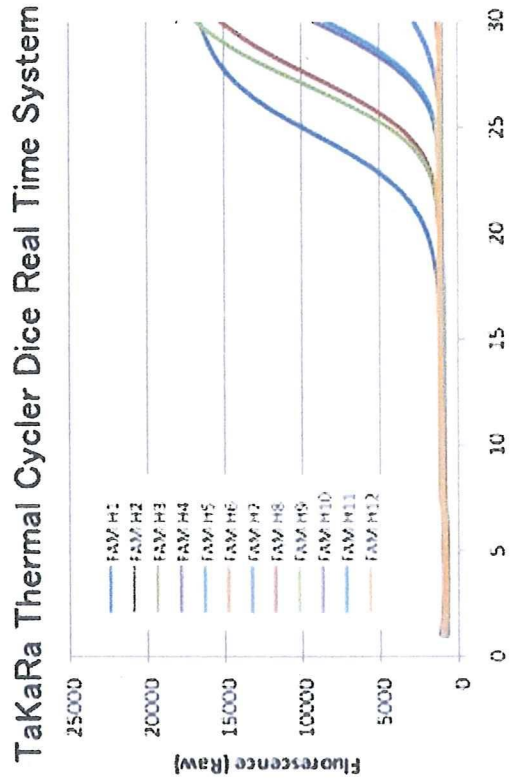
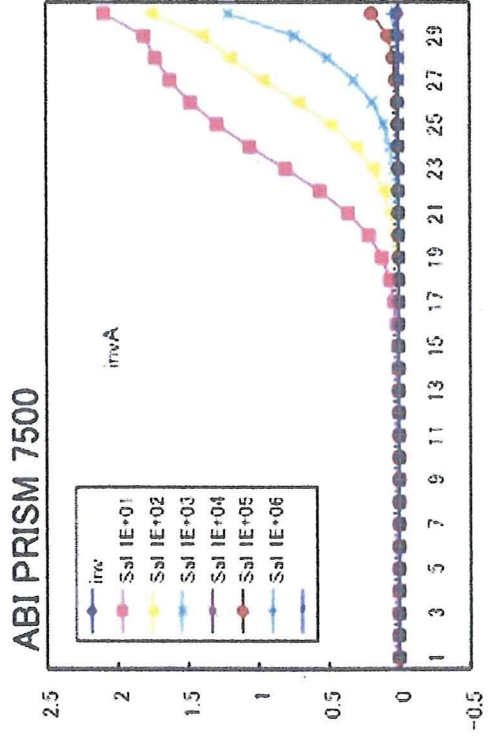
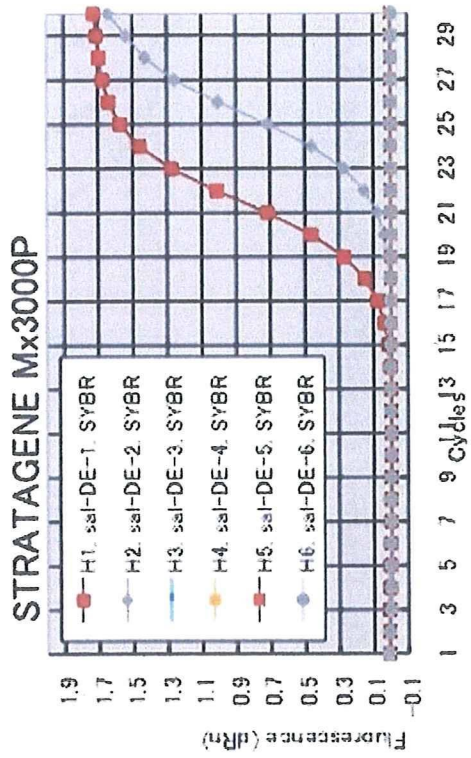
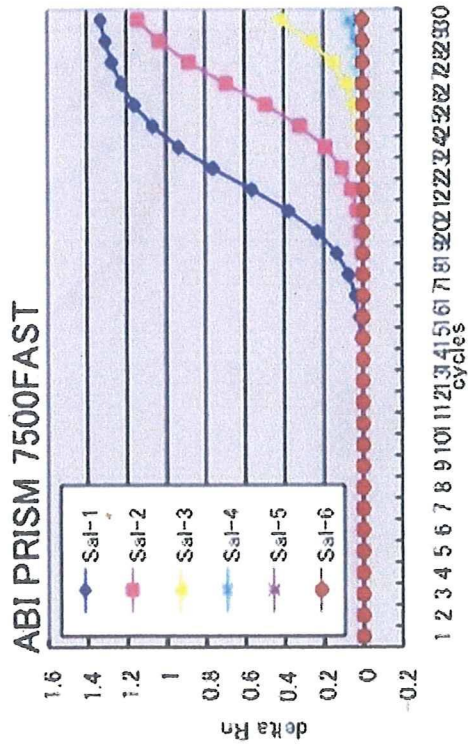


2-8 *Salmonella* spp.



地域における健康危機に対応するための地方衛生研究所機能強化に関する研究
— Multiplex リアルタイム SYBR Green PCR 法による食中毒菌の一斉スクリーニング法の検討 —

分担研究者 長井忠則 北海道立衛生研究所

要旨 食中毒の急性期患者7名の糞便からDNAを抽出し、96ウェルPCRプレートを用いたインターナルコントロールを含むmultiplexリアルタイムSYBR Green PCR法による検査で23種類の食中毒菌(腸管侵入性大腸菌と腸管病原性大腸菌、腸管出血性大腸菌、腸管毒素原生大腸菌、腸管凝集接着性大腸菌、分散接着性大腸菌、*Shigella* spp.、*Salmonella* spp.、*Yersinia enterocolitica*、*Y. pseudotuberculosis*、*Providencia alcalifaciens*、*Plesiomonas shigelloides*、*Campylobacter jejuni*、*C. coli*、*Vibrio cholerae*、TDH産生*V. parahaemolyticus*、TRH産生*V. parahaemolyticus*、*Aeromonas hydrophila*、*Staphylococcus aureus*、嘔吐毒産生*Bacillus cereus*、下痢毒産生*B. cereus*、*Clostridium perfringens*、*Listeria monocytogenes*)の24標的遺伝子を3時間以内に一齐に検出できる迅速スクリーニング法を確立した。過去の食中毒事例の患者糞便DNA試料を用いた検査で、食中毒の原因菌を網羅的かつ迅速に検出した。本法による急性期糞便からの食中毒菌の標的遺伝子の迅速な増幅と特異遺伝子の確実な検出は効率的かつ確実な細菌分離と食中毒の迅速診断を可能にすることが示唆された。

研究協力者

福島 博 島根県保健環境科学研究所
保健科学部長

A. 研究目的

近年、分子生物学の発展にともない、多くの疾病の迅速診断に遺伝子検査法が用いられるようになってきたが、細菌性食中毒発生時の原因菌検索には、ほとんどの検査室で未だ多くの種類の分離培地や増菌培地を用いた数日間にも及ぶ煩雑な分離、同定作業が行われている。遺伝子検査法のうちPCRは感度や特異性が高いという点から細菌性食中毒の補助的な検査に使用されるようになってきた。しかしながら、これまでのPCRは、反応を行った後にゲル電気泳動で遺伝子増幅産物を検出することを必要とし、迅速性および操作上の煩雑さという点で問題がある。これに対して、最近、迅速検査法として使用されるようになってきたリアルタイムPCRは、遺伝子増幅装置と蛍光検出器が一体化されコンピューターで制

御できる装置を使用する。リアルタイムPCRではDNAに結合するSYBR Green Iなどの蛍光物質あるいはTaqManプローブなどの蛍光標識プローブを用いることで標的遺伝子の増幅とPCR産物の量を反応中または終了後直ちにコンピューターで観察でき、ゲル電気泳動による遺伝子増幅産物の検出を必要としない。また、SYBR Green Iを用いたリアルタイムSYBR Green PCR(SG-PCR)では反応終了後に増幅産物の融解曲線を分析して、その融解温度(melting temperature: T_m)を計測することにより、増幅産物の特異性を確認することができる。

我々はLight Cyclerを用いたduplexリアルタイムSG-PCRで食中毒急性期患者の糞便5検体から食中毒菌の8種類の標的遺伝子を2時間以内に検出する迅速スクリーニング法を報告したが^{1, 2, 3)}、他の十数種類にも及ぶ食中毒菌の標的遺伝子のスクリーニングには更に2回の検査を必要とする。そこで、96ウェルPCRプレートを用いたmultiplexリアルタイムPCRで二十数種類の食中毒菌を一斉に検査することが可能であれば、リ

リアルタイム PCR は食中毒菌のスクリーニング法として極めて有用でかつ経済的な手段となることから、multiplex リアルタイム PCR による一斉検査法の開発が求められている⁴⁾。

本研究では PCR の正常な増幅の確認と偽陰性判定を防止するための internal amplification control (IAC)を含む multiplex リアルタイム SYBR Green PCR を 96 ウェル PCR プレートを用い行うことにより、食中毒菌の 24 標的遺伝子を 3 時間以内に一斉に検出できる迅速スクリーニング法を検討したので報告する。

B. 研究方法

B.1 使用菌株

本研究に使用した20種類の食中毒菌は大腸菌(腸管侵入性大腸菌[EIEC](菌株番号 EA32)と腸管出血性大腸菌[EHEC](SE-02027)、腸管毒素原性大腸菌[ETEC](EC-3515)、腸管凝集接着性大腸菌[EAEC](EC-4131)、分散接着性大腸菌[DAEC](KI2214))と赤痢菌(I00031)、*Salmonella* Enteritidis (Sal-2339)、*Yersinia enterocolitica* (Pa-241)、*Providencia alcalifaciens* (NIID124)、*Plesiomonas shigelloides* (NIID123)、*Campylobacter jejuni* (SC-009)、*C. coli* (SC-01)、*Vibrio cholerae* (ATCC14035)、TDH 産生 *V. parahaemolyticus* (SVP-02)、TRH 産生 *V. parahaemolyticus* (NIIDK4d)、*Aeromonas hydrophila* (ATCC7966)、*Staphylococcus aureus* (SS-05)、嘔吐毒産生 *Bacillus cereus* (No.127)、下痢毒産生 *B. cereus* (No.1)、*Clostridium perfringens* (H2) と *Listeria monocytogenes* serotype 4b (Scott A) である(表1)。培養菌から抽出したDNAをプライマーの特異性試験に使用した。各菌の培養法と菌数計算法は既に報告した方法で行った。

B.2 インターナル・アンプリフィケーション・コントロール (internal amplification control : IAC)

IACとして *Yersinia ruckeri* (JCM15110) から抽出した少量のDNAを用いた。*Y. ruckeri* はニジマスの“red mouth disease”の病原体であり、ヒトの糞便や食品には分布していない。*Y. ruckeri* をブレン・ハート・インフィージョンブローに30℃、48時間培養しDNAを抽出し、IACとして用いた。

B.3 DNAの抽出

食中毒菌の培養液 1 mL を 12,000×g、3 分間遠心し得られた沈渣を滅菌蒸留水 1 mL で洗浄・遠心後、滅菌蒸留水 1 mL に浮遊し菌液を作製した。食中毒菌を $10^7 \sim 10^9$ cfu/mL 含む菌液の 200 μL を QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen) で処理しDNAを抽出し、-20℃に保存した。PCRには 2 μL のDNA試料を使用した。食中毒急性期患者糞便は無菌的に 1 g 秤

量し、滅菌チューブに入れ滅菌蒸留水 9 mL と懸濁し、その 200 μL を QIAamp DNA Stool Mini kit で処理し 1 時間以内にDNAを抽出した。

B.4 プライマー

本研究に用いた24種類の標的遺伝子検出用プライマーおよび2種類のIAC検出用プライマーを表2に示した。食中毒菌検出用プライマーのうち大腸菌(EIEC、EPEC、EHEC、ETECとEAEC)と *Shigella* spp.、*Salmonella* spp.、*Y. enterocolitica*、*Y. pseudotuberculosis*、*P. alcalifaciens*、*C. jejuni*、*C. coli*、*V. cholerae*、TRH産生 *V. parahaemolyticus*、*A. hydrophila*、*S. aureus*、*B. cereus* (嘔吐毒産生および下痢毒産生菌)、*C. perfringens*、*L. monocytogenes* などの15菌種、20種類の食中毒菌を対象とした21種類の検出プライマーは既に論文に記載され、特異性と感度が確認されたものを使用した。TDH産生 *V. parahaemolyticus*、病原性 *Yersinia*、*P. shigelloides*、*Shigella* (EIEC) と DAEC の検出プライマー、tdh、yadA、PAG、ipaH と daaD の設計は Biosearch Technologies Japan Inc. (東京) に依頼した。TDH産生 *V. parahaemolyticus* の tdh 遺伝子、病原性 *Yersinia* の yadA 遺伝子、*P. shigelloides* の gyrB 遺伝子、*Shigella* および EIEC の ipaH 遺伝子と DAEC の daaD 遺伝子に特異性を有する領域は GenBank 内の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用い検索し設計された。

IACとして用いた *Y. ruckeri* の 16S rRNA 遺伝子を増幅するIAC検出用プライマーとして、Lundら²¹⁾ が報告した T_m 値が 77.3℃ の yers (yersF1 と yersR1) と新たに Biosearch Technologies Japan Inc. (東京) に設計依頼した PCR 増幅産物の T_m 値が 86℃ の yersH2 (yersH2-F と yersH2-R) の 2 種類のプライマーペアを使用した。IAC プライマー yersH2 は PCR 産物の T_m 値が 83℃ 以下を示す 15 種類の標的遺伝子を検出するためのプライマーセット A~E と共に使用し、IAC の濃度は増幅曲線と Threshold line との交点のサイクル数 (Ct) がほぼ 27 サイクルになる濃度 (1.5×10^3 CFU/ml) とした。IAC プライマー yers は PCR 産物の T_m 値が 80℃ 以上を示すプライマーセット F、G と H と共に使用し、IAC の濃度は 3×10^2 CFU/ml とした(表2参照)。

B.5 リアルタイム SG-PCR

表3 リアルタイムSG-PCR反応試薬の内訳

| 試薬 | 1反応当たりの使用量(μL) |
|----------------------------|----------------|
| SYBR DimerEraser (2×) | 10 |
| ROX Reference Dye II (50×) | 0.4 |
| dH ₂ O (滅菌蒸留水) | 0.8 |
| 混合プライマー | 4.8 |
| プライマー 1 Forward (10μM) | (0.6) |
| Reverse (10μM) | (0.6) |
| プライマー 2 Forward (10μM) | (0.6) |
| Reverse (10μM) | (0.6) |
| プライマー 3 Forward (10μM) | (0.6) |
| Reverse (10μM) | (0.6) |
| IACプライマー Forward (10μM) | (0.6) |
| Reverse (10μM) | (0.6) |
| IACの鋳型DNA | 2 |
| サンプルの鋳型DNA | 2 |
| 計 | 20 |

表4 リアルタイムPCRのサイクル条件

| 条件 | 初期変成 (1サイクル) | PCR反応 (30サイクル) | | | 融解曲線分析 (1サイクル) |
|----|-----------------|----------------|------------|-----|-------------------|
| | | 熱変性 | アニー リング | 伸長 | |
| 温度 | 95℃ | 95℃ | 55℃ | 72℃ | 95℃ 60℃ 95℃ |
| 時間 | 30秒 | 5秒 | 34秒 | 34秒 | 15秒 1分 15秒 |

リアルタイムSG-PCRはApplied Biosystems 7500 Real Time PCR system (ABI7500)を使用し、その反応試薬にはSYBR Premix DimerEraser™(タカラバイオ)を用いた。試薬の調製およびリアルタイムPCR法のプロトコールはSYBR DimerEraser™の添付説明書の記載に準じた(表3、4)。反応は2時間以内に終了し、PCRの特異性は増幅産物の融解曲線を分析しその T_m を決定することにより確認した。

B. 6 食中毒検査のためのMultiplexリアルタイムSG-PCR

ABI 7500 に装着する 96 ウェル PCR プレート (12 ウェル×8 行) の各行をプライマーセット 1~8 の反応に用いた。各行の 1 列目は陰性コントロール、2 列目は IAC、3~5 列目は IAC と陽性コントロール、6~12 列目の 7 ウェルには IAC と検体に用いた。試薬は分注によるロスを考慮し、反応系ごとに 12.5 検体分の反応液 (SYBR DimerEraser とプライマー、ROX Reference Dye II、滅菌蒸留水) で調製した。1 列目には反応液 16 μL を分注し、残りの反応液に IAC 23 μL (2 μL×11.5 検体) を加え軽く混和し、その 18 μL ずつを 2~12 列目の 11 ウェルに分注した。次いで、1 列目に滅菌蒸留水を 4 μL、2 列目に滅菌蒸留水を 2

μL、3~5 列目に各陽性コントロールを 2 μL、6~12 列目に検体 2 μL を注ぎ、シールを貼りスピンドウンし反応に供した。ABI 7500 による食中毒の急性期患者 7 名の糞便からの食中毒菌の 24 種類の標的遺伝子の検出のための multiplex リアルタイム SG-PCR 反応は 2 時間以内に終了した。反応後に PCR 産物の融解曲線分析を行い、陽性コントロールと IAC のそれぞれ融解曲線が異なる T_m 値を示すことを確認した後、検体の T_m 値を陽性コントロールの T_m 値と比較し検体中の PCR 産物が同一であることを判定した。

2005 年と 2006 年に島根県で発生した食中毒 7 事例の患者糞便から抽出し、-20℃に保管されていた DNA サンプルについて ABI 7500 を用いた Multiplex リアルタイム SG-PCR を行った。

C. 研究結果

C. 1 リアルタイム SG-PCR の感度と特異性

リアルタイム SG-PCR の感度は QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen) で糞便材料から DNA を抽出した場合は、反応チューブ 20 μL 中の濃度は 4 万倍に希釈されるため $10^3 \sim 10^5$ CFU/g であった。各プライマーによる PCR 増幅産物の融解曲線分析による T_m 値を表 1 に、各プライマーの特異性を表 2 に示した。

C. 2 IACを含む8組のmultiplex リアルタイムSG-PCR

16 菌種 23 種類の食中毒菌の 24 標的遺伝子を一度に網羅的かつ迅速に検出し、PCR 反応阻害などによる偽陰性判定を防ぐための汎用 IAC を含む multiplex リアルタイム SG-PCR を考案した。患者糞便 7 検体について 96 ウェル PCR プレートの各行で 3 種類ずつの食中毒菌を検出する 8 組のプライマーセットを考案した。汎用 IAC には *Y. ruckeri* を用い、その 16S rRNA を標的とした PCR 増幅産物の T_m 値が 77℃ と 86℃ と異なるように設計した 2 種類のプライマーを準備し、IAC と 3 種類の食中毒菌の PCR 増幅産物の T_m 値を識別できるように組み合わせた。なお、プライマーの組み合わせは標的遺伝子が複数の菌種や菌型に保有されている *ipaH* (*Shigella* spp. と EIEC)、*eaeA* (EPEC と EHEC)、*astA* (EAEC と ETEC、EPEC)、*yadA* (*Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis*)、*nheB* (*B. cereus* の嘔吐型と下痢型) や複数の標的遺伝子を保有する EHEC と EAEC、ETEC など を考慮し 組み合わせた (表 1)。8 組のプライマーセットには 8 主要食中毒菌 (TDH 産生 *V. parahaemolyticus* と *C. perfringens*、*S. enterica*、*C. jejuni*、*S. aureus*、嘔吐型 *B. cereus*、EHEC、*astA* 陽性 *E. coli*) のうち 1 菌種を検出するプライマーと他の 16 種類の食中毒菌検出プライマーのうち

の T_m 値が異なる2プライマーおよびIACプライマーを組み合わせた。これら3種類の食中毒菌の増幅産物の T_m 値が83°C以下のプライマーセットA～EにはIACプライマーyersH2、80°C以上のプライマーセットF～HにはIACプライマーyersを用いた。 T_m 値の間隔は3種類の食中毒菌検出用プライマー間では0.7～6.1°C、食中毒菌とIAC検出プライマー間では3.2～3.7°Cになるようにプライマーを選定し組み合わせた。図1に各プライマーセットによる食中毒菌(10⁷CFU)とIAC(10²または10³CFU)のmultiplex SG-PCRの増殖曲線と融解曲線分析を示した。

C. 3 Multiplex リアルタイムSG-PCRを用いた網羅的検索法の有用性の検証

県内で発生した食中毒7事例の患者糞便について、multiplexリアルタイムPCRを用い食中毒菌の24種類の標的遺伝子の網羅的検索を試み、迅速な原因菌の推定と混合感染の探知が可能であることが検証された。以下に結果を記載する。

a) 事例1： 2005年10月に発生し、患者糞便16検体のうち1検体から*C. jejuni*が分離されたが、原因が不明であった事例について、冷凍保存されていた患者糞便DNA 6検体について検査した。その結果、6検体から*astA*が検出され、内2検体からは*aggR*も検出された。本事例は*C. jejuni*による散発事例を含むEAECまたは*astA*陽性*E. coli*による食中毒か感染症であったことが示唆された(図2)。

b) 事例2： 2006年5月に発生し、培養法により患者糞便8検体のうち4検体から*S. aureus*が少量

(10³cfu/g)ずつ分離された事例について、冷凍保存されていた患者糞便DNA 5検体について検査した。その結果、1検体から*S. aureus*の*femB*が低濃度で検出され、他の1検体からは*astA*が検出された(図3)。

c) 事例3： 2006年7月に食中毒発生後数時間以内に採取された患者便50検体のうち19検体から*C. perfringens*が分離された事例について、冷凍保存されていた急性期患者便7検体について検査した。図4に示すように7検体全てから*cpe*が検出され、*C. perfringens*による食中毒であったことが確認されたが、3検体から*C. jejuni*の種特異遺伝子が低濃度ではあるが検出され、潜伏期が長く*C. perfringens*による症状が発現する時期には、まだ発症に必要な菌量に達しないと思われる*C. jejuni*にも感染していた可能性が示唆された。

d) 事例4： 2006年8月に培養検査により4検体のうち2検体から少量(10³cfu/g)の*B. cereus*が分離された事例について、冷凍保存されていた患者糞便DNA 4検体について検査した(図5)。*B. cereus*が分離された検体のうち1検体から*ces*と

*nheB*が検出され、嘔吐毒産生*B. cereus*による食中毒と確認された。他の2検体からはそれぞれ*astA*と*aggR*が検出されたが、EAECが本事例の原因となったかは明らかでない。

e) 事例5： 2006年9月に発生し、病院等の検査で*V. parahaemolyticus*が分離された事例で、発生3日後の検査で6名中3名からTDH産生のO1:K25が分離された。冷凍保存されていた患者糞便DNA 6検体をリアルタイムPCRで検索した結果、培養陽性患者3名から*tdh*が検出され、そのうち1名と他の1名から*C. jejuni*の種特異遺伝子、他の1名からは*st*が検出され、本事例ではTDH産生*V. parahaemolyticus*だけでなく、*C. jejuni*やETECにも感染していた可能性が示唆された(図6)。

f) 事例6： 2006年10月に発生し、duplexリアルタイムPCRで患者糞便5検体のうち2検体ずつから*P. shigelloides*の*gyrB*またはEPECの*eaeA*が低濃度で検出され、2検体から*P. shigelloides*が分離された事例について、冷凍保存されていた患者糞便DNA 5検体について検査したところ、2検体から*gyrB*または1検体から*eaeA*が検出された(図7)。

g) 事例7： 2006年11月に発生し、患者糞便7検体のうち4検体から*C. jejuni*、1検体から*astA*陽性*E. coli*が分離された事例について、冷凍保存されていた患者糞便DNA 7検体について検査した結果、*C. jejuni*の種特異遺伝子が4検体から、*astA*が1検体から検出された(図8)。

D. 考察

細菌性食中毒の原因菌検索に要する長時間にわたる煩雑な分離・同定作業の軽減と食中毒の迅速な診断を目的とし、患者糞便から原因菌の標的遺伝子をリアルタイムPCRで検索し、原因菌を推定する方法が報告されている。

リアルタイムPCRはPCRの増幅産物量に比例した蛍光強度を測定することにより、標的遺伝子を検出するものであるが、その方法の主なものとして、PCRによって増幅された2本鎖DNAへのSYBR Green I色素の結合により標的遺伝子を検出するインターカレーター法と蛍光標識プローブを用い標的遺伝子を検出するTaqManプローブ法の2種類が広く利用されている。

インターカレーター法は特異的プローブを使用するTaqManプローブ法に比較し、原理的には特異性が劣っており、糞便から食中毒菌を確実に検出するにはTaqManプローブ法が有用と考えられ、これまでにTaqManプローブ法を用いた主要食中毒菌4菌種²²⁾または7菌種²³⁾の迅速スクリーニング法が報告されているが、高価なプローブを多用するmultiplex PCRを用いた網羅的スクリーニング法は

報告されていない。

インターカレーター法の SG-PCR では増幅産物の特異性の確認に融解曲線分析で得られる増幅産物の T_m 値が用いられる。一反応系に T_m 値の異なる複数のプライマーを組み合わせることにより安価な蛍光物質である SYBR Green を用いた multiplex PCR が可能となり、大腸菌の病原因子の特定のために 8 種類のプライマーを組合せた multiplex SG-PCR も報告されている²⁴⁾。

我々は Light Cycler を用いた duplex リアルタイム SG-PCR で食中毒急性期患者の糞便 5 検体から食中毒菌 8 菌種の標的遺伝子を 2 時間以内に検出する迅速スクリーニング法を報告した^{12,3)}。本法を食中毒検査に試験的に導入し良好な成績を得ているが、主要食中毒菌 8 菌種以外の稀少菌種による感染の有無を検索し、最終的に原因菌を特定するには 3 回の PCR 検査を必要とし、より迅速で網羅的なスクリーニング法が求められた。そこで、本研究では ABI7500 などを使用される 96 ウェル PCR プレートの各行で IAC と 3 種類の食中毒菌の標的遺伝子を検索する 8 反応系からなる multiplex リアルタイム SG-PCR を用い、24 種類の食中毒菌標的遺伝子を一斉にスクリーニングする方法を検討した。本研究で使用したプライマーの多くはその感度と特異性が確認されたものを文献から選択し使用した。Multiplex リアルタイム SG-PCR の 8 種類のプライマーセットの組合せは、各プライマーセットに主要食中毒菌 8 菌種のうちの 1 菌種とその他の稀少菌種を検出するプライマーをセットし、セット内の 3 種類のプライマーの標的遺伝子が重複せず、その増幅産物の T_m 値が 1°C 以上離れており、PCR 検査終了後の融解曲線分析で T_m 値が容易に識別できるものを選択した。

PCR 検査のリスクの一つとして PCR 反応阻害物質による偽陰性の出現が指摘されている^{25,26)}。一般に、試薬の正常な反応を確認するために陽性および陰性コントロールが用いられるが、仮に試料中に PCR 反応阻害物質が存在した場合には、標的遺伝子の増幅が妨げられ偽陰性となるために、正常な増幅の確認と偽陰性判定を防止するためにそれぞれの反応液中に IAC が存在することが不可欠である。IAC には標的遺伝子と同じプライマー結合部位を有する competitive IAC と標的遺伝子とプライマー結合部位を共有しない noncompetitive IAC の 2 種類に分けられる²⁵⁾。前者は単一の標的遺伝子の検出に広く用いられている。これまでに報告された IAC のほとんどは competitive IAC であったが、近年、腸炎ビブリオの 4 種類の遺伝子を標的とする multiplex TaqMan

PCR のために合成された noncompetitive IAC が報告された²⁷⁾。その他に、noncompetitive IAC としてニジマスの“red mouth disease”の病原体でヒトの糞便や食品には分布していない *Y. ruckeri* の 16S rRNA やウイルス²⁸⁾、植物²⁹⁾の遺伝子などが報告されている。本研究では IAC として *Y. ruckeri* の 16S rRNA を使用し、その検出プライマーとして 24 種類の食中毒菌検出プライマーと一緒に汎用できる増幅産物の T_m 値が約 10°C 異なる 2 種類の IAC プライマーを使用した。

リアルタイム SG-PCR の検出限界は既に報告したように、QIAamp DNA Stool Mini Kit により患者糞便から抽出した DNA を用いた場合は、反応チューブ内の DNA 量は糞便 1 グラム当たりの四万分の一となり、検出感度は $10^3 \sim 10^5$ cfu/g となる。一般に、食中毒患者の急性期の糞便には 10^6 cfu/g 以上の原因菌が排菌されることから³⁾、急性期患者の糞便が入手できれば、3 時間以内に原因菌を推定することが可能となる。

本検査セットの有用性を検証するに足る食中毒の発生が本研究中になかったため、これまでに県内で発生した食中毒 7 事例の患者便から抽出し冷凍保存されていた DNA 試料を用い、網羅的スクリーニング法の有用性を検証した。その結果、リアルタイム SG-PCR は 2 時間以内に終了し、全ての事例で複数の検体から食中毒原因菌の標的遺伝子が検出された。糞便からの DNA の抽出に要する 1 時間を加味すれば、検体搬入から約 3 時間で稀少菌種を含めたほとんどの食中毒菌をスクリーニングし、原因菌を確実に推定することが可能になる。事例 1 は *C. jejuni* が患者 1 名から検出されただけで、原因不明の事例であったが、本検査により *astA* が全員から検出され、*astA* 陽性 *E. coli* が原因菌であったことが示唆された。なお、本事例をはじめ多くの事例で通常の分離培養では分離が困難な病原性大腸菌の特異遺伝子が一部の患者から検出された。また、事例 3 と 5 では主な原因菌として *C. perfringens* または TDH 産生 *V. parahaemolyticus* が分離されたが、これらの原因菌による感染初期に採取された糞便から潜伏期間が長い *C. jejuni* の種特異遺伝子が低濃度に検出された。これらのシグナルがどのような現象を示唆しているかを明らかにできなかったが、本法による網羅的迅速スクリーニングが培養検査に先行して実施されれば、混合感染や腸管内における生態がほとんど明らかにされていない病原性大腸菌に関する貴重な情報が得られ、当該菌に適した増菌培養や選択分離培養が的確に実施できるであろう。

リアルタイム PCR は食中毒の原因菌と感染者を迅速に推定し、その後の的確な培養検査と疫学調

査および再発防止のための適切な衛生指導等に役立てるために検討されてきたが、本研究で開発した96ウェルPCRプレートを用いた24種類の食中毒菌標的遺伝子を検索するmultiplexリアルタイムPCRは食中毒菌の網羅的迅速スクリーニング法として極めて有用かつ経済的な手段となろう。

E. 結論

食中毒の急性期患者7名の糞便からDNAを抽出し、96ウェルPCRプレートを用いたインターナショナルコントロールを含むmultiplexリアルタイムSYBR Green PCR法による検査で食中毒菌の24標的遺伝子を3時間以内に一齐に検査できる迅速スクリーニング法を確立した。過去の食中毒事例の患者糞便DNA試料を用いた検証試験で、食中毒の原因菌を網羅的かつ迅速に検出した。本法による急性期糞便からの食中毒菌の標的遺伝子の迅速な増幅と特異遺伝子の確実な検出は効率のよいかつ確実な細菌分離と食中毒の迅速診断を可能にすることが示唆された。

F. 研究発表

論文発表

○Fukushima, H., Katsube, K., Tsunomori, Y., Kishi, R., Atsuta, J. and Akiba, Y.: "Comprehensive and Rapid Real-Time PCR Analysis of 21 Food-borne Outbreaks.", *Int. J. Microbiol.*, epub article ID917623, 2009,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2775201/pdf/IJMB2009-917623.pdf>.

○Fukushima, H., Kawase, J., Ehoh, Y., Sugama, K. and Yamaguchi, K.: "Simultaneous Screening of 24 Target Genes of Food-borne Bacteria in Stool Specimens Using Multiplex Real-time SYBR Green PCR Analysis", AEM投稿中.

2. 学会発表

○福島博: SYBR green リアルタイム PCR 法による食中毒21事例からの原因菌の迅速スクリーニング, 第29回日本食品微生物学会学術総会, 広島, NOV 2008.

○福島博: Multiplex Real-time SYBR Green PCRによる食中毒原因菌24標的遺伝子の同時スクリーニング法の開発, 第30回日本食品微生物学会学術総会, 東京, NOV 2009.

○福島博: Multiplex Real-time SYBR Green PCRによる食中毒原因菌24標的遺伝子の同時スクリーニング法の開発, 平成21年度日本獣医公衆衛生学会, 宮崎, JAN 2010.

○福島博: Multiplex Real-time SYBR Green PCRによる食中毒原因菌24標的遺伝子の同時スクリーニ

ング法の開発, 第84回日本感染症学会総会, 京都, APR 2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況
特許出願中

H. 文献

1. 福島博ほか: 感染症学雑誌, 79, 644 (2005).
2. Fukushima, H. et al.: *J Clin. Microbiol.*, 41, 134 (2003).
3. Fukushima, H. et al.: *Int. J. Microbiol.*, Article ID 917623, 13 (2009), <http://www.hindawi.com/journals/ijmb/aip.917623.htm>.
4. Abubakar et al.: *Health Technol. Assess.*, 11, 1. (2007).
5. 加藤ほか: 感染症学雑誌, 67, 724 (1993).
6. Jothikuman, N. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3169 (2002).
7. Price, E. P. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 7793 (2006).
8. Nogva, H.K. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4029 (2000).
9. 西淵ほか: 日本臨床, 50, 348 (1992).
10. Hough, A. J. et al.: *J. Food Prot.*, 65, 1329 (2002).
11. Furrer B. et al.: *Lett Appl Microbiol.*, 10, 31 (1990).
12. Franck, S. M. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 36, 1795 (1998).
13. Nielsen, E.M. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 41:2884 (2003).
14. Gubala, A. J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 6424 (2006).
15. Ratchtrachenchai, O. A., et al.: *Bull. Dept. Med. Sci.*, 39, 211 (1997).
16. Klotz, K. et al.: *J Clin Microbiol.* 41, 4683 (2003).
17. Yatsuyanagi, J et al.: *J Clin Microbiol.*, 40:294 (2002).
18. Wang, G. et al.: *J Clin Microbiol.*, 41, 1048 (2003).
19. Yang I-C. et al.: *J. Food Prot.*, 70, 2774 (2007).
20. Fey, A. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 3618 (2004).
21. Lund, M. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 42, 5125 (2004).
22. Iijima, Y. et al.: *J Med Microbiol.*, 53, 617 (2004).
23. 児玉ほか: 北陸公衛誌, 34, 65 (2008).
24. Guion, C. E. et al.: *J Clin. Microbiol.*, 46, 1752 (2008).
25. Hoorfar, J. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 42, 1863 (2004).
26. Wilson, I. G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3741.
27. Nordstrom, J. L. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*,

- 73, 5840 (2007).
28. Lubeck, P. S. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 5664 (2003).
29. Cheng, Y. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 44, 3557 (2006).

表2 Multiplex SYBR Green PCRに使用したプライマーとプライマーセット

| ト セ ツ | 菌種 | 標的遺伝子 | プライマー名 | プライマーの塩基配列 | Gene Bank accession no. | 領域 | 増幅産物の 大きさ (bp) | T_m^a | 文献 | |
|--------------|---|--------------|---------------------|----------------------------------|----------------------------|---------------|-------------------|-----------|-----|--|
| A | * Clostridium perfringens | cpe | GAP-11 | GGTTCAITTAATGAAACTGGTG | X81849 | 583-604 | 154 | 75.8±0.37 | 5 | |
| | | | GAP-12 | AACGCCAATCATATAAATACAGC | | 712-736 | | | | |
| | | | gypB | TCTGCACGGTGGGTGGT | AJ300547 | 38-56 | 73 | 79.5±0.79 | 1 | |
| EHEC (Stx 2) | Stx2 | PAG110-R | ACCGTCACGGCGGATTAAT | | 110-92 | | | | | |
| | | JMS2-F | CGACCCCTTTGAACATA | EF441616 | 140-157 | 108 | 80.5±0.76 | 6 | | |
| B | Campylobacter coli | ceuE | JMS2-R | GATAGACATCAAGCCCTCGT | | 228-247 | | | | |
| | | | ceuE-For | CAAGTACTGCAATAAAAACACTAGCACTACG | X88849 | 2777-2805 | 72 | 73.7±0.43 | 7 | |
| B | Campylobacter jejuni | specific DNA | ceuE-Rev | AGCTATCACCCCTCATCACTCACTAATAATAG | | 2848-2819 | | | | |
| | | | AB-F | CTGAATTTGATACCTTAAGTGCAGC | AL111168 | 381121-381135 | 86 | 77.7±0.96 | 8 | |
| C | TRH陽性 Vibrio parahaemolyticus | trh | AB-R | AGGCACGCCATAAACCTATAGCT | | 381185-381206 | | | | |
| | | | trh2.50-F | GGCTCAAAAATGGTTAAAGC | AY742213 | 705-687 | 250 | 79.6±0.21 | 9 | |
| C | * 嘔吐毒産生 Bacillus cereus | hly | trh2.50-R | CATTTCCGCTCCTATATGC | | 456-474 | | | | |
| | | | Lm-bly-F | GGGAAATCTGTCAGGGTATGT | AF253320 | 973-995 | 106 | 77.4±0.78 | 10 | |
| D | EHEC and EPEC | eaeA | Lm-bly-R | CGATGATTTGAACCTTCATCTTTTCG | | 1078-1054 | | | | |
| | | | ces-TM-F | GATGTTTGGACGATGCCA | DQ360825 | 8689-8707 | 65 | 78.9±0.87 | 3 | |
| D | V. cholerae | ompW | ces-TM-R | CTTTCCGGCTGATACCCATT | | 8734-8793 | | | | |
| | | | LT-1 | TTACGGCGTTACTATCTCTCTA | X83966 | 233-255 | 275 | 80.5±0.21 | 11 | |
| E | EHEC (Stx 1) | stx1 | LT-2 | GGTCTGGTCAGATATGTGATTC | | 507-485 | | | | |
| | | | aggR | GCTAATGTGGCAATTTTATTTCTGTA | M25607 | 294-321 | 190 | 77.1±0.55 | 12 | |
| E | * Staphylococcus aureus | femB | STa-F | AGGATTACAACAAGTTTACACAGCACTAA | | 456-483 | | | | |
| | | | aggRks2 | CATTTGATCAGGATTTTCTGGTGA | Z11541 | 899-924 | 106 | 78.8±0.54 | 13 | |
| F | Yersinia enterocolitica と Y. pseudotuberculosis | yadA | eae-R | CCTATCGGAAATAGCCGTTA | | 979-1000 | | | | |
| | | | JMS1-F | AACATCCGTGGATTTGGCATCTG | X51948 | 675-692 | 89 | 81.4±0.69 | 14 | |
| G | Aeromonas hydrophila | aha1 | ompW-R | GCTGGTCTCAACGCTTCG | | 741-763 | | | | |
| | | | JMS1-R | GTATACACAAAAGAAAGAC | Z18751 | 18-38 | 254 | 79.2±0.25 | 15 | |
| H | * TDH陽性 Vibrio parahaemolyticus | tdh | aggRks1 | ACAGAACTGTCAGCATCAGC | | 170-151 | | | | |
| | | | FemB-Fw | GTCACAGTAACAAACCCGTAACA | EF441598 | 509-488 | 95 | 80.0±0.72 | 6 | |
| H | * Salmonella spp. | invA | FemB-rtv | TCGTGACTACTTCTTATCTGGA | | 415-437 | | | | |
| | | | tdh-R422 | AATTAACGAAATGGCAGAAACA | AF106850 | 277-299 | 93 | 81.6±0.62 | 16 | |
| I | Yersinia ruckeri | I6S rRNA | aggR | TGCCAACACCCCTGAACCT | | 351-370 | | | | |
| | | | tdh-F176 | TCCATCTGTCCCTTTTCTCTG | X54341 | 176-195 | 247 | 80.1±0.22 | 本研究 | |
| I | Yersinia ruckeri | I6S rRNA | tdh-R422 | AGACACCGCTGCCATTTGTAT | | 422-403 | | | | |
| | | | yadA-F1757 | ACGAGTTGACAAAGTTTAGCC | X13882 | 1757-1778 | 129 | 82.0±0.38 | 本研究 | |
| I | Yersinia ruckeri | I6S rRNA | yadA-R1885 | GAACCAACCCGTAATGCTGA | | 1885-1865 | | | | |
| | | | PSG-F64 | TTAACGCCCTGTCCGATAAG | AJ300545 | 64-83 | 250 | 86.3±0.26 | 本研究 | |
| I | * EHEC and EPEC | ipaH | PSG-R313 | TCGAGCAGATGAATCGACAC | | 313-294 | | | | |
| | | | EAST-1-S | GCCATCAACACAGTATATCC | L11241 | 63-82 | 106 | 83.7±0.88 | 17 | |
| I | Aeromonas hydrophila | aha1 | EAST-AS | GAGTGACGGCTTTGTATGTC | | 148-168 | | | | |
| | | | ipaH176-1-R | CTCTCAGAGGGTGGCTGACC | M32063 | 1672-1691 | 90 | 85.2±0.31 | 本研究 | |
| I | 下痢毒産生 B. cereus | nheB | ipaH176-1-R | TCACGCATCACTGTGCA | | 1761-1743 | | | | |
| | | | AHH1-F | GCCGAGCGCCAGAAAGGTGAGTT | CP000462 | 1653360-82 | 130 | 88.3±0.48 | 18 | |
| I | * EHEC and EPEC | stx2 | AHH1-R | GAGCGGCTGGATCGCGTTG | | 1653473-92 | | | | |
| | | | SG-F3 | GCCTTATGGCAGTATTGGCAGC | DQ153257 | 2101-2123 | 152 | 80.5±0.84 | 19 | |
| I | * Salmonella spp. | invA | SG-R3 | GCATCTTTTAAAGCCTTCTGGTC | | 2231-2252 | | | | |
| | | | invA2-F | GATCTGGTACTAATGCTGATGATC | M90846 | 1324-156 | 288 | 82.4±0.28 | 20 | |
| I | DAEC | daaD | invA2-R | GCCAGGCTATCGCAATAAC | | 419-400 | | | | |
| | | | daaD-F31 | GTCACCTGGGGATGTTACT | AF233530 | 31-50 | 233 | 88.6±0.32 | 本研究 | |
| I | Yersinia ruckeri | I6S rRNA | daaD-R263 | AGCTCATGACGACCATCCTT | | 263-244 | | | | |
| | | | yers-F | GGAGGAAGGTTAAGTGTTA | X75275 | 426-443 | 68 | 77.2±0.53 | 21 | |
| I | Yersinia ruckeri | I6S rRNA | yers-R | GAGTTAGCCGGTCTCTT | | 475-493 | | | | |
| | | | yersH2-F | GGCTCACCTAGGGCAGCA | X75275 | 245-262 | 211 | 86.1±0.53 | 本研究 | |
| I | IAC (セプト F.G.H) | IAC | yersH2-R | TCAGTCTATTAAACACTTAACCCCTTCC | | 455-429 | | | | |

* 偏差値は15~60 試験値から算出した。* 8主要食中毒菌

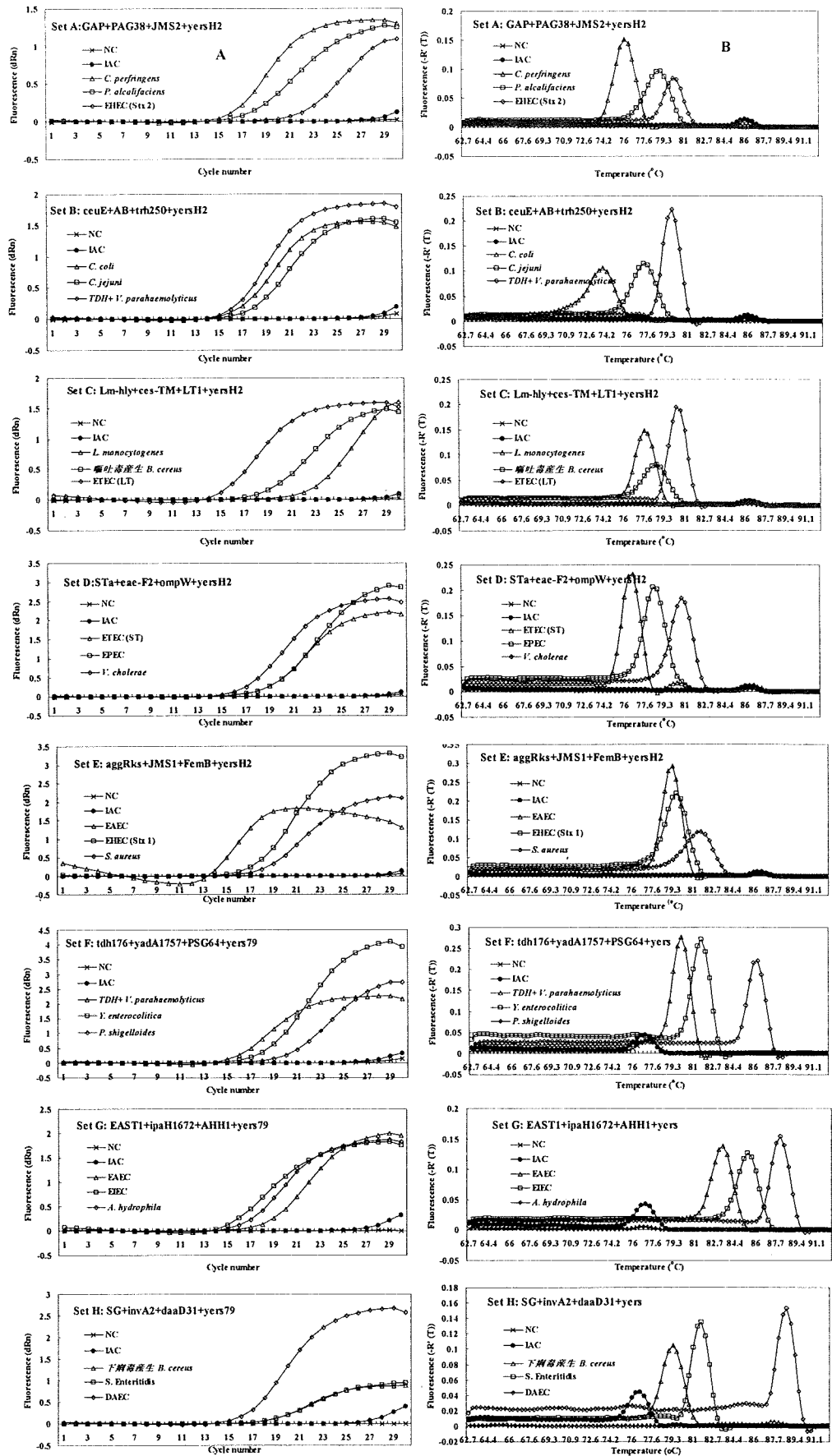


図1 ABI7500を用いたmultiplex SYBR Green PCRでのプライマーセットA~HにおけるIACと食中毒菌標的遺伝子の増幅曲線(A)と融解曲線分析(B)

表5 島根県で発生した食中毒7事例についてのMultiplex リアルタイムSG-PCRによる原因菌の検索

| 事例番号 | 発生年月日 | 検査までの期間 | 原因施設 | 原因食品 | 患者数/喫食者数 | 発生時の細菌培養結果 | | MultiplexリアルタイムSG-PCR | |
|------|------------------|---------|--------|------|----------|-------------------------------|-------|--|-------------------|
| | | | | | | 分離菌種 | 分離率 | 標的遺伝子 | 検出率 |
| 1 | 2005年 10月2~6日 | 1~5 | 小中学校 | 不明 | 39/94 | <i>C. jejuni</i> | 1/16 | <i>C. jejuni</i> の種特異遺伝子 | 1/6 |
| 2 | 2006年 5月28~30 | 0~2 | 一般食堂 | 食事 | 27/34 | <i>S. aureus</i> | 4/8 | <i>aggR</i> | 2/6 |
| 3 | 7月4日 | 0 | 寮の給食施設 | 弁当 | 34/51 | <i>C. perfringens</i> | 19/50 | <i>femB</i> <i>astA</i> | 1/5 1/5 |
| 4 | 8月16日 | 1 | 飲食店 | 焼き飯 | 15/34 | <i>B. cereus</i> | 2/4 | <i>cpe</i> | 7/7 |
| 5 | 9月2日 | 3 | 仕出店 | 仕出し | 14/49 | <i>V. parahaemolyticus</i> | 3/6 | <i>C. jejuni</i> の種特異遺伝子 | 3/7 |
| 6 | 10月21日 | 1 | 宿泊施設 | 食事 | 7/13 | <i>P. shigelloides</i> | 2/5 | <i>ces</i> <i>nheB</i> <i>aggR</i> | 1/4 1/4 1/4 |
| 7 | 11月29日 | 1 | 一般食堂 | 食事 | 8/13 | <i>C. jejuni</i> | 4/7 | <i>tdh</i> | 3/6 |
| | | | | | | <i>astA</i> 陽性 <i>E. coli</i> | 1/7 | <i>C. jejuni</i> の種特異遺伝子 | 2/6 |
| | | | | | | | | <i>st</i> <i>gyrB</i> | 1/6 2/5 |
| | | | | | | | | <i>eaeA</i> | 1/5 |
| | | | | | | | | <i>astA</i> | 4/7 |
| | | | | | | | | | 1/7 |

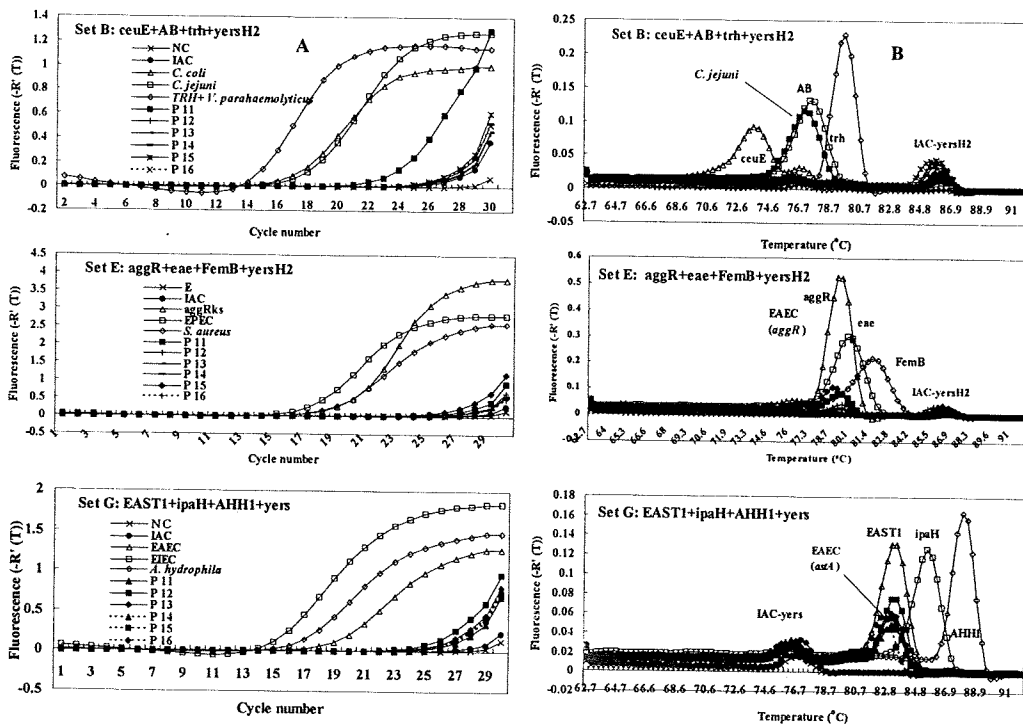


図2 食中毒事例1のABI7500を用いたmultiplex SYBR Green PCRで食中毒菌の標的遺伝子が検出されたプライマーセットにおける増幅曲線(A)と融解曲線分析(B)

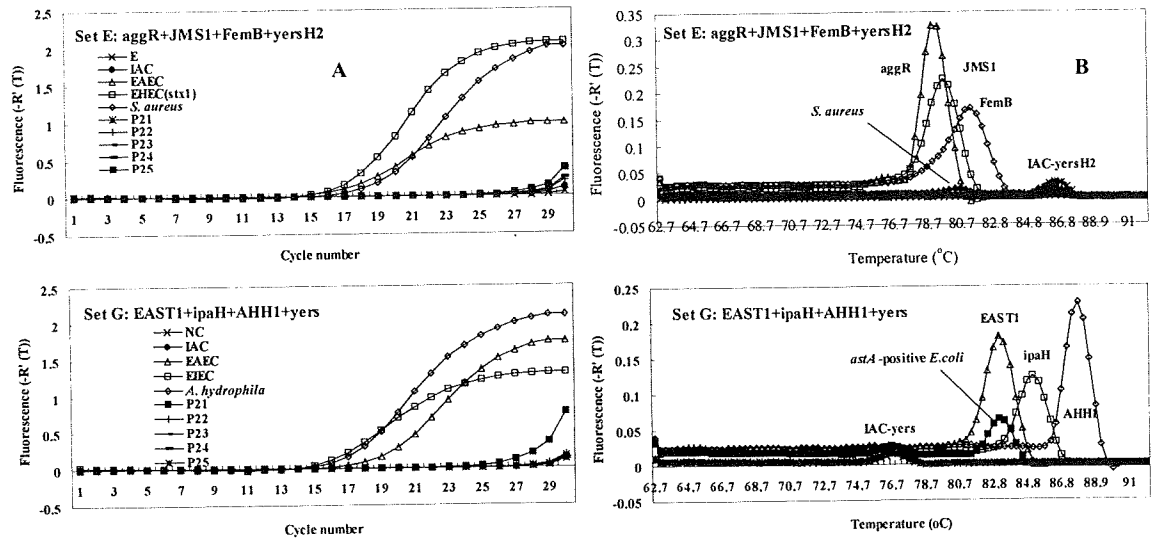


図3 食中毒事例2の ABI7500 を用いた multiplex SYBR Green PCR で食中毒菌の標的遺伝子が検出されたプライマーセットにおける増幅曲線 (A) と融解曲線分析 (B)

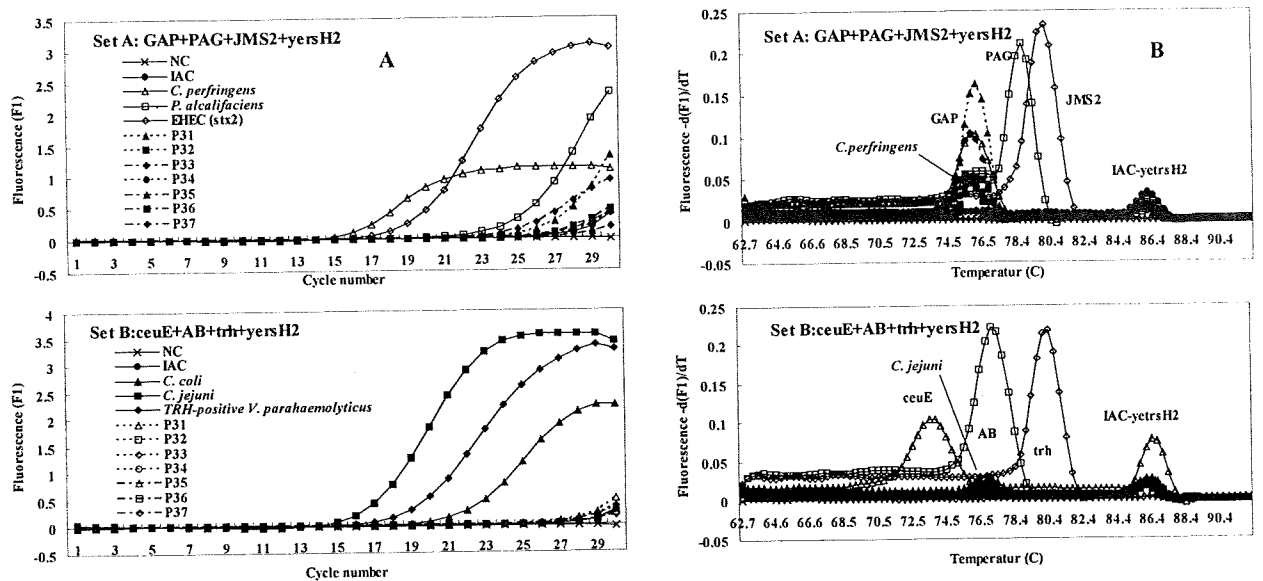


図4 食中毒事例3の ABI7500 を用いた multiplex SYBR Green PCR で食中毒菌の標的遺伝子が検出されたプライマーセットにおける増幅曲線 (A) と融解曲線分析 (B)

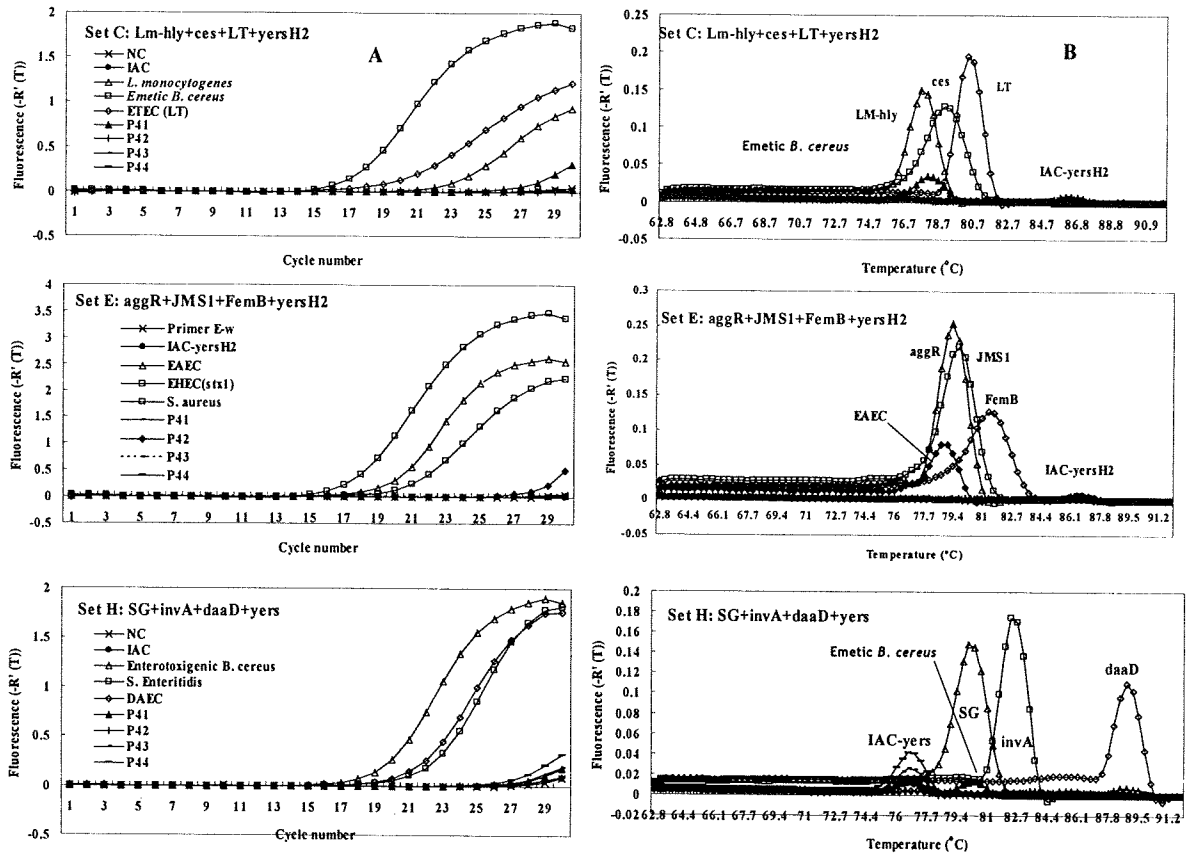


図5 食中毒事例4のABI7500を用いた multiplex SYBR Green PCRで食中毒菌の標的遺伝子が検出されたプライマーセットにおける増幅曲線(A)と融解曲線分析(B)

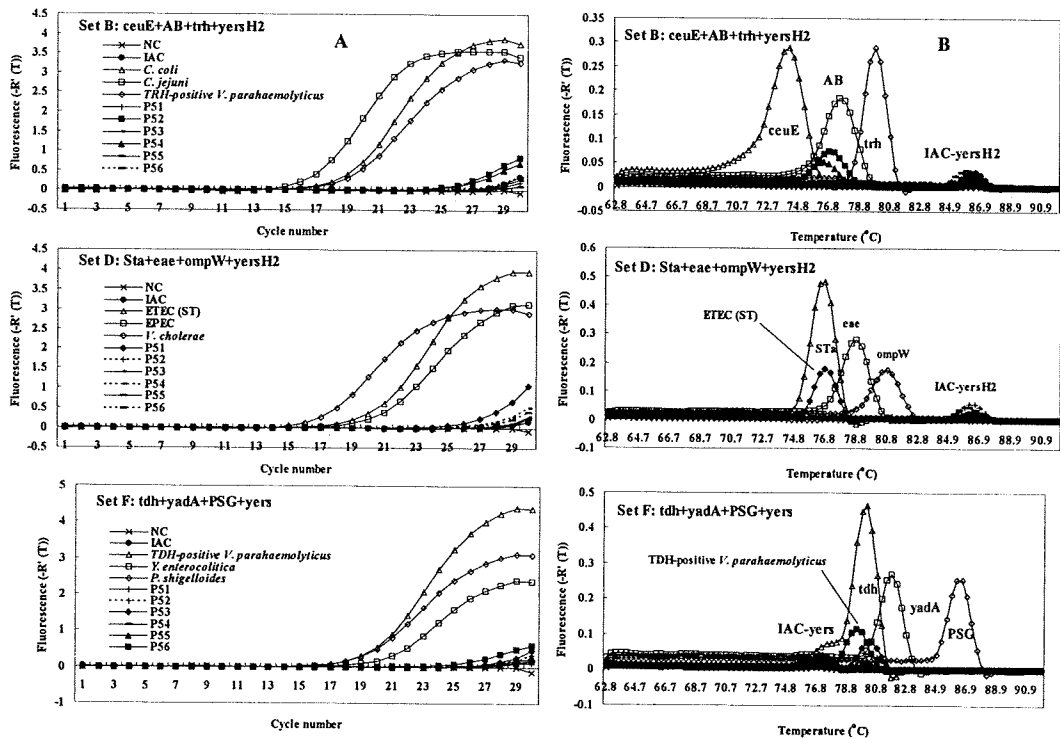


図6 食中毒事例5のABI7500を用いた multiplex SYBR Green PCRで食中毒菌の標的遺伝子が検出されたプライマーセットにおける増幅曲線(A)と融解曲線分析(B)

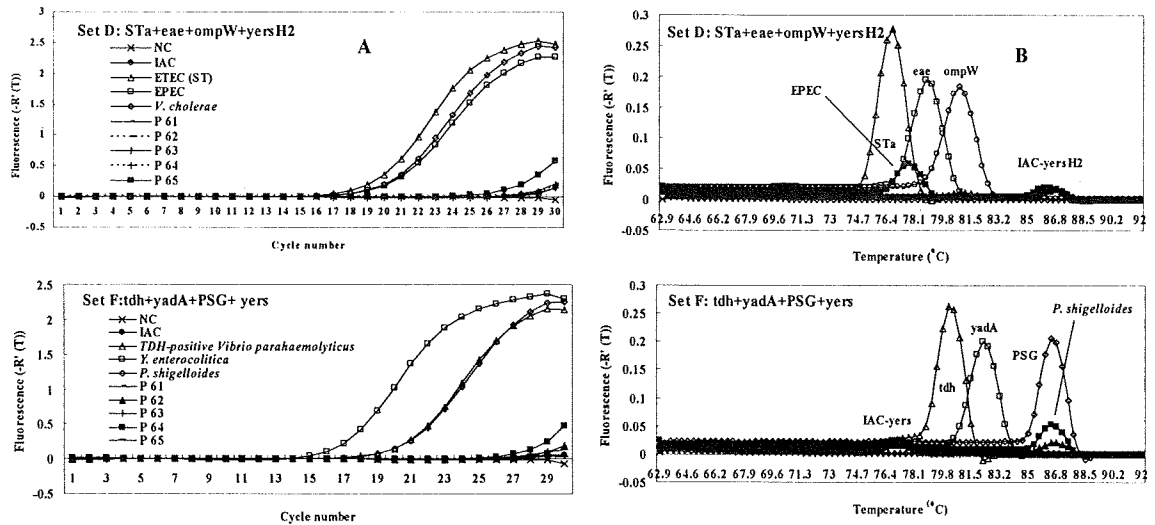


図7 食中毒事例6の ABI7500 を用いた multiplex SYBR Green PCR で食中毒菌の標的遺伝子が検出されたプライマーセットにおける増幅曲線(A)と融解曲線分析(B)

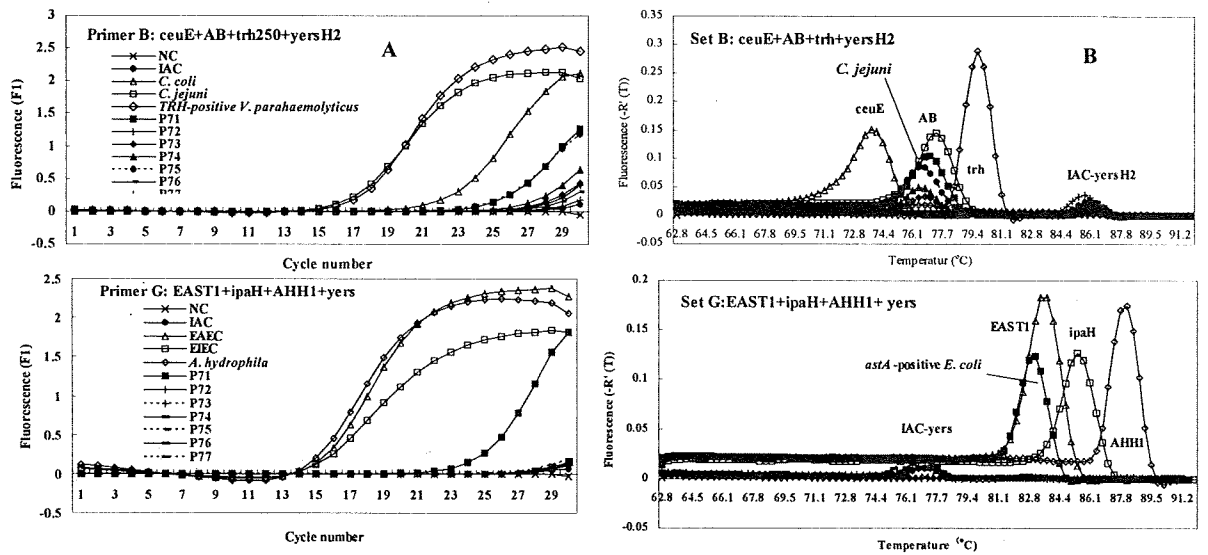


図8 食中毒事例7の ABI7500 を用いた multiplex SYBR Green PCR で食中毒菌の標的遺伝子が検出されたプライマーセットにおける増幅曲線(A)と融解曲線分析(B)

Multiplex real-time SYBR Green PCR を用いた食中毒細菌の網羅的検査法の検証

研究協力者

江藤良樹、市原祥子、村上光一、堀川和美、吉村健清 (福岡県保健環境研究所)

要 旨 福島らによって開発された multiplex real-time SYBR Green PCR のキットである Rapid Foodborne Bacteria Screening 24 II の検証を目的とし、食中毒事例 3 事例において、培養検査、Conventional PCR との比較を行った。その結果、市販プライマーを用いた Conventional PCR と比べ感度はやや劣ることがわかった。一方で、複数の食中毒起因菌の遺伝子を網羅的に検査することで、O157 による食中毒事例において O157 以外の大腸菌の遺伝子を検出することができた。このことから、この事例の感染源は複数の大腸菌で汚染されていたのではないかと推測することができた。

このような利点をさらに活かすためにも、今後、プライマーやサイクル数の再検討による、感度の向上が期待される。

A. 研究目的

福島らによって開発された multiplex real-time SYBR Green PCR のキットである Rapid Foodborne Bacteria Screening 24 II (RFBS24II) は、24 種の食中毒原因菌の遺伝子を網羅的に検査することができる。また、この方法は、迅速性に優れ、検査開始から 2～3 時間後にスクリーニングの結果を得ることが可能である。今回は、この RFBS24II の検証を目的とし、実際の食中毒事例において、培養法、conventional PCR との比較を行った。

B. 研究方法

今回、RFBS24II の食中毒事例 (3 事例) での検証には、7500 Fast Real-Time PCR System (アプライドバイシステムズ) と Mx3000P (ストラタジーン) を使用し、試薬には SYBR Premix DimerEraser (タカラバイオ) を使用した。

キャリブレアで搬入された検体は、2 ml 生理食塩

水に糞便が付着したキャリブレア培地 200 mg を入れ、十分に攪拌した後に、一部から菌数測定を行った。残りを 3000rpm で 20 分間遠心し、沈査を回収し QIAamp stool DNA mini kit (キアゲン) にて抽出した。生便の場合には、生理食塩水で 10 倍乳剤を作製して生菌数の測定を行った。また、200 mg 糞便を用い、QIAamp stool DNA mini kit にて DNA を抽出した。

Real-time PCR の条件は、7500 Fast Real-Time PCR System では、DNA 抽出物 2 μ l を用いて、反応液量は 20 μ l で実施した。反応条件は、Standard mode で 95°C、30 秒の酵素の活性化を行った後に、95°C、3 秒の熱変性、55°C、30 秒のアニーリング、72°C、30 秒の伸長反応を 30 サイクル行った。反応終了後、融解曲線解析を実施し、T_m 値の測定を行った。Mx3000P での反応条件は 7500 Fast Real-Time PCR System に準拠した。

また、RFBS24II の検証の為に、市販のプライマー

を用いて Conventional PCR を実施した。プライマーには、タカラバイオ社の製品を用い、*cpe* には CPE-1/2、*stx* には EVT-1/2、EVS-1/2、EVC-1/2 を、*invA* には SIN-1/2 を用いた。PCR 試薬には、GoTaq Green Master Mix (プロメガ) を使用し、DNA 抽出物 2 μ l を鋳型として加え、反応条件は製品の説明書に従った。

C. 研究結果

今回の研究では、1) ウェルシュ菌が分離された事例、2) 腸管出血性大腸菌 O157 (*stx1* + *stx2*) が分離された事例、3) サルモネラが培養検査にて分離された事例の 3 事例を対象に検証を行った。

ウェルシュ菌が検出された事例では、7 件中 6 件よりウェルシュ菌が分離されたが、RFBS24II では検出することができなかった (表 1)。この事例では、検体がキャリブレアで搬入され、直接塗抹した培地よりウェルシュ菌が分離されたものの、その菌数は数個であった。キャリブレア培地 1 g 当たりの生菌数は、全て 10^2 CFU 以下であった。また、RFBS24II の Internal amplification Control (IAC) は、増幅されていたことから培地成分による増幅阻害が起きているとは考えられなかった。これらのことから、RFBS24II の検出限界 (10^3 CFU/g) により検出できなかったと考えられた。このことから、キャリブレアで搬入された検体は、遺伝子検査には不向きであるため、必要に迫られて遺伝子検査に用いる場合には、濃縮などの工夫が必要であると考えられた。

腸管出血性大腸菌 O157 (*stx1* + *stx2*) が分離された事例では、7 検体の糞便を検査に用いた。この事例では食中毒原因施設の従事者から多数の O157 が分離された事例で、今回、検査を行った従事者の便のほとんどが、軟便または下痢便であった。これらの従業員の多くは、同店で提供された食事を賄い食として喫食していた。細菌分離の結果、7 件のうち 4 件より O157 が分離された (表 2)。RFBS24II を実施し

たところ、O157 が分離された 4 件の便のうち 2 件より *eae*、*stx1*、*stx2* が同時に検出された (図 1)。一方、Conventional PCR では、菌が分離された 4 件のうち 3 件から *stx1*、*stx2* が検出されていることから、RFBS24II の *stx1*、*stx2* に対する感度は、Conventional PCR と比較して、やや劣る程度だと考えられた。また、RFBS24II では腸管出血性大腸菌 O157 分離が陰性であった検体から、*astA* や *eaeA* が検出されたことから、その他の大腸菌による汚染の可能性が示唆される結果となった。

サルモネラによる食中毒事例では 2 件の糞便を検査に用いた。分離培養の結果、直接塗抹の培地よりサルモネラが検出され、糞便中の生菌数測定を行ったところ、2 件とも糞便 1 g 当たり $10^{4\sim 5}$ CFU であった (表 3)。RFBS24II では 2 件ともに陰性であったが、Conventional PCR で検査を実施したところ陽性であった。そこで、real-time SYBR Green PCR (single PCR) を用いて定量を行ったところ *invA* が検出され、その量は 6.3×10^5 CFU/ml 程度であった。

D. 結論

今回、実際の食中毒事例において RFBS24II の検証をおこなった。その結果、RFBS24II の検出感度は市販のプライマーと比較すると、やや劣ると推測された。特に、サルモネラ事例では、 6.3×10^5 CFU/ml 程度 (PCR チューブ当たり 1200 コピー) を検出することができなかった。今回使用したサルモネラの市販プライマーの PCR の反応サイクルは、RFBS24II より 5 サイクル多いことや、multiplex PCR で起こる競合阻害が、感度の差となって現れたものと考えられる。

一方で、今回の検証で網羅的に遺伝子を検査する利点を確認することができた。O157 食中毒事例において、O157 が分離されなかった検体 1 件より *eaeA* が検出され、7 件中 4 件より *astA* が検出された。このことから、この事例の感染源は、O157 以外の大腸菌にも汚染されていた可能性が示唆された。この事例

では、網羅的に遺伝子検査を行うことで、培養法のみでは得られなかった情報をえることができた。

RFBS24IIの最大の利点は検体搬入後の2-3時間後には、結果が得られることにある。この結果を元に、この後に行う培養検査で、より確実に起因菌を分離することができる。特に、稀な食中毒菌の分離では大きな助けとなるだろう。また、この検査法は糞便から直接、遺伝子検査を行うため、死菌を検出することができると考えられる。このような利点を生かせば、従来の培養法では得られなかった感染実態が明らか

かにできる可能性がある。これらの利点をさらに生かすためにも、今後、プライマーやサイクル数の再検討による、感度の向上が期待される。

E. 研究発表

なし

F. 文献

なし

表1 ウェルシュ菌による食中毒事例の検査結果一覧

| 番号 | 試料 | 菌分離 | | 菌数 ^b (CFU/g) | Conventional PCR(<i>cpe</i>) | RFBS24 II ^c |
|----|------------------|------|------|----------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| | | (直接) | (増菌) | | | |
| 1 | 患者便 ^a | ○ | ○ | <10 ² | × | × |
| 2 | 患者便 ^a | ○ | ○ | <10 ² | × | × |
| 3 | 患者便 ^a | ○ | ○ | <10 ² | × | × |
| 4 | 患者便 ^a | × | × | <10 ² | × | × |
| 5 | 患者便 ^a | ○ | ○ | <10 ² | × | × |
| 6 | 患者便 ^a | ○ | ○ | <10 ² | × | × |
| 7 | 患者便 ^a | ○ | ○ | <10 ² | × | × |

^a キャリブレアにて搬入

^b 菌数は、キャリブレア培地1g当たりの生菌数

^c 使用機種はMx3000P(ストラタジーン)

表2 腸管出血性大腸菌 O157 による食中毒事例の検査結果一覧

| 番号 | 試料 | 菌分離 | | 菌数 (CFU/g) | Conventional PCR | | | RFBS24 II ^a |
|----|------|------|------|-------------------|------------------|-------------|-------------|------------------------|
| | | (直接) | (増菌) | | <i>stx</i> 共通 | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | |
| 26 | 従事者便 | ○ | ○ | <10 ² | × | × | × | × |
| 27 | 従事者便 | × | × | <10 ² | × | × | × | × |
| 28 | 従事者便 | × | × | <10 ² | × | × | × | × |
| 29 | 従事者便 | × | × | <10 ² | × | × | × | × |
| 30 | 従事者便 | × | ○ | <10 ² | × | △ | △ | × |
| 31 | 従事者便 | ○ | ○ | <10 ² | × | ○ | ○ | ○ |
| 45 | 従事者便 | ○ | ○ | 10 ^{2~3} | × | ○ | ○ | ○ |

^a 使用機種は7500 Fast real-time PCR system

表3 サルモネラによる食中毒事例の検査結果一覧

| 番号 | 試料 | 菌分離 | | 菌数 (CFU/g) | Conventional PCR(<i>invA</i>) | RFBS24II ^a |
|----|-----|------|------|-------------------|------------------------------------|-----------------------|
| | | (直接) | (増菌) | | | |
| 15 | 患者便 | ○ | ○ | 10 ^{4~5} | ○ | × |
| 16 | 患者便 | ○ | ○ | 10 ^{4~5} | ○ | × |

^a 使用機種は7500 Fast real-time PCR system

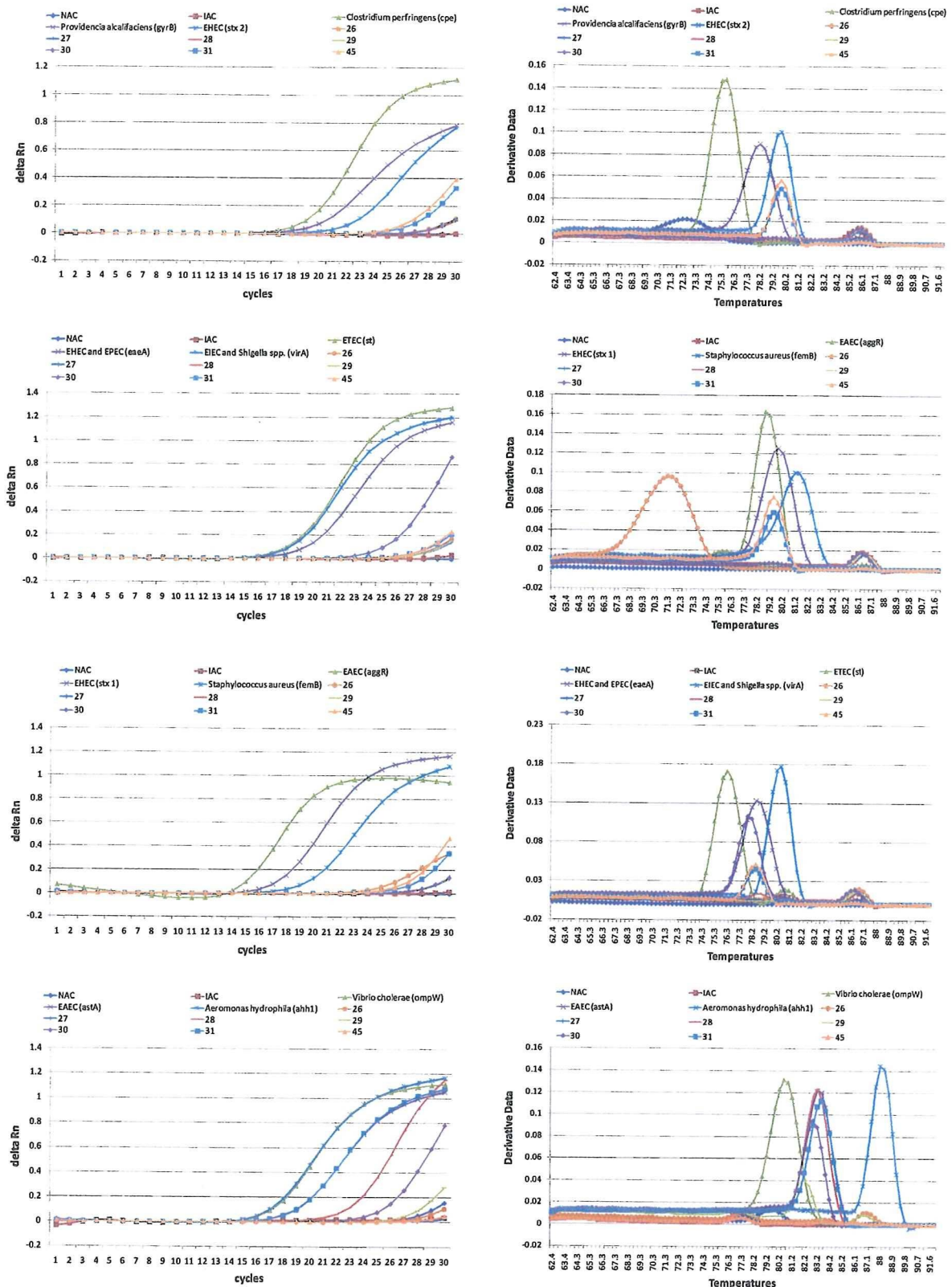


図1 O157 食中毒事例における RFBS24II による増幅曲線と融解曲線解析の結果

左に増幅曲線、右に融解曲線解析の結果を示す(上から順にプライマーセット A、D、E、G)。

機種は 7500 Fast Real-Time PCR System を使用した。