

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＞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、特許出願中であり、カンピロバクター、志賀毒素、サルモネラについても同じように検出システムの構築において有望と期待できる抗体候補を得て特許出願などの準備を進めている。

＜まとめ＞本研究では当初の計画通り、日本国内で問題となっている主要な細菌性食中毒を迅速かつ簡便に検出・同定できる技術基盤を開発した。さらに、イムノクロマトなどの細菌性食中毒の迅速検出システムの実用化に向けたメーカーなどとの共同研究へと発展しており、本研究期間の終了後も本成果を基盤として、実用化に向けた研究開発を継続し、食品衛生ならびに公衆衛生の向上に貢献したいと考えている。

畑中律敏

大阪公立大学・助教

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

抗体ライブラリの作製

カンピロバクターやサルモネラの加熱死菌体、ウエルシュ菌エンテロトキシン、志賀毒素（Stx2）、コレラ毒素などをマウスに免疫し、脾臓や所属リンパ節を回収し、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）に対する反応性をELISA法により評価し

た。

ELISA法による検出

カンピロバクターやサルモネラなどの菌体は、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。ウエルシュ菌エンテロトキシン、志賀毒素、コレラ毒素などのタンパク質抗原は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。

フローサイトメトリーによる検出

カンピロバクターを血液寒天培地やBolton基礎培地にて培養し、遠心分離により菌体を回収、抗体と混和し37℃で30分間反応、洗浄後に蛍光標識した2次抗体と反応させ、フローサイトメーターで分析した。

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、菌を界面活性剤やソニケーションなどで可溶化し、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。

サンドイッチELISA法による検出

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。

イムノクロマトによる検出

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。

（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

カンピロバクターに対する検出技術基盤の構築

本研究ではまず、これまでに樹立しているカンピロバクターに反応し、常在菌カクテルには反応しない約40種類の抗体ライブラリから、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、検出系に適した抗体を絞り込んだ。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*, *Staphylococcus 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法により抗体の特異性を評価した。

さらに、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ため、血清型や由来が異なる*C. jejuni*30株、*C. coli*30株、また同じ*Campylobacter*属の他菌種（*C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. helveticus*など）に対する反応性を評価し、*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複数の抗体を見出した。検出システムとしては*C. jejuni*と*C. coli*の両方を同定できることが望ましいと考え、*C. jejuni*と*C. coli*を特異的に検出できる抗体を候補とした。

イムノクロマトなどの検出システムでペアとなる抗体が必要となることから、上記の候補抗体が認識する抗原を同定し、さらに、本抗原をマウスに免疫し、標的抗原特異的な抗体ライブラリを作製、上記と同じ手順で高感度かつ特異的な抗体を絞り込み、複数の候補抗体を得た。このように、独自に樹立したカンピロバクターに対する抗体ライブラリを活用し、カンピロバクターに対する検出技術基盤を構築できたと考える。

他の細菌性食中毒に対する検出技術基盤の構築

カンピロバクターで培った抗体ライブラリ作製のノウハウを活用し、サルモネラ（菌体）、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性しない抗体ライブラリを樹立した。

次に、カンピロバクターと同様に、臨床分離菌株や他の食中毒菌、常在菌などとの反応性を評価し、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抗体ライブラリから反応性と特異性に優れた複数の候補抗体を得た。一方で、志賀毒素については、免疫に用いたリコンビナントタンパク質に比べて、生毒素に対する反応性が低いことが明らかとなり、検出には適さないと判断した。そこで、新しい抗体を作製し直して、生毒素を用いたスクリーニングなどにより、有用な抗体を得た。また、サルモネラは多くの血清型に細分されていることから、家畜伝染病予防法や国立感染症研究所の病原微生物検出情報から日本国内のサルモネラ食中毒の主要な血清型（Enteritidis, Infantis, Typhimurium, Thompson, Schwarzengrundの5つの血清型）との反応性を評価した。その結果、多くの抗体は免疫に用いたEnteritidisに特異的に反応したが、Thompsonを除く4つの血清型もしくは5つの血清型すべてと反応する抗体が見出された。本研究では5つの血清型すべてと反応する抗体に着目し、本抗体が認識する抗原を同定し、さらに、本抗原をマウスに免疫し、標的抗原特異的な抗体ライブラリを作製、上記と同じ手順で高感度かつ特異的な抗体を絞り込み、複数の候補抗体を得た。

このように、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も抗体ライブラリを作製し、検出技術基盤を構築できたと考える。

カンピロバクターの候補抗体の反応性

本研究ではカンピロバクター検出における標的分子の発現様式などの基礎情報を得るため、菌体の培養条件や培養時間において抗体の反応性が変化するか検証した。カンピロバクターを血液寒天培地や血液を含まないBolton基礎培地にて24-72時間培養し、フローサイトメトリーにより抗体と菌の反応性を評価したところ、供したすべての菌株についてすべての条件において反応することが明らかになった。一方で、検出強度をみると、血液がない状態で培養した場合の菌体の方が抗体との反応性が高い傾向にあり、また、培養時間によっても多少の強弱があった。この結果から、候補抗体は、様々な状況下で検出できる有用な抗体であると期待できるが、食品中や患者体内などの環境中での検出において注意が必要であり、実用化に向けて慎重に検討すべきであると考えられる。

イムノクロマトによる検出システムの開発

本研究で構築した技術基盤を活用し、実用化に向けてイムノクロマトの作製を進めた。まず、候補抗体から検出に適した抗体の組合せをサンドイッチELISAにより評価し、高い検出感度を示す抗体と組合せを選定した。複数の候補についてイムノクロマトを作製し、抗体の選定と同じ手順で臨床分離菌株（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との反応性を評価し、イムノクロマトを構築した。ウエルシュ菌エンテロトキシンとコレ

ラ毒素については診断薬メーカーと共同で特許出願中であり（特願2021-164746、特願2022-5375）、カンピロバクターも出願準備中である。サルモネラと志賀毒素も含めて本研究期間終了後も研究を継続し実用化を目指す予定である。

イムノクロマトの構築と技術の知財化



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、特許出願中であり、カンピロバクター、志賀毒素、サルモネラについても同じように検出システムの構築において有望と期待できる抗体候補を得て特許出願などの準備を進めていることから、本研究の目標である迅速かつ高感度な検出技術基盤の確立を十分に達成できたと考えている。

現在のウエルシュ菌エンテロトキシンの検出は、培養法による菌の単離を主として、市販のラテックスビーズを用いた検出キットなどが併用されているが、現行のキットは前処理などの作業が煩雑で偽陽性が出やすいなどの課題があり、検査を行う現場から改善を求める声があるのが現状である。本研究で開発した技術基盤を応用したイムノクロマトシステムでは、前処理なども含めて15～30分程度で検出が可能であり、感度・特異度ともに良好な結果が得られていることから、現場のニーズに応える技術になると期待できる。

さらに、別事業において、ウエルシュ菌食中毒の患者便を収集し、本イムノクロマトシステムによって、ウエルシュ菌PCR陽性19例、陰性6例の便を評価したところ、1例のみ偽陰性となったが、感度94.7% (18/19)、特異度100% (6/6) と良好な予備検討結果を得ており、本研究で開発した技術基盤は、ヒトへの応用も可能なことから、幅広い領域で利用できるシステムへと展開できることが期待される。

また、本研究成果をもとに一般財団法人阪大微生物病研究会と地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所との共同研究へ発展しており、本研究によって実用化に資する技術基盤を開発できたと考えている。コロナ渦で自宅での調理機会やテイクアウト需要の増加などの生活様式の変化に伴い、ウエルシュ菌を含む細菌性食中毒の患者数は増加しており、今後、社会的なニーズが高まると予想されることも考慮し、研究期間終了後も実用化に向けた検討を積極的に進めて、社会へ貢献できるように努めたいと考えている。

また、学術的な観点から、別事業において、本研究で樹立した抗体の機能性についても評価を進めており、カンピロバクターやサルモネラの増殖や感染の制御に関わる抗体を見出している。抗体の機能解析を起点として食中毒の病態メカニズムを解明

し、創薬・ワクチン開発などへ展開できると期待される。このように、本事業で培った抗体技術を応用し、学術的ならびに社会的に意義のある研究へ発展させ、食品衛生ならびに公衆衛生の向上に貢献したいと考えている。

E. 結論

食中毒の原因菌もしくは毒素に対する抗体ライブラリを活用し、検出に適した候補抗体の選定、特許出願、実用化のためのイムノクロマトシステムの構築など検出技術基盤の開発を進め、さらに、本成果をもとにメーカーや地方衛生研究所との共同研究へ発展しており、研究期間終了後も本成果を基盤とした実用化研究に精力的に取り組んでいく。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - ① Ueta M, Hosomi K (equally first author), Park J, Mizuguchi K, Sotozono C, Kinoshita S, Kunisawa J. Categorization of the Ocular Microbiome in Japanese Stevens-Johnson Syndrome Patients With Severe Ocular Complications. **Front Cell Infect Microbiol.** 2021 Nov 19;11:741654.
 - ② Liu Z, Hosomi K, Shimoyama A, Yoshii K, Sun X, Lan H, Wang Y, Yamaura H, Kenneth D, Saika A, Nagatake T, Kiyono H, Fukase K, Kunisawa J. Chemically Synthesized Alcaligenes Lipid A as an Adjuvant to Augment Immune Responses to Haemophilus Influenzae Type B Conjugate Vaccine. **Front Pharmacol.** 2021 Oct 22;12:763657.
 - ③ Wang Y, Hosomi K, Shimoyama A, Yoshii K, Nagatake T, Fujimoto Y, Kiyono H, Fukase K, Kunisawa J. Lipopolysaccharide Derived From the Lymphoid-Resident Commensal Bacteria *Alcaligenes faecalis* Functions as an Effective Nasal Adjuvant to Augment IgA Antibody and Th17 Cell Responses. **Front Immunol.** 2021 Jul 1;12:699349.
 - ④ 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.
 - ⑤ Hosomi K, Kunisawa J. Impact of the intestinal environment on the immune responses to vaccination. **Vaccine.** 2020 Oct 14;38(44):6959-6965.
 - ⑥ 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.
 - ⑦ Lan H, Hosomi K, Kunisawa J. Clostridium perfringens enterotoxin-based protein engineering for the vaccine design and delivery system. **Vaccine.** 37(42): 6232-39, 20

- 19
- ⑧ 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
- ⑨ 細見晃司、國澤純 食と腸内細菌から考える健康長寿最前線 アンチ・エイジング医学 (印刷中)
- ⑩ 細見晃司、國澤純 粘膜面における獲得免疫と感染防御 医学のあゆみ 279(10):937-942, 2021
- ⑪ 吉井健、細見晃司、國澤純 腸内細菌の代謝物を介した免疫機能制御 腸内細菌学雑誌 36(1): 1-11, 2022
- ⑫ 吉井健、細見晃司、國澤純 感染症対策に効果的に機能する腸内環境の構築と腸内細菌のかかわり 体育の科学 5(71): 341-345, 2021
- ⑬ 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
- ⑭ 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
- ⑮ 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、下山敦史、柴田納央子、王韻茹、吉井健、長竹貴広、宇戸智哉、山浦遼生、藤本ゆかり、清野宏、深瀬浩一、國澤純、パイエル板組織内共生菌アルカリゲネスのリポ多糖の免疫学的特徴を利用したアジュバント開発 第25回日本ワクチン学会学術集会 (2021年12月3-5日)
- ② Koji Hosomi, Takahiro Nagatake, Hiroshi Kiyono, Jun Kunisawa, A symbiotic mechanism of intestinal lymphoid tissue resident *Alcaligenes* by controlling metabolic modification in dendritic cells. 第50回日本免疫学会学術集会 (2021年12月8-10日)
- ③ Koji Hosomi, Yunru Wang, Ken Yoshii, Atsushi Shimoyama, Takahiro Nagatake, Azusa Saika, Tomoya Uto, Haruki Yamaura, Davie Kenneth, Yukari Fujimoto, Hiroshi Kiyono, Koichi Fukase, Jun Kunisawa, Effective and safe adjuvant activity of *Alcaligenes* LPS and its synthetic lipid A for nasal vaccine. 16th Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2021年10月12-15日)
- ④ 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

用 第24年日本腸内細菌学会 (2020年6月11日)
*新型コロナのため誌上開催

- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
- ① 発明の名称: ウェルシュ菌エンテロトキシンの検出方法、出願人: 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所、一般財団法人阪大微生物病研究会、出願番号: 特願2021-164746、出願日2021年10月6日
- ② 発明の名称: コレラ毒素の検出方法、出願人: 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所、一般財団法人阪大微生物病研究会、出願番号: 特願2022-5375、出願日2022年1月17日
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし