

漁港漁村周辺地域におけるサルモネラ汚染のモニタリング法の開発

研究代表者 東京水産大学 教授 藤井建夫

共同研究者 東京水産大学 助教授 木村凡

研究成果の要旨

近年、世界中でサルモネラによる食中毒が頻発しており、本菌は、現在、食中毒発生病数の最も高い食中毒菌であるとされている。本菌は多くの哺乳動物、鳥類、爬虫類の腸内に生息が可能なことから、その汚染源や汚染環境は多様である。これまでの多くの事例では、食鶏肉や食肉、卵などに由来する食中毒が多くを占めているが、平成11年のイカ乾燥品によるサルモネラ食中毒に見られるように、水産食品も本菌の食中毒に無縁ではない。漁港内やその周辺沿岸海域に流入する河川からサルモネラが恒常的に流入していると考えられる。また、漁港周辺に生息する鳥類の糞による漁港施設への直接的サルモネラ汚染についても疑われているが、その実態は不明である。漁港およびその周辺水域でのサルモネラ汚染の実態を解明することは、これらの施設や水域環境の向上に欠かせない。

これまでに、環境や食品からのサルモネラの検出は、もっぱら培養法を主体とした方法で行われてきたが、これらの方法は、操作が煩雑で、時間を要するという欠点がある。漁港およびその周辺水域における日常検査に活用できるように、極めて簡便でかつ迅速な微生物のモニタリングシステムの技法開発が求められている。

本研究では、サルモネラの蛍光プローブPCR法（TaqMan法）による検出技術により、漁港およびその周辺のサルモネラ汚染の迅速モニタリング技術の確立に取り組むこととした。本法は、電気泳動のかわりに直接PCRチューブ中の蛍光量の増加によりPCR増幅の有無を感知するこれまでにないPCR法である。原理としては、Taq DNAポリメラーゼの5' nuclease活性を利用し、サルモネラの標的遺伝子のPCR増幅とともにプローブの切断による蛍光値の増加を自動モニタリングするものである。本研究に用いたアッセイ系では、実験に用いたサルモネラ菌株のほとんどを検出し、且つ、サルモネラ以外の菌は検出しないことが確認された。PCRチューブ当たり500fgDNA、サルモネラ細胞では1～10cfuの検出が可能であった。また、約100試料の同時分析が可能で、PCR反応から結果判定までの分析に要する時間は2～3時間であった。

次に、エビなどの水産生鮮魚介類からの検出適正を検討した。まず、エビなどの水産魚介類や環境試料からの純度の高いサルモネラDNAを回収する方法を検討した。この際、食品成分からのPCR阻害物質の除去効率や取り扱いの簡便さなどを考慮し、試料水をキークレス樹脂とともに煮沸し、DNAを共沈させる方法と、グアニジンイソシアネート等のタンパク変成剤を用いる方法の検討をおこなった。その結果、前者が、不純物の除去効率において、より優れていると判断されたので、以後の実験にはグアニジンイソシアネート法を採用することとした。

また、本研究では、タックマン蛍光をさらに経時的に蛍光強度をモニタリングするリアルタイム定量PCR法の適用を試みた。これまで、食中毒菌の定量のためには、もっぱら、最確（most probable；MPN）法が用いられてきたが、この方法では煩雑な作業をとめない、また、結果がでるまでに数日がかかるため、多量の環境試料の迅速調査という目的には適していない。リアルタイム定量PCR法は、上述のタックマン反応により生じた蛍光強度の増加をリアルタイムに測定することで増幅産物を定量するシステム（ABI Prism 7700 Sequence Detectorを使用）である。経時的に蛍光強度をモニタリングすることによりカイネティクス解析が可能であり、PCRチューブ内の初発DNA量と検出閾値までのPCRサイクル（Ct値）との

相関性を基に検量線を作成することで、初発DNA量の定量が可能となった。この方法により実験に用いた57株のサルモネラのうち、56株について正確な定量が可能であった。また、本方法により、あらかじめサルモネラを植菌した海水と海泥試料からの菌の回収、定量を試みた結果、得られた定量値は純粋培養で得られた値をほぼ同一であることが明らかとなった。

以上、本研究により、水産生鮮魚介類、海水、および海泥からの、迅速なサルモネラ定量技術の確立という目的はほぼ達成できた。本技術は、漁港およびその周辺のサルモネラ汚染の実態調査に活用が可能であると思われる。