

機関番号：24403

研究種目：基盤研究 (c)

研究期間：2008 年度～2010 年度

課題番号：20580357

研究課題名 (和文) 鶏型特異的抗体の食品・飼料添加による食中毒の制圧

研究課題名 (英文) Control of food poisoning using food and feed additives of chicken monoclonal antibodies.

研究代表者 笹井 和美 (SASAI KAZUMI)

(大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授)

研究者番号：70211935

研究成果の概要 (和文)：

アピコンプレックス門原虫の感染を防御する目的で、原虫特異的な鶏型抗体の作製を試みた。20 年度には既存の鶏型モノクローナル抗体の交差性を *Crptosporidium* に対して確認した。21 年度には、原虫の宿主細胞侵入に強い関与が報告されている Apical complex に対する種々の抗体を用いて、*Eimeria* 属原虫での交差性を、最終の 22 年度には交差性が確認できた鶏型モノクローナルのリコンビナント一本鎖抗体を作製し、その反応性を確認した。

研究成果の概要 (英文)：

In order to protect against Apicomplexan parasites infection, tried to prepare the chicken monoclonal antibodies specific for them. In FY 2008, the cross-reactivity of chicken monoclonal antibodies against *Crptosporidium* was confirmed. In FY 21, monoclonal antibodies against apical complex which had been reported to be involved in protozoa invasion of host cells had cross-reactivities against *Eimeria* species, in the 2010 final, ScFv recombinant antibodies were produced and had the cross-reactivities against Apicomplexan parasites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：獣医内科学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：Apicomplexan parasites, リコンビナント抗体、感染防御、食品・飼料添加

## 1. 研究開始当初の背景

サルモネラ、およびクリプトスポリジウムによる食中毒は日本を含めた世界各地において発生し、サルモネラ食中毒は、わが国に

においても年間数千人もの発症が報告されている。サルモネラによる食中毒は鶏肉・鶏卵が、クリプトスポリジウムによる食中毒は罹

患動物の排泄物の混入した飲料水が主な原因と考えられている。サルモネラに対するヒトへのワクチンは使用されておらず、主な汚染源である鶏では、国内で予防効果の低い不活化ワクチンが、また、海外で弱毒生ワクチンが使用されているが、弱毒化したサルモネラの野外での強毒化等の危険性が高く、また、安定した予防効果が得られていない。クリプトスポリジウムは上水道で一般的に消毒に用いられる塩素に耐性で飲料水に混入した場合は、除去することが困難である。現在、本症に対する予防・治療法はなく、サルモネラ症と同様に発症後に対症療法が施されている。また、産業動物・伴侶動物においてもサルモネラ、およびクリプトスポリジウムによる下痢を主徴とする症例が幼弱、老齢、抗ガン剤や免疫抑制治療を受けている動物に認められるが、健康な成獣では臨床症状を伴わずキャリアとなり新たな人や動物への感染源として警戒が必要となってきた。申請者の研究室では伴侶動物・産業動物・野生動物における細菌性・寄生虫性の人と動物の共通感染症に関する調査を実施し、その存在を報告してきた。

現在、サルモネラ、およびクリプトスポリジウムに対する食中毒の発生を抑制する目的で、マウスを免疫動物としたマウス型モノクローナル抗体の作製が世界各地で試みられてきたが、感染防御能を有するモノクローナル抗体の作製例はほとんど認められない。感染防御に関連するワクチン候補となる抗原の同定も遅々として進まない状況である。

鶏は系統発生的にはほ乳類とは異なり、ほ乳類の免疫系では認識が困難である抗原に対する抗体の産生が可能であると報告されており、かつ、鶏卵は永きにわたり、食物、食材として利用され、機能性食品の原材料として適している。そこで、申請者の研究室では、

鶏型モノクローナル抗体作製系を利用することにより特異的抗体の作製を試みてきた。その結果、クリプトスポリジウムに近縁のアイメリアに対する鶏型モノクローナル抗体が、クリプトスポリジウムだけでなく、分類学上で近縁なトキソプラズマ、ネオスポラなどと交差性を有することを報告してきた。具体的には、鶏にのみ感染するアイメリアという原虫について、マウスのモノクローナル抗体では感知し得なかったタンパク質が同定された。そのタンパク質は、虫体の先端に存在する 21kDa の分子量で、そのタンパク質は、細胞への侵入に深く係わっていることが報告された (Sasai et al., 1996)。さらに、その後の解析で、このタンパク質は、トキソプラズマやネオスポラ原虫など広い原虫種において共通に存在し (Sasai et al., 1998)、原虫種において広く存在する可能性が示唆された。更に、クリプトスポリジウム原虫においては、48kDa のタンパク質として存在し、さらにこれまでに報告のない抗原であることが示され (文献 15)、さらに、このタンパク質を認識する抗体を処置した場合、クリプトスポリジウム原虫の培養細胞への侵入が有意に抑制されることが判明した。(松林ら、2003 年第 135 回、2004 年第 138 回日本獣医学会学術集会にて発表)。これより、このタンパク質は、虫体の先端に存在し、原虫類に広く存在する可能性があり、細胞への侵入に深く係わっていることが分かっている。今回の申請では、クリプトスポリジウム原虫をターゲットとし、機能解明と免疫原性を検討し、その結果は他の原虫類にも応用可能であると考えている。

サルモネラに対する抗体作製に関しても、3 種類の鶏型モノクローナル抗体を作製することに成功し、免疫組織学的手法、および、Western blotting 法を用いて、その抗体が認

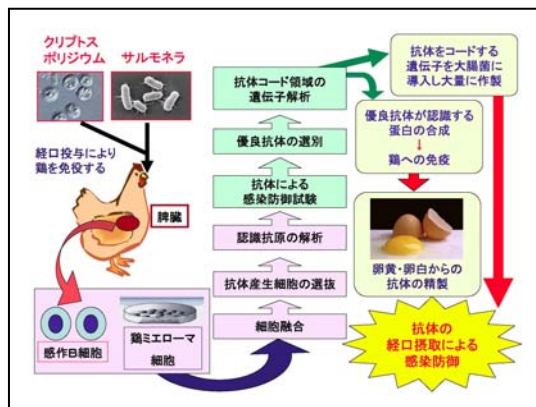
識する部位および抗原蛋白の分子量を検討した結果、全ての抗体がサルモネラ食中毒の主な原因菌である *Salmonella Enteritidis* (SE) の菌体表面を認識していることが判明した。また、SE 以外のサルモネラ血清型5種類 (*S. Typhimurium*、*S. Infantis*、*S. Hadar*、*S. Heidelberg*、および *S. Montevideo*) に対する交叉性を検討した結果、5血清型と交叉性を示すことが判明した。

## 2. 研究の目的

本研究においては、既存の抗体の解析、更に、受動免疫効果の高い鶏型モノクローナル抗体を作製し、最終的には特異的抗体をコードする遺伝子を大腸菌に導入することにより大量の特異的な抗体を作製する。あるいは、抗体が認識する抗原を鶏に免疫することにより、特異的卵黄抗体を得て、食品・飼料に添加し、経口受動免疫によりヒトおよび動物のサルモネラ、クリプトスポリジウムによる食中毒を予防・治療の一助とする。

## 3. 研究の方法

従来の研究結果をふまえて下記の図による研究計画を、3年計画で実施する(チャート内のボックスの色分けは単年度における研究計画を示し、平成20年度はピンク、平成21年度は緑、平成22年度は黄色にて示している)。



即ち、(1) クリプトスポリジウム、あるいは、サルモネラの鶏への免疫、(2) 免疫したニワトリのクリプトスポリジウム、あるいは、サルモネラに対する抗体価の測定 (3) クリプトスポリジウム、あるいは、サルモネラに感作されたニワトリを用いた抗体産生ハイブリドーマの作製、(4) 体産生ハイブリドーマの選別、(5) (1)から(4)の過程、および、既に申請者の研究室にて作製した抗体産生ハイブリドーマの抗体可変領域をコードするcDNAの単離、(6) 抗体の重鎖および軽鎖を連結させた一本鎖可変領域(scFv) DNAの作製、(7) 抗クリプトスポリジウム、あるいは、抗サルモネラ組換え抗体発現プラスミドの調整、(8) 組換え抗体の大腸菌で作製、(9) (4)にて作製した抗体が認識する抗原タンパク質をに免疫し(卵白に高率に抗体を産生する鶏系を共同研究者から入手)、卵白内の抗体価を測定し、抗体価の高い鶏を選別し、卵白から抗体を抽出する。(10) 上記過程にて作製した抗体をニワトリに経口摂取後、クリプトスポリジウム、あるいは、サルモネラの感染実験にて抗体の感染防御能を検討する。

最終的には食物、あるいは飼料への抗体の添加によりサルモネラ、クリプトスポリジウム等により発生する食中毒を経口受動免疫を用いた手法により制圧することを試みるとともに、本研究から得た知見を他の病原微生物による食中毒制圧の基礎的研究の一助とする。

## 4. 研究成果

アピコンプレックス門原虫の感染を防御する目的で、原虫特異的な鶏型抗体の作製を試みた。20年度には既存の鶏型モノクローナル抗体の交叉性を *Cryptosporidium* に対して確認した。21年度には、原虫の宿主

細胞侵入に強い関与が報告されている Apical complex に対する種々の抗体を用いて、*Eimeria* 属原虫での交差性を、最終の 22 年度には交差性が確認できた鶏型モノクローナルのリコンビナント一本鎖抗体を作製し、その反応性を確認した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Phylogenetic identification of *Cystoisospora* spp. from dogs, cats, and raccoon dogs in Japan. Matsubayashi M, Carreno RA, Tani H, Yoshiuchi R, Kanai T, Kimata I, Uni S, Furuya M, Sasai K, Vet Parasitol. 176(2-3):270-4. (2011).
- ② Effect of low pH on the morphology and viability of *Cryptosporidium andersoni* sporozoites and histopathology in the stomachs of infected mice. Matsubayashi M, Ando H, Kimata I, Takase H, Nakagawa H, Furuya M, Tani H, Sasai K., Int J Parasitol. 41(3-4):287-92. (2011)
- ③ Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan. Yoshiuchi R, Matsubayashi M, Kimata I, Furuya M, Tani H, Sasai K, Vet Parasitol. 174(3-4):313-6. (2010)
- ④ Morphological changes and viability of *Cryptosporidium parvum* sporozoites after excystation in cell-free culture media. Matsubayashi M, Ando H, Kimata I, Nakagawa H, Furuya M, Tani H, Sasai K,

Parasitology. 137(13):1861-6. (2010)

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者 笹井 和美 (SASAI KAZUMI)  
(大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授)  
研究者番号：70211935
- (2) 研究分担者 谷 浩行 (TANI KIROYUKI)  
(大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授)  
研究者番号：00305658
- (3) 研究分担者 松林 誠 (MATSUBAYASHI MAKOTO)  
(独)農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所・主任研究員)  
研究者番号：00321076
- (4) 研究分担者 古家 優 (FURUYA MASARU)  
(大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教)  
研究者番号：30500706