

Multiplex Real-Time PCR法を用いた食中毒菌24遺伝子の網羅的検索法

山口県環境保健センター

亀山 光博, 矢端 順子, 野村 恭晴, 富永 潔, 調 恒明

北海道立衛生研究所

池田 徹也, 山口 敬治, 後藤 良一

富山県衛生研究所

嶋 智子, 綿引 正則

島根県保健環境科学研究所

川瀬 遵

福岡県保健環境研究所

江藤 良樹, 堀川 和美

島根県畜産技術センター

福島 博

Screening for 24 Genes of Food-Borne Bacteria by Using Multiplex Real-Time PCR

Mitsuhiro KAMEYAMA, Junko YABATA, Yasuharu NOMURA, Kiyoshi TOMINAGA and Komei SHIRABE¹⁾

Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment

はじめに

食中毒の原因究明のために行われる細菌培養法は、専門的な技術と多大な労力を必要とする上に、結果が出るまでに時間がかかるという問題点がある。福島らは、細菌検査の迅速化・効率化を目的として、食中毒菌 20 菌種 24 標的遺伝子を網羅的に検索する multiplex real-time PCR 法を開発した (Rapid Foodborne Bacteria Screening 24; RFBS24)¹⁾²⁾。厚生労働科学研究補助金事業*により、この RFBS24 を改良し、RFBS24 version 5 (RFBS24-V)を確立した。本報告では、平成 22~24 年度に山口県内で発生した食中毒等の事例について RFBS24-V によるスクリーニングを行い、その有効性を評価した。

材料と方法

1 材料

平成 22~24 年度に発生した食中毒及び感染症(有症苦情を含む)のうち、14 事例由来患者便 64 検体及び 1 事例由来患者吐物 2 検体を供試した。

2 DNA 抽出

検体 200 μ L(200mg)を 2.0mL チューブに採取し、患者便については QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN), 患者吐物については QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)を用いて DNA を抽出した。

3 RFBS24-V

RFBS24-V は、表 1 に示す 24 種の病原遺伝子と種特異的遺伝子を同時に検出できるシステムをキット化したものであり、基本構成は SYBR Green を用いた intercalator multiplex real-time PCR 法である。PCR 試薬には SYBR Premix DimerEraser (Takara Bio)を用い、サーマルサイクラーは 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を使用した。Fast 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems)を使用し、第 1 列は陰性対照 (NC), 第 2 列は PCR 増幅確認用内部標準対象 (IAC), 第 3~5 列は陽性対照 (PC), 第 6~12 列は検体 DNA 用とした。なお、PCR 反応液の調整及び PCR 反応条件は島根県保健環境科学研究所(島根衛研)作成のマニュアルに従い実施し、プライマーセット、IAC 溶液及び陽性対照 DNA は島根衛研で調製され

表1 RFBS24-Vの対象菌種及び標的遺伝子

set	菌種	遺伝子	set	菌種	遺伝子
A	ウェルシュ菌	<i>cpe</i>	E	カンピロバクター・コリ	<i>ceuE</i>
	プロビデンスシア・アルカリファシンス	<i>gyrB</i>		EAEC	<i>aggR</i>
	EHEC(Stx2)	<i>stx2</i>		黄色ブドウ球菌	<i>femB</i>
B	EHEC(Stx1)	<i>stx1</i>	F	ETEC(STp)	<i>stp</i>
	カンピロバクター・ジエジニ	<i>specific</i>		ETEC(STh)	<i>Sth</i>
	腸炎ヒドリア(TRH)	<i>trh</i>		腸炎ヒドリア(TDH)	<i>Tdh</i>
		プレジオモナス・シグロイデス		<i>gyrB</i>	
C	ETEC(LT)	<i>lt</i>	G	EAEC	<i>astA</i>
	セレウス菌(嘔吐型)	<i>ces</i>		EIEC/赤痢菌	<i>ipaH</i>
	コレラ菌	<i>ompW</i>		エロモナス・ヒドロフィラ	<i>ahh1</i>
D	リステリア・モサイトゲネス	<i>hly</i>	H	エルシニア・エンテロコリチカ/シュードツベルクローシス	<i>yadA</i>
	EHEC/EPEC	<i>eae</i>		サルモネラ属菌	<i>invA</i>
	セレウス菌(下痢型)	<i>nheB</i>		DAEC	<i>daaD</i>

*EHEC；腸管出血性大腸菌 ETEC；腸管毒素原性大腸菌 EPEC；腸管病原性大腸菌
EAEC；腸管凝集付着性大腸菌 EIEC；腸管侵入性大腸菌 DAEC；分散接着性大腸菌

たものを使用した。

結果の判定については、PCR反応自体のバリデーションをNC・IAC・PCの増幅曲線で確認後、検体DNAで増幅が認められ、融解曲線分析でTm値が陽性対照のいずれかと近似しており、かつ曲線ピークがIACの1/2以上のものを陽性と判定した。なお、IACと同程度の増幅が認められるが、融解曲線ピークがIACの1/2以下のものは「±」とした。

コピー数既知のDNAを用いた精度管理により、RFBS24-Vの検出限界は2種類の対象遺伝子を除き、概ね $5 \times 10^3 \sim 10^4$ cfu/mLである(EHEC(*stx2*)と黄色ブドウ球菌(*femB*)は 1.0×10^5 cfu/mL程度)。

当センターでRFBS24を実施した場合、所用時間はDNA抽出を含め概ね4～5時間である。

4 細菌分離培養・ウイルス検査

細菌分離培養検査については山口環境保健所及び周南環境保健所試験検査課で実施した結果を、ウイルス検査については当センターで実施した結果を使用した。また、RFBS24-Vで陽性と判定された一部の検体については、当センターで追加の細菌分離培養検査を行った。

結果及び考察

1 RFBS24-Vで検出された食中毒菌遺伝子

14事例66検体(吐物2検体(事例No.2)を含む)についてRFBS24-Vを実施した結果、12事例36検体から1種類以上の食中毒菌遺伝子が検出された(判定「±」を含む)。黄色ブドウ球菌が14検体と最も多く、次いでEAEC(*astA*, 11)、ウェルシュ菌(8)、カンピロバクター・ジェジニ(6)、セレウス菌(下痢型, 2)、エロモナス・ヒドロフィラ(2)、エルシニア・エンテロコリチカ/シュードツベルクローシス(2)、DAEC(*daaD*, 2)、セレウス菌(嘔吐型, 1)、EHEC/EPEC(*eae*, 1)、プレジオモナス・シグロイデス(1)であった(表2及び表3)。黄色ブドウ球菌や一部の下痢原性大腸菌(EAEC等)は健康人からも分離されることがあるため³⁴⁾、事例No.2(表2)を除き患者の症状とこれらの菌との関連は不明であった。しかしながら、RFBS24-Vによりこのような菌種の遺伝子が複数名から検出され、疫学的な背景を十分考慮した結果、原因菌としての可能性が推察される場合は、菌分離を鋭意実施後、その性状(血清型、毒素型、遺伝子型等)を精査する必要があると考えられる。

表2 細菌性食中毒事例に対する培養法とRFBS24-Vの比較

No.	病因物質	検体数	検出菌種(検出数)	
			細菌培養	RFBS24-V
1	カンピロバクター・ジエリニ	5(便)	<u>カンピロバクター・ジエリニ(4)</u> 黄色ブドウ球菌(4) DAEC(1)	<u>カンピロバクター・ジエリニ(4)</u> 黄色ブドウ球菌(1) DAEC(1)
2	黄色ブドウ球菌	5(便)	<u>黄色ブドウ球菌(5)</u>	<u>黄色ブドウ球菌(1)</u> EAEC(<i>astA</i>)(2) セレウス菌(嘔吐型)(1)
		2(吐)	<u>黄色ブドウ球菌(2)</u>	<u>黄色ブドウ球菌(1)</u> EAEC(<i>astA</i>)(2) セレウス菌(下痢型)(1)
3	ウェルシュ菌	7(便)	<u>ウェルシュ菌(7)</u> *うち <i>cpe+</i> ウェルシュ菌(5)	<u>ウェルシュ菌(<i>cpe+</i>)(7)</u> 黄色ブドウ球菌(2) EAEC(<i>astA</i>)(1)
4	不明	2(便)	<u>カンピロバクター・ジエリニ(2)</u> EAEC(<i>astA</i>)(1)	<u>カンピロバクター・ジエリニ(2)</u> EAEC(<i>astA</i>)(1) 黄色ブドウ球菌(1)

表3 感染症、有症苦情事例に対するRFBS24-Vの結果

No.	検体数 (便)	検出菌種/ウイルス(検出数)		
		ウイルス検査	細菌培養	RFBS24-V ^{a)}
5	6	ノロウイルス(6)	エルシニア・インテロコリチカ(1)	エルシニア・インテロコリチカ/シュートツベルクロシス(1) 黄色ブドウ球菌(3) EAEC(<i>astA</i>)(1) エロモナス・ヒトロフィラ(2) セレウス菌(下痢型)(1)
6	6	ノロウイルス(6)	-	EAEC(<i>astA</i>)(1) エルシニア・インテロコリチカ/シュートツベルクロシス(1)
7	3	ノロウイルス(3)	-	-
8	5	ノロウイルス(3)	-	-
9	4	ノロウイルス(3)	-	黄色ブドウ球菌(1) ウェルシュ菌(1)
10	6	サルモネラ(6)	-	黄色ブドウ球菌(1)
11	3	-	黄色ブドウ球菌(1) ウェルシュ菌(1)	黄色ブドウ球菌(1)
12	5	-	-	EAEC(<i>astA</i>)(1) DAEC(1)
13	5	-	-	EHEC/EPEC(<i>eaecA</i>)(1) EAEC(<i>astA</i>)(1)
14	2	-	-	黄色ブドウ球菌(2) プロシモナス・シゲロフィス(1) EAEC(<i>astA</i>)(1)

a) ; RFBS24-Vで判定「±」

2 細菌性食中毒事例

細菌性食中毒3事例19検体及びカンピロバクター・ジェジュニが分離された1事例2検体について、RFBS24-Vを実施した結果を表2に示す。RFBS24-Vの検出率は、No.1とNo.4のカンピロバクター・ジェジュニ事例では培養法と同程度であり、No.3のウェルシュ菌事例では、*cpe+*ウェルシュ菌検出率は培養法を上回った。No.4のカンピロバクター事例2検体のうち1検体については、直接分離培養(バツラー及びCCDA寒天培地)で3日間、増菌培養後の選択分離培養(プレストン及びボルトン培地→CCDA及びバツラー寒天培地)でも2日間要した(増菌1日+分離1日)。培養に数日を要するカンピロバクターのような事例の際には、数時間で結果が得られるRFBS24-Vは迅速スクリーニング法として有効であることが判明した。

No.2の黄色ブドウ球菌事例では、便、吐物ともに培養法の方がRFBS24-Vよりも検出率は高かった(陽性検体数は、便では培養5に対しRFBS24-Vでは1、吐物では培養2に対しRFBS24-Vでは1)。便中の黄色ブドウ球菌数を測定したところ、RFBS24-V陽性であった1検体は 1.0×10^5 cfu/mL、陰性であった4検体は $4.0 \times 10^2 \sim 7.0 \times 10^4$ cfu/mLであり、この結果はRFBS24-Vの黄色ブドウ球菌(*femB*)の検出感度の低さ(10^5 cfu/mL程度)と一致する。便検体からのRFBS24-Vを用いた黄色ブドウ球菌の検出には、ある程度の菌数(少なくとも 10^5 cfu)が必要であることが分かった。また吐物の黄色ブドウ球菌数は測定していないが、吐物のうちRFBS24-V陰性であった1検体については、検体量がきわめて少なく、DNA抽出の際に十分量が確保できなかったことが影響したと考えられた。

3 感染症・有症苦情事例

細菌性食中毒以外の感染症・有症苦情事例10事例45検体について実施したRFBS24-Vの結果を表3に示す。10事例のうち8事例(No.5, 6, 9~14)で食中毒菌遺伝子が検出された。No.5と6の各1検体(いずれもノロウイルス+)からエルシニア・エンテロコリチカ/シュードツベルクローシス遺伝子(*yadA*)が検出されたため、細菌分離培養検査を行った結果、No.5の検体からエルシニア・エンテロコリチカ(O8群)が検出された。エルシニア属菌等は国内で食中毒の病因物質と特定されるこ

とは極めて稀であり、通常食中毒検査の1次スクリーニング段階では見落とされることもある。RFBS24-Vをスクリーニングに用いることによって、このような稀な菌種も検出可能であり、またNo.5の事例のように、ノロウイルスと他の食中毒菌の混合感染の証明にも有効であると考えられた。

まとめ

本調査の結果、カンピロバクターやウェルシュ菌による食中毒事例の際には、RFBS24-Vを用いてスクリーニングを行うことにより、迅速かつ効率的に病因物質を推定することが可能であることが判明した。また通常の細菌培養検査で有意な食中毒菌が検出されない場合であっても、RFBS24-Vを用いることにより、エルシニア属菌等の稀な菌種も検出可能であると考えられた。

*本研究は、「平成22年度～24年度 厚生労働科学研究補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業 地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究(研究代表者 調 恒明 (山口県環境保健センター))リアルタイムPCR法を用いた食水系感染症原因細菌の網羅的検査法と精度管理(細菌部門)(研究分担者 後藤 良一 (北海道立衛生研究所))」の一環として実施した。

参考文献

- 1 Fukushima, H. et al: Inter. J. Microbiol. vol. 2010, article ID 864817, 18pages (2010)
- 2 福島博ほか: 感染症誌. 79, 644~655 (2005)
- 3 厚生労働省監修: 食品衛生検査指針. 微生物編. p236~248. (2004)
- 4 緒方喜久代ほか: 病原微生物検出情報(IASR). 25, 101~102 (2004)