

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品における微生物迅速検査法の開発及びその精度評価システム  
に関する研究

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小崎 俊司

平成 19 (2007) 年 3 月

## 目次

### I 総括研究報告

- 食品における微生物迅速検査法の開発及びその精度評価システムに関する研究 --- 1  
小崎 俊司

### II 分担研究報告

1. 毒素型食中毒菌の迅速検出法の開発と評価 --- 7  
小崎 俊司・勢戸 和子
2. 生菌数および汚染指標細菌等の簡易迅速試験法の検討 --- 15  
浅尾 努・久米田 裕子・河合 高生・小笠原 準
3. 一般生菌数や汚染指標細菌などを標的とした迅速法の検討 --- 35  
木村 凡・浅尾 努・高橋 肇
4. 分子生物学的手法を応用した食中毒菌の迅速検出法の開発 --- 47  
宮本 敬久・李 睿・原田 天章
5. 迅速検査法に適する検体処理方法の検討 --- 61  
五十君 静信・岡田 由美子・朝倉 宏・石和 玲子・木村 晃一
6. 培養法・非培養法・ハイブリッド法による迅速法の開発 --- 69  
松岡 英明
7. 食品を対象とした感染型食中毒菌の迅速検査法の評価に関する検討 --- 75  
甲斐 明美・下島 優香子・尾畑 浩魅・小西 典子・門間 千枝・仲真 晶子
8. 標準検査法を尺度として、迅速検査法を評価する方法の検討 --- 83  
荒川 英二
9. 食品由来ウイルスの抽出法および検出法の検討と評価 --- 95  
勢戸 祥介
10. ノロウイルス迅速検査法の検討と評価 --- 101  
吉田 靖子・林 志直・森 功次・野口やよい・秋場 哲哉

### III 研究成果の刊行物に関する一覧表 --- 111

### IV 研究成果の刊行物・別刷 --- 113

# I 総括研究報告

総括研究報告書

**食品における微生物迅速検査法の開発及びその精度評価システムに関する研究**

主任研究者 小崎俊司 大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科

**研究要旨**

これまで食品危害を起こす病原微生物の検出は、主として食中毒事例から菌あるいは毒素を分離（検出）・同定することを想定し、特定された起因因子により行政的な措置をとることに主眼がおかれている。この一連の検査を行うためには専門的な知識と技量が要求され、結果を得るためには数日間程度の日数を要する。一方、食品製造における安全性確保は、衛生管理が適切に行われているかを評価することが最も重要であり、そのために食品や作業工程中の汚染指標細菌や食中毒菌（あるいは毒素）の検出が行われている。一般に、これらの検査対象となる食品などの汚染度は低いため使用する検査法は高感度、迅速で簡便なことが要求され、さらに検査が日常的に行われるため専門知識を必要とせず、安定的に一定した結果が得られるような検査法が要求される。本研究ではこのような日常的な衛生管理の中で食の安全性を確保するために必要な迅速・簡便検査法のあるべき要件と検査対象となる領域を調べ、現在使用されている迅速検査法を検討することに加えて、培養法に基づく標準法を尺度とする検査精度の評価システムの構築を目指すことを目的とした。細菌検査で最も使用頻度が高い一般生菌数や汚染指標細菌に関する検査法について国内外の情報を収集解析し、わが国の告知法・通知法は欧米で使用されている FDA/BAM 法や ISO 法とは異なり、検査法の国際的調和の視点から好ましくない状況にあることが明らかになった。欧米では迅速培養法も検査法として認知されていることがわかった。迅速検査を行う必要性の高い食中毒菌を選別し、腸炎ビブリオについては市販検出用キットの調査、酵素基質培地の有用性、特異遺伝子の PCR 法による検出法の検討を行った。標準法の検討が進んでいる腸管出血性大腸菌の産生するペロ毒素の市販キットの検討を行った。ノロウイルスについては、市販 ELISA キットの特異性、感度について検討した。検体から菌を効率よく回収、濃縮する条件を検討し、さらに分画濾別可能な新規デバイスを試作した。

## 分担研究者

浅尾 努 大阪府立公衆衛生研究所感染症部  
細菌課 主任研究員

木村 凡 東京海洋大学海洋科学部助 教授

宮本 敬久 九州大学大学院農学研究院 教授

五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所食品管  
理部 室長

松岡 秀明 東京農工大学大学院工学研究部  
教授

荒川 英二 国立感染症研究所細菌第一部 主  
任研究員

勢戸 祥介 大阪府立大学大学院生命環境科学  
研究科 助教授

吉田 靖子 東京都健康安全研究センター微生  
物部 科長

## 研究協力者

勢戸 和子 大阪府立公衆衛生研究所

久米田 裕子 大阪府立公衆衛生研究所

河合 高生 大阪府立公衆衛生研究所

小笠原 準 大阪市立環境科学研究所

高橋 肇 山脇学園短期大学

李 睿 九州大学大学院生物資源環境科学  
府

原田 天章 九州大学農学部生物資源環境学科

下島 優香子 東京都健康安全研究センター

尾畑 浩魅 東京都健康安全研究センター

小西 典子 東京都健康安全研究センター

門間 千枝 東京都健康安全研究センター

仲真 晶子 東京都健康安全研究センター

林 志直 東京都健康安全研究センター

森 功次 東京都健康安全研究センター

野口やよい 東京都健康安全研究センター

秋場 哲哉 東京都健康安全研究センター

## A. 研究目的

食品のリスクマネジメントでは製造あるいは作業工程中での衛生管理が正当に行われているかを評価するために、しばしば、食品や環境中の一般生菌数、汚染指標細菌、あるいは食中毒菌の検出を行う必要がある。このような場合、検体に含まれる菌数は非常に少ないため、使用する検査法は高感度であるばかりでなく、迅速や簡便性が要求される。また、食中毒発生時の検査とは根本的に異なり、実施に当たっては可能な限り専門的な知識や技術を必要としないが、規格化され安定した結果が得られる方法であることが重要である。本研究では食品の安全性を確保するための迅速・簡易検査法についての要件を精査し、さらに培養による標準検査法を基本とし、これら迅速法の検査精度の評価システムの構築を試み、より優れた迅速高感度な検出法の開発が可能な環境作りを行うことを目的とする。本年度は一般生菌数および汚染指標細菌に関する情報収集、種々の病原細菌の市販迅速法の調査、迅速法評価の要請が急がれている腸炎ビブリオ、ペロ毒素およびノロウイルスの検出法の検討、および食品に含まれる細菌の濃縮法の条件検討をおこなった。

## B. 研究方法

### 1. 汚染指標菌試験法の検討

わが国における公定法・通知法等と欧米で使用されている検査法を調べ比較した。利用した資料は汚染指標菌試験法を比較検討した。主たる資料は以下の三点である。①食品衛生小六法（日本の告示法・通知法）②ISO（International Organization for Standardization）は日本規格協会から購入した③米国FDA/BAM（Bacterial Analytical Manual）はインターネット

(<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.htm>) から入手した。その他 American Public Health Association (米国公衆衛生協会) の乳製品試験法、Health Protection Agency (英国食品安全庁) の National Standard Method や Health Canada (カナダ厚生省) の Official Methods for the Microbiological Analysis of Foods も参考にした。

## 2. 迅速法の調査と基礎情報の収集

インターネット検索、メーカーからの情報、ならびに商業誌に記載された最近の総説等から、食品や環境中の一般生菌数測定や汚染指標菌の検出・定量キットや装置に関する情報を収集した。迅速法の客観的な評価法に関する基礎情報を AOAC による評価法等を参考に収集し、今後、これらの方法を評価するために必要な項目の予備整理を行った。

## 3. 腸炎ビブリオの酵素基礎培地による同定と PCR 法による検討

腸炎ビブリオの汚染率が高いといわれる二枚貝について、市販の冷蔵活アサリを材料として、アルカリペプトン水で増菌後、酵素基礎培地であるクロモアガービブリオ (以下 CA) と従来から使用されている TCBS (日水製薬) 平板に増菌液をそれぞれ塗抹し、出現する集落の性状を調べた。種々の食品検体の増菌培地を対象として、PCR 法による検出状況を比較した。

## 4. 腸管出血性大腸菌の検出

標準法の検討が進んでいる腸管出血性大腸菌 O157 および O157 以外のベロ毒素産生性大腸菌検出用市販キットの評価について検討した。免疫学的検査法として従来から使用されているラテックス凝集反応と同様の体外診断用医薬品として利用されているイムノクロマト法を比較した。

## 5. 迅速法に適した検体処理方法の検討

菌または濃縮による菌数確保などの迅速検査法に適した検体処理について情報収集を行い、食品検体から、当該微生物を濃縮により菌数確保する手法について検討した。この中から実用性が高く論文的にも報告のある方法として、免疫磁気ビーズ法 (A 社) とその応用型である循環型濃縮システム (B 社) について検討を行った。さらに、非培養法による迅速法の信頼性を確保するために、不可欠な食品からの生菌分離法として密度勾配法についての有用性について調べた。

## 6. ノロウイルスの迅速診断法としての ELISA 法の検討

培養法が確立していないノロウイルスについては遺伝学的診断法が広く用いられているが、迅速および簡便な方法として ELISA 法による検出キットの検討を行った。

## C. 研究結果

汚染指標菌として国際的に利用されている大腸菌群、糞便系大腸菌群、大腸菌などの試験法に関する国内外の情報を収集し、FDA/BAM 法と欧州で使用されている ISO 法を、わが国の食品衛生六法に記載されている告示法および通知法と比較した。BAM 法と ISO 法は試験法、使用培地、培養温度など類似点が多く認められたが、わが国の告知法・通知法とは大きく異なっていた。

ビブリオ属菌用に開発された酵素基質培地を分離培地に用いて、簡易・迅速性を調べたが、腸炎ビブリオ以外の一部の菌が同一の色調を呈することがわかった。また、腸炎ビブリオのもつ特異的 *toxR* 遺伝子を指標に PCR 法の有用性を調べたところ、培養法と同程度の検出感度を持つ知見が得られた。しかし、培養法陰性、PCR 陽性の検体も散見された。

市販腸管出血性大腸菌の遺伝学的検出キットについて調べた結果、多くはペロ毒素遺伝子の他、O抗原決定因子の内部配列を指標に PCR を行う検査試薬であり、菌株によっては目的のサイズとは異なる産物が得られることもわかった。ペロ毒素の免疫学的検出法として使用されているラテックス凝集反応と比ベウムクロマト法は迅速性と簡便性に優れた方法であることを確認した。しかし、キットに使用されている抗体の特性から、毒素のバリエーションを産生して検出できない株が存在すること、また検出感度が劣っていた。

濃縮法について情報収集を行い、実行性の高いと思われる免疫磁気ビーズ法と磁気ビーズ法を応用した循環型濃縮システムについて検討を開始した。微生物はリステリア・モノサイトゲネスを対象とし、食品としてはナチュラルチーズを想定した。免疫磁気ビーズ法で2倍程度の濃縮結果が得られたが、磁気ビーズ法を応用した循環型濃縮システムでは、原理的には期待される手法ではあるが、報告されている高い濃縮結果は得られなかった。迅速および簡便な方法として ELISA 法による検出キットの検討を行った。遺伝学的診断法で陽性となった検体 (genogroup I, 7 種; genogroup II, 13 種) を用いて検討した結果、genogroup I 4 種類と genogroup II 8 種類の遺伝子型のノロウイルスが検出可能であった。リアルタイム PCR 法で算出されたノロウイルス遺伝子のコピー数から、ELISA 法の検出限界は約 105 コピーであると考えられた。

#### D. 考察

一般生菌数および汚染指標細菌に関する欧米の情報を収集し、わが国の告知法・通知法と比較した結果、わが国の方法は欧米で使用されている方

法とは一部の検査法で異なり、検査法の国際的な調和を図る視点から好ましくない状況にあることがわかった。また、欧米では迅速法も検査法の正当性を担保するバリデーションによる評価を受けた上で、公的な検査法として認知を受けていることが明らかになった。腸炎ビブリオの迅速検出法を評価するために、酵素基質培地による同定の効率性を検討したが、他の菌が同一の反応を示すことから、現法では適用できないことがわかった。しかし、特異 *toxR* 遺伝子を指標に PCR を行ったところ、培養法と同程度の検出感度を持つ知見を得ることができた。腸管出血性大腸菌の産生するペロ毒素の免疫学的診断用として市販されているイムノクロマトキットの有用性を調べた結果、迅速性および簡易性に優れているが、キットに使用されている抗体の特性から一部抗原性の異なる変異型毒素は検出できないこともわかった。ノロウイルスの簡易迅速検出法としての ELISA 法の評価をリアルタイム PCR 法で算出されたウイルス遺伝子のコピー数および検出可能な遺伝子型の有無を基に行い、ELISA 法による検出限界は、国内で発生しているノロウイルスには対応可能であることがわかった。食品からの検出には効率のよい濃縮方法の開発が必要であると考えられた。

#### E. 結論

細菌検査で最も頻度が高い一般生菌数や汚染指標細菌に関する試験法について国内外の情報を収集、解析した。その結果、国内の告知法・通知法は欧米で使用されている FDA/BAM 法や ISO 法とは一部の検査法で異なっており、検査法の国際的調和の視点から好ましくない状況にあることが明らかになった。また、欧米では検査法の正当性を担保するバリデーションによる評価を受けた上

で、本研究課題である迅速培養法も検査法として認知されていることもわかった。国内で使用されている迅速法の実態調査を行い、これらの評価法に関する情報を AOAC による評価方法を参考に収集し整理を行っている。迅速に検査を行う必要性の高い食中毒菌を選別し、腸炎ビブリオについては市販検出用キットの調査、酵素基質培地の有用性、特異遺伝子の PCR 法による検出法の検討を行った。“標準法”の検討が進んでいる腸管出血性大腸菌の産生するペロ毒素の市販検出キットの検討を行った。ノロウイルスについては、市販 ELISA キットの特異性および感度について検討した。非培養法・ハイブリッド法については、濾過が困難な食材からの遠心分離法による菌の回収の最適条件を調べ、分画濾別可能な新規デバイスを試作した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) B. Kimura: Recent advances in the study of the genotypic diversity and ecology of *Listeria monocytogenes*. *Microbe. Environ.*, 21, 69-77(2006)
- 2) 丸山弓美, 木村 凡, 藤井建夫, 徳永宜則, 松林潤, 相川保史 食卓用ドライアイス装置内の魚介類における腸炎ビブリオの増殖抑制, *食品衛生学雑誌*, 46, 213-217 (2006)
- 3) 藤川 浩・矢野一好・諸角 聖・木村凡・藤井建夫: 各種温度条件下における微生物増殖予測プログラムの開発, *食品衛生学雑誌*, 47, 288-292 (2006)

4) 尾畑浩魅, 下島優香子, 小西典子, 門間千枝, 矢野一好, 甲斐明美, 諸角聖, 福山正文: 腸炎ビブリオ食中毒事例における PCR 法を用いた食品からの耐熱性溶血毒(TDH)産生菌の分離, *感染症学雑誌*, 80, 383-390 (2006)

5) T. Shimakita, Y. Tashiro, A. Katsuya, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid Separation and Count of Viable Microbial Cells in Foods by Non-culture Method with a Bioplorer, a Focusing-free Microscopic Apparatus with a Novel Cell Separation Unit. *J. Food Protection*, 69, 145-151 (2006).

6) K. Fujioka, I. Kozone, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid Evaluation of the Efficacy of Microbial Cell Removal from Fabrics. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 995-1002 (2006).

### 2. 学会発表

- 1) 須田貴之, 高橋 肇, 五十嵐和典, 木村凡, 藤井建夫. TaqMan 法を用いた鑑別培地からの大腸菌の迅速判定法の開発. 日本食品微生物学会. 平成 18 年 9 月 21 日、22 日、大阪。
- 2) 石川達也, 木村凡, 宮 聡子, 高橋肇, 佐藤美紀, 藤井建夫. MLVA を用いた *Listeria monocytogenes* 4b のタイピング手法の開発. 日本食品微生物学会. 平成 18 年 9 月 21 日、22 日、大阪。
- 3) 木村竜介, 木村凡, 深谷哲也, 佐久間欣也, 藤井建夫. pH 調整無菌化米飯のボツリヌスリスクについて. 日本食品微生物学会. 平成 18 年 9 月 21 日、22 日、大阪。
- 4) 五十嵐和典, 高橋肇, 木村凡, 藤井建夫. *Listeria monocytogenes* のバイオフィルム形成能について. 日本食品衛生学会, 平成 18 年 10 月



26日、27日、名古屋。

5) 木村竜介, 木村 凡, 藤井 建夫, 小澤 毅. 無菌化米飯における容器内残存酸素濃度とボツリヌスA・B型菌の増殖の関係について. 日本食品衛生学会, 平成18年10月26日、27日、名古屋.

6) 荒川英二、泉谷秀昌、森田昌知、T. Ramamurthy、渡辺治雄 *Vibrio fluvialis* のtoxRを標的とした検出法の検討 第40回腸炎ビブリオシンポジウム 11月 東京

7) 木村晃一、原田勝一郎、上橋健三、岡田由美子、五十君静信。市販のナチュラルチーズにおけるリステリア・モノサイトゲネスの挙動。第27回日本食品微生物学会学術総会。2006.9.大阪

8) 岡田由美子、石和玲子、高谷幸、山本茂貴、五十君静信。未殺菌乳を原料とするチーズ製造工程における *Listeria monocytogenes* の消長。日本

細菌学会 2007.3.大阪

9) 高山幸大、荒木恵美子、藤井建夫、斉藤美佳子、松岡 英明：魚肉ホモジネートからのヒスタミン生成菌の生菌分離条件の検討。平成18年度日本防菌防黴学会大会、ICp-9、東京、2006年5月。

10) 河西ちか子、新井達、斉藤美佳子、松岡英明、島北寛仁、田代義和、神田修平：生乳中の微生物迅速検出法の開発。平成18年度日本防菌防黴学会大会、ICp-8、東京、2006年5月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## II 分担研究報告

## 食品における微生物迅速検査法の開発及びその精度評価システムに関する研究

### 毒素型食中毒菌の迅速検出法の開発と評価

主任研究者 小崎 俊司 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 教授  
研究協力者 勢戸 和子 大阪府立公衆衛生研究所

#### 研究要旨

大腸菌からのベロ毒素 (VT) 検出について、従来法であるラテックス凝集反応 (RPLA) 法とイムノクロマト (IC) 法を比較した。キャピリアは EHEC 59 株中 57 株で、デュオパスは EHEC 66 株中 61 株で、RPLA 法と一致した結果が得られ、VT 非産生大腸菌やその他の腸内細菌、*Vibrio* 属菌などは、RPLA 法、IC 法ともに陰性を示した。不一致株はいずれも VT2 型遺伝子が *stx2c* の株で、RPLA 法で VT2 陽性を示すものの IC 法は陰性であった。22 株の *stx2* バリエーション株を用いて、RPLA 法と 2 つの IC 法を同時に実施したところ、試薬によって VT 検出能が異なっていた。*stx2* バリエーション以外の株では、IC 法で陽性と判定されるには毒素型に関わらず RPLA 力価 16 倍以上が必要であった。したがって、EHEC の特徴的な生化学的性状を示す 0157 や 026 であるのに IC 法陰性の場合、他の方法でも VT または VT 遺伝子を確認できるよう備える必要がある。しかしながら、判定に一夜を要する RPLA 法に比べ、IC 法は迅速性と簡便性に優れており、EHEC の同定に非常に有用である。また、分離平板上の典型的なコロニーから調整した被検液でも、IC 法で分離株と一致した成績が得られ、分離平板からのスクリーニングに使用可能であると考えられた。

#### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症は、毎年 3000 名以上の届出があり、その多くは汚染食品の摂食が原因である。EHEC の同定には、分離された大腸菌からのベロ毒素 (VT) の検出が必須であり、各種の VT 検出試薬が市販されている。最も簡便な検出法としてイムノクロマト法が注目されていることから、従来法であるラテックス凝集反応法とその性能を比較した。

#### B. 研究方法

##### 1. 供試材料

菌株は、当所保存の EHEC 100 株と、毒素原生大腸菌 (ETEC) 4 株を含む VT 非産生大腸菌 29 株およびその他の細菌 21 株を使用した (表 1)。また、選択分離平板からの検討に、凍結保存した EHEC 患者便 5 検体を使用した。

##### 2. 被検液の調製

菌株はトリプティックケースソイブイオン (日本ベクトン・デッキンソン) で前培養した後、以下の a-c の方法で、糞便検体は d の方法で被検液を調製し、いずれも遠心上清を使用した。(a) 振とう CAYE 液: 自家調製した CAYE 培地 2ml で 37°C 一夜

振とう培養し、ポリミキシン B 5 万単位/ml (PB 原液) を 0.2ml 加えてさらに 37°C 30 分間反応させた。(b) 静置 CAYE 液: CAYE 添加剤 (メルク) を加えた CAYE 培地 (メルク) 1ml で 37°C 一夜静置培養し、PB 原液を 0.1ml 加えて 37°C 10 分間反応させた。(c) Sonic 液: トリプトソイ寒天培地 (ニッスイ) で 37°C 一夜培養した発育菌 3 エーゼ相当量を生理食塩水で 10 倍希釈した PB 原液 (PB 加生食水) 0.5ml に懸濁し、細胞破砕機 BIORUPTOR (コスモ・バイオ) で 5 分間超音波破碎を行った。(d) MAC 液: 凍結保存便を CT-SMAC と DHL で分離培養し、0157 陽性検体は CT-SMAC の白コロニーあるいは DHL の赤コロニーを、065 陽性検体は CT-SMAC のやや中心が赤い白コロニーを選び、コロニー 5 個相当分を PB 加生食水 1ml に懸濁した後、37°C 30 分間反応させた。

### 3. ラテックス凝集反応 (RPLA) 法

VTEC-RPLA (デンカ生研) を使用し、階段希釈した被検液とラテックス試薬を混合して室温で一夜静置後判定し、VT1 および VT2 について凝集を示した最高希釈倍数を測定した。

### 4. イムノクロマト (IC) 法

キャピリア VT (以下キャピリア、日本ベクトン・デッキンソン、図 1a) は、被検液 100  $\mu$ l を滴下し、15 分後に VT の有無を判定した。デュオパス・ベロトキシシ (以下デュオパス、メルク、図 1b) は 150  $\mu$ l の被検液を滴下し、20 分後に VT1 および VT2 の有無を判定した。いずれも、判定時は必ず対照部に赤紫色のラインが出ていることを確認し、MAC 液では判定部のラインの強さを + からの 3 段階で判定した。検出感度は、被検液および RPLA 法と同じ希釈液を使用し、RPLA の最高希釈倍数から計算した RPLA 力価での陽性率を求めた。

### 5. PCR 法

供試菌株の VT 遺伝子 (*stx1* および *stx2*) の有無は、小林のプライマーあるいは市販プライマー (タカラ) を用いた PCR 法で確認した (表 2)。また、*stx2* バリエーションについては、LIN らのプライマーを用いた PCR-RFLP で型別し、一部の株については塩基配列も確認した (表 2)。

## C. 研究結果

### 1. IC 法の特異性

キャピリアと RPLA の比較は、振とう CAYE 液と sonic 液を用いて実施した (表 3)。小林のプライマーを用いた PCR 法で *stx* 陽性を確認した 59 株の EHEC (*stx1* および *stx2* 陽性菌 23 株、*stx1* 陽性菌 19 株、*stx2* 陽性菌 17 株) について、RPLA は PCR と同一の VT 型を示したが、キャピリアでは 57 株で VT 陽性と判定されたものの *stx2* 陽性菌 2 株は陰性を示した。EHEC 以外の大腸菌 29 株とその他の腸内細菌や *Vibrio* 属菌など 21 株は、RPLA で VT1、VT2 ともに陰性と判定され、キャピリアでも陰性を示した。

デュオパスと RPLA の比較は、市販プライマーで *stx* を確認した EHEC 66 株 (*stx1* および *stx2* 陽性菌 24 株、*stx1* 陽性菌 17 株、*stx2* 陽性菌 25 株) と EHEC 以外の大腸菌 20 株について、静置 CAYE 液を用いて検討した (表 4)。RPLA と PCR の VT 型は全株で一致したが、デュオパスは 5 株で不一致が見られた。すなわち、VT1 については *stx1* および *stx2* 陽性菌、*stx1* 陽性菌ともに全株で陽性を示したが、VT2 は *stx1* および *stx2* 陽性菌 2 株、*stx2* 陽性菌 3 株の合計 5 株で陰性と判定された。EHEC 以外の大腸菌はすべて RPLA、デュオパスともに陰性を示した。

### 2. 検出感度

特異性の検討でキャピリア陽性を示した中の39株の希釈液について、VT1、VT2に関わらずRPLA力価16倍以上では全株キャピリア陽性を示したが、8倍では67%、4倍では50%の陽性率であった(図2a)。デュオパスは、7株分の希釈液と最高RPLA力価が64倍以下であった34株の被検液を用いて検討したところ、RPLA力価4倍の陽性率はVT1が20%、VT2は15%と低かったが、8倍ではVT1 83%、VT2 73%で、16倍以上ではどちらも陽性を示した(図2b)。

### 3. *stx2*バリエーション株の検討

特異性の検討でRPLA法とIC法の結果が一致しなかった株について、*stx2*バリエーション型別を実施したところ、全株*stx2c*と型別された。そこで、*stx2*バリエーション株について株数を増やし、sonic液を用いて、RPLA法、キャピリア、デュオパスを同時に実施した(表5)。*stx2c*陽性0157 15株については、RPLAで全株VT2陽性を示し、その力価は8-128倍以上であったが、デュオパスでVT2陽性は12株、キャピリアで陽性と判定された株は5株のみであった。*stx2c*陽性OUT 2株は、全ての方法でVT2陽性を示した。また、*stx2f*陽性063 2株はRPLAとキャピリアでは陽性となるが、デュオパスでは検出できなかった。ブタ浮腫病由来の*stx2e*陽性3株(いずれもOUT)は、RPLA、キャピリア、デュオパスのすべてで陰性を示した。

### 4. 分離平板からの使用

EHEC 0157 (VT1, VT2) が分離された検体1-3とEHEC 065 (VT1, VT2) が分離された検体5は、CT-SMAC上の典型的なコロニーをかきとってMAC液を調整したところ、RPLA法とデュオパスではVT1、VT2がともに陽性を示し、キャピリアも陽性と判定された。検体4は、CT-SMACで0157と考えられる白コロニーが小さく数も少なかったが、RPLA法とデュオパスでVT2

陽性、キャピリアでVT陽性を示し、EHEC 0157が分離された。この検体のDHLからはEHECが分離されず、赤コロニーをかきとったMAC液は、キャピリアで陽性を示したが、RPLA法とデュオパスでは陰性と判定された(表6)。

## D. 考察

本研究に用いた3つのVT検出試薬はいずれも体外診断用医薬品であるが、最終判定に一夜を要するRPLA法に比べ、キャピリアとデュオパスは迅速性と簡便性において優れていた。

EHECを用いた検討では、キャピリアは59株中57株で、デュオパスは66株中61株で、RPLA法と一致した結果が得られた。どちらの試薬もEHEC以外の大腸菌とは反応せず、キャピリアはコレラ毒素や耐熱性溶血毒とも交叉反応を示さないことが確認できた。一方、不一致の株は*stx2*バリエーション株であり、RPLA法では検出されるもののIC法での検出に課題が残った。*stx2*バリエーション株の検討で、デュオパス陰性であった*stx2c*陽性0157 3株はRPLA力価が8-16倍であり、毒素量が検出感度以下であったと考えられたが、キャピリアはRPLA力価128倍以上の*stx2c*陽性0157でも陰性を示し、試薬のモノクローナル抗体が*stx2c*型の毒素を認識しにくい可能性が推察された。これらの0157には保育園での集団事例由来株も含まれており、0157でイムノクロマト陰性となった場合には、RPLAあるいはPCR法で確認する必要があると考えられる。

*stx2*バリエーション以外の株では、キャピリア、デュオパスとも陽性の結果を得るのにVT型に関係なくRPLA力価16倍以上の毒素液が必要であり、検出感度はRPLA法に比べやや劣っていた。当所では大阪府で分離されたEHECのVT産生性をRPLA

法で確認しているが、血清型、VT 型にかかわらず RPLA 力価 16 倍以下を示す株は非常にまれであり、IC 法は十分に実用可能な検出感度を有していると考えられる。

IC 法は大腸菌と同定された菌株について検査する試薬であるが、アメリカの医療機関で分離平板上のコロニーからデュオパスを使って VT を検出し、良好な結果が得られたとの報告がある (J. Clin. Microbiol. 41:2650-3, 2003)。これは、EHEC (0157 および non-0157) 陽性の凍結保存便 41 検体と新鮮便 250 検体について、SMAC 上のコロニーを掻き取って被検液を調製したもので、全ての凍結保存便と新鮮便のうち EHEC 0157 が分離された 2 検体はデュオパスで VT 陽性を示し、偽陽性を示した検体はなかった。本研究での検討数は少なく、検体 4 の DHL から調製した MAC 液は、キャピリアでのみ陽性を示したため、釣菌株を増やして精査したが EHEC は分離されず、偽陽性反応であると考えられた。しかし、典型的なコロニーから調整した 5 検体分の MAC 液では、分離株と一致した成績が得られ、IC 法による分離平板からのスクリーニングが可能であると考えられた。

VT の免疫学的検出法は、本研究で検討した IC 法および RPLA 法に加え、ELISA 法の試薬キットが市販されているが、*stx2* バリエーション株検出の可否について成績は示されていない。また、ELISA 法は操作が煩雑で、2 波長測定可能なマイクロプレートリーダーが必要となることから、迅速性、簡便性において IC 法が最も優れている。いずれの方法も毒素液の調製が重要で、デュオパスでは過剰の菌量は非特異反応が見られることをメーカーが注意している。メルク製 CAYE 培地は静置培養が可能であることから、釣菌時に TSI、LIM に加えて CAYE 培地でも培養することにより、翌日大腸菌の

性状確認と同時に VT 産生性を判定できる。しかし、検出感度が RPLA よりも劣ること、検出されない *stx2* バリエーション株があること、非特異反応が見られることを考慮し、EHEC の特徴的な生化学的性状を示す 0157 や 026 であるのに、イムノクロマト法陰性の場合や、まれな血清型で VT 陽性と判定された場合には、他の方法でも VT または *stx* を確認できるよう備える必要がある。

今後は、増菌培地からの VT 検出に向けて、VT 産生に適した培地および培養条件の検討が課題である。

## E. 結論

VT 検出用イムノクロマト試薬であるキャピリアとデュオパスは、検出感度が RPLA よりもやや劣り、*stx2* バリエーション株では検出されないこともあるが、迅速性に優れ簡便であることから、EHEC の同定に有用である。また、分離平板上の典型的なコロニーからのスクリーニングにも応用可能である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 供試菌株

菌種 (血清型)	<i>stx</i> <sup>a</sup>	菌株数
EHEC (O157, O111, OUTなど)	<i>stx1, stx2</i>	34
EHEC (O26, O157, O103, OUTなど)	<i>stx1</i>	24
EHEC (O157, O111, O165, OUTなど)	<i>stx2</i>	42
小 計		100
ETEC (O6, O126, O159, O169)	—	4
その他の大腸菌	—	25
<i>Shigella</i> 属菌	—	2
<i>Salmonella</i> Enteritidis	—	1
<i>Citrobacter</i> 属菌	—	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	—	1
<i>Escherichia hermanii</i>	—	1
<i>Klebsiella pneumonia</i>	—	1
<i>Vibrio cholerae</i>	—	5
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	—	3
<i>Vibrio vulnificus</i>	—	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	—	1
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	—	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	1
小 計		50

a VT遺伝子

表2 PCR プライマー

標的 遺伝子	プライマー		増幅サイズ (bp)	アニーリング 温度(°C)	文献 (メーカー)
	センス	アンチセンス			
<i>stx1</i>	V1	V5	817	55	1
<i>stx2</i>	V3	V4	474	55	1
<i>stx1</i>	EVT-1	EVT-2	349	55	(タカラ)
<i>stx2</i>	EVS-1	EVS-2	404	55	(タカラ)
<i>stx</i>	up	down	約900	43	2, 3

文献 1 小林一寛, 食品と微生物 9:77-88, 1992

2 Lin Z, *et al*, Microbiol. Immunol. 37:543-8, 1993

3 Bastian SN, *et al*, Res. Microbiol. 149:457-72, 1998

表3 キャピリアの特異性

菌種	stx <sup>a</sup>	被検株数	RPLA陽性株数		キャピリア
			VT1	VT2	陽性株数
EHEC	stx1, stx2	23	23	23	23
EHEC	stx1	19	19	0	19
EHEC	stx2	17	0	17	15
<i>Escherichia coli</i> <sup>b</sup>	—	29	0	0	0
その他の細菌	—	21	0	0	0

a VT遺伝子

b ETECを含む

表4 デュオパスの特異性

菌種	stx <sup>a</sup>	被検株数	RPLA陽性株数		デュオパス陽性株数	
			VT1	VT2	VT1	VT2
EHEC	stx1, stx2	24	24	24	24	22
EHEC	stx1	17	17	0	17	0
EHEC	stx2	25	0	25	0	22
<i>Escherichia coli</i> <sup>b</sup>	—	20	0	0	0	0

a VT遺伝子

b ETECを含む



表5 *stx2* サブタイプ株の検出

血清型	<i>stx2</i> 型別	被検株数	RPLA陽性株数		デュオパス陽性株数		キャピリア陽性株数
			VT1	VT2	VT1	VT2	
O157:H7, NM	<i>stx2c</i>	15	0	15	0	12	5
OUT:HUT	<i>stx2c</i>	2	0	2	0	2	2
O63:H6	<i>stx2f</i>	2	0	2	0	0	2
OUT:H4, H12, HUT	<i>stx2e</i>	3	0	0	0	0	0

表6 EHEC 陽性検体 MAC 液からの VT 検出

検体番号	分離平板	コロニー数 <sup>a</sup>	分離株 (毒素型)	RPLA力価		デュオパス		キャピリア
				VT1	VT2	VT1	VT2	
1	CT-SMAC	白+++ , 赤+	O157 (VT1,VT2)	≥256	≥256	+++	+++	+++
2	CT-SMAC	白++, 赤+	O157 (VT1,VT2)	≥256	≥256	+++	+++	+++
3	CT-SMAC	白+, 赤+	O157 (VT1,VT2)	≥256	64	+++	+	+++
4	CT-SMAC	白小+, 赤+++	O157 (V2)	<2	16	-	+	+
4	DHL	赤+++ , 白+	-	<2	<2	-	-	+
5	CT-SMAC	白赤+, 赤+++	O65 (VT1,VT2)	≥256	16	+++	+	+++

<sup>a</sup> アンダーラインは分離されたEHECの典型的なコロニー

a)キャピリア

b)デュオパス

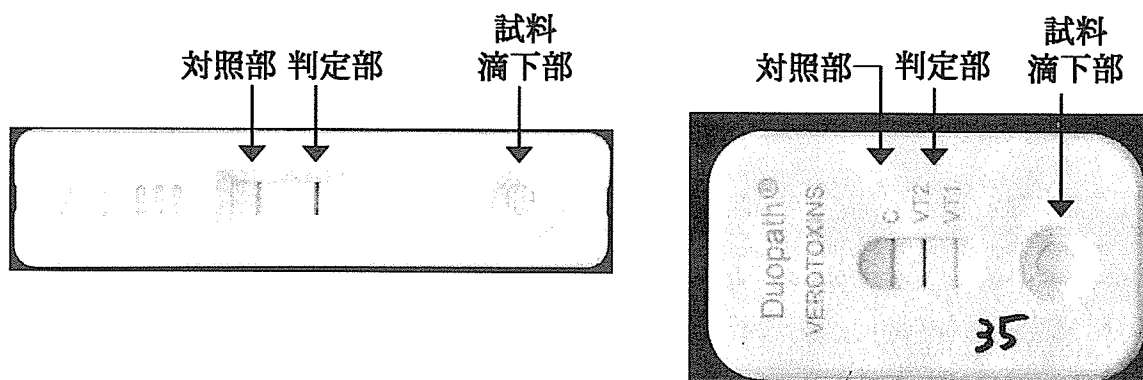


図1 イムノクロマト法の陽性判定例

a)キャピリア

b)デュオパス

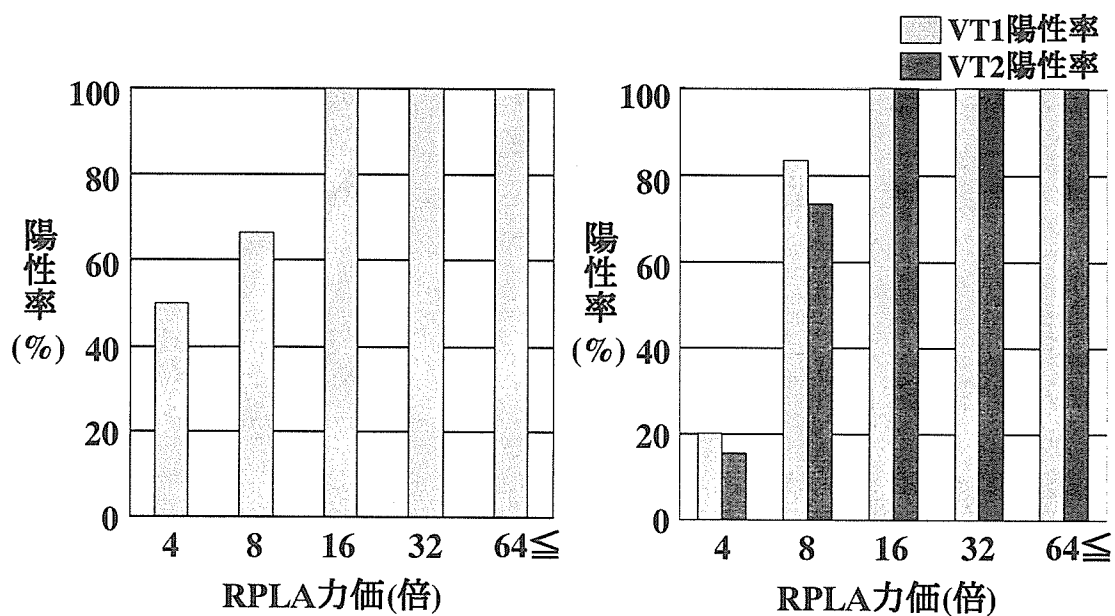


図2 イムノクロマト法の検出感度

## 食品における微生物迅速検査法の開発及びその精度評価システムに関する研究

### 生菌数および汚染指標細菌等の簡易迅速試験法の検討

分担研究者 浅尾 努 大阪府立公衆衛生研究所

研究協力者 久米田裕子 大阪府立公衆衛生研究所

河合 高生 大阪府立公衆衛生研究所

小笠原 準 大阪市立環境科学研究所

#### 研究要旨

国際的に汚染指標菌として利用されている大腸菌群、糞便系大腸菌群（食品衛生法で使用されている *E. coli* と同意語）、大腸菌などの試験法に関する国内外の情報を収集・解析した。その対象とした主たる試験法は、米国食品医薬品局（FDA）の Bacterial Analytical Manual（BAM）いわゆる FDA/BAM 法、ヨーロッパの International Organization for Standardization（ISO）法、日本の食品衛生小六法に記載された告示法と通知法である。これら試験法の手順、使用培地、培養温度などを比較・解析した結果、米国の FDA/BAM 法とヨーロッパの ISO 法は、培養温度等の細部では異なるが、使用培地を含む試験法の概要は互いに類似した部分が多いことがわかった。これに対して、日本の告示法・通知法は、FDA/BAM 法や ISO 法とは特に使用する培地が大きく異なっていた。例えば、日本では大腸菌群数測定用平板培地にはデソキシコレート寒天培地が指定されているが、FDA/BAM 法と ISO 法では VRBA 培地が使用されている。汚染指標菌試験のスタート時に使用する液体培地は、FDA/BAM 法と ISO 法では LST 培地にほぼ一本化されているが、日本では BGLB 培地、BTB 加 BGLB 培地あるいは EC 培地を食品群別に使い分けることになっている。FDA/BAM 法には損傷大腸菌群試験法が、ISO 法には損傷大腸菌試験法が示されている。ISO 法には FDA/BAM 法や日本の告示法・通知法にはない *Enterobacteriaceae*（仮約：腸内細菌科菌群）試験法が記載されている。FDA/BAM 法と ISO 法には合成酵素基質を利用した迅速培養法も採用されているが、日本では旧来の方法のみしか認められていない。日本の汚染指標菌試験法は迅速性が乏しいだけでなく、試験法の国際的な調和の視点からも好ましくない状況にあることが明確となった。

#### A. 研究目的

食品衛生法に定められた告示法による生菌数試験法では、カキや冷凍食品以外は最

終結果が得られるまでに 2 日間を要し、大腸菌群や *E. coli* 試験法（カキの MPN 試験法を除く）では最長 5 日間の培養期間が必

要である。このような現状から、食品製造業界では、製品の流通を迅速かつ円滑に行うために、最終結果が出るまでに製品を流通ルートに乗せ、規格試験に合格の結果が得られた時点で実際に販売されるというような措置が取られている場合もあると推察される。出荷前の製品の安全性や品質の良否を評価できる迅速・簡便な汚染指標菌試験法を開発し評価することは、食品産業での食品の製造コストや流通コスト削減にも寄与することが期待される。食品流通がグローバル化している現状を勘案すれば、国際調和に立脚した汚染指標菌試験法の迅速・簡便化を目指すことも重要目標であるとする。本年度は試験法の国際的な趨勢を把握するため、国内外の汚染指標菌試験法に関する情報を収集・解析した。

## B. 研究方法

汚染指標菌試験法を比較検討した主たる資料は以下の三点である。①食品衛生小六法（日本の告示法・通知法）②ISO（International Organization for Standardization）は日本規格協会から購入した③米国 FDA/BAM（Bacterial Analytical Manual）はインターネット（<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>）から入手した。その他 American Public Health Association（米国公衆衛生協会）の乳製品試験法、Health Protection Agency（英国食品安全庁）の National Standard Method や Health Canada（カナダ厚生省）の Official Methods for the Microbiological Analysis of

Foods も参考にした。

## C. 研究結果

### 1. 日本の汚染指標菌試験法の現状と問題点

食品衛生法には乳等省令の28種類の食品（表1）と、それ以外の18種類の一般食品（表2）に対して、大腸菌群陰性あるいはE. coli 陰性（一部でMPN限界値や菌数限界値）の成分規格が定められている。食品の規格基準への適否の判定は、乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（いわゆる乳等省令）、氷雪の成分規格、冷凍食品の成分規格に記載された試験法などに従わなければならない。しかし、これらの試験法は長年改訂されていないために、国際的な趨勢から取り残された感は否めない。国内的にも、既存の汚染指標菌試験法が見直されないままに新たな試験法が告示・通知されてきた弊害により、例えば以下のような問題点が生じている。

- ① 食品の希釈液が統一されていない。告示された時期が古い試験法では希釈液に生理食塩水が指定されたが、その後はリン酸緩衝液になり、最近ではペプトン加生理食塩水へと変遷してきた（表1、表2）。ペプトンは食品中の損傷菌の回復に効果があるといわれている。
- ② 培養温度の表示方法が統一されていない。告示時期の新しい一般食品では、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ の厳密な培養条件が設定されているが、告示時期の古い乳等省令関連の食品に対しては、 $32\text{--}35^\circ\text{C}$ と幅のある培養