

食品からの腸管出血性大腸菌検出法の公定法改定について

1 はじめに

腸管出血性大腸菌は1977年にペロ細胞に毒性を示すペロ毒素^注（または志賀毒素）を産生する大腸菌として発見され、1982年に米国でハンバーガーによる食中毒を発端に全世界に感染が拡大した。我が国では1995年までは、浦和市の幼稚園で集団事例が発生した1990年を除き、毎年患者数100名前後に留まる稀な菌でしかなかった。ところが、1996年に堺市を中心として患者数9,451名の全国規模の大流行（アウトブレイク）が発生した。それに伴い、翌1997年には当時の厚生省から平成9年7月4日付け衛食第207号及び衛乳第199号「腸管出血性大腸菌O157の検査法について」により食品からの検査法が通知された。我が国で検出される腸管出血性大腸菌の血清型は1996年まではO157が90%近くを占めていたものの、翌97年にはO157は70%台にまで減少し、その後も上下を繰り返しながら徐々に減少し、2004年以降は60%台にまで減少した。対照的にO157以外の血清型、なかでもO26の検出される割合は96年までは数%台でしかなかったが、97年に入って18%にまで上昇し、以降はやはり上下しながら徐々に増加し、現在では20%を超えている。このため厚生労働省はO157以外の血清型の腸管出血性大腸菌についても食品からの検査法に加える必要があると判断し、国立医薬品食品衛生研究所（国立医食研）に公定法の変更を依頼していた。国立医食研はこの改定の作業のために研究班を結成し、その研究班に当所も参加していた（他機関として東京都健康安全研究センター、埼玉県衛生研究所、及び（財）日本食品分析セン

ターが参加）。平成18年11月2日に「腸管出血性大腸菌O157及びO26の検査法について」（食安監第1102004号）が厚生労働省食品安全部監視安全課長から通知されたことに伴い平成9年の通知法は廃止されることになった。今回は新通知法の解説とともに、改定作業に協力した立場から検査法改定の経緯についても紹介する。

2 新通知法

新通知法に示された検査法の内容を図1に検査フローチャートとして示した。前通知法と大きく異なる点は、

- 1) O157以外にO26も検査対象菌として加えられたこと
- 2) 遺伝子検出法がスクリーニング法として加えられたこと

の2点にある。これらの点につき以下に順に説明を加える。

3 培養法

我が国で検出される腸管出血性大腸菌の血清型はO157、O26及びO111の順に多く、その他の血清型の比率は合計しても数%にすぎない。当初、研究班ではO26とともにO111（我が国での検出率5%前後）もまた検出対象に加える予定であった。しかしO111については未だ適当な検出用培地が分離、増菌用とも開発されていないうえに、培養温度をはじめとする適当な培養条件を研究班において確定するに至らなかったため、今回の改正ではその他の血清型とともに見送られた。現在、O157及びO26の2血清型で検出される腸管出血

性大腸菌の90%以上を占めるため、当面この2血清型のみを検出対象とする検査法を作成することとなった。O157の検査法については、既にほぼ確立されているため、前通知法と大きな変更点はない。

O26の増菌培養は、O157のノボピオシン加mEC培地を用いた方法で可能と判断されたため、両血清型に共通の増菌培養法を採用した。ただし、凍結等により菌損傷が考えられる場合には、両血清型ともノボピオシン無添加mECでの36±1℃培養等、選択性が弱い増菌培養法が推奨される。分離培地には、良好な検出率が確認されたCT-RMAC培地（当所が開発したO26のラムノース非分解性を利用する分離培地）が、第一義の分離培地として採用された。またCT-RMAC培地のほかに、O26の検出率はCT-サプリメントを添加すると上昇するため、CT-サプリメントを添加した通知法に記載のある分離培地（例：CT-Vi RX O26培地）を1種類以上併用することとなった。なお、O157の分離培地はCT-SMAC培地を第一義とし、その他酵素基質培地を1種類以上併用することになっている。また、免疫磁気ビーズ法は両血清型ともに有効であることが確認されたので、直接培養法とともにその実施が義務づけられた。

4 確認試験

血清型別試験は、各分離培地からO157及びO26と疑われるコロニーを普通寒天培地等に純培養し、市販の免疫血清または抗体を感作したラテックスを用いて行うが、その際生菌を用いるとしばしば誤判定があるため、最終判定には加熱死菌を用いる。また、生化学的性状試験のために、O157及びO26と疑われるコロニーを、TSI培地、LIM培地、CLIG培地、各種キット等に接種し、生化学的性状を確認する。さらに、ベロ毒素(VT)遺伝子またはVT産生性を1) PCR法（ベロ毒素遺伝子 PCR Screening Set(タカラバイオ)ほか）、2) 逆受身ラテックス凝集反応(RPLA)法(VTEC-RPLA「生研」(デンカ生研)ほか)、3) イムノクロマトグラフィー法(ラインジャッジ(ベリタス)ほか)等によって確認することになっている。

5 遺伝子検出法

新たにO26が検査対象に加えられたことのほか、新通知法ではスクリーニング法として遺伝子検出法が取り入れられたことが今回の改定のもう1つの大きな変更点である。新通知法にはベロ毒素(VT)遺伝子を検査対象とした遺伝子検出法が採用され、少なくとも10⁴/mlの検出感度を確保できることを基準とし、妥当と認められた方法が記載されている。例として1) PCR法（市販品または公表されているオリゴヌクレオチドプライマーを各試験検査機関で合成・調製し市販の遺伝子増幅酵素を使用する。ただし、PCR産物の電気泳動においては1,000bp以下の核酸分離に対応した低分子用アガロースゲルを使用する）、2) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法（市販品）、3) リアルタイムPCR法（市販品または公表されている塩基配列のオリゴヌクレオチドプライマー primerを各試験検査機関で合成・調製し市販の遺伝子増幅酵素を使用）、が挙げられている。図1の検査フローにも示すとおり、遺伝子検出法で陰性になった場合はその時点で検査終了となるが、陽性になった場合は直ちに培養検査に移らなければならない。

PCR法に必要な機器は愛知県の保健所検査室にも既に配備されているが、増菌培養液からのDNA抽出は菌株とは異なり、従来の熱抽出法では感度が不十分であり、新通知法記載の抽出法を使用しなければならない。また、約1時間の反応で結果判定が可能なLAMP法及びリアルタイムPCR法と異なり、通常のPCR法は判定までに約半日を要するため、スクリーニング法として採用する可能性については検体搬入時間等を考慮し慎重を期する必要がある。

また、今回の通知法では食肉（内臓を含む）、食肉製品及びチーズの検査については、分離培養法のみで遺伝子検出法は適用しないこととなった。その理由として食肉、食肉製品、特に牛肉を含む食肉ではO157及びO26以外の血清型の腸管出血性大腸菌による汚染が多く、遺伝子検出法では陽性であるが、培養法により最終的に陰性となる可能性が多いと考えられるためである。またチーズについては、今回の研究班の検討では再現性の高い効率的なDNA抽出法及び遺伝子検出法が見いだせなかった。

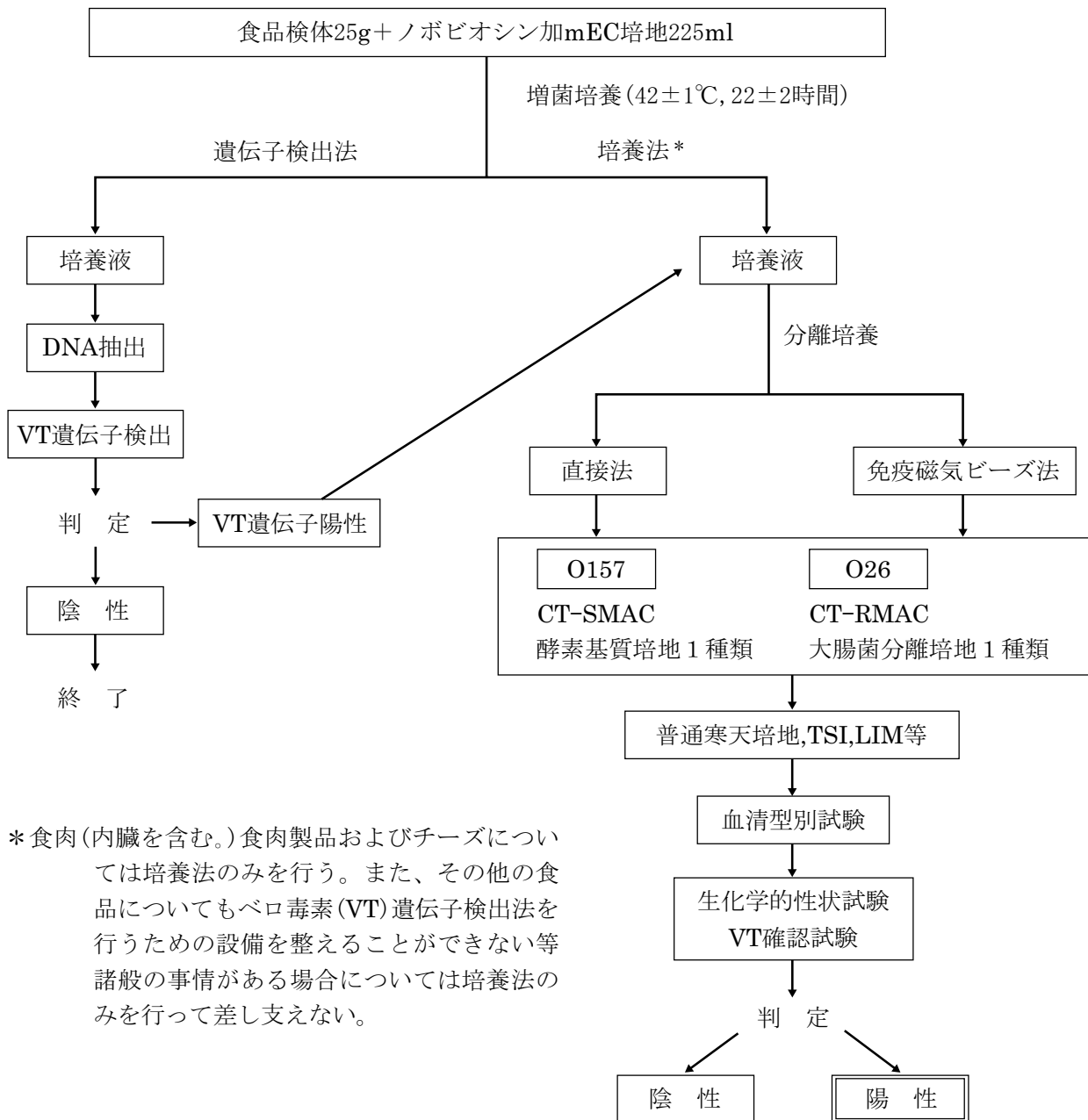


図1 食品からの腸管出血性大腸菌O157およびO26の検査法

6 判定

陽性判定は「腸管出血性大腸菌 O157 または O26 が分離された」ことによる。すなわち分離株は血清型が O157 または O26、性状が大腸菌、かつベロ毒素陽性菌の全てを満たす必要がある(図2)。一方陰性判定の条件は、遺伝子検出法陰性、あるいは遺伝子検出法陽性であったがベロ毒素陽性の O157 または O26 が分離されない、または培養法でベロ毒素陽性の O157 または O26 が分離されない、ことである(図2)。

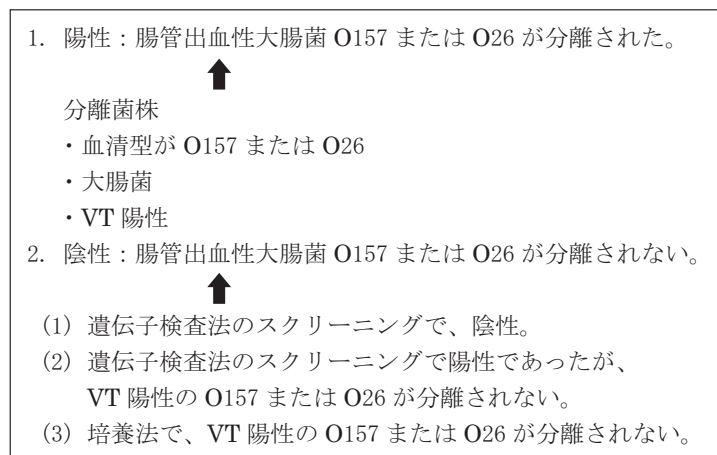


図2 本検査法の結果判定の条件

表1 コラボレイティブ・スタディ参加機関

機 関 名	
1. 北海道衛生研究所	12. 広島県保健環境センター
2. 宮城県保健環境センター	13. 鳥取県衛生環境研究所
3. 富山県衛生研究所	14. 福岡県保健環境研究所
4. 千葉県衛生研究所	15. 長崎県衛生公害研究所
5. 東京都健康安全研究センター	16. 熊本県保健環境科学研究所
6. 埼玉県衛生研究所	17. 横浜検疫所輸入食品・検疫検査センター
7. 神奈川県衛生研究所	18. 神戸検疫所輸入食品・検疫検査センター
8. 静岡県環境衛生科学研究所	19. 財団法人日本食品分析センター
9. 愛知県衛生研究所	20. 財団法人東京顕微鏡院
10. 大阪府立公衆衛生研究所	21. (財)中部衛生検査センター
11. 神戸市環境保健研究所	22. 国立医薬品食品衛生研究所

7 コラボレイティブスタディ

公定検査法の検証については、国際的にコラボレイティブスタディ評価が求められており、本検査法についても地方衛生研究所、厚生労働省検疫所、及び登録検査機関の計22カ所の参加協力の下に行われた(表1)。具体的には国立医食研を中心として当所も参加した研究班が、牛挽肉及びアルファルファに腸管出血性大腸菌 O157 または O26 を接種した検体を作製し、非接種検体とともに参加協力機関に配布して行った。各協力機関において配布検体及び陽性対照用牛挽肉について遺伝子検査法の1つである LAMP 法、培養法の直接法及び免疫磁気ビーズ法を実施した。その結果、O157 は LAMP 法、直接法、及び免疫磁気ビーズ法のいずれの方法においても全検体で正しく検出され、感度及び特異性が非常に高い結果であった。

一方、O26 は、いずれの方法も高い特異性を示したが、感度は牛挽肉において直接法では0.5以下、免疫磁気ビーズ法では約0.8、LAMP 法では1.0と方法間で大きな差が見られた。アルファルファにおいては直接法のうち CT-RMAC 培地を用いた方法のみが免疫磁気ビーズ法及び LAMP 法と同等の感度0.9を示し、分離培地のなかでは CT-RMAC 培地の有用性が確認された。

以上の結果から、遺伝子検出法は従来の免疫磁気ビーズ法も含む培養法に比較して感度、特異性とも劣らず、さらに CT-RMAC 培地を必須とすることが妥当であることが明らかとなった。

8 おわりに

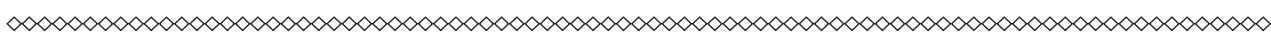
今回の改定では前通知法の O157 のみの培養法に O26 検出法が追加され、さらにスクリーニング法として遺伝子検出法が加えられたため、検査方法及び検査条件が複雑となった。そのため、通知法の最後に添付されている検査フローチャートのみではなく本文を熟読のうえ、通知法に従って検査を実施するよういっそうの注意が必要である。

注) 研究分野では志賀毒素 Shiga toxin (Stx) の呼称が一般的であるが、行政分野ではベロ毒素 Vero toxin (VT) の呼称が使用される場合が多く、今回の通知法においても使用されているため、本稿ではすべてベロ毒素の呼称に統一した。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知(食安監発第1102004号): 腸管出血性大腸菌 O157 及び O26 の検査法について。(2006)
- 2) 工藤由起子、高鳥浩介: 食品における腸管出血性大腸菌 O157 および O26 の検査法. 食品衛生研究 57:21-27 (2007)
- 3) 平松ほか: 第27回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集:30 (2006)

(文責:微生物部食品微生物科 平松礼司、皆川洋子)



愛知衛研技術情報 第 31 巻第 1 号 平成 19 (2007) 年 4 月 2 日
照会・連絡先 愛知県衛生研究所
〒 462-8576 名古屋市北区辻町字流 7 番 6 号
愛知県衛生研究所のホームページ【<http://www.pref.aichi.jp/eiseiken>】

所 長 室 : 052-910-5604	毒性部・毒性病理科 : 052-910-5654
次 長 : 052-910-5683	毒性部・毒性化学科 : 052-910-5664
研 究 監 : 052-910-5684	化学部・生活化学科 : 052-910-5638
総 務 課 : 052-910-5618	化学部・環境化学科 : 052-910-5639
企 画 情 報 部 : 052-910-5619	化学部・薬品化学科 : 052-910-5629
微生物部・細菌 : 052-910-5669	生活科学部・水質科 : 052-910-5643
微生物部・ウイルス : 052-910-5674	生活科学部・環境物理科 : 052-910-5644

FAX : 052-913-3641