

資料

食中毒原因食品からの サルモネラ及びカンピロバクター遺伝子検出法の確立（第I報）

上野 伸 広 上村 晃 秀 湯田 充 典
 養田 祥 子 吉國 謙一郎 本田 俊 郎¹
 藤崎 隆 司

1 はじめに

本県（鹿児島市を除く）の食中毒発生状況は、2004年度の21件をピークに年々減少し、2008年度は8件の発生となっている。そのうち、病因物質がサルモネラあるいはカンピロバクターと特定された事例は2004年度にそれぞれ7件と1件、2005年度4件と2件、2006年度5件と1件、2007年度1件と2件、2008年度1件と2件の報告があり、5年間の食中毒総数66事例の中でも上位を占める。

しかしながら、推定原因食品現品を検査に供したにもかかわらず、病因物質の検出に至っていない事例も少なくない（表1）。

これら検出できない原因として、菌の死滅あるいはVNC (viable but non-culturable) が考えられるが、食品等に残存する病原性微生物の遺伝子を検出することで、食中毒原因食品及び汚染経路の特定に寄与することが可能となる。

本研究は当センター調査研究事業として、2008年度か

ら3ヶ年計画で実施予定で、初年度はリアルタイムPCRシステム LightCycler 2.0 (Roche) を使用して、条件設定を行ったので報告する。

2 方法

2.1 リアルタイムPCR

リアルタイムPCRは、SYBR Green 1 を利用したインターカレーター法により実施した。LightCycler 2.0の専用試薬LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green 1を使用し、検討したプライマー、反応混液調製方法、反応条件をそれぞれ表2、表3、表4に示した。

なお、測定に使用したサルモネラ (SE) 及びカンピロバクター菌株 (*C. jejuni*, *C. coli*) は、臨床分離株を用い、加熱処理 (100°C10分) 後、テンプレートとした。

2.2 サルモネラ

至適PCRアニーリング温度を探るため、Tm値より低い51°Cから3°Cずつ上げながら測定を繰り返した。メルティングピークで増幅産物の融解温度を確認し、非特異反応が消失した温度を至適アニーリング温度とした。

反応条件を決定した後、プライマー濃度を変えながら、検出感度を調べ、至適プライマー濃度も検討した。

2.3 カンピロバクター

PCRアニーリング温度をTm値より5°C低い53°Cから66°Cまで変更しながら、増幅産物の融解温度を確認し、非特異反応が出現しなくなる温度を探った。

また、*C. jejuni*と*C. coli* のMultiplex Real Time PCRの反応条件についても検討した。

表1 推定原因食品からの病因物質検出事例

(2004～2008年度、鹿児島市を除く)

原因物質	有症者便		推定原因食品現品		未搬入	
	検出	非検出	確保あり	なし		
細菌	サルモネラ	16		6(4)	10	2
	カンピロバクター	7		2(0)	5	1
	ブドウ球菌	6		5(5)	1	
	腸炎ビブリオ	2			2	
	その他	3			3	
ウイルス	ノロウイルス	18		4(0)*		
	アストロウイルス	1		1(0)		
不明		4	3(0)	1		
自然毒等					6	

(注)：() 中数値は食品から原因物質を検出できた事例数

*：NVは食品を検査した事例数を計上

1 鹿児島県立大島病院

〒894-0015 鹿児島県奄美市名瀬真名津町18-1

表2 プライマーの塩基配列

目的菌	増幅遺伝子		塩基配列 (5'-3')	Tm(°C)	増幅産物	参考文献
Genas <i>Salmonella</i>	<i>invA</i>	sense	TTT CTC TAT TGT CAC CGT GG	54.3	212bp	1)
		antisense	CGT CAA AGG AAC CGT AAA G	53.9		
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>hippuricase</i>	Forward	CGA TGA TGG CTT CTT CGG ATA	56.5	111bp	2)
		Reverse	CCA CAA GCA AAG AAG CAG CAT A	56.7		
<i>Campylobacter coli</i>	<i>cdt</i>	Forward	AGG CGC CTT AGT AAC CTT GCT A	58.6	73bp	2)
		Reverse	CGT AGA AGA AGG CGG AAC AAC TAC	60.5		

表3 反応混液の調製

試料	濃度	1test	最終濃度
DNA Master SYBR Green 1	×10	2.0μL	×1
MgCl ₂ 溶液	25mM	2.4μL	4mM*
Primer混液 F/R	10μM	1.0μL	0.5μM
DW		12.6μL	
Working solution		18.0μL	
テンプレート		2.0μL	
合計		20.0μL	

* : 計算上3mMとなるが, DNA Masterに1mM添加されている。

表4 反応条件 (LightCycler 2.0)

Analysis Mode	Temperature	Hold Time	Acquisition Mode
Denature (Hot Start)	95°C	10min	none
PCR 45cycle	Denaturation	95°C	10sec
	Annealing	51-66°C	10sec
	Extension	72°C	10sec*2
Melting	Denaturation	95°C	0sec
	Annealing	56-71°C*1	15sec
	Melting	95°C Slope=0.1°C/sec	0sec
Cooling	40°C	30sec	none

*1 : PCRのAnnealing温度+5°Cに設定した。

*2 : カンピロバクターは増幅産物が小さいため, 5secで実施

3 結果

3.1 サルモネラ (*invA*遺伝子)

3.1.1 PCRアニーリング温度の設定

サルモネラの希釈系列を試料として, アニーリング温度を51°C, 54°C, 57°C, 60°Cと条件を変更して測定した。サルモネラの陽性試料は, 86°C付近に融解温度のピークを認めた。また, アニーリング温度51~57°Cでは融解温度74°C付近に非特異反応を認めたが, 60°Cでは非特異反応がほぼ消失したため, 至適アニーリング温度を60°Cとした (図1)。

前述の検討を行った際に得られた陽性反応38件について, 増幅産物の融解温度を求めたところ, 平均86.483°C, 標準偏差0.097であった。この融解温度はアニーリング温度の差に関係なく, 同様の結果が得られた。

3.1.2 プライマー濃度と検出感度

本検討で使用した機器と専用試薬による組み合わせでは, プライマー最終濃度の初期設定として0.5mMが一般的であるが, 検討段階では0.3~1.0mMを目安にすることが推奨されている。

そこで, 最終濃度0.3, 0.5, 1.0mMとなるよう調製し, 希釈系列試料を測定したところ, 実測値 $4 \times 10^2 \sim 8 \times 10^2$ cfu/mL付近にそれぞれの検出限界値があることが推察された。そのため, 4×10^3 と 8×10^2 cfu/mLの2試料に

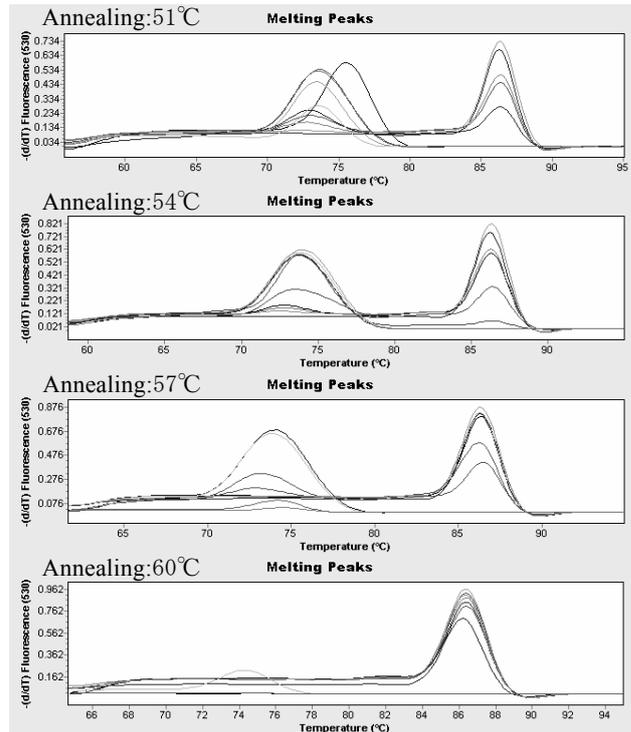


図1 サルモネラ融解温度

表5 5回測定での検出回数

実測菌数	プライマー最終濃度		
	0.3mM	0.5mM	1.0mM
8×10^2 cfu/mL	3	4	4
4×10^2 cfu/mL	3	4	4

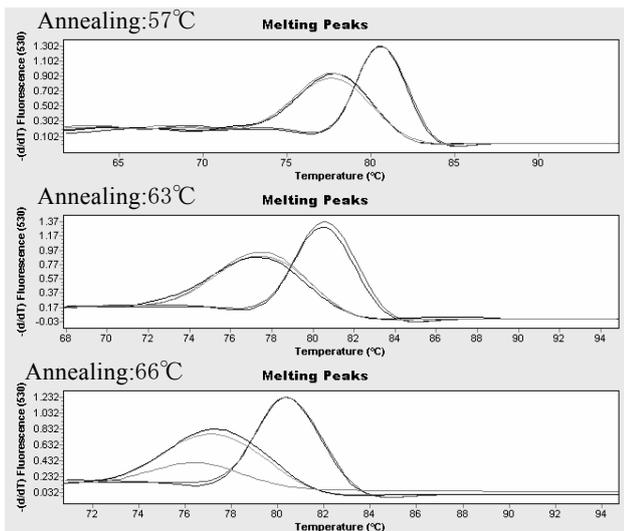


図2 *C. jejuni*融解温度

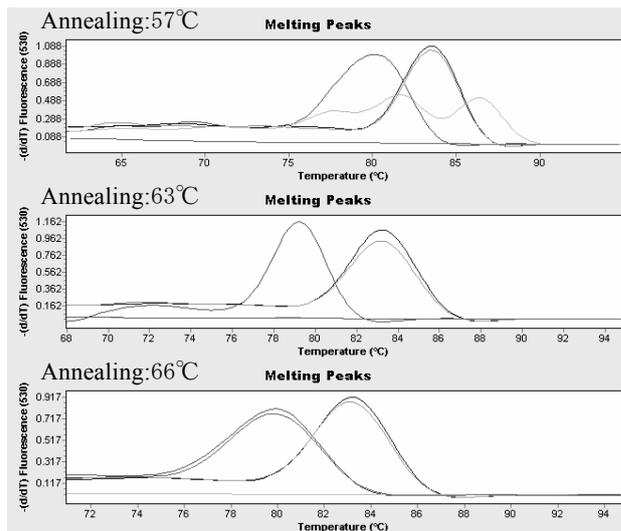


図3 *C. coli*融解温度

ついて、各条件で5回測定を行ったが、明確な差は得られなかった(表5)。さらに厳しい条件下での比較が必要であった。

3. 2 カンピロバクター

3. 2. 1 PCRアニーリング温度の設定

(1) *Campylobacter jejuni*

試料は*C. jejuni*, *C. coli*, *C. jejuni* + *C. coli*, SE と陰性コントロールの5種類を使用し、アニーリング温度を53°C, 57°C, 60°C, 63°C, 66°Cと条件を変更して測定した。

いずれの温度でも*C. jejuni*の陽性試料は、融解温度81°C付近(平均80.611°C, 標準偏差0.128)にピークを認めた。アニーリング温度を66°Cまで上げたが、非特異反応は消失しなかった。非特異反応の融解温度が78°C付近であったことから、区別は可能であった。

各アニーリング温度での非特異反応には大差はなかったものの、66°Cでの陰性コントロールの反応が減衰したことから、検討した範囲ではアニーリング温度66°Cが適当と思われた(図2)。

(2) *Campylobacter coli*

*C. jejuni*と同様に測定したところ、*C. coli*の陽性試料は、融解温度83°C付近(平均83.456°C, 標準偏差0.137)にピークを認めた。いずれのアニーリング温度でも非特異反応が出現したが、63°Cと66°Cでは非特異融解温度が80°C付近であったため、区別が可能であった。検討した範囲では、アニーリング温度63°Cか66°Cが適当と思われた(図3)。

(3) Multiplex Real Time PCR

*C. jejuni*と*C. coli*のプライマーを同じ濃度で加え、こ

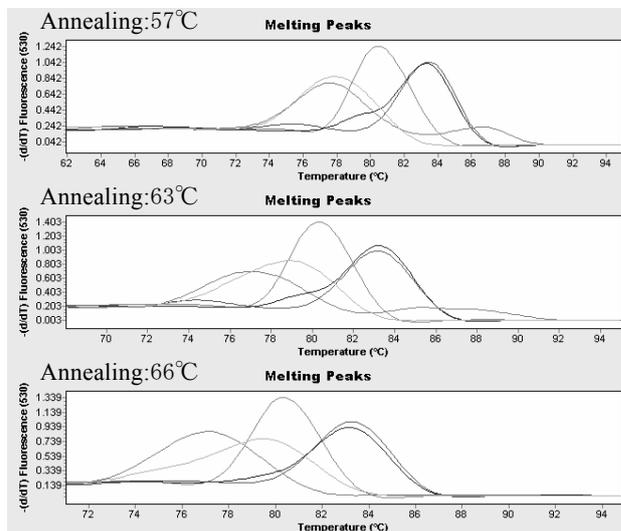


図4 Multiplex Real Time PCR

れまでと同様に測定した。

いずれのアニーリング温度でも非特異反応が認められ、温度が上がるほど陰性コントロールが*C. jejuni*の融解温度の81°C付近に移動する傾向にあった。

また、*C. jejuni*と*C. coli*を同じ濁度で混合した試料は、*C. coli*の産物のみ増幅される傾向にあった(図4)。

今回の検討では、Multiplex Real Time PCRの条件設定は困難であった。

4 考察

インターカレーター法は、陰性コントロールでも非特異反応が出現しやすいことでも知られている。そのため、当初からMgCl₂濃度を通常より高く設定し、アニーリング温度を上げることで非特異反応を回避しようと考えた。これにより、サルモネラでは非特異反応を抑制する

ことができたが、カンピロバクターでは抑制できなかった。

サルモネラについては、使用可能な基礎的条件の設定ができ、現状でもスクリーニング検査には使用可能と思われるが、検出感度と特異性をさらに向上させるためにも、プライマーやMgCl₂濃度など、いくつかの課題を明確にする必要がある。

カンピロバクターについては、基礎的条件設定のため、さらに追加試験が必要と思われた。非特異反応を消失させることができない現状では、目的増幅産物の融解温度と区別が可能であるか、多種多彩な検体を測定し、結果を集積する必要がある。或いは*C. jejuni / coli* 両方を捉えるプライマーの設計を試みることも、一つの手段かもしれない。

カンピロバクターのMultiplexに関しては、条件設定の困難が予想され、*C. jejuni / coli* の増幅効率の違いによる結果の信憑性に問題が残ることも考えられることから、当面の検討項目からは外すこととする。

リアルタイムPCRはいくつものメーカーから多くの機種が発売されているが、メーカーや機種または試薬により、設定条件やデータに違いがある。今回得られた結果は、LightCycler 2.0と専用試薬を使用した結果であって、他の組み合わせでは良好な結果が得られることも十分考えられる。

今後の検討により、インターカレーター法を軌道に乗せることは難しいことではないと思われる。しかし、次のステップとして、液体培地や食品または便などに含まれるPCR阻害物質をどのように取り除き、DNAを効率よく精製・濃縮していくかが、最も大きな課題と考える。

5 まとめ及び感想

本研究でインターカレーター法を初めて経験した。考えていたより反応も早く1時間程度で結果が判明し、迅速性に優れた方法であった。

リアルタイムPCRは感度と特異性が高くかつ迅速な結果が得られることから、ノロウイルス、新型インフルエンザの台頭に乗じて急速に普及してきた。このリアルタイムPCRには測定原理の違いにより、インターカレーター法以外にもTaqManプローブ法など、いくつかの方法があり、微生物の分野では感度と特異性の優れたTaqManプローブ法が広く用いられている。しかし、高価な試薬が必要なため、細菌検査のように培養できるものについての、スクリーニング的なリアルタイムPCRは一般的には行われていない。

このようなことから、本研究ではリアルタイムPCRの中でも最も安価な試薬で検査可能なインターカレーター法に着目した。この方法は、特異性を得るための高価なプローブを使用せず、代わりに融解温度により増幅産物の真偽を判断することから、基礎的な検討が重要となってくる。

この安価なインターカレーター法を軌道に乗せることで、文頭で示した、食中毒の推定原因食品から病原性遺伝子を検出するだけに留まらず、食中毒発生当日に原因菌を遺伝子レベルで推定することも不可能ではない。

謝辞

*Campylobacter coli*を分与してくださいました熊本県保健環境科学研究所微生物科学部に対し深謝いたします。

参考文献

- 1) 細井知弘；液卵中サルモネラのリアルタイムPCRによる迅速検出，東京都立食品技術センター研究報告，13，8～12（2004）
- 2) 村瀬浩太郎，清水寧，下原悦子；リアルタイムPCRを用いた*Campylobacter jejuni*および*Campylobacter coli*の迅速検出法の検討，第34回九州衛生環境技術協議会抄録，67～68，平成20年10月9日