

前処理を簡略化した real-time PCR 法による

食中毒菌の糞便からの迅速検出法

【保健衛生室】

加藤喜幸、市川利奈、花原悠太郎^{*1}、上田豊^{*2}

要旨

食中毒発生時には、食中毒菌を糞便から迅速に簡単に検出する方法が求められている。我々は、界面活性剤を用いた DNA 熱抽出法と PCR 阻害物質耐性試薬を用いたリアルタイム PCR 法を組み合わせた遺伝子検査法（新法）を試み、その効果を検証した。菌の添加試験では、標的遺伝子である *stx1*, *stx2*（腸管出血性大腸菌）、*invA*（サルモネラ属菌）、*tdh*（腸炎ビブリオ）、*gyrA*（カンピロバクタージェジュニ）、*ceuE*（カンピロバクターコリ）、*SEA*（黄色ブドウ球菌）、*ces*（セレウス菌）、*cpe*（ウェルシュ菌）を糞便懸濁液中の菌濃度にして $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^3$ CFU/mL のレベルまで検出できた。更に、個人差のある糞便組成の違いや、試験に供する糞便濃度の高低による検出感度への影響は見られなかった。また、実際に発生した事例においても新法を試みたが、培養法とほぼ同等の感度であった。これらのことから新法は、糞便から食中毒菌を迅速で簡単に検出できる方法であると考えられた。

1 はじめに

細菌性食中毒の検査は、培養法が一般的に用いられているが、原因菌の同定までに 3 日以上と長時間を要し、検査時間の短縮が求められている。近年、患者糞便から直接細菌の DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて原因菌を同定する遺伝子検査法が報告されている。この方法は、培養法と比較して迅速性に優れるが、糞便中に含まれる PCR 阻害物質等を除去する必要があり、カラムを用いた複雑な前処理が行われている。そこで我々は、界面活性剤を用いた DNA 熱抽出法¹⁾と PCR 阻害物質耐性試薬を用いたリアルタイム PCR 法を組み合わせ、前処理を簡略化した遺伝子検査法（新法）を試みた。その有用性を評価するため検証試験を実施したので、その概要について報告する。

2 材料及び方法

2.1 菌添加試験における新法及び DNA 抽出キットによるリアルタイム PCR 法の検出限界

試験対象は、腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生遺伝子：*stx1*, *stx2*）、サルモネラ属菌（*invA*）、腸炎ビブリオ（耐熱性溶血毒産生遺伝子：*tdh*）、

カンピロバクタージェジュニ（*gyrA*）、カンピロバクターコリ（*ceuE*）、黄色ブドウ球菌（A 型毒素産生遺伝子：*SEA*）、セレウス菌（セレウリド産生遺伝子：*ces*）、ウェルシュ菌（エンテロトキシン産生遺伝子：*cpe*）の 8 菌種（9 標的遺伝子）とした。

各標的遺伝子を含有していないことを確認した糞便液に段階希釈した菌液を添加し試料を作製した。試料の糞便濃度は 40mg/mL、菌濃度は $1.0 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^3$ CFU/mL になるように調製した。新法は、各試料について終濃度が 1% になるように SDBS を添加し、加熱処理（100℃、10 分）後、遠沈（12,000rpm、3 分、4℃）し、その上清を DNA 抽出液とした。

一方、新法との感度比較のために、糞便からの DNA 抽出に多用されている市販の DNA 抽出キットを用いて、各試料から DNA 抽出液を得た。DNA 抽出キットは、QIAamp DNA Stool Mini Kit（キアゲン、以下 Stool Kit）を用いた。

DNA 抽出液を鋳型として Direct Ace qPCR Mix plus ROX Tube（ニッポンジーン）を用いたリアルタイム PCR により、標的遺伝子を検出した（表 1）。新法については、SDBS の PCR 阻害作用を抑

※1 暮らしの安心局暮らしの安心推進課

※2 食肉衛生検査所

制するため、終濃度が5%になるように Tween20 を PCR 反応液に添加し¹⁾、試験を行った。検出機器は、Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system(Thermo Fisher Scientific)を用いた。プライマーおよびプローブは、表2のとおりとした。菌種毎に、新法と Stool kit による同一試験を3回実施し、検出限界の菌濃度を測定した。3回全てにおいて検出できた最小菌濃度を検出限界とした。

2.2 糞便組成の違いによる検出感度への影響

実例での糞便検体の組成は一定ではない。そこで、糞便組成の違いによる検出感度への影響を評価するため、次のとおり検討を行った。10人の標的遺伝子を含むしていない糞便液に、食中毒細菌の代表としてカンピロバクター・ジェジュニの菌液及び SDBS を添加し、糞便組成が個人差によって異なる10種類の試料を調製した。糞便濃度は40 mg/mL に統一し、SDBS 濃度は1%になるように調製した。2.1の新法の手順に従い、DNA を抽出し、各試料について新法による同一試験を5回実施し、Ct 値の平均値から各試料間の有意差を評価した。なお、解析は一元配置分散分析法により行い、p 値<0.05の場合、有意差ありとした。

2.3 糞便濃度の違いによる検出感度への影響

実例での糞便の懸濁量は目算である。少しでも量が多いと阻害を生じるのであれば、実用性に欠ける。そこで、糞便濃度の違いによる検出感度への影響を評価するため、次のとおり検討を行った。カンピロバクター・ジェジュニ菌液及び SDBS を含む糞便濃度の異なる3種類の試料を調製した。糞便濃度は40 mg/mL、80 mg/mL、160 mg/mL になるように調製し、SDBS 濃度はいずれも1%に調製した。2.1の新法の手順に従い、DNA を抽出し、各試料について新法による同一試験を5回実施し、Ct 値の平均値から各試料間の有意差を評価した。なお、解析は、一元配置分散分析法により行い、p 値<0.05の場合、有意差ありとした。

2.4 食中毒及び感染症事例における実証試験

H26年度からH28年度にかけて県内で発生した食中毒事例(疑い事例も含む)について新法と培養法による検査を並行して行い、検出感度を比較した。腸管出血性大腸菌については、感染症患者の接触者調査の事例も含めた。新法は

糞便懸濁液に SDBS を1%になるように添加し、2.1と同様に加熱、遠沈後 DNA を抽出しリアルタイム PCR を実施した。一部の事例については抗生物質の使用の有無について聞き取りをした。

3 結果及び考察

3.1 菌添加試験における新法及び DNA 抽出キットによるリアルタイム PCR 法の検出限界

新法の検出限界は $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^3$ CFU/mL であったが、Stool Kit を用いた場合は、 1.0×10^3 CFU/mL あるいはそれ以上であった(表3)。Iigima らは同じく Stool Kit を用いたサルモネラ属菌のリアルタイム PCR での検出限界を 10^4 CFU/g (CFU/mL) と報告している²⁾。新法は、これらの方法より高感度と考えられた。これは、SDBS による効率的な DNA 抽出とカラムによる DNA の回収ロスをなくしたことが要因と考えられた。急性期の糞便中の菌濃度は 10^6 CFU/g 以上とされている。しかし、患者は常に急性期であるわけではなく、菌量は少ないことがしばしばある。新法では、急性期を過ぎていても検出できる可能性が示唆された。

3.2 糞便組成の違いによる検出感度への影響

10種類の試料の各 Ct 平均値から算出された p 値は、0.23 (>0.05) となり、各試料間に有意差は有るとは認められなかった(表4)。よって、新法の検出感度は糞便組成の個人差による影響をほとんど受けないと考えられた。

3.3 糞便濃度の違いによる検出感度への影響

3種類の試料の各 Ct 平均値から算出された p 値は、0.12 (>0.05) となり、各試料間に有意差は有るとは認められなかった(表5)。実務では糞便を計量することなく目算で懸濁液を調製しているが(通常30~60mg/mL)、新法では糞便を多少多くとっても感度低下は生じず、実務で適用可能と考えられた。

3.4 食中毒及び感染症事例における実証試験

実際の感染症、食中毒疑い検査での新法を用いた結果は、陽性数が培養法とほぼ一致し、偽陽性、偽陰性は実務上問題にならない程度と考えられた(表6)。新法は DNA の精製過程がなく前処理が簡略化されており、①糞便の懸濁、② SDBS 添加、③100℃加熱、④遠沈、⑤上清採取の

5ステップでリアルタイムPCRを行うことができ、1人で処理しても8検体以内であれば8菌種(9標的遺伝子)を検体受領後3時間以内に検出可能である。簡易であっても培養法と同等の感度であることが示された。

抗生物質の使用の有無について確認したカンピロバクタージェジュニによる食中毒事例、腸管出血性大腸菌の接触者調査で腸管出血性大腸菌O26が分離された事例での検体別検出状況は表7のとおりである。6検体で抗生物質が使用されていたが、新法ではすべて陽性を示した。しかし、培養法では、カンピロバクタージェジュニ、腸管出血性大腸菌O26では各1検体が陰性であった。採便する前に抗生物質を服用していることは時々あり、新法は抗生物質投与後で菌が死滅していて、培養法で原因菌を同定できない事例についても有用である可能性が示唆された。

Huらは500mgまたは500μLの糞便を用いてカラムを使用せずに病原細菌を検出する方法を

報告している³⁾。一方、新法は少量(30~60mg程度)で検出しており、糞便量が十分でない検体についても有用であり、このことも利点の一つと考えられた。

以上より、今回試みた新法は、培養法とほぼ同等の検出感度、糞便組成の個人差や採取量の影響を受けない安定性、3時間以内に検出できる迅速性、前処理が5ステップである簡易性を有しており、食中毒原因菌のスクリーニング検査法として有用であると考えられた。

4 参考文献

- 1) Sekikawa S., et al. Journal of Japan Society on Water Environment. 2008;31:565-568.
- 2) Iijima Y, et al. J Med Microbiol. 2004;53:617-622.
- 3) Hu Q, et al. Foodborne Pathog Dis. 2014;11:207-214

表1 PCR試薬組成および反応条件

新法及びStool Kitの場合におけるPCR反応試薬

試薬	容量 (μL)	
	新法	Stool Kit
2×Direct Ace qPCR Mix No Rox	25	25
Primer F and R (25 μM each)	1	1
Probe (10 μM)	1	1
50×ROX	0.1	0.1
20%Tween20	12.5	0
DDW	5.4	17.9
抽出DNA	5	5
合計	50	50

【反応条件】
95℃、10分

↓
95℃、15秒
60℃、1分 ×45

表2 使用したプライマーとプローブ

対象食中毒細菌	標的遺伝子	プライマー、プローブ名	配列(5'-3')
腸管出血性大腸菌	<i>stx1</i>	st1-F	GGATAATTTGTTTCAGTTGATGTC
		st1-R	CAAATCCTGTCACATATAAATTAATTCGT
		st1-P	CCGTAGATTATTAACCGCCCTTCCTCTGGA
腸管出血性大腸菌	<i>stx2</i>	st2-F	GGGCAGTTATTTGCTGTGGA
		st2-R	GAAAGTATTTGTTGCGGTATTAACGA
		st2-P	ATGTCTATCAGGCGGTTTGGACCATCTT
サルモネラ属菌	<i>invA</i>	invA-F	TTCCATTACCTACCTATCTGGTTGATT
		invA-R	GAACGACCCATAAACACCAA
		invA-P	CCTGATCGCACTGAATATCGTACTGGCG
腸炎ビブリオ	<i>tdh</i>	tdh-F	CATCTGCTTTTGAGCTCCATCT
		tdh-R	CTCGAACAACAACAATATCTCATCA
		tdh-P	TCCCTTTTCTGCCCCGGTT
カンピロバクタージェジュニ	<i>gyrA</i>	gyrA-F	AAGATACGGTTCGATTTTGTTC
		gyrA-R	CTACAGCTATACCCTTGAACCAATTAATA
		gyrA-P	TGATGGTTCAGAAAGCGAACCTGATGTTT
カンピロバクターコリ	<i>ceuE</i>	ceuE-F	AAGCTCTTATTGTTCTAACCAATCTAACA
		ceuE-R	TCATCCACAGCATTTGATTCCTAA
		ceuE-P	TTGGACCTCAATCTCGCTTGGAAATCATT
黄色ブドウ球菌	<i>SEA</i>	SEA-F	AAAATACAGTACCTTTGGAAACGGTT
		SEA-R	TTTCTGTAAATAACGTCTTGCTTGA
		SEA-P	AACGAATAAGAAAAATGTAACCTGTTTCAGGAGTTGGATC
セレウス菌	<i>ces</i>	ces-F	CGCCAAAAGTGATTATACCAA
		ces-R	TATGCCCGTTCTCAAACCTG
		ces-P	GGGAAAAAATACGAGAAATGCA
ウエルシュ菌	<i>CPENT</i>	CPENT-F	AGCTGCTGCTACAGAAAGATTAATTT
		CPENT-R	TGAGTTAGAAAGACGCCAATCATATAA
		CPENT-P	ACTGATGCATTAACCTCAAATCCAGCT

F = Forward, R = Reverse, P = Probe, 5'-FAM, 3'-TAMRA

表3 新法及び Stool Kit によるリアルタイム PCR 法における検出限界

菌数 (Log cfu/mL)	3回実施して検出された回数					
	新法		Stool kit		Stool kit	
腸管出血性大腸菌 (stx1)						
3	3	3	3	3	3	3
2	2	1	2	1	3	2
1	1	0	0	0	2	0
0	0	0	0	0	0	0
腸管出血性大腸菌 (stx2)						
3	3	3	3	3	3	3
2	2	1	2	1	3	2
1	1	0	0	0	2	0
0	0	0	0	0	0	0
サルモネラ属菌 (invA)						
3	3	3	3	3	3	3
2	2	1	2	1	3	2
1	1	0	0	0	2	0
0	0	0	0	0	0	0
腸炎ピブリオ (tdh)						
3	3	0	3	1	3	3
2	3	0	3	0	3	0
1	0	0	3	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0
カンピロバクター ジュジュニ (gyrA)						
3	3	0	3	1	3	3
2	3	0	3	0	3	0
1	0	0	3	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0
カンピロバクター コリ (ceuE)						
3	3	1	3	0	3	3
2	3	0	3	0	3	0
1	0	0	1	0	3	0
0	0	0	1	0	1	0
黄色ブドウ球菌 (SEA)						
3	3	1	3	0	3	3
2	3	0	3	0	3	0
1	0	0	1	0	3	0
0	0	0	1	0	1	0
セレウス菌 (ces)						
3	3	0	3	0	3	3
2	3	0	3	0	3	0
1	0	0	1	0	3	0
0	0	0	1	0	1	0
ウエルシュ菌 (cpe)						
3	3	1	3	0	3	3
2	3	0	3	0	3	0
1	0	0	1	0	3	0
0	0	0	1	0	1	0

3 : 3回実施して全て(3回)検出されたことを示す。

表4 10人の糞便への菌の添加試験結果

試料	Ct 平均値 (標準偏差)	P 値
1	23.65 (0.09)	
2	23.65 (0.09)	
3	23.74 (0.05)	
4	23.72 (0.07)	
5	23.71 (0.09)	0.23
6	23.70 (0.12)	
7	23.63 (0.08)	
8	23.63 (0.07)	
9	23.63 (0.04)	
10	23.65 (0.03)	

表5 糞便濃度の違いによる菌の添加試験結果

便濃度 (mg/mL)	Ct 平均値 (標準偏差)	P 値
40	23.86 (0.09)	
80	23.92 (0.06)	0.12
160	23.94 (0.02)	

表6 実例における新法と培養法による検出状況

菌種	陽性数		検体 総数
	新法	培養法	
ウエルシュ菌	28	28	119
腸管出血性大腸菌	15	10	118
カンピロバクター ジュジュニ	7	6	95
黄色ブドウ球菌	6	4	85
セレウス菌	1	2	85
腸炎ピブリオ	0	0	85
サルモネラ属菌	0	0	85
カンピロバクター コリ	0	0	85

表7 抗生物質の使用状況と新法及び培養法の検出状況

事例 No.	検出細菌	検体 No.	新法	培養法	抗生 物質
1	カンピロバクター ジュジュニ	1	+	+	○
		2	+	+	○
		3	+	+	×
		4	+	+	×
		5	+	+	○
		6	+	+	×
		7	+	-	○
		8	-	-	×
		9	-	-	×
		10	-	-	×
2	腸管出血性大腸菌 026	1	+	+	○
		2	+	+	×
		3	+	+	×
		4	+	+	×
		5	+	+	×
		6	+	-	○
		7	+	-	×
		8	-	-	×

○: 抗生物質の投与あり ×: 抗生物質の投与なし

A Rapid and Simple Real-Time PCR Assay for Detecting Foodborne Pathogenic Bacteria in Human Feces

Nobuyuki KATO, Rina ICHIKAWA, Yutaro HANABARA, Yutaka UEDA

Abstract

A rapid, simple method for detecting foodborne pathogenic bacteria in human feces is greatly needed. Here, we examined the efficacy of a method that employs a combination of a commercial PCR master mix, which is insensitive to PCR inhibitors, and a DNA extraction method which used sodium dodecyl benzene sulfonate (SDBS), and Tween 20 to counteract the inhibitory effects of SDBS on the PCR assay. This method could detect the target genes (*stx1* and *stx2* of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *invA* of *Salmonella* Enteritidis, *tdh* of *Vibrio parahaemolyticus*, *gyrA* of *Campylobacter jejuni*, *ceuE* of *Campylobacter coli*, *SEA* of *Staphylococcus aureus*, *ces* of *Bacillus cereus*, and *cpe* of *Clostridium perfringens*) in a fecal suspension containing 1.0×10^1 to 1.0×10^3 CFU/ml. Furthermore, the assay was neither inhibited nor influenced by individual differences among the fecal samples of 10 subjects or fecal concentration (40-160 mg/ml in the fecal suspension). When we attempted to detect the genes of pathogenic bacteria in 26 actual clinical cases, we found that this method was almost as sensitive as standard culture method. These results showed that this assay is a rapid, simple detection method for foodborne pathogenic bacteria in human feces.