

国立医薬品食品研究所における人体（血液・尿等）試料中の病原細菌の検査法の 開発と標準化

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、近年、日本で散発するエルシニア症に関して、病原体である病原性 *Yersinia enterocolitica* ならびに *Y. 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 法と Real-time Multiplex PCR 法の開発を試みた。標的遺伝子として、*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、改良した Multiplex PCR 法ならびに新たに開発した Real-time Multiplex PCR 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

Y. 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、O32、O5、O27、O8、O9、O13a、O13b、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、O27、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、O32、O8、O13a、O13b、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、主に北米に局限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08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08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、08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、*Y. pseudotuberculosis* は0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 を識別できる昨年度開発した Multiplex PCR 法を改良するとともに、新たに Real-time Multiplex PCR 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* 03、05、27、08、09 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℃で保存していた菌株を、trypticase soy agar (TSA) (BD) に接種し、発育した *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) 10 ml に接種し、*Yersinia* については25℃で、*Salmonella* は37℃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0.5 ml を10,000×gで10分間遠心し、その沈渣沈渣に滅菌蒸留水0.5 ml 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0.5 ml を添加して再浮遊させ、100℃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

①改良 Multiplex PCR

改良した Multiplex PCR に用いる標的遺伝子とプライマーは、表 1 に示した。*VirF* は病原性 *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。

②Real-time Multiplex PCR

Real-time Multiplex PCR に用いる標的遺伝子とプライマーは表 2 に示した。標的遺伝子として、*ail*、*inv* および *irp2* を用いた。

(5) PCR 反応

①改良 Multiplex PCR

PCR 用マイクロチューブに鋳型 DNA 溶液を 5.0 μl 、Taq GoTaq[®] DNA Polymerase set (Promega) を 7.625 μl 、4 種の標的遺伝子に対する 50 μM プライマー (Forward と Reverse) をそれぞれ 0.5 μl 、および UltraPure[™] Distiller Water (Life Technologies) を 8.375 μl 加え、計 25 μl 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。また、最適な条件が設定できた後は、抽出した DNA を希釈し、改良 PCR 法で検出できる検出限界を求めた。

②Real-time Multiplex PCR

PCR 用のマイクロチューブに、供試菌株から抽出し滅菌精製水を用いて 100 ng/ μl に調整した鋳型 DNA 溶液を 2.0 μl 、TB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ(株)、滋賀) を 10 μl 、10 μM プライマー (Forward と Reverse) をそれぞれ 0.8 μl ずつおよび滅菌水 6.4 μl を加え、計 20 μl の反応液とした。陰性コントロールとしては、鋳型 DNA の代わりに滅菌精製水 2.0 μl を加えたものを用いた。発色基質としては、サイバーグリーンを用いた。Real-time PCR 反応には、MiniOpticon[™] (Bio-rad) を使用した。Real-time PCR の反応条件としては、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。

C. 研究結果

(1) 改良 Multiplex PCR

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 45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。

②Multiplex PCRの結果

供試菌株13株について、Multiplex
PCRを行った結果を表3と図1に示し
た。病原性 *Y. enterocolitica* 4株に
ついては、*virF* 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08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 *virF* と *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。また、
検出感度を調べたところ、*Y.*
enterocolitica 08、*Y.*
pseudotuberuclosis 1bと4bの3菌株
については、 10^1 CFU/tubeの菌量で、
Y. enterocolitica 03では 10^3
CFU/tubeの菌量で検出可能であった
(図2)。

(2)Real-time Multiplex PCR

①最適なReal-time Multiplex PCR条

件

全ての標的遺伝子が検出できる最適
なReal-time Multiplex PCR条件を探
索した結果、95°Cで30秒間反応させ
た後、95°C 5秒および60°C 30秒を40
サイクル行う条件が最適であることが
判明した。以後はこの条件でReal-time
Multiplex PCRを行った。

②Real-time Multiplex PCR

ail、*inv* および *irp2* の解離曲線を
図3に示した。3つの標的遺伝子の解
離曲線のT_m値が異なっており、T_m値
の違いから、3つの標的遺伝子を識別
することが可能であった(図3)。今回、
開発したReal-time Multiplex PCR法
によって、病原性 *Y. enterocolitica*
のうち、強毒なAmerican strainsと
弱毒なEuropean strainsならびに
Y. pseudotuberculosis の3つの菌種・グ
ループを分けて検出することが可能で
あった。

③Real-time Multiplex PCRの結果

供試21株について、Multiplex PCR
を行った結果を表4に示した。病原性
Y. enterocolitica 4株については、
virF 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08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

昨年度、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 08 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、これらの 3 菌種・グループを識別して分離・同定することが可能であったが、*ail* と *inv* のバンドの大きさが近かったため、より明確に識別できるプライマーを選んで、最適な Multiplex PCR の確立を試みた。その結果、改良した Multiplex PCR では、昨年度のものより、より明確に 3 菌種・グループを識別し同定できた。また、検出感度もおおむね $10^1 \sim 10^3$ CFU/tube で高かった。これらのことから、今回改良した Multiplex PCR 法は、病原性 *Y. enterocolitica* 血清型 08 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、実用的で有用な診断ツールになり得ると思われる。

本研究では、さらに病原性 *Yersinia* のより迅速な検出・同定を目指して、インターカレータ法による Real-time

Multiplex PCR 法を用いた迅速検出法の開発を試みた。標的遺伝子として、*ail*、*inv* および *irp2* を標的とした。その結果、3 つの標的遺伝子の Tm 値は異なっており (図 3)、今回開発した Real-time Multiplex PCR 法により、3 つの菌種・グループを迅速に識別することが可能であった (表 4)。改良 Multiplex PCR に比べ、Real-time Multiplex PCR 法は、2 時間以内で迅速に診断が可能であるので、病原性 *Yersinia* 検出の有用なツールになり得ると思われる。現在、さらに TaqMan 法による Real-time Multiplex PCR 法も開発中であり、さらに IMS による *Y. enterocolitica* ならびに *Y. pseudotuberculosis* の主要な血清型に対する IMS 法の開発も進めている。

図 4 は、血液・糞便や食品検体から、病原性 *Yersinia* を迅速に分離するために作成したプロトコールである。検体を 25-32℃ で 12 時間増菌後、Multiplex または Multiplex Real-time PCR で、病原性 *Y. enterocolitica* または *Y. pseudotuberculosis* の保有する病原遺伝子を検出し、陽性になった検体について、さらに増菌培地を、1. 直接選択培地に塗抹、2. 代表的な病原性 *Y. enterocolitica* または *Y. pseudotuberculosis* の血清型に対する抗体を用いた IMS で処理後、選択培地に塗抹し、標的とする病原体の分離・同定を行う。本プロトコールにより、

病原性 *Yersinia* 病原遺伝子検出ではお
おむね1日、菌の分離まで3日程度で
終了できる。昨年度ならびに今年度の
研究で、このプロトコールのうち、
MultiplexまたはMultiplex Real-time
PCR での迅速検出法を確立し、また、
IMSについても一部方法を確立できた。

最終年度は、次のステップとして、
子のプロトコールに従って、開発した
遺伝子ならびに免疫学的診断法を用い
て、血液などの臨床検体への応用を試
みる予定である。

E. 結論

病原性 *Y. enterocolitica* の強毒な
American strains と European
strains および *Y.*
*pseudotuberculosis*を識別できる、よ
り高感度な Multiplex PCR 法ならびに
インターカレーター法による Real-
time Multiplex PCR 法の開発を試みた。
標的遺伝子として、*ail*、*inv*、*irp2* お
よび *virF* 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、改良
した Multiplex PCR 法ならびに Real-
time 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

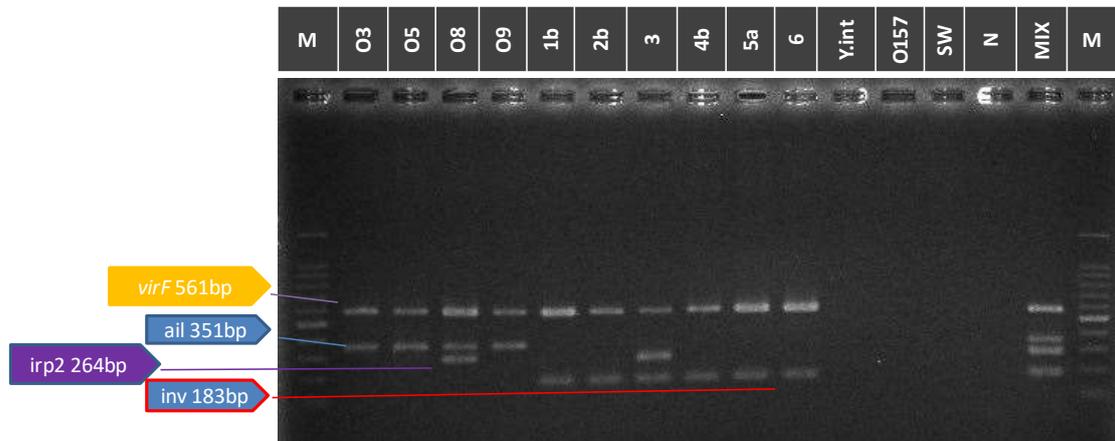
なし

2. 学会発表

1) Bui Thi Hien、池内隼佑、工藤由
起子、林谷秀樹、病原性 *Yersinia* の
Multiplex PCR による迅速検出法の開
発。第40回 日本食品微生物学会学術
集会、東京、2020年11月。

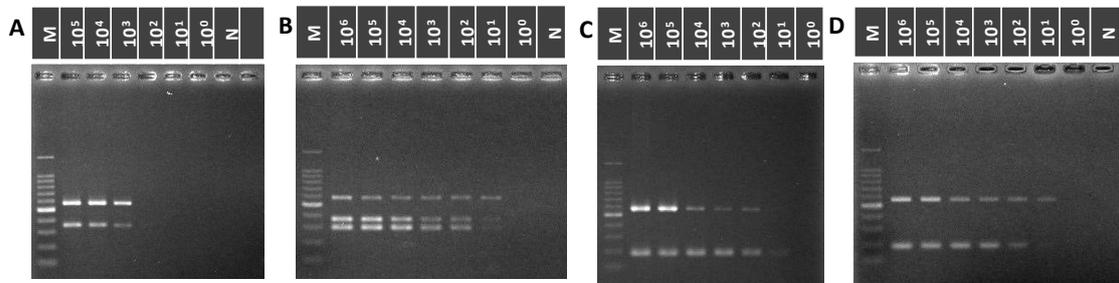
G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



M: molecular marker 100bp, N: negative control, MIX: Mix DNA of *Y.e.* O8 and *Y.p.* 1b
 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,
 5a: *Y.p.* 5a, 6: *Y.p.* 6, Y.int.: *Y.intermedia*, O157: *E.coli* O157, SW: *Salmonella* Weltevreden

図1. Multiplex PCRの結果



Lane: Molecular Maker 100bp, 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 CFU/per reaction tube of template DNA of *Y. enterocolitica* O3 (A) and O8 (B), *Y. pseudotuberculosis* 1b (C), and 4b (D), N: negative control

図2. 新たに改良した Multiplex PCR の検出感度の確認

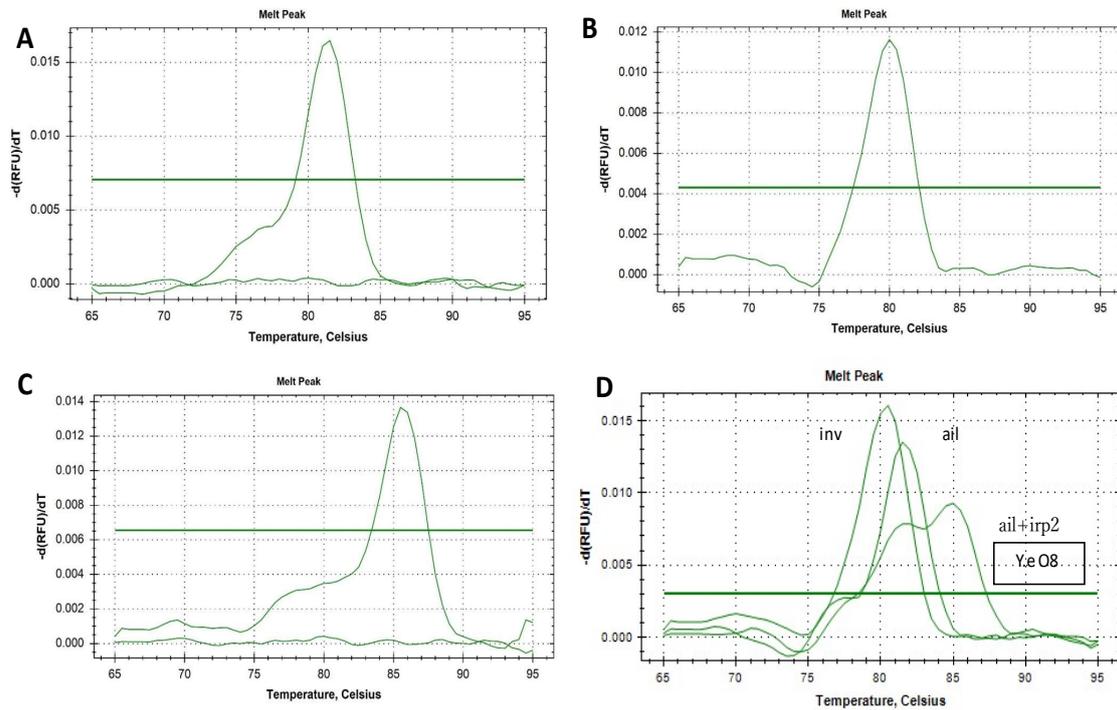


図3. 解離曲線 *ail* (A), *inv* (B), *irp2* (C), および Real-time Multiplex PCR 解析 (D)

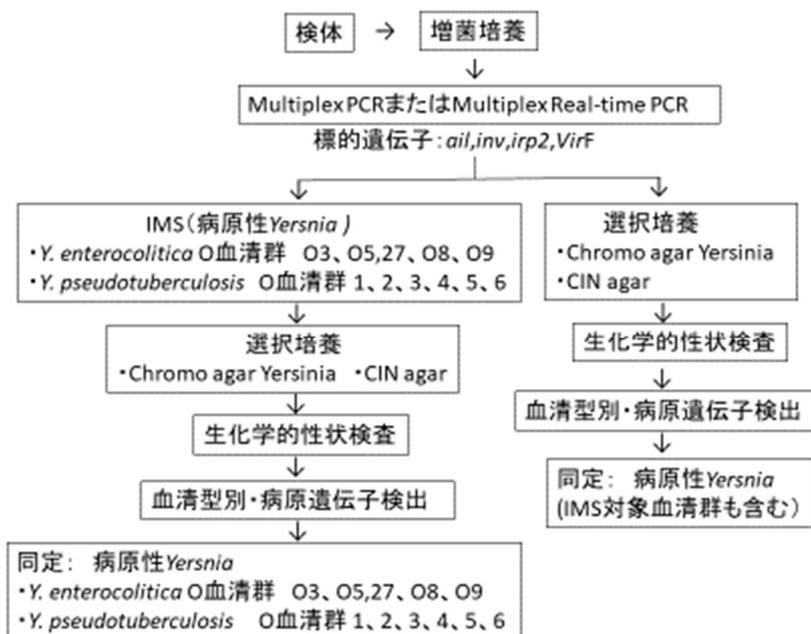


図4. 病原性Yersiniaの迅速検出法のプロトコール

表 1. 新たに改良した病原性 *Yersinia* を検出する Multiplex PCR 法

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	TAATGTGTACGCTGCGAG	351	病原性 <i>Y. enterocolitica</i>	Thoerner et al, 2003
	R	GACGTCTTACTTGCACTG			
<i>inv</i>	F	CGGTACGGCTCAAGTTAATCTG	183	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	Thoerner et al, 2003
	R	CCGTTCTCCAATGTACGTATCC			
<i>irp2</i>	F	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	264	病原性 <i>Y. enterocolitica</i> (American strains) <i>Y. pseudotuberculosis</i> (血清型 I と III の一部)	Schubert et al, 1998
	R	TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT			
<i>Vir F</i>	F	GGCAGAACAGCAGTCAGACATA	561	病原性 <i>Y. enterocolitica</i> と <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Thoerner et al, 2003
	R	GGTGAGCATAGAGAATACGTCG			

表 2. 病原性 *Yersinia* を検出する Real-time Multiplex PCR 法

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	GCTCACGGAAAGGTTAAGTCATCT	101	病原性 <i>Y. enterocolitica</i>	Wang et al. 2014
	R	TTTGAAGCGGGTTGAATTG			
<i>inv</i>	F	GCTTTTGACACAACCTTAGCCAATA	75	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	本研究で開発
	R	GGTCAATGGTGCCTATAAGTG			
<i>irp2</i>	F	ACTGCGCTTTAACTGGGATT	84	病原性 <i>Y. enterocolitica</i> (American strains) <i>Y. pseudotuberculosis</i> (血清型 I と III の一部)	Gaddy et al., 2014
	R	AGCAATGCCAATACTGTTC			

表 3. 改良した Multiplex PCR 法による同定結果

菌種	<i>Y. enterocolitica</i>				<i>Y. pseudotuberculosis</i>						<i>Y. int.</i>	<i>S. Welte.</i>	<i>E. coli</i> O157
	O3	O5.27	O8	O9	1b	2b	3	4b	5a	6			
<i>inv</i>	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—
<i>irp2</i>	—	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—
<i>ail</i>	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>virF</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—

表 4. Real-time Multiplex PCR による同定結果

菌種	<i>Y. enterocolitica</i>				<i>Y. pseudotuberculosis</i>												<i>Y. int.</i>	<i>S. Welte.</i>	<i>E. coli</i> O157
	O3	O5.27	O8	O9	1a	1b	1c	2a	2b	2c	3	4b	4b	5a	5b	6			
標的 遺伝子																			
<i>inv</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>irp2</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ail</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-