

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 米北 太郎

細菌性食中毒は汚染された食品の摂取により発生し、激しい腹痛や下痢、重篤な場合には死に至ることから、その制御は社会的に重要な課題である。腸管出血性大腸菌は広域集団食中毒を発生させ、死亡事例も度々報告されており、国家的にその対策が取られてきた。腸炎ビブリオは、日本では食中毒発生が多かったが、2001年に食品衛生法の規格基準が改正されて以降激減した。しかし、沿岸海水などの環境中に菌自体は今でも存在するため、取り扱いを誤れば食中毒が発生する。食中毒細菌の公定検査法は一般的に培養法だが、検査結果が得られるまで数日を要し、煩雑な作業と検査員の十分な経験が必要である。そのため、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。本研究は、食品に含まれる腸管出血性大腸菌と腸炎ビブリオを検出するイムノクロマト法を開発するために、特異性の検討、新たな検査系の構築、および特異的エピトープの解明を行ったものである。

第 1 章では、腸管出血性大腸菌 O26 の検出系を開発した。O26 を抗原としてウサギを免疫し、2 種のポリクローナル抗体(PAb1・PAb2)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て新しいイムノクロマト法を開発した。本法は、供試した O26 の大腸菌 18 株全てで陽性を示し、その他の血清型および大腸菌以外の細菌では全て陰性反応を示した。検出感度は  $2.2 \times 10^3 \sim 4.2 \times 10^4$  CFU/mL であった。接種検査の結果、牛ひき肉やカイワレ大根等 8 種類の食品において、25 g 当たり数個程度存在すれば、18 時間培養後に検出可能であり、結果は培養法および PCR 法の成績と 100%一致した。市販食品 115 検体の食肉検体では、5 検体が大腸菌 O26 陽性を示し、PCR の成績と一致した。以上の結果は、本基礎研究が実用化に直結することを示したものと評価した。

第 2 章は、腸管出血性大腸菌 (O157・O26・O111) を識別して検出する

イムノクロマト法を開発するため、イムノクロマト法に使用する 2 種の抗体のうち一方を、幅広い微生物との結合能を持つ抗菌ペプチドに置き換える検査系の構築を検討した。 $\alpha$ 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、抗大腸菌 O157・O26・O111 ポリクローナル抗体をニトロセルロース膜に塗布して組み合わせると、3 種類の血清型の大腸菌をそれぞれ識別して同時に検出可能なことを確認した。本法は、22 株の O157, 17 株の O26, 8 株の O111 全てで陽性を示した。他の血清型の 7 株の大腸菌、および大腸菌以外の 14 株の菌に対して交差反応を示さなかった。検出感度はいずれも  $10^4$  CFU/mL であった。接種試験では、O157・O26・O111 が牛ひき肉 25 g あたり数個で、18 時間培養後に検出可能であり、培養法・PCR 法と一致した。以上の成績より、抗菌ペプチドを利用した検査系が、複数の血清型の病原細菌の同時識別に応用できるという実用的な価値ある発見と評価した。

第 3 章では、腸炎ビブリオ 全血清型 (O1 ~ O12) に反応し、鑑別が重要な 6 種の病原ビブリオに交差反応しないモノクローナル抗体 VP7・VP11 および VP24 を作製した。このうち、VP24 を金コロイド標識し、VP7 と組み合わせることにより腸炎ビブリオ検出用イムノクロマト法を開発した。本法は、全血清型、臨床および環境由来の 25 株の腸炎ビブリオを検出した。35 株の他菌種では、全てで交差反応しなかった。作製した抗体は、ウエスタンブロット解析で質量約 11 キロダルトン (kDa) と 16 kDa のタンパク質と反応しており、nano LC-MS/MS 法で分析した結果、いずれも外膜リポタンパク質 (UniProt Accession No. Q87G48) であった。無細胞タンパク質合成系で部分配列を作製し抗体の認識領域を確認したところ、N 末 22~41 番目のアミノ酸を含む領域 22-SDDAATANA AKLDEL-36 だった。これは腸炎ビブリオ特異的配列であり、多くの細菌で保存されている lipoprotein のオルソログである。lipoprotein 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ため、腸炎ビブリオ検出の標的因子として有用であることが裏付けられた。

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するイムノクロマト法開発のため種々の基礎研究が実施された。その成果の利用で、さらに別の病原細菌の検査法開発が加速し、この分野の技術革新に貢献すると期待され、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。