８．食中毒網羅的検査法（リアルタイムPCR）導入による保健所機能強化のための検討

○間　京子　（千葉県衛生研究所）
横山　栄二　（千葉県衛生研究所）

【研究目的】

千葉県における細菌性食中毒検査では、県内 7 箇所に設置された保健所内検査課において原因菌の分離を行い、衛生研究所で二次的解析を行っている。本検討では、食中毒検査においてリアルタイムPCR法を用いた網羅的食中毒菌検査法を千葉県内保健所検査課に導入することにより、原因菌の分離に多大な労力を要する菌種の分離能力を向上させ、保健所検査課における検査機能の強化をはかることを目的とした。

【研究の必要性】

食中毒の原因菌には、カンピロバクターやサルモネラのように、培養法による原因菌の分離が容易な菌種（以下「メジャー菌種」とする。）と、下痢原性大腸菌（DEC)、エロモナス、プレシオモナス等のように、適当な選択分離培地等が存在しないため通常の培養検査のみで分離することが難しく、原因菌の分離に多大な労力を要する菌種（以下「マイナー菌種」とする。）がある。保健所検査課の人的資源には限界があり、マイナー菌種の全てにおいて多大な労力を要する検査を実施することが難しいため、原因菌の分離に苦慮する事例があるものと推察される。

上記の問題の解決策として、培養法と遺伝子検査法を併用することがあげられる。千葉県内保健所検査課に設置されているリアルタイム PCR 装置を用いたリアルタイム PCR 法によるスクリーニングを実施することで、マイナー菌種を網羅的に検査し、スクリーニング陽性となった菌種に集中的に人的資源を投入することによって原因菌の分離能力が向上する可能性が考えられる。しかしながら、リアルタイムPCR法による網羅的検査用キット等は市販されていないため、ニーズ（＝マイナー菌種の効率的な検査による分離能力の向上）とその解決策のハード面（＝リアルタイムPCR装置）はあるが、解決策のソフト面（＝網羅的検査法）がない状態であり、保健所検査課の機能強化のためにソフト面を調査する必要がある。

【研究計画】

1）プライマーセットの構築及び保存菌株による確認

マルチプレックスリアルタイム PCR 法による食中毒原因菌の網羅的検出法については、既報[1)2)]があるが、これらの方法ではメジャー菌種とマイナー菌種が同じプライマーセット

に組み込まれており、費用対効果の観点から保健所検査課においてルーチンワークとするのに適していない。そのため、本検討ではメジャー菌種又はマイナー菌種のみのプライマーセットとなるようプライマーの組み合わせを変更することとした。ただ、単純に組み合わせを変更するだけでは Tm 値の重複やプライマー・ダイマーの形成といった問題が発生する可能性があることから、Tm 値の重複等を考慮しつつプライマーセットを構築し、その効果を確認する。

2）実検体での試用

保健所検査課に試薬を配布し、実際の食中毒事案で網羅的検出法の効果を確認する予定であったが、新型コロナウイルス対応で多忙な保健所検査課での試用が難しくなった。そこで当初の計画を変更し、マイナー菌種及び DEC の病原遺伝子をターゲットとし、それらの遺伝子が検出される可能があるウシ（第一胃、第一胃内容物及び便）及びブタ（直腸便及び便）検体を用いて、構築したプライマーセットを使用してマイナー菌種の検出を試みることとした。

【実施内容・結果】

1）プライマーセットの構築及び保存菌株による確認

当所保存菌株及び他機関からの分与株を用いて、Tm 値の把握のために既報[4)]と同様の方法でシングルリアルタイム PCR を実施し、得られた Tm 値からプライマーセットを作成した（表 1）。作成したプライマーセットを用いて既報[4)]と同様の方法でマルチプレックスリアルタイム PCR を実施し、プライマー・ダイマー等の非特異的な増幅遺伝子がないことを確認した。

2）実検体での試用

DNA 抽出は増菌培養液及び直接分離培地の colony-sweep から実施した。抽出した DNA を用いて、本検討で構築したマイナー菌種及び DEC のプライマーセット A、B 及び C を使用しマルチプレックスリアルタイム PCR を実施したところ、増菌培養液からは *astA* が 24 検体中 23 検体、*eae* が 20 検体、*ahh1* が 12 検体、*stx2* が 10 検体、*st1a* が 8 検体、*stx1* が 7 検体、*gyrB*（*Plesiomonas shigelloides*）が 3 検体検出された。また、直接分離培地の colony-sweep からは、*astA* が 19 検体中 11 検体、*eae* が 10 検体、*ahh1* が 7 検体、*stx2* 及び *st1a* が 3 検体、*stx1* が 1 検体検出された（表 2）。

【考察と今後の課題】

本検討では、既報によるマルチプレックスリアルタイム PCR 法[1)2)3)]を改良することで、病原遺伝子の検出がより効率的に検出できる系を作成した。なお、既報[1)2)]にあった病原菌のうち、検出事例が少なく分離が容易である *Vibrio cholerae* 及び検出しても疫学的な意味付けが難しい enterotoxigenic *Bacillus cereus* は除外した。

本検討では、過去の日本における食中毒発生件数で上位を占めるカンピロバクター属菌（ジェジュニ及びコリ）、腸炎ビブリオ、サルモネラ属菌をメジャー菌種用として同一のプライマーセットにまとめ、発生件数が同様に上位であり、潜伏時間等の疫学情報に類似点が

多いウェルシュ菌・黄色ブドウ球菌等を同一のプライマーセットにまとめ、さらにマイナー菌種及び DEC を 3 つのプライマーセットのまとめたことで、既報[1)2)]と比較して、少ないプライマーセットでのスクリーニングが可能となり、保健所検査課での検査の負担軽減が期待できると考えられる（表 1）。

増菌培養液からのマルチプレックス PCR において、一番多く検出された病原遺伝子は *astA* であり 24 検体中 23 検体から検出され、次いで *eae* が 20 検体から検出された（表 2）。他に、同一の農場のウシから *ahh1* が 12 検体検出されたが、別の農場のウシからは *ahh1* は検出されなかったため、検出された農場におけるエロモナスの水系感染等、農場における感染が疑われた（表 3）。*st1a* は 8 検体検出され、そのうち 7 検体は毒素原性大腸菌（ETEC）ST1a の検出率が高いとされるブタからの検出であった。また、*gyrB*（*Plesiomonas shigelloides*）が 3 検体検出され、増菌培養液からマイナー菌種及び DEC の病原遺伝子が確認できた。

直接分離培地からの colony-sweep は、増菌培養液と比較して検出率が悪かった。*astA* が 19 検体中 11 検体、*eae* が 10 検体、直腸便及び便検体のみから検出された。なお、第一胃及びその内容物の直接分離培地は集落の発育が悪く、数個しか集落が発育しない平板がみられ、colony-sweep から病原遺伝子の確認がほとんどできなかったのに対し、直腸便及び便検体では集落の発育に問題はなく、増菌培養液と比較して検出率は若干落ちるものの colony-sweep から病原遺伝子の確認が可能であった。直接分離培地からの colony-sweep では他に、*ahh1* が 7 検体、*stx2* 及び *st1a* が 3 検体、*stx1* が 1 検体検出されたが、増菌培養液と比較して検出率が悪く、また、*gyrB*（*Plesiomonas shigelloides*）は検出されなかった。これらのことから、直接分離培地からの colony-sweep によるマルチプレックスリアルタイム PCR 法によるスクリーニングは可能であるものの、菌量が少ないことが予想される食品検体等では増菌培養液からの DNA 抽出を併用することが望ましいと考えられる。

作成したプライマーセットを用いて、マイナー菌種及び DEC の病原遺伝子検出が可能であることが確認できたことから、マイナー菌種のマルチプレックスリアルタイム PCR 法によるスクリーニングを使用した効率的な検査による分離力向上という目的及びそれによる保健所検査課の機能強化に今回の検討は寄与すると考える。

本検討にあたり、菌株を分与いただきました島根県保健環境科学研究所の川瀬遵先生、検体の採材にご協力いただいた千葉県南総食肉衛生検査所の宮木様をはじめ職員の皆様へ深く感謝申し上げます。

【参考文献】

1) Jun Kawase, et al. Jpn J Infect Dis.69:191-201(2016)
2) Hiroshi Fukushima, et al. Int J Microbiol.2010(2010)
3) Chase E.Guion, et al. J. Microbiol.46:1752-1757(2008)
4) 菊池俊,他:千葉県衛生研究所年報.65:55-61(2016)

(表 1)

Primer set	Bacteria	Target gene	Primer	Sequence	Tm (°C) Mean	Tm (°C) Max	Tm (°C) Min	Strain.No.	Reference
A	EAEC (aggR)	*aggR*	aggR F	CGAAAAAGAGATTATAAAAATTAAC	71.6	71.7	71.5	CEC00021	3
			aggR R	GCTTCCTTCTTTTGTGTAT					
	ETEC (LT)	*lt*	LT-F2	AGCCATTGAAAGGATGAAGGA	73.4	73.6	73.0	CEC9203	1
			LT-2	GGTCTCGGTCAGATATGTGATTC					
	ETEC (ST)	*st1a* and *st1b*	Sta-Et-F2	CTGTATTATCTTTCCCCTCTTTTAGTC	75.3	75.4	75.1	CEC06005	1
			Sta-Et-R	AGGATTACAACACAGTTCACAGCAG					
			STb-Et-F	CGCTCAGGATGCTAAACCAG	76.5	76.6	76.4	CEC97104	
	EHEC (Stx 2)	*stx2*	stx2-ET-F	CATGACAACGGACAGCAGTTAT	81.8	82.0	81.7	CEC17004	1
			stx2-ET-R	AACTCCATTAACGCCAGATATGA					
B	EHEC and EPEC	*eae*	eaeA F	ATGCTTAGTGCTGGTTTAGG	77.6	77.8	77.5	CEC9666	3
			eaeA R	GCCTTCATCATTTCGCTTTC					
	EHEC (Stx 1)	*stx1*	stx1 F	CTGGATTTAATGTCGCATAGTG	81.6	81.8	81.5	CEC19039	3
			stx1 R	AGAACGCCCACTGAGATCATC					
	EIEC and *Shigella* spp.	*ipaH*	ipaH F	GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	85.9	86.1	85.8	CEC17062	3
			ipaH R	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC					
	DAEC	*afaD*	daaD-F31	GTCACCTGCGGGATGTTACT	88.6	88.7	88.5	FB13001	1,2
			daaD-R263	AGCTCATGACGACCATCCTT					
C	*Providencia alcalifaciens*	*gyrB*	PAG38-F	TCTGCACGGTGTGGGTGTT	78.4	78.7	78.1	FB15030	1
			PAG110-R	ACCGTCACGGCGGATTACT					
	Yersinia . Pseudotuberculosis and Y.enterocolitic a	*yadA*	yadA-F1757	ACGAGTTGACAAAGGTTTAGCC	80.8	80.9	80.6	YP86-1	1
			yadA-R1885X	GAACCAACCGCTAATGCCTGA	81.4	81.5	81.2	CYE17001	
	EAEC (astA)	*astA*	EAST-1-S	GCCATCAACACAGTATATCC	82.6	82.9	82.1	CEC0030	1,2
			EAST-AS	GAGTGACGGCTTTGTAGTCC					
	Plesiomonas shigelloides	*gyrB*	PSG-F64	TTAACGCCCTGTCGGATAAG	85.9	86.1	85.7	ATCC4029	2
			PSG-R313	TCGAGCAGATGAATCGACAC					
	Aeromonas hydrophila	*ahh1*	AHH1-F	GCCGAGCGCCCAGAAGGTGAGTT	87.3	87.6	87.1	ATCC9766	2
			AHH1-R	GAGCGGCTGGATGCGGTTGT					
D	*Listeria monocytogenes*	*hly*	Lm-hly-F	GGGAAATCTGTCTCAGGTGATGT	72.8	73.1	72.4	ATCC19114	1
			Lm-hly-R-kai1	GTAAATTACGGCTTTGAAGGAAGA					
	Clostridium perfringens	*cpe*	CPE-Et-F	TAATAGATAAAGGAGATGGTTGGAT	75.4	75.5	75.2	CCP19030	1
			CPE-Et-R	AAATCCATATTCTACAGATGCTTG					
	Emetic *Bacillus cereus*	*ces*	ces-TM-F	GATGTTTGCGACGATGCAA	77.5	77.8	77.3	CBC09002	1,2
			ces-TM-R	CTTTCGGCGTGATACCCATT					
	Staphylococcus aureus	*femB*	FemB-fw	AATTAACGAAATGGGCAGAAACA	80.7	80.9	80.5	CSA14004	1,2
			FemB-rv	TGCGCAACACCCTGAACTT					
E	*Campylobacter coli*	*ceuE*	ceuE-For	CAAGTACTGCAATAAAAACTAGCACTACG	73.5	73.7	73.3	CC18035	1,2
			ceuE-Rev	AGCTATCACCCTCATCACTCATACTAATAG					
	Campylobacter jejuni	*cj0414*	AB-F2	GATACCTTAAGTGCAGCCTGTGA	75.7	76.0	75.4	CC18017	1
			AB-R2	ACGCCTAAACCTATAGCTCCTTC					
	TDH-positive *Vibrio parahaemolyticus*	*tdh*	tdh-F2	ATGAGATATTGTTTGTTGTTCGAGA	78.4	78.5	78.2	CVP06006	1
			tdh-R2	TCACAGTCATGTAGGATGTCA					
	TRH-positive *Vibrio parahaemolyticus*	*trh*	F-trh82	CCATCMATACCTTTTCCTTCTCC	79.4	79.6	79.4	CVP02002	1
			R-trh287	ACYGTCATATAGGCGCTTAAC					
	Salmonella spp.	*invA*	invA386-F	CGTTCGGGCAATTCGTTAT	84.7	84.8	84.5	CS01042	1
			invA662-R	ATAAACTTCATCGCACCGTCA					

（表 2）

標的遺伝子	増菌培養液(mEC) 陽性数 / 検体数	直接分離培地(DHL) 陽性数 /検体数
astA	23 / 24	11 / 19
eae	20 / 24	10 / 19
ahh1	12 / 24	7 / 19
stx2	10 / 24	3 / 19
st1a	8 / 24	3 / 19
stx1	7 / 24	1 / 19
gryB(*P.shigelloides*)	3 / 24	0 / 19

（表 3）

実施日	農場	検体	検体数	標的遺伝子	増菌培養液(mEC) 陽性数 / 検体数	直接分離培地(DHL) 陽性数 /検体数
2021/5/17	①	ウシ第一胃	5	*ahh1*	5 / 5	5 / 5
				astA	5 / 5	0 / 5
				eae	4 / 5	0 / 5
				stx1	2 / 5	0 / 5
				stx2	1 / 5	0 / 5
		ウシ第一胃内容物	5	*ahh1*	4 / 5	実施せず
				astA	4 / 5	
				stx1	2 / 5	
				eae	2 / 5	
2021/6/7		ウシ第一胃	3	*ahh1*	3 / 3	2 / 3
				eae	3 / 3	1 / 3
				astA	3 / 3	0 / 3
				stx2	3 / 3	0 / 3
				stx1	2 / 3	0 / 3
2021/7/14	②	ウシ便	1	*astA*	1 / 1	1 / 1
				eae	1 / 1	1 / 1
				stx1	1 / 1	1 / 1
				st1a	1 / 1	1 / 1
2021/7/14	③	ブタ直腸便及び便	5	*astA*	5 / 5	5 / 5
				eae	5 / 5	4 / 5
				st1a	3 / 5	2 / 5
				stx2	3 / 5	1 / 5
				gryB(*P.shigelloides*)	2 / 5	0 / 5
	④	ブタ直腸便及び便	5	*astA*	5 / 5	5 / 5
				eae	5 / 5	4 / 5
				st1a	4 / 5	0 / 5
				stx2	3 / 5	2 / 5
				gryB(*P.shigelloides*)	1 / 5	0 / 5

【経費使途明細】

使　　途	金　額
リアルタイム PCR 用試薬（Takara TB Green Premix DimerEraser）	183,114 円
DNA 抽出試薬（InstaGene DNA 精製マトリックス等）	66,011 円
プラスチック消耗品（Fast 96-Well Reaction Plate 等）	41,613 円
培地等（DHL 寒天培地等）	8,162 円
振込手数料	1,100 円
合　　計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円