

PCR法による食品中の腸炎ビブリオ *tdh* 遺伝子の検出 と食中毒検査への応用について

樋脇 弘¹・椿本 亮¹・栗原 淑子¹
本田 己喜子¹・小田 隆弘¹

Detection of *tdh* gene of *Vibrio parahaemolyticus* in food by polymerase chain reaction and its application to an examination on food poisoning

Hiroshi HIWAKI, Makoto TSUBAKIMOTO, Yoshiko KURIHARA,
Mikiko HONDA and Takahiro ODA

腸炎ビブリオ食中毒において、その原因食品を特定するため、PCR法による食品からの *tdh* 遺伝子の検出を検討した。

食品を含まない混合菌液においては、TDH陽性菌が 10^3 CFU/ml 存在すれば、TDH陰性菌や他の雑菌が混在しても、*tdh* は確実に検出されたが、混合菌液に食品を添加すると、TDH陽性菌が 10^4 CFU/ml 存在しても、食品の種類によっては *tdh* が検出されない場合があり、食品そのものから直接 *tdh* を検出する方法は、安定した結果が得られないことがわかった。

食品の増菌培養液から *tdh* を検出する方法を検討した結果、食品中にTDH陽性菌が 10^2 CFU/g 以上存在すれば、食品の増菌液から *tdh* は検出可能であった。

腸炎ビブリオ食中毒において、原因食品の検査にPCR法を応用したところ、食品残物の増菌液から *tdh* が検出され、本法は原因食品の特定に有効な検査法であることが立証された。

Key Words : 腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus*, 耐熱性溶血毒 thermostable direct hemolysin (TDH), *tdh* 遺伝子 *tdh* gene, PCR polymerase chain reaction, 神奈川現象 Kanagawa phenomenon, 食中毒 food poisoning

I はじめに

腸炎ビブリオ（以下Vpと略）食中毒はサルモネラ食中毒と並んで、その事例数、患者数ともに常に1、2位を争っている日本の代表的な食中毒である。本菌の病原因子については、神奈川現象（以下KPと略）に関与する耐熱性溶血毒（以下TDHと略）およびTDHに類似する易熱性溶血毒（以下TRHと略）が証明されており、これらTDH、TRHの産生は *tdh* および *trh* と呼ばれる遺伝子に支配されている¹⁾。食中毒患者から分離されるVpの多くはKP陽性であるが、魚介類や海水から分離されるVpのほとんどはKP陰性である^{1, 2)} ため、Vp食中毒の原因食品を特定することは困難な実状である。

近年、Polymerase Chain Reaction（以下PCRと略）法の普及はめざましく、細菌の病原遺伝子を検出するプライマーも多数市販されている。そこで、PCRによる食品からの *tdh* の検出法について検討を行ったところ、本法は、Vp食中毒での原因食品を特定する検査法として十分応用できることが判明したので報告する。

また、平成5年8月に発生したVp食中毒において、原因食品の検査にPCR法を応用した結果、その有用性が認められたので、その概要についても紹介する。

II 材料および方法

1. 使用菌株

tdh+のVp（以下Vp+と略）は血清型K8の患者由来株を、*tdh*-のVp（以下Vp-と略）はK6の食品由来株

1. 福岡市衛生試験所 微生物課

を、および *V.alginolyticus* (以下Vaと略) は食品由来株を実験に使用した。

Vpは食塩ポリミキシンブイオン (以下PBと略) で、Vaはアルカリペプトン水で一晩振とう培養して、菌液を調整した。

なお、VpおよびVaの菌量は、TCBS寒天にスパイラルプレーティングを行い、コロニー数を計測した。Vp+とVp-の混在比率の測定は、我妻培地を用いて行った。

2. PCRによるtdhの検出

tdh検出用プライマーは、VPD-1および-2³⁾ (島津製作所) を使用し、鋳型DNA溶液には、93℃、5分間、加熱した試料の遠心上清を用いた。

PCR反応バッファーは市販プライマーに添付された×10バッファーを、dNTP溶液はDNA Polymerization Mix (ファルマシア) を、ポリメラーゼはAmpli Taq™ DNA Polymerase (宝) を使用した。

PCRは、鋳型DNA溶液3μlを加えた30μl系の反応液で、94℃1分間の熱変性、55℃1分間のアニーリング、74℃1分間の伸長の計35サイクルの増幅を行った³⁾。反応終了後、増幅した251bpのDNAを3%アガロース電気泳動で検出した。

III 結 果

1. 食品を含まない混合菌液からのPCRによるtdhの検出

食品を添加せず、それぞれ培養した菌液をPBに添加後、所定の菌量に混合し、試験菌液を作成した。

この混合菌液からPCRを行うと、表1に示すように、tdhはVp-およびVaとの混在比率にかかわらず、Vp+が混合菌液1ml中に10³CFUあれば常に検出された。

Vp+単独の菌液およびVp+とVp-混合菌液からのPCR産物の電気泳動像を図1に示した。

本実験のPCRの検出感度を10³CFU/試験菌液1mlとすれば、3μlの鋳型DNA溶液を使用してPCRを行うことから、PCR反応チューブ中には、計算上3CFU分

のVp+のDNAが含まれることになる。しかし、数回の実験を繰り返した中で、10¹~10²CFU/mlの菌液、つまり、反応チューブ中で0.03~0.3CFUの菌量で、PCRが陽性となることがあった (表1に例示)。このことは、試料菌液中には死菌の菌体が混在し、見かけ上、CFU/mlに対する検出感度が上がっていることが原因と考えられたため、次の実験を行った。

Vp+単独の菌液を遠心 (2,500rpm, 5分, 3回) 洗浄して、上清 (遊離DNA) を除去し、その沈渣をPBに再浮遊させ、再度菌量を調整し直してPCRを行った。

表2にその結果を示したが、洗浄後の菌液では10³CFU/mlの検出感度に下がった。

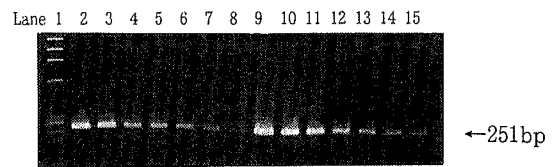


図1 Vp+単独の菌液およびVp+とVp-の混合菌液からのPCR

- レーン 1. ϕ X174/HaeIII 2、9. 陽性コントロール
 3. Vp+10⁶/ml 10. Vp+10⁶:Vp-10⁷/ml
 4. Vp+10⁵/ml 11. Vp+10⁵:Vp-10⁷/ml
 5. Vp+10⁴/ml 12. Vp+10⁴:Vp-10⁷/ml
 6. Vp+10³/ml 13. Vp+10³:Vp-10⁷/ml
 7. Vp+10²/ml 14. Vp+10²:Vp-10⁷/ml
 8. Vp+10¹/ml 15. Vp+10¹:Vp-10⁷/ml

表2 未洗浄菌液と洗浄した菌液での検出感度

添加菌量 : 未洗浄 (CFU/1ml)	PCR結果	添加菌量 : 洗浄 (CFU/1ml)	PCR結果
Vp+10 ⁶	+	Vp+10 ⁶	+
〳 10 ⁵	+	〳 10 ⁵	+
〳 10 ⁴	+	〳 10 ⁴	+
〳 10 ³	+	〳 10 ³	+
〳 10 ²	-~+	〳 10 ²	-
〳 10 ¹	-~+	〳 10 ¹	-

表1 食品を含まない試験菌液からのPCR結果

添加菌量 (CFU/PB 1ml)	PCR結果	添加菌量 (CFU/PB 1ml)	PCR結果	添加菌量 (CFU/PB 1ml)	PCR結果
Vp+10 ⁶	+	Vp+10 ⁶ :Vp-10 ⁷	+	Vp+10 ⁶ :Vp-10 ⁶ :Va10 ⁷	+
〳 10 ⁵	+	〳 10 ⁵ : 〳 10 ⁷	+	〳 10 ⁵ : 〳 10 ⁶ : 〳 10 ⁷	+
〳 10 ⁴	+	〳 10 ⁴ : 〳 10 ⁷	+	〳 10 ⁴ : 〳 10 ⁶ : 〳 10 ⁷	+
〳 10 ³	+	〳 10 ³ : 〳 10 ⁷	+	〳 10 ³ : 〳 10 ⁶ : 〳 10 ⁷	+
〳 10 ²	-~+	〳 10 ² : 〳 10 ⁷	-~+	〳 10 ² : 〳 10 ⁶ : 〳 10 ⁷	-~+
〳 10 ¹	-~+	〳 10 ¹ : 〳 10 ⁷	-~+	〳 10 ¹ : 〳 10 ⁶ : 〳 10 ⁷	-~+

2. 食品を添加した混合菌液からのPCRによるtdhの検出

食品成分のPCRの感度への影響と、食品から直接PCRでtdhが検出可能なのかを検討するため、食品を添加した混合菌液からのPCRを検討した。食品は、「刺身」、「煮魚」、「焼き魚」、「卵焼き」および「和風サラダ」の5種類を使用し、食品10gまたは食品の10倍ホモゲナイズ液10mlを、それぞれ90mlのPBと混合し、試料液を作成した。菌液は未洗浄のまま試料液に添加し、試料液中の菌量は、試料液中に食品が1/10量（食品10gを混合）含まれる場合も、1/100量（10倍ホモゲナイズ液10mlを混合）含まれる場合も、Vp+が 10^4 CFU/ml、Vp-が 10^7 CFU/ml、Vaが 10^3 CFU/mlとした。

表3に、それぞれの試料菌液からのPCRの結果を示した。食品を添加した場合、表1に示した未添加の場合と比べると検出感度が悪くなり、1/100量添加では1検体が、1/10量添加では3検体が陰性となった。

食品を添加した混合菌液からのPCR産物の電気泳動像を図2および図3に示した。

表3 食品を添加した混合菌液からのPCR結果

(添加菌量は、いずれも試料液1ml中に
Vp+ : 10^4 CFU、Vp- : 10^7 CFU、Va : 10^3 CFU)

食品	食品成分が培地の 1/100量含まれる 場合	食品成分が培地の 1/10量含まれる 場合
	PCR結果	PCR結果
刺身	+	-
焼き魚	+	-
煮魚	+	+
卵焼き	-	+
和風サラダ	+	-

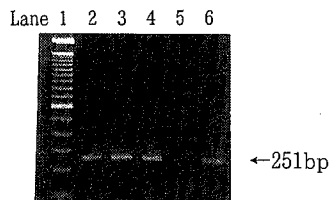


図2 食品を1/100量添加した混合菌液からのPCR

- レーン 1. 100bp DNA Ladder
2. 刺身
3. 焼き魚
4. 煮魚
5. 卵焼き
6. 和風サラダ

3. 菌を添加した食品の増菌液からのPCRによるtdhの検出

食品中にVp+がどれ位の菌量で存在すれば、その増菌液から検出できるかを検討するため、食品にVp+、Vp-およびVaを所定の菌量で添加し、PBに接種後、35℃で一夜培養し、その増菌液の上清からPCRを行った。

まず、「刺身」にVp+とVp-の混在比率が1:10~1:100,000となるように、表4に示す菌量（条件No.1~No.5）のVp+、Vp-およびVaを添加し、その10gおよび10倍ホモゲナイズ液10mlをそれぞれPB90mlに接種した。

表4 食品への添加菌量/g

条件	Vp+ : Vp- : Va	Vp+とVp-の比率
No. 1	10^4 : 10^5 : 10^6	1 : 10
No. 2	10^3 : 10^5 : 10^6	1 : 100
No. 3	10^2 : 10^5 : 10^6	1 : 1,000
No. 4	10^1 : 10^5 : 10^6	1 : 10,000
No. 5	10^0 : 10^5 : 10^6	1 : 100,000

「刺身」10gを増菌した場合のVp（Vp+およびVp-）とVaの菌量とPCRの結果を表5に示した。培養前の食品中のVp+は 10^0 ~ 10^4 CFU/gであり、食品は培養液全体の1/10量であるため、増菌前の培養液中のVp+の菌量は計算上、 10^{-1} ~ 10^3 CFU/mlとなった。一夜培養後、Vpは 10^7 CFU/mlのオーダーとなり、Vaは 10^5 未満~ 10^6 CFU/mlのオーダーであった。PCRの結果は、食品中のVp+が 10^1 ~ 10^4 CFU/g（条件No.1~No.4）であった培養液からtdhを検出できた。

「刺身」の10倍ホモゲナイズ液10mlを増菌した場合は、食品は培養液全体の1/100量であるため、増菌前の培養液中のVp+の菌量は計算上、 10^{-2} ~ 10^2 CFU/mlとなった。一夜培養後、Vpは 10^7 CFU/mlのオーダーとなり、Vaは 10^5 ~ 10^6 CFU/mlのオーダーであっ

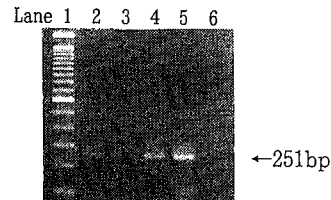


図3 食品を1/10量添加した混合菌液からのPCR

- レーン 1. 100bp DNA Ladder
2. 刺身
3. 焼き魚
4. 煮魚
5. 卵焼き
6. 和風サラダ

た。PCRの結果は、食品中のVp+が $10^2 \sim 10^4$ CFU/g (条件No. 1~No. 3)であった培養液からtdhを検出できたが、食品10gの培養液のPCRと比較すると検出感度が低下した(表5)。「刺身」を添加した増菌液からのPCR産物の電気泳動を図4に示した。

「刺身」以外の食品について、その増菌液からのPCRを行った。「焼き魚」、「煮魚」、「卵焼き」および「和風サラダ」に表4に示す菌量のVp+, Vp-およびVaを添加し、その10倍希釈液10mlをPB90mlで増菌した。

表6に示すように、一夜培養後、Vpは $10^6 \sim 10^8$ CFU/mlのオーダーとなり、Vaは 10^4 未満 $\sim 10^7$ CFU/mlのオーダーとなったが、食品ごとにやや差が認められた。PCRの結果も、食品ごとに差が見られたが、いずれの食品も増菌前のVp+の菌量が、 10^2 CFU以上/g(条件No. 1~No. 3)であれば、tdhが確実に検出された。各

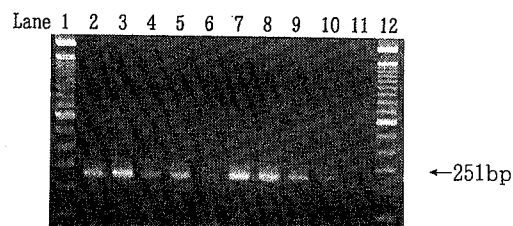


図4 「刺身」の増菌液からのPCR

- レーン1, 12. 100bp DNA Ladder
 2. 1/10量添加、条件No.1 7. 1/100量添加、条件No.1
 3. 1/10量添加、条件No.2 8. 1/100量添加、条件No.2
 4. 1/10量添加、条件No.3 9. 1/100量添加、条件No.3
 5. 1/10量添加、条件No.4 10. 1/100量添加、条件No.4
 6. 1/10量添加、条件No.5 11. 1/100量添加、条件No.5

表5 「刺身」のPB増菌とPCR結果

PBへの「刺身」の添加割合	添加菌量	増菌前の培養液中の菌量 (/ml)			増菌後の培養液中の菌量 (/ml)		PCR結果
		Vp+	Vp-	Va	Vp	Va	
1/10量 (10g) 添加	No.1	10^3	10^4	10^5	7.4×10^7	3.4×10^6	+
	No.2	10^2	10^4	10^5	4.2×10^7	2.0×10^5 未満	+
	No.3	10^1	10^4	10^5	7.0×10^7	4.0×10^5	+
	No.4	10^0	10^4	10^5	5.6×10^7	2.0×10^6	+
	No.5	10^{-1}	10^4	10^5	2.0×10^7	1.8×10^6	-
1/100量 (10倍ホモゲナイズ液を10ml) 添加	No.1	10^2	10^3	10^4	7.6×10^7	1.4×10^6	+
	No.2	10^1	10^3	10^4	9.6×10^7	2.0×10^6	+
	No.3	10^0	10^3	10^4	8.0×10^7	4.0×10^5	+
	No.4	10^{-1}	10^3	10^4	5.8×10^7	4.0×10^6	-
	No.5	10^{-2}	10^3	10^4	7.8×10^7	1.0×10^6	-

表6 各食品をPBに1/100量接種した場合の増菌とPCR結果

食品	添加菌量	増菌前の培養液中の菌量 (/ml)			増菌後の培養液中の菌量 (/ml)		PCR結果
		Vp+	Vp-	Va	Vp	Va	
焼き魚	No.1	10^2	10^3	10^4	1.0×10^8	4.0×10^6	+
	No.2	10^1	10^3	10^4	1.1×10^8	2.0×10^4 未満	+
	No.3	10^0	10^3	10^4	1.5×10^8	1.0×10^7	+
	No.4	10^{-1}	10^3	10^4	8.5×10^7	2.0×10^4 未満	-
	No.5	10^{-2}	10^3	10^4	1.5×10^8	3.6×10^6	+
煮魚	No.1	10^2	10^3	10^4	4.6×10^7	1.2×10^6	+
	No.2	10^1	10^3	10^4	9.8×10^7	7.4×10^5	+
	No.3	10^0	10^3	10^4	1.2×10^8	3.8×10^5	+
	No.4	10^{-1}	10^3	10^4	5.2×10^7	4.0×10^5	+
	No.5	10^{-2}	10^3	10^4	1.3×10^8	8.0×10^5	-
卵焼き	No.1	10^2	10^3	10^4	2.0×10^7	6.6×10^7	+
	No.2	10^1	10^3	10^4	2.2×10^7	3.4×10^7	+
	No.3	10^0	10^3	10^4	1.6×10^7	6.8×10^7	+
	No.4	10^{-1}	10^3	10^4	2.4×10^7	2.8×10^7	+
	No.5	10^{-2}	10^3	10^4	8.4×10^7	4.2×10^7	+
和風サラダ	No.1	10^2	10^3	10^4	1.0×10^7	2.2×10^7	+
	No.2	10^1	10^3	10^4	3.0×10^7	4.2×10^7	+
	No.3	10^0	10^3	10^4	2.8×10^8	2.0×10^7	+
	No.4	10^{-1}	10^3	10^4	6.0×10^6	4.2×10^7	+
	No.5	10^{-2}	10^3	10^4	5.2×10^7	9.4×10^7	-

食品を添加した増菌液からのPCR産物の電気泳動を図5および図6に示した。

増菌後の培養液中のV_{p+}とV_{p-}の割合を煮魚の検体について測定し、その結果を表7に示した。条件No. 1～No. 4においては、接種時の食品中のV_{p+}とV_{p-}の混在比率は1:10～10,000であったが、増菌後はその比率が縮まり1:50未満となり、PCRの結果が陽性であった。混在比率が1:100,000であった条件No. 5では、増菌後、釣菌した100株中にはV_{p+}は存在せず、PCRの結果も陰性であった。

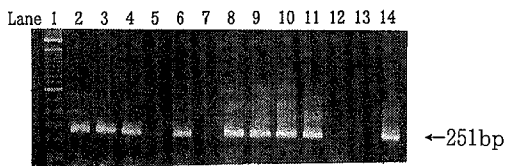


図5 「焼き魚」、「煮魚」の増菌液からのPCR

- レーン 1. 100bp DNA Ladder
 2. 焼き魚、条件No.1 8. 煮魚、条件No.1
 3. 焼き魚、条件No.2 9. 煮魚、条件No.2
 4. 焼き魚、条件No.3 10. 煮魚、条件No.3
 5. 焼き魚、条件No.4 11. 煮魚、条件No.4
 6. 焼き魚、条件No.5 12. 煮魚、条件No.5
 7, 13. 陰性コントロール 14. 陽性コントロール

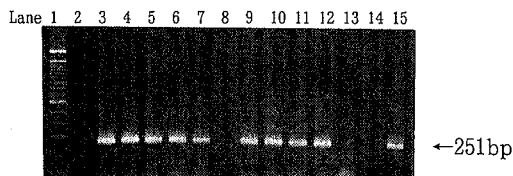


図6 「卵焼き」、「和風サラダ」の増菌液からのPCR

- レーン 1. 100bp DNA Ladder
 2, 8, 14. 陰性コントロール 15. 陽性コントロール
 3. 卵焼き、条件No.1 9. 和風サラダ、条件No.1
 4. 卵焼き、条件No.2 10. 和風サラダ、条件No.2
 5. 卵焼き、条件No.3 11. 和風サラダ、条件No.3
 6. 卵焼き、条件No.4 12. 和風サラダ、条件No.4
 7. 卵焼き、条件No.5 13. 和風サラダ、条件No.5

表7 「煮魚」を1/100量添加した増菌液中のV_{p+}とV_{p-}の比率

条件	増菌前の食品中の菌量 (/g)		増菌後の培養液中の菌量 (/ml)		増菌後の培養液中のV _{p+} とV _{p-} の割合 100株中(比率)	PCR結果
	V _{p+} : V _{p-} : V _a	V _{p+} とV _{p-} の比率	V _p : V _a	V _p		
No.1	10 ⁴ : 10 ⁵ : 10 ⁶	1 : 10	4.6×10 ⁷ : 1.2×10 ⁶	70	30 (1 : 0.43)	+
No.2	10 ³ : 10 ⁵ : 10 ⁶	1 : 100	9.8×10 ⁷ : 7.4×10 ⁵	35	65 (1 : 1.86)	+
No.3	10 ² : 10 ⁵ : 10 ⁶	1 : 1,000	1.2×10 ⁸ : 3.8×10 ⁵	24	76 (1 : 3.12)	+
No.4	10 ¹ : 10 ⁵ : 10 ⁶	1 : 10,000	5.2×10 ⁷ : 4.0×10 ⁵	2	98 (1 : 49)	+
No.5	10 ⁰ : 10 ⁵ : 10 ⁶	1 : 100,000	1.3×10 ⁸ : 8.0×10 ⁵	0	100	-

4. PCRを応用したV_p食中毒事件における原因食品の検査

平成5年8月、福岡市内でV_pによる食中毒が発生した。法事のために集まった約20名の親族が、仕出し料理を喫食したところ、10名以上が水様の下痢と腹痛、嘔吐を訴えた事件であった。

患者からは、共通してK56のV_{p+}が検出された。本事件の共通食品は鉢盛り料理であったため、料理を刺身、卵焼きとグラタン、イカと貝の煮物、およびゆでたエビの4種類に分けて検査を行った。食品の検査は、通常通り、食品の10倍ホモゲナイズ液を、各食中毒菌用の分離培地と増菌培地に接種した。なお、V_pの増菌培地はPB10 mlを使用し、食品の10倍ホモゲナイズ液を1 ml接種した。

食品から分離されたV_pについては、我妻培地でKPの検査を行うとともに、食品のPB増菌液の上清からPCRを行い、*tdh*の検出を試みた。

通常の細菌検査では、「刺身」および「煮物」の直接培養とすべての食品残物の増菌培養からV_pが20数株程、分離されたが、いずれもKP陰性であり、原因菌であるK56のV_{p+}は見つからなかった。

しかし、4種類に分けた食品残物の増菌液のPCRでは、いずれの検体も陽性となった(表8)。この増幅されたDNAの特異性を検討するために、制限酵素*Sau*3 AIで処理し、7.5%ポリアクリルアミド電気泳動を行った。その結果、増幅されたDNAは約110 bpと約140 bpのサイズの2つのフラグメントに切断され、いずれも*tdh*であることが確認された(図7)。

表8 食品残物の増菌液のPCR結果とV_{p+}とV_{p-}の比率

被検食品	PCR結果	V _{p+} の検出	V _{p+} :V _{p-} の比率
刺身	+	+(1/100)	1:99
卵焼き、グラタン	+	-(0/100)	
イカ、貝の煮物	+	-(0/100)	
ゆでエビ	+	-(0/100)	

このため、各食品残物の増菌培地からV_pの再分離を行い、1検体あたり100株のV_pについてKPを調べた。表8に示すように、KP陽性のV_pは、刺身の増菌試料から1株が検出され、血清型もK56と原因菌と一致した。

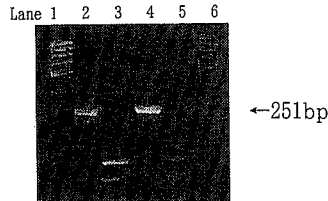


図7 制限酵素 *Sau*3 AIによる切断後のPCR産物

- レーン1, 6. ϕ X174/*Hinf* I digest
 2. 食品残物からのPCR産物 (切断前)
 3. 食品残物からのPCR産物 (切断後)
 4. 陽性コントロール (切断前)
 5. 陽性コントロール (切断後)

IV 考 察

食品成分を含まない混合菌液からPCRを行った場合、V_{p+}とV_{p-}の混在比率や雑菌であるV_aの混在は、PCRの結果に影響せず、混合菌液中にV_{p+}が 10^3 CFU/ml以上あれば、*tdh*は常に検出できた。

PCRの感度としては、1分子の鋳型DNAがPCR反応溶液に含まれれば、理論的には増幅可能であるため、3 μ lの鋳型DNA溶液を使用した今回のPCRに必要な計算上の菌量は1 CFU/3 μ lであり、試料1 ml中では 3.3×10^2 CFU/mlが検出限界となる。

しかし、 $10 \sim 10^2$ CFU/mlの菌量でもPCRが陽性となることがあったため、菌液を遠心洗浄して、上清を除去し、再度菌量を調整し直してPCRを行うと、洗浄後の試料では 10^3 CFU/mlの検出感度に下がった。これは、振とう培養で調整した菌液中には死菌の菌体がかかり混在しており、見かけ上、CFU/mlに対する検出感度が上がるためであり、PCRの検出感度を菌のCFUに置き換えて示す場合は、試料中に混在する死菌を考慮に入れる必要があると考えられた。

食品を含まない混合菌液においては、 10^3 CFU以上/mlのV_{p+}が試料中に存在すれば*tdh*が検出可能であったが、食品を含んだ混合菌液になると、食品の種類によっては 10^4 CFU/mlのV_{p+}が存在しても*tdh*が検出されない場合があった。また、食品成分の量によってもPCRの成績が異なり、V_{p+}が 10^4 CFU/ml含まれる同じ混合菌液に、食品を1/10量添加すると、1/100量添加した場合よりも、*tdh*が検出されない試料が、より多く見られた。これは、鋳型DNA溶液に含まれた食品成分

が、PCR反応の阻害要因となっていると思われる、食品中にV_{p+}が 10^5 CFU/g存在しても、その10倍ホモニズ液から直接PCRを行った場合は、安定した結果が得られないことがわかった。

したがって、食品の増菌培養液からPCRを行うことを検討した。菌を添加した食品(刺身)を増菌培養すると、V_pの菌数はいずれの試料も 10^7 CFU/mlのオーダーとなった。PCRの結果は、食品が培地の1/10量含まれた増菌液の場合、培養前の食品中のV_{p+}が 10^1 CFU以上/gであれば、*tdh*が検出可能であった。1/100量を含む食品(刺身)の増菌液では、食品中のV_{p+}が 10^2 CFU以上/gであれば、*tdh*が検出可能であり、1/10量の食品を含む増菌液の方が、検出感度が良好であった。

「刺身」以外の食品(焼き魚、煮魚、卵焼きおよび和風サラダ)についても、同様の実験を行った。食品が培地の1/100量含まれた増菌培養液中では、V_pの菌数は $10^6 \sim 10^7$ CFU/mlのオーダーとなり、PCRの結果は、もとの食品中のV_{p+}が 10^2 CFU以上/gであれば、いずれの試料からも*tdh*が検出可能であった。

増菌後の培養液中のV_{p+}とV_{p-}の割合を「煮魚」の試料について測定した。PCRの結果が陽性であった試料では、もとの食品中のV_{p+}とV_{p-}の混在比率が、1:10~1:10,000であったが、増菌後はその比率が縮まり、1:50未満となり、増菌液中のV_{p+}の菌量は、その混在比率から算出すると $10^6 \sim 10^7$ CFU/mlと推定された。以上のことから、食品の増菌液からPCRを行った場合には、前述の食品を含んだ混合菌液(V_{p+}が 10^4 CFU/ml存在)での実験と比較すると、増菌液中に存在するV_{p+}の菌量が 10^6 CFU以上/mlと非常に多くなったために、食品成分のPCRへの影響は少なくなったものと思われる。

PCRの結果が陰性であった増菌液では、もとの食品の混在比率が1:100,000であり、増菌後、KP陽性を示す株は調べた100株中に存在しなかった。板屋ら⁴⁾は、増菌培養前のV_{p+}とV_{p-}の混在比率に大きな差がある場合、増菌液中のV_{p+}の増殖が著しく抑制されることを報告しており、このPCRが陰性となった増菌液においても、V_{p+}の増殖抑制が起こったものと思われる。

食品中のV_{p+}が1~10 CFU/g (V_{p+}とV_{p-}の混在比率が1:10,000~100,000)の場合、PCRの成績が食品により、まちまちであった。この成績のばらつきは、増菌後のV_{p+}の菌量の差によるもの大きいと考えられたが、その原因については、食品中のV_{p+}とV_{p-}の混在比率の大きな差に起因しているのか、増菌液に含まれる食品成分がV_{p+}の増殖態度に影響しているのか、あるいはその他の要因が関与しているのか、さらに今後の検討が必要と思われる。

我妻培地で食品からV_p+の検出を試みる場合、その成否はV_p+とV_p-の混在比率に大きく左右される。特にその比が1:100以上であれば、V_p+を検出することは労力的にも容易ではなく、これまでに福岡市で発生したV_p食中毒で、原因食品からV_p+を検出できたのはわずか1事例だけであった⁵⁾。

原因食品から効率的にV_p+を検出するために、小川ら⁶⁾は、試料10gをPBで増菌し、3株のTCBS寒天平板で分離培養後、100～150株のV_pを我妻培地に釣菌する方法を報告した。その結果、V_p食中毒の原因となった食品の増菌液中におけるV_p+とV_p-の混在比率は、最高で18.10% (1:4.5)、最低で1.33% (1:74.2)、平均では5.95% (1:15.8)であったことが示された。

しかし、V_p食中毒の原因食品を特定する検査としては、我妻培地による検査方法は迅速性に欠け、また増菌液中の混在比率が1:100または150以上であるとV_p+の検出が困難となる。一方、通常の食中毒検査において、持ち込まれる原因食品の量は必ずしも多くはなく、またV_p以外の他の食中毒菌も同時に検査するため、通常、食品の10倍ホモゲナイズ液を作成し、増菌培地に接種するため、増菌培地に含まれる食品の割合は、1/100量であることが多い。

今回、行った1/100量の食品(刺身)を含む増菌液と、1/10量の食品(刺身)を含む増菌液でのPCRの結果を比較すると、1/100量の食品を含む増菌液では*tdh*の検出感度がやや低下するものの、食品中にV_p+が10²CFU/g存在していれば、V_p-やV_aが混在していても、*tdh*は検出可能であった。また、「刺身」以外の食品についても、培地の1/100量の食品を接種した増菌液からPCRを行うと、「刺身」の場合と同じように、もとの食品中で10²CFU/gという高い検出感度が得られた。したがって、1/100量の食品を接種したPB増菌液からのPCR法は、多量の食品残物を必要とせず、食中毒時の原因食品の検査に十分応用できるものと考えられた。

平成5年8月に発生したV_p食中毒において、その原因食品の検査にPCR法を応用した。その結果、4種類に分けた食品残物の増菌液からのPCRで、いずれの検体からも*tdh*を証明した。一方、通常検査で、食品残物から分離されたV_pは、患者から分離されたK56のV_p+ではなかったため、各食品残物の増菌培地から100株ずつ、V_pの再分離を行ったところ、「刺身」の増菌液からK56のV_p+が1株見つかった。「刺身」以外の食品残物では、PCRの結果と我妻培地での結果が一致しなかったが、これはV_p+とV_p-混在比率が1:100以上であるため、さらに数多くの株を釣菌することでV_p+を回収できるものと思われた。

したがって、食品のPB増菌液からPCRで*tdh*を検出する方法は、V_p食中毒における迅速な原因食品検査として極めて有用性が高いと考えられた。

文 献

- 1) 本田武司: 耐熱性溶血毒および類似毒素, 腸炎ビブリオ第Ⅲ集, 105～115, 近代出版
- 2) 竹田美文ら: 腸炎ビブリオ, 日細菌誌, 36, 617～628, 1981
- 3) 西淵光昭ら: PCRによる腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒遺伝子および類似毒素の検出法, 日本臨床, 50, 348～352, 1992
- 4) 板屋民子ら: Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による食品中の病原性Vibrio parahaemolyticusの検出, 食品と微生物, 10, 127～132, 1993
- 5) 磯野利昭ら: 原因食品から神奈川現象陽性株が検出された腸炎ビブリオ食中毒について, 福岡市衛試報, 7, 101～102, 1982
- 6) 小川博美ら: 腸炎ビブリオ食中毒における原因食品からの神奈川現象陽性株回収法の検討 (10-3-100法), 食品と微生物, 8, 189～195, 1992