

博士論文

論文題目

Development of simple and rapid inspection methods for *Escherichia Coli*

-Development of an Immunochromatographic test for Escherichia Coli O111-

-Development of PCR-Nucleic Acid Lateral Flow Assay for Shiga Toxin-

腸管出血性大腸菌の簡便・迅速な検査法の開発

—大腸菌O111検出イムノクロマト法の開発—

—ベロ毒素遺伝子検出PCR-核酸クロマト法の開発—

氏 名 寺尾 義孝

目次

要旨.....	1
I. 緒言.....	2
1. 食中毒とは	
2. 腸管出血性大腸菌とは	
3. 腸管出血性大腸菌の検査方法	
4. イムノクロマト法	
5. PCR-核酸クロマト法	
6. 本研究の枠組み	
7. 本研究の目的と意義	
II. 方法.....	11
1. 菌株と培養条件	
2. 抗大腸菌 O111 ポリクローナル抗体の作製	
3. ポリクローナル抗体のサンドイッチ ELISA による評価	
4. イムノクロマトテストストリップの開発	
5. 大腸菌及び大腸菌以外の細菌を用いたイムノクロマトテストストリップの評価	
6. 大腸菌を接種した食品検体を用いたイムノクロマトの評価	
7. stx 検出 PCR プライマー及びプローブの開発	
8. 着色ラテックス微粒子標識オリゴヌクレオチドの作製	
9. BSA 標識オリゴヌクレオチド固相化メンブレンの作製	
10. 核酸クロマト展開用バッファの最適化	
11. 核酸クロマトの品質管理	
12. 腸管出血性大腸菌及びその他の菌を用いた PCR-核酸クロマト法の評価	

13. 腸管出血性大腸菌を接種した食品検体を用いた PCR-核酸クロマト法の評価
14. PCR-核酸クロマト法と Real-time PCR 法 (USDA MLG) の性能比較

III. 結果.....23

1. 抗大腸菌 O111 ポリクローナル抗体の選抜
2. 開発した O111 検出イムノクロマト法の特異性
3. 開発した O111 検出イムノクロマト法の検出感度
4. 大腸菌を接種した食品検体からの O111 検出イムノクロマト法による検出
5. ベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法の開発
6. 開発したベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法の特異性
7. 開発したベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法の検出感度
8. STEC を接種した食品検体からの開発したベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法による検出
9. 開発したベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法と Real-time PCR 法 (USDA MLG) の性能比較

IV. 考察.....30

1. 開発した O111 検出イムノクロマト法について
2. 開発したベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法について

V. 結論.....36

謝辞 引用文献 図表

要旨

本研究において、大腸菌 O111 検出イムノクロマト法及び *stx* 遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法の開発及び評価を実施した。菌株は 77 株の大腸菌と 24 株の大腸菌以外の細菌からなる合計 101 株を用いた。

開発したイムノクロマト法は *Salmonella* O35 への交差反応の有無や PAb のロット差等について更なる検証が必要であるものの、十分な検出限界と特異性を有し、食品検体からの検出においても PCR 同程度の検出率で検出が可能であることが示された。一方、PCR-核酸クロマト法はトマトの培養液からの検出等について更なる検証が必要であるものの、設計したプライマー及び核酸クロマト法による高感度化で既存方法と同等の検出限界及び特異性を有することが示された。

開発した 2 種類の方法は、いずれも既存方法と比べ低コスト、簡便、迅速等の利点を持ち、かつ遜色ない性能を有しており、食品企業等におけるルーチンスクリーニングに非常に有用であると考えられる。

I. 緒言

1. 食中毒とは

食中毒とは、飲食物に含まれる有害微生物や化学物質等を摂取することで起こる疾病の総称である。広義には、有害微生物の増殖によって消化管の感染症を発生させる感染型食中毒と、直接に毒物として作用する毒素型食中毒に分けられる。前者には細菌性食中毒及びウイルス性食中毒、後者には化学性食中毒及び自然毒食中毒が含まれる。また細菌性食中毒の原因の一部に消化管内で増殖する際にのみ毒素を生成する病原菌が存在し、これによる食中毒を生体内毒素型食中毒と呼ぶ。一方で感染型と毒素型の間際に位置する食中毒として中間型食中毒とも呼ばれる一群がある。図1にみられるように、患者発生の多くはノロウイルス等のウイルスが原因となっている(65%)が、細菌が占める割合も大きい(29%)。細菌性食中毒において腸管出血性大腸菌が原因である患者発生数は2%にとどまる(図2)が、年によっては食中毒による死亡の主な原因となっており(図3)、食品衛生管理において非常に重要な細菌である。

2. 腸管出血性大腸菌とは

腸管出血性大腸菌 *Shiga toxin-producing Escherichia coli* (STEC) は、食中毒感染の重要な原因となっており、産生するベロ毒素(Shiga toxin、以下 STX または verotoxin、以下 VT)により、下痢症、出血性結腸炎(hemorrhagic colitis、以下 HC)、溶血性尿毒症症候群(hemolytic uremic syndrome、以下 HUS)等の症状を引き起こす(Griffin PM et al. 1991; Karmali MA et al. 1989; Nataro JP et al. 1998; Paton JC et al. 1998)。STX とは STEC が細胞内で産生し分泌するタンパク質性の毒素であり、互いのアミノ酸

配列の一致率が 50~60%であるベロ毒素 1 型 (STX1) とベロ毒素 2 型 (STX2) の 2 つが知られている。その他の病原性因子として、腸管粘膜定着に必須で *eae* 遺伝子によりコードされる細胞外膜タンパクであるインチミン、*hlyA* 遺伝子によりコードされる溶血素であるエンテロヘモリシンがある。STEC の原型である大腸菌 O157:H7 に加えて、多数の非 O157 が発生し O157 に類似の HC や HUS を含む重大な症状をもたらしてきた。アメリカ、カナダ、イギリス、日本で発生する STEC のアウトブレイクにおいて大腸菌 O157:H7 は原因の多くを占めてきたが、アメリカにおいて非 O157 による感染者数は O157:H7 の 2 倍以上発生していると推定されている (Scallan E et al. 2011)。一方、ヨーロッパ、アルゼンチン、オーストラリア、チリ、南アフリカで発生する STEC のアウトブレイクにおいては非 O157 が原因の多くを占めている (Meng J et al. 2013)。また、アメリカ疾病予防センター (CDC) のデータによれば、非 O157 の約 80%を O26 (27%)、O45 (4%)、O103 (21%)、O111 (19%)、O121、O145 (5%) といった血清型の STEC が占めている。さらに、他の国々においてもこれらの血清型は重要な STEC 血清型であることが示されている (Brooks JT et al. 2005; Johnson KE et al. 2006; Gyles CL. 2007)。これらの血清型は「top6」または「big6」と呼ばれ、これら血清型の STEC による HC や HUS の重大な症例が数多く報告されている (Bettelheim KA. 2007; Mathusa EC et al. 2010; Schaffzin JK et al. 2012)。O91 と O113 を含む他の血清型も、HC や HUS の症例及び発生と関連しており、多くの国において報告されている血清型となっている (Bettelheim KA. 2007; EFSA. 2009; Johnson KE et al. 2006; Mellmann A et al. 2009; Paton AW et al. 1999)。

3. 腸管出血性大腸菌の検査方法

日本における食品からの腸管出血性大腸菌の検査法については、「腸管出血性大腸菌 O26、O111 及び O157 の検査法について」（食安監発 0515 第 1 号）にて通知されている。検査法の流れは図 4 の通りであり、まずストマッカー袋に 25 g の試料と 225 ml の増菌培地 (mEC) を加え 1 分間以内のストマッカー処理などを行った後、 $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で 22 ± 2 時間培養する。次に培養液から DNA 抽出を行い抽出した DNA テンプレートを用いて、*stx* 遺伝子の検出試験を実施する。遺伝子検出法としては、O-157 (ベロ毒素遺伝子) PCR Screening Set (タカラバイオ株式会社, 大津, 日本) 等の polymerase chain reaction (PCR) 法 (Lin Z et al. 1993)、Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット (栄研化学株式会社, 東京, 日本) 等の Loop mediated isothermal amplification (LAMP) 法 (Hara-Kudo Y et al. 2007)、Cycleave PCR O-157 (VT gene) Screening Kit (タカラバイオ株式会社) 等の Real-time PCR 法 (Beutin L et al. 2009; Bellin T et al. 2001; Madic J et al. 2010; Madic J et al. 2011; Nielsen EM et al. 2003) がある。*stx* 遺伝子の検出試験において陰性の場合は検査終了となり、陽性の場合は続いて培養法を実施する。培養法には上述の増菌培養液を直接塗抹する直接法と免疫磁気ビーズ濃縮液を各種分離平板培地に塗抹する免疫磁気ビーズ法がある。画線塗抹した分離平板培地を $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で 18~24 時間培養後、疑われるコロニーを分離・釣菌し普通寒天培地等にて純培養後 ($36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で 18~24 時間)、血清型別試験を実施する。血清群 O26、O111 及び O157 と疑われるコロニーについては、生化学的性状試験及び STX 確認試験を実施する。生化学的性状試験は、TST 寒天培地、LIM 培地、CLIG 培地、各種キット等から選択し $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で 18~24 時間培養後、大腸菌固有の特徴の有無を確認する。STX 確認試験は、*stx* 遺伝子又は STX 産生性を PCR 法、逆受身ラテックス凝集反応 (reverse passive latex agglutination、以下 RPLA) 法、イムノクロマト

グラフィー法等のいずれかを実施する。腸管出血性大腸菌血清群 O26、O111 又は O157 が分離されたことをもって、陽性とする。*stx* 遺伝子検出法によって陽性であったが、血清群 O26、O111 又は O157 の分離ができなかった場合は陰性とする。

一方アメリカにおける食品からの腸管出血性大腸菌の検査法は、United States Department of Agriculture Microbiology Laboratory Guidebook (USDA MLG) 5B に記載されており、日本における方法とは異なる部分がある。まず始めの増菌培養における検体量が 325 ± 32.5 g であり、培地にカザミノ酸及びノボビオシン添加の modified Trypcase Soy broth (TSB) 培地を 975 ± 19.5 ml 使用する。さらに遺伝子検出法においても Real-time PCR による *stx* 遺伝子と *eae* 遺伝子のスクリーニングを実施した後、両遺伝子が陽性の検体についてのみ O 血清型特異的な *wzx* 遺伝子を増幅するマルチプレックス Real-time PCR を 3 セット行う。1 セット目は O26 及び O111、2 セット目は O45 及び O121、3 セット目は O103 及び O145 を検出する。これら 6 種類の血清型のうちいずれかが陽性となった検体については、陽性となった血清型の免疫磁気ビーズで培養液を濃縮し、免疫磁気ビーズ濃縮液及び未濃縮の培養液をレインボーアガープレートに塗抹する。 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ で 20-24 時間培養後、コロニーの性状確認を実施し、続いて *stx* 遺伝子及び *eae* 遺伝子検出 multiplex PCR と血清型特異的 (*wzx*) multiplex PCR による確認試験を行う。

4. イムノクロマト法

イムノクロマト (immunochromatography) 法は、抗原抗体反応と毛細管現象の組み合わせにより、金コロイドあるいはラテックス粒子などの色素標識物を介して検査対象物質が可視化されることを原理としている。反応は以下の順序で進行する (図 5)。

まず金コロイドあるいはラテックス粒子などの色素が標識された抗体とサンプル中の抗原が毛細管現象によりメンブレン上を移動する。次に抗原と色素標識抗体が抗原抗体反応により結合し、抗原抗体複合物が形成される。さらに抗原抗体複合物がメンブレン上に固定された捕捉抗体と抗原抗体反応により結合し、捕捉抗体上に色素が集積することで可視化される。イムノクロマト法はサンプル中における標的物質の有無を迅速に判定できる方法である。イムノクロマトを用いた大腸菌 O111 の検査は非常に簡便で、増菌培養した培養液をイムノクロマトに添加し 15 分静置後、テストライン上の赤紫色のラインの有無を目視判定することにより、陽性と陰性を識別する。従来用いられてきた培養法に比べ、検査の効率化及び簡易化、検査期間の短縮が可能である。また特別な機器が不要で誰でも簡単に判定することができる。イムノクロマト法を原理とした試薬は体外診断薬として利用されることが多く、代表的なものとして妊娠検査薬やインフルエンザ検査キットが広く知られている。

5. PCR-核酸クロマト法

核酸クロマト法とは特異的に増幅された核酸遺伝子を検出するためのバイオセンサーとして、核酸ラテラルフローアッセイ (nucleic acid lateral flow assay、以下 NALFA) を利用する方法である (Rule G et al. 1996)。NALFA においては、抗体依存のあるいは抗体非依存の原理により核酸がラテラルフローテストストリップのメンブレン上で捕捉される (Ngom B et al. 2010; Posthuma-Trumpie GA et al. 2009)。前者の抗体依存の原理においては、メンブレン上に固相化された抗体により、PCR でタグを付加された増幅産物が捕捉されるため、タグ付きのプライマーを使用する必要がある (Blažková M et al. 2009; Mens PF et al. 2008; Ngom B et al. 2010; Posthuma-

Trumpie GA et al. 2009)。後者の抗体非依存的でより特異性の高い原理 (図 6) においては、メンブレン上を検体が浸潤する際に起こる核酸同士のハイブリダイゼーションを利用する (Carter DJ et al. 2007; Kalogianni DP et al. 2007; Litos IK et al. 2009; Ngom B et al. 2010; Posthuma-Trumpie GA et al. 2009)。どちらの原理においてもイムノクロマトと同様に、金コロイドあるいはラテックス粒子などの色素標識物を介して検査対象物質である核酸が可視化されることを原理としている。NALFA 法はサンプル中における標的核酸の有無を迅速に判定できる方法である。NALFA を用いた検査は非常に簡便で、PCR 反応後の反応液に展開用バッファーを加え、テストストリップに供し、15 分静置後テストライン上の濃青色のラインの有無を目視判定することにより、陽性と陰性が識別できる。ラテラルフローテストストリップを用いる利点はワンステップアッセイ、簡便、迅速、ローコスト、用途の広さ、常温での保存安定性といったものがある (Aldus CF et al. 2003; Capps KL et al. 2004; Gordon J et al. 2008; Ngom B et al. 2010; Posthuma-Trumpie GA et al. 2009)。さらに、従来法である電気泳動と比較しても NALFA はより短い反応時間で、エチジウムブロマイドの様な危険な試薬を必要としない、といった利点を持つ (Blažková M et al. 2009; Mens PF et al. 2008)。また、核酸クロマトストリップは細菌検出に用いるバイオセンサーに必要な大部分の要件 (優れた特異性と検出限界、15 分程度の短いアッセイ時間、熟練の必要が無い、コンパクトサイズで携帯可能、フィールド試験に便利) を満たす (Invitski D et al. 1999)。さらに安価で製造が簡単という特性も有し、使い捨てであるため再利用に有する時間やコストが必要無い。そして核酸クロマトストリップが着色微粒子で作製される場合、視覚的な検出が容易となるため、免疫センサー技術のアプリケ

ーションにおける重大な欠点の1つである高額な機器のコストをかける必要が無い (Tokarsky O et al. 2008)。

6. 本研究の枠組み

日本での食品からの腸管出血性大腸菌の検査においては、遺伝子検出法で陽性となった検体について培養法を実施することとなっており、検査開始から腸管出血性大腸菌 O26、O111、O157 の分離まで4~5日を要する。加えてこの方法は信頼性が高いものの、多種類の試験を実施することになるため、熟練者と設備の整った検査室を必要とする。このため、迅速かつ高感度な遺伝子検出法によるスクリーニングを実施できれば、検査の効率を大幅に高めることが可能である。また、培養法の血清型別試験においても、従来法であるラテックス凝集法は煩雑な操作と時間を必要とし、その他の方法である enzyme-linked immunoassay (ELISA) (Blais BW et al. 2006)、Real-time PCR、LAMP といった方法も高価な機器及び熟練者を要する。

一方、本研究のターゲットの1つである大腸菌 O111 は米国で報告されている非 O157 STEC による HUS 症例の大部分を占めており (Brooks JT et al. 2005) 日本でも死者が出ていることから、O111 の簡便、迅速な血清型別試験は非常に有用である。また、腸管出血性大腸菌の病原性因子としては、*eae* 遺伝子によりコードされるインチミン、*hlyA* 遺伝子によりコードされるエンテロヘモリシンがあるものの、*eae* 遺伝子を保有しない腸管出血性大腸菌 O91:H10 (Bonnet R et al. 1998)、O104: H4 (Bielaszewska M et al. 2011) や *hlyA* 遺伝子を保有していない腸管出血性大腸菌 (Brunner W et al. 1999) による HUS 症例が報告されている。このため *eae* 遺伝子及び *hlyA* 遺伝子を保有していなくても、*stx* 遺伝子を有する腸管出血性大腸菌は危険であ

る。以上の理由から、日本の食品検査においては *stx* 遺伝子のみ検出が必須となっており、厚生労働省は *stx1* と *stx2* を分けて報告している。

さらに国及び公的機関などの検査室から食品加工工場などの現場へと検査実施施設が推移してきており、迅速なスクリーニング方法の需要はますます強くなっている (Alocilja EC et al. 2003)。しかし、これまで大腸菌 O111 を検出するためのイムノクロマト法やラテックス凝集法といった簡便な方法は開発されていなかった。一方、*stx* 遺伝子検出法としては PCR 法、Real-time PCR 法、LAMP 法といった方法が存在するものの、いずれも検出感度の低さや高額な機器の価格という欠点があり、食品加工工場などにおいては実用化が難しかった。

以上から本研究の枠組みとして、大腸菌 O111 検出イムノクロマト法及び *stx1* と *stx2* の識別が可能な *stx* 遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法の開発及び評価を日本ハム株式会社中央研究所にて実施した。

7. 本研究の目的と意義

本研究では、食品中の腸管出血性大腸菌を簡便・迅速に検出するための大腸菌 O111 検出イムノクロマト法及び *stx1* と *stx2* の識別が可能な *stx* 遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法の開発と性能の実証を行うことを目的とする。

イムノクロマト法は従来腸管出血性大腸菌の中でも患者数の多い血清型であるにもかかわらず簡易迅速キットの無かった大腸菌 O111、PCR-核酸クロマト法は日本における腸管出血性大腸菌のスクリーニングとして必須であるにもかかわらず簡便・安価で高感度な検査法が無かった *stx* (*stx1*、*stx2*) 遺伝子をターゲットとし開発を行った。

本研究において開発及び性能の実証を行った大腸菌 O111 検出イムノクロマト法及び *stx* (*stx1*、*stx2*) 検出 PCR-核酸クロマト法は、従来法より短時間で食品検体の培養液からの検出が可能であることから、検査の現場において有用な方法であると考えられる。

II. 方法

1. 菌株と培養条件

71 株の大腸菌と 24 株の大腸菌以外の細菌からなる合計 95 株の細菌を本研究で用いた (表 1)。標準株は American Type Culture Collection (ATCC)、大阪大学の Research Institute for Microbial Diseases (RIMD)、RIKEN BioResource センターの the Japan Collection of Microorganisms (JCM)、東京大学の Institute of Medical Science (IID) から得られた。そして、野生 (wt) 株は、日本ハム株式会社中央研究所で分離されたものを用いた。各菌は tryptic Soy broth (TSB) (日水製薬株式会社) で播種した後、Micro バンク (イワキ株式会社) を用いて保存した。大腸菌株は mEC 培地 (日水製薬株式会社) またはノボビオシン添加 mEC (NmEC) 培地 (メルク株式会社) を用いて 42°C で 22 時間、大腸菌以外の細菌株は TSB を用いて 37°C で 22 時間、それぞれ circulating-air インキュベーター (東京理化学器械株式会社) 内で培養した。

2. 抗大腸菌 O111 ポリクローナル抗体の作製

検査現場においては、安全上の問題から食品を培養後オートクレーブしたものからも大腸菌 O111 を検出する必要があると考えたため、本研究では抗原に対して様々な結合が可能で抗原の変性に強いポリクローナル抗体 (PAb) を作製した。大腸菌 O111 の免疫抗原を以下の手順に従って菌株から精製した。まず寒天培地上で培養し confluent にした大腸菌 O111 を回収し、リン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline、以下 PBS) で二回洗浄した。さらに 10v/v% のホルマリン加リン酸緩衝生食液 (PBS) で 25°C、18 時間不活化し PBS で 3 回洗浄したものを抗原とした。SPF ウサギ (日本白色種) を 4 匹用意し免疫開始初日にフロイント完全アジュバントを用いて抗原を接

種し、その後2週間の間隔でフロイント不完全アジュバントを用いて同じ抗原を継続的に接種した。ウサギから少量採血した血液サンプルを用いて、抗原とした大腸菌に対する抗体の反応性を確認した後、最終免疫の10日後に全採血を行った。全採血した血清から ProteinG Sepharose 4 Fast Flow カラム (GEヘルスケア・ジャパン株式会社, 東京, 日本) を用いてウサギ IgG を精製し、ウサギの個体違いにより PAb-1~4 として使用した。

3. ポリクローナル抗体のサンドイッチ ELISA による評価

前段階として biotin protein labeling kit (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, 東京, 日本) を用いて抗 O111 PAb-1~4 にビオチン標識を行った。

まずマイクロタイタープレートの各ウェルに 1 M NaHCO₃, pH 8.5 で希釈した未標識の PAb 溶液を 100 μl ずつ分注し 4°C、16 時間インキュベートすることで固相化した。次に 1w/v% Tween 20 in PBS (PBS-T) で 2 回洗浄後、1w/v%BSA in PBS を分注し 25°C で 3 時間ブロッキングを行った。続けて PBS-T で 3 回洗浄後、培養液で段階希釈された 100 μL の菌液または陰性コントロールとして培養液のみをプレートに分注し、25°C で 1 時間反応させた。大腸菌 O111 として標準株 2 株と日本ハム株式会社中央研究所で分離された分離株 6 株の計 8 株、非 O111 大腸菌として標準株 16 株を用いた。さらに PBS-T で 5 回洗浄後、希釈したビオチン標識抗体をプレートに加え 25°C で 1 時間インキュベートした。反応後 PBS-T で 5 回洗浄し、希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社, 神奈川, 日本) を 100 μL ずつプレートに分注し、25°C で 30 分インキュベートした。最後に PBS-T で 5 回洗浄後、3, 3', 5, 5', -tetramethylbenzidine

(モス株式会社, メリーランド, アメリカ) を 100 μ l ずつプレートに分注し 25°C で 20 分インキュベート後、0.25 M H₂SO₄を加え反応を停止した。

反応後のサンプルは測定波長 450 nm (対照波長 620 nm) で、プレートリーダー (SUNRISE 2000; 和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) により吸光度を測定された。また、これらの測定は全て二重測定で 2 回繰り返し実施された。

4. イムノクロマトテストストリップの開発

イムノクロマトテストストリップは、既報論文 (Kawatsu K et al. 2006) で報告されているプロトコルに従い作製した。具体的には、抗大腸菌 O111 PAb 溶液 (1 mg/ml) をメンブレン部分のほぼ中間の位置に幅 1 mm の線状に吸着させ、大腸菌 O111 検出用のテストラインを作製した。また、コントロールラインとして、ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン G 溶液 (0.50 mg/ml) をテストラインの下流 8 mm に幅 1 mm の線状に吸着させた。一方、金コロイド標識 PAb を作製するために、1 ml の PAb 溶液 (20 μ g/ml) を 5 ml の金コロイド懸濁液 (田中貴金属工業株式会社, 東京, 日本) に加えた。さらにインキュベーションとブロッキングを行った後、金コロイド標識 PAb を 5 ml の 1w/v% bovine serum albumin (BSA), 1w/v% Trehalose in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 で懸濁し、最後にコンジュゲートパッドに含浸させ凍結乾燥を行った。イムノクロマトテストストリップ作製のために、吸収パッド (メルク株式会社) と作製したコンジュゲートパッドを、ラミネート加工されたメンブレンカード (HiFlow Plus 135; メルク株式会社) に取り付けた。その際、メンブレン (1 mm) と吸収パッド (1 mm) がわずかに重なるようにした。

5. 大腸菌及び大腸菌以外の細菌を用いたイムノクロマトストリップの評価

増菌培養後の大腸菌及び大腸菌以外の菌株を用いて、作製したイムノクロマトテストストリップの試験を以下の通り実施した。試験に際しては、未処理及びオートクレーブ処理した菌株を作製し、生菌と死菌の違いによる検出限界の差異についても検討した。まずディスポーザブル用の試験管にサンプルを 150 µl 分注しそこにイムノクロマトテストストリップを挿入した。15分室温でインキュベーションし、メンブレン上をサンプルが移行した後、テストラインとコントロールライン両方に赤紫色のラインが出現した場合を大腸菌 O111 陽性、コントロールラインのみに赤紫色のラインが出現した場合を陰性と判定した（陽性、+；陰性、-）。これらの測定は全て二重測定で2回繰り返し実施された。

6. 大腸菌を接種した食品検体を用いたイムノクロマトの評価

食品検体 (豚肉、牛肉、鶏肉) は、市販のものを 4°C で最長 2 日間貯蔵後使用した。まず、10 倍段階希釈した大腸菌 O111 (RIMD 0509829) の菌液を、25 g の食品検体を含む 225 ml の NmEC 培地にそれぞれ加え、STOMACHER400 CIRCULATOR (オルガノ株式会社, 東京, 日本) によるストマッキング後 42°C で 22 時間インキュベートした。この際、菌液を接種しない食品検体もコントロールとして用意した。これらの培養検体を用いて、イムノクロマト法と PCR 法による試験を実施した。PCR 法は以下の方法の通り試験を行った。まずメーカーの取扱説明書に従い Wizard genomic DNA purification キット (プロメガ株式会社, 東京, 日本) を用いて、一晚培養した培養液から DNA を抽出・精製した。そして PCR 反応は、既報論文 (Bastin DA et al. 1995; Paton AW et al. 1998) に記載の方法で行った。具体的にはプライマーとして O111F (TAG AGA AAT TAT CAA GTT AGT TCC) /O111R (ATA GTT ATG AAC ATC TTG TTT AGC) (*E.coli* O111 rfb 領域) を使用し、プログラムは denaturation (94°C、30 s)、

annealing (60°C、30 s)、extention (72°C、30 s) を 30 サイクル実行した後、最後に extention (72°C、7 m 分) という内容で実施した。さらに得られた PCR 産物 3 µl を 6 × ローディングダイ (0.3w/v% Orange G, 0.1w/v% ブロモフェノールブルー, 0.1w/v% キシレンシアノール, 40w/v% グリセロール in TE) 0.6 µl と混合後、2w/v% アガロースゲルにアプライし 1×TAE Buffer を用いて 25 分間電気泳動した。その後、アガロースゲルをエチジウムブロマイド染色液 (0.50 µg/ml エチジウムブロマイド in TAE) に入れ 30 分間振とうし、UV によりバンドを可視化して DNA の増幅の有無 (406 bp) を確認した。これらの測定は全て二重測定で 2 回繰り返し実施された。

7. *stx* 検出 PCR プライマー及びプローブの開発

stx 検出 PCR の開発は、下記の手順で実施した。まず STX1、STX2 をコードする *stx1* 遺伝子配列、*stx2* 遺伝子配列を文献データベース MEDLINE/PubMed から複数取得し、Clustal W プログラムを用いて両遺伝子について各々アライメントを行った。このアライメントした遺伝子配列を基に Primer3-web プログラム (インターネットフリーソフトウェア, <http://primer3.sourceforge.net/>) により各遺伝子検出用プライマー及びプローブを設計し (表 2) 各プライマー及びプローブの合成を依頼した (シグマアルドリッチジャパン株式会社, 東京, 日本)。

8. 着色ラテックス微粒子標識オリゴヌクレオチドの作製

核酸クロマトテストストリップは、既報論文 (Kalogianni DP et al. 2009) に記載のプロトコルに従い作製した。まず 120 mg のカルボキシル修飾着色ラテックス微粒子 (Bangs Laboratory 株式会社, インディアナ, アメリカ) を 19.2 ml の 0.1 M Carbonate, pH 9.6 で、2 回洗浄した。次に 16.2 ml の 0.1M 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES),

pH 5.4 で 2 回洗浄した後、12,000× g で 10 分遠心分離を行った。沈殿を 13.5 ml の 0.1 M MES で再懸濁し 1 分間の超音波破碎後、用時調製した 13.5 ml の 2w/v% 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (塩酸塩) (EDC) (株式会社同人化学研究所, 熊本, 日本) in MES を加え、3 時間室温で反応させた。反応後、遠心分離 (12,000× g、10 分) でラテックス微粒子を沈殿させ、21.6 ml の MES で洗浄を 2 回行った。さらに 26 ml の 0.2 M Borate, pH 8.5 で再懸濁し 1 分間の超音波破碎後、12 nmol の 5' アミノ基修飾オリゴヌクレオチド (stx11 プローブまたは stx21 プローブ) (シグマアルドリッチジャパン株式会社, 東京, 日本) を加え、12 時間室温で反応させた。反応後、遠心分離 (12,000× g、10 分) で沈殿させ、0.25 M ethanolamine in Borate と 10 mg/ml BSA in Borate により洗浄を行った。洗浄後、4.8 ml の保存用バッファー (1w/v% BSA, 0.095w/v% NaN₃, 5w/v% glycerol 0.1 M PB, pH 7.4) で再懸濁し 1 分間の超音波破碎を行った。さらに 64 ml の 0.5w/v% BSA, 0.5w/v% TritonX-100, 2w/v% polyethylene glycol (PEG)、5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1w/v% Trehalose in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 で希釈後、コンジュゲートパッド (メルク株式会社) に浸潤させた状態で凍結乾燥を実施した。

9. BSA 標識オリゴヌクレオチド固相化メンブレンの作製

BSA 標識オリゴヌクレオチドは、既報論文 (Duncan RJS et al. 1983; Oku Y et al. 2001) に記載のプロトコルに従い作製した。まず、200 mg の BSA (シグマアルドリッチジャパン株式会社) にチオール基を導入し、SH基導入 BSA を 190 mg (1つの BSA 分子当たり 6.4 の SH基) 得た。

一方、マレイミド基導入オリゴヌクレオチドは以下の通り作製した。まず 37.5 nmol のアミノ基修飾オリゴヌクレオチド (シグマアルドリッチジャパン株式会社) の

stx1m、stx2m、anti-stx2l を 0.58 mg の N-(6-Maleimidocaproyloxy) succinimide (EMCS) (株式会社同人化学研究所) と混合し 37°C で 60 分間反応させた。さらにエタノール沈殿により精製した沈殿物を 5 mM EDTA in 0.1 M PBS, pH 6.0 で溶解した。その結果、36 nmol のマレイミド基導入 stx1m (stx1m 1 分子あたり 0.53 のマレイミド基)、30 nmol のマレイミド基導入 stx2m (stx2m 1 分子あたり 0.81 のマレイミド基) と 36 nmol のマレイミド基導入 anti-stx2l (anti-stx2l 分子あたり 0.95 のマレイミド基) を得た。

さらに作製した S H 基導入 BSA (1.3 mg、1.8 mg、2.0 mg) とマレイミド基導入オリゴヌクレオチド (29 nmol の stx1m、25 nmol の stx2m、23 nmol の anti-stx2l) をそれぞれ混合した。60 分間の反応後、終濃度が 0.01 M になるよう N - エチルマレイミド (和光純薬工業株式会社) を加え、さらに 37°C で 30 分間反応させた。その後、透析膜 CelluSep H1 (メンブレンフィルトレーションプロダクツ株式会社, テキサス, アメリカ) を用いて透析を行い、5 mM EDTA in 10 mM PBS, pH 7.0 に置換した。最終的に BSA 標識オリゴヌクレオチドをそれぞれ (15 nmol の stx1m、14 nmol の stx2m と 12 nmol の anti-stx2l) 得た。オリゴヌクレオチド濃度は、NanoDrop (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を用いて 280 nm の吸光度から算出した。作製した BSA 標識オリゴヌクレオチド (stx1m、stx2m、anti-stx2l) は、stx1 増幅産物と stx2 増幅産物の検出、及びコントロールライン作製のためにニトロセルロース膜上の 3 つの異なる位置に固相化された。具体的には、10 μ M の BSA 標識オリゴヌクレオチド溶液を BioDot XYZ 3000 (バイオドットジャパン株式会社, 東京, 日本) プラットフォーム上に取り付けられたディスペンス用モジュール BioJet 3000 (バイオドットジャパン株式会社) に満たし、BSA 標識 stx1m、BSA 標識 stx2m、BSA 標識 anti-stx2l

をそれぞれラミネート加工されたメンブレンカードの異なる3つの位置に幅2 mm-帯として塗布した。BSA 標識 stx1m と BSA 標識 stx2m の塗布位置の間隔は4 mm、BSA 標識 stx2m と BSA 標識 anti-stx21 の塗布位置の間隔は8 mm 空けた。塗布したメンブレンは3時間室温で乾燥させた後、デシケーター内で保管した。核酸クロマトテストストリップ作製に際しては、膜とわずかに(1 mm) 重なるように吸収パッド及び作製したコンジュゲートパッドをそれぞれラミネート加工されたメンブレンカードに貼り付けた。

10. 核酸クロマト展開用バッファの最適化

核酸クロマトでPCR産物を試験する際に用いる展開用バッファの最適化を以下の手順で実施した。まず一般的な核酸のハイブリダイゼーションに用いられる、非特異結合を抑制する特性を持つハイブリダイゼーション用緩衝液を参考にした。これに含まれる主な成分としては、5~40w/v% Formamide、0.01~10×SSC 緩衝液(クエン酸ナトリウム緩衝液; 1×SSC: 0.15 M NaCl, 15 mM クエン酸ナトリウム, pH 7.0)、2~10×Denhardt's 溶液(デンハルト溶液; 50×デンハルト溶液組成: 1% BSA, 1% Ficoll, 1% Polyvinylpyrrolidone) 等が挙げられる。これらの成分の最適な濃度を検討するために、各成分の濃度が異なる展開用バッファを作製し、これと GeneLine リステリア・モノサイトゲネス テストストリップ(日本ハム)を用いて1×EX Taq Buffer (TaKaRa) で希釈したリステリア・モノサイトゲネス *hly* 遺伝子のPCR増幅産物(25 ng/μl) 及び1×EX Taq Buffer を試験し、15分後イムノクロマトリーダー C10066(浜松ホトニクス, 磐田, 日本)により吸光度を測定した。各成分の濃度と吸光度をプロットし、1×EX Taq Buffer に対する吸光度が5未満かつ、PCR増幅産物に対

する吸光度が高いほど核酸クロマトの反応性が優れていると判断し、展開用バッファの最適化を実施した。これらの測定は全て二重測定で 2 回繰り返し実施された。

1 1. 核酸クロマトの品質管理

核酸クロマトが PCR 産物を半定量的に検出可能であるか、またロット差がどの程度であるかを検討するために評価を行った。まず核酸クロマトストリップを 2 ロット異なる日に作製し、各々 Batch 1 と Batch 2 とした。PCR 増幅産物は O111 RIMD05091865 (*stx1+*)、O157 RIMD05091061 (*stx2+*) のゲノム DNA から PCR で増幅した後、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Düsseldorf, Germany) を用いて精製した。PCR 増幅産物の DNA 濃度は NanoDrop を用いて測定した 280 nm の吸光度から算出した。PCR 増幅産物は 1×EX Taq Buffer を用いて 4.0~0.016 ng/μl まで希釈し、20 μl に調整後、95°C、5 分の denaturation ならびに 4°C で急冷した。調製した PCR 増幅産物 (*stx1*、*stx2*) に 50 μl の展開用バッファ (30w/v% formamide, 5× Denhardt's solution, 4× SSC, 2w/v% PEG2000, 0.095w/v% NaN₃, 1.5w/v% Tween 100, 0.2 mg/ml salmon sperm DNA) を加え測定用の検体とした。調製した各検体に作製した核酸クロマトを挿入し、室温で 15 分インキュベーションした後、イムノクロマトリーダー C10066 (浜松ホトニクス, 浜松, 日本) により吸光度を測定した (n=3)。横軸に PCR 増幅産物の DNA 濃度、縦軸に吸光度の平均値をプロットし 1SD を表すエラーバーを加え、*stx1* 及び *stx2* 各々について用量反応曲線を作成した。これらの測定は全て三重測定で 1 回ずつ実施された。

1 2. 腸管出血性大腸菌及びその他の菌を用いた PCR-核酸クロマト法の評価

72 種類の培養した菌株を用いて、PCR 法-核酸クロマト法の特異性及び検出限界を評価した。検出限界の評価においては既存法である O-157 PCR Screening Set、Cycleave PCR O-157 (VT gene) Screening Kit との比較を実施した。まず、メーカーのプロトコルに従い Wizard ゲノム DNA 精製キットを用いて一晩培養した菌液から DNA 抽出を行った。さらに TaKaRa EX Taq HS (タカラバイオ株式会社) を用いて、*stx1* 及び *stx2* 遺伝子を検出する PCR を実施した。まずプライマー *stx1F* と *stx1R* (それぞれ 0.6 μM)、プライマー *stx2F* と *stx2R* (それぞれ 0.3 μM)、dNTP mixture (0.2 mM)、10 \times Taq バッファー (2 μl)、TaKaRa EX Taq HS (0.5 U)、鋳型 DNA 溶液 (1 μl) と蒸留水 (to 20 μl) を反応用チューブで混合した。次に denaturation (95 $^{\circ}\text{C}$ 、30s)、annealing (60 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s) 及び extension (72 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s) を 45 サイクル行った後、denaturation (95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 m) と冷却 (4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 m) を行った。さらに各菌株のゲノム DNA から増幅した PCR 増幅産物に 50 μL の展開用バッファー (30w/v% formamide, 5 \times Denhardt's solution, 4 \times SSC, 2w/v% PEG2000, 0.095w/v% NaN₃, 1.5w/v% Tween 100, 0.2 mg/ml salmon sperm DNA) を添加した後、反応用チューブにテストストリップを挿入した。混合物は 15 分間反応しながらメンブレン上を移動し、*stx1* 検出ラインとコントロールラインに濃青色が出現した際は *stx1* 陽性、*stx2* 検出ラインとコントロールラインに濃青色が出現した際は *stx2* 陽性、コントロールラインのみに濃青色が出現した際は陰性と判定した (陽性、+; 陰性、-)。これらの測定は全て二重測定で 2 回繰り返し実施された。

1 3. 腸管出血性大腸菌を接種した食品検体を用いた PCR-核酸クロマト法の評価

食品検体 (かいわれ大根、トマト、牛ひき肉、牛レバー) は、過去の腸管出血性大腸菌による食中毒事例ならびに公的機関の研究例から種類を選定し、市販のものを

最長で2日間、4°Cで貯蔵後使用した。腸管出血性大腸菌を希釈する際の食品由来培養液を用意するため、かいわれ大根、トマト、牛ひき肉、牛レバーをそれぞれ25gずつフィルター付ストマッカー用袋（アテクト、大阪、日本）に計量し225mlのmEC培地を加えStomacher400 Circulatorを用いてストマッキングを行った後、42°Cで18時間培養した。一方、食品由来培養液への菌接種のため、血清型O26（IID3005）、O111（RIMD05091865）、O121（RIMD05091859）とO157（RIMD05091061）の4種類のSTECをTSBで37°C、18時間培養した。菌培養液を 10^2 - 10^5 Colony Forming Unit（CFU）/mlまで食品由来培養液で希釈後、エッペンドルフチューブに100 μ lずつ分注し、10,000 \times g、10分間の遠心後、上清を除去した。この際、菌液を接種しない食品由来培養液もコントロールとして同様の操作を行った。沈殿物に85 μ lの50mM NaOHを加え再懸濁後、95°C、10分間加熱した。さらに15 μ lの1M Tris-HCl, pH 7.0を加え震盪攪拌し、10,000 \times g、10分間の遠心分離を行った。この上清を新しいマイクロチューブに移し、開発したベロ毒素遺伝子検出法、O-157 PCR Screening Set、Cycleave PCR O-157（VT gene）Screening Kit、Loopamap Verotoxin typing reagent kit（栄研化学株式会社）に用いる鋳型DNA溶液とした。これらの試験は、自らが開発したベロ毒素遺伝子検出法を除き、製造業者の指示に従って実施した。これらの測定は全て二重測定で2回繰り返し実施された。

1 4. PCR-核酸クロマト法と Real-time PCR（USDA MLG）の性能比較

STX1及びSTX2を産生する大腸菌O157（野生株 wtO157-1）を25gの牛ひき肉にそれぞれ1.0 CFU、0.60 CFU、0.30 CFU、0.075 CFU接種し、ノボビオシン添加mTSBを225ml加えた後、42°Cで15時間培養した。これらの培養液を用いて United States Department of Agriculture Microbiology Laboratory Guidebook（USDA MLG）5B

0.3 に従い DNA 抽出を行った。さらに抽出した DNA を用いて今回開発したペロ毒素遺伝子検出法及び Real-time PCR による試験を行った。Real-time PCR は、Mx3000P Real-Time PCR System (アジレントテクノロジー株式会社, 東京, 日本) を使用した点を除き、USDA (MLG 5B appendix 1.01) のガイドラインに従い実施した。これらの測定は全て五重測定で 2 回繰り返し実施された。

Ⅲ. 結果

1. 抗大腸菌 O111 ポリクローナル抗体の選抜

不活化した 8 株の大腸菌 O111 を用いて、サンドイッチ ELISA を行い PAb の反応性を評価した (図 7)。PAb-3 以外の全ての PAb は、5 株の大腸菌 O111 において 1.0×10^5 CFU/ml 以上の菌数、1 株の大腸菌 O111 (RIMD0509829) において 1.0×10^6 CFU/ml 以上の菌数に対して反応性を示した。この結果から、PAb-1、PAb-2、PAb-4 は PAb-3 より高い力価であることが示唆された。

続いて不活化した 8 株の大腸菌 O111 及び 18 株の非 O111 大腸菌 (10^8 CFU/ml) を用いて、サンドイッチ ELISA を行い PAb の特異性を評価した (表 3)。その結果、PAb-1 は陰性コントロールにおける吸光度が 0.016 に対して大腸菌 O111 における吸光度が 7 株で 3.0 以上、1 株で 1.0 以上と非常に強く反応し、非 O111 大腸菌における吸光度は 9 株で 0.080 (陰性コントロールの 5 倍) 以上、9 株で 0.080 未満となった。また、PAb-2 は陰性コントロールにおける吸光度が 0.018 に対して大腸菌 O111 における吸光度が 6 株で 3.0 以上、1 株で 2.0 以上、1 株で 0.4 以上と強く反応し、非 O111 大腸菌における吸光度は 4 株で 0.090 (陰性コントロールの 5 倍) 以上、14 株で 0.090 未満となった。しかし大腸菌 O91 における吸光度は 0.73 と一定の反応性が見られた。そして PAb-3 は非 O111 大腸菌 18 株全てにおいて吸光度が 0.17 (陰性コントロールの吸光度 0.033 の 5 倍) 以上、PAb-4 は 0.060 (陰性コントロールの吸光度 0.012 の 5 倍) 以上と反応が見られ、特異性が高くなかった。以上より PAb-1 及び PAb-2 が PAb-3 及び PAb-4 より力価及び特異性に優れることが判明した。しかしカットオフラインを陰性コントロールの 5 倍以上の吸光度とした際 PAb-1、PAb-2 ともに特異度が低かった (50%、78%) ため、既報論文 (Crowther JR. 2000) を参考に 2 種

類の抗体を各々固相抗体とビオチン標識抗体に用いて ELISA を行ったところ、陰性コントロールにおける吸光度が 0.015 に対して大腸菌 O111 における吸光度が 7 株で 3.0 以上、1 株で 0.4 以上と強く反応し、非 O111 大腸菌における吸光度は 18 株全てで 0.075 (陰性コントロールの 5 倍) 未満となった。2 種類の抗体を組み合わせることにより特異性を向上させることができたため、大腸菌 O111 検出イムノクロマトテストストリップの構築 (図 8) に際しては、メンブレン上に固相化した捕捉抗体として PAb-1、金コロイド標識抗体として PAb-2 を使用した。

2. 開発した O111 検出イムノクロマト法の特異性

開発したイムノクロマト法の特異性を調べるため、培養された様々な大腸菌 O111 株、非 O111 大腸菌株、及び大腸菌以外の菌株を検体として使用した。結果は、表 4 に要約される。標準株あるいは分離株に関わらず、試験された 8 株の大腸菌 O111 全てにおいて陽性であった。また、血清型 (O1、O6、O7、O8、O9、O10、O16、O18、O25、O26、O45、O91、O101、O103、O121、O139、O141、O145、O149、O157) に関わらず、供試された 55 株の非 O111 大腸菌全てにおいて陰性だった。また供試された大腸菌以外の菌株 22 株 (*Citrobacter freundii*、*Cronobacter*、*Enterobacter aerogenes*、*Enterobacter cloacae*、*Escherichia hermannii*、*Klebsiella oxytoca*、*Klebsiella pneumonia*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Proteus vulgaris*、*Salmonella enteritidis*、*Salmonella typhimurium*、*Salmonella abaeetuba*、*Salmonella anatum*、*Salmonella arizonae*、*Salmonella choleraesuis*、*Salmonella kunzendorf*、*Salmonella tallahassee*、*Salmonella vellore*、*Serratia liquefaciens*、*Serratia marcescens*、*Serratia odorifera*) 全てにおいて陰性であった。これらの結果より、開発したイムノクロマト法が大腸菌 O111 を検出するために十分な感度と特異度を持つことが示唆された。

3. 開発した O111 検出イムノクロマト法の検出感度

開発したイムノクロマト法の検出感度を調べるために、新鮮な培地で培養された大腸菌 O111 (8 株) 純培養液を検体として使用した。結果は、表 5 の通りである。イムノクロマト法の検出限界は、1 株 (wtO111-4) において 5.6×10^5 CFU/ml、6 株 (RIMD 0509829、RIMD 05091865、wtO111-2、wtO111-3、wtO111-5、wtO111-6) において $1.1 \sim 5.0 \times 10^4$ CFU/ml、1 株 (wtO111-1) において 1.8×10^3 CFU/ml であった。また、生菌あるいはオートクレーブによる死菌の状態に関わらず、開発したイムノクロマト法は同等の感度で検出することが可能であった。

4. 大腸菌を接種した食品検体からの O111 検出イムノクロマト法による検出

開発したイムノクロマト法の食品検体から大腸菌 O111 を検出する能力を評価するために、大腸菌 O111 (RIMD0509829) が接種された食品検体 (豚肉、牛肉、鶏肉) を NmEC で 22 時間培養した培養液をイムノクロマト法及び PCR 法のサンプルとして用いた。その結果、いずれの食品においても、イムノクロマト法の検出限界は、培養前の食品中の菌濃度が 1.6×10^0 CFU/25 g という結果 (表 6) となり、PCR と同等の検出限界であった。一方大腸菌 O111 を接種していない食品検体においては、イムノクロマト法と PCR 法のいずれも陰性を示した。従って、開発したイムノクロマト法は PCR 法と遜色ない検出感度で、食品検体から大腸菌 O111 を検出することが可能であった。

5. ベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法の開発

展開用バッファー中の各成分の濃度と PCR 増幅産物を試験した際の吸光度を、それぞれグラフの横軸と縦軸にプロットし展開用バッファーの検討を行った (図 9)。そ

の結果、Formamide 濃度は 25~35w/v%、SSC 緩衝液は 4~6×、Denhardt's 溶液は 5~10×、Tween20 は 0.2~2w/v%、PEG2000 は 1~3w/v%において、1×EX Taq Buffer に対する吸光度が 5 未満かつ PCR 増幅産物 (25 ng/μl) に対する反応性が高くなる傾向が見られた。さらに各成分が全て溶解するよう展開用バッファーを検討し、組成を 30w/v% formamide, 5× Denhardt's solution, 4× SSC, 2w/v% PEG2000, 0.095w/v% NaN₃, 1.5w/v% Tween 100, 0.2 mg/ml salmon sperm DNA とした。

最適化した展開用バッファーを用いて、PCR により増幅された *stx1* 及び *stx2* を半定量的に検出できるよう核酸クロマト法を開発した (図 10)。*stx1* 及び *stx2* の一本鎖 DNA 断片が核酸クロマトテストストリップのコンジュゲートパッドに浸潤する際、着色ラテックス微粒子を標識された相補オリゴヌクレオチド (*stx1*1 及び *stx2*1) と結合する。一本鎖 DNA-着色ラテックス微粒子は毛細管現象で浸潤していき、核酸クロマトストリップの上流と中間に固相された BSA 標識 *stx1*m 及び BSA 標識 *stx2*m に捕捉される。一本鎖 DNA と結合しなかった着色ラテックス微粒子標識 *stx2*1 は核酸クロマトストリップの下流に固相された BSA 標識 anti-*stx2*1 に捕捉される。展開用バッファーは、バックグラウンドを減少させるため非結合着色ラテックス標識オリゴヌクレオチドを洗い流し、結合ラテックス標識オリゴヌクレオチドを集積させることでその大きさと吸光度を上昇させる。図 11 の結果から、増幅した *stx1* 及び *stx2* を検出するために開発及び最適化された核酸クロマトテストストリップは、これらを半定量的に検出できることが示唆された。

6. 開発したベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法の特異性

開発したベロ毒素遺伝子検出法の特異性を調べるため、培養した様々な STEC 株、非 STEC 大腸菌株、及び大腸菌以外の細菌株をゲノム DNA 抽出の検体として使用し

た。結果を表 7 に集約した。血清型 (O26、O45、O91、O103、O111、O121、O145 と O157) に関わらず、供試された 45 株の STEC (STX1 産生、STX2 産生、STX1 と STX2 産生) 全てにおいて *stx1* と *stx2* の区別をすることが可能だった。また供試された 14 株の非 STEC (O1、O6、O25、O26、O111、O157、その他) 全てにおいて陰性であった。さらに供試された大腸菌以外の菌株 13 株 (*Citrobacter freundii*、*Cronobacter*、*Enterobacter aerogenes*、*Enterobacter cloacae*、*Escherichia hermannii*、*Klebsiella pneumonia*、*Klebsiella oxytoca*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Proteus vulgaris*、*Serratia liquefaciens*、*Serratia marcescens*、*Serratia odorifera*) 全てにおいて陰性であった。これらの結果より、開発したベロ毒素遺伝子検出法が STEC を検出するために十分な特異性を持つことが示唆された。

7. 開発したベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法の検出感度

開発したベロ毒素遺伝子検出法の検出感度を調べるために、我々は新鮮な培地で培養した 9 株の STEC をゲノム DNA 抽出の検体として使用した。結果は、表 8 に要約される。開発したベロ毒素遺伝子検出法の検出限界は、4 株の STEC (RIMD05091876、IID3005、RIMD05091859、RIMD 05091061) において 1 pg/μl である一方、5 株 (RIMD05091858、RIMD05091855、RIMD05091878、RIMD05091865、RIMD05091870) において 0.1 pg/μl であった。一方、既存法である O-157 PCR Screening Kit と Cycleave PCR O-157 (VT gene) Screening Kit の検出限界はそれぞれ 10-100 pg/μl と 0.1-1 pg/μl であった。開発したベロ毒素遺伝子検出法は、Cycleave PCR O-157 (VT 遺伝子) Screening Kit と同程度の検出感度で、STEC 培養液から抽出したゲノム DNA を検出することが可能であった。

8. STEC を接種した食品検体からの開発したベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法による検出

開発したベロ毒素遺伝子検出法の食品検体中の STEC 検出能を評価するために、O26 (IID3005)、O111 (RIMD05091865)、O121 (RIMD05091859)、O157 (RIMD05091061) の STEC 4 株をそれぞれ食品検体 (かいわれ大根、トマト、牛ひき肉、牛レバー) に接種し、mEC 培地で 22 時間培養した。培養後の培養液から抽出した DNA を遺伝子検出法の鋳型 DNA として用いた。牛ひき肉における RIMD05091859 の検出限界は培養後の STEC 濃度が 10^2 CFU/ml のときであった。牛レバーにおける全ての STEC 株、かいわれ大根における IID3005、牛ひき肉における 3 株 (IID3005、RIMD05091865 と RIMD05091061) の検出限界は、培養後の STEC 濃度が 10^3 CFU/ml のときであった。かいわれ大根における 3 株 (RIMD05091865、RIMD05091859 と RIMD05091061)、トマトにおける RIMD05091859 の検出限界は、培養後の STEC 濃度が 10^4 CFU/ml のときであった。トマトにおける 3 株 (IID3005、RIMD05091865 と RIMD05091061) の検出限界は、培養後の STEC 濃度が 10^5 CFU/ml のときであった。一方、食品検体全てにおける市販の Real-time PCR の検出限界は、培養後の STEC 濃度が 10^2 - 10^5 CFU/ml のときであった。また、菌を接種していない食品検体は、開発したベロ毒素遺伝子検出法と市販の Real-time PCR いずれにおいても STEC 陰性の結果となった。従って本研究においては、開発したベロ毒素遺伝子検出法の食品検体からの STEC 検出能は市販の Real-time PCR と同程度であった (表 9)。

9. 開発したベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法と Real-time PCR (USDA MLG) との比較

開発したベロ毒素遺伝子法の食品中の STEC 検出能を USDA MLG 記載の Real-time PCR 法と比較するために、*stx1* 及び *stx2* を保有している大腸菌 O157 を牛ひき肉 5 検体ずつにそれぞれ 1 colony forming unit (CFU)、0.6 CFU、0.3 CFU、0.075 CFU 接種し、mTSB で 15 時間培養した培養液から抽出した DNA を鋳型 DNA として用いた。1 CFU、0.6 CFU、0.3 CFU、0.075 CFU を接種した牛ひき肉における開発したベロ毒素遺伝子検出法の陽性率は、それぞれ 100%、40%、60%、20%であった。また、1 CFU、0.6 CFU、0.3 CFU、0.075 CFU を接種した牛ひき肉における Real-time PCR 法の陽性率は、100%、40%、40%、20%であった。一方、菌を接種していない牛ひき肉は、開発したベロ毒素遺伝子検出法と USDA MLG 記載の Real-time PCR 法いずれにおいても STEC 陰性と判定された。従って、開発したベロ毒素遺伝子検出法は、USDA MLG 記載の Real-time PCR 法 と同等の検出能を示した (表 10)。

IV. 考察

1. 開発した O111 検出イムノクロマト法について

本研究においては、食品中の大腸菌 O111 の迅速・簡便な検査法としてイムノクロマト法を開発することを目的とし、免疫クロマトグラフィー技術と大腸菌 O111 細胞表面に反応する抗体を組み合わせることによりイムノクロマト法を開発した。

日本における通常の大腸出血性大腸菌の検査方法（大腸出血性大腸菌 O26、O111、O157 の検査法について）を実施するには、煩雑な操作と 4~5 日間の検査期間を要する。中でも *stx* 遺伝子検出試験で陽性となった検体について必要な操作が、免疫磁気ビーズ法、分離培養法、血清型別試験、生化学的性状試験、VT 確認試験と非常に多く、一部の検査施設を除いて実施する事が難しいのが実情である。このため食品工場等多くの検査施設でも実施可能な O26、O111、O157 の検出法が必要であるが、これまで O111 の簡便迅速検査キットは開発されていなかった。そこで我々は誰でも簡単に使える O111 検出キットの開発を目指して本研究に取り組んだ。

一方、イムノクロマト法は大きく分けて 2 つの過程から成り立つ。最初の過程は、検出対象と抗体を感作した金コロイド試薬との免疫複合体を形成させる反応で、言い換えるならば、検出対象を染色する過程である。次はこれを検出する過程で、免疫複合体を含むサンプルがニトロセルロース膜中を拡散する過程で、その途中に固定された抗体に捕捉される反応である。捕捉された対象はすでに染色されているため、陽性の場合には抗体が固定された場所に線が現れ、他の試験紙同様に **dip and read** で判定できる簡便さと迅速性を併せ持った方法である。

開発したイムノクロマト法は、供試された 8 株の大腸菌 O111 に対して全て陽性反応を示し、77 株の大腸菌 O111 以外の細菌に対して全て陰性反応を示した。この結

果からイムノクロマト法に用いた PAb が既報論文 (Brade H et al. 1999) のように大腸菌 O111 に特異的な O 抗原多糖類を認識しているため、特異的に検出できた可能性が示唆された。しかし今回の試験で使用されていない *Salmonella* O35 は大腸菌 O111 と化学的に同一な構造を持つことが報告 (Bastin DA et al. 1991; Kenne L et al. 1983; Ørskov F et al. 1992) されており、開発したイムノクロマト法が *Salmonella* O35 に交差反応を起こす可能性があるため、今後さらなる検証が必要である。また、開発したイムノクロマト法の検出限界は 1.8×10^3 から 5.6×10^5 CFU/ml と、同じ血清型 O111 においても菌株によって検出感度が大きく異なることがわかった。これは既に報告されている (Clark CG et al. 1995) ように、イムノクロマト法に用いた PAb が反応するエピトープの産生量が株により異なることを示唆しているのかもしれない。さらに、供試された大腸菌 O111 の培養液が生菌かオートクレーブされた死菌であるかにかかわらず、ほぼ同等の感度で検出可能であったことから、開発したイムノクロマト法が検査室において培養液から直接検査することも安全のためオートクレーブ後に検査することも可能であるということが明らかになった。最後に、食肉検体中の大腸菌 O111 の菌数が極めて少ない (25 g の食品あたり $1.6 \times 10^0 \sim 1.6 \times 10^1$ CFU) 場合でも、NmEC で 42°C、22 時間培養し十分に増菌されていれば、信頼性の高い PCR (Bastin DA et al. 1995; Madic J et al. 2011) と同程度の検出率で検出が可能であることが示された。これは 1993 年に西アメリカの複数の州においてアウトブレイクが発生した際、原因食材が菌数 0.3~15 CFU/g の牛ひき肉や 0.3~0.4 CFU/g のサラミだった事例 (Meng J et al. 2013) から考えても、十分な検出感度であることが示唆された。豚肉及び鶏肉において 1.6×10^0 の O111 を接種した検体 1 と 2 で結果が異なったのは、

検出感度の高い PCR 法でも同様の結果となったことから、接種菌数が少なすぎたため菌が増殖した検体と増殖しなかった検体が発生したことが原因と考えられる。

また、検査現場においては、安全上の問題から食品を培養後オートクレーブしたものからも大腸菌 O111 を検出する必要があると考えたため、本研究では抗原に対して様々な結合が可能で抗原の変性に強い PAb を用いてイムノクロマト法を開発したが、キットとしては次の PAb を作製する際のロット差ならびに開発費が課題である。今後は、同等の性能を有するキットの作製に向けて、良好な性能を持つ PAb を安定的に取得する方法や複数の良好な性能を持つモノクローナル抗体を最適に組み合わせる方法などの検討が必要であると考えられる。

今回開発した大腸菌 O111 検出イムノクロマト法を用いて腸管出血性大腸菌の検査を行う場合、mEC 増菌培養液を直接検査することができるため、検査開始後 24 時間以内に結果を得られる。また、培養法あるいは感度が高いと言われる PCR と比較しても、イムノクロマトテストストリップを増菌培養液に dip するだけの操作であり、多検体を素早く処理する上でも非常に有用と考えられる。また、Real-time PCR のように高価な機器を必要としない。これらの利点のため、今後さらなる評価やフィールド試験が必要であるものの、開発したイムノクロマト法は食品製造工場などの小規模施設においても容易に実施可能な方法であると考えられた。

2. 開発したベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法について

我々は、STEC を検出するための迅速及び簡便なベロ毒素遺伝子検出法を開発した。アメリカでは *eae* 及び *stx* 遺伝子が共に陽性的の場合に STEC 陽性と判定されるが、*eae* 遺伝子を保有しない大腸菌も毒性を有し日本では *stx* 遺伝子のみが陽性でも STEC 陽性と判定されることから、本研究におけるターゲット遺伝子は *stx* 遺伝子とした。食

品中の STEC を日常的にスクリーニングすることは食品衛生において重要であるが、ELISA、Real-time PCR、LAMP といった既存の方法は熟練した技術及び多くのコストが必要となるため適していなかった。例えば、既報の ELISA (Parma YR et al. 2012) は複数の操作とマイクロプレートリーダーを必要とする上、STEC 株の検出限界が高いという課題があり (精製された Stx2 において 115 ng/ml)、LAMP は Eiken GENOME SITE に記載の通りレバー類の食品の検査には使用できない。一方、簡便、迅速で安価な方法である PCR 及び核酸クロマト法は日常的なスクリーニングに適しているものの、Real-time PCR に近い性能を有するものがなかった。本研究で開発された核酸クロマトテストストリップの性能 (その前に PCR 反応ステップを伴う) は、システムの汎用性や信頼性が高く、2つの大腸菌の毒性に関わる遺伝子 (*stx1* 及び *stx2*) を 2 時間で特異的に検出可能であることを示した。本研究では、開発したイムノクロマト法を用いた試験において STEC 45 株は全て陽性判定、非 STEC 14 株及び大腸菌以外の菌株 13 株は全て陰性判定であった。この結果は、本研究において開発したプライマー及びプローブが *stx1* 及び *stx2* 遺伝子の特異的な配列を認識していることを示唆しており、開発したベロ毒素遺伝子検出法が STEC を特異的に検出できることを示している。また、本研究において、迅速な PCR 反応と核酸クロマトテストストリップの利用が、その他の迅速法が有する大部分の要件を持ち合わせていることが示唆されている。それは非常に優れた検出感度と特異性、信頼性を有し、異なる大腸菌毒性因子 (*stx1* と *stx2*) の正しい区別が可能である。この方法は従来の優れた分析法である Real-time PCR との比較においても、ランニングコスト (テストストリップ、試薬) が低く、必要な機器が 1 種 (サーマルサイクラー) である点で明らかに有利である。この方法が有するその他の利点は、核酸クロマトストリップの製

造が容易で、品質保持期間が長く、一般環境下での保存が可能で、非常に使いやすいという点である。

PCRは一般的に25から35サイクルにて実施され(Kainz P. 2000)、過度に多いサイクル数は非特異増幅産物を増加させる。しかし開発した遺伝子検出法においては、核酸クロマトストリップに用いるプローブにより特異性を補完することができるため、PCRを45サイクルにて実施することが可能となった。これによりアガロースゲル電気泳動では非特異増幅産物のバンドが見られるものの、核酸クロマトストリップにより正しい判定が可能となり検出限界も改善した。開発した遺伝子検出法の本研究における STEC 株のゲノム DNA 量検出限界は 0.1-1.0 pg/test と株により若干の差が見られた。この原因として既報 (Fuller CA et al. 2011) のように STEC 株の遺伝子配列が異なっていたことが考えられうる。さらに食品検体(かいわれ大根、トマト、牛ひき肉、牛レバー)の培養液中に存在する STEC が極めて少ない ($10^2 \sim 10^5$ CFU/ml) 場合でも、開発した遺伝子検出法が Real-time PCR (Ministry of Health and Welfare. 2012) に匹敵する検出能であることを菌接種試験が示しており、一方で菌を接種していない食品検体においては STEC 陰性と判定することが可能であった。トマトの培養液からの検出は他の食品検体の培養液からの検出に比べて検出限界が高いが、培養後の菌濃度が 10^5 CFU/ml で検出可能であり、培養前の菌濃度が低くても培養後に到達する菌濃度であることから実用には問題無いと考えられる。また、Real-time PCR も同様の傾向がみられることから、原因は PCR の反応系であることが考えられ、今後の検討が必要である。そして、開発された核酸クロマトストリップは非常に優れた感度と特異性を持ち、得られる判定結果は対照として使われた方法 (Real-time PCR) と非常に良く一致していた。両者の試験方法を比較すると、多くの

場合 Limit of detection (LOD) において Real-time PCR の方が PCR と核酸クロマト法の組み合わせより優れており、ワンステップで検出が可能であるという利点がある。しかしながら、Real-time PCR には以下の欠点がある。第1は機器の価格であり、第2は結果の理解や解釈には知識が必要であるということである。そして、第3は整備された検査室の設置が必要ということである。結論として、核酸クロマト法の技術を利用することで Real-time PCR より多項目の検査が可能であり、検査室の設備に関して実質的な必要事項が少なく、1試験あたりの価格が低くなる。更なる評価やフィールド試験が必要であるものの、今回開発したベロ毒素遺伝子検出法は Real-time PCR と異なり、特定の機器を必要とせず小規模の研究施設でも容易に実施可能であるため、食品企業における日常的なスクリーニング検査に非常に適していると考えられる。

V. 結論

食品検体に含まれる腸管出血性大腸菌 (STEC) を簡便・迅速に検出できる大腸菌 O111 検出イムノクロマト法とベロ毒素遺伝子検出法の開発及び評価を行った。その結果、開発した 2 種類の方法はいずれも、既存の方法と比べて遜色ない感度及び特異性を持つ方法であることが明らかになった。また、開発した 2 種類の方法はいずれも腸管出血性大腸菌を接種した食品検体からの検出能も高く、食品からの腸管出血性大腸菌の検査方法の代替法としても実用的であることが示唆された。さらに、既存の遺伝子検出法や培養法と比べ簡便・迅速な方法であるため、食品加工工場等におけるルーチンスクリーニングにも非常に有用であると考えられる。

謝辞

本研究にご協力いただいた日本ハム株式会社株式会社中央研究所の皆様、共同研究実施施設のスタッフの皆様に深く御礼申し上げます。本研究に際し、多くのご指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻発達医科学教室の牛島廣治先生、水口雅先生に心より感謝申し上げます。また、貴重なご助言を下さいました教室の皆様に感謝いたします。

引用文献

- Albretsen, C., B. I. Haukanes, R. Rasland, and K. Kleppe. 1988. Optimal conditions for hybridization with oligonucleotides: a study with myc-oncogene DNA probes. *Anal Biochem*, 170: 193-202.
- Aldus, C. F., A. van Amerongen, R. M. Ariens, M. W. Peck, J. H. Wichers, and G. M. Wyatt. 2003. Principles of some novel rapid dipstick methods for detection and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol*, 95: 380-389.
- Alocilja E. C. and S. M. Radke. 2003. Market analysis of biosensors for food safety. *Biosens Bioelectron*, 18: 841-846.
- Baumner, A. J., B. Leonard, J. McElwee, and R. A. Montagna. 2004. A rapid biosensor for viable *B. anthracis* spores. *Anal Bioanal Chem*, 380: 15-23.
- Bastin, D. A., L. K. Romana, and P. R. Reeves. 1991. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* K-12 of the *rfb* gene cluster determining the O antigen of an *E. coli* O111 strain. *Mol Microbiol*, 5: 2223-2221.
- Bastin, D. A. and P. R. Reeves. 1995. Sequence and analysis of the O antigen gene (*rfb*) cluster of *Escherichia coli* O111. *Gene*, 164: 17-23.
- Bellin T., M. Pulz, A. Matussek, HG. Hempen, and F. Gunzer. 2001. Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes. *J Clin Microbiol*, 39:370-374.
- Bettelheim, K. A. 2007. The non-O157 Shiga toxicogenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. *Crit Rev Microbiol*, 33: 67-87.
- Beutin, L., S. Jahn, and P. Fach. 2009. Evaluation of the 'GeneDisc' real-time PCR system for detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O26, O103, O111, O145 and O157 strains according to their virulence markers and their O- and H-antigen-associated genes. *J Appl Microbiol*, 106: 1122-1132.

Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., and Bauwens, A., Peters, G., and Karch, H. 2011. Characterization of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis*, 11: 671-676.

Blais, B. W., J. Bosley, A. Martines-Perez, and M. Popela. 2006. Polymyxin-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Escherichia coli* O111 and O26. *J Microbiol Methods*, 65: 468-475.

Blake, R. D. and S. G. Delcourt. 1996. Thermodynamic effects of formamide on DNA stability. *Nucleic Acids Res*, 24: 2095-2103.

Blažková', M., M. Koets, P. Rauch, and A. van Amerongen. 2009. Development of a nucleic acid lateral flow immunoassay for simultaneous detection of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in food. *Eur Food Res Technol*, 229: 867-874.

Bonnet, R., B. Souweine, G. Gauthier, C. Rich, V. Livrelli, J. Sirot, B. Joly, and C. Forestier. 1998. Non-O157: H7 Stx2- producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. *J Clin Microbiol*, 36: 1777-1780.

Brade, H., S. M. Opal, S. N. Vogel, and D. C. Morrison. 1999. Endotoxin in Health and Disease. Marcel Dekker, Inc., New York.

Brooks, J. T., E. G. Sowers, J. G. Wells, K. D. Grenne, P. M. Griffin, R. M. Hoekstra, and N. A. Strockbine. 2005. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J Infect Dis*, 192:1422-1429.

Brunder, W., H. Schmidt, M. Frosch, and H. Karch. 1999. The large plasmids of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. *Microbiology*, 145: 1005-1014.

Capps, K. L., E. M. McLaughlin, S. W. Murray, C. F. Aldus, G. M. Wyatt, M. W. Peck, A. van Amerongen, R. M. Ariens, J. H. Wichers, C. L. Baylis, D. R. Wareing, and F. J. Bolton.

2004. Validation of three rapid screening methods for detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* in foods: interlaboratory study. *JAOAC Int*, 87: 68-77.

Carter, D. J. and R. B. Cary. 2007. Lateral flow microarrays: a novel platform for rapid nucleic acid detection based on miniaturized lateral flow chromatography. *Nucleic Acids Res*, 35: e74.

Clark, C. G., S. Johnson, and R. P. Johnson. 1995. Further characterization of a monoclonal antibody reactive with *Escherichia coli* O157: H7. *J Med Microbiol*, 43: 262-269.

Crowther, J. R. 2000. The ELISA guidebook. Humana Press New York.

Duncan, R. J. S., P. D. Weston, and R. Wrigglesworth. 1983. A new reagent which may be used to introduce sulfhydryl groups into proteins, and its use in the preparation of conjugates for immunoassay. *Anal Biochem*, 132: 68.

EFSA (European Food Safety Authority) . 2009. Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food) on request of EFSA. Summary. *EFSA J*, 7: 1366.

Fuller, C. A., C. A. Pellino, M. J. Flagler, J. E. Strasser, and A. A. Weiss. 2011. Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. *Infect Immun*, 79: 1329-1337.

Gordon, J., and G. Michel. 2008. Analytical sensitivity limits for lateral flow immunoassays. *Clin Chem*, 54: 1250-1251.

Griffin, P. M. and R. V. Tauxe. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev*, 13: 60–98.

Gyles, C. L. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci*, 85 (Suppl. 13) : E45-E62.

Hara-Kudo Y, J. Nemoto, K. Ohtsuka, Y. Segawa, K. Takatori, T. Kojima, and M. Ikedo. 2007. Sensitive and rapid detection of Vero toxin-producing *Escherichia coli* using loop-mediated isothermal amplification. *J Med Microbiol*, 56: 398-406.

Ivnitski, D., I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, and E. Wilkins. 1999. Flow-through immunofiltration assay system for rapid detection of E. coli O157:H7. *Biosens Bioelectron*, 14: 599-624.

Johnson, K. E., Thorpe, C. M., and Sears, C. L. 2006. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis*, 43: 1587-1595.

Kainz, P. 2000. The PCR plateau phase-towards an understanding of its limitations. *Biochem Biophys Acta*, 1494: 23-27.

Kalogianni, D. P., I. K. Litos, T. K. Christopoulos, and P. C. Ioannou. 2009. Dipstick-type biosensor for visual detection of DNA with oligonucleotide-decorated colored polystyrene microspheres as reporters. *Biosens Bioelectron*, 24: 1811-1815.

Kalogianni, D. P., S. Goura, A. J. Aletras, T. K. Christopoulos, M. G. Chanos, M. Christofidou, A. Skoutelis, P. C. Ioannou, and E. Panagiotopoulos. 2007. Dry reagent dipstick test combined with 23S rRNA PCR for molecular diagnosis of bacterial infection in arthroplasty. *Anal Biochem*, 361: 169-175.

Karmali, M. A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 2: 15-38.

Kawatsu, K., M. Ishibashi, and T. Tsukamoto. 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.

- Kenne, L., B. Lindberg, E. Söderholm, D. R. Bundle, and D. W. Griffith. 1983. Structural studies of the O-antigens from *Salmonella greenside* and *Salmonella adelaide*. *Carbohydr Res*, 111: 289-296.
- Lin, Z., H. Kurazono, S. Yamasaki, and Y. Takeda. 1993. Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol*, 37: 543-548.
- Litos, I. K., P. C. Ioannou, T. K. Christopoulos, J. Traeger-Synodinos, and E. Kanavakis. 2009. Multianalyte, dipstick-type, nanoparticle-based DNA biosensor for visual genotyping of single-nucleotide polymorphisms. *Biosens Bioelectron*, 24: 3135-3139.
- Madic, J., C. Peytavin de Garam, N. Vingadassalon, E. Oswald, P. Fach, E. Jamet, and F. Auvray. 2010. Simplex and multiplex real-time PCR assays for the detection of flagellar (H-antigen) fliC alleles and intimin (eae) variants associated with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and O157:H7. *J Appl Microbiol*, 109: 1696-1705.
- Madic, J., N. Vingadassalon, C. P. de Garam, M. Marault, F. Scheutz, H. Brugère, E. Jamet, and F. Auvrya. 2011. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28, and O157:H7 in raw-milk cheeses by using multiplex real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*, 77: 2035-2041.
- Mathusa, E. C., Chen, Y., Enache, E., and Honts, L. 2010. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *J Food Prot*, 73: 1721-1736.
- Mellmann, A., Fruth, A., Friedrich, A. W., Wieler, L. H., Harmsen, D., Werber, D., Middendorf, B., Bielaszewska, M., and Karch, H. 2009. Phylogeny and disease association of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91. *Emerg Infect Dis*, 15: 1474-1477.

Meng, J., LeJeune, J. T., Zhao, T., and Doyle, M. P. 2013. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Ch 12 In: Doyle, M. P., and Beuchat, L. R. (eds) Food microbiology: Fundamentals and frontiers. 4th ed, ASM Press, Washington D.C., 287–309.

Mens, P. F., A. van Amerongen, Sawa, P., Kager, P. A., and Schallig, H. D. 2008. Molecular diagnosis of malaria in the field: development of a novel 1-step nucleic acid lateral flow immunoassay for the detection of all 4 human *Plasmodium spp.* and its evaluation in Mbita, Kenya. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 61: 421-427.

Ministry of Health and Welfare, Japan. 2012. Detection Method for Enterohemorrhagic *E. coli* O26, O111 and O157. Annex of Notice Syoku-An-Kan No. 1217-3. Available at: <http://www.mhlw.go.jp/topics/yunyu/other/2012/dl/121217-03.pdf>. Accessed 17 December 2012 (in Japanese).

Nataro, J. P. and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 11: 142-201. *Erratum in: Clin Microbiol Rev*, 11: 403.

Nielsen, E. M., and M. T. Andersen. 2003. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J Clin Microbiol*, 41:2884-2893.

Ngom, B., Y. Guo, X. Wang, and D. Bi. 2010. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Anal Bioanal Chem*, 397: 1113-1135.

Oku, Y., K. Kamiya, H. Kamiya, Y. Shibahara, T. Ii, and Y. Uesaka. 2001. Development of Oligonucleotide lateral-flow immunoassay for multi-parameter detection. *J Immun Methods*, 258: 73-84.

Ørskov, F., and I. Øskov. 1992. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *J Microbiol*, 38: 699-704.

Parma, Y. R., P. A. Chacana, P. M. A. Lucchesi, A. Roge, C. V. Granobles Velandia, A. Krüger, A. E. Parma, and M. E. Fernández-Miyakawa. 2012. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using chicken egg yolk IgY antibodies. *Front Cell Infect Microbiol*, 2: 84-91.

Paton, A. W. and J. C. Paton. 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx₁, stx₂, eae A, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb_{O111}, and rfb_{O157}. *J Clin Microbiol*, 36: 598-602.

Paton, A. W., M. C. Woodrow, R. M. Doyle, J. A. Lanser, and J. C. Paton. 1999. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113: H21 strain lacking eae responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol*, 37: 3357-3361.

Paton, J. C. and A. W. Paton. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev*, 11: 450-479.

Posthuma-Trumpie, G. A., J. Korf, and A. van Amerongen. 2009. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem*, 393: 569-582.

R. Montagna, and R. Durst. 1996. Rapid method for visual identification of specific DNA sequences based on DNA-tagged liposomes. *Clin Chem*, 42: 1206-1209.

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L., and Griffin, P. M. 2011. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerg Infect Dis*, 17: 7-15.

Schaffzin, J. K., Coronado, F., Dumas, N. B., Rood, T. P., Halse, T. A., Schoonmaker-Bopp, D. J., et al 2012. Public health approach to detection of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: summary of two outbreaks and laboratory procedures. *Epidemiol Infect*, 140:283-289.

Tokarsky, O. and D. L. Marshall. 2008. Immunosensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 - perspectives for use in the meat processing industry. *Food Microbiol*, 25: 1-12.

U. S. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service. 2012. Primer and probe sequences and reagent concentrations for non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) real-time PCR assay. Microbiology Laboratory Guidebook. Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science, USDA, Athens, GA. Available at: http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_5B_Appendix_1_01.pdf. Accessed 1 November 2013.

U. S. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service. 2012. Detection and Isolation of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) from Meat Products. Chapter 5B. 03, Microbiology Laboratory Guidebook. Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science, USDA, Athens, GA. Available at: <http://www.fsis.usda.gov/shared/PDF/MLG-5B.pdf>. Accessed 21 April 2014.

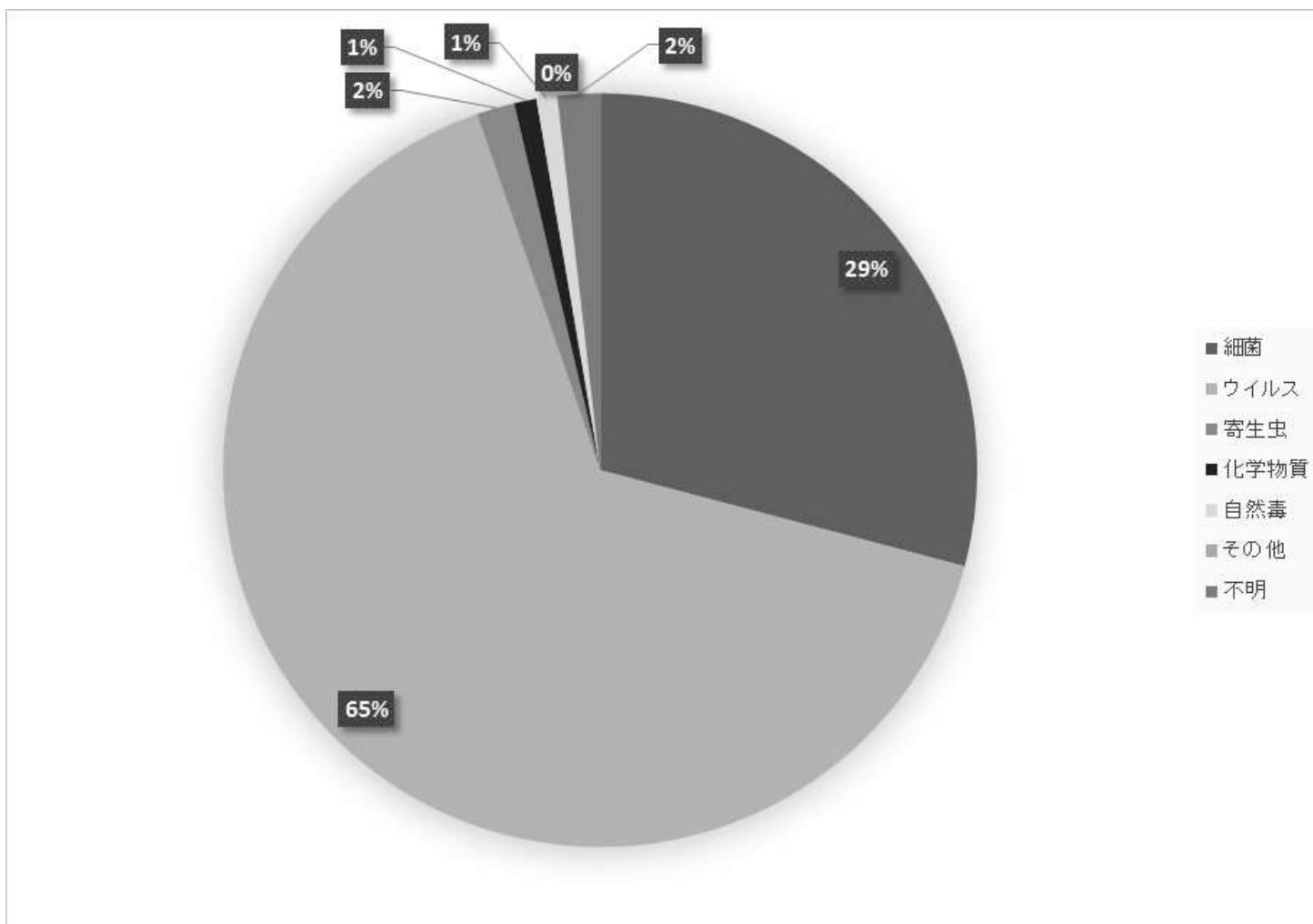


図1 平成25年 病因物質別食中毒発生状況

出所) 厚生労働省 過去の食中毒発生状況 平成25年(2013年)食中毒発生状況 ウェブサイト

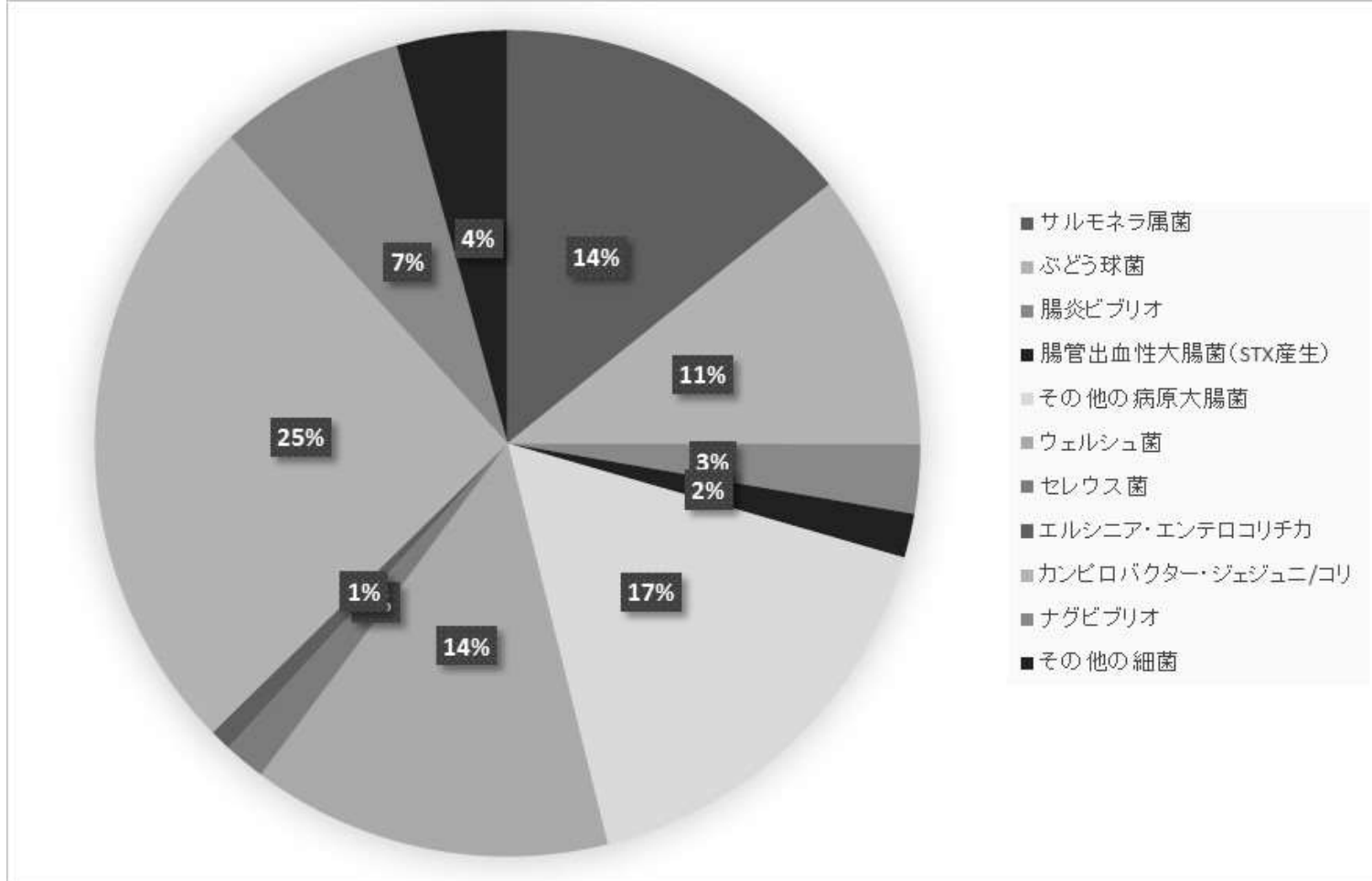


図2 平成25年 細菌別食中毒発生状況

出所) 厚生労働省 過去の食中毒発生状況 平成25年(2013年)食中毒発生状況 ウェブサイト

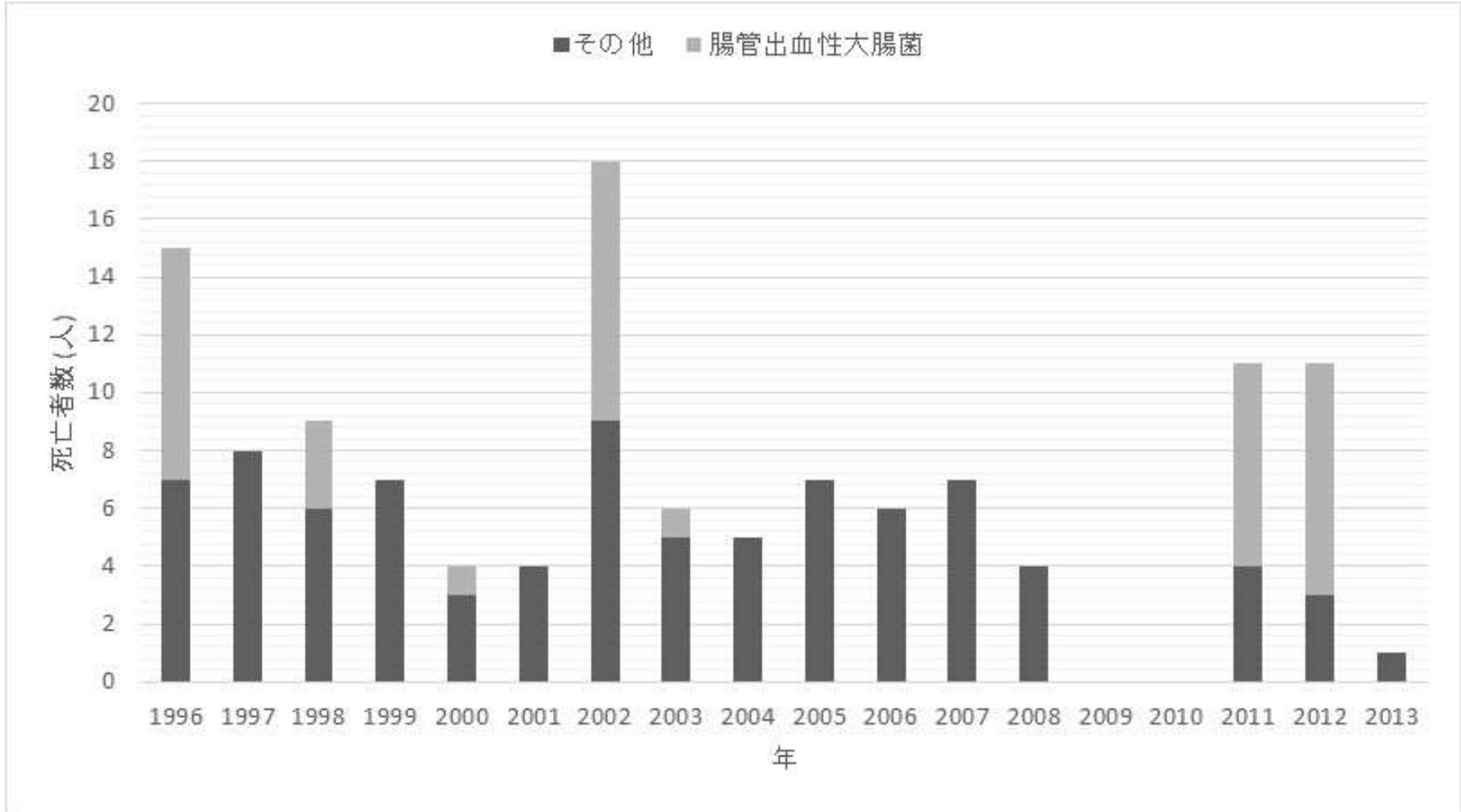


図3 食中毒による死亡者数の推移

出所) 厚生労働省 過去の食中毒発生状況 平成25年(2013年)食中毒発生状況 ウェブサイト

食品からの腸管出血性大腸菌O26, O111, O157検査法

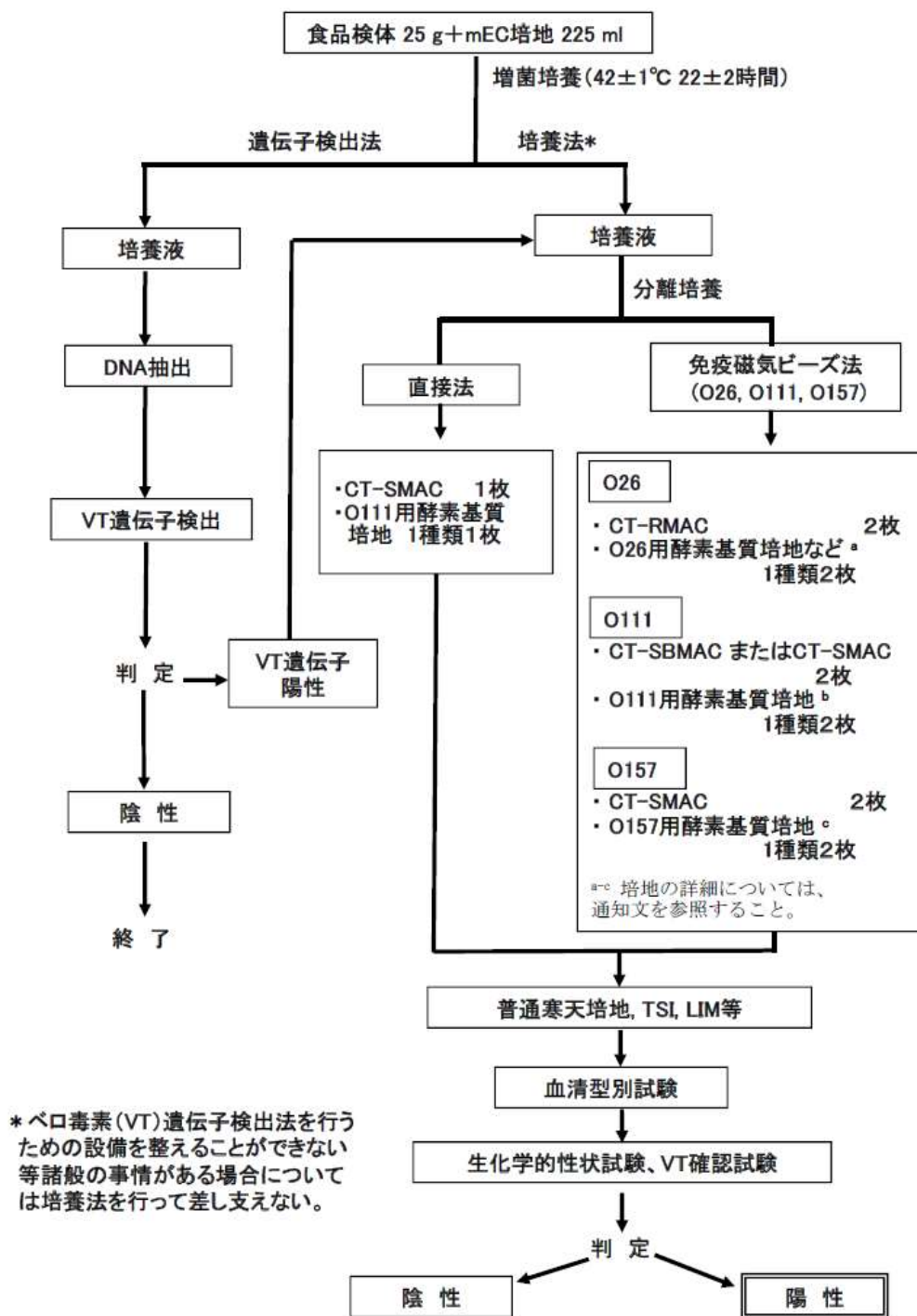
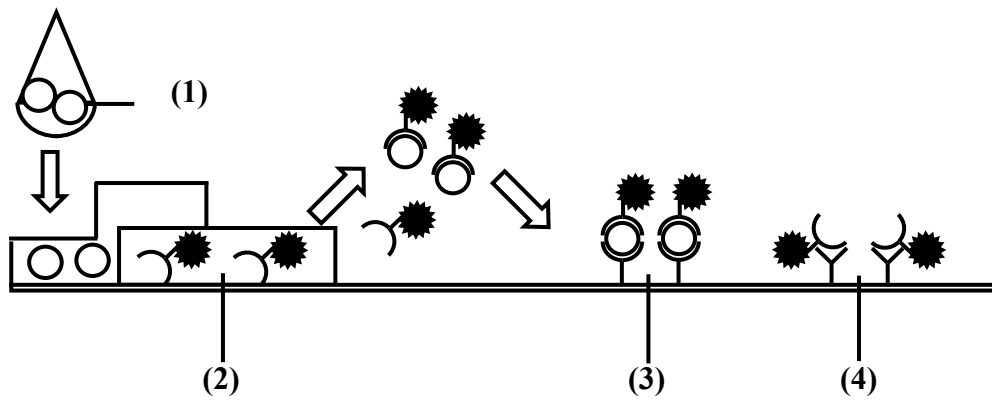


図4 食品からの腸管出血性大腸菌 O26、O111、O157 検査フローチャート

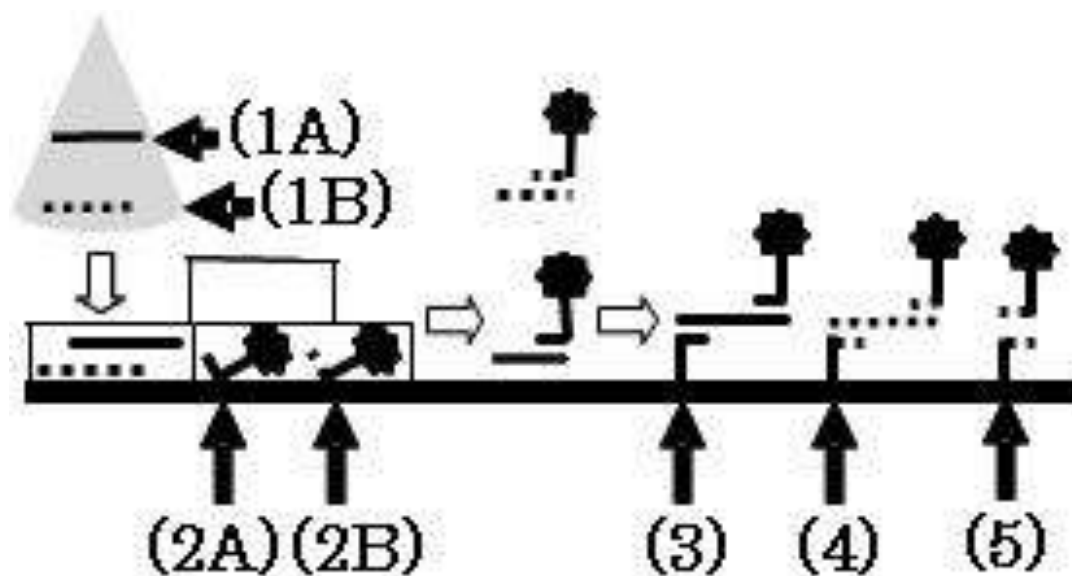
出所) 厚生労働省 食安監発 1217 第1号



- (1) 試料溶液中の大腸菌 O111
- (2) 金コロイド標識抗大腸菌 O111 抗体
- (3) 固相化された抗大腸菌 O111 抗体
- (4) 固相化された抗ウサギ免疫グロブリン抗体

図5 開発した大腸菌 O111 検出イムノクロマトの検出原理

出所) NHイムノクロマト O111 (日本ハム株式会社, 大阪, 日本) 《取扱説明書》



- (1A) stx1 増幅産物
- (1B) stx2 増幅産物
- (2A) 着色ラテックス標識 stx1
- (2B) 着色ラテックス標識 stx2
- (3) 固相化された stx1m
- (4) 固相化された stx2m
- (5) 固相化された anti-stx2

図6 開発したベロ毒素遺伝子検出核酸クロマトの検出原理

出所) GeneLine ベロ毒素プライマーミックス/テストストリップ《取扱説明書》

テストストリップの試料滴下部に展開用バッファーと混合した PCR 反応液を含浸させると、ラテックス標識プローブ (2A、2B) が溶解し、試験溶液中の腸管出血性大腸菌由来増幅遺伝子 (1A、1B) と複合体を形成する。形成された複合体は毛細管現象により移動し、stx1 テストラインに固定化された stx1 検出プローブ (3)、stx2 テストラインに固定化された stx2 検出プローブ (4) に捕捉され、ラテックスによる青黒色のラインが出現する。また、余剰のラテックス標識プローブ (2B) はコントロールライン用プローブ (5) に捕捉され、コントロールライン出現位置に青黒色のラインを形成する。

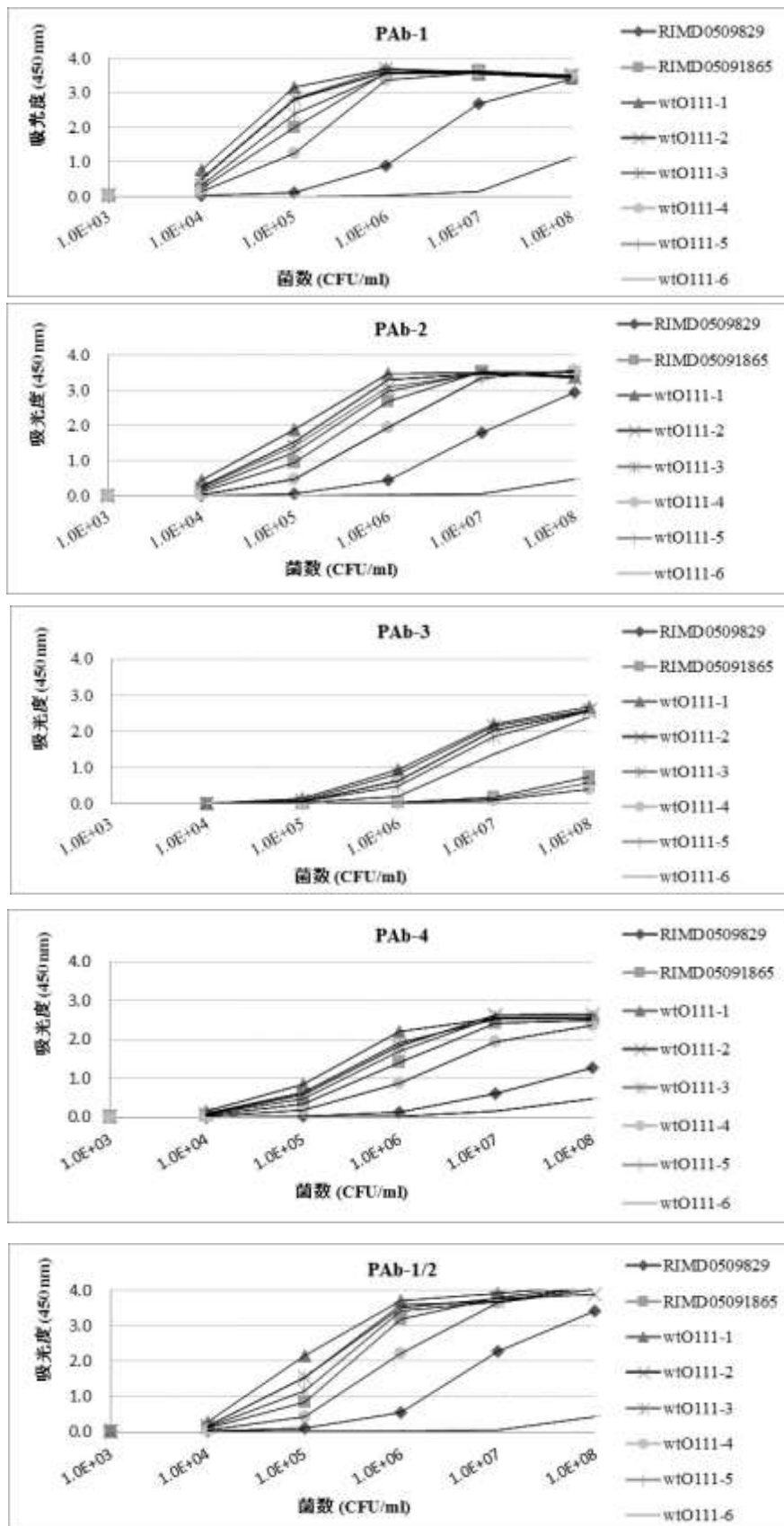


図7 抗大腸菌 O111 ポリクローナル抗体の力価 (ELISA)

陽性



T C

陰性

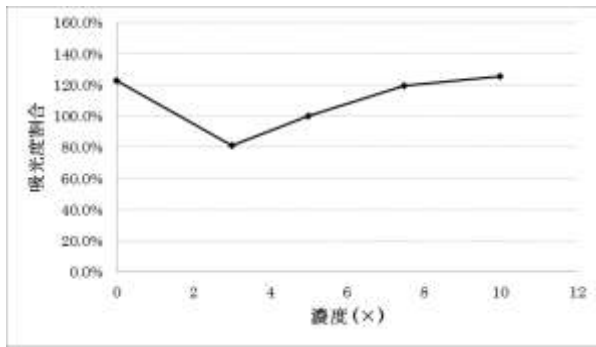


T C

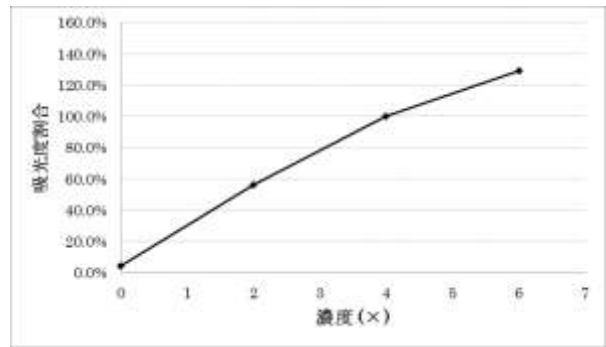
T : 大腸菌 O111 検出用テストライン

C : コントロールライン

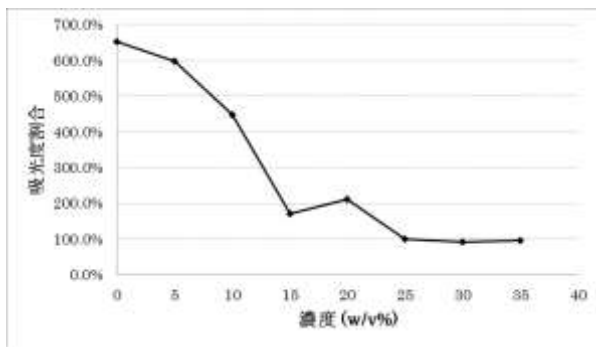
図8 開発した大腸菌 O111 検出イムノクロマトの判定



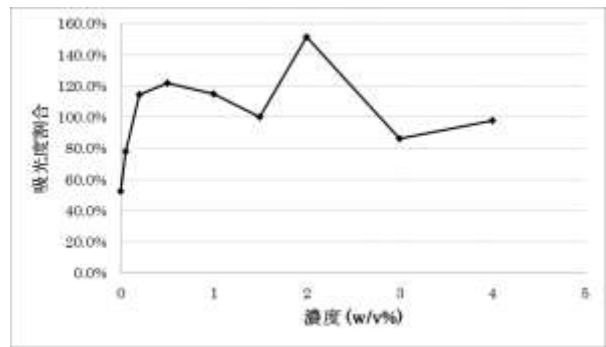
Denhart's 溶液



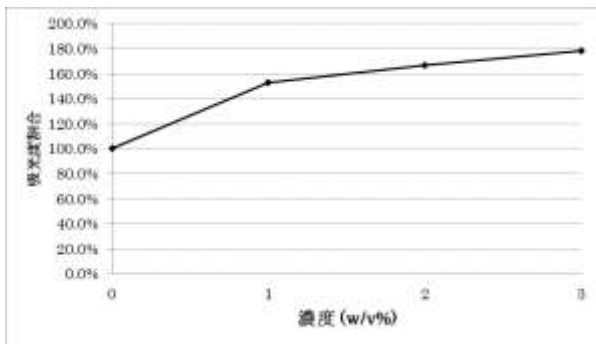
SSC



Formamide



Tween20



PEG2000

図9 展開用バッファーの各成分の濃度検討

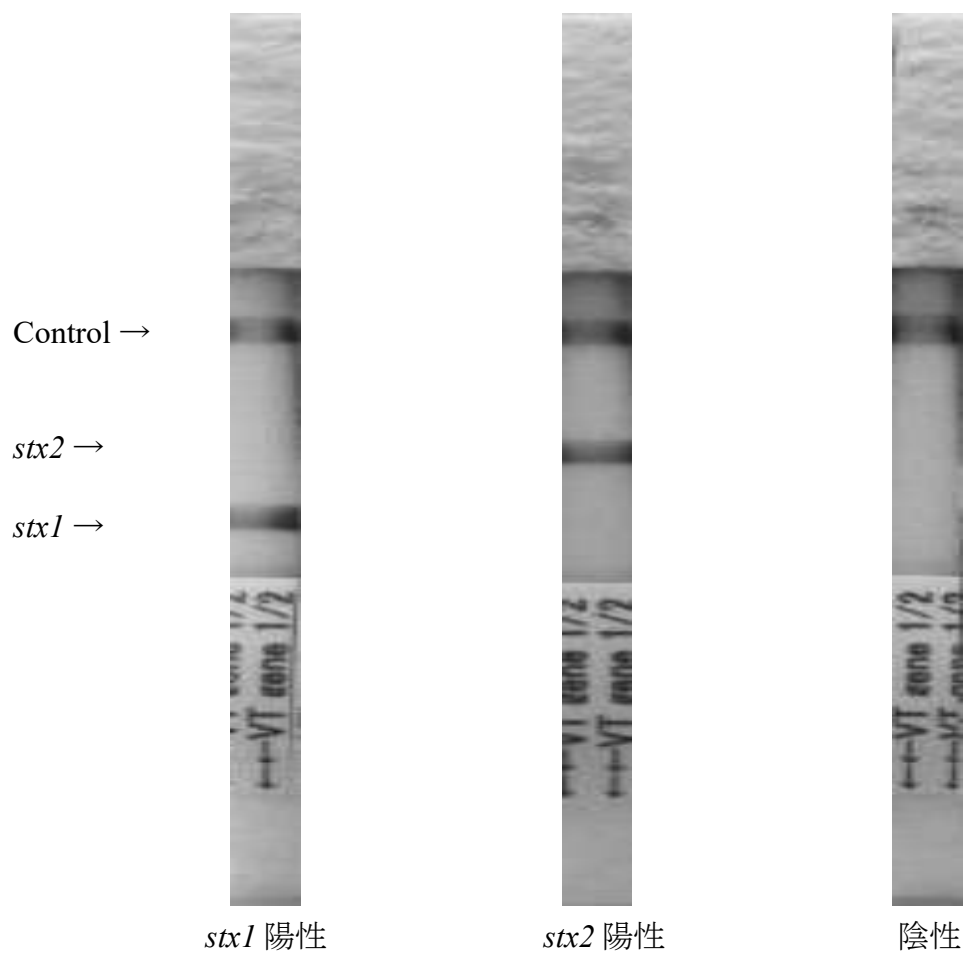
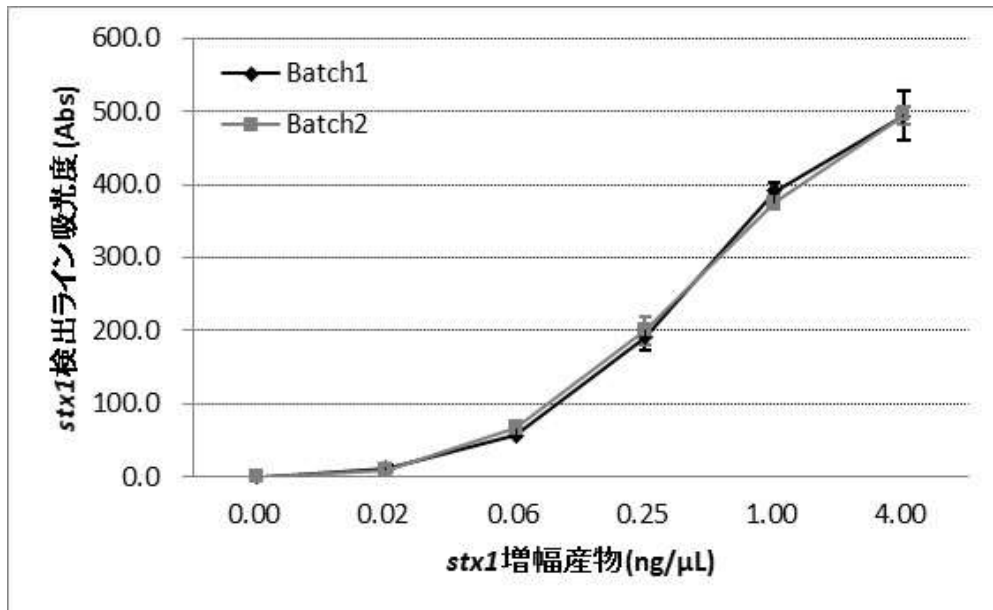


図 1 0 開発したベロ毒素遺伝子検出核酸クロマトの判定

A



B

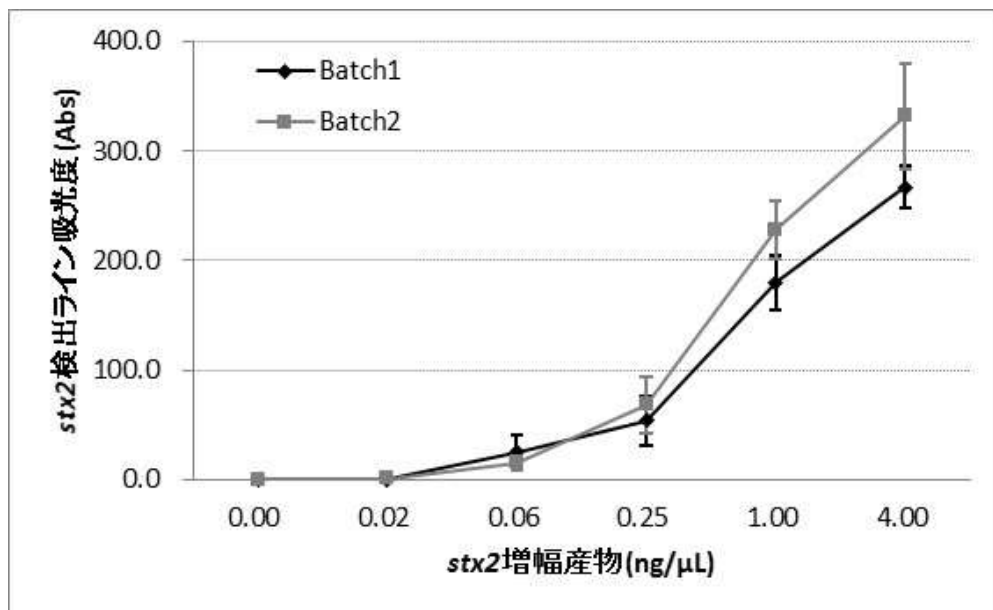


図 1 1 開発したベロ毒素遺伝子検出核酸クロマトの反応性

検査法	デメリット	メリット
PCR	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 検出感度が若干低い ⇒ <u>偽陰性が比較的</u>生じやすい ➤ 発がん性物質を用いる電気泳動が必要 ⇒ <u>日常検査に落とし込みにくい</u> 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 安価
LAMP	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <u>高価な専用機器が必要</u> ➤ レバー等一部の食品に対応していない ⇒ <u>食品によっては偽陰性が生じやすい</u> 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 高感度 ➤ 判定が容易
Real-time PCR	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <u>高価な機器が必要</u> 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 高感度 ➤ 判定が容易

図1 2 各遺伝子検出法のメリットおよびデメリット

表1 本研究に用いた菌株

菌種	血清型	試験株数	VT 産生	
			VT1	VT2
<i>Escherichia coli</i>	O1	1	—	—
	O6	1	—	—
	O7	1	—	—
	O8	1	—	—
	O9	2	—	—
	O10	1	—	—
	O16	1	—	—
	O18	1	—	—
	O25	1	—	—
	O26	3	+	+
	O26	14	+	—
	O26	1	—	—
	O45	1	+	—
	O91	1	+	—
	O101	1	—	—
	O103	1	+	—
	O111	3	+	+
	O111	4	+	—
	O111	1	—	—
	O121	1	—	+
	O139	1	—	—
	O141	1	—	—
	O145	1	+	—
	O149	1	—	—
	O157	3	+	+
	O157	14	—	+
O157	6	—	—	
	その他	3	—	—
<i>Citrobacter freundii</i>		1	—	—
<i>Cronobacter</i>		1	—	—
<i>Enterobacter aerogenes</i>		1	—	—
<i>Enterobacter cloacae</i>		2	—	—
<i>Escherichia hermannii</i>		1	—	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		1	—	—
<i>Klebsiella oxytoca</i>		1	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		1	—	—
<i>Proteus vulgaris</i>		1	—	—
<i>Salmonella</i> Enteritidis		1	—	—
<i>Salmonella</i> Typhimurium		3	—	—
<i>Salmonella</i> Abaetetuba		1	—	—
<i>Salmonella</i> Anatum		1	—	—
<i>Salmonella</i> Arizonae		1	—	—
<i>Salmonella</i> Choleraesuis		1	—	—
<i>Salmonella</i> Kunzendorf		1	—	—
<i>Salmonella</i> Tallahassee		1	—	—
<i>Salmonella</i> Vellore		1	—	—
<i>Serratia liquefaciens</i>		1	—	—
<i>Serratia marcescens</i>		1	—	—
<i>Serratia odorifera</i>		1	—	—

表2 開発したベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法のプライマーおよびプロ

ーブの配列

プライマーまたはプローブ	配列	増幅サイズ (bp)
stx1F	5'-TCCAGAGGAAGGGCGGTTTA-3'	214
stx1R	5'-CTGCATCCCCGTACGACTGA-3'	
stx1m	5'-CGGCTTATTGTTGAACGAAA-3'	
stx1l	5'-GCGGTTACATTGTCTGGTGA-3'	
sxt2F	5'-GAGATGCATCCAGAGCAGTT-3'	183
stx2R	5'-GATACTCCGGAAGCACATTG-3'	
stx2m	5'-CTGTGTATACGATGACGCCG-3'	
stx2l	5'-TGCGTTTTGTCACTGTCACA-3'	
anti-stx2l	5'-ACGCAAAACAGTGACAGTGT-3'	

表3 作製したポリクローナル抗体の様々な血清型の大腸菌への反応性 (ELISA)

試験菌株	ELISA 吸光度 (OD)				
	PAb-1	PAb-2	PAb-3	PAb-4	PAb-1/2a
O111 RIMD0509829	3.421	2.952	0.594	1.286	3.428
O111 RIMD05091865	3.498	3.503	0.782	2.520	4.134
O111 wtO111-1	3.431	3.404	2.706	2.605	4.154
O111 wtO111-2	3.541	3.370	2.634	2.681	3.910
O111 wtO111-3	3.447	3.359	2.588	2.599	4.128
O111 wtO111-4	3.509	3.576	0.434	2.385	4.043
O111 wtO111-5	3.470	3.432	2.597	2.570	4.123
O111 wtO111-6	1.150	0.494	2.419	0.477	0.441
O1 ATCC11775	0.058	0.051	0.273	0.137	0.029
O6 ATCC25922	0.088	0.088	0.878	0.137	0.037
O9 NIAH10053	0.050	0.052	0.449	0.139	0.018
O25 RIMD0509301	0.095	0.072	2.493	0.259	0.026
O26 RIMD05091876	0.050	0.055	0.460	0.147	0.033
O26 IID3005	0.116	0.091	2.525	0.317	0.035
O45 RIMD05091858	0.055	0.056	0.430	0.145	0.014
O91 RIMD05091855	0.144	0.748	2.657	0.358	0.049
O101 NIAH 10052	0.053	0.050	0.302	0.140	0.027
O103 RIMD05091878	0.115	0.245	2.449	0.342	0.046
O121 RIMD05091859	0.097	0.089	2.259	0.276	0.050
O139 NHAH 11170	0.046	0.049	0.229	0.130	0.030
O141 NIAH11149	0.033	0.038	0.173	0.079	0.034
O145 RIMD05091870	0.091	0.070	2.333	0.284	0.028
O149 NIAH10054	0.046	0.049	0.260	0.137	0.017
O157 ATCC43888	0.100	0.082	2.565	0.263	0.023
O157 ATCC700728	0.147	0.119	2.510	0.319	0.036
O157 RIMD05091061	0.072	0.074	1.924	0.140	0.040
培地のみ	0.016	0.018	0.033	0.012	0.015

表4 開発したイムノクロマト法の特異性

試験菌株	株数	陽性株数 (%)
<i>Escherichia coli</i> O1	1	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O6	1	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O7	1	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O8	1	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O9	2	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O10	1	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O16	1	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O18	1	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O25	1	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O26	13	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O45	1	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O91	1	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O101	1	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O103	1	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O111	8	8 (100)
<i>Escherichia coli</i> O121	1	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O139	1	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O141	1	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O145	1	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O149	1	0 (0)
<i>Escherichia coli</i> O157	23	0 (0)
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0 (0)
<i>Cronobacter</i>	1	0 (0)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0 (0)
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0 (0)
<i>Escherichia hermannii</i>	1	0 (0)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0 (0)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0 (0)
<i>Salmonella enteritidis</i>	1	0 (0)
<i>Salmonella typhimurium</i>	1	0 (0)
<i>Salmonella abae</i>	1	0 (0)
<i>Salmonella anatum</i>	1	0 (0)
<i>Salmonella arizonae</i>	1	0 (0)
<i>Salmonella choleraesuis</i>	1	0 (0)
<i>Salmonella kanzendorf</i>	1	0 (0)
<i>Salmonella tallahassee</i>	1	0 (0)
<i>Salmonella vellore</i>	1	0 (0)
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	0 (0)
<i>Serratia marcescens</i>	1	0 (0)
<i>Serratia odorifera</i>	1	0 (0)
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0 (0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0 (0)

表5 開発した免疫クロマト法の検出感度

		アッセイ用段階希釈			
		$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-4}$	$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-6}$
RIMD 0509829	培地中の菌濃度 (CFU/ml)	200000	20000	2000	200
	生菌	+	+	-	-
RIMD 05091865	培地中の菌濃度 (CFU/ml)	500000	50000	5000	500
	死菌	+	+	-	-
wtO111-1	培地中の菌濃度 (CFU/ml)	180000	18000	1800	180
	生菌	+	+	+	-
wtO111-2	培地中の菌濃度 (CFU/ml)	260000	26000	2600	260
	死菌	+	+	-	-
wtO111-3	培地中の菌濃度 (CFU/ml)	450000	45000	4500	450
	生菌	+	+	-	-
wtO111-4	培地中の菌濃度 (CFU/ml)	560000	56000	5600	560
	死菌	+	-	-	-
wtO111-5	培地中の菌濃度 (CFU/ml)	110000	11000	1100	110
	生菌	+	+	-	-
wtO111-6	培地中の菌濃度 (CFU/ml)	400000	40000	4000	400
	死菌	+	+	-	-

+ ; 陽性

- ; 陰性

表6 開発した免疫クロマト法の大腸菌 O111 を接種した食品からの検出能

食品検体	大腸菌 O111 の接種菌数 (CFU/25g)	免疫クロマト法		PCR 法	
		1	2	1	2
豚肉	1.6×10^1	+	+	+	+
	1.6×10^0	+	-	+	-
	1.6×10^{-1}	-	-	-	-
	1.6×10^{-2}	-	-	-	-
	0	-	-	-	-
牛肉	1.6×10^1	+	+	+	+
	1.6×10^0	+	+	+	+
	1.6×10^{-1}	-	-	-	-
	1.6×10^{-2}	-	-	-	-
	0	-	-	-	-
鶏肉	1.6×10^1	+	+	+	+
	1.6×10^0	+	-	+	-
	1.6×10^{-1}	-	-	-	-
	1.6×10^{-2}	-	-	-	-
	0	-	-	-	-

+ ; 陽性

- ; 陰性

表7 開発したベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法の特異性

菌種	血清型	試験株数	STX 産生		陽性菌株 (%)	
			STX1	STX2	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
<i>Escherichia coli</i>	O26	3	+	+	3 (100)	3 (100)
	O111	3	+	+	3 (100)	3 (100)
	O157	3	+	+	3 (100)	3 (100)
	O26	14	+	-	14 (100)	0 (0)
	O45	1	+	-	1 (100)	0 (0)
	O91	1	+	-	1 (100)	0 (0)
	O103	1	+	-	1 (100)	0 (0)
	O111	3	+	-	3 (100)	0 (0)
	O145	1	+	-	1 (100)	0 (0)
	O121	1	-	+	0 (0)	1 (100)
	O157	14	-	+	0 (0)	14 (100)
	O1	1	-	-	0 (0)	0 (0)
	O6	1	-	-	0 (0)	0 (0)
	O25	1	-	-	0 (0)	0 (0)
	O26	1	-	-	0 (0)	0 (0)
	O111	1	-	-	0 (0)	0 (0)
	O157	6	-	-	0 (0)	0 (0)
	その他	3	-	-	0 (0)	0 (0)
	<i>Citrobacter freundii</i>		1	-	-	0 (0)
<i>Cronobacter</i>		1	-	-	0 (0)	0 (0)
<i>Enterobacter aerogenes</i>		1	-	-	0 (0)	0 (0)
<i>Enterobacter cloacae</i>		2	-	-	0 (0)	0 (0)
<i>Escherichia hermannii</i>		1	-	-	0 (0)	0 (0)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		1	-	-	0 (0)	0 (0)
<i>Klebsiella oxytoca</i>		1	-	-	0 (0)	0 (0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		1	-	-	0 (0)	0 (0)
<i>Proteus vulgaris</i>		1	-	-	0 (0)	0 (0)
<i>Serratia liquefaciens</i>		1	-	-	0 (0)	0 (0)
<i>Serratia marcescens</i>		1	-	-	0 (0)	0 (0)
<i>Serratia odorifera</i>		1	-	-	0 (0)	0 (0)

+ ; 陽性

- ; 陰性

表8 開発したベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法の検出感度

菌株	血清型	STX		ゲノム DNA 量 (pg)				
				100	10	1	0.1	0.01
RIMD05091876	O26: NM	STX1	PCR-核酸クロマト法	+	+	+	-	-
			PCR	+	-	-	-	-
			Real-time PCR	+	+	+	-	-
IID3005	O26: H11	STX1	PCR-核酸クロマト法	+	+	+	-	-
			PCR	+	-	-	-	-
			Real-time PCR	+	+	+	-	-
RIMD 05091858	O45: H2	STX1	PCR-核酸クロマト法	+	+	+	+	-
			PCR	+	-	-	-	-
			Real-time PCR	+	+	+	-	-
RIMD 05091855	O91: H14	STX1	PCR-核酸クロマト法	+	+	+	+	-
			PCR	+	+	-	-	-
			Real-time PCR	+	+	+	+	-
RIMD 05091878	O103: H-	STX1	PCR-核酸クロマト法	+	+	+	+	-
			PCR	+	-	-	-	-
			Real-time PCR	+	+	+	-	-
RIMD05091865	O111: NM	STX1	PCR-核酸クロマト法	+	+	+	+	-
			PCR	+	-	-	-	-
			Real-time PCR	+	+	+	-	-
RIMD 05091870	O145: NM	STX1	PCR-核酸クロマト法	+	+	+	+	-
			PCR	+	-	-	-	-
			Real-time PCR	+	+	+	-	-
RIMD 05091859	O121: H19	STX2	PCR-核酸クロマト法	+	+	+	-	-
			PCR	+	-	-	-	-
			Real-time PCR	+	+	+	-	-
RIMD 05091061	O157	STX2	PCR-核酸クロマト法	+	+	+	-	-
			PCR	+	-	-	-	-
			Real-time PCR	+	+	+	-	-

+ ; 陽性

- ; 陰性

PCR には O-157 PCR Typing Set (タカラバイオ株式会社) を、Real-time PCR には CycleavePCR O-157 (STX gene) Screening Kit (タカラバイオ株式会社) を用いた。

表9 開発したベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法の STEC を接種した食品からの検出能

菌株	血清型	STX	食品検体	検出限界 (CFU/ml)	
				PCR-核酸クロマト法	Real-time PCR
IID3005	O26: H11	STX1	かいわれ大根	10 ³	10 ³
			トマト	10 ⁵	10 ⁵
			牛ひき肉	10 ³	10 ³
			牛レバー	10 ³	10 ³
RIMD05091865	O111: NM	STX1	かいわれ大根	10 ⁴	10 ³
			トマト	10 ⁵	10 ⁴
			牛ひき肉	10 ³	10 ³
			牛レバー	10 ³	10 ³
RIMD 05091859	O121: H19	STX2	かいわれ大根	10 ⁴	10 ³
			トマト	10 ⁴	10 ⁴
			牛ひき肉	10 ²	10 ²
			牛レバー	10 ³	10 ³
RIMD 05091061	O157	STX2	かいわれ大根	10 ⁴	10 ³
			トマト	10 ⁵	10 ⁵
			牛ひき肉	10 ³	10 ³
			牛レバー	10 ³	10 ²

Real-time PCR には CycleavePCR O-157 (STX gene) Screening Kit (タカラバイオ株

式会社) を用いた。

表 1 0 開発したベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法と USDA 記載 Real-time

PCR 法の比較

接種菌数 (CFU) / 牛ひき肉 25 g	繰り返し 回数	陽性検体数 (%)	
		PCR-核酸クロマト法	Real-time PCR
1	5	5 (100)	5 (100)
0.6	5	2 (40)	2 (40)
0.3	5	3 (60)	2 (40)
0.075	5	1 (20)	1 (20)
0	5	0 (0)	0 (0)

Real-time PCR には MLG 5B Appendix 1.01 (the guideline of USDA) を用いた。