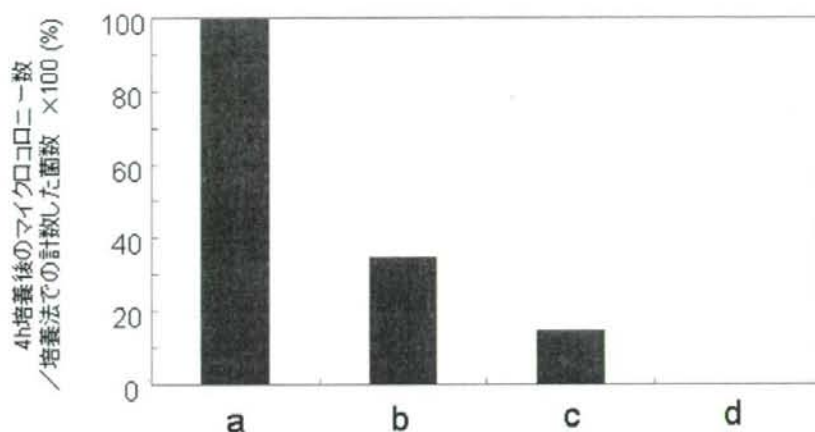


図3. 腸炎ビブリオのPercoll各密度層への分布



菌数 438 (cells/計測画面)

図4. CFDAで染色した腸炎ビブリオ生菌のBP測定画像



- a: 培養法によって計数した菌数
 b: 0hに、BP計測せず、4h培養後、CFDA染色しBP計測。フィルター上部にはグリセリンカPBS。
 c: 0hにCFDA染色、BP計測し、引き続き4h培養後、CFDA染色しBP計測。フィルター上部にはグリセリンカPBS。
 d: 0hにCFDA染色、BP計測し、引き続き4h培養後、CFDA染色しBP計測。フィルター上部にはミネラルオイル。

図5. 腸炎ビブリオの非培養法から培養法へのトレーサブル計数におけるBP計測及び乾燥防止剤の影響

表2. 密度勾配層回収装置による大腸菌の自動回収成績

試験回数	検体数	Percoll各密度層への分布菌数					各層の菌数総和
		0%層	25%層	50%層	75%層	100%層	
Nb.1	1	0	6	61	308	12	387
Nb.2	1	1	12	46	268	18	345
Nb.3	1	0	1	55	284	9	349
平均		0	6	54	287	13	360
各層への分布率 (%)		0.1	1.8	15	79.5	3.6	100

平成20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）
研究分担報告書

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

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

研究分担者 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, 尾畑浩魅, 小西典子, 上原さとみ, 門間千枝 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、リアルタイムPCR法による検出と、Ethidium Monoazide (EMA) を用いて生菌と死菌を区別する方法について検討した。

リアルタイムPCR法として、菌株の培養液を用いて検討した結果、 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) としてTaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents (ABI) を加えても同程度の感度で検出することができた。

生カキの2%食塩加APW培養液に腸炎ビブリオを接種した場合においても、 $10^3 \sim 10^4$ cfu/mlまで検出することができた。さらにICを加えても同様に検出可能であった。

遺伝子検出では死菌の遺伝子も検出してしまうという問題点を解決するために、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による定量では、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。以上の結果より、食品培養液から遺伝子を検出する際、EMA処理は死菌と生菌を判別するのに有効な方法であることが明らかになった。

A. 研究目的

現在国内において、食品の細菌学的検査は、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の簡易迅速検査法としてリアルタイムPCR法による検出と、生菌と死菌を区別する遺伝子検出系を検討し

た。

B. 研究方法

1. リアルタイムPCR法による腸炎ビブリオ検出

(1)リアルタイムPCR法

腸炎ビブリオを特異的に検出するリアルタイムPCR法として、*t1h*を標的とした2種類のTaqMan PCR法：A (Davis CR *et al.*, J. Food Prot. 67: 1005-8, 2004.)、B

(Nordstrom JL *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5840-7, 2007.)を検討した。機器はABI PRISM 7000を使用した。

(2)検出感度の検討

腸炎ビブリオV89-056株(ヒト由来)及びV89-655株(ヒト由来)の3%食塩加トリプチケースソイブロス(TSB)培養液をそれぞれ $1.6 \times 10^6 \sim 10^3$ cfu/ml及び $2.0 \times 10^6 \sim 10^3$ cfu/mlに段階希釈した。各希釈液からアルカリ抽出法でDNAを抽出して、リアルタイムPCR法と従来のPCR法(LDH;石橋ら、大阪府立公衛研所報23:67-71,1992.)により検出感度を比較検討した。

(3)インターナルコントロール(IC)の検討

リアルタイムPCR法のICとしてTaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents(ABI)を加えて検討した。従来のPCR法ではプラスミドDNA pBR322内に当センサーでプライマーを設計して検討した。

(4)生カキへの添加実験

生カキを2%食塩加アルカリペプトン水(pH8.6)で37°C18時間培養した培養液に、腸炎ビブリオV89-056株を段階希釈して添加し $1.0 \times 10^7 \sim 10^3$ cfu/mlになるように試料を調整した。各試料からアルカリ抽出法でDNAを抽出し、リアルタイムPCR法による腸炎ビブリオ検出の検討を行った。また、TCBS、ク

ロマアガービブリオ、ESビブリオ寒天培地で分離培養を行い、結果を比較した。

2. 生菌と死菌の区別

(1)Ethidium Monoazide(EMA)処理

試料100 μ lに反応系の濃度10 μ g/mlとなるようにEMAを添加した。遮光下室温で5分間反応させた後、氷上で20cmの距離で500Wのハロゲンランプを照射しEMAを失活させた。

(2)EMA濃度の検討

菌株V89-056の3%食塩加TSB培養液を供試した。死菌は、75°C5分の加熱により作成した。1.7あるいは 1.1×10^7 cfu/mlの生菌と死菌に反応系濃度100 μ g、10 μ g、1 μ g、0.1 μ g/mlにEMAを加えて処理を行い最適濃度を検討した。

(3)加熱死菌に対するEMA処理効果の検討

菌株V89-056及びV07-58(食品由来)の生菌と加熱死菌の段階希釈液をそれぞれ 1.6×10^7 及び $1.9 \times 10^7 \sim 10^3$ cfu/mlに調整した。各段階希釈液をEMA処理(10 μ g/ml)後、アルカリ抽出法でDNAを抽出し、リアルタイムPCR法Aと従来のPCR法(*toxR*;Kim *et al.*, J. Clin. Microbiol. 37: 1173-7, 1999.)で、EMA未処理検体と結果を比較検討した。

(4)増殖ステージとEMA処理効果の検討

菌株V89-056及びV07-58の培養液を濃度 1.6×10^7 及び 1.9×10^7 cfu/mlに3%食塩加TSBに添加し、37°Cで静置培養した。2、4、6、8、12、18、24時間後に寒天平板塗抹法により菌数を測定した。各検体はEMA処理(10 μ g/ml)あるいは未処理の後、リアルタイムPCR法でも菌数を測定し、結果を比較検討した。

C. 研究結果

1. リアルタイムPCR法による腸炎ビブリオの検出

(1) 検出感度の検討

腸炎ビブリオV89-056及びV89-655株の段階希釈液 ($10^5 \sim 10^3$ cfu/ml) は従来のPCR法でいずれも 10^4 cfu/ml まで検出された (表1、図1)。一方、2種類のリアルタイムPCR法A、Bによる検出ではいずれの菌株も 10^3 cfu/ml まで検出された (図2)。

(2) ICの検討

上記(1)の操作にICを加えて検討した結果、従来のPCR法では 10^4 cfu/ml まで検出され (図1、表1)、2種類のリアルタイムPCR法A、Bではいずれも 10^3 cfu/ml まで検出された (図2)。すなわち、従来のPCR法もリアルタイムPCR法もICを加えない場合と同様の感度で検出された。

(3) 生カキへの添加実験

腸炎ビブリオ濃度 $10^7 \sim 10^3$ cfu/ml に調整した生カキの培養液を対象にリアルタイムPCR法で腸炎ビブリオの検出を検討した結果、リアルタイムPCR法A及びBでそれぞれ 10^3 cfu/ml 及び 10^4 cfu/ml まで検出され、ICを添加しても同様に検出することができた (図3)。

寒天平板による分離培養では、TCBSでは 10^7 cfu/ml の試料のみ、クロモアガービブリオでは 10^7 、 10^6 、 10^5 の試料、ESビブリオでは 10^7 、 10^6 の試料から、接種した菌を分離することができた (図4)。

2. 生菌と死菌の区別

(1) EMA処理濃度検討

腸炎ビブリオV89-056株の濃度 1.7×10^7 cfu/ml の生菌及び加熱死菌液に、EMAを反応系濃度 $100 \mu\text{g/ml}$ で処理すると、生菌も死菌も検出されなくなった。

そこで、 1.1×10^7 cfu/ml の生菌及び加熱死菌液に 10 、 1 、 0.1 、 $0.01 \mu\text{g/ml}$ の濃度で

処理した結果、いずれの濃度でも生菌には影響がなかった。 10 、 $1 \mu\text{g/ml}$ の濃度では死菌は検出されなくなったが、 0.1 、 $0.01 \mu\text{g/ml}$ の濃度では死菌にも作用しなかった (図5)。これらの結果から、EMA処理濃度を反応系あたり $10 \mu\text{g/ml}$ として、以下の実験を行った。
(2) 加熱死菌に対するEMA処理効果：従来のPCR法による検出

腸炎ビブリオV89-056株の段階希釈液 $1.6 \times 10^7 \sim 10^3$ cfu/ml の生菌及び加熱死菌は従来のPCR法 (*toxR*) で 10^4 cfu/ml まで検出することができた。それぞれにEMA処理をすると、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 (図6)。

菌株V07-58も同様の結果であった。

(3) 加熱死菌に対するEMA処理効果：リアルタイムPCR法による検出

腸炎ビブリオV89-056株の段階希釈液 $1.6 \times 10^7 \sim 10^3$ cfu/ml の生菌及び加熱死菌液をリアルタイムPCR法Aで定量した。EMA未処理試料は生菌及び加熱死菌いずれも $1 \times 10^7 \sim 10^3$ cfu/ml に定量された (図7)。EMA処理試料では生菌は未処理試料と変わらず $1 \times 10^7 \sim 10^3$ cfu/ml に定量されたが、加熱死菌は 1.6×10^7 cfu/ml の試料では 2.2×10^5 cfu/ml に、以下 1.6×10^6 、 10^5 、 10^4 cfu/ml の試料ではそれぞれ 2×10^4 、 10^3 、 10^2 cfu/ml と約 10^2 cfu/ml 少なく定量され、 1.6×10^3 cfu/ml の試料では検出されなかった。

菌株V07-58も同様の結果であった。

(4) 増殖ステージとEMA処理効果の検討

腸炎ビブリオV89-056株を 1.6×10^2 cfu/ml に添加した3%食塩加TSBを 37°C で培養して寒天平板塗抹法で菌数を測定すると、培養後約8時間で約 10^8 cfu/ml まで対数増殖した (図8)。約4時間の静止期の後減少期となり、培養24時間では約 10^7 cfu/ml であった。リアル

タイムPCR法による定量では、対数増殖期及び静止期は培養法と同程度に定量された。減少期でも定量値は約 10^9 cfu/mlであったがEMA処理をすると培養24時間では 2×10^8 cfu/mlと約1オーダー少なく定量された。菌株V07-58も同様の結果であった。

D. 考察

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、研究的に報告されている中から全ての腸炎ビブリオを検出する二種類の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。

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必要がある。そこで市販されているIC; Exogenous Internal Positive Control Reagents (ABI) を検討した結果、添加による検出感度の低下もなく使用可能であることを確認した。

次に生カキの培養液に腸炎ビブリオを $1.0 \times 10^7 \sim 10^3$ cfu/ml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。リアルタイムPCR法では $10^4 \sim 10^3$ cfu/mlまで

検出することができた。しかし、平板に分離して添加した菌の分離を試みたが、 10^4 cfu/mlより低濃度の培養液では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。

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。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。

EMA処理の濃度について検討した結果、終濃度 $0.1 \mu\text{g/ml}$ では死菌に作用せず、 $100 \mu\text{g/ml}$ では生菌も破壊されるため、 $10 \mu\text{g/ml}$ とした。反応時間は氷上30分間とする報告もあり、比較検討したが同じ結果であったため、室温で5分間とした。

EMA処理による効果をリアルタイムPCR法でみると、加熱死菌は2オーダー程度少なく定量された。従来のPCR法では、 10^7 cfu/mlの試料も検出されなくなった。従来のPCR法の検出感度は 10^4 cfu/mlであるので、4オーダー以上減少したと考えられる。これは、従来のPCR法 (*toxR*) が368bpであるのに対してリアルタイムPCR法の増幅産物が通常60bp程度と短く、EMA処理により遺伝子が損傷を受ける確率が低いためであると推測した。

37℃で培養した腸炎ビブリオは静止期が短く、比較的早く減少期に移行する。減少期に入り腸炎ビブリオが死滅しはじめてもそれらの遺伝子は検出される。しかし、EMA処理により増殖後死滅した菌体の遺伝子も損傷を受ける可能性が示唆されたため、培養時

間是对数増殖期を過ぎない時間が良いと考えられた。

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。

リアルタイムPCR法として腸炎ビブリオに特異的な遺伝子である *t1h* を標的にした2種類のTaqMan PCR法を検討した。検出感度は 10^3 cfu/ml であり、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法でスクリーニングすることは有用であると示唆された。また、市販のICが有効であることを確認した。

次に、EMAを用いて生菌と死菌を区別する方法を検討した。EMA処理により従来のPCR法では 10^7 cfu/ml の腸炎ビブリオ死菌が検出されなくなり、リアルタイムPCR法では2オーダー程度少なく定量された。食品培養液の遺伝子検出においても、EMA処理により死菌のDNAを破壊し影響をなくす、あるいは減少させることが可能であった。この際、培養時間は対数増殖期を過ぎない時間が適当であると考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

〈発表論文〉

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。

(学会発表)

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。

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。

Shimajima 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. 知的所有権の取得状況

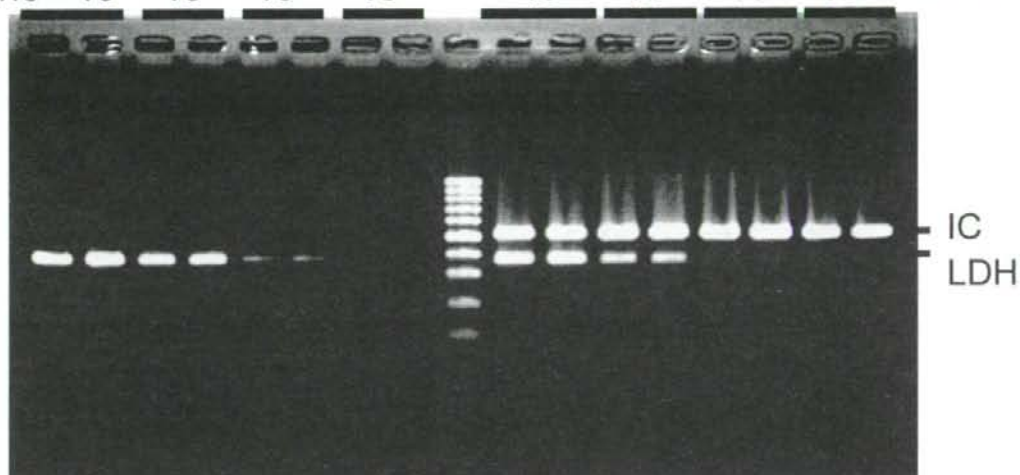
なし

表1 PCR法による腸炎ビブリオの検出感度と
 インターナルコントロール(IC)の検討:菌培養液

供試菌株	検出部位	供試菌数 cfu/ml			
		1.6×10^6	10^5	10^4	10^3
V89-056	LDH	+++	+++	+	-
	LDH/IC	+++ / +++	++ / +++	+ / +++	- / +++
		2.0×10^6	10^5	10^4	10^3
V89-655	LDH	+++	+++	+	-
	LDH/IC	+++ / +++	++ / +++	+ / +++	- / +++

供試菌株:V89-056

1.6×10^6 10^5 10^4 10^3 10^6 10^5 10^4 10^3 cfu/ml



供試菌株:V89-655

2.0×10^6 10^5 10^4 10^3 10^6 10^5 10^4 10^3 cfu/ml

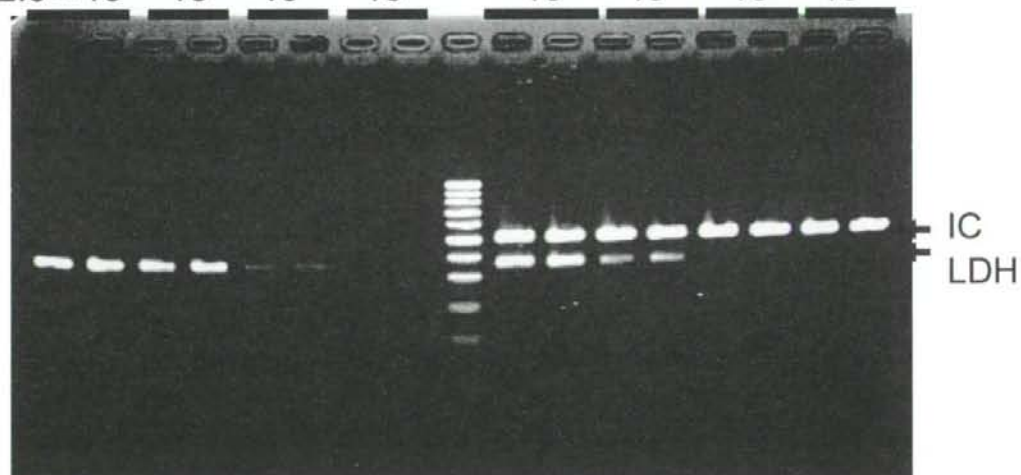
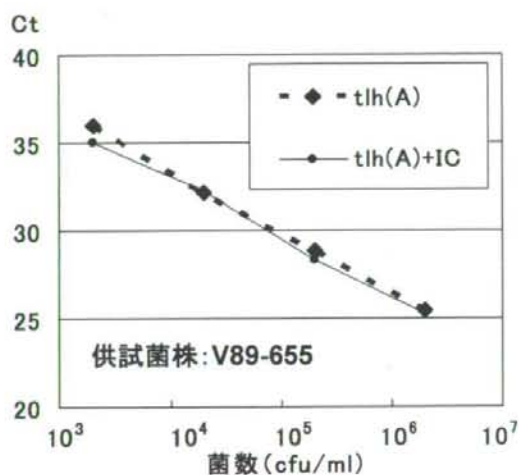
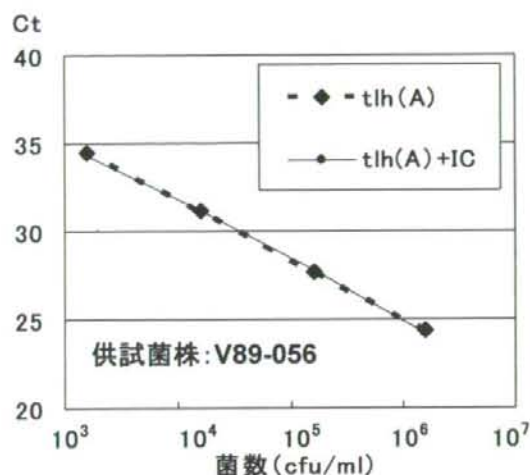


図1 PCR法による腸炎ビブリオの検出感度と
インターナルコントロール(IC)の検討:菌培養液

使用プライマー:LDH;372bp

IC:pBR322(プライマーは当センターにて設計);511bp

リアルタイムPCR法 A



リアルタイムPCR法 B

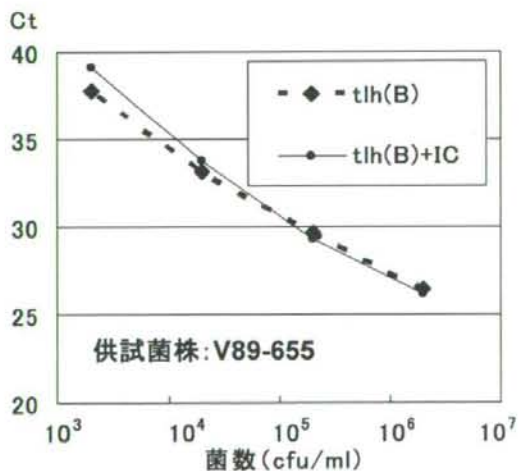
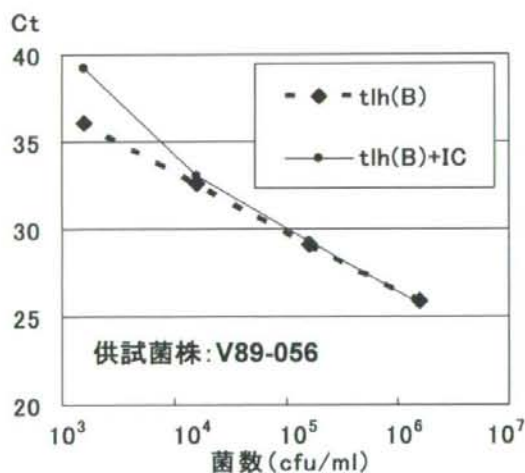
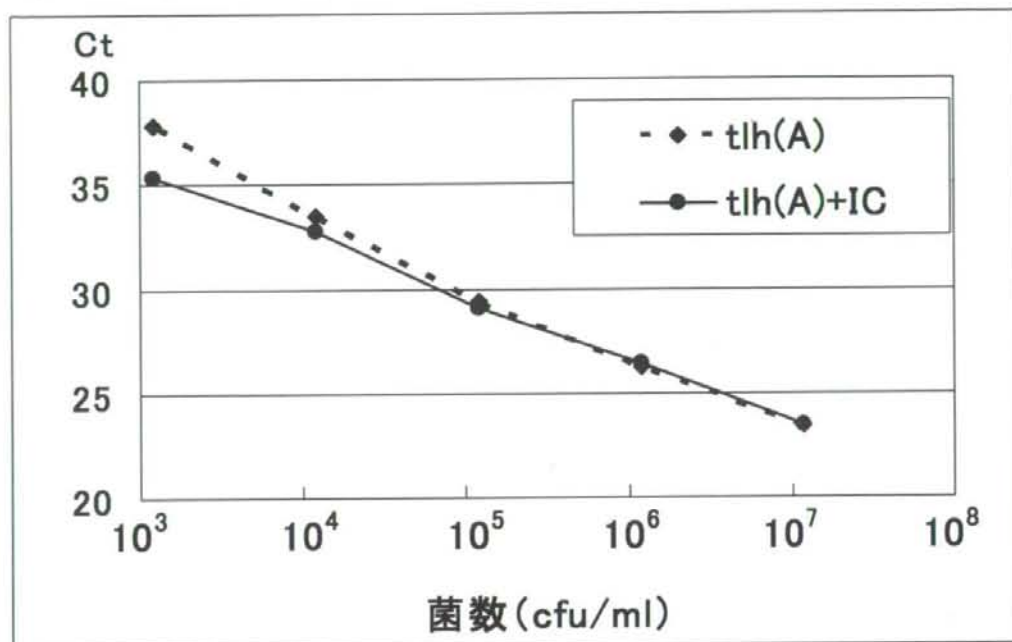


図2 リアルタイムPCR法による腸炎ビブリオの検出感度とインターナルコントロール(IC)の検討: 菌培養液

リアルタイムPCR法 A



リアルタイムPCR法 B

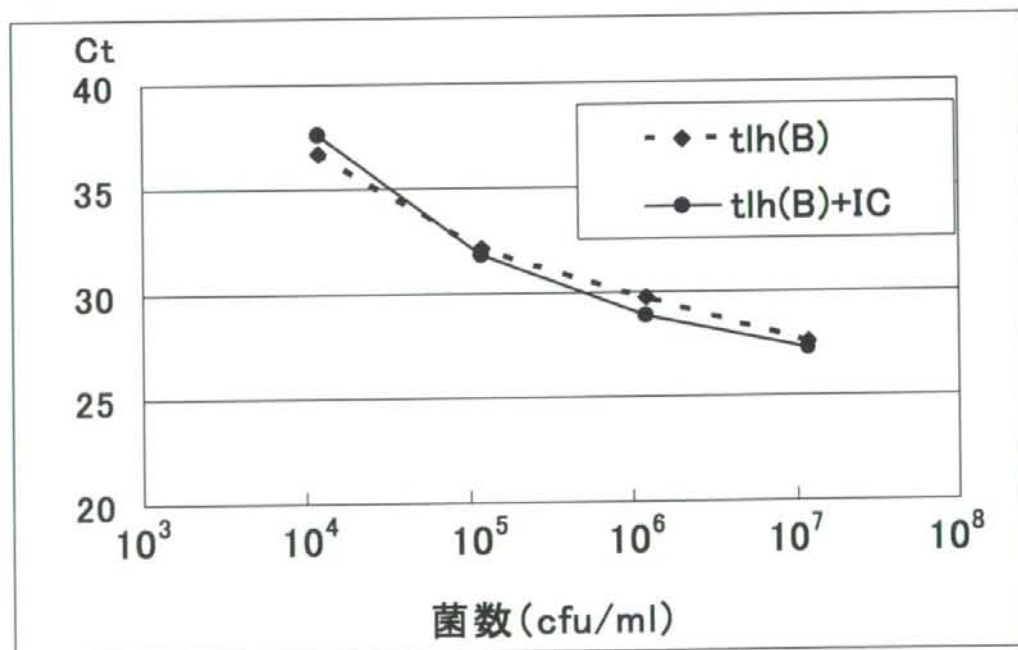
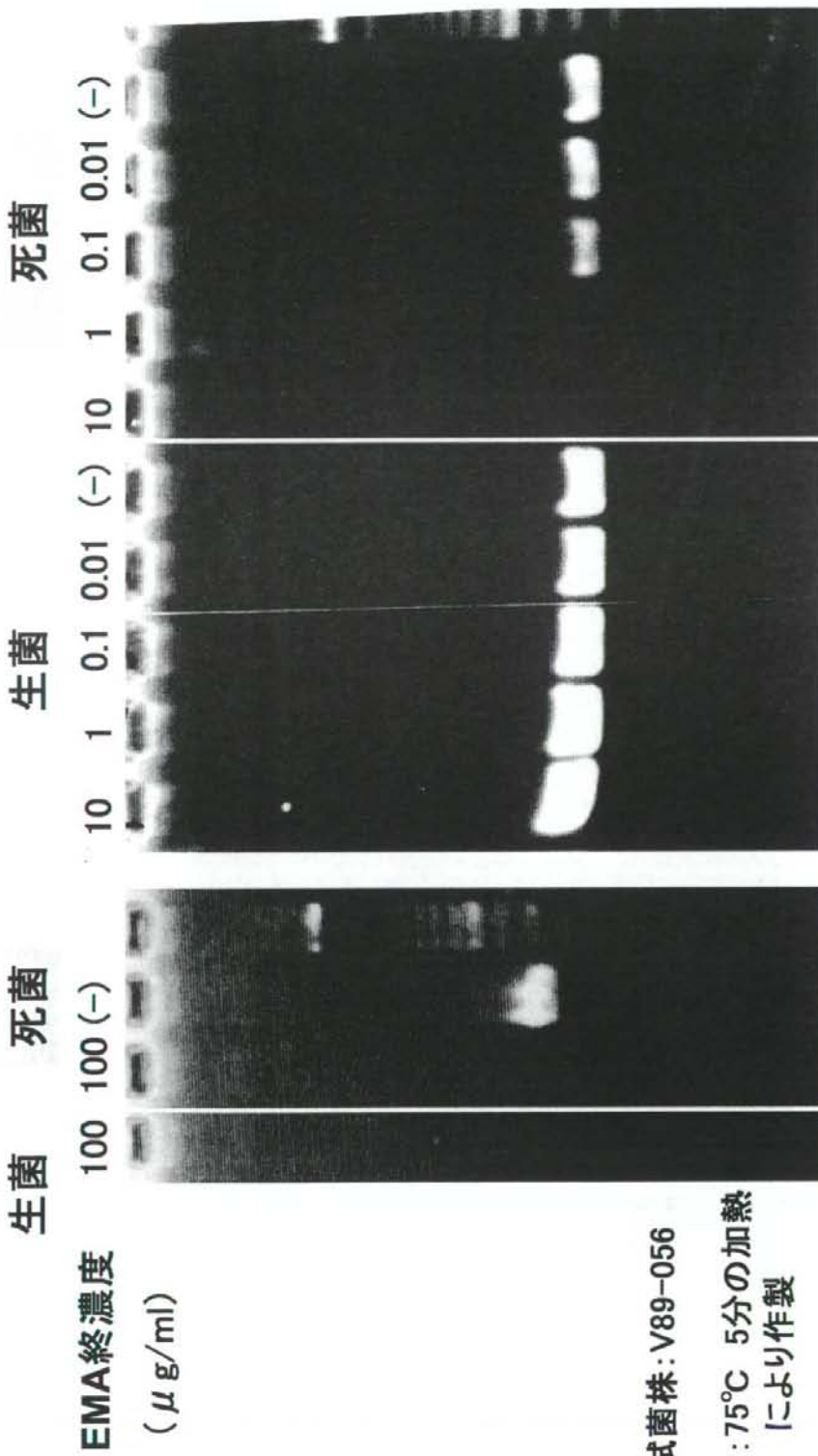


図3 リアルタイムPCR法による腸炎ビブリオの検出と
 インターナルコントロールICの検討: 生カキへの添加実験



供試菌株: V89-056

死菌: 75°C 5分の加熱
により作製

試料濃度:
1.7 × 10⁷cfu/ml

試料濃度:
1.1 × 10⁷cfu/ml

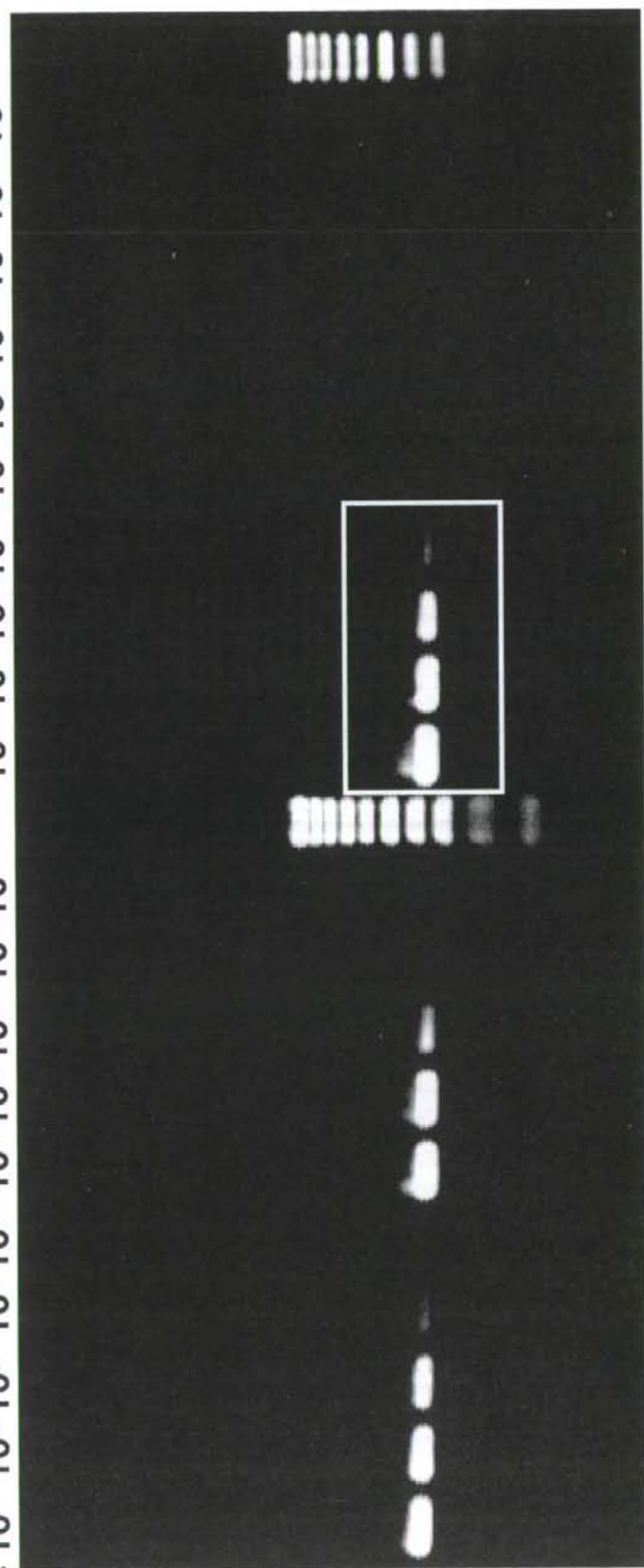
図5 EMAの濃度の検討

生菌

死菌

EMA未処理 EMA処理* EMA未処理 EMA処理*

1.6 × 10⁷ 10⁶ 10⁵ 10⁴ 10³ 10⁷ 10⁶ 10⁵ 10⁴ 10³ 10⁷ 10⁶ 10⁵ 10⁴ 10³ 10⁷ 10⁶ 10⁵ 10⁴ 10³



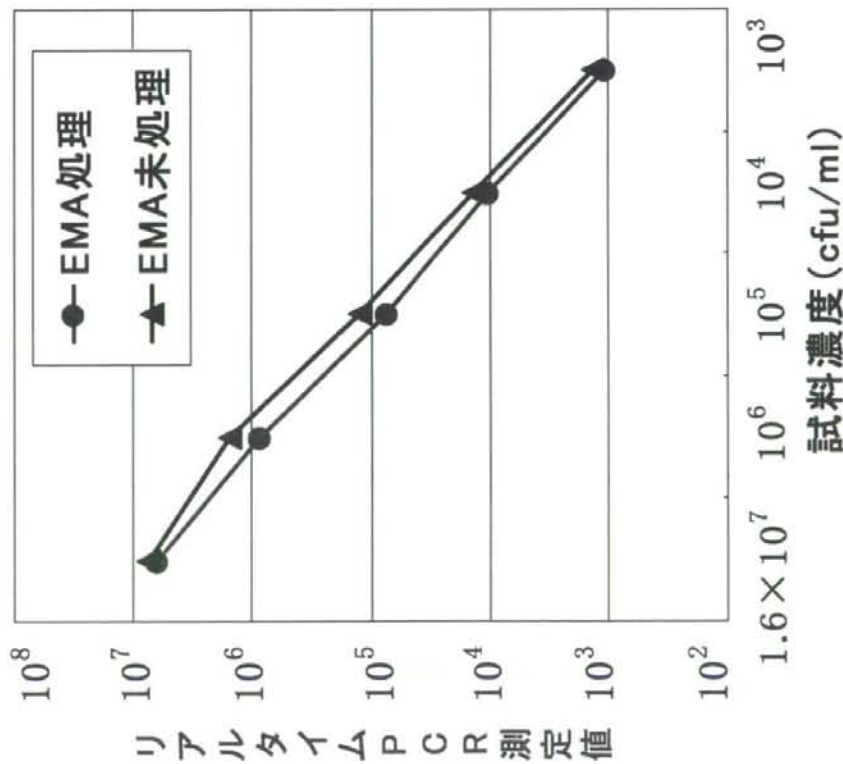
* 反応系あたり10 μg/ml

供試菌株: V89-056

図6 加熱死菌に対するEMA処理効果:PCRによる検出

供試菌株: V89-056

生菌



死菌

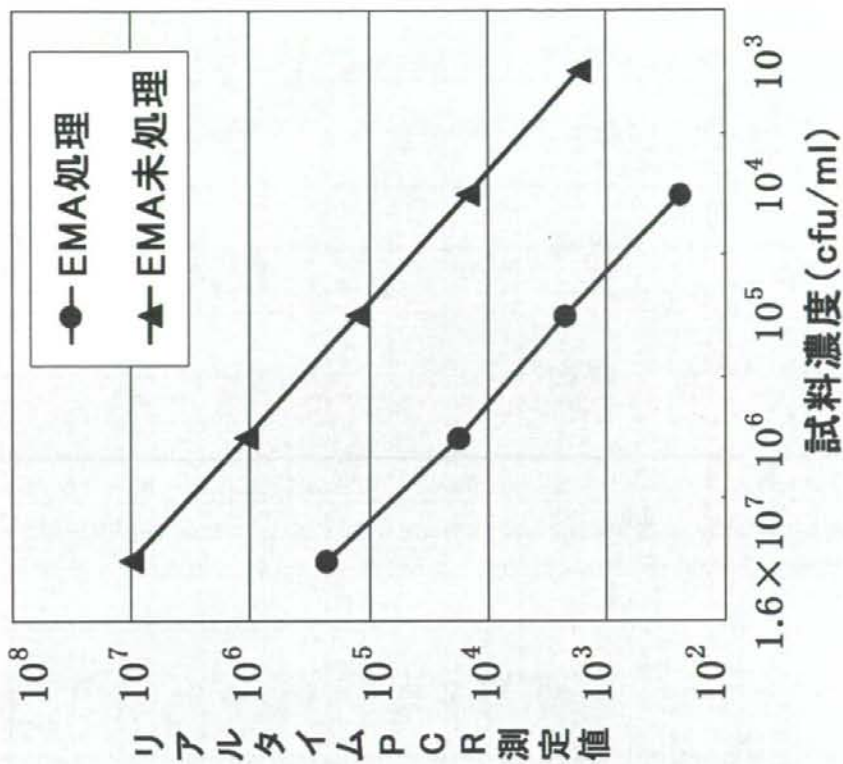


図7 加熱死菌に対するEMA処理効果:リアルタイムPCRによる定量

供試菌株: V89-056

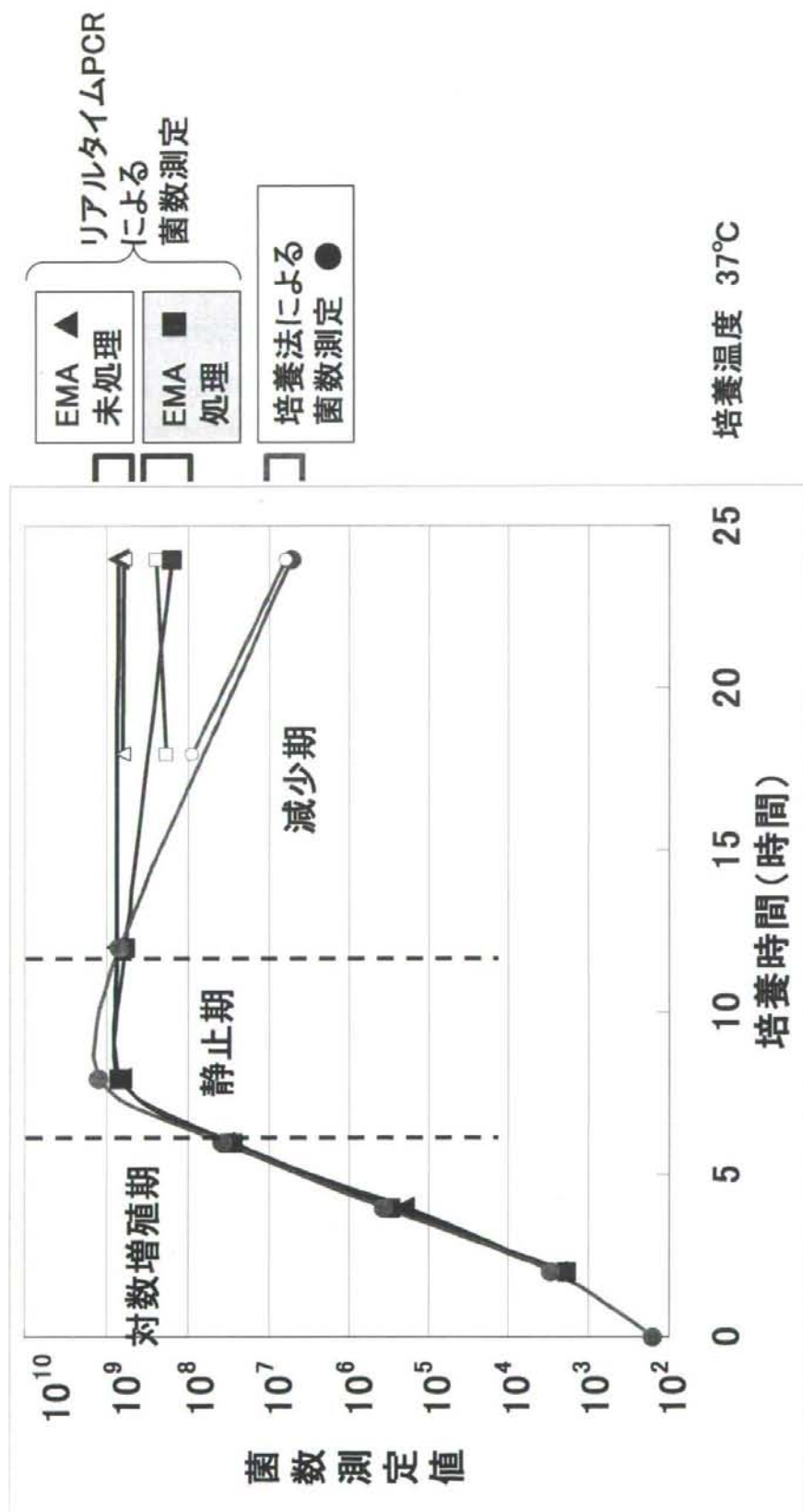


図8 増殖ステージとEMA処理効果

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保研究事業)
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

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
研究協力者	宮原美知子	国立医薬品食品衛生研究所	衛生微生物部第二室長
	磯部順子	富山県衛生研究所	細菌部
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター	微生物担当
	山崎貢	愛知県衛生研究所	生物学部 細菌研究室
	山崎涉	大阪府立公衆衛生研究所	細菌課
	米北太郎	日本ハム株式会社	中央研究所 研究員

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。本研究では主に遺伝子増幅法を活用し、菌の検出を迅速化する事を検討してきた。病原性の有無に関わり無く保持している *toxR* 遺伝子を標的として腸炎ビブリオに特異的な配列の再解析を行ない、類縁菌との峻別を行ないつつ高感度に検出する事を試みた。また、内部陽性コントロール(PCT)を添加する事により、その確度を上げ検査法として信頼出来るものとする事が可能となった。

それとは別に LAMP 法も検討し、PCR よりも高速な検出が可能であった。さらに遺伝子増幅法よりもさらに簡便な方法として、イムノクロマト法も開発した。この方法は特別な機器や技術を必要とせず、試料の処理も短時間で判定出来た。

標準検査法は増菌培養、選択分離培養、確認試験培養にそれぞれ 16-18 時間を要するが、遺伝子増幅法やイムノクロマト法はその特異性を利用し、選択分離や確認試験を代替出来る。しかしながら、それぞれの試験には欠点も残されており、培養法をすべて別な方法に置き換えるまでには至っていない。今後さらなる研究で、これらの試験法を組み合わせ、より迅速でより簡便、確実な検査法が確立出来るものと期待される。

A. 研究目的

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。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。

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、また標準検査法と比較して、その迅速性、簡便性、および精度について検討する事を目的とする。

B. 研究方法

研究方法は以下の 4 点について行なった。

1. 内部陽性コントロール用鋳型 DNA (PCT) 添加 toxRn-PCR による腸炎ビブリオの検出

2. イムノクロマト法による腸炎ビブリオの検出

3. *t1h* 遺伝子を標的とした LAMP 法による腸炎ビブリオの検出

4. *tdh* 遺伝子を標的とした LAMP 法による腸炎ビブリオの検出

C. 研究結果

別紙各報告書参照

D. 考察

別紙各報告書参照

E. 結論

別紙各報告書参照

F. 研究発表

別紙各報告書参照

G. 参考文献

別紙各報告書参照

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

協力研究者 宮原美知子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部第二室長

研究協力者 磯部順子 富山県衛生研究所 細菌部

研究協力者 緒方喜久代 大分県衛生環境研究センター 微生物担当

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、菌の検出を迅速化する事を検討してきた。食品そのもの、あるいは共存菌の成分がPCR反応液に影響を与える事により、実際に目的の菌が存在していても検出出来ない場合がある。これを除外するためPCR反応液にあらかじめ陽性コントロールとなる鋳型DNAを添加し、PCR反応の確度を上げ、検査法として信頼出来るものとする事が可能となった。

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℃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。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を増菌培養せず、菌体 DNA の増幅のみで検出する事を試み、特異的かつかなり高感度に検出する事ができた。食品検査においては食品由来の夾雑物が PCR 反応に影響を与える場合もあり、また、共存菌由来の DNA が多量に存在した場合の非特異反応についても注意が必要である。

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、内部陽性コントロールの添加による、PCR 法を導入した場合の検査精度の向上について検討を行なった。

B. 研究方法

1. 内部陽性コントロール用鋳型 DNA の調製
クローニングベクター pBR322 を鋳型として、昨年度、腸炎ビブリオ検出用として新たに設計した *toxRn* の primer に pBR322 の領域を増幅する primer を融合させた primer を新たに設計した(図1)。この primer セットを用いて、pBR322 を鋳型とした PCR を行なった。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 50 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。primer および PCR 条件は以下の通りとした。

322*toxRn*f

5' -GCTTCTTCAGACTCAAGCTCAA
gctcaagcccttgagagccttcaac-3'

322*toxRn*r

5' -CGCAAATCGGTAGTAATAGTGC
ggacagcatggcctgcaacg-3'

なお大文字は *toxR* 特異的な配列、小文字は pBR322 特異的な配列である。

増幅産物 400bp

反応サイクル

94°C 5分

94°C 30秒

50°C 30秒

72°C 1分

72°C 10分

4°C ∞

} 30回

増幅産物は MinElute PCR purification kit (Qiagen) を用いて精製し、260nm の吸収を測定して濃度を求めた。これを内部陽性コントロール鋳型 DNA (positive control template: PCT) として用いた。

2. PCT を反応液に添加した場合の腸炎ビブリオ検出 PCR の反応条件
腸炎ビブリオ検出用の *toxRn*-PCR に PCT