

せが最もよく、4 検体から分離され、次いでプレストンとmCCDAあるいはフィルター法の組み合わせでそれぞれ3 検体から分離された。*A. butzleri*については、増菌培地としてプレストン(13 検体)よりボルトン(3 検体)培地の方が良かった(結果は示さず)。特に、ボルトン培地とフィルター法の組み合わせが最も良く、31 検体から、次いでボルトン培地とmCCDAの組み合わせで21 検体から*A. butzleri*が分離された。

2)我が国の食肉:鶏肉20 検体のうち、12 検体から*C. jejuni*が、3 検体から*C. coli*が、8 検体から*A. butzleri*が分離された。Nested-multiplex PCRでは、16 hrの増菌培養で*C. jejuni*が7 検体で、*C. coli*が3 検体で陽性となった。一方、豚肉17 検体のうち、1 検体から*C. jejuni*が、2 検体から*A. butzleri*が分離された。Nested-Multiplex PCRでは、プレストン培地を用いた増菌培養で*C. jejuni*と*C. coli*がそれぞれ1 検体で陽性となった。牛肉に関しては、調べた34 検体のうち、*C. jejuni*は全く分離されず、2 検体から*C. coli*と*C. fetus*がそれぞれ分離された。また、5 検体から*A. butzleri*が分離された。Nested-multiplex PCRを用いた解析では、プレストン増菌培地を用いた場合、48 hrの増菌後に1 検体でのみ*C. coli*が検出され、ボルトン増菌培地を用いた場合、48 hrの増菌後に2 検体からそれぞれ*C. coli*と*C. fetus*が

検出された。

*C. jejuni*は、タイの結果と同様プレストン培地を増菌培地として用いた場合、12 検体から分離できたが、ボルトン培地では4 検体でしか分離できなかった。*C. coli*は、プレストン培地で1 検体、ボルトン培地で2 検体から分離されたが、全てにおいてフィルター法との併用であった。タイの結果と同様、*A. butzleri*はボルトンの増菌培地でのみ単離され、フィルター法を組み合わせた場合最も分離率が高く7 検体から、次いでmCCDAを組み合わせた場合、4 検体から分離された。

#### D. 考察

タイと我が国の食肉におけるカンピロバクター関連細菌の汚染状況を調べることを目的とし、ほぼ同じ条件で当該菌の検出・分離を行った。その結果、タイと我が国の食肉がかなりの割合でカンピロバクター属菌やアルコバクター属菌に汚染されていることが明らかとなったが、その質はかなり異なっていた(表)。例えば、Nested-multiplex PCRでの検出の場合、増菌培養の時間はタイの場合24 hrでの検出率は低く(そのため16 hrを行わなかった)、48 hrの増菌が必要であったが、我が国の場合、16 hrの増菌でも鶏肉と豚肉では検出され、24 hrと48 hrの結果もほぼ同じであった。このことはタイよりも我が国の鶏肉の方が、汚染菌量が多いことを示唆している。また、我が国では分離されなかった*C. hyointestinalis*や*A.*

*Cryaerophilus* がタイの豚肉から分離され、我が国の牛肉ではタイで分離されなかった *C. fetus* が分離された。もう一つの特筆すべき点は、タイの場合、全ての食肉で我が国と比べ *A. butzleri* の汚染率が高かった。今後、*A. butzleri* についてもタイや我が国における下痢症の関係を調べていくことが重要であると考えられる。

#### E. 結論

タイと我が国の食肉、特に鶏肉がカンピロバクター属細菌でかなり汚染されていた。特にタイでは、鶏肉のみならず豚肉や牛肉においても 30% から 60% の割合でアルコバクター属菌によって汚染されていた。

#### F. 健康危機情報

タイ、我が国の食肉がかなりの割合で、カンピロバクター関連細菌で汚染していた。食肉の加熱調理の重要性を消費者に伝えることが重要である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) S. M. Lutful Kabir, K. Kikuchi, M. Asakura, S. Shiramaru, N. Tsuruoka, A. Goto, A. Hinenoya, and **S. Yamasaki**. Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from diarrheal patients in Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 64:19-27, 2011.

##### 2. 学会発表

(1) S. Shiramaru, H. Inoue, S. Nishikawa, M. Asakura, S. Samosornsuk, W. Samosornsuk, S. Yamasaki. Isolation of *Campylobacter* and *Arcobacter* strains from meat in Thailand and Japan. 45<sup>th</sup> Joint Conference on cholera and other bacterial enteric infections panel. December 6-8, 2010, Kyoto, Japan.

(2) 四良丸 幸、朝倉昌博、西川明芳、井上春奈、松久明生、Worada Samosornsuk、山崎伸二：タイと日本における食肉からのカンピロバクター、アルコバクターの分離、第3回日本カンピロバクター研究会 2010年12月、宮崎

(3) S. Shiramaru, M. Asakura, H. Inoue, A. Hinenoya, A. Matsuhisa, and S. Yamasaki. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in food sample by a *cdt*-gene based duplex real-time PCR assay. FoodMicro 2010, 30 August - 3 September, 2010. Copenhagen, Denmark

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当無し
2. 実用新案登録  
該当無し
3. その他  
該当無し

表 タイと我が国の食肉におけるカンピロバクター関連細菌の検出結果

Country	Meat	Bacterial Species	Nested-multiplex PCR										Isolation (enrichment for 24 h/48 h - selective culture for 48 h)						
			Preston					Bolton					PS	PC	PF	BS	BC	BF	Total
			16 h	24 h	48 h	16 h	24 h	48 h											
Thailand	Chicken /Duck (24)	<i>C. jejuni</i>	ND	1	4	ND	1	1	4	11	0	0	4	2	15 (63%)				
		<i>C. coli</i>	ND	0	1	ND	1	3	0	0	1	1	2	4	4 (17%)				
	Pork (17)	<i>A. butzleri</i>	NA	NA	NA	NA	NA	1	3	2	0	11	12	13 (54%)					
		<i>C. jejuni</i>	ND	0	0	ND	0	1	0	0	0	0	0	0					
		<i>C. coli</i>	ND	0	1	ND	1	2	0	3	2	0	0	3 (18%)					
	Beef (34)	<i>C. hyointestinalis</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	1	0	0	0	1 (5.9%)					
		<i>A. butzleri</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	3	3	1	4	9 (64%)					
<i>A. cryaerophilus</i>		NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	1	0	0	1 (5.9%)						
<i>A. butzleri</i>		NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	1	2	1	6	10 (30%)						
Japan	Total	NA	Cj:1	Cj:4 Cc:2	ND	Cj:1 Cc:2	Cj:2 Cc:5	Cj:4	Cj:11 Cc:3 Ch:1 Ab:7 Ac:1	Cc:3	Cc:1	Cj:4 Cc:2	Cc:4	Cj:2 Cc:4					
		3	3	5	4	6	5	6	4	7	2	0	4	12 (60%)					
	Chicken (20)	<i>C. jejuni</i>	1	1	2	2	2	2	0	0	1	0	0	2	3 (15%)				
		<i>A. butzleri</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	0	2	4	6	8 (40%)				
	Pork (17)	<i>C. jejuni</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1 (5.9%)				
		<i>C. coli</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	Beef (34)	<i>A. butzleri</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0	2	0	2 (12%)				
		<i>C. coli</i>	0	0	1	0	0	2	2	2	0	1	1	0	2 (5.9%)				
		<i>C. fetus</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	2	0	2 (5.9%)				
	Total	<i>A. butzleri</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	0	1	3	3	5 (15%)				
			Cj:4 Cc:2	Cj:3 Cc:1	Cj:5 Cc:3	Cj:4 Cc:2	Cj:6 Cc:2	Cj:5 Cc:4 Cf:2	Cj:6 Cc:2	Cj:4 Cc:2	Cj:7 Cc:1	Cj:2 Cc:1 Cf:1 Ab:3	Cc:1 Cf:2 Ab:9	Cc:2 Cf:2 Ab:9	Cj:5 Cc:2 Ab:9				

NA: not applicable, ND: not done, Cj: *C. jejuni*, Cc: *C. coli*, Ch: *C. hyointestinalis*, Ab: *A. butzleri*, Ac: *A. cryaerophilus*

厚生労働科学研究費補助金  
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）  
分担研究報告書

下痢を起こす細菌性病原体の網羅的な遺伝子検査法の作成に関する研究

研究分担者 江崎 孝行 岐阜大学教授

研究要旨：

食中毒を起こす病原体を網羅的で迅速に遺伝子検査するための共通な増菌培地を開発した。この目的に出血性大腸菌、炭酸ガスと血液を使用せず、単一培地でキャンピロバクターを始めとしてサルモネラ菌、リステリア、エルシニアを効率よく増殖させることができた。

A. 研究目的

CODEX 等の国際基準では食品検査では 25g の食材から検査を行うことを基本に検査指針が作成されているため、網羅的に遺伝子検査を行う場合、増菌工程が不可欠である。検査方法を単純化するため単一の増幅培地を作成し、網羅的な遺伝子検査法を導入することを目的とした。現在、食肉の検査では *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* および出血性大腸菌の検査を行う場合、それぞれ選択増幅培地を使用して増菌している。これを 4-6 時間の短時間培養で増幅し、遺伝子検査を行えば、選択薬剤を使用する必要がないため、単一培地で対応ができれば、検査方法を大幅に単純化できる。特に *Campylobacter* は発育に炭酸ガスと溶血した血液を必要とするため検査方法が煩雑でコストがかかる。

B. 研究方法

1) 供試菌種: *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteric* var. *Enteritidis*,

*Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus* を評価に使用した。試作した培地 ( Food Pathogen Enrichment Culture:FPEC) broth を炭酸ガス添加、無添加、Bolton 培地、Frazer 培地、*Salmonella* 増幅培地、Peptone 水、大腸菌の増幅培地と定量的に増幅を比較した。

C. 研究結果

1) 食中毒菌としてもっとも頻度が高い *Campylobacter* に焦点を合わせて検討した。FPEC ブイヨンと Bolton ブイヨンに *C. jejuni* を加え、増殖を比較した。*C. jejuni* は溶血液の添加、無添加にかかわらず、同等の増殖を示した (図 1)。いずれの培地でも振とうをせず培養した場合、*C. jejuni* の増殖は見られなかった。Bolton ブイヨンと:FPEC ブイヨンでの発育は差はなく、同等に増殖したが増殖は 6 時間で数倍、18 時間で数百倍の増幅が得られた。

比較に使用した緩衝ペプトン水では全く増幅が得られなかった。

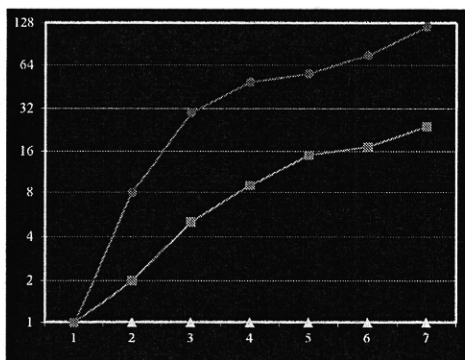


図 1-1. *Campylobacter* の増殖  
赤◆ : FPEC、青□ : Bolton、黄色 : 緩衝ペプトン

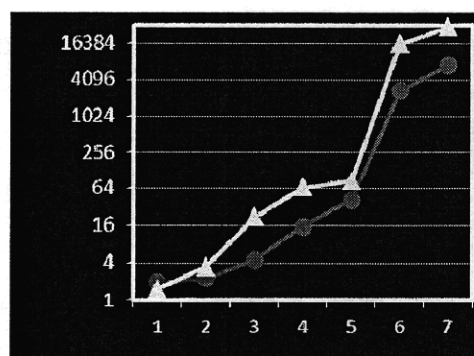


図 2-1. *Salmonella enterica* の増殖  
赤○; ペプトン水、黄色△ ; FPEC  
横軸: 時間、縦軸: 増殖倍数

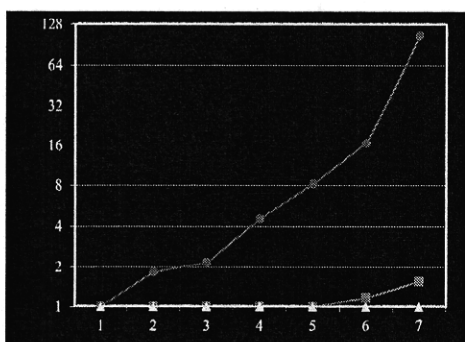


図 1-2. *Listeria* の増殖  
赤◆ : FPEC、青■ : Half Frazer、  
黄色△ : 緩衝ペプトン水

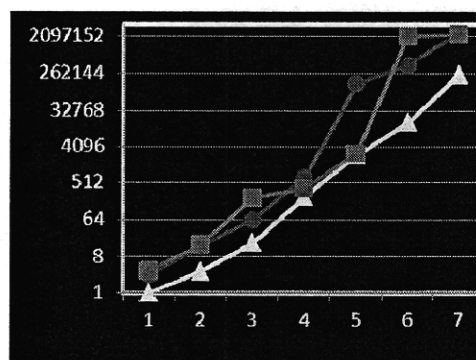


図 2-2. *Vibrio parahaemolyticus* の増殖  
赤○; ペプトン水、黄色△ ; FPEC  
横軸: 時間、縦軸: 増殖倍数

*Campylobacter* と *Listeria* 以外の菌種の *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Yersinia*, *Listeria* は 6 時間で数千倍、*Vibrio* は一万倍以上に増殖した (図 2)。

このことから *Campylobacter* 以外では *Listeria* の増殖が遅く、ほぼ *Campylobacter* と同等の増殖曲線をしめした。その他の菌種では 6 時間培養で遺伝子検査に必要な菌数まで菌が増殖すると結論した (表 1)。

表 1. FPEC ブイヨンでの 6 時間培養後の増殖

初期の菌数を 1 として 6 時間後の菌数が何倍まで増殖したかを表示した。

菌 種	増幅倍数
大腸菌	65,000 倍
サルモネラ菌	16,000 倍
腸炎ビブリオ菌	210,000 倍
コレラ菌	260,000 倍
リステリア菌	16-64 倍
セレウス菌	10,000 倍
腸炎エルシニア菌	1,000 倍
カンピロバクター	16-64 倍

## 2) 鶏肉の spike 実験

鶏肉 25g を 225ml の FPEC ブイヨンに添加し、増殖を計測した。*Campylobacter* の増殖は 6 時間でも十分な増殖が得られないため、25g に一個の菌を遺伝子検査するには増幅が不十分であったため、18 時間場で培養を行った。

*C. jejuni* は 6 時間までは順調に増殖したが、18 時間では逆に混入した一般細菌の増殖がおきたため、*C. jejuni* 菌数は低下し、選択分離培地に塗布しても分離培養には成功しなかった。

0 時間、6 時間、18 時間と 3 ポイントで FPEC ブイヨンの上澄み 1 ml から DNA を抽出し、*C. jejuni* に特異的な PCR を行ったところ、6 時間で最大の Ct 値が得られ、18 時間では菌数

は低下していた。このことから *Campylobacter* の増殖を 18 時間まで行うには選択薬剤の添加が必要であると結論した。

3) Bolton に使用されている選択薬剤を FPEC ブイヨンに添加した spike 実験。

食材を 6 時間を超えて非選択培地で増幅する場合、雑菌の増殖が優位になり *Campylobacter* の選択的な検出ができなくなることから抗菌剤（ポリミキシン B, トリメトプリム, リファンピシン およびサイクロヘキサマイド）を加え spike 実験を実施した。上記記載と同様に 25g の鶏肉に 225ml の FPEC ブイヨンを添加し、振とう培養を実施し、増殖曲線を作成した。

本培地で *Campylobacter* は選択的に増殖し Preston, Bolton 選択ブイヨンと同等の増殖を示した。

## 4) 鶏の糞便汚染の調査

抗菌剤入り FPEC ブイヨンと選択性が良いとされる Preston ブイヨンを使用し、鶏の糞便内の *Campylobacter* の検出を実施した。20 検体の鶏糞便の調査を実施した。Preston および FPEC ブイヨン 10ml に鶏糞便 0.5g を加え 18 時間、振とう培養を行った。

分離率は Preston ブイヨンで 73% (16 例陽性/22 サンプル)、FPEC ブイヨンで 86% (19 例陽性/22 サンプル) の分離率で *Campylobacter* が検出された。選択増幅をさらに継続し 48 時間培養を実施したところ、抗菌剤入りの Preston ブイヨンおよび FPEC ブイヨンのいずれからも *Campylobacter* は検出されず、選択分離に使用した modified CCDA preston 平板には抗菌剤抵抗性の大腸菌が多数分離された。

#### D. 考察

溶血液と炭酸ガスの添加が不要な FPEC ブイヨンで *Campylobacter* を増殖させることができた。この培地ではほかの食中毒病原体も良好に増殖し、*Campylobacter* と *Listeria* 以外では 6 時間培養で 25g 中に 1 個の *Salmonella*, *Vibrio*, *Shigella*, Shiga 毒素生産性 *E. coli* がカクテルプライマーで検出することが実証された。しかし *Campylobacter* はこの培地でも増殖が遅く、25g に一個の *Campylobacter* を食品から検出するには 18 時間の抗菌剤入りの選択薬剤が入った培地での培養が必要であることが分かった。また、抗菌剤入りの FPEC ブイヨンは糞便からの *Campylobacter* の検出にも利用できることが分かったが培養時間は 18 時間まで、48 時間培養を行うと選択薬剤に耐性の大腸菌が増殖したことから 18 時間で遺伝子検査と分離培養に持っていく検査が適していると判断した。溶血液と炭酸ガスを使用せず *Campylobacter* を増幅する FPEC ブイヨンは Preston や Bolton と比較し、液体培地の透明性が高いため、*Campylobacter* の増殖が目視で推測できた。

#### E. 結論

食材 25g を 10 倍量の増菌培地に懸濁して培養する検査に非選択性の単一培地を使用して 6 時間培養を行い、*Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* 等の遺伝子を迅速スクリーニング法を作成した。*Campylobacter* を 25g 中に 1 個検出する高感度検査を行うには抗菌剤を開発した FPEC に添加し、18

時間の培養を行う必要があることが鶏肉、鶏糞の実証試験で明らかになった。

#### F. 健康危機情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Pham van Hung, J. Zhang, M. Hayashi, S. Yoshida, K. Ohkusu, and T. Ezaki. 2011. Genetic relatedness and identification of clinical strains of genus *Campylobacter* based on dnaJ, 16S rDNA and rpoB gene sequences. Jpn Soc. Cul. Coll. (submitted)

##### 2. 学会発表

1) 林将大、窪田佐代子、森麻美、水野卓也、江崎孝行 2010, 遺伝子検査用増菌培地およびカクテルプライマーを組み合わせた食品中の生菌のスクリーニングシステムの構築第 31 回日本食品微生物学会総会講演要旨集、大津、11 月、2010

2) 江崎孝行 2010. 直接培養で検出できない少数の糞便細菌の迅速な検出方法。  
第 84 回日本感染症学会総会、京都、感染症学会誌、84:156

3) 大楠清文、江崎孝行、遺伝子解析技術を用いた感染症迅速診断の実践 2010, 第 84 回日本感染症学会総会、京都、感染症学会誌、84:101.

- 4) Ezaki, T. 2010, dnaJ 遺伝子を用いた食中毒起炎菌の検査法。Campylobacter の検査・診断の最前線。第3回日本カンピロバクター研究会総会プログラム、宮崎、12月3-5日。 bacterial species. 12<sup>th</sup>, international congress on culture collection(WFCC-ICCC12). Santa Catarina, Brazil, Sep. 25<sup>th</sup>-Oct. 3<sup>rd</sup>
- 5) Ezaki, T. 2010. Rapid genetic screening of live food pathogens with a single enrichment culture and multiplex cocktail amplification method. Next Generation Diagnostics for infectious Diseases. U.S. Japan Cooperative medical Science program. October 4-6, Penang, Malaysia. 2010.
- 6) Ezaki, T. 2010. Shuffling Classification of high Risk pathogens after complete genome sequencing. Shanghai, International Symposium on Bacterial genomics, evolution and pathogenesis. Jiangsu, China. Nov. 30- Dec. 3<sup>rd</sup>.
- 7) Ezaki T. 2010. Influence of different set of variable gene cluster analysis on the phylogenetic definition of
- 8) Ezaki T. 2010. History and future of taxonomists to unzip chromosomal information to define bacterial species. The 30<sup>th</sup> anniversary symposium of the Japan Society for Microbial Systematics. Dec 9th, Tokyo
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
 予定なし
1. 特許取得  
 至当なし
1. 実用新案登録  
 該当なし
3. その他  
 該当なし



厚生労働科学研究費補助金  
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）  
分担研究報告書

食品からの *Vibrio cholerae* 検出法に関する研究

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	横山 敬子	東京都健康安全研究センター
	高橋 正樹	東京都健康安全研究センター
	河村 真保	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
	尾畑 浩魅	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

研究要旨：

食品からコレラ菌を検出することは非常に困難であるが、その理由の一つは、コレラ菌を特異的に増殖させる増菌培地が無く、食品に存在する様々な夾雑菌の影響でコレラ菌の増殖が抑えられてしまう、あるいはコレラ菌の増殖以上に夾雑菌が発育してしまうことが考えられる。そこで、食品からコレラ菌を効果的に検出するために、増菌培養法、特に増菌時の NaCl 濃度および培養温度の影響について検討を行った。その結果、魚介類等からのコレラ菌の検査方法として、アルカリペプトン水の NaCl 濃度が 1~2% (1%)、培養温度は 42℃、分離培養温度 42℃の場合が最も有効であった。

A. 研究目的

我が国におけるコレラ患者発生数は、年間 50 事例前後で推移している。報告数の 70~80% は海外を推定感染地とする輸入感染事例であるが、海外旅行が認められない国内事例も年間 10~20 事例程度発生している。国内事例の感染原因としては輸入魚介類の喫食が推定されているが、原因となった食品からコレラ菌が検出された事例はほとんど無い。また、検疫所の検査でも輸入生鮮魚介類からコレラ菌が検出された例は非常に少ない。この様に、食品からコレラ菌を検出することは非常に困難である。その理由の一つとして、コレラ菌を特異的に増殖さ

せる選択増菌培地が無く、食品に存在する様々な夾雑菌（マリンビブリオ）の影響でコレラ菌の増殖が抑えられてしまう、あるいはコレラ菌の増殖以上に夾雑菌が発育してしまうことが考えられる。そこで、食品からコレラ菌を効率的に検出する検査法の確立を目指し、増菌培養法、特に増菌時の NaCl 濃度および培養温度の影響について検討を行った。

B. 研究方法

1) 増菌培養温度および NaCl 濃度による増殖態度の検討

供試菌株：ヒトおよび環境材料から分離された *V. cholerae*,

*V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, および *V. alginolyticus* の各 3 株を供試した。

方法：アルカリ性ペプトン水 10ml (pH8.6) に、それぞれ 0%, 1%, 2%, 3% となるように NaCl を加えたものを増菌培地とした。各増菌培地に供試菌をそれぞれ  $10^0$  cfu/10ml 以下となるように接種し、培養温度 37°C および 42°C で 15 時間培養後、増菌培地中の菌数を TCBS 寒天 (栄研化学) を用いた塗抹法で測定し、増殖態度を比較検討した。更に 4 種類の供試菌を混合した菌液をアルカリ性ペプトン水に接種した場合についても同様に各菌株の増殖態度を比較した (表 1)。

## 2) 分離培養時の培養温度の影響について

供試菌株：*V. cholerae* 01 Eltor Ogawa CT+ (3 株), *V. cholerae* 01 Eltor Ogawa CT- (3 株), *V. cholerae* 01 Eltor Inaba CT+ (3 株), *V. cholerae* 01 Eltor Inaba CT- (1 株), *V. cholerae* 01 Classical Ogawa CT+ (1 株), *V. cholerae* 0139 CT+ (1 株), *V. cholerae* non01, non0139 CT- (3 株), *V. parahaemolyticus* (3 株), *V. fluvialis* (3 株), *V. alginolyticus* (3 株)

方法：各供試菌株を TCBS 寒天平板上に塗抹し、25°C, 37°C, 42°C で 15 時間培養した。培養後、TCBS 寒天平板上の菌の発育態度について調べた。

## 3) 上海ガニへのコレラ菌接種実験

供試菌株：*V. cholerae* 01 Eltor Ogawa CT+

方法：上海ガニ 25 g にコレラ菌を、低濃度 ( $1.7 \times 10^0$  cfu/25 g), 中濃度

( $1.7 \times 10^1$  cfu/25 g), 高濃度 ( $1.7 \times 10^2$  cfu/25 g) となるよう接種し、-30°C で 3 日間保存した。室温で解凍後、アルカリ性ペプトン水 (2% NaCl, pH8.6) を 225ml 加えて①37°C (6 時間および 18 時間) 培養, ②42°C (6 時間および 18 時間) 培養, ③37°C (6 時間) 培養→42°C (12 時間) 培養の 3 種類の条件で増菌培養した。培養後、TCBS 寒天へ塗抹分離し、37°C および 42°C で培養し、コレラ菌の発育状況を比較した (図 1)。更に各増菌培養液から *ctx* 遺伝子を標的としたリアルタイム定量 PCR 法を行い、コレラ菌の菌数を推定した。

## C. 研究結果

1) 増菌培養温度および NaCl 濃度による増殖態度の検討

### (1) 単独培養

0%, 1%, 2%, 3% の各濃度の NaCl 加アルカリ性ペプトン水に供試菌を接種し、37°C および 42°C で増菌培養を行った。培養後、菌数を測定し増菌効果を比較した。その結果、0% NaCl 加アルカリペプトン水 37°C 培養ではコレラ菌のみが  $10^7$  cfu/ml 程度まで増菌されていたが、他のビブリオ属菌の発育は抑制されており、菌は検出されなかった。1%~3% NaCl 加アルカリペプトン水 37°C 培養では、いずれの菌株も  $10^7$  cfu/ml 程度まで発育していた。

一方、42°C 培養を行った場合、0% NaCl 加アルカリ性ペプトン水では、コレラ菌を含め全ての菌種で発育が認められなかった。1% NaCl 加アルカリペプトン水では、コレラ菌のみ  $10^7$  cfu/ml まで増菌されていたが、他菌種の発育は抑制された。2% および 3%

NaCl 加アルカリ性ペプトン水による増菌では、コレラ菌の発育は  $10^7$  cfu/ml 程度であったが、他菌種も  $10^6$  cfu/ml 程度に発育していた(図2)。

## (2) 混合培養

4種類の菌を混合して同様に培養した場合、1%NaCl 加アルカリペプトン水で  $42^{\circ}\text{C}$  培養した場合が、最もコレラ菌の増殖がよく、かつ他のビブリオ属菌の増殖を抑えるという結果であった(図3)。

## 2) 分離培養時の培養温度の影響について

10種類の菌種(各1~3株)をTCBS寒天平板に塗抹分離し、 $25^{\circ}\text{C}$ 、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $42^{\circ}\text{C}$ で培養した場合の発育状況を確認した。その結果、 $25^{\circ}\text{C}$ 、 $37^{\circ}\text{C}$ で培養した場合は全ての菌種で発育が認められた。しかし、 $42^{\circ}\text{C}$ 培養ではコレラ菌のみ発育が認められ、*V. parahaemolyticus*、*V. fluvialis*、*V. alginolyticus* は発育が認められなかった(表2)。

## 3) 上海ガニへのコレラ菌接種実験

上海ガニにコレラ菌を接種し、 $-30^{\circ}\text{C}$ で3日間冷凍保存した検体を室温で解凍後、アルカリ性ペプトン水を加え3種類の培養条件で増菌培養を行った。その結果、最も効率良くコレラ菌を分離できた条件は、増菌培養温度  $42^{\circ}\text{C}$ 、分離培養温度  $42^{\circ}\text{C}$ で培養した場合であった(図4)。この条件では、コレラ菌は増菌培地中で  $10^4\sim 10^5$  cfu/ml 程度にまで増菌され、TCBS寒天平板上では夾雑菌の増殖をかなり抑えることができた。一方、コレラ菌検出率が最も低い培養条件は、増菌培養温度  $37^{\circ}\text{C}$ 、分離培養温度  $37^{\circ}\text{C}$ の場

合であった。この条件下では夾雑菌が優位に発育してしまい、コレラ菌は増菌培養液中で  $10^3$  cfu/ml 以下しか増菌されていなかった(表3, )。

## D. 考察

現在、国内でコレラが発生した時の食品の検査法は、厚生労働省からの通知法「魚介類等の食品からのコレラ菌の検出方法について(平成14年10月21日食監発第1021006号)」に基づいて実施している。通知法では、0%NaCl 加アルカリ性ペプトン水(pH8.6)で  $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、18~20時間培養(1次増菌培養)後、更にアルカリペプトン水に接種し  $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、8~10時間培養(2次増菌培養)した後、TCBS寒天平板へ分離培養を行う方法が示されている。この方法は夾雑菌が非常に少ない食品では有効であるが、コレラ菌以外のビブリオ属菌が付着している生鮮魚介類等ではコレラ菌の検出が非常に困難である。そこで、効果的にコレラ菌を検出するための方法を検討した結果、増菌培地の塩分濃度と培養温度、培養時間、更に分離平板の培養温度を変化させることで、コレラ菌を非常に効率良く検出できることが明らかとなった。今回行った検討では、増菌培地のNaCl濃度を1~2%とし、培養温度を通常より少し高めの  $42^{\circ}\text{C}$ で培養することで、夾雑菌の発育を抑え、コレラ菌のみを比較的特異的に増菌させることが可能であった。また、TCBS寒天平板へ塗抹分離後  $42^{\circ}\text{C}$ で培養することで夾雑菌の発育を抑えることができた。今回は食品として上海ガニを用いたが、魚介類の種類によっては付着している細菌叢に多少の差があると考えられるので、食品の種類を変えてさらに検討する必要がある。

また, Viable But Nonculturable (VBNC)についても検討課題である。

#### E. 結論

魚介類等からのコレラ菌の検査方法としては, アルカリペプトン水のNaCl濃度が1~2% (1%), 培養温度は42°C, 分離培養温度42°Cの場合が最も有効であった。

#### F. 健康危機情報

無し

#### G. 研究発表

準備中

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

無し

##### 2. 実用新案登録

無し

図1. コレラ菌の上海ガニへの添加実験

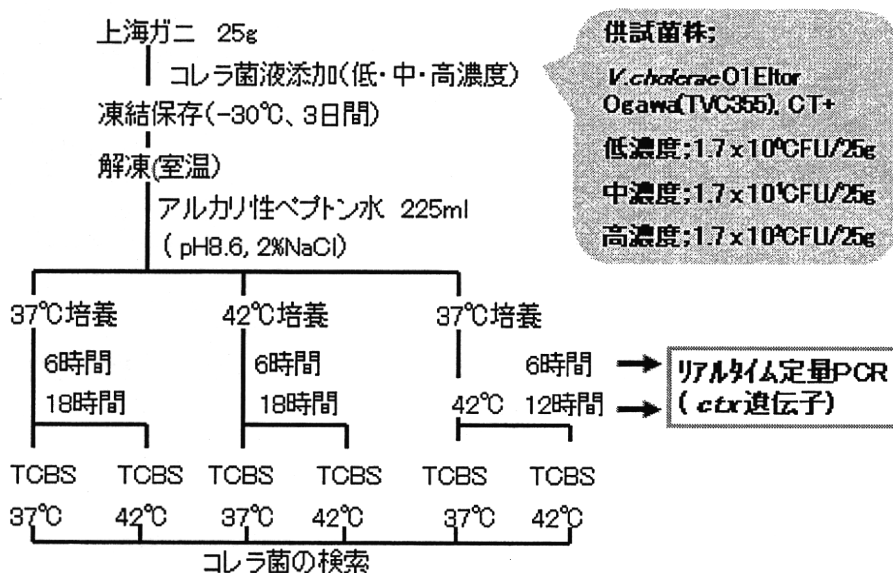


図2. 増菌培養温度およびNaCl濃度の影響  
(実験1: 単独培養)

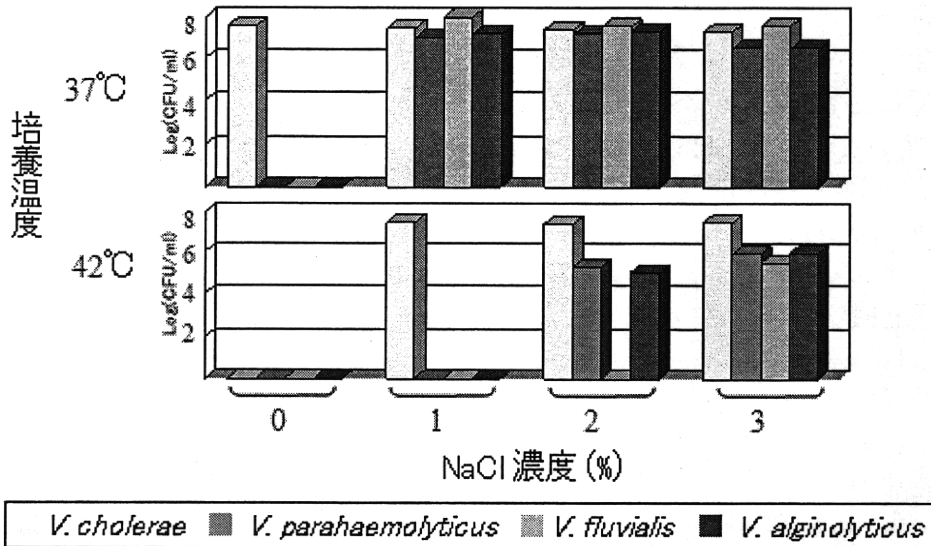


図3. 増菌培養温度およびNaCl濃度の影響  
(実験2: 混合培養)

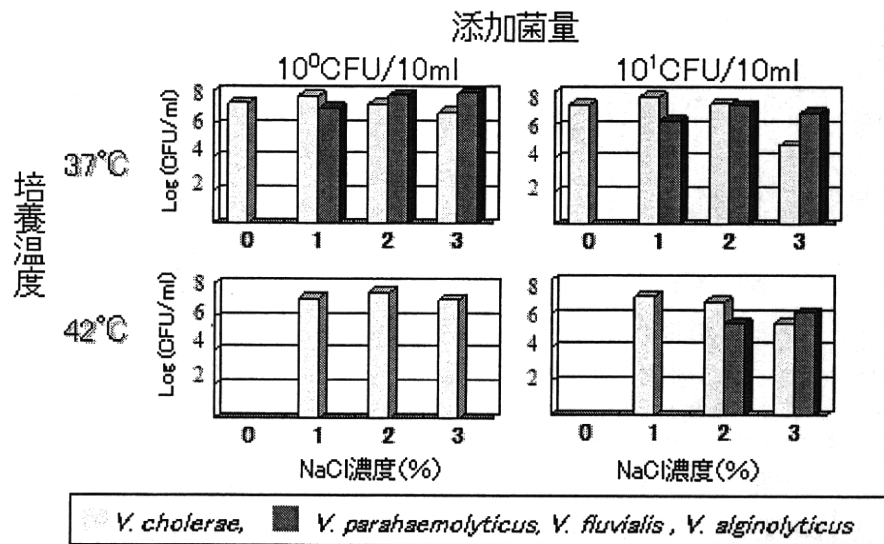


図4. コレラ菌添加上海ガニのTCBS寒天平板

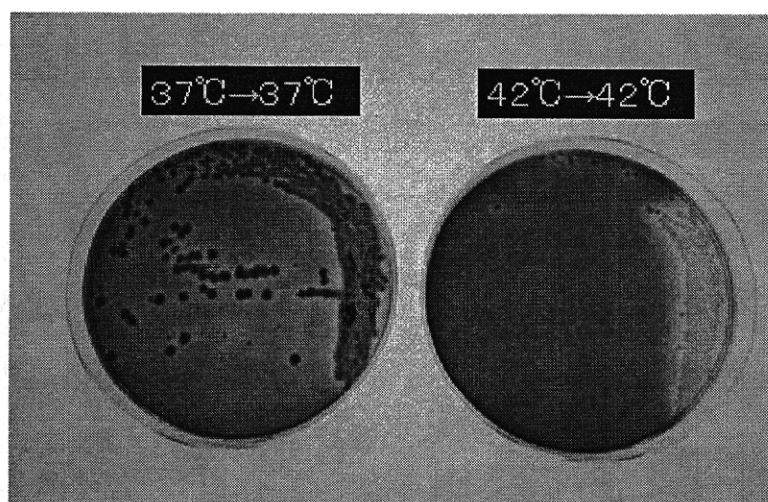


表1. ビブリオ 属菌の増菌培養温度および  
NaCl 濃度による増殖態度の検討

供試菌	<i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. alginolyticus</i> 各3株
添加菌量(実験1:単独培養)	~10 <sup>0</sup> CFU
(実験2:混合培養)	~10 <sup>0</sup> CFUおよび~10 <sup>1</sup> CFU
増菌培地	アルカリ性ペプトン水 10ml (pH8.6) NaCl 濃度 0, 1, 2, 3 %
培養温度	37°C, 42°C
培養時間	15時間
菌数測定	TCBS寒天(栄研), 37°C培養

表2. コレラ菌およびその他のビブリオ属菌の  
TCBS寒天での培養温度別発育状況

菌種	供試株数	発育の有無		
		25°C	37°C	42°C
<i>V. Cholerae</i> O1 Eltor Ogawa (CT+)	3	+	+	+
<i>V. Cholerae</i> O1 Eltor Ogawa (CT-)	3	+	+	+
<i>V. Cholerae</i> O1 Eltor Inaba (CT+)	3	+	+	+
<i>V. Cholerae</i> O1 Eltor Inaba (CT-)	1	+	+	+
<i>V. Cholerae</i> O1 Classical Inaba (CT+)	1	+	+	+
<i>V. Cholerae</i> O139 (CT+)	1	+	+	+
<i>V. Cholerae</i> nonO1, nonO139 (CT-)	3	+	+	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	3	+	+	-
<i>V. fluvialis</i>	3	+	+	-
<i>V. alginolyticus</i>	3	+	+	-

表3. 上海ガニのコレラ菌添加実験結果

増菌培養温度	菌濃度レベル	添加菌量 (cfu/25g)	リアルタイム定量PCR (cfu/ml)			TCBS寒天上でのコレラ菌発育状況*	
			培養時間			平板培養温度	
			0h	6h	18h	37°C	42°C
		添加せず	ND	ND	ND	-	-
37°C	低	$1.7 \times 10^0$	ND	$<10^3$	$<10^3$	-/+++	+ /+++**
	中	$1.7 \times 10^1$	ND	$<10^3$	$<10^3$	-/+++	+ /+
	高	$1.7 \times 10^2$	ND	$9.0 \times 10^3$	$9.7 \times 10^3$	-/+++	+++/-
42°C	低	$1.7 \times 10^0$	ND	$<10^3$	$9.5 \times 10^4$	+ /++	+++ /+
	中	$1.7 \times 10^1$	ND	$3.2 \times 10^3$	$9.8 \times 10^4$	+ /+++	+++ /+
	高	$1.7 \times 10^2$	ND	$2.0 \times 10^4$	$3.1 \times 10^5$	+ /+++	+++ /+
37°C→42°C	低	$1.7 \times 10^0$	ND	$<10^3$	$6.3 \times 10^3$	+ /+++	++ /+
	中	$1.7 \times 10^1$	ND	$<10^3$	$2.7 \times 10^4$	+ /+++	++ /+
	高	$1.7 \times 10^2$	ND	$2.2 \times 10^3$	$8.8 \times 10^4$	+ /++	+++ /+

\*18h 増菌培養後にTCBS寒天に塗抹，\*\*コレラ菌/その他の菌

厚生労働科学研究費補助金  
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）  
分担研究報告書

サルモネラ属菌の産生するエンテロトキシンの作用解析と迅速同定法の開発

研究分担者 倉園 久生 帯広畜産大学 教授

研究協力者 山崎 栄樹 帯広畜産大学 助教

研究要旨 我々はこれまでにサルモネラエンテロトキシン(Stn)がサルモネラ属菌特異的に存在し、培養細胞に対して障害活性を持つ事を明らかにしてきたが、その詳細な細胞障害機構及びサルモネラ属菌がもつ下痢原性への Stn の関与は未だ不明である。本研究においては、これまで困難とされてきた組換え Stn タンパク質の精製に成功した。得られた精製 Stn は特異性の高い抗 Stn 抗体作製のための抗原として有用である。また一方で4つの血清型を含む31の臨床及び環境分離株の *stn* 遺伝子配列解析から本遺伝子配列がサルモネラ属菌内で高く保存されている事を明らかにし、本遺伝子がサルモネラ属菌にとって不可欠な遺伝子である可能性を示唆した。

A. 研究目的

サルモネラ属菌は分類学的に2菌種、6亜種からなり、2500種以上の膨大な血清型に分類されている菌群である。この中でヒト及び家畜に対して病原性を示すものはごく一部であるものの、サルモネラ感染症は血清型 serovar Typhi及びserovar Paratyphi A感染により引き起される重篤なチフス症（全身感染症）や serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) や serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) に代表される食中毒原因菌の感染により引き起される非チフス性サルモネラ症（腸管感染症）まで多岐にわたっている。この中で、非チフス性サルモネラ症は世界的に最も多い食中毒であり、本邦を含む先進諸国においてもしばしば大きな問題

となる。

サルモネラ属菌感染の分子機構に関しては、本菌の標的細胞に対する侵襲性について世界中で詳細な解析が行われてきたが、これらの標的細胞侵襲性とサルモネラ属菌感染症の主症状である下痢症状との直接的な関連性は明らかにされていない。一方で、1994年に下痢原性を担う毒素タンパク質候補分子として*S. Typhimurium*の染色体DNA上にコレラ毒素や毒素原性大腸菌の易熱性エンテロトキシンのAサブユニットと一部ホモロジーのある遺伝子 (*Salmonella enterotoxin; stn*) が報告された。しかしながらそれ以降、Stnのサルモネラ属菌感染症における役割は全く解明されていない。本研究では、Stnの下痢原性解明によりサルモネラ属菌の病原性を分



子レベルで解明する事を最終目的としている。

我々は昨年度までに、*stn* 遺伝子がサルモネラ属菌に特異的に存在する遺伝子である事を明らかにした。更に、Stn タンパク質の発現解析を目的として、Stn に特異的な 2 種類の抗ペプチド抗体を用いた Sandwich-ELISA 系を構築した。複数の臨床分離株における Stn の発現量を解析した結果、全てのサルモネラ属菌が *stn* 遺伝子を持っているにもかかわらず、Stn タンパク質の発現性には菌株間で差が認められる事が明らかとなった。一方で、Stn の細胞毒性について解析する目的で、患者分離株である *S. Enteritidis* 171 株の培養液を出発材料にして Stn 精製系を構築した。得られた精製 Stn は培養細胞に対して細胞障害活性を持っており、これらの結果から、Stn がサルモネラ属菌の病原性発現において重要な役割を担うタンパク質である事を示唆した。

詳細な Stn の分子活性の解明には特異性の高い抗 Stn 抗体が必須である。また、Stn が上述の様にサルモネラ属菌の病原性発現において重要な役割を担うタンパク質である事が示唆されている事から、Stn はサルモネラ属菌に対する迅速同定法の有用なターゲットとなる可能性が考えられ、Stn に対する特異性の高い抗体の獲得は公衆衛生上重要な意義を持つと考えられる。本年度の研究においては特異性の高い抗体を得るための抗原として必須な全長 Stn タンパク質の獲得を

行った。また一方で、*stn* 遺伝子の多様性解析を目的として、様々な臨床及び環境分離株の *stn* 遺伝子配列の比較解析を行った。

## B. 研究方法

1) 組換え Stn タンパク質を発現する大腸菌形質転換株の作製：

Trigger Factor (TF)-tagged Stn (TF-Stn) タンパク質をコードするプラスミド遺伝子を獲得する目的で、PCR 法によって標準株である *S. Typhimurium* LT2 株のゲノム DNA より *stn* 遺伝子を増幅し、pCold-TF vector (TaKaRa Bio. Inc.) へ導入した。構築したプラスミドは遺伝子配列を確認後、*E. coli* BL21 (DE3) へ導入し、得られた形質転換大腸菌株を TF-Stn 発現大腸菌株とした。

2) TF-Stn タンパク質の精製：

TF-Stn 発現大腸菌株を LB 培地にて 30°C で一晚培養した (前培養) 後、100 倍容の LB 培地に接種し、30°C で 4.5 時間培養した。得られた培養液を 15°C で 30 分冷却後、1mM の IPTG 添加により TF-Stn タンパク質の発現誘導を行った。菌株は 15°C で更に一晚培養後、回収し Lysis Buffer (0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Tris, pH 8.0) に懸濁した。ソニケーションにより菌体を破碎後、遠心分離を行い、得られた上清を Clare cell lysate とした。Clare cell lysate からの TF-Stn タンパク質の精製は Ni-NTA Agarose (Qiagen) を用いて行った。さらに、得られたサンプルを 6% SDS-PAGE Gel にて展開し、Native

染色を行った後、TF-Stn に相当するバンドを切り出した。切り出したゲル片から electro gel elution 法により TF-Stn を溶出し、Ficoll PM400 にて濃縮したものを最終精製標品とした。

### 3) *stn* 遺伝子の増幅及び配列解析：

4 つの血清型を含む 31 のサルモネラ属菌分離株の whole cell DNA をテンプレートとし、*S. Typhimurium* LT2 株ゲノム上の *stn* 遺伝子上流及び下流配列に対して相補的に設計された特異的プライマー (SF12 及び SR12, Table 1) を用いて、全長 *stn* 遺伝子を含む約 1.2kbp の PCR 増幅断片を得た。得られた遺伝子断片を精製後、*stn* 遺伝子内部配列に対して相補的に設計された 2 種類のプライマー (SF3 及び SR4, Table 1) を用いて遺伝子シーケンシングを行った。得られた遺伝子配列の比較は Clustal W (v. 1.83) program (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) により行った。

### 4) 試供菌株

*stn* 遺伝子配列の解析に用いた菌株は全て 1995 年にタイ王国の下痢患者及び食品から共同研究者により分離された菌株であるが、調査にあたっては協力者にその趣旨を説明済みであり、納得の上でご協力頂いている。ま

Table 1. Primers used in this study.

Primer name	Sequence	Binding site
SF12	5'- CCTGAGCCAACGCAT -3'	-135 - -121 <sup>a</sup>
SR12	5'- GGTTCCGCGTAACGG -3'	+377 - +363 <sup>b</sup>
SF3	5'- TCCCGCTATCGGTAA -3'	201 - 216 <sup>c</sup>
SR4	5'- AACCTCAATGATATT -3'	450 - 436 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> The numbers donate the binding position of the primer counting from the initiation codon of *stn* gene in serovar Typhimurium genome.

<sup>b</sup> The numbers donate the binding position of the primer counting from the termination codon of *stn* gene in serovar Typhimurium genome.

<sup>c</sup> The numbers donate the binding position of the primers on the *stn* gene sequence of serovar Typhimurium.

た、得られている情報に関してもプライバシーの保護に配慮し、患者の個人情報への取扱いには最善の配慮を行っているため、倫理面での問題は無い。

## C. 研究結果

### 1. 組換え Stn タンパク質精製法の構築：

Stn 精製法構築に関する試行については過去に海外のグループにより発表された幾つかの報告内において言及されているものの(1)サルモネラ属菌内における Stn 産生量の低さ、及び(2)大腸菌を用いた組換えタンパク質発現系によっても Stn の大量発現には至っておらず、また、発現した Stn タンパク質の大部分が宿主として用いた大腸菌内で封入体を形成してしまう事などが原因となり Stn タンパク質の精製は困難であるとされてきた。一方で、われわれは昨年度までの研究で、患者分離株である *S. Enteritidis* 171 株の培養液を出発材料にして Stn 精製系を構築した。しかしながら本法においては低濃度の精製タンパク質が得られるのみであり、高純度・高収量での Stn の獲得が困難であった。そこで、本年度の研究においては、大腸菌を用いた組換え Stn タンパク質の大量発現系の構築及び本組換えタンパク質の精製系の構築を行った。

His-tagged Stn (His-Stn)、GST-tagged Stn (GST-Stn) 及び Trigger Factor -tagged Stn (TF-Stn) を発現する大腸菌株を作製し、それぞれの組換え Tagged-Stn タ

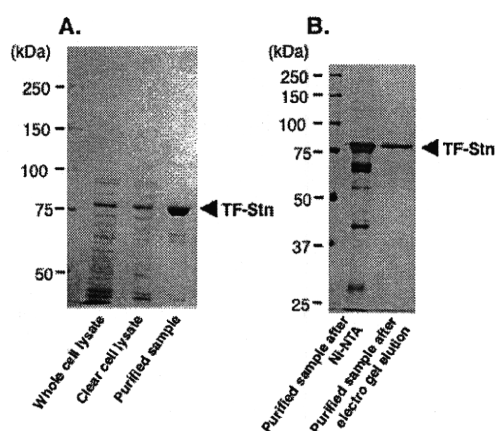


Fig. 1 Purification of TF-Stn.

A. Purity of the purified TF-Stn after Ni-NTA agarose purification. Purity was analyzed with SDS-PAGE and CBB staining. B. Purity of the purified TF-Stn after Ni-NTA agarose purification followed by electro gel elution. Purity was analyzed with SDS-PAGE and silver staining.

ンパク質の発現性及び可溶性について解析した。その結果、全ての大腸菌株において tagged-Stn の大量発現が観察されたものの、His-Stn 及び GST-Stn は大腸菌内で封入体を形成しており、また、本大腸菌株からこれらの tagged-Stn を精製する事は困難であった (data not shown)。一方で、TF-Stn は可溶性タンパク質として発現が認められた。TF-Stn を含む cell lysate から Ni-NTA agarose を用いて TF-Stn の精製を試みた結果、精製標品中に全長 TF-Stn と分子量の異なる幾つかのバンドが確認された (Figure 1, Panel A)。そこで、得られた粗精製標品の精製度の上昇を目的として、SDS-PAGE 及び electro gel elution 法による再精製を行った。その結果、

Table 2. *Salmonella* serotypes used for *stn* gene sequence analysis.

Serotypes of <i>Salmonella</i>	Isolated from	No. of isolates tested
Choleraesuis	diarrhea patient	2
	food sample	2
Enteritidis	diarrhea patient	6
	food sample	6
Typhimurium	diarrhea patient	3
	food sample	8
Agona	diarrhea patient	2
	food sample	2

銀染色上で TF-Stn に相当する分子量をもつ単一タンパク質の精製が確認された。(Figure 1, Panel B)。また、本精製 TF-Stn タンパク質は濃縮後も可溶性として回収された。以上の結果から、今回開発した精製法により高純度・高濃度の組換え Stn タンパク質の獲得が可能である事が明らかとなった。

## 2. *stn* 遺伝子配列の多様性解析:

過去の我々の解析及び他のグループによる解析から、種や血清型にかかわらず全てのサルモネラ属菌が *stn* 遺伝子を保有する事が明らかとされている。しかしながら、*stn* 遺伝子の配列の多様性に関する知見は存在しない。そこで、本年度の研究においては、タイ王国の下痢患者及び食品から分離されたサルモネラ属菌分離株の *stn* 遺伝子配列の解析を行った。4つの血清型を含む31の分離株 (Table 2) の whole cell DNA から *stn* 遺伝子の全長を含む約 1.2kbp の遺伝子断片を増幅した後、*stn* 遺伝子領域に対して配列解析を行った。その結果、*stn* 遺伝子領域の配列は血清型内で完全に保存されており、また、血清型間での相同性も 98.5 - 99.3% と非常に高い事が明らかとなった (Table 3)。

Table 3. Homologies of *stn* gene sequences between each serotypes.

	Choleraesuis			
Choleraesuis	-	Enteritidis		
Enteritidis	99.1 %	-	Typhimurium	
Typhimurium	99.3 %	98.9 %	-	Agona
Agona	98.5 %	98.7 %	98.9 %	-

#### D. 考察

Stn はサルモネラ属菌の下痢原性を担う毒素候補分子として発見されたものの、その細胞障害機構の詳細や分子活性に関する解析は全く進んでいない。解析が進まない第一因として、Stn タンパク質の精製法が確立されていない事が挙げられる。その先述の様に、Stn の精製法に関しては様々な試行が報告されているものの、高純度・高収率での精製は困難であるとされてきた。これに対し我々は、組換え Stn を可溶性タンパク質として発現する大腸菌株の作製に成功し、更に、本大腸菌株から組換え Stn タンパク質を可溶性タンパク質として高純度・高収量で精製する系の構築に成功した。得られた精製標品が Native な Stn の活性を保持しているかは不明であるものの、本精製標品は特異性の高い抗 Stn 抗体作製のための抗原として非常に有用である。すなわち、Stn に対する高感度の抗体は Stn の細胞障害活性及び分子活性の詳細な解析に非常に有用であり、高感度の抗 Stn 抗体の獲得には抗原として高純度の精製 Stn タンパク質(全長配列)が不可欠である。今後、得られた精製 Stn タンパク質を用いて高感度の抗 Stn 抗体の作製を行い、免疫染色法、免疫沈降法等によってサルモネラ属菌感染細胞内での Stn の動態解析及び Stn のターゲット分子の同定を行う。加えて、得られる抗体は公衆衛生上、非常に有用なツールであるイムノクロマト法、ELISA 法といったサルモネラ属菌の迅速同定法の構築

にも非常に有用であると考える。

一方で、我々は4つの血清型を含む31のサルモネラ属菌分離株の *stn* 遺伝子配列の比較解析を行った。その結果、*stn* 遺伝子配列は由来及び血清型の異なるサルモネラ属菌間でも、その遺伝子配列全長に渡って高く保存されている事が明らかとなった。過去の PCR 法を用いた様々な報告により、*stn* 遺伝子が他の菌種には認められない一方で、調査された全てのサルモネラ属菌に存在する事が明らかとなっている。この様に、サルモネラ属菌特異的な *stn* 遺伝子が、今回の解析で明らかになった様に、その遺伝子配列においても高い保存性を保持している事実は、本遺伝子がサルモネラ属菌にとって不可欠な遺伝子である事を示唆するものと考える。本可能性を検討するために、今後、Stn の分子活性の解析に加え、今回用いなかった他の血清型における *stn* 遺伝子配列の解析を行う必要があると考える。

#### E. 結論

本年度の研究においては、これまでに困難であるとされて来た精製 Stn タンパク質の獲得に成功した。現在、本精製タンパク質を抗原として高感度の抗 Stn 抗体を作製中である。今後、得られる抗体を用いて Stn の分子活性に関する詳細な研究を行うとともに、Stn を指標としたサルモネラ属菌に対する免疫学的迅速同定法の構築を行う。

また一方で、我々は *stn* 遺伝子配列