

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
総括研究報告書

多価の細菌性食中毒に対する迅速かつ高感度な検出技術基盤の開発

研究代表者 細見 晃司 医薬基盤・健康・栄養研究所・研究員
研究分担者 畑中 畑中律敏 大阪府立大学・特任助教

研究要旨

<目的>カンピロバクター、ウエルシュ菌、サルモネラ、腸管出血性大腸菌、コレラを対象に、原因菌もしくは毒素に対する抗体を作製し、細菌性食中毒に対する迅速かつ高感度な検出技術基盤を開発することを目的とする。

<方法>これまでに樹立しているカンピロバクターに対する抗体ライブラリについて、カンピロバクターの臨床分離菌株（食品、患者など）、他の食中毒菌や腸内細菌などの常在菌などを対象に、抗体の特異性を評価した。サルモネラ、ウエルシュ菌エンテロトキシン、志賀毒素、コレラ毒素に対するハイブリドーマを樹立し、病原体および常在菌カクテル（マウス糞便を培養したもの）への反応性をELISA法により評価した。

<結果>カンピロバクター属以外の常在菌や病原菌との反応性を評価した結果、今回調べた18菌種すべてと反応しなかったことから、カンピロバクターの検出に適した特異性の高い抗体を樹立できた。サルモネラ菌、ウエルシュ菌エンテロトキシン、志賀毒素、コレラ毒素に対しても反応性が高い抗体を樹立できた。

<まとめ>細菌性食中毒に対する検出技術基盤の開発を目標に、各病原体に対する抗体を樹立できたことから、今後、検出に適した抗体の組み合わせや食品などのサンプルから検出できるか評価していく。

細見晃司

医薬基盤・健康・栄養研究所・研究員

A. 研究目的

カンピロバクター、ウエルシュ菌、サルモネラ、腸管出血性大腸菌は日本国内において食中毒を引き起こす主要原因細菌であり、細菌性食中毒は公衆衛生上の重要課題である。食品の安全確保や感染拡大防止など食品衛生・公衆衛生の観点から、畜産や食品流通などの現場において簡便で迅速かつ高感度な検出法の開発が求められている。そこで本研究では、カンピロバクター、ウエルシュ菌、サルモネラ、腸管出血性大腸菌、ならびに鑑別診断が必要なコレラを加えた5つの細菌性食中毒を対象に、原因菌もしくは毒素に対する抗体を作製し、細菌性食中毒に対する迅速かつ高感度な検出技術基盤を開発することを目的とする。

B. 研究方法

これまでに樹立しているカンピロバクターに対する抗体ライブラリについて、カンピロバクターの臨床分離菌株（食品、患者など）、他の食中毒菌や腸内細菌などの常在菌などを対象に、抗体の特異性を評価した。具体的には、日和見細菌を含む他の病原菌として、*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylo-*

coccus aureus, *Serratia liquefaciens*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia hermannii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*の12菌種、腸内細菌などの常在菌として、*Bacteroides vulgatus*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Prevotella copri*, *Lactobacillus gasseri*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*の6菌種に対する反応性をELISA法により評価した。菌を培養し、熱処理で不活化した後、凍結乾燥し、PBSに懸濁し、固相抗原とした。菌を固相化したプレートを洗浄後、精製抗体を反応させ（室温、2時間）、検出用抗体（HRP標識anti-mouse IgG、室温、1時間）を反応させた後、基質を加えて450 nmで測定した。

サルモネラ、ウエルシュ菌エンテロトキシン、志賀毒素、コレラ毒素をそれぞれマウスに免疫し、定法によりハイブリドーマを作製した。各病原体につき、2,000クローン以上について病原体および常在菌カクテル（マウス糞便を培養したもの）への反応性をELISA法により評価した。

（倫理面への配慮）

該当しない。

C. 研究結果

カンピロバクター感染症の原因菌は*C. jejuni*と*C. coli*であり、その中でも95%以上が*C. jejuni*

の感染によるものである。これまでに*C. jejuni*だけに特異的に反応する、もしくは*C. jejuni*と*C. coli*の両方に高感度に反応する抗体をすでに得ている。そこで、研究分担者と協力して、評価する細菌の種類を増やして抗体の特異性を評価した。カンピロバクター属以外の常在菌や病原菌との反応性を評価した結果、今回調べた18菌種すべてと反応しなかった。

次に、サルモネラ、ウエルシュ菌エンテロトキシン、志賀毒素、コレラ毒素に対して高い反応性を示し、かつ、常在菌カクテルには反応しない抗体をそれぞれ、11種類、8種類、11種類、7種類樹立した。サルモネラは多くの血清型が存在することから、日本国内で患者数の多いEnteritidis, Infantis, Typhimurium, Thompson, Schwarzengrundの5つの血清型に対する反応性を評価した結果、11種類の抗体のうち、8種類の抗体は免疫に用いたEnteritidisに特異的に反応し、2種類の抗体はThompsonを除く4つの血清型、1種類の抗体は5つの血清型すべてと反応した。

D. 考察

カンピロバクターに対する抗体については、他の病原菌や常在菌と反応しなかったことから、カンピロバクターの検出に適した特異性の高い抗体であると期待できる。今後は抗体が認識している抗原を同定し、抗体と抗原の結合様式や強度などを解析することで検出に適した抗体の組み合わせを検討するとともに、糞便などの患者検体や食肉などの食品から検出できるか検討を進める必要があると考えている。

サルモネラ、ウエルシュ菌エンテロトキシン、志賀毒素、コレラ毒素に対しても反応性が高い抗体を樹立できたことから、今後、カンピロバクターと同様に、抗体の特異性を評価し、検出に適した抗体を選定する。

E. 結論

反応性や特異性の観点から、カンピロバクターの検出に適した抗体を選定した。また、サルモネラ、ウエルシュ菌エンテロトキシン、志賀毒素、コレラ毒素に対する抗体を樹立し、検出技術基盤の開発を当初の計画通りに進めている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Lan H, Hosomi K, Kunisawa J., Clostridium perfringens enterotoxin-based protein engineering for the vaccine design and delivery system. Vaccine, 37(42): 6232-39, 2019

Hosomi K., Hinenoya A., Suzuki H., Nagatake T., Nishino T., Tojima Y., Hirata S. I., Matsunaga A., Kondoh M., Yamasaki S., and *Kunisawa J., Development of a bivalent food poisoning vaccine: augmenting the antigenicity of Clostridium perfringens enterotoxin by fusion with the B subunit of Escherichia coli Shiga toxin 2. Int.

2. 学会発表

なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし