

酵素抗体法による病原性 *Yersinia enterocolitica* の同定

山口県衛生公害研究センター (所長: 宮村恵宣)

富田正章・松崎静枝・片山 淳
遠藤隆二

Enzyme Immunoassay for Identifying the Virulence Plasmid-Harboring *Yersinia enterocolitica*

Masaaki TOMITA, Shizue MATSUSAKI, Atsushi KATAYAMA
Ryuji ENDO

Yamaguchi Prefectural Research Institute of Health (Director: Dr. Shigenori MIYAMURA)

はじめに

Yersinia enterocolitica はヒトの急性腸炎の原因菌の一つであり、近年ヒトの感染症例の増加が指摘されている。*Y. enterocolitica* の病原性は約70kbのプラスミドの保有に依存している³⁾。このプラスミドを保有する菌株の性状は、培養温度により異なり、菌体が37°Cで培養されたときに、カルシウム依存性⁵⁾、自発凝集性¹³⁾、血清抵抗性¹¹⁾、タンパク質の合成^{2, 6)}などが報告されている。しかし、30°C以下で培養されたときはこれらの性状は認められない。

病原性プラスミド保有 *Y. enterocolitica* を非病原性株と区別する方法としては、一般的にカルシウム依存性試験と自発凝集性試験が用いられている。この他に、プラスミド依存性特異抗原の検出⁹⁾、DNA hybridization^{10, 12)}、PCR¹⁴⁾なども最近報告されている。このうち、DNA hybridizationやPCR法は経費を要したり、特別な機器を必要とするなど簡便な方法とはいえない。

プラスミド依存性特異抗原を検出する方法としてはKanekoら⁹⁾の報告がある。彼らは酵素抗体法により病原性 *Y. enterocolitica* が同定出来ることを報告した。しかし、この方法は、プラスミド

依存性特異抗原を発現させる操作がやや煩雑である。

そこで酵素抗体法を用いて、より簡便な方法で病原性 *Y. enterocolitica* を同定する方法を検討した。

材料と方法

菌株: 被験菌株として、病原性プラスミド保有 *Y. enterocolitica* のうち血清型0:3 生物型3B, 血清型0:3 生物型4, 血清型0:5, 27 生物型2を各1株とこれらの株のプラスミド脱落変異株を各1株、抗血清の作製のために *Y. pseudotuberculosis* 血清型0:2bを1株用いた。実験に用いたこれらの菌株のうち *Y. enterocolitica* 血清型0:5, 27と *Y. pseudotuberculosis* 血清型0:2bは島根県衛生公害研究所福島博博士から分与された菌株を用いた。*Y. enterocolitica* 血清型0:3 生物型3B及び血清型0:3 生物型4の2株は当所で、豚の腸内容物から分離された株を用いた。これらの菌株は自発凝集性試験、カルシウム依存性試験、約70kbのプラスミドの保有について確認した。

自発凝集性試験: 自発凝集性の判定は、各菌株をトリプトソイブイオン(日水製薬)でそれぞれ

37°C及び25°Cで1夜培養を行った。37°Cで菌体に凝集を認め、25°Cでは凝集が認められず均一な発育を示した場合を陽性と判定し、いずれの培養温度においても均一に発育し、凝集しない場合を陰性と判定した。

カルシウム依存性試験：Gemskiら⁵⁾の方法により実施した。

プラスミドDNAの検出：4mlのL brothで25°C、1夜培養後の菌体をKadoら⁶⁾の方法によりプラスミドDNAを調製した。プラスミドDNA試料は、0.8% agaroseでトリス・ホウ酸緩衝液(pH 8.3)を用い、100V、2時間泳動後、エチジウムブロマイド(0.5 µg/ml)で染色後、トランスイルミネーターにより観察した。

プラスミドの脱落変異株の分離：病原性プラスミド保有株をMOX寒天培地で37°C、1夜培養後、大型の集落をMOX寒天培地に37°Cで2回継代することによりプラスミド脱落変異株を得た。更に、この変異株は自発凝集性試験が陰性であることとプラスミドDNAを保有していないことを確認した。

免疫血清の作製：(1) 抗原：*Y.pseudotuberculosis* 血清型0:2bをブレインハート・インフュージョン(BHI)液体培地2mlに接種、25°C、1夜培養後、この2mlを40mlのBHI液体培地に接種し37°C、2時間、120rpmで振とう後、3000xg15分間遠心し集菌した。この菌体をBHI・MOX培地(BHI液体培地に20mM塩化マグネシウム、20mM 蔞酸ナトリウム、10mMブドウ糖を添加した培地)に接種し37°C、3時間、120rpmで振とう後、3000xg15分間遠心し集菌した。この菌体に1%ホルマリン加生理食塩水を添加し、最終菌液を約 2×10^9 /mlに調製し抗原菌液とした。

(2) 免疫血清の作製：抗原菌液に等量の Freund's complete adjuvantを加え ddY系マウスの腹腔内に0.1ml、1週間毎4回接種した。最終接種1週間後エーテル麻酔により採血し血清を分離した。血清は、免疫原に使用した菌株と同様に処理したプラスミド脱落変異株により吸収し、プラスミド依存性抗原に対する抗体を得た。

酵素抗体法：CFA液体培地⁹⁾に*Y.enterocolitica*

の各菌株を接種し、37°C、1夜培養した。この培養菌液50 µlをドットブロッキング装置を用いニトロセルロースメンブランフィルター(φ0.45 µm, アドバンティック東洋)で吸引、ろ過した。その後、菌体の吸着したニトロセルロースメンブランフィルターをクロロホルム蒸気で30分間殺菌処理した。ブロッキング処理は、5%ゼラチン添加TBST(20mMトリス、150mM NaCl、0.1% Tween20 (pH7.6))で50°C、1時間行った。抗原の検出は10000倍希釈した抗血清を用い室温で30分間反応を行った。その後の処理はプロテインブロッキング検出キット(アマーシャム、No. RPN65)の使用法に従って実施した。

結果及び考察

Y.enterocolitica はヒトの腸炎の原因菌として重要である。我が国における病原性株の分離例では、大多数が血清型0:3に属し、次いで0:5、27、0:9、0:8などが報告されている^{4,7)}。

一方、病原性プラスミドを保有しない非病原性株も自然界に多く分布している。このため分離された菌株が病原性プラスミドを保有しているか否かを判定するために、自発凝集性試験¹⁰⁾、カルシウム依存性試験⁵⁾、血清抵抗性試験¹¹⁾、実験動物に対する病原性試験¹⁾などが行われている。しかし、これらの検査方法は、単独ではプラスミドを保有しているか否かを判定するには特異性に問題がある。最近、Kanekoら⁹⁾は酵素抗体法(ドットプロット法)による病原性プラスミド保有 *Y.enterocolitica* と *Y.pseudotuberculosis* の同定方法を報告した。この方法は病原性プラスミドにより産生される抗原が検出できることから、病原性プラスミドの保有を確認する方法として特異性が高いと考えられる。彼らは、*Y.enterocolitica* の病原性プラスミドが産生する抗原に対する抗体を用い、MOX寒天上にメンブランフィルターを重層し、被験菌を37°C、3時間培養後、菌体を洗浄除去し、酵素抗体法の抗原用試料としている。しかし、この方法は、操作が煩雑で殺菌処理工程がない。

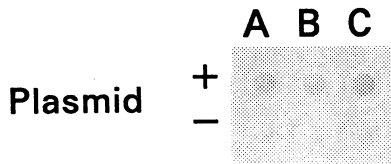


Fig.1 Detection of specific antigens produced by virulence plasmid-harboring *Y. enterocolitica* by the enzyme immunoassay

+ : plasmid-harboring strains,
- : plasmid-cured strains. A : serotype 0:3 biotype 3B, B : serotype 0:3 biotype 4, C : serotype 0:5, 27 biotype 2, respectively.

そこで、酵素抗体法(ドットプロット法)を用いて、病原性 *Y. enterocolitica* を同定するための迅速で、より簡便な方法について検討した。 *Y. enterocolitica* の病原性プラスミドは *Y. pseudotuberculosis* の病原性プラスミドとDNAの高い相同性を有し、プラスミド依存性抗原も免疫学的に交差性を持つことが報告されている^{2,6)}。そこで、病原性プラスミド保有 *Y. pseudotuberculosis* を免疫原とした抗血清を作製し、これを用いて病原性 *Y. enterocolitica* の同定を行った。

Y. enterocolitica の抗原としてはCFA液体培地で37°C、1夜培養し、ニトロセルロースメンブランフィルターでろ過しクロロホルム蒸気で殺菌したものを用いた。被験菌株としては我が国での分離頻度が最も高い血清型0:3の生物型3B、及び生物型4、と血清型0:5, 27生物型2を用いた。病原性プラスミド保有株とプラスミド脱落変異株の酵素抗体法による反応の結果はFig.1に示すとおりである。病原性プラスミド保有菌株にのみ反応が陽性であり、プラスミド脱落変異株には反応が認められなかった。このことは、病原性プラスミド保有 *Y. pseudotuberculosis* を免疫原として作製した抗血清は *Y. enterocolitica* の病原性プラスミドに依存した抗体と反応していると考えられる。なお、CFA培地の他にトリプトソイブイオンとブレインハートインフュージョンブイオンを用いて同様に反応を行ったが、これらの培地では非特異反

応がみられたので(データ省略)この反応系には適さないと考えられた。このプラスミド特異抗原の検出方法は、Kanekoら⁹⁾のメンブランフィルター上での培養法に比べ操作が簡易で、クロロホルムによる殺菌過程があるので安全性が高いと考えられる。また、培養菌液も50 µlで充分であり、マイクロタイター用のトレイで多数の被験菌を培養することも可能である。

これらのことから、今回検討した病原性 *Y. enterocolitica* の検出方法は操作性と特異性において優れていると考えられる。

要約

酵素抗体法(ドットプロット法)による病原性プラスミド保有 *Y. enterocolitica* の同定方法について検討した。抗血清は病原性プラスミド保有 *Y. pseudotuberculosis* を免疫原として作製し、被験菌として用いた *Y. enterocolitica* の抗原は、CFA液体培地で37°C、1夜培養しニトロセルロースメンブランフィルターでろ過後、クロロホルム蒸気で殺菌することにより調製した。被験菌株としては病原性プラスミド保有株のうち血清型0:3の生物型3Bと4、血清型0:5, 27生物型2の各1株及びこれらの菌株のプラスミド脱落変異株を各1株用いた。酵素抗体法(ドットプロット法)により病原性プラスミド保有株にのみ反応が認められたことから、この方法は、従来の検出方法に比べ操作性や特異性において優れている。

謝辞

本実験に用いた菌株を分与頂いた島根県衛生公害研究所の福島博博士に深謝します。

文献

- 1) Bakour, R. et al: J. Med. Microbiol. 19, 237~246(1985)
- 2) Bolin, I. et al: Infect. Immun. 48, 234~240(1985)
- 3) Evans, D. G. et al: Infect. Immun. 18, 330~337(1977)

- 4) Fukushima, H. et al: *Contribut. Microbiol. Immunol.* **9**, 103~110(1987)
- 5) Gemski, P. et al: *Infect. Immun.* **27**, 682~685 (1980)
- 6) Heesemann, J. et al: *Infect. Immun.* **54**, 561~567(1986)
- 7) Ichinohe, H. et al: *J. Clin. Microbiol.* **29**, 846~847(1991)
- 8) Kado, C. I. and Liu, S. T: *J. Bacteriol.* **145**, 1365~1373(1981)
- 9) Kaneko, S. and Maruyama, T: *J. Clin. Microbiol.* **27**, 748~751(1989)
- 10) Miliotis, M. D. et al: *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1667~1670(1989)
- 11) Pai, C. H. and Destephano, L: *Infect. Immun.* **35**, 605~611(1982)
- 12) Robins-Browne, R. M. et al: *J. Med. Microbiol.* **19**, 297~308(1985)
- 13) Skurnik, M. et al: *J. Bacteriol.* **158**, 1033~1036(1984)
- 14) Fenwick, S. G. and Murray, A: *Lancet.* **337**, 496~497(1991)