

## 平成 26 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

(計画年度：平成 26 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

瀬川由加里\* 榊田希 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

### 目的

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法が様々な機関で開発されている。当担当でも rPCR による一斉迅速スクリーニング法を導入するにあたり、便を用いた添加試験による rPCR 法と培養法との比較を行った。

### 材料及び方法

1 希釈菌液における rPCR 一斉検出法の検出確認及び抽出方法による検出感度の比較

SYBR Green を用いた rPCR 法による食中毒原因菌の検出感度試験を行った。12 種類の菌液を段階希釈し蒸留水に浮遊させ、加熱による抽出と抽出試薬を用いる抽出を行った。それぞれの抽出法で作製したテンプレートについて Roche LightCycler 480 にて rPCR 一斉検出法による遺伝子検出を行った。

2 便の添加試験

食中毒菌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。便沈渣に 1 菌種につき 3 段階の濃度の菌液を添加し検体とした。検体を抽出キットで抽出し、rPCR 法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 1 白金耳量を各分離平板培地に塗抹すると同時に各増菌培地に添加し、培養検査を行った。

### 成果概要

1 加熱抽出によるテンプレートは、菌種により異なるものの抽出チューブあたり  $10^3$  cfu/ml または  $10^2$  cfu/ml の菌液から目的の病原遺伝子が検出され、抽出試薬を用いたテンプレートでは、全ての菌種で  $10^2$  cfu/ml の菌液から検出された。以上の結果から、菌液については  $10^2$  cfu/ml (rPCR

反応チューブあたり 1.8 cfu 以下)の試薬抽出検体から標的遺伝子が検出され、十分な検出感度が得られると確認できた。

2 便に菌を添加した検体からの rPCR 法による検出は、培養法による検出と比較して多くの食中毒菌においてほぼ同等に検出することができた。セレウス菌（嘔吐毒）以外のいずれの菌種も  $10^3$  cfu/200mg の便でほぼ検出できており、スクリーニングには十分に使用できると考えられた。また腸管病原性大腸菌や腸管毒素原性大腸菌では培養法より rPCR 法の方が低菌数の検体から検出できた。平板培地での鑑別が困難な菌については rPCR 法の結果をもとに原因菌を推測し、よりの確な培養検査を行うことができるため、スクリーニングが非常に有効であると考えられた。なお今回 rPCR 法で低菌数では検出されなかった菌種、特にセレウス菌（嘔吐毒）については、プライマーの選択など、さらに検討を重ねる必要がある。

### 自己評価

今回検討した rPCR による食中毒菌迅速スクリーニング法により便から直接遺伝子が検出されれば、培養法における確実な菌の検出や早い段階での検査項目の絞り込みが可能となる。また遺伝子検査の結果を報告することにより迅速な行政対応が期待できる。

### 展望

本研究をもとに、今回検討を行った以外の食中毒原因菌についての検出や食品及びふき取りからの検出について検討し、rPCR 法による更なる検査体制の構築を図りたい。また今後実検体へ適用し、結果を活用するため、食品安全課及び保健所との連携を構築する必要があると考えられた。

### 公表等

平成 26 年度地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会 第 27 回研究会：神奈川（2015）

\*現 狭山保健所