

連で報告されているものの、健康豚由来株や豚肉由来株とヒトの VTEC 感染症との関わりについては不明な部分が多いのが実情である。そこで今回著者らは、食用動物として牛とともに重要な豚の VTEC 汚染状況について、関東地区 2 県と九州地区 2 県の計 4 県の養豚場で飼育されていた健康豚から VTEC の分離を試みたところ、5.0～18.2% (平均 10.9%) の豚が本菌を保菌していることが明らかとなった。これまで、健康豚の保菌率については、1.8～2.1%、あるいは、14.0%という報告があるが、この差は分離培養法、地域性、季節性などの違いが影響しているものと思われる。事実、著者らの成績では、一部の飼育地域において分離率に 3 倍以上の差が見られたことから、地域や農場によって保菌状況に差があるものと考えられた。

一方、今回分離された VTEC の zoonotic risk を推定するために、血清型および毒素型を調べたところ、分離率は低いものの、ヒトの症例由来株と共通する O126:H-、VT1 産生株や O157:H7、VT2 産生株が分離されたことから、豚も潜在的な保菌源であることが明らかとなった。これまで、豚からの O157:H7 の分離報告は世界的にも少なく注目度は低いですが、豚 VTEC 株の zoonotic risk を念頭に置いた食肉の生産・供給体制が必要であると考えられた。

E. 結論

豚の保菌する VTEC の zoonotic risk

を評価するために、保菌率を調べるとともに、分離株の性状を調べた。保菌率は地域差があり 5.0～18.2% (平均 10.9%) であった。型別された分離株のなかに O126:H-、O157:H7 などヒトの症例由来株と共通する菌型が存在したことから、豚は本菌の潜在的保菌源である可能性があり、zoonotic risk を考慮した豚肉生産体制の確立が望まれる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

福山正文ほか：豚からの Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) の分離および血清型．感染症学雑誌 65:1032-1039, 2003.

表1 豚でのVTECの保菌率

採材地域	検査頭数	VTEC 陽性頭数	保菌率(%)
A県	112	13	11.6
B県	100	9	9.0
C県	99	18	18.2
D県	100	5	5.0
合 計	411	45	10.9

表2 豚から分離されたVTECの血清型

血清型	採材地域				合 計
	A県	B県	C県	D県	
0112ac:H-	2				2
0126:H-	1				1
0157:H7		1			1
OUT:H2	2		3		5
OUT:H7		1			1
OUT:H19	1	1			2
OUT:H-	6		14	4	24
OUT:HUT	1	6	1	1	9
合 計	13	9	18	5	45

OUT : O 群型不明 HUT : H 抗原不明

表3 豚から分離されたVTECのVero毒素型

採材地域	検査株数	Vero毒素型		
		VT1	VT2	VT1+VT2
A県	13	10(58.8%)	2(7.4%)	1(100%)
B県	9	3(17.6)	6(22.2%)	0
C県	18	2(11.8)	16(59.3%)	0
D県	5	2(11.8)	3(11.1)	0
合計	45	17(37.8)	27(60.0)	1(2.2)

厚生科学研究費補助金(食品安全確保研究事業)
分担研究報告書

志賀毒素産生大腸菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*)の自然感染牛における排菌数とその持続

分担研究者 品川邦汎 岩手大学 教授

志賀毒素産生性大腸菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; STEC)は出血性腸炎、溶血性尿毒症症候群、血小板減少性紫斑病などを引き起こす重要な食中毒起因菌である。STEC のリザボアは牛であり、牛における STEC の動態を明らかにすることは、本食中毒を防除するうえで極めて重要である。本研究では、STEC O157 および O26 を対象に、経時的に採取した牛の糞便について免疫磁気ビーズ法を用いた最確数法により排菌期間および排菌数を調査した。その結果、STEC O26 の排菌期間は0-2週と短く、排菌数も3-2400 cfu/10g と少なかったのに対し、STEC O157 の排菌期間は0-10週と牛により異なり、その排菌数も4-110,000 cfu/10g と様々であることが明らかとなった。STEC O157 保菌牛では、14頭中11頭に間欠的な排菌が見られた。更に、パルスフィールドゲル電気泳動により分離菌株の遺伝子型別を行ったところ、排菌期間中に分離された菌株は同一型あるいは subtype の範囲内であることが明らかになった。

以上の結果より、STEC O157 は STEC O26 よりヒト感染症発生の危険性が高いと考えられた。

研究協力者

Widiasih D.A. 岩手大学
井戸徳子 岩手大学
重茂克彦 岩手大学
杉井俊治 大阪府立大学
鎌田洋一 大阪府立大学

A. 研究目的

志賀毒素産生性大腸菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; STEC)は出血性腸炎、溶血性尿毒症症候群、血小板減少性紫斑病などを引き起こす重要な食中毒起因菌である。STEC は種々の血清型が報告されているが、代表的な O 抗原型として、O157、O26、および O111 が知られている。わが国では、1990年に初めて STEC O157:H7 の集団感染事例が報告され、以降多くの集団感染事例や散发事例が各地で発生している(1)。これらの STEC のリザボアとして牛が重要視されている(2)。STEC は、多くの場合牛に感染しても症状を現さないが、保菌牛糞便による食肉処理工程での食肉の汚染、環境汚染、および堆肥を用いて生産される農産物への二次的汚染などが示唆されている。近年、食肉の製造段階だけではなく、生産段階(農場)においても、Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP)システムの導入の重要性が指摘されており、食肉の安全性確保を行うために農場での保菌牛対策を行うことが望まれている。

しかしながら、農場における STEC の動態については十分に明らかにされておらず、的確な除菌方策を行うためにも、また、その効果を評価するうえで

も詳細な STEC の動態を把握する必要がある。本研究では、岩手県の一農場で飼育されている牛群を対象として、STEC O157 と O26 の保菌牛における動態(排菌期間)を、定量的に明らかにすることを目的として調査を行った。

B. 方法

1) 検体

岩手県内の農場において、春期、夏期、冬季の3期間に渡り、1-10ヶ月例の牛の直腸便を採取した。ホルスタイン種 233頭、黒毛和種 26頭、および F1種 63頭を対象として STEC O157 のスクリーニングを行った。また、O26 のスクリーニングはホルスタイン種 123頭、黒毛和種 24頭および F1種 31の直腸便を対象とした。

2) O157 および O26 保菌牛のスクリーニング

牛糞便 1g をノボビオシン加 mEC 培地(9 ml)に摂取し、37°C で 18 時間培養後、その培養液 1 ml に抗 O157 あるいは抗 O26 免疫磁気ビーズ(Dynal) 20 μ l を添加・混和し、磁石ラックを用いてビーズを回収した。ビーズを滅菌生理食塩水で洗浄後、O157 スクリーニングでは CT-SMAC 平板培地、O26 スクリーニングでは CT-RMAC 平板培地に摂取し、培養した。培地上に出現したコロニーを釣菌し、HI 培地で再分離した。これらのコロニーについて病原大腸菌免疫血清によりスライド凝集試験を行い、STEC O157、O26 の同定を行った。分離菌株の stx1/stx2 遺伝子の保有については、市販のプライマー(宝酒造)を用いて PCR により行った。

3) 免疫磁気ビーズを用いた最確数法による STEC O157 および O26 の菌数測定

スクリーニング試験で STEC O157 あるいは O26 陽性となった保菌牛について、才覚数方により 1 週間隔で経時的に菌数測定を行った。4 週連続して排菌が認められなかった場合に保菌陰性と判断した。

4) パルスフィールドゲル電気泳動(Pulsed field gel electrophoresis; PFGE)

経時的に分離された STEC O157 および O26 について、PFGE を用いて遺伝子型別を行った。PFGE は Bio-Rad 社の CHEF DR III を使い、STEC O157 については XbaI、O26 については NotI を用いて定法に従って行った (3)。

C. 結果と考察

1) 牛の STEC O157 および O26 保有状況

STEC O157 は 11/324 頭 (3.4%)、STEC O26 は 14/178 頭 (7.9%) から検出された。今回の調査では、STEC O157、O26 とともに牛の月齢による保菌率の違いは認められなかった。牛種別では、黒毛和種の STEC O157 保菌率がホルスタイン種のそれに対して有意に高い ($P>0.05$) 傾向が認められた。また、STEC の保菌率は、夏期に増加することが認められた。

2) 牛の STEC O157 および O26 の排菌期間と排菌数

STEC O157 の排菌期間と排菌数を表 1 に示す。最長のもので 10 週間まで陽性のものと、最短では 1 週間で陰性となったものが見られた。多くの牛では排菌期間中間欠的排菌 (1-2 週排菌陰性を示し、その後再び排菌陽性となる) を示し、その排菌数は $4 \times 10^4 \sim 110,000$ cfu/10 g と、牛により様々であった。これに対し、STEC O26 保菌牛の排菌期間は短く、最長で 2 週間、最短で 1 週間以下であった。更に、排菌数も STEC O157 に比べて少なく、 $3 \sim 2400$ cfu/10 g であった。また、STEC O26 保菌牛では中間欠的排菌は観察されなかった (表 2)。

3) 経時的に分離した STEC O157 および O26 の遺伝子型

経時的に分離した STEC O157 および O26 について、PFGE による遺伝子型別と stx 遺伝子型別を行った。PFGE 型はバンドの位置と数により分類し、菌株間で 7 本以上のバンドが異なっていた場合は由来の異なる株と見なした。また、1-3 本のバンドが異なっていた場合は、近縁な株と見なし、subtype とした (4)。stx 遺伝子型は PCR により決定した。表 1 に各保菌牛から分離された STEC O157 の遺伝子型の変動を示す。ほとんどの牛で STEC O157 は同一あるいは subtype 内の遺伝子型の

O157 が分離され、間欠的に排菌している場合でも、その傾向は変わらなかったことから、ほぼ同一の STEC O157 が長期に渡って保菌牛に維持されていることが示唆された。STEC O26 においても STEC O157 と同様に、連続して同一あるいは subtype の遺伝子型の菌が連続して分離された (表 3, 4)。しかしながら、1 頭 (牛番号 2) において、1 週目と 2 週目で異なった遺伝子型の菌が分離されており、再感染の可能性が示唆された。

D. まとめ

本研究により、STEC O157 保菌牛の排菌期間は STEC O26 保菌牛に比してより長期間にわたり、またその排菌数も多いことが明らかになった。また、STEC O157 では一度排菌陰性となっても、1-3 週目に再び排菌を開始する、間欠的排菌が見られることが明らかとなった。その場合でも、排菌された STEC O157 の遺伝子型は排菌期間を通じてほぼ同一であり、一度牛消化管内に侵入、定着した STEC O157 は長期間にわたって牛消化管内に存在し、排菌されると考えられる。

以上の結果より、STEC O26 に比して STEC O157 は長期間にわたって保菌牛から排菌され、種々の経路を通じて食品および環境を汚染し、ヒト STEC 感染症を発生させる危険性が高いと考えられる。

E. 引用文献

1. 竹田美文. わが国における腸管出血性大腸菌感染症の疫学動向 (1997) 日本臨床 55: 631-633.
2. Wells, J. G. et al. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin producing *E. coli* from dairy cattle (1991) J. Clin. Microbiol. 29: 985-989.
3. Izumiya et al. Molecular typing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates in Japan by using pulsed-field gel electrophoresis (1997) J. Clin. Microbiol. 35: 1675-1680.
4. Tenover et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing (1995) J. Clin. Microbiol. 33: 2233-2239.

大腸菌耐熱性毒素 EAST1 に対する免疫抗体の作製
及びリコンビナント EAST1 の大腸菌発現系構築の試み

大阪府立大学大学院

農学生命科学研究科 獣医学専攻

獣医公衆衛生学研究室

鎌田 洋一

【緒 言】

大腸菌は人を含むすべての哺乳動物の腸管に常在しており、その大半は人や動物に害を及ぼさない。しかし、一部には飲食物を介して下痢を起こす大腸菌がある。それらは非病原性大腸菌と区別して下痢原性大腸菌と呼ばれ、現在まで、腸管病原性大腸菌 (*Enteropathogenic Escherichia coli*; EPEC)、腸管侵入性大腸菌 (*Enteroinvasive Escherichia coli*; EIEC)、腸管毒素原性大腸菌 (*Enterotoxigenic Escherichia coli*; ETEC)、腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*; EHEC)、腸管凝集性大腸菌 (*Enteroadgregative Escherichia coli*; EAaggEC) の5種に分類されている (10)。近年、日本では下痢原性大腸菌 (EHEC も含む) による食中毒事例が増え、全食中毒発生件数の約 9.0% までになっている (25)。特に ETEC による旅行者下痢症が増えてきた。そのような中、下痢原性大腸菌による食中毒事例において、*Enteroadgregative Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1; EAST1 が原因として疑われる事例も増えてきた (16)。EAST1 は当初、EAaggEC の病原因子の 1 つとして考えられていたが、1995 年 Savarino らは EAST1 の遺伝子である *astA* が EPEC、ETEC、EHEC から検出されたことを報告し、EAST1 が EAaggEC に特定された病原因子でなく、その他の下痢原性大腸菌の下痢症発現に関与する可能性を示唆した (18、23)。これら分離された大腸菌すべてに *astA* だけでなく、他の病原因子の遺伝子も確認されたことから、EAST1 が実際に下痢症に関与しているかどうかは不明のままであった。

1995 年秋田県で発生した集団食中毒事例から分離された EPEC (O126:NM) は、EPEC の下痢原性機構に深く関与していると考えられている遺伝子 *eaeA*、及び EPEC Adherence Factor (EAF) 遺伝子を保有していなかったが、*astA* は保有していた (7、9、24)。さらに、1996 年大阪で発生した集団食中毒事例から分離された大腸菌 (O166:H15) は下痢原性大腸菌の指標となる既知の病原遺伝子や腸管定着因子を保有していなかったが、*astA* を染色体とプラスミド上に保有していた (12)。その後、西川が 3 年間 (1997-1999) の大阪市内散発下痢症患者における下痢原性大腸菌の分離状況を調査した結果、*astA* だけを持ち、他の病原因子遺伝子を持たない大腸菌が 35% も占めることがわかった (13)。

EAST1 はアミノ酸 38 個からなる分子量 4,100 のペプチドとして *astA* にコードされている。EAST1 は分子内にシステインが 4 残基あり、2 本のジスルフィド結合を持つ可能性があること、及び ETEC が産生する大腸菌耐熱性毒素 (*E. coli* heat-stable enterotoxin; STI) とアミノ酸配列の一部に相同性があること、さらに腸管内のグアニ

レートシクラーゼを受容体とし、腸管上皮細胞内の cGMP の上昇を起こすことが報告されている (16、17、19)。これら STI との類似性や上記事例は、EAST1 が下痢症の発現や下痢原性大腸菌の疫学に重要な位置を占める可能性を示し、今後、下痢症例の検査項目に EAST1 が必要だと考えられる。現在、EAST1 の検査には Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による EAST1 遺伝子 *astA* の検出が行われているが、EAST1 ペプチドを検出する方法は開発されておらず、実際に事例株が EAST1 ペプチドを産生しているかどうかは確かめられていない。

そこで、本研究では EAST1 の確定診断のために、ペプチドそのものを検出する免疫学的方法の開発を最終目的とし、ポリクローナル抗体 (pAb)、モノクローナル抗体 (mAb) の作製、及びリコンビナント EAST1 (rEAST1) の大腸菌発現系の構築を試みた。

【材料・方法】

1. 抗体の作製

EAST1 の N 末端側の推定アミノ酸配列 [Arg-Arg-Pro-Ala-Ser-Ser-Tyr-Ala-Ser-Cys] (以下 N-1) と C 末端側のアミノ酸配列 [Cys-Gly-Arg-Thr-Thr-Lys-Pro-Ser-Leu-Ala-Thr] (以下 C-1) を抗原ペプチドとして設計した (TaKaRa により合成) (図 1)。2 種の抗原ペプチドそれぞれにグルタルアルデヒド法によりウシ血清アルブミン (PIERCE) を結合させた (2)。それぞれをオイルアジュバンド (Wako) と混合し、ウサギ (ニュージーランドホワイト) およびマウス (BALB/c) に免疫した。抗原ペプチドをアガロースゲル (SulfoLink Kit; PIERCE) に固定化したカラムを用い、ウサギ抗血清からアフィニティークロマトグラフィーにより精製し pAb とした。

mAb の作製は以下のように行った。免疫したマウス脾細胞とミエローマ細胞 (X63Ag.653) をポリエチレングリコール (PGE4000; MERCK) を用いて細胞融合した。抗原ペプチドをウェルに吸着させた ELISA によりハイブリドーマ培養上清をスクリーニングし、抗体産生ハイブリドーマを確立した。ハイブリドーマをプリステイン (SIGMA) 処置したマウス腹腔内 (BALB/c) に投与して得た腹水から mAb を精製した。IgG 型の抗体は Protein A Column (Amersham Pharmacia Biotech) により、IgM 型の抗体は Sephacryl S-300 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いたゲル濾過により精製した。抗体のクラス、及びサブクラスの決定にはマウスイムノグロブリンタイピングキット (Wako) を用いた。

2. リコンビナント EAST1 (rEAST1) の作製

集団食中毒事例株大腸菌 O166:H15 (00-39-102 株) の染色体由来 EAST1 遺伝子 *astA* が挿入された pGEM-T Vector (西川禎一博士 (大阪市立大学) より分与) を鋳型とした。プライマー 1 ; 5'-tatgccatcaacacagtatatccg-3' およびプライマー 2 ; 5'-ggtcgcgagtgactgctttgtagt-3'を用いて、94°C1分、49°C1分、72°C1分を25サイクルという条件で PCR (Thermal Cycler; ASTEC) を行った。ビオチン結合タグとの融合タンパクを発現させる PinPoint Xa-1 T Vector (Promega) に PCR 産物を挿入し、大腸菌 JM109 に形質転換した。1 mM イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 添加後、37°C で 9 時間培養 (LB medium) し、ビオチン結合タグのついた rEAST1 (B-rEAST1) を発現誘導させた。菌体を回収し、Cell Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl; pH7.5, 50 mM NaCl, 5% Glycerol) に懸濁した。超音波により菌体を破碎した (ULTRASONIC DISRUPTOR; TOMY)。これを遠心 (10,000 X g, 15 分間) し、その上清をアビジン担体 (Promega) を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製した (図 2)。溶出には 5 mM のビオチンを加えた Cell Lysis Buffer を用いた。リコンビナントタンパクの発現の確認にはダイデオキシ法によるシーケンス解析 (DSQ2000; SHIMADZU)、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (SIGMA) を用いたウェスタン・ブロット法を行った。

3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

① pAb、mAb の抗体価の測定

N-1 または C-1 (1.0 μ g/ml) を ELISA プレートに 0.1 ml/well 加え、37°C で 1 時間インキュベートし抗原を吸着させた後、PBS で 4 倍希釈したブロックエース (大日本製薬) 0.2 ml/well を加え、37°C で 1 時間インキュベートしブロッキングを行った。0.05% Tween20-PBS (PBS-T) で 2 回洗浄後、pAb または mAb 0.1 ml/well を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。同溶液で 6 回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識した Anti-Rabbit IgG (BIORAD)、Anti-Mouse IgG (BIORAD)、Anti-Mouse IgM (BIOSOURCE) 0.1 ml/well を加え、37°C で 1 時間反応させた。過酸化水素と o-フェニレンジアミン (Wako) で発色後、分光光度計 (MICROPLATE READER MODEL 550; BIORAD) を用いて 450 nm での吸光度を測定した。

② B-rEAST1 と抗体との反応

作製した pAb、mAb および無関係な抗体 (本研究室で作製した抗クサガメビテロジェニン抗体) 1.0 μ g/ml を上記の条件でコーティング、ブロッキングした後、B-rEAST1 を 0.1 ml/well 加え、37°C で 1 時間インキュベートした。PBS-T で 6 回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと 37°C で 1 時間反応させ、過酸化水素と o-フェニ

レンジアミンで発色後、450 nm での吸光度を測定した。

③ competitive ELISA

N-1 または C-1 を上記の条件でコーティング、ブロッキングをした後、competitor となる N-1、C-1 または B-rEAST1 と抗体を 0.05 ml/well ずつ加え 37°C で 30 分間インキュベートした。PBS-T で 6 回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識した二次抗体と 37°C で 1 時間反応させ、過酸化水素と o-フェニレンジアミンで発色後、450 nm での吸光度を測定した。

4. その他

タンパクの定量は Bradford 法で行った (1)。SDS-PAGE は Laemmli 法に従い、15% ポリアクリルアミドゲルを使用した (8)。ウエスタン・ブロットはセミドライ型転写装置 (ATTO) を用いた。アガロース電気泳動には 2%アガロースゲルを用いた。

【結 果】

1. 抗体の作製と反応性

①pAb の作製と反応性

C-1 および N-1 に対する pAb を得た。抗体価を ELISA で確認したところ、両抗体はともに抗体の濃度に依存して抗原ペプチドと反応した (表 1)。

②mAb の作製と反応性

N-1 に対する 2 種の mAb を得た。それぞれを AN2C、AN5C とした。AN2C のサブクラスは IgG₃ だった。AN5A は IgM 型だった。C-1 に対する 1 種の mAb を得た。それを ACD2 とした。サブクラスは IgG_{2b} だった。全ての抗体が抗体の濃度に依存して抗原ペプチドと反応した (表 1)。いずれの mAb も κ鎖を持つ抗体であった。

2. rEAST1 の作製

アガロースゲル電気泳動法の結果、PCR 産物は *astA* の大きさ (116 bp) と一致した (図 3)。これを PinPoint Xa-1 T Vector に挿入し、大腸菌 JM109 に形質転換した。ダイデオキシ法でインサートの塩基配列を確認したところ、大腸菌 O166:H15 由来 *astA* と塩基配列が一致した。1 mM IPTG 存在下で 37°C で 9 時間の培養を行ったところ、SDS-PAGE により 17.1 kDa のリコンビナントタンパクの発現が確認された (図 4a)。

そのバンドはペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応した (図 4b)。

大腸菌を菌体破碎した遠心上清から、アビジン担体を用いたアフィニティクロマトグラフィーを行ったところ (図 5)、SDS-PAGE により溶出分画中に 17.1 kDa と 15.6 kDa の位置にバンドが確認された (図 6a)。さらに、2本のバンドはともにストレプトアビジンと反応した (図 6b)。また、今回の発現誘導においては、500 ml 培養液から 0.271 mg の B-rEAST1 が回収された (表 2)。

3. B-rEAST1 と抗体との反応

pAb Anti N-1 を用いて B-rEAST1 との反応性を ELISA により調べた結果、0.03 $\mu\text{g/ml}$ 以上で B-rEAST1 の濃度に依存して吸光度が上昇したこと、また、それは無関係な抗体との反応よりも大きな上昇を示したこと、および抗原を B-rEAST1 からビオチンに置換しても反応を示さなかったことから、pAb Anti N-1 が B-rEAST1 を特異的に認識していることが示唆された (図 7 および 8)。

pAb、mAb と B-rEAST1 との反応性をウエスタン・ブロット法で調べたが、反応性を示さなかった。

4. N-1 および C-1 を competitor とした competitive ELISA

①pAb を用いた competitive ELISA

C-1 を competitor として pAb Anti C-1 0.1 $\mu\text{g/ml}$ で、competitive ELISA を行ったところ、吸着させた C-1 と pAb との反応が competitor C-1 10.0 ng/ml 存在下で阻害が確認された (図 9)。

同様に、N-1 を competitor として pAb Anti N-1 0.05 $\mu\text{g/ml}$ で、competitive ELISA を行ったところ、N-1 が 1.0 ng/ml 存在下で阻害が確認された (図 10)。

両抗体はともに無関係なペプチドは阻害しなかった (図 9 および 10)。

②mAb を用いた competitive ELISA

N-1 を competitor として AN2C 0.3 $\mu\text{g/ml}$ で、competitive ELISA を行ったところ、N-1 が 10 ng/ml 存在下で阻害が確認された (図 11)。

N-1 を competitor として AN5A 5 ng/ml で、competitive ELISA を行ったところ、N-1 が 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 存在下で阻害が確認された (図 12)。

両抗体はともに無関係なペプチドを阻害しなかった (図 11 および 12)。

ACD2 でも competitive ELISA を行ったが、C-1 が 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 存在下でも阻害が確認できなかった。

以上の結果より、pAb Anti N-1 を用いた competitive ELISA システムが EAST1 由来ペプチドを検出するのに最適であることがわかった。

5. B-rEAST1 を competitor とした competitive ELISA

B-rEAST1 を competitor として、pAb Anti N-1 0.05 µg/ml を用いた competitive ELISA を行ったところペプチド換算濃度 B-rEAST1 2.5 µg/ml まで阻害が確認できなかった (図 13)。

【考 察】

EAST1 に対する免疫抗体の作製にあたって、ウサギおよびマウスに免疫する抗原を合成ペプチドとした。EAST1 は、精製方法が確立されていないため、高純度の EAST1 を入手するのは不可能であった。しかし、EAST1 の推定アミノ酸配列は既に報告されていたので、本研究では合成ペプチドを免疫原とした (17)。本研究では、Hopp and Woods の理論を参考にして EAST1 の 38 個のアミノ酸から、親水性に富む 2 領域を選択した (6)。あるタンパク質を特異的に認識する抗体を作製するには 10 アミノ酸残基以上が必要であるとされている。それ以下では、その配列が他のタンパク質中にも存在する可能性が高くなり、抗体の特異性が低下すると考えられるので、本研究では 2 領域からそれぞれ 10 アミノ酸残基を選択した。合成ペプチド内でシステイン残基によるジスルフィド結合が形成されるのを防ぐために、システイン残基を 2 つ以上入れないように配慮した。それらを抗原として得られた pAb、mAb は ELISA による抗体価の測定や competitive ELISA の結果、mAb よりも pAb の方が抗体価が高く、低濃度でのペプチド検出が可能であることがわかった。抗体が認識する抗原エピトープはアミノ酸 5、6 残基とされているので、本研究で得られた精製 pAb は 2~3 種の抗体で構成されている可能性は否定できない (5)。よって、得られた pAb は mAb と同程度の特異性を持ち、mAb よりも高抗体価であったと考えられる。

次に rEAST1 の作製を試みた。rEAST1 は EAST1 検出 ELISA システムにおける標準曲線を得るために必須となる。EAST1 の N 末端側にビオチン結合タンパクがタグとして融合された rEAST1 (B-rEAST1) を大腸菌に発現させ、アビジン担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーでリコンビナントタンパクの精製を試みた。部分精製物は 17.1 kDa と 15.6 kDa の位置にバンドが確認された。17.1 kDa のバンドは、タグとして発現するビオチン結合タンパクが 13.0 kDa であるため、分子量の差からリコンビナントタンパクに 4.1 kDa の rEAST1 が含まれることが示唆された。15.6 kDa の位置に確認されたバンドについては 2 つの可能性が考えられた。発現された B-rEAST1 が大腸菌のプロテアーゼによって切断された、もしくは、EAST1 を構成するアミノ酸残基

の一部 (8 番目のアルギニンから 10 番目のプロリンまで、および 29 番目のグリシンと 30 番目のアルギニン) のコドン使用頻度が非常に低いため、アミノ酸の合成が途中で止まってしまったことが考えられた (11)。

本研究の大腸菌発現系から得られた部分精製 B-rEAST1 は 500 ml 培養で 0.271 mg だった。これは決して高い数値でないと考えられる。使用頻度が低いコドンが使われていることがその一因であろうが、発現させるタンパク (B-rEAST1) の回収量を向上させるために、予備実験として 25°C での培養、IPTG 低濃度での発現などを試みたが、本論文に記載した 37°C、1 mM IPTG の条件が最適だった。今後はまれなコドンの発現用にデザインされているコンピテントセル (BL21-CodonPlus; STRATAGENE) を用いての発現や、大腸菌以外の系での発現を検討することも重要であると思われる。

本研究で構築した大腸菌発現系から得られた B-rEAST1 は可溶性画分に含まれるものであった。すなわち、この発現系から得られた B-rEAST1 は尿素などを用いた変性条件下で精製されていないため、精製によって高次構造が大きく変化しておらず、B-rEAST1 中の EAST1 領域は native EAST1 の構造と類似のままであり、その活性を保った状態であると推察される。このことは全長の rEAST1 を免疫原とした抗体の作製において有用となるだろう。また、近年、EAST1 と同様に腸管グアニレートシクラーゼを活性化する STI や腸管内在性ホルモンのグアニリンで既に応用されている培養細胞 T84 を用いた rEAST1 アッセイ法の確立への利用なども期待できる (3、19、21、22)。

本研究では作製した pAb、mAb、および B-rEAST1 を用いた ELISA による検出法の開発も検討した。ELISA による検出として、Sandwich ELISA もしくは competitive ELISA が挙げられるが、本研究では EAST1 が Sandwich ELISA を適用するには小さすぎると考えたため、competitive ELISA による検出法の開発を選択した。まず、B-rEAST1 と抗体の ELISA での反応性を調べるために、作製した pAb、mAb をウェルにコーティングし、B-rEAST1 を抗原として反応させ、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで発色させる ELISA を行った。その結果、すべての抗体で反応が確認された。その中で pAb Anti N-1 が最も良い反応を示した。また、抗原ペプチドを competitor とした competitive ELISA でも、pAb Anti N-1 が最もペプチド検出感度が高かったため、pAb Anti N-1 を用いて B-rEAST1 を competitor とした competitive ELISA を行った。その結果、ペプチド換算濃度 B-rEAST1 2.5 μ g/ml まで阻害が確認されなかった。その原因として、抗原とした抗原ペプチド (N-1) と B-rEAST1 の立体構造が異なることが考えられる。このことは作製した抗体と B-rEAST1 がウェスタン・ブロット法で反応しなかったことから推察された。立体構造の違いによる抗体の反応性の低下は抗ペプチド抗体の弱点の 1 つである。特に EAST1 は 2 本のジスルフィド結合を有する可能性があるため、3 本のジスルフィド結合を持つ STI や 2 本のジスルフィド結合を持つグ

アニリンのように、特異な立体構造を持つことが推察される (3、4、14、20)。

本研究において pAb Anti N-1 が抗原ペプチド (N-1) を competitor とした時は 1.0 ng/ml で阻害が確認された。この competitive ELISA システムを用いてサンプルを Trypsin など酵素処理することで、10~20 アミノ酸残基に切断し、直鎖状のペプチドとし、それと作製した pAb、mAb を反応させる検出法の構築が期待できる。また、別の EAST1 検出法として、rEAST1 にビオチン結合タグがついていることを利用した系も考えられる。その方法は、本研究で B-rEAST1 と抗体との反応性を調べるために行った ELISA システムを利用するものであるが、B-rEAST1 と食中毒事例株の培養上清を混合し、もし培養上清中に EAST1 が存在すれば、ウェルに吸着させた抗体と B-rEAST1 の反応が阻害されるため、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンとビオチン結合タグとの反応がなくなり発色しなくなるという competitive ELISA システムである。いずれの検出法も更なる検討を要するが、EAST1 検出法を開発することは、下痢原性大腸菌が原因である食中毒事例の疫学的調査に有用であるだけでなく、緒言でも述べたように、EAST1 遺伝子 *astA* は EAggEC だけでなく、EHEC、EPEC、ETEC からも検出されているので、それらから実際に EAST1 ペプチドが産生されていることが確認されれば、現在までの下痢原性大腸菌の分類法に一石を投じることになるだろう (18、23)。また、近年、*astA* がサルモネラからも検出されたという報告があるので、EAST1 検出はサルモネラによる食中毒事例の疫学的調査への応用も期待できる (15)。

【参考文献】

1. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
2. Coligan, J.E. (ED) 1991. Coupling of synthetic peptide to carrier protein using glutaraldehyde. *Current protocol in immunology.* 9. 4. 3
3. Currie, M. G., K. F. Fok, J. Kato, R. J. Moore, F. K. Hamra, K. L. Duffin, and C. E. Smith. 1992. Guanylin: An endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:947-951

4. Garcia, K. C., F. J. Sauvage, M. Struble, W. Henzel, D. Reilly, and D. V. Goeddel. 1993. Processing and characterization of human proguanylin expressed in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 268:22397-22401
5. Geysen, H. M., S. J. Rodda, T. J. Mason, G. Tribbick, and P. G. Schoofs. 1987. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. J. Immunol. Methods. 102:259-274
6. Hopp, T. P. and K. R. Wood. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:3824-3828
7. Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall, and J. B. Kaper. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:7839-7843
8. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685
9. Levine, M. M., J. P. Nataro, H. Karch, M. M. Baldini, J. B. Kaper, R. E. Black, M. L. Clements, and A. D. O'Brien. 1985. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. J. Infect. Dis. 152:550-559
10. Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J. Infect. Dis. 155:377-389
11. Nakamura, Y., T. Gojobori, and T. Ikemura. 2000. Codon usage tabulated from international DNA sequence database: status for the year 2000. Nucleic Acids Res. 28:292
12. Nishikawa, Y., J. Ogasawara, A. Helander, and K. Haruki. 1999. An outbreak of gastroenteritis in Japan due to *Escherichia coli* O166. Emerg. Infect. Dis. 5:300
13. 西川 禎一. 2001. 1997年から1999年の大阪市内散発下痢症患者における下痢原性大腸菌の分離状況. 日本細菌学雑誌. 56:329

14. Ozaki, H., T. Sato, H. Kubota, Y. Hata, Y. Katsube, and Y. Shimonishi. 1991. Molecular structure of the toxin domain of heat-stable enterotoxin produced by a pathogenic strain of *Escherichia coli*. A putative binding site for a binding protein on rat intestinal epithelial cell membranes. *J. Biol. Chem.* 266:5934-5941
15. Pariva de Sousa, C. and J. D. Dubreuil. 2001. Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 gene) in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int. J. Med. Microbiol.* 291:15-20
16. Savarino, S. D., A. Fasano, D. C. Robertson, and M. M. Levine. 1991. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *J. Clin. Invest.* 87:1450-1455
17. Savarino, S. J., A. Fasano, J. Watson, B. M. Martin, M. M. Levine, S. Guandalini, and P. Guerry. 1993. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:3093-3097
18. Savarino, S. J., A. M. Veigh, J. Watson, A. Cravioto, J. Molina, P. Echeverria, M. K. Bhan, M. M. Levine, and A. Fasano. 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *J. Infect. Dis.* 173:1019-1022
19. Schulz, S., C. K. Green, P. S. Yuen, and D. L. Garbers. 1990. Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell.* 63:941-948
20. Shimonishi, Y., Y. Hidaka, M. Koizumi, M. Hane, S. Aimoto, T. Takeda, T. Miwatani, and Y. Takeda. 1987. Mode of disulfide bond formation of a heat-stable enterotoxin (STh) produced by a human strain of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 215:165-170
21. Uzzau, S., and A. Fasano. 2000. Cross-talk between enteric pathogens and the intestine. *Cell. Microbiol.* 2:83-89
22. Visweswariah, S. S., G. Shanthi, and T. S. Balganes. 1992. Interaction of heat-stable enterotoxin with human colonic (T84) cells: modulation of the activation of guanylyl cyclase. *Micro. Pathog.* 12:209-218

23. Yamamoto, T., N. Wakisaka, F. Sato, and A. Kato. 1997. Comparison of the nucleotide sequence of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea-associated *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 147:89-95
24. 八柳 潤, 木内 雄, 齊藤 志保子, 佐藤 宏康, 森田 盛大. 1995. 腸管集合性大腸菌耐熱性毒素エンテロトキシン-1(EAST-1)遺伝子を保有する,食中毒事例由来病原血清型大腸菌. 感染症学雑誌. 70:215-223
25. 厚生労働省. 食中毒発生状況(平成 12 年).

1 atgccatcaacacagtatatccgaaggccgcattatgcatgcatatggt 60
gc M P S T Q Y I R R P A S S Y A S C I W C

N-1 Peptide

61 caacagcctgcctcatgtcatggaaggactacaagcagtcactcgcgacc 114
A T A C A S C H G R T T K Q S L A T

C-1 Peptide

図1 EAST1の塩基配列および推定アミノ酸配列と抗原ペプチド選択部位

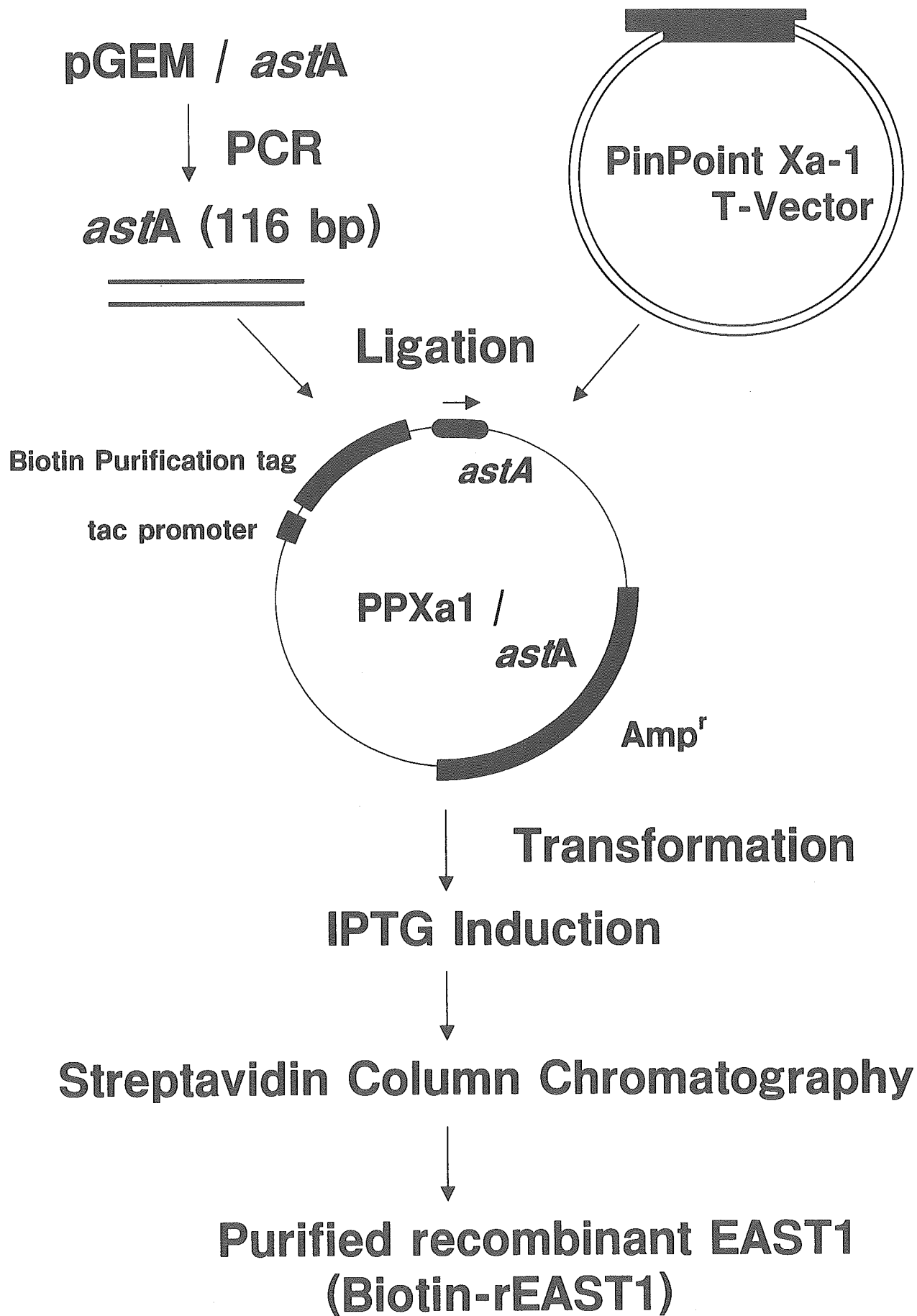


図2 B-rEAST1作製までのフローチャート

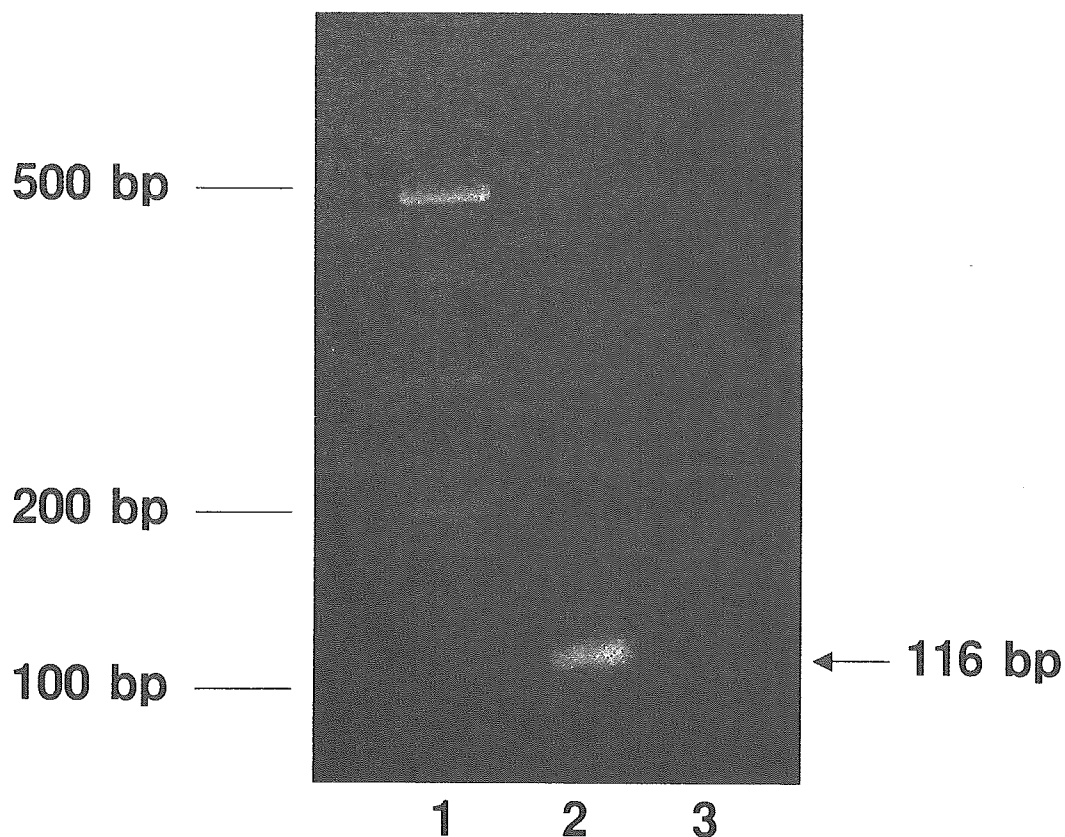


図3 PCR法によるEAST1遺伝子*astA*の増幅

2%アガロースゲル電気泳動

レーン1：分子量マーカー

レーン2：*astA*が挿入されたpGEM T-Vectorを
鋳型とした

レーン3：*astA*が挿入されていないpGEM T-Vector
を鋳型とした