

博士論文

食中毒細菌の簡易迅速検査技術に
関する研究

米北 太郎

目次

| | |
|------------------------------------|-----|
| 略語 | 3 |
| 緒言 | 5 |
| 第1章 大腸菌 O26 の簡易迅速検査法の開発 | 23 |
| 1.1 背景および目的 | 23 |
| 1.2 材料と方法 | 25 |
| 1.3 成績 | 29 |
| 1.4 考察 | 32 |
| 1.5 要約 | 37 |
| 1.6 図表 | 38 |
| 第2章 3種の血清型の大腸菌を同時・識別検出する簡易迅速検査法の開発 | 46 |
| 2.1 背景および目的 | 46 |
| 2.2 材料と方法 | 49 |
| 2.3 成績 | 52 |
| 2.4 考察 | 55 |
| 2.5 要約 | 59 |
| 2.6 図表 | 60 |
| 第3章 腸炎ビブリオの簡易迅速検査法の開発と特異的エピトープの解明 | 70 |
| 3.1 背景および目的 | 70 |
| 3.2 材料と方法 | 73 |
| 3.3 成績 | 77 |
| 3.4 考察 | 82 |
| 3.5 要約 | 87 |
| 3.6 図表 | 89 |
| 総括 | 104 |
| 謝辞 | 107 |
| 参考文献 | 108 |

略語

| | |
|----------|--|
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BLP | bombinin-like peptide |
| bp | base pairs |
| BPW | buffered peptone water |
| BSA | bovine serum albumin |
| CBB | Coomassie brilliant blue |
| CFU | colony-forming units |
| CP | cecropin P |
| CT-RMAC | rhamnose MacConkey agar supplemented with cefixime tellurite |
| CT-SBMAC | sorbose MacConkey agar supplemented with cefixime tellurite |
| CT-SMAC | sorbitol MacConkey agar supplemented with cefixime tellurite |
| CtxA | ceratotoxin A |
| EHEC | enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| Gb3 | globotriaosylceramide |
| HPLC | high-performance liquid chromatography |
| HRP | horseradish peroxidase |
| HUS | hemolytic uremic syndrome |
| IgG | immunoglobulin G |
| IID | International Research Center for Infectious Diseases |
| JCM | Japan Collection of Microorganisms |
| kDa | kilodalton |
| LAMP | loop-mediated isothermal amplification |
| LC-MS/MS | liquid chromatography-mass spectrometry/ mass spectrometry |
| LD50 | median lethal dose |
| LFA | lateral flow assay |
| LL-37 | leucine leucine-37 |
| lpp | lipoprotein |
| LPS | lipopolysaccharide |
| mEC | modified EC broth |
| MG | magainin |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NCTC | National Collection of Type Cultures |

| | |
|----------|---|
| NIAH | National Institute of Animal Health |
| NM | nonmotile |
| NT | not tested |
| PAb | polyclonal antibody |
| PAI | pathogenicity island |
| pBD-2 | porcine beta-defensin 2 |
| PBS | phosphate-buffered saline |
| PBST | PBS with 0.1% Tween 20 |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PVDF | polyvinylidene difluoride |
| RIMD | Research Institute for Microbial Diseases |
| SDS-PAGE | sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis |
| SE | <i>Salmonella</i> Enteritidis |
| SGSC | <i>Salmonella</i> Genetic Stock Center |
| STEC | Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> |
| Stx | Shiga toxin |
| TCBS | thiosulfate citrate bile sucrose |
| TDH | thermostable direct hemolysin |
| TEWP | turtle egg-white protein |
| TMB | 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine |
| TP I | tachyplesin I |
| TRH | TDH-related hemolysin |
| Tris-HCl | tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride |
| TSB | Trypto-Soya broth |
| T3SS | Type III secretion system |
| USDA | United States Department of Agriculture |
| VT | verotoxin |
| VTEC | verotoxin-producing <i>Escherichia coli</i> |

緒言

細菌性食中毒とは

細菌性食中毒は病原細菌に汚染された食品の摂取により発生する食中毒であり、激しい腹痛や下痢、重篤な場合には死に至ることから、その制御は極めて重要な課題である。

細菌性食中毒はその発病機序によって、感染型と毒素型に大別できる。毒素型食中毒は細菌が食品中で産生した毒素を含む食品を経口摂取しておこる食中毒であり、生菌の存在とは無関係に発症する。黄色ブドウ球菌・ボツリヌス菌・セレウス菌の一部が毒素型食中毒の原因菌に分類される。一方、感染型食中毒は、生菌を含む食品の経口摂取によって生じる食中毒である。体内に入った細菌は胃を通過し、腸管で定着・増殖するが、その挙動により感染型食中毒はさらに感染侵入型と感染毒素型に分類される（永宗ら, 1996）。感染侵入型食中毒の原因菌は、腸管上皮細胞や組織内に侵入して壊死・炎症を引き起こし、サルモネラ属菌・腸管侵入性大腸菌・エルシニアがこの型に該当する。感染毒素型食中毒は、腸管に定着した菌が毒素を産生し、この毒素が腸管細胞に毒性を示し下痢を引き起こす。腸管出血性大腸菌・腸炎ビブリオ・カンピロバクターをはじめ、大半の食中毒細菌が感染毒素型食中毒の原因菌に分類される。

国内での食中毒発生件数

厚生労働省の食中毒統計資料によると、2019 年における日本国内の食中毒事件数は 1,061 件、患者数は 13,018 人にのぼる。そのうち細菌性食中毒は事件数・患者数ともに 36%を占める。細菌性食中毒の原因菌として最も多いのはカンピロバクターであり、286 件の事件で 1,937 人の患者が発生している。本研究で着目したのは、腸管出血性大腸菌および腸炎ビブリオである。両菌種ともに食中毒細菌の代表例として名前が挙げられることが多いが、2019 年の食中毒発生状況は腸管出血性大腸菌が事件数 20 件・患者数 165 人であり、腸炎ビブリオについては 1 件も発生していない。過去の食中毒推移を確認すると、直近 10 年間の腸管出血性大腸菌食中毒の患者数は毎年 100～700 人程度である（表 緒-1）。一方、感染症法に基づく腸管出血性大腸菌感染症の患者統計によると、直近 10 年間の有症者の届出数は 2,500 人前後を推移している（表 緒-1）。食中毒患者数と感染症の届出数の乖離が極めて大きいことがその一因となっている（甲斐, 2017）。それに加えて、本菌が食中毒の原因食品から分離されるのは極めて稀であることから（寺嶋ら, 2017）、食中毒として計上されていない事例も数多く存在すると推察される。原因食品の同定が困難となっている背景には、腸管出血性大腸菌感染症の潜伏期間が長いこと（3 日～10 日程度）、発症に必要な菌

数が少ないこと（50 個以下）、検査法の開発が十分ではないことなどがある。集団食中毒発生時には、食中毒の原因食品の候補は、患者が共通して飲食した食品に絞り込むことが可能である。一方、それ以外の場合には、患者が潜伏期間の目安とされる 10 日程度の間に飲食した食品をもれなく洗い出し、その中から食中毒の原因食品の絞り込みを行わなければならない、原因食品を特定することは難しい場合が多い。また、検証試験を行おうとしても、対象食品が残っていない、保存状態が良くないなどの理由により、少量しか含まれない腸管出血性大腸菌を検出することは困難となる。腸管出血性大腸菌感染症は重症患者数も多く、2010 年以降の 10 年間だけでも 26 名もの尊い命が奪われていることから（表 緒-1）、その制御は極めて重要な課題である。

腸炎ビブリオは、かつては国内の食中毒発生要因の上位を常に占める代表的な食中毒細菌であったが、適切な対策を講じたことにより、その食中毒の発生数は激減した。1996 年以降の腸炎ビブリオ食中毒の患者数の推移を確認すると、1999 年以前は毎年 5,000 人以上の患者が発生し、ピークの 1998 年には 12,318 人の方が罹患している（図 緒-1）。2000 年以降は患者数が減少し、2008 年以降は 1,000 人を大きく下回る数で推移している。しかし、環境中の腸炎ビブリオ数に大きな変化はなく、沿岸海域を中心とした海水中に広く分布しているため、そこから獲れた魚介類の取り扱いを誤れば食中毒の発生につながるリスクがある。腸炎ビブリオ食中毒防止のために、食品衛生法でその成分規格が定められており、食中毒が激減した現在においても対象食品については検査により腸炎ビブリオの規格基準を満たすことを確認する必要がある。

本研究では、検査技術の開発を主題とするが、その議論に入る前に腸管出血性大腸菌および腸炎ビブリオの特徴・病原性・食中毒防止のために取られてきた対策等について紹介する。

腸管出血性大腸菌について

腸管出血性大腸菌（EHEC）は志賀毒素（Stx）あるいはベロ毒素（VT）と呼ばれる毒素を産生する大腸菌であり、志賀毒素産生大腸菌（STEC）あるいはベロ毒素産生大腸菌（VTEC）とも呼ばれる。本菌に感染すると激しい腹痛と水様性下痢を発症し、重症例では出血性大腸炎や溶血性尿毒症症候群（HUS）を引き起こし死に至ることもある（Gyles, 2007）。特に小児や高齢者では重篤化しやすいため注意が必要である。また少量の菌数（50 個以下）で感染が成立すること、広域で大規模な集団食中毒を引き起こすことなどから、制御が極めて重要な食中毒細菌の一つである。腸管出血性大腸菌の最も重要な保菌動物は牛であり、高い保有率を示す。日本国内の肉用牛農場の直腸内容物を検査した報告によると、406 農場のうち O157 陽性農場が 27.1%、O26 陽性農場が 1.7%で、陽性農場は 35 都道府県に及んでいた（Sasaki et al., 2011）。腸管出血性大腸菌は、多くの健康牛の腸管内に常在菌として存在するため、と畜場における牛解体時に、その糞便および腸内容物による枝肉や内臓肉等への直接的もしくは間接的な汚染を完全になくすことは難しい。このような理由から、ひき肉などの牛

肉・内臓肉およびその加工品が腸管出血性大腸菌の主要な感染源となっている

(Hussein et al., 2005)。それに加えて、家畜や野生動物の糞便により汚染された水・土壌を用いて栽培された野菜や果物などが食中毒を引き起こすこともあり（工藤, 2018）、腸管出血性大腸菌食中毒の原因食品は多岐にわたる。

大腸菌の血清型は、菌体表面に存在するリポ多糖（LPS）の構造の違いを示す菌体抗原 O と、運動器官であるべん毛の主要構成タンパク質フラジェリンの抗原性の違いを示す H 型を組み合わせた O:H、または単に O 抗原のみで示される。大腸菌の血清型に関する国際的な基準はデンマーク国立血清学研究所が管理しており、185 種類の O 抗原と 53 種類の H 型が報告されている（国立感染症研究所, 2019）。腸管出血性大腸菌として分離されている O 血清型は 66 種類以上にのぼるが (Blanco et al., 2004)、最も感染者の多い血清型は O157 であり、患者分離株の半分以上を占める。近年 O26 や O111 などの O157 以外の血清型（Non-O157）による食中毒が増加し、世界中で報告されている（Bettelheim, 2007、Brooks et al., 2005、Gerber et al., 2002）。国内の直近 5 年間の血清型別分離状況は、いずれの年も O157 の検出率が最も多く 50～60%を占め、O26 がそれに続き 15%～32%で推移している（表 緒-2）。検出数 3 位以下の血清型は年によって入れ替わり、O111・O103・O121・O145 がそれぞれ数%ずつを占める。O157 と O26 の 2 血清型のみで 70～85%程度、上記 6 血清型で 90%前後を占めることから、主要な血清型の検査を行うことで大半の腸管出血性大腸菌を検出できることがうかがえる。

O 抗原は菌体表面に存在する LPS の一部で、複数種類の糖ヌクレオチドによる基本構造（O ユニット）の繰り返しで形成される糖鎖である。O 抗原の生合成に関わる遺伝子の多くは染色体上の一つの領域にまとまってクラスター（O 抗原合成遺伝子クラスター）を形成しており、そこに含まれる遺伝子のうち糖鎖の修飾に関わる遺伝子群の塩基配列は血清型間で非常に多様性が高く、血清型を遺伝学的に特定する際に利用されている（小林ら, 2013）。糖鎖を膜外に移行する際に働く遺伝子 *wzx* と O ユニットの重合する遺伝子 *wzy* などがこれに含まれ、O157・O26・O111 をはじめ大半の血清型の大腸菌においては *wzx-wzy* ペアを保有している（井口, 2017）。米国農務省（USDA）等では多くの血清型に対して *wzx* が遺伝子検査時のマーカーとして活用されている。

腸管出血性大腸菌が産生する毒素

腸管出血性大腸菌が産生する毒素は、塩基配列・アミノ酸配列ともに赤痢菌が産生する志賀毒素と同じ Stx1 (VT1) と、Stx1 との相同性が 50～60%程度の Stx2 (VT2) の 2 種類が存在する（倉園ら, 1996）。Stx1 および Stx2 には、それぞれ数種類の亜型が存在する。腸管出血性大腸菌は Stx1 と Stx2 の一方または両方を産生する株が存在するが、Stx2 を産生する株に感染した時の方が重症化しやすいといわれている。動物実験による毒性の比較によると、マウス腹腔内投与による毒性は Stx2 が高く、

LD50 は Stx1 が 30 ng/匹に対し (Noda et al., 1987)、Stx2 は 1 ng/匹である (Yutsudo et al., 1987)。一方、ウサギに対する LD50 は Stx1 が 20.2 ng/kg に対し、Stx2 が 884 ng/kg となり、マウスの結果とは逆に Stx1 の毒性が高いという報告がある

(Yoshimura et al., 1998)。ヒトに対する毒性の違いは不明であるため、Stx2 産生株感染による重症化の要因に毒性の強さが直接寄与しているかどうかはわからない。Stx2 産生菌の方が重症化する理由として、毒素の生産量の違い、特に菌が腸管内でのストレス環境下に置かれた時に産生する毒素量が Stx2 の方が多いことが示唆されている (山崎, 2014)。Stx1 と Stx2 の毒素産生量の違いはその遺伝子 *stx1* と *stx2* の発現様式の違いに起因すると考えられている。両遺伝子はともに腸管出血性大腸菌に溶原化している志賀毒素転換ファージゲノム上に存在しており、このバクテリオファージが *stx* の大腸菌内およびその他の種間との水平伝播に関与している。*stx1* は基本的にその上流近傍に存在する Stx1 プロモーターから転写され *stx1* 下流のターミネーターで転写は終結するが、*stx2* は固有のプロモーターが存在しないためファージプロモーターから溶菌遺伝子・ファージ頭部・尾部遺伝子と共に転写される (清水, 2010)。このとき、志賀毒素転移ファージゲノムは腸管出血性大腸菌ゲノムより切り出され環状になっており、ファージの複製産物遺伝子によって環状ファージゲノムは更に劇的に増幅され、毒素も飛躍的に産生される。このようにして多数のファージ粒子が作られ、ファージの溶菌過程に伴って Stx2 も菌体外に放出される。Stx1 は低鉄イオン条件下で産生が増加する (Calderwood et al., 1987)。Stx2 は宿主大腸菌にストレスを与える条件 (マイトマイシン C 処理・UV 照射・抗生物質処理など) で産生が増強される (Köhler et al., 2000、Yee et al., 1993)。このような発現様式の違いにより大腸菌体内で産生された両毒素の局在も異なっており、通常 Stx1 はペリプラズム中に毒素が生産され、菌体外ではほとんど検出されない。Stx2 はペリプラズム中にも産生されるが、多くは菌体外に放出される。

Stx は細胞障害性を発揮する A サブユニット 1 分子と標的細胞に付着する機能を持つ B サブユニット 5 分子から構成される (藤永, 2013)。B サブユニットは細胞膜上の受容体である糖脂質グロボトリアオシルセラミド (Gb3) と結合するため、細胞表面に結合した Stx はエンドサイトーシスにより細胞に取り込まれる。その際 A サブユニットだけが細胞質に入り込み、60S リボソームを構成する 28S リボソーム RNA の 5'末端から 4,324 番目のアデノシンに作用して、RNA *N*-グリコシダーゼ活性によりその糖鎖を切断しアデニンを遊離させるため、新しいアミノアシル tRNA がリボソームに結合できなくなる (山崎, 2014)。このようにして、Stx はタンパク質合成を不可逆的に阻害し、毒性を発揮する。

腸管出血性大腸菌の食中毒事例と対策

腸管出血性大腸菌による大規模食中毒は国内で度々発生し、大きな社会問題となってきた。1996 年に大阪府堺市で発生した学校給食での O157 食中毒では、9,523 人の

方々が罹患し3人の児童が亡くなる痛ましい事件となった。2011年に富山・福井・神奈川の焼肉チェーン店で発生したユッケによるO111食中毒では、181人が感染し、34人がHUSを発症し、5人の貴重な命が奪われた。このような惨事を防止すべく、国をあげて集団食中毒の発生防止に取り組まれてきたので、その一部を紹介する。なお、後述する厚生労働省などから発出された通知等については表 緒-3に一覧化した。1996年に発生した学校給食でのO157集団食中毒事例を受け、同年に「腸管出血性大腸菌感染症」は伝染病予防法に基づく指定伝染病に指定された(健医発第940号)。現在においても腸管出血性大腸菌感染症は感染症法の3類感染症に指定されており、本感染症を診断した全ての医師は直ちに保健所に届出を行わなければならない。ちなみに前述の表 緒-1に示した感染症届出数は、この数字を集計したものである。翌年の1997年には集団給食施設等における食中毒の予防を目的とした「大量調理施設衛生管理マニュアル」(衛食第85号, 別添)が制定され、加熱温度の基準や温度管理の徹底などが示された。また食品衛生法施行規則の一部改正も行われ、病原物質の種別において「腸管出血性大腸菌」が「その他の病原大腸菌」と分けて分類された。ユッケ食中毒事例が発生した2011年には、生食用食肉の規格基準が制定され(食安発0912第7号)、適合しないものの販売を禁止した。また牛肝臓内部の腸管出血性大腸菌汚染の事実を踏まえ、2012年には牛レバーを生食用として販売することも禁止した(食安発第0625第1号)。検査法についても度々通知の改正が行われ、検出対象の拡充が図られてきた。制定当初の1997年には対象はO157のみの検査法であったが(衛食第207号および衛乳第199号)、2006年にnon-O157で最も検出率の高いO26が追加された(食安監発第1102004号)。2011年にはO111についても検査法が示され(食安監発0603第2号)、2014年からは前記3血清型に加え、O103・O121・O145も加えた6血清型が検査対象となり(食安監発1120第1号)、現在に至っている。

腸炎ビブリオ食中毒

腸炎ビブリオ(*Vibrio parahaemolyticus*)は海水中に生息する好塩菌で、本菌に汚染された魚介類やその加工品を生または加熱不足などの状態で摂取することにより食中毒を引き起こす。本菌の潜伏期間は12時間前後で、感染すると激しい腹痛と水様性の下痢症状を示す。本菌による食中毒は主に夏場に発生し、長年国内の細菌性食中毒の発生件数の上位を占めてきた。

環境中の腸炎ビブリオは、寒い冬の時期は海底の汚泥中に生息し、海水温が上昇する春から夏にかけて増殖し、沿岸部や汽水域で頻繁に検出される。1998年9~10月に富山県の漁港海水中に含まれる腸炎ビブリオ数は $2.3 \times 10^2 \sim 1.1 \times 10^4$ CFU/Lとの報告がある(刑部ら, 2000)。患者の下痢便から分離された腸炎ビブリオは神奈川現象と呼ばれる溶血性を示すことが知られており、神奈川現象を示す株の割合はヒト患者分離株では96.5%に対し、海水・魚から検出された腸炎ビブリオにおいてはわずか1.0%という報告がある(Sakazaki et al., 1968)。このように腸炎ビブリオは沿岸海

域を中心とした海水中に多数存在するが、環境から分離される菌株のほとんどは人に対して病原性を示さない。神奈川現象陽性株のヒトへの投与実験のデータより 2×10^2 および 2×10^5 CFU の投与では発症せず、 1×10^6 および 1×10^7 CFU では発症率が 50% であること、 3×10^7 および 1×10^9 CFU の投与では 100% 発症することが示されている（食品安全委員会, 2012）。一方、神奈川現象陰性株においては、 $2.5 \times 10^9 \sim 6.6 \times 10^{10}$ CFU 投与しても臨床症状は確認されていない（Sakazaki et al., 1968）。このように腸炎ビブリオは一部の株が病原性を示し、病原株においても発症に必要な菌数は腸管出血性大腸菌と比べはるかに多い。しかし、本菌の増殖速度は極めて速く、倍加時間は最適条件下で 8~9 分に達するため（Joseph et al., 1982）、増殖防止のためには温度や塩濃度の管理が重要である。腸炎ビブリオの増殖温度域は $10 \sim 42^\circ\text{C}$ ($35 \sim 37^\circ\text{C}$ が至適)、食塩濃度は 1~8% (2~3% が至適) で、淡水中では数分以内に死滅するため（坂崎, 2000）、鮮魚介類の腸炎ビブリオ対策として低温管理や真水での洗浄が有効とされている。ちなみに腸炎ビブリオの増殖速度の速さは、腸炎ビブリオがもつ大小 2 つの環状染色体に由来すると考えられている。大腸菌をはじめ一般的な細菌は 1 つの環状ゲノムを有するが、腸炎ビブリオはゲノムを分割することで DNA 複製に要する時間を短縮することができ、それが高い増殖性につながると考えられている（飯田, 2004）。

腸炎ビブリオの血清型は菌体抗原 O と莢膜抗原 K を組み合わせた O:K、または単に O 抗原のみで示される。これまでに型別されている血清型は O1~O12 まで存在するが、これらは食中毒患者より分離された株を分類したものであり、環境中にはさらに多くの血清型が存在するといわれている。日本で食中毒原因菌として分離される腸炎ビブリオの主要な血清型は、以前は O4:K8 や O1:K56 であったが（甲斐, 2013）、O3:K6 の世界的な大流行に伴い 1996 年以降 O3:K6 に置き換わっている。O3:K6 はインド・台湾・ラオス・タイ・韓国などのアジアをはじめ、これまで腸炎ビブリオ食中毒が少ないアメリカなどにおいても同一クローンが臨床検体から分離されている

（Matsumoto et al., 2000）。2000~2009 年までに国内で発生した腸炎ビブリオ食中毒事件で血清型が判明しているもののうち、O3:K6 の割合は 67.7% を占める（食品安全委員会, 2012）。

ビブリオ属の菌株の中には、腸炎ビブリオ以外にも病原性を示すものがいくつかも報告されている。その代表例はコレラ（*Vibrio cholerae*）であり、世界的な大流行を何度も発生させている。現在も第 7 次世界大流行中であり、毎年数十~百万人もの患者が発生しているといわれている。その他にはコレラの類縁菌とされる *Vibrio mimicus* や、*Vibrio fluvialis*、*Vibrio furnissii* が食中毒細菌として知られている。一方、創傷感染を起こす *Vibrio alginolyticus*、*Vibrio vulnificus* も食品検査時に多数分離されるため（千葉県衛生研究所, 2014）、腸炎ビブリオ検査の際はこれらの菌種との鑑別が重要となる。

腸炎ビブリオが産生する毒素

腸炎ビブリオが産生する主要な病原毒素は耐熱性溶血毒 (TDH)、およびその類似溶血毒 (TRH) であり、前述の神奈川現象は TDH によって引き起こされることが知られている (Shinoda, 2011)。神奈川現象を呈する TDH をコードする遺伝子は *tdh1* と *tdh2* の 2 種類が存在し、*tdh2* の発現レベルは非常に高く、菌体外に産生される TDH のほとんどが *tdh2* に由来する (西沢, 1996)。*tdh2* の発現レベルが高い理由は、非常に強力なプロモーターを持つこと、および転写調節因子 ToxR による発現促進作用が存在するためと考えられている。TDH はタンパク質毒素であるにも関わらず、100°C 10 分の加熱に耐えるが、TRH は易熱性である。

TDH の溶血活性メカニズムについても研究がなされており、TDH は赤血球膜上の受容体 GT₁ ガングリオシドに結合して小孔を形成し、浸透圧による赤血球内圧の上昇と物理的な赤血球膜破壊により溶血が生じると考えられている (松田, 2013)。小孔は 4 量体を形成した TDH の中央に形成されることが結晶構造解析によって示されており、TDH のチャネル機能によって細胞膜を介して水を通過させ、細胞の内圧上昇につながると推測されている (橋本ら, 2010)。TDH は溶血活性以外にも細胞毒性・下痢原性・心臓毒性を持つことが知られ、精製 TDH による心臓毒性は強力かつ即時的な致死活性を示し、マウスやラットに数 µg の静脈内投与を行うと 1~2 分で死亡することが報告されている (松田, 2013)。

TDH および TRH 以外の病原因子としてⅢ型分泌装置 (T3SS) が知られている。T3SS はグラム陰性菌が持つタンパク質分泌装置であり、自身の生産するエフェクタータンパク質を宿主細胞に注入し病原性を示す。腸炎ビブリオは 2 セットの T3SS を保有し、T3SS2 は神奈川現象陽性株に特異的に存在し、腸管毒性に主要な役割を果たすことが示されており、細胞毒性に関与するエフェクターとして VopT が同定されている (児玉, 2009)。T3SS2 関連遺伝子群は *tdh* および *trh* と同様に、腸炎ビブリオゲノム中で病原因子が集中する PAI 領域に存在することが明らかとなっている

(Makino et al., 2003)。PAI はファージやプラスミドなどにより水平伝播により獲得されたものと考えられている (飯田, 2004)。

腸炎ビブリオの食中毒事例と対策

1950 年に大阪で発生したシラス干しによる食中毒は 272 人の患者、20 人の死者を発生させ、藤野らによる腸炎ビブリオ発見の契機となった。その後、腸炎ビブリオによる食中毒は頻繁に発生し、食中毒による死者数は 1970 年までは毎年 5 人前後もいたが、それ以降減少し 1986 年以降は 5 年間で 1 人となり、2000 年以降は報告されていない (甲斐, 2013)。腸炎ビブリオによる食中毒は O3:K6 の流行も受け 1998 年に急増し 12,000 人を超える感染者を発生させたことから、同年から腸炎ビブリオ食中毒防止策について検討が重ねられ、行政によって具体的な対策が講じられた (工藤, 2013)。2001 年に腸炎ビブリオ食中毒低減のために厚生労働省により生食用鮮魚介類

等について表示基準・成分規格・加工基準及び保存基準が設けられた（食発第 170 号、表 緒-3）。この通知では、魚介類を洗浄・加工する際には飲料水・殺菌海水・人工海水を使用すること、魚介類の腸炎ビブリオの成分規格を設定し生食用鮮魚介類においては最確数 1 g あたり 100 以下、ゆでだこ・ゆでがにでは 25 g 当たり陰性であることなどが規定され、新たに腸炎ビブリオの試験法が定められた。この成分規格では生食用鮮魚介類 1 g 当たり 100 個以下の腸炎ビブリオの存在が認められているが、この理由は前述の通り海水中や鮮魚介類から高頻度で腸炎ビブリオが検出されるため 0 にすることは現実的に難しいためと考えられる。2000 年に実施された魚介類の腸炎ビブリオ汚染率調査で規格基準を超える生食用魚介類の割合は 0.2%であること、また貝類を主とした調査では腸炎ビブリオ菌数が規格基準を超える検体中での *tdh* 陽性検体率は 24.2%、基準値以下のものでは 6.4%であることから、生食用鮮魚介類における腸炎ビブリオの規格基準は現実的かつ一定の効果が期待できることが確認されている（工藤ら, 2003）。ゆでだこ・ゆでがにについては加熱処理しているため、腸炎ビブリオは死滅しており、海水や魚介類による二次汚染が起きていない限り腸炎ビブリオは検出されない。成分規格を超えた食品は、生産から消費までのいずれかの段階で、温度管理や加工処理に不具合が生じた可能性が考えられるため、成分規格はその食品が適切な衛生管理を受けて流通したかどうかを監視する際の指標となっている（大阪健康安全基盤研究所, 2012）。これらの対策が功を奏し、腸炎ビブリオ食中毒は年々減少し、現在の低い水準を保つことができていると考えられる。

腸管出血性大腸菌と腸炎ビブリオの共通点

本研究の対象とした 2 種の食中毒細菌は、菌の性質として対照的な側面が数多く存在する。腸炎ビブリオによる食中毒は主に魚介類を原因とし、潜伏期間が短いため、発症時に食中毒の原因食品の候補が絞り込みやすい。また食中毒の発症には非常に多くの菌数が必要であるため、食中毒原因食品中には多くの腸炎ビブリオが存在し、さらにこの細菌は増菌培養による増殖速度も極めて速いため、候補食品さえ残っていれば検査によって本菌を検出しやすいと考えられ、原因食品の特定も行いやすい。腸管出血性大腸菌による食中毒は、前述の通りその原因食品は牛肉やその加工品・野菜など多岐にわたっている。50 個以下の微量で食中毒が発症し、潜伏期間も長いため、原因食品の絞り込みは難しい。一方、両者に共通しているのは、家畜腸内や海水中などの環境に適合しているため自然界からの排除は困難であり、一定の確率で食品に混入することは避けられないという点である。牛の生産段階では、家畜伝染病予防法で定められた伝染病について監視が行われ、と畜場において臨床症状が認められた動物やその肉類は全廃棄することが定められているが、腸管出血性大腸菌は健康牛が保菌しているため監視の目をすり抜けてしまい、腸管出血性大腸菌が付着した肉類の流通を完全に阻止することはできない（関崎, 2014）。そのため食中毒発生防止のためには、各菌の性質を熟知し、生産・加工・流通・販売・保管・調理の各段階で適切な対策を

取り、食中毒細菌を制御していくことが求められる。そして、対策の立案・効果の検証・モニタリングなど様々な場面で検査を適切に実施し、肉眼では見えない食中毒細菌の挙動を確認していくことが極めて重要である。検査には多大な労力と時間を要するため、継続的に行うためには目的に応じて、適切な検査法を選択することが必要となる。次項以降は食品中の微生物検査法について述べる。

食品の微生物検査

食の安全確保のため、食品製造・販売業者は取り扱う原材料や最終製品の安全性の証明や、調理・加工・保管工程のモニタリングなどの目的で、日々検査しなければならない。行政においても、食品衛生法に基づく収去検査や、食中毒発生時に原因菌や原因食品の同定・感染経路解明のために検査が行われている。

食品微生物検査の基本は、一般生菌数や大腸菌群などの衛生指標菌の検査である。衛生指標菌は検査対象食品の病原微生物の汚染状況や、腐敗・変敗等の品質劣化の程度の推測に利用されている。例えば、加熱食品から衛生指標菌が検出された場合には、加熱工程での不適切な温度管理または二次汚染の発生などが推察される。衛生指標菌は食品の取り扱い状況を示す大変有用な指標となるが、その検出対象にはどんな菌種が含まれるかをよく理解しておかなければならない。例えば、大腸菌群は「乳糖を分解してガスを産生する菌群」と定義されているが、同一菌種であっても乳糖非分解・乳糖遅分解株やガス非産生株が存在する。また、サルモネラ属菌や赤痢菌は乳糖非分解株であるため、大腸菌群陰性の食品であってもこれらの菌が含まれる可能性がある。一方、2011年から国内の公定法に導入された腸内細菌科菌群を指標菌として検査を行えば、前述の乳糖非分解株についても見逃すことなく検出可能である。その他の例として、腸管出血性大腸菌 O157 は大腸菌検出の指標として使われる β-グルクロニダーゼを保有・産生しないため、酵素基質培地による大腸菌検査では陰性を示すことが知られている。このように衛生指標菌の検査は重要であるが、これらの検査のみでは重大な食中毒細菌を見逃してしまう恐れがあるため、食品ごとにリスクの高い食中毒細菌を個別に検査することが重要となる。

食品中の病原細菌検査法：培養法

食品中の食中毒細菌の公定検査法は一般的に培養法である。食中毒菌の種類に応じて使用する培地の組成や培養温度等の条件は異なるが、培養法の基本的な手順は次の通りである。はじめに検査対象食品を液体培地で希釈し、付着した微生物を培地中に浮遊させ、目的の食中毒細菌以外の微生物の増殖をできるだけ抑制する条件（培地組成・温度・酸素濃度等）下で 1～2 晩増菌培養を行う。培養後の増菌培養液の一部を、選択剤と鑑別剤が加えられた選択寒天培地上に塗抹し、さらに 1～2 晩分離培養を行う。得られたコロニーの中から、色・形・大きさなどの特徴をもとに目的の食中毒細菌と推定されるコロニーを複数釣菌し、各種生化学的性状試験（糖分解・呼吸機能・

アミノ酸分解・ガス産生・運動性などの確認）・血清型別試験・毒素産生性の確認等を行い、それらの総合結果より原因菌を同定する。培養法は検出感度が高く、正しく実施すれば最も信頼性の高い結果が得られる検査法と考えられている(五十君, 2017)。しかし、検査結果が得られるまでの日数が長く(増菌培養後数日)、作業も煩雑で検査実施者の経験や技術力の影響を受けやすいことから、知識と経験を兼ね備えた熟練者が検査しないと正しい検査結果が得られない恐れがある。培養法による検査を継続していくためには、莫大な労力・時間を要することから、迅速かつ簡便で精度の高い検査法が望まれている。培養法および後述するその他の検査法の特徴については表緒-4 にまとめた。

食品中の病原細菌検査法：遺伝子検査法・免疫検査法

近年、食中毒細菌の検査においても PCR 法・リアルタイム PCR 法・LAMP 法などの遺伝子検査法が普及してきている。これらの検査法は、遺伝子増幅工程を含むため検出感度は一般的に高い。通常、1 反応当たり 100~1,000 個の細菌から調製した DNA が存在すれば特異的な DNA 領域の増幅が可能である(宮本, 2000)。そのため食品検査で求められる「食品 25 g 中に数個程度の微量でも見逃さない検出感度」を満たすためには、増菌培養工程が必須となる。遺伝子検査法は増菌培養後数時間で検査結果を得ることができ、比較的迅速な検査法である。一方、DNA 抽出等の複雑な工程と数 μL 単位の細かなピペット操作を伴い、コンタミネーションを避け安定した結果を得るためには一定水準以上の検査技術が必要となる。通常の PCR 法の場合には、サーマルサイクラーでの増幅後に電気泳動を行い、増幅された DNA 断片のサイズが標的サイズと一致することを確認しなければならないため、労力と時間がかかる。一方、リアルタイム PCR 法では DNA 断片を増幅後に機械によって自動で結果を測定するため、電気泳動工程が不要で省力化が図れる上に、定量的な検査も可能であるが、蛍光検出のための高価な装置と試薬を準備しなければならない。

ELISA 法・ドットブロット法などの免疫検査法は、抗体を用いて検出対象の抗原を特異的に検出することが可能である。酵素標識や蛍光標識を用いることで、高い検出感度を得ることができるが、食品中の病原細菌の検出においては他の検査方法と同様に増菌培養工程が必須となる。検査は複数工程からなり、一般的には 30 分~1 時間の反応工程と 5 回程度の洗浄工程を複数セット繰り返す必要があり、操作は煩雑で検査には数時間を要する。測定にはプレートリーダーや蛍光検出機等の高価な機械が必要となる。これらのデメリットを克服した免疫検査法として、近年イムノクロマト法が注目されている。

簡易迅速検査法：イムノクロマト法

イムノクロマト法は、最も迅速かつ簡便な検査法の 1 つであり、ラテラルフローイムノアッセイまたはラテラルフローアッセイとも呼ばれる。イムノクロマト法は抗原

抗体反応を利用した検査法であり、2種の抗体を組み合わせたサンドイッチ法が最も一般的である。サンドイッチイムノクロマト法の構成要素および検出原理は図 緒-2 に示した。テストストリップは複数の部材が組み合わされて構成されており、サンドイッチアッセイを構築可能な2種類の検出対象特異的抗体がコンジュゲートパッドとニトロセルロース膜にそれぞれ含まれている。コンジュゲートパッドには、対象抗原に結合し可視化するために金コロイド等で標識した抗体を含浸・乾燥させている。ニトロセルロース膜上には金コロイド標識抗体を捕捉・集積しラインとして検出できるように、抗原特異的抗体およびコントロール抗体が塗布されている。コントロール抗体は抗原未結合の金コロイド標識抗体を検出するためのものであり、標識抗体としてウサギポリクローナル抗体を用いた場合には抗ウサギ IgG 抗体が、マウスモノクローナル抗体 (IgG) の場合には抗マウス IgG 抗体が用いられる。検出原理は次の通りである。サンプルパッドに試料溶液を滴下すると、毛細管現象により溶液が吸収パッド側に向かって流れ始め、コンジュゲートパッドを通過する際にそこに含浸されている金コロイド標識抗体を展開中の溶液に溶解する。検出対象の抗原が試料溶液中に含まれる場合、その抗原が金コロイド標識抗体と特異的に結合し複合体を形成する。この抗原抗体複合体がニトロセルロース膜上を移動する際に、テストライン領域に塗布された抗原特異的抗体に捕捉されるため、金コロイド抗体の集積により赤紫色のラインが出現する。抗原と結合しない余剰金コロイド抗体等はさらにニトロセルロース膜上を移動し、コントロールライン領域に塗布された抗 IgG 抗体に捕捉され、赤紫色に発色する。このようにして、試料溶液中に検出対象の抗原を含む場合には、赤紫色のテストラインおよびコントロールラインを目視で確認することができ、検査結果陽性と判断できる。一方、目的の抗原が試料溶液中に存在しない場合は、金コロイド抗体は複合体を形成できないため、抗 IgG 抗体にのみ捕捉され、コントロールラインのみが目視確認可能となる。食品中の食中毒細菌の検査時には、増菌培養液をそのまま、もしくは希釈液等に混合したものを試料溶液として用い、必要に応じて加熱処理などの殺菌工程を加えることもある。

イムノクロマト法による検査は試料溶液を滴下するだけの簡単操作で、増菌培養後 10~20 分程度で迅速に検査結果が得られる。テストラインの有無を目視で確認することにより容易に結果判定が可能であり、高価な機器を必要としない。操作・結果の判定が容易であることから、誰でも簡単に検査が可能である。一方、イムノクロマト法を開発する上では、感度と特異性を兼ね備えた抗体の開発が必要不可欠であり、どのような抗体を用いてどんな処方で試作するかにより、得られる性能は大きく左右される。ELISA 法のような洗浄工程もないため、非特異的な反応が問題になることも多く、開発の難易度は高いものとなっている。食品や臨床における日々の検査に活用するために大腸菌 O157 (Aldus et al., 2003、Jung et al., 2005)・サルモネラ属菌 (Hoerner et al., 2019)・リステリア モノサイトゲネス (Shim et al., 2007)・カンピロバクター ジェジュニおよびコリ (Kawatsu et al., 2008) など、いくつかの食中

毒細菌に対するイムノクロマト法が開発されている。シングルパスシリーズ (Merck KGaA) やラテラルフローシステム (Hygiena, LLC)、NH イムノクロマトシリーズ (NH Foods Ltd.) のように、食品検査キットとして実際に市販されているものもあり、誰でも簡単にイムノクロマト法による検査が実施可能な状況となってきた。

しかしながら、近年問題となってきた **non-O157** の腸管出血性大腸菌や、食中毒件数は激減しているが継続的な検査が必要な腸炎ビブリオを検出可能なものは開発されていない。そこで本研究では、食品に含まれる腸管出血性大腸菌と腸炎ビブリオを対象としたイムノクロマト法を開発するための基礎的技術検討を行い、その試作品を作製し、性能を評価した。また、それを通じて新たな検査系の構築や特異的エピトープの解明を実施した。腸管出血性大腸菌の検査においては、最も食中毒患者数の多い **O157** に加え、複数の血清型を識別して検出することが求められているため、本研究では第 1 章で **Non-O157** の代表例である **O26** の特異的検査法を開発し、続いて第 2 章で複数の血清型の同時検査法を開発した。特定の血清型の検査が重要な腸管出血性大腸菌とは対照的に、腸炎ビブリオにおいては血清型や毒素産生の有無に関わらず全ての株を検出することが求められる。そこで第 3 章では、全ての腸炎ビブリオを特異的に検出可能な検査法の開発を目指した。

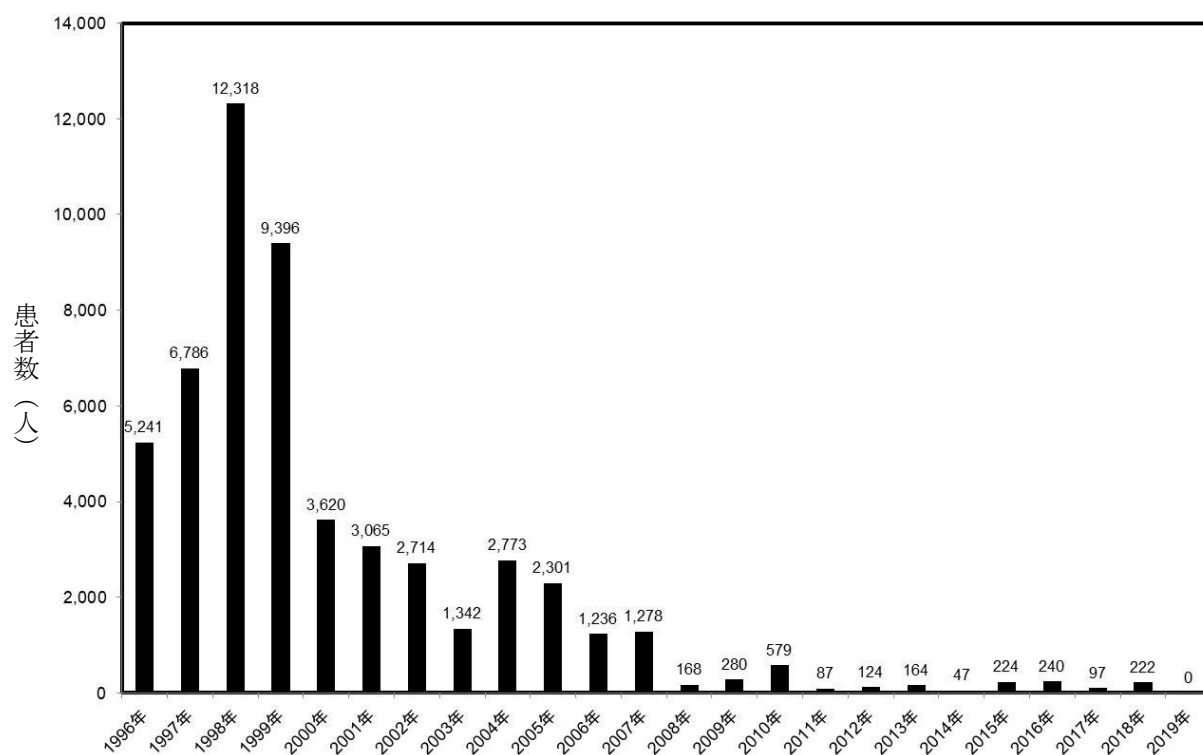


図 緒-1. 腸炎ビブリオ食中毒患者数の推移
厚生労働省の食中毒統計をもとに作成した。

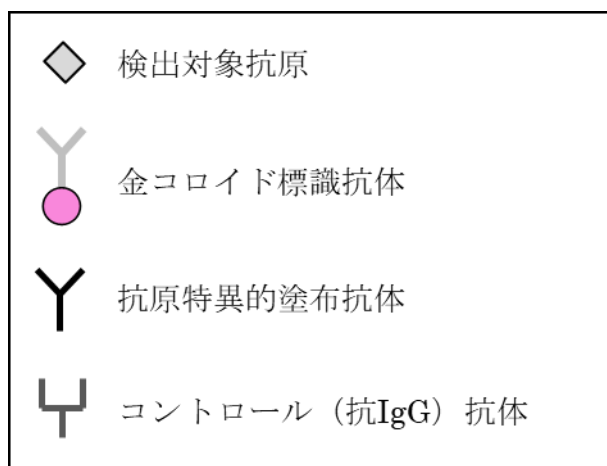
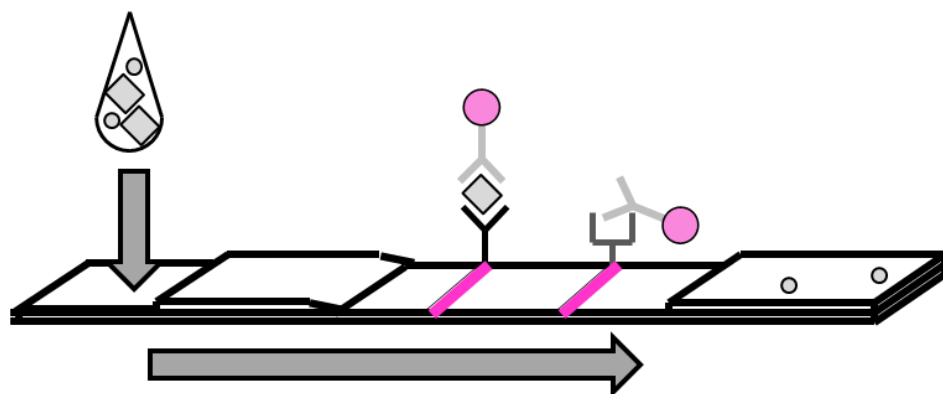
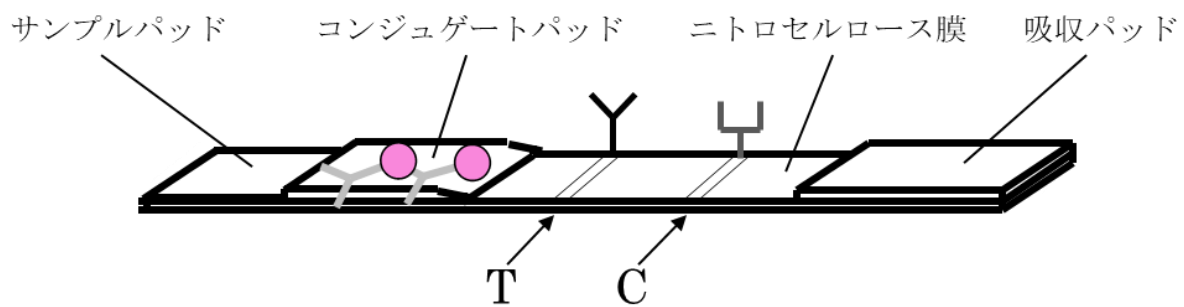


図 緒-2. イムノクロマト法の構成要素と検出原理

矢印はニトロセルロース膜上のテストライン領域（T）およびコントロールライン領域（C）を示す。

表 緒-1. 腸管出血性大腸菌による食中毒状況と腸管出血性大腸菌感染症届出数

| | 食中毒 | | | 感染症届出数 | |
|--------|------|-----|-----|--------------|-------|
| | 発生件数 | 患者数 | 死者数 | 無症状病原体保有者を含む | うち有症者 |
| 2010 年 | 27 | 358 | 0 | 4,135 | 2,719 |
| 2011 年 | 25 | 714 | 7 | 3,939 | 2,659 |
| 2012 年 | 16 | 392 | 8 | 3,770 | 2,363 |
| 2013 年 | 13 | 105 | 0 | 4,045 | 2,624 |
| 2014 年 | 25 | 766 | 0 | 4,156 | 2,839 |
| 2015 年 | 17 | 156 | 0 | 3,568 | 2,338 |
| 2016 年 | 14 | 252 | 10 | 3,647 | 2,246 |
| 2017 年 | 17 | 168 | 1 | 3,904 | 2,606 |
| 2018 年 | 32 | 456 | 0 | 3,855 | 2,584 |
| 2019 年 | 20 | 165 | 0 | 3,744 | 2,511 |

厚生労働省の食中毒統計および国立感染症研究所の感染症発生動向調査をもとに作成した。

表 緒-2. 分離・同定された腸管出血性大腸菌の血清型の推移

| 血清型 | 2015 年 | 2016 年 | 2017 年 | 2018 年 | 2019 年 |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| O157 | 60.9% | 52.8% | 53.8% | 56.0% | 53.5% |
| O26 | 21.2% | 31.6% | 25.3% | 23.9% | 15.9% |
| O111 | 3.0% | 2.2% | 2.6% | 3.2% | 5.7% |
| O103 | 4.2% | 3.6% | 6.6% | 3.5% | 5.8% |
| O121 | 1.9% | 2.4% | 3.0% | 4.1% | 3.6% |
| O145 | 1.3% | 1.1% | 1.4% | 1.7% | 2.1% |
| その他 | 7.5% | 6.3% | 7.3% | 7.6% | 13.4% |
| 型別された大腸菌株 の総数 | 1,709 | 1,669 | 1,689 | 2,140 | 1,784 |

国立感染症研究所の感染症発生動向調査をもとに作成した。

表 緒-3. 腸管出血性大腸菌および腸炎ビブリオに係る通知等（抜粋）

| 文書番号 | 発出日 | 文書名 |
|---------------------------|----------------------|---|
| 健医発第 940 号 | 平成 8 年 8 月 6 日 | 腸管出血性大腸菌感染症の指定伝染病への指定及び「腸管出血性大腸菌感染症について適用される伝染病予防法の規定を定める省令」の施行について |
| 衛食第 85 号 | 平成 9 年 3 月 24 日 | 大規模食中毒対策等について |
| 食安発 0912 第 7 号 | 平成 23 年 9 月 12 日 | 食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について |
| 食安発第 0625 第 1 号 | 平成 24 年 6 月 25 日 | 食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について |
| 衛食第 207 号および 衛乳第 199 号 | 平成 9 年 7 月 4 日 | 腸管出血性大腸菌 O157 の検査法について |
| 食安監発第 1102004 号 | 平成 18 年 11 月 2 日 | 腸管出血性大腸菌 O157 および O26 の検査法について |
| 食安監発 0603 第 2 号 | 平成 23 年 6 月 3 日 | 腸管出血性大腸菌 O111 の検査法について |
| 食安監発 1120 第 1 号 | 平成 26 年 11 月 20 日 | 腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について |
| 食発第 170 号 | 平成 13 年 6 月 7 日 | 食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について |

表 緒-4. 食品中の病原細菌検査法の比較

| | 培養法 | 遺伝子検査法 | | 免疫検査法 | |
|-----------------------|-------|--------------|--|----------|------------------|
| | | PCR 法 | | ELISA 法 | イムノクロマト法 |
| | | リアルタイム PCR 法 | | ドットブロット法 | |
| | | LAMP 法 | | | |
| 信頼性 | ◎ | ○ | | ○ | △～○ ^b |
| スキル・経験不要 | × | × | | △ | ○ |
| 簡便性 | × | △ | | △ | ○ |
| 迅速性（時間 ^a ） | ×（数日） | △（数時間） | | △（数時間） | ○（数十分） |
| 安価な設備 | ○ | × | | × | ○ |

^a 増菌培養後の検査所要時間を示す。

^b 性能は使用抗体とキット試作条件に依存し、他の検査法より性能差が大きいため、幅を持たせて記載した。

第 1 章 大腸菌 O26 の簡易迅速検査法の開発

1.1 背景および目的

腸管出血性大腸菌による食中毒事例で分離される大腸菌のうち最も主要な血清型は O157 であるが、近年 O157 以外の血清型による食中毒が世界各国で多数報告されている。Non-O157 で最もよく検出される血清型が O26 であり (Bettelheim, 2007)、アメリカ (Brooks et al., 2005)・ドイツとオーストリア (Gerber et al., 2002)・日本 (IASR, vol. 31, 2010) など患者から分離されている。国内においては、O26 による感染事例は保育所などで発生する「感染症事例」も多い。腸管出血性大腸菌 O26 の標準的な検査法は培養法である (Hara-Kudo et al., 2000、Hiramatsu et al., 2002)。日本において、O26 の公定検査法がはじめて示されたのは平成 18 年 11 月の「腸管出血性大腸菌 O157 および O26 の検査法について」(食安監発第 1102004 号)である。この通知法では、一般的な食品については、25 g の食品を 225 mL のノボビオシン加 mEC 培地に懸濁し、42°C で 22 時間±2 時間増菌培養後に *stx* 遺伝子検査を行い、陽性を示した場合には培養法による分離を行うという流れになっている。しかし、食肉・内臓肉・食肉製品およびチーズについては O157・O26 以外の腸管出血性大腸菌も多数存在するため、遺伝子検査によるスクリーニングは行わず、培養法のみを実施することとされている。その他の食品についても遺伝子検査を行うための設備を整えることができない場合については、培養法のための検査でよい。遺伝子検査法によるスクリーニングは死菌由来の遺伝子も検出する可能性が高いため、最終的な陽性判定は培養法により腸管出血性大腸菌を分離しなければならない (嶋ら, 2011)。増菌培養の際に、「培地へのノボビオシンの添加」と「42°C での培養」により選択性を高めることで、検体中の腸管出血性大腸菌以外の細菌の増殖を抑制し、O157 と O26 が検出しやすいよう工夫されている。分離培養を行う際には直接塗抹法と免疫磁気ビーズによる濃縮法が併記されているが、「O157 の検査において増菌培養後に免疫磁気ビーズによる濃縮工程を導入することにより直接塗抹と比較して検出率を上げられ有用である」という報告もあることから (Karch et al., 1996)、O26 においても見逃しのない検査を行うためには免疫磁気ビーズの使用が望ましい。O26 の分離培地としては、セフィキシムおよび亜テルル酸カリウムを添加したラムノース・マッコンキー寒天培地 (CT-RMAC) が広く使われる。この培地は大腸菌の分離に使用されるマッコンキー寒天培地の乳糖をラムノースに代えたもので、一般的な大腸菌はラムノースを分解して生ずる酸により中性紅が黄色から赤色に変色し、析出した不溶性の胆汁酸と強く結合し鮮明なレンガ色のコロニーが生じる (甲斐, 2017)。一方、O26 はラムノース非・

遅分解であるため、半透明のコロニーとなる。O157 も同様の原理で、マッコンキー寒天培地の乳糖をソルビトールに代えた「セフィキシムおよび亜テルル酸カリウムを添加したソルビトール・マッコンキー寒天培地 (CT-SMAC)」が用いられるが、CT-SMAC 上での O157 ほど明確なコロニーが CT-RMAC 上の O26 では形成されず、類似菌が多数発育することも多いことから、酵素基質培地と併用することが推奨されている。

培養法は正しく実施すれば最も信頼性の高い結果が得られる検査法であるが、操作が煩雑で、知識と経験が豊富な熟練者でないと検査精度の維持は難しく、検査に時間がかかり、非効率的である。食品検査においては腸管出血性大腸菌 O26 の汚染菌数は極めて少量であるため、増菌培養は必須であるが、その後の工程を効率化・迅速化するために様々な検査法が開発されている。すなわち、PCR 法 (DebRoy et al., 2004) ・マルチプレックス PCR 法 (Murphy et al., 2007) ・リアルタイム PCR 法 (O'Hanlon et al., 2004, Sharma, 2002) ・LAMP 法 (Hara-Kudo et al., 2008) ・ELISA 法 (Blais et al., 2006, Kerr et al., 1999) などによる大腸菌 O26 の検出が報告されている。しかしながら、これらの検査法はいずれも高価な機械が必要であり、検査に数時間を要する。検査手順も複雑であるためその実施には、一定水準以上の検査スキルが求められる。イムノスティックアッセイは高価な機械を必要としないが (Aldus et al., 2003)、洗浄工程など複数の工程があり、数時間の時間を要することから、多検体の検査には適していない。以上の背景から、日常の検査においては迅速かつ簡便で、高価な機械が不要な大腸菌 O26 の検査法が望まれていた。イムノクロマト法はこれらの要件を満たす検査法であるが、大腸菌 O26 を検出可能なイムノクロマト法は存在しない。

そこで本章では、大腸菌 O26 を迅速、簡便かつ信頼性の高い検査が可能なイムノクロマト法を開発するための基礎的技術検討を行い、その試作品を作製し性能を評価した。一般的にサンドイッチイムノクロマト法による検出系を構築するためには、認識するエピトープの異なる 2 種類の抗体が必要となる。しかし、細菌を検出対象とする場合には、菌体表面に多分子の O 抗原が存在するため、O 抗原を認識する 1 種類の抗体でサンドイッチイムノクロマト法が構築できる場合がある。高性能なイムノクロマト法を開発するためには、抗体の性能が極めて重要となるため、本章では大腸菌 O26 の O 抗原を認識する高力価の抗体を得るために、3 種の方法で調製した O26 免疫抗原をウサギに免疫し、得られたポリクローナル抗体の中から高感度で特異性の高い抗体を選抜した。選抜した抗体を用いて、イムノクロマト法構築のための最適条件を決定し、完成した試作品「O26 イムノクロマト」の検出感度・特異性について性能評価を行い、食品検査に求められる性能を有するかどうか確認した。

1.2 材料と方法

1.2.1 使用菌株

本研究に使用した微生物株（表 1-1）は、菌株保管機関の ATCC・RIMD（Osaka University）・IID（University of Tokyo）・NIAH・JCM（RIKEN BioResource Center）から入手した。SA および SAB 大腸菌株は SGSC（University of Calgary）から入手した。大腸菌野外分離株（wtO26・wtO111・wtO157）は日本ハム株式会社 中央研究所の保存株を使用した。

1.2.2 抗大腸菌 O26 ポリクローナル抗体の作製

大腸菌 O26 はトリプトソーヤ液体培地（TSB; Nissui Pharmaceutical Co. Ltd.）もしくは普通寒天培地（Nissui Pharmaceutical Co. Ltd.）で、37°C 18 時間培養した。培養後のコロニーを PBS に懸濁し、1 時間煮沸して加熱殺菌抗原を調製した。ホルマリン殺菌抗原はコロニーを 10%ホルマリン溶液に懸濁して、室温で 18 時間静置した。加熱殺菌およびホルマリン殺菌抗原いずれも 3 回洗浄し、PBS に懸濁した。これらの抗原溶液をフロイント完全アジュバントと 1:1 で混合して免疫抗原とし、体重 2.5~3.0 kg の日本白色種の雌ウサギの背部皮内に免疫した。2 回目以降の免疫ではアジュバントの種類をフロイント不完全アジュバントに変更した。免疫は 2 週間おきに 10 週間、合計 6 回実施した。最終免疫から 10 日後に麻酔下で全採血を行い、遠心分離により血清を得た。プロテイン G カラム（GE Healthcare Life Sciences）を用いたアフィニティー精製により血清からウサギ IgG を精製し、抗大腸菌 O26 ポリクローナル抗体として使用した。これらの実験は日本ハム株式会社 中央研究所の動物実験ガイドラインに従って実施した。

1.2.3 ELISA 法による抗血清の力価測定

抗原固相化 ELISA 法は Aldus らの方法を一部改良して実施した（Aldus et al., 2003）。すなわち、加熱殺菌した大腸菌 O26 を 50 mM 炭酸-重炭酸緩衝液（pH 9.6; Sigma-Aldrich）で 1×10^7 CFU/mL の濃度まで希釈し、96 ウェルプレート（Thermo Fisher Scientific Inc.）の各ウェルに 100 μ L 分注し、4°C で 1 晩固相化した。プレートを PBST で 2 回洗浄後、ブロックエース溶液（MEGMILK SNOW BRAND）200 μ L を加えて、4°C で 1 晩ブロッキングした。PBST で 3 回洗浄後、10 倍段階希釈した抗血清を各ウェルに 100 μ L 添加し、1 時間反応させた。PBST で 5 回洗浄後、各ウェルに 20,000 倍希釈した HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体（Thermo Fisher Scientific Inc.）を 100 μ L 添加し、1 時間反応させた。PBST で 5 回洗浄後、TMB 溶液（Moss, Inc.）を各ウェルに 100 μ L 添加し、25°C で 20 分間反応後、0.25 M 硫酸を 100 μ L 添加し反応を停止した。プレートリーダーを用いて主波長 450 nm・副波長 620 nm

の吸光度を測定した。

1.2.4 サンドイッチ ELISA 法によるポリクローナル抗体の評価

精製したポリクローナル抗体をビオチン標識キット (Roche Diagnostics K.K.) で標識した。ポリクローナル抗体を 0.1 M 炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 8.5) で 5 $\mu\text{g/mL}$ に希釈し、96 ウェルプレート各ウェルに 100 μL 分注し、4°C で 1 晩固相化した。プレートを PBST で 2 回洗浄後、1% BSA、PBS を 200 μL 添加し、25°C で 3 時間ブロッキングした。PBST で 3 回洗浄後、10 倍段階希釈した菌液を各ウェルに 100 μL 添加し、1 時間反応させた。PBST で 5 回洗浄後、各ウェルに 0.625 $\mu\text{g/mL}$ に希釈したビオチン標識ポリクローナル抗体を 100 μL 添加し、1 時間反応させた。PBST で 5 回洗浄後、40,000 倍に希釈した HRP 標識ストレプトアビジン溶液

(Thermo Fisher Scientific Inc.) を 100 μL 添加し、30 分間反応させた。PBST で 5 回洗浄後、TMB 溶液を各ウェルに 100 μL 添加し、25°C で 20 分間反応後、0.25 M 硫酸を 100 μL 添加し反応を停止した。プレートリーダーを用いて主波長 450 nm・副波長 620 nm の吸光度を測定した。

1.2.5 O26 イムノクロマトの開発

イムノクロマト法のテストストリップはサンプルパッド (GE Healthcare Life Sciences)・コンジュゲートパッド (Merck KGaA)・ニトロセルロース膜 (Merck KGaA)・吸収パッド (Merck KGaA) で構成されている。金コロイド抗体の調製は川津らの方法を一部改変して実施した (Kawatsu et al., 2006)。すなわち、25 $\mu\text{g/mL}$ の抗大腸菌 O26 抗体 1 mL と金コロイド溶液 (TANAKA Kikinzoku Kogyo K.K.) 5 mL を混合し、室温で 1 晩反応させた。10% BSA 溶液を 1 mL 添加し、室温で 1 時間ブロッキングした。10,000 $\times g$ 、4°C で 20 分間遠心後に、上清を除き、沈殿を 1% BSA、20 mM トリス緩衝液 (Tris-HCl ; pH 8.0) に懸濁した。超音波洗浄機で金コロイドを分散し、再度 10,000 $\times g$ 、4°C で 20 分間遠心した。上清を除き、沈殿を 1 mL の 1% BSA、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に懸濁した。超音波で金コロイドを分散後に吸光度を測定し、最終組成が吸光度 530 nm = 1.0、1% BSA、1%トレハロース、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に懸濁した。コンジュゲートパッドに金コロイド標識抗体を含浸し、-80°C にて凍結乾燥した。抗大腸菌 O26 抗体と抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (NH Foods Ltd.) を 10 mM リン酸緩衝液でそれぞれ 0.5 mg/mL に希釈し、ニトロセルロース膜のテストライン領域とコントロールライン領域にディスペンサー BioJet Quanti 3000 (BioDot Inc.) を用いて液量 1 $\mu\text{L/cm}$ で塗布し、室温で乾燥させた。抗体塗布ニトロセルロース膜のテストライン領域側に金コロイド抗体含浸コンジュゲートパッドとサンプルパッドを部分的に重なり合うように貼り合わせ、ラミネートシールで固定した。ニトロセルロース膜のコントロールライン領域側には吸収パッドを貼付した。貼り合わせ後のニトロセルロース膜を 5 mm 幅に裁断し、完成した

O26 イムノクロマトは使用直前まで 4°C で保管した。

1.2.6 O26 イムノクロマトによる検査

様々な血清型の大腸菌株をノボビオシン加 mEC 培地 (Merck KGaA) で 42°C 18～24 時間培養した。大腸菌以外の菌株は TSB で 37°C 18～24 時間培養した。培養後はそのままの状態 (生菌液)、もしくは 121°C で 15 分オートクレーブした死菌液を試料溶液として使用した。試料溶液 150 µL をディスポーザブル試験管に分注し、O26 イムノクロマトを投入した。室温で 15 分静置後にテストライン領域およびコントロールライン領域の両方に赤紫色のラインが目視で確認できた場合、大腸菌 O26 陽性と判定した。コントロールラインのみが確認された時は陰性と判定した。

1.2.7 接種食品を含む食品検体からの O26 の検出

検査に使用した食品検体は茨城県内にあるいくつかのスーパーマーケットで購入した。牛肉 43 検体・牛ひき肉 16 検体・牛タン 5 検体・牛レバー 4 検体・ハンバーグ 6 検体・豚肉 15 検体・豚タン 19 検体・鶏肉 4 検体・ラム肉 3 検体を使用した。接種試験においては、牛ひき肉・牛レバー・鶏ひき肉・アルファルファ・カイワレ大根・ほうれん草・ナチュラルチーズ・リンゴジュースを使用した。接種試験に使用した食品検体はあらかじめ培養法により検査を行い、大腸菌 O26 陰性であることを確認した。一部の食品については、リン酸緩衝液で 10 倍段階希釈を行い、標準寒天培地 (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd.) で 37°C 18 時間混釈培養を行い、生菌数を測定した。

食品への大腸菌 O26 の接種は次の通り実施した。大腸菌 O26 (IID 3005 および RIMD 05091876) をノボビオシン加 mEC 培地で 42°C 18 時間培養した。培養後の培養液を 10 倍ずつ段階希釈し、各段階の希釈液 1 mL を食品検体に接種した。接種した食品検体はフィルター付きストマッカー袋に 25 g ずつはかり取り、ノボビオシン加 mEC 培地を 225 mL 添加した。30 秒間ストマッキング後に、ストマッカー袋のまま 42°C 18 時間増菌培養した。培養液中の大腸菌 O26 の有無は、O26 イムノクロマト・培養法・PCR 法の 3 法によって確認した。

1.2.8 培養法による O26 の検出

増菌培養液 1 mL を免疫磁気ビーズ (Dynabeads O26; Thermo Fisher Scientific Inc.) で濃縮し、選択分離培地 CT-RMAC または Vi-RX O26 (Eiken Chemical Co., Ltd.) に塗抹し、37°C で 18～24 時間培養した。寒天培地上の大腸菌 O26 と疑われるコロニーは純培養を行い、抗大腸菌 O26 免疫血清 (Denka Seiken Co. Ltd.) を用いて、凝集法により確認試験を実施した。

1.2.9 O26 特異的遺伝子と *stx* の PCR 法による検出

細菌の DNA は PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Life Technologies Corporation) を用いて次の通り抽出した。増菌培養液 1 mL をマイクロチューブに分取し、室温 $10,000 \times g$ で 3 分間遠心した。上清を除去し、沈殿に PrepMan Ultra reagent を 100 μ L 添加し、懸濁した。1 分間ボルテックスした後、10 分間煮沸した。13,000 $\times g$ で 3 分遠心し、その上清を PCR 法の鋳型とした。O26 の O 抗原合成酵素遺伝子 (*wzy*) と *stx* 検出プライマーは文献の配列に従って作製した (DebRoy et al., 2004, Lin et al., 1993)。すなわち、O26 の *wzy* の検出には *wzyF* 5'-TAAATTGCGGGGAAAGAATG-3' と *wzyR* 5'-GACTTCATGGGTACCGCCTA-3' を用い、PCR 法のプログラムは 94°C で 2 分間反応したのち、94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒を 40 サイクル繰り返した後に、72°C 7 分間反応させた。*stx* の検出には、VT sense 5'-GAACGAAATAATTTATATGT-3' と VT antisense 5'-TTTGATTGTTACAGTCAT-3' を用い、PCR 法のプログラムは、94°C で 2 分間反応したのち、94°C 1 分、43°C 1 分 30 秒、72°C 1 分 30 秒を 40 サイクル繰り返した後に、72°C 7 分間反応させた。電気泳動により *wzy* (276 bp) と *stx* (905 bp) のバンドの有無を確認した。

1.2.10 イムノクロマト法による O157 および O111 の検出

イムノクロマト法による O157 および O111 の検査は、市販の食品検査キット (NH イムノクロマト O157・O111; NH Foods Ltd.) を用いて実施した。

1.3 成績

1.3.1 ポリクローナル抗体の作製

大腸菌 O26 を検出可能な高性能のポリクローナル抗体を取得するために、次の 3 種類の免疫抗原、①「普通寒天培地で培養した菌をホルマリン殺菌した抗原」、②「TSB で培養した菌をホルマリン殺菌した抗原」、③「TSB で培養した菌を加熱殺菌した抗原」を調製した。いずれの免疫抗原も濃度を 1×10^9 CFU/mL に統一してウサギ 2 羽ずつに免疫を行い、6 羽のウサギから得られた抗血清 S1～S6 の力価を ELISA 法により評価した (図 1-1)。①の寒天培養後にホルマリン殺菌した抗原を免疫して得られた 2 種の抗血清 S1・S2 はいずれも 10^5 倍希釈液を用いた時の吸光度は 3.0 を上回り、 10^6 倍希釈液を用いて試験した時の吸光度は 0.637 および 0.569 を示した。②の液体培養後にホルマリン殺菌した抗原を免疫して得られた 2 種の抗血清 S3・S4 は、 10^5 倍希釈液を用いた時の吸光度が 1.562 および 1.594 であり、 10^6 倍希釈液を用いた時の吸光度は 0.226 および 0.215 を示した。③の液体培養後に加熱殺菌した抗原を免疫して得られた 2 種の抗血清 S5・S6 は、 10^5 倍希釈液を用いた時の吸光度が 0.227 および 0.288 であり、 10^6 万倍希釈液を用いた時の吸光度はいずれも 0.050 を下回っていた。ウサギの個体差の影響を考慮して同一抗原を 2 羽ずつに免疫したが、得られた抗血清は同程度の力価を示した。これらの結果より、S1・S2 は S3・S4 に比べ力価が 3 倍程度、S5・S6 に比べ力価が 10 倍以上高いことから、S1・S2 をイムノクロマト法開発の有力候補とした。抗血清 S1 および S2 をアフィニティー精製し、得られたポリクローナル抗体 PAb1・PAb2 をその後の検討で使用した。

PAb1・PAb2 がそれぞれ単独でサンドイッチアッセイを構築できるかどうかを確認するために、はじめにサンドイッチ ELISA 法を試作した。PAb1/PAb2 固相化プレートとビオチン標識 PAb1/PAb2 を組み合わせ、複数の血清型の大腸菌に対する反応性を確認した (図 1-2)。その結果、 10^4 CFU/mL の大腸菌 O26 (RIMD 05091876 および IID 3005) を供試した時、バックグラウンドを差し引いた吸光度は PAb1 では 0.112 および 0.299、PAb2 では 0.306 および 0.689 であり、 10^6 CFU/mL 以上の濃度では吸光度はほぼプラトーに達していることを確認した。一方、6 種類の血清型の大腸菌 (O1、O103、O111、O121、O145、O157) を供試した場合は、 10^8 CFU/mL の濃度においても吸光度は全て 0.1 未満であり、交差反応を生じないことが判明した。このように PAb1・PAb2 はいずれもサンドイッチアッセイが構築可能であり、高い検出感度・特異性を有することが確認できた。

1.3.2 O26 イムノクロマトの開発

ポリクローナル抗体 PAb1 または PAb2 単独でイムノクロマト法が構築できるかどうかを確認するため、ニトロセルロース膜への塗布と金コロイド標識に使用する抗体

を同一のものに揃えて試作した。その結果、PAb1 および PAb2 抗体単独でサンドイッチイムノクロマト法を構築でき、大腸菌 O26 を検出できたが、いずれもバックグラウンドがやや高いことが判明した。具体的には、培地のみを供試した時、滴下 15 分後では陰性を示したが、そのまま放置すると滴下 60 分後には弱陽性を示した。結果の判定には問題にならないレベルではあるが、今後食品検体を用いた試験を行う予定のため、食品成分等による更なるバックグラウンドの上昇を懸念し、よりバックグラウンドの低い最適条件を見つけるために、抗体の組み合わせを変えて試作を繰り返した。その結果、PAb1 抗体を金コロイド標識し、PAb2 抗体を塗布したニトロセルロース膜と組み合わせることで、大腸菌 O26 を迅速検出可能な試作品を完成させることができ、「O26 イムノクロマト」と名付けた。O26 イムノクロマトに大腸菌 O26 を含む試料溶液を滴下すると、テストライン領域およびコントロールライン領域にいずれも赤紫色のラインが出現して可視化され、大腸菌 O26 陽性と判定できた(図 1-3)。

1.3.3 O26 イムノクロマトの特異性と検出感度

O26 イムノクロマトの特異性を確認するために、様々な血清型の大腸菌 67 株、および大腸菌以外の菌株 22 株を純培養し、生菌のまま O26 イムノクロマトに供試した(表 1-1)。その結果、大腸菌 O26 については、*stx* 保有株 17 株および非保有株 1 株の合計 18 株全てで O26 イムノクロマトは陽性を示した。O26 以外の主要な腸管出血性大腸菌血清型 (O45・O91・O103・O111・O121・O145・O157)、およびその他の血清型の大腸菌株については、試験した全ての株で交差反応を示さないことを確認した (0/49)。大腸菌以外の細菌についても、主な検査対象である肉類に存在し当該培地で増殖する可能性のある菌株を中心に反応性を確認したが、いずれも陰性を示すことを確認した (0/22)。これらの試験はオートクレーブ処理した死菌を供試した場合にも同様の結果を示した(表 1-1)。以上の結果より、O26 イムノクロマトは大腸菌 O26 を特異的に検出可能であることが示された。

O26 イムノクロマトの検出感度を確認するために、18 株の大腸菌 O26 を段階希釈して、生菌のまま O26 イムノクロマトに供試した(表 1-2)。その結果、H 型の違い (O26:NM または O26:H11)・保有する *stx* パターンの違い (*stx1* 単独・*stx1* および *stx2* 両方・毒素なし)・分離源の違い (臨床・畜産・食品)に関わらず、O26 イムノクロマトは同程度の感度で検出可能であり、その検出感度は $2.2 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^5$ CFU/mL であった。続いて、18 株の大腸菌 O26 段階希釈液をオートクレーブ処理により死菌にして O26 イムノクロマトに供試した(表 1-3)。その結果、検出感度は $2.9 \times 10^3 \sim 5.2 \times 10^4$ CFU/mL であり、生菌を供試した時と同等の感度を示した。

1.3.4 食品検体中の大腸菌 O26 の検出

食品検体中にどれだけの大腸菌 O26 が存在すれば、増菌培養後に O26 イムノクロマトで検出可能であるかを確認するため、8 種の食品検体 25 g に段階希釈した大腸菌

O26 を接種し、O26 イムノクロマト・培養法・PCR 法の 3 法で検査を実施した（表 1-4）。牛ひき肉 25 g に大腸菌 O26:NM（RIMD 05091876）を 0.77 CFU 接種した検体を 1 晩培養後に O26 イムノクロマトに供試した結果、陽性を示すことが確認できた。同様に、O26:H11（IID 3005）を牛ひき肉に 0.8 CFU または 0.29 CFU、ナチュラルチーズに 0.29 CFU、牛レバー・鶏ひき肉・アルファルファ・カイワレ大根・ほうれん草・リンゴジュースに 2.9 CFU の大腸菌 O26 を接種した検体についても、1 晩培養後に O26 イムノクロマトで検出できた。これらの結果は、培養法及び PCR 法による検査成績と完全に一致した。以上の結果より、O26 イムノクロマトは食品 25 g 中に大腸菌 O26 が 1～3 個程度存在すれば、18 時間の培養後に検出可能であることが実証された。

次に市販の様々な食肉検体（大腸菌 O26 未接種）を用いて、O26 イムノクロマトの性能を評価した（表 1-5）。その結果、115 検体の食肉検体のうち 5 検体が O26 陽性反応を示した。O26 検出 PCR 法により検査した 59 検体の結果は、全てイムノクロマト法の結果と完全に一致した。今回試験した食品中には、様々な細菌が存在すると考えられるが、それらに対して O26 イムノクロマトは交差反応を示さず、大腸菌 O26 を特異的に検出できたと考えられる。O26 イムノクロマト陽性検体のうち 2 検体（牛タンおよび豚タン）が PCR 法で *stx* 陽性を示した。培養法で検査した 41 検体のうち、大腸菌 O26 を分離できたのは牛ひき肉 1 検体のみであり、この検体は O26 イムノクロマト・PCR 法ともに陽性を示した。牛ひき肉から分離された大腸菌 O26 は *stx* 陰性を示した。O26 イムノクロマト陽性の残りの 4 検体については、O26 を分離することはできなかった。*stx* のみが陽性を示した 2 検体（豚肉・豚タン）については、O26 以外の腸管出血性大腸菌が存在したと考えられる。この 2 検体の培養液について、市販のイムノクロマト法を用いて O157 および O111 を検査した結果、豚肉は O157 および O111 共に陰性であり、豚タンについては O111 陽性を示した。

1.4 考察

腸管出血性大腸菌 O26 は non-O157 の腸管出血性大腸菌の中で最も分離頻度の高い血清型であるが、高価な機械や複雑な手順が不要な迅速検査法は存在しない。そこで本研究では、大腸菌 O26 を迅速かつ簡便に、信頼性の高い検査が可能なイムノクロマト法を開発するための基礎的技術検討を行い、その試作品「O26 イムノクロマト」を作製し、性能を評価した。

大腸菌 O26 の主要な血清型は O26:H- (O26:NM) と O26:H11 であり、両血清型が腸管出血性大腸菌 O26 分離株の 92.6%を占めることが報告されている (Bettelheim, 2007)。Stx 産生性については、Stx1 単独産生株が 89%、Stx1 と Stx2 の両毒素産生株が 11%を占めている (IASR, vol. 31, 2010)。本章で開発した O26 イムノクロマトは、H 型の違い (O26:H-と O26:H11)・保有する *stx* パターンの違い (*stx1* 単独・*stx1* および *stx2* 両方・毒素なし)・分離源の違い (臨床・畜産・食品)に関わらず、全ての大腸菌 O26 を検出可能であり、O26 以外の血清型の大腸菌には交差反応を示さないことが確認された。このように大腸菌 O26 のみを特異的に検出できた理由は、今回使用した抗体 PAb1・PAb2 の特異性に起因している。両抗体はホルマリン処理した大腸菌 O26 を免疫して得られたポリクローナル抗体であり、交差吸収処理等は行っていない。それにもかかわらず高い特異性を示した理由は、菌体の破碎や変性などを伴わないホルマリン処理を採用したため、菌体内の大腸菌共通タンパク質に対する抗体はほとんど作られず、大腸菌 O26 の表面に多数存在する O 抗原に対する抗体が作られたと考えられる。また O 抗原は抗原性が高いため、それに対する抗体も高力価なものが得られ易く、仮に大腸菌共通抗原を認識する低力価抗体が微量含まれていたとしても、その影響は無視できるほど小さいと考えられる。力価に関しても、ホルマリン処理抗原を免疫して得られた血清 S1~4の方が、加熱処理抗原に対する抗血清 S5・S6 より高い値を示した。その理由は、ホルマリン処理抗原では菌体表面の立体構造が保持されるため、一部変性が予想される熱処理に比べて抗体が作られやすいのではないかと考えられる。この傾向は、マウスを用いた実験においても再現されている (Arshadi et al., 2020)。Arshadi らはマウスに免疫する大腸菌 O157 の殺菌方法を比較した結果、ホルマリン処理した方が熱処理抗原を免疫して得られた抗体に比べ高い力価を示すと報告した。本章では、ホルマリン殺菌抗原の中でも普通寒天培地で培養したものを免疫した S1・S2の方が、TSB で培養したものを免疫した S3・S4 より高い感度を得られた。寒天培地と液体培地では酸素濃度などの環境や培養した菌の密度なども異なり、培養後の細菌の性状に差異が生じる可能性がある。例えば、腸炎ビブリオは液体培地中では 1 本の極べん毛しか観察されないが、寒天培地上で 30℃ 以下で培養した場合は周囲に多数の側べん毛が発現することが知られている

(Shinoda, 2011)。このように同一の細菌においても、培養条件の違いにより得られ

る菌体成分には差異が生じる可能性があるため、O26 の抗体開発においては寒天培養した菌体の方が免疫抗原に適していたと考えられる。

先行研究として、可溶化した腸管出血性大腸菌 O26 の外膜タンパク質をマウスに免疫して得られた抗大腸菌 O26 モノクローナル抗体 2F3 が開発されている (Kerr et al., 1999)。このモノクローナル抗体 2F3 は *stx* とインチミン遺伝子陽性の大腸菌 O26 を認識するため、この抗体を用いて構築したサンドイッチ ELISA 法においては、*stx* とインチミン遺伝子が共に陽性の大腸菌 O26 は 18 株全て検出可能となっている。一方、一部の *stx* 陽性株 (1/4)、およびインチミン遺伝子陽性株 (1/11) では陰性を示し、一部の *stx*・インチミン遺伝子陰性株では陽性を示した (2/10)。さらに、16 種の血清型の大腸菌を用いた試験では、O18 (3/14)・O111 (6/8)・O73 (1/1)・O113 (1/1) に対して交差反応を示すことが報告されている。このように 2F3 モノクローナル抗体を用いた ELISA 法は、病原性の高い O26 を検出可能であるが、偽陰性および偽陽性に関して課題がある。本研究で開発した O26 イムノクロマトは、病原性の有無に関わらず全ての大腸菌 O26 を検出するが、O18 (0/1) や O111 (0/8) を含め 20 種の血清型の大腸菌に交差反応を示さないことが確認できた。O26 イムノクロマトは、多様な細菌が存在する食品検体においても偽陽性反応を示さず、高い特異性を有することが確認できた。一般的にはモノクローナル抗体の方がポリクローナル抗体に比べ特異性が高い抗体が得られるが、2F3 が交差反応を示した理由として、O26 の外膜タンパク質を可溶化したものを免疫抗原として用いたことが挙げられる。可溶化処理により O 抗原のみならず、それに連なる血清型非特異的なコア多糖・リピド A 領域の一部も認識する抗体が作られたのではないかと考えられる。LPS は上記 3 領域から成るが、大腸菌外膜と結合するリピド A、それに共有結合する 15 個程度の糖が連なったコア多糖に比べ、O 抗原はより細胞表面側に存在し、長さも長いため (数個の単糖が結合した糖鎖ユニットが 20~40 個程度連結)、菌体表面は O 抗原に覆われている。本研究では可溶化処理は行わず、前述の通りホルマリン処理した抗原を免疫したため、ポリクローナル抗体にも関わらず高い特異性を示したと考えられる。

O 抗原は熱に安定であるため、O26 イムノクロマトは生菌・死菌のいずれの大腸菌 O26 も検出が可能であり、様々な検査ニーズに対応可能である。もし迅速な検査が必要であれば、増菌培養後すぐに、生菌のままで O26 イムノクロマトにより検査することが可能である。一方、食品工場での検査や検査担当者が微生物の取り扱いに不慣れなどの理由により、できるだけ安全な検査が望まれる場合は、増菌培養液を煮沸もしくはオートクレーブ処理により死菌にしてから検査を行うことも可能である。

一般的に腸管出血性大腸菌の食品汚染菌数は非常に少なく、50 個以下で感染することが知られていることから (Tilden et al., 1996)、食品検体からの腸管出血性大腸菌検査においては、高い検出感度を得るために増菌培養工程が必要である。これまで報告されている他の O26 検査法はいずれも、今回開発した O26 イムノクロマトと同様に、増菌培養工程が必要である (Hara-Kudo et al., 2008、Hara-Kudo et al., 2000、

Kerr et al., 1999、Sharma, 2002)。抗原抗体反応を用いた免疫検査法による増菌培養後の大腸菌 O26 の検出感度は、サンドイッチ ELISA 法で 10^5 CFU/mL (Kerr et al., 1999)、ポリミキシン ELISA 法で $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$ CFU/mL (Blais et al., 2006) という報告があるが、本章で開発した O26 イムノクロマトはこれらの検査法と同等以上の検出感度を示した。遺伝子検査法の増菌培養も含めた検出感度については、PCR 法で 10 CFU/mL (DebRoy et al., 2004) または 15 CFU/25 g (Murphy et al., 2007)、リアルタイム PCR 法で 15 CFU/mL (Sharma, 2002) または 10 CFU/mL (O'Hanlon et al., 2004)、LAMP 法で 10 CFU/25 g (Hara-Kudo et al., 2008) などの報告がある。同じ増菌培養を行うという条件下で、指数関数的に検出対象配列を増幅する遺伝子検査法と比較しても、O26 イムノクロマトの検出感度は同等またはそれ以上を示した。遺伝子検査法により検査するためには、DNA 抽出工程などの煩雑な前処理工程が必要であり、増菌培養後に検査結果が得られるまでには 1.5~4 時間程度を要する。O26 イムノクロマトは、増菌培養後にその培養液をテストストリップに滴下するだけの簡単な手順で、培養後 15 分以内に検査結果が迅速に得られるため、極めて有用な検査法である。

腸管出血性大腸菌 O26 は、患者からはしばしば検出されるが、食品検体からの検出は珍しく 1%未満の頻度である (Werber et al., 2008)。一部の報告では高頻度で検出された例もあり、腸管出血性大腸菌は牛ひき肉検体で 16% (46/285)、ラム検体で 40% (111/275) が PCR 法による検査で陽性となっているが、患者から分離頻度の高い血清型 O157・O26・O111 はいずれも検出されていない (Barlow et al., 2006)。今回、O26 イムノクロマト陽性で、PCR 法においても O26 と *stx* が陽性を示した検体が 2 検体存在したにもかかわらず、培養法により腸管出血性大腸菌 O26 を分離できなかった。培養法と異なり、イムノクロマト法と PCR 法は死菌も検出可能であるが、今回の結果は死菌を検出したわけではないと考えられる。仮に、肉検体を汚染した死菌を検出していたとしたら、その食肉検体は $10^4 \sim 10^5$ CFU/g の死菌に汚染されていたことになる。なぜなら、O26 イムノクロマトで陽性を示すには、その検出感度である $2.2 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^5$ CFU/mL を上回る菌数が試料溶液中に必要であり、試料溶液は食品検体を培地で 10 倍希釈して培養したものであるからである。しかし、前述の通り食品検体の腸管出血性大腸菌の汚染菌数は一般的に非常に少ないことから、これだけ多くの死菌が存在していたとは考えづらく、O26 イムノクロマト陽性を示した結果は検体中に含まれた増菌培養による生菌に由来すると考えられる。今回、培養法での大腸菌 O26 の分離には CT-RMAC 培地と酵素基質培地の Vi-RXO26 培地を使用した。これらの培地はラムノース非・遅分解および亜テルル酸カリウム耐性の株を分離対象としている (Hiramatsu et al., 2002)。一方、腸管出血性大腸菌 O26 株の中には、ラムノース分解株が 4%、亜テルル酸カリウム感受性株が 19%あることが報告されている (Evans et al., 2008)。本研究において、O26 イムノクロマトと PCR 法陽性にもかかわらず、培養法で大腸菌 O26 が分離できなかった検体は、ラムノー

ス分解株もしくは亜テルル酸カリウム感受性株が存在していたのではないかと考えられる。O26 イムノクロマトは大腸菌 O26 の表面抗原を認識することから、培養法では分離できないラムノース分解株と亜テルル酸カリウム感受性株を検出可能であると推察される。以上の結果から、O26 イムノクロマトは今回使用した CT-RMAC 等を用いた培養法に比べて、偽陰性が生じる可能性が低いことが示された。培養法を実施する際は、亜テルル酸カリウムを除いた RMAC を併用することで偽陰性の低減が可能と考えられる。検査法の有効性は培地の組成（基礎培地・選択剤の種類および濃度）と培養条件（温度・時間・酸素濃度）に依存する。これらの条件は培養法のみならず、O26 イムノクロマトによる検査にも影響を与える。本章では、増菌培養法としてノボビオシン加 mEC 培地で 42°C 18 時間培養する方法採用した。この方法は培地組成と培養温度により選択性を高められているため、多数の細菌が存在する食品から大腸菌 O26 を効率よく検出可能であり（Hara-Kudo et al., 2000）、O26 イムノクロマト開発当時に日本の公定検査法として採用されていた方法である。本章では、腸管出血性大腸菌の分離頻度が高い、もしくは腸管出血性大腸菌による食中毒の原因食品として報告例のある 8 種類の食品検体（牛ひき肉・牛レバー・鶏ひき肉・アルファルファ・カイワレ大根・ほうれん草・ナチュラルチーズ・リンゴジュース）を用いて接種試験を実施した結果、これらの食品の性状および内在する細菌叢は異なるにもかかわらず、いずれの検体においても 25 g 中に数個の大腸菌 O26 を接種すれば、1 晩培養後に O26 イムノクロマトで検出することができた。これらの食品は接種前に $10^2 \sim 10^6$ CFU/g 程度の一般細菌が存在することを確認している（表 1-4）。したがって、食品 25 g 中に接種された数個の大腸菌 O26 は、 $10^3 \sim 10^8$ 倍の量の夾雑菌が存在する中で、O26 イムノクロマトの検出感度である $10^3 \sim 10^5$ CFU/mL 以上の濃度まで増菌培養できたことが確認できた。この結果は、増菌培養の条件（ノボビオシン加 mEC 培地、42°C）が大腸菌 O26 の選択的培養に適していたことを示している。Arakawa らによると、牛ひき肉 25 g に大腸菌 O26・O111・O157 等を 7~8 CFU 接種し、ノボビオシン加 mEC 培地を加えて 42°C で 8 時間培養すると、いずれの血清型の大腸菌も 10^6 CFU/mL 以上の濃度まで増殖することが確認されている（Arakawa et al., 2011）。この濃度は本章で開発した O26 イムノクロマトの検出感度を十分上回る濃度であることから、O26 イムノクロマトによる検査も 8 時間の増菌培養と組み合わせて使用できる可能性があり、さらなる迅速化が期待できる。一方、損傷を受けた腸管出血性大腸菌が存在すると予想される食品検体においては、ノボビオシン加 mEC 培地（損傷回復 41.7%）より腸管出血性大腸菌の損傷回復能が高い緩衝ペプトン水 (BPW)（損傷回復 100%）での培養が推奨される（Drysedale et al., 2004）。O26 イムノクロマトは BPW で培養した大腸菌 O26 も検出可能であるが、BPW のみでの増菌培養は望ましくないと考えられる。BPW は選択性がないため、大腸菌 O26 以外にも培養液中に含まれる食品由来の夾雑菌が容易に増殖可能である。そのため、培地の栄養を夾雑菌に奪われてしまい、O26 が十分に増殖できない可能性がある。よって、冷凍食肉

など損傷菌を含む可能性がある検体を検査する場合は、BPW で前培養した後、その培養液の一部をノボビオシン加 mEC 培地に植え継ぎ、増菌培養した後、O26 イムノクロマトに供試することが望ましいと考えられる。

大腸菌 O26 陽性を示した非接種食肉検体については更なる検証が必要であるが、本章の結果より、O26 イムノクロマトは食品検体中の大腸菌 O26 を検出するのに十分な感度と特異性を備えていることが示された。O26 イムノクロマトは迅速簡便に使用でき、熟練の検査員が必要でないことから、日々のルーチン検査において食品中の大腸菌 O26 検出にとっても有用な手法と考えられる。培養法による検査と菌株の分離が必要な場合においても、O26 イムノクロマトによるスクリーニングは検査負担の軽減に効果的である。多数の検体を培養法のみで検査するには、膨大な時間と労力を必要とし、それにもかかわらず食品検体から大腸菌 O26 が検出されることは稀である。O26 イムノクロマトで全数検査を行い、陽性を示した検体のみを分離培養工程に進めることで、培養法による大腸菌 O26 の分離をより効率的に行うことができる。

食品検査法として十分な性能を有することが確認された試作品については、この後いくつかの検証を繰り返し、全ての基準をクリアできた場合のみ製品化が実現できる。具体的には、複数回製造試作を行い、製造ロット間差試験や保存安定性試験等を行い、再現性の確認と使用期限の設定を行う。また、試験規格の設定を行い、製造する度にそのロットの製品の性能が定められたスペックを満たすことを確認できるようにする。複数の外部有識者・検査のエキスパートに試作品の性能を評価いただき、性能に問題がないことを確認することも重要である。このようにして、性能のみならず安定した品質のものを継続して供給可能であることが十分に担保された段階で、新製品として販売開始ができるようになる。O26 イムノクロマト試作品については、これらの工程を経た後、2008 年より食品検査キットとして市販されている。このキットは大腸菌 O26 を検出する唯一のイムノクロマト法として、衛生研究所や食品企業等での日々の検査に活用され、製造された食品の安全性確認・食中毒発生時の原因食品の特定・大腸菌 O26 の汚染状況解明等に貢献している。

1.5 要約

腸管出血性大腸菌は、少量の菌数で感染し重篤な症状を引き起こし、広域で大規模な食中毒を発生させることから、制御が極めて重要な食中毒細菌の1つである。本章では、non-O157で最も分離頻度の高い大腸菌 O26 を食品検体から迅速に検出可能なイムノクロマト法を開発するための基礎的技術検討を行い、その試作品を作製し性能を評価した。はじめに大腸菌 O26 を抗原としてウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を作製した。得られた抗体から力価の高いものを選抜し、イムノクロマト法の試作条件を検討した。PAb1 抗体を金コロイド標識し、PAb2 抗体を塗布したニトロセルロース膜と組み合わせることで、大腸菌 O26 を迅速検出可能な試作品を完成し、「O26 イムノクロマト」と名付けた。O26 イムノクロマトの特異性を確認するために、純培養した大腸菌 67 株およびその他の細菌 22 株を供試した。その結果、O26 イムノクロマトは全ての大腸菌 O26 で陽性を示し (18/18)、その他の血清型の大腸菌および大腸菌以外の細菌では陰性を示した (0/71)。O26 イムノクロマトの検出感度を確認するために、H 型 (O26:NM または O26:H11)・保有する *stx* パターン・分離源の異なる大腸菌 O26 を段階希釈して供試した。その結果、検出感度は $2.2 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^5$ CFU/mL であり、いずれの株も生菌・死菌に関わらず同程度の反応性を示した。食品からの大腸菌 O26 の検出能を確認するため、腸管出血性大腸菌の分離頻度が高いもしくは食中毒原因食品として報告例のある 8 種類の食品 (牛ひき肉・牛レバー・鶏ひき肉・アルファルファ・カイワレ大根・ほうれん草・ナチュラルチーズ・リンゴジュース) 25 g に段階希釈した大腸菌 O26 を接種し、1 晩培養後に O26 イムノクロマトによる検出の可否を確認した。その結果、食品 25 g 当たり 1~3 個程度の大腸菌 O26 を接種すれば、いずれの食品検体においても 18 時間増菌培養後に O26 イムノクロマトで検出できた。またこの成績は、培養法および PCR 法の成績と 100%一致した。市販の食肉検体 115 検体を O26 イムノクロマトで検査した結果、5 検体が大腸菌 O26 陽性を示した。また 59 検体については、PCR 法により O26 の検査を実施したが、5 検体が大腸菌 O26 陽性となり、イムノクロマト法の結果と完全に一致した。O26 イムノクロマトは食品中に含まれる様々な細菌に対して交差反応を示さず、大腸菌 O26 を特異的に検出できた。以上の結果より、今回開発した O26 イムノクロマトは食品中の大腸菌 O26 を迅速かつ簡便に検出可能であり、精度の高い結果を得ることができる有用な検査法であることが示された。

1.6 図表

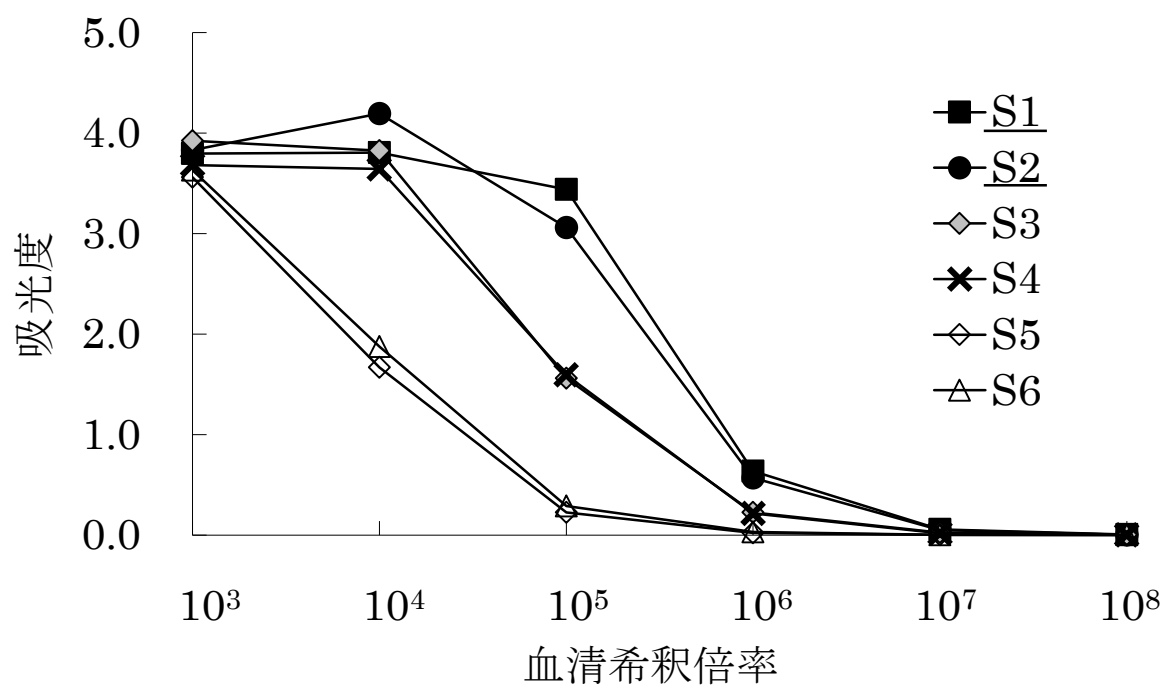


図 1-1. 作製した抗血清の力価

抗血清 S1～6 を 10 倍段階希釈し、ELISA 法によって大腸菌 O26 に対する力価を測定した。吸光度は主波長 450 nm・副波長 620 nm を測定した。O26 イムノクロマトに使用した抗血清を下線で示した。

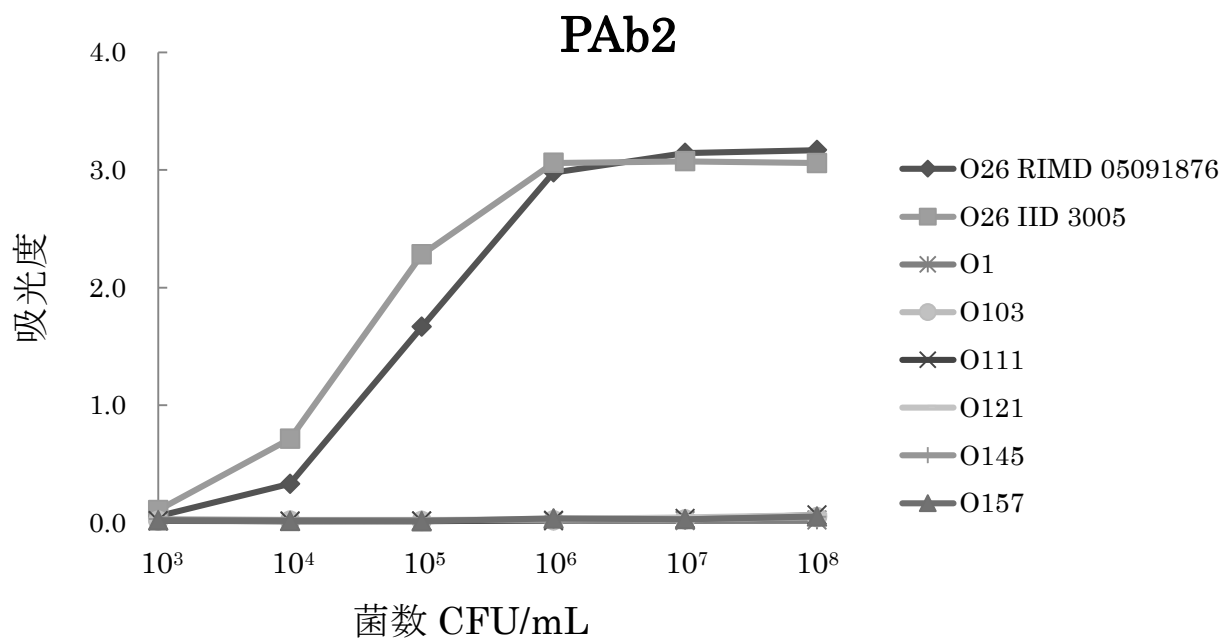
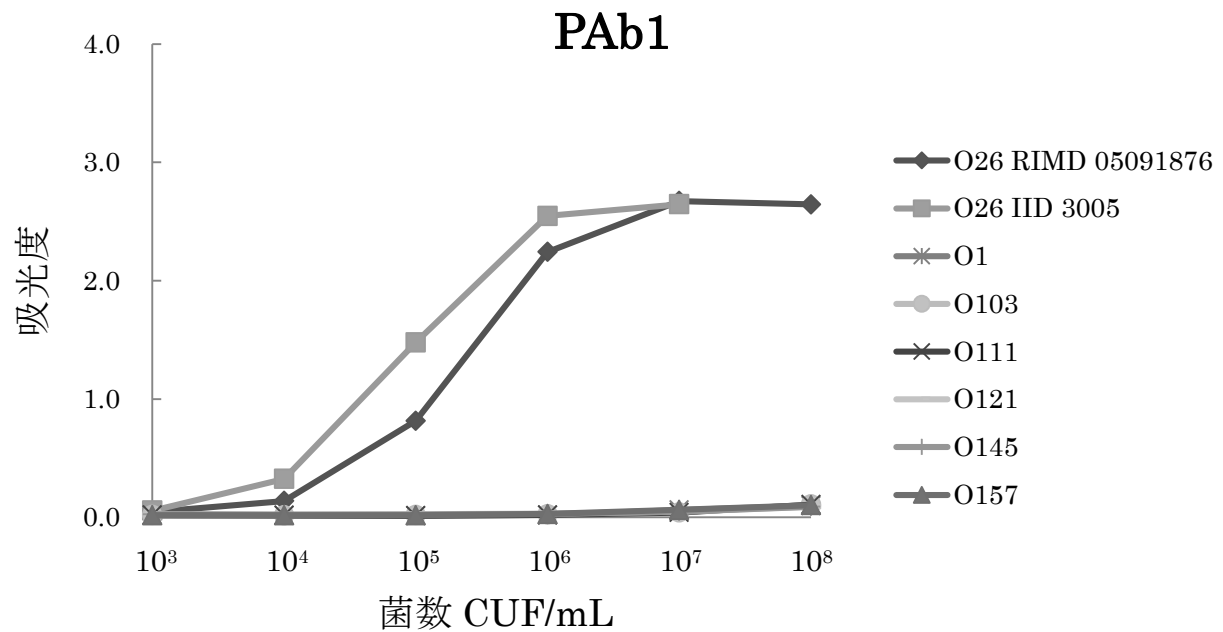


図 1-2. サンドイッチ ELISA 法による特異性の評価

精製した PAb1・PAb2 それぞれ単独でサンドイッチ ELISA 法を構築し、複数の血清型の大腸菌に対する反応性を比較した。吸光度は主波長 450 nm・副波長 620 nm を測定した。

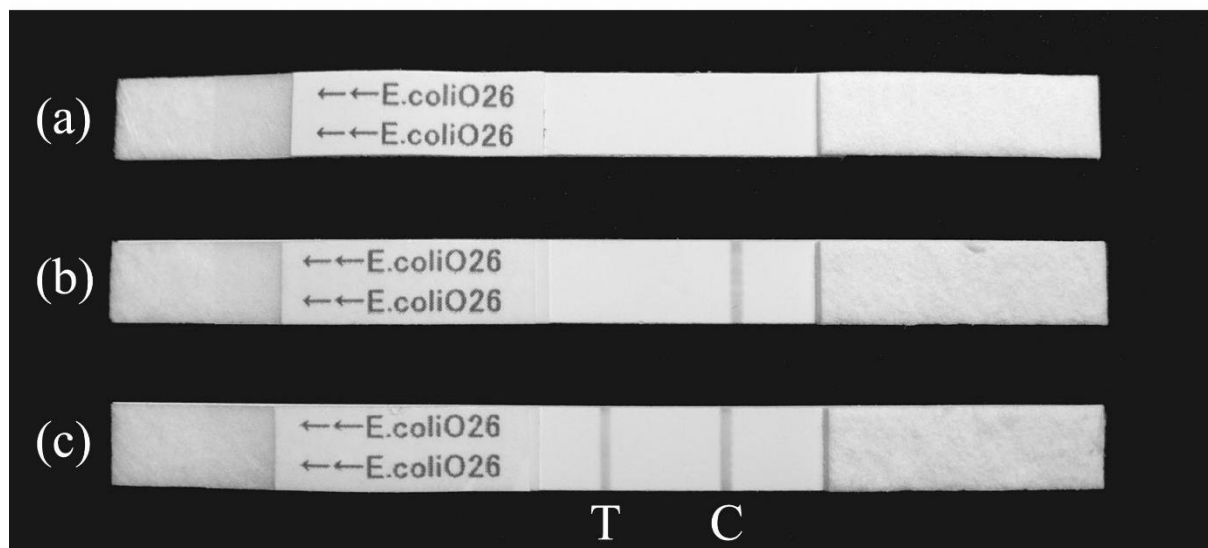


図 1-3. O26 イムノクロマトによる大腸菌 O26 の検出

(a) は使用前の状態を示す。大腸菌 O26 を含む試料溶液を供試すると、赤紫色のラインがコントロールライン領域 (C) のみに出現し、陰性と判定できた (b)。O26 を含む試料の場合は、テストライン (T) およびコントロールラインの両方を目視で確認でき、陽性と判定できた (c)。

表 1-1. O26 イムノクロマトの特異性

| 供試菌株 | 株名 | 株数 | O26 イムノクロマト 陽性数 (%) | |
|---|--|----|------------------------|----------|
| | | | 生菌 | 死菌 |
| <i>Bacillus cereus</i> | ATCC 14579 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> | ATCC 6051 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Citrobacter freundii</i> | ATCC 8090, ATCC 43864 | 2 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Cronobacter muytjensii</i> | ATCC 51329 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | ATCC 13048 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. cloacae</i> | ATCC 13047, ATCC 49141 | 2 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Escherichia coli</i> O1 | ATCC 11775 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O6 | ATCC 25922 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O7 | SA2817 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O8 | SAB1672 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O9 | NIAH 10053, SA2814 | 2 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O10 | SA2813 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O16 | SA2819 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O18ac | SA2816 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O25 | RIMD 0509301 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O26 | RIMD 05091876, IID 3005, wtO26-1 to 16 | 18 | 18 (100) | 18 (100) |
| <i>E. coli</i> O45 | RIMD 05091858 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O91 | RIMD 05091855 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O101 | NIAH 10052 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O103 | RIMD 05091878 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O111 | RIMD 0509829, RIMD 05091865, wtO111-1 to 6 | 8 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O121 | RIMD 05091859 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O139 | NIAH 11790 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O141 | NIAH 11149 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O145 | RIMD 05091870 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O149 | NIAH 10054 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O157 | ATCC 43888, ATCC 700728, RIMD 05091061, wtO157-1 to 19 | 22 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. hermannii</i> | ATCC 33650, JCM 1473 | 2 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | ATCC 8724 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>K. pneumoniae</i> | ATCC 4352 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | ATCC 7644 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Plesiomonas shigelloides</i> | ATCC 51903 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Proteus vulgaris</i> | ATCC 6380 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 9027 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis | ATCC 13076 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>S. Infantis</i> | ATCC 51741 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>S. Typhimurium</i> | ATCC 13311 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Serratia liquefaciens</i> | ATCC 27592 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>S. marcescens</i> | ATCC 8100 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>S. odorifera</i> | ATCC 33077 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |

表 1-2. O26 イムノクロマトの検出感度（生菌）

| 株名（分離源） | 血清型 | 毒素型 | 生菌の検出感度（CFU/mL） | | | | | | 菌数 |
|---------------|---------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| | | | 10 ⁸ | 10 ⁷ | 10 ⁶ | 10 ⁵ | 10 ⁴ | 10 ³ | |
| RIMD 05091876 | O26:NM | <i>stx1</i> | + | + | + | + | w+ | — | 3.0×10^4 |
| IID 3005 | O26:H11 | <i>stx1</i> | + | + | + | + | + | — | 1.4×10^4 |
| wtO26-1（臨床） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | + | w+ | 2.2×10^3 |
| wtO26-2（臨床） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | + | w+ | 7.6×10^3 |
| wtO26-3（臨床） | O26:Hnt | <i>stx1, stx2</i> | + | + | + | + | + | w+ | 5.8×10^3 |
| wtO26-4（臨床） | O26:H11 | <i>stx1</i> | NT | + | + | + | + | — | 1.3×10^4 |
| wtO26-5（臨床） | O26:NM | <i>stx1, stx2</i> | NT | + | + | + | w+ | — | 1.7×10^4 |
| wtO26-6（臨床） | O26:NM | <i>stx1, stx2</i> | + | + | + | + | + | w+ | 3.3×10^3 |
| wtO26-7（食品） | O26:Hnt | — | + | + | + | + | w+ | — | 1.5×10^4 |
| wtO26-8（畜産） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | w+ | — | 1.3×10^4 |
| wtO26-9（畜産） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | + | — | 1.3×10^4 |
| wtO26-10（畜産） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | + | — | 2.4×10^4 |
| wtO26-11（畜産） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | + | — | 2.7×10^4 |
| wtO26-12（畜産） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | w+ | — | 3.5×10^4 |
| wtO26-13（畜産） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | w+ | — | 3.0×10^4 |
| wtO26-14（畜産） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | + | — | 4.3×10^4 |
| wtO26-15（畜産） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | + | — | 5.7×10^4 |
| wtO26-16（畜産） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | — | — | 1.0×10^5 |

＋：陽性、w＋：弱陽性、—：陰性、NT：未試験

表 1-3. O26 イムノクロマトの検出感度（死菌）

| 株名（分離源） | 血清型 | 毒素型 | 死菌の検出感度（CFU/mL） | | | | | | |
|---------------|---------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------------|
| | | | 10 ⁸ | 10 ⁷ | 10 ⁶ | 10 ⁵ | 10 ⁴ | 10 ³ | 菌数 |
| RIMD 05091876 | O26:NM | <i>stx1</i> | + | + | + | + | w+ | — | 3.0 × 10 ⁴ |
| IID 3005 | O26:H11 | <i>stx1</i> | + | + | + | + | + | w+ | 7.2 × 10 ³ |
| wtO26-1（臨床） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | + | w+ | 3.5 × 10 ³ |
| wtO26-2（臨床） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | + | w+ | 7.6 × 10 ³ |
| wtO26-3（臨床） | O26:Hnt | <i>stx1, stx2</i> | + | + | + | + | + | w+ | 2.9 × 10 ³ |
| wtO26-4（臨床） | O26:H11 | <i>stx1</i> | NT | + | + | + | + | w+ | 6.3 × 10 ³ |
| wtO26-5（臨床） | O26:NM | <i>stx1, stx2</i> | NT | + | + | + | w+ | — | 1.7 × 10 ⁴ |
| wtO26-6（臨床） | O26:NM | <i>stx1, stx2</i> | + | + | + | + | + | w+ | 6.6 × 10 ³ |
| wtO26-7（食品） | O26:Hnt | — | + | + | + | + | + | — | 1.5 × 10 ⁴ |
| wtO26-8（畜産） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | w+ | — | 1.3 × 10 ⁴ |
| wtO26-9（畜産） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | + | — | 2.5 × 10 ⁴ |
| wtO26-10（畜産） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | + | — | 2.4 × 10 ⁴ |
| wtO26-11（畜産） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | + | — | 2.7 × 10 ⁴ |
| wtO26-12（畜産） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | + | — | 1.7 × 10 ⁴ |
| wtO26-13（畜産） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | + | — | 3.0 × 10 ⁴ |
| wtO26-14（畜産） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | + | — | 1.1 × 10 ⁴ |
| wtO26-15（畜産） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | + | — | 1.4 × 10 ⁴ |
| wtO26-16（畜産） | O26:Hnt | <i>stx1</i> | + | + | + | + | w+ | — | 5.2 × 10 ⁴ |

＋：陽性、w＋：弱陽性、—：陰性、NT：未試験

表 1-4. 接種食品からの大腸菌 O26 の検出

| 食品検体 (生菌数; CFU/g) | 接種菌株 (血清型) | 接種菌数 (CFU/25 g) | 試験結果 | | |
|-----------------------------------|---------------------------|--------------------|-------------|-----|--------------------|
| | | | O26 イムノクロマト | 培養法 | PCR 法 ^a |
| 牛ひき肉 (NT) | RIMD 05091876 (O26:NM) | 770 | + | + | + |
| | | 77 | + | + | + |
| | | 7.7 | + | + | + |
| | | 0.77 | + | + | + |
| | | 0 | — | — | — |
| 牛ひき肉 (NT) | IID 3005 (O26:H11) | 800 | + | + | + |
| | | 80 | + | + | + |
| | | 8 | + | + | + |
| | | 0.8 | + | + | + |
| | | 0 | — | — | — |
| 牛ひき肉 (1.1×10^4) | IID 3005 (O26:H11) | 290 | + | + | + |
| | | 29 | + | + | + |
| | | 2.9 | + | + | + |
| | | 0.29 | + | + | + |
| | | 0 | — | — | — |
| 牛レバー (9.8×10^2) | IID 3005 (O26:H11) | 290 | + | + | + |
| | | 29 | + | + | + |
| | | 2.9 | + | + | + |
| | | 0.29 | — | — | — |
| | | 0 | — | — | — |
| 鶏ひき肉 (NT) | IID 3005 (O26:H11) | 290 | + | + | + |
| | | 29 | + | + | + |
| | | 2.9 | + | + | + |
| | | 0 | — | — | — |
| アルファルファ (4.2×10^6) | IID 3005 (O26:H11) | 290 | + | + | + |
| | | 29 | + | + | + |
| | | 2.9 | + | + | + |
| | | 0.29 | — | — | — |
| | | 0 | — | — | — |
| カイワレ大根 (4.4×10^6) | IID 3005 (O26:H11) | 290 | + | + | + |
| | | 29 | + | + | + |
| | | 2.9 | + | + | + |
| | | 0.29 | — | — | — |
| | | 0 | — | — | — |
| ほうれん草 (NT) | IID 3005 (O26:H11) | 290 | + | + | + |
| | | 29 | + | + | + |
| | | 2.9 | + | + | + |
| | | 0 | — | — | — |
| ナチュラルチーズ (4.3×10^6) | IID 3005 (O26:H11) | 290 | + | + | + |
| | | 29 | + | + | + |
| | | 2.9 | + | + | + |
| | | 0.29 | + | + | + |
| | | 0 | — | — | — |
| リンゴジュース (1.8×10^2) | IID 3005 (O26:H11) | 290 | + | + | + |
| | | 29 | + | + | + |
| | | 2.9 | + | + | + |
| | | 0.29 | — | — | — |
| | | 0 | — | — | — |

+ : 陽性、— : 陰性、NT : 未試験

^a PCR 法では O26 *wzy* プライマーを使用した。

表 1-5. 食肉 115 検体からの大腸菌 O26 の検出（非接種試験）

| 食品検体 | 検体数 | 陽性検体数（検査数） | | | |
|-------|-----|------------|-------|-----------------------|------------------|
| | | O26イムノクロマト | 培養法 | PCR法：O26 ^a | PCR法： <i>stx</i> |
| 牛肉 | 10 | 0 | NT | 0 | 0 |
| | 33 | 0 | NT | NT | NT |
| 牛ひき肉 | 12 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| | 4 | 0 | 0 | 0 | NT |
| 牛タン | 5 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 牛レバー | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | NT |
| ハンバーグ | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 豚肉 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 ^b |
| | 6 | 0 | NT | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | NT | NT | NT |
| 豚タン | 3 | 3 | 0 | 3 | 1 |
| | 2 | 0 | NT | 0 | 1 ^c |
| | 14 | 0 | NT | NT | NT |
| 鶏肉 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 0 | 0 | 0 | NT |
| | 1 | 0 | NT | NT | NT |
| ラム肉 | 2 | 0 | 0 | 0 | NT |
| | 1 | 0 | NT | NT | NT |
| 合計 | 115 | 5（115） | 1（41） | 5（59） | 4（50） |

NT：未試験

^a PCR 法による O26 の検出は O26 *wzy* プライマーを使用した。

^b イムノクロマト法の結果、O157 および O111 陰性を示した。

^c イムノクロマト法の結果、O157 陰性、O111 陽性を示した。

.

第2章 3種の血清型の大腸菌を同時・識別検出する簡易迅速検査法の開発

2.1 背景および目的

腸管出血性大腸菌の主要な血清型は O157 であるが、近年 non-O157 の食中毒の世界的増加に伴い、複数の血清型の大腸菌を識別して検査することが重要となっている。腸管出血性大腸菌の最も一般的な検査法は培養法であるが (Safarikova et al., 2001)、複数の血清型の分離をするには膨大な時間と労力がかかり、非効率的である。検査の効率化を図るためにリアルタイム PCR 法 (Sharma, 2002)・LAMP 法 (Hara-Kudo et al., 2008)・イムノクロマト法 (Jung et al., 2005) など様々な迅速検査法が開発されている。イムノクロマト法は抗原抗体反応を利用した検査法であり、高価な機器や複雑な手順が不要な簡易迅速検査法である。日常的な臨床検査や食品検査で使用するため、様々な病原体に対するイムノクロマト法が開発されている。イムノクロマト法を開発する上で最も重要な点は使用する抗体の性能であるが、感度と特異性を兼ね備えた抗体を取得することは困難である場合も多く、検査法開発の長期化や障害となっている (相沢ら, 2015)。これを補うために、DNA/RNA 配列の特異的なハイブリダイゼーションを利用し抗体を核酸プローブに置き換えた方法 (Posthuma-Trumpie et al., 2009) や、アプタマーの標的への特異的な結合を利用した方法 (Huang et al., 2007) など、様々な応用例が開発されている。

本章では、複数の血清型の腸管出血性大腸菌を同時に検査する方法を開発するために、イムノクロマト法の認識分子として、抗菌ペプチドの利用を検討した。抗菌ペプチドは、細菌・原生動物・菌類・植物・多細胞動物など様々な種に広く分布しており、現在までに 1,200 種を超える天然ペプチドが発見されている (Wang et al., 2009)。抗菌ペプチドは一般的に小さな分子で 15~45 アミノ酸で構成され、塩基性アミノ酸を豊富に含むため生理的条件下では正に帯電し、両親媒性である。多くの抗菌ペプチドが幅広い抗菌スペクトルを示し、様々な微生物表面に結合能を持つことから、細菌の検出に利用できると期待されている。抗菌ペプチドはその構造により、直鎖状の α ヘリックス型と、分子内ジスルフィド結合により安定化された β シート型の 2 つのグループに分類される。抗菌ペプチドが脂質二重層に結合・挿入し、膜を破壊するメカニズムは抗菌ペプチドの種類によって異なり、3 つのモデルのいずれかをとると考えられている (Brogden, 2005)。いずれのモデルにおいても、抗菌ペプチドと標的細胞の最初の相互作用は電荷によって引き起こされる。正電荷の抗菌ペプチドは、負に荷

電した細菌外膜表面に静電相互作用により引き付けられる。カーペットモデルでは、抗菌ペプチドは細菌細胞質膜の脂質 2 重層の表面に平行に付着し、カーペットのように集積し濃度が高まると、細菌表面のペプチドは界面活性剤のような作用で脂質 2 重層を破壊する。 α ヘリックス型抗菌ペプチドの代表例の 1 つであるセクロピン P1 (CP1) はカーペットモデルをとる (Gazit et al., 1995)。バレルスティーブモデルでは、付着したペプチドが凝集して脂質 2 重層に挿入されるため小孔を形成し、細胞内容物の流出を引き起こす。トロイダルモデルは、抗菌ペプチドとリン脂質の相互作用で細胞質膜の脂質尾部同士を集積させて膜を内側から捻じ曲げ、細胞質膜を穿孔し抗菌活性を示す。マガイニン 2 (MG2) や LL-37 はこのモデルに分類される。

近年、抗菌ペプチドを認識分子として用いた細菌検査法がいくつか報告されている。これらの研究においては、検査対象の細菌はガラススライドに固相化された抗菌ペプチドによって捕捉され、細菌自体に直接標識された蛍光物質 (直接法) や蛍光標識した特異的抗体 (サンドイッチ法) によって検出される (Kulagina et al., 2005、Kulagina et al., 2006)。Cy5 標識された抗菌ペプチドを利用して、抗 O157 免疫磁気ビーズによって捕捉された大腸菌 O157 を検出した報告例もある (Arcidiacono et al., 2008)。これらの方法は高い感度を持つが、蛍光検出機が必要であるため用途が限られている。別の報告では、抗菌ペプチドによって捕捉された細菌を、電気的信号を用いて検出している (Mannoor et al., 2010)。しかし、この検出法ではスペクトルアナライザーが必要となる。より実用的な方法として、抗菌ペプチドを用いた比色検出法が開発されている。CP1 固相化プレートに捕捉された大腸菌を HRP 標識抗大腸菌抗体によって検出している (Gregory et al., 2005)。抗菌ペプチドを抗原捕捉分子として利用した例として、大腸菌 O157 単独 (Blais et al., 2004)、および O26 と O111 (Blais et al., 2006) を検出するポリミキシン ELISA 法が開発されている。しかし、これらの方法は検査ステップが複数あり、マイクロプレートリーダーも必要であることから、迅速かつ簡便に使用でき特別な機器を必要としない新しい検査法の開発が望まれていた。

本章では、幅広い微生物へ結合能を持つ抗菌ペプチド着目し、イムノクロマト法のテストストリップ作製に使用する 2 種の抗体のうち、一方を抗菌ペプチドで置き換える基礎的技術検討を行い、イムノクロマト法を応用した新規の検査法を開発した。第 1 章で開発した 2 種の抗体を用いたサンドイッチイムノクロマト法と区別するために、ここで開発した検査法を「ラテラルフローアッセイ」と呼ぶこととした。更に、金コロイド標識抗菌ペプチドを用いて腸管出血性大腸菌 O157・O26・O111 を同時に、識別して検出可能な「マルチプレックスラテラルフローアッセイ」も開発し、その性能を評価した。

著者が所属するグループでの先行研究により、サンドイッチ ELISA 法で使用する 2 種類の抗体のうち、一方を抗菌ペプチドで代替したサンドイッチ発色アッセイの開発が行われた。そして、 α ヘリックス型抗菌ペプチドの CP1 と MG2 が抗体の代替分

子として作用し、対象となる微生物を高感度に検出可能なプローブとして利用可能であることが明らかにされていた。そこで本章では **CP1** および **MG2** がラテラルフローアッセイにも応用可能であるかを確認するとともに、これらの抗菌ペプチドに類似した分子や β シート型抗菌ペプチドについても検討した。

2.2 材料と方法

2.2.1 使用菌株

本研究で使用した微生物株（表 2-4）は菌株保管機関の ATCC・RIMD・IID・JCM から入手した。大腸菌野外分離株（wtO26・wtO111・wtO157）は日本ハム株式会社中央研究所の保存株を使用した。

2.2.2 ポリクローナル抗体の作製

抗大腸菌 O26 抗体は第 1 章で作製した PAb2 抗体を使用した。抗大腸菌 O157 抗体および抗サルモネラ エンテリティディス抗体は、NH イムノクロマトシリーズに使用されている抗体（NH Foods Ltd.）を用いた。大腸菌 O111 に対するポリクローナル抗体は、第 1 章に従って作製した。すなわち、大腸菌 O111 を普通寒天培地上で 37°C 18 時間培養した。回収した菌体を 10%ホルマリン溶液に懸濁し、室温で 18 時間静置した。3 回洗浄後 PBS に懸濁したホルマリン殺菌菌体をフロイント完全アジュバントと 1:1 で混合して免疫抗原とし、体重 2.5~3.0 kg の日本白色種の雌ウサギの背部皮内に免疫した。2 回目以降の免疫ではアジュバントの種類をフロイント不完全アジュバントに変更した。免疫は 2 週間おきに 10 週間、合計 6 回実施した。最終免疫から 10 日後に麻酔下で全採血を行い、遠心分離により血清を得た。血清をプロテイン G カラムによって精製し、得られたウサギ IgG をそれぞれ抗 O111 ポリクローナル抗体として使用した。これらの実験は、日本ハム株式会社 中央研究所の動物実験ガイドラインに従って実施した。

2.2.3 ELISA 法による抗血清の力価測定

抗原固相化 ELISA 法は、第 1 章に記載の方法に従って実施した。96 ウェルプレートには、加熱殺菌した大腸菌 O111 を 1×10^6 CFU/ウェルで固相化した。

2.2.4 金コロイド標識抗菌ペプチド溶液の調製

本研究で使用した抗菌ペプチドは（表 2-1）に一覧化した。C 末端にビオチン標識した抗菌ペプチドは、Sigma-Aldrich Japan G.K. で化学合成した。合成したペプチドは HPLC により、70%以上の純度まで精製した。

金コロイド標識を行うため、30 $\mu\text{g/mL}$ のビオチン化抗菌ペプチド溶液 300 μL とストレプトアビジン金コロイド溶液（BioAssay Works, LLC）300 μL を混合し、室温で 1 晩反応させた。その後 10% BSA 溶液を 300 μL 添加して室温で 1 時間ブロッキングした。10,000 $\times g$ 、4°C で 20 分間遠心後に、上清を除き、沈殿を 1% BSA、2 mM ホウ酸バッファー（pH 8.0）に懸濁した。超音波洗浄機で金コロイドを分散し、再度 10,000 $\times g$ 、4°C で 20 分間遠心した。上清を除き、沈殿を 300 μL の 1% BSA、

2 mM ホウ酸バッファー (pH 8.0) に懸濁した。超音波で金コロイドを分散後に吸光度を測定し、最終組成が吸光度 530 nm = 1.0~1.5、1% BSA、1%トレハロース、2 mM ホウ酸バッファー (pH 8.0) となるよう希釈した。完成した金コロイド標識抗菌ペプチド溶液は使用直前まで 4°C で保管した。

2.2.5 ラテラルフローアッセイの開発

ラテラルフローアッセイの概略図は図 2-1 の通りである。ラテラルフローアッセイのテストストリップはサンプルパッド・コンジュゲートパッド・ニトロセルロース膜・吸収パッドから構成される。ニトロセルロース膜上には 10 mM リン酸バッファーで希釈した抗大腸菌 O157 抗体 (1.0 mg/mL)・抗大腸菌 O26 抗体 (2.0 mg/mL) および抗大腸菌 O111 抗体 (2.0 mg/mL) をテストライン領域に、抗ストレプトアビジン抗体 (GenScript Biothech Corporation; 2.0 mg/mL) をコントロールライン領域にディスペンサーCyberJet 2 (Musashi Engineering, Inc.) を用いて 1 μ L/cm の液量で塗布し、室温で乾燥させた。部分的に重なり合うように各構成品を貼り合わせ、4 mm 幅で裁断してラテラルフローアッセイのテストストリップを作製し、使用直前まで 4°C で保管した。使用時にはテストストリップと金コロイド標識抗菌ペプチド溶液を組み合わせで検査した。同様に、抗サルモネラ エンテリティディス抗体 (1.5 mg/mL) と抗大腸菌 O157 抗体 (1.5 mg/mL) をテストライン領域に塗布してテストストリップを試作した。

2.2.6 ラテラルフローアッセイによる検出

微生物株を TSB もしくはノボビオシン加 mEC 培地で 37°C 18~24 時間培養した。培養液は生菌のまま、もしくは 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌してから試験に使用した。培養液 100 μ L と金コロイド標識抗菌ペプチド溶液 30 μ L をディスポーザブル試験管に分取し、テストストリップを投入した。室温で 15 分静置後に、テストストリップ上のコントロールライン領域およびテストライン領域の O157・O26・O111 検出部位のいずれか 1 つ以上が共に赤紫色のラインを呈した時に、当該血清型陽性と判定した。コントロールラインのみが確認された時は陰性と判定した。

2.2.7 大腸菌接種牛ひき肉検体の調製

牛ひき肉は茨城県内のスーパーマーケットで購入した。接種牛ひき肉は次の手順で作製した。大腸菌 O157 (ATCC 43888)・O26 (IID 3005)・O111 (RIMD 05091865) をノボビオシン加 mEC 培地で 42°C 18 時間培養した。それぞれの培養液を 10 倍段階希釈し、25 g の牛ひき肉に 1 mL ずつ接種した。接種後の牛ひき肉 25 g にノボビオシン加 mEC 培地 225 mL を添加し、30 秒間ストマッキング後に、42°C で 18 時間増菌培養した。それぞれの増菌培養液は、ラテラルフローアッセイ・培養法・血清型毎のイムノクロマト法・PCR 法で試験した。

2.2.8 接種牛ひき肉からの大腸菌 O157・O26・O111 の検出

大腸菌 O157・O26・O111 の培養法による検査は、次の手順で実施した。増菌培養液 1 mL を免疫磁気ビーズ NH beads O157・O26・O111 (NH Foods Ltd.) により濃縮し、CT-SMAC・CT-RMAC・CT-SBMAC にそれぞれ塗抹し、37°C で 18~24 時間培養した。寒天培地上で大腸菌 O157・O26・O111 と疑われるコロニーを釣菌し、大腸菌 O157・O26・O111 免疫血清 (Denka Seiken Co. Ltd.) を用いて凝集反応による血清型別試験を実施した。イムノクロマト法による検査は市販の食品検査キット (NH イムノクロマト O157・O26・O111) を使用し、血清型毎に試験した。増菌培養液 150 µL をディスポーサブル試験管に分注し、イムノクロマト検査キットを投入した。室温で 15 分間放置後に、テストラインとコントロールラインの両方が目視で確認できた場合に陽性と判定した。コントロールラインのみが確認された時は陰性と判定した。

PCR 法では増菌培養液中の細菌 DNA を第 1 章と同様に PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent で抽出した。O 抗原特異的 PCR 法は文献の方法に従い、O157 (Maurer et al., 1999)・O26 (DebRoy et al., 2004)・O111 (Paton et al., 1998) を検出した。すなわち、O157 の検出には PF8 5'-CGTGATGATGTTGAGTTG-3' と PR8 5'-AGATTGGTTGGCATTACTG-3' を用い、PCR 法のプログラムは 94°C で 2 分間反応したのち、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒を 40 サイクル繰り返した後に、72°C 7 分間反応させた。O26 の検出は第 1 章に記載の方法で実施した。O111 の検出は O111F 5'-TAGAGAAATTATCAAGTTAGTTCC-3' と O111R 5'-ATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC-3' を用い、PCR 法のプログラムは 94°C で 2 分間反応したのち、94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒を 40 サイクル繰り返した後に、72°C 7 分間反応させた。電気泳動により O157 (420 bp)・O26 (276 bp)・O111 (406 bp) のバンドの有無を確認した。

2.3 成績

2.3.1 抗 O111 抗体の作製

本章では抗菌ペプチドのスクリーニングに先立って、ポリクローナル抗体を作製した。第 1 章と同様に、ホルマリン殺菌した大腸菌 O111 をウサギに免疫し、得られた抗血清の力価を抗原固相化 ELISA 法により評価した (図 2-2)。その結果、 10^5 倍希釈液の吸光度は 4.0 を上回り、 10^6 倍希釈液では 2.019、 10^7 倍希釈液においても 0.240 を示し、極めて高感度であることを確認した。この抗血清をアフィニティー精製し、抗 O111 抗体として用いた。抗 O26 抗体は第 1 章で作製した PAb2 を、抗 O157 抗体は既存抗体を使用し、抗菌ペプチドのスクリーニングを実施した。

2.3.2 抗菌ペプチドを用いたラテラルフローアッセイの構築

抗菌ペプチドと抗体を用いた新規ラテラルフローアッセイを構築するために、プローブとして最適な抗菌ペプチドを探索した。先行研究により、サンドイッチ ELISA 法においては α ヘリックス型抗菌ペプチドの CP1 と MG2 が抗体の代替分子として利用可能であることが明らかとなっていたため、これらの抗菌ペプチドを中心に検討した。CP1 にはそのオルソログとして配列が高度に保存された CP2・CP3・CP4 が存在し (Pillai et al., 2005)、MG2 にも 2 残基違いの MG1 が存在するため (Zasloff, 1987)、これらのペプチドも候補に加えた。さらに、CP1 および MG2 に類似した抗菌ペプチドを「Collection of Anti-Microbial Peptides」(CAMP; <http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial/>) で検索した結果、CtxA と BLP-7 が候補として得られた。別の α ヘリックス型抗菌ペプチドとして、LPS 結合ペプチドの LL-37、 α ヘリックスと β シートの両方を持つ抗菌ペプチドとして pBD-2、 β シート型抗菌ペプチドとして TP I・TEWP も使用することとした。これらの抗菌ペプチドがプローブとして利用可能であることを確認するために、ラテラルフローアッセイを試作した。各抗菌ペプチドを金コロイド標識し、抗 O157 抗体を塗布したラテラルフローアッセイテストストリップと組み合わせて試験した結果、BLP-7・CP1・CP2・CP3・CP4・CtxA・LL-37・MG1・MG2 をプローブとして用いた場合は O157 を検出でき、pBD-2・TEWP・TP I の場合は検出できなかった (表 2-2)。この試験で使用した抗菌ペプチドはいずれも培地成分と交差反応を示さないことを確認した。それぞれの抗菌ペプチドプローブの検出感度を比較するために、10 倍段階希釈した大腸菌 O157 培養液をラテラルフローアッセイに供試した。その結果、CP1・CP2・CP3・CtxA・MG1・MG2 をプローブとして用いた時の感度が最も高く、その検出感度は 10^5 CFU/mL であることが判明した (表 2-2)。BLP-7・CP4・LL-37 プローブの場合は、それぞれ 10^6 ・ 10^6 ・ 10^7 CFU/mL の検出感度を示した。

O157 以外の血清型の大腸菌に対しても抗菌ペプチドプローブによる検出が可能で

あるかを確認するために、抗大腸菌 O26 抗体または抗大腸菌 O111 抗体を塗布したニトロセルロース膜と CP1 プローブを組み合わせた。その結果、CP1 プローブを用いたラテラルフローアッセイは、大腸菌 O26 および O111 を検出でき、それらの検出感度はそれぞれ 10^6 および 10^5 CFU/mL であることが判明した（表 2-2）。

2.3.3 抗菌ペプチドを用いたマルチプレックスラテラルフローアッセイの開発

次に 1 本のテストストリップで複数の血清型の腸管出血性大腸菌を同時に検出するために、ニトロセルロース膜に位置をずらして抗大腸菌 O157・O26・O111 ポリクローナル抗体を塗布したテストストリップを作製した。これを CP1 プローブと組み合わせることにより、1 本のストリップ上で大腸菌 O157・O26・O111 を同時かつ識別して検出可能な検査法を確立し、「マルチプレックスラテラルフローアッセイ」と名付けた。この検査法は 3 種の血清型の大腸菌の任意の組み合わせで検出可能であり、2 種もしくは 3 種類の抗原を混合した試料溶液を用いても、陽性ラインの出現位置の違いにより各血清型を識別できた（図 2-3）。ノボビオシン加 mEC 培地で培養した大腸菌 O157・O26・O111 をそれぞれ 10 倍段階希釈し、生菌のままマルチプレックスラテラルフローアッセイに供試した結果、各血清型の検出感度は 10^4 CFU/mL であることが判明した（表 2-3）。マルチプレックスラテラルフローアッセイの特異性を確認するために、54 種の大腸菌と 14 種の大腸菌以外の菌株を培養し、供試した（表 2-4）。その結果、マルチプレックスラテラルアッセイは全ての血清型の O157

(22/22)・O26 (17/17)・O111 (8/8) を検出でき、O45・O91・O103・O121・O145 など他の血清型の大腸菌と 14 種類の大腸菌以外の菌株には交差反応を示さないことが確認された。生菌および死菌のいずれを用いても同様の結果を示した。

2.3.4 接種した牛ひき肉からの検出

マルチプレックスラテラルフローアッセイによる食品検体中の大腸菌 O157・O26・O111 の検出能を評価するために、これらの血清型の大腸菌を様々な濃度で接種した牛ひき肉検体を作製し、4 種の検査法で検査を行いその成績を比較した。その結果、マルチプレックスラテラルフローアッセイは牛ひき肉 25 g あたり 10^0 CFU（大腸菌 O157・O26・O111 をそれぞれ 6.3・2.9・5.6 CFU）接種した検体を 18 時間培養後に検出できた。この結果は培養法・血清型毎のイムノクロマト法・PCR 法の成績と一致した（表 2-5）。

2.3.5 サルモネラの検出への応用

抗菌ペプチドプローブを用いて大腸菌以外の食中毒細菌が検出できるかどうかを確認するために、抗サルモネラ エンテリティディス抗体を塗布したラテラルフローアッセイテストストリップと金コロイド標識抗菌ペプチドを組み合わせで試験した（表 2-6）。その結果、 α ヘリックス型の抗菌ペプチドを用いた場合は全てサルモネラ

エンテリティディスを検出可能であり、LL-37 以外のプローブはいずれも 10^6 CFU/mL の感度を示した。 α ヘリックスと β シートを持つ pBD-2 についても、感度は低いが 10^8 CFU/mL のサルモネラ エンテリティディスを検出できた。 β シート型の TP I については陰性を示した。

大腸菌 O157 とサルモネラ エンテリティディスを同時に検出できるかどうかを確認するためにマルチプレックスラテラルフローアッセイを試作した。O157 およびサルモネラ エンテリティディス培養液を供試した結果、両菌を同時かつ識別して検出できた (図 2-4)。

2.4 考察

Non-O157 による食中毒の発生増加に伴い、複数の血清型の腸管出血性大腸菌を同時に識別して検査することが重要となっている。腸管出血性大腸菌の標準的な検査法は培養法であるが、培養法による検査は時間がかかり、操作が煩雑で非効率的である。

本章では、抗菌ペプチドプローブと大腸菌の血清型特異的抗体を組み合わせることにより、当該血清型の腸管出血性大腸菌を検出可能な新規のラテラルフローアッセイを確立した。開発の過程で複数の抗菌ペプチドを比較したところ、大腸菌 O157 の検出感度は抗菌ペプチドの種類によって異なり、 α ヘリックス型抗菌ペプチド、特に CP1・CP2・CP3・MG1・MG2・CtxA の感度が高いことが判明した。単一血清型の検出のみならず、抗菌ペプチドプローブ（CP1）と 3 種の抗体（抗 O157・抗 O26・抗 O111 抗体）を組み合わせることにより、3 種類の血清型の大腸菌を同時かつ識別して検出可能なマルチプレックスラテラルフローアッセイの開発にも成功した。本検査法は牛ひき肉 25 g 中に数個程度の大腸菌 O157・O26・O111 が存在すれば、18 時間培養後に検出できた。今後更に食品や臨床検体での評価が必要であるが、本章で開発したマルチプレックスラテラルフローアッセイは腸管出血性大腸菌の日々の検査に有用なツールになると考えられる。

これまでに腸管出血性大腸菌のマルチプレックス検出法として PCR 法（Paddock et al., 2012）・リアルタイム PCR 法（Sharma, 2002）が報告されている。これらの遺伝子検査法では高価な機械と DNA 抽出などの複雑な操作が要求される。今回開発した抗菌ペプチドを用いたマルチプレックスラテラルフローアッセイは、特別な機器がなくても迅速かつ簡単に検査可能である。抗菌ペプチドを用いたマルチプレックスラテラルフローアッセイの検出感度は 10^4 CFU/mL であり、報告されている一般的な抗体だけを用いたイムノクロマト法と比較しても遜色のない検出感度を示した

（Jung et al., 2005、Kawatsu et al., 2008、Shim et al., 2007）。今回大腸菌接種牛ひき肉の検査で使用したイムノクロマト法のうち、大腸菌 O26 を検出する NH イムノクロマト O26 は、第 1 章で開発した O26 イムノクロマトを市販化したものである。2 種類のポリクローナル抗体を組み合わせた O26 イムノクロマトの検出感度は前述の通り $2.2 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^5$ CFU/mL であるのに対し、金コロイド標識抗体を CP1 プローブに置き換えたマルチプレックスラテラルフローアッセイの検出感度は 10^4 CFU/mL であり、O26 イムノクロマトと同等の感度を示した。両者で使用するニトロセルロース膜塗布抗体は同一であるが、塗布濃度を 4 倍に上げること、および金コロイド標識抗菌ペプチドの濃度を 1.5 倍に上げることなどによりラテラルフローアッセイ試作条件の最適化を行い、それによって抗菌ペプチドをプローブとした場合でも、高感度なポリクローナル抗体に遜色のない感度を実現できた。一方、本研究では実施していないが、もし抗菌ペプチドをニトロセルロース膜に塗布し金コロイド標識抗体

と組み合わせたラテラルフローアッセイを試作した場合は、条件を最適化してもこのような高感度な検出が実現できない可能性がある。なぜなら、イムノクロマト法の検出感度はニトロセルロース膜塗布抗体の力価の影響を大きく受ける場合が多いからである。さらに、この組み合わせの場合は、金コロイド標識抗体は全て1ヶ所に塗布された抗菌ペプチドに捕捉され、識別検出ができない。先行研究のELISA法では、抗菌ペプチドを捕捉分子、抗体を検出分子として利用しているが (Gregory et al., 2005, Blais et al., 2004)、ラテラルフローアッセイの場合は本章で実施したように、抗菌ペプチドを金コロイド標識して検出プローブとし、ニトロセルロース膜に塗布した捕捉抗体と組み合わせて利用することが最適である。

従来のイムノクロマト法を構築するためには、感度と特異性を兼ね備え、サンドイッチが構築可能な2種類の抗体が必要とされていた。このような抗体の開発は検出対象によっては非常に困難であり、検査法開発の律速となっていた。抗菌ペプチドをプローブとして利用することで、1種類の抗体さえ開発すればラテラルフローアッセイが構築可能であるため、検査法開発の進展に大きく貢献することが期待される。検出感度と特異性が高いマルチプレックスラテラルフローアッセイを構築するためには、最適な抗菌ペプチドプローブと抗体の選択が重要である。抗菌ペプチドは幅広い反応性を示すため、ラテラルフローアッセイの特異性は組み合わせる抗体に依存する。そのため、ラテラルフローアッセイ開発の際には、特異性の高い抗体との組み合わせることが重要である。本章で使用したO抗原特異的抗体は特異性が極めて高い抗体であるため、交差反応性を示さないラテラルフローアッセイが開発できた。一方、抗菌ペプチドプローブについても、微生物への反応性はその配列と構造に依存するため、検査対象により適切に選択することが必要である。本章では、O157およびサルモネラの検出においては、全ての α ヘリックス型抗菌ペプチドがラテラルフローアッセイのプローブとして利用可能であり、なかでもCP1・CP2・CP3・MG1・MG2・CtxAが高い検出感度を示した。BLP-7の構造は解明されていないが、他のBLPsが α ヘリックス構造を示すことから (Gibson et al., 1991)、修飾された α ヘリックス構造を持つと考えられる。一方、システインが豊富でジスルフィド結合により β シート構造を取るTEWP・TP Iは、大腸菌とサルモネラに対する抗菌活性が知られているにもかかわらず (Chattopadhyay et al., 2006, Miyata et al., 1989)、ラテラルフローアッセイのプローブとして機能しないことが判明した。pBD-2はO157への反応は認められないものの、サルモネラ エンテリティディスに対しては弱いながらもプローブとして働いた。pBD-2は β ディフェンシンに分類され、1つの α ヘリックスと3つの β シートから成ることが知られているため (Huang et al., 2015)、プローブとして働く可能性はあるものの、その感度は低値を示したと考えられる。pBD-2は大腸菌およびサルモネラ共に抗菌活性を示すが、サルモネラへの抗菌活性は大腸菌に比べて強く、それぞれ16 $\mu\text{g/mL}$ および 64 $\mu\text{g/mL}$ と報告されている (Veldhuizen et al., 2008)。抗菌活性とプローブ能の相関は不明であるが、今回サルモネラのみでプローブとして機

能したのは、この抗菌活性の違いに起因する可能性も考えられる。検出に最適なプローブの傾向はO157とサルモネラで類似するものの、微妙な差異がみられたことから、実際にラテラルフローアッセイを構築する際には、検出対象ごとに最適なペプチドかどうかを確認することが重要と考えられる。

抗菌ペプチドプローブを用いた新規ラテラルフローアッセイは、今後の応用研究を進める上で様々な利点を持つ。1つ目の利点として、抗菌ペプチドは幅広い結合能を有するため、様々な微生物の検出への応用が期待できる。例えば、CP1はグラム陰性細菌 (*Pseudomonas aeruginosa*・*Salmonella* Typhimurium・*Serratia marcescens*)、グラム陽性菌 (*Staphylococcus aureus*・*Bacillus subtilis*・*Micrococcus luteus*)、酵母 (Pillai et al., 2005) に対して抗菌活性を示すことが報告されている。また CP1 を捕捉試薬として利用したバイオセンサーが報告されており、細菌 (*Coxiella burnetti* と *Brucella melitensis*) と同様にウイルス (ポックスウイルス科のワクチニアウイルスとトガウイルス科のベネズエラウマ脳炎ウイルス) を検出している

(Kulagina et al., 2007)。本章では CP1 プローブを用いたラテラルフローアッセイで3種の血清型の大腸菌およびサルモネラ エンテリティディスを検出可能であることを示したが、他の微生物特異的抗体と組み合わせることで、細菌・酵母・ウイルスの検出系が開発可能と考えられる。2つ目の利点は、抗菌ペプチドを用いたマルチプレックスラテラルフローアッセイにより、同時検出する微生物の種類を変えたり、より多くの微生物を同時検出できる。本章では3種の血清型の大腸菌の同時検出、およびO157とサルモネラ エンテリティディスの同時検出に取り組んだが、大腸菌やサルモネラ以外の微生物の同時・識別検出への応用や4種類以上の微生物を同時・識別検出することも可能である。その後の研究によって、3種の血清型の大腸菌・サルモネラにコレラ (*V. cholerae*)・カンピロバクター (*Campylobacter jejuni*) を加えた合計6菌種を、マルチプレックスラテラルフローアッセイで同時かつ識別して検出することに成功している (相沢ら, 2015)。最後の利点は、抗菌ペプチドは変異体の作製が容易であるため、検出プローブとしての反応性に改良を加えることができる可能性がある。抗菌ペプチドプローブの結合活性はその配列と2次構造に依存するため、ラテラルフローアッセイに用いる抗菌ペプチドの配列を改変することにより、感度を向上させるもしくは結合する微生物種の幅を広げたプローブ等を作製可能であると考えられる。本章で使用した CP1~CP4 はいずれも31残基で配列が高度に保存されているが、O157の検出においては CP4 を用いた場合のみ検出感度が1桁低い結果を示した。CP1と相違するアミノ酸残基数は、CP2が1残基、CP2が2残基、CP4では4残基となり、CP4が最も相違残基数が多いことが知られている (Pillai et al., 2005)。今回のラテラルフローアッセイでの反応性の違いは、抗菌ペプチドプローブへの数残基の変異導入により、検出感度を10倍高感度化できる可能性を示している。ただし、サルモネラの検出において CP4 の検出感度は CP1 と同等のため、検出対象により配列の違いの影響は異なる可能性が考えられる。抗菌ペプチドの抗菌活性についても、

わずかなアミノ酸残基の置換で、大きく変化する場合がある。富永はペディオシンへの変異導入実験を行い、野生型では生育阻止円を形成しない *Leuconostoc lactis* に対して、わずか1残基の変異導入により抗菌活性を示すことを報告している（富永，2009）。抗菌ペプチドは化学合成もしくは大腸菌での組換えタンパク質発現により作製可能であるため、任意のアミノ酸に容易に変異を導入できる。今回開発したマルチプレックスラテラルフローアッセイの検出感度は 10^4 CFU/mL であり、増菌培養工程との組み合わせが必須である。食品検査においては、食中毒細菌の汚染菌数はごく少量であるためどんな検査法を選択しても増菌培養との組み合わせは必要となるが、感染症の診断などにおいては患者体内で病原体がすでに増幅しているため検査の際には培養工程なしで直接行われることも多い。このような少しでも高い感度が求められる状況においても、マルチプレックスラテラルフローアッセイは利用する抗菌ペプチドプローブの変異体の作製により、その感度を向上させられる可能性がある。これらの理由から、抗菌ペプチドを用いたマルチプレックスラテラルフローアッセイは、簡易迅速に複数の標的微生物を同時かつ識別して検出する技術として極めて有用であると考えられる。

2.5 要約

幅広い抗菌スペクトルを持つ抗菌ペプチドの微生物への結合能は、近年細菌やウイルスの特異的検出法に応用されている。本章では、金コロイド標識した抗菌ペプチドとニトロセルロース膜に固定した検出対象特異的抗体を組み合わせる基礎的技術検討を行い、新規ラテラルフローアッセイを確立した。ラテラルフローアッセイのプロブとして有用な抗菌ペプチドを探索した結果、 α ヘリックス型のペプチド、特にCP1・CP2・CP3・MG1・MG2・CtxAが最適であることが示された。CP1プロブと抗大腸菌O157・抗O26・抗O111ポリクローナル抗体を組み合わせ、3種類の血清型の腸管出血性大腸菌を同時かつ識別して検出可能な検査法を確立し、「マルチプレックスラテラルフローアッセイ」と名付けた。CP1を用いたマルチプレックスラテラルフローアッセイは迅速簡便な検査法であり、1本のテストストリップ上で3種類の血清型の大腸菌を同時に検出でき、陽性ラインの出現位置の違いにより血清型を識別することができた。

今回開発したマルチプレックスラテラルフローアッセイは、供試した全ての大腸菌O157 (22/22)・O26 (17/17)・O111 (8/8)で陽性を示し、検出感度は 10^4 CFU/mLであった。それ以外の血清型の大腸菌 (0/7) および大腸菌以外の菌株 (0/14) に対しては、試験した全ての菌株で交差反応を示さないことが確認された。牛ひき肉 25 gあたり大腸菌O157・O26・O111を6.3・2.9・5.6 CFU/mL接種した検体を18時間培養後にマルチプレックスラテラルフローアッセイで検出することが可能であり、その結果は培養法・イムノクロマト法・PCR法による成績と完全に一致した。このように、今回開発したマルチプレックスラテラルフローアッセイは食品中の大腸菌O157・O26・O111を迅速・簡便に、特異的かつ識別して検出可能であることが示された。マルチプレックスラテラルフローアッセイが大腸菌以外の菌種にも応用できるかを確認したところ、大腸菌O157とサルモネラエンテリティディスを同時かつ識別して検出することができた。幅広い結合能をもつ抗菌ペプチドプロブを活用することで、様々な微生物の検出法を開発できる可能性があり、より多くの種類の微生物を同時かつ識別して検出することができると考えられる。プロブとして用いる抗菌ペプチドの配列改変は容易であり、反応性の改良を図ることが期待できる。以上の理由から、今回開発したマルチプレックスラテラルフローアッセイは、簡易迅速に複数の標的微生物を同時かつ識別して検出可能であり、極めて有用な検査技術であると考えられる。

2.6 図表

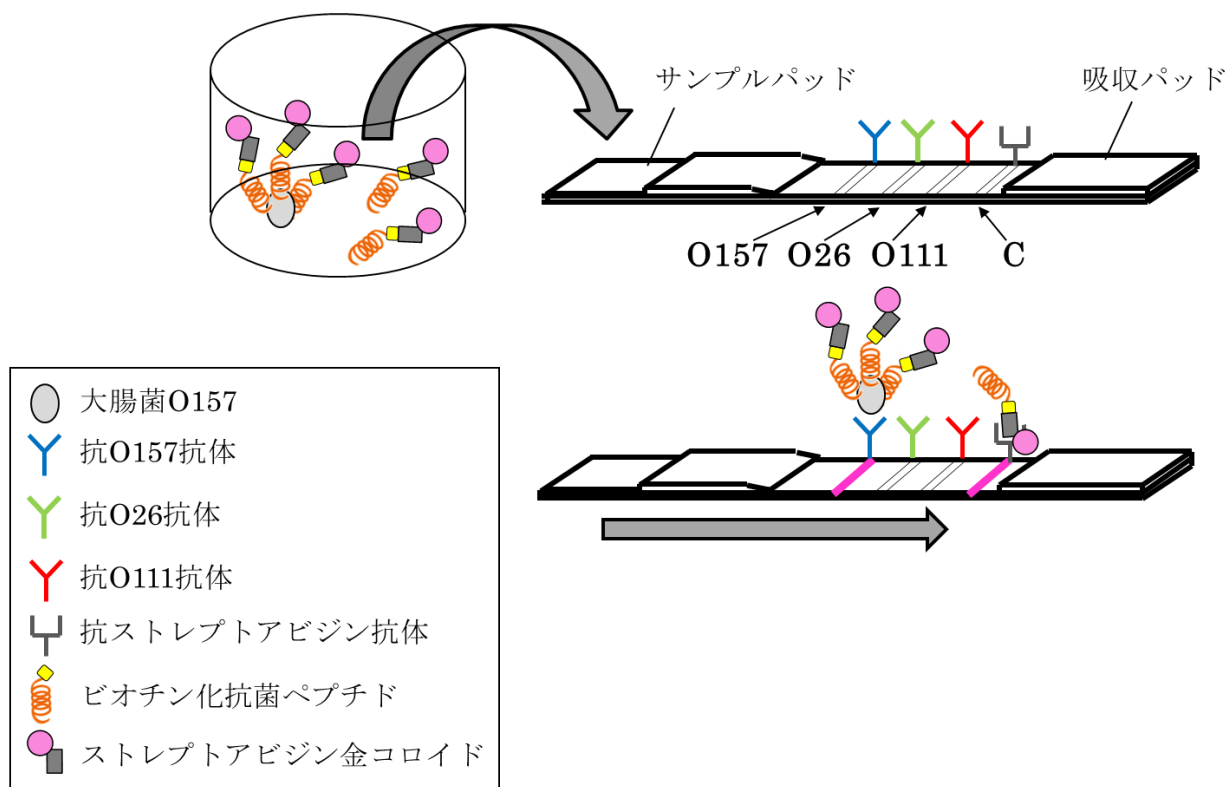


図 2-1. マルチプレックスラテラルフローアッセイの模式図

ビオチン化抗菌ペプチドとストレプトアビジン金コロイドを結合させた金コロイド標識抗菌ペプチド溶液に大腸菌 O157 を混合後、マルチプレックスラテラルフローアッセイのテストストリップに供試すると、O157 検出領域上でサンドイッチを形成し、赤紫色の陽性ラインを目視で確認することができる。抗原と結合しない金コロイド標識抗菌ペプチドは抗ストレプトアビジン抗体に捕捉されコントロールラインが可視化される。矢印はコントロールライン領域（C）および O157・O26・O111 を検出するテストライン領域を示した。

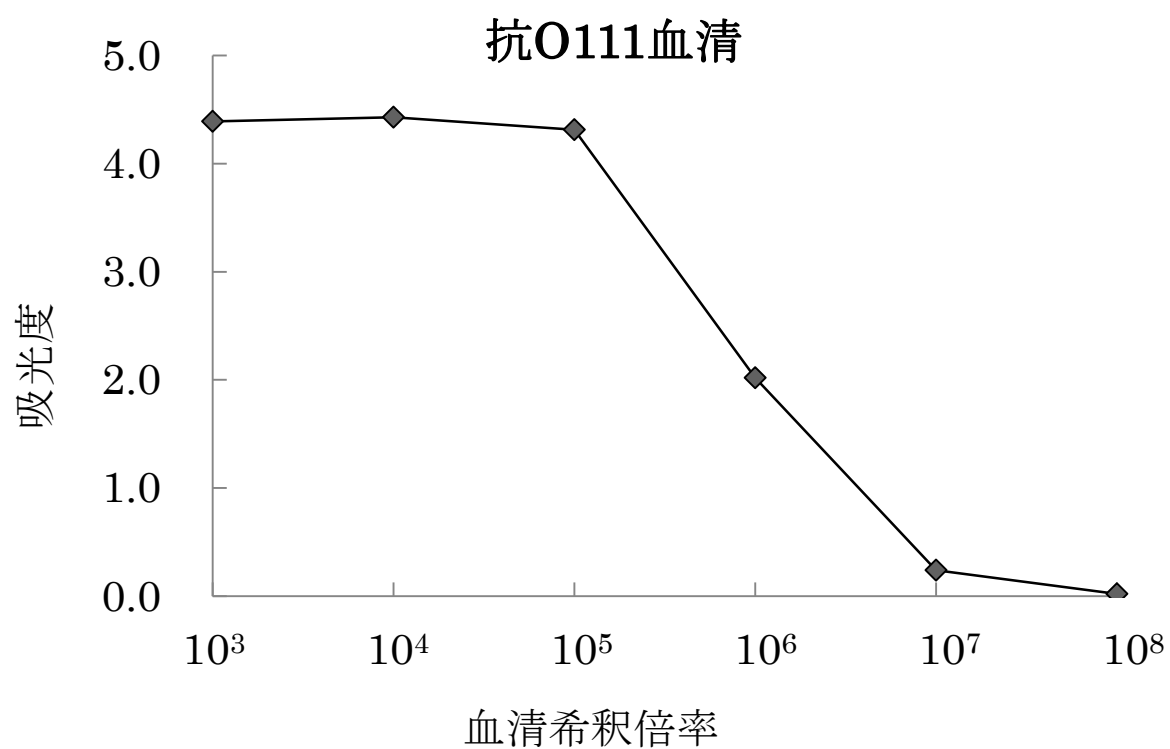


図 2-2. O111 抗血清の力価

抗 O111 血清を 10 倍段階希釈し、ELISA 法によって大腸菌 O111 に対する力価を測定した。吸光度は主波長 450 nm・副波長 620 nm を測定した。

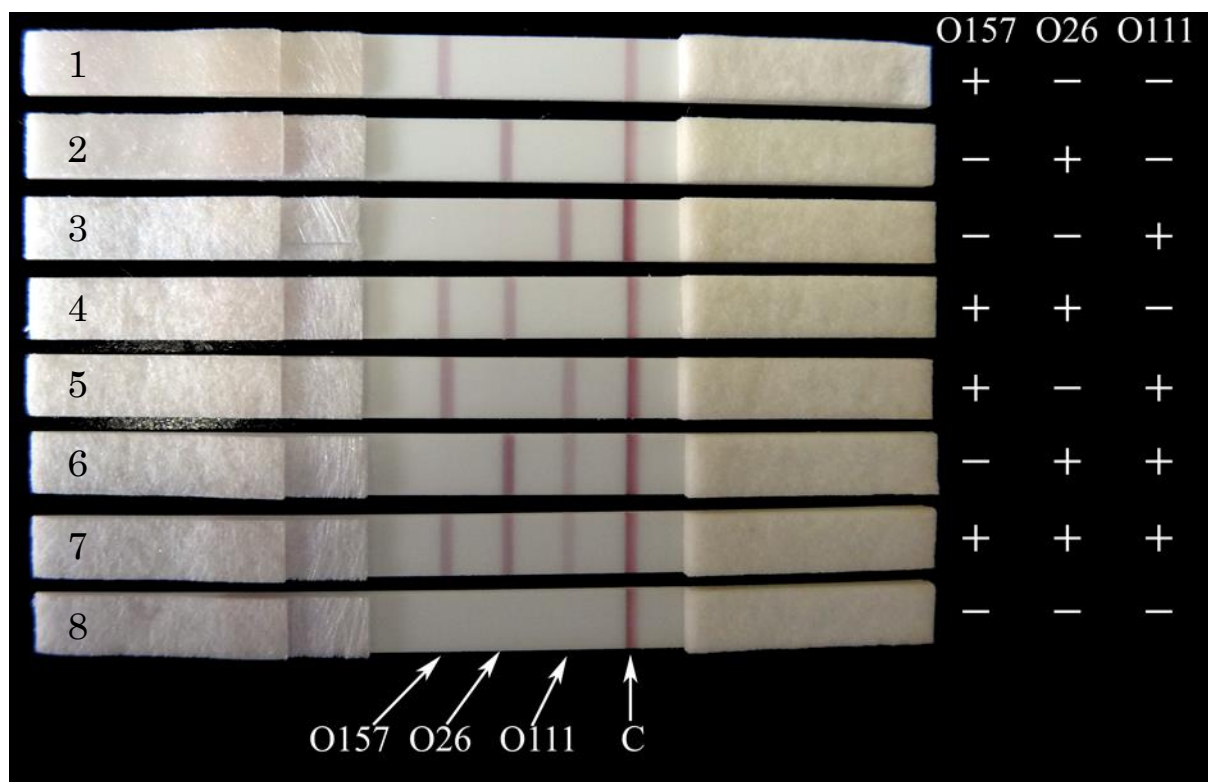


図 2-3. マルチプレックスラテラルフローアッセイによる腸管出血性大腸菌 O157・O26・O111 の同時かつ識別検出

マルチプレックスラテラルフローアッセイによる単一血清型の検出結果をストリップ 1～3 に、2 血清型の検出結果をストリップ 4～6 に、3 血清型の検出結果をストリップ 7 に示した。試料溶液に含まれる大腸菌株の種類に応じて、それに対応する血清型特異的抗体が塗布されたテストライン領域が赤紫色に可視化された。陰性検体の場合はコントロールラインのみが確認された（ストリップ 8）。矢印はコントロールライン（C）領域および O157・O26・O111 を検出するテストライン領域を示した。

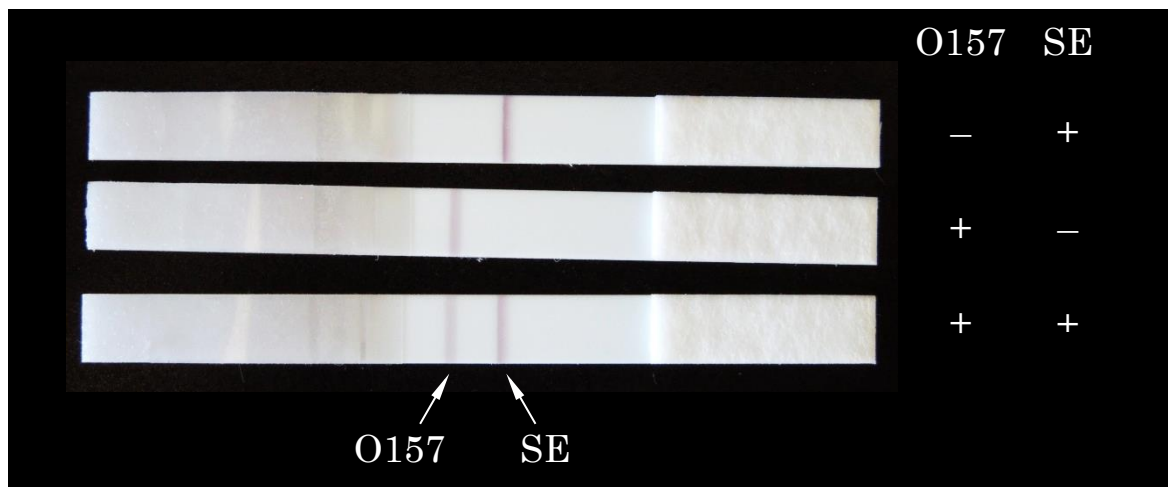


図2-4. マルチプレックスラテラルフローアッセイによるO157とサルモネラの同時検出

大腸菌O157とサルモネラ エンテリティディスを供試すると、同時かつ識別して検出できた。プローブとしてCP1を用い、コントロール抗体は塗布しなかった。矢印はO157およびSEを検出するテストライン領域を示した。

SE：サルモネラ エンテリティディス

表 2-1. プローブとして使用した抗菌ペプチド

| 抗菌ペプチド | 配列 | 残基数 | 構造 |
|--------|---------------------------------------|-----|---------------------------------|
| BLP-7 | GIGGALLSAGKSALKGLAKGLAEHFAN | 27 | α ヘリックス ^a |
| CP1 | SWLSKTAKKLENSAKKRISEGAIAIAIQGGPR | 31 | α ヘリックス |
| CP2 | SWLSKTYKKLENSAKKRISEGAIAIAIQGGPR | 31 | α ヘリックス |
| CP3 | SWLSKTAKKLENSAKKRISEGAIAIAIKGGSR | 31 | α ヘリックス |
| CP4 | SWLSKTYKKLENSAKKRISEGVIAAILGGLR | 31 | α ヘリックス |
| CtxA | SIGSALKKALPVAKKIGKIALPIAKAALP | 29 | α ヘリックス |
| LL-37 | LLGDDFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES | 37 | α ヘリックス |
| MG1 | GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS | 23 | α ヘリックス |
| MG2 | GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS | 23 | α ヘリックス |
| pBD-2 | DHYICAKKGGTCNFSPCPLFNRIEGTCYSGKAKCCIR | 37 | α ヘリックス + β シート |
| TP I | KWCFRVCYRGICYRRCR | 17 | β シート |
| TEWP | EKKCPGRCTLKCGKHERPTLPYNCGKYICCVPVKVK | 36 | β シート |

BLP-7 : bombinin-like peptide 7、CP : cecropin P、CtxA : Ceratotoxin A、LL-37 : leucine leucine-37、MG : magainin、pBD-2 : porcine beta-defensin 2、TP I : tachyplesin I、TEWP : turtle egg-white protein

^a BLP-7 の構造は明らかにされていないが、他の BLP が α ヘリックス構造を取ることから、BLP-7 も α ヘリックス構造を取ると考えられる。

表 2-2. 抗菌ペプチドプローブの検出感度（単独検出）

| 使用菌株 ^a (株名) | 塗布抗体 | 抗菌ペプチド | | 培養液の検出感度 (CFU/mL) | | | | | |
|--|-----------|--------------------|-------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---|
| | | 構造 | 名称 | 10 ⁸ | 10 ⁷ | 10 ⁶ | 10 ⁵ | 10 ⁴ | 0 |
| <i>Escherichia coli</i> O157 (RIMD 05091061) | Anti-O157 | α ヘリックス | BLP-7 | + | + | w+ | — | — | — |
| | | | CP1 | + | + | + | w+ | — | — |
| | | | CP2 | + | + | + | w+ | — | — |
| | | | CP3 | + | + | + | w+ | — | — |
| | | | CP4 | + | + | w+ | — | — | — |
| | | | CtxA | + | + | + | w+ | — | — |
| | | | LL-37 | + | w+ | — | — | — | — |
| | | | MG1 | + | + | + | w+ | — | — |
| | | | MG2 | + | + | + | w+ | — | — |
| | | α ヘリックス + β シート | pBD-2 | — | — | — | — | — | — |
| | | β シート | TP I | — | — | — | — | — | — |
| | | | TEWP | — | — | — | — | — | — |
| | | | | | | | | | |
| <i>E. coli</i> O26 (RIMD 05091876) | Anti-O26 | α ヘリックス | CP1 | + | + | + | — | — | — |
| | | | | | | | | | |
| <i>E. coli</i> O111 (RIMD 05091865) | Anti-O111 | α ヘリックス | CP1 | + | + | + | w+ | — | — |
| | | | | | | | | | |

+ : 陽性、w+ : 弱陽性、— : 陰性

^a TSB で培養した死菌液を使用した。

表 2-3. マルチプレックスラテラルフローアッセイの検出感度

| 使用菌株 ^a | 株名 | 生菌の検出感度 (CFU/mL) | | | | | |
|------------------------------|---------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | 10 ⁸ | 10 ⁷ | 10 ⁶ | 10 ⁵ | 10 ⁴ | 10 ³ |
| <i>Escherichia coli</i> O157 | ATCC 43888 | + | + | + | + | + | – |
| <i>E. coli</i> O26 | RIMD 05091876 | + | + | + | + | w+ | – |
| <i>E. coli</i> O111 | RIMD 05091865 | + | + | + | + | + | – |

+ : 陽性、w+ : 弱陽性、– : 陰性

^a ノボビオシン加 mEC で培養した菌液を使用した。

表 2-4. CP1 プローブを用いたマルチプレックスラテラルフローアッセイの特異性

| 使用菌株 ^a | 株名 | 株数 | 陽性数 (%) | |
|-------------------------------|--|----|----------|----------|
| | | | 生菌 | 死菌 |
| <i>Bacillus cereus</i> | ATCC 14579 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Citrobacter freundii</i> | ATCC 8090 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Cronobacter muytjensii</i> | ATCC 51329 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | ATCC 13048 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. cloacae</i> | ATCC 13047 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Escherichia coli</i> O1 | ATCC 11775 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O6 | ATCC 25922 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O26 | RIMD 05091876, IID 3005, wtO26-1 to 15 | 17 | 17 (100) | 17 (100) |
| <i>E. coli</i> O45 | RIMD 05091858 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O91 | RIMD 05091855 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O103 | RIMD 05091878 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O111 | RIMD 0509829, RIMD 05091865, wtO111-1 to 6 | 8 | 8 (100) | 8 (100) |
| <i>E. coli</i> O121 | RIMD 05091859 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O145 | RIMD 05091870 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>E. coli</i> O157 | ATCC 43888, ATCC 700728, RIMD 05091061, wtO157-1 to 19 | 22 | 22 (100) | 22 (100) |
| <i>E. hermannii</i> | ATCC 33650 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | ATCC 8724 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>K. pneumoniae</i> | ATCC 4352 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | ATCC 7644 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Proteus vulgaris</i> | ATCC 6380 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis | ATCC 13076 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Serratia liquefaciens</i> | ATCC 27592 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>S. marcescens</i> | ATCC 8100 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>S. odorifera</i> | ATCC 33077 | 1 | 0 (0) | 0 (0) |

^a 大腸菌はノボビオシン加 mEC、その他の細菌は TSB で培養した。

表 2-5. 接種した牛ひき肉中の大腸菌 O157・O26・O111 の検出（培養後）

| 使用菌株 (株名) | 検査法 | 接種菌数 ^a (CFU/食品 25 g) | | | |
|-------------------------|--------------|------------------------------------|-----------------|-----------------|---|
| | | 10 ² | 10 ¹ | 10 ⁰ | 0 |
| <i>Escherichia coli</i> | マルチプレックス LFA | + | + | + | — |
| O157 | 培養法 | + | + | + | — |
| (ATCC 43888) | イムノクロマト法 | + | + | + | — |
| | PCR 法 | + | + | + | — |
| <i>E. coli</i> O26 | マルチプレックス LFA | + | + | + | — |
| (IID 3005) | 培養法 | + | + | + | — |
| | イムノクロマト法 | + | + | + | — |
| | PCR 法 | + | + | + | — |
| <i>E. coli</i> O111 | マルチプレックス LFA | + | + | + | — |
| (RIMD 05091865) | 培養法 | + | + | + | — |
| | イムノクロマト法 | + | + | + | — |
| | PCR 法 | + | + | + | — |

+ : 陽性、— : 陰性、LFA : ラテラルフローアッセイ

イムノクロマト法 : NH イムノクロマト O157・O26・O111

^a 大腸菌 O157・O26・O111 の 10⁰ CFU の接種菌数はそれぞれ 6.3・2.9・5.6 CFU/25 g であった。

表 2-6. 抗菌ペプチドプローブの検出感度（サルモネラ）

| 使用菌株 ^a (株名) | 固相抗体 | 抗菌ペプチド | | 培養液の検出感度 (CFU/mL) | | | | | |
|--|---------|--------------------|-------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---|
| | | 構造 | 名称 | 10 ⁸ | 10 ⁷ | 10 ⁶ | 10 ⁵ | 10 ⁴ | 0 |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 13076) | Anti-SE | α ヘリックス | BLP-7 | + | + | + | — | — | — |
| | | | CP1 | + | + | + | — | — | — |
| | | | CP2 | + | + | + | — | — | — |
| | | | CP3 | + | + | + | — | — | — |
| | | | CP4 | + | + | + | — | — | — |
| | | | CtxA | + | + | + | — | — | — |
| | | | LL-37 | + | + | — | — | — | — |
| | | | MG1 | + | + | + | — | — | — |
| | | | MG2 | + | + | + | — | — | — |
| | | α ヘリックス + β シート | pBD-2 | w+ | — | — | — | — | — |
| | | β シート | TP I | — | — | — | — | — | — |

+ : 陽性、w+ : 弱陽性、— : 陰性

SE : サルモネラ エンテリティディス

^a TSB で培養した死菌液を使用した。

第3章 腸炎ビブリオの簡易迅速検査法の開発と特異的エピトープの解明

3.1 背景および目的

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) は、生または調理が不適切な魚介類の摂取により胃腸炎を引き起こす主要な食中毒細菌である。アメリカ (Newton et al., 2012)・中国 (Li et al., 2016)・日本 (Hara-Kudo et al., 2012) をはじめとした世界各国で腸炎ビブリオ食中毒が発生し、患者および環境から菌株が分離されている。主要な病原因子は耐熱性溶血毒 (TDH) または耐熱性溶血毒類似毒素 (TRH) であるが、TDH および TRH の検査により食品の安全性を確保することは難しい。その理由として次の3点が挙げられる。1つ目の理由は、大半の食品および環境分離腸炎ビブリオ株は TDH および TRH を保有していないことである。臨床分離株においては *tdh* 陽性率が 84%、*trh* 陽性率が 12% であるのに対し、食品分離株では *tdh* 陽性率が 1.57%、*trh* 陽性率が 3.66% と報告されている (Vongxay et al., 2008)。2つ目の理由は、毒素産生株を含む検体を検査する際に、見逃しなく検査することが難しいことである。なぜなら菌株ごとに毒素産生能は大きく異なり、同一株においても培養条件によって産生量が変化するため、見逃しなく毒素タンパク質を検出するためには非常に高い検出感度が求められる。遺伝子検査は比較的簡単に実施可能であるが、*tdh* または *trh* を持つ株が存在しても、実際にその株が毒素タンパク質を発現しているかどうかはわからない。3つ目の理由は、TDH および TRH 陰性株においても他の病原因子、例えばエフェクタータンパク質を宿主細胞に注入する T3SS 等を保有する可能性があることである (Park et al., 2004)。これらの理由より、食品または環境検体から腸炎ビブリオを検出するには、毒素よりも菌体そのものの方が検出対象として適している。日本においては、食品中の腸炎ビブリオの公定検査法は、毒素産生の有無に関わらず、全ての腸炎ビブリオを検出対象としている (Hara-Kudo et al., 2014)。すなわち腸炎ビブリオを衛生指標菌とし、その生菌数で規制を行い (荒川ら, 2008)、食品として適した状態であるかどうかを判断している。

腸炎ビブリオの一般的な検査法は培養法である。培養法による検査は、サンプリングした検体を適切な培地中で増菌培養し、選択分離寒天培地に塗抹し培養後、腸炎ビブリオと推定されるコロニーの同定を行うという流れで実施される。魚介類や海水中の腸炎ビブリオは損傷を受けているもののがかなり存在し、それらの損傷菌は抗菌薬や胆汁酸塩などを含む培地には発育できないものが多いので、増菌培地には選択性が高

くないアルカリペプトン水が用いられる（厚生労働省監修, 2004）。海水中には腸炎ビブリオとよく似た性状を示す細菌も多く、特にビブリオ属の細菌は極めてよく似た性質を示すため（荒川ら, 2008）、分離の際には注意が必要である。選択寒天培地は一般的に TCBS 寒天培地が用いられるが、この培地ではスクロース非分解菌は緑色コロニーを示すため、腸炎ビブリオと同じ緑色コロニーを形成する細菌（*V. mimicus* や *V. vulnificus*）との識別が難しい。酵素基質培地のクロモアガービブリオ寒天培地を用いれば疑わしいコロニーの 9 割以上が腸炎ビブリオと同定されるが、海水中には類似の反応を示す海水ビブリオが含まれているため、大きさや色調の濃淡も考慮してコロニーを選択しなければ腸炎ビブリオと同定される割合は低下する（荒川ら, 2008）。いずれの選択培地を用いても、腸炎ビブリオのコロニーを適切に選択するには豊富な知識と経験を要する上に、生化学試験等による腸炎ビブリオの同定試験の実施が不可欠である。同定試験を実施する際は、普通寒天培地・TSI 寒天培地・LIM 寒天培地・VP 半流動寒天培地・0%および 8%塩化ナトリウム加ニュートリエントブロスに、選択培地から釣菌した腸炎ビブリオと推定されるコロニーを接種し 18~24 時間培養後、発育の有無・培地の色調変化やガス産生の有無・試薬添加や試験紙への塗布による反応性の有無の確認などを行い、総合的に判断するため、多大な労力と時間を要する。他の細菌検査でもこれらの同定試験の一部を実施することが多いが、腸炎ビブリオの同定試験に使用する各種寒天培地には腸炎ビブリオの発育を促進するために 1~2% の塩化ナトリウムの添加が必要となるため、培地を別途調製しなければならない。このように培養法による検査は、検査日数がかかり、作業が煩雑で非効率的である。腸炎ビブリオの主要な感染源は、消費期限が短い鮮魚介類であるため、食品中の腸炎ビブリオ検査は製造後できる限り迅速に行うことが強く望まれていた。これまでに PCR 法（Kim et al., 1999）やリアルタイム PCR 法（Takahashi et al., 2005）・LAMP 法（Nemoto et al., 2011）・ドットプロットアッセイ（Sakata et al., 2012, Prompamorn et al., 2013）など、様々な迅速検査法が開発されている。PCR 法などの遺伝子検査においては、ビブリオ属に広く存在し様々な遺伝子の調節因子として働く *toxR* を標的とすることにより、病原性の有無に関わらず全ての腸炎ビブリオを検出できることが知られている。これらの検査法は腸炎ビブリオを迅速に検出可能であるが、十分に訓練された検査員とサーマルサイクラーなどの高価な検査機器が必要であり、現場での検査には適さない。また遺伝子検査においては、増菌培養液から病原細菌を検出する場合には、培養液中に含まれる様々な物質が遺伝子の増幅反応を阻害することもあるため、適切な DNA 抽出方法を選択しなければならない（工藤, 2008）。

そこで本章では食品中の腸炎ビブリオを迅速かつ簡便に検出可能なイムノクロマト法の開発を行うこととした。第 1 章および第 2 章に記載した腸管出血性大腸菌の検査においては、特定の血清型の検出が求められているため、O 抗原に対する抗体を利用してイムノクロマト法を開発した。一方、腸炎ビブリオにおいては病原性の有無に関わらず全ての腸炎ビブリオを検出することが求められるが、環境中には未知の血清

型の菌株が存在する可能性が高いことから、O 抗原は検出対象として適していない。全ての腸炎ビブリオに共通して存在し、菌体表面に発現する抗原があれば検出対象として最適であるが、そのような抗原は知られていない。腸炎ビブリオ特異的抗原を明らかにすることは、学術的にも極めて重要な課題であるため、本章では検査法の開発と並行して、腸炎ビブリオ特異的抗原の解明を目指した。ポリクローナル抗体は力価が高くイムノクロマト法開発に有用であるが、今回のように未知の抗原に対しては求める反応性を示す抗体を得ることは難しい。仮に腸炎ビブリオ菌体を免疫してポリクローナル抗体を試みたとしても、一部の血清型に特異的な抗体もしくは、他のビブリオ属の細菌に交差反応を示すべん毛等に対する抗体が作られると予想された。本章では未知の抗原に対しても特異性の高い抗体が得られる可能性があるモノクローナル抗体を開発した。得られたハイブリドーマが産生する抗体の性能評価を行い、腸炎ビブリオ特異的抗体産生株を選抜した。開発した抗体を応用して腸炎ビブリオ特異的イムノクロマト法を開発するため、基礎的技術な検討を行い、試作した「VP イムノクロマト」の性能を評価した。また得られたモノクローナル抗体が認識する抗原エピトープ解析を行い、腸炎ビブリオ特異的エピトープを解明した。

3.2 材料と方法

3.2.1 使用菌株

本研究で使用した微生物株は菌株保管機関の ATCC・NCTC (Culture Collection of Public Health England)・RIMD・JCM から入手した。環境および臨床分離株は、岡山大学の篠田純男名誉教授から分与されたものを使用した。

3.2.2 腸炎ビブリオモノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体は、川津らの方法を一部変更して作製した (Kawatsu et al., 2006)。すなわち、腸炎ビブリオ加熱死菌とフロイント完全アジュバントを混合し、エマルジョン化して免疫抗原とした。8~12 週齢の雌の BALB/c マウスに 4 回 (0、2、3、4 週目に) 免疫を行い、最終免疫の 3 日後に脾臓細胞を取り出し、P3U1 ミエローマ細胞と混合し、ポリエチレングリコールにより融合した。クローニングは限界希釈法により実施した。ハイブリドーマのスクリーニングは抗原固相 ELISA 法を行い、陽性抗原として腸炎ビブリオを、陰性抗原としてその他のビブリオ属菌株を使用して、培養上清の反応性を比較した。選抜したハイブリドーマは無血清培地の GIT 培地 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) で培養し、プロテイン G カラムにより抗体を精製した。動物実験は日本ハム株式会社 中央研究所の動物実験ガイドラインに基づいて実施した。得られたモノクローナル抗体は、IsoStrip アイソタイピングキット (Roche Applied Science) を用いて、サブクラスを決定した。

3.2.3 抗原固相化 ELISA 法

ELISA 法は Russell らの方法を一部変更して実施した (Russell et al., 1976)。すなわち、加熱殺菌した腸炎ビブリオ株およびその他のビブリオ属の菌株 (*V. alginolyticus*・*V. cholerae*・*V. fluvialis*・*V. furnissii*・*V. mimicus*・*V. vulnificus*) を 50 mM 炭酸-重炭酸緩衝液 (pH 9.6) で 5×10^7 CFU/mL に希釈し 96 ウェルプレートの各ウェルに 100 μ L ずつ分注し、4°C で 1 晩静置した。翌日プレートを PBST で 2 回洗浄し、ブロックエース溶液を添加して 4°C で 1 晩静置した。PBST で 3 回洗浄後、ハイブリドーマ培養上清 50 μ L をプレートの各ウェルに添加し、25°C で 1 時間静置した。その後プレートを PBST で 5 回洗浄し、5,000 倍希釈した HRP-標識ヤギ抗マウス抗体 (Bethyl Laboratories, Inc.) 100 μ L を各ウェルに添加し、25°C で 1 時間静置した。PBST で 5 回洗浄後、TMB 溶液 100 μ L を各ウェルに添加し、25°C で 20 分間反応させた。0.25 M 硫酸を 100 μ L 添加し反応を停止し、主波長 450 nm・副波長 620 nm の吸光度をプレートリーダーで測定した。

3.2.4 SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングによる抗原解析

ビブリオ属菌株の培養液を 2-メルカプトエタノール添加済み Laemmli サンプルバッファー (Bio-Rad Laboratories, Inc.) に懸濁し、5 分間煮沸した。その後 15% アクリルアミドゲル (ATTO Corporation) を用いて SDS-PAGE を行い、分離されたタンパク質を CBB (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) により染色した。また SDS-PAGE によって分離したタンパク質を PVDF 膜 (ATTO Corporation) に転写した。転写後の PVDF 膜はブロッキング溶液 (EzBlock Chemi; ATTO Corporation) で 1 時間振とうした。PBST にて洗浄後、本章で作製した抗腸炎ビブリオモノクローナル抗体 (0.2 µg/mL) で 1 時間反応させた。洗浄後、PVDF 膜を 10,000 倍希釈した HRP 標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (Bethyl Laboratories, Inc.) で 1 時間反応させた。洗浄後、PVDF 膜を TMB 溶液 (ATTO Corporation) に浸した。青色のバンドが目視で確認されるまで静置後、蒸留水で PVDF 膜を洗浄し反応を停止した。

3.2.5 VP イムノクロマトの開発

イムノクロマト法のテストストリップの作製は、第 1 章に記載の方法に従った。作製した抗腸炎ビブリオモノクローナル抗体は、50 µg/mL で金コロイド標識しコンジュゲートパッドに含浸させると共に、ニトロセルロース膜のテストライン領域へ 1.0 mg/mL で塗布した。コントロールライン領域にはヤギ抗マウス IgG (H+L) 抗体 (Abliance) を 0.4 mg/mL で塗布し、室温で乾燥させた。様々なビブリオ属菌株を 2% 食塩アルカリペプトン水 (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd.) に接種し、37°C で 18~24 時間培養した。培養液は 5 分間煮沸し、100 µL をデイスポーサブル試験管に分取し、0.5% Nonidet P40、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) を 25 µL 添加した。ボルテックス後に VP イムノクロマトを投入した。室温で 15 分静置後に結果を目視で観察した。テストライン領域とコントロールライン領域の両方で赤紫色のラインが検出された場合、検査結果は腸炎ビブリオ陽性と判定した。コントロールラインのみが確認された時は陰性と判定した。

3.2.6 免疫沈降による抗原濃縮

腸炎ビブリオ O3:K6 (RIMD 2210633) の 1 晩培養液を遠心し、1% Triton X-100、150 mM NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に懸濁した。Sonifire (Emerson Industrial Automation) を用いて超音波破碎後、遠心分離により得られた上清を本章で作製したモノクローナル抗体 VP7 (40 µg/mL) と混合し、室温で 1 時間反応させた。反応液にプロテイン G セファロース (GE Healthcare Life Sciences) を添加し、さらに 1 時間反応させた。3 分遠心後、上清を除き、沈殿を 1% Triton X-100、150 mM NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で洗浄した。遠心後のペレットを 2-メルカプトメタノール添加済み Laemmli サンプルバッファーに懸濁し煮沸した後、SDS-PAGE によりタ

ンパク質を分離し、銀染色（ATTO Corporation）した。

3.2.7 nano LC–MS/MS によるタンパク質の同定

ゲル内消化は Gharahdaghi らの方法を一部改変して実施した (Gharahdaghi et al., 1999)。すなわち、銀染色したアクリルアミドゲルより目的サイズのバンドを切り出し、15 mM フェリシアン化カリウム、50 mM チオ硫酸ナトリウムにより脱色した。ゲル片を蒸留水で洗浄し、アセトニトリル中で 10 分間振とうした。上清を除き、ゲル片を 10 分間減圧乾燥した。100 mM DTT、100 mM 炭酸水素アンモニウム溶液を添加し、56°C で 30 分間反応させた。上清を 100 mM ヨードアセトアミド、100 mM 炭酸水素アンモニウム溶液に置換し、37°C で 30 分間反応させた。上清を除き、100 mM 炭酸水素アンモニウム溶液で洗浄し、アセトニトリルで 10 分間振とうした。上清を除き、ゲル片を再度 10 分間減圧乾燥した。乾燥したゲル片にトリプシン溶液を添加し、氷上で 45 分間静置した。上清を 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) に置換し、35°C で 17 時間酵素消化した。切断後のペプチドは 5%ギ酸、50%アセトニトリル溶液で 37°C 30 分間反応させた。上清は減圧乾燥により濃縮し、ZipTipC18 (Merck KGaA) により精製した。0.1% TFA、70%アセトニトリル溶液で溶出後、0.1%ギ酸、2%アセトニトリル溶液を添加した。

Nano LC–MS/MS 分析には QSTAR XL Hybrid LC/MS/MS System (Thermo Fisher Scientific Inc.) と Bio nanoLC (KOA Technologies Corporation) を用いた。得られたデータは、タンパク質同定のために Mascot データベースにより解析した (Bouyssie et al., 2007)。

3.2.8 無細胞タンパク質合成によるヒスチジンタグ付加タンパク質の合成

腸炎ビブリオの外膜リポタンパク質は無細胞タンパク質合成試薬 PUREfrex 2.0 (GeneFrontier Corporation) を用い、取扱説明書と清水らの方法に従い合成した (Shimizu et al., 2010)。すなわち、タンパク質合成のための鋳型 DNA は 2 段階 PCR 法によって作製した。使用したプライマー配列は表 3-1 に一覧化した。腸炎ビブリオのゲノム DNA は PrepMan Ultra sample preparation reagent を用いて抽出した。ヒスチジンタグ付加外膜リポタンパク質遺伝子は、5 倍希釈した抽出 DNA を鋳型とし、OML-F1 プライマーと OML-His-R1 プライマーを用いて増幅した。PCR 法のプログラムは、98°C で 30 秒間反応したのち、98°C 10 秒、63°C 30 秒、72°C 60 秒を 30 サイクル繰り返した後に、72°C 2 分間反応させた。PCR 法の第 2 段階は第 1 段階の増幅産物を鋳型とし、T7PRO-SD プライマーと OML-His-R1 プライマーを用いて、第 1 段階の PCR 法と同じプログラムで増幅した。様々な長さの外膜リポタンパク質 N 末端欠失体 ΔN は、OML-F1 プライマーを OML-F2~OML-F7 に代えて合成した。C 末端欠失体 ΔC (1–39) は OML-F1 プライマーと OML-His-R2 プライマーを用いて合成した。ヒスチジンタグ付加 YcfL は、OML-F1 プライマーを YcfL-F プライマ

ーに、OML-His-R1 プライマーを YcfL-His-R プライマーにそれぞれ代えて合成した。タンパク質合成のために 37°C で 4~6 時間反応させた。合成されたタンパク質はニッケル磁気ビーズ (Merck KGaA) により精製した。精製したヒスチジンタグ付加タンパク質は、ウエスタンブロッティングによって抗体との反応性を解析した。ヒスチジンタグ付加タンパク質は 15,000 倍希釈した HRP 標識ウサギ抗ヒスチジンタグ抗体 (Bethyl Laboratories, Inc.) と、高感度検出のための化学発光基質 (LumiGLO; SeraCare life science, Inc.) (ECL prime; GE Healthcare Life Sciences) および検出機 (Ez-Capture II; ATTO Corporation) を用いた。欠失体とプロテアーゼ消化断片のタンパク質は 16.5% アクリルアミドゲルを使用し tris-tricine SDS-PAGE で分離した (Schagger et al., 1987)。

3.2.9 エピトープ解析に利用するプロテアーゼ消化断片の作製とペプチド合成

精製したヒスチジンタグ付加外膜リポタンパク質は 0.025 mg/mL クロストリパイン (Worthington Biochemical Corporation)、7.2 mM PBS (pH 7.4)、2.5 mM DTT、0.25 mM calcium acetate で 25°C 4 時間酵素処理した。

外膜リポタンパク質の 20~69 番目のアミノ酸領域において、15 残基長ペプチドに対し 5 残基ずつ開始位置をずらして合計 8 種類 (20-34・25-39・30-44・35-49・40-54・45-59・50-64・55-69) 化学合成した (GenScript Biothech Corporation)。2 mg/mL に希釈後に、これらの断片を用いてウエスタンブロッティングによりエピトープを解析した。

3.2.10 サンドイッチ ELISA 法によるエピトープ解析

0.1 M 炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 8.5) で 10 µg/mL に希釈したモノクローナル抗体を 96 ウェルプレートの各ウェルに 100 µL 分注し、4°C で 1 晩固相化した。プレートを PBST で 2 回洗浄後、1% BSA、PBS を 200 µL 添加し、25°C で 3 時間ブロッキングした。複数の長さの異なる精製外膜リポタンパク質断片を 25 倍または 250 倍に希釈し、PBST で 3 回洗浄した上記プレートの各ウェルに 50 µL 添加した。陰性コントロールとして、ヒスチジンタグ付タンパク質精製時の溶出バッファーを使用した。25°C 30 分間反応後、PBST で 5 回洗浄し、20,000 倍希釈した HRP 標識ウサギ抗ヒスチジンタグ抗体を 50 µL 添加した。25°C 30 分間反応後、再び PBST で 5 回洗浄を行い、TMB 溶液を 100 µL 添加し、25°C で 20 分反応させた。0.25 M 硫酸を 100 µL 添加し反応を停止し、プレートリーダーで主波長 450 nm・副波長 620 nm の吸光度を測定した。いくつかの実験ではペルオキシダーゼ標識 (DOJINDO LABORATORIES) した腸炎ビブリオモノクローナル抗体 (20,000 倍希釈) を HRP 標識ウサギ抗ヒスチジンタグ抗体の代わりに使用した。

3.3 成績

3.3.1 抗腸炎ビブリオモノクローナル抗体の作製と性能評価

腸炎ビブリオ特異的モノクローナル抗体を得るために、腸炎ビブリオ加熱死菌をマウスに免疫し、P3U1 ミエローマ細胞と融合して、ハイブリドーマを作製した。40 枚の 96 ウェルプレートに分注・培養されたハイブリドーマの中から、腸炎ビブリオに反応し、その他のビブリオ属の菌株に反応しないクローンを抗原固相化 ELISA 法によって選抜した。選抜した株については、さらに 12 種類の血清型の腸炎ビブリオへの反応性を確認した。得られたハイブリドーマを、産生する抗体の反応性の違いにより 4 つのグループに分類した（表 3-2）。グループ 1（VP7・VP11・VP24）は全ての血清型の腸炎ビブリオに反応し、腸炎ビブリオとの鑑別が重要なビブリオ属の菌株（*V. alginolyticus*・*V. cholerae*・*V. fluvialis*・*V. furnissii*・*V. mimicus*・*V. vulnificus*）に交差反応を生じないことが判明した。グループ 2（VP19）は全ての血清型の腸炎ビブリオと *V. alginolyticus* に反応し、その他のビブリオ属細菌には反応を示さなかった。グループ 3 とグループ 4 は血清型特異的抗体で、VP5 は O10 と O12 に、VP21 は O6 にそれぞれ反応した。これらのハイブリドーマは、ELISA 法やイムノクロマト法などのサンドイッチアッセイ構築に適した IgG2a または IgG2b 抗体を産生していた。全ての血清型の腸炎ビブリオ検出法を構築するために、グループ 1 および 2 に属するモノクローナル抗体をハイブリドーマ上清から精製し、その性能を評価した。モノクローナル抗体の特性を確認するために 7 種類のビブリオ属菌株を用いてウエスタンブロッティングを実施した。VP7 モノクローナル抗体で染色した結果、腸炎ビブリオを泳動したレーンでは約 11 および 16 kDa 付近に 2 本の特異的バンドが検出され、他の 6 種のビブリオ属細菌では特異的バンドは検出されなかった（図 3-1）。VP11・VP24 を用いた場合も VP7 と同様の結果を示した（図 3-2）。VP19 を用いた場合は、腸炎ビブリオだけでなく *V. alginolyticus* においても 2 本のバンドが検出され、それらのサイズは腸炎ビブリオを泳動したレーンと同様のサイズを示した（図 3-2）。ウエスタンブロッティングによる各抗体のビブリオ属細菌への反応性は、抗原固相化 ELISA 法で得られた結果と一致していた（表 3-2）。グループ 1 および 2 に属する 4 種のモノクローナル抗体は同一サイズの抗原を認識しているため、同一抗原を認識する可能性があり、サンドイッチアッセイ構築の際のペア抗体として使用できるかどうか検討した。

3.3.2 VP イムノクロマトの開発

作製したモノクローナル抗体を利用して、腸炎ビブリオ検出イムノクロマト法を試作した。はじめにサンドイッチアッセイを構築可能なモノクローナル抗体の組み合わせを確認・決定するために、4 種の抗体（VP7・VP11・VP19・VP24）それぞれをニ

トロセルロース膜に塗布、および金コロイド標識を行い、それらを組み合わせてテストストリップを試作した（表 3-3）。その結果、いずれの抗体の組み合わせにおいても腸炎ビブリオを検出可能であり、サンドイッチイムノクロマト法を構築することができた。一方、反応性は抗体によって異なり、VP19 抗体は高感度だが、金コロイド標識抗体として使用すると *V. alginolyticus* に対して強い交差反応を示した。VP24 抗体は特異性が高いが、ニトロセルロース膜塗布抗体として使用すると感度が低い傾向を示した。アルカリペプトン水に偽陽性を示す条件、*V. alginolyticus*・*V. cholerae* へ交差反応を示す条件・検出感度が低い条件を除くと、ニトロセルロース膜塗布抗体-金コロイド標識抗体の組み合わせ候補は VP7-VP24 と VP11-VP24 に絞られた。両組み合わせの性能はほぼ同等であったが、表 3-3 の結果より、VP7 をニトロセルロース膜に塗布した VP7-VP11・VP7-VP19 の方が、VP11 を塗布した VP11-VP7・VP11-VP19 に比べ交差反応性が低いため、より特異性が高いと考えられる VP7 抗体を塗布抗体として用いることとした。このようにして、VP7 を塗布したニトロセルロース膜に、金コロイド標識した VP24 を組み合わせることにより腸炎ビブリオを迅速検出可能な試作品を完成し、「VP イムノクロマト」と名付けた。検出感度を上げるためにサンプル前処理液への添加剤として複数の界面活性剤・ポリマーを比較検討した結果、nonidet P40 が最適であることを確認した。VP イムノクロマトは、試料溶液中に腸炎ビブリオが含まれている場合、試料溶液滴下後 15 分以内にテストラインおよびコントロールラインを目視で確認できた（図 3-3）。VP イムノクロマトの特異性を確認するために、様々な血清型の腸炎ビブリオ 25 株、腸炎ビブリオ以外の菌株 35 株を純培養し供試した（表 3-4）。その結果、VP イムノクロマトは血清型（O1~O12）、分離源（臨床及び環境）、*tdh* および *trh* の有無に関わらず、試験した全ての腸炎ビブリオを検出できた（25/25）。また腸炎ビブリオ以外の菌株は全て陰性を示した（0/35）。VP イムノクロマトの感度を確認するために、血清型の異なる 12 株の腸炎ビブリオ培養液を 10 倍段階希釈し、VP イムノクロマトに供試した。その結果、2%食塩含有アルカリペプトン水で培養した腸炎ビブリオの検出感度は $10^6 \sim 10^8$ CFU/mL であることが判明した（表 3-5）。アルカリペプトン水で 10 倍段階希釈した腸炎ビブリオ菌液を 1 晩培養することにより、培養前濃度が 10^0 CFU/10 mL の検体からも VP イムノクロマトで腸炎ビブリオを検出できた（図 3-3）。

3.3.3 モノクローナル抗体認識抗原の同定

本章で作製したモノクローナル抗体が認識する抗原を同定するため、免疫沈降法により VP7 抗体に結合する抗原を精製した。銀染色の結果、目的サイズの 11 および 16 kDa のタンパク質が濃縮できていることを確認した（図 3-4）。これらのバンドを切り出し、LC-MS/MS と Mascot データベースにより解析した結果、11 kDa のバンドからは外膜リポタンパク質（UniProt アクセッション番号 Q87G48）、16 kDa のバンドからは外膜リポタンパク質 Q87G48 と YcfL（UniProt アクセッション番号

A0A072IJX0) が検出された (表 3-6)。興味深いことに、サイズの異なる 2 本のバンドに同一のタンパク質 Q87G48 が含まれていた。これら 2 種のタンパク質のうち、どちらが VP7 抗体と結合するかを確認するため、無細胞タンパク質合成試薬

(PUREfrex 2.0) により、C 末端ヒスチジンタグを付加した両タンパク質を合成した。タンパク質合成の鋳型 DNA を合成するため、外膜リポタンパク質遺伝子 (NCBI アクセッション番号 NC_004605、1,569,402–1,569,656 領域) または *ycfL* (NCBI アクセッション番号 JNTA01000057、6,089–6,481 領域) の上流に T7 プロモーターとリボソーム結合サイト (SD 配列) を、下流にヒスチジンタグを PCR 法により付加した。合成したヒスチジンタグ付加タンパク質はニッケル磁気ビーズにより精製した。

無細胞合成により目的タンパク質が合成できているかを確認するため、ウエスタンブロッティングを実施した結果、両タンパク質共に抗ヒスチジンタグ抗体で検出され、そのバンドサイズは Mascot データベースより判明した質量 (YcfL : 14,676、外膜リポタンパク質 Q87G48 : 8,671) と近いサイズを示した (図 3-5 左 レーン 1、2)。これらの理由から、両タンパク質は設計通りに合成できたと判断した。更にモノクローナル抗体 VP7 との反応性をウエスタンブロッティングにより確認した結果、YcfL には反応せず、外膜リポタンパク質のみを検出可能であることを確認した (図 3-5 右 レーン 1、2)。これらの結果から VP7 抗体が認識する抗原は、外膜リポタンパク質 Q87G48 であることが判明した。UniProt データベースによると、外膜リポタンパク質はシグナル配列を含み、ホモ 3 量体構造をとることが示された。

3.3.4 外膜リポタンパク質のエピトープの同定

本章で作製したモノクローナル抗体が認識する外膜リポタンパク質のエピトープを明らかにするために、長さの異なる様々な部分タンパク質を合成し、モノクローナル抗体との反応性を確認した。無細胞合成により、ヒスチジンタグ付加 N 末端欠失体 ΔN (22–84) (外膜リポタンパク質の N 末端側 22–84 番目のアミノ酸) と C 末端欠失体 ΔC (1–39) を作製した。これらのタンパク質をサンプルとして用いてウエスタンブロッティングを実施した結果、両タンパク質は抗ヒスチジンタグ抗体で検出できたが、VP7 抗体は ΔN (22–84) のみ検出できた (図 3-5 左右 レーン 3、4)。これらの結果より、VP7 抗体は外膜リポタンパク質の C 末端側に結合することが示唆された。 ΔN (22–84) は腸炎ビブリオから抽出した外膜リポタンパク質同様に、VP7 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより 2 本のバンドが検出された。更に N 末端欠失体 ΔN (27–84) \cdot ΔN (32–84) \cdot ΔN (37–84) \cdot ΔN (42–84) \cdot ΔN (47–84) を無細胞合成し、ウエスタンブロッティングによって反応性を確認した (図 3-6)。その結果、抗ヒスチジンタグ抗体を用いた場合、全ての欠失体が検出されることから、これらの部分タンパク質についても無細胞合成できたことを確認した。一方、VP7 抗体では ΔN (27–84) \cdot ΔN (32–84) \cdot ΔN (37–84) しか検出されず、 ΔN (37–84) のバンドは薄かった。VP24 抗体を用いた場合も VP7 抗体と同じ結果となり、VP11

および VP19 抗体を用いた場合は ΔN (27-84) と ΔN (32-84) のみが検出された。外膜リポタンパク質の部分配列への反応性を確認するために、プロテアーゼで断片化した試料も用いた。ExPASy Peptide Cutter program

(https://web.expasy.org/peptide_cutter/) を用いてプロテアーゼの切断予想部位を検索し、ウエスタンブロッティングによる解析が可能な比較的大きな断片が得られるプロテアーゼとしてクロストリパインを選定した。クロストリパインの切断部位は、外膜リポタンパク質の 70 および 74 アミノ酸であり、70 残基 (1~70 番目) の断片が得られると予想された。実際にこの酵素によりヒスチジントグ付加外膜リポタンパク質を断片化後にウエスタンブロッティングを実施した結果、VP7・VP11・VP19・VP24 抗体では検出できたが、抗ヒスチジントグ抗体では検出されず、71 残基以降は抗体との反応性には関与しないことが示された (図 3-6)。外膜リポタンパク質の一部を化学合成した 8 種のペプチドについてもウエスタンブロッティングを実施したが、VP7・VP11・VP19・VP24 はいずれのペプチドにも反応性を示さないことが確認された (図 3-6)。

ウエスタンブロッティングは抗原タンパク質を SDS-PAGE により直鎖状に変性させて膜に固定化し反応性を確認するため、立体構造認識抗体の場合には正しい反応が得られない場合がある。そこで溶液状態の外膜リポタンパク質を用いて抗体の反応部位を絞り込むために、VP モノクローナル抗体を固相化したプレートと HRP 標識抗ヒスチジントグ抗体を用いてサンドイッチ ELISA 法を実施した。その結果、本アッセイにより外膜リポタンパク質を検出可能であり、特に ΔN (22-84)・ΔN (27-84)・ΔN (32-84) は他の部分タンパク質よりさらに 10 倍希釈して使用しても高い反応性が得られることを確認した (図 3-7)。HRP 標識抗ヒスチジントグ抗体を HRP 標識モノクローナル抗体に置き換えて、腸炎ビブリオモノクローナル抗体同士のサンドイッチ ELISA 法を実施した (表 3-7)。その結果、VP19 と VP24 はそれら自身も含めて全ての抗体とサンドイッチ ELISA 法を構築でき、ΔN (27-84) を検出することができた。一方、VP7-VP7・VP7-VP11・VP11-VP11 の組み合わせはいずれも ELISA 法を構築できず、エピトープを共有している可能性が考えられた。これらの結果より、外膜リポタンパク質に対するモノクローナル抗体の反応性は類似しているが、VP7/VP11・VP19・VP24 の抗原認識は異なることが示された。

腸炎ビブリオ外膜リポタンパク質とその他のビブリオ属菌株の推定オルソログ (*V. alginolyticus*, NCBI アクセッション番号 WP_053311657; *V. cholerae*, CPR29533; *V. fluvialis*, EPP26725; *V. furnissii*, WP_004727303; *V. mimicus*, EEEY36512; *V. vulnificus*, ADV88337) のアミノ酸配列を比較した (図 3-8 (a))。その結果、抗腸炎ビブリオモノクローナル抗体が主に反応する 22~36 残基領域は、腸炎ビブリオ特異的エピトープを含むことを確認できた。この領域に腸炎ビブリオ株間で変異が見られないかどうかを確認するため、外膜リポタンパク質 Q87G48 のアミノ酸配列を用いて、NCBI のタンパク質データベースを対象に「Basic Local Alignment Search Tool」

(blast; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) で検索した。その結果、仮説タンパク質 (hypothetical protein) として登録されている 6 種の配列 (NCBI アクセション番号 WP_140360827、WP_191116496、WP_140142040、WP_021484059、MBE4307554、WP_140072439) が得られた。これらの配列比較により、23 残基目に変異があるものが 1 株存在したが、腸炎ビブリオに最も特徴的な 29・30 残基には変異や欠失が見られず、その他の株は Q87G48 と 100%一致した (図 3-8 (b))。

3.4 考察

本章では、腸炎ビブリオ特異的モノクローナル抗体を作製し、選抜した抗体を用いて腸炎ビブリオの簡易迅速検査法 VP イムノクロマトを開発した。VP イムノクロマトは、O1～O12 までの全ての血清型・分離源（臨床および環境分離）の腸炎ビブリオを *tdh* および *trh* の有無に関わらず検出できた。ビブリオ属の細菌は極めてよく似た性質を示し、腸炎ビブリオ検査時には *V. alginolyticus* や *V. vulnificus* など多数分離されるため（千葉県衛生研究所, 2014）、それらとの鑑別が重要となる。今回開発した VP イムノクロマトはこれらの細菌とは交差反応を示さず、腸炎ビブリオのみを特異的に検出することができた。腸炎ビブリオは好塩菌であり、通常 1～3%の食塩濃度で培養が行われ、検査の目的に応じて使用する食塩濃度が使い分けられる。VP イムノクロマトの検出感度は、培養液のアルカリペプトン水の塩濃度の影響を大きく受け、1～3%の塩濃度においては 1%の培地を使用した時が最も高い感度を示した。現在の日本における公定法の食塩濃度は 1%だが、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」により策定された「腸炎ビブリオ試験法 NIHSJ-06-ST4 (20160729)」においては、アルカリペプトン水の食塩濃度は腸炎ビブリオの増殖により適した 2%に変更されている。今後国内の公定法が改訂される可能性を考慮して、本研究においても食塩 2%含有アルカリペプトン水を用いた。この条件下での VP イムノクロマトの感度は $10^6 \sim 10^8$ CFU/mL であり、想定より低い結果を示した。しかし、腸炎ビブリオは増殖性が極めて高く、検体中に数個の腸炎ビブリオがいれば 1 晩の増菌培養で VP イムノクロマトの検出感度に達するため、腸炎ビブリオの検査に使用可能と判断した。本章で作製した抗体は、腸炎ビブリオの総タンパク質を含む抗原溶液を免疫して作製したが、本章で実施した免疫沈降や無細胞合成などの方法により精製した外膜リポタンパク質のみを免疫抗原とすれば、より感度の高い抗体が得られる可能性がある。更にハイブドローマの選別時に、適切な塩濃度環境下でスクリーニングを行えば、塩濃度の影響を受けづらい抗体が取得できると考えられる。VP イムノクロマトは、腸炎ビブリオ培養液を煮沸および界面活性剤処理することで検出感度が向上したが、この理由は抗体の接触機会と抗原の反応性が向上したためと推察される。前者については、腸炎ビブリオは多糖類からなる粘液様の莢膜に覆われているが、上記処理によって莢膜の除去と外膜の可溶化が一部生じることで外膜リポタンパク質がより露出され、その結果抗体の接触機会が増したと考えられる。後者については、本抗体は加熱死菌を免疫して得られたモノクローナル抗体であるため、加熱によって抗原の抗体との反応性が向上した可能性がある。

坂田らは腸炎ビブリオ F₀F₁ ATP 合成酵素に対する 2 種類の抗体を組み合わせるイムノクロマト法を開発し、培養法により単離したコロニーから直接腸炎ビブリオを検出することができた（Sakata et al., 2015）。その検出感度は $1.3 \sim 1.6 \times 10^7$ CFU/mL

であり、本章で開発した VP イムノクロマトと同等の感度であることから、VP イムノクロマトもコロニーの同定目的で使うことができると考えられる。VP イムノクロマトは特異性が非常に高いため、その検査で陽性を示した検体は、労力と時間がかかる生化学検査をする必要がないため、腸炎ビブリオの同定に非常に有用であると考えられる。Liu らが開発したイムノクロマト法は、抗原不明の 2 つのモノクローナル抗体を使用しており、その検出感度は 1.2×10^3 CFU/mL と報告されている (Liu et al., 2016)。Liu らの検出対象は、腸炎ビブリオ感染者の便および感染バナメイエビの便・肝臓であり、これらの検体中には腸炎ビブリオが高濃度に存在するため、増菌培養せずに迅速に検出するためには高い感度のイムノクロマト法が必要となる。一方、本研究の対象は食品検体であり、一般的にその汚染濃度は極めて低いことから、腸炎ビブリオ検査の際には、必ず増菌培養を実施しなければならない。更に腸炎ビブリオの増殖速度は大腸菌など他の微生物と比べると非常に速く、最適条件下では倍加時間は 8~9 分であることが知られている (Joseph et al., 1982)。これらの理由から、食品検査に使用するイムノクロマト法においては、そこまで高い検出感度は必要ないと考えられる。

国内での腸炎ビブリオの成分規格は、前述の通り生食用鮮魚介類においては最確数 1 g あたり 100 以下、ゆでだこ・ゆでがにでは 25 g 当たり陰性であることとされている。後者については陽性／陰性の判定のため、定性的なイムノクロマト法による検査は可能である。一方、前者については定量的な検査が求められるため、定性検査法による検査が可能であるかについては議論が必要となる。もちろん培養法と同様に増菌培養時に 3 濃度を 3 本ずつ培養し、全ての試験区に対してイムノクロマト法で試験を行うことにより定量的な検査は可能であるが、これでは本法のメリットである簡便性が一部損なわれてしまう。1996 年から 2010 年までの生食用鮮魚介類を中心とした食品・調理器具等の腸炎ビブリオ検出率の推移の調査報告によると、2000 年の 7.3% をピークに年々減少傾向にあり 2010 年には 1.0% まで減少している (尾畑, 2013)。これは 2001 年に定められた規格・加工・保存の基準により衛生管理が徹底され、食品の腸炎ビブリオ汚染率・汚染菌数が低下しているものと考えられる。上記調査結果を食品別に分類すると、加熱調理用カキ (むき身) が 30.2%、生食用貝類 (カキを除く) が 18.8%、生食用カキが 13.8% となり、その他は 4.0% 以下となっている。腸炎ビブリオは二枚貝の消化管内に蓄積することが知られているため、貝類での検査には注意が必要であるものの、鮮魚介類全体での腸炎ビブリオ検出率は 1.0% であるため、イムノクロマト法による定性検査でも十分検査の目的は果たせると考えられる。腸炎ビブリオの食中毒患者数および食品の汚染率は年々低下しているが、腸炎ビブリオは成分規格が定められており、汚染指標菌という意味合いでも、食品製造業者は検査の継続が求められている状況であり、イムノクロマト法による検査の迅速化は極めて有用である。腸炎ビブリオ食中毒患者数は日本国内では 1998 年をピークに減少の一途を辿っているが、アメリカにおいては増加傾向にある。人口 10 万人あたりの腸炎ビブ

リオ感染症の年間発生率を 1996 年と 2010 年で比較すると、Cholera and Other *Vibrio* Illness Surveillance (COVIS) では 0.01 と 0.13、Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) では 0.06 と 0.23 となり、2 つのシステムいずれも増加していることが示されている (Newton et al., 2012)。増加理由の 1 つに沿岸部の海水温上昇が挙げられており、今後も温暖化傾向は続くため、腸炎ビブリオの制御および検査法は引き続き重要性が高いと考えられる。

本研究で開発したモノクローナル抗体の認識抗原は、腸炎ビブリオの染色体 2 にコードされている外膜リポタンパク質 Q87G48 であることが判明した。外膜リポタンパク質の N 末端欠失体やプロテアーゼ消化断片のウエスタンブロッティング解析により、腸炎ビブリオモノクローナル抗体の認識抗原は、外膜リポタンパク質の 22~41 アミノ酸領域であることが示された。サンドイッチ ELISA 法によりこれらのモノクローナル抗体は主に「²²SDDAATANAAKLDEL³⁶」配列に反応することが示された。ビブリオ属間の外膜リポタンパク質の配列比較によって、この領域は腸炎ビブリオ特異的エピトープを含むことを確認できた。4 種のモノクローナル抗体が、いずれも合成ペプチド「²⁰ASSDDAATANAAKLD³⁴」や「²⁵AATANAAKLDELSNQ³⁹」に反応しないのは、残基長が十分でないためと考えられる。抗体が直鎖エピトープを認識する場合は、一般的に 15~20 残基の合成ペプチドによりエピトープ同定可能であるが、この残基長では立体構造もしくは不連続エピトープの同定は難しい (Ladner, 2007)。Bottger らは α ヘリックスを持つケラチン 19 に対するモノクローナル抗体のエピトープ解析を行い、15 残基の合成ペプチドには反応しない抗体をいくつも確認している (Bottger et al., 1995)。

外膜リポタンパク質の N 末端欠失体 ΔN (22–84)・ ΔN (27–84)・ ΔN (32–84) がサンドイッチ ELISA 法で高い反応性を示した理由は、サンプルを溶液状態で使用する ELISA 法では、固相状態のウエスタンブロッティングに比べ立体構造が維持しやすく、容易に 3 量体を形成したためと考えられる。サンドイッチ ELISA 法において、抗腸炎ビブリオモノクローナル抗体が全長の外膜リポタンパク質に対する反応性が低い理由は、シグナル配列の存在により適切な立体構造をとりづらいためと考えられる。これらの理由から、今回取得した抗腸炎ビブリオモノクローナル抗体は、外膜リポタンパク質の α ヘリックス立体構造を認識する抗体である可能性が示唆された。 ΔC (1–39) は今回のモノクローナル抗体が主に反応する 22~36 番目のアミノ酸配列を含むにもかかわらず反応性が低いことから、外膜リポタンパク質の 40 残基目以降の配列も抗体の認識に重要であることが示された。

外膜リポタンパク質の N 末端側で、オルソログ間で配列が 100%一致している領域はシグナル配列である。一般的にリポタンパク質は、リポタンパク質前駆体 pre-pro-lipoprotein として、N 末端にシグナル配列が付加された状態で発現する。その後、シグナル配列は成熟過程で lipobox (LAGCX) のシステイン (C) 残基の前で切断され、除去される (Kovacs-Simon et al., 2011)。Lipobox のシステイン残基には

ジアシルグリセロールが付加され、グラム陰性菌ではさらに脂肪酸が結合する

(Kovacs-Simon et al., 2011)。腸炎ビブリオから抽出した外膜リポタンパク質のウエスタンブロッティング時のサイズ（約 11 kDa）と Mascot データベースにより得た外膜リポタンパク質の質量（8,671）が少し異なるのは、上記のようなシグナル配列の除去と脂肪酸の付加による影響と考えられる。リポタンパク質の局在は、Lipobox の X 残基によって決定されることが「+2 ルール」として知られている。X 残基がアスパラギン酸（D）・フェニルアラニン（F）・トリプトファン（W）・チロシン（Y）・グリシン（G）・プロリン（P）であれば内膜に、それ以外であれば外膜に局在する（Seydel et al., 1999、Yamaguchi et al., 1988）。今回の Q87G48 では、X 残基はアラニン（A）であるため、データベース検索により本タンパク質の存在部位が外膜リポタンパク質と予測されたと考えられる。

Microbial Genome Database (MBGD; <http://mbgd.genome.ad.jp/>) によるオルソログクラスター解析の結果、外膜リポタンパク質は lpp もしくはムレインリポタンパク質と呼ばれ、多くのバクテリアに存在することが判明した。大腸菌 lpp は構造や機能がよく研究されており、腸炎ビブリオのオルソログもそれと同様の構造や働きをすると考えられる。シグナル配列と N 末端のシステイン・C 末端のリジン（K）を除去した大腸菌 lpp は、水溶液中において生理学条件下でヘリックス 3 量体構造 (parallel three-stranded coiled coil) を示すことが知られている（Shu et al., 2000）。本研究で同一モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法（VP19–VP19 と VP24–VP24）で ΔN（27–84）を検出できたのは、この 3 量体構造に起因すると考えられる。大腸菌 lpp の N 末端側は外膜に埋まり、C 末端のリジン残基がペプチドグリカン層と共有結合することで、lpp は膜の構造維持とペリプラズムのサイズ決定（外膜と内膜間の距離）に寄与していると考えられている（Asmar et al., 2018）。大腸菌 lpp はいくつかの陽イオン性 α ヘリックス型抗菌ペプチドの特異的な受容体としても働いていることが知られており（Chang et al., 2012）、腸炎ビブリオにおいても同様の働きをしていると推察される。

今回得られた外膜リポタンパク質に対するモノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティングを実施した時に 2 本のバンドが検出された理由として、①外膜リポタンパク質の単量体と多量体がそれぞれ検出された、もしくは②脂肪酸の付加数の異なる単量体の外膜リポタンパク質が検出されたという 2 つの可能性が考えられる。①の場合は、通常 2-メルカプトエタノールを含む SDS-PAGE バッファーで強く変性を受け、ホモ 3 量体は単量体になり 1 本のバンドとして検出される。もし 3 量体のまま存在した場合は、3 倍のサイズのバンドが得られるはずである。通常、α ヘリックス構造も変性を受け直鎖状になるが、何らかの理由で立体構造の一部が保持されていた場合は、完全に直鎖状にならないまま電気泳動され、その結果低分子側にバンドが生じる可能性があると考えられる。②の場合には、脂肪酸のサイズが数 kDa 程度に相当すれば、腸炎ビブリオから抽出したタンパク質の結果については妥当と考えられる。

一方、無細胞合成した外膜リポタンパク質においても、成熟体と同様にシグナル配列を除去した ΔN (22–84) では 2 本の特異的なバンドが検出されており、リポタンパク質の成熟工程を経ない当該タンパク質に脂肪酸が付加しているとは考えづらい。脂肪酸はリパーゼ処理で分解できるため、腸炎ビブリオ抽出液をリパーゼ処理後にウエスタンブロッティングすることで、脂肪酸の有無による影響かどうかを確認可能である。

外膜リポタンパク質はその存在量と局在という観点から、腸炎ビブリオ検出の標的として大きな利点がある。1 つ目の利点は、外膜リポタンパク質は豊富に存在するため、検査の際の見逃しを避けることができる。腸炎ビブリオ VPA1469 (リポタンパク質 Q87G48) の mRNA 発現量は極めて高く、検査用培地中では海水と同等な条件下より発現量が 2 倍程度高くなることが報告されている (Garcia et al., 2017)。大腸菌においても lpp は最も豊富なタンパク質であり、1 細胞中に 750,000 コピー程度存在すると見積もられている (Cowles et al., 2011)。2 つ目の利点は、外膜リポタンパク質は細菌表面に露出しているため、抗体により認識がしやすい。大腸菌 lpp は 2 つの異なる形態で存在し、「bound-form」は前述の通りペプチドグリカン層と共有結合しているが、「free-form」は外膜をまたがり細胞表面に露出している (Cowles et al., 2011)。free-form は bound-form の約 2 倍量存在するといわれている (Inouye et al., 1972)。全ての血清型の腸炎ビブリオを検出可能な抗体はいくつか報告されているが、細胞表面に存在すると同定された抗原はない。例えば F_0F_1 ATP 合成酵素のデルタサブユニットは内膜の細胞質側に存在し、thermolabile hemolysin は分泌型である

(Wang et al., 2012)。このように外膜リポタンパク質は、TDH や TRH などの毒素産生性に関わらず全ての腸炎ビブリオで恒常的に発現し、菌体表面に豊富に存在することから、サンドイッチアッセイ構築時の検出対象として極めて有用と考えられる。

3.5 要約

腸炎ビブリオは主要な食中毒細菌の 1 つであり、世界中で数多くの食中毒事例が発生し問題となっている。腸炎ビブリオの主な感染源である鮮魚介類は消費期限が短いため、製造後速やかに出荷するには腸炎ビブリオによる汚染の有無をできるだけ早く検出する必要がある。本章では、血清型の違いによらず全ての腸炎ビブリオを特異的に検出可能なイムノクロマト法を開発するための基礎的技術検討を行い、その試作品を作製し、その性能を評価した。さらに腸炎ビブリオ特異的エピトープはこれまで明らかになっておらず、その解明は極めて重要な課題であることから抗体のエピトープ解析も実施した。

はじめに、腸炎ビブリオに対するモノクローナル抗体を作製し、その性能評価と抗原解析を実施した。作製したモノクローナル抗体をその特異性に応じて 4 つのグループに分類した。グループ 1 (VP7・VP11 および VP24) は、腸炎ビブリオ O1～O12 に特異的に反応し、その他の病原ビブリオ (*V. alginolyticus*・*V. cholerae*・*V. fluvialis*・*V. furnissii*・*V. mimicus*・*V. vulnificus*) に交差反応を示さないことが判明した。これらの抗体を応用し、VP7 をニトロセルロース膜に固定化し、VP24 を金コロイド標識抗体として用いて腸炎ビブリオの迅速検出が可能な試作品を完成し、

「VP イムノクロマト」と名付けた。VP イムノクロマトは、血清型や毒素産生性に関わらず試験した全ての腸炎ビブリオを検出可能であり (25/25)、腸炎ビブリオ以外の菌株については交差反応を示さず (0/35)、高い特異性を有することが確認された。

次にこれらのモノクローナル抗体が認識する抗原エピトープを同定した。ウエスタンブロッティング解析の結果、モノクローナル抗体グループ 1 は、約 11 および 16 kDa 付近に 2 本の特異的バンドを示した。これらのタンパク質を精製し、nano LC-MS/MS により分析した結果、グループ 1・2 のモノクローナル抗体認識抗原は外膜リポタンパク質 Q87G48 であることが示された。外膜リポタンパク質の N 末端欠失体およびプロテアーゼ消化断片に対する反応性から、腸炎ビブリオ特異的モノクローナル抗体によって認識されるエピトープの範囲は、外膜リポタンパク質の N 末端から 22～41 番目のアミノ酸であり、特に「²²SDDAATANAANKLDEL³⁶」領域が重要であることが判明した。他のビブリオ属菌株の推定外膜リポタンパク質を相同性比較することにより、この領域は腸炎ビブリオ特異的配列であることが確認された。

外膜リポタンパク質の C 末端欠失体 ΔC (1-39) は、腸炎ビブリオ特異的モノクローナル抗体が認識する 22～36 番目のアミノ酸配列を含むにもかかわらず、サンドイッチ ELISA 法による反応性が低いことが判明した。この結果より、今回作製した腸炎ビブリオ特異的モノクローナル抗体の抗原認識には、外膜リポタンパク質の 40 残基目以降の配列も重要であり、本抗体は立体構造を認識する可能性が高いと考えられる。バイオインフォマティクス解析により、外膜リポタンパク質は、多くの細菌で保

存されている lpp のオルソログであることが判明した。外膜リポタンパク質は、恒常的かつ豊富に発現し、その半分以上が菌体表面に存在することから、腸炎ビブリオ検出の標的因子として有用であると考えられる。

3.6 図表

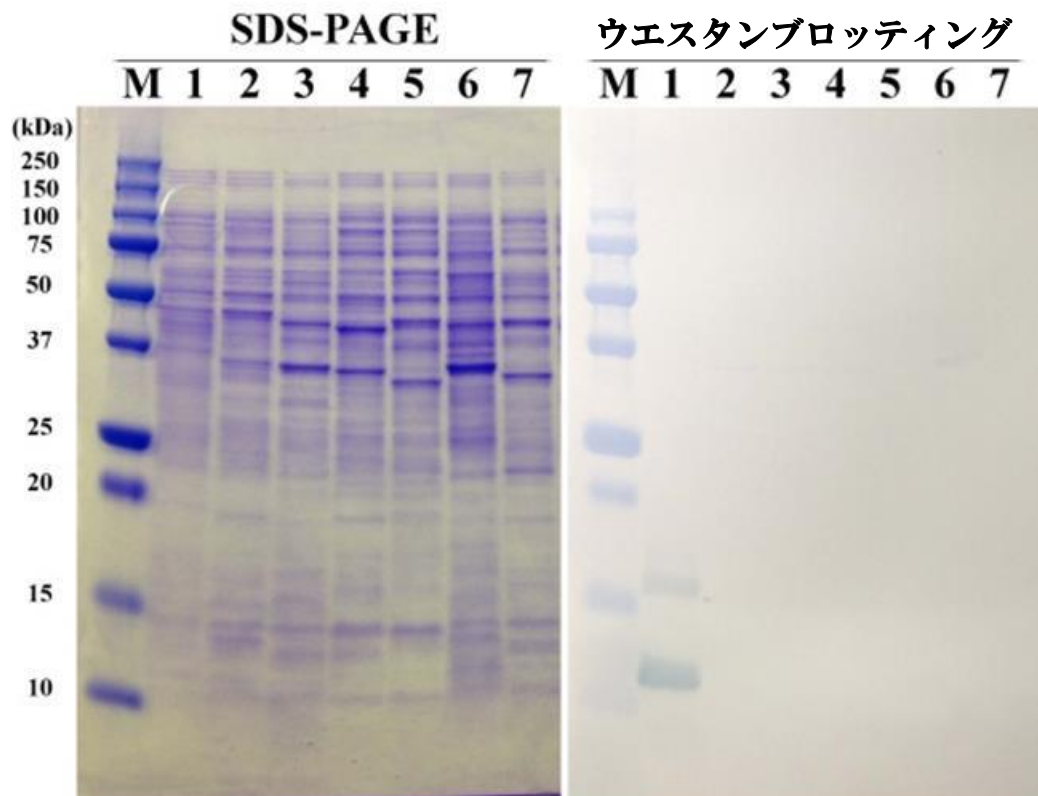


図 3-1. SDS-PAGE および VP7 抗体を用いたウエスタンブロッティング

腸炎ビブリオとその他のビブリオ属の細菌を供試した。レーン M：質量マーカー、レーン 1：*V. parahaemolyticus* RIMD 2210633、レーン 2：*V. alginolyticus* RIMD 2201013、レーン 3：*V. cholerae* RIMD 2203102、レーン 4：*V. fluvialis* JCM 3752、レーン 5：*V. furnissii* NCTC 11218、レーン 6：*V. mimicus* RIMD 2218001、レーン 7：*V. vulnificus* JCM 3725

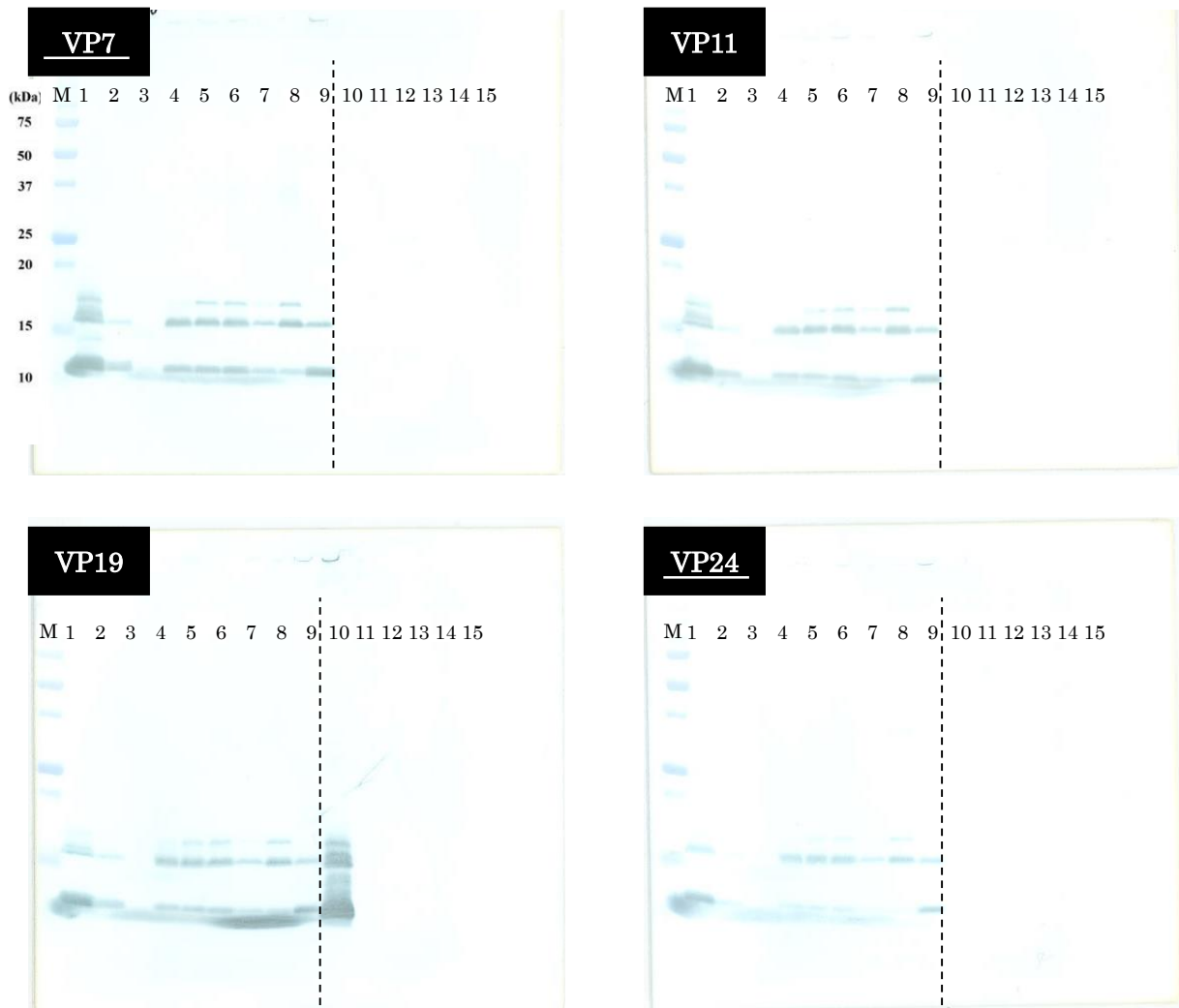


図 3-2. 4 種の抗体を用いたウエスタンブロッティング

腸炎ビブリオ（レーン 1～9）とその他のビブリオ属の細菌（レーン 10～15）を供試した。4 種の抗体を使用し、VP イムノクロマトに使用した抗体を下線で示した。
 レーン M: 質量マーカー、レーン 1: O1 10^{10} CFU/mL、レーン 2: O1 10^9 CFU/mL、
 レーン 3: O1 10^8 CFU/mL、レーン 4: O2 10^9 CFU/mL、レーン 5: O3 10^9 CFU/mL、
 レーン 6: O4 10^9 CFU/mL、レーン 7: O5 10^9 CFU/mL、レーン 8: O6 10^9 CFU/mL、
 レーン 9: O7 10^9 CFU/mL、レーン 10: *V. alginolyticus* 10^{10} CFU/mL、レーン 11: *V. vulnificus* 10^{10} CFU/mL、レーン 12: *V. cholerae* 10^{10} CFU/mL、レーン 13: *V. mimicus* 10^{10} CFU/mL、レーン 14: *V. fluvialis* 10^{10} CFU/mL、レーン 15: *V. furnissii* 10^{10} CFU/mL

接種菌数 10^2 10^1 10^0 10^{-1}

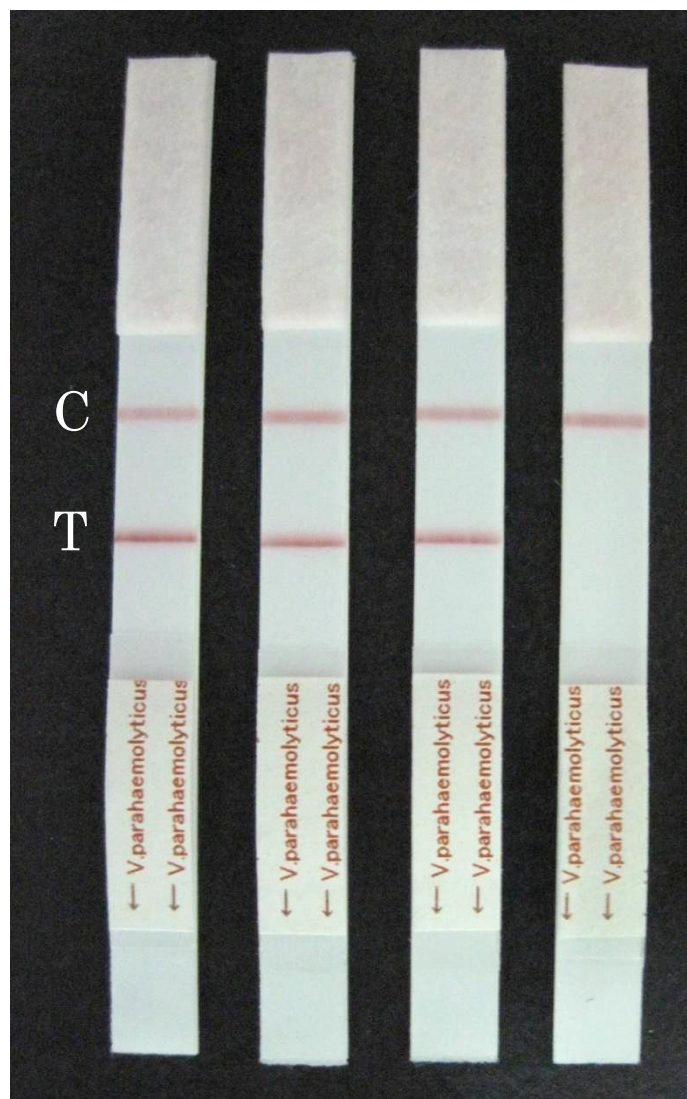


図 3-3. 培養後の VP イムノクロマトの感度

10 倍段階希釈した腸炎ビブリオ菌液を 1 晩培養後に、VP イムノクロマトに供試した。 10^0 CFU/10 mL を 1 晩培養したものでは、VP イムノクロマトのテストライン領域 (T) とコントロールライン領域 (C) が可視化され腸炎ビブリオ陽性と判定できた。 10^{-1} CFU/10 mL ではコントロールラインのみが可視化され、陰性であることが確認できた。

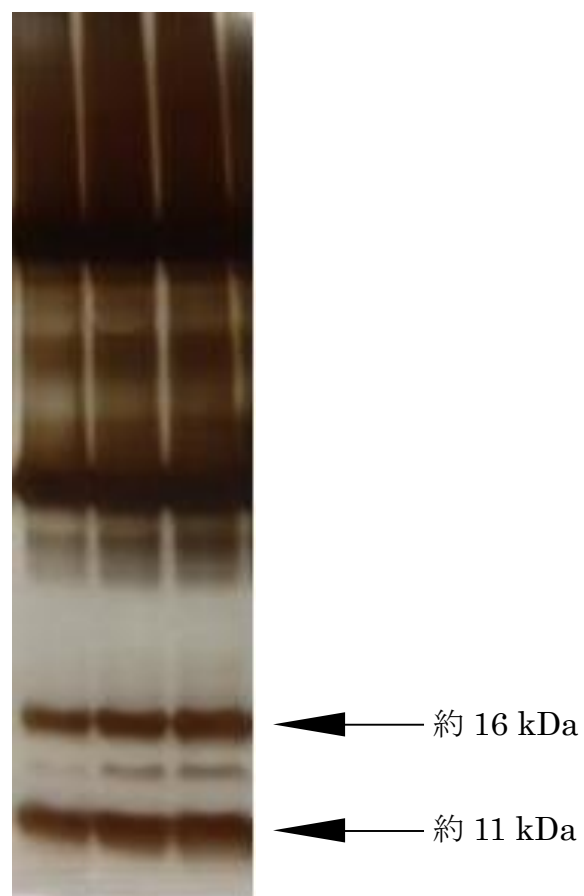


図 3-4. 銀染色による免疫沈降サンプルの確認

免疫沈降したサンプル中のタンパク質を SDS-PAGE により分離し、銀染色した。3つのレーンは全て同一サンプルを泳動した。矢印で示したバンドを切り出し、タンパク質を同定した。

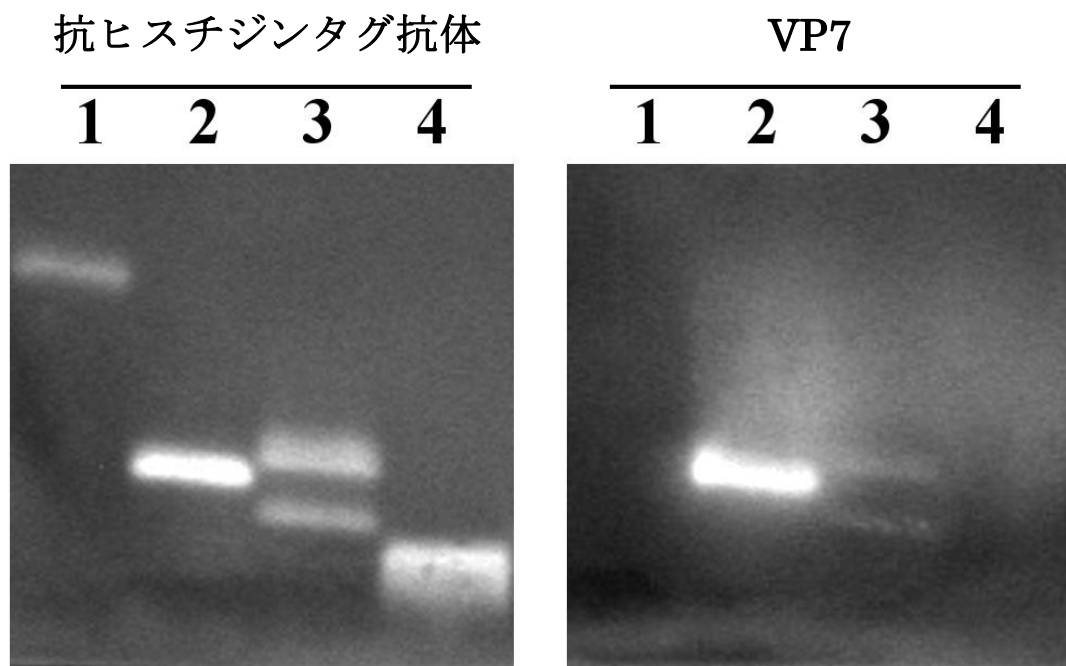


図 3-5. 抗ヒスチジンタグ抗体と VP7 抗体を用いたウエスタンブロッティング

無細胞合成したヒスチジンタグ付加タンパク質の反応性をウエスタンブロッティングにより解析した。レーン 1 : YcfL、レーン 2 : 外膜リポタンパク質 (全長)、レーン 3 : 外膜リポタンパク質 ΔN (22-84)、レーン 4 : 外膜リポタンパク質 ΔC (1-39)

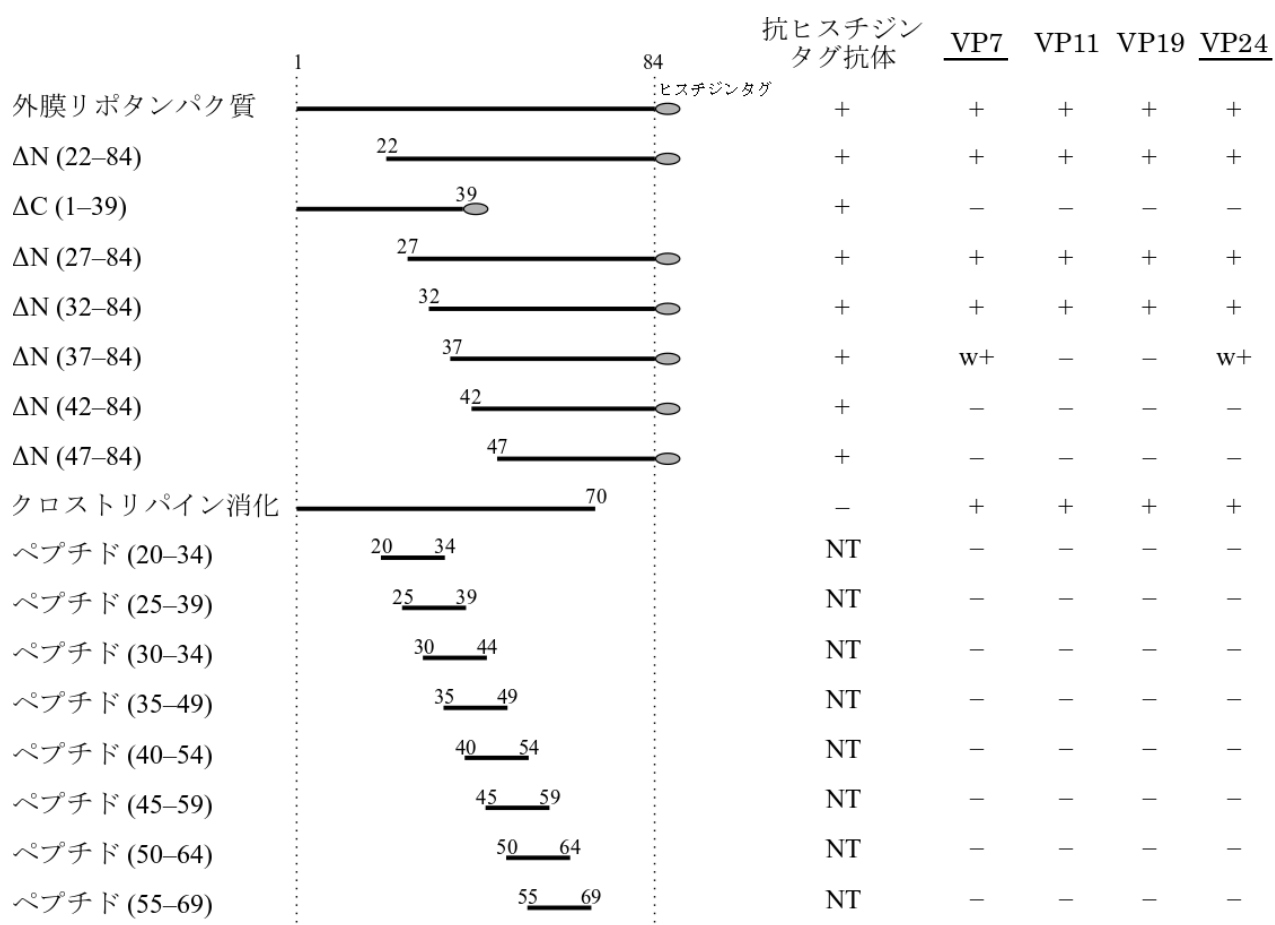


図 3-6. 外膜リポタンパク質の部分タンパク質への各抗体の反応性

各断片と抗ヒスチジンタグ抗体および VP7・VP11・VP19・VP24 の反応性をウエスタンブロッティングにより判定した。VP イムノクロマトに使用した抗体を下線で示した。

+：陽性、w+：弱陽性、-：陰性、NT：未試験

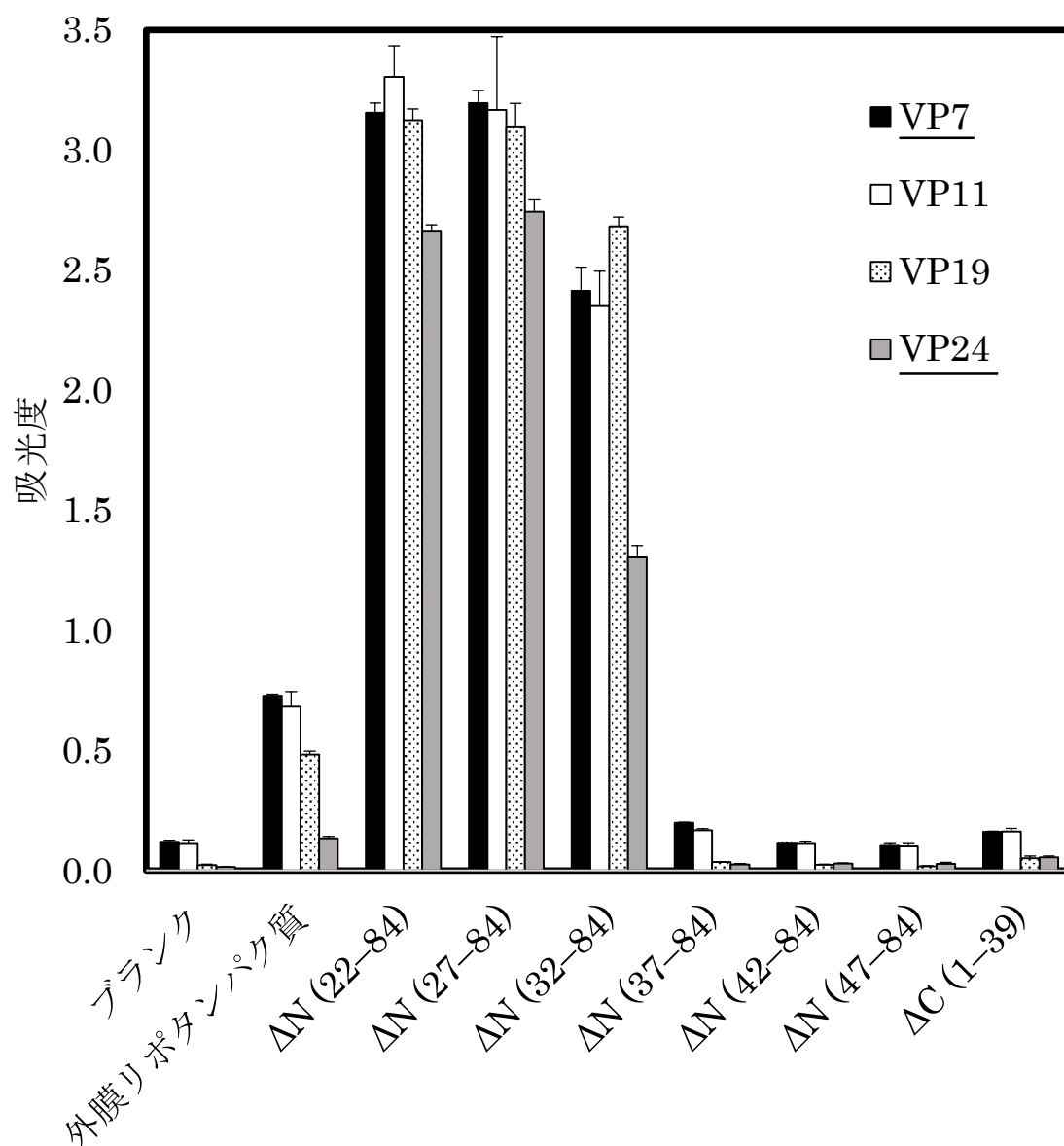


図 3-7. ヒスチジntag付加外膜リポタンパク質とその欠失体に対するモノクローナル抗体の反応性の比較（サンドイッチ ELISA 法）

各モノクローナル抗体を固相化したプレートと HRP 標識抗ヒスチジntag抗体を供試した。N 末端欠失体 $\Delta N (22-84)$ ・ $\Delta N (27-84)$ ・ $\Delta N (32-84)$ は、他の検体よりさらに 10 倍希釈して使用した。ブランクは外膜リポタンパク質の希釈に用いた希釈液のみを使用した結果を示した。グラフ中のエラーバーは標準偏差を示した。VP イムノクロマトに使用した抗体を下線で示した。

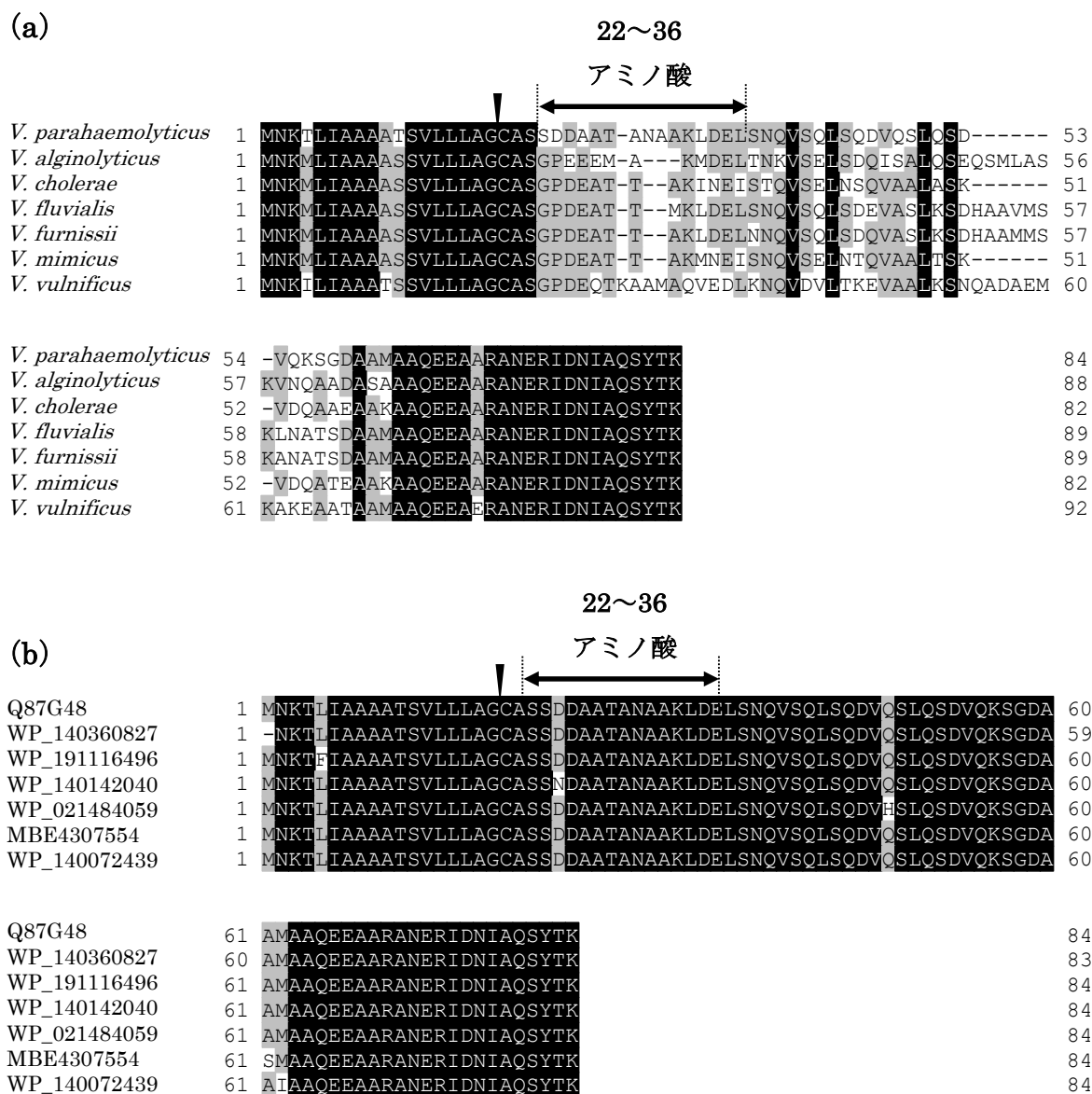


図 3-8. ビブリオ属の推定外膜タンパク質のアミノ酸配列比較

完全一致したアミノ酸は黒地に白文字で、相同性の高いアミノ酸は灰色の四角で囲んだ。(a) 腸炎ビブリオおよびその他のビブリオ属の細菌の配列を比較した。(b) データベース解析により腸炎ビブリオのタンパク質を比較した。矢印は腸炎ビブリオモノクローナル抗体が主に認識する領域 (22~36 アミノ酸) を示した。矢じりはシグナル配列の切断部位を示した。

表 3-1. 無細胞合成に使用したプライマー一覧

| プライマー | 配列 (5' → 3') | 設計位置 (アミノ酸) |
|------------|---|----------------|
| OML-F1 | <u>AAGGAGATATACCA</u> ATG AACAAAACGTTGATCGCAG | 1～ |
| OML-F2 | <u>AAGGAGATATACCA</u> ATG TCTGATGACGCAGCAACA | 22～ |
| OML-F3 | <u>AAGGAGATATACCA</u> ATG ACAGCAAACGCAGCTAAA | 27～ |
| OML-F4 | <u>AAGGAGATATACCA</u> ATG AAACTAGATGAACTAAGCAACCA | 32～ |
| OML-F5 | <u>AAGGAGATATACCA</u> ATG AGCAACCAAGTTAGCCAA | 37～ |
| OML-F6 | <u>AAGGAGATATACCA</u> ATG CAACTAAGCCAAGACGTACA | 42～ |
| OML-F7 | <u>AAGGAGATATACCA</u> ATG GTACAATCTCTTCAATCT | 47～ |
| OML-His-R1 | <u>GGATTAGTTATTCAT</u> TAG TGGTGATGGTGATG CTTAGT GTAAGACTGAGCGATG | ～84 |
| OML-His-R2 | <u>GGATTAGTTATTCAT</u> TAG TGGTGATGGTGATG CTTGGTT GCTTAGTTCATCTAG | ～39 |
| YcfL-F | <u>AAGGAGATATACCA</u> ATG AGAGCATGGCTTATTGG | 1～ |
| YcfL-His-R | <u>GGATTAGTTATTCAT</u> TAG TGGTGATGGTGATG ATCGTC TTGTGCTTCTCTA | ～130 |
| T7PRO-SD | <u>GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCC</u> <u>CTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCA</u> | |

プライマーは PUREfrex の取扱説明書に従って設計した。フォワードプライマーにはリボソーム結合配列と翻訳開始点のメチオニン（太字）を、リバースプライマーにはヒスチジンタグ（網掛け）と終始コドン（太字）を付加した（付加配列は下線で示した）。

表 3-2. モノクローナル抗体の反応性による分類

| グループ | 抗体名 | サブクラス | 特異性（抗原固相化 ELISA 法） |
|------|--------------------------------|-------|--|
| 1 | <u>VP7</u> , VP11, <u>VP24</u> | IgG2a | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> O1 to O12 |
| 2 | VP19 | IgG2a | <i>V. parahaemolyticus</i> O1 to O12, <i>V. alginolyticus</i> |
| 3 | VP5 | IgG2b | <i>V. parahaemolyticus</i> O10 and O12 |
| 4 | VP21 | IgG2a | <i>V. parahaemolyticus</i> O6 |

VP イムノクロマトに使用した抗体を下線で示した。

表 3-3. イムノクロマト法の試作

| 使用抗体 | | <i>V. parahaemolyticus</i> | | | <i>V. alginolyticus</i> | | <i>V. cholerae</i> | アルカリ |
|------------|-------------|----------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|---------|--------------------|--------|
| | | ATCC 17802 (CFU/mL) | | | ATCC | RIMD | RIMD | ペプトン水 |
| 塗布 | 金コロイド | 10 ⁸ | 10 ⁷ | 10 ⁶ | 17749 | 2201013 | 2203102 | (1%食塩) |
| <u>VP7</u> | VP11 | + | w+ | w+ | — | w+ | w+ | w+ |
| | VP19 | NT | + | + | — | — | w+ | — |
| | <u>VP24</u> | + | + | w+ | — | — | — | — |
| VP11 | VP11 | + | w+ | w+ | w+ | + | w+ | w+ |
| | VP19 | NT | + | + | + | + | + | w+ |
| | VP24 | + | + | w+ | — | — | — | — |
| VP19 | VP7 | NT | + | w+ | — | — | w+ | — |
| | VP11 | + | + | + | w+ | — | — | — |
| | VP19 | NT | + | + | + | + | — | — |
| | VP24 | + | w+ | — | w+ | w+ | — | — |
| VP24 | VP7 | NT | w+ | NT | — | — | — | — |
| | VP11 | w+ | w+ | — | — | — | — | — |
| | VP19 | NT | + | w+ | w+ | + | — | — |
| | VP24 | w+ | — | — | — | — | — | — |

+ : 陽性、w+ : 弱陽性、— : 陰性、NT : 未試験

VP イムノクロマトに使用した抗体の組み合わせを下線で示した。

表 3-4. VP イムノクロマトの特異性

| 供試菌株 | 血清型 | 株名 | 毒素型 ^a | 株数 | VP イムノクロマト 陽性数 (%) |
|--|---------|---|---------------------------|----|-----------------------|
| <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> | O1:K1 | ATCC 17802 | <i>tdh-</i> , <i>trh+</i> | 1 | 1 (100) |
| | O1:K56 | RIMD 2210774 | | 1 | 1 (100) |
| | O2:K3 | RIMD 2210786 | | 1 | 1 (100) |
| | O3:K6 | RIMD 2210633 | <i>tdh+</i> | 1 | 1 (100) |
| | O4:K8 | RIMD 2210056 | <i>tdh+</i> , <i>trh-</i> | 1 | 1 (100) |
| | O4:K12 | RIMD 2210086 | <i>tdh+</i> | 1 | 1 (100) |
| | O5:K15 | RIMD 2210794 | | 1 | 1 (100) |
| | O6:K18 | RIMD 2212010 | <i>tdh+</i> , <i>trh+</i> | 1 | 1 (100) |
| | O7:K19 | RIMD 2210129 | | 1 | 1 (100) |
| | O8:K41 | RIMD 2210789 | | 1 | 1 (100) |
| | O9:K44 | RIMD 2210286 | | 1 | 1 (100) |
| | O10:K52 | RIMD 2210014 | | 1 | 1 (100) |
| | O11:K36 | RIMD 2210013 | | 1 | 1 (100) |
| | O12:KUT | RIMD 2210775 | | 1 | 1 (100) |
| | | 臨床分離株 | | 3 | 3 (100) |
| | | 環境分離株 | | 8 | 8 (100) |
| <i>V. alginolyticus</i> | | ATCC 17749, RIMD 2201013 | | 2 | 0 (0) |
| <i>V. cholerae</i> | | RIMD 2203102, RIMD 2214034, 環境分離株 | | 12 | 0 (0) |
| <i>V. fluvialis</i> | | JCM 3752 | | 1 | 0 (0) |
| <i>V. furnissii</i> | | NCTC 11218 | | 1 | 0 (0) |
| <i>V. mimicus</i> | | RIMD 2218001 | | 1 | 0 (0) |
| <i>V. vulnificus</i> | | JCM 3726, JCM 3727, JCM 3728, JCM 3729, JCM 3730, JCM 3731, JCM 3732, 環境分離株 | | 17 | 0 (0) |
| <i>Photobacterium</i> <i>damisela</i> | | RIMD 2222006 | | 1 | 0 (0) |

^a 菌株分与元の大阪大学微生物病研究所 (RIMD) から入手した情報を記載した。

表 3-5. VP イムノクロマトの検出感度

| 株名 | 血清型 | 死菌の検出感度 (CFU/mL) | | |
|--------------|---------|------------------|-----------------|-----------------|
| | | 10 ⁸ | 10 ⁷ | 10 ⁶ |
| ATCC 17802 | O1:K1 | + | + | — |
| RIMD 2210786 | O2:K3 | + | + | — |
| RIMD 2210633 | O3:K6 | + | w+ | — |
| RIMD 2210056 | O4:K8 | + | + | — |
| RIMD 2210794 | O5:K15 | + | w+ | — |
| RIMD 2212010 | O6:K18 | + | + | — |
| RIMD 2210129 | O7:K19 | + | + | w+ |
| RIMD 2210789 | O8:K41 | + | + | — |
| RIMD 2210286 | O9:K44 | + | + | w+ |
| RIMD 2210014 | O10:K52 | NT | w+ | — |
| RIMD 2210013 | O11:K36 | + | w+ | — |
| RIMD 2210775 | O12:KUT | + | — | NT |

+ : 陽性、w+ : 弱陽性、— : 陰性、NT : 未試験

表 3-6. nanoLC-MS/MS による抗原の同定

| バンド | 候補 | タンパク質 | 質量 | アクセッション番号 (UniProt) | 残基長 |
|-----------|----|------------|--------|------------------------|-----|
| 16 kDa 付近 | 1 | YcfL タンパク質 | 14,676 | A0A072IJX0 | 130 |
| | 2 | 外膜リポタンパク質 | 8,671 | Q87G48 | 84 |
| 11 kDa 付近 | 1 | 外膜リポタンパク質 | 8,671 | Q87G48 | 84 |

表 3-7. サンドイッチ ELISA 法による外膜リポタンパク質 ΔN (27-84) の反応性

| プレート固相抗体 | HRP 標識抗体抗体 | | | |
|-------------|------------|-------|-------|--------------------------|
| | <u>VP7</u> | VP11 | VP19 | <u>VP24</u> ^a |
| <u>VP7</u> | 0.042 | 0.002 | 4.0 < | 0.135 |
| VP11 | 0.125 | 0.040 | 4.0 < | 0.165 |
| VP19 | 1.909 | 1.897 | 2.463 | 2.349 |
| <u>VP24</u> | 1.161 | 1.151 | 1.553 | 0.350 |

吸光度は主波長 450 nm・副波長 620 nm を測定し、ブランクを差し引いた吸光度を示した。VP イムノクロマトに使用した抗体を下線で示した。

^a 感度が低いため 4 倍濃度のサンプルを用いて測定した。

総括

食品検査においては、目的に応じて適切に検査法を選択することが重要である。公的な検査においては最も信頼性の高い検査法とされる培養法を一般的に用いるが、その他の多くの自主検査は、検査の目的・実施する場所・保有する設備・検査員のスキル等を考慮して検査法を決定することが望ましい。検査法の尺度は、精度・操作性・迅速性・経済性・利便性などがあるが、多くの場合これら全ての要素を満たす検査法が理想とされる。イムノクロマト法は一般的な性質として、精度以外のほぼ全ての要素を兼ね備えた数少ない検査法である。すなわち、1ステップの簡単操作で目視によって容易に検査結果を判定できるという操作性を有し、増菌培養後10～20分で迅速に結果が得られる。設備投資が不要で、人件費も考慮したランニングコストは比較的安価で経済性を兼ね備えている。導入の技術的・設備的ハードルは低く、検査コストは検体数に依存しないことから1検体のみでも手軽に検査可能であるため、検査未実施の施設や、外部機関・自社検査センター等に全国の検体を集約して検査している施設、発展途上国などインフラや設備が整っていない地域においてもイムノクロマト法を活用すれば自主検査を始めることができる。機器や電源設備が不要で、小さく軽いため、持ち運んでどこでも検査ができるという利便性を生かして、現場でサンプリング後ただちに検査を行うことも可能である。本研究では、上記のようなイムノクロマト法の特性に着目して、誰もが簡単に検査可能な食品中の食中毒細菌検査法の開発に取り組んだ。

イムノクロマト法の精度については、検出感度・特異性・再現性に加え、培養法の成績との一致率等の要素に更に分けることができる。これらの要素は、どのような特徴の抗体もしくはその代替となる検出分子を用いて、どのような処方でイムノクロマト法を構築するかによって大きく左右される。そのため、検査法開発時には試作品の性能評価を十分に行い、精度に関するデータをしっかりと示さなければならない。イムノクロマト法を開発する際には、はじめに抗体（もしくはその他の検出分子）の開発を行うが、いかに感度・特異性が高く、サンドイッチアッセイが構築可能なものが取得できるかが検査法開発の成否の分かれ目となり、この工程で多大な労力と時間を消費する。抗体を作製する上では、免疫抗原の選定が重要であり、対象菌に特異的かつ菌体表面に多数存在する抗原を選択すれば、上記の条件を満たす抗体が得られやすい。食中毒患者由来の臨床検体を検査する場合は、検査対象となる食中毒細菌は患者体内で発症レベルまで増殖しているため、培養工程を経ず直接検査を行い、迅速に原因細菌を同定することが求められる。そのため増菌培養なしでも見逃しの生じない高い感度が得られるかどうかは検査法開発のポイントとなる。一方、食品検査の場合は、被検食品に食中毒発症のリスクがないことを証明するため、25 gあたり数個程度の食

中毒細菌でも見逃さない高い検出感度が求められる。したがって、いかなる検査法を用いても増菌培養工程が必須となる。増菌培養工程によって食品中の微量の細菌は $10^4 \sim 10^8$ CFU/mL 程度の濃度まで増殖するため、食品検査用のイムノクロマト法開発においては検出感度の基準は比較的満たしやすい。食品検査においては対象食品が多岐にわたり、食品の特性や含まれる成分・夾雑菌の種類・量が多種多様であるため、交差反応・偽陽性反応等を示さずに対象菌だけを特異的に検出できる性能を保有しているかどうかイムノクロマト法を評価する上での大きな指標となる。

本研究では腸管出血性大腸菌および腸炎ビブリオを特異的かつ迅速簡便に検出可能なイムノクロマト法を開発した。開発にあたっては、対象菌の種類と検査の目的により、異なる方法を選択した。大腸菌 O26 の検査法については、当該血清型を特異的に検出することが目的であるため、検出の標的は明確であった。O 抗原は大腸菌の菌体表面に発現し抗原性も高いため、粗精製の抗原を免疫抗原としても特異性の高い抗体が取得しやすい。第 1 章ではホルマリン固定した大腸菌 O26 をウサギに免疫することで、菌体内部の非特異的成分を露出させずに菌体表面の立体構造を維持した状態で免疫細胞に感作できたと考えられる。その結果、検出感度・特異性の高いポリクローナル抗体を作製することができ、精度の高い実用的なイムノクロマト法の開発につながられた。O26 イムノクロマトは製品化の工程を経て 2008 年に食品検査キット新製品として市販化されており、大腸菌 O26 を検出する唯一のイムノクロマト法として、衛生研究所や食品企業等において日々の検査に活用され、食の安全確保と O26 の汚染状況解明に貢献している。このようにして non-O157 の 1 つの血清型を特異的に検出可能なイムノクロマト法の開発に成功したため、次は複数の血清型の腸管出血性大腸菌を同時に検出可能な方法の開発に取り組んだ。第 1 章と同様に O 抗原に対する 2 種類の抗体でサンドイッチ検出を行う方法で、3 種の血清型を同時検出するイムノクロマト法を構築しようとする、金コロイド標識側で 3 種の抗体を混合する必要があり、偽陽性反応の発生や 3 種の血清型への反応性に偏りが生じる恐れがある。そこで、第 2 章では幅広い微生物に対する結合能を持つ抗菌ペプチドを検出プローブとして利用することで新規の検査法開発に成功した。金コロイド標識抗体を金コロイド標識抗菌ペプチドに代えることで任意の血清型の大腸菌を捉えることが可能となり、ニトロセルロース膜の異なる位置に塗布された血清型特異的抗体でそれを捕捉することにより、同時型別検査法を開発することができた。抗菌ペプチドは多くの微生物に対して幅広い結合能を有するため、組み合わせる抗体を変えることにより、様々な微生物の検出系開発に応用可能である。裏を返せば、1 つの抗体さえあれば抗菌ペプチドプローブと組み合わせることでラテラルフローアッセイを開発することができるため、検査法開発の障壁や律速段階となる抗体開発の労力と時間を大幅に削減することが可能となる。ただし、検査法の特異性は抗体に左右されるため、検出対象とする微生物の範囲と抗体の反応性が適合しているかどうかをよく確認し、本法利用の可否判断を行わなければならない。抗菌ペプチドの種類によって微生物への結合能や

検出感度は異なることから、検査対象菌に最適なペプチドはあらかじめ作製した抗菌ペプチドストックから容易に比較・選定することが可能である。抗菌ペプチドの多くは、アミノ酸長が短く比較的単純な分子であるため、化学合成および遺伝子組換えによって合成してもプローブとして利用可能である場合が多い。そのため、抗菌ペプチドへの変異導入も容易に行うことが可能であり、それによって電荷の変化を与え菌体膜との静電相互作用を強めたり、立体構造の変化により抗原を捕捉しやすくしたりなどの効果が生じ、検出感度や特異性などの反応性の改良を比較的容易に行うことができると考えられる。その後の研究により、3種の血清型の大腸菌およびサルモネラにコレラ・カンピロバクターを加えた合計6菌種の同時識別検出法が開発されており、本研究で開発した技術が利用されている（相沢ら, 2015）。抗菌ペプチドはこれらのグラム陰性菌のみならず、グラム陽性菌・酵母・ウイルスに対しても抗菌活性を示すことから、今後さらに幅広い微生物検査法開発への応用が期待される。腸炎ビブリオの検出においては、病原性の有無に関わらず全ての腸炎ビブリオを検出することを目的とした。腸炎ビブリオのO抗原は病原株をもとに分類されているが、環境中の非病原株の中には未知の血清型が存在する可能性が高いため、O抗原を検出対象として利用した場合には目的の性能を満たすことは難しいと考えられる。血清型によらず全ての腸炎ビブリオに共通し、類縁菌には交差反応を示さない抗原の利用が必要であるが、そのような抗原は知られていない。そこで、第3章では腸炎ビブリオ加熱死菌に対するモノクローナル抗体を作製し、スクリーニングにより腸炎ビブリオ特異的な抗体を産生するハイブリドーマを単離した。得られた抗体を利用して腸炎ビブリオを特異的に検出可能なVPイムノクロマトの開発に成功した。抗体のエピトープ解析により、ビブリオ属細菌に共通して存在する外膜リポタンパク質のうち、一部の配列が腸炎ビブリオ特異的であることが判明した。この抗原は全ての腸炎ビブリオの菌体表面に恒常的に豊富に存在することから、腸炎ビブリオの検出に極めて有用な抗原を明らかにすることができた。

緒言でも触れたとおり、腸管出血性大腸菌と腸炎ビブリオは相違点も多いが、「環境中から排除できないため食品中への混入をゼロにできない」という点では共通している。腸管出血性大腸菌についても、今後さらに適切に対策を講じていくことにより、腸炎ビブリオのように感染者を減少できると考えられる。腸管出血性大腸菌は食中毒のみならず、ヒトからヒトへの感染を引き起こす事例も多いが、食中毒防止対策により一次感染者を減らすことができれば必然的に二次感染者も低減し、感染拡大を防止できる。今回開発した検査法は、腸管出血性大腸菌および腸炎ビブリオの汚染実態の解明・食中毒防止低減策の立案・食品製造工程における工程管理や妥当性検証・製品の抜き取り検査や同定試験などに利用可能であり、食の安全確保に貢献および新規検査技術の開発に貢献可能と考えられる。本研究で得られた知見を基にして、今後もさらに多くの病原細菌の検査法開発が加速し、この分野の技術的知見の蓄積にも貢献すると期待される。

謝辞

学位の取得に当たり主査として論文執筆のご指導くださった東京大学大学院 農学生命科学研究科 食の安全研究センターの関崎勉教授に心から感謝申し上げます。勤務先での私の担当業務変更に伴い、データ取得や論文執筆が思うように進められない時期が長かったにも関わらず、その状況を理解し、受け止め、励まし、お忙しい中最後までご指導くださいました。関崎先生の存在なくしては、ここまで辿り着くことは到底できなかったと痛感しています。副査としてご指導くださった堀本泰介教授・平山和宏教授・角田茂准教授・三浦こずえ准教授にも感謝申し上げます。

本研究を進める上で多大なご支援をいただきました岡山大学 インド感染症共同研究センターの篠田純男名誉教授、国立感染症研究所 細菌第一部の荒川英二先生、北海道大学 大学院生命科学院の相沢智康教授に厚く御礼申し上げます。また研究材料のご提供やアドバイスをいただいた酪農学園大学 獣医学群の田村豊教授・村松康和教授、城西大学 薬学部近藤誠一教授・一色恭徳教授にも感謝申し上げます。O26 およびVP イムノクロマト試作品の性能評価にご協力くださった衛生研究所の先生方、および食品微生物学会・ビブリオシンポジウムで様々な研究アドバイスを下さった先生方にも重ねて御礼申し上げます。

本研究は、2007年4月から2020年3月までの日本ハム株式会社 中央研究所における著者の研究成果をまとめたものです。第2章の研究は生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業の支援を受けました。本研究の機会を与えてくださいました徳島大学 生物資源産業学部の森松文毅教授、日本ハム株式会社 中央研究所の村上博様・松本貴之様・長谷川隆則様、本当にありがとうございました。研究開発・論文執筆の指導やご協力をいただいた日本ハム株式会社の藤村達也様・森下直樹様・西山泰孝様・北條江里様、株式会社テクノプロの大槻隆司様をはじめ、日常の業務を支えてくださった日本ハム株式会社 中央研究所所員の皆様にも心から感謝いたします。

最後に、学位取得の目標を達成するために、長年にわたり協力し支えてくれた妻と娘にも深く感謝いたします。

参考文献

1. 相沢 智康, 米北 太郎, 北條 江里, 2015. 抗菌ペプチドをプローブとして利用した微生物検出法の開発 (特集 抗菌ペプチド利用の最前線) . Bio industry 32, 42-48.
2. Aldus, C.F., Van Amerongen, A., Ariens, R.M., Peck, M.W., Wichers, J.H., Wyatt, G.M., 2003. Principles of some novel rapid dipstick methods for detection and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli*. J Appl Microbiol. 95, 380-389.
3. 荒川 英二, 甲斐 明美, 2008. 腸炎ビブリオの標準試験法作成へ向けての検討 (特集 微生物検査の標準化) . 月刊フードケミカル. 24, 69-75.
4. Arakawa, Y., Sawada, T., Takatori, K., Lee, K., Hara-Kudo, Y., 2011. Rapid detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef by an immunochromatography kit in combination with short-term enrichment and treatment for Shiga toxin release. Biocontrol Sci. 16, 159-164.
5. Arshadi, N., Mousavi, S.L., Amani, J., Nazarian, S., 2020. Immunogenic Potency of Formalin and Heat Inactivated *E. coli* O157:H7 in Mouse Model Administered by Different Routes. Avicenna J Med Biotechnol. 12, 194-200.
6. Arcidiacono, S., Pivarnik, P., Mello, C.M., Senecal, A., 2008. Cy5 labeled antimicrobial peptides for enhanced detection of *Escherichia coli* O157:H7. Biosens Bioelectron. 23, 1721-1727.
7. Asmar, A.T., Collet, J.F., 2018. Lpp, the Braun lipoprotein, turns 50-major achievements and remaining issues. FEMS Microbiol Lett. 365.
8. Barlow, R.S., Gobius, K.S., Desmarchelier, P.M., 2006. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and lamb cuts: results of a one-year study. Int J Food Microbiol. 111, 1-5.
9. Bettelheim, K.A., 2007. The non-O157 shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. Crit Rev Microbiol. 33, 67-87.
10. Blais, B.W., Bosley, J., Martinez-Perez, A., Popela, M., 2006. Polymyxin-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Escherichia coli* O111 and O26. J Microbiol Methods. 65, 468-475.
11. Blais, B.W., Leggate, J., Bosley, J., Martinez-Perez, A., 2004. Comparison of fluorogenic and chromogenic assay systems in the detection of

- Escherichia coli* O157 by a novel polymyxin-based ELISA. Lett Appl Microbiol. 39, 516-522.
12. Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, M.P., Gonzalez, E.A., Bernardez, M.I., Blanco, J., 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-xi*). J Clin Microbiol. 42, 645-651.
 13. Bottger, V., Stasiak, P.C., Harrison, D.L., Mellerick, D.M., Lane, E.B., 1995. Epitope mapping of monoclonal antibodies to keratin 19 using keratin fragments, synthetic peptides and phage peptide libraries. Eur J Biochem. 231, 475-485.
 14. Bouyssie, D., Gonzalez de Peredo, A., Mouton, E., Albigot, R., Roussel, L., Ortega, N., Cayrol, C., Burlet-Schiltz, O., Girard, J.P., Monsarrat, B., 2007. Mascot file parsing and quantification (MFPaQ), a new software to parse, validate, and quantify proteomics data generated by ICAT and SILAC mass spectrometric analyses: application to the proteomics study of membrane proteins from primary human endothelial cells. Mol Cell Proteomics. 6, 1621-1637.
 15. Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nat Rev Microbiol. 3, 238-250.
 16. Brooks, J.T., Sowers, E.G., Wells, J.G., Greene, K.D., Griffin, P.M., Hoekstra, R.M., Strockbine, N.A., 2005. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. J Infect Dis. 192, 1422-1429.
 17. Calderwood, S.B., Mekalanos, J.J., 1987. Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the fur locus. Journal of Bacteriology. 169, 4759-4764.
 18. Chang, T.W., Lin, Y.M., Wang, C.F., Liao, Y.D., 2012. Outer membrane lipoprotein Lpp is Gram-negative bacterial cell surface receptor for cationic antimicrobial peptides. J Biol Chem. 287, 418-428.
 19. Chattopadhyay, S., Sinha, N.K., Banerjee, S., Roy, D., Chattopadhyay, D., Roy, S., 2006. Small cationic protein from a marine turtle has beta-defensin-like fold and antibacterial and antiviral activity. Proteins. 64, 524-531.
 20. 千葉県衛生研究所, 2014. V. ビブリオ属の検査法
<https://www.pref.chiba.lg.jp/eiken/eiseikenkyuu/saikin/documents/05vib-kensa-2014.pdf>. (2020 年 9 月 24 日)

21. Cowles, C.E., Li, Y., Semmelhack, M.F., Cristea, I.M., Silhavy, T.J., 2011. The free and bound forms of Lpp occupy distinct subcellular locations in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 79, 1168-1181.
22. DebRoy, C., Roberts, E., Kundrat, J., Davis, M.A., Briggs, C.E., Fratamico, P.M., 2004. Detection of *Escherichia coli* serogroups O26 and O113 by PCR amplification of the *wzx* and *wzy* genes. *Appl Environ Microbiol.* 70, 1830-1832.
23. Drysdale, M., MacRae, M., Strachan, N.J., Reid, T.M., Ogden, I.D., 2004. The detection of non-O157 *E. coli* in food by immunomagnetic separation. *J Appl Microbiol.* 97, 220-224.
24. Evans, J., Knight, H.I., Smith, A.W., Pearce, M.C., Hall, M., Foster, G., Low, J.C., Gunn, G.J., 2008. Cefixime-tellurite rhamnose MacConkey agar for isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* serogroup O26 from Scottish cattle and sheep faeces. *Lett Appl Microbiol.* 47, 148-152.
25. 藤永 由佳子, 2013. 重篤な食中毒を引き起こす細菌毒素の研究の最前線 志賀毒素（ベロ毒素）とボツリヌス毒素. *ファルマシア.* 49, 764-768.
26. Garcia, K., Yanez, C., Plaza, N., Pena, F., Sepulveda, P., Perez-Reytor, D., Espejo, R.T., 2017. Gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* growing in laboratory isolation conditions compared to those common in its natural ocean environment. *BMC Microbiol.* 17, 118.
27. Gazit, E., Boman, A., Boman, H.G., Shai, Y., 1995. Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry.* 34, 11479-11488.
28. Gerber, A., Karch, H., Allerberger, F., Verweyen, H.M., Zimmerhackl, L.B., 2002. Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study. *J Infect Dis.* 186, 493-500.
29. Gharahdaghi, F., Weinberg, C.R., Meagher, D.A., Imai, B.S., Mische, S.M., 1999. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis.* 20, 601-605.
30. Gibson, B.W., Tang, D.Z., Mandrell, R., Kelly, M., Spindel, E.R., 1991. Bombinin-like peptides with antimicrobial activity from skin secretions of the Asian toad, *Bombina orientalis*. *J Biol Chem.* 266, 23103-23111.
31. Gregory, K., Mello, C.M., 2005. Immobilization of *Escherichia coli* cells by

- use of the antimicrobial peptide cecropin P1. *Appl Environ Microbiol.* 71, 1130-1134.
32. Gyles, C.L., 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci.* 85, E45-62.
 33. 刑部 陽宅, 細呂木 志保, 磯部 順子, 田中 大祐, 北村 敬, 2000. 免疫磁気ビーズによる海水からの耐熱性溶血毒産生性腸炎ビブリオ O3: K6 の分離. *日本食品微生物学会雑誌.* 17, 5-10.
 34. Hara-Kudo, Y., Konishi, N., Ohtsuka, K., Hiramatsu, R., Tanaka, H., Konuma, H., Takatori, K., 2008. Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157 and O26 in food by plating methods and LAMP method: a collaborative study. *Int J Food Microbiol.* 122, 156-161.
 35. Hara-Kudo, Y., Konuma, H., Nakagawa, H., Kumagai, S., 2000. *Escherichia coli* O26 detection from foods using an enrichment procedure and an immunomagnetic separation method. *Lett Appl Microbiol.* 30, 151-154.
 36. Hara-Kudo, Y., Kumagai, S., 2014. Impact of seafood regulations for *Vibrio parahaemolyticus* infection and verification by analyses of seafood contamination and infection. *Epidemiol Infect.* 142, 2237-2247.
 37. Hara-Kudo, Y., Saito, S., Ohtsuka, K., Yamasaki, S., Yahiro, S., Nishio, T., Iwade, Y., Otomo, Y., Konuma, H., Tanaka, H., Nakagawa, H., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S., 2012. Characteristics of a sharp decrease in *Vibrio parahaemolyticus* infections and seafood contamination in Japan. *Int J Food Microbiol.* 157, 95-101.
 38. 橋本 博, 山根 努, 池口 満徳, 中平 久美子, 柳原 格, 2010. 腸炎ビブリオが産生する耐熱性溶血毒 TDH の構造と機能. *日本結晶学会誌.* 52, 285-289.
 39. Hiramatsu, R., Matsumoto, M., Miwa, Y., Suzuki, Y., Saito, M., Miyazaki, Y., 2002. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains. *J Clin Microbiol.* 40, 922-925.
 40. Hoerner, R., Feldpausch, J., Gray, R.L., Curry, S., Islam, Z., Goldy, T., Klein, F., Tadese, T., Rice, J., Mozola, M., 2019. Reveal®Salmonella 2.0 Test for Detection of *Salmonella* spp. in Foods and Environmental Samples. *Journal of AOAC INTERNATIONAL.* 94, 1467-1480.
 41. Huang, C.C., Chiu, S.H., Huang, Y.F., Chang, H.T., 2007. Aptamer-functionalized gold nanoparticles for turn-on light switch detection of platelet-derived growth factor. *Anal Chem.* 79, 4798-4804.
 42. Hussein, H.S., Sakuma, T., 2005. Prevalence of shiga toxin-producing

- Escherichia coli* in dairy cattle and their products. J Dairy Sci. 88, 450-465.
43. 五十君 静信, 2017. 国内の食品微生物試験法と ISO 法とのハーモナイゼーション. THE CHEMICAL TIMES. 244, 10-13.
 44. 飯田 哲也, 2004. 腸炎ビブリオの病原性とゲノム構造に関する分子遺伝学的研究. 日本細菌学雑誌. 59, 457-464.
 45. 井口 純, 2017. 大腸菌の O 血清群と O 抗原と O 抗原合成遺伝子. 日本食品微生物学会雑誌. 34, 189-201.
 46. Inouye, M., Shaw, J., Shen, C., 1972. The assembly of a structural lipoprotein in the envelope of *Escherichia coli*. J Biol Chem. 247, 8154-8159.
 47. Joseph, S.W., Colwell, R.R., Kaper, J.B., 1982. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic Vibrios. Crit Rev Microbiol. 10, 77-124.
 48. Jung, B.Y., Jung, S.C., Kweon, C.H., 2005. Development of a rapid immunochromatographic strip for detection of *Escherichia coli* O157. J Food Prot. 68, 2140-2143.
 49. Köhler, B., Karch, H., Schmidt, H., 2000. Antibacterials that are used as growth promoters in animal husbandry can affect the release of Shiga-toxin-2-converting bacteriophages and Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* strains. Microbiology. 146, 1085-1090.
 50. 甲斐 明美, 2013. II-1. わが国の腸炎ビブリオ食中毒の動向および輸入感染症としての腸炎ビブリオ, 腸炎ビブリオ 第IV集, 近代出版, 34-43.
 51. 甲斐 明美, 2017. 腸管出血性大腸菌感染症の発生状況と検査法の変遷－酵素基質培地の導入－. THE CHEMICAL TIMES. 244, 14-19.
 52. Karch, H., Janetzki-Mittmann, C., Aleksic, S., Datz, M., 1996. Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture. Journal of clinical microbiology. 34, 516-519.
 53. Kawatsu, K., Ishibashi, M., Tsukamoto, T., 2006. Development and evaluation of a rapid, simple, and sensitive immunochromatographic assay to detect thermostable direct hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus* in enrichment cultures of stool specimens. J Clin Microbiol. 44, 1821-1827.
 54. Kawatsu, K., Kumeda, Y., Taguchi, M., Yamazaki-Matsune, W., Kanki, M., Inoue, K., 2008. Development and evaluation of immunochromatographic assay for simple and rapid detection of

- Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in human stool specimens. J Clin Microbiol. 46, 1226-1231.
55. Kerr, P., Ball, H., China, B., Mainil, J., Finlay, D., Pollock, D., Wilson, I., Mackie, D., 1999. Use of a monoclonal antibody against an *Escherichia coli* O26 surface protein for detection of enteropathogenic and enterohemorrhagic strains. Clin Diagn Lab Immunol. 6, 610-614.
56. Kim, Y.B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S., Nishibuchi, M., 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. J Clin Microbiol. 37, 1173-1177.
57. 小林 直樹, 工藤 由起子, 2013. 腸管出血性大腸菌の分子生物学的研究と食品での検査法の発展. 日本食品微生物学会雑誌. 30, 147-155.
58. 児玉 年央, 2009. 腸炎ビブリオの3型分泌装置2を介した細胞毒性 および腸管毒性機構に関する研究. 日本細菌学雑誌. 64, 303-309.
59. 国立感染症研究所, 2019. 腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/EHEC20190920.pdf>. (2020 年 9 月 24 日)
60. 厚生労働省監修, 2004. 食品微生物検査指針 微生物編, 201-223.
61. Kovacs-Simon, A., Titball, R.W., Michell, S.L., 2011. Lipoproteins of bacterial pathogens. Infect Immun. 79, 548-561.
62. 工藤 由起子, 2008. 食水系感染症病原体の検査法-3 腸炎ビブリオ. モダンメディア. 54, 189-192.
63. 工藤 由起子, 2013. 日本における腸炎ビブリオ食中毒の急激な減少と対策効果の検証. 日本食品微生物学会雑誌. 30, 177-185.
64. 工藤 由起子, 2018. 腸管出血性大腸菌による広域食中毒発生と食肉調理の要因について. 国立医薬品食品衛生研究所報告. 7-10.
65. 工藤 由起子, 熊谷 進, 2003. 国内の海産物の調査研究と腸炎ビブリオ対策. 日本食品微生物学会雑誌. 20, 165-169.
66. Kulagina, N.V., Lassman, M.E., Ligler, F.S., Taitt, C.R., 2005. Antimicrobial peptides for detection of bacteria in biosensor assays. Anal Chem. 77, 6504-6508.
67. Kulagina, N.V., Shaffer, K.M., Anderson, G.P., Ligler, F.S., Taitt, C.R., 2006. Antimicrobial peptide-based array for *Escherichia coli* and *Salmonella* screening. Anal Chim Acta. 575, 9-15.
68. Kulagina, N.V., Shaffer, K.M., Ligler, F.S., Taitt, C.R., 2007. Antimicrobial peptides as new recognition molecules for screening challenging species. Sens Actuators B Chem. 121, 150-157.

69. 倉園 久生, 林 英生, 1996. 病原性大腸菌 O 157 (腸管出血性大腸菌) の産生する Vero 毒素の性状. *Journal of toxicological sciences*. 21, 151-159.
70. Ladner, R.C., 2007. Mapping the epitopes of antibodies. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 24, 1-30.
71. Li, J., Xue, F., Yang, Z., Zhang, X., Zeng, D., Chao, G., Jiang, Y., Li, B., 2016. *Vibrio parahaemolyticus* Strains of Pandemic Serotypes Identified from Clinical and Environmental Samples from Jiangsu, China. *Front Microbiol*. 7, 787.
72. Lin, Z., Kurazono, H., Yamasaki, S., Takeda, Y., 1993. Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol*. 37, 543-548.
73. Liu, X., Guan, Y., Cheng, S., Huang, Y., Yan, Q., Zhang, J., Huang, G., Zheng, J., Liu, T., 2016. Development of a highly sensitive lateral immunochromatographic assay for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Microbiol Methods*. 131, 78-84.
74. Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M., Iida, T., 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V cholerae*. *Lancet*. 361, 743-749.
75. Mannoer, M.S., Zhang, S., Link, A.J., McAlpine, M.C., 2010. Electrical detection of pathogenic bacteria via immobilized antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107, 19207-19212.
76. 松田 重輝, 2013. VIII-1. 耐熱性溶血毒および類似毒素の作用機序, 腸炎ビブリオ 第IV集, 近代出版, 270-276.
77. Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., Wong, H.-C., Depaola, A., Kim, Y.B., Albert, M.J., Nishibuchi, M., 2000. Pandemic Spread of an O3:K6 Clone of *Vibrio parahaemolyticus* and Emergence of Related Strains Evidenced by Arbitrarily Primed PCR and *toxRS* Sequence Analyses. *Journal of Clinical Microbiology*. 38, 578-585.
78. Maurer, J.J., Schmidt, D., Petrosko, P., Sanchez, S., Bolton, L., Lee, M.D., 1999. Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. *Appl Environ Microbiol*. 65, 2954-2960.
79. 宮本 敬久, 2000. 食品衛生細菌の簡易迅速検出法. 日本食品科学工学会誌. 47, 173-180.

80. Miyata, T., Tokunaga, F., Yoneya, T., Yoshikawa, K., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., Shimonishi, Y., 1989. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. *J Biochem.* 106, 663-668.
81. Murphy, M., Carroll, A., Walsh, C., Whyte, P., O'Mahony, M., Anderson, W., McNamara, E., Fanning, S., 2007. Development and assessment of a rapid method to detect *Escherichia coli* O26, O111 and O157 in retail minced beef. *Int J Hyg Environ Health.* 210, 155-161.
82. 永宗 喜三郎, 本田 武司, 1996. 細菌性食中毒と毒素. 日本食品微生物学会雑誌. 13, 55-61.
83. National Institute of Infectious Diseases and Infectious Diseases Control Division, M.o.H., Labour and Welfare of Japan, 2010. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection in Japan as of May 2010. Infectious Agents Surveillance Report (IASR). Vol. 31, 152-153.
84. Nemoto, J., Ikedo, M., Kojima, T., Momoda, T., Konuma, H., Hara-Kudo, Y., 2011. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Prot.* 74, 1462-1467.
85. Newton, A., Kendall, M., Vugia, D.J., Henao, O.L., Mahon, B.E., 2012. Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996-2010: review of surveillance data from 2 systems. *Clin Infect Dis.* 54 Suppl 5, S391-395.
86. 西渕 光昭, 1996. 環境中に分布する病原性ビブリオの由来 コレラ菌と腸炎ビブリオの分子遺伝学的研究の成果が示唆するもの. 日本細菌学雑誌. 51, 823-832.
87. Noda, M., Yutsudo, T., Nakabayashi, N., Hirayama, T., Takeda, Y., 1987. Purification and some properties of Shiga-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is immunologically identical to Shiga toxin. *Microb Pathog.* 2, 339-349.
88. 尾畑 浩魅, 2013. IV-2. 感染経路, 原因食品, 腸炎ビブリオ 第IV集, 近代出版, 87-97.
89. O'Hanlon, K.A., Catarama, T.M., Duffy, G., Blair, I.S., McDowell, D.A., 2004. RAPID detection and quantification of *E. coli* O157/O26/O111 in minced beef by real-time PCR. *J Appl Microbiol.* 96, 1013-1023.
90. 大阪健康安全基盤研究所, 2012. 腸炎ビブリオ食中毒はなぜ減少したのか? <http://www.iph.osaka.jp/s008/030/010/010/110/20180106192000.html>. (2020 年 9 月 24 日)

91. Paddock, Z., Shi, X., Bai, J., Nagaraja, T.G., 2012. Applicability of a multiplex PCR to detect O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 serogroups of *Escherichia coli* in cattle feces. *Vet Microbiol.* 156, 381-388.
92. Park, K.S., Ono, T., Rokuda, M., Jang, M.H., Okada, K., Iida, T., Honda, T., 2004. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun.* 72, 6659-6665.
93. Paton, A.W., Paton, J.C., 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol.* 36, 598-602.
94. Pillai, A., Ueno, S., Zhang, H., Lee, J.M., Kato, Y., 2005. Cecropin P1 and novel nematode cecropins: a bacteria-inducible antimicrobial peptide family in the nematode *Ascaris suum*. *Biochem J.* 390, 207-214.
95. Posthuma-Trumpie, G.A., Korf, J., van Amerongen, A., 2009. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem.* 393, 569-582.
96. Prompamorn, P., Longyant, S., Pengsuk, C., Sithigorngul, P., Chaivisuthangkura, P., 2013. Rapid identification and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* from *Vibrio* spp. in seafood samples using developed monoclonal antibodies. *World J Microbiol Biotechnol.* 29, 721-731.
97. Russell, H., Facklam, R.R., Edwards, L.R., 1976. Enzyme-linked immunosorbent assay for streptococcal M protein antibodies. *J Clin Microbiol.* 3, 501-505.
98. Safarikova, M., Safarik, I., 2001. Immunomagnetic separation of *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from vegetables. *Lett Appl Microbiol.* 33, 36-39.
99. Sakata, J., Kawatsu, K., Iwasaki, T., Kumeda, Y., 2015. Development of a rapid and simple immunochromatographic assay to identify *Vibrio parahaemolyticus*. *J Microbiol Methods.* 116, 23-29.
100. Sakata, J., Kawatsu, K., Iwasaki, T., Tanaka, K., Takenaka, S., Kumeda, Y., Kodama, H., 2012. Production and characterization of a novel monoclonal antibody against *Vibrio parahaemolyticus* F₀F₁ ATP synthase's delta subunit and its application for rapid identification of the pathogen. *J Microbiol Methods.* 88, 77-82.
101. Sakazaki, R., Tamura, K., Kato, T., Obara, Y., Yamai, S., 1968. Studies on

- the enteropathogenic, facultatively halophilic bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*. 3. Enteropathogenicity. Jpn J Med Sci Biol. 21, 325-331.
102. 坂崎 利一, 2000. *Vibrio parahaemolyticus*, 新訂 食水系感染症と細菌性食中毒, 中央法規出版, 153-167.
 103. Sasaki, Y., Tsujiyama, Y., Kusakawa, M., Murakami, M., Katayama, S., Yamada, Y., 2011. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O26 in beef farms. Vet Microbiol. 150, 140-145.
 104. Schagger, H., von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem. 166, 368-379.
 105. 関崎 勉, 2014. 未来の畜産物の安全・安心. 畜産の研究. 684, 452-456.
 106. Seydel, A., Gounon, P., Pugsley, A.P., 1999. Testing the '+2 rule' for lipoprotein sorting in the *Escherichia coli* cell envelope with a new genetic selection. Mol Microbiol. 34, 810-821.
 107. Sharma, V.K., 2002. Detection and quantitation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, O111, and O26 in beef and bovine feces by real-time polymerase chain reaction. J Food Prot. 65, 1371-1380.
 108. Shim, W.B., Choi, J.G., Kim, J.Y., Yang, Z.Y., Lee, K.H., Kim, M.G., Ha, S.D., Kim, K.S., Kim, K.Y., Kim, C.H., Ha, K.S., Eremin, S.A., Chung, D.H., 2007. Production of monoclonal antibody against *Listeria monocytogenes* and its application to immunochromatography strip test. J Microbiol Biotechnol. 17, 1152-1161.
 109. 嶋 智子, 磯部 順子, 木全 恵子, 金谷 潤一, 倉田 毅, 綿引 正則, 2011. Ethidium Monoazide を用いた腸炎ビブリオ生菌の迅速定量法に関する検討. 日本食品微生物学会雑誌. 28, 21-28.
 110. 清水 健, 2010. 腸管出血性大腸菌が産生する志賀毒素の発現様式と菌体外への放出機構 —志賀毒素転換ファージの構造と機能からの考察—. 日本細菌学雑誌. 65, 297-308.
 111. Shimizu, Y., Ueda, T., 2010. PURE technology. Methods Mol Biol. 607, 11-21.
 112. Shinoda, S., 2011. Sixty years from the discovery of *Vibrio parahaemolyticus* and some recollections. Biocontrol Sci. 16, 129-137.
 113. 食品安全委員会, 2012. 食品健康影響評価のためのリスクプロファイル～生鮮魚介類における腸炎ビブリオ～ (改訂版)
https://www.fsc.go.jp/sonota/risk_profile/vibrioparahaemolyticus.pdf.

(2020 年 9 月 24 日)

114. Shu, W., Liu, J., Ji, H., Lu, M., 2000. Core structure of the outer membrane lipoprotein from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol.* 299, 1101-1112.
115. Takahashi, H., Iwade, Y., Konuma, H., Hara-Kudo, Y., 2005. Development of a quantitative real-time PCR method for estimation of the total number of *Vibrio parahaemolyticus* in contaminated shellfish and seawater. *J Food Prot.* 68, 1083-1088.
116. 寺嶋 淳, 工藤 由起子, 朝倉 宏, 2017. 腸管出血性大腸菌に係る食品の衛生管理基準の変遷. 国立医薬品食品衛生研究所報告. 13-18.
117. Tilden, J., Jr., Young, W., McNamara, A.M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M.A., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S.B., Hollingsworth, J., Morris, J.G., Jr., 1996. A new route of transmission for *Escherichia coli* infection from dry fermented salami. *Am J Public Health.* 86, 1142-1145.
118. 富永達矢, 2009. 配列空間適応歩行技術の展開に関する研究 ―新規抗菌ペプチドの開発―. 埼玉県産業技術総合センター研究報告. 第7巻.
119. Veldhuizen, E.J., Rijnders, M., Claassen, E.A., van Dijk, A., Haagsman, H.P., 2008. Porcine beta-defensin 2 displays broad antimicrobial activity against pathogenic intestinal bacteria. *Mol Immunol.* 45, 386-394.
120. Vongxay, K., Wang, S., Zhang, X., Wu, B., Hu, H., Pan, Z., Chen, S., Fang, W., 2008. Pathogenetic characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical and seafood sources. *Int J Food Microbiol.* 126, 71-75.
121. Wang, G., Li, X., Wang, Z., 2009. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res.* 37, D933-937.
122. Wang, R., Fang, S., Wu, D., Lian, J., Fan, J., Zhang, Y., Wang, S., Lin, W., 2012. Screening for a single-chain variable-fragment antibody that can effectively neutralize the cytotoxicity of the *Vibrio parahaemolyticus* thermolabile hemolysin. *Appl Environ Microbiol.* 78, 4967-4975.
123. Werber, D., Beutin, L., Pichner, R., Stark, K., Fruth, A., 2008. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in food and patients, Germany. *Emerg Infect Dis.* 14, 1803-1806.
124. Yamaguchi, K., Yu, F., Inouye, M., 1988. A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*. *Cell.* 53, 423-432.

125. 山崎 伸二, 2014. 腸管出血性大腸菌感染症と Vero (志賀) 毒素. 日本獣医師会雑誌. 67, 433-441.
126. Gyles, C.L., 1993. Mitomycin-induced synthesis of a Shiga-like toxin from enteropathogenic *Escherichia coli* H.I.8. Infection and Immunity. 61, 4510-4513.
127. Yoshimura, K., Fujii, J., Yutsudo, T., Kikuchi, R., Soejima, T., Shirahata, S., Yoshida, S., 1998. No direct effects of Shiga toxin 1 and 2 on the aggregation of human platelets in vitro. Thromb Haemost. 80, 529-530.
128. Yutsudo, T., Nakabayashi, N., Hirayama, T., Takeda, Y., 1987. Purification and some properties of a Vero toxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is immunologically unrelated to Shiga toxin. Microb Pathog. 3, 21-30.
129. Zasloff, M., 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. Proc Natl Acad Sci U S A. 84, 5449-5453.