

200837011B

厚生労働科学研究費補助金

食の安心・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およびその精度評価システム  
に関する研究

平成 18～20 年度 総合研究報告書

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およびその精度評価システム  
に関する研究

平成 18～20 年度 総合研究報告書

研究代表者 小崎俊司

平成 21 年 3 月

## 目 次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧 .....	23
III. 研究成果の刊行物・別刷 .....	27

## I. 総合研究報告書

総合研究報告書

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

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 教授

研究要旨

食品の細菌学的規格基準は、告示法等による培養法が用いられている。現状、食品現場のリスクマネジメントとして求められていることは、簡便、迅速、高感度な検査方法である。食品からの微生物検査法のダブルスタンダード化を避け、いかにして簡易・迅速法を使えるようにするかの解答を出し、その精度評価システムを構築し、それに基づいて評価した簡便・迅速法の提案するために、以下の研究課題について検討した。

一般細菌および汚染指標細菌の迅速法の評価:食品中の汚染指標細菌の簡易迅速試験法の有用性を検討するための基礎資料として、食品細菌規格基準およびその試験法（成分規格）を整理し、一覧表を作成・投稿した。簡易迅速試験法として開発された自動菌数測定装置の DOX（バイオシータ社）と TEMPO（ビオメリュー社）の有用性を、従来法（平板培養法）と比較することにより評価した。さらに、従来法との同等性評価試験に必要な、より自然汚染に近い指標菌汚染食品の作製法を考案した。現存する精度評価指針は迅速性に主眼を置いた方法の評価には過度に厳密となる部分も存在することがわかったため、この点を改良した精度評価指針案を考案した。

簡易迅速検査法に適した遺伝学的、免疫学的検査法の検討と開発:腸管出血性大腸菌 O157 については、市販遺伝子診断キットでは毒素産生性との一致率が 87%であったため、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。リステリア菌については市販遺伝子診断キット擬陽性が認められたため、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。サルモネラ検出キット（タカラバイオ社）は培養法と一致した結果が得られた。市販ベロ毒素検出キット（IC 法、RPLA 法）の有用性の検討では、*stx2* バリエーション株は IC 法では検出されなかった。プ

ドウ球菌エンテロトキシンH検出ELISAを開発し、食中毒由来ドウ球菌の毒素型を調べた結果、H型毒素産生菌が60%含まれていること見出した。B型ボツリヌス毒素の新しい変異型毒素を検出するELISA法を開発した。

感染型食中毒菌の迅速検査法の評価:腸炎ピブリオを迅速に検出するためにPCRを新規に開発した。MPN3本法の増菌液の一部を用いてこのPCRを行ったところ、培養法と一致した成績であった。さらに、食品由来の夾雑物による偽陰性や、何らかのPCR反応の不具合を排除するため、陽性コントロール鋳型をこのPCR反応液に添加することで検出の確度、ひいては検査の信頼性の向上を図ることが出来た。

非培養法による迅速法の検討:食品の前処理法として菌の直接濃縮法として原理的に期待される免疫磁気ビーズおよび陽イオントラップを応用した循環型濃縮システムの有用性を検討したが、添加した菌の回収率は最大で5%であり、緩衝液等のさらなる検討が必要である。

培養・非培養法ハイブリッドによる迅速法の開発:密度勾配遠心法と濾過法を組み合わせた生菌分離法を開発した。添加実験により各種食品マトリックスから高効率に菌を分離できた。本装置と蛍光顕微鏡法などの非培養法を組み合わせることにより、菌数測定の前自動化が可能となった。

ノロウイルスの迅速検査法の検討と評価:ノロウイルスの食品からの濃縮法として遠心式限外濾過法が簡便迅速で有用であることを示した。食品からのノロウイルス検出率を向上させる方法として、細菌の生物活性を利用した方法を考案した。ノロウイルス遺伝子診断法として、nested PCRを応用し、2<sup>nd</sup>PCRにリアルタイムPCRを用いることにより、検出感度を1000倍以上に上昇させることができた。

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 敬久 九州大学大学院農学研究院  
教授  
五十鈴 静信 国立医薬品食品衛生研究所

食品管理部 室長

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

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  
吉田 靖子 東京都健康安全研究センター微生物部 科長  
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  
居原 秀 大阪府立大学大学院理学系研究科  
酒井 史彦 雪印乳業株式会社食品衛生研究所  
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  
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  
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  
朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所  
梶川 揚申 国立医薬品食品衛生研究所  
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  
仲真 晶子 東京都健康安全研究センター  
山崎 貢 愛知県衛生研究所  
岩出 義人 三重県科学技術振興センター  
松本 昌門 愛知県衛生研究所  
皆川 洋子 愛知県衛生研究所  
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  
野口 やよい 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  
永野 美由紀 東京都健康安全研究センター

#### A. 研究目的

食品衛生検査においては、「信頼性が高く、調和のとれた検査法が求められ、かつ時代に即応した方法も取り入れられることが必要である」とされている。しかしながら、わが国の食品衛生に関わる微生物検査法は、多種多様な方法が提示されており、国際機関の検査法との調和が重要な課題となっている。検査法は、原則的にはプロトコール作成時の透明性を重視し、ハーモニゼーションを基調とする培養による標準法作成を行った上で、これを尺度として、食品のリ

スクマネージメントに適する微生物検査法の開発を活性化してゆくことが重要である。通常の微生物検査において迅速・簡便法の必要性は高いが、わが国においては現在それらの優れた迅速検査法が正当に評価され、広く用いられる環境とはなっていない。本研究班では、①一般細菌および汚染指標細菌の迅速法の評価、②簡易迅速検査法に適した遺伝学的、免疫学的検査法の検討と開発、③感染型食中毒菌の迅速検査法の評価、④非培養法による迅速法の検討、⑤培養・非培養法ハイブリッドによる迅速法の開発、

⑥ノロウイルスの迅速検査法の検討と評価の研究課題を設定し、標準法を尺度としたバリデーション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・評価を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 一般細菌および汚染指標細菌の迅速法の評価

平成18年度は、国際的に汚染指標菌として利用されている大腸菌群、糞便系大腸菌群（食品衛生法で使用されている *E. coli* と同意語）、大腸菌などの試験法に関する国内外の情報を収集・解析した。その対象とした主たる試験法は、米国食品医薬品局（FDA）の Bacterial Analytical Manual（BAM）いわゆる FDA/BAM 法、ヨーロッパの International Organization for Standardization（ISO）法、日本の食品衛生小六法に記載された告示法と通知法である。これら試験法の手順、使用培地、培養温度などを比較・解析した結果、米国の FDA/BAM 法とヨーロッパの ISO 法は、培養温度等の細部では異なるが、使用培地を含む試験法の概要は互いに類似した部分が多いことがわかった。これに対して、日本の告示法・通知法は、FDA/BAM 法や ISO 法とは使用する培地が大きく異なっており、日本の汚染指標菌試験法は迅速性が乏しいだけでなく、試験法の国際的な調和の視点からも好ましくない状況にあることが明確となった。平成19年度に、わが国の汚染指標菌等の簡易迅速試験法を検討するための基礎資料として、食品細菌規格基準およびその試験法（成分規格）を整理し、一覧表を

作成した。

平成19年度および20年度は、食品中の汚染指標菌の簡易迅速試験法の有用性を検討するために、バイオシータ社の DOX-30F（DOX）とピオメリュー社の TEMPO（テンポ）を選択した。迅速試験法と平板培養法の同等性を評価する方法として、理想的には汚染菌数の異なる各種の自然汚染食品を大量に用意する必要がある。これは、現実的には不可能であるので、自然汚染食品の代替となる食品が必要となる。より自然汚染に近い指標菌汚染食品を作製する方法として、動物・環境由来菌液を無菌食品に添加することを考えた。

平成19年度は、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、土壌から菌を抽出し、それぞれの菌液中の一般生菌、大腸菌群、大腸菌、*Enterobacteriaceae*（仮約：腸内細菌科菌群）数を、DOX およびテンポと従来法とで比較検討した。大量の食品に菌液を接種して菌数測定するためには、菌液の保存性が重要な要素となる。今回作製した菌液は、冷蔵保存下で最低7日間は菌数に大きな変化がなかった。DOX およびテンポで測定した菌数と、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った。

平成20年度は、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、腸内細菌科菌群数を、DOX およびテンポ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 およびテンポで測定した菌数と、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。テンポ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、テンポ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。

## 2. 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

一般生菌数 (SPC) は、食品の微生物学的汚染指標として最もよく利用されている。しかし、公定法では SPC 測定に最低 2 日間を要し、様々な要求から流通期間が短縮されてきている今日においては検査の迅速化が急務となっている。そこで時間短縮を目的とした各種の迅速法が近年、開発されてきた。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。

そこで本研究では、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。具体的には、現在国内の迅速法開発者が利用している、諸外国の認証制度 (AOAC、ISO) を参考に項目を整理し (平成 18 年度)、本邦における評価指針の方向性を検討した。それを受け、精度の評価方法について、既存の迅速測定法 2 件、本研究班が開発した迅速法 1 件による実験データをもとに、問題点を洗い出し、実験的に検証し、迅速法の評価に適したデータ精度評価法の案を立案した。

## 3. 簡易迅速検査法に適した遺伝学的、免疫学的検査法の検討と開発

食中毒細菌の簡易迅速検査のための市販

の遺伝学的方法、プライマーセット、キットの検出感度、精度などについての正確な評価が行なわれているわけではない。そこで本研究では、市販の分子生物学的手法を応用した食中毒細菌の迅速検査法の評価・検討および新規検出用プライマーの設計を行った。

まず、標準法が示されている腸管出血性大腸菌 O157 および O157 以外のペロ毒素産生性大腸菌検出用市販キットについて検討した。このために収集した 88 株の大腸菌 O157、33 株のペロ毒素産生性大腸菌、合計 121 株をリボプリントパターンにより分類し、119 株についてペロ毒素遺伝子の部分塩基配列を決定して *stx1* 及び *stx2* 遺伝子型による分類を行った結果、両遺伝子型ともに全体の 5-7 割を占める第 1 主要グループと約 2-3 割を占める第 2 主要グループおよびその他の少数の遺伝子型グループに分類された。RPLA による検査の結果、大腸菌 O157 では、*stx1* および *stx2* 遺伝子を保有しているにもかかわらず市販の免疫学的キットではペロ毒素を検出できない菌株が複数存在した。また、市販の大腸菌 O157 検出キットではペロ毒素遺伝子 *stx*、および O 抗原決定因子 *wzx*、*wzy* の内部配列を増幅して検出するものが多く、実際に増幅領域の塩基配列を決定した結果、タカラバイオ社の「O-157 & ペロ毒素遺伝子同時検出キット」で増幅される 349bp の産物は *stx1a* の 605-953 塩基部分であった。457bp 産物は、O157 抗原決定 *wzy* 遺伝子の 844 塩基部分から *wbdO* 構造遺伝子の 147 塩基までが増幅されたもので、112bp 産物は *stx2a* 遺伝子の 454-565 塩基部分であった。同社の「腸管

出血性大腸菌 VT2 遺伝子検出用プライマーセット EVS-1, -2 は、前述の同時検出キットとは異なり、*stx2a* 構造遺伝子の 454-857 塩基部分を増幅するものであった。また、Applied Biosystems 社「TaqMan *E. coli* O157:H7 detection kit」では、*eae* 遺伝子の 550-615 塩基部分を増幅してプローブで検出することが判明した。ペロ毒素遺伝子型により分類した 89 株の腸管出血性大腸菌 O157 について RPLA による毒素産生性と、タカラバイオ社の遺伝子診断キットによる型別との相関を調べた結果、タカラバイオ社のキットでは VT 型 1 & 2 の 52 株については検出率は 100% であった。24 株の VT 2 型は 23 株が 2 型、9 株の VT 1 型については 1 株のみ 1 型、VT 陰性の 4 株は 3 株が 1 & 2 型と判定された。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。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ペロ毒素遺伝子 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設計可能と思われる。

また、*Listeria monocytogenes* 192 株について、*hlyA*, *plcA*, *inlA* および *cIpc* 遺伝子の内部塩基配列を決定した。決定した塩基配列をもとに分類すると multi-locus sequence typing (MLST) による分類では 57 群に分類された。MLST 型の異なる 57 株についての試験結果、*inlA* 遺伝子を指標として検出するタカラバイオ社および Applied Biosystems 社の遺伝子診断キットでは偽陰性はなかったが、*L. monocytogenes* 以外のリステリア属細菌の

検出率が高かった。本塩基配列解析結果をもとに偽陽性の少ない *hlyA* 遺伝子を指標とした新規 PCR 検出用プライマーセットが設計可能と思われる。

最後に、50 検体の生肉を試料として、サルモネラ属菌の遺伝子診断法として市販されているタカラバイオ社および Applied Biosystems 社のサルモネラ検出キットによる検査結果を培養法と比較した結果、タカラ社のキットでは、偽陽性はなかったが、BPW による前増菌液を試料とすると偽陰性が 60% 程度検出されたが、選択培養後には 16% まで低下した。Applied Biosystems 社のキットでは同社の装置と判定基準の入ったプログラムを用いない場合には BPW 前増菌液を試料とすると偽陰性はなかったが、選択培養後には 12% の偽陰性が検出された。しかし、偽陽性が BPW 後の雑菌液では 76%、選択培養後でも 44% と高く、正確な判定には同社の装置と判定プログラムが必要と思われる。

#### 4. 毒素型食中毒菌の免疫学的検出法の開発

大腸菌からのペロ毒素 (VT) 検出について、従来法であるラテックス凝集反応 (RPLA) 法とイムノクロマト (IC) 法を比較した。キャピリアは EHEC 59 株中 57 株で、デュオパスは EHEC 66 株中 61 株で、RPLA 法と一致した結果が得られ、VT 非産生大腸菌やその他の腸内細菌、*Vibrio* 属菌などは、RPLA 法、IC 法ともに陰性を示した。不一致株はいずれも VT2 型遺伝子が *stx2c* の株で、RPLA 法で VT2 陽性を示すものの IC 法は陰性であった。22 株の *stx2* バリエーション株を用いて、RPLA 法と 2 つの IC 法を同時に実

施したところ、試薬によってVT検出能が異なっていた。*stx2*バリエーション以外の株では、IC法で陽性と判定されるには毒素型に関わらずRPLA力価16倍以上が必要であった。したがって、EHECの特徴的な生化学的性状を示す0157や026であるのにIC法陰性の場合、他の方法でもVTまたはVT遺伝子を確認できるよう備える必要がある。しかしながら、判定に一夜を要するRPLA法に比べ、IC法は迅速性と簡便性に優れており、EHECの同定に非常に有用である。また、分離平板上の典型的なコロニーから調整した被検液でも、IC法で分離株と一致した成績が得られ、分離平板からのスクリーニングに使用可能であると考えられた。

ブドウ球菌食中毒は代表的な毒素型食中毒でブドウ球菌エンテロトキシン(SE)が原因である。近年ブドウ球菌食中毒食品中にH型毒素が検出されることが報告され、H型毒素が食中毒発症に関与していることが示唆された。本研究では、H型毒素検出用のELISAを構築し定量化を試み、過去のブドウ球菌食中毒株についてH型毒素の産生能を精査した。本研究で構築したH型毒素検出用のELISAは、他の毒素と交差することなくH型毒素と特異的に反応することが確認され、検出限界は1 ng/mlであり、1-10 ng/mlの範囲で定量的に検出された。食中毒由来ブドウ球菌144株についてA、B、C、D、E型およびH型毒素を測定した結果、A型毒素産生株は90株(63%)と最も多く、次いでH型毒素産生株86株(60%)であった。これら黄色ブドウ球菌についてコアグラエ型と毒素型の関係を解析した結果、A型毒素産生株はコアグラエ型がII、III、

IV、VIおよびVII型に分散しているのに対して、H型毒素産生株は全てがコアグラエVII型であることが明らかとなった。以上の結果から、過去の食中毒事例において、H型毒素Hが食中毒の発症に深く関係している可能性が示唆された。よって、今後の黄色ブドウ球菌食中毒ではH型毒素も検査対象とする必要があるものと推察された。

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。

## 5. 感染型食中毒菌の迅速検査法の評価 (1)

食品からの腸炎ピブリオの簡便・迅速検出法の確立を目的として、遺伝子検査法であるPCR法及びリアルタイムPCR法を検討し、以下の結論を得た。

1. DNA抽出法としては、熱抽出法、アルカリ熱抽出法及び市販キットPrepMan(ABI)、DEXPAT(TAKARA)、High Pure PCR Template Preparation Kit(Roche)、QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN)による抽出法、いざ

れも同等であった。

2. 腸炎ビブリオを特異的に検出する PCR 法として、*toxR* (Kim YB *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* 37: 1173-7, 1999) 及び LDH (石橋ら, 大阪府立公衛研所報 23: 67-71) を標的とする PCR を検討した結果、 $10^4$ cfu/ml まで検出可能であった。しかし *toxR* は *V. alginolyticus* の一部の株に非特異反応が見られた。

3. リアルタイム PCR 法では、*tlh* (Davis CR *et al.*, *J. Food Prot.* 67: 1005-8, 2004. 及び Nordstrom JL *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5840-7, 2007.) を標的とする PCR を検討した。いずれも  $10^3$ cfu/ml まで検出可能であった。

4. インターナルコントロール (IC) の検討を行った。PCR 法では IC プライマーをプラスミド DNA PBR322 内に設計し、プラスミド DNA PBR322 と共に加えて検討した結果、腸炎ビブリオ濃度  $10^4$ cfu/ml まで検出できた。リアルタイム PCR 法では、TaqMan Exogenous Internal Positiime Control Reagents (ABI) を加えても  $10^3$ cfu/ml まで検出することができた。

5. 魚介類の 2%食塩加 APW 培養液に、腸炎ビブリオ段階希釈液を接種して検討した。LDH を標的とした PCR による検出感度は  $10^4 \sim 10^5$ cfu/ml であり、反応系に IC を加えた場合の検出感度は  $10^5$ cfu/ml であった。リアルタイム PCR では  $10^3 \sim 10^4$ cfu/ml まで検出することができ、IC を加えても同様であった。しかし、他ビブリオ属菌が多い場合、菌の分離は  $10^4$ cfu/ml より低濃度ではできなかった。

6. 食品 52 検体の増菌培養液を対象に、PCR

法と培養法で比較検討した結果、両法の一致率は 94.2%であった。

7. 遺伝子検出では死菌も検出してしまう大きな問題がある。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) による処理を検討した。 $10^7 \sim 10^8$ cfu/ml の生菌と加熱死菌に EMA 処理を行うと、PCR では加熱死菌はいずれの濃度も検出されなくなった。リアルタイム PCR では  $10^2$ cfu/ml 程度少なく定量された。

以上の結果より、食品からの腸炎ビブリオ検出の際に、食品培養液を PCR 法、またはリアルタイム PCR 法で検出することが有用であること、EMA 処理により死菌の DNA を破壊して影響をなくすか、あるいは低減させることが可能であることが示唆された。

## 6. 感染型食中毒菌の迅速検査法の評価 (2)

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。

#### 7. 非培養法による迅速法の検討

食品における微生物検査に於いて、一般に当該微生物の汚染菌数は低く、そのまま直接微生物検査を行っても、検出限界以下となる場合がほとんどである。このようなことから培養による検査法では、一般的に当該微生物を選択的に増菌する選択増菌培養を行った後、微生物の分離を行っている。一方、迅速検査法では、選択増菌培養を行うと時間がかかるため、可能であれば選択増菌は必要最小限に留めたい。迅速検査法の実用的な検出限界は、104~105 個/g と考えられており、食品の前処理や前増菌などにより迅速検査法実施前にこのレベルに菌数を高める必要がある。このレベルまで菌数を高める方法としては、当該微生物を選択的に濃縮して試験系に持ち込む方法と、短い時間の選択増菌を行い当該微生物の菌

数を高める方法がある。そこで、濃縮法について情報収集を行い、実行性の高いと思われる免疫磁気ビーズ法と磁気ビーズ法を応用した循環型濃縮システムについて検討を行った。微生物は細菌としてはリステリア・モノサイトゲネスとエンテロバクター・サカザキ、ウイルスとしてはノロウイルス (NV) を検討の対象とした。原理的には期待される手法ではある磁気ビーズ法を応用した循環型濃縮システムを用いた。細菌を対象として濃縮を行ったところ、実験結果では最大で 5% の捕集結果であった。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 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。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 回数率は 5% 以下であり、今後の検討が必要であると思われた。

#### 8. 培養・非培養法ハイブリッドによる迅速法の開発

Percoll を用いる密度勾配遠心分離法 (DGC 法\*1)、密度勾配層回収装置 (FC\*2)、顕微蛍光計数装置 (BP\*3、実用機開発済) から構成される迅速法のコンセプトを提示

し、それに必須の DGC 法、および FC の要素技術を開発した。DGC 法は、難濾過性食品 3 点（生乳、魚肉〔ブリ〕、牡蠣）からの汚染指標菌分離に適用できることを示し、FC は大腸菌の自動回収に適用できることを示した。さらに、BP で計数後の大腸菌をそのまま培養してマイクロコロニーにして計数できることを示した。以上により、非培養から培養へトレーサブルに繋がるハイブリッド法の可能性を示した。

(\*1: Density gradient centrifugation, \*2: Fraction collector, \*3: bioplorer\*)

#### 9. ノロウイルスの迅速検査法の検討と評価

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、溶出方法、濃縮方法およびノロウイルス検出方法として市販 ELISA キットの有用性について検討した。その結果、溶出液に 1% 牛肉エキスあるいは不含 Tris-Glycine buffer (pH 9.5)、溶出方法に超音波処理法 (15 min)、濃縮方法に遠心式限外ろ過法を組み合わせることにより簡便迅速に食品からウイルスを抽出することが可能であり、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。また、市販 ELISA キットの検出限界は  $10^6$  個前後であると考えられた。

#### 10. ノロウイルス迅速検査法の検討と評価

ノロウイルスが原因と考えられる食中毒

事件において、推定原因食品からのノロウイルスが検出される事例は非常に少ない。その要因として①食品中のノロウイルス量が少ないこと②食品中に存在する食品成分由来の妨害物質が検査に影響していることが考えられる。食品からのノロウイルスの検出率を向上させる目的で以下の研究を行った。①検出感度を向上させるために 2 n d リアルタイム PCR 法を導入した。その結果、大部分の検体で 1,000 倍以上の感度上昇が確認された。②食品成分由来の妨害物質を除去する方法として細菌の生物活性を利用した前処理法を考案した。この前処理法を用いることで、通知法と比較し回収率が 100~200 倍向上した。この方法はカキ由来成分による核酸抽出時の妨害作用を軽減させるものと推察された。

#### C. 研究結果

培養法を基準とした標準法の整備が遅れているため、標準法を尺度とした迅速検査法の精度評価に達していない研究課題もあるが、所期の目的を達成できた課題もある。一般細菌および汚染指標細菌の迅速法の評価

食品中の汚染指標細菌の簡易迅速試験法の有用性を検討するための基礎資料として、食品細菌規格基準およびその試験法（成分規格）を整理し、一覧表を作成・投稿した。簡易迅速試験法として開発された自動菌数測定装置の DOX（バイオシータ社）と TEMPO（ピオメリュー社）の有用性を、従来法（平板培養法）と比較することにより評価した。さらに、従来法との同等性評価試験に必要な、より自然汚染に近い指標菌汚染食品の

作製法を考案した。現存する精度評価指針は迅速性に主眼を置いた方法の評価には過度に厳密となる部分も存在することがわかったため、この点を改良した精度評価指針案を考案した。

#### 簡易迅速検査法に適した遺伝学的、免疫学的検査法の検討と開発

腸管出血性大腸菌O157については、市販遺伝子診断キットでは毒素産生性との一致率が87%であったため、毒素産生性との一致率の高いペロ毒素遺伝子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。リステリア菌については市販遺伝子診断キット擬陽性が認められたため、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。サルモネラ検出キット(タカラバイオ社)は培養法と一致した結果が得られた。市販ペロ毒素検出キット(IC法、RPLA法)の有用性の検討では、*stx2*バリエーション株はIC法では検出されなかった。ブドウ球菌エンテロトキシンH検出ELISAを開発し、食中毒由来ブドウ球菌の毒素型を調べた結果、H型毒素産生菌が60%含まれていることを見出した。B型ボツリヌス毒素の新しい変異型毒素を検出するELISA法を開発した。

#### 感染型食中毒菌の迅速検査法の評価

腸炎ビブリオを迅速に検出するためにPCRを新規に開発した。MPN3本法の増菌液の一部を用いてこのPCRを行ったところ、培養法と一致した成績であった。さらに、食品由来の夾雑物による偽陰性や、何らかのPCR反応の不具合を排除するため、陽性コントロール鋳型をこのPCR反応液に添加

することで検出の確度、ひいては検査の信頼性の向上を図ることが出来た。

#### 非培養法による迅速法の検討

食品の前処理法として菌の直接濃縮法として原理的に期待される免疫磁気ビーズおよび陽イオントラップを応用した循環型濃縮システムの有用性を検討したが、添加した菌の回収率は最大で5%であり、緩衝液等のさらなる検討が必要である。

#### 培養・非培養法ハイブリッドによる迅速法の開発

密度勾配遠心法と濾過法を組み合わせた生菌分離法を開発した。添加実験により各種食品マトリックスから高効率に菌を分離できた。本装置と蛍光顕微鏡法などの非培養法を組み合わせることにより、菌数測定の実用化が可能となった。

#### ノロウイルスの迅速検査法の検討と評価

ノロウイルスの食品からの濃縮法として遠心式限外濾過法が簡便迅速で有用であることを示した。食品からのノロウイルス検出率を向上させる方法として、細菌の生物活性を利用した方法を考案した。ノロウイルス遺伝子診断法として、nested PCRを応用し、2<sup>nd</sup>PCRにリアルタイムPCRを用いることにより、検出感度を1000倍以上に上昇させることができた。

#### **D. 考察**

食品の微生物検査は、公定法などの標準試験法は培養法を基本とし、検査結果を得るまでに数日を要する。一方、食品のリスクマネジメントにおいては、製造工程や製品管理で微生物汚染の評価を迅速に行う必要があり、そのため高感度で、迅速かつ

簡便な試験法が求められている。標準試験法と同等な検査精度が担保されるならば、迅速・簡便試験法を食品の微生物検査に利用することが可能となり、検査の実行性を高めることができる。本研究では、食品検査に利用可能な質の高い簡易・迅速試験法の開発とその精度評価システムの開発を目的として複数の研究課題に取り組んできた。

今後さらに、現在作成が進められている標準試験法や ISO 法と同等ないしはそれ以上の試験結果を得られる迅速・簡便試験法の具体的検証方法をガイドラインとして提供する必要があると考えられる。

また、培養できないノロウイルス試験法に関しては食品の検査として使用可能な検体処理方法および標準的な試験方法として提案する予定である。

#### E. 結論

本研究の成果は、国際機関の試験法との調和が求められているわが国の検査法に対する新たな提案が出来るばかりでなく、今後の迅速高感度な検出法の開発に必要な情報を開示できることが期待され、現在使用されている食品における微生物検査の範囲が拡大・徹底し、微生物的に安全な食品提供が確実となり、国民の食生活の向上に大きく貢献できるものと考えられる。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

平成 18 年度

- 1) B. Kimura: Recent advances in the study of the genotypic diversity and ecology of *Listeria monocytogenes*. *Microbe. Environ.*, 21, 69-77 (2006)
- 2) 丸山弓美, 木村 凡, 藤井建夫, 徳永宜則, 松林 潤, 相川保史: 食卓用ドライアイス装置内の魚介類における腸炎ピブリオの増殖抑制, *食品衛生学雑誌*, 46, 213-217 (2006)
- 3) 藤川 浩・矢野一好・諸角 聖・木村凡・藤井建夫: 各種温度条件下における微生物増殖予測プログラムの開発, *食品衛生学雑誌*, 47, 288-292 (2006)
- 4) 尾畑浩魅, 下島優香子, 小西典子, 門間千枝, 矢野一好, 甲斐明美, 諸角聖, 福山正文: 腸炎ピブリオ食中毒事例における PCR 法を用いた食品からの耐熱性溶血毒(TDH)産生菌の分離, *感染症学雑誌*, 80, 383-390 (2006)
- 5) T. Shimakita, Y. Tashiro, A. Katsuya, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid Separation and Count of Viable Microbial Cells in Foods by Non-culture Method with a Bioplorer, a Focusing-free Microscopic Apparatus with a Novel Cell Separation Unit. *J. Food Protection*, 69, 145-151 (2006).
- 6) K. Fujioka, I. Kozone, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid Evaluation of the Efficacy of Microbial Cell Removal from Fabrics. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 995-1002 (2006).

平成 19 年度



- 1) K Seto, M Taguchi, K Kobayashi, S Kozaki. Biochemical and molecular characterization of minor serogroup of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans in Osaka prefecture. *J. Vet. Med Sci.*, 69(12): 1215-1222, 2007
- 2) 浅尾 努 (2007) 食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法 (2) 大腸菌群、糞便系大腸菌群、大腸菌、日本防菌防黴学会誌、35: 401-410.
- 3) 浅尾 努、河合高生、久米田裕子、寺本忠司、石黒 厚、梅迫誠一、小笠原準、高須一重、美野朋隆、日野亮一、齋藤利江、小崎俊司、山本茂貴 (2007) 食品の細菌学的試験法の現状と問題点 (日本食品微生物学会 食品の細菌検査法問題検討委員会報告) *日本食品微生物学雑誌*、24: 134-143.
- 4) Y. Kasai, B. Kimura, Y. Tajima, and T. Fujii, Quantitative duplex PCR of *Clostridium botulinum* types A and B neurotoxin genes. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 48 (2007) 19-26.
- 5) S. Handa-Miya, B. Kimura, H. Takahashi, MSato, T. Ishikawa, K. Igarashi, T. Fujii.: Nonsense-mutated *inlA* and *prfA* not widely distributed in *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat seafood products in Japan, *Int. J. Food Microbiol.* 117 (2007) 312-318
- 6) H. Takahashi, S. Handa, B. Kimura, M. Sato, A. Yokoi, S. Goto, I. Watanabe, T. Koda, K. Hisa, and T. Fujii: Development of Multilocus Single Strand Conformational Polymorphism (MLSSCP) Analysis of Virulence Genes of *Listeria monocytogenes* and Comparison with Whole Genome DNA Typing *Int. J. Food Microbiol.* 118 (2007) 274-284
- 7) 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.* in press (2007, doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03652.x)
- 8) 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), 468-472.
- 9) 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) 839-844.
- 10) 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 O3:K6  
strains. *J. Microbiol. Meth.* 72  
(2008) 313-320.
- 11) K. Fujioka, P. Geis, M. Saito, H. Matsuoka: Visualization of Yeast Single-cells on Fabric Surface with a Fluorescent Glucose and Their Isolation for Culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 685-688 (2007).
- 12) K. Fujioka, I. Kozone, M. Saito, H. Matsuoka: Automatic mapping of viable microbial cells distributed in the surface layer of cotton fabrics. *Biocontrol Science*, 12, 31-34 (2007)
- 13) K. Yamada, M. Saito, H. Matsuoka, N. Inagaki: A Real-time Method of Imaging Glucose Uptake in Single, Living Mammalian Cells. *Nat. Prot.* 2, 753-762 (2007)
- 14) H. Kodaka, S. Mizuochi, M. Saito, H. Matsuoka: Evaluation of a new medium for the enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in Japanese surface waters. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1112-1118(2007).
- 15) Y. Yamada, N. Yamaguchi, M. Ozaki, Y. Shinozaki, M. Saito, H. Matsuoka: An instant Cell Recognition System Using Microfabricated Coordinate Standard Chip Useful for Combinable Cell Observation with Multiple Microscopic Apparatus. *Microsc. Microanal.* 14, 1-7 (2008)
- 16) N. Iritani, T Seto, H Hattori, K Natori, N Takeda, H Kubo, T Yamano, M Ayata, H Ogura, Y Seto.: Humoral immune responses against Norovirus infection of children. *J. Med. Virol.* 79:1187-1193. (2007)
- 平成 20 年度
- 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 O3: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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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)
- 18) 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)
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) 荒川英二、甲斐明美：腸炎ピ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。
- 22) 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)
- 23) 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)
- 24) 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.
- 25) 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

平成18年度

- 1) 須田貴之、高橋 肇、五十嵐和典、木村 凡、藤井建夫。TaqMan 法を用いた鑑別培地からの大腸菌の迅速判定法の開発。日本食品微生物学会。平成18年9月21日、22日、大阪。
- 2) 石川達也、木村凡、宮 聡子、高橋肇、佐藤美紀、藤井建夫。MLVA を用いた *Listeria monocytogenes* 4b のタイピング手法の開発。日本食品微生物学会。平成18年9月21日、22日、大阪。
- 3) 木村竜介、木村凡、深谷哲也、佐久間欣也、藤井建夫。pH調整無菌化米飯のボツリヌスリスクについて。日本食品微生物学会。平成18年9月21日、22日、大阪。
- 4) 五十嵐和典、高橋肇、木村凡、藤井建夫。*Listeria monocytogenes* のバイオフィルム形成能について、日本食品衛生学会、平成18年10月26日、27日、名古屋。
- 5) 木村竜介、木村 凡、藤井