

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)
総合研究報告書

臨床検査技術を応用した自然毒成分の新たな検出・定量法の樹立

岡田 光貴 (京都橘大学・健康科学部・専任講師)

伊藤 洋志 (神戸常盤大学・保健科学部・教授)

池田 哲也 (京都橘大学・健康科学部・教授)

研究要旨

本研究は、自然毒が原因である食中毒について、毒成分の同定と患者の病期の判定に有用な検査法の樹立を目的とした。令和3-5年度を通じて、フグ毒テトロドトキシンを検出する、新たな酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)と高速液体クロマトグラフィー分析系を構築することができた。本測定法は、食品・食材検査法としての応用が期待できる。また、馬鈴薯毒の α -ソラニンと α -チャコニンに対するELISAは、2種類の構築に成功した。本ELISAは食材・食品検査法のみならず、臨床検査法としての応用も期待ができる検出性能であった。

A. 研究目的

日本では現代においても、食材中に含まれる自然毒を原因とした食中毒が数多く発生している(登田美桜ほか, 食衛誌 2014, 55: 55-63)。現在、自然毒に対する臨床検査法がほとんど実施されておらず、多くの場合、現場では患者やその家族の聴取と症状から推察し、何が食中毒の原因であるか診断せざるを得ない。この事は誤診や対応の遅れに直結するため、対策が急務である。以上の背景から自然毒が原因である食中毒について、毒成分の同定と患者の病期(初期, 重症期, 完

治など)の判定に有用な検査法の樹立が必要と考えた。本研究を通じて樹立した手法は食品安全検査にも応用が可能であり、その関連業界への需要も見込まれる。そこで、本研究では、臨床検査技術を応用した、食材に含まれる代表的な自然毒成分の検出・定量法の樹立を目的とした。

B. 研究方法

1. 研究計画

当初の進捗予定を記載する。令和3年度は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、および酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)による自然毒測定系の構

(別添 3・4)

築に取り組むことを予定した。また、平行して抗体の作製に取り組む計画とした。令和4年度に両手法の構築を完了させ、新たにイムノクロマト(IC)法の構築に着手する予定であった。令和5年度にIC法の構築を完了させ、以降、各手法の精度評価を実施、自然毒の検査に最適な手法を提案することを想定した(表1)。また、検査法の構築対象とする自然毒は、フグ毒テトロドトキシン(TTX)、藻類および魚介類毒シガトキシン(CT)、馬鈴薯毒の α -ソラニン(SO)と α -チャコニン(CHA)とした。

2. 材料

本研究におけるHPLC分析には、汎用HPLC装置Prominence(株式会社島津製作所：京都)とDEAE-825(昭和電工株式会社：東京)を用いた。ELISAの吸光度測定には、iMarkマイクロプレートリーダー(Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)を用いた。IC

法の構築に、マイクロジェット装置LaboJet-Bio(株式会社マイクロジェット：長野)を用いた。TTXおよびCTの粉末製剤は、富士フイルム和光純薬株式会社(東京)より供した。SOとCHAの粉末試薬はSigma-Aldrich Co, LLC(東京)より供した。実際の患者検体に見立て、TTXを溶解する溶媒は健康人の血清試料として、Human Serum pool(serum)および尿試料は, Urine, Single Male Donor, Human(urine)(いずれも、コスモ・バイオ株式会社：東京)を用いた。その他の一般試薬および抗体類は、富士フイルム和光純薬株式会社(東京)、ナカライテスク株式会社(京都)、コスモ・バイオ株式会社(東京)、住友ベークライト株式会社(東京)、フナコシ株式会社(東京)より供した。また、SOとCHAに結合するウサギ由来のポリクローナル抗体2種類(anti-Sold antibody 1, 2)の作製は、合同会社カーバンクル・バイオサイ

表1 研究実施計画の概要

研究項目	R3年度	R4年度	R5年度
①HPLCによる自然毒の検出・定量 担当: 岡田, 池田	→		
②SOおよびCHAに対する抗体の作製 担当: 合同会社カーバンクル・バイオサイエンテック	→		
③ELISAによる自然毒の検出・定量 担当: 岡田, 伊藤	→		
④IC法による自然毒の検出 担当: 岡田, 伊藤	→		
⑤各検査法の精度評価, および測定法の最適化 担当: 岡田, 伊藤, 池田	→		

(別添 3・4)

エンテック(京都)に外注した。抗体作製の手順を簡略的に述べると、SO とCHA に共通の化学構造であるソラニジン部位をウシアルブミンに結合した人工ペプチドを免疫原とし、これを2週間おきに計5回ウサギ(日本白色種、メス、3.0 kg)に免疫した。解剖後、得られた血清からアフィニティカラムを用いて anti-Sold antibody 1, 2 を精製した。本研究ではこの2種類のうち、より感度に優れていた anti-Sold antibody 1 のみを使用した(以降、本抗体を anti-Sold antibody と記述する)。

(倫理面への配慮)

本研究に用いるヒトの尿試料および血清試料は、健常人から得られた市販品(コスモ・バイオ株式会社：東京)であり、倫理的な問題はない。その他、動物実験や遺伝子組換えも実施しないため、関連する指針や倫理規定への抵触もない。

3. 試料の調製

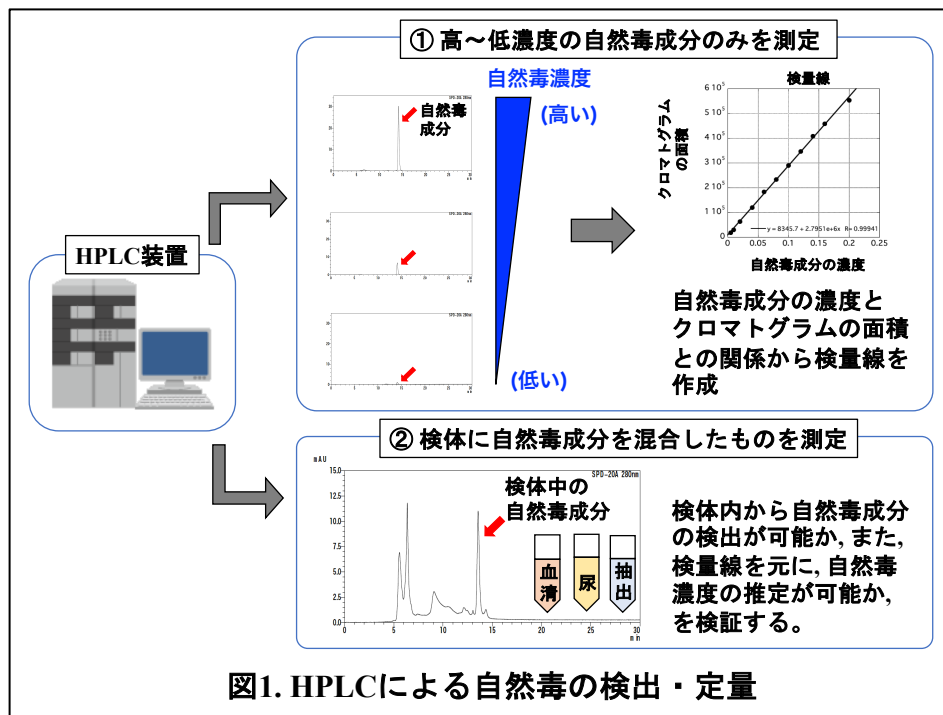
自然毒の粉末試薬をそれぞれ 10 mg 計量し、TTX は 10mM クエン酸緩衝液、CT はメタノール、SO とCHA は 10%ジメチルスルホキシド(DMSO) 10 mL に加え完全に溶解し、濃度 1.0 mg/mL の自然毒試料を調製し原液とした。自然毒性食中毒患者の生体試料を入手することは困難であるため、3つの溶媒、① buffer(TTX では

10mM クエン酸緩衝液、その他の自然毒は 10mM リン酸緩衝液)、② urine および③ serum にて原液を目的濃度に調製したものを生体試料と見做した。

また、馬鈴薯の成分抽出液を試料とした。馬鈴薯(Irish Cobbler, N=12)をスーパーマーケットで購入し、室温を 22°C に保った部屋の蛍光灯(波長 380-400 nm)下に静置した。馬鈴薯を Day 0(購入直後, n=4), Day 30(30 日静置後, n=4), Day 60(60 日静置後, n=4)の3群に分けて各部位の成分を抽出した。各群で、塊茎(tuber)、皮(peel)、芽(sprout)の3部位を切り取り、計量後に 15mL チューブにそれら部位を入れた。その後、10%DMSO 5mL をチューブ内に加え、ハンディホモジナイザー 150(Fisher Scientific Co LLC, USA)を用いて各部位をすり潰した。チューブを遠心分離(1,191 ×g, 30 分)後、上清を別のチューブに移し、これを馬鈴薯の成分抽出試料として実験に使用するまで-80°Cのデュープフリーザー内に保存した。

4. HPLC による自然毒の検出・定量 (R3-4 年度)

HPLC は検体をカラムに通過させ、成分ごとの速度の差により分離する解析法である(図 1)。本研究では、検体に様々な濃度で TTX, CT, SO, CO を添加し、これら毒成分の波形を検出・



定量する手法の構築を目指した。本研究における HPLC 分析は、汎用 HPLC 装置 Prominence に DEAE-825 カラムを接続して実施した。保持時間(Retention Time ; RT)は 30 min, 流速は 1.0 mL/min, 波長は 280 nm, カラムオープン温度は 20°Cに設定した。移動相の溶液は buffer とした。この HPLC 分析系を用いて, buffer 試料, urine 試料および serum 試料で調製した自然毒試料を分離分析し, 波形を検出した。得られた波形に基づき, HPLC 装置に付属のソフトウェア LabSolutions を用いて波形下面積を算出した。

5. ELISA による自然毒の検出・定量 (R3-4 年度)

ELISA は目的物質に標識抗体を結合させ, その標識物質による発色反応を

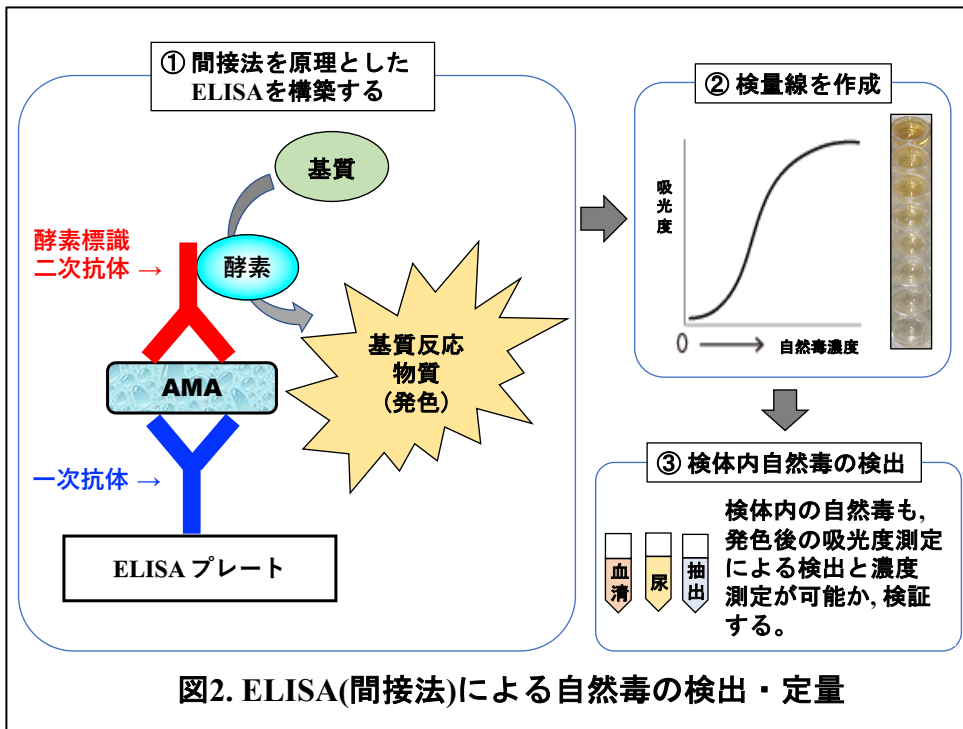
利用し, 目的物質の濃度を測定するものである(図 2)。本実験により, 検体中の毒成分濃度を正確に検出・定量する ELISA 測定系を構築した。

6. IC 法による自然毒の検出 (R4-5 年度)

本法は, 抗原抗体反応を試験紙や膜上で生じさせることで目的物質を検出する手法である(図 3)。本実験により, 検体中の毒成分を迅速・簡便に検出する IC 法を構築する。

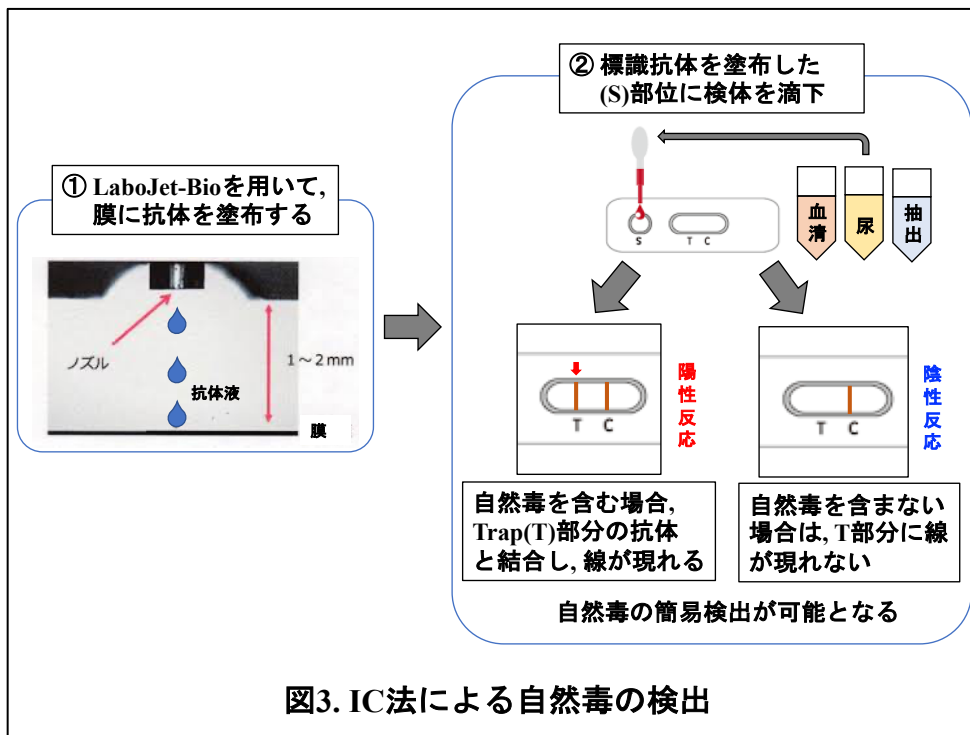
7. 各検査法の精度評価, および測定法の最適化 (R5 年度)

最終年度は検査法としての実用化を想定し, これまでに構築した各手法の精度を検証する。即ち, 各種自然毒の測定可能な濃度範囲(最大濃度と最小濃度)と特異性(別の自然毒や干渉物質と交差しないか)を精査する。また,



様々な濃度に調製した自然毒溶液、あるいは食材抽出液(各 N=100 程度)を解析し、標準偏差や変動係数を算出することで測定再現性を評価する。さらに、検体の前処理法や、使用する試

薬の種類を精査し、各種測定法の精度の向上を図る。以上の実験成果を踏まえて総合的に考察し、TTX, CT, SO, および CO の検出・定量法として最適化した測定系を提案する。



(別添 3・4)

8. 研究内容の分担

「1. 研究計画」の立案と「材料」の選定は、主として研究代表者である岡田光貴が行った。「3. 試料の調製」は岡田光貴、伊藤洋志が担った。「4. HPLCによる自然毒の検出・定量」は岡田光貴、池田哲也が担った。「5. ELISAによる自然毒の検出・定量」は岡田光貴、伊藤洋志が担った。「6. IC法による自然毒の検出」は岡田光貴、伊藤洋志が担った。「7.各検査法の精度評価、および測定法の最適化」は岡田光貴、伊藤洋志、池田哲也の3者で慎重に行った。最終的に、これらを総合的な観点から岡田光貴、伊藤洋志、池田哲也の3者で検討し、本報告書をまとめた。

C. 研究結果

1. 研究成果の概要

まず、研究成果の概要を表2に示す。結果として、フグ毒 TTX を検出する HPLC 分析法と ELISA の構築に成功した。また、馬鈴薯毒 SO と CHA を検

出する ELISA は 2 種類の構築に成功した。一方で、藻類および魚介類毒の CT に関しては、HPLC 分析および ELISA で良好な検出系を構築できず、実験を中断した。IC 法に関しては、いずれの自然毒に関しても検出に成功しておらず、現在も実験を継続中である。以下、構築に成功した検査法の詳細を記載する。

2. TTX に対する ELISA の構築

令和 3 年度は、特に TTX に対する ELISA の構築に尽力した。結果、緩衝液中の TTX のみならず、ヒトの血清および尿中の TTX の検出と定量を可能とする、新規 ELISA 測定系の開発に成功した(岡田光貴ほか、医学検査 2022, 71(1):1-9.)。

この ELISA を用いることで、buffer 試料中の TTX を、検出限界濃度(LOD)が 3.91 µg/mL の性能で検出することができた。また、urine 試料中と serum 試料中における TTX は、それぞれ LOD が 31.25 µg/mL と 15.63 µg/mL の性能で検出することができた。

表2 研究成果の概要

		対象とした自然毒		
		フグ毒TTX	藻類および魚介類毒CT	馬鈴薯毒SOおよびCHA
分析法	HPLC分析	○	×	×
	ELISA	○	×	○(2種類)
	IC法	×	×	×

○...構築に成功した
×...構築できていない

(別添 3・4)

3. TTX に対する HPLC 分析系の構築

令和 4 年度は、特に TTX に対する HPLC 分析系の構築に尽力した。結果、緩衝液と尿中の TTX の検出と定量を可能とする、新規 HPLC 測定系の開発に成功した(岡田光貴ほか, 医学検査 2023, 72(1):1-10.)。

この HPLC 分析系を用いることで、buffer 試料中の TTX を、LOD が 3.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の性能で検出することができた。また、urine 試料中における TTX は、LOD が 10.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の性能で検出することができた。一方で、serum 試料中における TTX は検出することができなかった。

4. SO と CHA の ELISA(2 種類)の構築

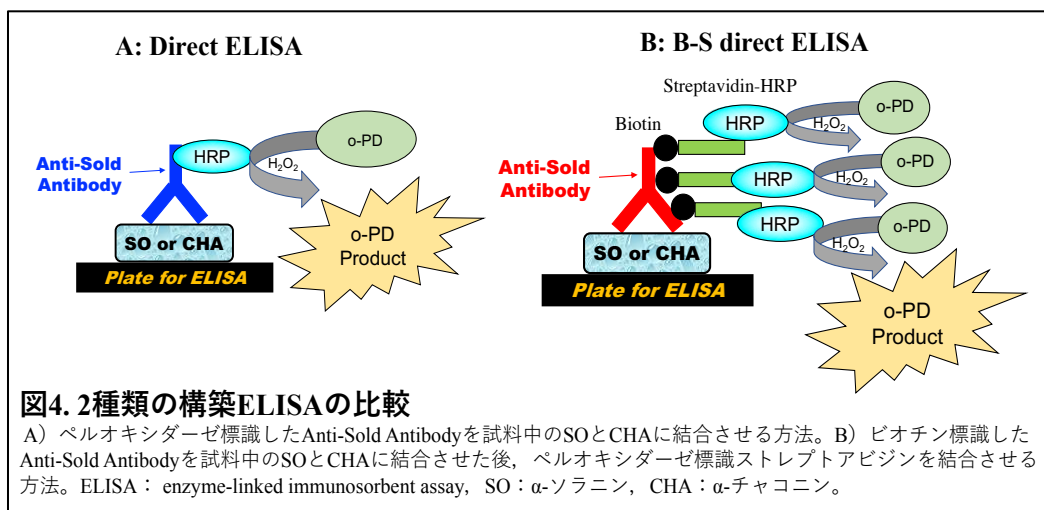
令和 5 年度は、特に SO と CHA に対する ELISA の構築に尽力した。結果、buffer, urine, serum に含まれる SO と CHA の検出と定量を可能とする高感度 ELISA(2 種類)の開発に成功した(岡田光貴ほか, Foods 2023, 12(8):1621. 岡

田光貴ほか, 医学検査 2024, in press.)。

構築した 2 種類の ELISA(A: Direct ELISA および B: B-S direct ELISA)を図 4 に示す。

これら 2 種類の ELISA の、SO と CHA(SO+CHA)に対する検出性能を比較した。まず、buffer にて調製した 5 ng/mL SO+CHA 試料の吸光度測定結果は、Direct ELISA で平均 0.140 に対し、B-S direct ELISA では平均 0.691 となり、約 5 倍の差が認められた。さらに、serum にて調製した 5 ng/mL SO+CHA 試料の吸光度測定結果は、Direct ELISA で平均 0.20 に対し、B-S direct ELISA では平均 0.51 となり、約 2.5 倍の差が認められた。一方で、urine にて調製した 5 ng/mL SO+CHA 試料の吸光度測定結果は、Direct ELISA で平均 0.082 に対し、B-S direct ELISA では平均 0.132 となり、約 1.6 倍の差が認められた。

また、2 種類の ELISA に対して、各試料を用いた場合の LOD を比較した。



Direct ELISA によって buffer, serum, urine 試料中の SO+CHA を測定した場合の LOD はそれぞれ, 1.68 ng/mL, 4.27 ng/mL, 4.92 ng/mL であった。一方で, B-S direct ELISA によって buffer, serum, urine 試料中の SO+CHA を測定した場合の LOD はそれぞれ, 0.32 ng/mL, 2.08 ng/mL, 4.88 ng/mL であった。

一方, SO と CHA に共通の化学構造であるソラニジンと, それに構造が類似するソラソジンは, anti-Sold antibody に結合し, 交差反応を示す可能性がある。また, serum 中の成分では, SO や CHA の構造に類似するステロイド骨格を有するコレステロールと, ビタミン D3 を交差反応の候補に挙げた。これら交差反応の候補物質を buffer にて 5 ng/mL に調製し, B-S direct ELISA にて吸光度測定したところ, ソラニジンの吸光度が高く, ソラソジンも SO や CHA と同等の吸光度を示した。対して, コレステロールは SO や CHA の 1/3 - 1/4 程度, ビタミン D3 は 1/10 以下の吸光度であるが交差性を示した。

また, 馬鈴薯の成分抽出液を B-S direct ELISA で測定したところ, 塊茎 (Tuber), 皮 (Peel), 芽 (Sprout) のいずれの部位からも SO+CHA の含有を確認できた。部位別では, 塊茎よりも皮, 皮よりも芽の SO+CHA の含有量が多く, 馬鈴薯購入後の時間が経過すると

各部位の SO+CHA 含有量が高まる傾向が確認された。

D. 考察

1. TTX に対する ELISA の考察

非競合 ELISA による urine および serum 内 TTX 測定の感度は, 臨床検査法として採用するには心許ない数値と思われる。実際, TTX が原因の食中毒患者において, urine および serum に含まれる TTX は数十~数百 ng/mL 程度と報告されている (Horie M, et al. *Analyst* 2023, 127: 755-759.)。そのため, 非競合 ELISA を用いて TTX 中毒患者の生体試料を測定するためには, 検体を濃縮する必要があると思われる。また, 濃縮操作も含め, 検体の前処理法や測定手法, 抗体濃度, 反応時間などを工夫することで, 非競合 ELISA の測定性能はさらに向上すると考えている。LC-MS, あるいは LC-MS/MS を利用した測定系では, 検体を濃縮する必要なく数十~数百 ng/mL の TTX 濃度が検出可能であるため (赤木浩一ほか, *食衛誌* 2006, 47: 46-50.), 現段階では本 ELISA の性能が劣るといわざるを得ない。一方で, 1 プレートで多数の検体が同時に測定可能であること, 極端に高額な装置を必要とせず操作も簡便であること, 発色の程度で TTX 濃度が分かるため結果の解釈が容易であること, などは非競合 ELISA の長所と思われる。さら

(別添 3・4)

に、この非競合 ELISA はフグ科魚類などの食材からの抽出液を試料とすることで、食品安全検査にも応用が可能と思われた。これまで TTX の測定手段が限られていた中で、本研究において非競合法を原理とする ELISA を構築できたことは、今後の TTX 検査の発展に有用な成果と考える。今後は、臨床検査法としての実用化に向け、TTX 測定用 ELISA の感度と特異性を向上させるための最適な測定条件を探求する予定である。まず、検体の前処理法も含めた TTX 測定 ELISA の手順書を確立したいと考えている。さらに、TTX に対するイ IC 法の構築にも着手し、より迅速かつ簡便な TTX 測定法の開発を目指したい。

2. TTX に対する HPLC 分析系の考察

HPLC 分析に関しても、臨床検査法としての検出感度は低いといえた。なお、LC-MS/MS 分析における TTX の LOD は ≥ 0.3 ng/mL と報告されている(赤木 浩一ほか, 食衛誌, 2006, 47: 46-50)。本 HPLC 分析系を TTX 中毒患者の生体試料に適応するためには、検体を濃縮する必要があった。濃縮操作も含め、検体の前処理法や測定条件(移動相溶液の種類や測定波長など)を工夫・変更することで、本 HPLC 分析系の測定性能はさらに向上する余地があると考えている。一方、我々が構築した ELISA 測定系における尿中 TTX

の LOD は $31.25 \mu\text{g/mL}$ であった。本 HPLC 分析系は、少なくともこの ELISA に勝る TTX 検出性能といえた。また、HPLC 分析の短所として、装置を導入している医療施設が少なく実施が困難である点が挙げられる。しかし、HPLC 分析の汎用性は高く、カフェインなどの中毒物質測定や血中薬物動態の分析には古くから導入されている(中島 憲一郎ほか, クロマトグラフィー: 分離・検出科学, 2009, 30: 57-60. 古谷 明ほか, 分析化学 2015; 64: 821-833)。今後、HPLC 分析は臨床検査へのさらなる応用が期待される。また、得られた波形が必ずしも TTX のものとは限らないのが弱点である。そのため、現状は確定診断に導入できないと思われる。検体中の TTX の存在を確定させるためには、ELISA 等の別の手法を用いる必要がある。緊急時を脱した TTX 中毒患者の経過観察において、生体試料中の TTX 濃度を測定するために HPLC 分析を活用することが現実的と思われた。本 HPLC 測定系の利点としては、特に結果が得られるまでの時間が極めて短い点が挙げられる。また、作業工程が少なく分析自体が簡単なことも利点として挙げられる。そのうえ、高い正確性と再現性を備えた測定法である点も重要である。やはり TTX 測定系に関しては、LC-MS/MS の優れ

(別添 3・4)

た検出性能が際立つが、HPLC 測定系でも測定時間や添加回収率、直線性では劣らないといえる。ELISA と比較すると、HPLC 測定系は検出性能を示すデータの大半が優位であった。

TTX 中毒患者尿に対する検査法として考えると、現状は LC-MS/MS が第一選択となり、次いで HPLC, ELISA の順が妥当と思われる。一方で、本 HPLC 測定系は性能の改善を図る余地が充分にある。具体的には、効率的な除タンパク処理法の探究、測定波長や測定時間の改善、最適な溶媒の検証により、性能の向上が見込まれる。近年、TTX の検出を可能とする測定法の報告がほとんど見られず、発展が乏しい。その中で、本研究を通じて新たな測定系を提案することができた。検出性能等には改善の余地があるものの、TTX 中毒の検査と診療の将来的な発展に寄与する、重要な知見を提供できたと考えている。

3. SO と CHA の ELISA(2 種類)の考察

本研究で我々は、Direct ELISA と B-S direct ELISA を構築し、両法の性能比較を通じて、その有用性を検証した。B-S direct ELISA では理論上、anti-Sold antibody に多数のビオチンを標識することが可能であるため、それに結合するペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンも多数となり、目的物

質の検出性能の向上が見込まれた。一方で、具体的に Direct ELISA から何倍程度の感度上昇が見込まれるかは不明であり、それにより有用性の評価も変動する。そのため、試料の溶媒を buffer, serum, urine と変更させた場合の検出感度の違いに注目した。また、食材検査あるいは食品検査法として応用が可能かを判断するためには、馬鈴薯の成分抽出液を試料とした解析が必要であった。さらに、ELISA に限らず抗体を使用した解析法では交差反応が常に問題となるため、馬鈴薯や生体試料中に含まれる構造類似物質との反応性も検証する必要があった。以上の検証内容から得られた本研究の成果は、臨床検査や食品科学といった学問領域に有益なエビデンスを提供できたと考えている。

同一濃度試料の測定における両 ELISA の吸光度差は、希釈液が buffer の場合で最も大きい 5 倍であり、これが Direct ELISA から B-S direct ELISA に改良した場合の検出性能の差を的確に表していると思われた。一方で、serum や urine 試料では B-S direct ELISA への改良による感度の向上が 2.5 倍と 1.6 倍に抑制されており、これは試料中の成分が測定結果に与える負の影響を示すものである。また、各試料における LOD で評価しても、Direct ELISA から B-S direct ELISA に

(別添 3・4)

変更したことで、buffer 試料では5倍の感度向上を認めた一方、serum 試料では2倍、urine 試料では等倍となり、生体試料に対してはELISAを改良することの大きな優位性は示されていない。加えて、Direct ELISA から B-S direct ELISA へ変更した場合でも、CV や Recovery の向上を認めず、やはり検出感度が唯一の改善点である。

他研究者による過去の報告と比較しても、我々のELISAの性能は劣るものではない。1990年代に開発されたモノクローナル抗体を用いたELISAにおいてSOとCHAのLODは70 ng/mLであり(Stanker LH et al. J Agric Food Chem. 1994, 42: 2360–2366. Friedman M et al. J Agric Food Chem. 1998, 46: 5097–5102.)、我々のB-S direct ELISAがいずれの試料を用いた場合でも数十倍の検出感度を有している。過去にHPLCで測定した報告は、血清試料で0.3 ng/mLのSOとCHAを検出できたことを示している(Hellenäs KE et al. J Chromatogr. 1992, 573: 69–78.)。しかし、HPLCは試料中成分の吸光度測定結果を波形として描写するものであり、無数の血清中成分からSOとCHAを示す波形のみを選び分けて解析することは非常に困難と思われる。そのためHPLCでは波形の解釈誤りが考えられ、その点で

はELISAの方がSOとCHAの検出特異性に勝ると予想する。なお、同報告内の結果では、馬鈴薯食中毒患者の血清中SOのピーク濃度は8 ng/mL、CHAのピークは14 ng/mLということであった(Hellenäs KE et al. J Chromatogr. 1992, 573: 69–78.)。このピーク濃度を事実と仮定し、B-S direct ELISAの血清試料におけるLODを比較すると、このELISAの患者への適応も可能と思われた。B-S direct ELISAには「測定試料をプレートに添加して一晩静置する」過程があるため、測定結果が出るまでに1日を要する。そのため緊急性を要する患者へは適応できないが、例えば入院患者のserumを測定し、残存しているSOとCHAの量から重症度の判定や、退院の可否の判断ができることで、医師による診断に貢献するのではないかと考えた。あるいは、緊急時でなくとも患者への治療が適切であったかどうかの確認として、治療前後で経時的に採取されたserum中のSOとCHAの濃度変化を測定することも有効と考えた。ただし、いずれの目的においても、前述したように、元々の血清成分が原因の交差反応やばらつきの問題が改善されてからの適応が望ましい。

SOとCHAに関するこれまでの分析法のほとんどは西暦2000年以前に

(別添 3・4)

報告されたものであり、20 年以上に渡りこれら 2 つの毒素の検出法の開発はほとんど行われていないため、本研究の成果は希少である。近年に LC-MS による馬鈴薯試料の分析が実施されているが(Popova I et al. *Plants*. 2022, 11: 269.), この分析を行うための機器は高額であり、保有する医療施設は現状少ないと思われる。ELISA で必要な機器類は基本的にマイクロプレートリーダーのみであり、HPLC や MS よりもはるかに安価である。ELISA では吸光度を測定する前であっても SO と CHA 濃度が発色の程度で示されるため、結果を視覚的にも解釈することができる。一方、HPLC や MS の結果の解釈には、ある程度の技術と専門知識が必要であり、習熟する臨床検査技師はまだまだ少ない印象である。

我々が構築した B-S direct ELISA の弱点は交差性と測定時間の長さに集約されると思われる。交差性に関しては、2 種類のポリクローナル抗体を用いた ELISA サンドイッチ法を構築することで改善する可能性があるため、今後取り組む予定である。また、時間と資金を要するものの、ポリクローナル抗体の作製に用いたものと同じの免疫原を使用し、モノクローナル抗体の作製に取り組むたいと考えている。さらに、優れた抗体を樹立した場合にはイムノクロマト法の構築に

も取り組む予定である。イムノクロマト法が完成すれば数分で結果を得ることができるため、患者の緊急時にも適応が可能となる。また、食品検査や食材検査法における馬鈴薯中の SO と CHA の検出も、イムノクロマト法が最も有用と思われる。しかしながら、我々が構築した B-S direct ELISA も、概ね生体試料ならびに馬鈴薯試料中における SO と CHA の濃度を推定できる点で有益である。何より本研究の成果は、SO と CHA の検査法がまだまだ発展可能であることを示した。ここから抗体の標識物質を、例えば蛍光色素に変更するなどで更なる検出感度の向上も期待できる。食中毒の原因となる食材の中でも特に馬鈴薯は広く流通しており、世界レベルでみると自然毒の中で最も検査法の需要が高いかもしれない。したがって、SO および CHA の検出法はさらなる発展が必要であり、探究を継続する姿勢が望まれる。

E. 結論

本研究において構築した TTX に対する ELISA は生体試料中 TTX の測定が可能であるが、主として感度に課題が残る。現段階で非競合 ELISA は、検査法としてある程度有用という評価に留まるが、検体の調製法や測定条件の改善を図ることで、将来的な実用化が期待される。

(別添 3・4)

また、本研究において構築した、陰イオン交換クロマトグラフィーを原理とする TTX の HPLC 測定系は、buffer や urine 試料を検体とした場合に適応可能である。なお、TTX の HPLC 測定系では、測定試料と同成分の溶媒を用いた希釈系列を作製し、その測定結果に基づいた検量線の作成が重要である。いくつかの弱点を考慮し、現状、臨床検査法としての有用性は乏しい。すなわち、検体の前処理法や測定条件の改善を図る追加検証が必須である。

さらに、本研究を通じて構築した B-S direct ELISA は、少なくとも試料が buffer と serum の場合において、Direct ELISA を超える SO と CHA の検出性能を示した。一方で、馬鈴薯中のソラニジンやソラソジン、血清中のコレステロールやビタミン D3 などと交差反応を示す点には注意すべきである。交差性や測定時間の長さなどの弱点から医療現場での活用には課題が残るが、試料中の SO と CHA の濃度を推定できる手法として希少かつ有用である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- i. 岡田光貴, 松尾佳乃. 「ビオチン-ストレプトアビジン ELISA による馬鈴薯由来の自然毒成分の検出」医学検査. 73(2):258-270, 2024.
- ii. 岡田光貴, 松尾佳乃. Development of new antibodies and an ELISA system to detect the potato alkaloids α -solanine and α -chaconine. *Foods*. 12(8): 1621, 2023.
- iii. 岡田光貴, 福田篤久, 竹下仁. 高速液体クロマトグラフィーによるフグ毒テトロドトキシンの検出と定量に関する基礎的検討. 医学検査 72(1):1-10, 2023.
- iv. 岡田光貴, 福田篤久, 竹下仁. フグ毒テトロドトキシニンに対する新規 ELISA 測定系の構築. 医学検査 71(1):1-9, 2022.

2. 学会発表

- i. 岡田光貴. Development of Laboratory Methods for Detecting Natural Toxins in Biological and Food Samples. SAH International Conference (SAHIC) 2024 (Nakhon Si Thammarat, Thailand). 招待講演, 口演, 2024 年 3 月 25 日.
- ii. 岡田光貴, 松尾佳乃. 馬鈴薯の自然毒成分を検出する増感 ELISA の構築. 第 34 回生物試料分析学会年次学術集会 (大阪), 一般演題, 口演, 2024 年 3 月 23

(別添 3・4)

- 日.
- iii. 岡田光貴、松尾佳乃. α -ソラニンおよび α -チャコニンを検出する新規 ELISA システムの構築. 第 63 回日本臨床化学会年次学術集会 (東京), 一般演題, ポスター, 2023 年 10 月 28 日.
- iv. 岡田光貴. Challenges in Developing New Laboratory Methods for Detecting Natural Toxins in Biological Samples. 日本医療検査化学会第 55 回大会 (神奈川), 招待講演, 口演, 2023 年 10 月 8 日.
- v. 岡田光貴、松尾佳乃. Establishment of new antibodies and ELISA system to detect the potato alkaloids α -solanine and α -chaconine. 2023 AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo (Anaheim, California, USA), 一般演題, ポスター, 2023 年 7 月 26 日.
- vi. 岡田光貴、松尾佳乃. Establishment of a new ELISA system for measuring the concentration of the mushroom toxin α -amanitin. The 17th Congress of Asian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (Hyogo) . 2022 年 10 月 9 日.
- vii. 岡田光貴、松尾佳乃. Establishment of a new high-performance liquid chromatography analytical method for measuring the concentration of pufferfish toxin tetrodotoxin. The 17th Congress of Asian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (Hyogo) . 2022 年 10 月 9 日.
- viii. 岡田光貴、松尾佳乃. 自然毒成分 α -アマニチンに対する Meixner 試験の検出性能評価. 第 62 回日本臨床化学会年次学術集会(富山). 2022 年 10 月 2 日.
- ix. 岡田光貴、竹下仁、福田篤久、所司睦文、米田孝司. 毒キノコ成分 α -アマニチンの検出および定量に関する基礎的検討. 第 71 回日本医学検査学会(大阪). 2022 年 5 月 21 日.
- x. 岡田光貴、竹下仁、福田篤久、所司睦文、米田孝司. 陰イオン交換クロマトグラフィーを活用したフグ毒テトロドトキシン測定系の構築. 第 71 回日本医学検査学会(大阪). 2022 年 5 月 21 日.
- xi. 岡田光貴. フグ毒テトロドトキシンに対する新たな測定系の構築と性能評価. 第 31・32 回生物試料分析科学会合同年次学術集会(三重). 2022 年 3 月 13 日.
- xii. 松尾佳乃、岡田光貴、南部昭、竹

(別添 3・4)

- 下仁, 福田篤久, 米田孝司. 自然毒成分 α -アマニチンの高速液体クロマトグラフィー測定系の構築. 第 31 回日本臨床化学会近畿支部総会(京都). 2022 年 3 月 6 日.
- xiii. 岡田光貴, 福田篤久, 竹下仁, 所司睦文, 米田孝司. 高速液体クロマトグラフィーを用いた食中毒成分 α -アマニチン測定法の検討. 日本医療検査科学会第 53 回大会(神奈川). 2021 年 10 月 10 日.
- xiv. 岡田光貴, 竹下仁, 福田篤久. フグ毒テトロドトキシンに対する非競合 ELISA 測定系の構築. 日本医療検査科学会第 53 回大会(神奈川). 2021 年 10 月 10 日.
- xv. 岡田光貴, 福田篤久, 竹下仁, 所司睦文, 米田孝司. 高速液体クロマトグラフィーを用いた食中毒成分 α -アマニチン測定法の検討. 第 70 回日本医学検査学会(福岡). 2021 年 5 月 15 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。