

表 7a. 赤痢国内発生例一覧 (2006 年 4 月～2007 年 3 月)

| 都道府県 | 報告年月日 | 患者類型 | 性別 | 診断時年齢 | 菌種 | 備考 |
|------|----------|------|----|-------|----------|--------------|
| 青森 | 20060904 | 患者 | 女 | 92 歳 | flexneri | - |
| 青森 | 20060905 | 疑似症 | 女 | 68 歳 | 臨床決定 | - |
| 青森 | 20060906 | 患者 | 女 | 53 歳 | flexneri | - |
| 宮城 | 20060915 | 患者 | 女 | 76 歳 | sonnei | 不明 |
| 宮城 | 20060929 | 患者 | 男 | 67 歳 | sonnei | 接触(婿モンゴルに渡航) |
| 宮城 | 20061002 | 患者 | 女 | 41 歳 | sonnei | 接触(父) |
| 宮城 | 20061029 | 患者 | 女 | 81 歳 | flexneri | 患者 A、いか塩辛? |
| 宮城 | 20061101 | 患者 | 男 | 82 歳 | flexneri | 患者 A 家族 |
| 宮城 | 20061101 | 無症状 | 女 | 54 歳 | flexneri | 患者 A 家族 |
| 山形 | 20060424 | 患者 | 女 | 72 歳 | flexneri | 不明 |
| 山形 | 20070307 | 患者 | 女 | 64 歳 | flexneri | 不明 |
| 山形 | 20070312 | 無症状 | 男 | 40 歳 | flexneri | 別居の母 |
| 福島 | 20070215 | 患者 | 男 | 74 歳 | flexneri | 白子? |
| 茨城 | 20061002 | 患者 | 女 | 38 歳 | sonnei | - |
| 埼玉 | 20060825 | 患者 | 女 | 7 歳 | sonnei | - |
| 千葉 | 20060825 | 患者 | 女 | 27 歳 | sonnei | - |
| 千葉 | 20060427 | 患者 | 男 | 23 歳 | sonnei | 不明 |
| 千葉 | 20060430 | 疑似症 | 女 | 22 歳 | 臨床決定 | 鶏ささみ? |
| 千葉 | 20061221 | 患者 | 女 | 5 歳 | sonnei | 豚肉すき焼き? |
| 千葉 | 20061013 | 患者 | 男 | 51 歳 | sonnei | - |
| 千葉 | 20060417 | 無症状 | 男 | 24 歳 | flexneri | 不明 |
| 千葉 | 20061226 | 患者 | 女 | 42 歳 | sonnei | - |
| 千葉 | 20061226 | 患者 | 女 | 7 歳 | sonnei | - |
| 千葉 | 20060405 | 患者 | 女 | 67 歳 | sonnei | - |
| 東京 | 20060415 | 無症状 | 男 | 58 歳 | flexneri | 不明 |
| 東京 | 20060908 | 患者 | 女 | 3 歳 | sonnei | 患者 B、不明 |
| 東京 | 20060913 | 無症状 | 女 | 27 歳 | sonnei | 患者 B 家族 |
| 東京 | 20060914 | 無症状 | 女 | 5 歳 | sonnei | 患者 B 家族 |
| 東京 | 20061016 | 患者 | 男 | 35 歳 | sonnei | 鈴鹿サーキット |
| 東京 | 20061020 | 患者 | 男 | 39 歳 | sonnei | 鈴鹿サーキット |
| 東京 | 20070314 | 患者 | 男 | 27 歳 | sonnei | - |
| 東京 | 20060401 | 患者 | 女 | 64 歳 | sonnei | - |
| 東京 | 20061017 | 患者 | 男 | 32 歳 | sonnei | 鈴鹿サーキット |
| 東京 | 20061023 | 患者 | 男 | 47 歳 | flexneri | 不明 |
| 東京 | 20061013 | 患者 | 男 | 30 歳 | sonnei | 鈴鹿サーキット |
| 東京 | 20070203 | 患者 | 男 | 55 歳 | flexneri | 不明 |
| 東京 | 20060412 | 患者 | 女 | 73 歳 | flexneri | 不明 |
| 神奈川 | 20060905 | 患者 | 女 | 54 歳 | sonnei | 夫 |
| 神奈川 | 20070124 | 患者 | 女 | 33 歳 | 不明 | 不明 |
| 神奈川 | 20061113 | 患者 | 女 | 38 歳 | sonnei | 不明 |
| 神奈川 | 20060811 | 患者 | 男 | 10 歳 | sonnei | 焼き肉 |
| 神奈川 | 20060821 | 患者 | 女 | 65 歳 | sonnei | 娘 |
| 神奈川 | 20061211 | 患者 | 男 | 7 歳 | sonnei | 不明 |
| 神奈川 | 20061213 | 無症状 | 男 | 3 歳 | sonnei | 弟 |
| 富山 | 20060518 | 患者 | 女 | 55 歳 | flexneri | - |
| 石川 | 20060923 | 患者 | 男 | 28 歳 | sonnei | 寿司店 |
| 石川 | 20060925 | 無症状 | 男 | 20 歳 | sonnei | 寿司店 |
| 石川 | 20060924 | 患者 | 男 | 53 歳 | sonnei | 寿司店 |
| 石川 | 20060923 | 患者 | 男 | 44 歳 | sonnei | 寿司店 |

| | | | | | | |
|----|----------|-----|---|------|----------|-------|
| 石川 | 20060924 | 患者 | 女 | 20 歳 | sonnei | 寿司店 |
| 石川 | 20060924 | 患者 | 男 | 48 歳 | sonnei | 寿司店 |
| 石川 | 20060922 | 患者 | 男 | 40 歳 | sonnei | 寿司店 |
| 石川 | 20060922 | 患者 | 男 | 14 歳 | sonnei | 寿司店 |
| 石川 | 20060922 | 患者 | 女 | 8 歳 | sonnei | 寿司店 |
| 石川 | 20060922 | 患者 | 男 | 12 歳 | sonnei | 寿司店 |
| 石川 | 20060927 | 患者 | 男 | 29 歳 | sonnei | 寿司店 |
| 石川 | 20060927 | 患者 | 男 | 55 歳 | sonnei | 寿司店 |
| 石川 | 20061005 | 患者 | 女 | 18 歳 | flexneri | |
| 山梨 | 20070105 | 疑似症 | 女 | 66 歳 | flexneri | - |
| 愛知 | 20060629 | 患者 | 女 | 71 歳 | flexneri | B 寿司店 |
| 愛知 | 20060623 | 患者 | 女 | 53 歳 | sonnei | 不明 |
| 愛知 | 20061227 | 患者 | 男 | 69 歳 | sonnei | 不明 |
| 愛知 | 20061016 | 患者 | 男 | 29 歳 | sonnei | 不明 |
| 愛知 | 20070107 | 患者 | 女 | 20 歳 | sonnei | 不明 |
| 愛知 | 20060909 | 患者 | 女 | 24 歳 | sonnei | - |
| 愛知 | 20060912 | 患者 | 女 | 46 歳 | sonnei | - |
| 愛知 | 20070309 | 患者 | 男 | 15 歳 | sonnei | 不明 |
| 愛知 | 20070313 | 患者 | 男 | 58 歳 | sonnei | 不明 |
| 愛知 | 20070313 | 患者 | 男 | 28 歳 | sonnei | 不明 |
| 愛知 | 20060512 | 患者 | 男 | 76 歳 | flexneri | 不明 |
| 愛知 | 20060518 | 患者 | 女 | 55 歳 | flexneri | 不明 |
| 愛知 | 20060714 | 患者 | 男 | 36 歳 | sonnei | 不明 |
| 大阪 | 20061026 | 患者 | 男 | 3 歳 | sonnei | 保育園児 |
| 大阪 | 20061027 | 患者 | 男 | 3 歳 | sonnei | 保育園児 |
| 大阪 | 20061027 | 患者 | 女 | 4 歳 | sonnei | 保育園児 |
| 大阪 | 20061029 | 患者 | 男 | 3 歳 | sonnei | 保育園児 |
| 大阪 | 20061029 | 患者 | 男 | 3 歳 | sonnei | 保育園児 |
| 大阪 | 20061029 | 患者 | 男 | 3 歳 | sonnei | 保育園児 |
| 大阪 | 20061029 | 患者 | 女 | 4 歳 | sonnei | 保育園児 |
| 大阪 | 20061029 | 患者 | 男 | 5 歳 | sonnei | 保育園児 |
| 大阪 | 20061029 | 患者 | 女 | 1 歳 | sonnei | 保育園児 |
| 大阪 | 20061031 | 疑似症 | 女 | 2 歳 | 臨床決定 | 保育園児 |
| 大阪 | 20061031 | 患者 | 女 | 30 歳 | sonnei | 保育園関連 |
| 大阪 | 20061101 | 患者 | 男 | 1 歳 | sonnei | 保育園児 |
| 大阪 | 20061108 | 患者 | 女 | 24 歳 | sonnei | 保育園関連 |
| 大阪 | 20061107 | 患者 | 男 | 31 歳 | sonnei | 保育園関連 |
| 大阪 | 20070228 | 患者 | 女 | 42 歳 | flexneri | 不明 |
| 大阪 | 20060823 | 患者 | 女 | 24 歳 | boydii | - |
| 大阪 | 20061026 | 患者 | 男 | 62 歳 | flexneri | 生イカ? |
| 大阪 | 20070109 | 患者 | 女 | 4 歳 | sonnei | 父、兄 |
| 大阪 | 20060526 | 患者 | 女 | 39 歳 | sonnei | 不明 |
| 兵庫 | 20060627 | 患者 | 男 | 43 歳 | flexneri | - |
| 兵庫 | 20060629 | 患者 | 男 | 7 歳 | sonnei | 母? |
| 兵庫 | 20060623 | 患者 | 女 | 4 歳 | flexneri | 不明 |
| 鳥取 | 20060929 | 患者 | 男 | 14 歳 | flexneri | 不明 |
| 鳥取 | 20061007 | 患者 | 男 | 11 歳 | flexneri | 兄 |
| 高知 | 20060602 | 無症状 | 男 | 24 歳 | flexneri | - |

表 7b. 九州・山口地区赤痢国内発生例一覧 (2006年4月～2007年3月)

| | | | | | | |
|----|----------|-----|---|-----|--------|---------------------------------------|
| 山口 | 20060821 | 患者 | 女 | 27歳 | sonnei | 不明 入院地と居住地が異なる |
| 福岡 | 20060609 | 疑似症 | 男 | 1歳 | 臨床決定 | 不明、boydiiとして届出 調査開始前、疑似症から 取り消し |
| 福岡 | 20061222 | 患者 | 女 | 2歳 | sonnei | 兄 標準調査票を使用 |
| 熊本 | 20060722 | 患者 | 男 | 64歳 | sonnei | 標準調査票を使用 |
| 熊本 | 20060822 | 患者 | 女 | 44歳 | sonnei | 幕の内? 標準調査票を使用 |
| 沖縄 | 20060929 | 患者 | 男 | 28歳 | sonnei | 時間不足による態勢不備 |

表8. 邦文論文に掲載された我が国における2類感染症の推定原因食品

| 年月 | 原因菌 | 場所 | 施設 | 共通食・推定 | 患者 | 備考 | 出典 |
|---------|----------------------|---------|------|--------------|------|----------------------|--|
| 1959.5 | Shigella B 3 | ? | 工場寮 | 小カブの浅漬け | 163 | 肥料にし尿 | 産業医学ジャーナル 28:78 |
| 1983.6 | S. sonnei | 大阪市 | 病院 | 弁当、サラダ | 44 | | 日本の感染性腸炎 59 |
| 1983.9 | S.flexineri 3a | 広島市 | 韓国旅行 | 土産キムチ | 2 | | 日本の感染性腸炎 62 |
| 1992.8 | S. sonnei | 東京 | | 生鮮魚介類(赤貝) | 4 家族 | 3 区 1 町 | 感染症学誌 67:1183 |
| 1998.5 | S. sonnei | 長崎市 | 大学 | 水道 | 821 | 消毒故障 | 日本公衆衛生誌 48:903 |
| 1999.11 | S. flexineri 2a, 3a, | 福岡市・北九州 | | | | | 福岡市保健研報 |
| -2000.1 | S. dysenteriae 2 | 市・長崎市 | | 輸入冷凍魚介類 | | | (2000)25:123、日本小児 科学会雑誌 105:1111 |
| 2001.11 | S. sonnei | 全国 | | 韓国産生牡蠣 | 160 | 牡蠣からの菌分離、 輸入中止 | 食品衛生研究 52:35 |
| -2002.1 | | | | | | | |
| 2002.1 | S. sonnei | 千葉県 | 保育所 | 手洗いで蔓延 | 42 | 初発不明 | 小児科 43:1105 |
| 2002.3 | S. sonnei | 山形県 | 小学校 | 調理実習 | 17 | | IASR 23:146 |
| 2002.5 | S.flexineri 3a | 岐阜県 | 飲食店 | 食事・サンドイッチ | 19 | 感染従業員が下準備 | 岐阜県保健環境研究所 報 11:27 |
| 2002.7 | V. cholerae O1 | 千葉県 | 飲食店 | 会席料理 | 8 | | 食中毒発生状況 Medical Technology32:230 |
| 2002.7- | V. cholerae O1 | 1都3県 | | 刺身等生の魚介類 | 15 | | |
| 2002.8 | | | | | | | |
| 2003.9 | S. flexineri 2b | 豊田市 | 飲食店 | 寿司 9/27-8 | 10 | 調理従事者からの2 次汚染の可能性 | IASR25:153 |
| 2004.5 | S. sonnei | 栃木県 | 飲食店 | マグロ・イカ | 14 | | IASR27:64 |
| 2004.8 | S. sonnei | 多県 | 航空機 | 機内食サラダ(にんじん) | 17 | ハワイからの航空機 | IASR25:338 |

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

食品由来の2類感染症のリスクアセスメントモデル構築
に関する研究（H17-新興-13）

食品における赤痢菌検出法の標準化と感度の向上

牧野壮一

国立大学法人帯広畜産大学・大動物特殊疾病研究センター・教授

研究協力者；

川本恵子（国立大学法人帯広畜産大学・大動物特殊疾病研究センター・助教授）

門田修子（国立大学法人帯広畜産大学・大動物特殊疾病研究センター・大学院生）

武士甲一（国立大学法人帯広畜産大学・畜産学部・教授）

研究要旨 赤痢菌は、グラム陰性桿菌で細菌性赤痢の原因菌であり二類感染症の1つに指定されている。細菌性赤痢は海外で感染した後、国内に持ち込まれるいわゆる輸入感染症による事例が多かったが、近年では国内感染例が増加傾向にある。その原因は汚染食品の摂食による食品媒介感染と考えられており、発症菌数が10個以下と極めて少ないことから、食品からの迅速かつ正確な赤痢菌の検出法を確立することは、食品食の安全確保上非常に重要である。

本研究では、食品からの赤痢菌検出法の標準化を図り、感度の向上を目指した。食品中の赤痢菌の検出法については、2001年に西日本で韓国産輸入カキが原因で細菌性赤痢が発生したとき、厚生労働省により参考試験法が示された。初年度においては、この参考法に変更を加え、検出感度に優れかつ迅速に結果が得られる試験法を考案し、1個以上の赤痢菌が試料中に存在すれば、24時間以内に検出を可能とするシステムを構築した。今年度においては、海外産のカキについて本試験法の有用性を国内産を含めて確認したが、すべて陰性であった。しかし、赤痢菌のヒトに対する発症菌数は著しく低いという観点から、本菌が食品中でVBNCのように培養不可能な状態になる可能性について検討し、赤痢菌もある条件下でVBNCに移行することが確認された。

A. 研究目的

現在、食中毒発生時において汚染食品が特定された事例は、全体の約3割と非常に低い。それには様々な理由が挙げられるが、疫学調査の困難さに加え、簡便で正確な検出法がないこと及び生きていない細菌の存在が検出を困難にしている場合も考えられる。このため、従来の微生物学的検出法に加え、より検出感度と簡易・迅速性に優れた新たな検出法の開発が求められている。

これまで細菌性赤痢感染症は、海外で食品や飲料水を介して感染するいわゆる輸入感染症がほとんどであったが、近年では発展途上国などへの渡航歴のないにもかかわらず、国内での感染例が増加傾向にある。その感染源として汚染食品が考えられており、実際に2001年には西日本で韓国産輸入カキが原因となって細菌性赤痢が発生した。

本菌は、腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌で、細菌性赤痢の原因菌である。「感

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」で二類感染症に指定されている。大腸菌との DNA 間の相同性は 85%以上と非常に高く、同一菌種内に含まれる値であるが、医学細菌上の重要な病原体として位置付けられているため、大腸菌属から独立している。ヒトにおける発症菌数が 10 個以下と少ないため、食品からの迅速かつ正確な赤痢菌の検出法の確立は、食品の安全確保の上で非常に重要である。本研究では、食品から赤痢菌を検出する方法を確立し、その標準化と感度の向上を図ることを目的とした。

初年度においては、輸入カキを原因とする細菌性赤痢が発生した際、2001 年に厚生労働省が各都道府県に配布した参考試験法を基本とし、これに変更を加えた方法を新規検出法として食品からの赤痢菌検出法を考案した。本年度においては、この方法を実際の検体に応用し、その有用性について確認を行った。

また、サルモネラ属菌や EHEC O157 は食品中で容易に“生きているが培養できない状態(VBNC)”に変化することが知られており、このような状態は見かけ上菌数が少なく検出されるが、実際は病気を起こす能力を保持している。VBNC 状態に入った細菌は、現在の検査法では検出が困難であり、食品衛生上大きな問題になると考えられており、特に発症菌数が少ないと考えられている赤痢菌の場合はさらに深刻であると推察される。そこで、本年度は赤痢菌が VBNC 状態に入り込む可能性の有無について検討し、その蘇生法の基礎資料を得ることを目的として実験を行った。

B. 研究方法

1. 使用菌株および培地

当研究室の保管株である *Shigella flexneri* YSH6000 を Trypticase-Soy Broth (TSB, Becton Dickinson)にて一晚培養し、滅菌生理食塩水で希釈して使用した。分離用の固形培地については Trypticase-Soy Agar (TSA)を使用した。

2. 赤痢菌検出法

図 1 に本研究で用いた検出法と厚生労働省配布の参考試験法の相違点を示す。試料として市販のカキを用い、25 g を試料量とした。滅菌済みのストマッカー用袋に試料とシゲラブロス[OXOID 社、0.5 µg/ml ノボビオシン (DIFCO) と Tween 80 (関東化学) を 0.75 ml 添加] 225 ml を入れ、ストマッカー (AES Labotire) により 30 秒間ストマッキングした。本乳剤を 5 袋用意し、 10^3 、 10^5 、 10^7 、 10^8 倍に希釈した菌液を各々乳剤に接種し、袋にガス抜き用の穴を数箇所開けた後、シールして 44°C で一晚培養した。なお、赤痢菌非接種の乳剤を陰性対照として用いた。

各培養液 2 ml づつを採取し、添付のマニュアルに従ってキット (MORA-EXTRACT DNA 抽出キット、極東製薬) を用いてゲノム DNA を抽出した。プライマーについては、赤痢菌および腸管侵入性大腸菌病原因子遺伝子の検出用プライマーである *invG*、*ipaH*、16S rDNA (タカラバイオ) を使用し、ライトサイクラー (Roche) にてリアルタイム PCR を行った。PCR の条件を Table 1 に示す。増幅反応終了後は 1%アガロースゲルにて電気泳動を行い、PCR 産物の有無とそのサイズを確認した。

3. VBNC への誘導実験

保存株を TSB にて一晚培養後、遠心し、洗浄して得られたペレットを滅菌済みの 3%、7%、13% NaCl 溶液に各々懸濁し、37°C にて静置培養した。培養後、各菌液を TSA にプレーティングして培養能を試みる一方、*BacLight* 染色を行ってその生存率を観察した。

C. 研究結果

1. 新規検出法による赤痢菌検出

国内で赤痢菌の検出は困難であると考え、タイ国バンコク市内で市販されているエビ 45 検体およびカキ 40 検体の合計 85 検体を用い、新規に考案した方法にしたがって検査を行った。その結果、培養法においては赤痢菌陽集落は検出できなかった。そこで、図 1 に示した方法により PCR による検出を試みたが、全て陰性であった。

2. 赤痢菌の VBNC への移行について

赤痢菌を 3%、7%、13% NaCl 溶液に浮遊し、37°C で静置培養を行った結果、7% および 13% NaCl 溶液中では 5 日後に TSA 上での集落形成が確認できなかった (図 2)。一方、3% 溶液中では 6 日後に集落が確認できなかった。また、顕微鏡にて観察すると、6 日後において約 40~50% の生存率であり、赤痢菌も VBNC に移行することが示された。

D. 考察

今回、われわれはカキを試験品とし、厚生労働省から示された参考試験法を改良した試験法により、実際に汚染の可能性のある水産物を検査対象として実用試験を行った。本年度においては、タイ国産のカキとエビについて現地での検査を行い、その結果、カキからは腸炎ビブリオが、また、エビからはサルモネラ菌属の汚染が検出されたが、赤痢菌については従来からの検査法および今回考案された改良法のいずれの試験法においても検出されなかった。このことから、タイ国産のこれら水産物には赤痢菌による汚染はなかったものと推察された。日本国内で流通する食品から赤痢菌が分離される可能性は極めて低いので、今後は輸入冷凍食品について検証することが必要であると考えられ、また、さらに細菌性赤痢の発生が多い国において、本試験法を現地での検証が必要であると考えられた。

サルモネラ属菌や EHEC O157 は、食品中で容易に VBNC に移行することが報告されており、今回、赤痢菌においても同様な現象が起きることが確認された。発症菌量が著しく低い赤痢菌の場合、VBNC 状態で食品を汚染すると、原因食材の特定は著しく困難となる。本研究により VBNC に赤痢菌が移行することが確認されたので、この VBNC の効率的かつ迅速な蘇生法の確立が今後の検討課題となる。サルモネラの蘇生因子として Rpf 蛋白が同定されており、その蘇生法が確立されているので、サルモ

ネラについては、Rpf 蛋白による蘇生効果についてさらに検証を行い、検出感度を上げる必要があると考える。また、他の病原菌においても同様の現象が確認されているので、赤痢菌の VBNC についても同様な対応が必要であると考えられる。

E. 結論

赤痢菌は発症菌数が著しく低いので、食品からの迅速かつ正確な赤痢菌検出法の確立は、食品の安全確保の上で非常に重要である。本年度においては新規に考案された検査法により、タイ国産の水産物を検査対象として実用試験を試みた。考案された試験法の実用性を検討するためには、今後、汚染率の高い地域における現地での検査およびわが国へ輸入される冷凍食品を検査対象として幅広く検査を実施する必要がある。また、赤痢菌は容易に VBNC に移行することが確認されたので、その蘇生法を早期に確立して検査法に応用する必要がある。

F. 健康危険情報

特に無い。

G. 研究発表

1. Sou-ichi Makino. Resuscitation of the viable but non-culturable (VBNC) state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella* Typhimurium strain LT2. In 10th International Symposium on Toxic Microorganisms-Meeting the Challenges of Toxic Microorganisms and Pathogens: Implications for Food Safety and Public Health-. Washington, DC (2006 年 11 月 7-9 日)

H. 特許出願状況

特にない

図1. 赤痢菌の迅速検出法

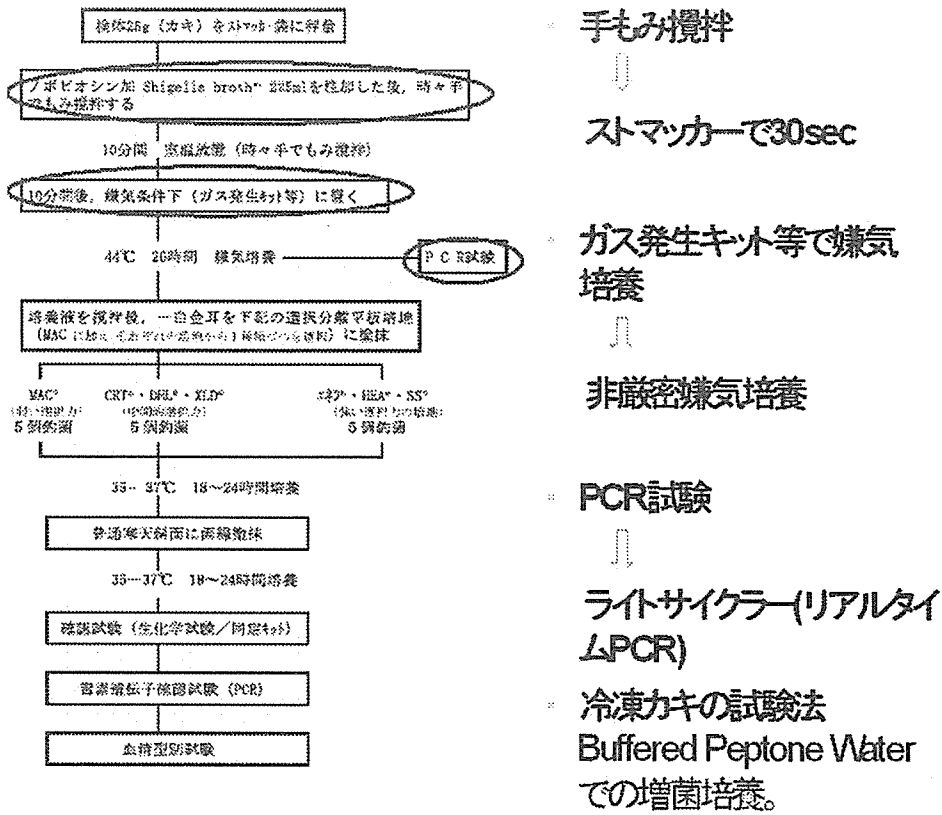
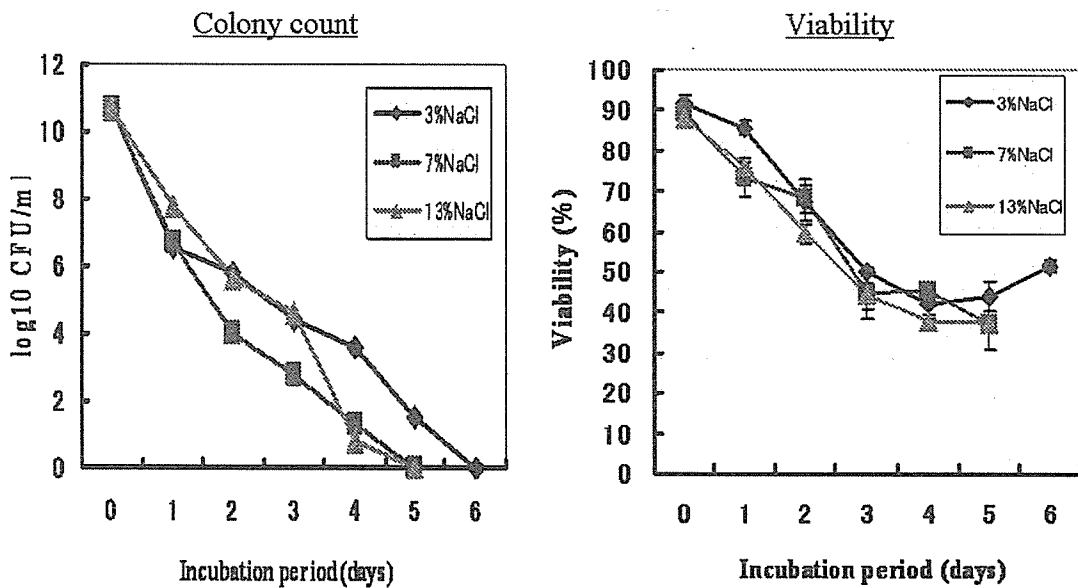


図2. VBNC誘導条件の検討



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

食品由来の2類感染症のリスクアセスメントモデル構築
に関する研究（H17-新興-13）

食品からのコレラ菌検査法に関する研究

| | | | | |
|-------|--------------|---------|-----|--------|
| 主任研究者 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 食品衛生管理部 | 部長 | 山本 茂貴 |
| 研究協力者 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 食品衛生管理部 | 第1室 | 五十君 静信 |
| | 国立医薬品食品衛生研究所 | 食品衛生管理部 | 第1室 | 朝倉 宏 |
| | 国立医薬品食品衛生研究所 | 食品衛生管理部 | 第1室 | 石和 玲子 |
| | 国立感染症研究所 | 細菌第1部 | | 荒川 英二 |

研究要旨

コレラ症の一因としては食品を介した感染経路が指摘されている。しかしながら、当該原因菌は複数の要因により食品からの検出に困難を来たすことが多い。従って、当該検出法の精度・感度の向上は、本感染症のリスクアセスメントモデルを構築するにあたっての重要な課題といえる。前年度、通知検査法の中にあるPCRスクリーニング法で擬陽性反応が報告されたことを受け、本年度は同法における内部標準に関する検討を行い、より精度の高い反応系を確立した。また、コレラ菌の食品からの培養に際する至適条件に関する知見を得た。加えて、魚介類からのコレラ菌検出を目的としたMultiplexリアルタイムPCR法を構築し、少数の汚染菌数を定量的に把握できる検出系として、その有用性を示した。

A. 研究目的

コレラ症は、短時間の潜伏期を経て、重篤な水様性下痢を引き起こす細菌性感染症であり、現在でも発展途上国を中心に発生は絶えない。本症は、飲料水或いは海産物などを介した報告もあり、食品中における汚染実態の把握は、感染リスクをはかる上で重要である。

輸入魚介類を中心とした食品からのコレラ菌検出報告について見ると、1997年に行われた検疫所での調査においては37.8%と非常に高率に分離されていた（1）。一方で、その後10年来の検疫所からの検出報告は激減している。

このことは、現在わが国に流通している冷凍魚介類の衛生管理が向上し、汚染菌数が低下したためとも考えられるが、一方で検出法の変更に伴う、検出限界の低下に因

る可能性も否定できない。また、汚染は生じているものの、冷凍により損傷を受けた菌が培養困難となっているために検出されない場合も想定される。

いずれにせよ、食品中の汚染菌数は極めて低いと想定されることから、より効率的な検出法の開発が、本菌の食品に起因するコレラ症のリスクを評価する上で極めて重要といえる。

現在、食品からのコレラ菌検査には、平成14年10月21日付の通知（食監発第1021005号）が用いられている。しかしながら、前年度に報告したように、同法に適用されているPCRスクリーニング検査項目で、複数の擬陽性反応の出現が報告され、その精度管理を改めて行うことが求められた。

こうした背景から、本研究事業2年目では、前年度に問題点として提起したPCRスクリーニング検査における内部標準の見直しを行い、精度の向上に努めた。また、検出感度に影響を及ぼすと想定される、培地条件として、pHを対象に至適条件を設定した。更に、少数の汚染菌数が極めて低いという疫学的背景より、食品中におけるコレラ菌の高感度な定量的検出を目指し、リアルタイムPCRを用いた実験系を構築し、培養法におけるデータとの比較解析により、その高い感度・精度を実証したので報告する。

B. 研究方法

1. 菌株および培地:

本研究で用いた菌株は、表1. に示した。特に記載のない限り、これらの培養にはトリプトイブロス(TSB, Becton Dickinson)を用いた。寒天平板培地にはTCBS寒天培地(栄研化学)を用いた。また、選択的培養にはアンピシリン(TCBS-Ap, 100 μ g/ml)を含むTCBS寒天培地を用いた。コレラ菌および類縁菌を含めた選択的培養には、ChromAgar Vibrio(関東化学)を用いた。

2. 内部標準コントロールの調整

コレラ毒素遺伝子(*ctxA*)をターゲットとしたPCRスクリーニング検査における内部標準の設定を行うため、ほぼ全てのグラム陰性菌に共通な配列をBlast検索による相同性解析により得た。同領域をPCR反応により増幅した後、これを鋳型DNAとして、両端に*ctxA*プライマータarget配列を含むプライマーを用いて、再増幅させた(表2)。増幅DNA断片は、QiaQuick PCR Purification kit(キアゲン)を用いて精製し、一定量を*ctxA*検出用のPCR反応系へ添加し、その特異性及び干渉性について検討した(図2)。

3. アルカリペプトン水中における至適pHの検討

一夜培養した*V. cholerae* O1およびO139、各3株(O1: NIH35A3, NIH41, P6973; O139:

ATCC51394, NIID236-93, NIID1061-93)を10²CFU/mlとなるよう、1%食塩を含む、pH8.6もしくはpH9.2のアルカリペプトン水(APW)中に接種し、37 $^{\circ}$ Cで20時間培養した。増殖性の検討にあたっては、一定時間毎に同培養液の吸光度(660nm)を測定した。

4. 冷凍エビ中からのコレラ菌検出効率に及ぼすAPWのpH設定

P6973株にアンピシリン耐性を付与するため、プラスミドpUC119を導入した。37 $^{\circ}$ Cで一夜培養し、10⁰、10¹、10²CFU/gとなるように市販冷凍剥きエビ25gに添加した。エビからの検出にあたっては、通知法に準じて、ストマッカー処理を行い、APW(1%NaCl, pH8.6及びpH9.2)中で37 $^{\circ}$ C、20時間培養した。培養液及び同希釈液100 μ lをTCBS及びTCBS-APIに接種し、発育したコロニー数をそれぞれ算出し、食品からのコレラ菌検出に際するAPWの条件検討を行った。

同時に、APW培養液を取り出し、先述のPCRスクリーニング検査に供した。

5. 冷凍エビにおける競合菌の分離

市販冷凍エビに含まれる夾雑菌を分離するため、市販冷凍エビ検体25gを通知法に従って培養し、TCBS寒天培地上に発育した複数のコロニーを形態学的に識別し、代表的な10コロニーを釣菌した。分離株の菌種はAPI 20E(日本ビオメュー)を用いた生化学性状に基づいて同定した(表3)。

6. 夾雑菌との競合阻害作用

TSBで一夜培養した*V. cholerae* P6973(pUC119)株を、10²CFU/mlとなるようAPW(pH8.6, 1% NaCl)に接種した。同時に、*V. parahemolyticus*、*V. vulnificus*あるいは上述の冷凍エビより分離した*V. fluvialis*を10¹-10⁴CFU/mlとなるように接種し、20時間静置培養した。培養液中における*V. cholerae*及び他菌の消長については、TCBS-APおよびCHROM Agar Vibrio上の発育コロニー数に基づいて算出した。

7. Multiplex real time PCR

1) 対象遺伝子の設定

本試験系では、①*V. cholerae*に特異的な遺伝子、②その中でも血清型O1およびO139に特異的な遺伝子、③コレラ毒素遺伝子(*ctxA*)の3種類を対象遺伝子として設定するため、Blast検索をベースに、その設定にあたった。

2) 反応条件

Real timePCRに用いたプライマー/プローブ配列については、表5に示した。

3) 冷凍エビへの添加回収試験における定量的検出に関する検討

冷凍エビ 25g に 10^0 , 10^1 , 10^2 CFU/g の *V. cholerae* O1, O139, O191 各菌株を接種した後、等量の APW (pH 8.6, 1% NaCl) を加え、十分にストマッカーにより混合させた。ここから 2ml を DNA 抽出に供し、抽出 DNA を用いてリアルタイム PCR を行った。同時に、菌体・食品懸濁溶液 25ml を 225ml の APW に接種し、通知法に従って、培養した。コレラ菌の検出には *ctxA* 遺伝子をターゲットとした PCR スクリーニング検査を用いた。

4) DNA抽出効率に関する検討

接種食品からのコレラ菌由来DNA抽出に際しては、従来の熱変性(100°C, 5分)に加えて、MORA Extraction kit(極東化学)を用いてターゲットDNAを抽出し、リアルタイムPCRによりその抽出効率を比較した。

参考:通知検査法における一次スクリーニング試験法の概要

(1) 一次増菌培養: 検体 25 g を無菌的に取り出し、225 ml のアルカリペプトン水 (APW) を加え、35~37°C で 18 ± 2 時間静置培養したものを一次増菌培養液とする。

(2) PCR法

①DNA抽出: 一次増菌培養液 50 μ l に、TE buffer (1 mM EDTA 加 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) 450 μ l を加え、100°C で 10 分間加熱後、氷冷したものを DNA 溶液とする。

②PCR反応: 別紙の条件 1 により PCR を行い、コレラ菌毒素遺伝子 (*ctxA*) を増幅する。

③電気泳動: 1.5~3% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、臭化エチジウムによ

り DNA を染色後、UV トランスイルミネーター上で写真撮影を行い、バンドの有無を確認する。バンドが確認されない場合はコレラ菌陰性とする。

C. 研究結果

1. PCR スクリーニング検査における内部標準の検討:

前年度に報告したとおり、通知法における PCR スクリーニング検査段階で、擬陽性反応が報告され、内部標準が原因として推察されたことから、本年度はその見直しを行った。擬陽性の一因と目された、内部標準検出用にコントロール DNA 及びプライマーの併用に着目し、*ctxA* プライマー配列を両端に保有する 16sDNA 断片のみを、反応液に添加することで改善を図った。

同内部標準遺伝子は *ctxA* プライマーを用いた現行反応系において、*ctxA* 遺伝子と共に増幅された。その至適濃度について検討した結果、1 反応 (50 μ l) あたり 781pg 以上の添加により、*ctxA* 遺伝子の増幅は干渉されたが、1 反応あたり 50pg の添加 (1pg/ μ l) により、*ctxA* 遺伝子は無添加コントロール群と同等の検出感度を示した (図 1)。

次に、検出感度・精度を確認するため、冷凍エビサンプル中にコレラ菌を添加し、加熱変性 DNA 抽出溶液を用いて PCR を行ったが、*ctxA* 遺伝子の検出感度は、無添加対照群と同等であった (データ未載)。また、前年度、擬陽性の原因菌として報告した *Aeromonas* 属菌 (62-11291 株) を添加し、同様の試験を試みたが、擬陽性反応は認められなかった (図 2)。以上の結果より、本内部標準の優位性が確認され、これを PCR 反応系へ取り入れることで、より精度の高いスクリーニング検査を担保できることが実証された。

2. アルカリペプトン水における至適 pH の設定

先述の通り、コレラ菌の検出頻度は極めて低いと想定されたため、増菌培養において、より高い増殖効率を示しうる至適 pH

の設定を試みた。まず、*Vibrio cholerae* 01 および 0139 各 3 株を用いて、pH8.6 および pH9.2 のアルカリペプトン水中での増殖性を比較した。血清型 01 の 3 菌株は、何れも両 pH で同等の増殖性を示したが、pH9.2 における 0139 菌株の増殖は、pH8.6 のそれに比べ明らかに低下していた(図 3、4)。

更に、市販冷凍エビを用いて、当該菌の添加回収試験を行ったところ、血清型 01 および血清型 0139 は上述の結果と同様に、pH8.6 の APW でより高い増殖性を示した(図 5)。

3. 市販冷凍エビからの TCBS 発育菌の分離と、夾雑菌によるコレラ菌増殖への影響について

市販冷凍エビについて通知法に従って、懸濁溶液を調整し、APW で 20 時間培養後、TCBS 寒天培地に接種し、発育したコロニーのうち、優勢な代表 10 コロニーを釣菌し、生化学性状に基づいて、同定した(表 5)。

病原性を示す *Vibrio* 属である *V. parahaemolyticus*、*V. vulnificus* については、コレラ菌の増殖に大きな影響を及ぼさなかったが、エビより分離された *V. fluvialis* は P6973 株の APW 中での増殖を顕著に抑制した(図 6)。本菌は pH9.2 の APW でも同様に干渉作用を示した(データ未載)ことから、pH 調整のみによる夾雑菌の増殖抑制は困難と考えられた。

4. 食品からのコレラ菌検出に伴う PCR 検出限界について

上述のように、食品からのコレラ菌検出に際して、本菌の増殖を左右する複数の因子が想定された。実際に食品への接種試験によりコレラ菌の検出限界を検討したところ、 10^1 CFU 以上の接種菌数では血清型に関わらず、PCR スクリーニングは陽性となったものの、1-10CFU 接種食品については非常に弱い PCR 反応を示すに留まった(図 7)。このことは、本培養法を用いてコレラ菌を検出するためには、少なくとも 10^1

個以上の汚染菌数が必要であることを示している。

3. リアルタイム PCR 検出系

コレラ菌は、しばしば生きていますが培養できない、いわゆる VNC 状態に陥ることが知られており(2)、その定量的検出は食品におけるコレラ汚染の危険性を図る上では、重要な課題といえる。加えて、先述のとおり、培養によってコレラ菌はしばしば競合的増殖抑制を受けること、そして通知法における培養では少なくとも 10^1 個以上の汚染菌数が必要であるという結果を受けて、食品汚染の定量化には直接的検出が必要となると考えられた。そこで、我々はより感度の高いリアルタイム PCR 法を用いて、その定量化への道を探った。

1) 対象遺伝子の設定

血清型 01 および 0139 以外の血清型の *V. cholerae* 計 9 株(9 血清型)については、*ompW* 遺伝子が陽性となったが、*ret* 遺伝子については全て陰性を示した(図 8、表 6)。また、*ret* 遺伝子の多様性についても懸念されたため、代表株について当該遺伝子の塩基配列も決定したが、01 および 0139 菌株間の相同性は 99.9% 以上であり(データ未載)、血清型 01 および 0139 の特異的検出に適した遺伝子候補と考えられた。

2) 各遺伝子のコレラ菌検出感度

各ターゲット遺伝子における定量性を確認するため、 10^0 - 10^5 CFU のコレラ菌懸濁溶液 1ml より全 DNA を抽出し、リアルタイム PCR 反応に供した。各遺伝子は血清型 01 および 0139 に対して、ほぼ同等に定量的な検出結果を示した(データ未載)。

3) Multiplex real time PCR による検出感度および定量性

検出に際する感度・精度の両面から、Multiplex での評価を行った。最終的に何れのターゲット遺伝子もプライマー $250\mu\text{M}$ 、プローブ $175\mu\text{M}$ で特異的な増幅が認められ、それぞれの検出感度にも定量性が認められた(図 9)。

4) 冷凍エビへの添加回収試験における DNA 抽出法の比較

冷凍エビ 25g に 10^0 , 10^1 , 10^2 CFU/g の *V. cholerae* O1 株を接種後、APW (pH 8.6, 1% NaCl) 225ml を添加し、十分にストマッカーにより混合させた後、2.0ml を DNA 抽出に供した。同時に、2.0ml を加熱変性させた。これらを鋳型としてリアルタイム PCR を行ったところ、 10^0 接種群においても、濃縮 DNA 抽出法により、各遺伝子は検出された (図 10)。

D. 考察

コレラを含む 2 類感染症病原体は、昨秋の法改正により、3 類感染症へと移管された。これに伴い、検疫所等での監視対象からも外れることとなったが、本感染症の発生はわが国でも少数ながら毎年発生しており、ルーチン検査として行なわれない体制への移行期にあたる今こそ、同検査法の精度を更に充実させ、不測の事態に備えておく必要がある。

検疫所での輸入冷凍食品のコレラ菌検査において、PCR 反応系で擬陽性が出たことを受け、前年度は内部標準にその原因があることを明らかにした。本年度は、これを是正するため、新たな内部標準の設定を行い、改善を確認した。

また、冷凍エビへのコレラ菌接種試験の結果から、極めて少数の菌数 (1-10 CFU) を接種した際には検出されない場合も認められた。さらに、食品からのコレラ菌検出に際して、腸炎ビブリオ (*V. parahaemolyticus*) あるいはビブリオバルニフィカス (*V. vulnificus*) はコレラ菌の増殖を干渉しなかったが、エビ検体に多数含まれていた、*V. fluvialis* はコレラ菌の増殖を顕著に抑制していた (図 6)。これらの結果は、培養法自体の改善を改めて講じる必要性を示唆しているといえよう。

その方法の改善策の一端として、本年度はアルカリペプトン水 (APW) の至適化を行ない、pH8.6 が血清型 O1 と O139 の増殖に有意に高い増殖を示すことを報告した

(図 3-5)。現行法における APW の規定は、pH8.6 もしくは pH9.2 で 0 もしくは 1% 食塩を含むこととされていることから、今回

の検討結果を踏まえて、これを修正事項として提案したい。

今から約 10 年前に実施された、輸入魚介類のコレラ菌汚染調査によると、全 7,439 検体中 2,803 検体 (37.4%) が、NAG ビブリオ陽性であった (1) が、それ以降の検疫所での調査では、コレラ菌はほとんど検出されていない。その原因としては、1) 輸出国における衛生管理の向上により、汚染菌が検出されないレベルにまで低下した、2) 通知法の変更 (一例としては、検査対象食品重量が 100g から 25g へ変更) されたために、検出限界が低下した、3) 食品中で、損傷あるいは生きていないが培養できない (VNC) 状態 (2) に移行しているために、通常の培養法では検出されないこと、などが想定される。

こうした状況を踏まえ、本年度は極めて低い汚染菌数を検出できるリアルタイム PCR を用いた遺伝学的な定量検出法についての検討を行った。本法では食品 1 グラムあたり 0.1CFU のコレラ菌を検出可能であり、更に対象病原体となる、コレラ毒素 (Ctx) 陽性の血清型 O1 及び O139 を選択的に検出する遺伝子検出系を構築した (表 6)。本法のフィールド調査への応用は、わが国に流通している、(輸入) 魚介類のコレラ菌汚染実態を正確に把握することが可能となり、ひいてはリスクアセスメントモデルの構築へとつながるものと期待される。

本年度の成果を受けて、来年度は、食品中における汚染実態の把握を行なうとともに、VNC 状態にあるコレラ菌の検出に APW を主体とした培養法がどの程度有効であるのかを明らかにすることで、食品に起因するコレラ症の実態を明らかにしていきたい。

E. 結論

本研究では、以下の結論を得た。

1) 前年度、PCR スクリーニング検査で *ctxA* 擬陽性反応が認められたことから、内部標準の変更を行い、擬陽性反応が生じない系を確立した。

2) 一次増菌に用いるアルカリペプトン水 (APW) の至適条件を、コレラ菌の増殖性および他菌による増殖抑制の点から検討し、1%食塩を含む pH8.6 が選択的かつ高い増殖効率を示す条件であることを確認した。

3) 食品中から病原性の高い、すなわち制御すべき対象となるコレラ菌を低い菌数でも定量的に検出できる遺伝学的手法の構築を行なった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

・朝倉宏、石和玲子、山本茂貴、五十君静信. Multiplex real time PCR を用いた魚介類からの *Vibrio cholerae* 検出に関する研究. 第 27 回日本食品微生物学会学術総会. 2006 年 9 月. 大阪.

論文発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 引用文献

1. 白石祥吾, 武田浩二, 多賀賢一郎 他.
(1996) 輸入冷凍魚介類における *Vibrio cholerae* の汚染状況と毒素産生性について. 感染症学雑誌. 70(2):175-179.
2. Oliver JD. (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. J Microbiol. 43 Spec No: 93-100. Review.

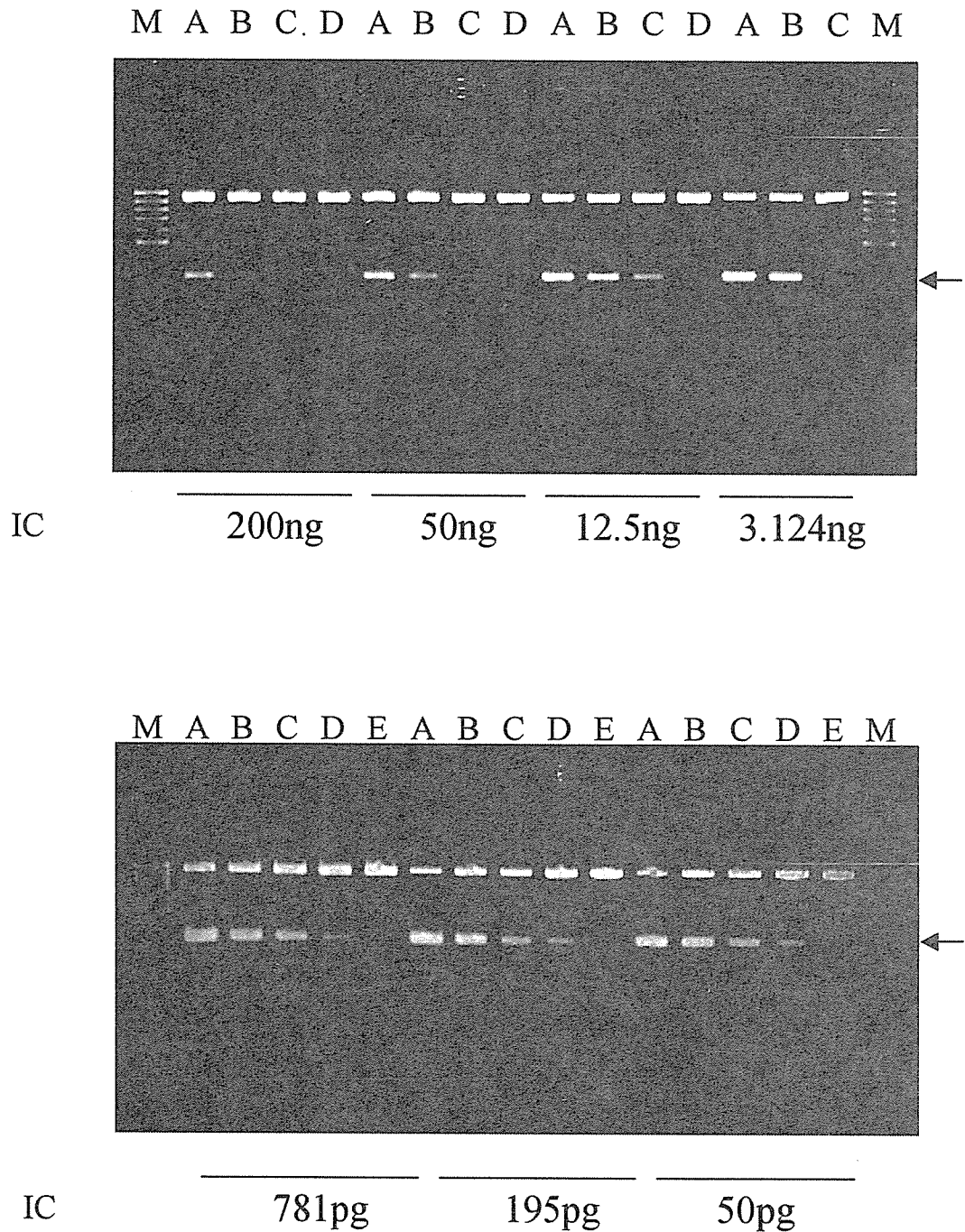


図1. 内在性コントロールの至適濃度に関する検討

レーンMは100 bp marker、レーンAからEはそれぞれ 1 μ g, 100ng, 10ng, 1 ng, および0ngの *V. cholerae* O1由来DNAを含む反応系の結果である。矢印は *ctxA* 遺伝子を示す。下部の数値は用いた内部標準DNA量を示している。(IC:内部標準DNA量)

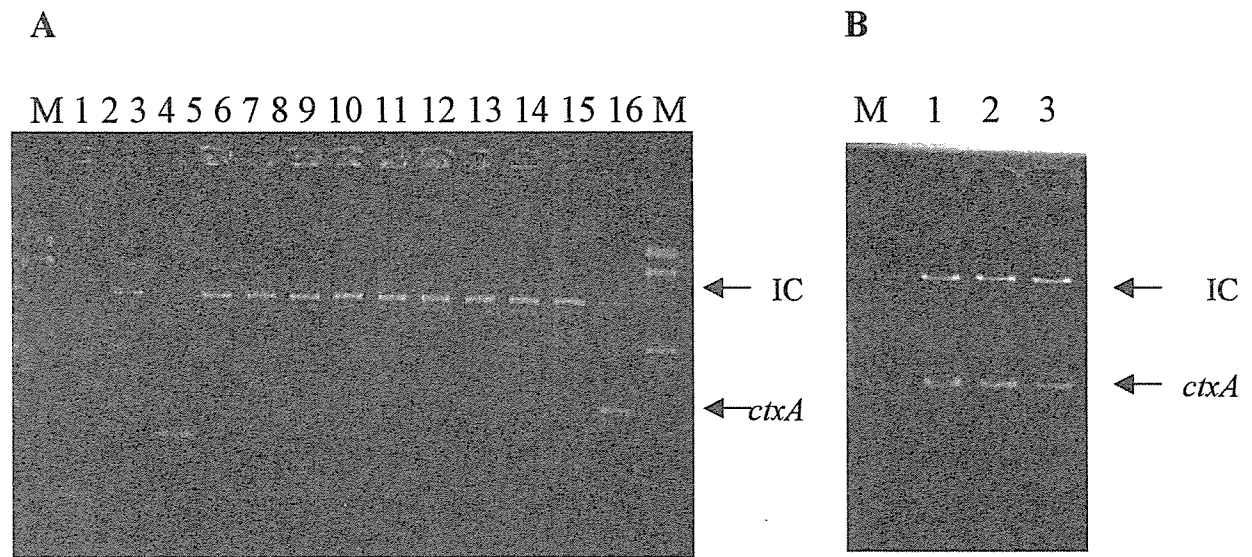


図2. PCR スクリーニング検査における擬陽性反応の出現に関する検討

A) 前年度に報告された擬陽性反応の出現 (白矢印: 擬陽性バンド)

B) *Aeromonas*存在下でのコレラ菌の検出精度に関する検討(新規内部標準DNA (50pg/反応) 添加反応系で*Aeromonas*属菌 (62-11291株) 由来DNAを100pg添加した際の擬陽性出現性について検討した。レーン1-3はそれぞれコレラ菌 10^3 、 10^2 、 10^1 CFU加熱菌体抽出DNAを添加した場合の擬陽性出現性について検討したが、同反応系では擬陽性反応は認められなかった。(IC: 内部標準, *ctxA*: コレラ毒素遺伝子)

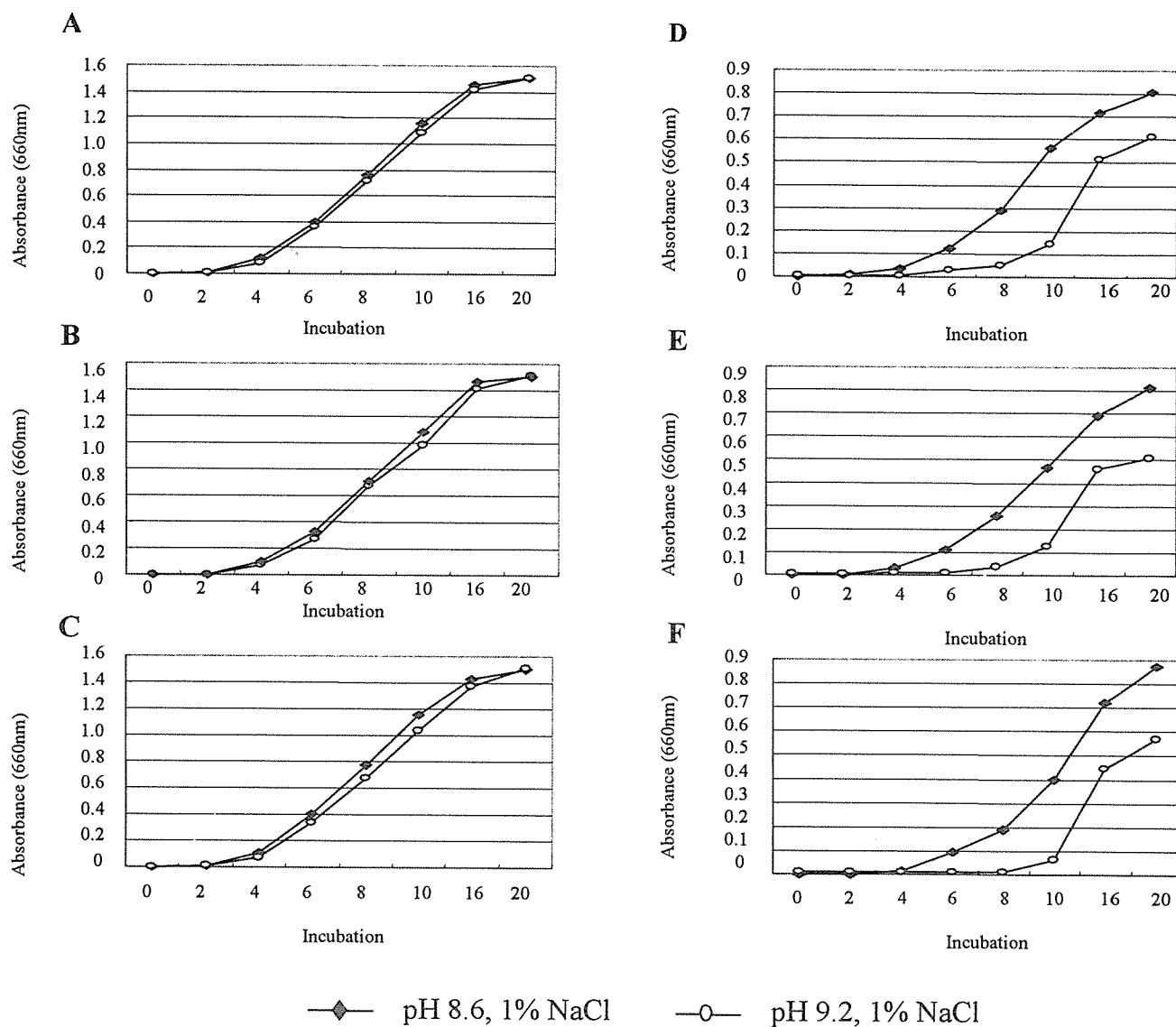


図3. APWのpH条件によるコレラ菌の増殖性について
 約 10^2 CFUの*V. cholerae*血清型O1 (A, NIH35A; B, NIH41; C, P6973) およびO139 (D, ATCC51394; E, NIID236-93; F, NIID1061-93)をpH8.6もしくはpH9.2のAPW中で培養した際の増殖性をOD値(660nm)で示した。

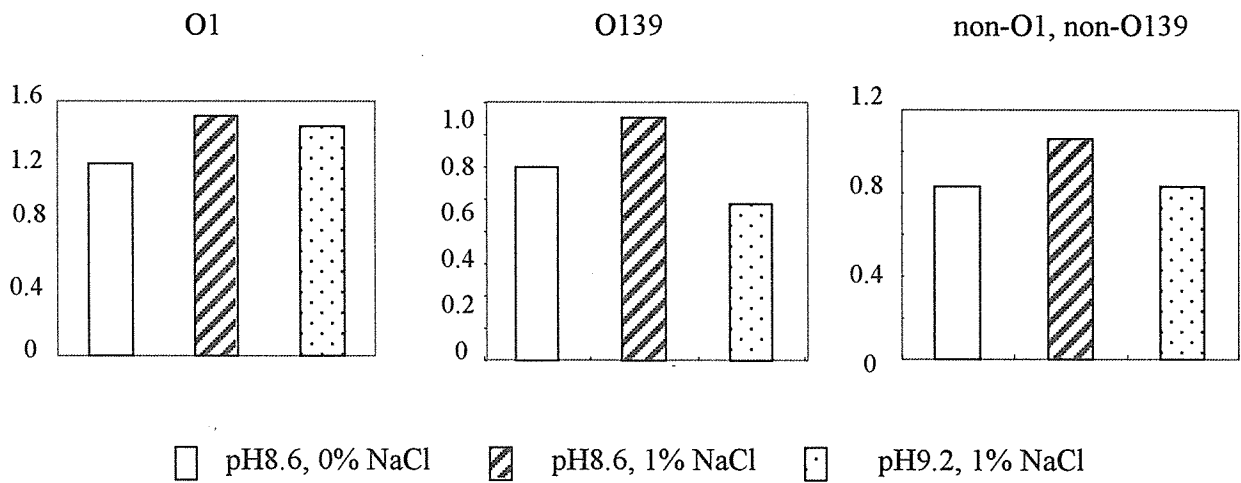


図 4. APW 培養 20 時間後のコレラ菌増殖性に関する比較
 図 3.と同様に培養 20 時間後の OD 値を求め、比較を行った。

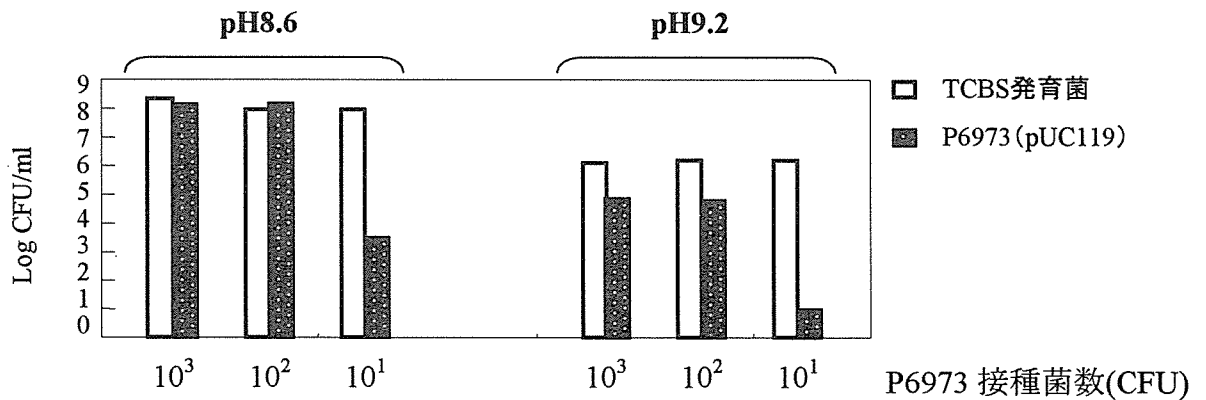
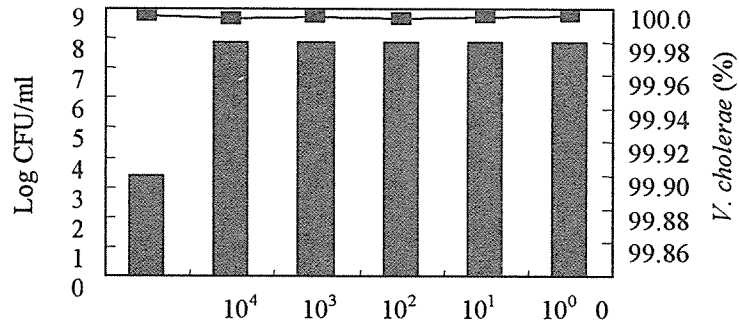
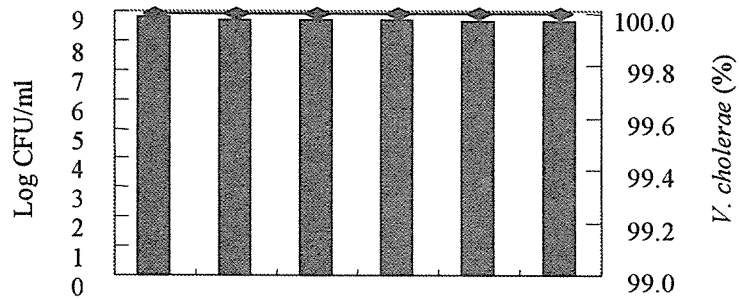


図 5. 冷凍エビを用いたコレラ菌添加回収試験
 約 10¹-10³CFU の *V. cholerae* O1 P6973 (pUC119) 株を冷凍エビ 25g に接種し、通知法に従って、APW (pH8.6, 1% NaCl) で 20 時間培養した。培養液 100ul を TCBS および TCBS-Ap 寒天培地に接種し、CFU 値を測定した。

V. parahemolyticus



V. vulnificus



V. fluvialis

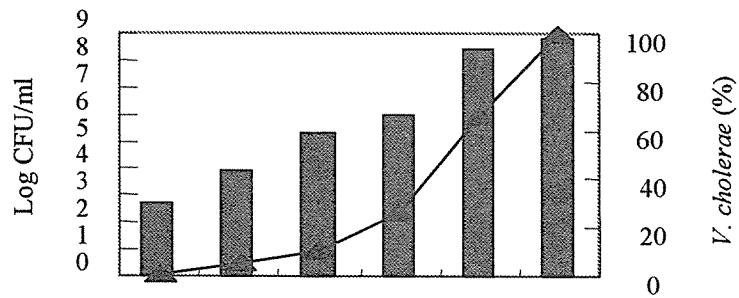


図6. 夾雑菌によるコレラ菌（血清型 O1）の APW 中での増殖抑制

約 10²CFU の *V. cholerae* O1 P6973 (pUC119) 株を APW(pH8.6, 1% NaCl)に接種すると同時に、0-10⁴CFU の *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis* を添加し、APW 中のコレラ菌および競合菌の発育を検討した。コレラ菌の増殖は、TCBS-Ap 寒天培地上でのコロニー数より算出し、棒グラフにて示した（左縦軸）。また、TCBS 培地上に発育した全コロニー数との比較からコレラ菌の占める割合を%表示した（右縦軸）。

PCR detection of *ctxA* gene

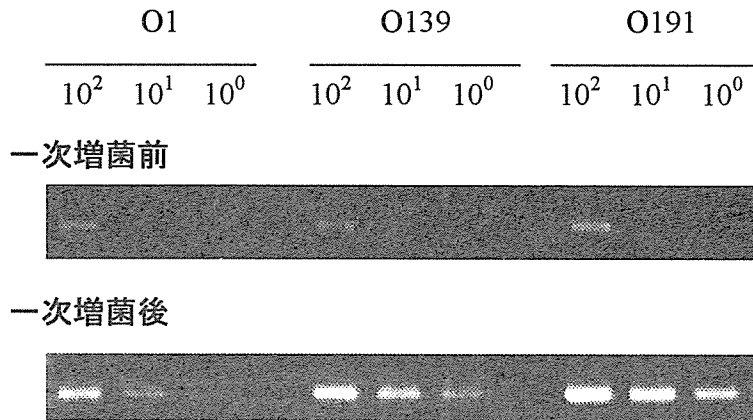
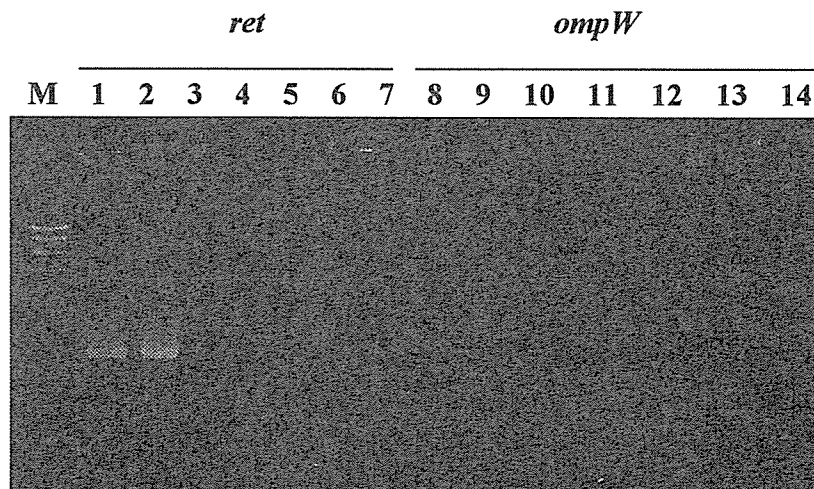


図7. 冷凍エビからのコレラ菌のPCR検出系における検出感度の比較
 冷凍エビ25g中に約10⁰-10²CFUのP6973株を接種し、ストマッカー処理後の懸濁液2mlを100ulのDDWに溶解させ、熱変性を経てPCRに供した（一次増菌前）。また、一次増菌後の培養液2mlについても同様の処理を行い、PCRに供した（一次増菌後）。



M: Molecular marker (λ /HindIII)
 lanes 1&8: *V. cholerae* O1
 lanes 2&9: *V. cholerae* O139
 lanes 3-5& 10-12: NAG *Vibrio* O39, O51, O191
 lanes 6&13: *V. mimicus*
 lanes 7&14: *E. coli* C600