

称号及び氏名	博士（獣医学）	坂田 淳子
学位授与の日付	平成24年3月31日	
論文名	<b>Study on Development of Rapid Immunoassay for <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in Food</b> (食品における腸炎ビブリオの免疫学的迅速検査法の開発に関する研究)	
論文審査委員	主査	児玉 洋
	副査	三宅 眞実
	副査	山崎 伸二

## 論文要旨

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) は海水中に生息し、主に生食用生鮮魚介類を原因食品とした食中毒を引き起こす。病原因子として、耐熱性溶血毒(thermostable direct hemolysin; TDH)とTDH類似溶血毒(TDH-related hemolysin; TRH)が知られており、これらの一方または両方を有する株が病原性株とみなされている。魚介類を検査すると、特に夏季に腸炎ビブリオが検出されることが多いが、食品から病原性株が分離されることは稀である。そのため、食品検査で腸炎ビブリオを試験対象とする場合には病原性株のみを検出の標的にはせず、総数を衛生管理における「汚染指標」とみなし、規制の対象としている。

わが国では平成13年の厚生労働省医薬局食品保健部長通知において、生食用鮮魚介類1gあたり100MPN以下であることが規定されている。現行の検査法である培養法(最確数法)では、この規格を満たしているかどうかを確認するために、まずアルカリペプトン液による増菌培養を行う。引き続き、選択培地を用いて分離培養を行う。この際、分離に最も一般的に用いられるTCBS寒天培地上では、腸炎ビブリオは白糖非分解性の緑色コロニーを形成する。一方で、*V. mimicus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. campbellii*等も同様に白糖非分解性の緑色コロニーを形成する。そのため、TCBS寒天培地上で緑色コロニーが分離された場合、それが腸炎ビブリオであるかどうかを同定するために各種生化学性状試験による確認検査を実施する。これら一連の検査は、約5日の期間を必

要とする。しかし、検査対象である生食用鮮魚介類は短期間で流通・消費されるため、この検査期間の長さが衛生管理を行う上で大きな障害となっている。

そこで本研究では培養法による標準的な検査法に対して、免疫学的手法による、より迅速な検査法の開発を目的とした。第1章では、1) 腸炎ビブリオ種特異的に産生すると考えられている易熱性溶血毒 (thermolabile hemolysin ; TLH) を標的としたモノクローナル抗体 (MAb) を作製し、2) その MAb を用いて、食品増菌培養液から酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) により腸炎ビブリオ汚染をスクリーニングする方法を考案、その有用性を検討した。第2章では、1) 腸炎ビブリオ菌体抗原を標的とした MAb を作製し、2) その MAb を用いた dot-blotting 法による迅速同定法を考案、その有用性を検討した。

## 第1章

### TLH に対する MAb の作製と、それを用いた ELISA による腸炎ビブリオ汚染の迅速スクリーニング法の開発

全ての腸炎ビブリオは血清型や病原因子の有無にかかわらず、TLH 遺伝子 (*tlh*) をほぼ種特異的に保有していると考えられている。従って、腸炎ビブリオに汚染された食品を増菌培養した場合、培養液中に TLH が産生されると予測される。そこで、TLH を検出することにより食品の腸炎ビブリオ汚染をスクリーニングできると考えた。

そのため、まず、大腸菌で発現誘導させたリコンビナント TLH 蛋白を抗原に用いて MAb (MAb-98) を作製した。次いで、この MAb-98 を捕捉および標識抗体に用いた sandwich-ELISA を構築した (TLH-ELISA)。培養液中での TLH の産生性は、腸炎ビブリオ 79 株および非腸炎ビブリオ 53 菌種 99 株のアルカリペプトン増菌培養液を TLH-ELISA で試験することで評価した。その結果、TLH-ELISA は腸炎ビブリオ 79 株全てに陽性反応を示したことから、タンパクレベルにおいても全ての腸炎ビブリオ株が TLH を産生していることが初めて明らかになった。一方で非腸炎ビブリオ 48 菌種 60 株 (ビブリオ属菌 13 種を含む) は、陰性反応を示したが、5 菌種 (*V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *Plesiomonas shigelloides*, *Shigella sonnei*) については一部または全ての株が陽性反応を示した。

これらの交差反応を示す菌種が偽陽性の原因となる可能性は考えられたが、全ての腸炎ビブリオが陽性となるため、TLH-ELISA は食品中の腸炎ビブリオの低汚染・陰性確認のスクリーニングに使用できると考えられた。そこで、規制値 (100 MPN/g) 以上の汚染のある検体のみを陽性とし、衛生管理上問題とならない低汚染の検体は陰性とする TLH-ELISA を用いたスクリーニング法 (TLH-ELISA スクリーニング法) を考案した。その有用性を、腸炎ビブリオを人為的に添加した魚介類 4 検体 (添加実験) および市販の生食用鮮魚介類 119 検体を用いて評価した。添加実験の結果から、TLH-ELISA スクリー

ニング法は 50 CFU/g 程度の汚染を検出できる一方で、10 CFU/g 程度の低い菌数を添加した場合は、陰性と判定できることが示された。市販食品を用いた検討では、最確数法及び TLH-ELISA スクリーニング法を実施し、その結果を比較した。119 検体のうち、最確数法で 100 MPN/g 以上を示した 1 検体については、本スクリーニング法でも陽性となった。一方、残りの 118 検体は全てが 50 MPN/g 以下の汚染レベルであり、TLH-ELISA スクリーニング法でも、117 検体で腸炎ビブリオ汚染が陰性となった。偽陽性の頻度については 1%以下と低かった。

TLH-ELISA スクリーニング法は、増菌培養開始から 24 時間以内に結果を出すことが可能であり、生食用鮮魚介類の腸炎ビブリオの低汚染・陰性をスクリーニングするのに有用な方法であると考えられた。

## 第 2 章

### 腸炎ビブリオ菌体抗原に対する MAb の作製と、それを用いた dot-blotting 法による腸炎ビブリオ迅速同定法の開発

第 1 章で開発したスクリーニング法は、食品増菌培養液から腸炎ビブリオの汚染状況を判定することが可能であると示された。スクリーニング法で陽性となった場合には、確認のために培養法による分離・同定を引き続き行う必要がある。その際、分離菌が腸炎ビブリオであると同定するまでに 3 日の期間を必要とする。そこで、本研究ではその同定に要する期間を短縮することを目的として、腸炎ビブリオの迅速・簡便かつ高精度の同定検査法の開発を試みた。

まず、腸炎ビブリオの菌体抽出液に対する MAb を作製し、その特異性を各菌種の培養液を抗原に用いて ELISA で調べた。その結果、MAb-VP34 は腸炎ビブリオ 140 株全てに陽性反応を示した。一方で、腸炎ビブリオ以外の菌種に対しては、*V. natriegens* を除いた 56 菌種 96 株全てに陰性反応を示した。この抗体が認識する抗原の解析をウエスタンブロット法及び質量分析法により行ったところ、MAb-VP34 の認識する抗原は F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素デルタサブユニットであることが判明した。さらにエピトープ解析を実施した結果、MAb-VP34 は <sup>47</sup>LLTSSFSA<sup>54</sup> を認識していることが明らかとなった。

次に MAb-VP34 を使用した dot-blotting 法 (VP-Dot 法) を考案し、TCBS 寒天培地上に形成された白糖非分解性の緑色コロニーが腸炎ビブリオか否かを迅速に判別できるか検討した。腸炎ビブリオ 20 株と腸炎ビブリオ以外の 19 株を用いて、VP-Dot 法と腸炎ビブリオ種特異的な既法の PCR 法を行い、結果を比較した。その結果、両法の結果は一致したため、VP-Dot 法は TCBS 寒天培地上の腸炎ビブリオのコロニーを同定するのに十分な精度を有すると考えられた。なお、この抗体は *V. natriegens* に対して交差反応を示したが、*V. natriegens* は、TCBS 寒天培地上で白糖分解性の黄色コロニーを形成するため腸炎ビブリオとは容易に判別可能であり、分離培養後の確認検査を必要としない

菌種である。

VP-Dot 法を用いて検査を行うと、TCBS 寒天培地上のコロニーを 40 分程度で同定することが可能であり、従来の同定法（3 日間）に比べ、簡便かつ迅速に腸炎ビブリオを同定することが可能となった。VP-Dot 法は、腸炎ビブリオの迅速、簡便な同定法として十分に現場応用が可能であると考えられた。

## 総括

1. 腸炎ビブリオの TLH に対する MAb を用いた ELISA により、全ての腸炎ビブリオ株がタンパクレベルにおいて TLH を産生することを明らかにした。また、一部の菌種で交差反応が見られたものの、この ELISA を用いたスクリーニング法は、腸炎ビブリオ汚染が規制値以下の食品に対して、それを確認する方法として有用であると考えられた。
2. 腸炎ビブリオの F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素デルタサブユニット上のエピトープ<sup>47</sup>LLTSSFSA<sup>54</sup> を認識する特異性の高い MAb を作出した。本抗体を用いた VP-Dot 法は、分離平板上の腸炎ビブリオの迅速・簡便な同定方法として有用であると考えられた。
3. 本研究で開発した TLH-ELISA スクリーニング法、および VP-Dot 法を組み合わせることによって、食品の腸炎ビブリオ検査を従来法に比べ、より迅速・簡便に行うことが可能になると考えられた。

## 審査結果の要旨

腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* は海水中に生息し、主に生食用生鮮魚介類を原因食品とした食中毒を引き起こす。毒素として耐熱性および易熱性溶血毒 (TLH)、また耐熱性毒素類似溶血毒が知られている。わが国では、食品検査で腸炎ビブリオを試験対象とする場合には、腸炎ビブリオ総数を衛生管理における「汚染指標」とみなし、規制の対象としている。生食用生鮮魚介類 1 g あたり最確数 100 MPN 以下であることと規定している。この規格を満たしているかどうかを確認するために、最確数検査を実施するとともに、増菌培養を行った後、選択培地を用いて分離培養を行う。この際、分離に最も一般的に用いられる TCBS 寒天培地上では、腸炎ビブリオの他、*V. mimicus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. campbellii* 等も同様に増殖するという欠点がある。そのため、腸炎ビブリオ同定のために各種生化学性状試験による確認検査が必須である。こ

れら一連の検査は約5日の期間を必要とする。しかし、検査対象である生食用鮮魚介類は短期間で流通・消費されるため、この検査期間の長さが衛生管理を行う上で大きな障害となっている。そこで申請者は、免疫学的手法による、生鮮食品中の腸炎ビブリオ汚染の迅速検査法開発を目的として研究を行った。

第1章において、腸炎ビブリオが種特異的に産生すると考えられているTLHに対するモノクローナル抗体(MAb)を作製し、それを用いて、食品増菌培養液から酵素免疫測定法(TLH-ELISA)により腸炎ビブリオ汚染をスクリーニングする方法を考案、その有用性を検討した。その結果、TLH-ELISAは腸炎ビブリオ79株全てに陽性反応を示した。一方で非腸炎ビブリオ48菌種60株(ビブリオ属菌13種を含む)は陰性反応を示したが、5菌種(*V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *Plesiomonas shigelloides*, および *Shigella sonnei*)については一部または全ての株が陽性反応を示した。これらの交差反応を示す菌種が食品検査で偽陽性の原因となる可能性は考えられたが、全ての腸炎ビブリオが陽性となるため、TLH-ELISAは食品中の腸炎ビブリオの低汚染・陰性確認のスクリーニングに使用できるとしている。そこで申請者は、規制値(100 MPN/g)以上の汚染のある検体のみが陽性を示し、衛生管理上問題とならない低汚染の検体は陰性となるTLH-ELISAを考案した。このスクリーニング法を採用することにより、50 CFU/g程度の汚染を検出できる一方で、10 CFU/g程度の低い菌数は陰性と判定できることを明らかにした。また、偽陽性となる頻度は1%以下と低かった。このように、TLH-ELISAは、増菌培養開始から24時間以内に結果を出すことが可能であり、生食用鮮魚介類の腸炎ビブリオの低汚染・陰性をスクリーニングする有用な方法であることを実証した。

次に第2章で申請者は、腸炎ビブリオの迅速・簡便かつ高精度の同定検査法を開発するため、菌体抗原を標的としたMAbを作製し、それを用いたdot-blotting法による迅速同定法を考案、その有用性を検討した。MAb-VP34は腸炎ビブリオ140株全てに陽性反応を示す一方で、腸炎ビブリオ以外の菌種に対しては、*V. natriegens*を除く56菌種96株全てに陰性反応を示した。申請者は、MAb-VP34の認識する抗原は腸炎ビブリオF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP合成酵素デルタサブユニットであると同定した。またエピトープ解析により、MAb-VP34は<sup>47</sup>LLTSSFSA<sup>54</sup>を認識していることを明らかにした。さらにMAb-VP34を用いたdot-blotting法を考案し、TCBS寒天培地上に形成された白糖非分解性のコロニーが腸炎ビブリオか否かを迅速に判別できるか検討した結果、本法は腸炎ビブリオのコロニーを同定するのに十分な精度を有し、しかも40分程度で同定可能であることを証明した。本法は、従来の同定法(3日間)に比べ、簡便かつ迅速に腸炎ビブリオを同定することが可能である。このように申請者は、MAb-VP34をdot-blotting法に応用することで、腸炎ビブリオの迅速、簡便な同定法の開発に成功した。

今回の研究において申請者は、腸炎ビブリオのTLHに対するMAbを用いたELISAにより、全ての腸炎ビブリオ株が蛋白レベルにおいてTLHを産生することを初めて明らかにした。さらに、このELISAを用いたスクリーニング法は、腸炎ビブリオ汚染が規制値以

下の食品に対して、それを確認する方法として有用であることを証明した。また申請者は、腸炎ビブリオの  $F_0F_1$ -ATP 合成酵素デルタサブユニット上のエピトープを認識する特異性の高い **MAb** を作出することにより、本抗体を用いた腸炎ビブリオの迅速・簡便同定法の開発に成功した。これらの研究成果は、食品の腸炎ビブリオ検査と菌の同定を、従来法に比べより迅速・簡便に行うことを可能にしたものであり、その成果は獣医公衆衛生学ならびに獣医微生物学の発展に大きく貢献するものである。よって、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。