第 36 回麻布環境科学研究会　一般学術講演 9

自家調製免疫磁気ビーズ作製法の検討

○尾畑　浩魅[1]，高橋　正樹[2]，河村　真保[1]，山本　浩平[2]，山梨　敬子[1]，
小西　典子[1]，平井　昭彦[1]，甲斐　明美[2,3]，貞升　健志[1]

[1] 東京都健康安全研究センター 微生物部，[2] 元東京都健康安全研究センター 微生物部，
[3] 公益社団法人日本食品衛生協会

【目的】増菌培養液等から対象菌を濃縮する方法である免疫磁気ビーズ法は厚労省通知「食品からの腸管出血性大腸菌検査法」にも利用されており，欠かせない手法となっている。免疫磁気ビーズは数社より販売されているが，細菌分離用としては腸管出血性大腸菌の 8 血清群とサルモネラおよびリステリアなど一部の菌種に限られているため，市販品がない血清群や他の菌種を検出したい場合はビーズを自家調製しなくてはならない。しかし，具体的な作製方法については，腸管出血性大腸菌（EHEC）検査・診断マニュアル（平成 24 年 6 月改訂，国立感染症研究所）に免疫磁気ビーズの作製方法の記載はあるが，反応時間が 4℃ 18 時間であるため当日使用するのは困難である。検査の迅速性の面からも，より短時間で簡便に免疫磁気ビーズを自家調製するための方法（感作する抗体量，反応温度，反応時間など）について，ソンネ赤痢菌を用いて検討を行った。

【方法】感作用ビーズ Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG（Dynal 社）250 μl をマイクロチューブ（1.5 ml 容）にとり，PBS/BSA でビーズを洗浄して上清を除去した。これに，赤痢菌免疫血清（デンカ生研）のソンネ赤痢菌Ⅰ相を 100, 50, 20, 10, 2, 1 μl 分取し PBS/BSA で総量 1 ml にしたものを各々加えて，室温で 2 時間混和しながらビーズに感作させ，血清量の異なる 6 種類のビーズを調製した。

ソンネ赤痢菌 12-181（国内由来株）を TSB 培地で 37℃ 18 時間培養後，同培地で 10 倍段階希釈して菌液（10^8 ～ 10^0 個 /ml）を調製した。各ビーズ 20 μl にこの菌液 1 ml を加え，常法により 100 μl に濃縮した後，その 10 μl を SS 寒天に分離して，どの菌数まで赤痢菌が検出されるのかを検討した。

【結果および考察】異なる血清量で感作させた 6 種類の免疫磁気ビーズを作製して集菌効果を比較したところ，血清量 100, 50, 20, 10，5 μl を感作させたビーズでは血清量との相関はなく，どのビーズでも 10^1 個 /ml まで検出可能であった。しかし，血清量 2 μl および 1 μl を感作させたビーズでは集菌能力が低下し，10^3 個 /ml 以上しか検出できなかった。このことから，ソンネ赤痢菌での検討ではビーズ 250 μl に対して血清 10 μl を感作すれば使用可能であることが示唆された。しかし，感作させる血清（菌種や血清群）によって抗体量（IgG 量）も異なることが推定されるため，血清の種類を増やして検討を行っている。今回は血清をビーズに感作するための温度は室温で，感作時間は 2 時間で行ったが，更に時間の短縮が可能か否かについて検討中である。

今回の検討により，市販血清を用いて簡便に免疫磁気ビーズを自家調製することが可能であったことから，これまで困難であった食品やふん便などの増菌培養液から目的とする菌の検出率向上につながると考えられた。