

表1 LAMP 反応用の 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'
LF1	20 pmol	15	5' TGGCATGTTTCTACA 3'
LB1	20 pmol	19	5' AAGACTATACAATGGCAGC 3'

表2 LAMP 反応の特異性

菌数:10⁴CFU/チューブ

菌種			供試株数	LAMP 陽性株数	
	<i>tah</i> +	<i>trh</i> -			
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tah</i> +	<i>trh</i> -	6	6	(100%)
	<i>tah</i> +	<i>trh</i> +	9	9	(100%)
	<i>tah</i> -	<i>trh</i> +	5	0	(0%)
	<i>tah</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. fumiisil</i>			2	0	(0%)
<i>V. vulnificus</i>			2	0	(0%)
<i>V. hollisae</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>Potobacterium damsele</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>Plasiomonas shigelloides</i>			1	0	(0%)

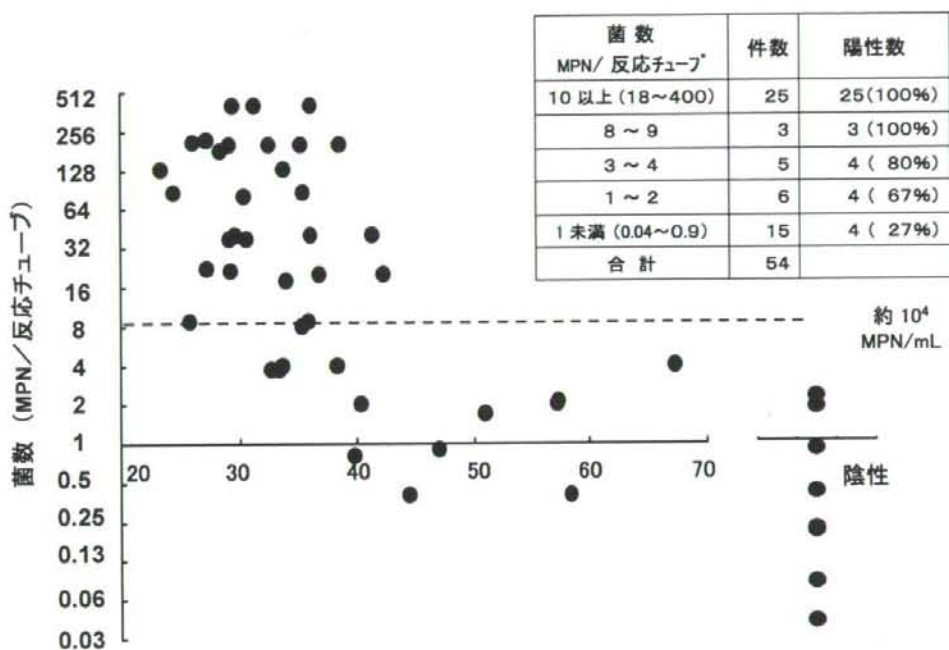


図3 Loop primer を添加した場合の LAMP 法の検出限界

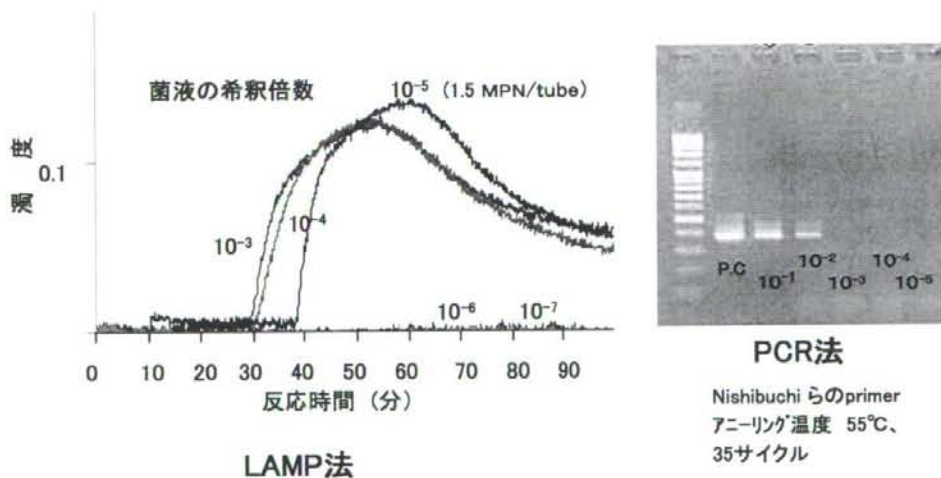


図4 LAMP 法と PCR 法の感度の比較

表3 *Vibrio alginolyticus* 共存の影響

菌 数 (cfu/mL)		比	立ち上がり時間	判定
1052A株 <i>V. parahaemolyticus</i> O3:K6(<i>tdh</i> +))	C-13株 <i>V. alginolyticus</i>			
1.0×10^5	—	—	29分 04秒	+
1.0×10^5	8.0×10^6	1:80	29分 21秒	+
1.0×10^5	8.0×10^7	1:800	30分 14秒	+
1.0×10^4	—	—	36分 06秒	+
1.0×10^4	8.0×10^6	1:800	30分 05秒	+
1.0×10^4	8.0×10^7	1:8000	34分 59秒	+
—	8.0×10^7	—	—	—
1.3×10^5	—	—	29分 44秒	+
1.3×10^5	8.0×10^6	1:61	28分 33秒	+
1.3×10^5	8.0×10^7	1:610	29分 52秒	+
1.3×10^4	—	—	31分 49秒	+
1.3×10^4	8.0×10^6	1:610	33分 08秒	+
1.3×10^4	8.0×10^7	1:6200	30分 54秒	+
—	8.0×10^7	—	—	—

表4 TDH⁻ *V. p.* 共存の影響

菌 数 (cfu/mL)		比	立ち上がり時間	判定
Vp 1052A 株 O3:K6(<i>tdh</i> +))	Vp 409F 株 O3:K6(<i>tdh</i> -)			
2.1×10^5	—	—	32分 36秒	+
2.1×10^5	1.5×10^7	1:71	30分 30秒	+
2.1×10^5	1.5×10^8	1:710	30分 39秒	+
2.1×10^4	—	—	35分 04秒	+
2.1×10^4	1.5×10^7	1:710	32分 31秒	+
2.1×10^4	1.5×10^8	1:7100	34分 59秒	+
—	1.5×10^8	—	—	—
1.0×10^5	—	—	31分 05秒	+
1.0×10^5	1.2×10^7	1:120	30分 18秒	+
1.0×10^5	1.2×10^8	1:1200	30分 20秒	+
1.0×10^4	—	—	42分 15秒	+
1.0×10^4	1.2×10^7	1:1200	33分 49秒	+
1.0×10^4	1.2×10^8	1:12000	42分 20秒	+
—	1.2×10^8	—	—	—

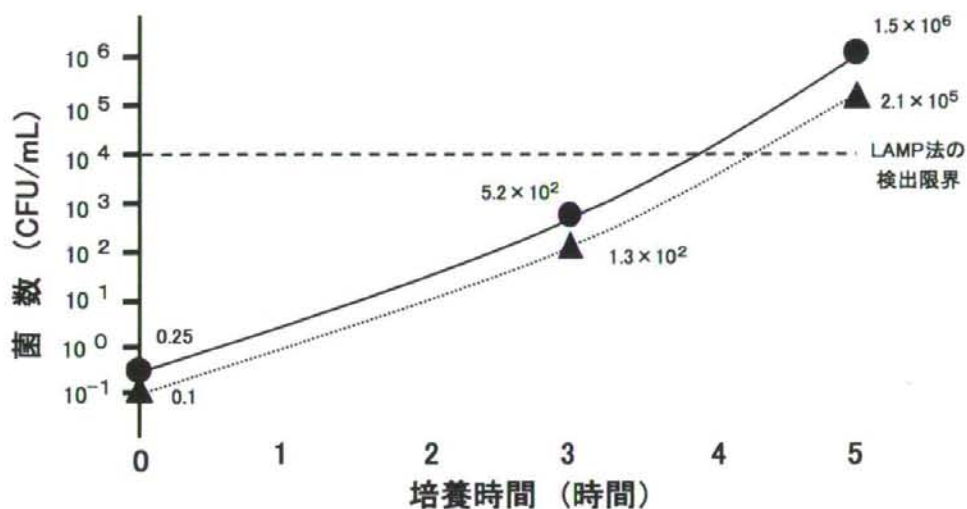


図5 培養液中における TDH⁺ *V. p* 菌数の経時変化

表5 培養液の氷冷保存による LAMP 反応への影響

	LAMP法 判定 (反応の立ち上がり時間)			
	800 MPN/チューブ	80 MPN/チューブ	8 MPN/チューブ	0.8 MPN/チューブ
0 時間	+	+	+	-
	(22分59秒)	(32分28秒)	(37分59秒)	
5 時間	+	+	+	-
	(22分28秒)	(35分47秒)	(40分54秒)	

表6 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/チューブ	立ち上り時間	判定	判定	MPN/チューブ	立ち上り時間
スルメイカ	13	5.8×10^6	-	+	2.1	40分40秒	-	+	21	29分30秒
スルメイカ	13	1.1×10^6	-	+	4.0	37分57秒	-	+	40	30分36秒
スルメイカ	12	2.3×10^6	-	+	8.6	36分00秒	-	+	86	32分53秒
スルメイカ	19	2.3×10^6	-	+	8.6	32分38秒	-	+	86	27分23秒
大正エビ	15	1.1×10^6	-	-	4.0	-	-	+	40	28分28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
生カキ	30	1.0×10^6	-	+	4.0	35分47秒	-	+	40	28分25秒
ホタテ貝柱	28	5.3×10^6	-	+	19	36分39秒	-	+	190	33分21秒
タラバガニ	19	6.0×10^6	-	+	22	37分47秒	-	+	220	26分06秒
マグロ	28	1.0×10^7	-	+	40	28分14秒	-	+	400	25分03秒

注) 接種菌数

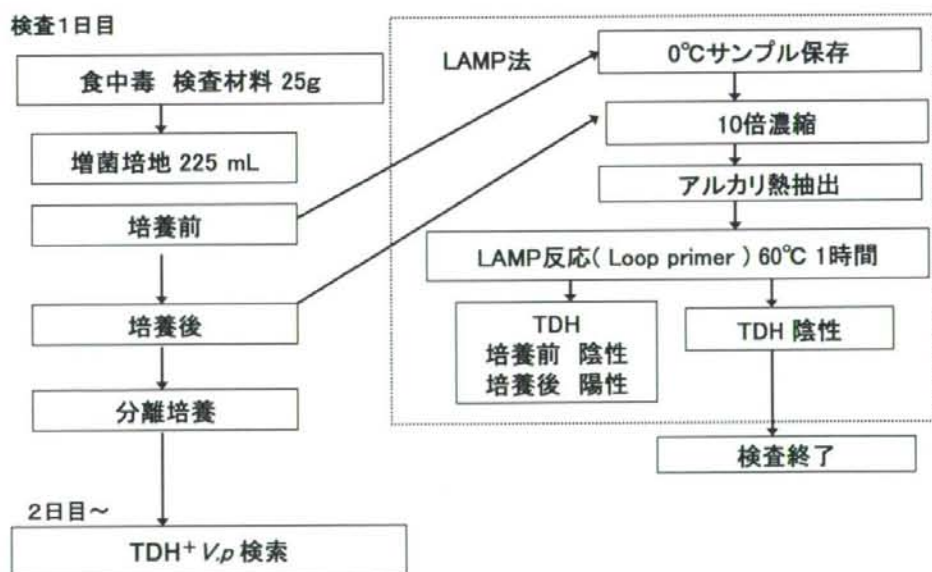


図6 増殖性を有するTDH⁺V.p.検出法のフロー

LAMP法による腸炎ビブリオの迅速鑑別法の開発

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 山崎 渉 大阪府立公衆衛生研究所 細菌課 研究員

研究要旨

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification)法による腸炎ビブリオの迅速鑑別法を開発した。本法は供試した143株の腸炎ビブリオには陽性であり、89株の非腸炎ビブリオには陰性だった。DNA抽出開始から判定まで、陽性検体の場合は40分以内、陰性検体の場合は80分以内で鑑別可能であった。菌培養の時間を加えても、培養開始から1日以内に判定が可能であり、分離・同定を基礎とする従来法と比較して、判定所要日数を1-2日以上短縮することが可能であった。今回開発したLAMP法は腸炎ビブリオの迅速検査法として有用と思われた。同時に魚介類からの腸炎ビブリオ直接検出法の開発を試みたが、検出感度のさらなる改善が必要と思われた。

A. 研究目的

臨床検体や市販魚介類からの腸炎ビブリオの検出は現行の検査法では2-3日以上が必要であり、従来から行ってきた細菌学的手法を用いた診断法だけでは、食中毒発生時に感染拡大防止のための迅速な行政措置を行う上で支障となっている。また、食品衛生法の定める収去食品検査において、生食用魚介類から規格基準に違反する菌数の腸炎ビブリオが分離された場合、その違反品を回収する必要がある。しかし、現行の細菌学的手法を用いた場合、結果判明に日数を要するため、消費者が喫食する前に違反品を迅速に回収することは困難である。これらの問題を解決するために、本研究にお

いてLAMP (Loop-mediated Isothermal

Amplification)法による腸炎ビブリオの簡易迅速鑑別法を開発した。さらなる迅速化のために、開発したLAMP法を用いて魚介類からの腸炎ビブリオ直接検出法の開発を試みた。

B. 研究方法

1. 菌株

表1に示した232株を使用した。143株の腸炎ビブリオのうち121株は臨床症状を呈する海外旅行からの帰国者および日本国内の患者から1986年から2008年の間に、22株は日本国内の魚介類から2008年に、それぞれ分離された。89株の非腸炎ビブリオは菌株保

存機関からの分与あるいは臨床患者・食品・環境からの分離により得られた。

2. プライマーの設計

腸炎ビブリオが菌種特異的に保持している易熱性溶血毒 (*tlh*) 遺伝子 (Taniguchiら) を標的とし、Primer Explorer V4 (富士通システムソリューションズ、東京) を用いて LAMP法のプライマーセットを設計した。プライマー配列等の詳細は表2に示した。

3. 菌体からのDNA抽出

TCBS寒天培地等に発育させた新鮮菌を 1.5-ml容のマイクロチューブ内で 50 μ l の水酸化ナトリウム溶液 (25 mmol l⁻¹) に浮遊させ、十分に混和したのちに 95 ° C で 5 分間加熱した。4 μ l の Tris-塩酸溶液 (1 mol l⁻¹, pH 7.5) で中和した後に 20,000 \times g、4 ° C で 5 分間遠心した。上清 2 μ l をテンプレート DNA として LAMP法に使用した。

4. LAMP 法

表1に示した143株の腸炎ビブリオと89株の非腸炎ビブリオの計232株を使用して、設計したプライマーセットの特異性を検証した。LAMP 法はLoopamp DNA amplification kit (栄研化学、東京) を用いて実施した。LAMP 反応液の組成は下記の通りである。テンプレート DNA 2 μ l、*Bst* DNA Polymerase (8 unit、栄研化学) 1 μ l、インナープライマーである FIP および BIP 各 1.6 μ mol l⁻¹、アウタープライマーである F3 および B3 各 0.2 μ mol l⁻¹ ならびにループプライマーで

ある LF および LB 各 0.8 μ mol l⁻¹ (プライマー合成: 北海道システムサイエンス社、札幌) を 1 \times Reaction Mix (栄研化学) および精製水で 25 μ l に調整した。混合液は Loopamp リアルタイム濁度計 (LA-320、Teramecs、京都) を用いて 65 ° C で 60 分間反応させた後に 80 ° C 2 分間の条件で酵素反応を失活させた。60 分以内に濁度 0.1 に達した検体を陽性と判定した。さらに肉眼による判定も実施し、LAMP 反応チューブ内に白濁が確認できた場合、陽性と判定した。

5. 市販魚介類からの直接検出

市販のエビに腸炎ビブリオを添加し、直接検出時の検出感度を測定した。定法により腸炎ビブリオ陰性であることを確認した市販のエビ 25 g に 225 ml のアルカリペプトン水 (APW、日本製薬、東京) を加えストマッカー (Pro-media, SH-001; ELMEX 東京) で 30 秒間、攪拌した。作成したエビ-APW 破碎混和液を 1.5-ml 容のマイクロチューブに 900 μ l ずつ分注し、氷上に静置した。並行して準備しておいた対数増殖期の腸炎ビブリオ菌液の階段希釈液各 100 μ l を前述のエビ-APW 破碎混和液 900 μ l に速やかに添加した。計 1 ml となる混和液を 900 \times g、4 ° C で 1 分間遠心後、氷上で上清を新しいマイクロチューブに移し、10,000 \times g、4 ° C で 5 分間遠心した。上清を捨て、ペレットに 50 μ l の水酸化ナトリウム溶液 (25 mmol l⁻¹) を加え十分に混和した。95 ° C 5 分加熱後、4 μ l の Tris-塩酸溶液 (1 mol l⁻¹, pH 7.5) で中和した。20,000 \times g、4 ° C で 5 分間

遠心後、上清2 μ lをテンプレートとして使用した。LAMP反応および判定は上記に従った。

6. PCR法

PCR法はLAMP法との感度・所要時間比較の目的で行った。詳細はBejらの方法に従った。

C. 研究結果

表1に示すとおり、設計したプライマーセットを用いてLAMP法を実施した結果、143株の腸炎ビブリオはすべて陽性であり、89株の非腸炎ビブリオはすべて陰性だった。リアルタイム濁度計と肉眼による判定結果は完全に一致した。分離平板上コロニーを用いた際、DNA抽出開始から判定まで、PCR法では4時間を必要としたのに対し、LAMP法では陽性検体の場合は40分以内、陰性検体の場合は80分以内で鑑別可能であった。菌培養の時間を加えても、培養開始から1日以内に判定が可能であった。さらにLAMP法では反応チューブ内の白濁を確認することにより、肉眼でも容易に判定が可能であった。腸炎ビブリオ新鮮菌を市販エビに添加して測定した際の本法の検出感度はPCR法よりも10倍高い530 CFU/g (2.0 CFU/LAMP test tube)であり(図1)、検出所要時間は60分であった。

D. 考察

今回開発したLAMP法は供試した232菌株を正確に鑑別し、非特異的な偽陽性反応は認められず、簡易迅速かつ明瞭な判定が可能であった。LAMP法を用いた場合、菌培養開

始から結果判定まで1日以内で可能であり、分離・同定を基礎とする従来法と比較して、判定所要日数を1-2日以上短縮することが可能であった。本法を用いて食中毒の原因病原体や原因食品を迅速に決定することにより、感染拡大防止のための迅速な行政措置の一助になると思われた。

本法は市販魚介類から分離された腸炎ビブリオ様菌を簡易かつ迅速に鑑別する際にも有用である。しかし、収去食品検査において、生食用魚介類から違反事例が発生した場合、増菌培養、分離培養および鑑別培養に計3日以上を要するため、結果が判明した時点では違反品はすでに消費されている可能性が高い。食品衛生法の定める生食用魚介類の腸炎ビブリオ規格基準値は100 CFU/g以下である。最確数(MPN)法による測定が定められているため、非常に日数と労力を要する。簡易迅速かつ高感度なスクリーニング法が開発出来れば、行政上のニーズは極めて高い。それゆえ本研究において、MPN法のスクリーニング法となり得る簡易迅速検査法の開発を目的として、LAMP法を用いて魚介類からの腸炎ビブリオ直接検出法の開発を試みた。その結果、60分以内で判定が可能となり、従来法であるMPN法と比較して3日以上の上記の判定所要日数短縮が可能であったが、規格基準値以下の検出感度を得ることは出来なかった。今後は検体からのDNA抽出法を検討することによって検出感度を改善し、実用的な直接検出によるスクリーニング法を開発する予定である。

E. 結論

今回開発した腸炎ビブリオを特異的に鑑別するLAMP法は、食中毒発生時の迅速な行政措置の一助になると思われた。魚介類からの腸炎ビブリオ直接検出によるスクリーニング法の開発には検出感度を改善するための更なる検討が必要と思われた。

F. 研究発表

Yamazaki, W., M. Ishibashi, R. Kawahara, and K. Inoue. 2008. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiol.* 8:163.

G. 参考文献

1. Taniguchi, H., H. Hirano, S. Kubomura, K. Higashi, and Y. Mizuguchi. 1986. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microb Pathog* 1:425-32.
2. Bej, A. K., D. P. Patterson, C. W. Brasher, M. C. L. Vickery, D. D. Jones, and C. A. Kaysner. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *Journal of microbiological methods* 36:215-225.

表1 使用菌株ならびにLAMPの結果

菌種	試験菌 株数	LAMP 陽性数
<i>V. parahaemolyticus</i>	143	143
<i>V. fluvialis</i>	10	0
<i>V. vulnificus</i>	10	0
<i>V. cholerae</i>	5	0
<i>V. alginolyticus</i>	2	0
<i>V. furnissii</i>	2	0
<i>V. mimicus</i>	2	0
<i>V. harveyi</i>	1	0
<i>V. metschnikovii</i>	1	0
<i>Grimontia hollisae</i>	5	0
Other bacteria	51	0

表2 設計した LAMP プライマー

プライマー	配列(5' → 3')
FIP	ATG TTT TTA AAT GAA ACG GAG CTC CGG CAA AAA ACG AAG ATG GT (F1c-F2)
BIP	ACG TCG CAA AAC GTT ATC CGG CGA AGA ACG TAA TGT CTG (B1-B2c)
F3	AGC TAC TCG AAA GAT GAT CC (F3)
B3	GGT TGT ATG AGA AGC GAT TG (B3c)
LF	ACC AGT AGC CGT CAA TG (LFc)
LB	TTA GAT TTG GCG AAC GAG A (LB)

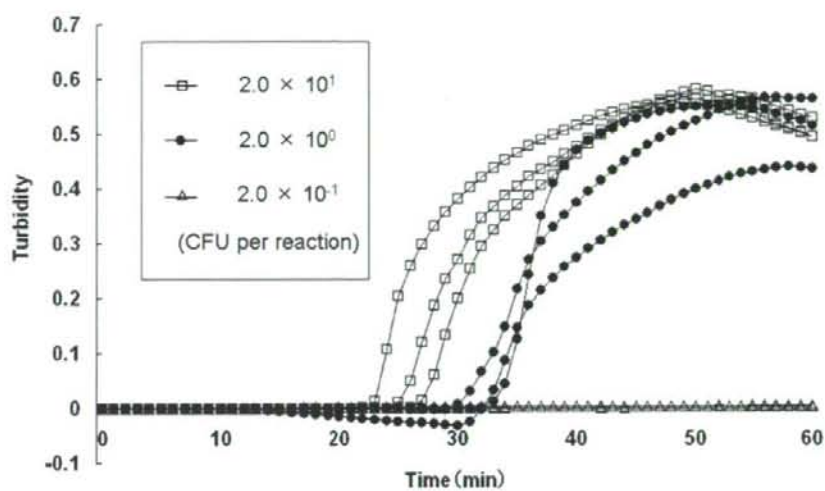


図1 エビに腸炎ビブリオを添加した際のLAMPの検出感度(リアルタイム濁度計による測定)

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	米北太郎	日本ハム株式会社	中央研究所	研究員
	藤村達也	日本ハム株式会社	中央研究所	研究員
	松本貴之	日本ハム株式会社	中央研究所	主任研究員
	森松文毅	日本ハム株式会社	中央研究所	所長

研究要旨

腸炎ビブリオ食中毒は腸炎ビブリオに汚染された魚介類を喫食して起こる食中毒である。腸炎ビブリオ食中毒防止対策として水産食品では規格基準が設定されており、その規格を満たしているかどうか確認するためには現行の検査法（培養法）では最低でも3日が必要である。水産食品は生食の機会が多く、消費期限の短い。そのため腸炎ビブリオ検査の結果が一日でも早く得られることが望まれており、迅速検査法の開発が期待されている。

今回の研究では、現在開発中の腸炎ビブリオ簡易迅速検査キット「NHイムノクロマト 腸炎ビブリオ」の特異性・検出感度の評価を行い、食品検査現場への適用可能性について検討を行った。

はじめに特異性を確認するため、血清型の異なる様々な腸炎ビブリオおよび環境分離株を「NHイムノクロマト 腸炎ビブリオ」に供したところ全ての菌株で陽性ラインを検出することができた。またビブリオ属および類縁の菌株について交差反応を示すかどうか検討を行った結果、*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*をはじめほとんどの菌株で陰性を示した。以上の結果より「NHイムノクロマト 腸炎ビブリオ」は様々な腸炎ビブリオ菌株を検出可能な、特異性の高い検査キットであることが示された。

次に検出感度を確認するため接種実験を行った結果、検体1gあたり100cfu以上の腸炎ビブリオが存在すれば、一晩の増菌培養後「NHイムノクロマト 腸炎ビブリオ」により検出可能であることが示唆された。したがって本キットは腸炎ビブリオ検査に必要な感度を有していると考えられる。

「NHイムノクロマト 腸炎ビブリオ」を用いて検査を行うと、従来用いられている培養法に比べ作業の簡易化、結果判定の簡便化に加え、検査日数も短縮でき、増菌培養後わずか20分で検査結果を得ることができる。また性能面においても、腸炎ビブリオ検査に必要な検出感度・特異性を有しているため、食品検査現場における腸炎ビブリオ検査に十分適応可能だと考えられる。

A. 研究目的

腸炎ビブリオ食中毒は鮮魚介類を生で喫食する機会の多いわが国では、細菌性食中毒発生数の上位を占めている(1)。

わが国では厚生労働省医薬局食品保健部長通知「食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について(平成13年食発第170号)」において、腸炎ビブリオの成分規格が「生食用鮮魚介類」、「むき身の生食用かき」及び「冷凍食品(生食用冷凍鮮魚介類)」については、最確数1gあたり100以下であること、「ゆでだこ」及び「ゆでがに」については、陰性であることが規定されている(2)。生食用鮮魚介類は消費期限の短い食品であることから、一日でも早く検査結果が得られることが望まれる。しかし現行の検査法(培養法)では、結果の判定までに日数を要することが問題となっている。

食品検査現場では検査期間の短縮や作業の効率化を目的として多くの迅速検査法が開発され普及している。迅速検査法には抗原抗体反応を利用したイムノクロマト法や遺伝子検査法のPCR法が知られている。PCR法は検出感度・特異性共に高いが、技術習得に時間がかかること、実験操作が煩雑であること、高価な機械が必要であることから、大規模な検査施設以外では導入が難しい。

一方イムノクロマト法は迅速性に加え簡便性も兼ね備えた検査法であり、技術の習得と結果の判定が容易で誰でも簡単に検

査・判定が行えること、特別な機器が不要であることが特徴である。検査方法は非常に簡単で、増菌培養した培養液をイムノクロマトキットに添加し10~20分静置後、テストライン部の赤紫色のラインの有無を目視判定することにより、陽性・陰性を識別する。

イムノクロマト法を原理としたキットは体外診断薬や食品検査用キットとして数多く市販されており、検出対象となる微生物も腸管出血性大腸菌0157をはじめ多岐に渡るが、腸炎ビブリオ(菌体)を検出対象としたキットは存在しない。

日本ハム(株)中央研究所では、イムノクロマト法により食中毒菌を簡便・迅速に検出する食品検査キットNHイムノクロマトシリーズの開発を行っている。腸管出血性大腸菌0157・026・0111、サルモネラ、リステリア、カンピロバクターをラインナップとして揃えている(図1)。国産メーカーとして上記キットを自社開発・製造しており、食品メーカーをはじめ、食肉衛生検査所・地方衛生研究所などの公的機関でも使用されている実績がある。

今回の研究では、NHイムノクロマトシリーズの新製品として現在開発中の腸炎ビブリオ簡易迅速検査キット「NHイムノクロマト腸炎ビブリオ」の性能評価を行い、食品検査への実用可能性について検討を行った。

B. 研究方法

1. 特異性の確認

血清型の異なる様々な腸炎ビブリオ菌株（表1）を2%食塩加アルカリペプトン水（日水製薬）に接種し、37℃で一晩増菌培養を行った。

その他ビブリオ属およびその類縁の菌株（表1）については1%食塩加アルカリペプトン水（日水製薬）に接種し、30℃で一晩増菌培養を行った。

増菌培養後の菌液75μLを試験管に分取し、キット添付の前処理用溶液を等量加え、ボルテックスによりよく混合した。イムノクロマトテストストリップの試料滴下部を下側にして前述の試験管に投入し、前処理済み菌液に浸らせ、15分間放置した。その後陽性ラインの有無を目視で判定した。試料溶液の菌濃度は、段階希釈した菌液を標準寒天培地で混釈培養して得られる生菌数を測定し算出した。

2. 検出感度の確認

ストマッカー袋に2%食塩加アルカリペプトン水（日水製薬）250mL、腸炎ビブリオ菌液を2000~4000cfu程度添加し、ストマッキングにより混合した。使用した菌株については、表2に記載したとおりである。溶液の一部（5mL）を滅菌済みの試験管に分取し、37℃で一晩振とう培養を行った。残りの菌液はストマッカー袋のまま37℃で一晩静置培養を行った。翌日「NHイムノクロマト腸炎ビブリオ」で検出できるかどうかを調べた。

海水中に多く存在し腸炎ビブリオと極めてよく似た性質を示す*Vibrio*

*alginolyticus*共存下でも腸炎ビブリオが検出感度以上に増殖するかどうかを確認するために、上記接種液に*Vibrio alginolyticus*を10⁸cfu程度接種し、37℃で一晩培養し腸炎ビブリオの増殖が阻害されないかどうかについてもイムノクロマトにより確認を行った。

C. 研究結果

1. 特異性の確認

前処理用溶液と混合した腸炎ビブリオ増菌培養液を「NHイムノクロマト 腸炎ビブリオ」に供すると陽性ラインを検出することができた（図2）。01~012まで血清型の異なる腸炎ビブリオに関しても同様にイムノクロマトに供したが、今回試験した全ての菌株で陽性ラインを検出することができた（表1）。また環境材料中の腸炎ビブリオについても検出できるか否かを確認するために、環境分離株7株についても同様の実験を行ったが、全ての菌株で陽性反応を示した。

腸炎ビブリオと性質が類似するビブリオ属および類縁の菌株について交差反応を示すかどうか検討を行った。その結果、*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Photobacterium damsela*, *Plesiomonas shigelloides*をイムノクロマトに供しても陰性であった（表1）。*Vibrio cholerae*についてもほとんどの菌株について陰性を示したが、一部の菌株（RIMD 2214034）で交差反応を示し、陽性ラインが

検出された。

2. 検出感度の確認

腸炎ビブリオ03:K6, 04:K8, 05:K15, 011:K36, 012:KUTを2000~4000cfu程度アルカリペプトン水250mLに接種すると、一晚増菌培養後に「NHイムノクロマト 腸炎ビブリオ」により検出が可能であった(表2)。ストッカー袋のまま培養するより、一部を別のチューブに分取して振とう培養を行った方が、イムノクロマトの陽性ラインがより明確に確認することができた。

また012:KUT 2952cfuと *Vibrio alginolyticus* 10⁸cfuをアルカリペプトン水250mLに接種して一晚培養しても、「NHイムノクロマト 腸炎ビブリオ」に供すると陽性ラインが検出された(表2)。

D. 考察

今回開発した「NHイムノクロマト 腸炎ビブリオ」は、腸炎ビブリオの血清型01~012 まで全ての菌株を検出でき、環境分離株も検出可能であった。交差反応性に関しては、腸炎ビブリオと性質が類似するビブリオ属の菌株、その中でも特に類似性の高い *Vibrio alginolyticus*、TCBS寒天培地を用いた培養法で腸炎ビブリオとの識別が難しい *Vibrio vulnificus* と区別できることが非常に重要である。これらの菌株についても本キットに供した結果ほとんどの菌株で陰性を示したことから、特異性の高い検査キットであることが示唆された。

生食用鮮魚介類の成分規格は製品 1g 当

たり最確数 100 以下であるので、検査の際には検体 25g をアルカリペプトン水 225mL に懸濁し 2500cfu 以上の腸炎ビブリオが存在した場合検出できる感度が必要となる。今回の実験では 2000cfu 以上の腸炎ビブリオ菌液をアルカリペプトン水 250mL に接種すると一晚の培養により「NHイムノクロマト 腸炎ビブリオ」で検出可能であったことから、本キットは生食用鮮魚介類が成分規格に適合しているかどうか検査するために必要な感度を有していると考えられる。

海水中での分布が腸炎ビブリオに類似し、本菌の検査時に食品検体中に多く含まれることが予想される *Vibrio alginolyticus* を腸炎ビブリオと共に大量に接種しても、イムノクロマトによる腸炎ビブリオの検出に影響を及ぼさなかったことから、実際の水産食品から腸炎ビブリオを検出できる可能性が示された。

E. 結論

腸炎ビブリオは増殖が早いことが知られ、生食用鮮魚介類 1g あたり 100 以上の腸炎ビブリオが存在すれば、一晚の増菌培養後「NHイムノクロマト 腸炎ビブリオ」により検出可能であることが示唆された。本キットは使用方法も簡単で、誰でも容易に結果の判定を行うことができ、特別な機械等も不要であることから、食品検査現場における腸炎ビブリオ検査に十分適応可能だと考えられる。従来用いられている培養法に比べ迅速かつ簡便に結果が得られることから、腸炎ビブリオ検査体制の充実、さらには腸

炎ビブリオ食中毒の発生件数減少につながることが期待される。

F. 参考文献

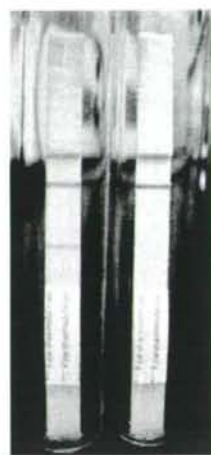
1. 荒川英二、甲斐明美、腸炎ビブリオの標準試験法作成へ向けての検討、月刊フード

ケミカル 2008 年 7 月号

2. 厚生労働省医薬局食品保健部長通知「食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について（平成 13 年 食発第 170 号）」



図1. NHイムノクロマトシリーズ



▲ コントロールライン
▲ テストライン

図2. NHイムノクロマト 腸炎ピブリオの判定結果（左：陽性、右：陰性）

表 1. 使用菌株と NH イムノクロマト 腸炎ビブリオによる検査結果

菌種	菌株	血清型	イムノクロマト結果
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	O1:K1	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	RIMD 2210774	O1:K56	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	RIMD 2210786	O2:K3	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	RIMD 2210633	O3:K6	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	RIMD 2210056	O4:K8	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	RIMD 2210086	O4:K12	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	RIMD 2210794	O5:K15	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	RIMD 2212010	O6:K18	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	RIMD 2210129	O7:K19	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	RIMD 2210789	O8:K41	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	RIMD 2210286	O9:K44	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	RIMD 2210014	O10:K52	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	RIMD 2210013	O11:K36	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	RIMD 2210775	O12:KUT	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	環境分離株ki-19	O10	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	環境分離株ki-22	O4	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	環境分離株ki-27	O3	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	環境分離株PK 0709-1	OUT	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	環境分離株PY 0709-2	O5	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	環境分離株PO 0710-1	O1	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	環境分離株PO 0711-1	O1	+
<i>Vibrio alginolyticus</i>	ATCC 17749		-
<i>Vibrio alginolyticus</i>	RIMD 2201013		-
<i>Vibrio cholerae</i>	RIMD 2203102	O1	-
<i>Vibrio cholerae</i>	RIMD 2214034	non-O1	ww+
<i>Vibrio cholerae</i>	環境分離株CA 0705-1		-
<i>Vibrio cholerae</i>	環境分離株CO 0707-1		-
<i>Vibrio cholerae</i>	環境分離株CA 0707-1		-
<i>Vibrio cholerae</i>	環境分離株CA 0707-6		-
<i>Vibrio cholerae</i>	環境分離株CA 0707-9		-
<i>Vibrio cholerae</i>	環境分離株CA 0707-13		-
<i>Vibrio cholerae</i>	環境分離株CA 0708-1		-
<i>Vibrio cholerae</i>	環境分離株CA 0708-6		-
<i>Vibrio cholerae</i>	環境分離株CA 0708-7		-
<i>Vibrio cholerae</i>	環境分離株CA 0710-1		-
<i>Vibrio fluvialis</i>	JCM 3752		-
<i>Vibrio furnissii</i>	NCTC 11218		-
<i>Vibrio mimicus</i>	RIMD 2218001		-
<i>Vibrio vulnificus</i>	JCM 3725	Serovar 1	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	JCM 3726	Serovar 2	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	JCM 3727	Serovar 3	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	JCM 3728	Serovar 4	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	JCM 3729	Serovar 5	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	JCM 3730	Serovar 6	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	JCM 3731	Serovar 7	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	JCM 3732	Serovar R	-
<i>Photobacterium damsela</i>	RIMD 2222006		-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	ATCC14027		-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	ATCC51903		-

+	陽性ラインあり
ww+	薄い陽性ラインあり
ww+	きわめて薄い陽性ラインあり
-	陽性ラインなし

環境分離株は岡山理科大学
理学部 臨床生命科学科の
篠田教授より分与していた
だいた

表 2. 検出感度の確認

接種菌種	腸炎ビブリオ	腸炎ビブリオ	腸炎ビブリオ	腸炎ビブリオ	腸炎ビブリオ	腸炎ビブリオ + <i>V. alginolyticus</i>
接種菌株	RIMD 2210633	RIMD 2210056	RIMD 2210794	RIMD 2210013	RIMD 2210775	RIMD 2210775 + ATCC17749
血清型	O3:K6	O4:K8	O5:K15	O11:K36	O12:KUT	O12:KUT
接種菌数 / cfu	2760	4092	2052	3120	2952	2952 + 10 ⁸
ストマッカー袋で培養	ww+	w+	w+	w+	ww+	ww+
振とう培養	+	+	w+	+	+	+

+	陽性ラインあり
w+	薄い陽性ラインあり
ww+	きわめて薄い陽性ラインあり
-	陽性ラインなし

食品における微生物迅速診断法の開発およ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出法の検討と評価

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
研究協力者 入谷展弘 大阪市立環境科学研究所 微生物保健 G 主任研究員

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。

A. 研究目的

ウイルス性食中毒は毎年冬期を中心に多発し、学校や病院では給食を介した大規模食中毒が発生しており食品衛生上重要視されている。厚生労働省食中毒統計によると平成 19 年に発生した食中毒事件総数 1,289 件のうち 348 件 (27.0%)、患者総数 33,477 名中 18,750 名 (56.0%) がウイルス性食中毒によるものであった。ウイルス性食中毒の主要な原因物質はノロウイルス (カリシウイルス科ノロウイルス属; NV) であり、NV はヒトの小腸上皮細胞内でのみ増殖し、糞便中や嘔吐物中にウイルス粒子が大量に排出される。NV 食中毒の原因は感染者由来の NV が食品取扱者を介して食品の表面を汚

染する場合が多いと考えられる。現在食品からの NV 検出法として RT-PCR 法が用いられているが推定汚染食品からの NV 検出の報告はほとんどなく、その理由として食品中のウイルス汚染量はごく少量であることが考えられるが、食品からウイルスを効率よく抽出する方法が確立されていないことが原因と思われる。

本研究ではウイルス性食中毒の主要な原因ウイルスであるノロウイルスに近縁で、培養細胞による培養が可能なネコカリシウイルスを用いて、食品表面を汚染した病原ウイルスの迅速かつ簡便で効率のよい検査方法を検討した。