

食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
研究者 工藤 由起子

研究要旨 食品の検査において食中毒細菌等の有害細菌の検出には迅速性が求められているため、本研究では遺伝子増幅法における問題点と改善について検討を行った。さらに、食品の衛生指標として測定される一般生菌数の遺伝子手法を用いた系を検討した。

分担研究者

- (1) 栄研化学株式会社 池戸正成
- (2) 株式会社日清製粉グループ本社
田中啓子

A. 研究目的

食品の検査において食中毒細菌等の有害細菌の検出には迅速性が求められている。しかし、これら有害細菌の食品汚染は通常ごく少量の菌によることが多く、さらにその食品中には多数の一般細菌が存在する。このため、時間を要する増菌培養等の培養法が必須となる。しかし、現代では迅速性も重要になっているため、最小限の培養法の後に遺伝子検出や抗原検出などを用いた迅速方法を組み込むことが有用と考えられる。本研究では、食品の特性に即した効果的培養方法を検討し、さらに迅速性を求めるために近年開発された LAMP 法など遺伝子増幅法を含めた検出法を検討する。今年度は、食品培養液から PCR 法によって目的の食中毒細菌の検出を行う際に PCR に供する鋳型 DNA を精製することによる PCR 効率の上昇を検討した。また、粘度が高く脂質の多く含まれ遺伝子検出の比較的困難な液卵についてサルモネラを対象にして LAMP 法を検討した。また、遺伝子検出法において、試料中の遺伝子増幅阻害物質の影響を受けやすく、また反応に用いるサンプル量が少ないため検出感度を高めるために、試料中の細菌あるいは核酸を濃縮・抽出する必要がある。新規遺伝子増幅法の LAMP 法を用いて、大腸菌をモデルとして水検体からの目的細菌の濃

縮法の検討と、食中毒細菌であるカンピロバクターの遺伝子検出のための検体処理法の研究を行った。

さらに、食品の衛生の指標として一般生菌数が測定されるが、これは標準寒天培地を用いて 30℃ 48～72 時間、有酸素環境（好気性）にて培養して得られる微生物の総集落数を把握することとして国際的に広く支持されている。しかし、この方法の場合微生物の増殖をモニターする試験であるため、検査に要する時間が長いという欠点がある。惣菜などの腐敗し易い食品の場合、製造後可能な限り早く出荷する必要がある、食品に汚染する一般生菌数を迅速に検査する方法が広く求められている。そこで、本研究の分担として、一般生菌数を迅速に測定する新規な方法を開発することに焦点をあて、研究を行う事とした。

B. 研究方法

1. PCR に供する鋳型 DNA を精製の精製効果の検討

9 種類（サバ、タイ、ブリ、タラ、イカ、エビ、カキ、アサリ、ホタテ）の生鮮魚介類を購入し供試した。耐熱性溶血毒 *tdh* 遺伝子陽性腸炎ビブリオの菌株を、3% 食塩加普通ブイヨンにて、37℃ で 20 時間静置培養し、菌液とした。上記食品 10g にアルカリペプトン水（日水）90ml をストマッカー袋に加えて、手でストマッカー袋上からもみほぐした後に、37℃にて 5 時間培養したものを食品培養液とした。TDH 産生菌は、3% 食塩加 PBS を用いて 10^{-4} まで 10 倍階段希釈し、各濃度の菌液 100 μ l を各々食品培養液 1ml に接種した。これによって、各

種菌濃度の TDH 産生腸炎ビブリオを含む食品培養液を作製した。この食品培養液 1ml を 15,000×rpm で 10 分間遠心し、得られた沈澱に 200 μ l の滅菌水を加えて 100°C で 5 分間熱処理した。次いで、10,000×rpm で 10 分間遠心を行い、その上清を鋳型 DNA とした。DNA 精製法として、NucleoSpin Tissue (シリカメンブレンフィルター法)、High Pure™ PCR Template Preparation Kit (ガラスファイバーフィルター法)、MagExtractor-Genome- Nucleic Acid Purification Kit (磁性ビーズ法) の 3 種類を検討した。これらはいずれもキット化されており添付の説明書に従い操作を行った。PCR は Takara Ex Taq, プライマーおよび Takara 腸炎ビブリオ TDH 検出用 primer set を用いて行った。PCR 反応液は、5 μ l の鋳型 DNA 溶液、5 μ l の添付のバッファー、4 μ l の 2.5mM dNTP ミクスチュアールおよび 0.5 μ l の 20mM プライマーに滅菌精製水を加えて計 50 μ l とした。PCR は、熱変性 94°C 1 分、アニーリング 55°C 1 分、伸長 72°C 1 分を 31 サイクル繰り返す反応条件下で行った。アガロースゲル電気泳動法によって産物を泳動し、エチジウムブロマイド液染色を行った後、紫外線を照射して放出した蛍光によって増幅 DNA バンドを確認した。

2. サルモネラの液卵からの検出についての LAMP 法の検討

Salmonella Enteritidis を Buffered-peptone water (BPW, Oxoid, UK) にて 37°C 18 時間培養し、PBS にて 10⁻⁴—10⁻⁷ に希釈した。また、液卵 25ml を BPW 225ml に加え 37°C で 18 時間培養した。この液卵培養液 9 ml に各濃度の希釈菌液 1 ml を加え、これを LAMP 検体とした。DNA は LAMP 法で推奨されているアルカリ熱処理によって抽出を行った。サルモネラ属菌が特異的に保存している侵入遺伝子の *invA* を標的としてデザインされたプライマー (サルモネラプライマーセット、栄研化学) を使用した。試験は、鎖置換型 DNA ポリメラーゼである *Bst* DNA polymerase、プライマー、dNTPs、バッファーを含む反応溶液 20 μ l に、インターカレーター 0.125 μ l、検体 5 μ l を添加して 65°C の等温で 60 分間行った (ABI 7700, Applied Bio System, USA)。蛍光測定によって増幅産物量を測定した。また、比較のためにサルモネラ *invA* 検

出キット (Takara) を用いて PCR 法も行った。

3. 水検体からの大腸菌細胞の濃縮

LAMP 法での大腸菌検出感度は 60 colony forming unit (cfu)/test であり、試験あたりのサンプル添加量が 5 μ l であることから試料 1 ml あたりの検出限界菌量は 1.2×10⁴ cfu となる。滅菌蒸留水に大腸菌を 6~6×10⁷ cfu/ml になるよう 10 倍連続懸濁液を作成し、各々 1ml を 2000G, 3000G, 19,000G で 30 分間遠心し得られた沈澱を TE buffer 10 μ l に懸濁し、その 5 μ l を LAMP 法に供試した。あわせて未遠心の懸濁液も試験した。試験数は 2 回行った。一方、より簡易な遠心法として卓上簡易遠心機 (2000G) の使用を前提として、供沈のキャリアーとして DEAE sepharose (45~165 μ m)、Chelex-100 (70~150 μ m)、シリカゲル粒子、*Enterococcus faecalis* 菌体 (加熱死菌) を用いて効果を確認した。

4. カンピロバクターの遺伝子検出のための検体処理法

小野らの検出法で用いる Preston broth での増菌培養液を LAMP のサンプルとして、その処理法について検討を行った。Preston broth に *Campylobacter jejuni* の菌体を最終濃度 600cfu/test になるよう接種し、95°C、5 分間の熱処理後 LAMP 法により反応性の確認を行った。対照として TE buffer を用いた。また、鶏肉鶏肉をモデル試料として市販のモツ (腸)、皮、レバー、砂肝、モモ肉それぞれ 25g に Preston broth 100ml を添加し、ストマッカーで 1 分間ホモジナイズした培地に、*C. jejuni* を最終濃度 600cfu/test になるよう接種したものを LAMP サンプルとし、試料による影響を確認した。LAMP 反応の条件はいずれも 65°C で 60 分まで観察した。

5. 惣菜類の一般生菌として検出される細菌叢の解析

惣菜類から検討対象とすべきモデル食品を選定して、モデル食品から一般生菌数として検出される細菌叢を把握し、それらの食品中における増殖性を解析した。また、モデル食品から分離した各菌株について、市販の細菌類検出 PCR キット等を用いて食品からの定性検出が可能であるかを検討した。あわせて、食品中に存在する死菌由来 DNA による上記 PCR による生菌検出の阻害性を確認した。

(本研究には倫理面に配慮すべき検体等を研究対象に含まなかった。)

C. 研究成果

1. PCR に供する鋳型 DNA を精製の精製効果の検討

水産食品の種類によって熱処理での *tdh* 遺伝子の検出感度に大きな違いがあることが明らかとなった。本研究で用いた水産食品では検出感度の低い順に、カキ、サバ、タイ、ブリ、イカ、タラ、アサリ、エビ、ホタテとなり、カキとホタテの間では検出感度に約 2,000 倍の差が認められた。また、PCR の検出感度の低下は水産食品特有ではなく肉類においても認められることが判明した。野菜類については、検出感度の著しい低下は認められなかった。磁性ビーズ法、シリカメンブレンフィルター法、グラスファイバーフィルター法の 3 種類の DNA 精製法とも食品中からの *tdh* 遺伝子検出の改善が認められたが、特にグラスファイバーフィルター法で最も改善が認められた。

2. サルモネラの液卵からの検出についての LAMP 法の検討

液卵中の *S. Enteritidis* の検出について LAMP 法を検討した結果、操作自体に困難がなく十分に検査方法として使用可能であった。また、感度を検討した結果、1 テストチューブあたり 2.8cfu の菌数で検出が可能であった。PCR 法では 1 テストチューブあたり 28cfu の菌数では検出されたものの 2.8cfu は検出されなかった。この実験においては LAMP 法は PCR 法よりも高い感度であった。

3. 水検体からの大腸菌細胞の濃縮

未遠心の懸濁液は、 6×10^3 cfu/ml の菌量では 2 回のうち 1 回に増幅を認めたが、それより少ない 6, 600 cfu/ml の菌量では反応が認められなかった。遠心濃縮法では、2000G では 600 cfu/ml の懸濁液で 2 回のうち 1 回が反応し、6, 60 cfu/ml は反応しなかった。3000G と 19000G では 600 cfu/ml では反応したが 6, 60 cfu/ml は反応しなかった。

供沈キャリアーのうち、DEAE sepharose は 2000G、30 分の遠心ではペレットとして沈渣が回収できなかった。その他の 3 種のキャリアーは沈渣として得られ、検出菌量は 60 cfu/ml であった。しかし、Chlex-100 は遠心に用いたチューブ (1.5ml 容エッペンチューブ) との付着性

が悪く沈渣の回収が非常に困難であった。シリカゲル粒子での回収では LAMP 反応が 30 分ほど遅れる現象が見られた。

4. カンピロバクターの遺伝子検出のための検体処理法

Preston broth を 95°C、5 分間熱処理を行うと培地成分である血液がゲル化し、その後の試験が出来なくなるため、loopamp サルモネラで用いているアルカリ処理剤 (Ex-F) を用いた。Ex-F と Preston broth と 1:1 に混合することでゲル化することなく熱処理が可能になった。対照の TE buffer の場合、反応 30 分付近で増幅が認められたが、Ex-F 処理をした場合、それより 10 分程度速度が低下した。市販の鶏肉、モツ(腸)、皮、レバー、砂肝、モモ肉を使用した場合、皮、砂肝、モモ肉は Preston broth のみと同様の反応時間であったが、モツ(腸)は増幅時間が 15 分程度遅れ、レバーは 60 分の反応時間内では増幅を認めなかった。Ex-F 処理の影響については、Ex-F 添加、加熱処理後のサンプル 100 μ l に 10 μ l の 1M Tris-HCl (pH 7.0) を添加することで回避が可能となった。食材のうち、影響のあったモツ(腸)は Preston broth で 2 倍希釈することで影響が見られなくなったが、同様にレバーの影響が見られなくなるには 10 倍の希釈が必要であった。

5. 惣菜類の一般生菌として検出される細菌叢の解析

惣菜類から検討対象とすべきモデル食品を選定して、モデル食品から一般生菌数として検出される細菌叢を把握した。各モデル食品からは *Leuconostoc* 属、*Lactococcus* 属、*Lactobacillus* 属、*Pseudomonas* 属、*Pantoea* 属、*Staphylococcus* 属、*Micrococcus* 属等の細菌が検出されたが、モデル食品の種類によって細菌叢には特徴がみられ、*Leuconostoc* 属、*Lactococcus* 属等の乳酸菌を主体とするもの、*Pseudomonas* 属、*Pantoea* 属等のグラム陰性桿菌を主体とするものなど、各食品にはそれぞれ特有の細菌が存在していた。また、それらの細菌の 10°C、25°C の温度帯における食品中での増殖性を確認した。また、細菌ゲノムの 16S rRNA コードする遺伝子 (以降 16s-rDNA と呼ぶ) 領域をターゲットとするプライマーセットを用いた細菌検出 PCR キットが各種市販されていること

から、リアルタイム PCR による食品中の一般生菌数推定法構築のための予備検討として、これらのキットを用いた通常の PCR による細菌の検出を試みた。モデル食品より分離した各種細菌から DNA を抽出して、PCR による各細菌の定性検出・定量検出を検討した。あわせて、食品中に存在する加工過程で死滅した細菌由来の DNA による、上記 PCR における生菌検出の阻害性を確認した。さらに、細菌ゲノムの 16s-rDNA 領域および他領域をターゲットとするプライマーセットを新規に設計して、食品の細菌叢を構成する細菌類の検出に適したプライマーセットの選抜を試みた。また、リアルタイム PCR の条件設定のための検討を実施した。

D. 考察

食品の一例として生鮮魚介類を対象にし、また生鮮魚介類の汚染で知られている腸炎ビブリオとくに TDH 陽性腸炎ビブリオを組み合わせて、遺伝子増幅法方法としての PCR 法の問題点について検討した。その結果、生鮮魚介類の種類によって *tdh* 遺伝子の検出感度に大きな差があることが判明した。そしてこれは水産食品特有の現象ではなく肉類にも認められたことから、他の食品でも同様に問題が有ることが分かった。また、熱処理による DNA 抽出法のみを用いた場合よりも DNA 精製法と組み合わせることによって *tdh* 遺伝子の検出感度が大きく改善されることが本研究によって明らかになった。また、粘度が高く脂質も多く含まれることから遺伝子検出が効率的に行えないことが考えられる液卵について LAMP 法について検討した。対象は液卵の衛生で問題となっている *S. Enteritidis* とした。その結果、PCR 法と比較して感度が高かった。このことから他の遺伝子検出が困難とされる食品についても LAMP 法を試みる価値があると考えられた。

また、LAMP においては、検査材料から増菌培養をすることなく目的とする細菌を検出する場合や、選択培養により十分に増菌効果が得られない場合、検出効果を高めるには菌体あるいは核酸が効果的である。遠心により菌体を濃縮するには高速冷却遠心機が必要であり、また核酸の濃縮には専用のデバイスが必要で、日常の衛生管理での適用は困難である。この事業では、遺伝子実験で汎用される

卓上の簡易遠心機を用いた菌体の濃縮を試みた。試料の直接の遠心では期待できる効果が得られなかったが、供沈させるキャリアーを用いることで約 100 倍の感度を得ることが出来た。キャリアーとして検討に用いた DEAE sepharose (45~165 μ m)、Chelex-100 (70~150 μ m)、シリカゲル粒子、*Enterococcus faecalis* 菌体(加熱死菌)のうち、*E. faecalis* 菌体が最も操作性が良く効果も高かった。カンピロバクター検出に用いられる Preston broth は培地組成として用いられている溶血液が加熱により凝固しその後の試験に支障が見られた。この回避にはアルカリによるタンパクの加水分解が効果的であったが、試料の pH 上昇により LAMP 反応に影響が見られた。アルカリ処理試薬の Ex-F は、LAMP 法を用いたサルモネラやペロ毒素検出の際に用いられ、これらの項目では影響は少ないもののカンピロバクターの系では反応の遅延が見られた。しかし、再度 pH を修正することで影響を回避することが可能であった。材料由来の影響は、今回用いた 5 種類の鶏部位のうちモツ(腸)、レバーが反応に影響した。レバーの影響は胆汁成分が原因と推測しているが、使用する培地を希釈し材料の持ち込み量を減らすことで回避できることがわかった。

さらに、惣菜の細菌叢の解析によって、汚染するおおよその菌叢が確認された。これら菌叢を衛生指標菌として、これら菌に共通し保有される遺伝子種を検索したところ、16s-rDNA が選定された。16s-rDNA は様々な細菌において普遍的に保有される遺伝子であるが、その配列は細菌種によりバリエーションが存在する。しかし、その部分構造は共通な領域があり、細菌種の同定の為にそれら領域を Primer にした PCR を行い、その配列確認する方法が用いられている。本研究では、この領域に焦点をあて、上記衛生指標菌で遺伝子が増幅されることを確認した。次年度はこの領域を用いた PCR の定量法確立を中心に研究を進める予定である。

E. 結論

生鮮魚介類と腸炎ビブリオの組み合わせについて遺伝子増幅法である PCR による検出を行い、その際に供試する鋳型 DNA の精製について検出改善効果を検討

した。その結果、用いた3種類のいずれも精製キットについても効果が認められた。また、他の食品や食中毒菌についても効果があると思われた。さらに、近年開発された LAMP 法についても液卵とサルモネラの組み合わせについて検討したところ、高い検出感度で有ることが判明し応用の価値が示された。また、水検体からの大腸菌細胞の濃縮は、汎用されている卓上簡易遠心機を用い、*Enterococcus faecalis* 菌体(加熱死菌)を供沈させるキャリアーとして用いるのが操作性が良く効果も高かった。カンピロバクターの遺伝子検出のための検体処理法として、アルカリ熱処理が効果的であったが、反応時間の遅延が見られた。この影響は pH の修正により回避できた。モツ(腸)、レバーを試料とした場合、増幅反応に影響が見られたが、その回避には希釈が必要であった。さらに、惣菜類のうちモデル食品として、ほうれん草白和え、カット野菜(玉ねぎ、キャベツ、キュウリ)を選定し、これらモデル食材に汚染する細菌類の菌叢を確認した。その結果 *Leuconostoc* 属、*Lactococcus* 属、*Lactobacillus* 属、*Pseudomonas* 属、*Pantoea* 属、*Staphylococcus* 属、*Micrococcus* 属等の細菌が確認された。これら細菌を衛生指標菌とし、16s-rDNA 領域の PCR を行い、いずれの菌においても標的遺伝子が増幅されることを確認した。これらの実験結果から、これら衛生指標菌に関する限り、PCR 法、あるいは PCR 法の基本原理を応用した方法により、細菌数を定量する方法が確立できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Hara-Kudo, Y., Kobayashi, A., Sugita-Konishi, Y., Kondo, K. Antibacterial activity of plants used in cocking for aroma and taste. *J. Food Prot.* 67: 2820-2824, 2004.
- Kobayashi, K., Hattori M., Hara-Kudo, Y., Okubo, T., Yamamoto, S., Sugita-Konishi, Y. Glycopeptide derived from hen egg ovomucin has the ability to bind enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Agri. Food Chem.* 52:5740-5746, 2004.

Hara-Kudo, Y., Yamasaki, A., Sasaki, M., Okubo, T., Minai, Y., Haga, M., Kondo, K., and Sugita-Konishi, Y. Antibacterial activity of green tea catechin for bacterial spore. *J. Sci. Food Agri. in press.*

Hara-Kudo, Y., Segawa, Y. and Kimura, K. Sanitation of seawater effluent from seaweed processing plants using a photo-catalytic TiO₂ oxidation. *Chemosphere. in press.*

H. Hayashidani, Y. Hara-Kudo, S. Kinoshita, K. Saeki, A. T. Okatani, Y. Nomura, and S. Kumagai. Differences in heat resistance among pathogenic *Yersinia enterocolitica* serovars. *J. Food Prot. in press.*

2. 学会発表

- 工藤由起子、山田加奈子、松寄洋輔、吉川邦衛、林谷秀樹、熊谷進. 腸炎ビブリオの挙動解析に有用な指標菌の検索. 日本食品衛生学会第 87 回学術講演会. 平成 16 年 5 月、東京.
- 工藤由起子. 液卵等によるサルモネラ食中毒について. 平成 16 年度食品安全行政講習会、平成 16 年 6 月、東京.
- 工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 O157 の発芽野菜における研究. 第 25 回日本食品微生物学会. 平成 16 年 9 月、東京.
- 大塚佳代子、柳川敬子、高鳥浩介、工藤由起子. LAMP 法による液卵からのサルモネラ検出および分離菌株の細菌学的解析. 第 24 回日本食品微生物学会. 平成 16 年 9 月、東京.
- 工藤由起子、高鳥浩介. 流通液卵の細菌学的解析と液卵に関連するサルモネラ食中毒について. 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会. 平成 16 年 11 月、広島.
- 工藤由起子. 海産物における腸炎ビブリオ汚染と制御. 日本食品微生物学会学術セミナー. 平成 16 年 11 月. 静岡.
- 大塚佳代子、田中成幸、柳川敬子、工藤由起子、高鳥浩介. 食品および牛枝肉の腸管出血性大腸菌 O157 検査における LAMP 法の評価. 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会. 平成 16 年 11 月、広島.

尾上洋一、工藤由起子、中川 弘、高橋淳子、高鳥浩介。小規模液卵製造工程のモニタリングによる微生物学的問題点とその改善について。日本食品衛生学会第88回学術講演会。平成16年11月、広島。

古川一郎、尾上洋一、工藤由起子、高鳥浩介。液卵による製造および加工施設内汚染を想定した *Salmonella* Enteritidis の生残性。日本食品衛生学会第88回学術講演会。平成16年11月、広島。

高橋肇、宮坂次郎、工藤由起子、熊谷進、小沼博隆。ToxR 遺伝子を標的とした Real-Time PCR 法による *Vibrio vulnificus* の定量法。日本食品衛生学会第88回学術講演会。平成16年11月、広島。

瀬川優子、工藤由起子、木村邦夫。光触媒を用いたノリ加工廃水の浄化・再生に関する研究。日本食品衛生学会第88回学術講演会。平成16年11月、広島。

杉山明、矢野拓弥、中野陽子、赤地重宏、岩出義人、山内昭則、巽俊彰、伊藤英雄、工藤由起子、高鳥浩介。養鶏場、食鳥処理場の施設及び鶏、卵等の *Salmonella* sp. 汚染状況。日本食品衛生学会第88回学術講演会。平成16年11月、広島。

工藤由起子。卵および液卵のサルモネラ汚染について。広島食品微生物研究会第5回衛生管理技術情報研修会。平成17年3月。広島。

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし