

腸管出血性大腸菌O157の検査法について

戎谷 佐知子・伊藤 敏行*・川本 歩
松本 範夫・本田 達之助**

1 はじめに

腸管出血性大腸菌による感染症は、消化器症状のみならず、合併症として溶血性尿毒症（HUS）や脳症を発症する可能性があるため注意が必要とされるが、1996年5月以降全国的に多発した。鳥取県においても例外ではなく1996年7月から8月にかけて4件の事例を経験した。

腸管出血性大腸菌O157の検査方法について、当科では polymerase chain reaction (PCR) および逆受身ラテックス凝集反応 (RPLA) によって検査を行なっているがこれらの検査方法における検出感度の確認と、検出感度をあげるために培地に Cefixime およびTelluriteを加える方法と、VERITAS 社製の DYNABEADS を用いる方法とを検討したので結果を報告する。

2 材料および試薬

(1) 被検菌株

1996年8月16日発生の腸管出血性大腸菌感染症由来株

(*Escherichia coli* O157:H7 Stx1, 2)

(2) 試薬、培地

MacConkey agar base (DIFCO製)

ソルビトール (MacConkey agar base に1%に加え SMAC とする、和光純薬)

トリプチケースソイブイオン (TSB、日水製薬)

標準寒天培地 (栄研科学)

ハートインヒュージョン寒天 (栄研科学)

DYNABEADS anti-*E. coli* O157 (VERITAS 社製)

Cefixime (DYNABEADS に付属のもの、SMAC に加え CT-SMAC とする)

Tellurite (DYNABEADS に付属のもの、SMAC に加え CT-SMAC とする)

ペプトン水緩衝液

VT1、VT2 遺伝子検出用プライマーセット (TaKaRa)

大腸菌ベロトキシン検出用キット (デンカ生研)

河川水 (腸管出血性大腸菌O157による汚染を受けていないもの)

病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研)

3 方 法

(1) PCR と RPLA における検出感度の確認と菌数の定量

被検菌株を TSB で 37℃、18時間振盪培養した培養液を生理食塩水で10倍段階希釈し、 $10^2 \sim 10^8$ / ml の菌液を調整した。これらの菌液について、PCR により毒素遺伝子の検出を、RPLA により毒素の検出を行なった。なお、PCR には TaKaRa のプライマーを使用し、RPLA にはデンカ生研のキットを使用した。菌数の定量は、調整した菌液を 1 ml ずつ2枚の滅菌シャーレにとり、標準寒天培地で混釈した後 37℃、24時間培養し、30～300個の集落のある平板で集落を計数し、希釈倍数をかけることにより行なった。

(2) Cefixime および Tellurite が分離におよぼす影響について

被検菌株を TSB で 37℃、18時間振盪培養した

培養液を生理食塩水で10倍段階希釈し、 $10^2 \sim 10^5 / \text{ml}$ の菌液を調整した。河川水9 mlに各々の菌液を加え、 $10^1 \sim 10^4 / \text{ml}$ となるように調整し、各希釈段階1 mlずつをSMACおよびCT-SMAC 3枚ずつに塗抹し、37℃、18時間培養後、コロニー密集部をかきとってPCRとRPLAとを実施した。また、被検菌株の確認は、ソルビトール非分解の独立したコロニーを30個ずつ区画分けしたハートインヒュージョン寒天に塗抹し、37℃、18時間培養後、生化学的性状および血清型別をすることにより行なった。

(3) DYNABEADS が分離におよぼす影響について

(2)と同様に菌液を調整し、 $10^1 \sim 10^4 / \text{ml}$ となるようにペプトン水緩衝液に接種し、37℃、6時間培養後、その1 mlをDYNABEADSを用いて濃縮し、(2)にしたがってPCR、RPLAおよび被検菌株の確認を行なった。

4 結果および考察

(1) PCRによる毒素遺伝子の検出は、 $10^6 / \text{ml}$ から可能であり、RPLAによる毒素の検出は、 $10^7 / \text{ml}$ から可能であった。(表1)

表1 PCRおよびRPLAにおける検出感度(／ml)

方法	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
PCR	-	-	-	-	○	○	○
RPLA	-	-	-	-	-	○	○

(2) SMACにおいて、PCRでは $10^5 / \text{ml}$ 接種したもの、RPLAでは $10^7 / \text{ml}$ 接種したものから検出可能であった。CT-SMACにおいて、PCRでは $10^3 / \text{ml}$ 接種したもの、RPLAでは $10^2 / \text{ml}$ 接種したものから検出可能であった。また、被検菌株についてはSMACでは $10^3 / \text{ml}$ 接種したものから、CT-SMACでは $10^2 / \text{ml}$ 接種したものから確認できた。即ち、SMACとCT-SMACとを比較すると、CT-SMACの方が検出感度が良いことがわかる。(表2)

表2 SMACおよびCT-SMACにおける検出感度(／ml)

方法		10^1	10^2	10^3	10^4
SMAC	確認	-	-	○	○
	PCR	-	○	○	○
	RPLA	-	○	○	○
CT-SMAC	確認	-	○	○	○
	PCR	-	○	○	○
	RPLA	-	○	○	○

(3) DYNABEADSを使用したところ、SMACにおいて、PCRでは $10^5 / \text{ml}$ 接種したもの、RPLAでは $10^7 / \text{ml}$ 接種したものから検出可能であった。CT-SMACにおいて、PCRでは $10^3 / \text{ml}$ 接種したもの、RPLAでは $10^2 / \text{ml}$ 接種したものから検出可能であった。また、被検菌株についてはSMACでは $10^3 / \text{ml}$ 接種したものから、CT-SMACでは $10^2 / \text{ml}$ 接種したものから確認できた。また、DYNABEADS使用時には、SMACよりCT-SMACで確認されたコロニー数の方が約10倍であったのでDYNABEADSを使用すると感度が良くなると考えられる。(表3)

表3 DYNABEADS 使用時のSMACおよびCT-SMACにおける検出感度(／ml)

方法		10^1	10^2	10^3	10^4
DYNABEADS SMAC	確認	-	-	○	○
	PCR	-	○	○	○
	RPLA	-	○	○	○
CT-SMAC	確認	-	○	○	○
	PCR	-	○	○	○
	RPLA	-	○	○	○

5 まとめ

(1) PCRによる毒素遺伝子の検出は、 $10^6 / \text{ml}$ から、RPLAによる毒素の検出は、 $10^7 / \text{ml}$ から可能であった。
 (2) SMACとCT-SMACとを比較すると、CT-SMACの方が検出感度が良好であった。
 (3) DYNABEADSを使用すると感度が良くなった。

参考文献

- 1) 小林一寛：腸管出血性大腸菌のPCR法による検出，臨床と微生物，18，p. 507～513（1991）
- 2) 福岡市衛生試験所 小田隆弘：市販生レバー等からの腸管出血性大腸菌の検出例，病原微生物検出情報，17，p. 215～216（1996）