

表4. 比較試験に用いた遺伝子型の異なる *L. monocytogenes* 49 株

MLST	菌株番号	各遺伝子型による分類				備考
		hly	inlA	clpC	plcA	
2	184	3	24	13	3	
3	140	1	12	13	4	
4	30	1	10	13	9	
5	167	1	23	13	9	
6	31	1	11	13	9	
7	107	2	10	13	9	
8	139	1	26	13	8	
9	135	3	27	13	24	
10	173	3	12	13	24	
11	142	4	12	13	2	
12	192	4	12	13	8	
13	70	4	12	12	8	
14	95	4	12	12	10	
15	48	4	12	12	5	
16	114	9	12	12	6	
18	74	3	12	12	8	
19	197	3	12	13	28	
20	179	3	12	13	4	
21	3	3	14	10	8	
22	7	3	14	13	8	
23	14	3	14	11	8	
24	53	3	14	14	3	
25	52	3	14	14	3	
26	59	3	14	14	3	
27	62	4	14	14	3	
28	149	3	19	13	22	
32	168	11	28	17	29	inlA 741-746aa 欠失
33	8	6	3	9	13	
34	66	7	4	8	15	
35	138	12	5	16	25	
36	13	8	1	3	19	Truncated inlA (528aa)
37	153	8	1	3	19	Truncated inlA (528aa)
38	33	6	2	3	19	Truncated inlA (684aa)
39	34	6	2	4	19	Truncated inlA (699aa)
40	191	6	2	3	21	
41	171	6	25	15	30	
42	144	7	5	3	21	
43	113	7	6	3	21	
44	160	6	18	15	23	
45	5	5	6	2	16	
46	11	5	6	2	17	
47	10	5	6	2	18	
49	189	10	6	2	16	
52	39	9	8	1	14	
53	181	9	8	1	26	
54	195	9	21	1	27	Truncated inlA (491aa)
55	166	6	8	15	23	
56	38	6	8	8	20	
57	177	6	20	8	25	

表5. 比較試験に用いた *L. monocytogenes* 以外の *Listeria* 菌株

菌株番号	菌株
LIS30	<i>L. innocua</i>
LIS31	<i>L. innocua</i>
LIS33	<i>L. seeligeri</i>
LIS34	<i>L. seeligeri</i>
LIS35	<i>L. welshimeri</i>
LIS36	<i>L. welshimeri</i>
LIS37	<i>L. grayi</i>
40	<i>L. welshimeri</i>
41	<i>L. innocua</i>
42	<i>L. innocua</i>
43	<i>L. innocua</i>
50	<i>L. innocua</i>

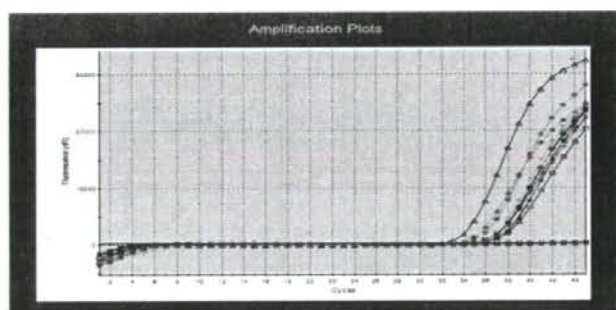
以下のPCRを行った  
 Template DNA量 約 5pg/ lIに調製

	12.5 l
	5.0 l
Template	2.5 l
dH <sub>2</sub> O	5.0 l
<hr/>	
Total	25.0 l

反応条件

95°C	10sec	} 45cycles
95°C	5sec	
55°C	10sec	
72°C	20sec	

LM以外の株



4%ゲル使用

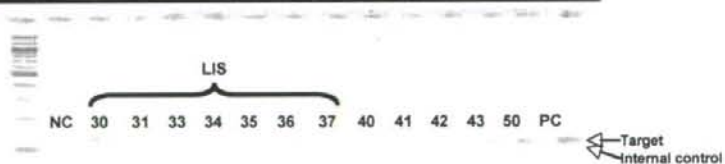
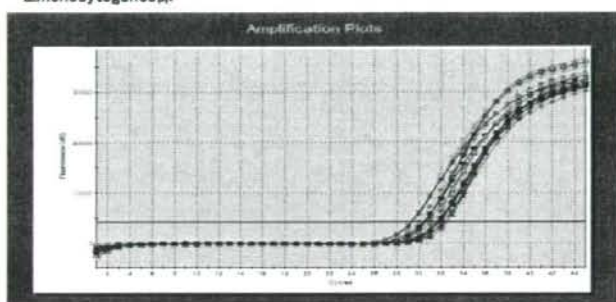
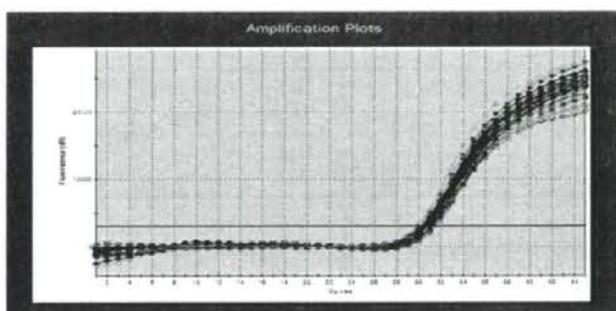


図 2-1. TaKaRa Cycleave PCR *Listeria monocytogenes* Detection Kit 検出特異性

*Listeria monocytogenes*株



NC 3 5 7 8 10 11 13 14 30 31 33 34 38 39 48 52 53 59



62 66 70 74 95 107 113 114 135 138 139 140 142 144 149 153

160 166 167 168

181 184 185 189

PC NC

171 173 177 179

191 192 195 197

図 2-2. TaKaRa Cycleave PCR *Listeria monocytogenes* Detection Kit 検出特異性

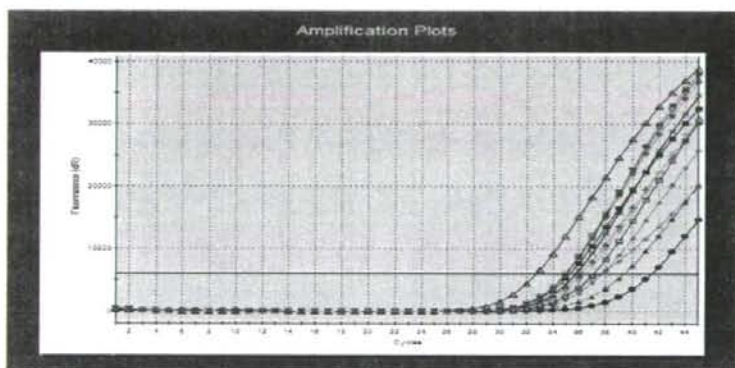
以下のPCRを行った  
 Template DNA量 約 5pg/ lに調製

	15.0 l
	3.0 l
Template	12.0 l
<hr/>	
Total	30.0 l

反応条件

95°E	10min	} 45cycles
95°E	15sec	
60°E	1min	

L. monocytogenes以外の株



1.5%ゲル使用

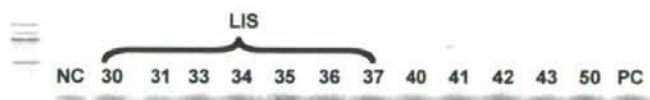
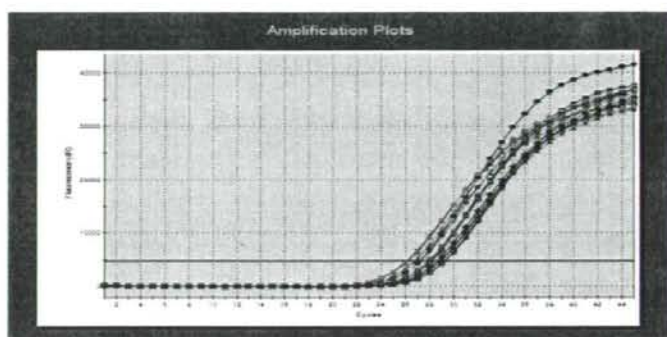
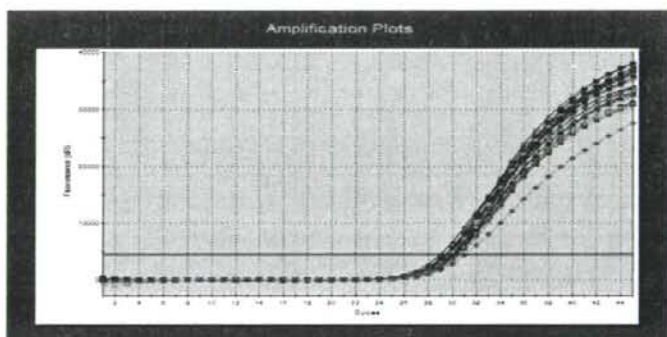


図 3-1. Applied Biosystems TaqMan *Listeria monocytogenes* Detection Kit 検出特異性



NC 3 5 7 8 10 11 13 14 30 31 33 34 38 39 48 52 53 59



62 66 70 74 95 107 113 114 135 138 139 140 142 144 149 153

160 166 167 168

181 184 185 189

NC

171 173 177 179

191 192 195 197

图 3-2. Applied Biosystems TaqMan *Listeria monocytogenes* Detection Kit 检出特异性

表6. 生肉のサルモネラ検査における培養法と遺伝子診断キットの比較

試料	検体数	培養法との一致数(%)									
		培養法		タカラバイオ社 invAキット				AB社 TaqManキット			
				BPW後		RV後		BPW後		RV後	
		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
牛ミンチ	3	1	2	0(0)	2(100)	0(0)	2(100)	0(0)	0(0)	1(100)	1(0)
豚ミンチ	5	0	5	0(100)	5(100)	0(100)	5(100)	0(100)	2(40)	0(100)	3(60)
鶏ミンチ	42	26	16	9(35)	16(100)	21(81)	16(100)	26(100)	3(19)	22(85)	8(50)
合計	50	27	23	9(33)	23(100)	21(78)	23(100)	26(96)	5(22)	23(85)	12(52)

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  
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

研究分担者 五十君 静信 (国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部)  
研究協力者 野田 衛 (国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部)

研究要旨：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。一方、循環型濃縮装置でのビーズによる NV 回収率は5%以下であり、改良の余地があった。

#### A. 研究目的

現在食中毒患者数の半数近くを占めるウイルス性食中毒事例において、原因食品からウイルスが検出される事例は極めて少なく、食中毒の原因究明に大きな支障をきたしている。原因となるウイルスはノロウイルス(NV)が最も重要であるが、近年サポウイルスによる食中毒が多発傾向にある他、種々のウイルスが原因となる。そのため、様々なウイルスを食品から検出できる検査法の開発が求められている。食品等から微生物を分離、濃縮する方法として免疫磁気ビーズ法が応用されているが、この方法では、特異抗体がなければ利用できない、目的とするウイルスのみしか検出できない、抗原性が変異したウイルスでは検出で

きないなどの問題点がある。一方、ウイルス粒子表面はマイナスに荷電していることから、プラスに荷電したカチオン系磁気ビーズ(ビーズ)を用いた検出が可能と考えられる。そこで、食品からのウイルス迅速検出法の確立を目的として、ビーズを用いた NV の濃縮法に関する基礎的研究を実施した。なお、今回はビーズによる NV 粒子の回収に関する基礎実験であり、すべて食品非存在下のデータである。

#### B. 研究方法

##### 1. 添加回収用ウイルス液と捕捉用磁気ビーズ

NV 遺伝子型 GII.4 陽性糞便の 10% 乳剤遠心上清を PBS(-) で約  $10^4 \sim 10^5 / \mu\text{l}$  に含むよ

うに希釈したものを添加用ウイルス液とした。ウイルス粒子の捕捉用ビーズは、カチオン系磁気ビーズ(ZCCB-CAT、マトリックス・マイクロサイエンス)を用いた。

## 2. ビーズによるウイルス粒子の捕捉と回収

### (1) 試験管と磁石台を用いる方法(試験管法)

微量遠心管に各種の反応液 1ml を加えた後、添加用ウイルス液 25  $\mu$ l とビーズ液 25  $\mu$ l を添加し、37°C で、一定時間、ローテーターで回転させ、ウイルス粒子とビーズを結合させた。反応後、磁石台(MPC-5、ダイナル)でビーズを固定し、洗浄液 500  $\mu$ l で 3 回洗浄した後、回収液 100  $\mu$ l を加え、ビーズを回収した。

### (2) 循環型濃縮装置を用いる方法(循環法)

大容量の食品検体からの微生物の濃縮のために考案された循環型濃縮装置(Pathatrix、プライムテック)を使用した。各種の反応液 50ml に添加用ウイルス液 25  $\mu$ l を添加したものを試料用ボトルに入れ、ビーズ液 25  $\mu$ l を循環装置内にセットした後、使用説明書に従い、37°C、30 分、反応液を循環させ、ウイルス粒子をビーズに捕捉させた。反応後、装置の磁石で捕捉されたビーズを回収液 100  $\mu$ l に回収した。

## 3. 反応液、洗浄液および回収液

ビーズによるウイルス粒子捕捉の際の反応液、洗浄液、および回収液に使用した試薬等は、PBS(-)(日水製薬)、SDS-TrisGlycine(第一化学、以下 SDS-TG)、Skim Milk(メルク、以下 SM)、牛血清アルブミン(シグマ、以下 BSA)、塩化ナトリウ

ム(和光純薬)、Tris pH7(シグマ)、Glycine(和光純薬)で、使用濃度は結果の各表に示した。溶媒は Milli-Q 水を用いた。なお、原則として、洗浄液、回収液は反応液と同じものを用いた。

## 4. RNA 抽出、逆転写反応およびリアルタイム PCR

ウイルスの定量は、リアルタイム PCR 法によるウイルス RNA の定量で行った。RNA 抽出は QIAamp Viral RNA Mini Kit(キアゲン)を用いて実施した。回収液からの RNA 抽出は、よく混和した回収液 25  $\mu$ l を AVL に添加し、ボルテックスで充分攪拌した後、ウイルス RNA のビーズへの再吸着を防ぐために、12,000rpm、数秒間遠心した後、速やかに上清を採取し、エタノールを添加した。廃棄液からの RNA 抽出は廃棄液 25  $\mu$ l からマニュアルに従い実施した。抽出 RNA から High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(ABI)を用いて cDNA を合成した後、Kageyama ら(J Clin Microbiol, 41, 1548-1557, 2003)のリアルタイム PCR 法でウイルス RNA コピー数を定量した。得られた定量値から、回収液あるいは廃棄液全量中のウイルス RNA コピー数を算出したものをそれぞれ回収ウイルス量、廃棄ウイルス量とした。なお、接種ウイルス量に対する回収(廃棄)ウイルス量の割合を回収(廃棄)率、回収ウイルス量と廃棄ウイルス量の和に対する回収(廃棄)ウイルス量の割合を捕捉(遊離)率とした。

## C. 研究結果

### 1. 反応液の検討

ビーズによる NV 粒子の回収量に及ぼす反応液の影響を調べるために表 1 に示す反



応液を用いて試験管法で回収試験を実施した。食品の乳剤作製に通常用いられている PBS(-) が 50% 程度の捕捉率であったのに対し、0.1M あるいは 1M NaCl 溶液では 99% 以上の捕捉率を示した。そこで NaCl 濃度の影響を調べた結果、0.01M~0.1M が比較的高い回収率、捕捉率を示した(データ示さず)。

次に、実際の検査では様々な pH の食品材料を扱うことが想定されることから、Glycine(pH7)、Tris(pH7)の2種類の緩衝液中での NaCl 濃度の影響を調べた。回収率、捕捉率とも 95%以上を示したのは、0.15M NaCl 溶液、0.01M NaCl 0.01M Glycine、0.15M NaCl 0.01M Glycine、0.15M NaCl 0.01M Tris であった(表2)。Tris は NaCl 非存在下でも比較的高い捕捉率を示し、緩衝液の種類により捕捉率は異なる傾向を示した。

## 2. 反応時間の影響

回収率が高かった反応液を中心に反応時間による回収量の変化を試験管法で調べた(表3)。捕捉率は経時的に増加し、30分の反応で概ね 95%以上の捕捉率に到達した。3~15分の短時間の反応では、Glycine 緩衝液より Tris 緩衝液が高い回収率、捕捉率を示した。

## 3. 接種ウイルス量の回収率に及ぼす影響

接種ウイルス量の回収率に及ぼす影響を調べるために、 $2.7 \times 10^7$  コピー/反応液から  $10^3$  オーダー(理論値  $2.7 \times 10^3$ ) まで 10 倍段階希釈して、試験管法で回収を試みた。回収率は概ね一定であり、回収率は接種ウイルス量に影響を受けなかった(データ示さず)。

## 4. RNA 抽出効率等に及ぼすビーズの影響

RNA 抽出効率へのビーズ量の影響を調べ

るために、5、10、20、25  $\mu$ l の回収液から RNA 抽出を行ったが、回収率に大きな違いは認められなかった(データ示さず)。また、ウイルス粒子から RNA が抽出された時点でビーズに再結合し、RNA の回収率が低下する可能性があることから、マニュアルに従った方法と、AVL を添加しボルテックスで充分攪拌した後、速やかに遠心した上清にエタノールを添加する方法を比較した結果、迅速に処理する方法が若干回収率が高い傾向にあった(データ示さず)。

## 5. 循環法による NV の回収

試験管法で高い回収率を示した反応液および対照として PBS(-)を用いて循環法による回収実験を実施した(表4)が、いずれも 5%以下の回収率で、回収率は極めて低かった。循環法が低い回収率を示した要因として、循環装置内にウイルス粒子が非特異的に吸着する可能性が考えられたので、SDS-TG、1%SM 加 PBS(-)、1%BSA 加 PBS(-)について回収実験を試みたが、回収率は低下した(データ示さず)。

## D. 考察

今回、ビーズと NV 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。結合効率は、NaCl 濃度、緩衝液の種類に影響を受けたが、0.01M~0.05M の Glycine あるいは 0.01M Tris 緩衝液に 0.15M の NaCl を加えた条件で、ほぼ 95%以上のウイルス粒子は捕捉された。また、捕捉率は添加するウイルス

粒子数に影響を受けなかったことから、定量的な回収が可能であると考えられた。

反応時間による捕捉率の変化を調べた結果、経時的に増加し、十分な回収率を得るためには、少なくとも30分程度の反応時間が必要であった。一夜反応させると回収率はさらに増加(データ示さず)することから、検出率の向上には反応時間の延長も必要であると考えられた。

一方、実際の食品検体の場合は、検体中のマイナス荷電物質による競合阻害やpHや塩濃度においてピーズとウイルス粒子の結合に最適の環境であるとは限らないことなどから、十分な回収効率が得られない可能性も考えられる。今後、食品検体存在下での回収実験を行い、食品からのウイルス濃縮に応用可能か、検証する必要がある。

大容量の食品検体からの微生物の濃縮のために考案された循環型濃縮装置を用いて、食品非存在下で回収実験を行ったが、回収率は5%以下で、試験管法と比較して極めて低い結果であった。回収ウイルス量と廃棄ウイルス量を合わせても、接種ウイルス量に足りないことから、循環装置内にウイルス粒子が非特異的に吸着する可能性が考えられた。非特異吸着を軽減させるために、SDS、SM、BSAなどを加えた反応液で回収実験を試みたが、回収率はさらに低下し(ピーズとウイルス粒子の結合効率が低下したものと考えられる)、回収率を増加させることはできなかった。今後、循環法をウイルスの検出に応用するためには、さらなる検討が必要であ

る。

## E. 結論

食品からのウイルス迅速検出法の確立を目的として、ピーズによるNVの濃縮法を検討した。ピーズによるウイルス粒子の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は回収された。また、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。循環型濃縮装置でのピーズによるNV回収率は5%以下であり、改良の余地があった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① 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)
- ② 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)
- ③ 野田 衛: ウイルス性食中毒の検査, *臨床と微生物*, 585-591 (2008)
- 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)

- 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）
- 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）
2. 学会発表
- ① 飯塚節子，岡 智一郎，片山和彦，武田直和，野田 衛：サポ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）
- ② 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：カキを用いたサポ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）
- ③ 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）
- ④ 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）
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

表1 反応液の種類によるビーズとNV粒子との捕捉率、回収率の変化

反応液	反応時間	回収液		廃棄液	
		捕捉率	回収率	遊離率	廃棄率
PBS	一夜反応	51.0%	38.0%	49.0%	37.0%
0.1M NaCl	一夜反応	100.0%	78.0%	0.0%	0.0%
1M NaCl	一夜反応	99.0%	77.0%	1.0%	1.0%
15% エタノール	一夜反応	24.0%	19.0%	76.0%	59.0%
30% エタノール	一夜反応	7.0%	5.0%	93.0%	71.0%
MilliQ	一夜反応	11.0%	7.0%	89.0%	58.0%

表2 ビーズとNV粒子との捕捉率、回収率へのNaCl濃度、緩衝液の影響

反応液	濃度	回収率				捕捉率			
		NaCl濃度				NaCl濃度			
		0M	0.01M	0.15M	0.1M	0M	0.01M	0.15M	0.1M
PBS(-)		10.6%	ND	ND	ND	17.0%	ND	ND	ND
MilliQ		41.0%	ND	129.4%	ND	85.1%	ND	99.9%	ND
Glycine(pH7)	0.01M	67.8%	100.7%	154.5%	84.5%	89.4%	96.7%	99.7%	97.0%
	0.05M	39.8%	63.4%	97.2%	89.7%	87.3%	97.1%	99.4%	91.7%
	0.1M	68.6%	90.1%	52.6%	86.6%	94.4%	95.2%	92.0%	82.3%
Tris(pH7)	0.01M	88.7%	ND	102.9%	ND	97.9%	ND	99.6%	ND
	0.05M	61.2%	ND	71.0%	ND	98.7%	ND	97.7%	ND
	0.1M	88.2%	ND	21.8%	ND	99.4%	ND	91.6%	ND

ND:検査せず

表3 ビーズとNV粒子との結合の経時変化

反応液	回収率				捕捉率			
	NaCl 濃度				NaCl 濃度			
	3分	15分	30分	60分	3分	15分	30分	60分
PBS(-)	4.1%	4.7%	7.8%	7.6%	4.7%	5.8%	9.7%	9.1%
MilliQ+0.15M NaCl	46.6%	57.3%	52.2%	49.1%	73.7%	92.3%	93.5%	96.2%
0.01M Glycine 0.15M NaCl	38.5%	52.7%	55.8%	62.5%	59.3%	90.1%	94.9%	97.3%
0.05M Glycine 0.15M NaCl	43.6%	58.1%	56.3%	70.5%	55.9%	81.8%	94.5%	97.6%
0.01M Tris 0.15M NaCl	45.0%	64.3%	67.3%	71.5%	67.1%	88.3%	95.1%	96.9%
0.01M Tris 0.01M NaCl	48.0%	53.2%	49.4%	72.1%	76.4%	91.8%	92.7%	94.4%

表4 循環型濃縮装置による回収率

反応液	回収率
PBS(-)	0.28%
MilliQ+0.15M NaCl	0.77%
0.01M Glycine 0.15M NaCl	1.88%
0.05M Glycine 0.15M NaCl	2.16%
0.05M Glycine 0.15M NaCl	3.59%
0.01M Tris 0.15M NaCl	2.10%

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

培養法・非培養法・ハイブリッド法による迅速法の開発

分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 大学院工学府生命工学専攻 教授

研究要旨

食品マトリクスからの生菌分離を利用したハイブリッド法（H法）によって、信頼性の高い微生物迅速法が可能になると考え、昨年度までに、濾過法および密度勾配遠心分離法（DGC法）により、生乳から大腸菌、魚肉（ブリ）からヒスタミン産生菌を、各々良好に分離できることを示してきた。しかし、さらに困難が予想された牡蠣・腸炎ビブリオでは、定性的分離の見通しを得るに留まっていた。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。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、H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、H法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。

A. 研究目的

実用的見地から最も有望と考えられる迅速法は蛍光顕微計数法である。しかし、共存する食品マトリクス微粒子等に起因する擬シグナルが問題となっている。一方、従来、基準とされてきた培養法でも、食品成分がコロニー形成能に影響を及ぼすことは否定できない。したがって、これらの問題を解決し、信頼性の高い結果を得るためには、前処理段階で微生物細胞のみを分離することが有効と考えられる。

細胞分離に際して考慮しなければならない点は、分離操作の過程で、微生物細胞のバイアビリティ（Viability）に影響を及ぼさないバイアブル分離（Viable separation）とすることが肝要である。バ

イアビリティとは、ここでは、「特定の単一酵素の活性ではなく、細胞が生きている状態を保つために多くの酵素系が活性を保持している状態」を意味する言葉として使用している。細胞分裂活性、したがってコロニー形成能に直接影響する指標であると言える。バイアビリティが保持されたまま分離でき、非培養迅速法で計数できれば、その結果を細胞単位で、トレーサブルに培養法で確認できることになる。

しかし、食品マトリクスからのバイアブル分離法は、個々の食品の物理化学的性質に応じて開発する必要がある。本研究では、特に難濾過性の食品を選び、そのバイアブル分離、それに続く生菌計数（非培養法、および培養法）からなるハイブリッド法（H

法)の開発を目的としている。

昨年度までに、濾過法および密度勾配遠心分離法(Density Gradient Centrifugation法;DGC法)により、生乳に添加した大腸菌(*Escherichia coli*)、魚肉(ブリ)に添加したヒスタミン産生菌(*Morganella morganii*)を、各々良好に分離ができることを示してきた。一方、牡蠣・腸炎ビブリオ(*Vibrio parahaemolyticus*)の場合は、定性的分離は可能でも、定量性には問題があった。本年度は、(1)腸炎ビブリオの定量的分離、(2)非培養法から培養法へのトレーサブル計数、(3)密度勾配層回収装置(Density Slicer; DS)の機能試験、を実施した。

## B. 研究方法

### (1) 腸炎ビブリオ定量的分離

#### 試験菌液の調製

3%NaCl添加のTSAプレート上で保存した腸炎ビブリオ *V. parahaemolyticus* (食品分析センターよりの分譲株、およびNBRCより入手した株)を、3%のNaClを添加したアルカリペプトン水に播種し、37℃・130rpmの条件で一晩培養して腸炎ビブリオ菌液とした。

大腸菌 *E. coli* K12は、LB液体培地に播種し、37℃、18h、130rpmで前培養した。前培養液から100・1採取し、10ml LB液体培地に播種し、同条件で本培養し大腸菌液とした。

#### 牡蠣抽出液の調製

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のリン酸緩衝液(50mM、pH7.0)(PBS)を用いて10倍希釈を行い、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。

この牡蠣抽出液に1,000-2,000cells/mlとなるように腸炎ビブリオ菌液を添加し、腸炎ビブリオ添加牡蠣抽出液とした。

#### Percoll密度勾配の調製

Percoll(#170891-01,GE Healthcare)を、滅菌したPBS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 $\mu$ lずつ遠心管(11 $\times$ 34mm)に重層し、密度勾配を作製した。

#### 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、検体(腸炎ビブリオ菌液、あるいは同菌添加牡蠣抽出液)200・1を重層し、4℃、5,000rpm、30minで遠心後、マイクロピペットで、遠心管上方から200・1ずつ回収した。回収した各密度層100・1について培養法、あるいは非培養法で生菌計数した。

培養法による菌数測定を行う場合は、各密度層100・1を3%NaCl加TSA培地に塗抹し、37℃、18h培養した。

非培養法で菌数測定を行う場合は、各密度層100・1をバイオプロローラー(BP)(松下エコシステム)で測定した。

### (2) 非培養法から培養法へのトレーサブル計数

図1に示すように、検体をBP用フィルターユニットに吸着固定し、これに50%グリセロールと3%NaClを含む300ppmのカルボキシフルオレッセイン・ジアセテート(CFDA)を100・1滴下するか、あるいはCFDAのPBS溶液を含浸させたペーパーディスクをフィルターユニット下部から装着して、室温で10分間反応させた。生菌のみ蛍光を発するので、これを、BPで計数した。

測定後のフィルターユニットの下部に、3%NaClを含むTSA培地を含浸させたペーパーディスクを装着し、ガラスディッシュ

内に静置し、乾燥を防ぐためパラフィルムでディッシュを覆い、37℃で培養した。培養後、フィルターユニットに装着したペーパーディスクを、CFDA 含浸したものに取替え、反応後、BP で生菌計測した。

### (3) 密度勾配層回収装置の機能試験

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、自動的に回収するために、5本の針が装着されたマルチニードルユニット、マイクロフローチャンネル、シリンジポンプ、制御用 PC からなる装置を製作した(図2)。マイクロフローチャンネル出口には BP のフィルターユニットが装着できるようになっていて、機能的に迅速計数ができるように設計されている。

## C. 研究結果

### (1) 腸炎ビブリオの定量的分離結果

牡蠣から、DGC 法で分離した腸炎ビブリオを、培養法で計数した。4回の繰り返し実験を2回行った結果を表1に示す。図3は表1のNo.1の結果である。添加した菌数は約400cells/200・1であり、その回収率はほぼ100%であった。

菌の回収は25%と50%の層に集中して回収された。繰り返し実験によっても、25%層と50%層での回収率の違いは特に見られなかった。

### (2) 非培養法から培養法へのトレーサブル計数結果

50%グリセリン加 PBS で調製した CFDA で、BP フィルターユニット上に集菌した腸炎ビブリオの生菌を染色し、BP で測定した結果、図4の画像が得られた。この BP 計測画像では 438 cells/計測画面となった。計測画面はフィルター面積の1/60なので、菌がフィルター上に平均して分布していると仮定すれば、 $2.6 \times 10^4$  cells/filter となる。これは、もともと 100・1 の検体中の菌数である。一方、同じ検体 100・1

を培養法で求めたところ、菌数は  $2.7 \times 10^4$  cfu となり、良い一致を示した。

しかし、同様の実験を重ねるに従い、CFDA 染色によって BP 計測した菌数が、3% NaCl 加 TSA 培地で計数したコロニー数よりも著しく多くなったり、逆に少ない場合がしばしば観察された。腸炎ビブリオに対して、TSA よりも選択性が高い 3%NaCl 加 TCBS 培地に変えても問題は解決しなかった。

CFDA で染色された細胞が生菌であるとの判断は、細胞内エステラーゼが活性を保持していることに基づく。しかし、それは培養法の基になっている細胞増殖能と等価ではない。そこで、CFDA 陽性の細胞が、どの程度細胞増殖能も保持しているかを検定することが必要であり、それを迅速に判定する方法がマイクロコロニー形成能の測定である。4h 程度で判定できれば実用的には十分迅速と考えられる。そこで、一旦、CFDA 法で生菌判定した細胞をそのまま 4h 培養を続け、マイクロコロニーを形成させるようにした。培養は培地含有ペーパーディスクをフィルターユニット下側に装着する方法によった。一旦マイクロコロニーが形成されれば、それを計数するために、再度、CFDA で染色すれば、これで陽性となったものは、生菌を含むマイクロコロニーと判断してよいと考えられる。

実際、その様にして、培養後のマイクロコロニー観察をしたところ、コロニー数は添加菌(培養法で計数した菌数)の1%以下であった。このことは、CFDA 染色法で生菌数が少ない場合がしばしば起こることとも関連して、腸炎ビブリオ細胞の性質に因るところが大きいのではないかと考えた。

例えば、フィルターユニットへの吸引固定操作が腸炎ビブリオに対しては大きなストレス、あるいは傷害を与える結果になっていることが考えられた。また、そのような傷害を受けた菌に CFDA 染色操作などを行うとさらに、菌の増殖活性が低下する



こともある、などが一因になっていると推察された。

腸炎ピブリオを、BP用フィルターに慎重に吸引固定した後、BP測定もCFDA染色(CFDAを含浸させたペーパーディスクをフィルターユニットの下側に装着する方法)もしないで、直ちにペーパーディスク法で培養した場合は、培養4hで添加菌数の35%のコロニー数が観察された(図5)。しかし、それらの操作をおこなった場合は15%であった。また、乾燥防止のためにグリセリンを使用してきたが、これをミネラルオイルに変えてみたが、かえって、マイクロコロニーは全く形成されなかった。

上述してきた、非培養法から培養法へのトレーサブル計数に関して、大腸菌では100%近いマイクロコロニー生成を観測していたが、腸炎ピブリオでは今のところ15%に留まっている。菌の性質に因るところが大きいのと思われるが、実用的観点からは、さらに穏和な条件で菌の固定、染色方法を考案する必要があると結論された。

### (3) 密度勾配層回収装置の改良および機能試験

腸炎ピブリオは、上述のように、物理的処理に対して感受性が高く、容易に死滅する可能性がある。そこで、新規装置の機能試験を行うにあたっては、より細胞の安定性の高い大腸菌を用いることとした。

大腸菌液200・1をPercoll 25, 50, 75, 100%層の上に重層し、5,000rpmで30min遠心分離した後、各層を、自動装置で回収した。回収した各層の100・1をそれぞれ標準寒天培地に塗抹し、37℃で24h培養後、コロニーを計数した。3回試行した結果、75%層に約80%の菌が再現性よく回収された(表2)。

## D. 健康危険情報

特になし。

## E. 研究発表

### ○投稿論文

- ・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).

### ○著書・総説等

- ・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).
- ・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).
- ・島北寛仁、斉藤美佳子、松岡英明 "微生物迅速検査装置「バイオプローラ」" 食品工業 51(16), 34-42 (2008).

### ○学会発表

- ・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)
- ・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).
- ・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)
- ・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)

## G. 知的所有権の取得状況

### ○特許申請

- ・松岡英明、斉藤美佳子、末崎拓広, "密

度勾配遠心分離による細胞の分離回収  
方法および部材”，(出願日:2008.9.24,

特許願:2008-244821)

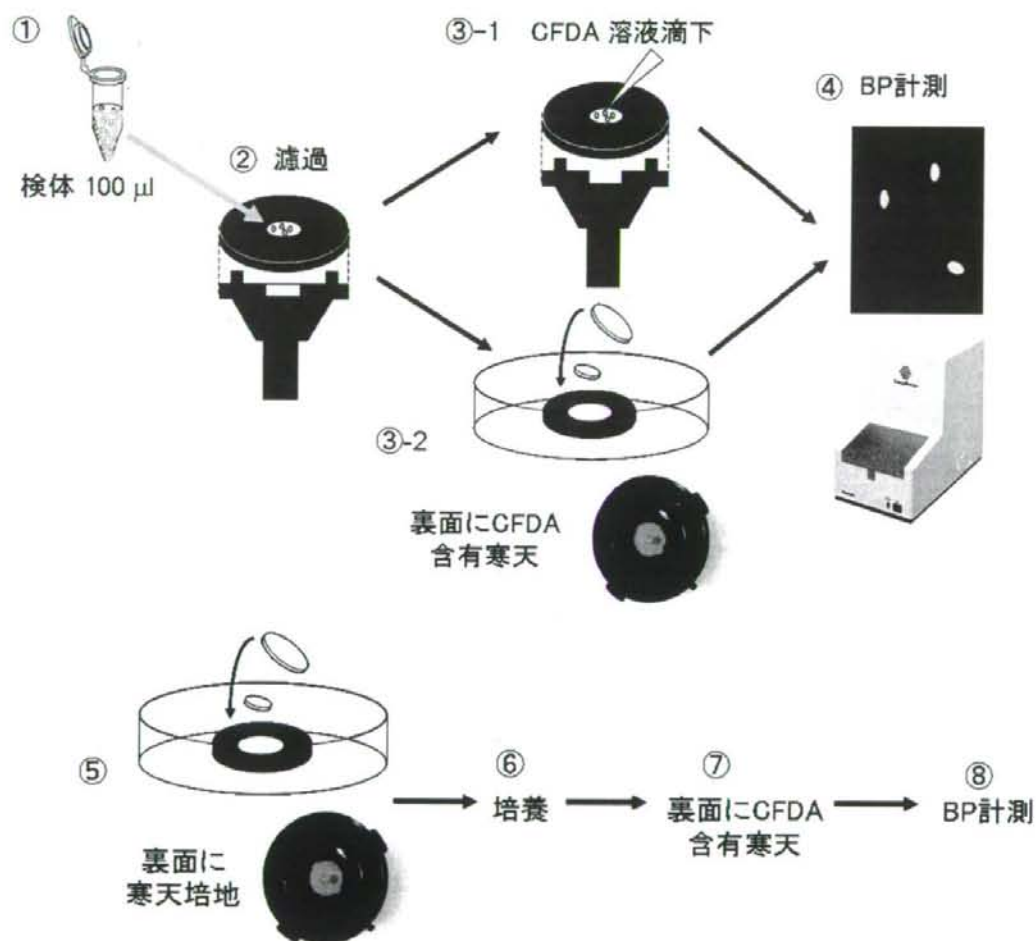


図1. バイオプレーラによる単一微生物細胞のトレーサブル計測

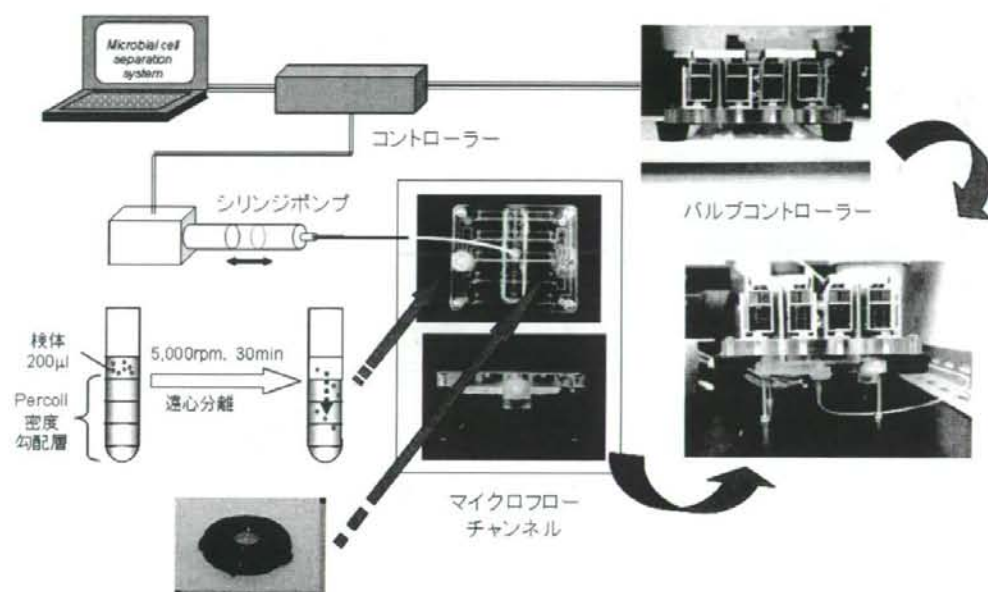


図2. 密度勾配層回収装置

表1. 腸炎ビブリオのDGC法による分離成績

試験回数	検体数	Percoll各密度層への分布率(%)					A:各層の菌数総和 (cells)	B:添加菌総数 (cells)	回収率 (100x A/B) (%)
		0%層	25%層	50%層	75%層	100%層			
No.1	4	7.8±5.1	39.0±11.0	40.5±6.4	10.3±1.5	2.5±1.3	427±25	396±44	108±6.8
No.2	4	7.2±8.7	40.8±26.0	37.3±21.7	9.7±6.6	5.0±2.3	428±17	417±25	103±4.2