

細菌性食中毒の主要な病原菌を迅速に増殖する FPEブイヨンの特徴と迅速遺伝子検査

Features of Food Pathogen Enrichment Broth for Quick Genetic Screening of Major Food Pathogens

岐阜大学名誉教授／岐阜大学研究開発・社会連携機構フェロー 江崎 孝行

Takayuki Ezaki (Emeritus Professor of Microbiology)

Fellow of Gifu Genetic Resource/Organization for Research and Community Development



キーワード

細菌性食中毒、前増菌培地、迅速検査法

1

はじめに

食中毒を起こす9種類の病原体を1つの培地で短時間増菌させるFood Pathogen Enrichment (FPE) ブイヨンを開発し、迅速な遺伝子検査法と組み合わせることで食品検査の簡便化を図った。細菌性病原体には病原体ごとに優れた増菌培地や選択平板培地が開発され使用されてきた。しかし、病原体ごとに異なった培地で数時間から一夜かけて増菌し、さらに1～2日かけて選択平板培地で集落を形成させて、同定作業に入る手順が用いられてきた。この手順を簡素化するため、FPEブイヨンは血液と炭酸ガス培養を使わない1つの培地で増菌し、増菌液から遺伝子検査を実施することで食品の出荷前に安全性を確認することを目指した。

増菌培養液からイムノクロマト法による検査で病原体の抗原を検出するには、増菌培養液中に少なくとも 10^6 cfu/mLの病原体が必要である。そのため、多くの検査では一夜かけて増菌培養する。通常の遺伝子検査では、増菌培養液中に5,000cfu/mL以上の病原体がいれば、容易に迅速遺伝子検査法が構築できる。25gの食品に最初1個の病原体がいれば大腸菌、サルモネラ、赤痢菌、腸炎ビブリオ、セレウス菌、黄色ブドウ球菌、およびエルシニア菌などの病原体が4～6時間培養で5,000cfu/mLに到達できるため、効率よく遺伝子検査ができる。また、遺伝子検査キットをカクテル化し、1時間以内にすべての遺伝子検査の結果が出るようにデザインすれば、安全性を担保した食材を迅速に市場に出すことができる。この方法で培地をデザインするには、発育が遅く、血液と炭酸ガスが必要なカンピロバクターとリステリアが問題になってくる。基盤となる培地に血液と炭酸ガス培養を加えない代わりに、酸素耐性を付与する成分を追加し、培地の酸化還元電位を下げることで9種類の病原体を1つの培地で増幅する方法を開発した。

2

微好気培養をやめ、好気培養でカンピロバクターを含む食中毒菌を培養するための増菌ブイヨンの改良

カンピロバクターの培養には酸素が毒性に働くため、酸素の毒性を回避する工夫がなされてきた。食品からカンピロバクターを増菌する培地として、ブルセラ培地に7%溶血した馬溶血液を用い、0.3%の琥珀酸ナトリウム、0.01%システイン塩酸塩を加えて酸素の毒性を回避した。

また、バンコマイシン、トリメトプリム、およびポリミキシンBを添加することで、カビや腸内細菌を抑制した¹⁾。しかし、この培地でも微好気培養が必要で42℃、16～18時間、振盪増菌培養が必要であった。

初期に開発されたPreston培地の処方では、カンピロバクターの培養に酸素耐性成分が著しく不足していたため、血液添加と微好気培養が不可欠であった。そこで、特に培養が難しいカンピロバクター・フィータス(*C. fetus*)の増菌培養に酸素毒性を回避するために報告²⁾されていたサプリメント(培地1Lあたりピルビン酸ナトリウム(0.25g)、ピロ亜硫酸ナトリウム(0.25g)、および硫酸第一鉄(0.25g))を採用し、Preston培地に添加することで分離効率があげられた³⁾⁻⁵⁾。

Bolton培地ではScrew Cap付きの培地で培養することにより、炭酸ガスは不要で微好気的环境を作ることができる⁶⁾とされた。しかし、その後、微好気的环境で増菌する方が、分離感度が上昇するとの評価を受けている。Bolton培地の成分で酸素毒性は幾分回避できたがこの1培地はまだカンピロバクターの培養に血液添加を必要とした。

3

血液無添加培地の採用と
歴史的背景

食中毒の原因菌の多くは、食品中で保存している損傷を受けたviable but not culturable (VNC)によるとみられる^{6), 7)}。特にカンピロバクターは培養後、VNCになるのが早いとされている。また、凍結保存に弱く、-20℃で食品を保存すると解凍後の生存率は急速に低下する^{7), 8)}。その過程で血液の添加は特に損傷菌の回復に効果があるとされ、Preston培地やBolton培地には5%の溶血液が添加され使用されてきた。

これに対してカンピロバクターの増菌ブイヨンに血液無添加培地(表1)が開発され⁹⁾⁻¹¹⁾、George²⁾により報告さ

れた酸素耐性添加成分を増量し、活性炭を追加することで血液無添加培地が開発された。活性炭は固形平板培地(mCCDA培地)での培養に重要であるが¹²⁾、FPEブイヨンによる増菌培養では活性炭無添加でも増菌培養には影響はないとの評価が出ている。

また、血液添加と酸素毒性を回避する両方の目的のために、培地の酸化還元電位を偏性嫌気性菌の培地に近いレベルまで下げるためシステインを増やした。また損傷菌の回復力を上げるために、ピルビン酸とヘミンを増加させた。特にヘミンは溶解度ぎりぎりまで添加してある。そのため、単にヘミンの粉末を滅菌水1000mLに加えても完全には溶けないので、自分で培地を調製する場合は、ヘミンを10%の炭酸ナトリウムに溶解する必要がある。システイン、ヘミン、ピルビン酸の添加変更で血液を添加せずにカンピロバクターに

表1 FPE増菌ブイヨンとCampylobacterの増菌ブイヨン

増菌ブイヨン(1000mL)の組成	FPE* (2013)	TranBFEB*(1998)	M-BFEB*(2011)	Preston*(1984)	Bolton*(1983)
脱繊維馬溶血液	不要	不要	不要	50 mL	50 mL
Meat Extract(Beef extract)	10 g	10 g	10 g	10g	10g
Lactalbumin hydrolysate					5 g
Peptone	3 g	10 g	10 g	10 g	
Soy-Bean Casein hydrolysate	17 g	6 g	6 g		
Activated Charcoal		4 g			
Glucose	2.5 g				
L-Cysteine-HCl	0.6 g				
Sodium Chloride	5.0 g	5 g	5 g	5 g	5 g
Sodium pyruvate	1 g	0.75 g	0.75 g		0.5 g
Sodium metabisulphite		0.75 g	0.75 g		0.5 g
Ferrous sulphate		0.5 g	0.5 g		
Dipotassium Phosphate	0.8 g				
Alpha-ketoglutaric acid monopotassium salt		1 g	1 g		1.0 g
Sodium carbonate anhydrous		1 g	1 g		0.6 g
Hemin	30 mg				10 mg
pH	7.4-7.5				
選択剤組成					
ポリミキシンB	5,000 IU			5,000 IU	
リファンピシン	10 mg			10 mg	
トリメトプリム	10 mg	11.4 mg	11.4 mg	10 mg	20 mg
シクロヘキサマイド	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	50 mg
セフォペラゾン		32 mg	32 mg		20 mg
バンコマイシン		10 mg	10 mg		20 mg
炭酸ガス	不要 (蓋付容器)	不要	不要	必須ではないが 微好気培養のほうが 発育が良い	蓋付容器、 あるいは微好気培養
推奨培養法	37℃、 4~6時間振盪培養	42℃、 24時間	42℃、 24時間	41.5度、 24時間	最初37度で4時間培養 し、42度24時間培養

a:文献13)、b:文献9)、c:文献12)、d:文献3)、e:文献11)

対する酸素毒性を緩和することができた。

FPEブイオン¹³⁾では、酸素毒性を回避する成分が入っているが、培養ではさらに最適な培養をするため、広口のスクリュウキャップ付きの容器に入れ、ジャイロトリー振盪機を使用して37℃で振盪培養すると短時間でカンピロバクターの培養条件が整った(図2)。これは、振盪することで炭酸ガスが溶解して攪拌されると推測している。25gの食材を培養する場合は、225mLのFPEブイオンを加え、500mLのキャップ付きのポリ容器を使用する。また、10gから25gの食材を100mLのFPEブイオンで培養する場合は、250mLの容器を使用する。液体培地が容器全体の4割ぐらいの空間を占める位置まで満たすキャップ付きの容器が、カンピロバクターの培養に最適な環境を作ることができる。

FPEブイオンの損傷菌の回収率は、カンピロバクターやリステリアの血液添加培地より回収率が良いとの報告(川本恵子、第88回日本細菌学会抄録集)がされており、これは酸化還元電位が嫌気培養培地に近いレベルに低く設定してあることが、損傷菌の回収率に影響していると推測している。



図2. FPEブイオンを入れるポリプロピレンボトル

左は、試料25gを500mlボトルに225mlのFPEブイオンを充填し、右は、試料10-25gを250mlボトルに100mlのFPEブイオンを充填する際に使用したボトルである。

4

FPEで採用した選択薬剤と薬剤耐性菌

Bolton培地やPreston培地の選択剤は、真菌や大腸菌の発育を抑制する組成になっているが、表1にあるように薬剤の組成は大きく異なる。カンピロバクターがセフォペラゾンに耐性であることから、Bolton培地のオリジナルの薬剤組成では、大腸菌群の抑制にバンコマイシンを使用している。しかし、近年、特に鶏の糞便中の大腸菌が薬剤耐性化し¹³⁾、¹⁴⁾、高度耐性化した大腸菌はBolton培地では抑制が難しくなっている。Preston培地の薬剤組成が耐性菌を抑制できるため¹⁵⁾、¹⁶⁾、我が国の検査指針でもPreston培地の選択剤を推奨している¹⁷⁾。我々の予備実験においても、Preston培地の抗菌剤の方が、鶏の腸内の大腸菌の抑制が良好であった¹³⁾、¹⁴⁾ため、FPEブイオンではPreston培地の抗菌剤を採用した。Bolton培地で増菌—mCCDA培地で分離培養した方法とFPEブイオンで増菌後、遺伝子検査をする方法を比較した。Bolton培地で増菌—mCCDA培地で分離培養の方法では、薬剤耐性の大腸菌を抑制できずカンピロバクターの検出感度が大幅に低下していた¹³⁾。新鮮な鶏肉50例で比較した結果、FPEブイオン—PCR法では50例中39例でカンピロバクター・ジェジュニーが陽性であったが、Bolton培地増菌—mCCDA培地分離法では50例中22例の陽性にとどまった。この主たる原因は、Bolton培地の選択剤が多剤耐性化した大腸菌の増殖を抑制できなかったことが推測される。

5

食中毒菌のFPEブイオンでの発育と最適な増菌培養時間

一般の食中毒病原体(大腸菌、赤痢菌群、サルモネラ、腸炎ビブリオ、セレウス菌、黄色ブドウ球菌、エルシニア菌、およびリステリア)が検査の目的であれば、4~6時間の増菌培養で遺伝子検査に必要な菌数に到達する。6時間培養すれ

表2. 25 gの食材から食中毒病原体1CFUを遺伝子検出するための増菌培養条件

培養温度、時間	培養条件	培地	標的病原体
37℃、6時間	Cap 付き容器、振盪培養	FPE	<i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella</i> spp., <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Salmonella enterica</i> serovars, <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
	ストマッカー袋、好気条件、静置培養		
37℃、8~18時間	Cap 付き容器、好気条件、振盪培養	FPE+Frazer supplement ^{a)}	<i>Listeria</i> spp.
	ストマッカー袋、微好気条件、静置培養		
37℃、8~18時間	Cap 付き容器、好気条件、振盪培養	FPE+Preston supplement ^{b)}	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. lari</i> , <i>Arcobacter</i> spp.
	ストマッカー袋、微好気条件、静置培養		

a) Frazer supplement: 塩化リチウム、アクリフラビン、ナリジクス酸を含む

b) Preston supplement: リファンピシン、トリメトプリム、シクロヘキサマイドを含む

ば振盪する必要もなく好気的な静置培養で5,000cfu/mLに菌数が到達する。国際的にも食材の検査は、25gの10倍量の225mLの増菌培地で増やす検査法が基本になっているため、食材25gに病原体が1個いたとして、5,000cfu/mLまで発育するのに6時間の増菌培養があれば遺伝子検査が可能となる。特にビブリオ属の菌種の増殖は速く4時間の増菌培養で遺伝子検査を開始できる。その他の腸内細菌群やセレウス菌は検査の安全性を考えて6時間培養後に遺伝子検査を開始することとした(表2)。

225mLのFPE培地に1cfu添加した場合、カンピロバクターとリステリア菌は5,000cfu/mLに到達するのに6~8時間以上かかる(図1)。

カンピロバクターの鶏肉汚染は高く、培養0時間でも検出できることがしばしばあり、FPEブイヨンに食材を懸濁した際にすでに1000cfu/mL以上の菌数に達しているケースがある。

6

増幅後の遺伝子検査のための核酸抽出

FPE培地を使用した食中毒病原体の遺伝子検査手順を図3に記載した。具体的には下記の手順で核酸を抽出する。

1. 所定培養時間後、培養上澄み1mL採取し、2mLのチューブに入れ、6,000g、3分間遠心して上澄みを完全に捨てた。

2. 上澄み1mLをSalineに再懸濁し、再び6,000g、3分間遠心し、上澄みを完全に捨てた。(培地成分が1.で十分除くことができれば2.は不要になる)
3. 200μLのT10E1bufferもしくは蒸留水に沈査を懸濁し、シリコニアビーズ(MORA-Beads)チューブに全量移す。
4. 振盪攪拌機(Dysruptor Genie)で1分間、攪拌し菌を破碎した。(Dysruptor Genieとシリコニアビーズが使用できない場合、場合100℃、3分間煮沸して菌を破碎する)
5. 上澄みを遺伝子検査に使用した。

カンピロバクターとリステリアの8時間増菌培養は、1日の勤務作業時間外になるので、一夜培養したのちに検査をしてもよい。

7

迅速で簡便な多項目遺伝子検査

6時間の増菌培養後、遺伝子検査結果を1時間以内に実施すれば、安全性の検証ができてから食品を市場に出荷することができる。抗原を検出するイムノクロマト法では、通常菌数が 10^6 cfu/mLに到達しなければ陽性にならないため、イムノクロマト法では一夜培養液を使用した方法に利用されていることが多い。

医療機関で使用されているTaqman probeを使用した遺伝子増幅産物の確認方法は、便利であるが高価な増幅機

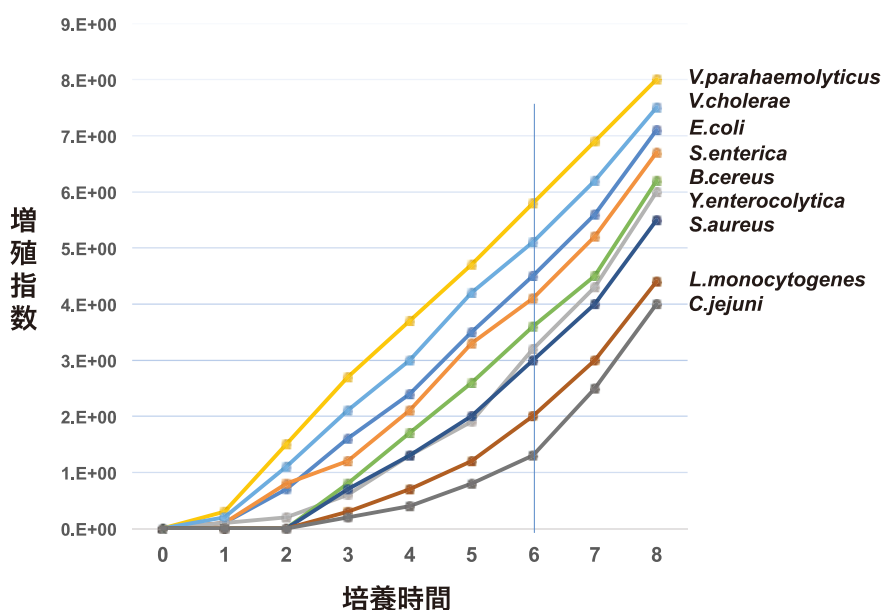


図1 FPEブイヨンでの各種病原体の増殖速度
縦軸は最初の接種菌数(1-50cfuの間)を1として各時間ごとの増殖菌数を指数で示した。横軸は菌数測定をした時間を示した。

器が必要になる。我々は反応系を10 μ Lで実施し、20～25分で遺伝子増幅を行い、増幅産物を核酸クロマト法で確認する方法を開発した(図3)¹⁸⁾。さらに、増幅プライマーを複数使用して2～4種類のターゲットを増幅後、多項目遺伝子検査を目視で識別する方法を開発した。

この方法は、増菌培養ブイオン1mLを採取してから、病原菌の確認まで1時間以内で検査ができるため、食品の出荷前に汚染が確認できる。迅速に食品の安全性を検証し、新鮮な食材をマーケットに出荷する体制の構築に有用であると考えている。

8 まとめ

食中毒の病原体検査の簡素化と迅速化をするため、主要な細菌性食中毒の病原体を増菌するFPEブイオンを開発した。

このブイオンを用いる検査方法では、カンピロバクターを

血液や炭酸ガスを使わず検査することができる。

また、遺伝子検査法における増菌培地として、サルモネラ、大腸菌、リステリア、バチルス菌および腸炎ビブリオなどの検査をFPEブイオンで短時間培養後に核酸抽出することで、多種類の病原体の遺伝子スクリーニング検査をすることができる。

食品検査の増菌培養をFPEブイオン1種類にして、病原体のスクリーニング検査を迅速にすることで、安全性検査の作業を簡素化し、検査にかかるトータルコストの削減を目指した。

参考文献

- 1) M. P., Doyle and D. J. Roman. Recovery of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from inoculated foods by selective enrichment. Appl Environ Microbiol 43, 1343-1353. (1982).
- 2) H. A. George. Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. J. Clin. Microbiol. 8,36-41. (1978).
- 3) F. J. Bolton, D. Coates, P. M. Hinchliffe, and L. Robertson. Comparison of selective media for isolation of *Campylobacter jejuni/coli*. J. Clin. Pathol. 36,78-83. (1983)
- 4) M. Rogol, B. Shpak, D. Rothman., and I. SECHTER. Enrichment Medium for Isolation of *Campylobacter jejuni*-*Campylobacter coli*.

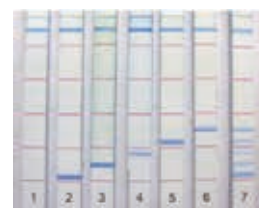
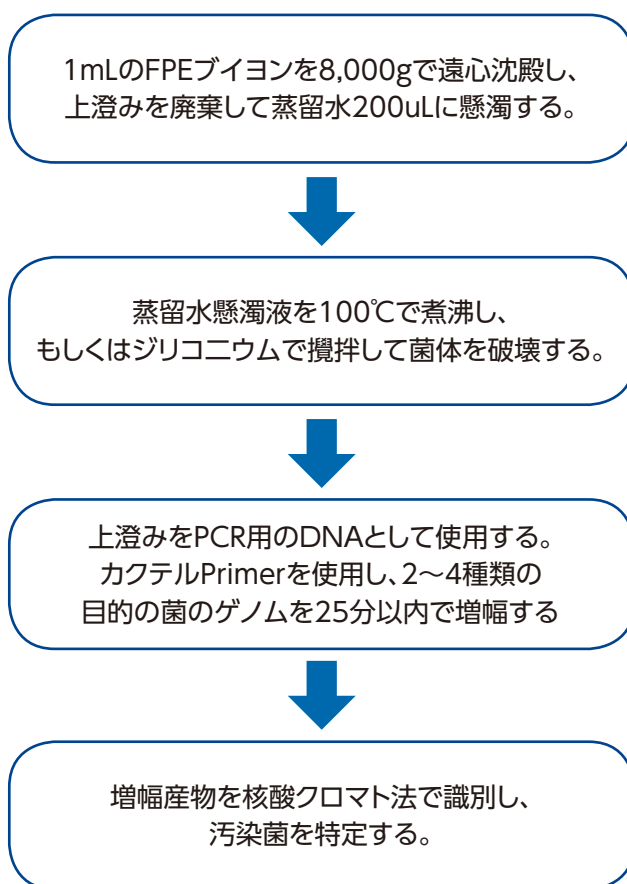


図3 カクテルプライマーと核酸クロマトを使用した遺伝子検査手順

- Appl. Environ. Microbiol. 50, 125-126. (1985)
- 5) Y. S. Luisa, S. Garcia, I. Wesley, and N. Heredia. A Charcoal- and Blood-Free Enrichment Broth for Isolation and PCR Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Chicken. J. Food Protection: 74, 221-227. (2011).
 - 6) 伊藤武 & 坂井千三. 主な食中毒起因細菌の食品中における増殖について. 食衛誌. 30, 123-137. (1989).
 - 7) B. Lázaro, J. Cárcamo, A. Audicana, I. Perales, and A. Fernández-Astorga. Viability and DNA maintenance in non-culturable spiral *Campylobacter jejuni* cells after long-term exposure to low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4677-4681. (1999)
 - 8) P. Wolffs, B. Norling, J. Hoorfar, M. Griffiths, and P. Rådstrom. Quantification of *Campylobacter* spp. in Chicken Rinse Samples by Using Flotation prior to Real-Time PCR. Applied. Environ. Microbiol. 71, 5759-5764. (2005).
 - 9) T.T. Tran, A blood-free enrichment medium for growing *Campylobacter* spp. Under aerobic condition Lett. Appl. Microbiol. 26, 145-148 (1998).
 - 10) L. Y. Soli, S. Soto, S. Garcia, I. Wesley, and N. Heredia. Charcoal- and Blood-Free Enrichment Broth for Isolation and PCR Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Chicken. J. Food Protect. 74, 221-227. (2011).
 - 11) F. J. Bolton, and D. Coates. 1983. Development of a blood-free *Campylobacter* medium: screening tests on basal medium and supplements, and the ability of selected supplements to facilitate aerotolerance. J. Appl. Bacteriol. 54:115-125. (1983)
 - 12) D. N. Hutchinson, and F. J. Bolton. Improved blood free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens. J Clin Pathol. 37, 956-957. (1984).
 - 13) M. Hayashi, S. K. Hayashi, T. Natori, T. Mizuno, M. Miyata, S. Yoshida, J. Zhang, K. Kawamoto, K. Ohkusu, S. Makino, and T. Ezaki. Use of blood free enrichment broth in the development of a rapid protocol to detect *Campylobacter* in twenty-five grams of chicken meat. Int. J. Food Microbiol. 63, 41-46. (2013).
 - 14) C. Kojima, M. Himoto, M. Miyata, N. Nomura, and S. Nomura, and T. Ezaki. Development of Rapid Screening of *Campylobacter* spp. and the *GyrA* Mutants Using PCR-DNA Strip and Real Time PCR. Jpn. J. Food Microbiol. 33, 12-18. (2016)
 - 15) FSA Project FS241044. Antibiotic Resistance Report for FS241044 A Microbiological survey of campylobacter contamination in fresh whole UK produced chilled chickens at retail sale (2014-15). (2016).
 - 16) Y. Tang, O. Sahin, N. Pavlovic, J. LeJeune, J. Carlson, Z. Wu, L. Dai and Q. Zhang. Rising fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* isolated from feedlot cattle in the United States. Scientific Reports 7, Article number: 494. (2017).
 - 17) NIHSJ-02-ST4(Draft20731). カンピロバクター・ジェジュニー・コリ 標準試験法(ステージ4:最終案). (2012)
 - 18) M. Hayashi, T. Natori, S. K. Hayashi, M. Miyata, K. Ohkusu, K. Kawamoto, H. Kurazono, S. Makino, and T. Ezaki. A New Protocol to Detect Multiple Foodborne Pathogens with PCR Dipstick DNA Chromatography after a Six-Hour Enrichment Culture in a Broad-Range Food Pathogen Enrichment Broth. BioMed Research Inter. Article ID 295050, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/295050>. (2013).