

201033040A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品中の有害衛生微生物を対象とした
ライブラリーシステム等の構築

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小西 良子

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成23（2011）年3月

目次

I. 総括研究報告

- 食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築……………3
小西 良子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

II. 分担研究報告

1. ストレス抵抗性との関連における腸炎ビブリオの分布状況の解析……………19
熊谷 進 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
2. 腸管出血性大腸菌および *Campylobacter* の分子遺伝子学的手法を用いた型別法の有用性の検討……………43
熊谷 進 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
3. 食品から分離されたカンピロバクター菌株の病原因子保有状況……………59
熊谷 進 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
4. 疫学指標としての *Campylobacter jejuni* 病原関連遺伝子に関する研究……………65
熊谷 進 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
5. 細菌の分子疫学に関する基礎研究……………75
泉谷 秀昌 (国立感染症研究所 細菌第一部)
6. 米国における食中毒細菌のタイピング法の現状……………81
小西 良子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)
7. データベース構築のための地方衛生研究所における有害衛生微生物の収集拠点機関の策定……………89
林 賢一 (滋賀県衛生科学センター 所長)
8. 真菌リスクプロファイルの作成および新規真菌分類法の確立……………95
小西 良子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)
(資料) アンケート調査用紙及び結果
9. 馬肉中に存在するザルコシスチスの遺伝子検査法……………105
野崎 智義 (国立感染症研究所 寄生動物部)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………117

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業)

主任研究報告書

食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築

主任研究者 小西良子 (国立医薬品食品衛生研究所)

要旨

本研究は、食品流通が多様化・広域化している現状において、食中毒予防に有用なリスク管理手法を確立するため、公衆衛生上重要視されている食品中の有害衛生微生物に関する科学的解析情報を集約し、国立試験研究機関（国立医薬品食品衛生研究所および国立感染症研究所）と地方衛生研究所（地研）等の食品安全関係機関の間で、効率的かつ効果的に共有するためのシステムを構築することを目的とする。

本研究では次の4つの課題に取り組む。1)食品中から分離される食中毒細菌の汚染実態情報、菌株のPFGE解析等による分子疫学情報等の関連性を総合的に解析する手法を開発する。2)消費者等から寄せられた食品中のカビ等に関する苦情について、地研が蓄積している情報を解析し、リスクプロファイルを作成する。3)近年原因不明食中毒の原因物質の一つと推定される馬肉中のザルコシスチスの検査法を開発する。4) 1)～3)の情報を集約した効率的なライブラリーシステムを構築するため、地研等との間で共有を可能とする連携モデルを構築する。

これら食品中の有害衛生微生物に関する体系的ライブラリーシステムの構築及び地研等との連携モデルの構築は、国内外でも初めての試みである。

腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* は、日本国内および国外における腸炎ビブリオの分布状況ならびにその特徴について、ストレス抵抗性を調べ、MALDI-TO F/MS解析とパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析を用いてそれぞれの関連について究明した。MALDI-TOF/MS解析やPFGE解析を用いた群分けはそれぞれの利点があるものの、類縁度の比較由来の探索には別のアプローチを組み入れる必要があることが明らかとなった。またストレス抵抗性試験により、環境中において低水温下でも生存できるような株や病原性保有株（特に患者由来株）が、酸ストレスに対して特に強い傾向があることが示され、酸ストレス抵抗性メカニズムの解明が食中毒リスクとなる株のマーカースとして検討できることが示唆された。

腸管出血性大腸菌では、菌株の複数の遺伝子部位の塩基配列解析による菌株識別法である Multi-locus sequence typing法 (MLST) は、*aspC*、*clpX*、*fadD*、*icdA*、*lysP*、*mdh* および *uidA* の7つの遺伝子領域を基に行った。DNAの反復領域を複数特定し、各反復領域の反復数の差異により菌株識別を行う Multi-locus variable number of tandem repeat analysis法 (MLVA) は、MLVA-TR法によりDNAの7つの反復領域 (VNTR領域: TR1, TR2, TR3, TR4, TR5, TR6, TR7) を用い、また、MLVA-VR法によりDNAの8つVNTR領域 (VR1, VR2, VR3, VR4, VR5, VR6, VR7, VR8) を用いそれぞれ行った。PFGEパターンの系統樹解析では、腸管出血性大腸菌については1事例の食中

毒由来30株は、90%以上の類似性を示し同一のクラスター I に分類されたが、散発患者由来菌株のS389およびS392 はそれぞれ異なるPFGEパターンを示し、また系統樹解析でも類似度は85%以下であり関連は認められなかった。

カンピロバクターでは、PCR法を用いて食品由来Campylobacter jejuni 16株に対する12種の病原遺伝子 (fla A、cad F、racR、dnaJ、virB11、ciaB、pldA、cdtA、cdtB、cdtC、wlaN、CfrA) の検索をした。cad F遺伝子は16株の全て (100%) が保有していたが、virB11とciaBはいずれの株も保有していなかった。これらは10のProfile (I~X) に型別され、多くの多様性が認められた。PCRによる病原性の保有を特徴とした分子疫学的解析手法を確立できる可能性が示唆された。つぎに食品等から分離されるカンピロバクターを対象に、病原性に関連すると考えられている2種類の因子、invasion-associated marker (IAM) およびcytolethal distending toxin (cdtABC) の遺伝子保有状況を調査し、これらの情報がカンピロバクターの効率的なライブラリーシステム構築のためのデータベースとして利用可能であるか検討した。その結果カンピロバクター分離株におけるIAM遺伝子およびcdtABC遺伝子の保有は、菌株によって差が認められ、ライブラリーシステム構築のためのデータベースとして利用可能であると考えられた。

サルモネラにおいては、O群型別に関する解析手法の検討を行い、長鎖PCR産物からのRFLP解析を行うことで、比較的簡便にO群別を実施する遺伝子解析システムを構築することに成功した。

真菌においては、食の安全・安心への国民的な関心の高まりの中で、カビ発生により苦情食品として地方衛研での検査依頼が増加し、その情報が蓄積されている。しかしながら検査体制は弱体化の傾向にある。このような状況の中で、国立試験研究機関と地方衛生研究所などの中で食の安全に危害を及ぼすカビのリスクプロファイルをネットワークシステムを介して共有することで構築する基礎的研究を行った

カビの同定方法では、簡便に効率よくDNAを抽出する方法として、Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) 法とビーズ破碎の併用法が適当であることが明らかになった。

さらに最近の知見として黒コウジカビ (アスペルギルス ニガー) がオクラトキシン、フモニシンのカビ毒産生性があることが相次いで報告され、汚染事例から分離された株と醸造株などについて、フモニシンの産生検討の結果、現在のところ産生能は認められなかった。

原因不明下痢症との関連が指摘される生食用馬肉とそこに含まれる住肉胞子虫ザルコシスチスに関して、ザルコシスチスと不明下痢症の因果関係を明らかにすることを目的に、馬肉中のザルコシスチス遺伝子検査法を考案した。不明下痢症事例残品ならびに市販馬肉商品を試料として、ザルコシスチスの検出と遺伝学的特定、さらに残品より検出されるザルコシスチスの定量をPCR法により行った。その結果、残品中にはウマ特有のザルコシスチスが存在することを明らかにし、残品と同程度のザルコシスチス量が市販品の中にも検出される場合があることを明らかにした。遺伝子検査法は客観性と迅速性を備え、検査現場にも導入可能と考えられ、同法を用いて残品調査を拡大し不明下痢発症とザルコシスチス量の関係を明確にするとともに、馬肉の汚染モニタリングを行う

ことにより下痢症発生のリスク管理を図ることが重要と考えられた。

国立試験研究機関と地研との連携ネットワークは、本研究班で解析対象とするサルモネラ、腸管出血性大腸菌および腸炎ビブリオの菌株収集拠点となる地方衛生研究所を選定した。

分担研究者

熊谷 進 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

野崎 智義 (国立感染症研究所 寄生動物部部长)

泉谷 秀昌 (国立感染症研究所 細菌第一部)

林 賢一 (滋賀県衛生科学センター)

協力研究者

長谷川朗生 (東京大学大学院)

加藤 行男 (麻布大学獣医学部)

岡谷友三アレシヤンドレ (麻布大学獣医学部)

三輪 憲永 (東海大学短期大学部)

森田 幸雄 (東京家政大学栄養学科)

古茂田恵美子 (東京家政大学栄養学科)

八木田健司 (国立感染症研究所 寄生動物部)

寺嶋 淳 (国立感染症研究所 細菌第一部)

陰地 義樹 (奈良県保健環境研究センター)

浅野 勝佳 (奈良県保健環境研究センター)

橋本ルイ子 (千葉県衛生研究所)

久米田裕子 (大阪府公衆衛生研究所)

渡辺麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所)

石川 和彦 (滋賀県衛生科学センター)

安田 奈央 (滋賀県衛生科学センター)

A. 研究目的

近年、食品流通方式の発展がめざましく、それに伴って食中毒の発生も広域化しやすい傾向にある。

また、輸入食品等の増加などに伴って食中毒原因物質も多様化してきており、従来の自治体主体の食中毒監視システムだけでは対応しきれない事例も存在してきている。また、食品貯蔵中も含めてかび等の混入に関する苦情は、各自治体の食品安全担当部等に日常的に寄せられるが、その専門知識がある担

当官は少なく対応に苦慮している。近年、新規の寄生虫性食中毒が報告されていることから、我が国においても未然防止のための対策を整備する必要がある。

このような背景にあつて、我が国の食中毒予防に有用なリスク管理手法を確立するために、公衆衛生上重要視されている食品中の食中毒細菌、かびおよび寄生虫を対象に、科学的解析情報を集約し、国立試験研究機関（国立医薬品食品衛生研究所および国立感染症研究所）と地方衛生研究所（地研）等の食品安全関係機関が連携して、効率的かつ効果的に共有するためのシステムを構築することは急務である。

本研究では1)食品中から分離される食中毒細菌（腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、カンピロバクター、腸炎ビブリオ等）2)消費者等から寄せられた苦情における食品中のカビ等3)輸入食品を含む食品中の寄生虫を対象に、市販食品を対象とした実態調査、検査法の確立・普及、分子学的な解析手法の確立、菌株ライブラリーの構築、リスクプロファイルの作成等を行う。これらの成果として得られた情報は、国立試験研究機関において集約され、地研等との間で共有を可能とする効率的なライブラリーシステムを連携モデルとして構築する。

本研究は3年間の研究期間で行い、それぞれ3つの課題ごとに基礎的研究を遂行すると同時に、地研等と協力して効率的なライブラリーシステム構築のためのデータベース作成を行う。

国内外では、主要な食中毒細菌に関しては食中毒患者から分離された菌株を対象として分子疫学情報システムは構築されつつあるが、食品から分離された菌株を対象としたシステムは例がない。また、食

品中の有害衛生微生物に関する体系的ライブラリーシステムの構築及び地研等との連携モデルの構築は、国内外でも初めての試みである。

B. 研究方法

I. 腸炎ビブリオの病原性遺伝子探索のための分子学的な解析手法の確立、菌株ライブラリーの構築

1. 菌株の収集と環境由来株の検出方法

腸炎ビブリオの菌株として142株を使用した。環境中から90株を集めた。クロモアガー・ビブリオ培地（クロモアガー社）により37℃下で18時間培養した。*tdh*検出のPCRの結果が陽性の場合希釈列を塗布した。菌株の特徴の検索は、DNAを抽出方法し、*toxR*、*VA*、*tdh*、*trh*遺伝子を標的としたPCR法で行った。*toxR*についてはTakahashiらの方法（*J. Microbiol. Methods*. 2005, 61:77-85）を使用した。*VA*についてはDi Pinto, A.らの方法（*J. Food Prot.* 2005, 68(1):150-153）を使用した。*tdh*についてはTadaらの方法（*Molecular Cellular Prob.* 1992, 6:477-487）を使用した。

*trh*については西瀬らの方法（日本臨床. 1992, 50:348-352）を使用した

2. 解析

MALDI-TOF/MSによる解析に用いた使用菌株として菌株10株を使用した。AXIMA微生物同定システム（島津製作所）を使用し、Dieckmann, R.らの方法（*J. Applied Microbiol.* 109:199-211）に依拠して分析を行った。

PFGE解析は、Parsons, M. B.らの方法（*Foodborne Pathog. Dis.* 2007, 4(3):285-292）を使用した。系統解析はBionumerics 6.5 (Bionumerics) を用いてJaccard 法により距離行列を作成して近隣結合法にて系統樹を推定した。

3. ストレス抵抗性の評価

ストレスとして、酸・低浸透圧・凍結・熱ストレスを設定した。暴露時間は酸ストレスでは8時間、

浸透圧ストレスでは9時間、熱ストレスでは30分とした。凍結ストレスは24時間ごとに-20℃から25℃下に2時間おき、十分溶けたことを確認して、もう一度冷凍という操作を繰り返した。これを4回繰り返す、0℃を通過する時点が4回あるというストレスを与えた。

ストレス暴露後、アルカリペプトン水にて増菌させた。増菌したか否かで判定し、数値化した。この方法により抵抗性の度合いを示す結果は0~1の間に おさまり、1に近い程抵抗性が高いことを意味する。

ストレス暴露後の抵抗性の評価にあたっては、採取された水温の差、*tdh*あるいは*trh*の保有状況、病原性保有株について由来の違いについてそれぞれ得られた結果の差の有意差検定（Studentのt検定）を行った。

4. ストレス耐性遺伝子の存否の評価

遺伝子の存否の評価にあたっては腸炎ビブリオ23株を抽出した。ストレス関連遺伝子としてストレス耐性や病原性との関連が考えられる*oppA*、*oppB*、*escC*、*yscOp*、*envZ*、*murQ*、*fadB*、*cspA*、*cadA*、*mg1c* についてNIBCの遺伝子情報検索システム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) を使用して検索し、それぞれの存否を比較した。

II. 腸管出血性大腸菌およびカンピロバクターの病原性遺伝子探索のための分子学的な解析手法の確立、菌株ライブラリーの構築

1. 供試菌株

腸管出血性大腸菌は、腸管出血性大腸菌による食中毒1事例の患者および保菌者から分離された30株ならびに散発事例の患者から分離された2株の計32株の*Escherichia coli* O157:H7を用いた。

*Campylobacter*は、4県1市（岩手県、山梨県、岡山県、長崎県、福岡市）の地方衛生研究所あるいは保健所で分離された、鶏肉あるいは牛レバー由来等の*Campylobacter* 24株を用いた。

2. PFGE法

腸管出血性大腸菌0157はトリプトソイ寒天培地 (TS A) に塗抹し、37°C、24時間培養後、プラグ作製に用いた。制限酵素は *Bln* I を用い3時間酵素処理を行った。

Campylobacter は Butzler 寒天培地で継代し、制限酵素は *Sma* I を用い3時間酵素処理を行った。PFGEの解析は、Bionumerics 5.1を用い、Dice係数によるUPGMA法にて行った。

3. Multilocus sequence typing (MLST) 法

MLSTは、EcMLST (<http://www.shigatox.net/ecmlst/cgi-bin/index>) の方法に準じ、*aspC*、*clpX*、*fadD*、*icdA*、*lysP*、*mdh*および*uidA*の7つの遺伝子領域を基に行った。各遺伝子は、PCR法により増幅した。

PCRで増幅した各遺伝子のシーケンス解析はABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。各遺伝子のシーケンス解析は、シーケンス解析ソフトMEGA4を用い、各遺伝子の対象領域を精査した塩基配列をCLC Main Workbench (CLC Bio) に取り込みCLC MLST Moduleで各菌株のSequence type (ST)を確定した。そのSTを基にPubMLSTでBURST解析によりグループ解析を行った。

4. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法

MLVAはMLVA-TR法およびMLVA-VR法で行った。MLVA-TR法は、各菌株のDNAの7つの反復領域 (VNTR領域: TR1, TR2, TR3, TR4, TR5, TR6, TR7) を用いた。MLVA-VR法は、各菌株のDNAの8つVNTR領域 (VR1, VR2, VR3, VR4, VR5, VR6, VR7, VR8) を用いた。

5. 病原遺伝子検索の検査法

12種の病原遺伝子の検索 (*fla A*, *cad F*, *racR*, *dnaJ*, *virB11*, *ciaB*, *pldA*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *wlaN*, *CfrA*) についてそれぞれ適切な増幅温度条件で標的遺伝子を増幅した。

カンピロバクターの病原性に関連している可能性

があると報告されている2種類の因子、invasion-associated marker (IAM) およびcytolethal distending toxin (*cdtABC*) を対象とし、PCR法により遺伝子保有状況を調査した。IAMについては、Carvalho et al.の報告 (J. Clin. Microbiol. 2001; 39, 1353-1359) に準じて行った。*cdtABC* については、Bang et al.の報告 (Genome Letters 2003; 2, 62-72) に準じて実施した。

III. サルモネラの病原性遺伝子探索のための分子学的な解析手法の確立

ゲノム配列が有用な血清型 (*Enteritidis*, *Paratyphi A*, *Typhi*, *Choleraesuis*, *Newport*, *Agona*, *Typhimurium*等) について、Genbankからゲノム配列を入手し、*gnd-yegH*遺伝子間の配列を抽出した。得られたゲノム配列をMauveソフトウェアにて解析し、各血清型の合成遺伝子群の構造を比較した。

*gnd*および*galF*遺伝子を標的に共通プライマーを設計し、KOD FX Neoを用いて長鎖PCRを行い、得られた増幅産物を精製した。

また上記ゲノム配列の比較から、上記増幅産物を切断した場合に0.1kb~10kb程度の断片を生じ、血清型毎に泳動パターンが異なることが期待された制限酵素を選定した。選択したAfeI, EcoRV, MfeI, MluI, SphIで消化し1%アガロースゲルで分離した。得られた泳動パターンを目視で比較すると共に、BioNumericsソフトウェアに取り込み、クラスター解析を行った。

IV. 真菌におけるリスクプロファイルと新規リスク

1. アンケート調査

各地方衛研 (地研) に苦情食品由来カビ検査体制のアンケートを送付し、検査体制の実態やリスクプロファイルなどやネットワーク形成について要望についての調査を行い、その結果をまとめた。

2. 遺伝子を用いたタイピング法の確立

病原性を有するカビ、アスペルギルス フミガータス (*Aspergillus fumigatus*) と2種の酵母、キャンディダアルビカンズ (*Candida albicans*)、マラセチア フルフル (*Malassezia furfur*)、ならびにフモニシン産生カビのフザリウム プロリフェレイタム (*Fusarium proliferatum*)、計4株を供試株として用いた。DNeasy Plant Tissue Kit法を用い、DNAの濃度および精製度を測定した。また、さらに、DNA精製度が分子生物学的実験での使用に十分であることを確認するため、本研究で得られた全てのDNA溶液を鋳型として、18SrRNA 遺伝子をターゲットとするPCRを行った。

3. 白米におけるカビ毒産生菌の同定

チトクロームbの遺伝子配列によりアスペルギルス ニガーと同定された食品汚染カビ2株と、アスペルギルス ニガーの近接種でアスペルギルス フォエチダスと同定された泡盛醸造用株1株に加え、フモニシンB2産生陽性アスペルギルス ニガー株1株の、計3株を供試株とした。白米培地で1週間培養した。培養抽出液を、LCMS/MSでフモニシンの分析を行った。

V. 新規食中毒起因寄生虫の検査法の確立

1. 検体

馬肉試料として食中毒事例残品（以下残品と略）を3検体、市販馬肉商品（以下、市販品と略）を5検体、計8検体を用いた。

2. 馬肉からのDNA試料の調整

肉試料からQIAamp DNA Mini Kit（キアゲン）を用いてDNAを抽出精製し、最終的に100 μ lのAE (kit付属) に溶出したものをDNA試料とした。

ザルコシスチスのシスト陽性対照DNAは、食中毒事例残品より分離回収し凍結保存したザルコシスチス・シストよりDNA精製キットを用いてゲノムDNAを抽出精製し、実験に供した。

3. 定性PCRおよびシーケンス解析

使用プライマーは、18S1F: 5' -GGATAACC GTGGTA ATTCTATGならびに18S11R: 5' -TCCTATGTCTGGACCTGG TGAGを用いた (Pritt, B.P., et al., (2008)。PCR産物のシーケンス用に以下の4種のプライマー (Sarco2F: 5' -cagagtaacaattg- gagggcaag-3'、Sarco3F: 5' -gcattcgt atttaactgtcagag-3'、Sarco12R: 5' -ct ctgacagttaaatacgaatgc-3、Sarco13R: 5' -cttccctccaattgttactctg-3') を各種ザルコシスチスの18SrDNAシーケンスアライメントに基づき設計し、18S1Fおよび11Rとともに、定性PCR増幅産物のダイレクトシーケンシングを行った。またClustal Wを用いてアライメントを比較した。

4. 定量PCR

PCR反応試薬にはPower SYBR Green PCR master Mix (アプライドバイオシステムズ: ABI)を使用した。装置にはStep One Plus™ (ABI)を用い、検量線作成および増幅DNAの定量も同装置を用いて行った。使用プライマーは、Sarco HRS 1F: 5' -GATA CAGA ACCAATAGGGACATCAC ならびにSarco HRS 3R: 5' -AC TACCGTCGAAAGCTG ATAGGを設計し、濃度100 nMでPCRを行った。このHRS 1F/3Rの組み合わせにより、定性PCRで増幅される領域内の140bpが増幅される。

5. スタンダード用DNAの調整

1F/11Rプライマーを用いた18SrDNAのPCR産物をプラスミド (pCR®4-TOPO®, インビトロジェン) に組み込み、単クローンのプラスミドを精製した。

C. 研究結果

I. 腸炎ビブリオの病原性遺伝子探索のための分子学的な解析手法の確立、菌株ライブラリーの構築

1. MALD-TOF/MS解析

測定により得られたサンプルのピークリストの質量情報をもとにクラスター分析を行ったところ、ビブリオ・アルギノリテカスと腸炎ビブリオは明確に別々のクラスターが形成されたが、腸炎ビブリオの株毎のクラスターは形成されなかった。腸炎ビブ

リオの株間ではほとんどの検出ピークが一致しており互いに識別することは困難であった。

2. PFGE解析

PFGEの結果を基に作成した系統樹において、系統樹は大きく8群に分かれ、多様な菌が日本各地に分布していることが明らかとなった。これらの群について地域やストレス耐性、採取温度との関連は認められなかったものの、病原性との関連が指摘されている遺伝子tdhの保有株の割合について見ると、割合が0%となり保有していない株だけで構成された群も存在した。しかし今回、tdh株が存在するのは患者由来株からのものであった。

3. ストレス抵抗性の評価

水温15℃以下（冬季）において採取された菌株45株と水温20℃以上（夏季）において採取された菌株18株のストレス抵抗性について比較した結果、水温15℃以下で採取された株は酸・低浸透圧ストレスに対して有意に高い抵抗性を示した（ $p < 0.05$ ）。一方で凍結・熱ストレスに対しては抵抗性に有意な差は認められなかった。

病原性との関連性が指摘されている遺伝子であるtdhあるいはtrhを有する菌株39株といずれも保有しない菌株103株のストレス抵抗性について比較した

（図dhあるいはtrhを有する株は酸ストレスに対して高い抵抗性を示す一方、低浸透圧・凍結ストレスに対しては低い抵抗性を示した（ $p < 0.05$ ）。一方で熱ストレスに対する抵抗性では有意な差は認められなかった。tdhあるいはtrhを有する株について由来による抵抗性の違いが認められるかを比較するために、環境食品由来（14株）か患者由来（25株）で比較した結果、tdhあるいはtrh保有株については患者由来の株が環境由来株と比較して酸に対して高い抵抗性が認められた（ $p < 0.05$ ）。一方で低浸透圧・凍結・熱ストレスに対する抵抗性では有意な差は認められなかった。

4. ストレス耐性遺伝子の存否

今回設定した23株においてはenvZ、ysc0、murQ、fadB、cspA、cadAはいずれの株も保有した。一方でoppA、oppB、escC、mg1cは保有に株間の差異が認められた。

II. 腸管出血性大腸菌およびカンピロバクターの病原性遺伝子探索のための分子学的な解析手法の確立、菌株ライブラリーの構築

1) 腸管出血性大腸菌のPFGE

腸管出血性大腸菌のPFGEパターンおよびその系統樹を作成した。食中毒事例からの菌株は、同一由来株によるものと考えられた。散発患者由来菌株のS389およびS392はそれぞれ異なるPFGEパターンを示し、関連は認められなかった。

2) CampylobacterのPFGE

CampylobacterのPFGEパターンおよびその系統樹を作成した。食肉由来のCampylobacter 24株は、90%以上の相同性を基準として、PFGEパターンのクラスター解析を行うと、18のクラスターに分かれた。

3) 腸管出血性大腸菌のMLST

MLSTの結果は、ECM株30菌株は全て同じシーケンスタイプ2（ST2）に型別され、散発患者由来のS389菌株はST3、S392菌株はST4に型別された。

4) 腸管出血性大腸菌のMLVA

MLVA-TR法では、集団食中毒事例株ECM株30菌株のうち28菌株は同一のTR type A（以下、TR-A）に分類され、残り2菌株（ECM28 およびECM30）はTR type B（以下、TR-B）に分類された。一方散発患者由来のS389株はTR-C、S392株はTR-Dに分類された。

MLVA-VR法では、ECM株30株中18菌株はVR type A：18, 1, 8, 9, 3, 6, 10, 6, 7菌株はVR-B：18, 1, 7, 9, 3, 6, 10, 6, 1菌株はVR-C：18, 1, 7, 9, 3, 6, 10, 5, 1菌株はVR-D：18, 1, 7, 9, 2, 6, 10, 6, 2菌株はVR-E：18, 1, 7, 9, 2, 6, 10, 5, 1菌株はVR-F：18, 1, 7, 8, 2, 6, 10, 5に分類された。

5) カンピロバクターの病原遺伝子保有状況

*C. jejuni*と同定された16株の12種の病原遺伝子 (fla A、cad F、racR、dnaJ、virB11、ciaB、pldA、cdtA、cdtB、cdtC、wlaN、CfrA) の保有を調べた結果、供試16株はI~Xの10のProfileに型別された。最も多い菌株である6菌株が該当したものはProfile Iでfla A、cad F、racR、dnaJ、pldA、cdtA、cdtB、cdtC、CfrAの9つの遺伝子を保有するものであった。供試した16株中cad Fは16株の全て (100%) が保有していた。

供試菌株24株のうち3株 (12.5%) がIAM遺伝子を、20株 (83.3%) がcdtABC遺伝子を保有していた。供試菌株のうち、1株は両遺伝子ともに保有しておらず、残りの23株は、どちらか一方の遺伝子のみを保有していた。両遺伝子を保有している株はなかった。

III. サルモネラの病原性遺伝子探索のための分子学的な解析手法の確立

血清型Enteritidis、Agona、Choleraesuisの0抗原合成遺伝子領域をMauveで比較した結果、それぞれの0群は09、04、07であった。この結果から増幅可能なプライマーとしてgndおよびgalF遺伝子内にプライマーを設計し、長鎖PCRを試みた。最終的にKOD FX Neoを使用した際に最も増幅効率がよかった。得られた増幅産物を精製し、制限酵素AfeI、EcoRV、MfeI、MluI、SphIでそれぞれ消化し電気泳動を行い確認した。EnteritidisおよびTyphimuriumに関してはそれぞれのゲノム株から予想された断片が観察された。InfantisについてはCholeraesuisから断片を予想したが、おおよそ予想通りのバンドパターンを示した。

上記5つの制限酵素によるバンドパターンをBioNumerics上で組み合わせてクラスター解析を行ったところ、0群によってグループが形成されることが明らかとなった。

IV. 真菌におけるリスクプロファイルと新規リスク

1. アンケート調査

全地研 (77機関) を対照にアンケート調査を行った結果、回収率 約96%であった。依頼検査を受けている機関は、過半数 (約55%) に達しており、ライブラリーシステムへの高い期待が寄せられた。

2. 遺伝子を用いたタイピング法の確立

従来のDNA抽出に用いるCTAB法とビーズ破碎の併用法では、その収量が高く、4菌種で大量のDNA抽出が可能であることを示した。また、DNeasy Plant Tissue Kitとビーズ破碎の併用法ではCTAB法とビーズ破碎の併用法と比較すると、全ての菌種においてDNA抽出効率は著しく低かった。つぎに分子生物学的実験的な精製度の確認を、PCRでを行った。PCR増幅産物が得られ、十分な精製度を有していることが示された。すなわち、CTAB法とビーズ破碎の併用法での、カビからの大量DNAの抽出は可能であることが示された。

3. 白米におけるカビ毒産生菌の同定

フモニシンB2産生陽性アスペルギルス ニガー株を用い、フモニシンB2の産生の経時的な変化を調べたところ、7日間培養で最高に達したことから、他の供試株も培養日数を7日間とした。結果は、泡盛醸造用株 (アスペルギルス フォエチダス) と国産干しブドウから分離されたアスペルギルス ニガー株の培養物では、フモニシンB2の産生は認められなかった。しかしながら、カビ汚染市販菓子パンから分離されたアスペルギルス ニガー株の培養物からは、このカビ毒が検出された。

V. 新規食中毒起因寄生虫の検査法の確立

1. ザルコシスチス属プライマーを用いた定性的PCRおよび増幅産物のシークエンスと系統解析

各肉試料につき1ヶ所よりDNA試料を調整し、PCRを行い、残品の0301、0201および0401、市販品のNo. 1-3、そして陽性対照から約1, 100bpのDNAが増幅された。一方、市販品のNo. 4および5からのDNA増幅は

見られなかった。

各検体より増幅されたDNAのダイレクトシーケンスの結果、検体および陽性試料のシーケンスはいずれも一致した。他種のシーケンスの中でと一致するものはなく、最も高い相同性を示したのは*S. fushiformis* の登録株で、その相同性は91%であった。

2. 症例タイプのシーケンス検出のための定量的PCR

症例タイプ特異的なプライマーHRS 1 FおよびHRS3 Rを用いてまず検量線の作成を行った。反応ケミストリーにはSYBR Greenを用い、スタンダードの10倍希釈段階試料についてPCRの条件設定を行った。その結果、SYBR Green法による定量限界が下限10コピー、上限106コピーとする定量PCR法を確立した。これはg(肉重量)あたりのコピー数に換算すると、下限が約 1.7×10^4 コピー/g、上限が約 1.7×10^9 コピー/gとなり、また検出限界は計算上1コピー/アッセイであるのでg肉重量あたりのコピー数では 1.7×10^3 コピー/gであった。

同一の検体内ではDNA試料間の差は2倍程度でザルコンシチスがほぼ均一に分布する傾向を示した。

D. 考察

食品流通が多様化・広域化している現状において、公衆衛生上重要視されている食品中の有害衛生微生物に関して食中毒予防に有用なリスク管理手法を確立し、その情報を、国立試験研究機関(国立医薬品食品衛生研究所および国立感染症研究所)と地方衛生研究所(地研)等の食品安全関係機関の間で、効率的かつ効果的に共有し、活用することが最も有効な予防となる。情報ライブラリー等は、1)食中毒細菌(病原性大腸菌、サルモネラ、腸炎ビブリオ、カンピロバクター) 2)食品汚染真菌 3)食品汚染寄生虫の3つの有害衛生微生物を対象として構築していく。

具体的には、食中毒菌においては、患者株と食

品由来株の間で①共有可能な迅速性のあるタイピング手法の確立、②病原性のマーカー遺伝子パネルの作成および共通性の解析を行い、リスクファクターの高い食品由来食中毒菌を把握するに役立つマーカーを特定する。これらの成果は、従来のタイピング方法である血清型、フェノタイプ、パルスフィールド(PFGE)等とともに、情報ライブラリーを通して、各自治体が定期的に行うサーベイランスに応用され、国立試験研究機関に情報を集約することにより地域的時系的にリスクファクターの高い食中毒菌の分布が把握できる。また食中毒原因食品の寄与率推定のためのベースラインデータベースともなる。

本年度は腸炎ビブリオ、腸管出血性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラを対象に、従来のタイピング法を適用してその有効性を検討するとともに、ストレス耐性など、病原因子を見いだすための手法を含めた検討を行った。

腸炎ビブリオのPFGE解析は非常に識別能が高く、系統樹は8群に分かれ、多彩な菌が日本各地に分布していることが明らかとなった。これらの群について地域やストレス耐性、採取温度との関連は認められなかったものの、それぞれの群間でtdh保有株の割合にばらつきが認められた。しかしながら、地理的分布の特徴や特徴の違いを生み出す環境要因を探るにあたっては不十分で、ある程度まとまった群に分かれることが理想だと考えられるため、PFGEとは別の手法としてMLVAを今後試す予定である。

ストレス耐性等の検討では、特に酸ストレス抵抗性について差が出た結果となり、環境中において冬季でも生存できるような株や病原性保有株(特に患者由来株)が、酸ストレスに対して特に強い傾向があることが示された。この結果を踏まえると、酸ストレス抵抗性メカニズムの解明が食中毒リスクとなる株のマーカーとして検討できる方向性が示された。

腸管出血性大腸菌では、PFGEのクラスター解析の結果、1食中毒事例からとれた30株は同じクラスター

一(クラスター I)に分類された。

本研究の腸管出血性大腸菌で用いた二つのMLVA法では、同一の食中毒事例から分離されたECM株30菌株と散発事例の分離菌株は、明確に分類された。MLST法では、ECM株と散発事例の菌株のSTは異なったものの、S392 菌株はECM菌株の同等のCC1に分類され、時系列的には近い可能性を示した。しかし、この菌株は二つのMLVA法でECM株とは全く異なる菌株であることが明らかになった。

しかし、他のMLVA法では、一領域で一反復の違いのみのものから、最大で18反復の差異また4領域で各1反復の差異が見られた。

この方法は (MLVA-TR) では、これら菌株は同一の起源を持つ菌株とみなされた。

一方MLVA-VRでは、VR type Aに比べ、VR-Bを示したECM04, 05, 14, 15, 16, 17およびECM20は一領域で1反復の差異のみ、VR-CおよびVR-Dは2領域でそれぞれ1反復のみの差異で、同一の起源を持つ菌株に分類された。一方、VR-Eでは3領域でそれぞれ1反復、VR-Fでは4領域でそれぞれ1反復の差異が見られた。したがって、MLVA-VRの結果を単独で見た場合には、ECM株30菌株中、27菌株は同一の起源を持つ菌株であり、VR-Eに分類されたECM10およびECM13ならびにVR-Fを示したECM09は異なる起源を持つ菌株と推測された。これらの結果から、食中毒事例と分離菌株の関連を迅速に判断しなくてはならない場合に、通常の電気泳動装置を用いたMLVA-VR法は有用な方法であることが改めて確認された。

ストレス耐性遺伝子と考えられるoppA、oppB、es cC、mg1cは保有に株間の差異が認められたが、採取場所やストレス抵抗性の強弱との関連は認められなかった。

カンピロバクターのPFGEについては、様々な場所で分離された24株のうち1株を除いて、分離場所が異なればクラスターが異なっており、ほとんどの菌株で地域と菌株の関連が明確になった。

C. *jejuni*による食中毒は発生件数、発生患者数が多く、食品衛生学上重要な感染型食中毒菌で、本菌の人への発症には様々な病原遺伝子の関与が報告されている。今回、鶏肉と牛肝臓由来株16株について12種の病原遺伝子の検索をしたところProfile I ~XIに型別され、保有病原遺伝子の多様性が示唆された。このことから、PCRによる病原性遺伝子の保有の有無を特徴とした分子疫学的解析手法を確立する可能性が示唆された。

カンピロバクターの病原性に関連している可能性のある因子についてはいくつかの報告が見られる。IAMとcdtABC遺伝子は病原性に関連している可能性が高いと報告されていることから、IAM遺伝子とcdtABC遺伝子の保有状況を調査することにより、カンピロバクター菌株をさらに詳細に分類することが可能と考えられ、これらの遺伝子の保有状況はライブラリーシステム構築のためのデータベースとして利用可能であることが示唆された。

サルモネラでは、長鎖PCR産物からのRFLP解析を行うことで、比較的簡便にO群別を実施する遺伝子解析システムを考案した。分離株を用いた場合でもゲノム株から予想された制限断片を得ることができた。制限酵素をいくつか組み合わせることで、今回の研究で浮上してきた欠点を補えることが示唆された。

通常は血清を使用してO群を決定することが定法であるが、対応できないものもあるので、本研究のような遺伝子を用いたシステムを構築して選択肢を増やしておくことは、ライブラリーに提供する方法として重要な知見となる。

食品汚染真菌においては、地研に寄せられる苦情の原因となる真菌について、カビ毒産生の有無などのリスクファクターをリアルタイムに解析できる遺伝子的検出法等を開発するとともに、遺伝子研究で新たに解明されたカビ毒産生真菌などの最新の情報をライブラリー化して、地研に還元することが重要

である。

今回の調査で、ライブラリーシステムに対する各地研の要望、期待は高かった。

そこで、1) 地方衛研と連携をとりながらネットワーク形成、確立をはかる。2) ネットワークの拠点とリファレンスセンターを明確にして、そのコンサルティング的な機能などを充実させる。3) 最新の情報を集めたリスクプロファイルを作成する。4) ネットワークを通じて、アスペルギルス ニガーのカビ毒産生性など、健康危害などに関する最新の情報を流し、日常的な連携を保持していく必要がある。

食品汚染寄生虫においては、近年原因不明とされていた生食用馬肉を原因食品とした食中毒原因物質のひとつが寄生虫であると推定されたことから、このような新しい寄生虫由来食中毒への対処法をライブラリー化する。この成果は、地研の寄生虫由来食中毒検査体制の効率化を促す。

まず、定性的PCRと18SrDNAのシークエンス解析を行った結果、残品中のザルコシスチスは既知のザルコ種とは異なる新規の配列をもつウマ特有のザルコシスチス（症例タイプ）と考えられた。本症例タイプが野生動物類（シカ等）に検出されるザルコシスチスのグループに近いことが示されたことは興味深い点で、症例タイプのザルコシスチスがどのような由来、また生活環をもつのか、今後の汚染対策を考える上でも重要な問題と思われる。今後ザルコシスチス属18SrDNAの高変異領域を利用し種特異的なプライマーを用いたNested-PCR等により、幅広くザルコシスチス検索を行うことでザルコシスチスの種と下痢症の関係を明らかにする予定である。

今回開発した症例タイプ特異的なプライマーを用いた定量PCR法は、10コピー/assayの定量限界はあるが、良好な定量性を示す検量線が得られた。現状でコピー数/gを用いているが、今後精製したプラズミドを用いて定量PCRを行い原虫数に換算した表示を行うことを予定している。

一般に遺伝子検査におけるDNA試料調整は結果に大きく影響する行程である。本研究では検査現場での実際を想定し、検査の迅速簡便性、多検体処理対応、相互汚染の防止という点を重視し、少量多検体処理の方法を考案した。肉片からの全DNA抽出はザルコシスチスの絶対量の測定を可能にするが、その方法は今後の課題とし、本研究では同一のDNA試料調整条件の上で各馬肉試料の汚染度を定量的に比較することとした。

定量PCRにより今回調べた残品のザルコシスチス量は $10^6 \sim 10^7$ コピー/gであり、かなり多量の虫体数が発症と関連することが示された。疫学調査からの発症喫食量のデータが充実すれば発症ザルコシスチス量を算出することが可能であると期待される。さらにザルコシスチスの毒性試験研究データと併せることで実際のリスク評価が可能となることが期待される。なおこの点に関しては、残品の最少ザルコシスチス量が大きく影響する要因となる。一方、市販品中に残品程度のザルコシスチス量が部分的ではあるが検出されたことは重要である。ウマのザルコシスチス感染率は形態学的な検査法では、国内外に報告がある。ザルコシスチス汚染のリスクコントロールという観点から、今後は輸入を含め流通販路を把握し、馬肉汚染の実態調査を国内外の肉製品あるいは屠畜段階で行うこと、さらにはモニタリングによる汚染監視の必要性も今後の課題になるものと考えられる。

E. 結論

1) 食中毒細菌（病原性大腸菌、サルモネラ、腸炎ビブリオ、カンピロバクター）、食品汚染真菌、食品汚染寄生虫の3つの有害衛生微生物を対象としてライブラリーにするための項目を検討した。

すなわち、患者株と食品由来株の間で共有するタイピング手法の確立、リスクファクターの高い食品由来食中毒菌を把握するための病原性マーカー遺

伝子の解析と検索をおこなった。

タイピング手法の確立をおこなったところ、腸炎ビブリオでは本研究の結果、多様な菌株を使用してPFGE解析を行うことの有用性について明らかになった。腸管出血性大腸菌ではMLVA-VRの型別能が最も高く、PFGEでは菌株間の関連性の判定が難しかった菌株でも菌株間の差異が明確になった。

サルモネラでは、タイピング手法の確立として長鎖PCR産物からのRFLP解析を行うことで、比較的簡便にO群別を実施する遺伝子解析システムを考案した。

病原遺伝子の検索はカンピロバクターで行ったところ、鶏肉と牛肝臓由来株C. jejuni 16株についてPCR法により12種の病原遺伝子について多くの多様性が認められた。これらのことから、PCRによる病原性の保有を特徴とした分子疫学的解析手法を確立する可能性が示唆された。

また、カンピロバクター分離株におけるIAM遺伝子およびcdtABC遺伝子の保有は、菌株によって差が認められた。これらの遺伝子の保有状況により、カンピロバクター菌株をさらに詳細に分類することが可能と考えられ、これらの遺伝子の保有状況はライブラリーシステム構築のためのデータベースとして利用可能であることが示唆された。

ストレス抵抗性については、腸管ビブリオのストレス関連遺伝子 (oppAB、EnvZ、EscC、YscO、murQ、fadB) の保有の解析では地理的分布やストレス抵抗性との関連は認められなかったものの、酸・低浸透圧・凍結・熱に対するストレス抵抗性を調べた結果では環境中において冬季でも生存できるような株や病原性保有株 (特に患者由来株) が、酸ストレスに対して特に強い傾向があることが示され、酸ストレス抵抗性メカニズムの解明が食中毒リスクとなる株のマーカーとして検討できる方向性が示された。真菌に関しては、アンケート調査から、リスクプロフィール作成およびライブラリー構築への要望が高

いことが確認された。また、カビの同定方法として、分子生物学的手法を開発し、簡便に効率よくDNAを抽出する方法を開発した。さらに最近黒コウジカビ (アスペルギルス ニガー) がオクラトキシン、フモニシンのカビ毒産生性があることが相次いで報告されたが、わが国の汚染事例から分離された株と醸造株などについてはフモニシンの産生が認められなかったが、さらに検討が必要である。

寄生虫性食中毒においては、馬肉中のザルコシチスを推定病原因子とし、その分子遺伝学的特定と定量のための遺伝子検査法の開発を行った。この方法を用い、残品中にはウマ特有のザルコシチスが存在することを明らかにし、その馬肉中含量を明らかにした。

地研等との間で共有を可能とする連携モデルを構築した。サルモネラについては滋賀県衛生科学センターを、腸管出血性大腸菌については福岡県保健環境研究所を、さらに腸炎ビブリオについては秋田県健康環境センターを選定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Watanabe, M., Lee, K., Goto, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y. Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA. Journal of Food Protection. 73, 1077-1084, 2010.

Akio Hasegawa, Yukiko Hara-Kudo and Susumu Kumagai. Survival of Salmonella strains differing in their biofilm-formation capability upon exposure to hydrochloric and acetic acid and to high salt. J Vet Med Sci (2011) in press

Ken-ichi Lee, Nigel P. French, Yukiko Hara-Kudo, Sunao Iyoda, Hideki Kobayashi, Yoshiko Sugita-Konishi and Susumu Kumagai. Multivariate Analyses Revealed Distinctive Features Different

iating Human and Cattle Isolates of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 in Japan.
JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 2011, p. 1495- 1500 Vol. 49, No. 4

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業)

ストレス抵抗性との関連における腸炎ビブリオの分布状況の解析 分担研究報告書

研究分担者 熊谷 進 東京大学大学院 農学生命科学研究科
研究協力者 長谷川朗生 東京大学大学院 農学生命科学研究科

要旨

腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* は、海産食品において問題となる食中毒菌であり、リスク評価を元にした対策が必要となっている。しかし本菌に関する疫学研究はまだ少なく、特にわが国においては広く菌株を分離収集し、それらを用いた分子疫学的解析の試みは行われてこなかった。日本国内および国外における腸炎ビブリオの分布状況ならびにその特徴について、ストレス抵抗性を調べ、MALDI-TOF/MS解析とパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析を用いてそれぞれの関連について究明した。

国内および海外各地での海水・魚介類中から腸炎ビブリオの菌株を採取し、食中毒患者由来の株や種の異なるビブリオ・アルギノリチカスと合わせてMALDI-TOF/MS解析を実施したところ、腸炎ビブリオとビブリオ・アルギノリチカスの区別はできたものの、腸炎ビブリオの種内の区別はできないことが明らかとなった。PFGE解析においては、今回使用した株においては大きく8群に分かれ、それぞれの間で *tdh* 保有株の割合にばらつきが認められた。類縁度による地理的分布やストレス抵抗性との比較については、バンドパターンは極めて多様となるため、PFGE解析単体では比較ができないことが明らかとなった。

ストレス抵抗性については、酸・低浸透圧・凍結・熱に対するストレス抵抗性を調べ、ストレス耐性との関連が考えられた遺伝子 (*oppAB*, *EscC*, *YscO*, *EnvZ*, *murQ*, *fadB*, *cspA*, *ca* *dA*, *mgIc*) の保有を調べた。株の由来ごとにストレス抵抗性の強弱の傾向が分かれ、環境中において冬季でも生存できるような株や病原性保有株 (特に患者由来株) が、酸ストレスに対して特に強い傾向が認められた。しかしこうした株について耐性関連遺伝子の保有状況やバンドパターンとの関連は認められず、ストレス抵抗性メカニズムが複合的に働いている可能性が示唆された。

以上より、MALDI-TOF/MS解析やPFGE解析を用いた群分けはそれぞれの利点があるものの、類縁度の比較由来の探索には別のアプローチを組み入れる必要があることが明らかとなった。またストレス抵抗性試験により、環境中において低水温下でも生存できるような株や病原性保有株 (特に患者由来株) が、酸ストレスに対して特に強い傾向があることが示され、酸ストレス抵抗性メカニズムの解明が食中毒リスクとなる株のマーカーとして検討できる方向性が示された。

A. 研究目的

腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus*
は、海産食品において問題となる食中毒

菌である。本菌は好塩性であり、海産物
において特に夏季に問題となる。今なお
患者数は 579 人 (平成22年) と腸管出血

性大腸菌の患者 358 人（同年）よりも多く、リスク評価を元にした対策が必要となっている。本菌の特徴として下記の二点が挙げられる。

①病原性関連遺伝子 *tdh* 陽性株は食中毒患者分離株では95%以上を占めるが、環境から分離した株では1%に満たない

②冬季において食中毒発生がなく、環境中より極めて低い確率でしか分離できなくなる

このような特徴は、環境からいかにして感染への経路へと至るのかの解明において大きな妨げとなっている。本菌に関する疫学研究はまだ少なく、特にわが国においては広く菌株を分離収集し、それらを用いた分子疫学的解析の試みは行われてこなかった。本研究は、環境食品由来株と食中毒患者由来株を広く収集し、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）解析や MALDI-TOF/MS などの分子疫学的手法を用いてそれぞれの特徴を探り、またストレス抵抗性の評価と組み合わせることで、健康被害の指標となる病原性マーカーの検討を行うことを目的としている。

B. 研究方法

1. 菌株の収集

腸炎ビブリオの菌株として 142 株を使用した。環境中からの収集にあたっては 2010 年 6 月から 2011 年 2 月までの間に環境中からの採取として海水および土着の貝であるムラサキイガイやイワガキなど種々の魚介類を設定し、90 株を集めた。収集場所として、北海道、宮城、新潟、東京、神奈川、静岡、香川、福岡を、さ

らに海外においてもタイとマレーシアを設定した。さらに大分県環境センターより大分とインドネシアの株を、福岡県衛生研究所より福岡の株を譲受して研究に用いた（表 1）。

2. 環境由来株の検出方法

（1）増菌方法

ストマッカー袋に入れた検体の重量を測定し、9 倍量のアルカリペプトン水（日水製薬）を加え、37℃下で18時間培養した。培養液10~20 μl をクロモアガー・ビブリオ培地（クロモアガー社）に画線し、37℃下で18時間培養した。*tdh* 検出の PCR の結果が陽性の場合には多数のコロニーが釣菌できるよう希釈列を塗布した。

（2）確定試験

クロモアガー・ビブリオ上のコロニーを観察し、腸炎ビブリオと思われる藤色のコロニーを釣菌し、*toxR* 遺伝子を標的とした PCR 法を行い確定した。ビブリオ・アルギノリティカスについてはクロモアガー・ビブリオ上の白色のコロニーを釣菌し、*V4* 遺伝子を標的とした PCR 法を行った上で 3%NaCl 加 TSI 培地（ISL 社）にて斜面 / 高層が黄 / 黄に変色することで確定した。

3. 菌株の特徴の検索

（1）DNA 抽出方法

増菌液 1ml を 10,000 × g で10分間遠心し、上清を除き沈殿に滅菌蒸留水を加えて菌液を洗浄した。その後 100℃にて10分加熱し、10,000 × g で10分間遠心して得られた上清を Template DNA とした。

(2) *toxR*, *VA*, *tdh*, *trh* 遺伝子を標的とした PCR 法

(1) で得られた Template DNA を用いて下記の方法に従い PCR を行った。

*toxR*については Takahashi らの方法 (*J. Microbiol. Methods*, 2005, 61:77-85) を使用した。反応試薬 20 μ l に Template DNA 5 μ l を加え計 25 μ l の反応とした。PCR 条件は熱変性 94°C 1 分、アニーリング 63°C 1.5 分、伸長 72°C 1.5 分を 1 サイクルとして 20 サイクル行った。得られた PCR 産物は 2% アガロースゲル (Nusieve 3:1 agarose: Cambrex Bio Science Rockland) にて電気泳動を行い、産物 (386bp) の確認を行った。

*VA*については Di Pinto, A. らの方法 (*J. Food Prot.* 2005, 68(1):150-153) を使用した。反応試薬 45 μ l に Template DNA 5 μ l を加え計 50 μ l の反応とした。PCR 条件は熱変性 94°C 0.5 分、アニーリング 57°C 0.5 分、伸長 72°C 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。得られた PCR 産物は電気泳動を行い、産物 (737 bp) の確認を行った。

*tdh*については Tada らの方法 (*Molecular Cellular Prob.* 1992, 6:477-487) を使用した。反応試薬 45 μ l に Template DNA 5 μ l を加え計 50 μ l の反応とした。PCR 条件は熱変性 94°C 1 分、アニーリング 55°C 1 分、伸長 72°C 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。得られた PCR 産物は電気泳動を行い、産物 (251bp) の確認を行った。

*trh*については 西沢らの方法 (日本臨床, 1992, 50:348-352) を使用した。反応試薬 45 μ l に Template DNA 5 μ l を加

え計 50 μ l の反応とした。PCR 条件は熱変性 94°C 1 分、アニーリング 55°C 1 分、伸長 72°C 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。得られた PCR 産物は電気泳動を行い、産物 (250bp) の確認を行った。

4. MALDI-TOF/MS を用いた解析

使用菌株として採取場所が多様な菌株 10 株を使用した。菌株をアルカリペプトン水にて振とうさせながら 12 時間し、10,000 \times g にて 4°C 下で 10 分遠心させた。滅菌蒸留水で洗浄させ、80% エタノールにつけて 4°C 下で 1 時間おき、template とした。

Dieckmann, R. らの方法 (*J. Applied Microbiol.* 109:199-211) に依拠して分析を行った。AXIMA 微生物同定システム (島津製作所) を使用し、マトリックスとして 20mg/ml CHCA を使用した。測定条件としてレーザー光源: N2 封入型レーザー m 検出イオン: 正イオン、飛行モード: リニアモード、加速電圧: +20kV を設定した。

サンプル調整にあたっては、サンプルを遠心し、得られた菌のペレットを \sim 0.2 μ l サンプルプレートに搭載した。その上にマトリックス溶液を 1 μ l 重層、ピペティングしてよく混和し、溶液を乾燥させた後、分析に供した。マススペクトルデータの取得を行うにあたり、各サンプルにつき 2 ウェルサンプルを搭載した。

大腸菌 DH5 α のマススペクトルを用い外部標準法による質量較正を行った後、各サンプルのマススペクトルを取得 (測