

平成 28 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

食品を対象とした毒素原性大腸菌（ETEC）検出に用いる免疫磁気ビーズ作製方法の検討

研究協力者 東京都健康安全研究センター 小西 典子
東京都健康安全研究センター 尾畑 浩魅
東京都健康安全研究センター 平井 昭彦
東京医科大学 甲斐 明美

研究要旨：食品を対象とした ETEC 検査法は未だ確立されておらず，その検査法の確立が急務となっている。食品培養液から目的とする菌を検出するには，免疫磁気ビーズ法で集菌する方法が最も効率の良い方法であると考えられる。しかし最も検出頻度の高い毒素原性大腸菌 7 血清群に対する免疫磁気ビーズは市販されていないため，これらは自家調製する必要がある。そこでこれら大腸菌の検査に用いるための自家調製免疫磁気ビーズ作製方法について検討した。使用する血清量および反応時間について検討した結果，磁気ビーズ 250 μ l あたり血清量は最低 5 μ l，反応時間は室温で 30 分以上であれば，検査に使用できる免疫磁気ビーズが得られることが明らかとなった。

作製した免疫磁気ビーズを用いて集菌効果を確認したところ，O27，O148 は 10^0 cfu/ml まで，O25，O153，O159，O169 は 10^1 cfu/ml まで検出することが可能であった。O6 については 10^3 cfu/ml と集菌効果は低かった。

今回の検討から明らかとなった課題は，使用する血清のロットによって凝集反応の強さが異なることがあること，菌株によっては生菌で凝集が認められない場合のあることである。生菌で凝集が認められない血清を用いて免疫磁気ビーズを作製しても，集菌効果は低いことが明らかとなった。今後，作製した免疫磁気ビーズの保存可能な期間，またより簡便な集菌効果の確認方法（感度試験）を検討する必要がある。

A. 研究目的

ヒトに下痢症を引き起こす大腸菌は，病原因子別に少なくとも，病原血清型大腸菌（EPEC），腸管出血性大腸菌（EHEC），毒素原性大腸菌（ETEC），組織侵入性大腸菌（EIEC），腸管凝集付着性大腸菌（EAEC）

の 5 種類と特定の病原因子を保有する「その他の下痢原性大腸菌」に分類されている。このうち ETEC による食中毒は全国で毎年数事例発生しており，事例数も EHEC に次いで多く報告されている。これら食中毒の感染源や原因食品を解明するためには，食

品から ETEC を検出することが重要である。しかし食品を対象とした ETEC 検査法は未だ確立されておらず、その検査法の確立が急務となっている。昨年までの本研究で、ETEC 食中毒の原因菌は O6, O25, O27, O148, O153, O159, O169 の 7 血清群が多く占めていること、原因食品としては野菜や飲用水が関与している事例が多いことが明らかとなった。

汚染菌量が少なく、目的菌以外の雑菌が多い食品から上記 7 血清群の ETEC を検出するためには免疫磁気ビーズ法により目的菌を集菌することが有効であると考えられる。しかし、7 血清群に対する免疫磁気ビーズは市販されていないため、当面は自家調製する必要がある。そこで今回、免疫磁気ビーズの作製方法について検討した。更に大腸菌 7 血清群に対する免疫磁気ビーズを作製し、その集菌効果の検討を行った。

B. 研究方法

1. 免疫磁気ビーズの作製方法に関する検討

1) 磁気ビーズに感作させる血清量の検討

供試菌株は赤痢菌 (ソネ) である。市販の磁気ビーズ (Dynabeads® M-280 Sheepanti-Rabbit IgG : ThermoFisher SCIENTIFIC 社製, ベリタス社販売) 250 μ l に対し市販の赤痢菌免疫血清「生研」ソネ赤痢菌 相 (デンカ生研) を 1 μ l, 2 μ l, 5 μ l, 10 μ l, 20 μ l, 50 μ l, 100 μ l 加えて免疫磁気ビーズを作製した。反応時間は 2 時間、反応温度は室温である。作製した免疫磁気ビーズを用い、ソネ赤痢菌の TSB, 37 培養液を PBS で階段希釈した菌液 (菌数 $10^5 \sim 10^1$ cfu/ml) から菌の検

出を試みた。

2) 血清と磁気ビーズの感作時間の検討

磁気ビーズに付属の説明書では、血清と磁気ビーズの感作時間は 4 ~ 18 時間となっているが、現場でより迅速に反応させることが可能であるかを検討した。磁気ビーズ 250 μ l に対し血清量 10 μ l 加え、感作時間を 15 分, 30 分, 60 分, 90 分, 120 分として免疫磁気ビーズを作製した。反応温度は室温である。作製した免疫磁気ビーズを用い、各濃度に階段希釈した菌液 (菌数 $10^5 \sim 10^1$ cfu/ml) から当該菌の検出を試みた。

2. 毒素原性大腸菌検出法に用いる免疫磁気ビーズ作製方法の検討

1) 供試菌株

食中毒患者および散発下痢症患者から分離された毒素原性大腸菌 O6 群 (LT & ST 産生), O25 群 (ST 産生), O27 群 (ST 産生), O148 群 (ST 産生), O153 群 (ST 産生), O159 群 (ST 産生), O169 群 (ST 産生) 各 1 株を供試した。

2) 血清の選択

血清は市販の病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いた。使用した血清のロット番号は A~D の 4 種類である。これら 4 ロット血清と供試菌株 (生菌) をスライド凝集法で反応させ、最も短時間で強い凝集が認められた血清を免疫磁気ビーズ作製用に使用した。

3) 免疫磁気ビーズの作製方法

磁気ビーズは Dynabeads® M-280 Sheepanti-Rabbit IgG (ThermoFisher

SCIENTIFIC 社製,ペリタス社販売)を使用した。血清は上記検討で選んだロットの血清を希釈することなく原液のまま用いた。血清を磁気ビーズへ感作させる方法の詳細は別紙 1 のとおりである。

3. 大腸菌自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果の検証

各血清群の大腸菌を TSB に接種し,37℃, 18~20 時間培養を行った。この培養液を滅菌したリン酸緩衝液 (PBS) で 10^{-5} ~ 10^{-8} まで 10 倍階段希釈を行い,菌液の調製を行った。想定菌数は 10^4 cfu/ml から 10^1 cfu/ml である。希釈した菌液 1ml を対象に自家調製免疫磁気ビーズを用いて集菌を行い,集菌したビーズを 10mM PBS 0.1ml に懸濁した。懸濁液を寒天平板 (SMAC 寒天, 抗生物質加 SMAC 寒天, クロモアガー-STEC 基礎培地, DHL 寒天) に各 $10\mu\text{l}$ ずつ接種し,塗抹培養後,37℃ で 18~20 時間培養し,各平板に発育した集落数を計測した。

C. 研究結果

1. 免疫磁気ビーズ作製方法に関する検討

1) 磁気ビーズに感作させる血清量の検討

磁気ビーズに感作させた血清量と集菌効果について検討を行った。血清量が 5, 10, 20, 50, $100\mu\text{l}$ では 10^1 cfu/ml まで検出することができた。平板上に出現した集落数は,いずれの血清量でも 10^1 cfu/ml 菌液を用いた場合が数集落, 10^2 cfu/ml では 10~99 集落, 10^3 cfu/ml 菌液では 100 集落以上であった。一方,血清量が 1~ $2\mu\text{l}$ では 10^3 cfu/ml までしか検出できなかった。

2) 血清と磁気ビーズの感作時間の検討

磁気ビーズ $250\mu\text{l}$ に血清 $10\mu\text{l}$ を用い,反応時間を 15 分,30 分,60 分,90 分,120 分の 5 段階について免疫磁気ビーズの感作時間の検討を行った。作製した免疫磁気ビーズを用いて感度試験を実施した結果,感作時間 15 分では 10^2 cfu/ml までの検出であったが,30 分以上感作させた場合には 10^1 cfu/ml まで検出することが可能であった。

2. 毒素原性大腸菌検出に用いる免疫磁気ビーズ作製方法の検討

1) 血清の選択

市販の病原大腸菌免疫血清 (4 ロット) と各血清群の ETEC との凝集反応性をスライド凝集法で確認した。ETEC O148, O153, O159, O169 は 2 種類の血清 (A, B) に,いずれにも強い凝集が認められた。O25 と O27 は血清のロットによって凝集の強さに差が認められた。すなわち O25 ではロット番号 A では凝集が認められたが, B では凝集が認められなかった。また, O27 はロット番号 A, B とは凝集せず, D とは弱い凝集であったが, C では強い凝集であった。また O25 ではロット番号 A では凝集が認められたが, B では凝集が認められなかった。O6 については全ての血清と凝集が認められなかった。これらの結果から自家調製免疫磁気ビーズを作製するための血清はロット番号 B (O6, O148, O153, O159, O169), A (O25), および C (O27) を選択した (表 1)。

3. 大腸菌自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果の検証

1) 血清群別検出感度

作製した免疫磁気ビーズの集菌効果の結果を表 4 に示した。O27, O148, O159 は 10^0 cfu/ml まで, O25, O153, O169 は 10^1 cfu/ml まで検出可能であった。しかし O6 は 10^3 cfu/ml までの検出で, 集菌効果は低かった。

2) 分離平板別発育状況

分離平板ごとに検出数をみると, 抗生物質加 SMAC 寒天では他の分離平板と比べてやや菌の発育に抑制が認められた。特に O148, O153 では他の分離平板と比較して検出感度が低かった。(表 3)

D. 考察

食品培養液から目的とする菌を検出するには, 免疫磁気ビーズ法で集菌する方法が最も効率が良いと考えられる。厚労省からの通知法である「腸管出血性大腸菌の検査法」では, 培養液を PCR 法でスクリーニングしたのち, 陽性となった培養液について免疫磁気ビーズで集菌する方法が記載されている。したがって, 毒素原性大腸菌の検査法を構築する上で免疫磁気ビーズ法を用いた集菌は必須である。しかし, 今回検査対象とした ETEC の 7 血清群に対する免疫磁気ビーズは市販されていないため, これらは自家調製する必要がある。そこで ETEC の検査に用いるための自家調製免疫磁気ビーズ作製方法について検討した。

免疫磁気ビーズの取扱い説明書および国立感染症研究編集のマニュアルでは血清と磁気ビーズの反応温度と感作時間は 4-18 時間とされている。以前行った検討で, 反応温度は室温で問題がないことから, 今回は室温で反応を行った。

磁気ビーズに感作させる血清量を検討したところ, 磁気ビーズ 250 μ l に対し, 最低 5 μ l の市販血清を反応させれば 10^1 cfu/ml まで検出できることが明らかとなった。5 μ l 以上であれば 100 μ l まで血清量を増やしても, 集菌効果に差は認められなかった。

次に血清と磁気ビーズの感作時間の検討を行った。反応時間を 15 分, 30 分, 60 分, 90 分, 120 分と変えて免疫磁気ビーズを作製し, 感度試験を行った結果, 反応時間 15 分では 10^2 cfu/ml までの集菌であったが, 反応時間 30 分以降は 10^1 cfu/ml まで検出することが可能であった。これら検討結果から, 毒素原性大腸菌免疫磁気ビーズの作製は, 磁気ビーズ 250 μ l 当たり血清 20 μ l, 室温で 2 時間反応させる方法とした。

市販免疫血清は加熱菌を検査対象としているが, 磁気ビーズ法での集菌は生菌が対象となっている。そこで生菌を用いて血清凝集反応を行い, 最も短時間で強い凝集が認められる血清を用いて免疫磁気ビーズを作製した。今回, 4 ロットの血清を用いて凝集試験を行ったところ, O25 と O27 はロットによって凝集の強弱が認められた。O6 についてはいずれの血清でも凝集は認められなかった。このように血清のロットによって凝集に強弱が認められ, 中には生菌では凝集が認められないものがあった。O6 は加熱菌を用いた凝集反応ではいずれも凝集が認められることから, 今回用いた O6 は K 抗原がリッチな株であった可能性が示唆された。今回作製した免疫磁気ビーズを用いて感度試験を行ったところ, O6 以外は 10^0 ~ 10^1 cfu/ml まで検出することが可能であった。

今回の検討から明らかとなった課題は,

使用する血清によって凝集の強さが異なることがあること、菌株によっては生菌で凝集が認められない場合のあることである。更に作製した免疫磁気ビーズの保存可能な期間、またより簡便な集菌効果の確認方法（感度試験）を検討する必要がある。

E. 結論

自家調製免疫磁気ビーズを作製するために使用する血清量および反応時間について検討した。その結果、磁気ビーズ 250 μ l あたり血清量は最低 5 μ l、反応時間は室温で 30 分以上であれば、検査に使用できる免疫磁気ビーズが得られることが明らかとなった。

作製した免疫磁気ビーズを用いて集菌効果を確認したところ、O27、O148 は 10^0 cfu/ml まで、O25、O153、O159、O169 は 10^1 cfu/ml まで検出することが可能であった。しかし、O6 については 10^3 cfu/ml と集菌効果は低かった。

今回の検討から明らかとなった課題は、使用する血清のロットによって凝集反応の強さが異なることがあること、菌株によっては生菌で凝集が認められない場合があることである。生菌で凝集が認められない血清を用いて免疫磁気ビーズを作製しても、集菌効果は低い。今後、作製した免疫磁気ビーズの保存可能な期間、またより簡便な集菌効果の確認方法（感度試験）を検討する必要がある。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

尾畑浩魅，高橋正樹，河村真保，山本浩平，山梨敬子，小西典子，平井昭彦，甲斐明美，貞升健志：自家調製免疫磁気ビーズ作製法の検討とその応用，第 37 回日本食品微生物学会学術講演会，2016 年 9 月，東京
小西典子，尾畑浩魅，平井昭彦，甲斐明美，大塚佳代子，寺嶋 淳，工藤由起子：毒素原性大腸菌による集団および散発下痢症の特性解析，第 112 回日本食品衛生学会学術講演会，2016 年 10 月，函館