

平成 29 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

食品での統一的検査法の開発

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究報告書

食品を対象とした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と作製した免疫磁気ビーズの有効性の検討

研究要旨

食品を対象とした ETEC 検査法の有効性を確認するために、複数の施設で一斉に検出を試みるコラボレイティブスタディを実施することになった。そこでコラボレイティブスタディに用いる免疫磁気ビーズ作製方法を検討し、集菌効果の検証を行った。大量の免疫磁気ビーズを作製する時は、一度にまとめて作製すると磁気ビーズと血清(抗体)が均一にならず、磁気ビーズ 1 個あたりに感作される抗体量に差が生じることが懸念されたことから、250 μ l ずつ小分けして作製し、最終的に 1 本にまとめて良く攪拌することで、感作される抗体量が均一である自家調製免疫磁気ビーズを作製することができた。作製した自家調製免疫磁気ビーズは、O148 および O159 いずれの血清群の大腸菌も 10^0 cfu/ml まで検出できたことから、作製した自家調製免疫磁気ビーズは問題がないことが確認でき、コラボレイティブスタディ参加 13 機関に 700 μ l ずつ配布した。

作製した自家調製免疫磁気ビーズの保存性を検討するために、作製後 4 で 1 年間冷蔵保管して、集菌効果の検証を行った。作製直後のデータと比較すると、いずれの血清群も 1 オーダー程度検出率が落ちている成績であったが、いずれも 10^3 cfu/ml 菌液を用いた場合は集菌効果が認められることから、調製後 1 年間程度は使用できるものと考えられた。

研究協力者

東京都健康安全研究センター 小西典子、尾畑浩魅、平井昭彦
公益社団法人日本食品衛生協会 甲斐明美

A. 研究目的

ヒトに下痢症を引き起こす大腸菌は、主に5種類に分類されている。すなわち、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)および腸管凝集付着性大腸菌(EAggEC)である。更に、特定の病原因子(*afa*, *astA*, CDT など)を保有するが、上記5種類に分類されない「その他の下痢原性大腸菌」も分類されている。全国で発生する食中毒のうち、下痢原性大腸菌による事例は毎年20~50事例程度である。

一方、厚生労働省による食中毒統計では「腸管出血性大腸菌」と「その他の病原大腸菌」として統計がとられているため、全国で発生するEHEC食中毒の状況を把握することは容易であるが、ETECによる食中毒発生数は、「その他の病原大腸菌」として統計がとられているため、正確に把握することは難しい。

昨年までの本研究で、全国および東京都で発生したETECによる食中毒・集団および散発下痢症事例について詳細な解析を行った。その結果、ETEC食中毒の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、原因となった大腸菌の血清群はO6, O25, O27, O148, O153, O159, O169の7血清群が多く占めていることが明らかとなった。

これら食中毒の感染源や原因食品を

さらに解明するためには、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の課題となっている。

今回、食品を対象としたETEC検査法の有効性を確認するために、複数の施設で一斉に検出を試みるコラボレイティブスタディを実施することになった。そこでコラボレイティブスタディに用いる免疫磁気ビーズ作製方法を検討し、集菌効果の検証を行った。更に作製した免疫磁気ビーズの使用期限を検証するために、作製後4週で約1年間保存した自家調製免疫磁気ビーズを用いて集菌し、作製直後の集菌効果と比較した。

またこれまでの検討で得られた知見を基に、自家製免疫磁気ビーズの作製方法について、詳細なマニュアルを作製した。

B. 研究方法

1. コラボレイティブスタディに使用する免疫磁気ビーズの作製

1) 供試菌株

O148群(ST産生)およびO159群(ST産生)を各1株ずつ用いた。

2) 血清の選択

コラボレイティブスタディで用いるETECの血清群であるO148とO159の血清を用いた。血清は市販の病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を使用

した。より抗体価の高い血清を選択するために、2種類の異なるロット番号の血清(31-5126, 28-4021)を用い、供試菌株(生菌)と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 Sheep anti-Rabbit IgG (ThermoFisher SCIENTIFIC 社製, ベリタス社販売)を使用した。血清は上記検討で選んだロットの血清を原液のまま用いた。

各血清群あたり 10ml の免疫磁気ビーズを作製した。抗体の感作方法は、別添の「免疫磁気ビーズ作製マニュアル」に従って実施した。

4) 自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果の検討

大腸菌 O148 および O159 を TSB に接種し、37℃, 18~20 時間培養した。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。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操作を行い、最終的に 10mM PBS 0.1ml に懸濁後、懸濁液 10 μ l ずつを 2 枚の普通寒天平板に滴下し、塗抹分離を行った。37℃ で 18~20 時間培養後、各平板に発育した集落数を計測し、集菌効果を確認した。

2. 自家調製免疫磁気ビーズの保存性に関する検討

自家調製した免疫磁気ビーズの使用

期限を検証するために、作製した免疫磁気ビーズを 4℃ の冷蔵下で約 1 年間保存した後、集菌効果を調べた。

1) 各血清群に対する免疫磁気ビーズの作製と保存

O6, O25, O27, O148, O153, O159, O169 の 7 血清群に対する免疫磁気ビーズを別添の「免疫磁気ビーズ作製マニュアル」に従って作製した。その後、4℃ の冷蔵庫に 1 年間保存した。

2) 保存後の自家調製免疫磁気ビーズを用いた集菌効果の検証

1 年間冷蔵保存後の自家調製免疫磁気ビーズを用いて 1-4) と同様の方法で集菌効果を確認した。使用した分離平板は、SMAC 寒天、抗生物質加 SMAC 寒天、クロモアガー STEC (基礎培地)、DHL 寒天である。

C. 研究結果

1. コラボレイティブスタディに使用する免疫磁気ビーズの作製

1) 血清の選択

大腸菌 O148 および O159 の診断用免疫血清 (デンカ生研) の各 2 ロットについて、生菌を用いたスライド凝集反応を行った成績を表 1 に示した。いずれの血清も短時間で強い凝集が認められ、凝集反応性に差は認められなかった。今回はロット番号 31-5126 血清を用いて免疫磁気ビーズの調製を行った。

2) 免疫磁気ビーズの作製方法

コラボレイティブスタディに使用す

るために必要な免疫磁気ビーズは合計 10ml であった。一度に大量の免疫磁気ビーズを作製すると、磁気ビーズと抗体が均一にならず、ビーズ 1 個あたりに感作される抗体量に差が生じることが懸念された。そこで Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG を 1.5ml マイクロチューブに 250 μ l ずつ 40 本に分注し、それぞれに血清を加えて感作させる方法で作製した。磁気ビーズに抗体を感作し、PBS に再浮遊させた自家調製免疫磁気ビーズは、最終的に 1 本にまとめ、良く混和して均一化してから集菌効果の検討に用いた。

3) 作製した免疫磁気ビーズの集菌効果の検証

作製した自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果の結果を表 2 に示した。O148 および O159 はともに 10^0 cfu/ml まで検出可能であった。以前に検討した結果と同等の成績であったことから、作製した自家調製免疫磁気ビーズは性能に問題がないことが確認できた。

2. 自家製免疫磁気ビーズの保存性に関する検討

1) 冷蔵保存した自家調製免疫磁気ビーズを用いた集菌効果

作製した免疫磁気ビーズの使用期限を検証するために、1 年間保存した免疫磁気ビーズを用いて集菌効果を検討した。免疫磁気ビーズを作製直後に実施した集菌結果を表 3 に、免疫磁気ビーズを 4 の冷蔵下で約 1 年間保存した後行っ

た集菌結果を表 4 に示した。保存後では血清群 O6 は 10^4 cfu/ml までの検出であったが、O25 および O159 は 10^2 cfu/ml まで、O27、O148、O153、O169 は 10^1 cfu/ml まで検出が可能であった(表 3、および表 4)。

2) 分離平板別発育状況

1 年間冷蔵保存した免疫磁気ビーズを用いて集菌操作を行い、各分離平板上に出現した菌の発育状況を調べた。分離平板別に最小検出菌数を比較した結果、供試した各血清群の大腸菌は、いずれの分離平板でも発育は良好であった(表 5)。分離平板ごとに発育した菌数を比較すると、O25、O153、O159 では抗生物質の入っていない SMAC 寒天、クロモアガー STEC (基礎培地)、DHL 寒天のいずれの平板でも同じような発育状況(菌数)であったが、抗生物質の入っている SMAC 寒天では 1 オーダー程度低い菌数であった。全体的にも抗生物質の入っている SMAC 寒天での発育は、やや抑制傾向であった。

D. 考察

食品培養液から ETEC を検出するためには、リアルタイム PCR 法を用いて毒素遺伝子をスクリーニングし、陽性となった検体を対象に免疫磁気ビーズを用いて集菌する方法が最も効率が良い方法である。現在、EHEC の検査に用いる免疫磁気ビーズは、複数種類が市販されているが、ETEC の血清群(O6、O25、O27、O148、O153、O159、O169)を検出するための免疫磁気ビーズは、市販

されていない。そこで複数機関で一斉検出するコラボレイティブスタディに提供するために免疫磁気ビーズの作製および集菌効果の検討を行った。1 血清群あたり 10ml と大量の自家調製免疫磁気ビーズを作製する必要があったが、まとめて一度に大量の免疫磁気ビーズを作製すると、磁気ビーズと血清が均一にならず、磁気ビーズ 1 個あたりに感作される抗体量に差が生じることが懸念された。そこで 250 μ l ずつ小分けして作製し、最終的に 1 つにまとめて良く攪拌することで、感作される抗体量が均一である自家調製免疫磁気ビーズを作製することができた。調製した免疫磁気ビーズの性能を評価するために、菌液を用いた集菌を行い集菌効果の検証を行った結果、O148、O159 のいずれの血清群も 10^0 cfu/ml まで検出できたことから、作製した自家調製免疫磁気ビーズは問題がないことが確認できた。コラボレイティブスタディでは各機関に 700 μ l ずつ 13 か所に配布した。

作製した自家調製免疫磁気ビーズの保存性を検討するために、作製後 4 の冷蔵庫で 1 年間保管した自家調製免疫磁気ビーズを用いて、集菌効果の検証を行った。作製直後のデータと比較すると、いずれの血清群も 1 オーダー程度検出率が落ちている成績であった。しかし、リアルタイム PCR 法の検出感度を 10^3 cfu/ml としており、いずれも 10^3 cfu/ml 菌液を用いた場合は集菌効果が認められることから、免疫磁気ビーズを自家調製後、1 年間程度は使用できるものと考

えられた。

分離平板ごとに菌株の発育状況を比較すると、抗生物質が入っていない培地と比較して抗生物質を添加した培地では 1 オーダー程度発育した菌数が少なかった。食品由来の夾雑菌を抑制するには非常に有効であるが、同時に目的菌も多少の抑制がかかることが明らかとなった。汚染菌量が少ない場合や損傷菌等を考慮すると、抗生物質を添加している培地としていない培地を必ず併用する必要があると考えられた。

E. 結論

大量の免疫磁気ビーズを作製する時は、一度にまとめて作製すると磁気ビーズと血清（抗体）が均一にならず、磁気ビーズ 1 個あたりに感作される抗体量に差が生じることが懸念された。そこで、250 μ l ずつ小分けして作製し、最終的に 1 本にまとめて良く攪拌することで、感作される抗体量が均一である自家調製免疫磁気ビーズを作製することができた。作製した自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果を検討した結果、O148、O159 いずれの血清群も 10^0 cfu/ml まで検出できたことから、作製した自家調製免疫磁気ビーズは問題がないことが確認できた。コラボレイティブスタディでは各機関に 700 μ l ずつ 13 か所に配布した。

作製した自家調製免疫磁気ビーズの保存性を検討するために、作製後 4 の冷蔵庫で 1 年間保管した自家調製免疫磁気ビーズを用いて、集菌効果の検証を行

った。作製直後のデータと比較すると、いずれの血清群も1オーダー程度検出率が落ちている成績であったが、いずれも 10^3 cfu/ml 菌液を用いた場合は集菌効果が認められることから、免疫磁気ビーズを自家調製後、1年間程度は使用できるものと考えられた。

抗生物質が入っている分離平板は、夾雑菌を抑制するには非常に有効であるが、同時に目的菌も多少の抑制がかかることが明らかとなった。汚染菌量が少ない場合や損傷菌等を考慮すると、抗生物質を添加している培地としていない培地を必ず併用する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
準備中

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1. 市販血清の大腸菌(生菌)に対する凝集反応性

血清群	血清のロット(デンカ生研)	
	31-5126	28-4021
O148	3+*	3+
O159	3+	3+

* スライド凝集法で実施

表2. コラボレイティブスタディに用いるための
自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果

血清群	PBS中の各血清群菌の菌数(cfu/ml)			
	10^3	10^2	10^1	10^0
O148	$\geq 3+*$	2+	1+	1+
O159	$\geq 3+$	3+	2+	1+

* 2枚の普通寒天平板上に発育した集落数の平均
1+:1~9個, 2+:10~99個, 3+:100~999個

表3. 調製直後の自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果

血清群	試料液中の菌数 (cfu/ml)					未接種
	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	
O6	NT	1+*	-	-	-	-
O25	≥3+	3+	2+	1+	NT	-
O27	NT	≥3+	3+	2+	1+	-
O148	NT	≥3+	2+	2+	1+	-
O153	≥3+	3+	1+	1+	NT	-
O159	NT	≥3+	2+	1+	1+	-
O169	≥3+	3+	2+	1+	NT	-

* SMAC寒天上に発育した集落数

1+:1~9個, 2+:10~99個, 3+:100~999個

NT:実施せず

表4. 調製後1年間保存した自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果

血清群	試料液中の菌数 (cfu/ml)					未接種
	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	
O6	1+*	-	-	-	NT	-
O25	≥3+	2+	1+	-	NT	-
O27	≥3+	3+	2+	1+	NT	-
O148	≥3+	2+	1+	1+	NT	-
O153	≥3+	3+	2+	1+	NT	-
O159	≥3+	2+	1+	-	NT	-
O169	≥3+	2+	2+	1+	NT	-

* SMAC寒天平板上に発育した集落数

1+:1~9個, 2+:10~99個, 3+:100~999個

NT:実施せず

表5. 各分離平板上の発育状況

血清群	最小検出菌数(cfu/ml)			
	SMAC	抗生物質加 SMAC	クロモアガー STEC(基礎培地)	DHL
O6	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ³
O25	10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ²
O27	10 ¹	10 ²	10 ²	10 ¹
O148	10 ¹	10 ³	10 ²	10 ¹
O153	10 ¹	10 ²	10 ¹	10 ¹
O159	10 ²	10 ³	10 ²	10 ²
O169	10 ¹	10 ²	10 ²	10 ¹

免疫磁気ビーズ作製マニュアル

試薬

- ・血清：病原大腸菌免疫血清（デンカ生研）あるいは同等品
- ・磁気ビーズ：Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG
(ThermoFisher SCIENTIFIC 社製，ベリタス社販売)
 - #DB11203 Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG (2ml)
 - #DB11204 Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG (10ml)

- ・.0.1% BSA 加 PBS

PBS の作製

NaH₂PO₄ · H₂O 0.157 g

Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.98g

NaCl 8.1 g

D.W. 900ml に溶解させオートクレーブ滅菌する。

1%BSA 溶液の作製

BSA (SIGMA® ALBUMIN, BOBINE #A-2153, あるいは同等品) 1g

D.W. 100ml に溶解させる。

このとき，無理に溶かすと泡立ってしまうので，一晩冷蔵庫内に放置してゆっくり溶かす。溶解後ろ過滅菌する。

と を合わせる。

- ・ 10mM PBS (pH7.4)

Phosphate Buffered Saline tablet (Sigma #P4417-100TAB, あるいは同等品)

器具

- ・ 1.5ml マイクロチューブ
- ・ 磁気ビーズ分離用磁石
DynaMag-2 (ThermoFisher SCIENTIFIC 社製，ベリタス社販売) #DB12321
マグネチックスタンド (デンカ生研) #240125
その他同様の機器
- ・ 攪拌器 (チューブローターなど)

作製方法

1. 1.5ml マイクロチューブを用意する。
2. Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG をよく混和し，1.5ml マイクロチューブに 250 μ l 分注する。
3. 0.1% BSA 加 PBS を 1ml 加え軽く転倒混和する（洗浄 1 回目）。
4. 磁気ビーズ分離用磁石を用いて磁気ビーズを集めた後，上清を取り除く。
磁気ビーズを吸い取らないように注意する。
5. 磁気ビーズ分離用磁石から外し，0.1% BSA 加 PBS を 1ml 加え軽く転倒混和する（洗浄 2 回目）。
6. 磁気ビーズ分離用磁石を用いて磁気ビーズを集めた後，上清を取り除く。
磁気ビーズを吸い取らないように注意する。
7. 0.1% BSA 加 PBS を 980 μ l 加え，磁気ビーズを再浮遊させる。
8. 病原大腸菌免疫血清を 20 μ l 加える。
9. 攪拌器（ローターなど）を用いて，室温で 2 時間，転倒混和させながら磁気ビーズと血清（抗体）を反応させる。
10. 磁気ビーズ分離用磁石を用いて磁気ビーズを集め，上清を完全に取り除く。
11. 10mM PBS（pH7.4）を 250 μ l 加え，磁気ビーズを再浮遊させる。
12. 4℃ で保管する。