

## 食品の腸管出血性大腸菌検査におけるVT遺伝子検出機器及び試薬の検討

○大塚佳代子<sup>1)</sup>, 森 哲也<sup>2)</sup>, 上田泰史<sup>3)</sup>, 中川 弘<sup>4)</sup>, 清水大輔<sup>4)</sup>, 甲斐明美<sup>5)</sup>,  
小西典子<sup>5)</sup>, 長尾清香<sup>6)</sup>, 寺嶋 淳<sup>6)</sup>, 工藤由起子<sup>6)</sup>

1) 埼玉県衛生研究所, 2) (一財)東京顕微鏡院, 3) 神戸検疫所輸入食品・検疫検査センター,  
4) (株)BMLフード・サイエンス, 5) 東京都健康安全研究センター, 6) 国立医薬品食品衛生研究所

【目的】腸管出血性大腸菌 (EHEC) はヒトに HUSを引き起こし重篤な被害を与えることがあり、食中毒発生時における本菌の食品検査では、迅速性と確実性を具備する必要がある。このため、平成17年には、食品のEHEC検査法において「VT遺伝子検出」によるスクリーニング検査が取り入れられた。一方、平成26年にEHECによる食中毒事件は25事例、患者数766名の発生があり、その血清型の多くはO157であるが、O26など他のO血清群も散見される。そこで、平成26年11月20日付け厚生労働省通知にて、食品のEHEC検査法が改定され「検査対象とするO血清群の拡大」、及び「遺伝子検査の精度を高めるために内因性コントロール (IC) の追加」があった。本発表では、通知の発出にあたり、VT遺伝子及びICの検出について各種機器及び試薬での検出感度を検討したので報告する。

【方法】試験検体は、8種類の食品 (牛レバー、牛挽肉、豚スライス肉、ヤギナチュラルチーズ、レタス、カイワレダイコン、トマト、ホウレンソウ) のmEC培養液に5株のEHEC O157菌液を終濃度 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ cfu/mLの4濃度となるよう接種し、そのアルカリ熱抽出試料を使用した。反応試薬は、市販キットとしてCycleave PCR O-157 (VTgene) Screening Kit Ver. 2.0 (カラハイ) 及びfoodproof STECスクリーニングキット (ハイテック・ダイグノスティックス)、自家調製試薬としてNielsenらの遺伝子検出方法とUSDAのIC用16SrRNA遺伝子検出方法を参照した試薬を

用いた。リアルタイムPCR機器は、ABI 7500、7900HT及び ViiA7 (ライフテクノロジー・システムズ)、LightCycler480 II (ロシュ・ダイグノスティックス)、Thermal Cycler Dice Real Time System II (カラハイ) を使用した。反応は2回ずつ行い、増幅反応後、Auto及びManual設定にて解析しCt値を得た。

【結果及び考察】1. Cycleave PCR O-157キットでは、ABI7500、7900、ViiA7、LC480 II 及びDice IIの5機種全機器で $10^4$  cfu/mLの菌濃度で、全食品からVT遺伝子が検出された。さらに、一部の機器では牛レバーやトマト以外の食品で、 $10^2$  または $10^3$  cfu/mLの菌濃度からも検出された。

2. foodproof STECキットでは、IC検出用にCy5フィルターを使用するため、当フィルター搭載のABI7500、ViiA7及びLC480 IIにて試験したところ、全機器で $10^2$  または $10^3$  cfu/mLの菌濃度で全食品からVT遺伝子が検出された。

3. 自家調製試薬では、5機種全機器で $10^2$  または $10^3$  cfu/mLの菌濃度で全食品からVT遺伝子が検出された。

4. ICは、いずれの反応試薬においても全機器で、全食品検体及び陰性コントロールから16SrRNA遺伝子が検出され、増幅反応が阻害されず正しく行われたことを確認できた。

以上の結果から、機器及び試薬の的確な組み合わせにより、優れた検出感度を確保ができ、またICの導入は、従来法よりも正確性を有した遺伝子検出法となることが示された。