PCR 法による食肉およびふん便中の下痢 原性大腸菌の迅速検査法の検討

大村 正美^{*1}・佐原 啓二^{*2}・大畑 克彦^{*2}・増田 高志^{*2}
内藤 満^{*2}・赤羽 荘資^{*2}

(^{*1} 浜松市衛生試験所, ^{*2} 静岡県衛生環境センター)

(受付 平成 6 年 4 月 4 日)

(受理 平成 6 年 11 月 19 日)

Rapid and Sensitive Method for Detection of Pathogenic *Escherichia coli* (ETEC, VTEC and EIEC) in Meats and Feces Using Polymerase Chain Reaction

Masami OMURA^{*1}, Keiji SAHARA^{*2}, Katsuhiko OHATA^{*2}, Takashi MASUDA^{*2}
Mituru NAITO^{*2} and Sousuke AKAHANE^{*2}

(^{*1} Hamamatsu City Institute of Public Health, 2-11-2, Kamoe, Hamamatsu, Shizuoka 432)

(^{*2} Shizuoka Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science,
4-27-2, Kitaando, Shizuoka, 420)

A direct polymerase chain reaction method to EC cultured broth (named EC-PCR) for screening detection of enteropathogenic *E. coli* (ETEC, VTEC and EIEC) in foods and feces is described.

Eleven *E. coli* strains belonging to three groups (4ETEC: 06, 025, 0128, 0148; 4VTEC: 026, 0111, 0145, 0157; and 3EIEC: 028ac, 0124, 0164) were used for this study. Four pairs of oligonucleotide primers homologous to LT, ST, VT and EIEC genes were used in combination. The culture condition at 37-43°C for 16-20 h in EC broth was most suitable for the EC-PCR method, and no cross readings were observed with other bacteria, substances in meats or feces.

After a 20-h enrichment step, it was possible to detect fewer than 10 to 10² bacteria per g of the artificially inoculated meat. *E. coli* was easily detected because of low contamination with other bacteria which disturb the detection of *E. coli*. However, in feces, it ranged from 10³ to 10⁴ cfu per g. The large number of bacteria with feces are the main limiting factor of the EC-PCR detection assay. All *E. coli* strains examined were detected from all the enrichment cultures on both the EC-PCR and the culture methods. In two sporadic cases and two food poisoning cases, the enteropathogenicity of *E. coli* isolates from patients was rapidly judged by the EC-PCR method.

These findings were consistent with those of the culture method. Thus, the findings suggest that the EC-PCR method is a suitable, sensitive and rapid method for detection of the potentially enteropathogenic *E. coli*.

Key words: *Escherichia coli*, Polymerase chain reaction (PCR), ETEC, VTEC, EIEC, Food poisoning.

はじめに

ヒトの腸管に感染し、急性胃腸炎や食中毒を起こす下

痢原性大腸菌はその病原機序によって4つのタイプ、すなわち組織侵入性大腸菌(EIEC)、病原血清型大腸菌(EPEC)、毒素原性大腸菌(ETEC)およびVero毒素産生性大腸菌(VTEC)に分類されている^{3,6)}。特にVTECは、1990年に浦和市の幼稚園で発生した事例^{1,7)}を契機とし

^{*1} ㊧432 浜松市鴨江 2-11-2

^{*2} ㊧420 静岡市北安東 4-27-2

て国内で注目されるようになり、その原因食品として、食肉およびその加工品との関連性を示唆する報告^{5, 8, 10, 12, 14)}が数多くみられている。

しかし、VTECをはじめとして下痢原性大腸菌の検査法は煩雑ではかの食中毒菌の検査に比べて多くの労力と時間を要するため、検査法の簡易化や迅速化が望まれ、最近ではPCR法の応用が検討されている^{11, 13, 15)}。

そこで、食肉などを汚染する下痢原性大腸菌を効率よく検出するため、著者らは検査材料をEC培地で増菌し、培養液を直接PCR法（遺伝子増幅法）でスクリーニングすることにより、下痢原性大腸菌の存在とそのタイプ（ETEC, EIEC および VTEC）を推定する方法（以下、EC-PCR法）について検討したので報告する。

材料および方法

1. PCR法を下痢原性大腸菌検査へ導入するための基礎実験

PCR法が一般食品や食中毒検体中の下痢原性大腸菌検索に応用できるか否かを知るため、大腸菌培養液を対象にPCR法で検索する方法について実験的に検討した。

1) 供試菌株

実験には下痢原性大腸菌の4つのタイプのうちPCR法の適用可能な次の3タイプ11株を用いた。ETECタイプは、O6:H16（LT, ST産生菌：分与株）、O25:H—（LT産生菌：分与株）、O128:H12（LT産生菌：食中毒患者由来）、O148:H28（ST産生菌：散発下痢症患者由来）の各1株、計4株、VTECタイプは、O26:H—（VT1産生菌：散発下痢症患者由来）、O111:H—（VT1, 2産生菌：分与株）、O145:H—（VT2産生菌：分与株）O157:H7（VT2産生菌：散発下痢症患者由来）の各1株、計4株、EIECタイプは、O124:H—（食中毒患者由来）、O28ac:H—（散発下痢症患者由来）、O164:H—（分与株）の各1株、計3株である。

2) 4種混合プライマーによるPCR法

PCR法は伊藤ら⁴⁾および小林ら⁹⁾の報告に準じた。すなわち、4種のプライマーは、それぞれLT（132bp）、ST（171bp）、VT（228bp）およびEIEC（382bp）特有の遺伝子領域を増幅するもので、この混合プライマー液に、10×Buffer, dNTP, DNAポリメラーゼ（1 unit）を加え、これにあらかじめ100℃ 5分間加熱した大腸菌のサンプル液5μlを加えた最終反応液50μlの系を自動温度変換装置（ASTEC社製、PC-700）で増幅した。反応条件は、熱変性94℃、30秒間、アニーリング45℃、60秒間、伸長反応72℃、90秒間の3ステップを1サイクルとして25サイクル行った。PCR産物は、その10μlをポリアクリルアミドゲルに負荷し、電気泳動後、期待されるサイズのDNA断片の生成の有無を調べた。

3) PCR法で検出可能な最少菌量の測定

3タイプ3株の大腸菌を用いて、上記設定条件で検出

できるPCR用試験菌液5μl当たりの最少菌量を測定した。

4) 増菌培地の検討

EC, LB, BGLBの3種類の増菌培地に、3タイプ8株を接種し、37℃、20時間培養後、増菌液をPCR法にかけ培地が反応に与える影響を比較検討した。

5) 培養時間の検討

3タイプ3株の大腸菌をEC培地10mlに数cfu（colony forming unit）の範囲で接種後、37℃培養しPCR法による検出に必要な培養時間を検討した。

6) 培養温度の検討

EC培地に接種した3タイプ11株の大腸菌は37, 43, 44.5℃の3段階の温度で20時間培養し、PCR法に最適な培養温度を調べた。

2. EC-PCR法の食肉やふん便中の下痢原性大腸菌検査への応用実験

1) 牛肉の汚染細菌がEC-PCR法による下痢原性大腸菌の検出に及ぼす影響

食品成分や食品汚染細菌（雑菌）が大腸菌の増殖に与える影響を調べるため、市販牛肉の10倍乳剤1mlをEC培地10mlに加え、これに供試大腸菌3タイプ3株の10倍段階希釈液0.1mlを数cfuから10⁶cfuオーダーに接種した。これらの試料を37℃、20時間培養後、PCR法で検出可能なEC培地10ml当たりの培養前の最少必要菌量を調べた。

2) 食肉に接種した大腸菌のPCR法による検出

ETEC 3株、VTEC 3株、EIEC 3株の計9株のうち、各1株ずつを組合わせた1組3株を牛肉1g当たり1株各々数百cfuのオーダーで接種し、EC培地増菌後の培養液からPCR法によりDNAバンドが検出されるかどうかを調べた。

次に、肉による違いを調べるため、牛肉のほか豚肉および鶏肉の3種類の食肉にVTEC O157:H7株を1g当たり10, 10³, 10⁵cfuの3段階の菌数で接種し、EC培地で増菌後、PCR法でDNAバンドの有無を確認した。また、PCR法と従来の培養法での検出状況を比較検討した。

3) ふん便に接種した大腸菌のPCR法による検出

ヒトふん便の10倍希釈液1mlをEC培地10mlに接種し、これに食肉と同様の方法で3タイプ3株の大腸菌を接種して菌の検出を試みた。

3. EC-PCR法による食肉および食中毒検体などからの下痢原性大腸菌の検出

1) 市販食肉

市販食肉140検体（牛肉48、豚肉40、鶏肉52）を対象に下痢原性大腸菌の検出を試みた。各食肉10gに90mlの希釈液を加え10倍乳剤を作成する。その1mlをEC培地10mlに接種し37℃20時間培養した増菌液を試料としてEC-PCR法と血清型別を行う従来法で比較検討した。

Table 1. Sensitivity of PCR for the detection of enteropathogenic *E. coli*

Type	Serotype	No. of organisms (cfu) in 5 μ l of sample					
		$\times 10^1$	$\times 10^2$	$\times 10^3$	$\times 10^4$	$\times 10^5$	$\times 10^6$
EPEC	O128:H12	— ¹⁾	—	(+)	+	+	+
VPEC	O157:H7	—	—	(+)	+	+	+
EPEC	O28ac:H—	—	—	(+)	+	+	+

¹⁾ —: not detection, +: detection, (+): thin layer of DNA band.

Table 2. Comparison on enrichment broth for PCR method

Type	Serotype	Enrichment broth ¹⁾		
		EC	LB	BGLB
EPEC	O6:H16	+	+	+
	O128:H12	+	+	+
	O148:H28	+	+	+
VPEC	O26:H—	+	+	+
	O111:H—	+	+	+
	O157:H7	+	+	+
EPEC	O28ac:H—	+	+	+
	O124:H—	+	+	+

¹⁾ Initial cells range in 10 ml of enrichment broth was 10 to 10² cfu.

2) 食中毒および散発下痢症検体

食中毒3例と散発下痢症4例の患者便を対象に、EC培地で増菌後PCR法を行う方法(EC-PCR)と便を直接PCR法にかける方法(Feces-PCR法)で下痢原性大腸菌の検出を行い従来の分離培養法と比較した。

結 果

1. PCR法を下痢原性大腸菌検査へ導入するための基礎実験

1) 3タイプ(EPEC, VPEC, EPEC)の下痢原性大腸菌について、各タイプ1株ずつ計3種類を対象にPCR法によって測定可能な最少菌量を調べた結果、いずれのタイプ株もPCR用試験菌液5 μ l当たり10³から10⁴オーダーの菌量が必要であった(Table 1)。

2) EC, LB, BGLBの3種類の増菌培地がPCR法による大腸菌の検出に与える影響について調べたところ、培地による差は認められなかった(Table 2)。したがって、以下の実験には選択性と培養時間を考慮してEC培地を用いることにした。

3) 各菌株の一定量をEC培地に接種し、PCRでの検出に必要な培養時間を検討した。その結果、37°C培養した場合、接種した数cfuの菌は16時間後に10⁶~10⁷台に、20時間後には10⁸台に達し、PCR法による測定結果も良好であったため、以後の実験の培養時間は20時間にした(Fig. 1)。

4) 増菌に最適な培養温度を検討したところ、37°C、

EPEC ●—●	—	NT	—	—	+	+	+
VPEC △—△	—	NT	—	—	+	+	+
EPEC ▲—▲	—	NT	—	—	+	+	+

Fig. 1. Detection of EPEC (O128:H12), VPEC (O157:H7) and EPEC (O28ac:H—) Using EC-PCR Methods, by Incubation Time for Enrichment.

The number of initial cells in 10 ml of EC broth were 1-10 cfu. —: not detection, +: detection, NT: not tested.

Table 3. Comparison of incubation temperature for EC-PCR method

Type	Serotype ¹⁾	The results of EC-PCR		
		37°C	43°C	44.5°C
EPEC	O6:H16	+	+	—
	O25:H—	+	+	+
	O128:H12	+	+	+
	O148:H28	+	+	+
VPEC	O26:H—	+	+	+
	O111:H—	+	+	—
	O145:H—	+	+	—
	O157:H7	+	+	—
EPEC	O28ac:H—	+	+	+
	O124:H—	+	+	+
	O164:H—	+	+	+

¹⁾ Initial cells range in 10 ml of EC broth was 10 to 10² cfu.

43°C 各20時間培養では供試したすべての株の発育は良好、PCR法の測定結果も良好であった。しかし、食品衛生法などで規定されている大腸菌検査の培養温度44.5°C 20時間培養ではVPEC株を中心に11株中4株

Table 4. Detection of enteropathogenic *E. coli* in beef homogenate by EC-PCR

Type	Serotype	No. of organisms for the initial inoculation ¹⁾						
		$\times 10^0$	$\times 10^1$	$\times 10^2$	$\times 10^3$	$\times 10^4$	$\times 10^5$	$\times 10^6$
ETEC	O128:H12	+ ²⁾	+	+	+	+	+	+
VTEC	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+
EIEC	O28ac:H—	+	+	+	+	+	+	+

¹⁾ cfu in 11 ml of sample (10 ml of EC broth+1 ml of beef solution).²⁾ Positive for EC-PCR method.Table 5. Detection of enteropathogenic *E. coli* from beef by EC-PCR using mixed primers

Test No.	Inoculation ¹⁾			Detection ²⁾		
	ETEC	VTEC	EIEC	ETEC	VTEC	EIEC
1	O6:H16	O26:H—	O28ac:H—	+	+	+
2	O128:H12	O111:H—	O124:H—	+	+	+
3	O148:H28	O157:H7	O164:H—	+	+	+

¹⁾ Initial inoculation of each strain per g of beef was 10^2 – 10^3 cfu.²⁾ EC broth enrichment culture at 37°C, 20 hrs was used for the detection.Table 6. Comparison of EC-PCR method and culture method for the detection of *E. coli* from meats inoculated with VTEC

Meat	Initial inoculation ¹⁾ (cfu/g)	Detection method	
		EC-PCR	Culture
Beef	0 (control)	—	—
	2×10^1	+	+
	2×10^3	+	+
	2×10^5	+	+
Pork	0 (control)	—	—
	2×10^1	+	+
	2×10^3	+	+
	2×10^5	+	+
Chicken	0 (control)	—	—
	2×10^1	+	+
	2×10^3	+	+
	2×10^5	+	+

¹⁾ VTEC O157:H7 strain was used.

の発育が抑制され、かつ PCR の結果も陰性であった。したがって、好適な培養温度は 37～43°C の範囲であったが、選択性を考慮すると 43°C が適当と考えられた (Table 3)。

2. EC-PCR 法の食肉やふん便中の下痢原性大腸菌検査への応用実験

1) 前記 1. の基礎実験によって得られた成績をふまえ食肉検査への本法の応用を実験的に検討した。食品成分あるいは食品に付着した細菌が大腸菌の増殖に与える影響を調べた結果、EC 培地で大腸菌のみを接種した場合の成績と同様、EC 培地 10 ml 当たり数 cfu、すなわち食肉 1 g 当たり数十 cfu 以上の菌数があれば接種菌は十分検出することができた (Table 4)。また、EC 培地や食肉中の成分が PCR 法による検出を妨げるなどの影響

は観察されなかった。

2) 牛肉に大腸菌の各タイプ 1 株を組合せた各組 3 株ずつを接種し 37°C, 20 時間培養後、それぞれの DNA バンドが同時に検出できるかを調べたところ、菌株の違いによる検出の差異は認められず、3 組ともおおむね良好な成績が得られた (Table 5)。

また、牛肉のほか、豚肉、鶏肉を加えた 3 種類の市販肉を用いて試験したところ、肉種の相違は PCR 法による検出に影響を与えない成績であった。PCR 法と従来の培養法による検出の比較試験でも両法の検出率に違いは認められなかった (Table 6)。

3) ふん便検査への応用

ふん便に前記 2) と同様の下痢原性大腸菌を接種し、これを EC 培地で 37°C, 20 時間増菌後、PCR 法で検出を試みた結果、検出可能な菌数として EC 培地 10 ml 当たり 10^2 cfu、ふん便 1 g 当たりに換算すると 10^3 cfu 以上が必要であった (Table 7)。

3. EC-PCR 法による食肉および食中毒検体からの下痢原性大腸菌の検出

1) 市販食肉

市販牛肉、豚肉、鶏肉の計 140 検体に本法を適用したところ、いずれの検体からも PCR 法で下痢原性大腸菌は検出されなかった。しかし、EC 増菌液を DHL 培地で分離する従来の培養法では 9 検体から市販下痢原性大腸菌診断用血清セットの型に一致する株が分離された (Table 8)。確認のためこれらの分離株を PCR 法で再検査したが、該当する病原因子の DNA バンドは認められなかった。このように EC-PCR 法と従来の培養法の成績は一致した。

2) 食中毒および散発下痢症検体

EC-PCR 法を食中毒や散発下痢症の患者ふん便に応用したところ、前者では 3 例 (14 検体) 中 2 例 (12 検体)

Table 7. Detection of enteropathogenic *E. coli* in feces sample by EC-PCR

Inoculated organisms		No. of organisms for the initial inoculation ¹⁾					
		$\times 10^0$	$\times 10^1$	$\times 10^2$	$\times 10^3$	$\times 10^4$	$\times 10^5$
ETEC	O128:H12	—	—	(+)	+	+	+
VTEC	O157:H7	—	(+)	+	+	+	+
EIEC	O28ac:H—	—	—	(+)	+	+	+

¹⁾ cfu in 11 ml of sample (10 ml of EC broth+1 ml of feces solution).

Table 8. Detection of enteropathogenic *E. coli* in meats by EC-PCR

Meat	No. of samples	No. of positives		Serotype of <i>E. coli</i> isolated ¹⁾
		EC-PCR	Culture	
Beef	48	0	3	O128:H—, O8:H—, O152:H—
Pork	40	0	3	O29:H—(2 strains), O144:H—
Chicken	52	0	3	O119:H—, O142:H6, O78:H11
total	140	0	9	

¹⁾ These strains were negative for the genes by PCR.

Table 9. Detection of enteropathogenic *E. coli* in feces of food poisoning and sporadic cases by EC-PCR and culture methods

No.	Source	No. of feces tested	No. of positives			<i>E. coli</i> isolated
			Feces-PCR ¹⁾	EC-PCR	Culture	
1. Food poisoning outbreak-1		2	0	2 (ETEC)	2	ETEC O169:H41
		6	0	6 (ETEC)	6	ETEC O6:H16
2. Food poisoning outbreak-2		2	0	2 (ETEC)	2	ETEC O148:H28
		2	0	2 (ETEC)	2	ETEC O6:O148
3. Sporadic case-1		1	0	1 (ETEC)	1	ETEC O169:H41
4. Sporadic case-2		2	2	2 (EIEC)	2	EIEC O28ac:H—

¹⁾ Direct PCR methods for feces sample.

より、後者では4例(5検体)中2例(3検体)より下痢原性大腸菌のDNAバンドが検出された。検出事例4例の概要をTable 9に示した。No. 1, 2の食中毒事例では、便を直接PCRにかけるFeces-PCR法では検出されなかったが、EC培地で増菌後、PCRにかけるEC-PCR法では全検体からDNAバンドが確認された。

また、同時に行った従来の分離培養法の結果もすべてEC-PCR法の成績と一致した。

考 察

従来の培養による下痢原性大腸菌の検査法は、分離同定に手数と時間を要し、その上、同定手段とする血清型別は釣菌数の制約を受け検査の幅が限定されるため、食品などからの検索には不十分な面があった。そこで、まず検体をEC培地で増菌後、標的DNAとして細胞侵入性関連抗原の発現調節に関与する*invE*遺伝子と毒素(LT, ST, VT)産生に関連する遺伝子の計4種を検出するプライマーを混合して検査するEC-PCR法について検討したところ、1回のPCR操作で複数の病原遺伝子を検出できる有用性が確認された。

下痢原性大腸菌をEC-PCR法で検査する場合の最少菌量は食肉では1g当たり数十cfu程度で足りたが、ふん便の場合には1g当たり 10^3 cfu以上の菌が必要で検出感度が低かった。このことは、ふん便中に存在する大量の雑菌によって接種菌の増殖が抑制されるため、検出には一定の菌量が必要であると推察された。

今回検討したEC-PCR法は下痢原性大腸菌のうちEPECに属する菌には対応できない欠点がある。しかし、最近EPECに分類されるタイプのうち、定着因子を有する大腸菌についてはPCR法の開発が精力的に行われているので近い将来の実用化が期待される⁹⁾。

本法を使用した場合、LT, ST, VT, EIECのDNAバンドの読み取りを妨害する疑似バンドの出現は少なく、そのうえ、食肉中の下痢原性大腸菌の存在とそのタイプを検査初期の増菌段階で推定できた。また市販血清に該当しない大腸菌にも対応できる特長がある。したがって、分離培地から釣菌する際、多数の大腸菌集落の中に混在する下痢原性大腸菌の拾い逃しを防ぐことができるなど業務の簡便化、迅速化および検査精度の向上に役立つことが確認された。

GANNON ら¹⁵⁾は牛肉中の VTEC を改良 Trypticase soy broth で培養し、直接 PCR にかける VT1, VT2 を分別検出する方法を実験的に検討し良好な成績を得たと報告している。また、多田ら¹³⁾は牛糞便を対象に BGLB 増菌液中の VT 遺伝子の有無を PCR 法で検査する BGLB-PCR 法について検討し、増菌培地から直接スクリーニングする方法が効率的であると報告した。

著者らが EC-PCR 法によって得た VTEC の成績もこれらの報告とほぼ一致しており、そのうえ ETEC や EIEC も同時に検出でき検査対象も食中毒材料をはじめ幅広く対応できる利点が認められた。しかし、今回は食中毒材料や各種食品などへの本法の適用例数が少なかったため今後その数を増やしてさらに検討したい。

また、最近、石崎ら²⁾はノボビオシンを添加した変法 EC (m-EC) 培地を用いて 43°C で培養すると、雑菌の発育が抑制され、かつ大腸菌が選択的に培養できると報告した。今後、これら各種の方法を比較検討し、より精度の高いスクリーニング検査法を確立する必要がある。

なお、EC-PCR 法によって得た成績は臨床診断には直ちに役立つが、疫学調査に不可欠の血清型やプラスミドプロファイルなどの情報を得るには菌の分離が必要となるため培養法との併用が必要である。すなわち、EC 増菌液中の LT, ST, VT, EIEC の DNA バンドの有無を PCR 法で検査し陽性検体を中心に菌検索する方法が最適と思われる。

ま と め

検査法が複雑な下痢原性大腸菌 (ETEC, VTEC, EIEC) の検索を簡易化して精度を高めるため、PCR 法の導入を検討し次の結果を得た。

1. PCR 法を下痢原性大腸菌検査へ導入するための基礎実験では、PCR 法で検出可能な試験菌液 5 μ l 当たりの最少必要菌量は 10^3 から 10^4 cfu オーダーであった。EC-PCR 法の培養条件を検討した結果、EC 培地で 37~43°C, 16~20 時間培養が適当であった。

2. 食肉の EC 培地増菌法では EC 培地 10 ml 当たり初期菌数として数~数十 cfu のオーダー、食肉では 1 g 当たり数十 cfu 以上の菌数があれば EC-PCR 法で十分検出可能であった。食肉成分の検出への影響は認められなかったが、ふん便成分の存在下での検出感度は食肉の値より 2~3 オーダー低下した。

牛肉、豚肉、鶏肉に ETEC, VTEC, EIEC 株を実験的に接種し EC-PCR 法と従来の培養法で検出率を比較したところ、前者の感度は良好で肉種や検査法による成績の違いは見られなかった。

3. 市販の牛肉、豚肉、鶏肉 140 検体を対象に EC-PCR 法で下痢原性大腸菌を検索した結果、培養法で市販診断用血清に凝集する 9 株が検出されたが、EC-PCR 法および分離後の菌株の再 PCR 法では ETEC, VTEC, EIEC に該当する株は検出されず両者の成績は

一致した。

4. 食中毒や散発症例由来の患者ふん便材料に EC-PCR 法を適用した成績は培養法の成績と一致した。増菌段階で行う PCR によるスクリーニング試験は、ETEC, VTEC, EIEC の存否を数時間で判定でき病原因子の検索と菌の分離に役立った。

以上の成績から、今回検討した EC-PCR 法は食品やふん便からの下痢原性大腸菌の検出法として有効であると結論を得た。

本報の概要は第 14 回食品微生物学会、1993. 11 (静岡) で報告した。

謝 辞

菌株の分与やご指導をいただいた国立予防衛生研究所田村和満博士、伊藤健一郎博士および東京都立衛生研究所の甲斐明美博士に深く感謝致します。

文 献

- 1) 赤司俊二, 城 宏輔, 辻 敦敏, 伊藤 沢, 星 博己, 早川 隆, 井原二郎, 阿部恒保, 羽鳥雅之, 森 健, 中村泰三: 浦和市における病原大腸菌による出血性大腸炎の臨床像. 日本小児科学会雑誌, **95**, 2607-2615 (1991).
- 2) 石崎直人, 金子誠二, 尾畑浩魅, 甲斐明美, 伊藤 武: 第 14 回食品微生物学会講演要旨集, p. 35 (1993).
- 3) 伊藤 武: 下痢原性大腸菌の検査法. 検査と技術, **20**, 981-987 (1992).
- 4) 伊藤健一郎, 渡辺治雄: 下痢原性大腸菌の遺伝子増幅法による迅速診断法. 臨床検査, **35**, 788-790 (1991).
- 5) 平田和則, 井上英幸, 光野貴文, 天野 武, 中沢宗生, 山崎伸二, Lin, Z., 竹田美文: 家畜よりの Vero 毒素生性大腸菌の分離と分離菌の血清型と Vero 毒素型. 感染症誌, **66**, 950-955 (1992).
- 6) 甲斐明美, 工藤泰雄: 下痢原性大腸菌 (腸管病原性大腸菌) の分類. 臨床と微生物, **18**, 55-60 (1991).
- 7) 甲斐明美, 工藤泰雄: 腸管出血性大腸菌 (Vero 毒素産生性大腸菌) とその疾病. モダンメディア, **37**, 148-156 (1991).
- 8) 神田 隆, 塩沢寛治, 佐藤文一, 青木慶祐, 仁科徳啓: Vero 毒素産生性 *Escherichia coli* O157:H7 の牛糞便からの分離. 日獣会誌, **45**, 45-57 (1992).
- 9) 小林一寛: 下痢起病性細菌診断のための PCR 法. 防菌防黴, **19**, 285-294 (1991).
- 10) 三輪好伸, 大畑克彦, 森 健, 増田高志, 塩沢寛治, 内藤 満, 赤羽荘資, 伊藤機一, 仁科徳啓, 三輪憲永, 野田寛治, 山口章一, 高橋昌里, 神田成夫, 浜崎 豊: 静岡県における腸管出血性大腸菌 O157 の検出状況. 静岡県衛生環境センター報告, **34**, 11-17 (1991).
- 11) 大村正美, 佐原啓二, 大畑克彦, 増田高志, 内藤 満, 赤羽荘資, 伊藤機一: 食肉およびふん便中に存在する下痢原性大腸菌の PCR 法による迅速検査法の検討. 静岡県衛生環境センター報告, **35**, 51-56 (1992).
- 12) 塩沢寛治, 仁科徳啓, 杉枝正明, 林 道明, 半田淑明, 中津川修二, 神田 隆: 胃腸炎患者, 動物, 食品および環境における病原大腸菌の分布. 静岡県衛生環境センター報

- 告, **31**, 41-48 (1988).
- 13) 多田 博, 伊丹幸子, 山本保男, 小林一寛, 田口真澄, 中沢宗生: PCR 法を用いた肥育牛からの Vero 毒素産生性大腸菌の検出. 感染症誌, **66**, 1383-1388 (1992).
 - 14) 田中 博, 西内 力, 近藤玲子, 木村真理, 目見田清, 菊地正健, 塚本定三, 奥 裕一, 山崎伸二, 竹田美文: Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) の輸入食肉からの分離. 感染症誌, **65**, 175-180 (1991).
 - 15) Victor P. J. Gannon, Robin K. King, Jong Y. Kim and Elizabeth J. Golsteyn Thomas: Repid and Sensitive Method for Detection of Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli* in Ground Beef Using the Polymerase Chain Reaction. Appl. Environ. Microbiol., **58**, 3809-3815 (1992).