

検査法の比較のため実施した分離培養法による菌の検出は、公定法に準じた。なお、使用した平板培地は CT 加 SORBITOL MacCONKEY AGAR (CT 加 SMAC、OXOID) のみとした。

3. 牛枝肉汚染調査

2003 年 6 月から 2004 年 8 月までに、埼玉県内のと畜場でとさつ・解体された牛枝肉ふきとり 230 検体について、培養法および LAMP 法による STEC O157 の検出成績を比較した。

ふきとり材料は nmEC で 42°C、18 時間増菌培養した。この培養液に Extraction Solution for Foods 試薬を加えて LAMP 鋳型を調製すると共に、培養液を免疫磁気ビーズ O157「生研」(IMS、デンカ生研)で集菌し、CT 加 SMAC、CHROMagar O157 (クロモアガー)、BCM O157 (栄研化学)に塗抹して 35°C、18~24 時間培養した。

C. 研究結果および考察

1. 特異性試験

供試した Stx 産生性の STEC O157 株 53 株すべて、STEC 検出試薬キットおよび O157 検出試薬キットで陽性反応を示した。*Citrobacter freundii*をはじめ他の病原細菌は陰性反応を示し、両キットを用いた LAMP 法は特異性に優れた(表 1)。

2. LAMP 法および培養法による食品培養液からの STEC O157 検出

STEC O157 を添加した食品の nmEC 培養液を用いた LAMP 法による STEC 検査は、牛生レバーが STEC 検出試薬キットおよび O157 検出試薬キットいずれのキットを用いた場合にも検出率 50%と低かったが、その他の食品ではほぼ 100%の検出率であった。

一方、CT 加 SMAC および IMS-CT 加 SMAC を使用した培養法の検出率は、食品によって異なり、ゴマ和え 100%、牛生レバー 35%、ブロッコリーの芽 5%であった(表 2)。

培養法により STEC O157 が検出された検体はすべて、LAMP 法で陽性反応を示した。

野菜類は栽培、収穫、流通過程および消費段階において土壌や塵埃など環境因子を介して微生物の汚染を受け、*Pseudomonas*、*Serratia*、*Lactobacillus*、*Bacillus* など様々な細菌が分布していると言われる。現に、今回検討に使用したブロッコリーの芽は、初期の一般細菌数が 1.0×10^8 個/g および大腸菌群数が 9.0×10^6 個/g で、生レバー等の食品よりも多数の細菌が付着し、添加した STEC O157 菌数の 10^8 倍以上の菌数があった。このため、STEC O157 は nmEC 培地中で LAMP 法の検出限界である菌量(一般的には $10^3 \sim 10^4$ 個/ml)にまでは十分に増殖しえたものの、ブロッコリーの芽の細菌叢と競合し、増殖抑制を

も受けたと推定された。

一方、培養後の nmEC 培地中の一般生菌数および大腸菌群数を測定していないため、ブロッコリーの芽に付着した細菌叢の菌数がどのように変化したかは不明であるが、初期の菌数と分離平板培地に発育したコロニーの様相から推定すると、その増殖は STEC O157 をかなり上回ったものと考えられる。結果としては、分離平板培地が目的以外の他の細菌にマスキングされ、STEC O157 の単離が不可能となり、培養法の検出率、特にブロッコリーの芽の検出率が低くなったものと考えられる。

3. 牛枝肉ふきとり検体からの STEC O157 検出

牛枝肉ふきとり 230 検体のうち、培養法陽性は 12 検体、STEC 検出試薬キットおよび O157 検出試薬キット陽性はそれぞれ 16 検体と 45 検体であった。培養法で STEC O157 が分離されず、STEC 検出試薬キットおよび O157 検出試薬キットのみ陽性は、それぞれ 4 検体と 33 検体であった。これら菌が分離できなかつた検体はすべて、*Stx* 遺伝子を標的とした PCR 法で陽性を示し、STEC の存在が示唆された (表 3)。

D. 結論

今回検討した STEC O157 に関与する 2 種類の遺伝子を標的とした LAMP 法は、

培養法よりも検出率が高く、また検査日数の観点から見ても、培養法に要する日数が 4 日であるのに対し、LAMP 法は 2 日で判定することが可能であった。

厚生労働省食中毒報告によると、平成 15 年発生した細菌性およびウイルス性食中毒事例数と患者数は 1,392 件と 10,886 人で、そのうち STEC による事例は 12 件発生し、患者数 184 人であった。事例数および患者数は他の病因物質による事例に比べ少ないが、本菌により 1 人が死亡しており、STEC は重篤な健康被害を与える。このため、患者発生時には原因食品の特定 (推定) に迅速性が求められ、今回検討した LAMP 法に期待が持たれる。

健康被害を防御する方策としては、本菌の汚染防止は不可欠であるが、あらゆる食品の原料はもとより、最終製品の汚染を「零」にすることは容易でない。従って、LAMP 法の活用は、リスクの高い食品を中心に STEC の汚染状況を監視し、汚染食品の迅速な排除を行っていくに有効である。

この数年、STEC O157 による下痢症は、集団発生よりも散発性事例が多い。患者発生時に入手される喫食調査情報を分析して、リスクの高い食品を推定し、重点的にこれらの食品について LAMP 法を用いた汚染調査を実施することも必要である。

昨今、LAMP 法や PCR 法などの手法を用いて、微生物が保有する遺伝子を検査す

る方法が進歩し、食品の細菌検査分野に応用されはじめた。選択した標的遺伝子によっては、配列がわずかに異なるバリエントが存在し、また継代培養のために遺伝子が欠損する場合がある。いずれにしても遺伝子検査の対象部位は、標的遺伝子の一部を増幅しているものであり、複数の標的遺伝子について検査する必要がある。

また、遺伝子検査手法は試料中の他の細菌による非特異性反応や試料中の物質による阻害反応を受け、結果判定に支障を来すことも皆無ではない。従って、食品の STEC 検査は、従来から実施されてきた培養法を遺伝子検査法と併せて行う必要がある。加えて、培養法に使用される培地の開発も望まれる。

E. 研究発表

(学会発表)

大塚佳代子、田中成幸、柳川敬子、工藤由起子、高鳥浩介。食品および牛枝肉の腸管出血性大腸菌 O157 検査における LAMP 法の評価。日本食品衛生学会第 88 回学術講演会。平成 16 年 11 月、広島。

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

表 1 LAMP法の特異性試験結果

供試菌株 ^a	由来(株数)	LAMP法	
		STEC検出試薬キット	O157検出試薬キット
<i>Escherichia coli</i> O157 : H7 (VT+)	食品 (8)	+	+
<i>Escherichia coli</i> O157 : H7 (VT+)	人 (38)	+	+
<i>Escherichia coli</i> O157 : H- (VT+)	人 (3)	+	+
<i>Escherichia coli</i> O157 : H7 (VT+)	と畜場材料 (4)	+	+
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC8090	-	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25522	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC8724	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC13883	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC9610および人 (3)	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC35667	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC7080	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC10876	-	-
<i>Streptococcus faecalis</i>	ATCC29212	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC12915	-	-
<i>Vivrio cholera</i>	人	-	-

a LAMP反応当たり、Log 2~Log 4個に調製した菌液について試験した。

表2 食品のnmEC培養液からの腸管出血性大腸菌O157検査法における培養法とLAMP法の比較

食品の種類	添加菌量 ^a (cfu/25g)	培養法			LAMP法	
		nmEC-CT加SMAC	nmEC-IMS-CT加SMAC	STEC検出試薬キット	O157検出試薬キット	
牛生レバー	1~4	2/20	7/20	10/20	9/20	
	0	0/5	0/5	0/5	0/5	
ゴボウのゴマ和え	9~13	18/20	20/20	20/20	20/20	
	0	0/5	0/5	0/5	0/5	
ブロッコリーの芽	3~19	0/20	1/20	19/20	20/20	
	0	0/5	0/5	0/5	0/5	

a 幼稚園井戸水事例由来株、高齢者施設浅漬け事例由来株、学校給食事例由来株、牛枝肉ふきとり由来株を各食品に添加した。試験は食品および菌株ごとに5検体とした。

表3 培養法およびLAMP法による牛枝肉ふきとりからの腸管出血性大腸菌O157検出状況の比較

	STEC検出試薬キット			O157検出試薬キット		
	陽性	陰性	計	陽性	陰性	計
陽性	12	0	12	12	0	12
陰性	33 ^{ab}	185	218	4 ^a	214	218
計	45	185	230	16	214	230

a 4検体は、STEC検出試薬キットを用いたLAMP法およびPCR法で陽性であった。

b 7検体はSTEC 0157以外のSTECが分離され、他の26検体はPCR法で陽性であった。

平成 16 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進事業）

細菌性食中毒の予防に関する研究

主任研究者 高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究

生食用の食肉および野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌および

サルモネラ食中毒の予防に関する研究

分担研究者 高鳥 浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

協力研究報告書

腸管出血性大腸菌および腸管毒素原性大腸菌に関する研究

——大腸菌群に汚染された食材から志賀毒素産生性大腸菌および

腸管毒素原性大腸菌O169を適確に釣菌する手法の検討——

近年、集団食中毒事例の原因菌として腸管毒素原性大腸菌O169:H41の報告が増加している。腸管出血性大腸菌についても、O157以外の血清型菌による事例が増加しつつある。これらの下痢原性大腸菌を食品から適確に検出・釣菌する方法を確立する目的で、コロニープロット法の応用を試みた。O169については、選択分離培地上のコロニーをニトロセルロース膜に転写し、抗O169免疫血清を利用した酵素抗体法を実施することにより、多数の集落中に混在する同菌を確実に識別釣菌できた。腸管出血性大腸菌については、O157のみならず志賀毒素（Stx）産生菌の網羅的な捕捉を目標とした。毒素産生を高めるために、ブレインハートインフュージョン寒天培地にTrimethoprimとSulfamethoxazoleを添加し、ニトロセルロース膜上でコロニーを形成させた。ポリミキシンを用いて膜上で溶菌させ、膜への毒素の吸着を図った。抗Stx抗体を用いたアビジン-ビオチン法により、吸着毒素を発色させたところ、Stx産生コロニーの呈色を確認できた。特にStx 2産生菌の反応は明瞭であったが、Stx 2型バリエントに対する抗体を使用しなかったため、バリエント産生菌は呈色しなかった。今後はバリエントに対する抗体の併用も検討する必要があるが、本法は腸管出血性大腸菌の釣菌に有用と期待できる。

研究協力者

西川 禎一 大阪市立大学

A. 目的

細菌性食中毒を予防するには、食品や環境などの汚染状況を疫学的・生態学的に調査し、汚染源の除去と汚染経路の遮断を同時に実行することが最も有効な方法である。そのためには調査手法として有効な精度を有する検出法が必須である。

これまでも数多くの検査法が開発され、調査の改善に役立てられてきた。特に近年は分子遺伝学的手法の応用が目覚しく、非常に高い精度と感度で病原菌の有無をスクリーニングできるようになった。糞便や食品から直接的に、あるいは増菌培養後にスクリーニングする方法として、DNAプローブを用いた方法やPCR法による遺伝子の検出、酵素抗体法やラテックス凝集法などの免疫学的手法による菌体抗原や毒素の検出などが開発され、応用されてきた。しかしながら、スクリーニングのみで汚染菌を確定することは困難である。確かな証拠とするために、あるいは病原体の薬剤耐性を調べたり疫学的検討を加えたりするには、スクリーニングで陽性と判定された検体から実際に病原菌を分離することが欠かせない。

スクリーニング法の大いなる進歩に比べ、分離方法の改善が遅れていることは、細菌検査に携わる者が等しく実感すると

ころである。特に腸管出血性大腸菌（EHEC）や腸管毒素原性大腸菌（ETEC）などの下痢原性大腸菌は、腸内に常在する無害な大腸菌と生化学性状に大差が無く、培養検出時の識別に困難を極める。

ETEC O169:H41は、1991年の初報告以降わが国で急速に広まり^{1,4)}、最近では米国CDCからも主要な下痢原性大腸菌として報告が出されているが⁵⁾、その汚染経路は不明なままである。乳糖分解性を有し、培地上では通常の大腸菌と識別できないため、これを検出分離する簡便な方法は無い。EHECの場合、血清型O157の感染による患者が多く、同菌についてはソルビット遅分解など特異な生化学性状を利用した比較的有効な選択分離法がある。しかしながら、最近では他の血清型のEHECも増加する傾向にあり⁶⁾、EHEC全体を網羅的に分離釣菌する方法が求められているが、有効な方法は未だない。

我々は、環境水中に生息する多数の *Vibrio cholerae* の中から血清型O1のコレラ菌のみを適確に識別分離する方法として、コロニープロット二重染色法を開発し先に報告した⁷⁾。本研究では、下痢原性大腸菌の分離効率を改善する目的で、コロニープロット法を応用し、ETEC O169の検出に有効な釣菌方法の工夫を試みた。また、O157のみならず他の血清型も含め、EHECのコロニーを効率良く識別分離する方法として、Stx産生コロニーを識別する

ために、抗Stx抗体を用いたコロニープロット法の開発を試みた。

B. 方法

1 供試菌株

大阪市立環境科学研究所において我々が分離した*Escherichia coli* 48株と英国Central Public Health LaboratoryのH. R. Smith博士より分与されたETEC 4株およびEHEC 2株、計55株を陽性対照あるいは陰性対照として試験に供した。

2 使用培地

1. トリプトソーヤブイヨン (日水)
2. マッコンキー寒天培地 (日水)
3. ソルビットマッコンキー寒天培地 (Difco)
4. プレインハートインヒュージョン寒天培地 (BHI寒天培地) : 蒸留水 1L あたりプレインハートインヒュージョンブイヨン (日水) 35.0g と寒天 (Difco) 15.0g を加え、オートクレーブで121°C 15分間滅菌、使用した。
5. 抗生物質添加BHI寒天培地 : Trimethoprim (Sigma) 1mg と Sulfamethoxazole (Sigma) 5mg を10mlの蒸留水に溶解、ろ過滅菌したものを、オートクレーブ後に50°Cまで冷やしたBHI寒天培地に833 μ l/Lの割合で添加し (最終濃度0.5

mg/L)、使用した。

6. 抗生物質添加マッコンキー寒天培地 : 上記と同じ方法で抗生物質を添加し、抗生物質添加マッコンキー寒天培地として使用した。
7. グラム陽性菌抑制抗生物質添加トリプトソーヤ寒天培地 : 蒸留水 1Lにつき、Tryptone Soya Agar (Oxoid) 40.0g とBile Salts No.3 (Difco) 1.5g およびクリスタルバイオレット (和光純薬) 1mgの割合で溶解し、オートクレーブで121°C 15分間滅菌した。50°Cまで冷やした後、上記と同じ方法で抗生物質を添加し、グラム陽性菌抑制抗生物質添加トリプトソーヤ寒天培地として使用した。
8. グラム陽性菌抑制抗生物質添加BHI寒天培地A : 蒸留水 1Lにつき、プレインハートインヒュージョンブイヨン (日水) 35.0g と寒天 (Difco) 15.0g、Bile Salts No.3 (Difco) 1.5g およびクリスタルバイオレット (和光純薬) 1mgの割合で溶解し、オートクレーブで121°C 15分間滅菌した。50°Cまで冷やした後、上記と同じ方法で抗生物質を添加し、グラム陽性菌抑制抗生物質添加BHI寒天培地Aとして使用した。
9. グラム陽性菌抑制抗生物質添加BHI寒天培地B : 上記培地の組成からBile Salts No.3を省いたものを、グラム

陽性菌抑制抗生物質添加BHI寒天培地Bとして使用した。

3 試薬および溶液

1. Dulbeccoの燐酸緩衝食塩水 (PBS)
2. ブロッキング液：1% (w/v) ウシ血清アルブミン (Sigma) 加PBS
3. 洗浄液：0.1% (w/v) Twenn20加PBS
4. 抗体希釈液：PBSにウシ血清アルブミンを0.1% (w/v)、Twenn20を0.05% (w/v) 添加し、用事調整した。
5. 4 CN-A 液：4-chloro-1-naphthol (Sigma) 1錠をエタノール1mlに溶解し、冷凍保存した。
6. 4 CN-B液：4 CN-A液1mlをジエチレングリコール (和光純薬) 19mlに加え混和、冷凍保存した (最終濃度1.5mg/ml)。
7. 4 CN-C液：4 CN-A液1mlをジエチレングリコール (和光純薬) 11mlに加え混和、冷凍保存した (最終濃度2.5mg/ml)。
8. 4 CN発色液：PBS10mlあたり4 CN-A液0.1ml、あるいは4CN-BまたはC液を2ml添加し、30%の過酸化水素水を5 μ l加えて用いた。あるいはHRP Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad) のHRP color reagent A 2mlとHRP color reagent B 60 μ lおよびHRP color development

bufferの10倍希釈液10mlを混合して使用した。

9. 抗Stx抗体：抗StxマウスモノクローナルIgG抗体 (コスモバイオ SLTPI-1、Lot No. 72899PI、Sarasota, Florida, U. S. A.) 1バイアルを1mlの抗体希釈液に溶解し、用事希釈して使用した。
10. 二次抗体：以下の4種を二次抗体として使用した。アビジン-ビオチン法にはビオチン化抗マウス免疫グロブリンヒツジ抗体 (Pharmacia, Cat. No. RPN1001、Lot. No. 173966、Buckinghamshire, England) を抗体希釈液で400倍に希釈したものを使用した。化学発光法では、抗マウス免疫グロブリンペルオキシダーゼ結合ウサギ抗体 (ICN, Cat. No. 11355、Lot. No. 3413C) か抗マウス免疫グロブリンペルオキシダーゼ結合ヒツジ抗体 (Pharmacia, Cat. No. NIF825、Lot. No. 172632)、あるいは抗マウス免疫グロブリンペルオキシダーゼ結合ヒツジ抗体 (Pharmacia, Cat. No. NA931V、Lot. No. 198161) の3種の抗体を抗体希釈液で用事希釈し使用した。
11. ストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体：ストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体 (Pharmacia, Cat. No.

RPN1051、Lot. No. 177351) を抗体希釈液で1000倍に希釈し使用した。

12. 発光液：PharmaciaのECL Plus (Cat. No. RPN2132) をペルオキシダーゼの発光基質とし、添付の説明書に従って使用した。

4 コロニープロット法によるETEC 0169:H41の検出

1. マッコンキー寒天培地（日水）に大腸菌を接種、一夜培養し、コロニーを形成させた。
2. PBSで濡らした後、余分な水分を除いたニトロセルロース膜（Advantec、A045A082C）を培地上に乗せ、室温で15分間放置した。
3. メンブレンを培地から剥がし、コロニーに接していた面を上にして新しいガラスシャーレに置いた。
4. ブロッキング液をメンブレンに20 ml 注ぎ、30分間振盪（60回/min）した。
5. ブロッキング液をアスピレーターで吸引除去し、洗浄液を20 ml 加え洗浄した。
6. PBSにDiaminobenzidine (Sigma) を0.5 mg/ml、塩化コバルトを0.3 mg/ml 溶解し、30%の過酸化水素水を0.1% (v/v) 加えたもの、あるいは4-chloro-1-naphthol (Sigma) の冷凍保存用エタ

ノール溶液（30 mg/ml）を、10 ml のPBSに0.1 ml 加え、更に30%過酸化水素水90 μ l を添加した溶液を一次発色液とした。これをメンブレンに注ぎ振盪した。

7. 発色液を吸引除去し、洗浄液20 ml を加えて3分間、3回洗浄した。
8. 洗浄液を吸引除去し、抗0169免疫血清（デンカ生研、Lot No. 11309）を抗体希釈液で希釈した一次抗体液を10 ml 注いで60分間振盪した。
9. 一次抗体液を吸引除去し、上記のように洗浄液で3回洗浄した。
10. 抗ウサギ免疫グロブリンペルオキシダーゼ結合ブタ抗体（ICN, Aurora, Ohio, U.S.A）を抗体希釈液で3000倍希釈し、二次抗体液とした。これをメンブレンに10 ml 注ぎ、60分間振盪した。
11. 二次抗体液を吸引除去し、3回洗浄した。
12. PBSにDiaminobenzidine (Sigma) を0.5 mg/ml 溶解し、30%の過酸化水素水を0.1% (v/v) 加え二次発色液とした。これを、洗浄液を除去したメンブレンに10 ml 加えて15分間振盪した。
13. 発色液を吸引除去、蒸留水で洗浄した。
14. 蒸留水を吸引除去後、塩化ベンザルコニウム（甘糟化学）の200倍希

积液を20m l 加え、5 分間消毒した。

15. 消毒液を吸引除去し、蒸留水で再度洗淨後、メンブレンを乾燥保存した。

5 コロニープロット法によるEHECの検出

1. 寒天培地（日水）にニトロセルロース膜（Advantec、A045A082C）を置いた上で大腸菌を接種、37℃一夜培養し、コロニーを形成させた。
2. 滅菌生理食塩水で希釈したポリミキシンB溶液 2 m l をステンレスパットに置き、その上にメンブレンを浮かせて60分間室温で静置した。
3. メンブレンを新しいガラスシャーレに置き、ブロッキング液をメンブレンに20m l 注ぎ、30分間振盪（60回/min）した。
4. ブロッキング液をアスピレーターで吸引除去し、洗淨液を20m l 加え3回洗淨した。
5. 洗淨液を吸引除去し、一次抗体として抗Stx抗体希釈液を10m l 注いで60分間振盪した。
6. 一次抗体液を吸引除去し、上記のように洗淨液で3回洗淨した。
7. 洗淨液を吸引除去し、二次抗体溶液をメンブレンに10m l 注ぎ、60分間振盪した。
8. 二次抗体液を吸引除去し、3回洗淨した。
9. 洗淨液を吸引除去し、ストレプトア

ビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体を10m l 加えて60分間振盪した。

10. ストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体液を吸引除去、洗淨液を用いて3回洗淨した。
11. 洗淨液を吸引除去後、発色液を加え、15分間振盪した。
12. 発色液を吸引除去し、蒸留水で再度洗淨後、メンブレンを乾燥保存した。

C. 結果および考察

1 コロニープロット法によるETEC 0169:H41の検出

検討の結果、0169コロニーのみを転写メンブレン上で適確に発色させ識別することが可能となった。この手法により、多数の大腸菌群コロニーの中に混在する0169のコロニーを確実に捕捉できる（図1）。使用する血清を変えれば、他の血清型の下痢原性大腸菌検出にも応用できると考えられる。ただし、数多くの大腸菌株の中にはK抗原を保有するものもあり、菌体表面を覆うK抗原によって、O抗原と抗体の反応が阻止されることも起こりうる。本法では、メンブレンに転写された菌体に対して、K抗原を除去するための熱処理過程は含まれていないので、検出対象とする株が、K抗原を保有するか否か事前に調査した上で適用を決定することが

必須である。

デンカ生研の抗0169免疫血清を抗体希釈液で段階希釈し、大腸菌株を転写したメンブレンと反応させて、発色の程度と非特異反応の有無を調べた。200倍希釈では0169のコロニーと近似の強さで発色する株も認められたが、希釈率が上がるとともに非特異反応は消失した。12800倍に希釈した一次抗体でも十分な反応が見られたので、以後は12800倍希釈した免疫血清を用いた。

メンブレン上に発色したスポットに該当するコロニーを、元の寒天培地上の多数の集落から識別する際、発色スポットと他の周辺コロニーとの位置関係がメンブレン上に見られれば、作業を容易に勧めることができる。コレラ菌コロニーの識別法としてコロニープロッティング法を開発していた際、メンブレンに転写された全てのコロニーの位置を、*Vibrio*属細菌が有する内因性のオキシダーゼと反応する一次発色液（塩化コバルト含有Diaminobenzidine溶液）を利用して最初に薄墨色に発色させつつ、内因性オキシダーゼをブロックした。その後、コレラ菌と反応する抗体液を注ぎ、抗体に結合したペルオキシダーゼと二次発色液の反応により、コレラ菌コロニーの位置だけに褐色色素が沈着し二重染色されるように工夫したところ、メンブレン上の発色スポットに該当するコロニーを、元の寒

天平板上において極めて容易に識別できた⁷⁾。

0169のコロニープロットでも、前記の様な二重染色法を試みたが、大腸菌群など*Enterobacteriaceae*の細菌は内因性オキシダーゼを有しないために、培地上の集落全ての位置や形状をメンブレンに現像させることはできなかった。しかしながら、実際の食品や環境の調査においては、*Pseudomonas*などオキシダーゼ陽性のグラム陰性菌集落が混在して生育すると予想されることから、一次発色の過程を含めることは有用と推定される。

2 コロニープロット法によるEHECの検出

Stx産生菌株にニトロセルロース膜上で集落を形成させ、メンブレンに吸着したStxを酵素抗体法で検出したところ、Stx 2産生菌では明瞭な発色が認められた（図2B）。Stx 1産生菌の場合、逆受身ラテックス凝集試験で毒素産生の低い株（図2BのNo.1と2）は不明瞭であったが、高い毒素産生が確認された株（No.13）は明瞭に発色したことから、本法はStx産生菌を識別釣菌する方法として有効と判断される。

一般にStx 2が菌体外によく分泌されるのに対して、Stx 1は溶菌されるまで菌体内にとどまる傾向にあると報告されていることから⁸⁾、毒素型により発色の差が生

じた理由は、メンブレン吸着毒素量の差によるものと推察される。本研究では、Stxの精製品を用いた検討をしていないため、本法の感度については未だ決定できていない。腸管毒素原性大腸菌のLTに対する抗体とペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いたコロニープロット法の報告で、検出限界はおよそ1 ng/mm²であったとの報告がある⁹⁾。LTの分子量は約86kDaであり、Stxが約70kDaであることを考慮すると、検出限界も近似したものになっていると考える。

毒素の吸着量以外に、種類の影響についても考慮する必要がある。PCR法によってStx遺伝子が確認されているにもかかわらず、本法で発色しなかった株は、Stx2ヴァリエント遺伝子保有株であった(図2BのNo. 7, 9, 11, 12)。今回用いた抗Stx抗体は、変異型毒素には反応性を保有しないために発色させられなかったと判断される。変異型毒素に対する抗体を一次抗体液に追加すれば、産生毒素の型に影響されることなく網羅的に識別・分離できる可能性もあると期待できる。

前記の0169コロニープロット法は、メンブレンに転写したコロニーの菌体抗原に対して直接的に酵素抗体法を適用するものである。一方、EHECコロニーの検出を目的とする本法は、EHECが産生するStxに対して酵素抗体法を適用するものであり、十分な量の毒素をメンブレンに吸着

させる必要がある。そこで、本法では寒天上に予め置かれたニトロセルロースメンブレン上に被験菌を接種し、膜上で発育させた。さらに、菌体内のStxが放出されてメンブレンに吸着することを期待し、ポリミキシンを用いてメンブレン上のコロニーを溶菌させることとした。

上記のプロット法を用いたところ、0169のコロニープロット法では認められなかった問題が生じた。すなわち、プロット部位に弱いながらも非特異的発色反応が認められた。これは、一次抗体や二次抗体による処理を行っていないメンブレンでも見られ、Diaminobenzidine溶液だけで発色した。内因性のオキシダーゼ様活性物質による非特異反応の可能性を疑い、過酸化水素処理やアジ化ナトリウム処理あるいは過ヨウ素酸処理を行ったが、完全に抑制することはできなかった。0169のコロニープロット法のように寒天上のコロニーをメンブレンに転写した場合には、このような問題は生じず、メンブレン上でコロニーを生育させた場合にのみ認められた。また、過酸化水素を加えていない発色液でも同反応が認められたため、オキシダーゼ様の酵素による非特異反応ではなく、Diaminobenzidineに内在する問題と推察した。そこで、発色剤を4-CNに変更したところ、非特異反応は観察されなくなった。以後、EHECのコロニープロ

ット法では4-CNを発色剤とした。

抗Stx抗体を段階希釈して反応を見たところ、1000倍希釈液では反応が弱くなったが、500倍希釈と250倍希釈では差を認めなかったため、以後500倍希釈液を用いることとした。使用する寒天培地としては、マッコンキー寒天培地ではメンブレンが赤色に着色し、酵素抗体反応による呈色を観察し難いことが分かった。そこで、トリプトソーヤ寒天やBHI寒天培地を基礎とし、Stxの産生促進効果が報告されている抗生物質を加えるとともに¹⁰⁾、抑制剤として胆汁酸やクリスタルバイオレットの添加を試みた。BHI寒天培地に比べ、抗生物質を添加したBHI寒天培地ではStxの産生が明白であった(図2)。しかしながら、抑制剤として胆汁酸とクリスタルバイオレットを併用、あるいはクリスタルバイオレットを単独で追加したところ、Stx検出コロニー数は減少した。胆汁酸単独添加の培地は設けなかったため、毒素産生の低下がクリスタルバイオレットによるものか、胆汁酸によるものか、断定はできていないが、検査には抗生物質添加BHI寒天培地を用いることとした。

抑制剤を加えない培地では、混在する雑菌のために検査に支障をきたす可能性も予想される。しかしながら、食品のEHEC検査では、選択増菌の後で寒天培地に塗抹すると考えられることから、胆汁酸などが添加されていなくてもグラム陽性菌

などの生育が検査の障壁になる率は低いと考えている。

Strockbineら¹¹⁾もコロニープロット法を用いた実験で観察したように、EHECの毒素産生性は株によって著しく異なり、今回の実験においても毒素のプロットが検出されない株があった。Mytomycin Cや紫外線照射によるファージ誘導がStxの産生促進に有効という報告もあることから^{12, 13)}、これらの方法を今回用いた抗生物質の代替として検討してみる価値もあると考える。毒素産生性の低い株を検出するために、感度を上げる方法として酵素発光法も試みた。今回は非特異反応が強く実用化できなかったが、今後更に検討の価値はあると考えている。

Stx産生の良好な株と毒素非産生株を1:100の割合で混合し、1平板当たり100-300のコロニーを形成する濃度で播種し、コロニープロット法を適用したところ、毒素産生菌のコロニーを検出できた(図3)。集団食中毒の検査時には、患者由来の菌株と同じクローンが食品から検出されることが、重要な証拠として求められる。原因菌の毒素産生性が良い場合は、現在の手法でも事件への応用が可能と考える。

以上、PCR法、リアルタイムPCR法、LAMP法PCR、免疫蛍光法など、病原体のスクリーニング法は急速な進化を遂げているが、原因菌の分離には未だ簡便確実な方法は

ない。今回は、検査室でも実施しやすい方法として、酵素抗体法を用いたコロニープロット法による、Stx産生菌および腸管毒素原性大腸菌O169の識別分離法を検討した。コロニープロット法は、これまで分離株の毒素産生性をチェックする手段として利用される傾向にあったが、増菌後のスクリーニングで陽性を示した検体について本法を実施すれば、疫学調査や食中毒事例の調査時に原因菌の分離率が改善されるものと期待できる。

D. 文献

- 1) Nishikawa, Y., Helander, A., Ogasawara, J., Moyer, N.P., Hanaoka, M., Hase, A., and Yasukawa, A. (1998) Epidemiology and properties of heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O169:H41, *Epidemiol. Infect.*, **121**, 31-42.
- 2) Nishikawa, Y., Hanaoka, M., Ogasawara, J., Moyer, N.P., and Kimura, T. (1995) Heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* O169:H41 in Japan, *Emerg. Infect. Dis.*, **1**, 61.
- 3) Hamada, K., Oshibe, T., Tsuji, H., Yoshida, S., and Aoki, Y. (2000) Outbreaks of heat stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* O169 in the Kinki district in Japan: genotypic comparison by pulsed-field gel electrophoresis of isolates from two outbreaks in 2000 with isolates from four outbreaks in 1997-1998, *Jpn. J. Infect. Dis.*, **53**, 174-176.
- 4) Ando, K., Itaya, T., Aoki, A., Saito, A., Masaki, H., and Tokumaru, Y. (1993) An outbreak of food poisoning caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* O169:H41, *Jpn. J. Food Microbiol.*, **10**, 77-81.
- 5) Beatty, M.E., Bopp, C.A., Wells, J.G., Greene, K.D., Puhf, N.D., and Mintz, E.D. (2004) Enterotoxin-producing *Escherichia coli* O169:H41, United States, *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 518-521.
- 6) Shiomi, M. (2002) [Indicators for early diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and methods for final diagnosis], *Nippon Rinsho*, **60**, 1108-1113.
- 7) Nishikawa, Y., and Kishi, T. (1988) A note on colony-blot double-stain method for isolation of *Vibrio cholerae* serotype O1 from specimens heavily contaminated with non-O1 *Vibrio cholerae*, *Lett. Appl. Microbiol.*, **7**, 91-94.
- 8) Strockbine, N.A., Marques, L.R.M., Newland, J.W., Smith, H.W., Holmes, R.K., and O'Brien, A.D. (1986) Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933

- encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities, *Infect. Immun.*, **53**, 135-140.
- 9) Shah, D.B., and Rhea, U.S. (1986) Foodborne enterotoxigenic *Escherichia coli*: Identification and enumeration on nitrocellulose membrane by enzyme immunoassay, *International J. Food Microbiol.*, **3**, 79-88.
- 10) Karch, H., Strockbine, N.A., and O'Brien, A.D. (1986) Growth of *Escherichia coli* in the presence of trimethoprim-sulfamethoxazole facilitates detection of Shiga-like toxin producing strains by colony blot assay, *FEMS Microbiol. Lett.*, **35**, 141-145.
- 11) Strockbine, N.A., Marques, L.R.M., Holmes, R.K., and O'Brien, A.D. (1985) Characterization of monoclonal antibodies against Shiga-like toxin from *Escherichia coli*, *Infect. Immun.*, **50**, 695-700.
- 12) Yamamoto, T., Kojio, S., Taneike, I., Nakagawa, S., Iwakura, N., and Wakisaka-Saito, N. (2003) ⁶⁰Co irradiation of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* induces Stx phage, *FEMS Microbiol. Lett.*, **222**, 115-121.
- 13) Yee, A.J., De Grandis, S., and Gyles, C.L. (1993) Mitomycin-induced synthesis of a Shiga-like toxin from enteropathogenic *Escherichia coli* H.1.8, *Infect. Immun.*, **61**, 4510-4513.

図 1 . 腸管毒素原性大腸菌 O169:H41 に対するコロニーブロッティング . (A) マッコンキー寒天培地上で乳糖を分解している赤色コロニーが O169 . (B) コロニーブロッティングで O169 コロニーは褐色に呈色、マッコンキー寒天培地上のコロニーに各々対応している (矢印) .

図 2 . EHEC のコロニーブロッティングに与える抗菌剤の影響と菌株による反応の差 . (A) BHI 寒天培地上で培養したコロニーに対するブロッティング . (B) Trimethoprim と Sulfamethoxazole を添加した BHI 寒天培地上で培養したコロニーに対するブロッティング . (C) 使用した菌株の Stx 産生性 . No.1,2,13 は Stx1 単独産生株、No.3,6,8 は Stx2 単独産生株、No.11 と 12 は Stx2 ヴァリアント単独産生株、No.4 と 5 は Stx1 および Stx2 両方を産生、No.7 と 10 は Stx1 と Stx2 ヴァリアント両方を産生、No.9 は Stx2 と Stx2 ヴァリアントの両方を産生、No.14-23 は毒素非産生株 .

図 3 . 非病原性大腸菌と混在する EHEC のコロニーブロッティングによる検出 . (A) BHI 寒天培地上のニトロセルローズ膜に非病原性大腸菌と O157 を 100 : 1 の割合で接種し、生じたコロニー . (B) 抗 Stx 抗体を用いたコロニーブロッティングにより発色した 3 つのコロニー .

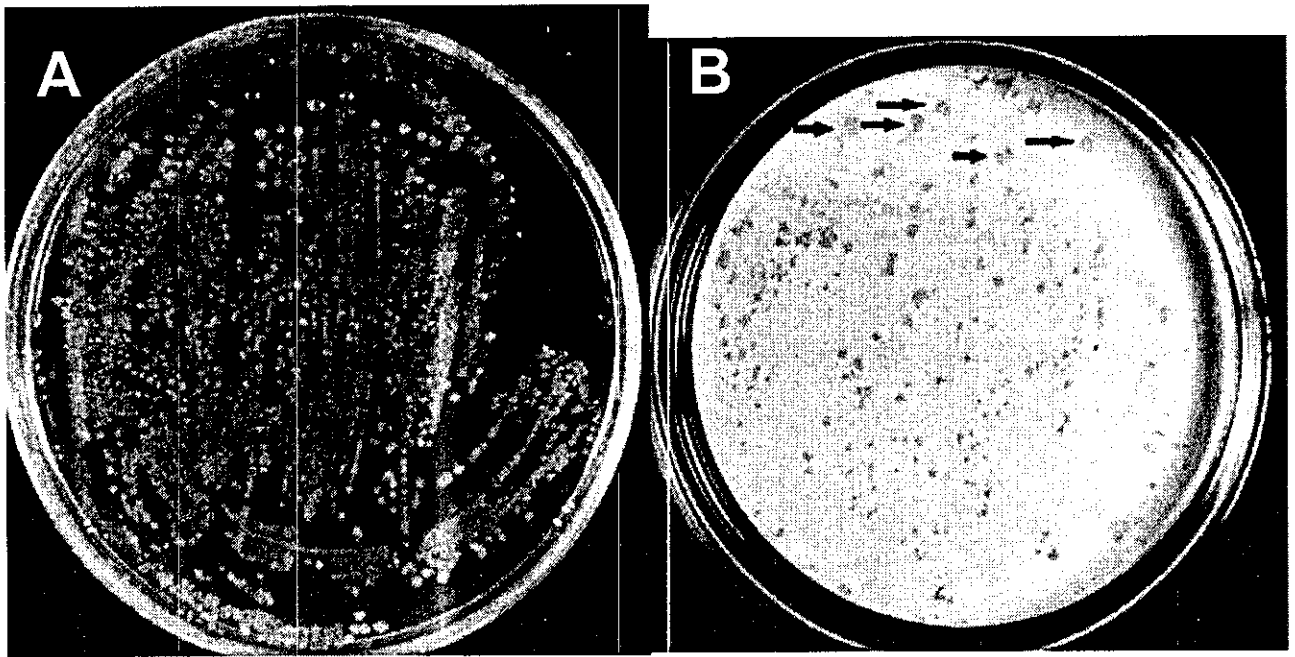


图 1

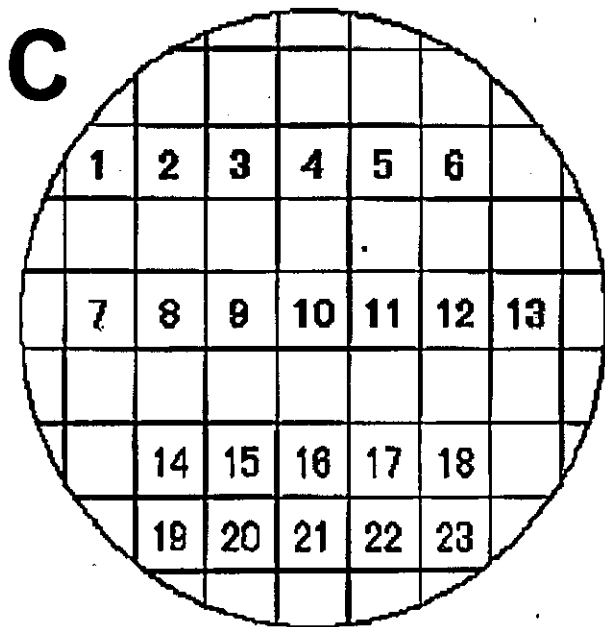
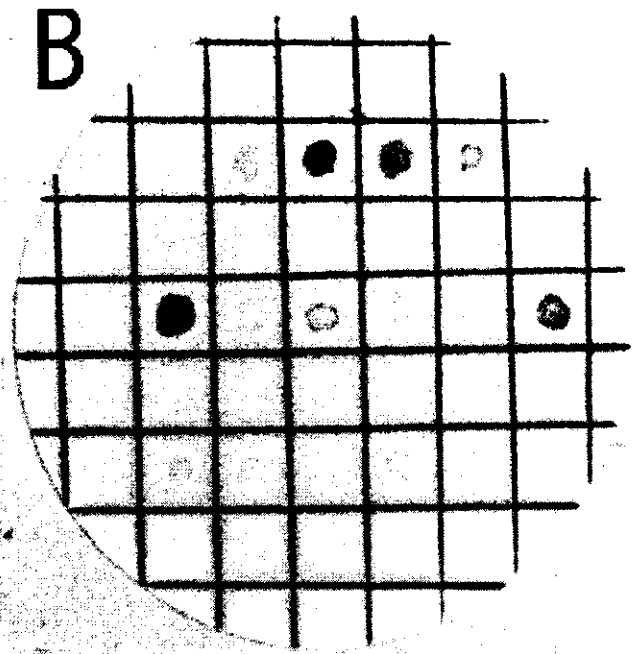
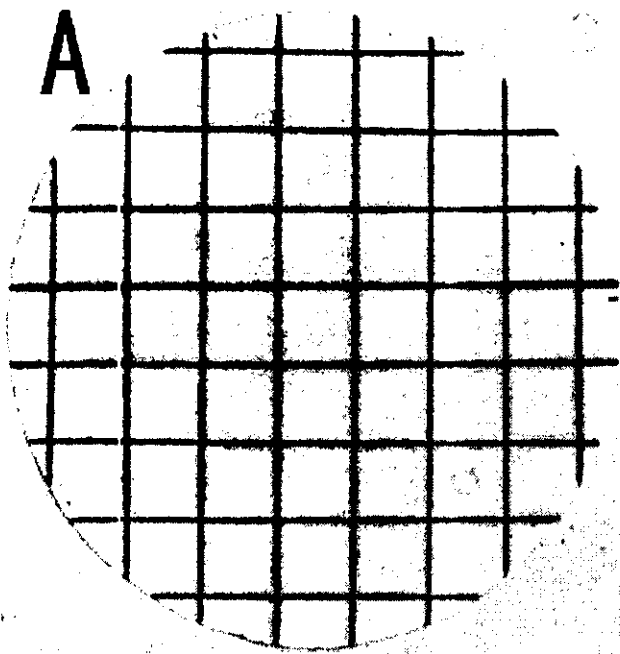


图 2