

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：84407

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780206

研究課題名(和文) 腸炎ビブリオの迅速な現場即応型検査法の開発

研究課題名(英文) Development of a rapid immunochromatographic assay for detection of *Vibrio parahaemolyticus*

研究代表者

坂田 淳子 (Sakata, Junko)

大阪府立公衆衛生研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：30455547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腸炎ビブリオATP合成酵素サブユニットに対する2種類の単抗体(MAb-VP34とMAb-VP109)を用いて、イムノクロマト法による腸炎ビブリオの迅速同定法(VP-ICA法)を構築した。VP-ICA法は、試験に供した腸炎ビブリオ124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93株(ビブリオ属菌27菌種53株、非ビブリオ属菌35菌種40株)には陰性反応を示した。

VP-ICA法による分離菌の同定にかかる時間は30分程度で、特別な機器も必要としないことから、VP-ICA法は腸炎ビブリオの迅速・簡便な同定法として有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To rapidly and simply determine whether bacterial colonies growing on agar, represented *Vibrio parahaemolyticus*, an immunochromatographic assay (VP-ICA) using a generated couple of different monoclonal antibodies (designated MAb-VP34 and MAb-VP109) against *V. parahaemolyticus* FOF1-ATP synthase's delta subunit was developed. When cells of 124 *V. parahaemolyticus* strains were treated with a detergent and the resulting extracts were tested with the VP-ICA, they yielded positive results. In contrast, those of 62 non-*V. parahaemolyticus* species, including 93 different strains, did not. These results show that VP-ICA is highly specific for *V. parahaemolyticus*.

The VP-ICA procedure took 30 min, indicating that VP-ICA will greatly reduce labor and time required to identify *V. parahaemolyticus* colonies as compared with the conventional biochemical tests.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：腸炎ビブリオ イムノクロマト法 迅速同定法 品質管理

1. 研究開始当初の背景

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) による食中毒は、一般に本菌に汚染された水産食品を人が生食することにより引き起こされる。それゆえ、生食用鮮魚介類については、腸炎ビブリオの成分規格が定められており、その汚染が厳しく監視されている。現在、その汚染の監視は「細菌培養法」により実施されており、それは「食品の増菌培養」→「増菌培養液からの菌の分離」→「分離した菌が腸炎ビブリオかどうかの確認」の3工程から成る。しかし、この方法は手技が煩雑な上、検査の開始から終了までに長い検査期間(約5日)を必要とする。

したがって、腸炎ビブリオ検査法の迅速・簡便化が待ち望まれている。多種の迅速診断法の中でも、簡便性及び迅速性に優れたイムノクロマト法は有用な手段の一つであり、そのため、イムノクロマト法を用いた腸炎ビブリオ検査法の開発は、食品衛生の検査現場のニーズに応え得るものとする。

2. 研究の目的

腸炎ビブリオに対して、特異的に反応するモノクローナル抗体(MAb)を作出し、それを用いて、本菌の迅速・簡便な検査法(イムノクロマト法)を開発する。

3. 研究の方法

すでに申請者らは、腸炎ビブリオに特異性が高い抗体(MAb-VP34)を保有している。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*を除いた56菌種96株全てに陰性反応を示した。さらにこのMAbはF₀F₁-ATP合成酵素デルタサブユニットを認識していることが判明している。

本研究ではこのMAb-VP34を用いて、サンドイッチタイプの検出系であるイムノクロマト法を開発するために、以下の実験を実施した。

(1) F₀F₁-ATP合成酵素デルタサブユニットに対する新たなMAb(ペア抗体)の作製

大腸菌で発現誘導したりコンビナントF₀F₁-ATP合成酵素デルタサブユニットを免疫したマウスから脾臓細胞を取り出し、その中に多数含まれる抗体産生リンパ球とマウスミエローム細胞を常法により細胞融合させた。

ハイブリドーマのスクリーニングは、以下の条件で行い、イムノクロマト法の構築においてMAb-VP34のペアとして最適なMAbを産生するハイブリドーマを選抜した。

・1次スクリーニング

Direct-ELISA(抗原;腸炎ビブリオ菌体タンパク抽出液、一次抗体:ハイブリドーマ培養上清(×10)、二次抗体:ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGヤギ抗体(×2,000))

・2次スクリーニング

Sandwich-ELISA(捕捉抗体;MAb-VP34のFab'部分、抗原;腸炎ビブリオ菌体タンパク抽出液および*V. natriegens*菌体タンパク抽出液、一次抗体:ハイブリドーマ培養上清(×10)、二次抗体:ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGヤギ抗体(×2,000))

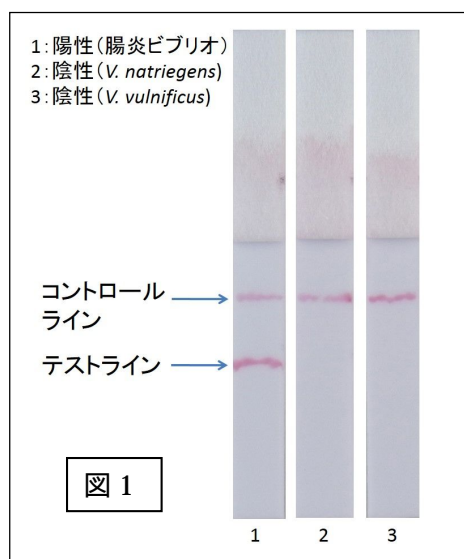
得られた抗体のアイソタイピングは、IsoStrip kit(Roche Diagnostics)を用いて行った。

(2)イムノクロマト法(VP-ICA法)の構築

VP-ICA法

菌体を2.0% n-Octyl-β-D-glucopyranoside 溶液200μlに懸濁し、1分間攪拌した。遠心(×15,000rpm、5分、4℃)後、上清25μlを金コロイド標識した25μlのMAb-VP34溶液(100mM Tris-Buffer、pH10.0;2% Triton-100;2% BSA;0.2% Lipidure[®]405)と96ウ

エルプレートのウェル内で混合し、同ウェルに MAb-VP109 溶液 (2mg/ml; 5mM ホウ酸バッファー、pH 8.5) および抗マウス IgG ヤギ抗体 (1mg/ml; 5mM ホウ酸バッファー、pH 8.5) を線状に塗布したメンブレン (HiFlow Plus 135) を挿入した。15 分後、ラインの有無を目視で判定した (図 1)。



VP-ICA 法の特異性の評価

・使用菌株；腸炎ビブリオ 124 株、腸炎ビブリオ以外のビブリオ属菌 27 菌種 53 株 (*V. natriegens* 1 株含む)、非ビブリオ属菌 35 菌種 40 株

・評価方法；上記菌株を TSA 平板等の非選択培地に塗抹し、発育した菌をディスポーザブルの 1 μ l エーゼを用いて掻きとり、その 1 μ l ループ分の菌体について、VP-ICA 法を実施した。なお、用いた株が腸炎ビブリオであるかどうかの判定には、生化学的性状試験に加えて、腸炎ビブリオ特異的 PCR (*toxR*-PCR; Kim, Y. B. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 37, 1173-1177, 1999) により実施した。

(3) VP-ICA 法の分離平板上のコロニー同定能の評価

・使用菌株；腸炎ビブリオ 124 株、腸炎ビ

ブリオ以外のビブリオ属菌 6 株 (*V. vulnificus* 3 株、*V. harveyi* 2 株、*V. natriegens* 1 株)

・評価方法；TCBS 寒天培地上に発育した 1 コロニー (最大 1 μ l ループ分) をディスポーザブルの 1 μ l エーゼを用いて掻きとり、その 1 コロニー分の菌体について、VP-ICA 法を実施した。なお、用いた株が腸炎ビブリオであるかどうかの判定には、生化学的性状試験に加えて、腸炎ビブリオ特異的 PCR (*toxR*-PCR、Kim, Y. B. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 37, 1173-1177, 1999) により実施した。

4. 研究成果

(1) F_0F_1 -ATP 合成酵素デルタサブユニットに対する MAb (ペア抗体) の作製

リコンビナント F_0F_1 -ATP 合成酵素デルタサブユニットをマウスに免疫後、抗体価の上昇が認められたマウスの脾臓細胞とマウスミエローマ細胞を細胞融合させた結果、ハイブリドーマが 3,800 個得られた。続いて、Direct-ELISA 法による系で 1 次スクリーニングを行った結果、候補のハイブリドーマクローンが 124 個得られた。124 個のクローンのうち、MAb-VP34 の Fab' 部分を捕捉抗体に用いた Sandwich-ELISA による系で 2 次スクリーニングを行ったところ、腸炎ビブリオ菌体タンパク抽出液には陽性反応を示すが、*V. natriegens* 菌体タンパク抽出液には陽性反応を示さない抗体 (MAb-VP 109) が得られた。MAb-VP 109 のサブクラスは、IgG1、() であった。

(2) VP-ICA 法の構築および特異性の評価

MAb-VP34 と MAb-VP109 を用いてイムノクロマト法による腸炎ビブリオの迅速同定法 (VP-ICA 法、図 1) を構築した。

特異性を検証した結果、VP-ICA 法は試験に供した腸炎ビブリオ全てに陽性反応を示し、

試験に供した腸炎ビブリオ以外の菌種に対しては、全て陰性反応を示した（表 1）。

表 1

菌種名	(toxR-PCR法の結果)	被検菌株数	VP-ICA法陽性株数
腸炎ビブリオ	(+)	124	124
他のビブリオ属菌27菌種 (<i>V. natriegens</i> を1株含む)	(-)	53	0
非ビブリオ属菌35菌種	(-)	40	0

(3)VP-ICA 法の分離平板上のコロニー同定能の評価

培地上で発育した腸炎ビブリオのコロニーの形状の差に関係なく、1つのコロニーから本法により直接同定可能か検証するため、培地上の1コロニーを使用してVP-ICA法を実施した。

長期保存した株の中には通常よりかなり小さいコロニーを形成し、図2程度しか菌体を掻きとれない株が数株存在したが、VP-ICA法を実施した結果、腸炎ビブリオのみ全て陽性反応を示した（表2）。これは、ディスポーザブルの1μl エーゼで菌体をかきとった時、エーゼ内に含まれる菌量の平均は 4.3×10^8 CFUであったのに対し、VP-ICA法は、100μlの抽出液内に腸炎ビブリオが 2.2×10^6 CFU存在すれば陽性と判定できたため、図2程度の菌量でも検出が可能であったと考えられた。

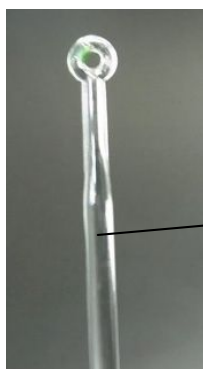


図 2

ディスポーザブルの
1μl エーゼ

表 2

菌種名	(toxR-PCR法の結果)	被検菌株数	VP-ICA法陽性株数
腸炎ビブリオ	(+)	124	124
他のビブリオ属菌 (<i>V. natriegens</i> を1株含む)	(-)	6	0

(4)まとめ

生化学的性状試験による従来法（培養法）では、分離平板上の腸炎ビブリオのコロニーを同定するのに3日間を必要とするが、本ICA法は直接「分離平板上のコロニー」から試験を行うことが可能であるため、同定にかかる時間は30分程度である。さらに、本ICA法は特別な機器を必要としないことから、規模が小さい検査場でも導入が容易である。そのため、本ICA法は腸炎ビブリオの迅速・簡便な同定法として有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

第33回日本食品微生物学会、「腸炎ビブリオの免疫学的迅速同定法の開発」、坂田淳子、川津健太郎、岩崎忠、田中勝啓、竹中重雄、久米田裕子、児玉洋（2012）

第46回腸炎ビブリオシンポジウム、「イムノクロマト法による腸炎ビブリオ迅速同定法の開発」、坂田淳子、川津健太郎、久米田裕子（2012）

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等；なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂田 淳子 (SAKATA, Junko)

大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課・研究員

研究者番号：30455547