

図5 ブドウ球菌エンテロトキシンを検出する QCM 反応：センサーにプロテイン G を化学吸着させる際の、抗エンテロトキシン A 抗体 ( $\alpha$ SEA) の至適濃度の検討

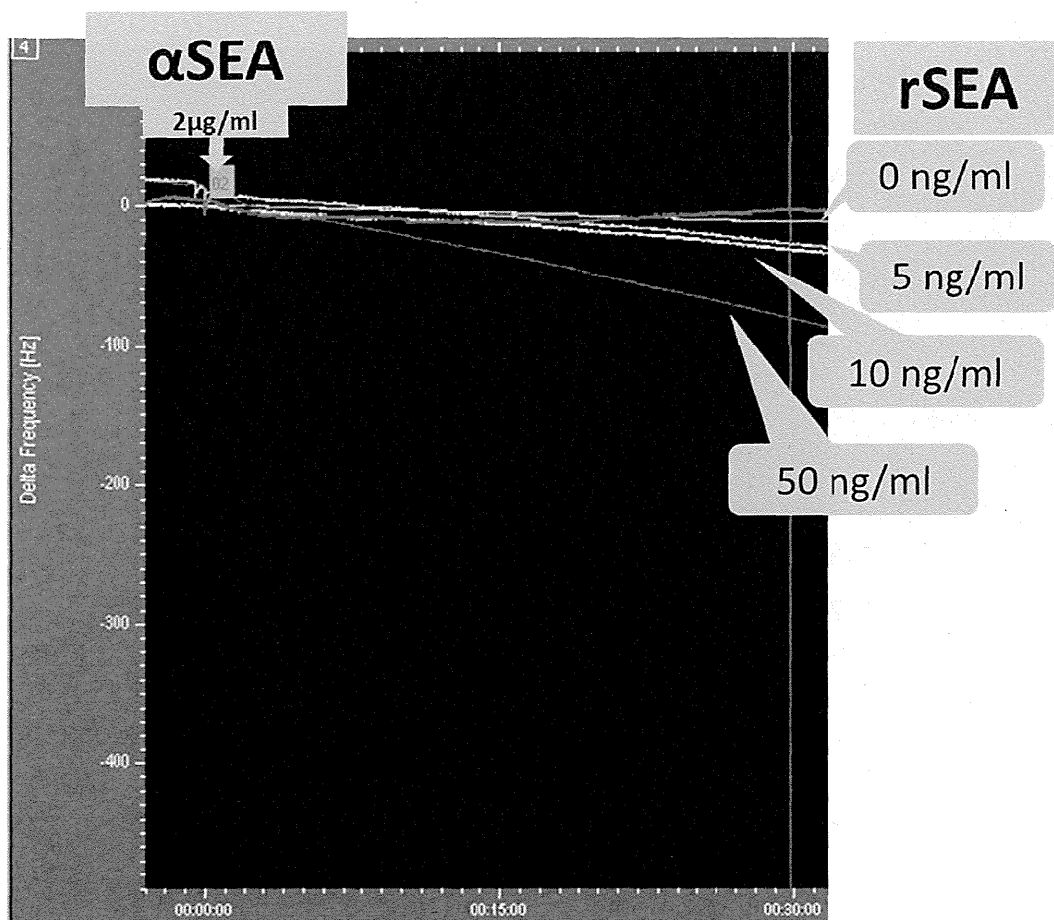


図6 ブドウ球菌エンテロトキシンを検出する QCM 法の検出感度

センサーに化学吸着でプロテイン G を固着させた。その後、抗エンテロトキシン A 抗体を 10 μg/ml の濃度で処理し、エンテロトキシン (rSEA) を添加し、周波数を測定した。

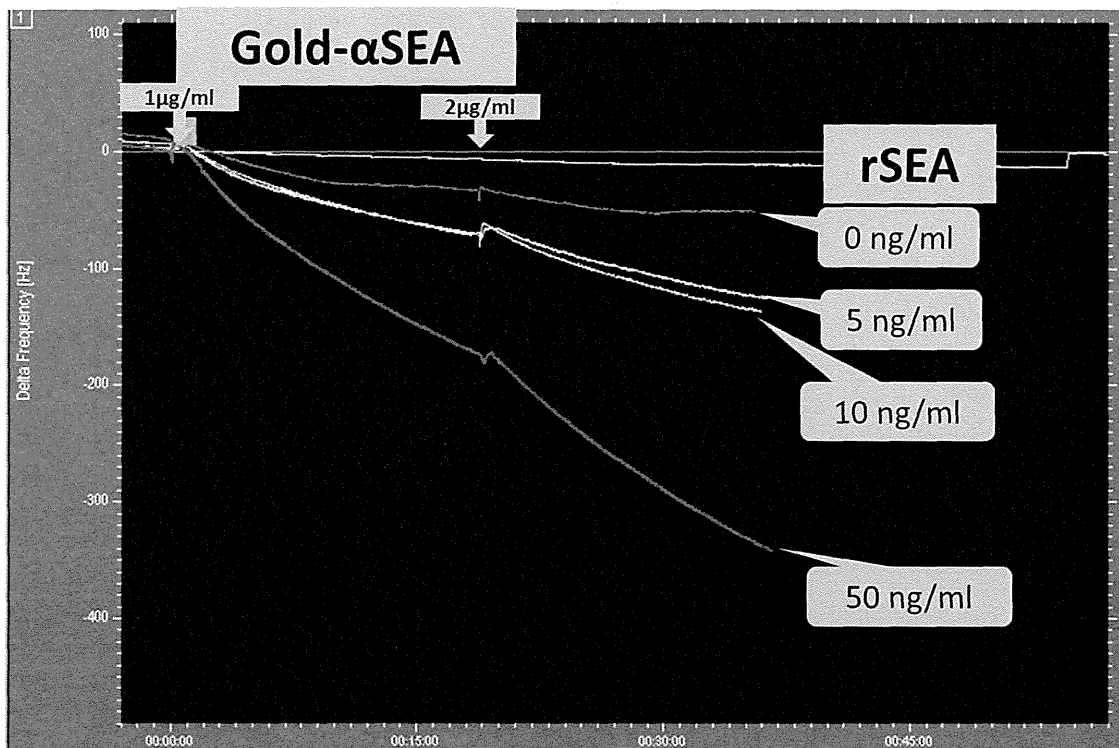


図7 金コロイド標識抗体を用いてのサンドイッチ法によるブドウ球菌エンテロトキシンを検出する QCM 反応

エンテロトキシン添加後、金コロイド標識抗体を、1 および 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で反応容器に添加し、センサーの周波数を測定した。

厚生労働科学研究補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究

平成24年度 分担研究報告書

核酸クロマト法によるエンテロトキシン産生性

ウエルシュ菌検出法の開発

株式会社カイノス 研究開発部

宇治家 武史

厚生労働省科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

「食品中の毒素産生食中毒細菌及び毒素の直接試験法の研究」

平成24年度 分担研究報告書

核酸クロマト法によるエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌検出法の開発

分担研究者 宇治家武史 株式会社カイノス 開発研究部 課長

研究要旨:ウエルシュ菌食中毒の原因食品中には、エンテロトキシン (CPE) 産生性ウエルシュ菌の生菌が多く含まれている。従って、喫食前の食品から CPE 産生性ウエルシュ菌の生菌を検出できれば、食中毒発生の防止に繋がる可能性が高い。そこで、生菌に存在する CPE mRNA を指標とし、Nucleic Acid Sequence-based Amplification (NASBA) - 核酸クロマト法を用いた遺伝子検出法を開発した。この遺伝子検出法を用いれば、増菌培養することなく主要な原因食材であるカレー試料から、食中毒発症菌量に相当する  $10^6$  cfu/g の CPE 産生性ウエルシュ菌を特異的に検出可能であった。今年度は、「操作性の更なる向上と作業手順の確立」および「食中毒事例検体を含むカレー以外の多種食品への適応性の確認」を目的に研究を進めた。操作性の改善としては、核酸抽出工程の前後にある「10%乳剤のフィルター処理工程」および「抽出核酸の希釈工程」を省略化し、操作性が向上するとともに、検出感度を 10 倍向上させる作業手順を確立した。食中毒事例検体は入手し難く、疑似試料を調製し代用した。具体的には、カレー試料中で CPE 産生ウエルシュ菌を増殖させ、本法で検出可能であることを証明した。また、検出感度の CPE 産生ウエルシュ菌を、その 100 倍量の CPE 非産生ウエルシュ菌と共存させた条件下でも、本法で CPE 産生ウエルシュ菌を検出可能であることを明らかにした。本法の多種食品への適応性確認としては、ウエルシュ菌に関して厚生労働省食中毒一覧に記載されている 6 品目の原因食品に CPE 産生ウエルシュ菌を接種し、検出感度の菌量を検出可能であることを確かめた。また、多様な食品成分に起因した増幅反応阻害の有無を把握するための Internal control (IC) を設計し、本検出系を再構築した。同一チューブ内で標的核酸 (本研究では CPE mRNA) と IC を同時に増幅させる共増幅系の場合、増幅反応に必要な酵素や基質を取り合うため、往々にして標的核酸の検出感度は低下するが、本法では CPE 産生ウエルシュ菌の検出感度 ( $10^5$  cfu/g) を維持したまま、共増幅系に再構築可能だった。本法は本研究成果を元に、スイフトジーン CPE 産生ウエルシュ菌「カイノス」という製品名で平成 24 年 10 月 1 日より販売を開始した。

## A.研究目的

グラム陽性嫌気性桿菌であるウエルシュ菌は、河川や海、土壌などに広く分布しており食品を汚染する機会が多い。食中毒の原因となる下痢原性ウエルシュ菌(CPE産生性ウエルシュ菌)は、耐熱性芽胞を形成し食品の加熱調理に耐え生き残り、汚染した食品の温度低下に伴い芽胞から出芽し、急速に増殖を開始する。

下痢や腹痛を起こすウエルシュ菌食中毒には幾つかの特徴が認められる。まず、食中毒の発症には、多量の生菌の喫食が必要であり、原因食品1グラムあたり $10^6$  cfu以上の生菌が、ウエルシュ菌食中毒の発生条件となっている。また、ウエルシュ菌食中毒事例では事件あたりの患者数が多いという特徴も認められる。これは、原因食品に弁当や給食など大規模調理施設で製造された食品が含まれるためである。具体的な原因食品として、カレーやシチューなどの煮込み料理が多い。

食中毒の最も確実な診断は、CPE産生性ウエルシュ菌を分離することであるが、培地による菌分離法ではCPE産生・非産生菌を鑑別することができない。これらを識別するためPCR法を用いた方法が開発されているが、PCR法では遺伝子検出前に菌の増菌培養を必要としており、食中毒防止に寄与する迅速性は有していなかった。

上述したように、ウエルシュ菌食中毒の発症には、 $10^6$  cfu/g以上のCPE産生性ウエルシュ菌の生菌で汚染された食品の喫食が必要である。即ち、喫食される前に大規模調理施設で製造された食品からCPE産生性ウエルシュ菌の生菌を検出できれば、大規模食中

毒発生の防止に繋がる可能性がある。そこで、カレーやシチューなどの煮込み料理に含まれるCPE産生性ウエルシュ菌( $10^6$  cfu/g)の生菌を、培養することなく迅速かつ簡便に検出する遺伝子検出法の開発を行った。

これまでにCEP mRNAを標的とするNASBA-核酸クロマト遺伝子検出法を構築し、*in vitro*合成した10コピーのCPE RNAを30分の増幅反応時間で検出可能である事を示した。また、NASBA増幅工程から65°C5分のプレヒートを省略し操作性を向上させた。本遺伝子検出法は、食中毒の発症菌量である $10^6$  cfu/gのCPE産生性ウエルシュ菌を菌培養することなく直接カレー試料から検出可能であった。更に、この検出法の操作性を確かめるため、研究業務未経験者を含む5名で菌接種試験を実施した結果、5名とも $10^6$  cfu/gのCPE産生性ウエルシュ菌を検出し、本検出法が遺伝子をターゲットとする方法ながら、作業者の技量に左右され難い簡易な方法である事が示された。

平成24年度は、「操作性の更なる向上と作業手順の確立」および「食中毒事例検体を含むカレー以外の多種食品への適応性の確認」を目的として研究を進めた。具体的には、操作性向上に関しては、核酸抽出工程前後の簡略化をはかり、本検出系の操作手順の確立を目指した。多種食品への適応性確認に関しては、厚生労働省のウエルシュ菌食中毒一覧に記載されている原因食品を用いた菌接種試験による本法の検出感度変化の有無を確認した。また、食品成分に由来した増幅反応阻害の有無を把握可能にするため、Internal controlを設計し本検出系を再構築した。こう

した本年度の研究成果を元に、H24 年度中の製品化を最終目標とした。

## B. 実験方法

### 1. 菌株

エンテロトキシン (CPE) 産生性ウエルシュ菌株として、NCTC8239 株を使用した。CPE 非産生性ウエルシュ菌株としては、ATCC13124 株を使用した。

### 2. 培地の調製

0.2 g のチオグリコレート (TGC) 培地に 10 ml の水を加え、オートクレーブ (121°C、20 分) したものを液体培地とした。

寒天培地は、以下の手順で調製した: 5.5 g の CW 寒天培地 (栄研化学株式会社) に 90 ml の水を加えオートクレーブ (121°C、20 分) する。50°C まで温度を下げた後、5 ml の卵黄と 5 ml の生理食塩水を加え、プラスチックシャーレに 10 ml ずつ分注し、2 時間室温で寒天培地表面を乾燥させた。

### 3. ウエルシュ菌の液体培養

TGC 培地にウエルシュ菌を接種し、37°C ウォーターバスで培養した。ウエルシュ菌培養液の濁度は、DU640 (ベックマン・コールター株式会社) を用い、OD<sub>600</sub> の値を計測した。本検討では、培養液濁度として 0.3-0.5 Abs のウエルシュ菌を用いた。

### 4. ウエルシュ菌の嫌気培養

TGC 培地で液体培養したウエルシュ菌を生理食塩水で段階希釈し、希釈菌液を CW 寒天培地上に滴下してコンラージ棒で広げた。菌を接種した寒天培地は、速やかに脱酸素剤と脱酸素指示薬入りの嫌気ボックス内で、密

閉した後 37°C インキュベーターで培養した。

### 5. カレー試料中でのウエルシュ菌培養

オートクレーブ (121°C、20 分) した 200g のレトルトカレーに  $5 \times 10^2$  cfu/g のウエルシュ菌を接種し、速やかに脱酸素剤と脱酸素指示薬入りの嫌気ボックス内に密閉静置し、37°C で 3 日間嫌気培養した。

### 6. 菌接種試験

ストマフィルター S タイプ (株式会社 GSI クレオス) に、25 g のレトルトカレーおよび 225 ml の生理食塩水を加え 10% 乳剤とした。ここに TGC 培地で培養したウエルシュ菌をレトルトカレー 1 g あたり  $10^5$  または  $10^6$  cfu で接種し、直ちに Pulsifier (Microgen Bioproducts Ltd.) で 1 分間混和した。この 10% 乳剤から 1 ml を 1.5 ml チューブに入れ、1,890 x g 以上で 1 分間遠心し、ウエルシュ菌を沈澱させた。上清を除去した沈澱に核酸抽出試薬を 400  $\mu$ l 加え、vortex で 10 秒間混和した後、90°C のヒートブロックで 5 分間加熱した。加熱チューブは 1,890 x g 以上で 5 秒間遠心し上清と沈澱部に分け、上清部を抽出核酸液とした。抽出核酸液は、NASBA 増幅の試料として使用した。NASBA 増幅産物の検出には、サンドイッチハイブリダイゼーションを原理とする核酸クロマト法を用い、検出ラインの有無を目視判定した。

### 7. Nucleic Acid Sequence-based Amplification (NASBA) 法 1)

核酸増幅法である NASBA 法の試薬には、NASBA Amplification キット (株式会社カインノス) を使用した。NASBA 試薬に 55  $\mu$ l の

NASBA 溶解液を加え vortex で混和し、NASBA 反応溶液を調製した。NASBA 酵素試薬に 30  $\mu$ l の RNase free water を加え、NASBA 酵素液を調製した。NASBA 反応溶液に最終濃度で 0.4  $\mu$ M の CPE 産生ウエルシユ菌特異的なフォワード (F11) およびリバース (R81) プライマーを加え反応液を調製した。

核酸増幅は以下の手順で実施した：0.5 ml チューブに反応液 5 $\mu$ L と抽出核酸 2.5  $\mu$ l を加え混和した後、41 $^{\circ}$ C のヒートブロックで 5 分保温した。チューブ温度の低下に注意し、ヒートブロック上で NASBA 酵素液を 2.5  $\mu$ l 加え、素早く 5 回ピペティングした後、41 $^{\circ}$ C で 30 分保温した。

## 8. 核酸クロマトグラフィー (核酸クロマト法) 2)

核酸クロマト法で使用する検出ストリップには、NASBA 法で増幅したヌクレオチド鎖と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドプローブをメンブレン、およびラテックスパッド中の着色微粒子に結合させている。検出ストリップ上を NASBA 増幅産物が展開すると、これらオリゴヌクレオチドプローブと配列特異的にサンドイッチハイブリダイゼーション結合し、検出ストリップ上に着色微粒子のラインが目視で識別される。

この核酸クロマト法で NASBA 増幅産物を検出する場合は、NASBA 増幅が終了したチューブに 90  $\mu$ l の展開液を加え、検出ストリップを挿入し、NASBA 産物を展開させ、15 分後に着色ラインを目視確認した。

## 9. Internal control (IC) との共増幅系

NASBA 試薬および NASBA 反応溶液を上記 7. に従い調製した。NASBA 反応溶液には、フォワードおよびリバースプライマーの他、さらに IC 用のフォワード (IC-F)、リバース (IC-R) プライマー、および IC-テンプレートを加え反応液を調製した。核酸増幅は、上記 7. と同じ操作を行った。

## C. 結果と考察

### 1. 操作性と検出感度の向上

昨年度の検出法では、食品成分の影響を低減させるため、食品の 10%乳剤をフィルター濾過する前処理工程を含んでいた。ウエルシユ菌食中毒の原因食品には、カレー以外に、麻婆豆腐やおから等、様々な食品がある (厚生労働省のウエルシユ菌食中毒一覽)。今後、これら多様な食品へ本検出法を適応するうえで、食品種によってはフィルターの目詰まりから、ウエルシユ菌を含む濾過試料の回収が困難となる可能性がある。さらに、フィルター処理工程そのものが資材や工程増に伴うコスト負担や、操作性低下の一因となっていた。昨年度の研究知見から、カレー試料中のウエルシユ菌を直接核酸増幅することが可能であることが示されたことから、このフィルター処理工程を省略するための新たな操作方法を検討した。

様々な食品成分の除外方法を試した結果、最終的に 10%乳剤の遠心法が最も操作性に優れていることを見出した。具体的な操作方は、まず食品の 10%乳剤 1 ml を 1.5ml チューブに入れ 1 分間遠心し、食品成分由来の



上清を除去する。その後、ウエルシュ菌を含む遠心沈殿物に核酸抽出液を加え、核酸抽出工程に移る。この遠心法は、フィルター法に比べると単純であり、操作性に優れた方法であった。

また、昨年度に構築した検出法では、上記フィルター処理以外に核酸抽出工程後に抽出核酸の希釈工程が必要であった。これは抽出核酸に混入する増幅阻害物質の影響を軽減するために実施していたが、操作性低下の一因でもあるため、同様に工程の省略化を試みた。幾つか増幅阻害対策法を検討し、最終的に核酸抽出液を現行の 50  $\mu\text{l}$  から 400  $\mu\text{l}$  に増量するのみで、抽出核酸の希釈を行うことなく NASBA 増幅法の試料に適用可能となることを確認した。

上述の「10%乳剤のフィルター処理工程」および「抽出核酸の希釈工程」を省き、操作性が向上した新たな操作手順で、カレー試料の菌接種試験を実施した。その結果、変更前と同様にウエルシュ菌食中毒の発症菌量である  $10^6$  cfu/g の菌を検出し得た (図 1)。

操作手順変更の副次効果として、10%乳剤のフィルター処理工程から遠心法への変更に伴い、10%乳剤中のウエルシュ菌は遠心濃縮され、結果的に抽出効率改善から検出感度向上が期待された。10%乳剤 1 ml 中に含まれるウエルシュ菌量と遠心沈殿物中のウエルシュ菌量を比較した結果、1,890 x g の遠心力で約 90%の菌が沈殿する事が判明した。さらに、実際にカレー試料を用いた菌接種試験から、従来の検出感度 ( $10^6$  cfu/g) の 10 倍となる、 $10^5$  cfu/g の菌を検出し得た。(図 1)

新たに構築した操作手順は、操作性の大幅

な向上のみならず、本検出法の性能改善にも寄与し、検出感度は 10 倍高くなった。以降の検討では、この新規操作手順に従い試験を行った。

## 2. 抽出時間

新規操作手順に従い抽出核酸の液量を 50  $\mu\text{l}$  から 400  $\mu\text{l}$  へ増量したため、核酸抽出の処理時間への影響を確認した。具体的には、核酸抽出の処理時間を 1、3、5、10、および 20 分と変化させ、カレー試料を用いた菌接種試験における検出感度を調べた。その結果、90°C 1 分でも NASBA 増幅に十分な CPE mRNA が抽出されること、また、90°C で 20 分処理しても  $10^5$  cfu/g の CPE 産生ウエルシュ菌を検出し、検出感度に影響ないことが示された (図 2)。このことから、核酸抽出液量を 400  $\mu\text{l}$  に増量した新操作手順でも、核酸抽出時間は従前同様 5 分で十分である事が確認された。

## 3. 疑似検体

食中毒の事例検体の入手が困難であるため、本研究ではこれまで食品試料への菌接種試験で代用してきた。上述の結果から本法の操作手順が確立したので、より実検体に近い食品試料を用い、CPE 産生ウエルシュ菌の検出能を調べた。具体的には、200 g のカレー試料に  $5 \times 10^2$  cfu/g のウエルシュ菌を接種し、嫌気的条件下でカレー試料中の CPE 産生ウエルシュ菌を増殖させた疑似検体を調製し、この食品試料からの菌検出試験を行った。37°C で 3 日静置した後、まずこのカレー試料 25 g を用いて 10%乳剤を調製し、CW 寒天培

地で培養した結果、菌数は  $5 \times 10^5$  cfu/ml と算出された。また同 10%乳剤を用いて核酸抽出、NASBA 増幅、核酸クロマト検出を行うと明確な検出ラインが示された。この事から菌接種試験のウエルシュ菌だけでなく、食品試料中で増殖したウエルシュ菌でも本法で検出可能であることが示された (図 3)。また、上記カレー試料を  $-20^\circ\text{C}$  で 1 ヶ月冷凍保存した後、融解し本法で再試験した場合でも明確なラインを示した。

#### 4. CPE 陰性株共存下での CPE 陽性株の検出

食中毒事例検体の場合、試料中に CPE 産生ウエルシュ菌のみ存在する事は希であり、通常他の菌も共存する。そこで、過剰量の他菌を共存させても CPE 産生ウエルシュ菌を検出し得るかを確認した。

共存菌には、ゲノム上類似性が高いながら、既に本法では非特異検出されない事が証明されている CPE 非産生のウエルシュ菌を用い、その共存時の菌量は、CPE 産生ウエルシュ菌の 100 倍量に設定した。25 g のカレー試料に CPE 産生ウエルシュ菌 ( $10^5$  cfu/g) および CPE 非産生ウエルシュ菌を ( $10^7$  cfu/g) を加えた菌接種試験の結果、本法では CPE 産生ウエルシュ菌よりも 100 倍多い菌との共存下であっても、CPE 産生ウエルシュ菌の検出感度低下は認められなかった (図 4)。

#### 5. 複数種のカレー試料を用いた菌接種試験

これまでのカレー試料を用いた試験は、いずれも試験再現性を重視し、特定メーカー (A 社) のレトルトカレーを用いていた。しかし、レトルトカレーは、各メーカーで塩分

量や脂質量、タンパク質量など成分が異なり、本法が成分の異なる多様なカレーで適応可能かは不明だった。そこで、従前から検討に用いていた A 社とは異なる 4 社のレトルトカレーを用い、ウエルシュ菌の菌接種試験から検出感度が変化するかを確かめた。各メーカーのカレー 25g に生理食塩水 225 ml を加え、 $10^5$  cfu/g のウエルシュ菌を接種し 10%乳剤を調製すると、メーカーにより沈澱の量や色が異なっていた。しかし、本法での検出では、全メーカーのカレーで、 $10^5$  cfu/g のウエルシュ菌を検出した (図 5)。

#### 6. カレー以外の食品への適応性

ウエルシュ菌食中毒の主要な原因食品はカレーであるが、八宝菜や麻婆豆腐など多種多様な食品が原因食品となっている (厚生労働省 ウエルシュ菌食中毒一覧, 2008-2010 年掲載情報)。カレー以外の食品への本法の適応性を調べるため、食中毒原因食品から、肉じゃが、麻婆豆腐、春巻き、八宝菜、パスタ、およびおからの 6 種を選択し、菌接種試験を実施した。各食品から 25 g を採取し、 $10^5$  cfu/g のウエルシュ菌を加え、菌接種試験を実施した結果、全ての食品でウエルシュ菌を検出可能であった (図 6)。

#### 7. Internal control との共増幅系の構築

多種多様な食品に本法を適応させる上で、食品成分に由来した増幅反応阻害の把握は必須である。そこで、NASBA 増幅反応時に同一チューブ内で CPE mRNA と共増幅する Internal control (IC) を設計した。IC のヌクレオチド配列は、非特異増幅や非特異検出を

防ぐために、既知の配列とは異なる配列であることが望ましい。また、核酸クロマトで検出する場合、CPE 検出ラインとは異なる IC 専用の位置でライン検出させる必要があり、検出ストリップの改良も行った。

まず、Gene Bank に登録されているヌクレオチド配列を確認、比較検討することで、登録済みの配列とは類似性を有しない新たなヌクレオチド鎖 (IC-テンプレート) を見出した。

IC-テンプレートに対する NASBA 用 IC-プライマーとして、IC-F および IC-R を設計した。CPE mRNA との共増幅系を構築する前に、10 コピーの IC-テンプレートを用いて、IC-プライマーによる NASBA を実施した結果、核酸クロマトで CPE ラインとは異なる位置で IC ラインを検出した。

IC-テンプレートの NASBA 増幅を確認後、CPE の NASBA 増幅系との共増幅試験を行った。共増幅時の性能は、レトルトカレー 25 g に  $10^5$  cfu/g のウエルシュ菌を加えた菌接種試験で検証した。同一チューブ内で標的核酸 (本研究では CPE mRNA) と IC テンプレートを同時に増幅させる共増幅系の場合、増幅反応に必要な酵素や基質を取り合うため、往々にして標的核酸の検出感度は低下するが、本法では CPE 産生ウエルシュ菌の検出感度 ( $10^5$  cfu/g) を維持しながら共増幅系の再構築に成功した (図 7)。

#### D. 結論

核酸抽出の前処理工程として実施していた 10%乳剤のフィルター処理を遠心法に変更する事で、操作性の向上を果たした。また、

核酸抽出液の量を 50  $\mu$ l から 400  $\mu$ l へ増量することで、核酸抽出後の希釈工程が省かれ、より簡便な操作手順を確立する事に成功した。更に、この新しい操作手順による検出法では、性能面でも改善が認められ、カレー試料への菌接種試験において、検出感度が 10 倍向上した。この検出感度から、本法では食中毒発症菌量よりも 1 桁低い菌量を検出し得る。

食中毒事例検体は入手困難で本研究では試験できないため、カレー試料中でウエルシュ菌を増殖させた疑似検体を調製した。この疑似検体からでも、増殖したウエルシュ菌を本法で検出可能であることが示された。また、100 倍量多い CPE 非産生ウエルシュ菌を混合した条件下でも、検出感度に影響することなく CPE 産生ウエルシュ菌を検出した。

各種食品への適応性を確認するため、塩分量や脂質量など成分の異なる 4 社のレトルトカレーを用いて菌接種試験を実施した。何れのメーカーのレトルトカレーでも  $10^5$  cfu/g の検出感度で検出し得た。次に、カレー以外の食品への適応性を確認した。厚生労働省のウエルシュ菌食中毒一覧に記載されている原因食品から 6 食品 (肉じゃが、麻婆豆腐、春巻き、八宝菜、パスタ、おから) を選定し試験した結果、何れの食品でも  $10^5$  cfu/g の検出感度で CPE 産生ウエルシュ菌を検出可能であった。

多種多様な食品に本法を適応する上で、食品成分に由来した増幅反応阻害の把握は必須であることから、増幅阻害の有無を把握する Internal control (IC) を設計した。データベース登録情報との比較検討から、既存配列

とは類似性を有しない新たなヌクレオチド配列を見出し、IC テンプレートとした。この IC テンプレートが NASBA 法で増幅されることを予め確認した上で、CPE mRNA との共増幅系の構築を行った。この共増幅系では、増幅反応時に同一チューブ内で IC 増幅系と CPE 増幅系が同時並行して動くため、酵素と基質を奪い合う。このため、検出感度の低下が懸念されたが、菌接種試験における検出感度は、非共増幅系と同じ 105 cfu/g であった。

これら検出法の性能を踏まえ、株式会社カイノスにおいて製品化を進め、平成 24 年 10 月 1 日にスイフトジーン CPE 産生ウエルシュ菌「カイノス」という製品名で上市、販売を開始した。

#### E. 健康危害情報

なし

#### F. 文献

1) Compton J :Nucleic acid sequence-based amplification、Nature、350 : 91-92 (1991)

2) 宇治家武史、簡便な遺伝子検査のツール「核酸クロマト法」、臨床化学 36 : 19-24 (2007)

#### G. 研究発表

なし

#### H. 学会発表

宇治家武史、林 司、山本茂貴、鎌田洋一. NASBA 核酸クロマト法を用いた新しいウエルシュ菌の検出法. 第 33 回 日本食品微生物学会学術総会. 2012 年 10 月. 福岡.

#### I. 学知的所有権の取得状況

1) 特許取得

なし

2) 実用新案取得

なし

3) その他

CPE 産生ウエルシュ菌の検出試薬の製品化 (平成 24 年 10 月 1 日上市)

製品名 : スイフトジーン CPE 産生ウエルシュ菌「カイノス」

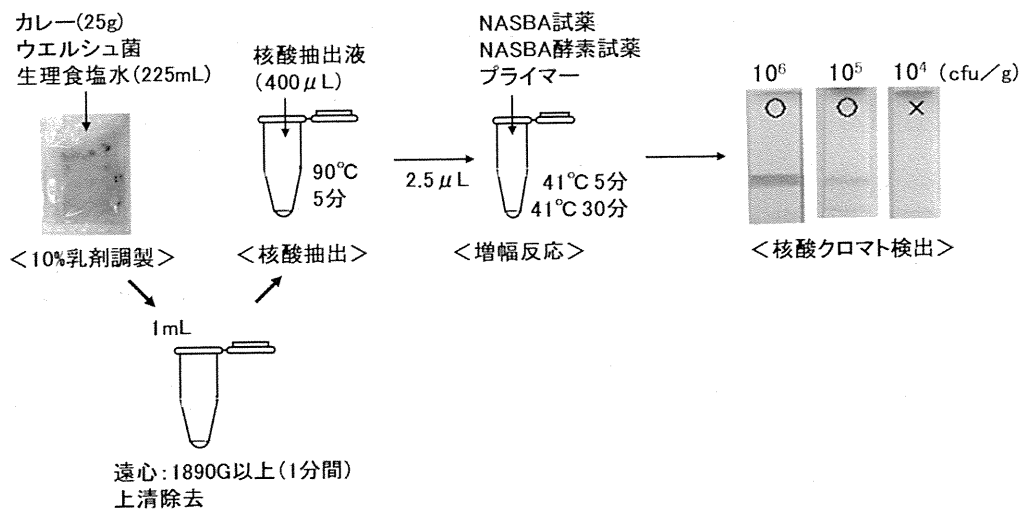


図1 CPE 産生ウエルシュ菌を検出する新しい操作手順

10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup> cfu/g の CPE 産生ウエルシュ菌の菌接種試験

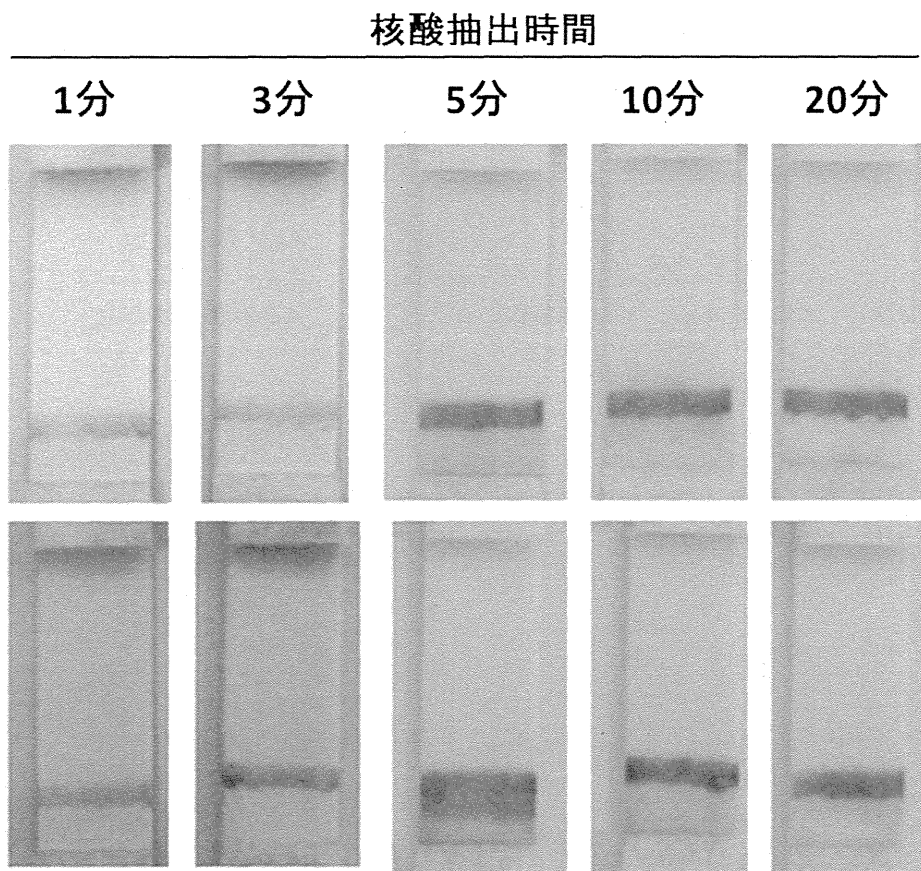


図 2 核酸抽出時間

$10^5$  cfu/g の CPE 産生ウエルシュ菌の菌接種試験において

90°Cの核酸抽出時間を変えての試験

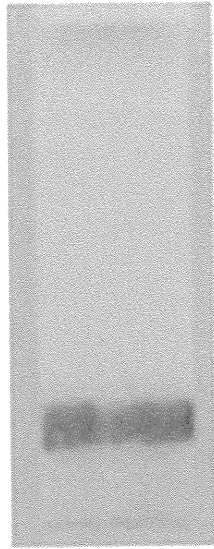


図3 疑似検体からのCPE産生ウエルシュ菌検出

カレー試料中で増殖させたCPE産生ウエルシュ菌の検出

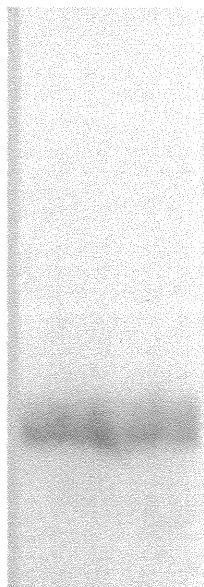


図4. CPE 非産生ウエルシュ菌共存下での CPE 産生ウエルシュ菌の検出

$10^5$ cfu/g の CPE 産生ウエルシュ菌と  $10^7$ cfu/g の CPE 非産生ウエルシュ菌を用いたカレー試料への菌接種試験



レトルトカレーのメーカー

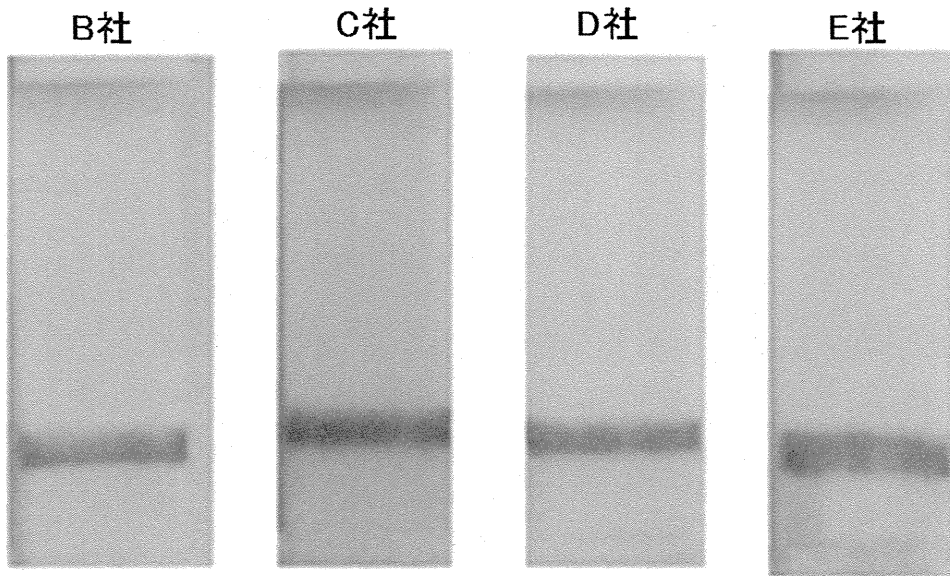


図5 レトルトカレーのメーカー差

$10^5$ cfu/g の CPE 産生ウエルシュ菌を用いたカレー試料への菌接種試験

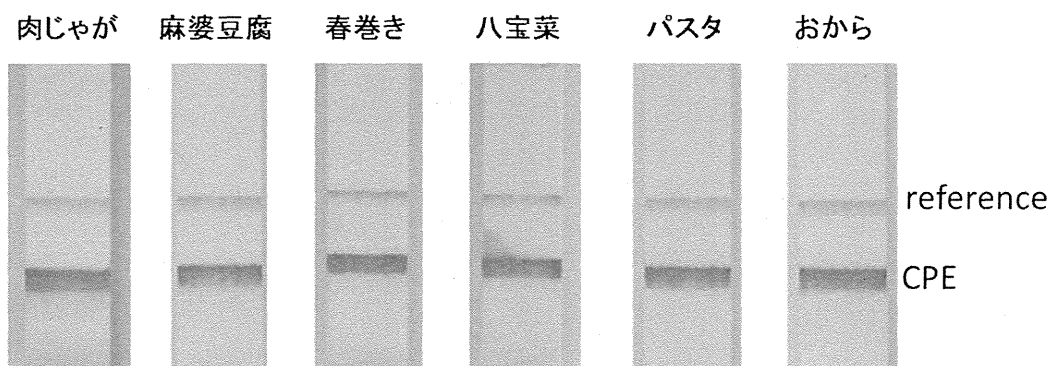


図6 各種食品への菌接種試験

CPE 産生ウエルシュ菌の接種菌量は  $10^5$ cfu/g

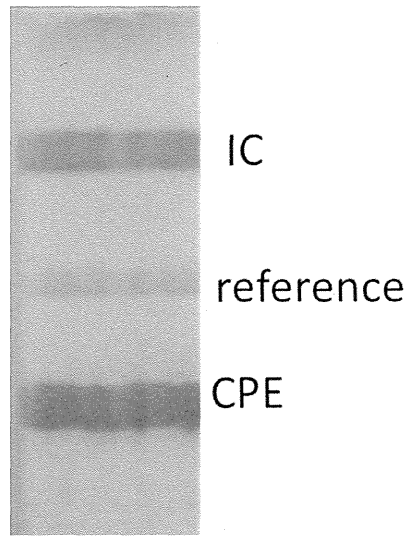


図7 Internal control(IC)との共増幅 NASBA

$10^5$ cfu/g の CPE 産生ウエルシュ菌を用いた菌接種試験

厚生労働科学研究補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究

平成24年度 分担研究報告書

ウエルシュ菌食中毒発現機構の考察

大阪府立大学大学院

三宅 眞実