

Ⅱ．分担研究報告

2．牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

研究分担者 工藤由起子

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)

令和6年度 分担研究報告書

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

研究分担者 工藤由起子 星薬科大学

研究要旨：

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減のための研究を実施した。

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査では、2024年9月から4施設の協力のもとに牛枝肉合計 108 検体から7血清群(026、045、0103、0111、0121、0145、0157)の STEC およびサルモネラ属菌を対象とした調査を行った。また、このうち3施設については衛生指標として生菌数についても測定を行った。供試検体を増菌培養後、または施設にて増菌培養した培養液の二次増菌培養後、STEC7血清群マルチプレックスリアルタイム PCR およびサルモネラ特異的リアルタイム PCR に供試した。スクリーニングを行い、陽性になった検体については菌分離を行った。分離された株については生化学的性状試験および血清型別を行った。この結果、1検体(0.9%)からサルモネラ属菌が分離されたが、1検体のみであったことからウシの種類や性別などの特徴については考察には至らなかった。なお、STEC7血清群は検出されなかった。また、

2. MLG 掲載または第3者認定を受けた STEC スクリーニング方法についての試行では、菌液および菌添加牛肉培養液からのキットを用いた DNA の抽出および検出を実施した。今後、より詳細な使用手順が整備されることによって、簡易に技術を習得し、確実な試験実施が行えるものと考えられた。

研究協力者

岩手県食肉衛生検査所

阿部嘉智

栃木県食肉衛生検査所

関口明子

大分県食肉衛生検査所

吉田史子

日本フードパッカー株式会社

星薬科大学

本多伽衣、天野壮俊、鏡山雅人、内場健斗、

大塚佳代子、奥 輝明、築地 信

A. 研究目的

昨今の海外での和牛の需要の高まりや日本政府および業界関係者による和牛輸出促進の影響のため、海外への和牛輸出量が増加している。特に、米国への輸出においては、米国の示す腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; STEC）およびサルモネラ属菌の検査が必要である。対米輸出食肉取扱施設や食肉検査所では、牛肉の腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌の検査を輸出先国の試験法で実施している。本研究では、一定の方法で腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌が陽性ではない検体でも汚染リスクが潜むことを考え、より精度高く腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌の検出指標を変えて検体の汚染リスクを検討した。令和 5 年度には、各食肉衛生検査所での牛肉検体培養液を研究班に送付としたが、陽性検体は認められなかった。一方、令和 2 年度から 4 年度に実施した各食肉衛生検査所で滅菌ガーゼを枝肉表面に密着させて回収する方法では複数検体から腸管出血性大腸菌 0157 が分離された。このことから今年度は滅菌ガーゼを密着させ回収したガーゼを検体とすることにした。結果について、処理工程の改善検討等に役立てられることを期待して、即時にフィードバックすることとした。

また、対米輸出食品での試験法は、MLG 掲載 (<https://www.fsis.usda.gov/news-events/publications/microbiology-laboratory-guidebook>) または第 3 者認定を受けた方法 (https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/documents/Validated-Test-Kit.pdf) が認

められており、それらは国内試験法とは異なるため知識や手技の高度な習得が必要である。2024 年 9 月には、MLG 5C.04 (https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/documents/MLG-5C.04.pdf) の更新があり、特に、遺伝子スクリーニング法が変更になったため、その方法と第 3 者認定を受けた方法のうち国内流通可能な方法について、今年度から食肉衛生検査所での導入の参考になる試行を開始した。

B. 研究方法

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

2024 年 9 月から 2025 年 3 月に国内の食肉衛生検査所 4 ヶ所にて、ウシ 108 頭からサンプリングを行った。

試験に供試されたウシの種類と月齢を表 1-1 に示す。

(1) と畜場での作業

3 施設において、処理された異なるウシ 3 頭から枝肉を各 1 本ずつ選定し、選定した枝肉ごとに頸部から胸部の任意の 3 箇所を選び、滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で浸漬した 30 cm×30 cm サイズの滅菌したガーゼを密着させることによって検体の採取を行った。サンプリングを行ったガーゼは、それぞれ滅菌済みポリエチレン袋（サンプリングバッグ）に入れ、冷蔵で保存し、宅配便（冷蔵）によって星薬科大学へ送付した。合計 99 検体であった。

なお、別の 1 施設については、当該施設での STEC 試験に伴い発生する培養液残液 9 検体を宅配便（冷蔵）によって星薬科大学へ送付した。

(2) STEC・サルモネラ属菌検出法および生菌数測定

1) 検体の調製

枝肉に密着させたガーゼ検体 (99 検体) は、試験に使用するまで冷蔵で保管された。サンプリングバッグを無菌的に開封し、Modified tryptone soya broth (mTSB) 300 mL を加え、バックの外からよく手で揉み、検体液とした。この検体液から、3 mL を生菌数測定用に使用した。また、定量的検出用として 37 mL を別容器に分注し 4℃ に保管した。

2) 生菌数測定

検体液を 10 倍階段希釈にて 10^{-2} 希釈液まで作製し、検体液原液は 0.2 mL ずつを標準寒天培地 5 枚に塗抹し、 10^{-1} および 10^{-2} 希釈液については 0.1 mL ずつを標準寒天培地にそれぞれ 2 枚ずつ塗抹し、37℃ で 48 時間培養後、生菌数測定を行った。

3) 定性的な STEC 7 血清群の検出

定性的な検出方法の流れを図 1-1 に示す。また、食肉衛生検査所 1 施設から分与された培養液残液の検査方法の流れを図 1-2 に示す。

3-1) 検体の増菌液からの DNA 抽出

検体液はサンプリングバッグのまま、 $42 \pm 1^\circ\text{C}$ で 15-24 時間培養を行った。この培養液から DNA アルカリ熱抽出を行った。この DNA 抽出液をマルチプレックスリアルタイム PCR のテンプレートとして用いた。また、食肉衛生検査所 1 施設から分与された培養液残液については、培養液残液 2 mL を Tryptone soya broth (TSB) 8 mL に添加して 42°C で 18 時間培養 (二次増菌培養) した。この培養液の DNA 抽出液をリアルタイム PCR のテンプレートとして用いた。

3-2) STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定

プライマーセット Assay 1 (*stx/eae*) ではベロ毒遺伝子 (*stx* 遺伝子) およびインチミンタンパク質遺伝子 (*eae* 遺伝子) を、Assay 2 (16S/0157) では 16SrRNA 遺伝子および 0157 遺伝子を、Assay 3 (026/0111) では 026 遺伝子および 0111 遺伝子を、Assay 4 (045/0121) では 045 遺伝子および 0121 遺伝子を、Assay 5 (0103/0145) では 0103 遺伝子および 0145 遺伝子を検出する。プライマーセット、プライマーおよびプローブの組み合わせおよび配列を表 1-2 に示す。

Assay 1 から Assay 5 の反応溶液の組成および量を表 1-3-1 から表 1-3-5 に示す。リアルタイム PCR の反応条件は、 95°C で 10 分を 1 サイクル、次いで 95°C で 15 秒、 59°C で 1 分の組み合わせを 45 サイクルとした。まず初めに Assay 1、2 を行った。その結果、*stx* 陽性かつ *eae* 陽性の検体は、続けて Assay 3、4、5 を同時に行い、7 血清群 0 遺伝子が陽性になるかを確認した。STEC 7 血清群陽性の検体は、陽性となった 0 血清型について免疫磁気ビーズ法を以下のように行った。7 血清群 0 遺伝子がない場合は STEC 7 血清群陰性とした。

3-3) STEC 7 血清群の免疫磁気ビーズ法による濃縮および選択培地による単離

免疫磁気ビーズ法は、免疫磁気ビーズ 026、045、0103、0111、0121、0145、0157 「生研」 (デンカ株式会社) を用いて行った。最終的に滅菌リン酸緩衝液 (PBS) 1 mL に懸濁したものをビーズ濃縮液とした。このビーズ濃縮液を 0.1 mL をソルビトールマッコンキー寒天 (SMAC) 培地、セフィキシム・亜テルル酸加ソルビトールマッコンキー寒天

(CT-SMAC) 培地、クロモアガーSTEC培地またはセフィキシム・亜テルル酸加クロモアガーSTEC (CT-クロモアガーSTEC) 培地に塗抹した。これらを $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 18–24 時間培養し、培地上に増殖した疑わしいコロニーに関して、以下の STEC 7 血清群の確認を行った。

3–4) コロニーの STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定

コロニーを 0.1 mL の TE 緩衝液 (PH8) に懸濁し、DNA 熱抽出を行なった。この抽出液をテンプレートとして、Assay 1 および目的とする 0 群によるプライマーを用いて、3–2) と同様にリアルタイム PCR を行った。この結果、7 血清群 0 遺伝子が陰性となったこのコロニーを STEC 7 血清群陰性と判定した。*Stx* 陽性かつ *eae* 陽性、血清群 0 遺伝子が陽性のコロニーは、STEC 7 血清群陽性と判定した。

3–5) STEC 分離株の血清型の再確認

基本的には、血清群 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 の血清型別は、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ株式会社) または市販のラテックス凝集試薬を用いた。7 血清群に凝集したものについては、H 血清型を抗血清を用いて H 血清型を決定した。

(3) サルモネラ属菌の検出方法

検出方法の流れを図 1–3、図 1–4 に示す。

1) 試験検体

STEC 試験で調製した mTSB 培養液 99 検体および 1 施設での STEC 試験に伴い発生する培養液残液の二次増菌培養 9 検体を供した。

2) 検体の増菌培養液または培養液残液の二次増菌培養からの DNA 抽出

STEC 試験で抽出した培養液からの DNA 抽出液を以下に示すリアルタイム PCR のテンプレートとして用いた。

3) サルモネラ属菌特異的遺伝子の検出

プライマーセット (*ttr*/16S) ではサルモネラ属菌特異的 *ttr* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子を検出する。16S rRNA 検出用プライマーおよびプローブは、表 1–3–2 に示した 16S Assay2 と同じ配列を用いた。プライマーセット、プライマーおよびプローブの組み合わせおよび配列を表 1–4 に示す。反応溶液の組成および量を表 1–5 に示す。リアルタイム PCR の反応条件は、 95°C で 10 分を 1 サイクル、次いで 95°C で 15 秒、 59°C で 1 分の組み合わせを 45 サイクルとした。*ttr* 遺伝子がない場合はサルモネラ属菌陰性とした。

4) 選択培地を用いたサルモネラ属菌の分離

3) で *ttr* 遺伝子が陽性だった検体の増菌培養液または培養液残液の二次増菌培養 0.5 mL をテトラチオネート (TT) 培地 10 mL に、同液 0.1 mL を Rappaport-Vassiliadis R10 (RV) 培地 10 mL に接種し、 42°C で 18–24 時間培養した。TT 培地および RV 培地での培養液を攪拌後、1 白金耳を DHL 寒天培地および CHROMagar Salmonella にそれぞれ画線塗抹し、 35°C で 18–24 時間培養した。DHL 寒天培地と CHROMagar Salmonella に単離された疑わしいコロニーを観察し、DHL 寒天培地は黒色 (H_2S 陽性)、CHROMagar Salmonella は紫色コロニーを選択した。疑わしいコロニーがある場合は、各プレート 2 コロニー以上を目安として Tryptone Soya Agar (TSA) へ画線塗抹すると同時に、4 分画した DHL 寒天培地と CHROMagar

Salmonella にもそれぞれ画線し、35℃で 18～24 時間培養した。コロニーの密集によって単離が難しい場合は、DHL 寒天培地あるいは CHROMagar Salmonella へ適宜画線塗抹し単離した。典型的なコロニーが認められない平板は、陰性と判断した。

5) サルモネラ属菌の同定

TSA 上のシングルコロニーを用いて、デンカ生研の「サルモネラ LA」で凝集試験を行った。凝集試験陽性のコロニーは、ブドウ糖、乳糖および白糖の発酵およびガス産生、硫化水素産生を観察するために Triple sugar iron agar (TSI 寒天培地) に、リジン脱炭酸産生、インドール産生、運動性を観察するために Lysine Indole motility medium (LIM 培地) に培養して、生化学的性状試験を行った。

6) 血清型別試験

サルモネラ属菌と同定された菌株は、サルモネラ免疫血清「生研」(O 群, Vi 血清) とサルモネラ免疫血清「生研」H 血清を用いて血清型を決定した。

7) サルモネラ属菌の汚染菌数の定量

定量的な検出方法の流れを図 1-5 に示す。

上記の菌株が、サルモネラ属菌であった場合、4℃で保存しておいた培養前の検体液を用いて、MPN 測定 (3 本法) を行った。mTSB を用いて希釈段 3 段とし、37±1℃で 15-24 時間培養した。前培養液は TT 培地および RV 培地で選択増菌培養し、4) 選択培地を用いたサルモネラ属菌の分離に従った。

2. MLG 掲載または第 3 者認定を受けた STEC

スクリーニング方法についての試行

(1) 試薬キットおよび機器

GENE-UP 試薬シリーズの STEC 検出キット

(bioMérieux [フランス]、ビオメリュー・ジャパン国内対応) を使用した。なお、機器は専用機器を使用した。

STEC 検出キット [検出対象: *Escherichia coli* 0157:H7 & non-0157 STEC Top 6] には、以下を使用した。

- GENE-UP LYSIS KIT [用途: 試料液中の検出対象微生物細胞の溶菌]
- GENE-UP STEC STX & EAE (EH1) [検出対象: STEC (*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子)]
- GENE-UP *E. coli* 0157:H7 (EC0) [検出対象: *E. coli* 0157:H7]
- GENE-UP Pathogenic *E. coli* (PEC) [検出対象: EHEC (*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子との共局在と高い相関性のある病原因子遺伝子)]
- GENE-UP STEC-TOP 6 (EH2) [検出対象: *E. coli* 026, 045, 0103, 0111, 0121, 0145]

(2) 検体作製

1) 菌株および牛肉の培養

腸管出血性大腸菌 (血清群 026: 2 株、045: 1 株、0103: 1 株、0111: 1 株、0121: 1 株、0145: 1 株、0157: 2 株) を Trypticase soy broth (TSB) 中にて 37℃で 18 時間培養した。また、市販の牛スライス肉を 9 倍量の mTSB 中にて 42℃で 18 時間培養した。

2) 菌希釈検体の作製

各菌株の培養液を滅菌リン酸緩衝液 (PBS) 中にて 10^{-7} まで 10 倍階段希釈し、菌液を作製した。また、それら 10 倍階段希釈菌液を 9 倍量の牛肉培養液にて 10 倍希釈し、菌添加牛肉培養液を作製した。

3) 菌数測定

PBS で希釈した 10^{-7} および 10^{-6} 希釈菌液 0.1 mL を TSA に塗抹し、37℃で 18 時間培養

し、生育したコロニー数を測定し、菌液の菌数を算出した。

(3) 菌液および菌添加牛肉培養液からのキットを用いた DNA の抽出および検出
各キットの使用手順に従って、実施した。

C. 研究結果

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

(1) 生菌数

調査した検体 99 頭のうち 55 頭の検体から生菌数が測定され、その平均は $1,704.6 \pm 10,772.1$ (平均 $\pm$ SD) CFU/cm² であった (表 1-6)。

雌雄で比較すると、オスの 57 頭は 61.7 ± 117.3 CFU/cm² であるのに対して、メスの 27 頭では $3,408.4 \pm 15,331.9$ CFU/cm² であった (表 1-6)。

ウシの種類別で比較すると、ホルスタインの平均値が $4,669 \pm 17,755.4$ CFU/cm² で最も多く、次いで交雑種、黒毛和種、日本短角種の 12.9 ± 35.9 CFU/cm²、 12.3 ± 21.6 CFU/cm²、 3.2 ± 3.2 CFU/cm² であった。ホルスタインは、生菌数 100 CFU/cm² を超えるウシが 16 頭、1,000 CFU/cm² を超えるウシが 4 頭、約 80,000 CFU/cm² のウシが 1 頭含まれていた。

施設別の生菌数の結果を表 1-7 に示す。採材期間を通して、平均生菌数が最も多かった施設は C 施設であった。平均生菌数は $4,455.6 \pm 17,333.5$ CFU/cm² であり、100 CFU/cm² を超えるウシが 13 頭、1,000 CFU/cm² を超えるウシが 3 頭であった。

月別で算出した生菌数の結果を表 1-8 に示す。10 月が最も高く

$8,859.0 \pm 26,544.3$ 、次いで 11 月が $1,240.4 \pm 3,388.2$ であった。両月の平均生菌数が高いのは、C 施設のホルスタインで、10 月採取のウシ 1 頭が約 80,000 CFU/cm²、11 月採取のウシ 1 頭が約 10,000 CFU/cm² であったことによる。

(2) STEC7 血清群の分離

定性的な検出を図 1-1 および図 1-2 に示すように行い、増菌培養液が *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方あるいは片方が陽性であった検体の STEC7 血清群のリアルタイム PCR の結果を表 1-9 に示す。供試検体 108 検体のうち、11 検体が *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の少なくとも片方が陽性であり、両遺伝子のいずれもが陽性となった検体はそのうち 4 検体であった。この 4 検体のうち 1 検体が STEC 7 血清群の 045 で陽性となり、Ct 値は 29.7 であった (検体番号 24-105)。

リアルタイム PCR で *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子陽性となった培養液から分離した菌株の O 血清群と保有遺伝子を表 1-10 に示す。検体番号 24-105 から分離された菌株は、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子を保有せず、045 血清群のみを保有していた。この検体は、生菌数が 33.2 CFU/cm² で、ホルスタイン種の 19 ヶ月齢から採取された。

(3) サルモネラ属菌の検出

定性的な検出を図 1-3 および図 1-4 に示すように行い、増菌培養液が *ttr* 遺伝子陽性となった検体は 1 検体 (検体番号 24-27) で、CT 値は 35.6 であった (表 1-9)。

ttr 遺伝子陽性となった検体番号 24-27 の培養液から分離した菌株は、TSI 寒天培地で斜面赤色、高層黄色、硫化水素産生、LIM 培地でリジン陽性、インドール陰性、運動性

陽性の典型的なサルモネラ属菌の性状を示した（表 1－11）。血清型は、*Salmonella* Dublin であった（表 1－12）。

検体番号 24-27 の検体は、10 月に黒毛和種のオス、30 ヶ月齢から採取された（表 1－12）。

（4）サルモネラの定量

定性試験で *Salmonella* Dublin が分離された検体番号 24-27 の検体については、定量的な試験を行った（図 1－5）。MPN 法（3 本法）での定量結果を表 1－12 に示す。検体の生菌数は 3.3 CFU/cm²、サルモネラ MPN は 3 未満/試験液 100mL であり、ガーゼ表面積 100 cm²あたり 0.33MPN 未満であった。

2. MLG 掲載または第 3 者認定を受けた STEC スクリーニング方法についての試行 実施結果については、別途とりまとめた。

D. 考察

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

本調査では牛枝肉からガーゼを用いた 99 検体および培養液残液 9 検体（合計 108 検体）からは STEC は分離されなかった。リアルタイム PCR で *stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子、045 血清群いずれも陽性となった培養液が 1 検体あったが、分離できた菌株は 045 血清群のみ陽性で、STEC ではなかった。より効果的な分離方法の検討が必要であると考えられる。

一方、108 検体中 1 検体から *Salmonella* Dublin が分離された。令和 5 年度に行った同様の調査では、サルモネラ属菌は検出されていない。また、令和 2 年度から 4 年度の調査ではサルモネラ属菌は検出対象でなかったため、今回の調査で検出されたこと

は今後の牛肉の衛生管理において重要な対象となることが考えられる。ただし、今回のサルモネラ定量試験において、MPN 法により、検出限界以下であったことから、汚染濃度は低いことが推察される。

測定された生菌数は施設の影響が大きいと考えられた。生菌数の多かった施設は、調査した 21 検体中すべてから生菌数が検出され、また牛の種類は殆どがホルスタインであった。令和 2 年度から 4 年度の調査において、ホルスタインの平均生菌数は、各々 2.9 CFU/cm²、130.3 CFU/cm²、1,948.7 CFU/cm² であったのに比べると、今年度 4,669.1 CFU/cm² と高かった。

この理由として、特に施設 C の生菌数（表 1－7）が高かったことが影響したと考えられた。

2. MLG 掲載または第 3 者認定を受けた STEC スクリーニング方法についての試行

本キットシリーズは、STEC7 血清群が効率的に検出できるコンセプトになっていることが確認された。今後、より詳細な使用手順が整備されることによって、簡易に技術を習得し、確実な試験実施が行えるものと考えられる。

E. 結論

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減のための研究を実施した。1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査では、2024 年 9 月から 4 施設の協力のもとに牛枝肉合計 108 検体から 7 血清群（026、045、0103、0111、0121、0145、0157）の STEC およびサルモネラ属菌を対象とした調査を行った。また、このうち 3 施設については衛生指標として生菌数についても測

定を行なった。供試検体を増菌培養後、または施設にて増菌培養した培養液の二次増菌培養後、STEC7 血清群マルチプレックスリアルタイム PCR およびサルモネラ特異的リアルタイム PCR に供試した。スクリーニングを行い、陽性になった検体については菌分離を行った。分離された株については生化学的性状試験および血清型別を行った。この結果、1 検体(0.9%)からサルモネラ属菌が分離されたが、1 検体のみであったことからウシの種類や性別などの特徴については考察には至らなかった。なお、STEC7 血清群は検出されなかった。また、2. MLG掲載または第3者認定を受けた STEC スクリーニング方法についての試行では、菌液および菌添加牛肉培養液からのキットを用いた DNA の抽出および検出を実施した。今後、より詳細な使用手順が整備されることによって、簡易に技術を習得し、確実な試験実施が行えるものと考えられた。

F. 研究発表

(誌上発表)

Hirose, S., Tomaru, A., Akiyama, H., Hara-Kudo, Y. Effective decontamination methods for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on beef carcass surfaces for application in beef carcass hygiene. J. Food Prot. 2024 Nov;87(11):100366.
doi: 10.1016/j.jfp.2024.100366.

(学会発表)

Ikeuchi, S. Hirose, S., Chiba, Y., Akiyama, H., Hayashidani, H., and Hara-Kudo, Y. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* contamination on the surfaces of beef carcasses in slaughterhouses in Japan. IAFP Annual Meeting 2024. 2024 年 7 月 15 日 米国.

G. 知的所有権の取得状況・登録状況 なし

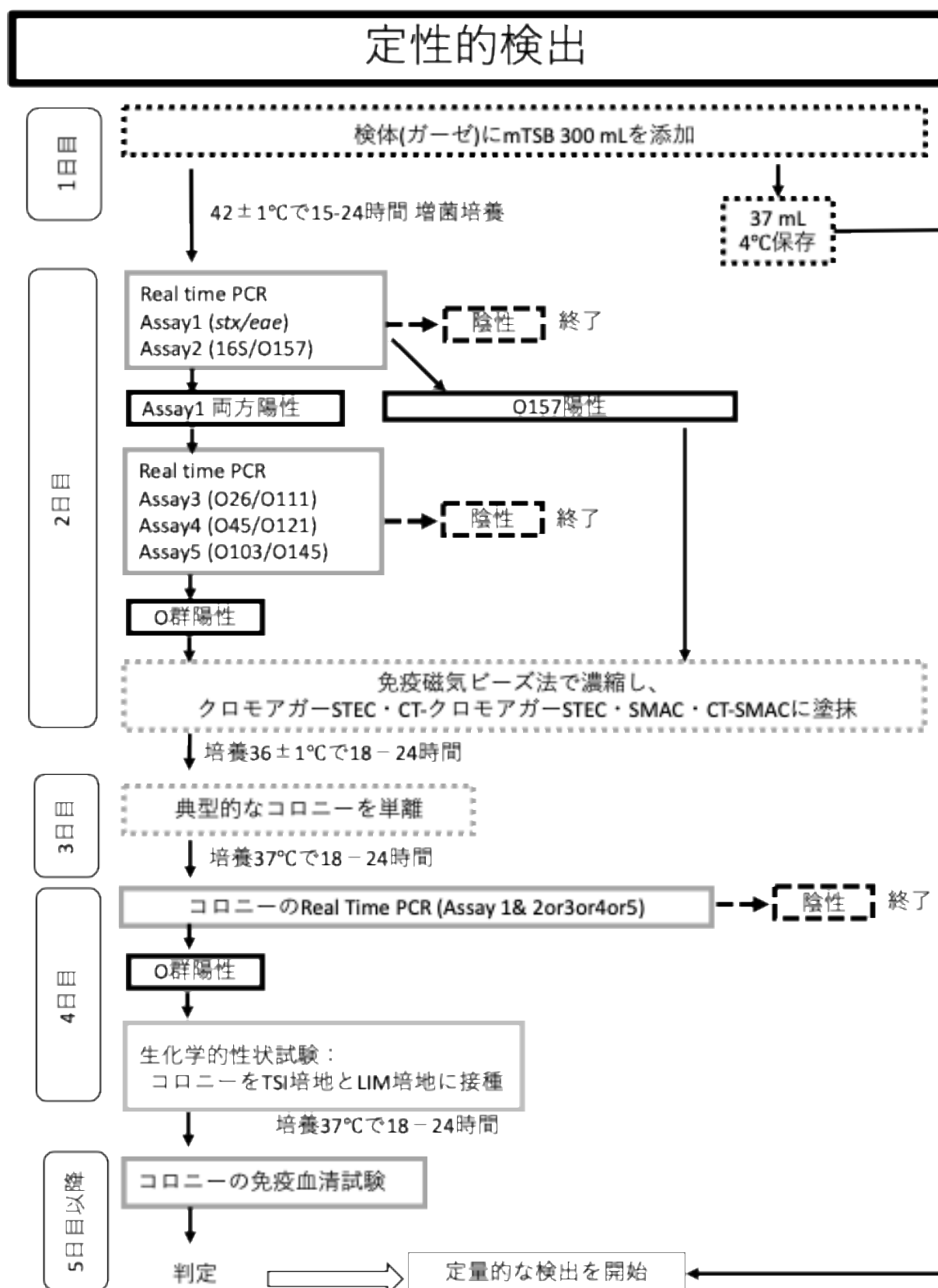


図1-1 志賀毒素産生性大腸菌（STEC）の定性的な検出方法

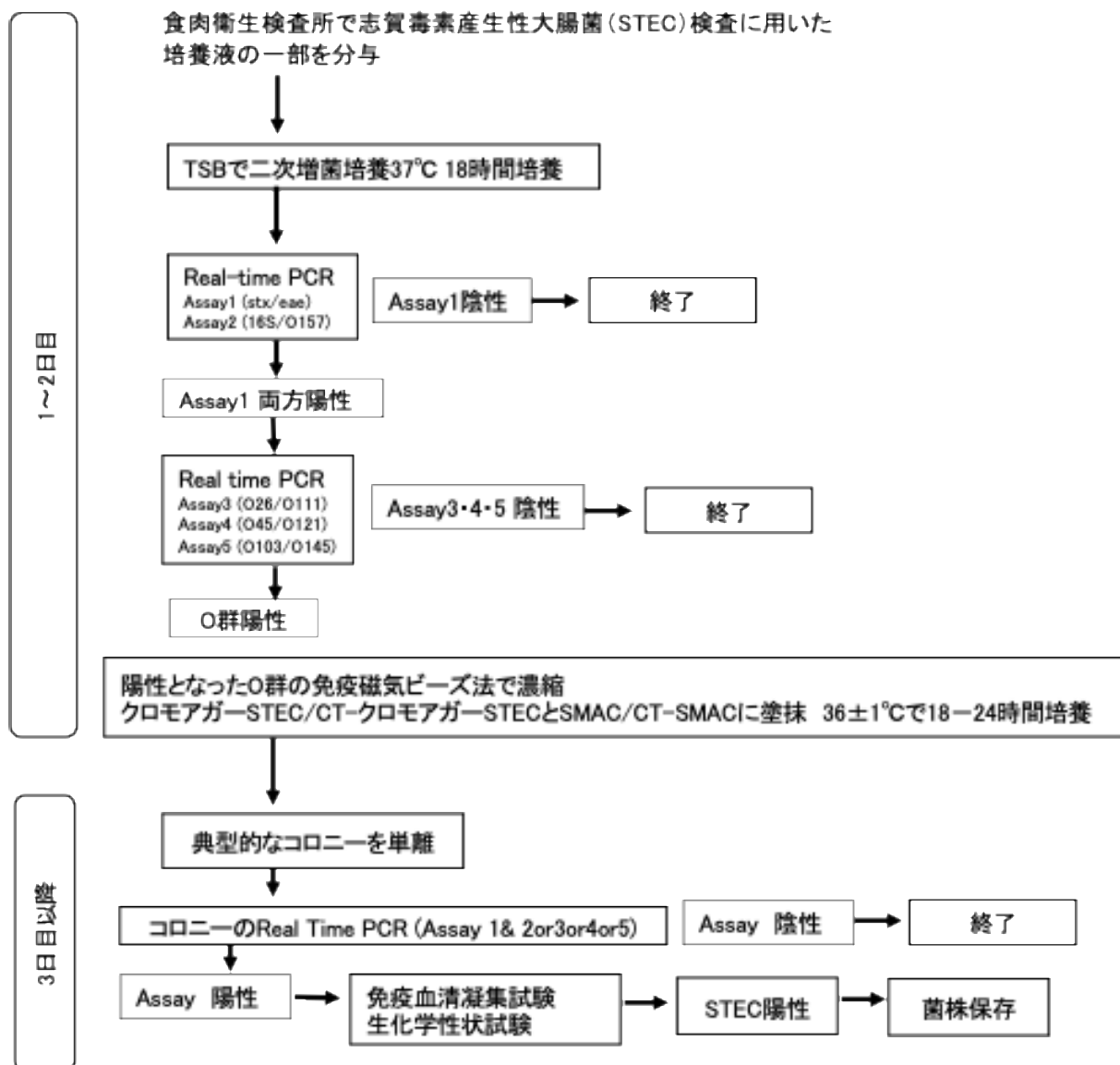


図1-2 志賀毒素産生性大腸菌（STEC）の検出・分離方法

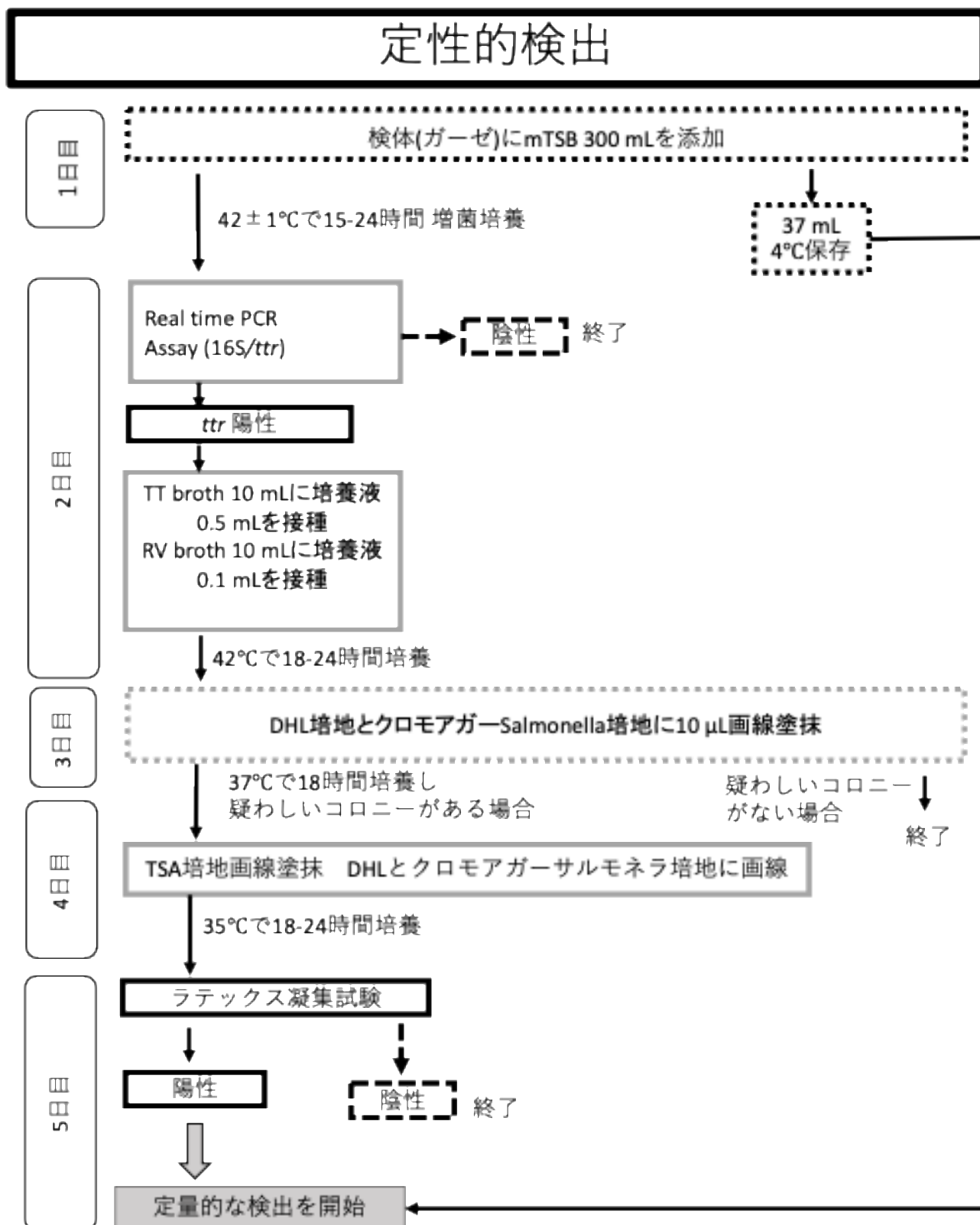


図1-3. サルモネラ属菌の定性的な検出方法

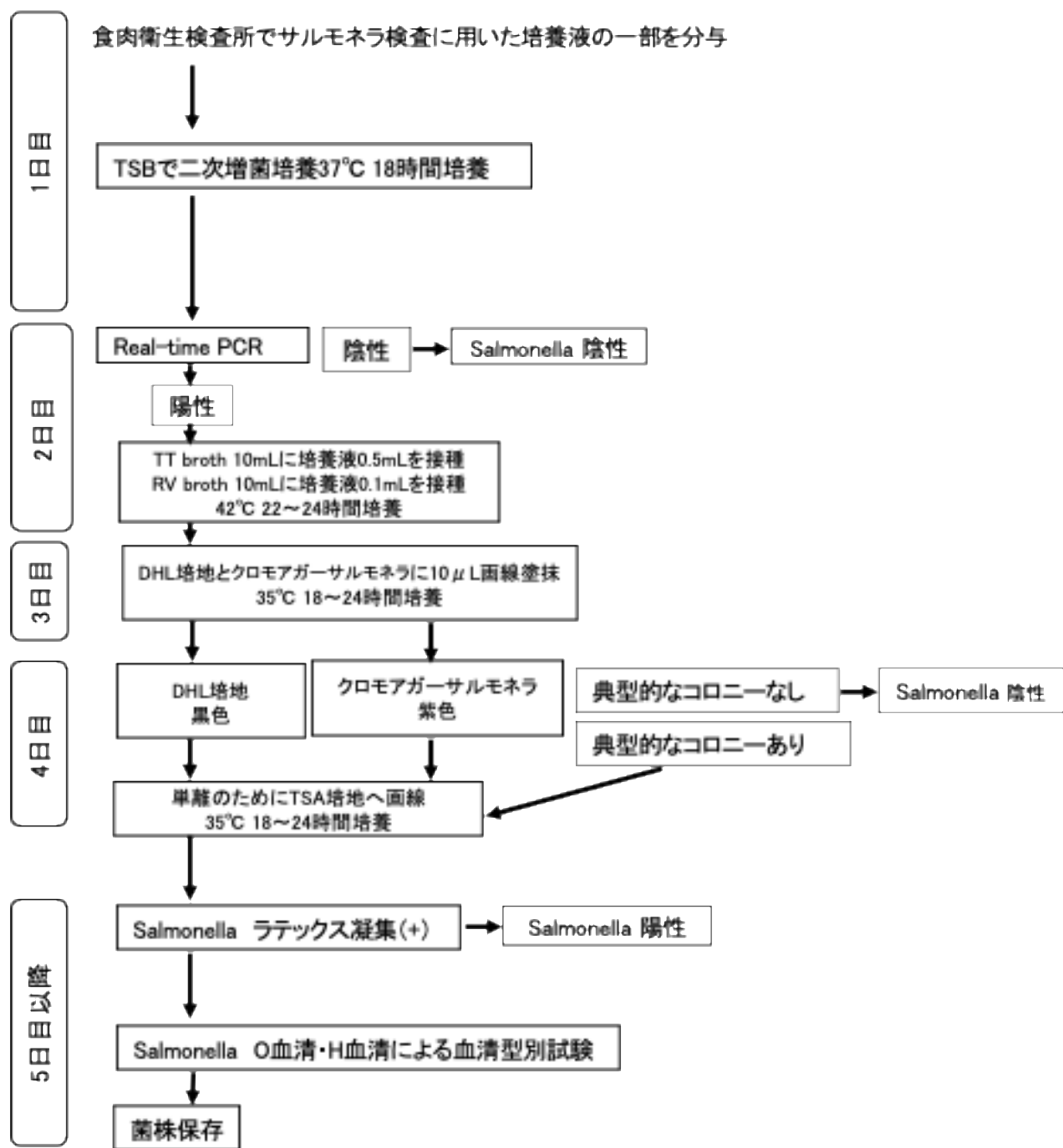


図1-4 サルモネラ属菌の検出・分離方法

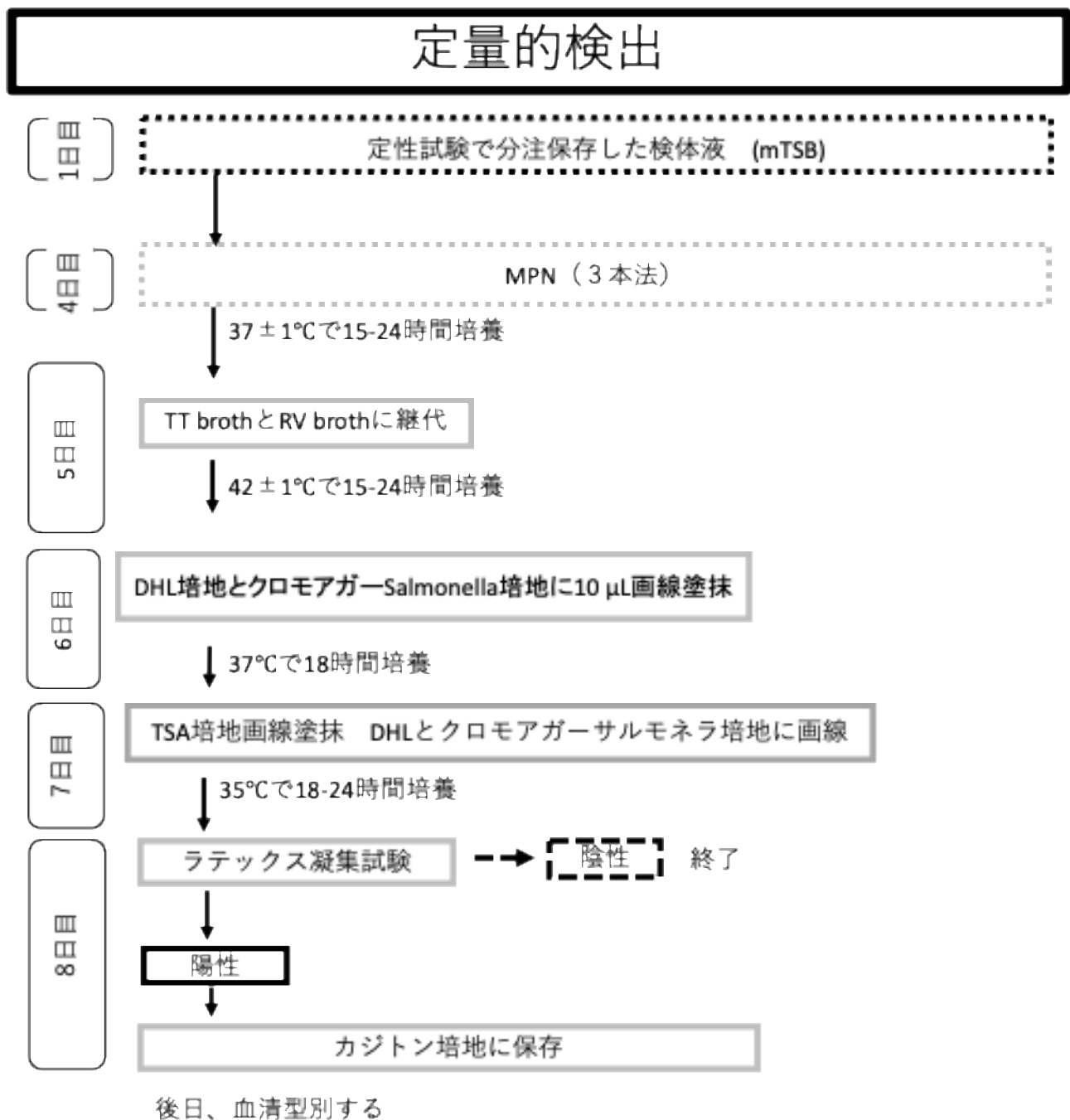


図1-5. サルモネラ属菌の定量的な検出方法

表 1-1 ウシの種類別、性別、齢別の個体数

種類	合計 個体数	性別	個体数	齢の幅 (ヶ月)	齢 (ヶ月)	個体数
ホルスタイン	24	オス	9	17 - 19	20未満	9
					20以上30未満	0
					30以上	0
		メス	15	34 - 95	20未満	0
					20以上30未満	0
					30以上	15
黒毛和種	34	オス	18	25- 33	20未満	0
					20以上30未満	14
					30以上	4
		メス	16	27 - 70、不明	20未満	0
					20以上30未満	5
					30以上	10
交雑種	31	オス	21	21 - 30	不明	1
					20未満	0
					20以上30未満	20
		メス	10	24 - 93	30以上	1
					20未満	0
					20以上30未満	8
日本短角種	9	オス	9	22-35	30以上	2
					20未満	0
					20以上30未満	4
		メス	0	—	30以上	5
					20未満	0
					20以上30未満	0
ジャージー種	1	オス	0	—	30以上	0
					20未満	0
					20以上30未満	0
		メス	1	45	30以上	1
					20未満	0
					20以上30未満	0
肉用牛	1	不明	1	不明	不明	1
不明	8	不明	8	119、不明	30以上	1
					不明	7

表 1-2 リアルタイム PCR のプライマーおよびプローブ

アッセイ名	標的 遺伝子	プライマー とプローブ	配列	出典
Assay1	Stx	Stx-F	5' TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG 3'	USDA
		Stx-R	5'CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACDTC 3'	
		Stx1-P	5' FAM-CTG GAT GAT CTC AGT GGG CGT TCT TAT GTA A-BHQ_1 3'	
		Stx2-P	5' FAM-TCG TCA GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC- MGB 3'	
	eaeA	Eae-F	5' CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA 3'	USDA
		Eae-R	5' CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTM 3'	
		Eae-P	5' HEX-ATA GTC TCG CCA GTA TTC GCC ACC AAT ACC-BHQ_1 3'	
Assay2	16S rRNA gene	16S rRNA-F	5' CCT CTT GCC ATC GGA TGT G 3'	USDA
		16S rRNA-R	5' GGC TGG TCA TCC TCT CAG ACC 3'	
		16S rRNA-P	5' HEX-GTG GGG TAA CGG CTC ACC TAG GCG AC- BHQ_1 3'	
	RfbEO157	RfbE O157-F	5'-TTT CAC ACT TAT TGG ATG GTC TCA A-3'	EFSA
		RfbE O157-R	5'-CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT-3'	
		RfbE O157-P	5' FAM-AGG ACC GCA GAG GAA AGA GAG GAA TTA AGG-BHQ_1 3'	
Assay3	WzxO26	Wzx O26-F	5' GTA TCG CTG AAA TTA GAA GCG C 3'	USDA
		Wzx O26-R	5' AGT TGA AAC ACC CGT AAT GGC 3'	
		Wzx O26-P	5' 56-FAM-TGG TTC GGT TGG ATT GTC CAT AAG AGG G- 3BHQ_1 3'	
	WbdIO111	WbdI O111-F	5' TGT TCC AGG TGG TAG GAT TCG 3'	USDA
		WbdI O111-R	5' TCA CGA TGT TGA TCA TCT GGG 3'	
		WbdI O111-P	5' 5MAXN - TGA AGG CGA GGC AAC ACA TTA TAT AGT GC- 3IABkFQ 3'	
Assay4	WzxO45	Wzx O45-F	5' CGT TGT GCA TGG TGG CAT 3'	USDA
		Wzx O45-R	5' TGG CCA AAC CAA CTA TGA ACT G 3'	
		Wzx O45-P	5' 56-FAM- ATT TTT TGC TGC AAG TGG GCT GTC CA-3BHQ_1 3'	
	WzxO121	Wzx O121-F	5' AGG CGC TGT TTG GTC TCT TAG A 3'	USDA
		Wzx O121-R	5' GAA CCG AAA TGA TGG GTG CT 3'	
		Wzx O121-P	5' 5MAXN - CGC TAT CAT GGC GGC ACA ATG ACA GTG C- 3IABkFQ 3'	
Assay5	WzxO103	Wzx O103-F	5' TTG GAG CGT TAA CTG GAC CT 3'	USDA
		Wzx O103-R	5' ATA TTC GCT ATA TCT TCT TGC GGC 3'	
		Wzx O103-P	5' HEX- AGG CTT ATC TGG CTG TTC TTA CTA CGG C-BHQ-1 3'	
	WzxO145	Wzx O145-F	5' AAA CTG GGA TTG GAC GTG G 3'	USDA
		Wzx O145-R	5' CCC AAA ACT TCT AGG CCC G 3'	
		Wzx O145-P	5' FAM-TGC TAA TTG CAG CCC TTG CAC TAC GAG GC-BHQ_1 3'	
Assay6	16S rRNA gene	16S_br_F	5'TCCTACGGGAGGCAGCAGT 3'	Nadkarni MA et al., 2002.
		16S_br_R	5'GGACTACCAGGTATCTAATCCTGTT 3'	
		16S_br_P	5' FAM- CGTATTACCGCGCTGCTGGCAC-BHQ_1 3'	

USDA: USDA, Laboratory Guidebook, MLG 5C Appendix 4.01

EFSA: EFSA Journal. 11:3138、2013

表 1-3-1 Assay1 stx1&2, eae gene の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2 × Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer stx F (50 μM)	0.63	1.25	
Primer stx R (50 μM)	0.63	1.25	
Primer Eae F (50 μM)	0.50	1.00	
Primer Eae R (50 μM)	0.50	1.00	
Probe stx1 P (5 μM)	1.25	0.25	FAM
Probe stx2 P (5 μM)	1.25	0.25	FAM
Probe Eae-P (5 μM)	1.00	0.20	HEX
滅菌蒸留水	1.74		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-3-2 Assay2 O157、16SrRNA gene の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2 × Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer 16SRna-F (20 μM)	0.20	0.16	
Primer 16SRna-R (20μM)	0.20	0.16	
Primer RfbE-O157-F (20μM)	0.25	0.20	
Primer RfbE-O157-R (20μM)	0.25	0.20	
Probe 16SrRNA-P (5 μM)	0.50	0.10	HEX
Probe RfbE-O157-P (5 μM)	0.25	0.05	FAM
滅菌蒸留水	5.85		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-3-3 Assay3 O26、O111 gene の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2 × Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer Wzx O26 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O26 R (20 μM)	0.31	0.25	
Primer WbdI O111 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer WbdI O111 R (20 μM)	0.31	0.25	
Probe Wzx O26 P (2 μM)	1.88	0.15	FAM
Probe WbdI O111 P (5 μM)	1.00	0.20	HEX
滅菌蒸留水	3.38		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-3-4 Assay4 O45、O121gene の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2 × Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer Wzx O45 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O45 R (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O121 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O121 R (20 μM)	0.31	0.25	
Probe Wzx O45 P (2 μM)	2.34	0.19	FAM
Probe Wzx O121 P (5 μM)	1.00	0.20	HEX
滅菌蒸留水	2.92		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-3-5 Assay5 O103、O145 gene の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2 × Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer Wzx O103 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O103 R (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O145 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O145 R (20 μM)	0.31	0.25	
Probe Wzx O103 P (5 μM)	1.00	0.20	HEX
Probe Wzx O145 P (2 μM)	2.50	0.20	FAM
滅菌蒸留水	2.76		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-4 プライマーセット、プライマーおよびプローブの組み合わせと配列

アッセイ名	標的 遺伝子	プライマー とプローブ	配列	出典
サルモネラ属菌	16S rRNA gene	16S rRNA-F	CCTCTTGCCATCGGATGTG	USDA
		16S rRNA-R	GGCTGGTCATCCTCTCAGACC	
		16S rRNA-P	GTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGAC	
	ttr	ttr-6 (forward)	CTCACCAGGAGATTACAACATGG	Appl Environ Microbiol. 2006 Jul;72(7):4545-53. doi: 10.1128/AEM.00131-06.
		ttr-4 (reverse)	AGCTCAGACCAAAAAGTGACCATC	
		ttr-5 (Target probe)	CACCGACGGCGAGACCGACTTT	

USDA: USDA, Laboratory Guidebook, MLG 5C Appendix 4.01

表 1-5 サルモネラ属 Assay *ttr*、16SrRNA gene の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2 × Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer 16SRna-F (20 μM)	0.20	0.16	
Primer 16SRna-R (20μM)	0.20	0.16	
Primer ttr-6 F (20 μM)	0.50	0.40	
Primer ttr-4 R (20 μM)	0.50	0.40	
Probe 16SrRNA-P (5 μM)	0.50	0.10	HEX
Probe ttr-5 (5 μM)	1.25	0.25	FAM
滅菌蒸留水	4.35		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-6 ウシの種類別、性別の生菌数

		試験 個体数	生菌検出* 個体数 (%)	生菌数** (平均±SD CFU/cm ²)
ウシの種類	ホルスタイン	24	20 (83.3)	4669.1±17755.4
	黒毛和種	34	16(47.1)	12.3±21.6
	交雑種	31	12(38.7)	12.9±35.9
	日本短角種	9	7(77.8)	3.2±3.2
	ジャージー種	1	0(0)	—
性別	オス	57	28(49.1)	61.7±117.3
	メス	42	27(64.3)	3408.4±15331.9
全体		99	55 (55.6)	1704.6±10772.1

SD: standard deviation

*：非検出は、0.11 CFU/cm²未満

**：検出個体のみの平均±SD

表 1-7 施設別の生菌数

施設	月	個体数		生菌検出 個体数*		生菌数** (平均±SD CFU/cm ²)	
		月ごと	合計	月ごと	合計	月ごと	施設合計
A施設	4	—		—		—	
	6	—		—		—	
	7	—		—		—	
	8	—		—		—	
	9	6	42	3	11	14.2±21.1	5.4±11.4
	10	6		1		9.2	
	11	6		—		—	
	12	6		4		0.3±0.3	
	1	6		1		5.6	
	2	6		1		0.1	
	3	6		1		0.1	
B施設	4	—		—		—	
	5	—		—		—	
	6	—		—		—	
	7	—		—		—	
	8	—		—		—	
	9	3	36	—	23	—	5.6±16.0
	10	6		5		1.1±1.3	
	11	6		5		1.0±0.9	
	12	6		4		4.8±5.3	
	1	6		4		20.4±38.3	
	2	6		5		3.4±3.0	
	3	3					
C施設	4	—		—		—	
	5	—		—		—	
	6	—		—		—	
	7	—		—		—	
	8	—		—		—	
	9	3	21	3	21	146.3±78.3	4455.6±17333.5
	10	3		3		26571.9±45885.3	
	11	3		3		3306.1±5471.7	
	12	3		3		739.22±995.2	
	1	3		3		295.3±226.7	
	2	3		3		62.4±55.2	
	3	3		3		60.1±56.7	
D施設	4	—					
	5	—					
	6	—					
	7	—					
	8	—					
	9	1	9				
	10	1					
	11	2					
	12	2					
	1	2					
	2	1					

SD: standard deviation、*：非検出は、0.11 CFU/cm²未満、**：検出個体のみの平均±SD

表 1-8 月別の生菌数

年	月	ウシの種類	個体数		生菌検出個体数*		生菌数** (平均±SD CFU/cm ²)	
			種類ごと	合計	種類ごと	合計	種類ごと	月の合計
2024	9	ホルスタイン	3	12	3	6	146.3±78.3	80.3±88.7
		黒毛和種	6		3		14.2±21.1	
		交雑種	3		—		—	
		日本短角種	—		—		—	
		ジャージー種	—		—		—	
	10	ホルスタイン	5	15	3	9	26571.9±45885.3	8859.0±26511.3
		黒毛和種	4		3		2.0±2.0	
		交雑種	6		3		0.6±0.6	
		日本短角種	—		—		—	
		ジャージー種	—		—		—	
	11	ホルスタイン	3	15	3	8	3306.1±5471.7	1240.4±3388.2
		黒毛和種	5		2		1.1±1.4	
		交雑種	7		3		0.9±0.8	
		日本短角種	—		—		—	
		ジャージー種	—		—		—	
	12	ホルスタイン	6	15	5	11	443.6±811.8	203.5±562.6
		黒毛和種	3		1		11.4	
		交雑種	3		2		0.4±0.5	
		日本短角種	3		3		2.6±3.6	
		ジャージー種	—		—		—	
	1	ホルスタイン	3	15	3	8	295.3±226.7	121.6±189.8
		黒毛和種	9		4		21.8±37.4	
		交雑種	3		1		0.11	
		日本短角種	—		—		—	
		ジャージー種	—		—		—	
	2	ホルスタイン	1	15	—	9	—	22.7±40.7
		黒毛和種	3		2		20.0±28.1	
		交雑種	6		3		50.0±66.0	
		日本短角種	4		4		3.6±3.4	
		ジャージー種	1		—		—	
	3	ホルスタイン	3	12	3	4	68.3±54.6	51.2±56.1
		黒毛和種	4		1		0.1	
		交雑種	3		—		—	
		日本短角種	2		—		—	
		ジャージー種	—		—		—	

SD: standard deviation、*：非検出は、0.11 CFU/cm²未満、**：検出個体のみの平均±SD

表 1-9 増菌培養がリアルタイム PCR 陽性となった検体

検体番号	施設	リアルタイムPCRの結果*										サルモネラ ttr
		eae	stx	16S	O157	O26	O111	O45	O121	O103	O145	
24-11	C施設	24.0	36.0	UD	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NA
24-27	B施設	UD	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	35.6
24-68	C施設	27.9	24.7	NT	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	NA
24-96	B施設	20.0	15.0	NT	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
24-105	C施設	17.6	42.0	NT	NT	UD	UD	29.7	UD	UD	UD	UD

* 数値はCT値、CDは非検出、NTは非試験

表 1-10 *stx*&*eae* 陽性検体のうち 7 血清群陽性検体

項目	リアルタイムPCR陽性検体		ウシの種類	月齢 (ヶ月)	生菌数 (CFU/cml)	分離株	
	検体数	検体番号				分離コロニー数	
<i>stx</i> (+) & <i>eae</i> (+) & O45 (+)	1	24-105	ホルスタイン	19	33.2	8 (<i>stx</i> (-)& <i>eae</i> (-)&O45(+))	

表 1-11 サルモネラの生化学的性状

培地	検体24-27からの分離株		参考
			サルモネラの性状
TSI	斜面	赤色	赤色
	高層	黄色	黄色
	硫化水素産生	+	+(非定型-)
	ガス産生	-	+
LIM	リジン	+	+(非定型-)
	インドール	-	-
	運動性	+	+(非定型-)

表 1-12 リアルタイム PCR で *ttr* 遺伝子が陽性の培養液からサルモネラが分離された検体

血清型	検体 番号	採材日	施設記号	生菌数 (CFU/cm ²)	サルモネラMPN 値 (100cml)	ウシの種類	月齢 (ヶ月)	性別
S. Dublin	24-27	241021	B施設	3.3	<0.33	黒毛和種	30	オス