原 著

Vero 毒素産生性大腸菌の検出に PCR 法の有用性

片井敦雄* 振津琢磨* 永井 勲*²

Usefulness of Polymerase Chain Reaction to Detect Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*

Atsuo Katai*, Takuma Furitsu*
and Isao Nagai*²

*Department of Laboratory Medicine,
Kinan General Hospital

*² Department of Surgical,
Kinan General Hospital

Abstract

We used polymerase chain reaction (PCR) method to detect Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and evaluated this method in view points of simplicity, promptitude and economy. Commercial common primers were used. These results were evaluated as follows.

1. When 10 μ l samples contain over 1,500CFU, this test method was available.
2. Cost of this test was ¥130 per one sample. Twenty five minute were necessary to deal with ten samples.
3. It took 3 ~ 4 hours to judge the result of the test after the start of bacterial cultivation.
4. Because the liquid culture medium inhibits the PCR reaction, it was necessary to use sterilized water to dilute the samples.

As the VTEC is getting various serotypes recently, the PCR method will become one of the good method to detect the VTEC rapidly.

1. はじめに

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) 感染症は、1996年8月に指定伝染病とされ、1999年4月からは、感染症新法により3類感染症に位置づけられ、診断すれば直ちに届ける疾患となっている。EHEC

感染症の起炎菌となる大腸菌は、Vero 毒素を産生するのが特徴であり、現在 Vero 毒素を産生する大腸菌は100種以上もの血清型の存在が甲斐ら¹⁾に報告されている。1996年8月より1998年4月までに厚生省に届けられたEHEC感染症は3,219例で、その内訳はO-157 (79.8%)、O-26 (15.5%)、O-111 (2.8%)、その他13種の血清群1.4%、群不明が0.5%報告されている。Vero毒素産生大腸菌(Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*, VTEC) の検出方法として

* 社会保険紀南総合病院 中央臨床検査部

*² 同 外科

(2) 医器学 Vol. 70, No. 2 (2000)

は、O-157・O-26・O-111などの頻度の高い特定の血清型については0抗原を検出した後にVero毒素を確認するのが一般的である。しかし、この方法では他の頻度の低い(あるいは未知の)血清型まですべて検出することは、日常検査では、不可能である。VTECの検出方法は、便中のVero毒素を証明するか、あるいはVero毒素産性遺伝子(VT遺伝子)を検出してから血清型を決定するのが理想である。方法として、VT遺伝子を検出するPolymerase chain reaction (PCR)法が多方面で推奨されているが、保険適用外等のため、病院検査室に普及していない。今回われわれは、簡便性・経済性・迅速性をクリアーしたPCR法を平成9年7月1日より導入し現在に至っている。今回これらの成績と若干の知見を報告する。

2. 機器と試薬

PCR装置はラピッドサイクラー(アイダホ社製)を使用した。試薬は市販Kit (TaKaRa)を用いた。試薬にはO-157 (Vero毒素遺伝子) PCR One shot (48回用 58,000円)とO-157 PCR Screening Set (100回用 65,000円)があり、いずれもprimerの標的遺伝子は、VT1・VT2・VT2vha・VT2vhb・VT2vplでPCR産物は171bpのものが得られる。One shot法は、調整された試薬がマイクロチューブに各々50 μ lずつ入っており、サンプルの数だけ取りだして検査する方法である。一方Screening Setは6種類の試薬を混和しマイクロチューブに各々50 μ lずつ分注するよう記している。われわれは、当初方法が安定するまでOne shotを1/5量の10 μ lで検討し、安定した後Screening Setを調整し、10 μ lずつ分注冷凍保存し使用している。

3. 方 法

方法は図1に示した。材料は、糞便をトリプトソイブロス(ブロス)に接種35 $^{\circ}$ C overnight培養する。翌日、滅菌水で50倍に希釈後6分間煮沸釜にてDNAを熱抽出する。抽出後12,000 rpm、4 $^{\circ}$ C 10分間遠心し検体とした。PCRは、調整した試薬10 μ lと検体10 μ lを混和し94 $^{\circ}$ C

図1

1分・55 $^{\circ}$ C 1分・72 $^{\circ}$ C 1分, Slope 9.9秒, 35 cycles (約2時間)で増幅させる。判定は、電気泳動後トランスイルミネータの上で行う。検体10 μ l中に含まれる菌数の限界(感度試験)とブロスそのものの影響を、1996年堺市で発生したO-157株を用い併せて検討した。

4. 結 果

感度と阻害試験成績を図2に示す。PCR反応が正しく反応しているかは685bpの内部陽性コントロールが指標となる。目的のVT遺伝子産物は171bpである。左端はDNAマーカーで下から上に100bp単位になっている。レーンNo.1-7はO-157の感度試験を見たもので、レーンNo.の下に10 μ l中に含まれる菌数を示している。レーン8-10はブロスそのものの影響を見たもの、11-14は検体である。レーン15は陰性コントロール、レーン16は171bp陽性コントロールである。ブロス培養後の細菌数は、 1.5×10^9 /mlであった。レーンNo.1はO-157ブロス培養後原液で、レーン2から7は滅菌水で10倍希釈系列での成績である。目的の171bpは一番菌数の多いレーンNo.1には見られず、レーン2からレーン5まで明瞭に検出でき、レーン6は僅かに薄いバンドが見られた。すなわち、検体10 μ l中に1,500 CFUが存在すれば確実に

図2 感度試験およびPCR阻害試験

検出できた。レーン8から10は、レーン1が何故バンドが現れなかったかを検討したもので、レーン8はブロスのみ、レーン9は菌数濃度がレーン4と同濃度になるようにブロスで希釈、レーン10は、レーン9を滅菌水で10倍に希釈した。結果は、レーン8と9のようにブロスが原倍存在すると内部コントロールも陰性となりPCR反応が阻害されている。しかし、滅菌水で希釈したレーン10はレーン5と同様なバンドの濃さが見られた。このことからブロス原液が存在している状態ではPCR反応が進行しないことが判明した。レーン11-14の患者検体は、内部コントロールが陽性のみで判定は陰性である。このような測定方法で1997.7.1より1999.7.31までの成績は、2,627件の糞便検体中PCR陽性が4例(0.15%)で、いずれも血清型はO-157:H7でVT1・VT2が陽性であった。遺伝子の検出に要した時間は増菌培養後3-4時間、10検体の実処理時間は約25分、1検体に要した費用は130円であった。

5. 考 察

Vero毒素産生大腸菌の血清型は先にも述べたが100種を超えている現在¹⁾、VT遺伝子を検出するPCR法が一番有用と思われる。その検

出においても多田ら²⁾は、平板培地からコロニーをかきとるよりも増菌培養からスクリーニング検査後、陽性検体のみ菌検索を実施するのが効率と報告している。今後、VTECの多様な血清型に対する病院検査においても今回われわれが検討したPCR法は、簡便性・経済性・迅速性に適した補助診断法と思われる。

6. 結 語

- 1) 検体10 μ l 中1,500 CFU $\uparrow$ の存在なら確実に検出できる。
- 2) 1検体のコストは130円ででき、10検体の実処理時間は約25分である。
- 3) 判定までの時間は、ブロス培養後3-4時間である。
- 4) ブロス原液が存在すればPCR反応が阻害され、希釈は滅菌水が必要であった。

文 献

- 1) 甲斐明美ほか：腸管出血性大腸菌(Vero毒素産生性大腸菌)O-157の検査法，医学検査 45(10): 1461-1468, 1996.
- 2) 多田 博ほか：PCR法を用いた肥育牛からのVero毒素産生性大腸菌の検出，感染症誌，66(10): 1383-1388, 1992.