

# 研究情報

## マルチプレックス PCR によるサルモネラ主要血清型同定法

AKIBA Masato

細菌・寄生虫研究領域 主任研究員 秋庭 正人

サルモネラ感染は家畜生産の障害要因であるのみならず、畜産物を介してヒトに食中毒を起こすことから、公衆衛生上の脅威ともなっています。サルモネラは表面抗原の違いにより 2,500 以上の血清型に型別できますが、このうち家畜や人にしばしば感染する主要な 6 血清型は家畜伝染病予防法により監視伝染病に指定されています。分離されたサルモネラが監視伝染病に含まれるか否かでその後の対応が異なるため、飼料や食肉衛生検査の現場では血清型別を行う必要があります。サルモネラの血清型別には通常、4 日程度の時間を要することから、監視伝染病を含む主要な血清型を迅速に同定する手法の開発が望まれています。そこで、我々は主要 7 血清型 (Typhimurium, Choleraesuis, Enteritidis, Dublin, Gallinarum, Infantis, Hadar) であるか否かを 3 時間以内で高精度に判定できるマルチプレックス PCR 法 (m-PCR) を開発しました。

m-PCR では各標的血清型について、サルモネラ属菌が共通に保有する *invA* 遺伝子 (600 bp) と各血清型に特異的な遺伝子 (300 bp, 200 bp, 100 bp) の計 4 遺伝子を同時検出します。例えば図 1 の血清型 Typhimurium (ST) 同定用 m-PCR では ST を検査材料としたとき、4 遺伝子 (*invA*, TMP1 ~ 3) が全て増幅されますが、2 相 H 抗原を発現しない ST 単相変異株を除き、その他血清型で 4 遺伝子が全て増幅されることはありません。したがって、4 遺伝子が全て増幅された株は ST であると判定できます。これら手法の特異性の高さは多くの野外分離株を用いて実証済みです。また、PCR のサイクル条件は 7 つの標的血清型で統一してあるので、複数血清型で同時に検査を進めることが可能です。本技術を利用した 7 種の簡

易キットが国内試薬メーカーから入手できます (図 2)。これらの m-PCR は飼料検査、食肉衛生検査、家畜衛生検査、食中毒検査、臨床検査など様々な検査の迅速化や精度向上に寄与することが期待されます。

現在、検査の迅速性が強く求められる食肉衛生検査、飼料検査、輸出入検疫の現場での m-PCR 利用を促進するため、検査プロトコルの検討を行っています。ここで検査プロトコルとは検査材料の培養を開始し、菌を分離、同定し、血清型別を行うまでの一連の手順を意味します。従来法では増菌培養、分離培養、抗血清による血清型別を 10 日程度 (飼料検査の場合) の時間をかけて行います。検討中の迅速法 1 では血清型別の段階を m-PCR に置き換えることで 10 日程度を要した検査時間を 5 日以内に短縮することができます。さらに増菌培養液から DNA を抽出して m-PCR を行う迅速法 2 では検査時間を 2 ~ 3 日に短縮することが可能となります。現在、従来法と比較したときの迅速法 1 および 2 の感度と特異度を算出し、これらプロトコルの有用性を検討しています。

掲載誌 Akiba M. et al., J. Microbiol. Methods, 85, 2011, 9-15.

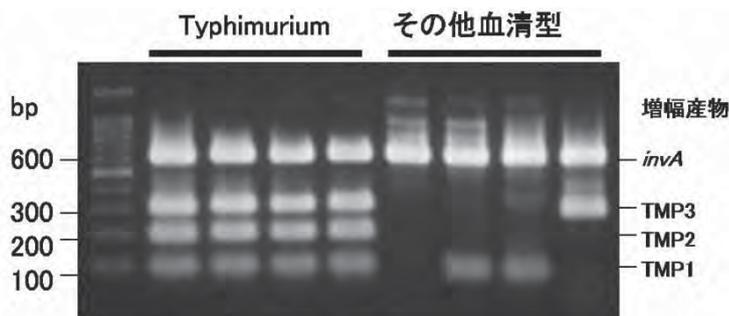


図 1. 血清型 Typhimurium 同定用 m-PCR 実施例



図 2. 7 種の市販簡易キット