

〈技術〉

毒キノコ成分 α -アマンニチンに対する新規ELISA測定系の構築

岡田 光貴¹⁾、牛島 秀爾²⁾、福田 篤久³⁾、竹下 仁¹⁾

Establishment of a New ELISA System for Measuring the Concentration of the Mushroom Toxin α -Amanitin

Kohki Okada¹⁾, Shuji Ushijima²⁾, Atsuhisa Fukuda³⁾ and Hitoshi Takeshita¹⁾

Summary α -Amanitin (AMA) is a lethal toxin produced by *Amanita virosa*. In this study, we established a new Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) to assess AMA concentration, and evaluated whether this assay allowed detection of AMA from *Amanita virosa* extracts and other biological samples. The ELISA using H12D6 and C2C4 monoclonal antibodies (H12D6-C2C4 ELISA) showed a good calibration curve with high correlation between the concentration of AMA and the absorbance. In this ELISA, we determined the concentration of AMA diluted in PBS with high accuracy and precision. However, when the AMA concentration in urine was measured, we had to correct the effect of interference components in the samples. While, by this ELISA, we could detect and quantify AMA from *Amanita virosa* extracts, but not from other mushrooms. In conclusion, H12D6-C2C4 ELISA may be used to detect and quantify AMA from urine samples and *Amanita virosa* extracts.

Key words: α -Amanitin, *Amanita virosa*, ELISA, Monoclonal antibody

¹⁾ 京都橋大学健康科学部臨床検査学科
〒607-8175京都市京都市山科区大宅山田町34

²⁾ 日本きのこセンター菌草研究所
〒689-1125鳥取県鳥取市古郡家211

³⁾ 大阪医科大学三島南病院臨床検査科
〒569-0856大阪府高槻市玉川新町8-1

連絡先：岡田 光貴
京都橋大学健康科学部臨床検査学科
Tel: +81-755-71-1111 (ex.4938)
E-mail: okada-ko@tachibana-u.ac.jp

¹⁾Department of Medical Technology and Sciences, Faculty of Health Sciences, Kyoto Tachibana University, 34 Yamada-cho Oyake, Yamashina-ku, Kyoto-shi, Kyoto, 607-8175, Japan

²⁾The Tottori Mycological Institute, The Japan Kinoko Research Center Foundation, 211 Kokoge, Tottori-shi, Tottori, 689-1125, Japan

³⁾Department of Medical Technology, Osaka Medical College Mishima-Minami Hospital, 8-1 Tamagawashinmachi, Takatsuki-shi, Osaka, 569-0856, Japan

受付日：2020年10月29日

採択日：2021年1月14日

I. 緒言

テングタケ属の毒キノコであるドクツルタケは、その摂食後の死亡率がキノコ食中毒の中で特に高く、危険視されている¹⁾。ドクツルタケの主要な毒成分は、アマトキシン類に属する α -アマニチン (AMA) である²⁾。AMAの推定致死量は成人で約0.1mg/kgであるが、ドクツルタケには通常5~15mgのAMAが含まれており^{3,4)}、1本の摂食でも生命の危機に瀕することが予想される。具体的に、AMAが原因の食中毒では、初期に腹痛や下痢などの消化器症状が見られ、24~48時間後には主として肝・腎障害が進行し、2~6日後には肝性昏睡や多臓器不全に陥ることが報告されている^{5,6)}。特にAMAは肝細胞に取り込まれやすく、そこでRNAポリメラーゼIIを抑制することで重要なタンパク質の合成代謝を阻害する⁷⁾。したがって、ドクツルタケを摂食した食中毒患者に対しては、早急な診断と治療が必要である。一方、臨床現場においてAMAを対象とした検査が実施されていないため、医師は患者本人やその家族からの聴取や症状を基に診断せざるを得ない。

キノコ本体からAMAを検出する方法の1つにMeixner試験がある。本法は新聞紙などのリグニンを含む紙にキノコの抽出液を含ませ、そこに濃塩酸を滴下して青色呈色の有無を確認する、迅速かつ簡易な試験である^{8,9)}。一方、他の毒性キノコ成分や、ヒトの生体内ではセロトニンがAMAに類似した構造を有しており、これらが本試験では偽陽性の原因となる^{8,10)}。したがって、本法はAMAに対する特異性が乏しく、ヒト検体への適応も困難と言わざるを得ない。一方、患者の尿や血清といった生体試料を対象としたAMAの定量分析にはHigh performance liquid chromatography (HPLC)¹¹⁻¹²⁾ やLiquid Chromatography-Mass spectrometry (LC-MS)¹³⁾ を利用した報告が多い。これらは生体試料のみならずキノコの抽出液に対しても適応が可能と考えられるが、高額な分析機器を要するため医療現場での実施は難しい。

以上の背景から、既存のAMA検出法には弱点があると言わざるを得ない。そこで、我々はAMAに対するモノクローナル抗体 (mAb) を利用したEnzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

(ELISA) を構築することで、キノコ成分の抽出液、および生体試料のいずれにも適応可能な、新たなAMA定量法を考案した。本稿では我々が構築したELISAの性能評価を実施し、その実用性について考察する。

II. 材料と方法

1. 材料

マウス由来IgG2aタイプの抗体であるMouse Anti-Amanitin mAb H3E1、C2C4、H12D6 (Levena Biopharma Co., Ltd, USA) (以下、それぞれH3E1、C2C4、H12D6と表記) を、ELISA構築用に購入した。また、これらmAbをペルオキシダーゼ (HRP) 標識するため、Peroxidase Labeling Kit - SH (株式会社 同仁化学研究所、熊本) を購入した。さらに、mAbを希釈するため、Blocking One (ナカライテスク株式会社、京都) を供した。ELISAの反応プレートには、ELISAプレートHタイプ (住友ベークライト株式会社、東京) を採用した。また、ヒトの血清および尿試料として、市販のHuman Serum pool、およびUrine, Single Male Donor, Human (いずれもコスモ・バイオ株式会社、東京) を入手し、使用した。その他、 α -アマニチンおよび各種一般試薬 (富士フイルム和光純薬株式会社、東京) を供した。また、鳥取県内で採取した毒キノコ(6種10サンプル)を実験に供した。内訳は、ドクツルタケ (*Amanita virosa*; *A. virosa*) が5サンプル (AV1~AV5)、フクロツルタケ (*A. volva*: OS1)、ヘビキノコモドキ (*A. spissacea*: OS2)、テングタケ (*A. pantherina*: OS3)、コタマゴテングタケ (*A. citrina*.; OS4)、およびオオツルタケ (*A. cheelii*: OS5) が各々1サンプルである (Fig. 1A and B)。子実体は肉眼あるいは顕微鏡的特徴を調査、原色日本菌類図鑑¹⁴⁾ に基づき種を同定した。なお、ドクツルタケの傘の部分には、3% KOH溶液を滴下した際に黄変する性質を有する⁹⁾。そこで、肉眼的特徴からドクツルタケと判断したサンプルは、3% KOHを傘に滴下し黄変(陽性)を示すことを確認した (Fig. 1C)。その結果、AV1~AV5は全て陽性を示した。

2. 方法

1) 抗体のHRP標識

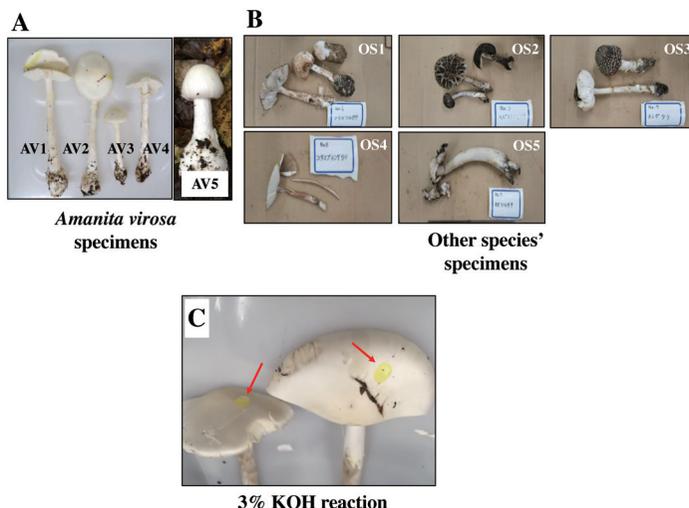


Fig. 1 Acquisition and identification of *Amanita virosa*

To evaluate whether mushroom extract AMA concentration may be quantified using a novel ELISA, we obtained specimens of *Amanita virosa* (A. virosa) (Panel A, AV1-5) and five other species of mushroom (Panel B, OS1-5) from the Tottori Mycological Institute (Tottori). A 3% KOH test was performed on all mushrooms, yielding a positive reaction (yellow, indicated by the red arrow) (Panel C). OS-1: *A. volvata*, OS-2: *A. spissacea*, OS-3: *A. pantherina*, OS-4: *A. citrina*, OS-5: *A. cheelii*.

ELISAの二次抗体として使用するため、H3E1、C2C4、およびH12D6をPeroxidase Labeling Kit – SHによりHRP標識し、H3E1-HRP、C2C4-HRP、およびH12D6-HRPを作製した。

2) 検体の調製

中毒患者の検体を入手することは困難であるため、市販のAMAを10 mmol/L(以下mMと表記)リン酸緩衝液 (PBS)、Urine, Single Male Donor, Human (尿)、およびHuman Serum pool (血清)に溶解したものを検体とした。また、各種キノコ (材料を参照) は、その上部から順に傘、柄、及びツボの3部位に分割 (OS-5はツボが欠損していたため、今回は柄の最下部の5cm程度をツボ相当と仮定し、使用した)、各部位の計量を行なった後で細切れにし、50mlチューブに入れ-80℃で凍結、それらを解凍後によく絞って得られた抽出液を検体とした。

3) ELISAの構築

検体中に含まれるAMAを一次、及び二次抗体で挟み込む、非競合法を原理としたELISA¹⁵⁾の構築を目指した。まず、ELISAプレートの各

ウェル (well) に対して、50mM 炭酸-重炭酸緩衝液 (pH9.4) により2 μ g/mLに希釈した一次抗体を100 μ L/well添加、4℃で一晩静置し、これら抗体をプレートにコーティングした。150mM NaClおよび0.05% Tween 20を含む10 mM PBS (10mM PBS-T) でこれを3回洗浄後、Blocking Oneを100 μ L/well添加、室温で1時間静置しブロッキングを行なった。3回洗浄後、25mM PBS-Tを100 μ L/well添加し、さらにPBS, 尿, あるいは血清で調製した検体を25 μ L/well添加して1時間静置することで、検体内のAMAを一次抗体に結合させた。その後、3回洗浄し、10倍希釈したBlocking Oneで2 μ g/mLに希釈した二次抗体を100 μ L/well添加、30分間静置することでAMAに結合させた。その後、3回洗浄し、1mg/mL α -フェニレンジアミン溶液10mLにH₂O₂を5 μ L加えたものを100 μ L/well添加することで発色させた。30分後、3mol/L H₂SO₄を100 μ L/well添加して発色反応を停止させ、490nmにおける吸光度をiMarkマイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Inc. USA) で

測定した。測定原理の概略はFig. 2で示した。ELISAの性能は、測定の精密度（ばらつき）を反映した「変動係数 (CV, %) = 100 × {標準偏差 (SD) / 平均値 (Average)}」、および正確さを反映した「添加回収率 (Recovery, %) = 100 × (AMAの測定値-溶媒のみの測定値) / AMAの添加量」、により評価した。

4) Meixner試験

構築したELISAの検出感度を評価するため、既存のAMA検出法であるMeixner試験との比較を試みた。Meixner試験の手順は、臨床中毒学第1版⁹⁾に掲載された手法を参考にした。まず、新聞紙の文字が書かれていない部分を長方形（縦2cm×横6cmほど）に切り、そこに鉛筆で直径1cmほどの円を描いた。次に、検体を円内に収まるように10 μ l滴下し、軽く乾燥させた。さらに、同箇所濃塩酸を10 μ l滴下し、軽く乾燥させてから結果を判定した。検体内にAMAが含まれる場合、そのインドール構造が新聞紙中に含まれるリグニンと塩酸酸性下で反応し、青色化合物を生成する¹⁰⁾。そこで、試験結果を3名の研究者で確認し、全員が青変と判断した場合を陽性とした。

Ⅲ. 結果

1. AMAに対するmAbを用いたELISAの構築とAMA希釈系列の測定

ELISAの構築に最適な一次、および二次抗体を決定するため、各mAbの組み合わせで6パターンのELISAを構築し、PBSで調製した15段階のAMA希釈系列（0.061~1,000 μ g/mL）を測定した。その結果、各ELISAで概ね希釈系列に応じた発色反応が得られたが、一部で非特異的発色や感度が低いものが認められた（Fig. 3）。

2. 各ELISAにおけるAMA検量線の比較

次に、先の実験における発色後の吸光度を測定し、検量線を作成した。なお、AMA濃度が1.953 μ g/mL未満の場合には各ELISAにおいてブランク相当の吸光度であったため、1.953~1,000 μ g/mLの10段階希釈系列の測定結果を検量線に用いた。結果、一次抗体としてH3E1を用いた場合では、濃度と吸光度の関係に若干のばらつきが見られた（Fig. 4A and B）。また、一次抗体としてC2C4を用いたELISAでは、濃度と吸光度の相関性(R値)が比較的良好であった（Fig. 4C-D）。また、H12D6とC2C4を用いたELISA（H12D6-C2C4 ELISA）はR値が0.998と最も高く、良好な検量線を描くことができた

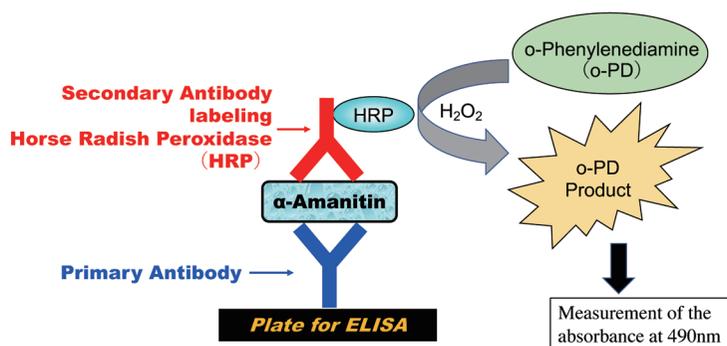


Fig. 2 Design of a non-competitive ELISA platform

To accurately measure AMA concentrations in samples, a novel non-competitive ELISA platform was designed. A set of three monoclonal antibodies (H3E1, C2C4, and H12D6) with distinct AMA epitope specificities was selected, and performance of each as a primary (antigen-capture) or HRP-conjugated secondary (antigen detection) antibody was evaluated. In the presence of H₂O₂, HRP reacts with o-phenylenediamine to produce a yellow color. The reaction was terminated by addition of 1N sulfuric acid, and absorbance at 490 nm was measured using an iMark microplate reader (Bio-Rad Laboratories).

	A		B		C		D		E		F	
Primary	H3E1		H3E1		C2C4		C2C4		H12D6		H12D6	
Secondary	C2C4-HRP		H12D6-HRP		H3E1-HRP		H12D6-HRP		C2C4-HRP		H3E1-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

AMA concentration (µg/ml)

Fig. 3 Quantification of AMA based on HRP activity in each ELISA reaction

ELISA assays were carried out using H-type plates, each coated with 2 µg/mL of the candidate primary antibody of interest (H3E1, C2C4, or H12D6). Per primary antibody type (e.g. H3E1), the remaining two antibody types (e.g. C2C4 or H12D6) were added as HRP-conjugated candidate secondary antibodies, followed by HRP-dependent colorimetry. Columns A-F demonstrate results of ELISAs using H3E1, C2C4, and H12D6 as primary antibodies (combinations: H3E1-C2C4-HRP, H3E1-H12D6-HRP, C2C4-H3E1-HRP, C2C4-H12D6-HRP, H12D6-C2C4-HRP, and H12D6-H3E1-CRP). Within each column, lane 1 represents the first eight steps (rows I-VIII) and lane 2 represents the next seven steps (rows I-VII) of 15 two-fold serial dilutions of the AMA standard (1,000-0.061 µg/mL), using 10 mM PBS as the diluent and blank (0 µg/mL AMA; lane 2, row VIII). Each experiment was repeated in quintuplicate.

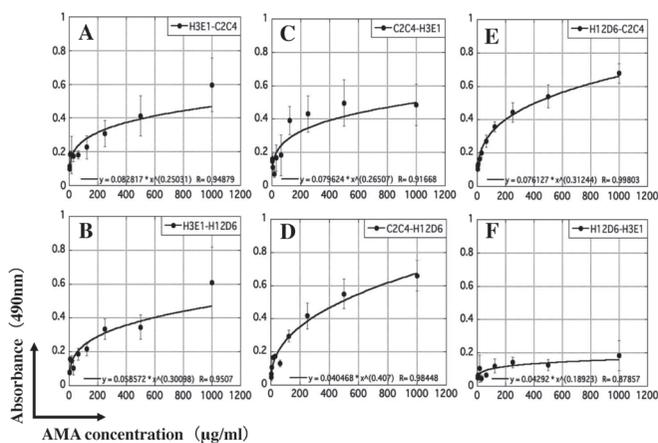


Fig. 4 Calibration curves of each ELISA for all antibody pairs, based on the correlation between AMA concentration and absorbance

Blank-subtracted absorbance means ± standard deviations were plotted against AMA concentration in order to construct calibration curves for each antibody pair: H3E1-C2C4-HRP (A), H3E1-H12D6-HRP (B), C2C4-H3E1-HRP (C), C2C4-H12D6-HRP (D), H12D6-C2C4-HRP (E), and H12D6-H3E1-CRP (F). In each graph, the x-axis indicates AMA concentration (1.953-1,000 µg/mL) and the y-axis indicates absorbance at 490 nm. Spearman's rank correlation formula and resulting correlation coefficients (R-values) are indicated on each graph; an R-value between 0.5 and 1.0 indicates good correlation. Here, the best correlation (R = 0.998) was obtained when using H12D6 as the primary antibody and C2C4-HRP as the secondary antibody (H12D6-C2C4 ELISA) (E).

(Fig. 4E)。一方、H12D6とH3E1の組み合わせでは非常に感度が低い結果となった (Fig. 4F)。
 3. 同時再現性の検証によるH12D6-C2C4 ELISAの性能評価

H12D6-C2C4 ELISAがAMAの定量に最も優れていると考え、PBS、尿、および血清を溶媒として100 μg/mLに希釈したAMAを同時に10検体測定し、その性能を検証した。PBSで希釈したAMAの発色は概ね均一であった (Fig. 5A)。一方、尿中AMAは、やや発色が抑制される傾向にあった (Fig. 5B)。また、血清中AMAは非

常に発色が強かった (Fig. 5C)。これら発色後の吸光度を測定しAMA濃度を求めたところ、PBS、尿、および血清で希釈したAMAはそれぞれ平均値が、91.45 μg/mL、53.12 μg/mL、480.35 μg/mLであった (Fig. 5D)。なお、PBS、尿、および血清中AMAの10回測定におけるAverage、SD、CV、およびRecoveryを算出したものがTable. 1である。

4. 尿または血清で調製したAMA希釈系列の測定結果に基づくH12D6-C2C4 ELISAの検量線の補正

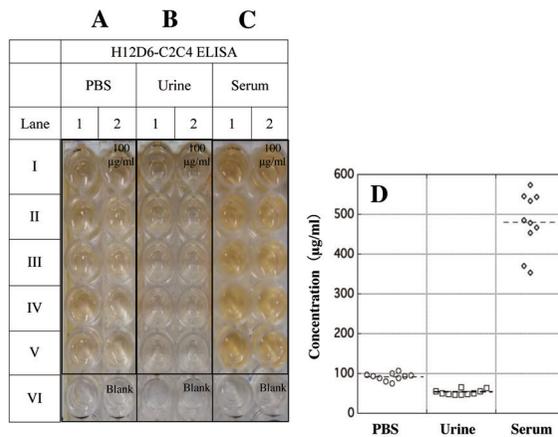


Fig. 5 Reproducibility of H12D6-C2C4 ELISA AMA quantification results within different biological matrices

The novel assay was used for ten simultaneous measurements of equivalent AMA concentrations (100 μg/mL) within different biological matrices. Columns indicate verification of H12D6 and C2C4-HRP mediated detection of AMA in 10 mM PBS (A), urine (B), and serum (C). Within each column, lanes 1 and 2 (rows I-V) represent ten replicates (100 μg/mL AMA), while lanes 1 and 2 (row VI) represent blanks (equal volumes of 10 mM PBS). Measured AMA values were most accurate in PBS and least consistent as well as least accurate (over-estimation of AMA concentration) in serum; urine resulted in consistent measurements but slight underestimation of AMA concentration (D). In each graph, the x-axis indicates biological matrix (10 mM PBS: circles, urine: squares, and serum: diamonds) and the y-axis indicates measured AMA concentration (μg/mL). Dotted lines indicate the average of measurements.

Table 1 Measurement performance of H12D6-C2C4 ELISA, in case of the calibration curves based on measuring PBS dilution series

	Solvents		
	PBS	Urine	Serum
Average (μg/ml)	91.45	53.12	480.35
SD	9.13	6.69	73.97
CV (%)	9.98	12.60	15.40
Recovery (%)	91.50	51.80	217.60

(n=10 each)

SD; Standard Deviation, CV; coefficient of variation, PBS; phosphate buffered saline

先の検証ではPBSで調製したAMAの検量線に基づき濃度の算出を行なったため、尿や血清における干渉成分の影響が検量線に反映されていなかった。そこで、尿や血清を用いて調製した検量線用AMA希釈系列をH12D6-C2C4 ELISAで測定した。結果、尿中AMA測定では発色が抑制されるものの、15.6~1,000 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で概ね良好な検量線を作成できた (Fig. 6A and C)。一方、血清中AMA測定では非特異的発色を認め、測定結果もばらつきが大きかった (Fig. 6B and D)。これら検量線に基づき、改めて尿と血清中の100 $\mu\text{g/mL}$ AMAの10回測定における濃度を算出したところ、それぞれ平均値は90.49 $\mu\text{g/mL}$, 85.52 $\mu\text{g/mL}$ であった (Fig. 6E)。本実験の尿と血清中AMAの10回測定における

Average、SD、CV、およびRecoveryを算出したものがTable. 2である。

5. H12D6-C2C4 ELISAによるキノコ成分の抽出液中AMA濃度の測定

ドクツルタケ (AV1~5)、およびテングタケ

Table 2 Measurement performance of H12D6-C2C4 ELISA, in case of the calibration curves based on measuring urine or serum dilution series

	Solvents		
	Urine	Serum	
Average ($\mu\text{g/ml}$)	90.49	85.52	
SD	7.80	29.92	
CV (%)	8.62	34.99	
Recovery (%)	86.41	64.86	(n=10 each)

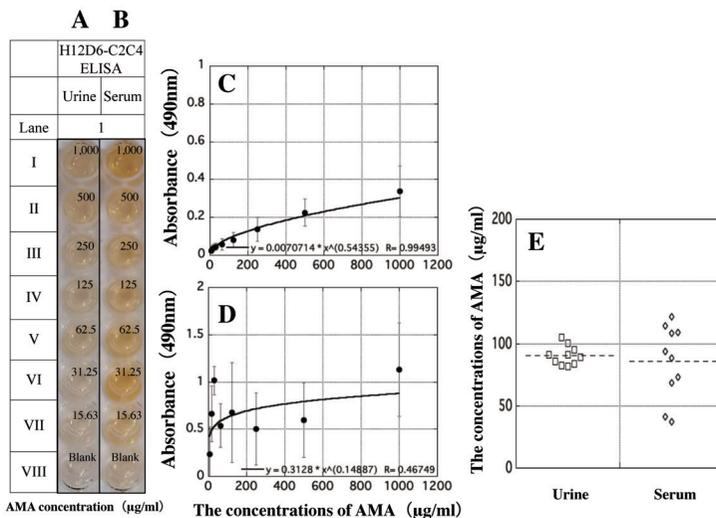


Fig. 6 Reconstruction of calibration curves to improve accuracy of H12D6-C2C4 ELISA AMA quantification in urine and serum

To adjust for interfering substances present in urine and serum, new calibration curves were constructed (as already described for PBS) for urine (A) and serum (B), based on seven serial two-fold dilutions of AMA (1,000-15.63 $\mu\text{g/mL}$; rows I-VII), using each biological matrix type as the diluent. Equal volumes of each diluent were used as blanks (row VIII). Resultant calibration curves for urine and serum are provided in panels C and D, respectively. Blank-subtracted absorbance means \pm standard deviations were plotted. In these graphs, the x-axis indicates AMA concentration (15.63-1,000 $\mu\text{g/mL}$) and the y-axis indicates absorbance at 490 nm. Spearman's rank correlation formula and the resulting correlation coefficients (R-values) are indicated on each graph. Here, an excellent correlation ($R = 0.995$) was obtained for urine, but that for serum ($R = 0.467$) indicates only moderate correlation. Reproducibility of H12D6-C2C4 ELISA AMA quantification in urine and serum was re-evaluated using the new calibration curves, via ten simultaneous measurements of AMA concentration (100 $\mu\text{g/mL}$) within these biological matrices (as already described) (E). In each graph, the x-axis indicates biological matrix (urine: squares, serum: diamonds) and the y-axis indicates AMA concentration ($\mu\text{g/mL}$). Dotted lines indicate the average of measurements. The average of measured AMA values relatively reflects actual AMA concentration in both biological matrices, although measurements remain somewhat inconsistent within serum.

属のキノコ各5種 (OS1~5) の傘、柄、およびツボから得られた抽出液中AMA濃度を、H12D6-C2C4 ELISAを用いて測定した。ドクツルタケは、抽出液を50倍希釈した検体において検量線内に収まる適度な発色を得た (Fig. 7B)。また、ドクツルタケ以外のキノコ5種は抽出液を検体として用いた際に全く発色を示さなかった (Fig. 7C)。吸光度を検量線に当てはめキノコ1g当たりのAMA濃度を算出したところ、ドクツルタケの傘で平均5,232 $\mu\text{g/mL/g}$ 、柄で平均2,531 $\mu\text{g/mL/g}$ 、ツボで平均2,563 $\mu\text{g/mL/g}$ のAMAが検出された (Fig. 7D)。さらに、これらの結果に各部位の抽出液量 (mL) と重量 (g) を乗じて、部位ごとのAMA含有量を概算したところ、ドクツルタケは傘で平均2,126 μg 、柄で平均939 μg 、ツボで平均852 μg のAMAを含むことが分かった (Fig. 7E)。

5. Meixner試験によるAMAの検出性能の評価

我々が構築したELISAの性能を、既存の

AMA検出法であるMeixner試験と比較した。PBS、尿、血清を用いてAMA濃度を200 $\mu\text{g/mL}$ に調製した検体を用いてMeixner試験を実施した場合、それらは全て陽性であった (Fig. 8A)。また、本試験において、AV1~5の抽出液を検体とした場合は全て陽性であり、一方で、OS1~5の抽出液を検体とした場合では全て陰性であった (Fig. 8B)。次に、PBS、尿、血清で調製した5段階のAMA希釈系列 (12.5~200 $\mu\text{g/mL}$) に対して、Meixner試験を実施した。結果、検体内AMA濃度が100 $\mu\text{g/mL}$ 以上の場合を陽性と判断した (Fig. 8C、赤枠内の結果を陽性と判定)。さらに100 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度を詳細に検証するため、PBS、尿、血清で調製した6段階のAMA希釈系列 (20~100 $\mu\text{g/mL}$) に対して、本試験を実施した。この時、AMA濃度が80 $\mu\text{g/mL}$ 以上の場合を陽性と判断した (Fig. 8D、青枠内の結果を陽性と判定)。

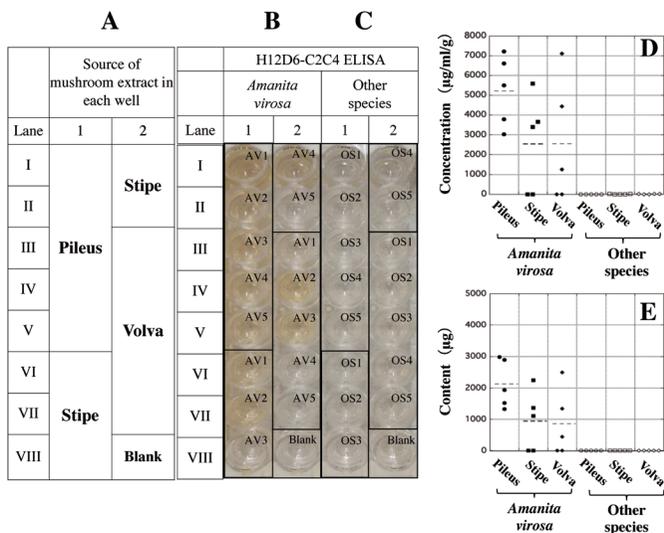


Fig. 7 Using the novel H12D6-C2C4 ELISA to quantify AMA concentration in mushroom extracts

Extracts of each mushroom anatomical part (pileus, stipe, and volva) were prepared from *Amanita virosa* (AV1-5) and other species (OS1-5, see Materials and Methods). The volva of OS-5 were sampled from the lowest part of the stipe (approximately 5 cm). Which wells correspond to which extracts are indicated in panel A, including blanks (10 mM PBS; lane 2, row VIII). The ELISA, colorimetry, and calculations were performed to quantify AMA in extracts of *A. virosa* (B) and other species (C) (as already described), repeating each experiment in quintuplicate. Measured AMA concentrations (D) and total content (E) indicate the presence of AMA in *A. virosa* (with the highest levels in pileus extracts), but not in other tested species. In these graphs, the x-axis indicates extract type (pileus, stipe, or volva) of *A. virosa* (closed circle, square, and diamond, respectively) or other species (open circle, square, and diamond, respectively), and the y-axis indicates AMA concentration ($\mu\text{g/mL/g}$) or content (μg). Dotted lines indicate the average of measurements.

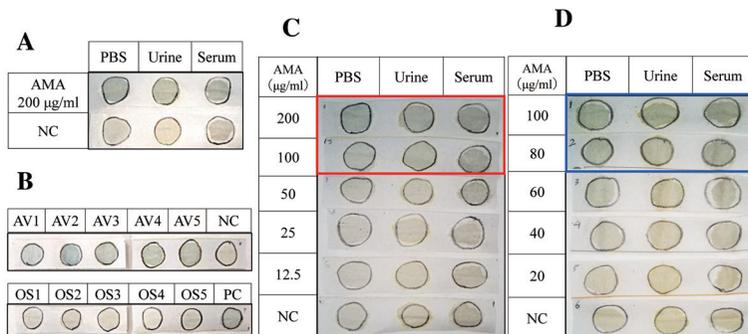


Fig. 8 Validating performance of the H12D6-C2C4 ELISA by comparison with the current AMA detection method (Meixner test)

Performance of the H12D6-C2C4 ELISA was compared to that of the Meixner test. All experiments were performed in triplicate. First, the Meixner test was applied to 10 mM PBS, urine, and serum (Panel A) containing AMA at a concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$ (upper row) or 0 $\mu\text{g/mL}$ (lower row; NC: negative control). Next, the Meixner test was applied to extracts of AV1-5 (Panel B, upper row) and OS1-5 (Panel B, lower row), including an NC consisting of an equivalent volume of 10 mM PBS and a positive control (PC) consisting of 200 $\mu\text{g/mL}$ AMA in an equivalent volume of 10 mM PBS. Finally, the Meixner test was applied to two sets of five two-fold serial dilutions of AMA (200-12.5 $\mu\text{g/mL}$ (Panel C) and 100-20 $\mu\text{g/mL}$ (Panel D)) in 10 mM PBS (left), urine (center), and serum (right), including appropriate NCs. The red and blue frames indicate positive reactions.

IV. 考察

本研究ではAMA濃度の測定に有用なELISAの構築を目的とした。一次、二次抗体におけるmAbの組み合わせを変え6種類のELISAを構築したところ、どの測定系でも概ねAMA濃度に応じた発色反応が得られた。ここで用いた3種類のmAbは全てマウス由来IgG2aタイプのモノクローナル抗体である。そのため、クローン種ごとの感度と特異性の違いが結果の差に繋がると考えられた。そこで、これらELISAの検量線を作成し、吸光度と濃度の関係を表すR値を比較した。その際、最もAMA濃度と吸光度の相関性に優れたH12D6-C2C4 ELISAが、測定系として最良と思われた。また、本ELISAにおいて、AMA濃度の測定可能範囲は1.953~1,000 $\mu\text{g/mL}$ と推定される。既存のAMA検出法と比較すると、Meixner試験では最小検出濃度が約200 $\mu\text{g/mL}$ と報告されており^{8,9)}、本ELISAはこれ以上に高感度と思われた。実際にMeixner試験を行い検証したところ、本試験の最小検出濃度は100 $\mu\text{g/mL}$ 、甘く見積もっても80 $\mu\text{g/mL}$ と推定された。H12D6-C2C4 ELISAの検出限界1.953 $\mu\text{g/mL}$ はMeixner試験の結果と比較すると、本

ELISAが40倍以上の感度を有し、検出性能で大きく勝ると思われた。

医療現場での応用を想定した場合、尿や血清に含まれるAMAを検出できることが重要である。それら試料にAMAを溶解し100 $\mu\text{g/mL}$ としたものを10回測定した場合、尿中AMAで実際の半分程度の濃度、血清中AMAで約5倍もの濃度に算出されたことは問題と考える。なお、尿中に含まれる尿素はタンパク質変性剤として機能することが報告されている¹⁶⁾。そのため、尿素がプレートに結合した一次抗体を変性させることが、尿を検体に用いた場合の全体的な吸光度の低下に繋がったと考えられる。これを改善するためには尿素の除去処理が必要であると思われる。一方で、血清内には様々な成分が含まれており、これらが抗原抗体反応に大きな影響を与えると予想する。特に、総タンパク量の6割程度を占めるアルブミンが抗体へ非特異的に結合することで、偽陽性反応を生じる原因になると推察された。あるいは、血清自体に含まれる免疫グロブリンがELISAプレートと疎水性に結合し、HRP標識二次抗体がそれに結合することで発色反応が増強されることも考えられた¹⁷⁾。これを回避するためには血清に除タンパク処理

を施すことや、血清自体を十分に希釈する必要があるが、AMAの検出がより困難となることも予想される。そこで我々は、検量線用のAMA希釈系列を尿および血清を用いて調製することで干渉成分の影響をある程度補正できると考えた。結果、尿で調製したAMA希釈系列では低感度であるものの、良好な検量線を作成することが出来たと考える。このことから、一次抗体は尿素が有するタンパク質変性作用の影響を確かに受けるが、抗原との結合能を完全に失うものではないと予想される。即ち、一次抗体とAMAとの結合力は弱まったが、AMA濃度を上げればある程度は結合するために、このような結果になったと推測した。一方、血清で調製したAMA希釈系列の測定結果はばらつきが大きく、検量線として不良と思われた。これは、先にも述べたように、血清中の成分が多種多様であることが原因として挙げられる。血清中の免疫グロブリンやその他の成分がELISAプレートや一次抗体に結合することで、その後の反応にも影響すると思われた。やはり、検体中の成分が多いほど不確定要素も多く、結果のばらつきが大きくなる可能性が高いと考える。また、尿および血清で100 μ g/mLに調製したAMAをこれら検量線に当てはめて濃度換算した。結果、尿で調製したAMA希釈系列による検量線を用いた場合、尿中AMAの平均値は実際の濃度に近似した。一方、血清で調製したAMA希釈系列を用いた検量線に当てはめた場合、血清中AMAの平均値は実際の値に近づいたが、CVおよびRecoveryは依然不良であった。なお、本ELISAにおける尿中AMAの測定可能濃度は15.63~1,000 μ g/mL程度と考えられる。ドクツルタケの摂食が原因の食中毒患者において、尿中AMA濃度は高くとも数百ng/mLであるため¹⁸⁾、本ELISAを適応するには検体を濃縮する必要があると思われた。一方、LC-MSではAMA濃度が1ng/mL未満でも検出が可能であり¹³⁾、これらとの比較では本ELISAの感度が劣る結果となった。

次に、キノコの成分抽出液内のAMA濃度をH12D6-C2C4 ELISAで測定した。結果、ドクツルタケは傘の部分に最もAMAが多く、柄とツボでもある程度AMAが検出された。本ELISAを用いた場合、ドクツルタケのAMA総量は、

各部位の平均値を足し合わせると3.92mgと概算できる。通常、ドクツルタケ1本には5~15mgのAMAが含まれるため^{3,4)}、この結果はやや低い値と思われる。しかし、キノコ中のAMAが全て抽出液に溶出されることは無く、抽出過程における成分の損失もあることから、概ね妥当な測定値が得られていると考える。何より、ドクツルタケ以外のキノコの抽出液からは殆どAMAは検出されなかった。なお、ヘビキノコモドキに関してはアマトキシシキ類を有するという報告があるが¹⁹⁾、今回の実験に用いた検体からはAMAが検出できなかった。これはヘビキノコモドキにおいてAMA含有量が少ないか、元々がAMAを殆ど有していない個体の可能性が考えられた。一方で、キノコの抽出液を検体とする場合、本ELISAは非特異的発色、即ち偽陽性反応が殆ど認められず、これはH12D6-C2C4 ELISAの測定精度が高いことを強く示唆している。

なお、AMAに対する既存のELISA製品は非常に少ない。例としてBÜHLMANN社の製品が存在するが²⁰⁾、この製品はポリクローナル抗体を用いており、AMA以外の物質とも反応し易い点が問題である。H12D6-C2C4 ELISAの短所は、測定に2~3時間程度を要すること、AMAに対するmAbが高額であることが挙げられる。一方、長所は1プレートで96の検体が同時に測定可能であること、操作が簡便であり、発色の程度でAMA濃度が分かるため結果の解釈が容易であること、である。なお、本ELISAの有用性は検体に大きく依存する。即ち、血清を検体とした場合には、AMAの有無に関わらず発色が認められるため、結果を信用するべきではない。一方、尿を検体とした際には発色が抑制されるが、これは検量線作成用のAMA希釈系列を尿で調製することで、低感度であるものの測定が可能である。なお、尿および血清に関しては、前処理や希釈を適切に行うことで測定結果が改善する可能性がある。また、キノコの抽出液を検体として用いた場合もAMAが含まれていれば明瞭な発色を示すが、キノコ成分の抽出法に結果が左右されると思われる。即ち、本ELISAでAMAが検出されない場合でも、そのキノコがAMAを含有しないとは限らないことは注意すべきである。しかし、分類学的な種の

同定やMeixner試験等を併用して本法を用いることで、中毒原因のキノコ種の特異性や、毒成分の推定が可能と考える。今後は、AMA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検証すると共に、検体の前処理法も含めた手順書の作成に取り組む予定である。また、AMAに対するmAbを利用した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AMA測定法の開発を目指す。

V. 結語

本研究において構築したH12D6-C2C4 ELISAは、尿やキノコの抽出液を検体とした場合に効果的で、医療現場での活用やキノコの分析手法として一定の有用性がある。

VI. 謝辞

本研究は、生産開発科学研究所第7回生化学術奨励資金および公益財団法人ひと・健康・未来研究財団研究助成の援助を受け実施しました。厚く御礼申し上げます。

本論文内容に関連する著者らの利益相反：なし

文献

- 1) 登田美桜, 畝山智香子, 豊福 肇, 森川 馨: わが国における自然毒による食中毒事例の傾向 (平成元年~22年). 食衛誌. 53: 105-120, 2012.
- 2) 福内史子, 飛田美穂, 佐藤 威, 猪口貞樹, 澤田裕介: 毒キノコ(ドクツルタケ)中毒により急性腎不全をきたした1症例. 透析会誌. 28: 1455-60, 1995.
- 3) 戸崎洋子: 自然毒 キノコ. 救急医学. 12: 1551-1559, 1988.
- 4) 吉田省造, 岡田英志, 土井智章, 中島靖浩, 鈴木浩大, 田中 卓, 福田哲也, 北川雄一郎, 安田 立, 水野洋佑, 宮崎 渚, 森下健太郎, 牛越博昭, 竹村元三, 白井邦博, 豊田 泉, 小倉真治: ドクツルタケ中毒による昏睡型急性肝不全に対し急性血液浄化療法を併用し救命しえた1症例. 透析会誌. 48: 129-135, 2015.
- 5) Mitchel DH: Amanita mushroom poisoning. Annu Rev Med. 31: 51-57, 1980.
- 6) Floersheim GL: Treatment of human amatoxin mushroom poisoning. Myths and advances in therapy. Med Toxicol. 2: 1-9, 1987.
- 7) Vetter J: Toxins of Amanita phalloides. Toxicol. 36: 13-24, 1998.
- 8) 水谷太郎: アマニタ毒群. 中毒研究. 4: 233-8, 1991.
- 9) 上條吉人: ドクツルタケ類 (コレラ様症状型毒キノコ). 臨床中毒学 第1版. p453-458, 医学書院, 東京, 2009.
- 10) Beuhler M, Lee DC, Gerkin R: The Meixner test in the detection of alpha-amanitin and false-positive reactions caused by psilocin and 5-substituted tryptamines. Ann Emerg Med. 44: 114-120, 2004.
- 11) Jehl F, Gallion C, Birckel P, Jaeger A, Flesch F, Minck R: Determination of alpha-amanitin and beta-amanitin in human biological fluids by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem. 149: 35-42, 1985.
- 12) Pastorello L, Tolentino D, Alterio M, Paladino R, Frigerio A, Bergamo N, Valli A: Determination of alpha-amanitin by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr. 233: 398-403, 1982.
- 13) Abbott NL, Hill KL, Garrett A, Carter MD, Hamelin EI, Johnson RC: Detection of α -, β -, and γ -amanitin in urine by LC-MS/MS using 15N10- α -amanitin as the internal standard. Toxicol. 152: 71-77, 2018.
- 14) 今関六也, 本郷次雄 (編): テングタケ科. 原色日本新菌類図鑑I. p115-135, 保育社, 大阪, 1987.
- 15) Belanger L, Sylvestre C, Dufour D: Enzyme-linked immunoassay for alpha-fetoprotein by competitive and sandwich procedures. Clin Chem Acta. 48: 15-18, 1973.
- 16) Song MF, Li YS, Ootsuyama Y, Kasai H, Kawai K, Ohta M, Eguchi Y, Yamato H, Matsumoto Y, Yoshida R, Ogawa Y: Urea, the most abundant component in urine, cross-reacts with a commercial 8-OH-dG ELISA kit and contributes to overestimation of urinary 8-OH-dG. Free Radic Biol Med. 47: 41-46, 2009.
- 17) Terato K, Do CT, Cutler D, Waritani T, Shionoya H: Preventing intense false positive and negative reactions attributed to the principle of ELISA to re-investigate antibody studies in autoimmune diseases. J Immunol Methods. 407: 15-25, 2014
- 18) Butera R, Locatelli C, Coccini T, Manzo L: Diagnostic accuracy of urinary amanitin in suspected mushroom poisoning: a pilot study. J Toxicol Clin Toxicol. 42: 901-912, 2004
- 19) 大作晃一, 吹春俊光, 吹春公子: ヘビキノコモドキ. 持ち歩き図鑑 おいしいきのこ 毒きのこ. p272-273, 主婦の友社, 東京, 2011.
- 20) AMANITIN Product Information in BÜHLMANN laboratories AG Home Page <https://www.buhlmann-labs.ch/products-solutions/special-products/amanitin/> (2020年10月12日参照)