

200837011A

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 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小崎 俊司

平成 21 年 3 月

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 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小崎 俊司

平成 21 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. 毒素型食中毒の迅速検査法の開発と評価	15
わが国で発生したB型乳児ボツリヌス症分離株の遺伝学的解析-	
小崎 俊司、幸田 知子、梅田 薫	
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	21
浅尾 努、河合 高生、久米田 裕子、小笠原 準、木村 凡、山田 和子、井上 由和、 黒瀬 直孝	
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精度評価に関する検討	53
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	67
宮本 敬久、本城 賢一、李 睿、原田 天章	
5. カチオン系磁気ビーズを用いたウイルスの迅速検出法の検討	85
五十君 静信、野田 衛	
6. 培養法・非培養法・ハイブリッド法による迅速法の開発	93
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	103
甲斐 明美、下島 優香子、尾畑 浩魅、小西 典子、上原 さとみ、門間 千枝	
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	117
荒川 英二、宮原 美知子、磯部 順子、緒方 喜久代、山崎 貢、山崎 渉、米北 太郎	
9. 食品由来ウイルスの抽出法および検出法の検討と評価	161
勢戸 祥介、入谷 展弘	
10. 細菌を利用したノロウイルス検査用検体処理方法の検討	173
仲真 晶子、秋場 哲哉、林 志直、森 功次、永野 美由紀	
III. 研究成果の刊行に関する一覧	179
IV. 研究成果の刊行物・別刷	181

I. 総括研究報告

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

研究代表者 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

食中毒の危害要因となる病原微生物の検出は、主として食中毒患者あるいは原因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、特定された病原体あるいは毒素などにより行政的な措置をとることに主眼がおかれている。しかし、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における汚染指標細菌や食中毒菌（あるいは毒素）の検出が重要な課題となっている。通常、製造工程で生産される食品は、当然ながら汚染度は低く、このため検査に適した方法は高感度、迅速であることが必要であり、さらに日常的に検査が行われるため、使用される方法においては専門知識を必要とせず、また一定の安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するために、より実用的な条件で検討を加えた。迅速検査を行う必要性の高い腸炎ブドウ球菌については、リアルタイム PCR 法による検出と生菌・死菌を Ethidium Monoazide 処理により選別する方法を検討した。毒素型食中毒菌では最近増加しつつある乳児ボツリヌス症由来菌の特性を調べ、わが国で分離される特徴のある株の検出方法を確立した。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。とくに、培養が困難なノロウイルスについて

は種々の添加・回収実験から検出方法の阻害要因および検出感度について重要な知見を提示した。

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 敏久 九州大学大学院農学研究院
教授
松岡 秀明 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 部長
荒川 英二 国立感染症研究所細菌第一部
主任研究員
五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所 食
品管理部 室長
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
仲真 晶子 東京都健康安全研究センター
微生物部 科長

研究協力者

幸田 知子 大阪府立大学大学院生命環境
科学研究科
梅田 薫 大阪市立環境科学研究所
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
入谷 展弘 大阪市立環境科学研究所
山田 和子 生活品質科学研究所
井上 由和 生活品質科学研究所
黒瀬 直孝 生活品質科学研究所
高橋 肇 東京海洋大学
本城 賢一 九州大学大学院農学研究院
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
野田 衛 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
上原 さとみ 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
秋場 哲哉 東京都健康安全研究センター
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
永野 美由紀 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. 生菌数および汚染指標細菌等の簡易迅速試験法の検討

動物糞便から抽出した菌を食品内に接種し、バイオシータ社の食品細菌検査装置 DOX-30F (DOX) とピオメリュー社の自動生菌数測定装置 TEMPO (テンポ) を用いた細菌数の測定を、従来から実施されている平板培養法による汚染指標菌の試験法と比較検討した。テンポについては、総菜および生鮮食品を用いて調べた。

2. 一般生菌数や汚染指標細菌の迅速法の精度評価に関する検討

国際的には、各種の迅速法は定められた指針に従って妥当性を確認することで、そのような迅速法の適切な利用を促し、食品の安全・衛生管理の高度化に活かされている。しかし本邦においてはそのような指針は存在せず、ユーザーへの適切な情報提供という観点からも望まれるところである。生菌数迅速測定法の評価指針の策定に必要な各種事項について検討した。過去2年の研究成果より、既存の評価指針には過度に厳密となる点が判明している。そこで、本年度はA迅速法に加えて新たにB迅速法、C迅速法によるデータを収集し、これらの有用性を確かめた。これらが十分な有用性を持つと判断されたため、そのデータを用いて考察を行い、過

度な厳密性を排除した、本邦における迅速法評価指針の案を考案した。

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リアルタイムPCR法の有用性について検討した。まず腸炎ビブリオを特異的に検出するために、*tlh*を標的とした2種類のTaqMan PCR法を検討した。遺伝子検出では、死菌の遺伝子も検出してしまう大きな問題点がある。そこで死菌の細胞壁を通過して遺伝子を切断するが、生菌は通過しないEthidium Monoazide (EMA)を用いて、生菌の遺伝子のみを検出する方法について検討した。ヒト由来株V89-056株、及び食品由来株V07-058株の生菌と加熱死菌 $10^7 \sim 10^8$ cfu/mlの段階希釈液を試料として、EMA処理をした場合のPCR及びリアルタイムPCRによる検出について検討した。

4. 遺伝学的迅速検出法の評価

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。89株の腸管出血性大腸菌O157をベロ毒素遺伝子型により分類し、その毒素産生性と、タカラバイオ社などの遺伝子診断キットによる検出率との相関を調べた。また、これまで得られた遺伝子解析の結果をもとに腸管出血性大腸菌O157については市販のものより毒素産生性との一致率の高いベロ毒素遺伝子1型、2型およびO157血清型決定因子遺伝子のマルチプレックスPCR検出用新規プライマーセットの有用性について検討した。さらに *L. monocytogenes* (LM) Mについても擬陽性の少ない新規PCR検出用プライマーセットの開発を目指した。

5. 毒素型食中毒菌の免疫学的検出法の開発

乳児ボツリヌス症は、生後1年未満の乳児が芽胞を摂取し、腸管内で発芽、増殖することにより産生された毒素を吸収して発症する疾患である。主に第I群に属するボツリヌスA型菌およびB型菌によって引き起こされる。I群B型菌は産生する毒素の毒力および抗原性によって主に2つのsubtype (B1およびB2) に分類されることが報告されている。わが国で1995年に発生したB型乳児ボツリヌス症由来株の毒素型はsubtype B2であった。本研究では、最近相次いで発生した2事例のB型乳児ボツリヌス症分離株について毒素遺伝子の分子系統解析およびPFGE型別を実施した。またMultiplex-PCR法によるB型毒素遺伝子subtyping法を検討した。

6. 迅速法に適した検体処理方法の検討

増菌または濃縮による菌数確保などの迅速検査法に適した検体処理について情報収集を行い、食品検体から、当該微生物を濃縮により菌数確保する手法について検討した。この中から実用性が高く論文的にも報告のある方法として、免疫磁気ビーズ法の応用型である循環型濃縮システムについて、抗体を用いる手法とは菌体の捕集様式の異なる陽イオン吸着型磁気ビーズについて検討を行った。患者由来ノロウイルスGII/4を用いて、循環式濃縮装置(ブライムテック社製、Pathatrix)およびカチオン系ビーズ(ブライムテック社)を用いた濃縮法を検討した。特に、反応時間、反応液の組成(緩衝液の種類、NaCl濃度)による回収率の影響を調べた。ウイルスの回収率は、リアルタイムPCR法によるRNA定量値で求めた。培養行わずに直接牡蠣からの腸炎ビブリオ検出分離法では、定性的分離に留

まっていたが、本年度はその点に焦点を絞り、分離の定量性について詳しく調べた。自動化を目指し開発を進めてきた密度勾配層回収装置については、昨年度試作した装置を改良し、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、細菌の生物活性を利用した検体処理方法を考案した。

C. 研究結果

ウシおよびブタ糞便から抽出した菌液の食品への接種試験を行い、それぞれの食品試料液中の一般生菌、大腸菌群、大腸菌、*Enterobacteriaceae* (仮約: 腸内細菌科菌群) 数を、DOXおよびテンボと従来法とで比較検討した。糞便菌液を直接測定したときと同様に食品への接種試験においても、DOXおよびテンボで測定した菌数と、平板培養法で測定した菌数との間には高い相関関係があることがわかった。テンボについては自然汚染食品を用いた平板培養法との比較試験も実施し、テンボによる菌数測定法は平板培養法と同等の性能を有すると考えられた。

現存する精度評価基準にはそれぞれ特性がある。方法の精度評価の精確性に関してはAOAC基準が最も厳密であるが、微生物検査の迅速法への適用時には過度に厳密である。ISO16140

はAOAC基準と比較すると微生物検査の目的に合うように検討されており、実用的である。生菌数測定においては、精度と迅速性はトレードオフの関係となりやすい。また実使用状況を鑑みると対数の世界である微生物数計測において1桁の誤差は大きな問題とはならないことが多い (CCFRA guideline #29, Guidelines for establishing the suitability of food microbiology methods, Campden guideline, Campden company, 2001)。その上で今回検討した迅速法3種類のデータセットを考察すると、いずれも実用充分に良好な結果と言える。鮮魚というやや難しい検体(低温あるいは好塩性の細菌が存在する)であるためA社迅速法においては若干の精度の不良が見られるが、概ね良好である。これらの迅速法は、培養と原理を同一にする手法ではなく、迅速性に主眼を置いており、迅速性と精度のバランスを鑑みるとその有用性が認められて然るべきと考えられる。そこで、現存の妥当性確認基準のような厳密な評価指針と同時に、実用レベルの迅速法の価値を正當に評価する基準の存在は有用と考えられ、本研究で考察した素案は迅速法により収集したデータセットを用いた精度評価に関する部分のみであり、その他の項目についてはさらに検討を行うことでより良い迅速法評価指針の策定に資すると考えられた。

食品からの腸炎ビブリオ簡便・迅速検出法の確立を目的として、遺伝子学的手法を導入するために、*tlh*を標的とした2種類のTaqMan PCR法を検討した。ヒト由来のV89-056株、及びV89-655株の培養液を段階希釈した試料を用いて検討した結果、いずれ方法でも 10^3 cfu/mlまで検出することができた。インターナルコン

トロール(IC); TaqMan Exogenous Internal Positiime Control Reagents (ABI)を加えても同様に検出することができた。生カキの2%食塩加APW培養液に、V89-056株の段階希釈液を接種して検討した結果、 $10^3 \sim 10^4$ cfu/mlまで検出することができた。ICを加えても同様であった。しかし、各培養液を平板に分離して、添加したV89-056株の分離を試みたが、他ビブリオ属菌が多く 10^4 cfu/mlより低濃度では当該菌の検出は出来なかった。以上の結果から、食品からの腸炎ビブリオ検出の際に、食品培養液をリアルタイムPCRでスクリーニングすることは有用であることが示唆された。遺伝子検出では、死菌の遺伝子も検出してしまいう大きな問題点があるため、死菌の細胞壁を通過して遺伝子を切断するが、生菌は通過しないEthidium Monoazide (EMA)を用いて、生菌の遺伝子のみを検出する方法について検討した。*toxR*を標的とするPCR(Kim YB *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* 37, 1173-7)では、生菌、加熱死菌いずれも 10^4 cfu/mlまで検出された。一方、EMA処理後では、生菌は検出に変化がなかったが、加熱死菌はいずれの濃度でも検出されなくなった。リアルタイムPCR (Davis CR *et al.*, *J. Food Prot.* 67: 1005-8, 2004.)での定量では、加熱死菌はEMA処理後 10^2 cfu/ml程度少なく定量されたが、生菌は影響を受けなかった。これらの結果より、食品培養液の遺伝子検出の際、EMA処理により死菌のDNAを破壊し影響をなくすか減少することが可能であることが示唆された。

89株の腸管出血性大腸菌O157をベロ毒素遺伝子型により分類し、その毒素産生性と、タカラバイオ社の遺伝子診断キットによる検出率との相関を調べた結果、偽陰性は無かったが、毒素産生性との一致率は87%であった。また、*L. monocytogenes* (LM)についてはmulti locus

sequence typing (MLST) 型の異なる 57 株についての試験結果、タカラバイオ社および ABI 社の遺伝子診断キットでは偽陰性はなかったが、LM 以外のリステリア属細菌の検出率が高かった。50 検体の食肉検査においてタカラバイオ社および ABI 社のサルモネラ検出キットによる結果を標準法(培養法)と比較した結果、ABI 社のキットでは少数だが擬陽性が認められた。これらの遺伝子解析の結果をもとに腸管出血性大腸菌 O157 については市販のものより毒素産生性との一致率の高いベロ毒素遺伝子 1 型、2 型および O157 血清型決定因子遺伝子のマルチプレックス PCR 検出用新規プライマーセットを開発した。LM についても擬陽性の少ない新規 PCR 検出用プライマーセットを開発した。

乳児ボツリヌス症 B 型分離株 (111 株、Osaka05 株、Osaka06 株) の持つ神経毒素遺伝子とこれまでデータベースに登録されている毒素遺伝子塩基配列を分子系統解析したところ、B 型毒素遺伝子は 3 つのクラスター (subtype B1, B2 および Osaka05) に分類された。Osaka06 株毒素遺伝子は、111 株と同じく subtype B2 に分類された。Osaka05 株毒素遺伝子は B1 および B2 のどちらにも属さない新たな subtype に分類された。Osaka05 株、111 株 (B2) の無毒成分遺伝子 (*ha70*, *ha17*, *ha33*, *p21*, *ntnh*) 塩基配列を決定し、Okra 株 (B1) (Genebank accession No. AB232927) と比較した。各遺伝子における 3 つの subtype 間の相同性は 83~99% であった。他の遺伝子と比較して *ha33* 遺伝子の相同性が低かった。各 B 型毒素 subtype (B1, B2 および Osaka05) の遺伝子を識別する Multiplex-PCR 法を検討した。PCR には 4 種類の混合プライマーを用いた。Okra 株、111 株、Osaka05 株を用いて PCR を実施した結果、

それぞれの subtype に特異的なフラグメントが増幅された。その他の供試菌株においても、PCR の結果それぞれ毒素遺伝子の系統解析から決定した subtype に特異的なフラグメントの増幅を確認することができた。

Enterobacter sakazaki について陽イオン吸着磁気ビーズを応用した循環型濃縮システムを検討した。陽イオン吸着磁気ビーズを用いた循環型濃縮システム法では最大 5% の捕集効率が観察されたが、そのまま培養法と比較できるほどの高い捕集率は得られなかった。この方法は、培養が出来ない試験法の濃縮に有効と思われ、これにより理論的には、10 倍以上の感度の上昇が期待できるものと思われた。食品無添加時のカチオン系ビーズを用いた循環式濃縮装置でのノロウイルスの回収率は平均 0.38% で、極めて低い値であった。そこで、回収率を向上させるために、カチオン系ビーズとウイルスとの結合が最適化する条件を探索した結果、ビーズとウイルスとの結合力は、反応時間および反応液の組成に影響をうけることが明らかになった。特に、一般に用いられる PBS(-) での結合率 (回収率) は 20% 以下であったが、反応液を改良することで 99% 以上の結合率を示し、回収率は大幅に上昇した。また、循環式濃縮装置は使用せず、試験管等で反応させる方法の回収率が高かった。

腸炎ビブリオの直接分離法の定量性について詳しく調べた。その結果、菌数確認で基準とした培養法自体の定量性に問題があることが判明した。また、腸炎ビブリオは、分離操作に伴う各種ストレスに弱いことも明らかとなった。したがって、直接分離法の適用に際しては、菌の性質を十分考慮して分離操作条件を精密

に調節することが肝要との結論を得た。一方、自動化を目指し開発を進めてきた密度勾配層回収装置については、昨年度試作した装置を改良し、自動装置としての性能を確認した。

食品からのウイルス迅速検出法の確立を目的として、カチオン系磁気ビーズ(ビーズ)によるノロウイルス(NV)の濃縮法を検討した。食品非存在下で試験管法を用いてビーズによるウイルス粒子の捕捉率を調べた結果、捕捉率は反応液の組成に影響を受け、0.01M~0.05MのGlycineあるいは0.01M Tris緩衝液に0.15MのNaClを加えた反応液を用いることにより、95%以上のウイルス粒子が回収された。捕捉量は経時的に増加し、十分な捕捉量を得るためには少なくとも30分間の反応時間が必要であった。このことから、試験管法によりビーズを用いてNVを効率よく濃縮できることが示された。ウイルスの回収を阻害する物質の除去方法として細菌の生物活性を利用した検体処理法を考案し、カキ乳剤を用いたノロウイルス添加回収実験を行った。厚生労働省通知による手法で得られた回収率の平均は、添加したノロウイルス GI /8、GII /4とも0.2%であったのに対し、*Proteus vulgaris* NBRC 3045を用いてカキ乳剤を処理した場合にはそれぞれ45.9%、21.3%に向上した。また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回収実験を行い、各種溶出液および溶出方法を検討した。ウイルス添加・回収実験の結果、溶出液には1%牛肉エキス加あるいは不含Tris-Glycine buffer (pH 9.5)および溶出方法は超音波処理法(15 min)の組み合わせが

優れていると考えられた(濃縮方法には遠心式限外ろ過法を用いた)。これらの方法を用いた検査法の食品(2.5 g)からのウイルス検出限界は20~200個程度と考えられた。

D. 考察

ウシおよびブタ糞便から抽出した菌液の牛乳、牛肉10倍乳剤への接種試験を行い、テンポによる菌数測定法と平板培養法による菌数測定法を比較した。生菌数、大腸菌群数、大腸菌数および腸内細菌科菌群数のいずれの場合においても、テンポ法と平板培養法で測定した菌数の R^2 値は0.929~0.989の範囲を示し、テンポ法と平板培養法で測定した菌数には高い相関性があることがわかった。接種試験における R^2 値は、昨年度実施したウシおよびブタの糞便菌液を用いてのテンポ法と平板培養法との比較試験で得られた R^2 値(0.964~0.986)とほぼ同一であった。以上の結果、テンポ法は種々の汚染指標菌が混在した牛乳や牛肉10倍乳剤から従来法と高い相関性をもって確実に対象とする汚染指標菌数を測定できると考えられた。市販惣菜および生鮮食品の自然汚染食品を用いた試験では、テンポ法と平板培養法で測定した生菌数、大腸菌群数、腸内細菌科菌群数の一致率はそれぞれ97.5%、96.4%、100%であった。一致率がいずれも95%以上を示したことから、Campdenの評価基準により、テンポ法は平板培養法と同等の性能を有すると考えられた。また接種試験における生菌数、大腸菌群数とDOXによる検出時間の R^2 値は、ブタ糞便菌液を接種した食品中の大腸菌群数の測定を除いたすべての場合で、0.935以上であった。従ってDOXは種々の汚染指標菌が混在した牛乳や牛肉10倍乳剤から従来法と高い相関性をもって生菌数と大腸菌群数を測定できると考

えられた。これらの結果から自然汚染食品および従来の方法で作製された指標菌汚染食品を用いて AFNOR と AOAC の認証を得たテンポは、糞便菌液を添加した無菌食品中の各種汚染指標菌の菌数を平板培養法と高い相関性をもって測定できた。動物糞便菌液を無菌食品に添加する方法は、迅速試験法と平板培養法の同等性評価試験に必要な指標菌汚染食品の作製法の1つとして利用可能であると考えられた。

本研究では、近年ますます重要性が増している生菌数測定の迅速化法について、その精度を評価するための基準について諸外国の例も踏まえつつ検討した。その結果、現在本邦の迅速法はAOAC、ISOの精度評価制度を利用しており、本邦からの申請にあたってはいくつかの課題点があることが判明した。その内、精度評価の基準に関する問題点は特に重要であると判断した。そこで実験的な検証を行い、現在市販されている迅速法（培養法と原理を異にし、迅速性を高めた方法）についてその有用性を正に評価できる基準はどうあるべきかについて実験を含めた検討を行った。

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。前年度までに従来のPCR法による検出を検討してきたが、今年度はリアルタイムPCR法による検出を検討した。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としているが、リアルタイムPCR法の腸炎ビブリオ検出キットは病原因子を検出するものしか市販されていないため、二種類のTaqMan PCR法A、Bを選んで検討した。その結果、検出感度はいずれも 10^3 cfu/mlであった。生カキの培養液に腸炎ビブリオを接種した試料を

リアルタイムPCR法と培養法による検出で比較検討した。培養法では 10^4 cfu/mlより低濃度の当該菌の検出はできなかった。これは他ビブリオ属菌等の共雑菌が多いためであり、TCBS寒天のみならず酵素基質培地の併用や高い分離技術が必要であると考えられた。これらの結果からリアルタイムPCR法の方が培養法よりも感度が良く、食品の培養液のスクリーニングとして有用であることが示唆された。

ベロ毒素遺伝子型により分類した腸管出血性大腸菌については市販のRPLAと遺伝子診断キットについては検出率が異なることから、毒素遺伝子と血清型決定因子遺伝子のマルチプレックスPCRに適したプライマーを、遺伝子解析結果を基にして設計が可能になった。*Listeria monocytogenes*の検出用遺伝子キットでは他のリステリア属菌も検出されることから比較的擬陽性の少ないhlyA遺伝子を指標とした新規PCR検出用プライマーの構築が期待される。

食品マトリクスから直接生菌分離を行うハイブリッド法について検討を加えてきたが、これまで回収率の定量性について問題があった腸炎ビブリオについて詳細な検討を加えた。その結果、分離法ではなく菌数確認を行う培養法に問題があることがわかり、本菌は分離操作で生じるストレスに弱いことがわかった。

カチオン系磁気ビーズとノロウイルスGII.4を用いて試験管法によりウイルスの回収を試みた結果、適切な反応液を用いることにより、ウイルス粒子はビーズと効率よく結合し、ビーズによりNVが回収できることが示された。今後は食品検体におけるマイナス電荷物質の競合阻害などの条件を勘案しながら本法が食品からのウイルス濃縮に応用可能かどうかについて検証が必要と考えられた。カキ乳剤を用

いたウイルス添加回収実験において、添加用として用いた GI /8 と GII /4 では、いずれのカキに添加した場合も今回開発した方法は通知法より高い回収率を示した。この結果から、産地やロットが異なるカキや、GI /8、 GII /4 以外の遺伝子型においても *Proteus vulgaris* NBRC 3045 を用いてカキ乳剤を処理する方法は通知法より高い回収率を示すものと推察された。検体の濃縮からリアルタイム PCR 法を用いたノロウイルス検出までの一連の検査工程において、カキ由来の成分は主に核酸抽出工程を妨害すると推察された。またノロウイルス代替ネコカリシウイルスを用いて食品からのウイルス回収実験を行い、ウイルス回収溶出液には 1 % 牛肉エキス加あるいは不含 Tris-Glycine buffer (pH 9.5) と超音波処理法の組み合わせが優れていると考えられた。

E. 結論

市販総菜、生鮮食品中の生菌数、大腸菌数および腸内細菌科群菌の菌数測定ではテンポ法と平板培養法で高い相関が認められた。さらに家畜の糞便菌液を接種した検体を用いて平板培養法と比較しても、テンポ法および DOX は共に培養法で測定した菌数と高い相関性が認められることが明らかになった。また、動物糞便菌液を食品に接種する方法は従来法との同等性を評価する際に利用できると考えられた。現在食中毒細菌の遺伝子診断に用いられているキットを精査し、それらの有用性を従来法と比較しながら評価した。迅速診断法が特に求められている腸炎ビブリオ検出にリアルタイム PCR 法がスクリーニングに有用であり、この遺伝子検出の際に問題となる生菌・死菌の区別については Ethidium Monoazide 処理が有効であることを示した。

ペロ毒素遺伝子解析の結果をもとに新規のプライマーセットを開発した。わが国のボツリヌス症起因菌は欧米と比較して特徴のある神経毒素遺伝子を保有し、特に米国の原因菌とは異なるサブタイプに分類される。これらのサブタイプを簡便に判定可能な PCR 法を開発した。食品からのノロウイルス迅速検査法を確立するために、カチオン磁気ビーズによる補足を試みたところ効率よく濃縮できることがわかった。今後は種々の食品を用いた場合の適応性について検討する必要がある。一方、食品からの簡便迅速なウイルス抽出法を代替ウイルス(ネコカリシウイルス)で検討し、抽出液および処理条件を提示した。さらに検査の際に用いられるリアルタイム PCR 法を阻害する要因の一つが牡蠣由来成分に含まれるが、これを軽減するために細菌の生物活性を利用した検体処理方法を考案した。これら一連の操作を組み合わせた総合的な評価を今後実施することで、食品からより迅速で簡便なノロウイルス検出法を確立できると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 浅尾 努、河合高生 (2008) 特集 微生物検査の国際規格への対応 食品の衛生指標菌試験法の現状と今後、食品と開発、43 : 7-10.
- 2) 浅尾 努 (2008) 特集 検査態勢の無駄を見直す ～微生物検査とアレルギー管理～ 衛生指標菌と規格基準の現状と今後―国際動向を踏まえて―このままで良いのか、日本の食品細菌試験法～、月刊 HACCP、14 : 20-30

- 3) 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.* 104 (2008) 1283-1293.
- 4) 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) 468-72.
- 5) 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) 839-842.
- 6) 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 03:K6 strains. *J. Microbiol. Meth.* 72 (2008) 313-320
- 7) B. Kimura, H. Takahashi, S. Hokimoto, Y. Tanaka, and T. Fujii. Induction of the histidine decarboxylase genes of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (formally *P. histaminum*) at low pH. *J. Appl. Microbiol.* In press (2009).
- 8) H. Takahashi, S. Miya, B. Kimura, K. Yamane, Y. Arakawa, and T. Fujii. Difference of Genotypic and Phenotypic Characteristics and Pathogenicity Potential of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* between Clinical and Environmental Isolates from Japan. *Microbial Pathogenesis*, 45 (2008) 150-158.
- 9) S. Miya, B. Kimura, M. Sato, H. Takahashi, T. Ishikawa, T. Suda, C. Takakura, T. Fujii and M. Wiedmann. Development of a multilocus variable-number of tandem repeat typing method for *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains. *International Journal of Food Microbiology*, 124 (2008) 239-249.
- 10) K. Honjoh, K. Fujihara, T. Haraguchi, Y. Ono, H. Kobayashi, H. Hiwaki, H. Kamikado, S. S. Jang, S. Ryu, and T. Miyamoto, (2008) Subtyping of *Listeria monocytogenes* based on nucleotide polymorphism in the *clpC*, *inlA*, *hlyA*, and *plcA* genes and rapid identification of *L. monocytogenes* genetically similar to clinical isolates. *Food Science and Technology Research*, 14(6): 557-564
- 11) Hansman GS, Oka T, Li TC, Nishio O, Noda M, Takeda N: Detection of Human Enteric Viruses in Japanese Clams, *J Food Protect*, 71, 1689-1695 (2008)
- 12) 有田知子、木村博一、野田 衛、西尾 治: パンに含まれるノロウイルスの回収法の検討, *感染症学雑誌*, 82, 473-475 (2008)
- 13) 野田 衛: ウイルス性食中毒の検査, *臨床と微生物*, 585-591 (2008)

- 1 4) 五十君静信:微生物試験法の国際規格にどう対応していくか, 食品と開発, 43, 4-6 (2008)
 - 1 5) 五十君静信:食品からの微生物検査標準法の検討〜これまでの経緯とこれからの展望〜, 月刊フードケミカル, 24, 51-54 (2008)
 - 1 6) 五十君静信:食品の微生物試験法を国際規格にどの様に対応していくか, 月刊 HACCP, 14, 20-29 (2008)
 - 1 7) E. Araki, K. Takayama, M. Saito, H. Matsuoka, "Separation of Viable Histamine -Producing Bacteria from Yellowtail Meat Components by Density Gradient Centrifugation." *Biocontrol Sci.* 14, 31-34 (2009)
 - 1 8) 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)
 - 1 9) 斉藤美佳子、松岡英明“微生物の迅速検出法”クリーンテクノロジー 18 (11), 1-5 (2008)
 - 2 0) 島北寛仁、斉藤美佳子、松岡英明“微生物迅速検査装置「バイオブローラ」”食品工業 51(16), 34-42 (2008)
 - 2 1) 荒川英二、甲斐明美:腸炎ビブリオの標準試験法作成へ向けての検討、月刊フードケミカル, 2008-7, 2008.
 - 2 2) Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Murakami T, Vennema H, Koopmans M, Takeda N, Ogura H, Seto Y. Genetic analysis of the capsid gene of genotype GII.2 noroviruses. *J Virol.* 82(15):7336-7345 (2008)
 - 2 3) Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Murakami T, Vennema H, Koopmans M, Takeda N, Ogura H, Seto Y. Genetic analysis of the capsid gene of genotype GII.2 noroviruses. *J Clin Microbiol.* 46:2406-2409 (2008)
 - 2 4) 秋場哲哉、田中達也、新井輝義、林志直、森功次、野口やよい、永野美由紀、吉田靖子、矢野一好:細菌添加培養処理によるカキ等からのノロウイルス検出率の向上. 食品衛生学雑誌. 2008, 49, 6, 407-410.
 - 2 5) 秋場哲哉、尾畑浩魅、林志直、森功次、野口やよい、永野美由紀、仲真晶子、甲斐明美、矢野一好:細菌の生物活性を利用したカキからのノロウイルス検査法の改良. 東京都健康安全研究センター年報. 2008, 59, 57-61.
2. 学会発表
 - 1) Umeda, K., T. Kohda, Y. Seto, M. Mukamoto and S. Kozaki. A new BoNT/B subtype detected from infant botulism in Japan. The 6th International Conference on Basic and Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus Toxins, イタリア ピエモンテ州 (2008. 6. 12-14)
 - 2) 梅田 薫、小笠原 準、幸田知子、勢戸祥介、向本雅郁、小崎俊司. わが国で発生したA型ボツリヌス症分離株の分子疫学的解析. 第61回日本細菌学会関西支部総会、京都市 (2008. 11. 8)
 - 3) 梅田 薫、小笠原 準、幸田知子、勢戸祥介、向本雅郁、小崎俊司. わが国で発生したA型乳児ボツリヌス症分離株の分子疫学的解析. 第29回日本食品微生物学会学術総会、広島市 (2008. 11. 12-13)
 - 4) 倉本晋太郎、高橋肇、須田貴之、木村凡. ステンレス上で乾燥させた *Listeria*

- monocytogenes* の生残性についての研究. 第 95 回日本食品衛生学会学術講演会, 銀座プロッサム (2008. 5/15~16)
- 5) 高倉知佳子, 高橋肇, 木村凡. Real-time PCR 法を用いた米飯サンプル中の *C. botulinum* のモニタリング法. 第 96 回日本食品衛生学会学術講演会, 神戸学院大学 (2008. 9/18~19)
 - 6) 大内歩, 高橋肇, 木村凡. ネズミノロウイルスのステンレス表面上における生残性. 第 29 回日本食品微生物学会学術総会, 広島国際会議場 (2008. 11/12~13)
 - 7) 上村周子, 高橋肇, 山本純子, 中筋愛, 橋爪克仁, 木村凡. Cycleave PCR を用いた *Listeria monocytogenes* の定量法および検出法の開発. 第 29 回日本食品微生物学会学術総会, 広島国際会議場, (2008. 11/12~13)
 - 8) 北澤奈緒, 田中悠一郎, 高橋肇, 木村凡. 16SrDNA T-RFLP 法による鮮魚の菌叢解析法の検討. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学, (2008. 3・27~30)
 - 9) 犬塚嶺, 倉本晋太郎, 真船碧, 高橋肇, 木村凡. 非加熱喫食水産食品における *Listeria monocytogenes* の増殖挙動とその制御法についての予備検討. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学, (2008. 3・27~30)
 - 10) R. Li, T. Harada, K. Honjoh, T. Miyamoto. Genotyping Characterization of Enterohemorrhagic Escherichia Coli Strains Isolated from Human Patients in Japan, ASM 2008 Melbourne/Annual Scientific Meeting Exhibition, 2008. 07. 09.
 - 11) L. Pei, K. Fujihara, H. Mizue, K. Honjoh and T. Miyamoto. Studies on subtyping and pathogenicity of *Listeria monocytogenes*. 14th World Congress of Food Science & Technology, 2008. 10.
 - 12) 飯塚節子, 岡 智一郎, 片山和彦, 武田直和, 野田 衛: サボウイルスとノロウイルスが検出された食中毒事例, 第 56 回日本ウイルス学会学術総会, 岡山市, 10/28 (2008)
 - 13) 植木 洋, 庄司美加, 山本美和子, 阿部勝彦, 伊藤文明, 池田義文, 西尾 治, 岡 智一郎, 片山和彦, 武田直和, 野田 衛: カキを用いたサボウイルスの環境調査, 第 56 回日本ウイルス学会学術総会, 岡山市, 10/28 (2008)
 - 14) 田村 務, 西川 眞, 野田 衛, 武田直和, 田中智之, 鈴木 宏: 急性胃腸炎患者から嘔吐後に採取された口腔うがい液中のノロウイルスの定量, 第 56 回日本ウイルス学会学術総会, 岡山市, 10/28 (2008)
 - 15) 野田 衛, 阿部勝彦, 伊藤文明, 武田直和: 表面汚染が推定される食品からのノロウイルス検出法に関する検討, 第 29 回日本食品微生物学会学術総会, 広島市, 11/12 (2008)
 - 16) 重富知也, 斉藤美佳子, 松岡英明, “生乳中微生物の非培養・培養トレーサブル検出”, 日本化学会第 89 春季年会, 船橋 (2009 年 3 月 29 日)
 - 17) H. Matsuoka, T. Matsuzaki, T. Shimakita, M. Saito, Automatic system for the non-destructive separation of microbial cells from food samples and its applicability to nonculture-to-culture seamless method. 122nd AOAC International

Annual Meeting and Exposition,
Dallas (September 21-24, 2008).

- 18) 末崎拓広, 島北寛仁, 斉藤美佳子, 松岡英明. 密度勾配遠心分離法に基づく食品中微生物のバイアブルセパレーション. 日本防菌防黴学会第35回年次大会, 浜松 (2008年9月12日)
- 19) 島北寛仁, 高山幸大, 末崎拓広, 水野靖紀, 斉藤美佳子, 松岡英明. CFDA 法対応型蛍光顕微計数装置の開発. (同上)
- 20) 尾畑浩魅, 下島優香子, 小西典子, 上原さとみ, 門間千枝, 仲真晶子, 甲斐明美, 矢野一好: 「いかの塩辛」を原因とした腸炎ビブリオ食中毒事例, 第29回日本食品微生物学会学術総会, 2008年, 広島

21) 下島優香子, 尾畑浩魅, 小西典子, 上原さとみ, 門間千枝, 甲斐明美, 矢野一好: Ethidium Monoazide を用いた腸炎ビブリオ生菌と死菌の鑑別法の検討, 第42回腸炎ビブリオシンポジウム, 2008年, 富山

- 22) Shimojima Y., H. Obata, N. Konishi, C. Monma, S. Uehara, A. Nakama, A. Kai, and K. Yano: A rapid method for estimating viable *Vibrio parahaemolyticus* cell counts using real-time PCR, 29th World Veterinary Congress, 2008, Vancouver, Canada

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅱ. 分担研究報告

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全・安心確保推進研究事業）
分担報告書

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

毒素型食中毒の迅速検査法の開発と評価

-わが国で発生した B 型乳児ボツリヌス症分離株の遺伝学的解析-

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 幸田知子 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 助教
梅田 薫 大阪市立環境科学研究所

研究要旨

乳児ボツリヌス症は、生後 1 年未満の乳児が芽胞を摂取し、腸管内で発芽、増殖することにより産生された毒素を吸収して発症する疾患である。主に第 I 群に属するボツリヌス A 型菌および B 型菌によって引き起こされる。I 群 B 型菌は産生する毒素の毒力および抗原性によって主に 2 つの subtype (B1 および B2) に分類されることが報告されている。わが国で 1995 年に発生した B 型乳児ボツリヌス症由来株の毒素型は subtype B2 であった。本研究では、最近相次いで発生した 2 事例の B 型乳児ボツリヌス症分離株について毒素遺伝子の分子系統解析および PFGE 型別を実施した。また Multiplex-PCR 法による B 型毒素遺伝子 subtyping 法を検討した。

A. 研究目的

ヒトのボツリヌス症は食中毒に加えて乳児ボツリヌス症、創傷ボツリヌス症、成人腸管定着性ボツリヌス症の 4 型に分類される。わが国では、1951 年～2007 年の間に 24 症例の乳児ボツリヌス症および 117 事例のボツリヌス食中毒の発生が報告されている。食中毒は魚介類を原因食品とする E 型食中毒がよく知られているが、乳児ボツリヌス症は初めての国内の発生が認められた 1986 年から翌年にかけてハチミツを感染源とする 10 症例が連続して報告され、毒素型が調べられた 7 症例はすべて A 型であった。その後当時の厚生省から乳児にハチミツを与えない

よう指導する通達が出されたこともあり、ハチミツを原因とする発生は報告されなくなったが、1999 年以降、感染源が不明な A 型および B 型症例の発生がみられる。ボツリヌス食中毒においても 1990 年代後半以降、輸入食品や容器包装詰低酸性食品を原因とする A 型および B 型起因食中毒事例が散発的に発生している。これまで、わが国で発生したボツリヌス症起因菌の持つ神経毒素および遺伝子を解析した結果、B 型菌のもつ神経毒素遺伝子は欧米で分離された菌がもつ遺伝子とは異なることが明らかになっている。そこで、今回は B 型乳児ボツリヌス症起因菌の

分子疫学的解析を行うとともに、これらの菌の持つ神経毒素遺伝子の特性と特異検出法について検討を行った。

B. 研究方法

1. 使用菌株

わが国で発生した乳児ボツリヌス症由来株 3 株 (111 株 [1995 年・石川県]、Osaka05 株 [2005 年・大阪市]、Osaka06 株 [2006 年・大阪府]) およびこれらの株と比較するために、米国での同症由来株 5 株、その他の由来株 (食品由来株等) 7 株の、I 群 B 型菌計 15 株を供試した。

2. DNA の調製

各菌株をクックドミード培地で 30℃ 18 時間培養後、DNAeasy Tissue Kit (Qiagen Inc.) により菌体 DNA を調製した。

3. 毒素遺伝子群の塩基配列

B 型菌には神経毒素遺伝子、無毒成分遺伝子 (*ntnh*) の他に、血球凝集素成分に関係する 3 つの遺伝子 (*ha33*、*ha17*、*ha70*) と調節蛋白をコードする遺伝子 *p21* が存在する。これらの遺伝子の全塩基配列を決定するために GenBank から既知の塩基配列を基にしてプライマーを設計した。Osaka05 株、Osaka06 株の毒素遺伝子全長 (3,876 bp) の塩基配列を決定し、既知の B 型毒素遺伝子塩基配列とともに分子系統解析を実施し、B 型毒素の subtype を決定した。その他の株については毒素遺伝子 C 末端領域塩基配列 (400 bp) を用いて解析し B 型毒素の subtyping を行った。

4. PFGE

定法に従いプラグを調製し制限酵素 *Sma* I を用いて 25℃ 18 時間処理を行っ

た。CHEF-DRIII (Bio-Rad Lab.) を用いて泳動を行い、PFGE 型別を実施した。得られたバンドパターンから FingerprintingII ソフトウェアによって similarity (%) を求めた。

5. Multiplex-PCR による subtyping

神経毒素遺伝子 3 '末端領域で異なる部位を検索し、forward 側が共通で reverse 側が異なる 4 つのプライマーを設計し Multiplex-PCR による subtyping が可能かどうかについて検討した。

C. 研究結果

1. Osaka05 株毒素遺伝子および無毒成分遺伝子塩基配列

Osaka05 株、Osaka06 株およびデータベースに登録されている B 型毒素遺伝子塩基配列全長を用いた分子系統解析から、B 型毒素遺伝子は 3 つのクラスター (subtype B1, B2 および Osaka05) に分類された。Osaka06 株毒素遺伝子は、111 株と同じく subtype B2 に分類された。Osaka05 株毒素遺伝子は B1 および B2 のどちらにも属さない新たな subtype に分類された。Osaka05 株毒素アミノ酸配列 (1,296 残基) において、B1 もしくは B2 と異なる変異アミノ酸は 61 残基であった。軽鎖領域に 2 残基、重鎖領域には 59 残基と、変異は重鎖領域に集中していた。中でも重鎖 C 末端領域に多かった。軽鎖、重鎖 N 末端領域では B2 と一致する変異が多いが重鎖 C 末端領域では B1 と一致あるいは特異的な配列が見られた。Osaka05 株、111 株 (B2) の無毒成分遺伝子 (*ha70*, *ha17*, *ha33*, *p21*, *ntnh*) 塩基配列を決定し、Okra 株 (B1) (Genebank accession No. AB232927)