

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05717

研究課題名（和文）カリブ海型シガトキシンを認識するモノクローナル抗体を基盤とする微量検出法の開発

研究課題名（英文）Development of a trace detection method based on monoclonal antibodies recognizing Caribbean ciguatoxin.

研究代表者

円谷 健（Tsumuraya, Takeshi）

大阪府立大学・理学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：00372855

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：米国大西洋やカリブ海域におけるシガテラ食中毒の予防のため、その主要原因毒素であるカリブ海型シガトキシン(C-CTX)を認識するモノクローナル抗体を用いたC-CTXの微量検出法を確立することを目的として研究を行った。C-CTXの左端構造5環からなるハプテンを設計・合成し、マウスに免疫してモノクローナル抗体4H5を獲得した。4H5は、C-CTXに強く結合することが判明した。同様に、C-CTXの右端構造5環からなるハプテンを設計・合成し、マウスに免疫し、モノクローナル抗体を獲得したが、いずれもハプテンそのものには結合しなかった。現在、さらにハプテンの構造の改良を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまでの研究代表者の抗P-CTXモノクローナル抗体に関する研究成果の蓄積を踏まえ、C-CTXの部分構造化合物をハプテンとして用いたC-CTXを特異的に認識するモノクローナル抗体の作製とこれを用いた微量検出法への応用に取り組み、世界規模の驚異となりつつあるシガテラ食中毒の予防、撲滅に貢献することを目的とする。現在までに、C-CTXを認識するモノクローナル抗体は全く得られていないことから、今回の研究でC-CTXを特異的に認識するモノクローナル抗体が得られれば、C-CTXの微量検出のみならず抗体を用いたシガテラ食中毒の治療（抗体医薬）への展開などが考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to establish a method for the trace detection of C-CTX using monoclonal antibodies that recognize Caribbean ciguatoxin (C-CTX), the major causative toxin of ciguatera food poisoning in the U.S. Atlantic and Caribbean seas. The hapten consisting of the right five rings of C-CTX was designed and synthesized, and was immunized to provide a monoclonal antibody 4H5. The monoclonal antibody 4H5 was found to bind strongly to C-CTX. Similarly, we designed and synthesized a hapten consisting of the right five rings of C-CTX, immunized mice with the hapten, and obtained monoclonal antibodies, but none of them bound to the hapten itself. Further improvement of the hapten structure is currently under investigation.

研究分野：生体分子化学

キーワード：シガトキシン シガテラ モノクローナル抗体 ハプテン ナトリウムチャネル

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

カリブ海型シガトキシン(C-CTX)は、米国大西洋やカリブ海域におけるシガテラ食中毒の主要原因毒素であり、これまでに知られている太平洋型シガトキシン(P-CTX)と比べて複雑な構造を有する。近年、C-CTX による食中毒が世界的に拡大しつつあり、その予防対策は急務の課題である。C-CTX の予防には、魚類からの C-CTX の微量検出法を確立することが必要であるが、そのためには C-CTX を特異的に認識する抗体の作製が必須である。しかし、C-CTX は自然界から純粋な試料の収集が困難であるため、これまで抗体の作製に成功していなかった。本研究では、低分子ハプテンを免疫することによる C-CTX を特異的に認識する抗体の作製およびこれを用いた微量検出法の開発を目的とする。本研究の成果は、近年地球規模で大きな脅威となりつつあるシガテラ食中毒の予防と撲滅に貢献する。

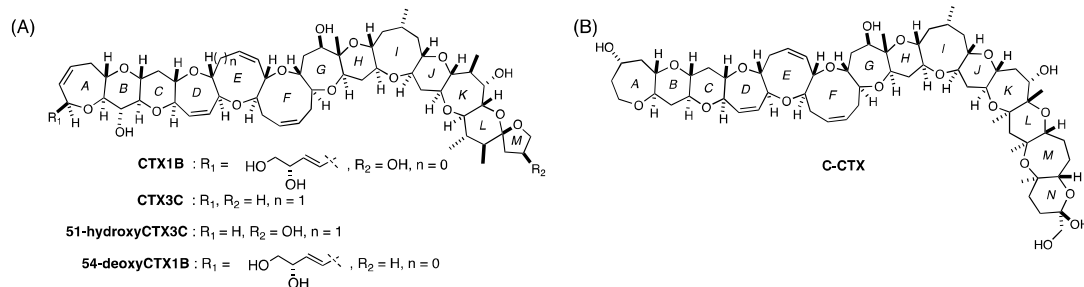


図1. 太平洋型シガトキシン(P-CTX) (A)およびカリブ海型シガトキシン(C-CTX) (B)の構造

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究代表者の抗 P-CTX モノクローナル抗体に関する研究成果の蓄積を踏まえ、C-CTX の部分構造化合物をハプテンとして用いた C-CTX を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製とこれを用いた微量検出法への応用に取り組み、世界規模の驚異となりつつあるシガテラ中毒の予防、撲滅に貢献することを目的とする。

現在までに、C-CTX を認識するモノクローナル抗体は全く得られていないことから、今回の研究で C-CTX を特異的に認識するモノクローナル抗体が得られれば、C-CTX の微量検出のみならず抗体を用いたシガテラ食中毒の治療（抗体医薬）への展開などが考えられる。

### 3. 研究の方法

C-CTX を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製方法として、我々がこれまで P-CTX を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製する際に用いた方法を適用する。すなわち、C-CTX の左端あるいは右端構造の 5～6 員環からなるハプテンを免疫することにより、C-CTX そのものを認識するモノクローナル抗体を獲得しようというものである。同様の手法により、主要な P-CTX の中で異なる末端構造を有する P-CTX を認識する 4 種類（左端構造 2 種類、右端構造 2 種類）のモノクローナル抗体の獲得に成功していることから、この方法が C-CTX を認識するモノクローナル抗体の獲得にも有効であると考えられる。

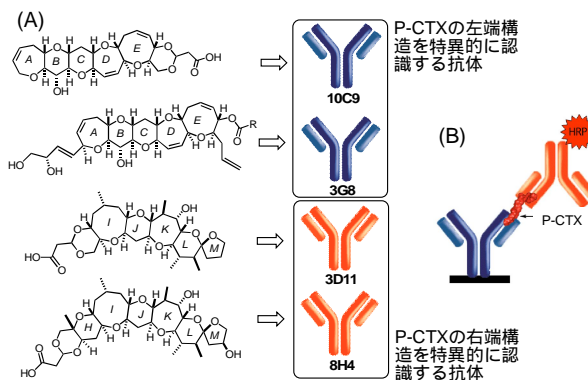


図2. P-CTXの部分構造化合物（ハプテン）の免疫による抗P-CTX抗体の作製(A)とサンドイッチELISA法によるP-CTXの検出 (B)

### 4. 研究成果

#### (1)C-CTX 左端構造を認識するモノクローナル抗体の作製

これまでの P-CTX 抗体作製の結果より、合成ハプテンの免疫により毒本体に結合する抗体を作製するためには、5 環性以上の部分構造が必要であることが明らかとなっている。そこで、C-CTX 左端構造を認識する抗体を作製するため、5 環性ハプテン(1)を設計、合成した。化合物(1)をハプテンとして免疫することにより、数個の候補抗体を獲得した。これらの中から、ハプテンに強く結合する 4H5 を選び、C-CT-1 との結合活性を調べた。まず、C-CTX-1 を含有する魚肉抽出物を用いて 4H5 の阻害実験を行ったところ、約 30%の阻害活性が観測された。そこで、4H5 の Fab

断片を用いて、比較的高純度の C-CTX-1 を含有するサンプルを用いて阻害実験を行ったところ、4H5 Fab は強い阻害を示し暫定的  $K_d = 0.2 \text{ nM}$  を示した。また、4H5 はその左端構造が類似している CTX3C にも弱く結合することが判明した。これらの結果より、モノクローナル抗体 4H5 は C-CTX-1 を特異的に認識していることが明らかとなった。

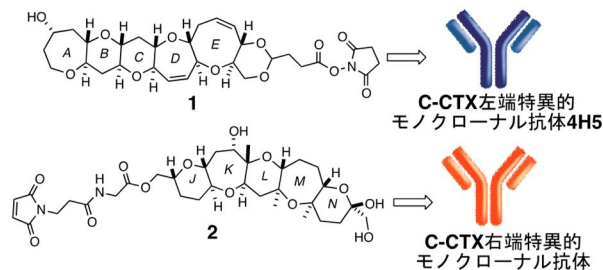
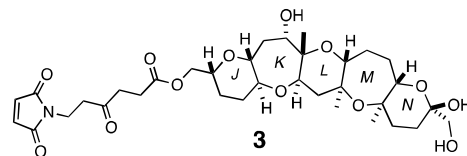


図3.C-CTX左端および右端構造を認識するモノクローナル抗体作製のためのハプテン構造

## (2)C-CTX 右端構造を認識するモノクローナル抗体の作製

C-CTX 右端構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を獲得するためのハプテンとして、5環性ハプテン(2)を設計、合成した(図2)。化合物(2)を KLH にコンジュゲートした後、RIBI アジュバント共存下でマウスに免疫し、脾臓細胞とミエローマ細胞との細胞融合を電気細胞融合装置を用いて行った。ELISA により抗体産生ハイブリドーマを選別し、クローニングを2回行ってモノクローン化した。これらのハイブリドーマを大量培養し、抗体を Protein G アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。得られた抗体のハプテン(2)に対する結合活性を競合 ELISA 法により評価した結果、いずれのモノクローナル抗体もハプテンそのものには強い結合活性を示さないことが判明した。この理由としては、リンカー部分と抗体が相互作用している可能性が示唆されたため、現在リンカーをハイドロカーボンとした新たなハプテン(3)を合成している。



## (3)シガトキシンアッセイのための Neuro-2 細胞毒性試験

多くの電位依存性  $\text{Na}^+$ チャネルが細胞表面に発現していることが知られているマウス神経芽腫細胞 Neuro-2a を用いてシガトキシンの機能アッセイを行った。シガトキシンは  $\text{Na}^+$ チャネルのサイト 5 に特異的に結合し、脱分極状態を持続させる。そこで、 $\text{Na}^+$ チャネルを開口状態に持続させる veratridine と、細胞外への  $\text{Na}^+$ の汲み出しを行う  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase を阻害する ouabain を作用させ、 $\text{Na}^+$ が流入し続ける状態に負荷をかけておく。ここにシガトキシンを添加すると脱分極持続作用によって細胞内にさらに  $\text{Na}^+$ が流入し続け、細胞死に至る。Neuro-2a 細胞を用いた細胞毒性試験法によるシガトキシンの微量検出法は、再現性の低さが問題となっているため、最初に veratridine 濃度、ouabain 濃度、および Neuro-2a 細胞数の最適条件を模索し、veratridine 濃度  $3.12 \mu\text{M}$ 、ouabain 濃度  $31.2 \mu\text{M}$ 、Neuro-2a 細胞数  $5 \times 10^4 \text{ cells}$  と決定した。その後、本条件を用いて、6種類のシガトキシン類縁体に対して細胞毒性試験を行い、 $\text{EC}_{50}$  を決定した。本手法により6種類すべてのシガトキシン類縁体がいずれも高い毒性を示すことが明らかとなった。

次に、本手法を用いて、LC-MS/MS によってシガトキシンの含有が確認されている魚から抽出されたサンプルのシガトキシン濃度の推定を行った。シガトキシン CTX1B に対する細胞毒性試験を行い、CTX1B 濃度 細胞生存率のグラフを検量線とし、細胞生存率からシガトキシン濃度の推定を行った。本実験では、16種類のシガトキシン含有サンプルに対して細胞毒性試験を行い、含有シガトキシン濃度を推定した。その結果、推定したシガトキシン濃度は LC-MS/MS および ELISA により求められた濃度と近い濃度が得られ、いずれのサンプルも FDA ガイダンスレベルを超えるシガトキシンが含まれていると推定した。

## (4) 抗シガトキシン抗体による毒性中和効果の評価

さらに本手法を用いて、シガトキシンに特異的に結合するモノクローナル抗体の毒性中和効果について検討した。抗体がシガトキシンに結合することで、 $\text{Na}^+$ チャネルへの結合を阻害し毒性を中和する。シガトキシンの末端構造を認識する2種類の抗体をそれぞれ単独で添加した場合と両方添加した場合について毒性中和効果の評価を行ったところ、抗体を単独で用いる場合と比較して、2種類の抗体を用いる場合の方がより高い毒性中和効果を持つことが判明した。

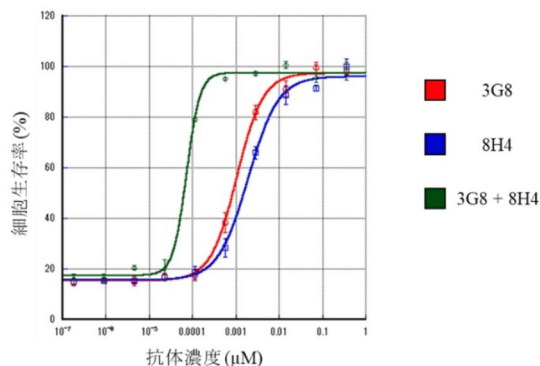


図4. 抗体3G8および8H4による毒性中和効果

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Tudo Angels, Gaiani Greta, Rey Varela Maria, Tsumuraya Takeshi, Andree Karl B., Fernandez-Tejedor Margarita, Campos Monica, Diogene Jorge	4. 巻 12
2. 論文標題 Further Advance of Gambierdiscus Species in the Canary Islands, with the First Report of Gambierdiscus belizeanus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 692 ~ 692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins12110692	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Gaiani G., Leonardo S., Tudo A., Toldra A., Rey M., Andree K.B., Tsumuraya T., Hiram M., Diogene J., O'Sullivan C.K., Alcaraz C., Campos M.	4. 巻 204
2. 論文標題 Rapid detection of ciguatoxins in Gambierdiscus and Fukuyoa with immunosensing tools	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ecotoxicology and Environmental Safety	6. 最初と最後の頁 111004 ~ 111004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ecoenv.2020.111004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Takeshi Tsumuraya and Masahiro Hiram	4. 巻 11
2. 論文標題 Rationally Designed Synthetic Haptens to Generate Anti-Ciguatoxin Monoclonal Antibodies, and Development of a Practical Sandwich ELISA to Detect Ciguatoxins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 533 (1-16)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins11090533	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sandra Leonardo, Greta Gaiani, Takeshi Tsumuraya, Masahiro Hiram, Jean Turquet, Nuria Sagrista, Maria Rambla-Alegre, Cintia Flores, Josep Caixach, Jorge Diogene, Ciara K. O'Sullivan, Carles Alcaraz, and Monica Campas	4. 巻 92
2. 論文標題 Addressing the Analytical Challenges for the Detection of Ciguatoxins Using an Electrochemical Biosensor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 4858-4865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b04499	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Gaiani Greta, Cucchi Francesca, Toldra Anna, Andree Karl B., Rey Maria, Tsumuraya Takeshi, O'Sullivan Ciara K., Diogwne Jorge, Campas Monica	4. 巻 806
2. 論文標題 Electrochemical biosensor for the dual detection of Gambierdiscus australes and Gambierdiscus excentricus in field samples. First report of G. excentricus in the Balearic Islands	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science of The Total Environment	6. 最初と最後の頁 150915 ~ 150915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scitotenv.2021.150915	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Campas Monica, Leonardo Sandra, Oshiro Naomasa, Kuniyoshi Kyoko, Tsumuraya Takeshi, Hiramasa Masahiro, Diogene Jorge	4. 巻 374
2. 論文標題 A smartphone-controlled amperometric immunosensor for the detection of Pacific ciguatoxins in fish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 131687 ~ 131687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2021.131687	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujiwara Daisuke, Mihara Kousuke, Takayama Ryo, Nakamura Yusuke, Ueda Mitsuhiro, Tsumuraya Takeshi, Fujii Ikuo	4. 巻 22
2. 論文標題 Chemical Modification of Phage Displayed Helix Loop Helix Peptides to Construct Kinase Focused Libraries	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 3406 ~ 3409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202100450	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Takeshi Tsumuraya
2. 発表標題 Development of a Practical Sandwich ELISA to Detect Ciguatoxins
3. 学会等名 EUROCIUGA INTERNATIONAL WORKSHOP 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横関俊昭、円谷健、藤田和弘、五十嵐友二、安元健
2. 発表標題 レセプターバインディングアッセイによるシガトキシン検出のための新規蛍光プレベトキシンの作製
3. 学会等名 第116回日本食品衛生学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sandra Loonardo, Takeshi Tsumuraya, Oshiro Naomasa, Masahiro Hiram, Jorge Digene, Monica Campas
2. 発表標題 Smartphone-based electrochemical immunosensor for ciguatoxins detection
3. 学会等名 1st Intenational Electronic Conference on Toxins (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Greta Gaiani, Sandra Leonardo, Takeshi Tsumuraya, Maria Rambla, Jorge Digene, Ciara Kathleen O'Sullivan, Carles Alcaraz, Monica Campas
2. 発表標題 Detection of ciguatoxins in fish and algal samples with an electrochemical biosensor
3. 学会等名 1st Intenational Electronic Conference on Toxins (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 円谷 健
2. 発表標題 有機合成化学との連携による海洋毒認識モノクローナル抗体の作製と微量検出法の開発
3. 学会等名 バイオインタラクション研究会第12回ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤史織, 國吉杏子, 大野祐美, 岩屋あまね, 佐久川さつき, 小島尚, 円谷健, 平間正博, 安元健, 大城直雅, 朝倉宏
2. 発表標題 ELISAによるシガトキシンの検出
3. 学会等名 食品衛生学会第115回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Tsumuraya
2. 発表標題 Detection of Ciguatoxins based on anti-Ciguatoxin Monoclonal Antibodies
3. 学会等名 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem) 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshiaki Yokozeki, Tomoji Igarashi, Takeshi Yasumoto, Takeshi Tsumuraya
2. 発表標題 A novel receptor binding assay of ciguatoxins using a near-infrared fluorescent ligand
3. 学会等名 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Giorgia Honsell, Monica Campas, Greta Gaiani, Takeshi Tsumuraya, Masahiro Hirama, Aurelia Tubaro, Marco Pelin
2. 発表標題 Cell immunolocalization of ciguatoxins in the benthic dinoflagellate <i>Gambierdiscus australes</i>
3. 学会等名 International Conference on Harmful Algae 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M. Campas, G. Gaiani, S. Leonardo, M. Rambla-Alegre, C. Alcaraz, T. Tsumuraya, M. Hirama, N. Oshiro, C. K. O'Sullivan, J. Diogene
2. 発表標題 Smart biosensors for the detection of ciguatoxins
3. 学会等名 International Conference on Harmful Algae 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	平間 正博  (Hirama Masahiro)		
研究協力者	佐々木 誠  (Sasaki Makoto)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スペイン	IRTA	Universita Rovira i Virgili	University of Vigo	
米国	University of Washington	FDA		
イタリア	University of Udine	University of Trieste		