

PCRによる腸管出血性大腸菌の迅速検査法の検討

砂原千寿子・山中 康代・藤井 康三・三木 一男・十川みさ子・山西 重機

Studies of a Rapid Method for Detection of Enterohemorrhagic Escherichia coli Using PCR

Chizuko SUNAHARA, Yasuyo YAMANAKA, Koozou FUJII, Kazuo MIKI, Misako SOGAWA and Shigeki YAMANISHI

I はじめに

1990年に埼玉県の幼稚園で腸管出血性大腸菌O157による集団感染事例で死亡例が報告され、腸管出血性大腸菌O157が注目されるようになったが、1996年5月に岡山県での発生を起し、腸管出血性大腸菌O157による食中毒は全国的な広がりを見せ、7月には大阪府堺市の小学校で5000名を越える集団発生など、全国で9400名余りの患者発生を見た。そこで、厚生省は1996年8月に腸管出血性大腸菌を指定伝染病に指定し、二次感染の防止や感染経路の解明を行い事態の対応にあたることになったが、この時点ではまだ腸管出血性大腸菌の検査法は確立されておらず、検査は手探りの状態であった。

食品等の腸管出血性大腸菌O157の検査法については厚生省が検査方法を示したが、糞便からの検出方法やO157以外の血清型についてはまだ確立されていないのが現状である。通常の検査法では、O157以外の血清型、特に健康保菌者からの分離はできない可能性が高い。二次感染予防の為に確実な検査法が望まれる。当研究所では、腸管出血性大腸菌の迅速検査法として図1に示す方法で検査を進めている。スクリーニングに増菌培地からのPCR法を実施しているが、1996年からこれまでに分離培地で検出しPCR法でVT遺伝子を検出できなかった2例を経験した。そこで、従来のスクリーニング法について検討し、若干の知見を得たので報告する。

II 材料と方法

1. 使用菌株

当衛生研究所で分離したEH980006株(O157:H7 VT

1, VT2), EH980019株(O157:H7 VT1, VT2), EH980027株(O26:H11 VT1), EH000003株(O26:H11 VT1)の4株を使用した。EH980019, EH000003株は増菌培地にN-mEC培地を用いてのPCRスクリーニングで検出できなかった株である。

2. 使用増菌培地

トリプトソイブロス, mEC培地, N-mEC培地を使用し、それぞれについて36°C及び42°Cで検討した。

3. 菌液及び糞便液の調製

菌液は、各4株をトリプトソイブロスで36°C 18時間培養したものを、約 10^8 , 10^7 , 10^6 cfu/mlになるようにPBSで 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 倍希釈した。

糞便液は、3名分の便約3gにPBS40mlを加え混和後15000rpm 5分遠心し上清を糞便液とした。この糞便液1.8mlに各希釈段階の菌液0.2mlを添加し、菌添加糞便液を調製した(菌オーダー 10^4 , 10^3 , 10^2 cfu/ml)。これをトリプトソイブロス, mEC培地, N-mEC培地10mlに0.1ml添加し(菌オーダー 10^2 , 10^1 , 1 cfu/ml), 36°C及び42°Cで18時間培養した。

4. PCR及び発育菌数計測

DNAの抽出は、各増菌培養液1mlを15000rpm 1min冷却遠心し、上清を捨て沈渣にDW100 μ l加えVortexする。沸騰水中で10min煮沸後、15000rpm 1min冷却遠心し、上清10 μ lをPCR用鋳型とし、50 μ l系でKarchらのprimerを用いてPCRを実施した。(94°C 30sec 50°C 60sec 72°C 90sec 30サイクル 72°C 180sec)各増菌培地での発育菌数は、糞便液中の競合菌を考えO157についてはCT-SMAC, O26にはCT-RMACを用いて計測した。

その結果を表1に示す。便宜上PCR産物の量を表すため、バンドの太いものを++, 細いものを±とした。また、PCRの方法を図2に示す。

表1 増菌後の菌数及びPCRの結果

培養温度	増菌培地	接種菌量 cfu/ml	0157		026	
			100 : 120cfu/ml	100 : 120cfu/ml	100 : 83cfu/ml	100 : 70cfu/ml
			10 : 12cfu/ml	10 : 12cfu/ml	10 : 8.3cfu/ml	10 : 7cfu/ml
			1 : 1.2cfu/ml	1 : 1.2cfu/ml	1 : 0.8cfu/ml	1 : 0.7cfu/ml
			PCR結果(増菌後菌数) 菌株EH980006	PCR結果(増菌後菌数) 菌株EH980019	PCR結果(増菌後菌数) 菌株EH980027	PCR結果(増菌後菌数) 菌株EH000003
42℃	TSB	100	++ (4.2×10 ⁷)	++ (4.5×10 ⁷)	+ (6.3×10 ⁷)	++ (4.2×10 ⁷)
		10	+ (9.1×10 ⁶)	+ (9.9×10 ⁶)	± (6.7×10 ⁶)	+ (3.3×10 ⁶)
		1	± (6.7×10 ⁵)	+ (5.1×10 ⁵)	± (5.5×10 ⁵)	± (4.3×10 ⁵)
	mEC	100	± (1.3×10 ⁶)	+ (1.1×10 ⁷)	++ (2.4×10 ⁷)	++ (6.8×10 ⁷)
		10	+ (6.7×10 ⁵)	+ (1.3×10 ⁶)	++ (2.7×10 ⁶)	+ (9.1×10 ⁶)
		1	- (4.2×10 ⁴)	± (6.1×10 ⁴)	++ (4.3×10 ⁵)	+ (9.1×10 ⁵)
	N-mEC	100	+ (1.6×10 ⁵)	++ (2.0×10 ⁵)	++ (2.6×10 ⁶)	++ (2.7×10 ⁶)
		10	+ (8.1×10 ⁴)	++ (1.2×10 ⁵)	- (<300)	- (<300)
		1	- (<300)	- (4.3×10 ³)	-	-
36℃	TSB	100	++	++	+	+
		10	+	+	±	±
		1	± (1.8×10 ⁶)	± (7.2×10 ⁵)	- (3.7×10 ⁵)	- (2.2×10 ⁵)
	mEC	100	++	++	+	+
		10	+	++	+	+
		1	+ (1.3×10 ⁶)	+ (2.6×10 ⁶)	± (3.0×10 ⁵)	+ (1.2×10 ⁶)
	N-mEC	100	+	++	- (<300)	- (<300)
		10	++	++	-	-
		1	++ (2.0×10 ⁵)	++ (6.1×10 ⁷)	-	-

(注) ++ : PCR産物のバンドの太いもの
± : PCR産物のバンドの細いもの

III 結 果

1. TSBを用いた場合

各菌株ともTSBで42, 36℃いずれも旺盛な発育を示したが、競合菌の影響のためかPCR産物は思ったほど増幅されてなかった。特に36℃培養でその傾向が見られた。しかし、36℃ 1 cfu/ml接種の026以外はPCR (+) となった。当所で実施しているPCR法の感度は純培養の場合、いずれの増菌培地でも10⁴~10⁵cfu/mlでPCR (+) となるが、今回の糞便液に菌を添加した競合菌がある状態では、TSBでは増菌後の菌数が10⁵を越えていてもPCR (-) となり、阻害がみられた。

2. mECを用いた場合

TSBより総じてやや菌数は少ないものの、0157 1株が接種菌量1 cfu/ml 42℃培養でPCR (-) だった以外はPCR (+) となった。0157 2株はいずれも36℃培養の方が菌数、PCR産物共に多かった。026につ

いては増菌後の菌数は差が認められなかったが、PCR産物量は42℃培養が明らかに多かった。今回の検討では、026はmEC 42℃培養が最も良い結果を得た。

3. N-mECを用いた場合

N-mECでは接種菌量が100cfu/mlの場合、42℃では各菌株とも発育菌量はTSBより10~10²オーダー低かったが、PCRでは十分増幅されていた。しかし接種菌量が少なくなるにつれ、増菌後の菌数も少なく0157は接種菌量10cfu/mlでもPCRは (+) になったが、1cfu/mlではPCRの検出感度まで菌が増殖できずPCR (-) となった。026は10及び1 cfu/ml添加では菌の発育が見られなかった。36℃培養では0157は旺盛な増殖を示し、接種菌量が1 cfu/mlでもPCR産物が十分増幅されていた。026は100cfu/ml接種でも菌の増殖が抑えられて発育できなかった。

そこで、026がノボビオシンで発育の阻害を受けるのか検討した。始めにセンシディスク (NCCLS法) でのノボビオシン30µgに対する感受性を、EHEC68株

(O157 33株・O26 31株・その他血清型 4株), 通常の大腸菌13株で実施した。通常の大腸菌のO128 1株を除きいずれも耐性であったが, 全く発育を阻止されていない株はO157の5株のみで後はいずれも若干の発育阻害を受けていた。同一菌株内のコロニーでも差があり, ノボピオシンによる発育の阻害が全くないとはいえない。今回使用したN-mECはノボピオシナトリウムが25mg/lの割合で添加されているので, その前後の濃度で発育に影響があるかどうか検討し

た。

増菌培地にはTSB・mECを使用し, ノボピオシナトリウムを0・5・10・25・50・100 mg/lになるよう添加した。使用菌株は増菌培地の検討に使用した菌株が, O157間・O26間では発育の差がほとんど認められなかったので1株ずつを用い, 接種菌量は10・10⁸cfu/mlとなるよう各純培養菌液を添加し36℃・42℃で培養した。

結果を表2に示す。

表2 ノボピオシン添加によるEHECの発育状況

1) O157 (菌株EH980006)

培地	温度	接種菌量	ノボピオシナトリウム mg/l						
			0	5	10	25	50	100	
TSB	36℃	1500cfu/ml	++ 3.9×10 ⁹	++	++	++ 4.1×10 ⁹	++ 3.2×10 ⁹	+	5.6×10 ⁸
		15cfu/ml	++	++ 2.2×10 ⁹	++ 5.0×10 ⁹	++ 4.0×10 ⁹	-	-	-
	42℃	1500cfu/ml	++ 4.1×10 ⁹	++	++	++ 2.1×10 ⁹	++	++	++ 3.4×10 ⁹
		15cfu/ml	++	++ 4.3×10 ⁹	++	++ 5.4×10 ⁹	++ 7.0×10 ⁹	-	-
mEC	36℃	1500cfu/ml	++ 8.0×10 ⁸	++	++	++ 1.3×10 ⁹	++ 2.8×10 ⁹	-	-
		15cfu/ml	++	++ 1.5×10 ⁹	++ 1.3×10 ⁹	++ 1.4×10 ⁹	-	-	-
	42℃	1500cfu/ml	++ 4.4×10 ⁹	++	++	++ 4.1×10 ⁹	+	+	-
		15cfu/ml	++	++ 2.8×10 ⁹	++ 8.4×10 ⁸	++ 1.2×10 ⁹	-	-	-

(注) ++・+・- : 菌の発育の有無表示
下段は増菌後の菌数

2) O26 (菌株EH000003)

培地	温度	接種菌量	ノボピオシナトリウム mg/l						
			0	5	10	25	50	100	
TSB	36℃	1000cfu/ml	++ 7.7×10 ⁹	++	++	++ 1.3×10 ¹⁰	++	++	++ 4.0×10 ⁸
		10cfu/ml	++	++ 1.9×10 ⁹	++	++ 2.0×10 ¹⁰	+	+	-
	42℃	1000cfu/ml	++ 1.3×10 ¹⁰	++	++	++ 9.6×10 ⁸	++	++	++ 7.8×10 ⁸
		10cfu/ml	++	++ 8.0×10 ⁸	++ 1.4×10 ⁹	++ 1.0×10 ⁷	-	-	-
mEC	36℃	1000cfu/ml	++ 2.7×10 ⁹	++	++	++ 7.2×10 ⁸	++ 2.0×10 ⁹	-	-
		10cfu/ml	++	++ 8.6×10 ⁸	++ 3.4×10 ⁸	-	-	-	-
	42℃	1000cfu/ml	++ 2.7×10 ⁹	++	++	++ 3.3×10 ⁹	++ 3.3×10 ⁹	-	-
		10cfu/ml	++	++ 5.2×10 ⁸	++ 4.1×10 ⁸	++ 4.2×10 ⁸	-	-	-

O157はどの条件下でもノボビオシンナトリウム25mg/1までは阻害されることなく旺盛な発育がみられた。TSBベースでは接種菌量1500cfu/mlの場合、100mg/1でも発育した。ノボビオシン濃度が濃くなるに従い42℃の方が阻害が少なかった。mECベースでは、ノボビオシンナトリウム100mg/1添加ではいずれも発育が認められず、接種菌量1500cfu/mlの場合、50mg/1でも発育したが36℃の方がやや阻害が少なかった。今回の接種菌量ではノボビオシンナトリウム25mg/1までは温度による発育の差はなかった。

O26はTSBベースでは接種菌量1000cfu/mlの場合、36℃・42℃共に100mg/1でも旺盛な発育がみられた。25mg/1までは42℃でやや阻害がみられたが、概ね発育良好であった。mECベースでは接種菌量1000 cfu/mlの場合、温度による差はなく50mg/1まで発育が認められたが、接種菌量が少なく42℃の方が発育が良好で、接種菌量10cfu/ml・25mg/1添加では36℃は阻害を受け発育しなかった。O157と比べると接種菌量が少ない場合は、ノボビオシンによる阻害を受けやすい。森らが、O26の各増菌培地（TSB・CT-TSB・mEC・N-mEC）の37℃及び42℃での8時間及び18時間後の生菌数は、増殖静止期に早く達するのはTSB42℃で、N-mECが極端に遅いが18時間後には菌数は若干CT-TSB・N-mECで低い程度で大差なかったと報告している¹⁾。この時の接種菌量は約 10^6 cfu/mlで、接種菌量が多い場合は、どの増菌培地でも問題がない。

表1の検討でN-mECが増菌培地として問題があると示唆されたが、純培養菌でみる限りはN-mECに含まれるノボビオシン量では接種菌量が10cfu/ml以上あれば、接種菌量が10cfu/mlで36℃培養のO26を除き影響は少なかった。しかし競合菌の存在下では明らかに他の増菌培地より阻害が認められた。

IV 考 察

今回の検討の結果では、いずれの菌株でもTSBでは旺盛な増殖が認められ、42℃培養ではTSB>mEC>N-mECの順に菌数が約1オーダーづつ違っていた。O157はTSBでは培養温度による菌数の差はほとんどなかったが、PCRによるスクリーニングの増菌としては42℃培養がやや優れていた。

選択性のないTSBの36℃培養では、糞便中の競合菌の増殖で煮沸法によるDNAの抽出に影響を与え、PCR反応が抑制されたと思われる。多くの競合菌の存在下では、TSBは目的菌を検出できないこともあると考えられる。今回使用した糞便液は好気条件で発育する菌数が 5.4×10^3 cfu/ml含まれていたが、実際の検体中にはより多くの競合菌が考えられ、食品、水等本来汚染の少ないものまた、何らかの損傷を受けていると考えられる場合の増菌にはTSBは有効と思われるが、汚染の多い検体の増菌培地として使用する場合は考慮する必要がある。O157についてはmEC、N-mECはいずれもPCR、菌数共に36℃の方が優れていた。接種菌量が少ない場合mEC、N-mECでは42℃での菌の発育が抑制されていた。N-mEC 42℃培養では一部のO157の発育が阻害されることが岡崎らの報告でも示されている²⁾。胆汁酸塩とかノボビオシンの様に菌の発育を抑制する物質を含む培地中では、O157はそれらに対し抵抗性があるとは言え、通常の大腸菌に比べ発育可能温度が低い³⁾ため42℃でも選択性のないTSBに比べ、発育抑制を受け易かったのではと思われる。O157は、N-mEC 36℃培養で菌数、PCR共によい結果を得た。

しかし、O26は36℃では、いずれの増菌培地でも菌数が増加していてもPCR産物は少なく、N-mECにおいては発育が認められず、増菌効果よりむしろ抑制されていた。O157に比べ、O26は増菌培地や培養温度、接種菌量などの影響を受けやすい結果となった。N-mECでは明らかに発育阻害が認められたが、42℃では接種菌量が100cfu/mlあれば菌量がPCRに十分対応できるまで増菌した。接種菌量が少ない場合はPCRスクリーニング用増菌培地としては適さない結果となった。36℃培養ではO26は増菌効果が得られなかった。mECでは培養温度、接種菌量に関わらず菌数が増加し、PCRで検出可能となったが、PCR産物量は42℃の方が多く、mEC42℃培養がよい結果を得た。O157とO26では、増菌に適した条件に大きく差がみられた。

当所でN-mECを用いたスクリーニングで検出できなかった2例はこれらのことから考えると、EH980019(O157)の場合は、培地による阻害と言うよりは42℃の培養温度に併せ、抗生剤使用の上検体量も少なく糞便中のO157の菌数が少なかったため、PCRの感度まで増菌できなかったものと思われる。EH000003(O26)については検体中の菌量が少なかったため、N-mEC培地による阻害が考えられる。

検討の結果、予め目的菌が判明している場合は、O

157ならN-mEC 36℃培養, 026なら mEC 42℃培養で増菌し検査を進めればよいが, 食中毒, 感染性胃腸炎等の起因菌の検索等で検査を進める時はその他の血清型の腸管出血性大腸菌も考えなければならない。この場合, 迅速簡便になおかつ見落としのない方法として, 競合

菌等の影響も考慮に入れ, mEC 42℃培養での増菌を取り入れ当研究所では迅速検査法として図1に示す方法で実施している。この増菌法ではO157の発育がやや劣るが培養時間を18時間以上取ること等で対応できると考えている。

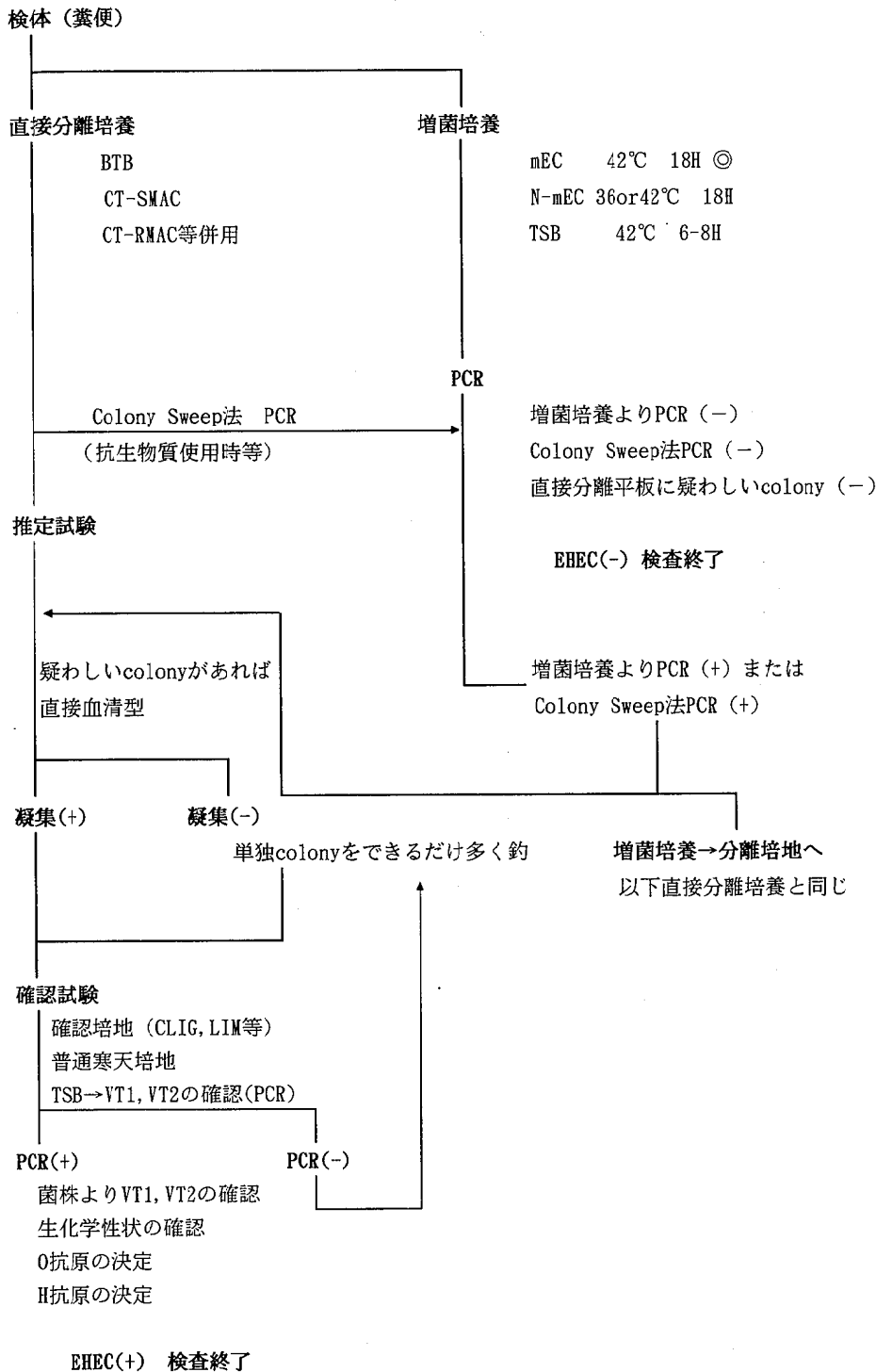


図 1 Enterohemorrhagic Escherichia coli の迅速検査法

primer

1. VT1, VT2(Karch)

VT-1 MK-1 5' -TTTACgATAgACTTCTCgAC-3'
VT-2 MK-2 5' -CACATATAAAATTATTTCGCTC-3'
VT1:225bp VT2:228bp

2. VT1, VT2(Kobayashi)

VT-1 VT-1(A) 5' -AgTTAATgTggTggCgAA-3'
VT-1(B) 5' -gACTCTCCATCTgCCg-3'
VT-2 VT-2(A) 5' -TTCggTATCCTATTCCG-3'
VT-2(B) 5' -TCTCTggTCATTgTATTA-3'
VT1:811bp VT2:471bp

DNAの抽出

1.1 増菌培養

増菌培養液 1ml 15000rpm 1min 冷却遠心
上清を捨て沈渣にDW 100 μ l加えVortex

1.2 純培養菌

マイクロチューブにDW 100 μ lを入れ培養菌を少量入れVortex

2. 細胞の破壊

沸騰水中 10min

3. 15000rpm 1min 冷却遠心 上清をTemplateとする

PCR(50 μ l系)

	(Karch)	(Kobayashi)
Template	10.0 μ l	
10 \times Gene Taq Unibarsal Buffer	5.0 μ l	
dNTP Mixture	4.0 μ l	
primer	2.0 μ l	4.0 μ l
Gene Taq(Taq DNA polymerase)	0.5 μ l	
DW	28.5 μ l	26.5 μ l

増幅

変性 94 $^{\circ}$ C 30sec
アニール50 $^{\circ}$ C 60sec
伸長 72 $^{\circ}$ C 90sec
30サイクル
最終 72 $^{\circ}$ C 180sec

PCR反応阻害因子の除去方法

1) CT等添加培地からのPCR反応をする場合、阻害を受けることがある。阻害因子を除去するには

- ① CT-TSB, CTV-TSB等増菌培地の場合その1mlをTSB 10mlに、平板培地の単独コロニーから直接またはColony Sweep法の場合はTSB 1mlに接種
- ② 36 $^{\circ}$ C 6H または42 $^{\circ}$ C 4H培養
- ③ 培養液1mlを15000rpm 1min 冷却遠心
- ④ 上清除去
- ⑤ DW 100 μ lに再浮遊
- ⑥ Vortex
- ⑦ DNAの抽出

2) BTB等選択性の弱い培地からColony Sweep法でPCR反応をする場合

- ① DW 100 μ lに浮遊
- ② Vortex
- ③ 15000rpm 1min 冷却遠心
- ④ 上清除去
- ⑤ DW 100 μ lに再浮遊
- ⑥ Vortex
- ⑦ DNAの抽出

図 2 PCRの方法

1. 検査法概要

1) 増菌培地 (mEC 42 $^{\circ}$ C 18H・N-mEC 36 $^{\circ}$ C 18H TSB 42 $^{\circ}$ C 6-8H)

以前はN-mEC42 $^{\circ}$ Cを主体にTSBを併用していたが、現在は基本的にはmEC 42 $^{\circ}$ C 18H増菌している。抗生剤投与時にはTSBを併用し、図2に示すPCR法でスクリーニング。抗生剤投与時等、場合により直接分離培地 (BTB) からColony Sweep法でのPCRも併用する。

2) 分離培養

直接または増菌培地からの分離培地には種々の培地があるが、使用しているのは、BTB・CT-SMAC・CT-RMAC等併用

3) 推定試験

疑わしいコロニーがあれば直接単独血清(O157, O26, O111等)で凝集を確認する。凝集が認められたものは、確認培地に接種する。スクリーニングのPCRが(+)で凝集がくるコロニーが見つからない場合は、できるだけたくさんの大腸菌を確認培地に接種する。CT含有等の選択性の強い培地からの釣菌はコンタミに注意し、またこれらの培地か

ら直接血清にあたる場合は、発育した多くのコロニーで弱い凝集がみられるので強く凝集するものを釣菌する。できれば同時にTSB1mlに接種し42 $^{\circ}$ Cで4時間以上培養すればPCRでVT遺伝子の確認ができる菌量になる。PCRで確認ができなかった時は再度釣菌する。目的菌が見つからない場合、Beutine培地の使用も有効と思われる。確認培地にはCLIG・LIMを使用し、普通寒天にもできれば接種する。

4) 確認試験

菌株よりPCRでVT1, VT2の確認をする。(小林のprimer使用)E. coli以外にVTを産生するCitrobacter freundiiやEnterobacter cloacae等もある⁴⁾ので、生化学的性状でE. coliであることの確認をし、腸管出血性大腸菌とし、O抗原血清型別(加熱処理でも確認)、H抗原血清型別をする。

腸管出血性大腸菌確定

菌株による発育の個体差、搬入されてくる検体、特に糞便の場合常在菌の個体差・治療状況等複雑に阻害要因が絡んでくると思われるが、このスクリーニングでは、増菌培地に接種した検体中に10~100個目的菌が

あれば競合菌の影響が有っても十分検出可能となる。増菌培地の併用, Colony Sweep法によるPCRの併用等で検出率をより向上する事もでき, スクリーニングにPCR法を用いたこの迅速検査法は, O157, O26のみならずその他の血清型を含めた腸管出血性大腸菌の検出に有効と思われる。増菌培地からのDNAの抽出に, プロテナーゼK処理をするとPCRの感度が上がるとの報告⁵⁾もありまた, O157, O26以外の血清型の腸管出血性大腸菌についても適切な増菌培養条件の把握等今後検討していきたい。

文 献

- 1) 森良一他: O157以外の腸管出血性大腸菌のスクリーニング方法に関する研究(地方衛生研究所間の連携によるモデル研究), 1~4, (1998)
- 2) 岡崎則男他: ペロ毒素産生性大腸菌(VTEC) O157の増菌培養に関する基礎的検討, 日本細菌学雑誌, 52(2), 505~511, (1997)
- 3) 伊藤武: 食品からの腸管出血性大腸菌O157検出法, 日本食品微生物学会雑誌, 13(4), 205~219, (1997)
- 4) 坂崎利一: 志賀毒素産生性(腸管出血性)大腸菌-細菌学的性状, 病原性, および発症機序-, 日本食品微生物学会雑誌, 13(4), 187~193, (1997)
- 5) 新潟市衛生試験所年報: 食肉からのO157検出法の検討, 23, 39~42, (1998)