

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-225360

(P2017-225360A)

(43) 公開日 平成29年12月28日 (2017. 12. 28)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2016-121670 (P2016-121670)  
 (22) 出願日 平成28年6月20日 (2016. 6. 20)

(71) 出願人 504300088  
 国立大学法人帯広畜産大学  
 北海道帯広市稲田町西2線11番地  
 (72) 発明者 山崎 栄樹  
 北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立  
 大学法人帯広畜産大学内  
 (72) 発明者 倉園 久生  
 北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立  
 大学法人帯広畜産大学内  
 Fターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA14 QQ06 QQ42  
 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34  
 QX02

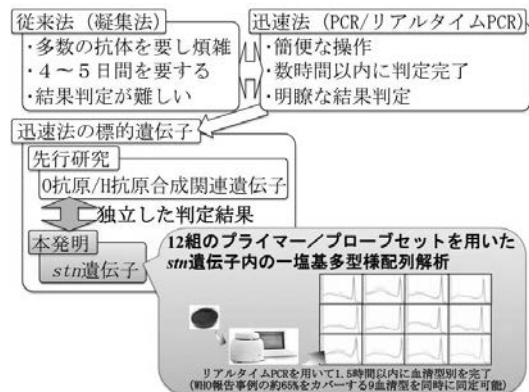
(54) 【発明の名称】 サルモネラ属菌の血清型判別用プローブ及びプライマー並びにその使用

(57) 【要約】

【課題】サルモネラ属菌の血清型判別を迅速に行うためのプライマー及びプローブを提供する。

【解決手段】サルモネラ属菌に特異的なサルモネラのエンテロトキシン遺伝子 ( s t n ) の一塩基多型様配列を指標とし、高解像度融解曲線分析法 ( H R M 法 ) によりサルモネラ属菌の血清型を迅速に判別するためのプローブ及びプライマー並びにその使用に関するものである。

【選択図】 図 1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

サルモネラ属菌のサルモネラ エンテロトキシン遺伝子に認められる一塩基多型様配列を検出するための表 2 に記載の遺伝子増幅用プライマーおよびプローブ。

**【請求項 2】**

サルモネラ属菌の血清型を判別するために用いる請求項 1 に記載の遺伝子増幅用プライマーおよびプローブ。

**【請求項 3】**

エンテロトキシン遺伝子の 85、118、163、180、260、306、313、376、456、565、712、732 位の少なくとも一か所に認められる一塩基多型様配列を含む遺伝子断片を増幅し、増幅産物内の一塩基多型様配列を検出するための請求項 2 に記載の遺伝子増幅用プライマーおよびプローブ。

10

**【請求項 4】**

増幅産物の検出法が高解像度融解曲線分析法 (High Resolution Melting: HRM法) である、請求項 1 から 3 に記載の遺伝子増幅用プライマーおよびプローブ。

**【請求項 5】**

請求項 4 に記載の遺伝子増幅用プライマーおよびプローブを用いることを特徴とするサルモネラ属菌の血清型を判別する方法。

**【請求項 6】**

請求項 4 に記載の遺伝子増幅用プライマーおよびプローブを含む、サルモネラ属菌の血清型を判別するためのキット。

20

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、サルモネラ属菌に特異的なサルモネラ エンテロトキシン遺伝子 (stn) の一塩基多型様配列を指標としてサルモネラ属菌の血清型を判別する際に使用するプローブ及びプライマー並びにその使用に関するものである。

**【背景技術】****【0002】**

サルモネラはグラム陰性通性嫌気性桿菌の腸内細菌科の一属 (サルモネラ属) に属し、主にヒトや動物の消化管に生息する腸内細菌の一種であり、その一部はヒトや動物に感染して病原性を示す。

30

**【0003】**

ヒトに対して病原性を持つサルモネラ属菌には腸チフスやパラチフスを起こすもの (チフス菌 *S. Typhi* とパラチフス菌 *S. Paratyphi A*) と、感染型食中毒を起こすもの (食中毒性サルモネラ: ネズミチフス菌 *S. Typhimurium* や腸炎菌 *S. Enteritidis* など) が知られている。チフス性サルモネラはヒトのみに感染する細菌で、患者の糞便や糞便によって汚染された土壌や水の中に残存しているものが感染源になる。これに対して食中毒性サルモネラ属菌はペットや家畜の腸管に常在菌として存在しており、食用肉や鶏卵が食中毒の感染源となることもある。

40

**【0004】**

食中毒性サルモネラ属菌に感染すると 12 から 48 時間の間に吐き気や下痢の症状があらわれ、続いて水様性下痢、発熱、嘔吐が始まる。これらの症状は 1 週間以内に治まるが、治癒後もサルモネラ属菌が検出されることがある。また一部の感染者では下痢や嘔吐の症状が治まった数週間から数ヶ月後に股関節、膝、アキレス腱などに痛みと腫れを伴う反応性関節炎を発症することが知られている。

**【0005】**

サルモネラ属菌の血清型判別法は本菌の最も基本的な分類法であるが、サルモネラの O 抗原 67 種類と H 抗原 80 種類および一部の菌の持つ K 抗原の抗原性の組み合わせで分類さ

50

れ、これら抗原の組み合わせにより、2,500以上もの血清型が存在する。従来血清型判別法(型別血清を用いた凝集法)は判定までに4~5日を要し、さらに手技的にも非常に煩雑である(非特許文献1)。このため、迅速かつ簡便な手法の開発が求められているところである。

【0006】

2000年代半ば頃よりサルモネラ属菌の血清型判別のための迅速法に関する複数の報告がなされはじめている。サルモネラ属菌の血清型判別はO抗原およびH抗原の組み合わせにより行われるため、既報の迅速法もそれら抗原の合成にかかわる遺伝子群を標的としたPCR法あるいはリアルタイムPCR法によるものが多い(特許文献1、特許文献2)。

10

【0007】

Zeinzingerらは、サルモネラ属菌の三つの遺伝子fliB, gyrB, 及びycfQにみられる配列多型置換に着目し、高解像度融解曲線分析法(HRM法)により39種の血清型の迅速なタイピングを可能とした。これはオーストリアで2008年から2009年の2年間で分離されたヒト由来のサルモネラ属菌の94%以上、非ヒト由来の85%以上をカバーできると報告している(非特許文献2)。

【0008】

高解像度融解曲線分析法(High Resolution Melting: HRM法)は比較的新しい一塩基多型解析にも利用可能なリアルタイムPCR技術である。HRM法では非標識プローブを利用するため従来に比べて安価での一塩基多型解析が可能となっている。HRM法により一塩基多型部位のジェノタイピングを行うためには一塩基多型部位を含む領域を増幅するためのフォワードプライマーおよびリバースプライマー、および一塩基多型部位に結合するプローブが必要となる。これらのプライマーおよびプローブは各々の一塩基多型部位について個々に設計が必要であるが、一塩基多型の検出効率はプライマーおよびプローブ結合部位の微細な変更により大きく影響される。

20

【0009】

さらに、HRM解析用プライマーおよびプローブ構築のための予測(設計)ツールが確立されていないため、各々のプライマーおよびプローブの一塩基多型検出効率は、作製されたプライマーおよびプローブを用いて実際にHRM解析を行う事によってのみ検証可能である。このため、効果的な一塩基多型の検出が可能でプライマーおよびプローブの獲得のためには実際に数多くのプライマーおよびプローブを設計・合成し、それらを用いた非常に多くの試行が必要となっている。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特開2012-170380号公法

【特許文献2】特開2011-234739号公法

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】クラスIII細菌検査シリーズ サルモネラ菌キット サルモネラ免疫血清「生研」 使用説明書

40

【非特許文献2】J. Zeinzinger et al., Appl. Environ. Microbiol., 2012, 78(9): 3352-3360

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

サルモネラ属菌の血清型は2,500種以上に細分化されており、それゆえ似通っていて区別が難しいものもある。このため、一種類の解析手法のみを用いて血清型を判定した場合、一定の割合で誤った判定結果を含んでしまうのが現状である。この理由から本菌の血清型の判定は複数の解析手法を複合的に用いて検証されることが望ましい。

50

## 【0013】

前記したように、非特許文献2を含む先行研究では標的遺伝子群の配列多型を指標としたサルモネラ属菌の血清型の迅速な判別法を記載しているが、先行研究の標的遺伝子群とは全く独立した遺伝子(stn遺伝子)を解析に加え、凝集法や既存の迅速法と共に使用することで判定結果の精度を大きく上昇させることができる。

## 【0014】

図1は本発明の概要を示す模式図である。従来のサルモネラ属菌の血清型別法は操作が煩雑である事や判定までに長時間を要する事、試験結果が明瞭ではなく判定が難しい場合がある事などが問題となっていた。このため、近年、PCR法あるいはリアルタイムPCR法を用いた迅速法が開発されてきた。本発明では、先行研究とは完全に独立した遺伝子(stn遺伝子)をターゲットとする事で、既報の迅速法とは独立した判定結果を得る事を可能とした。本発明の特許請求項に含まれる12種類のプライマー/プローブセットを用いて血清型と相関のあるstn遺伝子内の一塩基多型様配列を解析することで1.5時間以内に少なくとも9種類(WHOへの報告事例の約65%をカバーする)の血清型を同時に判別する事が可能である。

10

## 【課題を解決するための手段】

## 【0015】

本発明においてはstn遺伝子を血清型別の指標とする。stn遺伝子は既報の迅速血清型別法で標的とされた遺伝子群とは全く独立した遺伝子座に存在する遺伝子である。このため、本発明を用いた解析により得られる結果は既存の血清型別法により得られる結果とは完全に独立した判定結果を与える。発明者らは様々な分離株に由来するstn遺伝子の配列解析を行い、stn遺伝子の配列多型が血清型の指標となる事を示し、かつstn遺伝子の配列多型の迅速な解析に利用できるプローブ及びプライマーを作製して迅速な血清型判別法の構築に成功したことで、本発明を完成させた。

20

## 【0016】

(1)サルモネラ属菌のサルモネラ エンテロトキシン遺伝子に認められる一塩基多型様配列を検出するための表2に記載の遺伝子増幅用プライマーおよびプローブ。

## 【0017】

(2)サルモネラ属菌の血清型を判別するために用いる(1)に記載の遺伝子増幅用プライマーおよびプローブ。

30

## 【0018】

(3)エンテロトキシン遺伝子の85、118、163、180、260、306、313、376、456、565、712、732位の少なくとも一か所に認められる一塩基多型様配列を含む遺伝子断片を増幅し、増幅産物内の一塩基多型様配列を検出するための(2)に記載の遺伝子増幅用プライマーおよびプローブ。なお、すべての塩基番号は*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*由来のエンテロトキシン遺伝子(Accession No KF032246)に対応している。

## 【0019】

(4)増幅産物の検出法が高解像度融解解析法である、(2)に記載の遺伝子増幅用プライマーおよびプローブ。

40

## 【0020】

(5)(2)に記載の遺伝子増幅用プライマーおよびプローブを用いることを特徴とするサルモネラ属菌の血清型を判別する方法。

## 【0021】

(6)(2)に記載の遺伝子増幅用プライマーおよびプローブを含む、サルモネラ属菌の血清型を判別するためのキット。

## 【発明の効果】

## 【0022】

本発明では既存の迅速法における標的遺伝子群とは全く独立した遺伝子であるstnを標

50

的とした。これにより既存法とは完全に独立した判定結果を得る事が可能となり、凝集法や既存の迅速法と共に使用する事で判定結果の精度上昇に大きく貢献できる。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】本発明の概要を示す模式図。

【図2】表2の各プライマー/プローブセットを利用して得られる標準的なTm Callingの結果。

【図3】表2の各プライマー/プローブセットを利用して得られた解析結果例。

【発明を実施するための形態】

【0024】

10

以下、本発明に係るプライマー及びプローブ、並びにこれらを利用するサルモネラ属菌の血清型判別法について詳細に記載する。

【0025】

タイの下痢患者から分離されたサルモネラ属菌株151株(24種類の血清型を含む)に由来するstn遺伝子配列および、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)を用いて得られた249株(47種類の血清型を含む)に由来するstn遺伝子配列を比較した結果、stn遺伝子の中に観られる一塩基多型様配列(計73箇所)の使用塩基と血清型の間に関連が確認された。

【0026】

20

さらに、これらの一塩基多型様配列の中から選抜された12箇所の使用塩基の組み合わせパターンに基づき少なくとも表1に示す9種類の血清型が同定可能である事が明らかとなった。9種類の血清型は分離頻度の最も高い血清型Enteritidisや高病原性である血清型Typhiを含んでおり、2001年から2010年の10年間にWHOに報告されたサルモネラ属菌分離事例の65.4%をカバーするものであった。表1は血清型判定に有効なstn遺伝子内の一塩基多型様箇所の使用塩基の組み合わせパターンとそれぞれの組み合わせパターンに対応する血清型を示す。

【0027】

【表1】

		stn遺伝子中の塩基位置												血清型
		85	118	183	180	260	308	313	376	456	565	712	732	
使用塩基の 組合せパターン	1	G	C	-	A	G	A	-	-	C	G	C	G	Enteritidis
	2	G	C	-	G	G	A	C	-	C	G	C	A	Typhi
	3	G	C	-	G	G	A	C	-	-	A	C	G	Derby
	4	G	C	C	A	C	A	C	C	-	G	C	G	Newport
	5	G	A	C	G	C	A	C	C	-	G	C	G	Infantis
	6	G	A	C	G	C	G	C	C	-	C	G	-	Stanley
	7	A	C	C	A	C	A	C	C	-	A	-	G	Heidelberg
	8	A	C	C	G	G	G	C	C	-	A	C	G	Saintpaul
	9	G	A	C	G	C	A	C	C	-	G	-	G	Anatum

30

【0028】

本発明では表1に挙げた9種類の血清型について迅速に同定する方法を構築するために、表1に示された12箇所の一塩基多型様配列に対してリアルタイムPCRを用いた使用塩基の迅速判別法を開発した。

【0029】

40

解析手法として高解像度融解曲線分析法(HRM法)を用い、それぞれの箇所に対して1から27組のプローブ及びプライマーのセットを用いた計226パターンのトライアルを行った。その結果、各箇所の使用塩基を明確に判定可能なプローブ/プライマーセット(表2)およびPCR条件の構築に至った。表3にLightCycler Nano (Roche)を利用した際のPCRおよび融解曲線分析の条件を示す。

【0030】

【表 2】

Set	検出 番位	Forward Primer	Reverse Primer	Probe
A	85	配列番号1	配列番号2	配列番号3
		CTGGCAACCGATAGTAAAGACC	GCGGTGGTGCAAATATCATC	ACAGCATGGCG <sub>3</sub> CGATTAAG
B	118	配列番号4	配列番号5	配列番号6
		TCCGTGGTCTCGCTATCACTG	CGACCGGTTATCATCACTGTTA	CTG <sub>3</sub> CGGTGGTGCAAATATCATCG
C	163	配列番号7	配列番号8	配列番号9
		GCCATGCTGTTGATGATATTTTG	GACCGGTTATCATCACTG	TTGGTGGTAAATAAAGG <sub>3</sub> CGTAAAA
D	180	配列番号10	配列番号11	配列番号12
		CTGTTGATGATATTTTGCAACCAC	GCGTTATCATCACTGTTACCG	CGGATCAG <sub>3</sub> CTGGAGCGATTT
E	260	配列番号13	配列番号14	配列番号15
		CGCTATCGGTAACAGTATGAT	TGTACCTGAAAGCTATTATGTC	GGGAAAGATTAC <sub>3</sub> CGTAGAGGC
F	306	配列番号16	配列番号17	配列番号18
		TCCCACTTTCTTTTGCTCTAC	CAAAGCAGAGAGATTCACTGAG	TTGAAT <sub>3</sub> CTGTACCTGAAACGC
G	313	配列番号19	配列番号20	配列番号21
		GCGGCCAATCGCATGAATA	CTTAAGCGTATTCAAGCTGAC	TTCAA <sub>3</sub> CAGCACCTGAGTCAGCC
H	376	配列番号22	配列番号23	配列番号24
		GGTCAGCCTGAATACGCTT	TTACTCACTCCCTGAATCTGGT	TGAA <sub>3</sub> CCTCAACTGAATCTCT
I	456	配列番号25	配列番号26	配列番号27
		ACCAGATTCAAGGAGTGAAGTA	GCGAATTGCTCGAACTGGTA	TTAACCG <sub>3</sub> CTGGAGCGTCA
J	565	配列番号28	配列番号29	配列番号30
		GCTTTACCAGTTGAGCAATTC	TAAACCGCTCTCGTCCATC	CGG <sub>3</sub> CGCGAGTGCATGAACTG
K	712	配列番号31	配列番号32	配列番号33
		ATCGCCACCAGCTTTCTTTAC	TTTGGCATCAGCGTTATCAG	CTGTG <sub>3</sub> CGAGCGCTGATAACG
L	732	配列番号34	配列番号35	配列番号36
		GCTTCATTGCATCAAGCAGTTC	GGTCTGTTGGCAACGTTACTG	TTTTGG <sub>3</sub> ATCAGCGTTATCAGCGC

10

20

サルモネラ属菌の迅速血清型別用プローブ及びプライマーの配列。プローブにおいては塩基多型様箇所下線を付している。また、すべてのプローブの3'末端はリン酸化修飾がなされている。

【0031】

【表 3】

Step	Temp. (°C)	Time (s)	Ramp(°C/s)	Cycle	
Hold	95	600	5	-	
3-Step T. D. Amplification (First temp. 5°C higher, drop 1 °C per cycle)	95	10	5	39	
	59	15	4		
	72	10	5		
Hold	95	60	5	-	
Hold	40	240	5	-	
High resolution Melting	Initial Stage	40	20	4	-
	Final Stage	90	20	0.05	-

30

【0032】

図 2 にはそれぞれの一塩基多型様箇所に対して、表 2 に示したプローブ/プライマーセットを用いて得られた標準的な融解曲線分析の結果を示す。

40

【0033】

解析は 1 . 5 時間以内に完了し、各箇所において融解曲線のピークの出現位置に基づく使用塩基の判定が可能である。得られた結果を表 1 に示す各々の一塩基多型様箇所の使用塩基と照らし合わせることで表 1 に挙げた 9 種類の血清型の同定が可能となる。

【実施例】

【0034】

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0035】

50

サルモネラ属菌分離株に対して表2に示すプローブ/プライマーセットおよび高解像度融解曲線分析法(HRM法)を用いて、表1に示す12箇所の使用塩基を同時に決定する方法を以下に示す。下記手法においては、各プローブ/プライマーセットに対して別々の反応チューブ内で反応を行う必要があるが、共通のPCR条件(表3)を使用するため、12箇所に対する解析を同時に遂行可能である。

【0036】

Luria-Bertani寒天培地上に発育した新鮮なサルモネラ属菌の単離コロニー(1集落)を蒸留水(100 $\mu$ l)に懸濁し、100 で10分間加熱処理を行った後に20,000 x gで5分間の遠心分離操作により得られた上清をゲノム遺伝子粗抽出試料とした。HRM反応はLightCycler 480 High Resolution Melting Master(以下、HRMキット)を用いた非対称PCRにより行った。すなわち、得られたゲノム遺伝子粗抽出液2.0 $\mu$ Lにプローブ(6 $\mu$ mol/L)を0.8 $\mu$ L、プローブと同鎖に結合するプライマー(6 $\mu$ mol/L)を0.2 $\mu$ L、プローブと逆鎖に結合するプライマー(6 $\mu$ mol/L)を1.0 $\mu$ L、DMSOを1.0 $\mu$ L、MgCl<sub>2</sub>, 25mM(HRMキットに付属)を2.4 $\mu$ L、H<sub>2</sub>O, PCR-grade(HRMキットに付属)を2.6 $\mu$ L、Master Mix, 2X conc.(HRMキットに付属)を10.0 $\mu$ Lと良く混合し、リアルタイムPCR装置を用いて解析した。

10

【0037】

リアルタイムPCR装置としてLightCycler Nano(Roche)および専用解析ソフトウェアLightCycler Nano Software-1.1を使用した。PCRおよび融解曲線分析の条件は表3に示す通りである。解析結果の判定(使用塩基の判定)はLightCycler Nano Software-1.1においてResoLight DyeをTargetとしたTm Callingにより得られた波形(図2および図3)に基づいて行った。

20

【0038】

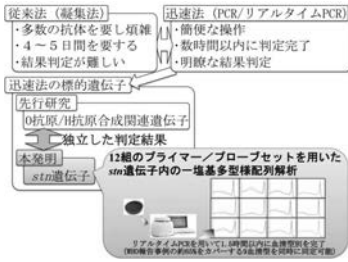
一例として図3にタイの下痢患者より分離されたサルモネラ属菌分離株に対する解析結果を示す。図3の結果を標準的な解析結果例(図2)と比較することで各箇所の使用塩基が判明し、判明した使用塩基のパターンを表1と照合する事で血清型の決定が可能であった(図3に示す株は血清型Enteritidisと判明)。

30

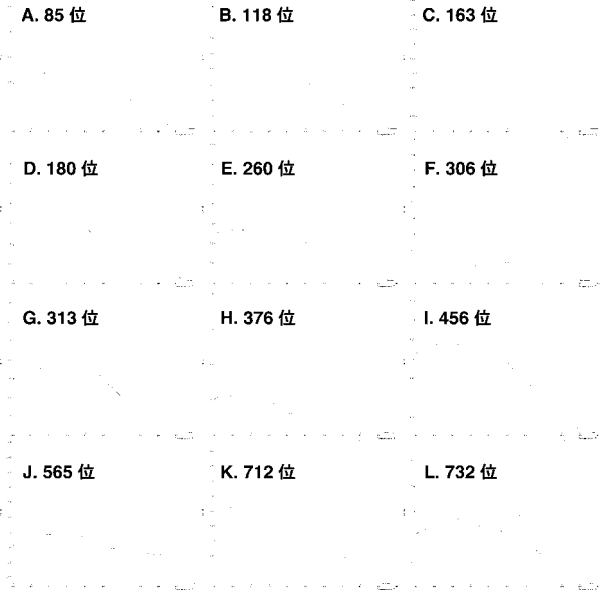
【0039】

上記の操作は、PCR試料の調製に約15分、PCR反応に約1時間、解析に約5分を要し、全ての解析が1時間20分程度(作業時間は約20分)で完了する。

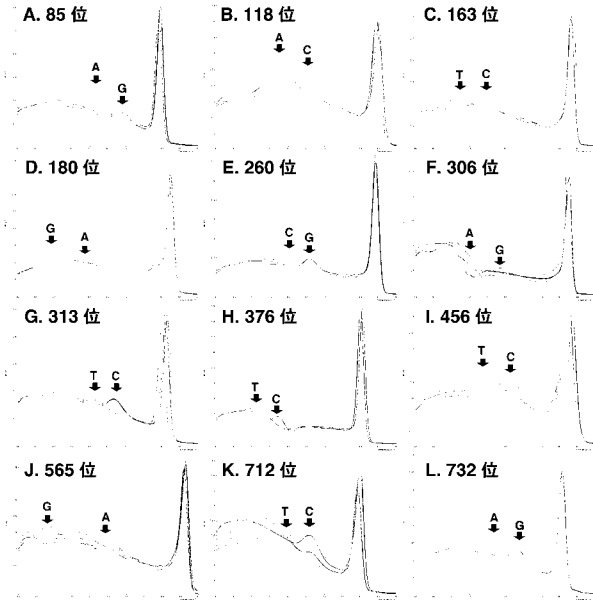
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



【 配列表 】

2017225360000001.app