

【別紙 1】

論文の内容の要旨

論文題目 Development of simple and rapid inspection methods for *Escherichia Coli*
-Development of Immunochromatographic test for *Escherichia Coli* O111-
-Development of PCR-Nucleic Acid Lateral Flow Assay for STEC-
(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-
--ペロ毒素遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法の開発-)

氏 名 寺尾 義孝

【緒言】

腸管出血性大腸菌 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) は、産生するペロ毒素により、溶血性尿毒症症候群等の症状を引き起こす。日本における食品からの STEC の検査法では、まず PCR 法、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法、Real-time PCR 法のいずれかによる stx 遺伝子の検出試験を行い、陰性の場合には検査終了、陽性の場合には血清群 O26、O111、O157 を分離する必要がある。しかしこれらの菌株の分離には、複数の培地による培養、血清型別試験、生化学的性状試験、VT 確認試験といった煩雑な方法を要するのが現状である。

一方、イムノクロマト法は標的物質の有無を目視判定できる迅速な方法であり、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あることから O111 のイムノクロマト法は非常に有用であるが、これまで O111 を検出するための簡便な方法は開発されていなかった。核酸クロマト法は PCR 反応後の標的物質の有無を目視判定できる方法であり、従来の電気泳動と比べ迅速で、危険な試薬を必要としないといった利点を持つ。また、高額な機器を必要としないことから stx 遺伝子の PCR-核酸クロマト法は有用であるが、高感度な方法が開発されていなかった。

以上から本研究においては、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。

【方法】

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。

O111 検出イムノクロマト法の開発においては、まずポリクローナル抗体 (PAb-1~4) を作製し、ELISA により抗体を選定した。次にイムノクロマトストリップを作製し、大腸菌及び大腸菌以外の細菌を用いて検出限界及び特異性を評価した。さらに菌液を接種した食品検体の培養液を用いて、イムノクロマト法と PCR 法の検出限界を比較した。

stx 遺伝子検出 PCR-核酸クロマト法の開発においては、まず stx1 遺伝子、stx2 遺伝子検出プライマー及びプローブを各々設計し、核酸クロマトストリップの作製並びに展開用バッファの最適化を実施した。次に核酸クロマト法が 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。続いて菌株を用いて PCR-核酸クロマト法の特異性の評価並びに既存方法との検出限界の比較を行った。さらに食品検体の培養液に菌液を接種した検体を用いて既存方法との検出限界の比較を行った。最後に菌液を接種した食品の培養液を用いて United States Department of Agriculture (USDA) (MLG 5B appendix 1.01) のガイドライン収載法と検出能を比較した。

【結果】

ELISA による高い力価の抗体の選定において 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 ELISA による特異性の高い抗体の選定において、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。以上の結果より 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。PAb-1 及び PAb-2 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、イムクロマトストリップの捕捉抗体として PAb-1、金コロイド標識抗体として PAb-2 を使用した。開発したイムクロマト法は、試験された 8 株の大腸菌 O111 全てにおいて陽性、55 株の非 O111 大腸菌と 22 株の大腸菌以外の菌株全てにおいて陰性だった。純培養液をサンプルとした際の検出限界は、1 株において 5.6×10^5 CFU/ml、6 株において $1.1 \sim 5.0 \times 10^4$ CFU/ml、1 株において 1.8×10^3 CFU/ml であった。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。さらに培養前に菌を接種した食品検体をサンプルとした際の検出限界は、培養前の食品中の菌濃度が 1.6×10^6 CFU/25 g となり、PCR と同等であった。

展開用バッファの検討及び最適化により、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、増幅した stx1 及び stx2 を半定量的に検出できることが示唆された。開発した PCR-核酸クロマト法の特異性については、供試された 45 株の STEC 全てにおいて stx1 と stx2 の区別をすることが可能であり、14 株の非 STEC 及び 13 株の大腸菌以外の菌株全てにおいて陰性であった。純培養液をサンプルとした際の検出限界は、4 株の STEC において 1 pg/μl、5 株において 0.1 pg/μl であった。一方、既存方法である 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/ μ l と 0.1-1 pg/ μ l であった。さらに培養後に菌を接種した食品検体培養液をサンプルとした際の検出限界は、培養後の STEC 濃度が 10²-10⁵ CFU/ml となり市販の Real-time PCR と同等であった。また、培養前に菌を接種した食品検体培養液をサンプルとした際の検出能は、USDA MLG 記載の Real-time PCR 法と同等であった。

【考察】

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。

【結論】

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、食品検査において十分な検出限界及び特異性を有することが示されたため、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。