

ノタイプアレイの3手法を中心に情報収集を行った。

B. 視察内容

1. マイクロアレイ

CFSAN のマイクロアレイのチームでは *Esherichia coli*、*Salmonella*、*Shigella* に関するマイクロアレイの開発を行っていた。特に *E. coli* 0157:H7 に関してはゲノム中の一塩基多型 (SNPs) を検出できるマイクロアレイを開発し、SNPs をもとに株のタイピングを行っていた。マイクロアレイによる SNPs 検出には図 1a のようにゲノムのある領域に相当する 29-mer のプローブを作成し、さらに 24-mer ずつ重なったプローブを作成していく。通常、SNP の位置がプローブの中央に位置するほど、そのプローブに結合しにくくなる。そのため、SNP のないリファレンス株の DNA がこのプローブに結合する場合の結合強度と SNP の入っているテスト株の DNA の結合強度との比を出すと、図 1b のように SNP の位置が真ん中にあるプローブ 4、5 を中心としたピークを描くことができる。この手法を用いることによって、テスト株のリファレンス株に対する SNPs の位置を特定することができる。CFSAN のマイクロアレイのチームではこの SNPs 情報を分類し、菌株のタイピングに利用していた。特に *E. coli* 0157:H7 に関しては全ゲノムの約 1% に相当する 60 の遺伝子座 (約 60000 bp) の一塩基多型 (SNPs) を検出できるアレイが開発されており、非常に高解像度の解析を行うことができた。また、このチームは *E. coli*、*Shigella* 合わせて 140,524 の遺伝子のうち 23,092 の遺伝子発現を定量するアレイを開発した。このアレイを用いて、各遺伝子の発現を定量的に解析し、そのパターンをもとに菌株のタイピングを行って

いた。現在、*E. coli* では上記の SNPs と遺伝子の定量的解析を 1 枚のチップで行えるものを開発中しているところであった。このチームが開発したアレイはすべて商業的に入手が可能で、他の研究機関もこのアレイを用いて解析を行えるようになっていた。

マイクロアレイによるタイピングの欠点として、ゲノムの塩基配列が解析されている細菌にしか使用できないことが挙げられる。また現時点では、マイクロアレイを行うにはまだまだ高価な機器が必要であり、消耗品などのランニングコストの面からいっても、どのような研究機関にでもすぐに導入できるというわけではない。しかし、マイクロアレイは非常に高解像度のデータをわずか 1 日で手に入れることができる。よって、コスト的な問題が解決されれば、今後急速に普及していくものと予想された。

2. オプティカルマッピング

細菌のゲノムをガラススライド上に固定し、制限酵素で切断する (図 2a)。そうしてできたガラススライド上の DNA 断片をスキャナーで長さを測定し (図 2b)、コンピューター上で DNA の切断パターンをもとに各断片をつなげていき (図 2c)、ゲノム全長の制限酵素地図を作成するのがオプティカルマッピングである。オプティカルマッピングによるタイピングではこの作成された制限酵素地図を比較することによって、菌株の分類を行う。現在ではアメリカの OpGen 社より、全自動装置が発売されている。

DNA を制限酵素で切断し、その切断パターンを比較するという点においては PFGE 法と原理的には同じであるが、オプティカルマッピングは PFGE 法の

問題点をいくつも克服している。PFGE 法は電気泳動によって DNA 断片を分離するため、分離できるのは 10 断片程度であるが、オプティカルマッピングではガラススライド上に DNA 分子を固定し切断するため、そのような制限がなく、700 以上の断片を分離できる。そのため、PFGE 法では XbaI のようにゲノム配列中で比較的切断部位の少ない制限酵素を用いていたが、オプティカルマッピングでは BamHI のように切断部位の多い制限酵素を使用することができ、PFGE よりはるかに高解像度の制限酵素地図を作成することができる (図 3)。また PFGE 法では、ある DNA 断片がゲノム上のどの部分に相当するかは、最終的にシーケンスするまではわからないが、オプティカルマッピングではすでに公開されているゲノム情報を用いて作成した制限酵素地図と比較することによって、簡単に特定することができる。このため、オプティカルマッピングではゲノム上の欠失やファージなどの挿入、遺伝子の逆位なども検出できる (図 4)。さらに、DNA 断片の長さを測定し、コンピューター上で結合していくという原理から、サンプル中に複数の菌が混じっている場合でも、それぞれの菌に対して制限酵素地図を作成することができる。また、制限酵素地図を作成するだけなら、マイクロアレイのように全ゲノム情報を必要としないため、どのような細菌に対しても使用できる。

このように PFGE 法の欠点を克服しつつ、様々な解析に応用することができるのがオプティカルマッピングの大きな特徴である。しかも 1 コロニー以下の菌量を使用するだけで、ゲノム全長にわたる制限酵素地図を作成することができる。もちろん解像度の面ではゲノムシーケンスにはかなわないが、通常の菌株のタイピングには全塩基配列情報は情

報過多であり、しかもゲノムシーケンスには膨大な時間と費用が掛かる。オプティカルマッピングはゲノムシーケンスほどは細かくないが、PFGE 法よりはるかに高解像度のデータをわずか 1 日で得ることができる。現時点ではマイクロアレイ同様、コストの面で普及が妨げられているが、それが解決されれば PFGE 法に置き換わる新しい手法として、一気に普及していくものと考えられる。

3. フェノタイプアレイ

窒素原、炭素源、浸透圧、イオン強度、pH など細菌の発育条件や薬剤感受性など約 2000 種の表現型を 1 度の培養で解析する方法である。現在はアメリカの Biolog 社よりシステムが発売されている。このシステムでは 96 ウェルプレートのウェル毎に最小限の培地と共に栄養要求性を調べるための基質 (各種炭素源など) や薬剤感受性を調べるための抗生物質などが加えられている。さらに pH や浸透圧などの発育条件が変えてあったりする。このような各ウェルに試験菌を接種する。試験菌が発育すると培地中に含まれているテトラゾリウム塩が還元され、培地が着色する。この培地の着色を専用の孵卵器中の CCD カメラがモニターしている。CFSAN のフェノタイプアレイのチームでは、こうやって得られた培養条件ごとの発育パターンを比較することによって、菌株のタイピングを行っていた。フェノタイプアレイはマイクロアレイやオプティカルマッピングのように単に遺伝子上の変異を検出するというのではなく、実際に細菌の増殖に関係する表現型を検出することが大きな特徴である。そこで現在、CFSAN のフェノタイプアレイのチームでは、得られた栄養要求性のデータを用いて、菌を接種し発育を見るだけでその *E. coli* がどの菌株であるか

を同定できる寒天培地を作成中である。

C. 結論

今回視察した 3 つの手法はこれまでの従来の技術では到底実現できなかったものである。例えばマイクロアレイでは DNA チップ上に高密度にプローブを配列する技術、オプティカルマッピングでは DNA 分子の長さを正確に測定する技術や、網羅的に得られた DNA 断片の長さ情報からゲノム全長の制限酵素地図を作成するコンピューター処理能力、フェノタイプアレイでは 2000 種に及ぶ表現型を 1 度で解析できるように構成されたシステムなど、これらの手法は機器の発達や最近の高性能コンピューターの恩恵をフルに利用しているといえよう。そのため、いずれの手法も現時点ではコスト的な問題があるため、普及に時間がかかっているが、それが解決されれば、日本でもすぐに普及していくだろうと考えられる。とくにオプティカルマッピングは PFGE 法とダイレクトに置き換えられる技術であるため、その普及が期待される場所である。

CFSAN 内ではこれら 3 つの手法は競合するものではなく、お互いが補完しあうものとしてとらえている。実際に大きな食中毒が発生した場合、3 つのチームが同時に動き、得られた結果を共有し合う体制が整っている。そうして得られた結果から、マイクロアレイでは SNPs や遺伝子発現に関する情報、オプティカルマッピングでは制限酵素地図に加えて挿入や欠失、逆位など遺伝子の位置情報を得ることができ、さらにフェノタイプアレイでは細菌の栄養要求性や薬剤耐性、培養条件を得ることができる。このようにひとつの菌株に対して 3 つの手法で解析を行うことによって、ひとつの手法だけでは分類で

きない菌株も分類できるような体制になっている。また、この豊富な情報を用いて複数の食中毒由来の菌株を比較することによって、試菌株の来歴を詳細に解析することができる。

以上のように、FDA では食中毒対策に豊富な研究費を投入し、研究体制を強化している。我が国でも食中毒に対する研究体制の拡充に努めていく必要性が強く感じられた。

(a)



(b)

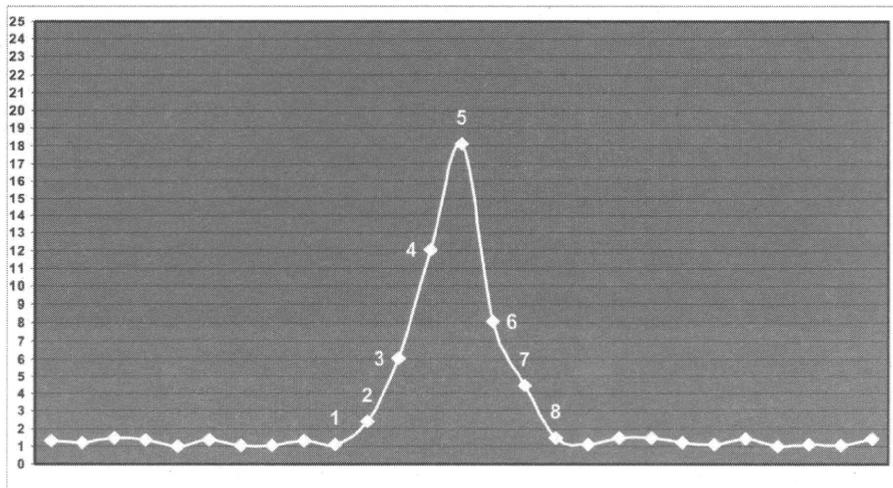
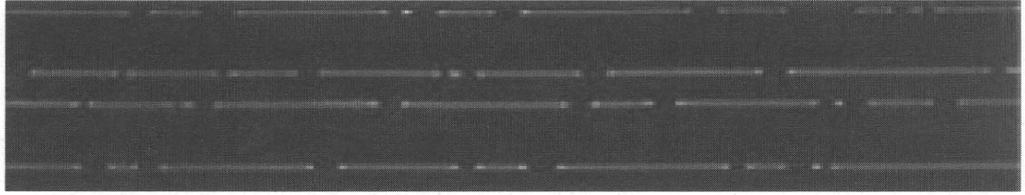
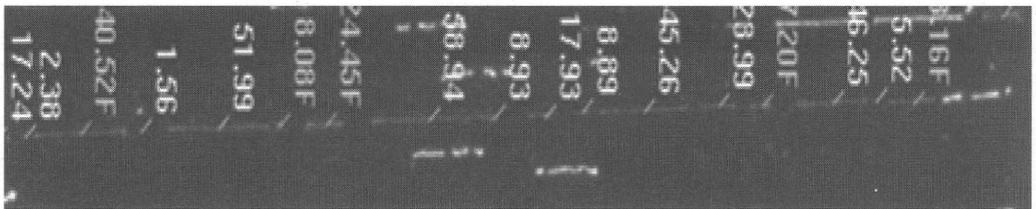


図1 マイクロアレイによる SNPs 検出の原理

(a)



(b)



(c)

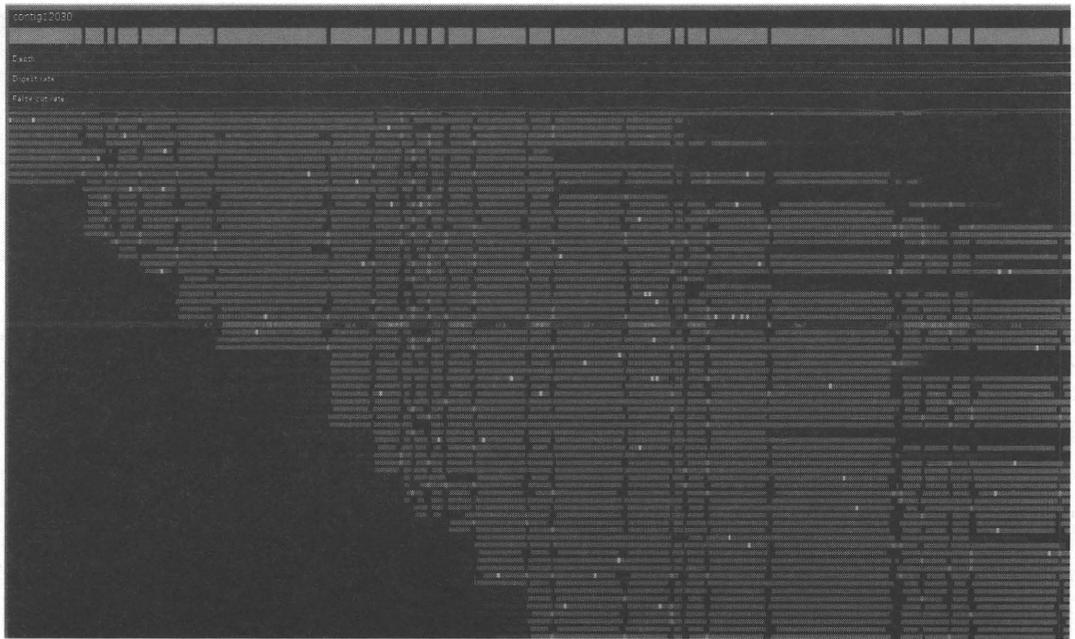


図2 オプティカルマッピングの原理

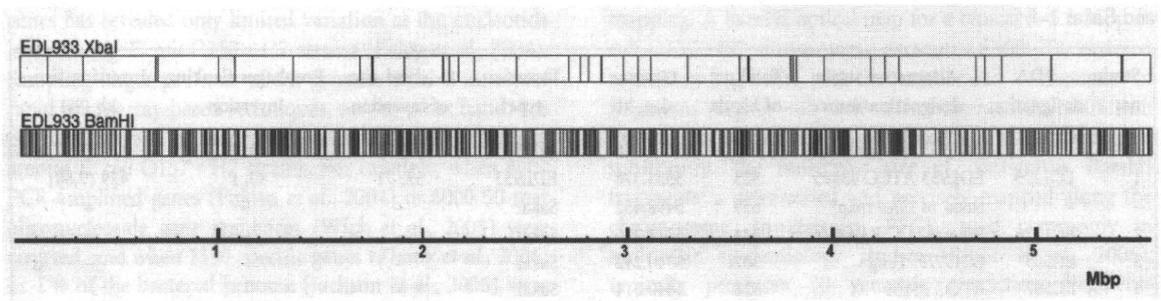


図3 オプティカルマッピングとPFGE法の解像度の比較

図は *E. coli* O157:H7 EDL933 株のゲノムの一部を XbaI もしくは BamHI で切断した制限酵素地図。通常、PFGE 法では XbaI を使用するがオプティカルマッピングでは BamHI を使用することができる。また、PFGE 法では XbaI による切断で生じた断片すべてをゲル上で分離できるわけではない。

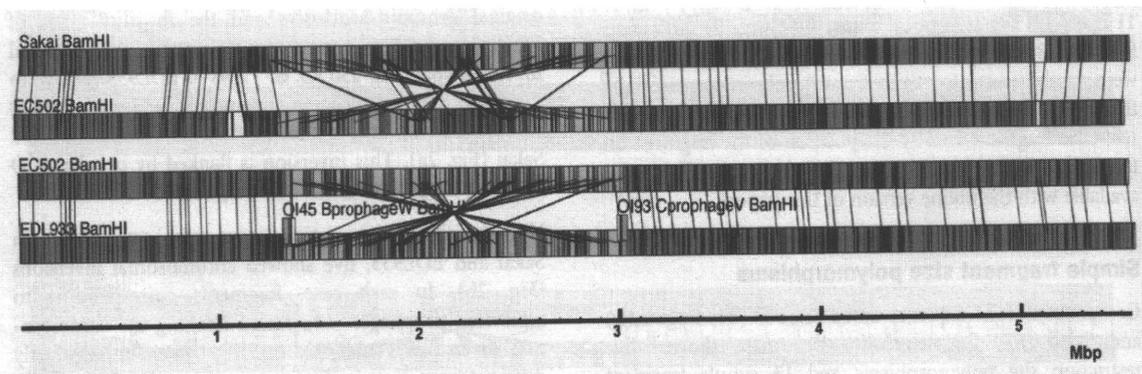


図4 オプティカルマッピングによる解析例

図は *E. coli* O157:H7 Sakai 株、EDL933 株、EC502 株のゲノムの一部を BamHI で切断し、オプティカルマッピングで解析したもの。

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)

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 分担研究報告書

分担研究者	林 賢一	滋賀県衛生科学センター	所長
研究協力者	石川和彦	滋賀県衛生科学センター	専門員
研究協力者	安田奈央	滋賀県衛生科学センター	技師

要旨

全国の地方衛生研究所では、食中毒事例、食品の汚染調査等において分離された有害衛生微生物が保管されている。主な有害衛生微生物を策定し、本研究班で行う解析に使用する菌株を収集するため、拠点となる地方衛生研究所を策定した。研究班で扱う主要な衛生有害微生物としては、サルモネラ、腸管出血性大腸菌および腸炎ビブリオとし、それぞれの収集拠点機関として、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、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。サルモネラについては保管菌株のうち219株を選定し、分子疫学解析等の対象とすることとした。

A. 研究目的

食品流通が多様化し、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には、公衆衛生上重要視されている有害微生物に関しての科学的解析情報を集約することが極めて重要である。

その手法として、国立の試験研究機関である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等の食品安全関係機関の間でネットワークシステムを構築することが、効率的かつ効果的である。全国の地方衛生研究所では、食中毒事例や有症苦情事例において食中毒菌などの有害衛生微生物の検索を行うとともに、食中毒予防の観点から、市販食品中などから有害衛生微生物の検査も行っている。

全国の地方衛生研究所のネットワークを活用するとともに、国立試験研究機関と地方衛生研究所のネットワークの構築について検討したので報告する。

B. 研究方法

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に際しては、全国の地方衛生研究所から発行されている年報（所報：業務の概要、調査研究論文等を掲載）等を参考にして、有害衛生微生物の分離状況などの資料を収集した。また、地方衛生研究所間の地区分けの状況を考慮し、主要な有害衛生微生物の収集拠点機関を選定した。

C. 研究結果

1. 地方衛生研究所の組織

地方衛生研究所は、地方衛生研究所設置要綱（最終改正：1997年3月14日付け発健政第26号）により全国の地方自治体に設置されている機関で、衛生行政の科学的かつ技術的中核機関として、関係行政機関と緊密な連携の下に、①調査研究、②試験検査、③研修指導および④公衆衛生情報の解析・提供の業務を行っている。

地方衛生研究所は全国に77機関あり、これ

らの機関で地方衛生研究所全国協議会という組織を構築し、表1のとおり、①北海道・東北・新潟地区(12機関)、②関東・甲・信・静地区(21機関)、③東海・北陸地区(8機関)、④近畿地区(14機関)、⑤中国・四国地区(10機関)および⑥九州地区(12機関)の6ブロックに分割されている。また、全国の地方衛生研究所からは、年報が発行されており、有害衛生微生物の分離状況をはじめ、解析情報などの論文も掲載されている。

一方、1995年から、全国の中央卸売市場を管轄する全国の自治体19~20カ所程度を対象に「食品中の食中毒汚染実態調査」が厚生労働省の委託事業として行われており、これらの食中毒菌の汚染実態等を参考にして特定した。

すなわち、本研究で対象とする有害微生物を、サルモネラ、腸管出血性大腸菌および腸炎ビブリオとし、サルモネラの収集拠点機関として滋賀県衛生科学センターを、腸管出血性大腸菌の収集拠点機関として福岡県保健環境研究所、ならびに腸炎ビブリオの収集拠点機関として秋田県健康環境センターとした。

D. 考察

全国の地方衛生研究所が発行している年報によると、各地方衛生研究所では食中毒事例や有症苦情事例において食中毒菌などの有害微生物検査を行うとともに、食中毒予防の基礎資料とするため、市販食品から有害衛生微生物の汚染実態調査も行っている。したがって、各地の衛生研究所では、これらの食品などから分離された病原体を保管し、血清型の推移、パルスフィールドゲル電気泳動などの細菌学的疫学解析に使用されている状況が伺える。

滋賀県衛生科学センターでは、国の事業として「病原体検出情報」が開始された時期(1982年)から、当時、腸管系病原菌として最も多く分離され、かつ発生動向調査として重要視されていたサルモネラの収集を病院検査室等の協力を得て開始され、その状況を当

所所報に論文として報告してきた(横田ら:1980、木下ら:1982、松根ら:1999、高木ら:2006・2007、安田ら:2009)。保存されているサルモネラ株は、1982年から当所、保健所あるいは県内の病院検査室などで分離された食品あるいはヒト由来株である。当所には約1,000株のサルモネラが保管されていることから、サルモネラの収集拠点機関としては、当所(滋賀県衛生科学センター)が担うこととした。保管株のうち219株が選定され、国立感染症研究所(泉谷分担研究者)において、本研究期間を通して行われる分子疫学的解析等に供試される予定である。

一方、厚生労働省から委託されている「食品の食中毒菌汚染実態調査」の成績(2010年度の調査結果は、2011年3月30日付け食安監発0330第1号により全国各地の衛生主管部長あて通知)をみると、表2に示したように、2008~2010年度の傾向としては、野菜では大腸菌の汚染が著しく、一部にはサルモネラが、食肉(生肉、タタキ)では多くの検体から大腸菌が検出され、鶏肉を中心にサルモネラ、カンピロバクターが、また食肉の一部(生レバー、ミンチ肉等)では腸管出血性大腸菌が検出されている。

本研究班では、サルモネラ、腸管出血性大腸菌および腸炎ビブリオを分子疫学等の解析を行う有害衛生微生物とすることから、これらの菌株を収集する拠点地方衛生研究所を地区別に偏りを避けて選定した。すなわち、腸管出血性大腸菌については九州地区から福岡県保健環境研究所を、腸炎ビブリオの収集拠点としては、北海道・東北・新潟地区から秋田県健康環境センターを選定したところである。次年度には、これらの地方衛生研究所が菌株収集の拠点になり、菌株の収集かつ分子疫学的解析等が行われることと期待される。

E. 結論

食品中の有害衛生微生物に関しての科学的解析情報を集約し、国立試験研究期間と地方衛生研究所の間で、効果的かつ効率的に共有

するライブラリーシステムを構築するために、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。

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) 安田奈央, 児玉弘美, 宮下康雄, 石川和彦, 林 賢一: 過去10年間の滋賀県におけるサルモネラの発生動向. 第31回日本食品微生物学会学術総会, 2011年、大津市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 地方衛生研究所全国協議会会員名簿

平成22年4月1日現在

地区	名 称	郵便番号	所 在 地	T E L	F A X
北海道	北海道立衛生研究所	060-0819	札幌市北区北19条西12丁目	011-747-2718	011-736-9476
	札幌市衛生研究所	003-8505	札幌市白石区菊水9条1丁目5-22	011-841-2341	011-841-7073
	函館市衛生試験所	040-0001	函館市五稜郭町23番1号	0138-32-1540	0138-32-1505
	青森県環境保健センター	030-8566	青森市東造道1丁目1番1号	017-736-5411	017-736-5419
	秋田県健康環境センター	010-0874	秋田市千秋久保田町6番6号	018-832-5005	018-832-5938
	岩手県環境保健研究センター	020-0852	盛岡市飯岡新田1-36-1	019-656-5666	019-656-5667
	宮城県保健環境センター	983-0836	仙台市宮城野区幸町4丁目7番2号	022-257-7181	022-257-7194
	仙台市衛生研究所	984-0002	仙台市若林区卸町東2丁目5番10号	022-236-7722	022-236-8601
	山形県衛生研究所	990-0031	山形市十日町1丁目6番6号	023-627-1358	023-641-7486
	新潟地区	福島県衛生研究所	960-8560	福島市方木田字水戸内16番6号	024-546-7104
新潟県保健環境科学研究所		950-2144	新潟市西区曾和314番1号	025-263-9411	025-263-9410
新潟市衛生環境研究所		950-2023	新潟市西区小新2151番地1	025-231-1231	025-230-5818
関東甲信静地区	茨城県衛生研究所	310-0852	水戸市笠原町993番2号	029-241-6652	029-243-9550
	栃木県保健環境センター	329-1196	栃木県宇都宮市下岡本町2145番13号	028-673-9070	028-673-9071
	宇都宮市衛生環境試験所	321-0974	宇都宮市竹林町972番地	028-626-1119	028-626-1121
	群馬県衛生環境研究所	371-0052	前橋市上沖町378	027-232-4881	027-234-8438
	埼玉県衛生研究所	338-0824	さいたま市桜区上大久保639番1号	048-853-4995	048-840-1041
	さいたま市健康科学研究センター	338-0013	さいたま市中央区鈴谷7丁目5番12号	048-840-2250	048-840-2267
	千葉県衛生研究所	260-8715	千葉市中央区仁戸名町666番2号	043-266-6723	043-265-5544
	千葉市環境保健研究所	261-0001	千葉市美浜区幸町1丁目3番9号	043-238-1900	043-238-1901
	東京都健康安全研究センター	169-0073	東京都新宿区百人町3丁目24番1号	03-3363-3231	03-3368-4060
	足立区衛生試験所	120-0011	東京都足立区中央本町1丁目5番3号	03-3880-5370	03-3880-6998
	杉並区衛生試験所	168-0072	東京都杉並区高井戸東3丁目20番3号	03-3334-6400	03-3334-6232
	神奈川県衛生研究所	253-0087	茅ヶ崎市下町屋1丁目3番1号	0467-83-4400	0467-83-4457
	横浜市衛生研究所	235-0012	横浜市磯子区滝頭1丁目2番17号	045-754-9800	045-754-2210
	川崎市衛生研究所	210-0834	川崎市川崎区大島5丁目13番10号	044-244-4985	044-246-2606
	横須賀市健康安全科学センター	238-0006	横須賀市日の出町2丁目14番地	046-822-4057	046-822-5540
	相模原市衛生試験所	252-0236	相模原市中央区富士見1丁目3番41号	042-769-8348	042-750-4664
	山梨県衛生環境研究所	400-0027	甲府市富士見1丁目7番31号	055-253-6721	055-253-5637
	長野県環境保全研究所	380-0944	長野市大字安茂里字米村1978番地	026-227-0354	026-224-3415
	静岡県環境衛生科学研究所	420-8637	静岡市葵区北安東4丁目27番2号	054-245-0201	054-245-7636
	静岡市環境保健研究所	422-8072	静岡市駿河区小黒1丁目4番7号	054-285-2131	054-283-3119
浜松市保健環境研究所	435-8642	浜松市東区上西町939-2	053-411-1311	053-411-1313	
東海北陸地区	富山県衛生研究所	939-0363	富山県射水市中太閤山17丁目1番	0766-56-5506	0766-56-7326
	石川県保健環境センター	920-1154	金沢市太陽が丘1丁目11番地	076-229-2011	076-229-1688
	福井県衛生環境研究センター	910-8551	福井市原目町39番4号	0776-54-5630	0776-54-6739
	愛知県衛生研究所	462-8576	名古屋市北区辻町字流7番6号	052-910-5618	052-913-3641
	名古屋市衛生研究所	467-8615	名古屋市瑞穂区萩山町1丁目11番地	052-841-1511	052-841-1514
	岐阜県保健環境研究所	504-0838	岐阜県各務原市那加不動丘1丁目1番地	058-380-2100	058-371-5016
	岐阜市衛生試験所	500-8881	岐阜市青柳町5丁目2番地	058-253-5156	058-253-5158
三重県保健環境研究所	512-1211	四日市市桜町3684-11	059-329-3800	059-329-3004	

地区	名 称	郵便番号	所 在 地	T E L	F A X
近畿地区	滋賀県衛生科学センター	520-0834	大津市御殿浜13番45号	077-537-3050	077-537-5548
	京都府保健環境研究所	612-8369	京都市伏見区村上町395番地	075-621-4067	075-612-3357
	京都市衛生環境研究所	604-8845	京都市中京区壬生東高田町1番地2	075-312-4941	075-311-3232
	大阪府立公衆衛生研究所	537-0025	大阪市東成区中道1丁目3番69号	06-6972-1321	06-6972-2393
	大阪市立環境科学研究所	543-0026	大阪市天王寺区東上町8番34号	06-6771-8331	06-6772-0676
	堺市衛生研究所	590-0953	堺市堺区甲斐町東3丁目2番8号	072-238-1848	072-227-9991
	東大阪市環境衛生検査センター	578-0947	東大阪市西岩田3-3-2	06-6787-5021	06-6787-7404
	兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター	652-0032	神戸市兵庫区荒田町2丁目1番29号	078-511-6640	078-531-7080
	神戸市環境保健研究所	650-0046	神戸市中央区港島中町4丁目6番地	078-302-6197	078-302-0894
	姫路市環境衛生研究所	670-0931	姫路市坂田町3番地	079-289-1855	079-289-1899
	尼崎市立衛生研究所	661-0012	尼崎市南塚口町4丁目4番8号	06-6426-6355	06-6428-2566
	奈良県保健環境研究センター	630-8131	奈良市大森町57番6号	0742-23-6175	0742-27-0634
	和歌山県環境衛生研究センター	640-8272	和歌山市砂山南3丁目3番45号	073-423-9570	073-423-8798
	和歌山市衛生研究所	640-8422	和歌山市松江東3丁目2番67号	073-453-0055	073-454-7831
中国・四国地区	鳥取県衛生環境研究所	682-0704	鳥取県東伯郡湯梨浜町南谷526-1	0858-35-5411	0858-35-5413
	島根県保健環境科学研究所	690-0122	松江市西浜佐陀町582番地1号	0852-36-8181	0852-36-8171
	岡山県環境保健センター	701-0298	岡山市南区内尾739番1号	086-298-2681	086-298-2088
	広島県立総合技術研究所 保健環境センター	734-0007	広島市南区皆実町1丁目6番29号	082-255-7131	082-252-8642
	広島市衛生研究所	733-8650	広島市西区商工センター4丁目1番2号	082-277-6575	082-277-0410
	山口県環境保健センター	753-0821	山口市葵2丁目5番67号	083-922-7630	083-922-7632
	香川県環境保健研究センター	760-0065	高松市朝日町5丁目3番105号	087-825-0400	087-825-0408
	徳島県保健環境センター	770-0941	徳島市万代町5丁目71番地	088-625-7751	088-625-1732
	愛媛県立衛生環境研究所	790-0003	松山市三番町8丁目234番地	089-931-8757	089-947-1262
高知県衛生研究所	780-0850	高知市丸の内2丁目4番1号	088-821-4960	088-872-6324	
九州地区	福岡県保健環境研究所	818-0135	太宰府市大字向佐野字迎田39番地	092-921-9941	092-928-1203
	福岡市保健環境研究所	810-0065	福岡市中央区地行浜2丁目1番34号	092-831-0660	092-831-0726
	北九州市環境科学研究所	804-0082	北九州市戸畑区新池1丁目2番1号	093-882-0333	093-871-2535
	佐賀県衛生薬業センター	849-0925	佐賀市八丁畷町1番20号	0952-30-5009	0952-30-5033
	長崎県環境保健研究センター	856-0026	長崎県大村市池田2丁目1306番地11	0957-48-7560	0957-48-7570
	長崎市保健環境試験所	852-8104	長崎市茂里町2番34号	095-846-3163	095-846-4103
	大分県衛生環境研究センター	870-1117	大分市高江西2丁目8番	097-554-8980	097-554-8987
	熊本県保健環境科学研究所	869-0425	宇土市栗崎町1240-1	0964-23-5771	0964-23-5260
	熊本市環境総合研究所	862-0946	熊本市画図町所島404番地1	096-379-2511	096-379-7783
	宮崎県衛生環境研究所	889-2155	宮崎市学園木花台西2丁目3番2号	0985-58-1410	0985-58-0930
	鹿児島県環境保健センター	892-0853	鹿児島市城山町1番24号	099-224-2612	099-224-2614
	沖縄県衛生環境研究所	901-1202	沖縄県南城市大里字大里2085番地	098-945-0781	098-945-9366

地方衛生研究所全国協議会事務局:群馬県衛生環境研究所 TEL 027-232-4881 FAX 027-234-8438

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)

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
分担研究報告書

研究分担者 小西 良子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
協力研究者 高橋 治男 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
渡辺麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
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

要旨

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。この様な状況の中で、国立試験研究機関と地方衛生研究所などの間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し、ヒトへの健康被害を防止することを目的とする。

そこで、

- 1) 食品中の有害カビを対象としたライブラリーシステム等の構築
- 2) ヒトへの有害性を持つ真菌の DNA 抽出効率検討に関する研究
- 3) 黒コウジカビ（アスペルギルス ニガー）のフモニシン産生能の検討を検討した。

1)では地方衛生研究所を対象にアンケートを実施し、現時点で必要な情報は何かを明らかにし、ライブラリー構築の拠点となる地方衛生研を選定した。2)では、カビの同定方法として、簡便性・迅速性・客観性に優れた分子生物学的手法を開発し、簡便に効率よく DNA を抽出する方法は、Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) 法とビーズ破砕の併用法であることを明らかにしてきた。3)では汚染事例から分離された株と醸造株などについて、フモニシンの産生の検討を行い、現在のところ産生能は確認されていないが今後培地等を検討し、より詳細な検討を行う。

A. 目的

1) 食品中の有害カビを対象としたライブラリーシステム等の構築

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。一方、近年、地方衛研におけるカビの検査担当者の退職などにより、検査体制の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間で食の安全に危害を及ぼすカビの情報を、効率的かつ効果的に共有するリスクプロファイルとネットワークシステムを構築し、ヒトへの健康被害を防止する。

2) ヒトへの有害性を持つ真菌の DNA 抽出効率検討に関する研究

カビの同定方法は、これまで形態学的手法が主であったが、形態学的差異を識別するのに経験が求められるうえ、時間を要することから、近年、簡便性・迅速性・客観性に優れた分子生物学的手法はカビの分野でも、汎用されてきている。真菌はその細胞構成成分の特徴から DNA 抽出が比較的困難であることが知られ、過去、多くの DNA 抽出法が検討されてきた。簡便に効率よく DNA を抽出する方法として、これまで、液体培養で短時間に大量に得た菌体を用いた、Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) 法とビーズ破碎の併用法であることを明らかにしてきたが、菌種によって抽出効率には差が見られることがある。そこで、これまで未検討であったヒトへの有害性を持つ菌種へも CTAB 法とビーズ破碎の併用法を用いて調べた。

3) 黒コウジカビ (アスペルギルス ニガー) のフモニシン産生能の検討

黒コウジカビ (アスペルギルス ニガー) は、食品汚染カビとして最も普遍的に認められるカビの一つで、泡盛などの醸造に加え、アミラーゼなどの酵素剤など食品工業的に極めて重要な菌である。近年、このカビにオクラトキシン、フモニシンのカビ毒産生性が相次いで報告された。特に、生コーヒー豆などから分離された株は、その大部分がフモニシン産生を有すると報告された。そこで、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

の産生の検討を加えた。

B. 研究方法

1) 食品中の有害カビを対象としたライブラリーシステム等の構築

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 (資料 1) 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、その結果をまとめる。2) 結果の送付は、事前に地研担当者などと mail で連絡をとり、連携体制を確立しながら進める。3) 主な食品汚染カビ形態学的、生理学的特徴に関する情報を掲載したリスクプロファイルの構成などの大枠について決める。

2) ヒトへの有害性を持つ真菌の DNA 抽出効率検討に関する研究

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*)、マラセツィア 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 プロリフェイタム (*Fusarium proliferatum*)、計 4 株を供試株として用いた。それらの株を 25°C で 65 から 70 時間振盪培養後、集菌し、その凍結菌体を試料とした。抽出には、CTAB 法に加え、比較対照として、フェノールや塩化ベンジルなど危険な有機溶液を使わないことなどの利点がある DNeasy Plant Tissue Kit 法を用いた。DNA の濃度および精製度は、それぞれ波長 260nm、ならびに 260 nm と 280 nm 波長における吸光度から算出した。OD_{260 nm} の値から濃度を算出した。また、さらに、DNA 精製度が分子生物学の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) 黒コウジカビ (アスペルギルス ニガー) のフモニシン産生能の検討

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。それらの株を、白米 20 g に水を 15 ml 加えた培地を滅菌して調製した培地に接種し、25℃で 1 週間培養した。培養後、メタノール：水 (3:1) を加え、さらにポリトロンでホモジュネートし、抽出後、その濾液を試験液とした。それらの試験液を、LCMS/MS でフモニシンの分析を行った。

C. 研究結果および考察

1) 食品中の有害カビを対象としたライブラリーシステム等の構築

全地研 (77 機関) を対照にアンケート配布を配布し、74 機関から回答 (回収率 約 96%) をえた。各地研からの結果は機関毎にまとめ (資料 2)、また、全体的な集約も行った (資料 3) から、1) 依頼検査を受けている機関は、過半数 (約 55%) に達した。2) リスクプロファイルは検査に活用できる (64%)、あるいは、ライブラリーシステムを活用したい (68%) などの、ライブラリーシステムへの高い期待が寄せられた。4) プロファイルの内容構成としては、菌分離、同定からカビ毒産生など多種多様な要望があった。5) リファレンスセンター的な機関の設置や研修コース開設などについても要望が寄せられた。検査を受けていないと回答した機関で、その理由として、① 細菌など他の微生物試験へのコンタミなど、設備構造上問題 (10 機関)、② 経験者不在。人的余裕がない (7 機関) ③ 需要がない。(2 機関) であった。理由①と②は密接に関連していることから、設備、人材面での改善が図られれば、依頼検査受託はさらに増加すると考えられる。また、受けていない (B)、その他 (C) と答えた機関の中でも、顕微鏡観察程度の観察を行っていると付記した機関が 8 機関 (3 県 5 市) あった。

2) ヒトへの有害性を持つ真菌の DNA 抽出効率検討に関する研究

2 抽出方法での菌体 100 mg から抽出した DNA 量を菌体 1 g あたりから得られた DNA 収量に換算し、3 回繰り返しの DNA 収量の平均値を表 1 に示した。

CTAB 法とビーズ破碎の併用法では、その収量が、454.1 ~ 2217.8 $\mu\text{g/g}$ 、今回用いた 4 菌種でも大量の 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最低値は 13.4 ~ 16.5 $\mu\text{g/g}$ で、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。また、得られた DNA 抽出物の精製度は、吸光度比率の 3 回測定の前平均値を表 1 に示した。この結果、全ての菌種・抽出方法の組み合わせから全体として良い精製度の DNA 抽出物が得られていたということが示された。

分子生物学的実験的な精製度の確認は、得られた全ての DNA 抽出物を鋳型として PCR を行った (図 1)。2 抽出方法を用いた 4 菌種の 3 回の繰返し実験の全てにおいて、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。また、DNA 抽出物の含む高分子 DNA の割合を確認するために、菌体 100 mg あたりで得られた DNA 抽出物 100 μl のうち 4 μl を用いてアガロースゲル電気泳動を行った (図 1)。その結果、いずれの抽出法によって得られた DNA も、いずれの菌種においても比較的高分子 DNA の占める割合が多いこと、また RNA は十分除去されていることも示された。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。DNase Plant Tissue kit は PCR などといったそれほど DNA 量を必要としない実験に用いるには簡便で安全性の高い抽出方法と言える。

3) 黒コウジカビ (アスペルギルス ニガー) のフモニシン産生能の検討

結果を表 1 に示す。まず、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 (表 2)。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。アスペルギルス ニガー株の 60~70% はフモニシンを産生するという海外の報告もあり、このカビによる汚染食品は、フモニシン汚染の可能

性があり、今後、注意をはらう必要がある。また、醸造用黒麹カビについても、更なる検討が必要と言える。

D. 結論

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。

地研レベルにおけるライブラリーシステムは、これまでも構築されてきたが、実際にはほとんど活用されていない。この原因としては、ネットワークの構築が不十分であることやリファレンスセンターが不明確であるためと考えられる。

これらのことから、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。

E. 研究発表

発表論文

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 抽出した真菌DNAの収量および精製度

分類群	菌種	CTAB法/ビーズ		DNeasy Plant Tissue Kit /ビーズ	
		OD 260/280	DNA収量 (μg/菌体 1 g)	OD 260/280	DNA収量 (μg/菌体 1 g)
		平均値 ± SD*1	平均値 ± SD	平均値 ± SD	平均値 ± SD
カビ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.71 ± 0.02	1116.0 ± 180.4	1.69 ± 0.16	13.4 ± 5.1
	<i>Fusarium proliferatum</i>	1.78 ± 0.02	454.1 ± 47.3	1.72 ± 0.03	15.8 ± 3.7
酵母	<i>Candida albicans</i>	1.71 ± 0.05	851.4 ± 101.4	1.81 ± 0.06	16.5 ± 13.7
	<i>Malassezia furfur</i>	1.89 ± 0.02	2217.8 ± 214.4	1.78 ± 0.04	14.0 ± 3.1

*1: Standard deviation

表2 食品汚染*Aspergillus niger*および醸造用黒麹菌のフモニシン産生性

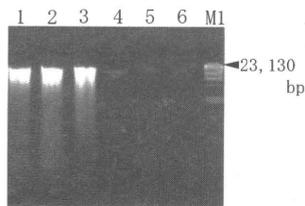
菌種名*1	分離源など	菌株 No.	米培地 培養日数	産生量*4 (ug/フラスコ) FB1	産生量 (ug/フラスコ) FB2
<i>Aspergillus foetidus</i>	泡盛醸造用黒麹菌	IFM*2 59443	7	N.D.	N.D.
<i>Aspergillus niger</i>	市販食品(パン)汚染カビ	IFM 59749	7	N.D.	7.6
<i>Aspergillus niger</i>	国産干しブドウ	IFM 59773	7	N.D.	N.D.
<i>Aspergillus niger</i>	フモニシンB2産生陽性 対照株	MAFF*3 425037	3	N.D.	49.7
			5	N.D.	99.5
			7	N.D.	116
			14	N.D.	69.5

*1: チトクロームb遺伝子型配列より同定

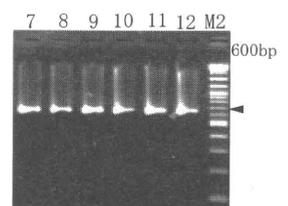
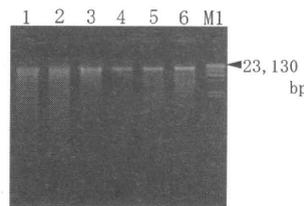
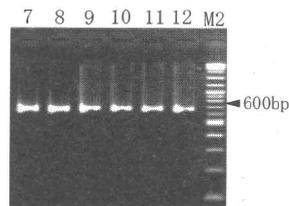
*2: 千葉大学真菌医学研究センター保存株

*3: 農林水産省保存株 *4: 検出下限(ppb): 1.5 定量下限(ppb): 4.9

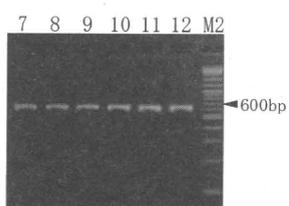
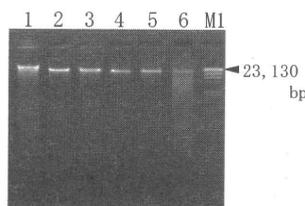
A. *Aspergillus fumigatus*



B. *Fusarium proliferatum*



C. *Candida albicans*



D. *Malassezia furfur*

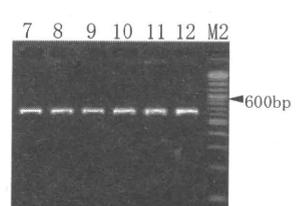
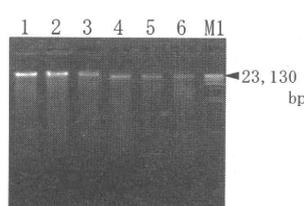


図1 抽出した真菌 DNA およびこれらをテンプレートとして用いた PCR 増幅産物のアガロースゲル電気泳動像

レーン 1-3 : CTAB 法とビーズ破碎の併用法によって抽出された DNA、レーン 4-6 : DNeasy Plant Tissue Kit とビーズ破碎の併用法によって抽出された DNA、レーン 7-9 : CTAB 法とビーズ破碎の併用法によって抽出された DNA をテンプレートとした PCR 増幅産物、レーン 10-12 : DNeasy Plant Tissue Kit とビーズ破碎の併用法によって抽出された DNA をテンプレートとした PCR 増幅産物、レーン M1 : 分子マーカー-λ Hind (コスモバイオ株式会社, 東京)、レーン M2 : 分子マーカー-2-log DNA Ladder (New England Biolabs Japan Inc., 東京)

苦情食品に係るカビの検査体制に関する実態調査について（回答結果まとめ）

アンケート送付数：77 回答数：74（回収率 約96%）

（斜体書きは設問です）

問い2 貴所属においては、カビの発生もしくは発生が疑われる苦情食品の検査依頼を受け付けていますか。

「回答結果」

- A. 受けている（55%、41機関） B. 受けていない（26%、19機関）
C. その他（19%、14機関）

大部分の機関が依頼検査を受けていた。この他、その他（C）と回答した中で、行政依頼検査のみ受けていると回答した機関が、3機関（1県2市）あった。

受けていないと回答した機関で、その理由として、① コンタミなど設備構造上問題（10機関）、②経験者不在。人的余裕がない（7機関）③需要がない。（2機関）であった。理由①と②は密接に関連していると見られることから、設備、人材面での改善が図られれば、依頼検査受託はさらに増加すると考えられる。

また、受けていない（B）、その他（C）と答えた機関の中でも、顕微鏡観察程度の観察を行っていると付記した機関が8機関（3県5市）あった。

問い3 カビの検査を担当する部署がありますか、あるいは職員を配置していますか。

「回答結果」

- A. 部署がある（他部署内に所属する場合も含みます）（45%、33機関）
B. 配置していない（41%、30機関）
C. その他（14%、11機関）

その他（C）と回答した機関は、兼務、あるいは必要に応じ体制をとる機関がほとんどであった。

問い4 カビに係る依頼検査を実施していない所属においては、検査の必要が生じた場合にどのように対処していますか。（複数回答可。支障のない場合の機関名も記入願います）

（回答：機関数：28、回答数36）

- A. 民間の検査機関を紹介する（22%）
B. 他の行政検査機関に依頼する（14%）
C. 検査体制がないことを苦情者に説明する（36%）
D. その他（28%）

その他（D）では、できる範囲内での検査を行ったり、行政側との協議のうえに対応など、対応は多様であった。

問い5 問い2.において、「A. 依頼を受理している」と回答された方のみご回答ください。

6. 今回の事業においては、主要な食品汚染カビの形態的特徴及びカビ毒産生性等の主な生理学的特徴を記載した地方衛生研究所等の行政機関が利用できるリスクプロファイルの作成を予定しています。

このファイルの検査への活用についてのご意見をお伺いします。

A. 検査に活用できる

（ 活用例・案などがありましたらお書き下さい。 ）

B. 検査に活用できない

（ 理由などについて、ご回答ができましたらお願い致します。 ）

C. ファイルあっても検査はできない

（ 状況などについて、ご回答ができましたらお願い致します。 ）

7. 今回の事業では、食品の主要な汚染カビの形態的な特徴と、カビ毒産生性などの主な生理学的特徴を記載したデータベースを作成し、アクセスによる活用及びデータを集積できるライブラリーシステムの構築を目標としています。つきましては、このファイルを検査などの苦情処理に活用したいと思いますか？

A. 活用したい

B. 興味はあるが検査はできない

C. 活用は無理と思う

8. このファイルはアクセスによる活用だけでなく、その後の新たな情報を蓄積できるシステムをも加えたいと思います。新たな情報を加えることにご協力頂けますか？

A. 協力する

B. 協力は無理

C. その他（ご意見をお書きください）

9. その他

苦情食品に係るカビの検査体制及びリスクプロファイル作成並びにデータベースの構築等に関するご意見など、またその他のご意見がございましたらご記入をお願いします。

（ ）

ご協力ありがとうございました。

検査結果をどのように管理されていますか。管理されている場合、管理方法を具体的に記入願います。

「回答結果」

- A. 処理簿等により管理している (90%) B. 管理していない (2%)
C. その他 (7%)

問い6 今回の事業においては、主要な食品汚染カビの形態的特徴及びカビ毒産生性等の主な生理学的特徴を記載した地方衛生研究所等の行政機関が利用できるリスクプロファイルの作成を予定しています。

このファイルの検査への活用についてのご意見をお伺いします。

「回答結果」

- A. 検査に活用できる (64%) B. 検査に活用できない (15%)
C. ファイルがあっても検査はできない (20%) 無回答 (1%)

設問として回答を求めていませんでしたが、リスクプロファイルの内容として要望があったのは、分離方法から同定にいたるまでの基礎的な検査法(5機関)から遺伝子検査(2機関)までかなり幅広かったが、写真などを多用したわかりやすい同定法を求めるものが多数であった。その他、食品別事例集など、汚染食品に関する情報の要望も有った。

問い7 今回の事業では、食品の主要な汚染カビの形態的な特徴と、カビ毒産生性などの主な生理学的特徴を記載したデータベースを作成し、アクセスによる活用及びデータを集積できるライブラリーシステムの構築を目標としています。つきましては、このファイルを検査などの苦情処理に活用したいと思いませんか？

「回答結果」

- A. 活用したい (68%) B. 興味はあるが検査はできない (28%)
C. 活用は無理と思う (4%)

問い8 このファイルはアクセスによる活用だけでなく、その後の新たな情報を蓄積できるシステムをも加えたいと思います。新たな情報を加えることにご協力頂けますか？

「回答結果」

- A. 協力する (43%) B. 協力は無理 (28%)
C. その他 (ご意見をお書きください) (26%) 無回答 (3%)

問い9 その他

苦情食品に係るカビの検査体制及びリスクプロファイル作成並びにデータベースの構築等に関するご意見など、またその他のご意見がございましたらご記入をお願いします。

回答機関数：46%

設問として回答を求めていないが、カビ検査のリファレンスセンター的な組織の設置、あるいは活動の要望が寄せられた。