

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

令和5年度 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)
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 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 部長

研究要旨

本研究は、対米輸出牛肉処理施設の検査所で腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌：STEC）およびサルモネラ試験で使用した検体培養液から試験陽性対象外であるベロ毒素またはインチミン遺伝子保有大腸菌の分離やサルモネラ属菌特異的遺伝子検出を行うことで衛生指標として評価して各施設へのフィードバックによって処理工程の改善検討等に役立てること、また、各検査所での SOP 収集および検査体制の聞き取り調査を実施して対米輸出に必要な検査の逸脱防止を試みることを目的とした。まず、STEC 試験培養液残液 40 検体およびサルモネラ試験培養液残液 86 検体を供試したところ、いずれの遺伝子も検出されなかった。また、供試された培養液に濁りが認められても牛脂等検体からの成分による濁りが生じることから、微生物の濁りの判別は困難であることが検体の特性として認められた。さらに、試験に用いた外部標準対象としての 16S rRNA を対象としたリアルタイム PCR 法は培養法で検出される一部の細菌を検出しないことが認められ、それらは主に、*Arcobacter* 属、*Bacillus* 属、*Campylobacter* 属、*Morganella* 属、*Proteus* 属、*Vibrio* 属および *Staphylococcus* 属であった。次に、各検査所での SOP 収集および検査体制の聞き取り調査から、同一ロットの定義が施設によって解釈が異なること、遺伝子検出では判定のトラブルが多いこと、陽性対照用 DNA 液の作製方法や確認試験の方法が異なる施設があることが判明した。各施設の採材場所、手順、検査施設・機器等を現地で確認し、多くの情報交換されたことによって検査所のこれまでの疑問点の解決や共通の問題点の把握がされた。今後、検査所と検体採取法について調整を行い、異なるアプローチによって衛生指標となる微生物の試験を行う予定である。

研究協力者（*STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査について）

北海道帯広食肉衛生検査所*	鈴木竹彦、松本斉子
岩手県食肉衛生検査所	久松暢子、北村洸人
岐阜県飛騨食肉衛生検査所	越 勝男
栃木県食肉衛生検査所	関口明子
京都市衛生環境研究所食肉検査部門*	川見明日香
姫路市食肉衛生検査センター*	橋本朋美
熊本県食肉衛生検査所	小林将英

大分県食肉衛生検査所
宮崎県高崎食肉衛生検査所*
国立医薬品食品衛生研究所

渡邊春香
越野慶太
廣瀬昌平、千葉由美

A. 研究目的

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（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の試験法で実施しているが、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。検査担当者は、試験法についてウェブサイト等を参照し、標準作業手順書（SOP）を作成するが、緻密な試験への経験や知識の必要性や慢性的な人員不足による記載事項の再確認や再検討など精査が不足する傾向があり、試験法について高い専門性を有する者による客観的な検査体制の確認の機会が必要とされている。このため、本研究では、各検査所の SOP 収集および検査体制の聞き取り調査を実施し、対米輸出に必要な検査の逸脱防止を試みる。一方で、各検査所での STEC およびサルモネラ試験で使用した検体培養液から試験陽性対象外であるペロ毒素またはインチミン遺伝子保有大腸菌の分離やサルモネラ属菌特異的遺伝子検出を行い、衛生指標として評価し、フィードバックして処理工程の改善検討等に役立てる。

B. 研究方法

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染調査

(1) STEC の検出

検出方法の流れを図 1 に示す。

1) 試験検体の収集

食肉衛生検査所 5 施設での STEC 試験に伴い発生する培養液残液 40 検体を収集した。試験に供試されたウシの種類と月齢を表 1-1 に示す。

2) 試験検体の二次増菌培養

肉眼で濁りが認められない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。

3) 培養液残液および二次増菌培養液からの DNA 抽出

収集した培養液残液から 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。

4) 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 Assay1 (*stx/ea*) ではペロ毒素遺伝子 (*stx* 遺伝子) およびインチミンタンパク質遺伝子 (*ea* 遺伝子) を、Assay2 (16S/0157) では 16SrRNA 遺伝子および 0157 関連遺伝子を、Assay3 (026/0111) では 026 関連遺伝子および 0111 関連遺伝子を、Assay4 (045/0121) では 045 遺伝子および 0121 遺伝子を、Assay5 (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。

Assay1 から Assay5 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。また、Assay1 から Assay5 は、陰性対照も Ct 値 35 から 40 で検出されることから (USDA, Laboratory Guidebook, MLG 5C Appendix 4.01)、本研究では、Ct 値 35 未満を陽性とした。まず初めに Assay1、2 を行った。その結果、*stx* 陽性かつ *eae* 陽性の検体は、続けて Assay3、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実施した。7 血清群 0 遺伝子がない場合は STEC 7 血清群陰性とした。

5) 16S rRNA 検出用リアルタイム PCR 法の評価

4) に示した 16S rRNA 検出用リアルタイム PCR 法 (16S Assay2) および 16S Assay2 とは異なるプライマーおよびプローブの組み合わせによる 16S rRNA 検出用リアルタイム PCR 法 (Nadkarni et al., 2002, 16S Assay6、表 1-2) に 26 菌種 (*Arcobacter butzleri*、*Arcobacter cryaerophilus*、*Arcobacter skirrowii*、*Bacillus cereus*、*Campylobacter coli*、*Campylobacter jejuni*、*Citrobacter freundii*、*Enterobacter aerogenes*、*Enterobacter cloacae*、*Escherichia albertii*、*Escherichia coli*、*Escherichia fergusonii*、*Escherichia*

hermannii、*Hafnia alvei*、*Klebsiella oxytoca*、*Morganella morganii* subsp. *Morganii*、*Proteus mirabilis*、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serover Typhimurium、*Shigella boydii*、*Shigella dysenteriae*、*Shigella flexneri*、*Shigella sonnei*、*Staphylococcus aureus*、*Vibrio parahaemolyticus*、*Yersinia enterocolitica* および *Yersinia pseudotuberculosis*) の抽出 DNA 溶液を供試し、各 PCR 法で検出可能な細菌種を評価した。陰性対照は滅菌蒸留水を用いた。Nadkarni らは 16S Assay6 の検出限界を Ct 値 33 から 38 としており、本研究では、Assay2 と合わせて Ct 値 35 未満を検出陽性とした。

6) 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 E バッファー 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 E バッファーで 10 倍および 100 倍希釈し、各希釈液 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 培地およびセフィキシム・亜テルル酸加クロモアガー STEC (CT-クロモアガー STEC) 培地にそれぞれ 1 枚ずつ塗抹した。

さらに、酸 (1N 塩酸) を加え、ローテーターで 1 時間反応させたものを酸

処理ビーズ濃縮液とした。この酸処理ビーズ濃縮液は E バッファーで 2 倍および 20 倍に希釈した液 0.1 mL ずつを SMAC 培地、CT-SMAC 培地、クロモアガー-STECC 培地、および CT-クロモアガー-STECC 培地に 1 枚ずつ塗抹し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 18-24 時間培養した。

これらの培地上に増殖した疑わしいコロニーに関して、以下の STECC 7 血清群の確認を行った。

7) コロニーの STECC 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 (PH 8) 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、Assay1 および目的とする 0 群によるプライマーを用いて、4) 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 STECC 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、STECC 7 血清群陽性と判定し、必要に応じて同様の操作を行った。

8) STECC 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 血清型を抗血清および H-genotyping (1) を用いて H 血清型を決定した。なお、7 血清群以外については 0 血清群を抗血清および 0-genotyping (2) にて決定した。

9) STECC 7 血清群の生化学的性状試験

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) を、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) の培養を行った。

(2) サルモネラ属菌の検出

検出方法の流れを図 2 に示す。

1) 試験検体の収集

食肉衛生検査所 5 施設でのサルモネラ試験に伴い発生する培養液残液 86 検体を収集した。試験に供試されたウシの種類と月齢を表 1-1 に示す。

2) 試験検体の二次増菌培養

肉眼で濁りが認められない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。

3) 培養液残液および二次増菌培養液からの DNA 抽出

各食肉衛生検査所でのサルモネラ試験に伴い発生する培養液残液から DNA アルカリ熱抽出を行った。この 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。

4) 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、(1) の 5) 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℃で 10 分を 1 サイクル、次いで 95℃で 15 秒、59℃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。

5) 選択培地を用いたサルモネラ属菌の分離

4) で ttr 遺伝子が陽性だった培養液残液 0.5 mL をテトラチオネート (TT) 培地 10 mL に、培養液残液 0.1 mL を Rappaport-Vassiliadis R10 (RV) 培地 10 mL に接種し、42℃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 白金耳をスルファピリジン添加ブリリアントグリーン (BGS) 培地または Double Modified Lysin Iron Agar (DMLIA) 培地にそれぞれ接種し、35℃で 18~24 時間培養した。BGS 培地と DMLIA 培地に単離された疑わしいコロニーを観察し、疑わしいコロニーが見られない場合は、更に 6 時間培養を続けた。BGS 培地は、平坦で不透明なピンク色で、辺縁全域の培地が赤色を呈するコロニーを選択した。コロニーが密集した培地では、緑色のバックグラウンドに対し黄褐色を呈するコロニーを選択した。DMLIA 培地は、中心部が黒色 (H₂S 陽性)、非黒色 (H₂S 陰性) の紫色コロニーを選択した。典型的なサルモネラはリジンを脱炭酸し、乳糖やショ糖を発酵しないので、培地の色が紫色に変化した。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

を目安として標準寒天培地へ画線塗抹すると同時に、4 分画した BGS 培地と DMLIA 培地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、BGS 培地あるいは DMLIA 培地へ適宜画線塗抹し単離した。または、TT 培地培養液と RV 培地培養液から再画線した。典型的なコロニーが認められない場合は、35℃で 18~24 時間継続培養し、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。

6) 選択培地を用いたサルモネラ属菌の同定

標準寒天培地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 AXIMA (島津製作所) で菌種を同定した。

7) 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。

2. STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査

2023 年 11 月から 2024 年 2 月に国内の対米輸出認定食肉取扱施設 9 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、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。

さらに、各食肉衛生検査所の微生物検査室を視察し、SOP に記載されていない諸項目として実験機器・設備、実験エリアの区分け、実験者の導線を含めた検査体制について聞き取り調査を実施した。

C. 研究結果

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染調査

(1) 試験培養液および二次増菌培養液中の細菌増殖

STEC 検査の培養液残液 40 検体中 36 検体が濁っており、23 検体が 16S Assay2 で陽性 (CT 値 35 未満) であった (表 1-6)。二次増菌培養液では 4 検体中 4 検体が濁り、2 検体が 16S Assay2 で陽性 (CT 値 35 未満) であった。サルモネラ属菌検査の培養液残液 86 検体中 18 検体が濁ってお

り、17 検体が 16S Assay2 で陽性 (CT 値 35 未満) であった (表 1-6)。二次増菌培養液では 68 検体中 68 検体が濁り、7 検体が 16S Assay2 で陽性 (CT 値 35 未満) であった。16S rRNA 検出用リアルタイム PCR 法の評価では、16S Assay2 では 14 菌種が陽性であったのに対し、16S Assay6 では、23 菌種が陽性であった (表 1-7)。*Arcobacter butzleri*、*Arcobacter cryaerophilus* および *Arcobacter skirrowii* はいずれの PCR 法でも検出されなかった。

(2) STEC の検出

供試した全検体が stx および eae 遺伝子陰性であり、STEC 陰性であった。(表 1-8)。

(3) サルモネラ属菌の検出

供試した全検体が ttr 遺伝子陰性であり、サルモネラ属菌陰性であった。(表 1-9)。

2. 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 4 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 2-1)。検体採取法は、全施設が N60 サンプルング法であり、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 4 施設だった (表 2-2)。遺伝子検出のための使用機器は、クオリバックス Q7 システムが 6 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 8 施設、通知法を一部改正して実施が 1 施設だった (表 2-3)。病原因子確認試験の方法は、概ね通知法に準拠が 8 施設、クオリバックの説明書に準拠が 1 施設だった (表 2-4)。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 7 施設、一部改変が 2 施設だった (表 2-5)。

(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 2-6)。遺伝子検出のための使用機器は、クオリバック Q7 システムが 7 施設、3M Molecular Detection System が 3 施設だった (表 2-7)。判定時のトラブルは、クオリバック Q7 システムを使用している 5 施設で認められ、サルモネラ Tm 値の波形の乱れや測定時のエラー表示などが挙げられた。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、施設によってばらつきが大きかった (表 2-8)。

(3) 検査に関わる諸項目

一部の施設では、作業導線の効率化および生菌・遺伝子使用エリアの区分けが不足していた。

D. 考察

牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染は、食品衛生上重要な課題である。過去

の報告では、日本の牛肉からの STEC 分離率は 0.6% であり、分離された株は全て STEC 0157 であった (Ikeuchi et al., 2024)。海外の牛肉からの STEC 0157 の分離率は、オーストラリアで 0.1% (Phillips et al., 2006)、米国で 0.66% (U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, 2016)、英国で 1.4% (Chapman et al., 2001)、デンマークで 3.4% (Breum & Boel, 2010)、アイルランドで 3.9% (Prendergast et al., 2011) およびスペインで 14.7% (Ramoneda et al., 2013) と報告されている。また、日本の牛肉からのサルモネラ属菌分離率は 0.2% であった (Shimajima et al., 2020)。海外の牛肉からのサルモネラ属菌の分離率は、米国で 0.66% (Vipham et al., 2012) および英国で 1.3% (Little et al., 2008) であり、オーストラリアでは 27 施設 1155 頭の枝肉を調査し全検体サルモネラ属菌陰性であったと報告されている (Phillips et al., 2006)。本研究では、牛枝肉のサルモネラおよび STEC 検査の結果が全て陰性であったことから、日本の対米輸出認定食肉取扱施設の牛枝肉処理工程において STEC およびサルモネラ汚染が適切に防除されていることが示唆された。また、試験方法は異なるが、検体供試元の食肉衛生検査所の試験結果も全て陰性だったことから、各検査所での STEC およびサルモネラ検査法の信頼性が改めて示された。一方で、検体の特性として、供試された培養液に濁りが認められても牛脂等検体からの成分による濁りが生じることから、肉眼での微生物の増殖の程度の判別は困難であった。また、試験に用いた外部標準対象としての 16S

rRNA を対象としたリアルタイム PCR 法 (16S Assay2) は、培養法で検出される一部の細菌を検出しないことが認められ、それらは主に、*Arcobacter* 属、*Bacillus* 属、*Campylobacter* 属、*Morganella* 属、*Proteus* 属、*Vibrio* 属 および *Staphylococcus* 属であった。異なるプライマーおよびプローブを用いた 16S Assay6 では、多くの菌種の検出性が改善されたが、16S Assay2 と同様に *Arcobacter* 属が検出されなかったことから、微生物の増殖を幅広く評価するためには、さらに広い検出性をもつ 16S rRNA 用プライマーおよびプローブを組み合わせる必要があることが考えられた。

STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査では、複数の項目において施設ごとに異なる点が認められた。1 ロットの定義は、カット日、と畜日および農場のどの項目を共通項とするかにおいて施設ごとにばらつきが認められた。しかし、1 ロットの定義については MLG でも厳密な指定はされておらず、現在の定義は、各食肉取扱施設の処理工程および処理頭数等に合わせ適切に設定しているため問題ないと考えられた。また、クオリバックス Q7 システムおよび RapidFinder での STEC 判定時のトラブルは、9 施設中 7 施設で認められ、サルモネラ判定時のトラブルは 7 施設中 5 施設で認められた。検査機器のトラブルは、検査の信頼性確保と検査再実施による検査員作業時間の浪費につながる。そのため、次年度には、トラブルの発生状況の詳細について追加で聞き取り調査し、検査機器でのトラブルの再現性を検証し、場合によっては機器メーカーに問い合わせることで障害を改

善する必要があると考えられた。陽性対照株の培地への植菌量は、施設によってばらつきが大きかったため、植菌量と培養の安定性について、検証が必要と考えられた。作業動線の効率化および生菌・遺伝子エリアの区分け等は、試験の逸脱につながる恐れもあるため、現地でディスカッションし、改善案を提示した。これらの改善によって検査体制の効率化が図られれば、輸出食肉 STEC 検査およびサルモネラ検査の信頼性の担保に寄与できると考えられた。

E. 結論

日本の対米輸出認定食肉取扱施設の牛枝肉処理工程における STEC およびサルモネラ汚染の適切な防除および各食肉検査所での STEC およびサルモネラ検査法の信頼性が改めて示された。また、STEC 検査およびサルモネラ検査において、クオリバックス Q7 システムおよび RapidFinder での判定時のトラブルが複数の施設で認められたため、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. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Ikeuchi S, Hirose S, Shimada K, Koyama A, Ishida S, Katayama N, Suzuki T, Tokairin A, Tsukamoto M, Tsue Y, Yamaguchi K, Osako H, Hiwatashi S, Chiba Y, Akiyama H, Hayashidani H, Hara-Kudo Y.: Isolation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*

from the Surfaces of Beef Carcasses
in Slaughterhouses in Japan. J Food
Prot. 2024;87:100263.

(学会発表)

廣瀬昌平，池内隼佑，島田光平，児山綾
子，石田祥士，吉田千央，東海林明子，
高橋むつみ，山口健一，大迫英夫，塚
本真由美，津江友紀，片山直人，瀧下
恵里子，樋渡佐知子，林谷秀樹，龜山
浩，工藤由起子．国内食肉処理施設に
おける牛枝肉の志賀毒素産生性大腸菌
保有状況調査．日本食品衛生学会第119
回学術講演会．令和5年10月12日-13
日．東京

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

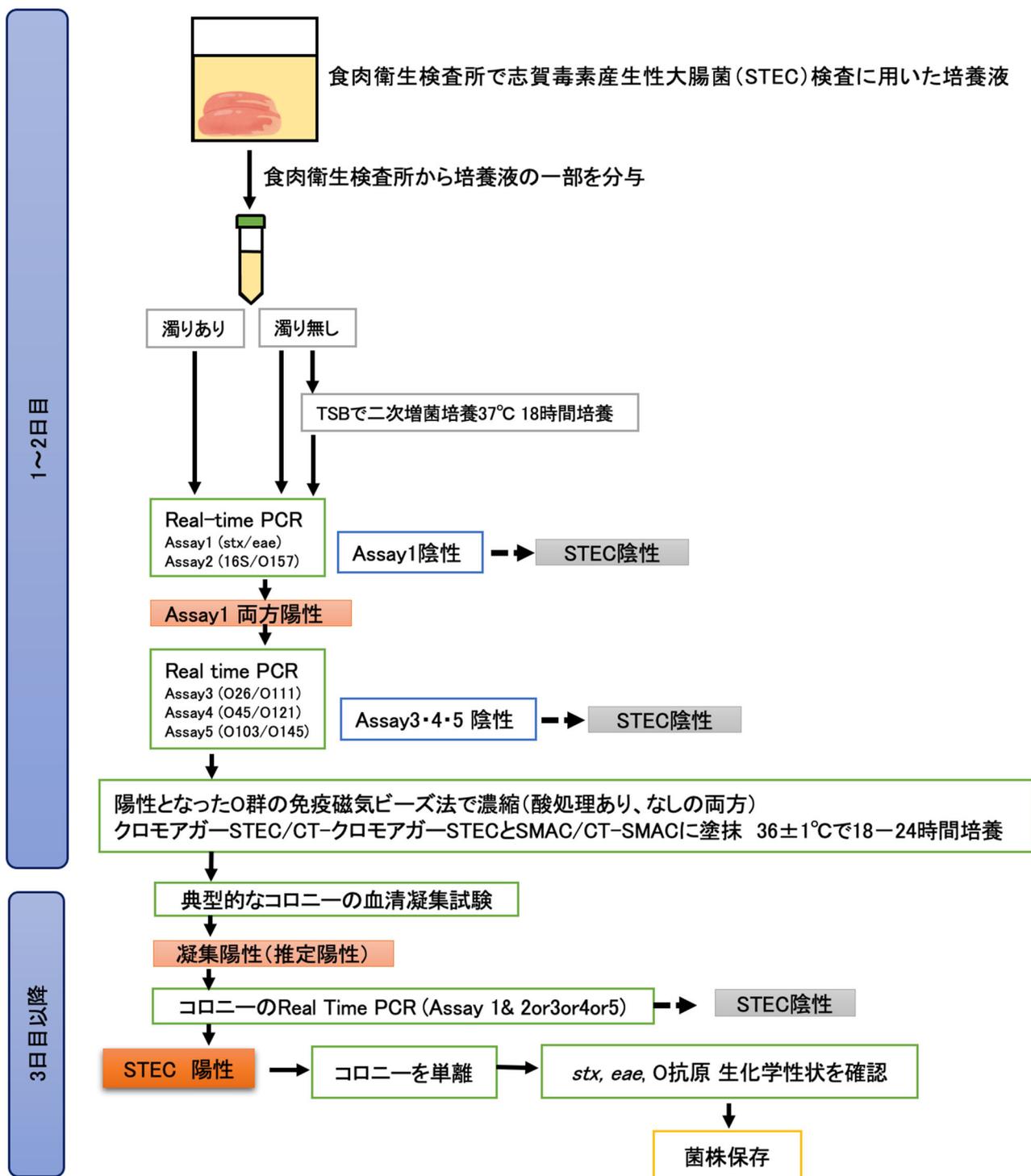


図1 志賀毒素産生性大腸菌(STEC)の検出・分離方法

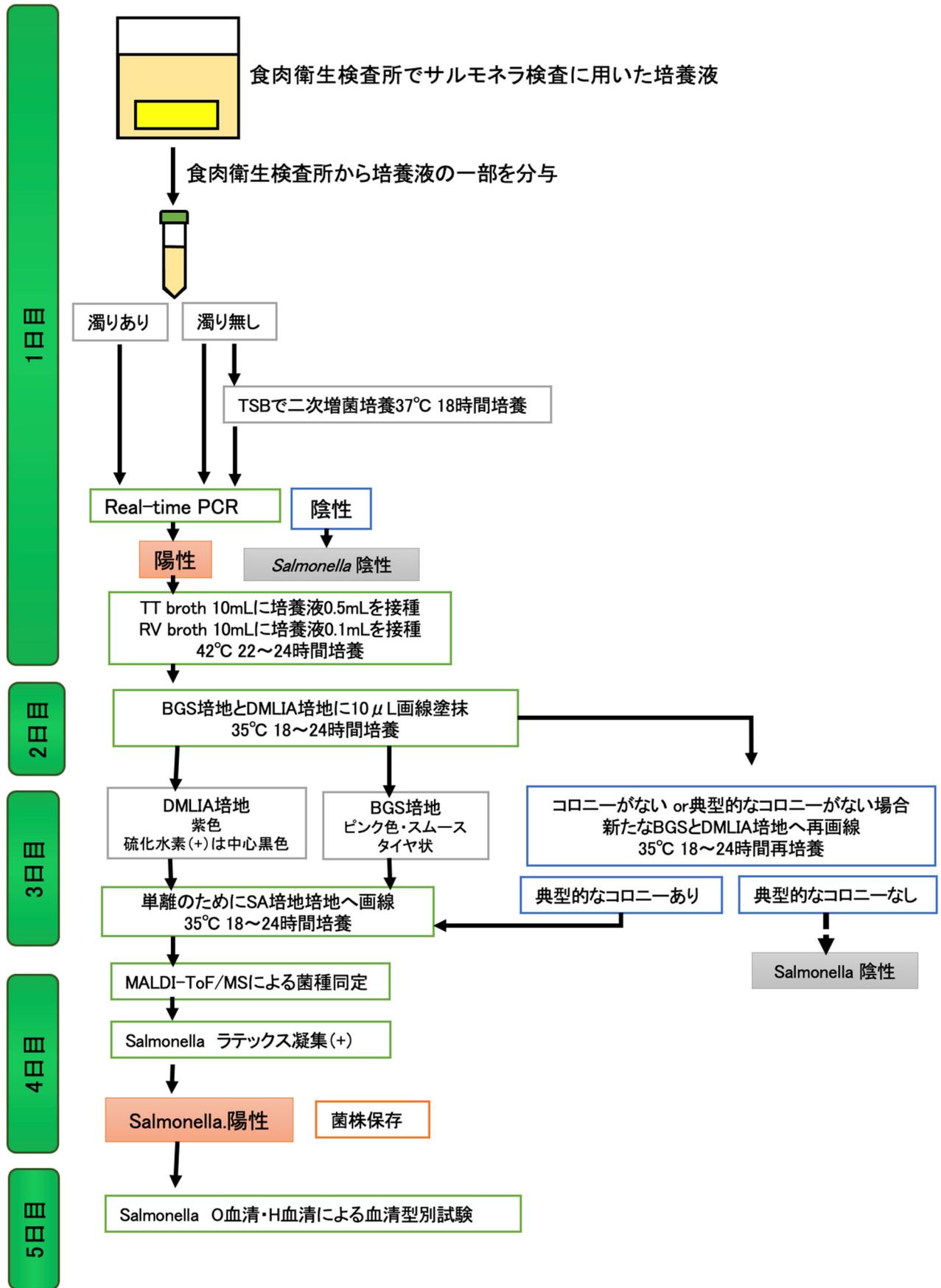


図2 サルモネラ属菌の検出・分離方法

表1-1. 供試した培養液残液のウシの情報

検査	種類	合計 個体数	齢の幅 (ヶ月)	齢 (ヶ月)	
					個体数
STEC*	黒毛和種	41	23-182	20未満	0
				20以上30未満	28
				30以上	13
	交雑種	57	23-29	20未満	0
				20以上30未満	57
				30以上	0
	牛情報なし	16	NT	20未満	NT
				20以上30未満	NT
				30以上	NT
サルモネラ属菌	褐毛和種	10	24-26	20未満	0
				20以上30未満	10
				30以上	0
	黒毛和種	61	25-83	20未満	0
				20以上30未満	52
				30以上	9
	交雑種	13	25-27	20未満	13
				20以上30未満	0
				30以上	0
	ホルスタイン	2	37, 95	20未満	0
				20以上30未満	0
				30以上	2

*: STEC検査の培養液は複数個体の検体が混合

表1-2. 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
Assay1	Stx	Stx-F	5' TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG 3'	USDA
		Stx-R	5'CCCCAGTTTCARWGTRAGRTCMACDTC 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'	
WbdI0111		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 GGG 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'GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT 3'			
16S_br_P	5' FAM- CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-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, 16S rRNA 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, O121 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 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. サルモネラ属菌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. 培養液の濁りと16S real-time PCRの結果

対象菌	全検体数	培養液残液		二次増菌培養	
		濁りの認められた検体数 /全検体数	16S陽性 (Ct値<35) 検体数 /全検体数	濁りの認められた検体数 /二次増菌培養 供試検体数	16S陽性 (Ct値<35) 検体数 /二次増菌培養 供試検体数
志賀毒素産生性大腸菌 (STEC)	40	36/40	23/40*	4/4	2/4**
サルモネラ属菌	86	18/86	17/86***	68/68	7/68****

*Ct値13.9~31.9、**Ct値33.8~34.8、***Ct値13.8~29.5、****Ct値14.1~15.9

表1-7. 16S rRNA リアルタイムPCR Assay2およびAssay6の検出性

菌種	16S	16S
	Assay2*	Assay6**
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	-
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	-	-
<i>Arcobacter skirrowii</i>	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	+
<i>Campylobacter coli</i>	-	+
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	+
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+
<i>Escherichia albertii</i>	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+
<i>Escherichia fergusonii</i>	+	+
<i>Escherichia hermannii</i>	-	+
<i>Hafnia alvei</i>	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+
<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>Morganii</i>	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	+	+
<i>Shigella boydii</i>	+	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	+	+
<i>Shigella flexneri</i>	+	+
<i>Shigella sonnei</i>	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	+
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	+
陰性対照 (MilliQ)	-	-

* USDA, Laboratory Guidebook, MLG 5C Appendix 4.01

** Nadkarni MA et al., 2002.

表1-8. 供試培養残液からSTEC分離結果

施設	供試 検体数	陽性 検体数
A	8	0
B	8	0
C	8	0
D	8	0
E	8	0
合計	40	0

表1-9. 供試培養残液からのサルモネラ属菌分離結果

施設	供試 検体数	陽性 検体数
A	32	0
B	54	0
合計	86	0

表2-1. 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	4
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	9
検体採取方法	
N60法	9

表2-2. 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
検体培養条件	
通知法 例1 MLG	1
通知法 例2 AOAC	5
通知法 例3	3
遺伝子検出使用機器	
Applied BioSystems Rapid Finder STEC (AOAC)	3
BAXクオリバックスQ7 (MLG)	6
遺伝子検出キット	
STEC Ditection Workflow (AOAC061602)	3
STEC Screening(AOAC091301)、E.coli O157:H7(AOAC031002)、 STEC Panel 1&2(AOAC022203)	6
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クオリバックスQ7)	
あり	5
なし	1

表2-3. 陽性対照DNA溶液の作成方法

項目	施設数
作製方法の根拠	
通知法	8
通知法から一部改変	1
増菌培地	
mTSB	7
TSB	1
羊血液寒天培地 (MLG)	1

表2-4. 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	8
BAXクオリバックス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°Cで10 分間加熱後、14,000 \times g の遠心処理した上清をキットへ	8
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2-5. 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	
「生研」デンカ	9
免疫磁気ビーズの洗浄回数	
1 回	7
2 回以上	1
3 回	1

表2-6. サルモネラ検査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	5
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	9
増菌培地	
mTSB 60 m（検体採取時にスポンジに染み込ませた10 mLを含む）	9
検体の培養条件	
42 \pm 1°Cで15~24時間	7
42 \pm 0.5°Cで22~24時間	2

表2-7. サルモネラ属菌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クオリバックスQ7 (AOAC)	7
3M Molerular 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	7
3 M病原菌検出アッセイ 2 サルモネラ属菌用	2
判定時のトラブル (BAXクオリバックスQ7)	
あり	5
なし	0
聞き取り未調査	2
判定時のトラブル (3M Molerular Detection System)	
あり	0
なし	2

表2-8. 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	9
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	3
マクファーランド0.5に希釈した培養液を1白金耳	1
培養液を1白金耳	1
培養液を 1 mL	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
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	2
普通寒天斜面で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 $10^5 \sim 10^6$ 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