

調查研究

I 研究報告・資料

高齢者福祉施設で発生した細菌性赤痢の SYBR Green real-time PCR 法を用いたスクリーニング

吉原 純子¹、島村 亮子²、鈴木 信一²、大木 旬子²、北橋 智子²

(1 現保健所 食品安全課 2 環境保健研究所 健康科学課)

要 旨 平成26年11月、千葉市内の高齢者福祉施設で細菌性赤痢の患者が発生した。SYBR Green real-time PCR法により、調査対象者104名（入所者及び職員）のうち2名から赤痢菌（*Shigella flexneri* 6型）の遺伝子が検出された。SYBR Green real-time PCR法は使用する機器や試薬等により陽性コントロール（*Shigella sonnei*）と陽性検体（*Shigella flexneri* 6型）のTm値に差が認められるため、判定に注意を要するが、多くの調査対象者を短時間でスクリーニングする際に有用な方法であることが確認された。

Key Words : *Shigella flexneri*, 赤痢菌, SYBR Green real-time PCR

1. はじめに

細菌性赤痢は3類感染症届出対象であり、アジア地域を中心とする国外からの輸入感染事例が多い。赤痢菌（*Shigella*）属は*S. dysenteriae*、*S. flexneri*、*S. boydii*、*S. sonnei*の4群に分類され、国内では*S. sonnei*の報告が最も多く、次いで*S. flexneri*が報告されている¹⁾。平成25年には全国で143件、千葉県内で4件の細菌性赤痢の発生届出があった。

千葉市内の高齢者福祉施設において平成26年11月に赤痢菌の発生が報告されたので、その事例概要を報告する。

2. 発生概要

平成26年11月1日、千葉市内の医療機関から細菌性赤痢の発生の届出があった。

そこで保健所が調査を行ったところ、患者は市内の高齢者福祉施設に入所する80歳代の女性で、同年10月23日に下腹部の違和感を訴えた後に発熱（40.6℃）、24日に嘔吐と水様性下痢等の消化器症状を呈し、糞便から*S. flexneri* 6型が分離同定されていた。

このため、施設における感染拡大防止の観点から、入所者及び職員104名について、SYBR Green real-time PCR法²⁾（SYBR-qPCR）を用いた一斉スク

リーニングを実施したところ、2名から赤痢菌（*Shigella flexneri* 6型）の遺伝子が検出された。

3. 材料および方法

3. 1 糞便検体

11月4日～14日の10日間に搬入された入所者40名、介護職員53名及び食品従事者11名の合計104名の糞便を検査対象とした。

3. 2 SYBR Green real-time PCR法

糞便検体をDHL平板培地と白糖加SSS平板培地（栄研化学）に塗抹し、37℃で20～24時間培養した。DHL平板培地からコロニースライプにより得た菌苔を100μLの2.5mM NaOHに懸濁させ、100℃で10分加熱した後、8μLの1M Tris-HCl（pH7.0）で中和させ、遠心処理した上清をDNAテンプレートとした。

SYBR-qPCRによるスクリーニングは、飯田らの方法²⁾により実施した。プライマーは16種類の食中毒起因菌関連遺伝子のうち赤痢菌の*virA*遺伝子検出系のみを使用した（表1）。なお、増幅装置はABI 7300 Real-time PCR system（Applied Biosystems）を使用した。

3. 3 赤痢菌の分離同定

糞便検体をノボビオシン加mEC培地（以下N・mEC）に加え、42℃で18～24時間増菌培養した。SYBR-qPCR

でスクリーニング陽性となった糞便検体の増菌液を DHL及び白糖加SSS平板培地に塗抹し、37℃で20～24時間培養した。増菌培養液を塗抹した平板もしくは糞便検体を直接塗抹した平板から糖非分解コロニーを釣菌し、TSI及びLIM培地により37℃で18～24時間、確認培養を行った。

確認培養により赤痢菌の生化学性状を示した検体について、赤痢菌免疫血清（デンカ生研）を用いた凝集反応により、分離菌株の血清型を同定した。

なお、分離菌株の病原遺伝子の確認については、*invE*及び*ipaH*遺伝子検出用プライマー（TaKaRa）を用いたPCR法により行った。

3. 4 薬剤感受性試験

分離菌株の薬剤感受性試験は、米国臨床検査標準化協会（CLSI：Clinical and Laboratory Standards Institute, 旧NCCLS）の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づき、市販の感受性試験用ディスク（センシディスク；BD）を用いて行った。供試薬剤は、クロラムフェニコール(CP)、テトラサイクリン(TC)、アンピシリン(ABPC)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤(ST)、ナリジクス酸(NA)、ホスホマイシン(FOM)、ノルフロキサシン(NFLX)及びセフトキシム(CTX)の8剤を使用した。

表1. SYBR Green real-time PCR 使用プライマー

検出菌	検出遺伝子	プライマー名	配列	Tm 値
EIEC and <i>Shigella spp.</i>	<i>virA</i>	virA-F	CTGCATTCTGGCAATCTCTTCACA	80.4
		virA-R	TGATGAGCTAACTTCGTAAGCCCTCC	

表2. SYBR Green real-time PCRによるスクリーニング検査結果

検体	検査件数	陽性	陰性
入所者	40	1	39
介護職員	53	1	52
食品従事者	11	0	11
合計	104	2	102

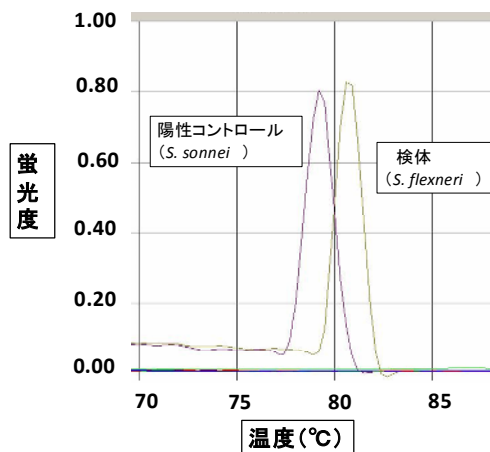


図1 融解曲線

表3. 分融解曲線のTm値（検査4回）

陽性コントロール <i>S. sonnei</i>	検体からの分離株 <i>S. flexneri</i> 6型	<i>S. sonnei</i> と <i>S. flexneri</i> 6型 のTm値の差
79.2～79.5℃	79.9～80.6℃	0.6～1.4℃

表4. *S.flexneri* 6型の薬剤感受性試験

薬剤	CP	TC	ABPC	ST	NA	FOM	NFLX	CTX
感受性	R	R	R	R	S	S	S	S

S:感受性 R:耐性

4. 結果

SYBR-qPCRによるスクリーニングの結果、入所者1名及び介護職員1名の2名が陽性となり、2名から*S.flexneri* 6型が分離された(表2)。PCR法による病原遺伝子の確認では、2検体ともに*invE* 及び*ipaH* が検出された。

初回のSYBR-qPCRの融解曲線のTm値(融解温度)は80.4℃を挟み、陽性コントロールとして使用した*S.sonnei*は79.2℃、本事例の原因菌である*S.flexneri* 6型は80.6℃であった(図1)。一連の検査(4回分)において、*S.sonnei*のTm値は79.2~79.5℃、*S.flexneri* 6型のTm値は79.9~80.6℃、*S.sonnei*と*S.flexneri* 6型のTm値の差は0.6~1.4℃の範囲であった(表3)。

なお、今回の事例において分離された菌株の薬剤感受性試験を行った結果、CP、TC、ABPC及びSTに耐性であった(表4)。

5. 考察

本事例では原因菌が判明していたことから、赤痢菌のみをターゲットにした反応系を利用するSYBR-qPCRを用いて、迅速且つ効率的に遺伝子のスクリーニングを実施した。

SYBR-qPCRは、融解曲線のTm値(融解温度)で菌種の判定を行う。今回、患者菌株が入手できていない初回のスクリーニングで、陽性コントロールとして使用した*S.sonnei*のTm値と*S.flexneri* 6型のTm値に1.4℃の差が認められた。このため、検体から分離された*S.flexneri* 6型について、再度SYBR-qPCRによる*virA*のTm値を測定するとともに、PCR法で*invE*及び*ipaH*の存在確認をした。このようなTm値の差(検査ごとのTm値のバラツキ)は増幅装置による要因が大きいと思われる。従って、SYBR-qPCRをスクリーニングに用いる際には、増幅装置ごとに予想されるTm値の範囲を把握することによって、より客観的な判定が可能となり、検査効率も上がるものと考えられた。

近年、ほとんどの赤痢菌が何らかの薬剤に耐性であることが報告されている³⁾。今回の赤痢患者(入所者)は抗菌薬服用後も排菌していたことから、薬剤耐性菌

であることを疑い検査したが、本事例の*S.flexneri* 6型も、殆どの赤痢菌と同じ薬剤に耐性(CP、TC、ABPC及びST耐性)で、ESBL産生菌ではなかった。近年はESBL産生赤痢菌やキノロン形薬剤耐性赤痢菌も報告されており³⁾、その動向を注視していく必要があると思われる。

文献

- 1) 病原微生物検出情報(IASR);細菌性赤痢, The Topic of This Month Vol.30, p.311-313, No.12(No.358), 2009.
- 2) Natsuko Iida, Hiroshi Fukushima, Midori Hiroi et al: Development of Duplex SYBR Green Real-Time PCR for Rapid and Simultaneous Detection of 16 Specific Genes of 16 Major Foodborne Bacteria, Jpn.J. Food Microbion, 30(3), 106-164, 2013.
- 3) 東京都において分離された赤痢菌の菌種、血清型および薬剤感受性について(2012年), 東京都微生物検査情報(月報), 第34巻第6号: 1-2, 2012.