ELISA kit「Locate」による食肉からの サルモネラ検出法の検討

楠 淳・伊藤 武

(東京都立衛生研究所 微生物部)

(受付 平成6年 9月 9日)

(受理 平成6年 11月 12日)

Comparison of the Commercial Locate Kit with Conventional Culture Method for the Detection of *Salmonella* in Raw Chicken

Jun KUSUNOKI and Takeshi ITOH

(Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health,
24-1 Hyakunincho 3-chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169)

The commercial ELISA kit (Locate) was compared with a conventional culture method for the detection of *Salmonella* in foods. The sensitivity of the ELISA kit was detection of 10^6 cells/ml of *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* and *S. Infantis* in pure culture. All of the 23 serovars of *Salmonella* tested gave correctly positive results, while the 7 strains of *C. freundii* gave correctly negative results.

Raw meat and liquid egg which had been inoculated with low levels of different serovars of *Salmonella* gave positive results by the kit and culture method. In 50 samples of raw chicken, the correlation between the ELISA kit and culture method was very high, 98.0%. An ELISA false negative result was obtained in one sample. *Salmonella* recovered from the enrichment broth was not reactive with the ELISA, because the organism was covered with mucoid substance. The ELISA kit was found to be a rapid screening method for the detection of *Salmonella* in food.

Key words: ELISA, *Salmonella*, Rapid method, Meat.

緒 言

サルモネラの鞭毛抗原を認識するモノクローナル抗体は各種血清型のサルモネラと反応するが、*Citrobacter freundii* などほかの腸内細菌とはほとんど反応しない特異性の高いものであることが明らかにされてきた。これらのモノクローナル抗体を応用し、食品からサルモネラを検出する各種の ELISA kit が開発されるに及んでいる^{4,6,7)}。これらのサルモネラ検出用 ELISA kit は米国の AOAC においてその実用性などが評価され、市販化されている。著者らもサルモネラの鞭毛抗原に対するモノクローナル抗体を応用した Bio-Enzabead kit[®] や Equate Rapid *Salmonella* ELISA kit[®] についてその有用性の検討を進め、各キットの検出感度、特異性、実用

性にそれぞれ特長があることを報告した。

従来の鞭毛抗原をターゲットとしたモノクローナル抗体ではなく、耐熱性細胞壁抗原を認識するモノクローナル抗体を応用した ELISA kit (Locate) が開発されたので、本法のサルモネラ検出に対する反応性や食品からサルモネラ検出に応用した成績について報告する。

材料および方法

1. サルモネラ検出用キット

マイクロトレイにサルモネラの耐熱性抗原に対する特異モノクローナル抗体が固相化された Locate (Rhône-Poulenc Inc. UK, モリテック株式会社取扱い) を用いた。

2. 供試菌株

本実験にはヒト下痢症患者から分離された *S. Typhi*-

Table 1. Sensitivity of the ELISA to the boiled and autoclaved cells of *Salmonella*

Serovar	Viable cells/ml	A ₄₅₀ under heat treatment	
		Boil, 20 min	121°C, 20 min
S. Typhimurium	1.2 × 10 ⁸	1.139	1.983
	1.2 × 10 ⁷	1.236	1.720
	1.2 × 10 ⁶	0.513	1.809
	1.2 × 10 ⁵	0.093	0.299
	1.2 × 10 ⁴	0.027	0.037
	1.2 × 10 ³	0.021	0.027
S. Infantis	1.1 × 10 ⁸	1.404	1.531
	1.1 × 10 ⁷	0.357	1.172
	1.1 × 10 ⁶	0.223	0.755
	1.1 × 10 ⁵	0.064	0.120
	1.1 × 10 ⁴	0.023	0.020
	1.1 × 10 ³	0.038	0.010
S. Enteritidis	9.9 × 10 ⁸	1.369	2.064
	9.9 × 10 ⁷	0.887	1.976
	9.9 × 10 ⁶	0.287	0.555
	9.9 × 10 ⁵	0.130	0.113
	9.9 × 10 ⁴	0.009	0.002
	9.9 × 10 ³	0.020	0.001

Positive control: A₄₅₀, 2.003.Negative control: A₄₅₀, 0.130.

murium 89-33 株, S. Enteritidis 89-98 株および S. Infantis 89-51 株の各菌株を供試した。そのほか、血清型が異なる 18 菌株のサルモネラおよび運動性陰性のサルモネラ 2 菌株, *C. freundii* の 7 菌株を本実験に使用した。

3. 供試食品

市販の鶏肉 50 件を実験に用いた。

4. ELISA による食肉からのサルモネラの検出法

試料の調整: 食肉 25 g を EEM ブイヨン (栄研化学) 225 ml に接種し, 35°C, 18 時間培養した。本培養液 0.2 ml をセレナイト培地 (日水製薬), ハーナーのテトラチオン酸塩培地 (日水製薬) にそれぞれ接種した。42°C, 18~24 時間培養を行い, その増菌培養液 1 ml をそれぞれ GN ブイヨン (Difco Laboratories) に接種し, 42°C, 4~6 時間培養した。本培養液を ELISA 用試料とした。

ELISA 術式: ELISA Kit (Locate) の記載に従った。すなわち, GN ブイヨンで培養した菌液 1 ml ずつを試験管内で混合し, 加熱処理を施した。この加熱菌液 100 μ l をモノクローナル抗体を固相化したウェルに接種した。同時に, 添付されている陽性対照および陰性対照も 100 μ l ずつ加え, 30 分間反応させた。3 回洗浄後, horseradish peroxidase でラベルした conjugate 液 2 滴を加え, 室温で 30 分間反応させた。洗浄後, 基質液を 2 滴添加し, 暗室箱で 30 分間反応させた。判定は青色に発色した場合を陽性とした。さらに確認のために EIA リーダー (SLT-Lab instruments, Austria) により吸光度 (450 nm) を測定した。吸光度 0.300 以上を陽性とし

Table 2. Reactivity of the ELISA to *Salmonella* and *Citrobacter freundii*

Serovar	O group	A ₄₅₀
S. Derby	4	1.385
S. Paratyphi B	4	1.263
S. Typhimurium	4	1.601
S. Sofia	4	1.150
S. Isangi	7	1.175
S. Thompson	7	1.106
S. Bareilly	7	1.211
S. Infantis	7	1.660
S. Litchfield	8	1.360
S. Panama	9	1.205
S. Enteritidis	9	1.756
S. Weltevreden	3, 10	1.343
S. Anatum	3, 10	1.125
S. Krefeld	1, 3, 19	1.171
S. Senftenberg	1, 3, 19	1.273
S. Poona	13	1.102
S. Hvittingfoss	16	1.181
S. Cerro	18	1.250
S. Alachua	35	1.107
S. Champaign	39	1.310
S. Johannesburg	40	1.266
Non-motile O4	4	1.157
Non-motile O7	7	1.173
<i>C. freundii</i> (n=7)		0.021-0.065

Positive: A_{450 nm} $\geq$ 0.3.Negative: A_{450 nm} < 0.3.

た。陽性対照は通常吸光度が 1.200~2.100 であった。陰性対照は 0.050~0.180 であった。

5. 培養法による食肉からのサルモネラの検出法

前述の ELISA のために培養したセレナイト培地, ハーナーのテトラチオン酸塩培地の培養液を DHL 寒天と SS 寒天に塗抹し, 37°C, 18~24 時間培養した。出現したサルモネラを疑う集落を TSI 培地と LIM 培地に接種し, 常法によりサルモネラのスクリーニング試験を行った。サルモネラの同定試験ならびに血清型別試験は善養寺ら¹²⁾の記載に従った。

成 績

1. サルモネラの菌量と ELISA kit (Locate) の反応性

S. Typhimurium, S. Enteritidis および S. Infantis の GN ブイヨン培養菌を一方は 100°C, 20 分, 他方を 121°C, 20 分間加熱し, 生理食塩液で希釈して 10³ cfu/ml から 10⁸ cfu/ml の菌液に調整した。各菌液について Locate kit による ELISA を実施した。Table 1 に示すごとくいずれの菌株も 100°C よりも 121°C 加熱処理を施した菌液の方が反応性が高かった。各菌とも 10⁶ cfu/ml 以上の菌量で陽性反応を示し, 肉眼でも明瞭な青色を呈した。したがって, 以下の実験では ELISA 法用の

試料の加熱条件は 121℃, 20 分間とした。

2. 各種血清型サルモネラとの反応性

ELISA kit (Locate) は Table 2 に示す 21 型の各サルモネラとはいずれも陽性に反応した。また、運動陰性の O4 群と O7 群のサルモネラとも前者が 1.157, 後者が 1.173 の吸光度で、陽性に反応した。

サルモネラの O 抗原と類属反応を示すことが多い *C. freundii* との反応性を検討したが、供試した 7 菌株とも陰性であった。

3. サルモネラ接種食肉および液卵からの ELISA によるサルモネラの検出

鶏肉に *S. Typhimurium* および *S. Infantis* をそれぞれ人為的に接種した試料を作製した。1 g 当たりの接種菌量は前者が 0.44 cfu/g および 0.22 cfu/g, 後者が 0.48 cfu/g および 0.24 cfu/g とした。EEM ブイヨンで前培養後セレナイト培地, ハーナーのテトラチオン酸塩培地で培養を行った結果, ELISA および培養法とも陽性となった。

液卵に *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* および *S. Infantis* をそれぞれ 0.3~0.8 cfu/ml 接種し, 上述と同様に検討した結果, ELISA, 培養法ともサルモネラが陽性となり, 食品中のサルモネラ菌量が 1 cfu/g 以下でも増菌培養後の ELISA によりサルモネラを検出することが可能であった。

4. 市販鶏肉からの ELISA によるサルモネラの検出

鶏肉 50 件について EEM ブイヨンによる前培養後選択増菌培養を行い, ELISA と従来の培養法のサルモネラ検出率を比較した。

Table 3 に示すごとく ELISA と培養法の両者が陽性の件数は 12 例, 両者陰性が 33 例, ELISA のみ陽性が 4 例, 培養法のみ陽性が 1 例であった。ただし, ELISA からサルモネラが証明され, 培養法ではサルモネラが検出されなかった 4 例については, 当該増菌培養液から再度増菌培養と菌検出を繰り返した。その結果, 4 例の増菌培養液からサルモネラが検出された。したがって, ELISA kit (Locate) と培養法との一致率は 98.0% と極めて高い成績が得られた。

なお, ELISA 陰性, 培養法で陽性となった 1 例から検出された血清型は *S. Alachua* であった。ELISA kit (Locate) に利用されているモノクローナル抗体が *S. Alachua* とは反応しないことが想定されたので保存菌株 4 株で検討を行った。しかし, 供試した 4 菌株とは明瞭に反応した。その後の検討から, 今回分離された *S. Alachua* は初代培養菌や数代の継代では ELISA kit とは反応しなかったが, 2 カ月保存後では陽性となった。

考 察

ELISA を応用したサルモネラ検出キットは 1980 年代初期から開発が進められ, *Salmonella*-Tek^{1,3)}, *TECRA Salmonella*⁵⁾, *Q-Trol Salmonella*^{2,10)}, *Equate*

Table 3. Comparison of the ELISA method and conventional methods for detection of *Salmonella* in commercial raw chicken

No. of Samples	ELISA	Conventional method	No. of subject	Confirmatory examination
50	+	+	12	Culture positive*
	+	—	4	
	—	+	1	
	—	—	33	

* Four samples were recorded as positive by confirmed culture from the GN broth, tetrathionate broth or selenite broth.

Rapid *Salmonella* ELISA⁸⁾ などの各種キットが市販化されている。これらの ELISA 法はサルモネラの鞭毛蛋白を認識する方法であった。今回検討した ELISA kit の Locate はそれらとは異なり, 細胞壁抗原を検出する新たな方法である。従来のキットと同様の高い特異性が認められた。特にサルモネラの細胞壁抗原と *C. freundii* のそれとは交差性があることが以前から指摘されていたが, 本 ELISA kit は *C. freundii* とも反応しなかったことより, 特異性の高い ELISA 法であると考えられる。なお, 抗原液の加熱条件は煮沸よりも 121℃ の高温の方が吸光度値が高く得られたことは本キットの抗体が O 抗原を認識することから, 菌体表層の易熱性成分が反応性を阻害するものと考えられた。また, 今回の実験で分離された *S. Alachua* は分離初期では本 ELISA と反応しなかった。しかし, 継代培養後では本 ELISA と明瞭に反応した。このことは本キットの抗体が O 抗原を認識するために分離初期の菌株では菌体表層に M 抗原様物質が形成され, 抗体との反応を阻害していたものと推察された。

サルモネラを検出できる菌量限界もこれまでのキットとはほぼ同様の 10⁶ cfu/ml であった。したがって, サルモネラ菌量を多くするために選択増菌培養した後に非選択培地である GN ブイヨンによる培養が必要となる。食肉や液卵に人工的にサルモネラを接種した実験では 1 g 当たり 1 cfu 以下の少量菌であっても前培養, 選択増菌培養を施すことにより ELISA で正確にサルモネラを証明することができ, 本法は実用性の高いものと考えられた。

現在開発されている各種の ELISA kit と従来の培養法との一致率は極めて高いことがこれまでに多く指摘されている。例えば, 両者の一致率は Rapid *Salmonella* ELISA kit では 96.0%⁸⁾, *Salmonella*-Tek では 99.1%³⁾, *TECRA Salmonella* では 96.7%⁵⁾, *Q-Trol Salmonella* では 98.5%²⁾ である。今回検討した ELISA kit (Locate) でもその一致率は 98.0% で, これまでに報告され ELISA kit とほぼ同様の成績が得られた。WALTER¹¹⁾ は水や排水からのサルモネラ検索に本 ELISA を応用した結果, 従来の培養法との一致率は 96.7% と好成績を報告している。なお, サルモネラの検出は選択増菌

培地により大きく変動することから、ELISA を用いる際には2種類の増菌培地を利用し、増菌培地によるサルモネラ検出の変動を極力少なくすることが重要であると考えられる。

わが国でも1989年からS. Enteritidisによる食中毒が激増してきた。本菌食中毒の増加の背景には感染源と推察される産卵鶏におけるS. Enteritidis 保菌があることが明らかにされ、本食中毒防止のために感染源である鶏や養鶏場の環境あるいは飼料に対するサルモネラ検出の重要性が強調されている。また、鶏卵や液卵についてのサルモネラ検査や食品工場におけるサルモネラ検査が重視されてきた。こうした現場でのサルモネラ検査は従来の培養法に固守せずに、ELISAなどを応用した簡易、迅速検査法を導入すべきであると考え。

要 約

食品からのサルモネラ検出用に開発されたELISA kitであるLocateの実用性を検討した。

1. 血清型の異なるサルモネラ23菌株とELISA kit (Locate)の反応性はすべて陽性であった。サルモネラのO抗原との類属性が問題となる*C. freundii*の7菌株に対してはELISAは陰性であった。

2. *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* および *S. Infantis* の菌量の異なる菌液との反応性ではいずれの菌株も 10^6 cfu/ml以上の菌数で明瞭な陽性反応を示し、肉眼で色調(青色)の判定ができた。

3. *S. Typhimurium* ならびに *S. Infantis* をそれぞれ鶏肉あるいは液卵に1g当たり0.22~0.8 cfu添加し、選択増菌培地(セレナイト培地、ハーナーのテトラチオン酸塩培地)で培養を行い、添加菌の回収実験を行った結果、いずれもELISA kitによりサルモネラを証明できた。

4. 市販鶏肉50件を対象にELISAと従来の培養法によるサルモネラ検出を比較した結果、両者の一致率は98.0%と高率であった。

文 献

1) Curiale, M. S., Klanttt, M. J., Robinson, B. J. and Beck,

L. T.: Comparison of Colorimetric monoclonal enzyme immunoassay screening method for detection of *Salmonella* in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**, 43-50 (1990).

- 2) Curiale, M. S., Klatt, M. J., Gehle, W. D. and Chandonnet, H. E.: Colorimetric and fluorometric substrate immunoassays for detection of *Salmonella* in all foods: Comparative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**, 961-968 (1990).
- 3) Eckner, K. F., Flowers, R. S., Robinson, B. J., Mattingly, J. A., Gabis, D. A. and Silliker, J. H.: Comparison of *Salmonella* Bio-Enza Bead immunoassay method and conventional culture procedure for detection of *Salmonella* in foods. *J. Food Prot.*, **50**, 379-385 (1987).
- 4) Feng, P.: Commercial assay systems for detecting foodborne *Salmonella*: A review, *J. Food Prot.*, **55**, 927-934 (1992).
- 5) Flowers, R. S., Klatt, M. J. and Keelan, S. L.: Visual immunoassay for detection of *Salmonella* in foods: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 973-980 (1988).
- 6) 石崎直人, 金子誠二, 伊藤 武: PATH-STIK Rapid *Salmonella* Test による鶏肉からのサルモネラ迅速検査法の検討. *食品と微生物*, **10**, 95-100 (1993).
- 7) 伊藤 武: 食品細菌検査の簡易化・迅速化, サルモネラ検査. *食品と微生物*, **9**, 217-226 (1993).
- 8) 平田一郎, 鈴木敬子, 神 真知子, 伊藤 武, 柳沼真一: 食品からのサルモネラ検出用 Equate Papid *Salmonella* ELISA Kit の評価. 最新検査, **84**, 473-477 (1992).
- 9) 楠 淳, 伊藤 武: 食肉からのサルモネラ検出のための bio-Enzabead 酵素抗体法の評価. *Assoc. Rapid Meth. Auto. Microbiol.*, **1**, 191-199 (1989).
- 10) 尾崎寿司, 朝倉征雄, 村瀬 稔, 仲西寿男, 小沼博隆, 中村博臣: 食品中のサルモネラ迅速検出キット, Q-TROL (Dynatech) の評価. *食品と微生物*, **6**, 113-116 (1989).
- 11) Walter, K. S., Fricker, E. J. and Fricker, C. R.: Use of a commercially available ELISA kit for detection of salmonellas in water. *Lett. Appl. Microbiol.*, **16**, 280-281 (1993).
- 12) 善養寺 浩ほか: 腸管系病原菌の検査法. p. 171-191, 医学書院, 東京 (1985).