トピックス

食品微生物検査における遺伝子診断

Genetical Diagnosis Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Food

小林 一寛*・勢戸 和子*・田口 真澄*

(大阪府立公衆衛生研究所)

Kazuhiro KOBAYASHI, Kazuko SETO and Masumi TAGUCHI

(Osaka Prefectural Institute of Public Health)

細菌による感染症や食中毒の診断は、(1)培養によって原因となっている病原細菌を検出する、(2)病原細菌が産生する毒素や酵素などの代謝産物を検出する、さらに推定原因菌が分離されたならば、(3)その細菌が持っている病原因子を実験動物や培養細胞などで生物学的に確認する、によって行われているが、実験に使用する各種の試薬や培地、動物や細胞などを常時使用できる状態に準備しておく必要があり、労力やコストがかかるうえに、検査感度や精度においても問題が指摘されている。また食中毒発生時には原因調査のためいろいろな材料について検査されるが、それらは雑菌汚染が高いのが普通で、少数汚染と考えられる原因菌を検出するには、対象細菌ごとに増菌培養が行われ、かなりの労力と時間がかかる。患者の糞便や吐物では急性期のものが入手できれば比較的容易に検出できるが、すでに抗生物質の投与が開始されているような検体では、原因菌の検出は期待できない。一方、患者血清を得ることができれば、菌体あるいは毒素などに対する抗体を測定することによっても診断は可能であるが、検査対象ごとの抗原準備や、同一暴露であっても患者ごとに抗体価が異なったり、感染していても抗体上昇が見られない場合も多く、さらに抗体の上昇までに1週間以上かかるなど確実な迅速診断法とはならない。

近年、病原細菌の遺伝学的研究から属、種に特異的な遺伝子や病原性に関連する遺伝子の解明が進展し、それらの遺伝子の存在を証明することが、病原細菌の存在あるいはその病原因子の検出になり、培養結果によらないことから感染症を迅速かつ高感度に診断できる方法として広範囲に利用されている。

本稿では食中毒菌を対象とした遺伝子(DNA)診断法のうち多くの検査で利用されることが多い polymerase chain reaction (以下 PCR) 法と hybridization (以下 Hbr) 法を取り上げ、DNA 診断法のいろいろな問題点を明らかにし、より検査精度の高い方法について考える。

また迅速、簡便、高感度、特異性ならびに複数因子同時診断などから、今後頻用されると思われるリアルタイム PCR 法、loop mediated isothermal amplification (LAMP) 法や DNA マイクロアレイ法についても言及する。

1. PCR 法とその判定法および問題点

PCR 法は被検菌株もしくは検体液中に標的とした遺伝子領域が存在するときには、酵素反応によってその領域を試験管内で増幅し、その DNA 断片を染色して、肉眼的に観察しようとする極めて高感度で簡便な方法である。DNA を合成させるためには耐熱性の酵素 (*Taq* polymerase) と DNA を構成する 4 種類の塩基 (アデニン、グアニン、シトシン、チミン)、複製の開始点となる 2 つのプライマーを加熱後被検液と混合し、94℃ → 55℃ → 72℃ の温度変換を 25 回程度反復することによって 1 本の DNA が約 100 万倍に増幅するもので、アガロース電気泳動によって両プライマーで挟まれた長さの標的 DNA 断片が確認できる。DNA 断片が確認されれば被検液中に 2 カ所のプライマーと相補的な塩基配列が存在したことになる。PCR 法による診断は研究段階のものもあるが Table 1 に示したように、ほとんどの食中毒菌や病原細菌に応用することが可能である。

PCR 法にはヒートブロック方式とキャピラリー方式があり、各ステップの加熱時間の設定法が異なるのでマニュアルに従って必要な時間を設定する。キャピラリーでは微量の PCR 反応液によって行うため、増幅に要する時間が非常に短く前者の約 3 時間 (コレラ菌の場合) に比べ 30 分位で可能である。各方法については多くの実施例が報告されているのでそれらを参考にされたい。

Hbr 法は溶菌処理してニトロセルロース膜に固定した被検菌 DNA に、あらかじめ調べようとする病原菌あるいは病原因子に関連した DNA 断片を酵素や放射性同位元素 (RI) で標識したプローブという短い DNA を反応させ、余分なプローブを洗浄した後、酵素基質で発色

* ㊞537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69

Table 1. Microbial genes for the detection by PCR

Bacterial strains	Characters and target genes	
<i>Aeromonas</i> spp. <i>V. vulnificus</i> <i>L. monocytogenes</i>	hemolysin	aerolysin cytolysin <i>hlyA</i>
<i>C. botulinum</i> <i>C. difficile</i> <i>C. perfringens</i> <i>E. coli</i> , ETEC STEC <i>V. cholerae</i> O1 <i>V. cholerae</i> non-O1 <i>V. mimicus</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>B. cereus</i> <i>S. aureus</i>	toxin	neurotoxin enterotoxin (A), Cytotoxin (B) enterotoxin LT, ST STX <i>ctx</i> , <i>toxR</i> , <i>zot</i> <i>ctx</i> , <i>toxR</i> , <i>zot</i> <i>ctx</i> , <i>toxR</i> , <i>zot</i> <i>tdh</i> , <i>ldh</i> , <i>trh</i> enterotoxin enterotoxin, coagulase
<i>E. coli</i> , STEC EPEC EAggEC	adherence	<i>eaeA</i> <i>eaeA</i> , <i>bfpA</i> <i>aggR</i> , EAST1 (<i>astA</i>)
<i>Shigella</i> spp. <i>E. coli</i> , EIEC <i>Salmonella</i> spp. <i>Y. enterocolitica</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i>	invasion	<i>invE</i> , <i>ial</i> , <i>ipaH</i> <i>invE</i> , <i>ial</i> , <i>ipaH</i> <i>invA</i> <i>inv</i> , <i>ail</i> , <i>yop</i> , <i>virF</i> <i>inv</i> , <i>ail</i> , <i>yop</i> , <i>virF</i>
<i>Salmonella</i> spp. <i>Y. enterocolitica</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i>	outer membrane pore protein	<i>phoE</i> <i>phoB</i> , <i>phoP</i> <i>phoB</i> , <i>phoP</i>
<i>Salmonella</i> spp. <i>S. Typhi</i> <i>C. jejuni/coli</i> <i>L. monocytogenes</i>	antigen	chromosome (IS200, <i>oriC</i>) O-gene (<i>rfb</i>), H-gene (<i>fla</i> , <i>hin</i>) Vi-Ag (<i>viaB</i>), H-Ag (H-d) <i>flaA</i> , <i>flaB</i> <i>L. monocytogenes</i> antigen (<i>lmaA</i>)
<i>C. jejuni/coli</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>P. shigelloides</i> <i>B. cereus</i>	rRNA	16S rRNA 16S rRNA 23S rRNA 23S rRNA
<i>S. aureus</i> (MRSA)	toxic shock syndrome toxin (TSST), methicillin resistance (<i>mecA</i>)	
All bacteria	16S rRNA	common region (universal primer)

させるかレントゲン用フィルムに撮影し、標的 DNA の存在を確認する方法である。RI 標識の方が感度が高いといわれるが、取り扱いが規制され、設備も必要で、一般の検査室ではほとんど使われない。

両法ともあらかじめ目的となる病原菌の特異的な DNA 断片を準備する必要があり、それらが検査法の感度や精度に関係する。あらかじめ作成しておく DNA 断片は、PCR 法ではプライマーとよばれるもので、毒素遺伝子や病原因子などの塩基配列が明らかにされたものについて、一定の長さの特異的な DNA 領域を選び、両端の約 20 の塩基配列を合成したものである。Hbr 法では病原菌から切り出してきた（クローニングという）標的遺伝子の一部もしくは PCR 法で合成した DNA 断片を使用しプローブとすることが多い。

2. PCR 法の実例

(1) コレラ菌 (*Vibrio cholerae* O1 & O139)

コレラ毒素 (cholera enterotoxin; CT) 産生を抗体を用いて検出する免疫学的方法 (RPLA 法など) が一般に行われているが、迅速性に欠け、産生用培地や培養条件により産生毒素量が異なり、非特異反応も見られることから検査感度や精度の問題が指摘されている。コレラは症状の経過が速く、伝染性も強いので迅速な確定診断と防疫対策の実施が重要であり、DNA 診断法が有効である。

V. cholerae O1, O139 だけではなく *V. cholerae* non-O1 や *V. mimicus* にも Table 2 に示したように CT 遺伝子 (*ctx*) 保有株が見られたことから⁷⁾、分離菌株からの検査では問題がないが、増菌培地からの PCR 法陽性がそのまま *V. cholerae* O1 もしくは O139 陽性と

Table 2. Comparison of two methods for the detection of cholera-enterotoxin gene

Method		No. of strains examined	Number of <i>ctx</i> -carrying strains			
PCR	RPLA		<i>V. cholerae</i>		<i>V. mimicus</i>	Others ^a
			O1	non-O1		
+	+	235	188	18	29	0
+	−	5	5 ^b	0	0	0
−	+	27	0	4 ^c	0	23 ^d
−	−	199	54	76	41	28
Total		466	247	98	70	51

^a *V. fluvialis* (8), *Aeromonas* spp. (5), *P. shigelloides* (3), *Salmonella* spp. (3), ETEC (25), EHEC (3), EIEC (2), EPEC (2) were examined.

^b The *ctx*-gene were confirmed by Hbr-method.

^c All strains were not confirmed of *ctx*-gene by Hbr-method.

^d These strains were LT-producing *E. coli*.

することには問題がある。したがって現在のところ選択分離平板培地 (TCBS) 集落から直接診断用血清で *V. cholerae* O1 あるいは O139 を確認し、その菌苔を蒸留水に浮遊したものから実施することが望ましい。このときには必ず陽性と陰性の菌株を対照に置き PCR 法が正確に行われたかを確認する。また PCR 法に比べて RPLA 法では 5 株の *V. cholerae* O1 の偽陰性と 4 株の *V. cholerae* non-O1 の非特異反応と思われる偽陽性が認められた。これらは Hbr 法でも同じ結果で DNA 診断の特異性が確認された。

著者などの PCR 法⁷⁾ は増幅断片中に *Hinf* I の制限酵素切断部位を 2 カ所含めたものを標的にしており、日常検査で得られた DNA 断片が標的であるかどうかを確認するには、その PCR 液を *Hinf* I で切断し、そのまま泳動することで Fig. 1 のように 3 つの DNA 小断片に切断されたことを確認すればよいので簡便である (380 bp が 183, 136, 61 bp)。なお免疫学的に CT と区別できない *E. coli* 易熱性毒素 (LT) はこの PCR 法では陰性である。

(2) 下痢原性大腸菌

下痢原性大腸菌は、以下に述べるいずれかの病原因子を保有するカテゴリーに属するものが多い。それを証明するには、従来の生物学的方法ではいろいろ煩雑な検査法によらねばならないが、DNA 診断法はその性質に関連している遺伝子を証明するためのプライマーやプローブが要るだけで、迅速、正確に結果が得られる。

(i) 志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) または腸管出血性大腸菌 (EHEC)

STEC には数種類の毒素型の存在が明らかにされているが、ヒトの下痢症由来株は志賀毒素 1 型 (STX1) と STX2 の 2 つが主なものである。これらの毒素は市販の免疫学的診断用キット (RPLA, ELISA, EIA 法) を用いて、培養後培地中に産生された STX を検出することになる。この場合も CT と同様に毒素産生量が違ったり、検査感度や迅速性に問題がある。またペロ細胞を用い細胞変性の有無を確認することによっても STX を確認で

Fig. 1. Identification of *ctx* gene by endonuclease digestion of the PCR product
lane 1: DNA size marker (100 bp ladder)
lane 2: *Hinf* I digestion of PCR product (lane 3)
lane 3: *V. cholerae* O1 isolate (target)

きるが時間がかかり煩雑で、毒素型別はできず疫学的な利用価値は低い。これらの毒素産生性はそれぞれ別々のフェージにより獲得していることが明らかにされており、その毒素遺伝子 (*stx*) の脱落による陰性化もあるので分離後速やかに型別することが必要である。

これまでの *stx* 型別結果を Table 3 に示した。わが国で分離頻度が高い STEC O157 (H7, H-) は *stx1* と *stx2* の両毒素型が最も多く、次いで *stx2* 単独, *stx1* 単独型であり、4 株は RPLA 法でも非産生株であった。STEC 以外の O157 は 8 株あるが *stx* は確認されなかった。次いで多い血清型 O26 : H11 は大部分が *stx1* 単独型, O111 : H- は両毒素型と *stx1* 単独型であった。他の血清型では *stx1* 単独型と *stx2* 単独型に別れ、O128 : H2 の

Table 3 Detection and typing of shiga toxin gene(s) by PCR method

STEC serotypes		No. of strains tested	stx-type by PCR				RPLA
			1 + 2	1	2	Total	
O157:H7		127 ^a	102 (80.3)	2 (1.6)	21 (16.5)	125	125
O157:H-		3 ^a	1	0	0	1	1
O157:H16		1	0	0	0	0	0
O157:H45		3	0	0	0	0	0
O157:HUT		4	0	0	0	0	0
O26:H11		11	1 (9.1)	10 (90.9)	0	11	11
O111:H-		20	14 (70.0)	6 (30.0)	0	20	20
O15:H2	O119:H15						
O103:H2	O128:H2						
O113:H2	O161:H-						
O118:H2	O167:H32	11	0	11	0	11	10 ^b
O114:H19	O166:H15						
O121:H19	O171:H2						
O160:H21		7	0	0	7	7	7
<i>S. dysenteriae</i> 1		12	0	12	0	12	6

^a Four isolates examined of two O157 serotypes were STX-non-producing.

^b STX of O128:H2 isolate, which is one isolate, was not confirmed by RPLA method.

1 株と *Shigella dysenteriae* type 1 の半数は、RPLA 陰性であるのに対し、PCR では全株陽性で培養法による毒素産生性に問題があると考えられた。

stx の場合もコレラ毒素と同じく制限酵素切断部位を含むようにデザインしてあるので (*stx1* は *HincII* で 2 カ所、*stx2* は *AccI* で 1 カ所)、確認が必要となきにはその酵素処理後の泳動で小さくなった DNA サイズを確認すればよい⁸⁾。

(ii) 毒素原性大腸菌 (ETEC)

ETEC は海外旅行者下痢症患者から高頻度で分離されている¹²⁾。本菌は下痢の原因となる易熱性毒素 (LT) と耐熱性毒素 (ST) (免疫学的にさらに細分されている) という異なったエンテロトキシンを産生する。これらの毒素による水様性下痢はコレラ菌のときに似ており、水分の代謝異常による水分の流出と吸収阻害によって起こる。この下痢原因となる毒素の検出は、培養細胞 (Y1, CHO) や乳飲みマウスを使った方法あるいは抗毒素抗体を使った方法 (RPLA 法と ELISA 法) が行われるが、迅速性、簡便性に問題がある。これらの毒素産生もプラスミドやトランスポゾン上の遺伝子に支配されていることから PCR 法が開発されている。

増幅用プライマーは数多く報告されているが、LT と ST を同時に確認できるマルチプライマー法が経済的にも便利である⁶⁾。

(iii) 腸管組織侵入性大腸菌 (EIEC) および赤痢菌 (*Shigella* spp.)

このカテゴリーに分類される大腸菌は赤痢菌と同じく腸管上皮細胞に侵入する能力のあることが病原因子として明らかにされている。この性質を調べるには HeLa 細胞を用いて試験する方法やモルモットの眼に菌液を滴下する方法 (セレーニテスト) があるが、細胞や動物を常

時準備しておく必要があり、実験法も煩雑で一般には行い得なかった。そのため EIEC はこれまで検査対象として取り上げられず、汚染実態は明らかになっていない。この侵入性を制御している遺伝子は約 120~140 メガダルトン (Md) の大きなプラスミド上にあることが解明されている。DNA 診断法はこのプラスミド上の侵入性に関する *invE*, *ipaH* などいくつかの遺伝子領域を標的とした PCR 法が行われることが多い。

(iv) 病原性大腸菌 (EPEC) あるいは血清型大腸菌 (classical serotype *E. coli*)

特定の血清型に属し下痢起病性の大腸菌と定義されているが、その病原的機序はよくわかっていない。本菌は培養細胞 (HeLa あるいは HEP-2) に密集して付着する限局型付着 (localized adherence: LA) をし、菌体が付着した粘膜上皮細胞部に細胞質成分 (アクチン) 密度の増加が見られ、これにより絨毛の剥離などの組織障害を起こした結果、下痢を発現するものと考えられている。この現象は染色体性の遺伝子 (attaching and effacing gene; *eae*) によって制御され、この *eae* を標的とした PCR 法が利用される。これまでの Hbr 法による結果では *eae* 陽性株に *stx* も保有する株があり、さらにその有無は菌体抗原と関係があるという報告¹⁾ もあって本カテゴリー菌株の付着因子の病原的意義は今後明らかにされなければならない。

(v) 腸管細胞付着性大腸菌 (EAEC)

上記の 4 カテゴリーに属さない下痢原性大腸菌で培養細胞に種々のタイプの付着をする大腸菌のカテゴリーであるが、その付着型によって EPEC に含まれない血清型の限局型付着性大腸菌 (localized adherent *E. coli*: LAEC) や散在型付着性大腸菌 (diffuse adherent *E. coli*: DAEC)、凝集型付着性大腸菌 (aggregative adherent *E.*

coli: EAggEC)¹⁴⁾などに分類されることもある。これらの付着性はプラスミドに制御され、この性質が下痢原性に関係していると考えられている。付着性は培養細胞を使用した試験で区別されるが、判定が紛らわしく、実験法も煩雑である。そこでそれを制御しているプラスミド DNA を標的にした PCR 法が迅速、簡便な試験法として有用である。

以上の5カテゴリーの細胞付着性に関する保有状況を Table 4 に示すが、保有するパターンや別のカテゴリー株でも同じ付着因子を保有するもの、同じカテゴリーでも別の因子を持つものなどさまざま、それぞれの菌株における病原的意義や菌株の分類学上の位置も検討されなければならない¹¹⁾。著者らは日常検査の *E. coli* 鑑別を簡便に行うため付着性因子と病原因子を PCR 法で検査した結果に基づいて大腸菌を同定する方法を報告している¹⁰⁾。

(3) 腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*)

本菌食中毒では患者糞便由来は、耐熱性溶血毒素 (TDH) あるいは TDH 様毒素 (TRH) 産生株が分離されるが、推定原因食品や魚類、海水由来株からは非溶血株でいろいろな血清型が検出され、患者株と同じ菌株が認められず食中毒の原因菌決定に際し躊躇するところがある。このような場合には多数の集落を釣菌することによって溶血株の検出ができるといわれる。したがって増菌培養液からの DNA 検査が理想的であるが、本菌のみならず類似菌 (*V. mimicus* や *V. hollisae*) にも保有株が見られることから、増菌培地から直接に DNA 検査を行う場合には注意が必要である。この場合には病原因子の TDH 遺伝子 (*tdh*) と TRH 遺伝子 (*trh*) に *V. parahaemolyticus* だけに見られるレシチン依存性溶血毒素 (LDH) 遺伝子 (*ldh*) とマルチプライマーにし判定の正確性を考慮した方法が報告されている⁵⁾。本菌食中毒の場合、いろいろな種類の食品や残渣、夾雑菌が混在している検査材料を検査することが多いが、その場合にも増菌培養液から *tdh* や *trh* を検出し、精査する検体をスク

リーニングすることは検査精度の向上に有益であると考えられる。

(4) リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*)

本菌を対象とした被検材料は糞便をはじめ野菜サラダや食肉および加工品、乳および乳製品、各種環境材料が多く、これまでの研究から検体中の反応阻害物質を除去した後の PCR 法が良い結果を得るとされている。一般に食中毒事例では食品中の原因細菌汚染菌量は少なく、増菌培養を必ず行うので、それからの PCR 法は、阻害物質が希釈され、生菌による (増殖させた菌の) 検査をしたことになりかなり信頼できる。しかし阻害物質の程度は食品によって異なることから完全に除去したサンプル調製が重要となる。

標的 DNA は本菌の病原因子と考えられているリステリオリシン O (*hlyA*) あるいは β 溶血毒 (*msh*) の構造遺伝子ならびにモノサイトゲネス抗原 (*lmaA*) などである⁴⁾。

(5) サルモネラ (*Salmonella* spp.)

本菌種を対象とした検査材料としては各種臨床材料、畜産食品、乳製品をはじめ非常に多くのものが考えられる。*Salmonella* は 2500 種以上の血清型が存在することから、DNA 診断法では Vi 抗原 (構造遺伝子領域; *viaB*) をもつ *S. Typhi* のように何らかの特徴がある血清型以外のすべてについて同定、検出することはできない。*Salmonella* spp. に有効な標的遺伝子は本菌に特異的な染色体性の遺伝子 (IS200) やリン酸代謝に関係している遺伝子 (*phoE*)、侵入性関連遺伝子 (*invA*) が利用されている。著者らは *phoE* を標的にし、*S. Arizonae* を含むすべての被検 *Salmonella* 株 (25 血清型 86 株) に特異的な PCR 法を行った⁹⁾。その中で迅速診断のため増菌培養液 (SBG) からの PCR 法では被検液のキレート剤 (Chelex®, Bio-Rad) 処理が阻害物質の除去には簡便で安価な方法として有効であったことを確認している。

Salmonella spp. は食中毒菌として特に重要であることから Hbr 法もよく研究され、市販の non-RI 標識キッ

Table 4 Carrying patterns of three adherence-related genes and EAST1 gene of *E. coli* isolates

Patterns ^a	STEC		ETEC		EIEC		EPEC		Others	
	Hm ^b	Nhm ^b	Hm	Nhm	Hm	Nhm	Hm	Nhm	Hm	Nhm
	202 (100) ^c	134 (100)	166 (100)	52 (100)	8 (100)	0	508 (100)	266 (100)	91 (100)	316 (100)
<i>eaeA</i> · <i>bfpA</i> · <i>astA</i>									12 (4.5)	
<i>eaeA</i> · <i>bfpA</i>							2 (0.4)	1 (1.1)	1 (0.4)	1 (0.3)
<i>eaeA</i> · <i>astA</i>	9 (0.5)	3 (2.2)	1 (0.6)				3 (0.6)		4 (1.5)	3 (0.9)
<i>eaeA</i>	172 (85.1)	81 (60.4)	3 (1.8)				69 (13.6)	10 (11.0)	41 (15.4)	18 (5.7)
<i>aggR</i> · <i>astA</i>			2 (1.2)				88 (17.3)	2 (2.2)	3 (1.1)	
<i>aggR</i>	1 (0.5)						49 (9.6)		13 (4.9)	
<i>astA</i>	1 (0.5)	4 (3.0)	107 (64.5)	24 (46.2)			23 (4.5)	21 (23.1)	43 (16.2)	41 (13.0)
None	19 (9.4)	46 (34.3)	53 (31.9)	28 (53.8)	8 (100)	0	274 (53.9)	149 (56.0)	57 (62.6)	253 (80.1)

^a Each *eaeA*, *bfpA* and *aggR* is an adherence factor gene, and *astA* is the gene of ST-like toxin (EAST1).

^b Hm: stool from patients with diarrhea or from healthy controls, Nhm: non-human specimens.

^c No. of cases (%).

トが入手できスクリーニング法として利用できる。これらを使った DNA 診断法と培養法の比較を Table 5 に示した。サルモネラアッセイ法、核さんテスト法、PCR 法の順に培養結果との一致率は高いが、PCR 法が最も安価で迅速である。

(6) 下痢原性カンピロバクター (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*)

Campylobacter spp. による下痢症は全年齢層で多数みられ、細菌検査室では必須の検査対象となっているが、培養に時間がかかり、特殊な培地が必要であることから PCR 法が簡便である。プライマーには 42°C 発育の thermophilic *Campylobacter* を検出するための 23 SrRNA を標的にしたものや³⁾、*C. jejuni* だけを検出するものなど多くの方法がある。著者らは前者を用いた PCR 法で *Campylobacter* spp. 7 菌種、146 株を調べ下痢原性の 3 菌種のみが陽性となることを確認した（結果は省略）。

(7) 他の病原性細菌

Table 1 に掲げたように、培養が煩雑で時間がかかる *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* の検出と鑑別に染色体性の侵入性遺伝子 (*inv*) とプラスミド性の病原性因子 (*virF*) を標的にした混合法や *C. botulinum* 毒素、*C. perfringens* や *C. difficile* の毒素、*S. aureus* のエンテロトキシン、コアグラゼなど多くの報告があり迅速、簡便法として臨床的、疫学的解析に利用することができる。以上の細菌を含めて PCR 用のプライマーと Hbr 用のプローブは Olsen らの報告にまとめられている¹³⁾。またそこに示されている以外でも、その細菌に特徴的な抗原や病原因子に関連するリボゾーム RNA を用いた診断用プローブ（オリゴヌクレオチドプローブを含む）が作成され実用化しているものもあり、今後各種の特異的な遺伝子領域の塩基配列が明らかになれば診断用あるいは同定用 PCR 法、Hbr 法が実施できるであろう。

3. DNA 診断法利用上の注意点

理論からも明らかなように細菌を培養しないでその細菌だけに特異的な DNA 塩基配列を検出することによって同定あるいは診断するもので、検査法についての熟練

を要しない、極めて高感度の検査法である。したがって多種類の細菌が混在する検体中のごく少数含まれている病原菌を検出することができる。そのため検出された細菌がたまたま保菌もしくは汚染しているだけで、その感染症あるいは食中毒の原因菌（または因子）は別に存在する可能性や、死菌の DNA や、あるいは毒素産生などの遺伝子形質発現をしない DNA を検出している可能性も否定できないことは考えておかなければならない。さらに薬剤感受性試験、血清型別、生化学的性状、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法などの分子生物学的方法による比較など、疫学的解析に必要な菌株が得られないことも問題となることがあることから、従来の細菌培養検査法に完全にとって変わるものではないことを認識すべきである。

4. これからの DNA 診断法

これまでの問題点を解決した特異的で高感度、多種類の病原体を同時に迅速に検査できる方法が普及するものと思われる。以下に近年注目されている 3 つの方法についてその概略を紹介する。

(1) DNA マイクロアレイ法

これまでの方法では症状などから検査対象菌を限定し、それぞれのプローブやプライマーによる検査が行われているが死菌であるとか、別の細菌であるとか問題が指摘されている。検体中に含まれる生きた病原体を一度に同時検出する方法として、短時間増菌した培養液から検出する本法が注目されている。増菌液中の標的 DNA をビオチンもしくは蛍光基質を結合したヌクレオチド (dATP または dUTP) を使って PCR 法を行い、標識 DNA 断片を作成する。この PCR 液を、先に標準菌株を使って増幅後、精製した標的 DNA を固定、あるいは検査対象菌ごとに標的 DNA 断片内の 50 程度の塩基配列を合成し、そのオリゴマーの同量をガラス板上にそれぞれスポットし、固定して作成した DNA アレイ (DNA チップ) と Hbr させる。その後未反応 DNA を洗浄し基質を発色あるいは発光させ Hbr の有無を確認する。これにより多菌種を同時に検査できる。発色の強度を適当なスキャナーにより測定すれば定量も可能である。近年

Table 5 Detection of *Salmonella* spp. by DNA-methods^a

Conventional culture method ^b	Probe (A) (85) ^d	Probe (B)		PCR ^c (222)
		Naked eye (69)	OD (69)	
Agreement (%)	83 (97.6)	63 (91.3)	65 (94.2)	205 (92.3)
Disagreement (%)	2 (2.4)	6 (8.7)	4 (5.8)	17 (7.7)

^a Probe (A) is *Salmonella* assay (Chisso Co., Ltd.), Probe (B) is Kakusan test (Nihonseifun Co., Ltd.). PCR was examined to *phoE* gene.

^b For the culture method, SBG enrichment broth and MLCB selective agar plate were used.

^c Template was prepared from SBG enrichment broth treated with 10% Chelex[®] solution.

^d No. of samples examined.

食中毒菌検査用は実用に向けた研究が進展中で、STECや *Salmonella* spp. などの6種類の病原因子を標的に、試験的に行った報告が見られる²⁾。

この基質を標識したDNAによるHbrは、標識物質がHbr効率を低下させ、検査感度に影響を与えるので、二本鎖DNAになれば取り込まれる「挿入剤」を使った方法が検討されている。この場合には電圧をかけると発色する挿入剤や、挿入剤が入ったDNAとの電圧の違いを測定して判定することになる。また色分けしたビーズにプローブを固定し、被検菌液とHbrさせた後、各ビーズごとにソーターで分けてHbrした蛍光量をレーザーやCCD (charge coupled device) で測定することによって判定する方法などが考えられている。近い将来キット化されるものと期待される。

(2) リアルタイムPCR法

100 bp 程度の短い標的DNAをマルチプライマー法で増幅させるが、特異性を上げ、Hbr量を測定するためにそのDNA断片内に特殊な蛍光基質で標識したプローブをHbrさせる。この蛍光基質はHbrすればヌクレオチドから遊離し蛍光を発するもので、それぞれの蛍光強度を測定することにより、どのプローブがHbrしたかがわかる。経時的に連続して測定すれば、増幅されたDNA量の定量ができるが、日常の検査ではコントロールと比べて標的DNAが合成されたと判定されるレベル以上に達したときに結果判定を行うことになる。これまでのように電気泳動せずにPCR途中で判定できるの

で、多種類の同時、迅速診断に有用である。

著者らがSTEC O157:H7, STX産生株を用いて *stx1* と *stx2* を同時検出したときの蛍光測定曲線をFig. 2に示したが、増幅器にセット後、約20~25サイクル(90分)でどちらの毒素産生も確認された。現在のところまだやや高価につくが菌種ごとに検査法が確立され、統一したガイドラインが示されたならば将来の日常検査法として広く導入される方法と思われる。

(3) Loop mediated isothermal amplification (LAMP) 法

標的領域を挟む鋳型DNAのsense鎖とantisense鎖の3'末端にそれぞれ3カ所ずつの領域を設定し、その内側とプライマーの外側が相補的であって中央部も相補的なプライマーを2本と外側だけに相補的なプライマー2本の合計4本を合成する。これをアニールすれば2本鎖DNAを解離しながら相補鎖を伸長していく鎖置換型DNAポリメラーゼ、4種類のdNTPを1本のバッファー液に入れ、65°Cで感作すると増幅産物の5'と3'末端に相補的な領域を持ち、ループ構造を作ることができる1本鎖DNAができダンベル構造となる。この3'末端とこれのループ部を形成している1本鎖部の中央部に順次プライマーがアニールして、それぞれが2本鎖DNAを合成していく。したがってDNAを1本鎖にする熱変成行程が必要でなく65°C程度の等温で増幅が継続するので迅速で、サーマルサイクラーも必要としない。しかしながら種々のサイズのDNA断片が合成され

Fig. 2. Realtime PCR method for the detection of *stx*.

① through ④ shows the STEC strain examined, respectively.

The vertical axis (Delta R_n) indicates the reporter signal as amplicon copy number of target gene (*stx1* or *stx2*).

るので、判定はPCR産物を菌種ごとに決まった制限酵素によって切断し、標的サイズにそろえた後に電気泳動して行うことになる。さらにループ状のプライマーを使用することにより判定までの時間を短縮でき15～30分で判定可能といわれている。本法についても特異性の高いプライマーと標的ごとの試験法、判定のガイドラインが必要であり、検査キットが容易に入手できることが一般的な検査法となる必要条件と思われる。

引用文献

- 1) Campos, L. C., Whittam, T. S., Gomes, T. T., Andrade, J. R. and Trabulsi, L. R.: *Escherichia coli* serogroup O 111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. *Infect. Immun.*, **62**, 3282-3288 (1994).
- 2) Chizhikov, V., Rasooly, A., Chumakov, K. and Levy, D. D.: Microarray analysis of microbial virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3258-3263 (2001).
- 3) Eysers, M.: Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by polymerase chain reaction amplification of 23S rRNA gene fragments. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 3340-3343 (1993).
- 4) 井上 智: PCRを用いたリステリア症病原菌の迅速検出・同定法の検討. p. 405-411, 感染症一遺伝子診断と分子疫学一, 日本臨床, 東京 (1992).
- 5) 石橋正憲, 大津啓二: 混合プライマーを用いたPCR法による腸炎ビブリオの迅速診断. 大阪府立公衛研所報, 食品衛生編, 23号, 67-71 (1992).
- 6) 伊藤文明, 荻野武雄, 伊藤健一郎, 渡辺治雄: 混合プライマーを用いたPCRによる下痢原性大腸菌の病原遺伝子の同時検出法. p. 343-347, 感染症一遺伝子診断と分子疫学一, 日本臨床, 東京 (1992).
- 7) 小林一寛, 勢戸和子: PCR法によるコレラ毒素遺伝子確認法と診断用プローブの開発. p. 361-367, 感染症一遺伝子診断と分子疫学一, 日本臨床, 東京 (1992).
- 8) 小林一寛: Polymerase Chain Reaction (PCR)法による下痢・食中毒菌の同定. 食品と微生物, **9**, 77-88 (1992).
- 9) 小林一寛, 田口真澄, 勢戸和子: 増菌培養からキレックス樹脂を用いたPCR法によるサルモネラ直接検出法. 感染症誌, **68**, 1203-1210 (1994).
- 10) 小林一寛, 勢戸和子, 八柳 潤, 斎藤志保子, 寺尾通徳, 金子通治, 芹川俊彦, 倉本早苗, 藤沢倫彦, 鈴木理恵子, 山崎 貢, 林 賢一, 松根 渉, 安岡富久, 堀川和美, 村上光一, 河野喜美子, 山田 享, 伊藤健一郎: 下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査法の一考察. 感染症誌, **76**, 911-920 (2002).
- 11) Law, D.: Adhesion and its role in the virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, **7**, 152-173 (1994).
- 12) 松下 秀: 旅行者下痢症. 総合臨床, **46**, 1613-1615 (1997).
- 13) Olsen, J. E., Aabo, S., Hill, W., Notermans S., Wernars, K., Granum, P. E., Topovic, T., Rasmussen, H.N. and Olsvik, O.: Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*, **28**, 1-78 (1995).
- 14) Schmidt, H., Knop, C., Franke, S., Aleksic, S., Heesemann, J. and Karch, H.: Development of PCR for screening of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 701-705 (1995).