

薬生食監発1109第1号
平成30年11月9日

各 $\left[\begin{array}{c} \text{都道府県} \\ \text{保健所設置市} \end{array} \right]$ 衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課長
（公印省略）

対米輸出食肉認定施設における腸管出血性大腸菌 O26、O45、O103、O111、O121、
O145 及び O157 の検査法について

我が国から米国向けに輸出する食肉については、「対米輸出食肉を取り扱うと畜場等の認定について」（平成2年5月24日付け衛乳第35号）の別紙「対米輸出食肉を取り扱うと畜場等の認定要綱」（以下「対米認定要綱」という。）により取り扱っているところです。

対米認定要綱については、「対米輸出食肉を取り扱うと畜場等の認定について」等の一部改正について」（平成30年7月10日付け生食発0710第2号）により、対米輸出食肉に対する腸管出血性大腸菌 O26、O45、O103、O111、O121、O145 及び O157（以下「STEC」という。）に係る管理及び検証の手順を加える旨、通知したところですが、今般、STEC の検査法に係る米国農務省食品安全検査局との協議が終了したことから、STEC の検査法を別添のとおり通知します。

つきましては、本検査法により、対米認定要綱別添3第3の6（2）及び第4の4に基づく STEC 検査を 2019 年 1 月 1 日から開始いただくようお願いします。ただし、2019 年 1 月 1 日から 3 月 31 日までの間は、本通知に基づく検査法その他、「腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について」（平成26年11月20日食安監発1120第1号厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知）に基づく検査法により検査を実施して差し支えないことを申し添えます。

(別 添)

牛肉からの腸管出血性大腸菌 026、045、0103、0111、0121、0145 及び 0157 の検査法

1 スクリーニング検査

(1) 検査法

対米認定要綱別添 3 の 6 により採取された検体を用い、以下の検査法を用いてスクリーニング検査を実施する。検査手順については、AOAC の認証を得た手順に沿って実施する。ただし、イについては、MLG5.09、MLG 5A.04 及び MLG5B.05 に基づく手順に沿って実施することを可能とする。

ア GeneDisc® Plate STEC (AOAC-RI#021103) /GeneDisc® Plate STEC Top 7 (AOAC-RI#031401) (Pall GeneDisc Technologies)

※ GeneDisc® Plate STEC Top 7 を用いてスクリーニング検査を行う場合は、GeneDisc® Plate STEC は不要である。また、GeneDisc® Plate STEC を使用する場合は、はじめに GeneDisc® Plate STEC を用いてスクリーニング検査を行い、*stx* 及び *eae* が陽性かつ 0157 抗原遺伝子が陰性の場合、GeneDisc® Plate STEC Top 7 の検査を実施し、血清型を絞り込む必要がある。

イ BAX® System Real-Time PCR Assay Suite for STEC (AOAC-RI # 091301) and BAX® Real-Time PCR Assay for E. coli O157:H7 (AOAC-RI # 031002) (Qualicon Diagnostics LLC, a Hygiena Company)

ウ Applied BioSystems RapidFinder STEC Detection Workflow (AOAC - RI # 061602) (Thermo Fisher Scientific)

エ QIAGEN mericon® E. coli 0157 Screen Plus (AOAC-OMA # 2017.05) and mericon® E. coli STEC O-Type Pathogen Detection Assays (AOAC-RI#101504) (Qiagen Germantown, MD)

(2) 結果の判定

各検査法の判定手順に従い判定する。陽性判定の場合は、以下に示す確認検査を実施する。

2 確認検査

(1) から (5) の方法又は、MLG5.09 及び MLG5B.05 の手順に従い、確認検査を実施する。

(1) 分離培養法

分離培養は増菌培養液の免疫磁気ビーズ濃縮液の塗抹及び増菌培養液の

直接塗抹によって行う。病原因子遺伝子 (*stx* 及び *eae*) 検出試験及び O 抗原遺伝子検出試験の両方が陽性であった血清群について、当日中に分離培養をしない場合は、保存培養液を使用して実施する。なお、磁石スタンド接触面へのビーズの吸着が芳しくない場合は、免疫磁気ビーズ塗抹法と同様に分離平板培地各 2 枚の計 4 枚を使用して直接塗抹法を実施する。その他、必要があると思われる場合は目的に合わせた分離培養法を実施する。

ア 免疫磁気ビーズ法

(ア) 免疫磁気ビーズ濃縮法

免疫磁気ビーズとしては i から vii の血清群ごとに示した試薬又はこれらと同等の試薬が利用できる。各社ビーズの仕様に合わせたビーズ液量を 1.5 ml チューブに入れ、培養液 1 ml を加えて濃縮する。この際、複数の O 抗原遺伝子が陽性であった場合においても、血清群ごとにビーズ濃縮操作を行い、異なる血清群のビーズを混合して用いない。また、濃縮操作は各社製ビーズの仕様に合わせ最終的に 0.1 ml に懸濁する。詳細な試験方法は、各仕様書を参照する。交差汚染を避けるためにマイクロチューブの蓋をあける際は、固く絞ったアルコール綿で蓋を覆うなどの配慮が必要である。また、ビーズ吸着操作後の培養液や洗浄液を取り除く際には、ディスポーザブルのスポイトの使用やマイクロピペットの汚染防止などを配慮する。

i 血清群 026

- (i) 免疫磁気ビーズ 026「生研」(デンカ生研)
- (ii) Dynabeads EPEC/VTEC 026 (ベリタス販売)

ii 血清群 045

- (i) 免疫磁気ビーズ 045「生研」(デンカ生研)

iii 血清群 0103

- (i) 免疫磁気ビーズ 0103「生研」(デンカ生研)
- (ii) Dynabeads EPEC/VTEC 0103 (ベリタス販売)

iv 血清群 0111

- (i) 免疫磁気ビーズ 0111「生研」(デンカ生研)
- (ii) Dynabeads EPEC/VTEC 0111 (ベリタス販売)

v 血清群 0121

- (i) 免疫磁気ビーズ 0121「生研」(デンカ生研)

vi 血清群 0145

- (i) 免疫磁気ビーズ 0145「生研」(デンカ生研)
- (ii) Dynabeads EPEC/VTEC 0145 (ベリタス販売)

vii 血清群 0157

- (i) 免疫磁気ビーズ 0157「生研」(デンカ生研)
- (ii) Dynabeads anti-E.coli 0157 (ベリタス販売)

(イ) 免疫磁気ビーズ塗抹法

分離平板培地には i のセフィキシム・亜テルル酸カリウム (CT) 添加ソルビトールマッコッキー (CT-SMAC) 寒天培地を必ず使用する。

また、腸管出血性大腸菌の分離に適した ii 又は iii の酵素基質培地 (これらと同等の培地の使用も可能。) を併用する。なお、凍結等によって菌の損傷が考えられるなど、汚染菌の CT 感受性が高いことが考えられる場合などは、CT 非添加の分離平板培地も使用する。

免疫磁気ビーズ濃縮液 10~20 μ l を各種分離平板培地 1 枚あたりに画線塗抹し 36 \pm 1 $^{\circ}$ C で 18~24 時間培養後、疑われるコロニーを分離する。多くの単離コロニーが出現するように、1 種類につき 2 枚以上の分離平板培地を用いる。二分画培地の場合は相当の面積に塗抹する。菌が密集して発育した場合には、コロニー形態の鑑別ができないため、単離コロニーが 30 個程度以上出現するよう工夫して塗抹する。1 検体につき各種培地の典型的コロニーをできる限り 5 個以上釣菌し、(2) 以降の試験を行う。

- i CT-SMAC 寒天培地 (市販生培地、自家調製又は基礎培地使用：オキソイド製造；関東化学販売、日水製薬、メルク、栄研化学、日本ベクトン・ディッキンソン等、極東製薬工業等) (045 対応)

(i) 基礎培地組成

ペプトン	20.0 g
胆汁酸塩	1.5 g
ソルビトール	10.0 g
NaCl	5.0 g
ニュートラルレッド	0.03 g
クリスタルバイオレット	0.001 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 ml
pH	7.2 \pm 0.1

(ii) 培地の調製

121 $^{\circ}$ C で 15 分間滅菌後、50 $^{\circ}$ C 以下に冷却し、(iii) に示す添加剤を無菌的に加えたのち、滅菌シャーレに分注し寒天平板として使用する。

(iii) 添加剤

培地 1,000 ml に対し、セフィキシム 0.05 mg 及び亜テルル酸カリウム 2.5 mg (オキシイド製造; 関東化学販売、メルク、ベリタス等) を加える。

(iv) 各血清群コロニーの典型的色調

典型的な血清群 0157 はソルビトール非分解又は遅分解の無色透明コロニー、血清群 026、045、0103、0111、0121 及び 0145 は一般的な大腸菌と同様にソルビトール分解の赤色コロニーを形成する。

ii CT-クロモアガー-STEPC 培地 (市販培地: 関東化学、基礎培地使用 (クロモアガー-STEPC 基礎培地: クロモアガー社製造; 関東化学販売))

(i) 基礎培地組成

ペプトン及び酵母エキス	8.0 g
NaCl	5.2 g
特殊酵素基質混合物	2.6 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 ml
pH	7.0±0.2

(ii) 培地の調製

加熱溶解後 (オートクレーブは不可。過度の加熱も避ける。) 50°C 以下に冷却してから、(iii) に示す添加剤を無菌的に加えたのち、滅菌シャーレに分注し寒天平板を作製する。なお、作製した寒天平板は冷蔵保存し、その保存期間は 2~8°C で 30 日以内とする。

(iii) 添加剤

培地 1,000 ml に対し、セフィキシム 0.05 mg 及び亜テルル酸カリウム 2.5 mg (オキシイド製造; 関東化学販売、メルク、ベリタス等) を加える。

(iv) 各血清群コロニーの典型的色調

典型的な血清群 026、045、0103、0111、0121、0145 及び 0157 は藤色コロニーを形成する。

iii Modified レインボーアガー-0157 培地 (バイオログ製造; セントラル科学貿易販売)

(i) 基礎培地組成

ペプトン	6.0 g
糖類	35.63 g
発色基質	0.4 g
3-indoxyl-β-D-galactoside	0.25 g
3-indoxyl-β-D-glucuronide	0.12 g

寒天	14.0 g
精製水	1,000 ml
pH	6.8±0.1

(ii) 培地の調製

加熱溶解又は121℃で5分間滅菌した後、50℃以下に冷却し、以下に示す添加剤を無菌的に加えたのち、滅菌シャーレに分注し寒天平板として使用する。作製した寒天平板は冷蔵保存し、その保存期間は2～8℃で14日以内とする。

(iii) 添加剤

培地1,000 mlに対し、以下のとおり調製したノボビオシン溶液(4 mg/ml) 1.25 ml、亜テルル酸カリウム溶液(1 mg/ml) 0.15 ml及びセフィキシム溶液(0.5 mg/ml) 0.1 mlを加える。

① ノボビオシン溶液

ノボビオシンナトリウム0.4 gを精製水100 mlにて溶解。保存期間は遮光下2～8℃で1年以内とする。

② 亜テルル酸カリウム溶液

亜テルル酸カリウム10 mgを精製水10 mlにて溶解。保存期間は遮光下2～8℃で8日以内とする。

③ セフィキシム溶液

セフィキシム三水合物50 mgをメタノール10 mlにて溶解し、この1 mlに精製水9 mlを加えて10倍に希釈し、濾過滅菌した後、当日中に使用。メタノール溶解液の保存期間は-20℃で6か月とする。

(iv) 各血清群コロニーの典型的色調

典型的な血清群0157は黒から灰色のコロニーを形成する。血清群026、045、0103、0111、0121及び0145は多様な色調のコロニーを形成する。

イ 直接塗抹法

直接塗抹法については増菌培養液10 µlをア(イ)で示した分離平板培地のi及びii又はiiiの酵素基質培地のいずれか1つについて各1枚ずつ計2枚に画線塗抹し36±1℃で18～24時間培養後、疑われるコロニーを分離する。なお、詳細はア(イ)免疫磁気ビーズ塗抹法に準拠して実施する。また、単一コロニーの出現には、増菌培養液を希釈したものを塗抹するなどの操作を必要に応じて行う。

(2) 血清型別試験

分離平板培地から血清群 026、045、0103、0111、0121、0145 又は 0157 と疑われるコロニーを釣菌し、普通寒天培地等にて $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 18～24 時間純培養する。アからキの血清群ごとに示した免疫血清又は抗体を感作したラテックスを使用した凝集試薬（これらと同等の免疫血清及びラテックス凝集試薬の使用も可能）を用いて、仕様書の試験方法を参照し血清型別試験を行う。なお、免疫血清を使用する場合には、生菌を用いた場合に誤判定となることがあるため、最終判定には加熱死菌を用いる。

ア 血清群 026

(ア) 病原大腸菌免疫血清 026 (デンカ生研)

(イ) E. coli 026-F「生研」(デンカ生研)

イ 血清群 045

(ア) 病原大腸菌免疫血清 045 (デンカ生研)

ウ 血清群 0103

(ア) 病原大腸菌免疫血清 0103 (デンカ生研)

エ 血清群 0111

(ア) 病原大腸菌免疫血清 0111 (デンカ生研)

(イ) E. coli 0111-F「生研」(デンカ生研)

オ 血清群 0121

(ア) 病原大腸菌免疫血清 0121 (デンカ生研)

カ 血清群 0145

(ア) 病原大腸菌免疫血清 0145 (デンカ生研)

キ 血清群 0157

(ア) 病原大腸菌免疫血清 0157 (デンカ生研)

(イ) 大腸菌 0157 検出試薬「UNI」(オキシイド製造；関東化学販売)

(ウ) E. coli 0157-F「生研」(デンカ生研)

(3) 生化学的性状試験

血清群 026、045、0103、0111、0121、0145 又は 0157 と疑われるコロニーについては、生化学的性状を確認する。TSI 寒天培地、LIM 培地、CLIG 培地、各種キット等から選択して使用できる。培地を使用する場合の培養条件は $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 18～24 時間である。

ア TSI 寒天培地 (日水製薬、栄研化学、メルク、オキシイド製造；関東化学販売等)

(ア) 基礎培地組成

ペプトン	20.0 g
肉エキス	3.0 g
酵母エキス	3.0 g

NaCl	5.0 g
乳糖	10.0 g
ショ糖	10.0 g
ブドウ糖	1.0 g
クエン酸鉄アンモニウム	0.2 g
チオ硫酸ナトリウム	0.2 g
フェノールレッド	0.024 g
寒天	12.0 g
精製水	1,000 ml
pH	7.4±0.2

(イ) 培地の調製

加温溶解後、小試験管に3ml ずつ分注し121℃で15分間滅菌後、斜面寒天（半高層）として使用する。市販品を使用してもよい。

(ウ) 大腸菌の発育性状

TSI 寒天培地での典型的な大腸菌は、高層部黄変、斜面部黄変、硫化水素非産生、ガス産生を示す。

イ LIM 培地（日水製薬、極東製薬工業、栄研化学等）

(ア) 基礎培地組成

ペプトン	12.8 g
酵母エキス	3.0 g
ブドウ糖	1.0 g
L-リジン塩酸塩	10.0 g
L-トリプトファン	0.5 g
ブロムクレゾールパープル	0.02 g
寒天	2.7 g
精製水	1,000 ml
pH	6.8±0.2

(イ) 培地の調製

加温溶解後、小試験管に約5ml ずつ分注し121℃で15分間滅菌後、急冷し高層培地とする。

(ウ) 大腸菌の発育性状

多くの大腸菌は、高層部紫色変、運動性陽性、インドール産生を示すが、高層部黄色変（血清群0111の多くの株）、運動性陰性など、非定型の性質を持つ場合もあることから、これらについても大腸菌の性状として検査する。

ウ CLIG 培地（極東製薬工業）

(ア) 基礎培地組成

カゼインペプトン	7.5 g
肉ペプトン	2.5 g
ラクトース	1.0 g
セロビオース	10.0 g
トリプトファン	0.1 g
MUG	0.02 g
NaCl	5.0 g
フェノールレッド	0.025 g
寒天	14.9 g
精製水	1,000 ml
pH	7.4±0.2

(イ) 培地の調製

加温溶解後、小試験管に約3ml ずつ分注し115℃で15分間滅菌後、斜面寒天（半高層）培地とする。

(ウ) 大腸菌の発育性状

典型的な血清群0157は、高層部黄変、斜面部赤変を示し、紫外線照射下で蛍光を示さない。

(4) 病原因子遺伝子 (*stx* 及び *eae*) 確認試験

血清群026、045、0103、0111、0121、0145 又は0157 と疑われるコロニーについては、病原因子遺伝子 (*stx* 及び *eae*) を1に示すスクリーニング検査法により確認する。

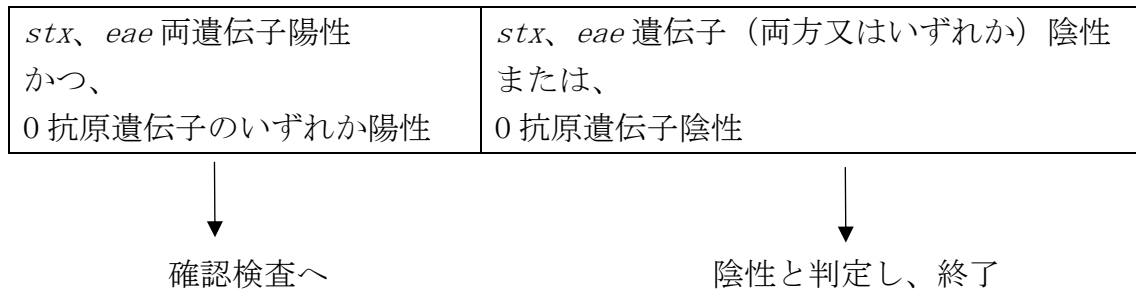
(5) 判定

最終的に腸管出血性大腸菌血清群026、045、0103、0111、0121、0145 又は0157 が分離されたことをもって、陽性と判定する。スクリーニング検査において陽性であったが、確認検査で血清群026、045、0103、0111、0121、0145 又は0157 の分離ができなかった場合は陰性とする。

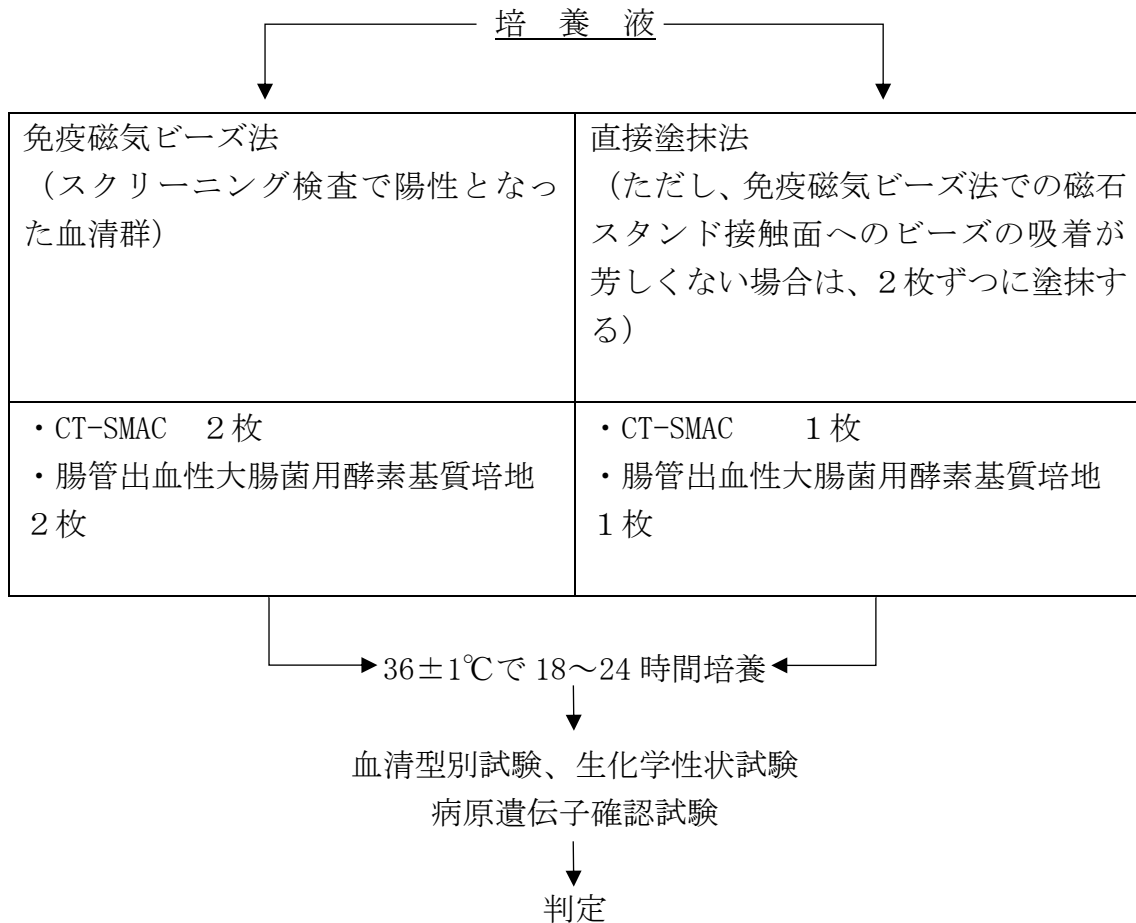
STEC 検査の流れ

○ スクリーニング検査

食品検体 + 培地 (各スクリーニング法に示される培地を使用))



○ 確認検査



血清型別試験

分離平板培地から血清群 026、045、0103、0111、0121、0145 又は 0157 と疑われるコロニーを釣菌し、普通寒天培地等にて純培養（36±1℃で 18～24 時間）する。凝集反応により、抗原を決定する。

生化学的性状試験

TSI：(典型的な大腸菌) 高層部黄変、斜面部黄変、硫化水素非産生、ガス産生

LIM：(典型的な大腸菌) 高層部紫色変、運動性陽性、インドール産生（非定型もある）

CLIG：(典型的な 0157) 高層部黄変、斜面部赤変、蛍光を示さない

病原因子遺伝子 (*stx* 及び *eae*) 確認試験

スクリーニング検査法：*stx*、*eae* 両遺伝子陽性

【判定】

・免疫ビーズ法及び直接塗抹法により培養されたコロニーを釣菌し、血清型別試験、生化学的性状試験、病原因子遺伝子 (*stx* 及び *eae*) 遺伝子検出により、腸管出血性大腸菌血清群 026、045、0103、0111、0121、0145 又は 0157 が分離されたことを確認した場合、陽性と判断する。