

食中毒検査における次世代シーケンサーの活用の検討

徳島県立保健製薬環境センター

高木 夕嘉・新田 真友・山本 瑞希・石田 弘子

The utilization of next-generation sequencers for food poisoning bacteria

Yuka TAKAGI, Mayu NITTA, Mizuki YAMAMOTO and Hiroko ISHIDA

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

要 旨

食中毒細菌の検査を実施するにあたり、検体からの培養を介さない新たな手法として、次世代シーケンサーによる細菌叢の16S rRNA 遺伝子解析が病原体の検出に活用できるか検討したところ、従来の培養法の結果と概ね一致した。また、腸内細菌叢の多様性解析について原因物質別で比較したところ、*Clostridium* 属、*Campylobacter* 属、*Salmonella* 属による食中毒の患者便は、症状のない従事者の便に比べ腸内細菌叢の多様性が低下する傾向が見られた。

Key words : 食中毒 Food poisoning, 次世代シーケンサー Next-generation sequencer, 細菌叢解析 Bacteria flora analysis

I はじめに

食中毒とは、細菌、ウイルス、寄生虫などの病原体や化学物質に汚染された食品、または自然毒を含む食品を摂取することにより引き起こされる、嘔吐、下痢などの消化器症状をはじめとした幅広い症状の健康被害である。これらの健康被害発生時には、被害拡大防止に向け迅速な検査対応が求められており、当センターでは保健所からの行政検査依頼を受けて原因物質の検査を行っている。細菌検査では、培養法やPCR法で原因菌の探索を行っているが、病原体が検出されない事例がある。

そこで本研究では、食中毒を疑う便検体からの培養を介さない新たな手法として、次世代シーケンサー（以下「NGS」という。）を用いた細菌叢の16S rRNA 遺伝子解析（以下「16S解析」という。）を行い、病原体の検出に活用できるか検討したので報告する。

II 材料及び方法

1 材料

2023年4月から2025年3月までの間に依頼のあった、食中毒12事例における行政検査で搬入された患者便43検体及び従事

者便30検体の計73検体を使用した。

原因物質の内訳は、細菌性食中毒8事例（*Clostridium* 属1事例、*Campylobacter* 属5事例、*Staphylococcus* 属1事例、*Salmonella* 属1事例）、ウイルス性食中毒2事例（いずれも *Norovirus*）、寄生虫食中毒1事例（*Kudoa* 属）、原因物質不明が1事例であった（表1）。

表1 事例詳細

	原因物質	患者	従事者
細菌	<i>Clostridium</i> 属	6名	2名
	<i>Campylobacter</i> 属	8名	7名
	<i>Staphylococcus</i> 属	5名	1名
	<i>Salmonella</i> 属	10名	搬入なし
ウイルス	<i>Norovirus</i>	10名	7名*
寄生虫	<i>Kudoa</i> 属	4名	7名
その他	不明	搬入なし	6名

**Norovirus* を検出した従事者3名は、患者として検討した。

2 方法

(1) 培養法

新鮮便1gをPBS(-)で希釈して10%乳剤とし、常法¹⁾に従って直接培養及び増菌培養を行い、菌の分離及び同定を実施した。

(2) 16S解析

① 便からのDNA抽出方法

DNAの抽出には、新鮮便を-80℃で凍結保存したものをを用いた。従事者便7検体及び患者便4検体について、酵素法(QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit, QIAGEN)及びビーズ破砕法(Nucleo Spin DNA Stool, タカラバイオ)の2種類の方法を用いて、メーカーの手順書に従ってDNAを抽出した。

② ライブラリ調製

東らの研究結果²⁾を参考にシーケンス解析領域をV3-V4領域としてライブラリ調製を行った。

まず、16S(V3-V4) Metagenomic Library Construction Kit for NGS (タカラバイオ)を用いて表2の組成でPCR反応液を作製し、94℃ 1分 → [98℃ 10秒 → 50℃ 15秒 → 68℃ 15秒] × 28 サイクルで遺伝子増幅を行った後、AMPure XP (BECKMAN COULTER)を用いてDNAを精製し、電気泳動にて確認を行った(約550bp)。

表2 1st PCR反応調整液

試薬	容量
2×Gflex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTPplus)	12.5 µL
16S V3-V4 Primer Mix (10×)	2.5 µL
Tks Gflex DNA Polymerase	0.5 µL
DNA template (10ng 程度)	X µL
DW	9.5 µL-X µL
合計	25 µL

次に、Nextera XT Index Kit (illumina)を用いて表3の組成でPCR反応液を作製し、94℃ 1分 → [98℃ 10秒 → 60℃ 15秒 → 68℃ 15秒] × 8 サイクルで解析用アダプターの付加を行った後、再度DNAの精製を行い、電気泳動にて確認を行った(約600bp)。

表3 2nd PCR反応調整液

試薬	容量
2×Gflex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTPplus)	5.0 µL
Index 1 primer	2.5 µL
Index 2 primer	2.5 µL
Tks Gflex DNA Polymerase	12.5 µL
1st PCR 精製産物	0.5 µL
DW	2.0 µL
合計	25 µL

最後に、各ライブラリを4nMになるように10mM Tris HClで希釈調製後に等量混合し、10% PhiX Control v3 (illumina)のスパイクインを含めた終濃度6pMのプーリングライブラリを調製した。

③ 16SrRNA配列の決定

600 サイクル MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) 及び Illumina MiSeq シーケンサーにより、ペアエンドの2×300塩基対のリードで配列を決定した。

④ 菌の同定

CLC Genomics Workbench (QIAGEN)を用いて、得られた配列データの菌種解析を行った。リファレンスデータ(SILVA SSU ver138.1)に対する相同性が99%以上のものを同一菌種として、分類学的操作単位であるOTUs (Operational Taxonomy Units)で分類した。

⑤ 添加試験

濃度既知の *Campylobacter* 属菌及び *Salmonella* 属菌を使用して添加試験を行い、16S解析の感度確認を行った。16S解析でこちらの菌も検出しなかった3検体(A, B, C)の便200mgに1.0×10³, 1.0×10⁵, 1.0×10⁷, 1.0×10⁹個/mLに調製した細菌をそれぞれ50 µl添加後、①~④のとおり検査を実施し、検体中における対象菌の検出リード数を確認した。

⑥ 細菌叢の多様性解析

CLC Genomics Workbench (QIAGEN)を用いて、全ての検体について、腸内細菌叢のα多様性解析(Chao 1 及び Shannon 指数)を行った。

III 結果及び考察

1 DNA抽出方法の検討結果

QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit 及び Nucleo Spin DNA Stool を用いて検体からDNAを抽出し、シーケンス解析領域の遺伝子増幅を行ったところ、全ての検体で目的の約550bp付近にバンドを確認できたのはNucleo Spin DNA Stoolのみだった。Zoetendalらの報告³⁾では、ビーズによる破砕が有効であるとされており、本結果と一致している。これらのことから、Nucleo Spin DNA Stoolを用いて以降の検査を実施した。

2 添加試験によるリード数の検出感度の結果

16S解析における菌量の検出限界を調べるため、既知の濃度の菌を用いて希釈系列を作製し、試験を行った。

表4に *Campylobacter* 属および *Salmonella* 属の添加菌量に対する検出リード数を示す。どちらの菌についても便200mgに対して5.0×10⁹個以上で、全ての検体でリードが検出できた。

表4 添加菌量と検出リード数

< *Campylobacter* 属 >

		添加菌量 (個/便 200mg)			
		5.0×10 ³	5.0×10 ⁵	5.0×10 ⁷	5.0×10 ⁹
リード数	検体A	0	0	53	5329
	検体B	0	0	79	6087
	検体C	0	2	42	4571

<Salmonella 属>

		添加菌量 (個/便 200mg)			
		5.0×10^1	5.0×10^3	5.0×10^5	5.0×10^7
リード数	検体 A	11	9	31	1767
	検体 B	0	0	10	1311
	検体 C	18	22	29	1271

3 細菌叢解析の結果

(1) リード数と菌種数

① Clostridium 属, Staphylococcus 属

図1は各検体について、検出リード数に対して得られた菌種数を経時的に捉えたものである。検出リード数が多くなるにつれて菌種数も多くなり、8~9 万リード程度で平衡状態となることが確認された。なお、今回解析した検体はいずれも 10 万リード以上検出した。

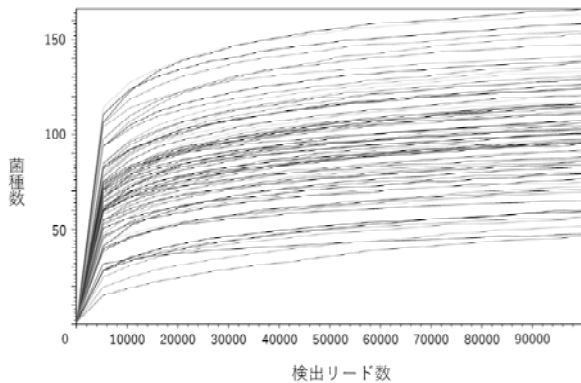


図1 検出リード数と菌種数 (属)

(2) 培養法との比較結果

16S 解析で得られた結果について、培養法との比較を行った。

① Clostridium 属, Staphylococcus 属 (表5)

Clostridium 属, Staphylococcus 属は、腸内に保菌しているヒトもいるため、培養法では菌数測定も行っていることから、患者及び全事例の無症状従事者について、培養法における検出菌量と 16S 解析における検出リード数を比較した。

Clostridium 属の事例では、培養法で検出できた検体だけでなく、定量限界以下 (N.D.: 1000 CFU/g 以下) であった検体についても 16S 解析ではリード検出ができた。

Staphylococcus 属の事例では、一部の患者 (S53, S54, S55) 及び従事者 (S1, S6, S25, S50) については直接培養で定量限界以下であったが増菌培養では検出された。培養法で検出された 16 検体中、16S 解析で検出できたのは 8 検体にとどまり、培養法の検出感度の方が高いことが示唆された。

② Campylobacter 属, Salmonella 属 (表6)

Campylobacter 属及び Salmonella 属は本来ヒトの腸内に常在して

いる菌ではないため、培養法では菌が分離された場合に「検出」と報告していることから、患者及び全事例の無症状従事者について、培養法における検出の有無と 16S 解析における検出リード数を比較した。

Campylobacter 属の事例では、培養法で検出された検体は全て 16S 解析でも検出できた。また、培養法で不検出であった検体についても一部でリード検出が可能であった。

Salmonella 属の事例では、一部の患者 (S58, S64) については直接培養で検出限界以下であったが増菌培養では検出された。培養法で検出された 8 検体中、16S 解析で検出できたのは 5 検体にとどまったが、培養法で不検出であった検体についても一部でリード検出が可能であった。リード検出ができなかった検体については、便の保存状態による影響や検体に含まれる菌量が検出限界以下であったことなどが考えられる。菌量が少ないことが想定される検体については、前処理として検体濃縮を行うなどの工夫が必要と考える。また、新鮮便及び凍結便での検出の違いについての評価も必要と考える。

(3) 多様性解析の結果

それぞれの検体について、Chao1 及び Shannon 指数を算出し、原因物質別に無症状従事者との腸内細菌叢の多様性を比較した (図2)。Chao1 では、感染型の Campylobacter 属及び Salmonella 属の食中毒患者群において、細菌叢の多様性が有意に低下しており、腸管内毒素型の Clostridium 属でも低下傾向にあった。また、Shannon 指数ではこれら 3 属の多様性は有意に低下していた。Staphylococcus 属、寄生虫、ウイルスでは有意な変化を認めなかった。

腸管内毒素型の Clostridium 属では、摂取された菌が腸管内で芽胞を形成する際に発生した毒素が、感染型の Campylobacter 属及び Salmonella 属では、腸管粘膜に付着・侵入して増殖した菌体がそれぞれ腸管上皮細胞を障害する。腸管上皮細胞で形成された粘膜バリアが食中毒細菌の感染により破綻すると、細菌叢の変化や腸管上皮組織への腸内細菌の侵入により腸管の炎症を惹起し、下痢や腹痛などの下部消化管症状を引き起こす^{7~10}。Staphylococcus 属は、食品内で増殖した菌が発生した毒素が、胃や下部消化管まで達する前に吸収され、短時間で嘔吐などの上部消化管症状を引き起こす食品内毒素型に分類される²。これらの発症機序の違いより、腸管内毒素型及び感染型の細菌性食中毒では、毒素や菌による腸管への直接的な作用により、腸内細菌叢のバランスが崩れることが推測された。

IV まとめ

食中毒を疑う便検体からの菌培養を介さない新たな手法として、NGSを用いた腸内細菌叢の 16S 解析のプロトコールを作成し、病原体の検出に活用できるか検討した。

表5 培養法と16S解析の比較結果 (*Clostridium*属, *Staphylococcus*属)

区分	検体 No.	<i>Clostridium</i> 属			<i>Staphylococcus</i> 属		
		培養法		16S解析	培養法		16S解析
		判定	菌量 (CFU/g)	リード数	判定	菌量 (CFU/g)	リード数
患者	S12	検出	1.0×10^8	86453	/		
	S13	検出	1.5×10^6	12259			
	S14	検出	3.9×10^7	25804			
	S15	検出	4.7×10^6	823			
	S16	検出	8.2×10^5	858			
	S17	検出	2.6×10^7	5350			
	S2	/					
	S3				検出	増菌	1
	S4				検出	増菌	
	S5				検出	増菌	4
	S56				検出	1.6×10^5	38
無症状	S1	N.D.		399	検出	増菌	
	S2	N.D.		1	不検出		
	S3	N.D.		74	検出	2.9×10^4	
	S4	検出	4.0×10^3	559	検出	2.1×10^5	
	S5	検出	1.3×10^4	639	検出	1.1×10^4	
	S6	検出	1.4×10^7	1147	検出	増菌	3
	S7	検出	3.4×10^4	1332	検出	9.7×10^4	4
	S18	検出	2.0×10^3	518	検出	1.4×10^4	7
	S19	N.D.		1	不検出		
	S22	N.D.		59	不検出		
	S23	N.D.		26	不検出		
	S24	検出	1.0×10^3	2970	不検出		
	S25	N.D.		833	検出	増菌	
	S26	検出	4.5×10^5	1420	不検出		
	S27	N.D.		301	不検出		2
	S36	検出	1.0×10^3	154	検出	2.2×10^4	
	S44	検出	1.0×10^3	38	不検出		
	S45	検出	4.0×10^3	47	不検出		
	S46	検出	1.0×10^3	1377	不検出		
	S47	検出	1.0×10^3	116	不検出		
	S48	N.D.		511	不検出		
	S49	検出	1.0×10^3	12	不検出		
	S50	検出	2.0×10^3	114	検出	増菌	4
	S51	検出	9.0×10^3	5	不検出		
	S70	検出	1.0×10^3	1448	検出	4.7×10^4	4
	S72	検出	7.9×10^5	2301	N.D.		
S73	検出	2.5×10^6	1038	検出	2.0×10^3		

表6 培養法と16S解析の比較結果 (*Campylobacter*属, *Salmonella*属)

区分	検体 No.	<i>Campylobacter</i> 属		<i>Salmonella</i> 属			
		培養法	16S解析	培養法	16S解析		
		判定	リード数	判定	リード数		
患者	S20	検出	362	/			
	S21	検出	35				
	S28	検出	1481				
	S29	検出	993				
	S40	検出	2800				
	S41	検出	8				
	S42	検出	30				
	S43	検出	2076				
	S57					不検出	
	S58					検出 (増菌)	
	S59					検出	5
	S60					検出	63
	S61					検出	
	S62					不検出	
	S63					検出	64835
	S64					検出 (増菌)	7
S65			検出	70			
S66			検出				
無症状	S1	不検出		不検出	14		
	S2	不検出		不検出			
	S3	不検出		不検出			
	S4	不検出	2	不検出			
	S5	不検出		不検出			
	S6	不検出		不検出			
	S7	不検出		不検出	3		
	S18	不検出	10	不検出			
	S19	不検出		不検出			
	S22	不検出		不検出	6		
	S23	不検出	12	不検出			
	S24	不検出		不検出	1		
	S25	不検出	59	不検出			
	S26	不検出		不検出	6		
	S27	不検出		不検出			
	S36	不検出		不検出	3		
	S44	不検出		不検出			
	S45	不検出	2	不検出			
	S46	不検出	3	不検出	4		
	S47	不検出	2	不検出			
S48	不検出		不検出	1			
S49	不検出		不検出	11			
S50	不検出		不検出				
S51	不検出		不検出	3			
S70	不検出		不検出				
S72	不検出		不検出				
S73	不検出		不検出				

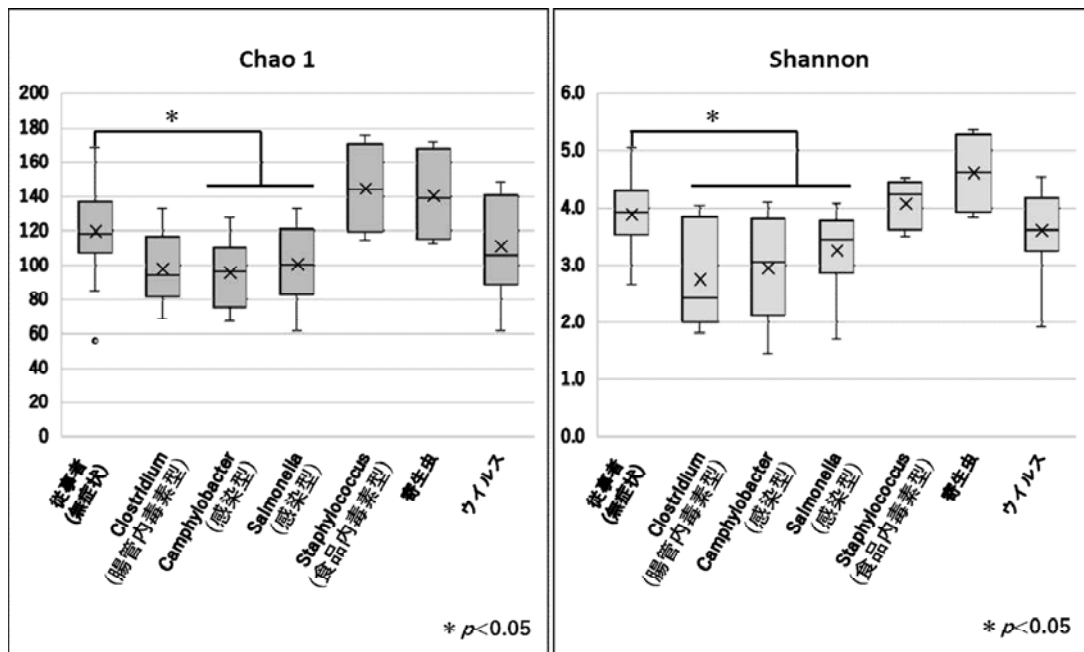


図2 腸内細菌叢の α 多様性解析

便からのDNA抽出方法について、酵素法と破砕法の比較検討を行ったところ、破砕法によるDNA抽出が有用であることが確認された。

Campylobacter 属及び *Salmonella* 属菌を用いた添加試験による検出感度の確認では、便検体 200mg に対して 5.0×10^6 個以上の菌量があれば、検討した全ての検体で病原体由来の 16S rRNA が検出できた。

実際の食中毒における検体を用いて、作成したプロトコールで検査を実施し、培養法の検査結果と比較したところ、概ね一致したが、16S解析での検出ができなかった検体もみられたため、前処理の導入や便の保存状態による検出の違いについての評価も必要と考えられる。

腸内細菌叢の多様性解析による比較では、細菌性食中毒のうち腸管内毒素型及び感染型食中毒の患者において、症状のない従事者に比べて細菌叢の多様性が低下する傾向が確認され、二次的な細菌叢の変化が原因究明の手がかりになることが示唆された。

今後も 16S解析の事例数を蓄積することで、培養法では原因不明と判断された食中毒が発生した際の原因究明方法の1つとして活用されることが期待される。

参考文献

- 1) 厚生省監修：微生物検査必携 細菌・真菌検査，第3版，日本公衆衛生協会，東京（1987）
- 2) 東佳那子，中山二郎：進化する次世代シーケンサーによる腸内細菌叢の解析，腸内細菌学雑誌 **29** (3)，135-144

- 3) Zoetendal EG, Ben-Amor K, Akkermans AD, *et al.* :

DNA isolation protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract, *Syst Appl Microbiol*, **24** (3), 405-410. (2001)

- 4) 井上亮：腸内細菌叢解析のいろは，日本乳酸菌学会誌 **30** (1)，27-31

- 5) 高安伶菜，増岡弘晃，須田瓦：腸内細菌叢の解析法の進歩，モダンメディア **66**，133-138

- 6) 須田瓦：454GS シリーズを用いた 16S アンプリコンシーケンシングによる腸内細菌叢解析（技法セミナー），日本微生物生態学会誌 **28** (2)，63-69

- 7) FDA. Bad Bug Book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins (2012)

- 8) Mitchell LA, Koval M. : Specificity of interaction between clostridium perfringens enterotoxin and claudin-family tight junction proteins, *Toxins (Basel)*, **2** (7) :1595-611 (2010)

- 9) Bhunia, A.K. : *Salmonella enterica*, Foodborne Microbial Pathogens, 271-287, Food Science Text Series, Springer, New York, NY (2018)

- 10) Lobo de Sá FD, Schulzke JD, Bücker R. : Diarrheal Mechanisms and the Role of Intestinal Barrier Dysfunction in *Campylobacter* Infections, *Curr Top Microbiol Immunol*, 431, 203-231 (2021)