

# 損傷を受けた病原性 *Yersinia enterocolitica* の免疫磁気ビーズ法による分離

東京農工大学農学部  
林谷 秀樹

## I. 緒言

*Yersinia enterocolitica* は人に発熱、下痢および腹痛を主徴とした胃腸炎や、腸間膜リンパ節炎、関節炎、結節性紅斑、敗血症などを起こすグラム陰性の小桿菌で、我が国では 1982 年に食中毒菌に指定されている。本菌は O 抗原群の組み合わせにより血清型別されるが、このうち、人や動物からの分離頻度が高い血清型 O:3, O:5, 27, O:8 および O:9 は、代表的な病原株として知られている[21,28]。病原性 *Y. enterocolitica* のうち、血清型 O:3, O:5, 27 および O:9 は世界的に広く分布している[2,36]が、血清型 O:8 (以下、O:8 菌) は近年まで北アメリカにのみ分布することが報告されていたが[3,23]、1989 年、Iinuma らは新潟県で捕獲した野ネズミから O:8 菌を我が国で初めて分離し[17]、本菌が我が国にも分布していることが明らかになった。その後、青森県を中心とする東北地方では O:8 菌による人の感染例が散発し[16,31]、疫学調査[14]の結果、これらの地域では野ネズミが本菌の主要なレゼルボアとなっており、本菌に感染した野ネズミの糞便等による土壌・水界汚染と、それらとの沢水や山菜などの食品の、直接的・間接的接触を通じて汚染され、これらを介して人への感染が起こっていることが明らかにされている。

現在までに、病原性 *Y. enterocolitica* を増菌するための液体培地はいくつか開発[7,18,26,35,37,41,42]されているが、いずれも検出感度があまり高くなく、現在までのところ病原性 *Y. enterocolitica* のための適切な選択増菌培地はないのが現状である。この理由として、通常食品や環境中には病原性 *Y. enterocolitica* の他に、一般的に“環境 *Yersinia*”と呼ばれる非病原性の *Yersinia* が存在し、これら“環境 *Yersinia*”と病原性 *Y. enterocolitica* を選択できる適切な抗菌物質がなく、しかも、これら非病原性 *Yersinia* は病原性 *Y. enterocolitica* に比べ選択増菌培地中での増殖速度が速いために[11]、病原性 *Y. enterocolitica* だけを選択的に分離しづらいことがあげられる。人や動物の糞便からの病原性 *Y. enterocolitica* の分離には、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に糞便を懸濁し 4℃ で培養する低温増菌法が一般的に用いられている[42]。本法は、低温条件下では中温菌である腸内細菌は発育できないが、低温細菌である *Y. enterocolitica* は糞便などの栄養を利用して発育できることを利用した方法で、増菌に 3~4 週間を要するが、簡便な増菌方法として一般的に用いられている。しかし、“環境 *Yersinia*”を含む低温細菌が多数存在する環境材料から、病原性 *Y. enterocolitica* を選択的に分離するためには、低温増菌法では病原性 *Y. enterocolitica* だけでなく、“環境 *Yersinia*”や他の低温菌も増菌してくるため、本法は不適である。このように競合菌の多数存在する河川水などの環境材料から病原性 *Y. enterocolitica* を選択的に分離する方法としては、*Yersinia*

が他のグラム陰性桿菌よりもアルカリに強く抵抗する性状を利用したアルカリ処理法が開発されている[1]。Fukushima ら[8,10]は、水や食肉からの病原性 *Yersinia* の分離に、これらの検体を直接アルカリ処理する方法を考案し、検出感度の高いことを報告している。

環境中では、細菌がなんらかの損傷を受けたため、生きてはいるが人工培地では発育できない (Viable but Non-Culturable, VNC) 状態になることが、いくつかの菌種において報告されている。VNC 状態は一般的にグラム陰性菌にみられる現象で、Rollins ら[6]は、人工培地上でコロニー形成能を失った *Salmonella* Enteritidis の菌株でも、発育可能な菌株と同様の代謝活性を持っていることを証明し、これらの菌を VNC と名付けた。さらに *Vibrio Cholerae* でも同様に低栄養、低温ならびに高塩濃度で VNC 状態に誘導しうることを報告した[6]。現在までのところ *S. Enteritidis* や *V. Cholerae* のほかにも、*Escherichia coli*[33]、*Campylobacter jejuni*[31]、*Aeromonas salmonicida*[30]など 30 菌種ほどで、菌が VNC 状態になることが報告されている。環境中で細菌が VNC 状態で存在している場合、通常分離培養法ではこれらの菌を検出することは困難なので、これらの菌を分離するためには培地を改善したり、新たな分離培養法を開発する必要がある。現在、上述したように、水や食肉からの病原性 *Y. enterocolitica* の分離には、直接アルカリ処理が応用されている。しかし、グラム陰性菌である *Yersinia* は河川水などの環境中では VNC 状態になっているものがあることが想定されるため、このような状態の菌はアルカリにより損傷したり死滅したりしてしまう可能性が高く、アルカリ処理法は VNC 状態の菌の分離に適しているとは考えにくい。

近年、標的微生物を認識する抗体を表面に結合した磁気ビーズを検体と混和し、抗原抗体反応によりビーズに結合した目的の微生物を、磁石により選択的に分離、濃縮し、検出する免疫磁気分離法 (IMS 法) が開発され、食品や環境材料などからの病原細菌の分離に有用であることが報告されている[5,15,22,27,29,39]。

本研究では、VNC 状態になった病原性 *Y. enterocolitica* を分離することを目的に、VNC 状態の病原性 *Y. enterocolitica* を接種した河川水から、IMS 法と従来から用いられているアルカリ処理法とを用いて接種菌の回収を行い、両法による回収率の比較を行なった。また、合わせて分離培地についても検討を行なった。

## II. 材料と方法

### 1) 供試菌株

供試菌株として *Y. enterocolitica* 血清型 O:8 (以下、O:8 菌) の YE92012、YE91009、YE9200 および WA[4]の 4 菌株を用いた。全ての供試菌株は trypticase soy broth (BBL) (以下、TSB) を用いた自己凝集性試験[25]ならびにカルシウム依存性試験[12]により、病原性の有無を確認した。

### 2) 抗 O:8 菌抗体結合免疫磁気ビーズの作成と反応条件の検討

### (1) 抗 O:8 菌免疫血清の作成

供試菌株を trypticase soy agar (BBL) (以下、TSA) に接種し 25℃で 24 時間培養後、発育したコロニーを TSB 500ml に接種し、25℃で 24 時間振盪培養した。105℃で 1 時間、オートクレーブで加熱滅菌後、2,000×g で 30 分間遠心分離した。菌体は 0.85%生理食塩水 (以下、生食) に懸濁後、2,000×g で 30 分間遠心分離し、洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、菌体を生食に 2mg/ml の濃度となるように浮遊させ、加熱死菌抗原液とした。

上述した加熱死菌抗原液 1ml をフロイント完全アジュバント (和光純薬) 1.2ml とよく混和した後、体重 1.5kg のニュージーランドホワイト種のウサギ 2 羽の背部 20 ヶ所程度に少量ずつ計 1.1ml となるように皮下接種した。初回接種から 3 週間後に、加熱死菌抗原液 1ml とフロイント不完全アジュバント (和光純薬) 1.2ml とを混合したものを、追加免疫としてそれぞれのウサギの背部に 1.1ml ずつ皮下接種した。追加免疫後、ウサギから血液を採取し、試験管内凝集反応 (Widal 反応) にて供試菌に対する抗体価の測定を行い、抗体価が 1280 倍以上に達した時点で、ウサギの心臓から全採血を行った。採取した免疫血清は 0.45 μm のメンブランフィルター (ADVANTEC) でろ過滅菌後、使用するまで -20℃で凍結保存した。

作成した抗 O:8 菌家兎免疫血清は、Protein G を結合させたアフィニティークロマトグラフィー (Protein G Sepharose-4 Fast Flow; Pharmacia Biotech) で、O:8 菌に対する IgG 抗体のみを含む血清に精製した。

### (2) 抗 O:8 菌家兎免疫血清と磁気ビーズとの結合

IMS 法には、抗 O:8 菌家兎免疫血清をアフィニティー精製し、IgG 抗体のみを含む血清 (以下、精製血清) と、抗ウサギ IgG 羊血清を結合させた市販の免疫磁気ビーズ Dynabeads- M-280 Sheep anti-Rabbit IgG (Dyna) (以下、磁気ビーズ) を用い、製品の使用説明書に従って以下のように両者の結合を行なった。

まず、1.5ml のマイクロチューブ (ASSIST) に 25 μl の磁気ビーズを入れ、0.1% ウシアルブミン加 PBS バッファー (以下、PBS バッファー) で洗浄した後、精製血清を加え、Sample Mixer (MX-3, Dynal) で穏やかに混和しながら、4℃で 24 時間反応させ、磁気ビーズと精製血清中の IgG 抗体とを結合させた。その後、磁性粒子収集装置 (MPC-M, Dynal) で IgG 抗体と結合した磁気ビーズ (以下、免疫磁気ビーズ) を集め、上清を捨てた後、PBS バッファーで 4 回洗浄した。

なお、精製血清と磁気ビーズの結合を行なうに際して、両者の最適な結合比ならびに反応時間を調べるために、精製血清の量をいろいろと変えて両者の最適比を求めるとともに、免疫磁気ビーズと O:8 菌の最適な反応時間についても検討した。

### (3) 生理食塩水に実験的に接種した O:8 菌の免疫磁気ビーズを用いた IMS 法による回収

O:8 菌を TSA に接種し、25℃で 24 時間培養した後、滅菌した生食で 10 倍段階

希釈し、 $10^1 \sim 10^3$ CFU/ml の菌量となるように菌液を調整した。各菌量を含む菌液の 1ml ずつを、 $25 \mu\text{l}$  の免疫磁気ビーズの入ったマイクロチューブに加え、 $4^\circ\text{C}$  で 60 分間 Sample Mixer で穏やかに混和させた後、PBS バッファーで 2 回洗浄した。最終的に免疫磁気ビーズは 1ml の PBS バッファーに再懸濁したものを、TSA に  $0.1\text{ml}$  ずつ塗抹し、 $25^\circ\text{C}$  で 48 時間培養後、発育してきたコロニーの数をカウントした。なお、分離菌の同定は、抗 O:8 菌家兎免疫血清を用いたスライド凝集反応によって行なった。

### 3) 河川水に実験的に接種した O:8 菌の IMS 法とアルカリ処理法による回収率ならびに選択分離培地の比較検討

#### (1)河川水に実験的に接種した O:8 菌新鮮培養菌の IMS 法とアルカリ処理法による回収

供試した河川水は黒目川（東京都東久留米市）、柳川（東京都清瀬市）、仙川（東京都三鷹市）、多摩川（東京都府中市）および野川（東京都国分寺市）の 5 箇所より採取したものをを用いた。採取した河川水の 10L を  $0.45 \mu\text{m}$  のメンブランフィルター（ADVANTEC）でろ過し、そのメンブランフィルターを 10ml の滅菌生食に入れて付着物をよく振り落とした後、 $5,000 \times g$  で 30 分間遠心分離を行なった。上清を捨て、沈査を 9ml の生食に浮遊させた。これを IMS 法ならびにアルカリ処理法を行なう際の濃縮河川水とした。濃縮河川水は、後述する菌液を加えて最終的に元の河川水の  $1/1,000$  濃度となるように調整した。なお、採取した河川水中の総生菌数は TSA を用いた塗抹法により、大腸菌群数は乳糖ブイヨン（KYOKUTO）を用いた発酵管法で MPN 法によって測定[24]した。

O:8 菌を TSA に接種し、 $25^\circ\text{C}$  で 24 時間培養した後、滅菌した生食で 10 倍段階希釈し、 $10^1 \sim 10^4$ CFU/ml の菌量となるように菌液を調整した。各菌量の菌液をその 9 倍量の濃縮河川水に加えて、 $10^0 \sim 10^3$ CFU/ml の菌量となるように菌液を調整し、これを供試検体とした。そして、以下のように IMS 法とアルカリ処理法を用いて、接種した O:8 菌を回収し、その回収率を比較した。

IMS 法では、それぞれの供試検体  $0.5\text{ml}$  に等量の生食を加え、 $25 \mu\text{l}$  の免疫磁気ビーズの入ったマイクロチューブ 4 本に  $1\text{ml}$  ずつ入れた。 $4^\circ\text{C}$  で 60 分間 Sample Mixer で穏やかに混和させた後、PBS バッファーで 2 回洗浄した。最終的に免疫磁気ビーズは  $0.1\text{ml}$  の PBS バッファーに懸濁したものを、cefsulodin-irgasan-novobiocin (OXOID) 寒天平板培地（以下、CIN）と virulent *Yersinia enterocolitica* 寒天平板培地（以下、VYE）〔 〕に  $0.1\text{ml}$  ずつ塗抹し、 $25^\circ\text{C}$  で 48 時間培養後、発育してきた典型的なコロニーの数をカウントした。なお、CIN と VYE には、抗生物質として YERSINIA Selective Supplement (OXOID) を添加した。

アルカリ処理法では、Fukushima[10]の方法に従って、それぞれの供試検体  $0.5\text{ml}$  に等量の  $0.72\%$  KOH 加生食を加え、直ちにボルテックスで 30 秒混和した後、CIN および VYE に  $0.1\text{ml}$  ずつ塗抹し、 $25^\circ\text{C}$  で 48 時間培養後、発育してきた典型的なコロニーの数をカウントした。

なお、分離菌の同定は、抗 O:8 菌家兎免疫血清を用いたスライド凝集反応によ

って行なった。

## (2) 実験的に作出した **Viable but Non-Culturable (VNC)** 状態の **O:8** 菌を河川水に接種した時の **IMS** 法とアルカリ処理法による回収

### ①凍結融解による **VNC** 状態の **O:8** 菌の作出

O:8 菌の YE92012、YE91009、YE92009 および WA の 4 菌株を TSA に接種し、25℃で 24 時間培養した後、Milli-Q Plus Filter (Nihon Millipore Ltd.) で精製した滅菌水 (以下、精製水) で 10 倍段階希釈し、 $10^0 \sim 10^4$ CFU/ml の菌量となるように菌液を調整した。各菌量の菌液を 1ml ずつ 2 本のマイクロチューブに入れ、1 本は直ちに TSA、CIN に 0.1ml ずつ塗抹し、残りの 1 本は -20℃で 24 時間凍結保存した後、4℃で融解し、TSA、CIN に 0.1ml ずつ塗抹し、いずれも 25℃で 48 時間培養後、発育してきたコロニーの数をカウントした。

凍結融解により **VNC** 状態となった O:8 菌の割合は、 $\{(TSA \text{ 上に発育したコロニーの数} - CIN \text{ 上に発育したコロニーの数}) / TSA \text{ 上に発育したコロニーの数}\} \times 100 (\%)$  で表し、各菌株間で比較した。

### ②**VNC** 状態の **O:8** 菌の各選択培地別にみた回収率の比較

供試菌株として O:8 菌の YE92012 株を用いて、3)-(2)-①と同様に、凍結前と後に O:8 菌を TSA および選択培地に塗抹し、培養後に発育してきたコロニーの数をカウントした。選択培地としては CIN、VYE、CIN に抗生物質を入れない CIN を重層した培地 (以下、重層 CIN) および VYE に抗生物質を入れない VYE を重層した培地 (以下、重層 VYE) を用いた。

凍結融解により **VNC** 状態となった O:8 菌の回収率は、 $(\text{選択培地上に発育したコロニー数} / TSA \text{ 平板上に発育したコロニー数}) \times 100 (\%)$  で表し、TSA に発育してきた菌数と比較することで選択分離培地ごとに算出した。

### ③河川水に実験的に接種した **VNC** 状態の **O:8** 菌の **IMS** 法とアルカリ処理法による回収

供試した河川水は野川 (東京都国分寺市) から採取したものをを用いた。採取した河川水 21L を、2)-(3)-①と同様に処理して濃縮河川水とした。菌液は O:8 菌を TSA で 25℃で 24 時間培養したものを、精製水で 10 倍段階希釈し、 $10^0 \sim 10^5$ CFU/ml の菌量となるように菌液を調整した。各菌量の菌液を -20℃で 24 時間凍結保存したものを、4℃で融解した後、9 倍量の濃縮河川水に加えて 10 倍希釈し供試検体とした。そして、2)-(3)-①と同様に、IMS 法とアルカリ処理法を用いて O:8 菌の回収を行なった。なお、選択分離培地としては CIN、VYE および重層 VYE を用いた。

### Ⅲ.結果

#### 1) 生理食塩水に実験的に接種した O:8 菌の IMS 法による回収

表 1 は、精製した抗 O:8 菌家兎免疫血清を用いて免疫磁気ビーズを作成し、生食に実験的に接種した O:8 菌を IMS 法によって回収した結果である。回収菌量と接種菌量との間には相関がみられた。回収率は、接種菌量が  $10^3$  (CFU/ml) のとき 21.7%、 $10^2$  のとき 20.3%、 $10^1$  のとき 19.1%であった。

#### 2) 河川水に実験的に接種した O:8 菌の IMS 法とアルカリ処理法による回収率の比較

表 2 は、実験的に河川水に O:8 菌を接種し、選択分離培地として CIN と VYE を用いて、IMS 法とアルカリ処理法による接種菌の回収率を比較したものである。接種菌量が  $10^3$  (CFU/ml) の場合には、IMS 法、アルカリ処理法ともに、いずれの選択分離培地においてもすべての検体から接種菌を回収できた。しかし、接種菌量が  $10^2$  の場合には、IMS 法ではいずれの培地ともにすべての検体から接種菌が回収できたが、アルカリ処理法では、CIN では全ての検体から接種菌が回収できたものの、VYE では 5 検体中 3 検体からしか回収できなかった。接種菌量が  $10^1$  の場合には、IMS 法では、CIN で 5 検体中 3 検体、VYE で 5 検体中 1 検体から接種菌が回収されたが、アルカリ処理法では、両培地ともに 5 検体中 1 検体から回収できただけであった。

#### 3) 実験的に作出した VNC 状態の O:8 菌の回収

表 3 は、O:8 菌を精製水に実験的に接種し凍結融解することにより、VNC 状態となった O:8 菌の割合を菌株ごとに比較した結果である。供試した 4 菌株すべてにおいて、凍結融解後、選択分離培地である CIN に発育したコロニー数は、非選択培地である TSA に発育したコロニー数に比べて著しく少なく、凍結融解によって O:8 菌の約 90% が VNC 状態となることが明らかとなった。なお、供試した 4 菌株中、我が国由来の YE92012、YE91009 および YE92009 の 3 株では、YE92012 株は凍結融解により VNC 状態となったものの割合が 94.7% で最も高かったので、以後の実験は YE92012 株を用いて行なった。

表 4 は、凍結融解により VNC 状態となった YE92012 株の回収率を、選択分離培地ごとに比較した成績を示したものである。凍結融解後に、選択分離培地に発育してきたコロニー数を TSA 上に発育してきたコロニー数と比較して、各培地ごとに TSA に対する回収率 (%) を求めると、CIN、VYE、重層 CIN および重層 VYE では  $5.6 \pm 5.0$ 、 $8.4 \pm 8.2$ 、 $8.9 \pm 6.1$ 、 $16.5 \pm 13.8$  で、重層 VYE は供試 4 選択分離培地中で最も回収率が高かった。

表 5 は、河川水に実験的に接種した VNC 状態の O:8 菌の IMS 法とアルカリ処理法による回収率を比較したものである。IMS 法では、接種菌量が  $10^3$  の場合にはいずれの選択分離培地においても 4 検体すべてから接種菌が回収でき、 $10^1$  の場合でもすべての培地で 4 検体中 2 検体からは接種菌が回収できた。また、 $10^0$  の

場合でも VYE 重層では4検体中1検体で回収が可能であった。一方、アルカリ処理法では、接種菌量が  $10^5$  の場合は、いずれの選択分離培地においても4検体すべてから接種菌が回収されたものの、 $10^3$  の場合にはいずれの培地においても4検体中2検体から接種菌が回収されたに過ぎず、 $10^1$  の場合にはいずれの培地においても接種菌は回収されなかった。以上のように、河川水に VNC 状態の O:8 菌を接種した場合には、IMS 法はアルカリ処理法に比べ明らかに回収率が高かった。

#### IV. 考察

今回、病原性 *Y. enterocolitica* のうち、近年我が国で水系感染によると思われる患者が散発している O:8 菌を選び、実験に供試した。O:8 菌を実験的に河川水に接種し、IMS 法とアルカリ処理法で検出感度を比較した結果、接種菌に新鮮培養菌を用いた場合にはやや IMS 法のほうがアルカリ処理法より優れている程度であったが、VNC 状態の O:8 菌を用いた場合には IMS 法はアルカリ処理法に比べて明らかに高い回収率を示した(表 2,5)。すなわち、検出限界をみると、新鮮培養菌の場合は IMS 法とアルカリ処理法のいずれの場合とも  $10^1 \sim 10^2$  CFU/ml の接種菌量まで回収されたが、VNC 状態の菌の場合は IMS 法では  $10^1 \sim 10^2$  CFU/ml の接種菌量まで回収されたのに対し、アルカリ処理法の場合には  $10^3 \sim 10^4$  CFU/ml の接種菌量までしか回収されなかった。このことは凍結融解により 90%以上の菌が VNC 状態になったことと考え合わせると(表 3)、アルカリ処理により VNC 状態の菌は損傷または死滅してしまい、選択分離培地上に発育できなくなっているものと推測される。今までのところ、*Yersinia* 属菌が環境中で VNC 状態になることを明らかにした報告は見当たらないが、グラム陰性菌の多くの菌種で VNC の存在が確認されており、また今回、O:8 菌を凍結融解することで VNC 状態の菌を作出することができたことから、環境中にも VNC 状態の病原性 *Y. enterocolitica* が存在する可能性は高いと思われる。凍結融解により菌が VNC になるメカニズムは現時点では不明であるが、いずれにしろ、冷凍食肉や河川水などで VNC 状態となっている病原性 *Y. enterocolitica* を分離する際には、アルカリ処理法よりも IMS 法の方が検出感度が高く、有用であると思われる。

現在、*Yersinia* 属菌の選択分離培地として、CIN が市販乾燥品(*Yersinia* Selective Agar(CIN):BBL,Difco,Oxoid,Merck)もあることから最もよく使用されている。本培地上で、*Yersinia* 属菌はマンニット分解能により、スムーズで辺縁が半透明の深紅色の集落を形成し、他菌種との鑑別は容易である。しかし、本培地では病原性 *Y. enterocolitica* も非病原性の“環境 *Yersinia*”も形態、色調とも同じコロニーを形成するので、コロニー性状から両者を識別することは困難である。一方、Fukushima の開発した VYE は、*Y. enterocolitica* の病原性株がエスクリン非分解性であることを利用した病原性株の鑑別分離培地である。本培地上で、エスクリン非分解性の病原性 *Y. enterocolitica* は赤色のコロニーを形成し、エスクリン分解性の“環境 *Yersinia*”は、黒色のコロニーを形成するため両者の区別が容易であり、

非病原性の“環境 *Yersinia*”で高度に汚染された環境検体などからの病原性 *Y. enterocolitica* の分離には有用とされている[9]。病原性 *Y. enterocolitica* の代表的な血清型である O:3、O:5,27、O:8 および O:9 はいずれの血清型とも、これらの病原性血清型菌と共通の O 抗原を有する非病原性の *Y. enterocolitica* や他の *Yersinia* 属菌が存在する。*Yersinia* 属菌の中で O 抗原因子として O:8 の因子を持つものとしては、O:8 抗原因子を単独で持つ病原性の O:8 菌のほかに、非病原性の *Y. enterocolitica* 血清型 O:7,8、O:8,19 および *Y. bercovieri* O:8 の計 4 種が存在する[40]。今回作成した抗血清を用いた IMS 法では、O:8 菌のほかに O:8 の抗原因子を持つこれらの菌株も一緒に分離されてくるが、これらの菌株と病原性の O:8 菌とでは、CIN ではコロニー性状から両者を識別できないが、VYE では両者はコロニーの色調の違いから分離することが可能である。今回、河川水に VNC 状態の O:8 菌を接種した時、選択分離培地として CIN と VYE を用いて接種菌の回収率を比較すると、IMS 法ならびにアルカリ処理法いずれにおいても両培地間では回収率に差はみられなかったことから(表 5)、IMS 法で病原性 *Y. enterocolitica* を分離する際は、VYE は選択分離培地として CIN よりも適していると思われる。また、環境中などから、損傷などにより VNC 状態になった細菌を分離する際、これらの菌は抗菌物質等を含む選択平板培地上では本来であれば感受性のほとんどない抗菌物質などの影響を受け発育してこないことが多い。そのため、VNC 状態の菌の分離には、抗菌物質を含まない液体培地で一定時間これらの菌を培養させ、損傷した菌を回復させた後に選択平板培地で分離する方法[13]や抗菌物質の入った選択平板培地の上に抗菌物質を含まない培地を重層させ、下層の選択培地から上層の培地に抗菌物質が浸透してくるまでの時間に損傷した菌を回復させ、以後上層まで浸透した抗菌物質で他の細菌の発育を抑制し、目的とする菌を分離する方法[19,20]などが開発されている。今回、VNC 状態の O:8 菌の分離を行なう際、CIN および VYE で抗生物質を含まない培地を重層する方法を併用し、接種菌の回収率を比較した結果、有意な差はみられなかったもの、重層培地では回収率の明らかな改善が認められた(表 4)。このことから、VNC 状態の O:8 菌の分離には VYE 重層が最も適していると思われる。

本研究では、磁気ビーズに結合させる免疫抗体として、O:8 菌を兎に接種して作成した免疫血清をアフィニティー精製したものを用いたが、この方法では病原性 *Y. enterocolitica* の分離のために全ての病原性血清型に対する免疫血清を用意する必要があり、また、上述したように、いずれの病原性血清型においても、共通抗原を有する非病原性の株が存在するという問題点もある。今後は、全ての病原性 *Y. enterocolitica* の検出を可能にしかつ検出感度を高めるために、病原性 *Y. enterocolitica* に共通する抗原を特定し、これに対するモノクローナル抗体を用いた免疫磁気ビーズの開発を行なう必要がある。

## V.まとめ

環境中で生きてはいるが人工培地上で発育できない状態 (Viable but non-



culturable,VNC) になった病原性 *Y. enterocolitica* の分離を図ることを目的に、VNC 状態の病原性 *Y. enterocolitica* 血清型 O:8 (以下、O:8 菌) を接種した河川水から、免疫磁気ビーズ法 (以下、IMS 法) と従来から用いられているアルカリ処理法を用いて接種菌を回収を行い、両者間の分離成績を比較し、以下の成績を得た。

1. 実験的に河川水に O:8 菌新鮮培養菌を接種し、IMS 法とアルカリ処理法で回収率を比較した結果、IMS 法のほうがアルカリ処理法よりもやや回収率が優れていた。
2. 凍結融解により VNC 状態となった O:8 菌を実験的に河川水に接種し、IMS 法とアルカリ処理法で回収率を比較した結果、IMS 法では接種菌量が  $10^1 \sim 10^2$  CFU/ml の場合まで回収されたのに対し、アルカリ処理法では  $10^3 \sim 10^4$  CFU/ml の場合までしか回収されず、IMS 法はアルカリ処理法に比べて、明らかに高い回収率を示した。
3. VNC 状態となった O:8 菌を IMS 法で分離する際、virulent *Yersinia enterocolitica* (VYE) 培地に抗生物質を含まない培地を重層した培地が最も回収率が高かった。
4. 以上の成績から、VNC 状態となっている O:8 菌の分離には、IMS 法と選択平板培地として VYE の重層培地を用いた方法が最も優れた分離法であると思われた。

## VI.参考文献

1. Aulisio, C. C. G., Mehlman, I. J., Sanders, A. C., 1980, Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:135-140.
2. Bottone, E. J., Gullans, C., and Sierra, M. F., 1987, Disease spectrum of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3, the predominant cause of human infection in New York City. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 9:56-60.
3. Caprioli, T., Drapeau, A., J., and Kasatiya, S., 1978, *Yersinia enterocolitica* : serotypes and biotypes isolated from humans and the environment in Quebec, Canada. *J. Clin. Microbiol.* 8:7-11.
4. Carter, P. B., Yarga, C. F., Keet, E. E., 1973, New strain of *Yersinia enterocolitica* pathogenic for rodents. *Appl. Microbiol.* 26:1016-1018.
5. Christensen, B., Torsvik, T., Lien, T., 1992, Immunomagnetically captured thermophilic sulfate-reducing bacteria from North Sea oil field waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1244-1248.
6. Colwell, R. R., Brayton, P. R., Grimes, D. J., Roszak, D. R., Huq, S. A., Palmer, L. P., 1985, Viable, but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment : implication for release of genetically engineered microorganisms. *Bio/Technology.* 3:817-820.
7. Doyle, M. P., Hugdahl, M. B., 1983, Improved procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:127-135.
8. Fukushima, H., 1985, Direct isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:710-712.
9. Fukushima, H., 1987, New selective agar medium for isolation of virulent *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 25:1068-1073.
10. Fukushima, H., 1992, Direct isolation of *Yersinia pseudotuberculosis* from fresh water in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2688-2690.
11. Fukushima, H., Gomyoda, M., 1986, Inhibition of *Yersinia enterocolitica* serotype O3 by natural microflora of pork. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:990-994.
12. Gemski, P., Lazere, J. R. Casey, T., 1980, Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 27:682-685.
13. Hara-kudo, Y., Ikedo, M., Kodaka, H., Goto, K., Masuda, T., Konuma, H., Kojima, T., Kumagai, S., 2000, Selective enrichment with a resuscitation step for isolation of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 from foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2866-2872.
14. Hayashidani, H., Ohtomo, Y., Toyokawa, Y., Saito, M., Kaneko, S., Kosuge, J., Kato, M., Ogawa, M., and Kapperud, G., 1995, Potential source of sporadic human infection with *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 in Aomori prefecture, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 33:1253-1257.

15. Hornes, E., Wasteson, Y., Olsvik, Ø., 1991, Detection of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin genes in pig stool specimens by an immobilized, colorimetric, nested polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29:2375-2379.
16. Ichinohe, H., Yoshioka, M., Fukushima, H., Kaneko, S., and Maruyama, T., 1991, First isolation of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 29:846-847.
17. Iinuma, Y., Hayashidani, H., Kaneko, K., Ogawa, M., and Hamasaki, S., 1992, Isolation of *Yersinia enterocolitica* serovar O8 from free-living small rodents in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 30:240-242.
18. Inoue, M., Nakashima, H., Ishida, T., Tsubokura, M., Sakazaki, R., 1988, Isolation of *Yersinia pseudotuberculosis* from water. *Zbl. Bakt. Hyg. B186*:338-343.
19. Kang, D. H., Sirragusa, G. R., 1999, Agar underlay method for recovery of sublethally heat-injured bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5334-5337.
20. Kang, D. H., Fung, D. Y. C., 1999, Thin agar layer method for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *J. Food. Prot.* 62:1346-1349.
21. Kapperud, G., 1991, *Yersinia enterocolitica* in food hygiene. *Int. J. Food Microbiol.* 12:53-66.
22. Kapperud, G., Vardund, T., Skjerve, E., Hornes, E., Michaelsen, T. E., 1993, Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested polymerase chain reactions, and colorimetric detection of amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2938-2944.
23. Kay, B. A., Wachsmuth, K., Gemski, P., Feeley, J. C., Quan, T. J., and Brenner, D. J., 1983, Virulence and phenotypic characterization of *Yersinia enterocolitica* isolated from humans in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 17:128-138.
1. 厚生省生活衛生局監修, 1990, 汚染指標菌, 食品衛生検査指針(微生物編). pp.67-107. (社) 日本食品衛生協会.
25. Laird, W. J., Cavanaugh, D. A., 1980, Correlation of autoagglutination and virulence of yersiniae. *J. Clin. Microbiol.* 11:430-432.
26. Lee, W. H., Harris, M. E., McClain, D., Smith, R. E., Johnston, R. W., 1980, Two modified selenite media for the recovery of *Yersinia enterocolitica* from meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:205-209.
27. Lund, A., Hellemann, A. L., Vartdal, F., 1988, Rapid isolation of K88<sup>+</sup> *Escherichia coli* by using immunomagnetic particles. *J. Clin. Microbiol.* 26:2572-2575.
28. Maruyama, T., 1987, *Yersinia enterocolitica* infection in humans and isolation of the microorganism from pigs in Japan. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 9:48-55.
29. Morgan, J. A. W., Winstanley, C., Pickup, R. W., Saunders, J. R., 1991, Rapid immunocapture of *Pseudomonas putida* cells from lake water by using bacterial flagella. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:503-509.
30. Morgan, J. A., Rhodes, G., Pickup, R. W., 1993, Survival of nonculturable *Aeromonas salmonicida* in lake water. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:874-880.

31. Ohtomo, Y., Toyokawa, Y., Saito, M., Yamaguchi, M., Kaneko, S., Maruyama, T., 1991, Epidemiology of *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 infection in the Tsugaru area in Japan. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 13:48-51.
32. Rollins, D. M., Colwell, R. R., 1986, Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:531-538.
33. Roszak, D. B., Grimes, D. J., Colwell, R. R., 1984, Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* 30:334-338.
34. Roth, W. G., Leckie, M. P., Dietzler, D. N., 1988, Restoration of colony-forming activity in osmotically stressed *Escherichia coli* by betaine. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:3142-3146.
35. Schiemann, D. A., 1982, Development of a two-step enrichment procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:14-27.
36. Schiemann, D. A., 1989, *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*, Foodborne bacterial pathogens, pp. 601-672, ed. Doyle, M. P., Marcel Dekker, New York, NY.
37. Schiemann, D. A., Toma, S., 1978, Isolation of *Yersinia enterocolitica* from raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:54-58.
38. Shayegani, M., DeForge, I., McGlynn, D. M., and Root, T., 1981, Characteristics of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from human, animal, and environmental sources. *J. Clin. Microbiol.* 14:304-312.
39. Skjerve, E., Rørvik, L. M., Olsvik, Ø., 1990, Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by immunomagnetic separation. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3478-3481.
1. Wauters, G., Aleksis, S., Charlier, J., Schulze, G., 1991, Somatic and flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related species. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 12:239-243.
41. Wauters, G., Goossens, V., Janssens, M., Vandepitte, J., 1988, New enrichment method for isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 from pork. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:851-854.
42. Weagant, S. D., Kaysner, C. A., 1983, Modified enrichment broth for isolation of *Yersinia enterocolitica* from nonfood sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:468-471.

表1. 生理食塩水に実験的に接種したO:8菌のIMS法による回収

接種菌量 (CFU/ml)	回収菌量 (CFU/ml) <sup>a</sup>	回収率 (%) <sup>a</sup>
$6.1 \times 10^3$	$128.8 \pm 76.8$	$21.7 \pm 8.4$
$6.1 \times 10^2$	$13.5 \pm 8.3$	$20.3 \pm 6.3$
$6.1 \times 10^1$	1.5	19.1

<sup>a</sup> 平均値±標準偏差

表2. 河川水に実験的に接種したO:8菌のIMS法とアルカリリ処理法による回収率の比較

接種菌量 (CFU/ml)	回収率 (陽性検体数/供試検体数)			
	IMS法		アルカリリ処理法	
	CIN	VYE	CIN	VYE
10 <sup>3</sup>	5/5	5/5	5/5	5/5
10 <sup>2</sup>	5/5	5/5	5/5	3/5
10 <sup>1</sup>	3/5	1/5	1/5	1/5
10 <sup>0</sup>	0/5	0/5	0/5	0/5

\* 河川水は黒目川、柳川、仙川、多摩川およびお鷹の水より採取した。

\* 河川水中の生菌数(log<sub>10</sub>CFU/ml)は3.61±0.44、大腸菌群数(log<sub>10</sub>CFU/ml)は1.44±0.30。

表3. 凍結融解によりVNC状態となりVNC状態となったO:8菌の各菌株における割合

菌株	VNC状態のO:8菌の割合 (%) <sup>a</sup>
YE92012	94.7
YE91009	91.8
YE92009	89.8
WA	94.8

<sup>a</sup> { (TSA上に発育したコロニー数 - CIN上に発育したコロニー数) / TSA上に発育したコロニー数} × 100 (%)

表4. 凍結融解によりVNC状態となったO:8菌の各選択培地ごとの回収率の比較

培地	回収率 (%) <sup>a</sup>
CIN	5.6 ± 5.0 <sup>b</sup>
VYE	8.4 ± 8.2
重層CIN	8.9 ± 6.1
重層VYE	16.5 ± 13.8

\* 供試菌株はYE92012株

<sup>a</sup> (選択培地上に発育したコロニー数/TSA上に発育したコロニー数) × 100 (%)

<sup>b</sup> 平均値 ± 標準偏差



表5. 河川水に実験的に接種したVNC状態のO:8菌のIMS法とアルカリ処理法による回収率の比較  
 回収率 (陽性検体数/供試検体数)

接種菌量 (CFU/ml)	IMS法			アルカリ処理法		
	CIN	VYE	重層VYE	CIN	VYE	重層VYE
10 <sup>5</sup>	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4
10 <sup>4</sup>	4.4	4.4	4.4	4.4	3.4	4.4
10 <sup>3</sup>	4.4	4.4	4.4	2.4	2.4	2.4
10 <sup>2</sup>	4.4	3.4	4.4	1.4	1.4	1.4
10 <sup>1</sup>	2.4	2.4	2.4	0/4	0/4	0/4
10 <sup>0</sup>	0/4	0/4	1.4	0/4	0/4	0/4

\* 河川水はお鷹の水より採取した。

\* 河川水中の生菌数(log<sub>10</sub>CFU/ml)は2.82±0.41、大腸菌群数(log<sub>10</sub>CFU/ml)は1.18±1.02。

## 分担研究報告書

### 腸炎ビブリオの増殖

分担研究者：小沼博隆（国立医薬品食品衛生研究所）

研究協力者：仁科徳啓・長谷川順子（東海大学短期大学部）、

小澤一弘・浅川 豊（(株)中部衛生検査センター）、金子孝昌・

久保亮一（関東化学（株））

O3K6 を含めた腸炎ビブリオの 1%ペプトン水中における増殖に及ぼす温度、pH、食塩濃度の影響を実験的に調べた結果、O3:K6 株を含め腸炎ビブリオは、中性域で10℃下では4日間増殖が見られず、食品の保存期間を考慮すると、実質上10℃下での保存で安全性が確保できるものと考えられた。15℃においては、pH5.5で初期菌数が $10^2 \sim 10^3$ であれば、誘導期が若干長いものの6日目には大部分の菌株で顕著な増殖が認められた。20℃においては、pHが5.2以下であれば実質上増殖が起こらないことが判明した。

#### 1. 研究目的

腸炎ビブリオによる食中毒が増加傾向を示し、とくに血清型 O3K6 による事例が増加してきた。この血清型の増加傾向は我が国のみならず、米国等においても認められており、世界的にその対策が必要とされている。増加の原因については不明であり、その究明のための調査研究も必要とされているが、一方では、既に増加している菌による食品汚染を防止し、食品中での増殖を防止することも急務とされている。本研究の目的は、食品中での腸炎ビブリオ増殖の

制御に必要な基礎的知見として、血清型 O3K6 を含む腸炎ビブリオの増殖を、食塩濃度、温度、pH との関連において明らかにすることにある。前年度は、15℃下で pH と食塩濃度が適切であれば良好に増殖できること、pH5.8 においても他の条件が適切であれば良好に増殖できること、15℃、pH5.8、食塩濃度7%においては、菌が増殖し難いことを明らかにした。今年度は、さらに低温または低 pH の条件下で増殖が起こるか否かを検討した。

## 2. 研究方法

供試菌株：O4K8、静岡、患者由来、TDH+、1997

O3K6、秋田、食品由来、TDH+、1998

O3K6、秋田、患者由来、TDH+、1998

O1K56、新潟、患者由来、TDH+、1998

O3K6、新潟、患者由来、TDH+、1998

O1K56、静岡、患者由来、TDH+、1999

O4K8、新潟、患者由来、TDH+、1998

O3K6、静岡、患者由来、TDH+、1999

各菌株を、食塩濃度1%の緩衝ペプトン水（OXOID）中で35℃下18時間静置培養した後に、培養菌体を新鮮な同ペプトン水でさらに同条件下で培養した。ついで培養菌液を1%ペプトン加生理食塩水で希釈し、その希釈菌液を接種菌液とした。その菌液を、食塩濃度を1または3%に、pHを5.0~7.2に調整した1%緩衝ペプトン水に、 $10^1$ ~ $10^3$  cfu/ml 接種した後に、10~20℃

下で静置培養した。なお、緩衝ペプトン水の pH は、リン酸緩衝液とクエン酸緩衝液を混合することによって調整した。

逐次培養液を採取し、ペプトン水で希釈倍列を作成し、それらの 100 $\mu$ l を 2 枚の TCBS 寒天平板培地上へコンラージを用いて塗抹してから 37 $^{\circ}$ C 下で一晩培養し、発育した集落数を計測することによって、ml 当たりの菌数を求めた。

### 3. 研究結果と考察

培養温度 10, 12 $^{\circ}$ C, 食塩濃度 3%, pH7.2 の BPW へ  $10^2$ /ml オーダ接種した O3:K6 株 ('98, 秋田ポイルホタテ), O1 ; K56 株 ('98 新潟患者) では、両菌株とも 10 $^{\circ}$ C で 96 時間後まで接種菌数の有意な増殖は観察されなかった。12 $^{\circ}$ C では、O3:K6 株は 48 時間後に  $10^4$ /ml, 72 時間後  $10^6$ /ml, 96 時間後  $10^7$ /ml オーダに達した。O1 ; K56 株は、72 時間後に  $10^4$ /ml, 96 時間後に  $10^6$ /ml オーダに達し、O3:K6 株に比較して誘導期が長い傾向を示した (図 1)。以上の成績から、腸炎ビブリオは O3:K6 株を含め、中性域で 10 $^{\circ}$ C 下では 4 日間増殖が見られず、食品の保存期間を考慮すると、実質上 10 $^{\circ}$ C 下での保存で安全性が確保できるものと考えられた。

培養温度 20 $^{\circ}$ C, 食塩濃度 3%, pH5.0, 5.2, 5.5 の BPW へ  $10^2$ /ml オーダ接種した O3:K6 株 ('98, 秋田ポイルホタテ), O1 ; K56 株 ('98 新潟患者) では、両株とも pH5.0 及び 5.2 において 96 時間後まで増殖は見られず、いずれの株も 48 時間後に検出限界以下を示した (図 2)。PH5.5 での O3:K6 株は、48 時間後に  $10^6$ /ml, 96 時間後に  $10^8$ /ml オーダに達したが、O1 ; K56 株は 48 時間後に  $10^5$ /ml, 96 時間後にも  $10^5$ /ml オーダであった (図 2)。本実験で