

【別紙 2】

審査の結果の要旨

氏名 寺尾 義孝

本研究は食中毒感染の重要な原因となっている腸管出血性大腸菌（STEC）を簡便・迅速に検出するため、二つの検査法（大腸菌 0111 検出イムノクロマト法とベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法）の開発と評価を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 作製した抗大腸菌 0111 ポリクローナル抗体を ELISA により評価し、力価と特異性が高いポリクローナル抗体を 2 種類選抜した。この 2 種類のポリクローナル抗体を組み合わせることで特異性を向上できることが示された。
2. 開発した大腸菌 0111 検出イムノクロマト法の特異性を評価したところ、供試された 8 株の大腸菌 0111 全てに対して陽性、77 株のその他の菌株に対して陰性を示した。また、検出感度を評価したところ、供試された 8 株の大腸菌 0111 において 1.8×10^3 - 5.6×10^5 CFU/ml であった。
3. 開発した大腸菌 0111 検出イムノクロマト法と PCR 法の食品検体からの検出能を比較・評価した。その結果、3 種類の食品検体（豚肉、牛肉、鶏肉）いずれ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 という結果となり、PCR 法と同等の検出限界を示した。
4. PCR に用いるプライマー及び核酸クロマトに用いるプローブを設計し、それらを用いて PCR-核酸クロマト法を開発した。核酸クロマト法の最適化においては、PCR 産物をクロマトグラフィーにアプライする際の展開用バッファーを検討し、PCR 産物を特異的かつ高感度に検出できる組成を確立した。
5. 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を評価したところ、供試された 45 株の STEC 全てに対して陽性を示し、かつ *stx1* と *stx2* を識別できることが確認された。一方、供試された 14 株の非 STEC 及び 13 株の非大腸菌の全てに対して陰性を示した。さらに既存の PCR キット及び Real-time PCR キットと検出感度を比較・評価したところ、供試された 9 株の STEC 由来のゲノム DNA において 0.1-1 pg/ μ l と、既存の PCR キットより優れ Real-time PCR キットと同程度の結果であった。
6. 開発したベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法と既存の Real-time PCR キットの食品検体からの検出能を比較・評価した。その結果、4 種類の食品検体（かいわれ大根、トマト、牛ひき肉、牛レバー）において PCR-核酸クロマト法の検出限界は、培養後の食品培養液の菌濃度が 10^2 - 10^5 CFU/mL という結果となり、Real-time PCR キットと同等の検出限界を示した。

7. 開発したベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法と USDA 指定の Real-time PCR 法の検出能を比較・評価した。その結果、異なる菌濃度の STEC を接種（1 CFU、0.6 CFU、0.3 CFU、0.075 CFU）した牛ひき肉において PCR-核酸クロマト法の陽性率は、それぞれ 100%、40%、60%、20%となり、Real-time PCR 法と同程度の検出限界を示した。

以上、本論文は開発した二つの検査方法（大腸菌 0111 検出イムノクロマト法とベロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法）の性能を評価し、いずれも既存の方法と比べて遜色ない検出感度及び特異性をもつ方法であることを示した。また、開発した二つ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。本研究は食品中の腸管出血性大腸菌の検査に寄与し食品衛生の分野に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。