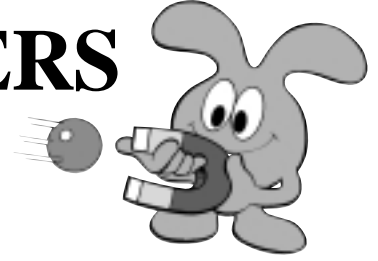


DYNABEADS LETTERS



免疫磁気ビーズを用いた特定のK serotypeをもつ *Vibrio parahaemolyticus* の選択的増菌法 (集団食中毒事件における、原因食品の特定)

神戸市環境保健研究所

友保 孝洋

1. 目的

V. parahaemolyticus の食中毒事件では、食中毒患者ふん便から分離される *V. parahaemolyticus* 株の K serotype と推定原因食品から分離される *V. parahaemolyticus* 株の K serotype とはほとんどの場合一致しない。食中毒の原因究明のためには、患者から分離されたものと同じ Serotype の *V. parahaemolyticus* 株を食品中から分離することが是非とも必要である。

この目的のために、*V. parahaemolyticus* の特定の K serotype に選択的な増菌法を、ダイナビーズを用いて開発した (Immunomagnetic Enrichment Method Selective for *V. parahaemolyticus* Serotype K ; IEM) (文献 1. 参照)

この方法 (IEM) を実際の食中毒事件に適用したところ、患者から分離されたものと同じ K serotype をもつ *Vibrio* 株が原因食品と推定された食べ物から高頻度に分離でき、汚染源の特定のために非常に有効な方法であることが示された。これらの菌株は、これまでの方法を用いては、分離できなかったものである。

2. 原理

この選択的増菌法 (IEM) を用いるためには、食中毒患者ふん便から分離された *V. parahaemolyticus* 株の K serotype があらかじめ解かっていることが必要である。ここでは仮に患者の Serotype は K3 とする。この K3 serotype の *Vibrio* を原因食品の中に見いだすために Rabbit anti-K3 antibody を食品の増菌培養液に添加してこの K 抗原をもつ *Vibrio* を感作 (sensitize) する。次に Sheep anti-Rabbit immunoglobulin G で覆われた (coat された) Dynabeads を添加し、感作された *Vibrio* を Beads 上に抗原抗体反応により結合させる。Dynabeads は Fe_2O_3 を含んでいるので、この Dynabeads-*Vibrio* 複合体は磁石により容易に分離回収することができる。回収した Beads を *Vibrio* 増菌用液体培地に移し、K3 serotype を持つ *Vibrio* の菌数を増やす。*Vibrio* 選択用寒天培地に撒き、成長してきた Colony を分離し、anti-K3 antibody を用いて Serotype を同定する。

3. 用意する材料および機器

腸炎ビブリオ型別用免疫血清 : K 型血清セット (デンカ生研)

Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG

Magnetic particle concentrator : DYNAL MPC-1

Phosphate-buffered Saline (PBS : 0.01M , pH7.2) (食品1検体につき 約35 ml 必要)

Polymyxin broth , Thiosulfate citrate bile salt (TCBS) agar plates (日水製薬)

Escherichia coli K-12 ; Heart infusion broth (10 ml , Difco Laboratories) 中での Overnight culture (約 10^9 cells/ml) , 食品1検体につき 0.5 ml 用いる。

その他 ; 卓上遠心器、ディスポーザブル・スピッツ遠心チューブ、濾紙を敷いたプラスチックシャーレ、Vortex mixer、アルミキャップ付き滅菌小試験管 (15 × 105 mm) 等。

4. 検査法

- 1) 推定原因食品を Polymyxin broth に入れ、37℃、17-20 時間 *Vibrio* の増菌培養を行い、培養液の白金匙を TCBS 寒天培地に撒く (streak する)。この培養液は、一時冷蔵庫に保存しておき、翌日 TCBS 寒天培地上に青緑色の *V. parahaemolyticus* と思われる、特徴的なコロニーを生じた培養液を、新しい Polymyxin broth (2 ml) に接種する^a。
 - ^a この時、別に Heart infusion broth (10 ml) を用意し、*E. coli* も接種し培養しておく。
食品の Polymyxin broth 増菌培養は、20% Dimethyl sulfoxide (vol/vol) を含む等量の Polymyxin broth を加えて -80℃ に保存しておき、後でこの保存 Sample を新しい Polymyxin broth に接種して IEM を行ってもよい。
- 2) この継代培養液 2 ml に、患者から分離された K serotype に相当する腸炎ビブリオ型別用 K 型血清 20 µl を加え、室温で 15-20 分間時々手で軽く攪拌しながら Incubate する。
- 3) *Vibrio* と結合していない Free の抗体を除くため、Phosphate - buffered saline (PBS) を加え、2 回遠心して洗う (8 ml, 10 min, 3,500 rpm)^b。沈殿に 0.2 ml の PBS を加えて Vortex mixer で再懸濁する。
 - ^b ディスポーザブルのスピッツ・プラスチックチューブを用い、遠心上清は、オスバン液入り容器にデカント (decant) する。遠心チューブの管口に付いた Buffer は、プラスチック・シャーレに敷いた濾紙に吸い取らせる。
 - ^c 沈殿が懸濁液になりにくい場合は、ピペットの先端等で強引に押し潰して、できるだけきめ細かな懸濁液にする。
- 4) 遠心を行っている間に、Dynabeads (10 µl) を小試験管にいれ、*E. coli* 培養 0.5 ml を加え、15-20 分間室温で incubate する。4 ml の PBS を添加し、軽く (1 秒間程度) Vortex した後、MPC-1 (マグネット) にセットする。約 1 分間 Beads を磁石に吸着させた後、溶液をデカントする。
 - ^d *E. coli* 処理により、Dynabeads への *Vibrio* の非特異的吸着を、実用的レベルまで抑制できる。Beads に吸着している *E. coli* は、Polymyxin broth 中では、殆ど増殖せず TCBS 寒天平板上では Colony を作らない。
- 5) (3) で用意した感作 *Vibrio* 懸濁液 (0.2 ml) をこの *E. coli* 処理 - Dynabeads に加え混合し、15-20 分間室温で時々手で軽く攪拌しながら Dynabeads と感作 *Vibrio* とを反応させる。
- 6) 4 ml の PBS を加え軽く vortex し、MPC-1 にセットし、(4) と同様にデカントして、Dynabeads に吸着していない Bacteria を洗い流す。この操作を 4 回繰り返す^e。
 - ^e あらかじめ 4 回分の洗浄用 PBS, 16 ml を滅菌試験管に分注しておくとも便利である。
- 7) Polymyxin broth (4 ml) を加え、37℃ で培養し選択した *V. parahaemolyticus* を増殖させる。TCBS 寒天平板に streak し、生育してきた Single colony (5-10 個) を TSI (Triple sugar iron agar slant) に分離培養する。
- 8) TSI での *V. parahaemolyticus* の特徴的生育パターンを確認後、スライド凝集反応で、目的の Serotype を持つ *Vibrio* を探し出す。

5. 検出限界

V. parahaemolyticus は、菌株により Dynabeads への吸着能力が異なる。小数の細胞を含む "吸着能力の強い菌株 A (1.6×10^3 cells/ml)" と多数の細胞を含む "吸着能力の弱い菌株 B (4×10^9 cells/ml)" の細胞混合液をもちいて、菌株 A を選択する IEM を行った時、この A 菌株は B 菌株の 3000 倍以上も濃縮できる。逆に多数の "吸着能力の強い菌株 A (1.2×10^9 cells/ml)" の存在下で、小数の "吸着能力の弱い菌株 B (3.9×10^5 cells/ml)" を選択する IEM では、菌株 B は菌株 A の 100 程度の濃縮にとどまる。従って IEM を適用する Polymyxin broth 培養ごとに、混ざり合った *Vibrio* の種々の Serotype の菌株及びそれらの菌数が異なるため、検出感度は変動する。¹⁾

6. 予備実験

このIEM を食中毒の検査に適用する前に、試薬およびテクニックの確認のため、以下の予備実験をお勧めします。K serotype の解かっている 2 種類の *V. parahaemolyticus* 菌株を用意する。Overnight 培養後、一方の培養液10 ml に、他方の培養液 0.1 ml を混ぜて、二つの菌株の濃度比が約1 対 100 になるように細胞混合液を作成する。小数の *Vibrio* を選択するIEM を行い、うまく目的の serotypeをもつ *Vibrio*を濃縮して回収できることを確かめる。

7. 文献

- 1) Tomoyasu . T.(1992)Development of the immunomagnetic enrichment method selective for *Vibrio parahaemolyticus* serotype K and its application to food poisoning study .
Appl . Environ . Microbiol. 58 : 2679-2682

発行元

 **日本タイナル**
株式会社

お問合せは

日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL(03)5593-3211(代) FAX(03)5593-3216