5	ネ-6	①	+	19.2
		②	-	ND		②	+	16.3		②	+	19.3
	ネ-7	①	+	15.7	ネ-7	①	-	ND	ネ-7	①	+	18.4
		②	+	15.4		②	-	ND		②	+	18.7
	ネ-8	①	+	16.1	ネ-8	①	-	ND	ネ-8	①	-	ND
		②	+	15.9		②	-	ND		②	-	ND
	ネ-9	①	-	ND	ネ-9	①	+	16.4	ネ-9	①	-	ND
		②	+	39.0		②	+	16.2		②	-	ND
陽性コントロール		①	+	16.0		①	+	16.1		①	+	17.7
		②	+	15.6		②	+	16.1		②	+	18.3



高菌数接種



低菌数接種




非接種（ただし、陽性コントロールは除く）

+：陽性、 -：陰性


Ct値： 検出サイクル数

ND： 検出されない


機関番号	13			
検体	検体番号	+/-	Ct値	
キュウリ	キ-1	①	+	15.6
		②	+	15.7
	キ-2	①	-	ND
		②	-	ND
	キ-3	①	-	ND
		②	-	ND
	キ-4	①	+	15.5
		②	+	15.7
	キ-5	①	-	ND
		②	-	ND
	キ-6	①	+	15.9
		②	+	16.0
	キ-7	①	+	15.3
		②	+	15.2
	キ-8	①	+	16.8
		②	+	16.9
	キ-9	①	+	15.7
		②	+	15.8
長ネギ	ネ-1	①	-	ND
		②	-	ND
	ネ-2	①	-	ND
		②	-	ND
	ネ-3	①	-	ND
		②	-	ND
	ネ-4	①	+	17.4
		②	+	17.5
	ネ-5	①	+	18.1
		②	+	18.0
	ネ-6	①	+	18.0
		②	+	18.0
	ネ-7	①	+	17.0
		②	+	17.3
	ネ-8	①	+	18.3
		②	+	18.2
	ネ-9	①	+	17.4
		②	+	17.2
陽性コントロール		①	+	16.9
		②	+	16.8

 高菌数接種

+: 陽性、 -: 陰性

 低菌数接種

Ct値: 検出サイクル数

 非接種 (ただし、陽性コントロールは除く)

ND: 検出されない

表 3 血清群0159検体でのリアルタイムPCR法によるIC遺伝子の検出結果 (Threshold Line; Auto)

機関番号	1			2			3					
検体	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値			
キュウリ	キ-1	①	+	15.9	キ-1	①	+	14.0	キ-1	①	+	14.2
		②	+	15.9		②	+	14.0		②	+	14.3
	キ-2	①	+	14.1	キ-2	①	+	15.3	キ-2	①	+	14.1
		②	+	14.0		②	+	15.4		②	+	14.2
	キ-3	①	+	14.3	キ-3	①	+	17.5	キ-3	①	+	14.3
		②	+	14.4		②	+	17.8		②	+	14.5
	キ-4	①	+	13.7	キ-4	①	+	19.2	キ-4	①	+	18.4
		②	+	13.9		②	+	19.2		②	+	20.5
	キ-5	①	+	14.3	キ-5	①	+	15.2	キ-5	①	+	15.4
		②	+	14.2		②	+	15.3		②	+	15.4
	キ-6	①	+	13.9	キ-6	①	+	15.4	キ-6	①	+	16.3
		②	+	13.9		②	+	14.8		②	+	16.4
	キ-7	①	+	13.5	キ-7	①	+	17.8	キ-7	①	+	18.8
		②	+	13.7		②	+	18.6		②	+	25.3
	キ-8	①	+	14.1	キ-8	①	+	14.6	キ-8	①	+	15.2
		②	+	14.2		②	+	15.2		②	+	19.7
	キ-9	①	+	13.7	キ-9	①	+	14.5	キ-9	①	+	14.8
		②	+	13.6		②	+	15.0		②	+	17.5
長ネギ	ネ-1	①	+	14.9	ネ-1	①	+	15.3	ネ-1	①	+	15.2
		②	+	14.7		②	+	15.0		②	+	15.0
	ネ-2	①	+	14.8	ネ-2	①	+	15.4	ネ-2	①	+	14.6
		②	+	14.7		②	+	14.9		②	+	14.7
	ネ-3	①	+	14.1	ネ-3	①	+	16.3	ネ-3	①	+	15.7
		②	+	14.1		②	+	16.2		②	+	15.9
	ネ-4	①	+	14.9	ネ-4	①	+	17.6	ネ-4	①	+	15.4
		②	+	14.9		②	+	17.4		②	+	16.0
	ネ-5	①	+	15.1	ネ-5	①	+	17.7	ネ-5	①	+	17.7
		②	+	15.3		②	+	17.8		②	+	17.8
	ネ-6	①	+	14.0	ネ-6	①	+	17.6	ネ-6	①	+	15.9
		②	+	14.1		②	+	16.2		②	+	16.8
	ネ-7	①	+	14.6	ネ-7	①	+	15.9	ネ-7	①	+	15.8
		②	+	14.7		②	+	16.2		②	+	15.7
	ネ-8	①	+	14.4	ネ-8	①	+	17.7	ネ-8	①	+	20.2
		②	+	14.5		②	+	17.4		②	+	21.1
	ネ-9	①	+	14.7	ネ-9	①	+	15.4	ネ-9	①	+	15.3
		②	+	14.5		②	+	15.7		②	+	15.5
陽性コントロール		①	+	14.9		①	+	14.7		①	+	14.7
		②	+	14.9		②	+	14.9		②	+	14.8



高菌数接種



低菌数接種



非接種 (ただし、陽性コントロールは除く)

+: 陽性、 -: 陰性

Ct値: 検出サイクル数

ND: 検出されない

機関番号	4				5				6			
検体	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値			
キュウリ	キ-1	①	+	17.1	キ-1	①	+	15.4	キ-1	①	+	13.4
		②	+	16.6		②	+	15.0		②	+	13.4
	キ-2	①	+	19.4	キ-2	①	+	15.1	キ-2	①	+	21.2
		②	+	18.3		②	+	15.3		②	+	21.9
	キ-3	①	+	16.2	キ-3	①	+	20.5	キ-3	①	+	14.1
		②	+	16.3		②	+	20.3		②	+	14.3
	キ-4	①	+	19.3	キ-4	①	+	16.0	キ-4	①	+	14.5
		②	+	19.0		②	+	15.7		②	+	14.8
	キ-5	①	+	24.1	キ-5	①	+	15.0	キ-5	①	+	14.0
		②	+	24.3		②	+	14.7		②	+	14.5
	キ-6	①	+	17.6	キ-6	①	+	22.1	キ-6	①	+	14.3
		②	+	17.2		②	+	22.1		②	+	15.2
	キ-7	①	+	17.2	キ-7	①	+	15.5	キ-7	①	+	14.5
		②	+	19.5		②	+	15.3		②	+	14.8
	キ-8	①	+	16.6	キ-8	①	+	16.1	キ-8	①	+	19.9
		②	+	16.7		②	+	15.2		②	+	20.7
	キ-9	①	+	17.0	キ-9	①	+	15.3	キ-9	①	+	17.7
		②	+	16.2		②	+	15.4		②	+	18.3
長ネギ	ネ-1	①	+	17.2	ネ-1	①	+	15.6	ネ-1	①	+	15.8
		②	+	17.2		②	+	15.5		②	+	15.6
	ネ-2	①	+	18.1	ネ-2	①	+	17.0	ネ-2	①	+	14.6
		②	+	19.2		②	+	17.4		②	+	14.5
	ネ-3	①	+	16.7	ネ-3	①	+	16.4	ネ-3	①	+	14.5
		②	+	18.0		②	+	16.5		②	+	14.4
	ネ-4	①	+	17.4	ネ-4	①	+	16.3	ネ-4	①	+	14.7
		②	+	17.2		②	+	17.0		②	+	14.5
	ネ-5	①	+	17.3	ネ-5	①	+	16.9	ネ-5	①	+	16.1
		②	+	17.0		②	+	16.9		②	+	16.5
	ネ-6	①	+	18.3	ネ-6	①	+	16.0	ネ-6	①	+	16.4
		②	+	17.7		②	+	16.4		②	+	16.4
	ネ-7	①	+	16.9	ネ-7	①	+	16.1	ネ-7	①	+	15.0
		②	+	17.3		②	+	15.5		②	+	15.1
	ネ-8	①	+	19.9	ネ-8	①	+	16.4	ネ-8	①	+	14.8
		②	+	19.3		②	+	16.4		②	+	14.7
	ネ-9	①	+	17.9	ネ-9	①	+	16.2	ネ-9	①	+	14.5
		②	+	17.9		②	+	16.0		②	+	14.5
陽性コントロール		①	+	16.7		①	+	14.6		①	+	14.4
		②	+	16.5		②	+	15.0		②	+	14.6



高菌数接種



低菌数接種



非接種（ただし、陽性コントロールは除く）

+: 陽性、 -: 陰性

Ct値: 検出サイクル数

ND: 検出されない

機関番号		7			8			9				
検体		検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値		
キュウリ	キ-1	①	+	13.6	キ-1	①	+	16.0	キ-1	①	+	13.1
		②	+	13.6		②	+	15.5		②	+	13.2
	キ-2	①	+	13.7	キ-2	①	+	15.9	キ-2	①	+	16.0
		②	+	13.4		②	+	15.5		②	+	15.9
	キ-3	①	+	14.7	キ-3	①	+	23.1	キ-3	①	+	16.2
		②	+	14.7		②	+	23.7		②	+	16.1
	キ-4	①	+	13.7	キ-4	①	+	15.3	キ-4	①	+	15.3
		②	+	13.7		②	+	15.5		②	+	15.4
	キ-5	①	+	13.4	キ-5	①	+	15.5	キ-5	①	+	12.1
		②	+	13.3		②	+	15.5		②	+	12.2
	キ-6	①	+	18.4	キ-6	①	+	15.5	キ-6	①	+	13.3
		②	+	18.4		②	+	15.5		②	+	13.2
	キ-7	①	+	19.6	キ-7	①	+	15.1	キ-7	①	+	12.9
		②	+	19.6		②	+	15.2		②	+	13.4
	キ-8	①	+	13.3	キ-8	①	+	23.1	キ-8	①	+	13.3
		②	+	13.2		②	+	22.9		②	+	13.0
	キ-9	①	+	13.7	キ-9	①	+	14.8	キ-9	①	+	14.0
		②	+	13.8		②	+	15.1		②	+	13.9
長ネギ	ネ-1	①	+	14.0	ネ-1	①	+	15.3	ネ-1	①	+	13.1
		②	+	14.1		②	+	15.2		②	+	13.4
	ネ-2	①	+	13.9	ネ-2	①	+	17.0	ネ-2	①	+	14.1
		②	+	13.8		②	+	16.7		②	+	14.2
	ネ-3	①	+	14.0	ネ-3	①	+	19.3	ネ-3	①	+	13.4
		②	+	14.0		②	+	19.1		②	+	13.5
	ネ-4	①	+	13.9	ネ-4	①	+	16.5	ネ-4	①	+	13.6
		②	+	13.9		②	+	17.1		②	+	13.7
	ネ-5	①	+	15.2	ネ-5	①	+	16.0	ネ-5	①	+	13.3
		②	+	15.2		②	+	16.9		②	+	13.3
	ネ-6	①	+	13.9	ネ-6	①	+	15.5	ネ-6	①	+	15.8
		②	+	13.9		②	+	15.4		②	+	16.0
	ネ-7	①	+	14.0	ネ-7	①	+	15.6	ネ-7	①	+	14.3
		②	+	14.0		②	+	15.4		②	+	14.3
	ネ-8	①	+	18.2	ネ-8	①	+	15.5	ネ-8	①	+	15.3
		②	+	18.2		②	+	15.7		②	+	15.2
	ネ-9	①	+	15.6	ネ-9	①	+	17.0	ネ-9	①	+	16.0
		②	+	15.6		②	+	16.5		②	+	16.0
陽性コントロール		①	+	13.3		①	+	15.2		①	+	13.7
		②	+	13.3		②	+	15.1		②	+	13.9



高菌数接種



低菌数接種



非接種（ただし、陽性コントロールは除く）

+: 陽性、 -: 陰性

Ct値: 検出サイクル数

ND: 検出されない

機関番号	10				11				12			
検体	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値			
キュウリ	キ-1	①	+	14.5	キ-1	①	+	14.9	キ-1	①	+	23.1
		②	+	14.0		②	+	14.1		②	+	22.8
	キ-2	①	+	13.6	キ-2	①	+	14.0	キ-2	①	+	24.8
		②	+	13.6		②	+	14.0		②	+	24.8
	キ-3	①	+	16.9	キ-3	①	+	14.2	キ-3	①	+	16.2
		②	+	16.9		②	+	14.0		②	+	15.4
	キ-4	①	+	13.9	キ-4	①	+	18.2	キ-4	①	+	16.0
		②	+	13.9		②	+	18.2		②	+	15.8
	キ-5	①	+	13.9	キ-5	①	+	14.1	キ-5	①	+	15.9
		②	+	13.8		②	+	13.7		②	+	15.4
	キ-6	①	+	16.0	キ-6	①	+	14.3	キ-6	①	+	19.0
		②	+	16.0		②	+	14.2		②	+	21.4
	キ-7	①	+	18.2	キ-7	①	+	14.2	キ-7	①	+	16.1
		②	+	18.6		②	+	14.1		②	+	16.6
	キ-8	①	+	14.1	キ-8	①	+	17.5	キ-8	①	+	16.9
		②	+	14.1		②	+	17.0		②	+	17.6
	キ-9	①	+	13.7	キ-9	①	+	14.1	キ-9	①	+	15.6
		②	+	13.8		②	+	14.2		②	+	15.7
長ネギ	ネ-1	①	+	14.2	ネ-1	①	+	15.5	ネ-1	①	+	19.2
		②	+	14.0		②	+	15.5		②	+	18.4
	ネ-2	①	+	13.6	ネ-2	①	+	14.4	ネ-2	①	+	17.0
		②	+	13.7		②	+	14.9		②	+	17.7
	ネ-3	①	+	14.0	ネ-3	①	+	15.9	ネ-3	①	+	19.4
		②	+	13.9		②	+	16.0		②	+	19.0
	ネ-4	①	+	13.7	ネ-4	①	+	16.0	ネ-4	①	+	21.1
		②	+	13.5		②	+	16.1		②	+	21.2
	ネ-5	①	+	15.7	ネ-5	①	+	16.0	ネ-5	①	+	17.9
		②	+	15.3		②	+	15.6		②	+	17.4
	ネ-6	①	+	14.7	ネ-6	①	+	14.6	ネ-6	①	+	17.3
		②	+	14.2		②	+	14.8		②	+	17.5
	ネ-7	①	+	13.6	ネ-7	①	+	15.3	ネ-7	①	+	17.7
		②	+	13.7		②	+	15.2		②	+	17.6
	ネ-8	①	+	14.1	ネ-8	①	+	16.3	ネ-8	①	+	20.0
		②	+	14.0		②	+	16.2		②	+	20.0
	ネ-9	①	+	14.6	ネ-9	①	+	16.0	ネ-9	①	+	18.7
		②	+	14.2		②	+	15.9		②	+	18.2
陽性コントロール		①	+	13.8		①	+	15.3		①	+	18.3
		②	+	13.4		②	+	15.0		②	+	17.7



高菌数接種



低菌数接種




非接種（ただし、陽性コントロールは除く）

+: 陽性、 -: 陰性


Ct値: 検出サイクル数

ND: 検出されない


機関番号	13			
検体	検体番号	+/-	Ct値	
キュウリ	キ-1	①	+	14.4
		②	+	14.2
	キ-2	①	+	15.6
		②	+	15.6
	キ-3	①	+	16.5
		②	+	15.7
	キ-4	①	+	14.3
		②	+	14.4
	キ-5	①	+	16.5
		②	+	16.7
	キ-6	①	+	14.4
		②	+	14.4
	キ-7	①	+	13.9
		②	+	14.1
	キ-8	①	+	15.3
		②	+	15.0
	キ-9	①	+	14.0
		②	+	14.1
長ネギ	ネ-1	①	+	16.7
		②	+	16.8
	ネ-2	①	+	17.5
		②	+	16.8
	ネ-3	①	+	18.3
		②	+	18.5
	ネ-4	①	+	15.3
		②	+	15.0
	ネ-5	①	+	15.3
		②	+	15.8
	ネ-6	①	+	16.0
		②	+	15.7
	ネ-7	①	+	14.9
		②	+	14.9
	ネ-8	①	+	15.9
		②	+	16.1
	ネ-9	①	+	14.9
		②	+	14.8
陽性コントロール	①	+	14.5	
	②	+	14.7	

 高菌数接種

+: 陽性、 -: 陰性

 低菌数接種

Ct値: 検出サイクル数

 非接種 (ただし、陽性コントロールは除く)

ND: 検出されない

表 4 血清群0159直接塗抹法・免疫磁気ビーズ法によるコロニー分離結果の合計

		直接塗抹法				免疫磁気ビーズ法	
		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	抗生物質加SMAC	抗生物質加クロモア ガーSTEC
キュウリ	接種：低菌数	98/123	120/120	120/123	118/120	120/120	118/120
	：高菌数	110/123	121/123	122/123	121/123	122/123	123/123
	非接種	0/117	0/30	0/109	3/33	3/76	6/36
長ネギ	接種：低菌数	72/123	120/123	120/123	120/123	118/120	122/123
	：高菌数	86/123	123/123	123/123	123/123	120/123	122/123
	非接種	0/120	0/22	0/108	0/28	0/83	1/40
合計		366/729	484/541	485/709	485/550	483/645	492/565

陽性コロニー数／釣菌したコロニー数

表 5 血清群0159の検出方法の感度と特異性

方法	感度				特異性	
	キュウリ		長ネギ		キュウリ	長ネギ
	低菌数 ^a	高菌数 ^a	低菌数	高菌数		
Real-time PCR						
ST・LT検出 (Threshold ; Auto)	0.974 ^b	1.000	0.974	1.000	0.923 ^c	0.667
(Threshold ; 0.25)	0.974 ^b	1.000	0.974	1.000	1.000 ^c	0.974
IC検出 (Threshold ; Auto)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
(Threshold ; 0.25)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
直接塗抹法						
SMAC	0.949	1.000	0.846	0.897	1.000	1.000
クロモアガーSTEC	0.974	1.000	0.974	1.000	1.000	1.000
抗生物質加SMAC	0.974	1.000	0.974	1.000	1.000	1.000
抗生物質加クロモアガーSTEC	0.974	1.000	0.974	1.000	0.974	1.000
総合	0.974	1.000	0.974	1.000	0.974	1.000
免疫磁気ビーズ法						
抗生物質加SMAC	0.974	1.000	0.974	1.000	0.974	1.000
抗生物質加クロモアガーSTEC	0.974	1.000	1.000	1.000	0.897	0.974
総合	0.974	1.000	1.000	1.000	0.872	0.974

a 低菌数 : 7.4 CFU/25g、高菌数 : 37 CFU/25g

b 陽性検体数／総検体数

c 陰性検体数／総検体数 (ただし、IC検出では陽性検体数／総検体数)

表 6 試験検体における血清群0148接種菌数

	4	2	8	4	2
	1	6	4	1	8
	2	4	2	3	4
	5	3	1	5	2
	4	7	4	7	
	2	2	8	10	
	3	7	3	6	
	2	3	7	3	
	4	4	1	3	
平板培地あたりのコロニー数*	0	9	8	4	
	2	4	3	6	
	3	3	2	4	
	6	8	5	7	
	2	2	3	4	
	1	5	6	8	
	7	4	5	2	
	4	4	4	3	
	1	2	4	8	
	2	0	7	6	
	3	4	3	6	
平均			4.1		
低菌数			4.1 cfu/25g		
高菌数			20.5 cfu/25g		

* 低菌数用接種菌液

表 7 血清群0148検体でのリアルタイムPCR法によるST・LT遺伝子の検出結果 (Threshold Line; Manual)

機関番号	1			2			3					
検体	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値			
キュウリ	キ-1	①	+	15.0	キ-1	①	-	ND	キ-1	①	+	19.3
		②	+	15.0		②	-	ND		②	+	19.4
	キ-2	①	+	15.5	キ-2	①	-	ND	キ-2	①	+	18.9
		②	+	14.6		②	-	ND		②	+	18.9
	キ-3	①	+	14.9	キ-3	①	+	19.7	キ-3	①	+	17.3
		②	+	15.3		②	+	19.9		②	+	17.3
	キ-4	①	-	ND	キ-4	①	+	18.9	キ-4	①	+	17.6
		②	-	ND		②	+	19.0		②	+	17.8
	キ-5	①	-	ND	キ-5	①	+	18.9	キ-5	①	+	18.2
		②	-	ND		②	+	19.1		②	+	18.2
	キ-6	①	-	ND	キ-6	①	+	18.5	キ-6	①	-	ND
		②	-	ND		②	+	18.4		②	-	ND
	キ-7	①	+	13.8	キ-7	①	-	ND	キ-7	①	-	ND
		②	+	13.6		②	-	ND		②	-	ND
	キ-8	①	+	17.5	キ-8	①	-	ND	キ-8	①	-	ND
		②	+	17.3		②	-	ND		②	-	ND
	キ-9	①	+	17.7	キ-9	①	+	19.2	キ-9	①	+	18.1
		②	+	17.8		②	+	19.3		②	+	18.1
長ネギ	ネ-1	①	+	17.7	ネ-1	①	-	ND	ネ-1	①	-	ND
		②	+	17.8		②	-	ND		②	-	ND
	ネ-2	①	+	33.4	ネ-2	①	+	35.5	ネ-2	①	-	ND
		②	+	32.7		②	+	35.7		②	-	ND
	ネ-3	①	+	18.3	ネ-3	①	-	ND	ネ-3	①	-	ND
		②	+	18.3		②	-	ND		②	-	ND
	ネ-4	①	+	36.8	ネ-4	①	-	ND	ネ-4	①	-	ND
		②	+	37.0		②	-	ND		②	-	ND
	ネ-5	①	+	22.2	ネ-5	①	-	ND	ネ-5	①	+	23.6
		②	+	22.4		②	-	ND		②	+	23.6
	ネ-6	①	+	22.2	ネ-6	①	+	29.8	ネ-6	①	+	25.5
		②	+	22.2		②	+	29.8		②	+	25.6
	ネ-7	①	-	ND	ネ-7	①	-	ND	ネ-7	①	+	36.6
		②	-	ND		②	-	ND		②	+	37.0
	ネ-8	①	+	20.8	ネ-8	①	-	ND	ネ-8	①	+	29.9
		②	+	20.8		②	-	ND		②	+	29.8
	ネ-9	①	-	ND	ネ-9	①	-	ND	ネ-9	①	-	ND
		②	-	ND		②	-	ND		②	-	ND
陽性コントロール		①	+	14.7		①	+	17.9		①	+	17.4
		②	+	14.7		②	+	18.1		②	+	17.4



高菌数接種



低菌数接種



非接種 (ただし、陽性コントロールは除く)

+: 陽性、 -: 陰性

Ct値: 検出サイクル数

ND: 検出されない

機関番号	4				5				6			
検体	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値			
キュウリ	キ-1	①	+	13.5	キ-1	①	+	15.6	キ-1	①	+	13.6
		②	+	13.5		②	+	15.4		②	+	13.6
	キ-2	①	+	33.9	キ-2	①	-	ND	キ-2	①	+	13.6
		②	+	33.3		②	-	ND		②	+	13.7
	キ-3	①	+	13.6	キ-3	①	+	14.1	キ-3	①	-	ND
		②	+	13.6		②	+	14.2		②	-	ND
	キ-4	①	+	13.9	キ-4	①	+	15.3	キ-4	①	-	ND
		②	+	13.9		②	+	15.0		②	-	ND
	キ-5	①	+	28.2	キ-5	①	+	34.9	キ-5	①	-	ND
		②	+	28.4		②	+	35.1		②	-	ND
	キ-6	①	+	14.5	キ-6	①	+	15.7	キ-6	①	+	13.2
		②	+	14.8		②	+	15.7		②	+	13.7
	キ-7	①	+	30.5	キ-7	①	+	17.4	キ-7	①	+	13.6
		②	+	30.4		②	+	17.4		②	+	13.7
	キ-8	①	+	13.2	キ-8	①	-	ND	キ-8	①	+	13.2
		②	+	13.3		②	-	ND		②	+	13.7
	キ-9	①	+	13.1	キ-9	①	-	ND	キ-9	①	+	13.9
		②	+	13.1		②	-	ND		②	+	13.7
長ネギ	ネ-1	①	+	36.9	ネ-1	①	-	ND	ネ-1	①	+	25.4
		②	-	ND		②	-	ND		②	+	25.3
	ネ-2	①	-	ND	ネ-2	①	+	36.0	ネ-2	①	+	19.2
		②	-	ND		②	+	37.0		②	+	19.0
	ネ-3	①	-	ND	ネ-3	①	+	22.3	ネ-3	①	+	14.5
		②	-	ND		②	+	22.3		②	+	14.6
	ネ-4	①	-	ND	ネ-4	①	+	17.0	ネ-4	①	-	ND
		②	-	ND		②	+	17.0		②	-	ND
	ネ-5	①	+	34.9	ネ-5	①	-	ND	ネ-5	①	-	ND
		②	+	36.6		②	-	ND		②	-	ND
	ネ-6	①	-	ND	ネ-6	①	-	ND	ネ-6	①	-	ND
		②	-	ND		②	-	ND		②	-	ND
	ネ-7	①	-	ND	ネ-7	①	-	ND	ネ-7	①	-	ND
		②	-	ND		②	-	ND		②	-	ND
	ネ-8	①	-	ND	ネ-8	①	-	ND	ネ-8	①	-	ND
		②	-	ND		②	-	ND		②	-	ND
	ネ-9	①	-	ND	ネ-9	①	-	ND	ネ-9	①	-	ND
		②	-	ND		②	-	ND		②	-	ND
陽性コントロール		①	+	14.0		①	+	16.9		①	+	13.6
		②	+	14.6		②	+	17.1		②	+	13.8



高菌数接種



低菌数接種



非接種（ただし、陽性コントロールは除く）

+: 陽性、 -: 陰性

Ct値: 検出サイクル数

ND: 検出されない

機関番号		7			8			9				
検体		検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値		
キュウリ	キ-1	①	-	ND	キ-1	①	+	17.7	キ-1	①	+	14.1
		②	-	ND		②	+	18.0		②	+	14.1
	キ-2	①	-	ND	キ-2	①	+	18.1	キ-2	①	+	14.0
		②	-	ND		②	+	18.2		②	+	14.2
	キ-3	①	+	17.9	キ-3	①	-	ND	キ-3	①	+	15.6
		②	+	18.0		②	-	ND		②	+	15.3
	キ-4	①	+	17.9	キ-4	①	-	ND	キ-4	①	+	14.2
		②	+	18.1		②	-	ND		②	+	14.3
	キ-5	①	-	ND	キ-5	①	-	ND	キ-5	①	+	13.8
		②	-	ND		②	-	ND		②	+	14.0
	キ-6	①	+	17.6	キ-6	①	-	ND	キ-6	①	-	ND
		②	+	17.6		②	-	ND		②	-	ND
	キ-7	①	+	17.9	キ-7	①	+	17.3	キ-7	①	+	13.9
		②	+	17.8		②	+	17.6		②	+	13.7
	キ-8	①	+	18.2	キ-8	①	+	18.2	キ-8	①	+	32.3
		②	+	18.5		②	+	18.5		②	+	32.4
	キ-9	①	+	17.6	キ-9	①	+	16.9	キ-9	①	-	ND
		②	+	17.5		②	+	16.7		②	-	ND
長ネギ	ネ-1	①	+	23.3	ネ-1	①	+	19.0	ネ-1	①	+	17.4
		②	+	23.2		②	+	18.9		②	+	17.6
	ネ-2	①	-	ND	ネ-2	①	+	21.3	ネ-2	①	+	15.9
		②	-	ND		②	+	21.2		②	+	15.9
	ネ-3	①	-	ND	ネ-3	①	-	ND	ネ-3	①	+	19.0
		②	-	ND		②	-	ND		②	+	19.0
	ネ-4	①	-	ND	ネ-4	①	-	ND	ネ-4	①	-	ND
		②	-	ND		②	-	ND		②	-	ND
	ネ-5	①	+	35.6	ネ-5	①	+	23.0	ネ-5	①	+	18.5
		②	+	35.8		②	+	22.9		②	+	18.5
	ネ-6	①	+	37.0	ネ-6	①	+	21.2	ネ-6	①	-	ND
		②	+	34.9		②	+	21.2		②	-	ND
	ネ-7	①	+	36.1	ネ-7	①	-	ND	ネ-7	①	-	ND
		②	+	35.0		②	-	ND		②	-	ND
	ネ-8	①	+	36.8	ネ-8	①	+	19.7	ネ-8	①	+	18.4
		②	-	ND		②	+	19.6		②	+	18.4
	ネ-9	①	+	18.8	ネ-9	①	+	19.1	ネ-9	①	-	ND
		②	+	18.9		②	+	19.2		②	-	ND
陽性コントロール		①	+	19.4		①	+	17.6		①	+	16.4
		②	+	19.7		②	+	17.4		②	+	16.5



高菌数接種



低菌数接種



非接種（ただし、陽性コントロールは除く）

+: 陽性、 -: 陰性

Ct値: 検出サイクル数

ND: 検出されない

機関番号	10				11				12			
検体	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値			
キュウリ	キ-1	①	-	ND	キ-1	①	+	18.9	キ-1	①	+	18.9
		②	-	ND		②	+	18.6		②	+	19.2
	キ-2	①	+	15.6	キ-2	①	-	ND	キ-2	①	+	20.3
		②	+	15.3		②	-	ND		②	+	20.1
	キ-3	①	+	14.9	キ-3	①	-	ND	キ-3	①	+	19.5
		②	+	15.0		②	-	ND		②	+	19.5
	キ-4	①	-	ND	キ-4	①	-	ND	キ-4	①	+	22.2
		②	-	ND		②	-	ND		②	+	20.3
	キ-5	①	-	ND	キ-5	①	-	ND	キ-5	①	+	19.6
		②	-	ND		②	-	ND		②	+	20.0
	キ-6	①	+	14.7	キ-6	①	+	19.2	キ-6	①	-	ND
		②	+	14.6		②	+	19.2		②	-	ND
	キ-7	①	+	14.6	キ-7	①	+	19.6	キ-7	①	-	ND
		②	+	14.7		②	+	19.4		②	-	ND
	キ-8	①	+	14.4	キ-8	①	+	19.9	キ-8	①	+	19.7
		②	+	14.6		②	+	19.3		②	+	19.9
	キ-9	①	+	14.8	キ-9	①	+	18.8	キ-9	①	-	ND
		②	+	15.0		②	+	18.9		②	-	ND
長ネギ	ネ-1	①	-	ND	ネ-1	①	-	ND	ネ-1	①	+	26.0
		②	-	ND		②	-	ND		②	+	23.4
	ネ-2	①	+	15.9	ネ-2	①	-	ND	ネ-2	①	+	20.7
		②	+	16.0		②	-	ND		②	+	20.4
	ネ-3	①	+	19.1	ネ-3	①	-	ND	ネ-3	①	-	ND
		②	+	18.7		②	-	ND		②	-	ND
	ネ-4	①	+	19.6	ネ-4	①	-	ND	ネ-4	①	-	ND
		②	+	19.5		②	-	ND		②	-	ND
	ネ-5	①	+	27.2	ネ-5	①	+	31.5	ネ-5	①	+	19.7
		②	+	27.3		②	+	31.7		②	+	19.8
	ネ-6	①	-	ND	ネ-6	①	+	25.4	ネ-6	①	-	ND
		②	+	37.0		②	+	25.2		②	-	ND
	ネ-7	①	+	23.4	ネ-7	①	-	ND	ネ-7	①	-	ND
		②	+	23.3		②	-	ND		②	-	ND
	ネ-8	①	+	17.4	ネ-8	①	-	ND	ネ-8	①	-	ND
		②	+	17.4		②	-	ND		②	-	ND
	ネ-9	①	-	ND	ネ-9	①	+	25.8	ネ-9	①	+	20.8
		②	-	ND		②	+	25.7		②	+	20.2
陽性コントロール		①	+	13.4		①	+	19.1		①	+	18.4
		②	+	13.4		②	+	18.9		②	+	18.4



高菌数接種



低菌数接種




非接種（ただし、陽性コントロールは除く）


+：陽性、 -：陰性


Ct値： 検出サイクル数

ND： 検出されない

機関番号		13		
検体	検体番号	+/-	Ct値	
キュウリ	キ-1	①	+	13.6
		②	+	13.8
	キ-2	①	+	14.0
		②	+	14.0
	キ-3	①	-	ND
		②	-	ND
	キ-4	①	+	14.4
		②	+	14.4
	キ-5	①	-	ND
		②	-	ND
	キ-6	①	+	13.7
		②	+	13.9
	キ-7	①	+	37.1
		②	-	ND
	キ-8	①	-	ND
		②	-	ND
	キ-9	①	+	14.3
		②	+	14.5
長ネギ	ネ-1	①	-	ND
		②	-	ND
	ネ-2	①	+	14.4
		②	+	15.4
	ネ-3	①	-	ND
		②	-	ND
	ネ-4	①	+	22.4
		②	+	22.3
	ネ-5	①	-	ND
		②	-	ND
	ネ-6	①	-	ND
		②	-	ND
	ネ-7	①	+	19.1
		②	+	19.2
	ネ-8	①	-	ND
		②	-	ND
	ネ-9	①	+	21.4
		②	+	21.4
陽性コントロール		①	+	15.9
		②	+	16.0

 高菌数接種

 低菌数接種

 非接種（ただし、陽性コントロールは除く）

+: 陽性、 -: 陰性

Ct値: 検出サイクル数

ND: 検出されない

表 8 血清群0148検体でのリアルタイムPCR法によるIC遺伝子の検出結果 (Threshold Line; Auto)

機関番号	1			2			3					
検体	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値			
キュウリ	キ-1	①	+	13.3	キ-1	①	+	15.8	キ-1	①	+	16.0
		②	+	13.3		②	+	15.9		②	+	16.4
	キ-2	①	+	13.4	キ-2	①	+	15.9	キ-2	①	+	15.2
		②	+	13.4		②	+	16.2		②	+	15.2
	キ-3	①	+	14.0	キ-3	①	+	15.2	キ-3	①	+	14.6
		②	+	14.0		②	+	15.0		②	+	14.8
	キ-4	①	+	13.2	キ-4	①	+	15.4	キ-4	①	+	15.4
		②	+	13.2		②	+	15.4		②	+	15.5
	キ-5	①	+	15.1	キ-5	①	+	15.8	キ-5	①	+	15.7
		②	+	15.1		②	+	16.0		②	+	15.9
	キ-6	①	+	14.6	キ-6	①	+	15.7	キ-6	①	+	16.4
		②	+	14.8		②	+	15.9		②	+	16.6
	キ-7	①	+	14.1	キ-7	①	+	14.9	キ-7	①	+	16.7
		②	+	14.1		②	+	15.1		②	+	16.9
	キ-8	①	+	15.6	キ-8	①	+	15.9	キ-8	①	+	16.4
		②	+	15.3		②	+	16.3		②	+	16.6
	キ-9	①	+	15.9	キ-9	①	+	15.1	キ-9	①	+	15.4
		②	+	16.0		②	+	15.7		②	+	15.5
長ネギ	ネ-1	①	+	15.2	ネ-1	①	+	15.2	ネ-1	①	+	19.0
		②	+	15.2		②	+	15.5		②	+	18.8
	ネ-2	①	+	15.6	ネ-2	①	+	16.2	ネ-2	①	+	16.6
		②	+	15.2		②	+	15.8		②	+	16.6
	ネ-3	①	+	15.4	ネ-3	①	+	17.9	ネ-3	①	+	16.4
		②	+	15.5		②	+	17.9		②	+	16.5
	ネ-4	①	+	15.9	ネ-4	①	+	19.0	ネ-4	①	+	16.5
		②	+	16.1		②	+	18.2		②	+	16.7
	ネ-5	①	+	16.2	ネ-5	①	+	18.8	ネ-5	①	+	16.9
		②	+	16.2		②	+	19.6		②	+	17.0
	ネ-6	①	+	16.6	ネ-6	①	+	17.0	ネ-6	①	+	16.9
		②	+	16.5		②	+	16.9		②	+	17.0
	ネ-7	①	+	16.2	ネ-7	①	+	17.1	ネ-7	①	+	17.2
		②	+	16.1		②	+	17.2		②	+	17.2
	ネ-8	①	+	16.1	ネ-8	①	+	16.4	ネ-8	①	+	17.6
		②	+	16.1		②	+	16.2		②	+	17.6
	ネ-9	①	+	16.0	ネ-9	①	+	16.4	ネ-9	①	+	16.5
		②	+	15.6		②	+	16.6		②	+	16.4
陽性コントロール		①	+	15.6		①	+	14.4		①	+	14.9
		②	+	15.6		②	+	14.5		②	+	14.8

高菌数接種
 低菌数接種
 非接種 (ただし、陽性コントロールは除く)

+: 陽性、 -: 陰性
 Ct値: 検出サイクル数
ND: 検出されない

機関番号	4			5			6					
検体	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値			
キュウリ	キ-1	①	+	14.4	キ-1	①	+	16.0	キ-1	①	+	15.0
		②	+	14.5		②	+	15.3		②	+	15.0
	キ-2	①	+	15.7	キ-2	①	+	15.9	キ-2	①	+	14.8
		②	+	15.2		②	+	15.6		②	+	15.1
	キ-3	①	+	14.0	キ-3	①	+	14.4	キ-3	①	+	15.5
		②	+	13.9		②	+	14.3		②	+	15.4
	キ-4	①	+	14.6	キ-4	①	+	15.2	キ-4	①	+	15.0
		②	+	14.3		②	+	15.0		②	+	15.4
	キ-5	①	+	14.8	キ-5	①	+	16.4	キ-5	①	+	15.9
		②	+	15.1		②	+	16.2		②	+	16.2
	キ-6	①	+	14.1	キ-6	①	+	16.1	キ-6	①	+	14.2
		②	+	14.8		②	+	16.0		②	+	14.9
	キ-7	①	+	14.9	キ-7	①	+	16.8	キ-7	①	+	14.4
		②	+	15.3		②	+	16.5		②	+	14.9
	キ-8	①	+	13.5	キ-8	①	+	15.4	キ-8	①	+	14.0
		②	+	13.7		②	+	14.6		②	+	14.7
	キ-9	①	+	13.6	キ-9	①	+	15.5	キ-9	①	+	14.9
		②	+	13.5		②	+	15.5		②	+	15.0
長ネギ	ネ-1	①	+	17.0	ネ-1	①	+	17.3	ネ-1	①	+	16.2
		②	+	21.0		②	+	17.4		②	+	16.0
	ネ-2	①	+	18.5	ネ-2	①	+	16.4	ネ-2	①	+	15.8
		②	+	18.8		②	+	17.1		②	+	15.8
	ネ-3	①	+	16.5	ネ-3	①	+	18.9	ネ-3	①	+	14.9
		②	+	16.7		②	+	19.0		②	+	15.0
	ネ-4	①	+	17.5	ネ-4	①	+	17.0	ネ-4	①	+	16.2
		②	+	17.4		②	+	17.0		②	+	16.1
	ネ-5	①	+	16.7	ネ-5	①	+	20.5	ネ-5	①	+	17.3
		②	+	16.9		②	+	20.5		②	+	16.8
	ネ-6	①	+	17.0	ネ-6	①	+	18.0	ネ-6	①	+	16.7
		②	+	17.0		②	+	18.2		②	+	16.7
	ネ-7	①	+	16.9	ネ-7	①	+	20.7	ネ-7	①	+	16.1
		②	+	16.9		②	+	20.9		②	+	16.0
	ネ-8	①	+	17.2	ネ-8	①	+	17.0	ネ-8	①	+	16.0
		②	+	16.9		②	+	17.1		②	+	16.1
	ネ-9	①	+	18.1	ネ-9	①	+	17.2	ネ-9	①	+	15.8
		②	+	18.1		②	+	17.1		②	+	15.8
陽性コントロール		①	+	14.4		①	+	16.0		①	+	15.0
		②	+	14.4		②	+	16.3		②	+	15.3



高菌数接種



低菌数接種



非接種（ただし、陽性コントロールは除く）

+: 陽性、 -: 陰性

Ct値: 検出サイクル数

ND: 検出されない

機関番号		7			8			9				
検体		検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値		
キュウリ	キ-1	①	+	18.0	キ-1	①	+	14.5	キ-1	①	+	13.5
		②	+	18.0		②	+	14.8		②	+	13.4
	キ-2	①	+	17.4	キ-2	①	+	15.6	キ-2	①	+	13.6
		②	+	17.4		②	+	15.8		②	+	13.7
	キ-3	①	+	17.8	キ-3	①	+	14.7	キ-3	①	+	14.6
		②	+	17.7		②	+	15.1		②	+	14.5
	キ-4	①	+	18.3	キ-4	①	+	14.2	キ-4	①	+	13.6
		②	+	18.3		②	+	14.8		②	+	13.6
	キ-5	①	+	16.6	キ-5	①	+	16.0	キ-5	①	+	13.3
		②	+	16.6		②	+	16.1		②	+	13.5
	キ-6	①	+	18.9	キ-6	①	+	15.8	キ-6	①	+	14.5
		②	+	18.8		②	+	16.1		②	+	14.6
	キ-7	①	+	18.0	キ-7	①	+	13.9	キ-7	①	+	13.0
		②	+	18.0		②	+	14.6		②	+	13.2
	キ-8	①	+	18.8	キ-8	①	+	14.7	キ-8	①	+	13.0
		②	+	18.8		②	+	15.1		②	+	12.9
	キ-9	①	+	17.3	キ-9	①	+	14.2	キ-9	①	+	13.6
		②	+	17.3		②	+	14.0		②	+	13.9
長ネギ	ネ-1	①	+	18.5	ネ-1	①	+	16.1	ネ-1	①	+	14.8
		②	+	18.5		②	+	16.0		②	+	15.0
	ネ-2	①	+	19.5	ネ-2	①	+	16.7	ネ-2	①	+	14.3
		②	+	19.5		②	+	16.3		②	+	14.5
	ネ-3	①	+	20.4	ネ-3	①	+	16.9	ネ-3	①	+	15.1
		②	+	20.4		②	+	16.3		②	+	15.2
	ネ-4	①	+	19.4	ネ-4	①	+	17.4	ネ-4	①	+	15.5
		②	+	19.4		②	+	16.8		②	+	15.5
	ネ-5	①	+	19.0	ネ-5	①	+	15.6	ネ-5	①	+	14.7
		②	+	19.1		②	+	15.6		②	+	14.8
	ネ-6	①	+	18.9	ネ-6	①	+	16.6	ネ-6	①	+	15.3
		②	+	18.9		②	+	16.6		②	+	15.4
	ネ-7	①	+	19.1	ネ-7	①	+	16.2	ネ-7	①	+	15.6
		②	+	19.3		②	+	16.4		②	+	15.7
	ネ-8	①	+	20.8	ネ-8	①	+	16.6	ネ-8	①	+	15.2
		②	+	20.9		②	+	16.2		②	+	15.2
	ネ-9	①	+	18.9	ネ-9	①	+	15.5	ネ-9	①	+	15.1
		②	+	19.0		②	+	15.8		②	+	15.0
陽性コントロール		①	+	20.6		①	+	15.2		①	+	15.6
		②	+	20.7		②	+	14.9		②	+	15.6



高菌数接種



低菌数接種



非接種（ただし、陽性コントロールは除く）

+: 陽性、 -: 陰性

Ct値: 検出サイクル数

ND: 検出されない

機関番号	10				11				12			
検体	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値	検体番号	+/-	Ct値			
キュウリ	キ-1	①	+	15.1	キ-1	①	+	15.9	キ-1	①	+	15.4
		②	+	15.5		②	+	15.2		②	+	16.1
	キ-2	①	+	14.0	キ-2	①	+	16.6	キ-2	①	+	16.6
		②	+	13.9		②	+	16.4		②	+	16.5
	キ-3	①	+	14.7	キ-3	①	+	15.0	キ-3	①	+	16.2
		②	+	14.7		②	+	15.0		②	+	16.3
	キ-4	①	+	15.3	キ-4	①	+	17.0	キ-4	①	+	19.4
		②	+	15.4		②	+	17.0		②	+	16.6
	キ-5	①	+	14.5	キ-5	①	+	15.9	キ-5	①	+	16.6
		②	+	14.7		②	+	15.9		②	+	16.9
	キ-6	①	+	14.3	キ-6	①	+	15.7	キ-6	①	+	18.8
		②	+	14.6		②	+	15.4		②	+	17.6
	キ-7	①	+	14.1	キ-7	①	+	15.9	キ-7	①	+	17.3
		②	+	14.0		②	+	15.8		②	+	18.0
	キ-8	①	+	13.9	キ-8	①	+	15.9	キ-8	①	+	16.1
		②	+	14.3		②	+	14.9		②	+	16.3
	キ-9	①	+	13.9	キ-9	①	+	15.0	キ-9	①	+	16.2
		②	+	13.9		②	+	15.0		②	+	15.9
長ネギ	ネ-1	①	+	16.5	ネ-1	①	+	17.2	ネ-1	①	+	22.5
		②	+	16.1		②	+	17.2		②	+	17.8
	ネ-2	①	+	14.8	ネ-2	①	+	16.9	ネ-2	①	+	17.2
		②	+	14.7		②	+	17.4		②	+	16.9
	ネ-3	①	+	15.9	ネ-3	①	+	17.9	ネ-3	①	+	18.8
		②	+	15.7		②	+	18.3		②	+	18.0
	ネ-4	①	+	15.9	ネ-4	①	+	17.6	ネ-4	①	+	17.8
		②	+	15.6		②	+	18.0		②	+	17.9
	ネ-5	①	+	15.3	ネ-5	①	+	16.9	ネ-5	①	+	17.0
		②	+	15.5		②	+	17.2		②	+	17.0
	ネ-6	①	+	16.3	ネ-6	①	+	16.9	ネ-6	①	+	18.8
		②	+	16.3		②	+	17.1		②	+	17.6
	ネ-7	①	+	16.1	ネ-7	①	+	17.0	ネ-7	①	+	20.5
		②	+	15.8		②	+	17.1		②	+	19.2
	ネ-8	①	+	15.8	ネ-8	①	+	17.3	ネ-8	①	+	19.2
		②	+	15.7		②	+	17.3		②	+	17.7
	ネ-9	①	+	15.8	ネ-9	①	+	17.8	ネ-9	①	+	18.0
		②	+	15.5		②	+	17.5		②	+	17.2
陽性コントロール		①	+	14.0		①	+	16.3		①	+	15.2
		②	+	14.3		②	+	16.2		②	+	15.2



高菌数接種



低菌数接種




非接種（ただし、陽性コントロールは除く）


+：陽性、 -：陰性


Ct値： 検出サイクル数

ND：検出されない

機関番号	13			
検体	検体番号	+/-	Ct値	
キュウリ	キ-1	①	+	14.2
		②	+	14.2
	キ-2	①	+	14.1
		②	+	13.9
	キ-3	①	+	16.7
		②	+	16.6
	キ-4	①	+	15.1
		②	+	15.1
	キ-5	①	+	16.3
		②	+	16.1
	キ-6	①	+	13.2
		②	+	13.3
	キ-7	①	+	15.7
		②	+	15.4
	キ-8	①	+	15.0
		②	+	15.1
	キ-9	①	+	14.4
		②	+	14.5
長ネギ	ネ-1	①	+	15.7
		②	+	15.6
	ネ-2	①	+	14.7
		②	+	17.7
	ネ-3	①	+	18.0
		②	+	17.3
	ネ-4	①	+	17.4
		②	+	17.3
	ネ-5	①	+	16.6
		②	+	15.6
	ネ-6	①	+	16.5
		②	+	16.9
	ネ-7	①	+	16.4
		②	+	16.1
	ネ-8	①	+	16.2
		②	+	16.2
	ネ-9	①	+	16.1
		②	+	15.9
陽性コントロール	①	+	16.0	
	②	+	15.6	

 高菌数接種

 低菌数接種

 非接種（ただし、陽性コントロールは除く）

+: 陽性、 -: 陰性

Ct値: 検出サイクル数

ND: 検出されない

表 9 血清群0148直接塗抹免疫磁気ビーズ法によるコロニー分離結果の合計

		直接塗抹法				免疫磁気ビーズ法	
		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	抗生物質加 SMAC	抗生物質加クロモア ガーSTEC
キュウリ	接種：低菌数	50/123	97/112	101/123	103/116	103/123	107/120
	：高菌数	49/120	119/122	113/123	122/123	122/123	120/123
	非接種	0/108	0/31	0/117	0/32	0/97	0/41
長ネギ	接種：低菌数	13/117	16/34	37/118	34/79	49/115	49/89
	：高菌数	18/120	42/53	66/120	58/76	86/114	91/101
	非接種	0/116	0/24	0/114	0/30	2/95	0/32
合計		130/704	274/376	317/715	317/456	362/667	367/506

陽性コロニー数／釣菌したコロニー数

表 10 血清群0148の検出方法の感度と特異性

方法	感度				特異性	
	キュウリ		長ネギ		キュウリ	長ネギ
	低菌数 ^a	高菌数 ^a	低菌数	高菌数		
Real-time PCR						
ST・LT検出 (Threshold ; Auto)	0.923 ^b	1.000	0.590	0.769	0.769 ^c	0.744
(Threshold ; 0.25)	0.923 ^b	1.000	0.590	0.769	0.897 ^c	0.923
IC検出 (Threshold ; Auto)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
(Threshold ; 0.25)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
直接塗抹法						
SMAC	0.641	0.615	0.179	0.231	1.000	1.000
クロモアガーSTEC	0.872	1.000	0.154	0.462	1.000	1.000
抗生物質加SMAC	0.897	1.000	0.333	0.641	1.000	1.000
抗生物質加クロモアガーSTEC	0.897	1.000	0.308	0.513	1.000	1.000
総合	0.872	1.000	0.333	0.641	1.000	1.000
免疫磁気ビーズ法						
抗生物質加SMAC	0.872	1.000	0.385	0.744	1.000	0.974
抗生物質加クロモアガーSTEC	0.872	1.000	0.385	0.744	1.000	1.000
総合	0.872	1.000	0.385	0.744	1.000	0.974

a 低菌数： 4.1 CFU/25g、高菌数： 20.5 CFU/25g

b 陽性検体数／総検体数

c 陰性検体数／総検体数（ただし、IC検出では陽性検体数／総検体数）

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

平成29年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究

研究者代表 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

(食中毒調査における食品中の病原大腸菌の統括的検査法の開発に関する研究)

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 O169: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て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O169から脱落する原因になっていると推察される。しかしながら、O169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、O169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O169に提供することで、野外では保持されている可能性があり、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
中台(鹿毛)枝里子	大阪市立大学大学院生活科学研究科 准教授
和田崇之	長崎大学 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 (Enterocoagulative *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 O169:H4k (以後 O169 と略す) は 1991 年に日本で初めて発見されたが(7) , 以後 , O169 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) . O169 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 , O169 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 EAEC の HEp-2 細胞への付着像に酷似しているが , EAEC の凝集接着に關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) . O169 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 , この接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) .

O169 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 , O169 は細胞付着性も毒素産生性も喪失する(13) . しかし , O169 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るが , 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 , 27 年度に報告した O169 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 O169 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 O169 が優勢を保てるようにし , ETEC O169 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種の接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。従来の付着性試験では培養細胞への菌の接着状況を顕微鏡観察することで接着性を定性的に評価してきたが、今年度は定量的に調べるため付着菌数を測定した。さらに、昨年度の試験で強い付着像を示した接着因子 K88-like に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。

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 O169:H41 の YN10 株、大腸菌の実験室株として One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Life technologies), O169 の接着因子である CS6、K88-like および CS8-like の各遺伝子で TOP10 を形質転換した株を実験に供した。

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. 付着性試験

25 cm² のフラスコに細胞がフルシートになるまで HEp-2, IPEC-1, そして BIE を培養した。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細胞を培養液 12 ml で懸濁し、予め直径 13 mm の丸形カバーグラスを入れた 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 α-D-マンノピラシド(和光純薬)を 0.5% 含む細胞培養液を 0.5 ml 加えた。供試菌株を培養した LB ブイヨンに 10 μl 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)。また、付着菌数測定用のウェルからは丸形カバーグラスをピンセットで取り出し、滅菌 PBS 中で振り動かして洗浄、これを 3 本の PBS 容器中で連続した。洗浄済みのカバーグラスを 1% Tween80 溶液に浸けて細胞を溶解させ、PBS で段階希釈した。スパイラルプレート法で寒天培地に塗布し、37 °C で一晩培養した。翌日コロニー計数を行い接着していた生菌の数を算定した。

4. モノクローナル抗体の作製

K88-like の特異的な付着性に関与すると推察される遺伝子 *faeG1* と *faeG2* の塩基配列に基づきアミノ酸 9 個分の合成ペプチドを抗原としてラットの後足裏に接種し、約 3 週間飼育後に腸骨リンパ節を取り出した。細胞融合により、ハイブリドーマを作製した。96 ウェルプレートで培養し、抗原と反応する抗体を産生する細胞を ELISA 法と凝集反応試験により選別した。スクリーニングにより、抗体の産生が確認された細胞群を限界希釈、シングルコロニーとなるまで培養し、ELISA 法で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。

5. 免疫電顕

供試菌は、O169 および O169cured , Top10 , K88-like 組込み株を使用した。親水処理した炭素膜グリッドに菌懸濁液をのせて吸着させた後、1% TritonX-100 で菌体の中身を抜いた。2% BSA で 10 倍希釈した 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 1 時間反応させ、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。

6. ウエスタンブロット

供試菌は Buffered Peptone Water で 16 時間培養後、超音波処理破碎によりタンパクを回収し、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。検出には ECL Prime Western Blotting Detection Reagent を用いた。

7. 凝集反応試験

供試菌は Luria Broth で 16 時間培養後、1%ホルムアルデヒド添加生理食塩水で処理し、実験に供する際にはホルムアルデヒド添加生理食塩水を除き、生理食塩水で再懸濁した。96 ウェルプレートにモノクローナル抗体を段階希釈し、死菌懸濁液を加え、室温で一晩静置した。

C. 結果

1. ヒト、ブタ、ウシ由来の腸粘膜上皮細胞にに対する接着性

28 年度に顕微鏡観察で判定した結果が今回の定量試験でも再確認された。すなわち、O169 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、附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 O169cured 株、実験室株の TOP10 , 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，ならびに 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 株は 1-2 桁低い菌数にとどまった (図 1-3)．ただし，ブタ由来 IPEC-1 細胞では病原プラスミドを喪失した O169cured と TOP10CS6 株もやや高い菌数を示し，O169cured 株はウシ由来 BIE 細胞でも他と比べて高い菌数を示した．しかしながら，顕微鏡観察では 28 年度に報告したのと同様に O169 と TOP10K88-like 株のみが強い付着像を示した．

2．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おいて，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．これらについて，TOP10K88-like を抗原として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．これらを限界希釈し，シングルコロニーとなるまで培養を繰り返し，再び ELISA 法によりスクリーニングを行った結果，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．

3．免疫電顕

菌体間で金コロイド数に有意な差は見られず，抗 K88-like 抗体が強く反応している様子は見られなかった (図 4)．

4．ウエスタンブロットティング

ハウスキーピングの DnaK を 1 次抗体とした試験では，有効なバンドを確認することができた．続いて，定着因子が発現していることを確認するため抗 CS6 抗体を 1 次抗体とした試験を行い TOP10CS6 で有効なバンドを確認できた．実験手技と定着因子の発現確認ができたため，抗 K88-like モノクローナル抗体を利用した試験を行ったが 3 クローンいずれの抗体も明瞭なバンドを生じさせなかった．

5．凝集反応試験

3 種のモノクローナル抗体いずれもが TOP10K88-like を凝集したが，本来陽性と期待される O169 では確認できなかった．そこで，念のためにネガティブコントロールの Top10 を調べたところ陽性反応が見られた．このことから，今回作製したモノクローナル抗体は K88 様定着因子と特異的に反応するものではないことが示唆された．

D．考察

EPEC 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 O169 は異色の存在であった(12)。

O169 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(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、O169 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推察された。実際に 3 種の各遺伝子で組み換えた TOP10 株を用いた実験によって定性的にも定量的にも K88-like が in vitro における O169 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 O169 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 O169 が多様な宿主に感染する能力を得ているとすれば、脱落しやすいブ

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 O169 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がありそうだ。

K88-like 抗原を簡便に検出したり、その菌体における局在や宿主細胞との結合に重要なエピトープを決定したりする目的で今回はモノクローナル抗体の作製を試みた。しかしながら、免疫電顕でもウェスタン・ブロッティングでも明瞭な反応が出ず、凝集試験によって K88-like で組み替えた菌体のみならず TOP10 自体とも反応していることが判明した。抗原として作製した合成ペプチドと同様の抗原を TOP10 が保有している可能性を予想せず、合成ペプチドを用いた ELISA と TOP10K88-like の凝集試験でクローンの選別を進め、陰性対照として TOP10 を凝集試験に置いていなかったことが失敗の原因である。基本に立ち返り、再度挑戦する予定である。

E. 結論

ETEC O169: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、O169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、ブタおよびウシの腸粘膜上皮細胞への付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ると考えられる。

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
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, Puhf 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, Sjoling 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.

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., 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.*70:464-9.

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.* 249:44-52.

2. 学会発表

Parvej, M. S., Kage-Nakadai, E., and Nishikawa, Y. (2017) Molecular characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) isolates from poultry. The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, Japan, Abstract: 68. 2017/9/5-8

Takeuchi, N., Tanimoto, Y., Tamai, S., Yanagida, S., Yamaguchi, Y., Kage-Nakadai, E., and Nishikawa, Y. (2017) 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, Awaji Yumebutai International Conference Center, Japan, Abstract: 71. 2017/9/5-8
- 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) O169:H41 to porcine intestinal epithelial cells by the novel colonization factor. Vaccines for Enteric Diseases, AAU Sao Rafael Atlantico Hotel, Albufeira, Portugal, Abstract; Poster A128. 2017/10/9-11
- 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19-21日 仙台国際センター
- WS4-4 (P-216) 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O169: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19-21日 沖縄コンベンションセンター 2A-E52(p.243)
- 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19-21日 沖縄コンベンションセンター 2A-E53(p.244)
- 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関する因子の探索、第38回日本食品微生物学会学術総会、平成29年10月5-6日 あわぎんホール 1C02 (p.51)
- 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25日 大阪府立大学
I-siteなんば 若手-14

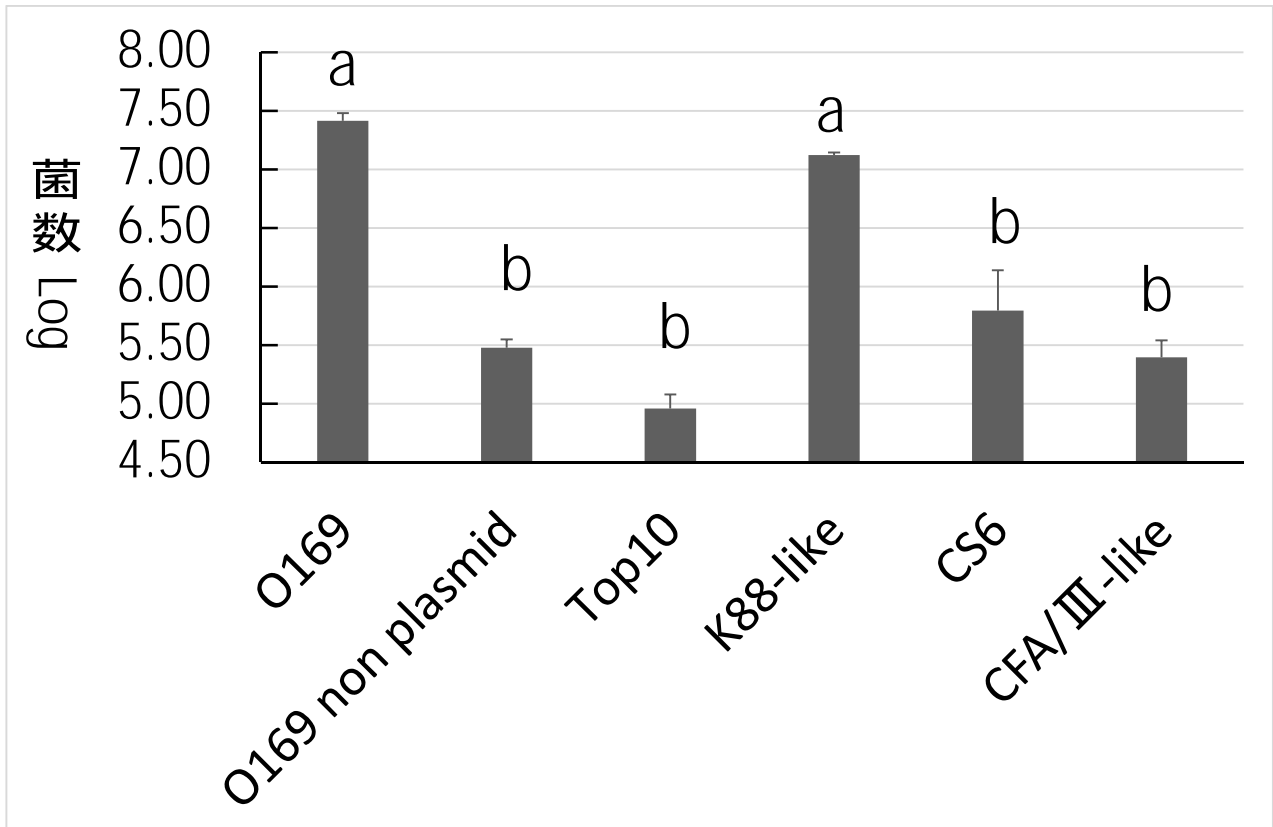


図1 . ヒト上皮細胞 HEp-2 への付着菌数 (n=5)

p<0.05: O169 と CS6 の間、 K88-like と O169 non plasmid, CS6, CFA/III-like の間

p<0.01: O169 と O169 non plasmid, Top10, CFA/III-like の間、
K88-like と Top10 の間

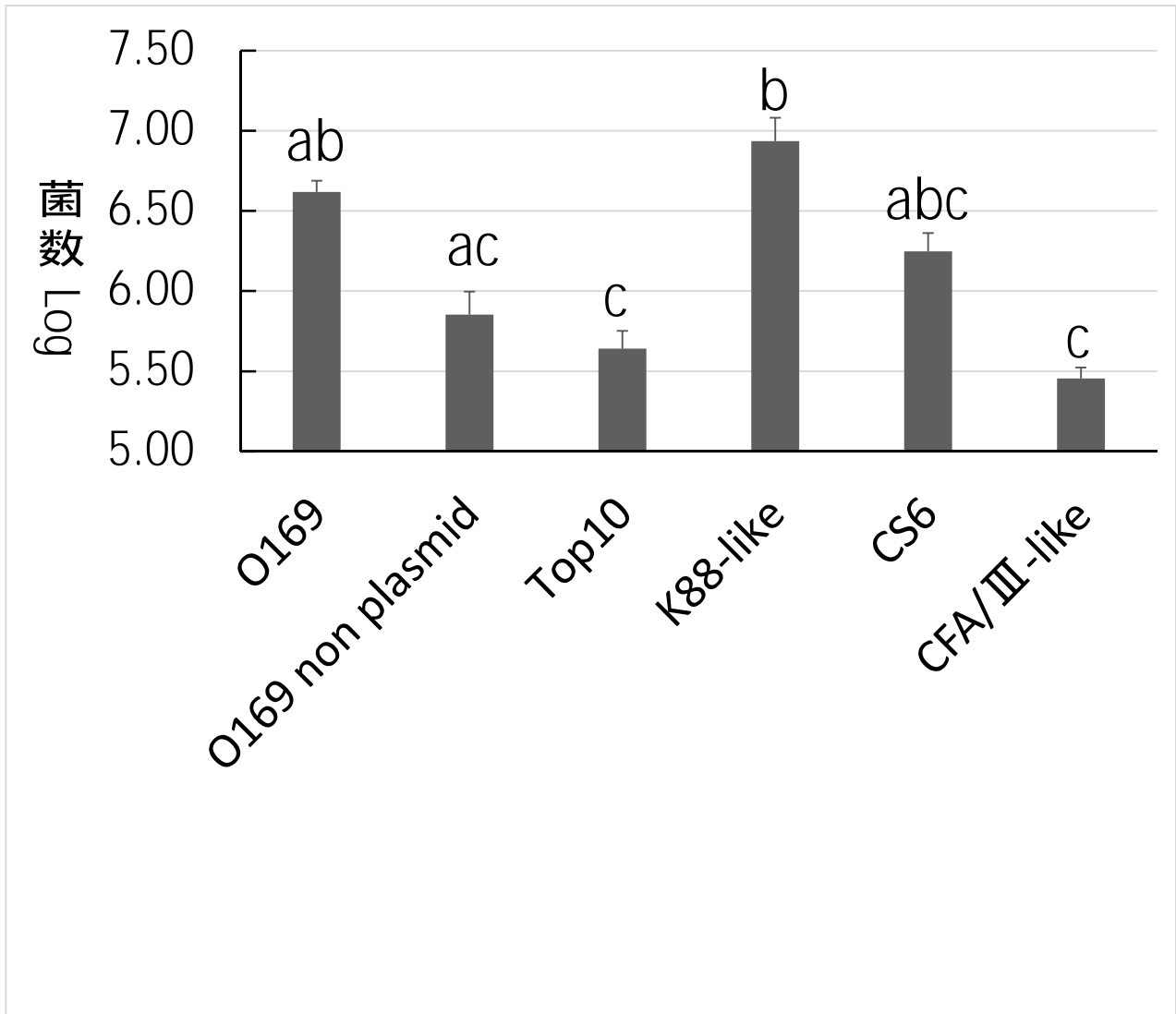


図2 . ブタ上皮細胞 IPEC-1 への付着菌数 (n=3)
 p<0.05: O169と Top10, CFA/III-like の間、K88-likeと O169 non plasmid, Top10, CFA/III-like の間

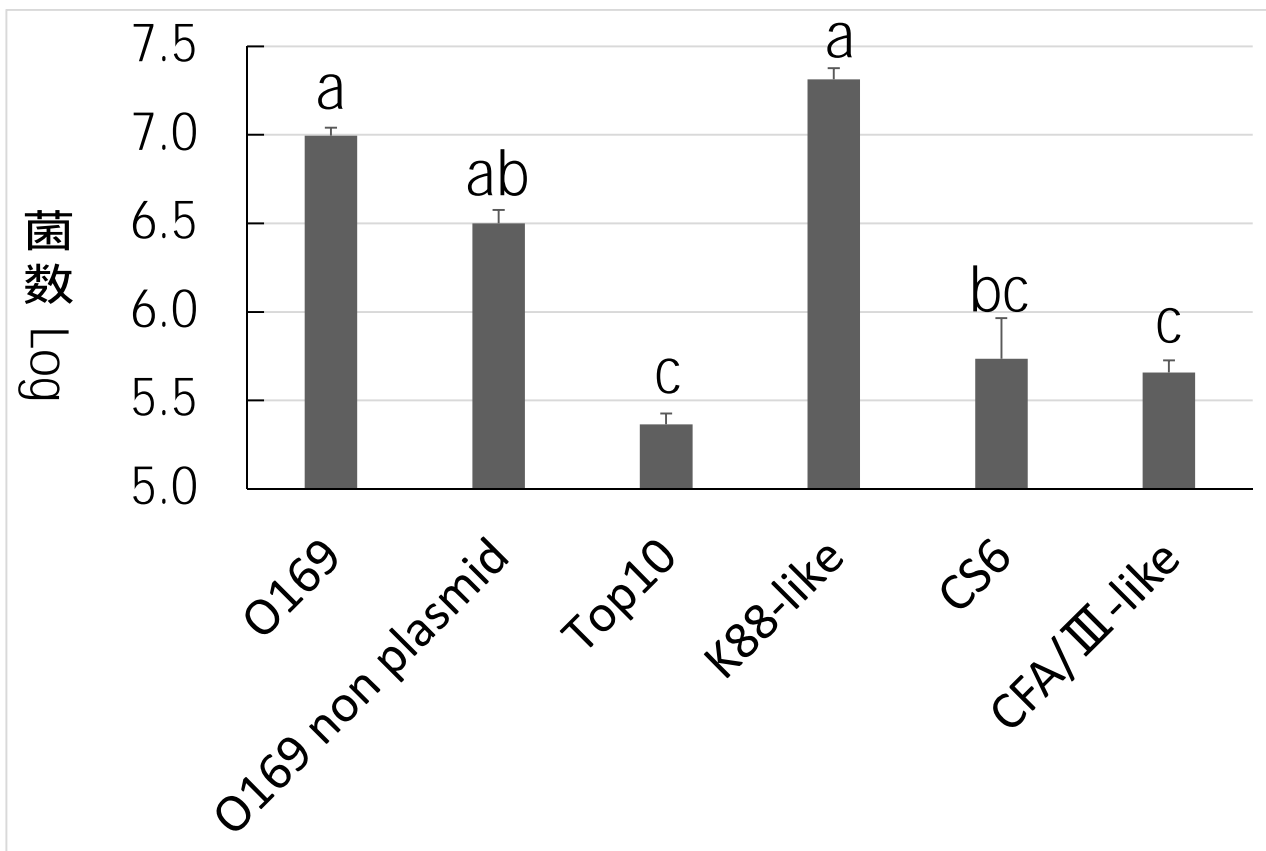


図3. ウシ上皮細胞 BIE への付着菌数 (n=3)

p<0.05: O169 と CS6, CFA/III-like の間、O169 non plasmid と Top10, CFA/III-like の間

p<0.01: O169 と Top10 の間、K88-like と Top10, CS6, CFA/III-like の間

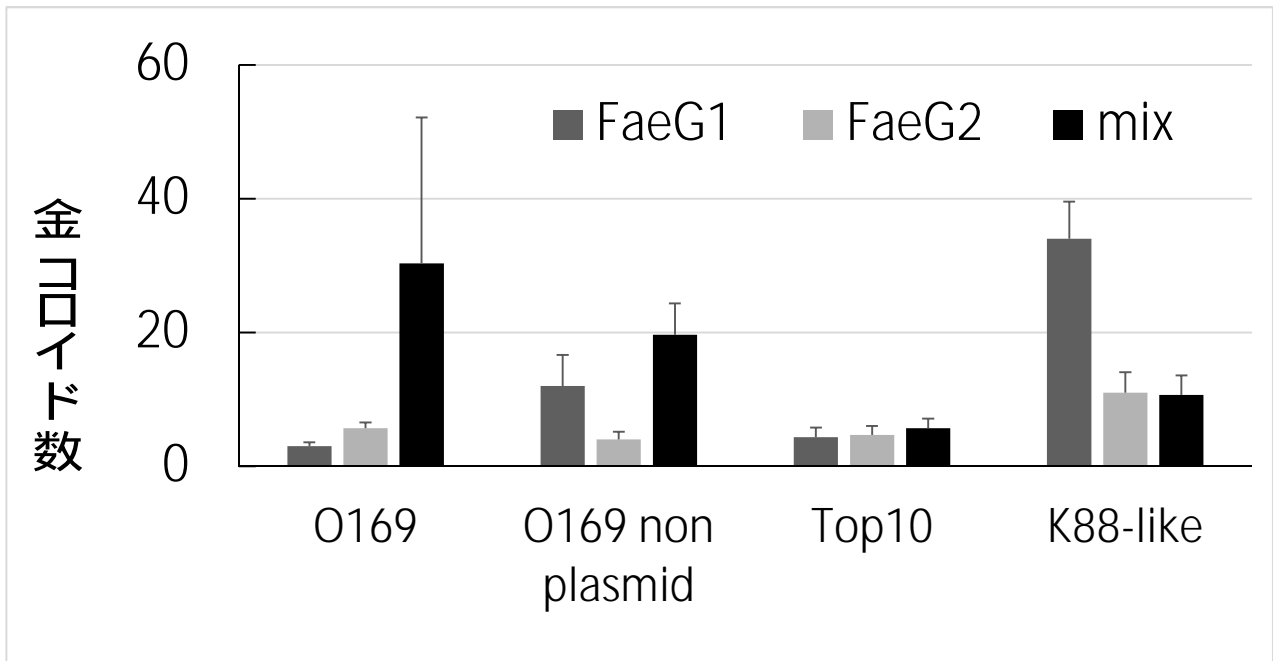


図4. 免疫電顕 金コロイド計数結果 (n=3)
 抗 FaeG1, 抗 FaeG2, 両抗体同時に反応させた結果を示している。

・ 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
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	24 (1)	72-76	2017
工藤由起子、寺嶋 淳	冷凍メンチカツの加熱調理による腸管出血性大腸菌の殺菌条件の検討	食品衛生研究	67 (9)	7-13	2017
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.	70 (4)	464-469	2107
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 <i>Escherichia coli</i> isolated from different retail foods.	Int. J. Food Microbiol.	249	44-52	2107