

図3. *ctxB*アライメント図

- 1: BI2-4, 2: BI3-4, 3: BI4-1, 4: BI7-3, 5: BR19-2, 6: BR19-3, 7: BR29-1  
8: Classical (Genotype1), 9: El Tor (Genotype3)  
10: Australian strain (Genotype2)

### 3) *ribosomal DNA* の塩基配列に基づく菌種同定

16S rDNA の塩基配列解析による菌種同定を行ったところ、*V. cholerae* と同定された株は BI4-1 の 1 株のみであり、BI2-4、BI3-4、BI7-3 の 3 株は *V. cholerae* と同じ *Vibrio* 属の他種の菌、BR19-2、BR19-3、BR29-1 の 3 株は *Aeromonas* 属の菌であると同定された (表 1)。これらの 7 株の 16S rDNA の配列を全塩基配列解析株である *V. cholerae* O1 El Tor N16961 と比較したところ、BI4-1 は相同性 100%であった一方、残りの 6 株は 90~94%という低い相同性であった。

### D. 考察

本研究は、El Tor 型 *V. cholerae* 分離用培地として用いられている PMT 寒天培地を用い、*V. cholerae* に類似した黄色いコロニーを計 65 株釣菌した。本実験の供試菌株 65 株の中には、*V. cholerae* のコロニーよりは大きさや色が少し異なるものも含まれていたが、環境水より分離した野生株であることが原因であると考えた。しかし、Primary-PCR を行うだけで明瞭なバンドが確認することが出来た BI4-1 は、*V. cholerae* に非常に類似したコロニー性状であったが、*ctxAB* の塩基配列解析を行った他の 6 株 (BI2-4、BI3-4、BI4-1、BI7-3、BR19-2、BR19-3、BR29-1) のコロニーに関しては、色や大きさの違いが多少見られた。

Nested-PCR まで行い、明瞭なバンドを得た 7 株については、*ctxAB* の塩基配列解析を行ったところ、3 株が Classical 型、4 株が El Tor 型であることから、本実験では新たな *ctxAB* の多型の検出には繋がらなかった。

*ctxA* と *ctxB* は CTX フェージ上に隣接

して存在しているとされる (Boyd et al., *Infect. Immun.* 68, 1507-13 [1999] & *J. Bacteriol.* 182, 5530-8 [2000])。しかし、今回、*ctxA* を標的とした Nested-PCR を行って明瞭なバンドを得ることが出来た 53 株全株が *ctxB* を標的とした Nested-PCR で明瞭なバンドを得ることが出来た訳ではない。また、*ctxA*、*ctxB* を各々保有しているにも関わらず、プライマーを組み合わせると予想されるサイズのバンドは得られないという株も存在した。これらの株に関しては、Boyd ら (*Infect Immun.* 68, 1507-13 [1999]) の報告の様に *ctxA*、*ctxB* が隣り合わせでセットとして存在しているのではなく、*ctxA* もしくは *ctxB* が欠損、もしくは ORF が逆位となっているなど、これまで *V. cholerae* や *V. mimicus* (Spira & Fedorka-Cray, *Infect. Immun.*, 45, 679-84 [1984]) が持つとされる *ctxAB* とは異なる位置関係にあるという可能性が考えられる。

本研究では、「環境中に存在し、将来コレラを引き起こす細菌の検出」という目的の下、7 回目の世界的流行の“発祥地”とされるインドネシアの環境水から菌を分離した。結果的には、コレラ毒素遺伝子保有の非コレラ菌株を環境中から発見することに成功した。この結果によって、これまで *V. cholerae*、*V. mimicus* が保有しているとされてきた *ctxAB* が、他の属や種にも伝播していることが示唆されるため、フェージの宿主領域を見直さなければならなくなる。しかし、*ctxAB* がどのようなフェージ上に存在しているのか、フェージが抜け落ちにくい培養条件は如何なるものなのかということなどについては未だ不明な点が多い。今後は、これらの詳細な解析を

表1. 16S rDNAのsequence解析による同定結果

Ac. No.	Strain No.	Taxon Identification by 16S rDNA sequence analysis
1	BI2-4	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (99%) <i>Vibrio alginolyticus</i> (99%) <i>Vibrio cholerae</i> (94%)
2	BI3-4	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (99%) <i>Vibrio harveyi</i> (99%) <i>Vibrio cholerae</i> (94%)
3	BI4-1	<i>Vibrio cholerae</i> (100%)
4	BI7-3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (99%) <i>Vibrio alginolyticus</i> (99%) <i>Vibrio cholerae</i> (94%)
5	BR19-2	<i>Aeromonas salmonicida</i> (99%) <i>Aeromonas hydrophila</i> (99%) <i>Vibrio cholerae</i> (99%)
6	BR19-3	<i>Aeromonas allosacchalophila</i> (100%) <i>Aeromonas sobria</i> (100%) <i>Vibrio cholerae</i> (90%)
7	BR29-1	<i>Aeromonas allosacchalophila</i> (100%) <i>Aeromonas sobria</i> (100%) <i>Vibrio cholerae</i> (90%)

行い、環境中には如何なる菌が存在しているのかを明らかにする必要がある。

#### E. 結論

インドネシアの環境水中には既知の *V. cholerae*, *V. mimicus* 以外の属種の菌でもコレラ毒素遺伝子を保有する菌株が存在する。

#### F. 健康危機情報

現段階で国民に緊急知らせた方がよい情報は無い。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
特になし

#### 2. 学会発表

1) 西堀友之、柴田裕介、Made Agus Hendrayana、大澤朗：インドネシア環境水より分離されたコレラ毒素遺伝子保有非コレラ菌株に関する研究、第45回腸炎ビブリオシンポジウム、抄録集 p.13（国立感染症研究所）（2011.10）

2) 西堀友之、柴田裕介、Made Agus Hendrayana、大澤朗：インドネシア環境水より分離されたコレラ毒素遺伝子保有非コレラ菌株に関する研究、第64回日本細菌学会関西支部総会、予稿集、p.23（大阪府立大学中百舌鳥キャンパス）（2011.11.19）

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特に無し

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

食材中の低濃度病原体を網羅的にスクリーニングする方法の食材を使った検証

研究分担者 江崎孝行 岐阜大学大学院教授  
研究協力者 大楠清文 岐阜大学大学院准教授

研究要旨：

食中毒を起こす多種類の病原体をスクリーニングする共通の増菌培地法を開発し、その利用法を検証した。サルモネラ、出血性大腸菌、セレウス菌、ビブリオでは 25g に 1 個を 4 時間培養で達成、リステリア、カンピロバクターは一夜培養で目標を達成した。冷凍肉はアルコバクターに 7 割が汚染、新鮮鶏肉は 8 割がカンピロバクターに汚染されていた。一般に使用されているボルトン増菌法は耐性菌のためわが国の鶏肉検査にはもはや適用できないことが実証された。

A. 研究目的

食品から病原体を検出する際、*Salmonella* や腸管出血性大腸菌では食材 25 中 1 個の病原体を検出することが求められる。このように微量な菌を検出するため、食品の検査指針では確定検査を終えるまでに約 1 週間必要であり、検査の迅速化が求められている。そこで我々は、培養と遺伝子検査を組み合わせることにより 1 日で汚染の有無を判定できる検査法を作成した。そのために食中毒の病原体を一つの培地で増菌し検査する新しい培地を考案し検査方法を構築した。本培地については一昨年の本研究会で

報告した。実際に食品検査において本培地（UFP:Universal Food Pathogen）Enrichment broth を利用する上で最も問題となるのは、検出に時間がかかるのは微好気性菌の *Campylobacter* である。*Campylobacter* を原因とする食中毒は細菌性食中毒の中でも発生件数が最も多いことが知られており、現在の食品検査指標では *Campylobacter* の増菌培養に Bolton 液体培地を用いることが基準となっている。しかしながら、この培地はウマ溶血液を使用するため、保存面で不経済である。また、血液は PCR 阻害となるため両培地は遺伝子検査には適さない。そこで我々が開発した血液を必要

としない、かつ炭酸ガスの添加も必要がないUFP 培地を用いて有用性を比較した。

## B. 研究方法

本研究では市販食肉・鶏糞からの *C. jejuni / coli* およびその類縁菌の検出について血液や炭酸ガスを使用していない本培地と標準的に使用されている Bolton 液体培地と同等の性能を有するか検討を行い、さらに実際の食品を使用して性能を評価した。

## C. 研究結果

*Campylobacter jejuni* (Type strain) を用いてUFP 培地と Bolton 液体培地および Preston 液体培地の性能を比較した。

培養 12 時間、24 時間で本培地は Preston 液体培地や Bolton 液体培地と同等に *Campylobacter* の増殖を支持する能力があることが分かった (図 1)。本培地では *Campylobacter* は 24 時間後に 10 万倍に増えることが確認できたので、25g の検体に存在する 1 個の *Campylobacter* を遺伝子検査法で検出するには 24 時間培養で達成できた。

市販食肉・鶏糞からの *C. jejuni / coli* およびその類縁菌の検出: 結果は表 1 に記載した。

培養法と遺伝子検査法の両法を比較検討した結果、遺伝子検査法の法が、検出率が高い

という結果になった。これは、ESBL 株をはじめとする  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の混在が、平板での *Campylobacter* の単離ができなかったためと考えられる。よって、我々が作成した増菌と遺伝子検査を組み合わせた方法は培養法よりも感度がよく、検査の迅速化をはかることができた。

## D. 考察

現在の一般的なスクリーニングプロトコルは real time PCR を利用した検査であるため現場で即座に検査することは難しい。そこで、安価で持ち運び可能な conventional PCR を利用して 30 分で遺伝子を増幅し、増幅産物を目視で識別判定できる核酸クロマトグラフィー検査法の確立を目指している。食品の検査は出荷前検査が重要で、4-6 時間で実施できれば、食品産業には重要な改革になる。一方、下痢症の診断では増菌は不要で直接クリニックで 30 分以内に判定できれば、診断後の適切な化学療法へとつながる。現有機器では増幅に 30 分かかるので、クリニックの診察が始まる前に結果を出す医療体制を構築することがでいる。現在の機器でも可能であるが、論理的には遺伝子増幅は 10 分で達成できるため、今後はさらに迅速で安価な検査体制の構築が必要になる。我々は技術的には多項目プライマーを使用したカクテル増幅法で増幅産物を確認する方法を試作しており、この方法が完成すれば 20 万円程度の低価

格機器で30分で遺伝子を増幅し、核酸クロマト法で5分で目視で結果を確認する方法を試作している。この方法が完成すれば、感染症や食肉検査をクリニックや小規模食品製造業者が自ら実施することが可能になるので、次年度の重要課題として完成させたいと希望している。

## E. 結論

無血清、無炭酸ガス環境で増幅する UFP 培地で *Campylobacter* が食材に 25g に 1 個いれば 24 時間で検出できる遺伝子検査法を作成した。UFP 培地は汎用されている Bolton 培地をつかった方法より、分離、検出に優れており、汎用されている Bolton 増菌培用法は耐性菌を抑制できないのでわが国の食肉検査にはもはや適していないことが実証された。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Zhang J, van Hung P, Hayashi M, Yoshida S, Ohkusu K, Ezaki T. 2011. DnaJ sequences of *Bacillus cereus* strains isolated from outbreaks of hospital infection are highly similar

to *Bacillus anthracis*. *Diag. Microbiol. Inf. Dis.* 270:307-315.

Pham Van Hung, Jiwei Zhang, Hayahi M, Yoshida S, Ohkusu K, Ezaki T. Genetic relatedness and identification of clinical strains of genus *Campylobacter* based on *dnaJ*, 16SrDNA, *groEL*, and *rpoB* gene sequences. *Microbiol Cult. Coll.* 2011;27:1-12.

Yamada Y, Ohkusu K, Yanagihara M, Tsuneoka H, Ezaki T, Tsuboi J, Okabayashi H, Suwabe A. Prosthetic valve endocarditis caused by *Bartonella quintana* in a patient during immunosuppressive therapies for collagen vascular diseases. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 2011;70(3):395-398.

Saito H, Iwamoto T, Ohkusu K, Otsuka Y, Akiyama Y, Sato S, Taguchi O, Sueyasu Y, Kawabe Y, Fujimoto H, Ezaki T. Butler R.: *Mycobacterium shinjukuense* sp. nov.; a slowly growing, nonchromogenic species isolated from human clinical specimens. *Int. Syst. Evol. Microbiol.* 2011;61:1927-1932.

大楠清文, 江崎孝行. 肺炎 臨床と研究の最新動向 遺伝子解析技術を用いた肺炎の起炎菌診断の実践, 医学のあゆみ 2011年 ; 237 巻 : 193-199.

江崎孝行, 水野卓也, 林将大, 吉田滋, 張継偉, 大楠清文. 【新たなゲノムベースの感染症診断-開発の現状、応用と展望-】 臨床所見から原因病原体を絞り込めない不明感染症の検査, 化学療法の領域 2011年 ; 29 巻 : 2006-2020

大楠清文, 江崎孝行. 遺伝子解析技術の新たな潮流と感染制御への適応, 日本化学療法学雑誌 2011年 ; 59 巻 : 441-453.

## 2. 学会発表

Ezaki, T., Hayashi, M, Takuya Mizuno T., Izumi Kanazawa, K. Asami Mori, and Kiyofumi Ohkusu. 1st Harpin International Symposium: Survival strategy of *Salmonella enterica* serovar Typhi during human infection Ist international Symposium on Salmonellosis. Harpin, May, China, 2011

Ezaki T. Screening of Environmental Human, Animal and Plant Pathogens in Soil and Water. 2011 International Conference on Environmental OMICS., Guangzhou

November 8 - 12, 2011

Ezaki T, Mizuno T, Hayashi M, Asami Mori, Shigeru Yoshida Izumi Kanazawa, and Kiyofumi Ohkusu . Shuffling Classification of genus *Escherichia* and *Shigella* for better Identification of *E. coli* and *Shigella* spp. after complete genome era. 46<sup>th</sup> Annual Joint Panel Meeting. Cholera & Other Bacterial Enteric Infections. December 13-15, Kolkata, India. 2011.

Ezaki, T., T. Mizuno, I. Kanazawa, M. Hayashi, S. Yoshida, J.W. Zhang, and K. Ohkusu. Shall We Spin out Classical Taxonomy of High Risk Pathogens Even after Complete Genome Era IUMS Sapporo, Japan. 2011.

Ezaki T. Quick respiratory panel assay for screening of bacterial and viral pneumonia. IUMS Symposium Sapporo, Japan. 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

## 1. 特許取得

核酸クロマトグラフ法を利用した肺炎原因菌の検出方法



PCT/JP2011/001934、

出願日：2011年3月30日、国際公開日

2011年10月6日

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

strain) 増殖曲線

表1 市販食肉・鶏糞からの*C. jejuni* / *coli* およびその類縁菌の検出結果

	UFP enrichment broth			Preston	Bolton
	Frozen chicken	Fresh chicken	Chicken stool	Fresh chicken	Fresh chicken
<i>C. jejuni</i>	9/89	39/50	29/40	41/50	9/50
<i>C. coli</i>	0/89	0/50	0/40	0/50	0/50
<i>C. fetus</i>	0/89	0/50	0/40	0/50	0/50
<i>A. butzleri</i>	39/89	0/50	0/40	0/50	7/50

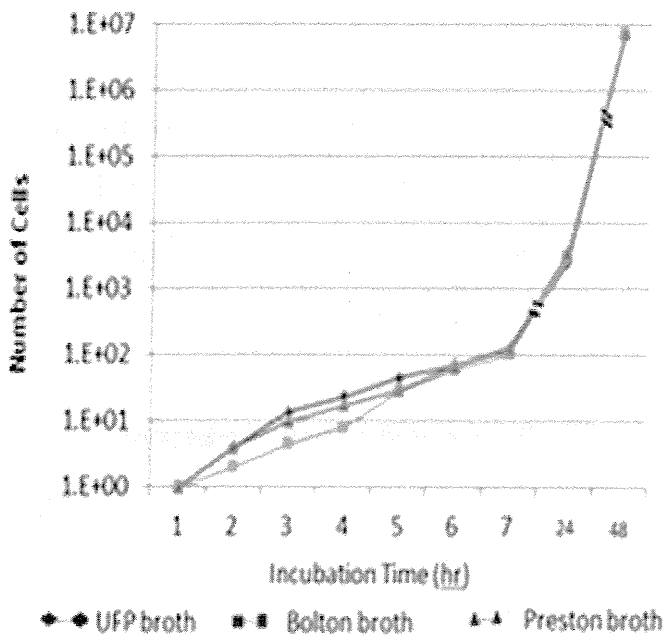


図1 3つの増菌培地の*Campylobacter jejuni* (type

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

次世代シーケンサの細菌性下痢症への応用

研究分担者 飯田 哲也 大阪大学微生物病研究所 特任教授

研究要旨：

本研究では、次世代シーケンサを用いバングラデシュ小児の糞便中の細菌叢の比較解析を行った。適正体重児に比べ低栄養児では糞便中の細菌フローラの多様性が低くなっていた。また、低栄養児においては偏性嫌気性菌群である Bacteroidetes が減少し、比較的好気的な Proteobacteria の比率が顕著に増加している傾向がみられた。特に Proteobacteria の中でも *Klebsiella* 属や *Escherichia* 属といった菌群の比率が顕著に高かった。このような偏った腸内フローラをもっていることが低栄養児の感染症などへの易感受性に関与している可能性がある。

A. 研究目的

本研究では、細菌性下痢症を中心とする感染症に対する次世代シーケンサを用いた迅速診断法を構築するとともに、原因未知症例において新規病原体の同定を目指すことを目的としている。さらに、細菌性下痢症の発病過程における病原菌と腸内細菌叢の動態について解析を行っている。本年度はこれらの第一段階として、バングラデシュの国際下痢症研究センターの研究者と共同研究を行い、小児の糞便中の細菌フローラについて解析を行った。

B. 研究方法

1) あきらかな疾病のみられないバングラデシュの小児（2歳から3歳）のうち、適正体重の小児7人と低栄養児7人から糞便サンプルを得、核酸を抽

出後 16S rDNA に対する PCR を行い、増幅産物を次世代シーケンサに供することにより糞便サンプル中の細菌叢の解析を行った。次世代シーケンサはロシュ社の GS-Junior を用いた。各検体平均 14,093 配列を得た。平均長は 293bp であった。得られた配列は既報 (Nakamura *et al.* 2011. *Exp. Biol. Med.* 236: 968-971.) に従い blast 解析を行い、サンプル中に含まれる細菌の組成を推定した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、ヒト臨床検体（糞便検体）を扱うので、「疫学研究に関する倫理指針」を遵守すべき研究に該当する。本研究については、バングラデシュ国際下痢症研究センターにおいて倫理承認ならびにインフォームドコンセントを得るとともに、大阪大学微生物病研究所生命研究倫理

委員会の承認を得ている。

### C. 研究結果

#### 1) 糞便フローラ解析

適正体重小児7人および低栄養児7人(いずれも採便前の2ヶ月前は抗菌薬投与なし)の糞便中の細菌フローラを次世代シーケンサを用いて解析をおこなった。平均 OTU (operational taxonomic unit) 数は適正体重児で546であったのに対し、低栄養児では310であった (Fig. 1)。このことは低栄養児に比べ適正体重児では糞便中の細菌の多様性が大きいことを意味する。

適正体重児および低栄養児の両者において、得られた配列の98-99%は Actinobacteria、Bacteroidetes、Firmicutes、Proteobacteria のいずれかの門に属していた。これら4つの門の比率は適正体重児と低栄養児で違いがみられた。適正体重児では Bacteroidetes と Firmicutes がそれぞれ44%であったのに対し、低栄養児では各々18%と32%であった。Proteobacteria は低栄養児で顕著に比率が高く、低栄養児で46%であったのに対し、適正体重児では5%であった。Actinobacteria の比率は適正体重児、低体重児でそれぞれ6%と1%であった。つまり適正体重児においては低栄養児と比較して、Bacteroidetes、Firmicutes および Actinobacteria はそれぞれ2.4倍、1.4倍、6倍高く、逆に Proteobacteria は低栄養児の方で9.2倍高いという結果になった (Fig. 2)。低栄養児では適正体重児に比べ *Klebsiella* 属が174倍、*Escherichia* 属が9倍と、腸内細菌科のうちヒトへの病気に関係する菌属の比率が顕著に高い傾向がみられた。

### D. 考察

本研究では、バングラデシュの小児において、適正体重児に比べ低栄養児では糞便中の細菌フローラの多様性が低くなっていることが明らかとなった。また、低栄養児においては偏性嫌気性菌群である Bacteroidetes が減少し、比較的好気的な Proteobacteria の比率が顕著に増加している傾向がみられた。特に Proteobacteria の中でも *Klebsiella* 属や *Escherichia* 属といった菌群の比率が顕著に高かった。*Klebsiella* 属や *Escherichia* 属といった菌群は、ヒトの疾患に関与する可能性のある細菌群である。低栄養児は一般に感染症などの疾患にかかりやすい傾向がある。それにはさまざまな原因が考えられるが、そのひとつにこのような偏った腸内フローラをもっていることが関与している可能性がある。この点については、今後検討していく必要がある。

### E. 結論

本研究により、低栄養児と適正体重児の腸内細菌フローラ(糞便中の細菌叢)に明らかな違いがあることが見出された。この腸内フローラの違いが小児の健康にどのような影響を及ぼしているかについて今後研究していく必要がある。

また、本研究により、ヒト糞便中の細菌フローラの組成の解析法を確立することができた。今後、この方法を用いることにより、細菌性下痢症を中心とする感染症に対する次世代シーケンサを用いた迅速診断法を構築するとともに、原因未知症例において新規病原体の同定を進めていく。さらに、

細菌性下痢症の発病過程における病原菌と腸内細菌叢の動態について解析を行っていく計画である。

F. 健康危機情報  
なし

G. 研究発表  
1. 論文発表

Monira, S., S. Nakamura, K. Gotoh, K. Izutsu, H. Watanabe, H., N. H. Alam, H. P. Endtz, A. Cravioto, S. I. Ali, T. Nakaya, T. Horii, T., T. Iida, and M. Alam. 2011. Gut microbiota of healthy and malnourished children in Bangladesh. *Front. Microbiol.* 2: 228.

Nakaya, T., S. Nakamura, Y. Okamoto, Y. Nagai, J. Kawai, Y. Hayashizaki, Y., T. Iida, and T. Horii. 2011. Direct Metagenomic Detection of Viral Pathogens in Human Specimens using an Unbiased High-throughput Sequencing Approach. In: *Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats*, Ed. Frans J. de Bruijn. Wiley-Blackwell (an imprint of John Wiley & Sons Ltd), Hoboken, NJ, USA.

Nakamura, S., T. Nakaya, and T. Iida. 2011. Metagenomic analysis of bacterial infections by means of high-throughput DNA sequencing. *Exp. Biol. Med.* 236: 968-971.

飯田哲也：感染症診断法の新天地. 化学療法の領域(2011)27:1986-1987

中村昇太, 中屋隆明, 飯田哲也：感染症のメタゲノミック診断. 化学療法の領域 (2011)27:2078-2084

2. 学会発表  
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

飯田哲也：次世代シーケンスによる感染症防御. 2011 次世代シーケンサーセミナー「1G シーケンスの挑戦、ゲノム解析の新たな地平へ」日経バイオテック創刊 30 周年記念セミナー コクヨホール、品川、2011 年 11 月 30 日

飯田哲也、中村昇太、中屋隆明：次世代シーケンサーを用いた臨床検体からの病原体探索. DNA シーケンサー最先端セミナー【大阪大学】次世代ゲノムシーケンシング技術がもたらす新潮流. 大阪大学吹田キャンパステクノアライアンス棟 2011 年 7 月 20 日

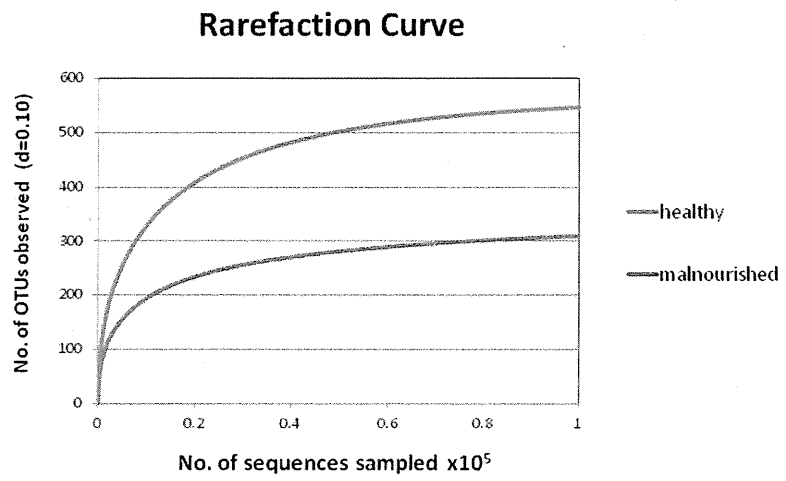
H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)

1. 特許取得  
なし

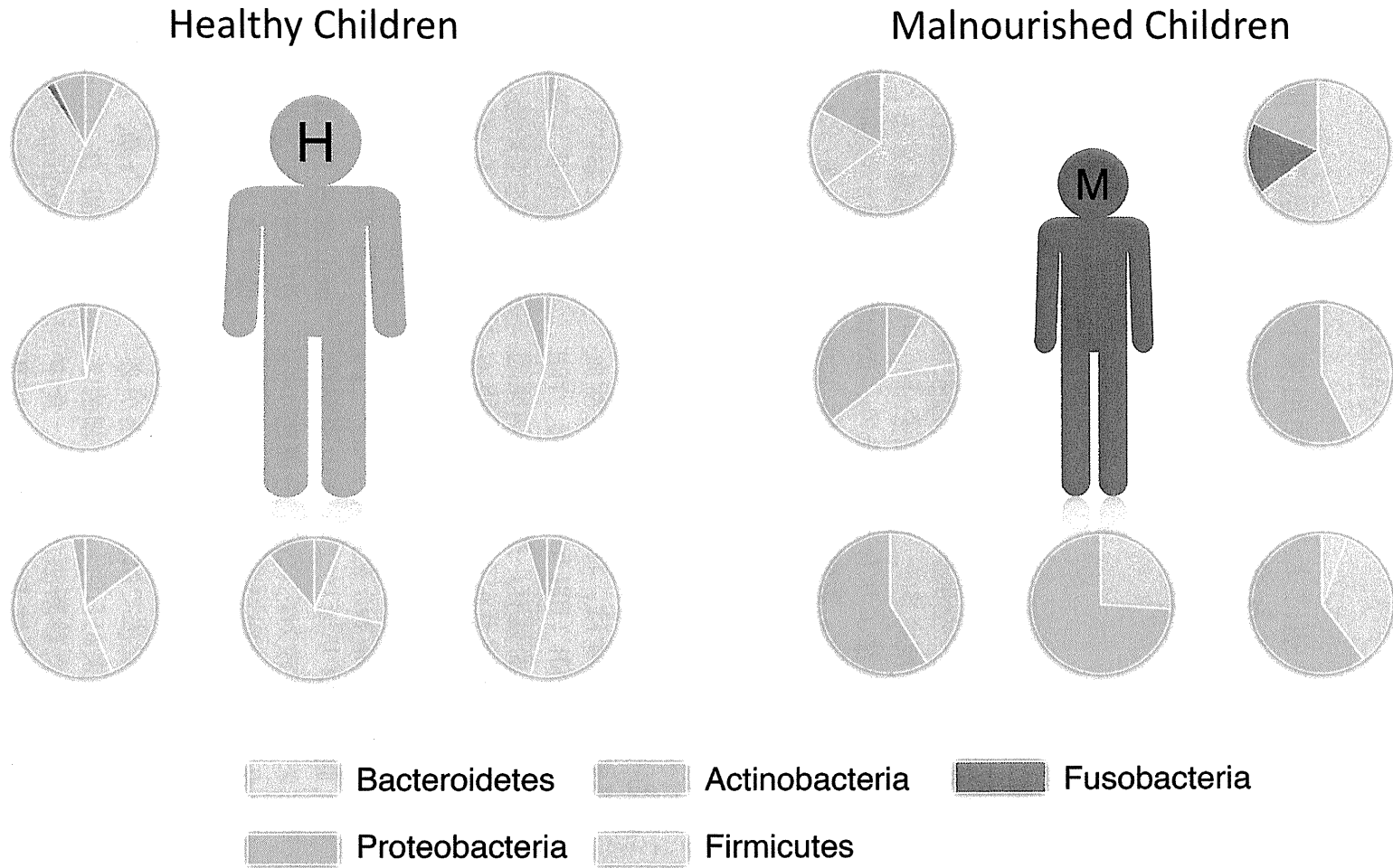
2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

Fig. 1 Estimated Species Richness



# Fig. 2 Relative Abundance of Phylum



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

LAMP 法による魚介類由来下痢症起因菌の包括的検出法の開発  
と途上国における普及活動に関する研究

研究分担者 山崎 渉 宮崎大学 准教授

研究要旨：

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification)法を用いて、腸炎ビブリオの主要な病原因子の一つである *trh* の迅速鑑別法の開発を試みた。80 株の腸炎ビブリオコロニーを供試して有用性を検討した。自家製反応試薬を使用することによって、1 反応あたりの費用を 100 円以下に削減することができた。LAMP 法は既存の PCR 法よりも迅速であり、DNA 抽出開始から 90 分以内に判定が可能であった。しかし、診断的特異度は 100% (20/20)であったものの、診断的感度は 93.3% (56/60)と不十分であった。実用化のためにはプライマーの再設計等のさらなる改良が必要であると思われた。

A. 研究目的

腸炎ビブリオは、TDH（耐熱性溶血毒）および TRH（TDH 類似溶血毒、TRH 1・TRH2 の 2 亜種有）を主要な病原因子とする病原菌である。環境中の腸炎ビブリオの多くは *tdh/trh* を保有しないのに対し、臨床患者由来腸炎ビブリオの多くは *tdh/trh* を保有する。それゆえ腸炎ビブリオによる食中毒発生時における行政対応には、分離菌からの *tdh/trh* の検出が重要である。しかし、臨床検体や市販魚介類からの腸炎ビブリオの分離ならびに病原因子検出は現行の検査法では 2-3 日以上が必要であり、従来から行ってきた細菌学的手法を用いた診断法だけでは、食中毒発生時に被害拡大防止のための迅速な行政措置を行う上で支障となっている。

魚介類における腸炎ビブリオの規格基準においては、各国・国際機関が腸炎ビブリオ菌数を基に独自の規制値を設けている。FAO/WHO CODEX 委員会は腸炎ビブリオの主要な病原因子である TDH および TRH を基にする新たな規制値の策定に取り組んでいる。

図 1 に示すとおり、LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法は簡易迅速な遺伝子検査法であり、低コストであることに加え高価な測定機器を必要としないため、特に開発途上国での使用に適している。筆者らはすでに *tdh*、*trh1* および *trh2* 検出用の LAMP 法 (Yamazaki *et. al.* 2010. Appl Environ Microbiol 76:820-8) ならびにコレラ毒素遺伝子検出用の LAMP 法 (Yamazaki *et. al.* 2008. BMC Microbiol 8:94) を開発している。し

かし、これらのプライマーセットに、さらにビブリオ・バルニフィカス検出用のプライマーセットを組み合わせて、魚介類由来の主要な病原因子の包括的なスクリーニングを試みたところ、検出感度が低下し、実用には適さなかった。各プライマーの競合が原因と推測されたので、負荷を軽減する必要がある。また、より簡易かつ低コストの検出系はCODEX委員会が策定中の魚介類の腸炎ビブリオに関する新規制においても有用と思われる。それゆえ、今回 *trh1* および *trh2* を包括的に検出する単独のプライマーセットによる LAMP 法の開発を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 菌株

本学において保管されている臨床患者・食品・環境由来の腸炎ビブリオ 80 株を使用した。内訳は *tdh* 陽性/*trh* 陽性 30 株、*tdh* 陰性/*trh* 陽性 30 株、*tdh* 陽性/*trh* 陰性 10 株ならびに *tdh* 陰性/*trh* 陰性 10 株である。

### 2. プライマーの設計

GenBank から入手した 29 シークエンスならびに保存株より得た 46 シークエンスの計 75 の *trh* の塩基配列を使用して、Primer Explorer V4 (富士通システムソリューションズ、東京) を用いて、*trh* 検出用の LAMP プライマーセットを設計した。計 28 プライマーセットを試験に供した。

### 3. 菌体からの DNA 抽出

クロモアガービブリオ寒天培地等に発育させた新鮮菌を 1.5-ml 容のマイクロチューブ内で 50  $\mu$ l の水酸化ナトリウム溶液 (25 mmol l<sup>-1</sup>) に浮遊さ

せ、十分に混和したのちに 95 °C で 5 分間加熱した。4  $\mu$ l の Tris-塩酸溶液 (1 mol l<sup>-1</sup>, pH 7.5) で中和した後に 20,000  $\times$  g、4 °C で 5 分間遠心した。上清 1  $\mu$ l をテンプレート DNA として使用した。

### 4. LAMP 法

自家製の LAMP 反応液を使用した。その組成は表 1 に示すとおりである。反応液はリアルタイム濁度計 (Loopamp EXIA、Teramecs、京都) を用いて 63 °C で 60 分間反応させた後に 80 °C 2 分間の条件で酵素反応を失活させた。60 分以内に濁度の微分値が 0.1 に達した検体を陽性と判定した。

### 5. PCR 法

PCR 法を実施し、供試菌株の *trh* 保有状況を確認した。詳細は既報 (Tada *et al.* 1992. Mol Cell Probes 6:477-87) に従った。

## C. 研究結果

28 プライマーセットのうち、最も良好な増幅を示すセットを選択し、本試験に供した。その結果、表 2 に示すとおり、診断的特異度は 100% (20/20) であったものの、診断的感度は 93.3% (56/60) であった。1 反応あたりの費用は 100 円以下と低コストであった。DNA 抽出開始から判定まで、PCR 法では約 4 時間を必要としたのに対し、LAMP 法では 90 分以内で判定が可能であった。LAMP 法では菌培養の時間を加えても、培養開始から 1 日以内に判定が可能であった。さらに LAMP 法では反応チューブ内の白濁を確認することにより、肉眼でも容易に判定が可能であった。



#### D. 考察

市販の LAMP キットのコストはプライマー込の反応試薬で1反応あたり約1,200円、プライマーを除く反応試薬のキットで1反応あたり約400円であるが、本研究で使用した自家製試薬はプライマーと反応試薬で1反応あたり約100円という低コストで反応が可能であった。LAMP法は高価な測定機器を必要としないことから、開発途上国における病原体の簡易迅速な低コストの検査法としての普及が期待できる。

しかし、今回開発を試みた *trh* 検出用の LAMP 法は菌株毎に変異を有する *trh* の遺伝的多様性に完全に対応することが出来ず、供試した *trh* 陽性株 60 株中 4 株において陰性を示した。今後はプライマー設計領域を精査し、診断的特異度および診断的感度に優れた *trh* 検出用 LAMP 法の構築を継続する。さらに *tdh*、コレラ毒素遺伝子ならびにビブリオ・バルニフィカス検出用のプライマーと組み合わせて、魚介類由来下痢症起因菌の包括的検出法の開発に取り組む。

なお、当初計画していた途上国における LAMP 法の普及活動については、日程の都合等により、現地訪問は出来なかった。タイ国プリンスオブソクラ大学ならびにシンガポール国環境保健研究所に対して、メールによる技術的助言のみを実施した。

#### E. 結論

*trh* 検出用の LAMP 法の開発を試みた。1反応あたり約100円という低コストで検出が可能であったが、十分な精度を得られなかった。今後プライマ

ー設計領域を精査し、精度の向上を図る。

#### F. 健康危機情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yamazaki, W., Y. Kumeda, R. Uemura, and N. Misawa. 2011. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Vibrio parahaemolyticus* in naturally contaminated seafood samples. *Food Microbiol* 28:1238-41.

2. Yamazaki, W. 2011. Sensitive and Rapid detection of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* using loop-mediated isothermal amplification, In: Otto Holst (Ed.) *Methods in molecular biology - Microbial toxins methods and protocols-*. Humana Press, Clifton, N. J., United States, pp13-pp22.

##### 2. 学会発表

1. Yamazaki, W., S. Yamada, T. Taniguchi, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, and N. Misawa. 2011. Rapid, simple and cost-effective detection of the *trh* gene of *Vibrio parahaemolyticus* by loop-mediated isothermal amplification. 46th Conference Cholera and other bacterial enteric infections US-Japan cooperative medical science program. Kolkata, India.

pp13-pp22.

2. Tanaka, N., W. Yamazaki, V. Uddhakul, F. Gondaira, J. Sugiyama, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. 2011. A method combining a new immunomagnetic separation technique and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for sensitive detection of virulent strains of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. 46th Conference Cholera and other bacterial enteric infections US-Japan cooperative medical science program. Kolkata, India. pp286.

3) 田中夏子、山崎 渉、V. Uddhakul、権平文夫、杉山純一、中口義次、西渕光昭. 2011. 魚介類から腸炎ビブリオを定量検出する MPN 法の検出感度の改良. 第 45 回腸炎ビブリオシンポジウム. 東京都新宿区. 10 月 20 日-10 月 21 日. pp10.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他

なし。

表 1. 自家製 LAMP 反応液の組成

DNA テンプレート	1	μl
<i>Bst</i> ポリメラーゼ (8units)	1	μl
リアクションミックス <sup>a)</sup>	12.5	μl
プライマーミックス <sup>b)</sup>	1.3	μl
精製水	9.2	μl
計	25	μl

<sup>a)</sup> : Tris-HCl (pH8.8) 40 mM

KCl 20 mM

MgSO<sub>4</sub> 16 mM

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM

Tween20 0.2%

Betaine 1.6 M

dNTPs 2.8 mM each

<sup>b)</sup>: FIP 400 μL、BIP 400 μL、LF 200 μL、LB 200 μL、F3 50 μL、B3 50 μL (各 100 μM) を混合し、計 1,300 μL (1,000 検体用) とし、1 検体あたり 1.3 μL を使用。

表 2. LAMP と PCR の結果比較

	LAMP/PCR
診断的感度	56/60 98.3%
診断的特異度	20/20 100%

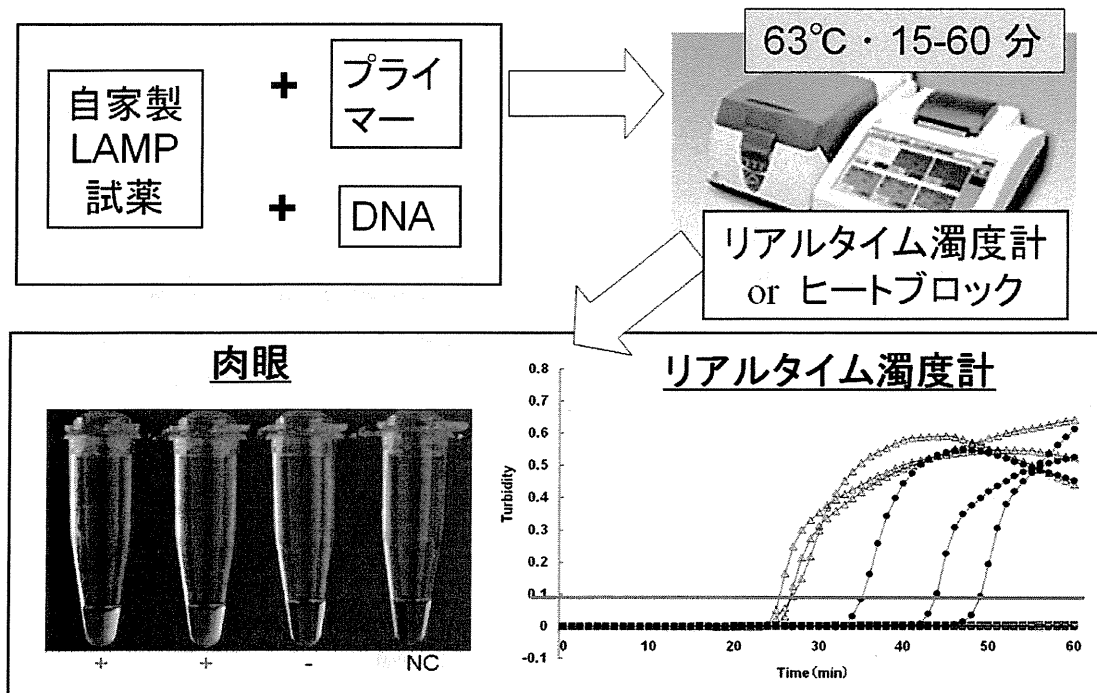


図1 LAMP法の手順

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

食品を対象とした下痢症起因菌の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	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
	下島優香子	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（いかの塩辛）を対象に，TDH 産生性の腸炎ビブリオの検出法を検討した結果，12 検体中 9 検体から目的菌を検出することができた。今回の検討から，以下の 3 点が明らかになった。(1)大量培養の培養液を対象としたスクリーニング試験を実施することで，的を絞った検査が可能になり，検出感度の上昇と作業の効率化を図ることが可能であった。(2)免疫磁気ビーズ法を用いて集菌することにより，目的とする血清型菌の釣菌が可能になること，また，培養液中に，腸炎ビブリオ以外のビブリオ属菌が多い場合も目的菌を濃縮できる効果を確認できた。(3)分離平板としての酵素基質培地は，培養時間が長くなっても色調変化が少なく，目的とする菌の色調が明確で釣菌しやすいという利点を確認された。これらの方法を食品検査に応用することは，検査精度や作業効率の上昇のために有効であることが明らかとなった。

A. 研究目的

生鮮魚介類を喫食する習慣のある日本において，腸炎ビブリオは代表的な下痢症起因菌の一つである。

本菌による食中毒事件数は 1998 年をピークに減少傾向ではあるが，2007 年 9 月に宮城県内で生産された「いかの塩辛」による大規模な腸炎ビブリオ食中毒が 9 都県（12 自治体）にわたり，広域的に発生した。本食中毒の患者数は 620 名（推定含む），喫食者数 2,050 名であった。

通常，食中毒事例では，患者(ヒト)

から検出された腸炎ビブリオは病原因子である溶血毒 (TDH/TRH) を産生するが，食品から検出される菌の大部分は溶血毒非産生菌である。また，食品から患者と同じ血清型で溶血毒産生性の腸炎ビブリオを検出することは非常に困難である。

そこで，食品から免疫学的手法や遺伝子学的手法を取り入れることで，患者由来株と同じ血清型および溶血毒産生性の腸炎ビブリオを検出することを検討した。