

食中毒発生時におけるスクリーニング検査法の検討

千葉一樹 渡邊奈々子¹⁾ 菅野奈美 二本松久子 小黒祐子 佐藤弘子²⁾
微生物課¹⁾ 福島県立総合衛生学院²⁾ 前衛生研究所

要 旨

細菌性食中毒の微生物学的検査は、培養法が主検査法であるために、これまで長時間を要し、複雑な検査工程を経て菌種の同定に至ってきた。近年では、スクリーニング検査法としてリアルタイム PCR 装置を用いて遺伝子検査を導入し、早期原因菌を推定し、その後の培養検査の負担を軽減しようとする試みが各研究機関で検討されている。

そこで、当所においても保存菌株を使用して、*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Clostridium perfringens* の標的遺伝子を検出するスクリーニング検査の検討を行った。

まず、食中毒菌陰性の糞便に段階希釈した菌液を接種し、疑似便を作製した。次に、疑似便の標的遺伝子検出限界の測定及び増菌培養による少量菌（初期量： 10^1 CFU/mL 程度）の標的遺伝子検出を検討した。その結果、検出限界値は各菌種とも 10^4 CFU/mL 程度であり、少量菌の標的遺伝子検出では、*S.Enteritidis* 及び *C.perfringens* が培養開始から 4 時間、*C.jejuni* 及び *C.coli* は 6 時間で検出できた。さらに、培養時間が経過するにつれて、Ct 値が減少するため、生菌由来の遺伝子証明に応用できることが示唆された。

キーワード：細菌性食中毒，リアルタイム PCR，スクリーニング検査，
生菌由来の遺伝子証明

はじめに

食中毒発生時は、迅速で正確な疫学調査や検査が、感染拡大の防止に大きく寄与する。

一方で、細菌性食中毒の微生物学的検査では、培養検査が主であるために、菌の同定までには長時間を要する。また、作業工程も複雑である。

近年、これらの問題点を解決するために、リアルタイム PCR 法で食中毒菌の遺伝子検出を目的に、食中毒検査のスクリーニング検査法として導入する試みがなされている。

そこで、本県で事例数が多い *C.jejuni*, *C.coli*, *S.Enteritidis*, *C.perfringens* の 4 菌種について、リアルタイム PCR を使用して疑似便の標的遺伝子検出限界の測定及び、増菌培養による少量菌からの標的遺伝子検出を検討したので報告する。

材 料

C.jejuni, *C.coli*, *S.Enteritidis*, *C.perfringens*

の 4 菌種を使用した。なお、各菌は、当所保存の食中毒事例由来株である。

方 法

1 各試料の調製

糞便は、標的遺伝子が陰性であることを確認した後、滅菌生理食塩水で 10 倍に希釈して、十分に混和し糞汁とした。

菌株原液は、各菌株の単独コロニーを表 1 に示した条件で培養後、培養液 1.0mL を 12,000rpm で 5 分間遠心し、次に、上清を捨て沈渣に滅菌生理食塩水 1.0mL を加え、再浮遊させ調製した。

希釈菌液は各菌株原液を 10^7 倍まで 10 倍ずつ段階希釈し調製し、菌株原液の生菌数をミスラ法²⁾によって算定した。

2 SYBR Green法リアルタイムPCR

PCR 溶液は、SYBR[®] Premix DimerEraser[™] (タカラバイオ) を使用して調製した。PCR

表 1 各菌種の培養条件

菌種	増菌培地	培養条件
<i>C.jejuni/coli</i>	プレストン培地	42℃・48時間・微好気
<i>S.Enteritidis</i>	セレナイトシスチン培地	37℃・24時間・好気
<i>C.perfringens</i>	変法TGC培地	37℃・24時間・嫌気

表 2 反応液の組成 (1反応あたり)

組成	添加量(μL)
D.W	6.40
Forward Primer (10 μM)	0.60
Reverse Primer (10 μM)	0.60
SYBR Premix Dimer Eraser	10.0
ROX Reference Dye II	0.40
Total	18.0
サンプル or NC or PC	2.0

表 3 PCRサイクル条件

ステージ	温度	時間	サイクル数
初期変性	95℃	30秒	1サイクル
熱変性	95℃	5秒	
PCR反応	アニーリング	55℃ 34秒	40サイクル
	伸長	72℃ 34秒	
		95℃ 15秒	
		60℃ 1分	
融解曲線分析	95℃ 15秒		1サイクル
	60℃ 15秒		

表 4 使用プライマーの塩基配列

菌種	標的遺伝子	プライマー名	塩基配列
<i>C.jejuni</i>	specificDNA	AB-F	CTGAATTTGATACCTTAAGTGCAGC
		AB-R	AGGCACGCCTAAACCTATAGCT
<i>C.coli</i>	<i>ceuE</i>	ceuE-For	CAAGTACTGCAATAAAAACTAGCACTACG
		ceuE-Rev	AGCTATCACCCCTCATCACTCATACTAATAG
<i>S.Enteritidis</i>	<i>invA</i>	invA2-F	GATTCTGGTACTAATGGTGATGATC
		invA2-R	GCCAGGCTATCGCCAATAAC
<i>C.perfringens</i>	<i>cpe</i>	GAP-11	GGTTCATTAATTGAACTGGTG
		GAP-12	AACGCCAATCATATAAATTACAGC

溶液 18 μ L とサンプル 2 μ L の計 20 μ L の PCR 反応系を作成し、7500Fast Real time PCR System (ABI) の FAST Mode で解析を行った。反応液の組成を表 2 に、PCR サイクル条件を表 3 に、各菌の標的遺伝子を表 4 に示す。

また、サンプルの PCR 産物の判定は、融解曲線分析で得られた陽性コントロールの Tm 値と比較して ± 1.0 $^{\circ}$ C の範囲内のものを目的産物とした。

3 疑似便の標的遺伝子検出限界の測定

各希釈菌液 20 μ L と糞汁 180 μ L をよく混合し、疑似便とした。これを QIAamp Stool Mini Kit (QIAGEN) のプロトコールに従って DNA 抽出を行った。

表 4 の福島ら³⁾ のプライマーを使用し、方法 2 によって PCR を行った。

4 増菌培養による少量菌の標的遺伝子検出の検討

10⁵ 倍の希釈菌液 100 μ L と糞汁 900 μ L をよく混和し、疑似便を作成した。さらに、この疑似便 1mL を各増菌培地 9mL に接種し、約 10¹CFU/mL の試料液とした。

試料液を 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 時間と経時的に培養し、その都度、アルカリ抽出法によって DNA 抽出を行った。アルカリ抽出法を下記に示す。

培養液 1.0mL を 1,200rpm で 5 分間遠心後、上清 0.1mL を 12,000rpm で 10 分間遠心した。次に、上清を取り除いた沈渣に、50mM NaOH を 85 μ L 加え、100 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱した。最後に、1M Tris-HCl (pH7.0) を 15 μ L 加え、12,000rpm で 10 分間遠心後の上清をサンプルとした。

DNA サンプルを使用して方法 3 と同法の PCR を行い、検体の初期量が少量である場合に、増菌培養を行い標的遺伝子が検出可能となるまでにかかる時間を検討した。

結果及び考察

1 菌原液の生菌数の測定

ミスラ法で得られた各菌株原液の生菌数を表 5 に示す。

全ての菌種で、段階希釈での集落数の逆転

は認められず、希釈操作および培地の選択は良好であったと考えられる。

表 5 菌原液の生菌数

菌種	使用培地	生菌数 (CFU/mL) *
<i>S.Enteritidis</i>	DHL	4.67 $\times 10^8$
<i>C.jejuni</i>	CCDA	4.67 $\times 10^8$
<i>C.coli</i>	CCDA	7.15 $\times 10^8$
<i>C.perfringens</i>	GAM	4.83 $\times 10^8$

※各平板 3 枚ずつ測定し、その平均値

2 疑似便の検出限界 Ct 値の測定

測定結果を表 6 に示した。各菌種とも約 10⁴CFU/mL の疑似便まで検出することが可能であった。細菌性食中毒の急性期便では、10⁶CFU/g 以上が排菌されることが知られているが³⁾、今回の結果より、急性期便を入手することが出来れば、本反応系での標的遺伝子検出が可能であることが示唆された。

3 増菌培養による少量菌の標的遺伝子検出の検討

約 10¹CFU/mL の各試料液の Ct 値の変化を表 7 に示した。Ct 値は標的遺伝子が検出可能となった時点での PCR サイクル数のことである。

結果は、*S.Enteritidis* 及び *C.perfringens* は培養開始から 4 時間、*C.jejuni* 及び *C.coli* は 6 時間で検出が可能であった。至適条件下での各菌の doubling time (世代時間) は、ウエルシュ菌で 7 ~ 29 分、サルモネラ属菌で 23 ~ 45 分、カンピロバクターで 48 ~ 90 分と報告されている⁴⁾。今回検討した菌種のなかで *C.jejuni* や *C.coli* は、検出までに時間がかかることが予想されていたが、結果からもそのことが伺えた。

また、一部、本来検出されるべき箇所でも検出となってしまった部分もあるが、おおむね各菌ともに培養時間の延長で、Ct 値が減少した。このことから増菌培養液からの検出は、生菌由来の遺伝子証明にも応用できるこ

表6 疑似便の検出限界Ct値の測定

菌種 (標的遺伝子)	10 ¹ CFU/mL	10 ² CFU/mL	10 ³ CFU/mL	10 ⁴ CFU/mL	10 ⁵ CFU/mL	10 ⁶ CFU/mL
<i>C.jejuni</i> (specific DNA)	N.A [*]	N.A	N.A	29.46	26.25	22.69
<i>C.coli</i> (<i>ceuE</i>)	N.A	N.A	N.A	31.59	28.41	24.72
<i>S.Enteritidis</i> (<i>invA</i>)	N.A	N.A	N.A	31.57	28.18	25.29
<i>C.perfringens</i> (<i>cpe</i>)	N.A	N.A	N.A	33.86	29.68	25.91

表7 培養経過にともなうCt値の変化

菌種 (標的遺伝子)	培養開始 直後	2時間	4時間	6時間	8時間	10時間	24時間
<i>C.jejuni</i> (specific DNA)	N.A	N.A	N.A	32.04	31.08	N.A	29.97
<i>C.coli</i> (<i>ceuE</i>)	N.A	N.A	N.A	34.64	34.49	32.57	23.76
<i>S.Enteritidis</i> (<i>invA</i>)	N.A	N.A	34.17	34.05	32.39	30.36	25.77
<i>C.perfringens</i> (<i>cpe</i>)	N.A	N.A	33.75	33.43	32.15	31.99	N.A

※ Non-Amplification (非増幅) の略

とが示唆された。

まとめ

今回検討した内容より、糞便から標的遺伝子が検出可能となる初期量が得られる場合は、直接 DNA を抽出し PCR を行う方法 (直接法)、検出可能な初期量が得られないと想定される場合は、増菌培養を経て DNA を抽出し PCR を行う方法 (増菌法) の 2 種類の方法が選択可能であると考えられる。

食中毒の急性期便は、10⁶CFU/g 以上の排菌があるとされているので、通常では、直接法での検出が可能であると考えられる。しかし、検査に十分な量が得られない、あるいは急性期便が入手出来ないといった事例にあった場合に増菌法は、有利であることが結果から示唆された。

さらに、増菌法は経時的に増菌培養することで、Ct 値の減少から生菌由来の遺伝子であることの証明にもなると考えられる。

以上から、細菌性食中毒検査のスクリー

ニング検査として遺伝子検査を導入することは、早期の原因菌の推定が可能となり得ると考えられる。今後は、反応系を改良し、より迅速で正確なスクリーニング検査法の確立を目指したい。

引用文献

- 1) 福島県 「食品安全のページ」 食中毒発生状況
<http://www.pref.fukushima.jp/eisei/syokuan/syokuhin1/syokuhin/foodpoison/kotoshi.htm> 2013/1/30
- 2) 坂崎利一, 吉崎悦郎, 三木寛二. 新 細菌培地学講座・上<第二版>. 東京: 株式会社近代出版, 1986; 182-190.
- 3) 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. 感染症学雑誌 2005; 79: 644-655.
- 4) 大阪府生菓子協同組合 安全衛生管理に関する参考情報
http://www.wagashi-osaka.or.jp/manual/09_06.html 2013/1/30