

PCR 法による食品中の腸管出血性大腸菌 O157 の VT 遺伝子検出の基礎的検討

吉田加寿子 柳沼幸 伊藤岩夫
県中支所

要 旨

食品中の腸管出血性大腸菌 O157 及び O26 の検査法として、食肉、食肉製品及びチーズを除きスクリーニング法としてベロ毒素 (VT) 遺伝子検出法を用いることが可能となった。

腸管出血性大腸菌 O157 培養法で陰性となった収去検体 164 件について、PCR 法による VT 遺伝子検出および検体に O157 を添加しての感度試験を実施した。

その結果、感度試験では 146 件で感度の確認ができたが、18 件で VT 遺伝子を検出せず感度の確認ができなかった。PCR 法による VT 遺伝子検出法では感度試験の必要性が示された。

DNA 抽出法として、アルカリ熱処理法、アルカリ処理法、熱処理法、ISOPLANT 法を実施したが、検体別に選択するには至らなかった。

内部標準法では、VT 遺伝子検出と同時に PCR 反応の検証も可能であったが、さらに検討を要する結果であった。

キーワード：腸管出血性大腸菌 O157、VT 遺伝子、PCR、DNA 抽出、感度試験

はじめに

従来食品中の腸管出血性大腸菌 O157 (以下“O157”とする) の検査は培養法で実施してきたが、平成 18 年 11 月 2 日付の通知の検査法では、腸管出血性大腸菌 O26 を追加した上で、食肉、食肉製品及びチーズを除きスクリーニング法として PCR 法によるベロ毒素 (VT) 遺伝子検出法を用いることが可能となった (以下、“通知法”とする)¹⁾。

通知法の VT 遺伝子検出法では、① DNA 抽出法では脂肪の多い食品では遺伝子増幅に影響があるのでアルカリ熱抽出法が適さない、②選択した VT 遺伝子検出法の感度が得られていることを確認しておく必要がある等の条項がある。

現在、当所では主に収去検査の中で O157 の検査を実施している。その中で、検体の半数以上を占める総菜類の種類は多岐にわたっており、脂肪含有の多い検体もある。

そこで、収去検査の検体を用いて通知法の問題点を整理するため VT 遺伝子検出及び感度の確認、DNA 抽出法の比較および内部標準法の検討を行ったので報告する。

材 料

検体：今年度当所で受け付けた収去検査検体 (凍結保存検体を含む) 164 件
試薬：O157 (ベロ毒素遺伝子) PCR Screening Set (TaKaRa)
ダイナビーズ O157 (ベリタス)
O157 増菌培地、分離培地等
ISOPLANT (NIPPON GENE CO.,LTD.)
菌株：腸管出血性大腸菌 O157 (当所保管菌株)

方 法

1 VT遺伝子検出

1) 収去検体からの VT 遺伝子検出

収去検体 164 検体について VT 遺伝子検出を実施した。

検体を 25g 採取し、N-mEC 225mL 加え、 $42 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$ 、 22 ± 2 時間増菌培養し、増菌培養液とした。

アルカリ熱抽出法により DNA 抽出を行った。操作方法は以下の通りである。増菌培養液 100 μL を 10,000 \times g、10 分間遠心し、その沈渣に滅菌 50mM NaOH 100 μL 添加して、

100 °C 10 分間加熱する。その処理液 50 μ L を分取後、滅菌 1M Tris-HCl(pH7.0) 8 μ L で中和し、10,000 \times g, 10 分間遠心し上清を DNA 抽出検体とする。

DNA 抽出検体を O157 (ベロ毒素遺伝子) PCR Screening Set (TaKaRa) を用い、94 °C 1 分、55 °C 1 分、72 °C 1 分を 35 サイクル、72 °C 10 分 1 サイクルの反応条件で増幅を行った。泳動、染色後バンドの有無により VT 遺伝子を判定した。増幅 DNA は 171bp である。

2) 感度試験

検体ごとの VT 遺伝子検出法の感度を確認するため、収去検体 164 件について感度試験を実施した。

TSB10mL に O157 を 1 白金耳接種し、約 36 °C、18 時間培養し、O157 培養液 (5×10^8 cfu/mL) とする。検体を 25g 採取し、N-mEC 225mL 加え、42 \pm 1 °C、22 \pm 2 時間培養し、検体の増菌培養液とする。O157 培養液と検体の増菌培養液で、菌濃度約 1×10^4 cfu/mL とした感度試験検体を作成し、1) と同様に VT 遺伝子検出法を行った。

3) 培養法との比較

一部の検体の感度試験検体を用いて、VT 遺伝子検出法とともに培養法 (直接法、ビーズ法) を実施し感度を比較した。

培養法は直接法では増菌培養液 10 μ L、ビーズ法では免疫磁気ビーズ濃縮液 20 μ L を分離平板培地 (CT-SMAC, BCMO157, クロモアガー O157) に塗抹し 36 \pm 1 °C で 18 ~ 24 時間培養後判定した。

2 DNA抽出法の比較

DNA 抽出方法の違いによる VT 検出を比較するため、アルカリ熱抽出法で VT 遺伝子が検出できない検体およびバンドが薄い検体についてアルカリ抽出法および熱抽出法を実施した。アルカリ抽出法は、アルカリ熱抽出法の操作の中で、100 °C で 10 分間加熱の過程を省いた。熱抽出法は培養液 100 μ L を 100 °C で 10 分間加熱後、10,000 \times g, 10 分間遠心し上清を DNA 抽出検体とした。

また、一部検体について、ISOPLANT (NIPPON GENE CO.,LTD.) による DNA 抽出を実施した。操作方法は ISOPLANT のマ

ニュアルに従った。

3 内部標準法の検討

PCR を行う際に、内部コントロールとして control template EC3 (TaKaRa) を添加して PCR を行った²⁾。EC3 (100pg/ μ L) は 1,000 倍に希釈して 1 μ L 添加した。

結果及び考察

1 VT遺伝子検出

1) 収去検体からの VT 遺伝子検出

VT 遺伝子検出を実施した検体数は 164 件で、内 98 件 (60 %) を総菜類が占めた。この他豆腐 20 件 (12 %), 漬物類, カット野菜各 13 件 (各 8 %), 生食用鮮魚介類, 魚卵各 10 件 (各 6 %) であった。この 164 件は O157 培養法はすべて陰性であった。

増菌培養液からの VT 遺伝子検査では、164 件中 163 件は VT 遺伝子が検出されず陰性が確認された。惣菜類には VT 遺伝子検出法が適さないとされている食肉製品やチーズを含むものもあったが、1 件を除き VT 遺伝子が検出されたものはなかった。

総菜類の「豆のサラダ」1 件で VT の位置と近い場所に薄いバンドが検出された。豆のサラダにはチーズや豆類等様々な食材が含まれていたため食材による偽陽性も疑われたので、後日、凍結保存検体を用いて増菌培養液で再検査を実施したところ、VT の位置にバンドは検出されなかった。感度試験を同時に実施していることから、菌または VT 遺伝子がコンタミした可能性も否定できない。感度試験を同時に実施することは避けるべきと判断される。

2) 感度試験

164 件すべてについて感度試験を実施した。結果を表 1 に示す。164 件中 146 件 (89%) で、VT 遺伝子が検出され、感度の確認ができたが、18 件では VT 遺伝子が検出されず、感度の確認ができなかった。

漬物類 13 件, カット野菜 13 件, 生食用鮮魚介類 10 件 (まぐろ, カツオ等刺身) ではすべて VT 遺伝子が検出された。総菜類は 98 件中 3 件, 豆腐は 20 件中 5 件で VT 遺伝子が検出されなかった。また魚卵では 10 件中

表 1 感度試験結果

	VT検出	VT非検出
惣菜類	98	3
漬物類	13	0
カット野菜	13	0
生食用鮮魚介類	10	0
豆腐	20	5
魚卵	0	10
計	146	18

10 件すべてで VT 遺伝子が検出されなかった。

総菜類 98 件中 95 件で VT 遺伝子が検出された。通知法では脂肪の多い食品は遺伝子増幅に影響するためアルカリ熱抽出法による DNA 抽出は適さないとされているが、肉類、フライや炒め物、マヨネーズ等の脂肪では影響のないことが明らかになった。VT 遺伝子が検出できなかった 3 件はクルミ小女子の佃煮 1 件とひじき煮 2 件であった。クルミ小女子の佃煮は、クルミの割合が高く脂肪分が高いことが影響したのではないかと考えられた。

ひじき煮は 9 月と 11 月に別施設から収取されたものである。具材は若干異なっていたが特に油分やタンパク質が多いとは思えないものである。PCR で VT 遺伝子が検出できない原因はひじきと考え、増菌培養液での再検査を実施し、やはり VT 遺伝子は検出できなかった。さらに、凍結検体を用い再度増菌培養液からの検査を実施した結果、2 件とも VT 遺伝子が検出できた。添加した菌の濃度の差や凍結による食材の変成等もあったと思われるが、ひじきには PCR 反応を阻害する何らかの要因がある可能性も考えられた。

豆腐は 20 件中 5 件で VT 遺伝子が検出できず、魚卵は 10 件中 10 件すべて（すじこ 5 件、たらこ、明太子 5 件）で VT 遺伝子が検出できなかった。魚卵は含まれるタンパク質や脂肪分の影響と思われたが、豆腐で VT 遺伝子の検出ができない理由は不明であった。

VT 遺伝子が検出できない原因の一つとして検体自体の何らかの要因で菌量不足に陥った可能性も考えられる。VT 遺伝子検出できなかった 7 検体（ひじき 2 件、豆腐 2 件、

クルミ小女子 1 件、魚卵のたらこ、すじこ各 1 件）を用いて、菌量を多くした増菌培養液（約 10^{7-8} cfu/mL）で検査を実施した結果、クルミ小女子以外の 6 件では VT 遺伝子が確認できた。増菌培養液に含まれる阻害成分と抽出 DNA 量の比によって、VT 遺伝子の検出に差が生じるものと考えられる。

通知法で「VT 遺伝子検出法では感度が 1×10^4 cfu/mL（検体の増菌培養液）より優れるものを使用すること」と示されている。魚卵、豆腐についてはこの感度の確保が出来ていないので、培養法で検査を実施するのが適当と思われた。また、総菜類については、その内容が多岐にわたっているため一概に判断は出来ないが、クルミ小女子の佃煮のように脂質が明らかに多いものを除けば概ねアルカリ熱抽出による VT 遺伝子検出法で判定できると思われた。

なお、以上のほか、きんぴらゴボウ（2 件）では VT 遺伝子は検出できたが、バンドが薄かった。

以上まとめると、感度試験では、O157 を添加しているにも拘わらず 18 件では VT 遺伝子は検出されなかった。この 18 件の中には特に油分やタンパク質が多いとは思えない検体も含まれていた。VT 遺伝子検出法で判定する場合は、偽陰性と判定する危険が含まれており、感度確認の必要性が明らかになった。

3) 培養法との比較

実検体では種々の細菌が N-mEC で増菌され分離培地上で疑わしい集落となることもある。今回実施した 164 件の培養法では分離培地から確認培養が必要であったのは 10 件、6.1%であった。

そこで、7 検体について O157 菌を添加し約 1×10^4 cfu/mL の濃度とした増菌培養液を用い、培養法で O157 の検索を行った。この 7 検体は総菜類とカット野菜で、VT 検出法では菌未添加で検出されず、菌添加で VT 検出できたもの 6 件と検出できなかったひじき煮 1 件である。

菌を添加しない増菌液では 7 検体の内 1 件は分離培地上に集落はなく、6 検体では集落が見られた。集落が見られた 6 件の内 2 件では CT-SMAC でソルビトール非分解の集落が

見られ、確認培地で生化学的性状を確認後陰性と判定した。

菌を添加した検体の培養法では、直接塗抹したもので分離培地で O157 を判別できたのは 2 件で、他の 5 件は O157 以外の集落が多く、O157 集落を判別することは出来なかった。また、ビーズ法後の分離培養では、O157 より他の菌が多く集落を作って O157 が判別できない培地もあったが、3 種類の分離培地のいずれかでは O157 が判別できた。また、感度試験において VT 遺伝子が検出できなかったひじき煮は、直接法では判別できなかったが、ビーズ法では O157 が判別でき、有用であった。

VT 遺伝子法の結果が陰性となる検体では、VT 遺伝子検出および感度試験をスクリーニングとして用いることで、検査開始の翌日には陰性の結果を得ることが可能であり、この点では培養法よりも優れていると思われる。

2 DNA抽出法の比較

アルカリ熱処理により VT が検出されなかったもの、VT 遺伝子のバンドが薄かったものの一部、10 検体について、アルカリ処理、熱処理を行った。結果を表 2 に示した。

表 2 DNA抽出法の比較

	アルカリ熱	アルカリ	熱
ゼンマイナムル	(+) 薄	(+) 薄	(-)
クルミ小女子	(-)	(-)	(-)
酢豚	(+) 薄	(+) 濃	(+) 薄
きんぴらごぼう	(+) 薄	(±)	(-)
ひじき煮(9月)	(-)	(+)	(-)
豆腐No.2	(-)	(-)	(-)
豆腐No.3	(-)	(-)	(-)
すじこ	(-)	(-)	(-)
たらこ	(-)	(-)	(+) 薄
ひじき煮(11月)	(-)	(+) 薄	(±)

酢豚、ひじき煮ではアルカリ処理抽出で VT 遺伝子が検出またはバンドが濃くなって、アルカリ熱処理より適していたと思われる。クルミ小女子、豆腐 2 件、すじこではいずれの方法でも VT 遺伝子が検出できなかった。また、VT のバンドが薄かったゼンマイナムル、きんぴらでも他の 2 法はアルカリ熱

処理と同等か劣っていた。たらこでは、通知法では適さないとされている熱処理法でのみ VT 遺伝子が検出された。以上の結果から、あらかじめ検体ごとに DNA 抽出法を選択するのは困難であると思われた。

今回、感度試験で VT 遺伝子が検出できなかった検体があったため、ISOPLANT による DNA 抽出を実施した(表 3)。

検体は感度試験で、アルカリ熱抽出で VT 遺伝子を検出できた 13 件、VT 遺伝子が検出できなかった 5 検体について実施した。

感度試験で、アルカリ熱抽出で VT 遺伝子検出ができた 13 検体のうち 11 検体では ISOPLANT 抽出でも VT 遺伝子が検出され、2 件で VT 遺伝子検出が出来なかった。

アルカリ熱処理では VT 遺伝子が検出されなかった 5 検体のうち 4 検体は、ISOPLANT 抽出では VT 遺伝子が検出された。ひじき煮 1 件はアルカリ熱抽出でも ISOPLANT 抽出でも VT 遺伝子が検出できなかった。

ISOPLANT による DNA 抽出は、アルカリ熱処理抽出では VT 遺伝子が検出できなかった 4 検体でも検出できたので有用であったが、抽出操作がやや煩雑でアルカリ熱抽出に比較して操作時間が長い。今回の通知法で増菌培養時間が 22 ± 2 時間となり、また「陽性であった場合は、当日中に血清型 O157 及び O26 を対象とした分離培養を行う」とあるので陽性の場合にはその後に培養法を実施しなければならない。収去検査での検体搬入の時間から VT 遺伝子検査終了までの時間を考えると、収去検査では ISOPLANT で DNA 抽出法を実施することは困難であると思われた。

3 内部標準法の検討

PCR を実施し、VT 遺伝子が検出されない場合、VT 遺伝子が陰性であることのほかに、PCR 反応が正常に行われなかった可能性が考えられる。それを判断する一助として、内部コントロールとして control template EC3 (TaKaRa) を添加して PCR 反応を行った。EC3 (100pg/μL) を 1,000 倍に希釈して 1 μL 添加した。

総菜類 15 件では PCR 反応液に DNA 抽出

表3 アルカリ熱抽出とISOPLANT抽出

検体名	アルカリ熱	ISOPLANT
チキンの照焼き	(+)	(+)
筑前煮	(+)	(+)
きのこのスパゲティ	(+)	(+)
きのこの和え物	(+)	(+)
エビカツ	(+)	(+)薄
さつま揚げニンジンの煮物	(+)	(+)
カレーハンバーグ	(+)	(+)
イカリング唐揚げ	(+)	(+)
10/1豆腐No.2	(+)	(+)
10/1豆腐No.3	(+)	(+)
10/15すじこ	(-)	(+)
9/10ひじき煮	(-)	(-)
10/15たらこ	(-)	(+)
チリソースの野菜炒め	(+)	(-)
ひじき煮物	(-)	(+)
きんぴらごぼう	(+)	(-)
くるみ小女子	(-)	(+)
N-mEC+10 ⁴	(+)	(+)

液と希釈した EC3 を添加して PCR を実施した。EC3 の位置 (685bp) にバンドが検出された (表 4)。また、これら 15 検体の感度試験用培養液で、同様に PCR 反応を実施した。VT 位置と EC3 位置にバンドが確認された。

アルカリ抽出法の感度試験で VT が検出されなかった 5 件 (クルミ小女子, ひじき煮, すじこ, たらこ, 豆腐) では, 菌を添加していない培養液でも, 菌添加の培養液でも VT 位置, EC3 の位置ともにバンドが検出できず, PCR 反応が正常に行われなかったことが明らかになった (表 4)。

上記とは異なる豆腐で感度試験培養液について内部標準法を行った。EC3 位置にバンドを検出できたが, VT 位置のバンドは検出されなかった (表 4 最下段の「もめんとうふ」)。この結果からは, PCR 反応は正常に行われ, VT が陰性という誤った判定が導かれる。

内部標準法の検討を開始した際に, EC3 の濃度が濃い場合, EC3 のバンドが濃く VT のバンドが薄くなったことがあった。この例も EC3 が添加されたことによって VT が検出されにくくなったと考えられた。

表4 内部標準結果

	菌添加なし		菌10 ⁴ 添加	
	VT	内標	VT	内標
チリソースの野菜炒め				
きのこの和え物				
エビカツ				
さつま揚げニンジンの煮物				
カレーハンバーグ				
イカリング唐揚げ				
ポークカレー				
白菜煮ひたし	(-)	(+)	(+)	(+)
エビとブロッコリー中華炒め				
さわら西京焼				
チキンの照焼き				
筑前煮				
きのこのスパゲティ				
きんぴらごぼう				
里芋煮物				
クルミ小女子				
ひじき煮				
すじこ	(-)	(-)	(-)	(-)
たらこ				
木綿豆腐				
もめんとうふ	(-)	(+)	(-)	(+)

そこで, 別の豆腐 10 件について EC3 を添加した, VT 遺伝子検査および感度試験を実施した。その結果を表 5 に示す。菌無添加 VT 遺伝子検査でも内部標準のバンドが検出されなかったものや, 感度試験で VT, 内部標準のバンドが検出されなかったものなどがあり, 豆腐には PCR 反応を阻害する要因があると考えられた。

表5 豆腐の内部標準結果

バンド位置	0157添加なし		0157 10 ⁴ 添加	
	VT	内部標準	VT	内部標準
1	(-)	(+)	(-)	(-)
2	(-)	(+)	(-)	(-)
3	(-)	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(+)	(+)	(-)
5	(-)	(-)	(+)	(+)
6	(-)	(+)	(+)	(+)
7	(-)	(+)	(+)	(-)
8	(-)	(-)	(+)	(-)
9	(-)	(+)	(+)	(+)
10	(-)	(+)	(+)	(-)

今回, ほとんどの検体で内部標準を加えることによって, PCR 反応についての検証も同時にでき, 内部標準法は有用であると思わ

れた。しかし、DNA 抽出液に含まれる VT の量が少ないときや PCR 反応に何らかの影響を及ぼすものを含む DNA 抽出液では、内部標準法でも誤った結果となることが示唆され、内部標準法を用いるにはさらに検討を重ねる必要があると考えられた。

まとめ

PCR 法による食品中の VT 遺伝子の感度試験を 164 件について行い、146 件で感度が確認された。感度試験において総菜類、豆腐の一部、魚卵の 18 件では VT 遺伝子が検出できず、PCR 法による VT 遺伝子検出法では感度試験も同時に実施する必要性が示された。

DNA 抽出方法としてアルカリ熱処理法の他に、アルカリ処理法、熱処理法、ISOPLANT 法を実施した。それぞれの方法で検体により有用な方法もあったが、検体別に選択するには至らなかった。

内部標準法では、VT 遺伝子検出と同時に PCR 反応の検証も可能であった。しかし、一部検体においては検証ができなかったためさらに検討が必要であると思われた。

引用文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長。腸管出血性大腸菌 O157 及び O26 の検査法について。平成 18 年 11 月 2 日付け食安監発第 1102004 号。
- 2) 清水美和子，磯部順子，木全恵子，他。食品からの腸管出血性大腸菌検査法における PCR 法の検討。第 28 回日本食品微生物学会講演集 2007 ; 71.