

原 著

大腸菌の病原因子検索のための混合プライマーによる迅速検出法の研究

山内昭則, 岩出義人, 中野陽子, 杉山明, 中山治, 熊沢教眞^{a)}

PCR法の応用により従来法に比べて病原大腸菌病原因子の迅速な検出が可能である。Stx, INV, ST, LT 4種の病原因子の検出できる混合プライマーを作製すればより簡便に検出することが可能である。二次増菌又は、カラムを使用することにより PCR 阻害物質を除去すれば、検出感度を上げることができ混合プライマーによる PCR 法はスクリーニングとして非常に有効である。
キーワード: PCR, 混合プライマー, スクリーニング

はじめに

病原大腸菌による食中毒は事件数が少ないものの、1件当たりの患者数が多いこと、症状が多彩であること、重症例が見られることなどから、近年注目されている。一般的に病原性大腸菌は、その病原の型によって腸管病原性大腸菌(Enteropathogenic *Escherichia coli*: EPEC)、毒素原性大腸菌(Enterotoxigenic *E. coli*: ETEC)、組織侵入性大腸菌(Enteroinvasive *E. coli*: EIEC)、志賀毒素産生性大腸菌(Shigatoxin producing *E. coli*: STEC)^{6) 8) 11) 12) 13) 14)}に分類されている。これらの型は菌の産生する組織侵入性因子(INV)、定着因子(EAE)、志賀毒素(Stx)、耐熱性毒素(ST)、易熱性毒素(LT)等の病原因子の産生能によって区別されている。これらの因子は培養細胞の変性や逆受身ラテックス凝集反応を利用し検出することができるが、これらの検出法は菌の分離から病原因子の確認までに多大な労力を要する。このため、より簡便な検出法が求められている。PCR法を用いると、簡便な操作でこれらの毒素遺伝子の存在を確認することができる⁵⁾。前回、我々が試験した *invE*, *stx*, ST gene, LT gene の混合プライマーによる遺伝子検出限界は概ね 10^3 cfu/tube であり^{1) 5)} 通常の検査としては十分であると考えられた。しかし、PCR法によるスクリーニングとして混合プライマーを用いるには増菌培養で 10^5 /mL 以上に増菌する必要がある¹⁵⁾。一般に PCR 法での検査は感度が高いと考えられているがプライマーを混合にしていることによる干渉作用から個々のプライマーを使用した場合より感度は若干落ちるものと推測され、食品や環境材料等からの病原因子の検出にスクリーニングとして用いるには、食品や環境材料等の検査物の中に多数混在すると考えられる PCR 阻害物質の除去^{1) 9)}をすることにより検出感度を保つことが必要となる。そこで、従来法により検出された菌株の病原因子保有状況及び PCR

阻害物質の除去について検討を行ったので報告する。

材料及び方法

1. 従来法とPCRスクリーニングによる病原因子検索

血清型別表を用いる従来法により検出された食中毒又は散発性下痢症由来の検体を用い病原因子検索を行った。スクリーニングとして PCR 法を用いた方法では、増菌培地又は分離培地から PCR 法による病原因子検索を行った。

2. 使用菌株及び材料

各病原因子の陽性株として INV は *Shigella boydii*, Stx は *E. coli* O157 : H7 Stx1&2 産生, ST は *E. coli* O148 : H28, LT は *E. coli* O25 : HNM (それぞれ公衆衛生院より分与された株) のテンプレートを使用した。これらの各病原因子は TaKaRa のプライマー *INV-1/2(invE)*, *EVT-1/2(stx1)*, *EVS-1/2(stx2)*, *ESH-1/2(ST gene)*, *ELT1/2(LT gene)* を用いて予め遺伝子の存在を確認した。

検体として熱抽出法、遠心法において分離しにくい食材としてマヨネーズ、牛乳、チーズを用いた。さらに、スピンカラムについても試験した¹⁾。被検菌は三重県で食中毒、散発性下痢症等の患者から分離されたものを用いた。

3. 混合プライマーの作製とPCR法

ST gene は TaKaRa のプライマー, *invE*, LT gene は伊藤⁴⁾, *stx1* & *stx2* は Karch⁷⁾ らがデザインしたプライマーを用い合成依頼した。100 検体分のワーキング溶液 4,500 μ L 中に I-1, I-5, MK1, MK2, 各 50 μ L, ESH1, ESH2, LT1, LT2, 各 25 μ L のプライマー溶液を混合した。PCR 法の反応条件は、DNA ポリメラーゼを TaKaRa の *Z-Taq*

a) 琉球大学熱帯生物圏研究センター

を用いることにより熱変性 95 5 秒間，アニーリング 50 20 秒間，伸長 72 20 秒間でサイクル数 30 回とし，2 % アガロースゲルで電気泳動した後，ethidium bromide 染色をし観察した²⁾³⁾⁴⁾。またワーキング溶液の組成は，反応混液 45 μ L にテンプレート 5 μ L を入れて PCR 法を実施した。

4. 各材料及び菌株の添加方法

マヨネーズ及びチーズは 50 g を 0.9 % NaCl 200mL で 120 秒間ストマッカーで混合したものを検体とし，牛乳は原液をそのまま用いた。各病原因子の陽性株は，LB 培地で 8 時間培養後，培養液を滅菌生理食塩水で 2 回洗浄，10 倍の階段希釈列の 1mL を標準寒天培地に混釈して菌数計算するとともに各，希釈列の菌液 50 μ L に TE Buffer 及び各材料 50 μ L を加えたものを 100 10 分加熱後急冷しテンプレートとして使用した。さらに，テンプレート 100 μ L をスピнкаラムで抽出し使用した。

成 績

1. 従来法にて検出された血清型及び病原因子保有状況

表 1 に今回の被検菌全 24 株中 19 株は病原因子が確認されなかった。また，O 血清型別不能 *E.coli* 5 株中 1 株が組織侵入性大腸菌 (EIEC) であることが確認できたのは，本菌が *Shigella* sp. 様の形態及び性状を示したこと及び PCR 法による *invE* 検査のためである。

2. 混合プライマーによる各材料の検出感度

表 2 に示したように混合プライマーを用いた各病原因子の遺伝子の検出限界は *invE* 1.4×10^3 cfu/tube，*stx* 8.0×10^3 cfu/tube，ST gene 7.5×10^3 cfu/tube，LT gene 5.0×10^3 cfu/tube であった。また，各菌液に牛乳，マヨネーズ，チーズを添加したところ，その検出限界は牛乳，チーズで *invE* 1.4×10^4 cfu/tube，*stx* 8.0×10^4 cfu/tube，ST gene 7.5×10^4 cfu/tube，LT gene 5.0×10^4 cfu/tube となり，検出限界の菌量が 10 倍～100 倍増加した。マヨネーズは検出できなかった。また，マヨネーズはスピнкаラムで抽出することにより，牛乳及びチーズとほぼ同一菌量で検出が可能となった。しかし，牛乳，チーズではスピнкаラム使用でも検出限界の改善はみられなかった。

表 1. 従来法により検出された菌株とその病原因子保有状況

No.	由来	血清型	ETEC		EHEC	EIEC
			ST*	LT*	Stx	inv
1	食中毒事例 1	O1:H12	-	-	-	-
2	食中毒事例 1	O146:HUT	-	-	-	-
3	食中毒事例 1	O128:HUT	-	-	-	-
4	散发性下痢症 1	O1:H7	-	-	-	-
5	食中毒事例 2	O6:H16	+	+	-	-
6	食中毒事例 2	O159:H9	-	-	-	-
7	有症苦情事例 1	O18:H7	-	-	-	-
8	海外渡航者下痢症 1	OUT:HNM	-	-	-	+
9	食中毒事例 3	O169:H41	+	-	-	-
10	食中毒事例 3	O142:HNM	-	-	-	-
11	食中毒事例 3	OUT:H27	-	-	-	-
12	食中毒事例 3	OUT:H4	-	-	-	-
13	食中毒事例 3	O126:HNM	-	-	-	-
14	食中毒事例 3	OUT:HUT	-	-	-	-
15	有症苦情事例 2	O126:HUT	-	-	-	-
16	有症苦情事例 2	O1:H7	-	-	-	-
17	海外渡航者下痢症 2	O26:H11	-	-	+	-
18	散发性下痢症 2	O157:H16	-	-	-	-
19	散发性下痢症 4	O6	-	-	-	-
20	散发性下痢症 5	O18	-	-	-	-
21	散发性下痢症 6	OUT:HUT	-	-	-	-
22	散发性下痢症 7	O1	-	-	-	-
23	散发性下痢症 9	O1	-	-	-	-
24	食中毒事例 4	O25	+	-	-	-

* (+) の場合は個々のプライマーで再確認

表2. 各材料の検出感度

標的病原因子	TE Buffer	牛乳	マヨネーズ*	チーズ
invE	1.4×10^3	1.4×10^4	検出せず	1.4×10^4
Stx	8.0×10^3	8.0×10^4	検出せず	8.0×10^4
ST	7.5×10^3	7.5×10^4	検出せず	7.5×10^4
LT	5.0×10^2	5.0×10^4	検出せず	5.0×10^4

* 菌量 invE(1.4×10^5), Stx(8.0×10^4), ST(7.5×10^4), LT(5.0×10^4)

スピнкаラム使用

標的病原因子	TE Buffer	牛乳	マヨネーズ	チーズ
invE	1.4×10^3	1.4×10^4	1.4×10^5	1.4×10^4
Stx	8.0×10^3	8.0×10^4	8.0×10^4	8.0×10^4
ST	7.5×10^3	7.5×10^4	7.5×10^4	7.5×10^4
LT	5.0×10^2	5.0×10^4	5.0×10^4	5.0×10^4

単位 :cfu/tube

考 察

今回の研究で用いた食中毒，散发性下痢症，海外渡航者の下痢便から分離した *E.coli* の病原因子の検索は，スクリーニングとして PCR 法を用いることにより，分離菌の生化学性状，血清型別をまず行う従来法より迅速な対応が可能であった¹⁰⁾。また，本法では感度についても分離培地では特徴的な集落の観察が不可能な検体からでも直接増菌培養から各病原因子の遺伝子が確認できたことから従来法に比較して特異性は高いと思われた。さらに，混合プライマーを用いれば4種類の病原因子を同時に検出できるため，個々に検査するよりも迅速に検査結果が出せ，作業時間も大きく短縮される。

また，PCR 阻害物質の影響は培養できる検体では単純に希釈することによっても阻害物質の影響は改善され，スクリーニングとして PCR 法を用いる場合は最初に選択性のない培地（10倍量の TSB）で 37℃，6時間増菌した後，さらに EC 等選択性のある培地で 37℃，16～20時間二次増菌を行うことによっても検出感度がアップし，より簡便で確実な検出が可能になると思われる。また，マヨネーズのような乳化物が混入した検体はスピнкаラムなどを用いることによっても改善される¹⁾。特に菌が死んで培養できない検体での毒素の検出などにはスピнкаラムは有効である。今回は検討しなかったが，濃縮の効果も期待できると考えられる。

文 献

- 1) 安形則雄：Campylobacter 検出のための Semi-nested PCR 法の検討。日本食品微生物学会雑誌，17，19-21，(2000)。
- 2) 伊藤文明，伊藤健一郎，Karunaratne,G.K.D.，渡辺治雄 他：混合プライマーを用いた PCR 法による腸管病原性大腸菌の病原遺伝子同時検出法。感染症誌，65,139,(1991)。
- 3) 伊藤文明，岸本亜弓，吉野谷進，山岡弘二 他：PCR 法による下痢原性大腸菌の病原遺伝子同時検出法の

応用。感染症誌，66,216,(1992)。

- 4) 伊藤文明，荻野武雄，伊藤健一郎，渡辺治雄 他：混合プライマーを用いた PCR 法による下痢原性大腸菌の病原遺伝子同時検出法。日本臨床，50,特別号 343-347,(1992)。
- 5) 伊藤健一郎，渡辺治雄：下痢原性大腸菌の遺伝子増幅法による迅速診断法。臨床検査，35，788-790 (1991)。
- 6) 伊藤武：ペロ毒素産生性大腸菌と食品衛生，モダンメディア，39，307-322.(1993)。
- 7) Karch H.,and T.Meyer：Single primer pair for amplifying segments of distinct shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction.J.Clin Microbiol.27,2751-2757,(1989)。
- 8) 厚生省監修：細菌・真菌検査 第3版，東京，日本公衆衛生協会，(1988)。
- 9) Lone R., Penille N., Kim H. et al：Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions, International Journal of Food Microbiology, 17, 37-45 (1992)。
- 10) 尾畑浩魅，甲斐明美，柳川義勢 他：コレラ菌検査における PCR 法と従来法の比較検討。感染症誌，66,219,(1992)。
- 11) 坂崎利一，田村和満：下痢原性大腸菌の血清型別について。メディアサークル，34,9-14,(1989)。
- 12) 杉山明，岩出義人，川田一伸：腸管出血性大腸菌感染症，三重県衛研年報，41,43-54 (1995)。
- 13) 竹田美文：病原大腸菌（下痢原性大腸菌），食品衛生検査指針 - 微生物編，108-117，日本食品衛生協会，(1990)。
- 14) 山本達男：病原性大腸菌とは，臨床と微生物，23，781-784，(1996)。
- 15) 山内昭則，岩出義人，杉山明：混合プライマーを用いた病原大腸菌の病原因子検出法に関する研究，三重県衛研年報，43,65-70 (1997)。

Studies of Rapid Method for Detecting Pathogenic Factors of
Escherichia coli with Mixed Primer

Akinori YAMAUCHI, Yoshito IWANE, Yoko NAKANO , Akira SUGIYAMA ,
Osamu NAKAYAMA and Norichika H, KUMAZAWA ^{a)}

Key words: polymerase chain reaction(PCR), mix primer, screening

Using polymerase chain reaction(PCR), pathogenic factors of *E.coli* can be detected more rapidly than previous methods. Stx, INV, ST and LT, that enteropathogenic *E.coli* has, can be detected easily with mixed primer of those four factors. Sub-culture or removal of inhibitor substances using the column can lead high sensitivity of the detection. PCR used those four mixed primer is very useful as a screening method.

a) Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus