

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

平成17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1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

### 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

### 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

### 第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

### 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

### 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

## 第1分野

### 課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 …… 13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 …… 17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 25

## 第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 …… 117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 …… 120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用－非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立－	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261



KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
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デリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
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デリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	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 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ー ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（平 成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・ 細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合 研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成 17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込細胞チップとナノセンサーによる 新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサ ーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬 効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤 の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺 伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的 評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640



## 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



## 食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発と リスクマネージメントへの応用

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

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、その病原因子等をマーカーとし、食品中における当該細菌の存在を特異性高く、高感度かつ迅速に検出する手法の開発に関する研究を行い、その手法を用い、食品におけるリスクマネージメントを検討する。

### 分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部 五十君静信
- (2) 大阪薬科大学薬学部 天野富美夫
- (3) 東京農工大学農学部 池袋一典
- (4) (株)シーエーエフラボラトリーズ・研究所 大田博昭
- (5) (株)矢内原研究所 矢内原千鶴子

### A. 研究目的

食品および環境中のサルモネラ、カンピロバクター、黄色ブドウ球菌等の食中毒起因菌の検出に有効な抗原あるいはマーカーとなる遺伝子を特定し、これを利用した高感度迅速検出法を開発し、食中毒起因菌のリスクマネージメントへの応用を検討し、食品および環境中における当該微生物の制御に関する方向性を見いだす。これらの高感度迅速検出法を提供し、リスクマネージメントへの応用を可能とすることにより、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菌の汚染の拡大防止を図る。

### B. 研究方法

検査の迅速化の方法としては、菌に特異的な抗原を利用する免疫学的な検出と、菌の遺伝子を利用する検出の2つの手法が通常用いられるので、本研究班でもこの2つの手法につき検討を行った。当該抗原の免疫学的検出法としては、矢内原らが抗体作成にあたり、遺伝子を用いた迅速検査法のシステム開発は池袋らが担当した。検査の標的とする抗原並びに遺伝子の

検討は、山本、五十君、天野らが担当し、特異的な抗原の選定および、感染論に根ざした病原性に重要な新奇のタンパク質の検討を行った。これらの結果として得られる迅速検出法をリスクマネージメントに応用する現場での検討は、養鶏場を持つ大田らが担当した。

食中毒菌の検出において標的とする抗原並びに遺伝子の検討は、カンピロバクター、サルモネラ、黄色ブドウ球菌を対象とした。特異的な抗原の選定および、感染論に根ざした病原性に重要な新奇のタンパク質については、当該蛋白のノックアウト株を作成し、マウスを用いた実験によりその機能の解明を行い、重要性を検討した。抗体の作成は、定法により行い、ウサギポリクローナル抗体に加えて、マウスモノクローナル抗体の作成を行った。抗体を用いた検出法は、ペーパークロマト法について検討した。遺伝子を用いた高感度検出システムとしては、一本鎖 DNA 結合タンパクと耐熱性グルコース脱水素酵素複合体を用いて、電気化学的に検出するセンサーの検討を試みた。リスクマネージメントへの応用については、従来 of 培養による検査法によるリスク管理に加え、迅速法も併用した。

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。SE の新規病原因子 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。SE の鞭毛抗原の感染に関する重要性を確認するためにヒト腸管由来 Caco-2 細胞の系を用いて、菌の侵入と抗体によるその阻止について検討した。

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。

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、あるいはクロマト法を応用した簡易検出法を検討した。新規の DNA 標識法として、1 本鎖 DNA 結合タンパク質(SSDBP)と耐熱性グルコース脱水素酵素(SM4GDH)とを架橋させた複合体を調整し、これを用いてプローブ DNA を標識し、電気化学的にハイブリダイゼーションを検出する DNA センサーを構築した。

養鶏場より分離したサルモネラ菌株について、研究班で検討した病原因子の保持状況を PCR 法にて調べるとともに、それぞれの病原因子の発現状況を RT-PCR 法で mRNA の発現レベルにより調べた。作成した抗体を用いて、タンパク質としての発現をモニターした。

### 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、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питオプの関係

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。ヒト腸管由来継代細胞 Caco-2 細胞を用いて、SE の感染に FliC がどの程度かわるか FliC 特異的抗体を用いて調べた。この抗体は濃度依存的に SE の Caco-2 への侵入をブロックし、細胞への侵入にこの抗原がかかっていることを示した。

カンピロバクターの菌体に対するモノクローナル抗体の作成を矢内原が行い、鞭毛抗原およびその他の環境抵抗因子と思われるタンパクを認識するモノクローナル抗体を得ることができた。モノクローナル抗体の認識する Peb4/Cbf2 は菌のコッコイド化に関わるタンパクであることが推測され、実験によりペプチドグリカンの分解活性を確認した。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、その株が発現している病原関連因子につき検討した。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た。天野は新たに発見した SE の病原性関連因子 SEp22 の病原性の検討、その発現調節機構につき検討を行った。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た。SEp22 の発現していない変異株の全てが、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。SEp22 の発現調節は、培養中の栄養因子によって転写レベルで発現が調節されるだけでなく、菌の増殖に伴って急速に分解されることが示され、菌の生理的な条件が病原性の発現にかかわっていることが示された。

サルモネラの検出用抗原の検討では、これまで知られていなかった病原因子である SEp22 等の新たな病原因子を発見し、当該遺伝子ノックアウト株を作成し、その病原メカニズムの解析を行うと共に、SEp22 に対する抗体を作成し、この病原因子をもつ一群のサルモネラの検出を可能とした。SEp22 のノックアウト株を



用いた実験により、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ることを証明した。サルモネラのマウスに対する病原性の発現において、SEp22は腸管から体内組織への侵入の過程で重要なはたらきをしていることを示した。

遺伝子を標的とした検出法については、酵素標識プローブ DNA を用いた検出システムの開発を試みた。これまでに耐熱性グルコース脱水素酵素で標識した DNA プローブを用いて、サルモネラが共通に有する *invA* 遺伝子を電気化学的に高感度に測定できるセンサーを開発した。更に現在、同遺伝子の 2 本鎖 PCR 産物を直接特異的に認識できるジンクフィンガータンパク質を設計・調製している。迅速検出に向いている蛍光偏光法や装置の小型化・簡素化に最適な電気化学的方法についても検討を行った。

#### D. 考察

従来、例えば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、あるいはファ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。一方、リスクマネジメントにおいては標準法と同等な正確さが担保される検査であれば、検査法は迅速で簡便であるほど実行性が高く、このような特性を持つ検査法が期待される。

さらに、食中毒起因細菌の分離菌株の疫学的検討から、環境中や食品から分離される食中毒起因菌において、その病原性が強い株とほとんどないと思われる株が混在していることがわかってきた。本研究では、従来の微生物検査と同等な食中毒菌の菌種を対象とした迅速検査法の開発に加え、環境抵抗性が強く食品からの暴露を受けやすい、あるいは病原性が強く感染リスクが高いといった、食品衛生上ヒトへのリスクが高く、特にその制御が必要と思われる菌群を特定する新たな迅速検出法を目指して研究を進めてきた。

従来の培養法と同等ないしはそれ以上の精度が得られる検査をめざす抗体と、新奇の病原因子を対象とした特に食品衛生上リスクの高い菌群を検出する目的の抗体を用いた免疫学的手法による迅速法についての検討は順調に進んでお

り、サルモネラとカンピロバクターでそれぞれ有効な抗体の取得と迅速法への応用が進んでいる。黄色ブドウ球菌では、ヒトの発症に直接かわるエンテロトキシンに対する抗体を作成し、迅速検査法への応用を進めた。免疫学的方法は従来法との組み合わせも可能であり、血清型、ファージ型診断、パルスフィールド電気泳動および PCR による DNA 診断など更に詳しい検査を追加し行うことが容易である。一方、遺伝子を標的とした検出法については、酵素標識プローブ DNA を用いた検出システムと、迅速検出に向いている蛍光偏光法や装置の小型化・簡素化に最適な電気化学的方法についても検討を開始し、これまでの結果からその応用性は高いと期待される。抗体とは異なった遺伝子をターゲットとする迅速検出法は一度システムが完成すると、遺伝子情報を変えることにより多くの微生物への応用は容易であり、汎用性は高い。一方、遺伝子を対象とした PCR 法などの迅速診断では、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という欠点も指摘されている。研究班では遺伝子を標的とする検査法ではこの点を考慮に入れた検討も行っている。

病原性や環境抵抗性因子の検討により、新奇の重要な蛋白が複数発見され、それぞれの機能を解明してきた。この結果から SEp22 はサルモネラの重要な病原因子であることが明らかとなり、カンピロバクターでは球形化に係わる重要なタンパク質を特定できた。これらをマーカーとする検査法は、食品衛生上特にリスクの高と思われる菌群を特定することが期待され、その道を開いたことは、この研究班の最も重要な研究成果と思われる。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。この抗体を用いて 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。本抗体は、本研究班の目的とする食品および環境中における病原性サルモネラの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を可能とし、マウスやヒトへの感染機序の解明など基礎的な研究への応用に大変有用である。また、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、SEp22 の検出によって病原性の特に高い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。

リスクマネージメントへの応用では、養鶏場の現場で、産卵鶏に関してサルモネラの従来法と迅速法での検査のデータが蓄積しており、本研究班の研究終了時には迅速検査法の評価が出来るものと思われる。

## E. 結論

食中毒起因菌の病原性、環境抵抗性などの因子の解析により、サルモネラの病原因子と、カンピロバクターの重要な環境抵抗因子を発見し、これらの病原性や環境抵抗性に関する基礎的知見を得た。食中毒起因菌の検出に重要な特異的抗体作成と検出用の遺伝子配列を決定した。食品衛生上リスクの高いと思われる菌群を特定するマーカーを発見し、これらのマーカーに対する抗体を作成した。遺伝子を標的とした検出法については、酵素標識プローブ DNA の開発を行った。標識酵素および標識について最適なものを検討し、その測定条件の最適化を行った。特定のタンパク質や遺伝子を用いた食中毒菌の高感度迅速検出法の養鶏場への応用につき、従来の培養による方法との併用により、現場での検討を続けている。以上、当初設定した研究計画の内容を十分満たした上で、さらに基礎研究の成果として新奇なタンパクの機能を複数報告するなど予想を越える成果を上げることが出来た。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Fukuda S, Tatsumi H, Igimi S, Yamamoto S. (2005) Improved bioluminescent enzyme immunoassay for the rapid detection of Salmonella in chicken meat samples. Letters in Applied Microbiology. 41:379-384.
2. Terai S, Yamasaki M, Igimi S, Amano F. (2005) Expression of SEp22, a pathogenicity related protein of Salmonella Dps, in Salmonella enterica serovar Enteritidis isolated from the poultry farms in Japan. Bioscience and Microflora. 24:113-118.
3. 天野富美夫, 炭岡孝志, 寺井志織. (2005) 病原性関連因子 SEp22 を発現するサルモネラ

環境分離株の接着因子について. Bacterial Adherence & Biofilm 19:40-46.

4. Igimi S, Yamasaki M, Yamamoto S, Amano F. (2006) An anti-Salmonella antibody prevents the Salmonella enterica serovar Enteritidis from infecting a human intestinal epithelial cell line, Caco-2, by interacting with flagella. Bioscience & Microflora. in press
5. Terai S, Yasuda M, Amano F. (2006) Regulation of SEp22 expression in Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis by culture medium. Microbe and Environ. in press.

### 2. 学会発表

1. Terai S, Yamasaki M, Igimi S, Amano F. Growth-dependent expression of a pathogenicity-related Salmonella Dps protein Sep22. 日本細菌学会総会 2005.4.4 東京
2. 天野富美夫, 寺井志織. サルモネラの新規病原性関連因子 SEp22 の、マウス経口感染における病原性の発現に対する役割. 第 78 回 日本細菌学会総会, 2005.4.4 東京
3. 天野富美夫, 山崎学, 五十君静信, 石井克幸, 寺井志織, 杉山奈穂子. サルモネラの環境分離株から見出した新規病原性関連因子 SEp22 の発現調節機構と病原性発現機序に関する研究. 学際シンポジウム「環境から病原細菌を見る」, 2005.5.16. 東京
4. 寺井志織, 山崎学, 五十君静信, 天野富美夫. サルモネラの新規病原性関連因子 SEp22 の菌の増殖に依存した発現および分解調節機構の研究 第 52 回 日本生化学会近畿支部例会, 2005.5.28. 神戸
5. Terai S, Sumioka T, Amano F. Reduced expression of a cell surface protein in a Salmonella Enteritidis mutant lacking SEp22, Salmonella Dps, and increased binding of this mutant to macrophages. The 4th Awaji International Forum on Infection and Immunity. September 7, 2005, Hyogo, Japan.
6. Terai S, Yamasaki M, Igimi S, Amano F. Rapid degradation of a pathogenicity-related SEp22 protein in Salmonella Enteritidis. 第 78 回日本生化学

学会大会, 2005.10.21. 神戸

7. Yamasaki M, Amano F, Kim T W, Yamamoto S, and Igimi S. Aerobic stress responses of *Campylobacter jejuni* precultured under anaerobic condition. 13th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms. 2005.9.4. Australia.
8. 山崎学、五十君静信、山本茂貴。カンピロバクターの酸素ストレスに対する応答性。第26回日本食品微生物学会学術総会シンポジウム“Campylobacter 食中毒の制御” 2005年11月10日。金沢
9. Yamamoto S, Yamazaki M, Kim TW Igimi S.

Risk profile of *Campylobacter* food borne disease in Japan. 40th Toxic Microorganisms Joint Panel, UJNR Scientific Session. 2005.11.16. Matsushima.

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



## 食品添加物等の新機能性に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部  
研究者 広瀬 雅雄

**研究要旨** フラボノイドを主成分とする酵素処理イソクエルシトリン、ヤマモモ抽出物あるいはムラサキトウモロコシ色素の発がん抑制作用について解析している。酵素処理イソクエルシトリンについては、ラット大腸中期発がん性試験法及びラット肝中期発がん性試験法の標準的スケジュールに従い、ヤマモモ抽出物についてはラット大腸中期発がん試験法により、0.01, 0.1 及び 1%濃度で混餌投与した。その結果、大腸中期試験法の 10 週剖検群では、いずれの被験物質も腫瘍発生に対し影響を示さなかった。大腸中期試験法の 20 週剖検群及び肝中期発がん試験法については実験を継続しており、それらの結果をあわせて最終評価する。また、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットにおいて乳腺発がん抑制作用の示されたムラサキトウモロコシ色素は、同ラットの乳腺腫瘍由来細胞株に対し、細胞増殖抑制作用及びアポトーシス誘発作用を示した。

### 分担研究者

- (1) 名古屋市立大学大学院医学研究科  
分子毒性学分野 津田洋幸
- (2) 香川大学医学部腫瘍病理学 今井田克己
- (3) 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社  
学術部 鈴木幸雄

### A. 研究目的

種々の天然物質のがん予防作用に関して多くの研究が進められているが、isothiocyanate のように予防物質として期待されていたものの中には (Yu et al., Cancer Res., 58:402-8, 1998) 発がん性が認められるなど毒性面で問題となる物質も多い (Ogawa, Hirose et al., Nutr. Cancer, 40, 134-9, 2001)。一方、現在多くの天然添加物が流通しており、これらの安全性については検討が進められている。それらの中には、ポリフェノール類や含硫化合物など、がん予防が期待される物質が数多く含まれているが、一般的にいずれの臓器組織を対象にした予防に関しても評価方法が複雑で、解析に長期間を要することから殆ど検討されていない。大腸発がんに関しては、予防物質のスクリーニングに用いられてきた腫瘍性病変を最終指標とした試験法は 30~40 週間と長期間を要することから、多数の物質を対象とした研究の立遅れがみられ、aberrant crypt foci (ACF) を指標にしたラット短期大腸試験法を用いた研究が多数報告されているが、中・長期試験での腫瘍発生と必ずしも一致しないものもあり (Zheng et al., Carcinogenesis, 20, 255-60, 1999)、適切な試験法を用いてがん予防物質を探索することが期待されている。乳腺発がんに関しては、腫瘍性病変を最終指標とした試験法が広く用いられているが、30~40 週間と長期間を要することから、多数の物質を対象とした研究の立遅れがみられる。一方、

肝発がんに関しては、ラット肝における前がん病変として広く認知されている胎盤型 glutathione S-transferase (GST-P) 陽性細胞巣を指標とした肝中期発がん性試験法により、多数の化学物質の発がん修飾性が検証されている。本研究では、我々が新たに開発した大腸発癌物質の 1,2-ジメチルヒドラジン (DMH) と大腸炎誘発物質であるデキストラン硫酸 (DSS) の組合せ投与による腫瘍性病変を最終指標としたラット大腸中期発がん性試験法及びヒトプロト型 *c-Ha-ras* を導入したトランスジェニックラット (Hras128) 乳腺発がん高感受性モデル、前がん病変を指標として化学物質の発がん性を比較的短期間に高い信頼性を持って予測できるシステムとして確立されたラット肝中期発がん性試験法を用いて、既存添加物を中心としてそのがん予防作用を検討する。

今年度はルチンの水に対する溶解度向上を図るためにその糖鎖構造を変換させ、フラボノイドである $\alpha$ -グリコシルイソクエルシトリンを主成分とする酵素処理イソクエルシトリン、及びヤマモモ (*Myrica rubra* SIEBOLD) より抽出して得られ、やはりフラボノイドであるミリシトリンを有効成分とするヤマモモ抽出物について検討を行った。フラボノイドはフェノール性水酸基を多数含むことから抗酸化作用を示し (Herrmann et al., J. Food. Technol., 11, 433-448, 1976)、酵素処理イソクエルシトリン及びヤマモモ抽出物ともに酸化防止剤として使用されている。フラボノイドについてはがん予防作用に関する報告もみられ (Feng et al., Free Radic. Res. 35, 779-788, 2001)、azoxymethane によるイニシエーション後、クエルセチン類縁化合物であるルチン、クエルセチンあるいはモリンを投与したラットモデルにおいて、大腸 ACF 発生の抑制作用が報告されている (Wargovich et al., Carcinogenesis, 21, 1149-1155, 2000; Tanaka et al., Oncol. Rep., 6, 1333-



---

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

平成18年7月31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