

の評価、(4) 密度勾配層回収装置の設計・製作、を行った。

B. 研究方法

(1) ハイブリッド法の適用範囲についての検討

食品マトリックスの選定

多様な食品をその成分構成から系統的に分類することは、細胞バイアブル分離の観点から有用である。図1は炭水化物 (C)、脂肪 (F)、タンパク質 (P) の含有量を基準とした分類図である。この図に基づき、本研究では C+F、F+P、P+F を多く含む食品の各々の一例として、生乳、ブリ、牡蠣、を選んだ。生乳・大腸菌、及びブリ・*M. morganii* に関しては初年度に調査した。本年度はブリ・*M. morganii*

関する再調査、及び牡蠣・*V. parahaemolyticus* についての調査を行ったが、その個別調査の前に、微生物細胞の種類についての適用性について検討した。

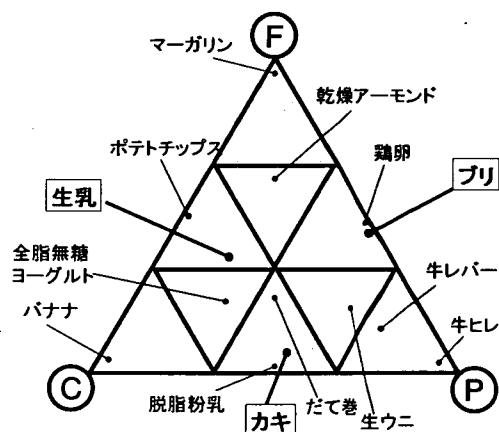


図1. 食品マトリックスの系統的分類

Percoll 密度勾配の調製

Percoll (#170891-01, GE Helthcare) を滅菌した 50mM、pH7.0 リン酸緩衝液で希釈し、25%、50%、75%、100%の密度溶液をそれぞれ調製した。各濃度の Percoll 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 ずつ超遠心管 (11 \times 34mm) に重層し、密度勾配を作製した。

適用菌種検討に供した試験菌液の調製

スラントで保管されている次の各株を LB 液体培地に播種し、37 $^{\circ}$ C、18h、130rpm で前培養した。前培養液から 100 μ l 採取し、10ml LB 液体培地に播種し、同条件で本培養し試験菌液とした。これを終濃度約 1×10^5 cells/ml あるいは 1×10^5 cells/ml となるようにリン酸緩衝液で希釈した。

M. morganii

Bacillus sp.

Escherichia coli

Enterobacter cloacae

Klebsiella pneumoniae

Pseudomonas aeruginosa

Staphylococcus aureus

V. parahaemolyticus については、3% NaCl 添加の TSA プレート上で保存した菌を、3% NaCl を添加したアルカリペプトン水に植菌し、37 $^{\circ}$ C、130rpm で 18 時間培養を行い試験菌液とした。

細胞バイアブル分離及び菌数計測

Percoll 密度勾配を調製した上に、試験菌希釈液 200 μ l (2×10^4 cells) を重層し、4 $^{\circ}$ C、5,000rpm、30min で遠心後、マイクロピペットで、遠心管上方から 200 μ l ずつ回収した。回収した各密度層 100 μ l をバイオプロ

ローラー（松下エコシステム）で菌数測定した。

(2) プリ・*M. morgani*における分離性能の再評価

魚肉試料の調製

新鮮なプリ 5g を秤量し、リン酸緩衝液 45ml を加え、これに Tween80 を 0.1% となるように添加し、ストマッカーを用いて 1min 破碎、攪拌した。ストマッカー付属のフィルターを通して抽出液を回収し、これを魚肉抽出液とした。

この①魚肉抽出液のみ、②*M. morgani* 菌液のみ（約 200cells/200 μ l）、③*M. morgani* 約 200cells を含む魚肉抽出液、各 200 μ l を試料とした。

細胞バイアブル分離及び菌数計測

上記の各試料 200 μ l を Percoll 密度勾配層の最上部に重層し、上記と同様の条件で遠心分離した。遠心後、各層から 200 μ l 回収し、標準寒天培地に播種し、37 $^{\circ}$ C、130rpm、18h 培養してコロニー計数した。

(3) 牡蠣 - 腸炎ビブリオ (*V. parahaemolyticus*) における分離性能の評価

牡蠣試料の調製

冷凍された牡蠣を凍結状態のまま大きく砕き、それぞれ冷凍用小袋に小分けにし、保存した。試験の際、流水中で解凍し、完全に解凍される前に線切りにし、均一化した。均一化された中から 25g 回収し、225ml の PBS で 10 倍希釈し、ストマッカーで破碎・混合した。ストマッカーフィルターを通して回収した溶液を牡蠣抽出液とした。

この①牡蠣抽出液のみ、②*V. parahaemolyticus* 菌液のみ（約 200cells

/200 μ l）、③*V. parahaemolyticus* 約 200cells を含む牡蠣抽出液、各 200 μ l を試料とした。

細胞バイアブル分離

上記の各試料 200 μ l を Percoll 密度勾配層の最上部に重層し、上記と同様の条件で遠心分離した。遠心後、各層から 200 μ l 回収し、菌数計測を行った。

菌数計測

腸炎ビブリオは好塩性で弱アルカリ性の条件を好んで生育する。その検出には TCBS 寒天培地を用いる方法が一般的である。しかし、計測結果のバラツキを小さくすることが難しかったので、栄養培地である TSA 培地に腸炎ビブリオの示適塩濃度になるように 3% の NaCl を加えた培地、および TCBS に同様に 3% の NaCl を添加した培地でも計数した。TCBS 培地では高圧蒸気滅菌を行わず、95 $^{\circ}$ C の湯を用いて 30 分加温溶解し、平板を作製した。

一方、非培養法としては、DAPI/PI 二重染色法によるバイオプレーヤーでの計測の他、CFDA による計測も行い比較した。

C. 研究結果 (1) ハイブリッド法の適用範囲についての検討

本法の性能は菌体の大きさや形状によって大きく異なることが予想された。そこで、形状の異なる 8 種の微生物について比較した。その結果、図 2 に示すように、6 種は 75% 層に最大の菌数が回収された。*M. morgani* は 50% が、*V. parahaemolyticus* では 25% が最大菌数回収層となった。

図2において、最大菌数層以外からも菌が回収されたが、これは同一菌種でも細胞周期の異なる細胞が混在しているためと考えられた。実際、*M. morgani*の場合、図3に示すように、50%層では単菌が観察されたが、75%層では分裂途中で連鎖状の細胞が観察された。

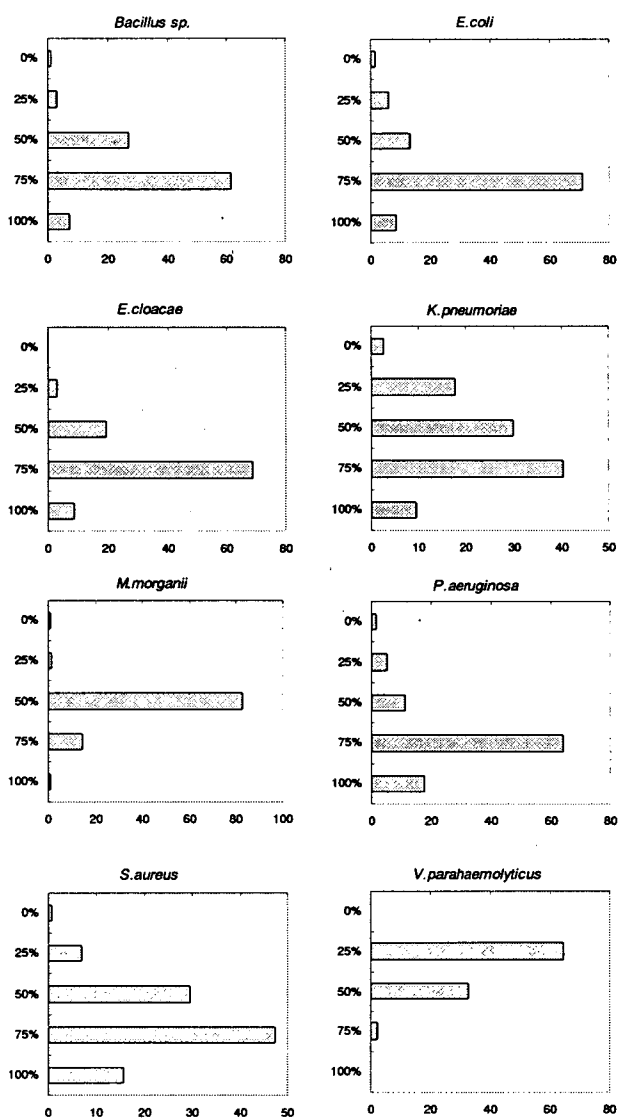


図2: 各菌株のPercoll密度勾配中の分布

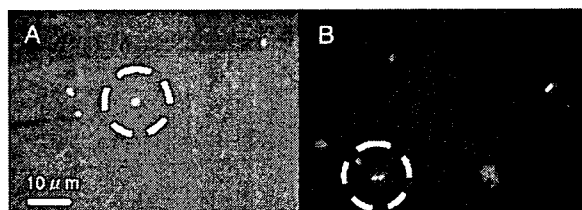


図3. 50%層(A)及び75%層(B)で観察された*M. morgani*

(2) プリ-*M. morgani*における分離性能の再評価

プリから各密度層に回収された菌数の相対値を図4に示す。昨年と同様の結果であり、50%層、75%層合わせて75%の生菌を回収できることが示された。

図5に示すように、魚肉成分は25%層に回収され、50%層以上の層への混入は見られなかった。

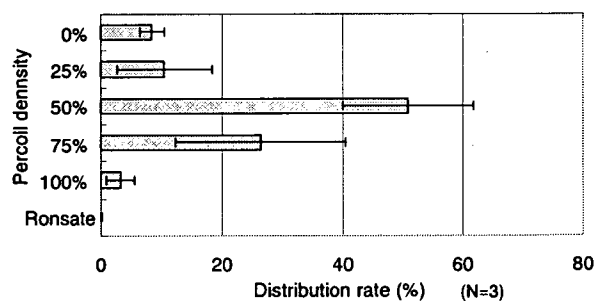


図4. プリから分離された*M. morgani*

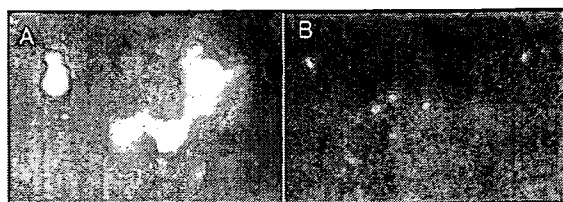


図5. 25%層(A)及び50%層(B)の警告頭微画像

(3) 牡蠣 - 腸炎ビブリオ (*V. parahaemolyticus*) における分離性能の評価

菌数計測結果

培養法では、3% NaCl 添加 TCBS ではコロニーが観察されなかった。3% NaCl 添加 TSA、及び TCBS では、TSA 多数のコロニーが形成された (図 6)。また、DAPI/PI 二重染色法を比較した結果、TSA の結果が良い相関を示した。さらに CFDA 法も TSA の結果と良い一致を示した。

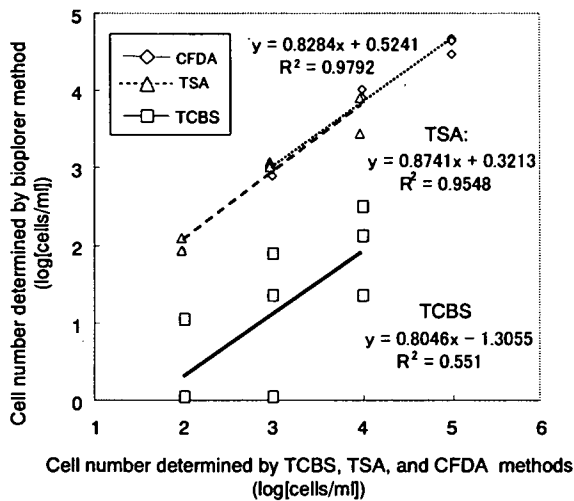


図6. *V. parahaemolyticus* 計測結果

V. parahaemolyticus 分離結果

V. parahaemolyticus のみの試料から Percoll 密度勾配遠心によって菌体を分離した結果、菌体は 25%層と 50%層から約 90%が回収された。そこで、Percoll 密度勾配を 15~75%を 15%刻みにして、分離を試みた。その結果、図 7 に示すように 45%層が最大菌数層となった。

次に、*V. parahaemolyticus* 含有牡蠣抽出液からの菌体分離を行った。その結果、図 8 に示すように、図 7 の場合と異なり、30%層が最大菌数層となった。

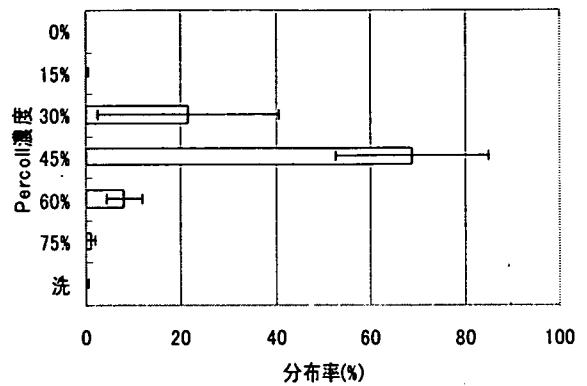


図7. 菌液からの *V. parahaemolyticus* 分離結果

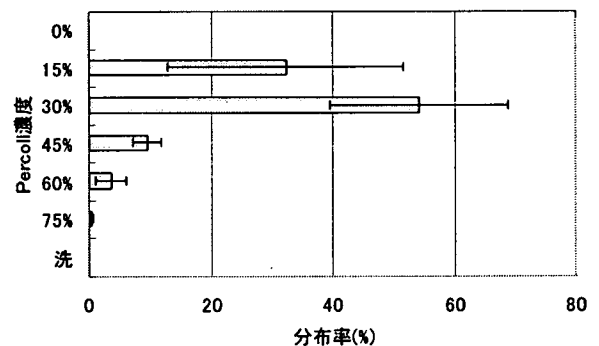


図8. 試験菌液含有牡蠣抽出液から *V. parahaemolyticus* 分離結果

一旦回収した菌液を再度、密度勾配遠心を行ったところ、最大菌数層が例えば 50%→25%に変化する場合は観察された。例えば *V. parahaemolyticus* 細胞が凝集塊を形成したものが、分離操作を繰り返す過程で単一細胞に分散したからではないかと推察した。しかし、DAPI で染色した顕微鏡写真で見ると、分離操作以前において特に凝集塊は認められなかった (図 9)。

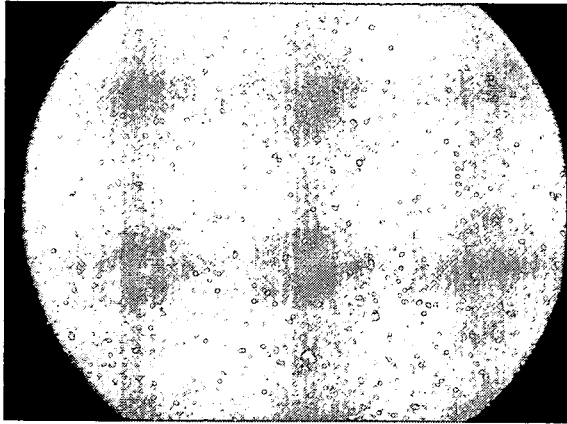


図9. *V. parahaemolyticus* DAPI染色画像

(4) 密度勾配層回収装置の設計・製作

図10に装置構成を示す。5層からなる密度勾配層を、下層から順次、相互に他層を乱すことなく回収するために、5本の針が装着された回収針チップを開発した。各層はマイクロフローチャンネルを介して顕微蛍光計数装置（バイオプロロー、松下エコシステムズ）専用の生菌回収フィルター上へ移送される。

すでに構成要素ごとの機能は確認しているが、全体システムとしての機能試験は最終年度に実施予定である。

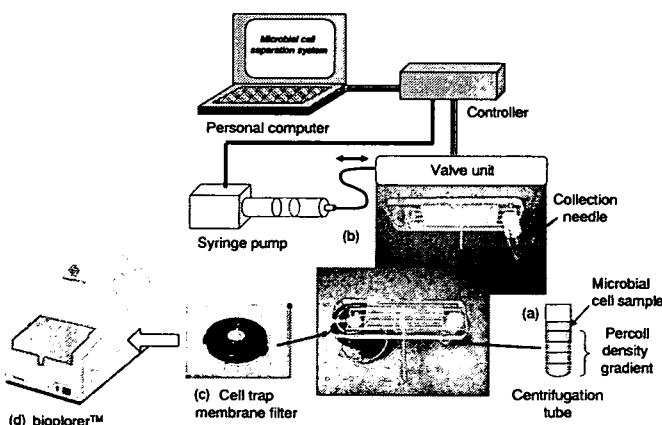


図10 密度勾配層回収装置

D. 健康危険情報
特になし。

E. 研究発表

○投稿論文

・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).

・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)

・T. Shimakita, H. Yamamoto, T. Naramura, A. Fujimori, T. Ide, Y. Tashiro, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid Count of Microbial Cells in Dialysate. *Ther. Apher. Dial.* 11, 363-369 (2007).

・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.* (in press).

・Y. Yamada, N. Yamaguchi, M. Ozaki, Y. Shinozaki, M. Saito, H. Matsuoka: Instant Cell Recognition System Using Microfabricated Coordinate Standard Chip Useful for Combinable Cell Observation with Multiple Microscopic Apparatus. *Microsc. Microanal.* (in press)

○著書・総説等

・松岡英明：微生物検査法のバリデーシヨンの概略 “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.

・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).

・斉藤美佳子、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).

○学会発表

・山田洋平, 山口直俊, 篠崎行啓, 斉藤美佳子, 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28日

・松岡英明, 高山幸大, 小泉貴寛, 荒木恵美子, 斉藤美佳子, "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28日

・荒木恵美子, 高山幸大, 宇田川藤江, 田中寛行, 斉藤美佳子, 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31日

・高山幸大, 荒木恵美子, 宇田川藤江, 田中寛行, 斉藤美佳子, 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31日

・畑 圭輔, 斉藤美佳子, 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31日

・瀬口裕介, 小泉貴寛, 斉藤美佳子, 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31日

・澤山成行, 坪井成緒, 津村和伸, 島北寛仁, 斉藤美佳子, 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31日

・澤山成行, 松嶋寛招, 山口典生, 島北寛仁, 斉藤美佳子, 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31日

・澤山成行, 島北寛仁, 永幡 肇, 斉藤美佳子, 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2日

・松岡英明, "微生物試験における精度目標", AOAC インターナショナル総会・シンポジウム『食品分析討論会 2007~ゴールはどこに?~』東京, 2007年6月9日

・松岡英明, "食品微生物試験の標準化の動向について", AOACI 日本セクション・食品分析研究会 合同シンポジウム in 信州, 長野県上伊那郡, 2007年11月2日

・松岡英明, "微生物検査法における生菌分離技術の開発", 日本防菌防黴学会 第35回通常総会付設講演会, 大阪, 2007年5月24日

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、今年度は遺伝子学的手法のうち PCR 法による腸炎ビブリオ検出と、検出の際に不可欠と考えられる内部コントロール（Internal Control; IC）を加えた検出系を検討した。

腸炎ビブリオを PCR 法で検出するプライマーとして、前年度に検討して感度が良好であった *toxR* と LDH について特異性を検討した結果、*toxR* では *V. alginolyticus* の一部の株に非特異反応が認められた。

当センターで作製した IC を検討した結果、菌培養液の検出感度は、 $10^4 \sim 10^5$ cfu/ml であり、IC 未添加の場合よりも 1 オーダー程度低下した。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、IC 未添加の場合と較べて 1～2 オーダー低下した。食中毒関連食品 11 検体の培養液について PCR 法による検出を検討したところ、IC 添加と未添加の場合の結果は一致した。また、海水及びアサリの MPN 法による定量で、各試験管からの検出を PCR 法と培養法で比較したところ、PCR 法での IC 添加と未添加の結果は一致し、培養法とほぼ同等の成績となった。以上より、今回検討した IC は有効であることが確認された。

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。

本年度は腸炎ビブリオを対象として、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。特に、PCR 法による腸炎ビブリオ検出と、PCR 法による検出の際に検査結果の保証のために不可欠と考えられる内部コントロール

(Internal Control; IC) を加えた検出系を検討した。

B. 研究方法

1. 腸炎ビブリオ検出用プライマーの特異性

腸炎ビブリオを PCR 法で検出するプライマーとして、前年度に検討して感度が良好であった *toxR* (Kim *et al.*, JCM 37, 1173-1177, 1999) と LDH (石橋ら、大阪府立公衛研所報, 23, 67-71, 1992) について特異性を検討した。供試菌株は、腸炎ビブリオ 101 株、*V.cholerae* O1, 3 株、*V.cholerae* O139, 1 株、NAG 7 株、*V.mimicus* 6 株、*V.fluvialis* 6 株、*V.vulnificus* 25 株、*V.alginolyticus* 105 株を用いた。

2. IC の検討

(1) 菌培養液を用いた IC の検討

腸管出血性大腸菌検出用に作製した IC を腸炎ビブリオ検出に応用して検討した。

腸炎ビブリオ菌株 V89-056 (ヒト由来) の 3% 食塩加トリプチケースソイブロス培養液を段階希釈した。IC のテンプレート DNA としてプラスミド DNA PBR322、IC プライマーとしてプラスミド DNA PBR322 内に設計したプライマーを加えた反応系で検出を行い、結果を比較した。

(2) 食品の大量培養液を用いた IC の検討：接種実験

魚介類 (ブリ、メバチマグロ、カキ) 25g に 2% 食塩加アルカリペプトン水 (APW) 225ml を加え 37℃ で 16~20 時間培養した。それぞれの培養液に腸炎ビブリオ菌株 V89-056 (ヒト由来) 培養液を段階希釈したものを接種した。各培養液から DNA を

アルカリ抽出法により抽出し、プライマー *toxR* 及び LDH を用いて通常の腸炎ビブリオ検出用 PCR と IC を加えた PCR を行い、検出感度を比較した。DNA ポリメラーゼは *Ex Taq* (TAKARA) を使用したが、非特異反応がみられた検体には Multiplex PCR Assay Kit (TAKARA) を使用した。

(3) 食品の大量培養液を用いた IC の検討：食中毒関連食品

食中毒関連食品 11 検体それぞれ約 25g に APW を加え、37℃ で 16~18 時間大量培養した。各培養液から DNA をアルカリ抽出法により抽出し、PCR によりスクリーニングを行った。プライマーは *toxR* 及び LDH を用いて、通常の PCR 反応系と IC を加えた反応系で行った。DNA ポリメラーゼは *Ex Taq* Hot Start Version を使用した。

菌の検出は、食品乳剤の直接分離、2% 食塩加 APW 10ml で中試験管での増菌培養後分離、2% 食塩加 APW で大量培養後分離により行い、結果を比較した。分離寒天平板には TCBS 寒天およびクロモアガービブリオを使用した。

(4) MPN 法で PCR 法による検出の IC の検討

2007 年 6 月 4 日に東京湾の 2 地点で採取した海水及びアサリについて、MPN 3 本法により腸炎ビブリオ菌数を測定した。それぞれの試験管からの腸炎ビブリオの検出は、PCR 法と培養法で行い、成績を比較した。PCR 法ではプライマーは *toxR* を、DNA ポリメラーゼは *Ex Taq* Hot Start Version を用いて、通常の反応系と IC を加えた反応系で行った。培養法は分離平板として TCBS 寒天とクロモアガービブリオを

用いて行った。

C. 研究結果

1. 腸炎ビブリオ検出用プライマーの特異性

腸炎ビブリオ及びビブリオ属菌について腸炎ビブリオ検出用プライマー *toxR*、LDH を用いた PCR 法による検出を行い特異性を確認した (表 1)。両プライマーとも腸炎ビブリオは 101 株中 100 株を検出した。プライマー-LDH は他のビブリオ属菌 6 菌種 153 株について陰性であったが、プライマー *toxR* は *V.alginolyticus* 105 株中 4 株が陽性となる非特異反応が認められた。

2. IC の検討

(1) 菌株培養液を用いた IC の検討

通常の PCR 検出では、プライマー *toxR* によるアンプリコンサイズ; 368bp、または LDH によるアンプリコンサイズ; 372bp のバンドが検出されるが、IC を添加すると更にアンプリコンサイズ; 511bp のバンドが検出された (図 1)。検出感度は、*toxR* が 5.0×10^4 cfu/ml、LDH が 5.0×10^3 cfu/ml であったが、IC を加えると、それぞれ 5.0×10^5 cfu/ml、 5.0×10^4 cfu/ml となりそれぞれ 1 オーダー感度が低下した (表 2)。

(2) 食品の大量培養液を用いた IC の検討：接種実験

3 種類の魚介類の大量培養液を対象として、*toxR* 及び LDH のプライマーを用いて PCR を行った場合、その検出感度は 1×10^4 ~ 10^5 cfu/ml であった。反応系に IC を加えると、検出感度は 1×10^5 ~ 10^6 cfu/ml となり、1 ~ 2 オーダー程度感度が低下した (表 3)。DNA ポリメラーゼは *Ex Taq* を使用

したが、ブリ及びメバチマグロでは非特異反応がみられたため、Multiplex PCR Assay Kit (TAKARA) を使用した結果、良好な PCR 反応が得られた。

(3) 食品の大量培養液を用いた IC の検討：食中毒関連食品

PCR による検出は、プライマー *toxR* を用いた場合は 11 検体の内 5 検体が、LDH では 4 検体が陽性となり、IC を加えた場合も結果は同じであり、一致率は 100% であった (表 4)。PCR によるスクリーニング試験において両プライマーで陽性になった 4 検体では、中試験管での増菌培養で 2 検体から、大量培養後の増菌で 4 検体から腸炎ビブリオが分離された。しかし、*toxR* のみ陽性であった 1 検体では腸炎ビブリオが分離されなかった。

(4) MPN 法で PCR 法による検出の IC の検討

MPN 法のそれぞれの試験管からの腸炎ビブリオ検出を PCR 法で行った結果、通常の反応系と IC を加えた系では検出結果は 100% 一致した。また、PCR 法と培養法で比較すると、その成績はほぼ一致し、一致率は 98% であった (表 5)。

腸炎ビブリオ菌数は、海水 2 検体およびアサリ 1 検体では PCR 法および培養法の両方法で成績は一致し、それぞれ 4.3×10^2 cfu/ml、 9.3×10^2 cfu/ml、 9.3×10^4 cfu/ml であった。アサリ 1 検体では PCR 法では 4.6×10^5 cfu/ml、培養法では 3.6×10^4 cfu/ml 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 PCR 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るが、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。昨年度検討して感度が良好であったプライマー *toxR* と LDH に関して、特異性を検討した結果、いずれも特異性が高かった。腸炎ビブリオ 101 株中両プライマーで検出できなかった 1 株の血清型は O10:KUT であったが、O10 の凝集は比較的弱かった。プライマー *toxR* は、腸炎ビブリオと DNA の相同性が非常に高いと報告されている *Valginolyticus* について 105 株中 4 株が陽性となり、*Valginolyticus* あるいは他の菌と非特異反応を起こす可能性があることが示唆された。

また、食品の増菌培養液について 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ことになる。しかし、その前提には用いた PCR 法が確実に反応していることを保証することが不可欠である。そのために反応系に IC を入れて反応系を確認することを検討した。今回は、当センターで腸管出血性大腸菌検出用に作製した IC が、腸炎ビブリオ検出用 PCR にも有効であるか否かを検討した。食品の大量増菌培養液、海水及びアサリの MPN 法による検出系の各試験管から PCR 法で腸炎ビブリオ遺伝子を検出したところ、IC を加えた場合も成績が一致し、IC の有効性が確認できた。また、複数の菌種に共通に使える IC は非常に有用であると考えられた。しかし、IC を加えると感度については 1 オーダー程度低下するため、PCR 検

出感度維持のために今後改良が必要と考えられた。一方、食品の増菌培養液を対象とした場合にはほとんど問題はないものと推定された。

今回、魚介類の増菌培養液を対象に腸炎ビブリオを PCR により検出する際に、DNA ポリメラーゼとして当初 EX Taq (TAKARA) を使用したが、3 検体中 2 検体において不明瞭な非特異反応が見られて陽性のバンドを確認できなかった。PCR 反応において反応初期の Hot Start 機能をもつ DNA ポリメラーゼである EX Taq Hot Start Version (TAKARA) あるいはキットとなっている Multiplex PCR Assay Kit (TAKARA) を使用すると良好な PCR 反応が確認された。

PCR 法には死菌も検出してしまうという大きな問題点があり、死菌と生菌を見分ける方法を検討する必要があるので、今後検討する予定である。

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。プライマー *toxR* と LDH について腸炎ビブリオに対する特異性を確認したが、*toxR* は一部の *Valginolyticus* と非特異反応を示す可能性が示唆された。

次に、PCR 反応の確実性を保証するために、当センターで作製した IC を検討した結果、有効であることが確認された。菌株培養液の希釈液では検出感度は $10^4 \sim 10^5$ cfu/ml であり、IC 未添加の場合よりもその検出感度は 1 オーダー程度低下した。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、IC 未添加の場合と較べて 1 ~ 2 オーダー低下した。しか

し、実際に食品 11 検体、海水 2 検体、アサリ 2 検体で比較検討した結果、IC 添加による検査結果に差異は認められなかった。

F. 健康危機情報

平成 18 年に全国で発生した細菌性食中毒事件のうち、腸炎ピブリオによる事件数（患者 2 名以上）は 53 件で、カンピロバクター（180 件）、サルモネラ属菌（99 件）、黄色ブドウ球菌（59 件）に次いで第 4 位、患者数は 1,236 人で、カンピロバクター（2,297 人）、サルモネラ（2,053 人）、ウエルシュ菌（1,545 人）に次いでやはり第 4 位であった。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〉

準備中

H. 知的所有権の取得状況

なし

表1 腸炎ビブリオ検出用プライマーの特異性

菌種	供試菌株数	プライマー*	
		<i>toxR</i>	LDH
<i>V.parahaemolyticus</i>	101	100	100
<i>V.cholerae</i> O1	3	0	0
<i>V.cholerae</i> O139	1	0	0
NAG	7	0	0
<i>V.mimicus</i>	6	0	0
<i>V.fluvialis</i>	6	0	0
<i>V.vulnificus</i>	25	0	0
<i>V.alginolyticus</i>	105	4	0

**toxR* :94°C 5m - (94°C 30s - 63°C 30s - 72°C 30s) 30cycles - 72°C 3m

Kim *et al.*, JCM 37, 1173-1177, 1999.

LDH : (94°C 1m - 54°C 1m - 72°C 1m) 30cycles

石橋ら, 大阪府立公衛研所報, 23, 67-71, 1992.

表2 インターナルコントロール(IC)の検討: 菌培養液

No.	1	2	3	4	5	6
菌数	5.0×10^7 *	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2
<i>toxR</i>	+++	+++	++	++	±	-
<i>toxR</i> /IC	+++ / +++	+++ / +++	+ / +++	- / +++	- / +++	- / +++
LDH	+++	+++	++	+	+	-
LDH/IC	+++ / +++	+++ / +++	++ / +++	+ / +++	- / +++	- / +++

*: cfu/ml

表3 ICの検討：食品の大量培養液（接種実験）

ブリ	No. 菌数	1	2	3	4	5	6
		1.0×10^6 *	10^5	10^4	10^3	10^2	-
	<i>toxR</i>	+++	+++	+	-	-	-
	<i>toxR/IC</i>	+ / +++	- / +++	- / +++	- / +++	- / +++	- / +++
	LDH	+++	+++	+	-	-	-
	LDH/IC	+++ / +++	+ / +++	- / +++	- / +++	- / +++	- / +++
メバチマグロ	菌数	1.1×10^6 *	10^5	10^4	10^3	10^2	-
	<i>toxR</i>	+++	+++	+	-	-	-
	<i>toxR/IC</i>	+ / +++	- / +++	- / +++	- / +++	- / +++	- / +++
	LDH	+++	+++	+	-	-	-
	LDH/IC	+++ / +++	++ / +++	- / +++	- / +++	- / +++	- / +++
カキ	菌数	0.9×10^6 *	10^5	10^4	10^3	10^2	-
	<i>toxR</i>	++	++	+	-	-	-
	<i>toxR/IC</i>	+ / +++	- / +++	- / +++	- / +++	- / +++	- / +++
	LDH	+++	+	-	-	-	-
	LDH/IC	+ / +++	+ / +++	- / +++	- / +++	- / +++	- / +++

*: cfu/ml

表4 ICの検討：食品の大量培養液（食中毒関連食品）

食品	PCR				菌の検出*		
	<i>toxR</i>	<i>toxR/IC</i>	LDH	LDH/IC	直接	増菌	大量
玉子焼き	+++	+/-	+++	+++ / +	-	+	+
スズキ	+++	++ / ++	+++	+++ / ++	-	+	+
真アジ	+++	+++ / +++	+++	+++ / ++	-	-	+
イクラ	+++	++ / ++	+++	+++ / ++	-	-	+
エビ	+++	++ / +++	-	- / +++	-	-	-
甘エビ	-	- / +	-	- / +++	-	-	-
サーモン	-	- / +++	-	- / +++	-	-	-
穴子1	-	- / ++	-	- / +++	-	-	-
マグロ	-	- / +++	-	- / +++	-	-	-
辛チャンジャ	-	- / ++	-	- / +++	-	-	-
穴子2	-	- / +++	-	- / +++	-	-	-

*直接：食品乳剤の直接分離

増菌：アルカリペプトン水10mlでの増菌培養後分離

大量：アルカリペプトン水で大量培養後分離

表5 ICの検討：MPN法

試料		陽性数(3本法)				
		10ml	1ml	0.1ml	0.01ml	0.001ml
海水-1	<i>toxR</i>	3	3	1	0	NT
	<i>toxR/IC</i>	3	3	1	0	NT
	培養	3	3	1	0	0
海水-2	<i>toxR</i>	3	3	2	0	NT
	<i>toxR/IC</i>	3	3	2	0	NT
	培養	3	3	2	0	0
アサリ-1	<i>toxR</i>	3	3	3	3	1
	<i>toxR/IC</i>	3	3	3	3	1
	培養	3	3	2	3	1
アサリ-2	<i>toxR</i>	3	3	3	2	0
	<i>toxR/IC</i>	3	3	3	2	0
	培養	3	3	3	2	0

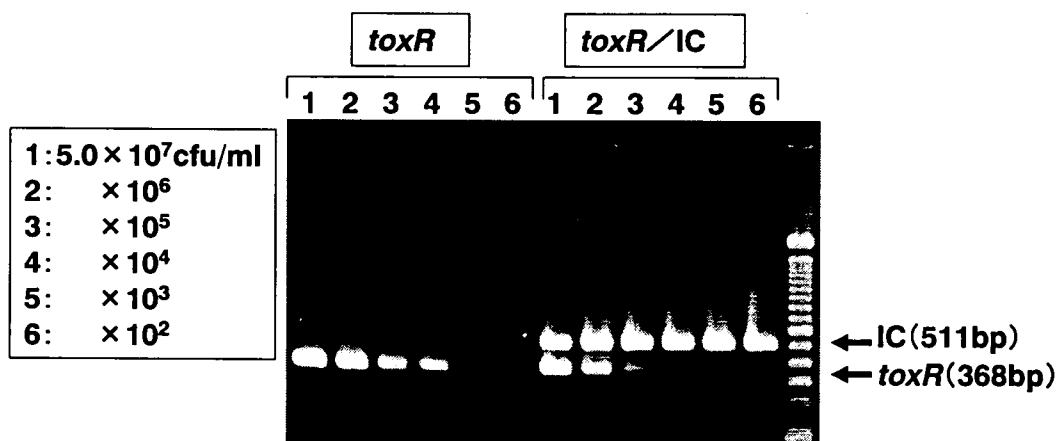


図1 インターナルコントロール (IC) の検討：菌培養液

- ・ IC テンプレート DNA : プラスミド DNA PBR322
- ・ IC プライマー : プラスミド DNA PBR322 内に設計したプライマー
- ・ IC サイズ : 511bp
- ・ 腸炎ビブリオ検出用プライマー : *toxR* (アンプリコンサイズ ; 368bp)
- ・ 反応系 : 25 μ l

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は培養法による菌体の検出に基づくものであり、菌増殖のための時間がかかり最低でも 3 日が必要である。腸炎ビブリオ食中毒の場合、その原因食材は主に生鮮魚介類であり、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。本研究では遺伝子増幅法を活用し、菌の増殖ではなく、菌体から得られた DNA を増幅する事により、汚染指標菌としての腸炎ビブリオを特異的に検出する PCR を開発した。さらに、増菌培養を行わずに Nested-PCR 法により 10^4 cfu/ml (20 cfu/tube) まで検出感度を上げる事が出来た。病原性腸炎ビブリオの迅速検出のための LAMP 法による検出系の開発も行い良好な成績が得られた。

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°C 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毒素産生菌が増殖し、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)。

一方、これまでの調査では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、

腸炎ビブリオを含むビブリオ属菌は、それぞれお互いに類似した性状を持っている (表 1)。したがって、腸炎ビブリオと環境中で同じ生態を示す菌では、通常の培地では増殖性や選択性にも差がなく、腸炎ビブリオだけを特異的に増菌培養することが困難である。また、選択分離培地上での集落の形態や色調、あるいは各種生化学性状試験での成績も特徴的ではなく、複数の生化学性状試験を総合的に判断して腸炎ビブリオと同定されるものである。

昨年度、本研究において腸炎ビブリオの特徴的な酵素反応を利用した酵素基質培地

の適用を試みたが、食品検体中に腸炎ビブリオであるがその発色が異なるもの(偽陰性)、腸炎ビブリオとされる発色であるが別の菌種と同定されたもの(疑陽性)という例外性状を示す菌がいたため、酵素基質培地だけで腸炎ビブリオを分離同定する事は出来なかった。酵素基質培地は組成不明のため、その成績を元にした追加試験を行う事も出来ないため手順の省略もはかれず、したがって検査の迅速化には不適という結果であった。

近年の分子生物学的手法の発達は基礎研究のみならず、応用研究にも大いに利用可能で、特に遺伝子を対象とした技術は様々な分野で活用されている。DNAの塩基配列は類縁種では相同な部分もあるが、種特異的な部分もある。また、PCRを始めとする遺伝子増幅法も様々な開発されており、細菌の迅速かつ特異的な検出に利用されている。

本研究では、培養法を基本とする現行の標準検査法にこれら迅速法が実際の検査法として導入可能かどうかを検討する事を目的とする。本年度は腸炎ビブリオ特異的なPCRによる検出系に関して、増菌培養を行わずにどこまで検出可能かについて検討を行った。

B. 研究方法

1. 染色体 DNA の調整

腸炎ビブリオ NIID-K7 株(O3:K6, TDH 陽性)と *Vibrio alginolyticus* 株をそれぞれ 10^9 cfu/ml に調整し、1 ml から染色体 DNA をプロメガ社の "Wizard

Genomic DNA Purification Kit" を用いて抽出、精製した。精製 DNA は A(260/280)測定により、純度と濃度の測定を行った。同時に同じ菌液を 10^3 , 10^4 , 10^5 cfu/ml に希釈し、 100°C 5 分間加熱し、同様に以下の実験の鋳型とした。

2. ゲノム DNA 増幅法を用いた鋳型 DNA の増幅

出発材料が少なかったり、培養が困難な生物材料に対し、その染色体 DNA 全体を増幅し、その後の解析に利用できる DNA を確保するために開発された GEヘルスケアバイオサイエンス社の "illustra GenomiPhi DNA amplification Kit" を用い、腸炎ビブリオの染色体 DNA 増幅を行った。反応原理は図 1 の通りで、random hexamer primer により染色体 DNA 全体を非特異的に増幅する。

3. Nested-PCR 法による二段増幅

PCR は増幅産物を電気泳動にてバンドを確認するが、バンドとして観察されない量の増幅産物が生成している時は、さらに PCR 増幅により感度増強をはかる事が出来る。一次増幅に *toxRS* 領域から *V. cholerae* や *V. alginolyticus* と相同性の高いプライマーによる PCR と、以下 4. で述べる腸炎ビブリオを特異的に検出できる PCR を用いた。二次増幅は 4. の PCR を両者に対し行った。

4. 腸炎ビブリオ特異的検出 PCR

toxR 遺伝子を標的とした PCR はこれまでに Kim らが報告した方法があるが、

類縁菌である *Valginolyticus* や *V. vulnificus* の一部が陽性となってしまう。そこで腸炎ビブリオとこれら類縁菌の *toxR* 遺伝子配列を比較し、腸炎ビブリオ特異的領域の検索を行った。それにより、以下に示すプライマーを設計し、反応条件についても検討を行った。耐熱酵素 *Taq* DNA polymerase はプロメガ社のものを用い、反応液組成もメーカーの指示に従った。反応液量は 20 μ l。サーマルサイクラーはアプライドバイオシステムズ社の GeneAmp PCR システム 2700 を用いた。

Primers

Vp-toxRnf

5'-GCTTTCTTCAGACTCAAGCTCAA
-3'

Vp-toxRnr

5'-CGCAAATCGGTAGTAATAGTGC-
3'

増幅産物 230bp

反応サイクル

94°C 5分

94°C 30秒

60°C 30秒

72°C 1分

72°C 10分

4°C ∞

} 30回

C. 研究結果

1. 染色体 DNA の調整

トリプチケースソイ寒天培地にて 30°C

一夜培養した菌体を生理食塩水 2 ml に懸濁し、660 nm の吸収で 0.9 に濃度を調整し、 10^9 cfu/ml 液とした。この 1 ml を採り、染色体 DNA の抽出を行い、得られた乾燥 DNA を 100 μ l の緩衝液に溶解し、260/280 nm の吸収を測定して DNA 濃度と純度を求めた。菌 10^9 cfu/ml 懸濁液を別に 10^3 cfu/ml に希釈したものを 100 μ l トリプチケースソイ寒天培地に塗抹し、菌数を測定した。菌数は腸炎ビブリオは 2.4×10^9 cfu/ml、*Valginolyticus* は 8.7×10^8 cfu/ml であった。抽出 DNA はそれぞれ 516.5 μ g と 550 μ g であった。いずれも 260/280 nm の吸収比は 1.8 を超えており、DNA としての純度は充分であった。

2. GenomiPhi による染色体 DNA の増幅

1. で得られた精製 DNA 10 ng を鋳型として、メーカーの説明書通り反応を行った。また、その 10^{-3} (10 pg)、 10^{-6} (10 ag) 希釈したものについても増幅が可能かどうか反応を行った。本キットは精製 DNA を用いて行う事になっているが、熱抽出 DNA でも適用可能かどうか、またその感度はどのくらいかについて 10^3 、 10^4 、 10^5 cfu/ml からの熱抽出 DNA を鋳型として同キットを用いた。増幅産物是非特異的に増幅されているため、長さや領域が特定できないため、以下の *toxR* 遺伝子を標的とした PCR 反応が十分に増幅産物が得られるかどうかで適用可能かどうかを判定した。

図2に示す通り、初期DNA量10 ngは本キット反応液20 μ l中に10 μ g/mlのDNAを1 μ l加えたものに相当し、反応後その1/20量を加えてVp-toxRn PCRを行った。レーン3に示すように初期DNA量10 ngでは*toxR*遺伝子断片が検出できた。さらにレーン4にあるように初期DNA量10 pgでも十分に検出可能であった。10³、10⁴、10⁵ cfu/mlの熱抽出DNAについては、腸炎ビブリオでは初期DNA量として反応液20 μ l中に2.4、24、240 cfuの菌に相当するDNAが存在するのであるが、いずれも検出は出来なかった。*V.alginolyticus*では初期DNA量10 ngでも検出されなかった。本キットによる染色体DNAの非特異的増幅産物が高分子量域にスミアで観察されたものにVp-toxRn PCR産物が検出できており、初期DNAが低濃度では本キットの増幅自体が行われていない事が推測できた。

3. Nested-PCR法による二段増幅

2.で用いたキットは非特異的に染色体DNA全体を増幅するものであるが、特異的増幅でも同様な感度増加が認められるかについてNested-PCR法を行った。腸炎ビブリオ特異的領域を増幅できる以下4.のVp-toxRn PCRと*V.alginolyticus*も増幅可能なより増幅産物の長い*toxRS*領域を増幅するPCRを行い、PCR反応液の一部(1 μ l)をさらにVp-toxRn PCRにより増幅を行っ

た。鋳型DNAは上記2.の初期DNAと同じものを使用した。

精製DNAあるいは熱抽出DNAを鋳型としたVp-toxRn PCRでは上記2.とほぼ同等の感度で*toxR*遺伝子断片が検出できた(図3)。さらにPCR反応液の一部(1 μ l)をVp-toxRn PCRにより増幅したものは、初期DNAとして精製DNAで10 fg、熱抽出で240あるいは24 cfuまでが検出可能であった(図4)。*toxRS*領域を増幅するPCRでは*V.alginolyticus*と腸炎ビブリオの陽性コントロールで増幅産物が見られ(図5)、さらにPCR反応液の一部(1 μ l)をVp-toxRn PCRにより増幅したものは、初期DNAとして精製DNAで10 fg、熱抽出で24 cfuが検出可能であった。しかし、GenomiPhiキットやVp-toxRn PCRのみの二段階増幅よりも非特異反応が多かった(図6)。

4. 腸炎ビブリオ特異的検出PCR

本PCRは「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)「畜水産食品の微生物等の試験方法に関する研究」(主任研究者:宮原 美知子)」にて標準検査法の補助的手段として開発し、良好な成績が得られている。

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。2006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71例(第3位)、患者数1,236名(第4位)であった。

腸炎ビブリオは沿岸海水中に生息し、魚介類に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。また、世界的な食品流通の発達により、海外からも生食用あるいは冷凍で魚介類が輸入されている。ビブリオ属菌は実験室での培養菌は冷蔵や冷凍により死滅しやすいが、魚介類、特に甲殻類のキチン質に付着した場合は生残しやすいと言われている。

1997、1998年に腸炎ビブリオO3:K6株が大流行した時も、それよりも少し前にインドを始めとするアジア地域で同じO3:K6の流行が発生しており、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法等で国内分離株と同一のパターンを示していた事から、同一クローンが拡がって行ったものと推察された。すなわち、海外の流行がいち早くわが国内に伝播し、国内沿岸地域をも汚染し、大流行に発展したものと考えられる。流行の伝播は海外で感染したが持ち込む事も考えられるが、腸炎ビブリオは一般にはヒト-ヒト感染を起こさないことから、輸入食品に付着して流入した事も十分に考えられる。

環境あるいは食品から病原因子である耐熱性の溶血毒(thermostable-direct hemolysin; TDH)、あるいはその類似毒(TDH-related hemolysin; TRH)産生性の腸炎ビブリオはほとんど検出されない。したがって、腸炎ビブリオの検査法は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。しかしながら、主な検査対象食品である生鮮魚介類は消費までの日数が短く、腸炎ビブリオの培養による検査法では、増菌培養、分離培養、確認培養と最低でも3日かかり、検査結果を待つからでは商品として成り立たない。

現行の腸炎ビブリオ検査法の問題点としては、上記のように菌の増殖を待たねばならない点大きい。

本年度の研究では、菌の増殖ではなく、菌の持つDNAを増幅させる事により検出する可能性について検討を行った。

近年の分子生物学的手法の発展、特に遺伝子検出法の開発は目覚ましく、微生物分野においてもその応用が広く行われ、その特異性、簡便性、迅速性、高感度等優れた点が多々見られる。

今回用いた染色体DNAの増幅キットは、難培養性の菌などの遺伝子解析に利用でき、腸炎ビブリオの場合でも培養をしなくとも

遺伝子の検出が可能になるものと期待された。反応は1チューブで行うことができ、しかも定温で2時間反応させるだけである。増幅された染色体DNAをさらに腸炎ビブリオ特異的PCR(Vp-toxRn PCR)で検出を行ったところ、初期DNA量で10 pgの検出が可能であって、腸炎ビブリオの染色体は約5 MBあり、菌1個のDNAは計算上 5.7×10^{-15} gであり、10 pgのDNAは 1.8×10^3 個に相当する。反応時間はキットが2時間でその後のPCRが1.6時間ほどである事から、反応時間だけでは3.6時間であった。

一方、同じ初期DNAをで増幅後、さらに同じPCRにより再増幅した場合は、10 fg(1.8個に相当)が検出可能で、熱抽出DNAでも24 cfuまで検出が可能であった。toxRSのPCR増幅後Vp-toxRn PCRを行った場合でも精製DNAを初期DNAに用いた場合は10 fgまで検出可能であったが、非特異反応が見られた。Vp-toxRn PCRの二段階増幅では反応時間は3.2時間であり、特異的バンドのみ検出された。

以上のように、いわゆるNested-PCRを用いた方が感度増強という点では優れており、PCRの試薬調整を入れても4時間あれば、数個から数10個程度の菌を検出する事が可能と考えられる。

今回は精製DNAを初期DNAとして用いた場合に1.8個(計算値)という検出感度が得られたが、菌体からのDNAの抽出精製には1時間ほど必要であり、また、少量菌の場合は抽出ロスも考えるとかなり難点があるものと考えられる。また、熱抽出においても

24 cfuが検出可能であったが、反応液に入れられる容量が1 μ lであった事から、元は 2.4×10^4 cfu/mlとなる。

染色体DNAの増幅キットGenomiPhiは非特異的に染色体全体を増幅するものであり、染色体全体のDNA量を増やすには有効であるが、検出すべき領域がわかっている場合はかえって効率が良くないといえる。したがって、今回用いたVp-toxRnあるいはtoxRSのような特定領域を増幅し、さらにNested-PCRによって再増幅を行う事で特異性を確保しつつ感度の増強を行う事は、少量の特定菌の検出には有効であるものと考えられる。

本研究では、標準法の最大の問題点である培養による時間を、遺伝子増幅により大幅に短縮できる可能性について明らかにする事が出来た。toxR遺伝子は染色体中に1コピーしか存在していないのに対し、16S rDNAや23S rDNAあるいはそのスペーサー領域の配列などは染色体上に11コピーしか存在しており、特異的配列を利用できれば感度増強が期待できる。

E. 結論

現行の腸炎ビブリオ検査法は培養法を標準としており、検査結果が得られるまでに最低でも3日かかる。対象食品が生鮮魚介類を主としている事から、消費までの日数を考えれば実用的とは言い難い。今日の遺伝子増幅技術によって、腸炎ビブリオを特異的に検出する事が可能であり、迅速性、簡便性からも有効な手段といえる。しかし、