

が国で評価法を確立するためには、今後、下記のいくつかの要点について重点的に評価法を確立する必要があると考えられた。

- 正確さ
- 精度
- 再現性（室内、室間）
- 特異性
- 感度検出限界・定量限界
- 範囲
- 分析の対象（matrix）
- 堅牢性

3. 国内評価法へむけての課題検討事項整理

上記調査結果を踏まえて、わが国の迅速キット評価に必須な項目の優先順位等の検討を行なった。その結果、平成19年度は下記のポイントを重点的に検討・整理していく必要があると整理された。

一 分析目的

迅速法は何との同等性を評価するのか？
（国内標準法か国際標準法か？）

一 分析対象

①Analyte

何を分析対象とするか？指標菌の場合、定義や標準法との兼ね合い

② Matrix

どのような食材を対象とするか？

一 無理のないコスト、評価時間

OMA (Official Methods Program)相当か
PTM (Performance Tested Method)相当か？

一 その他、認証評価の手法的課題

① コラボデータ（室間再現性）はどの範囲まで必要か？

② 判定基準としての有意差、相関係数、一致率について、対照培養法（標準法）との比較をどのような基準で判定するか？

③ LMH（食品高濃度汚染、中濃度汚染、低濃度汚染）モデル食品の設計

4. 次年度コラボ実験へ向けての予備実験

平成19年度のコラボラボのロールプレイの予備実験として、東京海洋大学食品微生物学研究室で開発した大腸菌の迅速判別法（コロニーダイレクトTaqMan PCR法）による迅速法鑑別法について、予備的に評価実験を実施し、以下の結果を得た。

まず、本法による各種鑑別培地にコロニーを形成した *E. coli* の識別能について、腸内細菌科の細菌 10 種 58 株を直接試料として TaqMan PCR に供試した結果、EMB 寒天平板培地に形成したコロニーを除きすべてのサンプルにおいて、*E. coli* 識別が可能であった（表 3）。また、EMB 寒天平板培地に形成したコロニーについても、50mM リン酸バッファーで 2 回洗浄後、その希釈液を試料として用いることで、供試した 30 コロニーすべてで検出が可能であった（表 4）。また、*Salmonella* Typhimurium, *Serratia marcescens* と混合塗抹した場合においても、*E. coli* の典型コロニーを供試することにより、92.5%のコロニーで TaqMan PCR による *E. coli* の検出が可能であった（表 5）。

以上の大腸菌の迅速判別手法を用いたの評価試験を通じて、平成19年度以降の大腸菌および大腸菌群の迅速キットおよび装置の評価試験（コラボスタディー）へ向け

ての予備的な準備を完了した。

D. 結論

以上、平成18年度は、国内で市販されている一般生菌数や汚染指標細菌などを標的とした迅速法の実態調査、これらの迅速法の客観的な評価法に関する基礎情報収集、これらの方法を評価するために必要な項目の予備整理、わが国の迅速キット評価に必須な項目の優先順位等の検討を行った。これらの研究成果により平成19年度は、1)バリデーションプログラムの設定(プロトタイプ)、2)申請企業の室内データの保有状況調査、3)申請企業、コラボラボ、レビュー者でのバリデーションプロセスのロールプレイを通じて、問題点の洗い出し、等の手順で検討を進めていく予定である。

E. 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(2), 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(5), 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(6), 288-292 (2006)

- 4) H. Takahashi, M. Sato, B. Kimura, T. Ishikawa and T. Fujii: Evaluation of PCR-single strand conformational polymorphism analysis for identification of gram-negative histamine-producing bacteria isolated from fish. *J. Food Prot.* 70, (2007) in press.

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 調整無菌化米飯のポ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.

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

特になし

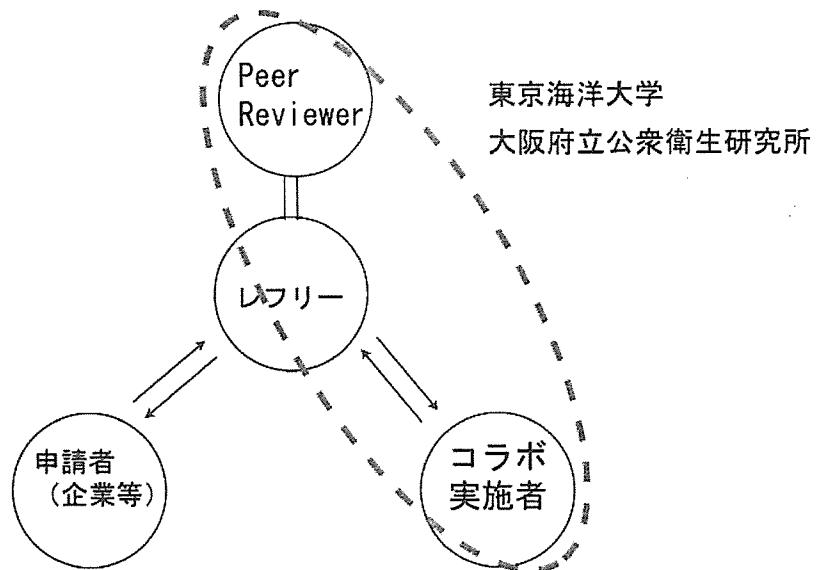


図1 平成19年度バリデーションプロセス検証の
ロールプレイ概念図

表1 現在国内に流通している主な市販キットや装置

商品名	メーカー	用途・特徴	測定原理	測定時間
ChemScan.D- CountiBactiFlow	chemunex	酵母・乳酸菌・微・細菌・ 生菌数測定	フィルター法(蛍光細胞染色法)	
微生物検出システムBactiFlow	AES-chemunex、 池田理化	わずか1分で微生物を 検出	フローサイトメトリー による検出(488nm レーザー)	1分間(毎時15 検体)
微生物検出システムBactiFlow	AES-chemunex、 池田理化	25検体を全自動で迅速 に測定	フローサイトメトリー による検出(488nm レーザー)	1分間(毎時25 検体)
BactiFlow生菌数 測定キット	AES-chemunex、 池田理化	一般生菌数測定	生菌の生理活性を用いた微生物の蛍光標識	染色12分、測定 1分
BactiFlow超高感 度生菌数測定キ ット	AES-chemunex、 池田理化	純水の一般生菌数測定	メンブレンを利用した 濃縮と生菌数測定 キットの組み合わせ により5CFU/100ml の検出	染色12分、測定 1分
BactiFlow腸内細 菌検出キット	AES-chemunex、 池田理化	発酵乳製品をはじめとし た食品の腸内細菌の検 出	選択培地で増殖した ものを生菌数測定 キットで測定	10時間(前培養 込)
BactiFlow無菌試 験キット	AES-chemunex、 池田理化	化粧品、化成品、果汁 飲料等の無菌試験	増菌培地で増殖した 菌を測定	20時間(前培養 込)
バイオプローラ	松下エコシステムズ	細菌、生菌数測定	蛍光染色法	10分
ラビットシステム	ドン・ホイットレー社	生菌数測定	インピーダンス法	数時間
テンポ(TEMPO)	日本ビオメリュー	一般生菌数測定、大腸 菌群数、大腸菌数	MPN法を自動化。 試料原液をMPNを 原理とするカードに 分注し、培養後に リーダーで読み取る ことより、菌数が自	48時間以下
バクテアラート3D 微生物培養検査シ ステム240検体用	日本ビオメリュー	各種微生物の検出、食 品飲料の迅速無菌検査	CO ₂ センサー	1~3日
バクテアラート3D 微生物培養検査シ ステム120検体用	日本ビオメリュー	各種微生物の検出、食 品飲料の迅速無菌検査	CO ₂ センサー	1~3日
バクテアラート3D 微生物培養検査シ ステム60検体用	日本ビオメリュー	各種微生物の検出、食 品飲料の迅速無菌検査	CO ₂ センサー	1~3日
Miliflex-Rapid生 菌数迅速検出シス テム	日本ミリポア	酵母・乳酸菌・微・細菌	メンブランフィルタ ー法+ATP法+フォ トン検出	
迅速菌数測定・判 定装置MicroFoss	FossElectric(DK)		細菌代謝に由来する 培地内の化学的特 性に基づく菌数の予	
Micro Foss TVCテ ストバイア		TVC(Total Viable Count:一般生菌数)		4~24時間
Micro Foss Coliformテストバイ アル		大腸菌群		10時間~
Micro Foss E. Co liテストバイアル		大腸菌		10時間~
Micro Fossカビ・酵 母テストバイアル		カビ・酵母		48時間~

総菌数迅速自動測定装置B-EX	アリオテクノ	細菌中の総菌数を短時間で測定可能なため、食中毒を未然に防ぐ事が可能である。	誘電電気泳動法・オート顕微鏡	役10分(前処理除く、セッティングを含む)
食品細菌検査システムDOX-60F/DOX-30F	バイオ・シーター	酸素電極により試料の微生物呼吸量をモニターし総菌数を計測する	試料と培地をセルに分注後セットするだけの簡便操作	10 ⁵ レベルで約6時間
BACTANA	シスメックス	一般生菌数(一般細菌、酵母、芽胞など)、微生物のスクリーニングとモニタリングが可能	フローサイトメトリー法	2分(全自動サンプラーで5試料を10分で測定)
コロニーカウントハンディタイプ	笛吹事務所	コロニを自動的に計測する。	計数、半導体を組み合わせた	数秒
Zeo(ゼオ)(Colony Viewer System)	重松貿易、キューアイ	全てのテストデータ・画像をデータベース管理、オートカウント・ズーム・自動集計等多彩な機能	高感度CCDカメラを使用した画像解析とデータベース管理	1秒
イメージアナライザーiSacⅢ	エルメックス	細菌数の計測、検査データのデジタル化によるデータ管理機構付き	高感度CCDカメラによる画像解析、データロガー標準搭載	約1秒
ペトリフィルムプレートリーダー	米国 スリーエム	ペトリフィルム専用でAC,CC,ECプレートのカウント可能、ガス発生の有無もカウント、結果は自動転送、コンパクト設	CMOSカメラ、専用ソフト	4秒/1秒
フラッシュアンドゴー	IUL	混釈・スパイラルプレート対応	CCD画像処理	数秒
エコライトSuper count	topac	混釈・スパイラルプレート対応	簡単な3ステップでの測定が可能	
プロコトールSR	Synoptics	混釈・スパイラルプレート対応	標準タイプ、CCD画像処理、0.2mm以上のコロニーを解析可	数秒
プロコトールHR	Synoptics	混釈・スパイラルプレート対応	高感度タイプ、CCD画像処理、0.1mm以上のコロニーを解析可能	数秒
スキャン500	interscience	スキャン500は色の異なる培地、寒天厚の変動、接触コロニー、メニスカスの影響、スプレッター、気泡、破片、異なるサイズのコロニーなど幅広い範囲のプレートの読み取りが可能	ソフトウェアによりプレートとサンプルを自動的に比較計測するスペシャルイルミネーションとカメラコントロールを組み合わせたユニークなコロニー検出システム	
コロニーアナライザーCA-11DS	システムサイエンス	高速画像積算機能装備。コロニーの自動計測。デソパイチ、各種選択培地。混釈、表面塗末、スパイラルコロニー、ペトリフィルム、コロニーの分離計測	高感度カメラを使用し、CRT上に生画像と検出画像が実時間で表示される。	0.9秒/シャーレ
多目的高速画像解析装置PCA-11DS	システムサイエンス	細菌・細胞コロニー、生死細胞数(無培養)阻止円、MIC、粒度分布等、コロニーの自動分離計	CA-11DSの上位機種。画像強調機能装備	0.9秒/シャーレ

マルチバイオス キャナー MB-2000	オリエンタルインスツ ルメンツ	コロニーカウント、阻止 円直径測定、MIC測定	超高速画像解析、低 価格、簡単操作、小 型軽量	
画像解析装置BV- 4100	東洋測器	コロニー数、阻止円の 大きさを測定し必要な画 像を保存管理	画像解析による微生 物自動測定技術	
コンパクトアイ130	日水製薬	小型コロニー数自動計 測機	小型カメラとスタンド のみ。パソコンは市 販品でOK	瞬時
BiomaticDMCS S- 12 12検体用	マイクロバイオ	デジタル顕微鏡技術 による微生物検出装 置。食品衛生法に基づく 公定試験法に準じた培 養法を用い、一般生菌 数のコンピューター画像 処理での自動計数が可	デジタル顕微鏡方 式細菌検出装置	大腸菌群最短 で6時間
BiomaticDMCS FA-100 100検体 用	マイクロバイオ	デジタル顕微鏡技術 による微生物検出装 置。食品衛生法に基づく 公定試験法に準じた培 養法を用い、一般生菌 数のコンピューター画像 処理での自動計数が可	デジタル顕微鏡方 式細菌検出装置	大腸菌群最短 で6時間
顕微鏡デジタルシ ステム MOTICAM2000SGI	島津理化器械	食中毒事故、混入事故 のサンプルを鏡検画像 として保存したり、メー ル添付画像として送付 したり、報告文書への画 像添付等ができる	1/2インチCMOS,200 万画素顕微鏡画像 をIUSBケーブルでパ ソコンへ入力し、保 存、加工、計測がで きる、実態顕微鏡、 生物顕微鏡に簡単 に取り付け	

表2 ATP等、間接的に微生物汚染を検査するキット、装置

商品名	メーカー	用途・特長	測定原理	測定時間
コンパクトルミ VS500	ヤマト科学	食品製造工場の清浄度管理	ATP測定法	10秒
ライトニングMVP		食品製造ライン等の清浄度測定、キットの室温保存が可能、pH・温度測定プローブを接続することでより簡単に測定可能	ATP法	12秒
MVPスワブキット 表面用				
MVPスワブキット 液体用				
温度プローブ				
pHプローブ				
ルミテスター	キッコーマン	清浄度測定/微生物測定	ATP法/生物発光免疫測定等	10秒(固定)
ルミテスター	キッコーマン	清浄度測定(ATP法)	ATPふきとり検査専用機	10秒
ルシパックⅡ	キッコーマン	清浄度測定(ATP法)	ATPふきとり検査用一体型試	10秒
ルシフェライト「ニッスイ」ルミメイト	キッコーマン	清浄度測定(ATP法)	ATP法、試薬器具一体化させた簡易検査キット	10秒
ルシパックワイド	キッコーマン	清浄度測定(ATP法)	ATPふきとり検査用一体型試	10秒
ルシフェール250プラス	キッコーマン	清浄度測定/一般生菌測定	ATPふきとり検査/ATP法	10秒
ルシフェール250	キッコーマン	一般生菌測定	ATP法(抽出剤別)	10秒
ルシフェールHS セット	キッコーマン	一般生菌測定	ATP法(高感度タイプ)	10秒
ルシフェール	キッコーマン	一般生菌測定	ATP法(乳製品、無菌試験用)	10秒
ルミテスターK-200	キッコーマン	食品衛生管理用ATP測定器	ATP生物発光法	約10秒
ATPアナライザ AF-100	東亜ディーケーケー	生菌数、細胞数、多種の測定モード、ろ過法に対応、高感度測	ATP法	数分
ATPテストAF-70	東亜ディーケーケー	高感度測定可、プリンタRS232C内蔵、豊富な測定モード	ATP法	数分
菌士郎ATP発光キット	東洋ビーネット	生菌数の測定、自主衛生検査:高感度	ATP法	数分
ユニライト	バイオトレース	簡易型洗浄度検査	ATP法	15秒
ユニライトNG	バイオトレース	洗浄度検査用、データ処理機能	ATP法	15秒
クリーントレース	バイオトレース	ワンショットタイプふき取り検査	ATP検出試薬	
アクアトレース	バイオトレース	ワンショットタイプ水測定試薬	ATP検出試薬	
マルチトレース	バイオトレース	ふき取り検査試薬	ATP検出試薬	
ウォータートレー	バイオトレース	水測定試薬	ATP検出試薬	
ベプトレース	バイオトレース	菌測定試薬	ATP検出試薬	
HY-Lite2、コンパクトキット、HY-Liteリフィルパック	メルク	ふきとりおよび液体テストによる微生物、食品残渣検出	ATP法	2分
OR-100	オルガノ	清浄度測定用および生菌数測定用の2種類の測定モード、プリンタRS232C	ATP法	1分
AccuPoint ATP測定装置	Neogen社	食品衛生検査システム/データ管理ソフト付属	ATP法/ATPふきとり検査装置	10秒
AccuPoint ATP	Neogen社	ワイドなサンプラー	ATP直接ふき取り検査用	
表面用サンプラー			表面測定試薬	
Accupoint ATP水用サンプラー	Neogen社	パッド、調理器具や手指に一定の水をサンプリングできるように設計、洗浄水や貯蔵飲料水向け	ATPふきとり検査用液体測定試薬	
Accupoint ATPアクセスサンプラー	Neogen社	綿棒タイプ、ノズルなど狭い場所向け	ATPふきとり検査用液体測定試薬	
ポールチェック	ポールコーポレーション	1つの装置でさまざまな微生物量検出、方法①フィルター上の微生物の検出(MF法)②作業台表面直接法③スワブ法④液体の微生物の検出直接法	ATP法	60秒以内
プロテクト	エアブラウン		タンパク法	
チェックプロ	メルク		タンパク法	
グリーンチェックタンパクです	日研生物医学研究所		タンパク法	
HY-Rise	メルク		NAD法	

表3 *uidA* 遺伝子を標的として大腸菌のTaq Man assay での判別特異性試験結果

Speicies	The number of strain	TaqMan assay result
<i>Escherichia coli</i>	24	+
<i>Citrobacter freundii</i>	3	—
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	—
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	—
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1	—
<i>Erwinia carotovora</i>	1	—
<i>Klebsiella planticola</i>	1	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	5	—
<i>Serratia marcescens</i>	14	—
<i>Salmonella</i> Typhimurium	2	—

表4 各種鑑別培地上のコロニーの *E. coli* のタックマン検出結果

Strain	Desoxycholate	Chromocult	MacCONKEY	EMB	EMB(After washing)
	P/N ^a	P/N	P/N	P/N	P/N
ATCC43894	10/0	10/0	10/0	0/10	3/0
ATCC43890	10/0	10/0	10/0	0/10	3/0
IAM12057	10/0	10/0	10/0	0/10	3/0
IAM12058	10/0	10/0	10/0	0/10	3/0
IAM12084	10/0	10/0	10/0	5/5	3/0
ATCC11775	10/0	10/0	10/0	0/10	3/0
C28	10/0	10/0	10/0	0/10	3/0
IAM12060	10/0	10/0	10/0	0/10	3/0
IAM1239	10/0	10/0	10/0	0/10	3/0
IAM12018	10/0	10/0	10/0	0/10	3/0

^aNumber of positive colony/Number of negative colony.

表5 *Salmonella* Typhimurium, *Serratia marcescens* と混合塗抹した場合の *E. coli* の典型コロニーのタックマン識別結果

Strain	Mixture ratio	Desoxycholate	Chromocult	MacCONKEY
	<i>E. coli</i> : <i>Serratia</i> : <i>Salmonella</i>	P/N	P/N	P/N
ATCC43894	1:1:1	10/0	10/0	10/0
	1:10:10	10/0	10/0	10/0
	10:1:1	10/0	10/0	10/0
ATCC11775	1:1:1	10/0	10/0	10/0
	1:10:10	10/0	10/0	10/0
	10:1:1	10/0	10/0	10/0
IAM12057	1:1:1	10/0	10/0	3/7
	1:10:10	10/0	10/0	1/9
	10:1:1	10/0	10/0	8/2

^aNumber of positive colony/Number of negative colony.

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

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

分担研究者 宮本 敬久 九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門 教授
研究協力者 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

研究要旨

新鮮で安全な製品の供給を行うためには食中毒細菌の簡易迅速検査法の開発が必須であり、遺伝学および免疫学的手法を駆使した様々な検出法が開発され、市販されている。しかしながら、これら市販の方法、プライマーセット、キットの検出感度、精度などについての正確な評価が行なわれているわけではない。そこで本研究では、市販の分子生物学的手法を応用した食中毒細菌の迅速検査法の評価・検討を行った。

本年度は、標準法の検討が進んでいる腸管出血性大腸菌 0157 および 0157 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。このため、今年度 122 株の腸管出血性大腸菌および大腸菌 0157 を収集した。このうち 88 株の大腸菌 0157 (EC-141 以外)、33 株のベロ毒素産生性大腸菌、合計 121 株をリボプリントパターンにより分類した結果、毒素型とは関係なく、腸管出血性大腸菌 0157 は大きく 2 つの大きなリボグループに分類された。このうちリボグループ 422-9-S-7 が主要なグループであり、0157 の 72% が含まれた。また、市販の大腸菌 0157 検出キットについて調査した結果、キットではベロ毒素遺伝子 *stx*、および O 抗原決定因子 *wzx*, *wzy* の内部配列を PCR により増幅して検出するものが多いようであった。収集した種々の腸管出血性大腸菌 0157 および 0157 以外のベロ毒素産生性大腸菌株 32 株で、これら遺伝子の全構造遺伝子部分を PCR 増幅した結果、全く増幅されない菌株および目的サイズとは異なる PCR 産物が増幅された菌株が存在した。

A. 研究目的

近年、消費者および生産者の食の安全に対する意識も高まり、食品の製造においても Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP) システムなどの衛生管理手法が導入されてきている。しかし、一方では食品流通の広域化、国際化が進み新た

な食の安全を脅かす要因が増加するなど、我々の食生活を取り巻く情勢は大きく変化し続けている。その中でも細菌性食中毒は、全食中毒事例の 7 割近くを占めており、食の安全を保つ上で、食中毒細菌を検出する技術の向上は最も重要な要素の一つである。現在、食中毒細菌検出法の多くは培養を基

礎としているため、検出までに数日を要する。さらに検査対象の菌種ごとに培養条件が異なり、多様な食中毒細菌を検出するには、煩雑な培養操作が必要となる。

このため新鮮で安全な食品の供給を行うためには食中毒細菌の簡易迅速検査法の開発が必須であり、遺伝学および免疫学的手法を駆使した様々な検出法が開発されてきている。この中でも特定の細菌に特異的な遺伝子の塩基配列を増幅して検出を行う、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法に基づいた検査法は、その感度、迅速性ならびに特異性の高さから様々な食中毒細菌検出法に応用されている。これに加え、同時に2つ以上の遺伝子を増幅する Multiplex PCR 法、リアルタイムに遺伝子の増幅を測定することができる Real-time PCR 法が開発され、食中毒細菌検出の更なる迅速、簡便化が期待されている。しかし、PCR 法をはじめ、これら迅速検査法の検出下限は 10^3 cfu/ml 程度であり、食品試料の10倍乳剤から直接標的食中毒細菌を検出する事は非常に困難である。このため高感度な検出の為には、効果的な増菌培養法も必要となってくる。しかし現在、市販されている分子生物学的原理に基づいた食中毒細菌検出法のプライマーセット、キットの検出感度、精度などについての正確な評価が我が国で行なわれているわけではない。

そこで本研究では、市販の分子生物学的手法を応用した食中毒細菌の迅速検査法の評価・検討を行った。通常、同じ種類の食中毒菌でも、ゲノムDNA中に塩基置換部位が存在し、これにより、構造遺伝子の機

能、特に病原因子をコードする遺伝子内部における塩基置換は、その病原性にも大きく影響することがある。食中毒菌検出用の分子生物学的方法で指標とする遺伝子は病原因子遺伝子が多いが、菌株の違いにより遺伝子内に塩基置換が存在するため、検査法評価の為には種々の起源の食中毒菌株を準備し、検討することが必要となる。このため、本年度は、腸管出血性大腸菌 O157 およびベロ毒素産生性大腸菌について、標準的な塩基配列を持つ、分子生物学的検査法評価のための遺伝学的な標準株の選択を行うために種々の菌株を入手した。これらの菌株のリボプリントパターンによる分類ならびに検出の指標となる O157 抗原決定因子遺伝子 wxy, wxz、およびベロ毒素遺伝子 stx1, stx2 の内部塩基配列を決定し、塩基配列置換部位の同定および共通塩基配列領域の確認を行った。さらに市販キットのプライマーの塩基配列および増幅領域を知るため、キットによる遺伝子増幅産物の塩基配列決定も試みた。

B. 研究方法

1. 供試菌株

福岡市保健環境研究所から合計 122 株の腸管出血性大腸菌株の分与を受けた。これら腸管出血性大腸菌株の血清型及び毒素型などを表 1 に示す。

2. リボプリンターシステムによる分類

種々の血清型および毒素型の腸管出血性大腸菌株についてリボプリンターシステム (DuPont 社) を用いた EcoRI キットによるリボプリントパターン解析を行った。

3. 腸管出血性大腸菌検出用の市販分子生物学的同定・検出キットで使用されるプライマーセットにより増幅されるPCR産物の塩基配列の決定

市販の食中毒菌検査用分子生物学検査キットについて調査した。これらのキットでは、PCRにより増幅される産物の大きさは明記されているが、これに使用されているプライマーセットの塩基配列及び増幅領域についての情報は少ない。このため、本年度はタカラバイオ社のキット O-157 & ベロ毒素遺伝子同時検出キット(Multiplex PCR O-157 /Verotoxin genes detection kit)に使用されているプライマーの配列と増幅される領域を同定するため、数種の腸管出血性大腸菌のゲノムDNAを鋳型として、キットに指示された反応条件でPCRを行った。増幅 DNA サイズは、O-157 抗原決定因子遺伝子は 457 bp、VT1 では 349 bp、VT2, VT2vha, VTvhb, VTvpl, VT2vp2 では 112 bp となる。各PCR産物は、アガロースゲル電気泳動による確認の後、各PCR産物を pGEM-T Easy ベクターシステム(プロメガ社)を用いてクローニングした。この各PCR産物をインサートとして含むプラスミドの塩基配列は株式会社バイオマトリックス研究所(千葉県流山市)に依頼して決定した。この結果より増幅産物(両端にプライマーの配列を含む)の標的遺伝子上の領域およびプライマーの領域を推定した。

4. 腸管出血性大腸菌株O157 株のO抗原決定因子遺伝子、ベロ毒素産生株のベロ毒素遺伝子の内部塩基配列の決定

現在保有している腸管出血性大腸菌株お

よび大腸菌O157 株について、腸管出血性大腸菌 O157:H7 EDL933 株の塩基配列を基に作製したプライマーセットを用いてベロ毒素産生株のベロ毒素遺伝子(stx1, stx2)の全構造遺伝子およびO抗原決定因子(wzy, wzx)の全構造遺伝子をPCR増幅し、増幅産物の塩基配列を直接決定して、その内部塩基配列を調べ、菌株間における塩基配列の置換の有無と程度について検討した。

各遺伝子増幅用プライマーの塩基配列は以下の通りである。塩基配列は5'→3'の向きに記してある。

(プライマー)

Shiga toxin 2 subunit A→B(1241 bp)増幅用プライマーセット

st2AB-F: atgaagtgtatattattttaaattgggta
(Length:27bp Tm:56.8)

st2AB-R: tcagtcattattaaactgcactt
(Length:23bp Tm:57.0)

Shiga toxin 1 subunit B→A (1272 bp) 増幅用プライマーセット

st1BA-F': ctattttctactgactatttctaag
(Length:24bp Tm:55.06)

st1BA-R': gctcaaggagtattgtgtaat
(Length:21bp Tm:54.9)

wzy (1179 bp) 増幅用プライマーセット

wzy-F: gtgaagtcagcggcta
(Length:16bp Tm:55.5)

wzy-R: gtcacagttataactgatattttcat
(Length:26bp Tm:56.1)

wzx (1392 bp) 増幅用プライマーセット

wzx-F: atgataatgaataaaatcaaaaaata

(Length:27bp Tm:56.9)

wzx-R: tcactcctcttatatttaactgtctatc

(Length:27bp Tm:56.8)

(PCR 反応条件)

DNA polymerase としては EX Taq DNA polymerase (タカラバイオ社) を用い、熱変性 (95°C、1min) の後、(95°C,15sec→55°C,30sec→72°C,90sec) の反応を 40 サイクル行った。PCR 産物のサイズはアガロースゲル電気泳動により確認した。

(PCR 産物の精製と塩基配列の決定)

PCR 増幅産物は、市販の PCR 産物精製キットで精製し、その塩基配列を直接、株式会社バイオマトリックス研究所 (千葉県流山市) に依頼して決定した。

C. 研究結果

1. 市販の食中毒菌検査用分子生物学的キット

市販の食中毒菌検査用分子生物学的検査キットについて調査した結果を表 2 に示す。国内外 14 社から種々の食中毒菌検査のための分子生物学的手法に基づいたキットやプライマーセットが販売されていた。これらのキットでは、PCR により増幅される産物の大きさは明記されているが、これに使用されているプライマーセットの塩基配列及び増幅領域についての情報はほとんど記載は無かった。同一の食中毒細菌検査においても、それぞれ推奨されている増菌培地や選択培地は異なっていた。

2. リボプリンター全自動細菌同定システムによる分類

今年度 122 株の腸管出血性大腸菌および大腸菌 O157 を収集した (表 1)。このうち 88 株の大腸菌 O157 (EC-141 以外)、33 株のベロ毒素産生性大腸菌、合計 121 株の腸管出血性大腸菌をリボプリントパターンにより分類した結果を表 3 に示す。この結果、毒素型とは関係なく、ベロ毒素産生性大腸菌 O157 は大きく 2 つの大きなリボグループに分類され、リボグループ 422-9-S-7 が主要なグループであり、大腸菌 O157 の 72% が含まれた。これら 2 つのグループに分類されないものもいくつか存在した。O157 以外の血清型のベロ毒素産生性大腸菌でも、それぞれの血清型毎に分類される傾向にあった。

3. 市販キットのプライマーセットによる増幅産物

タカラバイオ社の O-157 & ベロ毒素遺伝子同時検出キットのプライマーセットで増幅される遺伝子産物

保存番号 No.28, No.29, No.100, および No.16 株についてゲノム DNA を調製し、本キットのプライマーセットを用いて PCR を行った結果を図 1 に示す。この結果、O 抗原型および毒素型に対応した目的サイズの PCR 産物が正しく増幅された。これらの PCR 産物の塩基配列は現在決定中である。

4. 腸管出血性大腸菌株 O157 株の O 抗原決定遺伝子、ベロ毒素産生株のベロ毒素遺伝子の内部塩基配列

これまでに 32 株の腸管出血性大腸菌株について PCR を行った。結果は図 2 に示す。これより、NO.20 (EC-18) は VT1 &

2となっていたが、VT全構造遺伝子増幅用プライマーセットでは、増幅されなかった。また、EC-56ではVT2遺伝子のPCR産物のサイズが、目的のものより大きく、どちらかのプライマーのミスアニールまたは、遺伝子内部におけるDNAの挿入などが起きていることが推察された。これらの増幅産物は、市販のPCR産物精製キットで精製し、直接、塩基配列を決定しているところである。

D. 考察

今年度収集した腸管出血性大腸菌株122株のうち121株のリボプリントパターンを調べた結果、大腸菌O157の72%が含まれるグループが見出され、これらのグループには異なるベロ毒素産生性の菌株が含まれていたが、これらは腸管出血性大腸菌O157に標準的な塩基配列と遺伝子構成のゲノムDNAを持つグループであると推察された。今後、収集した全菌株のベロ毒素遺伝子(stx1, stx2)の構造遺伝子およびO抗原決定因子構造遺伝子(wzy, wzx)の塩基配列を決定し、塩基置換について解析した結果と合わせて、評価に使用する標準的な腸管出血性大腸菌を選択する計画である。また、これらの塩基配列決定後には、全ての大腸菌O157に共通のO抗原決定因子遺伝子の塩基配列領域および、各ベロ毒素遺伝子の共通塩基配列領域も明らかとなるので、これらのデータにより、市販の検出キットの評価が容易になるばかりではなく、より検出精度の高い腸管出血性大腸菌O157ならびにベロ毒素遺伝子保有株検出用のプライマーセットの設計が可能ともなる。

19年度は、タカラバイオ社以外の製品に

ついても評価を行う予定である。また、さらに腸管出血性大腸菌O157およびO157以外のベロ毒素産生性大腸菌株を収集し、塩基配列を決定して、菌株間における塩基置換部位を同定し、市販キットの評価を継続する。また、ベロ毒素遺伝子stxおよびO抗原決定因子遺伝子wzx, wzyの塩基配列のなかで、全ての菌株に普遍的に存在する配列部分でプライマー及びプローブをデザインし、これらの中で最も増幅効率の高いプライマーセットおよび検出感度の高いプローブを選択し、現在市販されているものよりも高性能な検出用プライマーセットおよびプローブを作製する計画である。時間的な余裕があれば、リステリア菌についても同様の検討を行う。

E. 結論

本年度は、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。このため、今年度122株の腸管出血性大腸菌および大腸菌O157を収集した。このうち88株の大腸菌O157(EC-141以外)、33株のベロ毒素産生性大腸菌、合計121株をリボプリントパターンにより分類した結果、毒素型とは関係なく、腸管出血性大腸菌O157は大きく2つの大きなリボグループに分類された。このうちリボグループ422-9-S-7が主要なグループであり、O157の72%が含まれた。また、市販の大腸菌O157検出キットについて調べた結果、キットではベロ毒素遺伝子stx, およびO抗原決定因子wzx, wzyの内部配列をPCRにより増幅して検出するものが多いようであった。収集した種々の腸

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株 32 株で、これら遺伝子の全構造遺伝子部分を P C R 増幅した結果、全く増幅されない菌株および目的サイズとは異なる P C R 産物が増幅された菌株が存在した。

F. 健康危害情報

無し

G. 研究発表

無し

**H. 知的財産権の出願・登録情報
(予定を含む)**

無し

表1. 腸管出血性大腸菌使用菌株

保存番号	<i>E.coli</i> 番号	O 抗原	H 抗原	VT 型	由来	性別	年齢
No.015	EC-14	26	11	1	?	?	?
No.016	EC-15	111	-	1&2	?	?	?
No.017	EC-16	114	19	2	?	?	?
No.020	EC-18	128	2	1&2	?	?	?
No.025	EC-52	157	-	1&2"	?	?	?
No.026	EC-53	157	-	1&2	?	?	?
No.027	EC-54	157	-	2	?	?	?
No.028	EC-55	157	7	1&2	?	?	?
No.029	EC-56	157	7	1&2	?	?	?
No.030	EC-57	157	7	1&2	?	?	?
No.031	EC-58	157	7	1&2	?	?	?
No.032	EC-59	157	7	1&2	?	?	?
No.033	EC-60	157	7	1	?	?	?
No.034	EC-61	157	7	2	?	?	?
No.035	EC-62	157	7	2	?	?	?
No.036	EC-63	157	7	2"	?	?	?
No.037	EC-64	157	20	-	?	?	?
No.092	EC-23	8		2	human	woman	1
No.093	EC-24	26		1&2	human	man	3
No.094	EC-25	26		1&2	human	woman	52
No.095	EC-26	26		1&2	human	man	53
No.096	EC-27	26		1&2	human	man	3
No.097	EC-28	26		1&2	human	man	6
No.098	EC-29	26		1&2	human	woman	35
No.099	EC-30	26		1&2	human	man	3
No.100	EC-31	26		1	human	man	10
No.101	EC-32	26		1	human	woman	2
No.102	EC-33	26		1	human	man	?
No.103	EC-34	26		1	human	woman	1
No.104	EC-35	91		1	human	woman	23
No.105	EC-36	91		1	human	man	?
No.106	EC-37	111		1&2	human	woman	?
No.107	EC-38	111		1	human	woman	1
No.108	EC-39	152		1	human	woman	23
No.109	EC-40	UT		2	human	man	69
No.110	EC-41	UT		2	human	woman	81
No.111	EC-42	UT		2	human	woman	13
No.112	EC-43	UT		2	human	woman	?
No.113	EC-44	UT		2	human	woman	53
No.114	EC-45	UT		1	human	man	10
No.115	EC-46	UT		1	human	man	62
No.116	EC-47	UT		1	human	man	64
No.117	EC-48	UT		1	human	woman	8
No.118	EC-49	UT		1	human	woman	?
No.119	EC-50	UT		1	human	woman	?
No.120	EC-51	UT		1	human	woman	?
No.121	EC-65	157		1&2	human	man	79
No.122	EC-66	157		1&2	human	woman	4
No.123	EC-67	157		1&2	human	woman	25
No.124	EC-68	157		1&2	human	man	24
No.125	EC-69	157		1&2	human	man	30
No.126	EC-70	157		1&2	human	woman	6
No.127	EC-71	157		1&2	human	woman	69
No.128	EC-72	157		1&2	human	man	72
No.129	EC-73	157		1&2	human	man	6
No.130	EC-74	157		1&2	human	woman	?
No.131	EC-75	157		1&2	human	man	8
No.132	EC-76	157		1&2	human	woman	4
No.133	EC-77	157		1&2	human	woman	11
No.134	EC-78	157		1&2	human	man	25
No.135	EC-79	157		1&2	human	woman	33
No.136	EC-80	157		1&2	human	woman	20
No.137	EC-81	157		1&2	human	man	16
No.138	EC-82	157		1&2	human	man	16

No.139	EC-83	157		1&2	human	man	24
No.140	EC-84	157		1&2	human	woman	69
No.141	EC-85	157		1&2	human	man	55
No.142	EC-86	157		1&2	human	man	51
No.143	EC-87	157		1&2	human	woman	2
No.144	EC-88	157		1&2	human	woman	28
No.145	EC-89	157		1&2	human	man	29
No.146	EC-90	157		1&2	human	woman	7
No.147	EC-91	157		1&2	human	man	10
No.148	EC-92	157		1&2	human	woman	38
No.149	EC-93	157		1&2	human	man	?
No.150	EC-94	157		1&2	human	man	?
No.151	EC-95	157		1&2	human	man	?
No.152	EC-96	157		1&2	human	man	?
No.153	EC-97	157		1&2	human	woman	?
No.154	EC-98	157		1&2	human	man	?
No.155	EC-99	157		1&2	human	?	?
No.156	EC-100	157		1&2	human	man	?
No.157	EC-101	157		1&2	human	woman	?
No.158	EC-102	157		1&2	human	woman	?
No.159	EC-103	157		1&2	human	man	?
No.160	EC-104	157		1&2	human	man	?
No.161	EC-105	157		1&2	human	man	?
No.162	EC-106	157		1&2	human	woman	8
No.163	EC-107	157		1&2	human	man	?
No.164	EC-108	157		1&2	human	woman	?
No.165	EC-109	157		1&2	human	man	?
No.166	EC-110	157		1&2	human	man	19
No.167	EC-111	157		1&2	human	man	49
No.168	EC-112	157		1&2	human	man	?
No.169	EC-113	157		1&2	human	man	?
No.170	EC-114	157		1&2	human	man	?
No.171	EC-115	157		2	human	woman	35
No.172	EC-116	157		2	human	woman	8
No.173	EC-117	157		2	human	man	23
No.174	EC-118	157		2	human	woman	18
No.175	EC-119	157		2	human	woman	3
No.177	EC-121	157		2	human	man	46
No.178	EC-122	157		2	human	man	16
No.179	EC-123	157		2	human	man	2
No.180	EC-124	157		2	human	woman	30
No.181	EC-125	157		2	human	woman	23
No.182	EC-126	157		2	human	woman	?
No.183	EC-127	157		2	human	man	?
No.184	EC-128	157		2	human	man	?
No.185	EC-129	157		2	human	man	?
No.186	EC-130	157		2	human	man	?
No.187	EC-131	157		2	human	man	6
No.188	EC-132	157		2	human	man	?
No.189	EC-133	157		2	human	woman	?
No.190	EC-134	157		2	human	woman	?
No.191	EC-135	157		2	human	man	?
No.192	EC-136	157		?	human	woman	?
No.193	EC-137	157		?	human	woman	?
No.194	EC-138	157		?	human	woman	29
No.195	EC-139	157		?	human	man	?
No.196	EC-140	157	7	1&2	human	woman	22
No.197	EC-141	157	7	2	human	man	9

表 2. 食中毒細菌検出用分子生物学的検査キット

* AOAC-RI validated

対象菌	原理	販売会社	製品名	標的遺伝子	増幅 DNA (bp)
enterohemorrhagic E. coli, EHEC Verocytotoxin-producing E. coli, VTEC	Multiple x PCR	カガク 伊	O-157 & ペロ毒素遺伝子同時検出キット Multiplex PCR O-157/Verotoxin genes detection kit	O-157 gene VT1 VT2, VT2vha, VTvhb, VTvp1, VT2vp2	457 349 112
	PCR	カガク 伊	腸管出血性大腸菌 VT1 遺伝子検出用 Primer set EVT-1,-2	VT1	349
	PCR	カガク 伊	腸管出血性大腸菌 VT2 遺伝子検出用 Primer set EVS-1,-2	VT2	404
	PCR	カガク 伊	腸管出血性大腸菌 VT 遺伝子検出用 Primer set EVC-1,-2	VT	171
	PCR	カガク 伊	O-157 One Shot PCR Screening kit	vt1, vt2, vt2vha, vtsvhb, vt2vpl	171
	PCR	カガク 伊	O-157 PCR Screening kit	vt1, vt2, vt2vha, vtsvhb, vt2vpl	171
	PCR	ロシュ	プロベリア 大腸菌 O157:H7 キット		
	PCR	genpoint	E. coli O157 primers	O157 ?	311
	LAMP 法	栄研化学	Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット		
	LAMP 法	栄研化学	Loopamp 大腸菌 O157 検出試薬キット		
	PCR	Applied Biosystems	TaqMan® Escherichia coli STX1 and STX2 Detection Kit*		
	PCR	Applied Biosystems	TaqMan® Escherichia coli O157:H7 Detection Kit *		
	real time PCR	Dupont Qualicon, Inc.	BAX® System PCR Assay for Screening E. coli O157:H7*		
	real time PCR	Warnex Diagnostics, Inc.	Warnex™ Rapid Pathogen Detection System for Escherichia coli O157 *		
	PCR	Idaho Technology, Inc.	R.A.P.I.D. System Escherichia coli O157 detection kit		
	real time PCR	Dupont Qualicon, Inc.	BAX® System PCR Assay for Screening E. coli O157:H7 MP *		
PCR	Roche Applied Science, Germany	LightCycler® foodproof E. coli O157 Detection Kit		167	
Multiple x PCR	SY-LAB company, Australia	GeneGen® EHEC Detection Kit	SLT1, SLT2, eaeA		
Salmonella spp. Salmonella typhimurium etc.	PCR	カガク 伊	サルモネラ菌 invA 遺伝子検出用 Primer set SIN-1,-2	invA	378
	PCR	カガク 伊	同菌 エンテロトキシン遺伝子検出用 Primer set	enterotoxin	264
	PCR	カガク 伊	Cycleave PCR Salmonella detection kit (Primer set SIN-1,-2)	invA	378
	PCR	ロシュ	プロベリア サルモネラキット		
	PCR	genpoint	Salmonella spp. Primers		247
	LAMP 法	栄研化学	Loopamp サルモネラ検出試薬キット		
	DNA 7 ⁺ -7 ⁻ 法	アズマックス	GENETRACK サルモネラアッセイ	16S-rRNA	
DNA 7 ⁺ -7 ⁻ 法	栄研器材	核さんテストサルモネラ	rRNA		
Listeria monocytogenes	PCR	ロシュ	プロベリア リアステリアモノサイトゲネスキット		
	PCR	genpoint	Listeria monocytogenes Primers		138
	LAMP 法	栄研化学	Loopamp L.monocytogenes 検出試薬キット		

	DNAアンプ法	アズマックス	GENETRAK リステリアアッセイ	16S-rRNA	
Listeria spp.	PCR	genpoint	Listeria spp. Primers (grayi, innocua, ivanovii, monocytogenes, seeligeri, welshimeri)		597
Campylobacter spp.	PCR	genpoint	Campylobacter spp. Primers		371
	LAMP法	栄研化学	Loopamp カンピロバクター検出試薬キット		
Campylobacter jejuni	PCR	genpoint	Campylobacter jejuni Primers		519
Campylobacter coli	PCR	genpoint	Campylobacter coli Primers		219
Bacillus cereus (嘔吐株)	PCR	カカハ イ	Bacillus cereus (CRS gene) PCR detection kit	crs	427
	PCR	genpoint	Bacillus cereus Primers		470
Staphylococcus aureus	PCR	カカハ イ	黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA遺伝子検出用 Primer set SEA-1,-2	SEA	423
	PCR	カカハ イ	黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA遺伝子検出用 Primer set SEB-1,-2	SEB	391
	PCR	カカハ イ	黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA遺伝子検出用 Primer set SEC-1,-2	SEC	146
	PCR	カカハ イ	黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA遺伝子検出用 Primer set SED-1,-2	SED	499
	PCR	カカハ イ	黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA遺伝子検出用 Primer set SEE-1,-2	SEE	557
	PCR	genpoint	Staphylococcus aureus Primers		170
	DNAアンプ法	栄研器材	核さんテスト黄色ブドウ球菌	rRNA	
Shigella spp. Enteroinvasive E. coli, EIEC	PCR	カカハ イ	赤痢菌および腸管侵入性大腸菌 invE 遺伝子検出用 Primer set INV-1,-2	invE	293
	PCR	カカハ イ	赤痢菌および腸管侵入性大腸菌 ipaH 遺伝子検出用 Primer set IPA-1,-2	ipaH	242
enterotoxigenic E. coli, ETEC	PCR	カカハ イ	毒素原性大腸菌 LT 遺伝子検出用 Primr set ELT-1,-2	LT	263
	PCR	カカハ イ	毒素原性大腸菌 STh 遺伝子検出用 Primr set ESH-1,-2	STh	131
	PCR	カカハ イ	毒素原性大腸菌 STp 遺伝子検出用 Primr set ESP-1,-2	STp	123
Clostridium perfringens	PCR	カカハ イ	ウェルシュ菌毒素遺伝子検出用 Primer set CPE-1,-2	enterotoxin	456
Staphylococcus aureus Escherichia coli, Salmonella spp.	PCR+DNAチップ	関東化学	Dr. Food Chip kit		
Staphylococcus aureus Escherichia coli O157:H7 Salmonella spp. Vibrio parahaemolyticus Listeria monocytogenes	PCR	Samsung(製造) JKインターナショナル(販売)	©gene-Check Multiplex-PathogenDetection Kit	femA	264
				vt2	208
				invA	678
				toxR	375
Vibrio parahaemolyticus	PCR	カカハ イ	腸炎ピブリオ溶血毒遺伝子検出用 Primer Set VPD-1,-2	tdh	251
	PCR	カカハ イ	耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子(trh1)検出用 Primer set VPS-1,-2	trh1	210
	PCR	カカハ イ	耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子(trh1&2)検出用 Primer set VPR-1,-2	trh1&2	250
Vibrio cholerae	PCR	カカハ イ	コレラ毒素遺伝子検出用 Primer set VCT-1,-2		307
	PCR	genpoint	Vibrio cholerae PCR primer pair		