

令和3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）

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

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

病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

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 *Escherichia albertii* 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

Escherichia albertii の食品での検査法を確立するために、11 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。*E. albertii* 遺伝子検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)では、鶏肉およびモヤシ検体にかかわらず、また高菌数接種 (88.5 CFU/25g) および低菌数接種 (17.7 CFU/25g) にかかわらず菌接種検体の全てが陽性であった。分離培養法では、高菌数接種の鶏肉検体においては、いずれの分離培地でも全検体から接種菌が分離され、モヤシ検体においても8割を超える検体から接種菌が分離された。低菌数接種の鶏肉検体においては、RX-DHL および RX-MAC では全検体から、その他の培地では9割以上の検体から接種菌が分離され、モヤシ検体においては、5-7割の検体から接種菌が分離された。これらのことから、菌数が1検体当たり約18 CFUの汚染レベルでは鶏肉検体で9割以上、モヤシ検体で5から7割、80 CFU以上の汚染レベルではほとんどの検体から分離されることが示された。また、*E. albertii* 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。さらに、実検体で遺伝子検出で陽性になった場合には、分離平板培地から釣菌するコロニー数を増やすことによって検出率を向上させることが重要であると考えられる。

研究協力者

埼玉県衛生研究所

土井りえ、榊田 希

東京都健康安全研究センター

小西典子、尾畑浩魅、齊木 大

岩手県環境保健研究センター	山中拓哉
宮城県保健環境センター	佐藤千鶴子、山谷聡子
秋田県健康環境センター	今野貴之
宇都宮市衛生環境試験所	床井由紀
山梨県衛生環境研究所	柳本恵太
三重県保健環境研究所	小林章人
川崎市健康安全研究所	小嶋由香
静岡市環境保健研究所	高橋直人
福岡市保健環境研究所	松永典久
(公社)日本食品衛生協会	甲斐明美
国立医薬品食品衛生研究所	新井沙倉、廣瀬昌平

A. 研究目的

近年、国内外で *Escherichia albertii* の病原性、特に下痢原性が周知され、海外では食中毒発生リスクが懸念されている。既に日本では2003年以降に集団食中毒事例が発生しており、患者数200人以上の事例も報告されている。しかし、本菌の主要な汚染食品や汚染環境、また、本菌の発症菌量の一部を除いて不明であり解明が求められている。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、*E. albertii* 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。これらの方法を参考にし、*E. albertii* の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。*E. albertii* の主要な O 血清型に関するデータが少ないため、本コラボレイティブ・スタディ参加の複数機関と先行研究を実施し、ヒト由来 *E. albertii* 株2株を用いて添加剤 AB 加 mEC 培地中で 42℃ にて良好に増殖することを確

認した。また、食肉や海産物などの複数の食品についても検討し、本コラボレイティブ・スタディでは、*E. albertii* による汚染が報告されている鶏肉を選定した。また、野菜が原因と推定される集団食中毒事例の報告があることから、より夾雑菌が多く *E. albertii* の分離が難しいと推定されるモヤシを選定した。

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：11 試験検査機関

岩手県環境保健研究センター、秋田県健康環境センター、宮城県保健環境センター、宇都宮市衛生環境試験所、埼玉県衛生研究所、東京都健康安全研究センター、山梨県衛生環境研究所、三重県保健環境研究所、川崎市健康安全研究所、静岡市環境保健研究所、福岡市環境保健環境研究所

2. 実施回数：1 回

令和 3 年 12 月 6 日月曜日検体着

3. 試験食品検体：鶏肉、モヤシ

1 機関につき、鶏肉 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）、モヤシ 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）、鶏肉の陽性 1 検体の計 19 検体とした。

4. 機器、試薬および事前準備等

1) 機器

- ・恒温器 (42±1℃、37±1℃)
- ・ABI リアルタイム PCR (機種 ABI PRISM 7500、7500fast、QuantStudio 3 または QuantStudio 5)

機器設定：*E. albertii* を標的とした FAM-BHQ ラベルについては「FAM-none」、インターナルコントロール (IC) の 16S rRNA 遺伝子を標的とした HEX-BHQ ラベルについては「VIC-none」に設定した。7500fast を使用時は standard chemistry に設定した。なお、Ct 値はオート設定で解析した。

2) 試薬

Modified EC 培地 (mEC; 日水製薬)、Deoxycholate hydrogen sulfide lactose 培地 (DHL; 日水製薬)、MacConkey 培地 (MAC; Difco)、mEC 用添加剤 AB 水溶液、キシロース (富士フィルム和光純薬)、ラムノース (富士フィルム和光純薬)、

アルカリ熱抽出用試薬、リアルタイム PCR 用試薬、熱抽出用試薬

3) 陽性用検体の準備

陽性用検体には、コラボレイティブ・スタディに使用する *E. albertii* 株を試験用接種検体よりも高い菌数レベルに設定して接種した(約 2.5×10^3 CFU/25 g)。

(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鶏もも肉(国産)およびモヤシ(国産)を購入し、事前に *E. albertii* 陰性であることを確認し、検体として使用した。

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培地にて一般生菌数を、XM-G 培地にて大腸菌群数、大腸菌数を測定した。1 食品あたり、高菌数接種用検体 33 検体、低菌数接種用検体 33 検体、非接種用検体 33 検体(計 99 検体)、すなわち 2 食品あたり計 198 検体、加えて、陽性用検体 11 検体(鶏肉のみ設定)を準備(計 209 検体)した。

2. 接種菌液の調製

室温下でカジトン培地に保

存した菌株を TSB 10 mL に 1 白金耳植菌し、37°C で 18 時間培養した。培養液に 9 倍量の PBS を加えて 1 分間混和した。同様に 10^{-7} まで 10 倍階段希釈し、これを接種菌液とした。

3. 検体の調製

ストッカー袋に検体を 25 g 量り採り、菌非接種の検体については空気を抜いてストッカー袋上部をヒートシールした。低菌数検体(約 15-20 CFU/25 g 予定)には接種菌液を 0.1 mL、高菌数検体(約 75-100 CFU/25 g 予定)には同菌液を 0.5 mL、陽性用検体には 10^{-5} 希釈液 0.145 mL を接種し(2.5×10^3 CFU/25 g)、空気を抜いて上部をヒートシールした。接種菌数を確認するために、接種菌液を Tryptic soy 寒天培地(TSA) 72 枚に 0.1 mL ずつ塗抹し、37°C で 24 時間培養した。

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(バイオセーフティーバッグ)に入れ、2 次容器と 3 次容器の間に保冷剤を 3 個入れた。また、保冷剤が検体に直接触れないように梱包剤を入れた。こ

れらをジュラルミンケースに入れてゆうパック（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

検体を添付の小型温度記録計とともに取り扱い、発送から増菌培養終了まで検体の置かれた環境温度を記録した。

検体入りのストマッカー袋にあらかじめ室温（20℃位）以上に温めた添加剤 AB 加 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

一部の培養液をリアルタイム PCR 法および分離培養法用に測り取った。残りは冷蔵保管し、当日使用の予備とした。小型温度記録計はこの段階で室温に置き、容器返送時に返送した。

1. 分離培養法

培養液 10 μL ずつを各分離培地（1%ラムノースおよび 1%キシロース添加 DHL;RX-DHL、1%ラムノースおよび 1%キシロース添加 MAC;RX-MAC、DHL、MAC）2 枚に接種し画線した。この際、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 22～24 時間培養した。

2. DNA 抽出およびリアルタイム PCR 法（*E. albertii* および IC を検出）

培養液 0.1 mL をマイクロチューブに移し、アルカリ熱抽出法にて DNA を抽出した。リアルタイム PCR に使用後、残ったアルカリ熱抽出物を -20℃にて保存した。

[*E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法（IC を含む）]

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

・ 2 × Master Mix (Environmental Mastermix) 12.5 μL

・ プライマー EA_rtF2 (10 μM)、EA_rtR2 (10 μM) 各 0.9 μL

16SRna-F (9.6 μM)、16SRna-R (9.6 μM) 各 0.5 μL

・ プローブ EA_rtP2 (5 μM) FAM-BHQ1 ラベルを 0.9 μL

16SrRNA-P (5 μM) HEX-BHQ1 ラベル 0.6 μL

・ D.W. 5.7 μl

反応条件: 50℃ 2 分、95℃ 10 分とし、95℃ 15 秒、60℃ 1 分を 45 サイクル

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。

1 検体につき 2 反応を行った。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、ポジコン DNA 抽出物 (*E. albertii* EA21 由来) を使用した。

3 日目

1. 分離菌の確認

平板を観察し、各平板種類 (2 枚) ごとに疑われるコロニー最大 5 個を釣菌した。

E. albertii は、DHL、RX-DHL、MAC および RX-MAC 上で無色透明のコロニーを形成し、コロニー周辺の培地の色が透明になる場合が多いが、コロニー中心が赤や茶に発色するものは *E. albertii* ではない場合が多いため注意を払った。

室温または冷蔵保管中にコロニーが赤色化して判別しにくくなるため、培養終了後、速やかにコロニーを確認し、釣菌するコロニーに印をつけた。それらコロニーを RX-DHL に継代 (隣接するコロニーと混ぜられている場合は画線し単離

する) し、 37 ± 1 °C にて 22 ~ 24 時間培養した。

4 日目

1. 分離菌の確認

継代したコロニーの色を 22 ~ 24 時間培養後速やかに確認した。無色透明コロニーとそれ以外の色のコロニーについて数を結果記入表に記入した *E. albertii* と思われるコロニーについてのみ、熱抽出法にて DNA を抽出した。

2. リアルタイム PCR (*E. albertii* および IC を検出)

E. albertii 検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) は、「2. DNA 抽出およびリアルタイム PCR 法 (*E. albertii* および IC を検出)」に従って実施した。ただし、1 検体につき 1 反応を行った。

3. 試験結果報告と解析

結果表に記入した試験結果およびリアルタイム PCR (スクリーニングのみ) 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、検体に添付された小型温度記録計および検体送付容器 (梱包付属品も含む) を試験終了後、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) 検体

供試した検体の一般生菌数は、鶏肉で 1.8×10^4 CFU/g、モヤシでは 6.9×10^7 CFU/g であった。大腸菌群数は、鶏肉で 3.4×10^3 CFU/g、モヤシでは 1.2×10^7 CFU/g であった。大腸菌は、鶏肉 3.0×10^2 CFU/g、モヤシでは検出されなかった (< 100 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、低菌数接種では 17.7 (6-73) CFU/25 g であった。この 5 倍量を高菌数用菌液としたことから、高菌数接種では 88.5 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°C 程度に下がり、その後徐々に低下し、輸送時の温度は

ほぼ -2.5°C から 1.5°C に保たれて各機関に配送された。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 32 時間後までに開梱し増菌培養に供された。増菌温度は全機関でおよそ 41°C から 44°C であった。

(3) 陽性用検体への菌の接種

陽性用検体(鶏肉)の接種菌数は検体あたり 2.6×10^3 CFU/25 g であった。いずれの機関においても、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)と分離培養法のいずれの培地においても陽性であった。

(4) *E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)での検出結果

E. albertii の検出結果は(表 1)、鶏肉検体においては、低菌数接種および高菌数接種ともに全機関で各 3 検体全てが陽性であった。それらの Ct 値は、低菌数接種で約 17~25、高菌数接種で 16~21 であった。菌非接種では、2 機関で 3 検体中 1 検体が陽性(Ct 値は約 20~40)、その他の機関では全検体が陰性であった。また、全機関とも陽性用検体は陽性であり、Ct 値は約 16~17 であった。モヤシ検体においても、鶏肉検体と同様に低菌数接種および高菌数接種ともに全機関で各 3 検体全てが陽性であった。

それらの Ct 値は、低菌数接種で約 19～34、高菌数接種で 18～30 であった。菌非接種では、1 機関で 3 検体中 2 検体が陽性 (Ct 値は約 40～41)、その他の機関では全検体が陰性であった。なお、同時に測定した IC は、全機関で全検体とも陽性であった。

(5) 各分離培地での *E. albertii* 様無色コロニーの分離

4 種類の分離培地 (ラムノースおよびキシロース添加 DHL ; RX-DHL、ラムノースおよびキシロース添加 MAC ; RX-MAC、DHL、MAC) 上のコロニーを観察し、各培地につき最大 5 コロニーの *E. albertii* 様無色コロニーを釣菌した。

各分離培地での *E. albertii* 様無色コロニーが分離された検体の割合を集計した。鶏肉検体の低菌数接種および高菌数接種のいずれでも 11 機関の 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 様無色コロニー陽性であった。鶏肉検体の非接種では、各機関や分離培地によって *E. albertii* 様無色コロニーが認められた検体数は 0 から 3 までばらつきが認められた。モヤシ検体の低菌数接種では、5 機関で 4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 様無色コロニー陽性であり、その他 6 機関はいずれかの分

離培地で陰性が認められた。モヤシ検体の高菌数接種では、4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 様無色コロニー陽性となったのは 9 機関あり、その他 2 機関はいずれかの分離培地で陰性が認められた。モヤシ検体の非接種では、各機関や分離培地によって *E. albertii* 様無色コロニーが認められた検体数は 0 から 3 までばらつきが認められた。

各分離培地での *E. albertii* 様無色コロニー数 (3 検体合計) を集計した。鶏肉検体の低菌数接種では、*E. albertii* 様無色コロニーの集計数は 9 機関が 4 種類の全分離培地のいずれにおいても合計 15 コロニー、2 機関では分離培地の一部で 10 から 15 コロニーであった。鶏肉検体の高菌数接種では、*E. albertii* 様無色コロニーの集計数は 8 機関が 4 種類の全分離培地で合計 15 コロニー、3 機関では分離培地の一部で 12 から 14 コロニーであった。鶏肉検体の非接種では、各機関や分離培地によって *E. albertii* 様無色コロニー数の合計が 0 から 15 までばらつきが認められた。モヤシ検体の低菌数接種では、*E. albertii* 様無色コロニーの集計数は 5 機関が 4 種類の全分離培地で合計 15 コロニー、6 機関で

は分離培地の一部で 0 から 15 コロニーであった。特に、RX-DHL および RX-MAC で各 1 機関で *E. albertii* 様無色コロニーが生育していなかった。モヤシ検体の高菌数接種では、*E. albertii* 様無色コロニーの集計数は 7 機関が 4 種類の全分離培地で合計 15 コロニー、4 機関では分離培地の一部で 2 から 15 コロニーであった。モヤシ検体の非接種では、各機関や分離培地によって *E. albertii* 様無色コロニー数の合計が 0 から 15 までばらつきが認められた。

(6) 分離培地から RX-DHL に継代したコロニーの色による判定

(5) で釣菌した分離培地上の *E. albertii* 様無色コロニー (最大 5 コロニー) を RX-DHL へ継代し培養した際の生育コロニーの色を判定した。

分離培地から RX-DHL に継代したコロニーが *E. albertii* 様無色コロニーであった検体の割合を集計した。鶏肉検体の低菌数接種では、11 機関中 10 機関が 4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検体、1 機関の DHL では 3 検体中 2 検体、MAC では 3 検体中 1 検体が *E. albertii* 様無色コロニー陽性であった。鶏肉検体の高菌数接種では、全機関で 4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検

体が *E. albertii* 様無色コロニー陽性であった。鶏肉検体の非接種では、全ての *E. albertii* 様無色コロニーが継代した RX-DHL 上では *E. albertii* 様無色コロニーではなかった。モヤシ検体の低菌数接種では、3 機関が 4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検体で *E. albertii* 様無色コロニー陽性であり、その他の機関はいずれかの条件かで陰性が認められた。特に、RX-DHL は 1 機関、RX-MAC は 1 機関、DHL は 2 機関、MAC は 3 機関が 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 様無色コロニー陰性となった。モヤシ検体の高菌数接種では、7 機関が 4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 様無色コロニー陽性となり、その他の機関はいずれかの条件で陰性が認められた。特に、DHL と MAC での分離においては 1 機関が 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 様無色コロニー陰性となった。モヤシ検体の非接種では、RX-DHL で 1 機関、RX-MAC で 2 機関でそれぞれ 1 検体が *E. albertii* 様無色コロニー陽性となったが、それらを除いた全検体が継代した RX-DHL 上では *E. albertii* 様無色コロニー陰性であった。

分離培地から RX-DHL に継代したコロニーのうちの *E. albertii* 様

無色コロニーの割合(3検体の合計)を集計した。モヤシ検体の低菌数接種では、RX-DHL および RX-MAC で各 1 機関、DHL で 2 機関、MAC で 3 機関、モヤシ検体の高菌数接種では、DHL および MAC で各 1 機関では継代した 2 から 15 個のコロニー全てが RX-DHL 上では *E. albertii* 様無色コロニーを形成しなかった。

分離培地から RX-DHL に継代したコロニーのうちの *E. albertii* 様無色コロニーの割合(全機関合計)を集計した(表 2)。鶏肉検体の低菌数接種では、RX-DHL で 0.942、RX-MAC で 0.957 と高い割合で釣菌したコロニーが RX-DHL 培地上で *E. albertii* 様無色コロニーであった一方で、DHL と MAC ではそれぞれ 0.761 と 0.744 と割合が低かった。高菌数接種では、いずれの培地でも継代したコロニーの RX-DHL 上での *E. albertii* 様無色コロニーの割合が 0.840 以上と高かった。非接種では、RX-DHL で 18 コロニー、RX-MAC で 25 コロニー、DHL で 94 コロニー、MAC で 138 コロニーを釣菌し継代したが、全て継代した RX-DHL 上では *E. albertii* 様無色コロニーを形成しなかった。モヤシ検体の低菌数接種では、RX-DHL で 0.825、RX-MAC で 0.847 と高い割合で継代したコロニーが RX-DHL 培地

上で *E. albertii* 様無色コロニーであった一方で、DHL と MAC でそれぞれ 0.537 と 0.323 と割合が低かった。モヤシ検体の高菌数接種では、RX-DHL、RX-MAC、DHL で 0.945 以上と高い割合で継代したコロニーが RX-DHL 培地上で *E. albertii* 様無色コロニーであった。MAC では、0.588 と約半数のコロニーは継代した RX-DHL 上では *E. albertii* 様無色コロニーを形成しなかった。モヤシ検体の非接種では、RX-DHL で 5 コロニー継代したうちの 1 コロニー、RX-MAC で 9 コロニー継代したうちの 3 コロニーが RX-DHL 上で *E. albertii* 様無色コロニーであったが、DHL の 40 コロニー、MAC の 130 コロニーを含むその他全てのコロニーは、継代した RX-DHL 上では *E. albertii* 様無色コロニーを形成しなかった。

(7) 継代 RX-DHL 培地上で *E. albertii* 様無色であったコロニーの PCR による確認

(6) で継代 RX-DHL 培地上で *E. albertii* 様無色コロニーを形成したコロニーについて、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR にて *E. albertii* であるか確認した。

継代で *E. albertii* 様無色であったコロニーのうち PCR で *E. albertii* であると確定された検体

の割合を集計した。その結果、鶏肉検体の低菌数接種では、11 機関中 10 機関で 4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陽性と判定され、1 機関で DHL の 2 検体中 2 検体、MAC の 1 検体中 1 検体が *E. albertii* 分離陽性と判定された。鶏肉検体の高菌数接種では、全機関で 4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陽性と判定された。鶏肉検体の非接種では、全機関の全分離培地で検出されなかった。モヤシ検体の低菌数接種では、11 機関中 3 機関において、4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陽性と判定された。特に、RX-DHL および RX-MAC では 2 機関、DHL は 4 機関、MAC は 3 機関で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陰性と判定された。モヤシ検体の高菌数接種では、11 機関中 7 機関において、4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陽性と判定された。その他 4 機関については、RX-DHL では 1 機関で 2 検体中 2 検体、RX-MAC では 1 機関で 1 検体中 1 検体、DHL では 1 機関で 2 検体中 2 検体、MAC では 2 機関で 2 検体中 2 検体が *E. albertii* 分離陽性となった。特に、DHL および MAC では各 1 機関で 3 検体中 3 検体が

E. albertii 分離陰性と判定された。モヤシ検体の非接種では、全機関で *E. albertii* 分離陰性であった。

継代で *E. albertii* 様無色のコロニーのうち PCR で *E. albertii* であると確定されたコロニーの割合（3 検体の合計）を集計した。鶏肉検体の低菌数接種では、RX-DHL で供試した 6 から 15 コロニー、RX-MAC で 9 から 15 コロニー、DHL で 7 から 15 コロニー、MAC で 2 から 15 コロニーの全てが *E. albertii* であると確定された。鶏肉検体の高菌数接種では、RX-DHL で供試した 12 から 15 コロニー、RX-MAC で 14 から 15 コロニー、DHL で 10 から 15 コロニー、MAC で 7 から 15 コロニーの全てが *E. albertii* であると確定された。鶏肉検体の非接種では、全機関の全分離培地で *E. albertii* が分離されなかった。モヤシ検体の低菌数接種では、RX-DHL および RX-MAC で 1 機関、DHL で 2 機関、MAC で 3 機関において、継代した RX-DHL 培地で *E. albertii* 様無色コロニーが存在しなかった。また、RX-DHL で 1 機関の 1 コロニー、RX-MAC で 1 機関の 3 コロニー、DHL で 2 機関の各 1 コロニーが全て *E. albertii* でないと確定された。上記以外のモヤシ検体の低菌

数接種は、継代した RX-DHL 培地で *E. albertii* 様無色であった各 1 から 15 コロニー全てが *E. albertii* であると確定された。モヤシ検体の高菌数接種では、1 機関の DHL および MAC において、継代した RX-DHL 培地で *E. albertii* 様無色コロニーが存在しなかった。上記以外のモヤシ検体の低菌数は、継代した RX-DHL 培地で *E. albertii* 様無色であった各 2 から 15 コロニー全てが *E. albertii* であると確定された。

また、継代で *E. albertii* 様無色のコロニーのうち PCR で *E. albertii* であると確定されたコロニーの割合（全機関合計）を集計した（表 3）。鶏肉検体の低菌数接種および高菌数接種では、PCR に供試した全コロニーが *E. albertii* 陽性であった。また、非接種では、継代した RX-DHL で *E. albertii* 様無色のコロニーが無かったため、PCR に供試したコロニーは無かった。モヤシ検体の低菌数接種では、RX-DHL、RX-MAC、DHL でそれぞれ 1、3、2 個の *E. albertii* 陰性コロニーが存在した。高菌数接種では、PCR に供試した全てのコロニーが *E. albertii* 陽性であった。非接種では RX-DHL および RX-MAC でそれぞれ 1、3 コロニーは *E. albertii* 陰

性であった。鶏肉検体およびモヤシ検体を合計したコロニー数で比較すると、*E. albertii* 陽性コロニー数は RX-MAC で最も多く（548 コロニー）、次いで RX-DHL（522 コロニー）、DHL（435 コロニー）、MAC（404 コロニー）となった。

（8）各分離培地での *E. albertii* 分離の結果

各分離培地での *E. albertii* が分離された検体の割合を集計した。鶏肉検体の低菌数接種では、1 機関の DHL（3 検体中 2 検体陽性）および MAC（3 検体中 1 検体陽性）を除く全ての条件で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陽性となった。また、鶏肉検体の高菌数接種では、全ての条件で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陽性となり、非接種では、全ての条件で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陰性となった。モヤシ検体の低菌数接種では、RX-DHL と RX-MAC において 6 機関、DHL において 5 機関、MAC において 3 機関で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陽性となった。モヤシ検体の低菌数接種において 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陰性となったのは、RX-DHL で 2 機関、RX-MAC で 2 機関、DHL で 4 機関、MAC で 3 機関あった。モヤシ検体の高菌数接種では、RX-DHL と RX-MAC

において 10 機関、DHL において 9 機関、MAC において 8 機関で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陽性となった。モヤシ検体の高菌数接種において 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陰性となったのは、機関 5 の DHL および MAC のみであった。鶏肉検体の非接種では、全ての条件で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陰性となった。

各分離培地での釣菌したコロニーのうち *E. albertii* コロニーの割合（3 検体の合計）を集計した。鶏肉検体の低菌数接種で、RX-DHL は釣菌した 10 から 15 コロニーのうちの 6 から 15 コロニー、RX-MAC は釣菌した 11 から 15 コロニーのうちの 9 から 15 コロニー、DHL は釣菌した 12 から 15 コロニーのうちの 7 から 15 コロニー、MAC は釣菌した 12 から 15 コロニーのうちの 2 から 15 コロニーが *E. albertii* であると確定された。鶏肉検体の高菌数接種では、RX-DHL は釣菌した 12 から 15 コロニーのうちの 12 から 15 コロニー、RX-MAC は釣菌した 15 コロニーのうちの 14 から 15 コロニー、DHL は釣菌した 12 から 15 コロニーのうちの 10 から 15 コロニー、MAC は釣菌した 13 から 15 コロニーのうちの 7 から 15 コロニーが *E. albertii* であると

確定された。鶏肉検体の非接種では、条件によって釣菌コロニーがなかったものから最大 15 コロニーであったが、全機関の全分離培地で *E. albertii* は分離されなかった。モヤシ検体の低菌数接種では、釣菌したコロニー数は分離培地の種類や機関によってはなかったものから最大 15 コロニーであり、それら釣菌したコロニーの全てが *E. albertii* でなかった分離培地が複数の機関で認められた。モヤシ検体の高菌数接種でも、釣菌したコロニー数は分離培地の種類や機関によっては 2 から最大 15 コロニーであり、それら釣菌したコロニーの全てが *E. albertii* でなかった分離培地が 1 機関で認められた。モヤシ検体の非接種では、全機関の各分離培地で釣菌したコロニー数は 0 から 15 コロニーであったが、いずれも *E. albertii* ではなかった。

また、各分離培地での釣菌したコロニーのうち *E. albertii* コロニーの割合（全機関合計）を集計した（表 4）。RX-DHL で 522/581（89.8%）、RX-MAC で 548/615（89.1%）、DHL で 435/684（63.6%）、MAC で 404/796（50.8%）が *E. albertii* であった。

（9）感度と特異性

各分離結果について、検出方法別に感度及び特異性を算出した(表5)。*E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)の検出感度は、鶏肉およびモヤシの両検体の低菌数接種および高菌数接種の両条件で 1.000 であった。分離培養法では、鶏肉検体の低菌数接種の検出感度は、RX-DHL および RX-MAC で 1.000、DHL で 0.970、MAC で 0.939 であった。鶏肉検体の高菌数接種の検出感度は、分離に用いた4種類の全分離培地で 1.000 であった。モヤシ検体の低菌数接種の検出感度は、RX-DHL で 0.667、RX-MAC で 0.727、DHL で 0.576、MAC で 0.515 であった。モヤシ検体の高菌数接種の検出感度は、RX-DHL で 0.970、RX-MAC で 0.939、DHL で 0.879、MAC で 0.848 であった。

特異性は、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)において、鶏肉検体およびモヤシ検体で、*E. albertii* 検出は 0.939 であった。なお、IC は、いずれの検体でも 1.000 であった。分離培養法において、鶏肉検体およびモヤシ検体で、4種類の全分離培地で特異性は 1.000 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、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)の IC 検出については、*E. albertii* 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)であることを確認するために設定しているため、統計解析には含めなかった。リアルタイム PCR 法および4種類の培地による分離培養法の計5種類の方法を比較した結果、鶏肉検体では方法間に有意な差は認められなかった。一方、モヤシ検体では、分離培養法の DHL および MAC は、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)よりも検出率が有意に低かった。次に、4種類の培地による分離培養法間を比較した結果、鶏肉検体では、DHL および MAC は、RX-DHL および RX-MAC よりも検出率が有意に低かった。一方、モヤシ検体では、MAC は、RX-DHL および RX-MAC よりも検出率が有意に低かった。

D. 考察

E. albertii を対象とした食品での検査法の確立のために、11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。*E. albertii* と同じく食中毒原因細菌の一種で

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、添加剤 AB 加 mEC 培地中での 42°C での増菌培養法と遺伝子検出法および各選択分離培地の組み合わせによる分離培養法で構成された。食品検体には、*E. albertii* の鶏肉汚染が報告されていることから鶏肉を選定し、また、野菜が原因と推定される集団食中毒事例の報告があったことから、より夾雑菌が多いモヤシを選定した。また、本コラボレイティブ・スタディ参加の複数機関と実施した先行研究にて、本コラボレイティブ・スタディに供試しなかった *E. albertii* 1 株についても野菜や海産物などの多種の食品に菌を接種して各種検出法を比較検討した。それらの結果を鑑みて、優れていると考えられる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。

本コラボレイティブ・スタディの結果、検出感度は、高菌数接種（88.5 CFU/25g）では、鶏肉検体で全ての検出方法で 1.000 であり、モヤシ検体では *E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法（IC を含む）で 1.000 であり、分離培養法では 0.848-0.970 であった（表 5）。80 CFU 以上であれば高率に *E. albertii* が検出されることが判明した。低菌数接種（17.7 CFU/25g）では、鶏肉検体で *E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法（IC を含む）および分離培養法の RX-DHL と RX-MAC で 1.000 であり、分離培養法の DHL で 0.970、MAC で 0.939 であった。モヤシ検体では *E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法（IC を含む）で 1.000 であり、分離培養法では 0.515-0.727 であった。これらの結果から、約 18CFU の菌数レベルであっても鶏肉検体からは高率に検出され、モヤシ検体でも過半数からは検出されることが判明した。モヤシ検体の分離培養法で検出率が低下した理由として、モヤシ検体に含まれる夾雑菌が影響している可能性が考えられた。本コラボレイティブ・スタディで使用した鶏肉検体の一般生菌数は 1.8×10^4 CFU/g であるのに対し、モヤシ検体

は 6.9×10^7 CFU/g と約 1,000 倍ほど高く、また、大腸菌群数も鶏肉検体の約 10,000 倍高かった。そのため、接種した *E. albertii* が増菌培養液中にて十分に増殖できていなかった可能性が考えられた。*E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) において、低菌数接種の鶏肉検体で Ct 値約 17-25、モヤシ検体で Ct 値約 19-34 であり、さらに高菌数接種の鶏肉検体で Ct 値約 16-21、モヤシ検体で Ct 値約 18-30 と、いずれの接種菌数でもモヤシ検体の方が Ct 値が高く、増菌培養液中の *E. albertii* 菌数が鶏肉検体よりも低いことが示された。

E. albertii 検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) で検出されたが、分離培養法で *E. albertii* が検出されない検体は、鶏肉検体の低菌数接種において 1 機関で DHL での 3 検体中 1 検体および MAC での 3 検体中 2 検体の合計 3 検体が存在した。同様に、モヤシ検体の低菌数接種において 8 機関で RX-DHL の 11 検体、RX-MAC の 9 検体、DHL の 14 検体、MAC の 16 検体の合計 50 検体が分離培養法で *E. albertii* が検出されなかった。モヤシ検体の高菌数接種において 4 機関で RX-DHL の 1 検体、RX-MAC の 2 検体、DHL の 4 検体、MAC の 5 検体の合計 12 検

体が分離培養法で *E. albertii* が検出されなかった。これらの結果から、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) のほうが分離培養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分離培養法に供試することで効率的な試験が行えるものと考えられた。

E. albertii 検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) で検出され、分離培養法で検出されない検体では、増菌培地中で *E. albertii* は増殖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 (5 コロニー) 以上に釣菌することによって分離培養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考えられる。

本コラボレイティブ・スタディでは、4 種類の分離培地を使用した。ラムノースとキシロースを添加した培地、すなわち RX-DHL および RX-MAC のほうが感度が高い結果であった (表 5)。また、釣菌したコロニー数はラムノースとキシロースを添加しない培地、すなわち DHL および MAC のほうが多いにも

かかわらず、コロニーが *E. albertii* であった割合は低い結果であった（表 4）。ラムノースとキシロースを添加した培地のほうが鑑別性が高くなることで、効率的かつ高感度に試験が実施されると考えられた。また、本コラボレイティブ・スタディでは、各種分離培地上のコロニーを RX-DHL に継代し、*E. albertii* の特徴である無色コロニーのみを PCR に供試した。これは、*E. albertii* の特異的な選択剤が未開発であるため糖の分解を指標にコロニーを選別する必要があり、隣接するコロニーの影響を大きく受ける可能性を考慮したためである。本試験結果においても、各種選択培地上に生育した *E. albertii* と疑われるコロニーを RX-DHL 上に単離した際に、*E. albertii* とは異なる発色を示すコロニーが生育した例が多数認められた。分離培地として RX-DHL を選択した場合でも、釣菌した 581 コロニーのうち 57 コロニー（約 1 割）は *E. albertii* 以外の細菌種であったため、分離培地から疑われるコロニーを RX-DHL に継代してコロニーの発色を確かめることは有効な手法と考えられる。

E. albertii 検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) の特異性につい

ては、非接種で偽陽性を示した鶏肉検体およびモヤシ検体が各 2 検体（合計 4 検体）（表 1、表 5）認められた。これら 4 検体全て、2 反応のうちの 1 反応のみ Ct 値が得られており、1 検体を除き Ct 値が約 40 以上と高かった。1 検体は Ct 値が 20 と低かったが、増幅曲線を確認したところ、波打つように乱れていたために正確な Ct 値が得られなかったと考えられた（詳細略）。これら 4 検体について、後日冷蔵保管していた食品培養液から改めて DNA を抽出し直し、リアルタイム PCR を実施したところ、全て陰性となった。培養液由来の夾雑物によるリアルタイム PCR の増幅効率への影響もあるため、Ct 値が約 40 以上など大きい値の場合や増幅曲線に乱れがある場合は、抽出操作から再度行うことが推奨される。また、検体作製前に食品が *E. albertii* 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と考える。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可能性も考えられる。

以上のように、本コロボレイティブ・スタディで使用された添加剤 AB 加 mEC 培地 (42°C) での増菌培養法、遺伝子検出法および各種分離培地を用いた分離培養法によって *E. albertii* の比較的高率な検出が認められた。また、本コロボレイティブ・スタディでは、釣菌するコロニー数に限度を設けていたが、実際の試験では遺伝子検出陽性になった検体では、分離平板培地から釣菌するコロニー数を多くすることによって検出率を向上させる必要があると考えられる。さらに、本コロボレイティブ・スタディの結果にかかわらず、各機関での試験室内や試験手順等の確認などを改めて行う機会として有用であると思われる。

E. 結論

本コロボレイティブ・スタディでは、*E. albertii* の食品での検査法を確立するために、11 試験研究機関の参加のもとに本菌接種食品検体 (低菌数レベル: 17.7 CFU/25g、高菌数レベル: 88.5 CFU/25g) を用いて検討した。その結果、*E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法は、分離培養法と同等またはそれよりも優れており、分離培養法のなかではラムノースおよびキシ

ロースを添加した分離培地が添加しないものよりも優れていた。それらの感度は、総じて比較的高いことが確認され、本コロボレイティブ・スタディの前に取り組んだ先行研究結果を鑑みると他食品への応用においても良好な結果が得られることが期待される。本コロボレイティブ・スタディで使用したような方法を用いて、選択増菌培養を行い、その増菌培養液を供試して *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法によるスクリーニングを行い、陽性検体については増菌培養液を選択分離培地にて分離培養することが、食品での *E. albertii* 検査法として優れた方法であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Hirose, S., Nakamura, Y., Arai, S., and Hara-Kudo, Y. Development of a selective enrichment medium for the detection of *Escherichia albertii* in foods and the analysis of a foodborne outbreak. (投稿中)

(学会等発表)

新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、
床井由紀、長岡宏美、永井佑樹、
前田莉花、土屋彰彦、小嶋由香、
柴田瑞葉、大岡唯祐、大屋賢司、
大西貴弘、工藤由起子。
Escherichia albertii 特異的リ
アルタイムPCR法の開発と市販鶏
肉の汚染実態調査。第42回日本食
品微生物学会学術総会。令和3年
9月21日-10月20日。オンデマ
ンド

廣瀬昌平、大屋賢司、新井沙倉、
小椋容子、工藤由起子。
Escherichia albertii に適する
選択増菌培地の開発。第117回
日本食品衛生学会学術講演会。令
和3年10月26日-11月9日。オ
ンライン

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

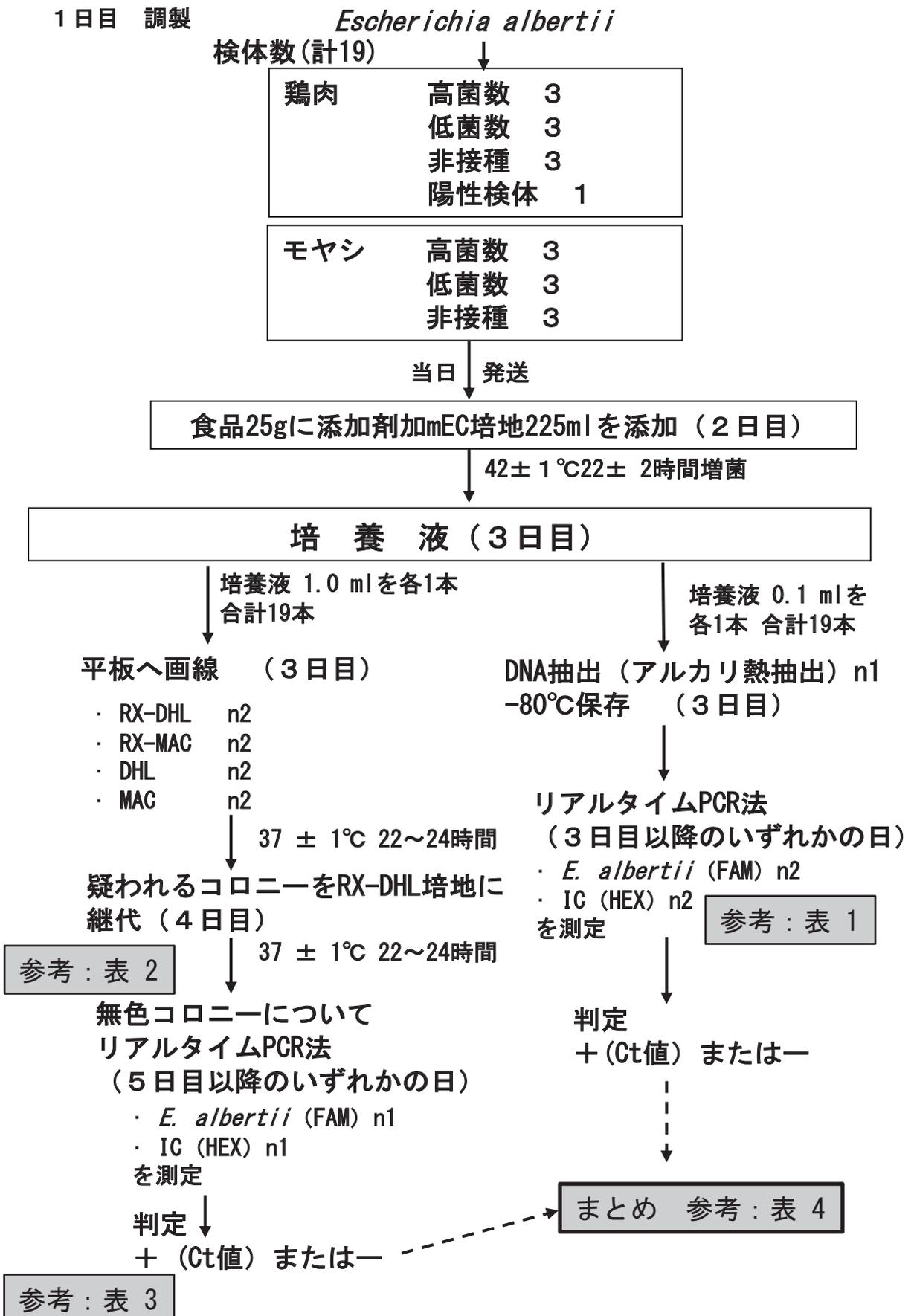


図1 *Escherichia albertii*の検査法のコラボレイティブ・スタディ

表 1. リアルタイムPCR法での*E. albertii*検出率

機関番号		1		2		3	
		判定	Ct値	判定	Ct値	判定	Ct値
鶏肉	接種：低菌数	3/3 ^a	18.9-20.8	3/3	20.1-21.5	3/3	17.9-18.5
	：高菌数	3/3	17.2-19.1	3/3	16.8-17.5	3/3	15.9-16.2
	非接種	0/3	-	0/3	-	1/3	20.2
モヤシ	接種：低菌数	3/3	20.7-23.3	3/3	23.0-26.0	3/3	20.2-21.7
	：高菌数	3/3	20.0-20.8	3/3	20.7-21.2	3/3	19.6-20.7
	非接種	0/3	-	0/3	-	0/3	-

機関番号		4		5		6	
		判定	Ct値	判定	Ct値	判定	Ct値
鶏肉	接種：低菌数	3/3	17.3-17.9	3/3	19.2-24.9	3/3	17.9-19.1
	：高菌数	3/3	16.8-19.4	3/3	18.9-21.0	3/3	17.1-17.8
	非接種	0/3	-	0/3	-	0/3	-
モヤシ	接種：低菌数	3/3	18.7-19.0	3/3	30.3-33.5	3/3	22.8-25.9
	：高菌数	3/3	18.6-19.1	3/3	26.4-29.8	3/3	21.3-21.6
	非接種	2/3	40.1-41.0	0/3	-	0/3	-

機関番号		7		8		9	
		判定	Ct値	判定	Ct値	判定	Ct値
鶏肉	接種：低菌数	3/3	18.3-19.4	3/3	18.0-21.7	3/3	18.2-20.6
	：高菌数	3/3	16.8-17.1	3/3	16.5-20.2	3/3	17.8-18.3
	非接種	0/3	-	0/3	-	1/3	39.7
モヤシ	接種：低菌数	3/3	24.3-26.6	3/3	20.7-24.7	3/3	24.2-24.7
	：高菌数	3/3	22.0-24.0	3/3	19.6-21.9	3/3	20.4-21.4
	非接種	0/3	-	0/3	-	0/3	-

機関番号		10		11	
		判定	Ct値	判定	Ct値
鶏肉	接種：低菌数	3/3	19.8-21.3	3/3	16.5-17.9
	：高菌数	3/3	18.0-18.5	3/3	16.0-17.4
	非接種	0/3	-	0/3	-
モヤシ	接種：低菌数	3/3	23.5-23.8	3/3	21.3-22.7
	：高菌数	3/3	20.8-21.4	3/3	18.3-20.2
	非接種	0/3	-	0/3	-

^a判定：陽性検体数／総検体数

Ct値：検出サイクル数

2反応のうち片方でも+の検体を陽性（+）としてカウント

表 2. 分離培地からRX-DHLに継代したコロニーのうちのエ. *albertii*様無色コロニーの割合 (全機関合計)

		RX-DHL	RX-MAC	DHL	MAC
鶏肉	接種：低菌数	146/155 ^a (0.942)	154/161 (0.957)	121/159 (0.761)	122/164 (0.744)
	：高菌数	160/161 (0.994)	164/165 (0.994)	147/160 (0.919)	137/163 (0.840)
	非接種	0/18 (0.000)	0/25 (0.000)	0/94 (0.000)	0/138 (0.000)
モヤシ	接種：低菌数	80/97 (0.825)	100/118 (0.847)	65/121 (0.537)	51/158 (0.323)
	：高菌数	137/145 (0.945)	133/137 (0.971)	104/110 (0.945)	94/160 (0.588)
	非接種	1/5 (0.200)	3/9 (0.333)	0/40 (0.000)	0/130 (0.000)
合計		524/581 (0.902)	554/615 (0.901)	437/684 (0.639)	404/796 (0.508)

^a継代したRX-DHL培地上的エ. *albertii*様無色コロニー数 / 各培地上的エ. *albertii*様無色コロニー数

表 3. 継代で *E. albertii* 様無色のコロニーのうちPCRで *E. albertii* であると確定されたコロニーの割合 (全機関合計)

		RX-DHL	RX-MAC	DHL	MAC
鶏肉	接種：低菌数	146/146 ^a (1.000)	154/154 (1.000)	121/121 (1.000)	122/122 (1.000)
	：高菌数	160/160 (1.000)	164/164 (1.000)	147/147 (1.000)	137/137 (1.000)
	非接種	0/0 (0.000)	0/0 (0.000)	0/0 (0.000)	0/0 (0.000)
モヤシ	接種：低菌数	79/80 (0.988)	97/100 (0.970)	63/65 (0.969)	51/51 (1.000)
	：高菌数	137/137 (1.000)	133/133 (1.000)	104/104 (1.000)	94/94 (1.000)
	非接種	0/1 (0.000)	0/3 (0.000)	0/0 (0.000)	0/0 (0.000)
合計		522/524 (0.996)	548/554 (0.989)	435/437 (0.995)	404/404 (1.000)

^aPCRで *E. albertii* であると確定されたコロニー数 / 継代したRX-DHL培地で *E. albertii* 様無色であったコロニー数

表 4. 各分離培地での釣菌したコロニーのうち*E. albertii*コロニーの割合（全機関合計）

		RX-DHL	RX-MAC	DHL	MAC
鶏肉	接種：低菌数	146/155 ^a (0.942)	154/161 (0.957)	121/159 (0.761)	122/164 (0.744)
	：高菌数	160/161 (0.994)	164/165 (0.994)	147/160 (0.919)	137/163 (0.840)
	非接種	0/18 (0.000)	0/25 (0.000)	0/94 (0.000)	0/138 (0.000)
モヤシ	接種：低菌数	79/97 (0.814)	97/118 (0.822)	63/121 (0.521)	51/158 (0.323)
	：高菌数	137/145 (0.945)	133/137 (0.971)	104/110 (0.945)	94/160 (0.588)
	非接種	0/5 (0.000)	0/9 (0.000)	0/40 (0.000)	0/130 (0.000)
合計		522/581 (0.898)	548/615 (0.891)	435/684 (0.636)	404/796 (0.508)

^aPCRで*E. albertii*であると確定されたと確定されたコロニー数/各分離培地で*E. albertii*様無色であったコロニー数

表 5. 検出方法の感度と特異性

方法	感度				特異性	
	鶏肉		モヤシ		鶏肉	モヤシ
	低菌数 ^a	高菌数 ^a	低菌数	高菌数		
Real-time PCR						
<i>E. albertii</i> 検出	1.000 (33/33) ^b	1.000 (33/33)	1.000 (33/33)	1.000 (33/33)	0.939 (31/33) ^c	0.939 (31/33)
IC検出	1.000 (33/33)	1.000 (33/33)	1.000 (33/33)	1.000 (33/33)	1.000 (33/33)	1.000 (33/33)
分離培養法						
RX-DHL	1.000 (33/33) ^d	1.000 (33/33)	0.667 (22/33)	0.970 (32/33)	1.000 (33/33)	1.000 (33/33)
RX-MAC	1.000 (33/33)	1.000 (33/33)	0.727 (24/33)	0.939 (31/33)	1.000 (33/33)	1.000 (33/33)
DHL	0.970 (32/33)	1.000 (33/33)	0.576 (19/33)	0.879 (29/33)	1.000 (33/33)	1.000 (33/33)
MAC	0.939 (31/33)	1.000 (33/33)	0.515 (17/33)	0.848 (28/33)	1.000 (33/33)	1.000 (33/33)

a 低菌数：17.7 cfu/25 g、高菌数：88.5 cfu/25 g

b 陽性検体数／総接種検体数

c 陰性検体数／総非接種検体数（ただし、IC検出では陽性検体数／総検体数）

d PCR陽性検体数／総検体数