

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 Real-time Multiplex PCR 法 (TaqMan 法) ならびに特異的に菌分離のできる免疫磁気ビーズ法 (IMS 法) の開発を試みた。さらに開発した手法を用いて、病原性 *Yersinia* に感染しているノネズミの糞便ならびに菌を接種したウサギ血液から、菌の検出を試みた。その結果、Multiplex Real-time Multiplex PCR (TaqMan 法) と IMS 法で、*Y. pseudotuberculosis* と病原性 *Y. enterocolitica* の American strains ならびに European strains を識別し、感度高く検出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、今年度は、Multiplex Real-time PCR (TaqMan法) ならびに免疫磁気ビーズ法を開発した。そして、病原性 *Yersinia* に感染しているノネズミの糞便ならびに菌を接種したウサギ血液を用いて、その検出能力を調べ、その有用性を評

価した。

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. aldovvae*、*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) TaqMan Real-time PCR

(1) 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。

(2) プライマー

Multiplex Realtime PCR(に用いる標的遺伝子とプライマーは、表 1 に示した。

ail は病原性 *Y. enterocolitica* を、*inv* は *Y. pseudotuberculosis* を、ならび *fyuA* は病原性 *Y. enterocolitica* のうち American strains を検出できる。

(3) PCR 反応

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 100ng/ μ l に調整した鋳型 DNA 溶液を 2.0 μ l、TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) premix(タカラバイオ(株), 滋賀) を 10 μ l、10 μ M プライマー (Forward と Reverse) をそれぞれ 0.8 μ l ずつおよび滅菌水 6.4 μ l を加え、計 20 μ l 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 μ l を加えたものを用いた。発色基質としては、yamaki yellow と FAM を用いた。Real-time PCR(TaqMan 法)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。

4) IMS 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* 1b、3、4b の計 7 菌株を用いた。

(2) 抗血清

IMS に使用する抗血清として、市販の抗

Y. enterocolitica と *Y. pseudotuberculosis* 血清 (デンカ生研) と自家製抗血清を用いた。感作用ビーズ Dynabeads® M-280 Sheep anti Rabbit IgG (DynaL 社)) 250 μ l を 1.5ml マイクロチューブにとり、PBS/BSA でビーズを洗浄して上清を除去した。これに、抗血清をそれぞれ加えて、室温で 2 時間混和しながらビーズに感作させ、免疫ビーズを調製した。

(3) IMS 反応

PBS で 10 倍階段希釈し 10^2 - 10^4 CFU/ml 濃度に調整した供試菌液 1ml に、5)-(2) で調整した免疫磁気ビーズ 20 μ l を加え、20 分間混和した。その後、PBS1ml を加えて混和、磁石での磁気ビーズの収集、上清の除去という洗浄処理を 3 回繰り返した後、免疫磁気ビーズを TSA に接種し、25°C で 24-48 時間好気培養し、発育してきたコロニー数を計測した。そして、投与した菌数と回収した菌数を比較して、回収できた菌の割合を計算した。

5) 開発した Multiplex PCR および Real-time Multiplex PCR を用いた野外検体などからの病原性エルシニア検出能の評価

(1) 血液からの検出

① 供試菌株

Y. enterocolitica 03, 08 および *Y. pseudotuberculosis* 1b の 3 菌株を用いた。

② 血液

血液として、ウサギ脱繊維血(ジャパン・ラム)を用いた。

2) ウサギ血液からの菌検出

供試菌株を TSA に接種して、25°C で 24 時間培養後、PBS で培養菌を 10 倍階段希釈し、ウサギ脱繊維血に 10^0 - 10^6 CFU/ml になるように接種した。菌を接種した血液からは、ISOSPIN Blood & Plasma DNA キット (NIPPON GENE) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA から開発した Multiplex PCR ならびに Multiplex Real-time PCR (IC 法ならびに TaqMan 法) を用いて接種菌の検出を行い、その感度を調べた。

(2) ノネズミ糞便からの分離

① 供試検体

供試検体として、*Y. enterocolitica* 08 が排菌されていることを確認しているノネズミの糞便 45 検体を用いた。

② ノネズミ糞便からの検出

供試検体を 9 倍量の PBS に加え、よく攪拌した後、QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出し、開発した TaqMan Multiplex Real-time PCR を用いて病原性 *Yersinia* の検出を行った。

C. 研究成果

1) Multiplex Real-time PCR (TaqMan 法)

(1) 最適な Multiplex Real-time PCR (TaqMan 法) 条件

全ての標的遺伝子が検出できる最適な Multiplex Real-time PCR (TaqMan 法) 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 Multiplex Real-time PCR (TaqMan 法) を行った。

(2) Multiplex Real-time PCR (TaqMan 法)

標的遺伝子である *ail*、*inv* および *fyuA* の増幅産物に対する蛍光値曲線を図 1 に示した。設計したプライマーは標的遺伝子に対し特異的に反応し、蛍光値の増幅が観察された。今回、開発した Multiplex Real-time 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。

(3) Multiplex Real-time PCR (TaqMan 法) の結果

供試菌株 13 株について、Multiplex Real-time PCR (TaqMan 法) を行った結果を表 2 に示した。病原性 *Y. enterocolitica* 4 株については、いずれの菌株とも *ail* に対する蛍光値の上昇が認められた。また、American strains である 08 については、*fyuA* に対する蛍光値の上昇が観察された。また、*Y. pseudotuberculosis* 株については、すべての菌株で *inv* に対する蛍光値の増殖が観察された。それ以外の菌株では、いずれの蛍光値の増殖は認められなかった。

2) 市販抗血清を用いた IMS 法の応用結果

供試した 7 菌株のうち、*Y. enterocolitica* 05, 27 以外の市販抗血清は、投与した菌の回収が可能で、実用上

使用可能と思われたが、*Y. enterocolitica* 05, 27 は回収菌量が少なかった(表 3)。

3) ウサギ脱繊維血からの検出結果

Multiplex Real-time PCR (TaqMan 法) により、ウサギ脱繊維血に接種した *Y. enterocolitica* 03, 08 および *Y. pseudotuberculosis* 1b の 3 菌株について、*Y. enterocolitica* 03, 08 は 10^1 CFU/tube まで、*Y. pseudotuberculosis* 1b は 10^2 CFU/tube の菌量まで、検出可能であった(表 4)。

4) ノネズミ糞便からの検出結果

ノネズミ 45 検体中 3 検体(6.7%)から、Multiplex Real-time PCR (TaqMan 法) で *ail* と *fyuA* が検出された。これらの検体からは、*Y. enterocolitica* 08 が培養法では分離されていた(表 5)。

D. 考察

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 Real-time PCR (TaqMan 法) 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。検出感度もおおむね $10^1 \sim 10^2$ CFU/tube で高かった。さらに、実際の使用の簡便性を考えて、市販抗血清を用いて、IMS 法による感度の

高い *Y. enterocolitica* ならびに *Y. pseudotuberculosis* の分離を検討した。その結果、用いた 7 血清型のうち、*Y. enterocolitica* 05, 27 以外の市販抗血清は IMS 法の抗血清として実用上使用可能であった。

本研究で開発した Multiplex Real-time PCR (TaqMan 法) が臨床検体からの病原 *Yersinia* の検出に応用可能かを検討する目的で、*Y. enterocolitica* 08 が排菌されていることが確認されているノネズミの糞便から、開発した Multiplex Real-time PCR (TaqMan 法) で病原性 *Yersinia* の検出を行ったところ、08 菌が分離された検体から *Y. enterocolitica* American strains を示唆する蛍光発色が検出された。また、さらにウサギ脱繊維血に *Y. enterocolitica* ならびに *Y. pseudotuberculosis* を接種し、開発した Multiplex Real-time PCR (TaqMan) 法で検出を行ったところ、 $10^1 \sim 10^2$ CFU の菌量で検出可能であった。

これらのことから、本研究で開発した Multiplex Real-time PCR (TaqMan 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性が高く、実際に糞便や血液検体から病原性エルシニアの菌種を分類しつつ、迅速に検出・同定可能な有用なツールであることが判明した。

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 Real-time PCR (TaqMan 法) の開発を試みた。標的遺伝子として、*ail*、*inv* および *fyuA* の 3 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。併せて、市販抗血清を用いた IMS 法の開発も行った。さらに血液や糞便から開発した TaqMan Multiplex Real-time PCR で菌の検出を試みた。その結果、開発した方法で *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

- 1) Bui Thi Hien, Shunsuke Ikeuchi, Yukiko Sassa, Takeshi Niwa, Yukiko Hara-Kudo and Hideki Hayashidani. Development of multiplex PCR for pathogenic *Yersinia*. J. Appl. Microbiol. (in submitted).

2. 学会発表

- 1) Bui Thi Hien、池内隼佑、佐々悠木子、仁和岳史、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 163 回日本獣医学会学術集会。2020 年 9 月。

山口 (Web 開催)

- 2) 池内隼佑、Bui Thi Hien、佐々悠木子、仁和岳史、工藤由起子、林谷秀樹。病原性 *Yersinia* の Multiplex Real PCR による迅速検出法の開発。第 163 回日本獣医学会学術集会。2020 年 9 月。山口 (Web 開催)
- 3) Bui Thi Hien、池内隼佑、工藤由起子、林谷秀樹。病原性 *Yersinia* の TaqMan 法による Multiplex RealTime PCR による迅速検出法の開発。第 116 回日本食品衛生学会学術集会。2020 年 11 月。長崎 (Web 開催)

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

表1. 病原性*Yersinia*を検出するMultiplex Real-time PCR法 (TaqMan法)

1. 標的遺伝子とプライマー

標的遺伝子	増幅産物 (bp)	検出病原体	参考文献
<i>ail</i>	163	病原性 <i>Y. enterocolitica</i>	Lambertzら, 2006
<i>fyuA</i>	97	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	本研究で開発
<i>inv</i>	89	病原性 <i>Y. enterocolitica</i> (American strains)	本研究で開発

2. PCR条件: 95°C 30秒 → 40サイクル(95°C 5秒 — 60°C 30秒)

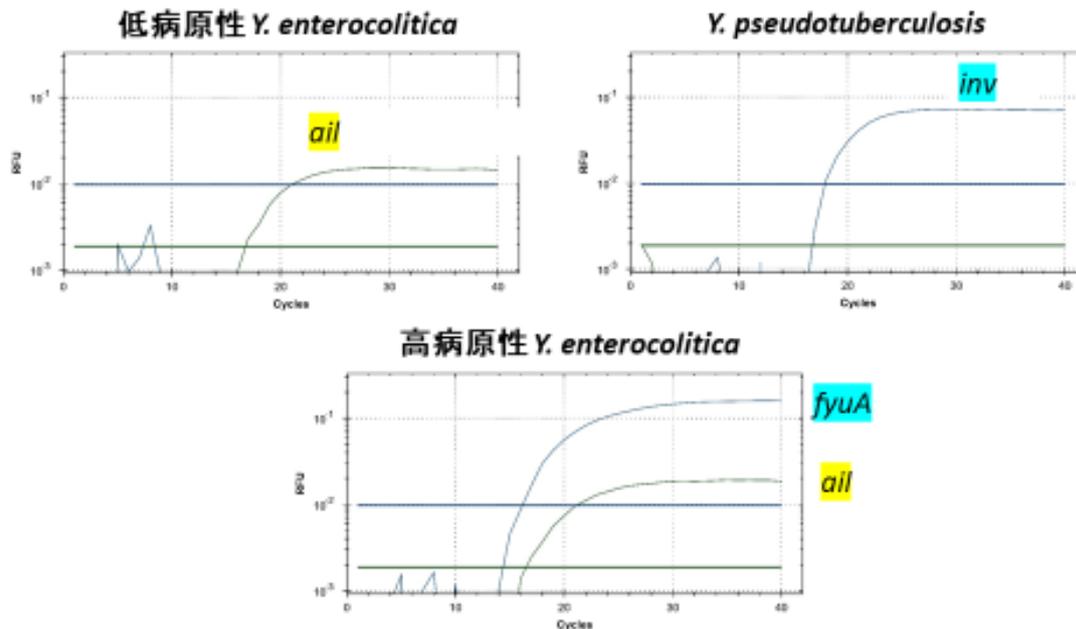


図1. Multiplex Real-time PCR(TaqMan法)による標的遺伝子の増幅産物に対する蛍光値曲線

表2. Multiplex Real-time PCR(TaqMan法)による検出結果

標的 遺伝 子	<i>Y.enterocolitica</i>				<i>Y.pseudotuberculosis</i>						<i>Y. int.*</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.W**</i>	
	O3	O5,27	O8	O9	1b	2b	3	4b	5a	6				
<i>ail</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>fyuA</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>inv</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Y.int:Yersinia intermedius*, *S.W:Salmonella Weltevreden*

表3.自家製と市販抗血清を用いた免疫磁気ビーズ法による接種菌の回収状況

接種 菌数 (CFU)	回収割合 (%)								
	<i>Y.e</i>	<i>Y.e</i>	<i>Y.e</i>	<i>Y.e</i>	<i>Y.e</i>	<i>Y.e</i>	<i>Y.p1</i>	<i>Y.p3</i>	<i>Y.p4</i>
	O3	O5,27	O5,27	O8	O8	O9			
	市販*	市販*	自家製	市販*	自家製	市販*	市販*	市販*	市販*
10 ⁴	85.4	1.0	2.2	6.8	131.1	80.1	72.7	72.6	19.5
10 ³	90.4	0.0	0.0	7.3	147.7	57.3	149.4	95.0	8.7
10 ²	80.0	0.0	0.0	12.2	107.1	78.9	72.7	96.2	12.5

*:デンカ生研

表4. Multiplex Real-time PCR(TaqMan法)による
ウサギ血液からの投与菌の検出

接 種 菌	接種菌数(CFU)						
	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰
<i>Y. enterocolitica</i> O3	+	+	+	+	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> O8	+	+	+	+	+	+	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 1b	+	+	+	+	+	-	-

表5. Multiplex Real-time PCR法(TaqMan法)による自然感染の
ノネズミ糞便からの検出

手 法	検体数	<i>Y. entero- colitica</i>	<i>Y. pseudotu- berculosis</i>
Multiplex Real-time PCR(TaqMan)	45	3(6.7%)*	0
分離培養法		3(6.7%)*	0

* *Y. enterocolitica* 血清型O8