

## 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＞最終年度となる本年度は、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、候補抗体を用いたイムノクロマトを作製し、十分な感度で検出できることを確認し、特許を出願中である。また、カンピロバクター、サルモネラ、志賀毒素についても各病原体に特異的な抗体ライブラリの樹立など検出技術基盤を確立した。

＜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

## 抗体の選定

昨年度までに樹立しているカンピロバクター、サルモネラ、ウエルシュ菌エンテロトキシン、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、ウェ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

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、昨年度までに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。さらに、本イムノクロマトにより抗原を十分な感度で検出できることを確認したことから、本年度はこれらの成果に基づいて、特許出願中である(特願2021-164746、特願2022-5375)。

さらに、カンピロバクター、志賀毒素についても昨年度に引き続いて抗体の選定を進め、カンピロバクターについては、候補抗体を用いたイムノクロマトを作製し、特許出願の準備を進めている。さらに、カンピロバクターについては、汚染された食肉や家畜などから分離された菌株とも反応することを確認しており、食品や家畜などの検出へ展開できると期待される。

また、サルモネラについては昨年度に複数の血清型を検出できる抗体を樹立、本抗体が認識している抗原を同定した。本年度は、本抗原に対する抗体ライブラリを新たに作製、抗体の反応性や特異性をELISA法などで評価し、サルモネラの複数の血清型を検出できる複数の抗体候補を得ることができた。

## 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、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分間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。コロナ禍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精力的に進めて、社会へ貢献できるように努めたいと考えている。

## 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 Alkaligenes 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 Alkaligenes faecalis Functions as an Effective Nasal Adjuvant to Augment IgA Antibody and Th17 Cell Responses. **Front Immunol.** 2021 Jul 1;12:699349.
- ④ 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)
- ⑤ 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
- ⑥ 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
- ⑦ 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わり **体育の科学** 5(71): 341-345, 2021

### 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2**

5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. **16<sup>th</sup> Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society** (2021年10月12-15日)

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