

食の安全を確保するための迅速検査技術

Rapid inspection technology to ensure food safety

黒瀬 直孝
Kurose Naotaka

食中毒の原因の上位は病原性を示す微生物が占めており、これらの病原微生物の検査法は公定法で定められている。しかしながら、公定法の基本である培養法では、検査に時間を要するため、病原微生物が検出されても対応が遅れる恐れがある。そのため、迅速で、かつ精度の高い病原微生物の試験法として遺伝子検査法が開発されている。本稿ではわが国の通知法に収載された病原微生物の遺伝子検査法について紹介する。

The test method for the pathogenic microorganisms that occupy the top of the causes of food poisoning is stipulated by the official method. However, the culturing method, the basis of the official method, takes time for inspection. So, genetic testing methods have been developed as rapid and accurate test methods. This article introduces the genetic testing methods of pathogenic microorganisms listed in the official method of Japan.

キーワード：食中毒、病原微生物、通知法、遺伝子検査法、PCR法

1 はじめに

健康志向の高まり、食品流通のグローバル化などの社会的背景のもとで、消費者の食への安全・安心の意識はますます高まっている。安全な食品とは、消費者がその食品を食べた場合、健康を損なわず、かつ食中毒などの病気にかからない、安心のおける食物のことである。また、消費者が食品に安心を感じるためには、安全であることの科学的証拠を事業者が提供しなければならない。食品の安全を確保するためには、科学的に妥当性確認が行われた試験法で食品を検査することが必要である。

2 食品の危害要因

食品中の危害物質は「食品中に存在するかまたは食品の特性として備わっており、健康に有害な影響を及ぼす可能性のある、生物学的、化学的または物理的物質」と定義される。

食品の危害要因を大別すると表1のようになる。各要因のうち、生物的要因の多くは病原細菌、ウイルスまたは寄生虫による食中毒である。化学的要因は、原材料に由来する自然毒、残留農薬・動物性医薬品、アレルギーあるいは環境汚染

物質、食品に含有している加工・調理由来物質、保存中生成物質、容器包装由来物質などである。また、物理的要因は、ガラス片、金属片、プラスチック片などの異物が考えられる。

これらの危害要因の中で、消費者が食品を喫食した後、比較的短時間で重篤な症状（食中毒症状）を起こす要因として、生物学的因子の中の病原細菌、ウイルスなどの病原微生物がある。

表1 食品危害要因

分類	危害要因	代表例、原因物質等
生物的要因	病原細菌	感染型(カンピロバクター、サルモネラ菌、腸炎ビブリオ) 生体内毒素型(腸管出血性大腸菌(EHEC)、ウエルシュ菌) 食品内毒素型(黄色ブドウ球菌、ボツリヌス菌)
	腐敗微生物	真菌(酵母・カビ)、乳酸菌、バシラス属、シュードモナス属
	ウイルス	ノロウイルス、A型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス
	寄生虫	クドア、アニサキス、サルコシステイス
	化学的要因	1)原材料由来物質
	自然毒	カビ毒(アフラトキシン、オクラトキシン、パツリン) 魚介毒(テトロドトキシン、テトラミン) 植物毒(キノコ有毒成分、アコニチン、ソラニン)
	原材料由来物質	残留農薬、動物性医薬品、ヒスタミン
	環境汚染物質	重金属(ヒ素、カドミウム、メチル水銀)、ダイオキシン類 放射性物質(セシウム)
	2)食品に含有する物質	
	加工・調理由来物質	アクリルアミド、トランス脂肪酸、過剰食品添加物
	保存中生成物質	過酸化物質、ニトロソ化合物、カルバミン酸エチル
	容器包装由来物質	ビスフェノールA、フタル酸エステル類、ノニルフェノール
物理的要因	異物	ガラス片、金属片、プラスチック片、ゴム片、木片、小石 昆虫、毛髪

厚生労働省が公表した2017年（平成29年）の食中毒に関する統計¹⁾では、2017年の国内の食中毒患者数は16464人で、その病因物質のほぼ半数をノロウイルスが占め、次いでカンピロバクター、ウエルシュ菌、病原性大腸菌（腸管出血性大腸菌を含む）、サルモネラ菌などが占めていた。

3 病原微生物の迅速検査法

わが国の食品微生物の試験法の中で公定法と呼ばれている試験法は、「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」に基づく省令法，食品衛生法に示されている告示法，行政機関から文書で通知される通知法に示されている。公定法で定められている微生物試験法は基本的に培養法である。培養法を基本とする微生物検査の公定法は精度が高く，妥当性が確認された試験法であるが，検査に時間を要し，かつ作業が煩雑であるという欠点を有している。

公定法の欠点を改善する目的で，食品中の微生物検査の迅速簡易検査法が種々開発され，食品メーカーなどで自主検査に使用されている。食中毒の起因微生物を特定するためには，迅速でかつ精度の高い試験法が求められる。そのようなニーズに応じて病原微生物検査に利用されたのが遺伝子検査法である。

遺伝子検査法とは，微生物の遺伝情報を保存しているDNA (Deoxyribonucleic Acid) またはRNA (Ribonucleic Acid) の配列が属種によって異なることを利用して，特定の微生物を検出・同定する手法である。遺伝子検査法には種々の手法が開発されているが，代表的なものはポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction : PCR) 法であり，より迅速に結果を判定できるPCR法としてリアルタイムPCR法がある。PCR法以外の遺伝子検査法としてLAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法もよく知られている。ウイルス検査を行うときはPCR産物の確認試験としてハイブリダイゼーション法も用いられる。

3.1 PCR法

PCR法は耐熱性のDNA合成酵素とプライマーDNA (合成するDNAの起点または終点の領域に相補性のあるDNA断片) を検査対象の微生物由来のDNA溶液に混合し，温度を3通りに変え，(1) ステップ1 : DNA鎖の熱変性，(2) ステップ2 : プライマーのアニーリング，(3) ステッ

プ3 : ポリメラーゼによる相補鎖の合成を25~40サイクル繰り返して行い，特定領域のDNAを増幅する手法である (図1)。増幅したPCR産物をアガロースゲル電気泳動で検出し，DNA増幅の有無と増幅サイズを確認して結果を判定する。リアルタイムPCR法は特定DNAを増幅させるPCR反応液中に蛍光物質を加え，リアルタイムにDNAの増幅を蛍光で検出し，結果を判定する方法である。アガロースゲル電気泳動を必要としないため，PCR法より迅速性に優れている。

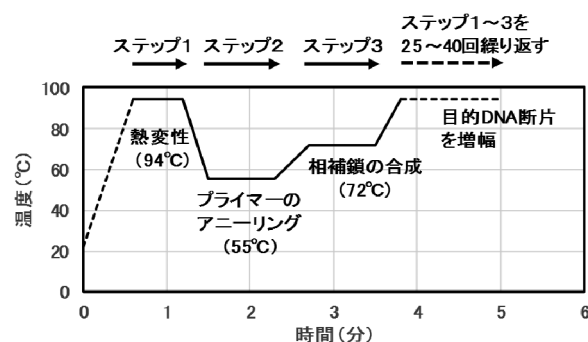


図1 PCR法における遺伝子増幅の工程
タカラバイオ (株) ホームページ : <http://www.takara-bio.co.jp/kensa/index.htm> のデータをもとに作成

3.2 LAMP法

LAMP法もDNAの特定領域を増幅する方法であるが，反応を一定温度で行う点がPCR法と異なる。検査対象の微生物遺伝子の6つの領域に対して4種類のプライマーDNAを設定し，検査対象の微生物から抽出したDNA溶液，プライマーDNA，鎖置換型DNA合成酵素，基質を混合し，一定温度 (65°C付近) で反応させ，15分~1時間でDNAの特定領域を $10^9 \sim 10^{10}$ 倍に増幅する。反応時の副産物によって上昇する反応液の濁度を測定して結果を判定する。

3.3 ハイブリダイゼーション

一本鎖のDNAまたはRNAの断片が相補的な配列をもつ一本鎖のDNAまたはRNAと結合して二本鎖を形成する性質を利用し，遺伝子の検出や同定を行う手法をハイブリダイゼーションという。ウイルスの遺伝子検査でPCR産物を確認する試験としてハイブリダイゼーションが用いられる。

4 通知法に収載された遺伝子検査法

通知法で定められている微生物検査法の中で、培養法以外で採用されている試験法として遺伝子検査法がある。病原細菌とウイルスの検査に関して厚生労働省の通知法に収載された遺伝子検査法について以下に紹介する。

4.1 病原細菌

(1) 腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli* : EHEC)

腸管出血性大腸菌 (EHEC) は腸内細菌科に属する感染型食中毒菌である。EHEC を起因菌とする食中毒は、産生するベロ毒素 (Verotoxin : VT) によって起こり、食肉、加工品 (ハンバーグ)、生乳、野菜類、サラダ類などの食品が汚染源となっている。地方衛生研究所や保健所で分離された腸管出血性大腸菌の血清型の大部分は O157 で、O26、O111 が続いている²⁾。その他に O103、O121、O145 などの血清型もある。

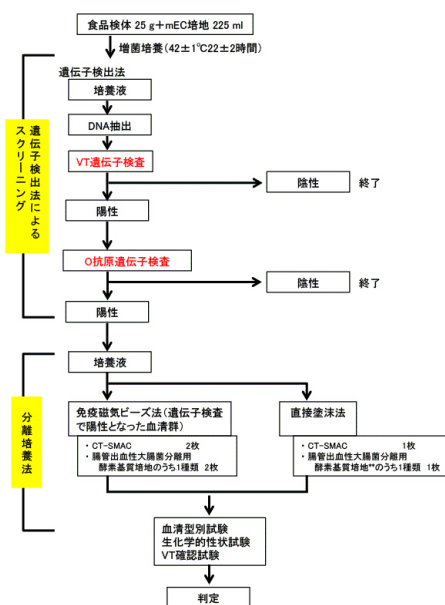


図2 腸管出血性大腸菌の検査法³⁾

通知法³⁾における食品からの腸管出血性大腸菌の検査法 (図2) は、原則として、VT 遺伝子及び O 抗原遺伝子検出法によるスクリーニングを行い、陽性であった場合には分離培養法で菌の分離を行い、確認試験の結果、判定することになっている。VT 遺伝子検出法として、

- ・リアルタイムPCR法

- ・LAMP法
 - ・PCR法
 - ・その他、同等の手法
- O 抗原遺伝子検出法として、
- ・リアルタイムPCR法
 - ・LAMP法
 - ・その他、同等の手法
- などの方法が収載されている。

(2) リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) 及びサルモネラ菌 (*Salmonella*)

リステリア菌の中でヒトに病原性を示すリステリア・モノサイトゲネスは乳 (ソフトチーズ等)、食肉 (生・発酵ソーセージ)、野菜、魚介類 (燻製品) などが汚染源であり、妊婦/胎児、免疫不全者、高齢者などに感染すると死亡率が高い。

サルモネラ菌は腸内細菌科に属する感染型食中毒菌である。畜産食品 (食肉、卵、乳等)、魚介類、香辛料、野菜類などが汚染源となり、ヒトに感染するが、特に幼弱者、高齢者などは重症となる場合がある。

通知法⁴⁾では、リステリア・モノサイトゲネスおよびサルモネラ菌に係るモニタリング検査において、検査にかかる時間の短縮のため、簡易測定装置 (キット) を用いて陰性の判定を行っても差し支えないとした。簡易測定装置として、「3MTM病原菌自動検出システム (3M)」が指定されている。分析法はMDS (Molecular Detection System) 法と呼ばれるAOAC-OMA 認証を取得した試験法で、LAMP法と生物発光検出法を組み合わせた方法である。

4.2 ウイルス

(1) ノロウイルス (Norovirus)

ノロウイルスはカリシウイルス科ノロウイルス属に分類されるウイルスの総称である。ノロウイルスによる感染性胃腸炎は冬期に多発する傾向にあり、患者は全年齢層にわたる。ノロウイルスによる食中毒は、汚染食品を喫食するか、あるいはノロウイルス感染者を介した二次感染によって発生する。

通知法⁵⁾では、ノロウイルスの検出法として、

- RT-PCR法
- ハイブリダイゼーション
- リアルタイムPCR法

などの遺伝子検査法が記載されている。

ウイルスの細胞では遺伝情報をRNAに保存している。RNAはPCR法での増幅の鋳型にならないため、RNAからcDNA (complementary DNA) を合成する逆転写 (Reverse Transcription : RT) という前処理を行った後、PCRを行うRT-PCR法が記載されている。

(2) A型肝炎ウイルス (Hepatitis A Virus : HAV)

A型肝炎ウイルスはピコルナウイルス科ヘパトウイルス属に分類されるウイルスである。わが国におけるA型肝炎ウイルスによる食中毒事例では、汚染された二枚貝の喫食や感染者からの二次汚染が主な発生原因である。

通知法⁶⁾では、食品からのA型肝炎ウイルスの検出法として、

- RT-PCR法
- ハイブリダイゼーション
- リアルタイムPCR法

などの遺伝子検査法が記載されている。

5 おわりに

食中毒の原因となった病原微生物を特定する場合、公定法では時間がかかり、緊急性が求められる病原微生物の検査に適しているとはいえない。そこで、迅速で、かつ特異性や感度の高い遺伝子検査法が厚生労働省の通知法に記載された。

遺伝子検査法は迅速性などの点で極めて有用な試験法であるが、死菌のみが存在する場合でも陽性と判定される点が唯一の欠点といえる。公定法(培養法)では陰性であるが、遺伝子検査法では陽性となるケースがある。そのため、遺伝子検査法の結果が陽性の場合、培養法などの試験結果と合わせて総合的に最終判定を行う必要がある。

最近、PCR法で病原細菌検査を行う場合に生菌が存在する場合にのみ結果が陽性と判定されるEMA (Ethidium Monoazide) -PCR法 (タカ

ラバイオ)が開発され、試薬類が販売されている。食品から抽出した病原細菌由来のDNAにEMAを加えて前処理を行うと、死菌由来のDNAがPCRで増幅されず、生菌由来のDNAのみが選択的に検出できる方法である。このような生菌に特異的な遺伝子検査手法が病原微生物検査の通知法に取り入れられ、培養法でのコロニー計測結果と遺伝子検査法での結果の一致性が確保されることを期待するものである。

<引用文献>

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課：平成29年食中毒発生状況の概要について、2018
- 2) 伊藤武：腸管出血性大腸菌O26による食中毒及び検査法、環境衛生と微生物検査の葉[es], 050, 栄研化学, 2010
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長(通知)：腸管出血性大腸菌O26, O103, O111, O121, O145及びO157の検査法について、食安監発1120第1号, 平成26年11月20日
- 4) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部監視安全課輸入食品安全対策室長(通知)：「平成28年度輸入食品等モニタリング計画」の実施について、生食輸発1007第1号, 平成28年10月7日
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長(通知)：ノロウイルスの検出法について、食安監発第1022第1号, 平成25年10月22日
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長(通知)：A型肝炎ウイルスの検出法について、食安監発1201第1号, 平成21年12月1日

<参考文献>

- 7) 日本食品衛生学会：食品安全の事典, 朝倉書店, 2009
- 8) 後藤哲久ほか監修：食品危害要因 その実態と検出法, テクノシステム, 2014
- 9) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 微生物編 改訂第2版 2018, 日本食品衛生協会, 2018
- 10) 伊藤武監修：食品微生物の簡便迅速測定法はここまで変わった!, サイエンスフォーラム, 2002

黒瀬 直孝 (くろせ なおたか)
技術士(生物工学部門)

(株)生活品質科学研究所
中央研究所
農学博士
e-mail : kurose-na@aeonpeople.biz

