

リアルタイム PCR を用いた糞便からの 主要食中毒菌スクリーニング法

永田暁洋・芦田澄江・大村勝彦・石畝 史

Screening of Food Poisoning bacteria by Real-Time Multiplex PCR in feces

Akihiro NAGATA, Sumie ASHIDA, Katsuhiko OMURA, Fubito ISHIGURO

食中毒発生時の糞便の細菌検査において、原因菌スクリーニングを迅速に行う方法として、リアルタイム PCR による検査法を確立した。検出対象は、食中毒菌 8 菌種の 21 遺伝子とし、菌の潜伏時間および融解曲線分析 (Tm 値) を考慮して 7 セット (A~G) のマルチプレックス PCR に集約した。糞便検体は、直接または各選択増菌培地で培養し、遺伝子抽出キットを用いて遺伝子抽出し、リアルタイム PCR 検査に供した。その結果、 10^3 cfu/g 程度の対象菌遺伝子を検出することが可能となった。構築した検査法を用いて過去の 3 事例の検体を検査したところ、スクリーニング検査としての有効性を確認できた。また、直接抽出検体および増菌抽出検体の双方の結果を比較することで、生菌・死菌の推定も可能となり、培養検査法の結果の推定が高い精度で行うことができた。

1. はじめに

食中毒事件(疑)の疫学調査では、細菌検査結果等を疫学調査に反映して、総合的に判断して行政対応を図ることが原則である。しかしながら、現在の培養検査法では、菌の検出に約 3 日から 6 日を要するため、疫学調査のみで行政対応を行わなければならない事例がある。また、糞便検体の培養検査法では食中毒菌の定量ができないことから、的確な分析に支障をきたす恐れがある。そこで、この問題を解消することを目的として、遺伝子解析手法を用いたリアルタイム PCR による検査法を確立したので報告する。

2. 方法

2. 1 対象食中毒菌とその遺伝子の選定

現在の食中毒検査状況を踏まえ、主要食中毒菌 8 菌種を選定した。その上で、既報告の論文¹⁾⁻¹⁴⁾を参考に、病原性および菌種特異性等を考慮し、21 遺伝子を検出対象とした(表 1)。また、各遺伝子を検出するプライマーは、PCR 反応による増幅産物が 50bp~400bp の範囲となり、かつ特異性が確認されているものとして、24 論文で報告されている 39 対のプライマーから選択した。

2. 2 リアルタイム PCR の試薬等および反応条件

リアルタイム PCR は、Thermal Cycler Dice Real Time System TP800(TaKaRa)に 96 穴マイクロプレートを使用し、反応液組成は、SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa)12.5 μ L、3 対 6 種の 10 μ M プライマー各 1 μ L、滅菌精製水 4.5 μ L および DNA 抽出液(サンプル) 2 μ L とした。反応条件は、95 $^{\circ}$ C で 30 秒の後、95 $^{\circ}$ C で 5 秒、58 $^{\circ}$ C ~61 $^{\circ}$ C で 30 秒を 35~40 サイクルで行い、最適な反応温度および反応サイクルを決定した。その後、融解曲線分析を行い、Tm 値を算出した。プライマーの組み合わせについては、PCR 増幅産物の融解曲線分析の結果(Tm 値)から、Tm 値が重ならない($\pm 0.5^{\circ}$ C 以上)こと、および菌の潜伏時間が類似していることを条件として、3 種類の遺伝

子検出系を 1 セットとして組み合わせた。その後、感度および特異性に問題が生じた場合は、別のプライマーを用いるか、組み合わせを変えて改善を行った。

2. 3 検体の処理方法の検討

リアルタイム PCR 検査の検出感度を高めるため、検体の増菌培養処理を行うか検討した。増菌培地としては、対象とした菌の選択増菌培地(病原大腸菌:mEC 培地、サルモネラ属菌:セレナイトシスチン培地、カンピロバクター:プレストン培地、ウェルシュ菌:クックドミート培地、セレウス菌:ポリミキシン B 加 TSB 培地、黄色ブドウ球菌:7.5%NaCl 加普通ブイヨン、腸炎ビブリオ:アルカリ性ペプトン培地)を使用することとした。また、生菌死菌判別については、Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative) (TaKaRa)を用いて検討した。さらに、遺伝子抽出方法については、市販 DNA 抽出キットのうち、比較的操作時間が短く、手順が簡易なものとして、QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN)、DNeasy Blood&Tissue Kit(QIAGEN)および NucleoSpin TissueXS (TaKaRa)の 3 種類を比較検討した。

2. 4 保存検体での検証

確立した検査法が、実際の検査に導入可能かどうか検証するため、凍結保存された過去事例の糞便検体を用いてリアルタイム PCR 検査を実施し、当時の培養法による結果と比較を行った。また、凍結保存中に菌の死滅等がないかを確認するため、培養法も併せて行った。

3. 結果

3. 1 リアルタイム PCR 反応条件等

本検査系に最適なアニーリング温度は 59 $^{\circ}$ C であった。また、反応サイクル数は、非特異反応と思われる増幅がみられる検体があったものの、偽陰性を防止するため 40 サイクルとした。プライマーの組合せ検討を行った結果、21 遺伝子を 7 セット (A~G) に集約した(表 2、図 1)。

3. 2 検体の処理方法

3. 2. 1 前処理方法

糞便から遺伝子を直接抽出して検査することも可能であった (QIAamp DNA Stool mini Kit 使用) が、感度が悪く偽陰性となる検体があった。また、食中毒疑い事例の検査として同時に実施することが多いノロウイルスの検菌株を添加した糞便を用いて、感度を確認したところ、検出できない遺伝子があったため、増菌培養液の採取量を 200 μ L にしたところ、全ての遺伝子が検出可能となった。

3. 2. 2 死菌由来遺伝子除去キットの検討

グラム陰性菌については生菌由来遺伝子のみを選択的に検出できたが、グラム陽性菌については良好な結果は得られなかった。また、1 検体 (1.4mL) を処理するためにキットの試薬を多量に消費してしまうこと、また、作業が煩雑となってしまうことが問題であった。そこで、検体から直接遺伝子抽出した場合の増幅曲線と増菌培養後に遺伝子抽出した場合の増幅曲線を比較することで、生菌死菌を推定することとした。

3. 2. 3 遺伝子抽出方法の検討

本検査手順で遺伝子抽出を行った場合、いずれの遺伝子においても NucleoSpin Tissue XS の DNA 収量が多い結果となった (図 2)。ただし、検体の状態によって、あるいはグラム陽性菌の遺伝子検出において、検出感度の低下がみられたため、このキットの基本工程のうち、抽出率低下の原因となると思われる事項に対処する工程を、キットの手順書を参考に検討した。

まず、糞便由来物や増菌培養液の影響を軽減するため、前処理の前に遠心工程 (5,000rpm 15min) を追加した。次に、溶菌しにくい黄色ブドウ球菌などのグラム陽性菌の遺伝子抽出率を高めるため、溶菌工程に加熱工程 (95 $^{\circ}$ C 10min) を追加した。さらに、検体によっては、エタノール処理工程の前に残渣が残る場合があるため、この残渣を除去する工程 (15,000rpm 5min) を追加した。最後に、リアルタイム PCR 検査に必要な容量を確保するため、最終容量を 30 μ L とした (図 3)。これにより、リアルタイム PCR 検査における検出感度の向上がみられた。

3. 3 過去検体での検証

過去に発生した食中毒 3 事例の凍結糞便 18 検体を用いて、これまでに構築したスクリーニング検査法の有効性を検証した。

事例 1 は 2011 年 6 月 5 日に搬入された 3 検体で、当時の培養法の結果は 1 検体のみ *Campylobacter jejuni* 陽性であった。リアルタイム PCR による結果は図 4 のとおりで、直接抽出では 3 検体とも陽性となったが、増菌培養後抽出では、1 検体 (F3) が陰性となった。また、残りの 2 検体も増菌培養後抽出の Ct 値が直接抽出の Ct 値とほぼ同じか高い結果となった。その後、凍結糞便を培養法で検査したところ、3 検体とも陰性であった。

事例 2 は 2012 年 5 月 30, 31 日に搬入された 7 検体で、培養法の結果は 7 検体ともサルモネラ属菌が陽性であった。リアルタイム PCR による結果は図 5 のとおりで、直接抽出では 2 検体が陽性、増菌培養後抽出の結果は 6 検体が陽性であった。凍結糞便の培養検査では 5 検体が陽性となり、増菌培養後抽出の結果とほぼ一致した。

事例 3 は 2012 年 7 月 25 日に搬入された 8 検体で、培養法の結果は 4 検体が *Campylobacter jejuni* 陽性であつ

た。リアルタイム PCR による結果は図 6 のとおりで、直接抽出では 4 検体が陽性、増菌培養後抽出の結果は 3 検体が陽性であった。しかし、増菌培養後抽出で陽性となった 3 検体は、いずれも増菌培養後抽出の Ct 値が直接抽出の Ct 値より高い結果となった。凍結糞便の培養検査では 8 検体全てが陰性となった。

4. 考察

食中毒事例が発生した際に、より迅速に原因菌のスクリーニングを行うことを目的に、リアルタイム PCR 法を用いた検査法が報告されている^{10),15)}。しかし、検出感度がやや低いことや死菌由来遺伝子も検出してしまうなど、課題も残されている。今回、我々はまず、糞便から直接遺伝子を抽出して検査することを検討したが、検体等の要因によって偽陰性となる場合があることを確認した。そのため、糞便を各選択増菌培地で培養後に、遺伝子抽出して検査する方法を追加した。結果として、培養法で陽性であった検体は、直接抽出または増菌後抽出のどちらかで陽性となることが確認でき、偽陰性の可能性を最小限度にとどめることができたと考えられる。

過去に発生した有症事例の保存検体による検証では、事例 1 において、培養法で陰性であったが直接抽出で陽性となった 2 検体は、増菌培養後抽出の Ct 値が直接抽出より高かったことから、死菌あるいは生存しているが培養出来ない (VNC) 菌であったと推定された。

事例 2 において、培養法の結果と相違がみられたのは 5 検体で、直接抽出で陰性となったが、増菌後抽出ではうち 4 検体が陽性となったため、菌量が少量であったと推察された。また、直接抽出でも増菌後抽出でも陰性となった 1 検体については、保存後検体の培養検査で陰性となり、保存中に死滅してしまったと思われる。増菌後抽出で陽性となった 6 検体の Ct 値比較では、いずれも直接抽出よりも増菌後抽出が低く、生菌の存在を推定できた。

事例 3 において、培養法の結果と相違がみられたのは、1 検体 (培養法陽性だったが増菌後抽出で陰性) であったが、直接抽出で陽性および保存後検体の培養検査で陰性だったため、保存中に死滅あるいは VNC となったと考えられた。

以上のことから、スクリーニング検査の感度は、培養法結果とほぼ同等かそれ以上であると示唆された。また、直接抽出検体と増菌後抽出検体の Ct 値を比較することで、増菌培養後抽出の Ct 値が直接抽出の Ct 値と同等か、上回る場合は、ほとんどが死菌あるいは VNC 菌であると推定することができた。結果として、検体搬入から約 24 時間で、培養法による最終結果を高い精度で推定することが出来ると考えられた。

実際の検査への導入に際しては、引き続き有症事例の生糞便検体において検証を重ね、培養法との一致率を含めた感度および特異性を確認することが必要であると考えられる。また、糞便検体だけでなく食品検体等に応用する場合には、検査方法に様々な検討が必要になると思われる¹⁵⁾。

本法を利用して食中毒事例のスクリーニング検査を実施することで、原因菌を早期に推定でき、原因究明や被害拡大防止に向けた行政対応を迅速に行うことが出来る。今後も実用化に向けてさらなる検討を重ねることが必要である。

参考文献

- 1) Catalina L, et al. Emerg Infect Dis, Single Multiplex Polymerase Chain Reaction To Detect Diverse Loci Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*, 9, 127-31(2003)
- 2) Nielsen E.M et al. J Clin Microbiol, Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay, 41, 2884-2893(2003)
- 3) Guion et al. J Clin Microbiol, Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli* by Use of Melting-Curve Analysis and Real-Time Multiplex PCR, 46, 1752-1757 (2008)
- 4) Villalobo E et al. Appl Environ Microbiol, PCR for Detection of *Shigella* spp. in Mayonnaise, 64, 1242-1245(1998)
- 5) Ratchtrachenchai O.A et al. Bull Dept Med Sci, Investigation on entero aggregative *Escherichia coli* infection by multiplex PCR, 39, 211(1997)
- 6) Yatsuyanagi J et al. J Clin Microbiol, Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks, 40, 294-297(2002)
- 7) Fey A et al. Appl Environ Microbiol, Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism, 70, 3618-3623 (2004)
- 8) Leblanc-Maridor et al. BMC Microbiology, Rapid identification and quantification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by real-time PCR in pure cultures and in complex samples. 11, 113(2011)
- 9) 加藤直樹ほか, 感染症学雑誌, 67, 724(1993)
- 10) Fukushima H et al. Int J Microbiol, Simultaneous Screening of 24 Target Genes of Foodborne Pathogens in 35 Foodborne Outbreaks Using Multiplex Real-Time SYBR Green PCR Analysis (2010)
- 11) Yang I-C et al. J Food Prot, Development of rapid real-time PCR and most-probable-number real-time PCR assays to quantify enterotoxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group 70, 2774-2781(2007).
- 12) Klotz K et al. J Clin Microbiol, Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins A to D by Real-Time Fluorescence PCR Assay. 41, 4683-4687(2003)
- 13) Akifumi N et al. J Med Microbiol, Development of a routine laboratory direct detection system of staphylococcal enterotoxin genes. , 55, 273-277(2006)
- 14) Jessica L et al. Appl Environ Microbiol, Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay with an Internal Amplification Control for the Detection of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Bacteria in Oysters. 73, 5840-5847(2007)
- 15) 飯田奈都子ほか, リアルタイム PCR 法による食中毒起因菌の一斉迅速スクリーニング法の検討, 静岡県環境衛生科学研究所報告, 53, 19-24(2010)

表 1 対象菌種とリアルタイム PCR の標的遺伝子

食中毒菌	標的遺伝子	プライマー	参考文献
病原大腸菌 (EHEC)	<i>stx1</i>	stx1-F, R	1)
病原大腸菌 (EHEC)	<i>stx2</i>	stx2-F, R	
病原大腸菌 (EHEC, EPEC)	<i>eae</i>	eae-F2, R	2)
病原大腸菌 (ETEC)	<i>lt</i>	lt-F, R	3)
病原大腸菌 (ETEC)	<i>st1a st1b</i>	st1a-F, st1b-F, st-R	
病原大腸菌 (EIEC), 赤痢菌	<i>virA</i>	virA-F, R	4)
病原大腸菌 (EAggEC)	<i>aggR</i>	aggRkas1, aggRkas2	5)
病原大腸菌 (DAEC)	<i>daaD</i>	daaD-F, R	4)
病原大腸菌 (その他)	<i>astA</i>	EAST-1S, 1AS	6)
サルモネラ属菌	<i>invA</i>	invA2-F, R	7)
カンピロバクター (<i>C. jejuni</i>)	<i>hipO</i>	hipO-F, R	8)
カンピロバクター (<i>C. coli</i>)	<i>glyA</i>	glyA-F, R	
ウェルシュ菌	<i>cpe</i>	GAP11, 12	9)
セレウス菌 (嘔吐型)	<i>ces</i>	ces-TM-F, R	10)
セレウス菌 (下痢型)	<i>nheB</i>	SG-F3, R3	11)
黄色ブドウ球菌	<i>femB</i>	femB-fw, rv	12)
黄色ブドウ球菌 (毒素遺伝子)	<i>sea seb sec sed</i>	eta-F, R etb-F, R etc-F, R etd-F, R	13)
腸炎ビブリオ	<i>tdh</i>	tdh forward, reverse	14)

表2 遺伝子の組み合わせと各 Tm 値

セット名	gene1	Tm 1	gene2	Tm 2	gene3	Tm 3
セット A	<i>stx1</i>	83.8±0.5	<i>astA</i>	85.2±0.5	<i>daaD</i>	90.9±0.5
セット B	<i>hipO</i>	80.6±0.5	<i>lt</i>	82.3±0.5	<i>stx2</i>	85.9±0.5
セット C	<i>eae</i>	80.6±0.5	<i>virA</i>	82.1±0.5	<i>invA</i>	84.1±0.5
セット D	<i>aggR</i>	74.2±0.5	<i>stIa</i> <i>stIb</i>	77.8±0.5 78.2±0.5	<i>glyA</i>	81.3±0.5
セット E	<i>sea</i>	76.4±0.5	<i>sed</i>	78.8±0.5	<i>femB</i>	83.2±0.5
セット F	<i>seb</i>	77.0±0.5	<i>ces</i>	80.5±0.5	<i>tdh</i>	81.6±0.5
セット G	<i>sec</i>	77.3±0.5	<i>cpe</i>	78.5±0.5	<i>nheB</i>	82.4±0.5

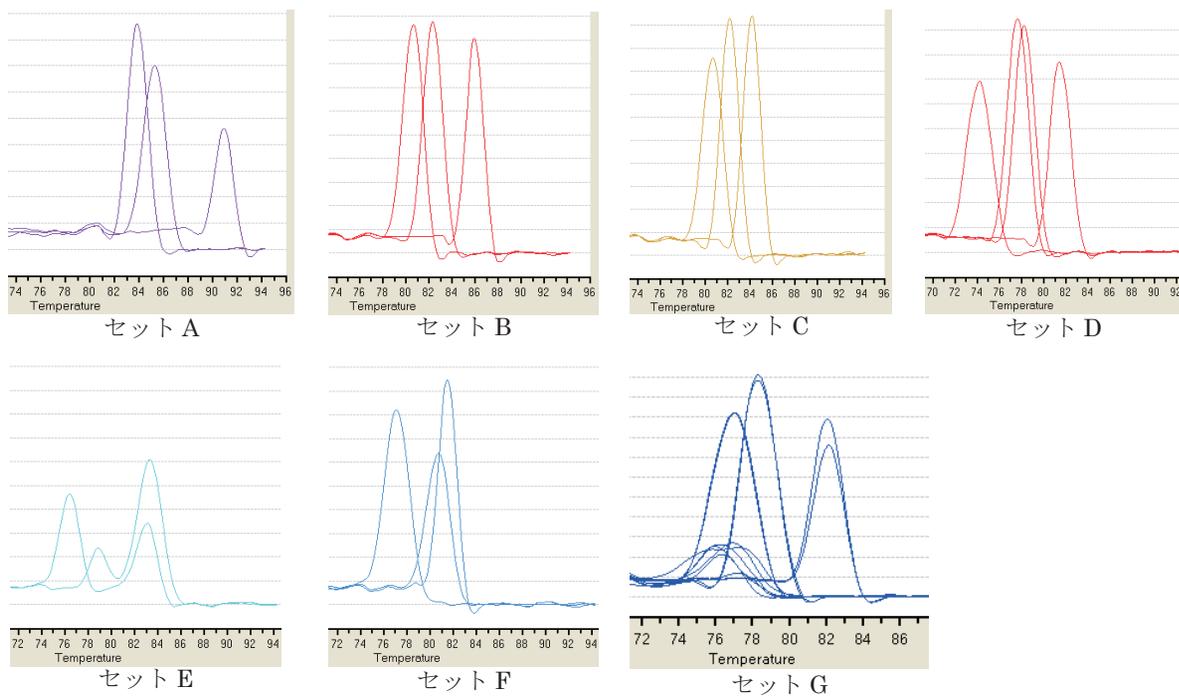


図1 各セットの融解曲線分析結果

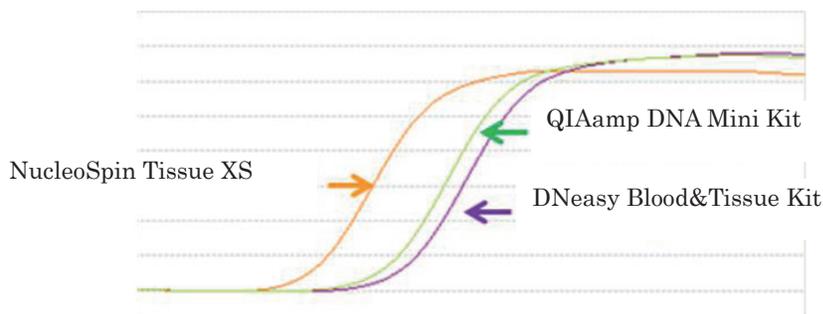


図2 DNA抽出キットの抽出率比較 (*invA* 遺伝子)

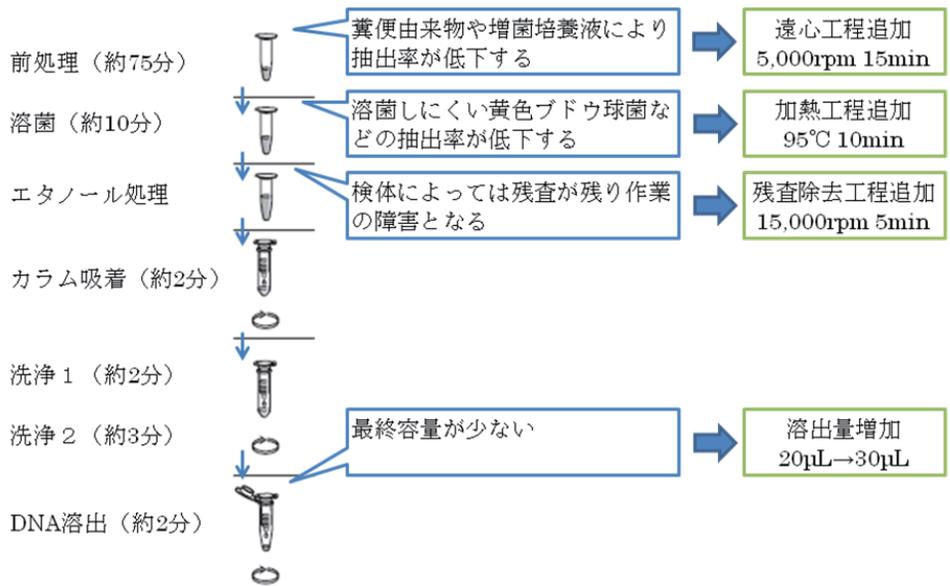


図3 DNA抽出キットの手順改善内容

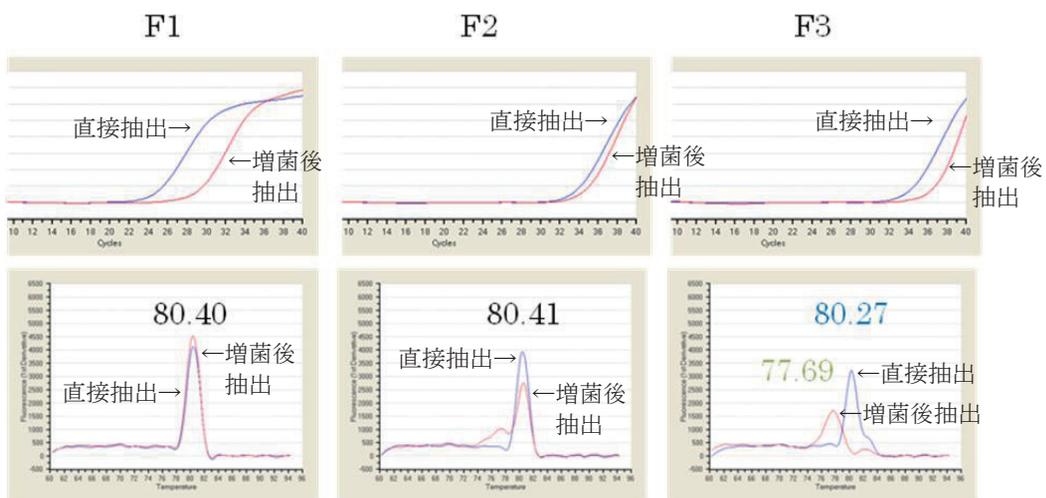


図4 事例1 2011年6月 (カンピロバクター検出事例)

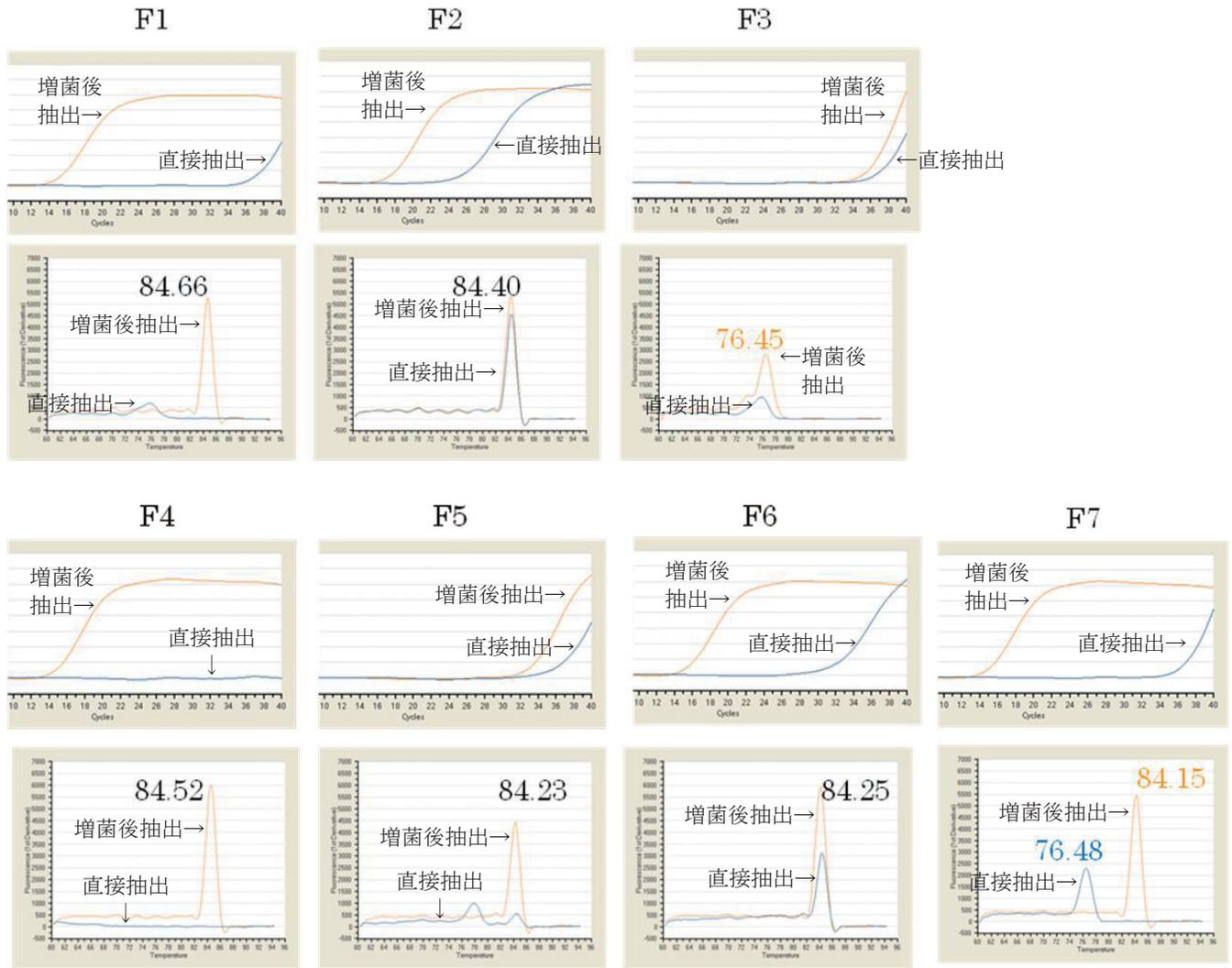


図5 事例2 2012年5月(サルモネラ属菌検出事例)

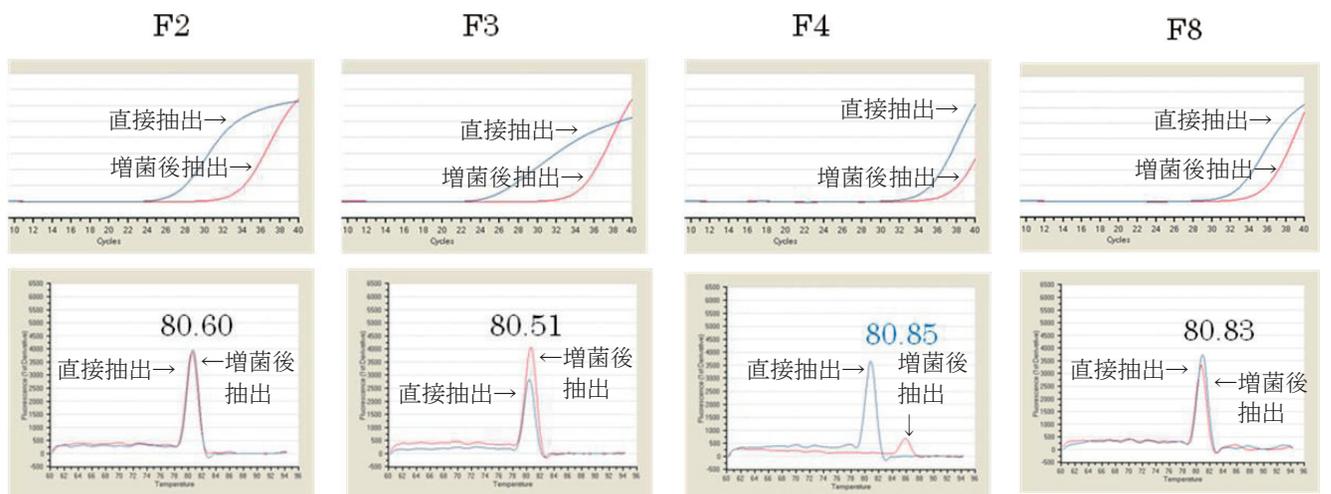


図6 事例3 2012年7月(カンピロバクター検出事例)