

食品や臨床検体に潜む病原大腸菌 の網羅的迅速検出法

新技術説明会

平成21年7月2日(木) 13:10~13:40

科学技術振興機構 JSTホール

大阪市立大学・大学院生活科学研究科

長寿社会食生活学分野

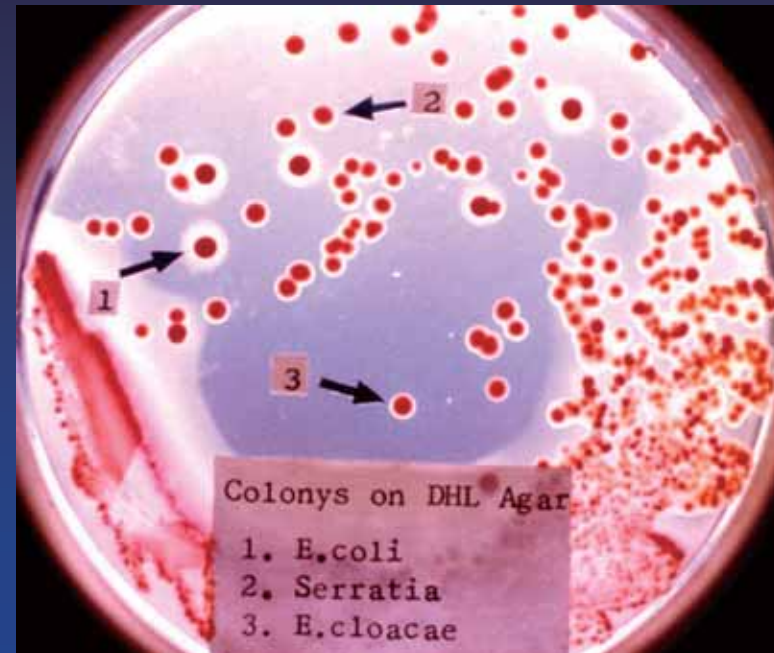
教授・西川禎一



研究の背景：下痢原性大腸菌 (DEC)

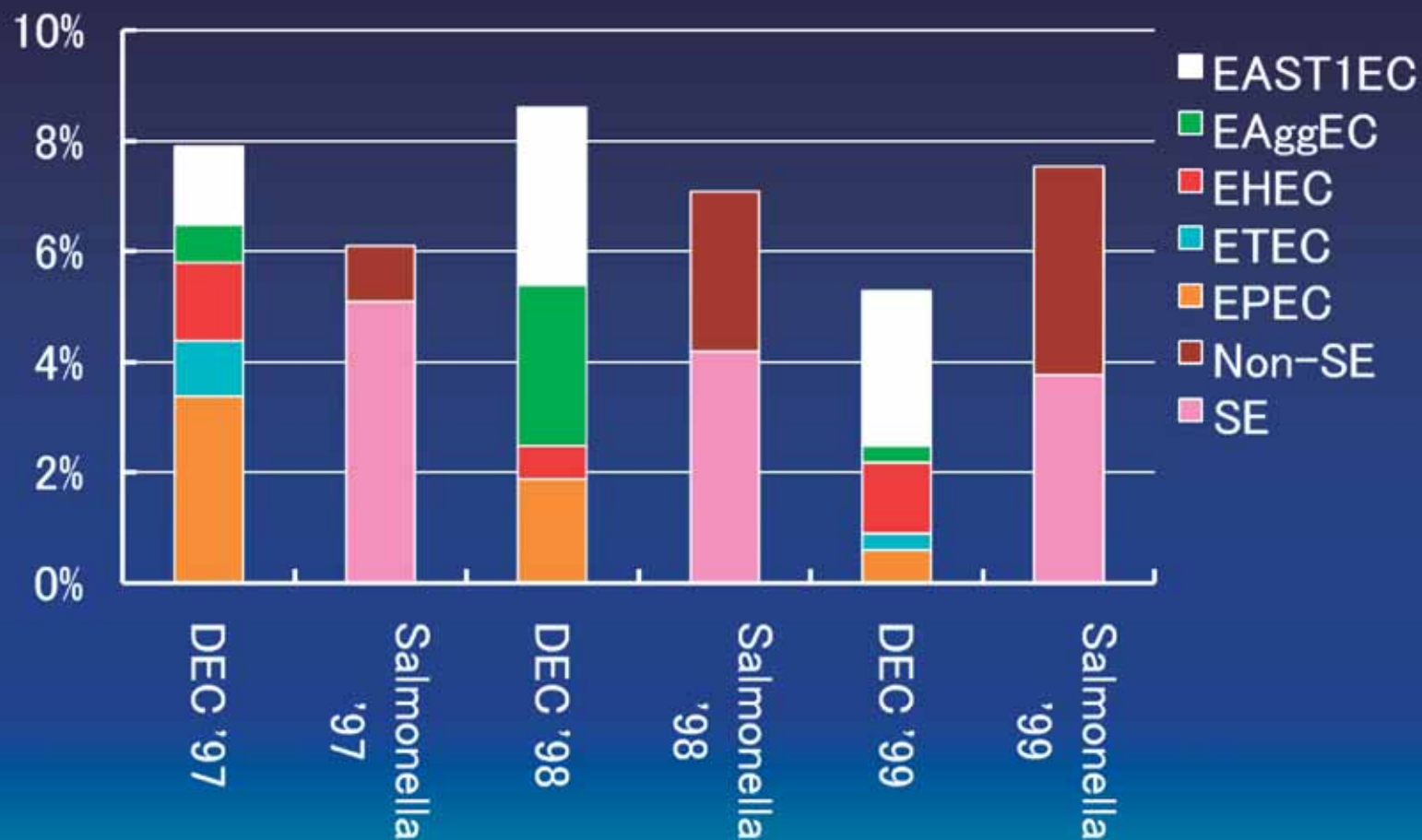
Diarrheagenic *Escherichia coli*

- ・腸管病原性大腸菌(EPEC)
- ・腸管出血性大腸菌(EHEC)
- ・腸管毒素原性大腸菌(ETEC)
- ・腸管凝集接着性大腸菌(EAggEC)
- ・腸管組織侵入性大腸菌(EIEC)
- ・分散接着性大腸菌(DAEC)
- ・腸管凝集接着性大腸菌耐熱性腸管毒素(EAST1)遺伝子保有大腸菌(EAST1EC)



常在する大腸菌からDECを識別するのは不可能！では無視するか？

'97 ~ '99年度に検出した各DECとサルモネラの検出率



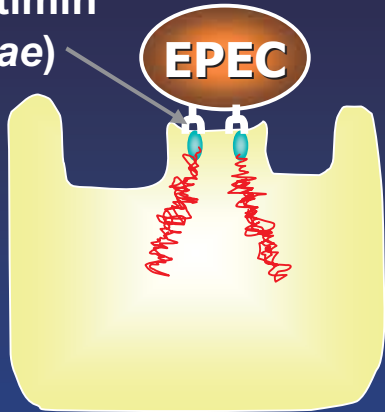
無視できる状態ではない！

もはやETECは旅行者下痢症のみに関連する菌ではない

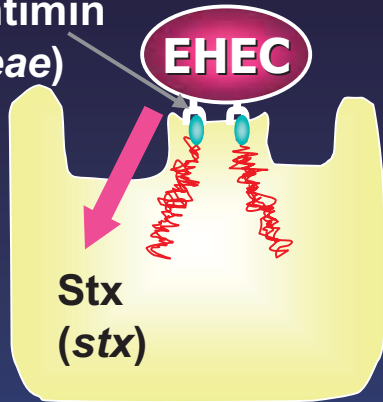
Rose A. Devasia et al. 2006.

DECの病原機構: 遺伝子は違う

病原接着因子
Intimin
(*eae*)

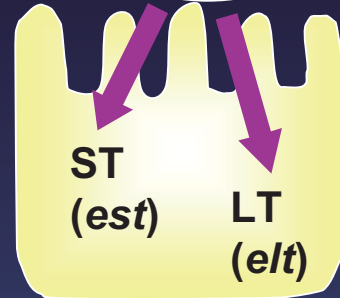


Intimin
(*eae*)



Stx: 志賀毒素
1型(Stx1)
2型(Stx2)

ETEC



ST: 耐熱性腸管毒素
—STp(ブタ型)、STh(ヒト型)
LT: 易熱性腸管毒素

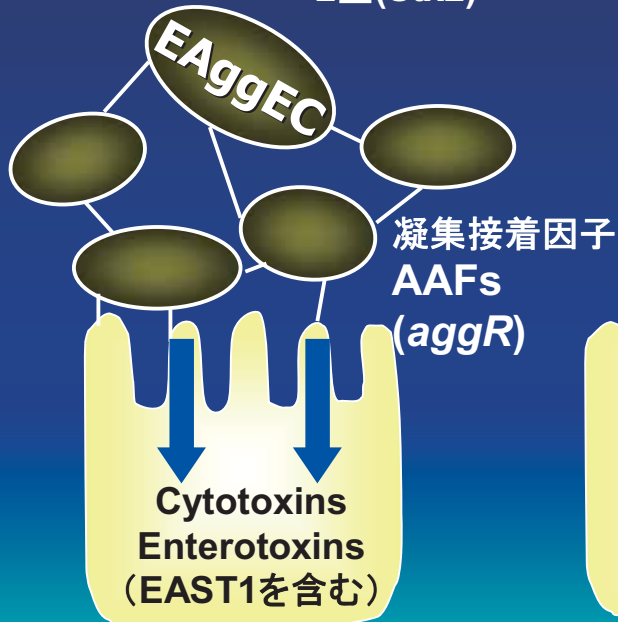
DAEC



EIEC



EAggEC



EAST1EC



検査における問題点

- DECは非病原性大腸菌との鑑別検査が困難
- 通常の細菌検査
腸管出血性大腸菌(EHEC) O157以外の検索はあまり実施されない

→見過ごされやすく、汚染源や汚染経路については不明な点が多い



迅速かつ的確なDEC検出法の開発が求められる

本研究の目的

DECを網羅的かつ迅速に検出するマルチプレックス・リアルタイムPCR法の確立

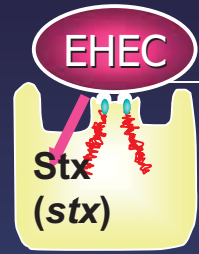
- 従来のPCR法より高感度
- 一度の検査で全DECを捕捉: 以前は標的遺伝子毎に検査
- リアルタイムに多検体を処理可能: 以前はPCR後の電気泳動が必要
- プローブにより塩基配列の確認が同時にできる: 偽陽性の心配が低下
- 標的遺伝子のコピー数に差がある場合にも定量性を確保

第 I 章

マルチプレックス・リアルタイムPCRによる DECの検出



リアルタイムPCRの組み合わせ



1

グループ

EPEC
EHEC

標的遺伝子

eae
[*stx1*
stx2]

蛍光標識

FAM
[VIC
VIC]



2

ETEC

[*est* (STp)
est (STh)
elt]

[FAM
FAM
VIC]



3

EAaggEC
EAST1EC

aggR
astA

FAM
VIC



4

EIEC
DAEC

virB
afaB

FAM
VIC



5

EHEC

stx1
stx2

FAM
VIC

6

ETEC

[*est* (STp)
est (STh)]

[FAM
VIC]

実験方法

菌液 (約 10^9 cfu/ml)
37°C 18時間培養

DNA抽出



ABI PRISM 7000

リアルタイムPCRにて検出

【プライマーとプローブの特異性】

・DECを含む大腸菌	96株
・非大腸菌(未同定)	1株
・志賀赤痢菌	1株
・コレラ菌	2株
計	100株

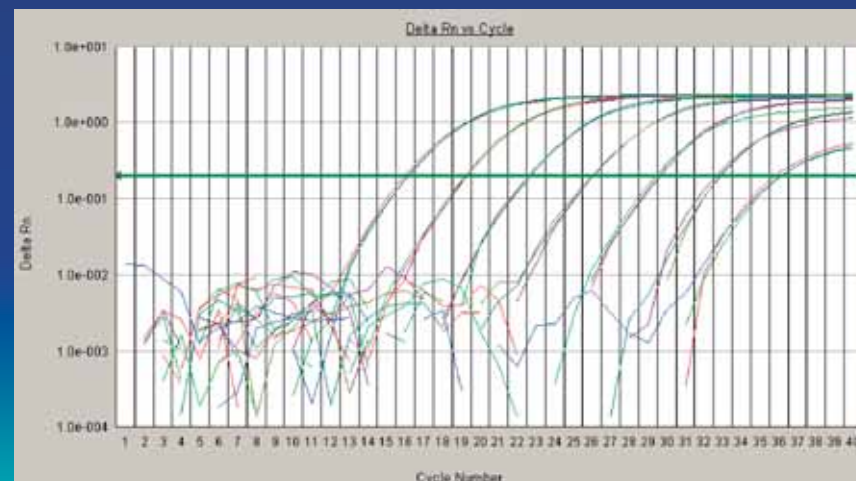
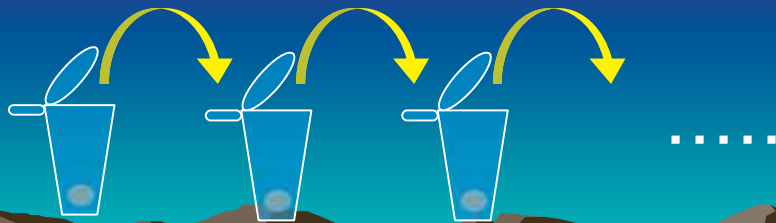
【検量線の作成】

各病原遺伝子陽性株

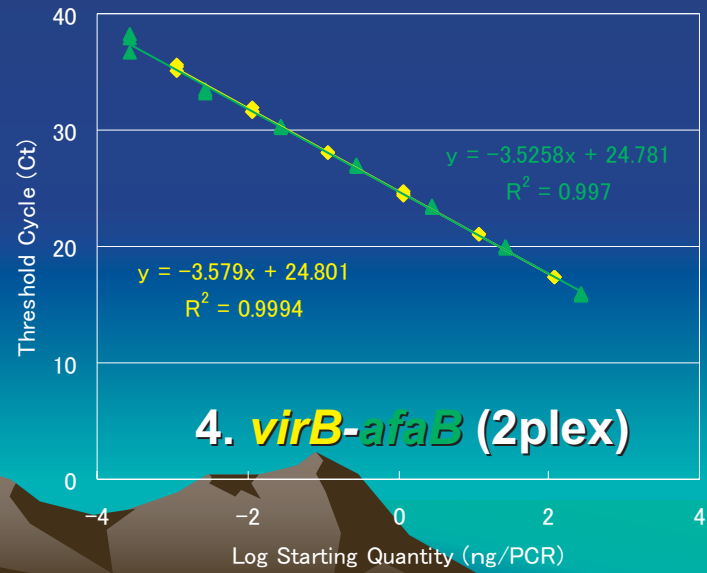
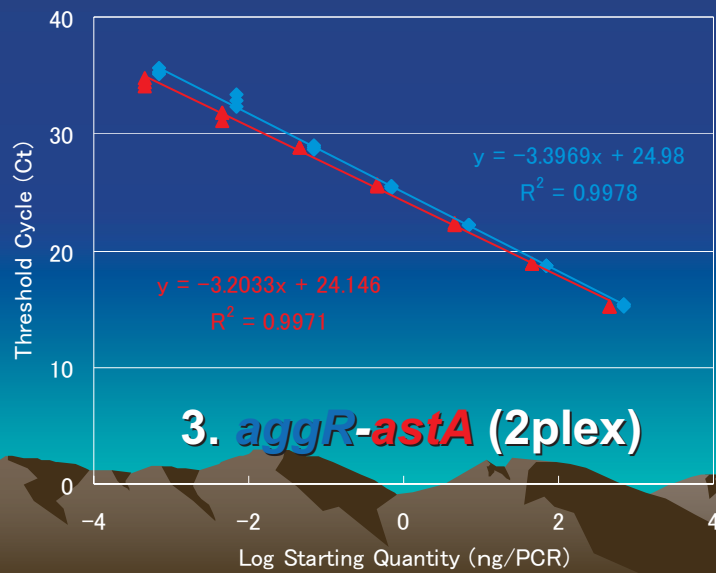
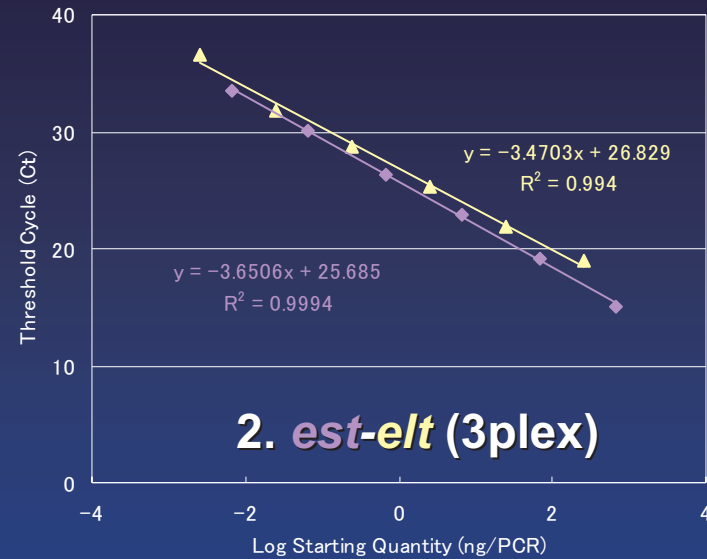
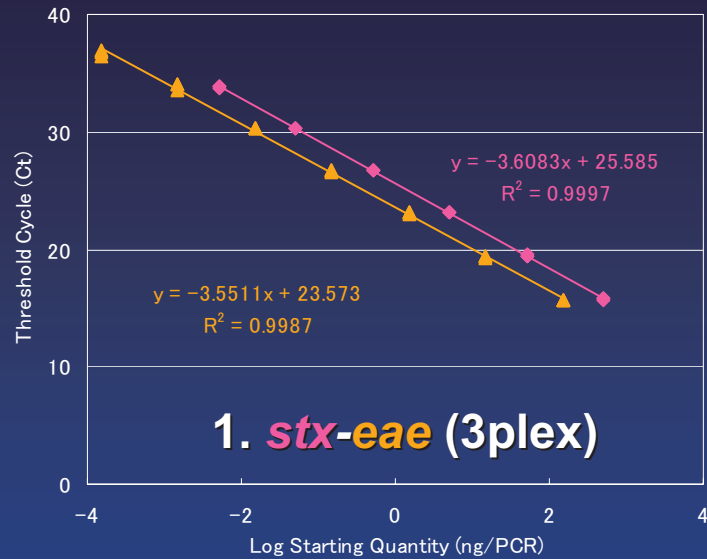
× 10

× 10

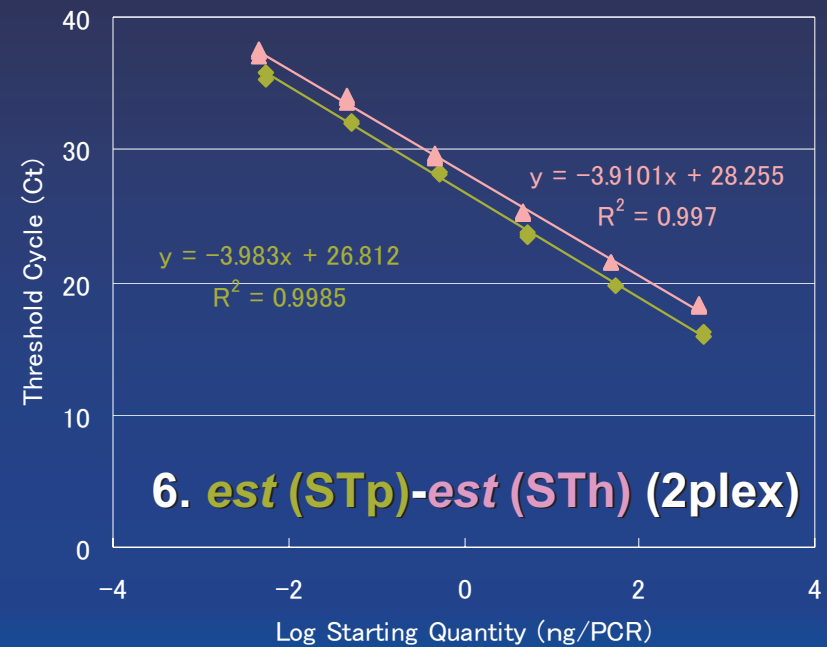
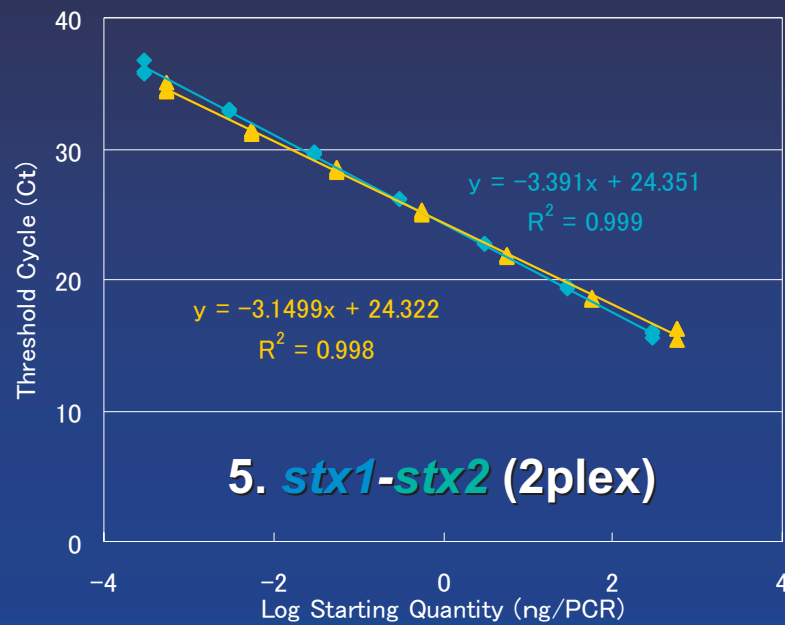
× 10



各陽性株による検量線①



各陽性株による検量線②



競合条件下での定量性能

competitive: eae 2.3ng/PCR存在下

stx eae
1 : 10⁵



stx eae
1 : 1

第 I 章のまとめ

- 従来は、下痢原性大腸菌と非病原性大腸菌との鑑別が非常に煩雑であった。
- 今回開発した手法により、最大10種の病原遺伝子を4本のチューブで迅速かつ網羅的に検出することが可能となった。検出感度は鋭敏で定量性にもすぐれており、6つのサブグループからなる下痢原性大腸菌を一度で検出できる。
- 検査の目的に応じて遺伝子の種類を1種から10種まで選ぶことができるので経済的。

第Ⅱ章

食品中のDEC検出への応用



食品の増菌培養法

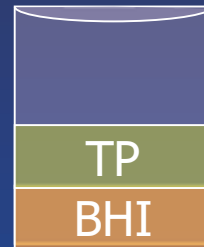
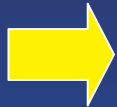
FDA 2段培養法



10g



37°C 3h



44°C 20h



DNA抽出



PCRまたは
リアルタイムPCR

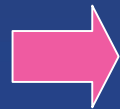
食品中のDEC検出①

—増菌培養液への添加実験—

【食品の増菌培養】

FDA 2段培養法

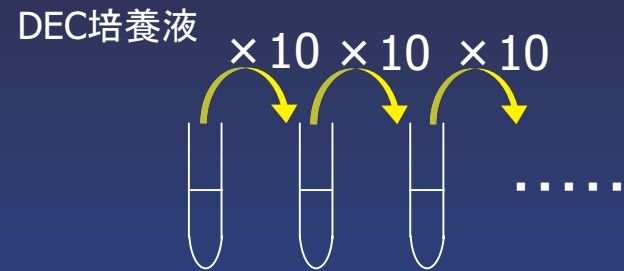
牛ミンチ肉
または
豚ミンチ肉
10g



37°C 3h



44°C 20h

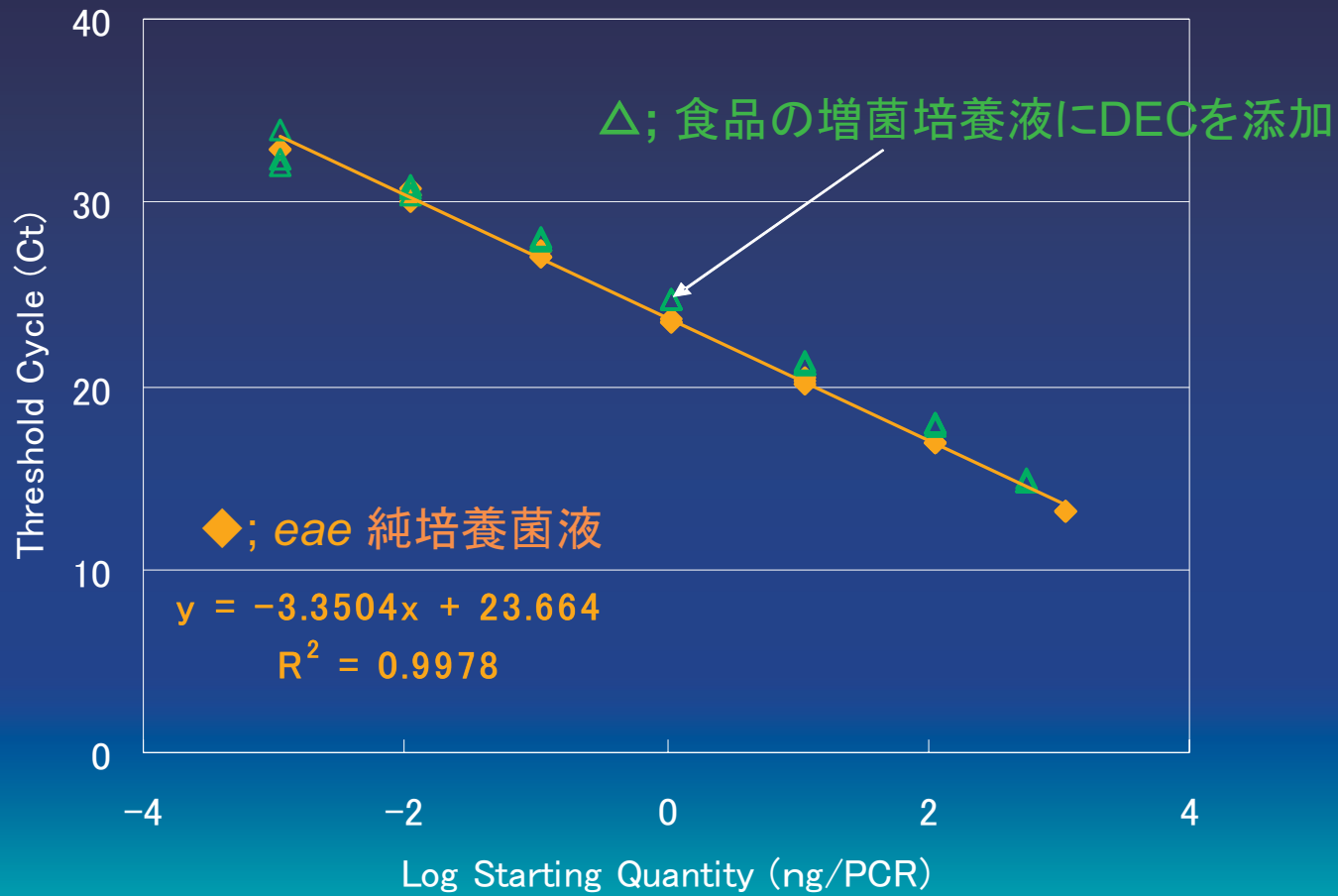


DEC陰性 培養液



PCRまたは
リアルタイムPCR
【検出感度測定】

食品の増菌培養液にDECを添加した際の定量性能



検出限界

(a) PCR (cfu/ml)^a

	<i>stx</i>	<i>eae</i>	<i>est</i>	<i>elt</i>	<i>sggR</i>	<i>astA</i>	<i>invE</i>	<i>afaC</i>
純培養	4.0–8.5 × 10 ⁶	1.2–1.6 × 10 ⁵	4.0–8.5 × 10 ⁵	4.0–8.5 × 10 ⁷	1.2–1.6 × 10 ⁵	9.2 × 10 ⁴ –1.7 × 10 ⁵	4.0–8.5 × 10 ⁵	9.2 × 10 ⁵ –1.7 × 10 ⁶
食品検体の増菌培養液に添加	6.4 × 10 ⁶ –2.9 × 10 ⁷	1.0–1.1 × 10 ⁵	6.4 × 10 ⁶ –2.9 × 10 ⁷	6.4 × 10 ⁶ –2.9 × 10 ⁷	1.0–1.1 × 10 ⁶	5.5 × 10 ⁵ –1.3 × 10 ⁶	6.4 × 10 ⁵ –2.9 × 10 ⁶	5.5 × 10 ⁵ –1.3 × 10 ⁶

(b) リアルタイムPCR (cfu/ml)^a

	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>est</i> (STp)	<i>est</i> (STh)	<i>elt</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>	<i>virB</i>	<i>afaB</i>
純培養	1.6 × 10 ³	1.8 × 10 ³	1.5 × 10 ³	1.1 × 10 ⁴	1.2 × 10 ⁴	9.0 × 10 ³	1.2 × 10 ³	1.3 × 10 ³	8.5 × 10 ³	7.3 × 10 ²
食品検体の増菌培養液に添加	1.2 × 10 ³	1.5 × 10 ³	1.5 × 10 ³	1.1 × 10 ⁴	9.6 × 10 ³	9.0 × 10 ³	1.3 × 10 ³	1.4 × 10 ³	8.5 × 10 ³	7.1 × 10 ²

^a cfu=colony forming unit

検出限界

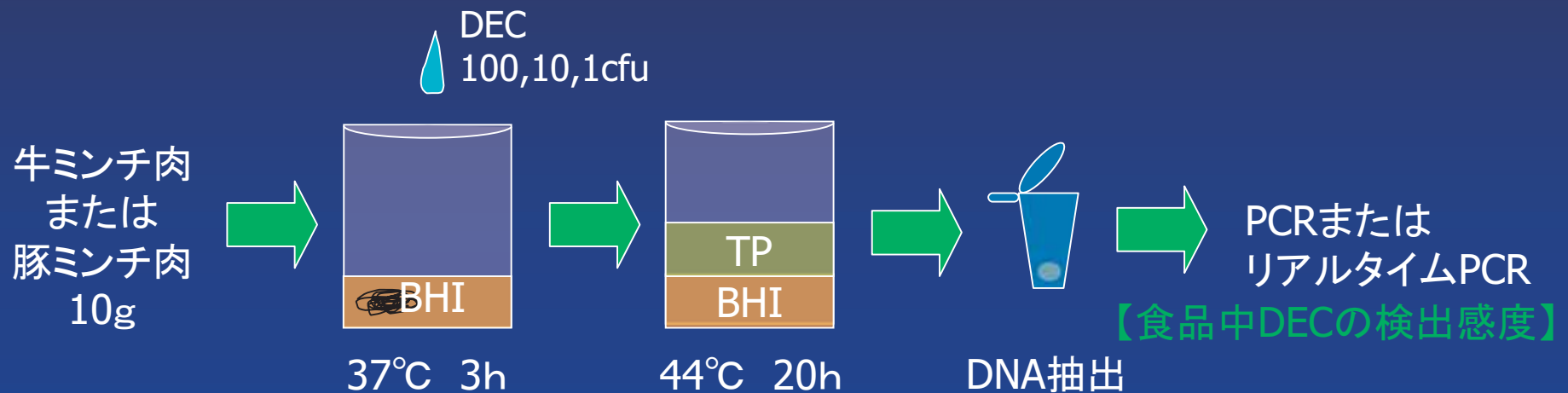
- 通常のPCR: 10⁵–10⁷cfu/ml
 - リアルタイムPCR: 10³–10⁴cfu/ml 10–1000倍の差
- 食品検体の増菌培養液にDECを添加した場合
- 通常のPCR: 1/10–1/70に感度低下(一部の遺伝子を除く)
 - リアルタイムPCRでは検出感度が保たれた

食品中のDEC検出②

—食品への添加実験—

【食品の増菌培養】

FDA 2段培養法



食品中のDEC検出感度

(a) PCR^a

菌液添加量 ^b	<i>stx</i>	<i>eae</i>	<i>est</i>	<i>elt</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>	<i>invE</i>	<i>afaC</i>	計	(%)
100	10/10	5/5	4/5	2/5	5/5	5/5	5/5	5/5	41/45	91
10	9/10	5/5	2/5	2/5	5/5	5/5	5/5	5/5	38/45	84
1	4/10	1/5	1/5	1/5	3/5	4/5	3/5	4/5	21/45	47

(b) リアルタイムPCR^a

菌液添加量 ^b	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>est</i> (STp)	<i>est</i> (STh)	<i>elt</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>	<i>virB</i>	<i>afaB</i>	計	(%)
100	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	50/50	100
10	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	50/50	100
1	2/5	4/5	1/5	3/5	4/5	5/5	4/5	5/5	4/5	4/5	36/50	72

^a 陽性検体数/総検体数

^b cfu/10g

DEC 1cfu/10gの添加検体における陽性率

- 通常のPCR: 47%
- リアルタイムPCR: 72%

食品のスクリーニング

(a) PCR陽性数

	検体数	大腸菌群 陽性数(%)	<i>stx</i>	<i>eae</i>	<i>est</i>	<i>elt</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>	<i>invE</i>	<i>afaC</i>	DEC陽性 検体数 ^a
肉類	56	50(89)	1	10	1			24		2	25
野菜類	46	18(39)			2	3		8			11
魚介類	17	7(41)			1	1		0			2
動物性加工食品	15	4(27)		1				3			3
植物性加工食品	14	1(7)						0			0
総計	148	80(54)	1	11	4	4	0	35	0	2	41

(b) リアルタイムPCR陽性数^a

	検体数	大腸菌群 陽性数(%)	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>est</i> (STp)	<i>est</i> (STh)	<i>elt</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>	<i>virB</i>	<i>afaB</i>	DEC陽性 検体数 ^a	検出遺伝子一致 検体数 ^c (%)
肉類	56	50(89)	2[1]	2[1]	12[10]	1	1	2		27[24]			27	17(63)
野菜類	46	18(39)				1				9[8]			10	6(60)
魚介類	17	7(41)								1			1	
動物性加工食品	15	4(27)			2[1]			1		2[2]			2	1(50)
植物性加工食品	14	1(7)								1			1	
総計	148	80(54)	2	2	14	2	1	3	0	40	0	0	41	24(59)

^a DECの病原遺伝子が陽性となった食品検体数を示す

^b []内の数字はPCRとリアルタイムPCRの結果が一致した数を示す

^c リアルタイムPCRで検出された遺伝子の組み合わせがPCRの結果と一致した検体数を示す

- PCRとリアルタイムPCRで41検体(28%)がDEC陽性
- 両PCRで検出遺伝子の内容が完全一致したのは59%

第Ⅱ章のまとめ

- 食品の増菌培養液にDECを添加してリアルタイムPCRで測定したところ、純培養菌液の場合と同程度に検出でき、通常のPCR法に比べて10～1000倍の高い感度が示された。
- 食品10g中にDECが1cfu含まれる場合においても約72%の検体から検出できた。

→リアルタイムPCRの高い検出感度

- 148検体の食品のスクリーニング試験では、通常のPCR法とリアルタイムPCR法とで41検体がDEC陽性となったが、両PCRの検出遺伝子の内容が完全に一致したのは6割程度に留まった。

→従来行なわれてきたPCR産物の大きさによって
判定するPCR法では偽陽性を生む可能性

食品中のDECの網羅的な定量検出法として有効

結 論

- 開発したリアルタイムPCR法は下痢原性大腸菌の網羅的な定量検出法として有効
- 分離菌株や臨床検体から食品や環境試料まで幅広い検体の検査に対応可能

想定される業界

- 想定される対応企業
試薬メーカーなど
- 想定されるユーザー
全国都道府県の地方衛生研究所、民間検査機関、病院（臨床診断薬には別途審査が必要）、大学など

実用化に向けた課題

- 技術的には特に無いが、商業的には使いやすくキット化しコストダウンする必要がある。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称: 下痢原性大腸菌検出方法
- 出願番号: 特願2007-131077
- 発明者: 西川禎一
- 出願人: 公立大学法人大阪市立大学、株式会社KALS、株式会社三共刃型工業

お問い合わせ先

大阪市立大学新産業創生研究センター コーディネーター 渡辺敏郎

〒558-8585 大阪市住吉区杉本3-3-138 Tel:06-6605-3468・3469, Fax:06-6605-3552

e-mail: watanabt@ado.osaka-cu.ac.jp