

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

○武田正嗣¹⁾，江田孝志¹⁾，中川 弘¹⁾

1) 株式会社 BML フード・サイエンス

【目的】健康保菌者の検便検査は、一般に直接分離培養法により実施されているが、その検出感度と信頼性は、便の塗抹状態や検査員の熟練度などにより大きく異なる。一方、特定の遺伝子を検出するPCR法は、高感度で特異性が高く、短時間に結果が得られることに加え、特に熟練度を必要としないことから、微生物検査や毒素産生遺伝子の検査などに広く活用されるようになった。

そこで今回、タカラバイオ株式会社が作成したマルチプレックスプライマーの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5,000検体を50検体ずつ、滅菌精製水3mlに混濁させた。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、腸管出血性大腸菌（O157、O26）が検出された検体を各1検体と陰性の新鮮便49検体を滅菌精製水3mlに混濁させ、これらの便溶液も用いて、特異性を評価した。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*遺伝子を、腸管出血性大腸菌がVT産生遺伝子を、赤痢菌は、*ipaH*遺伝子を目的遺伝子とした。判定には、Tm解析にて判定し、陽性と判定されたものは、再度培養法を実施し、目的菌の有無を確認した。

検出感度の評価として、当社で保存している赤痢菌2種、サルモネラ属菌5種及び腸管出血性大腸菌3種をトリソイブイオンで増菌後、10倍段階希釈し、陽性と判定された最大希釈倍率から検出感度を算出した。

【結果】培養法陰性の検体100テスト中、PCR法で陽性となった検体は、赤痢菌で2テスト（2%）、サルモネラ属菌で3テスト（3%）、腸管出血性大腸菌で1テスト（1%）となり、再度培養した結果は、全て陰性となった。陰性49検体と陽性1検体を混合し、測定した結果は、全ての目的菌を検出できた。最少検出菌量は、赤痢菌で 10^1 /テスト、サルモネラ属菌（チフス、パラチフスAを含む）で 10^1 /テスト、腸管出血性大腸菌で 10^2 /テストであった。

【考察】今回のプライマーを用いて、PCR法で測定した場合の擬陽性率は、6%であった。これらが培養法にて、全て陰性となったことから、培養法の目的菌の検出限界値以下あるいは類似菌の存在が考えられる。また、腸管出血性大腸菌の測定結果にて、便溶液を2倍以上希釈すると陽性となった検体もあったことから、糞便中に含まれる物質のPCR阻害が示唆された。

以上のことから、今回使用したプライマーは、高感度を有し、特異性も高いことから、検便検査に応用しうる可能性が高いことが示唆された。