

3 調査研究

3・1 報 文

1) トリプレックス・リアルタイム PCR 法による 糞便からの食中毒菌迅速スクリーニング法の開発

古川 真斗 徳岡 英亮 原田 誠也

要 旨

LightCycler 2.0/480 II を用い、主要な食中毒菌 3 菌種（カンピロバクター ジェジュニ、サルモネラ属菌、腸炎ビブリオ）の標的遺伝子を 1 チューブで一斉に検出できるトリプレックス・リアルタイム PCR 法（TaqMan プローブ法）を開発した。

本法を食中毒検査に導入することで、原因菌検索の手間、時間及びコストを大幅に削減することができ、かつ原因菌の推定情報を速やかに各関係機関へ提供することで、感染拡大の防止、及び行政対応の迅速化に大きく寄与できると考えられた。

キーワード：トリプレックス・リアルタイム PCR, 食中毒菌, LightCycler

はじめに

細菌性食中毒の検査は培養法が基本であり、患者便、検食、施設の拭き取り等から直接分離培養及び増菌培養等を行い、原因菌を分離・同定する。しかし培養法では、直接分離培養でも原因菌の推定に 1~2 日間、さらに生化学的性状検査による同定に 1~2 日間を要する。そのため、分離培養後、分離培地上のコロニーから直接 PCR 法で原因菌の特異遺伝子を検出・同定し、同定時間を数時間に短縮する方法が多用されているが、分離培養の時間は必要であり、顕著な時間短縮とはなっていない。

近年、従来の PCR 装置より迅速・正確・高感度に標的遺伝子を検出できるリアルタイム PCR 装置が急速に

普及した。この装置を用いたリアルタイム PCR 法には、二重鎖 DNA に結合する SYBR Green I などの蛍光物質を用いるインターカレート法と TaqMan プローブなどの蛍光標識プローブを用いる蛍光プローブ法があり、福島ら¹⁾や飯田ら²⁾は、患者便等から直接 DNA を抽出し、インターカレート法を用いたデュプレックス（1 チューブ 2 菌種）・リアルタイム PCR 法を報告した。しかし、インターカレート法は非特異的な増幅産物やプライマーダイマー等にも反応するため、リアルタイム PCR 法の反応終了後に融解曲線（Tm）分析を行い、特異性を確認する必要がある。一方、蛍光プローブ法は蛍光プローブが標的 DNA に対し特異的に設計してあるため、インターカレート法より特異性の面で優れ

ている。

そこで本研究では、蛍光プローブ法 (TaqMan プローブ法) による食中毒菌の迅速スクリーニング法を開発し、原因菌の検索作業を効率化することを目的とした。

手始めに、主要な感染型食中毒菌であるカンピロバクター ジェジュニ、サルモネラ属菌及び腸炎ビブリオをターゲットとしたトリプレックス (1 チューブ 3 菌種)・リアルタイム PCR 法を開発した。

材料と方法

1 試薬

リアルタイム PCR の反応試薬には、Premix Ex Taq (TaKaRa) を使用し、各種プライマーは TaKaRa の DNA 合成を利用して作製した。また、各種今回使用した TaqMan プローブ (FAM [検出波長: 530nm], Pulsar 650 [検出波長: 705nm], Cal Fluor Red 610 [検出波長: 610nm], クエンチャーは全て BHQ) は、バイオサーチテクノロジーズジャパンに合成を依頼した。

2 使用機器

本研究は当初、LightCycler 2.0 (Roche) の使用を前提として開始したが、新たに LightCycler 480 II (Roche) が整備されたため、こちらの機種でも同様の検討を行った。

3 使用菌種

実験には当所で分離した保存菌株を使用した。カンピロバクター ジェジュニは、プレストン培地で 48 時間好気培養した。菌数は 1.02×10^8 cfu/ml であった。サルモネラは、Trypticase Soy Agar (以下「TSA」という。) で一夜培養後、Tryptic Soy Broth (以下「TSB」という。) に接種して 24 時間培養した。菌数は 1.03×10^9 cfu/ml であった。腸炎ビブリオは 2%NaCl 加 TSA で一夜培養後、2%NaCl 加 TSB に接種して 24 時間培養した。菌数は 5.5×10^7 cfu/ml であった。

DNA の抽出は、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を

用いて、添付の説明書どおりに実施した。

4 リアルタイム PCR 法に最適なプライマーと蛍光プローブの選択及び反応条件の検討

今回、カンピロバクター ジェジュニ、サルモネラ属菌及び腸炎ビブリオについて、Josefsen ら³⁾、Luke ら⁴⁾及び Linda ら⁵⁾の文献を参照して標的遺伝子、プライマー及びプローブを決定した。採用したプライマー及びプローブの塩基配列は表 1 に示した。

使用する蛍光色素は、LightCycler 2.0 の説明書を参照し、検出チャンネルの離れた FAM 及び Pulsar 650 を選択した。また、クエンチャーはクエンチング性能のよい Black Hole Quenchre (BHQ) を採用した。

まず、モノプレックス (1 チューブ 1 菌種)・リアルタイム PCR 法は、前記文献³⁻⁵⁾記載の反応液組成及び条件を参照し、表 2 及び 3 のとおりに実施した。

次に、デュプレックス・リアルタイム PCR 法を検討した。最適な蛍光色素の組み合わせを選定するために、6 通りの組み合わせを検討した。反応液組成は表 4、反応条件は表 3 に示した腸炎ビブリオの反応条件とした。

さらに、トリプレックス・リアルタイム PCR 法を行うため、新たな蛍光色素・クエンチャーを 1 セット (Cal Fluor Red 610-BHQ) 追加した。反応液組成及び条件は表 5 に示した。また、異なる蛍光検出チャンネル間で蛍光が重なって検出されるクロストークを最小化し、1 つの蛍光検出チャンネルで 1 つの蛍光色素しか検出できないようにするため、LightCycler 2.0 の機能の一つである Color Compensation Analysis (以下「CCA」という。) を実施した。

表 1 各種プライマー及びプローブの塩基配列

プライマー名	菌種	標的因子	塩基配列	参考文献
Cj-F	カンピロバクター ジェジュニ	16SrRNA	5' CTG CTT AAC ACA AGT TGA GTA GG 3'	1
Cj-R			5' TTC CTT AGG TAC CGT CAG AA 3'	
Cj-Probe			5' TGT CAT CCT CCA CGC GGC GTT GCT GC 3'	
Sal-F	サルモネラ属菌	<i>invA</i>	5' GCG TTC TGA ACC TTT GGT AAT AA 3'	2
Sal-R			5' CGT TCG GGC AAT TCG TTA 3'	
Sal-Probe			5' TGG CGG TGG GTT TTG TTG TCT TCT 3'	
Vp-F	腸炎ビブリオ	<i>tdh</i>	5' GTA RAG GTC TCT GAC TTT TGG AC 3'	3
Vp-R			5' CTA CAG AAT YAT AGG AAT GTT GAA G 3'	
Vp-Probe			5' ATT TTA CGA ACA CAG CAG AAT GA 3'	

表 2 1 反応 1 菌種のリアルタイム PCR 反応液組成

カンピロバクター ジェジュニ		サルモネラ属菌		腸炎ビブリオ	
試薬名	容量(μl)	試薬名	容量(μl)	試薬名	容量(μl)
Premix Ex Taq	10	Premix Ex Taq	10	Premix Ex Taq	10
Cj-F(10μM)	0.5	Sal-F(10μM)	1	tdh-F(20μM)	0.4
Cj-R(10μM)	0.5	Sal-R(10μM)	1	tdh-R(20μM)	0.4
Cj-FAM(10μM)	0.5	Sal-FAM(10μM)	0.4	tdh-FAM(20μM)	0.2
DW	6.5	DW	5.6	DW	4
sub-total	18	sub-total	18	sub-total	15
DNA	2	DNA	2	DNA	5
total	20	total	20	total	20

カンピロバクター ジェジュニ		サルモネラ属菌		腸炎ビブリオ	
試薬名	容量(μl)	試薬名	容量(μl)	試薬名	容量(μl)
Premix Ex Taq	10	Premix Ex Taq	10	Premix Ex Taq	10
Cj-F(10μM)	0.5	Sal-F(10μM)	1	tdh-F(20μM)	0.4
Cj-R(10μM)	0.5	Sal-R(10μM)	1	tdh-R(20μM)	0.4
Cj-Pulsar650(10μM)	1	Sal-Pulsar650(10μM)	0.4	tdh-Pulsar650(20μM)	0.4
DW	6	DW	5.6	DW	3.8
sub-total	18	sub-total	18	sub-total	15
DNA	2	DNA	2	DNA	5
total	20	total	20	total	20

表 3 1 反応 1 菌種のリアルタイム PCR 反応条件

カンピロバクタージェジュニ	サルモネラ属菌	腸炎ビブリオ
pre-incubate 95°C 30s	pre-incubate 94°C 60s	pre-incubate 95°C 30s
PCR 95°C 15s (40cycle) 58°C 60s	PCR 94°C 0s (40cycle) 60°C 20s	PCR 94°C 20s 58°C 20s (50cycle) 72°C 30s
cooling 40°C 30s	cooling 40°C 30s	cooling 40°C 30s

表 4 1 反応 2 菌種同時スクリーニングの反応液組成

Cj(FAM)-Sal(Pulsar650)		Sal(FAM)-Cj(Pulsar650)		Vp(FAM)-Cj(Pulsar650)	
試薬名	容量(μl)	試薬名	容量(μl)	試薬名	容量(μl)
Premix Ex Taq	10	Premix Ex Taq	10	Premix Ex Taq	10
Cj-F(10μM)	0.5	Sal-F(10μM)	1	tdh-F(20μM)	0.4
Cj-R(10μM)	0.5	Sal-R(10μM)	1	tdh-R(20μM)	0.4
Cj-FAM(10μM)	0.5	Sal-FAM(10μM)	0.4	tdh-FAM(20μM)	0.2
Sal-F(10μM)	1	Cj-F(10μM)	0.5	Cj-F(10μM)	0.5
Sal-R(10μM)	1	Cj-R(10μM)	0.5	Cj-R(10μM)	0.5
Sal-Pulsar650(10μM)	0.4	Cj-Pulsar650(10μM)	1	Cj-Pulsar650(10μM)	1
DW	4.1	DW	3.6	DW	5
sub-total	18	sub-total	18	sub-total	18
DNA	2	DNA	2	DNA	2
total	20	total	20	total	20

Cj(FAM)-Vp(Pulsar650)		Sal(FAM)-Vp(Pulsar650)		Vp(FAM)-Sal(Pulsar650)	
試薬名	容量(μl)	試薬名	容量(μl)	試薬名	容量(μl)
Premix Ex Taq	10	Premix Ex Taq	10	Premix Ex Taq	10
Cj-F(10μM)	0.5	Sal-F(10μM)	1	tdh-F(20μM)	0.4
Cj-R(10μM)	0.5	Sal-R(10μM)	1	tdh-R(20μM)	0.4
Cj-FAM(10μM)	0.5	Sal-FAM(10μM)	0.4	tdh-FAM(20μM)	0.2
tdh-F(20μM)	0.4	tdh-F(20μM)	0.4	Sal-F(10μM)	1
tdh-R(20μM)	0.4	tdh-R(20μM)	0.4	Sal-R(10μM)	1
tdh-Pulsar650(20μM)	0.4	tdh-Pulsar650(20μM)	0.4	Sal-Pulsar650(10μM)	0.4
DW	5.3	DW	4.4	DW	4.6
sub-total	18	sub-total	18	sub-total	18
DNA	2	DNA	2	DNA	2
total	20	total	20	total	20

表 5 1 反応 3 菌種同時スクリーニングの反応液組成及び反応条件

試薬名	容量(μl)
Premix Ex Taq	10
Cj-F(10μM)	0.4
Cj-R(10μM)	0.4
Cj-Red610(10μM)	0.8
Sal-F(10μM)	0.4
Sal-R(10μM)	0.4
Sal-Pulsar650(10μM)	0.8
tdh-F(20μM)	0.2
tdh-R(20μM)	0.2
tdh-FAM(20μM)	0.4
DW	4
	18
DNA	2
total	20

反応条件	
pre-incubate	95°C 30s
PCR	95°C 5s (40cycle) 60°C 30s
cooling	40°C 30s

5 検出限界の測定

3で抽出したDNA溶液をQIAamp DNA Mini Kit付属のAE bufferで10倍段階希釈したものを検体としてリアルタイムPCR法を実施し、検出限界を測定した。

6 実際の食中毒事例への適用例

本年5月に飲食店で発生した食中毒事例で本法を適用した。すなわち、食中毒患者便8検体及び従業員便2検体について、QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)を用いて、添付の説明書どおりDNAを抽出し、本法に供した。

結果

1 リアルタイムPCR法に最適なプライマー、蛍光色素の選択及び反応条件の検討

まず、LightCycler 2.0を用い、モノプレックスで標的遺伝子の増幅及び2種類の蛍光色素標識プローブで検出可能か確認したところ、3菌種とも検出可能であった。次に、デュプレックス・リアルタイムPCR法を行うために、蛍光色素の組み合わせを選定した。結果は図1のとおり、いずれも同一反応条件で遺伝子の増幅が確認され、どの蛍光色素の組み合わせでも検出が可能であることが分かった。さらに、蛍光検出チャンネルをそれぞれの蛍光色素の検出波長に切り替えると、目的とする蛍光のみが検出された。このことから、

LightCycler 2.0を使用したデュプレックス・リアルタイムPCR法が可能となった。

続いて、トリプレックス・リアルタイムPCR法を行うため、蛍光色素にCal Fluor Red610-BHQを追加した。結果は、図2のとおりで、3菌種の遺伝子増幅は確認されたものの、蛍光検出チャンネルをPulsar 650 (705nm)に合わせると、FAM及びPulsar 650の蛍光波長が同時に検出されることが判明した。これを解決するためCCAを実施したところ、図3のとおり、蛍光強度が補正され、1蛍光検出チャンネルあたり1蛍光色素の検出が可能となった。以上の結果から、今回設定した反応条件及びCCAを用いることで、LightCycler 2.0によるトリプレックス・リアルタイムPCR法が確立した。

また、LightCycler 480 IIでも検討したところ、この機種でも同様にCCAを設定することでトリプレックス・リアルタイムPCR法が可能であった。

2 検出限界の測定

検出限界の測定結果を図4に示した。各菌種とも、LightCycler 2.0での定量下限値は 10^3 cfu/mlであり、LightCycler 480 IIでも同様であった。

3 実際の食中毒事例での適用例

本法を実際の食中毒事例に適用したところ、患者便8検体からカンピロバクター ジェジュニの標的遺伝子が検出され、そのうち7検体から実際に菌が分離された。

本食中毒事例では、2日に亘り患者便が搬入され、分離培養による原因菌の推定に2日、生化学的性状検査による同定に2日を要したが、本法では初回の搬入から約3時間で原因菌の推定情報を提供することができた。

考察

本研究は、リアルタイムPCR装置LightCycler 2.0によるトリプレックス・リアルタイムPCR法を開発するために開始した。LightCycler 2.0は96ウェルのプレートではなく、独立したガラスキャピラリーでPCR反応を行う装置であるため、少数の検体でも使い勝手が良く、非常に重宝している。この装置は6つの蛍光検出チャンネルを装備しているが、励起光源がLEDであるため、励起波長(470nm)は単一である。このため、TaqManプローブ法で検出する場合、この波長で効果的に励起できる蛍光色素を選択する必要があり、蛍光色素の種類が制限される。今回、デュプレックス・リアルタイムPCR法を開発するため、蛍光色素としてFAM

及び Pulsar 650 を先に選択した。検討を重ねてデュプレックス・リアルタイム PCR 法を開発することができたため、Cal Fluor Red 610 を追加し、トリプレックス・リアルタイム PCR 法を検討した。しかし、Pulsar 650 の検出チャンネルに合わせると、FAM と Pulsar 650 の蛍光が重なって検出されるクロストークの問題が発生した。この問題は、上述のとおり、CCA で解決することができた。

また本法は、トリプレックス・リアルタイム PCR 法であるため、使用する試薬は通常の 1/3 で済ませることができ、かつ蛍光プローブ法を採用しているため、インターカレート法より特異性も高い。

検出限界の測定を実施したところ、各菌種の定量下

限値は 10^3 cfu/ml であった。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⁶⁾、急性期患者の糞便が入手できれば、今回開発した方法で原因菌を検出することが十分可能である。

今回開発したトリプレックス・リアルタイム PCR 法を実際に発生した食中毒事例で試したところ、患者便 8 検体からカンピロバクター ジェジュニの標的遺伝子が検出された。培養検査により、そのうち 7 検体から菌が分離されたが、1 検体は分離することができなかった。この 1 検体は、本法でのピークの立ち上がりが極めて遅かったため、非特異的なものであったのか、または菌量ごく微量であった可能性等が考えられたことから、今後も十分な検討が必要である。

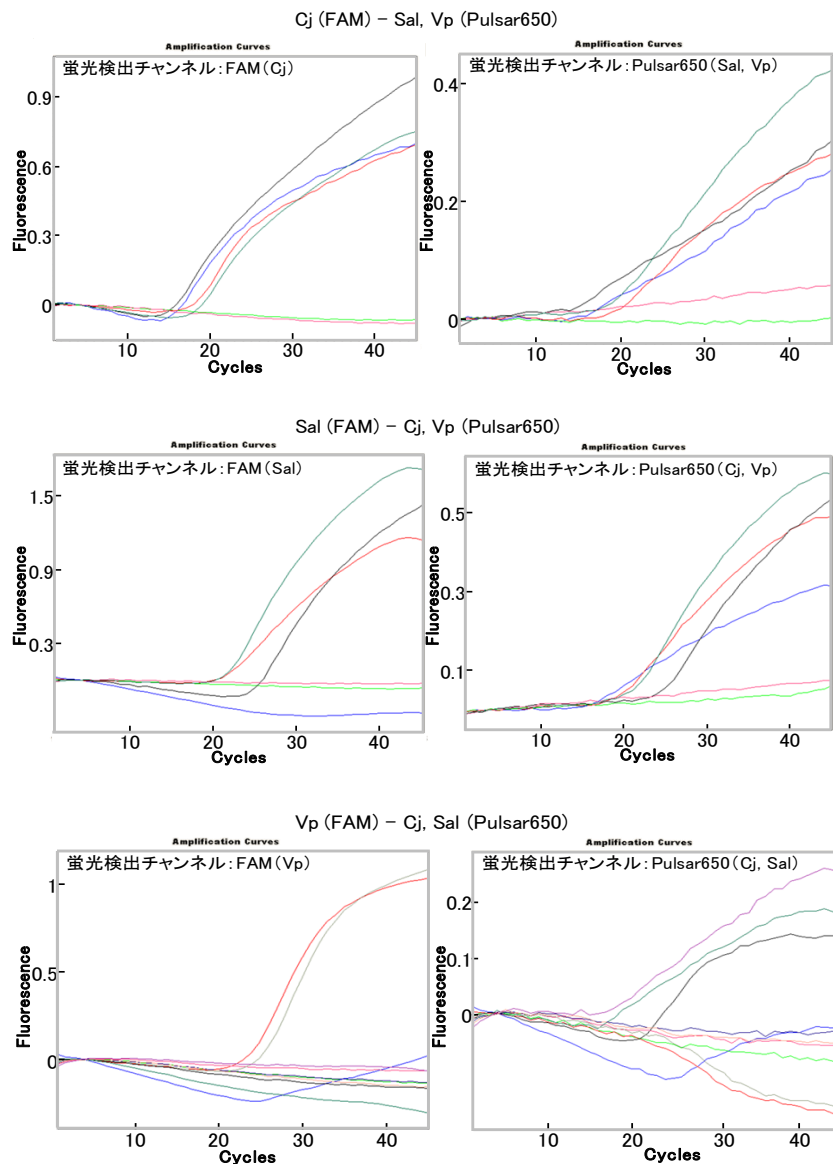


図 1 リアルタイム PCR 結果 (デュプレックス・スクリーニング)

Cj : カンピロバクター ジェジュニ Sal : サルモネラ属菌 Vp : 腸炎ビブリオ

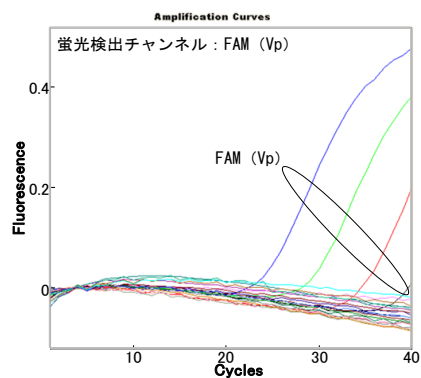
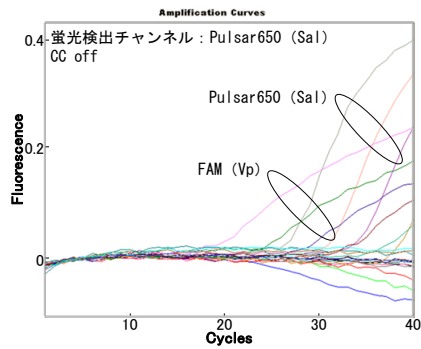
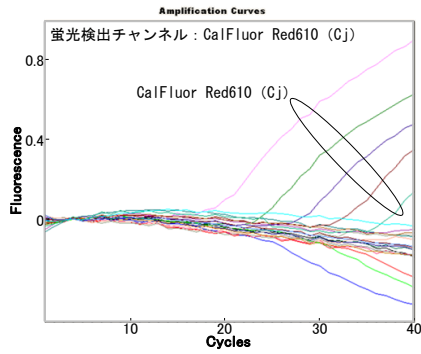


図2 リアルタイム PCR 結果 (Cj - Sal - VP)

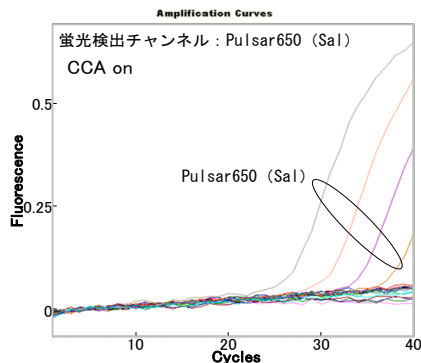


図3 リアルタイム PCR 結果 (CCA 補正後)

食中毒菌の培養検査は、直接分離培養でも菌の推定に1～2日間を要するが、本法ではわずか3時間程度で迅速に原因菌の推定情報を得ることができるため、その後の検査の方向性を決めやすく、検査の効率化に繋がる。

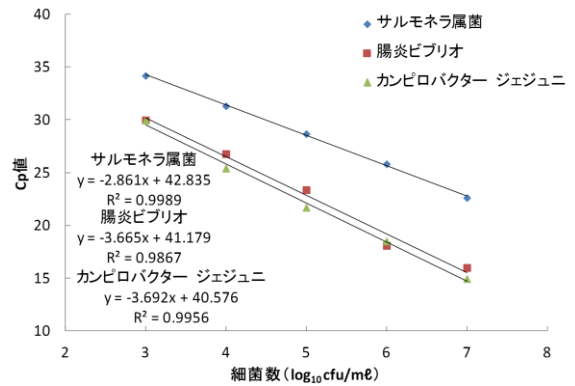


図4 定量下限値の測定

また、検体搬入後短時間で、現場へ原因菌の推定情報を提供できるため、極めて有用な方法であると考えられる。

まとめ

主要な食中毒起因菌3菌種(カンピロバクター ジェジュニ, サルモネラ属菌, 腸炎ビブリオ)を標的とした特異的プライマー及びTaqManプローブを用いたトリプレックス・リアルタイムPCR法の開発により、検体搬入後、約3時間で結果が判明する迅速スクリーニングが可能となった。本法はトリプレックス・リアルタイムPCR法であるため、使用する試薬も1/3で済ませることができ、かつ蛍光プローブを採用しているため、特異性も高い。検出下限値は各菌種とも 10^3 cfu/mlであったが、一般に食中毒患者の急性期糞便には 10^6 cfu/g以上の原因菌が排出されることから、本法は十分使用可能である。

本法を実際の食中毒事例に適用したところ、約3時間で結果が得られ、陽性となった検体から高率に目的の原因菌が分離された。また、このことから、その後の原因菌検索の手間が大幅に減少した。

今回構築したマルチプレックス・リアルタイムPCR法は、迅速性、特異性に優れた方法であり、食中毒検査時に本法を導入することで、余分な検査を省き、コストを大幅に削減することができる。さらに、今回の蛍光色素の組合せは他の菌種への応用が可能であり、現在、検査対象菌種の拡大を検討している。

参考文献

- 1) 福島博, 角森ヨシエ: 感染症学雑誌, 79, 644-655, (2005).
- 2) 飯田奈都子, 高橋奈緒美, 廣井みどり, 八木美弥, 西尾智裕, 神田 隆: 静岡県環境衛生科学研究所, 53, 19-24 (2010).
- 3) Josefsen MH, Jacobsen NR, Hoorfar J: *Appl. Environ.*

Microbiol., 3588-3592 (2004).

- 4) Luke TD, William JB, James CM, Margaret SN, Lynn AC, William BH, Linda G, W. S. Riggins, Sandra M, Ann S, Kenton LL : *J. Clin. Microbiol.*, **40**,3050-3052 (2002).
- 5) Linda NW, Asim KB : *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 2031-2042 (2006).
- 6) Fukushima H, Katsube K, Tsunomori Y, Kishi R, Atsuta J, Akiba Y : *Int. J. Microbiol.*, Published online June 24 (2009).