

腸管出血性大腸菌の O 抗原遺伝子検出のための Multiplex PCR 法

○三ヶ島壮士、慶野 昌明、田中 佳幸、柳沼 千春、横田 正則郡山市保健所食肉衛生検査所

【はじめに】 当所では、食用に供するために行われる獣畜のとさつ解体処理について、と畜検査により食用として不適な肉や内臓等を排除するとともに、処理が衛生的になされるよう監視指導を行っている。その一環として、管内と畜場で処理された牛の枝肉を対象として、腸管出血性大腸菌の汚染状況についてふき取り自主検査を実施し衛生指導に活用している。検査は、食品を対象とする 6 血清群 (026、0103、0111、0121、0145、0157) の通知法（平成 26 年 11 月 20 日食安監発 1120 第 1 号）に準拠している。しかし、当所では同通知法に記載されている O 抗原遺伝子スクリーニング検査の Real-Time PCR 法及び LAMP 法に必要な機器を保有しておらず、代替法の確立が懸案であった。今回、Conventional PCR 法を用いた検査法を検討したので、その成果について報告する。

【材料及び方法】 菌株：腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0157 は当市保健所、0145 は福島県衛生研究所から分与されたもの

を使用した。*Citrobacter freundii* と *Enterobacter cloacae* は、以前のふき取り検査で分離され、凍結保存されていた株を使用した。Multiplex PCR キット：QIAGEN Multiplex PCR Kit

(QIAGEN) を用いた。サーマルサイクラーはタカラバイオ TP-600 を使用した。

増菌培養液の調整：腸管出血性大腸菌の 6 血清群は、普通寒天培地により純培養した後、Tryptic soy broth (BD) 10ml に接種し 36±1°C で 18±1 時間培養した（予測濃度：約 5×10^8 cfu /ml）。この培養液を対象検体の mEC 培養液を用いて階段希釈し、大腸菌・大腸菌群用シート培地 MC-Media Pad (JNC) により菌濃度を決定した。濃度を決定した 6 血清群の増菌培養液は、それぞれ最終濃度が 1×10^4 cfu /ml となるように混合して調整し、混合試料液とした。

PCR 増幅は、2×Multiplex PCR Master Mix 25 μl、プライマー Mix (各 2 μM) 5 μl、蒸留水 15 μl にテンプレート

DNA 5 μl を加えた 50 μl の反応液を用いて、Paddock らの報告する Protocol 及び Multiplex PCR キットに記載されている Universal Protocol に基づき Multiplex PCR を行った。

Paddock らの Protocol : 95°C で 15 分間加熱後、94°C で 30 秒、67°C で 80 秒を 1 サイクルとして、35 サイクルの PCR 増幅を行った。その後 67°C で 7 分間維持した後 4°C で保存した。

Universal Protocol : 95°C で 15 分間加熱後、94°C で 30 秒、63°C で 90 秒、及び 72°C で 90 秒を 1 サイクルとして、35 サイクル

ルの PCR 増幅を行った。

(1) 感度の検証混合試料液からアルカリ熱抽出法により DNA を抽出し、Multiplex PCR に供して検出感度を検証した。(2) 特異性の確認ベロ毒素 (VT) を産生する株が報告されている 2 菌種 (*C. freundii*、*E. cloacae*) から抽出した DNA を Multiplex PCR

に供し、特異性を確認した。(3) 温度条件の決定サーマルサイクラーの Gradient 機能を使用してアニーリング

温度を段階的に比較し、より高感度で十分な特異性を示す条件を検討した。

(4) 再現性の確認アニーリング温度の最適化後に日を変えて 3 回実験を繰り返した。

【結果】(1) Paddock らの Protocol では、4 血清群について、通知法の求める検出感度 (1×10^4 cfu /ml) を満たさなかった。一方、Universal Protocol では全 6 血清群について検出感度を満たした。(2) Universal Protocol では *C. freundii* 及び *E. cloacae* のバンドは検出されず、特異性を満たすことが確認された。

(3) 他菌種を検出せず十分な特異性を示し、より高感度に検出できるアニーリング温度は 62°C であった。(4) 3 回の実験結果に齟齬はなく、再現性が確認された。

【考察】本研究で検討した Conventional PCR 法 (Multiplex PCR 法) により、Real-time PCR 法や LAMP 法を用いなくても、通知法の求める感度と特異性を満たした 0 抗原遺伝子スクリーニ

ング検査が可能であることが確認された。Paddock らの Protocol で検出感度を満たさなかった一因

は、使用した Multiplex PCR キットの違いによると推察される。当時、Paddock らが使用したキットの入手が困難であつ

たため、入手可能な他のキットを用いたが、このことは試薬の選択次第では検査をさらに低コスト化できる可能性を示唆

する。本法では、VT スクリーニング検査に使用したテンプレート DNA の残りを用いることで、約 4 時間で分離培養工程に進むか否かの判断が可能となる。Multiplex PCR 反応中に VT 陽性枝肉の消毒実施を指示する等、逐次的に公衆衛生措置を講じながら並行して検査を進めることができ、実践的で

あると考えられる。

【参考文献】Z. Paddock et al., Veterinary Microbiology 156 (2012) 381-388.