



「腸内細菌検査」を迅速簡便化する検体プールとPCRによるスクリーニング法の開発

(東洋紡株式会社 敦賀バイオ研究所) 松本 弘嵩・東 隆寛・荒川 琢*

腸内細菌検査とは

毎年冬が近づいてくると「食中毒発生、原因はノロウイルス」、あるいは夏場であれば「O157集団感染」、という記事を新聞紙上で目にするようになる。このような微生物やウイルスが感染することで起こる食中毒の感染源は汚染された食品や食材に加え、食品を調理したヒトである場合もある。この場合、そのヒトには症状があらわれておらず(健康保菌者という)、知らず知らずのうちに食品と接触し感染を広げていることが多い。そのため、調理従事者の衛生健康管理、特に給食や外食など大量の食数を調理する施設の従事者の管理は、食の安全安心を守る上で重要な意味をもつ。我が国では行政から大量調理施設衛生管理マニュアル¹⁾、学校給食衛生管理基準²⁾などが示され、食品取り扱い従事者の腸内細菌検査(検便)の実施が義務付けられている。大量調理施設とは同一メニューを1回300食以上または1日750食以上を提供する施設で、外食チェーン店、仕出し弁当業者などが該当する。大量調理施設の従事者は月に1回以上の検便検査を受けること、その検査には腸管出血性大腸菌を含めること、必要に応じて冬季にはノロウイルスの検査を含めることなどが規定されている。

実際の検査は腸管出血性大腸菌に加え、サルモネラ、赤痢菌の3菌種で行われるのが一般的である。それぞれの菌種をコロニーの色や形状から特異的に判別できる培地に直接便検体を塗抹し培養する。SS培地と呼ばれる培地上では、サルモネラは硫化水素を発生し黒色のコロニーを、赤痢菌は白色粟粒状のコロニーを形成する。CT-SMACと呼ばれる培地上では腸管出血性大腸菌のうちO157は灰色のコロニーを形成する。これらの色の違いや形状の違いによって菌種を判別する。

検体プールによるスクリーニングのコンセプト

検体プールによる検査の簡便化 この検査の目的は健康保菌者からの感染リスクの低減である。したがって、検査は全従事者について実施される。そのため、検体の数量が非常に多くなる。この意味で有症者の治療方針を決めるために行う臨床検査とは性格が異なる。その上、

コロニーの色や形状で菌種を判断するという専門的スキルも必要なため、検査は検査機関に委託されることが多い。検査機関では1日あたり数千から数万の検体を処理する。便検体を培地に塗抹する作業だけでも多大な労力を必要とするが、コロニーの判別も熟練を要する作業である。さらには、検体と同等数分の平板培地が使用され廃棄されていく。これらは感染性廃棄物として扱われ、その処理にはこれまた多大な労力をかける必要がある。

一方で、これらの検査の平均的な陽性率は3菌種合わせても0.02~0.1%であることがほとんどで、大部分が陰性である。このような場合、検体をプールしてスクリーニングを行い、陰性検体を粗々排除したのち、陽性となったプールについて、個々の検体で通常の検査をすることが有効であると考えられる。一方で、検体をプールすることは、もしプールの中に陽性検体が存在すればそれを陰性検体で希釈したことに他ならない。検査の精度としては希釈した分だけの感度が低下することになる。つまり、検体をプールしてスクリーニングを行う場合は、その後の検査方法と同等以上の感度を持つ別の方法が必要ということになる。

PCRによるスクリーニング PCRは病原微生物やウイルスを検出する方法としてすでに広く利用されている。筆者らはPCRを上記スクリーニングに適用するため、検討を行った。

スクリーニングにおいては迅速性と簡便性が求められる。そのため、以下の点を設計に取り入れた。①サルモネラ、赤痢菌、腸管出血性大腸菌の3菌種を同時に検出するマルチプレックスPCRであること、②検体から核酸の抽出を必要としない方法であること、③その上で塗抹培養法と同等以上の感度を有すること。

これらを満たした上で、培養法と同等以上の検出感度を有することを満たすPCR系の構築を行った。

マルチプレックスPCRによるスクリーニング系の構築

マルチプレックスPCR サルモネラは*invA*、赤痢菌は*ipaH*、腸管出血性大腸菌は*stx1*および*stx2*を標的としたプライマーセットを設計した。またPCRのコントロールとなる内部標準配列のDNA断片とプライマー

*著者連絡先 E-mail: taku_arakawa@toyobo.jp <http://lifescience.toyobo.co.jp/>



のセットも添加し、合わせて4つの標的を含むマルチプレックスPCRとした。産物の解析を融解曲線解析で行うため、増幅後のPCR産物のTm値が重なり合わないように設計した。

核酸抽出を必要としない方法 検便検体は保存培地の入った採便管に採取される。これに竹串のような細い棒を挿し、付着した便検体を水に懸濁してプール液を作成する簡便な方法を構築した。得られたプール液は95°C 5分間の加熱と12,000回転5分間遠心分離のみ行い、得られた上清をそのまま添加できるPCR液を構築した。

図1はこれらを組み合わせて各菌種の陽性検体と陰性検体を検査した例である。Tm値に応じて3つの菌種と内部標準が分離されて検出されている。PCRは決まった反応液に決まった量のプライマーを添加すれば成立すると思われがちだが、本目的においては種々の工夫が必要であった。3種のしかも増幅長の異なる標的の検出感を調節するためには、プライマーについては配列のみならず、その添加量、温度サイクルについてはアニーリング温度や伸長温度とそれらの時間、そして反応液の組成などを入念にチューニングし、最適条件を構築した。

検出感度 種々の菌濃度の便検体について、塗抹培養と本法に供し、検出感度を比較した。3菌種とも本法の感度が100倍から1000倍高く、これらの範囲で検体のプールが可能であることが示された(表1)。

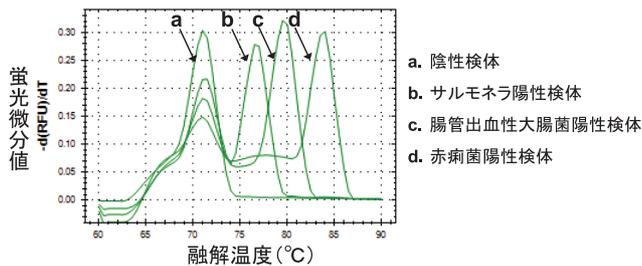


図1. マルチプレックスPCRの融解曲線解析

表1. 各菌種の塗抹培養と本法の検出感度

菌種	培養	菌濃度 (cfu/g)				
		7×10^2	7×10^3	7×10^4	7×10^5	7×10^6
サルモネラ	培養	-	-	+	+	+
	本法	+	+	+	+	+
腸管出血性大腸菌	培養	-	-	+	+	+
	本法	+	+	+	+	+
赤痢菌	培養	-	-	-	+	+
	本法	+	+	+	+	+

表2. 各菌種の塗抹培養と本法の検出感度

菌種	菌濃度 (cfu/g)	プール検体数				培養
		20	50	80	100	
サルモネラ	7×10^3	+	+	+	-	-
	7×10^4	+	+	+	+	+
腸管出血性大腸菌	7×10^3	+	+	+	+	-
	7×10^4	+	+	+	+	+
赤痢菌	7×10^3	+	+	-	-	-
	7×10^4	+	+	+	+	+

プール検体での検出感度 陽性便検体を1検体だけ含む種々の数の検体をプールし、塗抹培養と本法に供し、検出感度を比較した。いずれの菌種でも100検体のプールであれば培養法と同等、50検体のプールであれば培養法よりも10倍の検出感度となることが示された(表2)。

製品の進化 2010年9月に最初の製品を販売開始した。これはPCR後の検出を電気泳動で行うタイプのものであった。その後、改良を重ね、2014年8月にPCR後の検出を融解曲線解析で行うものを販売開始し、さらに2015年12月には、PCRの時間を1時間以上短縮し50分以内で完了する高速反応タイプの販売も開始した。

おわりに

ここまで本稿を読まれた読者は「それで、これのどこが新しいの?」と思われたことだろう。そう、マルチプレックスPCRも、検体から抽出を経ずにPCRを行うことも、検体をプールしてスクリーニングすることも、すべて既知の技術である。ただ、不思議なことに、これらを組み合わせて調理従事者の検便検査に適用することは実現していなかった^{3,4)}。これらの技術が単独でも、いや2つ組み合わせただけでもこの検査にはメリットはない。3つ組み合わせさせて初めてメリットが出せたのである。もちろん、技術的にこれらを組み合わせることは簡単ではない。しかし、そこは日本のお家芸「摺合せ」である。同様のコンセプトの製品は当社以外からも販売されるようになり、切磋琢磨しながら摺合せのレベルは日々向上している。この技術で食の安全安心に微力ながらも貢献できたとすれば幸いである。

文献

- 厚生労働省：大量調理施設衛生管理マニュアル(1997)。
- 文部科学省：学校給食衛生管理基準(2009)。
- 荒川 琢ら：日本食品微生物学会雑誌, **29**, 101 (2012)。
- 西村 直行ら：感染症学雑誌, **86**, 741 (2012)。