

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  
研究分担者 畑中 畑中律敏 大阪府立大学・特任助教

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>初年度に樹立したサルモネラ菌、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から、検出系のための候補抗体を選定した。ウエルシュ菌エンテロトキシンとコレラ毒素についてイムノクロマトにより抗原を少なくとも1 ng/mlの感度で検出できた。また、ウエルシュ菌エンテロトキシンに関しては、健康な人の便に毒素を添加した疑似患者便においても非特異的な反応は示さずに検出できた。

<まとめ>細菌性食中毒に対する検出技術基盤の開発を目標に、候補抗体を選定し、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高感度なイムノクロマトを作製できた。今後、他の細菌性食中毒についても検出技術基盤の開発を進めるとともに、食中毒患者などの臨床検体を用いて開発技術の有用性を評価していく。

細見晃司  
医薬基盤・健康・栄養研究所・研究員

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サルモネラ菌、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、ウエ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

カンピロバクター感染症の原因菌は*C. jejuni*と*C. coli*であり、これまでに*C. jejuni*だけに特異的に反応する、もしくは*C. jejuni*と*C. coli*の両方に高感度かつ特異的に反応する複数の抗体をすでに得ている。本年度は*C. jejuni*と*C. coli*の両方に反応する抗体について、抗原を同定し、サンドイッチELISAにより、高感度に検出できる抗体の組合せを選定した。

サルモネラ感染症の原因菌である*Salmonella enterica*は非常に多くの血清型に細分されており、チフス性疾患や胃腸炎など病態も多岐にわたる。本研究では、ヒトに胃腸炎、すなわち食中毒の原因となるサルモネラを対象とする。家畜伝染病予防法ではサルモネラ症(届出伝染病)として、Enteritidis, Typhimurium, Dublin, Choleraesuisの4つの血清型が定義されており、また、国立感染症研究所の病原微生物検出情報から、2004年~2019年までの日本国内のサルモネラ食中毒患者から分離されたサルモネラ菌について血清型別の分離率をみると、Enteritidisを筆頭に、Infantis, Typhimurium, Thompson, Schwarzengrundなどが高頻度に分離されている。そこで、本研究では免疫方法などを工夫することで、複数の血清型に反応する抗体の作製を試みたところ、少なくともEnteritidis, Infantis, Typhimurium, Thompson, Schwarzengrundの5つの血清型を検出できる抗体を樹立できた。他にも、Thompsonを除く4つの血清型(Enteritidis, Infantis, Typhimurium, Schwarzengrund)と反応する抗体も得られている。本年度は、5つの血清型を検出できる抗体について、免疫沈降とプロテオーム解析、ウエスタンブロットにより抗原を同定した。

志賀毒素については、昨年度に特異的なハイブリドーマ4種類を樹立しており、今年度は、抗体を精製し、反応性・特異性を評価した。リコンビナントタンパク質に対しては高い反応性を示したが、生毒素に対する反応性が低かったことから検出には適さないと判断した。現在、新しい抗体の作製を進めており、生毒素を用いてスクリーニングすることで有用な抗体を得たいと考えている。

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、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。イムノクロマトにより抗原を少なくとも1 ng/mlの感度で検出できた。また、ウエルシュ菌エンテロトキシンに関しては、健常な人の便に毒素を添加した疑似患者便においても非特異的な反応は示さずに検出できた。現在、特許出願の準備を進めている。

#### 患者検体の収集

実用化に向けて、食中毒患者などの臨床検体を用いた検討を行うため、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所の協力のもと、食中毒の行政検査の余剰分を用いた研究実施について、倫理審査委員会の

審査を受けて研究計画の承認を得た。今年度はカンピロバクター32検体、ウエルシュ菌22検体、サルモネラ4検体の患者糞便を収集した。

### 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、ウエルシュ菌エンテロトキシンについては健常な人の便に毒素を添加した疑似患者便においても検出できた。また、1 ng/mlの検出感度は、現在市販されている偽膜性腸炎の原因菌である*Clostridium difficile*のイムノクロマト検出キットなどと同程度であり、糞便からの毒素検出において利用可能な抗体を得られていると考えている。このように、この2つの食中毒については当初の研究目標はほぼ達成できており、最終年度である次年度は、臨床検体を用いた検証とともに、特許出願など一般財団法人阪大微生物病研究会と共同で実用化に向けた協議を進めていく予定である。

カンピロバクターやサルモネラについても有用な抗体が得られており、ウエルシュ菌エンテロトキシンと同様にイムノクロマトによる検出ならびに臨床検体を用いた評価を進めたいと考えている。また、サルモネラについては、これまでに確認した5つすべての血清型に反応する抗体が得られており、この抗体を活用した検出技術を開発することで、臨床現場など最前線において、サルモネラであるか否かを迅速に判断できるようになると期待できる。このような技術の実用化のため、今後、他の血清型や同じ血清型でも由来が異なる株などに対する反応性や抗原との結合様式などを検討し、抗体の特性を十分に理解する必要があると考えている。

### E. 結論

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、コレラ毒素については検出に適した候補抗体の選定やイムノクロマトによる検出技術の開発など、検出技術基盤の開発に向けて順調に進捗していると考えている。志賀毒素については樹立していた抗体の反応性が不十分であったことから、抗体作製からやり直す。他の食中毒菌で培ったノウハウを活かして有用な抗体を得られるように取り組んでいく。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- ① [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.](#)
- ② [Hosomi K, Kunisawa J. Impact of the intestinal environment on the immune responses to vaccination. \*Vaccine.\* 2020 Oct 14;38 \(44\):6959-6965.](#)
- ③ [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.

- ④ 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
- ⑤ 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
- ⑥ 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、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 **第24年日本腸内細菌学会** (2020年6月11日)  
\*新型コロナウイルスのため誌上開催

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

### 1. 特許取得

- ① 出願予定 (N161/JP1 : 医234 : ウェルシュ菌特異的抗体)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし