

## 資料

### リアルタイム PCR 法による 散発性下痢症患者便検査の 迅速スクリーニングの実施

伊東久美子, 石原ともえ, 黒木俊郎

#### Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of pathogens in Stools

Kumiko ITOH, Tomoe ISHIHARA  
and Toshiro KUROKI

神奈川県衛生研究所では、感染症発生動向調査の一環として県域内の小児科定点医療機関で感染性胃腸炎と診断された散発性下痢症患者便の腸管系病原菌検査を実施している。散発性下痢症患者便から分離された病原菌については、分子疫学等性状や薬剤感受性試験などを実施しその情報を集積しており、異なった散発事例間の関連性を推測し、集団発生の予防や疾病の治療等の基礎データとして活用したいと考えている。それには病原菌を効率よく確実に検出することが重要になる。

当所に医療機関から搬送される患者便の多くは採取される便の量が少なく、また週1回の回収日まで医療機関で保管されていた検体であるため、検査日までの間に菌の活性が落ちていたり、菌が死滅していることも考えられ、検出率が低下している可能性がある。従来から患者便の病原菌検査は培養法で行っており、病原菌ごとに異なる選択分離培地による培養や性状試験を必要とするため、作業が煩雑で病原菌の確定までに1週間近くを要する。近年は培養法以外に、糞便から直接に病原菌のDNAを抽出し、PCR法を利用して細菌の推定を迅速に行う方法が発表されている<sup>1,2)</sup>。特にリアルタイムPCR法は従来のPCR法より短時間で検出でき、菌数の定量もできることから、食中毒の原因菌推定の迅速スクリーニングとして福島<sup>3)</sup>はリアルタイムPCR法の有効な活用法を報告している。

神奈川県衛生研究所 微生物部  
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

そこで今回、菌の生存性が少ないと思われる散発性下痢症糞便においても、糞便から直接、病原菌の遺伝子を検出することで迅速に菌をスクリーニングできるリアルタイムPCR法を従来の培養法と並行して実施し、培養法から効率よく確実に菌を検出するための手法として活用できるか、その有用性を検討した。

検体である散発性下痢症患者便は平成19年7月から平成20年12月に医療機関から搬送された278件で、リアルタイムPCR法の対象にした病原菌はカンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*)、カンピロバクター・コリ (*Campylobacter coli*)、サルモネラ (*Salmonella* spp.) およびウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) とした。

患者便は綿棒にて採取して滅菌生理食塩水1ml中に懸濁し、リアルタイムPCR法および培養法の試料とした。

培養法は成書<sup>4)</sup>に従って直接培養と増菌培養を行い、菌の分離・同定を実施した。

DNAの抽出はQIAamp DNA Stool Mini kitを用い、リアルタイムPCR法はSmart Cycler<sup>®</sup> II System (Cepheid社)を使用して測定した。検出方法は福島<sup>3)</sup>のDuplexリアルタイムPCR法(以下、リアルタイムPCR法)を参考にし、SYBR Greenを用いたインターカラー法で、反応試薬はSYBR Premix EX Taq<sup>™</sup> (タカラバイオ)を用いた。

表1 陽性コントロールとして使用した病原菌と検出用プライマー

病原菌	検出用プライマー		
	標的遺伝子	シーケンス	
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>gyrA</i>	JL238	TGGGTGCTGTTATAGGTCGT
		JL239	GCTCATGAGAAAGTTACTC
<i>Campylobacter coli</i>	<i>ceuE</i>	CCceuE-F	ACGCGCACAAAGGCATACCT
		CCceuE-R	CCAGTATTCAGGATCAAGATAAATGATTT
<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>invA</i>	invA-F	CATTGTGGGGCCCAAGA
		invA-R	ACAAATATAACGCGCCATTGC
<i>Clostridium perfringens</i>	enterotoxin	CPE-F	CTGCAGATAGCTTAGGAAATATTGATCA
		CPE-R	GCAGCTAAATCAAGGATTTCTTTTTCT

表1に陽性コントロールとして使用した病原菌と検出用プライマーを示した。陽性コントロールは当所の分離菌株を使用し、プライマーは論文<sup>5)</sup>より選択した。PCR反応終了後、融解曲線分析による $T_m$ 値(melting temperature)を確認し、陽性コントロールと同一の $T_m$ 値を示した検体を陽性と判定した。増菌培養液についてもDNAを抽出してリアルタイムPCRを行った。

2種類の菌を組み合わせたDuplex-PCRはサイク

表2 リアルタイム PCR および培養法による病原菌の検出状況

検体 No.	検出病原菌	試料液		増菌培養液	
		リアルタイム* PCR法	培養法*	リアルタイム* PCR法	培養法*
1	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
2	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
3	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
4	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
5	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
6	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
7	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
8	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
9	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
10	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
11	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
12	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
13	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
14	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
15	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
16	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
17	<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	+	+
18	<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	+	+
19	<i>Campylobacter jejuni</i>	-	+	+	+
20	<i>Campylobacter jejuni</i>	-	+	+	+
21	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	-	+	+
22	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	-	-	-
23	<i>Salmonella</i> Poona	-	+	+	+
24	<i>Salmonella</i> Enteritidis	-	+	+	+
25	<i>Salmonella</i> Enteritidis	-	+	+	+
26	<i>Salmonella</i> Abony	-	+	+	+
27	<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	-	+	+	+
28	<i>Clostridium perfringens</i>	+	+	+	+
29	<i>Clostridium perfringens</i>	+	+	+	+

\* リアルタイムPCR法 : 陽性(+), 陰性(-)  
培養法

ル数が増えるに従ってプライマーダイマーが出来やすくなり、目的とする DNA 産物の検出を妨げる原因となったため適正サイクル数を検討し、一律35サイクルで実施した。さらに *Tm* 値の違いによる菌の組み合わせを考慮して、Duplex-PCR はカンピロバクター・ジェジュニとウエルシュ菌およびカンピロバクター・コリとサルモネラのセットで測定した。

リアルタイム PCR 法による対象菌の添加回収試験は、糞便の滅菌生理食塩水10倍懸濁液に陽性コントロールとして使用した病原菌の段階希釈液をそれぞれ接種し、検体と同様に DNA 抽出して測定したところ、4 菌種ともに検出感度は糞便 1g あたり、 $10^5$  個であった。

リアルタイム PCR 法および培養法による病原菌の検出状況を表2に示した。カンピロバクターについては試料液からのリアルタイム PCR 法と培養法の両方法またはどちらか一方で菌の確認が出来たのは22検体 (No. 1~22) であり、全てカンピロバクター・ジェジュニであった。試料液では、リアルタイム PCR 法と培

養法の両方法が陽性となった検体は16検体 (No. 1~16)、リアルタイム PCR 法と培養法の両方法が陰性となった検体は2検体 (No. 17, 18) であった。両方法における結果が一致しなかったのは、リアルタイム PCR 法陰性で培養法陽性の2検体 (No. 19, 20) と、リアルタイム PCR 法陽性で培養法陰性の2検体 (No. 21, 22) であった。増菌培養液では No. 1~21 はリアルタイム PCR 法と培養法ともに陽性であったことから、No. 17, 18 の2検体は糞便中の菌量がリアルタイム PCR 法の検出限界以下であり、菌の活性も落ちていたと考えられた。No. 19, 20 の2検体は糞便中の菌量がリアルタイム PCR 法の検出限界以下であったと推察され、No. 21 の検体はリアルタイム PCR 法の検出限界以上の菌量はあるものの、菌の活性が落ちていた可能性があると考えられる。さらに、No. 22 の検体は試料液のリアルタイム PCR 法陽性で培養法は陰性であった。この検体の DNA 抽出液を用いて Linton ら<sup>6)</sup> および Inglis ら<sup>7)</sup> の方法で通常の PCR 法を行い、増幅産物を泳動後、バンド位置を確認したところ、両方法ともにカンピロバクター・ジェジュニ陽性コントロールと一致し、通常の PCR 法でもカンピロバクター・ジェジュニであると判定された。この検体の増菌培養液からのリアルタイム PCR 法と培養法の両方法が陰性であったことにより、No. 22 は菌が死滅していた可能性が考えられた。

サルモネラは試料液からの培養法で5検体 (検体 No. 23~27) から検出されたが、リアルタイム PCR 法は全て陰性であった。増菌培養液からはリアルタイム PCR 法と培養法の両方法が陽性であった。これら5検体は糞便中の菌量がリアルタイム PCR 法の検出限界以下であると推察された。

ウエルシュ菌は、2検体 (検体 No. 28, 29) ともに試料液からのリアルタイム PCR 法と培養法の両方法が陽性であった。この2検体の糞便直接からのエンテロトキシン産生試験を PET-RPLA (デンカ生研) で実施したところ、エンテロトキシンの産生が確認された。さらに2検体から分離した菌株について、ウエルシュ菌毒性遺伝子検出用プライマー (タカラ) で通常の PCR 法を行ったところ、エンテロトキシン産生

遺伝子の保有も確認された。この2検体から検出されたウエルシュ菌分離株はいずれも Hobbs の血清型別 (デンカ生研) では型別不能であった。

糞便の試料液からのリアルタイム PCR 法は、カンピロバクター・ジェジュニでは培養法と結果がほぼ一致し、菌の活性が落ちていたり、死滅していると思われる検体でもリアルタイム PCR 法は有用であった。一方、リアルタイム PCR 法陰性で培養法陽性となった検体はカンピロバクター・ジェジュニ検出の2検体とサルモネラ検出の5検体であったが、増菌培養液から DNA 抽出することにより、検出限界以下の菌を検出できた。

ウエルシュ菌はエンテロトキシン遺伝子を標的としたプライマーを使用しており、リアルタイム PCR 法陽性の検体は、同日中に糞便中のエンテロトキシン産生試験を実施して、翌日判定することができる。また、急性期の患者便には1グラム当たり $10^6$ 個以上の菌が排泄され<sup>3)</sup>るが、健康な人からも少量ではあるが排泄される。リアルタイム PCR 法陽性であることは菌量が検出限界以上であることを示しており、健康な人との鑑別が容易になり、下痢症の原因菌推測の指標となった。

散発性下痢症患者便は便量が少量であることが多い。このため、患者便から直接的に病原菌をスクリーニングするリアルタイム PCR 法においては、菌量が検出限界以下であることも多く、糞便からのリアルタイム PCR による直接検出は困難であった。このような検出限界以下の菌でも増菌培養液からの DNA 抽出により、菌の検出は可能であった。特に菌の発育が遅く培養に長時間かかるカンピロバクターの検索にはリアルタイム PCR 法は有効であると思われた。ウエルシュ菌のリアルタイム PCR 法陽性の検体は、培養検査での確実な菌の分離とその後に続く性状検査や病原因子の確認検査の迅速な対応が可能となる。健康な人からも検出されるウエルシュ菌のように菌量と病原因子を証明する必要のある菌の検索にはこのスクリーニング

法は有効であると考えられた。

今後の課題としては、菌量が少ない検体の DNA をいかに効率よく抽出するか、さらに特異性の高い検出方法で、しかも安価で簡便な方法の確立が必要となると考える。

最後に、本調査にご協力いただきました小児科定点医療機関および健康増進課の方々、ならびに Duplex リアルタイム PCR 法について貴重なご助言をいただきました島根県保健環境科学研究所保健科学部長の福島博先生に深謝いたします。

(平成21年8月11日受理)

#### 参考文献

- 1) 田栗利紹, 野口栄太郎, 平山文俊: マルチプレックス PCR を用いた食中毒起因細菌一括検出方法, 長崎県衛生公害研究報, 48, 43-56 (2002)
- 2) 江崎孝行, 大楠清文: 腸内フローラの同定: DNA プローブとプライマー, 腸内細菌学雑誌, 20, 245-258, (2006)
- 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, 79, 644-655, (2005)
- 4) 坂崎利一編: 新訂 食水系感染症と細菌性食中毒, 中央法規出版, pp. 90-118, 336-362, 396-407, (2000)
- 5) 福島博: 食中毒検査・診療のコツと落とし穴, 渡辺治雄編, 中山書店, pp. 52-54, (2006)
- 6) Linton D., Lawson A. J., Owen R. J. and Stanley J.: PCR detection, Identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples, J. Clin. Microbiol., 35, 2568-2572 (1997)
- 7) Inglis G. Douglas, Lisa D. Kalischuk: Use of PCR for Direct Detection of *Campylobacter* Species in Bovine Feces, Applied and Environmental Microbiology, 69, 3435-3447 (2003)