

表 3-1. 腸管出血性大腸菌 121 株の EcoRI キットによるリボプリントパターン解析

Number	Label	How Assigned	Comment	DuPont ID	DuPont ID Label	RiboGroup	Similarity to Selected	RiboPrint™ Pattern				
								422-9-S-8	1 kbp	5	10	
1	422-14-S-1	EC-38	O111	1	DUP-19198	Escherichia coli	ECORI 422-14-S-1	0.79				
2	422-13-S-8	EC-37	O111	1&2	DUP-14147	Escherichia coli	ECORI 422-9-S-2	0.71				
3	422-9-S-2	EC-15	O111:H-	1&2			ECORI 422-9-S-2	0.70				
4	422-9-S-3	EC-16	O114:H19	2	DUP-3003	Escherichia coli	ECORI 422-9-S-3	0.17				
5	422-9-S-4	EC-18	O128:H2	1&2	DUP-14147	Escherichia coli	ECORI 422-9-S-4	0.59				
6	422-14-S-2	EC-39	O152	1	DUP-14147	Escherichia coli	ECORI 422-9-S-4	0.64				
7	422-24-S-4	EC-136	O157		DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97				
8	422-24-S-5	EC-137	O157		DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.93				
9	422-24-S-6	EC-138	O157		DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.87				
10	422-24-S-7	EC-139	O157		DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.96				
11	422-17-S-1	EC-77	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.95				
12	422-17-S-2	EC-78	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.96				
13	422-17-S-3	EC-79	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.98				
14	422-17-S-4	EC-80	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97				
15	422-17-S-5	EC-81	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.96				
16	422-17-S-6	EC-82	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.92				
17	422-17-S-7	EC-83	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.98				
18	422-17-S-8	EC-84	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.96				
19	422-20-S-1	EC-101	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.98				
20	422-20-S-2	EC-102	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.96				
21	422-20-S-3	EC-103	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.95				
22	422-20-S-4	EC-104	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97				
23	422-20-S-5	EC-105	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97				
24	422-20-S-6	EC-106	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.94				
25	422-20-S-7	EC-107	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97				
26	422-20-S-8	EC-108	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.96				
27	422-15-S-5	EC-65	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.95				
28	422-15-S-6	EC-66	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.94				
29	422-15-S-7	EC-67	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97				
30	422-15-S-8	EC-68	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.92				
31	422-16-S-1	EC-69	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97				
32	422-16-S-2	EC-70	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.98				
33	422-16-S-3	EC-71	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97				
34	422-16-S-4	EC-72	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.93				
35	422-16-S-5	EC-73	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.94				
36	422-16-S-6	EC-74	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-16-S-6	0.80				
37	422-16-S-7	EC-75	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97				
38	422-16-S-8	EC-76	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97				
39	422-18-S-1	EC-85	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.94				
40	422-18-S-2	EC-86	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.95				
41	422-18-S-3	EC-87	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97				
42	422-18-S-4	EC-88	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97				
43	422-18-S-5	EC-89	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97				
44	422-18-S-6	EC-90	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.93				
45	422-18-S-7	EC-91	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.98				
46	422-18-S-8	EC-92	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.98				
47	422-19-S-1	EC-93	O157	1&2	DUP-18664	Escherichia coli	ECORI 422-9-S-7	0.96				
48	422-19-S-2	EC-94	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.96				
49	422-19-S-3	EC-95	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97				
50	422-19-S-4	EC-96	O157	1&2	DUP-18664	Escherichia coli	ECORI 422-9-S-7	0.97				
51	422-19-S-5	EC-97	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97				
52	422-19-S-6	EC-98	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.94				
53	422-19-S-7	EC-99	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.96				
54	422-19-S-8	EC-100	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.95				
55	422-21-S-1	EC-109	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97				
56	422-21-S-2	EC-110	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.96				
57	422-21-S-3	EC-111	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97				
58	422-21-S-4	EC-112	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97				
59	422-21-S-5	EC-113	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.92				
60	422-21-S-6	EC-114	O157	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.94				
61	422-23-S-1	EC-125	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.96				
62	422-23-S-2	EC-126	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.90				

表3-2.腸管出血性大腸菌 121 株の EcoRI キットによるリボプリントパターン解析

Number	Label	How Assigned	Comment	DuPont ID	DuPont ID Label	RiboGroup	Similarity to Selected	RiboPrint™ Pattern			
								422-9-S-8	1 kbp	5	10 1550
63	422-23-S-3	EC-127	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97			
64	422-23-S-4	EC-128	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.96			
65	422-23-S-5	EC-129	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.95			
66	422-23-S-6	EC-130	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.92			
67	422-23-S-7	EC-131	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.95			
68	422-23-S-8	EC-132	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97			
69	422-21-S-7	EC-115	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97			
70	422-21-S-8	EC-116	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.96			
71	422-22-S-1	EC-117	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97			
72	422-22-S-2	EC-118	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97			
73	422-22-S-3	EC-119	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97			
74	422-22-S-5	EC-121	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.95			
75	422-22-S-6	EC-122	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.92			
76	422-22-S-7	EC-123	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97			
77	422-22-S-8	EC-124	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97			
78	422-24-S-1	EC-133	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.96			
79	422-24-S-2	EC-134	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.98			
80	422-24-S-3	EC-135	O157	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.98			
81	422-9-S-6	EC-53	O157:H-	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.92			
82	422-9-S-5	EC-52	O157:H-	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.93			
83	422-9-S-7	EC-54	O157:H-	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.96			
84	422-12-S-1	EC-64	O157:H20	-	DUP-14147	Escherichia coli	ECORI 422-9-S-4	0.64			
85	422-11-S-5	EC-60	O157:H7	1	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.95			
86	422-9-S-8	EC-55	O157:H7	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	1.00			
87	422-11-S-1	EC-56	O157:H7	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.96			
88	422-11-S-2	EC-57	O157:H7	1&2	DUP-18664	Escherichia coli	ECORI 422-9-S-7	0.95			
89	422-11-S-3	EC-58	O157:H7	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.95			
90	422-11-S-4	EC-59	O157:H7	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97			
91	422-24-S-8	EC-140	O157:H7	1&2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.97			
92	422-11-S-6	EC-61	O157:H7	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-5	0.91			
93	422-11-S-7	EC-62	O157:H7	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.91			
94	422-11-S-8	EC-63	O157:H7	2	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECORI 422-9-S-7	0.96			
95	422-13-S-2	EC-31	O26	1	DUP-3011	Escherichia coli	ECORI 422-9-S-1	0.73			
96	422-13-S-3	EC-32	O26	1	DUP-3011	Escherichia coli	ECORI 422-12-S-5	0.77			
97	422-13-S-4	EC-33	O26	1	DUP-3011	Escherichia coli	ECORI 422-9-S-1	0.72			
98	422-13-S-5	EC-34	O26	1	DUP-3011	Escherichia coli	ECORI 422-12-S-5	0.77			
99	422-12-S-3	EC-24	O26	1&2	DUP-3011	Escherichia coli	ECORI 422-9-S-1	0.75			
100	422-12-S-4	EC-25	O26	1&2	DUP-3011	Escherichia coli	ECORI 422-9-S-1	0.73			
101	422-12-S-5	EC-26	O26	1&2	DUP-3011	Escherichia coli	ECORI 422-12-S-5	0.81			
102	422-12-S-6	EC-27	O26	1&2	DUP-3011	Escherichia coli	ECORI 422-12-S-5	0.82			
103	422-12-S-7	EC-28	O26	1&2	DUP-18027	Escherichia coli	ECORI 422-9-S-1	0.72			
104	422-12-S-8	EC-29	O26	1&2	DUP-3011	Escherichia coli	ECORI 422-9-S-1	0.72			
105	422-13-S-1	EC-30	O26	1&2	DUP-3011	Escherichia coli	ECORI 422-9-S-1	0.70			
106	422-9-S-1	EC-14	O26:H11	1			ECORI 422-9-S-1	0.70			
107	422-12-S-2	EC-23	O8	2	DUP-14147	Escherichia coli	ECORI 422-9-S-4	0.63			
108	422-13-S-6	EC-35	O91	1	DUP-3006	Escherichia coli	ECORI 422-8-S-2	0.71			
109	422-13-S-7	EC-36	O91	1	DUP-14147	Escherichia coli	ECORI 422-8-S-2	0.68			
110	422-14-S-8	EC-45	OUT	1	DUP-3006	Escherichia coli	ECORI 422-8-S-2	0.65			
111	422-15-S-1	EC-46	OUT	1	DUP-14202	Escherichia coli	ECORI 422-15-S-1	0.44			
112	422-15-S-2	EC-47	OUT	1	DUP-19201	Escherichia coli	ECORI 422-8-S-2	0.66			
113	422-15-S-3	EC-48	OUT	1	DUP-3006	Escherichia coli	ECORI 422-8-S-2	0.67			
114	422-15-S-4	EC-51	OUT	1	DUP-18659	Escherichia coli	ECORI 422-15-S-4	0.73			
115	422-14-S-3	EC-40	OUT	2	DUP-14147	Escherichia coli	ECORI 422-8-S-2	0.68			
116	422-14-S-4	EC-41	OUT	2	DUP-3003	Escherichia coli	ECORI 422-9-S-3	0.16			
117	422-14-S-5	EC-42	OUT	2	DUP-14147	Escherichia coli	ECORI 422-9-S-4	0.70			
118	422-14-S-6	EC-43	OUT	2	DUP-3034	Escherichia coli	ECORI 422-14-S-6	0.67			
119	422-14-S-7	EC-44	OUT	2	DUP-14133	Escherichia coli	ECORI 422-14-S-7	0.68			
120	422-8-S-2	EC-50	OUT	1	DUP-14194	Escherichia coli	ECORI 422-8-S-2	0.70			
121	422-8-S-3	EC-49	OUT	1	DUP-14147	Escherichia coli	ECORI 422-8-S-2	0.70			

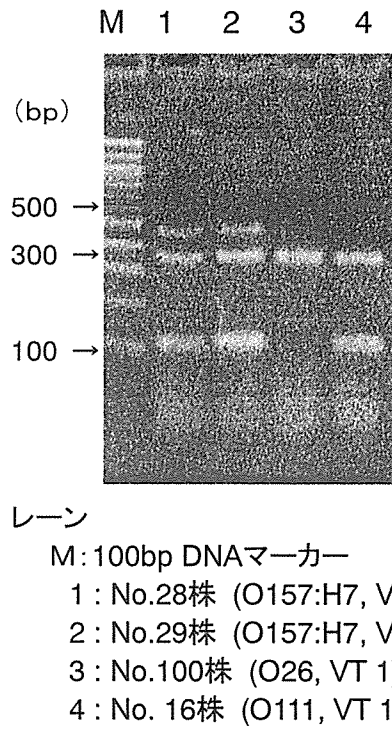
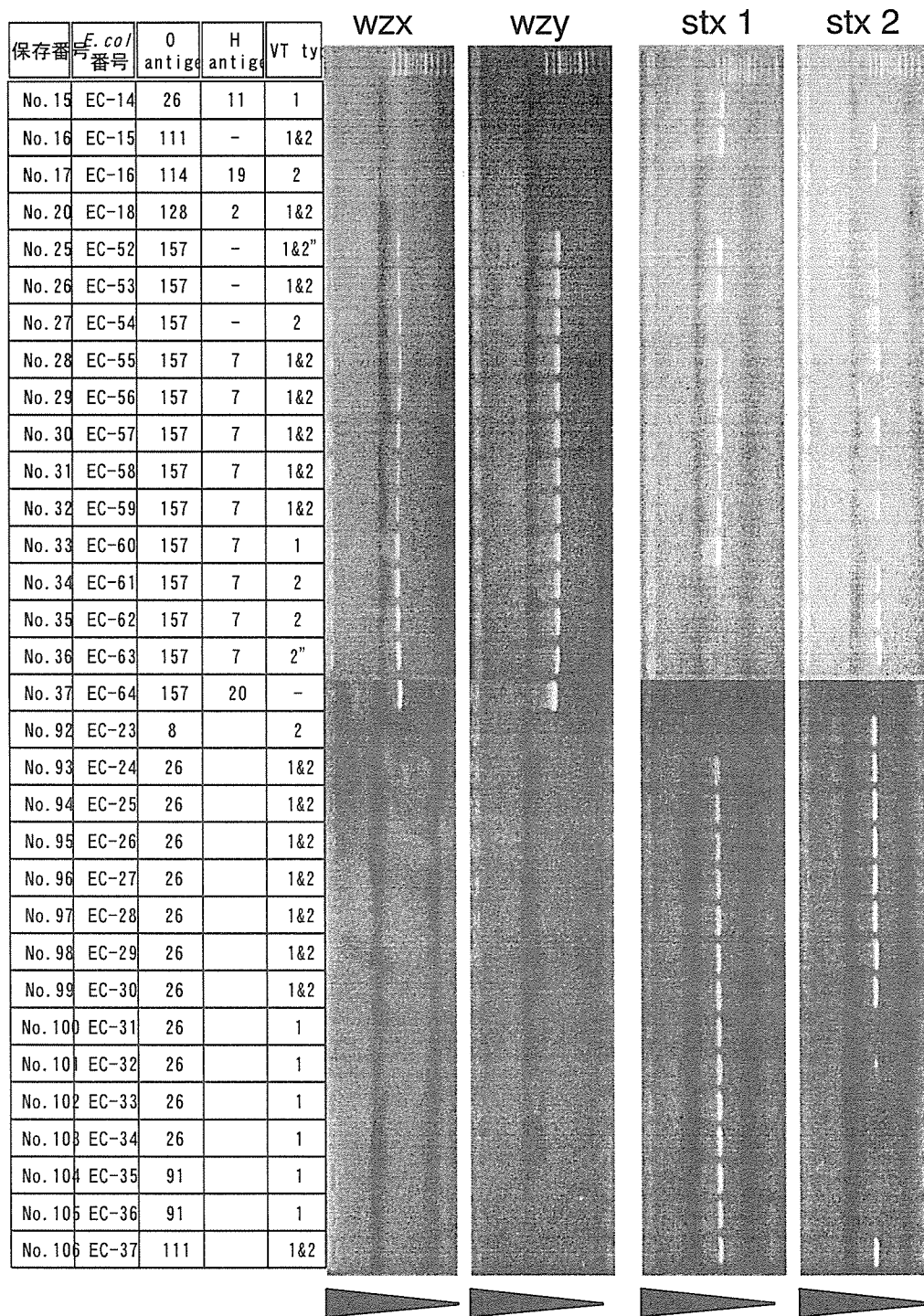


図1. 市販腸管出血性大腸菌検出用プライマーセットによるPCR



電気泳動の方向

図2. 全構造遺伝子増幅用プライマーセットによるベロ毒素遺伝子およびO157血清型決定因子遺伝子の増幅

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

迅速検査法に適する検体処理方法の検討

分担研究者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所 室長
研究協力者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
石和 玲子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
木村 晃一 株式会社G S I クレオス

研究要旨

食品における微生物検査に於いて、一般に当該微生物の汚染菌数は低く、そのまま直接微生物検査を行っても、検出限界以下となる場合がほとんどである。このようなことから培養による検査法では、一般的に当該微生物を選択的に増菌する選択増菌培養を行った後、微生物の分離を行っている。一方、迅速検査法では、選択増菌培養を行うと時間がかかるため、可能であれば選択増菌は必要最小限に留めたい。迅速検査法の実用的な検出限界は、 $10^4 \sim 10^5$ 個/g と考えられており、食品の前処理や前増菌などにより迅速検査法実施前にこのレベルに菌数を高める必要がある。このレベルまで菌数を高める方法としては、当該微生物を選択的に濃縮して試験系に持ち込む方法と、短い時間の選択増菌を行い当該微生物の菌数を高める方法がある。本年度は、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、今回の実験結果では文献的に報告されている高い濃縮結果は得られなかった。

A. 研究目的

食品からの微生物検査迅速法においては、様々な特性を持つ各種食品の影響を受けな
いで、食品中に存在する非常に低いレベル
の当該菌をいかにして迅速検査法の検出限
界以上に高めるかの方法論の提供が重要で
ある。本研究では、食品検体の処理方法、

増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検討し、
方法論を提供することを目的とする。

B. 研究方法

本年度は、まず、増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。循環型濃縮システムの原理は図 1 に示した。

モデル食品をナチュラルチーズ、対象病原微生物は、リステリア・モノサイトゲネスとした。ナチュラルチーズに一定量のリステリア・モノサイトゲネスをスパイクしたのち、上述の処理を行い、菌数の回収状況を調べた。ナチュラルチーズは、カマンベールチーズとゴーダチーズを、リステリア・モノサイトゲネスの血清型は、1/2b と 4b を用いた。菌の回収状況は直接寒天平板への接種による生菌数の測定と、リアルタイム PCR 法による検討を行った。

実験 1. 免疫磁気ビーズによる捕集効率

- ①BHI 37°C で 1/2b,4b Overnight
- ② 生食 8ml, チーズ 1g, 培養液 1ml(1/2b: 2.8×10^4 cfu/ml、4b: 2.1×10^5 cfu/ml)で混和
- ③サンプル 100 μ l を 2 枚のパルカム寒天平板培地へ接種（初期菌数）
- ④サンプル 1ml を免疫磁気ビーズ法で濃縮
- ⑤最終 100 μ l に濃縮
- ⑥50 μ l を 2 枚のパルカム寒天平板培地へ接種（濃縮菌数）
- ⑦培養後、コロニー数確認

実験 2. 条件を変えての免疫磁気ビーズの捕集効率確認

→方法は実験 1 と同様

→BHI 前培養を 30°C にて行う

→食品の影響を受けない生理食塩水での性能も確認する

接種菌数：1/2b: 9.3×10^3 cfu/ml、4b: 6.9×10^4 cfu/ml

濃縮システムを用いた濃縮法は免疫磁気ビーズ法に比べ、食品乳剤全量を循環、濃縮できるため、高い濃縮結果が期待される。したがって、低菌量での性能評価を行った。

実験 3. 濃縮システムを用いた捕集効率確認（低菌数接種）

- ①BHI 30°C で 1/2b,4b Overnight
- ② B P W 225ml, チーズ 25g, 培養液 1ml(1/2b: 2.0×10^3 cfu/ml、4b: 3.5×10^3 cfu/ml)で混和
- ③取り扱い説明書に従い、循環濃縮を行う
- ④最終 100 μ l に浮遊
- ⑤浮遊液 50 μ l をパルカム寒天平板培地へ接種し、培養後、菌数確認

実験 4. 濃縮システムを用いた捕集効率確認（再実験）

→接種菌数をやや増やし、再試験。

C. 研究結果

現在市販品として入手可能な濃縮手法としては、免疫磁気ビーズを用いた濃縮法とその発展型である循環型の濃縮システムがある。この 2 つの市販製品を購入して、ナチュラルチーズに人工的にスパイクし、リステリア・モノサイトゲネスの濃縮がどの程度行えるかを評価した。

実験 1. 免疫磁気ビーズによる捕集効率

濃縮結果は、表 1 に示した。血清型 1/2b 株はゴーダの 42.3%を除き、よく濃縮され、抗体との親和性が高いことが示唆された。一方、血清型 4b 株は接種菌量が多かったが、菌の回収は悪く、血清型により濃縮結果が異なった。BHI 37℃の前培養では菌の発育がいいが、ダイナビーズの抗体が菌のH抗原に関連している場合（一般的なキットはH抗原をターゲットにしている場合が多いが、本法も同様であるか不明）は抗体への結合に影響が出てしまう可能性を考え、実験 2 では 30℃の前培養を試みることにした。チーズは、油分が多く添加実験をする食品種としては厳しい条件であるので、生理食塩水における捕集効率を確認することにした。

実験 2. 条件を変えての免疫磁気ビーズの捕集効率確認

BHI での前培養を 30℃にて行った実験結果を表 2 に示す。実験 1 で、捕集効率の高かった血清型 1/2b 株は初期の接種菌量が低く、培養温度を 37→30℃に下げると、捕集効率が下がった。血清型 4b 株は逆に捕集効率が上がった。多くの検体で濃縮菌数が、初期菌数を下回る結果が得られた。そこで食品の影響を排除するため、生理食塩水を用いた捕集効率を測定した。結果は、表 3 に示す。血清型 1/2b 株は、捕集効率 200%を示し、免疫磁気ビーズ法により濃縮が観察できた。一方、血清型 4b 株では、濃縮菌数が初期菌数を下回り、濃縮効果は得られなかった。

実験 3. 濃縮システムを用いた捕集効率確認（低菌数接種）

理論上、10%乳剤 250ml を循環させ、当該菌を捕集することから、高い濃縮率が期待されたことから、接種菌数を約 10^3 個/250ml（血清型 1/2b 株 2,000 個、血清型 4b 株 3,500 個）で行った。磁気により回収された菌を 100 マイクロリットルに浮遊させ、その半量をパルカム寒天平板培地に接種したところ、いずれの検体においても菌の分離は観察されなかった（表 4）。

実験 4. 濃縮システムを用いた捕集効率確認（再実験）

実験 3 の結果を受け、接種菌数を少し高めて再実験を行った。血清型 4b の 1 検体のみ 1 コロニーを検出した以外は、検出できなかった（表 5）。

D. 考察

特定の菌を選択的な濃縮により定量的に検出可能であるかを調べるために、現在入手可能な市販品を調査した。抗体を磁気ビーズに固定化した免疫磁気ビーズと、磁気ビーズを循環型の装置により洗浄濃縮を行うシステムが入手可能であることがわかった。後者は、ノロウイルスの環境や食品からの分離に用いる方法として米国 FDA が検討を開始しているという情報もあり、実際にどの程度の濃縮効果が得られるか評価することにした。循環型のシステムはわが国で市販されて間もないこともあり、どの程度の濃縮が可能かに関する知見はなかった。腸管出血性大腸菌の食品等からの分離では、効果のあるといわれている免疫磁気ビーズ法と循環型の濃縮システムにつき、定量的にその効果を評価した。想定食品は、ナチュラルチーズ、病原体としてはリステ

リア・モノサイトゲネスを対象とした。

実験操作としては、免疫磁気ビーズ法は試験が一般的に広く知られていることと、操作が少し慣れれば簡単であることから、作業者の誤差は少ないと思われる。それに対し循環型の濃縮システムは操作が煩雑で熟練を必要とした。さらにサンプルが飛び跳ねたり、作業者が接触してしまったりする可能性があり、注意が必要である。操作にはシステムの熟練者からの教育が必須であると思われた。

免疫磁気ビーズ法に供試したリステリア・モノサイトゲネスは血清型 4b 株に比べ、血清型 1/2b 株の抗体親和性が高かったが、BHI 培地での前培養温度を 37℃と 30℃とでその回収率に差が生じた。前培養の条件や、血清型によって結果のバラツキが出てしまうことから、定量的な検査には適当と思われなかった。抗体を用いていることから、当該菌との親和性は抗体の影響を強く受け、理論値での濃縮は困難であると思われた。リステリアに於いて、免疫磁気ビーズ法による濃縮は、条件を整えば2倍程度が、得られるがチーズなどの食品では捕集効率が落ち、条件が悪いと操作を行わない方が良いこともあることが確認された。ただ食品成分の清浄に関しては効果が期待される。

免疫磁気ビーズの試験系はサンプル 1ml であるのに対し、循環型システムは全量濃縮であり、サンプル 250ml が試験系となる。菌濃度ではなく絶対数での比較が必要となる。免疫磁気ビーズでは最低の接種菌濃度として、表 2 のサンプル#6 の 1,150 cfu/ml があるが、1,980 cfu/ml(172.2%)へ濃縮が成功している。しかしながら、循環型システ

ムでは表 5 のように 11,520 cfu/ml の接種菌量で処理後の菌数が 20 cfu/ml (0.17%) であった。循環型システムではサンプルが循環式で内容物もかなりのスピードでビーズに接触することから、様々な夾雑物がビーズをマスキングしてしまう恐れがあり、流速スピードや各種な条件設定を検討する必要があると思われた。文献的には、循環型システムによりリステリアの濃縮が得られた結果が報告されている(表 6)。この結果では、最も条件が良い場合、MPN レベルとして 0.74cfu を検出しており、検査したほとんどの食品で 10cfu 以下を検出していた。ミルクでの結果でも、FDA の BAM 法よりも高い検出率が示されている(表 7)。

今回の実験の結果とは、全く異なっており、今後システムの稼働条件設定から見直しを行う必要があるのかもしれない。リステリアの自然汚染が 10-100 cfu/g と考えると、迅速法での検出の実現にはこのレベルの検出が可能な濃縮法を検討すべきと思われる。

今回理論値の濃縮が実現しなかった原因は、抗体による捕集に問題があるのか、システム自体の捕集効率に問題があるのかは今回の実験では判断できない。食品検体 25g を対象として濃縮可能というシステムとしては理論的には優れていると思われるので、今後はシステムの細かい条件設定に加え、微生物との親和性の部分を抗体から、陽イオン吸着素材に変えたものについても検討してゆきたいと思う。

E. 結論

食品(ナチュラルチーズ)からリステリア・モノサイトゲネスを濃縮する手法とし

て、免疫磁気ビーズ法と、磁気ビーズを応用した循環型濃縮システムを検討した。免疫磁気ビーズ法では最大2倍の濃縮効果が観察されたが、循環型濃縮システムでは十分な濃縮効果は得られなかった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

学会発表

- 1) 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
- 2) 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。

図1. 磁気ビーズを応用した循環型濃縮システムの原理

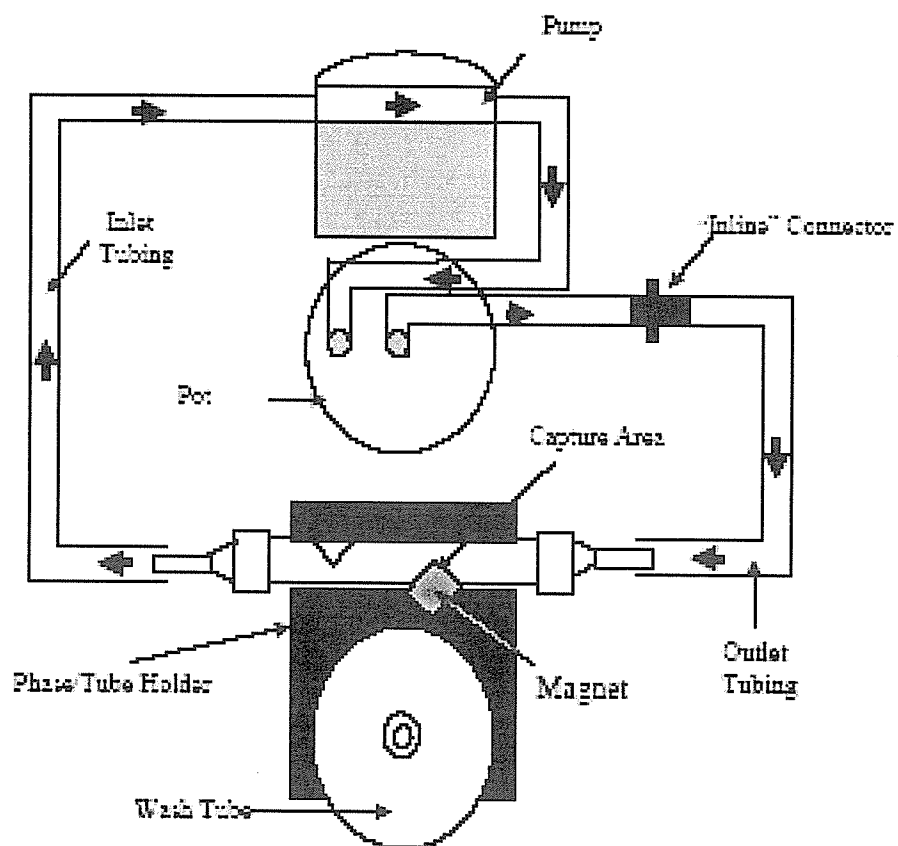


表 1

免疫磁気ビーズ法捕集効率		初期菌数		濃縮菌数		捕集効率(*2/*1)
チーズ	血清型	#	* 1 (CFU/ml)	* 2 (CFU/ml)		
カマンベール	1/2b	1	5,080	11,120	218.9%	
		2	3,980	5,620	141.2%	
	4b	3	28,000	420	1.5%	
		4	42,240	420	1.0%	
ゴーダ	1/2b	5	3,630	6,820	187.9%	
		6	7,840	3,320	42.3%	
	4b	7	31,040	900	2.9%	
		8	42,240	320	0.8%	

表 2

免疫磁気ビーズ捕集効率		初期菌数		濃縮菌数		捕集効率(*2/*1)
チーズ	血清型	#	* 1 (CFU/ml)	* 2 (CFU/ml)		
カマンベール	1/2b	1	1,230	510	41.5%	
		2	1,250	510	40.8%	
	4b	3	10,240	2,500	24.4%	
		4	8,320	3,000	36.1%	
ゴーダ	1/2b	5	1,770	840	47.5%	
		6	1,150	1,980	172.2%	
	4b	7	6,720	1,440	21.4%	
		8	8,320	3,600	43.3%	

表 3

生理食塩水での結果		初期菌数		濃縮菌数		捕集効率(*2/*1)
	血清型	#	* 1 (CFU/ml)	* 2 (CFU/ml)		
生食	1/2b	1	610	1,180	193.4%	
		2	550	1,250	227.3%	
	4b	3	5,680	4,020	70.8%	
		4	6,040	3,240	53.6%	

表 4

循環型濃縮システム結果			接種菌数		サンプル中の菌濃度	
チーズ	血清型	#	絶対数(CFU/250ml)	250ml中(CFU/ml)	濃縮菌数(CFU/ml)	
カマンベール	1/2b	1	2,000	8	ND	
		2	"	8	ND	
	4b	3	3,500	14	ND	
		4	"	14	ND	

ND: Not detected

表 5

循環型濃縮システム再実験			接種菌数		サンプル中の菌濃度	
チーズ	血清型	#	絶対数(CFU/250ml)	250ml中(CFU/ml)	濃縮菌数(CFU/ml)	
カマンベール	1/2b	1	1,740	7	ND	
		2	5,360	21	ND	
	4b	3	7,400	30	ND	
		4	11,520	46	20 *プレート上では1個	

ND: Not detected

表6. 文献による循環型濃縮システムの回収値

Comparison of PATHATRIX Listeria vs FDA BAM methods for a range of foods

Food Sample	MPN LEVEL	No +ve Samples PATH'X LOW	No +ve Samples CONV LOW	MPN LEVEL	No +ve Samples PATH'X HIGH	No +ve Samples CONV HIGH
Raw Ground Beef	7.5cfu	18	19	14cfu	20	20
Cooked sliced Ham	4.3cfu	18	18	18cfu	20	20
Milk Powder	0.74cfu	18	18	38cfu	20	20
Orange Juice	4.3cfu	20	19	27cfu	20	20
Black Ground Pepper	2.3cfu	18	9	12cfu	20	18
Chocolate	4.3cfu	18	18	24cfu	18	18
Soft Cheese	5.4cfu	20	19	27cfu	20	20
Lettuce	2.3cfu	20	19	28cfu	20	20
Raw Fish	0.92cfu	18	19	48cfu	20	20
Lasagne Ready Meal	9.3cfu	20	19	28cfu	20	20

表7. ミルクにおける循環型濃縮システムと BAM 法による検出の比較

Level of Contamination	PATHATRIX Listeria Test	FDA BAM Culture Method
0.575 cfu/25ml	No. Sample: Confirmed Positive for Listeria	

	13/20	5/20
--	-------	------

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

培養法・非培養法・ハイブリッド法による迅速法の開発

分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 大学院工学府生命工学専攻 教授

研究要旨

非培養法による迅速法の信頼性を確保するためには、食品からの生菌分離が鍵となる。即ち、生菌分離、非培養計数、確認培養の一連操作で、最終的には培養法と同等の結果が得られると考えられるからである。本研究は、濾過の困難な食品として①魚肉、②生乳、を選定し、密度勾配遠心分離法による生菌分離法の開発を目的としている。本年度は、①では、添加菌（ヒスタミン生成菌）を生菌として回収する最適条件として、Ficoll 濃度範囲 10～50%で 10%ごとの 5 段階、魚肉への付着防止に有効な Tween80 の添加濃度 0.1～1.0%を得た。②では添加菌（大腸菌）に対する最適分離条件が求められた。これらに基づき、各層の連続押し出し・分画濾別を行う新規デバイスを試作した。

A. 研究目的

微生物検出法は培養法を基礎としているが、培養時間が長く、その調整も難しいため、迅速法として種々の非培養法が開発されてきた。しかし、何れも公定法あるいは公認法として採用されるには至っていない。非培養法の信頼性を高めるためには、前処理としての生菌分離、その分離された菌を計数後、必要に応じて培養することができ、最終的には培養法でも確認できる、という方法が望まれる。このような方法をハイブリッド法と呼ぶことにする。

生菌分離法には、濾過法、遠心分離法、電気泳動法、音波分離法、フローサイトメトリーなどがあるが、簡便性、実用性などの観点からは濾過法が最適と考えられる。そして、既に多くの食品に関して検討した

結果、濾過法によって生菌分離可能な食品群のデータベースが構築されつつある。同時に、濾過の困難な食品群がクローズアップされている。本研究は、この濾過の困難な食品からの生菌分離法の開発を目的としている。具体的には①魚肉(ブリ)、②生乳、を選定し、密度勾配遠心分離法による、簡便分離装置の試作を目指す。

B. 研究方法

Ficoll 密度勾配の調製

Ficoll (PM400, Amersham Biosciences) 7.5g を、滅菌 (121℃、15 分間) した 50mM リン酸緩衝液 (pH7.0) (PBS) 10ml に溶解し、50% (W/V) となるように溶解した。これを更に PBS で希釈し 10% (W/V)、20% (W/V)、30% (W/V) 及び 40% (W/V) 各濃度の Ficoll

溶液を調製した。Ficoll 溶液を密度の高い方から順にマイクロピペットを用いて、200 μ l ずつ超遠心用チューブ (11 \times 34mm) に重層し、密度勾配を作成した。

魚肉試料の調製

東京海洋大学海洋科学部、藤井建夫教授から譲渡された *Morganella morganii* を試験菌として使用した。*M. morganii* 試験菌液 200 μ l を Ficoll 密度勾配の上に積層した。4 $^{\circ}$ C で 30,000rpm, 20 分、超遠心分離を行った後、Ficoll 界面上の上清画分から順に、マイクロピペットで 100 μ l 又は 200 μ l ずつ分取し、各画分を標準寒天培地 (23.5g/D.W.1000ml : 日水製薬) に播種し、37 $^{\circ}$ C で 18 時間培養した。培養後形成されたコロニー数を計数し、画分ごとの菌数を算出した。

ブリ切り身 (養殖) の魚肉約 5g を採取し、ストマッカー用袋に入れ、10 倍量の PBS を加えて 60 秒間ストマッキングし、魚肉抽出液とした。このとき魚肉に試験菌溶液をスパイクし、魚肉抽出液 100 μ l 当たり、*M. morganii* が 10^2 含まれるように調製した。また、抽出時の界面活性剤の添加効果を検討するため、超純水に溶解した 5% Tween80 溶液 (Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate) を、魚肉抽出液を調製する際に、0.1%、0.5%及び 1%となるよう添加した。

生乳試料の調製

東京農工大学農場で搾乳した新鮮な生乳 (4 $^{\circ}$ C、6 時間以内) に試験菌として *Escherichia coli* K12 を添加した。生乳 100 μ l 当たり、*E. coli* が 10^2 含まれるように

調製した。生乳 500 μ l に EDTA(20mM)/Triton X-100(2%) 混合溶液を 500 μ l 添加し 10 分間攪拌を行った。攪拌後 13000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10min で遠心分離を行った。遠心後に上清の界面に生じる固形物をアスピレーターとパスツールピペットを用いて吸引除去した。

得られた下層部 500 μ l 採取し、そのうち 200 μ l を標準寒天培地に塗抹した。標準寒天培地を 30 $^{\circ}$ C、48 時間で培養し、形成されたコロニーを計数し 1ml 中の生菌数として換算した。一方、残りの下層部の 200 μ l を Ficoll 密度勾配の上に積層し、4 $^{\circ}$ C で 30,000rpm, 20 分、超遠心分離を行った。遠心後の計数は、魚肉の場合と同様にして行った。

Percoll 密度勾配の調製と生菌分離

Ficoll は粘性が高く、実用的ではないので、粘性の低い Percoll の利用を検討した。密度勾配の調整法、魚肉、生乳の試料調製法は Ficoll の場合と同様である。

C. 研究結果

魚肉からの生菌分離結果

魚肉抽出液に菌体を添加して、分離状態を調べたところ、最上部に白濁が認められた。蛍光顕微鏡で観察し、魚肉組織に菌体が付着していることを認めた。そこで菌体が魚肉に付着することを防ぐため、Tween80 溶液を添加し、界面活性剤の効果を試験した。Tween80 の濃度を検討した結果、0.1%が最適と判断され、この条件で生菌分離を行った。その結果、図 1 に示すように、20%層に最大の菌数が回収された。

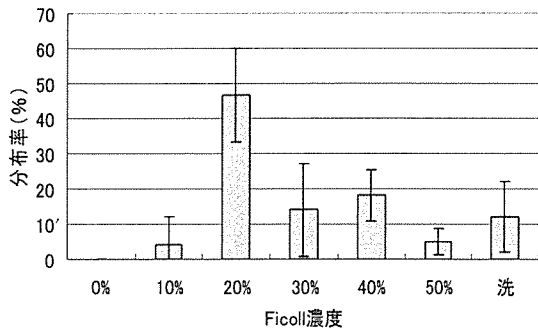


図1. 魚肉(ブリ)に添加した*M. morganii*のFicoll密度勾配遠心分離法による生菌回収試験結果

次に Percoll で生菌分離を行ったところ、図2に示すように、75%層に最大の菌数(64%)が回収された。

生菌は75%層に100%回収されるわけではない。その原因として、例えば試験菌は単一細胞の大きさが必ずしも同じではないこと、2細胞以上の凝集塊の存在、あるいは魚肉成分の付着が完全には除去できていない、などが考えられる。

さらに完全分離が必要な場合は、異なる条件の濾過法、遠心分離法、その他の分離法を組み合わせる必要がある。

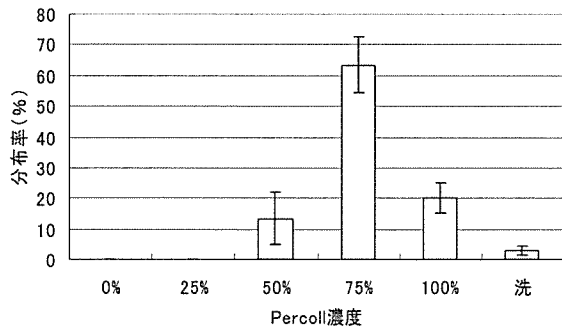


図2. 魚肉(ブリ)に添加した*M. morganii*のPercoll密度勾配遠心分離法による生菌回収試験結果

生乳からの生菌分離結果

Ficoll 密度勾配遠心分離法によって、生乳に添加した *E. coli* の生菌回収を行った結果、図3に示すように、30%、40%、50%の各層にそれぞれ20~30%ずつ回収された。

次に、Percoll 密度勾配で分離を行った。なお、この場合は生乳の代わりに市販の牛

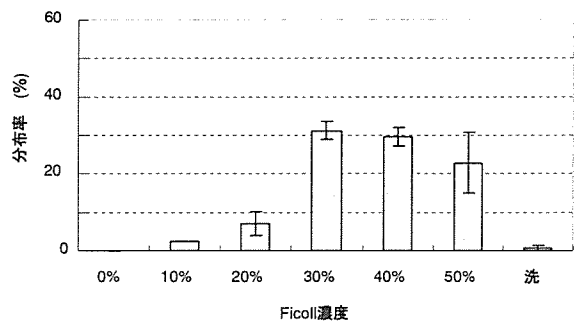


図3. 生乳に添加した*E. coli*のFicoll密度勾配遠心分離法による生菌回収試験結果

乳を用いた。図4に示すように50%層と75%層に回収されることがわかった。

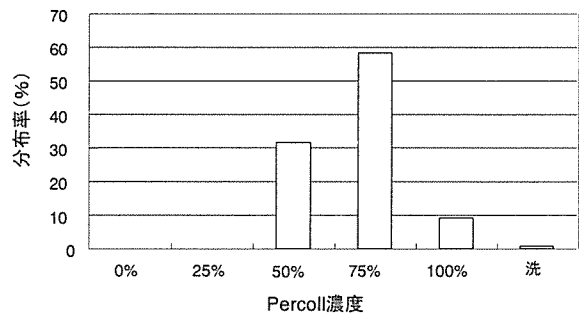
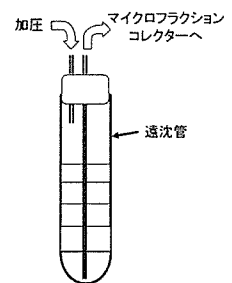


図4. 牛乳に添加した*E. coli*のPercoll密度勾配遠心分離法による生菌回収試験結果

密度勾配遠心分離画分の簡便回収装置の

試作

密度勾配遠心分離後の各層を回収する装置は市販品もあるが、種々の回収条件に対処できるように、専用装置を試作した。右図のような回収管を管中心の最下層まで挿入し、同時に挿入した加圧管から一定速度で上層を加圧して各層を回収した。



その結果、図6に示すように、100%層に最大の菌数が回収された。図4の場合は、マイクロピペットを用いるマニュアル操作によって、上部の層から順次回収した結果であるが、図5の装置で自動回収した場合は回収される層が異なる結果となった。これ

は、回収管挿入時に層間の乱れが生じたことが一因ではないかと推察された。したがって、上層から吸引する方法、吸引管先端形状の改良などが必要と考えられる。

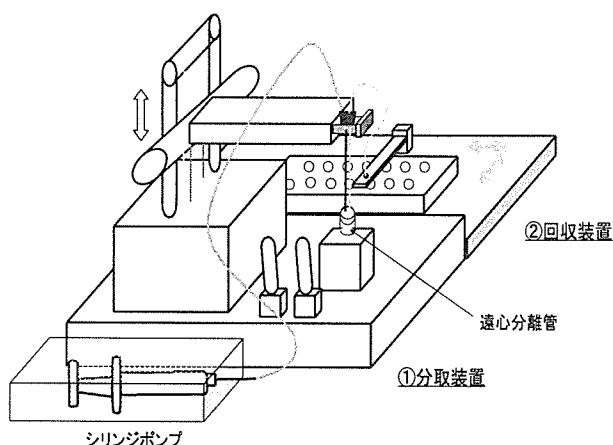


図5. 密度勾配遠心分離画分の簡便回収装置

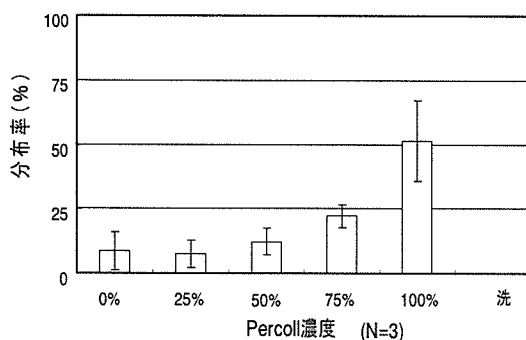


図6. Percoll密度勾配遠心分離法によって分離された、牛乳に添加された*E. coli*の簡便回収装置による回収結果

D. 健康危険情報

特になし。

E. 研究発表

○投稿論文

- ・ 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).

- ・ 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).
- ・ K. Fujioka, I. Kozone, M. Saito, H. Matsuoka: Automatic Mapping of Viable Microbial Cells Being Distributed in the Surface Layer of Cotton Fabrics. *Biocontrol Sci.* (2007, in press)
- ・ T. Shimakita, H. Yamamoto, T. Naramura, A. Fujimori, T. Ide, Y. Tashiro, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid Count of Microbial Cells in Dialysis Solution. *Ther. Apher. Dial.* (2007, in press)

○著書・総説等

- ・ 松岡英明: 微生物の迅速検出と自動化 “食中毒と食品微生物—食生活の安全性と衛生管理—”(山根誠久、仲西寿男、編) 第2章7節、臨床病理レビュー特集第136号、pp92-99 (2006)
- ・ 松岡英明: 微生物検査法の概略 “食品分析法の妥当性確認ハンドブック”(永田忠博、後藤哲久、丹野憲二、安井明美、湯川剛一郎、編) 第4章1節、サイエンスフォーラム、pp189-198 (2007)

○学会発表

- ・ 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。

- ・河西ちか子、新井達、齊藤美佳子、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。

F. 知的所有権の取得状況

なし

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

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

分担研究者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
研究協力者	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

研究要旨

食品から腸炎ビブリオを、より簡便、迅速に検出するための検査法の確立を目的として、免疫学的手法及び遺伝子学的手法を用いた検査法について検討する。今年度は現在市販されている腸炎ビブリオ検出用キットについて調査すると共に、遺伝子学的手法のうち PCR 法による腸炎ビブリオ検出を検討した。

食品 52 検体の増菌培養液を対象に、PCR 法と培養法で検出状況を比較検討した結果、両方法の一致率は 94.2%であり、PCR 法によるスクリーニングは、非常に有用である可能性が示唆された。次に PCR の前処理としての DNA 抽出法を検討した結果、熱抽出法、アルカリ熱抽出法及び市販のキットを用いた方法とも有意な差は認められなかった。PCR に用いるプライマーについて感度を検討した結果、*toxR* と LDH (石橋ら) は、菌数 8.6×10^3 /ml までほぼ検出することが出来た。

A. 研究目的

現在国内において、食品の細菌学的規格基準検査は、厚労省等からの告示法や通知法及び「食品衛生検査指針」等を参考に、培養法を基準として実施されている。しかし、食品検査の現場ではより簡便、迅速、高感度な検査法が求められている。そこで、培養法による標準的な検査法に対して、より検査時間を短縮し、簡便に検査する方法の検討を行う。本研究では、感染型食中毒

起因菌のうち腸炎ビブリオを対象として、免疫学的手法及び遺伝子学的手法を用いた検査法について検討し、簡易迅速検査法の確立を目指す。今年度は現在市販されている腸炎ビブリオ検出用キットについて調査すると共に、遺伝子学的手法のうち PCR 法による腸炎ビブリオ検出を検討した。

B. 研究方法

1. 腸炎ビブリオ迅速検査法の調査

腸炎ビブリオ迅速検査法の作成にあたり、現在市販されている腸炎ビブリオ検出用キット及び遺伝子学的検査法についての情報収集を行い、相違点を整理する。

2. 腸炎ビブリオを検出する PCR 法の検討

1) 食品の培養液からの腸炎ビブリオ検出

2006年夏期に食中毒が疑われて当センターに搬入された食品 52 検体を対象とした。食品 25g に 2%食塩加アルカリペプトン水 (pH8.6) 225ml を加え 35~37℃で 18 時間培養した。その培養液から TCBS 寒天(日水)とクロモアガービブリオ (OXOID) を用いて分離培養法で腸炎ビブリオの検出を行った。また、腸炎ビブリオに特異的な *toxR* を対象とした PCR 法 (Kim らの方法) を用いて腸炎ビブリオ検出を行い、両方法を比較した。

2) 腸炎ビブリオ検出のための PCR 法の再検討

(1) DNA 抽出法の検討

菌体からの DNA 抽出法として、熱抽出法、アルカリ熱抽出法、及び市販の DNA 抽出キット PrepMan (ABI)、DEXPAT (TAKARA)、High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) による DNA 抽出法を比較検討した。

(2) プライマーの検討

腸炎ビブリオを特異的に検出するプライマーとして *toxR* (Kim *et al.*)、LDH (飯田ら、私信)、LDH (石橋ら)、*gyrB* (Venkateswaran *et al.*) 及び *tl* (Bej *et al.*)、を用いて検討した。

(3) 菌株及びカキ培養液による検討

供試菌株は腸炎ビブリオ V89-056 (ヒト由来) を用いた。供試菌株の 3%食塩加 TSB

培養液を 10 倍段階希釈し、上記 6 種類の抽出法、5 種類のプライマーによる PCR 法で感度を検討した。また、2%食塩加アルカリペプトン水 (pH8.6) によるカキの培養液に、供試菌株培養液を 10 倍段階希釈して添加し、上記の抽出法、プライマーによる PCR 法で感度を検討した。

C. 研究結果

1. 腸炎ビブリオ迅速検査法の調査

現在市販されている腸炎ビブリオ検出用キットについて調査し、その結果をまとめた (表 1)。遺伝子検出キットは病原因子を持つ腸炎ビブリオを検出するものが市販されているのみで、病原因子陰性株を含む全ての腸炎ビブリオを検出するものはない。

また、食品を対象として、免疫学的手法などを利用して迅速に腸炎ビブリオを検出できるキット類の市販品もないことが明らかになった。

2. 腸炎ビブリオを検出する PCR 法の検討

1) 食品の培養液からの腸炎ビブリオ検出

食品 52 検体の増菌培養液を対象に、PCR 法と培養法で腸炎ビブリオの検出状況を比較検討した (表 2)。52 検体中 14 検体は両方法で陽性、35 検体は両方法で陰性であり、両方法の一致率は 94.2%であった。PCR 法陽性、培養法陰性が 3 検体 (5.8%) あったが、その逆の PCR 法陰性、培養法陽性は認められなかった。以上の成績から、PCR 法によるスクリーニングは、陽性検体を見逃すことなく、非常に有用である可能性が示唆された。

2) 腸炎ビブリオ検出のための PCR 法の再検討

(1) DNA 抽出法の検討

DNA を抽出する方法として、菌株培養液の段階希釈液での検討した結果、熱抽出法、アルカリ熱抽出法、及び PrepMan (ABI)、DEXPAT (TAKARA)、High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) によるいずれの抽出法を用いても有意な差は認められなかった (表 3)。

(2) プライマーの検討

プライマーによる感度を比較すると、*toxR* が最も感度が良く 8.6×10^3 まで検出することが出来た。次に感度が良いのは LDH (石橋ら) で 8.6×10^4 までは大体検出でき、 8.6×10^3 では抽出法等により陰性となる反応もあった。LDH (飯田)、*gyrB*、*tl* の検出感度は 8.6×10^5 程度であり、他に比較して低いものであった (表 3)。

(3) カキ培養液による検討

カキ培養液を用いた検討でも、DNA を抽出する方法としては、検討したいずれの抽出法を用いても有意な差は認められなかった (表 4)。

プライマーによる検討としては、菌株培養液とほぼ同様の結果を示した。すなわち、*toxR* と LDH (石橋ら) が感度が良く、 8.6×10^3 まではほぼ検出することが出来た (表 4)。LDH (飯田) や *gyrB* の検出感度は $8.6 \times 10^4 \sim 10^5$ であり、*tl* は 8.6×10^5 以下であった。

D. 考察

今年度は、食品を対象とした腸炎ビブリオの迅速検査法として遺伝子学的手法を用いた方法を検討した。市販されているキッ

トは全て腸炎ビブリオの中でも病原因子保有株のみを検出するものであった。しかし、食品衛生上では、病原性にかかわらず全ての腸炎ビブリオを検出することが求められているので、現在報告されている研究用プライマーを検討する必要がある。

今回、食品 52 検体の増菌培養液を対象に、PCR 法と培養法で腸炎ビブリオの検出状況を比較検討したところ、PCR 法陽性、培養法陰性が 3 検体 (5.8%) あった。この理由は、培養法では腸炎ビブリオ以外のビブリオ属菌が多く発育して分離が困難になったことと、PCR 法の非特異反応が考えられる。さらに、プライマーの特異性等の検討が必要である。1つのターゲットを目的とした PCR では困難な場合、2つのターゲットを併用する方法も考えられる。

PCR 法を用いて腸炎ビブリオをスクリーニングする場合、PCR 反応が陰性であれば、その食品は腸炎ビブリオ陰性と判定するためには、反応系に内部コントロールを入れておく必要があるので、今後検討する予定である。

次に、分離寒天平板上に出現した集落について、腸炎ビブリオであるか否かを同定するために、現行法では少なくとも 1~2 日を要しているため、この過程を短縮する方法についても検討が必要である。また、遺伝子検査法ではない生化学的・免疫学的方法を使った迅速検査法についても検討する。

E. 結論

食品の腸炎ビブリオ迅速検査法として遺伝子検査法について検討した。食品の増菌培養液を対象に、腸炎ビブリオの存在をス