

再循環免疫磁気ビーズ法 (Pathatrix™) による 糞便中のサルモネラ検出

勝 田 賢 (農研機構 動物衛生研究所)

Katsuda, K. (2010). Development for the detection of salmonella in fecal samples using flow-through immunocapture (Pathatrix™)

ALL about SWINE 36, 19-23

1. はじめに

ご存知のようにサルモネラは、公衆衛生上とても重要な細菌です。サルモネラを原因とする食中毒の発生件数や患者数はともに毎年上位にランクされ、食中毒の約10%に本菌が関与しています。サルモネラ食中毒の原因食品として、豚肉、牛肉、乳製品、鶏肉、魚介類、鶏卵などが挙げられます。畜産環境からサルモネラを根絶すれば畜産食品を原因とするサルモネラ食中毒はなくなるのですが、畜産環境中のサルモネラを完全に制御することは現在の技術水準では困難と考えられます。このためフードチェーンの出発点である生産現場において保菌率や汚染率の低減化を図ることが現実的と考えられます。

養豚では感染豚が糞便中にサルモネラ菌を排出することから環境や枝肉などの汚染源となります。サルモネラに感染して臨床症状を呈する豚は、糞便1グラム当たり $10^6 \sim 10^7$ 個を排菌することが報告されています。一方、不顕性感染豚の排菌量は、糞便1グラム当たり10個以下と非常に少量な場合もあります。サルモネラはその重要性から種々の培養法が報告されており、変法半流動 Rappaport-Vassiliadis (MSRV) 法のよう

に1グラム当たり10個以下と非常に少量の菌量でも検出可能な方法も存在します。しかし、培養法一般に言えることですが判定までに5~7日程度必要とし、また、煩雑な操作が必要とされます。このため簡便・迅速・高感度に検出可能な手法の開発が求められています。本稿では、サルモネラ検出の新技術として再循環免疫磁気ビーズ法 (Pathatrix™) の概要と豚の糞便からの検出結果について紹介したいと思います。

2. 免疫磁気ビーズ法と再循環免疫磁気ビーズ法

免疫磁気ビーズ (IMS) 法は、増菌培養液や乳剤中から検出対象とする微生物を濃縮する方法です。IMS法は、磁性高分子ポリマービーズ (磁気ビーズ) に特異抗体を結合させたもので、培養液中に存在する対象微生物を抗原抗体反応により効率に吸着・集菌することが出来ます。回収した磁気ビーズを選択分離培地で培養し対象病原体を検出します。IMS法を行うことで検出率が向上することが報告されていますが、本法で分析可能なサンプル量は1ml以下とされています。一方、再循環免疫磁気ビーズ (FTI) 法では、最大250mlのサンプルを分析することが可能な方法です。

FTI 法では、サンプルを循環させることで大容量の解析を可能とし、サンプル中に存在するターゲット病原体を効率的に補足することを可能としたシステムです (図1. FTI system (Pathatrix™) の模式図)。サンプルの一部を分析するよりも、全体を分析すれば検出率が向上すると考えられます。特に、糞便のような材料を用いる場合は、糞便中の共在菌もビーズに結合し、バックグラウンドが上昇することから、FTI のように大容量のサンプルを濃縮可能な手法は対象病原体を効率に補足できると考えられます。

FTI のワークフローを図解しました (図2)。FTI system では、効率的に5検体を同時に分析

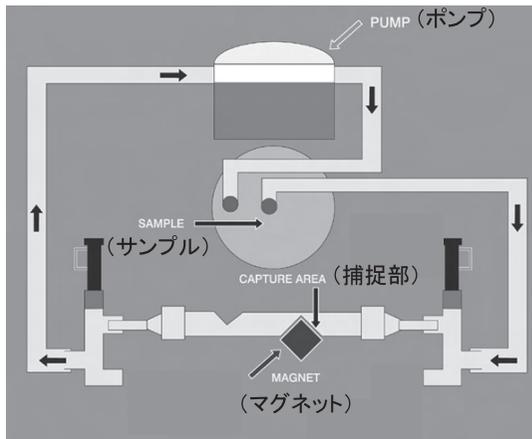
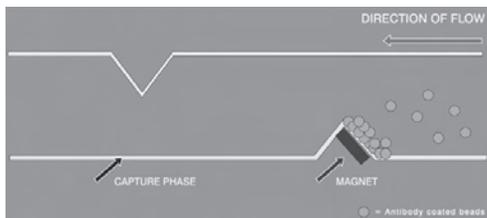
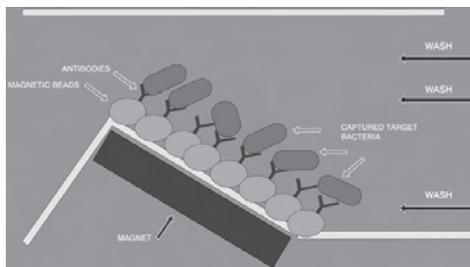


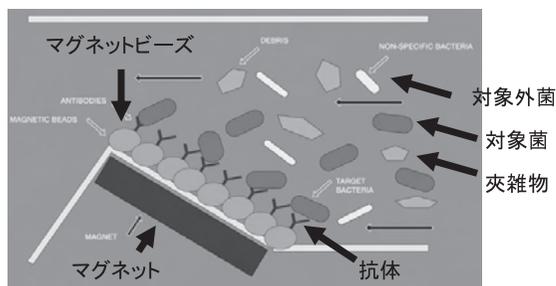
図1. 再循環免疫磁気ビーズ (Pathatrix™) の模式図
Matrix MicroScience Ltd, UK
(www.matrixmsci.com/pathatrix.htm)



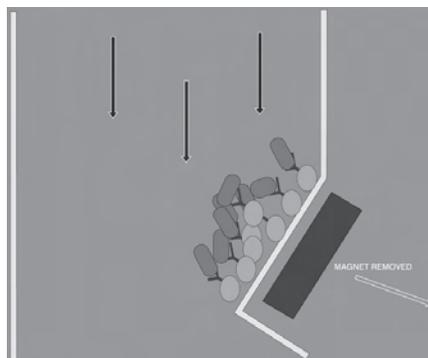
①抗体コーティング磁気ビーズの補足



③磁気ビーズと細菌の混合物を洗浄



②サルモネラの磁気ビーズによる補足
(30分間のサンプル循環)



④磁気ビーズと細菌の混合物を溶出

図2. 再循環免疫磁気ビーズ法のワークフロー
Matrix MicroScience Ltd, UK
(www.matrixmsci.com/pathatrix.htm)

再循環免疫磁気ビーズ法 (Pathatrix™) による糞便中のサルモネラ検出

でき、サンプルのセットから磁気ビーズと細菌の混合物の溶出までも 50 分程度と短時間です。溶出した磁気ビーズと細菌の混合物を 50 ~ 100 μ l の滅菌 PBS などに再浮遊させて、選択培地での培養や PCR 法での検出に用います。

3. 豚糞便からのサルモネラの検出

3-1. 検出方法

豚糞便に段階希釈したサルモネラ菌液 (*Salmonella* Infantis, *S. Anatis*, *S. Typhimurium*) を加え、FTI 法、培養法、Real-time PCR 法を比較した成績を紹介したいと思います。図 3 に今回比較したサルモネラの検出方法を示しました。培養法は MSR/V と Rappaport-Vassiliadis (RV) 法の 2 法を実施しました。MSR/V 法は ISO6579 に準じて行

いました。FTI 法は溶出した磁気ビーズと細菌の混合物をサルモネラの選択培地である XLD 培地で培養する FTI-XLD 法と溶出した磁気ビーズと細菌の混合物から DNA を抽出して PCR を行う、FTI-PCR 法の 2 通りで行いました。また、real-time PCR 法は前培養液から直接 DNA 抽出を行い、real-time PCR の市販キット (TaqMan *Salmonella enterica* Detection Kit) を用いて行いました。PCR 以外の方法では、培地上のサルモネラ様のコロニーをクローニング後、生化学性状および血清学的性状で同定しました。

3-2. 検出結果

各検出方法による結果を表 1 に示しました。*S. Infantis* または *S. Anatis* を加えた糞便では、RV

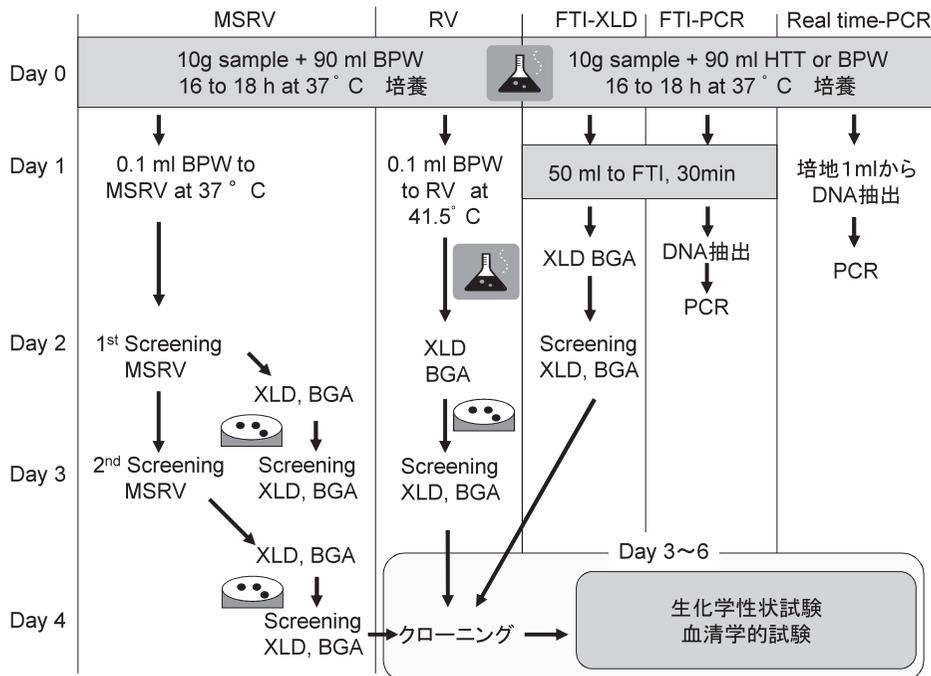


図 3. 糞便からのサルモネラ検出方法のチャート図

表 1. 豚糞便からのサルモネラ検出結果

| サルモネラの 血清型 | cfu/g | 検出方法 | | | | |
|------------------------|---------------------|---------------------|-------|---------|---------|------------------|
| | | MSRV | RV | FTI-XLD | FTI-PCR | real-time PCR |
| <i>S. Infantis</i> | ≥ 100 ¹⁾ | 30/30 ²⁾ | 25/30 | 30/30 | 30/30 | 30/30 |
| | 10 | 10/10 | 0/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| | 1 | 8/10 | 0/10 | 10/10 | 9/10 | 3/10 |
| | - ³⁾ | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| <i>S. Anatis</i> | ≥ 100 | 30/30 | 30/30 | 30/30 | 30/30 | 30/30 |
| | 10 | 10/10 | 3/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| | 1 | 8/10 | 0/10 | 10/10 | 8/10 | 4/10 |
| | - | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| <i>S. Typhimurium</i> | 100 | 30/30 | 20/30 | 30/30 | 30/30 | 30/30 |
| | 10 | 10/10 | 0/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| | 1 | 6/10 | 0/10 | 9/10 | 9/10 | 3/10 |
| | - | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| 陽性数 (TP) | | 142 | 78 | 149 | 146 | 130 |
| 陰性数 (TN) | | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| 偽陽性 (FP) | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 偽陰性 (FN) | | 8 | 72 | 1 | 4 | 20 |
| 精度 (AC) ⁴⁾ | | 95.6 | 60.0 | 99.4 | 97.8 | 88.9 |
| 感度 (SE) ⁵⁾ | | 94.7 | 52.0 | 99.3 | 97.3 | 86.7 |
| 特異性 (SP) ⁶⁾ | | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |

1) 100cfu, 1000cfu, 10000cfu 各 10 回の試験結果をまとめて記載

2) 陽性数 / 検査回数

3) サルモネラ添加せず

4) $AC = (TP + TN) / (TP + TN + FP + FN)$

5) $SE = TP / (TP + FN)$

6) $SP = TN / (TN + FP)$

法と real-time PCR 法以外の方法で 1cfu/g と非常に少量のサルモネラを検出可能でした。S. Typhimurium については FTI-XLD と FTI-PCR では、1cfu/g のサルモネラを加えた場合でも 10 回中 9 回と高率に検出可能でした。しかし、MSRV 法では 10 回中 6 回と検出率の低下が認められました。MSRV 法で S. Typhimurium の検出率が低下した理由はよくわからないのですが、特定のフェージタイプの S. Typhimurium の MSRV 法での分離率が低下することが報告されています。た

だし、今回用いた株のフェージタイプは特定していません。各検出方法の精度、感度、特異性は、表の下欄に示した式により計算しました。FTI-XLD 法の精度と感度がそれぞれ、99.4%と 99.3%と最も高い値を示し、FTI-PCR 法の精度と感度は、それぞれ 97.8%と 97.3%と 2 番目に高い値を示しました。3 番目は MSRV 法で、精度と感度はそれぞれ 95.6%と 94.7%でした。RV 法と real-time PCR 法の精度と感度は、それぞれ 60.0%～88.9%と 52.0%～86.7%と低値を示しました。

4. まとめ

FTI (FTI-XLD と FTI-PCR) 法や MSRV 法は、非常に高い精度と感度を有しており、糞便 1 グラム中 1 個と少量のサルモネラを糞便から検出することが可能でした。特に、FTI-PCR 法は、今回検討した方法の中では最も迅速な方法で、培養開始後 20 時間以内に結果が得られます。これは FTI 法による検出対象病原体の濃縮と糞便や培養液中に含まれる PCR 阻害物質の除去効果によると考えられます。

FTI 法は、もともと食品をターゲットとして開発された病原微生物検出システムです。今回の成績は、本システムが糞便のような食品以外にも応用でき、サルモネラを検出する際には非常に有効

なツールになることを示しています。

5. おわりに

わが国では豚のサルモネラ抗体保有率も十分にわかっていない状況にあります。このため農場のサルモネラ汚染の一次スクリーニングを菌分離・検出で実施することは、コストや労力から考え割が合わないと考えられます。本稿で紹介した検出方法は、抗体検査等の一次スクリーニング検査で高度汚染と判定された農場におけるサルモネラの分離・検出に威力を発揮すると考えられます。最後に Pathatrix™ に関する図表を提供していただいたプライムテック株式会社の関係者に深謝いたします。