

を 10 ng-100 ag/ μ l を添加し、PCR を行なった。

また、腸炎ビブリオから調製した染色体 DNA を 50、5、0.5 μ g/ μ l、*V. alginolyticus* から調製した染色体 DNA を 0.5 pg/ μ l を各反応液に加えて PCR を行ない、PCT 存在下での反応性を見た。

3. 生スルメイカに腸炎ビブリオを添加した場合の PCT 存在下 toxRn-PCR

食品由来雑物による PCR 反応の阻害についての検討を行なうため、生スルメイカに腸炎ビブリオを添加し、検出を行なった。

生スルメイカに 6.8×10^3 cfu/g、あるいは 6.8×10^4 cfu/g 接種および無添加の材料を 25 g それぞれ用意し、アルカリペプトン水 225 ml を加えてストマッカー処理にて均一化し、そこから 1 ml を採り 5,000 rpm、2 min 遠心し、沈渣に 100 μ l の滅菌蒸留水を加えて 100°C、5 min 加熱後、13,000 rpm、10 min 遠心した上清を DNA 抽出液とした。PCR は定法通り行ない、アガロースゲル電気泳動にてバンドの確認を行なった。

別に上記ストマッカー処理液 10 μ l をクロモアガービブリオに塗抹し、接種菌の確認を行なった。

PCR 反応は TaKaRa Ex-Taq を用い、反応液組成はメーカーの指示に従った。反応液量は 20 μ l。primer セットおよび反応条件は以下の通りとした。なお、PCT は

10 fg/ μ l を反応液にあらかじめ添加した。

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

4. 自然汚染アサリでの PCT 添加 PCR と標準法に基づく培養法での MPN 数の比較

産地の異なる市販アサリを 2 種類用意し、標準検査法にしたがって 3 段階希釈 3 本法で MPN 測定を行なった。アサリむき身 25 g をアルカリペプトン水または生理食塩水 225 ml に入れストマッカー処理後、10 ml のアルカリペプトン水にそれぞれ 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} になるように希釈し、35°C 18 時間増菌培養した。各試験管より増菌液 1 ml を採り、3 の方法と同様に PCR 用の鋳型 DNA を調製し、PCR も 3 の条件で行なった。

別に上記増菌液の上層から 1 白金耳を採り、クロモアガービブリオ寒天培地に塗抹し、35°C 18 時間培養した。腸炎ビ

ブリオが疑われる集落をいくつか採り確認後、集落数を数えてMPN数を最確数表より求めた。

5. 生鮮魚類からの腸炎ビブリオの検出

市販生鮮魚類から腸炎ビブリオの検出を培養法とPCT存在下のPCR法で行なった。

19種類の鮮魚のうろこ・えら・ひれ等海水と多く接触する部分を中心に10g採取し、それに90mlの食塩ポリミキシン培地を入れて手もみで乳剤を作製した。3本5段階のMPN法として接種し、(PCRの鋳型DNAはこの乳剤を5% chelexと等量混合100°C5分加熱した遠心上清を用いた)約18時間培養後、培養液の表面に近いところから1白金耳をとりTCBSに塗抹、18時間培養(長くても20時間)、緑色コロニーを釣菌した。腸炎ビブリオである事の確認を行ない、最確数表より菌数を求めた。

別に増菌培養前に調製した鋳型DNAを用いて3の条件でPCTを添加しPCRを行なった。

6. 輸入冷凍エビからの腸炎ビブリオの検出

輸入冷凍エビから腸炎ビブリオの検出を培養法とPCT存在下のPCR法で行なった。

輸入冷凍エビ20検体のうち10検体をそれぞれ50g採り、2%食塩加アルカリペプトン水100mlでスタマッキング後

37°C一晩増菌培養した。培養液1mlを採り、12,000rpm、5min遠心し、沈渣に5% chelex 200 μ lに懸濁後、100°C、10min加熱、12,000rpm、5min遠心上清を鋳型DNAとした。

それとは別に増菌培養液1白金耳をTCBSあるいはビブリオ寒天培地、クロモアガービブリオに塗抹し、いくつかの集落を確認培地に接種して腸炎ビブリオである事の確認を行なった。

また、コレラ菌との同時検出の目的に合わせ、10検体については検体50gに対し0.2%食塩加アルカリペプトン水150mlでスタマッキング後37°C一晩増菌培養し、さらにその1mlを0.25%食塩加アルカリペプトン水10mlに接種して二次増菌後、上記同様鋳型DNAの調製と菌の分離を試みた。

PCRはこのようにして調製した鋳型DNAを用いて3の条件でPCTを添加しPCRを行なった。

C. 研究結果

1. 内部陽性コントロール用鋳型DNA (PCT)の調製

図1に示す位置にprimerを設定し、腸炎ビブリオ *toxR* 遺伝子を特異的に増幅する primer 配列をその5'側に追加した hybrid primer を設計した。pBR322ベクターを鋳型として、PCR反応を行なうと、この primer は pBR322の部分のみが対合し、5'側にある *toxR* に相同な配列には対合しない。その状態でDNA合成

反応を行なうと 2 回目のサイクルでこの *toxR* 部分の配列も鋳型となり、最終的にはこの hybrid primer 全体を含む pBR322 断片が増幅される。primer を増幅産物が 400 bp になるように設計してあるので、腸炎ビブリオの *toxRn*-PCR の増幅産物 230 bp とは明らかに差がわかるようにしてある。この primer セットを用いて実際に PCR 反応を行なったところ、生成した PCR 産物は単一のバンドとして増幅され、これを精製キットにて鋳型 DNA として純化し、260 nm の吸光度を測定してその濃度を求めた。

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

1. で得られた精製 DNA 10 ng~100 ag/ μ l を鋳型として、*toxRn*-PCR 反応を行なうと、*toxR* 特異的配列が鋳型 DNA の 5' 側に存在するため、*toxRn* の primer セットを用いても 400 bp の増幅産物が生成される。検出限界は 100 ag/ μ l であるが、十分なシグナルを得るためには検出限界よりも多い方がよく、腸炎ビブリオ検出系にはその 10 倍から 100 倍量を添加する事とした。

腸炎ビブリオ検出系の条件検討を行なうため、腸炎ビブリオから精製した DNA と海水中に多く存在し、腸炎ビブリオ検査の際に混入しやすい *V. alginolyticus* の精製 DNA を様々な濃度で共存させて、*toxRn*-PCR 検出系における影響を検討した。図 2 に示した通り、

toxRn-PCR 検出系では腸炎ビブリオはその DNA 量に応じてバンドの濃淡が現れ、それは過剰量の *V. alginolyticus* の DNA の有無には影響しなかった。

PCT 添加についても同様に、PCT を添加しても腸炎ビブリオ DNA の増幅には全く影響を与えておらず、*V. alginolyticus* の DNA の共存下でも *toxRn*、PCT どちらの増幅反応にも影響しなかった。ただし、腸炎ビブリオ DNA の量が多くなると PCT の増幅効率が低下していたが、これは同じ primer による増幅反応のため競合しあうためであると考えられる。

3. 生スルメイカに腸炎ビブリオを添加した場合の PCT 存在下 *toxRn*-PCR

食品材料中の夾雑物による影響を調べるため、まず菌汚染のほとんどない食品検体について *toxRn*-PCR を試みた。腸炎ビブリオは培養菌を PCR の検出限界に近い量 (10^4 /ml) 付近を接種して行なった。図 3 に示すように検出限界である 10^4 /ml よりも少ない 6.8×10^3 /g (10 倍乳剤としているので、 6.8×10^2 /ml) では 3/10 の検出であったが、その 10 倍量を接種した群では全て検出可能であった。また、いずれの検体も PCT は全てで検出され、*toxRn*-PCR の反応は正常であり、検出限界以下の腸炎ビブリオであった事を示していた。なお、非接種群はいずれも *toxRn*-PCR は陰性で、PCT のみが増幅された。

4. 自然汚染アサリでのPCT添加PCRと標準法に基づく培養法でのMPN数の比較

比較的汚染の多い二枚貝を材料として自然汚染の腸炎ビブリオの検出を試みた。toxRn-PCRと培養法による標準検査法によりMPN測定を行なった。3段階希釈3本法でそれぞれの増菌液からPCR用の鋳型DNAの調製と選択分離培地への塗抹を行ない、両者の比較を行なった。表1に示すようにMPN試験管の培養法とPCR法は完全に一致し、検体の10倍乳剤作成溶液をアルカリペプトン水とした方が検出率が高かった。MPN値は生理食塩水で10倍乳剤を作成したものはA県産が23/g、C県産が460/gで、アルカリペプトン水で10倍乳剤を作成したものはA県産が150/g、C県産が>1400/gであった。

5. 生鮮魚類からの腸炎ビブリオの検出

市販生鮮魚類からの腸炎ビブリオの検出においては、夾雑菌が多く付着している事が予想され、腸炎ビブリオの増菌を主眼として、食塩ポリミキシン培地を増菌培地とした。toxRn-PCRは増菌前に行ない、培養を行わずに検出が可能かを試験した。

表2に示したように、ほとんどの魚種で腸炎ビブリオを検出したが、9月、10月に採取した鮮魚では判定不能あるいは陰性が多かった。また、toxRn-PCR陰性の検体はMPN値が<3のものが多かったが、MPN値<3でもtoxRn-PCR陽性の検

体もあった。toxRn-PCR陰性でMPN値が<3、toxRn-PCR陽性でMPN値>3となる培養法とPCR法の成績の一致率は34/48(70.8%)であった。

魚種別で見ると、タイは5検体全てにおいてtoxRn-PCRのPCTが検出されず、PCR反応自体が阻害されていた。それ以外ではアジで1検体でもPCR反応自体が阻害されていた。

6. 輸入冷凍エビからの腸炎ビブリオの検出

冷凍エビを検体とした場合は、損傷菌となっている事も考慮して、3倍あるいは4倍乳剤と高濃度の増菌液を調製した。表3に示すように、腸炎ビブリオ検出に主眼を置いた増菌培地に2%食塩加アルカリペプトン水を使用した場合では、培養法とPCR法は完全に一致していた。コレラ菌も同時に検出出来るように増菌培地を0.2%アルカリペプトン水を使用した場合でも、培養法とPCR法は完全に一致していた。この場合6/10(60%)に他の夾雑菌が見られたが、いずれもPCR法に影響はなかった。しかし、腸炎ビブリオも他のビブリオ属菌も検出されなかった4検体では、PCTも検出されておらず、PCR反応自体が阻害されていた。

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。2007年の食中毒統計

によれば、腸炎ビブリオ食中毒は事例数42例(第4位)、患者数1,278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、刺し身や寿司などで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03: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03: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ことから、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-ヒト感染を起ささないことから、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、検査結果を待って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が大い。

検査室ではPCR法はすでに標準的といえるほどに普及し、迅速検出系としてかなり確立してきている。操作自体も複雑ではなく、多検体処理にも充分対応出来るようになってきている。特異性の高いprimerセットを用いれば、特定の菌のみを検出する事が出来、感度もかなり高いので、確認試験の大体としても十分に活用可能である。

*Vibrio*属菌はお互いに比較的類縁度が高く、特に同じ環境に生息する腸炎ビブリオと*V. alginolyticus*や*V. vulnificus*は遺伝

的にも近縁である。昨年度の研究で、*toxR* 遺伝子についてこれらの菌との相同性比較を行ない、特に特異性の高い領域を選び、新たにVP-*toxRn* PCRを開発し、菌の増殖なしに少数菌の検出を行なった。

今年度は実際の魚介類を検体とした場合に、PCR法を用いる際の問題点である検体由来の夾雑物によるPCR反応の阻害について検討を行なった。検査法としてPCR法を導入して確立させる場合には、検査の精度が問題となる。培養法は菌の検出という事で、実際の菌が存在するかどうかを培地上で発育した菌を見て確認するのであるが、PCR法は増幅反応が十分に進行して電気泳動でのバンドでしか確認出来ない。PCR反応は耐熱性酵素によるDNAの合成という酵素反応であるため、酵素活性の阻害があると、たとえ目的の菌(のDNA)が存在していても検出出来ない。

今回はPCR反応液中に内部陽性コントロール鋳型DNA(PCT)を共存させる事で、この酵素反応が阻害されていない事を確認出来るようにした。このPCTはpBR322という腸炎ビブリオとは全く関係のないDNAを由来としており、腸炎ビブリオ検出には全く影響を与えない。また、primerサイトには腸炎ビブリオ検出用の*toxRn*-PCRと同一のprimerサイトを組み込んであるため、*toxRn*-PCRと同一の反応液組成にこのPCTを少量加えるだけの非常に単純化された系である。腸炎ビブリオ*toxR*とprimerが競合するが、*toxR*が多量に存在する場合には*toxR*の増幅産物が増える事になり、結果としてより強

くバンドとして検出されるので、特に問題はない。

この系による検出実験では、生スルメイカを材料として10%乳剤を作成し、そこに腸炎ビブリオを添加した場合、すなわちスルメイカ由来の成分共存下での*toxRn*-PCRに与える影響を調べると、添加菌の量に相応して*toxR*の検出率が上がり、*toxR*陰性の検体においてもPCTは陽性であったため、PCR反応は問題なく進行しているが、*toxR*は検出限界以下であった事を示していた。

また、市販アサリによる自然汚染検体については、標準検査法によるMPN値の測定とPCTを添加したPCR-MPNの値は完全に一致し、PCTバンドの検出により、PCR反応が陰性でない事を確認しながら、*toxR*の検出を確認出来るため、検出系の信頼性が保証されていることとなる。すなわち、この*toxRn*-PCRは特異性が充分確保されているので、PCR陽性検体では腸炎ビブリオの存在を意味し、PCT陽性によりPCRの正確性を確保しているので、菌検出を培養法に基づく標準検査法と同等に評価出来るものと考えられる。菌検出が同等であるならば、選択分離培地、確認培地へ接種、増殖を伴わず、増菌培養液から直接検出出来るPCT添加*toxRn*-PCRは2日以上検査時間の短縮になり、極めて迅速性が高まった事になる。

市販鮮魚類で実際にこの検査法で試験してみると(表2)、48検体中MPN3以上で6検体が*toxRn*-PCR陰性の検体があったが、内4検体についてはPCTも陰性であり、PCRの反応自体が阻害されている事になる。残りの2

検体についてもMPN値は4であり、増菌前PCRでは検出限界以下であったのかもしれない。また、魚種がタイの場合は成績が悪いようであるが、魚種によってはPCRの阻害物質を多く含むものもあることが考えられ、検体処理に工夫が必要であるかもしれない。この鮮魚を用いたtoxRn-PCR法と、培養法との比較はtoxRn-PCRが増菌前であるにも関わらず、高い検出率を示し、感度の高い事が示された。

輸入冷凍エビを用いてtoxRn-PCRと培養法を比較した場合では(表3)、食塩濃度2%の増菌培地を用いて腸炎ビブリオを標的とした培養法では、PCRによる検出と培養による菌検出は完全に一致しており、コレラ菌をも検出出来るよう食塩濃度を下げて増菌培養を行なった場合でも、他の*Vibrio*属菌が増殖し、そこから調製した鋳型DNAにはそれらのDNAが混入しているにも関わらず、腸炎ビブリオを検出出来ており、培養法で腸炎ビブリオが検出されない検体からはtoxRn-PCRも陰性となっており、こちらも成績が完全に一致していた。すなわち、特異性が充分確保されている事を示していた。

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、PCR反応は食品由来の夾雑物により反応阻害の起こる事があり、偽陰性が問題となる。今回導入したPCTはこのPCR反応の進行を担保するものであり、迅速検査であるPCR法の検査法としての確度を上げ、標準検査法の最大の欠点である時間と手間大幅に減少させた上で、信頼性は損なわないように出来、より実用的な検査法になるものと期待される。

F. 研究発表

荒川英二、宮原美知子：PCRによる食品からの腸炎ビブリオ迅速検査法の検討、第42回腸炎ビブリオシンポジウム、2008年10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

図1 内部陽性コントロール鑄型DNAの作成

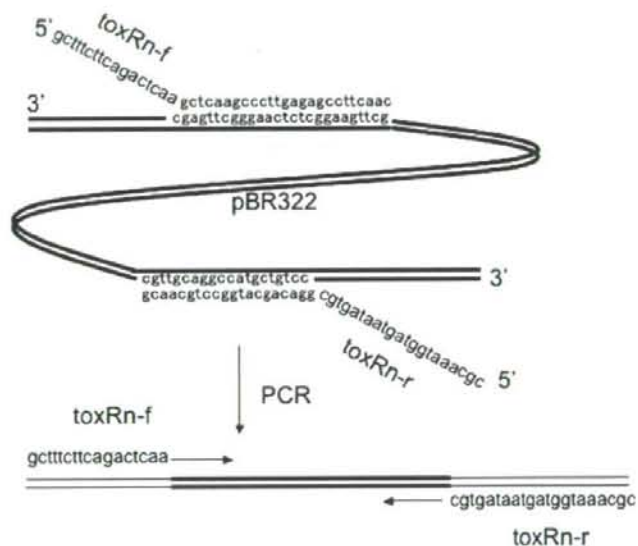


図2 PCT 添加 toxRn-PCR での腸炎ビブリオ *toxR* の検出

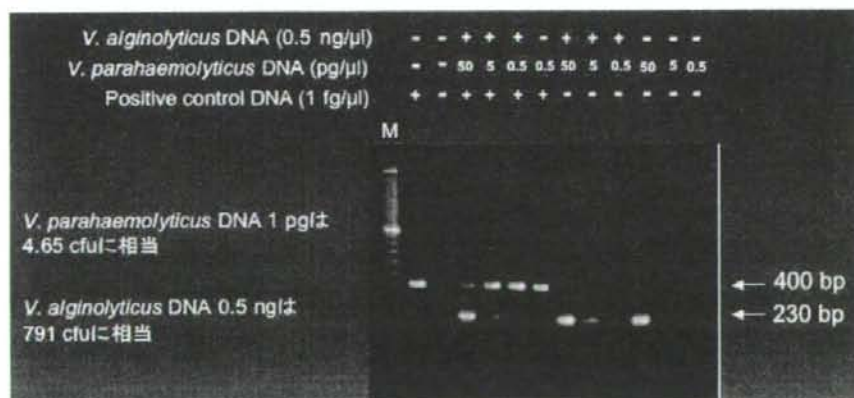


図3 腸炎ビブリオ添加生スルメイカにおける PCT 添加 toxRn-PCR

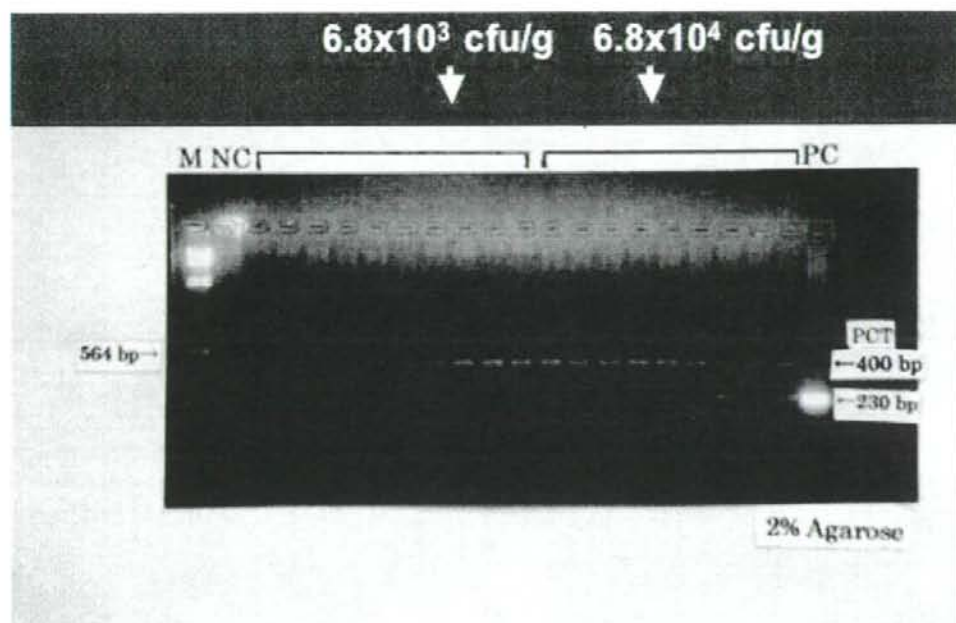


表1 市販むき身アサリを使った PCT 添加 toxRn-PCR と培養法の MPN 比較

むきみアサリから塗抹培養とAPW培養液PCRで検出								
	C県	1	2	3	A県	1	2	3
Salineで希釈	10^{-1}				10^{-1}			
塗抹で分離		+	+	+		+	+	+
PCRで検出		+	+	+		+	+	+
	10^{-2}				10^{-2}			
塗抹で分離		+	+	+		-	-	-
PCRで検出		+	+	+		-	-	-
	10^{-3}				10^{-3}			
塗抹で分離		+	-	-		-	-	-
PCRで検出		+	-	-		-	-	-
APWで希釈	10^{-1}				10^{-1}			
塗抹で分離		+	+	+		+	+	+
PCRで検出		+	+	+		+	+	+
	10^{-2}				10^{-2}			
塗抹で分離		+	+	+		+	-	+
PCRで検出		+	+	+		+	-	+
	10^{-3}				10^{-3}			
塗抹で分離		+	+	+		-	-	+
PCRで検出		+	+	+		-	-	+

表2 市販魚類からの腸炎ビブリオ検出の toxRn-PCR と培養法との比較

回	日	No.	魚種	toxR-PCR			MPN SPB(3×5)	
				レーン	PCT(400bp)	toxR(230bp)		判定
1	6/24	6	平目	1	-	+	+	<3
		7	ホーホー	2	-	+	+	7
		8	くちぼモカレイ	3	-	+	+	21
		9	アジ	4	-	+	+	<3
		10	トビウオ	5	+	-	-	<3
		11	タイ	6	-	-	判定不能	<3
2	7/8	6	アジ	7	-	+	+	<3
		7	カレイ	8	+	-	-	<3
		8	カサゴ	9	-	+	+	4
		9	トビウオ	10	+	+	+	<3
		10	アジ	11	+w	+	+	23
		11	ウルメイワシ	12	+w	+	+	<3
3	7/22	6	メバル	13	+w	+	+	4
		7	ヤナギ(ハチメ)	14	-	+	+	<3
		8	アサバカレイ	15	-	+	+	4
		9	トビウオ	16	-	+	+	<3
		10	アジ	17	-	+	+	4
		11	タイ	18	-	-	判定不能	<3
4	8/12	6	笹カレイ	19	+	+w	+w	<3
		7	キジンハチメ	20	-	+	+	<3
		8	アジ	21	+w	+	+	9
		9	コヅクラ	22	-	+	+	<3
		10	アジ	23	+	-	-	<3
		11	ツバイン	24	-	+	+	7
5	8/26	6	ハチメ	25	-	+	+	4
		7	ヒラメ	26	-	+	+	6
		8	アジ	27	-	+	+	7
		9	タイ	28	-	-	判定不能	3
		10	フクラギ	29	-	+	+	120
		11	シタヒラメ	30	+	+	+	<3
6	9/9	6	キジハタ	31	-	+	+	9
		7	タイ	32	-	-	判定不能	<3
		8	アジ	33	+	+	+	4
		9	フクラギ	34	+w	+	+	4
		10	クロダイ	35	-	+	+	4
		11	あじ	36	-	+	+	150
7	9/30	6	キジン	37	-	+	+	<3
		7	みずころころ	38	-	-	判定不能	4
		8	カレイ	39	+	-	-	<3
		9	フクラギ	40	-	+	+	4
		10	アジ	41	+w	-	-?	4
		11	カマス	42	-	+	+	4
8	10/14	6	あんこう	43	+	+	+	<3
		7	きじん	44	-	+	+	<3
		8	タイ	45	-	-	判定不能	9
		9	メジマグロ	46	-	+	+	15
		10	アジ	47	-	-	判定不能	6
		11	カマス	48	+w	-	-?	4

表3 輸入冷凍エビからの腸炎ビブリオおよびその他ビブリオ検出の toxRn-PCR と培養法との比較

	培養結果			PCR 結果		
	No.	V.p	その他検出菌	LDH	荒川 ToxR	+PC(100fg)
2%食塩加アルカリペプトン水	1	+		+	+	+
	2	+	<i>V.fluvialis</i>	-	+	+
	3	-		-	-	-
	4	-		-	-	-
	5	+		+	+	+
	6	+		+	+	+
	7	-		-	-	-
	8	-		-	-	-
	9	+		+	+	+
	10	+		+	+	+
0.2%食塩加アルカリペプトン水 ↓ 0.25%食塩加アルカリペプトン水	11	+	<i>V.cholerae</i> non O1	+	+	+
	12	+	<i>V.cholerae</i> non O1 <i>V.mimicus</i> <i>A.caviae</i>	+	+	+
	13	-		-	-	-
	14	-		-	-	-
	15	+	<i>V.cholerae</i> non O1	+	+	+
	16	-	<i>V.cholerae</i> non O1 <i>A.hydrohila</i> <i>A.caviae</i>	-	-	-
	17	-		-	-	-
	18	-		-	-	-
	19	+	<i>V.cholerae</i> non O1 <i>V.mimicus</i>	+	+	+
	20	+	<i>V.cholerae</i> non O1	+	+	+

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の開発
(平成 19、20 年度)

山崎 貢、岩出義人¹、青木日出美、松本昌門、平松礼司、
遠山明人、荒川英二²、皆川洋子
(愛知県衛生研究所、三重県保健環境研究所¹、国立感染症研究所²)

研究要旨

増殖性を有する耐熱性溶血毒 (TDH) 産生性腸炎ビブリオ (*V. p*) を食中毒推定原因食品から高精度で短時間、簡便に検出するために、LAMP 法を応用した検査法を開発した。本法は従来の PCR 法に比べて 100~1,000 倍高感度、かつ TDH⁻*V. p* や *V. p* 類縁菌に反応しない高い特異性を有するとともに、Loop primer を加えることにより、反応の立ち上がり時間も約 2 分の 1 に短縮された。また、本法の検出限界は 8 MPN/チューブ (増菌液 1mL 中約 10⁴MPN 相当) であり、TDH⁺*V. p* と *V. p* TDH⁺以外の菌との混在も成績に影響しなかった。海産魚介類に 1g 当たり約 1CFU の TDH⁺*V. p* を添加した実験では、検体を 37℃、5 時間培養後の 10 倍濃縮培養液からテンプレートを調製することにより TDH⁺*V. p* を検出できた。さらに、培養直前と 5 時間培養後の試料の成績陽転を指標とすることにより増殖性を有する TDH⁺*V. p* を検出できることも確認した。

今回確立した LAMP 法は感度・特異性がともに高く簡便であり、海産魚介類から増殖性 TDH⁺*V. p* を検査開始から僅か 7~8 時間 (培養 5 時間) と短時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。

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いで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。耐熱性溶血毒 (Thermostable direct hemolysin: TDH) は神奈川現象の本体であるとともに *V. p* の下痢症に強く関連しているため病原性を有する *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、労力と時間を要する推定原因食品からの原因菌分離同定を試みても、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 PCR 法を培養法と併用しても、現行 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晚以上の増菌培養が必要である。また、仮に TDH 遺伝子を検出しても死菌由来である

可能性もあり、当該食品が原因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 primer と鎖置換型 DNA polymerase により、60~65°Cの恒温で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。

そこで今回著者らは、*V.p* 食中毒の推定原因食品中に僅かに存在する増殖性 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 法とを組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* 検出法のフローを図1に示した。

供試株には TDH⁺ *V.p* である 1052A 株（血清型 O3:K6）を用いた。テンプレートには 2%食塩加アルカリペプトン（以下 AP 培地）で 37°C、18 時間培養後の菌液を最終濃度 2%となるように食塩を添加した PBS⁻（以下 PBS）で段階希釈した菌液を用いた。生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）には岩出らの Primer（未発表）を用い、Loop primer は primer 設計支援ソフト（Primer Explorer）を用いて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 社に委託作製した。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 2μL 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 希釈液を供試した。4種類の primer 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 pmol, 10 pmol, 20 pmol, 30 pmol 及び 40 pmol と濃度を変えて等量添加し、LAMP 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⁺ *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 29 株をチューブ当たり 10⁴CFU 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 10⁻³~10⁻⁶ 段階希釈液に由来する熱アルカリ抽出物 2μL 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 $2 \mu\text{L}$ 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 、60 秒、35 回増幅を行った。

5 他菌共存の影響の検討

1) *Vibrio alginolyticus* 共存の影響

$\text{TDH}^{+} V.p$ と *Vibrio alginolyticus* とが混在する場合の LAMP 反応の成績を調べるために、1052A 株を $10^3/\text{mL}$ 及び $10^4/\text{mL}$ 含む AP 培養液と $10^6/\text{mL}$ 及び $10^7/\text{mL}$ の *V. alginolyticus* C-13 株 (1052A 株に対し $10^2 \sim 10^4$ 倍過剰量) を含む AP 培養液をそれぞれ等量混合した検体を用いて LAMP 法を行った。

2) $\text{TDH}^{-} V.p$ 共存の影響

$\text{TDH}^{+} V.p$ と $\text{TDH}^{-} V.p$ とが混在する場合の LAMP 反応の成績を調べるために、1052A 株を $10^3/\text{mL}$ または $10^4/\text{mL}$ 含む AP 培養液と *V.p* 409F 株 (TDH^{-} 、O3:K6 型) を $10^6/\text{mL}$ または $10^7/\text{mL}$ を含む AP 培養液 (1052A 株に対し $10^2 \sim 10^4$ 倍過剰量) をそれぞれ等量混合した検体を用いて LAMP 法を行った。

6 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 (約 $10^{-1}\text{CFU}/\text{mL}$) となるように 2 本の 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。測定は 2 回行った。

7 培養液の氷冷保存の検討

$\text{TDH}^{+} V.p$ 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 8、80 及び 800MPN 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したものとを同時に測定し、①②間で LAMP 反応の成績に差異が生じるかを調べた。

8 食品への 1052A 株添加試験

エビ等 7 種類の海産魚介類 10 検体を用いた。細切した食品 25g に $12 \sim 30\text{CFU}$ 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、研究方法の項目 6 において決定した時間培養した。培養開始直前 (培養 0 時間) と培養後に採取した培養液 $100 \mu\text{L}$ 、及び培養液 1mL 由来の遠心残渣 $100 \mu\text{L}$ (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 pmol、20 pmol、30 pmol 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。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1に示した LAMP 反应用の 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 29 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。

3 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 分後に陽性陰性を判定し、成績を調べた。反応チューブ当たり $TDH^+V.p$ 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 法の検出限界は判定時間を 60 分とした場合には反応チューブ当たり 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} ~ 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。

4 他菌共存の影響

1) *Vibrio alginolyticus* 共存の影響

LAMP 反応の立ち上がり時間を $TDH^+V.p$ と *Vibrio alginolyticus* とが混在する場合と混在しない場合とを比較した (表3)。1052A 株 10^4 /mL を含む AP 培養液を試料とした LAMP 反応の立ち上がり時間は約 36 分であったがその 8,000 倍 (約 10^4 倍) の *V. alginolyticus* を含む AP 培養液を加

えても LAMP 法の立ち上がり時間は約 35 分であり 1052A 株単独の場合とほぼ一致していた。また、菌数の比を変えてもほぼ一致していた。

2) TDH⁻V.p 共存の影響

LAMP 反応の立ち上がり時間を TDH⁺V.p と TDH⁻V.p とが混在する場合と混在しない場合とを比較した (表 4)。1052A 株 10^4 /mL を含む AP 培養液を検体とした LAMP 反応の立ち上がり時間は約 42 分であったがその 12,000 倍 (約 10^4 倍) の TDH⁻V.p を含む培養液を加えても LAMP 法の立ち上がり時間は約 42 分と 1052A 株単独の場合と一致していた。また、菌数の比を変えてもほぼ一致していた。

5 増菌培養時間の検討

図 5 に、培養液中における TDH⁺V.p 菌数の経時変化を示した。各 2 本の AP 培地中に平均 0.1CFU/mL 及び平均 0.25CFU/mL 接種 (食品検体 1g 当たり換算して各 1.0 CFU/g、2.5 CFU/g) した 1052A 株は、培養 3 時間後では各 1.3×10^2 CFU/mL、 5.2×10^2 CFU/mL と菌数が少なかったが、培養 5 時間後には各 2.1×10^5 CFU/mL、 1.5×10^6 CFU/mL に増加した。従って、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) を超えていた。

6 培養液の氷冷保存の検討

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

応を行った場合と、氷冷保存せずに直ちに LAMP 反応を行った場合の成績を示した。反応チューブ当たり 8 MPN、80 MPN 及び 800 MPN の場合には、立ち上がり時間が 8 MPN 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 800 MPN を含め全て LAMP 陽性であり、氷冷の有無によらず成績は一致していた。一方、0.8MPN では氷冷の有無によらず LAMP 陰性であった。

7 食品への 1052A 株添加試験

表 6 に添加試験の結果を示した。培養 0 時間では供試した 10 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 10 検体中 9 検体が陽性であった。反応チューブ当りの菌数をみると陽性 9 例は 2.1~40MPN であり、陰性 1 例は本 LAMP 法の検出限界 8 MPN 以下の 4.0 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 10 検体全てが陽性 (21~400MPN/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 検出法のフローを示した。

海産魚介類等の食中毒原因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検査期間に 2 日を要する。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査開始から7~8時間と一日以内に検出可能である。さらに、培養開始直前接種検体の一部を氷冷保存し、培養5時間後の増菌培養液と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.*由来のものか否かの情報を得ることもできる。

以上から、本LAMP法は簡便かつ短時間で行えるばかりでなく、*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TDH⁺*V.p.*を検出できるので*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、急速増菌培養法を開発できれば検査時間をさらに短縮でき、ひいては本LAMP法を食品収去検査へ導入する意義が高まると考える。

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に短縮できた。

②LAMP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 (29株)は全株LAMP陰性であった。

③LAMP法の検出限界をTDH⁺*V.p.*菌数で表すと、反応チューブ当たり8MPN (増菌液中約10⁴MPN/mL相当)であった。また、その感度は従来のPCR法に比較して100~1,000倍高かった。

④TDH⁺*V.p.*に*V. alginolyticus*あるいはTDH⁻*V.p.*を過剰量 (約10²~10⁴倍)混ぜてもLAMP反応の立ち上がり時間に影響はみられなかった。

⑤培養液にTDH⁺*V.p.*を少数 (0.1CFU/mLまたは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10⁴MPN/mL)を超えた。

⑥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おり、氷冷5時間はLAMP反応の判定に影響がなかった。

⑦海産魚介類10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100μL (10倍濃縮液)を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5時間後のLAMP反応の成績陽転から増殖性を有するTDH⁺*V.p.*の検出が可能であった。

F. 文献

1. Honda T. and Iida T.: The pathogenicity 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. : 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.
Minireview, Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect. Immun. 1995; 63: 2093-2099.

H. 論文

なし

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

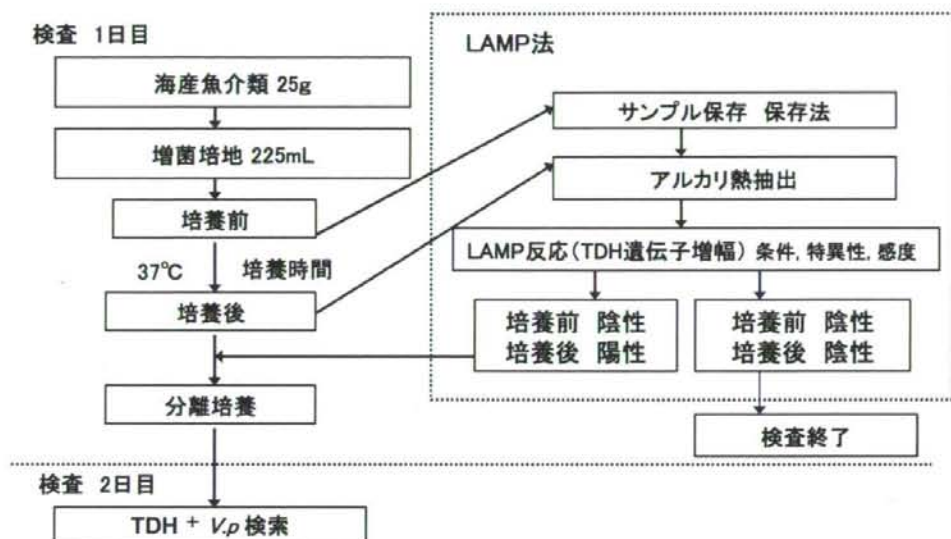


図1 増殖性を有する TDH + *V.p* 検出法のフロー (計画)

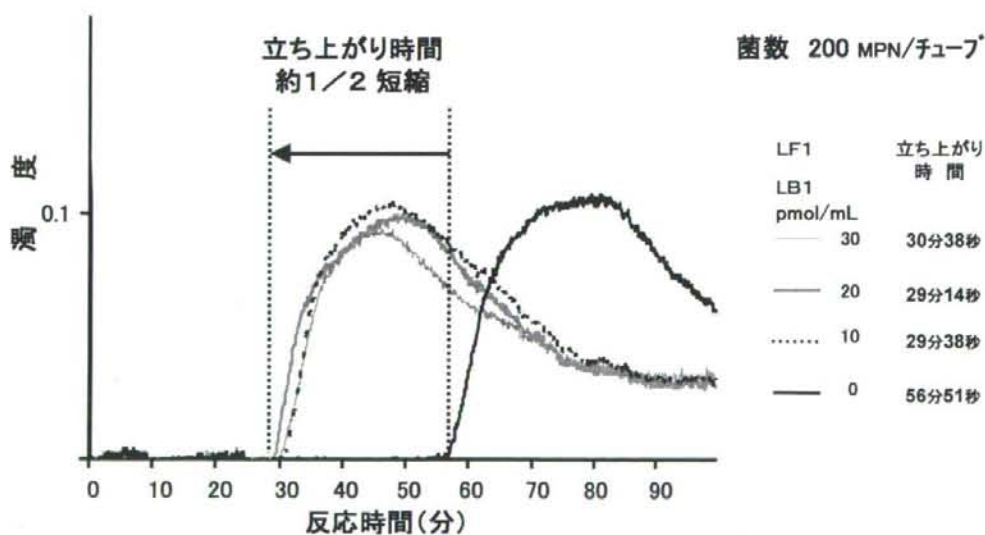


図2 Loop primer 添加による LAMP 反応時間の短縮効果