

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590749

研究課題名(和文) イムノクロマト法により数種の異なる食中毒を一度に迅速鑑別診断する

研究課題名(英文) Development of rapid and simple diagnostic assays for food poisoning bacteria and viruses using monoclonal antibodies

研究代表者

北元 憲利 (Kitamoto, Noritoshi)

兵庫県立大学・環境人間学部・教授

研究者番号：70145928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：食中毒の原因となるウイルスおよび細菌に対する単クローン抗体を作製し、網羅的・体系化することにより、数種の食中毒を一度に、迅速・簡便・安価・多検体鑑別診断可能な検査法を開発することが目的である。すでに実用化したもの(ノロウイルスのイムノクロマト法)を除き、よりよい単クローン抗体の樹立に取り組み、抗原的解析や抗体の特異性を確認した。対象とした微生物(10種類)に対する抗体はすべて樹立することができた。8種の抗体については、特異性などが確認できた。しかし、最終目的のイムノクロマト法の診断には有用とはいえない抗体が2種あり、今後再度抗体作製する必要がある。

研究成果の概要(英文)： Monoclonal antibodies (MAbs) are powerful tools for the study of microorganism. A panel of MAbs against food poisoning bacteria and viruses would be valuable for antigenic and structural analysis as well as useful for developing new diagnostic assays. The MAbs are of particular interest as possible reagents for the development of rapid and simple diagnostic assays (i.e., ELISA or immunochromatography) in clinical settings. In this study, we tried to establish such a panel of MAbs specific-reactive to food poisoning bacteria and viruses.

We obtained 8 MAbs to each bacterium. With an ELISA, Six MAbs were specific to each bacterium: enterotoxigenic Escherichia coli, Salmonella enterica serovar enteritidis, Vibrio parahaemolyticus, Campylobacter jejuni, Verotoxin producing Escherichia coli or Staphylococcus aureus. Three MAbs were further analyzed with an immunochromatography.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・食品衛生

キーワード：食中毒 単クローン抗体 迅速簡便診断法 ELISA法 イムノクロマト法

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ノロウイルスによる食中毒が多発するようになってきたが、カンピロバクターやサルモネラ菌など従来から知られている細菌性食中毒もいっこうに減少する気配がみられず、食品衛生上深刻な事態を招いている。このため、食中毒の予防対策として食品の安全性を確保することが急務となってきており、我々は、それらの課題を遂行するために、これまで、食品衛生の立場から、ウイルス性食中毒や細菌性食中毒について微生物学的、免疫学的あるいは疫学的研究を融合的・総合的に行ってきた。

食中毒など感染症の原因を調べる方法として、微生物の分離同定のほか、DNA や蛋白を検出する方法がある。PCR 法や DNA マイクロアレイ法などの DNA を調べる手法は、感度や特異性に優れるものの、多検体を調べるには手間や費用がかかり、特殊な装置が必要なのが欠点である。

それに比較して、免疫学的方法である ELISA 法は、材料の前処理も簡単にでき、多検体を迅速・簡便・安価に検出できるため、広い分野で使われている。また、スクリーニングの目的に有用であることは BSE (牛海綿状脳症) の例などでも知られている。我々もノロウイルスの診断などで有用性があることを証明している。しかし、この ELISA 法も、結果が出るまでに 2～3 時間かかり、測定器機などが必要となる欠点もある。

最近、より迅速簡便な方法として、イムノクロマト法やマイクロアレイ法などが利用されるようになってきた。ただ、これらの方法には単クローン抗体などの特異的かつ感度のよい抗体が必須であるため、必ずしもあらゆる微生物の検出に使われているわけではない。インフルエンザ、肝炎ウイルス、レンサ球菌など、少数の微生物や感染症、また、食品中のアレルゲンの検出などに使われているにすぎない。また、食中毒細菌に対する単クローン抗体は、国内外でも個別的には得られており、基礎的研究や抗原的解析には利用されているものの、それを応用した検出法としては、ペロ毒素検出キットなどがあるのみで体系化されたものはない。

種々の微生物に対する単クローン抗体の作製は 25 年以上継続しており、数にして 300 種類以上の抗体を得ている。単クローン抗体とは、化学的および生物学的に単一の性質を持った 1 つの蛋白あるいはペプチド成分に対する抗体のことであり、特定の抗原にのみ反応する抗体として、微生物の解析はもとより、診断や治療などにも応用されている。我々はこれまでに、ピロリ菌、ヒト型プリオン蛋白、種痘ウイルス、ノロウイルスなどに対する単クローン抗体を世界に先駆けて樹立してきた。特に、ノロウイルスに対する抗体は、基礎的な研究に利用されているほか、ELISA 法やイムノクロマト法で世界で初めて実用化に成功し、英国や米国 CDC などからも高い評価を受けた。また、生体内免疫物質に対する抗体

も得ている。さらに、研究分担者の加藤らとともに、生体内活性物質・活性酸素の研究や食品の機能性成分の解析を行うために、酸化バイオマーカーに対するいくつかの単クローン抗体を樹立し、抗体の一部はすでに世界唯一の抗体として市販されている。また、大学発ベンチャー創出推進研究「アゾポリマーを利用した抗体チップの作製と食品機能評価への応用開発」グループにも参画し、酸化バイオマーカーに対する単クローン抗体を利用した「抗体チップ」の技術的開発に貢献してきた。

## 2. 研究の目的

種々の食中毒を同時に簡便(複雑な手技や器械も不要で検体を加えるだけ)・迅速(20 分以内)に鑑別診断ができれば、食の安心・安全確保、また早期発見・予防・治療に役立つことができる。検出法としては、迅速・簡便な ELISA 法やイムノクロマト法が考えられる。ただし、これらの方法には単クローン抗体などの特異的かつ感度のよい抗体が必要であるため、必ずしもあらゆる微生物の検出に使われているわけではない。また、食中毒の鑑別診断のために、単クローン抗体を網羅・体系化し、数種の微生物を同時に簡便迅速に検出する方法はまだ開発されていない。長年手がけてきた単クローン抗体作製技術と診断・検出技術を活かして、本研究では、食中毒の原因となるウイルスおよび細菌に対する単クローン抗体を作製し、網羅的・体系化することにより、身近な病院や現場に近い関係機関で、10 種の食中毒を一度に、迅速・簡便・安価・多検体鑑別診断可能な検査法を開発することが目的である。その鑑別診断法が構築できれば、早期発見・早期治療・早期予防、また、食の安心・安全に役立つことができ、その意義は大きいと考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) 目標とする微生物

細菌性食中毒として、カンピロバクター、サルモネラ(SE 菌)、腸炎ビブリオ、病原大腸菌、腸管出血性大腸菌(ペロ毒素産生菌)、黄色ブドウ球菌、セレウス菌およびウエルシ菌など 8 種を対象とする。ウイルス性食中毒としては、ノロウイルスおよびサポウイルスである。計 10 種の食中毒起因微生物を対象とする。

### (2) 単クローン抗体の樹立とこれまでの研究進捗状

上述のように、ノロウイルスに対する抗体は、すでに作製済みで実用化されている。これまでに、腸管出血性大腸菌産生ペロ毒素、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンに対する抗体は、ほぼ解析も終わり、ELISA 法やイムノクロマト法に有用であるか否か確認する。カンピロバクター、サルモネラ(SE 菌)、腸炎ビブリオ、病原大腸菌に対する抗体も樹立しており、得られた抗体の解析と特異性の検討を行う。セレウス菌およびウエルシ菌に対する抗体は、これまでも

いくつか得られてはいるが、検出系には有用ではないことが分かったため、新たに作製する必要がある。免疫源等の具体的な条件は、これまでの検討により確かめている。抗体が得られれば随時、抗原的解析とともに検出法の感度と特異性の評価を行い有用かどうか検討する。免疫学的検出法の構築にあたり、Ultra performance liquid chromatography (UPLC)やLC/MS/MSを用いた化学的な分析法なども併用することで、抗体の信頼性の保証を行う。さらに、野外材料を用いて検出系に有用かどうか検討し、鑑別診断法の開発へと発展させる。

### (3) 検出・診断法の開発

まず、ELISA 法による有用性を検討する。さらに発展させて、イムノクロマト法による検出法の開発を試みる。すでに得られた抗体で、ELISA 法により有用と考えられる抗体については、現在イムノクロマト法への応用を手がけている。

食品や臨床材料から、簡便・迅速に鑑別診断可能な方法を開発し、食の安全確保とともに、早期発見・早期治療・早期予防に寄与することが最終目標である。

## 4. 研究成果

すでに実用化したもの（ノロウイルスのイムノクロマト法）を除き、よりよい単クローン抗体の樹立に取り組み、抗原的解析や抗体の特異性を確認した。

対象とした微生物(10種類)に対する抗体はすべて期間内には樹立することができた。このうちいくつかの抗体については、その特異性を確認することができた(表1)

表1 単クローン抗体の交差性と特異性 (ELISA 法)

抗体と抗原の交差性		抗原					
		病原大腸菌	サルモネラ	腸炎ピブリオ	カンピロバクター	腸管出血性大腸菌	黄色ぶどう球菌
抗体	病原大腸菌	+	-	-	-	-	-
	サルモネラ	-	+	-	-	-	-
	腸炎ピブリオ	-	-	+	-	-	-
	カンピロバクター	-	-	-	+	-	-
	腸管出血性大腸菌	-	-	-	-	+	-
	黄色ブドウ球菌	-	-	-	-	-	+

しかし、抗体は得たものの、それが最終目的のイムノクロマト法の診断には有用とはいえない抗体もあり、今後再度抗体を作製する必要がある。これまでの抗体解析の進捗状況を表2に示す。

抗ペロ毒素(腸管出血性大腸菌)抗体および黄色ブドウ球菌の抗エンテロトキシン抗体については、イムノクロマト法への実用化のめどが分かった(図1)

セレウス菌およびウエルシ菌に対する抗体は得られたものの実用的ではないことが分り、今後新たな抗体を作製する必要がある。

表2 単クローン抗体取得状況と今後の予定

微生物	ターゲット抗原	抗体樹立、進捗状況および今後の予定
ノロウイルス	共通抗原	イムノクロマト(IC)法開発済み
サボウイルス	共通抗原	ELISA 検討済 今後 IC 法の有用性
サルモネラ(SE 菌)	鞭毛蛋白	ELISA 検討済 今後 IC 法の有用性
カンピロバクター	外膜蛋白	ELISA 検討済 今後 IC 法の有用性
腸炎ピブリオ	耐熱性溶血毒	ELISA 検討済 今後 IC 法の有用性
病原大腸菌	易熱性毒素	ELISA 検討済 今後 IC 法の有用性
腸管出血性大腸菌	ペロトキシン	イムノクロマト法の有用性済 野外材料
ブドウ球菌	エンテロトキシン	イムノクロマト法の有用性済 野外材料
セレウス菌	*フォスフォリパーゼやスフィンゴミエリナーゼに対する抗体を得たが、ウエルシ菌とも反応した。今後新たな抗体を作製予定	
ウエルシ菌	*毒素(コラゲナーゼ)や毒素に対する抗体は得たが、有用性に乏しいことが分り、特異性の高い抗体を作製予定	

病原性大腸菌(易熱性毒素) 腸炎ピブリオ(耐熱性溶血毒) カンピロバクター(外膜蛋白)およびサルモネラ(鞭毛蛋白)に対する抗体については、ELISA 法やウエスタンブロット法により特異的な抗体であることが分り、今後、イムノクロマト法にて実用化への検討を行う。

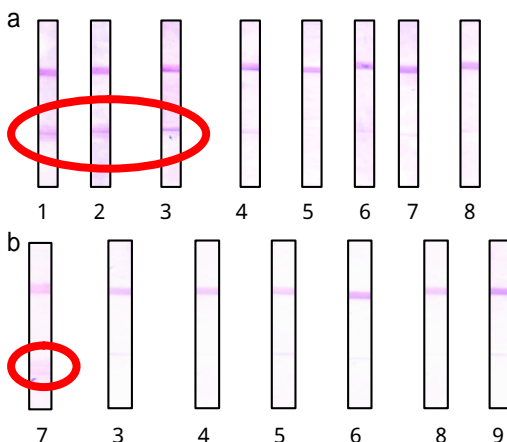


図1 イムノクロマト法への応用

a: 抗ペロ毒素抗体、b: 抗黄色ブドウ球菌エンテロトキシン抗体 1:026、2:0111、3:0157、4:病原大腸菌、5:サルモネラ、6:カンピロバクター、7:黄色ブドウ球菌、8:腸炎ピブリオ、9:PBS。いずれも特異的に反応している(丸印)。上部のバンドはコントロールライン。

今後、新たな抗体の樹立とともに、未解析の各種抗体抗体について、競争 ELISA 法、ウエスタンブロット法、二次元電気泳動法などでその解析を行う。エピトープマッピングなどの抗原的解析も行う。抗体の有用性については、感度と特異性を調べる必要があり、PCRを使った遺伝子学的検査法と比較検討する。また、野外材料を使って実際応用可能かどうか検討する。ELISA 法による有用性を検討したのち、さらに発展させて、イムノクロマト法による診断法の開発を試みる。これまでに手がけてきたノロウイルスの検出法を踏襲する。特別な器具も必要とすることなく、材料や試料を滴下するだけでバンド形成の有無あるいは発色の有無を可視判定できるようにしたい。

## 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18件)

- (1) 北元憲利、中谷唯、加藤陽二：不法投棄による河川源流上流の細菌汚染調査、人間と環境、査読有、40(1):39-44、2014  
<http://jaes.sakura.ne.jp/archives/2659>
- (2) Yoshizaki T., Ohtani K., Motomura W., Jang S.J., Mori K., Kitamoto N., Yoshida I., Suzuki Y., Wakamiya N.: Comparison of human blood concentration of collectin kidney 1 and mannan-binding lectin. J.Biochem、査読有、151:57-64、2012  
DOI: 10.1093/jb/mvr114.
- (3) Yoji Kato, Natsuki Umeda, Asuna Maeda, Daiki Matsumoto, Noritoshi Kitamoto, Hiroe Kikuzaki : Identification of a Novel Glycoside, Leptosin, as a Chemical Marker of Manuka Honey、Agric. Food. Chem.、査読有、50:3418-3423、2012  
DOI: 10.1021/jf300068w.
- (4) Kitamoto N., Oka T., Katayama K., Li T.-C., Takeda N., Kato Y., Miyoshi T., Tanaka T.: Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles、Microbiol. Immunol.、査読有、56:760-770、2012  
DOI:10.1111/j.1348-0421.2012.00499.x

〔学会発表〕(計34件)

- (1) 加藤陽二、藤中里衣、石坂朱里、北元憲利、瀧本陽介：マヌカ蜂蜜に特有な Leptosin の質量分析による検出定量と認証評価、日本農芸化学会、2014年3月30日-4月1日、東京プラザホテル(東京都新宿区西新宿)
- (2) Yoji Kato, Shigeki Ono, Noritoshi Kitamoto, and Anthony Kettle : Modification of tubulins by reactive quinone derived from serotonin in neuronal cells、17<sup>th</sup> Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International、March 23-26、2014、国立京都国際会館(京都府左京区岩倉)
- (3) 加藤陽二、藤中里衣、北元憲利、數村公子、瀧本陽介：マヌカ蜂蜜認証のための Leptosin 及び Methyl Syringate の検出定量、日本フードファクター学会、2013年11月9-10日、東京農業大学(東京都世田谷区)
- (4) Shigeki Ono, Kota Oki, Noritoshi Kitamoto, Anthony J. Kettle, Yoji Kato : Formation of reactive quinone from 5-hydroxyindoleacetic acid catalyzed by myeloperoxidase- Covalent adduction of quinone with protein thiols-、Antioxidants and Redox Process in Health、Bilateral Meeting Brazil-Japan、October 21-22 2013、サンパウロ(ブラジル)
- (5) Ryo Matsumoto, Noritoshi Kitamoto, Yoji

Kato : Formation of amide-type lipid-lysine adduct in model systems、Antioxidants and Redox Process in Health、Bilateral Meeting Brazil-Japan、October 21-22 2013、サンパウロ(ブラジル)

- (6) Yukako Araki, Rie Fujinaka, Noritoshi Kitamoto, Yosuke Takimoto, and Yoji Kato : Studies on Leptosin identified in Manuka Honey- Its Metabolism and Application of Plausible Certification for Manuka Honey-、Antioxidants and Redox Process in Health、Bilateral Meeting Brazil-Japan October 21-22 2013、サンパウロ(ブラジル)
- (7) Yoji Kato : Detection of protein tyrosine modifications by mass spectrometry and antibodies、Antioxidants and Redox Process in Health、Bilateral Meeting Brazil-Japan、October 21-22 2013、サンパウロ(ブラジル)
- (8) 北元憲利、新田陽子、加藤陽二、尾関健二：セレウス菌および黄色ブドウ球菌に対する塩麹の抗菌効果、第60回日本栄養改善学会、2013年9月12日-14日、神戸国際会議場(神戸市中央区港島)
- (9) 北元憲利、加藤陽二：兵庫県内河川源流上流における不法投棄による細菌学的汚染調査、第39回日本環境学会、2013年6月15-17日、広島大学(東広島市鏡山)
- (10) 加藤陽二、小野成輝、北元憲利、トニーケトル：セロトニン酸化トリプトミンダイオンによる神経細胞タンパク質の修飾、第66回日本酸化ストレス学会、2013年6月13-14日、名古屋キャッスルプラザ(名古屋市中村区名鉄)
- (11) 荒木裕佳子、松本大樹、北元憲利、室田佳恵子、伊藤美紀子、菊崎泰枝、瀧本陽介、加藤陽二：酵素グルコシダーゼや腸管モデル培養細胞を用いた配糖体 Leptosin の代謝研究、日本農芸化学会、2013年3月24日-28日、東北大学(仙台市青葉区川内)
- (12) 松本亮、磯見みづき、中村宜督、北元憲利、加藤陽二：蛍光色素 FITC 修飾タンパク質に対する抗体の作製とその応用、日本農芸化学会、2013年3月24日-28日、東北大学(仙台市青葉区川内)
- (13) 北元憲利、岡智一郎、片山和彦、三好龍也、田中智之：サポウイルス genogroup に特異的な単クローン抗体の作製とその解析、第60回日本ウイルス学会、2012年11月13-15日、グランキューブ大阪(大阪国際会議場、大阪市北区中之島)
- (14) 加藤陽二、松本大樹、荒木裕佳子、北元憲利、菊崎泰枝、マヌカ蜂蜜から発見された新規配糖体の単離と酵素を用いた構造解析、第6回日本フードファクター学会、2012年11月10日-11日、静岡県男女共同参画センター・あざれあ(静岡市駿河区)

- (15) 小野成輝、北元憲利、アンソニーケトル、加藤陽二 : Tryptamine-4,5-dione によるタンパク質修飾を抑制する食品成分の探索法、第6回日本フードファクター学会、2012年11月10日-11日、静岡県男女共同参画センター・あざれあ(静岡市駿河区)
- (16) 片山舞奈美、北元憲利、加藤陽二、横田正春、田中智之: 食中毒細菌に対する単クローン抗体を用いた迅速簡便診断法の基礎的検討、第55回中日本・第82回日本感染症学会、2012年11月5日-7日、アクロス福岡(福岡福岡市中央区天神)
- (17) 北元憲利、片山舞奈美、加藤陽二 : 次亜塩素酸のガス化による空間殺菌効果、第55回中日本・第82回日本感染症学会、2012年11月5日-7日、アクロス福岡(福岡福岡市中央区天神)
- (18) 北元憲利、三好龍也、田中智之 : サポウイルス単クローン抗体による迅速診断法の可能性、第53回日本臨床ウイルス学会、2012年6月16-17日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市新千里東町)
- (19) 加藤陽二、松本 亮、北元憲利、酒居一雄、竹内征夫、越智大倫、吉田晃浩、内藤通孝 : ELISA によるヒト尿中ジチロシン測定-酸化ストレスマーカーの比較-、第65回日本酸化ストレス学会、2012年6月7日-8日、あわぎんホール徳島県郷土文化会館(徳島市藍場町)
- (20) 松本亮、加藤陽二、北元憲利、酒居一雄、Rejc Barbara, Gersak Ksenija, Osredkar Josko : 妊娠中期における尿及び羊水中の酸化ストレスマーカーの検出、第65回日本酸化ストレス学会、2012年6月7日-8日、あわぎんホール徳島県郷土文化会館(徳島市藍場町)
- (21) 加藤陽二、梅田菜月、前田明日菜、松本大樹、北元憲利、菊崎泰枝 : マヌカ蜂蜜に由来する新規配糖体 Leptosin のケミカルマーカーとしての有用性について、日本農芸化学会、2012年3月22-26日、京都女子大学(京都市東山区今熊野北日吉町)
- (22) 加藤陽二、磯見みづき、中村俊之、北元憲利、中村宜督: リジン付加反応を利用した食品イソチオシアネートの生理機構を解明するための基礎的研究、第5回日本フードファクター学会、2011年11月20日-23日、台北国際会議中心(台北市、中華民国)
- (23) Yoji Kato, Natsuki Umeda, Asuna Maeda, Noritoshi Kitamoto, and Hiroe Kikuzaki : Novel chemical marker of manuka honey, International Conference on Food Factor (ICoFF2011)、11.20-23 2011、台北国際会議中心(台北市、中華民国)
- (24) Mizuki Isomi, Toshiyuki Nakamura, Yoshimasa Nakamura, Noritoshi Kitamoto, Yoji Kato, Analysis of formation of covalent adduct between isothiocyanate and protein lysine in physiological conditions using fluorescein-
- isothiocyanate as a model isothiocyanate、International Conference on Food Factor (ICoFF2011)、11.20-23 2011、台北国際会議中心(台北市、中華民国)
- (25) Noritoshi Kitamoto, Tomoichiro Oka, Grant S. Hansman, Kazuhiko Katayama, Yoji Kato, Tomoyuki Tanaka : Broadly reactive monoclonal antibody with several recombinant Sapovirus-like particles (SV-VLPs)、XV International Congress of virology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 12-15 2011、札幌コンベンションセンター(札幌市白石区東札幌)
- (26) 加藤陽二、沖公太、三浦陽子、内藤通孝、北元憲利、Anthony J. Kettle : 酵素ミエロペルオキシダーゼによる5-ヒドロキシインドール酢酸からのキノン体生成と蛋白質付加修飾、第64回日本酸化ストレス学会、2011年7月2日-3日、北海道ルスツリゾートホテル&コンベンション(北海道虻田郡留寿都村字泉川)
- (27) 北元憲利、中谷唯、加藤陽二 : 兵庫県内の河川源流上流の不法投棄による汚染調査~細菌学および理化学的検査を中心として~、第37回日本環境学会、2011年6月10日-11日、三重大学(三重県津市栗真町屋町)
- (28) Yoji Kato, Yoko Miura, Michitaka Naito, Noritoshi Kitamoto, Anthony J Kettle : Immunohistochemical detection of serotonin oxidation products in human atherosclerotic lesion, International Symposium on Free Radical Research: Contribution to Medicine, 1.20-22 2011、ハイアットリージェンシー京都(京都市東山区三十三間堂)
- 〔図書〕(計1件)  
 (1) 北元憲利、休み時間の微生物学(第3, 4, 5版改訂版)、講談社サイエンティク(2011, 2012, 2013)、190
- 〔その他〕  
 ホームページ等  
<http://www.shse.u-hyogo.ac.jp/kitamoto/>
6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
北元 憲利 (KITAMOTO NORITOSHI)  
 兵庫県立大学・環境人間学部・教授  
 研究者番号 : 7 0 1 4 5 9 2 8
- (2) 研究分担者  
加藤 陽二 (KATO YOJI)  
 兵庫県立大学・環境人間学部・教授  
 研究者番号 : 3 0 3 0 5 6 9 3