

Ⅲ 報告

大同生命厚生事業団地域保健福祉研究助成（令和 2～3 年度）

リアルタイム PCR を用いた食品等からの *Staphylococcus argenteus* 迅速検出法

高橋志保 今野貴之 鈴木純恵 伊藤佑歩 鈴木忠之 熊谷優子*

リアルタイム PCR を用いて *Staphylococcus argenteus* と黄色ブドウ球菌を迅速に検出するためのプライマー及びプローブを設計した。両菌種の菌株の DNA 抽出液を用いて、設計したプライマーの反応性の確認を行ったところ、それぞれ該当する菌種のみを検出し、交差反応がみられないことを確認した。また、検出感度を評価したところ、両菌種とも 10 cfu/tube まで検出可能であった。さらに Duplex リアルタイム PCR として、両菌種が混在した検体を用いた場合においても、*S. argenteus* 及び黄色ブドウ球菌をそれぞれ特異的に検出できることを確認した。

1. はじめに

Staphylococcus argenteus は、2015 年に黄色ブドウ球菌より細分化された新種である¹⁾。*S. argenteus* は、黄色ブドウ球菌と同様にブドウ球菌エンテロトキシンを産生する場合もあり、食中毒の原因となる^{2,3)}。*S. argenteus* と黄色ブドウ球菌の性状は、色素産生性に違いがあるものの、明確な鑑別性状は明らかでない。2018 年には本県において *S. argenteus* を原因とする食中毒事例が発生したが、本菌の同定には遺伝子解析などの特殊な検査が必要であり、結果が判明するまでに時間を要した。

近年、食品等の病原体を調べるため、遺伝子検査の一つであるリアルタイム PCR の利用が進んでいる。リアルタイム PCR は特異性と迅速性に優れており、食中毒事例が発生した際の検査に用いることで迅速な原因究明につながることを期待できる。そこで、本研究では *S. argenteus* と黄色ブドウ球菌の鑑別が可能な食品等からの *S. argenteus* 迅速検出法として、*S. argenteus* 及び黄色ブドウ球菌がともに保有し、菌種ごとの遺伝子配列の同一性が高い α -haemolysin 遺伝子⁴⁾を対象としたリアルタイム PCR を検討した。

2. 方法

2.1 プライマー及びプローブの設計

GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) に登録された *S. argenteus* 株及び黄色ブドウ球菌株の α -haemolysin 遺伝子の配列を、オンライン解析システムの ClustalW (<https://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>)

により比較参照し、両菌種にそれぞれ特異的な配列部分に対応するプライマーとプローブを設計した。

当センターで過去に分離された *S. argenteus* 10 株（9 株は同一事例由来）と黄色ブドウ球菌 9 株について、シカジーニアス DNA 抽出試薬（関東化学）を用いて DNA 抽出液を作製し、両菌種の検出用プライマーを用いて PCR を行い、反応性を確認した。試薬は、TaKaRa Ex Taq（タカラバイオ）を用い、94℃2 分の後、94℃30 秒、55℃30 秒及び 72℃30 秒を 25 サイクル後、72℃2 分の条件で行った。さらに、PCR 増幅断片のシーケンス解析（ファスマック）を行い、それぞれの α -haemolysin 遺伝子の登録配列と比較した。

2.2 リアルタイム PCR の評価

S. argenteus 及び黄色ブドウ球菌の各菌株を対象に検出用プライマーと対応するプローブを用いてリアルタイム PCR を試行し、特異性を確認した。機器は 7500 Fast real-time PCR system（Applied Biosystems）、反応試薬は TaqMan Environmental PCR Master Mix 2.0（Applied Biosystems）を使用した。反応条件は Standard Mode で、50℃2 分、95℃10 分の後、95℃15 秒及び 60℃1 分を 40 サイクル行った。さらに、菌数を測定した *S. argenteus* 及び黄色ブドウ球菌の培養液をそれぞれ 10 倍段階希釈し、各希釈液の DNA 抽出溶液を作製後、同様にリアルタイム PCR を試行して両菌種の検出感度を評価した。

*元秋田県健康環境センター

表 1 リアルタイム PCR 用プライマー及びプローブ

<i>S. argenteus</i> 検出用	塩基配列 (5'-3') * ¹
Staph hly F * ²	TATAGAGTYTATAGCGAAGAAGG
S.arg hly R-1n	GTATCATCAGCACTGATGCTG
S.arg hly Probe (5' FAM - MGB)	CTGGCATGGCCTTCTGCT
黄色ブドウ球菌検出用	塩基配列 (5'-3')
Staph hly F * ²	TATAGAGTYTATAGCGAAGAAGG
S.aureus hly R-1	TCATCACCAGTMACRTTACCG
S.aureus hly Probe (5' HEX - MGB)	AAGGTACAGTTGCAACT

*¹: 混合塩基 Y=C/T, M=A/C, R=A/G*²: 両菌種に共通のプライマー

3. 結果

3.1 プライマー及びプローブの反応性

設計したプライマー及びプローブを表 1 に示す。両菌種の検出用プライマーを用いた PCR では、それぞれに該当する菌株にのみ増幅反応が見られ、交差反応は見られなかった。また、各菌株の PCR 増幅断片のシーケンスは、*S. argenteus* もしくは黄色ブドウ球菌の α -haemolysin 遺伝子の登録配列と一致することを確認した。

3.2 リアルタイム PCR の評価

検出用プライマー及び対応するプローブを用いて試行したリアルタイム PCR では、該当する菌種をそれぞれ検出可能であった。培養液の希釈系列から作製した DNA 抽出溶液を用いてリアルタイム PCR を実施した結果、*S. argenteus*、黄色ブドウ球菌ともに 10 cfu/tube まで検出可能であった（表 2）。また、両菌種を同時に検索できるようにした Duplex リアルタイム PCR において、両菌種が混在していても、設計したプライマー及びプローブにより、*S. argenteus* と黄色ブドウ球菌をそれぞれ特異的に検出できることを確認した。

表 2 両菌種の各希釈液の Ct 値

	ウェル	cfu / tube				
		10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴
<i>S. argenteus</i>	1	ND	36.13	32.00	28.81	24.94
	2	ND	35.67	31.74	28.49	24.78
黄色 ブドウ球菌	1	ND	37.17	34.34	30.70	27.36
	2	ND	37.38	34.34	30.64	27.20

ND: 不検出

4. 考察

本研究では、 α -haemolysin 遺伝子を対象に *S. argenteus* と黄色ブドウ球菌を同時に検出可能なリアルタイム PCR を確立した。食品等における *S. argenteus* の汚染実態は十分にわかっていないが、本菌は黄色ブドウ球菌と類縁であり、検体によっては両菌種が同時に検出される可能性は否定できない。ブドウ球菌食中毒は、食品中で菌が増殖する際に産生する毒素を原因とする。*S. argenteus*、黄色ブドウ球菌ともにブドウ球菌エンテロトキシンを産生する場合があることから、両菌種を同時に検出できる本法は、食中毒事例発生時の検査法として有用性が高いと考えられる。また、ブドウ球菌食中毒は、時に発症者数が多く甚大な被害を及ぼす場合がある。リアルタイム PCR は迅速性に優れていることから、食中毒事例発生時の調査検体として、患者便のみでなく原因と思われる食品残品があれば、本法を用いることで原因食品を迅速に推察することができ、被害の拡大を最小限にとどめることが期待できる。さらに、本法は 10 cfu/tube と十分な感度を有しており、食品残品がない場合であっても、調理前の食材等が残っていれば、増菌培養と併用することで汚染源の推定につなげることも可能である。

これまでに国内で報告されている *S. argenteus* を原因とする食中毒事例は、本県での事例を含め 4 例のみで、事例に関する情報がまだ十分に蓄積されていない。本菌は黄色色素を産生しないため、黄色ブドウ球菌の選択分離培地として汎用される卵黄加マンニット食塩培地上で白色のコロニーを形成する。そのため、黄色ブドウ球菌を検査対象として、典型的なコロニーのみから判断した場合には、見落とされる可能性も考えられる。

今後, 本法を利用して黄色ブドウ球菌のみならず *S. argenteus* についても確実に検出することで, 本菌による食中毒の実態解明につながることを期待する。

参考文献

- 1) Tong S.Y., et al.: Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the nonpigmented *Staphylococcus argenteus* sp. nov. and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **65**, 2015, 15-22.
- 2) Suzuki, Y., et al.: Food poisoning outbreak in Tokyo, Japan caused by *Staphylococcus argenteus*, Int. J. Food Microbiol., **262**, 2017, 31-37.
- 3) Wakabayashi, Y., et al.: Staphylococcal food poisoning caused by *Staphylococcus argenteus* harboring staphylococcal enterotoxin genes, Int. J. Food Microbiol., **265**, 2018, 23-29.
- 4) Aung M.S., et al.: Molecular characterization of *Staphylococcus argenteus* in Myanmar: identification of novel genotypes / clusters in staphylocoagulase, protein A, alpha- haemolysin and other virulence factors, J Med Microbiol., **68**, 2019, 95-104.