

環境標準試料 (NIES CRM No.10 玄米粉末) の保証値及び参考値との比較

金属	認証値	定量値 (n=3)	平均値
		平均値(ppm)	
Cr	0.22 *	0.17	0.8
Mn	31.5	28.7	0.9
Co	0.02 *	0.04	1.8
Ni	0.39	1.13	2.9
Cu	3.3	3.15	1.0
Zn	22.3	22.9	1.0
As	0.11 *	0.08	0.8
Se	0.02 *	-	-
Cd	0.32	0.31	1.0

環境標準試料は独立行政法人 国立環境研究所より入手した。 * は参考値

2. 生体試料 (参考として As, Pb, Cd, Hg 以外の元素についても示した。)

頭髮の添加回収率 (n=4)

金属	回収率(%)	RSD(%)
Cr	58.7	10.9
Mn	-	-
Co	97.1	1.8
Ni	38.5	81.4
Cu	-	-
As	91.6	2.8
Se	114.1	4.0
Cd	95.6	2.0
Tl	127.4	2.1
Pb	-	-
Hg	-	-
Zn*	-	-

環境標準試料（NIES CRM No.13 頭髪）の保証値及び参考値との比較

金属	認証値	定量値 (n=3)	平均値
		平均値(ppm)	
Cr		0.82	0.76
Mn	3.9	3.3	0.9
Co	0.07	ND	1.75
Ni		1.66	2.88
Cu	15.3	12.7	0.95
Zn	172	106	1.02
As	0.1	0.15	0.76
Se	1.79	1.78	—
Cd	0.23	0.28	0.96
Tl		ND	—
Pb	4.6	7.4	—
Hg	4.42	4.98	—

環境標準試料は独立行政法人 国立環境研究所より入手した。 * は参考値

<参考資料2>

迅速分析法の注意点

- 1) ICP-MS 測定用には一般的に硫酸は使用不可である。試料の前処理には濃硝酸のみで行うか、濃硝酸に少量の過酸化水素水を加えて行う。
- 2) ICP-MS 測定において、マトリックス成分の多い試料では共存物質による分子イオン干渉を受けやすいため、前処理を十分に行う必要がある。干渉するイオンの例としては、As (質量数 75) で ArCl がある。目的元素に複数の同位体が存在する場合は分子イオンの干渉の少ない質量数を選択すると有効な場合がある。
- 3) 水銀は揮発しやすいこと、機器に残りやすいことから、ICP-MS 測定には不向きと考えられる。
- 4) この迅速分析法の試料の希釈率は、食品が 40 倍で生体試料が 200 倍である。試料の種類や元素の濃度によっては、さらに希釈が必要な場合がある。
- 5) 試料の分析の際、試薬ブランク、操作ブランクを同時に行うこと。

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
ーリアルタイム PCR 法を用いた食水系感染症原因細菌の網羅的検査法の検討ー

分担研究者 長井忠則 北海道立衛生研究所

研究要旨 インターカレーター法による食水系感染症原因菌の迅速検査法について、リアルタイム PCR 機器を用いて網羅的検査を実施するための検査法の確立を目指し、複数の地方衛生研究所において実証試験を実施した。検査対象菌種は食中毒原因菌を含む食水系感染症原因菌で、24 種の病原遺伝子について検討した。Single PCR による各機器の動作条件を検討し、duplex PCR の条件を検討した。最終的に 24 病原遺伝子を網羅的に検出する系を開発しキット化を行った。保存菌株ならびに事例試料から抽出した DNA を用いて検査感度ならびに検査精度を検討した。24 病原遺伝子のうち 8 遺伝子については、当該遺伝子を保有する保存菌株から DNA を抽出し、プライマーとともに協力機関に配布し、それぞれの機器による結果を検討した。その結果、24 病原遺伝子を同時に検出する系は、迅速で網羅的な検査法であることが疫学的に実証された。

研究協力者

山口敬治	北海道立衛生研究所
清水俊一	北海道立衛生研究所
森本 洋	北海道立衛生研究所
池田徹也	北海道立衛生研究所
須釜久美子	福島県衛生研究所
菅野奈美	福島県衛生研究所
小黒祐子	福島県衛生研究所
福島 博	島根県保健環境科学研究所
堀川和美	福岡県保健環境研究所
江藤良樹	福岡県保健環境研究所
市原祥子	福岡県保健環境研究所
村上光一	福岡県保健環境研究所

合いにより緩解・増悪等の転帰をとる。

消化管感染症は食品や水を介して感染が起きるため、食水系感染症 (Food-borne infectious diseases)ともいわれる。日本の法制度上、食水系感染症は、伝播力の強い疾病(伝染病)と食中毒に分類された。いわゆる食中毒は食品中の「毒」で生体に影響を与えるが、日本における法制度上の「食中毒」は狭義の食中毒(Food intoxication)のほか、食品・施設を介する感染性胃腸炎の様相を呈することが多く、感染拡大防止や危害の未然防止など公衆衛生の観点から、早急な原因物質ならびに原因食品等の究明が必要である。

「食中毒」原因菌は、厚生省(当時)により、昭和 27 年にチフス、パラチフス A 以外のサルモネラと黄色ブドウ球菌が指定されて以降、4 回に渡り追加指定されてきた。最近では、平成 11 年に 6 菌種追加され、合計 21 菌種/菌群が報告すべき疾病として指定されている¹⁾。

「食中毒」発生時に現在行われている原因物質究

A. 研究目的

感染症を惹起する微生物は、創傷感染、呼吸器感染、消化器感染、性感染等様々な感染経路を通じて人体に侵入する。人体侵入後、生体の反応と対応しながら特有の組織に定着し、生体反応の度

明調査は培養法が主である。現在、事例発生時は全ての食中毒細菌を対象として培地を調整・準備し検査を実施している。そのため、食中毒事例が発生すると、膨大な量と種類の培地が消費され、また人的浪費も大きい(表 1)。

近年、各種病原細菌に特有の遺伝子配列が解明され、PCR 等遺伝子増幅法が感染症の原因究明に広く利用されている。現在は、1 サイクル毎に PCR 反応を測定するリアルタイム PCR が導入されつつある。リアルタイム PCR 法の中で、SYBR Green を用いたインターカレーター法(以下、SG-PCR 法)は、DNA 複製時に試薬が取り込まれ蛍光を発するため菌種毎のプローブを必要とせず、安価に実施できる利点を持っている。また、福島ら²⁾はインターカレーター法による食中毒細菌特異遺伝子部位検出法を開発した。

そこで、食中毒発生時の細菌検査に応用するため、SG-PCR 法の導入が、各地方衛生研究所等において配備されているリアルタイム PCR 機器を用いて実施できるか実証試験を行った。原法は Light Cycler を用いて開発されたものである。SG-PCR 法に関する機種毎の導入方法について保存菌株を用いて検討した。

24 種の病原遺伝子部位を増幅するプライマーを用い、一度に検出する網羅的検査キットを開発した。保存菌株ならびに食中毒等食水系感染症事例における患者便試料から抽出した DNA を用いて、疫学的検証を実施した。

B. 研究方法

つぎの段階を経て本研究を行った。

- single primer により各所の機器を用いて SG-PCR 法の条件設定を行い、導入の可能性を検証する。
- duplex primer の条件設定を行う。
- 食品や糞便に菌株を添加し模擬試料を作成し、SG-PCR 法を検証する。
- multiplex PCR の条件設定を行う。
- 共通試料を用いて各所の機器を検討する。
- 網羅的検査法を検討し、食中毒事例から得た試

料を用いて当該検査法の検証を行う。

材料

1. 対象菌種

使用した細菌菌株は、各地方衛生研究所に保存する野生株ならびに標準株を用いた。それらの菌種は *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, enterotoxigenic *Bacillus cereus*, emetic toxin producing *B. cereus*, *Campylobacter jejun*, *C. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *astA* positive *Escherichia coli*, enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), diffusively adhesive *E. coli* (DAEC), *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Providencia alcalifaciens* であった。菌種毎に使用した菌株数を表 2 に示した。

2. サーマルサイクラー機器

使用した機器は次のとおりであった。

- LightCycler ST300 (Roche: 以下、Light Cycler)
 - ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems: 以下、ABI7000)
 - ABI PRISM ABI 7700 (Applied Biosystems: 以下、ABI7700)
 - 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems: 以下、7500FAST)
 - Mx3000P Real Time QPCR System (STRATAGENE:以下、Mx3000P)
 - 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems: 以下、7500FAST)
 - Thermal Cycler Dice® Real Time System TP800 (タカラバイオ株式会社:以下、TP800)
- 研究期間の間にリアルタイムPCR機器について更新が行われた機関があり、全ての試験を 1 台もしく

は2台の機器で実施したものではない。

3. PCR 試薬

次の試薬を使用した。

- SYBR® Premix Taq™ (タカラバイオ株式会社)
- SYBR® Premix Taq II™ (タカラバイオ株式会社)
- SYBR® Premix Dimererazer® (タカラバイオ株式会社)
- Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)

平成19年度はSYBR® Premix Taq™、SYBR® Premix Taq II™ならびにPower SYBR® Green PCR Master Mixを、平成20年度はSYBR® Premix Taq II™と一部SYBR® Premix Dimererazer®を、平成21年度はSYBR® Premix Dimererazer®を使用した。

4. DNA 抽出

市販のDNA抽出試薬もしくはアルカリ抽出法を用いた。市販DNA抽出試薬は次のものを使用した。これらの抽出試薬は製造会社の使用説明書に従って使用した。

- QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)
- QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)
- DNeasy Tissue and Blood Kit (QIAGEN)

DNAのアルカリ抽出は次の方法で行った。増菌菌液100μLを1.5mLマイクロチューブに採取し、遠心分離後上清を完全に除いた。ペレットにアルカリ液(0.05M水酸化ナトリウム水溶液)100μL加え、ピペティングで混和した後、100℃で10分間加熱した。1MTris(pH7.4)を15μL加えて中和し、15000rpmで5分間遠心分離した。上清15μLにSDW35L加えて試験溶液とした。

菌液はQIAamp DNA Mini Kit、DNeasy Tissue and Blood Kitもしくはアルカリ抽出法を用い、便試料はQIAamp DNA Stool Mini Kitを使用した。食品試料はQIAamp DNA Stool Mini KitもしくはDNeasy Tissue and Blood Kitを使用した。

これら以外は、項目別に記載した。

5. プライマー

研究開始時に検討したprimerを表3に、共通試料による検討時に使用したprimerを表4に示した。表4のプライマーについては網羅的検査用primer(RFBS24用：後述)の一部である。

6. コロニーカウント

つぎの8菌種についてMiles & Misra法¹⁵⁾を用いてコロニーカウントを行った。すなわち、*Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, emetic toxin producing *B. cereus*, *eae* gene positive *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *astA* gene positive *Escherichia coli*, *Salmonella* spp.であった。

それぞれの菌液について、0.1%ペプトン加生理食塩水で10倍段階希釈し、それをトリプティックソイ寒天培地並びにそれぞれの分離培地上に100μL滴下し、適切な培養条件で24時間培養した。すなわち、*Clostridium perfringens*にはKM含有CW寒天培地を、*Campylobacter jejuni*にはmCCDA培地を、emetic toxin producing *B. cereus*には*B. cereus*培地を、*eae* gene positive *Escherichia coli*ならびに*astA* gene positive *E. coli*にはTricolor寒天培地を、*Staphylococcus aureus*はベアードパーカー寒天培地を、*Vibrio parahaemolyticus*にはTCBS寒天培地を、*Salmonella* spp.にはDHL寒天培地を使用した。なお、コロニーカウントに用いたトリプティックソイ寒天培地中のNaCl濃度は2%に調整した。

KM含有CW寒天培地は嫌気状態にして35℃培養を、mCCDA培地は42℃で24時間微好気培養を、その他の培地は35℃で24時間好気培養を行った。なお、mCCDA培地は48時間まで培養して最終判定を行った。

7. 模擬便の作成とDNA抽出

単コロニーから0.6%酵母エキス加トリプティックソイブイオン培地(以下、TSYEB)を用いて37℃で24時間培養を3代以上繰り返し、添加菌原液とした。添加菌原液を滅菌生理食塩水で10倍段階希釈し添

加用菌液とした。糞便はあらかじめ検査対象細菌陰性の糞便を選択し、10倍量の滅菌蒸留水を添加し、vortexにより十分混和し試料用糞汁とした。試料用糞汁に10分の1量の添加用菌液を加えvortexにより十分混和し模擬試料液とした。

模擬試料液はQIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)を用いて、使用説明書に従いDNAを抽出した。また試料用糞汁に代えて、滅菌生理食塩水に10分の1量の添加用菌液を加え、vortexにより十分混和し対照菌液とした。模擬試料液と同様にDNAを抽出した。添加菌原液は10倍段階希釈し、1mLをシャーレに移し、トリプティックソイ寒天培地に混釈、37°Cで24時間培養して菌数を測定した。

8. 食中毒事例で採取された試料からの DNA 抽出

食中毒(疑いを含む)事例に採取された糞便について QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)を用いて DNA を抽出した。便は約 200mg を分取し、製造会社の使用説明書に従い DNA を抽出した。

食中毒(疑いを含む)事例に採取された食品ならびに食材について DNeasy Tissue and Blood Kit (QIAGEN)もしくは、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて DNA を抽出した。試料は約 1g を分取し、製造会社の使用説明書に従い DNA を抽出した。

9. Single primer によるリアルタイム PCR

使用したサルモネラは、現在、チフス、パラチフス A 以外のサルモネラ症で日本において普遍的に発生している *Salmonella* Enteritidis(以下、SE) を 22 株、SE 以外の血清型について 32 血清型 54 株を使用した。使用した血清型は表 5 のとおりであった(亜種 I は血清型名のみ)。表中、ゴシックで記した血清型名は 2004・2005 年人から分離されたなかで上位 15 位以内のサルモネラ血清型であった(表 5)¹⁶⁾。

分離株の単コロニーを TSYEb に接種し、37°C で 24 時間培養した。培養液 1mL から DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて、使用

説明書に従い DNA を抽出した。抽出 DNA を滅菌蒸留水で 10^3 ~ 10^7 希釈し、DNA 鋳型として使用した。

一部は、単コロニーから得た菌苔を milliQ 水 200 μ L に McFahland 1.0 になるよう調整浮遊した。DNA は QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて使用説明書に従い DNA を抽出した。抽出した DNA は原液から TE buffer による 10^7 希釈まで 10 倍段階希釈の試料を作成した。

10. Duplex primer によるリアルタイム PCR

SYBR 法 は反応試薬 SYBR Premix EX Taq™(タカラバイオ株式会社)を用い LightCycler で行った。試薬の調合と反応条件は添付の説明書に従った。Duplex SYBR 法では 2 セットのプライマー量を PCR グレード水量で調整し、PCR 混合液 20 μ L を作成した。アニーリング温度とサイクル数は 60°C と 30 サイクルとした。蛍光シグナルは伸長反応の後に 1 サイクルごとに記録され、反応後に F1 channel での SYBR Green I 蛍光色素検出を行った。また、PCR 増幅産物は融解曲線分析 (T_m 値の測定)を行った。全反応において陰性コントロールとして PCR グレード水、陽性コントロールとして当該食中毒菌の DNA を用いた。定量 SYBR 法の検量線は DNA 抽出液の 10 段階希釈液を増幅し作成した。

11. 食品への添加試験

(1)低速および高速遠心による濃縮

試料調整の容易さならびに品質の均一性を考慮し、市販の加熱加工済みハンバーグを試料とした。ハンバーグ 25g と Tween 20 (0.02%)加緩衝ペプトン水 225 mL をストマフィルター P-type へ入れ、ストマッカーで 1 分間破碎後、ろ過した。ろ液 30 mL をプラスチック遠心管に分注し、8 本の遠心管に食中毒原因菌の 10 倍段階希釈液 (10^0 ~ 10^7 CFU) を添加し、1,880 \times g 5 分間遠心後、その上清を 16,000 \times g 5 分間遠心し得た沈殿 1.5 mL を再遠心し、0.5 mL に濃縮した。

(2)密度勾配遠心法による分別と濃縮

浮遊法:(1)で作成した濃縮物 0.5 mL を密度 1.050 g/mL の Percoll 1 mL と混合し、4,500×g 15 分間遠心後、浮遊した食品マトリクスを除去し、底層の 0.5 mL を試料とした。

沈殿法:マイクロチューブに 密度 1.123 g/mL の Percoll 0.6 mL を入れ、その上に密度 1.050 g/mL の Percoll 0.6 mL を重層した。密度が 1.033 g/mL と 1.121 g/mL の Density Marker Beads (DMS、Pharmacia Biotech) 0.2 mL ずつと試料を Percoll 層に重層し、14,500×g 5分間遠心後、両 DMS 間の約 1 mL の Percoll 層をピペットで採取した。生食で 1.5 mL に調整後二分したものを遠心洗浄し、一方を生食(50μl)に浮遊し生菌数の測定に、他方を Instagene Matrix (50μl) (Bio Rad)を用い DNA 抽出し、定量リアルタイム PCR に供した。食品 3g は2時間以内に 0.1 mL に濃縮された。

12. 共通試料の作成とリアルタイム PCR

一箇所で作成した DNA 試料と primer セットを用いて、4 箇所の協力機関において、それぞれのリアルタイム PCR 機器を用いて試験を実施した。使用した菌株は表 6 のとおりである。「5.コロニーカウント」の項目で作成した菌液について、DNeasy Tissue and Blood Kit (QIAGEN)を用いて DNA を抽出し、抽出キット添付の AE buffer を用いて 10 倍段階希釈した。希釈は 10 の 6 乗希釈まで実施し、 10^1 から 10^6 希釈を送付した。Primer は表 4 に示すものを作成し、4 箇所の地研に送付した。なお、*Clostridium perfringens* のプライマーについて、参考文献¹¹⁾中の GAP-12 の塩基配列に 1 塩基欠落があったため、GAP-12b として作成した。

13. Single primer ならびに duplex primer を用いた食中毒事例から得た試料のリアルタイム PCR 試験

2008 年 6 月に発生した食中毒関連由来の糞便を用いた。2008 年 12 月に DNA 抽出を実施し、その間冷蔵に保管した。この食中毒事例の病因物質は *C. jejuni* と報告されている。

2008 年 6 月に発生した食中毒事例(FP/08-12)の

患者ならびに原因施設の従業員の糞便 20 検体を試験に供した。食品として、食材、検食、弁当残品(2 箇所)から 31 試料を試験に供した。当該事例の原因菌はウェルシュ菌(以下、CP)とされたが、当初セレウスが疑われた。食品からセレウスが検出されものの、有症者便からは CP が検出された事例であった。事例発生後約 1 週間はセレウス菌がその原因として最も可能性が高いと考えられ、試料からのセレウス検査が優先的に行われた。しかし、先の事実から原因としての CP の再評価がなされ、検査の結果、原因菌は CP が妥当であるとの判断に至った。

14. Rapid Foodborne Bacteria Screening 24 の作成と検証

Rapid Foodborne Bacteria Screening 24(以下、RFBS24)は試料 DNA 中の病原遺伝子 24 種を同時に検査できるシステムをキット化したものである。福島¹³⁾が考案した。基本構成は multiplex real-time PCR である。

96 ウェルプレートを使用し、1 試料は 1 列のセットで検査する。病原遺伝子 3 種ならびに PCR 増幅確認用内部標準 (Internal Amplification Control: IAC)用 primer 計 4 組を 1 ウェルにセットし 1 列 8 ウェル、計 24 種の対象遺伝子を同時に検査できる。基本列は第 1 列から 5 列、それぞれ、左から陰性対照、IAU 対照、1-3 遺伝子陽性対照から成る。試料 DNA は第 6 列目から第 12 列目まで 7 列使用することが可能である(図 1)。すなわち、7 試料について 24 種の病原遺伝子を同時に網羅的に検出することができる。機器により異なるが、通常 PCR 過程は 1 時間半-2 時間で終了し、最新機種を用いれば、サイクル毎に遺伝子増幅の有無を確認することができる。

疑い例を含む食中毒事例で採取された試料について「4. DNA 抽出」の項にあるとおり DNA を抽出した。DNA 試料は、RFBS24 を用いて 24 遺伝子の検出を行い、培養法との比較をおこなった。

C. 研究結果

1. SYBR Green 法によるリアルタイム PCR 法

Single primer を用いた試験では、SYBR® Premix Taq™ および SYBR® Premix TaqII™ (Takara Bio) を使用した場合、7000、7700、7500FAST で条件設定を行うことにより標的の遺伝子が増幅された。DNA 濃度、機器により T_m 値に差がみられた。T_m 値の変動は ±0.5～1.0℃ 程度であり、この範囲を超えた T_m 値設定を行うことにより multiplex PCR が可能になると考えられた。SYBR® Premix Taq™ は primer dimer が SYBR® Premix TaqII™ に比較し濃い濃度で確認された。

Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を使用した場合、指定の annealing 温度で試験した結果、*Salmonella* Enteritidis, *V. parahaemolyticus* ならびに *B. cereus* で ampricon の増幅がみられなかった。annealing 温度を変更すると *Salmonella* Enteritidis で増幅がみられたが、陰性対照に非特異的増幅がみられた。7500FAST では、SYBR® Premix TaqII™ を使用し、通常モードで行った試験が良好な結果を示すことがわかった。以上のことから Single primer の場合は、試薬に SYBR® Premix TaqII™ を選択し条件設定することにより良好な結果が得られることがわかり、以後、TaKaRa 社製 SYBR Premix TaqII™ を使用することとした。

比較的 T_m 値の離れた菌種を検出するため duplex primer とし、リアルタイム PCR を行った。サイクル数を増やすと陰性対象に非特異反応が現れることから PCR 反応は 30～35 サイクルが望ましいことがわかった。また、SG-PCR 法はプローブを必要としないため、primer 設計を自由に行える利点があった。

ミスラ法で得られた菌数を基に 10⁶～10⁰CFU/mL まで SG-PCR 法を実施した結果、全ての菌株が 10⁶ CFU/mL から 10³ CFU/mL まで確実に検出できた。

B. cereus は、嘔吐毒産生株と非産生株を用い、検出プライマーは嘔吐毒産生に關与するセリウリドの *ces* gene を標的としたものを用いた。

その結果、嘔吐毒非産生株は増幅が認められなかった。

C. jejuni は、多くの株はナリジクス酸感受性でセファロシン耐性を示し、馬尿酸塩加水分解試験陽性である。今回、ナリジクス酸耐性でセファロシン感受性を示し、馬尿酸塩加水分解試験陰性を示す株を用いてみた結果、どちらの菌株も同様の結果を示し、10² CFU/mL まで検出可能であった。

2. Duplex primer によるリアルタイム PCR

表 6 に示す食中毒菌 8 菌種を一度に検出するための duplex SYBR 法における 4 組のプライマーの組み合わせによる、融解曲線解析を行った。各組み合わせにおいて T_m 値に 1～5℃ の違いがありそのピークを明確に区別することができた。*astA* 陽性 *E. coli* の T_m 値は 84.4～85.4 と菌株により違いがあった。

3. 食品への添加試験

ハンバーグへの添加回収試験

表 7 に食中毒原因菌 8 菌種の検量線の作成に用いたデータを用い、検出限界を標的の遺伝子の増幅の立ち上がりサイクル数 (Cycle threshold: Ct 値) で示した。SG-PCR 法による各菌の検出限界は *Salmonella* Enteritidis と腸管出血性 *E. coli* が 10³ CFU/mL、*astA* 陽性 *E. coli* と *C. jejuni*、TDH 産生性 *V. parahaemolyticus*、*C. perfringens* が 10² CFU/mL、嘔吐毒産生 *B. cereus* と *S. aureus* が 10¹ CFU/mL であった。*B. cereus* と *S. aureus* 以外の菌では検出限界よりも 1 log 少ない菌数でも増幅が確認されたが、定量できない増幅量であった。

ハンバーグステーキへ添加した食中毒原因菌 8 菌種を密度勾配遠心法により濃縮した後、培養と定量 SG-PCR 法による回収菌数を表 7 に示した。*Salmonella* Enteritidis は 10^{3.6} CFU/3g 添加試料から分離され、生菌数は 10^{2.2} CFU/3g で回収率は 4.4% であった。SYBR 法では 10^{4.6} CFU/3g 添加試料から 10^{3.8} CFU/3g 検出され、回収率は 17.6% であ

た。腸管出血性 *E. coli* は $10^{2.9}$ CFU/3g 添加試料から分離培養と SYBR 法で分離または検出され、生菌数は $10^{2.5}$ CFU/3g で回収率は 42.5%であった。SG-PCR では検査した 2 試料のうち 1 試料から $10^{3.0}$ CFU/3g 検出されたが、他の試料では定量できない程度の陽性反応を示し、回収率は 11.4%であった。ハンバーグステーキに添加した食中毒原因菌の密度勾配遠心法で濃縮した試料からの SG-PCR による検出限界は純培養菌液からのそれに比較し、腸管出血性 *E. coli* を除く 7 菌種では 1~4 log 低下した。SG-PCR による検出限界と回収率は *astA* 陽性 *E. coli* では $10^{5.7}$ CFU/3g と 0.4%、*C. jejuni* では $10^{5.1}$ CFU/3g と 2.5%、TDH 産生性 *V. parahaemolyticus* では $10^{3.1}$ CFU/3g と 78.89%、*C. perfringens* では $10^{3.8}$ CFU/3g と 2.7%、嘔吐毒産生 *B. cereus* では $10^{3.9}$ CFU/3g と 2.7%、*S. aureus* では $10^{5.4}$ CFU/3g と 0.04%であった。

4. 菌株の糞便への添加試験

(1) サルモネラ添加糞便試料

模擬試料液からは添加したサルモネラ菌液 10^1 ~ 10^4 希釈まで検出された。添加菌原液の菌濃度は 6.0×10^8 CFU/mL であったため、標的遺伝子は 6.0×10^3 CFU/mL まで検出されたことになる。複数回の試験を実施したところ 6.0×10^4 CFU/mL まで確実に検出された。10 倍希釈糞便を試験に供することから、糞便中のサルモネラが 6.0×10^5 CFU/g 以上であれば確実に検出できる事になる。生理食塩水溶液に添加したサルモネラ試料も同様の結果を示し、使用した DNA 抽出キットは糞便・生理食塩水ともに、同様の回収率を示すことがわかった。

(2) サルモネラ以外の菌

腸炎ビブリオ菌株は 10^3 ~ 10^5 希釈の DNA を用いた。いずれも、良好な増幅を示した。TM 値は 81.1~81.8°Cの間であった。また、セレウス菌株は 10^3 ~ 10^5 希釈の DNA を用いた。いずれも、良好な増幅を示した。これらは 10^4 CFU/g 程度の検出感度と考えられた。

5. 共通試料の作成とリアルタイム PCR

(1) 同一機種による複数機関における試験

調査に参加した 4 機関に整備されていた 4 種 5 台のリアルタイム PCR 機器を用いた。

その中で同型機種が 2 台あった(7500FAST)ので、結果の一部を図 2 に示す。同じ PCR 試薬を使用した結果は、増幅曲線の形態、蛍光強度ともに、ほぼ同一のグラフが描かれた。これらの結果は、この機種を使用する場合、DNA および primer を共通にするとほぼ同様の結果が得られることを示している。

(2) 異なる機種による試験

表 7 に菌種毎に機器別の換算菌数別 Ct 値を示した。7500FAST はほぼ同様の結果を示したので、1 箇所の結果のみを示した。最大濃度の DNA 試料では Mx3000P がどの菌種も Ct 値が低く、少ないサイクル数で標的遺伝子の増幅が認められた。他の機種と比較すると Ct 値で 3 サイクル程度の差があった。使用した試料では、*Bacillus cereus* と *Salmonella* spp. を除いて 10~15 サイクル目で増幅曲線が立ち上がり、 10^3 ~ 10^4 希釈試料まで蛍光光度の指数増幅が確認された。*B. cereus* と *Salmonella* spp. では増幅曲線の立ち上がりが遅く、 10^2 ~ 10^3 希釈試料まで蛍光光度の指数増幅が確認されるに過ぎなかった(データは示していない)。

一方、機種毎に結果をみると、TP800 を用いた *Vibrio parahaemolyticus* の測定で、Ct 値が確認できる検出最低換算濃度が他機に比較しやや高かった。すなわち、他機では 10^2 ~ 10^4 CFU/mL であるのに対して、TP800 では 10^5 CFU/mL であった。また、もっとも高い濃度の試料においても増幅曲線の立ち上がりが遅かった。他の菌種ではそのような傾向はみられなかったことから、*V. parahaemolyticus* 試料について TP800 では検査感度が他機よりやや低いことが推測されるが、今後、試料数ならびに機器数を増やして検討する必要がある。

6. 食中毒事例から得た試料のリアルタイム PCR 試験

FP/08-12 事例における有症者便の直接培養で

は 17 名中 12 名からウェルシュ菌が検出された。便の RPLA では菌が陽性であった 8 名分を実施し、すべてからウェルシュ菌エンテロトキシンが検出された。便増菌液から抽出した DNA を用いた PCR では検査に供した 19 検体全てからウェルシュ菌エンテロトキシン遺伝子が検出された。便から直接抽出した DNA を用いたリアルタイム PCR 検査では、有症者からは 17 名中 13 名が、従事者からは 3 名中 2 名からウェルシュ菌エンテロトキシン遺伝子が検出された(表 8)。一方、セレウス菌は、増菌法による菌検出、PCR による下痢毒・嘔吐毒検査では検出されるものの、リアルタイム PCR では、下痢毒・嘔吐毒ともに検出されなかった(表 8)。

食材・食品の検査では、菌培養、食品 DNA による PCR ならびにリアルタイム PCR で煮物(鶏肉、コンニャク)からウェルシュ菌エンテロトキシン遺伝子が検出された(表 9)。セレウス菌は培養法・嘔吐毒遺伝子の PCR ならびにリアルタイム PCR 法で試料のほぼ全体から検出され、エンテロトキシン遺伝子は一部の食品から検出された(表 9)。

平成 19 年度に島根県で発生した食中毒 11 例のうち複数の糞便検体が検査できた 3 事例の検査結果を表 10 に示した。事例 1 は焼肉店で生牛レバーをはじめ焼肉料理を喫食した 11 名のうち 6 名が発症し、発症後 7 日後に採取された糞便 3 検体中 2 検体から duplex SG-PCR により *C. jejuni* の種特異遺伝子が検出され、その後の培養検査により当該菌が分離された。事例 2 では飲食店で夕食を喫食した 13 名のうち 7 名が発症し、翌日に採取された糞便 5 検体中 2 検体から初回の duplex SG-PCR で *eaeA* 遺伝子が 2 検体から検出され、2 回目の duplex SG-PCR で *Plesiomonas shigelloides* の *gyrB* 遺伝子が別の 2 検体から検出された。培養検査では *P. shigelloides* が PCR 陽性の 2 名から分離された。*eaeA* 遺伝子陽性検体からは他の病原大腸菌の遺伝子は検出されず、EPEC が存在することが示唆されたが、*eaeA* 遺伝子保有株を分離することは出来なかった。事例 3 では飲食店で生鶏レバーなどを含む料理を喫食した 8 名全員が発症し、4 日後に

採取された糞便 5 検体についての初回の duplex SG-PCR で 3 検体から *C. jejuni* の種特異遺伝子、うち 1 検体から *astA* 遺伝子が検出された。糞便 8 検体の培養検査で 4 検体から *C. jejuni*、1 検体から *astA* 陽性 *E. coli* が分離された。

7. RFBS24 の作成と検証

Fukushima *et al*⁶ が開発した RFBS24 法を、実際の食中毒事例から得た糞便試料を用いて検査した。結果を表 10 に示した。試料番号 1 ならびに 4 はサルモネラ食中毒であったが、サルモネラの SYBR 法は検出感度が他の菌に比較し高いことから、培養法の結果と整合しなかったものと考えられる。ウェルシュ食中毒の試料番号 6 ならびに黄色ブドウ球菌食中毒の試料番号 7 は PCR 法と同じ DNA を用いた結果であり、糞便試料は培養法で *C. perfringens* 陽性であった。特に、試料番号 6 のウェルシュ食中毒事例では、便から培養法でウェルシュ菌、食品からセレウス菌や黄色ブドウ球菌が検出されており、原因菌決定までに 1 週間を要した。糞便試料ならびに食品試料から抽出した DNA では、対象とする遺伝子部位が増幅され、疫学調査ならびに培養法により検討された結論と同じ結論を短時間に出せることが確認された。

表 11 に 2009 年に実施した RFBS24 法と培養法ならびに従来の PCR 法の比較結果を示した。培養法と PCR 法とで実施した検体数が異なるが、従来の PCR 法と SG-PCR 法を比較した。2 例のサルモネラ事例では 4 検体中 3 検体陽性であるのに対して、SG-PCR 法では 4 検体中陽性はなかった。その他の菌種については、従来の PCR 法と SG-PCR 法で差はほぼ見られなかった。

表 12 に RFBS24 で行った試験を表 11 と Fukushima *et al*⁶ の結果を合算し、本研究事業で試験したものの結果を示した。合計 34 事例検討し、SG-PCR 法と培養法と両方実施した試料は 193 試料であった。その中でどちらも陽性であったのは 107 試料、どちらも陰性であったのは 73 試料、計 180 試料であった(一致率 93.2%)。事例でみると培養法の

方が陽性例の多い事例は 12 例と多く、SG-PCR 法の方が陽性例の多い事例は 1 例であった。しかし、SYBR 法と培養法が同じ結果を示した事例は 21 例であった。

D. 考察

1. SYBR Green 法によるリアルタイム PCR 法

今回、ABI PRISM 7000 で Power SYBR Green PCR Master Mix を用い、食中毒細菌を検出できるか否かについて検討したが、*S. Enteritidis*、*V. parahaemolyticus* 及び *B. cereus* においては、福島ら¹⁾の条件では標的遺伝子を増幅できなかつた。*S. Enteritidis* においては、アニーリング温度を変更することで増幅されることが確認されたが、非特異的な増幅が陰性コントロールに出現した。しかし、福島ら²⁾の報告では Light Cycler と SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa) の組み合わせで、全ての菌種において標準の温度条件で問題なく標的遺伝子が増幅されていることから、反応試薬とプライマーの組み合わせが良くなかつたことも考えられた。このことから、SYBR Premix Ex Taq™ II を用い、再検討を行ったところ良好な結果を得た。以後、主として SYBR Premix Ex Taq™ II を用いることとした。

表 12 に各プライマーの SG-PCR による特異性を示した。各プライマーは標的遺伝子を保有する食中毒菌のみを増幅した。特に、今回設計した、嘔吐毒産生 *B. cereus* 検出用プライマー Ces は嘔吐毒産生株 10 株のみが陽性で、嘔吐毒非産生株 30 株は全て陰性であった。

食中毒菌 8 菌種 (*Salmonella* spp., *C. jejuni*, 腸管出血性 *E. coli*, TDH 産生性 *V. parahaemolyticus*, *astA* 陽性 *E. coli*, *C. perfringens*, 嘔吐毒産生 *B. cereus*, *S. aureus*) の検出プライマーの感度の向上を目的とし、最近報告されたプライマーを文献上で比較し選択した。特に、従来のプライマーでは検出感度が低かつた *C. perfringens* と嘔吐毒産生 *B. cereus*, *S. aureus* については検出感度の高いプライマーを検討した。*C. perfringens* は 16S rRNA を標的としたプライマー、*S. aureus* は種特異遺伝子

femB を標的としたプライマーを使用することにより、当該菌の検出感度は向上した。嘔吐毒産生 *B. cereus* については嘔吐毒産生に關与するセレウリドの *ces* 遺伝子²⁾を標的することにより特異性と感度の高いプライマーを設計することができた。腸管出血性 *E. coli* と *C. jejuni*, *Salmonella* spp. 検出用プライマーは増幅産物の Tm 値が duplex SG-PCR での組み合わせに適し感度の高いものを選択した。TDH 産生性 *V. parahaemolyticus* と *astA* 陽性 *E. coli* については従来のプライマーを使用し、表 7 と図 1 に示す 8 菌種を網羅的に検出する duplex SG-PCR システムを開発した。これらの 8 菌種の食中毒菌を検査することにより、表 1 に示すとおりわが国で発生する食中毒事例のほとんどに対応することができる。

2. Duplex primer によるリアルタイム PCR 法

表 2 に示す食中毒菌 8 菌種を一度に検出するための duplex SG-PCR における 4 組のプライマーの組み合わせによる、融解曲線解析を行った。各組み合わせにおいて Tm 値に 1~5℃ の違いがありそのピークを明確に区別することができた。*astA* 陽性 *E. coli* の Tm 値は 84.4~85.4 と菌株により違いがあった。

Duplex SG-PCR を 2002 年から 2006 年に発生した食中毒 20 事例の検査に応用した。細菌培養検査で原因菌が検出されなかつた 1 事例を除く 19 事例から原因菌の標的遺伝子が検出され、食中毒検査の迅速化に役立てることができた。2007 年には 3 事例を検査し、表 10 に示すように duplex SG-PCR により原因菌を推定し、効率的な分離作業が行えた。また、1 事例においては duplex SG-PCR の初回試験で *eaeA* 遺伝子が検出され、2 回目の試験では *P. shigelloides* の種特異遺伝子が検出された。その後の分離培養においては *eaeA* 遺伝子を保有する大腸菌を分離することはできなかつたが、*P. shigelloides* については分離培地に発育した 1~2 集落を探し分離することができた。これらのことは duplex SG-PCR の初回試験で原因と推測される菌

が検出されても、混合感染の有無の確認を目的とした他のプライマーによる試験は欠くことができないこと、また、SG-PCR によるスクリーニングは *P. shigelloides*をはじめ *Yersinia enterocolitica* や *Aeromonas hydrophila*, *Providencia alcalifaciens* などの発生頻度が極めて低く、培養する機会の少ない食中毒原因菌の検査に極めて有効な方法であることが示された。これらの稀少な食中毒原因菌のスクリーニングにも特異性に優れ検出感度の高いプライマーの再検討が必要と考えられた。

3. 食品への添加試験

新たなプライマーセットを用いたSG-PCRによる食品からの食中毒原因菌の検出について、市販レトルト食品のハンバーグステーキへの添加回収試験を行い検討した。食中毒における原因食品の多くはハンバーグなどの調理済み食品であり、これらの食品には動物性タンパク質の他に小麦粉、食油、調味料などをはじめ PCR 反応阻害物質や分別不可能な微細なマトリックスが含まれている。本研究では密度勾配媒体の Percoll を用い浮遊法と沈殿法を用いることにより、食品 3g に含まれる食中毒原因菌を生菌状態で高率に回収すると共に PCR 反応阻害に関わる食品マトリックスを除去し、その検体量を 1 mL に濃縮した。ハンバーグステーキへ添加した 8 種類の食中毒原因菌の濃縮物からの定量 SG-PCR による回収量を生菌数測定の結果と比較・評価した。生菌数測定による回収量は菌種によって異なるが、添加量から 0~2 log 低下し、その回収率は腸管出血性 *E. coli* と *C. jejuni*、*V. parahaemolyticus* が 10 ~ 43%、*Salmonella* Enteritidis は 4%であり、その他の菌は 0.2~0.9% 以下であった。定量 SG-PCR による回収量は腸管出血性 *E. coli* を除く 7 菌種では添加量から 1~4 log 低下した。その回収率は *V. parahaemolyticus* が 79%、*Salmonella* Enteritidis が 20%、腸管出血性 *E. coli* が 11%と高率であるのに対し、*C. jejuni* と *C. perfringens*、*B. cereus* は 3%、*astA* 陽性 *E.*

coli は 0.4%であり、*S. aureus* は 0.04%と低率であった。今回の試験ではハンバーグのみについて添加回収試験を行ったが、既に報告した 12 種類の食品への添加回収試験¹⁸⁾とほぼ同様な成績であり、今回新たに使用したプライマーも食品からの食中毒原因菌の検出に十分対応できるものと考えられた。いずれにせよ、密度勾配遠心法により数グラムの食品から濃縮した試料から SG-PCR で $\leq 10^3$ CFU/g の食中毒菌を確実に検出することは難しく、本法は食品を汚染する $>10^4$ CFU/g の食中毒菌の検出に有効であることが示された。

細菌性食中毒は食中毒原因菌が食品中で増殖し産生される大量の毒素や増殖した菌の摂取により発生する毒素型および中間型食中毒と食品と共に摂取された食中毒菌が腸管内で増殖して発生する感染型食中毒に分けられる。*S. aureus* や嘔吐毒産生 *B. cereus*, *C. perfringens* などの毒素型および中間型食中毒における摂取菌量は 10^4 個以上で多くの事例では 10^7 個程度の菌の摂取により発生する¹⁹⁾。また、*Salmonella* spp., *C. jejuni*, *E. coli* などの感染型食中毒においても潜伏期間が 50~60 時間以内の事例では摂取菌量は *Salmonella* 食中毒の研究で 10^4 個以上であることが報告されており¹⁷⁾、このような大量菌に汚染された食品を摂取した事例では SG-PCR は極めて有効な迅速検査法であることが示唆された。

4. 菌株の糞便への添加試験

菌株を糞便に添加した模擬試料から DNA を抽出し、SG-PCR を実施したところ T_m 値が変動した。複数回の試験ならびに複数の菌種の DNA による試験を実施した結果、 T_m 値に変動が生じるウェルに特徴があった。機器の光学系には問題は見られず、特定のウェルに変動が発生したため、PCR 用プレートならびにキャップについてロットの異なるものを使用したところ、変動は最小化した。しかし、温度変化がウェルにより固定化しているため、ブロックの温度管理の問題、ブロックと PCR プレートの形態的マッチング等安定な結果を得るためには器具の選択や

機器の使用についての詳細な検討が必要である。

5. 共通試料の作成とリアルタイム PCR

共通試料を用いたリアルタイム SG-PCR では、異なる施設で異なる検査者が行った、同一機器を用いた施設の結果はほぼ同一の結果を得ることができた。同一種の機器を使用した場合、検査者の技術は検査結果に影響する要因としては PCR 増幅系、プライマーの種類より小さいと考えられる。

機器が異なる場合、結果は様々であった。最大濃度の DNA 試料では Mx3000P がどの菌種も Ct 値が低く、少ないサイクル数で標的遺伝子の増幅が認められた。他の機種と比較すると Ct 値で 3 程度の差があった。検出できる amplicon 量の増加が 3 サイクル程度速く、*astA* 遺伝子陽性大腸菌とサルモネラ以外で、比較できる DNA 濃度試料での Ct 値の差として現れていた。一方、*astA* 遺伝子陽性大腸菌とサルモネラでは最大濃度の DNA 試料で 5-6 程度の差があるものの、比較できる DNA 濃度試料での Ct 値の差は 4 程度であった。

一方、DNA 試料の由来菌液のコロニーカウントは 10^7 - 10^9 cfu/mL であった。これらから 5 台の機器全てでそれぞれの菌株の対象遺伝子陽性示すためには、換算菌濃度で 10^5 - 10^6 CFU/mL が必要であることがわかった。急性期の患者便には 10^6 CFU/g 以上の菌が含まれているといわれており²⁾、今回の結果は、試料から抽出される DNA の抽出効率にもよるものの、使用した primer は、急性期便試料からほぼ検出できると考えられた。

6. Single primer を用いた食中毒事例から得た試料のリアルタイム PCR 試験

FP/08-12 事例では、初期対応で異なる菌種が原因と推測されたため、すべての検査過程に影響があったものと思われる。リアルタイム PCR は、ウェルシュ菌とセレウス菌について実施し、DNA 抽出後 2 時間程度で結果が得られた。

便の検査では、便から DNA を抽出しリアルタイム PCR を行う場合の検出感度が、 10^4 - 10^5 cfu/g 程度で

あることから、便中に十分菌が増殖していることが必要である。ウェルシュ菌やセレウス菌は、健康人の便検査でも検出されるために腸管内に常在していると考えられるが、その菌量は少なく、増菌培養を行って検出されるレベルである。感染症では、それぞれの菌が腸管内で十分な菌量にまで増殖していると考えられ、福島ら²⁾が報告しているとおおり、便から抽出した DNA によるリアルタイム PCR は、検出感度が低いために常在菌の影響を受けないことが考えられる。

食品から DNA 抽出を行い、食品由来感染症の原因食品を追求するための方法としてリアルタイム PCR を使用することは、便と同様食品中に菌が十分増殖していることが条件になる。感染型食中毒では食品中の菌量が少なく検出されないおそれがあるが、今回の事例の原因菌と推定されたウェルシュ菌やセレウス菌のような毒素型食中毒では食品中の原因菌量が多く、食品から抽出した DNA を用いたリアルタイム PCR は有効であると考えられる。特にウェルシュ菌の場合保存法に制限が多く、食材や検食を保管する通常の凍結では短時間で死滅することが知られている²⁰⁾。したがって、凍結や加熱などの操作により損傷を受け、その後の培養により菌が回収されない事例においても、DNA を抽出し過去の試料中の対象菌の増殖経過を明らかにすることが可能である。Ikeda *et al.*¹³⁾は黄色ブドウ球菌死菌の定量にリアルタイム PCR を使用し、添加回収試験で生菌と死菌に相関があるとし、加熱した試料から黄色ブドウ球菌遺伝子を検出している。FP/08-12 事例では菌培養でウェルシュ菌が一部の残品から検出されたが食品から抽出した DNA では、PCR、リアルタイム PCR ともに複数の食品(検食・残品)から検出され、保存中に菌が死滅したことが考えられた。リアルタイム PCR は、死菌を含めて対象遺伝子の定量を行うことから、保存条件が厳しい細菌で、培養できない条件であっても、過去における試料中の対象菌増殖の経過が解明され、食水系感染症の原因解明に有効な手段と考えられる。

SYBR Green リアルタイム PCR 法は TaqMan プロ

ープを用いたリアルタイム PCR 法に比べ、特異性は劣るが安価である。今回の結果から、福島らも報告している²⁾とおり、細菌感染症の集団感染事例を迅速にスクリーニングするために極めて有用であることが示唆された。さらに多くの菌のプライマーを用いて検討することにより、食水系感染症の診断をはじめ、食品衛生対策にも貢献できるものと考えられる。

福島らは Duplex SYBR Green リアルタイム PCR について、SYBR Green を用いたインターカレーター法の特異性は Tm 値で確認できることにあり、Tm 値の異なるプライマーを組み合わせることによって食中毒事例に対し迅速にスクリーニングできることを報告している²⁾。今回、数種類の組み合わせを実施したが、Tm 値が近い値のため、検体を用いた場合判別が困難になることが考えられた。Tm 値で確認ができるものの、さらに検討が必要であると考えられる。

食中毒由来の糞便検体を用いて実施した結果から、*C. jejuni* については分離培養と検出で結果はほぼ同様の結果となった。特に表 10 の番号 3 の検体については *C. jejuni* が糞便中に高濃度に存在していたと考えられた。DNA 抽出が食中毒発生時から時間を経過していたが、*C. jejuni* が糞便中で増殖しやすいとは考えにくく、食中毒発生時に対応できていても検出は可能であったと思われる。また、表 12 の培養において *Salmonella* O4 が検出されているが、増菌培養で検出したということから、糞便中の菌量が少なく、リアルタイム PCR では検出できなかったと思われる。

7. RFBS24 の作成と検証

試料番号 1 ならびに 4 はサルモネラ食中毒であったが、サルモネラの SYBR 法は検出感度が他の菌に比較し高くないことから、培養法の結果と整合しなかったものと考えられる。ウェルシュ食中毒の試料番号 6 ならびに黄色ブドウ球菌食中毒の試料番号 7 は PCR 法と同じ DNA を用いた結果であり、糞便試料は培養法で *C. perfringens* 陽性であった。特に、試料番号 6 のウェルシュ食中毒事例では、便から培養法でウェルシュ菌、食品からセレウス菌や黄色ブ

ドウ球菌が検出されており、原因菌決定までに 1 週間を要した。糞便試料ならびに食品試料から抽出した DNA では、対象とする遺伝子部位が増幅され、疫学調査ならびに培養法により検討された結論と同じ結論を短時間に出せることが確認された。

表 12 を見る限り、サルモネラを除いて良好な結果を示したと考えられる。Fukushima *et al*²⁾の結果を合算し、本研究事業で試験したのを見ると、合計 34 事例検討し、SYBR 法と培養法と両方実施した試料は 193 試料であった。その中でどちらも陽性であったのは 107 試料、どちらも陰性であったのは 73 試料、計 180 試料であった(一致率 93.2%)(表 12 参照)。

表 12 では、培養法の方が陽性例の多い事例は 12 例と多く、SYBR 法の方が陽性例の多い事例は 1 例であった。しかし、SYBR 法と培養法が同じ結果を示した事例は 21 例であり、SYBR 法は培養法とほぼ同じ結果を示すものと考えられる。

以下結果は示さないが、行政的には原因が不明であった事例について *astA* 遺伝子が 89%の検体から検出された例があった。培養検査ではカンピロバクターのみ検出されたが、リアルタイム PCR により EPEC およびエロモナスも関与していると推察された例があった。リアルタイム PCR で原因菌の遺伝子が先行検出され、培養検査により同一原因菌が分離された例があった。単一の原因と結論づけられたが、他の菌の関与が推定された例等があった。

これらの結果から、(1)食中毒発生時にリアルタイム PCR を用いることにより、迅速な結果が得られ、従来法の実施に関して効率的対応を可能にする、(2)迅速に複数の病原遺伝子を検出するため、原因物質の特定について重層的な解析を可能にし、原因究明に資することが可能となる、(3)原因不明の事例について網羅的に検査することにより、原因推定を可能にすることがあり、事例発生時に迅速網羅的検査が可能となると考えられる。

E. 結論

SYBR Green を用いたリアルタイム PCR は使用した機器で動作が確認され、導入する意義は高い。

Multiplex PCR とするために single primer 時より検出感度は落ちるものの、増幅産物の確認に T_m 値を用いるため分別は可能である。24 種の遺伝子を同時に検出する系を作出した。これを事例発生時に導入することは有用と考えられる。

F. 研究発表

1. 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., Etoh, Y., Sugama, K., Yashiro, S., Iida, N., Yamaguchi, K.:
Simultaneous Screening of 24 Target Genes of Foodborne Pathogens in 35 Foodborne Outbreaks Using Multiplex Real-time SYBR Green PCR Analysis, in applying to Inter. J. Medical Bact.

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.

○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、東京、APR、2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願中

H. 文献

1) 熊谷進: モダンメディア、47(7)、181-187、2001.

2) 福島博、角森ヨシエ: リアルタイムPCR法による食中毒細菌の迅速スクリーニングの検討、感染症誌、79:644-655、2005.

3) Hoorfar, J., Ahrens, P., Radstrom, P.: Automated 5'-Nuclease PCR Assay for Identification of *Salmonella enterica*, J. Clinical Microbiol., 38(9), 3429-3435, 2000.

4) Wise, M.G. & Siragusa, G.R.: Quantitative Detection of *Clostridium perfringens* in the Broiler Fowl Gastrointestinal Tract by Real-time PCR, Applied Environ. Microbiol., 71(7), 3911-3916, 2005.

5) Wilson, D.L., Abner, S.R., Newman, T.C., Mansfield, L.S., Linz, J.E. : Identification of Ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* by Use of a Fluorogenic PCR Assay, J. Clinical Microbiol., 38, 3971-3978, 2000.

6) 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>.

7) Nielsen, EM., Andersen, MT. : Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay, J Clin Microbiol, 41, 2884-2893, 2003.

8) Klotz, M., Opper, S., Heeg, K., Zimmermann, S.: Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A to D by real-time fluorescence PCR assay, J Clin Microbiol, 41, 4683-4687, 2003.

9) Nishibuchi, M., Takeda, Y., Tada, J., Ohashi,

- T., Nishimura, N., Ozaki, H., Fukushima, S.: Method to Detect the Thermostable Direct Hemolysin Gene and a Related Hemolysin Gene of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR, *Nihon Rinsho*, 642, 348-352, 1992.
- 10) Yatsuyanagi, J., Saito, S., Sato, H., Miyajima, Y., Amano, K., Enomoto, K.: Characterization of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strain Harboring the *astA* gene that were Associated with a Waterborne Outbreak of Diarrhea in Japan. *J. Clinical Microbiol.*, 41, 2033-2039 (2003).
- 11) Kato, N., Kim, S-M., Kato, H., Tanaka, K., Watanabe, K., Ueno, K, Chong, Y.: Identification of Enterotoxin-Producing *Clostridium perfringens* by the Polymerase Chain Reaction (in Japanese with English summary), *J. Jpn. Ass. Infect. Dis.*, 67(8), 724-729, 1993.
- 12) Nogva, H. K., Bergh, A., Holck, A., Rudi, K.: Application of the 5'-nuclease PCR Assay in Evaluation and Development of Methods for Quantitative Detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4029-4036, 2000
- 13) Fukushima, H., Kawase, J., Etoh, Y., Sugama, K., Yashiro, S., Iida, N., Yamaguchi, K.: Simultaneous Screening of 24 Target Genes of Foodborne Pathogens in 35 Foodborne Outbreaks Using Multiplex Real-time SYBR Green PCR Analysis, in applying to *Inter. J. Medical Bact.*
- 14) Fey, A., Eichler, S., Flavier, S., Christen, R., Hoefle, M.G., Guzman, C.A.: Establishment of a Real-time PCR-based Approach for Accurate Quantification of Bacterial RNA Targets in Water, Using *Salmonella* as a Model Organism.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 3618-3623, 2004.
- 15) 坂崎利一、吉崎悦郎、三木寛二: 新細菌培地学講座 -上-、第二版、182-192、近代出版、1986.
- 16) 感染症情報センター(国立感染症研究所): Salmonellosis in Japan as of June 2006. *IASR*, 27, 191-192, 2006.
- 17) Abe, K., Saito, N., Kasuga, F., and Yamamoto, S.: Prolonged incubation period of salmonellosis associated with low bacterial doses, *J. Food Prot.*, 67, 2735-2740, 2004.
- 18) Fukushima, H., Katsube, K., Hata, Y., Kishi, R. and Fujiwara, S.: Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 92-100, 2007.
- 19) Kramer, JM. And Gilbert, RJ.: *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species: Food borne bacterial pathogens. Doyle, MP (ed.) pp21-27, Marcel Dekker, Inc. New York, 1988.
- 20) Food and Drug Administration: Chapter 16. *Clostridium perfringens*, *Bacterial Analytical Manual*, 8th ed., 16.01-16.06, AOAC International, 1998.
- 21) Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K. and Makino, S-i.: Quantification analysis of *Staphylococcus aureus* in skimmed milk powder by real-time PCR, *J. Vet. Med. Sci.*, 67, 1037-1041, 2008.

表 1 我が国における細菌性食中毒の発生状況

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	469	428	447	491	558	645	416	335	509
<i>Salmonella</i> spp.	518	361	465	350	225	144	124	89	99
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	422	307	229	108	205	113	71	28	17
<i>Staphylococcus aureus</i>	87	92	72	59	55	63	61	43	58
<i>Clostridium perfringens</i>	32	22	37	34	28	27	35	20	34
<i>Bacillus cereus</i>	10	9	7	12	25	16	18	5	21
<i>Escherichia coli</i> (EHEC)	16	24	13	12	18	24	24	18	17
その他の <i>Escherichia coli</i>	203	199	83	35	27	25	19	9	12
<i>Clostridium botulinum</i>			1				1	1	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	4	8		1				
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1	5	1	2	2					1
<i>Vibrio cholerae</i>	1	1	2						3
<i>Shigella</i> spp.	1	3	2	1	1		1		3
その他の細菌	18	18	9	6	9	8	4	5	4
総事例数	1,783	1,469	1,377	1,110	1,152	1,065	774	553	778

表 2 使用した菌種と数

菌種	使用株数	備 考
Shigatoxin producing <i>Escherichia coli</i>	54	<i>stx1, stx2, eae, astA</i> 陽性含む
Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	8	
Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	22	LT, ST
Enterocoagulative <i>Escherichia coli</i>	64	
Diffusely adherent <i>Escherichia coli</i>	4	
Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	5	
<i>Shigella</i> spp.	38	<i>dysenteriae, flexneri, sonnei</i> 含む
<i>Salmonella</i> spp.	85	亜種I, 亜種II, 亜種III含む
<i>Yersinia enterocolitica</i>	28	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	27	
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	4	
<i>Providencia alcalifaciens</i>	8	
<i>Campylobacter coli</i>	43	
<i>Campylobacter jejuni</i>	44	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	45	
<i>Vibrio cholerae</i>	17	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	93	<i>tdh, trh</i> 含む
<i>Clostridium perfringens</i>	56	
<i>Listeria monocytogenes</i>	46	1/2a, 1/2b, 4b含む
<i>Staphylococcus aureus</i>	35	<i>sea, seb, sec, sed, see, seg</i> 含む
Emetic <i>Bacillus cereus</i>	27	
Enterotoxigenic <i>Bacillus cereus</i>	28	

表 3 single primer で試験した際に使用した primer

菌種	標的 遺伝子	primer F primer R	塩基配列	サイズ	文献
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	StyinvA-JHO-2-right	TCGTCATTCCATTACCTACC	20mer	3
		StyinvA-JHO-3-left	AAACGTTGAAAACTGAGGA	20mer	
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>itsA</i>	Cperf165F	CGCATAACGTTGAAAGATGG	20mer	4
		Cperf165R	CCTTGGTAGGCCGTTACCC	19mer	
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>gylA</i>	JL238	TGGGTGCTGTTATAGGTCGT	20mer	5
		JL239	GCTCATGAGAAAGTTACTC	20mer	
<i>Bacillus cereus</i>	<i>ces</i>	ces-TM-F	GATGTTTGGCAGCATGCAA	19mer	6
		ces-TM-R	CTTTCGGCGTGATACCCATT	20mer	
EHEC	<i>eae</i>	eae-F2-Nielsen	CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA	26mer	7
		eae-R-Nielsen	CTCATGCGGAAATAGCCGTTA	21mer	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femB</i>	FemB-fw	AATTAACGAAATGGGCAGAAACA	23mer	8
		FemB-rv	TGCGCAACACCCTGAACTT	19mer	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	Tdh199-F	GGTACTAAATGGCTGACATC	20mer	9
		Tdh199-R	CCACTACCACTCTCATATGC	20mer	
<i>astA</i> positive <i>Escherichia coli</i>	<i>astA</i>	EAST-1S	GCCATCAACACAGTATATCC	20mer	10
		EAST-1AS	GAGTGACGGCTTTGTAGTCC	20mer	

表 4 共通試料を用いる試験に使用したプライマー

菌種	Tm値	増幅部位	primer 名称	配列	文献
1 <i>Clostridium perfringens</i>	76.1	<i>cpe</i>	F GAP-11	GGTTCATTAATTGAAACTGGTG	11
			R GAP-12b	AACGCCAATCATATAAATTACCAGC	
2 <i>Campylobacter jejuni</i>	77.8	specific DNA	F AB-F	CTGAATTTGATACCTTAAGTGACGC	12
			R AB-R	AGGCACGCCTAAACCTATAGCT	
3 Emetic toxin producing <i>Bacillus cereus</i>	78.5	<i>ces</i>	F ces-TM-F	GATGTTTGGCAGCATGCAA	6
			R ces-TM-R	CTTTCGGCGTGATACCCATT	
4 <i>eae</i> positive <i>Escherichia coli</i>	78.9	<i>eaeA</i>	F eae-F2	CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA	7
			R eae-R	CTCATGCGGAAATAGCCGTTA	
5 <i>Staphylococcus aureus</i>	81.5	<i>femB</i>	F FemB-fw	AATTAACGAAATGGGCAGAAACA	8
			R FemB-rv	TGCGCAACACCCTGAACTT	
6 <i>tdh</i> positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	80.5	<i>tdh</i>	F tdh-F176	TCCATCTGTCCCTTTCTCTG	13
			R R422	AGACACCGCTGCCATTGTAT	
7 <i>astA</i> positive <i>Escherichia coli</i>	83.7	<i>astA</i>	F EAST-1-S	GCCATCAACACAGTATATCC	10
			R EAST-AS	GAGTGACGGCTTTGTAGTCC	
8 <i>Salmonella</i> spp.	82.6	<i>invA</i>	F invA2-F	GATTCTGGTACTAATGGTGATGATC	14
			R invA2-R	GCCAGGCTATCGCCAATAAC	

表 5 使用した *Salmonella* spp.株

抗原型	血清型名
亜種I <i>Salmonella enterica enterica</i>	
O2群	Paratyphi A
O4群	Agona, Chester, Derby, Heidelberg, Schleissheim, Schwarzengrund, Stanley, Typhimurium, O4:i:-
O7群	Braenderup, Choleraesuis, Infantis, Livingstone, Mbandaka, Montevideo, Oranienburg, Richmond, Rissen, Singapore, Tennessee, Thompson, Virchow
O8群	Kentucky, Kottbus
O9群	Typhi
O16群	Hvittingfoss
O3,10群	Anatum, Weltevreden
O11群	Abaetetuba
亜種I以外	
<i>Salmonella enterica salamae</i> serovar Sofia	
<i>Salmonella enterica diarizonae</i>	

ゴシック体の血清型は、2004・2005年、人から分離されたなかで上位15位以内のサルモネラ血清型

表 6 共通試料として使用した菌株および菌液濃度

菌種	菌株番号	由来等			コロ-カウント cfu/mL
		事例分類	事例番号	血清型等	
1 <i>Clostridium perfringens</i>	HIPH01324	食中毒事例	FP/01-53	Hobbs UT	5.0×10^8
2 <i>Campylobacter jejuni</i>	HIPH01278	食中毒事例	FP/01-LG	Penner K	4.9×10^8
3 Emetic toxin producing <i>Bacillus cereus</i>	HIPH06220	食中毒事例	FP/06-25		3.3×10^7
4 eae陽性 <i>Escherichia coli</i>	HIPH07066	感染症事例	sp/07-4	O157:H7	1.5×10^9
5 <i>Staphylococcus aureus</i>	HIPH09416	食中毒事例	FP/09-LG	sea positive	1.4×10^9
6 TDH-positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	HIPH06159	食中毒事例	FP/06-27	O3:K6	4.1×10^8
7 astA陽性 <i>Escherichia coli</i>	HIPH07162	感染症事例	HP/07-30	O153:HNM	1.1×10^9
8 <i>Salmonella</i> spp. (<i>S. Enteritidis</i>)	HIPH05316	食中毒事例	FP/05-11	O9:g,m:-	6.3×10^8