

## 安全・安心な食品製造工程の管理技術の確立

### —食中毒菌の迅速検出技術の開発—

富永達矢\*<sup>1</sup> 常見崇史\*<sup>1</sup> 関根正裕\*<sup>2</sup>

## Establishment of management techniques of a safe and secure food manufacturing process

### —Development of rapid detection method of food-borne pathogen—

TOMINAGA Tatsuya\*<sup>1</sup>, TSUNEMI Takashi\*<sup>1</sup>, SEKINE Masahiro\*<sup>2</sup>

#### 抄録

腸管出血性大腸菌O157の迅速検出のため、高感度イムノクロマト試験紙の開発を目指した。試作品の評価系を設定した後、感度に影響を与える要因を調べた。スキムミルクを用いた非特異的吸着の抑制、標識や固定に用いるポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の組み合わせ、より大きなコロイド径を有する金属コロイドを用いた抗体修飾を検討することにより、感度が約100倍に向上した。パラジウムコロイドを用いたクロマト試験紙により、 $10^3$  cfuのO157を検出できた。

キーワード：食品衛生，O157，イムノクロマト法，抗体

## 1 はじめに

昨年8月、北海道にて、腸管出血性大腸菌O157(以下、O157)による食中毒事件が発生した。白菜の浅漬けが原因とみられる本事件では、150名以上が発症する事態となった<sup>1)</sup>。1996年、大阪でO157による集団食中毒事件が発生した際には、患者数は8,000名近くにのぼった<sup>2), 3)</sup>。このような大規模な事件のみならず、O157による食中毒事件は毎年起きており、2009年～2012年の間でも検出報告数は1年あたり1,000件に及ぶ<sup>4)</sup>。このような事件の発生を未然に防止するため、食品からのO157の検査法が確立されている<sup>5)</sup>。その手法は、食品検体を増菌培養後、選択分離培地を用いてO157を分離培養し、生理・生化学試験に供するものや、PCR法を用いて毒素遺伝子を検出するものである。前者は検出までに長時間を要し、後

者は専門装置を要する点が食品製造現場に導入するための課題となっている。

近年、イムノクロマト法が検出法として注目を浴びている<sup>6), 7)</sup>。本手法は、滴下されたサンプル溶液中のO157が、金コロイド標識抗体と結合した後、試験紙上を毛細管現象により移動し、あらかじめ試験紙上に固定化されていた抗体に捕捉され、金コロイド由来の赤色ラインが生じることによりO157を検出する手法である。この試験に要する時間は15分程度で済み、特殊な装置も必要としない。しかし、この方法で検出を確認するには $10^5$  cfu以上の菌数が必要なため18～24時間の前培養が前提となる。本研究では、前培養時間の短縮、あるいは省略が可能になる高感度イムノクロマト技術の開発を目標とした。

## 2 実験方法

### 2.1 細菌、紙、抗体

被検菌として用いたO157は、加熱殺菌検体を

\*<sup>1</sup> 北部研究所 食品・バイオ技術担当

\*<sup>2</sup> 戦略プロジェクト推進担当

使用した(フナコシ社)。ポリクローナル抗体(ヤギ)、モノクローナル抗体(マウス)は市販品を用いた(フナコシ社)。クロマト展開部は 0.5cm 幅・3cm 長に切断したハイフロープラス、溶液滴下部は 0.5cm 幅・1cm 長に切断したグラスファイバーコンジュゲートパッド、展開後の溶液吸収部は 2cm 幅・1cm 長に切断したセルロースファイバーサンプルパッドを用いた(全てミリポア社)。

## 2.2 試作

イムノクロマトの試作は市販品および文献記載の手法を参考にした<sup>7),8)</sup>。金標識に用いた抗体量は 0.25 $\mu$ g、固定化に用いた抗体量は 0.5 $\mu$ g または 5 $\mu$ g である。モノクローナル抗体は固定の際、2 $\mu$ g 用いた。展開部上端より約 1.3cm の位置に抗体を固定した。O157 菌体を添加した溶媒 0.2mL を滴下し、クロマト紙上に添加した。必要な場合は、5%濃度の市販スキムミルクを混合した。溶媒展開後、乾いた試験紙の画像をスキャナー(キヤノン社 MX893)にて 600dpi の解像度で取得し、解析に用いた。

## 3 結果及び考察

### 3.1 感度評価法の確立

O157を $10^5$  cfu添加した溶液(以下、 $10^5$  cfu添加サンプル)を市販品に0.2 mL滴下したところ、テストライン(図1 A、左矢印)およびコントロールライン(同、右矢印)に赤紫色のラインを確認した。O157を加えない溶液(非添加サンプル)を滴下したときには、コントロールラインのみ1本のラインを検出した(図1 B、矢印)。溶液展開済み試験紙の画像をスキャナーで取り込み、紙上の濃淡を調べたところ、ラインに相当する位置にピークを検出した(図1 C、D)。視覚的に濃く見えるラインのピークは、薄く見えるラインのピークよりも大きかった。以上より、ラインの有無を客観的に評価できる手順を確立した。

市販の抗体、試験紙を用いてイムノクロマトの試作品を構築した。試験を簡略化するため、コントロールラインには抗体を塗布せず、テストライ

ンにのみ抗体を固定化した。本試作品の $10^5$  cfu添加サンプルでは、テストラインに相当する位置にピークを検出した(図2 A、矢印)。 $10^4$  cfu添加サンプルでも、 $10^5$  cfu添加時よりも小さいもののピークを検出した(図2 B、矢印)。O157を加えない非添加サンプルでは、ピークは検出されなかった(図2 C)。 $10^5$  cfu添加サンプル、 $10^4$  cfu添加サンプルのピーク面積を計算したところ、前者は後者の6.7倍であった(図2 D)。検量線を作成して相関関係を確認していないため、厳密な測定法ではないが、ピーク面積の計算により、テストラインの濃淡を数値化できることが分かった。以降、ピーク面積をもってイムノクロマトの感度を評価することとした。

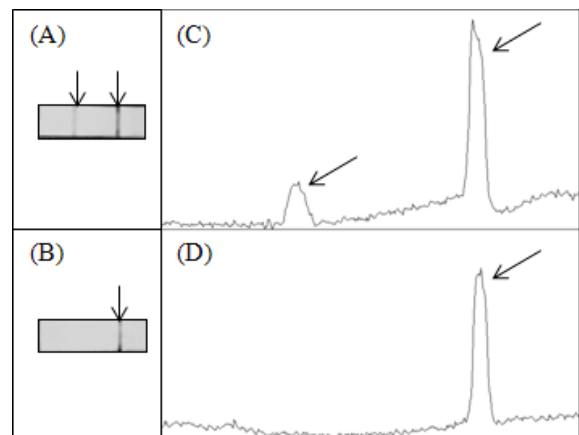


図1 市販品の評価

(A)O157 陽性、(B)O157 陰性、(C)(A)の濃淡評価、(D) (B)の濃淡評価。

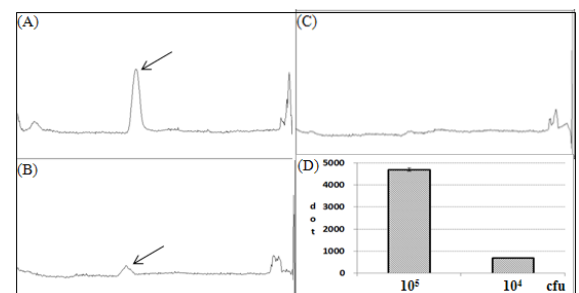


図2 試作品の評価

(A) $10^5$  cfu 添加、(B)  $10^4$  cfu 添加、(C)非添加、(D)(A)(B)の矢印部ピーク面積。横軸は O157 の菌数(cfu)。以下の図も同様。

### 3.2 非特異的吸着の抑制

イムノクロマトの感度が低下する要因として、金コロイド-抗体-O157 複合体がクロマト試験紙上のテストライン以外の部位に吸着する可能性が挙げられる。タンパク質の解析法として、ウェスタンブロッティング法が知られる。本手法は、電気泳動で分離したタンパク質をメンブレンに転写し、目的タンパク質を抗体で検出する。抗体とメンブレンとの非特異的な吸着を抑制するため、抗原抗体反応の前に BSA やスキムミルクなどでメンブレンを前処理する。そこで、サンプル溶液にスキムミルクを混合し、非特異的な吸着を抑制することにより、感度が向上するか試した。感度は劇的に向上し、スキムミルク非添加時の  $10^5$  cfu 添加サンプルと添加時  $10^4$  cfu 添加サンプルのピーク面積がほぼ同値であった(図3)。さらに、スキムミルク添加時は、 $10^3$  cfu であってもピークが検出され、ピーク面積を算出することができた。以上より、非特異的な吸着防止がクロマト感度の向上に有効であった。

クロマトの構築に使用した試験紙はニトロセルロース製で、タンパク質を結合する性質を有する。抗体の固定には都合がいいが、毛細管現象により展開された金標識抗体がテストラインに到達する前に試験紙に吸着してしまう恐れがある。スキムミルクは、牛乳から脂肪分を除いた脱脂乳を粉末状に乾燥させたもので、タンパク質を豊富に含む<sup>9)</sup>。展開溶液中でスキムミルク中のタンパク質

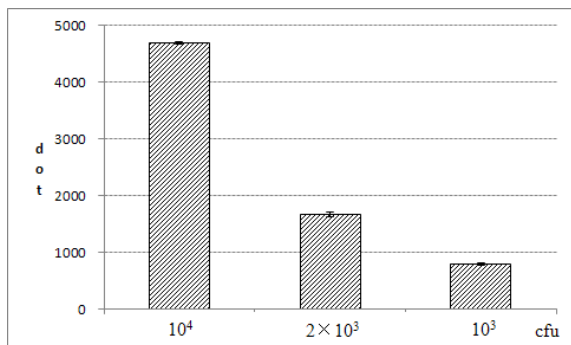


図3 非特異吸着抑制の効果

縦軸はピーク面積のドット値(dot)。同一試験紙について、3回エリア面積を算出した平均値。以下の図も同様。

がニトロセルロースと反応し、マスクすることにより、金標識抗体と試験紙の非特異的な吸着が抑制されると推察される。

なお、以降の試験では、 $10^3$  cfu 添加サンプルのピーク面積(dot 値)に注視し、クロマト感度について評価することにする。

### 3.3 抗体の種類の変化

抗体は作製法によって大別すると、ポリクローナル抗体(p)とモノクローナル抗体(m)が知られる。ポリクローナル抗体はO157抗原決定基に結合する抗体の混合であるのに対し、モノクローナル抗体は特異性が単一である。これらは、特異性や反応安定性において、一長一短であるとされる<sup>10)</sup>。これまでの試験では、標識抗体、固定化抗体ともにポリクローナル抗体を用いた。ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体とを標識・固定において組み合わせて使用することによる感度向上の可能性を調べた。図4(A)は、ポリクローナル抗体を金標識し、固定化抗体の種類や量を変えた。従

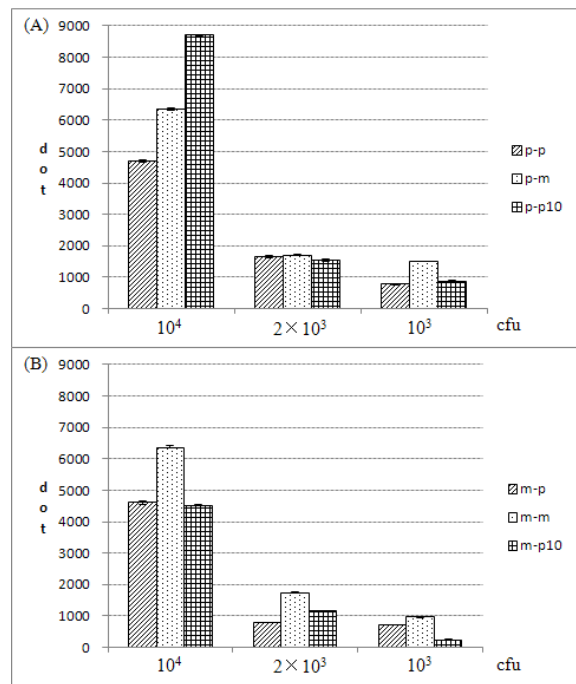


図4 抗体の種類の変化

(A)ポリクローナル抗体(p)を標識、(B)モノクローナル抗体(m)を標識。p-m は、標識 p・固定化 m の組み合わせを表す。p10 は、ポリクローナル抗体の濃度を 10 倍にしたものの。

来試験の結果(p-p)と比べ、固定化抗体にモノクローナル抗体を用いた際、約2倍の感度向上がみられた( $10^3$  cfu添加サンプル)。固定化抗体の濃度を高めたサンプル(p-p10)では、 $10^4$ cfu添加時にはdot値が大きく向上したが、 $2 \times 10^3$ cfu添加サンプルおよび $10^3$ cfu添加サンプルでは従来試作品(p-p)と比して変化がみられなかった。以上より、ポリクローナル抗体の固定化濃度を高めても感度は向上しないが、モノクローナル抗体を固定化に用いると感度が向上することが分かった。図4(B)は、モノクローナル抗体を金標識し、固定化抗体の種類や量を変えた。いずれの試験結果も図4(A)と比して、dot値は同等かそれよりも低い値だった。

標識・固定ともにポリクローナル抗体を用いた場合やモノクローナル抗体を用いた場合には、抗原結合部位を標識抗体で占有してしまい、固定化抗体が抗原を捕捉できず感度が低下すると思われた。予想通り、今回の試験では、ポリクローナル抗体を標識し、モノクローナル抗体で固定したときに最高感度が得られた。逆に、モノクローナル抗体を標識し、ポリクローナル抗体で固定した時には期待したほどの感度が得られなかった。金標識抗体がO157と接触する時間に比して、固定化抗体がO157と接触する時間は短時間である。本試験で使用したモノクローナル抗体は、ポリクローナル抗体よりも抗原との結合力が強く、そのため短時間でも捕捉できたと推測される。

以上の試験結果から、標識にはポリクローナル抗体、固定化にはモノクローナル抗体を用いることとした。

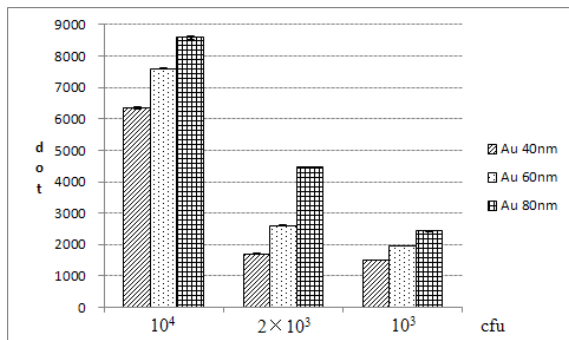


図5 コロイド径の変化

### 3.4 コロイド径の変化

これまでの試験で用いた金のコロイド径は40nmである。このサイズのコロイド径では、視認するのに小さすぎて感度が低下した可能性が考えられた。そこで、抗体を40nm、60nmおよび80nmの金コロイドで標識し、感度を評価した(図5)。全ての添加サンプルにおいて、コロイド径が大きくなる程、高いdot値を示した。80nmコロイドにおける $10^3$ cfu添加サンプルのdot値は40nmコロイドの $2 \times 10^3$ cfu添加サンプルより高い値を示したことから、これまでの2倍以上に感度が向上した。以上より、コロイド径が大きいくほど、感度が向上することが分かった。

### 3.5 標識金属の種類の変化

抗体標識用のコロイドとして、金以外に白金、パラジウム等が知られる。これらで抗体を標識してクロマト感度を評価した(図6)。白金を用いた試作品は金試作品以下の感度であった。使用した白金のコロイド径(20nm)が金(40nm)よりも小さいことが要因の1つであろう。また、白金コロイドは試験紙に非特異的に吸着しており、これも感度低下の要因とみられる。一方、パラジウム(120nm)を用いた試作品は非常に高い感度を示し、 $10^3$ cfu添加区分のdot値は金標識時の2倍以上の数値を示した。コロイド径の大きさが感度向上に寄与したものと推測される。

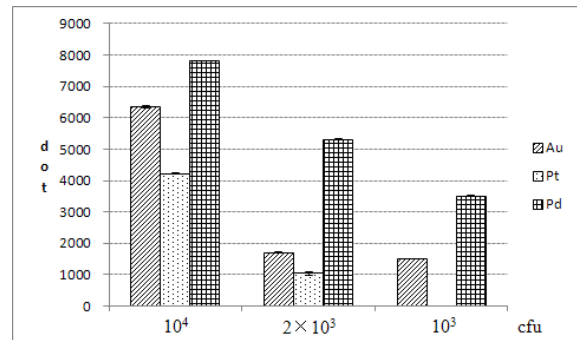


図6 金属の種類の変化

## 4 まとめ

本研究では、イムノクロマトの感度向上を目指し、試作品の評価系を設定した後、以下(1)~(4)の項目について検討した結果、従来の100倍以上の高感度化を実現し、 $10^3$  cfu の O157 を検出可能なイムノクロマトを作製できた。

### (1) 非特異的吸着の抑制

サンプル溶液にスキムミルクを混合し、非特異的な吸着を抑制した。非添加時と比して10倍程度感度が向上し、 $10^4$  cfu の O157 を十分に検出できた。

### (2) 抗体の種類と量の変化

標識抗体、固定化抗体の種類や量を変え、最大感度を示す条件を検討した。標識にポリクローナル抗体、固定化にモノクローナル抗体を用いた際に、最も高い感度が得られた。

### (3) コロイド径の変化

抗体の標識に用いる金コロイドの径を変え、感度に与える影響を調べた。コロイド径が大きいほど、感度が高まる傾向がみられた。

### (4) 標識金属の種類の変化

抗体の標識に用いる金属コロイドとして白金とパラジウムを用いて試験した。パラジウムで高い感度を得られ、 $10^3$  cfu の O157 を十分に検出できた。

## 謝辞

本研究を進めるに当たり、客員研究員として御指導いただきました東京大学大学院の空閑重則教授に感謝の意を表します。

## 参考文献

- 1) 厚生労働省薬事・食品衛生審議会配布資料, <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002kxlb.html>, 2013.3.14
- 2) 厚生労働省 : Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (enterohemorrhagic *E. coli*) infections, Japan, 1996-June 1997, Infectious Agents Surveillance Report, **18**, (1997) 153

- 3) 厚生労働省 : Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (verocytotoxin-producing *E. coli*) infection, 1996-April 1998, Infectious Agents Surveillance Report, **19**, (1998) 122
- 4) 国立感染症研究所, <http://idsc.nih.gov/jp/iasr/prompt/graph-lj.html>, 2013.3.14
- 5) (社)日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針 微生物編, (2004) 168
- 6) Fratamico, P. M. and Bagi, L. K. : Comparison of an immunochromatographic method and the TaqMan<sup>®</sup> *E. coli* O157:H7 assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in alfalfa sprout spent irrigation water and in sprouts after blanching, J. Indust. Microbiol. Biotechnol., **27**, (2001) 129
- 7) Jung, B. Y., Jung, S. C. and Kweon, C. H. : Development of a rapid immunochromatographic strip for detection of *Escherichia coli* O157, J. Food Prot., **68**, 10 (2005) 2140
- 8) 渡部正利, 古川成明, 赤松優, 織田哲弥 : 金ナノ粒子を用いた簡易診断技術開発, **10**, 22(2005) 60
- 9) (社)日本乳業協会, <http://www.nyukyoku.jp/dairy/powdered/powdered03.html>, 2013.3.14
- 10) 高津聖志, 三宅健介, 山元弘, 瀧伸介 : 抗体実験マニュアル, 羊土社, (2008) 25