

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25年 5月 28日現在

機関番号： 1 0 1 0 1
 研究種目： 研究活動スタート支援
 研究期間： 2 0 1 1 ~ 2 0 1 2
 課題番号： 2 3 8 6 0 0 0 3
 研究課題名(和文) 環境水中の病原細菌の特異的検出・定量・分離技術の開発-汚染源の特定に向けて-
 研究課題名(英文) Detection, quantification, and isolation of *Escherichia coli* O157 by using flow cytometry and fluorescence-activated sorting
 研究代表者
 石井 聡 (ISHII SATOSHI)
 北海道大学・大学院工学研究院・助教
 研究者番号： 1 0 6 1 2 6 7 4

研究成果の概要（和文）：

近年、大腸菌O157:H7などの病原細菌が環境水に混入し、生鮮野菜などを通してヒトに感染するという事例が相次いで報告されている。これらの感染症を未然に防ぐためには、環境水中における病原細菌を早期に検出し、汚染源を特定・除去する必要がある。そこで本研究では、蛍光標識したO157抗体とフローサイトメトリによるセルソーティング(FCM-FACS)を用いて、大腸菌O157を特異的に検出し、分離する手法を構築した。分離後の細胞は培地で増殖させたのちO157であることを確認した。純粋培養株を用いた実験の結果、大腸菌O157と大腸菌K12を任意の割合で混合したサンプルからも大腸菌O157だけを高効率に分離することができた。環境水サンプルに本手法を適用するにあたっては、濾過および細胞の回収方法、懸濁物質の除去手法などを検討し、最適化した。その結果、大腸菌O157を比較的低濃度（10 cells/ml）接種した環境水サンプルからも病原体を特異的に検出・分離することができた。今後は非接種の環境水サンプルから病原体を検出・分離し、分離後の病原体を解析することによって、汚染源の特定につなげていきたい。

研究成果の概要（英文）：

Pathogenic bacteria in irrigation water may attach to vegetables and can cause foodborne diseases. For safe water and food supply, sources of pathogen contamination should be identified and removed. To identify the sources of pathogens, specific detection and isolation of live pathogens is necessary. The objectives of this study were to develop a method to specifically detect and isolate pathogenic bacteria from environmental water samples by using flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting (FCM-FACS). We used fluorescence-labeled anti-O157 antibodies to specifically detect *E. coli* O157 cells. Detected cells were individually sorted and grown in a medium in 96-well plates, and their identities were confirmed as *E. coli* O157. Even when the proportion of O157 cells in O157/K12 cell mixture was as low as 0.01%, we could specifically detect O157 cells. In addition, we could detect O157 cells present at 10 cells/ml in environmental water samples. Isolated cells can be used to identify their origins by comparing their characteristics to those in known-source *E. coli* O157 databases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木環境システム

キーワード：大腸菌O157、水系感染症、フローサイトメトリ、セルソーティング、FACS

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦を含む先進諸国において、大腸菌O157:H7を含む病原性大腸菌、サルモネラ、カンピロバクターなどは、毎年食中毒の病因物質の上位に入っている。上下水道整備による衛生環境の向上によって、飲料水を通じたこれら細菌性病原体による感染症はほとんど見られなくなったものの、病原体に汚染された水が間接的に食品汚染を引き起こしている可能性が指摘されている。例えば、2007年に北米を中心に流行し、死者まで出た大腸菌O157:H7の感染症はカリフォルニアで栽培されたハウレンソウによってアメリカ全土およびカナダに拡大した。また2008年には、メキシコ産の青トウガラシを媒体とするサルモネラ感染症が北米を中心に大きな問題になった。いずれのケースにおいても、灌漑水が病原体に汚染され、野菜に混入したものと考えられている。我が国においても、1996年に大阪堺市を中心に流行した大腸菌O157:H7による大規模感染症は、原因は特定されていないものの、汚染された灌漑水による野菜栽培が原因であろうと推測されている。これら病原細菌による大規模感染を未然に防ぐためには、灌漑水や土壌、野菜などにおける病原細菌を特異的に検出・定量し、汚染源を特定する必要がある。

(2) しかしながら、水を含む環境サンプル中から病原細菌を特異的に検出・定量することは困難である、というのが現状である。現在は、選択的培地を用いた培養法か、あるいは遺伝子マーカーを用いた培養非依存的手法が主流であるが、前者は時間と手間がかかるうえに定量的解析に難があり、後者は生菌と死菌の区別が困難であるという問題がある。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、環境水中の病原性大腸菌O157の生菌を蛍光抗体染色法及びフローサイトメトリー法を用いたセルソーティング(FCM-FACS)により特異的に検出し分離する手法を構築することを目的とした。

(2) 前培養を経ることなく環境サンプルから一細胞ずつ菌体を単離できれば、単離株のジェノタイピングにより識別された菌の由来を判定することができ、汚染源の流出防止措置、水利用法の制限といった対策が可能であると考えている。

3. 研究の方法

(1) 純粋培養株を用いた単離

非病原性の大腸菌O157:H7 LMG21756株（以下、O157）を37℃で一晩培養した後、新しい培地に接種して2時間培養したものをを用いた。対照菌として大腸菌K12 MG1655株（以下、K12）を同様に用意した。培養液を希釈しK12に対するO157の存在比が50%、10%、1%、0.1%、0.01%となるよう混合したサンプルを用意した。FITCで標識した抗O157抗体（Virostat）とAllophycocyanin(APC)標識キット（同仁化学）によりAPC標識を行った抗O157抗体による二重染色を行い、FCM分析に基づくセルソーティング（FCM-FACS）を行った。抗体染色によるO157陽性ゲート（図1）、及び大腸菌サイズと識別されるゲート（図2）を設定し両ゲートに入る粒子をソートした。ソートは96-wellプレートに入れた培地へ一細胞ずつ行われ、37℃で一晩培養した後、Sorbitol Macconkey Agar

(SMAC)培地に移植培養し、O157を判別した。分取したwellの数と培養後のO157コロニー形成数から分取の精度を算出した。

(2) 環境水へと接種した菌体の単離

河川水1Lへ 10^6 、 10^5 、 10^4 cells/mLのO157を1mL接種したのち、孔径0.22 μm のポリエーテルスルホン膜を用いて加圧濾過を行なった。濾過後の膜を0.1%ゼラチンPBS中に入れてボルテックス攪拌することで菌体の懸濁液を得た。懸濁液からNycodenz密度勾配遠心法により土粒子等の不純物を除去し、FCM-FACSにより96-wellプレートに入れた培地へ取り分け、(1)と同様の手順で分取の精度を算出した。

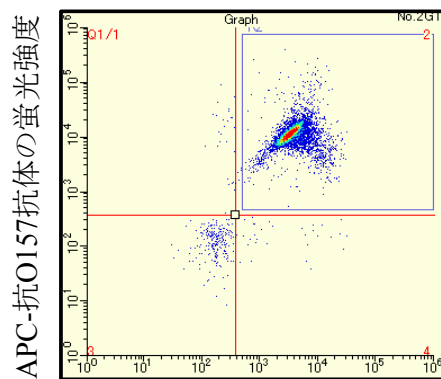


図1. FCM分析におけるO157陽性ゲート
青線で四角く囲った部分の粒子はFITC標識した抗O157抗体とAPC標識した抗O157抗体両方に反応しているため、O157陽性と判断した。

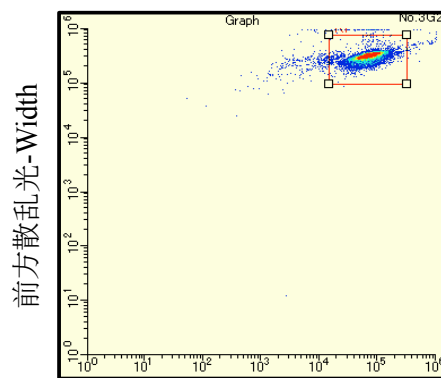


図2. FCM分析における菌体のサイズ
赤線で四角く囲った部分の粒子を菌体サイズと判断し、未反応の抗体と識別した。

4. 研究成果

(1) 純粋培養株を用いた単離

分取精度を(O157の増殖が確認できたWell数)/(分取したWell数)と定義し、O157の存在割合を変えたサンプル毎の結果を示した(図3)。この結果O157が0.01%という低濃度においても12.7%の精度で分取に成功した。この時のK12及びO157の濃度はそれぞれ 10^6 cells/mL及び 10^2 cells/mLであった。

(2) 環境水へと接種した菌体の単離

サンプル毎の分取精度を示した(図4)。表記の濃度は河川水へと添加後のO157濃度である。10 cells/mLで存在するO157サンプルからも濾過・濃縮・精製・FCM-FACSを行い25%の精度で分取に成功した。添加したO157の菌体数と単離されたO157の菌体数から求めた全体の回収率は0.1%であった。

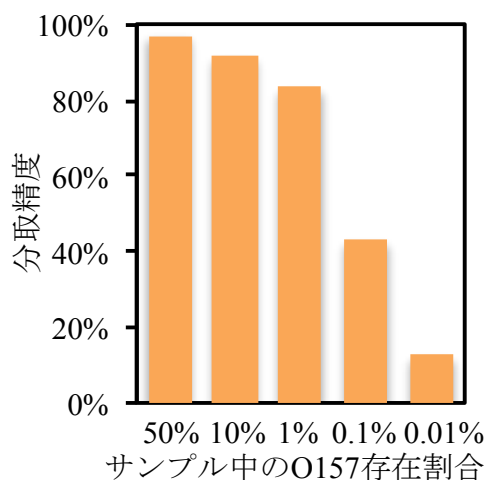


図3. O157、K12混合サンプルからの分取精度

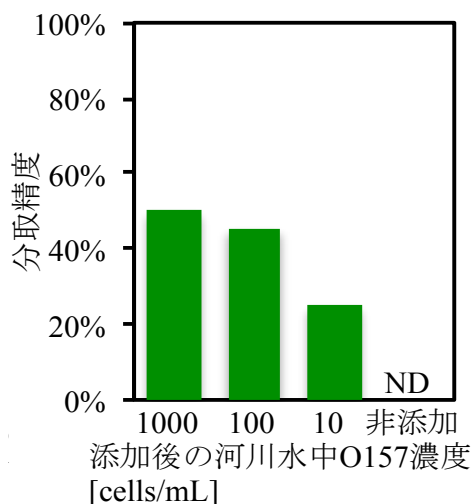


図4. O157を添加した河川水サンプルからの分取精度

(3) 結論

K12とO157を混合したサンプル及び河川水にO157を添加したサンプルからFCM-FACSによって低濃度のO157を特異的に単離できた。本手法は環境水にも十分適用可能な精度であると考えているが菌体回収率のさらなる向上が望まれる。

今後は数種類の大腸菌O157を混合したサンプルを用いて実験を行い、直接単離により菌体の多様性が保持されるか確認する予定である。将来的にはO157非接種の環境サンプルへと適用し、単離した後、DNAパターン解析により菌株間の比較を行うことで汚染源の特定をしていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計4件)

- ① 小澤就志、石井聡、岡部聡. フローサイトメトリーによる生きた病原性大腸菌O157の特異的検出および分離. 第46回日本水環境学会年会. 平成24年3月14日～16日. 東洋大学
- ② Ozawa, S., Ishi, S., and Okabe, S. Detection of enteropathogenic Escherichia coli O157 with flow cytometry. The 2nd Young Professors and Students Symposium of NSFC-JST Joing Resarch Program. Xi'an, P.R. China. Mar. 28th, 2012. Xi'an University of Architecture and Technology
- ③ Ozawa, S., Ishi, S., and Okabe, S. Detection, quantification and isolation of Escherichia coli O157 with flow cytometry and fluorescence-activated sorting. Japan and China Joint Symposium, Sustainable Sanitation and Environment and Human Health Risk Management. Sapporo, Hokkaido, Japan. Oct. 15th, 2012. Hokkaido University
- ④ 小澤就志、石井聡、岡部聡. 環境水中からのFCM-FACSを用いた大腸菌O157の単離手法の開発. 第47回日本水環境学会年会. 平成25年3月11日～13日. 大阪工業大学

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

研究室ホームページ

(<http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/water/>)にて
研究成果を公開

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 聡 (ISHII SATOSHI)
北海道大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号： 10612674

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし