

## 食中毒菌の24標的遺伝子を一斉検出するための MultiplexリアルタイムSYBR Green PCR法

福島 博

食中毒の急性期患者7名の糞便からDNAを抽出し、96ウェルPCRプレートを用いたインターナルコントロールを含むmultiplexリアルタイムSYBR Green PCR法による検査で23種類の食中毒菌（腸管侵入性大腸菌と腸管病原性大腸菌、腸管出血性大腸菌、腸管毒素原生大腸菌、腸管凝集接着性大腸菌、分散接着性大腸菌、*Shigella* spp.、*Salmonella* spp.、*Yersinia enterocolitica*、*Y. pseudotuberculosis*、*Providencia alcalifaciens*、*Plesiomonas shigelloides*、*Campylobacter jejuni*、*C. coli*、*Vibrio cholerae*、TDH産生 *V. parahaemolyticus*、TRH産生 *V. parahaemolyticus*、*Aeromonas hydrophila*、*Staphylococcus aureus*、嘔吐毒産生 *Bacillus cereus*、下痢毒産生 *B. cereus*、*Clostridium perfringens*、*Listeria monocytogenes*）の24標的遺伝子を3時間以内に一斉に検出できる迅速スクリーニング法を確立した。過去の食中毒事例の患者糞便DNA試料を用いた検査で、食中毒の原因菌を網羅的かつ迅速に検出した。本法による急性期糞便からの食中毒菌の標的遺伝子の迅速な増幅と特異遺伝子の確実な検出は効率的かつ確実な細菌分離と食中毒の迅速診断を可能にすることが示唆された。

キーワード：multiplexリアルタイムSYBR Green PCR、インターナルコントロール、食中毒菌、食中毒

### 1. はじめに

近年、分子生物学の発展とともに、多くの疾病の迅速診断に遺伝子検査法が用いられるようになってきたが、細菌性食中毒発生時の原因菌検索には、ほとんどの検査室で未だ多くの種類の分離培地や増菌培地を用いた数日間にも及ぶ煩雑な分離、同定作業が行われている。遺伝子検査法のうちPCRは感度や特異性が高いという点から細菌性食中毒の補助的な検査に使用されるようになってきた。しかしながら、これまでのPCRは、反応を行った後にゲル電気泳動で遺伝子増幅産物を検出することを必要とし、迅速性および操作上の煩雑さという点で問題がある。これに対して、最近、迅速検査法として使用されるようになってきたリアルタイムPCRは、遺伝子増幅装置と蛍光検出器が一体化されコンピューターで制御できる装置を使用する。リアルタイムPCRではDNAに結合するSYBR Green Iなどの蛍光物質あるいはTaqManプローブなどの蛍光標識プローブを用いることで標的遺伝子の増幅とPCR産物の量を反応中または終了後直ちにコンピューターで観察でき、ゲル電気泳動による遺伝子増幅産物の検出を必要としない。また、SYBR Green Iを用いたリアルタイムSYBR Green PCR (SG-PCR) では反応終了後に増幅産物の融解曲線を分析して、その融解温度 (melting temperature:  $T_m$ ) を計測することにより、増幅産物の特異性を確認することができる。

我々はLight Cyclerを用いたduplexリアルタイム

SG-PCRで食中毒急性期患者の糞便5検体から食中毒菌の8種類の標的遺伝子を2時間以内に検出する迅速スクリーニング法を報告したが<sup>1, 2, 3)</sup>、他の十数種類にも及ぶ食中毒菌の標的遺伝子のスクリーニングには更に2回の検査を必要とする。そこで、96ウェルPCRプレートを用いたmultiplexリアルタイムPCRで二十数種類の食中毒菌を一斉に検査することが可能であれば、リアルタイムPCRは食中毒菌のスクリーニング法として極めて有用でかつ経済的な手段となり、multiplexリアルタイムPCRによる一斉検査法の開発が求められている<sup>4)</sup>。

本研究ではPCRの正常な増幅の確認と偽陰性判定を防止するためのinternal amplification control (IAC) を含むmultiplexリアルタイムSYBR Green PCRを96ウェルPCRプレートを用い行うことにより、食中毒菌の24標的遺伝子を3時間以内に一斉に検出できる迅速スクリーニング法を確立したので報告する。

### 2. 材料および方法

#### 2.1 使用菌株

本研究に使用した23種類の食中毒菌は大腸菌（腸管病原性大腸菌[EIPC]（菌株番号：EC2736）、と腸管出血性大腸菌[EHEC]（SE-02027）、腸管毒素原生大腸菌[ETEC]（EC-3515）、腸管凝集接着性大腸菌[EAEC]（EC-4131）、分散接着性大腸菌[DAEC]（KI2214）、腸管侵入性大腸菌[EIEC]（EA32））と赤痢菌（I00031）、

表1 Multiplex SYBR Green PCRに用いたプライマーの特異性

菌種	菌株名	使用したプライマーの標的遺伝子の保有状況	プライマー (標的遺伝子)																										
			caE (caE)	JMS1 (Stx1)	JMS2 (Stx2)	Stx (stx)	LT (lt)	aggRk (aggR)	EAST1 (astA)	daaD (daaD)	virA (virA)	invA2 (invA)	yadA (yadA)	PSG (gyrB)	PAG (gyrB)	ceuE (ceuE)	AB (specific DNA of C. jejuni)	AH1 (ahh1)	ompW (ompW)	tdh (tdh)	trh (trh)	GAP (cpe)	hly (hly)	FemB (femB)	ces (ces)	SG (nheB)	yers (16S rRNA of Y. ruckeri)	yersH2 (16S rRNA of Y. ruckeri)	
<i>Escherichia coli</i> -EPEC	EC2736	caE	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EHEC	SE02007	caE, Stx1, Stx2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ETEC	EC3515	stx, lt, astA	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAEC	EC4131	aggR, astA	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DAEC	K12214	daaD	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EIEC	EA32	virA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Shigella sonnei	I00031	virA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salmonella spp.	Sal2339	invA	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yersinia enterocolitica	Pa241	yadA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y. pseudotuberculosis	SP988	yadA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Plesiomonas shigelloides	NIID123	gyrB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Providencia alcalifaciens	NIID124	gyrB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Campylobacter coli	SC01	ceuE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Campylobacter jejuni	SC009	specific DNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aeromonas hydrophila	ATCC7966	ahh1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vibrio cholerae	ATCC14035	ompW	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDH 産生 Vibrio parahaemolyticus	SVP02	tdh	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TRH 産生 Vibrio parahaemolyticus	NIIDk4d	trh	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Clostridium perfringens	H2	cpe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Listeria monocytogenes	Scott A	hly	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	SS05	femB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
嘔吐毒産生 Bacillus cereus	No.127	ces, nheB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
下痢毒産生 B. cereus	No.1	nheB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Yersinia ruckeri	JCM15110	16S rRNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

表2 Multiplex SYBR Green PCRに使用したプライマーとプライマーセット

セット	菌種	標的遺伝子	プライマー名	遺伝子配列	遺伝子登録番号	領域	増幅産物の大きさ (bp)	Tm 値	文献
A	● <i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpe</i>	GAP-11	GGTTCATTAATTGAAACTGGTG	X81849	583-604	154	76.1	5
			GAP-12	AACGCCAATCATATAAATTACAGC		712-736			
	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>gyrB</i>	PAG38-F	TCTGCACGGTGTGGGTGTT	AJ300547	38-56	73	79.1	1
			PAG110-R	ACCGTCACGGCGGATTACT		110-92			
EHEC (Stx 2)	<i>Stx2</i>	JMS2-F	CGACCCCTCTTGAACATA	EF441616	140-157	108	80.5	6	
		JMS2-R	GATAGACATCAAGCCCTCGT		228-247				
B	<i>Campylobacter coli</i>	<i>ceuE</i>	ceuE-For	CAAGTACTGCAATAAAAACTAGCACTACG	X88849	2777-2805	72	74.5	7
			ceuE-Rev	AGCTATCACCCCTCATCTACTACTAATAG		2848-2819			
	● <i>Campylobacter jejuni</i>	specific DNA	AB-F	CTGAATTTGATACCTTAAGTGCAGC	AL111168	381121-381135	86	77.8	8
			AB-R	AGGCACGCCTAAACCTATAGCT		381185-381206			
TRH 産生 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>trh</i>	trh250-F	GGCTCAAAATGGTTAAGCG	AY742213	705-687	250	80.2	9	
		trh250-R	CATTTCGCTCTCATATGC		456-474				
C	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i>	hly-F	GGGAAATCTGTCTCAGGTGATGT	AF253320	973-995	106	77.8	10
			hly-R	CGATGATTGAACTTCATCTTTTGC		1078-1054			
	● 嘔吐毒産生 <i>Bacillus cereus ces</i>	<i>ces</i>	ces-TM-F	GATGTTTGCACGATGCAA	DQ360825	8689-8707	65	78.5	3
			ces-TM-R	CTTTCGGCGTGATACCCATT		8734-8793			
ETEC (LT)	<i>lt</i>	LT-1	TTACGGCGTACTATCCTCTCTA	X83966	233-255	275	82.3	11	
		LT-2	GGTCTCGGTACAGATATGTGATTC		507-485				
D	ETEC (STa)	<i>st</i>	Sta-F	GCTAATGTTGGCAATTTTATTCTTGTA	M25607	294-321	190	76.6	12
			Sta-R	AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA		456-483			
	● EHEC and EPEC	<i>eaeA</i>	eae-F2	CATTGATCAGGATTTTCTGGTGATA	Z11541	899-924	106	78.9	13
			eae-R	CTCATGCGGAAATAGCCGTTA		979-1000			
EIEC and <i>Shigella</i> spp.	<i>virA</i>	virA-F	CTGCATTCTGGCAATCTCTTCA	D26468	1599-1622	215	80.9	14	
		virA-R	TGATGAGCTAACTTCGTAAGCCCTCC		1813-1788				
E	EAEC	<i>aggR</i>	aggRks1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	Z18751	18-38	254	79.1	15
			aggRks2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC		170-151			
	EHEC (Stx 1)	<i>Stx1</i>	JMS1-F	GTCACAGTAACAAACCGTAACA	EF441598	509-488	95	80.2	6
			JMS1-R	TCGTTGACTACTTCTTATCTGGA		415-437			
● <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femB</i>	FemB-fw	AATTAACGAAATGGGCAGAAACA	AF106850	277-299	93	81.5	16	
		FemB-rv	TGCGCAACACCCTGAACTT		351-370				
F	● TDH 産生 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	tdh-F176	TCCATCTGTCCCTTTTCTG	X54341	176-195	247	80.5	本研究
			R422	AGACACCGCTGCCATTGTAT		422-403			
	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>yadA</i>	yadA667-F	TGTTCTCATCTCCATATGC	X13882	667-685	203	83.7	2
			yadA851-R2	TCCTTTCGCTGCTTCAGCA		869-851			
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>gyrB</i>	PSG-F64	TAAACGCCCTGTCGGATAAG	AJ300545	64-83	250	86.7	本研究	
		PSG-R313	TCGAGCAGATGAATCGACAC		313-294				
G	<i>V. cholerae</i>	<i>ompW</i>	ompW-F	AACATCCGTGGATTTGGCATCTG	X51948	675-692	89	80.9	17
			ompW-R	GCTGGTTCCTCAACGCTTCTG		741-763			
	● EAEC	<i>astA</i>	EAST-1-S	GCCATCAACACAGTATATCC	L11241	63-82	106	83.7	18
			EAST-AS	GAGTGACGGCTTTGTAGTCC		148-168			
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>ahh1</i>	AHH1-F	GCCGAGCGCCAGAAGGTGAGTT	CP000462	1653360-82	130	88.1	19	
		AHH1-R	GAGCGGTGGATGCGGTTGT		1653473-92				
H	下痢毒産生 <i>B. cereus</i>	<i>nheB</i>	SG-F3	GCATTATGGCAGTATTGCGAGC	DQ153257	2101-2123	152	80.8	20
			SG-R3	GCATCTTTAAGCCTTCTGGTC		2231-2252			
	● <i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	invA2-F	GATTCTGGTACTAATGGTGATGATC	M90846	132-156	288	82.6	21
			invA2-R	GCCAGGCTATCGCCAAIAAC		419-400			
DAEC	<i>daaD</i>	daaD-F31	GTCACCTGCGGGATGTTACT	AF233530	31-50	233	88.69	本研究	
		daaD-R263	AGCTCATGACGACCATCCTT		263-244				
IAC	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>16S rRNA</i>	yersH2-F	GGCTCACTAGGCGACGA	X75275	245-262	211	86	本研究
			yersH2-R	TCAGTGCTATAACTTAACCCTTCC		455-429			
	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>16S rRNA</i>	yers-F	GGAGGAAGGGTTAAGTGTTA	X75275	426-443	68	77.3	22
			yers-R	GAGTTAGCCGGTGCTTCTT		475-493			

●主要 8 食中毒菌

*Salmonella* Enteritidis (Sal-2339)、*Yersinia enterocolitica* (Pa-241)、*Y. pseudotuberculosis* (SP988)、*Plesiomonas shigelloides* (NIID123)、*Providencia alcalifaciens* (NIID124)、*Campylobacter jejuni* (SC-009)、*C. coli* (SC-01)、*Aeromonas hydrophila* (ATCC7966)、*Vibrio cholerae* (ATCC14035)、TDH産生 *V. parahaemolyticus* (SVP-02)、TRH産生 *V. parahaemolyticus* (NIIDK4d)、*Clostridium perfringens* (H2)、*Listeria monocytogenes* serotype 4b (Scott A)、*Staphylococcus aureus* (SS-05)、嘔吐毒産生 *Bacillus cereus* (No.127) と痢毒産生 *B. cereus* (No.1) とである (表 1)。菌株は10%スキムミルク (Difco) に入れ-80℃で保存した。培養菌から抽出したDNAをプライマーの特異性試験に使用した。各菌の培養法と菌数計算法は既に報告した方法で行った。

## 2.2 インターナル・アンプリフィケーション・コントロール (internal amplification control : IAC)

IACとして *Yersinia ruckeri* (JCM15110) から抽出した少量のDNAを用いた。*Y. ruckeri*はニジマスの“red mouth disease”の病原体であり、人の糞便や食品には分布していない。*Y. ruckeri*をブレン・ハート・インフィージョンブローズに30℃、48時間培養しDNAを抽出し、IACとして用いた。

## 2.3 DNAの抽出

食中毒菌の培養液1mLを12,000×g、3分間遠心し得られた沈渣を滅菌蒸留水1mLで洗浄・遠心後、滅菌蒸留水1mLに浮遊し菌液を作製した。食中毒菌を10<sup>7</sup>~10<sup>9</sup> cfu/mL含む菌液の200μLをQIAamp DNA

Stool Mini kit (Qiagen) で処理しDNAを抽出し、-20℃に保存した。PCRには2μLのDNA試料を使用した。糞便は無菌的に1g秤量し、滅菌チューブに入れ滅菌蒸留水9mLと懸濁し、その200μLをQIAamp DNA Stool Mini kitで処理し1時間以内にDNAを抽出した。

## 2.4 プライマー

本研究に用いた24種類の標的遺伝子検出用プライマーおよび2種類のIAC検出用プライマーを表2に示した。食中毒菌検出用プライマーのうち大腸菌 (EIEC、EPEC、EHEC、ETECとEAEC) と *Shigella* spp.、*Salmonella* spp.、*Y. enterocolitica*、*Y. pseudotuberculosis*、*P. alcalifaciens*、*C. jejuni*、*C. coli*、*V. cholerae*、TRH産生 *V. parahaemolyticus*、*A. hydrophila*、*S. aureus*、*B. cereus* (嘔吐毒産生および下痢毒産生菌)、*C. perfringens*、*L. monocytogenes* などの15菌種、20種類の食中毒菌を対象とした21種類の検出プライマーは既に論文に記載され、特異性と感度が確認されたものを使用した。TDH産生 *V. parahaemolyticus*、*P. shigelloides*とDAECの検出プライマー *tdh*、*PAG*と *daaD*の設計はBiosearch Technologies Japan Inc. (東京) に依頼した。TDH産生 *V. parahaemolyticus*の *tdh* 遺伝子、*P. shigelloides*の *gyrB* 遺伝子とDAECの *daaD* 遺伝子に特異性を有する領域はGenBank内のBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)を用い検索し設計された。

IACとして用いた *Y. ruckeri*の16S rRNA 遺伝子を増幅するIAC検出用プライマーとして、Lundら<sup>22)</sup>が報告した *Tm* 値が77.3℃の *yers* (*yersF1*と *yersR1*)と新たにBiosearch Technologies Japan Inc. (東京) に設計依頼したPCR増幅産物の *Tm* 値が86℃の *yersH2* (*yersH2-F*と *yersH2-R*) の2種類のプライマーペアを使用した。IACプライマー *yersH2*はPCR産物の *Tm* 値が83℃以下を示す15種類の標的遺伝子を検出するためのプライマーセットA~Eと共に使用し、IACの濃度は増幅曲線とThreshold lineとの交点のサイクル数 (Ct) がほぼ27サイクルになる濃度 (1.5×10<sup>3</sup> CFU/ml) とした。IACプライマー *yers*はPCR産

表3 リアルタイムSG-PCR反応試薬の内訳

試薬	1反応当たりの 使用量 (μL)
SYBR DimerEraser (2×)	10
ROX Reference Dye II (50×)	0.4
dH2O (滅菌蒸留水)	0.8
混合プライマー	4.8
プライマー 1 Forward (10μM)	(0.6)
Reverse (10μM)	(0.6)
プライマー 2 Forward (10μM)	(0.6)
Reverse (10μM)	(0.6)
プライマー 3 Forward (10μM)	(0.6)
Reverse (10μM)	(0.6)
IACプライマー Forward (10μM)	(0.6)
Reverse (10μM)	(0.6)
IACの鋳型DNA	2
サンプルの鋳型DNA	2
計	20

表4 リアルタイムPCRのサイクル条件

条件	ステージ				融解曲線分析		
	初期変成 (1サイクル)	PCR反応 (30サイクル)		伸長	(1サイクル)		
	熱変性	アニー リング					
温度	95℃	95℃	55℃	72℃	95℃	60℃	95℃
時間	30秒	5秒	34秒	34秒	15秒	1分	15秒

物の  $T_m$  値が80°C以上を示すプライマーセットF、GとHと共に使用し、IACの濃度は  $3 \times 10^2$  CFU/mlとした(表2参照)。

### 2.5 リアルタイム SG-PCR

リアルタイムSG-PCRはApplied Biosystems 7500 Real Time PCR system (ABI7500) を使用し、その反応試薬にはSYBR Premix DimerEraser™ (タカラバイオ) を用いた。試薬の調製およびリアルタイムPCR法のプロトコールはSYBR DimerEraser™の添付説明書の記載に準じた(表3、4)。反応は2時間以内に終了し、PCRの特異性は増幅産物の融解曲線を分析しその  $T_m$  を決定することにより確認した。

### 2.6 食中毒検査のためのMultiplexリアルタイムSG-PCR

ABI 7500に装着する96ウェルPCRプレート(12ウェル×8行)の各行をプライマーセット1~8の反応に用いた。各行の1列目は陰性コントロール、2列目はIAC、3~5列目はIACと陽性コントロール、6~12列目の7ウェルにはIACと検体に用いた。試薬は分注によるロスを考慮し、反応系ごとに13検体分の反応液(SYBR DimerEraserとプライマー、ROX Reference Dye II、滅菌蒸留水)で調製した。1列目には反応液16  $\mu$ Lを分注し、残りの反応液にIAC 24  $\mu$ L(2  $\mu$ L×12検体)を加え軽く混和し、その18  $\mu$ Lずつを2~12列目の11ウェルに分注した。次いで、1列目に滅菌蒸留水を4  $\mu$ L、2列目に滅菌蒸留水を2  $\mu$ L、3~5列目に各陽性コントロールを2  $\mu$ L、6~12列目に検体2  $\mu$ Lを注ぎ、シールを貼りスピンドアウンし反応に供した。ABI 7500による食中毒の急性期患者7名の糞便からの食中毒菌の24種類の標的遺伝子の検出のためのmultiplexリアルタイムSG-PCR反応は2時間以内に終了した。反応後にPCR産物の融解曲線分析を行い、陽性コントロールとIACのそれぞれ融解曲線が異なる  $T_m$  値を示すことを確認した後、検体の  $T_m$  値を陽性コントロールの  $T_m$  値と比較し検体中のPCR産物が同一であることを判定した。

2005年と2006年に島根県で発生した食中毒7事例の患者糞便から抽出し、-20°Cに保管されていたDNAサンプルについてABI 7500を用いたMultiplexリアルタイムSG-PCRを行った。

## 3. 結果

### 3.1 リアルタイムSG-PCRの感度と特異性

リアルタイムSG-PCRの感度はQIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen) で糞便材料からDNAを抽出した場合は、反応チューブ20  $\mu$ L中の濃度は4万倍に希釈されるため  $10^3 \sim 10^5$  CFU/gであった。各プライ

マーによるPCR増幅産物の融解曲線分析による  $T_m$  値を表1に、各プライマーの特異性を表2に示した。

### 3.2 IACを含む8組のmultiplexリアルタイムSG-PCR

16菌種23種類の食中毒菌の24標的遺伝子を一度に網羅的かつ迅速に検出し、PCR反応阻害などによる偽陰性判定を防ぐための汎用IACを含むmultiplexリアルタイムSG-PCRを考案した。患者糞便7検体について96ウェルPCRプレートの各行で3種類ずつの食中毒菌を検出する8組のプライマーセットを考案した。汎用IACには *Y. ruckeri* を用い、その16S rRNAを標的としたPCR増幅産物の  $T_m$  値が77°Cと86°Cと異なるように設計した2種類のプライマーを準備し、IACと3種類の食中毒菌のPCR増幅産物の  $T_m$  値を識別できるように組み合わせた。なお、プライマーの組み合わせは標的遺伝子が複数の菌種や菌型に保有されている *virA* (*Shigella* spp. と EIEC)、*eeA* (EPEC と EHEC)、*astA* (EAEC と ETEC、EPEC)、*yadA* (*Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis*)、*nheB* (*B. cereus* の嘔吐型と下痢型) や複数の標的遺伝子を保有するEHECとEAEC、ETECなどを考慮し組み合わせた(表1)。8組のプライマーセットには8主要食中毒菌(*V. parahaemolyticus* と *C. perfringens*、*S. enterica*、*C. jejuni*、*S. aureus*、嘔吐型 *B. cereus*、EHEC、*astA* 陽性 *E. coli*)のうち1菌種を検出するプライマーと他の16種類の食中毒菌検出プライマーのうちの  $T_m$  値が異なる2プライマーおよびIACプライマーを組み合わせた。これら3種類の食中毒菌の増幅産物の  $T_m$  値が83°C以下のプライマーセットA~EにはIACプライマー *yersH2*、80°C以上のプライマーセットF~HにはIACプライマー *yers* を用いた。  $T_m$  値の間隔は3種類の食中毒菌検出用プライマー間では0.7~6.1°C、食中毒菌とIAC検出プライマー間では3.2~3.7°Cになるようにプライマーを選定し組み合わせた。図1に各プライマーセットによる食中毒菌 ( $10^7$  CFU) とIAC ( $10^2$  または  $10^3$  CFU) のmultiplex SG-PCRの増殖曲線と融解曲線分析を示した。

### 3.3 Multiplex リアルタイムSG-PCRを用いた網羅的検索法の有用性の検証

県内で発生した食中毒7事例の患者糞便について、multiplexリアルタイムPCRを用い食中毒菌の24種類の標的遺伝子の網羅的検索を試み、迅速な原因菌の推定と混合感染の探知が可能であることが検証された。以下に結果を記載する。

a) 事例1: 2005年10月に発生し、患者糞便16検体のうち1検体から *C. jejuni* が分離されたが、原因が不明であった事例について、冷凍保存されていた患者糞

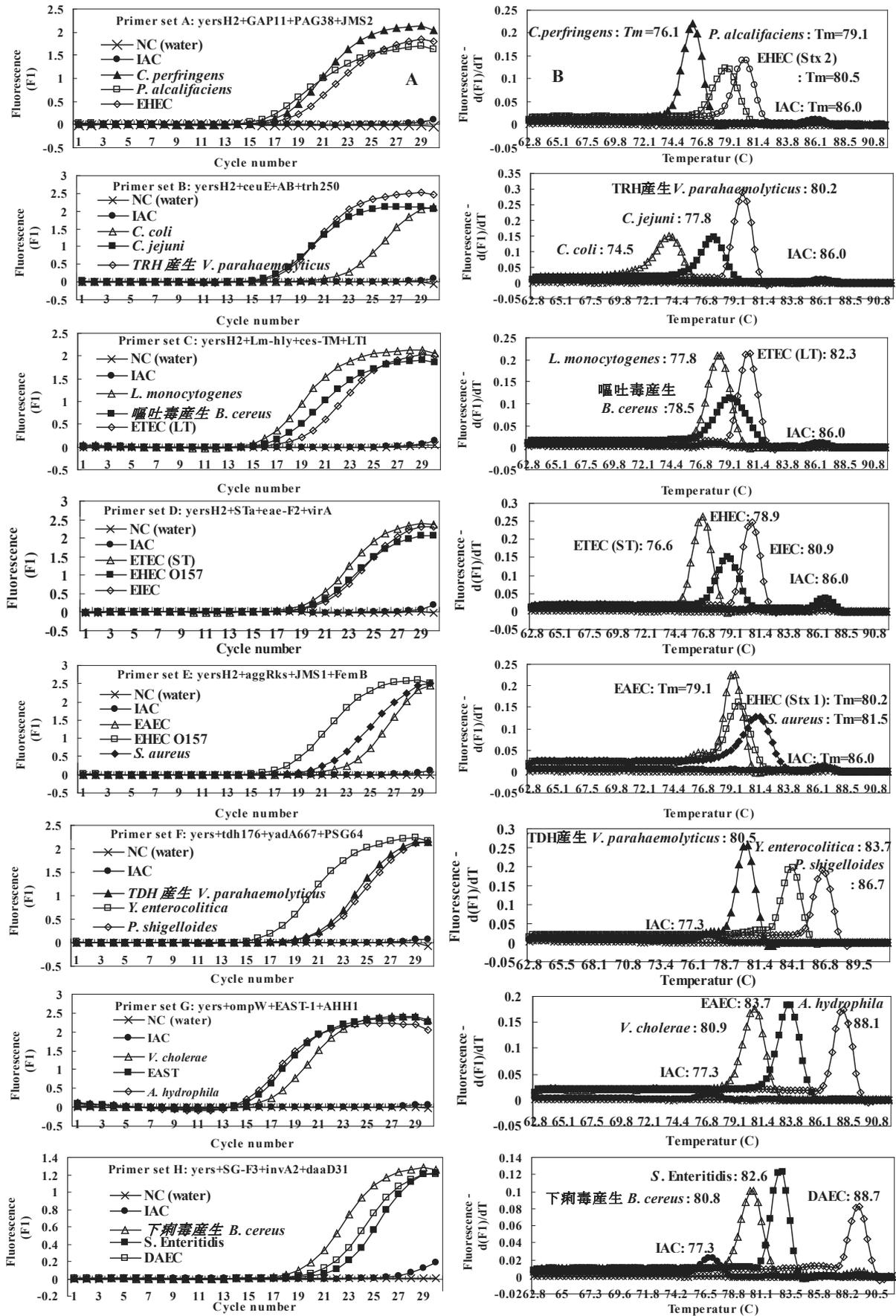


図1 ABI7500を用いたmultiplex SYBR Green PCRでのプライマーセットA～HにおけるIACと食中毒菌標的遺伝子の増幅曲線(A)と融解曲線分析(B)

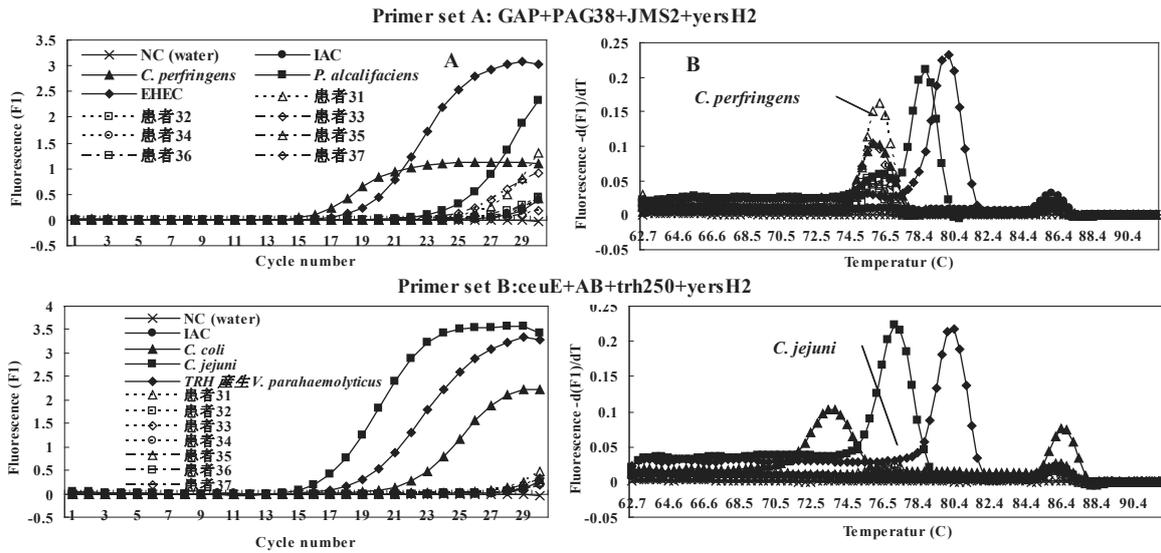


図2 食中毒事例3のABI7500を用いたmultiplex SYBR Green PCRで食中毒菌の標的遺伝子が検出されたプライマーセットにおける増幅曲線(A)と融解曲線分析(B)

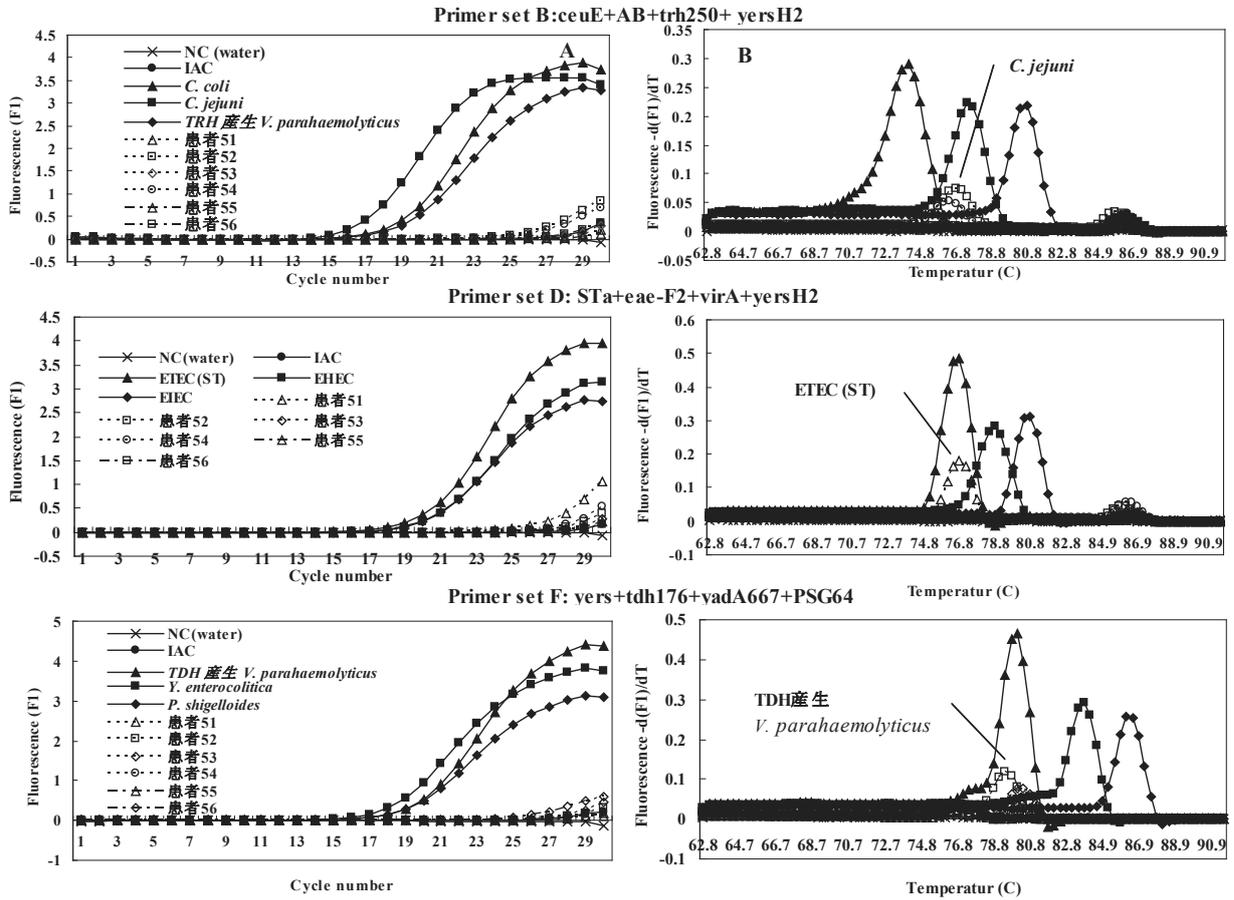


図3 食中毒事例5のABI7500を用いたmultiplex SYBR Green PCRで食中毒菌の標的遺伝子が検出されたプライマーセットにおける増幅曲線(A)と融解曲線分析(B)

便DNA 6 検体について検査した。その結果、6 検体からの *astA* の検出に加え、*C. jejuni* の種特異遺伝子、*eaeA*、*daaD* または *ahh1* が 1 検体ずつから検出された。*C. jejuni* が分離された検体からは *C. jejuni* の種特異遺伝子が高濃度に検出されたが、他の *eaeA*、*daaD* または *ahh1* の濃度は低かった。本事例は *C. jejuni* による散発事例を含む *astA* 陽性 *E. coli* による食

中毒または感染症であったことが示唆された。  
 b) 事例 2 : 2006 年 5 月に発生し、培養法により患者糞便 8 検体のうち 4 検体から *S. aureus* が少数ずつ分離された事例について、冷凍保存されていた患者糞便 DNA 5 検体について検査した。その結果、1 検体から *S. aureus* の *femB* が低濃度で検出され、他の 1 検体からは *astA* が検出された。

表5 島根県で発生した食中毒7事例についての Multiplex リアルタイム SG-PCR による原因菌の検索

事例番号	発生年月日	検査までの期間	原因施設	原因食品	患者数/喫食者数	発生時の細菌培養結果		Multiplex リアルタイム SG-PCR	
						分離菌種	分離率	標的遺伝子	検出率
1	2005年 10月2~6日	1~5	小中学校	不明	39/94	<i>C. jejuni</i>	1/16	<i>C. jejuni</i> の種特異遺伝子	1/6
								<i>astA</i>	6/6
								<i>eaeA</i>	1/6
								<i>daaD</i>	1/6
								<i>ahh1</i>	1/6
2	2006年 5月28~30日	0~2	一般食堂	食事	27/34	<i>S. aureus</i>	4/8	<i>femB</i>	1/5
								<i>astA</i>	1/5
3	7月4日	0	寮の給食施設	弁当	34/51	<i>C. perfringens</i>	19/50	<i>cpe</i>	7/7
								<i>C. jejuni</i> の種特異遺伝子	3/7
4	8月16日	1	飲食店	焼き飯	15/34	<i>B. cereus</i>	2/4	<i>ces</i>	1/4
								<i>nheB</i>	1/4
								<i>astA</i>	1/4
								<i>aggR</i>	1/4
5	9月2日	3	仕出店	仕出し	14/49	<i>V. parahaemolyticus</i>	3/6	<i>tdh</i>	3/6
								<i>C. jejuni</i> の種特異遺伝子	2/6
6	10月21日	1	宿泊施設	食事	7/13	<i>P. shigelloides</i>	2/5	<i>gyrB</i>	1/5
								<i>eaeA</i>	1/5
7	11月29日	1	一般食堂	食事	8/13	<i>C. jejuni</i>	4/7	<i>C. jejuni</i> の種特異遺伝子	7/7
						<i>astA</i> 陽性 <i>E. coli</i>	1/7	<i>astA</i>	1/7

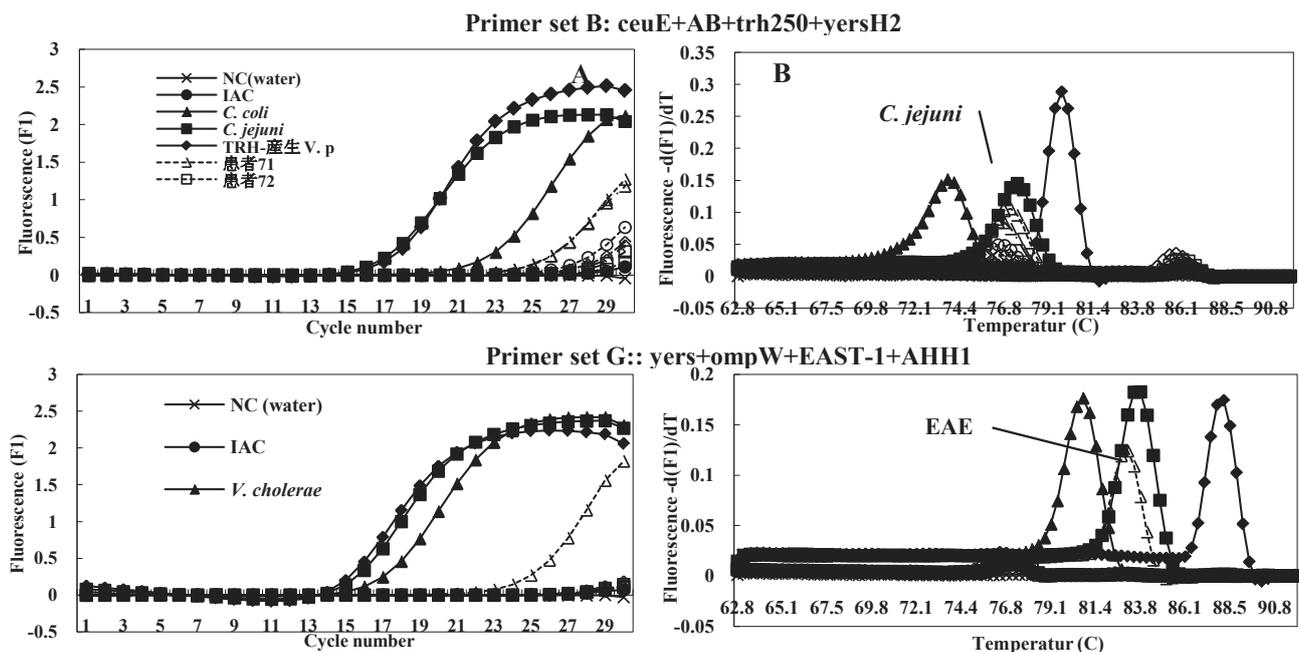


図4 食中毒事例7のABI7500を用いた multiplex SYBR Green PCR で食中毒菌の標的遺伝子が検出されたプライマーセットにおける増幅曲線 (A) と融解曲線分析 (B)

- c) 事例3：2006年7月に食中毒発生後数時間以内に採取された患者便50検体のうち19検体から *C. perfringens* が分離された事例について、冷凍保存されていた急性期患者便7検体について検査した。図2に示すように7検体全てから *cpe* が検出され、*C. perfringens* による食中毒であったことが確認されたが、3検体から *C. jejuni* の種特異遺伝子が低濃度ではあるが検出され、*C. jejuni* にも感染していた可能性が示唆された。
- d) 事例4：2006年8月に培養検査により4検体のうち2検体から少数の *B. cereus* が分離された事例について、冷凍保存されていた患者糞便DNA4検体について検査した。*B. cereus* が分離された検体のうち1検体から *ces* と *nheB* が検出され、嘔吐毒産生 *B. cereus* による食中毒と確認された。他の2検体からはそれぞれ *astA* と *aggR* が検出されたが、EAECが本事例の原因となったかは明らかでない。
- e) 事例5：2006年9月に発生し、病院等の検査で *V. parahaemolyticus* が分離された事例で、発生3日後の検査で6名中3名からTDH産生のO1:K25が分離された。冷凍保存されていた患者糞便DNA6検体をリアルタイムPCRで検索した結果、培養陽性患者3名から *tdh* が検出され、そのうち1名と他の1名から *C. jejuni* の種特異遺伝子、他の1名からは *st* が検出され、本事例ではTDH産生 *V. parahaemolyticus* だけでなく、*C. jejuni* やEPECにも感染していた可能性が示唆された（図3）。
- f) 事例6：2006年10月に発生し、duplex リアルタイムPCRで患者糞便5検体のうち2検体ずつから *P. shigelloides* の *gyrB* またはEPECの *eaeA* が低濃度で検出され、2検体から *P. shigelloides* が分離された事例について、冷凍保存されていた患者糞便DNA5検体について検査したところ、1検体ずつから *gyrB* または *eaeA* が検出された。
- g) 事例7：2006年11月に発生し、患者糞便7検体のうち4検体から *C. jejuni*、1検体から *astA* 陽性 *E. coli* が分離された事例について、冷凍保存されていた患者糞便DNA7検体について検査した結果、*C. jejuni* の種特異遺伝子が4検体から、*astA* が1検体から検出された（図4）。

#### 4. 考 察

細菌性食中毒の原因菌検索に要する長時間にわたる煩雑な分離・同定作業の軽減と食中毒の迅速な診断を目的とし、患者糞便から原因菌の標的遺伝子をリアルタイムPCRで検索し、原因菌を推定する方法が報告されている。

リアルタイムPCRはPCRの増幅産物量に比例した蛍光強度を測定することにより、標的遺伝子を検出するものであるが、その方法の主なものとして、PCRによって増幅された2本鎖DNAへのSYBR Green I色素の結合により標的遺伝子を検出するインターカレーター法と蛍光標識プローブを用い標的遺伝子を検出するTaqManプローブ法の2種類が広く利用されている。

インターカレーター法は特異的プローブを使用するTaqManプローブ法に比較し、原理的には特異性で劣っており、糞便から食中毒菌を確実に検出するにはTaqManプローブ法が有用と考えられ、これまでにTaqManプローブ法を用いた主要食中毒菌4菌種<sup>23)</sup>または7菌種<sup>24)</sup>の迅速スクリーニング法が報告されているが、高価なプローブを多用するmultiplex PCRを用いた網羅的スクリーニング法は報告されていない。

インターカレーター法のSG-PCRでは増幅産物の特異性の確認に融解曲線分析で得られる増幅産物の *Tm* 値が用いられる。一反応系に *Tm* 値の異なる複数のプライマーを組み合わせることで安価な蛍光物質であるSYBR Greenを用いたmultiplex PCRが可能となり、大腸菌の病原因子の特定のために8種類のプライマーを組合せたmultiplex SG-PCRも報告されている<sup>25)</sup>。

我々はLight Cyclerを用いたduplexリアルタイムSG-PCRで食中毒急性期患者の糞便5検体から食中毒菌8菌種の標的遺伝子を2時間以内に検出する迅速スクリーニング法を報告した<sup>1,2,3)</sup>。本法を食中毒検査に試験的に導入し良好な成績を得ているが、主要食中毒菌8菌種以外の稀少菌種による感染の有無を検索し、最終的に原因菌を特定するには3回のPCR検査を必要とし、より迅速で網羅的なスクリーニング法が求められた。そこで、本研究ではABI7500などで使用される96ウェルPCRプレートの各行でIACと3種類の食中毒菌の標的遺伝子を検索する8反応系からなるmultiplexリアルタイムSG-PCRを用い、24種類の食中毒菌標的遺伝子を一斉にスクリーニングする方法を検討した。本研究で使用したプライマーの多くはその感度と特異性が確認されたものを文献から選択し使用した。MultiplexリアルタイムSG-PCRの8種類のプライマーセットの組合せは、各プライマーセットに主要食中毒菌8菌種の中の1菌種とその他の稀少菌種を検出するプライマーをセットし、セット内の3種類のプライマーの標的遺伝子が重複せず、その増幅産物の *Tm* 値が1℃以上離れており、PCR検査終了後の融解曲線分析で *Tm* 値が容易に識別できるものを選択した。

PCR検査のリスクの一つとしてPCR反応阻害物質による偽陰性の出現が指摘されている<sup>26,27)</sup>。一般に、試薬の正常な反応を確認するために陽性および陰性コントロールが用いられるが、仮に試料中にPCR反応阻害物質が存在した場合には、標的遺伝子の増幅が妨げられ偽陰性となるために、正常な増幅の確認と偽陰性判定を防止するためにそれぞれの反応液中にIACが存在することが不可欠である。IACには標的遺伝子と同じプライマー結合部位を有するcompetitive IACと標的遺伝子とプライマー結合部位を共有しないnon-competitive IACの2種類に分けられる<sup>14)</sup>。前者は単一の標的遺伝子の検出に広く用いられている。これまでに報告されたIACのほとんどはcompetitive IACであったが、近年、腸炎ビブリオの4種類の遺伝子を標的とするmultiplex TaqMan PCRのために合成されたnoncompetitive IACが報告された<sup>28)</sup>。その他に、noncompetitive IACとしてニジマスの“red mouth disease”の病原体で人の糞便や食品には分布していない*Y. ruckeri*の16S rRNAやウイルス<sup>29)</sup>、植物<sup>30)</sup>の遺伝子などが報告されている。本研究ではIACとして*Y. ruckeri*の16S rRNAを使用し、その検出プライマーとして24種類の食中毒菌検出プライマーと一緒に汎用できる増幅産物の*Tm*値が約10℃異なる2種類のIACプライマーを使用した。

リアルタイムSG-PCRの検出限界は既に報告したように、QIAamp DNA Stool Mini Kitにより患者糞便から抽出したDNAを用いた場合は、反応チューブ内のDNA量は糞便1グラム当たりの四万分之一となり、検出感度は $10^3 \sim 10^5$  CFU/gとなる。一般に、食中毒患者の急性期の糞便には $10^6$  CFU/g以上の原因菌が排菌されることから<sup>3)</sup>、急性期患者の糞便が入手できれば、3時間以内に原因菌を推定することが可能となる。

本研究期間中に県内で食中毒事例の発生がなかったため、これまでに県内で発生した食中毒7事例の患者便から抽出し冷凍保存されていたDNA試料を用い、網羅的スクリーニング法の有用性を検証した。その結果、リアルタイムSG-PCRは2時間以内に終了し、全ての事例で複数の検体から食中毒原因菌の標的遺伝子が検出された。糞便からのDNAの抽出に要する1時間を加味すれば、検体搬入から約3時間で稀少菌種を含めたほとんどの食中毒菌をスクリーニングし、原因菌を確実に推定することが可能になる。事例1は*C. jejuni*が患者1名から検出されただけで、原因不明の事例であったが、本検査により*astA*が全員から検出され、*astA*陽性*E. coli*が原因菌であったことが示唆された。なお、本事例をはじめ多くの事例で通常の分離培養では分離が困難な病原性大腸菌の特異遺伝

子が一部の患者から検出された。また、事例3と5では主な原因菌として*C. perfringens*またはTDH産生*V. parahaemolyticus*が分離されたが、これらの原因菌による感染初期に採取された糞便から潜伏期間が長い*C. jejuni*の種特異遺伝子が低濃度に検出された。これらのシグナルがどのような現象を示唆しているかを明らかにできなかったが、本法による網羅的迅速スクリーニングが培養検査に先行して実施されれば、混合感染や腸管内における生態がほとんど明らかにされていない病原性大腸菌に関する貴重な情報が得られ、当該菌に適した増菌培養や選択分離培養が的確に実施できるであろう。

リアルタイムPCRは食中毒の原因菌と感染者を迅速に推定し、その後の的確な培養検査と疫学調査および再発防止のための適切な衛生指導等に役立てるために検討されてきたが、本研究で開発した96ウェルPCRプレートを用い24種類の食中毒菌標的遺伝子を検索するmultiplexリアルタイムPCRは食中毒菌の網羅的迅速スクリーニング法として極めて有用でかつ経済的な手段となる。

終わりに、本研究の一部は厚生労働科学研究補助金、地域健康危機管理研究事業の「地域における健康危機に対応するための地方衛生研究所機能強化に関する研究」により実施された。

## 文 献

- 1) 福島博ほか: 感染症学雑誌, 79, 644 (2005)
- 2) Fukushima, H. et al.: J Clin. Microbiol., 41, 134 (2003)
- 3) Fukushima, H. et al.: Int. J. Microbiol., Article ID 917623, 13 (2009), <http://www.hindawi.com/journals/ijmb/aip.917623.htm>
- 4) Abubakar, I. et al.: Health Technol. Assess., 11, 1. (2007)
- 5) 加藤直樹ほか: 感染症学雑誌, 67, 724 (1993)
- 6) Jothikuman, N. et al.: Appl. Environ. Microbiol., 68, 3169 (2002)
- 7) Price, E. P. et al.: Appl. Environ. Microbiol., 72, 7793 (2006)
- 8) Nogva, H. K. et al.: Appl. Environ. Microbiol., 66, 4029 (2000)
- 9) 西淵光昭ほか: 日本臨床, 50, 348 (1992).
- 10) Hough, A. J. et al.: J. Food Prot., 65, 1329 (2002)
- 11) Furrer, B. et al.: Lett Appl Microbiol., 10, 31 (1990)
- 12) Franck, S. M. et al.: J. Clin. Microbiol., 36,

- 1795 (1998)
- 13) Nielsen, E.M. et al.: J. Clin. Microbiol., 41: 2884 (2003)
- 14) Villalobo, E. et al.: Appl. Environ. Microbiol., 64, 1242 (1998)
- 15) Ratchtrachenchai, O. A. et al.: Bull. Dept. Med. Sci., 39, 211 (1997)
- 16) Klotz, K. et al.: J Clin Microbiol. 41, 4683 (2003)
- 17) Gubala, A. J. et al.: Appl. Environ. Microbiol., 72, 6424 (2006)
- 18) Yatsuyanagi, J et al.: J Clin Microbiol., 40: 294 (2002)
- 19) Wang, G. et al.: J Clin Microbiol., 41, 1048 (2003)
- 20) Yang, I-C. et al.: J. Food Prot., 70, 2774 (2007).
- 21) Fey, A. et al.: Appl. Environ. Microbiol., 70, 3618 (2004)
- 22) Lund, M. et al.: J. Clin. Microbiol., 42, 5125 (2004)
- 23) Iijima, Y. et al.: J Med Microbiol., 53, 617 (2004)
- 24) 児玉ほか: 北陸公衛誌, 34, 65 (2008)
- 25) Guion, C. E. et al.: J Clin. Microbiol., 46, 1752 (2008)
- 26) Hoorfar, J. et al.: J. Clin. Microbiol., 42, 1863 (2004)
- 27) Wilson, I. G.: Appl. Environ. Microbiol., 63, 3741
- 28) Nordstrom, J. L. et al.: Appl. Environ. Microbiol., 73, 5840 (2007)
- 29) Lubeck, P. S. et al.: Appl. Environ. Microbiol., 69, 5664 (2003)
- 30) Cheng, Y. et al.: J. Clin. Microbiol., 44, 3557 (2006)

## **Simultaneous Multiplex Real-time SYBR Green PCR Analysis of 24 Target Genes of Food-Borne Bacteria**

**Hiroshi FUKUSHIMA**

### Summary

A multiplex real-time SYBR Green PCR (SG-PCR) assays including an internal amplification control was simultaneously evaluated in 3 h or less with regard to detection of 24 target genes of 23 food-borne bacteria in DNA samples extracted from 7 stool specimens using a 96-well reaction plate. The 23 food-borne bacteria were enteroinvasive *Escherichia coli*, enteropathogenic *E. coli*, enterohemorrhagic *E. coli*, enterotoxigenic *E. coli*, enteroaggregative *E. coli*, diffusively adherent *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Providencia alcalifaciens*, *Plesiomonas shigelloides*, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Vibrio cholerae*, TDH-positive *V. parahaemolyticus*, TRH-positive *V. parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, emetic *Bacillus cereus*, enterotoxigenic *B. cereus*, *Clostridium perfringens* and *Listeria monocytogenes*. No interference from the multiplex real-time SG-PCR assay, including IAC, was observed in stool specimens in any of the 7 cases of food poisoning. We found multiplex real-time SG-PCR assay for simultaneous detection of 24 target genes of food-borne bacteria to be comprehensive, rapid, inexpensive, accurate, of high selectivity, and good for detection probability.

Key words: multiplex real-time SYBR green PCR, internal amplification control, food-borne bacteria, food poisoning