

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

# 目 次

課題番号			
2.0000970A 31015	結核菌の迅速薬剤感受性試験法の開発	山崎 利雄	1
971A 31028	バイオテクノロジーを用いた薬物代謝酵素の特性解析と医薬品の適正使用化に関する研究	頭金 正博	9
972A 31064	感染症予防効果のある糖鎖を付加した多機能食用難消化性多糖類の開発とその有効性及び安全性を評価する方法の開発	小西 良子	23
973A 31065	食中毒細菌の検出方法の開発と評価	山本 茂貴	29
974A 31093	リポソームを用いた遺伝子導入法の開発、その有効性、安全性に関する研究	北川 隆之	39
975A 31112	ラット初代培養肝細胞を用いる毒性評価系の確立	四宮 貴久	47
977A 31219	生殖細胞系列の完全連続培養系の開発	佐藤 英明	52
978A 31238	精巣細胞各種分化系列を標識する抗体の作成と精巣障害解析の技術基盤の整備	井上 達	55
979A 31239	加速試験で評価できない製剤機能の安定性評価に関する研究	吉岡 澄江	66
980A 31240	新開発食品の食品化学的特性の解析と評価に関する研究	豊田 正武	74
981A 31242	糖タンパク質及び糖鎖関連物質の糖鎖の機能及び構造解析と品質等評価技術の開発	早川 堯夫	83
982A 31244	食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性の評価・試験方法に関する研究	米谷 民雄	93
983A 31249	遺伝子改変テスターを用いる第二世代変異原性試験法の開発	能美 健彦	102
984A 31266	培養細胞を用いたインビトロ発熱性物質試験法の開発に関する研究	村井 敏美	108
985A 31267	薬物代謝活性の多型性とハイリスク患者における薬物評価に関する研究	大野 泰雄	116
2.0000976A 32146	トランスポーター遺伝子発現細胞を用いた薬物吸収・分布・排泄動態評価系の開発	辻 彰	126

## 感染症予防効果のある糖鎖を付加した多機能食用難消化性多糖類の開発とその有効性及び安全性を評価する方法の開発

所属 国立感染症研究所 食品衛生微生物部  
研究者 小西 良子

### 分担研究者

- (1) 太陽化学株式会社NF 事業部 研究開発 阪中専二
- (2) 国立予防衛生研究所細胞化学部 天野 富美夫

### 要旨

本年度は、オリゴ糖—食用難消化性多糖類コンジュゲイトを作成し、感染症起因菌の腸管細胞への吸着に対して阻害活性およびマウスを用いた感染実験において感染予防効果を評価した。また、腸管滞留時間をオリゴ糖だけの場合と比較検討した。安全性を評価した結果食用難消化性多糖類としてデキストランを用いたコンジュゲイトでは免疫毒性が低いことが明らかになった。

### 1. 研究目的

腸管出血性大腸菌や サルモネラ、コレラ、ロタウイルスなど、腸管を經由して感染しヒトに重篤な症状を起こす腸管感染症が近年増加している。しかし、これらの感染症に対するワクチンの開発は遅れており、その安全性に関しても問題がある。さらに抗生物質の乱用は耐性菌の出現が懸念されその使用は制限されつつある。そこで、安全性の極めて高くかつ腸管感染症に対して予防効果の高い多機能食用難消化性多糖類の開発ならびにその有効性・安全性の評価方法の確立は、急務と考えられる。近年の糖鎖に関する目覚ましい研究の発展から、感染性細菌、細菌毒素や virus が生体に感染するさいには、特定の糖鎖が関与していることが明らかになってきた。そしてこれらの糖鎖に対する病原微生物などの糖鎖認識能を利用して、感染症予防薬や医療等への応用も考えられている。本研究の目的は、病原微生物などが認識する糖鎖のうち複数を食用難消化性多糖類に人工的に付加して、感染予防効果をもつ食用難消化性多糖類を創製することである。

腸管出血性大腸菌や サルモネラ、コレラ、ロタウイルスなど、腸管を經由して感染しヒトに重篤な症状を起こす腸管感染症が近年増加している。しかし、これらの感染症に対するワクチンの開発は遅れており、その安全性に関しても問題がある。さらに抗生物質の乱用は耐性菌の出現が懸念されその使用は制限されつつある。そこで、安全性の極めて高くかつ腸管感染症に対して予防効果の高い多機能食用難消化性多糖類の開発ならびにその有効性・安全性の評価方法の確立は、急務と考えられる。近年の糖鎖に関する目覚ましい研究の発展から、感染性細菌、細菌毒素や virus が生体に感染するさいには、特定の糖鎖が関与していることが明らかになってきた。そしてこれらの糖鎖に対する病原微生物などの糖鎖認識能を利用して、感染症予防薬や医療等への応用も考えられている。本研究の目的は、病原微生物などが認識する糖鎖のうち複数を食用難消化性多糖類に人工的に付加して、感染予防効果をもつ食用難消化性多糖類を創製することである。

### 2. 研究方法

#### 1) オリゴ糖—ペプチドの作成

卵黄シアリルオリゴ糖ペプチド (SGP) は初年度報告した方法により作成した。脱シアリル化SGP

(Asialo-SGP) の作成はノイラミダーゼを用いた常法により行った。

## 2) オリゴ糖—食用難消化性多糖類コンジュゲイトの作成

食用難消化性多糖類としてデキストラン (分子量 50 万以上) およびセルロース (分子量 10 万以上) を用いた。これら食用難消化性多糖類は 15% モノクロロ酢酸を用いる方法によりカルボメチル化 (CM 化) を行った。食用難消化性多糖類と結合するオリゴ糖としてはシアリルオリゴ糖ペプチド (SGP) およびアシアロオリゴ糖ペプチド (Asialo SGP) を用いた。CM 化デキストランおよび CM 化セルロースは水溶性カルボジイミドにより共有結合させた。水溶性カルボジイミドには 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロカル) カルボジイミド (EDC) を用いた。シアリルオリゴ糖ペプチド (SGP) のアミノ基と CM 化デキストラン、CM 化セルロースおよび EDC のカルボキシル基の結合モル比は、SGP—デキストランおよび SGP—セルロース中に含まれるシアル酸の濃度から換算した。

## 3) ヒト腸管培養細胞を用いた腸管感染症起因菌接着阻害実験

腸管感染症起因菌としてはサルモネラ・エンテリティディス (SE)、下痢原性大腸菌 K-88 (E.coli) を用いた。SGP—デキストラン、SGP—セルロースおよび Asialo SGP—セルロースは、上記の方法で作成したものを使用した。ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 細胞は、コラーゲン処理した 24 well プレート (Coster 社) 上に単層培養したものを用いた。SGP—デキストラン、SGP—セルロースおよび Asialo SGP—セルロースは、シアル酸の濃度に換算して 100  $\mu$ M、1mM の濃度で調整し、Caco-2 細胞の apical 側より添加し 60 分インキュベートした。前培養した SE および E.coli を  $10^6$ - $10^7$ /well に調整し apical 側より加え、4°C 60 分インキュベートした。付着しなかった菌を PBS で洗浄後、0.1% triton X を含む PBS により細胞を破壊し段階希釈したのち tryptic soybean agar (TSA) にまき、一晚インキュベートしコロニーを測定した。

## 4) 放射性ヨウ素標識オリゴ糖 (SGP) およびカーボン標識 SGP—セルロースの作成

SGP は  $^{125}$ I を用いて常法により標識を行った。カーボン標識 SGP—セルロースはカーボン標識セルロースを用いて SGP を 1) の方法で結合させ作成した。

## 3) 放射性標識 SGP および SGP—セルロースの腸管内動態

マウスは、6 週齢 Balb/c のオスを用いた。 $^{125}$ I—SGP および  $^{14}$ C—SGP—セルロースを経口的にマウスに強制投与し、0、24、48、72 時間後に糞を集め  $^{125}$ I はガンマカウンターにより、 $^{14}$ C はサンプルオキシダイザーにより放射活性を測定した。

## 5) マウスを用いたサルモネラ・エンテリティディス感染実験

マウスは、6 週齢 Balb/c のオスを用いた。SE を経口感染させる 1 日前から蒸留水に SGP—セルロースを 0.1% の濃度に溶解して調整した飲水を与えた。 $1 \times 10^6$ /mouse の SE を胃ゾンデを用いて強制感染させ 2、4、6、9 日後の腸管リンパ節中の菌数を測定した。対照としては、蒸留水をあたえたマウスを用いた。

## 6) オリゴ糖—食用難消化性多糖類コンジュゲイトの安全性の評価

マウスマクロファージ系細胞株 J774.1 細胞に 100  $\mu$ M SGP、SGP—セルロース、SGP—デキストランを 0.1% 添加し、さらに 0.5mg/ml Zymosan を添加して 37°C、20 時間培養して培養上清中に遊離された TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  を ELISA で、NO $_2^-$  を Griess 試薬で検出・定量した。

## 3. 研究成果

CM 化デキストランおよびセルロースへの SGP の結合モル比は、それぞれ 12 対 1、20 対 1 であった。以下の実験はこの SGP—デキストランおよび SGP—セルロースを用いて行った。

Caco-2 cell を用いて腸管感染症起因菌接着阻害効果を調べた結果、SGP—デキストランでは SGP よりも強く SE の Caco-2 cell への接着を阻害していたことがわかった。さらにこの効果は濃度的に広範囲に見られた。SGP を結合させていない CM 化デキストランでは接着阻害は認められなかった。E.coli の Caco-2 cell への接着阻害は SGP のみでは認められなかったが、SGP—デキストランでは認められた (Fig.1)。これは SGP のみでは発現されなかったあたらしい阻害活性がコンジュゲイトになることによって生まれた可能性を示唆している。SGP—セルロースを用いた接着阻害実験では SGP 程強くはなかったが SE に対して阻害活性が

認められた。E.coli の接着阻害は SGP のみでは認められなかったが SGP-セルロースは強い阻害活性を示した。脱アシル化 SGP を結合させたセルロースにおいては、いずれの菌に対しても SGP-セルロースより低い接着阻害を示した(Fig.2)。

SGP-セルロースの腸管滞留時間を放射活性により測定した。Fig.3 で示されるように SGP は摂取後24時間をピークに糞中から検出されなくなった。一方 SGP-セルロースは摂取後24時間目から徐々にふえはじめ72時間目までも増加していた。このことから、SGP-セルロースは摂取後糞となって長時間かけて排出されることが示唆された。摂取後72時間目の盲腸内の放射活性は SGP のみ摂取した場合と比較して SGP-セルロースは高い活性を示した。これらのことは SGP-セルロースでは腸管滞留時間が SGP のみにくらべて有意に長くなったことを示唆している。

マウスを用いたサルモネラ・エンテリティディス感染実験では、Fig.5 に示されるようにコントロールでは感染後6日目から腸管リンパ節にその菌体が検出され9日後にはその菌数の増加が観察された。しかし SGP-セルロースをあらかじめ摂取させた場合では感染後6日目には菌が出現し始めるが9日には明らかに減少傾向を示した。これは SGP-セルロースの経口投与により、サルモネラ・エンテリティディスの経口感染を予防できる可能性を示唆している。

オリゴ糖—食用難消化性多糖類コンジュゲイトの安全性の評価はマクロファージの毒性を指標におこなった。TNF $\alpha$  産生は各試薬単独では添加効果がなかったが、Zymosan による TNF $\alpha$  の産生増加が SGP によって阻害され、SGP-デキストラン、SGP-セルロースによって更に強く阻害されたが、これらは担体として用いたデキストランあるいはセルロースによる阻害を反映したと考えられる。一方、IL-1 $\beta$  産生は+/Zymosan とも SGP、SGP-デキストランの影響がなかったが、SGP-セルロースは促進した。さらに、NO $_2$ -産生は+/Zymosan ともに SGP は影響を及ぼさず、SGP-デキストランは強い阻害を示したものの、これはデキストラン担体による阻害を反映したものと思われる。なお、セルロースおよび SGP-セルロースは NO $_2$ -の検出系に干渉し、定量が不可能であった(Fig.6)。

#### 4. 考察

食用難消化性多糖類に付加的価値をつけ、食品成分として利用することは多くの研究者が試みている。本研究ではその付加価値を腸管感染症に対する予防効果とし、腸管感染症起因菌の腸管への接着を特異的に抑制するオリゴ糖を検討し選択した。オリゴ糖はそのままでは多糖類に結合しないことからアミノ基を含む糖ペプチドとした。多糖類はカルボメチル化して糖ペプチドのアミノ基と反応させた。この反応によって10万から50万の分子量をもつ多糖類1分子につき12から20分子のオリゴ糖が付加されたオリゴ糖—食用難消化性多糖類コンジュゲイトが創製された。このコンジュゲイトの機能としては腸管に長時間滞留し、腸管感染症起因菌と結合して体内に速やかに排出させることによる感染予防効果が期待される。腸管に長時間滞留するかは放射性標識を用いた体内動態の実験によりオリゴ糖単独より有意に腸管に留まることが確認された。感染予防効果の有効性はヒト腸管培養細胞を用いた菌の接着阻害効果およびマウスを用いたサルモネラ感染実験によって検討した結果、サルモネラ・エンテリティディスに対しては *in vitro* 系、*in vivo* 系の両方でその有効性が示された。E.coli に対してはヒト腸管細胞への菌の接着を有意に阻害することがあきらかになり生体においてもこの有効性が期待される。本研究によって創製されたオリゴ糖—食用難消化性多糖類コンジュゲイトは、安全性の高い感染予防化合物として食品または飼料に添加することにより、か腸管感染症の発症を抑えることが期待される。

#### 5. 結論

すでに腸管感染症起因菌の接着阻害効果が明らかにされているオリゴ糖を食用難消化性多糖類であるデキストランおよびセルロースにつけることによってその腸管滞留性の向上を試みた。その結果、オリゴ糖—食用難消化性多糖類 コンジュゲイトは、その感染予防効果は保ったまま腸管滞留時間を延長させることに成功した。また、オリゴ糖だけでは感染予防効果のなかった菌種に対しても新たに予防効果をもつ可能性をヒト腸管培養細胞を用いた接着阻害実験において示した。

6. 研究発表

- 1) Sugita-Konishi, Y., Sakanaka, S., Sasaki, K. and Amano, F. Inhibitory effect of sialyloligosaccharide and their derivatives on adhesion of entero-pathogenic bacteria to human intestinal epithelial cells. IN VITRO, 36, 81-A (2000)
- 2) Karahashi, H., Nagata, K., Ishii, K., Amano, F.: A selective inhibitor of p38 MAP kinase, SB202190, induced apoptotic cell death of a lipopolysaccharide (LPS)-treated macrophage-like cell line, J774.1. Biochim. Biophys. Acta, 1502 (2000) 207-223.
- 3) Karahashi, H., Amano, F. : Changes of caspase activities involved in apoptosis of a macrophage-like cell line, J774.1/JA-4 treated with LPS and cycloheximide. Biol. Pharm. Bull., 23 (2000) 140-144.
- 4) Ishii, Y., Sonezaki, S., Iwasaki, Y., Miyata, Y., Akita, K., Kato, Y., Amano, F. : Regulatory role of C-terminal residue of Sula for its degradation by Lon protease in Escherichia coli. J. Biochem. (Tokyo), 127, (2000) 837-844.
- 5) Karahashi, H., Amano, F. : Lipopolysaccharide (LPS)-induced cell death of C3H mouse peritoneal macrophages in the presence of cycloheximide: different susceptibilities of C3H/HeN and C3H/HeJ mice macrophages. J. Endotoxin Res. 6 (2000) 33-39.
- 6) Sakanaka, S., Kitahara, K., Mitsuya T., Gutierrez, M.A. , and Juneja, L.R. : Protein quality of delipidated egg-yolk. J. Food Compos. Ana., 13, 773-781 (2000).
- 7) Sakanaka, S., Juneja, L.R., and Taniguchi, M.,: Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria. J. Biosci. Bioeng., 90, 81-85 (2000)
- 8) Juneja, L.R., Sakanaka, S., and Chu, D-C. , : Physiological and technological functions of partially hydrolysed guar gum (modified galactomannans). In "Advanced dietary fibre technology" Edited by McCleary, B.V. and Prosky, L., pp345-360. Blackwell Science, London (2001)

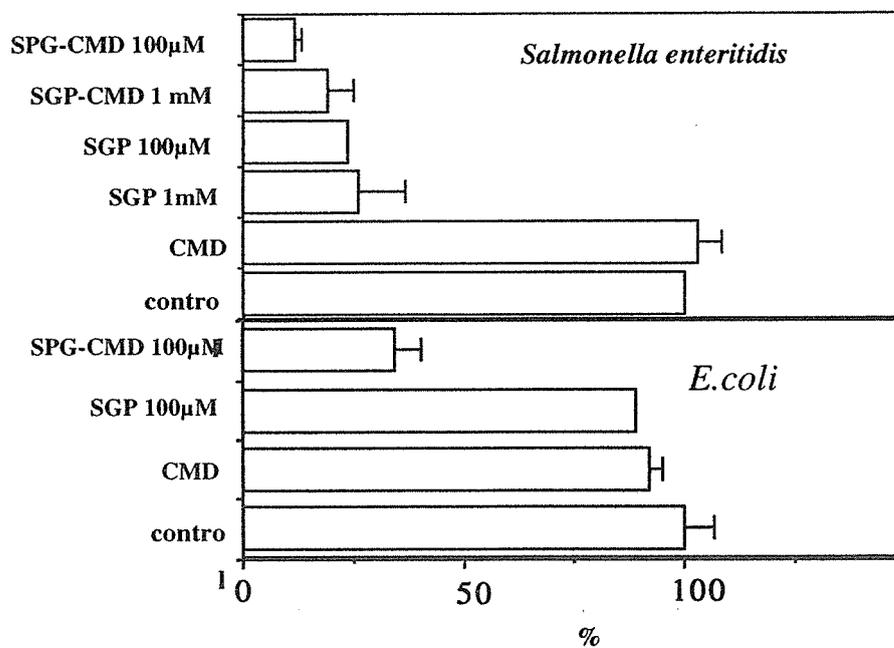


Fig.1 Effect of the oligo-dextran conjugate on binding activity of food-borne bacteria on Caco-2 cells

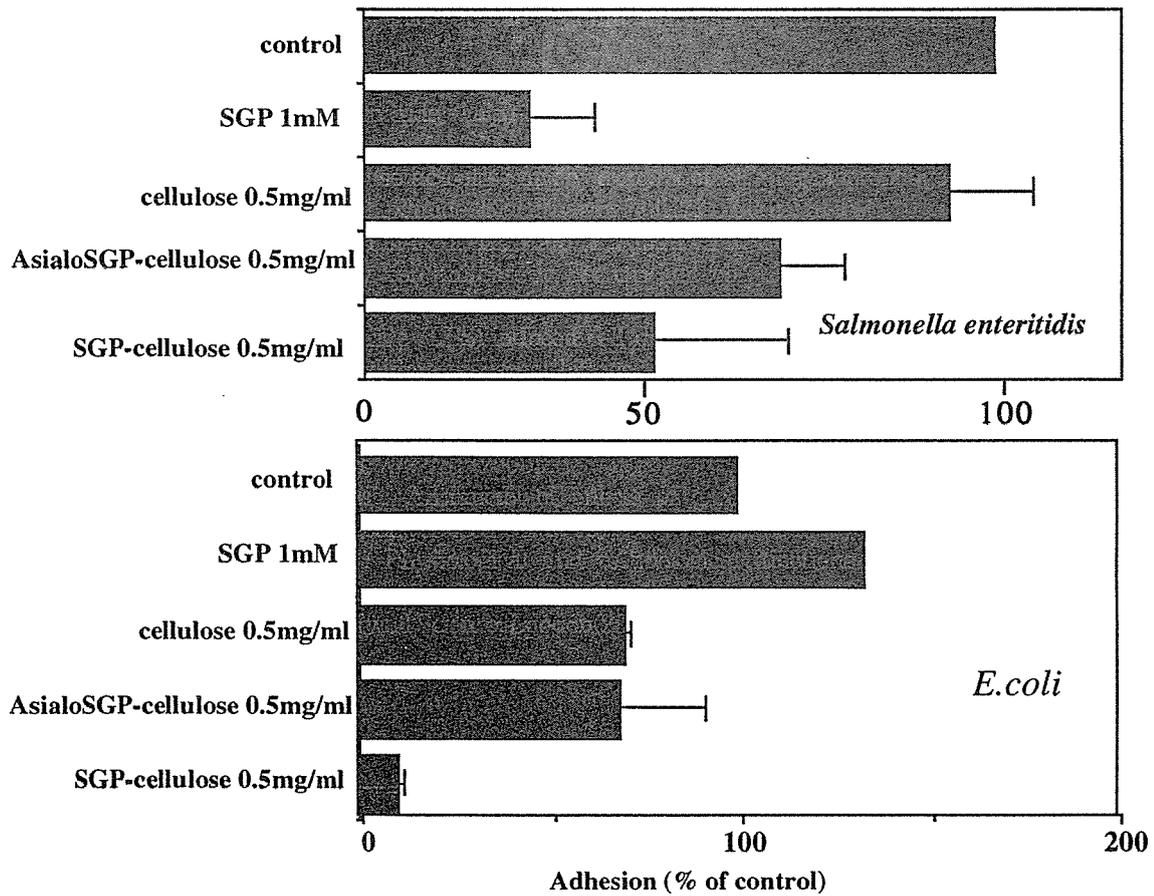


Fig.2 Effect of the oligo-cellulose conjugate on binding activity of food-borne bacteria on Caco-2 cells

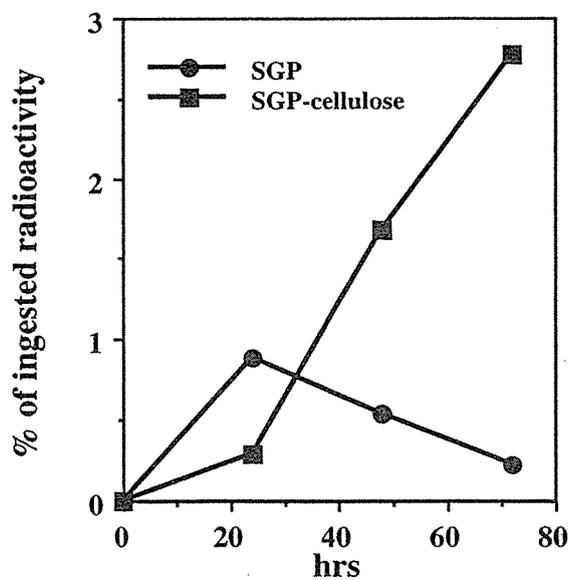


Fig. 3 Changes in concentration of SGP and SGP-cellulose conjugate in feces

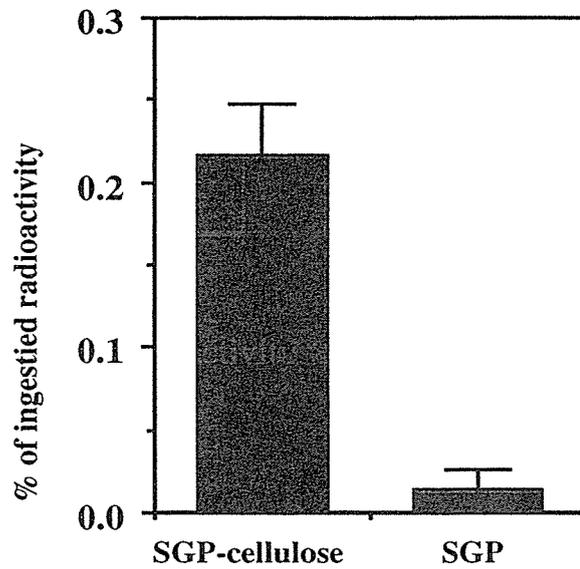


Fig. 4 The residue of radioactivity in cecum at 72 hrs after ingestion

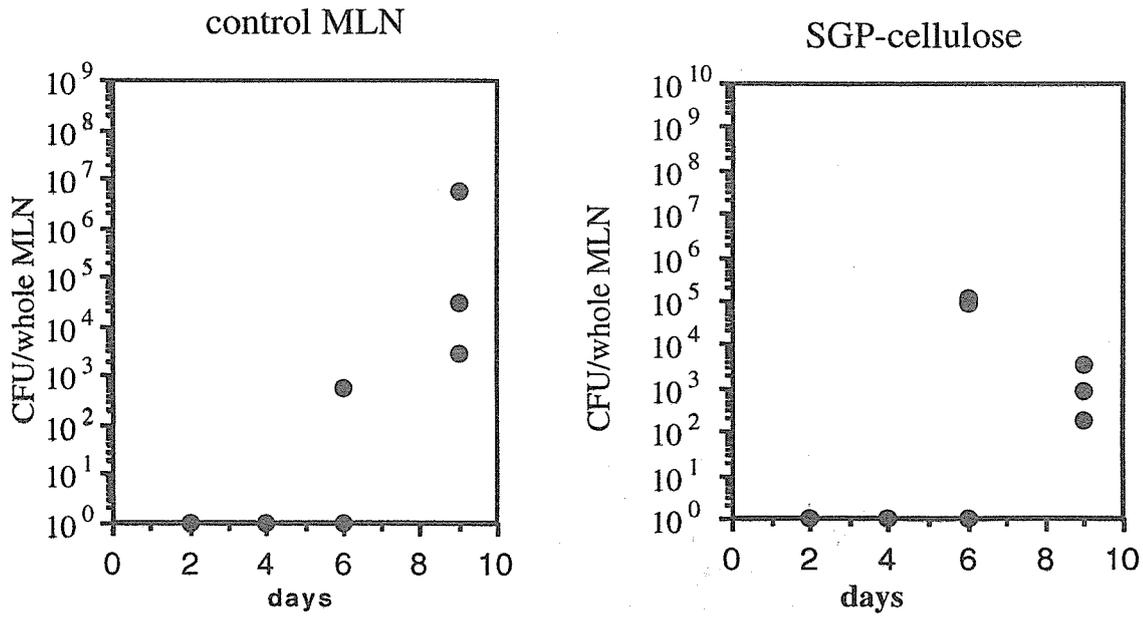


Fig. 5 The bacterial number of *Salmonella enteritidis* in MLN of mice given water with or without SGP-cellulose

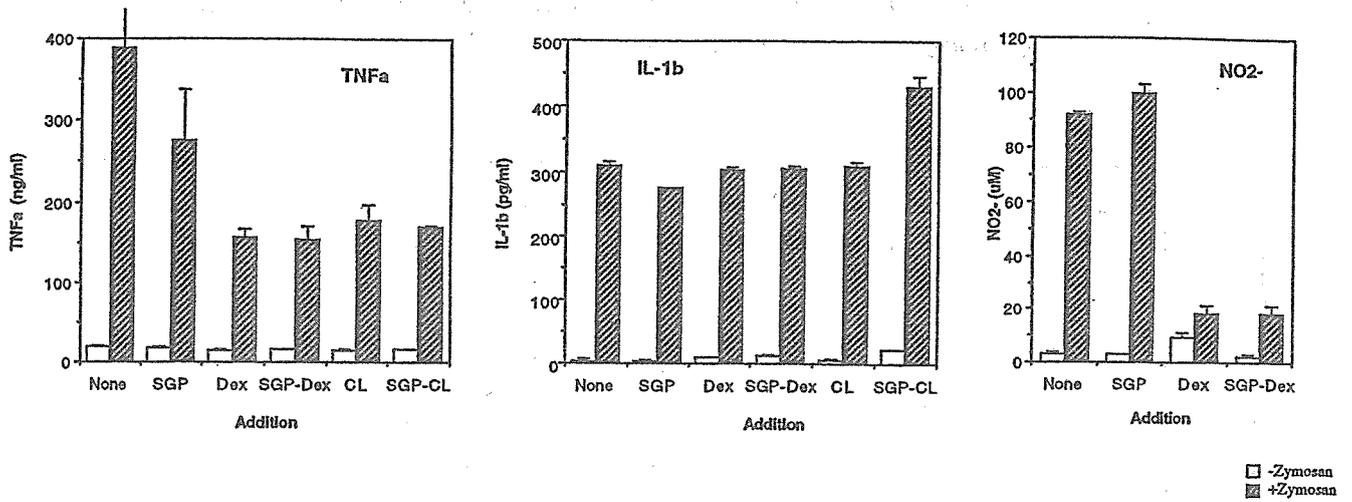


Fig. 6. Effect of SGP-cellulose and SGP-dextran on macrophage with or without zymosan

---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社