

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 3 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・助教)

伊藤 洋志 (長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授)

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 3 年度は主として、テトロドトキシン(TTX)に対する酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)および高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析系の構築に尽力した。結果、緩衝液中の TTX のみならず、ヒトの血清および尿中の TTX の検出と定量を可能とする、新規 ELISA 測定系の開発に成功した。検体の前処理法や測定工程には課題が残るが、本 ELISA は生体試料中 TTX の測定にある程度有用と思われた。

A. 研究目的

日本では現代においても、食材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。また、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 3 年度は主として、テトロドトキシン(TTX)に対する酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)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

抗体は Mouse Anti-Tetrodotoxin monoclonal antibody, clone TTX(CABT-L3089), TTX antibody(orb101965), TTX(5E7) antibody(orb7079)を用いた(以降,それぞれ Ab①, Ab②, Ab③と記載する)。なお, Ab③のみポリクローナル抗体であり, その他はモノクローナル抗体である。実際の検体と同様に扱うため, TTX を溶解する溶媒は健常人の血清試料, Human Serum pool(serum), また, 尿試料として Urine, Single Male Donor, Human(urine)を用いた。抗体のペルオキシダーゼ(HRP)標識は, Peroxidase Labeling Kit-SH, 抗体希釈液には Blocking One を用いた。反応プレートは ELISA プレート H タイプ, TTX 試薬はテトロドトキシン(フグ由来細胞生物学用)そして各種一般試薬を用いた。

#### (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. 検体の調製

TTX 中毒の患者検体を入手することは困難であるため, 3つの溶媒, ①緩

衝液(buffer)試料(100 mM クエン酸 buffer pH3.0), ②urine 試料および ③serum 試料に TTX 試薬を溶解したものを各測定試料とした。TTX 試薬を溶解した serum 試料にはタンパク質成分が多く分析を阻害するため, 除タンパク処理を行なったもの(dp-serum)を測定試料とした。具体的には, serum 試料にあらかじめ TTX を溶解した試料に, これと等量の 10%トリクロロ酢酸を加え, 微量高速冷却遠心機で 12,000 rpm, 15 分間遠心分離後, 得られた上清を dp-serum 試料とした。

### 3. ELISA の構築

測定試料内に含まれる TTX を一次および二次抗体で挟み込む, 非競合法を原理とした ELISA の構築を試みた。まず, ELISA プレートの各ウェル(well)に対して, 50 mM 炭酸-重炭酸緩衝液(pH9.4)にて 2 µg/mL に希釈した一次抗体を 100 µL/well 入れ, 4°Cで一晩静置して抗体をプレートにコーティングした。150 mmol/L NaCl および 0.05%Tween 20 を含む 10 mmol/L リン酸緩衝液(PBS) pH7.4(10 mM PBS-T)に調整した洗浄液にて室温で 3 回洗浄後, 10 mmol/L PBS pH7.4 にて 10 倍希釈した Blocking One (×1/10 Blocking One)を 100 µL/well 入れ, 室温で 1 時間静置してブロッキングを行った。3 回洗浄後, 25 mM PBS-T を 100 µL/well

入れ, buffer 試料, urine 試料, serum 試料で調製した TTX 試料を 25  $\mu\text{L}/\text{well}$ , それぞれの系列毎に入れて 1 時間静置し一次抗体に結合させた。その後, 洗浄液で 3 回洗浄を行い,  $\times 1/10$  Blocking One で 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した二次抗体を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  入れ, 1 時間静置して TTX に結合させた。その後, 洗浄液で 3 回洗浄し, 1  $\text{mg}/\text{mL}$  o-フェニレンジアミン溶液 10  $\text{mL}$  に 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  を 5  $\mu\text{L}$  滴下した反応液を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  入れて発色させた。30 分後, 3  $\text{mol}/\text{L}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  入れて発色反応を停止させ, 490  $\text{nm}$  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。測定原理の概略は Figure 1 で示した。

#### 4. ELISA の性能評価

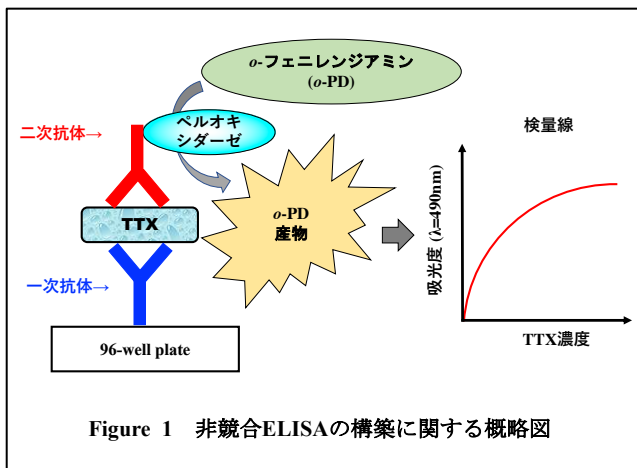
最初に, 非競合 ELISA の構築に最適な一次および二次抗体の組み合わせを検証した。本実験では, 抗体の組み合わせを変え 6 パターンの非競合 ELISA を構築し, buffer 試料で調製した 15 段階の TTX 希釈系列(0.061~

1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を測定した。なお, 各測定試料において吸光度の測定値がブランク(TTX 濃度が 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の試料)のそれを下回る場合は, 吸光度 0 と判定した。さらに, 各 ELISA の検量線を作成し, 吸光度と TTX 濃度との相関性を検証した。次に, buffer 試料, urine 試料および serum 試料といった各種溶媒で 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調製した TTX 試料 14 本 を同時測定し, その平均値(Average), 標準偏差(SD), 変動係数(CV)の値から同時再現性, 即ち測定の精密度(ばらつき)を評価した。

また, urine 試料および serum 試料で調製した TTX 測定試料は 7 段階の希釈系列(15.63~1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を調製した。さらに, dp-serum 希釈系列を調製した。それらの測定結果から改めて検量線を作成し, 吸光度と TTX 濃度との相関性を検証した。これら検量線に基づき, 各種溶媒で調整した TTX 濃度の換算を行うことで, 測定試料内の干渉物質が ELISA の発色反応に与える影響の補正を試みた。そのうえで, urine 試料および serum 試料で 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調製した TTX 試料 14 本, 並びに dp-serum 試料 14 本を同時測定し, 精密度を再評価した。

#### 5. 統計解析

同時再現性の検証を除く全ての実験は 5 重測定し, グラフ内ではその



Average±SD をプロットした。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 を用いて算出した。

## 6. 研究内容の分担

「1. 材料」の選定は研究代表者である岡田光貴が行った。「2. 検体の調製」は岡田光貴、池田哲也が担った。

「3. ELISA の構築」は岡田光貴、伊藤洋志が担った。「4. 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。「5. 統計解析」は岡田光貴が担った。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. TTX に対する ELISA の構築

抗体の組み合わせを変え6パターンのELISAを構築し、TTX希釈系列を測定した。この内、5パターンのELISAでは希釈系列に応じた発色反

Primary	A		B		C		D		E		F	
	Ab①		Ab①		Ab②		Ab②		Ab③		Ab③	
	Ab②-HRP	Ab③-HRP	Ab①-HRP	Ab②-HRP	Ab①-HRP	Ab③-HRP	Ab②-HRP	Ab①-HRP	Ab③-HRP	Ab②-HRP	Ab①-HRP	
Lane	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
I	1.000	3.906	1.000	3.906	1.000	3.906	1.000	3.906	1.000	3.906	1.000	3.906
II	500	1.953	500	1.953	500	1.953	500	1.953	500	1.953	500	1.953
III	250	0.977	250	0.977	250	0.977	250	0.977	250	0.977	250	0.977
IV	125	0.488	125	0.488	125	0.488	125	0.488	125	0.488	125	0.488
V	62.5	0.244	62.5	0.244	62.5	0.244	62.5	0.244	62.5	0.244	62.5	0.244
VI	31.25	0.122	31.25	0.122	31.25	0.122	31.25	0.122	31.25	0.122	31.25	0.122
VII	15.63	0.061	15.63	0.061	15.63	0.061	15.63	0.061	15.63	0.061	15.63	0.061
VIII	7.813	Blank	7.813	Blank	7.813	Blank	7.813	Blank	7.813	Blank	7.813	Blank

Figure 2 TTX ELISAの発色反応  
3種類の抗体(Ab①, ②, ③)から一次抗体と二次抗体の組み合わせを変え、6パターンのELISAを構築した。数値はTTX濃度(μg/mL)を示す。

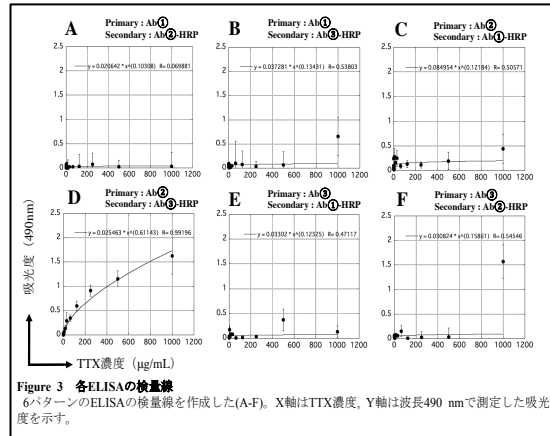


Figure 3 各ELISAの検量線  
6パターンのELISAの検量線を作成した(A-F)。X軸はTTX濃度、Y軸は波長490 nmで測定した吸光度を示す。

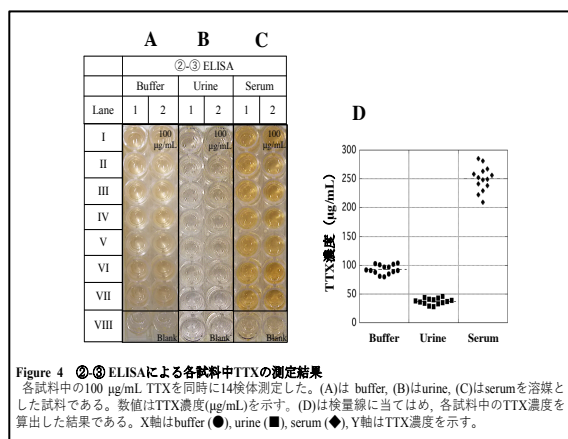
応を得ることが出来なかったが、一次および二次抗体にそれぞれAb②とAb③-HRPを用いたELISA(Ab②-③ ELISA)のみ、概ねTTX濃度に沿った発色が見られた(Figure 2)。また、Ab②-③ ELISAでは、TTX濃度が3.906 μg/mL以下において、ブランク相当の吸光度を示した。

### 2. 各ELISAにおけるTTX検量線の比較

次に、各ELISAにおける検量線を作成した。他のELISA(Figure 3A, B, C, E, F)と比較して、Ab②-③ ELISAにおいて、TTX濃度と吸光度の相関性に優れた良好な検量線を得ることができた(Figure 3D)。

### 3. 同時再現性の検証によるAb②-③ ELISAの性能評価

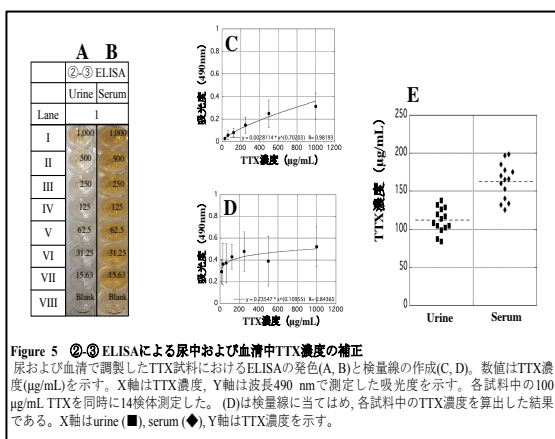
以降は全て、Ab②-③ ELISAの性能検証を実施した結果である。まず、buffer試料、urine試料およびserum試料を溶媒として100 μg/mLに希釈したTTX試料14本を同時測定した。結果、buffer調製試料の測定結果は平



均 92.93 µg/mL とやや低めに算出されたが、ばらつきは小さかった(**Figure 4A and D**)。一方, urine 調製試料では全体的に吸光度が低く, 平均 37.36 µg/mL となった(**Figure 4B and D**)。また, serum 調製試料ではばらつきが大きく, 全体的に吸光度も高いため平均濃度は 249.86 µg/mL となった (**Figure 4C and D**)。

#### 4. urine および serum による TTX 測定結果の補正

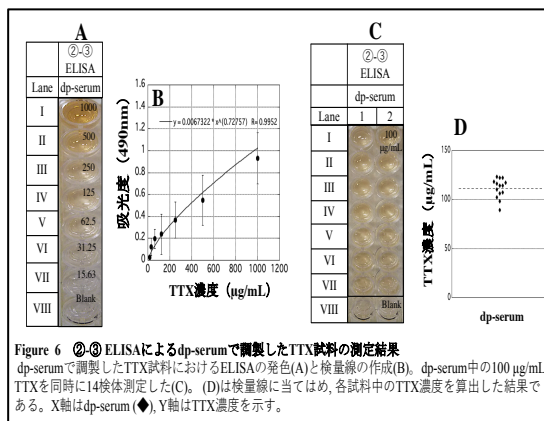
次に, urine 試料や serum 試料を用いて調製した TTX 希釈系列の測定結果から, 検量線を改めて作成した。結果, urine 調製希釈系列では発色が抑制されるものの, 相関性に優れた良好な検量線が得られた(**Figure 5A and C**)。一方, serum 調製希釈系列では全体的に強い発色を認め, SD も大きかった (**Figure 5B and D**)。これら検量線に基づき, urine 試料および serum 試料を用いて調製した 100 µg/mL TTX 試料 14 本の測定結果を濃度換算した結果, urine 試料では平均 111.86 µg/mL と実



際の値に近づいたが, serum 試料では平均 162.92 µg/mL とやや高い値であった(**Figure 5E**)。

#### 5. dp-serum による TTX 測定結果の補正

次に, dp-serum 試料を用いて, 検量線の作成と同時再現性の検証を試みた。結果, 概ね TTX 濃度に応じた吸光度が得られ, その値を基に検量線の作成が可能であった(**Figure 6A and B**)。この検量線に基づき, 改めて同時再現性を検証したところ, 依然ばらつきは認められたが, 平均値は 111.29 µg/mL と算出され, 実際の TTX 濃度に近似した値が得られた(**Figure 6C and D**)。



#### D. 考察

本研究にて構築した 6 パターンの抗体の組み合わせによる ELISA の内、実際に使用可能と考えられたものは Ab②-③ ELISA のみに留まった (Figure 2 and 3)。非競合 ELISA では、2 種類の抗体が目的物質における別々の抗原決定基に結合する必要がある。TTX の場合、分子量が 319 と小さいため、抗原決定基となりうる構造の候補が少ないことが予想される。そのために、既存の TTX 測定用 ELISA は、1 種類の抗体の利用で済む競合法の採用が多いと推測できた。本研究では、それぞれ別の抗原決定基を認識している抗体は Ab②および Ab③が考えられ、この 2 種類を用いた ELISA のみ、TTX 濃度に応じた検量線が得られたと考えられる。この場合、最初にモノクローナル抗体である Ab②が試料内の TTX と特異的に反応し、次にポリクローナル抗体である Ab③が TTX に対してより強い抗原抗体反応を示すため、この 2 種類が非常に有効な組み合わせとして結果に現れたと推測する。この検量線の作成にあたり、TTX を buffer 試料で倍々希釈した検体を測定したところ、濃度が 3.906  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下において、ブランク相当の吸光度を示した (Figure 2D)。そのため、TTX の最小検出濃度

は、希釈系列におけるその 1 段階上の濃度、7.813  $\mu\text{g}/\text{mL}$  程度と予想される。一方、既存の ELISA では、数十  $\text{ng}/\text{mL}$  の TTX 濃度も測定可能とされており、これらと比較して Ab②-③ ELISA は感度が劣る結果となった。しかし、非競合法を原理とする Ab②-③ ELISA では TTX の検出特異性が高いと思われ、この点は既存の ELISA よりも優位と考えられた。

次に我々は、Ab②-③ ELISA において、生体試料中 TTX の測定を試みた。その際、urine 試料で希釈した TTX の測定結果は、HRP 反応による発色が抑制された (Figure 4B)。逆に、serum 試料で希釈した TTX の測定結果では強い発色が確認された (Figure 4C)。即ち、これら結果を、buffer 試料で希釈した TTX の測定結果に基づいて作成した検量線に当てはめると、実際の TTX 濃度とは大きく乖離する結果となった。この結果は、urine や serum 内の成分が抗原抗体反応を阻害、あるいは抗体に対して非特異的に結合する物質が影響している可能性が考えられた。特に、urine に含まれる尿素はタンパク質変性剤として作用する。そのため、urine を測定試料に用いた場合、尿素が抗体を変性させ全体的な吸光度の低下に繋がったと考えられる。また、serum ではタンパク質が強く影響し、特に、免疫グロブ

リンが ELISA プレートと疎水性に結合し、これに HRP 標識二次抗体が結合することによる偽陽性反応が原因と予想された。

なお、これら実際の TTX 濃度と測定値の乖離は、それぞれ urine 試料および serum 試料で調製した TTX 希釈系列を用いて検量線を作成することで、ある程度は補正することが可能であった。特に、urine 試料に関しては測定値のばらつきは見られるものの、TTX 濃度に応じた吸光度が得られた (Figure 5A, C and E)。ただし、この時、TTX 濃度が 15.63  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ではブランク相当の吸光度となったため (Figure 5A and C), TTX の最小検出濃度は 31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  程度と予想される。一方、serum 試料で調製した TTX 希釈系列を用いて補正した場合には、非特異的な発色が目立ち、測定結果のばらつきも大きいため (Figure 5B, D and E), さらに工夫が必要と思われた。そこで、serum 試料に除タンパク処理を施すことで、ばらつきを抑え、概ね TTX 濃度を反映した測定結果を得ることができた (Figure 6)。この時、TTX 濃度が 15.63  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ではブランク相当の吸光度となったため、TTX の最小検出濃度は 31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  程度と思われた。ただし、除タンパク処理では 10% トリクロロ酢酸を試料に等量加え、遠心分離後の上清を測定試料とし

ていることから、上清に含まれる TTX が実際は約 1/2 倍に希釈されている。そのため、除タンパク処理を実施すると TTX の検出感度は低下すると考えられた。

なお、非競合 ELISA による urine および serum 内 TTX 測定の感度は、臨床検査法として採用するには心許ない数値と思われる。実際、TTX が原因の食中毒患者において、urine および serum に含まれる TTX は数十～数百  $\text{ng}/\text{mL}$  程度と報告されている。そのため、非競合 ELISA を用いて TTX 中毒患者の生体試料を測定するためには、検体を濃縮する必要があると思われた。また、濃縮操作も含め、検体の前処理法や測定手法、抗体濃度、反応時間などを工夫することで、非競合 ELISA の測定性能はさらに向上すると考えている。LC/MS, あるいは LC/MS/MS を利用した測定系では、検体を濃縮する必要なく数十～数百  $\text{ng}/\text{mL}$  の TTX 濃度が検出可能であるため、現段階では Ab②-③ ELISA の性能が劣るといわざるを得ない。一方で、1 プレートで多数の検体が同時に測定可能であること、極端に高額な装置を必要とせず操作も簡便であること、発色の程度で TTX 濃度が分かるため結果の解釈が容易であること、などは非競合 ELISA の長所と思われる。さらに、この非競合 ELISA はフ

グ科魚類などの食材からの抽出液を試料とすることで、食品安全検査にも応用が可能と思われた。これまで TTX の測定手段が限られていた中で、本研究において非競合法を原理とする ELISA を構築できたことは、今後の TTX 検査の発展に有用な成果と考える。今後は、臨床検査法としての実用化に向け、TTX 測定用 ELISA の感度と特異性を向上させるための最適な測定条件を探求する予定である。まず、検体の前処理法も含めた TTX 測定 ELISA の手順書を確立したいと考えている。さらに、TTX に対するイムノクロマト法の構築にも着手し、より迅速かつ簡便な TTX 測定法の開発を目指したい。

#### E. 結論

本研究において構築した Ab②-③ ELISA は生体試料中 TTX の測定が可能であるが、主として感度に課題が残る。現段階で非競合 ELISA は、検査法としてある程度有用という評価に留まるが、検体の調製法や測定条件の改善を図ることで、将来的な実用化が期待される。

#### 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, 福田篤久, 竹下仁. フグ毒テトロドトキシンに対する新規 ELISA 測定系の構築. 医学検査 71(1):1-9, 2022.

##### 2. 学会発表

- i. 岡田光貴. フグ毒テトロドトキシンに対する新たな測定系の構築と性能評価. 第 31・32 回生物試料分析科学会合同年次学術集会(三重). 2022 年 3 月 13 日.
- ii. 松尾佳乃, 岡田光貴, 南部昭, 竹下仁, 福田篤久, 米田孝司. 自然毒成分  $\alpha$ -アマニチンの高速液体クロマトグラフィー測定系の構築. 第 31 回日本臨床化学会近畿支部総会(京都). 2022 年 3 月 6 日.
- iii. 岡田光貴, 福田篤久, 竹下仁, 所司睦文, 米田孝司. 高速液体クロマトグラフィーを用いた食中毒成分  $\alpha$ -アマニチン測定法の検討. 日本医療検査科学会第 53 回大会(神奈川). 2021 年 10 月 10 日.
- iv. 岡田光貴, 竹下仁, 福田篤久. フグ毒テトロドトキシンに対する非競合 ELISA 測定系の構築. 日本医療検査科学会第 53 回大会(神奈川). 2021 年 10 月 10 日.
- v. 岡田光貴, 福田篤久, 竹下仁, 所司睦文, 米田孝司. 高速液体クロ



(別添 3・4)

マトグラフィーを用いた食中毒  
成分  $\alpha$ -アマニチン測定法の検討.  
第 70 回日本医学検査学会(福岡).  
2021 年 5 月 15 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし。