

=原 著=

蛍光RT-multiplex PCR法を用いた 食中毒起因微生物の包括的検出

重本直樹^{*1, †}・谷澤由枝^{*1}・山田裕子^{*1}
大原祥子^{*2}・松尾 健^{*1}・福田伸治^{*1}

(^{*1}広島県立総合技術研究所保健環境センター, ^{*2}広島県食肉衛生検査所)

(受付: 平成23年5月 2日)

(受理: 平成24年2月15日)

Comprehensive Detection of Food-Borne Pathogens from Fecal Specimens Using a Reverse Transcription Multiplex PCR with Fluorescent Dye-Labeled Primers

Naoki SHIGEMOTO^{*1, †}, Yukie TANIZAWA^{*1}, Hiroko YAMADA^{*1},
Sachiko OHARA^{*2}, Takeshi MATSUO^{*1} and Shinji FUKUDA^{*1}

(^{*1} Center for Public Health and Environment, Hiroshima Prefectural Technology Research Institute,
Minami-machi, Minami-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima 734-0007; [†] Corresponding author)

(^{*2} Hiroshima Prefectural Meat Inspection Office, Awaya-machi, Miyoshi-shi, Hiroshima 728-0025)

We have developed a reverse transcription (RT)-multiplex PCR assay with fluorescent dye-labeled primers for detection of 12 pathogens, including 9 bacteria and 3 viruses, that are highly associated with food-borne gastroenteritis outbreaks. This assay has a great advantage of comprehensive detection of bacterial DNAs and viral RNAs. PCR products of pathogens are easily discriminated by fluorescent color and fragment size visualized under ultraviolet light without staining, after electrophoresis. Simultaneous extraction of bacterial DNAs and viral RNAs were achieved using a commercial viral RNA extraction kit with some modification. After RT reaction, multiplex PCR was carried out with 3 primer sets (A, B, and C) labeled with 3 to 4 different colors of fluorescent dyes. Primer set A was designed for diarrheagenic *Escherichia coli*. Primer set B was for *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* and *C. coli*, and *Vibrio parahaemolyticus*. Primer set C was for *Clostridium perfringens*, Norovirus, Sapovirus, and Astrovirus. Upon analysis of 45 food-borne gastroenteritis outbreaks and 15 sporadic cases, this assay had nearly corresponding sensitivity and specificity compared with conventional methods, such as bacterial cultivation and multiplex PCR. This assay can be completed within 6 to 7 hours and is considered effective for rapid screening of food-borne bacteria and viruses.

Key words: food-borne pathogens, comprehensive detection, reverse transcription-multiplex PCR, fluorescent dye

緒 言

厚生労働省の食中毒統計 (<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/>) によると、食中毒は多くの病原微生物

物を原因として発生している。平成20年から22年の食中毒発生状況は細菌を原因とするものが536~778件(患者数6,700~10,331名)、ウイルスを原因とするものが304~403件(患者数10,953~14,700名)で減少傾向は認められていない。食中毒発生時には迅速な病因物質(微生物)の検出がその拡大防止には非常に重要である。一般的には、病原微生物に応じた個別の検査が実施され

[†] 連絡先

^{*1} ☎734-0007 広島県広島市南区皆実町1-6-29

^{*2} ☎728-0025 広島県三次市栗屋町1911-1

るが、多くの時間と労力を要している。

近年ではPCR機器および試薬の低価格化により、小規模の検査室においても比較的容易に遺伝子検査を実施することが可能となった。また、試薬などの充実により高感度に遺伝子を検出することが可能となっているため、Multiplex PCR法による多種の細菌あるいはウイルスの同時検出に関する研究が数多く見られるが^{14, 19, 21-23)}、細菌およびウイルスを同時に包括的あるいは網羅的に検出しようとする研究は見られない。

食中毒の原因微生物は過去の様相とは異なり、ウイルスによるものも多く報告され、細菌およびウイルスを同時に検出する意義は非常に大きくなっている。また、通常行われるMultiplex PCR法では電気泳動法により、PCR産物の大きさを指標として微生物の検出を行うため、PCR産物の大きさが近似すると鑑別が困難となる。先に、われわれはこれらの欠点を補う方法として、蛍光標識プライマーを用いたMultiplex PCR法を確立し、下痢症ウイルス¹⁶⁾あるいは下痢原性大腸菌病原因子⁷⁾の同時検出法を報告した。

本研究では、食中毒の原因となる率の高い細菌およびウイルスについて、一般に広く用いられるPCR法により多種の微生物を同時に検出することを目的に、蛍光標識プライマーを用いた遺伝子検出法を検討し、PCR産物の大きさおよびPCR産物の蛍光色の違いにより対象微生物を識別する包括的検査法を確立した。

材料および方法

1. 対象微生物および検出用プライマー

対象微生物はDiarrheagenic *Escherichia coli* [腸管出血性大腸菌 (EHEC), 腸管侵入性大腸菌 (EIEC), 毒素原性大腸菌 (ETEC), 腸管凝集性大腸菌 (EAEC) および腸管病原性大腸菌 (EPEC)], *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter jejuni* および *C. coli*, *Clostridium perfringens*, Norovirus (genogroup I および II), Sapovirus (genogroup I, II, IV および V) および Astrovirus (genotype I~VIII) の12種とした。ターゲットとした病原因子、プライマー配列および標識蛍光物質¹³⁾を Table 1 に示した。

2. 糞便からの細菌DNAおよびウイルスRNAの同時抽出

QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN) を用い、キット添付のプロトコルを一部改変して糞便から細菌およびウイルス核酸 (DNA および RNA) の同時抽出を行った。まず、PBSにより作製した10%糞便乳剤をボルテックスミキサーで30秒間激しく攪拌した後、室温で1分間静置した。そして、上清160 μ l を Buffer AVL 640 μ l に加え、15秒間ボルテックス後室温に10分間静置した。6,000 \times g で3分間遠心分離した上清700 μ l を用い、以降キット添付のプロトコルに従って核酸を抽出した。なお、直ちに次の操作を実施しない場合は抽出した

核酸を-20 $^{\circ}$ Cあるいは-70 $^{\circ}$ Cで保存した。

3. 逆転写反応

PrimeScript RT reagent kit (タカラバイオ) を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応組成は5 \times PrimeScript buffer 4 μ l, PrimeScript RT enzyme mix 1 μ l, Oligo dT primer (50 μ M) 1 μ l, Random 6 mers (100 μ M) 1 μ l, RNase free dH₂O 3 μ l および抽出核酸10 μ l の計20 μ l で、30 $^{\circ}$ C 10分間、42 $^{\circ}$ C 60分間、99 $^{\circ}$ C 5分間実施し、その後氷冷した。

4. 蛍光RT-multiplex PCR反応

逆転写反応後、Table 1 に示した3プライマーセットごとに、蛍光標識プライマーを用いたMultiplex PCR (蛍光RT-multiplex PCR) 法を実施した。AセットはDiarrheagenic *E. coli* を、Bセットは *Salmonella* spp., *C. jejuni* および *C. coli* と *V. parahaemolyticus* を、Cセットは *C. perfringens*, Norovirus, Sapovirus および Astrovirus を検出対象とした。また、Multiplex PCR反応はMultiplex PCR assay キット (タカラバイオ) を用いて、Multiplex PCR mix2 25 μ l, Multiplex PCR mix1 0.25 μ l および Table 1 に示す最終濃度のプライマーを含む反応液に逆転写反応液を2または5 μ l 加え、計50 μ l で実施した。反応条件は94 $^{\circ}$ C 60秒間の熱変性後、94 $^{\circ}$ C 30秒間、57 $^{\circ}$ C 90秒間および72 $^{\circ}$ C 90秒間を40サイクル行い、72 $^{\circ}$ C 10分間の最終伸長を行った。

5. 電気泳動

2.0%アガロースゲルにて電気泳動後、トランスイルミネータで312 nmの光を照射し泳動像および蛍光色を確認すると同時に、紫外線吸収フィルター(SC46, フジフィルム)を用いデジタルカメラで撮影した。なお、サイズマーカーは100 bp ラダー (GE Healthcare) 1 μ l に、等量の EzVISION (Amresco) を混合して用いた。

6. スタンダードDNAの作製

Diarrheagenic *E. coli* を除く個々の微生物について、Table 1 に示すプライマーで増幅したPCR産物をQIAGEN PCR Cloning Kit (QIAGEN) を用いてpDrive cloning vector (QIAGEN) に挿入し、*E. coli* DH5 α に保持した。そして、*E. coli* から MonoFas プラスミド抽出キット III (GL Sciences) を用いてプラスミドDNAを精製後、コピー数を算出した。

7. 検出限界の測定

(1) 下痢原性大腸菌

分離株の菌数 (cfu) を測定後、抽出したDNAを10倍段階希釈し検出限界 (cfu/反応) を測定した。

(2) 下痢原性大腸菌以外の細菌

スタンダードDNAを用いて、リアルタイムPCR法により分離株から抽出したDNAのコピー数を算出し、10倍段階希釈して検出限界 (コピー数/反応) を測定した。

(3) ウイルス

ウイルス含有糞便に含まれるRNAから逆転写反応により得たcDNAのコピー数をスタンダードDNAを用い

Table 1. Specific primer sets used in RT-multiplex PCR assay with fluorescent dye-labeled primers

Pathogen	Target gene	Primer name	Polarity	Sequence (5'-3')	5-Fluorescent dye	Color	Product size (bp)	Final concentration (μ M)	Reference
Primer set A									
Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (ETEC)	<i>elt</i>	LT_tF	+	ACCGGTATACAGAAAATCTG	Alexa Fluor 546	Orange	263	0.2	7 (slightly modified)
		LT_rRo	-	CTGTTATATATGTCAACCTC	Alexa Fluor 594	Red	157	0.2	7 (slightly modified)
Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> (EIEC)	<i>ipaH</i>	STh_Fr	+	CTCAGATGCTAAACCCAG	Alexa Fluor 546	Orange	337	0.1	7
		JW7	-	CACCCGGTACARGCAGGATT	Alexa Fluor 594	Red	337	0.2	17
Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EHEC)	<i>stx1</i>	ipaH-F	+	ACCATGCTCCAGAGAAAACCT	Alexa Fluor 546	Orange	482	0.2	7
		ipaH-Ro	-	CAGTCTACGCATCACCTGT	Alexa Fluor 488	Green	482	0.2	7
Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (EPEC)	<i>stx2</i>	STX1-F	+	TGAACTGGGAAGGTTGAG	Alexa Fluor 488	Green	285	0.1	7
		STX1-Rg	-	TGGCACTGAGAAGAAAGAGA	Alexa Fluor 488	Green	285	0.1	7
Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (EPEC)	<i>astA</i>	STX2-F	+	AGGGGCTTTGACCATCTT	Alexa Fluor 488	Green	106	0.08	24
		STX2-Rg	-	CTKATGCATCTCTGGTCAT	Alexa Fluor 488	Green	106	0.08	24
Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (EPEC)	<i>aggR</i>	EAST-1Sg	+	GCCATCAACACAGTATATCC	Alexa Fluor 488	Green	406	0.2	7
		EAST-1AS	-	GAGTGACGGCTTTGTAGTCC	Alexa Fluor 594	Red	390	0.2	7
Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> (EPEC)	<i>eae</i>	aggR-F	+	CCTAAAGGATGCCCTGATGA	Alexa Fluor 488	Green	390	0.2	7
		aggR-Rg	-	TGCTGCTTGTCTCATCTTTG	Alexa Fluor 594	Red	390	0.2	7
Primer set B	<i>invA</i>	eaeA-F	+	ATGCTTAGTCTGTTTAGG	Alexa Fluor 488	Green	406	0.2	7
		eaeA-Rr	-	GTCCGGGGACATTTAGTCA	Alexa Fluor 594	Red	406	0.2	7
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	INVA-1	+	ACAGTCTCGTTTACGACCTGAAT	Alexa Fluor 594	Red	244	0.2	1
		INVA-2	-	AGACGACTGGTACTGATCGATAAT	Alexa Fluor 594	Red	244	0.2	1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tdh, trh</i>	VPT346tdhF	+	ATTCTGCTGTGTTCCGTAATAATCAG	Alexa Fluor 532	Yellow	163	0.2	This study
		VPT346trhF	+	YTTWCAGGCTTTCACAAAATCAG	Alexa Fluor 488	Green	163	0.2	This study
<i>Campylobacter jejuni</i>	Oxidoreductase	VPT508R	-	CCACTACGGCTCTCATATGCYTC	Alexa Fluor 594	Red	196	0.2	20 (slightly modified)
		CJ166F	+	AACTTAGGATTCGCATCAAG	Alexa Fluor 594	Red	196	0.2	8
<i>Campylobacter coli</i>	Aspartokinase	C4m	-	CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT	Alexa Fluor 488	Green	502	0.4	8
		CC18F	+	GGTATGATTTCTACAAAGCGA	Alexa Fluor 594	Red	502	0.4	8
Primer set C	Norovirus genogroup I	CC519R	-	ATAAAAGACTATCGTCCGGGTG	Alexa Fluor 594	Red	502	0.4	8
		G1SKF	+	CTGCCGAATYGTAAATGA	Alexa Fluor 488	Green	330	0.4	6
Norovirus genogroup II	Polymerase, capsid	G1SKR	-	CCAAACCCARCCATTRTACA	Alexa Fluor 488	Green	330	0.4	6
		G2SKF	+	CNTGGAGGGCCATCGCAA	Alexa Fluor 594	Red	344	0.4	6
Sapovirus	Capsid	G2SKR	-	CCRCNGCATRHCRTTRTACAT	Alexa Fluor 594	Red	344	0.4	6
		G2ALSKR	-	CCACCAGCATATGAATGTACAT	Alexa Fluor 532	Yellow	435	0.2	11
Astrovirus	Capsid	SV-F21	+	ANTAGTGTTTGARA TGGAGGG	Alexa Fluor 350	Blue	230	0.2	15
		SV-R2	-	GWGGRTCAACMCCWGGTGG	Alexa Fluor 532	Yellow	435	0.2	12
<i>Clostridium perfringens</i>	Enterotoxin	AC1	+	ATGGCTAGCAAGTCTGACAAG	Alexa Fluor 532	Yellow	435	0.2	12
		AC230	-	GGTTTTGGTCTCTGACACC	Alexa Fluor 350	Blue	230	0.2	15
<i>Clostridium perfringens</i>	Enterotoxin	CPE697F	+	CCTTGGACTCAAAAAGCTTAATTTAC	Alexa Fluor 546	Orange	196	0.4	This study
		CPE892R	-	GAACATATTTGCCAGCATCTAAG	Alexa Fluor 546	Orange	196	0.4	This study

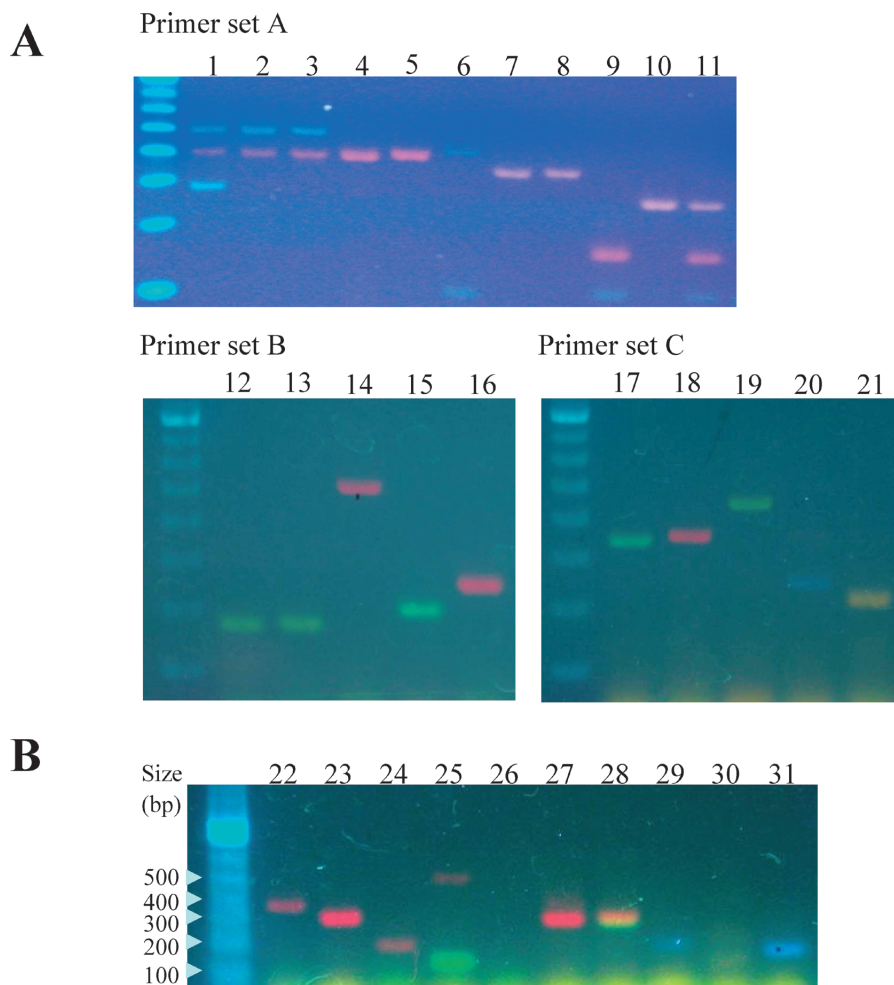


Fig. 1. Detection and identification of pathogens by fluorescent colors and size of PCR products (A) and application to gastroenteritis outbreaks and sporadic cases (B).

Lanes; 1, *Escherichia coli* O157:H7 (*stx1*, *eae*, and *stx2*); 2, *E. coli* O26:H11 (*stx1* and *eae*); 3, *E. coli* O111:HNM (*stx1* and *eae*); 4, *E. coli* O63:H6 (*eae*); 5, *E. coli* O142:H6 (*eae*); 6, *E. coli* O44:H18 (*aggR* and *astA*); 7, *E. coli* O28:HNM (*ipaH*); 8, *E. coli* O124:HNM (*ipaH*); 9, *E. coli* O148:H28 (*estA2* and *astA*); 10, *E. coli* O25:HNM (*elt*); 11, *E. coli* O6:H16 (*elt*, *estA2*, and *astA*); 12, *Vibrio parahaemolyticus* (*tdh*); 13, *V. parahaemolyticus* (*trh*); 14, *Campylobacter coli*; 15, *C. jejuni*; 16, *Salmonella* Enteritidis; 17, Norovirus genogroup I; 18, Norovirus genogroup II; 19, Sapovirus; 20, Astrovirus; 21, *Clostridium perfringens*; 22, EAEC (*aggR*) in primer set A; 23, Norovirus genogroup II in primer set C; 24, *Salmonella* spp. in primer set B; 25, *C. jejuni* and *C. coli* in primer set B; 26, Negative in primer set B; 27, Norovirus genogroup II in primer set C; 28, Norovirus genogroups I and II in primer set C; 29, Astrovirus in primer set C; 30, *C. perfringens* in primer set C; 31, Astrovirus in primer set C.

てリアルタイムPCR法により算出し、10倍段階希釈して検出限界（コピー数/反応）を測定した。

8. 食中毒等集団感染事例および散发事例への応用

平成21年から22年に発生した食中毒等集団感染45事例および散发15事例の患者糞便に蛍光RT-multiplex PCR法を適用し、常法（培養法あるいはmonoplex PCR法）と比較した。なお、蛍光RT-multiplex PCR法には常法による検査後、冷凍または冷蔵保存されていた患者糞便を用いた。

結 果

1. 蛍光RT-multiplex PCR法による病原微生物の検出

種々の病原因子を保有するDiarrheagenic *E. coli* 11血清型、*tdh*あるいは*trh*陽性*V. parahaemolyticus*, *C. jejuni*, *C. coli*, *Salmonella* Enteritidis, Norovirus genogroup I, Norovirus genogroup II, Sapovirus, Astrovirusおよび*C. perfringens*の計21種について、蛍光RT-multiplex PCR法による検出状況をFig. 1Aに示した。プライマーセットごとに、それぞれの病原微生物の標的とした遺伝子が目的とした増幅産物の大きさおよび蛍光色として検出された。また、Diarrheagenic *E. coli*は複数の

Table 2. Detection limits in RT-multiplex PCR with fluorescent dye-labeled primers

Primer set	Pathogen	Detection limit per reaction
A	Diarrheagenic <i>Escherichia coli</i>	10 ¹ to 10 ⁴ cfu
B	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁴ copies
	<i>Campylobacter jejuni</i>	10 ⁴ copies
	<i>Campylobacter coli</i>	10 ⁴ copies
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10 ¹ copies
C	<i>Clostridium perfringens</i>	10 ² copies
	Norovirus genogroup I	10 ² copies
	Norovirus genogroup II	10 ² copies
	Sapovirus	10 ² copies
	Astrovirus	10 ² copies

Diarrheagenic *Escherichia coli* contains ETEC, EIEC, EHEC, EAEC, and EPEC.

病原因子を保有する株を用いたが、それぞれの株が保有するそれぞれの病原因子が検出され、多重検出が可能であった。

2. 蛍光RT-multiplex PCR法の検出限界

各病原微生物遺伝子の検出限界を Table 2 に示した。Diarrheagenic *E. coli* 9 血清型を用いて測定した Primer set A の病原因子の検出限界は 10¹ から 10⁴ cfu/反応で、*ipaH* が約 10¹ cfu/反応と最も低く、*eae* が 10³ から 10⁴ cfu/反応で最も高かった。Primer set B では *V. parahaemolyticus* の検出限界が約 10¹ コピー/反応で、その他の病原微生物は約 10⁴ コピー/反応であった。また、Primer set C での検出限界はすべての病原微生物で約 10² コピー/反応であった。

3. 蛍光RT-multiplex PCR法による食中毒等集団感染事例および散発事例からの病原微生物の検出状況

蛍光RT-multiplex PCR法による患者糞便からの病原微生物検出の全工程に必要な検査時間は6~7時間であった。Fig. 1Bには、食中毒等集団感染事例および散発事例の患者糞便からの検出例を示した。レーン25では二つの病原微生物が同時に検出され、レーン28では増幅産物の大きさが非常に近似している場合でも増幅産物の大きさと蛍光色により複数の病原微生物を識別可能であり、レーン29から31に見られるように、増幅産物が近似している場合でも蛍光色により容易に識別可能であった。

常法である培養法あるいはmonoplex PCR法と蛍光RT-multiplex PCR法による検出結果を Table 3 に示した。検出感度は93.1%、特異度は93.5%および一致率は93.3%であり、常法との有意差は認められなかった (McNemar test, $p=1.00$)。夏季でウイルスを想定した検査がなされていなかったため、蛍光RT-multiplex PCR法でNorovirusを検出した事例が1事例あり、抗生物質が投与された後に患者糞便が採取された1事例では細菌培養陰性に対し、蛍光RT-multiplex PCR法で *Campylobacter* が検出された。また、細菌培養法で *Campylobacter* 陽性、蛍光RT-multiplex PCR法で陰性の事例と monoplex PCR で Norovirus GII 陽性、蛍光RT-

Table 3. Relationship between conventional and new methods

Method	Conventional			
	Positive	Negative	Total	
New (This study)	Positive	27	2	29
	Negative	2	29	31
	Total	29	31	60

New method: RT-multiplex PCR with fluorescent dye-labeled primers.

Conventional method: bacterial cultivation and monoplex PCR.

multiplex PCR法で陰性の事例がそれぞれ1例ずつ認められた。

考 察

食中毒等集団感染事例発生時には原因の究明、拡大防止のため、迅速な病因物質の特定が必要となる。近年の食中毒集団発生事例の病因物質は *Campylobacter* および Norovirus が大部分を占めていることからわかるように、原因細菌およびウイルスが同時にしかも迅速にスクリーニングできることは行政対応上、非常に重要であると考えられる。一般的に、糞便および食品を材料とした遺伝子検査の場合には、検査対象とする細菌あるいはウイルスのDNAあるいはRNAを個別に抽出し、遺伝子増幅反応も個別に実施しているが、煩雑であり、食中毒発生時に簡易に導入することは困難である。

今回われわれが開発した方法では、市販されているウイルスRNA抽出キットを利用して細菌とウイルスの核酸を同時抽出し、逆転写反応後に蛍光RT-multiplex PCR法を実施している。DNAとRNAを同時に抽出するキットも市販されているが、時間や特別な装置を必要とするケースが多い。しかし、今回は市販のウイルスRNA抽出キットのプロトコルを一部変更することで、簡易に短時間で細菌とウイルスの核酸の同時抽出が可能であった。また、蛍光RT-multiplex PCR法では3セットのプライマーセットで12種の食中毒起因微生物とその病原因子を電気泳動後に核酸染色を行うことなしに、

PCR産物の大きさとその蛍光色を指標として包括的に検出・識別できる簡便性がある。蛍光RT-multiplex PCR法の検出限界は病原微生物により差異が認められ、検出限界は 10^1 から 10^4 コピー/反応であったが、食中毒等事例患者糞便を用いた適用試験結果から実用上迅速スクリーニング検査法として問題ないことが確認された。食中毒起因微生物検査では微生物の血清型、毒素型、遺伝子型なども疫学調査上重要な要素であり、われわれの蛍光RT-multiplex PCR法により病原因子などを特定したうえで、検出された病原微生物を中心に血清型などの検査を進めることにより効率的な原因究明が可能であると考えられる。遺伝子学的方法是培養法に比較して迅速性が大きな特徴であるが、抗生物質などの投与により培養陰性で菌が分離できなかった事例からも病原微生物の遺伝子を検出することが可能となる。

キャピラリー型のリアルタイムPCR装置を使用し、時間短縮を図った食中毒細菌の網羅的検出法に関する研究²⁾あるいはリアルタイムPCR法装置を用いた細菌の網羅的検出試薬も販売されているが、リアルタイムPCR法ではその特性から1本のチューブ中で多数の微生物を検出することは困難な場合が多い。融解曲線分析による識別・同定では、検出対象微生物の増幅産物の T_m 値が近似している場合や、Norovirusなどのように非常に多くの遺伝子型が存在する⁵⁾と T_m 値が一定せず、 T_m 値のみで各病原微生物を区別することが困難になる。また、蛍光標識TaqManプローブを用いた方法でも対象微生物ごとに波長の異なった標識蛍光物質を選択する必要があるため、1本の反応チューブで複数の蛍光物質を用いることには限界がある。他方、蛍光マイクロビーズアレイシステムを用いて19種の呼吸器ウイルスを一度に包括的・網羅的に検出する方法も開発されている^{9, 18)}が、高額の専用機器が必要となる。われわれの蛍光RT-multiplex PCR法は、全工程6~7時間を要するが、特別な機器を必要とせず1本のチューブで3種類以上の病原微生物または病原因子の検出・同定が可能であり、簡易に実施できる。

包括的あるいは網羅的検出法の意義は食中毒等感染症発生時に複数の微生物を同時に検出できることにある。実際に複数のウイルスが同時に検出される事例¹⁰⁾あるいはウイルスと細菌が同時に検出された事例^{3, 4)}も報告されており、われわれの蛍光RT-multiplex PCR法はこれらの事例にも非常に有効である。食中毒起因微生物は今回対象とした12種以外にも多数存在するが、われわれの蛍光RT-multiplex PCR法は他の微生物の検出にも拡大可能で、必要に応じて検査対象とする病原微生物または病原因子のプライマーセットを追加することが可能である。

要 約

食中毒の原因の上位を占める12種の病原微生物（細菌9種およびウイルス3種）の包括的検出に、蛍光標識

プライマーを用いたRT-multiplex PCR法を適用した。本法は、細菌DNAおよびウイルスRNAを包括的に検出できる特徴があり、電気泳動後の染色を必要とせずPCR産物の蛍光色と大きさの違いから病原微生物を容易に識別することが可能である。

患者糞便から細菌DNAおよびウイルスRNAを市販のウイルスRNA抽出キットを用いて同時抽出し、逆転写反応後に逆転写反応物を鋳型にしてmultiplex PCR法を実施した。12種の病原微生物を三つのグループに区分し、AセットはDiarrheagenic *E. coli*を、Bセットは*Salmonella* spp., *V. parahaemolyticus*, *C. jejuni*および*C. coli*を、Cセットは*C. perfringens*, Norovirus, SapovirusおよびAstrovirusを対象としたプライマーセットとした。食中毒等集団感染45事例と散発15事例に本法を適用した結果、常法である培養法あるいはmonoplex PCR法と有意差はなく、ほぼ同等の感度と特異度が得られた。

本法は核酸抽出から遺伝子検出までを6~7時間で完了できることから、食中毒原因微生物の迅速スクリーニング検査法として有効であることが確認された。

文 献

- 1) Chiu, C. H. and Ou, J. T.: Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 2619-2622 (1996).
- 2) Fukushima, H., Tsunomori, Y. and Seki, R.: Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 5134-5146 (2003).
- 3) Gonzaga, V. E., Ramos, M., Maves, R. C., Freeman, R. and Montgomery, J. M.: Concurrent outbreak of norovirus genotype I and enterotoxigenic *Escherichia coli* on a U.S. navy ship following a visit to Lima, Peru. *PLoS ONE*, **6**, e20822 (2011).
- 4) 堀川和美, 野田多美枝, 濱 光宏, 村上光一, 竹中重幸, 石黒靖尚, 世良暢之, 石橋哲也, 江藤良樹, 千々和勝己: 平成16年度の食中毒(疑いを含む)事例について. 福岡県保健環境研究所年報, **32**, 80-82 (2005).
- 5) Kageyama, T., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Kojima, S., Takai, R., Oka, T., Takeda, N. and Katayama, K.: Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to *Norovirus* in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 2988-2995 (2004).
- 6) Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N. and Katayama, K.: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods*, **100**, 107-114 (2002).
- 7) Kuwayama, M., Shigemoto, N., Oohara, S., Tanizawa, Y., Yamada, H., Takeda, Y., Matsuo, T. and Fukuda, S.: Simultaneous detection of virulence factors from a colo-

- ny in diarrheagenic *Escherichia coli* by a multiplex PCR assay with Alexa Fluor-labeled primers. J. Microbiol. Meth., **86**, 119–120 (2011).
- 8) 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).
 - 9) Mahony, J., Chong, S., Merante, F., Yaghoubian, S., Sinha, T., Lisle, C. and Janeczko, R.: Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. J. Clin. Microbiol., **45**, 2965–2970 (2007).
 - 10) Nakagawa-Okamoto, R., Arita-Nishida, T., Toda, S., Kato, H., Iwata, H., Akiyama, M., Nishio, O., Kimura, H., Noda, M., Takeda, N. and Oka, T.: Detection of multiple sapovirus genotypes and genogroups in oyster-associated outbreaks. Jpn. J. Infect. Dis., **62**, 63–66 (2009).
 - 11) Nishida, T., Nishio, O., Kato, M., Chuma, T., Kato, H., Iwata, H. and Kimura, H.: Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. Microbiol. Immunol., **51**, 177–184 (2007).
 - 12) Okada, M., Shinozaki, K., Ogawa, T. and Kaiho, I.: Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapovirus-like viruses. Arch. Virol., **147**, 1445–1451 (2002).
 - 13) Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R. P., Bishop-Stewart, J., Bhargat, M. K., Millard, P. J., Mao, F., Leung, W. Y. and Haugland, R. P.: Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. J. Histochem. Cytochem., **47**, 1179–1188 (1999).
 - 14) Phan, T. G., Nguyen, T. A., Yan, H., Okitsu, S. and Ushijima, H.: A novel RT-multiplex PCR for enteroviruses, hepatitis A and E viruses and influenza A virus among infants and children with diarrhea in Vietnam. Arch. Virol., **150**, 1175–1185 (2005).
 - 15) Sakon, N., Yamazaki, K., Utagawa, E., Okuno, Y. and Oishi, I.: Genomic characterization of human astrovirus type 6 katano virus and the establishment of a rapid and effective reverse transcription-polymerase chain reaction to detect all serotypes of human astrovirus. J. Med. Virol., **61**, 125–131 (2000).
 - 16) Shigemoto, N., Fukuda, S., Tanizawa, Y., Kuwayama, M., Ohara, S. and Seno, M.: Detection of norovirus, sapovirus, and human astrovirus in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers. Microbiol. Immunol., **55**, 369–372 (2011).
 - 17) Stacy-Phipps, S., Mecca, J. J. and Weiss, J. B.: Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection. J. Clin. Microbiol., **33**, 1054–1059 (1995).
 - 18) 高尾信一, 原 三千丸, 岡崎富雄, 鈴木和男: ヒト呼吸器系ウイルスの検出における呼吸器系ウイルス多項目同時解析アッセイ (Luminex xTAG Respiratory Viral Panel FAST Assay) の有用性の検討. 感染症誌, **85**, 31–36 (2011).
 - 19) Toma, C., Lu, Y., Higa, N., Nakasone, N., Chinen, I., Baschkier, A., Rivas, M. and Iwanaga, M.: Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., **41**, 2669–2671 (2003).
 - 20) Winters, D. K. and Slavik, M. F.: Evaluation of a PCR based assay for specific detection of *Campylobacter jejuni* in chicken washes. Mol. Cell Probes, **9**, 307–310 (1995).
 - 21) Yamazaki-Matsune, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, Y., Kitazato, M., Nukina, M., Misawa, N. and Tsukamoto, T.: Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. J. Med. Microbiol., **56**, 1467–1473 (2007).
 - 22) Yan H., Nguyen T. A., Phan T. G., Okitsu S., Li Y. and Ushijima H.: Development of RT-multiplex PCR assay for detection of adenovirus and group A and C rotaviruses in diarrheal fecal specimens from children in China. Kansenshogaku Zasshi, **78**, 699–709 (2004).
 - 23) Yan, H., Yagyu, F., Okitsu, S., Nishio, O. and Ushijima, H.: Detection of norovirus (GI, GII), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. J. Virol. Methods, **114**, 37–44 (2003).
 - 24) Yatsuyanagi, J., Saito, S., Sato, H., Miyajima, Y., Amano, K. and Enomoto, K.: Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. J. Clin. Microbiol., **40**, 294–297 (2002).