

論文の内容の要旨

論文題目：食中毒細菌の簡易迅速検査技術に関する研究

氏 名：米北 太郎

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。腸管出血性大腸菌は広域で大規模な食中毒を発生させ、死亡事例も度々報告されており、その食中毒の発生を防止すべく国をあげて対策がとられてきた。一方、腸炎ビブリオは、かつては食中毒発生要因の上位を常に占める菌であったが、適切な対策により食中毒の発生を激減させることができた。しかし、菌自体は海水などの環境中に変わず存在するため、取り扱いを誤れば食中毒の発生につながるリスクがあり、検査により食品衛生法の規格基準を満たすことを確認していく必要がある。食中毒細菌の公定検査法は一般的に培養法であるが、培養法は検査結果が得られるまでの日数が長く（増菌培養後数日）、作業も煩雑で経験を積んだ検査員が検査しないと正しい結果が得られない恐れがある。継続して検査を行うためには、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の開発が望まれている。近年、食中毒細菌の検査においても **polymerase chain reaction (PCR)** 法やリアルタイム PCR 法などの遺伝子増幅による検査法が普及してきている。これらの検査法は、一般的に精度が高く迅速（増菌培養後数時間）であるが、複雑な工程と細かなピペット操作を伴うため、一定水準以上の検査技術と高価な機器が必要となる。最も迅速かつ簡便な検査法の 1 つにイムノクロマト法がある。イムノクロマト法は一般的に 2 種の抗体を組み合わせることで作製し、検査の際は培養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、特別な機器を必要としない。大腸菌 O157 やサルモネラなどは、イムノクロマト法が開発・市販されており食品検査に活用されている。一方、近年問題となっている O157 以外の血清型（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代表的な血清型は O157 であるが、Non-O157 による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求められている。本研究では、はじめに Non-O157 の検査法を開発し、続いて複数の血清型の同時検査法を開発することとした。第 1 章では、Non-O157 で患者からの分離頻度が最も高い血清型 O26 を特異的に検出するイムノクロマト法を開発した。ホルマリン固定した大腸菌 O26 をウサギに免疫しポリクローナル抗体を作製した。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確認の結果、供試した大腸菌 O26 (18 株) 全てで陽性を示し、その他の血清型の大腸菌 (49 株) および大腸菌以外の細菌 (22 株) では全て陰性を示した。O26 イムノクロマトの検出感度は生菌・死菌共に $2.2 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^5$ CFU/mL であった。実用性を確認するために接種試験及び市販食品を検査した。接種試験の結果、牛ひき肉やカイワレ大根等 8 種類の食品において、食品 25 g 当たり 1~3 個の O26 が存在すれば、18 時間培養後に検出可能であり、培養法および PCR 法の成績と 100%一致した。市販食品においては、115 検体の食肉検体のうち 5 検体が O26 イムノクロマト陽性を示し、59 検体で実施した PCR 法の成績と一致した。以上の成績より、本章で開発した 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、精度の高い検査法であることが示された。

第 2 章では、主要な 3 血清型の腸管出血性大腸菌 (O157・O26・O111) を識別して検出するために、イムノクロマト法を応用した新たな検査法の開発を行った。着目したのは幅広い微生物へ結合能を持つ抗菌ペプチドで、イムノクロマト法を構成する 2 種の抗体のうち、一方を抗菌ペプチドで置き換えた。比較検討により良好な結果を示した α ヘリックス型抗菌ペプチドのセクロピン P1 を金コロイド標識し、ニトロセルロース膜に塗布した抗大腸菌 O157・O26・O111 ポリクローナル抗体と組み合わせることにより、3 種類の血清型の腸管出血性大腸菌を同時に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。特異性確認の結果、マルチプレックスラテラルフローアッセイは供試した O157 (22 株)・O26 (17 株)・O111 (8 株) 全てで陽性を示し、陽性ラインの出現位置の違いにより血清型を識別できた。検出感度はいずれの血清型も 10^4 CFU/mL であった。その他の血清型の大腸菌 (7 株)、および大腸菌以外の菌株 (14 株) に対しては交差反応を示さないことが確認された。接種試験の結果、O157・O26・O111 が牛ひき肉 25 g あたり数個存在すれば、18 時間培養後に検出可能であり、培養法・各血清型のイムノクロマト法・PCR 法の成績と一致した。以上の結果より、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主要な 3 血清型を同時に識別して検査が可能であり、信頼性の高い結果が得られることが示された。

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。そこで第 3 章では、血清型や毒素産生の有無に関わらず全ての腸炎ビブリオを特異的に検出可能なモノクローナル抗体を作製し、イムノクロマト法の開発および抗原解析を行った。腸炎ビブリオをマウスに免疫し、作製したモノクローナル抗体 VP7・VP11 および VP24 は、腸炎ビブリオ O1~O12 に特異的に反応し、腸炎ビブリオとの鑑別が重要な 6 種の病原ビブリオに交差反応を示さなかった。VP24 を金コロイド標識し、VP7 を塗布したニトロセルロース膜と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。VP イムノクロマトは病原性因子の耐熱性溶血毒およびその類似毒素の存在に関わらず、全ての血清型 (O1 から O12) または分離源 (臨床および環境株) の腸炎ビブリオ (25 株) を検出できた。腸炎ビブリオ以外の菌株については試験した全ての株 (35 株) で交差反応を示さなかった。次にこれらの腸炎ビブリオ特異的モノクローナル抗体が認識する抗原エピトープを解明した。ウエスタンブロッティング

の結果、今回取得した抗体はいずれも、質量約 11 キロダルトン (kDa) と 16 kDa の 2 つの特異的バンドを示した。これらのバンドを切り出し、nano LC-MS/MS 法により分析した結果、いずれも外膜リポタンパク質 Q87G48 であることが示された。無細胞タンパク質合成によって、様々な長さのヒスチジンタグ付加外膜リポタンパク質の部分配列を作製し抗体との反応性を確認した結果、抗体の認識領域は外膜リポタンパク質の N 末端側 22~41 番目のアミノ酸を含む領域であり、特に「²²SDDAATANAAKLDEL³⁶」が重要であることが判明した。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。バイオインフォマティクス解析により、この外膜リポタンパク質は、多くの細菌にも存在する外膜リポタンパク質のオルソログであることが示された。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。

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。第 1 章で実用性が証明された 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、衛生研究所や食品企業等での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。第 2 章では 3 種の血清型の腸管出血性大腸菌を同時に識別するために、抗菌ペプチドを用いた新規の検査法開発に成功した。その後の研究により 3 種の血清型の大腸菌に、サルモネラ・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に、ここで開発した技術が応用されている。第 3 章では VP イムノクロマトの開発に加え、抗体のエピトープ解析により腸炎ビブリオ検出に有用な抗原エピトープを解明できた。イムノクロマト法による検査は迅速簡便であるため、培養法との使い分けにより作業負担の軽減・効率化を図ることが可能となる。また検査導入の技術的・設備的ハードルは低く、検査コストも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も可能であるため、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いる施設、発展途上国などインフラが整っていない地域においても検査が可能である。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。