

厚生労働科学研究補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業
食品中の毒素産生微生物および試験法に関する研究
平成22 - 25年度
分担研究報告書

核酸クロマト法による毒素産生ウエルシュ菌および
セレウス菌の検出法に関する研究

株式会社カイノス

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

「食品中の毒素産生微生物及び毒素の直接試験法の研究」

平成23 - 25年度 分担研究報告書

核酸クロマト法による毒素産生ウエルシュ菌および
セレウス菌の検出法に関する研究

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とされている。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する事が食中毒発生の防止に繋がる可能性が高い。生菌に存在する CPE mRNA を指標とした遺伝子検査法の開発を行った。Nucleic Acid Sequence-based Amplification (NASBA) -核酸クロマト法を利用して開発した遺伝子検査法は、CPE 産生性ウエルシュ菌を特異的に検出するのみならず、10 コピー（分子）の RNA を 15 分の増幅及び 20 分の検出時間で検出する感度と迅速性を有していた。ウエルシュ菌食中毒の主な原因食材の一つであるカレーを試料とした場合、本遺伝子検査法により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検出した。以上の研究成果を基に、スイフトジーン セレウリド産生セレウス「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。

セレウリド産生菌を特異的に検出するために、セレウリド合成酵素遺伝子を含む *ces* オペロンのポリシストロニック mRNA を標的核酸とした。また、検出法の汎用性を高めるため、専用機器や高額な機器を必要としない Nucleic Acid Sequence-based Amplification (NASBA) -核酸クロマト法を遺伝子検出法として採用した。NASBA 法及び核酸クロマト法に最適化させたプライマーやプローブは、標的核酸の合成 RNA (10 コピー) を僅か 10 分の増幅時間で検出する能力を示した。またセレウリド産生セレウスは 10cfu/t の感度で特異的に検出された。セレウス食中毒の事例食品は入手困難だったため、食品試料からのセレウリド産生セレウスの検出は、食品試料への菌接種試験で確認した。菌を接種する食品は、厚生労働省の食中毒一覧（2008-2011 年）を参照し、米飯やチャーハンを含む 5 種を用いた。これら食品への菌接種試験の結果、本検出法は全 5 種食品に対して 10^4 cfu/g の感度でセレウリド産生セレウスを検出した。この感度は、セレウリド食中毒の発症菌量とされる 10^5 cfu/g よりも 10 倍高かった。以上の研究成果を基に、スイフトジーン セレウリド産生セレウス「カイノス」という製品名で平成 25 年 8 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。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。ウエルシュ菌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。

セレウス (*Bacillus cereus*) は、土壌や河川などに広く分布しており食品の汚染機会が多いため食材や食品の製造過程から完全に除去することは難しい。セレウスによる食中毒には嘔吐型と下痢型の 2 種類があるが、日本における食中毒の大部分は嘔吐型である。嘔吐型食中毒を引き起こす嘔吐毒(セレウリド)は耐熱性を有しているため、加熱調理で毒性を失う事はなく、加熱殺菌による食中毒予防は困難である。

セレウリドを食材から簡便に検出する

方法がない現状では、セレウリド産生セレウスの検出が、本菌による食中毒の予防に有用な手段と考えられる。セレウリド産生セレウスを検出する方法として、これまでに PCR 法やイムノクロマト法が開発されているが、いずれも食材からの検出には前培養が必要であり、結果判定は翌日まで待つ必要がある。

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。そこで、前培養を経ることなく、食品中の CPE 産生ウエルシュ菌およびセレウリド産生セレウス菌を迅速かつ簡便に検出する遺伝子検出法を構築し、食中毒事件の原因調査のみならずセレウス食中毒予防へ繋げることを目標に研究を行った。

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。

セレウリド産生セレウス株としては、Type strain No.13 株を使用した。セレウリド非産生株としては、09-75-22 株（大阪府立大の西川先生より供与）を使用した。

2) 培地と菌培養

ウエルシュ菌の培養について、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、CW 寒天培地 (栄研化学株式会社) に卵黄液を加えたものを用いた。

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、OD₆₀₀ 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。

セレウス菌の培養について、Brain Heart Infusion (BHI, ベクトン・ディッキンソン社) 培地を用いた。BHI 培地にセレウス菌を接種し、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、OD₆₀₀ 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 のセレウス菌を用いた。

4) 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 (株式会社カイノス) を使用した。NASBA 試薬に 55 µL 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 µL の NASBA 酵素溶解液を加え、NASBA 酵素液を調製した。NASBA 反応溶液にフォワードおよびリバース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 µL と抽出核酸 2.5 µL を加え混和した後、41 °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 µL 加え、素早く 5 回ピペティングした後、41 °C で 30 分保温した。

5) 鋳型核酸の調製

セレウリド合成酵素遺伝子は *ces* オペロンを構成しており、このポリシストロニック mRNA を標的核酸とした。性能評価のため、この *ces* オペロンを基に *in vitro* で RNA を合成した。合成 RNA のコピー数は、260nm の吸光度より算出した。

6) NASBA プライマー

標的核酸と特異性の高い配列を検索し、NASBA 用のフォワードおよびリバースプライマーを設定した。各プライマーは標的核酸とアニール可能な約 20 塩基のオリゴヌクレオチドであり、リバースプライ

マーの 5' 末端側には、T7 RNA polymerase のプロモータ配列を付加した。

6) 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が集積しラインとして目視で識別される。

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 μ 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 分後の着色ラインを目視で確認する。

7) 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 μ l 加え、vortex で 10 秒間混和した後、90 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殿部に分け、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。

ストマフィルターS タイプ (株式会社 GSI クレオス) に、25g の米飯および 225mL の生理食塩水を加え 10% 乳剤とした。ここに BHI 培地で培養したセレウスを米飯 1g あたり 10^4 cfu から 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 1mL を 1.5mL チューブに入れ、1890 G 以上で 1 分間遠心し、セレウスを沈澱させた。上清を除去した沈澱に核酸抽出試薬を 200 μ L 加え、vortex で 10 秒間混和した後、90 のヒートブロックで 5 分間加熱した。加熱チューブは 1890 G 以上で 5 秒間遠心し上清と沈殿部に分け、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。

C . 結果と考察

1) NASBA 増幅性能

NASBA プライマーの増幅性能を確認するため、10 コピーの合成 RNA を鋳型に用い、増幅時間を 5、10、15、20 および 30 分と変え NASBA 反応を行った。NASBA 産物の検出は核酸クロマト法を用いた。その結果、10 コピーの合成 RNA であれば、10 分の増幅時間で、クロマトストリップ上にラインを検出した。しかし 10 分の増幅時間では核酸クロマトのライン強度は低く、十分なライン強度を得るためには、15 分以上の増幅が必要であった (図 1)。

増幅時間を 15 分に設定し、合成 RNA 10 コピーの増幅再現性を確かめた。5 回連続で評価した結果、全ての試験でラインが検出された。以上の結果より、本法は 15 分増幅で 10 コピーの合成 RNA を増幅する性能を有していると判断された。

2) 菌接種試験

平成 23 年度に CPE 産生ウエルシュ菌をカレー試料から直接検出する方法を開発した。この核酸抽出試液および検出手順を応用し、セレウリド産生セレウスを食品試料から直接検出する方法の構築を試みた。食品試料からのセレウリド産生菌検出試験は、セレウス食中毒の事例食品の入手が困難なため、食品試料への菌接

種試験で代用された。菌を接種する食品は、厚生労働省の食中毒一覧 (2008 年-2011 年掲載情報) から選択し、最初は米飯で確認した。米飯への菌の接種量は、米飯 1g 当たり 10^3 、 10^4 および 10^5 cfu とした。

CEP 産生ウエルシュ菌をカレー試料から検出するために開発した核酸検出試液および検出手順は、セレウリド産生セレウスを米飯から検出上でも有用であり、 10^4 cfu/g の菌を検出した (図 4)。この検出感度は、食中毒の発症菌量とされる 10^5 cfu/g よりも 10 倍高かった。また、核酸抽出から検出までの所用時間は約 1 時間であり、本法が迅速かつ高感度な方法であることが示された。

3) 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。

D . 結論

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 10^5 cfu/g であった。

セレウス菌は土壌菌であり、食品の汚染機会も多い。しかし、セレウリドを食材から簡便に検出する方法がない現状では、セレウリド産生セレウス菌の検出が、本菌による食中毒の予防に有用な手段と考えられる。

本法は、遺伝子検出法ながらセレウリド合成酵素遺伝子を含む *ces* オペロンのポリシストロニック mRNA を標的核酸とし、NASBA-核酸クロマト法を採用したことで、専用機器や高額機器を必要とせずに、セレウリド産生菌を特異的に検出することが可能である。また、約 1 時間で食品試料からセレウリド産生菌を 10^4 cfu/g の感度で直接検出が可能である。この感度は食中毒の発症量とされる 10^5 cfu/g よりも 10 倍高いため、食中毒事件の原因調査のみならず、大量調理施設等における調理前食材検査への本法の適応が、セレウス菌食中毒の防止に繋がる事が期待される。

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。また、本研究成果を基に、スイフトジーン セレウリド産生セレウス「カイノス」という製品名で平成25年8月1日より販売を開始した。

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

- 1) 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32回日本食品微生物学会学術総会. 2011年10月.

東京.

- 2) 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.

- 2) 小松原英介、宇治家武史、林 司、浅野桃子、西川禎一、鎌田洋一. NASBA 核酸クロマト法によるセレウリド産生菌の簡易検出法の確立. 第34回日本食品微生物学会学術総会. 2013年10月. 東京.

I . 学知的所有権の取得状況

- 1) 特許出願
(特願2001-189796、
特許出願日平成23年8月31日)

- 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」

セレウリド産生セレウスの検出試薬の製品化(平成25年8月1日上市)

製品名:スイフトジーンセレウリド産生セレウス「カイノス」