

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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小崎 俊司

平成 20 (2008) 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. ブドウ球菌エンテロトキシンHのELISA法の構築および食中毒由来株における
H型毒素の分布 --- 10
小崎 俊司・居原 秀・酒井 史彦
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 --- 19
浅尾 努、河合 高生、久米田 裕子、小笠原 準、木村 凡
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 --- 40
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 --- 49
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 --- 68
五十君 静信、朝倉 宏、梶川 揚申
6. 培養法・非培養法・ハイブリッド法による迅速法の開発 --- 76
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 --- 83
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 --- 91
LAMP法による増殖性を有する耐熱性溶血毒(TDH)産生性、腸炎ビブリオの海産
魚介類からの検出法の開発 --- 105
荒川 英二、山崎 貢、岩出 義人、松本 昌門、皆川 洋子
9. 食品由来ウイルスの抽出法および検査法の検討と評価 --- 115
勢戸 祥介
10. ノロウイルス迅速検査法の検討と評価 --- 124
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 --- 130

- IV 研究成果の刊行物・別刷 --- 132

I 総括研究報告書

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の患者あるいは食材から得られた検体から、菌あるいは毒素を分離（検出）・同定することを想定し、特定された病原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。これら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の日数を要する。一方、食品製造現場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必要であり、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）の検出が重要である。一般に、これらの検査対象となる食品は、当然ながら汚染度は低いため、使用に適した検査法は高感度、迅速で、さらに検査が日常的に行われるため実施するために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簡便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。迅速法の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、現在わが国においてこれらの菌を対象とした告知法・通知法が、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観点から好ましくない状況にあることがわかった。本年度は市販されている簡易迅速検査法の有用性を従来法と比較しながら検討した。迅速検査を行う必要性の高い腸炎ピブリオについては、PCR 法による特異検出法の検討を行い、さらに nested PCR 法を組み合わせることにより検出感度の改善がみられた。この nested PCR 法の適用はノロウイルスの検出にも期待が持てる成績も得た。毒素型食中毒菌ではブドウ球菌エンテロトキシンが多数報告されているが、エンテロトキシン H が FDA でも新規の毒素として認知されたことから、本邦における食中毒由来菌の H 型毒素産生性の実態把握と検査法の確立のために免疫学的検出法を開発した。食品検体からの菌およびウイルスの濃縮、回収法を多面的に調べ、さら回収菌の自動解析方法についても検討を加えた。

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 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 英明 東京農工大学大学院工学研究部
教授

甲斐 明美 東京都健康安全研究センター
微生物部 科長

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 准教授

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

居原 秀 大阪府立大学大学院理学系研
究科

酒井 史彦 雪印乳業株式会社食品衛生研
究所

河合 高生 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

小笠原 準 大阪市立環境科学研究所

高橋 肇 東京海洋大学

李 睿 九州大学大学院生物資源環境
科学府

原田 天章 九州大学大学院生物資源環境
科学府

朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所

梶川 揚申 国立医薬品食品衛生研究所

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

山崎 貢 愛知県衛生研究所

岩出 義人 三重県科学技術振興センター

松本 昌門 愛知県衛生研究所

皆川 洋子 愛知県衛生研究所

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の測定についての評価試験および市販されている迅速検査法を従来法との精度比較を行った。種々の病原細菌の中で迅速法の評価が求められている腸炎ビブリオ検査の検討および新規ブドウ球菌エンテロトキシン H の検査法の確立を行った。また、食品中から培養を経ずに菌の回収・濃縮を行う条件を調べた。

培養が不可能なノロウイルスについては検出法の改善、および食品中に含まれるウイルス濃縮法の問題検討を実施した。

B. 研究方法

1. 汚染指標菌試験法の検討

食品中の汚染指標菌の簡易迅速法の有用性を検討するために、バイオシータ社の DOX とピオメリュー社の TEMPO を使用した。DOX は酸素電極を利用し、細菌が増殖する際に利用する酸素消費量から生菌数を自動計測する検査システムである。TEMPO は MPN 法カード化した自動菌数測定装置で、AFNOR と AOAC から認証を得ている検査システムである。これらの検査法を評価するために自然汚染に近い状態の食品を調製する必要がある。その前段階として、動物・環境由来菌液として糞便あるいは土壌抽出液を検体として、これらの一般生菌、大腸菌群、大腸菌、腸内細菌科菌群数を従来法と比較検討した。

2. 迅速法の基礎情報の収集と課題整理

迅速法の客観的な評価法を AOAC による評価法等を参考に収集し、今後必要とされる項目についての整理を行った。また実際に AOAC に迅速キットとして申請過程の資料を基にして、評価法としての試験法の妥当性や問題点を抽出した。さらにこれらの問題点の具体的な実証を得るために、一般生菌数を対象に実験的な検証を行った。

3. 腸炎ビブリオの迅速検査法の検討

生鮮魚介類に対する汚染指標菌として腸炎ビブリオの迅速検査法として PCR 法の有用性について検討した。検出プライマーとして、*toxR* と LDH を用いて、定性的および定量的な観点から検討した。また、検出感度の上昇を期待して nested PCR の組み合わせも調べた。本法の実用

性の評価については、魚介類の培養液中に菌とインターナルコントロールを添加して調べた。

4. 腸管出血性大腸菌の迅速検出法の評価

標準法が示されて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 PCR キットの評価について検討した。PCR で増幅される遺伝子産物の領域を特定する試みを行った。また、ベロ毒素遺伝子の VT1 および VT2 とその variant の存在が知られているが、これらの毒素遺伝子が市販キットでどの程度検出可能かどうかを評価した。市販の免疫学的 VT 検出キットと比較することにより毒素産生性との関連性も調べた。

5. 毒素型食中毒菌の免疫学的検出法の開発

典型的な毒素型食中毒を起こすブドウ球菌エンテロトキシン A~E 型が病原因子と考えられてきたが、実際には多様な毒素群であること、また 1 つの菌株が複数の毒素を産生することもわかってきた。その中でも H 毒素が新規エンテロトキシンとして FDA で認知されている。しかしながら、この毒素を対象とした検査法は市販されていない。本邦における H 毒素産生菌と食中毒との関係を調べるために毒素のリコンビナントを調製し、これを抗原とした抗血清を用いた ELISA を開発した。

6. 迅速法に適した検体処理方法の検討

増菌培養を行わず、直接検体を濃縮することによる病原菌の検出の可能性について、磁気ビーズ、陽イオンラップによる濃縮法を評価した。また、非培養法による迅速法の信頼性を確保するために、難濾過性の食品（生乳、魚肉、牡蠣）に種々の菌を接種し、密度勾配分離法による各対象菌の食品からの分離を試みた。

7. ノロウイルス迅速診断法の検討

ノロウイルス食中毒では多種類の原因食品が報告されているが、原因食品から直接ウイル

スが検出できた事例は少ない。食品から迅速で簡便なウイルス抽出法を検討する目的でノロウイルス代替ネコカリシウイルスを用いて、各種食品にウイルスを添加後、ウイルスの抽出法を検討した。ノロウイルス検出感度を向上させるために、2ndリアルタイムPCRの検討を行った

C. 研究結果

動物（ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ）糞便および土壌から抽出した液を利用した自然汚染の実態に近い指標菌汚染食品を考案した。その前段階として、各抽出液中の菌数を測定したところ、DOX および TEMPO で得られた値は、平板培地法（標準法）で測定した菌数との間に高い相関関係が認められた。評価法としての試験項目の妥当性や問題点を調べたところ、有意差ありと判断されたケースにおいても、実用上問題ではないケースも存在することがわかった。

ビブリオ属菌の簡易・迅速法の確立のために、汚染指標菌としての立場から、腸炎ビブリオに特異的な PCR 法を開発し、さらにこれにより得られた遺伝子産物を鋳型として nested PCR 法を試みた。その結果、検出感度が 10,000 cfu/ml から 200 cfu/ml まで感度の上昇が認められた。一方、検出する対象遺伝子として *toxR* と LDH についての特異性を検討したところ、*toxR* を対象とした場合に *V. alginolyticus* の一部が非特異的に反応することがわかった。検出に不可欠な内部コントロールを添加した場合、菌培養液の検出感度は $10^4 \sim 10^5$ cfu/ml であり、相対的に内部コントロール未添加よりも 1 オーダー低下した。魚介類の培養液への添加実験では検出感度は $10^5 \sim 10^6$ cfu/ml であり低下傾向にあったが、他方、食中毒関連食品の培養液について PCR 法による検出を検討したが、内部コントロールの有無にかかわらず値は一致した。海水およびアサリの MPN 法の成績は PCR

法と同等の値が得られた。

市販腸管出血性大腸菌の遺伝学的検出キットが対象としている毒素遺伝子の塩基配列を詳細に調べた。ペロ毒素遺伝子の部分塩基配列を決定し、*stx1* および *stx2* 遺伝子型による分類を行った結果、両遺伝子型ともに 2 つの群に分類できることがわかった。RPLA による検査結果と比較したところ、大腸菌 0157 では *stx1* および *stx2* 遺伝子を保有しているにもかかわらず、免疫学的検査ではペロ毒素を検出できない菌株が存在していることが明らかになった。

ブドウ球菌エンテロトキシン H の検出用 ELISA は他の毒素との交叉反応もなく特異性が高いことがわかった。食中毒由来菌（144 株）について、他の毒素産生との関係も含めて調査した結果、A 型毒素産生株が最も多かったが（63%）、H 毒素産生株も同程度（60%）の存在していた。これらの菌から産生されるコアグラーゼ型と比較した結果、H 毒素産生株は全てコアグラーゼ VII 型であった。

食品から増菌培養を行わないで、直接、菌を回収・濃縮する方法について、昨年度収集した情報に基づいて検討した。免疫磁気ビーズ法では良好な結果が得られなかったため、陽イオントラップによる方法も併せて検討した。定性的には検出感度を上げることが可能であったが、選択増菌培養による標準法に相当する感度までには至らなかった。Percoll 密度勾配遠心分離法による難濾過性食品からの菌分離では、Percoll 濃度を不連続的に工夫することにより効率的に分離が可能であったことから、非培養法と培養法のハイブリッド法確立の可能性が示された。

ノロウイルスの食品からの直接濃縮法の検討では、遠心式限外濾過法が有効であることがわかった。しかし、食材による回収率の差が著しく懸濁に使用する溶液成分を検討する必要

があることが示唆された。現在使用されている PCR 法の検出感度の上昇を期待して 2nd リアルタイム PCR 法を試みた結果、Genogroup I 陰性例で陽性になった材料があった。Genogroup I と II 陽性材料で、半数が 1,000 倍以上の検出感度の上昇が認められた。

D. 考察

わが国の一般生菌数および汚染指標菌に関する告知法・通知法を欧米で使用されている方法と比較した結果、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。本年度は、現在食品中の汚染指標菌の簡易迅速試験法として使用されている原理の異なる 2 つの方法について、従来法との比較を行った。いずれの方法から得られた値（菌数）は従来法と比較して高い相関性を有していた。次年度は自然汚染に近い状態の食品を検体として迅速法の信頼性について検討を加える予定である。

ビブリオ属菌の簡易迅速検出法として、腸炎ビブリオと対象として PCR 法を検討し、さらに nested PCR 法を加えた場合の有効性について評価した。検出感度の上昇は期待できるが特異性については今後の課題となる。特異遺伝子を検出する場合でも、食材によっては検出感度の低下がみられたが、食中毒関連検体では十分評価が期待できることがわかった。

腸管出血性大腸菌の検査法として現在使用されている PCR 法の遺伝子産物の特性を調べた。これらの成績は今後の分子生物学的手法を開発するうえで基礎的な情報を提供すると考えられた。一方、免疫学的検出法では陽性を示さない菌株も存在することから、結果の評価方法についての詳細な検討が必要と考えられる。新規ブドウ球菌エンテロトキシンとして認知されている H 型毒素の産生性は、これまでわが

国で分離された食中毒由来菌株にも存在することがわかった。また、本毒素産生性はヒト由来コアグラゼ産生性と密接な関係があり、今回開発した方法は今後の食中毒診断に有効な手段となりうると考えられた。

食品中に含まれる菌を直接濃縮し、これを検体として迅速に測定が可能で標準的な培養方法に匹敵する感度を有する方法の開発については、現在まで十分な成果が得ること出来ていない。次年度は短時間の選択増菌を行った後に迅速・簡便法を適用することの妥当性についての検討を行うことにより実用性の高い迅速検出法についてのモデルケースを提案する。難濾過性の食材からの密度勾配遠心法と培養法との併用で菌の分離・測定が十分可能であることを示した。

食品からのノロウイルスの検出可能な濃縮法を検討したが、食材により回収率が大きく異なることから抽出法の詳細な検討が必要であることがわかった。検出感度の向上に向けて 2nd リアルタイム PCR 法の有効性を検討し、部分的に感度の上昇がみられた。

E. 結論

細菌検査で最も要求度の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は、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。これら汚染指標菌を対象とする市販の簡易迅速検査法の有用性が認められたため、自然食品に近い状態の製品を人工的に調製し、従来法と同等の検出精度を得られるかどうかについて今後検討する予定である。病原菌の中で、迅速法の確立が特に求められている腸炎ビブリオの検査法として PCR 法を検討した。対象遺伝子として *toxR* と LDH を用い

た場合には検出・定量性については問題はないが、魚介類の抽出液を検体とした場合には条件検討の必要があることがわかった。Nested PCR法の有用性も現在検討しており、今後は短時間の増菌を加味した方法で感度・特異性の改善を図る予定である。腸管出血性大腸菌のペロ毒素遺伝子の解析結果を基にした効率のよい PCR法の開発をする。新規ブドウ球菌エンテロトキシンHの検出法を開発し、食中毒由来菌の毒素産生実態を調べた。今後はその有用性の検討に加えて、毒素型食中毒検出のために必要とされる種々の方法について調査と検討を加える予定である。食品中の菌を直接濃縮する方法について検討したが、効率性の点で問題があり、今後は選択増菌法を行った後に、迅速法の適応の妥当性を検討する予定である。食材から密度勾配遠心による菌分離方法については、さらに検討を加え、実用性の高い新規デバイスを提示する。ノロウイルスについては、食品からの濃縮方法の検討を進め、実用性の高い方法を確認し、現在使用されている PCR法、さらには 2ndリアルタイム PCR法の組み合わせにより特異性・感度の改善を図り、実用可能な検査法を提示する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K Seto, M Taguchi, K Kobayashi, S Kozaki. Biochemical and molecular characterization of minor serogroup of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans in Osaka prefecture. *J. Vet. Med. Sci.*, 69(12): 1215-1222, 2007
- 2) 浅尾 努 (2007) 食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法 (2) 大腸菌群、糞便系大腸菌群、大腸菌、日本防菌防黴学会誌、35 : 401-410.
- 3) 浅尾 努、河合高生、久米田裕子、寺本忠司、石黒 厚、梅迫誠一、小笠原 準、高須一重、美野朋隆、日野亮一、齋藤利江、小崎俊司、山本茂貴 (2007) 食品の細菌学的試験法の現状と問題点 (日本食品微生物学会 食品の細菌検査法問題検討委員会報告) *日本食品微生物学雑誌*、24 : 134-143.
- 4) Y. Kasai, B. Kimura, Y. Tajima, and T. Fujii, Quantitative duplex PCR of *Clostridium botulinum* types A and B neurotoxin genes. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 48 (2007) 19-26.
- 5) S. Handa-Miya, B. Kimura, H. Takahashi, MSato, T. Ishikawa, K. Igarashi, T. Fujii.: Nonsense-mutated *inlA* and *prfA* not widely distributed in *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat seafood products in Japan, *Int. J. Food Microbiol.* 117 (2007) 312-318
- 6) H. Takahashi, S. Handa, B. Kimura, M. Sato, A. Yokoi, S. Goto, I. Watanabe, T. Koda, K. Hisa, and T. Fujii: Development of Multilocus Single Strand Conformational Polymorphism (MLSSCP) Analysis of Virulence Genes of *Listeria monocytogenes* and Comparison with Whole Genome DNA Typing *Int. J. Food Microbiol.* 118 (2007) 274-284
- 7) Y. Tanaka, B. Kimura, H. Takahashi, T. Watanabe, A. Kai, S. Morozumi, and T. Fujii: Lysine decarboxylase of *Vibrio parahaemolyticus*: kinetics of transcription and role in acid resistance. *J. Appl. Microbiol.* in press (2007, doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03652.x)
- 8) B. Kimura, R. Kimura, T. Fukaya, K. Sakuma, S. Miya, and T. Fujii: Growth and toxin

- production of proteolytic *Clostridium botulinum* in aseptic steamed rice products at pH 4.6 – 6.8 packed under modified atmosphere using a deoxidant pack. *J. Food Prot.* 71, (2008) , 468–472.
- 9) H. Takahashi, B. Kimura, Y. Tanaka, M. Mori, A. Yokoi, and T. Fujii: Use of single-strand conformation polymorphism of amplified 16S rDNA for grouping of bacteria isolated from foods. *J. Food Prot.* 71 (2008) 839–844.
- 10) B. Kimura, Y. Sekine, H. Takahashi, Y. Tanaka, H. Obata, A. Kai, S. Morozumi, and T. Fujii: Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis distinguishes *Vibrio parahaemolyticus* pandemic O3:K6 strains. *J. Microbiol. Meth.* 72 (2008) 313-320.
- 11) K. Fujioka, P. Geis, M. Saito, H. Matsuoka: Visualization of Yeast Single-cells on Fabric Surface with a Fluorescent Glucose and Their Isolation for Culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 685-688 (2007).
- 12) K. Fujioka, I. Kozone, M. Saito, H. Matsuoka: Automatic mapping of viable microbial cells distributed in the surface layer of cotton fabrics. *Biocontrol Science*, 12, 31-34 (2007)
- 13) K. Yamada, M. Saito, H. Matsuoka, N. Inagaki: A Real-time Method of Imaging Glucose Uptake in Single, Living Mammalian Cells. *Nat. Prot.* 2, 753-762 (2007)
- 14) H. Kodaka, S. Mizuochi, M. Saito, H. Matsuoka: Evaluation of a new medium for the enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in Japanese surface waters. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1112-1118(2007).
- 15) Y. Yamada, N. Yamaguchi, M. Ozaki, Y. Shinozaki, M. Saito, H. Matsuoka: An instant Cell Recognition System Using Microfabricated Coordinate Standard Chip Useful for Combinable Cell Observation with Multiple Microscopic Apparatus. *Microsc. Microanal.* 14, 1-7 (2008)
- 16) N. Iritani, T. Seto, H. Hattori, K. Natori, N. Takeda, H. Kubo, T. Yamano, M. Ayata, H. Ogura, Y. Seto.: Humoral immune responses against Norovirus infection of children. *J. Med. Virol.* 79:1187-1193.(2007)
2. 学会発表
- 1) 酒井史彦、居原秀、青山顕司、五十嵐英夫、柳平修一、浅尾努、小崎俊司。ブドウ球菌エンテロトキシンHのELISA法の構築および食中毒由来株におけるH型毒素の分布、第27回日本食品微生物学会、平成18年9月、大阪
- 2) 青山顕司、酒井史彦、居原秀、五十嵐英夫、柳平修一、浅尾努、小崎俊司。ブドウ球菌エンテロトキシンHの産生条件に関する検討、第27回日本食品微生物学会、平成18年9月、大阪
- 3) 木村竜介、木村凡、藤井建夫、宮沢純子、市岡法隆。低温増殖性 *clostridium botulinum* II型菌(B型、E型)の増殖抑制におよぼすチアミンラウリル硫酸塩の効果。日本食品衛生学会。平成19年5月、東京。
- 4) 田中悠一郎、高橋肇、下井敦美、清水潮、木村凡。SSCP法による魚類のフローラ解析。日本水産学会。平成19年9月、北海道。
- 5) 宮聡子、齊藤知佳、高橋肇、木村凡、藤井建夫。非加熱喫食水産食品における *L. monocytogenes* の分布に関する研究。日本食品微生物学会。平成19年9月、東京。
- 6) 宮聡子、須田貴之、石川達也、高橋肇、木村凡、藤井建夫。水産食品から分離したり

- ステリア菌の病原関連遺伝子の欠失とその病原性について。日本食品微生物学会。平成19年9月、東京。
- 7) 木村竜介, 高倉知佳子, 高橋肇, 木村凡, 宮沢純子, 市岡法隆. *L. monocytogenes* の増殖抑制におよぼすチアミンラウリル硫酸塩の効果。日本食品微生物学会。平成19年9月、東京。
- 8) 五十嵐珠美, 高橋肇, 大内歩, 木村凡. ネコカリシウイルスの固体表面上における生残性について。日本食品衛生学会。平成19年10月、静岡。
- 9) 石川達也, 滝沢是子, 宮聡子, 齊藤知佳, 高橋肇, 木村凡, 藤井建夫. 非加熱喫食水産食品における *L. monocytogenes* の挙動について。平成19年10月、静岡。
- 10) 五十君静信. 微生物検査標準法を必要とする背景とその目指すもの。シンポジウム“食品衛生管理と微生物検査のあり方”日本食品微生物学会総会。2007年9月、東京
- 11) 五十君静信. 微生物検査の標準化・日本の現状と今後。「食の安全確保のためのシステムづくり～世界・日本・埼玉の現状」。第29回日本食品微生物学会学術セミナー。2007年12月、さいたま
- 12) 山田洋平, 山口直俊, 篠崎行啓, 齊藤美佳子, 松岡英明, "細胞迅速呼び出し機能を利用した高効率単一細胞実験", 日本化学会第87春季年会, 大阪, 2007年3月
- 13) 松岡英明, 高山幸大, 小泉貴寛, 荒木恵美子, 齊藤美佳子, "食品中の生菌の迅速分画計数システムの開発", 日本化学会第87春季年会, 大阪, 2007年3月
- 14) 荒木恵美子, 高山幸大, 宇田川藤江, 田中寛行, 齊藤美佳子, 松岡英明, "水産食品からの食品マトリクスの物理化学的性質による分離条件の検討", 日本防菌防黴学会第34回年次大会, 大阪, 2007年8月
- 15) 高山幸大, 荒木恵美子, 宇田川藤江, 田中寛行, 齊藤美佳子, 松岡英明, "水産食品からの微生物の物理的性質による分離条件の検討", 日本防菌防黴学会第34回年次大会, 大阪, 2007年8月
- 16) 畑圭輔, 齊藤美佳子, 松岡英明, "生菌検出試薬としての2-NBDGの特性解析", 日本防菌防黴学会第34回年次大会, 大阪, 2007年8月
- 17) 瀬口裕介, 小泉貴寛, 齊藤美佳子, 松岡英明, "密度勾配遠心分離後の生菌画分回収システムの開発", 日本防菌防黴学会第34回年次大会, 大阪, 2007年8月
- 18) 澤山成行, 坪井成緒, 津村和伸, 島北寛仁, 齊藤美佳子, 松岡英明, "非培養法による豆乳中の細菌計数法の検討", 日本防菌防黴学会第34回年次大会, 大阪, 2007年8月
- 19) 澤山成行, 松嶋寛招, 山口典生, 島北寛仁, 齊藤美佳子, 松岡英明, "CMPスラリー中の微生物動向とその計数法の検討", 日本防菌防黴学会第34回年次大会, 大阪, 2007年8月
- 20) 澤山成行, 島北寛仁, 永幡肇, 齊藤美佳子, 松岡英明, "蛍光染色法による生乳中の細菌数と体細胞検出法の検討", 第144回日本獣医学会学術集会, 北海道, 2007年9月
- 21) 山崎貢, 岩出義人, 松本昌門, 荒川英二, 皆川洋子: LAMP法による増殖性を有する耐熱性溶血毒(TDH)産生性腸炎ビブリオの海産魚介類からの検出法(第41回腸炎ビブリオシンポジウム)。神戸。2007年11月
- 22) 宮原美知子, 荒川英二: 腸炎ビブリオの食品からの迅速検出法の検討。第41回腸炎ビブリオシンポジウム, 2007年11月

- 23) M. Miyahara, M. Miyahara, E. Arakawa :
Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR
in food and effect of electron-beam irradiation
on the detection of *Vibrio parahaemolyticus*.
Vibrio 2007, 2007 年 11 月
- 24) G. Chowdhuray, E. Arakawa, M. Morita, H.
Izumiya, G. P. Pazhani, M. K. Bhattacharya, P.
Dutta, G. B. Nair, K. Okamoto, S. Shinoda, A.
K. Mukhopadhyay, S. Yamasaki, H. Watanabe,
R. K. Nandy, Y. Takeda, S. K. Bhattacharya,
T. Ramamurthy: *Vibrio fluvialis*: An emerging
pathogen in causing acute diarrhea in Kolkata,
India *Vibrio* 2007, 2007 年 11 月
- 25) Seto Y, Iritani N, Seto T, Hattori H, Natori K,
Takeda N, Kubo H, Yamano T, Ayata M,
Ogura H, Humoral immune responses against
Norovirus infection of infant. 3rd International
Calicivirus Conference. November, 2007.
Mexico.
- 26) Iritani N, Vennema H, Siebenga J, Siezen R,
Renckens B, Seto Y, Kaida A, Koopmans M.
Genetic analysis of the capsid gene of
genotype GGII2 Noroviruses. 3rd International
Calicivirus Conference. November, 2007.
Mexico
- 27) 林 志直、森 功次、野口やよい、秋場哲
哉、貞升健志、新開敬行、長島真美、長谷
川道弥、田部井由紀子、吉田靖子、矢野一
好：社会福祉施設の調理従事者からのノロ
ウイルス検出、第 55 回日本ウイルス学会
学術集会、札幌市、2007 年 10 月

28)

3. 著書・総説等

- 1) 松岡英明：微生物検査法のバリデーシ
ョンの概略 “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 (2007) pp189-198.

2) 松岡英明：技能試験の必要性和標準化の動
向. *NISSUI TECHNOMEDIA* 7, 2-7 (2007).

3) 齊藤美佳子、松岡英明：微生物の迅速検出
法. *日本防菌防黴学会誌* 36, 99-105 (2008).

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

ブドウ球菌エンテロトキシン H の ELISA 法の構築および食中毒由来株における H 型毒素の分布

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 居原 秀 大阪府立大学大学院 理学系研究科 助教
酒井史彦 雪印乳業株式会社 食品衛生研究所

研究要旨

ブドウ球菌食中毒は代表的な毒素型食中毒でブドウ球菌エンテロトキシン（SE）が原因である。近年ブドウ球菌食中毒食品中に H 型毒素が検出されることが報告され、H 型毒素が食中毒発症に関与していることが示唆された。本研究では、H 型毒素検出用の ELISA を構築し定量化を試み、過去のブドウ球菌食中毒株について H 型毒素の産生能を精査した。本研究で構築した H 型毒素検出用の ELISA は、他の毒素と交差することなく H 型毒素と特異的に反応することが確認され、検出限界は 1 ng/ml であり、1・10 ng/ml の範囲で定量的に検出された。食中毒由来ブドウ球菌 144 株について A、B、C、D、E 型および H 型毒素を測定した結果、A 型毒素産生株は 90 株（63%）と最も多く、次いで H 型毒素産生株 86 株（60%）であった。これら黄色ブドウ球菌についてコアグララーゼ型と毒素型の関係を解析した結果、A 型毒素産生株はコアグララーゼ型がⅡ、Ⅲ、Ⅳ、ⅥおよびⅦ型に分散しているのに対して、H 型毒素産生株は全てがコアグララーゼⅦ型であることが明らかとなった。以上の結果から、過去の食中毒事例において、H 型毒素 H が食中毒の発症に深く関係している可能性が示唆された。よって、今後の黄色ブドウ球菌食中毒では H 型毒素も検査対象とする必要があるものと推察された。

A. 研究目的

ブドウ球菌食中毒は代表的な毒素型食中毒で、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) が食品中で増殖し、そこでブドウ球菌エンテロトキシン（SE）を産生するために起きる。SE は、菌体外毒素で、古くから血清学的に A、B、C、D、E 型（classical SE）の 5 タイプに分類されていたが、最近さらに 3 つのタイプの SE（G、H、I 型；new SE）、

10 種類のブドウ球菌エンテロトキシン様スーパー抗原が報告された。classical SE は、嘔吐と下痢を症状とするブドウ球菌性食中毒を引き起こし、また毒素性ショック症候群の病因でもあることが知られている。New SE は、サルの嘔吐反応を引き起こすことが示されているが、今のところ new SE が食中毒の原因になるのかどうかは明らかではない。しかしながら、H 型毒素は、H 型毒

素遺伝子保有菌を適当な培地で培養している。また、2000年の低脂肪乳を原因とする食中毒事件では、原材料の脱脂粉乳からA型毒素のほかにもH型毒素も検出された。これらの事実は、H型毒素もブドウ球菌性食中毒に関与していることを示唆しており、H型毒素と食中毒発症との関係を精査する必要がある。しかしながら現在市販されている毒素検出キットでは、A、B、C、D、E型の5種類しか検出できないため、H型毒素を検出するシステムの構築が必要である。本研究では、ELISAによるH型毒素の測定系を構築したのち、過去のブドウ球菌食中毒株についてH型毒素の産生能を精査することを目的とした。

B. 研究方法

1. 組換え体 SEH の調製：

Staphylococcus aureus H型食中毒分離菌(大阪府立公衆衛生研究所 浅尾博士より分与)を Brain-Heart Infusion 培地中 30℃ で 12 時間振盪培養した。遠心して菌を回収し、リゾチーム処理後、プロテイナーゼ K で蛋白質を分解した後ゲノム DNA を抽出した。さらに RNase で混入した RNA を分解した。抽出したゲノム DNA を鋳型とし、既報の H 型遺伝子の塩基配列(GenBank accession number AP 004822)をもとに設計したプライマーを用いて nested-PCR を行った。なお、プライマーは、最終的に発現される毒素蛋白質にシグナルペプチドが含まれないように設計し、クローニング用に 5'、3'側にそれぞれ Eco RI、Hind III 制限酵素認識配列を付加した。プライマーの配列を以下に示す。

とにより有意に産生されることが示され

First PCR;

Forward

GTTGTTTTTGTGTTTTATAAT

Reverse

AAAGACATGACAATTAACACTA

Second PCR;

Forward

GGAATTCGAAGATTTACACGATAAAA

Reverse

CCCAAGCTTATACTTTTTTCTTAGTATA
TA

PCR 産物を発現用ベクターにクローニングし塩基配列を確認した。発現ベクターには、免疫用に、ヒスチジンタグ融合蛋白質を産生する pET30a ベクター(Novagen)を、ELISA による力価測定用抗原、アフィニティー精製用としてマルトース結合蛋白質との融合蛋白質を産生する pMAL ベクター (NEB) を使用した (以下ではそれぞれのリコンビナント蛋白質を His-SEH、MBP-SEH とする)。

発現ベクターを含む大腸菌を培養し、isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside で毒素蛋白質の発現を誘導した。大腸菌を破碎し遠心上清よりリコンビナント毒素蛋白質を、His-SEHの場合Ni-Sepharoseカラムを、MBP-SEHの場合アミロースカラムを用いてアフィニティー精製した。

2. 抗 SEH ポリクローナル抗体の調製：

His-SEH を 20 μg/ml (6 回目は 200 μg/ml) になるように PBS で希釈し 1 ml を等量のフロイントアジュバントとよく混

合しエマルジョン化しウサギに免疫した。ウサギ3羽に2週間おきに5回(1回10 μ g/羽)、さらに40日後にもう1度(100 μ g/羽)免疫した。免疫から1週間後に採血を行い抗血清を得た。力価をMBP-SEHを抗原としたELISAで評価した。MBP-SEHを96穴プレートに1穴あたり0.5 μ gを吸着させ、ブロッキング後希釈した抗血清を加え37°Cで2時間インキュベートした。洗浄後パーオキシダーゼ結合2次抗体を加え37°Cで2時間インキュベートした。洗浄後にフェニレンジアミン、過酸化水素を添加し、室温で30分間インキュベーションした。硫酸を添加し反応を停止させた後マイクロプレートリーダーで492 nmの吸光度を測定した。

得られた抗血清をアフィニティー精製した。精製MBP-SEH(4 mg)を5 ml HiTrap-NHS (GEヘルスケア)に結合させ、SEHアフィニティーカラムを作製した。抗血清を10 mMリン酸ナトリウムバッファー(pH 7)で2倍に希釈しMBP-SEHアフィニティーカラムに供した。10 mMリン酸ナトリウムバッファー(pH 7)で洗浄後、0.1 Mグリシン-塩酸バッファー(pH 2.7)で溶出を行った。溶出液は失活を防ぐため、直ちに1.5 M Tris-塩酸(pH 8.8)で中和した。精製抗体を硫酸アンモニウム(70%飽和)沈殿し、0.05%アジ化ナトリウムを含むPBSに対して透析後、CBB法で牛血清グロブリンを標準タンパク質としてタンパク質定量した。タンパク質濃度を1 mg/mlになるように希釈し、-20°Cで保存した。

3. ELISAの構築:

アフィニティー精製抗SEH抗体は、

EZ-Link™ NHS-Biotin (PIERCE)を用いてビオチン標識した。500 μ lの抗体溶液(1 mg/ml, in PBS)に5 μ lのNHS-Biotin溶液(2.3 mg/ml, in ジメチルスルホキシド)を添加し、2時間水中でインキュベーションした。反応物を限外ろ過(Microcon, 50000cut, amicon)に供することで未反応のbiotinを除去し、ビオチン標識抗SEH抗体とした。

ビオチン標識抗体を用いたサンドイッチELISAを以下の手順で構築した。0.05M Sodium bicarbonate Bufferで非標識アフィニティー精製抗体を5 μ g/mlに希釈しCapture抗体溶液を調製した。100 μ lのCapture抗体溶液をマイクロプレートの各ウェルに添加し室温で1時間インキュベーションした。抗体溶液を除去し、Wash Buffer (PBS(-), 0.05% Tween20)で3回洗浄した。200 μ lのBlocking Buffer (PBS(-), 1% BSA)を添加し、室温で1時間インキュベーションしたあとBlocking Bufferを除去した。100 μ lの抗原溶液(PBS(-), 0.1% BSA)を添加し、室温で1時間インキュベーションした。

抗原溶液を除去し、Wash Buffer (PBS(-), 0.05% Tween20)で3回洗浄した。100 μ lのビオチン標識抗体溶液(PBS(-), 0.05% Tween20)を添加し室温で2時間インキュベーションし、Wash Buffer (PBS(-), 0.05% Tween20)で3回洗浄した。VECTA STAIN Elite ABC kit (Vector Laboratories, Inc.)を用いてビオチン-アビジン-ペルオキシダーゼ複合体を形成させた。ペルオキシダーゼの基質ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate))を添加し、室温で30分間インキュベーションした。ABTS stop solution(KPL inc.)を添加し、反

応を停止させた後マイクロプレートリーダーで405nmの吸光度を測定した。

4. ブドウ球菌エンテロトキシンの検出：
過去に国内で発生したブドウ球菌食中毒128事例から分離された黄色ブドウ球菌144株を用いた。また各型毒素産生株として strains 100 (A型), 243 (B型), FRI-137 (C型), 494 (D型), FRI-32 (E型), FRI-569 (H型)を用いた。菌株は、Brain-Heart Infusion培地で35℃、24時間振とう培養した後、培養上清中の毒素およびコアグラーゼ型を調べた。A、B、C、D、E型毒素は、reversed passive latex agglutination test kit(Enterotox-F, デンカ生研) または ELISA kit(Transia plate, Raisia Diagnostics)を用い、H型は、今回構築した ELISA で検出した。コアグラーゼ型は、coagulase typing kit(デンカ生研)を用いて血漿凝固阻害反応によって決定した。

C. 研究結果

PCRの結果、予測サイズの増幅産物を得た。クローニング後3クローンをシーケンスした結果、既報のH型毒素遺伝子と比較して蛋白質コード領域において1塩基の置換が認められた。アミノ酸配列に変換し比較したところ、その置換は同義置換でありタンパク質レベルでは本研究で用いた菌株が産生するH型毒素タンパク質は、既報のH型毒素タンパク質と同一のものであることが明らかとなった。

His-SEHの精製の結果を図1に示す。予測サイズ(32 kDa)の均一な蛋白質を得た。100 ml 培養液より16 mgの精製 His-SEHを得た。PBSにバッファー交換した後免疫

に使用した。

MBP-SEHの精製の結果を図3に示す。予測サイズ(70 kDa)の蛋白質を得た。100 ml 培養液より5 mgの精製 MBP-SEHを得た。PBSにバッファー交換した後 ELISA、アフィニティーカラム作製に使用した。

免疫していたウサギ2羽より全採血し抗血清を得た。それぞれの抗血清よりH型毒素特異的抗体をアフィニティー精製した。2ロットの抗 SEH 抗体(ウサギ1、2)について、両ロットの一部をビオチン標識化した。Capture 抗体とビオチン標識抗体の組合せと希釈割合を検討した結果、ウサギ1由来抗体を Capture 抗体(200倍希釈、約5 μg/ml)とビオチン標識抗体(1000倍希釈)として使用するのが最適であった(data not shown)。ELISAの測定感度を調べるため、0.1~10 ng/mlに調製した MBP-SEHを用いて ELISA を行った。その結果、MBP-SEHの検出限界は1 ng/mlで、1~10 ng/mlの範囲で定量的に検出された(図3)。

各型毒素産生株の培養上清を用いて ELISA を行った結果、H型毒素産生株である FRI-569 の培養上清のみ高い反応性を示し、他の型の毒素産生株の培養上清では反応しなかった(図4)。この結果は今回構築した ELISA が H型に特異的であることを示している。

食中毒由来ブドウ球菌144株についてA~EおよびH型毒素を測定した結果、SEA産生株は90株(63%)と最も多く、次いで SEH 産生株86株(60%)であった。SEBおよび SED 産生株は、それぞれ45および16株であった。また SEE 産生株は存在しなかった。これら黄色ブドウ球菌についてコアグラーゼ型を調べた結果、VII型が最も多く

全体の 69%(99 株)を占め、次いでⅢ型(14.6%)、Ⅱ型(8.3%)、Ⅳ型(3.5%)、Ⅵ型(3.5%)およびⅠ型(0.7%)の順であった。コアグラゼ型と毒素型の関係を解析した結果、SEA 産生株はコアグラゼ型がⅡ、Ⅲ、Ⅳ、ⅥおよびⅦ型に分散しているのに対して、SEH 産生株は全てがコアグラゼⅦ型であることが明らかとなった(表1)。

D. 考察

現在わが国で入手可能な市販のエンテロトキシン検出用キットは、SET-RPLA「生研」(デンカ生研)、バイダス SET(日本ピオメリュー)、黄色ブドウ球菌毒素 ELISA kit SETVIA48(TECRA 製)、黄色ブドウ球菌毒素 ELISA kit R4101(R-Biopharm 製)、トランジアプレートブドウ球菌エンテロトキシン(Diffchamb 製)、RIDA スクリーン黄色ブドウ球菌エンテロトキシン(アツマックス)などがあり、これらの中には、エンテロトキシンを A、B、C、D、E 型に型別できるキットと型別できないが A 型~E 型のいずれかのエンテロトキシンが存在するか否かを検査するキットがある。H 型毒素を検出できるキットは市販されていないが、今回我々は H 型毒素を特異的に検出する ELISA を構築した。各キットの検出感度は各社でそれぞれ表示されており、0.2 -2 ng/mL である。今回我々が構築した H 型毒素特異的な ELISA では検出限界は 1 ng/ml で市販キットとほぼ同等であり、H 型毒素の検出・定量には十分に利用できるものと考えられる。

食中毒事例の調査において、様々な疫学的マーカー(バイオタイピング、パルスフィールド電気泳動、ファージタイピング、

コアグラゼタイピング)が種を識別するために開発されている。日本では、コアグラゼタイピングが黄色ブドウ球菌性食中毒の最も一般的な疫学的マーカーとして用いられている。このタイピングはコアグラゼタンパク質の 8 タイプの異なった抗原性に基いている。日本で発生した食中毒の中で、コアグラゼⅦ型がもっとも多いが、classical SE 産生とコアグラゼ型との間には相関はない。また、H 型毒素を含めて他の型の毒素とコアグラゼ型との関連性に関する報告はない。今回我々は構築した H 型毒素検出 ELISA を用いて、日本国内で発生した過去のブドウ球菌食中毒由来菌 144 株について A~E および H 型毒素を測定し、コアグラゼ型との関係を解析したところ、A 型毒素産生株は複数のコアグラゼ型に分散しているのに対して、H 型毒素産生株は全てがコアグラゼⅦ型であった。以上の結果は、過去の食中毒事例において、H 型毒素が食中毒の発症に深く関係している可能性が示唆している。よって、今後の黄色ブドウ球菌食中毒では H 型毒素も検査対象とする必要があるものと推察された。

E. 結論

H 型エンテロトキシン産生ブドウ球菌より H 型毒素遺伝子をクローニングし大腸菌内で合成した組み換え毒素を用い H 型毒素特異的な抗体を作製した。作製した特異的な抗体をアフィニティー精製し、H 型毒素特異的な ELISA を構築した。検出限界は 1 ng/ml で H 型毒素の検出・定量には十分に利用できるものと考えられた。本 ELISA を用い過去のブドウ球菌食中毒由来菌の毒素産生と

コアグラゼ型との関係を解析した結果、H型毒素が食中毒の発症に深く関係している可能性が示唆され、今後の黄色ブドウ球菌食中毒ではH型毒素も検査対象とする必要があるものと推察された。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

K Seto, M Taguchi, K Kobayashi, S Kozaki. Biochemical and molecular characterization of minor serogroup of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans in Osaka prefecture. J. Vet. Med Sci., 69(12): 1215-1222, 2007

2. 学会発表

- 1) 酒井史彦、居原秀、青山顕司、五十嵐英夫、柳平修一、浅尾努、小崎俊司
ブドウ球菌エンテロトキシンHのELISA法の構築および食中毒由来株におけるH型毒素の分布
第27回日本食品微生物学会、
平成18年9月、大阪
- 2) 青山顕司、酒井史彦、居原秀、五十嵐英夫、柳平修一、浅尾努、小崎俊司
ブドウ球菌エンテロトキシンHの産生条件に関する検討
第27回日本食品微生物学会、
平成18年9月、大阪

H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

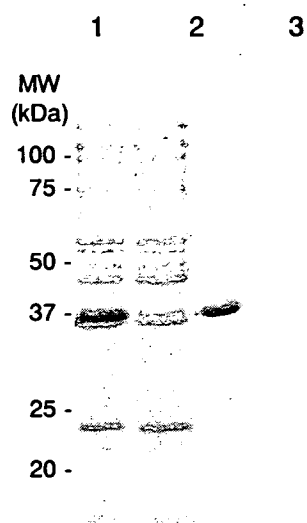


図1 ヒスチジンタグ融合組み換え H型エンテロトキシンの精製

黄色ブドウ球菌 H型エンテロトキシンを大腸菌内でヒスチジンタグ融合タンパク質として発現させ、ニッケルセファロースカラムでアフィニティー精製した。

レーン1:大腸菌抽出液、レーン2:ニッケルセファロースカラム非吸着

3:精製タンパク質

画分、レーン

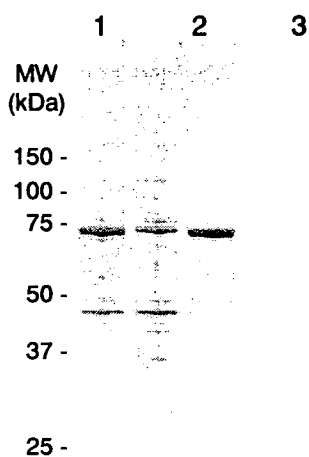


図2 マルトース結合タンパク質融合組み換えH型エンテロトキシンの精製

黄色ブドウ球菌H型エンテロトキシンを大腸菌内でマルトース結合タンパク質融合タンパク質として発現させ、アミロースカラムでアフィニティー精製した。

レーン1:大腸菌抽出液、レーン2:アミロースカラム非吸着画分、レーン3:精製タンパク質