

クリーニングする。その結果を培養法と比較したところ、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。

PCR の前処理として、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。また、PCR に用いるプライマーについても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が、その他 3 種のプライマーの検出感度は、 8.6×10^5 /ml 程度でやや低いものであった。

F. 健康危機情報

平成 16 年に全国で発生した細菌性食中毒事件のうち、腸炎ビブリオによる事件数(患者 2 名以上) は 132 件でカンピロバク

ター (136 件) に次いで第 2 位、患者数は 2,773 人で、サルモネラ (3,788 人) に次いでやはり第 2 位あった。本菌による食中毒予防のためにも、簡易・迅速な検査法の確立が必要である。

G. 研究発表

(発表論文)

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、2006, 80, 4, 383-390.

H. 知的所有権の取得状況

なし

表 1. 腸炎ビブリオ検出用キット

商品名	対象	メーカー	測定原理	測定時間	1テストの価格
遺子検出キット					
TRCRest tchrm	腸炎ビブリオ tch mRNA検出試薬	東ソー	TOF法	30分	1,200円
TRCRest ttrhm	腸炎ビブリオ ttrh mRNA検出試薬	東ソー	TOF法	30分	1,200円
VFD-1/2	而熱性溶血毒遺伝子 (<i>tch</i>)	TAKARA ヱイオ	PCR法	55時間	300円+
VFS-1/2	而熱性溶血毒類似毒素型遺伝子 (<i>tth1</i>)	TAKARA ヱイオ	PCR法	55時間	300円+
VFR-1/2	而熱性溶血毒類似毒素型及び2型遺伝子 (<i>tth1</i> & <i>tth2</i>)	TAKARA ヱイオ	PCR法	55時間	300円+
汚染指標菌の拭き取り検査キット					
HACBメイト (腸炎ビブリオ)	腸炎ビブリオ検出	EMロード・サイエンス	拭き取り検査、食品表面の汚染検査可	24時間以内	220円
チエックスリー	腸炎ビブリオ検出	SR, アズガ純薬	発色法	24時間以内	300円
STチューブQMW02	腸炎ビブリオ検出	コナテック工業		4~24時間	240円
表面・槽内等検出容易培地					
フードスタグアニックスII TOES寒天	腸炎ビブリオ検出	日ノ徳薬	アガースタグ法(面積0cm ²), 培養法(定性)	1日	150~160円
コンバトドライ VP	腸炎ビブリオ検出	日ノ徳薬	拡散プレート(50μl)にコナテックコーティング	18~20時間	100~160円
DDフェッカー「生研」 TOES寒天	腸炎ビブリオ検出	テノガ社研	アガースタグ法(10cm ²)	18~24時間	150~160円
ベランチエック	腸炎ビブリオ検出	栄研器材	スタグ法(面積5cm ²)	24時間	160円
ロダックルーナ TOES寒天	腸炎ビブリオ検出	日本ベクトン ディッキンソン	スタグ法(ロダックルーナ法)	1~2日間	120円
メルク・スタグア培地 TOES寒天	腸炎ビブリオ検出	メルク	スタグ法(ロダックルーナ法)	24~48時間	140円
ザンコリ	腸炎ビブリオ検出	ザン科学, アズマックス等	試験紙法	24時間	60円

表 2. 食品培養液からの腸炎ピブリオ検出
—分離培養法と PCR 法の比較—

		培養法		
		+	-	
PCR法	+	14	3	17
	-	0	35	35
		14	38	52

$$\text{一致率: } \frac{14+35}{52} = \frac{49}{52} = 94.2\%$$

表3. DNA抽出法とPCR法の比較検討：菌株培養液

DNA抽出法	<i>toxR</i>					LDH(飯田)					
	8.6×10^5 *	8.6×10^4	8.6×10^3	8.6×10^2	8.6×10^1	8.6×10^5	8.6×10^4	8.6×10^3	8.6×10^2	8.6×10^1	8.6×10^0
熱抽出	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
アルカリ抽出	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
PrepMan	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
DEXPAT	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
High Pure	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
QIAamp	2/2	2/2	2/2	1/2	1/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
抽出法	LDH(石橋)					<i>gyrB</i>					
	8.6×10^5	8.6×10^4	8.6×10^3	8.6×10^2	8.6×10^1	8.6×10^5	8.6×10^4	8.6×10^3	8.6×10^2	8.6×10^1	8.6×10^0
熱抽出	2/2	1/2	2/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2
アルカリ抽出	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2
PrepMan	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2
DEXPAT	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
High Pure	2/2	1/2	1/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
QIAamp	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2
抽出法	<i>ef</i>										
	8.6×10^5	8.6×10^4	8.6×10^3	8.6×10^2	8.6×10^1	8.6×10^5	8.6×10^4	8.6×10^3	8.6×10^2	8.6×10^1	8.6×10^0
熱抽出	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
アルカリ抽出	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
PrepMan	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
DEXPAT	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
High Pure	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
QIAamp	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

* *V.parahaemolyticus* 菌数/ml

表4. DNA抽出法とPCR法の比較検討: カキ培養液

DNA抽出法	10xPF											
	8.6x10 ⁵ *	8.6x10 ⁴	8.6x10 ³	8.6x10 ²	8.6x10 ¹	未添加	8.6x10 ⁵	8.6x10 ⁴	8.6x10 ³	8.6x10 ²	8.6x10 ¹	未添加
熱抽出	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
アルカリ抽出	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2
PredMan	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2
DEXPAT	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2
High Pure	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
QIAamp	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

DNA抽出法	LH(石橋)											
	8.6x10 ⁵	8.6x10 ⁴	8.6x10 ³	8.6x10 ²	8.6x10 ¹	未添加	8.6x10 ⁵	8.6x10 ⁴	8.6x10 ³	8.6x10 ²	8.6x10 ¹	未添加
熱抽出	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
アルカリ抽出	2/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2
PredMan	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2
DEXPAT	2/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
High Pure	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
QIAamp	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

DNA抽出法	LH(飯田)											
	8.6x10 ⁵ *	8.6x10 ⁴	8.6x10 ³	8.6x10 ²	8.6x10 ¹	未添加	8.6x10 ⁵	8.6x10 ⁴	8.6x10 ³	8.6x10 ²	8.6x10 ¹	未添加
熱抽出	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
アルカリ抽出	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2
PredMan	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2
DEXPAT	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2
High Pure	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
QIAamp	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

DNA抽出法	LH(石橋)											
	8.6x10 ⁵	8.6x10 ⁴	8.6x10 ³	8.6x10 ²	8.6x10 ¹	未添加	8.6x10 ⁵	8.6x10 ⁴	8.6x10 ³	8.6x10 ²	8.6x10 ¹	未添加
熱抽出	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
アルカリ抽出	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
PredMan	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
DEXPAT	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
High Pure	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
QIAamp	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

* *Vibrio parahaemolyticus* 菌数/ml

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

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

分担研究者 荒川 英二 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

研究要旨

腸炎ビブリオ食中毒は現行の検査法では最低でも3日が必要であり、生鮮魚介類がその原因食材である場合には、生産段階で検査を開始しても消費までに結果を得る事が困難である。菌の特徴を生かした培地の開発により、菌の同定を培地上の集落の観察により可能となれば、菌の同定にかかる時間、手順を省略でき迅速化が期待できる。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、腸炎ビブリオが効率良く検出できるかを検討した。腸炎ビブリオによる汚染が多いと考えられる貝類を用い、増菌液から直接塗抹により該菌の検出を行ったところ、大部分は腸炎ビブリオを示す藤色の集落であったが、藤色の集落でも腸炎ビブリオとは異なる性状を示す菌も認められた。したがって、酵素基質培地を用いても集落の色調だけで腸炎ビブリオと同定することはできず、菌の同定手順の省略による迅速化は困難であることが明らかになった。

A. 研究目的

腸炎ビブリオは汽水域を生息域とし、海水温が18℃を超えるような夏場に増殖し、近海の魚介類を汚染する。しかし、ヒトに対し病原性を持つものは、耐熱性溶血毒(TDH)あるいはその類似毒(TRH)を産生するもので、汚染魚介類を喫食した際にヒトの腸管内で増殖し、産生した毒素により下痢が発症する。したがって、腸炎ビブリオ食中毒は、主に生鮮魚介類の生食によって起こり、加熱加工した魚介類では菌が死滅しているため食中毒の原因にはならない(加熱加工後の二次汚染を除く)。

毒素産生菌は環境中あるいは魚介類からはほとんど検出されないため、食品検査においては毒素産生菌の有無を問わず、腸炎ビブリオの総数で規制対象としている。生食用魚介類の検査では、MPN法により生菌数を求める、すなわち増菌培養後、分離培地に接種してその集落数を求める事となる。増菌培養と分離培地での集落形成でそれぞれ1日必要であり、集落の性状確認により腸炎ビブリオと同定されるまでに少なくともさらに1日が確認培地での培養に要する。現行の培養法ではこのように最低でも3日が必要である。近海の生鮮魚介類では、水揚

げから消費までの時間がこれよりも短いことから、検査法の迅速化が必須である。

近年、分子生物学的手法が開発され、食品検査にもいくつか導入されてきている。腸炎ビブリオの検出にも迅速、高感度な技術が見いだされてきている。本研究では、これら迅速法が実際の検査法に導入可能かどうかを検討する事を目的とする。本年度は酵素基質培地を用い、腸炎ビブリオの分離と同定を同時に行う事が可能かどうかについて検討した。

B. 研究方法

1. 材料

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（愛知県産、千葉県産）、冷蔵活ハマグリ（中国産）を用いた。

2. 検体処理

各検体約25 gを殻と身に分け、殻は生理食塩水25 ml中で表面を洗い、この生理食塩水25 mlをアルカリペプトン水（日水製薬）225 mlに入れ、37℃18時間培養した。身も同様に生理食塩水25 ml中で表面を洗い、この生理食塩水25 mlと身からの浸出液をアルカリペプトン水225 mlに入れ、37℃18時間培養した。さらに生理食塩水で洗った身をハサミで細かく切り刻みアルカリペプトン水225 mlに入れ、37℃18時間培養した。

3. 分離培養

クロモアガービブリオ（以下CA；関東化学）とTCBS（日水製薬）平板を作成し、2. の

増菌液1 μ lをそれぞれ塗抹し、37℃18時間培養した。

3. 確認試験

CA平板から主に藤色の集落を、およびTCBS平板から緑色の集落を選択し、CA、TCBS、1% NaCl加トリプチケースソイ寒天培地（1% TSA；日水製薬）、0%、3%、8% NaCl加Nutrient broth 寒天培地（0%、3%、8% NBA；BD）、1% NaCl加 TSI（日水製薬）、1% NaCl加 LIM（日水製薬）にそれぞれ接種し、37℃18時間培養した。また、1% TSA上の菌体を直接オキシダーゼ濾紙につけ直ちに判定した。同じく1% TSA上の菌体の一部を滅菌蒸留水100 μ lに懸濁し、100℃、5分間加熱し、PCR用のテンプレートとした。

4. PCR

腸炎ビブリオの*toxR*遺伝子はKim¹⁾らの方法で、*tlh*遺伝子はBej²⁾らの方法で、*tdh/trh*遺伝子はIto³⁾、Toda⁴⁾らの方法で行った。

C. 研究結果

各検体の各培地上の集落の分布はおおよそ以下の通りであった。

アサリ（愛知県産）

殻洗浄液：CA-藤色集落約10%、白色集落約90%

殻洗浄液：TCBS-緑色集落約10%、黄色集落約90%

身洗浄液：CA-藤色集落約90%、白色集落約10%

身洗浄液：TCBS-緑色集落約90%、黄色集落約10%

身細切：CA-藤色集落約90%、白色集落約5%、青色集落約5%
身細切：TCBS-緑色集落約90%、黄色集落約10%
アサリ（千葉県産）
殻洗浄液：CA-藤色集落約25%、白色集落約75%
殻洗浄液：TCBS-緑色集落約5%、黄色集落約95%
身洗浄液：CA-藤色集落約95%、白色集落約5%
身洗浄液：TCBS-緑色集落約50%、黄色集落約50%
身細切：CA-藤色集落約50%、白色集落約50%
身細切：TCBS-緑色集落約95%、黄色集落約5%
ハマグリ（中国産）
殻洗浄液：CA-藤色集落約95%、白色集落約5%
殻洗浄液：TCBS-緑色集落約30%、黄色集落約70%
身洗浄液：CA-藤色集落約95%、白色集落約5%
身洗浄液：TCBS-緑色集落約95%、黄色集落約5%
身細切：CA-藤色集落約90%、白色集落約10%
身細切：TCBS-緑色集落約30%、黄色集落約70%

集落の色調あるいは発育状況からすると、CAでの白色集落は概ね集落が大きく、培地の説明書によれば色調からは *V. alginolyticus* が疑われた。また、同じ検体

のTCBSでの集落に黄色でやはり大きな集落を形成しているものは *V. alginolyticus* が疑われた。CAで白色集落が多い検体では、TCBSでも黄色集落が多く、アサリの殻（愛知県産、千葉県産ともに）には *V. alginolyticus* が多く存在していた事が予想された。CAで腸炎ビブリオが示す藤色集落の多い検体では、TCBSでも腸炎ビブリオが示す緑色集落が多い傾向がみられ、腸炎ビブリオが多く存在していた事が予想された。しかし、ハマグリ の検体では、殻洗浄液あるいは身細切の検体でCAで藤色集落とTCBSで緑色集落の割合が異なっていた。そこで各検体より主にCAからは藤色の集落（一部白色あるいは青色）を、TCBSからも一部（主に緑色）を任意に選択し、アサリ2件、ハマグリ1件から各30集落ずつ計90集落を釣菌し、各性状試験を行った。結果を表1に示した。

アサリ（愛知県産：菌株番号501-530）：菌株番号501-522は、CAで濃淡はあったが藤色集落を選択したものであったが、501、504はCAでも再培養では青色となり、またTCBSでも黄色、オキシダーゼ陰性である事などから、*V. metchnikovii* と推定された。523-530はCAで藤色以外の集落を選択したものであり、*V. fluvialis*、*V. vulnificus*、*V. cholerae*、*V. alginolyticus*、*Shewanella* spp. と推定された。CAで藤色、TCBSで緑色を示すものは、生化学的性状も腸炎ビブリオの性状を示すものであった。しかし、PCRの成績では *V. metchnikovii* と推定され

た501、504は腸炎ビブリオ検出用の*tlh*、*toxR*の両遺伝子とも陽性であった。

アサリ（千葉県産：菌株番号531～560）：菌株番号550と555はCAでも白色集落を選択したが、それ以外はCAで濃淡はあったが藤色集落を選択した。TCBSでは550は緑色、555は黄色であり、生化学的性状からそれぞれ*V. vulnificus*、*V. alginolyticus*と推定されたが、PCRでは*tlh*、*toxR*の両遺伝子とも陽性であった。また、CAで藤色集落として分離した551、553、556、557は再培養ではCAで白色となった。551はTCBSで緑色であり、生化学的性状からもPCRからも腸炎ビブリオが推定され、553はTCBSで緑色であったが、生化学的性状、PCRから*V. vulnificus*と推定された。556、557はTCBSで黄色であり、生化学的性状から*V. alginolyticus*と推定された。557はPCRでも*tlh*、*toxR*の両遺伝子とも陰性であったが、556は両遺伝子とも陽性であった。

ハマグリ（中国産：菌株番号561～590）：菌株番号570、580、590はCAでも白色集落を選択したが、それ以外はCAで濃淡はあったが藤色集落を選択した。570は再培養ではCAで藤色となり、生化学的性状、PCRからも腸炎ビブリオと推定された。580、590はTCBSでは黄色であり、生化学的性状からそれぞれ*V. alginolyticus*、*V. fluvialis*と推定されたが、580のPCRは*tlh*、*toxR*の両遺伝子とも陽性であった。また、571、576はCAでは藤色、TCBSでは緑色と集落の色調は腸炎ビブリオの性状を示しており、生化学的性状でも腸炎ビブリオの性状と一致していた

が、571では*toxR*が、576では*tlh*、*toxR*の両遺伝子とも陰性であった。

全ての検体において溶血毒素遺伝子*tdh/trh*は陰性であった。

D. 考察

わが国の腸炎ビブリオ食中毒は、細菌性食中毒の中でも発生事例数、患者数でも毎年上位を占めている。2005年度の食中毒統計によれば、腸炎ビブリオ食中毒は事例数113例、患者数2,301名であった。

腸炎ビブリオは汽水域を生息域とし、わが国の沿岸海中からはほぼ全国的に分離される。しかし、そのうちヒトに対し食中毒を起こす腸炎ビブリオは、神奈川現象で知られる耐熱性の溶血毒

(thermostable-direct hemolysin; TDH)、あるいはその類似毒(TDH-related hemolysin; TRH)という毒素を産生するものである。環境あるいは食品から分離される腸炎ビブリオはほとんどがこれら毒素を産生せず、多くの毒素非産生菌の中にわずかに毒素産生菌が含まれているものと考えられている。したがって、食中毒事例の推定原因食からも毒素産生菌が分離される事は少ない。そのため現行の食品衛生検査指針では、汚染指標菌として毒素非産生の腸炎ビブリオを含めた腸炎ビブリオの総数により規制されている。リスクアセスメントの調査解析から、腸炎ビブリオが食品1グラム当たり100個以上検出された場合規制対象となる。すなわち、食品検査を行う場合は

腸炎ビブリオの生菌数を求めなければならない。

腸炎ビブリオはこのように沿岸海水中に生息し、魚介類には付着しているものと考えられる。わが国では生鮮魚介類は、刺し身や寿司など生で喫食する機会が多い。また、比較的腸炎ビブリオ汚染の多い二枚貝などの場合、貝そのものは加熱して喫食しても、泥あるいは砂を吐かせるための水に菌が遊離し、汚染した水による二次汚染も起こりうる。生鮮魚介類は冷蔵技術が進歩した今日でも加工後は速やかに消費される。腸炎ビブリオの培養による検査法では、検査結果を待ってからでは商品として成り立たない。

本研究における「食品における微生物迅速検査法の開発」に関して、腸炎ビブリオの検査法はこの生菌数を求めるという“定量性”と、いわゆる-足が早い-食品の検査における“迅速性”という両者を満たす検査法でなければならない。

食中毒菌の培養による“標準検査法”は、菌が増殖することによって見られるその菌の性状の違いによって目的の菌を分離し、目的の菌であるかどうかの確認を行う方法である。分離あるいは確認のためには、それぞれ培養という操作があり、菌の増殖のための時間が必要となる。

腸炎ビブリオの現行の標準的な検査法としては、まず、食品中に少量付着している菌を増菌培養し、選択分離培地で培養し、確認試験培地で培養する。それぞれの培養は集落として見えるくらいまで増殖させる

ので、いずれも1日ずつを要するため、最低も3日必要である。確認試験でも性状が十分に求められない場合は、追加試験を行うためにさらに1日を要する。

最近、菌の性状を直接的に知る培地として、酵素基質培地が開発されてきた。分離培地や確認培地は、一般的に培地中に加えられた糖やアミノ酸を菌が代謝する際に来る、酸やアルカリによる培地のpH変化を利用したものが多く、その糖やアミノ酸の分解産物によって間接的に見ているものである。例えばTCBS寒天培地の場合は、培地中に加えられた白糖を分解する事で生じる酸により、同じく培地中に加えられているpH指示薬であるプロモチモールブルーとチモールブルーが反応し、緑色から黄色に変化する。白糖非分解菌では酸を産生しないため緑色のままである。酵素基質培地はその代謝酵素の基質に色素を結合させたもので、基質が分解される事で発色する。すなわち、ある特定の糖やアミノ酸の分解を直接的に見ているのである。

腸炎ビブリオは、白糖非分解菌であるためTCBS寒天培地上では緑色のままである。しかし、同じビブリオ属菌で同じ汽水域を生息域とする*V. vulnificus*も多くが白糖非分解菌であるため緑色のままである。また、同じビブリオ属菌の*V. mimicus*も白糖非分解菌で汽水域から検出される。そのためTCBSを用いた場合は確認試験を行わなければ、腸炎ビブリオと同定する事が出来ず、検査にその分日数が必要となるのである。酵素基質培地であるCA寒天培地は、どうい

う酵素基質を用いているのかは企業秘密でわからないのであるが、培地の添付文書によれば腸炎ビブリオは藤色に、*V. vulnificus*と*V. cholerae*は青緑色、*V. alginolyticus*は無色を呈するとなっている。

本年度の研究では、この酵素基質培地の特徴を利用し、確認試験を行わなくても分離されてくる菌が色調だけで腸炎ビブリオと同定できれば、CA培地は選択剤も培地中に加えられているという事なので（選択剤も企業秘密のため不明）、食品材料の増菌培養液を直接塗抹して分離培養を行い、発育してきた菌の色調を観察して、腸炎ビブリオの特徴を示す集落を計数する事で生菌数を求められる事になる。確認試験の培養のための1日を短縮できる事になる。

アサリとハマグリを用いた実検体でのCA培地による試験の成績では、藤色の集落のうち生化学的試験の成績により腸炎ビブリオと推定されたものは71/78 (91.0%)であった。そのうちCAへの再培養によって、2例は青色で*V. metchnikovii*と推定され、4例は白色で*V. vulnificus* (2) と*V. alginolyticus* (1) と推定されたが、1例は白色でも腸炎ビブリオの生化学的性状を示していた。また、CAで藤色を示したものでも、2例が腸炎ビブリオ検出用PCRに陰性であった。

E. 結論

酵素基質培地を用いても、集落の色調ですべてを腸炎ビブリオと同定する事は出来

ず、確認試験が必要であり、検査時間の短縮を行う事は困難であるものと考えられた。

ビブリオ属菌は、生化学的性状も非常によく似た菌群で、生息域も汽水域を中心とした海洋性の細菌である。そのため、菌の同定には複数の生化学的性状を比較しなければいけない。酵素基質培地はそれら性状のうちの一つまたはいくつかの性質を利用したものと考えられ、たとえ特異的な性状に対するものであったとしても、類似の性状をもつものが多い場合には区別するのが困難になるものと考えられる。したがって、ビブリオ属菌の場合は、生化学的性状を迅速法に利用するには限界があるものと考えられる。

近年、ヒトの病原菌であるコレラ菌、腸炎ビブリオ、*V. vulnificus*の全ゲノム配列が解析された。また、魚類の病原菌である*V. fisherii*についても全ゲノム配列が解析され、現在*V. alginolyticus*についても解析が進行中である。これら遺伝子情報に基づいた解析から、ビブリオ属菌の類縁関係が明らかになってきており、分類で良く用いられる16S rRNAの配列を比較しても、ビブリオ属菌はお互いが非常に近縁で、16S rRNAでは区別が困難である(図1)⁵⁾。いくつかの生育に必要な遺伝子についてもかなり類似度が高く、ビブリオ属菌を遺伝子配列から分類するのに利用可能な候補がこれまでなかった。しかし、最近報告された*toxR*遺伝子について、特定の領域については菌種間にかんりのばらつきのある領域が見つかった(図2)⁵⁾。*toxR*遺伝子全体の近縁度

も16S rRNAに比べて十分に差があり、この遺伝子領域を標的とする事で腸炎ビブリオ特異的な検出系が開発できるものと期待される。我々はすでに*V. fluvialis*について特異的に検出できるPCRを開発しており、腸炎ビブリオについても応用可能ではないかと期待される。

F. 研究発表

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

G. 参考文献

1. Kim YB et al, Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. J. Clin. Microbiol. 37(4), 1173-1177(1999)

2. Bej AK, Molecular based methods for the detection of microbial pathogens in the environment. J. Microbiol. Methods. 53(2):139-140(2003).

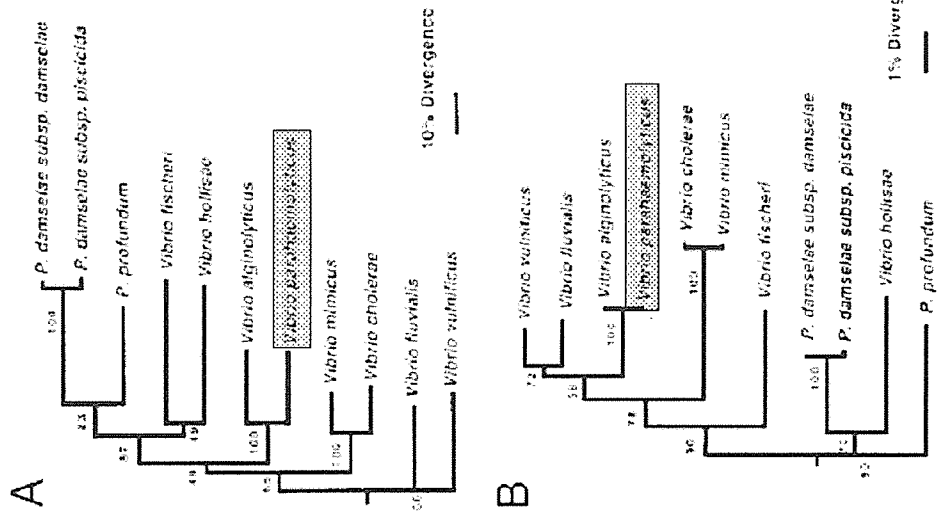
3. 伊藤文明ら 感染症学雑誌、臨時増刊号、67、181 (1993)

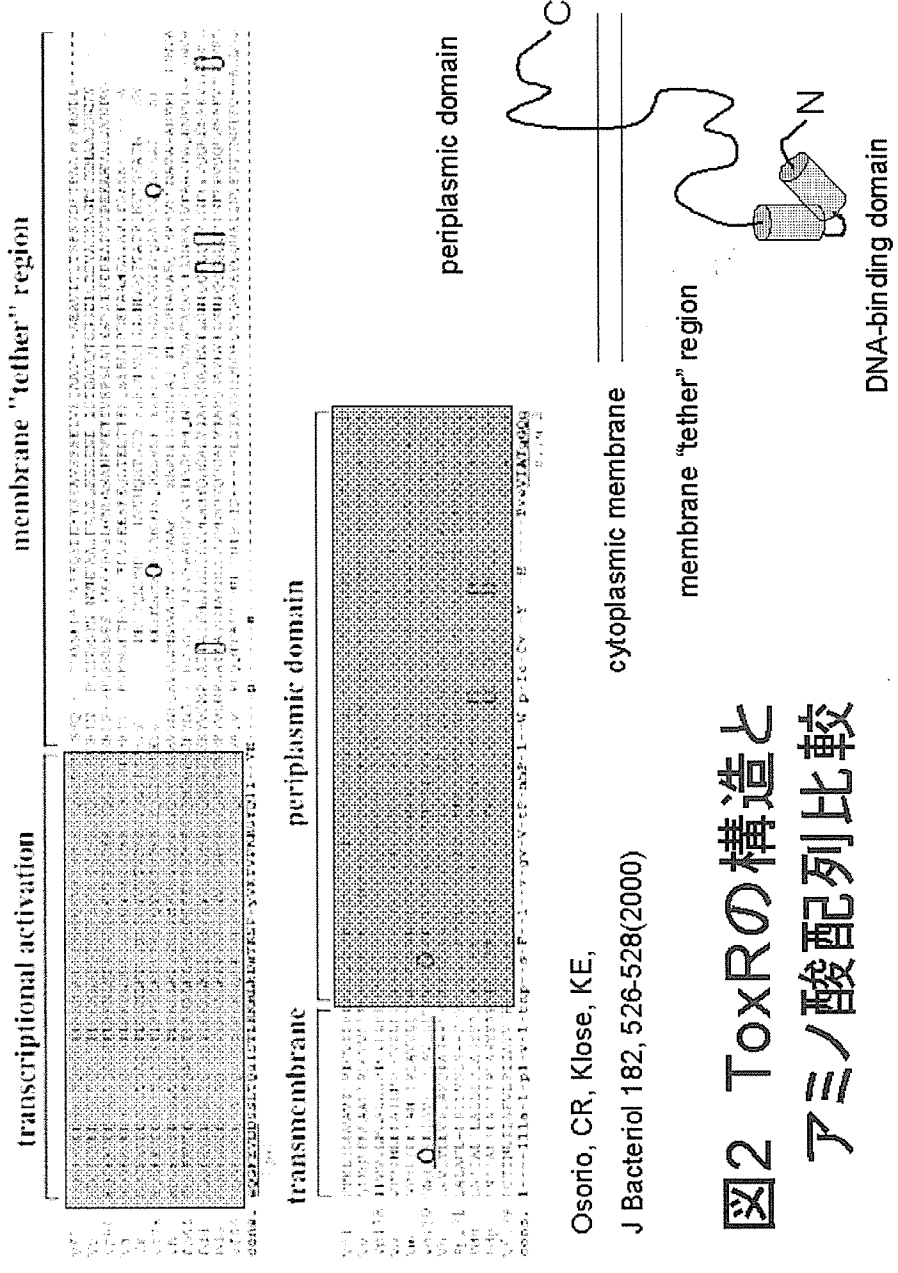
4. Tada J et al, Non-isotopic microtitre plate-based assay for detecting products of polymerase chain reaction amplification: application to detection of the *tdh* gene of *Vibrio parahaemolyticus*. Mol. Cell. Probes, 6, 477(1992)

5. Osorio CR et al, A region of the transmembrane regulatory protein ToxR that tethers the transcriptional activation domain to the cytoplasmic membrane displays wide divergence among *Vibrio* species. J. Bacteriol., 182(2), 526-528(2000)

菌株番号	CA	TCBS	オキシダーゼ	斜面	TSI高層	培地硫化水素	ガス	LIMリン	培地インドル	運動性	食塩加培地			PCR	推定される菌種
											0%	3%	8%		
501-06	青藤	黄緑	?	黄	黄	?	?	+	?	+	?	+	+	+	<i>V. metchnikovii</i>
502	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
503	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
504	青藤	黄	?	黄	黄	?	?	+	?	+	?	+	+	+	<i>V. metchnikovii</i>
505	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
506	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
507	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
508	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
509	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
510	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
511	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
512	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
513	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
514	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	?	+	+	腸炎ビブリオ
515	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
516	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
517	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
518	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
519	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
520	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
521	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
522	藤	緑	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
523	青	黄	+	黄	黄	?	?	+	?	+	?	?	?	?	<i>V. fluvialis</i>
524	青	黄	+	黄	黄	?	?	+	?	+	?	?	?	?	<i>V. fluvialis</i>
525	青	黄	+	黄	黄	?	?	+	?	+	?	?	?	?	<i>V. fluvialis</i>
526	青	黄	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	?	?	?	<i>V. vulnificus</i>
527	白	?	+	赤	黄	+	?	+	?	?	+	?	?	?	<i>Shwanella</i>
528	白	?	+	黄	黄	?	?	+	+	?	+	?	?	?	<i>V. vulnificus</i>
529	白	?	+	黄	黄	?	?	+	+	+	?	?	?	?	<i>V. cholerae</i>
530	白	?	+	黄	黄	?	?	+	+	?	+	?	?	?	<i>V. alginolyticus</i>
531	白	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
532	白	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
533	白	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	<i>V. vulnificus</i>
534	白	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
535	白	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
536	白	?	+	黄	黄	?	?	+	+	?	+	?	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
537	白	?	+	黄	黄	?	?	+	+	?	+	?	?	?	<i>V. alginolyticus</i>
538	白	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
539	白	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
540	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	?	+	+	腸炎ビブリオ
541	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
542	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
543	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
544	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
545	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
546	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
547	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
548	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
549	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
550	?	?	+	黄	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
551	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
552	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
553	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
554	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
555	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	?	+	+	<i>V. vulnificus</i>
556	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
557	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
558	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
559	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	?	?	腸炎ビブリオ
560	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
561	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
562	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
563	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ
564	?	?	+	赤	黄	?	?	+	+	?	+	+	+	+	腸炎ビブリオ

図1 ビブリオ属菌の
toxRと16SrRNAの
近縁度





Osonio, CR, Klose, KE,
 J Bacteriol 182, 526-528(2000)

図2 ToxRの構造と
 アミノ酸配列比較

PCR法の検討

- 標準PCR、real-time PCR
Templateの調整、感度
- 標的遺伝子
toxR、*t1h*、16S rDNA、*gyrB*、*sodA*、(*tdh/trh*)
- MPN値の測定
100/gの規制値、生菌数
- RT-PCR
Templateの調整、発現量
- 増菌法
他のVibrioや雑菌の抑制

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

食品由来ウイルスの抽出法および検出法の検討と評価

分担研究者 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

研究要旨

ウイルス性食中毒の主要な病原物質であるノロウイルスの迅速診断法として ELISA 法によるノロウイルス検出キットの評価を行った。遺伝子診断法で陽性となったノロウイルス患者糞便材料 (genogroup I : 7 種類の遺伝子型、genogroup II : 13 種類の遺伝子型) 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を検出可能であった。ELISA 法の検出限界をリアルタイム PCR 法で算出されたノロウイルス遺伝子コピー数から、 10^5 コピー前後であると考えられた。

A. 研究目的

厚生労働省の食中毒統計によると、ウイルス性食中毒は年間 300 件 (患者数 1 万人) 前後発生し、そのほとんどはノロウイルス (カリシウイルス科ノロウイルス属) に起因するものである。ノロウイルス食中毒は冬期に多発し、その約 30% はカキ等の二枚貝類の喫食に伴うものである。食品従事者により汚染された食品による食中毒事例が学校、各種施設、仕出し弁当調理施設などでも多発しており、これら調理済み食品の提供される形態の特徴から大規模食中毒を起こしている。ノロウイルスはノロウイルス属に属するウイルスの総称で、直径約 30nm の粒子表面に突起状の構造を有する一本鎖 RNA ウイルスであり、ノロウイルスの分類は遺伝子情報に基づいて遺伝子型に分類されている。ノロウイルスの遺伝子型は、大きく 2 群の遺伝子群 (genogroup I:GI,

genogroup II:GII) に分類され、さらに細かく 30 以上に分類されている。ノロウイルスは培養細胞や実験動物による培養法が見つかっておらず、その検出法としては RT-PCR 法あるいはリアルタイム PCR 法 (食安監発 1105001 号) の遺伝子診断法が広く用いられている。現在、数社から市販ノロウイルス検出キットが発売されているが、今回「迅速性」および「簡便性」から酵素抗体法 (ELISA 法) によるノロウイルス検出キットについて従来法の遺伝子診断法と比較検討を行った。

B. 材料と方法

1) ノロウイルス遺伝子型別およびコピー数の算出

ノロウイルス食中毒患者由来糞便を食安監発 1105001 号に従って 10% 乳剤を作製した。

糞便乳剤より QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用いてウイルス RNA を抽出し、ランダム・ヘキサマーと逆転写酵素 (SuperScript II, Invitrogen) を用いて cDNA を作製した。

Kojima ら (JMV, 100, 107-114, 2002) の報告に従い cDNA を G1SKF/R あるいは G2SKF/R を用いて Capsid N terminal/Shell domain (N/S) 領域を PCR 法にて増幅しダイレクトシーケンス法により、オートシーケンサー (ABI PRISM 310, ABI) で塩基配列を決定した。ノロウイルスの遺伝子型別は Katayama らの方法 (Virology 299, 225-239, 2002) に基づいて、得られた塩基配列をレファレンス株と同時に Clustal X により系統解析を行い、遺伝子型別番号は Seto ら (MI 49, 275-283, 2005) に従った。

Kageyama らの方法 (JCM 41, 1548-1559, 2003) に従い、cDNA を COG1F/R、RING1-TP (a)、RING1-TP (b) あるいは COG2F/R、RING2-TP を用いてリアルタイム PCR 法にてコピー数を定量した。

2) ELISA 法によるノロウイルスの検出

糞便乳剤 100 μ l を用いて、NV-AD「生研」(デンカ生研) によりノロウイルスの検出を行った。添付のマニュアルに従い反応停止後、各ウェルをマイクロプレートリーダーを用いて 450nm/630nm で測定し判定した。

C. 研究結果

ノロウイルス食中毒事件由来患者糞便を各事件複数検体用いて各遺伝子型のノロウイルスと NV-AD の反応性について検討した (図)。GI 遺伝子型 7 種類および GII 遺伝子型 13 種類中 GI/1, 2, 3, 4 および GII/1, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 14 の遺伝子型のノロウイルスが検出されたが、他の遺伝子型の

ノロウイルスについては NV-AD キットの判定基準以下であった。

ノロウイルス急性胃腸炎患者糞便 (16 検体) およびノロウイルス非感染急性胃腸炎患者糞便 (2 検体) を用いて NV-AD の反応性および感度を検討した (表)。患者糞便乳剤から検出されたノロウイルスの遺伝子型は GI/1, 2, 3 および未型別、GII/3, 4, 5, 6 および未型別に分類され、NV 遺伝子コピー数は $1.4 \times 10^2 \sim 2.8 \times 10^7$ コピー/100 μ l であった。ノロウイルス遺伝子陽性検体 16 検体中 12 検体から ELISA 法でノロウイルスが検出され、ノロウイルス遺伝子コピー数は $1.0 \times 10^5 \sim 2.1 \times 10^7$ コピーであった。同じ遺伝子型のノロウイルスではコピー数が増えると 450nm/630nm の測定値が大きくなっていた。ノロウイルス遺伝子陰性検体 2 検体は ELISA 法でも陰性であった。ノロウイルス遺伝子陽性検体中 NV-AD 陰性であった 4 検体は、04545 (GI/2, 0.4×10^5 コピー)、05112 (GI/3, 2.8×10^7 コピー)、05097 (GII/nt, 1.0×10^5 コピー) および 04804 (GI/1, 1.4×10^2 コピーと GII/6, 2.2×10^5 コピー) であった。

NV-AD で陰性であった 4 検体中 GI/2, GI/3, GI/1 と GII/6 はいずれも NV-AD で検出可能な遺伝子型であるため、ウイルス量が検出限界以下であったと考えられた。05112 (GI/3, 2.8×10^7 コピー) を除くと NV-AD の検出限界は 10^5 個前後であると考えられた。

D. 考察

NV-AD を用いて GI/1, 2, 3, 4 (4 種類) および GII/1, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 14 (8 種類) の 12 種類の遺伝子型のノロウイルスが検出可能であった。ノロウイルスには GI/1 ~ 14 および GII/1 ~ 17 の合計 31 種類以上に分類されることから、NV-AD を用いて全

ての遺伝子型のノロウイルスを検出することは不可能である。しかしながら、国内で多く検出されるノロウイルスの遺伝子型は GI/1、3、4 および GII/1～6、8、12、14 であることから、NV-AD は国内で流行しているノロウイルスの多くを検出できると考えられた。

ノロウイルス食中毒事件の原因食品としてパン、和え物、サラダ、寿司等が報告されているが二枚貝類以外の食品が特定されることは稀であり、二枚貝類以外の原因食品からのノロウイルス検出の報告も稀である。これらの理由として、食品からのウイルスの抽出が煩雑であることや各種阻害物質の存在も考えられるが、食品中に混入しているウイルス量が極少量であるためと考えられる。ノロウイルスの最少発症ウイルス量が 100 程度であること、NV-AD の検出限界が 10^5 個前後であると考えられること

から、NV-AD を用いて食品からノロウイルスの検出を行うためにはウイルスの濃縮操作が必要であると考えられた。

E. 結論

NV-AD を用いて検出されるノロウイルスの検出限界は 10^5 個前後であると考えられた。食品からのノロウイルスの検出には高効率の濃縮法の開発が必要である。さらに検出可能なノロウイルスの遺伝子型が限られていることから食品からノロウイルス抽出法としての有用性はさらに検討が必要と考えられた。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得

なし

A) Genogroup I NVs

