

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の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