

健康保菌者の検便検査を対象とした マルチプレックスプライマーの評価（第二報）

○武田正嗣¹⁾，小西啓太¹⁾，林 麻貴¹⁾，中川 弘¹⁾

1) 株式会社 BML フード・サイエンス

【目的】 前回の第35回日本食品微生物学術総会にて、健康保菌者の検便検査を対象としたマルチプレックスプライマーの評価をし、検便検査に応用しうる可能性が高いことを報告した。そこで今回、前述の学術総会にて報告した検便保存用培地キャリブリア培地（以下、液体キャリブリア培地）を用いて、プライマー配列を見直し改良したタカラバイオ株式会社製のマルチプレックスプライマーが検便検査への応用の可能性を調べる目的で、感度と特異性を評価した。

【方法】 赤痢菌、サルモネラ属菌及び腸管出血性大腸菌が陰性である新鮮便10,000検体を50検体ずつ、液体キャリブリア培地1mlに混濁させ、陰性混合便を200テスト分作製した。また、当社で保存しているサルモネラ属菌が検出された検体（5検体）、腸管出血性大腸菌が検出された検体（5検体）の計10検体を各1検体と陰性の新鮮便49検体を液体キャリブリア培地1mlに混濁させ、これらの陽性混合便も用いて、特異性を評価した。あわせて、PCR法で陽性となったプール検体を用いて、滅菌水にて2倍段階希釈し、感度の評価をした。マルチプレックスプライマーの目的遺伝子は、サルモネラ属菌が*invA*遺伝子、腸管出血性大腸菌がVT毒素由来の遺伝子、赤痢菌は、*ipaH*遺伝子を目的遺伝子とした。判定は、Tm解析にて判定し、陽性と判定さ

れたものは、再度分離平板培地を用いて培養法を実施し、目的菌の有無を確認した。

【結果】 陰性混合便200テスト中、PCR法で陽性となった検体は、赤痢菌で1テスト（0.5%）、サルモネラ属菌で8テスト（4%）、腸管出血性大腸菌で7テスト（3.5%）となり、再度1検体毎に培養した結果は、全て目的菌は検出されず陰性となった。陽性混合便10テストを測定した結果は、全ての目的菌を検出できた。感度については、PCR法で陽性となったが培養法で陰性となった陰性混合便は、サルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌で原倍から検出されたのに対し、培養法で陽性となった陽性混合便は、原倍、2倍、4倍まで検出することができた。

【考察】 今回の改良されたプライマーを用いて、PCR法で測定した場合の擬陽性率は、8%であった。前回の報告が、6%であり今回のプライマーを用いた測定した場合の擬陽性率は、5～10%前後と推測される。また、PCR法で陽性となったプール検体を2倍段階希釈し、測定した結果から培養法で陰性よりも陽性となった検体が含まれたプール検体の方が高い検出となったことから、培養法と同等以上の検出感度を有していた。

以上のことから、今回改良したプライマーは、高感度を有し、特異性も高く、液体キャリブリア培地を利用できることから、検便検査に応用しうる遺伝子検査系の1つであると考えられる。