

研究課題名： 食品微生物試験法の国際調和に関する研究

分担研究課題： 遺伝子検査法に関する研究

研究分担者 泉谷秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部 第二室 室長）

## 研究要旨

わが国の食品衛生法では食品（種）ごとに種々の微生物に対する規格基準が規定されており、それに対応する個別の試験法が定められている。試験法は培養法をベースに構築されている。その主たる工程は増菌、選択分離培養、同定からなる。いずれの工程も菌の生化学的および/もしくは血清学的特性を利用している。近年、遺伝子検査法の発展により、また微生物の性状の多様化により、遺伝子検査法を微生物試験法に取り入れる動きがある。こうした状況をふまえ、本研究では食品における遺伝子検査法について情報収集を行い、その活用にあたってのガイドラインの検討を目的としている。本年は、現在発表されている ISO 及び BAM 法において示されている、遺伝子検査法の情報を収集した。

### A. 研究目的

わが国の食品衛生法では食品（種）ごとに種々の微生物に対する規格基準が規定されており、それに対応する個別の試験法が定められている。試験法は培養法をベースに構築されている。その主たる工程は増菌、選択分離培養、同定からなる。いずれの工程も菌の生化学的および/もしくは血清学的特性を利用している。近年、遺伝子検査法の発展により、また微生物の性状の多様化により、遺伝子検査法を微生物試験法に取り入れる動きがある。こうした状況をふまえ、本研究では食品における遺伝子検査法について情報収集を行い、その活用にあたってのガイドラインの検討を目的としている。

### B. 研究方法

国際的な標準試験法として扱われている欧州 International Organization for Standardization（ISO）および、米国 Food and Drug Administration（FDA）による Bacterial Analytical Manual（BAM）ホームページ上にあ

る微生物試験法の中で、遺伝子検査法（PCR）に関する記載があるものを検索し、その情報を整理した。

### C. 研究結果および考察

ISO において PCR に関する記載があるものは約 30 あった。このうち、微生物の試験法に関するものは 7 であった。対象は STEC（Shiga toxin-producing *Escherichia coli*）、ボツリヌス菌、エルシニア、レジオネラ、A 型肝炎ウイルスであった。食品に関連した細菌の試験法としては前 3 者が該当した。これらについて表 1 にまとめた。

BAM において PCR に関する記載があるものは約 10 あった。食品に関連した細菌の試験法としては 5 であった。対象はサルモネラ、大腸菌 O157、リステリア、下痢原性大腸菌であった。これらについて表 2 にまとめた。

BAM において 2015 年以前に定められたサルモネラ、サルモネラ エンテリティディス、大腸菌 O157 を対象とした試験法は、特定の食品からの迅速な検出を目的とした方法と考えられた。

Testing methodology for *Salmonella* Enteritidis (SE) (2009) は 2008 年発表の鶏舎環境中のサルモネラ属菌のサンプリングと検出の代替法 (Environmental Sampling and Detection of *Salmonella* in Poultry Houses) の位置づけにあたるものである。

2017 年改訂の下痢原性大腸菌の試験法はスクリーニングおよび同定を目的としている。本項は 2009 年よりほぼ毎年改訂されている。

2009 年 7 月：リアルタイム PCR スクリーニング法。

2011 年 2 月：プライマー追記。O157:H7 確認用マルチプレックス PCR 追記。

2013 年 7 月：STEC 分子血清型別プロトコル (ルミネックス法)。

2014 年 7 月：葉菜類検体処理追記。

2015 年 11 月：STEC 分子血清型別および病原因子型別改訂 (ルミネックス法)。

2016 年 8 月：リアルタイム PCR 法改訂。

2017 年 10 月：STEC 分離注意事項追記。マルチプレックス PCR 法改訂。O157:H7 について PFGE 及び全ゲノム解析の追記。

ISO においては全ての方法に TS (Technical Specification) が付与されている。上記 BAM の下痢原性大腸菌の頻繁な改訂から推測されるように、遺伝子検査法は有用である一方、固定され

た標準法になりにくいことが予想された。

ISO では、本年度に情報収集した個別の微生物に対する遺伝子検査法に関する記載以外に、PCR を実施する際の要求事項をまとめたものもあり、次年度以後はこうした一般事項についてまとめていく必要があると考えられた。

#### D. 結論

細菌の食品からの微生物試験法は培養法をベースに構築されている。多様な微生物に迅速に対応するため PCR をはじめとした遺伝子検査法は有用であると考えられる。一方で、毎年多くの手法が発表され、技術改良も著しいことから、遺伝子検査法の導入においては多くの議論が予想される。

#### E. 研究発表

なし

#### F. 知的所有権取得状況

1 特許取得

なし

2 実用新案

なし

3 その他

なし

表1. 遺伝子検査法を使用しているISO法

ISO	No	年	タイトル	対象	用途	方法	工程	標的	備考
ISO/TS	13136	2012	Microbiology of food and animal feed - Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups	STEC	スクリーニング	リアルタイム △PCR	増菌後	stx1, stx2, eae	
						リアルタイム △PCR	増菌後	O157 rfbE, O111 wbdI, O26 wzx, O145 ihp1, O103 wzx	
					確認	PCR	分離後	stx1, stx2, eae	
						リアルタイム △PCR	分離後	stx1, stx2, eae	
ISO/TS	17919	2013	Microbiology of the food chain - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia	ボツリヌス菌	スクリーニング	PCR	増菌後	BoNT A, B, E, F	
ISO/TS	18867	2015	Microbiology of the food chain - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Detection of pathogenic <i>Yersinia enterocolitica</i> and <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	エルシニア エルシニア 仮性結核菌	スクリーニング スクリーニング スクリーニング	リアルタイム △PCR リアルタイム △PCR	増菌後 増菌後 増菌後	ye-all all ypS	生物型1Aは対象外 ブローブ2種類から選択 ブローブ2種類から選択

表2. 遺伝子検査法を使用しているBAM法							
年	タイトル	対象	用途	方法	工程	標的	備考
2011	qPCR method for the Detection of <i>Salmonella</i> in Papaya –General Laboratory Procedure	サルモネラ	スクリーニング	リアルタイムPCR	前増菌後	invA	
2012	Testing methodology for <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE)	サルモネラ エンテリティディス					
		サルモネラ エンテリティディス	代替法	イムノアッセイ		SDIX RapidChek SELECT™ Salmonella Enteritidis Test System	*1
		サルモネラ エンテリティディス	代替法	イムノアッセイ		Neogen Reveal Salmonella Enteritidis (SE) Test System	*1
		サルモネラ エンテリティディス	代替法	リアルタイムPCR		Applied Biosystems TaqMan® Salmonella Enteritidis Detection Kit from Life Technologies	*1
		サルモネラ エンテリティディス	代替法	リアルタイムPCR		Applied Biosystems TaqMan® Salmonella Enteritidis Detection Kit from Life Technologies	*2
		サルモネラ エンテリティディス	代替法	イムノアッセイ		SDIX RapidChek SELECT™ Salmonella Enteritidis Test System	*2
		サルモネラ エンテリティディス	代替法	PCR		BAX® System PCR Assay for Salmonella (2)	*2
2015	Testing Methodologies for <i>E. coli</i> O157:H7 and <i>Salmonella</i> species in Spent Sprout Irrigation Water (or Sprouts)	大腸菌O157	スクリーニング	リアルタイムPCR	増菌後	stx1,2, uidA	
2017	BAM Protocol: Simultaneous Confirmation of <i>Listeria</i> species and <i>L. monocytogenes</i> isolates by real-time PCR	リステリア	確認	リアルタイムPCR	分離後	iap (リステリア属菌、 <i>L. monocytogenes</i> )	
2017	BAM: Diarrheagenic <i>Escherichia coli</i>	下痢原性大腸菌					
		EPEC	スクリーニング	コロニーハイブリダイゼーション	(大腸菌レベル > 1e4/gのとき)	LT,ST	
			確認	PCR	分離後	LT,ST	
		EIEC	確認	PCR	分離後	invA ?	
		EPEC	確認	PCR	分離後	eae	
		STEC	スクリーニング	リアルタイムPCR	増菌後	stx1,2, uidA (,O157wzy)	
			確認	Luminex suspension array	分離後	O26, O45, O91, O103, O104, O111, O113, O121, O128, O145, O157, eae, aggR	
			確認	リアルタイムPCR	分離後	stx1, stx2	
*1, FDA has determined that the following methods are equivalent to "Environmental Sampling and Detection of Salmonella in Poultry Houses" (April 2008) in accuracy, precision, and sensitivity in detecting Salmonella Enteritidis:							
*2, FDA has determined that the following methods are equivalent to Chapter 5 (Salmonella) of FDA's Bacteriological Analytical Manual (BAM, December 2007 Edition) in accuracy, precision, and sensitivity in detecting Salmonella Enteritidis							