

令和4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）

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

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

病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

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

astA 特異的リアルタイム PCR 法の開発

研究要旨

astA 保有大腸菌の食品での検査法として、リアルタイム PCR 法の開発が期待されている。また、近年 *astA* の遺伝子多型（バリエーション）が明らかになっているため、本研究では、*astA* のバリエーションに着目して、リアルタイム PCR 法のプライマーおよびプローブ候補を新規に設計した。その結果、*astA* の現在判明している全バリエーションを検出するプライマーおよびプローブセット案と *astA* として機能していないことが予想されるバリエーション X (大岡らの解析) 以外の全バリエーションを検出するプライマーおよびプローブセット案をそれぞれ複数設計した。それらは、*astA* 陰性の各種食中毒細菌や食品由来細菌を増幅しなかったことから特異性が高いことが示された。今後は、各バリエーションの増幅性を確認し、感度についても評価を進めたい。

研究協力者

福井県衛生環境研究センター
姫路市環境衛生研究所
鹿児島大学
国立感染症研究所
国立医薬品食品衛生研究所

横山孝治
新免香織
大岡唯祐
伊豫田 淳、李 謙一
廣瀬昌平、新井沙倉

A. 研究目的

astA 保有大腸菌の食品での検査法として、*astA* 遺伝子特異的な遺

伝子検出法が有用であると考えられ、コンベンショナル PCR 法やリアルタイム PCR 法が既に複数報告さ

れている。特に、様々な細菌が混在する食品から *astA* 保有大腸菌を検出するためには、特異性が高く迅速な判定が可能なリアルタイム PCR 法のプローブ法の活用が適していると考えられる。

一方で、*astA* 遺伝子には、その遺伝子配列の違いから複数の遺伝子多型（バリエーション）が報告されている（Silva et al., BMC Microbiol. 2014, 14:135; Maluta et al, FEMS Microbiol. Lett. 2017, 364:6）。分担研究者の大岡の解析では、全バリエーションの中には *astA* として機能していないことが予想されるバリエーションも存在することが示されている（詳細略、Personal communication）。そこで本研究では、日本の集団食中毒事例由来株の *astA* バリエーションを同定し、それらのバリエーションを包括的に検出可能なリアルタイム PCR 法を新規に開発することを目的とした。

B. 研究方法

（1）集団食中毒事例由来 *astA* 保有大腸菌のバリエーションの特定

1）菌株

astA 保有大腸菌による集団食中毒事例由来株 14 株を供試した（表 1）。

2）*astA* 配列取得

14 株のうち 7 株については、分担研究者の伊豫田から MiSeq（イルミナ）にて取得した配列が提供された。その他 7 株については、国衛研にて以下の方法にて配列取得した。菌株を Tryptone soya broth (TSB、オキシイド) 中で 37℃にて 18 時間培養した。この菌培養液を NucleoSpin Tissue キット（タカラバイオ）を用いて DNA を抽出し、抽出 DNA の濃度を Quantus（プロメガ）によって測定した。Nextera XT DNA Library Prep キット（イルミナ）または Illumina DNA prep キット（イルミナ）を用いてライブラリーを調整した。ライブラリーのサイズは TapeStation（アジレント・テクノロジー）を用いて確認し、MiniSeq にて配列取得した。

3）バリエーションの特定

得られた配列は、分担研究者の大岡が *astA* の各種バリエーションリファレンス配列と照合、バリエーションを特定した。

（2）プライマーおよびプローブ設計領域の選定

astA の各種バリエーションリファレンス配列について、*astA* 遺伝子上流および下流を含めた領域を抜き出し、アライメントした。

各種バリエントで共通した配列について、プライマーおよびプローブを設計可能な領域とした。

(3) プライマーおよびプローブ候補の設計

プライマー等設計支援ソフトウェアである Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)にてプライマーおよびプローブ候補を設計した。設計されたプライマーおよびプローブ候補を *astA* リファレンス配列と比較し、設計したプライマーおよびプローブ候補配列の末端に 1 塩基多型が存在しない候補を選定した。また、分担研究者の大岡から、*astA* を保有する腸管出血性大腸菌の多くがバリエント X の *astA* を保有することおよびバリエント X の配列は *astA* として機能していないことが予想されるとの情報を得たため、バリエント X が検出対象から除外されるプライマーおよびプローブ候補も設計した。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。

(4) 特異性試験

1) 菌株

各種食中毒細菌や食品由来細菌の合計 26 菌種、32 株を供試し

た (表 1)。これらは、腸管病原性大腸菌 (EPEC) および腸管出血性大腸菌 (EHEC) の各 1 株、大腸菌と近縁の *Escherichia albertii* の標準株 (JCM 17328^T) および散発下痢症患者由来株 (EA40) が含まれた (表 1)。

2) DNA 溶液の調製

菌株を TSB 中で 37°C にて 18 時間培養した。この菌培養液を NucleoSpin Tissue キットを用いた DNA 抽出に供試した。抽出 DNA の濃度を Quantus によって測定した。抽出 DNA 溶液を滅菌蒸留水 (DW) にて 2 ng/ μ 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) *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法

Yamamoto らの方法のプライマーを用いて *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法を実施した (表 2)。陽性コントロールとして、*astA* 保有大腸菌の培養液から熱抽出した DNA を供試した。コンベンショナル PCR 試薬には、Quick Taq HS DyeMix (東洋紡) を用いた。反応条件は、94°C 2 分間、94°C 30 秒間 - 55°C 30 秒間 - 68°C 1 分の 30 サイクル、68°C 5 分間とした。

4) リアルタイム PCR 法

設計した Assay 1~11 (表 2) のプライマーおよびプローブにてリアルタイム PCR をそれぞれ行った。リアルタイム PCR 試薬には、TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (サーモフィッシュャーサイエンティフィック) を用いた。上記にて調製した希釈 DNA 溶液を 5 μ l 加えた。1 つの DNA 溶液につき 2 反応実施した。機器は QuantStudio 3 または QuantStudio 5 (サーモフィッシュ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 40 サイクル増幅反応させた。2 反応中 2 反応陽性の場合に陽性と判定した。

(5) 遺伝子シーケンスによる配列決定

供試した 28 株のうち、*E. coli* ESC425 および *E. albertii* EA40 の 2 株について、上記にて抽出した各 DNA を鋳型として供試し、Silva らのシーケンス用プライマー (Silva et al., BMC Microbiol. 2014, 14:135) にて PCR 反応による増幅を行った (表 2)。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

μ M に調製した。98°C 10 秒の熱変性ののち、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 産物を電気泳動した。ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (サーモフィッシュ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 (サーモフィッシュ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 (サーモフィッシュ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。決定した配列について、*astA* リファレンス配列と比較した。

C. 研究結果

(1) 集団食中毒事例由来 *astA* 保有大腸菌のバリエーションの特定

1) バリエーションの特定

供試した 14 株のうち、単一のバリエーションのみ保有する株は 6

株あり、2種類のバリエントを保有する株は7株、3種類のバリエントを保有する株は1株であった(表1)。最も多くの株が保有するのは、prototype(4株)であった。

(2) プライマーおよびプローブ設計領域の選定

バリエント間でミスマッチが少ない *astA* 遺伝子上流および下流までの範囲をプライマーおよびプローブ設計可能範囲と選定した(図1)。

(3) プライマーおよびプローブ候補の設計

全 *astA* バリエントの検出を目的としたプライマーおよびプローブセットを7種類(Assay 1、Assay 2、Assay 3、Assay 4、Assay 5、Assay 6およびAssay 9)およびバリエントX以外の全 *astA* バリエントの検出を目的としたプライマーおよびプローブセットを4種類(Assay 7、Assay 8、Assay 10およびAssay 11)設計した(表2)。

(4) 特異性試験

YamamotoらのコンベンショナルPCR法では、*E. albertii* EA40株のみ陽性であり、その他26菌種31株は全て陰性であった(表1)。

供試した *E. albertii* EA40株は、設計した全11種類のリアルタイムPCR法で陽性となった(Ct値:15.6~19.0)。また、Assay 1~Assay 6およびAssay 9において、*E. coli* ESC425株は陽性となった(Ct値:20.6~32.6)。特に、Assay 6では、ESC425株のCt値が20.6と最も低かった。その他、26菌種30株はいずれのPCR法でも陰性であった。

(5) 遺伝子シーケンスによる配列決定

E. albertii EA40は、*astA* リファレンス配列の中のPrototypeと100%配列が一致したため、prototypeと同定された(図2)。また、*E. coli* ESC425は、バリエントXと100%配列が一致したため、バリエントXと同定された。

D. 考察

astA については、その病原性が現時点で明確になっておらず、過去には *astA* 保有大腸菌が様々な食品から検出されたと報告されている(濱崎ら、腸管病原性大腸菌の検出方法に関する研究、平成20年度福岡県保健環境研究所年報)。そのため、機能している *astA* を効率よく検出することが、食品や患者から

astA を検出する上で重要である。本研究の過程で、分担研究者の大岡から *astA* 保有の腸管出血性大腸菌の多くがバリエーション X の *astA* を保有すること、さらに、バリエーション X の配列からこのバリエーションは *astA* として機能していないことが予想されるとの情報を得た。その情報を参考に、*astA* の全バリエーションを検出するプライマーおよびプローブセット案とバリエーション X 以外の全バリエーションを検出するプライマーおよびプローブセット案をそれぞれ複数設計した。

本研究にて、集団食中毒事例由来株の *astA* のバリエーションを同定したが、種類の異なる複数のバリエーションを複合的に保有する株が半数以上を占めていた。今後、開発している *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の特異性を精査するためには、個々のバリエーションの代表株を選出し、その株を用いた特異性試験を実施する必要がある。そのためには、1 種類の *astA* バリエーションを保有する各バリエーションの代表株を決めるためにシーケンス反応による *astA* の配列決定が必要である。次に、十分な特異性を示したプライマーおよびプローブセット案について、食品を用いた感度試験を実施する必要がある。ゲノム上に複数の *astA* をコ

ードする株や *astA* をコードするプラスミドを複数個保有する株も存在するため、供試する菌株の選定には注意を要することが予想される。さらに、実際の食品への応用性についても、培養法の利用と併せて検討を重ねる必要がある。

また、本研究では *astA* 保有大腸菌の食品での検査法の確立を最終目的としているが、本試験で *E. albertii* が *astA* を保有していたように、*astA* は他の細菌種でも検出される可能性がある。*astA* 保有大腸菌が原因と予想される食中毒事例の検査の際には、*astA* の検出に加えて大腸菌も同時に検出することが求められる可能性がある。

E. 結論

astA の現在判明している全バリエーションを検出するプライマーおよびプローブセット案とバリエーション X 以外の全バリエーションを検出するプライマーおよびプローブセット案をそれぞれ複数設計した。今後、これらの特異性および感度を検討し、最も優れたものについて食品への応用性を評価する必要性が考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Arai, S., Ooka, T., Shibata, M., Nagai, Y., Tokoi, Y., Nagaoka, H., Maeda, R., Tsuchiya, A., Kojima, Y., Ohya, K., Ohnishi, T., Konishi, N., Ohtsuka, K., and Hara-Kudo, Y. Development of a novel real-time polymerase chain reaction assay to detect *Escherichia albertii* in chicken meat. Foodborne Pathogens and Disease 19(12), 823-829, 2022.

(学会等発表)

新井沙倉、土井りえ、小西典子、尾畑浩魅、榊田希、甲斐明美、廣瀬昌平、工藤由起子. 食品からの *Escherichia albertii* 検出のための特異的リアルタイム PCR 法の検討. 第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 29-30 日. 東京

廣瀬昌平、小西典子、佐藤実佳、鈴木恭平、尾畑浩魅、大塚佳代子、後藤慶一、甲斐明美、新井沙倉、工藤由起子. 食品・環境検体中での *Escherichia albertii* の挙動解析. 第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 29-30 日. 東京

新井沙倉、小西典子、尾畑浩魅、工藤由起子. 野菜における腸管毒

素原性大腸菌の検出と型別を目的としたリアルタイム PCR 法の検討. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 4 年 11 月 10-11 日. 長崎

土井りえ、廣瀬昌平、小西典子、鈴木恭平、尾畑浩魅、佐藤実佳、後藤慶一、甲斐明美、新井沙倉、工藤由起子. 食品・環境検体中での *Escherichia albertii* の挙動解析. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 4 年 11 月 10-11 日. 長崎

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

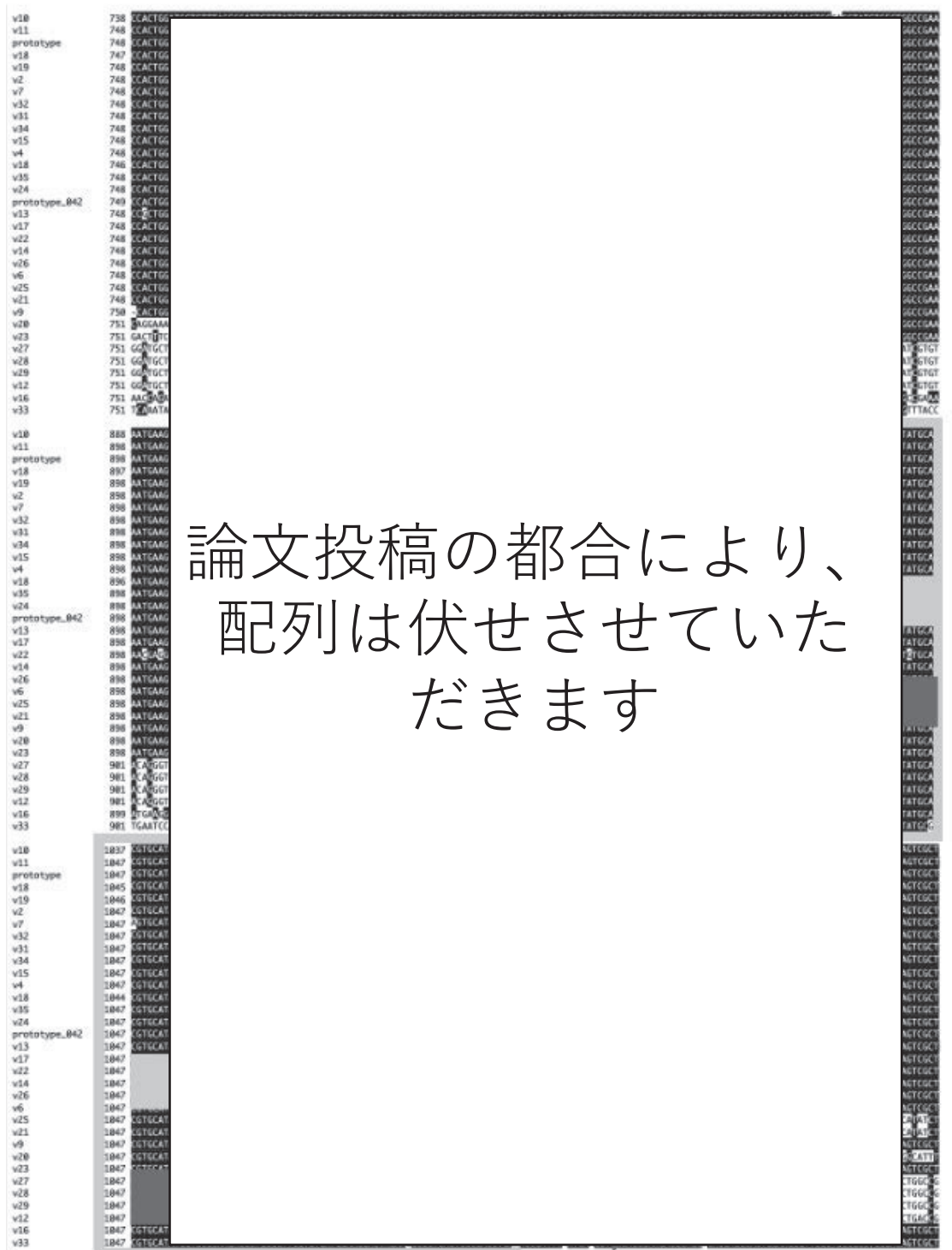


図1. *astA*特異的リアルタイムPCR法のプライマーおよびプローブ設計可能領域

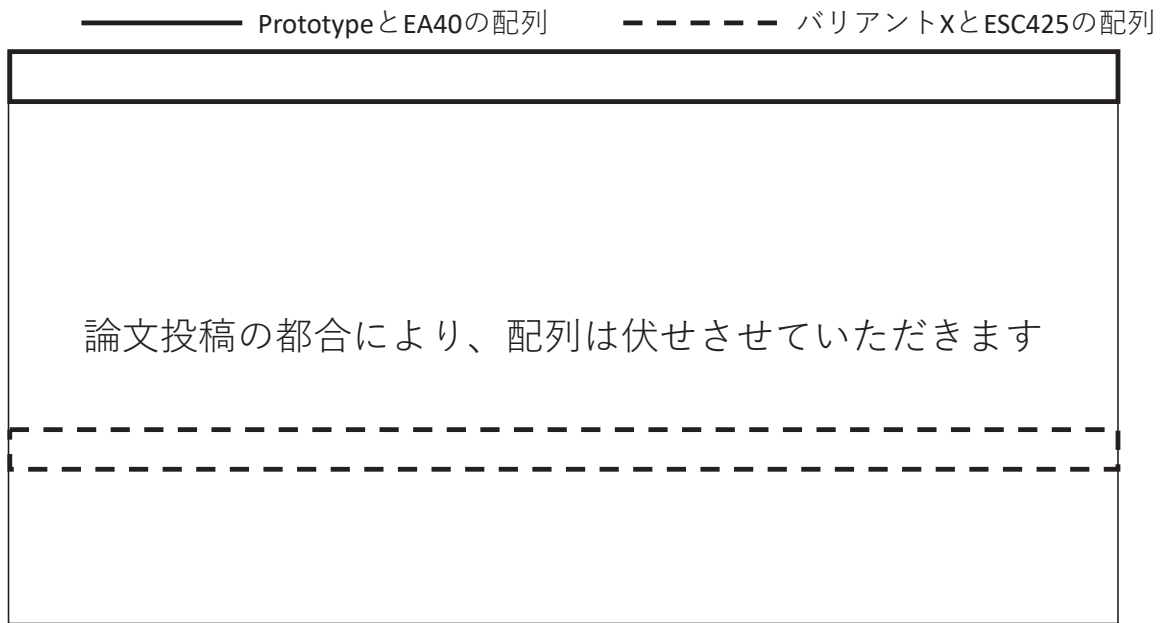


図2. *astA* リファレンス配列とESC425およびEA40の*astA*配列の比較

表1. 開発したリアルタイムPCRの特異性試験へ供試した菌種と結果

菌種	供試株数	コンベンショナルPCR陽性数*	リアルタイムPCR陽性数 (Ct値**)											
			Assay 1	Assay 2	Assay 3	Assay 4	Assay 5	Assay 6	Assay 7	Assay 8	Assay 9	Assay 10	Assay 11	
<i>Arcobacter butzleri</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Arcobacter skirrowii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Campylobacter coli</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Campylobacter jejuni</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia albertii</i>														
EA1 ^T	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EA40	1	1	1 (18.0)	1 (15.7)	1 (18.3)	1 (17.6)	1 (16.2)	1 (17.7)	1 (15.6)	1 (18.0)	1 (19.0)	1 (17.7)	1 (18.7)	
<i>Escherichia coli</i>														
ESC67 (EPEC)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESC425 (EHEC)	1	0	1 (29.8)	1 (29.7)	1 (32.6)	1 (32.6)	1 (29.5)	1 (20.6)	0	0	1 (28.4)	0	0	0
<i>Escherichia fergusonii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia hermannii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hafnia alvei</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>Morganii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella boydii</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* YamamotoらのPCR法をQuickTaqにて試験した

**Duplicateしたwellの平均Ct値

表2. 供試した *astA* 特異的PCR法のプライマーおよび *astA* 特異的リアルタイムPCR法のプライマーおよびプローブ候補

名称	目的	プライマーおよびプローブ (蛍光およびクエンチャー標識)	産物 (bp)
Yamamotoらの コンベンショナルPCR法	<i>astA</i> の検出	EAST11-a: CCATCAACACAGTATATCCGA EAST11-b: GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	111
Assay 1	全 <i>astA</i> バリエーションの検出	論文投稿の都合により、 配列等は伏せさせていただきます	
Assay 2	全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Assay 3	全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Assay 4	全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Assay 5	全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Assay 6	全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Assay 7	バリエーションX以外の 全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Assay 8	バリエーションX以外の 全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Assay 9	全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Assay 10	バリエーションX以外の 全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Assay 11	バリエーションX以外の 全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Silvaらのシーケンス反応	<i>astA</i> のシーケンス反応	EAST13a: AGAACTGCTGGGTATGTGGCT EAST12b: CTGCTGGCCTGCCTCTTCCGT	281