

短報

腸管出血性大腸菌感染症事例における
LAMP 法の活用

鈴木理恵子*，山本陽子，永井 裕

Study of LAMP method in infections by
enterohemorrhagic *Escherichia coli*

Rieko SUZUKI, Youko YAMAMOTO
and Yutaka NAGAI

はじめに

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli* 以下 EHEC) を原因とする感染事例が世界で初めて報告されたのは、1982 年米国で発生したハンバーガーによる事例であった。我が国では、1990 年の埼玉県の幼稚園で給水設備が原因となった事例、1996 年の岡山県、大阪府の給食施設を原因とする大規模な集団発生事例があり、いずれも血清型 O 157 による事例であるが、O 157 以外の O 26、O 111 等による事例報告もある。1996 年の事例発生後は、食品の衛生管理の徹底や給食施設の改善など様々な安全対策がとられ大規模な集団発生はなく、小規模または散発的な EHEC 患者発生が報告されている。

患者発生に伴う防疫・食中毒検査として、接触者調査や原因施設特定のための調査依頼がある。調査依頼の対象は主に非発症者や投薬後の患者の陰性確認検査であるため、患者および発症者と比べ保有菌数が少ないことが想定される。このような場合、直接培養法では菌が検出されにくい状態であるため、直接培養法に加え増菌培養法の併用を行っている。増菌培養法を併用すると検査の正確性は向上するが、結果報告に要する日数は、直接培養法で検査開始日を含め 2 日～3 日に対し、増菌培養法で 3 日～4 日と長くなる。EHEC が検出された場合には、届け出が必要な三類感染症と

なるため、行政サイドからは検査結果の正確性と迅速性が望まれる検査である。

地域調査部では、厚生労働省医薬食品局安全部監視安全課長からの「腸管出血性大腸菌 O 157 及び O 26 の検査法について」の通知¹⁾を受け、Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を食品 GLP 検査に導入するための検討²⁾を行い、平成 19 年より LAMP 法によるベロ毒素 (VT) 遺伝子検出を実施してきた。LAMP 法は従来の遺伝子増幅 (PCR) 法と比べ感度も高く操作も簡便で、短時間で遺伝子検出ができることから、迅速性が望まれる EHEC 検査への導入を試みた。平成 21 年度に地域調査部厚木分室に調査依頼のあった EHEC 感染症関連検査について、従来の培養法に加え LAMP 法による培養液中の VT 遺伝子検出を実施し培養法との成績を比較し、その有用性について報告する。

検査材料と方法

1. 検査材料

平成 21 年度の地域調査部厚木分室への細菌性食中毒菌検査依頼数は、51 事例 388 検体 (ヒト 166 検体、食品 143 検体、環境 79 検体)、三類感染症患者発生に伴う防疫検査依頼数は 9 事例 29 検体 (ヒト) であった。このうち、EHEC 患者 (O 157、O 26) 発生に伴う調査または臨床症状等から EHEC 感染症の疑いのある検体は、ヒト 54 検体、環境 23 検体、食品 6 検体 (計 83 検体) であった。このうち、食品 6 検体はすべて、通知¹⁾において VT 遺伝子による検索対象外としている食肉であったことから、この 6 検体を除く 77 検体について分離培養同定検査と併せ LAMP 法による培養液中の VT 遺伝子の検索を実施した (表 1)。

2. 分離培養法

各々の検体について定法³⁾に準じて検査を実施した。大腸菌全般を対象とする DHL 寒天培地 (栄研化学) に加え、選択培地として O 157 を対象としてセフェキシム亜テルル酸加ソルピトールマッコンキー (CT-SMAC) 寒天培地 (OXOID)、O 26 を対象としてセフェキシム亜テルル酸加ラムノースマッコンキー (CT-RMAC) 寒天培地 (BD)、セフェキシム亜テルル酸加 RX O 26 寒天培地 (栄研化学) を状況に応じて用いた。検体塗抹後 36、18～24 時間好気培養を行った (直接培養法)。

また、ノボピオシン加 mEC 培地 (栄研化学) に検体接種後 42、18～24 時間培養後 (培養液)、直接培養法と同様の培地で分離培養を行った (増菌培養法)。

3. DNA 抽出法

培養液 50 μl を 15,000rpm で 5 分遠心後上清を

神奈川県衛生研究所 地域調査部
〒243-0004 厚木市水引 2-3-1
suzuki.s3df@pref.kanagawa.jp
* 現 微生物部

表1 平成21年度 LAMP法による検査実施数

検体種別	食中毒疑い検査				防疫検査				合計
	秦野	厚木	大和	(小計)	秦野	厚木	大和	(小計)	
ヒト	1	20	4	25	3	16	10	29	54
環境	0	15	8	23	0	0	0	0	23
計	1	35	12	48	3	16	10	29	77

取り除き、精製水 50 μ l を加えたのち、Extraction Solution for Foods (栄研化学) 50 μ l を添加し、転倒混和後軽く遠心した。95℃, 5分間加熱処理後、簡易遠心分離器で1分間遠心し、氷上等に移し上清をテンプレートとした。直ちに使用しない場合には0~4℃で保存し4時間以内に使用した。

4. VT 遺伝子検出法 (LAMP 法)

Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット (栄研化学) を用いて、添付書に従い試薬調製を行った後、作製したテンプレート 5 μ l を加えた。遺伝子増幅の設定条件は添付書に従い、温度: 反応ブロック 65℃, ホットボンネット 75℃, 測定時間: 60分, 酵素失活処理: 80℃, 2分間とした。

Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA-320C (栄研化学) を用いて遺伝子増幅および濁度測定を行い、VT 遺伝子の有無を確認した。

5. 同定法

各々の分離平板に疑わしい集落を観察された場合は、TSI 寒天培地, SIM 培地, リジン脱炭酸塩培地, VP 半流動培地等の生化学的性状試験用培地およびハートインフュージョン寒天培地に釣菌接種後、36℃, 18~24時間培養し、大腸菌の生化学的性状を確認するとともに、O抗原等の血清型別, Loopamp ペロ毒素 (VT) タイピング試薬キット (栄研化学) を用いて VT 遺伝子の型別を行った。

結果および考察

今回、対象となったヒトおよび環境由来 77 検体中 5 検体から EHEC O 157 が分離され、いずれもヒトからの分離であった。血清型および毒素型は O 157 (VT1 & VT2) が 3 検体、O 157 (VT2) が 2 検体であった。

直接培養法で EHEC O 157 を疑う集落が確認され同定試験の結果、陽性と判定されたのは 3 検体であった。いずれも LAMP 法および増菌培養法ともに陽性であった。

直接培養法で分離平板上には疑わしい集落の発育を認めず陰性と判定されたのは 74 検体であった。そのうち 3 検体が、LAMP 法で陽性となり、増菌培養法による成績は陽性 2 検体、陰性 1 検体であった (表 2)。

LAMP 法の陽性判定は、濁度およびその増加速度

表2 平成21年度 EHEC の検出結果

検体	直接培養法	LAMP法	増菌培養法	血清型および毒素型
①	+	+	+	O157(VT2)
②	+	+	+	O157(VT2)
③	+	+	+	O157(VT1&VT2)
④	-	+	+	O157(VT1&VT2)
⑤	-	+	+	O157(VT1&VT2)
⑥	-	+	-	不検出

により機械的に判定される。検体に目的菌が存在していた場合、一夜培養すると 10^6 CFU/ml 程度に増殖する³⁾ことが知られており、これを検体とした場合 LAMP 法では 20 分程で濁度が増加し陽性と判定される。LAMP 法で陽性、増菌培養法で陰性となった 1 検体は、測定開始から約 50 分経過後に判定が陽性となったものの、濁度上昇速度が遅く測定終了時の最終濁度が低かったことから、明らかに目的菌が存在する場合と様相が異なっていた。この検査対象者は下痢、腹痛等の症状のない患者家族であったことから、接触者調査対象者であるため培養液中の対象とする VT 遺伝子の DNA 量 (菌量) が少ない、または非特異反応によるものと考えられた。この検体の培養液の分離培養には、Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キットの DNA 抽出に用いる培養液量 (50 μ l) と同量を用い、CT-SMAC 寒天培地 5 枚に培養液 10 μ l を各々塗抹し (計 50 μ l) 分離培養を行った。CT-SMAC 寒天培地上には EHEC O 157 を疑う集落の発育は認められなかったため、O 157 以外の EHEC を想定し、併せて培養していた DHL 寒天平板上に発育した大腸菌様集落について、LAMP 法により VT 遺伝子の検索を実施したが確認はできなかったため、偽陽性と判定した。

増菌培養法を従来法とし、評価する方法を直接培養法、LAMP 法として感度および特異度を求めた。直接培養法の感度は 60%、特異度 100% であり、直接培養法による検査だけでは見落としが起こる可能性が示唆された (表 3)。

LAMP 法の感度は 100%、特異度 99% であり、LAMP 法は偽陽性を検出する可能性があるものの、LAMP 法で陰性と判定され、増菌培養法でも陰性となる期待陰性率は 100% である。LAMP 法で陰性と判定された検体は、培養液の分離培養 (増菌培養法) を行わずに陰性と判定しても、増菌培養法と同等の成績が得られることが示唆され、検査日数の短縮も可能であった (表 4)。

培養液に対するスクリーニング法として、今までも簡便なイムノクロマト (IC) 法や PCR 法が行われてきた。検出感度は IC 法で $10^4 \sim 10^6$ CFU/ml、PCR 法で

表3 直接培養法と増菌培養法の結果の比較

		増菌培養法		合計
		陽性	陰性	
直接培養法	陽性	3	0	3
	陰性	2	72	74
合計		5	72	77

$$\text{感度} = 3 / (3+2) \times 100 = 60\%$$

$$\text{特異度} = 72 / (0+72) \times 100 = 100\%$$

表4 LAMP法と増菌培養法の結果の比較

		増菌培養法		合計
		陽性	陰性	
LAMP法	陽性	5	1	6
	陰性	0	71	71
合計		5	72	77

$$\text{感度} = 5 / (5+0) \times 100 = 100\%$$

$$\text{特異度} = 71 / (1+71) \times 100 = 99\%$$

$10^3 \sim 10^4$ CFU/ml, LAMP法で 10^2 CFU/ml, 所要時間は, IC法が約20分, PCR法は約3~4時間, LAMP法は約1時間である。LAMP法は検出感度, 所要時間ともに他の方法より優れ, EHEC培養液中のVT遺伝子のスクリーニング法として有用であると思われる。

正確性と迅速性が求められるEHEC感染症事例調査における検査では, 直接培養法のみだけでなく増菌培養法を実施し, 培養液はLAMP法によるVT遺伝子のスクリーニング検査を実施する。直接培養法, LAMP法で共に陰性であった場合は, 従来の増菌培養と同等の精度を保ちながら検査2日目で陰性の結果報告が可能となり, 正確性と迅速性の両面での改善が図られた。また, LAMP法陽性であった検体については分離培養を継続して行うことで, 作業効率は向上すると考えられた。

本検討にあたり, ご協力いただきました秦野保健福祉事務所, 厚木保健福祉事務所および大和保健福祉事務所の担当の皆様へ深謝いたします。

(平成22年8月20日受理)

文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知: 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日付食安監発第1102004号
- 2) 鈴木理恵子, 永井裕, 原みゆき, 小松祐子, 小泉明子, 小儀國太郎: 「腸管出血性大腸菌O157及びO26検査実施標準作業書」作成のための基礎的検討, 神奈川県衛生研究所研究報告, 37, 9-11 (2007).
- 3) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解 2005