

IV 学会発表・他誌掲載論文抄録

マルチプレックス PCR を用いた食中毒起因菌一括検出法の検討

○田栗利紹、野口英太郎、平山文俊、日本防菌防黴学会第 30 回年次大会要旨集、p.168

食中毒起因菌に対する菌属間を超えた一括検出法としてマルチプレックス PCR を検討した。11 種類の食中毒起因菌に対し特異性が証明されているプライマー対を数種類選抜した。使用頻度や使用条件が異なる菌ごとにグループ化を行い、プライマー対間の干渉作用を精査して、M-PCR の最適濃度比および反応条件を決定した。ビブリオ属菌 31 株、赤痢菌 10 株、非病原性および病原性大腸菌 28 株、サルモネラ属菌 15 株、カンピロバクター属菌 13 株、ウェルシュ菌 10 株および黄色ブドウ球菌 20 株からの煮沸抽出 DNA に対し、ビブリオ属菌群(1)、病原性大腸菌群(2)、赤痢菌/サルモネラ属菌群(3)、カンピロバクター/ウェルシュ菌群(4)および黄色ブドウ球菌群(5)の 5 グループからなるマルチプレックスプライマーにより、11 種類の食中毒起因菌の一括検出が可能となった。

マルチプレックス PCR 用プライマー対の選抜方法とそれらを用いた乳製品関連細菌検出用試薬の検討

○田栗 利紹、山崎 省吾、原 健志、第 24 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集、p.82

大腸菌(1)、腸管出血性大腸菌(2)、腸管毒素原性大腸菌(3)、腸管侵入性大腸菌(4)、サルモネラ属菌(5)、ウェルシュ菌(6)、カンピロバクター・ジェジュニ/コリ(7)、エルシニアエンテロコリチカ(8)、リステリアモノサイトゲネス(9)、セレウス菌(10)および黄色ブドウ球菌(11)からなる 11 種類の乳製品関連細菌に対するマルチプレックス PCR 用検出試薬を作製した。グラジエント式温度サイクラーにより測定した各細菌に対する特異プライマー対の至適アニーリング温度最高値は平均 62.7°C、最大値 70.0°C、最小値 54.1°C であり、T_m 値は平均 61.4°C、最大値 75.0°C、最小値 48.0°C であった。各プライマー対の至適アニーリング温度最高値と T_m 値の差は、平均 1.9°C、最大値 10.0°C、最小値 -7.9°C であり、プライマー対により変化した。プライマー対の至適アニーリング温度域は、T_m 値のみに依存せず、細菌の種類及び遺伝子マーカーの種類により特異性が異なることが認められた。最終的に作製した試薬の最適濃度比は、(1)~ (11)のプライマー対に対し、それぞれ 1.5:0.25:0.125:0.125:1:1:1:1:1:1:1 (1=0.4 μM final conc.) であった。

マルチプレックス PCR 法に用いるホットスタート用 TaqDNA ポリメラーゼの検討

○田栗 利紹、山崎 省吾、平成 15 年度日本獣医三学会(九州)一般講演要旨集、p.144

マルチプレックス PCR 法(以下 M-PCR 法)において異なった活性阻害作用を利用した 5 種類のホットスタート用 DNA ポリメラーゼ(以下 H ポリメラーゼ、A~ C; 化学修飾、D; インヒビター、E; 抗体)および 2 種類の非 H ポリメラーゼ(F、G)を比較検討した。プライマーは、既報*により作製した病原性大腸菌用およびカンピロバクター/ウェルシュ菌用のプライマーミックスを用いた。試料は、食中毒事件で菌が分離された 24 時間増菌後 TSB 培地 4 検体、起因菌調査で菌が分離された 24 時間増菌後プレストン培地 4 検体、並びにそれぞれの培地から分離された腸管毒素原性大腸菌 LT 陽性株 2 株/LTST 陽性株 2 株およびカンピロバクター・ジェジュニ 2 株/コリ 2 株を用いた。抽出は、洗浄及び煮沸法により行った。PCR 条件は、ポリメラーゼ固有の熱変性後、2 つのサイクル条件(I:94°C×30sec、55°C×30sec、72°C×30sec、II:94°C×30sec、57°C×90sec、72°C×30sec)を 1 回として、45 回繰り返して実施した。H ポリメラーゼは、修飾形態や反応バッファーの組成により特異性が異なった。インヒビターや抗体を利用した修飾形態を取る D、F は、比較的収量に優れていたが、化学修飾を利用した A~ C に比べて非特異バンドが多く形成された。非 H ポリメラーゼは、収量、特異性共に H ポリメラーゼに劣った。サイクル条件 II は I に比べて特異性と収量で優れていた。これらのことから、M-PCR 法用のポリメラーゼには化学修飾による H ポリメラーゼが有効であり、M-PCR 専用のサイクル条件の設定が必要であると考えられた。*田栗ら; 第 30 回日本防菌防黴学会要旨集、p168(2003)

マルチプレックス PCR を用いた食中毒起因菌一括検出法の検討

○田栗利紹、野口英太郎、平山文俊、日本防菌防黴学会第 30 回年次大会要旨集、p.168

食中毒起因菌に対する菌属間を超えた一括検出法としてマルチプレックス PCR を検討した。11 種類の食中毒起因菌に対し特異性が証明されているプライマー対を数種類選抜した。使用頻度や使用条件が異なる菌ごとにグループ化を行い、プライマー対間の干渉作用を精査して、M-PCR の最適濃度比および反応条件を決定した。ビブリオ属菌 31 株、赤痢菌 10 株、非病原性および病原性大腸菌 28 株、サルモネラ属菌 15 株、カンピロバクター属菌 13 株、ウェルシュ菌 10 株および黄色ブドウ球菌 20 株からの煮沸抽出 DNA に対し、ビブリオ属菌群(1)、病原性大腸菌群(2)、赤痢菌/サルモネラ属菌群(3)、カンピロバクター/ウェルシュ菌群(4)および黄色ブドウ球菌群(5)の 5 グループからなるマルチプレックスプライマーにより、11 種類の食中毒起因菌の一括検出が可能となった。

マルチプレックス PCR 用プライマー対の選抜方法とそれらを用いた乳製品関連細菌検出用試薬の検討

○田栗 利紹、山崎 省吾、原 健志、第 24 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集、p.82

大腸菌(1)、腸管出血性大腸菌(2)、腸管毒素原性大腸菌(3)、腸管侵入性大腸菌(4)、サルモネラ属菌(5)、ウェルシュ菌(6)、カンピロバクター・ジェジュニ/コリ(7)、エルシニアエンテロコリチカ(8)、リステリアモノサイトゲネス(9)、セレウス菌(10)および黄色ブドウ球菌(11)からなる 11 種類の乳製品関連細菌に対するマルチプレックス PCR 用検出試薬を作製した。グラジエント式温度サイクラーにより測定した各細菌に対する特異プライマー対の至適アニーリング温度最高値は平均 62.7°C、最大値 70.0°C、最小値 54.1°C であり、T_m 値は平均 61.4°C、最大値 75.0°C、最小値 48.0°C であった。各プライマー対の至適アニーリング温度最高値と T_m 値の差は、平均 1.9°C、最大値 10.0°C、最小値 -7.9°C であり、プライマー対により変化した。プライマー対の至適アニーリング温度域は、T_m 値のみに依存せず、細菌の種類及び遺伝子マーカーの種類により特異性が異なることが認められた。最終的に作製した試薬の最適濃度比は、(1)~ (11)のプライマー対に対し、それぞれ 1.5:0.25:0.125:0.125:1:1:1:1:1:1:1 (1=0.4 μM final conc.) であった。

マルチプレックス PCR 法に用いるホットスタート用 TaqDNA ポリメラーゼの検討

○田栗 利紹、山崎 省吾、平成 15 年度日本獣医三学会(九州)一般講演要旨集、p.144

マルチプレックス PCR 法(以下 M-PCR 法)において異なった活性阻害作用を利用した 5 種類のホットスタート用 DNA ポリメラーゼ(以下 H ポリメラーゼ、A~ C; 化学修飾、D; インヒビター、E; 抗体)および 2 種類の非 H ポリメラーゼ(F、G)を比較検討した。プライマーは、既報*により作製した病原性大腸菌用およびカンピロバクター/ウェルシュ菌用のプライマーミックスを用いた。試料は、食中毒事件で菌が分離された 24 時間増菌後 TSB 培地 4 検体、起因菌調査で菌が分離された 24 時間増菌後プレストン培地 4 検体、並びにそれぞれの培地から分離された腸管毒素原性大腸菌 LT 陽性株 2 株/LTST 陽性株 2 株およびカンピロバクター・ジェジュニ 2 株/コリ 2 株を用いた。抽出は、洗浄及び煮沸法により行った。PCR 条件は、ポリメラーゼ固有の熱変性後、2 つのサイクル条件(I:94°C×30sec、55°C×30sec、72°C×30sec、II:94°C×30sec、57°C×90sec、72°C×30sec)を 1 回として、45 回繰り返して実施した。H ポリメラーゼは、修飾形態や反応バッファーの組成により特異性が異なった。インヒビターや抗体を利用した修飾形態を取る D、F は、比較的収量に優れていたが、化学修飾を利用した A~ C に比べて非特異バンドが多く形成された。非 H ポリメラーゼは、収量、特異性共に H ポリメラーゼに劣った。サイクル条件 II は I に比べて特異性と収量で優れていた。これらのことから、M-PCR 法用のポリメラーゼには化学修飾による H ポリメラーゼが有効であり、M-PCR 専用のサイクル条件の設定が必要であると考えられた。*田栗ら; 第 30 回日本防菌防黴学会要旨集、p168(2003)

マルチプレックス PCR を用いた食中毒起因菌一括検出法の検討

○田栗利紹、野口英太郎、平山文俊、日本防菌防黴学会第 30 回年次大会要旨集、p.168

食中毒起因菌に対する菌属間を超えた一括検出法としてマルチプレックス PCR を検討した。11 種類の食中毒起因菌に対し特異性が証明されているプライマー対を数種類選抜した。使用頻度や使用条件が異なる菌ごとにグループ化を行い、プライマー対間の干渉作用を精査して、M-PCR の最適濃度比および反応条件を決定した。ビブリオ属菌 31 株、赤痢菌 10 株、非病原性および病原性大腸菌 28 株、サルモネラ属菌 15 株、カンピロバクター属菌 13 株、ウェルシュ菌 10 株および黄色ブドウ球菌 20 株からの煮沸抽出 DNA に対し、ビブリオ属菌群(1)、病原性大腸菌群(2)、赤痢菌/サルモネラ属菌群(3)、カンピロバクター/ウェルシュ菌群(4)および黄色ブドウ球菌群(5)の 5 グループからなるマルチプレックスプライマーにより、11 種類の食中毒起因菌の一括検出が可能となった。

マルチプレックス PCR 用プライマー対の選抜方法とそれらを用いた乳製品関連細菌検出用試薬の検討

○田栗 利紹、山崎 省吾、原 健志、第 24 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集、p.82

大腸菌(1)、腸管出血性大腸菌(2)、腸管毒素原性大腸菌(3)、腸管侵入性大腸菌(4)、サルモネラ属菌(5)、ウェルシュ菌(6)、カンピロバクター・ジェジュニ/コリ(7)、エルシニアエンテロコリチカ(8)、リステリアモノサイトゲネス(9)、セレウス菌(10)および黄色ブドウ球菌(11)からなる 11 種類の乳製品関連細菌に対するマルチプレックス PCR 用検出試薬を作製した。グラジエント式温度サイクラーにより測定した各細菌に対する特異プライマー対の至適アニーリング温度最高値は平均 62.7°C、最大値 70.0°C、最小値 54.1°C であり、T_m 値は平均 61.4°C、最大値 75.0°C、最小値 48.0°C であった。各プライマー対の至適アニーリング温度最高値と T_m 値の差は、平均 1.9°C、最大値 10.0°C、最小値 -7.9°C であり、プライマー対により変化した。プライマー対の至適アニーリング温度域は、T_m 値のみに依存せず、細菌の種類及び遺伝子マーカーの種類により特異性が異なることが認められた。最終的に作製した試薬の最適濃度比は、(1)~ (11)のプライマー対に対し、それぞれ 1.5:0.25:0.125:0.125:1:1:1:1:1:1:1 (1=0.4 μM final conc.) であった。

マルチプレックス PCR 法に用いるホットスタート用 TaqDNA ポリメラーゼの検討

○田栗 利紹、山崎 省吾、平成 15 年度日本獣医三学会(九州)一般講演要旨集、p.144

マルチプレックス PCR 法(以下 M-PCR 法)において異なった活性阻害作用を利用した 5 種類のホットスタート用 DNA ポリメラーゼ(以下 H ポリメラーゼ、A~ C; 化学修飾、D; インヒビター、E; 抗体)および 2 種類の非 H ポリメラーゼ(F、G)を比較検討した。プライマーは、既報*により作製した病原性大腸菌用およびカンピロバクター/ウェルシュ菌用のプライマーミックスを用いた。試料は、食中毒事件で菌が分離された 24 時間増菌後 TSB 培地 4 検体、起因菌調査で菌が分離された 24 時間増菌後プレストン培地 4 検体、並びにそれぞれの培地から分離された腸管毒素原性大腸菌 LT 陽性株 2 株/LTST 陽性株 2 株およびカンピロバクター・ジェジュニ 2 株/コリ 2 株を用いた。抽出は、洗浄及び煮沸法により行った。PCR 条件は、ポリメラーゼ固有の熱変性後、2 つのサイクル条件(I:94°C×30sec、55°C×30sec、72°C×30sec、II:94°C×30sec、57°C×90sec、72°C×30sec)を 1 回として、45 回繰り返して実施した。H ポリメラーゼは、修飾形態や反応バッファーの組成により特異性が異なった。インヒビターや抗体を利用した修飾形態を取る D、F は、比較的収量に優れていたが、化学修飾を利用した A~ C に比べて非特異バンドが多く形成された。非 H ポリメラーゼは、収量、特異性共に H ポリメラーゼに劣った。サイクル条件 II は I に比べて特異性と収量で優れていた。これらのことから、M-PCR 法用のポリメラーゼには化学修飾による H ポリメラーゼが有効であり、M-PCR 専用のサイクル条件の設定が必要であると考えられた。*田栗ら; 第 30 回日本防菌防黴学会要旨集、p168(2003)

マルチプレックスPCRを用いた鶏、牛および豚におけるカンピロバクターの検出

山・省吾, 松尾保雄*, 上田竜夫*, 田栗利紹, 原健志: 第 24 回日本食品微生物学会学術総会, 平成15年 10月2~3日(岡山市), *長崎県諫早食肉衛生検査所

本調査では, マルチプレックス PCR 法(以下 M-PCR 法)を用い, プレストン培地から *Campylobacter jejuni/coli* 特異的遺伝子を検出し, 分離培地による菌分離結果と比較検討した。

M-PCR 法での検出状況は, 糞便; 鶏で 12 検体中 8 検体 *C.jejuni*, 1 検体 *C.coli* が検出され, 豚で 10 検体全て *C.coli* が検出された。食肉; 鶏で 12 検体中 5 検体 *C.jejuni*, 2 検体 *C.coli* が検出されたが, 豚からは検出されなかった。市販食肉; 鶏で 12 検体中 5 検体 *C.jejuni* が検出されたが, 牛食肉および肝臓からは検出されなかった。菌分離結果は, M-PCR 法で陽性となった 31 検体中 30 検体からカンピロバクターが検出された。また牛糞便から 11 検体 *C.jejuni*, 1 検体 *C.coli* が検出され, 牛胆汁から 10 検体 *C.jejuni* が検出された。

M-PCR 法と菌分離の成績がほぼ同様な結果を得たことにより本 M-PCR 法はカンピロバクターのスクリーニング法として有効であると考えられた。

ダイオキシン類分析におけるフタル酸エステル類の妨害

○本多 隆、植野康成、馬場強三

第 12 回環境化学討論会講演要旨集(2003 年 6 月 25~27 日、新潟市)

【概要】

ダイオキシン類分析は、その前処理工程が長く、また濃縮率が非常に高いため、ダイオキシン類が濃縮されるだけでなく、測定妨害物質(いわゆるコンタミ)が混入した場合はこれらも濃縮されることになる。

通常のダイオキシン類分析の前処理後、高分解能 GC/MS-SIM 測定を行った場合、程度の差はあるが決まった時間にロックマスの強度とともに、その時間だけピーク強度も落ち込み、ダイオキシン類の定量に影響を及ぼすことがわかった。このロックマスの落ち込みは、操作ブランクだけでなく、ヘキサン 100ml 程度を濃縮(特に KD 濃縮)しただけで同様の現象が発生するため、コンタミは検体由来ではなく試料濃縮時に混入するものと思われる。

今回、ロックマス落ち込み試料の低分解能 GC/MS-Scan 測定を行った結果、コンタミ成分がフタル酸エステル類であることが判明し、その除去方法について良好な結果が得られた。

マルチプレックスPCRを用いた鶏、牛および豚におけるカンピロバクターの検出

山・省吾, 松尾保雄*, 上田竜夫*, 田栗利紹, 原健志: 第 24 回日本食品微生物学会学術総会, 平成15年 10月2~3日(岡山市), *長崎県諫早食肉衛生検査所

本調査では, マルチプレックス PCR 法(以下 M-PCR 法)を用い, プレストン培地から *Campylobacter jejuni/coli* 特異的遺伝子を検出し, 分離培地による菌分離結果と比較検討した。

M-PCR 法での検出状況は, 糞便; 鶏で 12 検体中 8 検体 *C.jejuni*, 1 検体 *C.coli* が検出され, 豚で 10 検体全て *C.coli* が検出された。食肉; 鶏で 12 検体中 5 検体 *C.jejuni*, 2 検体 *C.coli* が検出されたが, 豚からは検出されなかった。市販食肉; 鶏で 12 検体中 5 検体 *C.jejuni* が検出されたが, 牛食肉および肝臓からは検出されなかった。菌分離結果は, M-PCR 法で陽性となった 31 検体中 30 検体からカンピロバクターが検出された。また牛糞便から 11 検体 *C.jejuni*, 1 検体 *C.coli* が検出され, 牛胆汁から 10 検体 *C.jejuni* が検出された。

M-PCR 法と菌分離の成績がほぼ同様な結果を得たことにより本 M-PCR 法はカンピロバクターのスクリーニング法として有効であると考えられた。

ダイオキシン類分析におけるフタル酸エステル類の妨害

○本多 隆、植野康成、馬場強三

第 12 回環境化学討論会講演要旨集(2003 年 6 月 25~27 日、新潟市)

【概要】

ダイオキシン類分析は、その前処理工程が長く、また濃縮率が非常に高いため、ダイオキシン類が濃縮されるだけでなく、測定妨害物質(いわゆるコンタミ)が混入した場合はこれらも濃縮されることになる。

通常のダイオキシン類分析の前処理後、高分解能 GC/MS-SIM 測定を行った場合、程度の差はあるが決まった時間にロックマスの強度とともに、その時間だけピーク強度も落ち込み、ダイオキシン類の定量に影響を及ぼすことがわかった。このロックマスの落ち込みは、操作ブランクだけでなく、ヘキサン 100ml 程度を濃縮(特に KD 濃縮)しただけで同様の現象が発生するため、コンタミは検体由来ではなく試料濃縮時に混入するものと思われる。

今回、ロックマス落ち込み試料の低分解能 GC/MS-Scan 測定を行った結果、コンタミ成分がフタル酸エステル類であることが判明し、その除去方法について良好な結果が得られた。

Daily Concentration Variations of Air Pollutants Collected Onshore Area Faced to Asian Continent

K. Murano¹, A. Mori², T. Kamaya², T. Ohara³, N. Sugimoto¹, H. Mukai¹

¹National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan

²Nagasaki Prefectural Institute of Public Health and Environment, 1-9-5 Nameishi, Nagasaki,
Nagasaki 852-8061 Japan

³Shizuoka University, 3-5-1 Johoku, Hamamatsu, Shizuoka 432-8561 Japan

Proceedings of the Ninth International Joint Seminar of the Regional Deposition Processes in the Atmosphere (1-3 December 2003, Bangkok, Thailand) 77-82

Abstract

We conducted daily air pollutants collection and chemical analysis at onshore area faced to Asian continent from January 2001 through February 2002 to understand transboundary transport of air pollutants from the Asian continent to Japan. Monthly averaged concentration of total anion and cation in aerosol stayed approximately constant level (100-200 neq/m³) except for the samples collected in Yellow Sand season (January-April). High concentrations were observed in March 2001 and anion concentration reached up to about 350 neq/m³. Very big Yellow Sand event was observed from 22nd through 24th March 2001. Concentrations and fraction of Ca²⁺ and nss-SO₄²⁻+NO₃⁻ concentrations in aerosol are very high from 21st through 24th March. First the air mass brought the air pollutants from Chinese anthropogenic emissions in 21st March, so the concentrations of NO₃⁻, nss-SO₄²⁻ and NH₄⁺ were very high. Later, Yellow Sand was transported from inland of China to Japan, which brought the high concentration of Ca²⁺. However, on the way to Japan, air pollutants are added to the air mass.