

Ⅱ．分担研究報告

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
衛生微生物部

令和 7 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)
動物性食品輸出の規制対策の強化に資する研究
研究代表者 穂山 浩 (星薬科大学)

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

本研究では、対米輸出向け食肉の STEC 検査において報告された誤判定事例を踏まえ、市販の STEC 検査キットであるクオリバックス Q7 システムおよび RapidFinder について、誤判定がどのような条件で発生しうるのかを検証した。クオリバックス Q7 システムでは、開封後一定期間経過した試薬の一部で偽陽性、偽陰性および判定不能が認められた一方、開封直後の試薬ではこれらは認められなかったことから、試薬の保存条件が判定結果に影響する可能性が示唆された。RapidFinder では報告のあった偽陰性は再現されなかったが、高濃度の菌存在下の検体で *eae* の蛍光強度低下が認められ、これが偽陰性の一因となる可能性が考えられた。また、検体の希釈により蛍光強度低下が軽減されたことから、必要に応じた希釈操作が偽陰性の改善に有効であることが示唆された。以上より、適切な試薬管理および必要に応じた検体の希釈が検査精度の確保に重要であると考えられた。

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。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。新任の検査担当者も含めた一定の検査水準の維持および検査担当者の作業効率化が必要とされるため、各施設では、市販されている STEC 検査キットが使用されている。令和 5 年度から 6 年度に実施した各検査所への聞き取り調査において、検査キットを

供試した STEC スクリーニング検査における偽陽性判定および偽陰性判定が報告された。そこで、本研究では、対米輸出検査における逸脱防止対策として、検査の再実施による作業時間の浪費を防止し、検査の信頼性を確保するため、報告のあった検査キットについて誤判定がどのような条件で発生しうるのか検証した。

B. 研究方法

1. STEC スクリーニング検査で用いるクオリバックス Q7 システムの判定についての検証

(1) スクリーニング検査試薬

クオリバックス Q7 システムでのスクリーニング検査には、BAX® System Real-Time PCR Assay for STEC Screening、BAX® System Real-Time PCR Assay for *E. coli* 0157:H7、BAX® System Real-Time PCR Assay for STEC Panel 1 および BAX® System Real-Time PCR Assay for STEC Panel 2 を供試した。各検査試薬は、使用期限内の開封後 1 ヶ月から 6 ヶ月経過した製品を供試した。その結果、偽陽性、偽陰性および判定不能が認められた検査試薬については、BAX システムの機器本体のメンテナンスを実施した後に開封直後の製品を供試して再度試験を実施した。

(2) 偽陽性判定の検証

牛肉 50 g に変法トリプトソイブロス培地 (mTSB) 150 mL を添加し、ストマッカー処理を 1 分間実施し、42℃で 22 時間培養し、牛肉培養液とした。BAX System のプロトコルに従い、牛肉培養液および mTSB を各検査試薬 (各 8 well) で検査した。

(3) 偽陰性判定の検証

STEC 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 菌株を供試した。トリプトソイブロス培地 (TSB) に接種し、37℃で 18 時間培養した。

培養後の菌液を混合し、DNA を熱抽出し、7 血清型 STEC DNA とした。BAX System のプロトコルに従い、7 血清型 STEC DNA を各検査試薬 (5~40 well) で検査した。

2. STEC スクリーニング検査で用いる RapidFinder の判定についての検証

(1) スクリーニング検査試薬

RapidFinder でのスクリーニング検査には、RapidFinder™ STEC Screening

Assay を供試した。各検査試薬は、使用期限内の開封直後の製品を供試した。

(2) 偽陰性判定の検証

RapidFinder では偽陰性判定のみが報告されていたため、偽陰性判定について検証した。菌株は、STEC 0157 *stx1/2* 保有株および STEC 0157 *stx2* 保有株を供試した。供試菌株を TSB に接種し、37℃で 18 時間培養し、菌液とした。また、牛肉 25 g に mTSB 225 mL を加え、ストマッカー処理後に 42℃で 22 時間培養し、牛肉培養液とした。さらに、牛肉 25 g に 50 CFU の供試菌株を接種し、TSB 225 mL を加えてストマッカー処理後に 42℃で 22 時間培養し、菌接種牛肉培養液とした。菌液を TSB および牛肉培養液で 10^7 、 10^8 および 10^9 CFU/mL に希釈した。菌接種牛肉培養液は、TSB で 10 倍および 10^2 倍に希釈した。菌液の各希釈液および菌接種牛肉培養液の原液および希釈液から RapidFinder のプロトコルに従って DNA を抽出した。抽出した DNA を検査試薬 (各 2 well) で検査した。

C. 研究結果

1. STEC スクリーニング検査で用いるクオリバックス Q7 システムの判定についての検証

(1) 偽陽性判定の検証

開封後 1 ヶ月から 6 ヶ月経過した検査試薬では、以下の結果であった。STEC screening および *E. coli* 0157:H7 では、mTSB および牛肉培養液ともに偽陽性および判定不能は認められなかった (表 1)。panel 1 では、mTSB で偽陽性 (1 well/8

well)、牛肉培養液で偽陽性 (1 well/8 well) および判定不能 (1 well/8 well) が認められた。panel 2 では、偽陽性は認められなかったが、mTSB および牛肉培養液で判定不能 (1 well/8 well) が認められた。開封直後の panel 1 および panel 2 では、偽陽性および判定不能は認められなかった (表 2)。

(2) 偽陰性判定の検証

開封後 1 ヶ月から 6 ヶ月経過した検査試薬では、以下の結果であった。STEC screening では、偽陰性 (1 well/40 well) が認められた (表 3)。 *E. coli* 0157:H7、panel 1 および panel 2 では、mTSB および牛肉培養液ともに偽陰性および判定不能は認められなかった。開封直後の STEC screening では、偽陰性および判定不能は認められなかった (表 4)。

2. STEC スクリーニング検査で用いる RapidFinder の判定についての検証

RapidFinder™ STEC Screening Assay では、菌液および菌接種牛肉培養液の偽陰性判定は認められなかった (表 5 および 6)。しかし、 10^9 CFU/mL 菌液および菌接種牛肉培養液の原液では、一度立ち上がった *eae* の蛍光強度の cycle 数後半での低下が認められた (図 1-3)。*eae* の蛍光強度低下は、*stx2* 単独保有株よりも *stx1/2* 両保有株で強く、 10^7 および 10^8 CFU/mL 菌液ならびに菌接種牛肉培養液の 10 倍および 10^2 倍希釈液では非常に弱いかあるいは認められなかった (図 1-3)。また、*stx1/2* 両保有株の TSB での希釈菌液は、牛肉培養液での希釈菌液と比較して *eae* の蛍光強度低下がやや強い傾向であった (図 1-3)。

D. 考察

令和 5 年度から 6 年度における対米輸出向け食肉取扱施設および食肉検査所に対する聞き取り調査で、クオリボックス Q7 システムでは、偽陽性、偽陰性判定および判定不能、RapidFinder では、偽陰性判定の事例が報告された。そのため、本研究では、各キットの誤判定の再現および発生条件の検証を実施した。クオリボックス Q7 システムのキットでは、誤判定事例の聞き取り時に保管方法についても問い合わせがあったため、本検証では、開封後一定期間経過後のキットおよび開封直後のキットを用いて検討した。判定結果については、開封後一定期間が経過したキットの一部で偽陰性、偽陽性および判定不能が確認された。しかし、開封直後のキットでは、偽陰性、偽陽性および判定不能が認められなかったことから、開封後のキットの保存期間がこれらの判定結果に影響する可能性が推察された。吸湿性の高いキット試薬については、保管方法も含めた施設での運用方法の確認が必要と考えられた。

RapidFinder では、今回の検証では偽陰性判定は再現できなかったが、検体に高濃度の STEC が存在する場合に cycle 数後半での *eae* の蛍光強度低下が認められた。各施設からの偽陰性の報告では、全 cycle 終了までに *eae* の蛍光強度が閾値以下になっており、この蛍光強度低下が RapidFinder で偽陰性判定となる原因と推定された。 10^7 および 10^8 CFU/mL 菌液ならびに菌接種牛肉培養液の 10 倍希釈液では蛍光強度の低下が弱まったことから、検体の希釈は偽陰性判定の改善に有効であると考えられた。また、蛍光強度の低下は、*stx2* 単独保有

株よりも *stxI/2* 両保有株で強かったことから、*stx* の保有状況と *eae* の蛍光強度低下の関連が推察された。RapidFinder での STEC スクリーニング検査では、判定結果のみではなく波形も確認し、必要に応じて検体を希釈して検査を実施する必要があると考えられた。

E. 結論

STEC 検査で用いられるクオリバックス Q7 システムにおいて、キットの保存期間が判定時のトラブルに影響することが推察された。また、RapidFinder において、必要に応じて検体を希釈して検査を実施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

なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

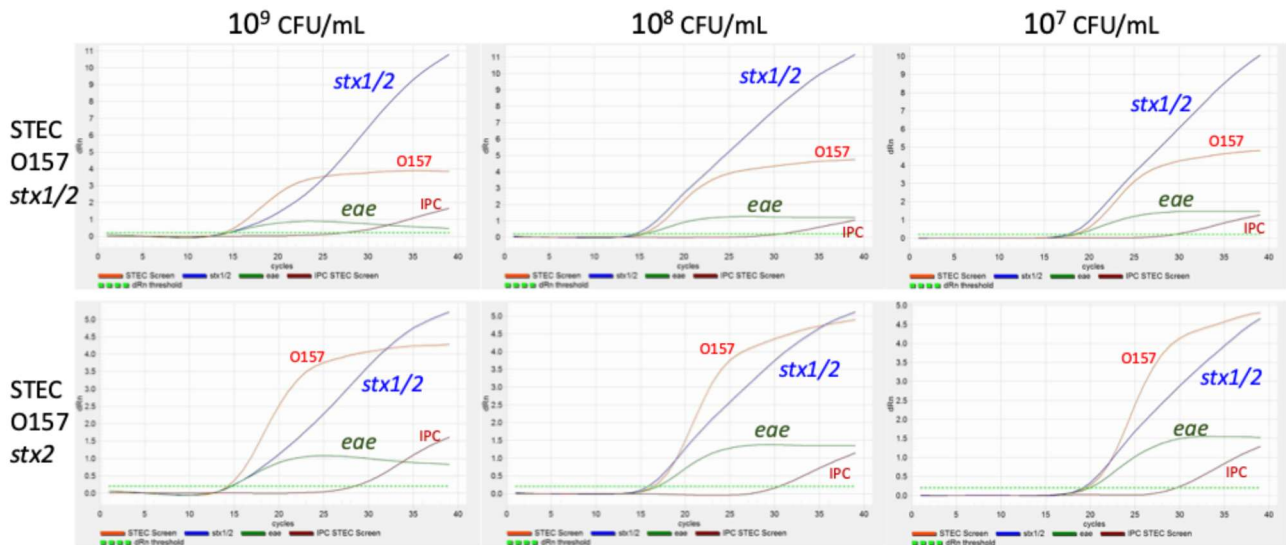


図 1 RapidFinder での TSB 希釈菌液の Amplification Plot

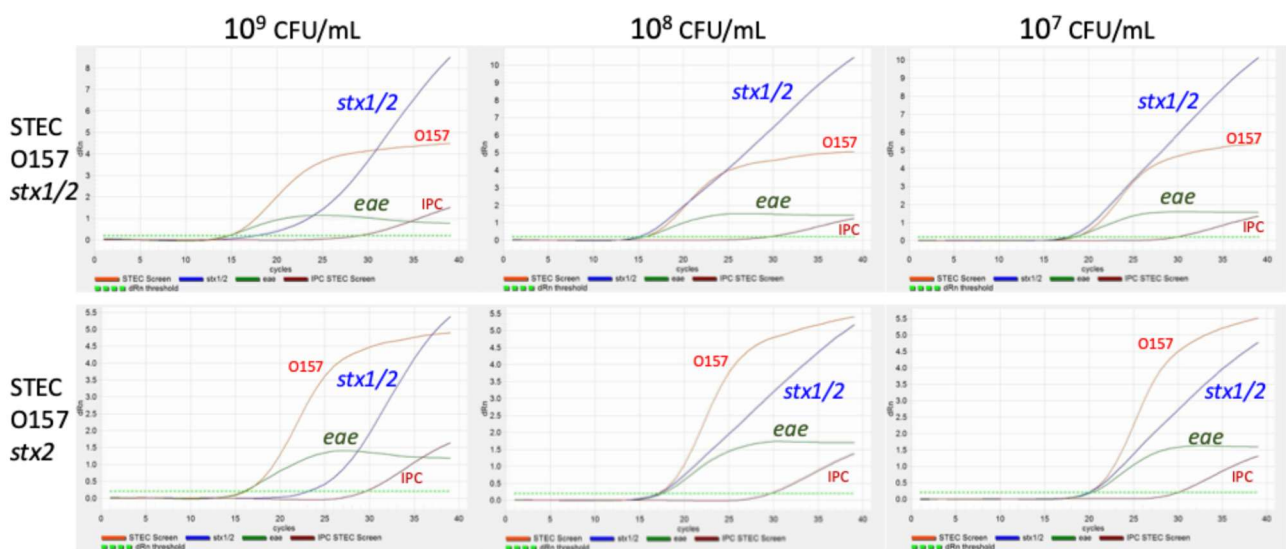


図 2 RapidFinder での牛肉培養液希釈菌液の Amplification Plot

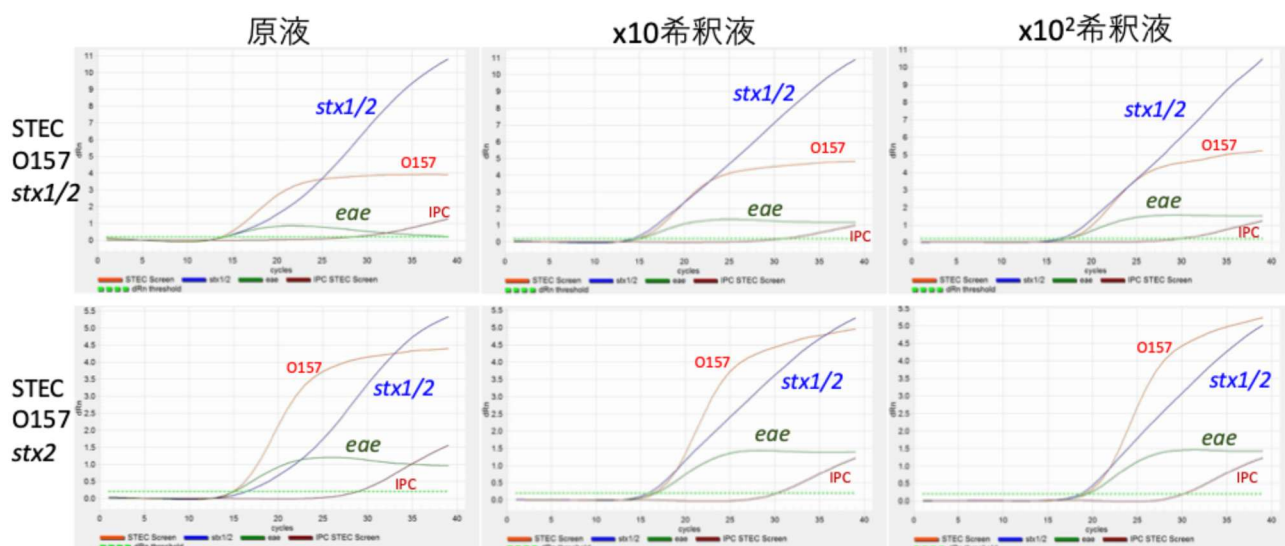


図3 RapidFinder での菌接種牛肉培養液の Amplification Plot

表1. 開封後一定期間経過したBAXキットでのmTSBおよび牛肉培養液の偽陽性および判定不能

キット	偽陽性 (判定well/供試well)		判定不能 (判定well/供試well)	
	mTSB	牛肉培養液	mTSB	牛肉培養液
STEC screening	0/8	0/8	0/8	0/8
<i>E. coli</i> O157:H7	0/8	0/8	0/8	0/8
panel1 (O26, O111, O121)	1/8	1/8	0/8	1/8
panel2 (O45, O103, O145)	0/8	0/8	1/8	1/8

表2. 開封直後のBAXキットでの培地および牛肉培養液の偽陽性および判定不能

キット	偽陽性 (判定well/供試well)		判定不能 (判定well/供試well)	
	mTSB	牛肉培養液	mTSB	牛肉培養液
panel1 (O26, O111, O121)	0/8	0/8	0/8	0/8
panel2 (O45, O103, O145)	0/8	0/8	0/8	0/8

表3. 開封後一定期間経過したBAXキットでの陽性対照DNA溶液の偽陰性および判定不能

キット	偽陰性 (判定well/供試well)	判定不能 (判定well/供試well)
STEC screening	1/40	0/40
<i>E. coli</i> O157:H7	0/6	0/6
panel1 (O26, O111, O121)	0/5	0/5
panel2 (O45, O103, O145)	0/9	0/9

表4. 開封直後のBAXキットでの陽性対照DNA溶液の偽陰性および判定不能

キット	偽陰性 (判定well/供試well)	判定不能 (判定well/供試well)
STEC screening	0/24	0/24

表5. RapidFinderでの菌液の偽陰性判定

供試菌株	TSB希釈			牛肉培養液希釈		
	10 ⁹ *	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷
STEC O157 <i>stx1/2</i>	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
STEC O157 <i>stx2</i>	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

*希釈後菌濃度 (CFU/mL)

表6. RapidFinderでの菌接種牛肉培養液の偽陰性判定

供試菌株	希釈倍率		
	x1 (原液)	x10	x10 ²
STEC O157 <i>stx1/2</i>	0/2	0/2	0/2
STEC O157 <i>stx2</i>	0/2	0/2	0/2