

原 著

食 品 に お け る 赤 痢 菌 検 出 法 の 感 度 の 向 上

門田修子 楠本晃子 牧野壮一 川本恵子[†]

帯広畜産大学大動物特殊疾病研究センター (〒080-8555 帯広市稲田町西2-11)

(2009年10月5日受付・2009年11月27日受理)

要 約

細菌性赤痢は、近年食品媒介感染が危惧されており、赤痢菌の食品からの迅速かつ高感度な検出法確立は急務である。本研究では、厚生労働省より配布された参考試験法中、検出結果に影響を与えられた手順に改良を加え新規試験法とし、検出系の感度や迅速性の向上を図った。結果、新規試験法は食品検体からの赤痢菌検出において、参考試験法よりも10倍高感度であった。また、菌検出までに要する時間がおおよそ21時間以内と、参考試験法より約3.5時間の短縮ができた。以上より、新規試験法は迅速微量検出法であり、食品からの赤痢菌検出に有用であると考えられる。

——キーワード：ジルコニアビーズ破砕法，リアルタイムPCR，*Shigella sonnei*。

日獣会誌 63, 297～300 (2010)

赤痢菌は細菌性赤痢の起因菌であり、*Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*の4つの菌種に分類されている。これらは10個程度と少ない菌数で感染することが知られており、公衆衛生上重要な細菌の一つである [1]。重症例の起因菌である *S. dysenteriae* や *S. flexneri* は、衛生状態の悪い地域から多く分離される。いっぽう、衛生環境の改善に伴い *S. sonnei* が分離される傾向にあり、先進国での発生事例のおおよそ70%を本菌種が占めている。本菌種は病原性が弱いめしばしば不顕性であり、自覚症状のない患者から感染が広がる危険性を包含している。また、赤痢菌は薬剤耐性を高率に獲得しており、多剤耐性菌の報告もあることから [1, 2]、病原性が弱い本菌種といえども軽視はできない。本感染症は従来、水系やヒト-ヒト間の感染が主とされており食品媒介性の感染症とは考えられてこなかったが、近年諸外国で輸入食品からの赤痢菌分離報告や細菌性赤痢の集団食中毒が相次いで報告され、食品媒介感染が危惧されている [3, 4]。故に、食品からの高感度かつ迅速な検出系の確立は急務である。

2001年に西日本を中心に発生した細菌性赤痢事例では、*S. sonnei*に汚染された輸入カキが原因食品であった [5]。本事例で、自然に汚染されたカキから *S. sonnei* が初めて国内で分離され、厚生労働省はその時の試験法を参考試験法として配布した。本研究では分離実績のある *S. sonnei* を標的とし、従来の参考試験法にさらに改良を加え、有用と思われる点を検討した。

材 料 お よ び 方 法

参考試験法によるカキからの赤痢菌検出法：参考試験法（平成14年1月9日付で厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課から各都道府県・各法令市・各特別区衛生

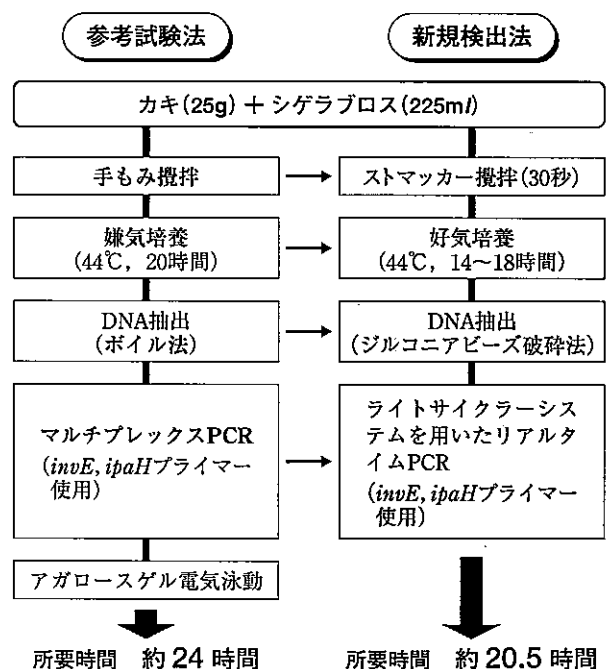


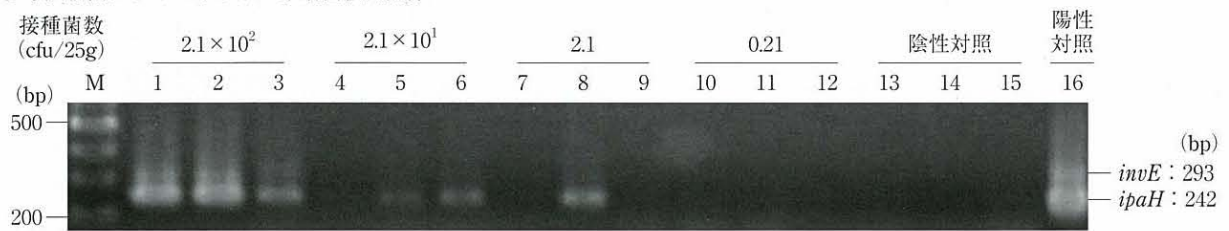
図1 参考試験法と新規試験法の簡易図

左図は参考試験法、右図は改良を加えた新規試験法を示す。参考試験法の内、変更部分を太字で表した。

[†] 連絡責任者：川本恵子（帯広畜産大学大動物特殊疾病研究センター食品有害微生物分野）

〒080-8555 帯広市稲田町西2線11 ☎0155-49-5890 FAX 0155-49-5386 E-mail: kkeiko@obihiro.ac.jp

a) 参考試験法によるカキからの赤痢菌検出限界



b) 新規試験法によるカキからの赤痢菌検出限界

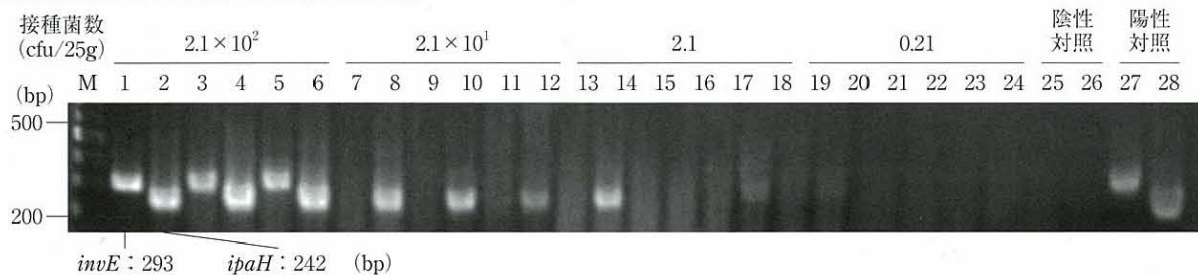


図2 各試験法のカキからの赤痢菌検出限界

S. sonnei で実験的に汚染したカキを用いて、各試験法による検出限界の比較を行った。

- a) 参考試験法による検出限界。接種菌数は、レーン1～3： 2.1×10^2 、レーン4～6： 2.1×10^1 、レーン7～9：2.1、レーン10～12：0.21 cfu/25gである。
- b) 新規検出法による検出限界。奇数レーン；invE、偶数レーン；ipaHを示す。陰性対照には、*S. sonnei* 非接種カキを、陽性対照には *S. sonnei* 培養液 (9.1×10^7 cfu/ml) からの抽出DNAを用いた。

主管部(局)食品衛生担当課(事務連絡)を図1左に示す。生食用カキ25gに、希釈した *S. sonnei* sh200606株培養液100 μ lを接種し、0.5 μ g/mlノボビオシン(Becton Dickinson, U.S.A.)含有シゲラブロス(SB:OXOID, U.K.)225mlとともにフィルター付きストマッカーバッグ(Creos, 東京)に入れ、10分室温にて放置し時々手もみ攪拌した後キャンピパックプラス(Becton Dickinson, U.S.A.)を用いて嫌気状態にした嫌気ジャー(OXOID, U.K.)内にて44℃で20時間嫌気培養した。培養液を攪拌後、1mlを採取し5,000rpmで2分間遠心した。得られたペレットに滅菌蒸留水100 μ lを加えて懸濁し、95℃で5分加熱した。その後13,000rpmで10分間遠心し、上清を検体DNAとした。標的遺伝子の検出にはTakaRa Ex Taq™(タカラバイオ(株), 滋賀)と、タカラ特殊細菌検出用プライマーセット(赤痢菌, 腸管侵入性大腸菌 invE および ipaH 遺伝子検出用, タカラバイオ(株), 滋賀)を用いたマルチプレックスPCRを行った。反応液組成は、 $\times 10$ 添付 Buffer を2 μ l, 添付 dNTP Mixture (2.5mM each) を2 μ l, プライマー(invE, ipaHともにforward, reverse) 0.2 μ lずつ、ポリメラーゼを0.1 μ l, 滅菌蒸留水14.1 μ l, 検体DNAを1 μ l混合した。PCR条件は、熱変性を94℃で30秒、アニーリングを55℃で30秒、伸長反応を72℃で30秒とし、これを35サイクル反復した後、伸長反応を72℃で7分を行った。

新規検出法によるカキからの赤痢菌検出法：新規試験法を図1右に示す。調整後の *S. sonnei* 培養液100 μ lを接種したカキ25gをノボビオシン含有SB 225mlとともにフィルター付きストマッカーバッグにいれ、ただちにストマッカー(AES Laboratoire, France)で機械的に30秒間攪拌した後44℃で18時間好気培養した。培養液を攪拌後2mlを採取し、ジルコニアビーズ破砕法を用いた市販のDNA抽出キット(MORA-EXTRACT Kit, 極東製薬工業(株), 東京)にてDNAを抽出した。本法により抽出したDNAは10倍に希釈してから検体DNAとしてリアルタイムPCRに用いた。新規検出法では、標的遺伝子の検出にLightCycler® 480 SYB Green I master mix (Roche Diagnostics, Germany)と、上記同様のプライマーセットを用いたリアルタイムPCRを行った。反応液組成は、 $\times 2$ Master Mixを10 μ l, プライマー1種類のforward, reverseを各1 μ lずつ、滅菌蒸留水を3 μ l, 検体DNA 5 μ lを混合した。PCR条件は、前熱変性を95℃で10分を行った後、熱変性を95℃で15秒、アニーリングを65℃で10秒、伸長反応を72℃で25秒とし、これを35サイクル行った。融解条件は、65℃で10秒の処理後、40℃で30秒処理した。本研究では、各試験方法の検出感度を比較し易くするために、リアルタイムのPCR産物についても電気泳動を行った。なお、各試験法の検出限界観察実験は3回繰り返して実施し、3回再現性が得られた希釈段階のみを陽性と判断

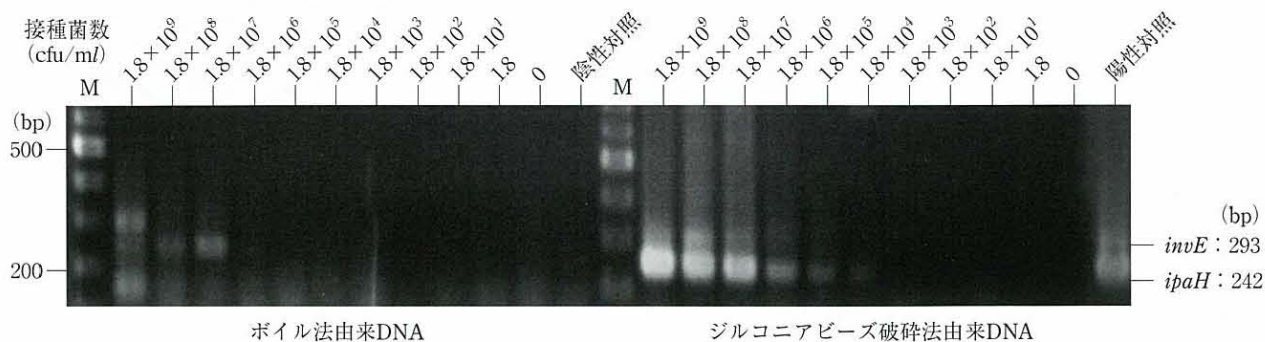


図3 各試験法由来抽出DNAの検出感度の比較

赤痢菌の培養液から、ボイル法(左図)またはジルコニアビーズ破砕法(右図)により抽出したDNAを階段希釈し、*invE*, *ipaH* プライマーによるマルチプレックスPCRを行い検出限界を比較した。陰性対照は滅菌蒸留水を、陽性対照は図2と同条件。

した。

各DNA抽出法の感度の比較：*S. sonnei* 培養液からボイル法とジルコニアビーズ破砕法によりDNA抽出を行った。抽出DNAを階段希釈し、上記プライマーを用いたマルチプレックスPCRを実施し、検出限界を比較した。

成 績

参考試験法の試験結果：参考試験法に従い、カキからの赤痢菌検出限界を観察した。その結果、210cfu/25gまでの検出限界であった(図2a)。また、所要時間は攪拌から標的遺伝子の検出までおよそ24時間であった。本研究では、DNA濃度が薄くなるにつれ、2組のプライマーの内*ipaH*の方が高感度であった(図2ab)。したがって、本研究では*ipaH*のみの検出でも赤痢菌陽性とした。

新規検出法の試験結果：続いて、新規検出法に従いカキからの赤痢菌検出限界を観察したところ、*invE*と*ipaH*遺伝子(*invE*, *ipaH*)の両方揃った状態での検出限界が210cfu/25g、*ipaH*のみの検出は21cfu/25gまでであり、参考試験法よりも10倍高感度であった(図2b)。また、本検出法において、攪拌から標的遺伝子の検出までの所要時間は約20.5時間であった。

各DNA抽出法の感度の比較：感度の向上に最も影響を与えると思われるステップであるDNA抽出法を比較するため、*S. sonnei*の培養液から各試験法の抽出法によりDNAを抽出し、マルチプレックスPCRから検出限界を比較した。結果、ボイル法による抽出DNAでは、*invE*と*ipaH*の両方揃った状態での検出限界が 1.8×10^9 cfu/ml、*ipaH*のみの検出は 1.8×10^7 cfu/mlまでであったのに対し(図3左図)、ジルコニアビーズ破砕法による抽出DNAでは、*invE*と*ipaH*が揃った状態で 1.8×10^6 cfu/ml、*ipaH*のみの検出は 1.8×10^4 cfu/mlまでと(図3右図)、1,000倍高感度であった。

考 察

新規試験法は参考試験法に比べ10倍高感度であり、食品25gに対し21個以上の菌数が存在した場合、21時間以内の検出が可能であった。検出感度が向上した要因としては、DNA抽出法の改良があげられる。

食品中の高濃度なタンパク質やDNaseはPCRに影響し、高感度な菌の検出を阻害する。参考試験法で採用されているボイル法は、簡便であるものの、夾雑物が除去されないため高純度のDNAを得ることは難しい。よって、新規試験法では夾雑物の除去を目的として、ジルコニアビーズ破砕法を採用した。*S. sonnei*の培養液より抽出したDNAを用いたPCRによる検出感度比較実験において、ジルコニアビーズ破砕法による抽出DNAは、ボイル法による抽出DNAより1,000倍高感度であった(図3)。したがって、ジルコニアビーズ破砕法は高純度DNA抽出法であり、検出感度の向上に寄与したと推察される。

新規検出法では、DNA抽出法その他攪拌法、培養法、PCR法についても変更した。

健康なカキの表面は粘膜で覆われ、微生物の付着はほとんどなく、食中毒菌は腸管内に存在すると推察される[6]。そのため、検体を十分に破碎処理する必要がある。そこで、より簡便で均一な攪拌を行うため新規試験法ではストマッカーによる機械的攪拌を導入した(図1右)。

赤痢菌の培養には嫌気条件下培養が推奨されており(FDA Bacteriological Analytical Manual: Chapter 6. *Shigella*. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-6.html>)、参考試験法においても同条件で増菌培養が行われている。赤痢菌は通性嫌気性細菌であることから、嫌気培養により検体中に存在する好気性菌の増殖を抑制することで目的菌の増殖を促し、検出感度を向上させるためと考えられるが、新規試験法では操作の簡便性や時間短縮を考え、好気条件下での培養に変更した(図1右)。赤痢菌を接種したカキを培地内で好気・嫌気培養し、培

養後の菌数を測定したところ、両条件下とも 5.0×10^6 cfu/ml と、培養条件による菌数の違いは認められず、夾雑菌の増殖においてもほとんど差が見られなかったことから (Data not shown), 好気培養への変更が可能であると考えられた。

参考試験法で採用されているマルチプレックスPCRは、一つの反応系に複数のプライマー対を使用することで複数の遺伝子領域の同時増幅が可能であり、迅速性が期待できるが、プライマーの混合による干渉作用より感度の低下が懸念される。いっぽう、リアルタイムPCRは融解曲線のピーク解析からTm値を求めることで目的の遺伝子特異的な増幅をモニターで判定できるため、アガロースゲルによる電気泳動を必要とせず、時間短縮が可能である。PCRにおいて参考試験法は約2.5時間、電気泳動に約0.5時間を要するが、新規試験法では判定を含めPCRが約1.5時間で終了することから、約1.5時間の短縮が可能となり、迅速性の向上に寄与した。

本研究では、新規試験法において菌体の検出が困難と思われるカキから迅速かつ高感度な赤痢菌の検出が認められたため、これらの改良により食の安全性向上に貢献できるものと推察される。

本研究は日本学術振興会の科学研究費補助金 (16255013)、厚生労働科学研究費補助金、文部科学省21世紀COEプログラムおよび新興・再興感染症拠点形成プログラムによる補助金により行った。

引用文献

- [1] Niyogi SK : Shigellosis, J Microbiol, 43, 133-143 (2005)
- [2] 松下 秀, 有松真保, 高橋正樹, 横山敬子, 小西典子, 柳川義勢, 山田澄夫, 諸角 聖 : 東京において最近5年間 (1995~1999) に分離された輸入及び国内事例由来赤痢菌の菌種・血清型と薬剤耐性, 感染症学雑誌, 74, 834-840 (2000)
- [3] Kapperud G, Rorvik ML, Hasseltvedt V, Hoiby AE, Iversen GB, Staveland K, Johnsen G, Leitao J, Herikstad H, Andersson Y, Langeland G, Gondrosen B, Lassen J : Outbreak of *Shigella sonnei*, Infection Traced to Imported Iceberg Lettuce, J clin Microbiol, 33, 609-614 (1995)
- [4] 松下 秀, 工藤泰雄 : わが国における細菌の細菌性赤痢の発生状況と新血清型赤痢菌の検出例, モダンメディア, 44, 312-319 (1998)
- [5] Terajima J, Tamura K, Hirose K, Izumiya H, Miyahara M, Konuma H, Watanabe H : A Multi-Prefectural Outbreak of *Shigella sonnei* Infections Associated with Eating Oysters in Japan, Microbiol Immunol, 48, 49-52 (2004)
- [6] Garland CD, Nash GV, McMeekin TA : Absence of Surface-Associated Microorganisms in Adult Oysters (*Crassostrea gigas*), Appl Environ Microbiol, 44, 1205-1211 (1982)

Improved Detection Method for *Shigella sonnei* from Food

Shuko MONDEN*, Akiko KUSUMOTO, Sou-ichi MAKINO and Keiko KAWAMOTO†

* Research Center for Animal Hygiene and Food Safety, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Nishi 2-11, Inada-cho, Obihiro, 080-8555, Japan

SUMMARY

Outbreaks of shigellosis have been associated with traveling to areas with poor hygiene. However, the number of foodborne cases is increasing in industrialized countries. Since the infectious dose of *Shigella* spp. is as low as 10 cells, a rapid and sensitive method of detecting *Shigella* spp. in food is required. The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (MHLW) released a detection protocol for *Shigella* spp. from oysters in 2002, but a number of problems with it, including low sensitivity and instability of results, have been identified. In this study, a new detection method was established based on the MHLW protocol with some modifications. We introduced mechanical stomaching instead of manual squeezing in the sample preparation step, a zirconia beads breakage procedure for DNA extraction in place of boiling, and real-time PCR instead of multiplex PCR. The results indicated that the new method had ten times the sensitivity of the MHLW protocol. Hence, we propose this sensitive and rapid real-time PCR based method to contribute to the improvement of *Shigella* spp. detection in food and assure food safety.

— Key words : real-time PCR, *Shigella sonnei*, zirconia beads breakage procedure.

† Correspondence to : Keiko KAWAMOTO (Research Center for Animal Hygiene and Food Safety, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Nishi 2-11, Inada-cho, Obihiro, 080-8555, Japan

TEL 0155-49-5890 FAX 0155-49-5386 E-mail : kkeiko@obihiro.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 63, 297~300 (2010)