

食中毒の原因となる有毒植物および毒キノコの遺伝子検査法の拡充

中田千恵子・長尾舞・西山隆之・安藤尚子・上眞佐美

Expanded Gene Analysis Methods for Poisonous Plants and Mushrooms that cause Food Poisoning

Chieko NAKATA・Mai NAGAO・Takayuki NISHIYAMA・Naoko ANDO
and Masami KAMI

誤認摂取による食中毒の多い有毒植物 5 種および毒キノコ 2 種について迅速、簡便かつ安価に鑑別するため、各有毒試料に特異的な遺伝子領域を利用したインターカレーター法および Conventional PCR 法の遺伝子検査法を確立した。交差性確認試料の植物 15 種またはキノコ 22 種を用いて、非特異的な増幅が見られないことを確認した。インターカレーター法では増幅効率を算出し検査法の性能を評価した。また、実際の食中毒事例を想定した調理および消化の影響を確認した。その結果、いずれの検査法においても 3~4 時間で原因物質の同定が可能であり、自然毒による食中毒時の迅速な鑑別に有用性を示した。

緒言

植物性自然毒による食中毒では、食用の高等植物やキノコと外観が類似する有毒種を誤認摂取することで、様々な急性中毒症状を呈し、稀に死に至る場合がある。厚生労働省の食中毒統計調査(平成 25 年~令和 4 年)では、食中毒による死者数の約 45%が植物性自然毒である。寄生虫や細菌による食中毒に比べて発生件数は少ないが、喫食量が少量でも症状が重篤化しやすく、過去 10 年間で 17 名が死亡している。そのため、厚生労働省などではリーフレットを作成し、特に注意喚起している。奈良県では、平成 25 年にバイケイソウ、平成 26 年にひょうたん、平成 27 年にジャガイモ、令和元年にツキヨタケによる食中毒が発生した。

食品衛生分野では、形態鑑別、LC-MS/MS 等での有毒成分分析や DNA バーコーディング法による遺伝子解析が鑑別法として利用されてきた。食中毒発生時は迅速な原因特定により、被害の拡大を防止することが重要となる。近年、Real-time PCR 法(プローブ法)¹⁾や PCR-RFLP 法²⁾等の迅速かつ簡便に検査可能な方法が着目されている。

当センターでは、高等植物およびキノコの DNA バーコーディング法による種鑑別を確立しているが³⁾、より迅速、簡便かつ安価な検査法の確立を目的とし、SYBR Green を用いたインターカレーター法および Conventional PCR 法を、また一部プローブ法も検討し、食中毒の発生件数または死者数の多い有毒植物および毒キノコの遺伝子検査法を確立したので、以下報告する。

方法

1. 試料

標的試料は、下記の有毒植物 5 種および毒キノコ 2 種を用いた。

有毒植物はスイセン、バイケイソウ、イヌサフラン、チョウセンアサガオおよびトリカブトを用い、毒キノコは、ツキヨタケおよびドクササコを用いた。

交差性確認試料は、植物 15 種とキノコ 22 種を用いた(表 1)。

なお、試料は自生するもの又は市販品であり、自生キノコは、自然採取後、専門家により同定されたものである。

表 1 交差性確認試料

植物	ニラ、タマネギ、ネギ、ジャガイモ、キャベツ、ニンニク、シュンギク、ニリンソウ、オクラ、サラダナ、ウレイ、ギョウジャニンニク、イリゴマ、モロヘイヤ、ゴボウ
キノコ	シイタケ、マイタケ、ヒラタケ、ブナシメジ、ホワイトマッシュルーム、ニオイドクツルタケ、テングタケ、クサウラベニタケ、ナラタケモドキ、イッポンジメジ、アケボノドクツルタケ、ヤマドリタケモドキ、タモギタケ、ハタケシメジ、ウラベニホテイシメジ、カキシメジ、クロアワビタケ、ホンシメジ、ニガクリタケ、ナメコ、マツタケ、タマシロオニタケ

2. 試薬等

DNeasy® Plant Mini Kit ((株)キアゲン製)、TaKaRa Ex Premier™ DNA Polymerase Dye plus (タカラバイオ(株)製)、PowerTrack SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific(株)製)、TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific(株)製)、GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, 10,000× in Water (Biotium 社製)、100 bp

DNA Ladder (東洋紡 (株) 製) を用いた。

抽出溶液は、100 mM Tris-HCl (pH9.5), 1 M KCl, 10 mM EDTA を用いた。

2%アガロースは、アガロース 2 g に TAE 緩衝液 100 mL を加え加熱溶解後、GelRed 10 μ L を加えて混合した。

ペプシンはブタ胃粘膜由来の 1:10000 (富士フィルム和光純薬 (株) 製) を用いた。人工胃液は、0.1%ペプシン含有溶出試験第 1 液³⁾を用いた。

3. 装置

ディスポーザブルホモジナイザー：バイオマッシャー[®] II と専用電動攪拌機パワーマッシャー II ((株) ニッピ製), 分光光度計：SmartSpec[™] Plus (BIO-RAD 製), リアルタイム PCR 装置：Applied Biosystems 7500 System (Thermo Fisher Scientific (株) 製), サーマルサイクラー：LifeECO (日本ジェネティクス (株) 製), 電気泳動装置：Mupid[®]-ex ((株) ミューピッド製), トランスイルミネーター：LED505-TR60W ((株) 美館イメージング製) を用いた。

4. プライマー

既報^{1,4,6)}の標的試料に対する特異的 PCR プライマーと、試料の DNA 抽出が確実にされているかを確認するために、真核生物共通 DNA 配列を検出するプライマー⁷⁾を合成して用いた (表 2)。

5. DNA 抽出

既報³⁾のとおりワンステップ法で DNA を抽出した。試料採取量を 200 mg, 抽出溶液を 250 μ L とし、50 倍に希釈したものを DNA 試料液とした。

6. インターカレーター法

DNA 試料液を鋳型として、各標的試料に特異的な DNA 領域を Real-time PCR で増幅した。

PCR 反応液の組成は 1 反応あたり、Yellow Sample

Buffer を 0.25 μ L, PowerTrack SYBR Green Master Mix を 5.0 μ L, 10 μ M の Forward (F)-プライマーおよび Reverse (R)-プライマーを各 0.25 μ L, DNA 試料液 1.0 μ L に滅菌精製水を加えて 10.15 μ L とし、1well に 10 μ L 供した。

反応条件は 95 $^{\circ}$ C で 2 分間保った後、95 $^{\circ}$ C 15 秒間、60 $^{\circ}$ C 1 分間を 1 サイクルとし、40 サイクル行った。陽性判定は Cq 値 38 未満 (Threshold line 0.2 設定) とし、融解曲線解析で各 Tm 値 にシングルピークを示すこととした (表 3)。

表 3 融解曲線解析

標的試料	Tm ($^{\circ}$ C)	標的試料	Tm ($^{\circ}$ C)
スイセン	74~75	トリカブト	89~90
バイケイソウ	75~76	ツキヨタケ	80~81
イヌサフラン	75~76	ドクササコ	80~81
チョウセンアサガオ	75~76		

7. Conventional PCR 法

PCR 反応液の組成は、1 反応あたり TaKaRa Ex Premier DNA Polymerase Dye plus を 5.0 μ L, 10 μ M の F-プライマーおよび R-プライマーを各 0.3 μ L, DNA 試料液 1.0 μ L に滅菌精製水を加えて全量 10 μ L とした。

反応条件はトリカブト以外の標的試料 6 種で 98 $^{\circ}$ C 10 秒間、55 $^{\circ}$ C 15 秒間、68 $^{\circ}$ C 15 秒間を 1 サイクルとし、35 サイクル行った。トリカブトは 94 $^{\circ}$ C で 1 分間保った後、98 $^{\circ}$ C 10 秒間、68 $^{\circ}$ C 8 秒間を 1 サイクルとし、40 サイクル行った。PCR 後の増幅産物は 2%アガロースゲルで 100 V, 25 分間電気泳動し、UV 照射下でバンドを検出した。

各目的長バンドの確認をもって陽性判定とした。

8. プローブ法

トリカブトの葉の DNA 試料液を鋳型として、特異

表 2 各標的試料に特異的な PCR プライマー

Name	Target	Sequence(5'-3')	Amplicon	Method	Reference
Narcissus_matK-F1	スイセン	CTTTTGGAACCTTTCTTGAACGAACAC	125 bp	I	1)
Narcissus_matK-R1		GAAAGGATCTTTGAAGAACCAGGAG			
Nmfoward primer	スイセン	GGAAGAGTCTTCTCATTACTCAG	260 bp	II	4)
Nmreverse primer		CCAGGAGGTCCTATGAAAATCG			
Veratrum_matK-F1	バイケイソウ	CGCAATGTTTTGAAAAGATTAGGTTCTGA	119 bp	I, II	1)
Veratrum_matK-R1		GATCCATGTAAAGTAAAAGGAAAAGGGT			
Colchicum_matK-F2	イフサフラン	CAGGATCCATATCAACCAATTAATAAACCC	97 bp	I, II	1)
Colchicum_matK-R2		CATTTTGTTTTGGACCGCCAAGGG			
Datura_matK-F6	チョウセンアサガオ	GAGGGATTTCCATTTATT[[*]]TGGAAATG	122 bp	I, II	1)
Datura_matK-R6-2		GGAAATGTTGAATGAATTGATCGGAAG			
aco15F	トリカブト	CCCGTCAACCACGTTGTGCGG	171 bp	I, II	5)
aco18R		GTCGATGTGTCCCAACGTGCAA			
OJSP-F	ツキヨタケ	GTGCACGTTTCTTTCAAT	107 bp	I, II	6)
OJSP-R		AGAATCATCAACAGAGCTGC			
CASP-F	ドクササコ	GGTGCACACCTGATAACCA	108 bp	I, II	6)
CASP-R		AGCTTAAGCTTTCGCACCAAG			
TR03	真核生物	TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA	137 bp	I, II	7)
TR04		AATTTGCGCGCTGCTGCCTTCTT			

*:デオキシイノシン I:インターカレーター法, II:Conventional PCR 法

的な DNA 領域を Real-time PCR で増幅した。

既報¹⁾のトリカブト特異的 PCR プライマーおよびプローブを合成して用いた。

PCR 反応液の組成は 1 反応あたり、TaqMan Universal PCR Master Mix を 12.5 μ L, 10 μ M の F-プライマーおよび R-プライマーを各 1.25 μ L, 10 μ M のプローブを 0.05 μ L, DNA 試料液 2.5 μ L に滅菌精製水を加えて 25 μ L とし、1well に 25 μ L 供した。

反応条件は 95°C で 10 分間保った後、95°C 15 秒間、60°C 1 分間を 1 サイクルとし、45 サイクル行った。

陽性判定は C_q 値を 43 未満 (Threshold line 0.2 設定) とした。

表 4 トリカブト特異的プライマー・プローブ

Primer		
Name	Sequence(5'-3')	Amplicon
Aconitum_matK-F1	ATCACTGGCTAAATCGAAATTTTGTA	100 bp
Aconitum_matK-R1	ACCAAATCTATCGATAAATATCAGAATCG	
Probe		
Name	Sequence(5'-3')	
Aconitum_matK-P1	FAM-CCATCAGTAAGCCGACTTGGGCCG-BHQ1	

9. 性能評価

インターカレーター法において、標的試料 7 種をワンステップ法で DNA 抽出し、DNA 試料液を 0.0005 ~ 0.5 ng/ μ L (ドクササコのみ 0.0005 ~ 1000 ng/ μ L) に調製して検出限界を算出した。また、DNA 抽出液の希釈系列を用いて 8 点検量線を作成し、増幅効率 (EF%) および決定係数 (R²) を確認した。

10. 調理および消化の影響

チョウセンアサガオは根を、その他の標的試料は葉を用いた。

1) 調理の影響

調理試料は、標的試料を食中毒報告事例のある調理方法によって処理し (表 5)、インターカレーター法および Conventional PCR 法で、各標的試料に特異的な DNA 領域で陽性判定可能か、調理の影響を確認した。

表 5 調理試料

標的試料	調理試料
スイセン	油炒め, 煮物, 味噌汁
バイケイソウ	油炒め, おひたし, 酢味噌, 天ぷら
イヌサフラン	油炒め, おひたし, 酢味噌, 天ぷら
チョウセンアサガオ	油炒め, 煮物, 味噌汁
トリカブト	油炒め, おひたし, 酢味噌, 天ぷら
ツキヨタケ	油炒め, 煮物, 味噌汁, 天ぷら
ドクササコ	油炒め, 煮物, 味噌汁, 天ぷら

2) 消化の影響

標的試料 7 種の未調理試料と一部の調理試料 (表 6) を用い、細切りにした試料 5 g に 0.1% ペプシン含有人工胃液 (溶出試験第 1 液) 100 mL を加え、攪拌しながら 37°C でインキュベートし、一定時間 (30 分, 1 時間, 2 時間および 3 時間) 毎に試料を処理し、インターカレーター法および Conventional PCR 法で、各

標的試料に特異的な DNA 領域で陽性判定可能か、調理の影響を確認した。

表 6 消化試料

標的試料	消化試料
スイセン	未調理, 油炒め, 煮物, 味噌汁
バイケイソウ	未調理, 油炒め, おひたし, 酢味噌
イヌサフラン	未調理, 油炒め, おひたし, 酢味噌
チョウセンアサガオ	未調理, 油炒め, 煮物, 味噌汁
トリカブト	未調理, 油炒め, おひたし, 酢味噌
ツキヨタケ	未調理, 油炒め, 煮物, 味噌汁
ドクササコ	未調理, 油炒め, 煮物, 味噌汁

結果および考察

1. 検査法の検討

標的および交差性確認試料は、真核生物共通プライマーにより、DNA 抽出を確認して用いた。標的試料の部位は、スイセン (葉)、チョウセンアサガオ (葉, 根, 種子, 蕾)、トリカブト (葉, 根, 花)、イヌサフラン (葉, 根)、バイケイソウ (葉) とした。

インターカレーター法の各標的試料に対する増幅曲線は、標的試料のみ増幅し、交差性確認試料の増幅を認めなかった (図 1-7)。また、全ての標的試料の融解曲線は、各 T_m 値 (表 3) 付近でのピークが確認された。プライマーダイマーの生成で見られる 75°C ~ 80°C 間のなだらかなピーク等はなく、副産物等の生成も確認されなかった。また、トリカブトの融解曲線では、83°C ~ 87°C に肩付きピークが確認されたが、Real-time PCR 後の反応液を用いて電気泳動したところ (図 8)、目的バンドのみの検出となり、非特異的な増幅産物の存在に起因するものではないことが示唆された。

Conventional PCR 法は、標的試料のみ目的バンドを検出し、交差性確認試料の目的バンドを検出できなかった (図 9)。

従って、部位に差なく各特異的プライマーの標的試料 7 種に対する特異性が示された。

以上より、インターカレーター法および

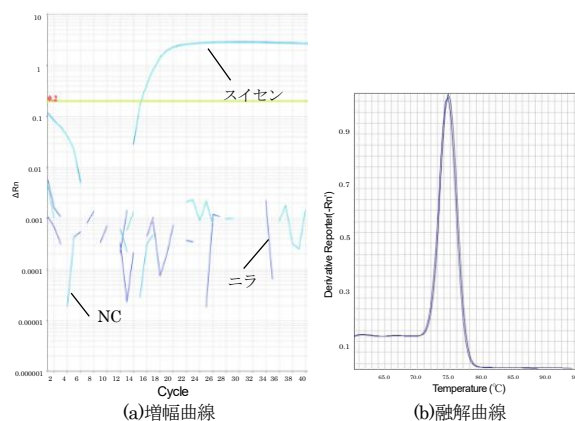
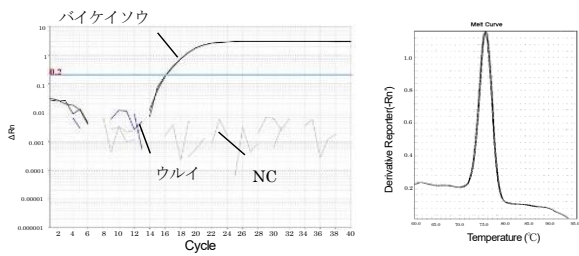


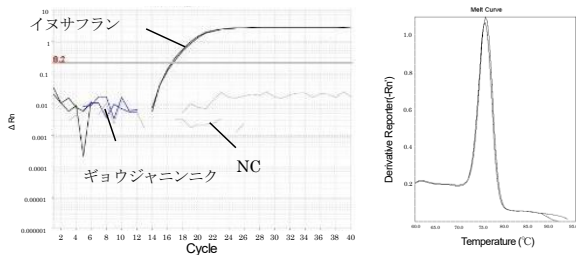
図 1 スイセンの特異性



(a)増幅曲線

(b)融解曲線

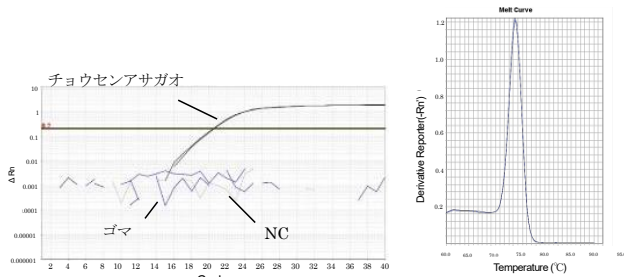
図2 バイケイソウの特異性



(a)増幅曲線

(b)融解曲線

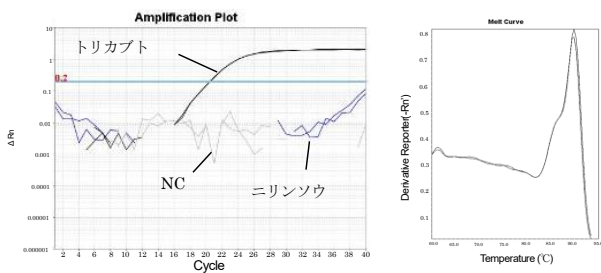
図3 イノサフランの特異性



(a)増幅曲線

(b)融解曲線

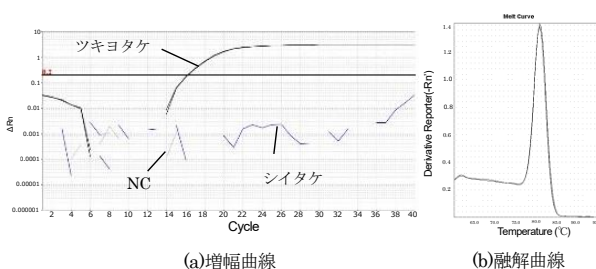
図4 チョウセンアサガオの特異性



(a)増幅曲線

(b)融解曲線

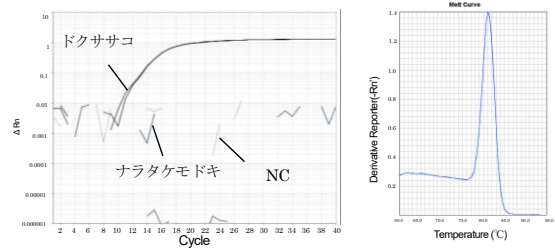
図5 トリカブトの特異性



(a)増幅曲線

(b)融解曲線

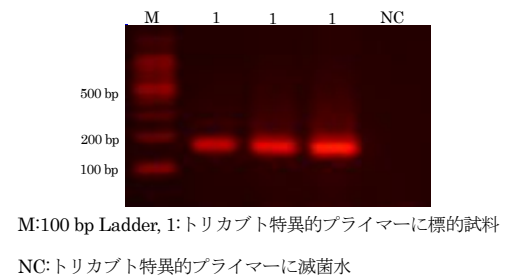
図6 ツキヨタケの特異性



(a)増幅曲線

(b)融解曲線

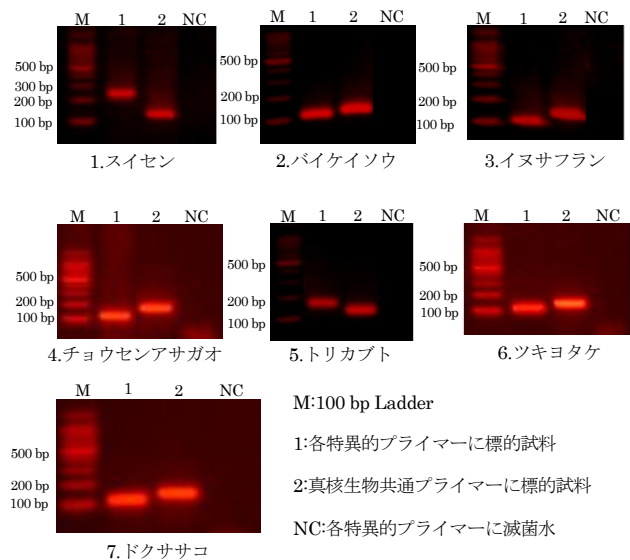
図7 ドクササコの特異性



M:100 bp Ladder, 1:トリカブト特異的プライマーに標的試料

NC:トリカブト特異的プライマーに滅菌水

図8 トリカブト Real-time PCR 後の電気泳動図



M:100 bp Ladder

1:各特異的プライマーに標的試料

2:真核生物共通プライマーに標的試料

NC:各特異的プライマーに滅菌水

図9 Conventional PCR 法の電気泳動図

Conventional PCR 法において標的試料 7 種の同定が可能であることが確認された。

2. 性能評価

増幅効率₀は 80~120%以内に、また検量線の決定係数は、ドクササコ以外で 0.98 以上となり良好な直線性を示した (表 7)。ドクササコの決定係数は 0.95 となったため、DNeasy Plant Mini Kit を使用して精製した DNA 試料液を用いて評価したところ、決定係数は 1.00 と改善した。検討に用いたドクササコは平成 28 年に採取し (その他標的試料 6 種は令和 3 年~4 年に採取)、冷凍保存 (-20°C) していた試料のため、DNA が劣化し、精製なしのワンステップ法では、夾雑の影響を受けた可能性がある。

以上より、標的試料 7 種における定性試験の有用性を確認した。

表 7 標的試料 7 種の性能評価

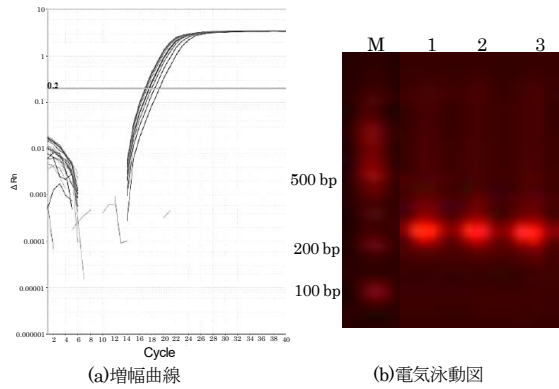
標的試料	検出限界	検量線					Tm値
		Slope	Y-Intercept	R ²	EF%	範囲(ng/μL)	
スイセン	0.005	-3.373	21.925	0.999	97.9	0.005~1	74.2±0.3
トリカブト	0.01	-3.77	28.369	0.986	84.2	0.01~2	90.2±0.3
イヌサフラン	0.005	-3.429	25.166	0.994	95.7	0.005~1	75.3±0.2
バイケイソウ	0.0005	-3.486	19.433	0.999	93.6	0.0005~1	75.7±0.2
チョウセンアサガオ	0.0005	-3.451	19.724	0.999	94.9	0.0005~1	75.2±0.2
ツキヨタケ	0.001	-3.486	19.433	0.999	93.6	0.001~1	80.2±0.2
ドクササコ	20	-3.092	21.957	0.958	110.6	20~1000	81.2±0.2
ドクササコ(Mini)	0.001	-3.443	16.58	1.000	95.2	0.001~1	

3. 調理および消化の影響

1) 調理の影響

インターカレーター法および Conventional PCR 法で標的試料 7 種の調理試料全てにおいて陽性と判定可能であった。

従って両法とも調理の影響を受けず判定可能ことが示された。

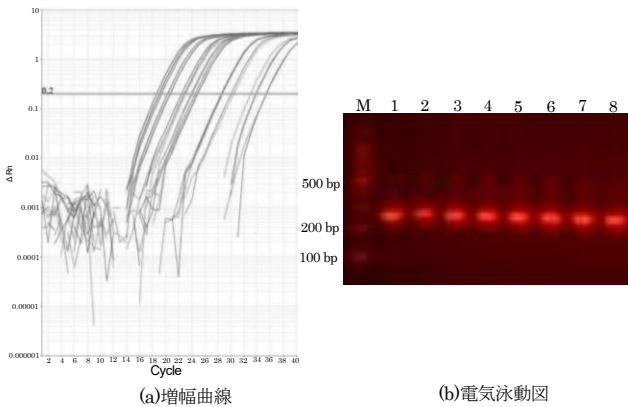


M:100 bp Ladder, 1:油炒め, 2:味噌汁, 3:煮物

図 10 スイセン調理実験

2) 消化の影響

インターカレーター法および Conventional PCR 法でトリカブト以外の標的試料 6 種の消化試料全てにおいて陽性と判定可能であった (図 11)。



M:100 bp Ladder, 1:未調理 0.5 h, 2:未調理 1 h, 3:未調理 2 h, 4:未調理 3 h, 5:煮物 0.5 h, 6:煮物 1 h, 7:煮物 2 h, 8:煮物 3 h

図 11 スイセン消化実験の一部

従って両法とも消化の影響を受けず、トリカブト以外の標的試料 6 種の判定が可能ことが示された。

トリカブト消化実験では、DNA 増幅が消化時間に関係なく確認できない試料があったため、検体数を増やして消化実験を行った。結果、インターカレーター法では、消化時間の影響を大きく受けなかったが、Conventional PCR 法では、消化時間が長くなるほど、検出しにくい傾向が見られた (図 12)。また、トリカブトの葉は柔らかく薄いことから DNA が消化の影響を受けやすい可能性があり、トリカブトの根についても確認したが、根においても葉と同様、不安定な検出となり、インターカレーター法の方が検出割合において高い傾向が認められた (表 8)。

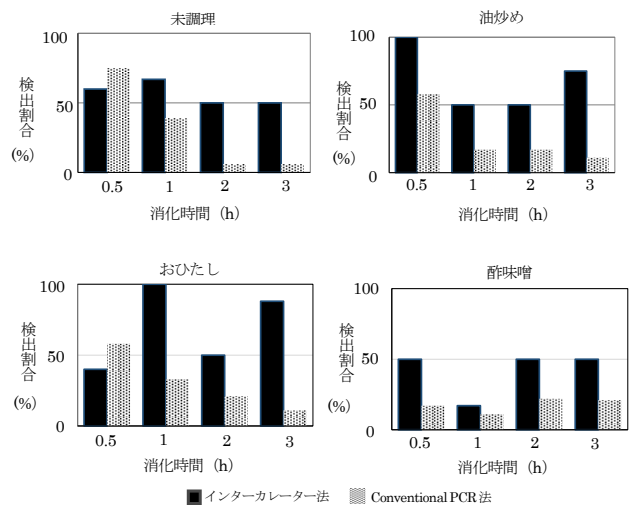


図 12 トリカブト葉の消化実験

表 8 トリカブト根の消化実験

検出方法		消化処理時間			
		0.5 h	1 h	2 h	3 h
インターカレーター法	未調理	○	○	○	○
	油炒め	○	○	○	×
	ボイル	○	○	×	×
Conventional PCR法	未調理	×	×	×	×
	油炒め	○	×	×	×
	ボイル	×	×	×	×

2 法において検出不安定となったため、検出方法としてプローブ法を、試料には 10 倍希釈のものを追加して検討を行った。結果、プローブ法の検出割合が最も高く、次いでインターカレーター法となった (図 13)。

従って、トリカブトの消化試料が搬入された場合は、プローブ法の 10 倍および 50 倍希釈で判定することで、鑑別可能ことが示唆された。

まとめ

本検討では遺伝子検査法の拡充として、迅速、簡便

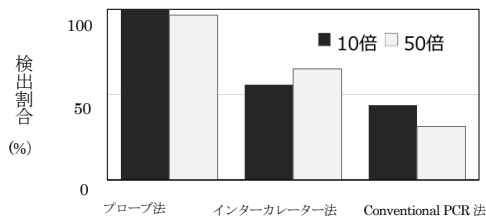


図 13 検査法および段階希釈検討

かつ安価なインターカレーター法および Conventional PCR 法を用いて、標的試料 7 種の鑑別を試みた。標的試料では、融解曲線のピーク形状や目的の外バンドの検出有無を確認し陽性となることを、交差性確認試料では陰性となることを確認することで、各標的試料への特異性が示された。

標的試料 7 種に対して、インターカレーター法の増幅効率および決定係数を算出し、定性試験における有用性を確認した。

また、実際の食中毒事例を想定した調理試料から 7 種とも同定でき、消化試料からトリカブトを除く 6 種が同定できることが示されたため、搬入される調理残品や吐物等の様々な形態に対応できることが示唆された。トリカブトの消化試料は 2 法において検出不安定となったが、プローブ法を用いることで鑑別可能であった。

食中毒事例が発生した際には、最も操作が簡便で迅速に結果が得られ、コンタミネーションの可能性の低いインターカレーター法を行い、さらに詳しい鑑別が必要であれば、Conventional PCR 法を実施し、目的長のバンドから DNA バーコーディング法による遺伝子解析を実施する。トリカブトの消化試料に対しては、プローブ法を用いることとする。3 法とも、同じ DNA 試料液を用いることができ、2~3 時間で結果が得られ

ることから、これらの検査結果を状況に応じて組み合わせることで、より正確な鑑別ができると推測される。

文 献

- 1) 近藤一成, 野口秋雄, 坂田こずえ, 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)「我が国ですべき生物学的ハザード特定と管理措置に関する研究」平成 29 年度分担研究報告書, 71-84 (2017)
- 2) 篠崎淳一, 数馬恒平, 佐竹元吉, 他: 食衛誌, 59, 134-140 (2018)
- 3) 中田千恵子, 仲井菜都希, 安藤尚子, 他: 奈良県保健研究センター年報, 55, 43-46 (2020)
- 4) 池野恵美, 松本裕子, 濟田 清隆: 第 57 回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 82-85 (2020)
- 5) 松山修二: *Int J. Legal Med.*, 125, 211-217 (2011)
- 6) Maeta K, Ochi T, Tokimoto K, *et al.*: *Apple. Environ. Microbiol.*, 74, 3306-3309 (2008)
- 7) 門間公夫, 田端節子, 牛山博文: 東京都健康安全研究センター年報, 72, 185-190 (2021)
- 8) 野田拓史: 福井県衛生環境研究センター年報, 18, 54-57 (2019)
- 9) 野田拓史: 福井県衛生環境研究センター年報, 19, 36-42 (2020)
- 10) 寺井朗子, 萩野賀世, 浅倉弘幸, 他: 食衛誌, 59, 174-182 (2018)
- 11) 野村千枝, 昌山 敦, 山口瑞香, 他: 食衛誌, 58, 132-142 (2017)
- 12) 門間公夫, 大石充男: 東京都健康安全研究センター年報, 68, 109-115 (2017)
- 13) 門間公夫, 牛山博文, 井部明広: 東京都健康安全研究センター年報, 71, 127-133 (2020)

加工食品に対する総アフラトキシン試験法の改良

竹田依加・上床知佐奈・中永絵理・田邊純子・安藤尚子・上眞佐美

Improved Analysis of Total Aflatoxins for Processed Foods

Erika TAKEDA・Chisana UWATOKO・Eri NAKAE・Sumiko TANABE・
Naoko ANDO and Masami KAMI

ピーナッツ加工品を対象に、多機能カラムを用いた総アフラトキシン試験法の改良を試みた。改良試験法では、砂糖を含まないピーナッツ加工品を対象とした添加回収試験で各アフラトキシンの回収率70%~110%を達成した。また、煎りピーナッツを対象として当該試験法の妥当性評価を実施し、各アフラトキシンに対し、すべての評価項目において目標を満たすことができた。試験法を改良したことで、迅速な検査対応への貢献および検査対象食品の拡大が期待できる。

緒言

アフラトキシン（以下、AFと呼ぶ）は熱帯・亜熱帯地域に生息する *Aspergillus* 属のカビが産生するカビ毒の一種で、天然物質の中で極めて発がん性が強い物質として知られる。また、極めて安定性が高く、通常に加熱調理条件等ではほとんど分解されない¹⁾。代表的な汚染食品はピーナッツなどの種実類等である。

日本での規制対象物質は平成23年3月31日付け食安発0331第5号により、AFB₁、AFB₂、AFG₁およびAFG₂の総和である総AFとなり、10 µg/kgを超えて検出する食品は全て食品衛生法第6条第2号に違反するものとして取り扱われる。総AFの試験法は規制対象の変更とともに、平成23年8月16日付け食安発0816第1号「総アフラトキシンの試験法について」

（以下、通知法と呼ぶ）で多機能カラムまたはイムノアフィニティカラムを用いた2種類の方法が示された。多機能カラムは逆相やイオン交換等の複数の充填剤を混合したカラムで、イムノアフィニティカラムよりも安価、かつ短時間の精製で迅速な分析が可能であり、使用前のカラムのコンディショニングも不要である。一方、精製後のクロマトグラムに夾雑ピークが多いといった欠点がある²⁾。

AFは毒性が強いカビ毒であるため、他府県においても検討が進められている³⁾⁷⁾。本県では令和3年度にピーナッツ、クルミおよび大豆を対象とした多機能カラムを用いた総AF試験法を確立したが、これらの加工食品に対する当該試験法の適用は一部に留まった⁸⁾。

そこで本研究では、検査対象食品の拡大を目的とし、ピーナッツの加工品を対象に多機能カラムを用いた総AF試験法の改良を試みたので報告する。

方法

1. 検査対象食品

検査対象食品はピーナッツの加工品とした。検査を行う場合は試験部位をフードプロセッサーであらかじめ粉砕均一化して用いた。

2. 試薬等

1) 標準品

AFB₁、AFB₂、AFG₁およびAFG₂は富士フイルム和光純薬（株）製AF混合標準溶液（各25 µg/mL）を用いた。

2) 精製カラム

多機能カラムはジーエルサイエンス（株）社製InertSep VRA-3およびRomer社製MultiSep #228を使用した。

3) その他試薬等

各種溶液調製等に使用したアセトニトリルは富士フイルム和光純薬（株）製、残留農薬分析用を用いた。誘導体化試薬として用いたトリフルオロ酢酸（以下、TFAと呼ぶ）は富士フイルム和光純薬（株）製、和光特級を用いた。

3. 試験溶液の調製

1) 抽出工程

試験溶液の調製方法を図1に示す。粉砕均一化した試料50.0gをホモジナイザーカップに採取した。アセトニトリル200mLを加え、ホモジナイザーで5分間抽出した。次にポリプロピレン製容器に抽出後の試料と溶液を合わせて移し、3500rpmで15分間遠心分離した。遠心分離後の上澄液5.95mLを分取し、水を50 µL加え混合した後、さらに3000rpmで10分間遠心分離した。遠心分離後の上澄液を抽出溶液とした。

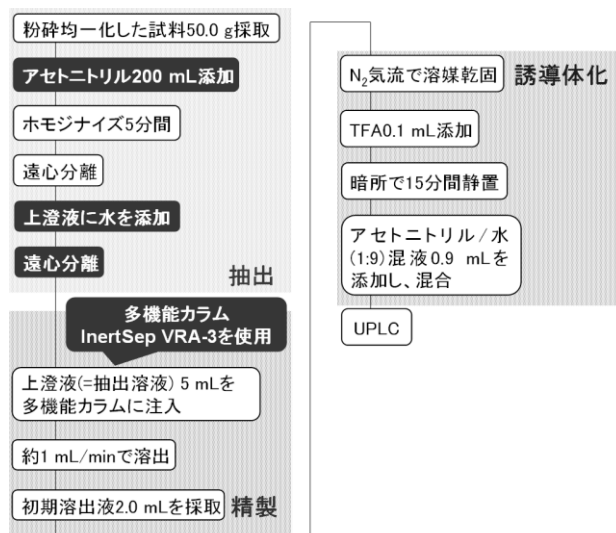


図1 総AF改良試験法フロー

2) 精製工程

カラムに抽出溶液 5 mL を負荷し、カラムから流速 1.0 mL/min で溶出させ、初期溶出液 2.2 mL 程度を採取した。採取した溶出液から 2.0 mL を分取し、精製溶液とした。

3) 誘導体化工程

精製溶液を 45°C 以下の加温状況下で N₂ ガスを用いて溶媒乾固後、TFA 0.1 mL を加え、再溶解させてから混合した。その後速やかに暗所で 15 分間静置し、アセトニトリル/水 (1:9) 混液 0.9 mL を加えて混合した。これを 0.2 μm メンブレンフィルターでろ過し、試験溶液とした。

4. 器具および機器

検体の粉碎には TOSHIBA 製、ミキシングカッター CQM-V2 を用いた。また、ホモジナイザーは NIHONSEIKI KAISHA 製、Ace HOMOGENIZER で、遠心分離機はエッペンドルフ・ハイマック・テクノロジーズ (株) 製、高速冷却遠心機 CR21 およびエッペンドルフ・ハイマック・テクノロジーズ (株) 製、卓上遠心機 CT6D を用いた。測定に用いた超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) は Waters 社製、ACQUITY UPLC H-Class であり、蛍光検出器 (FL) は Waters 社製、ACQUITY UPLC FLR Detector を用いた。

5. 測定条件

UPLC-FL による測定条件を表 1 に示す。

6. 検量線

検量線用標準液は各 AF 濃度が 0.5, 1.25, 2.5, 5, 10 ng/mL となるように、AF 混合標準液をアセトニトリルで希釈した。調製した検量線用標準液 1.0 mL を 45°C 以下の加温状況下で N₂ ガスを用いて溶媒除去後、TFA 0.1 mL を加え、再溶解させてから混合した。そ

表 1 UPLC-FL 測定条件

検出器	蛍光検出器 (FL) (励起 365 nm, 蛍光 450 nm)
移動相	メタノール : アセトニトリル : 水 = 3 : 1 : 6
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm
カラム温度	40°C
注入量	3 μL
流速	0.15 mL/min

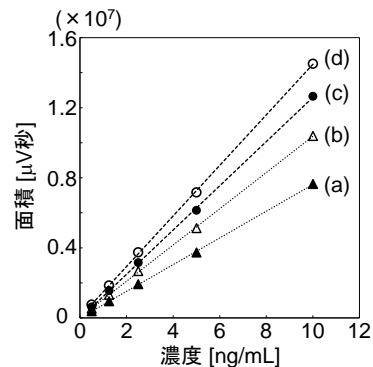


図2 検量線

(a) AFG₁ (b) AFG₂ (c) AFB₁ (d) AFB₂

の後速やかに暗所で 15 分間静置し、アセトニトリル/水 (1:9) 混液 0.9 mL を加えて混合した。これを測定し検量線 (図 2) を得た。各 AF の検量線は R²=0.999 以上の直線性を示し、各 AF の定量限界は 1.0 μg/kg であった。

7. 妥当性評価

妥当性評価は通知法および平成 19 年 11 月 15 日食安発第 1115001 号「食品に残留する農薬等に関する試験法の妥当性ガイドラインについて」(以下、妥当性評価ガイドラインと呼ぶ) に基づき、各検査対象食品に対し、それぞれ試験者 1 人、1 濃度、2 併行、5 日間で添加回収試験を実施した。添加回収試験では AF を含まない煎りピーナッツに対し、各 AF 濃度が 2.5 μg/kg となるように AF 混合標準液をそれぞれ添加した。

得られた結果より選択性を確認し、真度、併行精度および室内精度を求め、通知法に従い評価した。選択性は夾雑ピーク面積が各 AF 濃度 1.25 ng/mL に相当するピークの面積と比較し、1/10 未満であることが求められた。また、真度、併行精度および室内精度の目標値はそれぞれ 70%~110%、20%≧および 30%≧である。

8. 透過スペクトル測定

測定に用いた分光光度計は日本分光 (株) 製、V-670 であり、波長 200 nm~2700 nm の透過率を測定した。

結果および考察

1. 多機能カラムを用いた総 AF 改良試験法の検討

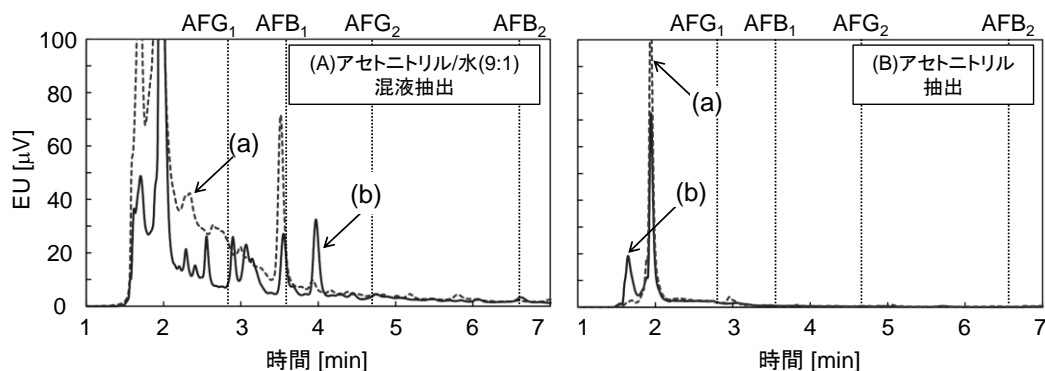


図3 溶媒と精製カラムに対する夾雑ピークの比較

(a) InertSep VRA-3 (b) MultiSep #228

検討試料には煎りピーナッツを用いた。添加回収試験ではAFを含まない煎りピーナッツに対し、各AF濃度が2.5 μg/kgとなるようにAF混合標準液をそれぞれ添加した。

1) 総AF改良試験法の検討

(1) 抽出溶媒と精製カラムの比較

抽出溶媒にアセトニトリル/水(9:1)混液を、精製カラムにMultiSep #228を使用していた昨年度の検討(以下、従来法と呼ぶ)⁸⁾ではクロマトグラム上のAF溶出付近に夾雑物由来のピーク(以下、夾雑ピークと呼ぶ)が多く見られていた。このため、夾雑ピーク抑制を目的とし、抽出溶媒と精製カラムを検討した。抽出溶媒は従来法で用いたアセトニトリル/水(9:1)混液とアセトニトリルを、精製カラムは従来法で用いたMultiSep #228とInertSep VRA-3をそれぞれ比較した。

抽出溶媒を変更した場合、図3に示すように、アセトニトリル/水(9:1)混液ではクロマトグラム上に夾雑ピークが多く出現した。一方、アセトニトリルのみでは夾雑ピークは少なかった。これより、抽出溶媒中の水含有量が夾雑ピークの抑制に大きな影響を及ぼしていると考えられた。

精製カラムを変更した場合、従来法で使用していたMultiSep #228は抽出溶媒に水が含まれないとカラム通液が困難であり、回収率20.0%~48.1%と不良であった。一方、InertSep VRA-3は抽出溶媒中の水の有無に関わらずカラム通液が容易であり、回収率も68.9%~73.3%とMultiSep #228を用いた場合より良好であった。以上より、抽出溶媒をアセトニトリルとし、操作性と回収率から使用する精製カラムをInertSep VRA-3とした。

(2) 水の添加効果

抽出溶媒をアセトニトリルとし、精製カラムInertSep VRA-3を用いた場合、夾雑ピークは抑制で

きたが、すべてのAF回収率が70%以上を満たしていないことが問題であった。そこで、回収率改善のため、アセトニトリルで抽出し、遠心分離した後の上澄液に水を添加することとした。添加する水の量を溶液中の検体相当量に変化しない程度の微量とすることで、夾雑ピークを抑制しつつ、回収率の改善を試みた。表2に示したように、分取した上澄液6 mL~5.9 mLに対し、添加する水の量は0~100 μL(水含有率0%~1.67%)とした。

AFを含まない煎りピーナッツを対象とし、添加する水の量を変更した場合のクロマトグラムを図4に示す。ここで、抽出溶媒中の水含有量に対する夾雑物の溶出量を簡便に比較するため、図4で溶出時間3分程度にみられる1本の夾雑ピーク(以下、主要夾雑ピークと呼ぶ)について面積値の推移を確認した。図5に示すように、溶液中の水含有率が高くなると、主要夾雑ピーク面積値は増加した。一方、図6に示すように、回収率はAFG₁以外で溶液中の水含有率が高くなると改善する傾向が見られた。なお、本検討では、水の添加量で夾雑ピーク面積値が異なったため、選択性に関わらずAFピークに重なりが見られた夾雑ピークを除外して回収率を得た。AFG₁は最も夾雑ピークの重なりの影響を受けたため、水の添加量の増加に従う夾雑ピーク面積値の増加により、回収率が低下した。以上のように夾雑ピーク的面積と回収率の関係から、本検討における改良試験法では、添加する水の量は夾雑ピークが抑制され、各AFの回収率が70%以上となる50

表2 水の添加条件

上澄液 [mL]	添加する水の量 [μL]	溶液中の水含有率 [%]
6.00	0	0.00
5.98	20	0.33
5.95	50	0.83
5.90	100	1.67

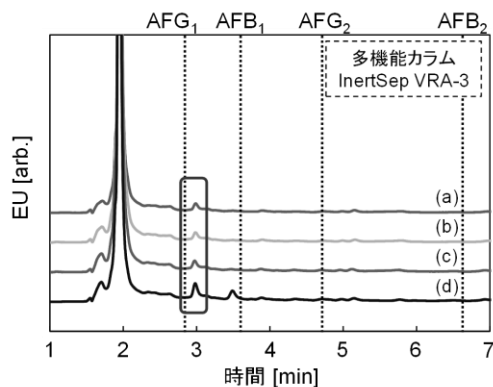


図4 水含有率に対するクロマトグラムの変化
 (a) 水含有率 0% (b) 水含有率 0.33%
 (c) 水含有率 0.83% (d) 水含有率 1.67%

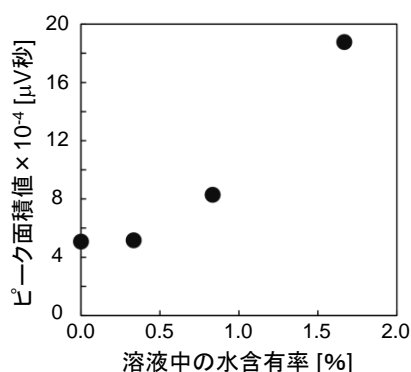


図5 主要夾雑ピーク面積と水含有率の関係

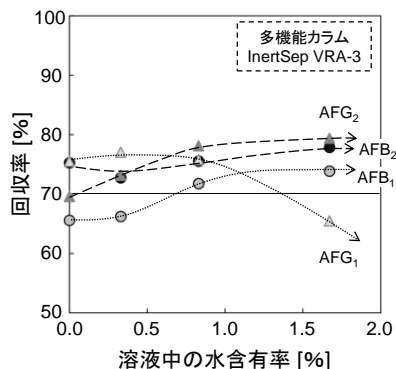


図6 各AF回収率と水含有率の関係

μL (水含有率 0.83%) とした。

2) イムノアフィニティカラム精製との比較

通知法において、加工品はイムノアフィニティカラム精製が推奨されている。そこで、イムノアフィニティカラム精製⁸⁾、多機能カラム精製の従来法⁹⁾および改良試験法で得られたクロマトグラムと回収率をそれぞれ比較した。図7に示したクロマトグラムより、イムノアフィニティカラム精製の場合に最も夾雑ピークが抑制されることがわかった。一方、多機能カラム精製では従来法よりも改良試験法の方が夾雑ピークは抑制された。また、表3に示したように、イムノアフィ

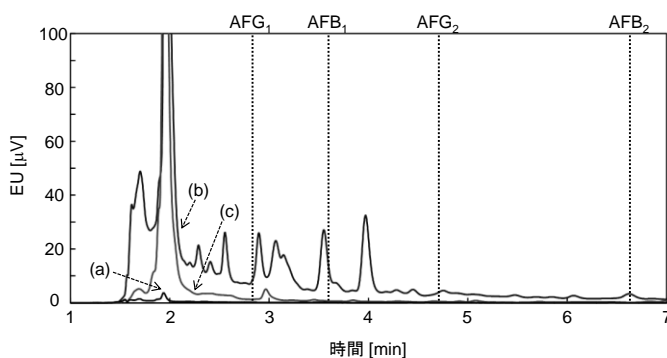


図7 各試験法のクロマトグラムの比較
 (a) イムノアフィニティカラム精製
 (b) 従来法 (c) 改良試験法

表3 各試験法の回収率比較

使用カラム	回収率 [%]			
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
イムノアフィニティカラム AflaStar R	85.7	86.8	85.8	91.4
多機能カラム MultiSep #228 (従来法)	不可	98.5	不可	99.3
多機能カラム InertSep VRA-3 (改良試験法)	77.5	77.4	82.9	77.5

ニティカラム精製では各 AF の回収率は 80%以上であった。一方、多機能カラム精製では従来法で大きな夾雑ピークとの重なりのため測定不可となった AF があったが、改良試験法では各 AF の回収率が 75%以上を達成した。以上より、改良試験法はイムノアフィニティカラム精製と比較すると溶液の精製度および回収率は劣るが、通知法ではイムノアフィニティカラム精製を適用するとされている加工品を多機能カラム精製に適用する試験法として有効であると考えられる。

3) カラムからの夾雑物および各 AF 溶出状況

改良試験法では抽出工程および精製工程を改良したため、カラムからの夾雑物および各 AF 溶出挙動が従来法と異なる可能性があった。そこで既報⁸⁾と同様に、図1に示すフローに従い、煎りピーナッツから得た抽出溶液を多機能カラム InertSep VRA-3 に負荷し、1 mL ずつ 3 mL まで溶出液を採取し、誘導体化後、夾雑物の測定に供した。

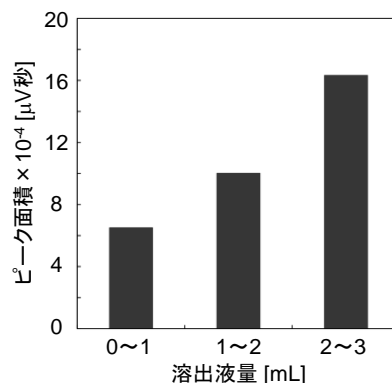


図8 カラムからの夾雑物溶出挙動

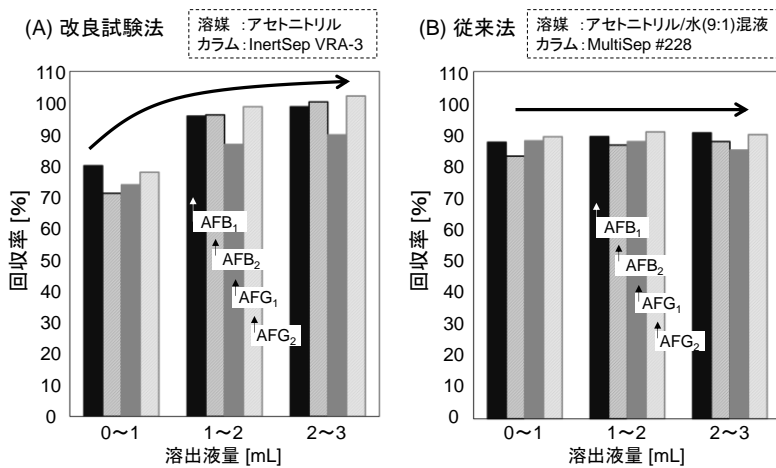


図9 カラムからの各AF溶出挙動

夾雑物の溶出状況を確認しやすくするため、主要夾雑ピークの面積を溶出液量 1 mL ごとに比較した。図 8 に示すように、主要夾雑ピーク面積は溶出液量に対して増加傾向がみられた。初期溶出液中の回収率の低下に対する夾雑物の影響を検討するため、アセトニトリル中に各 AF を 0.625 ng/mL ずつ含む疑似溶液を用いた。前述と同様に溶出液量 1 mL ごとに回収率を比較したところ、図 9 に示すように溶出液量 0~1 mL の場合で回収率が最も低くなった。これより、改良試験法ではカラム通液をする際にカラムに AF が吸着し、溶出が遅れることが示唆された。以上より、改良試験法ではカラムでの夾雑物の保持および各 AF の回収率確保のため、初期溶出液量 2 mL を採取することとした。

2. 妥当性評価結果

煎りピーナッツについて、選択性の評価を実施したところ、各 AF 濃度 1.25 ng/mL の場合に得られたピーク面積の 1/10 以上に相当する面積の夾雑ピークはそれぞれ認められなかった。また、真度、併行精度および室内精度の評価結果を表 4 に示した。各 AF に対し、真度は 76.0%~85.3%であり、併行精度は 1.9~5.0%、室内精度は 3.3%~6.9%であった。以上より、煎りピーナッツに対し、改良試験法で各 AF について、いずれも目標値を満たす良好な結果が得られた。

3. 加工食品に対する試験法の適応

昨年度流通実態調査を実施した際に⁸⁾、加工食品も多く販売されていたことから、多機能カラムの用途拡大を目指し、改良試験法のその他加工食品への適応を検討した。表 5 に示すように、煎りピーナッツの他、バターピーナッツ、揚げピーナッツおよびゆでピーナッツを対象とした。また、比較のため生ピーナッツについても改良試験法で添加回収試験を実施した。添加回収試験では各 AF 濃度が 2.5 μg/kg となるように各

表 4 妥当性評価結果

物質名	真度[%]	併行精度 [%]	室内精度 [%]	判定
AFB ₁	80.6	1.9	3.3	○
AFB ₂	76.0	2.3	5.4	○
AFG ₁	77.6	5.0	5.5	○
AFG ₂	85.3	2.1	6.9	○
目標値	70~110	20≥	30≥	

表 5 対象加工食品一覧

検体名	加工状況	原材料
ピーナッツ	生	落花生(中国)
煎りピーナッツ	煎り	落花生(中国)
バターピーナッツ	調理(炒め)	ピーナッツ 植物油脂 食塩
揚げピーナッツ	調理(揚)	ピーナッツ(中国) 植物油脂 食塩 粉末しょう油/調味料(アミノ酸等)
ゆでピーナッツ	調理(ゆで)	ピーナッツ(中国) しょうゆ 砂糖

ピーナッツに添加した。

1) 加熱の影響

加熱の影響を検討するため、最も単純な加熱処理食品と想定される煎りピーナッツと未加熱品である生ピーナッツについてクロマトグラムを比較したところ、大きな違いはみられなかった。一方、各 AF 回収率は煎りピーナッツではすべて 70%以上であったのに対し、生ピーナッツでは 50%~57%程度であった。十分な回収率が得られなかったことより、改良試験法は生ピーナッツには適さないと考えられる。

2) 加熱方法と調味料の影響

加熱方法と調味料が改良試験法に及ぼす影響を検討するため、前述の加工食品について改良試験法を用いた場合の回収率を比較した。表 6 に示すように、煎りピーナッツ、バターピーナッツおよび揚げピーナッツではすべての AF 回収率が 70%以上であった。一方、ゆでピーナッツの AFG₁ のみ回収率が 70%未満となった。これは図 10 に示すように、ゆでピーナッツのクロマトグラムにのみ見られた溶出時間 2 min~3 min 程度の夾雑物由来と想定されるピークによる大きなベースライン上昇のためと考えられる。

ゆでピーナッツの場合のみクロマトグラムにベースライン上昇が見られたことから、カラム精製前後における溶液中の成分変化を確認するため、分光光度計を

表 6 各加工品に対する回収率の比較

加工品名	加工方法	回収率 [%]			
		AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
煎りピーナッツ	煎り	77.5	77.4	82.9	77.5
バターピーナッツ	炒め	71.8	71.1	73.7	75.1
揚げピーナッツ	揚げ	71.0	70.0	70.1	80.6
ゆでピーナッツ	ゆで	78.1	73.4	61.7	77.2

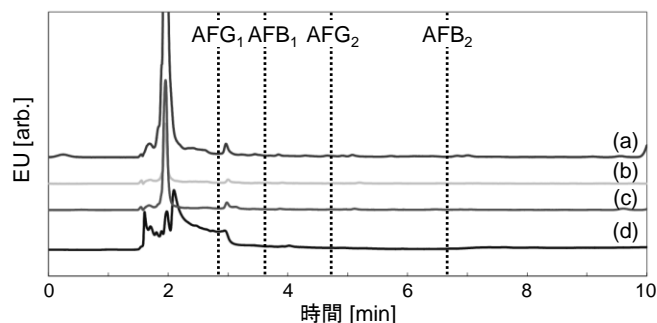


図 10 各加工品のクロマトグラム比較

- (a) 煎りピーナッツ (b) バターピーナッツ
(c) 揚げピーナッツ (d) ゆでピーナッツ

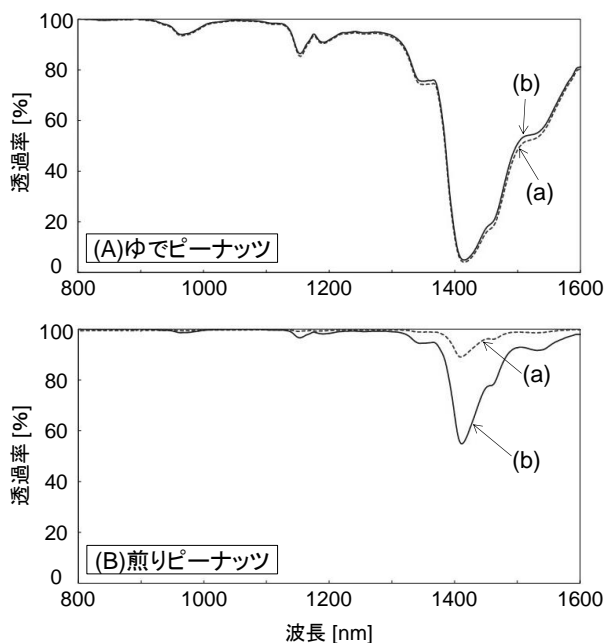


図 11 透過スペクトルの比較

- (a) カラム精製前溶液 (b) カラム精製後溶液

用いて透過スペクトルを測定した。測定対象食品はゆでピーナッツおよび比較のため煎りピーナッツとした。測定検体は、図 1 に示したフロー上で、ホモジナイズし、遠心分離した後の上澄液に水を添加し、遠心分離した後の上澄液（以下、カラム精製前溶液と呼ぶ）およびカラム精製で採取した精製溶液（以下、カラム精製後溶液と呼ぶ）とした。

図 11 に示すように、ゆでピーナッツの場合にはカ

ラム精製前溶液とカラム精製後溶液で透過スペクトルに大きな違いは見られず、カラム精製が溶液中の成分割合に大きな影響を与えなかったと考えられる。一方、煎りピーナッツの場合にはカラム精製前溶液よりカラム精製後溶液で吸収が大きく見られ、カラム精製により吸収が見られる波長の成分割合が溶液中で変化したと考えられる。これより、ゆでピーナッツの場合に改良試験法では精製不十分である可能性が高いといえる。精製不十分となった要因として、ゆでピーナッツにのみ含まれる砂糖が考えられる。また、ゆでピーナッツの透過スペクトルにおいて、水によると見られる波長 1410~1450 nm 付近⁹⁻¹³⁾の透過スペクトル吸収が大きいこと等から、食品に含有する水分の影響が大きいことも示唆された。

今回、単純な加熱加工から数種類の調味料を含む場合まで対応できる可能性が高い試験法を提案することができた。一方、加熱方法や調味料等の影響で精製不十分な場合があることも明らかとなったため、引き続き工夫・検討を重ねていきたい。

まとめ

1. 多機能カラムを用いた総 AF 試験法について検討し、煎りピーナッツを対象として試験法を改良することができた。
2. 改良した試験法の適用を確認したところ、生および砂糖を含む場合以外で適用できる可能性が高いことがわかった。
3. 総 AF 改良試験法を改良したことで、迅速な検査対応への貢献および検査対象食品の拡大が期待される。

参考文献

- 1) 食品安全委員会, かび毒評価書 総アフラトキシン(アフラトキシン B₁, B₂, G₁及び G₂)(2009)
- 2) 田端節子:ぶんせき 2008, 10, 551-557 (2008)
- 3) 谷口賢:*Mycotoxins*, 62, 127-131 (2012)
- 4) 吉成知也:*Mycotoxins*, 62, 121-125 (2012)
- 5) 岩屋あまね, 下堂蘭栄子, 榎元清美, 他:鹿児島県環境保健センター所報, 12, 77-82 (2011)
- 6) 大坪昌宏, 瀧井美樹, 小林千恵, 他:静岡県環境衛生科学研究所報告, 55, 51-54 (2012)
- 7) 小阪田正和, 吉光真人, 福井直樹, 他:大阪府立公衆衛生研究所研究報告, 54, 29-33

(2016)

- 8) 竹田依加, 南浦茉奈, 上床知佐奈, 他: 奈良県保健研究センター年報, **56**, 33-39 (2021)
- 9) 中島利郎, 的場修: 計測自動制御学会論文集, **52**, 531-537 (2016)
- 10) 中村睦子, 中内茂樹: 応用物理学会分科会日本光学会誌, **39**, 529-533 (2010)
- 11) 奥村幸広, 山木携, 本堂正明: 北海道立食品加工研究センター報告, **4**, 1-7 (2000)
- 12) 恩田匠: 日本食品保存科学会誌, **28**, 341-351 (2002)
- 13) 角田直人, 近藤克哉, 有本英伸, 他: システム/制御/情報, **57**, 493-498 (2013)

下水処理場流入水における VRE 実態調査及び臨床分離株との比較解析

井ノ上美紅・築山結衣・井上健太郎・井上ゆみ子・内田美枝

Genetic Analysis of Vancomycin-Resistant Enterococci in Nara Prefecture Sewage Water
: Comparison with Human Isolates

Miku INOUE・Yui TSUKIYAMA・Kentaro INOUE・Yumiko INOUE and Yoshie UCHIDA

環境中に潜在するバンコマイシン耐性腸球菌 (Vancomycin-Resistant Enterococci : VRE) の動向調査を目的とし、下水処理場流入水における VRE サーベイランスを実施した。流入水中から検出された VRE のうち、臨床上重要である耐性遺伝子 *vanA* を保有する菌株に対して、分子遺伝学的解析及び薬剤感受性試験を実施し、臨床分離株との比較解析を行ったところ、流入水分離株と臨床分離株の特徴や経時的変化は非常に類似しており、流入水 VRE サーベイランスの実施は、ヒトにおける VRE の地域動向把握に有用であると推察された。また、多剤耐性傾向の強まりや sequence type (ST 型) のバリエーションの拡大が認められた。

緒言

薬剤耐性菌とは、高濃度の抗菌薬存在下でも増殖が可能となった細菌で、近年、薬剤耐性菌による感染症が拡大している。薬剤耐性菌感染症が直接の原因となった死者数は約 127 万人 (2019 年) と推計され、関連死も含めると 495 万人に上り、世界的に重要な社会問題となっている¹⁾。世界保健機関は 2015 年、薬剤耐性 (Antimicrobial Resistance : AMR) に関する国際行動計画を採択し、日本においても AMR 対策アクションプラン (2016 年-2020 年) を策定した (<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000189799.pdf>)。この対策の中では、ヒト・動物・環境等の各分野で連携を行うワンヘルス・アプローチが重要とされている。また、2023 年から更なる AMR 対策の推進にあたって、新たな AMR 対策アクションプラン (2023 年-2027 年) がとりまとめられ (https://www.cas.go.jp/jp/seisaku/infection/activities/pdf/ap_honbun.pdf)、成果指標の 1 つに、バンコマイシン耐性腸球菌 (Vancomycin-Resistant Enterococci : VRE) 感染症の罹患数を 80 人以下 (2019 年時点に維持) にすることが掲げられている。

薬剤耐性機序の中で遺伝子の機能により薬剤耐性を獲得する場合があります、VRE が保有する *vanA* などの耐性遺伝子もその 1 つである。この耐性遺伝子は、プラスミド上に存在し、接合伝達により他菌種へ伝播する恐れがあり²⁾、より病原性の高い黄色ブドウ球菌に遺伝子が受け渡されることによるバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (vancomycin-Resistant *Staphylococcus*

aureus : VRSA) の出現も危惧されている。VRSA は海外ではすでに検知されており³⁾、VRSA 発生の母地となる VRE の蔓延を防止する点においても、分離状況や発生動向を監視することは肝要である。

腸球菌は、日和見感染症の起因菌で、病原性はさほど高くないが²⁾、自然耐性に加えて獲得耐性による多剤耐性傾向を示す系統株が、病院環境に適応進化して広まっている。この現象により、VRE 感染症患者が日本各地で増加傾向にある^{4,5)}。VRE 感染症に対する治療薬として、2000 年以降に新たに開発されたりネゾリド等の薬剤があるが、これらも多用することで新たな耐性菌の出現が報告されており⁵⁾、難治療化する恐れがある。また、奈良県内の VRE 感染症届出数は、近年、全国の報告数に占める割合が高い傾向にあり、これは喫緊の課題となっている。

一方、環境中において、腸球菌は多様な環境因子 (温度、pH 等) に耐性を有し生残性が極めて高く、糞便汚染の指標菌としても利用されている。環境中の VRE 汚染は、圃場や畜産現場の汚染をもたらす、農産物等を介したヒトへの保菌が懸念されているが、環境中の薬剤耐性化についての報告はごくわずかである。

そこで、本研究では、環境中に潜在する VRE の動向を調査し、地域における VRE の存在状況を明らかにするため、下水処理場の流入水サーベイランスを実施した。また、県内の VRE 感染症患者から分離された菌株 (臨床分離株) との比較解析を行った。

方 法

1. 材料

県内下水処理場から採取した流入水を試料原液とした。調査は、2020年4月から2022年12月までの月1回（計32回）実施した。

臨床分離株は、2018年以降VRE感染症として届出され、当センターに搬入された臨床分離株27株を対象とした。

2. 流入水からのVREの分離

試料原液50 mLを3000 rpmで30分間遠心分離を行い、上清を除き、沈渣に500 µLの生理食塩水を添加して100倍濃縮液を調製した。また、試料原液を生理食塩水で希釈した10倍希釈液を調製した。100倍濃縮液、試料原液、10倍希釈液の3段階に調製した試料を、クロモアガーVREスクリーン培地（関東化学）及びバンコマイシン塩酸塩（富士フィルム和光純薬）を8 µg/mL添加したエンテロコッカセル寒天培地(BD)の2種類の培地に、それぞれ100 µL塗抹し、37°Cで24~48時間培養した。クロモアガーVREスクリーン培地上のピンク色コロニー、エンテロコッカセル寒天培地上の周囲が黒変した灰白色コロニーを計30個程度鈎菌し、グラム染色を実施した。グラム陽性球菌であった菌株は、VP試験、運動性試験、6.5%塩化ナトリウム含有培地における生育試験等の生化学性状試験を行った。

腸球菌の性状を示した菌株に対して、バンコマイシン耐性遺伝子(*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/3*)の保有の確認及び*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*の2菌種の同定をPCR法^{6,7)}で行った。耐性遺伝子を保有しているもの上記2菌種ではなかった菌株に対しては、16S rRNA遺伝子領域の塩基配列を、ダイレクトシーケンスにより決定し⁸⁾、Basic Local Alignment Search Toolによって菌種同定を行った(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。

3. 流入水分離株及び臨床分離株の比較解析

流入水分離株と臨床分離株との比較解析を目的とし、流入水から分離された*vanA*型*E. faecium*及び2018年以降VRE感染症として届出され、当センターに搬入された臨床分離株（すべて*vanA*型*E. faecium*）を対象に、以下の方法を実施した。

1) MLST 型別

Multilocus Sequence Typing (MLST) を実施した。*E. faecium*の7つのハウスキーピング遺伝子(*adh*, *atpA*, *ddl*, *gdh*, *gyd*, *purK*, *pstS*)の塩基配列をダ

イレクトシーケンスにより判読し⁹⁾、各遺伝子のAllele Numberを決定した。7領域のAllele Numberの組み合わせにより、各株のsequence type (ST型)を特定した。Allele Number及びST型の決定には、pubMLSTのデータベースを参照した(https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_efaecium_seqdef)。

2) PFGE 法

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) を実施した。菌株は制限酵素SmaI（タカラバイオ、1検体あたり30 U）で処理した。サイズマーカーには*Salmonella* Braenderup H9812株を用い、制限酵素はXbaI（Roche、1検体あたり30 U）で処理した。泳動条件はInitial time 0.7 s, Final time 15.0 s, Voltage 6 V/cm, Run time 19 h, Buffer温度14°Cとし、泳動用Bufferは0.5×TBE（Invitrogen）を用いた。

PFGE型の類似度は、共有するバンドの割合から相似値を見積もるDice係数によって表した。得られたすべてのPFGEパターンは、非荷重結合法によってクラスタリングを実施し、デンドログラムを作製した。系統樹解析の一連の操作は、BIONUMERICSのソフトウェアを使用した。

3) 病原遺伝子の探索

腸球菌は保有の有無で病原性が決定されるような強い病原因子は保持していないが、日和見感染菌が保持している因子と類似の形質をもつとされる²⁾。そこで、*E. faecium*の病原因子とされ、院内感染株の多くから検出されている腸球菌表層タンパク(*esp*; biofilm形成因子等)及びヒアルロニダーゼ(*hyl*; 菌・毒素の組織内拡散因子)の2領域を対象としたPCR法^{10,11)}を実施した。

4) Etestによる拡散法

Etest (bioMérieux) を用いて抗菌薬に対する最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) の測定を実施した。菌液をマックファーランド約0.5に調製し、ミューラーヒントンII寒天培地(BD)に塗抹したのち、バンコマイシン(VCM)とテイコプラニン(TEIC)の薬剤ストリップを配置した。35°Cで24時間培養した後、阻止円がストリップを交差する位置でMIC値を測定した。

5) ディスク拡散法

ディスク拡散法による薬剤感受性測定を実施した。菌液をマックファーランド約0.5に調製し、ミューラーヒントンII寒天培地(150 mm) (BD)に塗抹したのち、薬剤ディスクを配置した。35°Cで16~18時間培養した後、ディスク周辺に形成された阻止円直径を測定し、Clinical and Laboratory Standards Instituteの

基準に従って、感性 (S)、中間耐性 (I)、又は耐性 (R) を判定した。供試薬剤はセフトキシム (CTX)、カナマイシン (KM)、ストレプトマイシン (SM)、シプロフロキサシン (CPFX)、アンピシリン (ABPC)、エリスロマイシン (EM)、リファンピシン (RFP)、ホスホマイシン (FOM)、クロラムフェニコール (CP)、テトラサイクリン (TC)、バシトラシン (BC)、リネゾリド (LZD) の 12 薬剤で、BC を除く 11 薬剤についてはセンシディスク (BD) を用いた。BC については薬剤原末 (ナカライテスク) を滅菌水で溶解し、1 ディスクあたり 10 U になるように抗生物質検定用濾紙 (ADVANTEC) に染みこませて用いた。

結果

1. 流入水からの VRE の分離

2020 年 4 月から 2022 年 12 月までの分離状況を図 1 に示す。临床上重要とされる *vanA* 型 *E. faecium* は計 78 株検出された。そのほか、*vanC1* 型 *E. gallinarum* が 31 株、*vanC2/3* 型 *E. casseliflavus* が 17 株検出された。調査開始時から優勢であった *vanA* 型 *E. faecium* は、2022 年以降分離が少なく、環境中 (植物等) から分離されることの多い *E. gallinarum* 及び *E. casseliflavus* が優位となった。一方、バンコマイシン耐性遺伝子を保有する *E. faecalis* の検出は認めなかつ

た。

2. 流入水分離株及び臨床分離株の比較解析

1. で分離した *vanA* 型 *E. faecium* 78 株及び臨床分離株 27 株を対象に実施した結果を次に示す。

1) MLST 型別

流入水分離株 78 株は、ST80、ST78 及び ST17 のいずれかに分類された。各 ST 型の経時的検出状況は、2021 年 9 月までは ST80 が占め、2021 年 2 月に初めて検出されてから増加していた ST78 が 2021 年 10 月以降には置き換わる傾向を認めた (図 2 (a))。

臨床分離株 27 株は、流入水分離株で検出された ST80、ST78 及び ST17 に加えて、ST400、ST612 及び ST117 がそれぞれ 1 株ずつ検出された。臨床分離株においても、2022 年は ST80 の検出がなく、ST80 から ST78 へ切り替わる流入水分離株と同様の傾向がみられた (図 2 (b))。分離された ST 型は、すべて Clonal Complex 17 (CC17) に分類され、世界的に流行している院内感染株であった¹²⁾。

2) PFGE 法

結果を図 3 (a) に示す。流入水分離株は、臨床分離株と類似度が高い株が多かった。また、類似度 85% で菌株を分類すると、大きなグループが 2 つ形成された。MLST 型別の結果と比較すると、主に ST78 及び ST17 を含む “PFGE グループ A” と ST80 のみの “PFGE

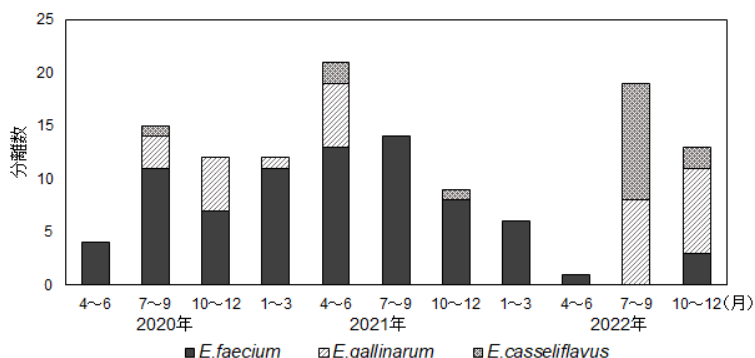


図 1 流入水からのバンコマイシン耐性腸球菌分離状況

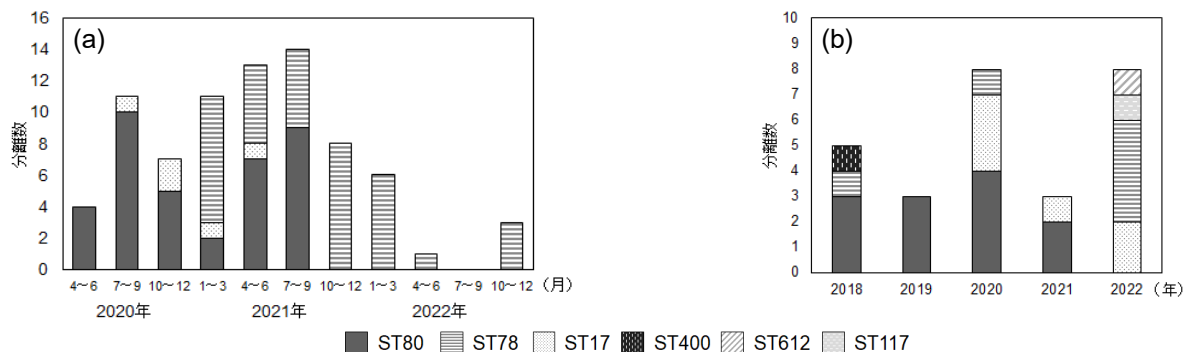


図 2 MLST 型別による経時的検出状況 (*vanA* 型 *E. faecium*)
(a) 流入水分離株 (b) 臨床分離株 (NESID 診断週)

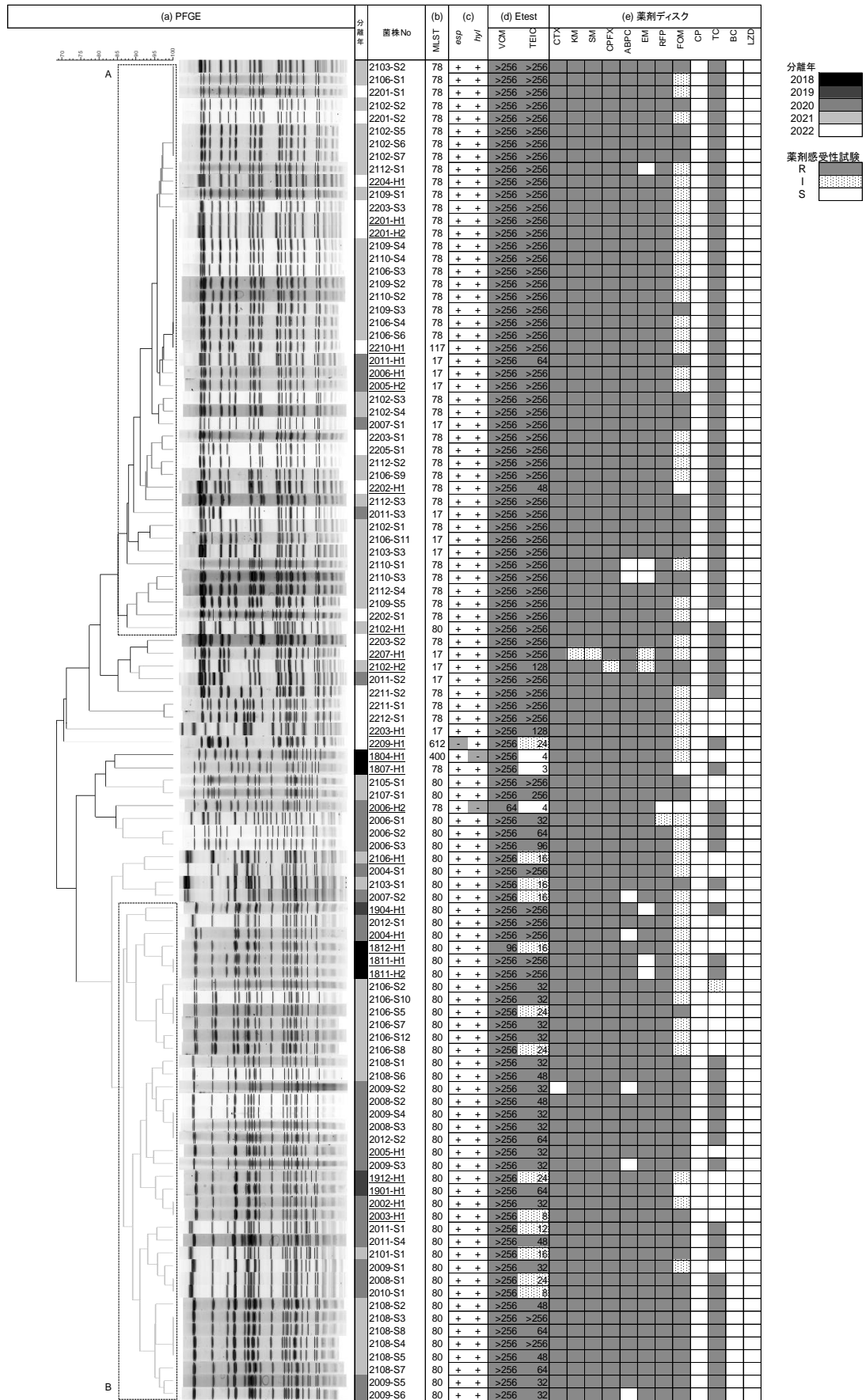


図3 *vanA*型 *E. faecium* 105株の検査結果
 (a) PFGE (b) MLST (c) 病原遺伝子の探索 (d) Etest (e) ディスク拡散法
 注) 菌株 No. の下線は臨床分離株を示す。

グループ B”を形成した。

MLST 及び PFGE 法による 2 種類の遺伝子型別手法の解析結果は概ね一致した。PFGE 型別は菌株間の詳細な類似度をはかるのに適していたが、“PFGE グループ A”内には複数の ST 型が含まれることから、VRE の解析においては MLST 型別の方がグループ分けに有用と考えられた。

3) 病原遺伝子の探索

流入水分離株 78 株すべてで *esp* 及び *hyl* を検出した。また、臨床分離株 27 株のうち 24 株から *esp* 及び *hyl* を検出した (図 3 (c))。

4) Etest による拡散法

VCM に対しては供試菌株のすべてが耐性を示した。また、全体の 98% が測定限界値である 256 µg/mL 以上の MIC 値を示し、高濃度耐性を有していた。一方、TEIC に対しては中間耐性及び感性を示す菌株 (32 µg/mL 未満) が全体の 15% に認められ、“PFGE グループ B”に属する菌株に多く、“PFGE グループ A”には存在しなかった (図 3 (d))。このことから ST78 及び ST17 の TEIC 耐性は ST80 より高いことが示唆された。

5) ディスク拡散法

CTX, KM 及び SM は、腸球菌の多くが自然耐性を示す薬剤で、供試菌株の 99% 以上が耐性を示した。供試菌株のすべてが前記 3 剤に加え、さらに 3 剤以上に耐性を示し、獲得耐性による多剤耐性傾向を示した。

院内感染株である CC17 において耐性を示すとされるニューキノロン系薬剤の CPFX¹³⁾ に対しては、99% 以上が耐性を示した。

また、ヒト由来株の *E. faecium* で耐性率の高い薬剤の ABPC 及び EM に対しては、92% 以上の株が耐性を示した。

一方、動物治療で抗菌薬の使用量の約 40% を占める薬剤の TC に対しては、76% の耐性に留まり、動物由来の *E. faecium* で耐性率の高い薬剤の BC に対しては、すべての株が感性を示した。さらに、VRE に有効とされている 2000 年以降に登場した比較的新しい薬剤の LZD に対しては、すべて感性を示した (図 3 (e))。

考 察

流入水分離株と臨床分離株は、PFGE 型別による系統樹解析において極めて近縁であり、MLST 型別による ST 型及びその経時変化においても類似性を認めた。さらに、病原遺伝子の探索及び薬剤感受性試験の結果からも、流入水分離株がヒト由来の腸球菌であることが裏付けられた。したがって、流入水 VRE サーベイ

ランスの実施は、ヒトが保有する VRE の地域動向把握に有用であると推察された。また、今回の調査地点である下水処理場は、県内の人口密集地である北西部地域の人口約 65.6 万人 (県内総人口の約 50%) を管理することから、この地点での調査は県内の VRE 動向把握に効果的と考えられた。

県内の VRE の動向は、調査期間において、ST78 の拡大による TEIC 耐性率の上昇傾向が確認された。また、2022 年は、新たな ST 型も検出されるなど、バリエーションの拡大も認められた。一方で、LZD に対する耐性菌の出現は検知せず、治療薬としての有効性が確認された。

臨床分野において、*pstS* 欠損 *E. faecium* ST1421 が新たな流行株として相次いで報告され^{4,12)}、また、新たなバンコマイシン耐性遺伝子 (*vanN*) が発見されていることから、全国での状況が注目されている¹⁴⁾。どちらも、県内では現在のところ未検出ではあるが、今後の動向を注視する必要がある。

環境分野において、ヒトへのリスクとなりうる環境水中の AMR 調査 (厚生労働省科学研究費課題「環境中における薬剤耐性菌及び抗微生物剤の調査法等の確立のための研究 代表：金森肇」) が開始され、環境水中の遺伝子レベルでの網羅的 AMR モニタリングの結果が徐々に明らかになるにつれ、今後、環境分野における AMR 対策がワンヘルス・アプローチの観点からも非常に重要な位置を占めることが推測される。

今回、我々が実施した「流入水 VRE サーベイランス」は、ヒト臨床分野及び環境分野の両面における、VRE の地域動向把握に有用であり、継続した調査の実施が重要である。

謝 辞

今回の調査を実施するにあたり、流入水及び菌株を提供していただきました関係機関の皆様には深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Antimicrobial Resistance Collaborators . : *Lancet*, 399 (10325), 629-655 (2022)
- 2) Tanimoto K. : *J. Antibact. Antifung. Agents.* , 47(11), 481-489 (2019)
- 3) Weigel LM, Clewell DB, Tenover FC, *et al.* : *Science.* , 302(5650), 1569-1571 (2003)
- 4) 国立感染症研究所. : IASR, 42 (8), 155-167 (2021)
- 5) Halle E, Padberg J, Witte W, *et al.* : *Infection*, 32, 182-183 (2004)

- 6) 病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌. :令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.0.
- 7) 国立感染症研究所主催 平成 21 年度薬剤耐性菌解析機能強化技術研修会 資料.
- 8) 第十八改正日本薬局方 厚生労働省告示第 220 号, 2600-2601 (2021)
- 9) H Billström. : *Karolnska Institutet.* , 1-61 (2008)
- 10) Freitas AR, Novais C, Peixe L, *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.* , 75 (14) , 4904-4908 (2009)
- 11) Vankerckhoven V , Van Autgaerden T , Goossens H, *et al.*: *J. Clin. Microbiol.* , 42(10), 4473-4479 (2004)
- 12) van Hal SJ, Beukers AG, Sintchenko V, *et al.*: *J. Antimicrob. Chemother.* , 73 , 1487-1491 (2018)
- 13) Leavis HL, Bonten MJ, Willems RJ, *et al.* : *Curr. Opin. Microbiol.* , 9, 454-460 (2006)
- 14) Nomura T, Tanimoto K, Tomita H, *et al.* : *Antimicrob. Agents. Chemother.* , 56 , 6389-6392 (2012)

