

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Detection of EspB using reversed passive latex agglutination : application to determination of enteropathogenic *Escherichia coli*

(逆受身ラテックス凝集法によるEspBの検出：腸管病原大腸菌の同定における応用)

氏 名 陸 彦 

【目的】

世界的に見ると下痢症は乳幼児死亡の主要原因疾患である。その原因菌で頻度の高い腸管病原大腸菌 (EPEC) の判定法として今日まで一般的に用いられてきた血清型別法は信頼性に極めて乏しいことが分かってきた。確定診断のために研究室で行われる、病原因子蛋白や遺伝子検出は手間と費用の面を考慮すると、現場では実用的でない。今回我々は、EPEC の病原因子、EspB 蛋白を RPLA (逆受身ラテックス凝集反応) によって検出する実用的な EPEC 判定法を開発した。

【方法】

被検大腸菌株は pathogenic gene cluster LEE に含まれる *eaeA* 陽性の 63 株 (*stx* 陽性の EHEC 38 株、*stx* 陰性の EPEC 25 株) と *eaeA* 陰性の 25 株、計 88 株を用いた。EspB の精製は *espB* 遺伝子を挿入したプラスミド pQE30 で *E. coli* M15 を形質転換し、IPTG 誘導で発現した His-tagged EspB をニッ

ケル His-Trap カラムで精製した。EspB カップリング Hi-Trap カラムを用いて、抗 EspB ウサギ血清から純化抗体を回収し、その純化抗体でラテックスを感作した。大腸菌を Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) 培地で 37°C、8 時間振盪培養の上清に対してラテックス凝集反応を行った。EHEC の Shiga 毒素は市販の RPLA キットで検出した。

【結果】

今回の RPLA 法では *eaeA* gene 陽性の 63 株すべて凝集反応を示し、陰性の 25 株は凝集しなかった。*eaeA* 陽性の中で *stx* 陽性の STEC は同じ培養液中に Shiga 毒素を産生し、市販のキットで検出できた。EspB の variation である α , β , γ -EspB は今回作成した抗体 (抗 β -EspB) と交叉反応を示した。

【考察】

今回開発したこの RPLA 法によって、発展途上国のフィールドでも EPEC の正しい判定が可能となり疫学的研究に大きく貢献するであろう。ま

だこの方法は出血性大腸菌 (EHEC) も同時に検出するため、EHEC のスクリーニング検査としても優れている。EHEC の確定診断となる Shiga 毒素の検出には CAYE 培地を用いるが、EspB を検出する DMEM 培地および条件で Shiga 毒素は十分産生されることも判明した。この RPLA 法は、EspB の検出に続いて市販の Shiga 毒素検出キットを用いることで、直ちに EHEC の確定診断もできる利点を持っている。このような状況から EPEC および EHEC 感染症の診断には今後この RPLA 法が主として用いられることになるだろう。

論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 論文博	第 号	氏 名	陸 彦
論文審査委員			平成 14年 10月 9日	
		主査教授	小川 由英	
		副査教授	山根 誠久	
		副査教授	松崎 吾朗	

(論文題目)

Detection of EspB using reversed passive latex agglutination:
application to determination of enteropathogenic *Escherichia coli*

(論文審査結果の要旨)

上記の論文について慎重に審査を行い、次のような結果を得た。

1. 研究の背景と目的

乳幼児下痢症の原因菌で頻度の高い腸管病原大腸菌 (EPEC) の判定法として今日まで一般に用いられてきた血清型別法は信頼性に極めて乏しいことが分かってきた。確定診断となる病原因子蛋白や遺伝子の検出は手間と費用を考慮すると臨床の現場では実用的でない。申請者らはEPECの病原因子であるEspB蛋白を逆受身ラテックス凝集反応 (RPLA) によって検出する実用的な判定法を開発した。

2. 研究内容

腸管病原大腸菌の病原遺伝子群LEE産物の1つであるEspB蛋白を組換え体として精製し、抗体を作成した。精製EspBをリガンドしたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて純化抗体を回収し、その純化抗体でラテックスを感作した。大腸菌をDMEM培地 (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) で37℃、8時間震盪後、培養上清中のEspB蛋白をラテックス凝集反応で検出した。その結果、*cacA* 遺伝子を有する大腸菌は全て陽性反応を示し、*cacA* 遺伝子を持たない大腸菌は全て陰性であった。*cacA* 遺伝子はいわゆる腸管病原大腸菌 (EPEC) の全てと腸管出血性大腸菌 (EHEC) の大半が保有しているため、この方法は両者を同時に検出する利点を有するが、両者を区別するには市販のShiga毒素検出RPLAキットを使用しなければならない。

3. 研究成果の意義と学術的水準

今回開発したRPLA法によって、発展途上国のフィールドでも腸管病原大腸菌の正しい判定が可能となり疫学的研究に大きく貢献すると思われる。さらにこの方法は出血性大腸菌も同時に検出するという利点を有している。EHECの確定診断となるShiga毒素の検出には通常CAYE培地を用いるが、今回用いた条件でShiga毒素も十分産生されることが新たに判明した。従って腸管病原大腸菌および腸管出血性大腸菌感染症の診断には今後この方法が世界的に用いられる可能性を持つという有意義な成果といえる。その成果は遺伝子型と表現形質を組み合わせた理論的発想によるものであり、学術的にも高い水準に位置するものと言える。

以上の結果から本論文は学位授与に十分値するものと判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格はA4とし縦にして左横書とすること。
 - 2 要旨は800字~1200字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。