

Application Note

島津アプリケーションノート No.5 (ライフサイエンス)



食品中の食中毒菌やカビの検査 — MultiNAの活用 —

稲垣 知子¹
T.INAGAKI

1.はじめに

食中毒とは、食中毒の原因となる細菌・ウイルスなどが付着した食品や有害な微生物や化学物質が含まれた食品を食べたり飲んだりすることによって起こる健康被害をいいます。また、人から人へ感染するコレラ菌や赤痢菌などによる感染症でも食品を介して起こる健康被害は食中毒として扱われます。

食中毒菌やウイルスなどが付着した食品は“味”や“におい”が変化することはありません。そのため、食品が微生物などに汚染されていると気付かずに食べてしまい、食中毒が発生します。多くの食中毒菌は腹痛、嘔吐、下痢などの胃腸障害を引き起こします。

また、食品に生えるカビも食品中で増殖をして食中毒の原因であるカビ毒を産生します。カビ毒は食中毒の原因となるだけでなく、がんの原因にもなります。

これら食中毒の原因となる細菌やウイルス、カビなどは食品関連業界の衛生管理において厳しく監視し、管理運営する必要があります。食中毒の原因菌を含め微生物全般に関しては、食品関連業界だけでなく、化粧品や医薬品関連業界においても重要視されています。

2.食中毒の分類

食中毒は原因物質によって、(1)細菌性食中毒、(2)ウイルス性食中毒、(3)自然毒性食中毒、(4)化学性食中毒、(5)その他の食中毒に大別されます(表1)。

(1)細菌性食中毒は、食品に付着した細菌が原因で起こります。細菌性の食中毒は、細菌が体内に入り腸管内で増殖したり、毒素を作ったりすることによって起こる感染型と、細菌が食品中で増殖し産生された毒素が体内に入って起こる毒素型に大きく分類されます。感染型の代表的なものは、サルモネラ属菌、腸炎ビブリオ、カンピロバクター、腸管出血性大腸菌(O157など)があります。毒素型の代表的なものは、黄色ブドウ球菌、ボツリヌス菌があります。

(2)ウイルス性食中毒は、食品に付着したウイルスが原因で起こります。代表的なものは、ノロウイルスがあります。

(3)自然毒性食中毒は、動物や植物に含まれる有害物質が原因で起こります。自然毒による食中毒は、動物性と植物性に大きく分類されます。動物性の代表的なものは、ふぐ毒や貝毒があります。植物性の代表的なものは、カビ毒や毒キノコがあります。

(4)化学性食中毒は食品に含まれる有害な化学物質が原因で起こります。代表的なものは、水銀、カドミウム、農薬があります。

(5)その他の食中毒は、肉、魚介類などの食品に存在する原虫や寄生虫が原因で起こる食中毒などがあります。

表1 食中毒の分類

種類	原因物質	
細菌性食中毒	感染型	サルモネラ属菌、腸炎ビブリオ、カンピロバクター、病原大腸菌、腸管出血性大腸菌(O157など)、ウェルシュ菌、細菌性赤痢菌など
	毒素型	黄色ブドウ球菌、ボツリヌス菌、セレウス菌(※1)など
ウイルス性食中毒	ノロウイルス、サポウイルス、肝炎ウイルス(A型、E型)、ロタウイルスなど	
自然毒性食中毒	植物性	カビ毒、毒きのこ、植物毒(毒ぜり、じゃがいもの芽など)など
	動物性	ふぐ毒(※2)、貝毒(※3)、魚毒(※4)など
化学性食中毒	水銀、カドミウム、農薬、鉛、メタノール、ヒスタミンなど	
その他の食中毒	原虫(クリプトスポリジウム、サイクロスポラ、トキソプラズマなど)	
	寄生虫(アニサキス、旋尾線虫、旋毛虫など)	

(※1)セレウス菌には、感染型(下痢型)と毒素型(嘔吐型)の2種類があります。

(※2)ふぐ毒の毒成分はテトロドトキシン(C₁₁H₁₇N₃O₈)で、ふぐ自身が生合成しているわけではありません。ふぐ毒の起源はビブリオ属やアルテロモナス属などのある真正細菌により生産され食物連鎖でふぐの体内に蓄積されるのではないかということが最近の研究で明らかになりました。

(※3)二枚貝が有毒プランクトンを摂取することにより、二枚貝内に蓄積された毒を貝毒と呼びます。

(※4)シガテラ毒が有名で毒成分はシガトキシン(C₅₉H₈₄O₁₉)。フグ毒のテトロドトキシンよりも数十倍も強いと言われています。シガテラ毒の起源は有毒渦鞭毛藻類によって作り出されるといわれており、フグ毒同様、食物連鎖によってその頂点の魚に蓄積されるといわれています。

3.食中毒の発生状況

これら食中毒の発生時期について、細菌性は春から夏(5月から9月)にかけての暖かい気候に多く、ウイルス性は冬場(11月から3月)に多く、自然毒性や化学性は季節を問わず発生します。

平成20年度の国内の食中毒発生状況は、発生件数1,369件、患者総数24,303人でした(※)。中でもウイルス性の食中毒が最も多く、患者数11,630人で全体の47%でした(※)。

次いで細菌性の食中毒が患者数10,331人で全体の43%でした(※)。他では、化学性や自然毒性などの食中毒が2,342人で全体の10%でした(※)(図1)。

国内における食中毒の原因菌で最も多い細菌は、カンピロバクターで、食肉の過熱が不十分によるものです。ウイルスではノロウイルスが多く、ウイルスが付着している貝類(特に二枚貝)を生で、あるいは加熱が不十分な状態ものを食すことによるものです。

(※)資料:厚生労働省「食中毒に関する情報」

<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/10hassei/xls/H20joukyou.xls>

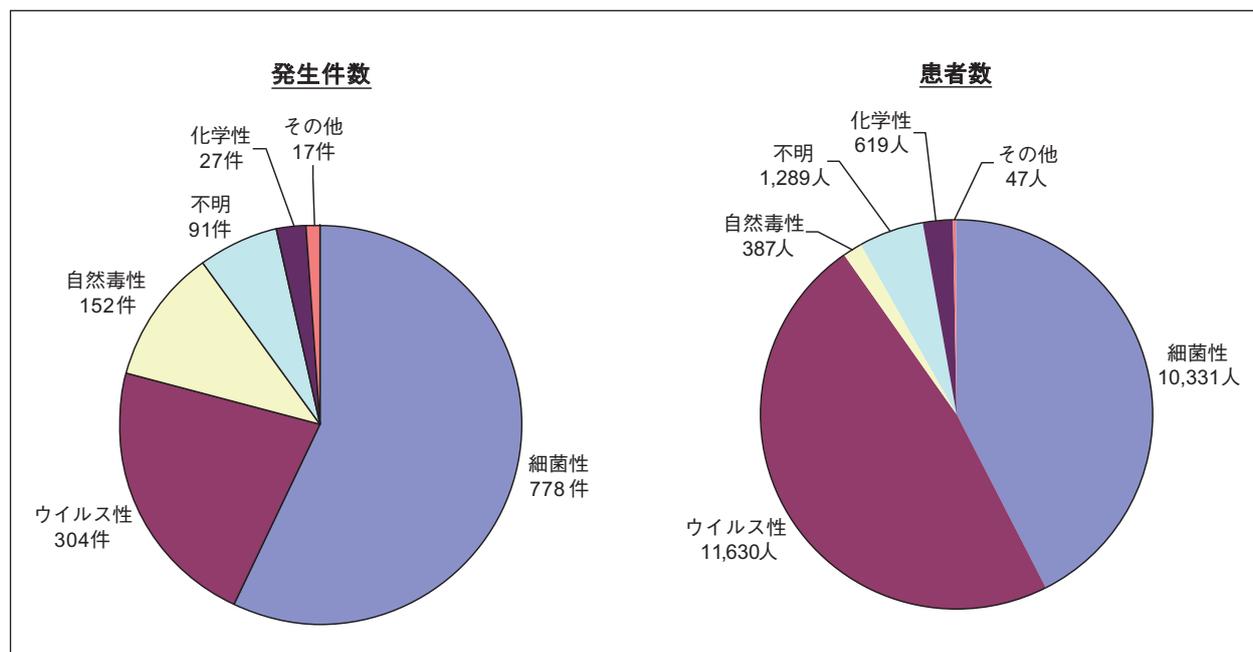


図1 平成20年度 国内における食中毒原因別発生件数と患者数(※)

4. 食中毒について

4-1. 細菌性食中毒

現在、国が指定する食中毒原因菌は16種類あります(※1)(表2)。その中でも国内で多く発生する食中毒はカンピロバクター、サルモネラ属菌、腸炎ビブリオ、腸管出血性大腸菌(O157など)などがあります。

細菌性食中毒の原因別発生状況の年次別推移については、サルモネラ属菌や腸炎ビブリオは平成10、11年を境に件数は減少傾向にあり、逆にカンピロバクターは増加傾向にあります(※2)(図2)。

平成20年度の国内の細菌性食中毒発生状況は、発生件数778件、患者総数10,331人でした(※3)。カンピロバクター・ジェジュニ/コリによる食中毒患者数が最も多く、患者数3,071人で細菌性による食中毒全体の30%でした(※3)。次に多いのがサルモネラ属菌で、患者数2,551人で25%でした(※3)(図3)。

国内における細菌性食中毒の主な原因菌について、カンピロバクターは牛・豚・鶏などの動物の腸管内をはじめ、自

然界に広く分布します。原因食品としては、主に鶏肉などの食肉や飲料水、牛乳などがあります。

サルモネラ属菌は、河川・下水など自然界に広く分布します。また、牛・豚・鶏などの動物も保有しており、乾燥に強いのが特徴です。原因食品としては、主に牛・豚・鶏などの食肉や卵などがあります。腸炎ビブリオは海に存在し、水温の上昇する夏に海水中で大量に増殖します。原因食品としては、主に魚介類などの海産物です。また、腸管出血性大腸菌(O157など)は、牛などの動物の腸管内に存在します。原因食品としては、糞尿を介して汚染した食品や飲料水などです。腸管出血性大腸菌は食中毒症状の原因であるベロ毒素(VT)を産生することからベロ毒素産生性大腸菌(VTEC:Verotoxin producing *Escherichia coli*)とも呼ばれます。

食中毒の感染源は、食品や飲料水などだけではなく、原因菌に汚染された調理器具や原因菌を保有している人を介しての二次感染もみられます。

(※1) 資料: 生衛発第1836号(平成11年12月28日) 食品衛生法施行規則の一部を改正する省令の施行等について

http://www1.mhlw.go.jp/topics/syokueihou/tp1228-1_13.html

(※2) 資料: 厚生労働省「食中毒に関する情報」

<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/xls/nenji.xls>

(※3) 資料: 厚生労働省「食中毒に関する情報」

<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/10hassei/xls/H20joukyou.xls>

表2 細菌性食中毒原因菌(※1)

1	サルモネラ属菌	9	エルシニア・エンテロコリチカ
2	ぶどう球菌	10	カンピロバクター・ジェジュニ/コリ
3	ボツリヌス菌	11	ナグビブリオ
4	腸炎ビブリオ	12	コレラ菌
5	腸管出血性大腸菌	13	赤痢菌
6	その他の病原大腸菌	14	チフス菌
7	ウエルシュ菌	15	パラチフスA菌
8	セレウス菌	16	その他の細菌

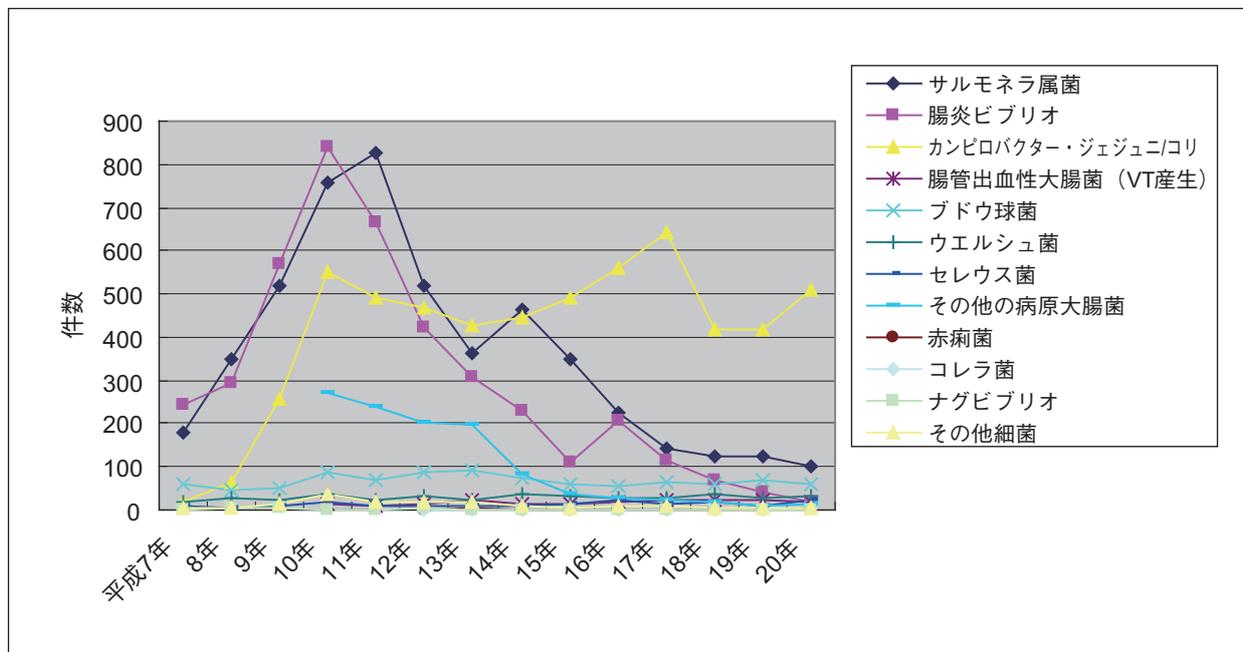


図2 国内における細菌性食中毒原因別発生件数（平成7年～平成20年）（※2）

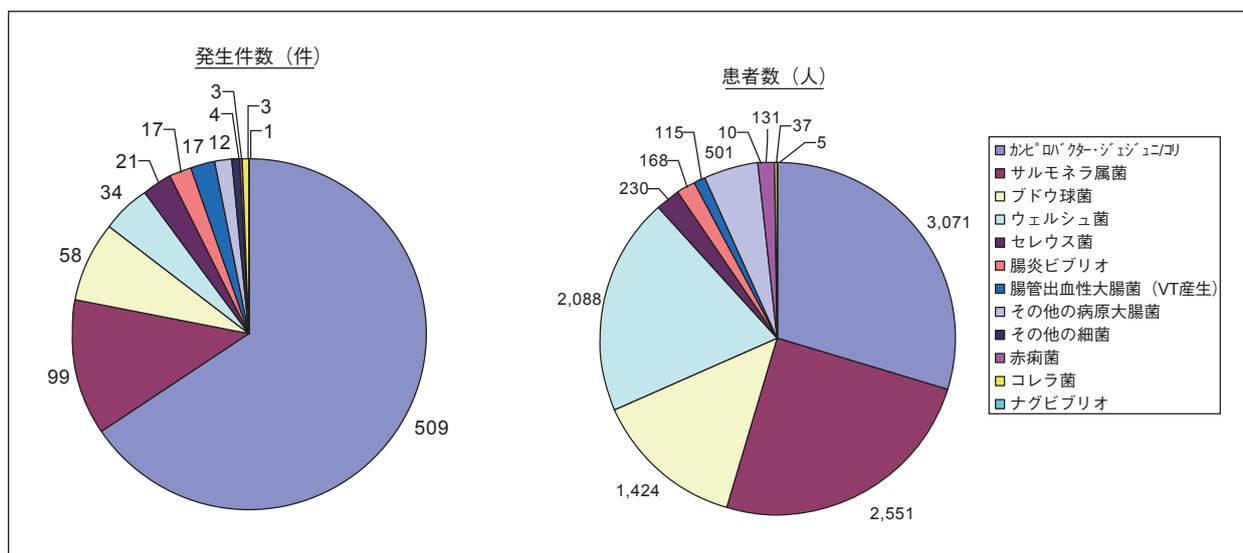


図3 平成20年度国内における細菌性食中毒原因別発生件数と患者数（※3）

4-2. ウイルス性食中毒について

ウイルス性の食中毒の原因菌は、ノロウイルス、ロタウイルス、サポウイルス、アデノウイルス、アストロウイルスなどがあります。国内で最も多く発生する食中毒はウイルス性で、中でもノロウイルスによるものがほとんどです。平成20年度の発生件数は、患者数11,618人と国内の食中毒総患者数24,303人のうち47.8%をノロウイルスが占めています(※)。

(※) 資料：厚生労働省「食中毒に関する情報」
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/10hassei/xls/H20joukyou.xls>

ノロウイルスは二枚貝(主に生カキ)に付着し、蓄積されません。原因食品としては、二枚貝(主に生カキ)が主ですが、ウイルスを保有している人により、汚染された食品(加熱しないで食べる食品)からも感染します。そのため、ノロウイルスによる食中毒は人から人の二次感染によって多くの患者が発生します。

5. カビについて

カビは食品中で増殖して食中毒の原因であるカビ毒を産生します。カビ毒とはカビが作り出す二次代謝産物の毒物を総称したものです。食中毒などの病気に関するカビ毒はマイコトキシンと呼ばれ、300種以上にも及びます。主となるカビ毒は、ピーナッツやその加工品、トウモロコシなどにみられるアフラ

トキシンです。他では、麦の病気の一つである赤カビ病の病原菌が産生するトリコテセン系カビ毒デオキシニバレノールや腐敗したりんごにみられるパツリンなどがあります。

食中毒の原因となるカビ毒を産生するカビは多種多様です(表3)。

表3 カビ毒産生菌

カビ毒	主要産生菌
アフラトキシン	<i>Aspergillus flavus</i>
	<i>Aspergillus parasiticus</i>
	<i>Aspergillus nomius</i>
トリコテセン系カビ毒 デオキシニバレノール	<i>Fusarium graminearum</i>
	<i>Fusarium culmorum</i>
パツリン	<i>Penicillium expansum</i>
	<i>Aspergillus clavatus</i>
オクラトキシン	<i>Aspergillus ochraceus</i>
	<i>Penicillium viridicatum</i>
シトリニン	<i>Penicillium citrinum</i>
	<i>Penicillium viridicatum</i>

6. 食中毒原因菌やカビの分析

食中毒の感染の拡がりを防ぐためには、食中毒の原因菌を特定して、適切な処置を行うことが必要です。また、食品の安全確保のために、食品製造工程における検査などは、正確、簡便、かつ迅速に行われる必要があります。特にノロウイルスに関しては、平成20年「大量調理施設衛生管理マニュアル」（厚生労働省：食安発第0618005号）の中で、大量調理施設内調理従事者の検便検査に必要に応じてノロウイルス検査を含めることとあります。

従来、食中毒原因菌を特定する検査法としては、寒天培地などによる培養法、ELISA法（※1）などによる生化学的性状の確認や遺伝子レベルの検査法など原因菌によって様々な方法が用いられています。

近年、その中でも遺伝子レベルの検査法（PCR法※2）が広く用いられるようになってきました（図4）。

一部の食中毒菌に関しては、厚生労働省監修「食品衛生検査指針（微生物編）」においてPCR法による検査法が記載されています。

また、食中毒の原因となるカビに関しては、カビ毒を産生しているか否かは、色などの見た目や臭いなどでは判断がつかず。そのため、食品に生えるカビ全般を検査することが必要になります。

（※1）ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 法：

酵素免疫測定法と呼ばれている分析方法で、免疫反応（抗原抗体反応）と酵素基質反応が組み合わされたものです。試料中に含まれる抗体あるいは抗原の濃度を検出・定量する際に用いられます。「イライザ法」、「エライザ法」と呼ばれます。

（※2）PCR(Polymerase Chain Reaction)法：

試料となるDNAを鋳型として、DNAのある一部分だけを選択的に増幅させる方法です。増幅したい領域の両端と配列特異的な短い1本鎖DNA（プライマー）とDNA合成酵素（DNAポリメラーゼ）を用いて、サイクル反応（DNA二本鎖の解離→プライマーの結合→DNA合成反応）を繰り返し行うことにより任意のDNA領域を増幅する方法です。原理的にはDNAが1分子でもあれば反応サイクルの乗数だけDNAが増えます。プライマーを挟む領域の増幅の有無を利用して目的物の有無が判断できます。

（※3）RT-PCR(Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction)法：

RNAの検出を目的に逆転写酵素(RNAからDNAを合成する酵素)によるDNA合成とPCR法とを組み合わせた遺伝子の増幅法です。

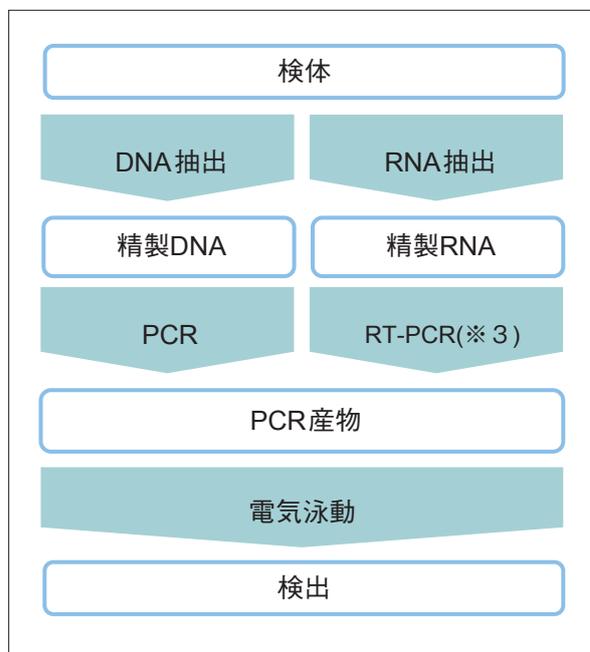


図4 PCR法による検出例

7. マイクロチップ電気泳動装置MCE-202 “MultiNA”

アガロースゲル電気泳動は試薬の調合、ゲルの作成、電気泳動、結果の画像取得、後片付けと一連の作業に多くの時間と手間を要します。さらにデータに関しては感度、分離、再現性、定量性など客観性に乏しいものです。

マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 “MultiNA” はアガロースゲル電気泳動の問題を解決します。



図5 MultiNA 専用マイクロチップ



図6 MultiNA 専用試薬キット

MultiNA特長

- MultiNA によるマイクロチップ電気泳動ではアガロースゲル電気泳動と比べて、より優れた感度、分離、再現性、定量性を実現しています。
- 試料と試薬をセットするだけで、あとは最大120分析まで無人で自動分析できます。分析前処理と分析泳動の並列処理により1分析あたりの時間はわずか約80秒^(※)です。
- MultiNAによる分析操作は非常に簡便です。分析スケジュールを作成したら、あとは試料と試薬をセットしてスタートボタンをクリックするだけです。
- 繰り返し利用可能な高性能マイクロチップがアガロースゲル電気泳動法と同等以下の安価なランニングコストを実現しました。

(※)DNA標準分析 (DNA-100キット/プレミックス) でマイクロチップを4枚使用時。ただし、初期洗浄・後洗浄の時間および初回分析は含まれません。

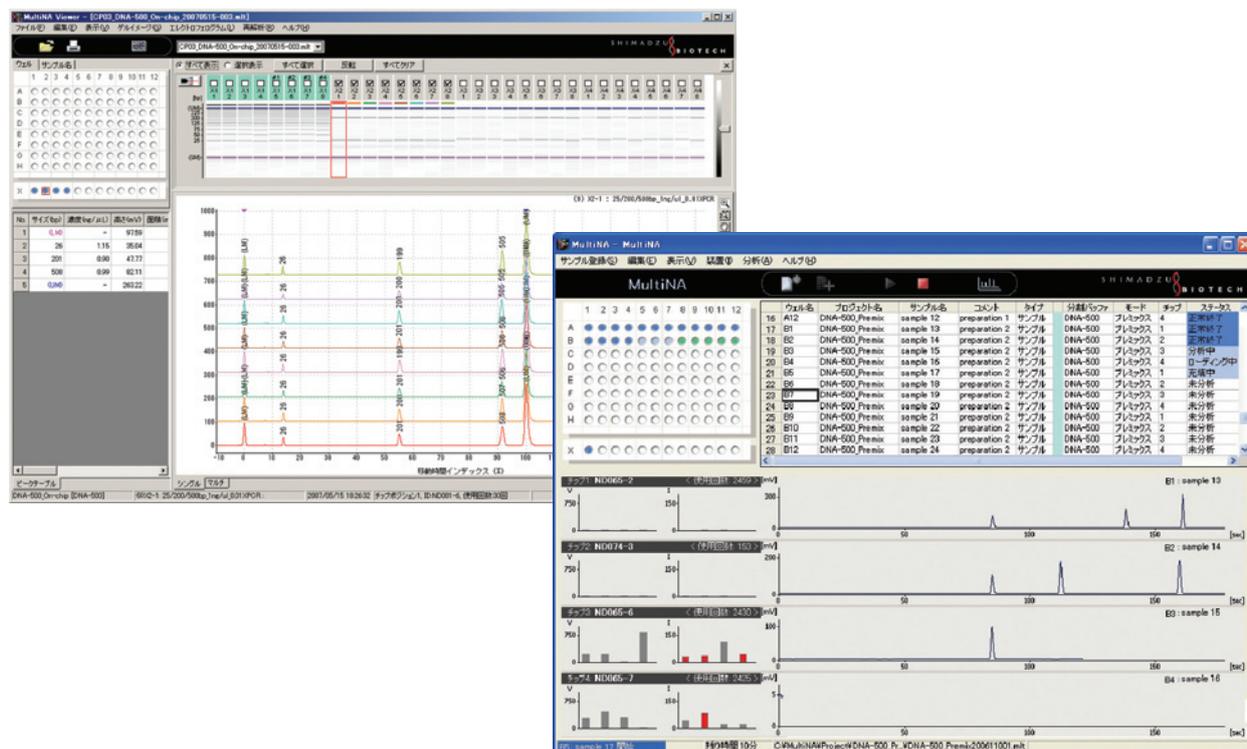


図7 MultiNA操作画面

8. 遺伝子増幅用試薬 “Ampdirect® Plus 酵素セット”

ヒトをはじめとする生物のゲノム配列情報の解析が進むにつれて、その配列情報が医学・医療をはじめ、さまざまな分野に応用されはじめています。

これら遺伝子の検査を行う上で、DNA増幅技術の一つであるPCR法は必須の基盤技術です。

通常、遺伝子のPCR増幅の際には鋳型となるDNAの抽出・精製を行うことが必要となりますが、鳥津製作所が独自開発した画期的な遺伝子増幅用試薬Ampdirect® Plusは、このDNA抽出精製のプロセスを不要もしくは簡便化することを可能とし、遺伝子検出の迅速化・簡略化・コストダウンを実現します。

簡便・迅速
DNA精製が不要、または簡便になり、迅速なPCRが可能

微量サンプルに最適
DNA精製が不要なため、精製時のサンプルロスがなく、微量サンプルからのPCRに最適

安定したPCR
サンプル中の夾雑物によるPCR阻害を受けにくくなり、安定したPCRが可能

低コスト
DNA抽出キットや装置は不要となり、ランニングコストを抑えることが可能

テイル、植物、血液・ろ紙血、微生物、昆虫、口腔粘膜細胞、培養細胞、パラフィン切片

Ampdirect® Plus
Nova Taq™ HS
プライマー

サンプル添加

PCR

図8 遺伝子増幅用試薬「Ampdirect® Plus」

9. ノロウイルスG1&G2検出試薬キット

ノロウイルスは培養ができないことから、ウイルスの検出には遺伝子増幅法が広く使われています。しかし、生体サンプル中には遺伝子を分解する酵素や遺伝子増幅反応を阻害する物質等が多量に存在するため、生体サンプルからウイルスを分離し、そこに含まれる遺伝子を抽出・精製する必要があります。

しかし、ノロウイルス遺伝子検出試薬キットは生体サンプル中の遺伝子分解酵素や増幅反応阻害物質の働きを抑え、遺伝子精製の工程なしに、生体サンプルから直接、ノロウイルス遺伝子を増幅して検出することが可能です。

簡便・迅速
RNA抽出・精製が不要のため、迅速なPCRが可能

操作性
糞便処理から増幅までのトータルの過程が1本のチューブでできるため、サンプルの取り違えが起りにくい

安定したPCR
RNA分解酵素や逆転写・増幅反応阻害物質の影響を受けにくいため、安定したPCRが可能

低コスト
RNA抽出キットや装置は不要となり、ランニングコストを抑えることが可能

検体処理試薬 19µL

10%糞便乳剤 上清1µL

糞便前処理

熱処理

RT反応液 25µL

PCR反応液 5µL

RT

PCR

- ・ RNase失活
- ・ ウイルスから RNA抽出

図9 ノロウイルスG1&G2検出試薬キット

10. MCE-202 “MultiNA” による食中毒菌関連遺伝子の検出例

サンプルは、菌株より抽出・精製したDNAを使用しました。弊社の遺伝子増幅用試薬 “Ampdirect® Plus” を使用してPCRを行い、得られたPCR増幅産物をMultiNAで分析した結果を図10に示します。

それぞれのターゲット領域のPCR増幅産物をMultiNAによって明瞭に検出することができました（図中のサイズ推定値は本実験によるものです）。

MultiNAでは、ゲルイメージ(図10-a)に加えてエレクトロフェログラム(図10-b)も得られるのでデータとしての確証が高いものとなります。MultiNAはアガロースゲル電気泳動と比べて分解能と感度が優れていますのでこれらを明確に検出することが可能です。

今回、PCRに使用した各Primerは、タカラバイオ株式会社で販売されています。

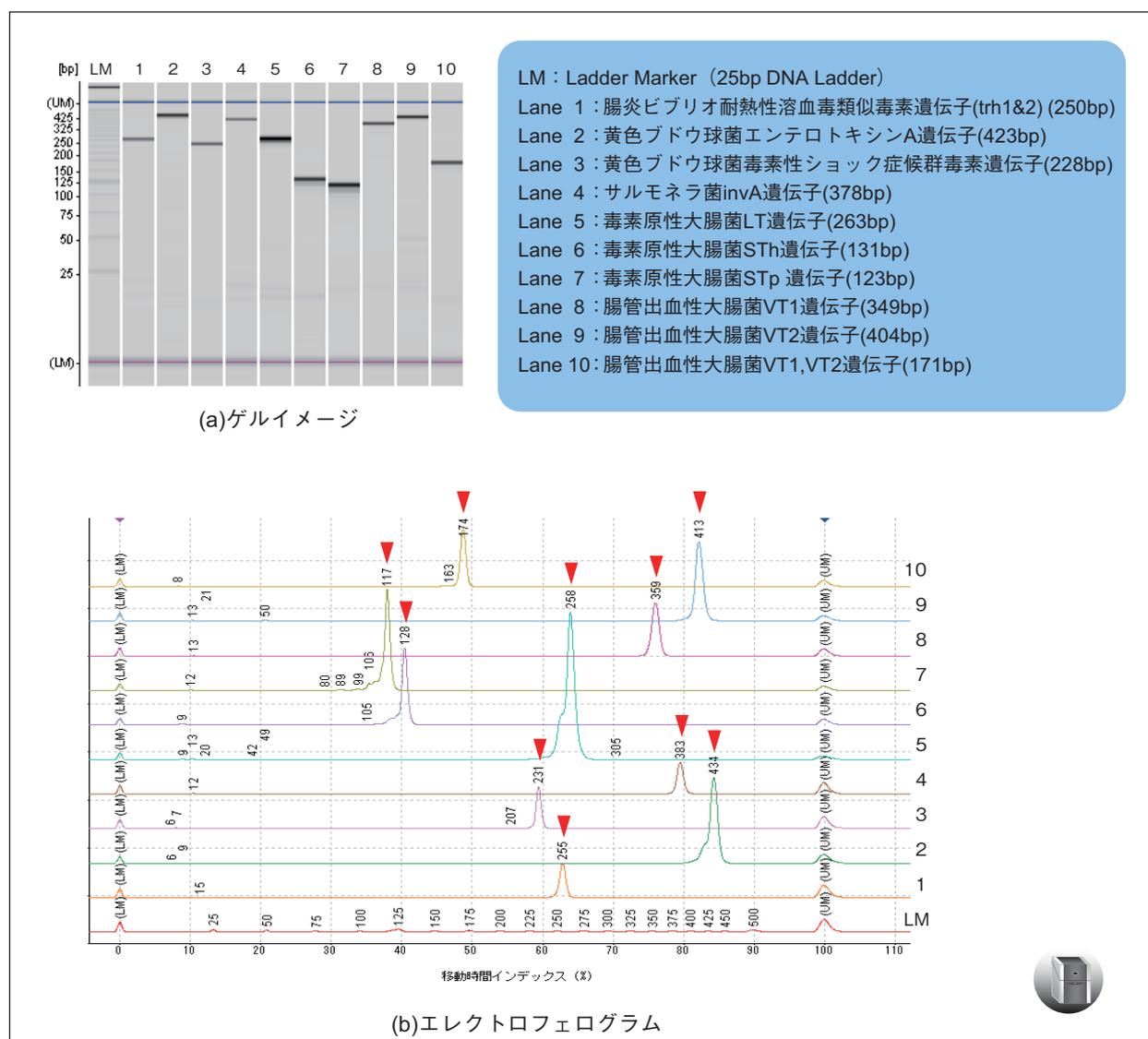


図10 食中毒関連遺伝子の分析結果

【参考資料】鳥津製作所アプリケーションニュース No.B22 「MCE-202 “MultiNA” による食中毒関連遺伝子の解析」

11. MCE-202 “MultiNA” によるノロウイルスG1&G2遺伝子の検出例

糞便サンプルを使用し、ノロウイルスG1とG2それぞれの陽性検体と陰性検体を用いました。

糞便サンプルの処理からRT-PCRまでは、弊社の“ノロウイルスG1&G2検出試薬キット” 付属の取扱説明書に準じました。得られたRT-PCR産物について、MultiNAで分析した結果を図11に示します。

ノロウイルスG1陽性糞便検体、G2陽性糞便検体ともそれぞれの特異的増幅産物を明瞭に検出することができました。

(図11-bのエレクトロフェログラムのサイズ推定値は本実験によるものです。“ノロウイルスG1&G2検出試薬キット”を用いた場合、ノロウイルスG1は85bp、G2は101bp、内部コントロールは204-211bpの増幅産物が得られます。)

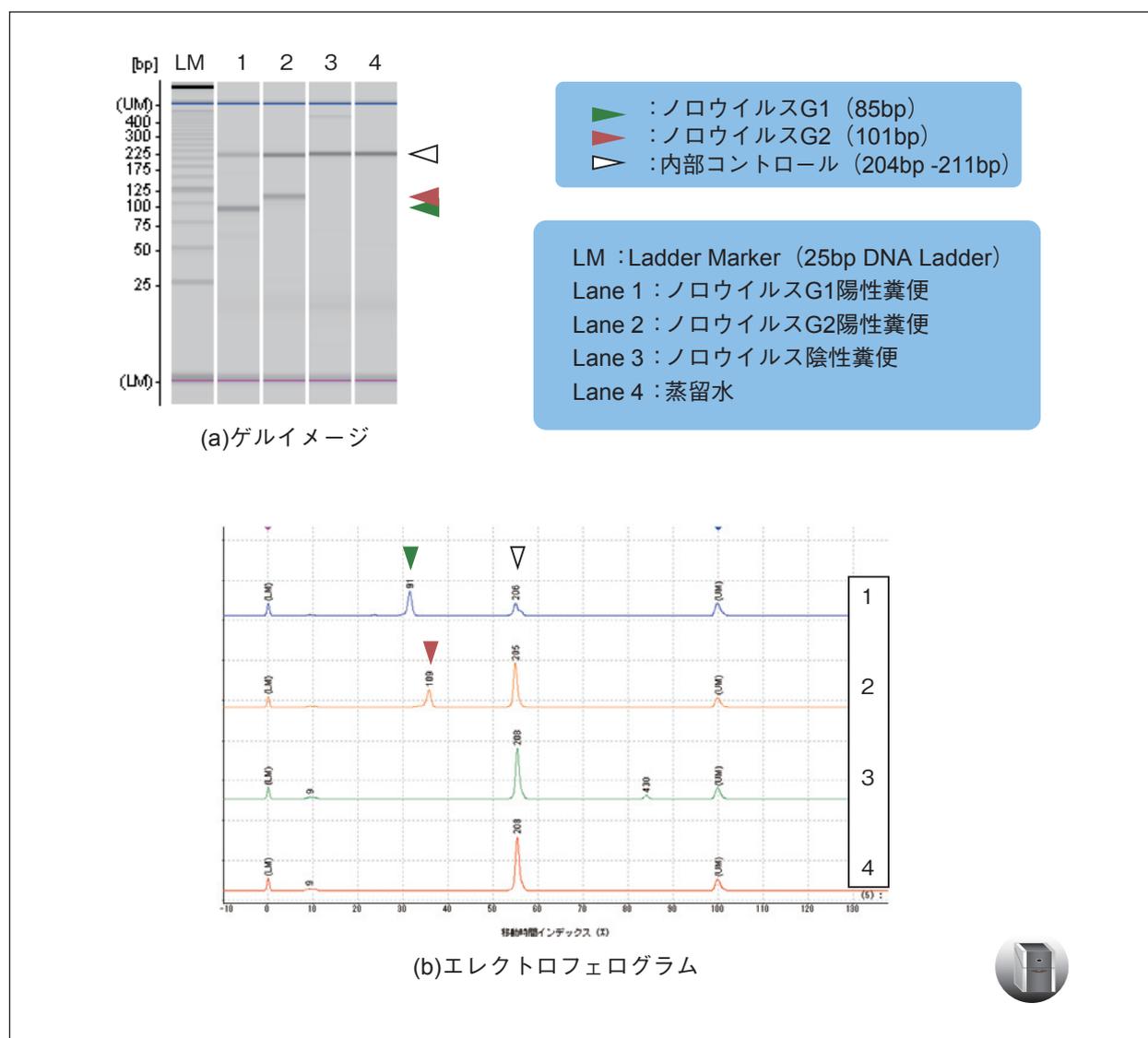


図11 ノロウイルスG1&G2遺伝子の分析結果

【参考資料】鳥津製作所アプリケーションニュース No.B26 「糞便直接RT-PCR法によるノロウイルスG1&G2遺伝子増幅産物の検出」

12. MCE-202 “MultiNA” によるカビ・酵母遺伝子の検出例

サンプルは、2種類のカビと1種類の酵母を用いました。*Eurotium*属は、乾物、パン、まんじゅうやジャムなどやや乾燥した食品に発生するカビです。*Penicillium*属は、アオカビとも呼ばれ、柑橘類、穀物や乳製品などの多くの食品に発生するカビであり、食用としてチーズの製造に用いられるものから、カビ毒を発生する有害なものまで、種類は様々です。*Saccharomyces cerevisiae*は、出芽酵母であり、パン酵母、ワイン酵母、清酒酵母などがあります。

PCR反応試薬は、弊社の遺伝子増幅用試薬“Ampdirect[®] Plus 酵素セット”を使用し、PCR反応条件は付属の取扱説明書に準じました。

寒天培地に培養したカビ・酵母をマイクロベットチップに付着させ、それをPCR反応液に懸濁し、PCRを行いました。

PCRは、ITS領域(※1)を検出するプライマー(日本薬局方(※2)記載の遺伝子解析による微生物の迅速同定法の真菌用ITSプライマー)を用いました。

PCR増幅産物をMultiNAで分析した結果を図12に示します。

カビ・酵母、それぞれに由来する遺伝子特異的増幅産物を明瞭に検出することができました。(図中エレクトロフェログラムのサイズ推定値は本実験によるものです。)

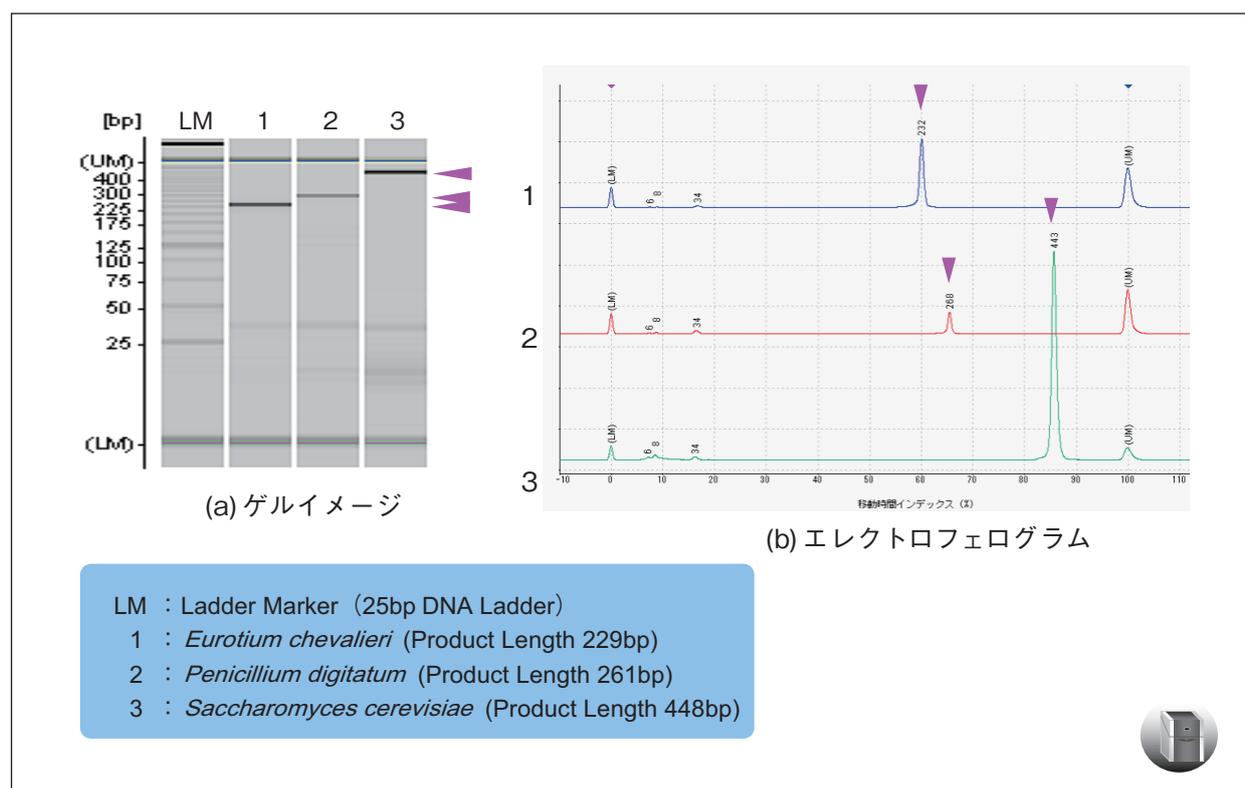


図12 カビ・酵母遺伝子の分析結果

(※1) ITS (Internal Transcribed Spacer) 領域とは、リボソームRNA遺伝子(rDNA)の18S、5.8S、28S、これら3つの間2ヶ所(18Sと5.8Sの間をITS1、5.8Sと28Sの間をITS2)にある領域です。菌種間でこのITS領域の塩基配列に差があることが知られています。

(※2) 日本薬局方とは、医薬品の性状及び品質の適正を図るために定められた医薬品の規格基準書です。

【参考資料】島津製作所アプリケーションニュース No.B27 「MCE-202 “MultiNA” によるカビ・酵母遺伝子の検出」

*本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2010年2月

島津製作所 分析計測事業部
 応用技術部

島津分析コールセンター

● 0120-131691 (携帯電話不可)
 ● 携帯電話専用番号 (075) 813-1691

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
 会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。