

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「小規模な食品事業者における食品防御の推進のための研究」
分担研究報告書（平成30年度）

国立医薬品食品衛生研究所における人体（血液・尿等）試料中の 毒物の検査手法の開発と標準化（2）

研究分担者 工藤由起子（国立医薬品食品衛生研究所）
研究協力者 林谷 秀樹（東京農工大学）

研究要旨

本研究では、病原細菌による食品テロが起こった際の標準検査法として、日本で散発するエルシニア症の病原体である病原性 *Yersinia enterocolitica* ならびに *Yersinia pseudotuberculosis* を対象にして、*Y. pseudotuberculosis* と病原性 *Y. enterocolitica* のうち、強毒な American strains と弱毒な European strains を識別できる Multiplex PCR 法の開発を試みた。標的遺伝子として、16S Ye、*ail*、*inv* ならびに *irp2* の4種を選び、これらの遺伝子を同時に検出できる PCR 条件を探索し、その条件で病原性 *Yersinia* の識別が可能かを検討した。その結果、開発した Multiplex PCR 法で、*Y. pseudotuberculosis* と病原性 *Y. enterocolitica* の American strains ならびに European strains を識別することが可能であった。

A. 研究目的

Yersinia enterocolitica は、*Yersinia* 属に属するグラム陰性通性嫌気性菌であり、感染性食中毒の代表的な原因菌として知られている。全世界的に発生がみられるが、ヨーロッパでの発生事例の報告が多く、ヨーロッパでは重要な食中毒菌である。本菌には50を超えるO血清型が知られているが、そのうちO3、O4、32、O5、27、O8、O9、O13a、13b、O18、O20 および O21 の9血清群が人に病原性を示す。このうち、O3、O5、27、O9 は“European strains”と呼ばれ、胃腸炎症状を示す程度の弱毒であるのに対し、O4、32、O8、O13a、13b、O18、O20 および O21 は“American strains”と呼ばれ、人に敗血症を引き起こすこともある強毒な血清型である。これらの“American strains”は、主に北米に

限局して分布することは報告されている。しかし、これらの“American strains”のうち、最も病原性に強い血清型 O8（以下 O8 菌）は、1991年に初めてわが国で東北地方のノネズミから分離され、わが国に分布することが明らかになって以降、近年わが国で人の発生事例が急激に増加しており、北は青森県から南は沖縄県まで全国的に発生が報告されるようになり、特にこれまで20例報告されている *Y. enterocolitica* の集団感染事例のうち、2004年以降ものはすべて O8 によるものとなった。また、この傾向はわが国だけでなく、2000年以前は O8 菌が分布していなかったヨーロッパ諸国においても、近年人の感染事例の報告が相次ぎ、特にドイツやポーランドでは2004年以降、O8 菌による感染が劇的に増加していることが報告され

ている。また、*Yersinia pseudotuberculosis* は O 抗原により、1～15 の血清群に型別され、さらに血清群 1,2,4 および 5 はさらに数亜群に分けられており、現在までのところ、21 血清群が知られている。このうち、血清群 1～6 群および 10 群が病原性を示す。ヨーロッパでは 1a および 3 の分離頻度が高いのに対して、我が国では多様な血清型が分離され、人からは 4b、5a および 5b の分離頻度が高く、かつ T-細胞の過剰活性化やサイトカインの過剰産生を誘導するスーパー抗原を産生する強毒のタイプの菌株が分布しており、人の感染患者は重篤な症状を引き起こすことが多い。

本研究では、病原細菌による食品テロが起こった際の標準検査法として、病原性 *Y. enterocolitica* ならびに *Y. pseudotuberculosis* の迅速診断を目的として、*Y. pseudotuberculosis* と病原性 *Y. enterocolitica* のうち、強毒な American strains と弱毒な European strains を識別できる Multiplex PCR 法の開発を試みた。

B. 研究方法

(1)供試菌株

供試菌株として、病原性 *Y. enterocolitica* O3、O5、27、O8、O9 の 4 菌株、*Y. pseudotuberculosis* 1a.1b.2a.2b.2c.3.4a.4b.5a.5b.6 の 11 菌株、*Y. intermedia*、*Y. kristensenii*、*Y. aldopvae*、*Y. rhodei* の 4 菌株および *Salmonella* Enteritidos、*Salmonella* Weltevreden の 2 菌株の計 21 菌株を用いた (表 1)。

(2)培養

スキンミルクに -80°C で保存していた菌株を、trypticase soy agar (TSA) (BD) に接種し、発育してきた菌株について、*Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* は自家製抗血清を用いて確認した。

(3)DNA の抽出

供試菌株を trypticase soy broth (TSB) (BD) 10ml に接種し、*Yerisnia* については 25°C で、*Salmonella* は 37°C で 24 時間振盪培養した。DNA の抽出はボイル法で行い、まず培養液 0.5mL を 10,000×g で 10 分間遠心し、その沈渣に滅菌蒸留水 0.5mL を添加して再浮遊させ、10,000×g で 10 分間遠心した。上清を捨てたのち、その沈渣に、滅菌蒸留水 0.5mL を添加して再浮遊させ、100°C で 10 分間加熱した後、10,000×g で 10 分間遠心し、その上清を鋳型 DNA 溶液とした。

(4)プライマー

Multiplex PCR に用いる標的遺伝子とプライマーは、表 2 に示した。16S Ye は *Y. enterocolitica* を、*ail* は病原性 *Y. enterocolitica* を、*inv* は *Y. pseudotuberculosis* を、ならびに *irp2* は病原性 *Y. enterocolitica* のうち、American strains と *Y. pseudotuberculosis* の血清型 1 と 3 の一部を検出できる。

(5)PCR 反応

PCR は、PCR 用マイクロチューブに鋳型 DNA 溶液を 5.0μl、Taq GoTaq® DNA Polymerase set (Promega) を 7.625μl、4 種の標的遺伝子に対する 50μM プライマー (Forward と Reverse) をそれぞれ 0.5μl、および UltraPure™ Distiller Water (Life Technologies) を 8.375μl 加え、計 25μl の反応液を作製し、T100™ Thermal Cycler (Bio-rad) を用いて行った。PCR 条件は、反応温度と反応時間を変えて、すべての標的遺伝子が検出できる最適な条件を探索した。PCR の遺伝子産物については、1.5% アガロースゲルを用いて、Mupid®-α (アドバンス) で 50V、40 分間程度の電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルをエチジウムブロマイド溶液で染色し、バンドを確認した。

C. 研究結果

(1) 最適な Multiplex PCR 条件

PCR の反応温度ならびに反応時間を変えて、すべての標的遺伝子が検出できる最適な PCR 条件を探索した結果、95°C 2 分間反応させた後、95°C 30 秒、56°C 30 秒および 72°C 30 秒を 30 サイクル行い、最後に 72°C 5 分間反応させる条件が最適であることが判明した。以後の PCR 反応はこの条件で実施した。

(2) Multiplex PCR の結果

供試菌株 21 株について、Multiplex PCR を行った結果を表 1 と図 1 に示した。病原性 *Y. enterocolitica* 4 株については、16S Ye と *ail* はいずれの菌株ともバンドが増幅された。また、American strains である O8 については、*irp2* が増幅された。また、*Y. pseudotuberculosis* 株については、すべての菌株で *inv* が増幅され、血清型 3 ではさらに *irp2* が増幅された。それ以外の菌株では、いずれのバンドの増幅も確認されなかった。

D. 考察

食品テロに使用可能な細菌としての条件を考えると、病原性 *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* は、強毒株も存在し、低温での増殖性も有し、増殖・生残に特殊な条件を要求しないことから、故意に食品にこれらの菌を入れてテロを起こし得るものと推察される。また、国内での入手も教育研究機関や野外検体からの分離によっても不可能ではないことも考慮し、本研究の対象病原細菌として選定した。

本研究では、まず、日本で問題となっている病原性 *Yersinia* である病原性 *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis*、特に病原性 *Y. enterocolitica* に関しては、血清型 O8 を含む強毒性 American strains

と弱毒性の European strains を識別して検出できる Multiplex PCR の開発を試みた。その結果、まず、病原性 *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* については、病原性 *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* に特異的な遺伝子である *ail* と *inv* ならびに *Y. enterocolitica* に特異的な 16S Ye により識別が可能であった(図 1)。また、*Y. enterocolitica* の American strains については、鉄取り込みタンパクに関係する *irp2* を検出することで、弱毒である European strains と識別可能であった。これまで *Yersinia* の研究が盛んなヨーロッパ諸国では、近年まで病原性 *Y. enterocolitica* のうち、強毒型である American strains が分布せず、また、*Y. pseudotuberculosis* も日本を含む東アジア地域に分布するような強毒なタイプが分布していないこともあり、病原性 *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* の両菌種を同時に識別検出できる Multiplex PCR は開発されていたものの、American strains まで同時に識別できる Multiplex PCR は開発されていなかった。今回開発した Multiplex PCR 法は、病原性 *Y. enterocolitica* 血清型 O8 が広く侵淫し、また、*Y. pseudotuberculosis* も散発している我が国においては、有用な診断ツールになり得ると思われる。

本研究では、人のエルシニア感染患者の迅速な診断法を開発するための基礎研究の一つとして、まず、病原性 *Y. enterocolitica* American strains と European strains ならびに *Y. pseudotuberculosis* を識別できる Multiplex PCR の開発を行った。本研究では、まだ菌株を用いて、その有用性を評価しただけであるが、実際の血液検体などで実施する場合、血液成分による影響だけでなく、複数の病原体が感染していた場合、正しい診断が下せない可能性がある。しかし、これまで得られている知見では、人のエルシニア症の場合、一人の感染個体

から複数の菌種や血清型が分離されることはこれまで報告されておらず、通常、感染患者からは1菌種1血清型のみが検出されることが知られていることから、今回開発した Multiplex PCR 法でも直接臨床検体から病原体の遺伝子を検出することで、エルシニア症の診断が可能であると思われる。次のステップとして、開発した本法の臨床検体への応用を試みる予定である。

今回、開発した Multiplex PCR の問題点として、*ail* (170bp) と *inv* (183bp) の分子量が近く、両者を識別できないわけではないが、少しわかりづらかった。現在、新たに両者間の分子量が異なり、もう少し両者のバンドがクリアーに識別できるプライマーを用いた Multiplex PCR 法についても検討中である。

E. 結論

病原細菌による食品テロが起こった際の標準検査法として、病原性 *Y. enterocolitica* の強毒な American strains と European strains を識別できる Multiplex PCR 法の開発を試みた。標的遺伝子として、16S Ye、*ail*、*inv* ならびに *irp2* の4種を選び、これらの遺伝子を同時に検出できる PCR 条件を探索し、その条件で病原性 *Yersinia* の識別が可能かを検討した。その結果、開発した Multiplex PCR 法で、*Y. pseudotuberculosis* と病原性 *Y. enterocolitica* の American strains ならびに European strains を識別することが可能であった。

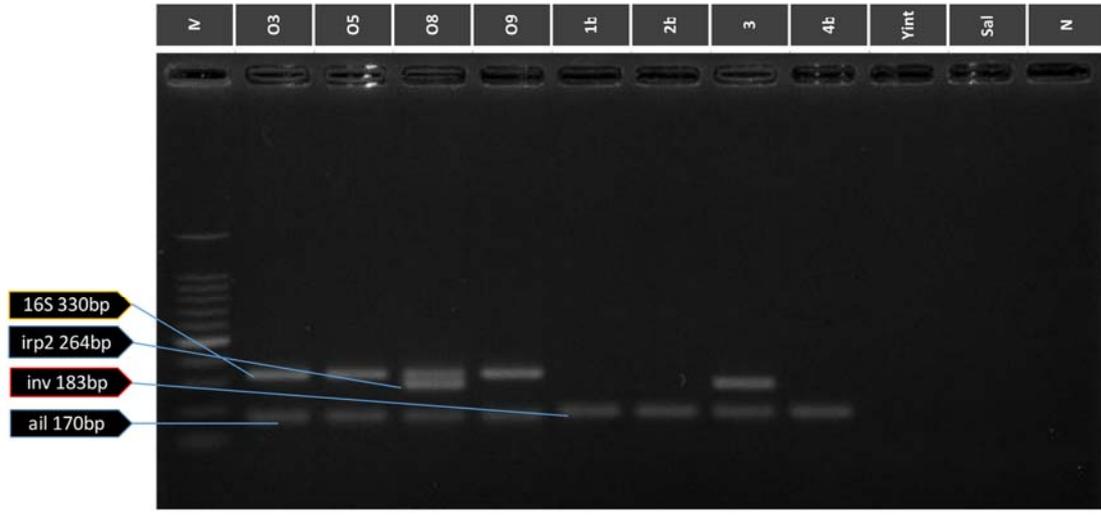
F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1. Multiplex PCRの結果



M: molecular marker 100bp, N: negative control
O3: *Y.e.* O3, O5: *Y.e.* O5,27, O8: *Y.e.* O8, O9: *Y.e.* O9, 1b: *Y.p.* 1b, 2b: *Y.p.* 2b, 3: *Y.p.* 3, 4b: *Y.p.* 4b,
Y.int.: *Y.intermedia*, *Sal*: *Salmonella* Weltevreden

表 1. 供試菌株とPCR増幅結果

供試菌株	標的遺伝子			
	<i>ail</i>	<i>inv</i>	<i>irp2</i>	16S Ye
<i>Y.e.</i> O3	+	-	-	+
<i>Y.e.</i> O5,27	+	-	-	+
<i>Y.e.</i> O8	+	-	+	+
<i>Y.e.</i> O9	+	-	-	+
<i>Y.p.</i> 1a	-	+	-	-
<i>Y.p.</i> 1b	-	+	-	-
<i>Y.p.</i> 2a	-	+	-	-
<i>Y.p.</i> 2b	-	+	-	-
<i>Y.p.</i> 2c	-	+	-	-
<i>Y.p.</i> 3	-	+	+	-
<i>Y.p.</i> 4a	-	+	-	-
<i>Y.p.</i> 4b	-	+	-	-
<i>Y.p.</i> 5a	-	+	-	-
<i>Y.p.</i> 5b	-	+	-	-
<i>Y.p.</i> 6	-	+	-	-
<i>Y.intermedia</i>	-	-	-	-
<i>Y.kristensenii</i>	-	-	-	-
<i>Y.aldovae</i>	-	-	-	-
<i>Y.rhodei</i>	-	-	-	-
<i>S.Enteritidis</i>	-	-	-	-
<i>S.Weltevreden</i>	-	-	-	-

表 2. 標的遺伝子とプライマー

標的 遺伝子		塩基配列	増幅産物 (bp)	検出病原体	参考文献
<i>ail</i>	F	ACTCGATGATAACTGGGGAG	170	病原性 <i>Y.enterocolitica</i>	Nakajimæ <i>et al.</i> , 1992
	R	CCCCCAGTAATCCATAAAGG			
<i>inv</i>	F	CGGTACGGCTCAAGTTAATCTG	183	<i>Y.pseudotuberculosis</i>	Thoerner <i>et al.</i> , 2003
	R	CCGTTCTCCAATGTACGTATCC			
<i>irp2</i>	F	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	264	病原性 <i>Y.enterocolitica</i> (America strains) <i>Y.pseudotuberculosis</i> (血清型 I と III の一 部)	Schubert <i>et al.</i> , 1998
	R	TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT			
16S- <i>Ye</i>	F	AATACCGCATAACGTCTTCG	330	<i>Y.enterocolitica</i>	Neubauer <i>et a.</i> , 2000.
	R	CTTCTTCTGCGAGTAACGTC			