

## 資 料

Food Pathogen Enrichment 培地を用いたと畜場での  
*stx* 遺伝子の迅速検査法と牛胆汁中の大腸菌病原遺伝子の検索

亀山芳彦, 野田万希子, 酢谷奈津, 水野卓也

## 要 旨

食品培養用の Food Pathogen Enrichment 培地を用いて、と畜場の衛生管理を目的とした *stx* 遺伝子の迅速検査法を検討した。牛枝肉と胆汁を検体とした検討では、 $10^0$  CFU/mL オーダーの菌量であっても、5 時間の培養によりリアルタイム PCR で検出可能な菌量 ( $10^3$  CFU/mL) まで増菌が可能であった。検査当日中に結果を判定できるため、HACCP の導入が困難または導入を検討中の施設において、通常業務の中で多数の検体の検査が可能になると考えられた。

また牛胆汁からは、個体により高い菌量で細菌が分離されることが知られており、肝臓等の汚染源として重要視されている。多くの報告がなされているカンピロバクターのほか、保菌率は低いものの大腸菌が高い菌量で分離された報告がある。これら的大腸菌が *stx* 遺伝子をはじめとした病原遺伝子を保有する可能性が考えられたため、詳細な検討を行った。

キーワード : Food Pathogen Enrichment 培地, *stx* 遺伝子, 牛枝肉, 胆汁

## 1 はじめに

腸内容物や糞便に由来する志賀毒素 (*stx*) 産生大腸菌 (Siga toxin-producing *Escherichia coli* ;以下 STEC) による汚染は、と畜場での牛の処理工程における最も重要な危害の一つであり、適切な衛生管理が求められている。STEC は枝肉に残存した場合のリスクは高いが、枝肉からの検出率は低いとされる<sup>1)</sup>。このため枝肉からの直接的な菌分離は非効率であり、*stx* 遺伝子検出を指標としたスクリーニング法が併用されることが多い<sup>2)</sup>。しかし従来の検査法では翌日以降の結果判定となるため、係留時間の短い市場非併設型等中小規模のと畜場では、枝肉の出庫時間に判定が間に合わないことが想定される。このため通常の工程とは別に、対象とする枝肉の保留措置等が必要となり、多くの検体を調査することは実務上困難とされる。

また、牛の胆汁内から大腸菌やカンピロバクターが高い菌量で検出される事例が報告<sup>3,4)</sup>されており、肝臓の重要な汚染源として指摘されている。胆汁内のカンピロバクターについては詳細な調査が行われている<sup>4,6)</sup>が、STEC の検討をした報告<sup>2,3)</sup>は少ない。肝臓は処理後短時間で消費されるため、細菌の検索には特に迅速性が求められる。

本研究では、Food Pathogen Enrichment (以下 FPE) 培地 (エーエムアール) による増菌培養とリアルタイム

PCR による遺伝子検出を組み合わせることにより、当日中に判定が可能となる検査法を検討した。FPE 培地は夾雑菌が比較的少ない食品検査用に開発された非選択性増菌培地で、大腸菌など増殖の速い細菌では 5 時間程度の培養で遺伝子検出が可能な菌量 ( $10^3$  CFU/mL) まで到達するとされている<sup>6)</sup>。本検査法による、と畜場での *stx* 遺伝子迅速検査について枝肉と胆汁を対象にその有用性を検討した。

あわせて胆汁から分離された大腸菌は、別途 PCR による検索を実施し、*stx* 遺伝子以外の病原遺伝子について保有の有無を調査した。

## 2 材料と方法

## 2.1 牛枝肉の拭取り

平成 27 年度～28 年度に県内 2 カ所のと畜場において、と畜検査に合格した肉用牛 (黒毛和種および交雑種) の枝肉から計 300 検体を採取した。綿棒付の拭取り用器材を用い、塩素噴霧を含めた最終洗浄直後 (A と畜場, A 検体 ; 100 検体) および係留庫に収納後 (B と畜場, B 検体 ; 200 検体) に胸部片側を約 100 cm<sup>2</sup> を拭取り、10 mL の phosphate-buffered saline (以下 PBS) に浮遊させたものを試料とした。

## 2.2 牛胆汁

平成 29 年 7 月～11 月に、と畜検査で枝肉および内

臓(肝臓を含む)に異常の認められなかった肉用牛77頭の胆汁を無菌的に約10 mL採取し試料とした。

### 2.3 増菌培養

各試料1 mLをFPE培地9 mLに添加し、36°C、5時間好気条件下で静置培養した。

### 2.4 *stx* 遺伝子の検出

*stx* 遺伝子の検出にはLight Cycler II (ロシュ)を用いた。培養液1 mLを10,000×g、10分間遠心後、沈渣を50 mM NaOH 85 μLで再浮遊し、100°C、10分間加熱した。冷却後、1 M Tris-HCl (pH7.0) 15 μLで中和した。10,000×g、10分間遠心後、上清を別容器に採りテンプレートとした(アルカリ熱抽出法)。プライマーはKarchら<sup>7)</sup>のMKプライマー、蛍光色素入りの増幅酵素としてFastStart DNA Master PLUS SYBR Green I (ロシュ)を用いた。表1に示した設定<sup>8)</sup>により実施し、融解度曲線(Tm値)の解析(*stx*1; 82±1°C, *stx*2; 84±1°C)により判定を行った。

表1 リアルタイムPCRプロトコル (*stx*1&2)

	°C	Time	Rate
Denature	95	10m	20
PCR	95	15s	20
(45 cycle)	55	10s	20
	72	15s	20
Melting	65-95		0.1

### 2.5 STECの同定

*stx* 遺伝子陽性と判定された検体は、クロモアガーSTEC培地(関東化学)およびDHL寒天培地(栄研化学)に塗抹した。発育したコロニー5~10個を混合したテンプレートを3~10本作製し、リアルタイムPCRで*stx* 遺伝子の有無を確認した。混合テンプレートが陽性と判定された場合、含まれる全てのコロニーから個別にテンプレートを作製し直し、陽性株を特定した。分離された菌株の同定は生化学性状(CLIG, TSI, リジン脱炭酸試験用, SIM各培地)によった。

血清型別は病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)及びO血清群遺伝子型(O genotype, 以下Og)をPCRにより検出する手法である*E. coli* O-genotyping PCR (ECOG-PCR, 宮崎大学)により実施した。*stx* 遺伝子のバリエーションの同定は、国立感染症研究所のマニュアル<sup>9)</sup>に従った。

### 2.6 胆汁中の菌検索

発育に関わる条件が異なる胆汁を選択するため、大腸菌と同様に高い菌量で分離されるカンピロバクターの有無を確認した。胆汁を等量のPBSと混合し、0.1 mLをmCCDA培地(関東化学)に塗抹、36°C48時間微好

気培養した。

同様にクロモアガーオリエンタシオン培地(関東化学)に塗抹、36°C、24時間好気培養し、定型的な大腸菌及び他の腸内細菌の発育を確認した。独立したコロニーが確認できない等、菌量が多すぎる場合には検体を10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup>に希釈し、再度塗抹した。大腸菌を疑うコロニーは1検体あたり3~5株について生化学性状および血清型別試験を行った。

またSTEC以外の病原遺伝子についても検討するため、大腸菌の代表的な病原因子(*eae*<sup>10)</sup>, *bfpA*<sup>10)</sup>, *aggR*<sup>10)</sup>, *astA*<sup>10)</sup>, *invE*, *ipaH*, *st*及び*lt*)の有無をPCRにより判定した(*invE*, *ipaH*, *st*及び*lt*はTaKaRa製プライマーを使用)。

### 2.7 FPE培地の増菌能確認試験

生物由来の検体では、試験の各段階において反応抑制物質が混在することがあるため、FPE培地による増菌能試験を実施した。*stx* 遺伝子陰性を確認済みの牛枝肉拭取液(A, B各検体10頭分ずつ)を混合したものを試料(プール試料)とし、それぞれ4検体(A1~A4, B1~B4)を供試した。これに最終濃度が10<sup>0</sup> CFU/mLオーダーになるよう調製した陽性コントロール菌液(O157;*stx*1a+*stx*2b, O174;*stx*2b, O174;*stx*2c)を1 mL添加し、FPE培地で36°C、5時間好気培養した。リアルタイムPCRにより*stx* 遺伝子の検出を試みると同時に、Light Cycler IIのマニュアルに従いFit point法による定量を行った。

胆汁は*stx* 遺伝子陰性を確認した検体に、最終濃度が10<sup>0</sup> CFU/mLオーダーになるよう調整した陽性コントロール菌液を添加し試験を行った。あらかじめ実施した菌検索により大腸菌(*stx* 陰性確認済)陽性(7検体)、カンピロバクター陽性(15検体)、大腸菌・カンピロバクター陰性(7検体)の3群に分類し供試した(表2)。大腸菌とカンピロバクターが同時に分離された検体はなかったため、実施しなかった。

表2 菌検索結果による検体の分類と供試数

	陽性コントロール菌株*		
	O157; <i>stx</i> 1a+ <i>stx</i> 2a	O174; <i>stx</i> 2b	O174; <i>stx</i> 2c
大腸菌陽性	4	1	2
カンピロバクター陽性	3	6	6
大腸菌・カンピロバクター陰性	2	2	3

\*培養開始時は1.4~6.2 × 10<sup>0</sup> CFU/mL

## 3 結果

### 3.1 牛枝肉拭取液からのSTEC検出

A検体100検体中2検体が*stx* 遺伝子陽性と判定された。ただし1検体では生菌が分離されず、増菌液の継代後に遺伝子の検出は確認できなかったため、死菌と

判定した。他の1検体はOUT (Og130) : H11 *stx2a* と判定した。B 検体では200 検体中1 検体で *stx* 遺伝子陽性となり、OUT (Og22) : HUT *stx2b+stx2d* と判定した。

### 3.2 胆汁の菌検索

供試した胆汁 77 検体中 9 検体から大腸菌が分離されたが、*stx* 遺伝子は全て陰性であった。他の病原因子は、ST 遺伝子が1 検体、*astA* 遺伝子が2 検体から検出された。血清型はECOG-PCR によっても不明(OgUT) が4 検体含まれた。高い菌量で検出された大腸菌は全て運動性を示したが、H 型については不明のもの(HUT) が8 検体となった(表3)。

表3 胆嚢内胆汁から分離された大腸菌

検体No.	O血清型	菌数(CFU/mL)	H血清型	病原因子*
2	E.coli OUT(Og32)	2.0 × 10 <sup>2</sup>	H-	-
	E.coli OUT(Og23)		HUT	-
3	E.coli OUT(OgUT)	>6.0 × 10 <sup>6</sup>	HUT	-
7	E.coli OUT(OgUT)	>6.0 × 10 <sup>6</sup>	HUT	<i>astA</i>
10	E.coli OUT(Og116)	>6.0 × 10 <sup>6</sup>	HUT	ST
11	E.coli OUT(Ogpp2)	>6.0 × 10 <sup>6</sup>	HUT	-
12	E.coli OUT(Og174)	>6.0 × 10 <sup>6</sup>	HUT	-
21	E.coli OUT(OgUT)	>6.0 × 10 <sup>6</sup>	H7	-
43	E.coli OUT(OgUT)	>6.0 × 10 <sup>6</sup>	HUT	-
54	E.coli O15(Og15)	>6.0 × 10 <sup>6</sup>	HUT	<i>astA</i>

\**stx* は全て陰性

### 3.3 FPE 培地の増菌能

拭取液のプール試料ではA, B 共に、陽性コントロールとして用いた3株全てで10<sup>0</sup> CFU/mL オーダーから、5 時間の培養で4.0 × 10<sup>3</sup> CFU/mL 以上に増菌されており、リアルタイム PCR での遺伝子検出が可能な菌量を確保された(表4)。

表4 プール試料培養後の Fit point 法による定量

	陽性コントロール菌株*			
	O157: <i>stx1a+stx2a</i>	O174: <i>stx2b</i>	O174: <i>stx2c</i>	
プ ー ル 試 料 No	A1	8760(CFU/mL)	7820	8120
	A2	6230	5340	8111
	A3	4831	5673	6784
	A4	5234	4894	7321
B	B1	4789	5891	6243
	B2	6781	5732	6124
	B3	8212	7564	4897
	B4	7765	5843	6243
	最大値	8212	7820	8120
	最小値	4789	4894	4897
	平均値	6263	6095	6730

\*培養開始時は2.4~4.8 × 10<sup>0</sup> CFU/mL

胆嚢内胆汁では、カンピロバクターまたは大腸菌の存在の有無に関わらず、全ての検体で培養後に陽性コントロール菌株の *stx* 遺伝子が検出可能であった。

## 4 考 察

と畜場の衛生管理は、HACCP 方式の導入が推進さ

れており、直接的な細菌検査の機会には減少傾向にある。しかしながら中小と畜場では、半数以上が HACCP 未導入であり、従来型の衛生管理方式によっている。このような施設では日常的な細菌検査を省略できないほか、HACCP 方式の導入を目指す施設においても、危害分析や検証の作業において、汚染実態を把握する作業が今後も必要とされる。

従来の STEC (EHEC) 汚染実態調査では O157 等病原性が高い血清型を中心に検出していたが、工程の衛生管理を目的とする場合には、他の血清型の STEC も広く監視し、工程中の汚染機会を正確に把握する必要がある。検討した検査法では、*stx* 遺伝子の検出により、血清型に関わらず STEC の有無を判定することができた。このため検査当日中に遺伝子レベルの結果を把握し、翌朝にはトリミング等必要な処置を行うことが可能となる。対象枝肉の分別、保留等特別な処置をあらかじめ行わなくても、出庫前に陽性個体のみを確保すれば良く、日常業務の範囲内で検体数を増加させることが容易となる。

本法によれば、極少量の STEC でも検出可能なため、枝肉の部位別の汚染状況調査や、工程別の汚染の有無、作業員の器具や手指の消毒状況の確認にも応用可能となる。この検査法の迅速性を生かし、翌日の作業前ミーティングで注意喚起すれば、HACCP で求められる従事者教育にも活用が期待できる。また、遺伝子レベルでの検出のほか、検査機関の目的に応じ菌分離、血清型の同定、*stx* 遺伝子のバリエーションの確認等各段階について検査手法を組み合わせることにより、汚染経路の推定等、より高度な解析も期待される。

なお、枝肉からは様々な *stx* のバリエーションが検出されるが、今回用いたプライマーでは牛からほとんど分離例のない *stx2f* 以外は検出が可能であった。一部のバリエーション (*stx2e, stx2g*) については Tm 値にずれが生じるが、いずれも牛からの分離は稀で、判定に影響はないと判断した。

また肝臓は速やかに流通、消費されるため本試験法の特徴である迅速性が特に有効と思われた。胆汁のほか、肝臓表面の拭取り等、検査の範囲を広げることにより、肝臓を汚染する要因の究明も可能となる。さらに簡便性やコスト面でのメリットも含め、農家ごとの解析や、季節変動など多数回のモニタリングに汎用性は高いと考えられる。今回の調査ではカンピロバクターのほか、同一の血清型の大腸菌が高い菌数で分離された個体が複数あり、これらは全て運動性を保持していた。これは十二指腸から上行性に移行した大腸菌が、胆汁内で増殖した可能性を示唆している。*stx* 遺伝子は非検出であったが、それ以外の病原遺伝子が検出

された事例が3例あった。胆汁は適切に処理されなければ、と体や肝臓のみならず、と畜環境自体を汚染する可能性があり、今度も大腸菌の公衆衛生上のリスクについて検討する必要があると考えられた。

### 文 献

- 1) 食品安全委員会：食品健康影響評価のためのリスクプロファイル～牛肉を主とする食肉中の腸管出血性大腸菌～（改訂版），2016.
- 2) 松本紀子，谷脇 妙，絹田美苗，千屋誠造：牛の胆汁及び肝臓中から分離されたカンピロバクター並びに志賀毒素産生大腸菌の血清型について，高知衛研報，53，37-40，2007.
- 3) 2012年3月30日開催薬事食品衛生審議会食品衛生分科会乳肉水産食品部会参考資料，8-1.
- 4) Kazuaki O, Katsuhiko Y: Cotamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan, *International Journal of Food Microbiology*, 47, 211-219, 1999.
- 5) Saito S, Yatsuyanagi J, Harata S, Ito Y, Suzuki N, Amano K, et al: *Campylobacter jejuni* isolated from retail poultry meat, bovine feces and bile, and human diarrheal samples in Japan: comparison of serotypes and genotypes, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 45, 311-319, 2005.
- 6) Masahiro H, Tatsuya N, Sayoko K-H, Machiko M, Kiyofumi O, Keiko K, et al; A new protocol to detect multiple Foodborne pathogens with PCR dipstick DNA chromatography after a six-Hour enrichment culture in a broad-range Food Pathogen Enrichment Broth, *BioMed Research International*, Volume 2013, Article ID 295050.
- 7) Karch H, Meyer T: Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol*, 27, 2751-2757, 1989.
- 8) Jothikumar N, Griffiths MW: Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 with multiplex real-time PCR assays, *Apply Environ Microbiol*, 68, 3169-3171, 2002.
- 9) 国立感染症研究所：病原微生物検出マニュアル「腸管出血性大腸菌（EHEC）検査・診断マニュアル（平成24年6月改訂）」
- 10) 小林一寛，勢戸和子，八柳潤，斎藤志保子，寺尾通徳，金子通治他：下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査法の一考察，*感染症*，76，911-920，2002.

Evaluation of rapid detection of *stx*-gene using Food Pathogen Enrichment broth at slaughterhouses and search of virulence genes of *Escherichia coli* isolated from bovine bile

Yoshihiko KAMEYAMA, Makiko NODA, Natsu SUDANI, Takuya MIUZUNO

Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:  
1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu, 504-0838, Japan