

201237004B

厚生労働科学研究費補助金
健康安全・危機管理対策総合研究事業

地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の
確立と、その精度管理の実施、及び疫学機能
の強化に関する研究

平成22年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 調 恒 明
山口県環境保健センター

平成25(2013)年 3月

目次

I	総合研究報告書	
	地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究	
	調 恒明 -----	1
II	分担研究総合報告書	
1	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と精度管理(細菌部門) 後藤 良一 -----	9
2	原因不明ウイルス感染症に対する迅速網羅的診断法とその精度管理法の開発(ウイルス部門) 高橋 和郎 -----	53
3	健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に関する研究(理化学部門) 田中 敏嗣 -----	67
4	疫学情報解析機能の強化と人材育成に関する研究(疫学部門) 小澤 邦寿 -----	83
III	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	101
IV	研究成果の刊行物・別刷 -----	101

I 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

総合研究報告書

地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、
その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究

研究代表者 調 恒明（山口県環境保健センター所長）

研究要旨：

地方衛生研究所は、地方行政のフロントラインにおける試験検査機関として、感染症、食中毒の原因究明のための検査を、利用可能な最も高いレベルの技術を用いて原因を迅速且つ正確に究明する事を使命としている。また、検査結果を行政機関に提出するのみならず、結果を分析し、科学的見地から対策に対する提言を行うことが重要である。

本研究では、地方衛生研究所の検査機能、疫学調査機能強化のために細菌、ウイルス、理化学の検査、及び疫学部門の研究分担班を構成し、食中毒菌の網羅的迅速検査法の開発と標準化、呼吸器疾患・中枢神経系疾患原因ウイルスの網羅的迅速検査法の開発と検査結果の標準化、LC-MS/MS を用いた自然毒の検出法の開発と標準化、地方衛生研究所における疫学データの分析・情報発信の強化について研究を行った。

その結果、1. リアルタイム PCR 法を用いて食中毒菌の 24 種の病原遺伝子を網羅的に検出するシステム RFBS24 の検出感度を従来の培養法と同等或いはそれ以上に向上させることに成功し、食中毒原因菌の同定までの時間を従来の 4-7 日から 1 日に短縮する事が可能となった。2. 20 種類の呼吸器系、中枢神経系ウイルスを検出する multiplex PCR 法を検討、改良し、検出感度の検証を行い一部のウイルスを除いて高感度を得ることを示し、この方法を臨床検体に応用した。3. 化学物質による健康危機事例について、検査法などの情報の共有を図る事を目的としてデータベース化し、迅速な対応に役立つツールを構築した。また、化学物質による食中毒事例への検査対応として、LC-MS/MS を用いてふぐ毒 TTX を始め 6 種類の自然毒の迅速検出法を確立し精度管理を行った。4. 地方衛生研究所における疫学機能の強化、人材育成を目的として研究を行った。研修については、研修プログラムの基礎項目、選択項目を策定した。また、日本公衆衛生学会自由集会において 3 回にわたり研修会を実施した。さらに、感染症情報（患者数）を保健所管区に分けて地図上に表示するための方法を開発した。

本研究班において確立した検査法は地方衛生研究所の検査において極めて有用であり、地方衛生研究所全国協議会のホームページに掲載するなど、普及を図っていく予定である。

研究分担者

長井 忠則（平成 22 年度）	北海道立衛生研究所	所長
後藤 良一（平成 23-24 年度）	北海道立衛生研究所	所長
高橋 和郎	大阪府立公衆衛生研究所	副所長
田中 敏嗣	神戸市環境保健研究所	所長
小澤 邦寿	群馬県衛生環境研究所	所長

A. 研究目的

本研究では、地方衛生研究所（地衛研）の検査機能、疫学調査機能強化のために細菌、ウイルス、理化学の検査、及び疫学部門の研究分担班を構成し検査法の開発等を行った。食中毒事例に対する営業停止などの行政処分はできる限り早期に行う事が望ましいが、食中毒菌の分離培養法では 4-7 日と時間と労力を要する。これを短縮するためにリアルタイム PCR 法を用いた網羅的迅速検査法を実用化した。また、呼吸器、中枢神経系疾患の原因ウイルスについては、20 種類のウイルス遺伝子を迅速に検出する方法の開発とその標準化を行った。さらに、健康被害を起こす自然毒は、原因物質が多種に上るため、地衛研がしばしば検査対応に苦慮する。そこで、LC-MS/MS を用いた自然毒の迅速検出法を開発し、その標準化を行った。疫学機能強化については、地衛研における疫学データの分析・情報発信の強化を目的として研修による人材育成と研究を行った。

B. 研究方法

B-1. 細菌部門 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と精度管理

既に開発されていた、リアルタイム PCR を用いて食品衛生法で定められた 22 の病原微生物と 2 つの下痢症原因菌の 24 の病原遺伝子を網羅的に検出する迅速検査法 RFBS24 を改良し実用化した。対象菌種はサルモネラ属菌、ビブリオ、2 つのセレウス菌、カンピロバクター・ジェジュニ、コリ、黄色ブドウ球菌、ウェルシュ菌、7 種類の病原大腸菌、赤痢菌、コレラ菌、プレジオモナス・シゲロイデス、エロモナス・ハイドロフィラ、2 つのエルシニア属菌、リステリア、プロビデンシア・アルカリファシエンスの 24 菌株である。まず、全ての菌の DNA を調整し、モル濃度をそろえ、検出感度を検証した。その結果、5 つの反応系において 1 つ以上の機関で検出不能であることがわかり、24 の反応系のうち、10 において PCR プライマーを再設計し、また反応条件の改良を行った。完成した方法を用いて実際の食中毒事例について検出感度の検証を行った。

B-2. ウイルス部門 原因不明ウイルス感染症に対する迅速網羅的診断法とその精度管理法の開発

平成 21 年度までに開発した 20 種類のウイルス遺伝子を検出する multiplex PCR 法の検出感度を検討し、臨床検体については、同一検体を参加 4 機関で検査を行い、

検出感度を比較した。対象としたウイルスは、図1のpanel Aに示したとおりである。

B-3. 理化学部門 健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に関する研究

1. 自然毒による中毒事例の集積：地衛研職員専用ホームページにある既存のデータベース「自然毒中毒事例情報システム」を活用し、事例の集積と情報共有を図った。2. LC-MS/MS による自然毒の迅速試験法の開発：検体にメタノールを加え抽出後、GFP 濾紙で濾過、Millex-LG4 (0.20 μ m)(Millipore)に通して LC-MS/MS で分析した。毎年、16-20 機関の地衛研の参加を得て、検査法の開発とその検証、精度管理を行った。

B-4. 疫学部門 疫学情報解析機能の強化と人材育成に関する研究

1. 感染症情報センターの研修プログラムを作成した。2. 地方感染症情報センターに必要な疫学機能の強化について検討するため、九州ブロック、及び中国四国ブロックにおいて地方感染症情報センターの現状と課題について調査した。3. 地方感染症情報センター職員に対する研修会を行った。4. 都道府県の保健所管轄地域ごとに地図上に患者数を表示する簡便な方法を開発した。

倫理面への配慮

本研究における検査手法の検討、評価については、原則としては倫理面への対応は必要ない。また、本研究の試験検査

で取り扱う対象は行政検査対象物のため、特に倫理面の問題は生じないと考える。その他、実験動物を用いる実験を行うにあたり、研究代表者、分担者の所属する地衛研の「動物実験管理手順」等に定める規則に従った。また、疫学情報を取り扱う感染症サーベイランスの関連情報は、定められた情報取扱い規則に準じて取扱い、個人情報保護の徹底を計っている。

C. 研究結果

C-1. 細菌部門 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と精度管理

24 セットの primer のうち、8 組 20 本のプライマーについて設計し直した。また、反応サイクル数を 30 回から 35 回に延長し、反応に用いる試薬も変更した。これらの改良により検出感度が 100 倍以上改善し、100 - 1000 個程度の細菌を検出可能となり、迅速かつ正確な食中毒原因の探索が可能となると考えられた。病原性大腸菌を例にとると、5 つの病原遺伝子の検出感度が全て培養法を同等かそれ以上に改善された (表 1)。そこで、実際の食中毒事例 (総患者数 67 名) に応用した。事例数はサルモネラ食中毒 4 事例、カンピロバクター食中毒 7 事例、下痢原性大腸菌による集団下痢症の事例 1 事例、プレシオモナス・シゲロイデス食中毒事例 1 事例、ウェルシュ菌、黄色ブドウ球菌、セレウス菌による食中毒 4 事例である。いずれも培養法と同等かそれ以上の感度を得た。

表 1 培養法、RFBS24II (改良前)、RFBS24V (本研究による改良) の検出率の比較

病原遺伝子名	培養法 (従来法) (%)	RFBS24 ver.2 (%)	RFBS24 ver.5 (%)
<i>aggR</i>	50	0	62.5
<i>astA</i>	75	87.5	100
ST	37.5	25	50
<i>daaD</i>	0	12.5	12.5
<i>eae</i>	0	0	37.5

C-2. ウイルス部門 原因不明ウイルス感染症に対する迅速網羅的診断法とその精度管理法の開発

研究協力者の4つの参加機関において、作製したマルチプレックス PCR 診断法を用いて呼吸器および中枢神経感染症患者検体について病原体の検出を行い、検出率等を検討した結果、single PCR と遜色ない検出感度が得られたと結論した。PCR 反応系は(図 1 Panel A)、20 種類の PCR を4つの反応で行うことから時間と

労力を大幅に軽減できる。図 1 Panel B には、山口県内の医療機関から検査依頼があった生後 2 週間の新生児突然死の症例について咽頭ぬぐい液を検査した結果を示した。黄色の下向き矢印が患者検体、その他は陽性コントロールである。赤の横向き矢印で示した様に患者検体で RS ウイルスの遺伝子が検出された。塩基配列決定の結果、確かに RS ウイルスであることが確認された。

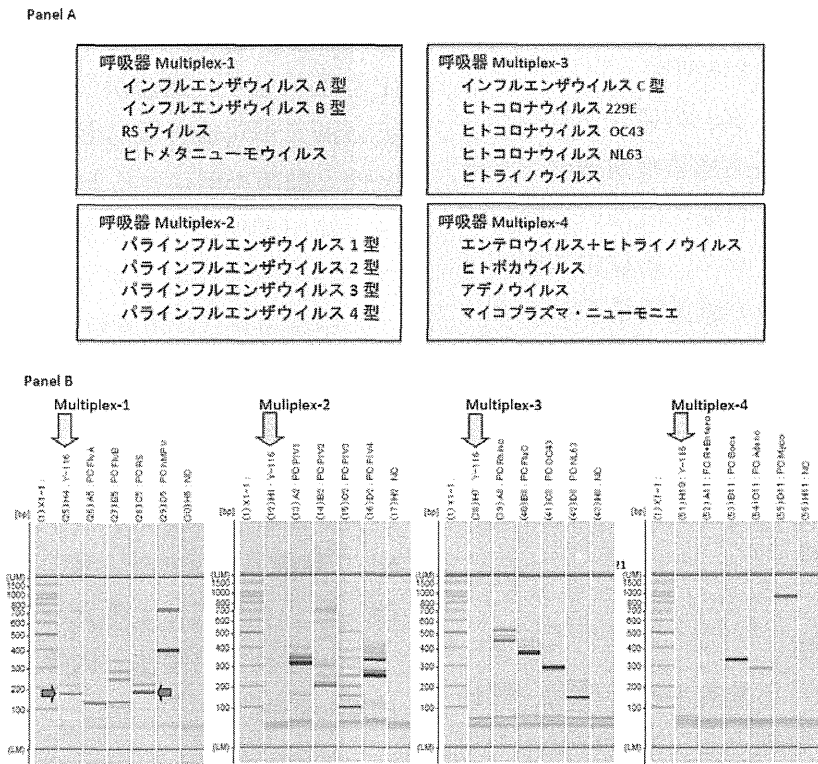


図 1. 網羅的迅速ウイルス遺伝子検査法による原因究明

C-3. 理化学部門 健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に関する研究

1. 自然毒による中毒事例データベースの収録件数

収録総件数は 255 件である。内訳は、魚類：80 件（ふぐ毒 66, シガテラ 9 など）、貝・蟹類：36 件（麻痺性 16, テトラミン 12 など）、キノコ：59 件、山野草：36 件、栽培植物：30 件、海藻：1 件、その他（ヒスタミンなど）：13 件であった。

2. LC-MS/MS による自然毒の迅速試験法の開発

検討した自然毒は、ふぐ毒 TTX；スイセンなどのリコリン；トリカブト毒のアコニチン、メサコニチン；チョウセンアサガオのアトロピン、スコポラミンである。抽出法を検討した結果、メタノールによる 2 回抽出が効率、迅速性の点からもっとも適していると考えられた。LC-MS/MS の条件もそれぞれ検討した。参加機関（平成 22 年度 16, 23 年度 17, 24 年度 20 機関）で添加回収試験を行ったところ全ての機関で良好な回収率を得た。

C-4. 疫学部門 疫学情報解析機能の強化と人材育成に関する研究

1. 地方感染症情報センターの体制、現状

中国四国ブロックでは、情報センター職員のほとんどは他業務との兼務である。感染症情報入力、解析の自動化のレベルは様々だが、多くの自治体で、ある程度の自動化が図られている。また、独自にプログラムを作成した自治体もあった。

2. 研修プログラムの検討

体系的な人材育成研修制度については、平成 23 年度の情報センター実務研修で作成した研修プログラムを基に、オーダーメイド研修プログラムの作成を行った。情報センター職員として習得が必要とされる基礎項目と、各自治体における優先度や制限により受講する選択項目に分けたオーダーメイド研修のプログラムを提案した。

3. 感染症情報センター職員の研修会

第 70 回日本公衆衛生学会総会自由集会「感染症情報の現状と展望を考える会」には、地衛研、保健所、国立感染症研究所、大学から 43 名の参加があり被災地においていかに感染症発生動向調査事業を継続し得たか、また避難所における感染症サーベイランスの実施状況、感染症対策について各講演者から報告を受け、質疑、参加者からの追加報告等が行われた。

4. 地図表示プログラムの開発

感染症情報（患者数）を保健所管区に分けて地図上に表示するための方法を開発した。

D. 考察

D-1. 細菌部門 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と精度管理

食中毒菌の網羅的迅速検査法 RFBS24 について検討し、プライマー、反応条件の改良により、大幅に感度が改善された。これにより初めて行政依頼検査に使用できるレベルとなった。実際の食中毒事例について培養法と比較し、同等またはそ

れ以上の感度を得た。山口県では、食中毒事例の早期解決のために使用しており、今後他の地衛研への普及を図って行きたい。

D-2. ウイルス部門 原因不明ウイルス感染症に対する迅速網羅的診断法とその精度管理法の開発

今年度は、実際に臨床検体に応用し、その有効性が確認された。平成 24 年度に、国立感染症研究所と地衛研の学術研究会である衛生微生物協議会でこの方法について発表を行った。改訂作業中の病原体検出マニュアルに記載するなど、地衛研への普及を図っていく予定である。

D-3. 理化学部門 健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に関する研究

20 機関と多くの参加機関があり、自然毒の検出法の開発、標準化に関するニーズが極めて高いことが示唆された。今回検討した LC-MS/MS による迅速試験法は約 2 時間で自然毒を定量することができ、また、精度管理も良好な結果であったことから、健康危機管理への迅速、的確な対応に有効な手段として活用が期待される。

D-4. 疫学部門 疫学情報解析機能の強化と人材育成に関する研究

感染症に関してわかりやすい情報を発信することは地方自治体にとって今後益々重要になってくる。一方、感染症情報センターの業務は、マニュアル化しにくいものであり、実地的な要素がある研

修が必須である。今後も、感染症情報センターの業務の重要性を認識し、人材の育成確保に努力する必要がある。

E. 結論

公衆衛生行政における地衛研の活動の重要性は、新型インフルエンザ、冷凍ギョウザの農薬汚染、麻疹排除における検査対応、福島原発事故に伴う環境、及び食品の放射能測定など、最近の健康危機事例への対応によって再認識されている。この研究班で開発した食中毒菌の網羅的迅速検査法、multiplex PCR を用いたウイルスの検査法、自然毒検出法のすべてについて有用性が示され、食中毒事例、臨床検体に応用し十分な検出感度があることが検証された。これらの方法が地衛研において使用されれば検査の迅速性、正確性の向上に大きく貢献するであろう。開発した方法についての地衛研の関心は極めて高く、今後普及をはかっていく。感染症情報センターは、新型インフルエンザをはじめとする新興感染症、薬剤耐性菌の院内感染等における自治体の対応、正確な情報発信において重要な役割を果たしていくべきであり、本研究班における活動が機能強化の一助となることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

○鈴木智之，神谷信行，八幡裕一郎，尾関由姫恵，岸本剛，灘岡陽子，中西好子，吉村健清，島田智恵，多田有希，調恒明，小澤邦寿

「地方感染症情報センター担当者に対す

る研修プログラムの需要」日本公衆衛生
雑誌、印刷中

G. 知的所有権の取得状況

1.特許取得

- リアルタイムPCR法による食品媒介
病原菌の網羅的迅速検出方法
(特願2009-096633)

2.実用新案登録

該当なし

3.その他

該当なし

Ⅱ 分担研究総合報告書

地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、
その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究

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と精度管理ー

研究代表者	調 恒 明	山口県環境保健センター	所長
研究分担者	後 藤 良 一	北海道立衛生研究所	所長
研究協力者	山 口 敬 治	北海道立衛生研究所	部長
	池 田 徹 也	北海道立衛生研究所	主査
	綿 引 正 則	富山県衛生研究所	主幹研究員
	嶋 智 子	富山県衛生研究所	主任研究員
	飯 田 奈都子	静岡県環境衛生科学研究所	主任
	川 瀬 遵	島根県保健環境科学研究所	主任研究員
	亀 山 光 博	山口県環境保健センター	研究員
	堀 川 和 美	福岡県保健環境研究所	病理細菌課長
	江 藤 良 樹	福岡県保健環境研究所	主任技師

研究要旨 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法による網羅的迅速検査法の確立を目的に研究を行った。SYBR Greenを用いたインターカラー法により24種の病原遺伝子を網羅的に検出するシステム（Rapid Foodborne Bacteria Screening 24: RFBS24）を開発し、改良を加えてRFBS24IIIとした（第1期：平成19～21年度）。第2期（平成22～24年度）にあたる本研究では、各研究協力機関で所有する機種を使用しRFBS24IIIの精度管理を行った上で、検出感度や精度の向上を図るため、さらに改良を行った。プライマーセットならびに組合せを変更してRFBS24IVを作成し、最終的には、PCRサイクル数の増加、プライマーセットの大幅変更、競合型内部標準を導入したRFBS24Vを作成した。RFBS24Vについて精度管理を行ったところ、 $10^1 \sim 10^3$ copies/wellの検出感度を示した。最終年度には、実際の食中毒・感染症等の事例から得た糞便試料を用いて検討を行った。RFBS24Vによる結果は、従来の培養法による結果とほぼ一致し、本システムは網羅的迅速検査法として実用的であることが証明された。これにより、迅速な行政対応に寄与することが期待される。また、数種類の標的遺伝子を同時に検出可能なRFBS24法を応用し、RFBS24VからSTEC用プライマー（*stx1*, *stx2*, *eae*）を採用したSTEC検査用キット（RFBS-STEC）を開発した。

A. 研究目的リアルタイム

人に感染症を引き起こす病原微生物は、創傷部、呼吸器、消化器、生殖器など様々な感

染経路を通じて侵入する。

そのなかで、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

and water-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、前者を旧伝染病予防法(現、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律)で、後者を食品衛生法で定義していた。

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」は狭義の食品による中毒(Food intoxication)のほか、食品・施設を介して病原物質が伝播する感染性胃腸炎をも含み、飲食物を介する中毒及び感染の双方を指している。このため事例が発生すると、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求められる。

「食中毒」原因細菌は、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回に渡り指定されてきた。近年では、平成11年に6菌種追加され、合計21菌種/菌群によるものが報告すべき疾病として指定されている¹⁾。

現在、「食中毒」事例発生時に行われている原因物質究明調査は培養法が主である。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などの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サイクル毎に蛍光を測定しPCR反応をモニターするリアルタイムPCR機器が導入された。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。特に、マルチプレックスPCRを行う場合、プローブ法では、同時に複数のプライマーセットとプローブを必要とし、シングルプライマーの場合に比べて高価なプローブの設定を行わなければならない。一方、SG-PCR法はマルチプレックスで行う場合、標的遺伝子増幅確認はTm値の差により行わなければならない。

Fukushima *et al.*²⁾はLight Cyclerを用いた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。その後、リアルタイムPCR機器を用いた方法³⁾を検討し改良を行った。その結果、平成19-21年度厚生労働科学研究費助成金(地域健康危機管理)研究事業「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」の成果として、Rapid Foodborne Bacteria Screening 24システム(RFBS24)が作成された⁴⁾。平成22年度当初に使用できたのは、RFBS24 ver. 3 (RFBS24III)であり、以後、当研究班で改良を加えた結果、平成22年度にはRFBS24 ver. 4 (RFBS24IV)、平成23年度にはRFBS24 ver. 5 (RFBS24V)を開発した。これらについて、菌数既知のDNA、コピー数既知のDNAを用いて検出限界を検討した。また、実用の可否を検討するために、食中毒などの事例で得た糞便からDNAを抽出し、実用上の検出精度を検討した。

また、近年、リアルタイムPCR機器が保健所等にも配備されつつある。これらの機器を有効に使用するために、検査現場における迅速検査の必要性を勘案し、特定の遺伝子群のみをマルチプレックスで安価に実施する方法

を検討した。

RFBS24の概説

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。Fukushima *et al.*⁴⁾が考案した。基本構成はSYBR Greenを用いたインターカレーター マルチプレックス リアルタイム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)用プライマー計4組を1ウェルにセットし、1列8ウェル計24種の標的遺伝子を同時に検査できる。基本列は第1列から5列である。第1列は陰性対照の、第2列はIAC対照の、第3～5列は陽性対照の試験系を検証する。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～1時間50分で終了し、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。

B. 研究方法

それぞれの年度で次の研究を行った。

平成22年度

(1) RFBS24IIIの全ての菌種のDNAを用いた精度管理

○菌数を確認した菌株DNAを用いた最低検出濃度の確認及び標的遺伝子の増幅確認。

(2) RFBS24IVの開発

○プライマーセットの改良と組合せ変更。

○新たなプライマーセットの共通DNAを用いた評価

平成23年度

(1) RFBS24Vの開発と精度管理

○ SG-PCR法感度向上のため、増幅サイク

ルを30から35サイクルに変更。

○ 上記の変更に伴い、必要なプライマーの再設計ならびにプライマーセットの再検討。

○ 精度管理を実施するためのコピー数既知のDNA試料の作成。

○ 競合型内部標準の検討と導入。

○ マルチプレックス リアルタイムSG-PCR法の機種ごとの検証。

(2) マルチプレックス リアルタイムSG-PCR法を用いた小規模検出系の検討。

○ RFBS-STEC (仮称) の検討。

平成24年度

(1) RFBS24Vと培養法の比較

○食中毒などの食水系感染症事例で得た糞便試料について、培養法とRFBS24Vを比較。

1. 対象とする24菌株

使用した細菌菌株は、各地方衛生研究所に保存する標準株ならびに野生株を用いた。それらの菌種は*Salmonella* spp. , *Vibrio parahaemolyticus*, enterotoxigenic *Bacillus cereus*, emetic toxin producing *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *astA* positive *Escherichia coli*, enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC), diffusively adherent *Escherichia coli* (DAEC), *Shigella* spp. , *Vibrio cholerae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudo-*

tuberculosis, *Listeria monocytogenes*, *Providencia alcalifaciens*の24菌株であった。使用した菌株およびその由来を表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。

- ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems: 以下, ABI7000)
- 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)
- Thermal Cycler Dice® Real Time System TP900 (タカラバイオ株式会社:以下, TP900)
- 7900HT Fast Real time PCR system (Applied Biosystems: 以下, ABI7900)

3. PCR試薬

試験検査には, SYBR® Premix DimerEraser® (タカラバイオ株式会社)の同一ロット製品を使用した。

4. 試験用DNA

平成22年度

DNA試料の作成は, 菌株をブレインハートインフュージョンブイヨン培地 (以下, BHIb) に接種し, それぞれの菌の適切な培養条件で24時間培養して, その1mLをDNA抽出に使用した。培養液は, 同時に菌数確認を行った (「5.コロニーカウント」の項参照)。

DNA抽出

市販のDNA抽出試薬キットを用いた。DNA抽出は製造会社の使用説明書に従って行った。

- DNeasy Tissue and Blood Kit (QIAGEN)
抽出DNAは, Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific社) でDNA濃度

を測定した。DNA試料を分取し各施設に送付した。

平成23年度

表2に示した菌株から抽出したDNAを用いた。得られたDNAの標的配列部位とその上下流域を増幅するプライマーを用いてDNAを増幅し, Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific社) でDNA濃度を測定し, コピー数を換算した。さらにコピー数を調整し (1×10^{10} copies/ μ L), これを共同試料原液とした。

平成24年度

試験に供した糞便は, 同一ロットの市販DNA抽出キットであるQIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) でDNA抽出を行った。

5. コロニーカウント

使用した24菌株 (表2) についてBHIbで培養後, 滅菌した0.1%ペプトン加生理的食塩水により10倍段階希釈を行った。適切な希釈溶液から100 μ Lをブレインハートインフュージョン寒天培地 (以下, BHIa) に接種し, コンラージ棒で広げたのち, それぞれの適切な培養条件で24時間培養し, コロニーカウントを行った。希釈倍率から培養液中の菌数を定量した。

6. プライマーの設計

共通試料による検討に用いたRFBS24IVのプライマーセットを表3に, RFBS24Vのプライマーセットを表6に示した^{2, 4~20}。プライマーセットは次の改変を行った。検出限界向上のための増幅サイクルの増加 (30→35サイクル) を導入し, ほぼ半数のプライマーについて再設計を行った。また, プライマーの再設計によるTm値の変化ならびにプライマー同士のconfliction防止のために, 6プライマーセットについて, プライマーの組み直しを行った。

7. Rapid Foodborne Bacteria Screening 24IVの作成と検証

RFBS24IIIで検出できなかった標的遺伝子を増幅させるために、新たに一部のプライマーセットを再設計した。PCR反応サイクル数は従来どおり30回に止めた。

RFBS24IIIまでは陽性対照を24種準備していたが、RFBS24IVからは、混合陽性対照とした。すなわち、図1に示す第3列から第5列の各8種の陽性対照を混合し、3種の陽性対照とした。

「4. 試験用DNA」の項で準備し、各所に分配したDNAを、菌株毎の希釈率から抽出試薬キット添付の抽出試薬 (AE buffer) により希釈し、すべてのDNA試料を一定濃度に調整したあと試験に供した。各施設では、抽出したDNA試料について、 10^6 希釈まで希釈した試料溶液を鋳型として、SG-PCRを実施した。マルチプレックスPCRの結果は、Ct値ならびに融解曲線解析により、それぞれの標的遺伝子の検出検出限界を確認するとともに、同一機種があったことから、それらを用いて施設間の差を検討した。

8. 競合型内部標準の作成

RFBS24IVまで使用した非競合型IACでは、1ウェル当たり使用するプライマーセットが4組 (標的遺伝子用3組+IAC用1組) になる。プライマー同士のconflictionはプライマー数の増加とともに発生しやすくなることから、競合型IACの導入を図った。それぞれのプライマーセットによる増幅産物に基づくTm値から、A~FセットまでとG・Hセット (図1) についてTm値の異なるIACが必要であった。各セットの代表プライマーを選定し、Tm値の高いIAC (A~Fセット用) は *Aeromonas* spp. がもつAHH1領域の一部をスペーサーとし、それぞれのプライマーでサ

ンドウィッチしたものとし、Tm値が低いIAC (G・Hセット用) は、それぞれのプライマーを挟んだものとし、それらが一連となったものを合成した (図2)。

9. Rapid Foodborne Bacteria Screening 24Vの作成と検証

RFBS24IVならびにRFBS24Vの作成は1箇所の施設 (島根県環境保健科学研究所) で作成し、各施設に配布した。

各施設に「DNA抽出」で作成したDNA試料を送付した後、滅菌蒸留水により希釈し、すべてのDNA試料を $10^0 \sim 10^3$ copies/wellとなるように調整したあと試験に供した。

プライマーセットを2ロット作成し (LOT1 & LOT2)、ロット毎に、それぞれの希釈について3回ずつ測定し、蛍光強度が確認できる最低コピー濃度 (検出限界値) を確認した。

RFBS24V法による結果は、Ct値ならびに融解曲線解析により、それぞれの標的遺伝子検出限界を確認した。標的遺伝子検出最小コピー数は、Tm値ならびにIACが示す蛍光強度の半分のピーク以上のものとして判定した。

10. 培養法との比較

実際の事例における比較を行うために、感染症・食中毒・食品苦情・その他の事例で採取した糞便からDNAを抽出し、RFBS24Vを用いて試験し培養法と比較した。事例発生時の培養法は各所の方法で実施し、それと同時もしくは事例収束後にRFBS24Vを用いて試験検査を行い成績を比較した。また、事例収束後の検査には、「人を対照とする研究に関する倫理審査」を経たものを対象とした。

11. マルチプレックスSG-PCR法を用いた小規模検出系

RFBS24は、24種の食水系感染症原因細菌

の特異遺伝子を網羅的に調べることは可能であるが、志賀毒素産生性大腸菌の遺伝子の検討等あらかじめ検査すべき内容が限定されている場合は、24種の遺伝子すべてを検討する必要はない。そこで、少ないプライマーセットで効率的に検出できる系を検討した。標的遺伝子は、*stx1*, *stx2*, *eae*の3種とした。RFBS24Vで使用されるプライマーを用い、非競合型のIAC (RFBS24IVまで使用したもの) を用いたものを作成した (RFBS-STEC)。感染症や食中毒事例で分離したSTECの野生株を用いて、このキットの性能を検討した。

菌株：血清型および*stx1*, *stx2*, *eae*遺伝子の保有状況が分かっている86株のSTECを調査対象とした (表11)。

サンプル調製およびDNA抽出：86株は全て、(1) DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN社) を用いてDNA抽出を行った。また、O157:H7 (*stx1*, *stx2*, *eae*保有) のうち3株については、(2) TE煮沸法、(3) アルカリ熱抽出法によるDNA抽出も行い、更に、DNA抽出をせずにサンプルを直接PCRチューブに加える方法として、(4) 培養液 (トリプトソイブロスで37°C24時間培養)、(5) 培養液をTEで10倍希釈した菌液を用意した。

SG-PCR：TaKaRaのSYBR Premix Dimer Eraser (Dimer Eraser) 及びABIのPower SYBR Green PCR Master Mix (Power SYBR Green)、SHIMADZUのAmpdirect Plus 酵素セット (Ampdirect)、BIOLINEのBIOTAQ DNA Polymerase (BIOTADimer EraserQ DP) を用意した。

このうち、Dimer EraserおよびPower SYBR Greenは添付のマニュアルに従って使用し、BYOTAQ DPはSYBR Green I (Invitrogen社) を最終濃度が2.5×になる

ように添加した上で添付のマニュアルに従って使用した。いずれの試薬でもプライマーミックス (*stx1*-ET-F, *stx1*-ET-R (各40uM)、*stx2*-ET-F, *stx2*-ET-R, *eae*-F2, *eae*-R, *yersH2*-F, *yersH2*-R (各20uM)) とRFBS24IVのIAC (*Yersinia ruckeri*のDNA) を10分の1量になるように添加し、DNA 1μlを加え、合計20μlになるようにしてマルチプレックスリアルタイムPCRを行った。Ampdirectに関しては、2×Ampdirect plusを500μl、プライマーミックスを20μl、125× SYBR Green Iを20μl、IACを100μl、滅菌精製水360μlをよく混和し、試験原液とした。試験原液から必要量を取り、試験原液20μlあたりBIOTAQを0.1μl混和して反応液とし、それを20μlずつPCRチューブに分注し、DNAもしくは菌液を1μlずつ加えた。試験原液の残りは冷凍保存し、次回以降の検査のときに利用した。

なお、Dimer Eraserの場合、最初に95°C30秒を1回行い、その後95°C5秒、58°C34秒、72°C34秒を30サイクル行い、最後に融解曲線分析 (95°C15秒、65°C30秒、95°C15秒) を行った。Power SYBR Green, Ampdirect, BYOTAQ DPの場合、最初に95°C10分の反応行い、その後はDimer Eraserと同様に30サイクルおよび融解曲線分析を行った。

C. 研究結果および考察

1. DNAの抽出ならびに菌数測定

各施設で調整したDNA濃度ならびに菌数は表2のとおりであった。

2. RFBS24IVを用いたリアルタイムPCR法

24菌種28株についてSG-PCRの結果を、融解曲線と希釈DNA毎の蛍光強度変化のグラフを図3-1～図3-7までに示した (TP-800のみ)。

RFBS24IVにおける各群のTm値は、理論的にそれぞれ1~4°Cで離れている3種の標的遺伝子と、それらからさらに2~6°C程度離れるIACで構成されている。一部の菌種を除いて理論Tm値付近に実際のTm値が存在した。*Listeria monocytogenes* (LM) と *stx2f* positive *E. coli* (*stx2f*) は実際のTm値が1°C以上変化した(図5-1ならびに図5-2)。LMは1ウェルの検出遺伝子の中ではTm値がもっとも低い温度であり、菌株により、理論値より低温にシフトした。また、もともとの*stx2*のTm値は中央にあったが、*stx2f*はそれより1°C程度低温側にシフトし、*tdh* positive *V. parahaemolyticus*との分別が困難であると考えられた。

調査に参加した5機関に整備されていた4種6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機種2台あった(TP800ならびに7500FAST)。

Ct値、Tm値ならびに融解曲線におけるIACと比較したピークの大きさから検出の有無を決定し、検出した最大希釈率(表4)を用いて、最低検出濃度(換算)を算出した。それらを、対照遺伝子毎ならびに検査機器毎に集計し表5に結果を示した。

一部の標的遺伝子をのぞいて、検出限界はおおむね $10^4 \sim 10^6$ cfu/mLであった。検出限界が高い試料は、ETEC(*lt*)、ETEC(*stp*)、*Staphylococcus aureus* (*femB*)、*Vibrio parahaemolyticus*(*tdh*)、*Yersinia enterocolitica*、*Y. pseudotuberculosis*(*yadA*)、*Salmonella* spp(*invA*)であった。

また、一部の施設で増幅が確認できなかったものは、*V. parahaemolyticus* (*trh*)、ETEC(*sth*)、EAEC(*aggR*)であった。

*trh*遺伝子については、通常のPCRで十分ampriconが増幅したことから、*Taq*の変更とPCR時の伸長反応の延長を試みたところ、いずれも $10^1 \sim 10^3$ 程度の結果の向上がみられ

た。

TP800を使用した2施設の結果は、 $10^0 \sim 10^1$ 倍の範囲にあった。ABI7500FAST使用施設では、一部増幅が確認できない標的遺伝子以外では、サルモネラをのぞいて $10^0 \sim 10^1$ 倍の範囲にあった。

すべての施設を対象に比較すると、最低発現菌数(換算値)の範囲が $10^0 \sim 10^1$ 倍の範囲にある標的遺伝子は20種あり、 10^2 のものが2種(*enterotoxigenic B. cereus*、*Salmonella* spp.)、 $>10^2$ のものが2種(ETEC(*lt*)、*V. parahaemolyticus*(*tdh*))、1施設以上で検出できなかったものは4種(*V. parahaemolyticus*(*trh1* & *trh2*)、ETEC(*sth*)、EAEC(*aggR*))であった。

RFBS24IVはRFBS24IIIと比較し、Tm値の調整のため、3種のプライマーを再設計と5種のプライマーセットを再調整したものであった。

さらに、新しいキットでは、従来24本の陽性対照を添付していたのに対し、3種の混合陽性対照にするということで、試料準備をより容易にすることが可能となった。

表4で示すとおり、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。Ct値でみると1~2サイクルの差であり、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。すべての施設の結果が $10^0 \sim 10^1$ 乗差である標的遺伝子が20であり、今回使用した4機種を用いた場合、ほぼ均質な成績を示すことができると考えられた。一方、 10^2 乗もしくはそれ以上の差を示す標的遺伝子が4、および1施設以上で検出できなかった標的遺伝子が4種あったことは、PCR反応を確実に行う必要が

あること、ならびにプライマーの再設計の必要性があることが示唆された。

特に、*trh*遺伝子について、試料DNAならびに使用プライマーを用いて、通常のPCRをsingle primerで実施したところ、十分増幅がみられ、プライマーセットの競合による感度低下が示唆された。そこで、*trh*遺伝子を検出するB群のプライマーセットを用いて、TaqをSYBR Green Premix Taq IIを用いた場合とTaqは変更せずにextension timeを延長した場合を試行したところいずれも $10^1 \sim 10^2$ 乗程度の感度向上がみられた（図4-1および図4-2）。

そこで、*trh*ならびに*aggR*遺伝子を増幅する系であるB群とE群について、extension timeを30秒から1分間に変更して3+3種、計6種のDNA試料について試行したところ、PCR時間は15分間の増加（75分間→90分間）にとどまり、競合するプライマーで増幅される他の遺伝子は、extension time 30秒の時と同様の検出感度であったが、*trh*ならびに*aggR*については、それぞれ 10^1 乗の感度向上が確認された。

3. RFBS24IVからRFBS24Vへの改良

RFBS24キットは過去3回の改変を行った。いずれも、検出限界を向上するべくプライマーの再設計、プライマーセットの調整を行ったものであった。RFBS24IVにおける問題点、すなわち、検出限界の高さと検出できない遺伝子の存在は、RFBS24Vで解消された。

一箇所以上の施設で検出されなかった*sth*、*aggR*、*trh* 遺伝子を含めてプライマーの再設計を行った。*st* 遺伝子については*sth* 遺伝子用のプライマーを加えて3本とした。また、*aggR* 遺伝子を含め、12組22本のプライマーについて再設計しRFBS24Vに組み込

んだ。さらにTm値からA～Fの6セットで構成プライマーセットを組み直した（表3および6、図1）。

PCR増幅を35サイクルとし、競合型IACを用いたキットは良好な結果を示した。また、RFBS24IVと同様に、3種の混合陽性対照としたため、PCR mixture調製における時間短縮に寄与するものと考えられた。

4. RFBS24Vの精度管理

コピー数既知のDNAテンプレートを用いて、各施設にある機器を用いて検出限界ならびに検出精度を確認した。表7に機器毎の結果を示した。DNAの希釈列をLOT1およびLOT2のプライマーセットで3回試験を行い、発現した最小のコピー数の、10を底とする指数で表現し、その指数が確認された回数を表中の数字とした。表7-1～7-15では、機器毎、標的遺伝子毎に最も多く確認されたコピー数のカラムを着色した。

機器毎に評価すると、殆どの試験で標的遺伝子検出は 10^1 の差であったが、一部 10^2 の差が認められた（表7-2 *sth*、表7-3 *aggR*、それぞれ1機種）。

病原大腸菌の遺伝子の検出をみると、*stx1*ならびに*stx2*では機器により異なるものの、結果は機器毎に均質なデータとなっている（表7-1）。結果はいずれも $10^1 \sim 10^2$ copies/wellの範囲に収まっているが、検出できた最低コピー数は機器毎に傾向を示していると考えられた。

すなわち、TP900およびABI7900では 10^2 copies/well、ABI7500、TP800およびMX3000Pでは 10^1 copies/wellが今回使用した試料では限界と考えられる。これはETECの*lt*にもその傾向がみられる（表7-2）。しかし、今回は、各々1台の機器を使用しているところであり、これが、同種で他の機器に同

様の結果を示すかは、今後の試験に待たれる。一方、*stx2f*については、今回実験に供した機種で、2ロットの試料を用いて合計30回の試験で 10^3 copies/wellが25回を示し、*stx1*、*stx2*に比べて、少なくとも 10^1 以上検出限界が高い（最低検出コピー数が大きい）ものと考えられた。*stx2f*と同様に、平均的に 10^3 copies/wellが検出限界と考えられるものは*S. aureus*の*femB*遺伝子であった。

機器を問わず、検出限界が一つの濃度に収束した試料はなかったが、検出限界が安定して同一濃度に出現する標的遺伝子は3種あった（嘔吐型*B. cereus*, *trh2* positive *V. parahaemolyticus*, *Y. enterocolitica*）。全体を評価すると、今回使用したDNAテンプレートでは、検出限界はどの機種も 10^1 ～ 10^2 copies/wellが最も多い結果を示した。*stx2f*遺伝子および*femB*遺伝子を除いた26試料を5種の機器を用いて行った結果、 10^1 ～ 10^2 copies/wellに収束した試料数は767（98.3%）であった。このキットの検査限界は、試験に用いたDNAテンプレートはどの機器も $2\mu\text{L}/\text{well}$ を用いていることから、 5×10^3 ～ 10^4 copies/mLであると考えられる。

5. 原因物質調査結果と行政判断

原因究明調査時に、原因物質が検出できた事例でも、疫学調査結果を併せて行政機関が原因物質を特定しない場合がある。今回、複数の事例を検討した細菌種は6種、すなわち、カンピロバクター、ウェルシュ菌、サルモネラ、黄色ブドウ球菌、腸管出血性大腸菌および病原大腸菌であった。それぞれ、行政判断で原因物質を特定した事例数/病原体検査で原因物質を検出した事例数で表現すると、カンピロバクター7/13、サルモネラ4/6、黄色ブドウ球菌2/3、腸管出血性大腸菌3/3、その他の病原大腸菌1/2であった（表

8）。

6. 培養法とRFBS24V法との比較

各種事例から得た試料を用いて、培養法とRFBS24V法とを比較した。事例毎の結果を表10-1～3に、まとめたものを表9に示した。表10中で（）内に示すものは増菌培養を行ったものである。

(1)カンピロバクター

カンピロバクターでは、培養法ならびにRFBS24V法ともに同数の検出は、13事例中9事例11項目であった。培養法の検出数が多かったものは13事例中3事例3項目、RFBS24V法の検出数が多かったものは13事例中2事例3項目であった。カンピロバクターは、*C. jejuni*ならびに*C. coli*の2種の検出を行った。2つの方法で2菌種を検出したものは3事例、一方（RFBS24V法）のみ2菌種検出したものは1事例あった。

(2)ウェルシュ菌

ウェルシュ菌については、多くの例で増菌培養を行っており、また、直接培養、増菌培養いずれもウェルシュ菌が確認されると、従来のPCR法で*cpe*遺伝子検出を行った。*cpe*遺伝子を検出した検体はアスタリスク（*）をつけて区別した。*cpe*遺伝子の検出による評価では、培養法ならびにRFBS24法ともに同数の検出はなく、どちらかが多い事例が2例ずつであった。

表5-1原因物質の項で「CPE?」と記した3事例は、培養法で検出された菌は*cpe*遺伝子を保有していなかった。1事例から1検体のみRFBS24V法で*cpe*遺伝子を検出したが、優勢な遺伝子検出とはいえ、これら3事例から分離したウェルシュ菌は事例に関与しないものと考えられた。

(3)サルモネラ

サルモネラでは、培養法ならびにRFBS24V法ともに同数の検出は、6事例中3