

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

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

令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 細見 晃司

令和2（2020）年 6月

## 目 次

I．総括研究報告	
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	3
細見晃司	
II．分担研究報告	
1．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	5
畑中律敏	
III．研究成果の刊行に関する一覧表	7

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（96ウェル）に、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.

Immunol., 31(2): 91-100, 2019

##### 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

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ティ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

ウエスタンブロッティ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ティ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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Lan H, Hosomi K, Kunisawa J.	<i>Clostridium perfringens</i> 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., Yamashita S., Kunisawa J.	Development of a bivalent food poisoning vaccine: augmenting the antigenicity of <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin by fusion with the B subunit of <i>Escherichia coli</i> Shiga toxin 2	Int. Immunology	31(2)	91-100	2019

令和2年 4 月 9 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立研究開発法人  
医薬基盤・健康・栄養研究所

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 米田 悦啓 印

次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 医薬基盤研究所 ワクチン・アジュバント研究センター・ 研究員  
(氏名・フリガナ) 細見晃司・ホソミコウジ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	医薬基盤・健康・栄養研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。  
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。