

リアルタイム PCR 法による三類感染症の迅速検査法の検討

田村佐和子・久保田晶子・生石育代・阿部有利

福岡市保健環境研究所保健科学課

Improvement of Rapid Real-Time PCR Assays for Detecting Pathogens of Category III Infectious Diseases

Sawako TAMURA, Akiko KUBOTA, Ikuyo OISHI and Yuri ABE

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

発生時に迅速な対応が求められる三類感染症について、迅速かつ特異性の高い検査法の確立を目的に、各病原体についてリアルタイム PCR (qPCR) 法による遺伝子検出法の検討を行った。各病原体に特徴的な遺伝子をターゲットにインターカレーター法及び TaqMan プローブ法の 2 種類の検出系について検討し、検出感度の確認を行った。検討した検出系が糞便からのスクリーニング検査に導入可能であるか、糞便の増菌培養液に各病原体の希釈調整菌液を添加した糞便増菌培養菌液を模擬検体として、検出感度の確認を行った。各病原体における糞便増菌培養菌液での検出下限値は、インターカレーター法で赤痢菌： 1.8×10^3 cfu/mL、コレラ菌 (O1)： 1.2×10^3 cfu/mL、サルモネラ属菌： 1.7×10^3 cfu/mL、TaqMan プローブ法で腸管出血性大腸菌： 1.7×10^3 cfu/mL、赤痢菌： 1.8×10^2 cfu/mL、コレラ菌 (O1)： 1.2×10^2 cfu/mL、コレラ菌 (O139)： 8.3×10^2 cfu/mL、チフス菌： 3.8×10^2 cfu/mL、パラチフス A 菌： 4.9×10^2 cfu/mL、サルモネラ属菌： 1.7×10^2 cfu/mL であった。糞便中に含まれる DNA 増幅阻害物質の影響を受けやすい糞便増菌培養液で、全ての病原体において十分な検出感度が確認され、本法は三類感染症の迅速遺伝子検査法として有用であることが示された。

Key Words : リアルタイム PCR Real-Time PCR, 腸管出血性大腸菌 enterohemorrhagic *Escherichia coli*, 赤痢菌 *Shigella* spp., コレラ菌 *Vibrio cholerae*, チフス菌 *Salmonella* Typhi, パラチフス A 菌 *Salmonella* Paratyphi A

1 はじめに

福岡市保健環境研究所では、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（以下、「感染症法」とする。）の分類における三類感染症の発生時に、感染症法に基づき、患者や接触者等の病原体検査を実施している。三類感染症の中でも腸管出血性大腸菌（以下、「EHEC」とする。）や赤痢菌による感染症は発生頻度が高く、乳幼児や高齢者では症状が重篤化することがあり、保育園等での集団感染のリスクも高い。そのため、他の感染者の早期発見やまん延防止の措置が必要となり、迅速かつ正確に検査結果を還元することが求められている。

当所での検査方法は図 1 に示すとおり、便から直接分離培養と増菌培養を並行して行い、増菌培養後の増菌液から、病原体に特徴的な遺伝子について PCR によるスク

リーニング検査を実施している。スクリーニング検査陽性時には、増菌液からも分離培養を行う。目的の病原体について菌の分離と同定、特徴的な遺伝子の確認等を行い、結果を判定している。細菌の分離・同定には一定の時間を要するため、検査の迅速化には、遺伝子検査法の改良が求められる。当所では、平成 30 年度から EHEC のベロ毒素（以下、「VT」とする。）遺伝子検査にリアルタイム PCR（以下、「qPCR」とする。）法を導入しているが、その他の三類感染症病原体（赤痢菌、コレラ菌、チフス菌、パラチフス A 菌）の遺伝子検査については、コンベンショナル PCR 法を用いており、qPCR 法と比較すると結果の還元までに時間を要していた。

そこで、三類感染症の病原体検査について、迅速かつ特異性の高い検査法の確立を目的に、qPCR 法による遺伝子検出法の検討を行った。なお、検査体制の強化のため、検出特異性は高いが検査コストが高い TaqMan プロ

ープ法と、検査コストが安く反応系の構築も容易だが TaqMan プローブ法に比べて検出特異性に劣るインターカレーター法の2種類の検出系で検討を行った。

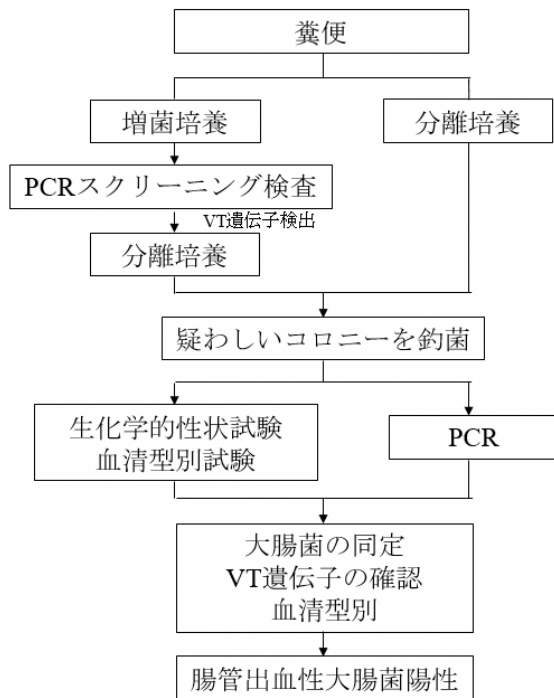


図1 便からの検査手順（腸管出血性大腸菌）

2 実験方法

2.1 qPCR 検出系の検討と検出感度の確認

2.1.1 使用菌株及び使用培地

当所保存の6菌種7株（表1）を用い、菌数計測及び増菌培養に表2の培地を使用した。

表1 使用菌株

対象疾病	菌種
腸管出血性大腸菌感染症	enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EHEC) (O157 VT1,2)
細菌性赤痢	<i>Shigella sonnei</i>
コレラ	<i>Vibrio cholerae</i> (O1) <i>Vibrio cholerae</i> (O139)
腸チフス	<i>Salmonella</i> Typhi
パラチフス	<i>Salmonella</i> Paratyphi A
サルモネラ感染症 (腸チフス・パラチフス含む)	<i>Salmonella</i> Oranienburg

表2 使用培地

菌種	菌数計測用培地	増菌用培地
EHEC <i>S. sonnei</i> <i>S. Typhi</i> <i>S. Paratyphi A</i> <i>S. Oranienburg</i>	標準寒天培地	Tryptic Soy Broth (TSB) 培地
<i>V. cholerae</i>	Trypto Soya Agar (TSA) 培地	アルカリペプトン水

2.1.2 インターカレーター法

1) プライマー

3菌種の標的遺伝子検出用に4種類のプライマーを選定した（表3）。また、PCR内部増幅標準（以下、「IAC」とする。）として、*Yersinia ruckeri* (JCM15110) から抽出したDNAを用い、*Y. ruckeri*の16S rRNA遺伝子を増幅するIAC検出用プライマーを使用した（表3）。

表3 プライマー（インターカレーター法）

セット	菌種	標的遺伝子	名称	塩基配列 (5'→3')	増幅産物の大きさ (bp)	Tm値	文献																																
A	<i>S. sonnei</i>	<i>ipaH</i> 細胞侵入性因子遺伝子	ipaH1672-F	CTCTCAGAGGGTGGCTGACC	90	85.2	1																																
			ipaH1761-R	TCACGCATCACCTGTGCA				B	<i>V. cholerae</i>	<i>ctxA</i> コレラ毒素遺伝子	ctxA-F	TCCGGAGCATAGAGCTTGGA	120	82.9	2	ctxA-R	TCGATGATCTTGGAGCATTCC	<i>ompW</i> 種特異外膜タンパク遺伝子	ompW-F	AACATCCGTGGATTGGCATCTG	89	80.9	1	ompW-R	GCTGGTTCCTCAACGCTTCTG	C	<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i> 侵入性因子関連遺伝子	invA139	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA	284	85	3	invA141	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	IAC	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>16S rRNA</i>	yers-F
B	<i>V. cholerae</i>	<i>ctxA</i> コレラ毒素遺伝子	ctxA-F	TCCGGAGCATAGAGCTTGGA	120	82.9	2																																
			ctxA-R	TCGATGATCTTGGAGCATTCC						<i>ompW</i> 種特異外膜タンパク遺伝子	ompW-F	AACATCCGTGGATTGGCATCTG	89	80.9	1	ompW-R	GCTGGTTCCTCAACGCTTCTG	C	<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i> 侵入性因子関連遺伝子	invA139	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA	284	85	3	invA141	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	IAC	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>16S rRNA</i>	yers-F	GGAGGAAGGGTTAAGTGTTA	68	77.3	1	yers-R	GAGTTAGCCGGTGCTTCTT		
		<i>ompW</i> 種特異外膜タンパク遺伝子	ompW-F	AACATCCGTGGATTGGCATCTG	89	80.9	1																																
			ompW-R	GCTGGTTCCTCAACGCTTCTG				C	<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i> 侵入性因子関連遺伝子	invA139	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA	284	85	3	invA141	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	IAC	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>16S rRNA</i>	yers-F	GGAGGAAGGGTTAAGTGTTA	68	77.3	1	yers-R	GAGTTAGCCGGTGCTTCTT												
C	<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i> 侵入性因子関連遺伝子	invA139	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA	284	85	3																																
			invA141	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC				IAC	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>16S rRNA</i>	yers-F	GGAGGAAGGGTTAAGTGTTA	68	77.3	1	yers-R	GAGTTAGCCGGTGCTTCTT																						
IAC	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>16S rRNA</i>	yers-F	GGAGGAAGGGTTAAGTGTTA	68	77.3	1																																
yers-R	GAGTTAGCCGGTGCTTCTT																																						

2) qPCR 反応条件

qPCR 装置には QuantStudio 5 (ライフテクノロジーズ ジャパン) を用い, 反応試薬には TB Green® Premix DimerEraser™ (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を用いた. PCR 反応液の組成は表 4 のとおりである. 表 5 に示す反応条件で PCR を行い, 増幅曲線で増幅を確認し, 増幅産物の融解曲線分析で標的遺伝子の陽性コントロールと同一の Tm 値が得られたものを陽性とした.

表 4 PCR 反応液の組成 (インターカレーター法)

試薬	使用量 (μL)
TB Green Premix DimerEraser	10
ROX Reference Dye II	0.4
Primer F (10 μM)	0.6
Primer R (10 μM)	0.6
IAC Primer F (10 μM)	0.6
IAC Primer R (10 μM)	0.6
滅菌精製水	3.2
IAC DNA	2
template DNA	2
計	20

表 5 PCR の反応条件 (インターカレーター法)

ステージ	温度 (°C)	時間 (秒)	サイクル数
初期変性	95	30	1サイクル
	95	3	
PCR反応	55	34	35サイクル
	72	40	
	95	15	
融解曲線分析	60	60	1サイクル
	95	15	

2.1.3 TaqMan プローブ法

1) プライマー及びプローブ

6 菌種の標的遺伝子検出用に 10 種類のプライマー及びプローブを選定した (表 6). また, IAC として, 16S rRNA 遺伝子又は人工合成遺伝子を用い, 各 IAC を増幅する IAC 検出用プライマー及びプローブを使用した (表 6).

2) qPCR 反応条件

qPCR 装置には QuantStudio 5 (ライフテクノロジーズ ジャパン) を用い, 反応試薬には Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を用いた. PCR 反応液は Premix Ex Taq™ の添付説明書に従い調製し, 表 6 に示す

終濃度になるようプライマー及びプローブを混合し, 人工合成遺伝子 1 μL (IAC として人工合成遺伝子を用いる場合), 鋳型 DNA 5 μL を加えて計 25 μL の反応系とした. 表 7 に示す反応条件で PCR を行い, 増幅曲線で Ct 値が得られたものを陽性とした.

表 7 PCR の反応条件 (TaqMan プローブ法)

ステージ	温度 (°C)	時間 (秒)	サイクル数
初期変性	95	30	1サイクル
PCR反応	95	5	45サイクル
	60	20	

2.1.4 検出感度の確認

各供試菌株を表 2 の菌数計測用培地で 36°C, 24 時間培養後, 分離されたコロニーを滅菌生理食塩水に懸濁し, McFarland Standard 4 (ビオメリュー・ジャパン) に濁度を合わせた調整菌液を作成した. 各菌株の調整菌液を滅菌生理食塩水で段階希釈を行い, 希釈系列を作成して段階希釈菌液とした. 各菌株の段階希釈菌液 100 μL を各菌数計測用培地 (n=3) に塗抹し, 36°C, 24 時間培養後コロニー数を計測した. コロニー数が 30~300 個の範囲の段階希釈菌液を基準とし, 希釈倍率から菌数を算出した.

続いて, 菌数オーダー 10⁸ cfu/mL の段階希釈菌液を EHEC の通知法¹⁰⁾ に従い, アルカリ熱抽出法で DNA 抽出を行った. 菌液 100 μL を 12,000 rpm, 5 分間遠心後, 上清除去した沈渣に 50 mM NaOH 85 μL 加え 98°C, 10 分間加熱処理した. その処理液を 1M Tris-HCl (pH7.0) 15 μL で中和し, 12,000 rpm, 5 分間遠心した上清を DNA 抽出液とした. DNA 抽出液を TE buffer (pH8.0) で菌数が 1×10⁸ cfu/mL となるように段階希釈したものを鋳型 DNA とし, 2.1.2 2), 2.1.3 2)の各条件で qPCR を実施した. Ct 値が陽性判定の上限となる時の菌数 (cfu/mL) を検出下限値として算出した.

2.2 糞便増菌培養液での検出感度の確認

2.2.1 qPCR 法

表 1 の菌株を用い, 2.1.2 と 2.1.3 で検討したインターカレーター法及び TaqMan プローブ法の 2 種類の検出系で qPCR を実施した.

2.2.2 検出感度の確認

ヒト糞便を表 2 の増菌用培地で 36°C, 24 時間培養後, あらかじめ標的遺伝子が陰性であることを確認したもの

表 6 プライマー及びプローブ (TaqMan プローブ法)

セット	菌種	標的遺伝子	名称	塩基配列 (5'→3')	終濃度 (μ M)	増幅産物の 大きさ (bp)	文献
A	EHEC	<i>stx1</i> VT1遺伝子	stx1-F	GGTTACATTGTCTGGTGACAGTAGCT	0.16	71	4
			stx1-R	GCATCCCCGTACGACTGATC	0.16		
			stx1-P	FAM-ACGTTACAGCGTGTTC-BHQ1	0.12		
		<i>stx2</i> VT2遺伝子	stx2-F	GAACGTTCCGGAATGCAAAAT	0.16	63	4
			stx2-R	CTCCATTAACGCCAGATATGATGA	0.16		
			stx2-P	HEX-AGTCGTCACCTACTGGT-BHQ1	0.12		
B	<i>S. sonnei</i>	<i>ipaH2</i> 細胞侵入性因子 遺伝子	ipaH2-F	GCACGCCAACACCTTTTCC	0.20	59	5
			ipaH2-R	TGCGTGCAGAGACGGTATC	0.20		
			ipaH2-P	FAM-CCTTGACCGCCTTTCC-BHQ1	0.20		
C	<i>V. cholerae</i>	<i>ctxA</i> コレラ毒素遺伝子	ctxA-F	TCCGGAGCATAGAGCTTGGGA	0.20	120*	2
			ctxA-R	TCGATGATCTTGGAGCATTCC	0.20		
			ctxA-P	FAM-CCGTGGATTTCATCATGCACCGCCACGG-BHQ1	0.20		
		<i>ompW</i> 種特異外膜タンパク 遺伝子	ompW-F	AACAAACCATTTGCGGC	0.20	104	6
			ompW-R	TACCGAGGCAATACCGG	0.20		
			ompW-P	HEX-CACCAAGAAGGTGACTTTATTGTGCG-BHQ1	0.20		
D	<i>V. cholerae</i>	O1- <i>rfb</i> O1抗原遺伝子	O1-F	GTAAAGCAGGATGGAACATATTC	0.20	113	7
			O1-R	TGGGCTTACAACTCAAGTAAG	0.20		
			O1-P	FAM-AGAAGTGTG/ZEN/TGGGCCAGGTAAAGT-BHQ1	0.20		
		O139- <i>rfb</i> O139抗原遺伝子	O139-F	CATACCAACGCCCTTATCCATT	0.20	160	2
			O139-R	GCATGACTGGCATCCAAAAT	0.20		
			O139-P	HEX-CGGGTGAGAAAAGACAGCAATAACACCCG-BHQ1	0.20		
E	<i>S. Typhi</i>	<i>ST</i> チフス菌特異遺伝子	ST-F	CGCGAAGTCAGAGTCGACATAG	0.20	131	8
			ST-R	AAGACCTCAACGCCGATCAC	0.20		
			ST-P	FAM-CATTGTCTGAGCAGGCTGACGG-BHQ1	0.20		
	<i>S. Paratyphi A</i>	<i>Pa</i> パラチフスA菌 特異遺伝子	Pa-F	ACGATGATGACTGATTTATCGAAC	0.20	104	8
			Pa-R	TGAAAAGATATCTCTCAGAGCTGG	0.20		
			Pa-P	HEX-CCCATAACAATTCATTCTTATTGAGAATGCGC-BHQ1	0.20		
F	<i>S. Oranienburg</i>	<i>invA</i> 侵入性因子関連 遺伝子	invA-F	AGCGTACTGAAAAGGGAAAAG	0.20	115	9
			invA-R	ATACCGCCAATAAAGTTCACAAAAG	0.20		
			invA-P	FAM-CGTCACCTTTGATAAACTTCATCGCA-BHQ1	0.20		
IAC		<i>16S rRNA</i> セットAに使用	16SrRNA-F	CCTCTTGCCATCGGATGTG	0.04		10
			16SrRNA-R	GGCTGGTCATCCTCAGACC	0.04		
			16SrRNA-P	CY5-GTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGAC-BHQ3	0.12		
		IAC セットB~Fに使用	IAC-F	CTAACCTTCGTGATGAGCAATCG	0.10	145	11
		IAC-R	GATCAGCTACGTGAGGTCCTAC	0.10			
			IAC-P	※-AGCTAGTCGATGCACTCCAGTCTCCT-BHQ1	0.10		

*本研究で得られた値.

※セット B, F は蛍光色素 HEX, セット C~E は蛍光色素 Cy5 を使用.

を糞便増菌培養液として使用した。3.6 mL の糞便増菌培養液に 2.1.4 で作製した各菌株の段階希釈菌液を 400 μ L 加えた糞便増菌培養菌液を供試検体とした。各供試検体 100 μ L を 2.1.4 と同じアルカリ熱抽出法で DNA 抽出し、鋳型 DNA とした。2.1.2 2), 2.1.3 2) の各条件で qPCR を実施した。1 菌株あたりヒト糞便 3 検体を用い、1 希釈系列につき同一試験を 3 回繰り返した (計 9 テスト)。9 テスト全てにおいて陽性となった最小菌数 (cfu/mL) を検出下限値とした。

3 実験結果

3.1 qPCR 検出系の検出感度

インターカレーター法及び TaqMan プローブ法における各菌種の検出下限値を表 8, 9 に示す。インターカレーター法による検出下限値は、赤痢菌 : 10^3 cfu/mL, コレラ

菌 : 10^3 cfu/mL, サルモネラ属菌 : 10^3 cfu/mL であり, TaqMan プローブ法による検出下限値は EHEC : 10^3 cfu/mL, 赤痢菌 : 10^1 cfu/mL, コレラ菌 : 10^2 cfu/mL, チフス菌 : 10^2 cfu/mL, パラチフス A 菌 : 10^2 cfu/mL, サルモネラ属菌 : 10^2 cfu/mL であった。

3.2 糞便増菌培養液での検出感度

3.2.1 インターカレーター法

インターカレーター法による検出感度の測定結果を表 10, 各菌種の qPCR の融解曲線分析結果を図 2 に示す。各菌株の菌液を添加した糞便増菌培養菌液での検出下限値は赤痢菌 : 1.8×10^3 cfu/mL, コレラ菌 (O1) : 1.2×10^3 cfu/mL, サルモネラ属菌 : 1.7×10^3 cfu/mL であった。

3.2.2 TaqMan プローブ法

TaqMan プローブ法による検出感度の測定結果を表 11 に示す。各菌株の菌液を添加した糞便増菌培養菌液での検出下限値は, EHEC : 1.7×10^3 cfu/mL, 赤痢菌 : 1.8×10^2

表 8 インターカレーター法における検出感度

対象疾病	菌種	標的遺伝子	検出下限値 (cfu/mL)
細菌性赤痢	<i>S. sonnei</i>	<i>ipaH</i>	10^3
コレラ	<i>V. cholerae</i>	<i>ctxA</i>	10^3
		<i>ompW</i>	10^3
サルモネラ感染症 (腸チフス・パラチフス含む)	<i>S. Oranienburg</i>	<i>invA</i>	10^3

表 9 TaqMan プローブ法における検出感度

対象疾病	菌種	標的遺伝子	検出下限値 (cfu/mL)
腸管出血性大腸菌感染症	EHEC	<i>stx1, stx2</i>	10^3
細菌性赤痢	<i>S. sonnei</i>	<i>ipaH2</i>	10^1
コレラ	<i>V. cholerae</i>	<i>ctxA, ompW</i>	10^2
		O1- <i>rfb</i>	10^2
		O139- <i>rfb</i>	10^2
腸チフス	<i>S. Typhi</i>	<i>ST</i>	10^2
パラチフス	<i>S. Paratyphi A</i>	<i>Pa</i>	10^2
サルモネラ感染症 (腸チフス・パラチフス含む)	<i>S. Oranienburg</i>	<i>invA</i>	10^2

表 10 糞便増菌培養菌液での検出感度 (インターカレーター法)

対象疾病	菌種	標的遺伝子	菌数オーダー (cfu/mL)	10 ²	10 ³	10 ⁴
			細菌性赤痢	<i>S. sonnei</i>	<i>ipaH</i>	菌数 (cfu/mL)
			陽性数/n	1/9	9/9	9/9
コレラ	<i>V. cholerae</i> (O1)	<i>ctxA</i>	菌数 (cfu/mL)	1.2×10 ²	1.2×10 ³	1.2×10 ⁴
			陽性数/n	2/9	9/9	9/9
		<i>ompW</i>	菌数 (cfu/mL)	1.2×10 ²	1.2×10 ³	1.2×10 ⁴
			陽性数/n	0/9	9/9	9/9
サルモネラ感染症 (腸チフス・パラチフス含む)	<i>S. Oranienburg</i>	<i>invA</i>	菌数 (cfu/mL)	1.7×10 ²	1.7×10 ³	1.7×10 ⁴
			陽性数/n	0/9	9/9	9/9

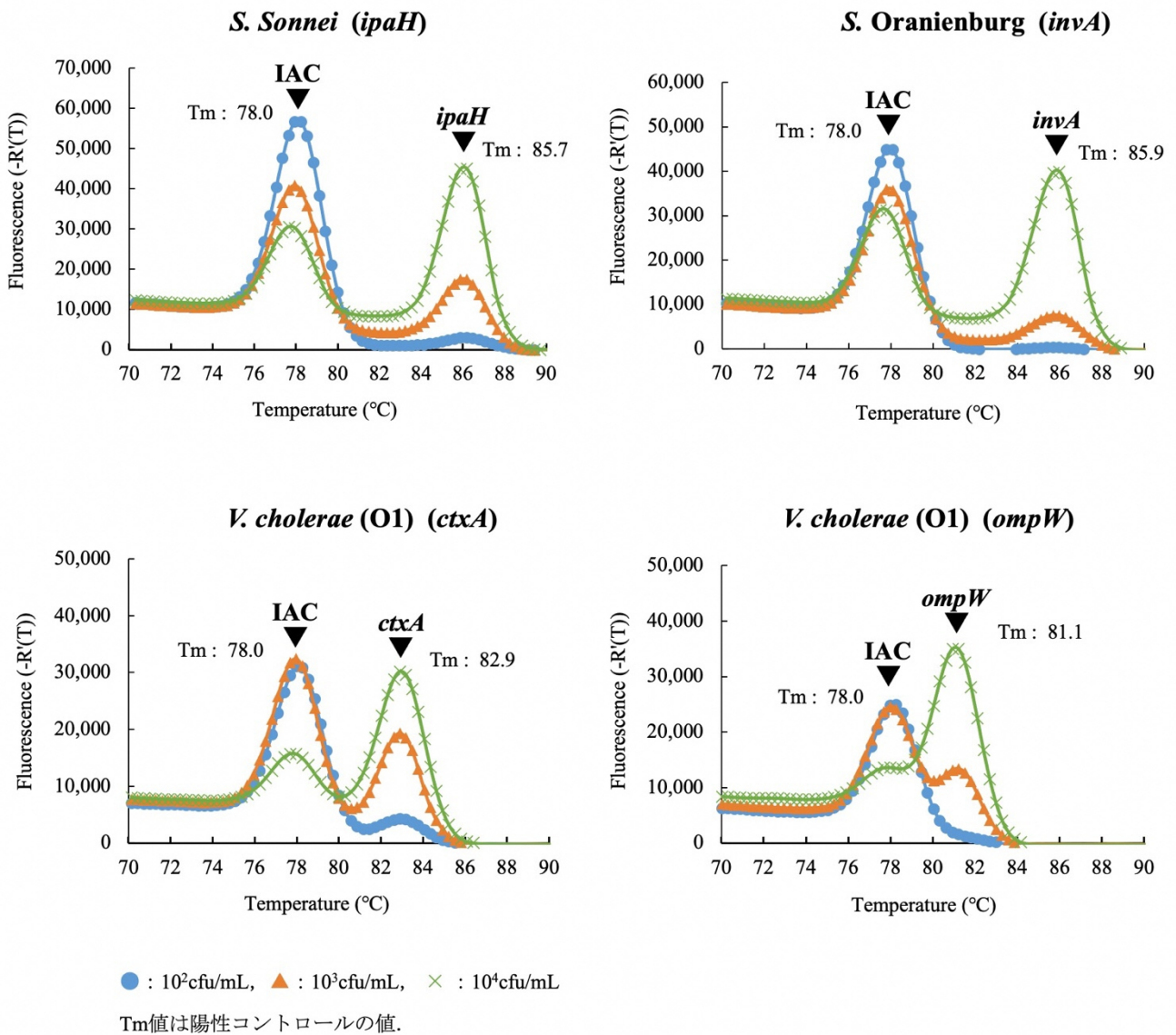


図 2 各菌種における融解曲線分析

表 11 糞便増菌培養菌液での検出感度 (TaqMan プローブ法)

対象疾病	菌種	標的遺伝子	菌数オーダー (cfu/mL)	10 ¹	10 ²	10 ³
腸管出血性大腸菌感染症	EHEC	<i>stx1, stx2</i>	菌数 (cfu/mL)	1.7×10 ¹	1.7×10 ²	1.7×10 ³
			陽性数/n	1/9	6/9	9/9
			平均Ct値 (<i>stx1</i>)	37.71	39.61	36.27
			平均Ct値 (<i>stx2</i>)	37.38	40.26	37.09
細菌性赤痢	<i>S. sonnei</i>	<i>ipaH2</i>	菌数 (cfu/mL)	1.8×10 ¹	1.8×10 ²	1.8×10 ³
			陽性数/n	4/9	9/9	9/9
			平均Ct値	38.83	35.40	32.23
コレラ	<i>V. cholerae</i> (O1)	<i>ctxA, ompW</i>	菌数 (cfu/mL)	1.2×10 ¹	1.2×10 ²	1.2×10 ³
			陽性数/n	5/9	9/9	9/9
			平均Ct値 (<i>ctxA</i>)	37.12	34.41	31.45
		平均Ct値 (<i>ompW</i>)	39.83	39.20	36.25	
		O1- <i>rfb</i>	菌数 (cfu/mL)	1.2×10 ¹	1.2×10 ²	1.2×10 ³
			陽性数/n	3/9	9/9	9/9
	平均Ct値		38.60	36.72	32.80	
	<i>V. cholerae</i> (O139)	<i>ctxA, ompW</i>	菌数 (cfu/mL)	8.3×10 ¹	8.3×10 ²	8.3×10 ³
			陽性数/n	9/9	9/9	9/9
			平均Ct値 (<i>ctxA</i>)	37.01	34.09	30.98
		平均Ct値 (<i>ompW</i>)	38.51	35.50	32.52	
		O139- <i>rfb</i>	菌数 (cfu/mL)	8.3×10 ¹	8.3×10 ²	8.3×10 ³
陽性数/n			3/9	9/9	9/9	
平均Ct値	38.95		35.36	32.34		
腸チフス	<i>S. Typhi</i>	<i>ST</i>	菌数 (cfu/mL)	3.8×10 ¹	3.8×10 ²	3.8×10 ³
			陽性数/n	3/9	9/9	9/9
			平均Ct値	39.14	36.42	32.77
パラチフス	<i>S. Paratyphi A</i>	<i>Pa</i>	菌数 (cfu/mL)	4.9×10 ¹	4.9×10 ²	4.9×10 ³
			陽性数/n	2/9	9/9	9/9
			平均Ct値	39.83	38.29	35.00
サルモネラ感染症 (腸チフス・パラチフス含む)	<i>S. Oranienburg</i>	<i>invA</i>	菌数 (cfu/mL)	1.7×10 ¹	1.7×10 ²	1.7×10 ³
			陽性数/n	2/9	9/9	9/9
			平均Ct値	38.55	38.34	34.41

cfu/mL, コレラ菌 (O1) : 1.2×10^2 cfu/mL, コレラ菌 (O139) : 8.3×10^2 cfu/mL, チフス菌 : 3.8×10^2 cfu/mL, パラチフス A 菌 : 4.9×10^2 cfu/mL, サルモネラ属菌 : 1.7×10^2 cfu/mL であった. 2 種類の検出系を検討した赤痢菌, コレラ菌及びサルモネラ属菌については, インターカレーター法による測定結果より 1 オーダー優れた検出感度が得られた.

4 まとめ

三類感染症の迅速検査を行うため qPCR 法を検討し, 各病原体における標的遺伝子の検出感度の確認を行った. その結果, インターカレーター法の検出下限値は 10^3 cfu/mL, TaqMan プローブ法の検出下限値は $10^1 \sim 10^3$ cfu/mL で, 検討した条件下で標的遺伝子を高感度に検出できた. また, 糞便からの遺伝子スクリーニング検査法として導入可能であるか確認するため, 糞便の増菌培養液に各病原体の希釈調整菌液を添加したものを実際の検体と見立て, 標的遺伝子の検出感度の確認を行った. その結果, インターカレーター法の検出下限値は $1.2 \times 10^3 \sim 1.8 \times 10^3$ cfu/mL, TaqMan プローブ法の検出下限値は $1.2 \times 10^2 \sim 1.7 \times 10^3$ cfu/mL であった. DNA 増幅阻害物質の影響を受けやすい糞便増菌培養液においても十分な検出感度が確認され, 本法が三類感染症の迅速遺伝子検査法として有用であることが示された. また, インターカレーター法と TaqMan プローブ法の 2 種類の検出系を整備したことで, 目的や用途に応じて検査法が選択できるようになり, 検査体制の強化を図ることができた.

今回検討した qPCR 法を導入することで, 検査時間の大幅な短縮を図ることが可能となり, 感染症のまん延防止及び行政対応の迅速化に寄与できるものと考え.

文献

- 1) Fukushima H et al. : Simultaneous Screening of 24 Target Genes of Foodborne Pathogens in 35 Foodborne Outbreaks Using Multiplex Real-Time SYBR Green PCR Analysis, *International Journal of Microbiology*, 18pages, 2010
- 2) Huang et al. : Quadruplex Real-Time PCR Assay for Detection and Identification of *Vibrio cholerae* O1 and O139 Strains and Determination of Their Toxigenic Potential, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 6981~6985, 2009
- 3) Iida N et al. : Development of Duplex SYBR Green Real-Time PCR for Rapid and Simultaneous Detection of 16 Specific Genes of 16 Major Foodborne Bacteria, *日本食品微生物学会雑誌*, 30(3), 160~164, 2013
- 4) Harada T et al. : Multiplex Real-Time PCR Assays for Screening of Shiga Toxin 1 and 2 Genes, Including All Known Subtypes, and *Escherichia coli* O26-, O111-, and O157-Specific Genes in Beef and Sprout Enrichment Cultures, *Journal of Food Protection*, 78(10), 1800~1811, 2015
- 5) P.Cremonesi et al. : Development of 23 individual TaqMan® real-time PCR assays for identifying common foodborne pathogens using a single set of amplification conditions, *Food Microbiology*, 43, 35~40, 2014
- 6) Bielawska-Drozd A et al. : Development of Real-Time PCR Assay for Detection of *Vibrio cholerae*, *Polish Journal of Environmental Studies*, 21(2), 279~288, 2012
- 7) Nasreen T et al. : Simultaneous Quantification of *Vibrio metoecus* and *Vibrio cholerae* with Its O1 Serogroup and Toxigenic Subpopulations in Environmental Reservoirs, *Pathogens*, 9(12), 2020
- 8) Nga et al. : The sensitivity of real-time PCR amplification targeting invasive *Salmonella* serovars in biological specimens, *BMC Infectious Diseases*, 10, 2010
- 9) Kasturi et al. : Real-Time PCR Method for Detection of *Salmonella* spp. in Environmental Samples, *Applied and Environmental Microbiology*, 83(14), 2017
- 10) 厚生労働省通知食安監発 1120 第 1 号 : 腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145 及び O157 の検査法, 平成 26 年 11 月 20 日
- 11) D.M.Deer et al. : A versatile internal control for use as DNA in real-time PCR and as RNA in real-time reverse transcription PCR assays, *Letters in Applied Microbiology*, 50(4), 366~372, 2010