

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）
分担研究報告書

食品や家畜由来株等を用いた抗体の反応性・特異性の評価と認識抗原の同定

研究分担者 畑中 律敏 大阪府立大学・特認助教

研究要旨

<目的> *Campylobacter jejuni* および *C. coli* に対する特異的抗体が反応する菌体の条件の検討および標的タンパク質の決定

<方法> *C. jejuni* 特異的または *C. jejuni*, *C. coli* に特異的反応する抗体が反応する際の *Campylobacter* の培養条件を検証した。これらの抗体の標的タンパク質を決定するために抗体アフィニティークロマトグラフィーによる、標的タンパク質の粗精製を行った。

<結果> 各抗体は、Bolton 培地で培養した菌体とではなく血液寒天培地上で培養した際の菌体で、標的タンパク質と反応した。抗体アフィニティークロマトグラフィーによる標的タンパク質の粗精製法を構築した。

<まとめ> 粗精製したサンプルより、プロテオーム解析により標的タンパク質を決定していくとともに、抗体のエピトープについても明らかとしていく。標的タンパク質の発現条件についてもさらに検証していくことで、今後検出系の構築において、適切な抗体またはサンプルの調整法についても検討を行っていく。

A．研究目的

*Campylobacter*による食中毒は我が国において、細菌性食中毒の中で最も発生事件数が多く、我が国のみならず世界中で問題となっている。しかしながら本菌属は、検出・培養に時間がかかるため、食品の安全確保には、迅速かつ簡便でかつ高感度の検出方法の構築が重要となる。そのため、*Campylobacter* 属菌の中で我が国において食中毒細菌に指定されている *C. jejuni*、*C. coli* を迅速かつ簡便に検出するイムノクロマトグラフィーの構築を目標に、これまでに研究代表者が作製してきた抗体の検証を行うことを目的とする。

本研究では、これまで特異性の評価を行ってきた *C. jejuni* のみまたは *C. jejuni* および *C. coli* に反応する抗体の、反応する培養条件および標的タンパク質の決定を試みた。

B．研究方法

- 1). *C. jejuni* を血液寒天培地または血液を含まない Bolton 基礎培地にて培養した後ウエスタンブロットングを行い各菌体と抗体との反応性について評価を行った。
- 2). *C. jejuni* の菌体破碎上清と各抗体を混和し反応させたのち rProteinA カラムを用いて抗体と反応した菌体タンパク質を抗体とともに粗精製を行った。得られたフラクションについて SDS-PAGE および

ウエスタンブロットングにて標的タンパク質の存在を確認した。

（倫理面への配慮）
該当しない

C．研究結果

- 1). 今回評価を行った抗体はどちらも血液寒天培地にて培養した菌体と強く反応したが、Bolton 基礎培地とした菌体との反応性は確認されなかった。
- 2). Buffer 条件を界面活性剤を加えた条件にて精製を行うことで、溶出フラクションよりウエスタンブロットングにより標的タンパク質を検出し粗精製に成功した。

D．考察

今回評価を行った抗体は Bolton 基礎培地で培養した菌体とは反応しなかったことより、抗体の標的タンパク質は *Campylobacter* において常時発現しているタンパク質ではないと考えられる。今後、食品等を汚染している *Campylobacter* を検出するにあたり、食品中の *Campylobacter* においても標的タンパク質が発現しているのか、および発現する条件について検討していく必要があると考えられた。

また、粗精製したサンプルより、プロテオーム解析により標的タンパク質を決定していく。

E . 結論

今後抗体を用いて*Campylobacter*の検出系を構築していくにあたり、菌種の特異性のみならず、菌体中の標的タンパク質の発現状態についても検証する必要があることが明らかとなった。

F . 健康危険情報

G . 研究発表

1. 論文発表

なし

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