

令和 7 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）
食中毒原因病原大腸菌の検査法の整備及び食中毒対策推進のための
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

食中毒の原因食品解明と拡大防止のための検査法に関する研究

研究分担者 大西貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

これまでに公表されている腸管毒素原性大腸菌（Enterotoxigenic *E. coli*: ETEC）検査法をもとに、通知法案を作成した。自治体の衛生研究所で汎用されているリアルタイム PCR 装置 5 機種を用いて、通知法案に収載した遺伝子検査法を実施したところ、すべての機種が EHEC 通知法を参考にした場合の検出感度を満たすことが示された。今回作成した通知法案は厚生労働省と協議を行い、通知法案の発出を進めていきたいと考える。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所
国立医薬品食品衛生研究所

廣瀬 昌平
新井 紗倉

A. 研究目的

腸管毒素原性大腸菌（Enterotoxigenic *E. coli*: ETEC）は、易熱性エンテロトキシン（LT）、耐熱性エンテロトキシン（ST）の両方、もしくはいずれか一方を産生し下痢を引き起こす。症状は水溶性の下痢を伴うことが多く、ひどい場合には便が米のとぎ汁様になり脱水症状を起こすこともある。野菜や水を介して伝搬することが知られている。腸管毒素原性大腸菌 06、025、027、0148、0153、0159 及び 0169 による事例が多く報告されている。我が国では、

令和 2 年に腸管毒素原性大腸菌による大規模食中毒（患者 1,896 人）が発生しており、その後、減少傾向は認められていない。

本研究では、ETEC を検出または型別するための各種遺伝子検出法についてまとめ、通知法案の作成を目的とした。ETEC の分離同定法については、厚生労働科学研究費による研究事業で検討が行われている¹⁾。この分離同定法は、13 自治体との共同研究の中でその有効性が確認されている²⁾。今回は、この分離同定法を基に PCR 装

置の性能を評価し、これらを盛り込んだ通知法案の作成を行った。

B. 研究方法

[1] 供試リアルタイム PCR 装置

Thermal Cycler Dice Real Time System III 及び IV (タカラバイオ)、QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific)、LightCycler 96 及び PRO (ロシュ・ダイアグノスティックス) を供試した。

[2] ETEC の ST および LT 遺伝子検出法 (スクリーニング) の検討

(1) 供試菌株

患者由来の ESC633 (O159:H34, STh) および ESC673 (O148:H28, STp, LT) の 2 株を供試した。

(2) 食品検体

市販の国産キュウリを供試した。

(3) DNA 溶液の調製

-80℃ に保存された各種菌株を TSB 5 mL に接種し、37℃ にて 18 時間培養した。食品検体を 25 g 採取し、mEC 225 mL を加えて 1 分間ストマッカー処理し、42℃ にて 22±2 時間培養した。この食品培養液にて各 2 株の供試菌株の増菌培養液を 10 倍階段希釈し、菌接種キュウリ培養液 (想定 5~3 log CFU/mL 食品培養液) を調製した。菌接種キュウリ培養液各 100 µL を上記の方法でアルカリ熱抽出法に供試した。抽出

DNA を下記リアルタイム PCR 法のテンプレートとした。

(4) キットを用いたリアルタイム PCR 法

ESC633 および ESC673 のキュウリ培養液希釈 DNA をそれぞれ単独で使用了。Dice III および Dice IV を用いる場合は、ETEC (LT/STp/STh) qPCR Screening Kit (RC100A、タカラバイオ) を供試し、QS5 を用いる場合は、ETEC (LT/STp/STh) qPCR Screening Kit (RC110A、タカラバイオ) を供試した。いずれもオート解析にて判定した。

(5) 自家調整リアルタイム PCR 法

ESC633 および ESC673 のキュウリ培養液希釈 DNA をそれぞれ単独で使用了。LT 遺伝子については West らの方法 (Vet. Microbiol. 122:323-331、2007)、STh 遺伝子については Konishi らの方法 (食品衛生学雑誌. 59:161-166、2018)、STp 遺伝子については Frydendahl らの方法 (Mol. Cell. Probes 15:151-160、2001)、内因性コントロールとしての 16SrRNA 遺伝子については米国農務省 (USDA、MLG 5B Appendix 1.01) のリアルタイム PCR 法を参照した。いずれもオート解析にて判定した。

[2] ETEC の ST および LT 遺伝子型別法の検討

(1) 供試菌株

患者由来の ESC633 (0159:H34, STh) および ESC673 (0148:H28, STp, LT) の 2 株を供試した。

(2) 食品検体

市販の国産キュウリを供試した。

(3) DNA 溶液の調製

-80℃ に保存された各種菌株を TSB 5 mL に接種し、37℃ にて 18 時間培養した。培養液 100 μ L を滅菌 PBS 900 μ L で 10 倍希釈し 10^{-1} ~ 10^{-7} 希釈液を調製した。残りの菌培養液は -80℃ にて冷凍保存した。 10^{-6} および 10^{-7} 希釈液各 100 μ L を 5 枚の TSA に塗抹し、37℃ にて 18 時間培養し、コロニー数をカウントした。また、食品検体を 25 g 採取し、mEC 225 mL を加えて 1 分間ストマッカー処理し、42℃ にて 22 ± 2 時間培養した。この食品培養液にて各 2 株の供試菌株の増菌培養液を適宜希釈し、 10^8 CFU/mL 希釈食品培養液を調製した。さらに、食品培養液 400 μ L にて 100 μ L の 10^8 CFU/mL 希釈食品培養液を 5 倍希釈し、 2×10^7 CFU/mL 希釈食品培養液を調製した。食品培養液にてさらに 10 倍階段希釈し、菌接種キュウリ培養液 (想定 2×10^6 ~ 2×10^3 CFU/mL 食品培養液) を調製した。菌接種食品培養液各 100 μ L を上述のアルカリ熱抽出法に供試した。抽出 DNA のうち、想定 2×10^5

CFU/mL、 2×10^4 CFU/mL および 2×10^3 CFU/mL の 3 濃度の食品培養液について、それぞれ ESC633 および ESC673 の DNA を等量混合し (各株想定 5~3 log CFU/mL)、下記リアルタイム PCR 法のテンプレートとした。

(4) キットを用いたリアルタイム PCR 法

LT および STh を型別する組み合わせでは、ESC633 のキュウリ培養液希釈 DNA および ESC673 のキュウリ培養液希釈 DNA の混合 DNA を用いた。STp を型別する方法では、ESC673 のキュウリ培養液希釈 DNA を単独で使用した。DiceⅢ および DiceⅣ を用いる場合は、ETEC (LT/STp/STh) qPCR Typing Kit (RC101A、タカラバイオ) を供試し、QS5 を用いる場合は、ETEC (LT/STp/STh) qPCR Screening Kit (RC111A、タカラバイオ) を供試した。いずれもオート解析にて判定した。

(5) 自家調整リアルタイム PCR 法

LT および STp の型別法では、ESC673 のキュウリ培養液希釈 DNA を単独で使用した。STh の型別法では、ESC633 のキュウリ培養液希釈 DNA を単独で使用した。リアルタイム PCR 法は、LT 遺伝子については West らの方法、STh 遺伝子については Konishi らの方法、STp 遺伝子

については Frydendahl らの方法、内因性コントロールとしての 16SrRNA 遺伝子については米国農務省 (USDA、MLG 5B Appendix 1.01) のリアルタイム PCR 法を参照した (表 1)。いずれもオート解析にて判定した。

C. 研究結果

[1] ETEC の ST および LT 遺伝子検出法の検討

(1) キットを用いたリアルタイム PCR 法

STh、STp および LT 遺伝子は、Dice Real Time System III、IV、QuantStudio 5、LightCycler 96、PRO のいずれも検出限界が 3 log CFU/mL であった (表 2)。

(2) 自家調整リアルタイム PCR 法

STh、STp および LT 遺伝子は、Dice III および Dice IV では検出限界が 4 log CFU/mL であり、QS5、LightCycler 96 及び PRO では検出限界が 3 log CFU/mL であった (表 2)。

[2] ETEC の ST および LT 遺伝子型別法の検討

(1) キットを用いたリアルタイム PCR 法

Dice Real Time System III、IV、QuantStudio 5、LightCycler

96、PRO のいずれも検出限界が 3 log CFU/mL であった (表 2)。

(2) 自家調整リアルタイム PCR 法

Dice Real Time System III、IV、QuantStudio 5、LightCycler 96、PRO のいずれも検出限界が 3 log CFU/mL であった (表 2)。

D. 考察

ETEC の ST および LT 遺伝子検出法、ST および LT 遺伝子型別法では、キットを用いたリアルタイム PCR 法および自家調整のリアルタイム PCR 法のいずれも検出限界が 3 log CFU/mL または 4 log CFU/mL であり、今回検討したすべての機種が EHEC 通知法を参考にした場合の検出感度を満たすことが示された。

これらのリアルタイム PCR 装置の性能評価を踏まえ、ETEC 通知法案の作成を行った。

E. 結論

食品培養液を用いて ETEC の ST および LT 遺伝子検出法並びに ST および LT 遺伝子型別法の検出限界を比較した。今回対象とした PCR 装置は多くの自治体で使用されているものである。今回の通知法案の中で採用されている ETEC 検査法は、これらのいずれの装置でも使用することができた。今回作成した通知法案は厚生労働省に提出す

る予定である。今後、厚生労働省と協議を行い、通知法案の発出を進めていきたいと考える。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1．論文発表

なし

2．学会発表

なし

H．知的財産権の出願・登録状況

なし

I．参考文献

- 1) Ohtsuka K *et al.*: Selective media and real-time PCR assays for the effective detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in vegetables. LWT, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108409>
- 2) Hara-Kudo Y *et al.*: An interlaboratory study on the detection methods for enterotoxigenic *Escherichia coli* in vegetables using enterotoxin gene screening and selective agars for ETEC-specific isolation. Int J Food Microbiol, 2020, doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108832](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108832).

表1 自家調整リアルタイム PCR 法で使⽤したプライマー

STh	STh-F	AAAGTGGTCCTGAAAGCATGAATAG	Konishi ら, 食 品衛⽣学雑誌. 59:161-166, 2018
	STh-R	CACCCGGTACAAGCAGGATT	
	STh-P	FAM-AGCAATTACTGCTGTGAATTGTGTT-BHQ1	
STp	STp-F	GCAAAATCCGTTTAACTAATCTCAA	Frydendahl et al., Mol. Cell. Probes 15:151-160, 2001
	STp-R	ACAGAAATAAAATTGCCAACATTAGC	
	STp-P	FAM-TTACCTCCCGTCATGTTGTTTCACGGAT-BHQ1	
LT	LT-F	CCGGCAGAGGATGGTTACAG	West et al., Vet. Microbiol. 122:323-331, 2007
	LT-R	GAATCCAGGGTTCTTCTCTCCAA	
	LT-P	FAM-TAGCAGGTTTCCCACCGGATCACC-BHQ1	
16S rRNA	16SrRNA-F	CCTCTTGCCATCGGATGTG	USDA, MLG 5B Appendix 1.01
	16SrRNA-R	GGCTGGTCATCCTCTCAGACC	
	16SrRNA-P	HEX-GTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGAC-BHQ1	

表2 リアルタイム PCR 装置の性能評価

方法	目的	DNA抽出法	標的遺伝子	検出限界 (log CFU/mL)				
				DiceⅢ	DiceⅣ	QS5	96	PRO
キット使用	ST、LT遺伝子検出 (スクリーニング)	アルカリ熱抽出	STh、STp、LT	3	3	3	3	3
	ST、LT遺伝子型別	アルカリ熱抽出	STh	3	3	3	3	3
			STp	3	3	3	3	3
			LT	3	3	3	3	3
自家調整	ST、LT遺伝子検出 (スクリーニング)	アルカリ熱抽出	STh、STp、LT	4	4	3	3	3
	ST、LT遺伝子の型別	アルカリ熱抽出	STh	3	3	3	3	3
			STp	3	3	3	3	3
			LT	3	3	3	3	3