

Ⅱ. 分担研究報告

4. 食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

研究分担者 廣瀬昌平

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

食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

研究分担者 廣瀬昌平 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

本研究は、対米輸出向け食肉施設における腸管出血性大腸菌（STEC）およびサルモネラ属菌検査の信頼性向上を目的として、各施設で使用されている標準作業手順書（SOP）を収集し比較するとともに、検査手技および手法に関する精度検証を実施した。令和5年度に協力を得た国内9施設に加えて、令和6年度には新たに1施設の協力を得て、計10施設からSOPを収集した。SOPの内容には施設ごとの差異があるものの、各施設の処理工程に即しており試験法の逸脱等は認められなかった。また、聞き取り調査で各施設から寄せられたSTEC検査における問題点の報告を受け、STEC検査に使用される免疫磁気ビーズのSTEC非特異的濃縮の検証を実施した。菌液と免疫磁気ビーズの血清型の組み合わせによっては、非特異的濃縮が生じることが示唆された。今後さらに検証を進め、改善案を提示する必要があると考えられた。

研究協力者 星薬科大学 工藤由起子

A. 研究目的

対米輸出向け食肉取扱施設および食肉検査所では、牛肉の腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌：STEC）およびサルモネラ属菌の検査を輸出先国が指定する試験法に従って実施している。しかし、国内の一般的な試験法と手法や基準が異なるため、担当者には高度な技術と知識の習得が求められる。検査担当者は、通知法および輸出先国がウェブ上で公開している試験法を参照し、標準作業手順書（SOP）を独自に作成している。しかし、緻密で専門性の高い試験手順に関する知識習得にかかる時間的制約および慢性的な人員不足などが原因で、記載内容の十分な精査が困難となっている。

そのため、専門的な知識を有する第三者による客観的な検査体制の確認が必要とされている。本研究では、令和5年度に引き続き、各検査所のSOP収集および検査体制についての聞き取り調査を行い、対米輸出検査における逸脱防止対策を一層強化することを目的とした。また、令和5年度に実施した各検査所への聞き取り調査において、特定の血清型を対象とした免疫磁気ビーズでの非特異的なSTECの濃縮が報告された。検査の再実施による検査員作業時間の浪費を防止し、検査の信頼性を確保するため、免疫磁気ビーズでの濃縮法における非特異的な濃縮の発生について検証した。

B. 研究方法

1. STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査

令和5年度には、国内の対米輸出認定食肉取扱施設9ヶ所の協力を得た。令和6年度には、新たに対米輸出認定食肉取扱施設1ヶ所の協力を得て STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査を実施し、令和5年度の結果と統合して計10施設の結果として表にまとめた。まず、各施設で使用している SOP を収集し、その内容について項目ごとに整理した。次に、各対米輸出認定食肉取扱施設を訪問し、食肉取扱施設内で食肉処理行程の詳細な説明を受け、STEC およびサルモネラ検査に関連する項目として検体の採材場所および手法等について聞き取り調査を実施した。続いて、整理した SOP の内容をふまえて各食肉衛生検査所で検査業務担当職員に以下の調査項目について聞き取り調査を実施した。

(1) STEC 検査

調査項目は、1ロットの定義、検体採取法、前培養条件、遺伝子検出のための使用機器、偽陰性・偽陽性・判定不能等の判定時のトラブル、陽性対照 DNA 溶液の作成方法、病原因子確認試験の方法および免疫磁気ビーズのプロトコルとした。

(2) サルモネラ検査

調査項目は、検体採取法、前培養条件、遺伝子検出のための使用機器、判定時のトラブルおよび陽性対照株の管理方法とした。

2. STEC 免疫磁気ビーズの濃縮工程の検証

(1) 供試菌株および増菌培養

STEC 026、045、0103、0111、0121、0145、0157 を供試した。供試菌株をトリプトソイブロス培地 (TSB) に接種し、37°C で一晩培養した。

(2) 免疫磁気ビーズ法

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。STEC 026、045、0103、0111、0121 および 0157 の増菌液は、免疫磁気ビーズ 0145 と反応させ、STEC 0145 は免疫磁気ビーズ 0103 と反応させた。また、STEC 0103 の増菌液(10^9 CFU/mL) は、TSB 培地で 10^2 倍希釈液(10^7 CFU/mL) および 10^4 倍希釈液(10^5 CFU/mL)を作成し、原液および各希釈液を免疫磁気ビーズ 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 と反応させた。免疫磁気ビーズ1滴に増菌液および希釈液1 mL を添加し、ローテーターで10分間反応させた。マグネチックスタンドで5分間吸着させた後、上清を除去して滅菌生理食塩水で洗浄後、E バッファー1 mL で懸濁した。この懸濁液を滅菌生理食塩水で 10^{-5} 倍まで希釈し、トリプトソイアガー培地 (TSA) に塗抹し、 36 ± 1 °C で18~24時間培養した。培養後に平板上に生育したコロニー数をカウントした。

C. 研究結果

1. STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査

(1) STEC 検査

1 ロットの定義は、同一カット日が1施設、同一と畜日が1施設、同一農場・

同一と畜日が5施設、同一農場・同一と畜日・同一カット日が3施設であった(表1)。検体採取法は、全施設がN60サンプリング法であり、検体は複数の個体または枝肉の混合であった。前培養条件は、通知法に準拠が3施設、米国農務省が発行している Microbiology Laboratory Guidebook (MLG)に準拠が1施設、AOACに準拠が6施設だった(表2)。遺伝子検出のための使用機器は、クオリボックス Q7 システムが7施設、RapidFinder が3施設だった。判定時のトラブルは、7施設で認められ、陽性対照 DNA 溶液の偽陰性等が挙げられた。陽性対照 DNA 溶液の作成方法は、通知法に準拠が9施設、通知法を一部改正して実施が1施設だった(表3)。病原因子確認試験の方法は、概ね通知法に準拠が9施設、クオリボックスの説明書に準拠が1施設だった(表4)。免疫磁気ビーズのプロトコルは、全施設で「生研」デンカを使用しており、キットのプロトコルに準拠が8施設、一部改変が2施設だった(表5)。

(2) サルモネラ検査

検体採取法および前培養条件は、全施設が MLG および農林水産省が公開しているアメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱に準拠していた(表6)。遺伝子検出のための使用機器は、クオリボックス Q7 システムが8施設、3M Molecular Detection System が2施設だった(表7)。判定時のトラブルは、クオリボックス Q7 システムを使用している5施設で認められた。陽性対照株は様々な血清型が供試されており、培地への植菌量は、施設に

よって様々であった(表8)。

2. STEC 免疫磁気ビーズの濃縮工程の検証

STEC 026、0111 および 0157 の各菌液において免疫磁気ビーズ 0145 で濃縮後の菌数は、各血清型特異的免疫磁気ビーズで濃縮した場合と比較して $1.9\sim 2.5 \log_{10}$ 低下した(図1)。また、STEC 0145 菌液を免疫磁気ビーズ 0157 で濃縮した場合は、0145 特異的免疫磁気ビーズで濃縮した場合に比べて菌数が $1.7 \log_{10}$ 低下した。一方で、STEC 045、0103 および 0121 の各菌液については、免疫磁気ビーズ 0145 と各血清型特異的免疫磁気ビーズとの菌数差は $1.0 \log_{10}$ 以下であった。

また、STEC 0103 の菌液を3種類の菌濃度 (10^5 CFU/mL、 10^7 CFU/mL および 10^9 CFU/mL) で各種血清型特異的免疫磁気ビーズを用いて濃縮したところ、どの菌濃度においても免疫磁気ビーズ 0103 で濃縮後の菌数が他の血清型免疫磁気ビーズでの濃縮後の菌数よりも高かった(図2)。免疫磁気ビーズ 0103 濃縮後と他の血清型免疫磁気ビーズ濃縮後との菌数差は、 10^9 CFU/mL の菌液よりも 10^5 CFU/mL および 10^7 CFU/mL の菌液でより大きくなる傾向が認められた。0103 以外の血清型免疫磁気ビーズ間で濃縮後の菌数に大きな差は認められなかった。

D. 考察

STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査では、令和5年度から追加で1施設の結果が加わった。令和5年度と同様に複数の項目において施設ごとに異なる点が認められたが、内容は各食肉取扱施設の処理工程および処理頭数等の状況に合わ

せて適切に設定されており、問題はないと考えられた。一方で、各施設において記載内容および基準設定に迷う箇所があるとの相談を受けることは多く、特に新規登録施設では、既存の登録施設と SOP を共有する機会を設けることが可能であれば、より正確な検査法の逸脱防止および検査員の負担軽減に繋がると考えられた。また、クオリボックス Q7 システムおよび RapidFinder での STEC 判定時のトラブルは、10 施設中 7 施設で認められており、今後、判定時のトラブルが発生した状況および供試した試薬の保管方法等の詳細な情報を追加で聞き取る必要があると考えられた。STEC 免疫磁気ビーズの濃縮工程の検証では、STEC 045、0103 および 0121 の菌液を免疫磁気ビーズ 0145 で濃縮後の菌数とその他の血清型の免疫磁気ビーズで濃縮後の菌数との差が 1.0 log₁₀ 以下であったことから、STEC 菌液の血清型と免疫磁気ビーズの組み合わせによっては、非特異的濃縮が生じることが示唆された。3つの菌濃度の STEC 0103 菌液を用いた試験では、10⁹ CFU/mL よりも 10⁵ CFU/mL および 10⁷ CFU/mL での免疫磁気ビーズ濃縮で血清型特異的濃縮と非特異的濃縮の差が大きかったことから、濃縮前の菌数が多いほど非特異的濃縮が顕著に生じることが推察された。そのため、精度管理試験等で特定の血清型の STEC のみに汚染され、その他の大腸菌等の汚染が少ない牛肉検体を用いた場合、培養液中の当該 STEC の菌数が 10⁹ CFU/mL に近くなり、免疫磁気ビーズでの濃縮で非特異的濃縮が生じやすくなると考えられた。

E. 結論

日本の対米輸出認定食肉取扱施設の

STEC 検査およびサルモネラ検査において、各施設の SOP は異なる記載はあるものの、問題点は認められなかった。免疫磁気ビーズ濃縮では、特定の血清型の STEC と免疫磁気ビーズの組み合わせで非特異的濃縮が起こりやすいことが示唆された。今後検証を進め、改善策を提示する必要があると考えられた。

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

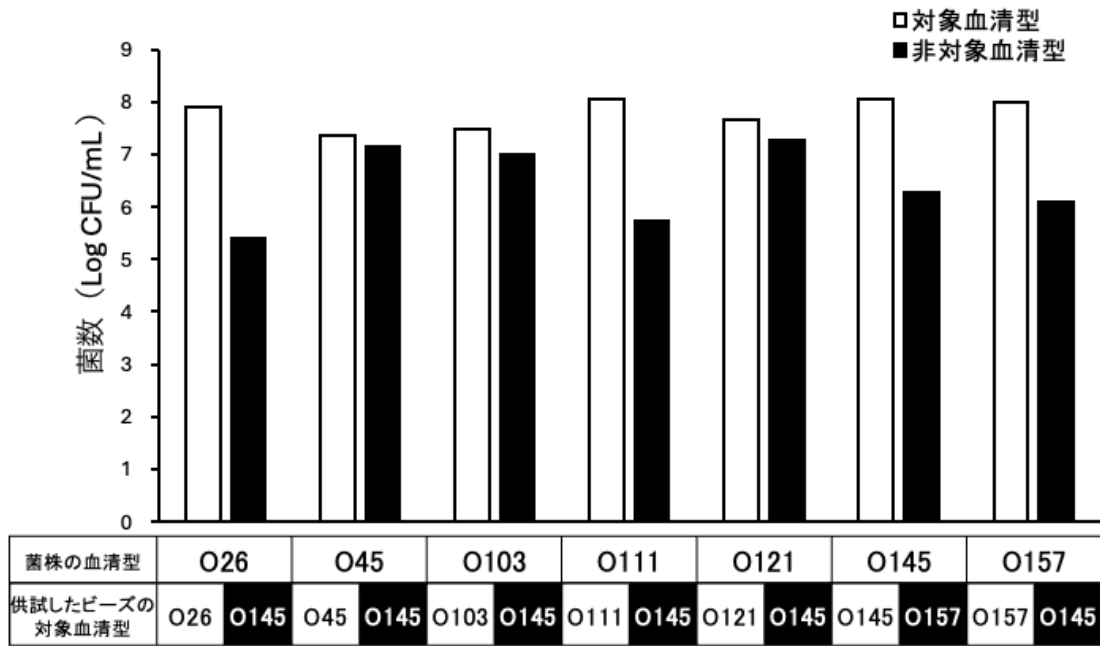


図1 STEC O26、O45、O103、O111、O121、O145 および O157 菌液の当該血清型免疫磁気ビーズおよび免疫磁気ビーズ O145 での濃縮後の菌数

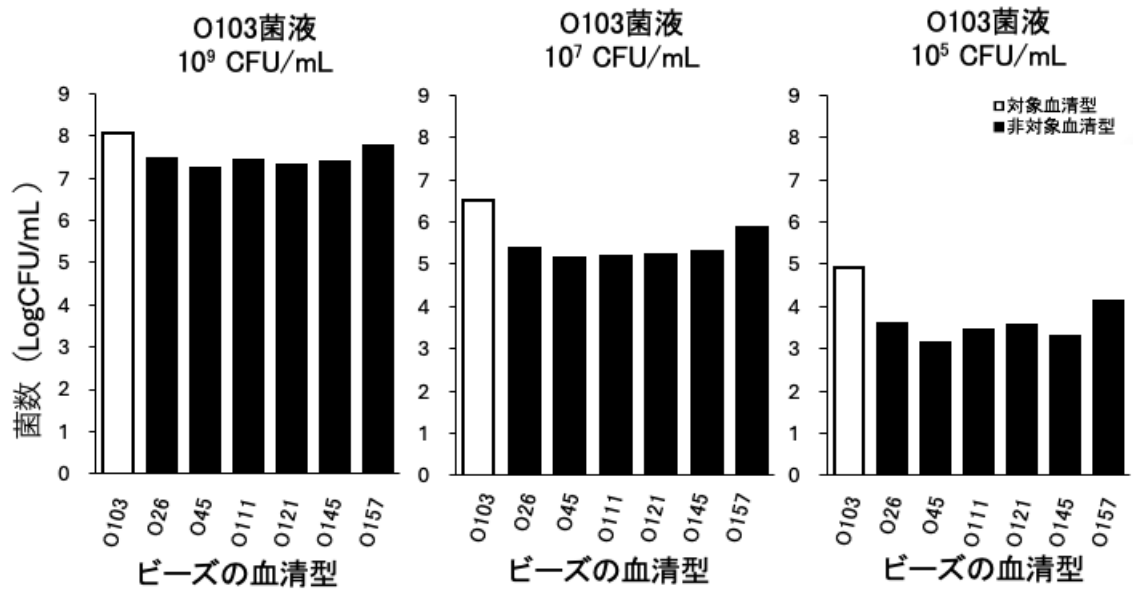


図2 菌濃度ごとの STEC O103 菌液の各血清型免疫磁気ビーズでの濃縮後の菌数

表1. STEC検査1ロットの定義および検体採取方法

項目	施設数
1ロットの定義	
同一カット日	1
同一と畜日	1
同一農場および同一と畜日	5
同一農場、同一と畜日および同一カット日	3
検体	
複数の個体または枝肉	10
検体採取方法	
N60法	10

表2. STEC検査の検体培養条件、遺伝子検出方法および判定時のトラブル

項目	施設数
検体培養要件	
通知法 例1 MLG	1
通知法 例2 AOAC	6
通知法 例3	3
遺伝子検出使用機器	
Applied BioSystems Rapid Finder STEC (AOAC)	3
BAXクオリボックスQ7 (MLG)	7
遺伝子検出キット	
STEC Ditection Workflow (AOAC061602)	3
STEC Screening(AOAC091301)	
E.coli O157:H7(AOAC031002)	6
STEC Panel 1&2(AOAC022203)	
判定時のトラブル (Applied BioSystems Rapid Finder STEC)	
あり	2
なし	1
判定時のトラブル (BAXクオリボックスQ7)	
あり	5
なし	2

表3. 陽性対照DNA溶液の作製方法

項目	施設数
作製方法の根拠	
通知法	9
通知法から一部改変	1
増菌培地	
mTSB	8
TSB	1
羊血液寒天培地 (MLG)	1

表4. コロニーからの病原因子確認試験の方法

項目	施設数
DNA抽出方法の根拠	
通知法	9
BAXクオリボックスQ7	1
抽出方法	
1 コロニーを100 μ l の滅菌蒸留水に懸濁し、97 \pm 2 $^{\circ}$ C、10 分間加後 14,000 \times g の遠心処理した上清をキットへ	9
1 コロニーを100 μ l の滅菌蒸留水に懸濁し、検体培養液と同様の操作で キットへ	1

表5. 免疫磁気ビーズのプロトコル

項目	施設数
免疫磁気ビーズ試薬	
「生検」デンカ	10
免疫磁気ビーズの洗浄回数	
1回	8
2回以上	1
3回	1

表6. サルモネラ件あ の検体採取法および培養法

項目	施設数
検体	
去勢／未経産 82	4
去勢／未経産 82 + 廃用／種雄 58	6
検体採取方法	
牛枝肉表面3か所（腹部、胸部及び臀部）それぞれ100 cm ² を滅菌 mTSB培地 10 mlを含ませたスポンジで拭き取り	10
増菌培地	
mTSB 60 mL（検体採取時にスポンジに染み込ませた10 mLを含む）	10
検体の培養条件	
42°C ± 1°Cで15~24時間	8
42°C ± 0.5°Cで22~24時間	2

表7. サルモネラ属遺伝子検出のための使用機器および判定時のトラブル

項目	施設数
サルモネラ属菌遺伝子検出機器	
BAXクオリボックスQ7（AOAC）	8
3M Molecular Detection System (MLG)	2
サルモネラ属菌遺伝子検出キット	
エンドポイント試薬サルモネラ2	8
3M病原菌検出アッセイサルモネラ属菌用	2
判定時のトラブル（BAXクオリボックスQ7）	
あり	5
なし	1
聞き取り未調査	2
判定時のトラブル（3M Molecular Detection System）	
あり	0
なし	2

表8. サルモネラ陽性対照株の管理方法

項目	施設数
サルモネラ陽性対照株の増菌培地	
mTSB 60 mL	10
植菌量	
マクファーランド0.5に希釈した培養液を1 μ L	4
マクファーランド0.5に希釈した培養液を1白金耳	1
3M病原菌検出アッセイサルモネラ属菌用	1
培養液を1白金耳	1
保存培養液の約13倍希釈液を1 mL	1
マイクロバンクビーズ1粒	1
1白金耳 (10 μ L) あるいはマイクロバンクビーズ1粒	1
サルモネラ陽性対照株 (<i>Salmonella enterica</i>) の血清型	
AbaetetubaおよびCholeraesuis	1
AbaetetubaおよびEnteritidis	1
AboyおよびEnteritidis	1
AboyおよびEnteritidisあるいはCholeraesuis	1
BaetetubaおよびSenftenberg	1
DerbyおよびHarder	1
EnteritidisおよびCholeraesuis	1
TyphimuriumおよびInfantis	1
TyphimuriumおよびMuenchen	1
SOPに記載なし	1
保存方法	
マクファーランド0.5に希釈した培養液を-20°C以下で保存	3
普通寒天斜面培地で4°C保存	2
カジトン培地で4°C保存	1
マイクロバンクビーズを冷凍保存	1
マイクロバンクビーズを-70°C以下で保存あるいは培養液を-75°C以下で保存	1
スキムミルク中 10^5 から 10^6 CFU/mLで-20°Cに保存	1
培養液を10倍希釈し-70°C以下で保存	1