

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5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

# 目 次

## 課題番号

20030933A KH51041	臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究	梨井 康 …… 1
934A KH51042	組換えDNA食品遺伝子産物の慢性経口毒性評価モデルの確立	廣瀬 雅雄 …… 5
935A KH51043	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦 善治 …… 10
936A KH51044	細胞内脂質輸送系に着目した血清脂質改善薬の開発のための基礎的研究	最上 知子 …… 16
KH51045	粘膜インフルエンザワクチンの実用化に関する研究	佐多 徹太郎 …… 21
937A KH51046	日本人糖尿病感受性遺伝子に基づく脂肪細胞を分子標的とした糖尿病・肥満の予防及び治療薬の開発	門脇 孝 …… 24
938A KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチン開発のための基礎研究	竹森 利忠 …… 27
939A KH51048	ノーウォークウイルスの超高感度核酸定量システム、及びベッドサイド抗原検出システムの開発	武田 直和 …… 31
940A KH51049	ワクチン創製の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島 朝人 …… 38
941A KH51050	食品および環境中の食中毒原因菌の病原因子に対する免疫学的高感度検出法に関する研究	五十君 静信 …… 43
942A KH51051	安全なアジュバントを用いた粘膜ワクチンの開発に関する研究	後藤 紀久 …… 48
943A KH51052	リポソーム表面結合型抗原のアレルギー予防・治療への応用に関する研究	内田 哲也 …… 55
944A KH51053	肺炎球菌感染症の標準的抗体価測定方法の確立に関する研究	岡部 信彦 …… 61
945A KH51054	PPAR $\alpha$ をターゲットとした生活習慣病予防薬の開発	片山 茂裕 …… 64
946A KH51055	感染症領域における先端的遺伝子診断技術の開発に関する研究	薄井 貢 …… 68
947A KH51056	乳幼児下痢症の原因ウイルス検出法に関する研究	西尾 治 …… 71
948A KH51057	可溶性ウイルス受容体等によるウイルス吸着阻止を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口 文広 …… 77
949A KH51058	EPA・DHA含有エステル交換構造脂質の体脂肪蓄積抑制効果に関する研究	斎藤 衛郎 …… 86
950A KH51059	エネルギー消費調節機構に立脚した生活習慣病予防薬に関する基礎研究	大坂 寿雅 …… 89
951A KH51060	遺伝子解析によるヒトエンテロウイルス同定の標準化	清水 博之 …… 93
952A		

## 食品および環境中の食中毒原因菌の病原因子に対する 免疫学的高感度検出法に関する研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部  
研究者 五十君 静信

研究要旨 食中毒起因菌について、その病原因子を検討するとともに、菌体および病原因子に対する抗体を作出した。これらの抗体を用いて、食品および環境中から病原性のある食中毒菌を迅速・高感度に検出する方法の開発を試み、複数の検出システムを作出した。

### 分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 春日文子
- (2) 大阪薬科大学薬学部 天野富美夫
- (3) 香川医科大学医学部 阪本晴彦
- (4) 東京農工大学農学部 片山葉子
- (5) CAF ラボラトリーズ(株) 研究所 大田博昭
- (6) (株) 矢内原研究所 矢内原千鶴子
- (7) キッコーマン(株) 研究本部 辰巳宏樹

### A. 研究目的

食中毒原因菌のサルモネラ、カンピロバクター等を鋭敏に認識する抗体を作成して、食品、環境中あるいは臨床材料から簡便、迅速高感度に菌を検出するとともに、これらの細菌の病原因子を同定しその病原因子に対する抗体を作成し、免疫学的高感度検出法に応用することを目的とする。これらによって食中毒を未然に防ぐとともに、食品および環境中における病原因子の安定性を研究して菌の汚染の拡大防止を図る。

### B. 研究方法

サルモネラエンテリティディス(SE)の環境分離株、食品からの分離株および食中毒患者からの臨床分離株をおのおの数株ずつ選び、その中から経口感染させた BALB/c マウスに対する致死毒性の強い株を選択した。これらの全菌体、ホルマリン固定菌体、および生菌体の膜分画を調製してウサギを免疫し、抗体を作成した。SEp22 に対する家兎抗血清を用いてヒトおよ

び SE 感染鶏組織における SEp22 抗原陽性の細菌あるいは組織内陽性反応の分布について検討を加えた。サルモネラ新規病原因子 SEp22 を用いた ELISA 測定系の検討は精製した SEp22 とウサギの抗 SEp22 抗体を用いて、ELISA の測定系の作成を試みた。SEp22 の病原性については、KO 株を作成し検討を行った。また、食中毒患者の糞便および汚染食品から分離された病原性のカンピロバクターを抗原にしてウサギを免疫して抗体を作成した。免疫に用いる菌体は、菌の増殖時間を変化、遊走クローンの選択、および酸素ストレスをかけた菌体を調製するなど前処理方法を検討した。それぞれの病原性の菌株に共通して発現する病原因子を検索した。新たに得られた病原因子のアミノ酸配列から特異性の高い領域を選んでペプチドを合成し、マウスに免疫してモノクローナル抗体の作成を試みた。得られた抗体の性質を調べるため、菌との反応性を、凝集活性、Western blotting、ELISA、FACSscan により検証した。また、高感度迅速検出方法の開発のため、既存の抗体あるいは市販の抗体を用いて SE およびカンピロバクターの磁気ビーズを利用した集菌法の改良、あるいは発光を利用した高感度検出法を応用し、菌を含む検体から最終の検出まで 8 時間程度で完了するような方法を検討した。

### C. 研究成果

病原細菌の選択と抗体の作成に関して、五十君、春日、矢内原と天野が SE の抗体を数種類作成し、SE の菌株の間で強さが異なる病原性、

ならびに菌の増殖状態によって変動する病原性とこれらの抗体が認識する抗原エピトープの関係について解析を行った。その結果、菌体表面の FliC タンパク質の発現が病原性に連動して変化することが示唆された。この他、19、32、39kDa のタンパク質について発現の解析を進めている。また、カンピロバクターの菌体に対する抗体の作成を五十君、天野および矢内原が行い、微好気条件下で培養した菌を前処理して不活化して免疫した結果、Western blotting で使用可能な抗血清を得ることができた。その抗原エピトープと菌の増殖状態や感染性の変化の関連を研究した。

大田は鶏卵および養鶏場の周辺環境(土壌あるいは塵埃等)から多数の SE を分離し、天野、五十君と共同で病原性を検討した。さらに、SE が自然感染したニワトリとサルモネラワクチンを接種したニワトリの血清を解析し、後者で有意に高い認識をする 68kDa のタンパク質を同定した。また、新たに発見した SE の病原性関連因子 SEp22 の病原性の検討を行った。SEp22-KO 株を用いたサルモネラの病原性試験では、養鶏場の環境から分離されたサルモネラ SE の病原性株、SECl15-1 を親株にしてその SEp22 遺伝子を欠損させたサルモネラの変異株を数株作出し、これらに SEp22 タンパク質および mRNA が発現しないことを確認した。さらに、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)に対する抵抗性が欠損していることを確認し、変異株から独立に 4 株を選んで、BALB/c マウスに経口感染させた。その結果、用いた変異株の全てが、親株に比べ、マウスに対する致死毒性が著しく低下していた。特に、SECl15-KO5 株は、全く致死毒性を示さなかった。以上の結果は、SEp22 がマウスに対する病原性に関連した遺伝子産物であることを強く示唆する結果である。そこで、SEp22 の ELISA による検出系を作成を試みた。SEp を 220.05 μg/ウエルでコーティングした場合、血清希釈倍数は 50 倍、0.1 μg/ウエルでコーティングした場合は 100 倍、0.2 μg/ウエルコーティングでは 250 倍、0.3 μg/ウエルコーティングでは 1000 倍の希釈まで非特異反応が見られる。一方、陽性血清の場合は血清希釈倍数 50~100 倍のところでは、抗原の各コーティング量に比例してやや幅のある OD 値が得られ、またそれぞれのコーティング抗原量について希釈倍数 50 倍の OD 値と 100 倍の OD 値に変化はなかった。陽性血清の

500~2000 倍の希釈においては、それぞれのコーティング量ともほぼ直線的に低下していることが明らかとなった。これまでに作成済みのウサギの抗 SEp22 ポリクローナル抗体のほか、モノクローナル抗体の作成に着手した。一方、辰巳はルシフェラーゼを主とする生物発光検出系を用いて、食品に混入した SE を増菌過程を入れて約 32 時間以内に cfu=10/25mL 以上で検出する方法を開発することができ、従来法を約 1 日短縮した。これをさらに迅速化するための検討を行った。片山と天野、五十君は河川水からの病原性の SE を迅速に検出する方法を開発するため、多摩川の河川水からの SE の分離を短時間で行う方法を研究し、採取の場所と条件、ならびに分離された SE の血清型診断および病原性の評価を行った。さらに片山はフィルターに集菌した細菌の細胞内抗原の検出条件を検討した。多種の微生物が混在する環境中の試料から特定の機能のみを有する細菌を高感度に検出する技術を確立するため、自然環境での検出頻度が比較的低いチオシアネート分解細菌を選んで解析を行なった。本菌で発現されるチオシアネート分解酵素 (thiocyanate hydrolase: SCNase) は、それぞれをコードする遺伝子、scnA, scnB および scnC がクローニングされている。湖水の微生物群集からチオシアネート分解活性を有する細菌を免疫化学的方法によって検出することに成功した。また、SCNase の活性中心を含むと予想されるサブユニットタンパクをコードする scnC に対して、PCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE)、in situ PCR 法を使った解析を行い、その遺伝情報を保有する細菌を検出することができた。さらに、細菌の 16S rDNA の系統解析によって、その結果の確認を行なった。阪本は敗血症を起こした食中毒患者の血清ならびに原因となった菌株の収集を行い、少数例ではあるが、それぞれの患者の症状と経過についての調査を行った。ヒト症例では今回検索された範囲では抗 SEp22 抗体で陽性に染まる細菌は観察されなかった。鶏組織では腸間膜から腸の漿膜にかけて化膿性の炎症が特徴的に見られた。この化膿性炎症の部分では macrophage が多数見られ、炎症を起こしている部分の表面に浸潤している macrophage では胞体内に SEp22 による陽性反応が見られた。春日は SE による食中毒の原因となった食品や食材についての解析を行い、リスクマネジメ

ントと共に、食品からの病原性 SE の迅速検出に必要な過程の検討を行った。以上の研究に加えて、基礎研究として、SEp22 の発現の変化に関する研究、ならびにカンピロバクターのストレス応答タンパク質の同定に関する研究を行った。

#### D. 考察

従来、食品あるいは環境中にサルモネラが検出されたことをもって、「病原性のサルモネラの混入(存在)」の判断基準としていた。また、サルモネラの検出は、通例、培養による増菌の過程をへてその後血清型診断、あるいはフェージ型別診断をおこなってきたため、診断前に最低3日間あるいはそれ以上の操作を要した。迅速診断では PCR 法による検出があるが、これらは生菌/死菌の別なく遺伝子(DNA)による検出であるので、高感度な検出法ではあるが実際の検体中に存在する生菌数を反映していない。そこで、従来法を改善し、約8時間以内に病原性 SE を検出/同定する方法を開発する必要があった。そのために、新たに抗 SE 抗体を作成し、短時間の前培養の後、固相化ビーズに結合させた抗体で SE を捕集/濃縮し、さらに化学発光法や ELISA 法を用いて検出を試みた。また新たな病原因子の同定/精製を行い、それに対する抗 SE 病原因子抗体を作成することにより、従来報告されてきたサルモネラの病原因子の遺伝子 (*invA*, *SipB* など)の検出に加え、実際に発現しているタンパク質等の検出によって増殖可能な病原性サルモネラの検出を行うことができるものと期待される。この方法は従来法との組み合わせも可能であり、血清型およびフェージ型診断やパルスフィールド電気泳動および PCR による DNA 診断のための検体を、前培養/濃縮の後に供給することができる。五十君、矢内原、春日らにより、サルモネラやカンピロバクターの菌体に対する高感度検出用の抗体作成が試みられ、特にサルモネラでは良好な抗体を得ることが出来、カンピロバクターに対する抗体の検討も続いている。大阪薬科大学の天野らがサルモネラの病原性関連因子、SEp22 の大量精製法を確立し、さらにウサギの抗 SEp22 抗体を作成して SDS-PAGE/Western によるサルモネラ菌体抽出物からの SEp22 の高感度な検出法を確立した。これによって SEp22 が病原性のサルモネラ菌株に強く発現されていることを確認する

ことができたが、これによって本研究の目的とする免疫学的な高感度迅速測定法への応用のみでなく、SEp22 の分子的な性状の解析が可能になった。本研究により見いだされた SE 由来の新規病原性関連因子 SEp22 に対する抗体は、食品および環境中における病原性 SE の検出とマウスやヒトへの感染機序の解明に有効である。Sep22 の KO 実験により、用いた変異株の全てが、親株に比べ、マウスに対する致死毒性が著しく低下していた。特に、SECI15-KO5 株は、全く致死毒性を示さなかった。以上の結果は、SEp22 がマウスに対する病原性に関連した遺伝子産物であることを強く示唆する結果である。これは、本研究の当初の目的の一つである、「食中毒原因菌の病原因子の同定と検出」についての重要な成果であると考えられる。CAF ラボラトリーズの大田が ELISA の測定系の確立に向けて種々の検討を行っているが、SEp22 を  $0.10 \mu\text{g}$ /ウエルでコーティングし、本実験で得られた陽性血清の 500 倍希釈時の OD 値を 1.295 と固定した条件で、以後の各被検血清の値を修正 OD 値として求めるようにすれば、ELISA の測定系として用いることができると考えられた。香川医科大学の阪本が集めた敗血症患者血清中の SEp22 および抗 SEp22 抗体の検討では、ホルマリン固定されたヒト組織と鶏組織について SEp22 陽性を示す細菌および組織について検索した。いずれも敗血症の状態にあるもの、あるいは細菌感染のあるものについて検討したが、ヒトでは陽性の結果は全く得られなかったのに対し、鶏では腸内細菌叢の細菌および化膿性炎症内の macrophage 胞体に陽性反応がみられた。鶏例では SE の投与の有無にかかわらず腸内細菌叢に SEp22 が陽性に認められたので、salmonella 以外の細菌にも SEp22 が存在する可能性は高いと考えられる。さらに、東京農工大学の片山が本年度 Thiobacillus を対象にして行った自然環境中における細菌抗原の安定性ならびにその発現調節機構の研究を、次年度以降は、河川水に存在することが確認されている病原性のサルモネラの SEp22 を指標にして検討することが可能になった。また、キッコーマンの辰巳が本年度の研究で、26時間程度の検出を可能とした。改良した高感度迅速検出法によって食品中のサルモネラが検出された場合に、これを SEp22 などの病原因子の検出系と併行して使用し、病原性のサルモネラの診断

に応用することも可能である。

## E. 結論

(1) サルモネラの菌の増殖時間をコントロールし免疫を行うことにより、迅速診断に適すると思われる検出用抗体を得ることができた。

(2) サルモネラ新規病原因子 SEp22 の精製法改良により、大量精製が可能となり、その性質の検討および特異的抗体の作成を行うことができた。さらに ELISA 測定系に用いることができる設定を行うことができた。

(3) 生物発光酵素免疫測定法を応用し、従来の培養法では6日以上必要とした検出法を、1日の培養と2時間の測定操作で、従来の培養法と同等の感度で検出を行うことを可能とした。

(4) サルモネラの簡易、迅速かつ高感度の検出系としてイムノクロマト法をモデルケースとして検討を進め、サルモネラを簡易迅速に検出することが出来た。

(5) 遊走性を指標にクローン化することにより、カンピロバクターの多くの抗原に反応する抗体を作成し、この菌が病原性を示すようならせん状の増殖期に選択的に反応する抗原を検出した。

(6) 敗血症患者の発症期および緩解期のペーア血清、ならびに原因菌を収集した。

(7) 特定の酵素タンパク質ならびにその遺伝子に注目して、環境試水からの特定細菌の検出を試み、目的の細菌をきわめて精度良く検出する手法を開発した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Fukuyasu T, Igimi S, Uchida K, Eguchi M, Endo T, Ooshima K, Kuwano A, Sawada T and Tamura Y. Standards of the in vitro mutation frequency study and the antimicrobial activity study in gut. The Journal of Antibiotics. 56:191-196. (2003)
2. Karahashi, H. and Amano, F. Endotoxin-tolerance to the cytotoxicity toward a macrophage-like cell line, J774.1, induced by lipopolysaccharide and cycloexmide; Role of p38 MARK in induction of the cytotoxicity. Biol. Pharm. Bull., 26, 1249-1259. (2003)
3. Katayama, Y., T. Oura, M. Iizuka, I. Orita, K. J. Cho, I. Y. Chung, and M. Okada. Effects of spilled oil on microbial communities in tidal flat. Marine Pollution Bulletin. 47(1-6), 85-9-(2003)
4. Matuoka H, Oishi K, Watanabe M, Kozone I, Saito M and Igimi S. Viable cell detection by the combined use of fluorescent glucose and fluorescent glycine. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. Vol. 67, No. 11 Nov. pp. 2459-2462. (2003)
5. 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. 67:1425-1428. (2003)
6. Valdivieso-Garcia, A., Desruisseau, A., Riche, E., Fukuda, S. and Tatsumi, H. J. Food Prot. 66, 1996-2004. (2003)
7. Yamasaki M, Igimi S, Katayama Y, Yamamoto S and Amano F. Effect of anaerobic preculture on aerobic stress responses of Campylobacter jejuni. Bioscience Microflora. 22:21-25. (2003)
8. Kasuga F, Hirota M, Wada M, Yunokawa T, Toyofuku H, Shibatsuji M, Michino H, Kuwasaki T, Yamamoto S, and Kumagai S. Archiving of food samples from restaurants and caterers? quantitative profiling of outbreaks of foodborne Salmonellosis in Japan. J. Food Prot. in press
9. Kishimoto M, Hioki Y, Okano T, Konuma H, Takamizawa K, Kashio H, Kasuga F. Ribotyping and a Study of Transmission of Staphylococcus aureus Collected from Food Preparation Facilities. J. Food Prot. in press
10. Okutani A, Okada Y, Yamamoto S, and Igimi S. Nationwide survey of Listeria monocytogenes infection in Japan. Epidemiology and Infection. in press.
11. Okutani A, Okada Y, Yamamoto S, Igimi S. Overview of Listeria monocytogenes contamination in Japan. International Journal of Food Microbiology. in press.

12. Yamasaki M, Igimi S, Katayama Y, Yamamoto S and Amano F. Identification and Characterization of an Oxidative Stress-Responsive Protein from *Campylobacter jejuni*, Homologous to Rubredoxin Oxidoreductase/Rubrerhythrin. FEMS Microbial. Letters. in press.
13. 五十君静信。黄色ブドウ球菌検査法。月刊 HACCP 3月号。9:27-29。(2003)
14. 五十君静信。食品由来のリストeria菌による健康被害。食品衛生研究, 53:No. 4:19-23.(2003)
15. 五十君静信。リストeriaー注目されるようになった食品媒介感染症菌一。食品衛生研究, 53:No. 9:11-16。(2003)
16. 春日文子。食品中の微生物のリスクアナリシス 微生物学的リスクアセスメントの普及に向けての世界の取り組み。バムサ会誌、第15巻、第2号、p. 2-6(2003)
17. 春日文子、宮崎晴久、齋藤麻美、村松ミネ子、中原理善、小林昌子、貞永明彦、波多野義純、河原章、坂本卓雄、中村実、金児克忠、牧島満利子、佐野暁男、片山三重子、角田光淳、皆川武人、森田師郎。保育室の清潔と感染防御。保育と保健、第9巻、第1号、p.14-21、(2003)
18. 森川馨、山本美智子、中野達也、春日文子、山本都。医薬品、食品、化学物質の安全性情報への取り組み。国立医薬品食品衛生研究所報告121号 Page1-11。(2003)

## 2. 学会発表

### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

---

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5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法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