

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2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 細見 晃司

令和3（2021）年 5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 -----	6
畑中律敏	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	8

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>抗体ライブラリについて、ELISA法により反応性・特異性を評価するとともに、サンドイッチELISA法により抗体の組合せを検討し、検出系のための候補抗体を選定する。候補抗体については、認識抗原を同定するとともに、イムノクロマトキットを作製し、有用性を評価する。

<結果>初年度に樹立したサルモネラ菌、ウエルシュ菌エンテロトキシン、志賀毒素、コレラ毒素に対する抗体ライブラリから、検出系のための候補抗体を選定した。ウエルシュ菌エンテロトキシンとコレラ毒素についてイムノクロマトにより抗原を少なくとも1 ng/mlの感度で検出できた。また、ウエルシュ菌エンテロトキシンに関しては、健康な人の便に毒素を添加した疑似患者便においても非特異的な反応は示さずに検出できた。

<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、候補抗体を選定し、ウエルシュ菌エンテロトキシンとコレラ毒素については高感度なイムノクロマトを作製できた。今後、他の細菌性食中毒についても検出技術基盤の開発を進めるとともに、食中毒患者などの臨床検体を用いて開発技術の有用性を評価していく。

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

抗体の選定

昨年度までに樹立しているサルモネラ菌、ウエルシュ菌エンテロトキシン、志賀毒素、コレラ毒素に対する抗体ライブラリについて、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。日和見細菌を含む他の病原菌や腸内細菌な

どの常在菌を培養し、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。毒素はPBSに懸濁し、固相抗原とした。抗原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。

抗体の組合せを検討するため、サンドイッチELISAを実施した。精製抗体を固相化したプレートを洗浄後、抗原（菌や毒素など）を反応させ（室温、2時間）、HRP標識した精製抗体（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。

イムノクロマトキットは外注して作製した。毒素もしくはヒト糞便の懸濁液を調整し、バンドの有無により判定した。

抗原の同定

免疫沈降とプロテオーム解析により、候補分子を同定し、リコンビナントタンパク質として作製し、抗体との反応性を確認することで認識抗原を同定した。具体的には、菌を界面活性剤で可溶化し、抗体と反応させた後、Protein Gで沈降させ、SDS-PAGEを用いて電気泳動した。ゲルからバンドを切り出して、トリプシン消化した後に質量分析装置で分析した。同定された候補抗原をクローニングし、リコンビナントタンパク質として大腸菌で発現させて、ウエスタンブロットで反応性を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究は、医薬基盤・健康・栄養研究所において倫理審査、承認を得た後、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に従って遂行した。

C. 研究結果

抗体の選定と抗原の同定

カンピロバクター感染症の原因菌は*C. jejuni*と*C. coli*であり、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*の両方に高感度かつ特異的に反応する複数の抗体をすでに得ている。本年度は*C. jejuni*と*C. coli*の両方に反応する抗体について、抗原を同定し、サンドイッチELISAにより、高感度に検出できる抗体の組合せを選定した。

サルモネラ感染症の原因菌である*Salmonella enterica*は非常に多くの血清型に細分されており、チフス性疾患や胃腸炎など病態も多岐にわたる。本研究では、ヒトに胃腸炎、すなわち食中毒の原因となるサルモネラを対象とする。家畜伝染病予防法ではサルモネラ症(届出伝染病)として、Enteritidis、Typhimurium、Dublin、Choleraesuisの4つの血清型が定義されており、また、国立感染症研究所の病原微生物検出情報から、2004年～2019年までの日本国内のサルモネラ食中毒患者から分離されたサルモネラ菌について血清型別の分離率をみると、Enteritidisを筆頭に、Infantis、Typhimurium、Thompson、Schwarzengrundなどが高頻度に分離されている。そこで、本研究では免疫方法などを工夫することで、複数の血清型に反応する抗体の作製を試みたところ、少なくともEnteritidis、Infantis、Typhimurium、Thompson、Schwarzengrundの5つの血清型を検出できる抗体を樹立できた。他にも、Thompsonを除く4つの血清型(Enteritidis、Infantis、Typhimurium、Schwarzengrund)と反応する抗体も得られている。本年度は、5つの血清型を検出できる抗体について、免疫沈降とプロテオーム解析、ウエスタンブロットにより抗原を同定した。

志賀毒素については、昨年度に特異的なハイブリドーマ4種類を樹立しており、今年度は、抗体を精製し、反応性・特異性を評価した。リコンビナントタンパク質に対しては高い反応性を示したが、生毒素に対する反応性が低かったことから検出には適さないと判断した。現在、新しい抗体の作製を進めており、生毒素を用いてスクリーニングすることで有用な抗体を得たいと考えている。

ウエルシュ菌エンテロトキシンとコレラ毒素については、ELISAならびにサンドイッチELISAにより検出に適した抗体の組合せを選定し、候補抗体を用いたイムノクロマトキットを作製した。イムノクロマトにより抗原を少なくとも1 ng/mlの感度で検出できた。また、ウエルシュ菌エンテロトキシンに関しては、健常人の便に毒素を添加した疑似患者便においても非特異的な反応は示さずに検出できた。現在、特許出願の準備を進めている。

患者検体の収集

実用化に向けて、食中毒患者などの臨床検体を用いた検討を行うため、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所の協力のもと、食中毒の行政検査の余剰分を用いた研究実施について、倫理審査委員会の

審査を受けて研究計画の承認を得た。今年度はカンピロバクター32検体、ウエルシュ菌22検体、サルモネラ4検体の患者糞便を収集した。

D. 考察

ウエルシュ菌エンテロトキシンとコレラ毒素についてはイムノクロマトによる検出系を確立でき、ウエルシュ菌エンテロトキシンについては健常人の便に毒素を添加した疑似患者便においても検出できた。また、1 ng/mlの検出感度は、現在市販されている偽膜性腸炎の原因菌である*Clostridium difficile*のイムノクロマト検出キットなどと同程度であり、糞便からの毒素検出において利用可能な抗体を得られていると考えている。このように、この2つの食中毒については当初の研究目標はほぼ達成できており、最終年度である次年度は、臨床検体を用いた検証とともに、特許出願など一般財団法人阪大微生物病研究会と共同で実用化に向けた協議を進めていく予定である。

カンピロバクターやサルモネラについても有用な抗体が得られており、ウエルシュ菌エンテロトキシンと同様にイムノクロマトによる検出ならびに臨床検体を用いた評価を進めたいと考えている。また、サルモネラについては、これまでに確認した5つすべての血清型に反応する抗体が得られており、この抗体を活用した検出技術を開発することで、臨床現場など最前線において、サルモネラであるか否かを迅速に判断できるようになると期待できる。このような技術の実用化のため、今後、他の血清型や同じ血清型でも由来が異なる株などに対する反応性や抗原との結合様式などを検討し、抗体の特性を十分に理解する必要があると考えている。

E. 結論

カンピロバクター、サルモネラ、ウエルシュ菌エンテロトキシン、コレラ毒素については検出に適した候補抗体の選定やイムノクロマトによる検出技術の開発など、検出技術基盤の開発に向けて順調に進捗していると考えている。志賀毒素については樹立していた抗体の反応性が不十分であったことから、抗体作製からやり直す。他の食中毒菌で培ったノウハウを活かして有用な抗体を得られるように取り組んでいく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① [Hosomi K, Shibata N, Shimoyama A, Uto T, Nagatake T, Tojima Y, Nishino T, Takeyama H, Fukase K, Kiyono H, Kunisawa J. Lymphoid Tissue-Resident Alcaligenes Establish an Intracellular Symbiotic Environment by Creating a Unique Energy Shift in Dendritic Cells. *Front Microbiol.* 2020 Sep 24; 11:561005.](#)
- ② [Hosomi K, Kunisawa J. Impact of the intestinal environment on the immune responses to vaccination. *Vaccine.* 2020 Oct 14;38 \(44\):6959-6965.](#)
- ③ [Hosomi K, Kunisawa J. Diversity of energy metabolism in immune responses regulated](#)

by micro-organisms and dietary nutrition.

Int Immunol. 2020 Jun 26;32(7):447-454.

- ④ 細見晃司、國澤純 腸内細菌叢研究とデータの取得・解析 **コスメティックステージ** 14(4): 40-48, 2020
- ⑤ 細見晃司、國澤純 善玉菌・悪玉菌とは **糖尿病ケア** 17(1): 14-15, 2020
- ⑥ 河合総一郎、細見晃司、國澤純 腸内細菌叢解析の外部委託時の注意点と活用の考え方 **腸内細菌叢の基礎知識と研究開発における留意点** (情報機構) 85-96, 2020

2. 学会発表

- ① 細見晃司、柴田納央子、下山敦史、宇戸智哉、長竹貴広、東島陽子、西野友美、竹山春子、深瀬浩一、清野宏、國澤純、小腸パイエル板組織内共生菌アルカリゲネスと樹状細胞の相互作用 **第24年日本腸内細菌学会** (2020年6月11日)
*新型コロナウイルスのため誌上開催

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

- ① 出願予定 (N161/JP1 : 医234 : ウェルシュ菌特異的抗体)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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・客員研究員/特認助教

研究要旨

<目的> *C. jejuni* と反応する抗体の標的タンパク質の同定および、培養条件・時間の違いによる菌体と抗体の反応性の検証

<方法> 粗精製した標的タンパク質よりプロテオーム解析により標的候補タンパク質を絞り込み、大腸菌を用いて組換えタンパク質を作製し抗体との反応性を確認する。異なる培養条件で培養した菌体と抗体との反応性を FCM にて確認する。

<結果> 今回選択した標的候補タンパク質は全て抗体と反応しなかった。異なる培養条件で培養した菌体と抗体との反応性は Bolton 培地で培養した場合 24>48>72 時間培養の菌体の順に血液寒天培地で培養した場合 24<48<72 時間培養の順に抗体との反応性が強かった。

<まとめ> 抗体の標的はタンパク質ではない可能性もあるため、今後 LOS 等の可能性も考慮し同定作業を進めていく。今後より抗体の標的が発現する条件等についてさらに検討を行い、検出法の構築にあたり基礎データとしてより多くの情報を蓄積していく。

A. 研究目的

我が国において発生している細菌性食中毒の多くは *Campylobacter jejuni* または *C. coli* によるものである。*Campylobacter* 属菌による食中毒は我が国のみならず、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をスクリーニングし *C. jejuni* のみまたは *C. jejuni* および *C. coli* に反応する抗体を見出してきた。本研究ではこれらの抗体が認識する標的タンパク質の同定および、菌体の培養条件・培養時間において抗体との反応性が変化するか検証を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) 抗体が認識する標的タンパク質の同定

1. *C. jejuni* の菌体破碎上清より抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィにて、抗体の標的タンパク質の粗精製
2. 粗精製した Sample よりプロテオーム解析を行い標的タンパク質の候補をピックアップ
3. 標的候補タンパク質の組換えタンパク質を大腸

菌を用いて作製

4. 作製した組換えタンパク質に対してウエスタンブロッティングを行い、抗体との反応性を確認

2) 菌体の培養条件・培養時間

1. *C. jejuni* を血液寒天培地、または Bolton broth にて 24, 48 または 72 h 培養後菌体を回収
2. 菌体を4種類の抗体 (*C. jejuni* 特異抗体: 3種類、*C. jejuni*, *C. coli* 特異抗体: 1種類) とそれぞれ反応させた後、蛍光標識した2次抗体と反応させた
3. FCM にてサンプルを解析

(倫理面への配慮)

該当しない

C. 研究結果

- 1). 2種類の抗体について、標的候補タンパク質12および13種類を組換えタンパク質として作製し、各抗体との反応性を確認したが、今回選択した標的候補タンパク質は全て抗体と反応しなかった。
- 2). 検証した4種類の抗体全ては、Bolton培地で培養した場合24>48>72時間培養の菌体の順に抗体との反応性が強かった、一方で血液寒天培地で培養した菌体ではBolton培地で培養した場合と逆に24<48<72時間培養の順に抗体との反応性が強かった。

D. 考察

- 1) 各抗体の標的候補タンパク質をメンブレンタン

パク質だけでなく様々なタンパク質を候補として、組換タンパク質を作製したが、抗体と反応するタンパク質を見出すことができなかった。以上のことより抗体が認識しているのはタンパク質ではない可能性も示唆された。

2) 培養条件・時間によって抗体と菌体の反応性は異なっていたことより、栄養条件および培地の状態（液体・寒天平板）等で抗原の発現条件は異なっていると考えられる。

E. 結論

抗体の標的はタンパク質ではない可能性もあるため、今後LOS等の可能性も考慮し同定作業を進めていく。

抗体と菌体との反応性は培養条件によって異なっていることが明らかとなったことより、今後より抗体の標的が発現する条件等についてさらに検討を行う。さらに、検出法を確立していくにあたって、実際の患者検体等において、菌体がどの程度抗体の標的抗原を発現しているのか検討していく必要があると考えられた。

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
河合総一郎、細見晃司、國澤純	腸内細菌叢解析の外部委託時の注意点と活用の考え方	梅崎良則、藤沢倫彦	腸内細菌叢の基礎知識と研究開発における留意点	情報機構	日本	2020年	85-96

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
Hosomi K, Shibata N, Shimoyama A, Uto T, Nagatake T, Tomijima Y, Nishino T, Takeyama H, Fukase K, Kiyono H, Kunisawa J	Lymphoid tissue-resident <i>Alcaligenes</i> establish an intracellular symbiotic environment by creating a unique energy shift in dendritic cells	Frontiers in Microbiology	11	561005	2020
Hosomi K, Kunisawa J	Impact of the intestinal environment on the immune responses to vaccination	Vaccine	38(44)	6959-6965	2020
Hosomi K, Kunisawa J	Diversity of energy metabolism in immune responses regulated by micro-organisms and dietary nutrition	International Immunology	32(7)	447-454	2020
細見晃司、國澤純	腸内細菌叢研究とデータの取得・解析	コスメティックステージ	14(4)	40-48	2020
細見晃司、國澤純	善玉菌・悪玉菌とは	糖尿病ケア	17(1)	14-15	2020

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2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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	医薬基盤・健康・栄養研究所	<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 checked="" 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。

令和3年 3月 26日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 大阪府立大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 辰巳砂 昌弘



次の職員の令和2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) 生命環境科学研究科・客員研究員
(氏名・フリガナ) 畑中 律敏・ハタナカ ノリトシ

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 type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<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 checked="" 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) 未審査に場合は、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:)

