

平成 27 年度・衛生研究所研究費事業報告

リアルタイム PCR 法による食中毒原因菌の  
一斉迅速検出に関する検討（その 2）

（計画年度：平成 27 年度）

研究代表者

食品微生物担当

門脇奈津子

共同研究者

食品微生物担当

榊田希 星野梢 大阪美紗 大塚佳代子

副所長兼食品微生物検査室長

鈴木浩治\*

はじめに

食中毒発生時には原因を特定するため、迅速かつ的確な検査が求められる。現在、食中毒菌の培養法による細菌検査では原因菌が確定されるまでに日数を要し、各種の分離同定試験が必要となる。そのため、リアルタイム PCR（以下 rPCR）を利用した食中毒原因菌の一斉迅速検出が様々な機関で開発されている。担当でも rPCR による一斉迅速スクリーニングを導入するにあたり、平成 26 年度から衛生研究所研究事業により、便を用いた添加回収試験を行っている。今年度は平成 26 年度に未実施であった菌種について便への添加回収試験による検出を行い、更に食品からの検出についても添加回収試験にて評価を行った。

材料および方法

1 rPCR による食中毒菌検出法

便からの検出については、腸管出血性大腸菌 6 種の O 血清群、リステリア及びエルシニアを対象に検討を行った。また、平成 26 年度に便の添加回収試験において低菌数からの検出が困難であったセレウス菌（嘔吐毒）について再試験を行った。食品からの検出については、カンピロバクター・ジェジュニ及び黄色ブドウ球菌を対象に検討を行った。

2 便の添加回収試験

食中毒菌の標的遺伝子が陰性であることを確認した便に 9 倍量の生理食塩水を加え 10 倍乳剤とし、チューブに 2mL ずつ入れ、遠心後、上清を捨て約 200mg の便沈渣を作製した。2 名の便沈渣それぞれに 1 菌種につき 3 段階の濃度の菌液を添加し検体とした。検体を抽出キットにて抽出し、rPCR による遺伝子検出を行った。また培養法と比較するため、検体は培養検査を行った。

3 食品の添加回収試験

1 菌種につき 2 食品を使用した。カンピロバクター検体については、食品に 9 倍量の増菌培地を加え培養した培養液を調製し、1mL あたり  $10^2$  及び  $10^1$  cfu になるよう菌を添加した。黄色ブドウ球菌検体については、9 倍量の生理食

塩水を加えた食品乳剤を調製し、1mL あたり  $10^3$ 、 $10^2$  及び  $10^1$  cfu になるよう菌を添加した。それぞれの検体はアルカリ熱抽出法にて抽出し、遺伝子検出を行った。また培養法と比較するため、検体は培養検査を行った。

成果概要

腸管出血性大腸菌 O 血清群を添加した便からの rPCR 法による検出は、全ての O 血清群が  $10^4$  cfu/200mg の菌数の検体から検出され、使用したプライマーは有効であった。しかし、血清群によっては培養法よりも rPCR 法の方が高い菌数が必要であった。このことから、便に菌量が少ない場合、rPCR 法が陰性であっても培養法で陽性になる場合があり、今後 rPCR 法を O 血清群におけるスクリーニングとして使用するには、増菌培養後の便検体を抽出するなど、更に検討が必要であると考えられた。リステリア、エルシニアについては培養法とほぼ同等に検出することができ、スクリーニングに有効であると考えられた。セレウス菌の再試験については、培養法とほぼ同等に検出できた。平成 26 年度の研究事業において  $10^2$  cfu/200mg の検体から rPCR で検出できなかったのは、便検体による差異と考えられた。

食品については、今回検討したカンピロバクター・ジェジュニ及び黄色ブドウ球菌については rPCR 法は培養法とほぼ同等に検出することができ、食品からの検出についても rPCR 法がスクリーニングに有効であると考えられた。

展望

平成 26 年度及び平成 27 年度の研究事業において検討した試験により、食中毒細菌菌量  $10^4$  cfu/mg の便からの検出については、rPCR による食中毒菌迅速スクリーニング法を確立できた。今後は実際の食中毒疑い事例において実検体へ適用し、rPCR 法及び培養法の検出データを収集し、rPCR 法の有用性を検証する予定である。また食品からの検討については、菌種及び食品の種類を増やし、更に検討を重ねる必要があると考えられた。

\*現 春日部保健所