

平成15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

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

目 次

第3分野

課題番号

20030917A KH31028	非晶質の特異性を活かしたバイテク薬物および超難溶性薬物の製剤化とその評価	吉岡澄江 …… 1
918A KH31029	ハイ・スループット遺伝毒性試験系の開発	能美健彦 …… 10
919A KH31030	バイオテクノロジー応用医薬品等の評価技術の開発	川崎ナナ …… 18
920A KH31031	医薬品等における汚染菌および汚染菌体成分検出のための正当な評価と新試験法の開発に関する研究	棚元憲一 …… 27
921A KH31032	動物を用いたヒト型薬物代謝酵素誘導能検索法と薬物動態における変動巾を規定する因子に関する研究	大野泰雄 …… 33
922A KH31033	医薬品開発と再生医学への応用を目指した細胞成熟制御法の開発	藤本純一郎 …… 43
923A KH31034	創薬における毒性回避のための戦略：cDNAマイクロアレイ解析による関連分子の探索と毒作用予見技術の確立	井上 達 …… 48
924A KH31035	新機能素材の食品化学的評価と分析に関する研究	合田幸広 …… 58
925A KH31036	医薬品の適性使用に向けたヒト薬物代謝特性の解析・予測支援システムの構築とハイスループット試験系についての研究	頭金正博 …… 67
926A KH31037	多剤併用療法に則した新しい迅速結核菌薬剤感受性試験法の開発	山崎利雄 …… 74
927A KH31038	食中毒菌および毒素のレセプター結合能等を応用した検査法の開発とその評価法の確立	山本茂貴 …… 83
928A KH32081	DNA-カチオン性脂質複合体製剤の保存安定性の評価法に関する研究	阿曾幸男 …… 90

第4分野

929A KH41039	ボツリヌスA～F型神経毒素を用いたジストニア等の治療方法の確立	小熊恵二 …… 97
930A KH41040	小児先天異常症の原因遺伝子の解明と治療法の開発に関する研究	奥山虎之 …… 101
931A KH42074	熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究	名和行文 …… 105
932A KH42075	新生児臨床試験組織の育成と新生児用医薬品開発の科学性・倫理性に関する研究	山崎俊夫 …… 115

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

食中毒菌および毒素のレセプター結合能等を応用した 検査法の開発とその評価法の確立

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
研 究 者 山本 茂貴

分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 小西 良子
- (2) 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 工藤 由起子
- (3) 東京農工大学 農学部 服部 誠
- (4) 栄研化学株式会社 生物化学研究所 池戸 正成
- (5) 太陽化学株式会社 NF事業部研究開発 大久保 勉

研究要旨

糖ペプチドと食中毒菌との特異的結合を利用した新規の食中毒菌検査法を開発する目的で、食中毒菌と特異的に結合する新たな食品成分をダイズタンパク質酵素分解物から探索すると共に、前年度までに確立した鶏卵オボムチン由来糖ペプチドと EHEC O-157:H7 との結合能を利用した検査法を実用化するための基礎実験を行った。その結果、ダイズタンパク質由来の糖ペプチドは EHEC O-157:H7 と *Salmonella enteritidis* に結合することが認められた。実用化に関する基礎実験結果から、オボムチン由来糖ペプチドと EHEC O-157:H7 との結合能は pH3.0-pH9.0 および塩濃度 0.14-1.0M まで保持されていることが示され、使用可能の条件が免疫ビーズ法より広いことが明らかになった。また、この結合能を阻害する食品成分は果実類、野菜類では認められず、ほとんどの食品腐敗菌も糖ペプチドと EHEC O-157:H7 の結合を阻害しなかった。さらに結合した菌の検出法として直接蛍光染色法と Lamp 法を検討したが、いずれもこの検査法に適応可能であることが示された。

A.研究目的

食中毒菌の検査法としては、特異抗体を用いる免疫ビーズ法が一般的に行われているが、この方法は特異性が高く分離性に優れているが、抗体の使用による高コスト、低保存性、煩雑な操作性、特殊な器具が必要といった問題点があり、これらの欠点を無くした新たな検査法の開発が必要である。そこで、特に菌体と腸管上皮細胞の認識において宿主細胞表面の糖鎖（シアル酸、マンノースなど）が認識分子となっていることを応用して選択的に目的とする菌体を検出するため、食品成分よりレセプター物質の探索してその結合能を利用した、抗体を用いる手法にかわる画期的な新規の検査法を開発することを目的とした。本年度は新たなレセプター物質の探索を行うと共に、すでに前年度までに確立したオボムチン由来の糖ペプチドが腸管出血性大腸菌 O-157:H7 に特異的に結合することを見出ししていることから、この結合能を利用して検査法の実用化するための結合反応の適応可能な pH、塩濃度の範囲および結合を阻害する食品成分や非特異的細菌の検討を行った。さらに結合した菌の検出法の検討、評価も行った。

B.研究方法

[ダイズタンパク質由来糖ペプチドの調製]

1) 食品起源糖ペプチド

分離ダイズタンパク質（SPI、ソルピー5000、日清製油株式会社）を出発物質として食品起源糖ペプチドの調製を行った。SPI 400 mg を 6 M 塩酸グアニジン溶液（8 ml）に懸濁の後、完全に溶解するまで攪拌し、引き続き、0.03 M トリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）に対して透析した。次に、酵素：タンパク質=1:100の割合でトリプシン（4 mg）を添加し、37℃で17時間反応させた。さらに、トリプシン（4 mg）を添加の後、37℃で24時間反応させた。酵素分解物を遠心分離し（4℃、18,000 rpm、30分間）、得られた上清をポアサイズ0.2 μmのフィルターでろ過の後、ゲルろ過に供した。ゲルろ過は、Sephadex G-50（2.5 ID x 110 cm, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK）、移動相としては0.1 M 硫酸アンモニウムを含む0.03 M トリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）、あるいは、MilliQ水を用い、流速1.0 ml/minの条件で行った。タンパク質の検出は230 nmの吸光

度により、糖の検出はフェノール硫酸法による 490 nm の吸光度により行った。

2) ダイズタンパク質由来糖ペプチドの化学的性質の分析

ダイズタンパク質由来糖ペプチドの分子量については、サイズ排除クロマトグラフィー、SDS-PAGE により分析した。

ダイズタンパク質由来糖ペプチドの糖組成については、ABEE 糖組成分析キット プラス S (Honen, Tokyo, Japan) を用い、HPLC により分析した。キットに付属の反応用試験管に GMP 水溶液を加え、遠心濃縮機用蓋をし、乾固した。シアル酸の遊離と N-アセチルマンオサミンへの変換を行うために、酵素溶液 10 μ l を加えて攪拌し、45°C で 1 時間保温した。空冷の後、遠心分離を行い液を底部に集めた。その後、TFA 溶液 10 μ l を加え、100°C で 3 時間反応させ、加水分解を行った。溶液を乾固し、2-プロパノール 40 μ l、無水酢酸 10 μ l を加えて攪拌し、室温で 30 分間静置した。溶媒の乾固後、純水 10 μ l および ABEE 化試薬(酢酸 170 μ l および還元剤 145 μ l を ABEE 溶液に加えた溶液)を加え、80°C で 60 分間反応させて、単糖の ABEE 化を行った。ABEE 化した後、純水 100 μ l およびクロロホルム 200 μ l を加え、激しく攪拌した後、遠心分離して上層を回収した。この回収サンプル溶液を HPLC 分析に供した。HPLC は、カラムに Honenpack C18 カラム (Honen, Tokyo, Japan)、溶媒に 0.2 M ホウ酸カリウム緩衝液を用いて、流速 1ml/min の条件で行い、305 nm の吸光度で検出した。

3) 菌体のピオチン化

予め、*S. enteritidis*、*E. coli* O157 を含む数種の菌体を 660 nm の吸光度で 1.0 となるように PBS に懸濁し、この懸濁液に EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (PIERCE, Rockford, USA) を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。遠心分離 (2,500 rpm, 20 分) 後、上清を除去し、PBS を約 3 ml 加え、再懸濁・遠心分離を行い、洗浄した。この洗浄操作は、さらに 2 回繰り返した。遠心分離前の液量と同量の PBS を加え、懸濁したものをピオチン化菌体として、結合アッセイに供した。

4) ピオチン化菌体を用いた糖ペプチドとの binding assay

菌体に対する糖ペプチドの結合能は、96 well イムノプレート (Nunc) を用いて測定した。まず、種々の糖ペプチドを 1 mg/ml 濃度となるように、PBS に溶解後、順次 2 倍希釈し、100 μ l ずつ 96well プレートに分注し、4°C で一晩、あるいは室温で 2 時間インキュベートした。また、ブランクとして PBS を 100 μ l ずつ分注した well も設けた。インキュベート終了後、PBS (200 μ l) で 3 回洗浄し、1% 低分子

オセインゼラチン (Mw: 9,000, Nippi, Tokyo, Japan) /PBS 溶液を 200 μ l ずつ 96well プレートに分注し、室温で 2 時間ブロッキングした。PBS (200 μ l) で 3 回洗浄後、ピオチン化菌体/PBS 懸濁液を 100 μ l ずつ分注し、室温で 1 時間インキュベートした。次に、PBS (200 μ l) で 3 回洗浄後、1% BSA/PBS もしくは Blocking reagent for ELISA で 2,000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン (Zymed) を 100 μ l ずつ分注し、室温で 1 時間インキュベートした。PBS (200 μ l) で 3 回洗浄後、0.1% p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム/ジエタノールアミン-塩酸 buffer (pH 9.8) を 100 μ l ずつ分注し、室温でインキュベートした。5 M NaOH 溶液を 20 μ l ずつ分注することにより、酵素反応を停止した後、microplate reader を用いて、405 nm の吸光度を測定した。

[オボムチン糖ペプチドと *E. coli* O157 との結合能の pH および塩濃度の影響]

E. coli O157:H7 とオボムチン糖ペプチドの結合に対する塩および pH の影響は、ELISA 法により測定した。まず、96-well マイクロタイタープレート (Nunc) に 1 mg/mL 濃度のオボムチン糖ペプチド/PBS 溶液の順次 2 倍希釈した溶液を 100 μ L ずつ分注し、4°C で一晩もしくは室温で 2 時間インキュベートした。その後、PBS (150 μ L) で 3 回洗浄後、Blocking reagent for ELISA (Roche Biochemicals) を 150 μ L/well で分注し、室温で 2 時間ブロッキングした。次に、PBS (150 μ L) で 3 回洗浄した後、塩および pH の影響を調べるために、あらかじめ PBS (0.14 M NaCl)、0.5 M NaCl を含む PBS、1.0 M NaCl を含む PBS あるいは 0.1 M クエン酸バッファー (pH 3.0)、0.1 M 酢酸バッファー (pH 5.0)、PBS (pH 7.0)、0.1 M トリシュー塩酸バッファー (pH 9.0) に懸濁したピオチン化 *E. coli* O157:H7 (終濃度が 1×10^9 cells/mL となるように) を 100 μ L ずつ分注し、室温で 1 時間インキュベートした。あとの操作は前述と同様に行った。

[オボムチン糖ペプチドと *E. coli* O157 との結合能の阻害因子]

食品腐敗菌としては、*Staphylococcus epidermidis*、*Pseudomonas fluorescens*、*Micrococcus lylae*、*Enterobacter cloacae*、*E. coli*、*Citrobacter freundii*、*Klebsiella omithinolytica*、*Proteus vulgaris* を用いた。食品成分の調製は、市販されている生鮮食品を使用し冷凍品は使用しなかった。使用した試料は、野菜として、モヤシ、キャベツ、トマト、シュンギク、カイワレ、キヌサヤ、ハクサイ、シロネギ、ダイコン、ニンジン、チンゲンサイ、ホウレンソウ、ブロッコリー、インゲン、ピーマン、ナス、キュウリ、レタス、バレイショ、タマネギの 20 種類であ

る。果物としてリンゴ、ヨウナシ、カキ、ミカン、イチゴ、キンカン、ブルーベリー、バナナ、グレープフルーツ、キウイフルーツの 10 種類である。肉類として豚肉、鶏肉、牛肉、牛タン、鶏レバーの 5 種類である。魚介類としてアサリ身、カキ、アジ、サケ、マイワシ、マダイ、シジミ、サンマの 10 種類であり、貝類は食用の中身を使用した。*E. coli* O157:H7 とオボムチン糖ペプチドの結合に対する阻害能は、競合法 ELISA 法により測定した。

オボムチン由来糖ペプチドに結合した菌の検出法として、直接蛍光染色法および Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)法を検討した。直接蛍光染色法は蛍光色素 SYTO16 (Molecular Probes) を用いて以下の方法で行った。適時希釈した菌懸濁液を滅菌生理食塩水で 10 倍希釈し、この希釈液 (100 μ l) を 96 well plate (Maxisorp, Nunc) に加え、室温で 1 時間インキュベートした後、滅菌生理食塩水で 3 回洗浄した後、1% Blocking reagent for ELISA (Roche Diagnostics) /ミリ Q 水 (200 μ l) を添加し、室温で 1 時間ブロッキングした。洗浄した後、蛍光色素 SYTO16 (Molecular Probes) を滅菌生理食塩水で 20 μ M とした溶液 (100 μ l) を加え、暗所、室温で 30 分間インキュベートした。滅菌生理食塩水で 3 回洗浄した後、蛍光プレートリーダー (CYTO FLUOR Series 4000, PerSeptive Biosystems, Inc.) を用いて励起 488 nm、発光 518 nm の条件で測定した。

LAMP 法はサルモネラをモデルとして行った。サルモネラ属菌が特異的に保存している侵入遺伝子の *invA* を標的にしてデザインされた 7 種類のプライマーを使用した。試験は鎖置換型 DNA ポリメラーゼである Bst DNA polymerase, プライマー dNTPs, バッファーを含む反応溶液 20 μ l に検体 5 μ l を添加して 65°C の等温で 60 分間行った。測定は、簡易な増幅物検出法として Lamp 増幅反応により生じるピロリン酸塩が試薬中のマグネシウムと結合して生成されるピロリン酸マグネシウムを専用濁度計 (LA100) を用いて波長 620nm での吸光度を測定した。つぎにサルモネラ添加試験食材として肉類(牛、豚、鶏の挽肉およびレバー)を用いた。遺伝子抽出方法としては Extragen (カイノス), DNAzol (インビトロジェン), PrepMan Ultra (アプライドバイオシステムズ), InstaGene Matrix (バイオラッド) の 4 種類を用いた。

C. 研究成果

[ダイズタンパク質由来糖ペプチドの性質と菌体との結合能]

ダイズタンパク質をトリプシンで分解した後、ゲルろ過に供した結果、F1、F2、F3、F4 の 4 フラ

クションに分画した。これら各フラクションの分子量を G3000SW_{XL} (Tosoh)を用いた SEC により分析したところ、それぞれの主分子量を、1,200,000 以上、16,000、12,000、12,000 と算出することができた。また、これら各フラクションの糖組成を分析したところ、F1 にはマンノース、N-アセチルグルコサミン、ガラクトースが含まれ、F2 には少量のマンノースとシアル酸が含まれ、F3 には少量のマンノースが含まれ、F4 にはごく少量のマンノース、N-アセチルグルコサミンが含まれることが明らかとなった。F1 画分と菌体との結合性はデオチン化菌体を用いた結合アッセイにより行った。F1 の未加熱の試料、ならびに、加熱処理した試料 (5% 濃度の溶液を 90°C で 120 分間加熱処理) を用い、*Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*) および *E. coli* O157 に対する結合性を評価した。その結果、F1 は *S. enteritidis*、*E. coli* O157 いずれに対しても結合性を有し、その結合性は、加熱処理後も低下しなかった。この結合性は過ヨウ素酸処理により大幅に減少したことから、F1 の糖鎖構造が重要であると考えられた。

[オボムチン糖ペプチドと *E. coli* O157 との結合能の pH および塩濃度の影響]

オボムチン糖ペプチドと *E. coli* O157:H7 との結合に及ぼす塩および pH の影響を調べた結果を Fig. 1-2 に示した。塩の影響を調べた結果 (Fig. 1)、0.5 M および 1.0 M NaCl 濃度においても、結合能に影響は認められなかった。また、pH の影響を調べた結果、酸性~中性条件下 (pH 3~7) においても (Fig. 2a)、その結合能に変化は認められなかった。しかし、アルカリ条件下 (pH 9) では (Fig. 2b)、pH 7 の場合よりも結合能が低下した。

[オボムチン糖ペプチドと *E. coli* O157 との結合能の阻害因子]

オボムチン糖ペプチドをコーティングしたイムノプレートに *E. coli* O157:H7 (1 x 10⁸ cells/mL) と菌数の異なる種々の食品由来の腐敗菌 (10⁹, 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵ cells/mL) を同時に加えて、*E. coli* O157:H7 の結合性を測定した。この時、食品由来の腐敗菌が無い状態でのオボムチン糖ペプチドと *E. coli* O157:H7 の結合を 1 とし、結合率を算出した。その結果、*S. epidermidis*、*C. freundii* および *P. fluorescens* は最高菌濃度である 10⁹ cells/mL の場合であってもオボムチン糖ペプチドと *E. coli* O157:H7 の結合を阻害しないことが明らかになった (Fig. 3)。*E. coli* および *M. lylae* は 10⁸ cells/mL 濃度までは結合阻害を示さなかったが、10⁹ cells/mL において約 10~20% の阻害を示した (Fig. 1)。*E. cloacae* および *K. omithinolytica* においては 10⁸

cells/mL までは結合阻害を起こさなかった (Fig. 1)。しかし、逆に 10^9 cells/mL 濃度において結合増進を示した。*P. vulgaris* については菌濃度と結合性の一環性が認められなかったが、最高菌濃度である 10^9 cells/mL においても明らかな結合阻害はなかった (Fig. 3)。

オボムチン糖ペプチドと *E. coli* O157:H7 との結合に及ぼす食品成分の阻害能は、肉類では、牛タン、牛肉、鶏肉、豚肉において阻害効果が認められ、その効果は牛肉が最も強かった (Table 1)。魚類においては、イワシ以外で阻害効果は認められなかったが、貝類 (アサリ、シジミ) には、阻害効果が認められた。果物類および野菜類では、イチゴ、キウイ、シュンギクが強い阻害を示し、グレープフルーツ、ブルーベリー、インゲンは弱い阻害効果を示した。しかし、大部分の果物類および野菜類は、オボムチン糖ペプチドと *E. coli* O157:H7 との結合を阻害しなかった。

検出法の検討の結果、直接蛍光染色法の場合、SYTO16 ($10\ \mu\text{M}$) の検出限界菌濃度は 1×10^5 から 10^6 cells/well の範囲であった。菌体として *S. enteritidis* および *EHEC* O157:H7 を用いた場合蛍光強度がそれぞれ菌濃度依存的に上昇し、直接蛍光染色法で測定が可能であることが示された。従来結合能の検出に用いていたピオチン化菌体による検出法と比較すると両者の示した検出挙動がほとんど一致したことから、蛍光色素 SYTO16 はピオチン化菌体を用いた方法と同様に、糖ペプチドに結合した菌の検出に用いることができることが示された。LAMP 法の検出感度は *Salmonella Enteritidis* で 60 colony forming unit (cfu)/test であり、試験したサルモネラ属菌 48 株と非サルモネラ属の 66 株を用いた特異性試験ではサルモネラ属の 48 株すべてに増幅が確認され、非サルモネラ属菌は全株陰性であった。食材にサルモネラを接種した材料からの回収試験では、食材 25g あたり 5.5 cfu の菌量でも検出可能であった。一方 LAMP 法は増幅反応により生じるピロリン酸塩が試薬中のマグネシウムと結合して生成されるピロリン酸マグネシウムを濁度として簡易に測定することも可能であったが、食材によっては濁度が高く比濁による測定が困難なものや、成分が遺伝子の増幅反応に影響し判定が困難な例がみられた。それらの影響を回避する方法として Extragen、DNAzol、PrepMan Ultra、InstaGene Matrix の 4 種類の遺伝子抽出法を評価した結果、Extragen 処理が濁度及び増幅阻害物質の除去に有効であった。

D. 考察

ダイズタンパク質由来糖ペプチドの内、マンノー

ス、N-アセチルグルコサミン、ガラクトースが含まれた画分は *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*) および *E. coli* O157 に対する結合性を有していた。また、これらの結合能は加熱処理でも減少が見られなかった。しかし、結合性の特異性の点から比較すると、すでに *E. coli* O157 との特異的結合性が見い出されているオボムチン由来糖ペプチドの方が優れていると考えられた。

そこで、オボムチン糖ペプチドと *E. coli* O157 との結合能を用いた検査法を実用化するにあたり、結合能に対する pH および塩濃度の影響、食品成分および食品腐敗菌の結合能への阻害作用を行った。さらに結合した菌の検出方法を直接蛍光染色法および Lamp 法での検討した。

オボムチン糖ペプチドと *E. coli* O157:H7 との結合に及ぼす塩および pH の影響を検討した結果、塩存在下および酸性～中性 (pH 3～7) 領域において、その結合能に変化は認められなかったが、弱アルカリ性領域 (pH 9) では結合能がやや低下した。しかし、アルカリ性を示す食品は少ないため、本糖ペプチドは食品中の *E. coli* O157:H7 の検出に応用可能な素材であると考えられた。

食品腐敗菌の阻害の有無は、*S. epidermidis*、*C. freundii*、*P. fluorescens*、*E. cloacae*、*K. omithinolytica* および *P. vulgaris* については阻害しなかったが、*E. coli* および *M. lylae* については若干阻害が認められた。今年度は生菌を用いて検討を行ったがオボムチン由来糖ペプチドは食品由来の腐敗菌よりも *E. coli* O157:H7 と結合した。このことから、オボムチン由来糖ペプチドの *E. coli* O157:H7 との特異的結合性が明らかになった。しかし、*E. coli* および *M. lylae* においては高い菌数の場合に阻害が若干起こる事から、これらの菌の増殖抑制を組み入れることによって、より特異性の高い検出系が確立されるものと考えられる。さらに、実際に食品中に存在することが考えられる細菌について検討を行うことが必要であるが、応用の可能な検出系であることが示された。

食品成分の阻害物質の有無であるが、牛肉、シジミ、イチゴ、キウイ、シュンギクが、オボムチン糖ペプチドと *E. coli* O157:H7 との結合を強く阻害した。果物であるクランベリーに含まれる高分子成分が、ヘリコバクターピロリ菌や大腸菌の腸管細胞への付着を阻害したという報告があることから、イチゴやキウイにも *E. coli* O157:H7 と結合する成分が含まれている可能性がある。一方、牛タン、鶏肉、豚肉、イワシ、アサリ、グレープフルーツ、ブルーベリー、インゲンの影響は、弱い阻害効果にとどまり、また大部分の果物類および野菜類は、オボムチン糖ペプチドと *E. coli* O157:H7 との結合を阻害し

なかった。総合すると、肉類および貝類は、オボムチン糖ペプチドと *E. coli* O157:H7 との結合を阻害する傾向が認められたが、果物類および野菜類は、その結合に対して阻害効果は弱く、特に、野菜類で顕著であった。*E. coli* O157:H7 の食中毒原因食品としては、主に肉類、果物類、野菜類などが挙げられるが、果物類および野菜類は、オボムチン糖ペプチドと *E. coli* O157:H7 との結合に対して阻害効果が弱かったことから、オボムチン糖ペプチドが、果物や野菜中の *E. coli* O157:H7 の検出には食品自体の成分がその結合を阻害する可能性は極めて少ないことが示唆され、今後これらの検体での応用が考えられる。

E.まとめ

本研究では、*E. coli* O157:H7 と特異的に結合する糖ペプチドを見出し、その選択性を利用して検査法を開発することが目的であるが、実用化するまでには、結合可能な条件の設定、検体として用いる食材が含む食品成分や非特異的細菌の妨害を効率良く防ぐことなどが必要である。オボムチン糖ペプチドと *E. coli* O157:H7 の結合は、弱アルカリ性領域で結合能がやや低下したが、通常の食品の環境である酸性～中性領域および塩存在下では結合能に変化はなかったことから、オボムチン糖ペプチドは、食品中の *E. coli* O157:H7 の検出に利用可能な素材と考えられた。さらに食品成分の阻害活性であるが、肉類や魚類では阻害する可能性が指摘されたため、野菜、果実類においての実用化が考えられた。今後肉類魚類に対してもこの検査法を行うとすれば、結合阻害を抑えるような物質を探索する必要がある。さらに、糖ペプチドと結合した菌体の検出に蛍光検出法を検討した。その結果、蛍光色素 SYTO16 を用いての直接染色法が感度の点においても結合能の面においても適応可能であることが明らかになった。また、迅速で高感度な遺伝子増幅法である Lamp 法も検討した。特に食中毒菌の検出法の実施にあたって食材による反応への影響を回避する検討を行った。市販の遺伝子抽出試薬 4 種類を試験した結果、Extragen が乳製品由来の濁度や肉類由来の増幅阻害の除去に最も効果がある抽出法と思われた。したがって、Extragen を用いた DNA 精製処理によって食材の影響を回避し、目的とした検査法の評価法として有用であると判断された。

以上のことから、オボムチン由来糖ペプチドと EHEC O157:H7 との結合能を利用した新規の検査法は、免疫抗体より pH や塩濃度への耐久性が高く、果実類、野菜類を対象とする場合は食品成分および食品腐敗菌との阻害も少なく、実用化の可能性があることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugita-Konishi, Y., Yamashita, S., Amano, F., and Shimizu, M., Effects of carrageenans on the binding, phagocytotic and killing abilities of macrophages to Salmonella, Biosci. Biotech. Biochem., 67 (6), 1425-1428, 2003
 - 2) Hara-Kudo, Y., Sugiyama, K., Nishibuchi, M., Chowdhury, A., Yatsuyanagi, J., Ohtomo, Y., Saito, A., Nagano, H., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Miyahara, M., and Kumagai, S. Prevalence of Pandemic TDH-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Seafood and the Coastal Environment in Japan. Applied and Environmental Microbiology. 69:3883-3891, 2003.
 - 3) Hara-Kudo, Y., Kasuga Y., Kiuchi, A., Horisaka, T., Kawasumi, T., and Kumagai, S. Increased sensitivity in PCR detection of TDH-producing *Vibrio parahaemolyticus* in seafood using purified template DNA. J. Food Protection. 66: 1675-1680, 2003.
 - 4) Nishina, T., Wada, M., Ozawa, H., Hara-Kudo, Y., Konuma, H., Hasegawa, J., Kumagai, S. Growth Kinetics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 under Varying Conditions of pH, NaCl Concentration and Temperature. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 45:35-37, 2004.
 - 5) Hara-Kudo, Y., Watai, M., Tanno, K., Sunada, A., Saito, N. Kumagai, S. and Konuma, H. Survival of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* Enteritidis in Seeds during Storage and Contamination of Sprouts from the Seeds. Jpn. J. Food Microbiol. In press.
- ##### 2. 学会発表
- 1) 小西 良子、小林 一夫、阪中 専二、JUNEJA LEKH RAJ、天野 富美夫鶏卵卵黄シアリル糖ペプチドー難消化性多糖複合体の食中毒菌感染予防効果 日本農芸化学会 2004 年度大会 平成 16 年 3 月
 - 2) 坂田隠行、小西良子、小林一夫、好田 正、高橋幸資、服部 誠、大豆タンパク質由来糖ペプチドの腸管感染症予防効果 日本農芸化学会 2004 年度大会 平成 16 年 3 月
 - 3) 工藤由起子、杉山寛治、西瀧光昭、Ashrafuzzaman Chowdhury、大友良光、八柳潤、中川弘、仁科徳啓、斎藤章暢、長野英俊、宮原美知子、小沼博隆、熊谷進。国内産魚介類からの TDH 産生性腸炎ビブリオの検出と分離菌株の解析。 日本食品衛生学会第 85 回学術講演会。平成 15 年 5 月、東京。
 - 4) 工藤由起子。 国内の海産物の調査研究と腸炎ビブリオ対策。 第 24 回日本食品微生物学会。平成 15 年 10 月、岡山。

5) 工藤由起子、仁科徳啓、三輪憲永、増田高志、小沼博隆、長谷川順子、熊谷進. 鮮魚の洗浄による腸炎ビブリオ汚染菌数の減少. 日本食品衛生学会第86回学術講演会. 平成15年10月、盛岡.

G. 知的所有権の取得状況
特になし

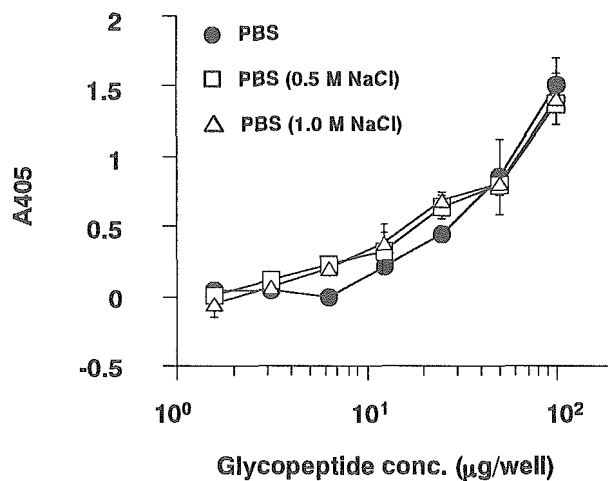


Fig. 1 Effect of NaCl on the binding between ovomucin glycopeptide and *E. coli* O157:H7

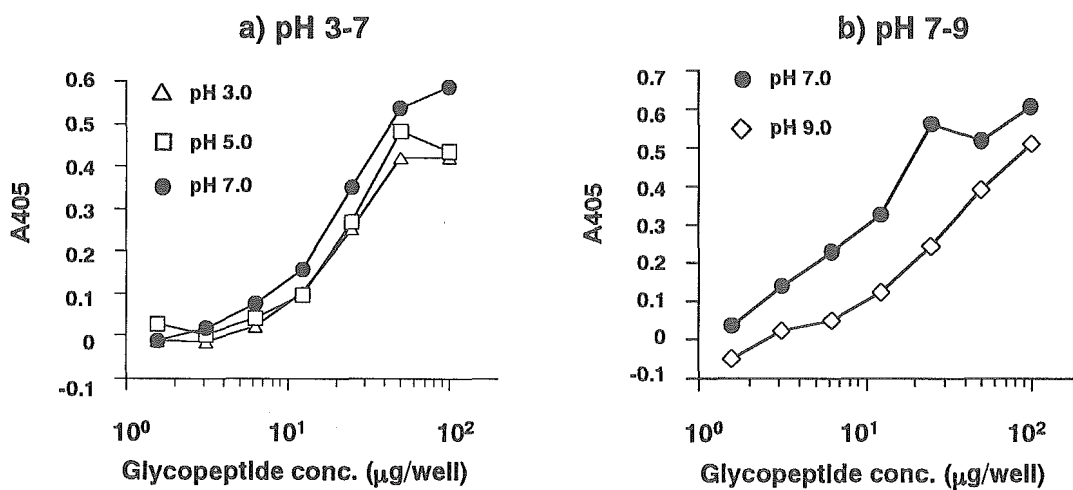


Fig. 2 Effect of pH on the binding between ovomucin glycopeptide and *E. coli* O157:H7

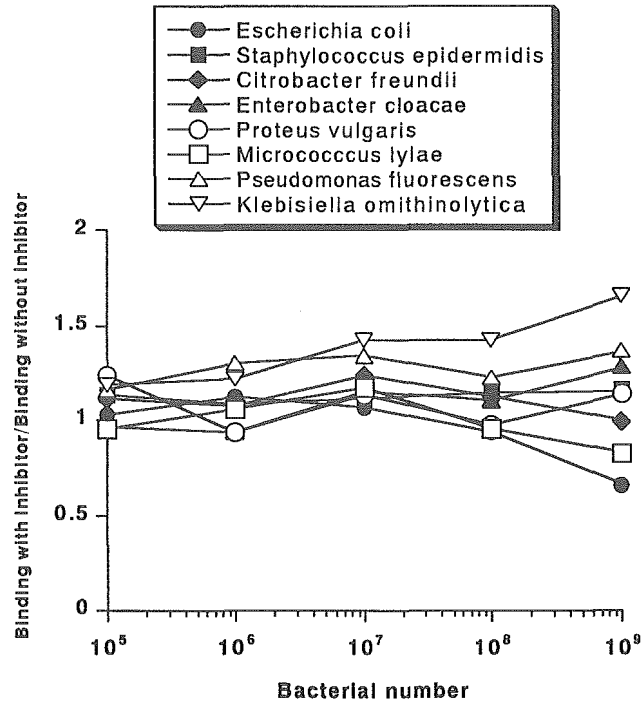


Fig. 3 Inhibitory effect of nonpathogenic bacteria on the binding between ovomucin glycopeptide and *E. coli* O157:H7

Table 1 Inhibitory effect of food components on binding between ovomucin glycopeptide and *E. coli* O157:H7

Meat		Fish and shellfish		Fruits		Vegetables	
牛タン	+	アジ	-	イチゴ	++	インゲン	+
牛肉	++	イワシ	+	カキ	-	カイワレ	-
鳥肉	+	ブリ	-	キウイ	++	キヌサヤ	-
豚肉	+	アサリ	+	キンカン	-	キュウリ	-
		シジミ	++	グレープフルーツ	+	シュンギク	++
				ヨウナシ	-	ダイコン	-
				バナナ	-	チンゲンサイ	-
				ブルーベリー	+	トマト	-
				ミカン	-	ネギ	-
				リンゴ	-	ハクサイ	-
						パレイシヨ	-
						ピーマン	-
						ブロッコリー	-

平成15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

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成16年9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