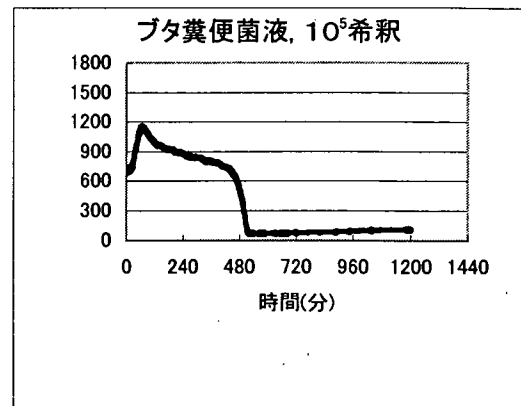
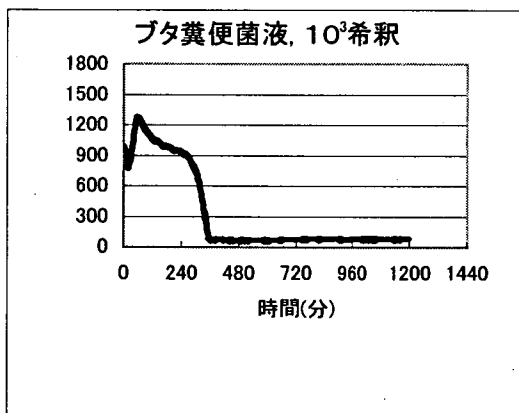


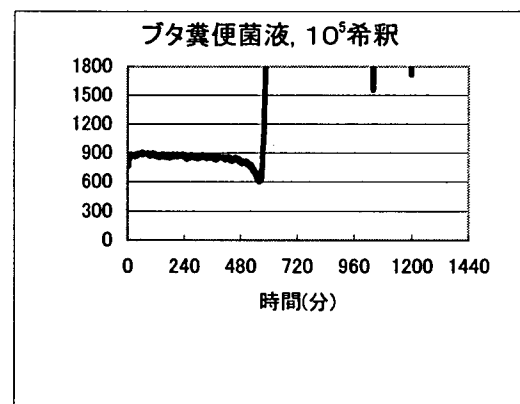
A 生菌数



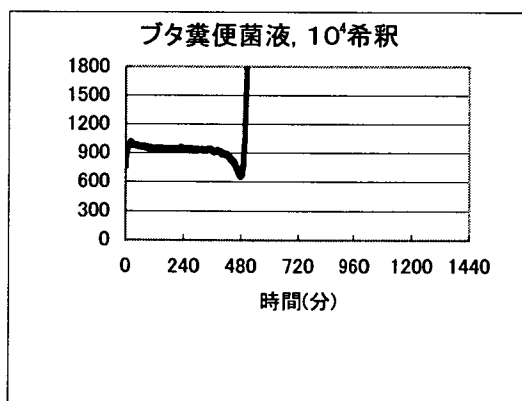
B 生菌数



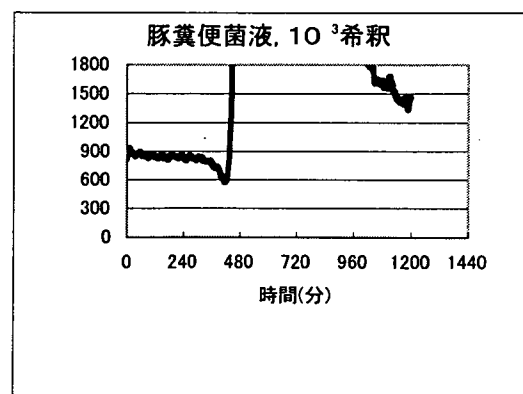
C 生菌数



D 大腸菌群



E 大腸菌群



F 大腸菌群

図6 ブタ糞便抽出菌液中の生菌数と大腸菌群数を DOX で測定した典型的な電流値の波形

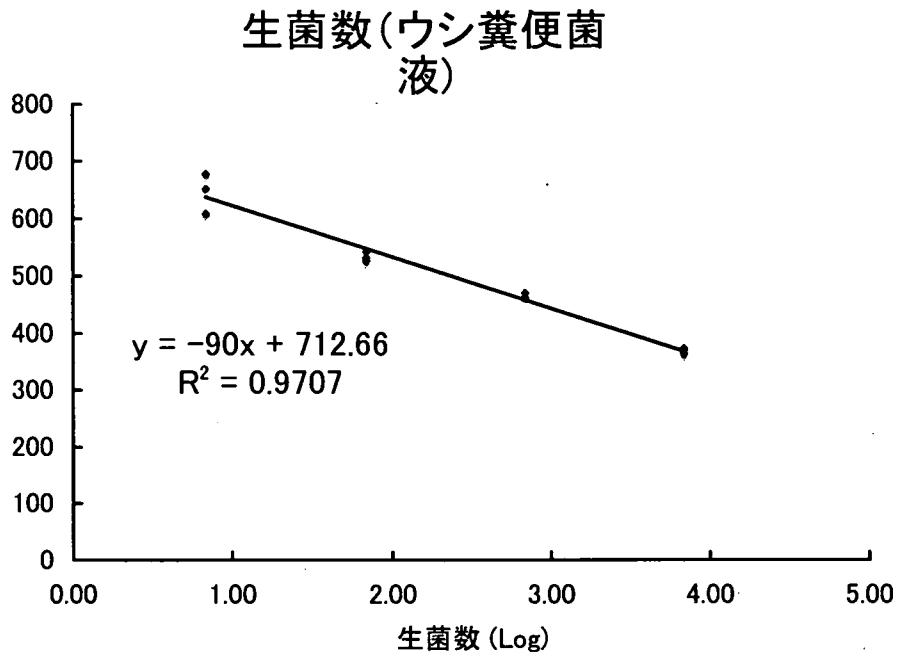


図 7A ウシ糞便抽出液中の一般生菌を DOX と寒天培養法で測定した菌数の相関性

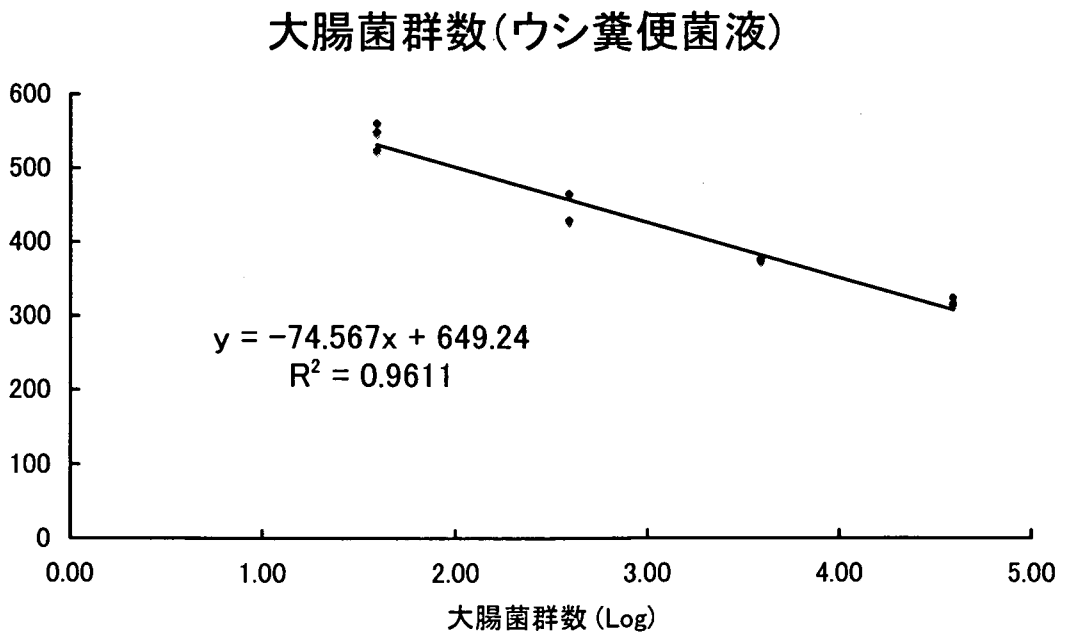


図 7B ウシ糞便抽出液中の大腸菌群を DOX と寒天培養法 (デソキシコレート) で測定した菌数の相関性

生菌数(ブタ糞便菌液)

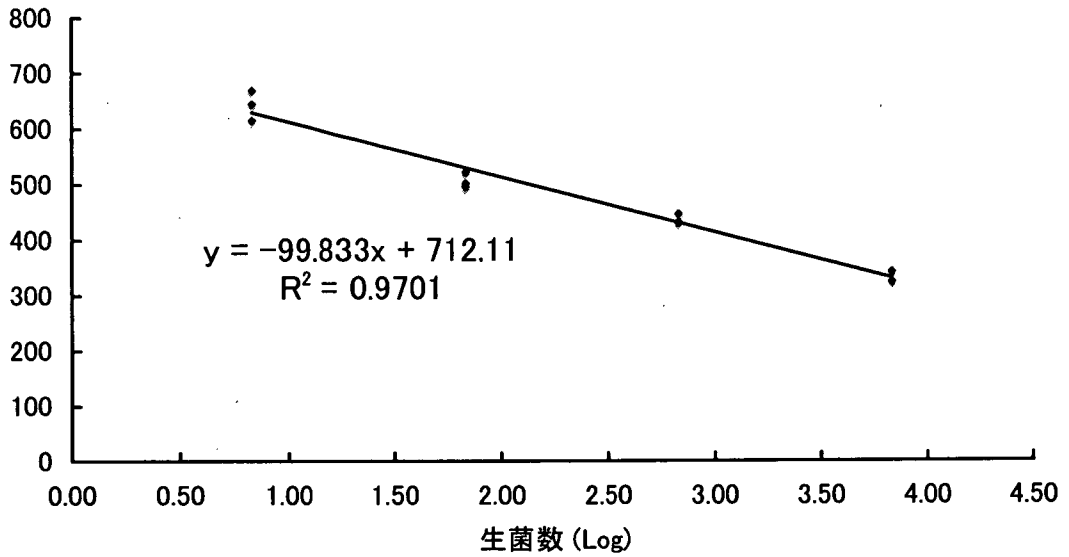


図 7C ブタ糞便抽出液中の一般生菌を DOX と寒天培養法で測定した菌数の相関性

大腸菌群数(ブタ糞便菌液)

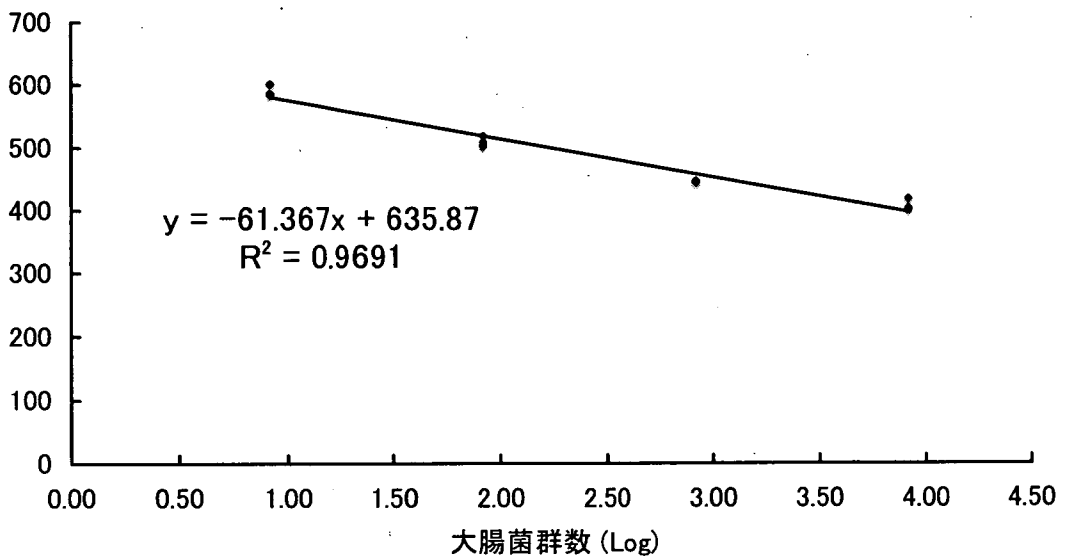


図 7D ブタ糞便抽出液中の大腸菌群を DOX と寒天培養法 (デソキシコレ寒天培地) で測定した菌数の相関性

食品における微生物迅速検査の開発及びその精度評価システムに関する研究

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

分担研究者 木村 凡（東京海洋大学 海洋科学部）

研究協力者 浅尾 努 大阪府立公衆衛生研究所感染症部

高橋 肇 東京海洋大学

研究要旨

上半期は、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評価法に関する基礎情報を収集した。特に、本年度については東京海洋大学木村は、一般生菌数の評価試験を中心に担当することとした（大阪府立公衆衛生院：浅尾先生は主として汚染指標菌）。現在AOACの迅速キット評価認定を申請中のA社より情報を詳細に入手し、評価法としての試験項目の妥当性や問題点を抽出した。

下半期は、これらの整理情報を踏まえて、迅速法販売メーカー1社の協力により、前述の評価試験における問題点等の実験的な検証を試みた。具体的には、一般生菌数の認証評価において、有意差検定のみで判断すると評価が著しく厳しくなり、使用される検査目的に合わないのではないか（A社指摘問題点）という点について、実験的な検証を行った（A社の内部データ、および、海洋大学での検証）。また、各種食中毒菌（リステリア、腸炎ビブリオ、ボツリヌス菌）についての迅速検出法についての開発および実験的検証を行った。

A. 研究目的

一般生菌数（SPC；標準寒天培地において、35℃48時間の培養）は、食品における微生物学的汚染の指標を得ることを目的として行われる微生物検査の項目であり、食品関連企業、検査機関、研究所等各所で日常的に実施されている。SPCは食品の微生物学的汚染状態を実際によく反映するため有用な指標となっているが、結果判定までの時間短縮が近年、特に望まれている。そのような中、各種の迅速測定法が開発されてきた。しかしこれらの迅速測定法について精度や結果の妥当性に関して認証する制度は本邦においてはまだ存在せず、それを望む開発者はAOAC（米国）の認証取得を行っている

状態である。本邦においてもこのような認証制度を策定することは、特に中小の食品製造業者等では導入時に自前で手法評価を行う余裕が無いと考えられることもあり、ユーザーへの適切な情報提供という観点から望まれるところである。

本研究ではこのような日常検査における食品の安全性を確保するための迅速・簡易検査法はどうあるべきか、満たすべき要件とその性能等について検討し、培養による“標準検査法”を尺度とした検査精度の評価システムの構築を試み、異なる仕様で開発され使用されている迅速検査法の評価を行うことの出来る環境を整備することを目的とした。

B. 研究方法

1. 迅速法評価法に関する基礎情報収集

迅速法の客観的な評価法に関する基礎情報をAOACによる評価法等を参考に収集し、今後、これらの方法を評価するために必要な項目の予備整理を行った。上半期は、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評価法に関する基礎情報を収集した。特に、本年度については東京海洋大学木村は、一般生菌数の評価試験を中心に担当することとした

(大阪府立公衆衛生院：浅尾先生は主として汚染指標菌)。現在AOACの迅速キット評価認定を申請中のA社より情報を詳細に入手し、評価法としての試験項目の妥当性及問題点を抽出した。

2. 国内評価法へむけての課題検討事項整理

下半期は、これらの整理情報を踏まえて、迅速法販売メーカー1社の協力により、前述の評価試験における問題点等の実験的な検証を試みた。具体的には、一般生菌数の認証評価において、有意差検定のみで判断すると評価が著しく厳しくなり、使用される検査目的に合わないのではないか(A社指摘問題点)という点について、実験的な検証を行った(A社の内部データ、および、海洋大学での検証)。

2. 1. 試料と方法

・測定機器：
生菌数迅速測定装置(A社)
測定用消耗品として、生菌数迅速測定装置用一般生菌数培地(標準寒天培地と同組成)
・測定試料：

サバ(2007年11、12、1月期：鮮魚14検体および冷凍1検体)

・公定法による一般生菌数測定：
標準寒天平板培地(栄研)を用いた混釈法により実施した。培養は35℃48時間行った。その他、各操作は食品衛生検査指針およびBacteriological Analytical Manualに従って行った。

なお一部試験区については菌数調整のため、適宜、恒温保管した鮮魚を試料とした。

2. 2. 試験手順

各サバ試料について、標準寒天培地(栄研)による一般生菌数測定(35℃、48h)とA社開発迅速測定法による試験を並行して行った。

A社迅速法の実施にあたっては、パッケージインサートに従って行った。A社迅速法の一次結果は“増殖の指標となる測定因子が既定値まで減少するのに要した時間”として、時間(min)として表示される。この数値(min)と、並行して行った一般生菌数測定値を両軸にプロットすることで、本実験におけるA社迅速法・一般生菌数換算の検量線とした。

また、各種食中毒菌(リステリア、腸炎ビブリオ、ボツリヌス菌)についての迅速検出法についての開発および実験的検証を遺伝子手法を中心として行った。

C. 結果

1. 迅速法評価法に関する基礎情報収集

現在AOACの迅速キット評価認定を申請中のA社より情報を詳細に入手し、わが国の迅速キット評価に必要な項目の優先順位等の検討を行った(表1)。その結果特に、以下の点が大きな検討事項として抽出された。

すなわち、AOAC 認証における一般生菌数測定法の認証においては、用意した検体について公定法 (AOAC966. 23) による測定と申請法による測定を各適切な n 数 (n=5) 並行して行い、得られた 2 群のデータについて両群間に有意差を生じないこと (P value ≥ 0.05)、これを複数サンプルに渡って確かめることが求められる。

しかし、この有意差検定による評価を行う際、申請法による測定結果と公定法による測定結果のずれが実用可能レベルにもかかわらず、有意差有りとな検定される場合がある。一例として試料中の菌数が多い場合を挙げると、公定法では 10 倍段階希釈を重ねるため誤差の蓄積等により結果の繰り返し精度がややゆるむことがある。これに対し、申請法は原理によっては多段階の希釈を必要とせず、繰り返し精度の低下が生じにくいものもある。この間で比較した場合、申請法の繰り返し結果のぶれがごく小さくなることから、公定法結果との有意差有りと判定されやすくなってしまふ (例、図 1、A 社内部データ)。

このことから、一般生菌数のように雑多な菌群を、幅広いレンジで迅速に計数する手法については、有意差検定による評価では手法の実用性を十分に評価しきれていない可能性があると言える。このため、本邦で同様の認証制度を検討するに当たっては、手法の実用性を適切に評価できるように考慮に入れることが望ましい。

上述のような調査結果を上半期において得たため、本年度下半期では、中長期的に一般生菌数の認証制度を定めることを念頭に、そのための適切な評価基準を策定するための各種検討を行うこととした。具体的には A 社生菌数迅速測定を用いた一般生菌

数測定手法をとりあげ、適正を評価すると共に手法認証における評価基準について検討する上でたたき台となるべきデータセットを収集した。

2. 1. A 社迅速法検量線

B-2. 2. 項に示した試験の結果をもとに A 社迅速法による鮮魚生菌数測定用の検量線を作成した (図 2)。本研究では、油分の多いサバを試料として選定したため (A 社法の測定原理では最も扱いにくいサンプルの一つ)、回帰直線の相関係数は 0.79にとどまったが、以後の試験へ適用可能と判断された。

2. 2. 迅速法による SPC 算出と値の比較

検量線作成に用いたデータと同じデータを用い、上記式へ代入することで菌数相当値を算出した。

この結果、公定法との菌数には概ね 1 桁以内の誤差に収まっており、A 社迅速法は本課題のモデルとして適用可能と判断された。次年度以降にデータを追加し、有意差検定を行うことで実際に AOAC の認証基準が過度に厳密になる場合があるのかどうか、検証を行う。

3. 次年度以降への課題

本年度上半期の調査結果より、有意差検定による精度評価法は乾燥シート状培地のような、根本原理を公定法と同一にする手法の評価には適しているものの、測定原理を全く異にしてさらなる迅速化・簡便化を図った手法の評価には必ずしも適していないと考えられる例が挙げられた (図 1)。迅速法認証法を考慮する際、手法の精度評価は重要であるが、迅速性を優先する上である程度の誤差は避けられないことから、そ

の手法が実用的であるかということの主眼に置く必要があると考えられた。

そこで次年度以降は、まず実際に AOAC 基準では過度に厳しくなるのか否かについて、A社迅速法にてさらにデータを収集したのち有意差検定を行うことで検証する予定である。その後、実用的な評価基準とはどのようなものかを検討していく予定である。評価基準案としては、草案の段階ではあるが、AOAC 準拠を含め、以下の4法のいずれが国内認証評価制度に最適であるか整理する必要があると考えている。

- A) 有意差検定 (AOAC の評価基準に準拠して、国内の状況を鑑みた認証基準案とする)
- B) 迅速法の結果と、公定法の結果を両軸にプロットし、回帰直線の式の $y=x$ に対する近さ (傾き・切片で評価)、かつ一定以上の相関係数を条件とする
- C) Zスコアを用いる・・・機関間精度管理等に用いられるが適切な母集団数が要求されるため、本課題の目的に向くかどうかは不明である。
- D) データの一致率を評価する・・・ある定めた範囲内の誤差におさまるデータポイント%を条件とする。

よって、次年度以降は下記3項目の実施を予定している。

(1) A社迅速法の結果について公定法結果との有意差検定を行う (AOAC 基準に合わせたモデル評価)。この際、A社とは異なる原理の迅速法 (新たに1~2社程度を予定) についても同様の検証を行い、不都合が生じるか否かを検証する。

(2) 1の結果をもとに、評価法A~Dのいずれが今回の目的である迅速法評価法の

策定に関する案として適しているか検討する。

(3) 検討した結果適していると判断した案について、詳細な条件案を決定していく。例えばD案であれば許容誤差の範囲、承認とする一致割合の案等について、予備検討する。検討材料として、迅速法によるデータセットを収集する必要がある。

なお、本研究では、上述の生菌数迅速測定法の評価法に関する検討事項以外に、各種食中毒菌 (リステリア、腸炎ビブリオ、ボツリヌス菌) についての迅速検出法についての開発および実験的検証を、迅速法の評価法の確立を視野に入れ、実施する予定である。

D. 結論

以上、平成19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評価法に関する基礎情報を収集し、特に、本年度については東京海洋大学木村は、一般生菌数の評価試験を中心に担当することとした (大阪府立公衆衛生院：浅尾先生は主として汚染指標菌)。

まず現在 AOAC の迅速キット評価認定を申請中のA社より情報を詳細に入手し、評価法としての試験項目の妥当性や問題点を抽出した。その結果、有意差有り判定されたデータにおいても、実用上は問題のない程度の差であるケースが示された (図1)。このため、有意差検定を用いて手法を評価することは正確ではあるものの、評価対象手法の迅速性を考慮すると過度に厳密すぎる面があると考えられる。

その上で、一般生菌数迅速測定法の一例として、A社迅速法を用いたデータを収集した (表2)。一般生菌数の迅速測定法と

して適用できる可能性を確認することができ、本課題において認証案を策定する際のモデル系として適用できると判断された。

次年度はこれを推し進め、A社、ならびに測定原理の異なる他の迅速法（新たに1～2社程度を予定）を用いて測定データを収集し、具体的な一般生菌数迅速測定法の認証案を検討する予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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)
- 5) **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.
- 6) 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.
- 7) **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.

2. 学会発表

- 1) 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10日、11日、銀

座.

- 2) 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 25 日、26 日、27 日、28 日、北海道.
- 3) 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 26 日、27 日、品川.
- 4) 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リ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 26 日、27 日、品川.
- 5) 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 26 日、27 日、品川.
- 6) 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 26 日、27 日、静岡.
- 7) 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 26 日、27 日、静岡.

表1) 2007年 上半期 東京海洋大学 (国内認証試験へむけての検討事項の整理)

	AOAC等の例	国内認証制度へ向けての課題
社 内 デ ー タ	○基準の公開・入手 WEBサイトでの公開及び書面での入手ができない。	公平性からも公開されるのがよいのでは？
	○判定基準 LMHそれぞれ1点につきN=5のデータを取得し、AOAC法と比較、有意差検定を行う。	<ul style="list-style-type: none"> 有意差検定上、データが揃い過ぎると使えないデータになることがある 有意差と一致率がうまく合致しないことがある 有意差and一致率でなく、有意差 or 一致率にするだけでも随分とデータを揃えやすくなるはず <p>実際、サンプルN=5においてMin-Maxで 差が1桁の半分にみえないようなデータでは有意差がでて認証が得られそうにない、1桁近く差があるデータで有意差がでて認証が得られそうといった奇妙な現象が現れた。 使用される検査目的に合わせてほしいとの要望有り。</p>
	○プロトコル レフェリーが決められ、そのレフェリーのもと相談しながら決定する。	プロトコルまで、レフェリー (AOAC)が踏み込むのは妥当か？AOAC流では主観も混入する可能性あり endpointで計測する方法、迅速法各々に合わせあらかじめ決められているのがわかりやすい。
	○システムの信頼性のデータの提出 Lot間格差やA社装置であればセルの差込位置での性能格差など、ハード側の信頼性も同等の統計的分析と、有意差のない品質がもとめられる。	システム信頼性の分析は、レポート量や手間が、上記性能検証のAOAC法とのcompareよりもかかる。ここまで必要？
	○審査 2-3人のレフェリーによって審査	レフェリーの主観の影響大。客観データのみを重視しすぎる傾向にある。 実際迅速測定法では多少有意差があっても1桁以下の誤差の範囲で精度が保障されればよいと考えたが、有意差にこだわったレフェリーがいて初回審査がとらなかつた、補正データを出しても判定を覆すのは難しかった(A社)。 AOACコーディネータよりレフェリーを変更することを推奨されたが、それには再申請手続き・費用、データ再取得がすべて必要だった(A社)
	手間、難易度	
	○システム信頼性も提出する	上述のように負荷大
	○大腸菌群のAOAC法プロトコル	現方法では、1週間に1プロセス(1データ)しかとれないA社装置では生肉(生牛肉、生ひき肉、生鶏肉)申請で大腸菌群申請だけで12ヶ月ほど日数がかかる
	○LMHの準備	初発菌数の多いサンプル(生牛肉で 10^5)ではLのサンプルが作りにくい
	第 三 者 機 関 (コ ラ ボ 先)	○第三者機関の選定 AOACが第三者評価機関(コラボ先)を2-3機関選定。申請者が選択する。 コラボ先は3、4日トレーニング後、データ取得試験は-
○第三者機関での実行 第三者機関はAOAC法との性能比較データの一部をとる。一部の範囲はAOACが申請者と相談して決める。 A社装置では生肉申請において 社内、牛生肉、牛ひき肉、とり生肉 コラボ先で、牛ひき肉データを取得		一旦結果が出ると(ミスの種類、機器・先方の過失の区別なく)、再度データ取得試験を発注する必要あり。不合理でも費用が嵩む場合がある。
		コラボ先のミスでおかしなデータがでて、レフェリーの判断ですべてログ(レポート)に残る可能性あり、判断材料にされてしまう。

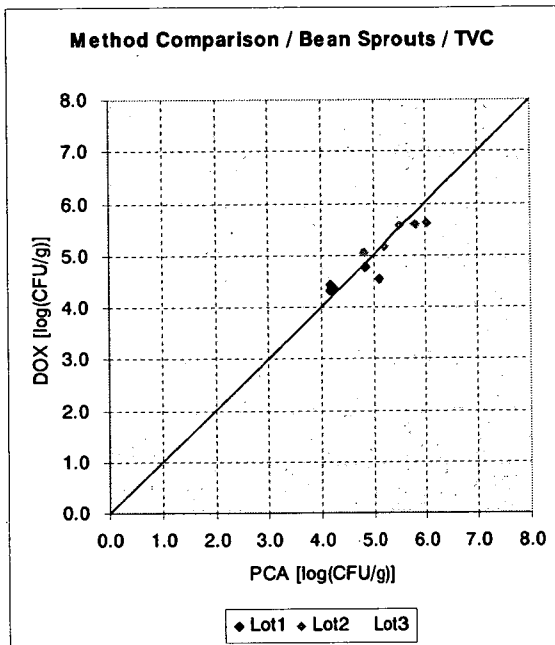


図1) 有意差検定が過度に厳密である一例。

Lot3 (黄色) の食品試料においてA社迅速法—公定法間に有意差有りと判定されている。
 A社迅速法結果： $4.0 \times 10^7/g$ 、公定法結果： $2.5 \times 10^7/g$ であり、微生物検査の実際上は
 問題にならない違いといえる。

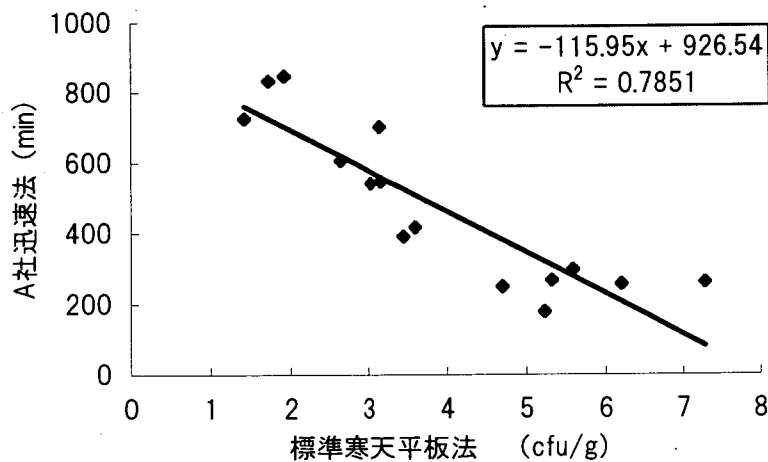


図2) A社迅速法によるサバ一般生菌数測定用検量線

表2) A社迅速法と公定法による一般生菌数測定値の比較

サンプル (全てサバ)	標準寒天平板法(Log cfu/g)		A社迅速法(Log cfu相当/g)	
	mean	SD	mean	SD
1	3.60	0.01	4.39	0.04
3	4.69	0.12	5.84	0.06
4	7.28	0.00	5.74	0.04
5	3.44	0.06	4.62	0.03
6	7.58	0.09	7.42	0.15
7	8.20	0.07	7.78	0.03
B01	1.42	0.10	1.72	N/A
B04	3.09	0.34	1.93	0.62
B06	2.63	0.06	2.75	0.24
B08	5.17	0.04	5.27	0.33
B09	1.66	0.31	0.81	N/A
B14	3.03	0.06	3.32	0.24
B16	5.32	0.02	5.69	0.40
B22	1.89	0.19	0.69	0.02
B24	5.23	0.04	6.46	0.28

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 九州大学大学院生物資源環境科学府

研究要旨

本年度は、標準法が示されている腸管出血性大腸菌 O157 および O157 以外のペ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。その結果、タカラバイオ社の「O-157 & ペロ毒素遺伝子同時検出キット」で増幅される遺伝子産物のうち、349bp の産物は *stx1a* の 605-953 塩基部分 (*stx1a* 構造遺伝子全長は 948 塩基なので 5 塩基分長い) であった。457bp 産物は、O157 抗原決定 *wzy* 遺伝子 (1186 塩基) の 844 塩基部分からこれに 32 塩基重複して続く *wbdO* 構造遺伝子の 147 塩基までが増幅されたものであった。112bp 産物は *stx2a* 遺伝子の 454-565 塩基部分であった。同社の「腸管出血性大腸菌 VT2 遺伝子検出用プライマーセット EVS-1,-2」は、前述の同時検出キットとは異なり、*stx2a* 構造遺伝子の 454-857 塩基部分 (404 塩基) を増幅するものであった。また、Applied Biosystems 社「TaqMan *E. coli* O157:H7 detection kit」では、*eae* 遺伝子の 550-615 塩基部分の 66 塩基分を増幅してプローブで検出することが判明した。腸管出血性大腸菌株 119 株について、ペロ毒素遺伝子の部分塩基配列を決定して *stx1* 及び *stx2* 遺伝子型による分類を行った結果、両遺伝子型ともに全体の 5-7 割を占める第 1 主要グループと約 2-3 割を占める第 2 主要グループおよびその他の少数の遺伝子型グループに分類された。RPLA による検査の結果、大腸菌 O157 では、*stx1* および *stx2* 遺伝子を保有しているにもかかわらず市販の免疫学的キットではペロ毒素を検出できない菌株が複数存在した。この中には、*stx1* 遺伝子としては標準的な構造遺伝子を保有していると思われるが毒素を産生しない菌株も存在した。これらの結果より、今回分類したペロ毒素を産生する各遺伝子型の腸管出血性大腸菌 O157 及び O26 株は、分子生物学的手法を応用した腸管出血性大腸菌検出キットの評価に有用であると思われる。

A. 研究目的

我が国をはじめ、世界的にも食品流通の広域化や国際化が進んだことから、食品の賞味期限表示の偽装や冷凍食品における農薬の混入問題など、食の安全に関わる問題

は後を絶たない。近年は、食中毒の件数も、毎年、1500 件程度、患者数は 25000 名と、減少する傾向はない。これら細菌性食中毒により、我が国でも死者も出ている。2006 年にアメリカ合衆国では、ウィスコンシン

州、ニューヨーク州などでカリフォルニア産ホウレンソウによる食中毒が発生し、これは全米の20州以上に拡大し、約150名がO157に感染・発症し、1名が死亡している。厚生労働省が毎年実施している食品の食中毒菌汚染実態調査 (<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/yobou/060317-1.html>) の結果では、近年でも生の肉や内臓、レタス、三つ葉、キュウリなどから、サルモネラ属菌や腸管出血性大腸菌O157が検出されており、生の食材の食中毒細菌汚染対策が強く求められている。

このような状況にあることから、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) システムやISO22000などの衛生管理手法および品質管理手法が導入が進んできている。また、農産物生産段階においても適正農業規範 (Good Agricultural Practice, GAP) の導入による生産管理や工程管理が行われつつある。しかし、食品流通の広域化、国際化が進むことにより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。これら食の安全を保つ上で、食中毒細菌検査法の簡易化、高感度化は重要である。従来の食中毒細菌検出法は培養を基礎としており、検出までに数日を要し、煩雑な培養操作も必要となることから、様々な食中毒細菌の簡易迅速検査法の開発が行われてきた。これまでに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が、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・検討を行っている。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、遺伝子検査法では検出できないことがある。通常、同じ種類の食中毒菌でも、菌株によってはゲノム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。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、まず、腸管出血性大腸菌O157およびペロ毒素産生性大腸菌について、ペロ毒素遺伝子の塩基配列を解析し、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に異なる菌株の選択を試みた。また、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ペロ毒素遺伝子の塩基配列に基づく遺伝子型、市販の免疫学的ペロ毒素検出キットによる毒素産生性を比較することにより、毒素産生性との関連も調べた。これらの塩基配列解析結果から、ペロ毒素遺伝子検出用新規プライマーセットの設計を試みる計画である。

また、*Listeria monocytogenes* についても、検出感度および精度の高い分子生物学的検査法開発のため、遺伝子診断で最も良く利用されているリステリオリシンOをコードする *hly* 遺伝子の部分塩基配列解析を行った。

B. 研究方法

1. 供試菌株

本研究で使用した腸管出血性大腸菌株 119 株は福岡市保健環境研究所から分与を受けた。また、*L.monocytogenes* については食品及び環境中からの分離株、福岡市保健環境研究所ならびに佐久保健所より分与を受けた患者由来株の合計 192 株を使用した。

2. リボプリンターシステムによる分類

収集した種々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ない。このため、本年度は昨年度から継続してタカラバイオ社のキット「O-157 & ペ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の同定を試みた。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、ペロ毒素 1 型 (VT1) では 349 bp、ペロ毒素 2 型 (VT2) および variant, VT2vha, VT2vhb, VT2vpl, VT2vp2 では 112 bp となる。また、「腸管出血性大腸菌 VT2 遺伝子検出用プライマーセット EVS-1,-2」では VT2, VT2vha, VT2vhb, VT2vpl が検出でき、増幅サイズは 404bp である。各 PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動による確認の後、精製して 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。

Applied Biochemicals 社の「TaqMan *E. coli* O157:H7 detection kit」についても増幅領域の同定を行った。本キットの試薬はプレミックスの形で供給され、リアルタイム PCR 検出することから増幅産物のサイズも明記されていない。そこでまず、*E. coli* O157:H7(*stx1*, *stx2*)のゲノム DNA を用いてキットのプロトコールにしたがって反応を行い、電気泳動により増幅産物のサイズを確認し、これをクローニングして塩基配列を決定した。

これら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のベロ毒素遺伝子の内部塩基配列の決定

収集した腸管出血性大腸菌株について、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 VT 産生株の VT 遺伝子 (*stx1*, *stx2*) 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。Shiga toxin 2 subunit A→B(1241 bp)増幅用プライマーセットとしては、st2AB-F:

ATGAAGTGTATATTATTAAATGGGTA,
st2AB-R:

TCAGTCATTATTAAGTGCACCTT,
stx2b: GCAATCCGCCCATNGCRTT,
Takara EVS-1 プライマーを用いた。

Shiga toxin 1 subunit B→A (1272 bp) 増幅用プライマーセットとしては、st1BA-F:
ATGAAAAAACATTATTAATAGCTG,
st1BA-R: TCAACTGCTAATAGTTCTGCG,
Takara EVT-1(タカラバイオ社), および
Takara EVT-2(タカラバイオ社)を用いた。

PCR には EX Taq DNA polymerase (タカラバイオ社) および TaKaRa PCR Thermal Cycler (タカラバイオ社) を用いた。st1BA-F と-R, およびst2AB-Fと-RによるPCRでは、各細菌のゲノム DNA を鋳型として熱変性 (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。

これにより *stx1* 遺伝子を増幅できなかった No.130,169,178,および 195 株については、st1BA-F と EVT-1, st1BA-R と EVT-2 の各プライマーの組み合わせで、94°C,60sec→55°C,60sec→72°C,60sec の反応を 35 サイクルそれぞれ行った。また、*stx2* 遺伝子の増幅ができなかった No.122, 125, 130, 131, 141, 169, 169,および 178 株の場合には、*stx2b* と stsAB-F および st2AB-R と EVS-1 の各プライマーの組み合わせで、94°C,60sec→55°C,60sec→72°C,60sec の反応を 35 サイクルそれぞれ行った。

5.VT産生量の測定

各大腸菌 O157 株については、VT 産生能を「ベロトックス-F「生研」(デンカ生研(株))」を用いて、指定の方法で測定した。凝集反応の認められた培養液の最大稀釈倍率を力価とした。

6. *L. monocytogenes hly* 遺伝子部分塩基配列の決定

被検菌株を TSB 5 ml で 37°C、一晚静置培養し、培養液 1 ml を 5,100×g で 10 分間遠心分離して集菌後、DNA Tissue Kit (キアゲン社) を用い、付属のプロトコールに従ってゲノム DNA 調製を行った。

hly 遺伝子の内部塩基配列を増幅するための PCR に用いるプライマーとして、既に全塩基配列が決定されている *L. monocytogenes* EDG-e 株 (血清型 1/2a) および F2365 (血清型 4b) において共通性の高い塩基配列部分で以下に示すプライマーセ

ットを作製した。ゲノム DNA を鋳型とし、*hlyA* 遺伝子の 1070-1558 bp を増幅するための LM f2-r2 プライマーセット (f2: AAATCATCGACGGCAACCT, r2: ATTTCCGGATAAAGCGTGGTG), EX Taq DNA polymerase (タカラバイオ社), および TaKaRa PCR Thermal Cycler (タカラバイオ社) を用い、熱変性 (95°C, 1min) の後、95°C, 30sec → 55°C, 30sec → 72°C, 60sec の反応を 35 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後、市販の PCR 産物精製キットで精製し、その塩基配列は、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。

C. 研究結果

1. 市販キットのプライマーセットによる増幅産物

1.1. タカラバイオ社の「O-157 & ペ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

本キットは、分離培養用培地から大腸菌 O-157、VT (志賀毒素) 1 型産生菌および 2 型産生菌を簡便、迅速かつ確実に検出するために開発された PCR 用検出キットである。本キットの Primer Mixture は O-157 関連遺伝子の特異的に検出するプライマーと、*stx1* および *stx2* (変異型を含む) 遺伝子をそれぞれ検出するプライマーの混合物で、O-157 および VT について 1 反応で同時に判定が行えるものである。各増幅産物を TA クローニングして塩基配列を決定した結果、本キットで増幅される 349bp の産物は、図 1 に示すように、*stx1a* の 605-953 塩基部分 (*stx1a* 構造遺伝子全長は 948 塩基なので 5 塩基分長い) であることが分かった。

同様にして、457bp 産物は、O157 遺伝子由来とあるが、正しくは、図 2 に示すように O157 抗原決定 *wzy* 遺伝子 (1186 塩基) の 844 塩基部分からこれに 32 塩基重複して続く *wbdO* 構造遺伝子の 147 塩基までが増幅されたものであった。

112bp 産物は、図 3 に示すように *stx2a* 遺伝子の 454-565 塩基部分が増幅されたものであった。

1.2. 腸管出血性大腸菌 VT2 遺伝子検出用プライマーセット EVS-1,-2

本プライマーセットは、前述の同時検出キットとは異なり、*stx2a* 構造遺伝子の 454-857 塩基部分を増幅するものであった (図 4)。

1.3. Applied Biosystems 社 TaqMan *E. coli* O157:H7 detection kit

E. coli O157:H7(*stx1*, *stx2*)のゲノム DNA を用いてキットのプロトコールにしたがって反応を行い、PCR 産物をクローニングして塩基配列を決定した。その結果、本キットは、*eae* 遺伝子の 550-615 塩基部分の 66 塩基分を増幅してプローブで検出するものであった (図 5)。プローブの配列は不明である。

2. 腸管出血性大腸菌株のペロ毒素遺伝子の内部塩基配列による分類

これまでに PCR を行って塩基配列を決定した腸管出血性大腸菌株のうち 119 株について解析した。*stx1a-stx1b* の領域 (1272 塩基) では、87 株について本遺伝子領域の 31-1189 塩基までの 1159 塩基を決定した。また、*stx2a-2b* の DNA 領域 (1241 塩基) では、101 株について本遺伝子の 58-1167 塩基部分の 1110 塩基を決定した。これらのアラ

イメント解析結果から Neighbor joining 法により作製した系統樹を図 6 及び 7 に示す。

stx1 遺伝子の遺伝子型による分類では、塩基配列を決定できた 87 株は、59 株 (68%) が含まれるグループ A と 25 株 (29%) が含まれるグループ B に大きく分けることができた。また、*stx2* 遺伝子の遺伝子型による分類では、塩基配列を解読できた 101 株は、56 株 (55%) が含まれるグループ A および、25 株 (25%) が含まれるグループ H を含むグループに大きく分類された。両遺伝子を保持する大腸菌では両遺伝子とも主要な遺伝子型を含む *stx1*-A & *stx2*-A のグループには 38 株が含まれ、これは試験した 119 株の 32% であった。これらの菌株が最も標準的な *stx1* および *stx2* 遺伝子を有する腸管出血性大腸菌株であると思われる。今回試験に使用した 119 株では、ペロ毒素遺伝子を有していれば、タカラバイオ社のペロ毒素検出用プライマーセットを用いた PCR により、全て検出できた。

3. 腸管出血性大腸菌 O157 株のペロ毒素産生能と毒素遺伝子型の関連

試験した 95 株の腸管出血性大腸菌 O157 株についてデンカ生研社のキットを用いて調べた VT 産生性についての結果と毒素遺伝子型による分類、リボタイピングによる分類結果を表 1 に示す。試験した腸管出血性大腸菌 O157 株うち、*stx1* 遺伝子を保有しているが、免疫学的検査キットで毒素が検出されなかった株が 4 株存在した。同様に、*stx2* 遺伝子を保有しているにもかかわらず免疫学的検査キットで毒素が検出されなかった株は 11 株存在した。

4. *L. monocytogenes* の *hly* 遺伝子型による分類

全塩基配列決定済みの *L. monocytogenes* 血清型 1/2a 株 (EDG-e) および 4b 株 (F2365) の *hlyA* 遺伝子内においてそれぞれ共通性の高い塩基配列部位で作製したプライマーセットを用いて、内部配列を PCR により増幅し、塩基配列を決定した。今回使用した 192 株全てにおいて、設計したプライマーセットで *hly* 遺伝子は正しく増幅されたことから、*L. monocytogenes* の全ての菌株は本遺伝子を保有しているものと考えられた。

hlyA 遺伝子の 1126-1527 塩基部分の比較より、表 2 に示すように、本菌は 12 群に分類された。Neighbor joining 法により作製した 12 群の系統樹を図 8 に示す。臨床 1/2a 11 株のうち 7 株は約 40% の食品 1/2a と同一群に分類された(グループ 5)。臨床 4b 12 株のうち 11 株および臨床 1/2b 8 株のうち 5 株は全ての食品 4b と同一群に分類された(グループ 3)。今回試験した全ての *L. monocytogenes* は *hlyA* 遺伝子を有しているが、菌株によってその内部塩基配列中に塩基置換部位があるため同一血清型でも異なる遺伝子型に分類される場合があった。これは特に食品・環境由来 1/2a 株で顕著で、6 群の遺伝子型に分かれた。また、食品・環境由来 1/2b および 4b 株はそれぞれ 2 群の遺伝子型に集中した。

D. 考察

腸管出血性大腸菌株 119 株についてペロ毒素遺伝子の部分塩基配列を決定して *stx1* 及び *stx2* 遺伝子型による分類を行った結果、両遺伝子型ともに全体の 5-7 割を占める第 1 主要グループと約 2-3 割を占める第 2 主要グループおよびその他の少数の遺伝子型

グループに分類された。両遺伝子とも保持する大腸菌では両遺伝子とも主要な遺伝子型を含む *stx1*-A & *stx2*-A グループは、全体の3割程度を占めた。これらの菌株が最も標準的な *stx1* および *stx2* 遺伝子を有する菌株であると思われる。さらに、毒素の免疫学的検出結果から、特に *stx2* 遺伝子型 F, G, H, I, J, K, L では、本検出キットによる毒素産生量の少ないものが含まれていた。これらは variant の可能性があるが、グループ H では同じ遺伝型でも毒素産生量の異なるものが含まれており、本グループの *stx2* 遺伝子発現機構に興味を持たれる。また、*stx1* 遺伝子保有株でも、使用したデンカ生研の検出キットでは毒素を検出できない株が4株あったが、これらの *stx1* 遺伝子型は最も主要なグループ A であった。これらについてはさらに、Vero 細胞を用いた細胞毒性試験を行って、毒素の確認をする必要があると思われる。今回、大腸菌 O157 で、VT1 については、*stx1* 遺伝子としては標準的な構造遺伝子を保有しているながら毒素を産生しない菌株が存在したが、この菌株の *stx2* 遺伝子型は variant が多いことから、より精度の高い腸管出血性大腸菌検出法開発のためには、これらの菌株についての毒素学的、遺伝学的な検討が必要と思われる。また、試験した血清型 O26 では、*stx1* 遺伝子型は全てグループ B であったことも興味深い結果である。さらに毒素産生性についても検討する必要があると思われる。今後は、これらの毒素遺伝子の塩基配列で、保存性の高い領域を用いて PCR による検出用新規プライマーセットを設計する計画である。

Applied Biosystems 社「TaqMan *E. coli* O157:H7 detection kit」の試薬はプレミックスの形で供給され、リアルタイム PCR によ

り検出することから増幅産物のサイズも明記されていない。キットのプロトコールにしたがって反応を行い、増幅産物のサイズを確認し、塩基配列を決定した結果、本キットでは、*eae* 遺伝子の 550-615 塩基部分の 66 塩基分を増幅してプローブで検出することが判明した。腸管出血性大腸菌を精度良く検出するためには本領域及び VT 遺伝子の特異領域を同時に検出するマルチプレックス PCR の開発も有効と思われる。また、今年度の *stx* 遺伝子の塩基配列解析結果から、標準的な *stx* 遺伝子を有する菌株および *stx1* および *stx2* 遺伝子の variant も見出すことができたので、各遺伝子型を代表する毒素遺伝子のセットを用いることで市販の *stx* 遺伝子検出キットの評価が容易になるばかりでなく、より検出精度の高い腸管出血性大腸菌 O157 ならびに *stx* 遺伝子保有株検出用プライマーセットの設計が可能であると考えられる。

本年度は *L. monocytogenes* についても *hly* 遺伝子の部分塩基配列を決定したが、塩基配列決定用の PCR に使用したプライマーセットは、ゲノム DNA を鋳型とした PCR により試験した 192 株全てにおいて目的の PCR 産物が増幅されたことから、全ての *L. monocytogenes* 菌株は本遺伝子を保有していると考えられた。また、この結果より、今回設計したプライマーセットは、増幅サイズが多少大きいですが、*L. monocytogenes* の検出用プライマーセットとして有効であることが示された。さらに今回決定した塩基配列を基に保存性の高い領域を見出して新規の検出用プライマーセットを設計する予定である。

現在、O 抗原決定因子構造遺伝子 (*wzy*, *wzx*) の塩基配列についても塩基配列を決定

中で、来年度は血清型 O157 のみを特異的に検出するための市販のプライマーセットについても評価結果を取りまとめ、腸管出血性大腸菌および *L. monocytogenes* の分子生物学的検査法の評価・検討を継続するとともにサルモネラ属細菌検出用分子生物学的キットの評価にも着手する計画である。

E. 結論

本年度は、標準法が示された腸管出血性大腸菌 O157 および O157 以外のペ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。その結果、タカラバイオ社の「O-157 & ペロ毒素遺伝子同時検出キット」で増幅される遺伝子産物のうち、349bp の産物は *stx1a* の 605-953 塩基部分 (*stx1a* 構造遺伝子全長は 948 塩基なので 5 塩基分長い) であることが分かった。457bp 産物は、O157 抗原決定 *wzy* 遺伝子 (1186 塩基) の 844 塩基部分からこれに 32 塩基重複して続く *wbdO* 構造遺伝子の 147 塩基までが増幅されたものであった。112bp 産物は *stx2a* 遺伝子の 454-565 塩基部分を増幅するものであった。また、同社の「腸管出血性大腸菌 VT2 遺伝子検出用プライマーセット EVS-1,-2」では、前述の同時検出キットとは異なり、*stx2a* 構造遺伝子の 454-857 塩基

部分の 404 塩基を増幅するものであった。さらに、Applied Biosystems 社「TaqMan *E. coli* O157:H7 detection kit」では、*eae* 遺伝子の 550-615 塩基部分の 66 塩基分を増幅してプローブで検出することが判明した。腸管出血性大腸菌株 119 株について、ペロ毒素遺伝子の部分塩基配列を決定して *stx1* 及び *stx2* 遺伝子型による分類を行った結果、両遺伝子型ともに全体の 5-7 割を占める第 1 主要グループと約 2-3 割を占める第 2 主要グループおよびその他の少数の遺伝子型グループに分類され、大腸菌 O157 で、*stx1* および *stx2* 遺伝子を保有しているにもかかわらず市販の免疫学的キットでは VT1 および VT2 を検出できない菌株が複数存在したことから *stx1* 遺伝子としては標準的な構造遺伝子を保有していると思われるが VT1 を産生しない菌株が存在することが判明した。

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

無し