

令和元年度 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）  
食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究  
研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

### 分担研究報告書

#### *Escherichia albertii* の制御法の確立

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

### 協力研究報告書

#### *Escherichia albertii* 特異的リアルタイム PCR 開発の検討

#### 研究要旨

日本では、*Escherichia albertii* による集団食中毒事例の発生が多数報告されているが、原因食品が特定された事例はわずかし報告されていない。このため、*E. albertii* 原因食品特定に対応する食品中の *E. albertii* を迅速かつ高感度に検出する遺伝子検査法を確立することを目標に研究を行った。その結果、*E. albertii* に特異性が高いリアルタイム PCR のプライマーおよびプローブ 1 組が選定された。次年度には、食品を用いた検討等を重ねることにより、さらに研究を発展させ、新たな *E. albertii* 特異的遺伝子検出法の確立を目指す。

#### 研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所 新井沙倉、大屋賢司、大西貴弘  
鹿児島大学 大岡唯祐

#### A. 研究目的

日本において *Escherichia albertii* の検査法を確立することが求められている。  
原因食品が特定された事例は少ない（大岡，日本食品微生物学会雑誌 34;151-157, 2017）。このため、原因食品特定に対応する *E. albertii* 同定用プライマーには、*clpX*、*lysP*、*mdh* を標的とした Hyma らのマルチプレックス PCR (J. Bacteriol, 2005, 187(2),

619-628)が広く用いられているが、食品(野菜)を対象とした試験で、本プライマーが非特異的反応を示すことが Maeda らによって発表された(Jpn. J. Infect. Dis., 2014, 67, 503-505)。また、本研究事業の別の分担研究を実施する大岡唯祐研究分担者の報告した EACBF2103 および EACBF2104 遺伝子を検出対象とした nested PCR 法(Ooka et al., Genome. Biol. Evol., 2015, 7(12), 3170-3179)は、PCR 反応を 2 回繰り返すため煩雑であり、判定までに時間を要する。そこで、判定までの時間を短縮し、感度が高く、食品検査分野でも広く使用されている遺伝子検出系としてリアルタイム PCR に着目した。今年度は、その中でも特に特異性の高いプローブ法の開発を検討することとした。

## B. 研究方法

### (1) プライマーおよびプローブ候補の設計

*E. albertii* 特異的リアルタイム PCR のプライマーおよびプローブを設計する遺伝子を検討し、プライマーおよびプローブ候補を設計した。

#### 1) 菌株

食中毒および下痢症の事例由来株 21 株、無症状保菌者由来株

2 株、動物(トリおよびサル)由来株 13 株、食品由来株 2 株の合計 38 株を供試した(表 1)。

#### 2) DNA 抽出

カジトン培地に保存している菌株(38 株)1 エーゼ分(10  $\mu$ L)を Trypticase Soy Broth (TSB、オキシソイド)10 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。菌培養液を以下の方法で熱抽出法に供試した。菌培養液 100  $\mu$ L を 10,000  $\times$ g にて 10 分間遠心し、沈渣に滅菌蒸留水(滅菌 DW)を 100  $\mu$ L 加え混和後、100°C にて 10 分間加熱した。冷却後、10,000  $\times$ g にて 10 分間遠心し、その上清を DNA 溶液として保存した。

#### 3) 遺伝子シーケンスによる配列決定

本研究事業の別の分担研究を実施する大岡唯祐研究分担者が昨年度同定した 9 個の *E. albertii* 特異的遺伝子(遺伝子 A ~ 遺伝子 I)を試験対象とした。各遺伝子の 3' 端および 5' 端に遺伝子シーケンス用のプライマーを設計した。

上記にて抽出した各 *E. albertii* 菌株 DNA を鋳型として供試し、設計した遺伝子シーケンス用プライマーにて PCR 反応による増幅を行った。PCR 反応に

は、TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) を使用した。また、プライマーの終濃度を  $0.4 \mu\text{M}$  に調製した。機器は MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Global Medical Instrumentation) を使用した。98°C 10 秒の熱変性のうち、98°C 10 秒 - 50°C 5 秒 - 72°C 90 秒を 35 サイクルの増幅反応後、72°C で 5 分間反応させた。PCR 産物を TE バッファーにて 10 倍希釈した後、DNA/RNA 分析用マイクロチップ電気泳動装置の MultiNA (島津製作所) によって電気泳動した。

非特異的反応が認められず、目的のサイズの産物のみを増幅した場合に、ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (サーモフィッシャーサイエンティフィック) によって PCR 産物を精製した。精製 PCR 産物を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いた cycle sequencing に供試した。Cycle sequencing には、上記 PCR 反応と同一のプライマーを用いた。Cycle sequencing 産物は、エタノール沈殿にて精製した。遺伝子配列は、Applied Biosystems SeqStudio Genetic

Analyzer (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いた遺伝子シーケンスにて決定した。

#### 4) 遺伝子配列の解析

遺伝子シーケンスによって得られた配列データを遺伝子シーケンス解析用ソフトウェアである CLC Genomics Workbench (シーエルシーバイオ) に取り込み、配列のクオリティが低い領域をトリミングによって除いた。取得した合計 38 株の遺伝子配列をアライメントにより整列させ、一塩基多型 (SNP) の存在を確認した。

次に、既に遺伝子配列が登録されている *E. albertii* 株の遺伝子配列情報も併せて解析するために、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Nucleotide BLAST を利用して、登録されている *E. albertii* 株の対象遺伝子配列を検索した。検索結果として表示された合計 75 株の *E. albertii* 株の遺伝子配列情報を抜き出し、上記にて解析した国立医薬品食品衛生研究所の衛生微生物部保有 *E. albertii* 38 株の CLC Genomics Workbench 中のアライメントデータへ追加し、合計 113 株のアライメントデータを取得した。その配列中の SNP を確認し、比較的

SNP の少ない遺伝子配列領域を選定した。

#### 5) プライマーおよびプローブ候補の設計

比較的 SNP の少ない遺伝子配列領域 (392 bp) を選択し、Primer3 にてプライマーおよびプローブ候補を設計した。設計されたフォワードプライマー、リバースプライマー、およびプローブ候補を 4) にて解析した合計 113 株のアライメントデータへ追加し、設計したプライマーおよびプローブ候補配列中に SNP が当たらない候補を選定した (表 2)。選定されたプライマーおよびプローブ候補のオリゴを合成した。なお、プローブは、FAM の蛍光標識を選択した。

#### (2) プライマーおよびプローブの至適濃度の検討

設計したプライマー候補のリアルタイム PCR 反応溶液中の至適濃度を検討した。その後、プローブ候補のリアルタイム PCR 反応溶液中の至適濃度を検討した。

##### 1) 菌株

*E. albertii* の type strain である JCM17328T (=NBRC 107761) を供試した。

##### 2) DNA 溶液の調製

カジトン培地に保存している

菌株 1 エーゼ分 (10  $\mu$  L) を TSB 10 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。菌培養液を NucleoSpin Tissue キット (タカラバイオ) を用いた DNA 抽出に供試した。抽出 DNA の濃度を超微量紫外可視分光光度計である Nanodrop 2000 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) にて測定した。*E. albertii* NBRC 107761 の全ゲノム配列長を NCBI 上で検索し、Accession No. NZ\_BBMY00000000 に記載されている全ゲノム配列長 4,422,416 bp から、抽出 DNA 中の DNA コピー数を算出した (Ritalahti et al., Appl. Environ. Microbiol., 2006, 72 2765-2774)。抽出 DNA 溶液を滅菌 DW にて  $2 \times 10^6$  copy/ $\mu$  L の濃度に希釈した。この DNA を原液とし、滅菌 DW にて  $10^{-1}$  から  $10^{-7}$  まで 10 倍階段希釈した。このうち  $10^{-2}$  から  $10^{-7}$  の希釈 DNA 溶液 ( $2 \times 10^4 \sim 0.2$  copy/ $\mu$  L) をリアルタイム PCR のテンプレートとした。

##### 3) プライマーおよびプローブの濃度設定

まず、プライマーの至適濃度を検討した。その際に、プローブの終濃度が 0.25  $\mu$  M となるよう調製した。プライマーの終濃度は、0.1  $\mu$  M、0.3  $\mu$  M、0.4  $\mu$  M、0.5  $\mu$  M、

0.6  $\mu$ M、0.9  $\mu$ M となるよう調製した（表 3）。次に、プローブの至適濃度を検討した。プライマーの濃度は上記にて検討した結果、最も適した濃度（EA\_rt1 および EA\_rt2 で共に終濃度 0.3  $\mu$ M）となるよう調製した。プローブの終濃度は、0.05  $\mu$ M、0.1  $\mu$ M、0.15  $\mu$ M、0.25  $\mu$ M、となるよう調製した（表 4）。

#### 4) リアルタイム PCR

設計した EA\_rt1 と EA\_rt2(表 2) のプライマーおよびプローブにてリアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR 試薬には、TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いた。上記にて調整した希釈 DNA 溶液を 5  $\mu$ l 加えた。少なくとも  $10^{-5}$  から  $10^{-7}$  の希釈 DNA 溶液を供試する際には、1 濃度につき 3 反応実施した。機器は Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システム (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用した。50°C 2 分および 95°C 10 分の熱変性ののち、95°C 15 秒 - 60°C 1 分を 45 サイクル増幅反応させた。検出された蛍光から求められる Ct 値を蛍光強度のプロットした図を参考に、検出感度や蛍

光強度を求め、プライマーおよびプローブの至適濃度を決定した。

### (3) 特異性試験

#### 1) 菌株

食中毒および下痢症の事例由来株、無症状保菌者由来株、動物由来株、食品由来株の合計 42 株の *E. albertii* を供試した(表 6)。また、その他の細菌種として、*E. albertii* の遺伝的近縁種である *Escherichia coli*、*Escherichia fergusonii*、*Hafnia alvei*、*Shigella boydii*、*Shigella dysenteriae*、*Shigella sonnei* (Lukjancenko et al., Microb. Ecol., 2010, 60(4), 708-720; Oh et al., J. Microbiol., 2011, 49(5), 747-752; Na et al., J. Microbiol., 2018, 56(4), 280-285) に加え、各種食中毒細菌や食品由来細菌の合計 24 菌種、27 株を供試した(表 6)。

#### 2) DNA 溶液の調製

*E. albertii* 株は、カジトン培地に保存している菌株 1 エーゼ分 (10  $\mu$  L) を TSB 10 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。その他の菌株は、-80°C に冷凍保管されている菌株 1 エーゼ分 (10  $\mu$  L) を TSB 5 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。菌培養液を NucleoSpin Tissue キットを用

いた DNA 抽出に供試した。抽出 DNA の濃度を Nanodrop 2000 によって測定した。抽出 DNA 溶液を滅菌 DW にて  $2 \text{ ng}/\mu\text{L}$  の濃度に希釈した。この希釈 DNA 溶液をリアルタイム PCR のテンプレートとした。

### 3) リアルタイム PCR

前述の (2) 4) と同様に実施した。但し、全ての希釈 DNA 溶液を 3 反応実施した。また、リアルタイム PCR のサイクル数は 40 サイクルとし、3 反応のうち 1 反応でも蛍光が検出された場合は陽性と判定した。

## C. 研究結果

### (1) プライマーおよびプローブ候補の設計

#### 1) 遺伝子シーケンスによる配列決定

供試した *E. albertii* 全 38 株において遺伝子配列の約全長が得られた遺伝子は、遺伝子 A のみであった。遺伝子 A の配列を NCBI の Nucleotide BLAST にて検索したところ、合計 75 株の登録配列を得た。この配列も合わせた合計 113 株の遺伝子配列を解析し、比較的 SNP の少ない遺伝子配列領域 (392 bp 中に 19 か所の SNP) を対象にプライマーおよびプロ

ーブ候補を設計し、選定したところ、産物長が 150 bp および 97 bp の 2 ペアのプライマーおよびプローブ候補が得られた (表 2)。(2) プライマーおよびプローブの至適濃度の検討

プライマーの濃度を検討したところ、感度が高く、かつ蛍光強度が十分得られた条件は EA\_rt1 および EA\_rt2 で共にプライマーの終濃度が  $0.3 \mu\text{M}$  の場合であった (図 1、図 2)。プローブの濃度を検討したところ、EA\_rt1 ではプローブの終濃度が  $0.1 \mu\text{M}$  の条件、EA\_rt2 ではプローブの終濃度が  $0.15 \mu\text{M}$  の条件が最も適していた (図 3、図 4)。決定したプライマーおよびプローブ濃度から、EA\_rt1 および EA\_rt2 の反応溶液組成を確定した (表 5)。

#### (3) 特異性試験

EA\_rt1 および EA\_rt2 共に供試した全 *E. albertii* 株が陽性となった (表 6)。その他の細菌種では、EA\_rt2 では全て陰性となったが、EA\_rt1 では、*Enterobacter aerogenes*、*Escherichia hermannii*、*Shigella boydii*、*Shigella sonnei*、*Yersinia enterocolitica* の 5 株が陽性となった (表 6)。

#### D. 考察

特異性試験の結果から、EA\_rt1において *E. albertii* 以外の菌株DNAも増幅されたため、特異性が低いと考えられた。そこで、非特異的反応が認められず、特異性の高いEA\_rt2のプライマーおよびプローブセットを暫定的な *E. albertii* 特異的リアルタイムPCR候補とした。

*E. albertii* 特異的リアルタイムPCRとして確立するためには、さらに複数の項目について検討する必要がある。まず、本リアルタイムPCRは、食品中の *E. albertii*を検出することを目的としているため、細菌全般の遺伝子を検出する16S rRNA遺伝子を同時に検出することで、食品中のPCR阻害物質の影響を考慮する必要がある。そのため、DuplexリアルタイムPCRの検出系として今回開発したEA\_rt2が利用できるか評価する必要がある。

次に、*E. albertii* 菌株のみ、および食品培養液と *E. albertii* 菌株を併せて試験した場合のリアルタイムPCRの検出感度を評価する必要がある。さらに、実際の食品検体を検査する際には、まず増菌培養を行うため、試験的に *E. albertii* を接種した食品検体を増菌培養し、その培養液から抽出した

DNAをリアルタイムPCRに供試し、検出されるかを評価する必要がある。これらの検討において良好な成績が得られた際に、*E. albertii* 特異的リアルタイムPCRとして提唱することが可能となる。さらに、実際の食品検体中の *E. albertii*を検出することで、実検体の応用性も示せると考えられる。

#### E. 結論

*E. albertii* 特異的リアルタイムPCRの候補として、EA\_rt2と名付けたプライマーおよびプローブ1組を選定した。次年度にはさらに感度試験や食品を用いた検討を重ね、食品からの *E. albertii* 検出に有用なリアルタイムPCRを確立する。また、本リアルタイムPCR法と培養法を組み合わせ、食品からの *E. albertii* 検出分離法について総合的に検討する。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

(誌上発表)

Mori, T., Nagao, S., Kishino, K., Namba, T., Hara-Kudo, Y. DNA extraction for sensitive detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in

food by real-time PCR assays. Food Hygiene and Safety Science (shokuhin eiseigaku Zasshi). 60(6), 183-186, 2019.

(学会等発表)

新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、床井由紀、土屋彰彦、小嶋由香、長岡宏美、大屋賢司、甲斐明美、工藤由起子．鶏肉からの *Escherichia albertii* 検出法のための nested PCR の検討．第 115 回日本食品衛生学会学術講演会．令和元年 10 月 3、4 日．東京

新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、大屋賢司、工藤由起子．鶏肉における *Escherichia albertii* 検出のための PCR 法の検討．第 93 回日本細菌学会総会．令和 2 年 2 月 19、20、21 日．名古屋

H. 知的所有権の取得状況・登録状況  
なし