＝短 報＝

食品中の腸管出血性大腸菌 O157 および O26 検査法における内部コントロールを用いた偽陰性を回避する遺伝子検出法

清水美和子・磯部 順子・木全 恵子・嶋 智子
金谷潤一・倉田 毅・綿引正則[†]

(富山県衛生研究所)

(受付: 2007 年 11 月 18 日)

(受理: 2009 年 1 月 15 日)

Studies on Genetic Testing Using Internal Control to Avoid False-negative Results in the Official Method for Isolation of *Escherichia coli* O157 and O26 from Food

Miwako SHIMIZU[†], Junko ISOBE, Keiko KIMATA, Tomoko SHIMA,
Junichi KANATANI, Takeshi KURATA and Masanori WATAHIKI

(Toyama Institute of Health, Nakataikoyama, Imizu-shi,
Toyama 939-0363; [†]Corresponding author)

The official method for screening *Escherichia coli* O157 and O26 in food involves the detection of the VT genes by PCR. In this study, we evaluated the efficacy of the application of an internal control (EC 3 DNA is coamplified with the VT gene) in preventing false-negative results of VT gene screening. A modular approach was applied to consider the effect of each parameter: (1) 4 food samples were tested by using 3 types of cultures artificially inoculated with *E. coli* O157 before or after enrichment; (2) 2 commercial kits were used; and (3) 2 DNA extraction methods in the official method were employed. We found that the PCR performance was greatly affected by each experimental parameter; in particular, the DNA extraction method that influenced the concentration of PCR inhibitors in each food sample. Hence, the use of internal control was found to be critical for avoiding false-negative results. Isolation of bacteria is the final assessment in the official method. If it is true-negative, however, any steps for isolating the *E. coli* will not be required. In conclusion, the results of our study may be useful in establishing an overall rapid and efficient test.

Key words: EHEC, PCR, internal control

緒 言

腸管出血性大腸菌感染症は、堺市で平成 8 年に発生した大規模食中毒事例から 10 年を経過した現在でも、腸管出血性大腸菌 O157 (以下、EHEC O157 と略記) のみでなく、EHEC O26, O111 などによる散発あるいは集団

感染例もしばしば報告されている^{1, 2)}。しかし、その感染源が特定されない事例が極めて多いのが現状である。したがって、本菌による食中毒を未然に防止すること、あるいは食中毒の感染源を究明することを目的とし、平成 18 年 11 月 2 日に「腸管出血性大腸菌 O157 及び O26 の検査法について」³⁾ (食安監発第 1102004 号) が厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長から通知 (以下、通知法と略記) された。

通知法に関する詳細は、工藤ら⁴⁾によって解説されて

[†] 連絡先

〒939-0363 富山県射水市中太閤山 17-1

いる。これによると今回の通知法の大きな特徴は、チーズと食肉以外の食品については、効率的なベロ毒素 (VT) 遺伝子検出法をスクリーニングとして用いても良いとしているところにある。したがって、VT 遺伝子が検出されれば培養法を実施し、VT 遺伝子が不検出ならば、EHEC O157 および O26 は陰性と判定し、検査を終了することができるかとされている。

しかしながら、実際の検査では食品中の阻害物質などにより PCR が正常に行われない場合がある⁵⁾。そのような食品では、VT 遺伝子の有無を判定できないだけでなく、EHEC 陰性と誤判定するリスクが危惧される。そこで、PCR による遺伝子検査で確実に陰性と判定するために、競合的 PCR の原理⁶⁾を応用し、VT 遺伝子を増幅する同一のプライマー対により、異なる領域が増幅される DNA を内部コントロール (Internal Control) として用いる方法について検討した。その結果、効率的に偽陰性を回避することが可能となったので報告する。

材料および方法

1. 供試菌株

使用菌株は、当所に保存されている臨床分離株である EHEC O157:H7 EC2687 (VT1, VT2), EHEC O157:HNM EC2691 (VT2) および EHEC O26:H11 EC2706 (VT1) を使用した。これら分離株を Brain Heart Infusion 培地 (Difco) にて 35°C、一晚培養し、培養菌液を 9 ml の滅菌生理食塩水を用いて 10^{-8} 倍まで 10 倍段階希釈した。

2. 供試材料

食品は、魚刺身 (ブリ、マグロ)、豆腐厚揚げ、ショートケーキおよびイクラの 4 種類、計 16 検体を使用した。これらは、いずれも脂肪含量の高いと思われる食品として選択した。特にイクラについては、平成 10 年の北海道産イクラ醤油漬による EHEC O157 食中毒事件⁷⁾の際に PCR が阻害された経験から供試材料として選択した。

3. PCR 法

PCR は、O-157 (ベロ毒素遺伝子) PCR Screening Set (TaKaRa, 以下 Screening Set と略記) および O-157 (ベロ毒素遺伝子) One Shot PCR Screening Kit Ver. 2 (TaKaRa, 以下 One Shot と略記) を使用した。両製品とも使用しているプライマーは EVC-1/2 で、VT 遺伝子を標的とし 171 bp の増幅産物が得られる。Screening Set の反応液組成は、 $10\times Ex Taq^{TM}$ buffer 2.5 μ l, dNTP Mixture 2 μ l, EVC-1/2 プライマー各 0.25 μ l, TaKaRa Ex Taq[®] 0.125 μ l, Template 2.5 μ l, 滅菌水で全量 25 μ l とした。また、One Shot は、反応液 25 μ l に、Template 2.5 μ l, 滅菌水 22.5 μ l (Template を 10 倍希釈) を添加した。

サイクルプログラムは製品のプロトコルに従い、装置は PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa) を用いた。増

Fig. 1. Flow chart of the experimental procedure for evaluating the detection of EHEC O157 in food.

幅産物の検出は、1.5% アガロースゲル (Agarose S, Wako) にて 100 V, 20 分間電気泳動後、エチジウムブロマイドにて染色し、UV 照射下で行った。

4. 内部コントロール鋳型 DNA

PCR の内部コントロール鋳型 DNA として、Positive Control Template EC3 (TaKaRa, 以下 EC3 と略記) を用いた。EC3 を鋳型として EVC-1/2 プライマー対で PCR を行うと、685 bp の増幅産物が得られる。EC3 (100 pg/ μ l = 10^7 コピー/ μ l) を必要に応じて希釈し、EC3 を添加する系は、上記 PCR 反応液に 1 μ l 添加した。

5. VT 遺伝子と EC3 の競合的 PCR

DNA の抽出は、培養液から 10^4 CFU/ml および 10^8 CFU/ml の菌液を調製後、遠心集菌し、その菌沈渣を 100 μ l の 5% (w/v) キレックス 100[®] (BioRad) に懸濁し、100°C、10 分間処理を行った。熱処理後、12,000 rpm, 10 分間遠心し、その上清を DNA 溶液とした。

この DNA 溶液を用いて、それぞれ 0, 2.5×10^2 および 2.5×10^6 CFU に相当する DNA 量に対して、EC3 を 0, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 コピー混合し、Screening Set を用いて PCR を行った。

6. 食品検体の作製

EHEC O157 (EC2687) を添加した各種検体の作製方法の概略および試験の手順を Fig. 1 に示した。各食品

25 g にノボビオシン加 mEC 培地 (栄研化学) 225 ml を加え, ストマッカー処理したものを 3 つに分け, それぞれ試料 A, B, C とした. 試料 A は, 42°C 22 時間培養し, EHEC O157 を添加しないコントロールとした. 試料 B は, 42°C 22 時間培養後, EHEC O157 を約 10^4 CFU/ml (通知法に示された PCR 感度下限値に相当) となるように, 増菌液 10 ml に EHEC O157 菌液 (約 10^9 CFU/ml) の 10^{-3} 倍希釈菌液 (約 10^6 CFU/ml) を 100 μ l 添加した. また試料 C は, EHEC O157 による汚染食品を想定し, ストマッカー処理液 40 ml に EHEC O157 菌液の 10^{-7} 倍希釈菌液 (約 10^2 CFU/ml) を 100 μ l (約 10 CFU) 接種後, 42°C で 22 時間培養した.

7. 菌数の測定

EHEC O157 を添加後培養した試料 C について, 増菌培養液を滅菌生理食塩水にて 10 倍段階希釈し, その 0.1 ml をクロモアガー O157 培地 (関東化学) 2 枚にコンラージ棒で塗抹し, 35°C 一晚培養後の紫色コロニー数より EHEC O157 菌数を算出した.

8. 食品検体試料からの DNA 抽出

食品増菌液の DNA 抽出は, 通知法に記載されているアルカリ熱抽出法および PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent (アプライドバイオシステムズ社, 以下 PrepMan 抽出法と略記) を用いた. アルカリ熱抽出法は通知法に, PrepMan 抽出法は製品のプロトコルに従った.

9. PCR 結果の判定法

EC3 添加の場合, その増幅産物の検出の有無 (以下, 検出の場合は「EC3 検出」, 不検出の場合は「EC3 不検出」と記載) にかかわらず, VT 遺伝子の増幅産物が検出 (以下, 「VT 検出」と記載) されれば, VT 遺伝子陽性と判定した. EC3 検出で, VT 遺伝子の増幅産物が不検出 (以下, 「VT 不検出」と記載) の場合, VT 遺伝子陰性と判定した. EC3 不検出かつ VT 不検出の場合は, PCR が正常に行われていない (偽陰性) と判定した.

結果および考察

実験 1. VT 遺伝子と EC3 の競合的 PCR

VT 遺伝子と EC3 の競合的 PCR の結果を Fig. 2 に示した. EHEC 菌量を 10^8 CFU/ml に調製した場合, EC3 の増幅産物を検出したのは, その添加したコピー数が VT1, 2 を保有する株 EHEC O157:H7 (a) では 10^5 コピー, VT1 または VT2 どちらか一方のみ保有する株 EHEC O157:HNM, O26:H11 (b, c) では 10^4 コピーまでであった. 一方, EHEC 菌量を 10^4 CFU/ml に調製した場合, EC3 の増幅産物は, 添加コピー数が 10 コピーまで検出された. いずれの菌株 (a, b, c) においても, これらは VT 遺伝子の増幅により EC3 の増幅が抑制されることを示し, それは VT 遺伝子の量に相関すると思われた.

これらの結果から, 増菌培地の EHEC 菌量が $10^4 \sim 10^8$ CFU/ml の範囲 (反応チューブ当たり, $2.5 \times 10^2 \sim 2.5 \times 10^6$ CFU の DNA に相当) にあれば, EC3 を添加しても VT 遺伝子は確実に検出できる. また, VT 不検出かつ EC3 検出の場合には, VT 遺伝子陰性と判定することが可能になると思われた.

実験 2. EHEC O157 添加食品を用いた VT 遺伝子の検出

1. EHEC O157 を接種したノボビオシン加 mEC 培地中の菌数測定

EHEC O157 を 10 CFU/40ml 接種後, 42°C 22 時間培養した試料 C の EHEC O157 菌数は, いずれの食品の増菌液においても $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml の菌数を示した.

2. Screening Set を用いた EC3 の効果

EC3 の添加量は, 実験 1 より VT 遺伝子 2.5×10^6 CFU のとき EC3 の増幅が確実に抑制される 10^4 コピーとした.

Screening Set を用いた PCR の結果を Table 1 に示した. 各食品当たり 4 回の実験を行い, Table 1 に示す

Fig. 2. Competitive PCR of EHEC DNA and EC3 DNA.

¹⁾ Colony numbers corresponding to DNA amount and the parenthesis is culture concentration.

Table 1. Use of EC3 DNA as an internal control in PCR assay for detection of VT gene in food with O-157 (Vero Toxin Gene) PCR Screening Set

EHEC O157	Food	Lot No.	Alkaline extraction method			PrepMan		
			without EC3 DNA	with EC3 DNA		without EC3 DNA	with EC3 DNA	
			VT gene	EC3 DNA	VT gene	VT gene	EC3 DNA	VT gene
Sample A (null)	Raw fish	#1	—	+	—	—	+	—
		#2	—	+	—	—	+	—
		#3	—	+	—	—	+	—
		#4	—	+	—	—	+	—
	Flid bean curd	#1	—	+	—	—	+	—
		#2	—	+	—	—	+	—
		#3	—	+	—	—	+	—
		#4	—	+	—	—	+	—
	Cake	#1	—	+	—	—	+	—
		#2	—	+	—	—	+	—
		#3	—	—	—	—	+	—
		#4	—	+	—	—	+	—
	Salmon rae	#1	—	—	—	—	+	—
		#2	—	+	—	—	+	—
		#3	—	+	—	—	+	—
		#4	—	+	—	—	+	—
Sample B (10 ⁴ CFU/ml)	Raw fish	#1	+	+	+	+	+	+
		#2	+	+	+	+	+	+
		#3	+	+	+	+	+	+
		#4	+	+	+	+	+	+
	Flid bean curd	#1	+	+	+	+	+	+
		#2	+	+	+	+	+	+
		#3	+	+	+	+	+	+
		#4	+	+	+	+	+	+
	Cake	#1	+	+	+	+	+	+
		#2	+	+	+	+	+	+
		#3	—	—	—	+	+	+
		#4	+	+	+	+	+	+
	Salmon rae	#1	—	—	—	+	+	+
		#2	+	+	+	+	+	—
		#3	+	+	+	+	+	+
		#4	+	+	+	+	+	—
Sample C (10 ⁸ –10 ⁹ CFU/ml)	Raw fish	#1	+	—	+	+	+	+
		#2	+	—	+	+	+	+
		#3	+	—	+	+	+	+
		#4	+	—	+	+	—	+
	Flid bean curd	#1	+	+	+	+	+	+
		#2	+	+	+	+	—	+
		#3	+	+	+	+	—	+
		#4	+	+	+	+	—	+
	Cake	#1	+	+	+	+	—	+
		#2	+	+	+	+	+	+
		#3	—	—	—	+	—	+
		#4	+	+	+	+	+	+
	Salmon rae	#1	—	—	—	+	+	+
		#2	+	—	+	+	+	+
		#3	+	—	+	+	—	+
		#4	+	—	+	+	+	+

+, positive reaction in PCR, —; negative reaction in PCR

Table 2. Evaluation of PCR assay for detection of VT gene in food with O-157 (Vero Toxin Gene) One Shot PCR Screening Kit Ver.2

EHEC O157	Food	Lot No.	Alkaline extraction method		PrepMan	
			EC3 DNA	VT gene	EC3 DNA	VT gene
Sample A (null)	Raw fish	#2	+	—	+	—
		#3	+	—	+	—
		#4	+	—	+	—
	Flid bean curd	#2	+	—	+	—
		#3	+	—	+	—
		#4	+	—	+	—
	Cake	#2	+	—	+	—
		#3	+	—	+	—
		#4	+	—	+	—
	Salmon rae	#2	+	—	+	—
		#3	+	—	+	—
		#4	+	—	+	—
Sample B (10 ⁴ CFU/ml)	Raw fish	#2	+	+	+	+
		#3	+	+	+	+
		#4	+	+	+	+
	Flid bean curd	#2	+	+	+	+
		#3	+	+	+	+
		#4	+	+	+	+
	Cake	#2	+	+	+	+
		#3	+	+	+	+
		#4	+	+	+	+
	Salmon rae	#2	—	—	—	+
		#3	+	+	+	+
		#4	+	+	+	—
Sample C (10 ⁸ –10 ⁹ CFU/ml)	Raw fish	#2	+	—	+	+
		#3	+	—	+	+
		#4	+	—	+	+
	Flid bean curd	#2	+	+	+	+
		#3	+	+	+	+
		#4	+	+	+	+
	Cake	#2	+	+	+	+
		#3	—	—	+	+
		#4	+	+	+	+
	Salmon rae	#2	—	—	—	+
		#3	+	—	+	+
		#4	+	—	+	+

+; positive reaction in PCR, —; negative reaction in PCR

検体 Lot#2～#4 は同じロットの食品から調製した。

ケーキ Lot#3 およびイクラ Lot#1 のアルカリ熱抽出法で抽出した DNA は、試料 A, B, C において、VT 不検出、EC3 不検出であり、PCR が正常に行われていないと判定された。この場合、EC3 未添加の PCR であれば、試料 B, C において VT 不検出のため、VT 遺伝子陰性と判定するが、EC3 を添加することにより、EC3 も不検出であることから PCR 阻害が推定できた。

ケーキ Lot#3 およびイクラ Lot#1 以外の検体では、試料 A においては、すべて VT 不検出、EC3 検出であり、VT 遺伝子陰性と判定できた。試料 B においては、PrepMan 抽出法により抽出した DNA のイクラ Lot#2、

4 において、EC3 未添加の PCR では VT 検出であり VT 遺伝子陽性となったが、EC3 を添加した PCR では EC3 が検出されたにもかかわらず VT が不検出であったことから、VT 遺伝子陰性と判定された。これは、EC3 を添加したことにより VT 遺伝子の増幅が抑制された可能性は否定できない。しかし、この DNA について EC3 未添加の PCR による VT の増幅産物のバンドが薄かったこと (data not shown) から、この検体からの VT 遺伝子の抽出量が検出限界付近であったため、VT 不検出となった可能性も考えられた。また、イクラの Lot#1, 3 については、VT 遺伝子が検出できていることに加え、実際の EHEC 汚染食品検査では、42℃ 22 時間後の培

養液で EHEC 菌量は 10^4 CFU/ml にとどまらず、検出感度以上に増菌されることが考えられることから問題はないと思われる。しかしながら、このような PCR 阻害物質が多く含まれる食品からの DNA 抽出法については、さらなる検討が必要と思われる。その他の試料 B は VT 検出、EC3 検出であり、VT 遺伝子陽性となった。この結果から、通知法に記載されている検出感度をほぼ確保していることが確認できた。試料 C においては、EC3 不検出のものはあったが、すべて VT 検出であり、VT 遺伝子陽性となった。

以上の結果から、EC3 を添加することにより、偽陰性を回避することが可能となり、精度の高い検査が実施できると思われる。

3. One Shot を用いた EC3 の効果

One Shot を用いた PCR の結果を Table 2 に示した。本キットの評価のために使用した食品は、Table 1 で使用した各食品 Lot#2~#4 と同一である。試料 A においては、DNA 抽出法を問わず、すべて VT 不検出、EC3 検出であり、VT 遺伝子陰性となった。試料 B においては、PrepMan 抽出法により抽出した DNA のイクラ Lot#4 で VT 不検出、EC3 検出であり VT 遺伝子陰性となったが、その他はすべて VT 検出、EC3 検出であり、VT 遺伝子陽性となった。この結果から、通知法に記載されている検出感度をほぼ確保していることが確認できた。試料 C においては、アルカリ熱抽出法により抽出した DNA のケーキ Lot#3 は、VT 不検出、EC3 不検出であり、PCR が正常に行われていないと判定できた。それ以外は、EC3 不検出のものはあったが、すべて VT 検出であり、VT 遺伝子陽性となった。

以上の結果は、Screening Set とほぼ同様の結果であり、One Shot も通知法に示された遺伝子検出法として

使用できると思われた。

今回我々は、内部コントロール DNA を試料 Template と同一のチューブに添加し、同一プライマーを用いて行う PCR が、PCR の成否を判定して偽陰性を回避する方法として非常に有用であることを示した。よって、本法を用いることは、通知法が意図する迅速、効率的な検査をより確実なものにすると考える。さらに、適切な内部コントロールを作製することにより、EHEC 以外の菌の遺伝子検出時にも応用することができると思われる。

文 献

- 1) 刑部陽宅, 磯部順子, 平田清久, 田中大祐, 細呂木志保, 北村 敬, 南 幹雄, 川原たま子, 尾崎博子, 田中桂子: 病原微生物検出情報, **19**, 176 (1998).
- 2) 感染症情報センター: 病原微生物検出情報, **27**, 141-143 (2006).
- 3) 感染症情報センター: 病原微生物検出情報, **28**, 131-133 (2007).
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長: 腸管出血性大腸菌 O157 及び O26 の検査法について. 平成 18 年 11 月 2 日, 食安監発第 1102004 号 (2006).
- 5) 工藤由起子, 高鳥浩介: 食品における腸管出血性大腸菌 O157 および O26 の検査法. 食品衛生研究, **57**, 21-27 (2007).
- 6) 中山広樹: 定量的 PCR. バイオ実験イラストレイテッド ③本当にふえる PCR. p. 141-145, 秀潤社, 東京 (1998).
- 7) Walsh, P. S., Metzger, D. A. and Higuchi, R.: Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques, **10**, 506-513 (1991).
- 8) Wilson, I. G.: Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl. Environ. Microbiol., **63**, 3741-3751 (1997).