

- Pneumonia. Inflammation. In press.
- 10) Osaki, T., T. Matsuki, T. Asahara, C. Zaman, T. Hanawa, H. Yonezawa, S. Kurata, T. D. Woo, K. Nomoto, S. Kamiya. Comparative analysis of gastric bacterial microbiota in Mongolian gerbils after long-term infection with *Helicobacter pylori*. *Microb Pathog.* 53:12-8. 2012.
- 11) Inoue, S., M. Niikura, S. Takeo, S. Mineo, Y. Kawakami, A. Uchida, S. Kamiya, F. Kobayashi. Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing $\gamma\delta$ T cells is responsible for protective immunity to *Plasmodium* parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24:12129-34, 2012.
- 12) Hojo, F., D. Sato, J. Matsuo, M. Miyake, S. Nakamura, M. Kunichika, Y. Hayashi, M. Yoshida, K. Takahashi, H. Takemura, S. Kamiya, H. Yamaguchi. Ciliates expel environmental *Legionella*-laden pellets to stockpile food. *Appl Environ Microbiol.* 78:5247-57, 2012.
- 13) Oka, K., T. Osaki, T. Hanawa, S. Kurata, M. Okazaki, T. Manzoku, M. Takahashi, M. Tanaka, H. Taguchi, T. Watanabe, T. Inamatsu, S. Kamiya. Molecular and microbiological characterization of *Clostridium difficile* isolates from single, relapse, and reinfection cases. *J Clin Microbiol.* 50:915-21, 2012.
- 14) Yonezawa, H., T. Osaki, T. Hanawa, S. Kurata, C. Zaman, T. D. Woo, M. Takahashi, S. Matsubara, H. Kawakami, K. Ochiai, S. Kamiya. Destructive effects of butyrate on the cell envelope of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol.* 61:582-9, 2012.
- 15) Okuda, M., S. Kamiya, M. Booka, S. Kikuchi, T. Osaki, T. Hiwatani, K. Maekawa, Y. Fukuda. Diagnostic accuracy of urine-based kits for detection of *Helicobacter pylori* antibody in children. *Pediatrics Internatl.* 2013, in press
- 16) Osaki, T., M. Okuda, J. Ueda, M. Konno, H. Yonezawa, F. Hojo, K. Yagyu, Y. Lin, Y. Fukuda, S. Kikuchi S. Kamiya. Multi locus sequence typing for the analysis of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori* by using fecal specimens. *J Med Microbiol.* 2013, in press
- 17) S. Shiramaru, M. Asakura, H. Inoue, A. Nagita, A. Matsuhisa and S. Yamasaki. A cytolethal distending toxin gene-based multiplex PCR assay for detection of *Campylobacter* spp. in stool specimens and comparison with culture method. *J. Vet. Med. Sci.*, 74:857-862, 2012.

- 18) Wang, L., M. Wakushima, T. Aota, Y. Yoshida, T. Kita, T. Maehara, J. Ogasawara, C. Choi, Y. Kamata, Y. Hara-Kudo, and Y. Nishikawa. 2013. Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal patients: comparison with the strains from foods and fecal specimens of cattle, pigs, healthy carriers in Osaka City, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* (in press)
- 19) Wani, S. A., I. Hussain, M. A. Rather, Z. A. Kabli, K. Nagamani, Y. Nishikawa, S. D. Qureshi, and I. Khan. (2012) Putative virulence genes and biofilm production among typical enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic children in Kashmir and Andhra Pradesh. *Indian J. Microbiol.* 52: 587–592.
- 20) Mitobe J, Itaru Yanagihara I, Ohnishi K, Yamamoto S, Ohnishi M, Ishihama A and Watanabe H, 2011 RodZ regulates the post-transcriptional processing of the *Shigella sonnei* type III secretion system EMBO report vol.12(9) 911-916.
- 21) Takaya, A., Erhardt, M., Karata, K., Winterberg, K., Yamamoto, T., Hughes, KT. 2012. YdiV: a dual function protein that targets FlhDC for ClpXP-dependent degradation by promoting release of DNA-bound FlhDC complex. *Mol Microbiol.* 83, 1268-84.
- 22) Nakano M., Yamasaki E., Ichinose A., Shimohata T., Takahashi A., Akada K. J., Nakamura K., Moss J., Hirayama T., and Kurazono H. 2012. *Salmonella* enterotoxin, Stn, regulates membrane composition and integrity. *Dis. Model. Mech.*, 5(4): 515-521.
- 23) Yahiro, K., H. Tsutsuki, K. Ogura, S. Nagasawa, J. Moss, and M. Noda. 2012. Regulation of Subtilase cytotoxin (SubAB)-induced cell death by a PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)-dependent proteasome pathway in HeLa cells. *Infect Immun* 80:1803-1814.
- 24) Tsutsuki, H., K. Yahiro, K. Suzuki, A. Suto, K. Ogura, S. Nagasawa, H. Ihara, T. Shimizu, H. Nakajima, J. Moss, and M. Noda. 2012. Subtilase cytotoxin enhances *E. coli* survival in macrophages by suppression of nitric oxide production through the inhibition of NF-kappaB activation. *Infect Immun* 80:3939-3951.
- 25) Arimitsu H, Sasaki K, Shimizu T, Tsukamoto K, Shimizu T, Tsuji T. 2012. Large-scale preparation of Shiga toxin 2 in *Escherichia coli* for toxoid

vaccine antigen production. Microbiol Immunol. (in press). 3.その他
なし

26) Tsukamoto K, Arimitsu H, Ochi S, Nakamura K, Tanaka Y, Nuemket N, Taniguchi K, Kozaki S, Tsuji T. 2012. P19 embryonal carcinoma cells exhibit high sensitivity to botulinum type C and D/C mosaic neurotoxins. Microbiol Immunol. 56(10):664-72.

27) Fujii J, Naito M, Yutsudo T, Matsumoto S, Heatherly DP, Yamada T, Kobayashi H, Yoshida S, Obrig T: Protection by recombinant Bacillus Calmette-Guérin vaccine expressing Shiga toxin 2B subunit against Shiga toxin producing *Escherichia coli* in mice. 2012. Clin. Vaccine Immunol. 19(12): 1932-1937.

28) Klinosky DJ, et al. (著者多数のため省略 Fujii J 333 番目): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. 2012. Autophagy 8(4):445-544.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

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

重要な食中毒菌種検出法開発と食材汚染調査のためのアジア 4
カ国との共同研究

研究分担者	西淵光昭	京都大学教授
研究協力者	中口義次	京都大学助教
研究協力者	Varaporn Vuddhakul	(タイ) プリンズ・オブ・ソンクラ大学
研究協力者	Son Radu	マレーシア・プトラ大学教授
研究協力者	Chengchu Liu	上海海洋大学教授
研究協力者	暮沼武士	青島誠誉食品検測有限公司副社長
研究協力者	Ng Lee-Ching	シンガポール環境保健研究所
研究協力者	田中夏子	京都大学大学院医学研究科
研究協力者	Yaman Kayali	京都大学大学院医学研究科
研究協力者	Escalante Maldonado, Oscar Roberto	京都大学大学院医学研究科
研究協力者	岩出義人	三重県保健環境研究所
研究協力者	大嶋彰	栄研化学海外事業部
研究協力者	権平文夫	デンカ生研株式会社
研究協力者	山崎渉	宮崎大学農学部

研究要旨：

食品から腸炎ビブリオ、腸管出血性大腸菌、あるいはコレラ菌を検出するために、増菌培養法（定量検出の場合 MPN 法を含む）に免疫磁気ビーズ（IMS）法および LAMP（loop mediated amplification）法を組み合わせた迅速、高感度、簡便な病原細菌の検査法を開発し、東南アジアの市販食品を現場で、検査することにより評価した。魚介類中の腸炎ビブリオの検査法（*tdh* 遺伝子および *trh* 遺伝子を標的とした、LAMP 法）は、validation の段階に入り FAO 主催のワークショップにおいて良い評価を得た。腸管出血性大腸菌（7 種 [国内用] または 12 種 [世界用] の特定の O 抗体を用いた免疫磁気ビーズを用い、*stx* 遺伝子を標的遺伝子）およびコレラ菌（O1 および O139 抗原対象、*ctx* 遺伝子標的）に関しては、in vitro 実験によって解決しなければならない問題点が発見された。食中毒原因菌について、マレーシアでの食材の汚染に関する共同研究の結果、野菜・穀類の *Klebsiella pneumoniae*、*Bacillus cereus*、*Bacillus thuringiensis*、および大腸菌 O157:H7 による汚染、肉類の *Listeria monocytogenes* による汚染が明らかになった。

A. 研究目的

我々は、東南アジアで多発する下痢症について、発生と伝播に関する環境要因について国際共同研究を展開してきた。(1) グローバル化の影響として、食中毒原因菌が輸出入食品に含まれて、国境を越えて移動していること、および(2) アジアの途上国では、先進国のように衛生環境が良くないため、喫食方法が先進国と異なる。途上国では、生食に供される魚介類や肉類でも、途上国ではリスクが高いため、何らかの加熱調理をする。したがって、経済発展の程度が異なる2グループ間で異なる食品衛生規範が必要である。いづれにしても、高感度かつ特異性の高い検査法が必要であるが、さらに食品の2グループ間での貿易を考慮に入れると、国際的に統一された、かつ途上国でも実施可能な簡便な方法が必要である。本研究では、東南アジアで重要な下痢原因菌を対象にして、食品や環境の汚染を東南アジアの熱帯環境でも高感度で検査できる安定的な検査の開発し、現地で試験して有効性を実証することを目標とする。一方でこのような環境中でまだ明らかになっていない、食品の汚染状況の調査を継続した。

B. 研究方法

1) **新たな検査法の開発と評価**：二枚貝中の腸炎ビブリオを検査する場合は、貝の身をアルカリペプトン水を用いた増菌培養に供して、続いて必要に応じて食塩ポリミキシンブイオンを用いた増菌培養を行った。増菌培養の

前後に既知のK抗原すべてに対する抗血清で作成した免疫磁気ビーズ (IMS) 処理を施し、必要な場合は増菌培養を継続した。菌の定量検査が必要な場合、増菌培養に MPN (most probable number) 法を組み合わせた。評価の対象とする増菌培養液からボイル上澄法により、DNA 抽出液を作成して、*tdh* 遺伝子や *trh* 遺伝子の検出を行った。遺伝子検査は既報に従って実施した：従来の PCR 法 (Tada, J. et al. 1992. Mol. Cell. Probes 6:477-487) ; LAMP 法 (Yamazaki, et al. 2010. Appl. Environ. Microbiol. 76, 820-828.) ; リアルタイム PCR 法 (Ward, L. N., and Bej. A. K. 2006. Appl. Environ. Microbiol. 72, 2031-2042)。菌の分離確認が必要な場合、磁気ビーズを CHROMagar Vibrio 寒天培地に接種した。改良法では、ビーズを寒天培地に接種せずに食塩ポリミキシンブイオン増菌培養に供し、必要に応じてこのステップを再度実施した後に CHROMagar Vibrio 寒天培地に接種した。腸炎ビブリオに特有な形状を示した集落について、特異的な K 抗血清を用いたスライド凝集試験によってスクリーニングに供した。陽性と判定された集落について、上記のように同定と PCR 法による遺伝子型検査を実施した。

コレラ菌および腸管出血性大腸菌の場合も、同様の原理で、IMS 法および LAMP 法を適用した。IMS 法において、コレラ菌では、01 および 0139 抗原に対する 2 種の抗体を用いて、腸管出血性大腸菌の場合 7 種 (国内用) または 12 種 (世界用) の特定の O 抗体で処理した免疫磁気ビーズを用いた。IMS 法において、コレラ菌では、*ctxA* 伝子、腸管出血性大腸菌の場合は *stx* 遺伝子

を標的遺伝子として選んだ。当研究室に保存している *Vibrio* 属細菌種に属する菌株を検査法の評価試験に用いた。血清型および *ctxA* 遺伝子の有無は、それぞれ特異抗血清を用いたスライド凝集試験およびPCR法により確認した。マレーシアの首都、クアラルンプール近郊の卸売市場や商店、市場、スーパーマーケット、コンビニエンスストアなどで購入した有頭エビ114サンプルを用いた。

2) **その他**：上記以外の食中毒原因菌について、マレーシアでの食材の汚染に関する検査は既知の方法 (*Klebsiella pneumonia* [Puspanadan, S., et al. 2012. Int. Food Res. J. 19: 1757-1762]、*Bacillus cereus* および *Bacillus thuringiensis* [Sandra, A., et al. 2012. Int. Food Res. J. 19: 829-836.] および大腸菌 0157:H7 [Chang, W. S., et al. 2013. Int. Food Res. J. 20:1023-1029.] *Listeria monocytogenes* [Wong, W. C., et al 2012. Int. Food Res. J. 19: 1751-1756.]) に従って実施した。

C. 研究結果

1) **腸炎ビブリオ**：以前から二枚貝中の腸炎ビブリオ病原性菌株 (*tdh+*、*trh+*、または *tdh+*かつ *trh+*) を検出するための高感度・迅速・簡便な検査法を模索してきた。これは、現在FAO/WHO傘下のCODEX委員会での重要な課題である。すなわち、腸炎ビブリオは魚介類中の病原性ビブリオ属細菌の中で最も重要と考えられる3菌種の中で、アジアの熱帯地域を含めて世界的に重要な魚介類由来食中毒原因菌として取り組まれており、その基本

的衛生規範が決定した。今後は世界各地で病原性菌株の定量データを蓄積して、定量リスクアセスメントを実施し、魚介類を加熱調理用と生食用に区別して安全性規準を決定していくことになっている。そのために必要なのが上記のような検査法であり、特に発展途上国でも実施可能な方法であることが重要である。

昨年までにアルカリペプトン増菌培養法をベースにして (MPN法を含めた定量検査法を含む) して考案した新検査法 (免疫磁気ビーズ IMS [immunomagnetic separation] 法と LAMP [loop mediated amplification] 法を組み合わせた方法) が適した方法であるということを示唆するデータが得られている。IMS法は磁気ビーズに既知の約70種のそれぞれのK抗原に対する抗体を結合させたビーズである。LAMP法は一定温度で高速かつ特異的にDNAを増幅させ、反応結果は肉眼判定できる遺伝子検出法で、まだコストが高いという点を除いては、本研究の目的に適している。本研究では、国際的な validation も含めて、アルカリペプトン増菌培養 - MPN法をベースにして標的遺伝子 (病原性菌株の *tdh+*、*trh+*、または *tdh+*かつ *trh+* 遺伝子) を定量検出するための遺伝学的検査法として、新法またはそのコンポーネントである LAMP法あるいはIMS法の検出感度向上への影響を、他の代表的遺伝学的検査法 (従来のPCR法、リアルタイム検査法) と比較・評価した。

1-1) 熱帯地域 (タイ南部、ハジャイ市) と温帯地域 (三重県) の比較：春の高温時にタイ南部の市販ハマグリ検体9セットを検査した結果と、我が国 (三重県) で夏場を中心に市販さ

れているアサリとハマグリ合計 21 セットの検体を検査し、結果を比較した。病原性株が比較的高濃度に二枚貝に分布する時期の熱帯環境では、大部分のサンプルから *tdh* 遺伝子、*trh* 遺伝子、あるいは両遺伝子が検出され、高感度の新検査法と従来の PCR 法による検査結果に差が認められなかった。一方、我が国の三重県のような温帯地域のサンプルでは、夏場でも貝中の病原性菌株濃度が比較的低いと考えられている。21 セットの二枚貝を検査した結果、*tdh* が検出された検体が 4 検体あり、すべて検体はアサリであった。*tdh* 遺伝子が検出されたサンプルの増菌液中の腸炎ビブリオ総菌数は、1 回目の増菌液では、IMS 処理しなかった群が平均 3.8 log CFU/mL であったのに対して、IMS 処理した群は平均 5.1 log CFU/mL であった。これらから、従来の PCR 法では陰性（偽陽性）で新法では陽性になるサンプルが存在することが確認され、その原因の少なくとも一部は、IMS の腸炎ビブリオに対するスクリーニング・濃縮効果とそれによる *tdh* 遺伝子検出効率の向上によるものであると考えられる。

1-2) FAO 主催のワークショップ検査法の validation: シンガポールで 2012 年 11 月にアジア諸国を対象に実施した市販二枚貝の検査法評価 (FAO 主催のワークショップで検査法の validation に協力) の結果、リアルタイム検査法を用いた場合、信頼における定量結果を得るには、やはり MPN 法を含める必要があり (新法と同じ)、LAMP 法より偽陰性 (おそらく DNA 増幅酵素の阻害) が生じやすいサンプルもある (新法が有利) ことが示された。したがって LAMP 法に IMS 法 (標的菌を洗浄し阻害物質を除去可能) を組み

合わせた新法がさらに有利であると考えられる。また最近、LAMP 法に使用する酵素を凍結乾燥したキットが販売されているので、これの酵素部分のみを、従来の液体培地の代わりに使用しても結果は変わらず、むしろ DNA の特異的増幅結果を肉眼で判定することが容易になったので、高い評価を得た (2012 年 11 月シンガポールでの FAO のワークショップにおける validation でアジア諸国の代表者も確認)。このように、キットを室温で輸送・保管することへの道が開け、電気泳動検査や光学検査が省けると言える。

1-3) マレーシアにおけるワークショップ: その後 LAMP 法による *trh* 遺伝子検出用のプライマーが改良されて、1 セットのプライマーで *trh1* 遺伝子と *trh2* 遺伝子を同時に検査できるようになった (山崎渉グループとの共同研究 [下記]; 2013 年 2 月マレーシアでのマレーシア・プトラ大学とジョイント・ワークショップを開催し、ここで参加者に実際にこの点を確認してもらった)。Vibrio 属菌種の中で魚介類の汚染を介して腸管感染症を起こす最も重要な菌種は、腸炎ビブリオとコレラ菌の病原性菌株である。この新しいプライマーセットを用いると、魚介類を汚染するこれらの 2 種類の菌を同時に検出できる multiplex LAMP 法が確立できる。これにさらに IMS 法を追加すれば、より高感度かつ特異的であることは、タイと日本の比較で検証した (上記) が、これらの結果について、世界各国を対象にして今後 validation の結果を蓄積していきたい。中国での validation は延期して、2013 年 7 月に上海海洋大学とのジョイント・ワークショップで実施するこ

とにした。

2) 腸管出血性大腸菌：先に国内（京都市および大阪市）で購入した肉サンプル（牛肉等の食肉、および食用臓器）を対象に腸管出血性大腸菌に特に重要な O 抗原 7 種（国内対象）または 12 種（全世界対象）の O 抗原を対象にした IMS 法と *stx* 遺伝子を標的とした LAMP 法を組み合わせた方法について、それぞれの特異性と感度を評価するために市販の肉サンプルを対象に検査を実施した。その結果、陽性菌が検出できなかったため、本研究ではタイ南部の市場で市販されていた汚染度が高いと考えられるサンプルから目的菌の分離を試みた。IMS 法を含めた増菌培養のスクリーニング段階では陽性であったが、その後分離培養法によって目的菌が単離できなかったため、磁気ビーズの非特異反応を含めて、原因を解明中である。

3) コレラ菌：まず標準菌株を用いた *in vitro* 試験で、O1 抗原および O139 抗原を対象にした IMS 法の特異性と *ctx* 遺伝子を標的とした LAMP 法の感度を評価した。O1 抗原は特異性が確認できたが、O139 菌株の場合確認が困難であった。O139 菌株に特有な菌体最外層の莢膜用物質による阻害作用が考えられるため、今後この点を改良することが重要であると考えられる。マレーシアにおいて、春期に市販の養殖エビ 114 セットを対象にして *ctx* 遺伝子を標的とした LAMP 法と従来の PCR 法の感度の比較を試みたが、両方法とも *ctx* 遺伝子を保有する *Vibrio cholerae* を検出できなかったため、検出感度の比較に至らなかった。今後は、*ctx* 遺伝子を保有する *V. cholerae* を含むサンプルを対象にして、検証したい。

4) その他：上記以外の食中毒原因菌について、マレーシアでの食材の汚染に関する共同研究を継続した。その結果、野菜・穀類の *Klebsiella pneumoniae*、*Bacillus cereus*、*Bacillus thuringiensis*、および大腸菌 O157:H7 による汚染、肉類の *Listeria monocytogenes* による汚染が明らかになった。

D. 考察

本研究において成果を報告した研究において、迅速、高感度、簡便な方法の開発を目指している。こればアジアに限らず、発展途上国を視野に入れた研究では重要である。例えば、輸出入魚介類のフェアな貿易の基礎となる微生物学的安全性に関する世界的な規範を作成する作業が、WHO/FAO 傘下の CODEX 委員会で進行中である。現在は、世界各地で定量リスクアセスメントを実施するための定量データを得るために必要な世界標準検査法の選定のための validation の段階にあり、昨年 11 月に FAO がアジア諸国の検査機関の代表を招集して実施した魚介類中の腸炎ビブリオの検査法に関するワークショップでは、本研究代表者が報告した検査法（*tdh* 遺伝子および *trh* 遺伝子を標的とした、LAMP 法 [上記]）が最も良い評価を得た。本年 11 月にチリで開催予定の第 2 回ワークショップでは、上記のような改良法（*trh* プライマーの改良と multiplex 化 [西淵、山崎渉] および IMS 法の併用）を提案予定である。

E. 結論

アジアの研究者との情報交換と連携をベースとして実施した研究により、研究の展開が見られた。PCRをベースにする各種病原菌の検出法の有効性がアジアでの validation によって証明されはじめるまでになった。またこれらの遺伝学的検査法がアジア諸国における食品を含む環境サンプルや患者サンプルの調査において有効に活用され、これらのサンプルが腸管感染症原因細菌種によって汚染している実態の詳細が明らかになった。

F. 健康危機情報

本研究において検査の標的とした病原細菌のうち、腸炎ビブリオについては、世界標準検査法の選定のための validation で高い評価を得たので、健康被害情報獲得の基礎となるであろう。

マレーシアで継続している食品の汚染検査で新たな情報が得られた（野菜・穀類の *Klebsiella pneumoniae*、*Bacillus cereus*、*Bacillus thuringiensis*、および大腸菌 0157:H7 による汚染、肉類の *Listeria monocytogenes* による汚染）。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sandra, A., Afsah-Hejri, L., Tunung, R., Tuan Zainazor, T.C., Tang, J.Y.H., Ghazali, F.M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M. Son, R. 2012. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat cooked rice in Malaysia. International Food Research Journal 19(3): 829-836.

Loo, Y. Y., B. W. Chieng, M.

Nishibuchi, and S. Radu. 2012. Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from *Camellia sinensis*. Int. J. Nanomedicine 7:4263-4267.

Wong, W. C., Pui, C. F., Tunung, R., Cheah, Y. K., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M. and Son, R. 2012. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in frozen burger patties in Malaysia. International Food Research Journal 19(4): 1751-1756.

Puspanadan, S., Afsah-Hejri, L., Loo, Y.Y, Nillian, E., Kuan, C.H., Goh, S.G., Chang, .S., Lye, Y.L., John, Y.H.T., Rukayadi, Y., Yoshitsugu, N., Nishibuchi, M. and Son, R. 2012. Detection of *Klebsiella pneumoniae* in raw vegetables using Most Probable Number-Polymerase Chain Reaction (MPN-PCR). International Food Research Journal 19(4): 1757-1762.

Patrick, G. B., Nishibuchi, M., Tunung, R. and Son, R. 2012. Molecular characterization of clinical isolate of *Vibrio cholerae* isolated from outbreaks cases in Malaysia. International Food Research Journal 19(3): 1267-1274.

Chang, W.S., Afsah-Hejri, L., Rukayadi, Y., Khatib, A., Lye, Y. L., Loo, Y. Y., Mohd Shahril, N., Puspanadan, S., Kuan, C.H., Goh, S.G., John, Y.H.T., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M. and Son, R. 2013. Prevalence and quantification of

Escherichia coli O157:H7 in organic vegetables and chickens. International Food Research Journal 20:1023-1029.

Lye, Y. L., Afsah-Hejri, L., Chang, W. S., Loo, Y. Y., Puspanadan, S., Kuan, C. H., Goh, S. G., Shahril, N., Rukayadi, Y., Khatib, A., John, Y. H. T., Nishibuchi, M., Nakaguchi, Y. and Son, R. 2013. Risk of *Escherichia coli* O157:H7 transmission linked to the consumption of raw milk. International Food Research Journal 20:1001-1005.

Goh, S. G., C. H. Kuan, Y. Y. Loo, W. S. Chang, Y. L. Lye, P. Soopna, J. Y. Tang, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, L. Afsah-Hejri, and R. Son. 2012. *Listeria monocytogenes* in retailed raw chicken meat in Malaysia. Poultry Sci. 91(10):2686-2690.

2. 学会発表

中口義次、Abdul Aziz Djamaal、Harry Fajri Zisoni、清水理香、勢戸和子、西渕光昭. 「ドネシアでの腸炎ビブリオ食中毒の発生とその要因分析」日本防菌防黴学会第39回年次大会（東京都新宿区 2012年9月11-12日）、口頭発表

中口義次、Abdul Aziz Djamaal、Harry Fajri Zisoni、清水理香、勢戸和子、西渕光昭. 「インドネシアにおける魚介類媒介食中毒とその発生要因の地域間での比較」第33回日本食品微生物学会学術総会（福岡県福岡市、2012年10月25-26日）、口頭発表

中口義次、西渕光昭 「タイにおける

魚介類の生産流通消費と腸炎ビブリオ汚染のフィールド調査」第46回腸炎ビブリオシンポジウム、大分県由布市、2012年11月15日-16日、口頭発表

岩出義人、中口義次、西渕光昭、権平文夫 「tdh保有腸炎ビブリオ検出における免疫磁気ビーズとLAMPの効果」第86回日本細菌学会総会（千葉県千葉市、2013年3月18日-20日）ポスター発表

Oscar R. Escalante-Maldonado、Ahmad Yaman Kayali、中口義次、西渕光昭 「Dried LAMP is Highly Reliable in Detecting Virulent Strains of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood」第86回日本細菌学会総会（千葉県千葉市、2013年3月18日-20日）ポスター発表

H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む）

I. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

短時間培養と遺伝子検査を組み合わせた *Campylobacter* の迅速検査法の構築

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
研究協力者	林将大	岐阜大学大学院助教

研究要旨：

多種類の食中毒原因菌をスクリーニングする共通の増菌培地（Food Pathogen Enrichment；以下 FPE 培地）を開発し、その利用法を検証した。本培地はカンピロバクターの増菌培養について好気条件および血液無添加にもかかわらず、従来使用されている Bolton 培地および Preston 培地と同等の発育を示した。さらに、PCR によって増幅した増幅産物を迅速かつ簡便に検出・識別するデバイスとして、DNA クロマトグラフィーの構築を試みた。カンピロバクター検出用 DNA クロマトについての基礎検討を実施した結果、既存法よりも高感度に検出することができた。本検査法は、従来法に比べ、高感度かつ短時間に結果が得られるためカンピロバクターの検査法として有用であることが示唆された。

A. 研究目的

カンピロバクター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いる。食品から本菌を検出するには増菌培養が不可欠であり、その培養には微好気条件にて長い時間を必要とする。また、菌種間での生化学的性状が酷似しているため、菌種同定が困難である。したがって安全な食肉の提供には、カンピロバクター属菌の迅速かつ精度の高い検査法の確立が急務である。現在の食品検査指標ではカンピロバクターの増菌培養には Bolton 培地や

Preston 培地を用いることが標準となっている。しかしながら、これらの培地はウマ溶血液を大量に使用するため、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。そこで我々は、好気条件下にてカンピロバクターが発育可能な増菌培地（Food Pathogen Enrichment；以下 FPE 培地）を作製し、本培地を用いた短時間培養と遺伝子検査を組み合わせた検査方法を構築した。

本培地を用いた市販冷凍肉および糞便からのカンピロバクターの検出について昨年

の本研究会で報告した。本研究では、冷凍ストレスを与えたカンピロバクターの検出について、従来法および我々の検査プロトコルを比較した。

さらに目視で増幅産物を識別する DNA クロマトグラフィーを組み合わせ、カンピロバクター 3 菌種を迅速に検出同定する手法を検討したので併せて報告する。

B. 研究方法

作製した増菌培地および既存の増菌培地を用いてカンピロバクターの発育速度を比較した。続いて、冷凍ストレスを与えたカンピロバクターの検出について、市販鶏肉から培養法と遺伝子検査法の両法を用いて検証を行った。また、増幅産物を用いてアガロースゲル電気泳動と DNA クロマトグラフィーの検出感度を比較した。

C. 研究結果

Campylobacter jejuni (基準株 GTC259) を用いて FPE 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 液体培地と同等にカンピロバクターの増殖を支持する能力があることが分かった (図 1)。

続いて、冷凍ストレスを与えた *Campylobacter jejuni* GTC259 (基準株) および GTC14977 (食品分離株), *C. coli* GTC14978 (基準株) および GTC15058 (食品分離

株) について、従来法と我々の検査法を用いて比較検討した (表 1)。その結果、冷凍ストレスを与えていない場合、両手法とも 25 g の鶏肉中 $5.8 \sim 1.1 \times 10^1$ CFU までカンピロバクターの検出が可能であった。しかしながら、 -25°C にて 10 日のストレスを与えた条件下では我々の検査法および従来法はそれぞれ $9.9 \times 10^1 \sim 2.0 \times 10^2$ CFU、 $1.6 \times 10^2 \sim 2.1 \times 10^2$ CFU まで低下した (表 1)。

段階希釈した標準 DNA を用いて PCR を実施し、得られた増幅産物を用いてアガロースゲル電気泳動および DNA クロマトを実施して両手法の検出感度を比較した。その結果、DNA クロマトはアガロースゲル電気泳動法よりも高感度に検出することが可能であった (図 2)。

D. 考察

カンピロバクターの増菌培養には上述の通り血液添加の増菌培地を使用する。したがって、遺伝子検査を実施する場合、血液成分の除去を目的とした精製が必要となる。しかしながら、我々が使用した FPE 培地は血液不添加にもかかわらず既存培地と同程度の発育速度を示す。そのため、精製過程を省略することが可能となり、このことも検査の迅速化に寄与すると考える。

現在の一般的なスクリーニングプロトコルは Real-time PCR あるいは電気泳動法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。一方、増幅産物を目視で識

別判定できる我々のDNAクロマトグラフィーは簡便であり、アガロースゲル電気泳動法よりも高感度に検出することができた。このDNAクロマトは増幅産物をELISA反応のような酵素-基質反応を使用せず、直接ラテックスの凝集で可視化が可能である。この酵素を使わない検出原理は簡便性と迅速性の視点からきわめて重要な方法であると考えられる。

食品の検査は出荷前検査が重要で、数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。

E. 結論

FPE培地による増菌培養法と遺伝子検査を組み合わせた本検査法は、従来法に比べ、高感度かつ短時間に結果が得られるためカンピロバクターの検査法として有用である。

食中毒原因菌を迅速かつ簡便に検出する我々が構築した DNA クロマトは一度に多種類の項目についてスクリーニングすることが可能であることから、広い分野にて利用されることが期待される。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表 (投稿中)

2. 学会発表

林将大, 名取達矢, 水野卓也, 宮田町子, 大楠清文, 江崎孝行: DNA クロマトグラフィーを用いた食中毒病原細菌の迅速検出, 平成 24 年度東海乳酸菌研究会, 愛知, 2013 年 2 月

名取達矢, 林将大, 水野卓也, 窪田佐代子, 大楠清文, 江崎孝行: DNA クロマトグラフィーと遺伝子検査を組み合わせた *Campylobacter* の迅速検査法の構築, 第 24 回日本臨床微生物学会総会, 横浜, 2013 年 2 月

林将大, 名取達矢, 窪田佐代子, 水野卓也, 大楠清文, 江崎孝行: 短時間培養と遺伝子検査を組み合わせた *Campylobacter* の迅速検査法の構築, 第 49 回日本細菌学会中部支部会, 金沢, 2012 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

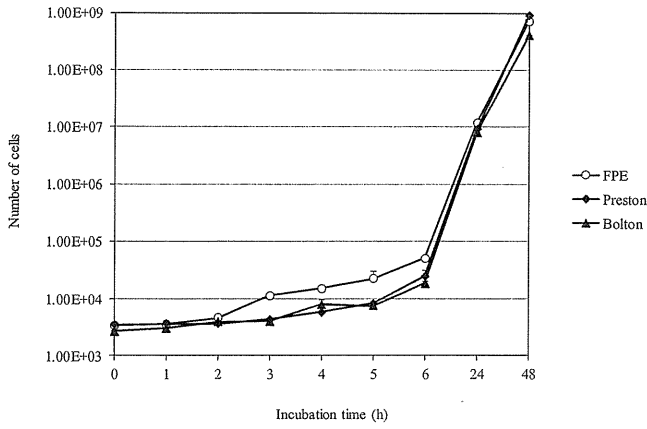


図1 *Campylobacter jejuni* GTC259の増殖曲線の比較

表1 冷凍ストレスを与えたカンピロバクターの検出感度比較

Bacterial strains	No. of spiked cells(CFU/25g of chicken meat)		Non-stressed sample		Freeze-stressed sample		
	Mean (n=3)	SD	FPE-PCR	Bolton-mCCDA	FPE-PCR	Bolton-mCCDA	
<i>C. jejuni</i> GTC 259	1.7×10 ²	19.6	+	+	+	+	
	Type strain	8.8×10 ³	16.8	+	+	+/-	+/-
		4.7×10 ³	9.0	+	+	-	-
		2.0×10 ³	5.0	+	+	-	-
		8.4	2.9	+	+	-	-
	0.0	0.0	-	-	-	-	
<i>C. jejuni</i> GTC14977	2.0×10 ²	19.1	+	+	+	+	
	Clinical isolate	9.2×10 ³	5.1	+	+	+/-	-
		4.2×10 ³	4.8	+	+	-	-
		1.9×10 ³	6.4	+	+	-	-
		8.2	3.9	+	+	-	-
	0.0	0.0	-	-	-	-	
<i>C. coli</i> GTC14978	3.3×10 ²	13.9	+	+	+	+	
	Type strain	1.6×10 ²	5.0	+	+	+	+
		7.0×10 ³	12.3	+	+	-	-
		3.2×10 ³	8.0	+	+	-	-
		1.1×10 ³	8.4	+	+	-	-
	0.0	0.0	-	-	-	-	
<i>C. coli</i> GTC15058	2.1×10 ²	27.7	+	+	+	+	
	Clinical isolate	9.9×10 ³	10.5	+	+	+	+/-
		4.4×10 ³	6.4	+	+	-	-
		2.2×10 ³	3.4	+	+	-	-
		5.8	5.7	+	+	-	-
	0.0	0.0	-	-	-	-	

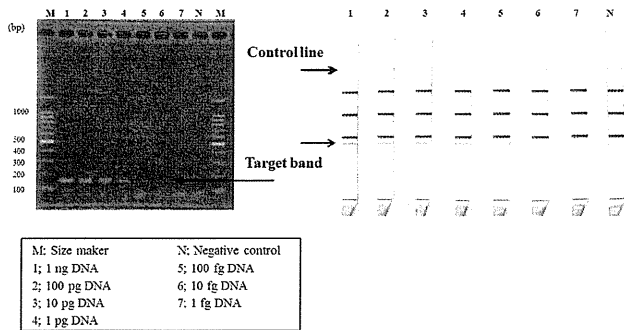


図2 アガロースゲル電気泳動法およびDNAクロマトによる検出感度の比較

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

食品からの下痢症起因菌の効率的検査法に関する研究

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	小西 典子 尾畑 浩魅	東京都健康安全研究センター 東京都健康安全研究センター

研究要旨：通常、食品から食中毒の原因菌を検出することは困難である。そこで食品から原因菌を効率良く検出する方法について検討した。食品に mEC 培地を加え①37°C18 時間培養、②37°C18 時間培養後、一部を mEC 培地へ接種し 42°C 18 時間培養、③42°C18 時間培養の 3 種類の条件で増菌培養を行い、リアルタイム PCR 法でスクリーニングする方法で実施した。その結果、①および②の方法で小さい CT 値が得られ、効率良く増菌することが確認された。食品の培養液中には、目的とする大腸菌の他、大腸菌群も多数存在する。DHL 寒天では、両者とも似たようなピンク色集落を形成するが、酵素基質培地である XM-G 寒天では大腸菌が青色、大腸菌群がピンク色を示し、釣菌が容易となった。

A. 研究目的

食中毒調査において、最も確実に原因食品を特定する方法は、発症者が喫食した食品あるいは検食（集団給食施設などで衛生検査用に保存する食品）から、直接原因菌を検出することである。しかし、発症者が喫食した食品はすでに食べ尽し、あるいは廃棄され、残っていないことが多い。例え、残っていた場合でも、量が少ないことも多い。一方、食品中の原因菌量は非常に少ない上、雑菌が多いため、食品中から原因菌を分離することは非常に困難である。

本研究では、食品から原因菌を効率良く検出する方法について検討した。その結果、2011 年 9 月に発生した大規

模食中毒事例（患者数 516 名）では、検食のネギから食中毒の原因である毒素原性大腸菌（ETEC）0148 を検出することができた。これらの成績について報告する。

B. 研究方法

1) 食品：都内の事業所から収去された食品（検食および原材料）74 検体を供試した。

2) 増菌培養法：食品 10～15 g を無菌的にストマッカー袋に採取し、mEC 培地を加えた後、① 37°C18 時間培養（37°C一段階増菌法）、② 37°C18 時間培養後、培養液 0.5ml を mEC 培地（10ml）へ接種し 42°C18 時間培養（二段階増菌法）、③ 42°C18 時間培養

(42°C一段階増菌法)の3種類の条件で増菌培養を行なった(図1)。

3) スクリーニング試験

(1) DNA抽出法: 培養液 500 μ l をマイクロチューブに移し 12,000rpm, 10 分間遠心した。沈渣に 25mM NaOH を 100 μ l 加え 100°C, 10 分間加熱後, 2/50M Tris-HCl (pH7.5) 100 μ l を加えて中和し, 遠心上清をテンプレートとして用いた。

(2) リアルタイム PCR 法: 遺伝子情報を基に Sth 検出用プライマーとプローブを設計し, 蛍光プローブ法を用いて ABI 7500 Real-time PCR System で検出を行った。反応後, オート解析で CT (Threshold Cycle) 値が得られた試料を陽性とした。

4) 分離培地

スクリーニング試験で陽性となった試料については, DHL 寒天, XM-G 寒天培地へ塗抹培養した。寒天平板上に発育した大腸菌様集落について, ST 産生性試験 (ELISA 法またはリアルタイム PCR 法) を実施後, 生化学的性状試験, 血清型別試験を実施し, 大腸菌の同定を行なった。

5) 免疫磁気ビーズ法を用いた集菌

スクリーニング試験で陽性であったが, ETEC が検出できなかった試料については, Dynabeads M-250 Sheep anti-IgG (Invitrogen) に 0148 抗体を感作させて作製した免疫磁気ビーズを用い, 集菌を試みた。

C. 研究結果

1) 増菌培養法の検討

食品 34 検体を対象に 3 種類の増菌

培養法で増菌後, リアルタイム PCR 法でスクリーニング検査を行った結果, 7 検体が陽性となった。これら 7 検体からは ETEC 0148 を分離することができた。

リアルタイム PCR 法で得られる CT 値は培養液中の ETEC 菌数を現している。すなわち, 菌数が多いほど CT 値は小さい値を示し, CT 値を比較することで, 培養液中に目的とする菌がどの程度存在するかを相対的に比較することが可能である。今回 0148 が検出された 7 検体について CT 値を比較したところ, 37°C 一段階増菌では 20 サイクル以下が 3 検体, 21 から 30 サイクルが 3 検体, 31 サイクル以上は 1 検体であった。

二段階増菌では, 20 サイクル以下が 5 検体, 21 から 30 サイクルが 1 検体, 31 サイクル以上が 1 検体と一段階増菌法とほぼ同等な成績であった。一方, 42°C 一段階増菌法では 7 検体中 4 検体が 31 サイクル以上となり, 増菌効果が低かった(表 1)。

以上の結果から, 残りの食品 40 検体については 37°C 一段階増菌法および二段階増菌法で増菌培養を行なった。リアルタイム PCR 法でのスクリーニング試験の結果, 両増菌法で陽性であったのは 6 検体, 二段階培養法のみ陽性が 2 検体, 37°C 一段階増菌法でのみ陽性が 1 検体であった。このうち実際に 0148 が検出されたのは, 両増菌法で陽性であった 6 検体の内の 5 検体であった(表 2)。

3) 免疫磁気ビーズ法を用いた集菌

スクリーニング試験で陽性を示したが、EPECが検出できなかつた4検体について、免疫磁気ビーズ法を用いた集菌法を実施し、菌の分離を試みた。しかし、いずれの検体からも0148を検出することはできなかつた。これらの検体のCT値は33から34サイクルであったことから、培養液中の0148菌数が非常に少なく検出できなかつたものと考えられた。

4) 分離培地の比較

今回は目的とする菌が大腸菌であったことから、大腸菌用の選択培地2種類(DHL寒天, XM-G寒天)を用いた。DHL寒天では大腸菌と大腸菌以外の菌(大腸菌群)が同じような色調の集落を示してしまうため釣菌が困難であったが、XM-G寒天平板上では、大腸菌と大腸菌群の集落をはっきり区別することができたため、大腸菌のみを効率よく釣菌することが可能であった(写真1)。

4) EPEC 0148 が検出された食品

供試した食品74検体中、12検体から0148(ST産生)が検出された(表3)。0148が検出された食品は検食や原材料として保存されていたネギ、カットキャベツ、鱈の唐揚げ、冷奴(ネギ)等であった。

D. 考察

2011年9月、7自治体で合計516名の患者が発生したEPEC 0148(ST産生)による広域的集団発生が認められた。発生施設は事業所の集団給食で、全て

同じ給食事業者が提供していた。食品から食中毒の原因菌であるEPEC 0148の分離法を検討した結果、保管してあった検食および原材料74検体中12検体から0148を検出することができた。

通常、食中毒の原因菌を食品から検出することは非常に困難である。特に大腸菌が原因である場合、病原大腸菌のみを特異的に増殖させる増菌培地や選択分離培地が存在しないため、分離できない場合が多い。

大腸菌用の増菌培地のうち、今回はmEC培地を使用した。そして培養条件を変えることで大腸菌以外の菌の発育をなるべく抑さえ、原因となった大腸菌のみをより増菌させる方法を検討した。3種類の培養方法で培養後、培養液からリアルタイムPCR法でST遺伝子を対象にスクリーニング試験を行なった。CT値を比較することで、増菌培地中に存在するST産生大腸菌の量を相対的に比較できる。今回供試した食品では、37°C一段階増菌法および二段階増菌法で、より良い増菌効果が認められた。このように、より小さいCT値を示した増菌培養液からEPECの分離を行なうことで、効率よく菌を分離することが可能となった。

食品中(生野菜)には大腸菌以外の菌(特に大腸菌群)が非常に多く存在している。増菌培養でEPECを増やすことができて、同時に大腸菌群も増菌されてしまうため、この中から目的とするEPECのみを分離するためには、大腸菌を選択的に発育させる選択分離培地が必要である。今回、大腸菌の分離にDHL寒天と酵素基質培地であるXM-G寒天の2種類の選択分離培地を用いた。DHL平板では、大腸菌も大腸菌群も同じようなピンク色の集落を示してしまい区別が難しいため、大腸

菌のみを数多く釣菌することが困難となる。一方 XM-G 寒天では、大腸菌が青色から紫色、大腸菌群が赤色と全く異なる色調を示すため、釣菌が非常に容易であった。

J. 実用新案登録

無し

K. その他

無し

E. 結論

通常、食品から原因菌を検出することは困難であるため、複数の条件で増菌培養を行い、リアルタイム PCR 法でスクリーニングをする方法を検討した結果、より増菌効果の高い培養液を選択することが可能であった。また、選択分離培地に大腸菌と大腸菌群を区別することができる酵素基質培地を用いることで、効率よく大腸菌を釣菌することができた。食品 74 検体について、これらの方法を適応した結果、12 検体から食中毒の原因菌である ETEC 0148 を検出することができた。

F. 健康危機情報

無し

G. 学会発表

小西典子, 齊木大, 鈴木康規, 横山敬子, 門間千枝, 仲真晶子, 甲斐明美: 野菜を原因とした毒素原性大腸菌 0148 による大規模食中毒事例, 第 86 回日本感染症学会学術講演会, 2012, 長崎

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

I. 特許取得

無し

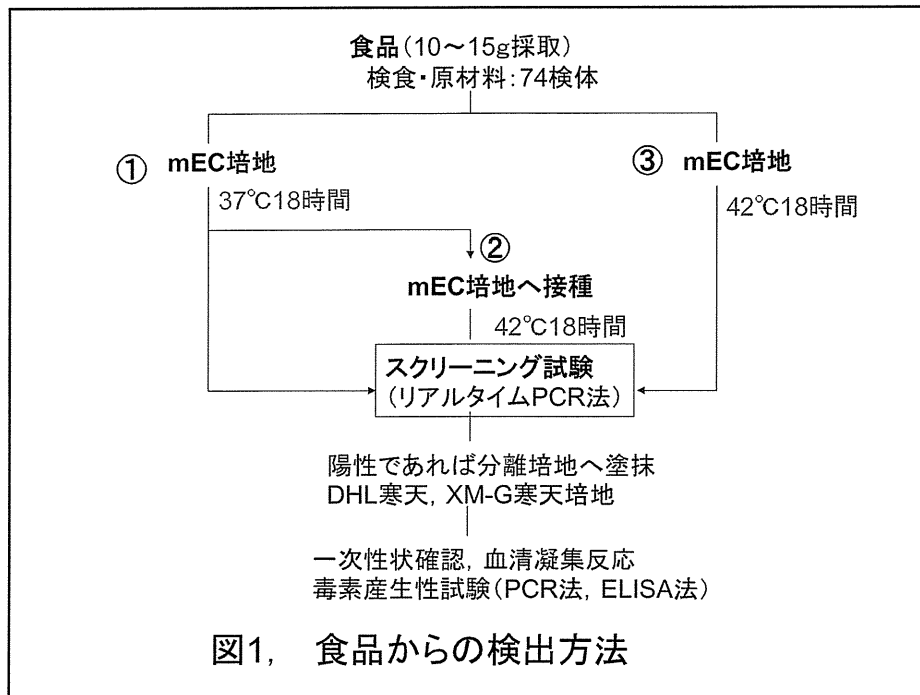


表1, 3種類の増菌培養法とCT値の比較

No.	食品名	CT値		
		mEC 37°C	mEC 37°C →mEC 42°C	mEC 42°C
1	冷奴(ネギ)	◎	◎	▲
2	ネギ	○	◎	▲
3	ネギ	◎	◎	▲
4	冷奴(ネギ)	○	◎	▲
5	カットネギ	○	○	◎
6	カットネギ	◎	◎	◎
7	カットキャベツ	▲	▲	◎

◎20サイクル以下, ○21から30サイクル, ▲31サイクル以上

表2, 2種類の増菌培養法からのETEC O148の検出

方法		PCR陽性 検体数	O148分離 検体数
mEC 37°C	mEC 37°C →mEC 42°C		
+	+	6	5
+	-	1	0
-	+	2	0
-	-	31	0
合計		40	5

