

リアルタイム PCR 法を用いた食中毒原因菌検出法の検討

千葉一樹 菅野奈美 横山博子¹⁾ 小黒祐子 佐藤弘子
微生物課 ¹⁾ 前衛生研究所

要 旨

細菌性食中毒の原因菌を特定するまでには非常に煩雑で長時間の作業を必要とするため、検査の迅速化と効率化が求められている。そこで 2010 年に発生した食中毒事例の糞便検体をもとにリアルタイム PCR 法を用いた検査方法の検討を行った。原因菌が既に *Campylobacter jejuni* と特定された検体については標的遺伝子を検出することが可能であった。原因菌が特定されていない時点の食中毒の検体を用い、8 種の細菌を標的としたリアルタイム PCR 法を用いた検査で *Clostridium perfringens* および EAEC が検出され、後日培養検査において確認された。しかし、培養検査で確認検出された *Staphylococcus aureus* は検出できなかった。今後はスクリーニング検査としてリアルタイム PCR 法を導入するため、さらに事例検討が必要と考える。

キーワード：リアルタイム PCR 法、スクリーニング検査、食中毒

はじめに

2010 年に本県で発生した細菌性食中毒は 8 例あった。そのうちカンピロバクターによる食中毒が 7 例で、ウェルシュ菌による食中毒が 1 例であった。また、全国的にも両細菌による食中毒が大半を占めていた。^{1), 2)}

細菌性食中毒の検出は長時間を費やし、同定に至るまでに非常に煩雑な作業を必要とする。そこで検査作業の負担を軽減させることを目的とし、本研究では PCR 増幅産物の増加を経時的に測定可能なリアルタイム PCR 法の導入を試みた。

また、リアルタイム PCR 法の検出方法として実験コストが安価で反応系の構築も容易なインターカレーターを用いる方法で糞便試料から食中毒原因菌を検出する方法を検討した。その結果を報告する。

材料及び方法

1 対象菌種

次の菌種を対象とした。

Salmonella spp., *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, *eaeA* gene positive *Escherichia coli* (EHEC, EPEC), *astA* gene positive *Escherichia coli* (EAEC), *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*

2 サーマルサイクラー機器

次の機器を使用した。

7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

3 PCR試薬

次の試薬を使用した。

SYBR[®] Premix DimerEraser[™] (タカラバイオ株式会社)

4 プライマー

本研究に用いた 8 種類の標的遺伝子検出用プライマーを表 1 に示した。使用したプライマーは既に論文に記載され、感度と特異性が確認されたものを用いた。

5 糞便試料からのDNA抽出

DNA 抽出は糞便を約 200mg 分取して QIAamp DNA Stool Mini kit (QIAGEN) を用いて使用説明書に従って実施した。

6 SYBR Green法によるリアルタイムPCR

PCR 反応液は SYBR[®] Premix DimerEraser[™] の使用説明書に従って 20 μ L 反応系を作製した。これを 3step 標準プロトコール (熱変性：95 $^{\circ}$ C 3 秒, アニーリング：55 $^{\circ}$ C 30 秒, 伸長：72 $^{\circ}$ C 30 秒の 40 サイクル) に従って PCR

表 1 実験に使用したプライマー

菌種	標的 遺伝子	プライマー名	塩基配列	増幅産物の 大きさ (bp)	文献
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	Styinva-JHO-2-right	TCG TCA TTC CAT TAC CTA CC	119	3
		Styinva-JHO-3-left	AAA CGT TGA AAA ACT GAG GA		
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>itsA</i>	Cperf165F	CGC ATA ACG TTG AAA GAT GG	101	4
		Cperf269R	CCT TGG TAG GCC GTT ACC C		
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>gyrA</i>	JL238	TGG GTG CTG TTA TAG GTC GT	192	5
		JL239	GCT CAT GAG AAA GTT TAC TC		
<i>Bacillus cereus</i>	<i>ces</i>	ces-TM-F	GAT GTT TGC GAC GAT GCA A	104	6
		ces-TM-R	CTT TCG GCG TGA TAC CCA TT		
<i>eaeA</i> gene positive <i>Escherichia coli</i> (EHEC, EPEC)	<i>eaeA</i>	eae-F2	CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA	102	7
		eae-R	CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTA		
<i>astA</i> gene positive <i>Escherichia coli</i> (EAEC)	<i>astA</i>	EAST-1S	GCC ATC AAC ACA GTA TAT CC	106	8
		EAST-1AS	GAG TGA CGG CTT TGT AGT CC		
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femB</i>	FemB-fw	AAT TAA CGA AAT GGG CAG AAA CA	94	9
		FemB-rv	TGC GCA ACA CCC TGA ACT T		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	Tdh199-F	GGT ACT AAA TGG CTG ACA TC	251	10
		Tdh199-R	CCA CTA CCA CTC TCA TAT GC		

反応を行った。

判定基準は増幅曲線より得られた Ct 値が 35 よりも小さく、融解曲線の波形が陽性コントロールの波形と同一パターンであり、同時に検体の Tm 値が陽性コントロールの Tm 値 ± 1.5 °C の範囲に含まれる時、陽性であると判定した。

また今回使用した陽性コントロールは 2009 年に厚生労働科学研究費補助金「健康安全・危機管理対策総合研究事業」の協力研究として参加した際に使用したものである。

結果及び考察

1 既知の原因菌を対象とした検出

2010 年に本県で発生した食中毒は先にも述べたとおりその大半が *C.jejuni* によるものであった。そこで既に原因菌が *C.jejuni* であると判明している事例について表 1 の *gyrA* 遺伝子を検出するプライマーを用いて *C.jejuni* を検出できるかどうか試みた。結果を表 2 に示す。

事例 1：2010 年 7 月に発生した食中毒で患者便の培養検査において 3 検体のうち 1 検体から *C.jejuni* が分離された事例について、冷蔵保存されていた患者便 3 検体から DNA を

抽出し検査を行った結果、3 検体から *gyrA* 遺伝子が検出された。

事例 2：2010 年 7 月に発生した食中毒で患者および従事者便の培養検査において 15 検体のうち 4 検体から *C.jejuni* が分離された事例については、患者便 15 検体中培養で陽性となった 4 検体すべてから *gyrA* 遺伝子が検出された。

事例 3：2010 年 8 月に飲食店で起きた食中毒で患者および従事者便の培養検査において 5 検体のうち 2 検体から *C.jejuni* が検出された事例については、患者便 5 検体中 3 検体から *gyrA* 遺伝子が検出された。

事例 1 や事例 3 のように培養では原因菌が分離できなかったが、リアルタイム PCR 法で標的遺伝子を検出できた。したがって、リアルタイム PCR 法は、培養に比べ感度が高いと推察される。また、リアルタイム PCR 法は DNA 抽出を含めても 4 時間程度で分析が可能であるため迅速性に優れていると判断される。

そこで食中毒発生時におけるスクリーニング検査としてリアルタイム PCR 法の利用を試みた。

表2 福島県で発生した*C. jejuni*による食中毒3事例についてのリアルタイムPCR法の結果

事例	発生年月	原因施設 (所在地)	原因食品	患者数/ 摂食者数	細菌培養の結果		リアルタイム PCR 法の結果	
					分離菌	分離	標的遺伝子	検出率
1	2010年 7月6日～7日	不明 (南会津町)	不明	3/5	<i>C.jejuni</i>	1/3	<i>gyrA</i>	3/3
2	2010年 7月6日～7日	不明 (川俣町)	不明	12/46	<i>C.jejuni</i>	4/15	<i>gyrA</i>	4/15
3	2010年 8月3日～6日	飲食店 (会津若松市)	食事	4/23	<i>C.jejuni</i>	2/5	<i>gyrA</i>	3/5

2 食中毒発生時のスクリーニング検査

2010年10月に県内で発生した食中毒疑い事例で、ノロウイルス検査のために当所に搬入された有症者便14検体の検査後の残存便を検体として用いて、細菌性食中毒の原因菌検出のため、表1に示す食中毒起因8菌種を標的とし、試行的にリアルタイムPCR法を用いた検査を実施した。結果を表3に示す。

リアルタイムPCR法では14検体の内11検体から*itsA*遺伝子が、2検体から*astA*遺伝子が検出された。従って今回の食中毒起因は、*C.perfringens*と*astA* gene positive *Escherichia coli* (EAEC)である可能性が示唆された。試験検査課および会津支所で実施し

た培養で14検体のうち5検体からエンテロトキシン産生*C.perfringens*が分離され、本食中毒は*C.perfringens*が原因菌であると判明した。また3検体からエンテロトキシン産生*S.aureus*が分離されたが、リアルタイムPCR法では*S.aureus*を標的とした*femB*遺伝子を検出することができなかった。この原因は明らかではないが、例えば、糞便中に含まれる標的細菌の初期量不足、阻害物質の影響等によるDNA精製の不良、検出感度や特異性に関わる反応試薬やPCR反応条件の問題などが考えられる。

表3 スクリーニング検査の結果

検体番号	検体性状	リアルタイムPCR結果 (検出遺伝子)	培養結果 (検出細菌)
1	キャリブレア入	<i>itsA</i>	<i>C.perfringens</i> ※
2	キャリブレア入	検出無し	検出無し
3	キャリブレア入	検出無し	検出無し
4	硬便	<i>itsA</i>	<i>S.aureus</i> ※
5	普通便	<i>itsA</i>	<i>C.perfringens</i> ※, <i>S.aureus</i> ※
6	やや軟便	<i>itsA</i>	検出無し
7	水様便	<i>astA</i>	検出無し
8	硬便	<i>itsA</i>	<i>C.perfringens</i>
9	普通便 (少量)	<i>itsA</i> , <i>astA</i>	<i>C.perfringens</i> ※, <i>S.aureus</i>
10	硬便	<i>itsA</i>	<i>C.perfringens</i> ※
11	硬便	<i>itsA</i>	<i>S.aureus</i> ※
12	硬便	<i>itsA</i>	<i>S.aureus</i>
13	水様便	<i>itsA</i>	<i>C.perfringens</i> ※
14	普通便	<i>itsA</i>	<i>C.perfringens</i> , <i>S.aureus</i>

※はエンテロトキシン産生菌

まとめ

リアルタイム PCR 法を食中毒原因菌のスクリーニング検査として用いることは、高感度に検出できることや検査作業量軽減という点において有用であると考えられる。しかし、培養は陽性であるが、標的遺伝子が検出されない事例もあったため今後、さらに検討を積み重ねる必要があると思われる。

引用文献

- 1) 福島県「食品安全のページ」
平成 22 年食中毒発生状況
<http://www.pref.fukushima.jp/eisei/syokuan/syokuhin1/syokuhin/foodpoison/kotoshi.htm> 2011/2/2
- 2) 厚生労働省「食中毒に関する情報」
食中毒統計資料
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>
2011/2/2
- 3) J. Hoorfar, P. Ahrens & P. Radstrom.
Automated 5'-Nuclease PCR Assay for Identification of *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000 ; 38 (9) ; 3429-3435.
- 4) Mark G. Wise & Gregory R. Siragusa.
Quantitative Detection of *Clostridium perfringens* in the Broiler Fowl Gastrointestinal Tract by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005 ; 71 (7) ; 3911-3916.
- 5) David L. Wilson, Sheila R. Abner, Thomas C. Newman, et al. Identification of Ciprofloxacin-Resistant *Campylobacter jejuni* by Use of a Fluorogenic PCR Assay, *Journal of Clinical Microbiology* 2000 ; 38 (11) ; 3971-3978
- 6) Hiroshi Fukushima, Kazunori Katsube, Yoshie Tsunomori, et al. Comprehensive and Rapid Real-Time PCR Analysis of 21 Foodborne Outbreaks, *International Journal of Microbiology* 2009
- 7) Eva Moller Nielsen & Marianne Thorup Andersen, Detection and Characterization of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* by Automated 5' Nuclease PCR Assay, *Journal of Clinical Microbiology* 2003 ; 41 (7) ; 2884-2893
- 8) Jun Yatsuyanagi, Shioko Saito, Yoshimichi

- Miyajima, et al. Characterization of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Harboring the astA Gene That Were Associated with a Waterborne Outbreak of Diarrhea in Japan, *Journal of Clinical Microbiology* 2003 ; 41 (5) ; 2033-2039
- 9) M. Klotz, S. Opper, K. Heeg, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins A to D by Real-Time Fluorescence PCR Assay, *Journal of Clinical Microbiology* 2003 ; 41 (10) ; 4683-4687
- 10) Nishibuchi M, Takeda Y, Tada J, et al. Method to Detect the Thermostable Direct Hemolysin Gene and a Related Hemolysin Gene of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR, *Nihon Rinsho* 1992 ; 642 ; 348-352
- 11) 福島博, 角森ヨシエ. リアルタイム PCR 法による食中毒菌の迅速スクリーニングの検討. *感染症誌* 2005 ; 79 ; 644-655