

当所における腸管出血性大腸菌の増菌培養及びリアルタイム PCR を用いた
VT 遺伝子検出法の改訂に向けた検証

神奈川県食肉衛生検査所 ○篠原良輔 辻本なの子* 和泉晶子
* 現神奈川県鎌倉保健福祉事務所

はじめに

当所では、と畜場における食肉等の衛生的な取扱い状況を検証するため、牛及び豚枝肉の拭き取り検査を実施しており、牛枝肉に関しては、平成 26 年に厚生労働省から発出された通知[1]（以下、通知）に準じて腸管出血性大腸菌の検査を行っている。当検査では、まず、増菌培養を行った後、培養液から DNA を抽出し、PCR 法を用いてベロ毒素（VT）遺伝子を検出する。VT 遺伝子検出法は令和元年度以降、より迅速なリアルタイム PCR 法を採用することで業務時間は改善されたが、次の 2 点について課題が残っていた。1 点目は、増菌培養について、従来、恒温水槽を用いて行っていたが、インキュベーターを用いた培養に比べ、安全面等に課題があること、2 点目は、PCR 法に関して、抽出 DNA の濃度や夾雑物の影響で、DNA の増幅が阻害されることを考慮し、DNA 抽出液の希釈を行っているため、作業が煩雑になっていることであった。リアルタイム PCR 法については、採用するにあたり、検出感度の検証は実施したが、増菌培養や上記の DNA 抽出液の希釈は従来通り行っていた。そこで今回、この 2 点について、より安全で作業効率が高い方法に変更するため、検証を行ったので、報告する。

材料及び方法

1 試験菌液

菌株は、当所において、2012 年 11 月 26 日に牛の糞便から分離した腸管出血性大腸菌 0157:H7 (VT 1 及び VT 2 遺伝子保有) を用いた。当該菌株を Trypticase™ soy broth (BD) に接種し、37℃、18 時間培養し、培養液中の生菌数を測定した。その培養液とノボビオシン加 mEC 培地（以下、nmEC）（極東製薬工業）を用いて約 1×10^2 CFU/ml に調整したものを試験菌液とした。

2 方法

(1) 増菌培養の検討

試験菌液 1 ml を、nmEC 9 ml に接種し、①恒温水槽又は②インキュベーターで 42 ± 1 °C、 22 ± 2 時間培養した。その後、①及び②について、生菌数を測定し、増殖効率を比較検討した。また、同様の試験を 3 回行い、その結果を比較した。

(2) リアルタイム PCR 法の検討

試験菌液 1 ml を加えた nmEC 9 ml に、夾雑物として、陰性を確認した牛枝肉拭き取

りスワブを接種し、③恒温水槽又は④インキュベーターで 42 ± 1 °C、 22 ± 2 時間培養した。この2つの培養液及び(1)で作製した2つの培養液について、アルカリ熱抽出法を用いて、DNA抽出を行った。各DNA抽出液の原液及び10倍、100倍希釈液を用いて、リアルタイムPCR法によりVT遺伝子の検出を試みた。なお、①及び②に関しては、(1)において、増菌培養後の菌数が、通知における基準である 1×10^4 CFU/ml以上であることを確認の上、実施した。

成 績

1 増菌培養の検討

増菌培養の結果は表1のとおりであった。増菌培養後の菌数は、恒温水槽とインキュベーターでほとんど差はなかったが、インキュベーターでの増菌後の菌数は、3回いずれも恒温水槽と比較して多く、1.4~3.7倍であった。

表1. 恒温水槽又はインキュベーターでの増菌培養後の菌数 (CFU/ml)

	1回目	2回目	3回目
①恒温水槽	1.5×10^8	5.6×10^8	4.9×10^8
②インキュベーター	5.5×10^8	8.3×10^8	6.9×10^8

2 リアルタイムPCR法の検討

①~④のDNA抽出液の原液及び希釈液について、リアルタイムPCRを行ったところ、すべての検体におけるT_m値(融解温度)は、VT1及びVT2遺伝子ともに陽性コントロールのT_m値と ± 0.6 °C以内の範囲で一致した。

考 察

増菌培養において、恒温水槽とインキュベーターで、培養後の菌数にほとんど差はなく、むしろ、3回の検証すべてでインキュベーターでの培養後の菌数の方が多かった。このことから、増菌培養にインキュベーターを用いることは適切であることが示された。

リアルタイムPCR法の検証に関しては、DNA抽出液の原液及び希釈液のいずれも、VT1及びVT2遺伝子が増幅された。DNA濃度が高い抽出液や、夾雑物が多く含まれるnmECを用いたDNA抽出液においても、VT遺伝子が増幅されたことから、DNA濃度や夾雑物の影響によるDNAの増幅阻害はなかったことが明らかとなった。よって、当検査法をリアルタイムPCRで行うにあたって、DNA抽出液の調整における希釈液の作製は不要であることが示された。

以上の検証の結果、腸管出血性大腸菌の増菌培養に関しては、恒温水槽からインキュベーターに変更し、また、リアルタイムPCR法に関しては、DNA抽出液の希釈工程を削除することで、当所における腸管出血性大腸菌のスクリーニング検査をより作業効率の高い方

法に変更することの妥当性が確認された。この結果に基づき、当所で使用しているマニュアルを改訂したことで、より安全で迅速な腸管出血性大腸菌の検査が可能となった、と考える。

まとめ

当所で実施している牛枝肉の腸管出血性大腸菌のスクリーニング検査において、増菌培養及びリアルタイム PCR 法について、より作業効率の高い方法に変更するため、検証を行った。増菌培養においては、従来使用していた恒温水槽とインキュベーターの増殖効率を比較し、ほとんど差がないことが明らかとなった。また、リアルタイム PCR 法に関しては、DNA 濃度や夾雑物の影響を調査するため、DNA 抽出液の原液及び希釈液について、PCR を行ったところ、いずれにおいても標的遺伝子を検出することができた。以上のことから、増菌培養に使用する機器をインキュベーターに変更し、リアルタイム PCR 法の希釈工程を削除することで、当所における腸管出血性大腸菌のスクリーニング検査をより作業効率の高い方法に変更することが可能となった。

[1] 「腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145及び 0157の検査法について」

食安監発1120第1号平成26年11月20日付厚生労働省監視安全課長通知