

24. TDH/TRH 産生性腸炎ビブリオの 簡便かつ迅速な検査法の開発

○坂田淳子（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課）

川津健太郎（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課）

【研究目的】

水産食品が食中毒原因菌である腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) に汚染されていないかどうかを、製造現場において出荷前に簡便・迅速にチェックできる現場即応型検査法（イムノクロマト法）を開発し、本菌による食中毒の発生防止に役立てる。

【研究の必要性】

腸炎ビブリオによる食中毒は、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。病原因子としては、耐熱性溶血毒（thermostable direct hemolysin, TDH）と耐熱性溶血毒類似毒素（TDH-related hemolysin, TRH）が知られており、これらの一方または両方を産生する株が病原性株とみなされている。それゆえ、本菌による食中毒の発生を予防するためには、水産食品における TDH/TRH 産生性腸炎ビブリオの汚染状況の監視が重要である。

現在、水産食品における TDH/TRH 産生性腸炎ビブリオ汚染の検出方法としては、DNA コロニーハイブリダイゼーション法や PCR 法、LAMP 法などの遺伝子学的手法が報告されている⁽¹⁾⁽²⁾。しかし、遺伝子学的手法は手間や時間・高価な機器を要すること、食品に蓄積した死菌により偽陽性を示す可能性が高い等の問題がある。従って、より簡便・迅速で高価な機器を必要としない検出法の開発が望まれている。

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る。TDH/TRH 産生性腸炎ビブリオに汚染された食品を増菌培養した場合、これらの毒素は菌体外に放出されるため、培養液中に TDH/TRH が分泌されると予測される。従って、これらの毒素を迅速に検出できれば、水産食品における TDH/TRH 産生性腸炎ビブリオの汚染状況の監視が可能になると考えられる。

そのため、本研究では、食品増菌培養液から腸炎ビブリオが産生する TDH と TRH を特異的かつ同時に数分で検出するイムノクロマト法（TDH/TRH イムノクロマト法）の開発を目指した。TDH/TRH イムノクロマト法の開発に際して、すでに申請者らは、TDH のイムノクロマト検出系（TDH-ICA 法）を開発していたため⁽³⁾、本研究では、TRH に対するモノクローナル抗体を作製し、その抗体を用いたイムノクロマト法による TRH 検出系（TRH-ICA 法）の構築を試みた。TDH/TRH イムノクロマト法の開発は、短期間で流通・消費される水産食品においては、速やかな検査結果の判明が重要であることから、食品衛生の検査現場のニーズに応えるものと考えられる。

【材料および方法】

1. 使用菌株

腸炎ビブリオ AQ4037 株（患者由来，*tdh* 陰性/*trh* 陽性）⁽⁴⁾

2. 腸炎ビブリオ AQ4037 株の人工培地における TRH 産生性の確認

AQ4037 株を SPP 培地⁽⁴⁾ に接種し，37°C で一夜振とう培養を行った。培養液の遠心上清を回収し塩析（硫酸沈殿）を行った後，抗 TRH/TDH ウサギポリクローナル抗体（バイオアカデミア社製）を用いたウエスタンブロッティング法を実施し，培養上清中に TRH が産生されたかどうかを調べた。

3. リコンビナント TRH タンパク（以下 rTRH）の作製

腸炎ビブリオ AQ4037 株の *trh* の断片(540bp)を pET SUMO ベクターに組み込んだ。得られた組み換えプラスミドを用いて大腸菌 BL21(DE3)を形質転換し，SUMO-rTRH 融合タンパクを発現誘導させた。発現させた SUMO-rTRH 融合タンパクは，ニッケルキレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。

4. 抗 TRH モノクローナル抗体の作製

精製した SUMO-rTRH 融合タンパクを BALB/c マウスに腹腔内投与し，免疫を行った。抗体価の上昇が認められ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マ細胞(P3-X63-Ag8.U1 myeloma cell)を常法⁽⁵⁾により細胞融合させた。続いて，TRH に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンを選抜するために，1 次スクリーニングを SUMO-rTRH 融合タンパクを抗原に用いた酵素免疫測定法（ELISA）により行い，さらに 2 次スクリーニングを腸炎ビブリオ AQ4037 株の培養上清濃縮液，精製 TDH 等を抗原に用いた ELISA により実施した。選抜したハイブリドーマクローンは，モノクローナル抗体を高濃度に含むマウス腹水を誘導するため，プリスタンを投与したマウスの腹腔内に接種した。マウス腹水からの抗 TRH モノクローナル抗体の精製は，プロテイン A カラムによるアフィニティークロマトグラフィーにより実施した。

5. イムノクロマト法の構築に最適な抗体の組み合わせの選抜

サンドイッチタイプの検出系であるイムノクロマト法の構築に最適な抗 TRH モノクローナル抗体の組み合わせを選抜するために，サンドイッチ ELISA を実施し，その結果を比較した。サンドイッチ ELISA の検出抗体には，抗 TRH モノクローナル抗体をペルオキシダーゼ標識化したものを用いた。

6. TRH 検出用イムノクロマトの構築

サンドイッチ ELISA の結果により選抜した抗体の組み合わせに対して，検出抗体側の

抗体の金コロイド標識化と、捕捉抗体側の抗体のメンブレンへの固相化を実施し、イムノクロマトを作製した。イムノクロマトの性能は、精製 TDH、リコンビナント易熱性溶血毒タンパクおよび腸炎ビブリオ AQ4037 株培養上清から本実験で作出したモノクローナル抗体を用いてアフィニティー精製したネィティブ TRH (nTRH) を用いて、評価を行った。

【結果および考察】

食品増菌培養液から TRH をイムノクロマト法で検出するために、まず検出対象となる TRH が人工培地中に産生されるかどうかを抗 TRH/TDH 毒素ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティング法により検討した。その結果、腸炎ビブリオ AQ4037 株の培養上清を流したレーンにおいて、TRH の分子量である約 21k の位置にバンドが検出されたことから、腸炎ビブリオ AQ4037 株が培地中に TRH を産生することを確認できた (図 1 参照)。

次に TRH に対するモノクローナル抗体を作出するのに必要な免疫原を準備するため、大腸菌で SUMO-rTRH 融合タンパクを発現誘導した。これをマウスに免疫した後、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融合させた結果、ハイブリドーマが 2748 個得られた。

この中より TRH に対するモノクローナル抗体を産生するクローンを選抜するために、1 次スクリーニングを実施した結果、ELISA の OD 値 0.68 以上の抗体を産生する 173 個のクローンを採取した。173 個のクローンのうち、さらに 2 次スクリーニングを実施した結果、安定した増殖性と抗 TRH モノクローナル抗体産生性を持つ 20 種類のクローン (抗 TRH モノクローナル抗体 No. : 16, 17, 27, 54, 55, 60, 62, 63, 64, 81, 84, 91, 95, 96, 98, 128, 129, 137, 146, 166) が得られた。

そこで、サンドイッチタイプの検出系であるイムノクロマト法の構築に最適な抗体の組み合わせを選抜するために、20 種類の抗 TRH モノクローナル抗体をそれぞれ捕捉抗体と検出抗体に用いたサンドイッチ ELISA により 400 パターンの抗体の組み合わせを検討した。その結果、TRH に対して高い反応性を示す 8 パターンの抗体の組み合わせ (捕捉抗体 No. × 検出抗体 No. ; 27×63, 64×63, 95×63, 96×63, 96×137, 137×54, 137×17, 137×81) を選抜した。

続いて、ELISA により選抜した抗体の組み合わせを用いて、イムノクロマトを作製し、その性能を比較した。その結果、8 パターンの組み合わせのうち、捕捉抗体に No.96 の抗体を、検出抗体に No.137 の抗体の組み合わせを用いたイムノクロマトで最も良好な結果が得られた (TRH-ICA 法, 図 2 参照)。

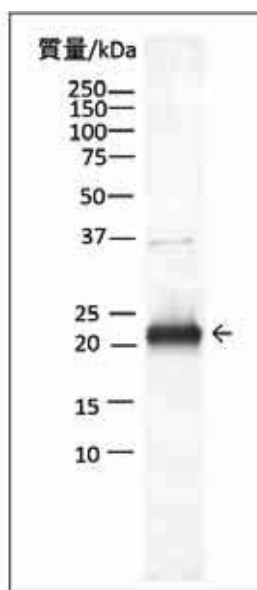


図1. 抗TRH/TDHポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットによる腸炎ビブリオAQ4037株培養上清中のTRHの検出

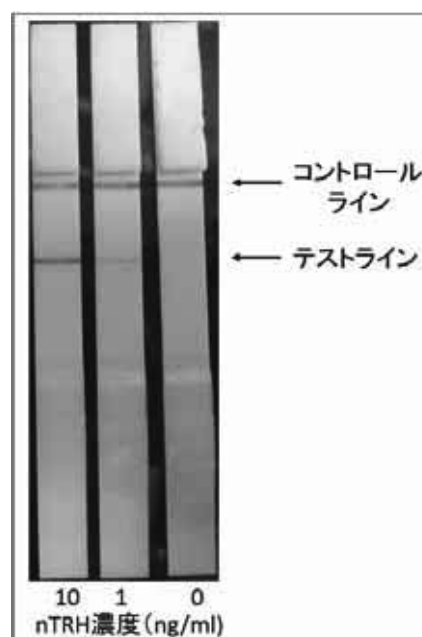


図2. TRH-ICA法によるTRHの検出

【今後の課題】

今後、食品増菌培養液から腸炎ビブリオが産生する TDH と TRH を特異的かつ同時に数分で検出するイムノクロマト法 (TDH/TRH イムノクロマト法) を開発するために、TDH-ICA 法と本研究で構築した TRH-ICA 法とを 1 枚のテストメンブレン上に組み込み、両方の毒素を検出するのに最適な条件を検討する。さらに、確立した TDH/TRH イムノクロマト法の有用性を、水産食品への腸炎ビブリオの添加試験において検討する予定である。

【謝辞】

本研究を進めるにあたり、研究助成をいただきました公益財団法人 大同生命厚生事業団に感謝申し上げます。また、本研究の一部は大阪府「平成 27 年度開発研究」の支援を受けて実施されました。

【参考文献】

- (1) Su, Y.-C. and Liu, C. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiol.* 24:549-558.
- (2) Nemoto, J., Sugawara, C., Akahane, K., Hashimoto, K., Kojima, T., Ikedo, M., Konuma, H., and Hara-Kudo, Y. 2009. Rapid and specific detection of the thermostable direct hemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* by

- loop-mediated isothermal amplification. *J. Food Prot.* 72:748-754.
- (3) Kawatsu, K., Ishibashi, M., and Tsukamoto, T. 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(5):1821-1827.
- (4) Honda, T., Ni, Y., and Miwatani, T. 1988. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infect Immun.* 56:961-965.
- (5) Galfre, G., and Milstein, C. 1981. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedure. *Methods Enzymol.* 73B:3-46.

【経費使途明細】

PCR 関連試薬	¥42,319
細胞培養関連試薬	¥113,400
ELISA・抗体精製・タンパク解析関連試薬	¥127,465
プラスチックチップ類	¥21,816
合計	¥305,000