

短報

「腸管出血性大腸菌O157及びO26 検査実施標準作業書」作成のための 基礎的検討

鈴木理恵子, 永井 裕, 原みゆき, 小松祐子
小泉明子, 小儀國太郎

Examination about a standard operation procedure of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 & O26

Rieko SUZUKI, Yutaka NAGAI, Miyuki HARA
Yuko KOMATSU, Akiko KOIZUMI
and Kunitarou KOGI

はじめに

厚生労働省医薬食品局安全部監視安全課長から「腸管出血性大腸菌O157及びO26の検査法について」¹⁾(平成18年11月2日付け食安監発第1102004号、以下「新通知」)が通知された。それに伴い、平成9年7月4日付け衛食第207号及び衛乳第199号「腸管出血性大腸菌O157の検査法について」、並びに平成9年7月17日付け事務連絡「腸管出血性大腸菌O157の検査法の解説について」(以下、併せて「旧通知」)が廃止された。通知による主な変更内容は2点あり、食品中の腸管出血性大腸菌O157のほかに、血清型O26を検出する方法が定められたこと、食肉(内臓を含む)、食肉製品及びチーズ以外の食品について、ペロ毒素(以下、VT)遺伝子検出法をスクリーニング法として用いることが可能であることであった。

地域調査部では旧通知にもとづく「腸管出血性大腸菌O157検査実施標準作業書」について平成18年12月1日付けで部分修正を行い新通知に対応してきた。平成19年度より実施する食品検査には、主要な改正点であるVT遺伝子検出法を取り入れた新たな標準作業書(「腸管出血性大腸菌O157及びO26検査実施標準作業書」)の作成を行う必要があった。

新たに採用されたVT遺伝子検出法は、PCR法、Loop

mediated isothermal amplification(以下、LAMP)法、Real-time PCR法の3種の方法が示された。今回、操作が簡便で、短時間で遺伝子検出が可能であるLAMP法について、DNA抽出法を含めた標準作業書作成のための基礎的検討を行なったので報告する。

材料と方法

1. 検査材料

供試菌株は、平成18年度に腸管出血性大腸菌患者由来ふん便より分離したO157:H7(VT1, 2)2株を用いた。

供試食品検体は野菜2検体(ナス、レタス)および新通知では対象外とされているが、適用の可能性を検討するため食肉2検体(鶏ひき肉、豚ひき肉)の計4検体を用いた。

2. 菌液および培養液の調製

菌液：供試菌株をTryptic soy broth(日本ベクトン・デッキンソン)10mlに接種し36℃、18時間培養後、遠心分離(3,000rpm, 20分間)を行った。この沈渣を滅菌生理食塩水で3回洗浄後、滅菌生理食塩水10mlに再浮遊し菌原液とした。菌原液を滅菌生理食塩水9mlで段階希釈を行い(以下、菌液)、ミスラー法²⁾により菌数の測定を実施した。

培養液：食品検体25gを滅菌ストマッカー袋に採取し、ノボジオシン加mEC(栄研化学)225mlを加え1分間ストマッカーで処理後、42℃、20~24時間増菌培養を行った。

この食品検体の増菌培養液に段階希釈した供試菌株O157の菌液を加え、培養液中のO157菌量を $10^2 \sim 10^5$ cfu/mlになるように検体調製を行なった。

これらを模擬培養液(以下、培養液)として、以下の方法について検討を行った。

3. DNA抽出法

アルカリ熱抽出：培養液0.1mlを遠心分離(10,000×g, 10分間)し、上清を取り除いた沈渣に滅菌50mmol/L NaOH 0.1mlを添加した。100℃で10分間加熱処理後、その処理液50μlを滅菌1mol/L Tris-HCl(pH7.0)8μlで中和し、遠心上清(10,000×g, 10分間)をテンプレートとした。抽出後は氷上等に静置し、直ちに使用しない場合には0~4℃で保存し4時間以内に使用した。

Extraction Solution for Foods : Extraction Solution for Foods(栄研化学)(以下、EX F)50μlに培養液50μlを添加し、転倒混和後軽く遠心した。95℃、5分間加熱処理後、簡易遠心分離器で1分間遠心し、氷上等に移し上清をテンプレートとした。直ちに使

用しない場合には0~4℃で保存し4時間以内に使用した。

PrepMan Ultra Sample Preparation Regent：培養液1.0mlを遠心分離（16,000×g，3分間）し，上清を取り除いた沈渣にPrepMan Ultra Sample Preparation Regent（アプライド・バイオシステムズジャパン）

（以下，PrepMan）0.2 mlを添加した。この添加液を攪拌機で10~30秒混和し，100℃で10分間加熱処理後，遠心分離（16,000×g，3分間）し，上清を新しい滅菌チューブに移しテンプレートとした。直ちに使用しない場合には0~4℃で保存した。

4. VT遺伝子検出法（LAMP法）

Loopamp腸管出血性大腸菌検出試薬キット（栄研化学）を用いて，添付書に従い試薬調製を行なった後，各々の方法で作製したテンプレートを加えた。遺伝子増幅の設定条件は添付書に従い，温度：反应用ブロック65℃，ホットボンネット75℃，測定時間：60分，酵素失活処理：80℃，2分間とした。

Loopampリアルタイム濁度測定装置（LA-320C）（栄研化学）を用いて遺伝子増幅および濁度測定を行い，VT遺伝子の有無を確認した。

5. 分離培養法

分離培養は，培養液を直接塗抹（以下，直接法）及び免疫磁気ビーズ（Dynabeads anti-E.coli O157，ダイナル製造，ベリタス販売）濃縮液の塗抹（以下，ビーズ法）により行なった。

培養液10 μl及び免疫磁気ビーズ濃縮液20 μlをセフィキシム・亜テルル酸カリウム加ソルビトールマッコンキー寒天培地（以下，CT-SMAC培地）（オキソイド）

及びクロモアガーO157培地（クロモアガー製造，関東化学販売）の2種類の分離平板培地各2枚に塗抹し，36℃18~24時間培養を行なった。典型的コロニーを釣菌し，TSI寒天培地，SIM培地，リジン脱炭酸塩培地，VP半流動培地等の生化学的性状試験用培地に接種³⁾後，36℃，18~24時間培養し，生化学的性状およびO抗原等の確認を行った。

結 果

供試菌株2株の菌原液の菌数は，いずれも10⁸cfu/mlであった。供試食品4検体は培養法（直接法およびビーズ法）で大腸菌O157陰性，LAMP法ではVT遺伝子陰性であることを確認した上で模擬検体作成に用いた。

増菌培養液9ml（4種類）に段階希釈した10³~10⁶cfu/ml相当の菌液を1ml添加し，培養液（10²，10³，10⁴，10⁵cfu/ml）（4段階）を作成し，各々の培養液についてDNA抽出（3方法）を行い，テンプレートを作製した。このテンプレートを用いLAMP法によるVT遺伝子増幅を行うとともに，培養法による菌分離を実施した（一部培養液を除く）。

野菜（ナス・レタス），食肉（鶏ひき肉・豚ひき肉）の10³~10⁵cfu/ml模擬検体では，抽出方法毎に3回の繰り返し実験を行ったところ，いずれの抽出法でもVT遺伝子陽性であった。培養法では直接法，ビーズ法ともに腸管出血性大腸菌O157陽性であった。

10²cfu/ml模擬検体では，アルカリ抽出と他の2方法（EX F，PrepMan）で差が見られた。野菜（ナス・レタス）培養液について計8回（5回・3回）の繰り返し実験を実施したところ，アルカリ処理はすべて陽性，EX

表 1 LAMP 法における DNA 抽出法の比較と培養法の結果

模擬検体		野菜(ナス)					野菜(レタス)					食肉(鶏ひき肉)					食肉(豚ひき肉)					
培養液中の菌量cfu/ml (cfu/tube)		10 ⁵ (10 ³)	10 ⁴ (10 ²)	10 ³ (10 ¹)	10 ² (10 ⁰)	陰性 Cont.	10 ⁵ (10 ³)	10 ⁴ (10 ²)	10 ³ (10 ¹)	10 ² (10 ⁰)	陰性 Cont.	10 ⁵ (10 ³)	10 ⁴ (10 ²)	10 ³ (10 ¹)	10 ² (10 ⁰)	陰性 Cont.	10 ⁵ (10 ³)	10 ⁴ (10 ²)	10 ³ (10 ¹)	10 ² (10 ⁰)	陰性 Cont.	
DNA 抽出 法	アルカリ処理 (陽性数/検査数)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	- ^{a)}	+	+	+	+	-	
	EX F (陽性数/検査数)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	
	Prep Man (陽性数/検査数)	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	
培養 法	直接 法	CT-SMAC (陽性数/検査数)	NT ^{b)}	+	+	+	-	NT ^{b)}	+	+	NT ^{b)}	-	NT ^{b)}	+	+	+	-	NT ^{b)}	+	+	NT ^{b)}	-
		クロモアガーO157 (陽性数/検査数)	NT ^{b)}	+	+	+	-	NT ^{b)}	+	+	NT ^{b)}	-	NT ^{b)}	+	+	+	-	NT ^{b)}	+	+	NT ^{b)}	-
	ビーズ 法	CT-SMAC (陽性数/検査数)	NT ^{b)}	+	+	+	-	NT ^{b)}	+	+	NT ^{b)}	-	NT ^{b)}	+	+	-	-	NT ^{b)}	+	+	NT ^{b)}	-
		クロモアガーO157 (陽性数/検査数)	NT ^{b)}	+	+	+	-	NT ^{b)}	+	+	NT ^{b)}	-	NT ^{b)}	+	+	+	-	NT ^{b)}	+	+	NT ^{b)}	-

a: 非特異的な増幅が認められた。ただし、Loopamp濁度測定器による判定は陰性。

b: 実施せず

Fでは陽性1回（ナス）、PrepManでは陽性0回（陰性）であった。同じく、食肉（鶏ひき肉・豚ひき肉）培養液について計8回（5回・3回）のアルカリ処理では陽性7回（4回・3回）、EX FおよびPrepManでは陽性0回（陰性）であった。野菜（ナス）、食肉（鶏ひき肉）についてのみ実施した培養法では、直接法およびビーズ法とも大腸菌O157陽性であったが、分離培地毎では若干の差が見られた（表1）。

考 察

近年の腸管出血性大腸菌患者から検出される血清型はO157に加えO26による患者報告例が増加し、O26による集団感染事例⁴⁾の報告もある。このことから、食品における腸管出血性大腸菌の検査法にO26も追加実施する通知（食安監発第11020004号）¹⁾が出され、従来の培養法とともに特異性に優れたVT遺伝子検出法が記載された。本通知法でも陽性判定に要する日数は同じであるが、VT遺伝子検出法を実施することで、陰性判定に要する最短日数が検体搬入後2日から1日に短縮される。結果判定までの時間が短縮されることで、食品の安全性を速やかに確認でき、食の安心・安全に寄与することができる。と考える。

PCR法を採用した場合、検査2日目の増菌培養（22±2時間）終了時間は、前日の検体搬入時間に大きく左右され、その後DNA抽出、PCR法、電気泳動などの煩雑な検査工程に約4時間を要する。さらに陽性判定となり培養検査に移行する場合には、2日目の検査工程は長時間におよぶことになる。

Real-time PCR法やLAMP法を用いた場合の所要時間は2.5時間、1.5時間であり、PCR法に比べ電気泳動を必要とせず短時間で終了し、検査工程の煩雑さは軽減される。しかし、各々の方法には専用機器が必要となりReal-time PCR法対応機器は高額で、LAMP法対応機器は比較的安価であった。また、LAMP法はReal-time PCR法に比べ、操作が簡便で、短時間で増幅が終了すること、通知に記載された試薬の提供があることから、年間約350検体（平成18年度厚木分室実績）を実施する日常検

査には適していると考えた。

通知に記載されたDNA抽出法は4種類（5方法）あるが、今回の標準作業書作成には操作法が簡便であるアルカリ処理、EX F、PrepManの3方法について検討をおこなった。10²cfu/ml培養液ではアルカリ処理の検出が良好であるが、再現性のある10³cfu/ml培養液では抽出法による差異は認められず再現性は100%であった。また、本通知では10⁴cfu/mlを検出可能なVT遺伝子検出法を用いることになっているが、LAMP法の再現試験での得られた検出限界は10³cfu/mlであり、通知に示された検出限界を十分満たしていた。

VT遺伝子検出法の対象外の食品である食肉について適用の可能性について検討したところ、陰性コントロールにおいて濁度上昇（非特異的な増幅）が1例認められた。しかし、特異的な濁度上昇とは異なったため判定は陰性であった。メーカーに問い合わせたところ、特異的な増幅の場合、濁度は急激に上昇するため増幅の勾配により判別は可能であり、このような現象は脂肪分の多い検体で稀にみられる現象であるとの説明があった。

以上より、LAMP法にはいずれの抽出方法でも十分な検査精度が得られており、今回の基礎的検討をふまえて「腸管出血性大腸菌O157及びO26検査実施標準作業書」を作成し、平成19年4月2日より地域調査部では施行することになった。

本検討にあたり、ご協力いただきました地域調査部小田原分室および茅ヶ崎分室の微生物検査担当の皆様へ感謝いたします。

（平成19年7月20日受理）

文 献

- 1) 腸管出血性大腸菌O157及びO26の検査法について、食安監発第11020004号、平成18年11月2日
- 2) 坂崎利一：新 細菌培地学講座、pp204、近代出版、東京(1978)。
- 3) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2005
- 4) 腸管出血性大腸菌感染症2007年4月現在、病原微生物検出情報、28、131-132(2007)