

京都大学	博士（医学）	氏名	田中夏子
論文題目	Most-Probable-Number Loop-Mediated Isothermal Amplification-Based Procedure Enhanced with K Antigen-Specific Immunomagnetic Separation for Quantifying <i>tdh</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in Molluscan Shellfish (K 抗原特異的免疫磁気ビーズ法により増強される、MPN-LAMP をベースにした二枚貝中の <i>tdh</i> 遺伝子陽性腸炎ビブリオの定量検査法)		
(論文内容の要旨) 耐熱性溶血毒(TDH)産生腸炎ビブリオは、汚染された魚介類、特に、海水を濾過し消化管に微生物を濃縮する二枚貝の喫食を通じて、胃腸炎を引き起こしうするため、FAO/WHO 主導の下、二枚貝中の <i>tdh</i> 陽性株の濃度を正確に定量・管理する方法論の開発に、大変な努力が払われてきた。二枚貝の輸出国には、多くの途上国が含まれるため、こうした国々をも含む世界中で実施可能な、簡便かつ安価な検査法の開発が強く望まれている一方、 <i>tdh</i> 陽性株は、環境中では、総腸炎ビブリオの 1%にも満たない、ごく低濃度でしか存在しないため、その正確な定量は、依然として課題となっている。 本研究では、most-probable number (MPN)法に、臨床的に重要な全 69 種類の既知 K 抗原に特異的な immunomagnetic separation (IMS) 法と、 <i>tdh</i> 遺伝子を標的とした loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を組み込んだ検査法を開発した。これは、(i) IMS 法により、 <i>tdh</i> 陽性株を高度に濃縮すると同時に、DNA 増幅反応を阻害しうる二枚貝成分や雑菌を除いた上で、(ii) 腸炎ビブリオの選択増菌培養により、 <i>tdh</i> 陽性株を増幅し、(iii) LAMP 法により、 <i>tdh</i> 陽性株を高感度に検出することにより、検査法の感度を最大限に高めよう、という考えに基づいている。また、IMS の操作を簡略化・ハイスループット化するとともに、二枚貝成分や雑菌の持ち込みを最小に抑えるため、8 チャンネル・intra-solution 型磁気ビーズ回収デバイスである PickPen を導入した。 本検査法が、広い濃度範囲の <i>tdh</i> 陽性検体に適用可能かどうかを調べるため、地元産二枚貝が、比較的低濃度(日本)あるいは高濃度(タイ南部)の腸炎ビブリオを含むことが知られている、日本とタイ南部で実験調査を実施した。その結果、日本産二枚貝 21 検体からは比較的低濃度(<3~11 MPN/10 g)の、タイ産二枚貝 9 検体からは非常に高濃度の(930~110,000 MPN/10 g)の <i>tdh</i> 陽性株が検出された。これは、タイ南部の朝市において、国内消費者向けに小売されている二枚貝の安全性に、懸念を投げかけるものである。 LAMP 法は、MPN チューブレベル及び MPN 値レベルのいずれにおいても、広い濃度範囲の <i>tdh</i> 陽性検体に対して、conventional PCR 法と同等か良い結果を与えた。一方、PickPen-IMS の有効性は、MPN 値レベルでは認められなかったものの、MPN チューブレベルでは、日本産二枚貝から <i>tdh</i> 陽性株を平均して 32 倍濃縮する効果があることが認められた。このことは、これまで特に検査が難しいとされてきた、低濃度の <i>tdh</i> 陽性検体に対して、PickPen-IMS をオプションとして追加することにより、検査法の感度をさらに高めうる可能性を示唆するものである。 本検査法を用いれば、途上国の衛生当局でも、二枚貝中の <i>tdh</i> 陽性株の濃度を正確に定量でき、世界標準レベルの品質管理に対応できるようになることから、魚介類の輸出入における大きなハードルが取り除かれ、公衆衛生と公正な貿易に貢献できるものと期待される。			

(論文審査の結果の要旨)

本研究では、重要な食中毒原因細菌である耐熱性溶血毒(TDH)産生腸炎ビブリオを、二枚貝から高感度・簡便・低コストに定量するため、most-probable number (MPN)法に、臨床的に重要な 69 種類の既知 K 抗原に特異的な immunomagnetic separation (IMS) 法と、*tdh* 遺伝子を標的とした loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を組み込んだ検査法を開発し、その有効性を評価した。

日本とタイ南部で行った実験調査を通じて、(i) 本検査法が、広い濃度範囲の *tdh* 陽性検体に適用可能であることが確かめられた。(ii) 国産二枚貝からは比較的低濃度 (<3~11 MPN/10 g) の、タイ産二枚貝からは非常に高濃度の (930~110,000 MPN/10 g) の *tdh* 陽性株が検出された。これは、タイ南部の朝市において、国内消費者向けに小売されている二枚貝の安全性に、懸念を投げかけるものである。(iii) LAMP 法が、広い濃度範囲の *tdh* 陽性検体に対して、PCR 法と同等以上の結果を与えることが確認された。(iv) IMS 法に、*tdh* 陽性株を濃縮する一定の効果認められたことから、低濃度の *tdh* 陽性検体に対して IMS をオプションとして追加することにより、検査法の感度をさらに高めうる可能性が示唆された。

以上の研究は腸炎ビブリオ感染症の予防に貢献し、病原細菌学および公衆衛生学に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 26 年 3 月 6 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである

要旨公開可能日： 年 月 日