

感度的には問題があり、通常の PCR 法では 10^4 cfu が限界であるとされている。しかし、増幅反応を繰り返す事でその感度を上げる事が可能である事が今回の研究で明らかとなった。今後さらなる感度の増強と食品試料からの菌体 DNA の抽出方法を検討して行く予定である。

F. 研究発表

<学会発表>

○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。2007.11.21.

○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

OG. 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 and T. Ramamurthy, *Vibrio fluvialis*: An emerging pathogen in causing acute diarrhea in Kolkata, India *Vibrio* 2007, 2007年11月

○Michiko Miyahara, Makoto Miyahara, Eiji 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

G. 参考文献

Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibuchi M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J Clin Microbiol.* 1999 Apr;37(4):1173-7

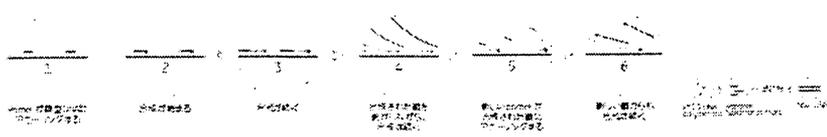
表1. *Vibrio cholerae*およびその類縁菌の生理・生化学的性状

テスト(基質)	<i>V. minicus</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>
硝酸塩還元	100	0	100	100	100	100	100	100	100
オキシダーゼ	100	0	100	100	100	100	100	100	100
インドール	99	20	97	97	13	11	98	85	99
VP	0	96	0	0	0	0	0	95	75
硫化水素(TSI)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
運動性(37°C)	99	74	99	0*	99	99	99	99	99
ゼラチン液化	65	65	75	0	85	86	95	90	90
ブイヨンでの発育									
0%(食塩加)	100	0	0	0	0	0	0	0	100
1%(食塩加)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6%(食塩加)	49	78	65	83	96	100	99	100	53
8%(食塩加)	0	44	0	0	71	78	80	100	1
10%(食塩加)	0	4	0	0	0	0	0	69	0
エスクリン加水分解	0	60	40	0	70	65	5	8	3
PPA	0	0	35	0	0	0	1	0	0
尿素分解	0	0	1	0	0	0	15	0	0
リシン脱炭酸	100	35	99	0	0	0	100	99	99
アルギニン加水分解	0	60	0	0	96	100	0	0	0
オルニチン脱炭酸	99	0	55	0	0	0	95	50	99
ONPG	99	50	99	0	60	60	8	3	94
ブドウ糖:ガス産生	0	0	0	0	0	100	0	0	0
クエン酸塩(シモンズ)	99	75	75	0	93	100	3	1	97
発酵:									
アドニット	0	0	0	0	0	0	0	1	0
アラビノース	0	0	5	97	96	100	80	3	0
セロビオース	0	9	99	0	30	11	5	3	8
ズルシット	0	0	0	0	0	0	3	0	0
ガラクトース	82	45	1	100	96	100	92	20	90
グリセロール	13	100	0	0	7	55	50	80	30
イノシット	0	40	0	0	0	0	0	0	0
乳糖	21	50	85	0	3	0	1	0	7
マルトース	100	100	100	0	100	100	99	100	99
マンニット	100	96	45	0	97	100	100	100	99
マンノース	100	100	98	100	100	100	100	99	78
メリビオース	0	0	40	0	3	11	1	1	1
ラフィノース	0	0	0	0	0	11	0	0	0
ラムノース	0	0	0	0	0	45	1	0	0
サリシン	0	9	95	0	0	0	3	8	3
ソルビット	0	45	0	0	3	0	1	1	1
白糖	0	100	15	0	100	100	1	99	100
トレハロース	100	100	100	0	100	100	99	100	99
キシロース	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Stringテスト	100	100	100	100	100	100	64	91	100
O/129 (150mcg)	95	90	98	40	31	0	20	19	99
DNA分解酵素	55	50	50	0	100	100	92	95	93
リパーゼ	17	100	99	0	90	89	90	85	92
ポリミキシンB感受性	88	100	3	100	100	89	54	63	22
スワオーミング	0	0	0	0	0	0	5	50	0

数字は陽性%を示す。

**V. hollisae*の運動性は37°C培養菌では陰性であるが、室温培養では運動性が観察される。

GenomiPhi V2 (NEW)



GenomiPhi HY (NEW)



GenomiPhi V2 (NEW) 検出感度比較表

	GenomiPhi V2 (NEW)	GenomiPhi HY (NEW)	GenomiPhi (従来品)
検出可能な DNA 量	10 ng	50 ng	1 ~ 10 ng
検出可能な 試料量	20 µl	50 µl	20 µl
試料濃度	4 ~ 7 µg	45 ~ 55 µg	4 ~ 7 µg
DNA 濃度	200 ~ 350 ng/µl	900 ~ 1100 ng/µl	200 ~ 350 ng/µl
検出時間	2 時間	4 時間	16 ~ 18 時間
検出感度の向上	2.5 倍	2.5 倍	2.5 倍

図1

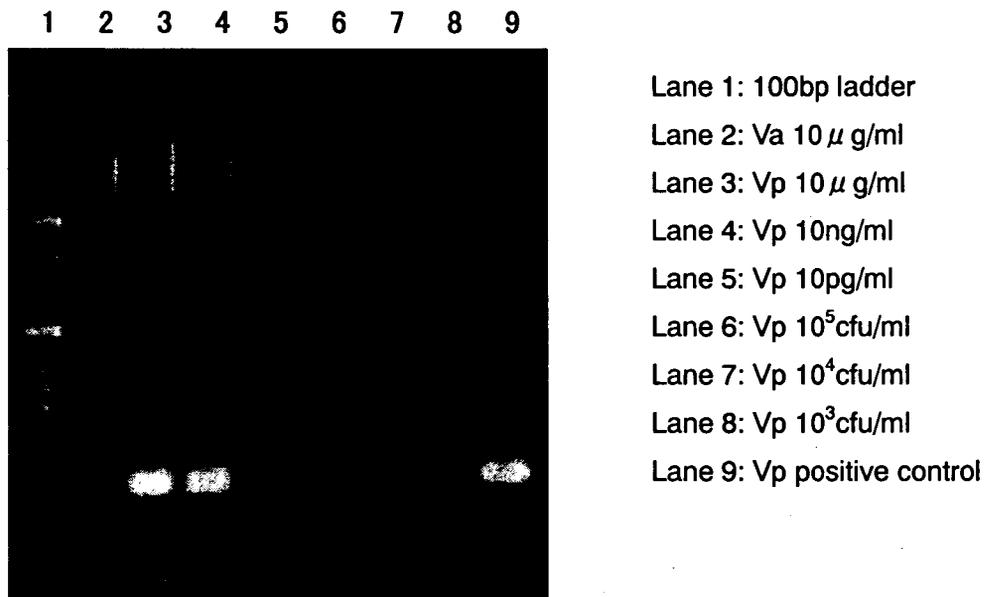


図2 Genomiphiを用いたゲノムDNAの増幅後、Vp-toxRnのPCR増幅

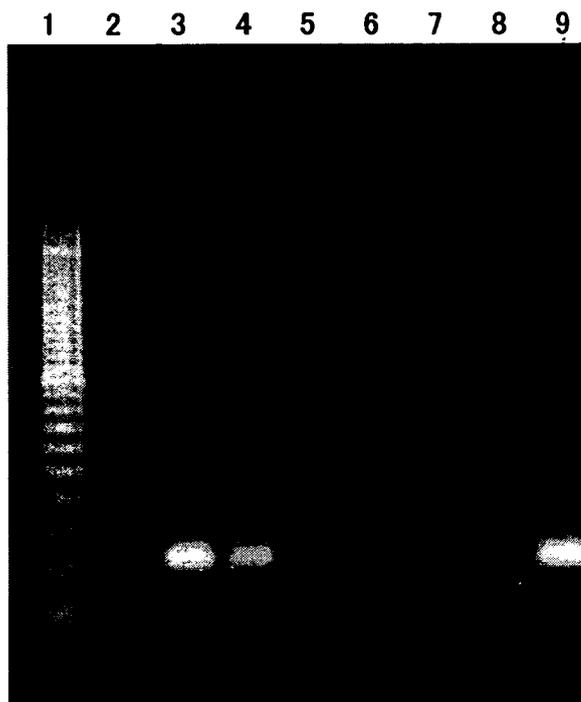


図3 Vp-toxRnのPCR増幅

Lane 1: 100bp ladder

Lane 2: Va 10 μg/ml

Lane 3: Vp 10 μg/ml

Lane 4: Vp 10ng/ml

Lane 5: Vp 10pg/ml

Lane 6: Va 10⁵cfu/ml

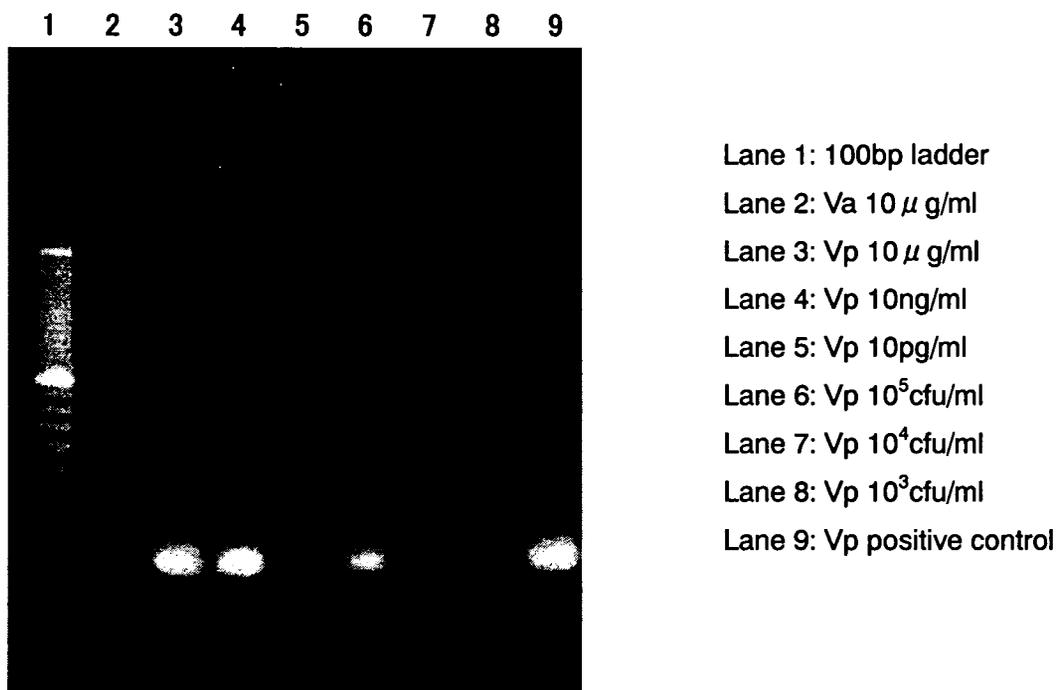


図4 Vp-toxRnのPCR増幅後、Vp-toxRnのPCR増幅

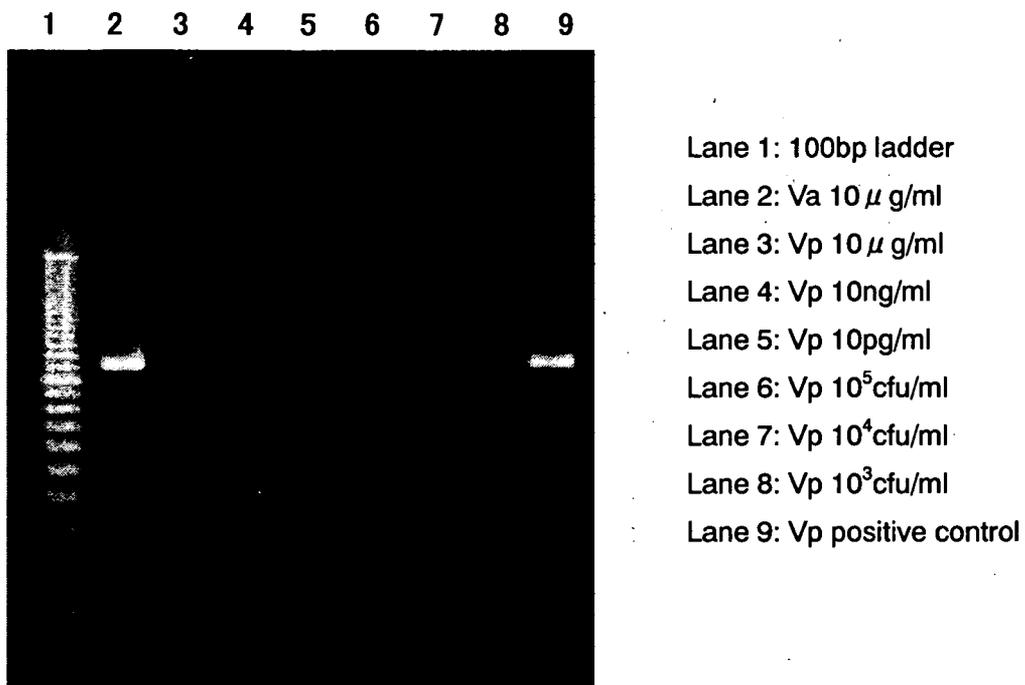
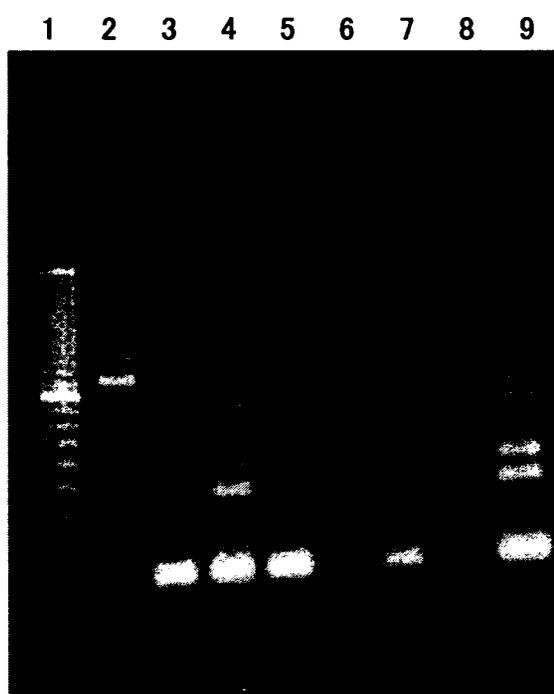


図5 toxRSのPCR増幅



Lane 1: 100bp ladder
Lane 2: Va 10 μ g/ml
Lane 3: Vp 10 μ g/ml
Lane 4: Vp 10ng/ml
Lane 5: Vp 10pg/ml
Lane 6: Vp 10⁵cfu/ml
Lane 7: Vp 10⁴cfu/ml
Lane 8: Vp 10³cfu/ml
Lane 9: Vp positive control

図6 toxRSのPCR増幅後、Vp-toxRnのPCR増幅

食品における微生物迅速検査法の開発及びその精度評価システムに関する研究

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

研究協力報告

LAMP 法による増殖性を有する耐熱性溶血毒(TDH)産生性

腸炎ピブリオの海産魚介類からの検出法の開発

研究協力者 山崎貢 愛知県衛生研究所

研究協力者 岩出義人 三重県科学技術振興センター

研究協力者 松本昌門 愛知県衛生研究所

研究協力者 皆川洋子 愛知県衛生研究所

研究要旨

食中毒菌である腸炎ピブリオ（以下 *V. p*）の主要な病原因子は耐熱性溶血毒（Thermostable direct hemolysin:TDH）であるが、自然界に分布する *V. p*のうち TDH 産生菌（TDH⁺*V. p*）は非産生菌（TDH⁻*V. p*）に比べて僅かしか存在しない。*V. p*食中毒の原因究明のために培養検査を実施しても推定原因食品中から TDH⁺*V. p*を分離することは少ない。TDH 遺伝子を指標にした遺伝子診断法で培養液を検査しても、従来の PCR 法では感度が十分高いとはいえず TDH 遺伝子を確実に検出するためには一晚以上の増菌培養を要す。また、TDH 遺伝子を検出しても死菌 TDH⁺*V. p*由来の可能性もあり原因食品とは直ちに判断できない問題もある。

そこで、*V. p*食中毒の推定原因食品中に存在する増殖性を有する生菌 TDH⁺*V. p*を短時間に簡便に検出するために、近年開発された LAMP（loop-mediated isothermal amplification）法を応用した検査法を検討した。LAMP 反応には、TDH⁺*V. p*の熱アルカリ抽出物、Primer セット（F1P, B1P, F3, B3）、Loop primer（Loop-F, Loop-B）及び Loopamp DNA 増幅試薬キットを用い、リアルタイム濁度測定装置により TDH 遺伝子を検出した。

その結果、①Primer セットと Loop primer を組み合わせることにより LAMP 反応の立ち上がり時間を約 2 分の 1 に短縮した。②TDH⁺*V. p*（15 株）は全株 LAMP 陽性であったのに対し、TDH⁻*V. p*（10 株）及び *V. p*類縁菌（28 株）は全株陰性であり LAMP 法の特異性は高かった。③検出限界は反応チューブ当たり 8 MPN（増菌液 1mL 中約 10⁴MPN 相当）であり、LAMP 法は PCR 法に比べ 100～1,000 倍感度が高かった。④培養液中に TDH⁺*V. p*を少数菌数接種した場合、5 時間増菌培養を行うことで LAMP 法の検出限界（約 10⁴ MPN /mL）を超えた。⑤増菌培地を増菌時間相当の 5 時間氷冷した場合と氷冷なし（0 時間）の場合とで LAMP 法の成績は一致した。⑥海産魚介類 7 件への TDH⁺*V. p*添加実験において、AP 培地で 37℃5 時間培養した

増菌液の10倍濃縮液をテンプレートに用いると、培養5時間後に全検体が成績陽転した。培養によるLAMP法の成績陽転によって増殖性を有するTDH+*V. p*を検出できることを確認した。

今回検討した高感度なLAMP法は、海産魚介類から増殖性のTDH+*V. p*を検体入手から僅か約8時間（培養5時間）と短期間に検出可能であるため*V. p*食中毒の原因解明につながる有用な検査法と期待される。今後、類似菌が混在する場合のLAMP法の性能確認、及び培養時間の短縮を検討する予定である。

A. 研究目的

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*: *V. p*) 食中毒は全国の細菌性食中毒の発生件数および患者発生数の約1割を占めており、*V. p*はカンピロバクター、サルモネラ属菌に次ぐ重要な食中毒菌である。下痢症患者から分離された*V. p*は我妻培地に発育させると溶血（神奈川現象）を起こす。その本体は耐熱性溶血毒（Thermostable direct hemolysin: TDH）であり、*V. p*の下痢症に強く関連するTDHは病原性を有する*V. p*の最も重要な指標とされている¹⁾。

一方、本食中毒の原因解明を目的とした疫学調査において、食中毒発生の原因解明のために労力と時間を要する培養法により推定原因食品を調べても、TDH産生性の*V. p*を検出することは少なく、原因食品の特定は非常に難しい。

また、TDH遺伝子を指標にした遺伝子診断法であるPCR法を培養法と併用しても、PCR法の感度が十分高いとはいえないため食品中に存在するTDH遺伝子を確実に検出するためには一晩以上の増菌培養が必要である。また、例えTDH遺伝子を検出しても死菌のTDH+*V. p*由来である可能性もあり、当該食品が原因食品であるとは直ちに判断できない問題点もある。

近年、Notomiら²⁾により開発されたloop-mediated isothermal amplification

(LAMP)法は、4種類のプライマーと鎖置換型DNA polymeraseにより、60~65℃付近の恒温で遺伝子増幅反応を行う新しい遺伝子増幅法である。本LAMP法は特異性が高く、また、反応時間が約1時間と迅速である利点がある。さらにLoop primerの追加により増幅効率を上げて微量の標的遺伝子を検出することも可能である。

そこで著者らは、今回、*V. p*食中毒の推定原因食品中に僅かに存在する増殖性を有する生菌TDH+*V. p*を短時間に簡便に検出するために、増菌培養法とTDH遺伝子を標的としたLAMP法とをみ合わせた検査法の確立を目指した。

B. 研究方法

本研究が目指したTDH+*V. p*検出方法のフローを図1に示した。

供試株はTDH+*V. p*である1052A株（血清型O3:K6）を用いた。テンプレート用の菌液は2%食塩加アルカリペプトン（以下AP培地）で37℃、18時間培養後の菌液を2%食塩加（最終濃度）PBS⁻（以下PBS）で段階希釈したものをを用いた。菌数は平板塗抹培養（CFU）法もしくは最確数（MPN）法により求めた。CFUとMPNの相関係数は0.78（n=27）であった。

1 LAMP反応の条件

LAMP反応用のPrimerセット(FIP, BIP,

F3, B3) は岩出らの Primer (未発表) を用い、Loop primer はプライマー設計支援ソフト (Primer Explorer) を用いてそれぞれ 2 組の Loop-F (LF1, LF2) と Loop-B (LB1, LB2) を設計した。Primer は全て HPLC 精製グレードを Sigma 社に委託作成した。TDH 遺伝子検出用試薬は Loopamp DNA 増幅試薬キットの説明書に従い調製した。テンプレートには熱アルカリ抽出物 2 μ L を用いた。LAMP 反応はリアルタイム濁度測定装置 (RT-160C) を用いて 60°C で 100 分まで測定した。

2 Loop primer の検討

テンプレートには 1052A 株培養液の 10^{-4} 段階希釈液を供試した。4 種類のプライマーセット (FIP: 40 pmol, BIP: 40 pmol, F3: 5 pmol, B3: 5 pmol) に対し、Loop-F 及び Loop-B を反応チューブ当たり 0、10、20、30 及び 40 pmol と濃度を変えて等量添加し、LAMP 法による反応の立ち上がり時間を調べた。

3 特異性の検討

PCR 法にて TDH 陽性の *V. p* 15 株 (1052A 株を含む)、TDH 陰性の *V. p* 10 株、及び *V. p* 以外のビブリオ等 16 種の類縁菌 28 株をチューブ当たり 10^4 CFU 加えて LAMP 法を実施した。

4 検出感度の検討

1) 検出限界: テンプレートには 1052A 株培養液の $10^{-3} \sim 10^{-6}$ 段階希釈液に由来する熱アルカリ抽出物 2 μ L を供試した。検出限界の値は、LAMP 法の一般的な判定時間である反応 60 分後において陽性を示す菌数 (MPN/反応チューブ) を基にして求めた。

2) PCR 法との比較: テンプレートには

1052A 株培養液の $10^{-3} \sim 10^{-7}$ 段階希釈液由来の同一の熱アルカリ抽出物 2 μ L を PCR 法と LAMP 法に供試した。陽性となった最高希釈倍率を基にして感度を比較した。PCR 法は Nishibuchi ら³⁾の Primer セットを用いてアニーリング 55°C で 35 回増幅を行った。

5 増菌培養時間の検討

LAMP 法の検出限界を超える菌数への増殖に要する培養時間を調べた。即ち、1052A 株を少数菌量 (0.25CFU/mL) となるように AP 培地 250mL に接種し、37°C で培養 3 時間後及び 5 時間後の菌数を測定した。

6 培養液の氷冷保存の検討

TDH⁺*V. p* の増殖性判定には増菌培養による LAMP 法の成績陽転を指標として行う。そのために、培養開始直前の菌液の氷冷保存可能であるかを調べた。即ち、反応チューブ当たり 800、80 及び 8MPN の 1052A 株を含む PBS を①氷冷保存せずにテンプレートにしたものと、②増菌培養時間に相当する期間氷冷保存してからテンプレートものを測定し、①②間で LAMP 反応の成績の違いを調べた。

7 食品への 1052A 株添加試験

エビ等 7 種類の海産魚介類 7 件を用いた。細切した食品 25g に 15~30CFU の 1052A 株を接種後、225mL の AP 培地を添加してストマッカーで 1 分間粉碎混和後、37°C で、項目 5 において決定した時間増菌培養した。培養開始直前 (培養 0 時間) と培養後に採取した培養液 100 μ L、及び培養液 1mL 由来の遠心残渣 100 μ L (10 倍濃縮液) とをテンプレートにして LAMP 法を行った。

C. 研究結果

1 Loop primer 添加による LAMP 反応時間の短縮効果

図 2 に、Primer セット (FIP, BIP, F3, B3) と Loop primer (LF1, LB1) を添加した場合の反応時間短縮効果を示した。供試した反応チューブ当たりの TDH + *V. p* 量は約 200MPN である。立ち上がり時間は Loop Primer (LF1, LB1) を全く加えない場合が約 56 分であったのに対し、10、20、30 及び 40pmol の LF1 と LB1 を等量ずつ添加すると、立ち上がり時間は無添加に比べ約 2 分の 1 (29~30 分) に短縮された。また、図は示さなかったが、LF2 と LB2 を組み合わせ場合、及び LF1 と LB1 の何れかを添加しない場合のそれぞれの反応時間の短縮効果は LF1 と LB1 の等量添加に比べて小さかった。本結果から、LAMP 反応には Primer セットに Loop Primer (LF1 と LB1 各 20 pmol) を添加することとした。以後の実験では、表 2 に示した Lamp 反応用の Primer セットを用いた。

2 LAMP 反応の特異性

Loop primer を添加した場合の LAMP 法の特異性を調べた (表 2)。PCR 法にて TDH 陽性の *V. p* 15 株は全て LAMP 陽性であったのに対し、TDH 陰性の *V. p* 10 株と *V. p* 以外の 28 株は全株陰性であった。従って、LAMP 法の特異性は非常に高かった。

4 LAMP 反応の感度

1) 検出限界: Loop primer を添加した場合の LAMP 法の検出限界を調べた (図 3)。合計 54 件について反応 60 分後の成績を調べた。反応チューブ当り TDH + *V. p* 菌数が 1 MPN 未満 (0.04~0.9 MPN) の場合は 15 件中 4 件が陽性 (うち、0.4 MPN [95%信頼限

界: 下限 0.1 MPN、上限 1.6 MPN、以下数値のみ順に記載] 2 件、0.8 MPN [0.2、3.1] 1 件、0.9 MPN [0.2、3.3] 1 件) であった。1~2 MPN の場合は 6 件中 4 件が陽性であった。3~4 MPN の場合は 5 件中 4 件が陽性を示し、反応 60 分後に陰性であった残り 1 件は 67 分後に陽性となった。また、8~9 MPN の 3 件及び 10 MPN 以上 (18~400 MPN) の 25 件は全て陽性を示した。以上から、LAMP 法の感度は判定時間を 60 分とした場合には反応チューブ当り 8 MPN と判断された。これは増菌培養液中の菌数に換算すると約 10^4 MPN / mL に相当した。

2) PCR 法との比較: 1052A 株培養液の $10^{-3} \sim 10^{-7}$ 段階希釈液に由来するテンプレートを用いて LAMP 法と PCR 法の感度を比較した (図 4)。LAMP 法では 10^{-5} (1.5MPN/反応チューブ) まで陽性であったものが、PCR 法での陽性は 10^{-2} までに留まった。実験を繰り返すと 10^{-5} の場合にも LAMP 陰性例があったので、LAMP 法の感度は PCR 法に比べ 100~1,000 倍高いと推定された。

5 増菌培養時間の検討

図 5 に、増菌培養液中の TDH + *V. p* の増殖性を示した。AP 培地中に 0.25CFU/mL 接種 (検体 1g 当たりに換算すると 2.5 CFU / g) した 1052A 株は、培養 3 時間後では約 5.2×10^3 CFU/mL に増加し、培養 5 時間後には 1.5×10^6 CFU/mL に増加した。僅かな菌数の TDH + *V. p* が培養液中に存在していても培養 5 時間で LAMP 法の検出限界 (約 10^4 MPN/mL) を超えた。

6 培養液の氷冷保存の検討

表 2 に、1052A 株の培養液を増菌時間に相当する時間 (5 時間) 氷冷保存し LAMP 反

応を行った場合と、氷冷保存せずに直ちに LAMP 反応を行った場合との成績を示した。反応チューブ当たり 0.8MPN では氷冷の有無によらず LAMP 陰性であった。また、8、80 及び 800 MPN の場合には、立ち上がり時間は 8 及び 80 MPN では氷冷が無氷冷に比べて 3 分程度長かったものの全てにおいて LAMP 陽性であり、氷冷の有無によらず成績は一致していた。

7 食品への 1052A 株添加試験

表 3 に添加試験の結果を示した。培養 0 時間では供試した 7 検体全てが LAMP 陰性であったのに対し、培養 5 時間後では、培養液 100 μ L に由来するテンプレートを用いた場合は 7 検体中 6 検体が陽性（反応チューブ当りの菌数：陽性 6 例は 4~19 MPN、陰性 1 例は 4 MPN）であった。一方、培養液 1mL 由来の 10 倍濃縮テンプレートでは 7 検体全てが陽性（40~190 MPN/反応チューブ）となった。

D. 考 察

図 6 に、本研究の検討から作成した増殖性を有する TDH⁺*V. p* 検出方法のフローを示した。

海産魚介類等の食中毒推定食品中に含まれる TDH⁺*V. p* の存在を従来の PCR 法で調べる場合は 8 時間程度の増菌培養が必要であり、電気泳動や染色作業を含めると 2 日間の検査期間を要する。一方、今回検討した PCR 法よりは 100~1,000 倍感度の高い LAMP 法は、TDH 遺伝子を培養 5 時間、検体処理及び試薬調製を含めると検体入手から約 8 時間と一日以内に検出可能である。さらに、培養開始直前を氷冷保存し、培養 5 時間後

の増菌培養液とを同時に検査した場合の LAMP 法の成績陽転を指標にすることにより、食品から検出された TDH 遺伝子が増殖性を有する TDH⁺*V. p* に由来するものか否かの情報を得ることもできる。

以上から、本 LAMP 法は *V. p* 食中毒の推定原因食品中に僅かに存在する増殖性を有する生菌 TDH⁺*V. p* を短時間に簡便に検出できるので *V. p* 食中毒の原因解明につながる有用な検査法と期待される。

今後、引き続き精度を検討すると共に、*V. p* とは異なる菌種や TDH⁻*V. p* が TDH⁺*V. p* と混在する場合の LAMP 法の性能確認、さらには培養時間の短縮を検討する予定である。

E. まとめ

①Primer セットと Loop primer を組み合わせることにより LAMP 反応の立ち上がり時間を約 2 分の 1 に短縮した。

② LAMP 法の特異性は高く、TDH⁺*V. p* (15 株) は全株 LAMP 陽性に対し、TDH⁻*V. p* (10 株) 及び *V. p* 類縁菌 (28 株) は全株 LAMP 陰性であった。

③LAMP 法の感度を TDH⁺*V. p* 菌数で表すと、反応チューブ当たり 8 MPN (増菌液中約 10⁴ MPN/mL 相当) であった。従来の PCR 法と比較するとその感度は 100~1,000 倍高かった。

④培養液に TDH⁺*V. p* を少数菌数 (0.25CFU/mL) 接種した場合は、5 時間増菌培養を行うことで LAMP 法の検出限界 (約 10⁴ MPN/mL) を超えた。

⑤増菌液を氷冷保存なしに直ちに反応を行った場合と増菌時間に相当する 5 時間氷冷保存した場合とで、LAMP 法の成績は一致し

ていた。

⑥海産魚介類7検体の細切検体25gにTDH⁺*V. p*を接種後、培養5時間後の培養液1mL由来の遠心残渣100 μ L(10倍濃縮液)をテンプレートにしたところ、全検体が陽性となった。また同検体は、培養0時間では陰性であったことから、培養時間の差によるLAMP反応の成績陽転によりTDH⁺*V. p*の増殖性を確認できた。

F. 文献

1. Honda T. and Iida T. :The pathogenesis of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysin. Rev. Med. Microbiol.1993; 4:106-113.
2. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., and Hase T. : Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000; 28: e63.
3. Nishibuchi, M., Kaper, J.B. : Minireview, Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect. Immun. 1995; 63: 2093-2099.

G. 学会発表

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。2007.11.21.

H. 論文

なし

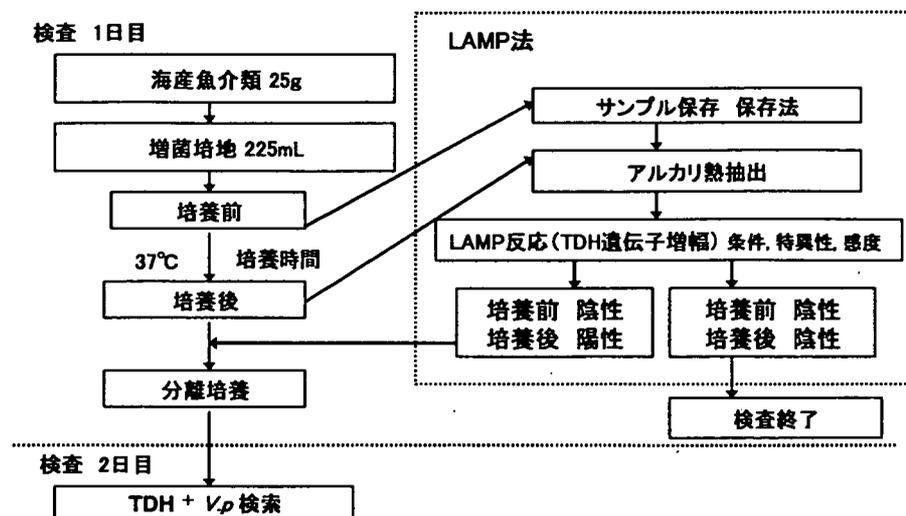


図1 増殖性を有する TDH + *V. p* 検出方法のフロー (計画)

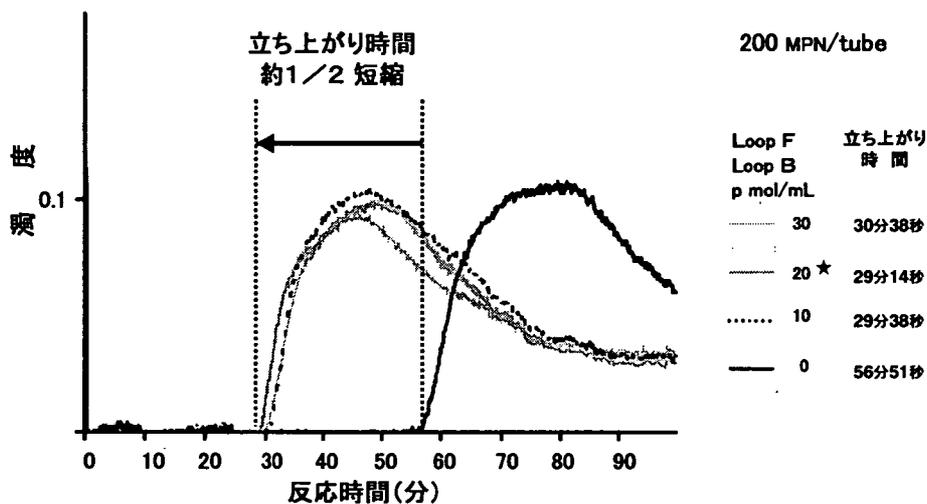


図2 Loop primer 添加による LAMP 反応時間の短縮効果

表1 LAMP 反应用の Primer セット

名称	添加量 /tube	塩基数	塩基配列
F3 2005-75	40 pmol	18	5' CAATGCACCGGTCAATGT 3'
B3 2005-75	40 pmol	19	5' ACGAACACAGCAGAATGAC 3'
FIP 2005-4	5 pmol	44	5' CTGACGTTGTGAATACTGATTGACC- GGTCTCTGACTTTTGGACA 3'
BIP 2005-75	5 pmol	40	5' ATGGCTGACATCCTACATGACT- TGCTTATAGCCAGACACC 3'
Loop-F	20 pmol	15	5' TGGCATGTTTCTACA 3'
Loop-B	20 pmol	19	5' AAGACTATACAATGGCAGC 3'

TDH2 ACCESSION No. X54341

表2 LAMP 反応の特異性

菌数: 10⁴CFU/tube

菌種	供試株数		LAMP 陽性株数	
	<i>tdh</i> +	<i>trh</i> -		
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i> +	<i>trh</i> -	6	6 (100%)
	<i>tdh</i> +	<i>trh</i> +	9	9 (100%)
	<i>tdh</i> -	<i>trh</i> +	5	0 (0%)
	<i>tdh</i> -	<i>trh</i> -	5	0 (0%)
<i>V. alginolyticus</i>			6	0 (0%)
<i>V. cholerae</i> non-O1			2	0 (0%)
<i>V. mimicus</i>			1	0 (0%)
<i>V. fluvialis</i>			6	0 (0%)
<i>V. furnissii</i>			2	0 (0%)
<i>V. vulnificus</i>			2	0 (0%)
<i>V. holisae</i>			1	0 (0%)
<i>V. metschnikovii</i>			1	0 (0%)
<i>V. costicola</i>			1	0 (0%)
<i>V. cincinnatiensis</i>			1	0 (0%)
<i>Listonella anguillarum</i>			1	0 (0%)
<i>Photobacterium damsela</i>			1	0 (0%)
<i>Aeromonas hydrophila</i>			1	0 (0%)
<i>Aeromonas sobria</i>			1	0 (0%)
<i>Aeromonas caviae</i>			1	0 (0%)
<i>Plesiomonas shigelloides</i>			1	0 (0%)

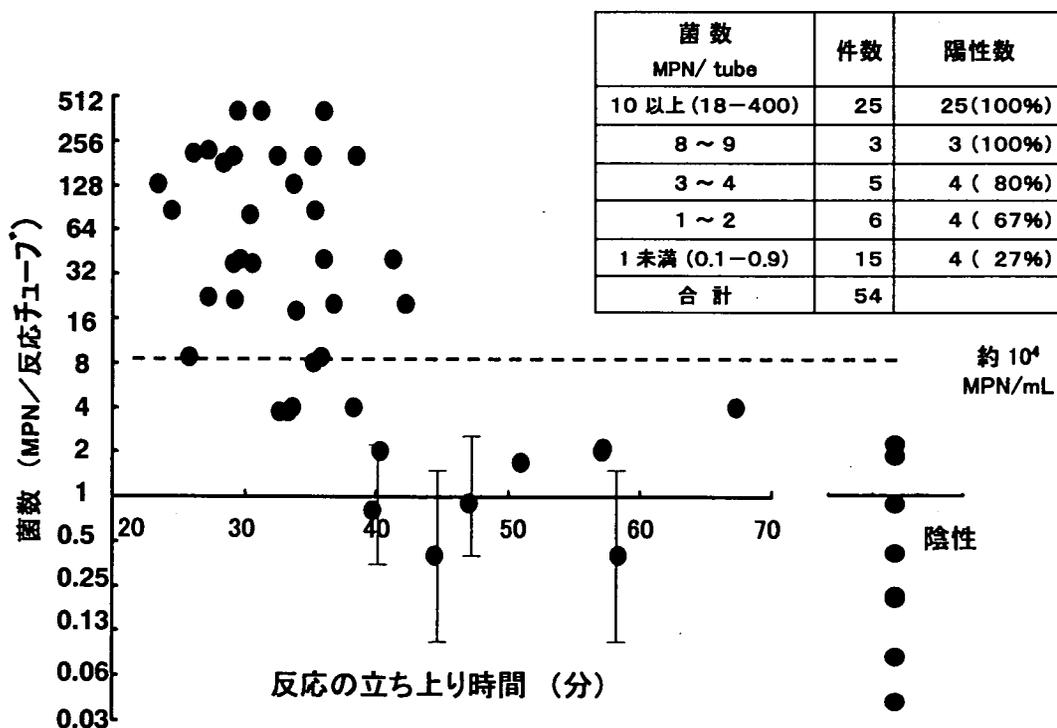


図3 Loop primer を添加した場合の LAMP 法の検出限界

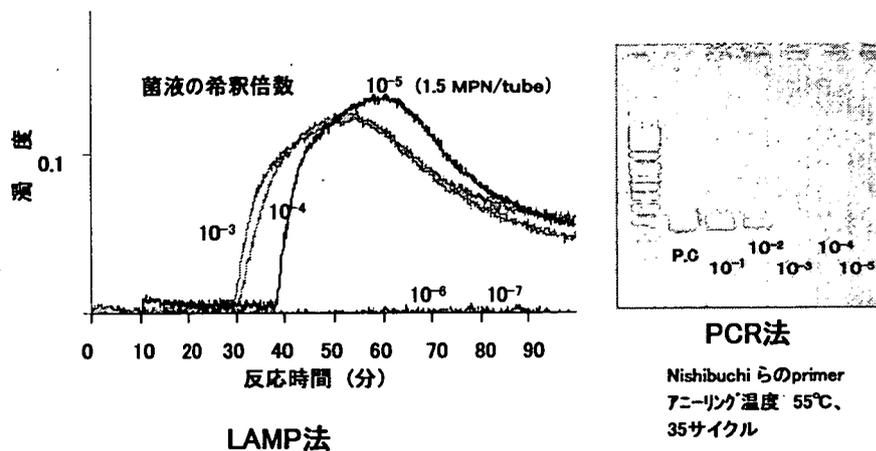


図4 LAMP法とPCR法の感度の比較

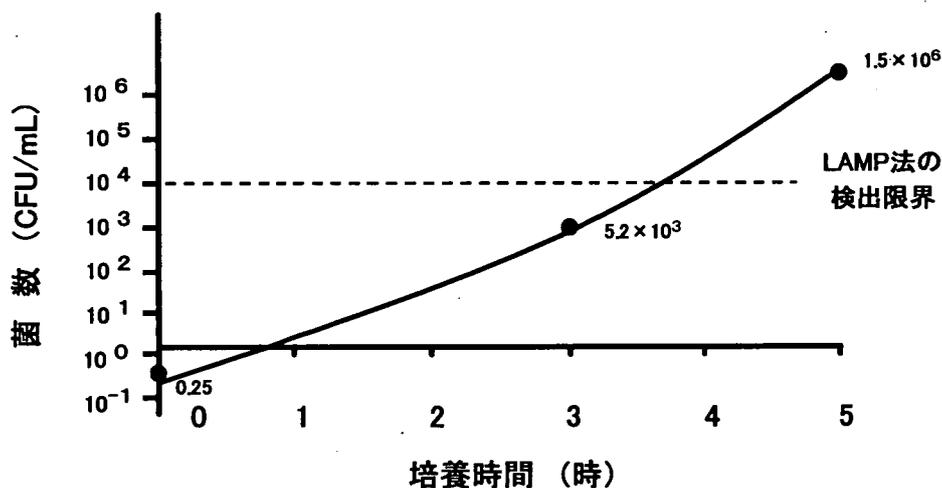


図5 増菌培養液中のTDH⁺V.pの増殖性

表3 培養液の氷冷保存の検討

氷冷保存時間	LAMP法 判定(反応の立ち上り時間)			
	800 MPN/tube	80 MPN/tube	8 MPN/tube	0.8 MPN/tube
0時間	陽性 (22分59秒)	陽性 (32分28秒)	陽性 (37分59秒)	陰性
5時間	陽性 (22分28秒)	陽性 (35分47秒)	陽性 (40分54秒)	陰性

表4 食品への1052A株添加試験

検体	菌数		LAMP (原液)				LAMP (10倍濃縮液)			
	0時間	5時間	0時間	5時間			0時間	5時間		
	CFU/25g	MPN/25g	判定	判定	MPN/tube	立ち上り時間	判定	判定	MPN/tube	立ち上り時間
マグロ	28	1.0×10^7	-	+	40	28分14秒	-	+	400	25分03秒
タラバガニ	19	6.0×10^6	-	+	22	37分47秒	-	+	220	26分06秒
ホタテ貝柱	28	5.3×10^6	-	+	19	36分39秒	-	+	190	33分21秒
ブラックタイガー	15	2.3×10^6	-	+	8.6	34分08秒	-	+	86	33分57秒
スルメイカ	19	2.3×10^6	-	+	8.6	32分38秒	-	+	86	27分23秒
生カキ	30	1.0×10^6	-	+	4.0	35分47秒	-	+	40	28分25秒
大正エビ	15	1.1×10^6	-	-	4.0	-	-	+	40	28分28秒

注 接種菌数

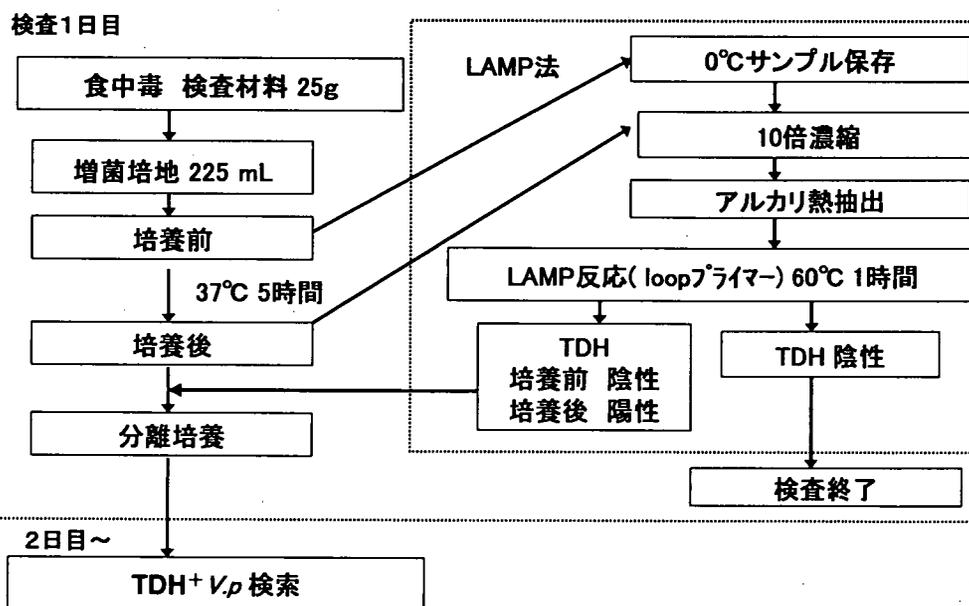


図6 増殖性を有するTDH⁺V.p検出方法のフロー

平成 19 年度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）
分担研究報告書

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

分担研究項目 食品由来ウイルスの抽出法および検査法の検討と評価

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 准教授

研究要旨

ノロウイルス食中毒事件において多種類の原因食品が報告されているが、原因食品からのウイルスの検出の報告は殆どされていない。食品から簡便迅速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食品からのウイルスの抽出法を検討した。食品けん濁液の作製方法はストマッカーによるけん濁が有効であると考えられたが、食品の粉碎による濃縮効率への影響が認められた。けん濁液からのウイルス濃縮法は遠心式限外ろ過法が有効であると考えられた。

A. 研究目的

病原微生物検出情報（Vol.28 p 282 - 283:2007 年 10 月号）によると、2006/2007 シーズン（2006 年 7 月~2007 年 6 月）には例年の約 1.7 倍の 474 事例のノロウイルス食中毒事例が発生し、患者数は約 2.7 倍の 28,271 人であったことが報告されている。これらの事例の疫学的調査等から原因食品は「施設提供食品」が最も多く（154 件、33%）、弁当、会席料理、宴会料理、会食料理等の複合食品が多数を占めており、カキの事例は 11 件であった。その他の食品では、寿司、パン・サンドイッチ、刺身などが原因食品として報告されている。カキ以外の食品では調理行程あるいは配膳過程において食品取扱者からの直接的・間接的な二次汚染が原因と考えられている。しかしながら、食品へのノロウイルス汚染が

極少量であると考えられる事や食品からの適当なウイルス抽出方法の報告が無い事などから、これら推定原因食品からノロウイルスの検出報告は殆ど認められない。食品からのノロウイルス検出法は、「ノロウイルスの検出法（食安監発 1105001 号）」に貝類(カキ)の処理方法が記載されており、また「他の食品においても基本的にこの方法に準じて行える」とされており、食品からのノロウイルスの抽出にはこの方法を用いて行われ、リアルタイム PCR 法で検出している。現在、ノロウイルスの検出法としてリアルタイム PCR 法が特異性および感度の点で最も優れていると考えられるため、上記告示法の「食品からのウイルスの抽出法および濃縮法」の検討が必要であると考えられる。

ノロウイルス食中毒の原因となる食品は

多種類にわたり、食品の種類に応じて検出方法の検討が必要である事、ウイルスの抽出が煩雑で超遠心機等の高価な機器が必要である事を踏まえて、食品からの簡便迅速なウイルス抽出法について検討した。

B. 材料と方法

1) 供試ウイルス

ネコカリシウイルス（カリシウイルス科ベジウイルス属、FCV）F9 株を ATCC より購入し用いた。

2) 細胞株

CRFK 細胞（ネコ腎臓細胞）はダルベッコ変法 MEM(DMEM)にウシ胎児血清（FBS）を 10%加えたものを使用し培養・増殖させた。

3) ウイルス浮遊液の調整

培養用フラスコ内に CRFK 細胞を単層培養した後、増殖用培地を除去し、ネコカリシウイルスを接種し、37℃で 1 時間吸着させた後、接種液を除去し、1%FBS 加 DMEM を加えて 37℃の炭酸ガスインキュベーター (CO₂: 5%) 内で 5 日間培養した。顕微鏡下で細胞変性が起こっていることを確認した後、培養液を 2 回凍結融解後 3,000 rpm 10 分間遠心し、上清をさらに 10,000 rpm 20 分間冷却遠心した上清を粗精製ウイルス液として回収した。

粗精製ウイルス液を 35,000 rpm 120 分間冷却遠心し、沈渣を 1/100 容の滅菌精製水に再浮遊しウイルス浮遊液とした。

4) ショ糖重層遠心濃縮法

粗精製ウイルス液を 30%ショ糖溶液に重層し 35,000 rpm 150 分間冷却遠心し、沈渣を 1/100 容の滅菌精製水に再浮遊しウ

イルス濃縮液とした。

5) ポリエチレングリコール 6000 による濃縮法

粗精製ウイルス液に最終濃度 8.0%ポリエチレングリコール 6000、0.35M NaCl になるように添加し、室温で 2 時間攪拌後、10,000 rpm 20 分間冷却遠心し上清を除去後沈渣を 1/100 容の滅菌精製水に再浮遊しウイルス濃縮液とした。

6) ウイルス感染価の測定

被験液中のウイルス感染価は、1%FBS 加 DMEM にて 10 倍段階希釈した各希釈液 0.1ml を 96 穴マイクロプレートに単層培養された CRFK 細胞 4 穴ずつに接種し、37℃の炭酸ガスインキュベーター内で 5 日間培養し、顕微鏡下で細胞変性の有無を確認し、細胞の 50%を感染させる被験ウイルス液の希釈度（50%組織培養感染量：TCID₅₀/0.1ml）を算出してウイルス感染価とした。TCID₅₀は Reed-Muench 法により算出した。

7) 添加・回収試験方法

ウイルス浮遊液を約 10⁶TCID₅₀/0.1ml になるように調整後、10 μl を 2.5g の市販惣菜に数箇所に分けて塗付し安全キャビネット内で風乾した。惣菜に 22.5ml（9 倍容）の抽出液を加え振盪・攪拌しけん濁液とし、ウイルスを再浮遊させた後 3,000r/m、10 分間遠心し、上清 20ml をセルストレーナー（70 μm、Falcon）のフィルターでろ過後、アミコンウルトラ 15（100K）を用いて 4000g にて遠心し、最終容量 0.2ml に濃縮した。濃縮液の CRFK 細胞に対するウイルス感染価を測定し回収率を求めた。