

免疫磁気ビーズ法による腸管出血性大腸菌O26の検査法の検討

池田嘉子¹・椿本 亮¹・財津修一¹・石北隆一¹

Trial for Isolation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 by an Immunomagnetic Separation Method

Yoshiko IKEDA, Makoto TSUBAKIMOTO,
Syuichi ZAITSU and Ryuichi ISHIKITA

要 旨

市販の抗家兎IgG抗体磁気ビーズと市販の血清型別診断用免疫血清病原大腸菌O26を用い、抗大腸菌O26抗体磁気ビーズを簡易的に作成し、免疫磁気ビーズ法による腸管出血性大腸菌O26の分離を試みた。

腸管出血性大腸菌O26を添加した食品の増菌培養液を用いたモデル実験では、免疫磁気ビーズ法を用いた場合は用いない場合と比較して有意に菌の分離ができた。また、福岡市内の保育所で発生した集団発生事例において園児および患者家族検便に応用したところ、直接塗抹培養法および通常の増菌培養法では分離できなかった健康保菌者からも腸管出血性大腸菌O26の分離ができ本法が有用と考えられた。

Key Words : 腸管出血性大腸菌O26 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26,
免疫磁気ビーズ法 Immunomagnetic Beads Separation

I はじめに

腸管出血性大腸菌(以下EHEC)O26はO157について多いEHECであり、集団発生等も見られる。O157については検査用の試薬やキット等が多数発売されており、免疫磁気ビーズ法(以下IMS法)も広範囲に利用され効果を発揮している¹⁾が、O157以外のEHECについては、特別な試薬やキット等がないのが現状である。そのため特異的に鑑別のできる培地のないEHEC O26を検査する場合は数多くのコロニーについて検査を実施しなければならない。そこで、市販の抗家兎IgG抗体磁気ビーズと市販の血清型別診断用免疫血清病原大腸菌O26を用い簡易的に抗大腸菌O26抗体磁気ビーズを作成し、EHEC O26の分離を試みたところ良好な結果が得られたので報告する。

II 材料および方法

1. 抗大腸菌O26抗体磁気ビーズの作成方法

抗家兎IgG抗体磁気ビーズ(M-280 Sheep anti-Rabbit IgG DYNABEADS)20 μ lをPBSにて2回洗浄し、血清型別診断用免疫血清病原大腸菌O26(デンカ生研)100 μ lを加え攪拌、5 $^{\circ}$ Cで18時間放置後、PBSにて5回洗浄し、PBS20 μ lに懸濁作成した。

2. IMS法によるEHEC O26の分離法

食品および糞便の増菌培養液1mlに上記の方法で作成した抗大腸菌O26抗体磁気ビーズ20 μ lを加え、室温で20分攪拌後、0.05%Tween20加PBSで3回洗浄、100 μ lに懸濁し分離平板に塗抹した。

1. 福岡市保健環境研究所 微生物課

3. EHEC O26を添加した食品増菌培養液からのIMS法による分離

牛肉および弁当をノボピオシン加m-EC培地で42℃18時間増菌培養した液に、 $1.1 \times 10^2 \sim 10^6$ コ/mlの濃度になるようEHEC O26菌液（患者由来EHEC O26; H11 VT1+, m-EC培地42℃18時間培養）を加えモデル培養液を調整し、平板に塗抹した場合（以下培養液塗抹法）とIMS法での菌の分離状況を比較した。分離平板は亜テルル酸加ソルビトールマッコンキー平板（以下TSMAC平板）およびDHL平板を用いた。

なお、各平板の典型的なコロニーを5個釣菌し、血清型別でO26と判明したコロニー数が4~5個の場合○、1~3個の場合△、0個の場合×と判定した。

4. 集団発生事例における患者家族検便への応用

平成9年7月に福岡市内の保育園で発生したEHEC O26の集団発生事例において園児および患者家族検便（延473検体）へ応用した。

便は、まずCAYE培地で振とう培養後RPLA法でペロ毒素の産生をスクリーニングした。ペロ毒素の産生性を確認した検体について、便および増菌培養液を平板に塗抹し、EHEC O26の分離を試みた。その後、EHEC O26を分離できなかった検体はIMS法を用い分離を試みた。

III 結 果

1. EHEC O26を添加した食品増菌培養液からのIMS法による分離

表1に示すとおり牛肉の増菌培養液の場合、IMS法ではTSMAC平板で添加菌量 1.1×10^3 コ/mlまで分離可能であったが、培養液塗抹法では 1.1×10^5 コ/ml以上の菌量を必要とした。同様にDHL平板ではIMS法は 1.1×10^4 コ/ml、培養液塗抹

表1 EHEC O26を添加した食品増菌培養液からのIMS法による分離結果

増菌培養液中の菌量 (コ/ml)	牛肉の増菌培養液に添加した場合				弁当の増菌培養液に添加した場合			
	IMS法		培養液塗抹法		IMS法		培養液塗抹法	
	TSMAC	DHL	TSMAC	DHL	TSMAC	DHL	TSMAC	DHL
1.1×10^6	○	○	△	△	○	○	○	○
1.1×10^5	△	○	△	△	○	○	△	△
1.1×10^4	△	△	×	×	○	○	△	×
1.1×10^3	△	×	×	×	△	×	×	×
1.1×10^2	×	×	×	×	△	×	×	×

典型的なコロニーを5個釣菌し、4~5個がO26の場合○、1~3個の場合△、0個の場合×

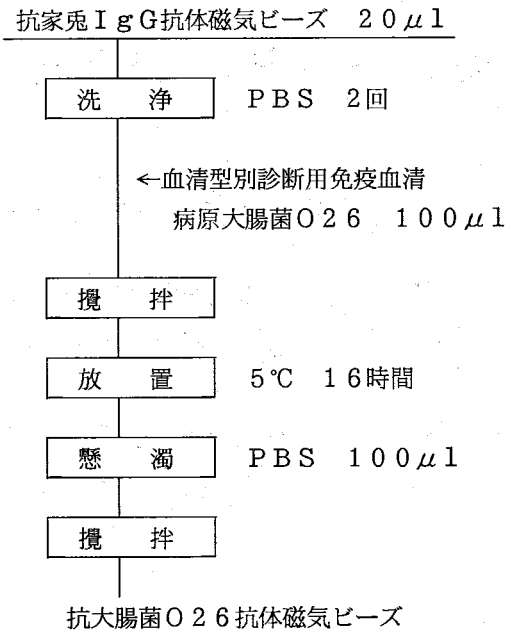


図1 抗大腸菌O26抗体磁気ビーズの作成方法

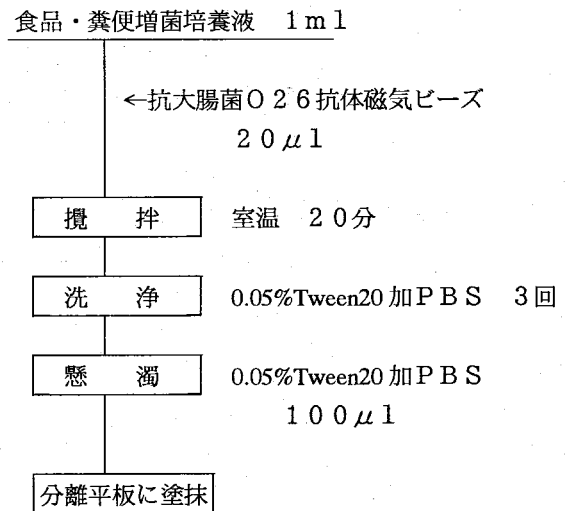


図2 IMS法によるEHEC O26の分離法

法は 1.1×10^5 コ/mlであった。

また、弁当の増菌培養液の場合でも、IMS法ではTSMAC平板で添加菌量 1.1×10^2 コ/mlまで分離が可能であったが、培養液塗抹法では 1.1×10^4 コ/ml以上の菌量を必要とした。DHL平板では、IMS法で 1.1×10^4 コ/ml、培養液塗抹法では 1.1×10^5 コ/mlであった。

いずれの場合もIMS法を用いた方が有意にEHEC O26を分離することが可能であった。

2. 集団発生事例における患者家族検便への応用

473検体中44検体がベロ毒素産生性が確認され、43検体は直接塗抹培養法および通常の増菌培養法で分離できた。残り1検体はIMS法を用いることによって分離できた。

IV まとめ

EHECは少ない菌量で感染すると言われているが、特別のキットや試薬のないO157以外のEHECを汚染菌量の少ない食品や健康保菌者から分離することは難しかった。しかし、今回の方法は市販の抗家兎IgG抗

体磁気ビーズと市販の血清型別診断用免疫血清を用い、比較的簡易な操作で抗大腸菌O26抗体磁気ビーズを作成でき、EHEC O26を添加した食品増菌培養液を用いたモデル実験でも比較的少ない菌量まで分離できた。

また、福岡市内の保育所で発生した集団発生事例で患者家族検便に応用したところ、直接塗抹培養法および通常の増菌培養法では分離できなかった健康保菌者からもEHEC O26を分離することができ、本法が大変有用と思われるが、今後さらに応用例数を増やし検討する必要がある。

さらに、EHEC O26に限らず、広く患者由来菌株と同じ血清型菌を原因食品から分離する際等にも応用が期待できるものと考えられる。

文 献

- 1) 浅井良夫 他：免疫磁気分離（IMS）法による腸管出血性大腸菌O157の検出。感染症学雑誌1997;71:46-55