BAX™ スクリーニングシステムおよびその増菌 培養法の改良による食肉の腸管出血性 大腸菌 O157:H7 検査法の 高感度化・迅速化の検討

中島和英^{*1}・三浦和行^{*1}・清水義治^{*2}・福山正文^{*3}

(^{*1}(株)東京食肉安全検査センター, ^{*2}東海大学医療技術短期大学, ^{*3}麻布大学)

(受付 平成 11 年 2 月 7 日)

(受理 平成 11 年 3 月 19 日)

Increasing the Sensitivity and Speed of *Escherichia coli* O157:H7 Detecting Method in Edible Meats Using the BAX™ Screening System and Improvement of the Enrichment Culture Techniques

Kazuhide NAKAJIMA^{*1}, Kazuyuki MIURA^{*1}, Yoshiharu SHIMIZU^{*2}
and Masafumi FUKUYAMA^{*3}

(^{*1}Tokyo Meat Safety Inspection Center Co., Ltd., 2-5-7 Kounan, Minato-ku, Tokyo 108-0075)

(^{*2}Tokai University Junior College of Nursing and Medical Technology,
143 Minamikaname, Hiratsuka, Kanagawa 259-1201)

(^{*3}Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Sagamihara, Kanagawa 229-0006)

This study was performed to increase the speed and sensitivity of the detection of *E. coli* O157:H7 in edible meats. We examined the efficiency and assay time of an improved enrichment culture procedure of the BAX™ screening system developed by Qualicon Ltd. in the United States. The results are follows:

- 1) At 10⁵ cfu/ml, the sensitivity of the PCR kit in detecting *E. coli* O157:H7 (VT2, VT1, 2) in broth was less than that obtained by the culture method at 10⁴ cfu/ml. On the other hand, the ability of the PCR kit to detect *E. coli* O157:H7 inoculated into edible beef, pork, chicken and calf/ox liver was greater than the culture method (1~40 cfu/25 g compared with 10~2,100 cfu/25 g) except in the case of VT1,2-producing strain in chicken.
- 2) An assay time of 40 hours was required with the culture method, but with the PCR kit, the assay time was only 25 hours. It is therefore possible to detect the presence of *E. coli* O157:H7 in slightly over one day before a product is distributed.
- 3) Because the main reagents of the PCR kit were in tablet form, the whole PCR kit process was much simpler than that of the culture method. Consequently, the PCR kit is practical and useful.
- 4) Enrichment by shaking the culture shortened the time required for the PCR kit from 20 to 10 hours.

Key words: *E. coli* O157:H7, PCR kit, BAX™ screening system, Enrichment

^{*1} ☎108-0075 東京都港区港南 2-5-7

^{*2} ☎259-1201 神奈川県平塚市南金目 143

^{*3} ☎229-0006 神奈川県相模原市淵野辺 1-17-71

緒 言

腸管出血性大腸菌 O157:H7 (以下 O157:H7) は、周知のとおり感染力および病原性³⁾が強く、しばしば感染者を死に至らしめ、また主要な食中毒菌¹⁾として注目されている。

一方、食品からの本菌の検査法は、簡易キットによる場合でも 1 日を要し、厚生省通知による方法⁴⁾ (以下、厚生省法) では結果がわかるまでに 3~4 日を要するほか、実際に食品に付着している微量な本菌を正確かつ簡易に検出するという面では少なからず問題がある²⁾。

そこで、O157:H7 検査法の高感度化および迅速化の一方策として米国の Qualicon 社が開発した BAXTM スクリーニングシステム (以下 PCR キット法) を用い、O157:H7 に特異的な遺伝子断片を PCR 法により増幅して検出する方法で、食肉における実用性 (検出感度、検査所要時間、検査コストなど) を検討するとともに同法の迅速性をさらに高めるための増菌培養法について検討したのでその結果を報告する。

材料および方法

1. PCR キット法の実用性の検証

1) 供試菌株

牛の糞便より分離された VT 産生性 O157:H7、2 菌株 (No. 1: VT2 産生株, No. 2: VT1 & 2 産生株) を用いた。

2) 供試食肉

あらかじめ O157:H7 に汚染されていないことを確認した牛肉、豚肉、鶏肉および牛レバーの 4 種類を用いた。

3) 増菌培地および培養方法

ノボオシオン (Nb) を添加した mEC (極東; 以下 mEC-Nb) を用いて 37°C で 20 時間の静止培養を行った。

4) PCR キット法による O157:H7 の検査法

本法の特長は、PCR に必要なプライマー、ポリメラーゼおよびヌクレオチドを一つの錠剤とし、チューブ (PCR チューブ) に封入することにより、PCR 操作を簡略化したことである。

操作は、菌液あるいは増菌培養後の溶液 3 μ l をプロテアーゼ入り Lysis 試薬 400 μ l に加え、37°C で 20 分間インキュベーションにより溶菌させた後、95°C で 10 分間の恒温処理によりプロテアーゼを不活化させる。その後、急速に冷却させたその 50 μ l を錠剤の入った PCR チューブに移し、サーマルサーキュレーター (パーキンエルマー; 9600) で目的の遺伝子を増幅した。

反応条件は、ディネーター 94°C で 15 秒間、アニーリングおよびイックステンション 72°C で 2 分間の 2 ステップを 1 サイクルとして 38 サイクル行い 72°C で 7 分間の最終伸長反応を行った。

PCR 産物は、その反応液 15 μ l をエチジウムブロマイド入りアガロースゲルで電気泳動を行い、500 bp の位置に現れる DNA 断片の有無で判定した。

5) 培養法による O157:H7 の検査法

菌液あるいは増菌培養後の溶液を 1 白金耳量取りソルビトールマッコンキー培地 (Oxoid; 以下 SMAC) に塗抹し、37°C で 20 時間培養後、典型的なコロニーをラテックス標識免疫抗体からなる「UNI キット」(Oxoid) を用い凝集の有無を確認した。

6) 培養菌液による PCR キット法と培養法との検出感度の検討法

普通寒天培地 (日水) で 37°C で 24 時間培養した O157:H7 をそれぞれ滅菌生理食塩水に $10^0 \sim 10^7$ cfu/ml の菌量を浮遊させた菌液を作成し、両法の検出感度を調べた。

7) 人工的に O157:H7 を接種した食肉からの PCR キット法と培養法による検出感度の検討法

牛、豚、鶏肉および牛レバーをそれぞれ 25 g ずつストマッカー用ポリ袋中に秤量し、それに mEC-Nb 培地を 225 ml 加え、O157:H7 の菌液を肉 25 g 当たり $10^0 \sim 10^3$ cfu になるように接種し、ストマッカーでよく混合し 37°C で 20 時間増菌培養した。その培養液を用いて上記両法の検出感度を調べるとともに、検査所要時間、簡便性および検査コストを検討した。

2. 迅速化を目的にした増菌培養法の検討法

mEC-Nb 培地とトリプトソイブイオン培地 (栄研; 以下 TSB) に No. 1 菌株を培地に $10^0 \sim 10^3$ cfu/225 ml になるように接種し、増菌温度 (37, 42°C)、増菌時間 (5, 10, 20 時間) および増菌方法 (静止、振とう培養) の組合せについて 5, 10 および 20 時間ごとに菌数を調べ、かつ PCR キット法で DNA 断片の有無を確認し PCR キット法のさらなる迅速化を図るための増菌培養法について検討した。

結 果

1. PCR キット法の実用性の評価

1) PCR キット法と培養法の菌液中 O157:H7 の検出感度

PCR キット法の検出感度は、Table 1 および Fig. 1 に示すとおり VT2 産生株および VT1 & 2 産生株とも、 10^5 cfu/ml であり、培養法のそれは、 10^4 cfu/ml で

Table 1. Sensitivity of PCR kit method and culture method in detecting *E. coli* O157:H7 in broth

Methods	VT Type	
	VT2	VT1 & 2
PCR kit	10^{5*}	10^5
Culture	10^4	10^4

* Detection limit (cfu) of broth / ml

Fig. 1. Efficiency of the PCR kit method in amplifying the DNA of *E. coli* O157:H (VT1 & 2).
 Rank: A~Sample (500 bp), B~Control (800 bp)
 Column: 1~blank, 2~ 10^1 cfu/ml, 3~ 10^2 cfu/ml, 4~ 10^3 cfu/ml, 5~ 10^4 cfu/ml, 6~ 10^5 cfu/ml,
 7~ 10^6 cfu/ml, 8~ 10^7 cfu/ml, 9~1 kb marker
 A sample is considered positive for *E. coli* O157:H7 if a band appears in the sample rank, whether or
 not one appears in the corresponding control rank.
 A sample is considered negative for *E. coli* O157:H7 if no band appears in the sample rank, even if a
 band appears in the corresponding control rank.

Table 2. Sensitivity of PCR kit method and culture method to detect *E. coli* O157:H7 (VT2, VT1 & 2) inoculated into edible meats

Methods	Meats	VT Type	
		VT2	VT1 & 2
PCR kit	Beef	1*	5
	Pork	1	1
	Chicken	10	40
	Calf/ox liver	5	5
Culture	Beef	100	50
	Pork	25	25
	Chicken	90	10
	Calf/ox liver	2100	750

* Detection limit (cfu) of meat 25 g

あった。

なお、この感度実験に供した試料は、PCR キット法の場合 3 μ l であったのに対し、培養液の場合は 1 白金耳 (約 10 μ l) であった。

2) PCR キット法と培養法の食肉断片に接種した O157:H7 の検出感度

試験菌 2 菌株の PCR キット法と培養法の検出感度を Table 2 に示した。PCR キット法では、2 菌株とも牛、豚、牛レバーでは肉重量 25 g 当たり 1~5 cfu であり、鶏肉では 10~40 cfu であった。一方、培養法では牛肉が No. 1 株では 100 cfu であったが No. 2 株はやや少なく 50 cfu であった。また、豚肉では 2 菌株とも 25 cfu、

Table 3. Assay time simplicity and cost of PCR kit method and culture method

Methods	Assay time (hr)	Simplicity	Cost (¥/Test)
PCR kit	25	Simple	1,500
Culture	40	Experience required	500~1,000

牛レバーでは 750~2,100 cfu であった。鶏肉の場合は No. 1 株では 90 cfu であったが、No. 2 株では、10 cfu であった。

なお、PCR キット法と培養法の検査所要時間、簡便性および検査コストを比較した結果を Table 3 に示した。

2. PCR キット法の増菌培養法の改良による迅速化の検討

PCR キット法の増菌に用いる培地の種類、温度および方法について検討した結果、mEC-Nb 培地での 37°C および 42°C の静置培養では 1 オーダーの極少の菌を PCR キット法で検出可能な 10^5 cfu/ml 以上にするために 20 時間を要したが、37°C の振とう培養では 10 時間で 10^6 cfu/ml に増菌させることができた。また、TSB 培地での 37°C および 42°C の静止培養では 10^5 cfu/ml に増菌させるのに 20 時間を要したのに対し、同一温度の振とう培養では 10 時間で 10^7 cfu/ml に達した。

以上のことから、PCR キット法の 20 時間を要する増菌培養を短縮し検査の一層の迅速化を図るためには、振

とう培養が有効であると考えられる。

考 察

菌液中の O157:H7 の検出感度は、培養法では 10^4 cfu/ml, PCR キット法では 10^5 cfu/ml で前者の方が高かった。この原因の一つとしては、供試菌量が PCR キット法の場合 $3\mu\text{l}$ であったのに対し培養法では 1 白金耳量 (約 $10\mu\text{l}$) であったことが挙げられる。なお、今回著者らは免疫磁気ビーズ法を用いなかったが、伊藤ら²⁾は免疫磁気ビーズ法を用いることにより検出感度が上がると報告していることから、今回検討した両法に免疫磁気ビーズ法を加えることにより検出感度は上がるものと考えられる。

食肉に大腸菌 O157:H7 を接種した場合、PCR キット法の検出感度が培養法のそれより高かったのは、前者が細菌に最も特異的な DNA 断片を確実に増幅し検出するのに対し、後者の場合は分離培地からコロニーを釣菌する際に拾い逃していた可能性がある。なお鶏肉に接種した O157:H7 の PCR キット法の検出感度 ($10\sim 40$ cfu/25 g) が他の肉 ($1\sim 5$ cfu/25 g) よりやや低く、加えて No. 2 株の場合は培養法よりも検出感度が低かったが、この原因については目的菌以外の細菌の汚染度や汚染菌の増殖などが影響したものと考えられる。

今回の培養法では、分離培地に SMAC 培地を用いたが、酵素基質培地や選択性のある CT-SMAC 培地による検討も必要であろう。

検査所要時間は、増菌培養時間を含め培養法では 40 時間であったのに対し、PCR キット法はその 2/3 の 25 時間で結果を得ることができた。これは、従来の確実性の高いどのような方法でも困難であった食肉処理場から納品あるいは販売までに極めて短い食肉において、検査結果を得て、納品あるいは販売を可能にするものと考えられる。また簡便性は培養法の場合、正確な検査を行うためには、塗抹、釣菌などに経験を要するが、PCR キット法は他の PCR 法^{5,7)}に比し、主要な試薬が錠剤になっていることなどからマイクロピペットが正確に操作できれば、その分野の未経験者でも 1~2 回のトレーニングで十分に検査可能であったことから検査の合理化、特に省力化に役立つものと考えられる。ただし、現時点での検査に要するコストは、培養法の場合 1 検体当たり 500~1,000 円であったのに対し、PCR キット法の場合 1,500 円ほどと単純なコスト比較では、PCR キット法は割高となった。

増菌培養法の改良による PCR キット法のさらなる迅速化においては、既報^{2,6)}を参考に 2, 3 の検討を行った結果、振とう培養が有効であり、 37°C での 10 時間の振とう培養によって PCR キット法で検出可能な 10^5 CFU 以上に達することが確認され、増菌培養時間を 20 時間から 10 時間程度に短縮できる目処がつけられた。このことにより O157:H7 検査の一層の迅速化が図られる

ものと考えられるが、O157:H7 以外の大腸菌などに汚染されている食肉に微量の O157:H7 を接種した場合の振とう培養の増菌効果についても早急な検討が必要と思われる。

要 約

食肉における O157:H7 検査法の高感度化および迅速化を図るための試みとして米国の Qualicon 社が開発した BAXTM スクリーニングシステムを取り上げ、その有効性と同法の増菌培養法の改良による迅速化について検討した結果は以下のとおりである。

1) PCR キット法の菌液中の O157:H7 (VT2, VT1 & 2) の検出感度は、 10^5 cfu/ml で培養法の 10^4 cfu/ml より低かった。しかし、食肉 (牛, 豚, 鶏, 牛レバー) に接種した O157:H7 検出感度は、鶏肉の NO. 2 株の場合を除くいずれの食肉についても PCR キット法 ($1\sim 40$ cfu/25 g) の方が培養法 ($10\sim 2,100$ cfu/25 g) よりも高かった。

2) 検査所要時間は、培養法では 40 時間を要するが、PCR キット法では 25 時間に短縮でき、1 昼夜で安全性を確認し販売に供することが可能であることが明らかになった。

3) PCR キット法は、主要な試薬が錠剤に加工されていることなどから一連の操作が培養法よりも著しく簡便で、検査の合理化および省力化に役立つことが明らかになった。

4) PCR キット法の一層の迅速化には、同法の前段での増菌を振とう培養で行うことにより従来の培養時間を 20 時間から 10 時間に短縮が可能と考えられる。

本報の概要は、第 18 回日本食品微生物学会、1997. 12 (東京) で報告した。

謝 辞

本研究を行うに当たり、研究の計画、実施および結果の取り纏めに懇切な御指導と御助言を賜った (財) 東京顕微鏡院食品・環境科学センターの所長伊藤 武博士に深く謝意を表します。

文 献

- 1) 伊藤 武, 甲斐明美: 腸管出血性大腸菌 O157 感染症と食品. 食衛誌, 38, 275-285 (1997).
- 2) 伊藤 武, 甲斐明美, 尾畑浩魅, 貫名正文, 黒木 学, 仲西寿男: 食品からの腸管出血性大腸菌 O157 検出. 日食微誌, 13, 205-219 (1997).
- 3) Karmali, M. A., Steel, B. T., Petric, M. and Lim, C.: Sporadic case of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. Lancet, 1, 619-620 (1983).
- 4) 厚生省生活衛生局長: 腸管出血性大腸菌 O157 の検査

- 法について平成9年7月4日，衛食第207号/衛乳第199号(1997).
- 5) Lindqvist, R.: Preparation of PCR samples from food by a rapid and simple centrifugation technique evaluated by detection of *Escherichia coli* O157:H7. Int. J. Food Microbiol., **37**, 73-82 (1997).
 - 6) Okrend, A. J. G., Rose, B. E. and Bennett, B.: A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. J. Food Prot., **53**, 249-225 (1990).
 - 7) 大村正美, 佐原啓二, 大畑克彦, 増田高志, 内藤 満, 赤羽荘資: PCR 法による食肉及び便中の下痢原性大腸菌の迅速検査法の検討. 日食微誌, **11**, 215-221 (1995).