

(別添 3・4)

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)
令和 5 年度 総括研究報告書

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。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。令和 5 年度は主として、馬鈴薯に含まれる自然毒、 α -ソラニン(SO)と α -チャコニン(CHA)に対する酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)2 種類の構築に尽力した。結果、リン酸緩衝液、尿、血清に含まれる SO と CHA の検出と定量を可能とする高感度 ELISA の開発に成功した。本 ELISA は食材・食品検査法のみならず、臨床検査法として応用可能な検出感度を有すると思われた。

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。令和 5 年度は主として、馬鈴薯に含まれる自然毒、 α -ソラニン(SO)と α -チャコニン

(CHA)に対する酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)2種類の構築に尽力したので、その成果を中心に報告する。

B. 研究方法

1. 材料

市販の健常人血清試料 Human Serum pool(Serum), 尿試料 Urine, Single Male Donor, Human(Urine)およびペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(コスモ・バイオ株式会社:東京)を用いた。SO, CHA, 化学構造類似物質であるソラニジンおよびソラソジンの粉末試薬(Sigma-Aldrich Co, LLC:東京)を用いた。抗体のビオチン標識は Biotin Labeling Kit - SH を用い、ペルオキシダーゼ標識は Peroxidase Labeling Kit - SH(株式会社同仁化学研究所:熊本)を用いた。抗体希釈液には Blocking One(ナカライテスク株式会社:京都)を用いた。反応プレートは ELISA プレート H タイプ(住友ベークライト株式会社:東京)を使用した。ペルオキシダーゼの基質である、*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩(*o*-PD)の錠剤, コレステロール, ビタミン D3 の粉末試薬および各種一般試薬(富士フイルム和光純薬株式会社:東京)を用いた。なお, 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ーカラムを用いて 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。

2. 試料の調製

SO と CHA の粉末試薬をそれぞれ 10 mg 計量し, 両方をまとめて 10%ジメチルスルホキシド(DMSO) 10 mL に加え完全に溶解し, 1.0 mg/mL SO+CHA 混合試料を調製し原液とした。馬鈴薯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(10 mM リン酸緩衝液 pH 7.4), ② urine および③ serum にて原

(別添 3・4)

液を目的濃度に調製したものを生体試料と見做した。SO と CHA の構造類似物質であるソラニジンとソラソニンも同様に、まずは 10%DMSO にて完全に溶解した後で、buffer を用いて目的濃度に調製した。コレステロールとビタミン D3 はイソプロパノールにて完全に溶解し、buffer を用いて目的濃度に調製した。

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。

3. ELISA の構築

本研究では、2 種類の ELISA(Direct ELISA, B-S direct ELISA)を構築し

た。それぞれ、以下に概説する。

<Direct ELISA の構築>

まず、ELISA プレートの各ウェル(well)に 50 mM 炭酸-重炭酸緩衝液(pH 9.4)を 100 μL/well 入れ、そこに測定試料を 25 μL/well 加え、4°C で一晩静置して well 内に試料中成分をコーティングした。150 mmol/L NaCl と 0.05% Tween 20 を含む 10 mmol/L PBS pH 7.4(10 mM PBS-T) 200 μL/well を用いて、室温で 3 回洗浄した。その後、10 mmol/L PBS pH 7.4 にて 10 倍希釈した Blocking One(×1/10 Blocking One)を 200 μL/well 入れ、室温で 1 時間静置してブロッキングを行い、3 回洗浄した。10 μg/mL ペルオキシダーゼ標識 anti-Sold antibody を 100 μL/well 添加し 2 時間静置した。3 回洗浄後、1 mg/mL o-PD 溶液 10 mL に 30% H₂O₂ を 5 μL 滴下した反応液を 100 μL/well 入れて発色させた。30 分後、3 mol/L H₂SO₄ を 100 μL/well 入れて発色反応を停止させ、490 nm における吸光度を iMark マイクロプレートリーダー(Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)で測定した。

<B-S direct ELISA の構築>

試料のコーティングと洗浄、続くブロッキングと洗浄までは上記 Direct ELISA と同様である。その後、10 μg/mL ビオチン標識 anti-Sold antibody

(別添 3・4)

を 100 μL /well 添加し、1 時間静置した。3 回洗浄後、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、1 時間静置した。その後、Direct ELISA と同様の発色液を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 入れ、発色させた。30 分後、3 mol/L H_2SO_4 を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 入れて発色反応を停止させ、490 nm における吸光度を iMark マイクロプレートリーダーで測定した。

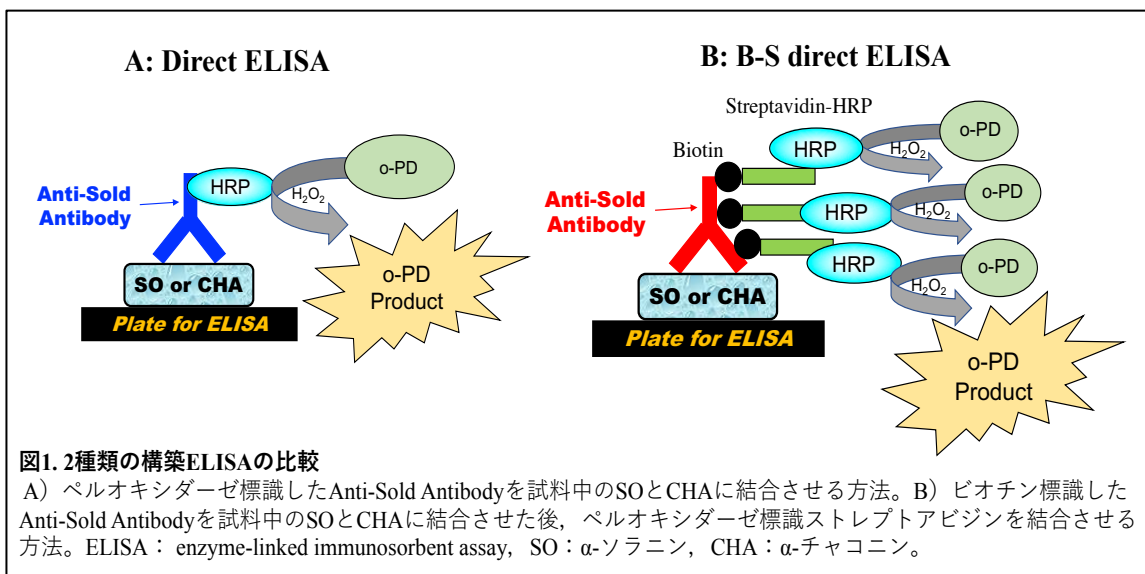
試料のコーティングを除く、全ての工程は室温(22°C)で実施した。また、使用した洗浄液は全て 10 mM PBS-T を用いた。図 1 にて、Direct ELISA(図 1A)と B-S direct ELISA(図 1B)の構成の違いを図示した。

各試料において希釈系列を作製し、その吸光度測定結果と SO と CHA(SO+CHA)濃度の関係性から検量線を作成した。また、馬鈴薯の成分抽出液は、検量線の範囲内の発色反応が得られる程度に buffer で希釈したも

のを測定し、最終的に希釈倍率を乗じて SO+CHA 濃度を測定した。測定結果は、馬鈴薯各部位の重量と抽出液量で補正し、各部位 1g に含まれる SO+CHA の含有量($\mu\text{g}/\text{g}$)を算出した。

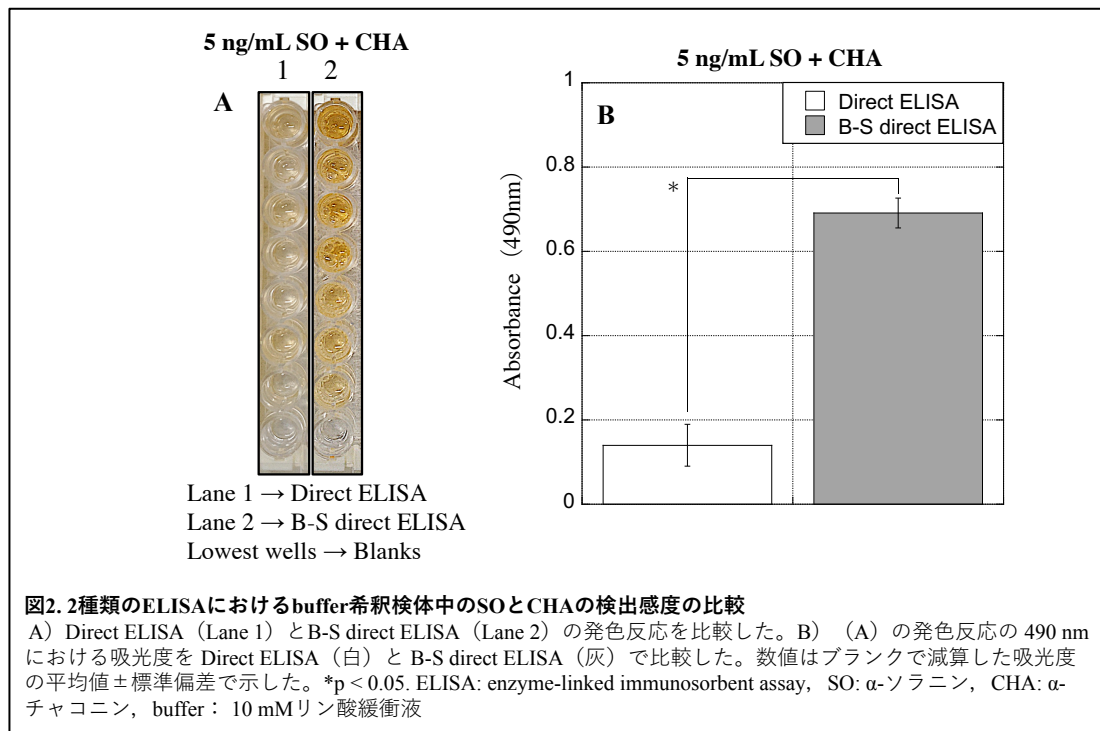
4. 統計解析と ELISA の性能評価

各実験は全て 5 回実施し、グラフ内ではその平均値(mean) \pm 標準偏差(SD)をプロットした。また、 $(\text{SD}/\text{mean}) \times 100\%$ の数式から変動係数(CV)を算出した。また、ELISA の LOD は過去の報告に則り、ブランク(溶媒のみ、n=16)測定値の mean + 3SD の数式から算出した。検量線の作成にあたり、その数式とスピアマンの順位相関係数(R-value)を、ソフトウェア KaleidaGraph(株式会社ヒューリンクス：東京)を用いて算出した。測定結果の有意差は、統計解析ソフトウェア Easy R version 1.54 を用いて、Mann-Whitney U 検定にて評価した。p 値 <0.05 を統計的に有意とした。



5. 研究内容の分担

光度測定結果は、Direct ELISA で平均



「1. 材料」の選定は研究代表者である岡田光貴が行った。「2. 試料の調製」は岡田光貴、伊藤洋志が担った。

「3. ELISA の構築」は岡田光貴、池田哲也が担った。「4. 統計解析と ELISA の性能評価」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. ELISA2 手法の検出感度の比較

まず、buffer にて調製した 5 ng/mL SO+CHA 7 試料に対して B-S direct ELISA を施行したところ、視覚的にも Direct ELISA に勝る発色反応が得られた(図 2A)。5 ng/mL SO+CHA 試料の吸

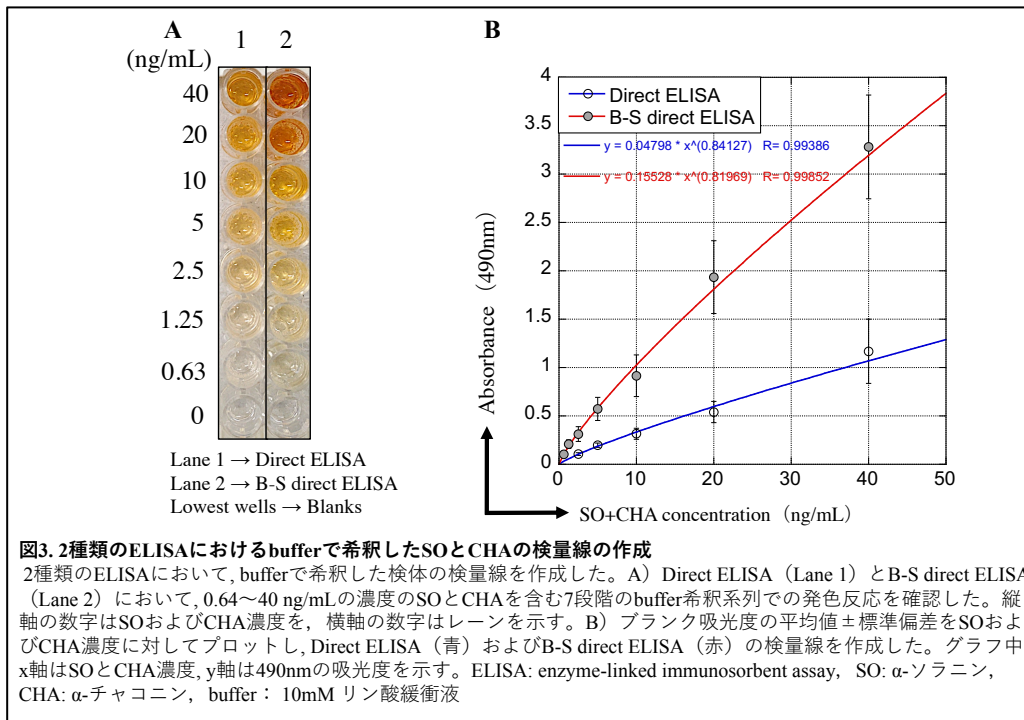
0.140 に対し、B-S direct ELISA では平均 0.691 となり、約 5 倍の差が認められた(図 2B)。

2. ELISA2 手法の検量線の比較

次に、buffer にて調製した SO+CHA の 7 段階希釈系列(0.63 - 40 ng/mL)に対して両手法を試みたところ、視覚的にもやはり B-S direct ELISA で、Direct ELISA に勝る発色反応が得られた(図 3A)。この吸光度測定結果に基づき両手法とも良好な検量線を描くことができたが、SO+CHA の検出感度が勝るのは B-S direct ELISA であった(図 3B)。

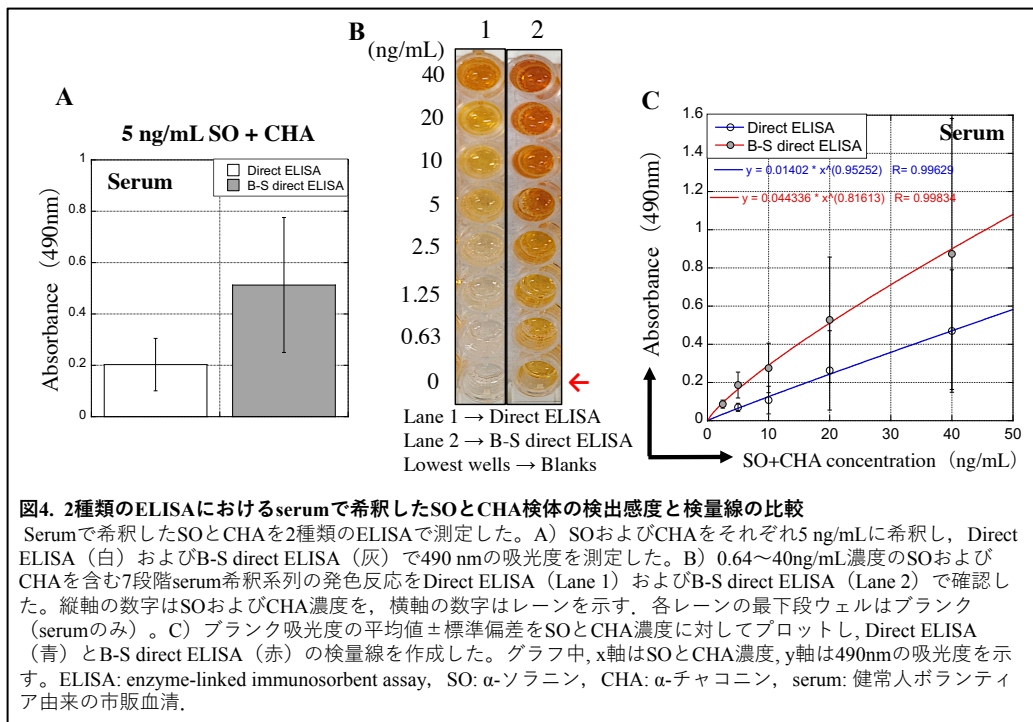
3. Serum 試料に対する ELISA2 手法の検出性能

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(図 4A)。Serum にて調製した SO+CHA の 7 段階希釈系列 (0.63 - 40 ng/mL) に対して両手法を試みたところ、B-S direct ELISA にて

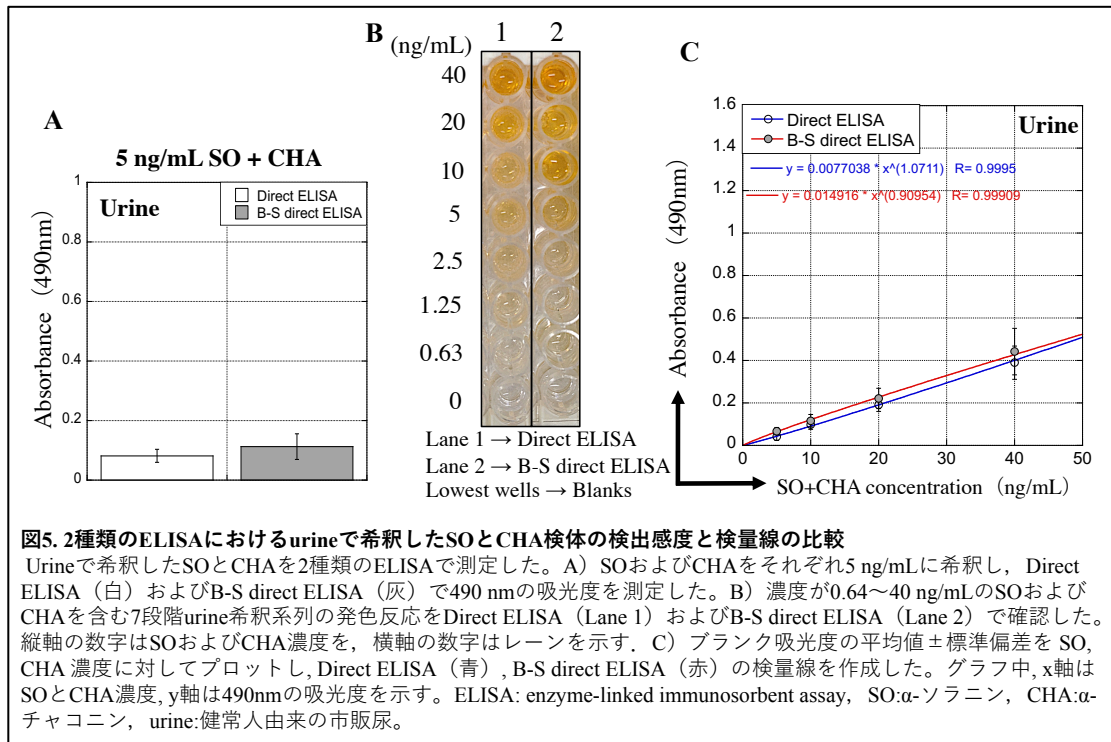
強い発色反応を認めたが、同時にブランク(serum のみ)試料に対する発色も確認された(図 4B)。この吸光度測定結果に基づき両手法とも検量線を描くことができたが、各 SO+CHA 濃度



における吸光度のばらつきが大きかった(図 4C)。

4. Urine 試料に対する ELISA2 手法の検出性能

両 ELISA にて同一濃度(20 ng/mL SO+CHA)の 14 試料を同時測定し SO+CHA 濃度を算出した結果, mean が実際の濃度に近似するのは buffer 試料



加えて, 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(図 5A)。Urine にて調製した SO+CHA の 7 段階希釈系列 (0.63 - 40 ng/mL) に対して両手法を試みたところ, 全体的に発色が抑制され, 肉眼的には発色の差が乏しかった(図 5B)。この吸光度測定結果に基づき検量線を描いたところ, 両手法の吸光度差が乏しい傾向にあった(図 5C)。

5. 同時再現性, 検出限界, 回収率の評価

であり, 次いで urine 試料であった(表

表1. 各検体におけるELISA 2手法のSOおよびCHA検出性能の比較

Direct ELISA	Buffer	Serum	Urine
Mean (ng/mL)	21.08	22.56	18.00
SD	1.84	2.67	1.94
CV (%)	8.71	11.83	10.75
LOD (ng/mL)	1.68	4.27	4.92
Recovery (%)	96.82	108.25	85.48
B-S direct ELISA	Buffer	Serum	Urine
Mean (ng/mL)	22.08	24.56	17.10
SD	1.85	3.01	1.12
CV (%)	8.38	12.26	6.57
LOD (ng/mL)	0.32	2.08	4.88
Recovery (%)	103.54	116.28	88.29
buffer: 10 mM phosphate buffer solution			
serum: commercial serum derived from healthy volunteers			
urine: commercial urine derived from healthy volunteers			
SD: standard deviation			
CV: coefficient of variation			
LOD: limit of detection			

1)。Serum 試料では実際の濃度からやや遠ざかり、両 ELISA とも CV が 10% を超えた(表 1)。前述した計算式に基づき LOD を算出したところ、urine 試料, serum 試料, buffer 試料の順に検出性能が高かった(表 1)。添加回収試験の結果, urine 試料で 90%を下回る回収率, serum 試料では 105%を上回る回収率をそれぞれ示した(表 1)。

6. 相関性の検討

次に、各試料を溶媒に用いた際の、Direct ELISA と B-S direct ELISA における測定結果の相関性を検証したところ、buffer, serum および urine 試料で R-value はそれぞれ 0.967, 0.941 および 0.984 であった(図 6)。

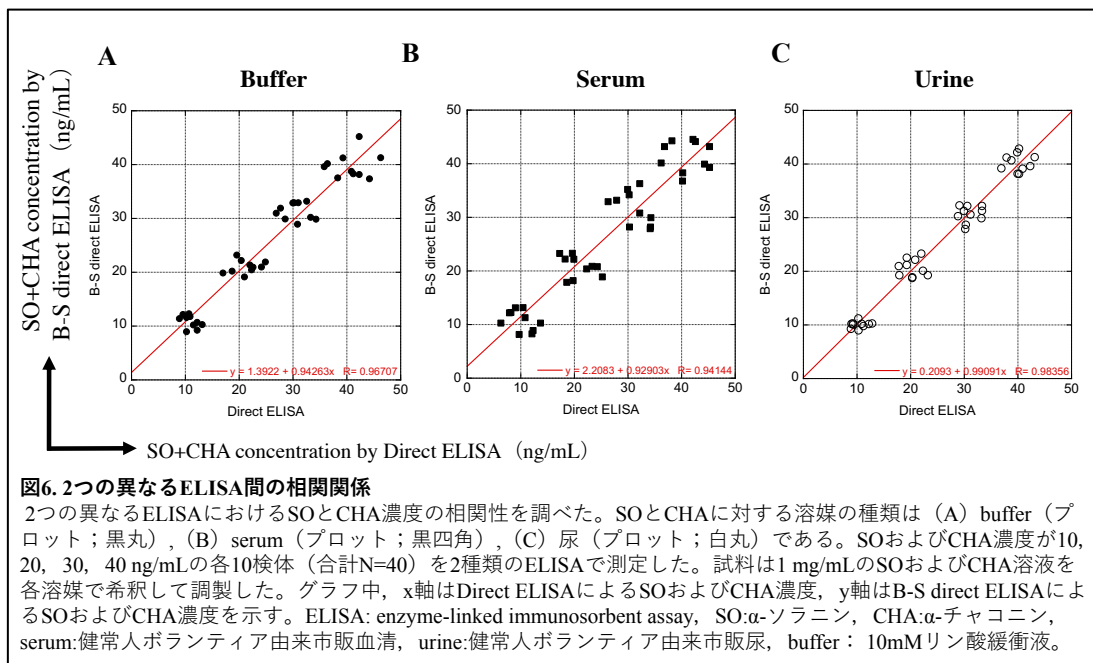
7. B-S direct ELISA における交差反応の検討

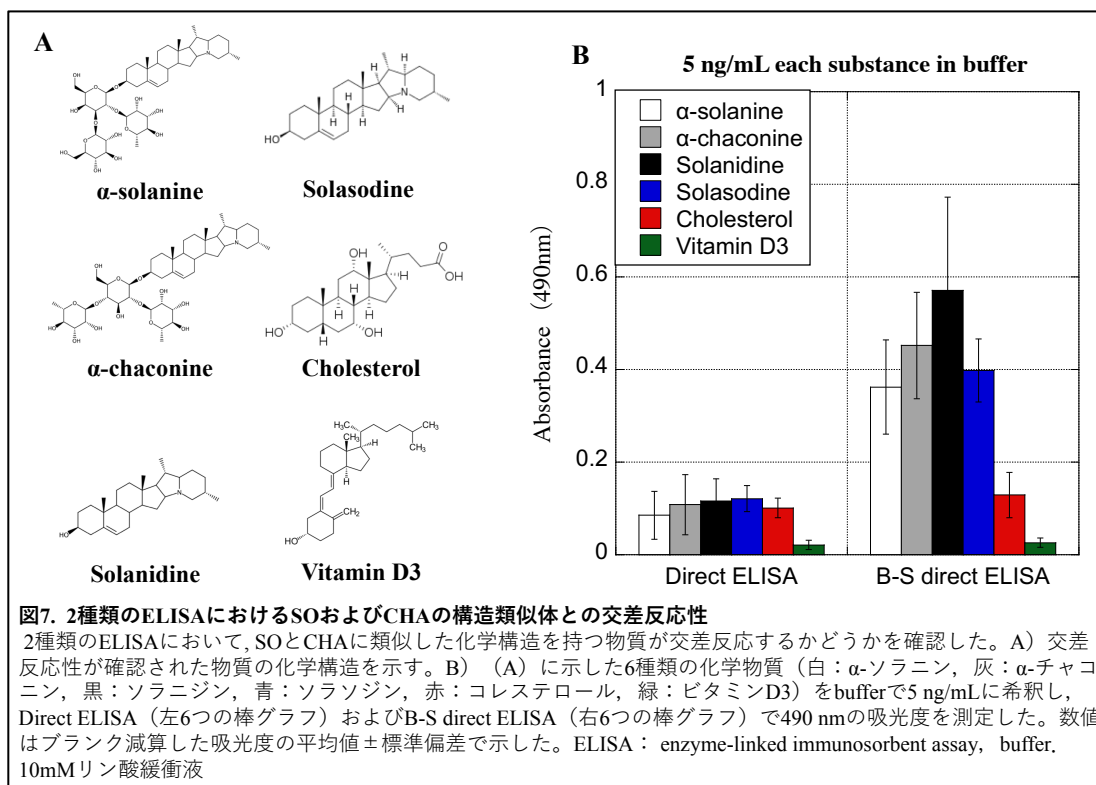
SO と CHA に共通の化学構造であるソラニジンと、それに構造が類似する

ソラソジンは、anti-Sold antibody に結合し、交差反応を示す候補である(図 7A)。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(図 7A)。化学構造式は PC ソフト Ketcher ver 2.11(EPAM Systems Inc, USA)を使用し、作製した。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(図 7B)。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(図 7B)。

8. B-S direct ELISA による馬鈴薯の成分抽出液の測定

馬鈴薯の成分抽出液を B-S direct

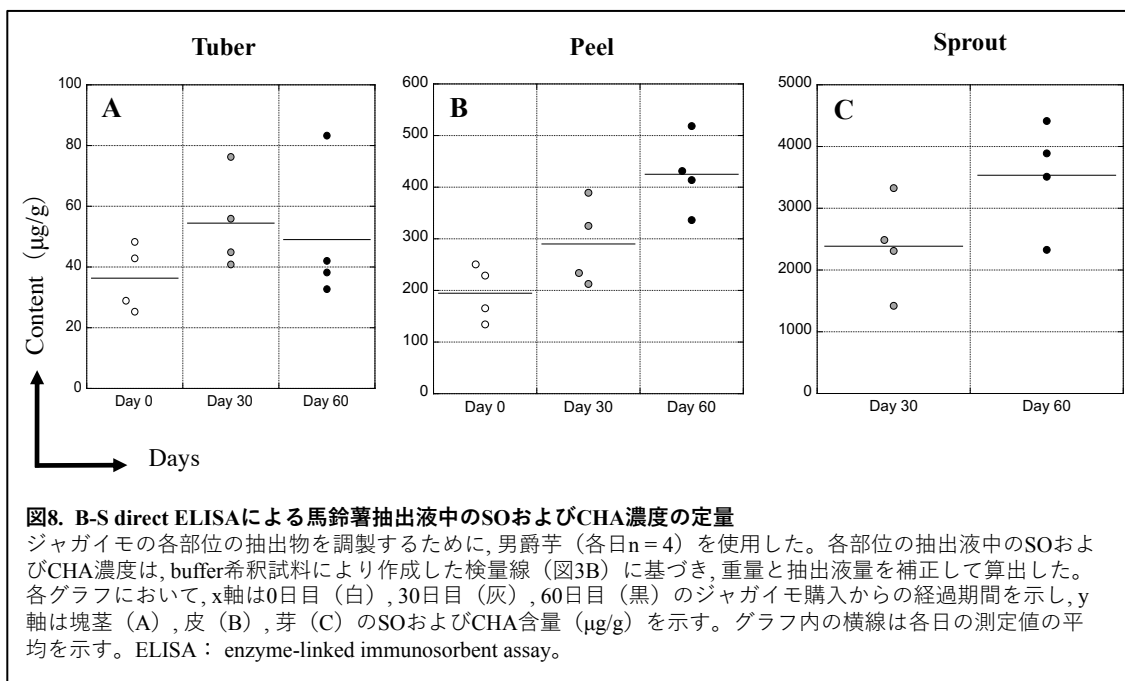




ELISAで測定したところ、塊茎(Tuber)、皮(Peel)、芽(Sprout)のいずれの部位からもSO+CHAの含有を確認できた(図8)。部位別では、塊茎よりも皮、皮よりも芽のSO+CHAの含有量が多く、

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(図8)。

D. 考察



(別添 3・4)

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(図 2B, 4A, and 5A), 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(同上), 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 に変更したことで, buffer 試料では 5 倍の感度向上を認めただ一方, serum 試料では 2 倍, urine 試料では等倍となり(表 1), 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(表 1), やはり検出感度が唯一の改善点である。検出可能な SO と CHA の濃度範囲内において, Direct ELISA と B-S direct ELISA における測定結果の相関性は良好であることから(図 6), 測定時間や操作の簡便性を優先する際には Direct ELISA でも問題ないと思われた。Serum 試料ではブランク, すなわち SO や CHA を含まない通常の serum にも関わらず, B-S direct ELISA で発色反応を認めており(図 4B, Lane 2), これが検出感度の低下と測定結果のばらつきの大きさに繋がっていると考えた。要因の一つは, やはり交差反応と思われる。少なくとも血清中

(別添 3・4)

のコレステロールは本 ELISA における吸光度の上昇に寄与しており、ビタミン D3 も僅かながら影響することが示唆された(図 7B)。今回検証したものの以外でも、SO や CHA と類似の化学構造を有する serum 内の物質は存在すると思われ、同じ抗体を使用する限り交差反応は避けて通れない問題である。この影響をできる限り取り除くためには、ELISA 側ではなく serum 試料への介入が必要と考える。例えば、serum 試料に除タンパク処理を施し、リポ蛋白を取り除くことで、コレステロールも同時に除去できるのではないかと予想する。ただし、除タンパク法も多数の種類が存在し、いずれが今回の検証に適するのかの選定が困難であるため、今回は見送りとなった。今後は、複数の除タンパク方法の性能を検証し、ELISA に適する serum 試料の前処理法を突き止めたいと考えている。他方、urine 試料ではむしろ、検証した SO+CHA の全濃度において発色反応の抑制を認め、Direct ELISA に対する B-S direct ELISA の優位性が乏しい結果となっている(図 5B and C)。これは urine 試料中に多量に含まれる尿素が原因と思われる。尿素はタンパク質変性剤として作用することが知られているため、ELISA プレートの各ウェルに結合した尿素が、後から添加される anti-Sold antibody

を変性させたと推測する(Song MF et al. Free Radic Biol Med. 2009; 47: 41–46.)。これが原因となり、使用する抗体自体は同一である Direct ELISA と B-S direct ELISA において、試料を urine とした場合に有意な性能差は発揮されなかったと思われる。この対策としては urine から尿素を取り除く前処理が必要になるが、これは非常に困難と予想する。イオン交換クロマトグラフィーを原理とするカラムに urine 試料を通すなどして、イオン化している尿素をカラムに結合させることができれば有効と考えられるので、今後の課題としたい。

食材検査あるいは食品検査法としての有用性についても検証が必要であり、そのために馬鈴薯の各部位に由来する抽出液を試料として、B-S direct ELISA による測定を実施した。基本的な馬鈴薯の性質として、塊茎には SO と CHA が少なく、古くなり緑色になった皮でその含有量が高まり、さらに芽で最も含有量が多いことが知られている(Wilson AM et al. J Food Prot. 1983; 46: 119–121. Phillips BJ et al. Food Chem Toxicol. 1996; 34: 439–448.)。本研究において、馬鈴薯における SO と CHA の含有性と測定結果に矛盾はなく(図 8)、概ね正しく測定できているのではないかと推測する。ただし、馬鈴薯に通常含まれる SO+CHA の含有

量に 0.4 - 1000 μ g/g と差があるため (Bushway RJ. J Agric Food Chem. 1981; 29: 814-817.), ELISA において真値が得られているかは不明である。また、本研究で B-S direct ELISA が SO および CHA と類似の構造を有する、ソラニジンおよびソラソジンに反応することがわかった(図 7)。ただし、この両物質とも馬鈴薯に含まれる毒成分であるため、SO や CHA と併せて測定されてしまうことは必ずしも欠点ではない。また、馬鈴薯に含まれる毒成分の 90%以上が SO と CHA という報告もあるため(Bushway RJ. J Agric Food Chem. 1981; 29: 814-817.), 馬鈴薯の検査法としての ELISA の交差反応は、大きな懸念材料にならないと思われた。

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(表 1), 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

(別添3・4)

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、先に提案した 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.

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 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

