

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 of 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ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	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	綱脇祥子 …… 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	アレルゲン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	アレルゲン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共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型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

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

所 属 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部
研究者 工藤 由起子

研究要旨 食中毒細菌等の有害細菌の食品の検査に応用できる迅速性に優れる遺伝子増幅法の問題点と改善について検討を行った。さらに、食品の衛生指標として測定される一般生菌数の遺伝子手法を用いた系を検討した。

分担研究者

- (1) 栄研化学株式会社 池戸正成
- (2) 株式会社日清製粉グループ本社
田中啓子

A. 研究目的

食中毒細菌の迅速検査法である新規遺伝子増幅法の LAMP 法は、その感度、特異性および操作の簡便性から非常に有用な方法である。反面、現状の Golden standard 法の培養法との感度・特異性の差により、両方法での成績に違いが生じる恐れがある。そこで、食中毒細菌の検出試験における LAMP 反応の特異性の確認法として、LAMP 増幅産物を制限酵素で処理し、得られた断片の分子量とその配列の解析により反応の特異性を確認する方法を検討した。

また、LAMP 法等の遺伝子増幅法を用いた迅速検出法は食品成分による感度の低下が考えられる。有害細菌の食品汚染は通常ごく少量の菌によることが多く、さらにその食品中には競合する多数の一般細菌が存在するため、増菌培養等の培養法が必須となる。しかし、食品中の競合する細菌が検出に際して妨害することが考えられる。このため食品の細菌叢の解析を行い、これらを抑制する方法を組み合わせる事によって、目的の食中毒細菌が効率的に検出でき、迅速検出法の感度を補うものと考えられる。

さらに、食品衛生法に基づく成分規格や製造基準、調理基準、保存基準、加工基準などに微生物の規格が定められている。特に、生菌総数は一般生菌数とも呼ばれ、標準寒天培地にて 48～72 時間好気性培養して得られる微生物

の総集落数を把握することとして国際的に広く支持されている。しかし、この方法の場合微生物の増殖をモニターする試験であるため、検査に要する時間が長いという欠点がある。惣菜などの腐敗し易い食品の場合、製造後可能な限り早く出荷する必要があり、食品に汚染する一般生菌数を迅速に検査する方法が広く求められている。そこで、一般生菌数を迅速に測定する新規な方法を開発することに焦点をあて、研究を行った。

B. 研究方法

1. 腸管出血性大腸菌のベロ毒素(VT)検出における LAMP 反応の特異性の確認

LAMP 法には、VT1 と VT2 に対応した系があるため、それぞれの標的遺伝子の配列から、制限酵素の切断部位を検索した。検索した制限酵素の中から LAMP 反応の増幅領域内に作用部位があるものを選別し、あわせて VT1 と VT2 の鑑別にも有用と思われる制限酵素を選定した。これらの制限酵素を用いて VT1 と VT2 の LAMP 産物を処理し、特異性の確認の検討を行った。

制限酵素処理で得られた断片の分子量確認のために、VT1、VT2 のおのこの LAMP 増幅領域内に作用部位を有し、VT1、VT2 の鑑別に有用な制限酵素を検索した結果、*Hind* III と *Eco*T221 を選定した。VT1 の配列からこれら 2 種の制限酵素での消化パターンを予測すると *Hind* III では、189～193 bp と 46 bp になり、*Eco*T221 では消化されない。一方、VT2 では *Hind* III では消化されず、*Eco*T221 で、105 bp と 122 bp に消化さ

れることが推測できた。VT1 産生株として *Escherichia coli* EKN 3631、VT2 産生株として *E. coli* EKN 3632 を用い、それぞれの LAMP 反応での増幅物を制限酵素、*Hind*III および *Eco*T221 で消化し、2%アガロースゲルで電気泳動を行い、消化物の分子量を確認した。

制限酵素により得られた断片の配列確認のために、VT1、VT2 産生株 *E. coli* EKN 5902 の LAMP 産物を *Hind*III で消化したものをエタノール沈殿し、それぞれ VT1 用インサート DNA とした。サブクロニングには *Hind*III、*Pst*I がマルチクロニングサイトにあり、挿入の有無をコロニーの色で選択できるベクター(pBS SK+)を使用した。*Hind*III 消化と BAP (bacterial alkaline phosphatase)処理を行ったベクターとインサート DNA を混合した後、ライゲーションを施した。これにより、*Hind*III サイトには *Hind*III 消化物のみが挿入される。*E. coli* JM109 への導入を行った後、IPGX-Gal を添加した LB 寒天平板上に塗抹し、37℃、一夜培養後、白色コロニーを選択し直接 PCR を行った。この時のプライマーはベクターのマルチクロニングサイトをはさむように置かれた M13F と M13R を用い、インサート DNA を含む形で増幅させた。増幅物はゲル抽出法で精製後、北海道システムサイエンス(株)にてシーケンス解析を行った。

2. 食品における細菌叢の解析

市販されているサラダやカットフルーツなどを用いた。サンプルはサラダ類 9 種類、カット野菜 9 種、スプラウト類 7 種類およびカットフルーツ 9 種の合計 34 検体であった。それぞれの食品 25 g に等量の PBS を加えてホモジナイズし食品乳剤を調整した。これの 10^{-4} までの 10 倍階段希釈液を TSA 平板培地に塗抹し、静置培養後生菌数を測定した。

上記検体のうち、大豆スプラウト、サラダ(キャベツ、パプリカ、スプラウト)、カットほうれん草、ミックスハーブ、カットパイヤの 5 検体については、優勢菌を分離するために 25-100 コロニーが生育した平板を選択し、7-15 コロニーをランダムに釣菌し計 49 株について 16S rDNA シークエンスによる同定を行った。

供試菌株を TSB に接種し、30℃で 18 時間培養後 Sambrook ら(1989)の常法で DNA 抽出を行い、Lane ら(1991)のプライマーを用いて PCR 反応を行った。PCR は 100 μ l で行い、反応組成は 10 mM Tris-HCl (pH9.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、5 pmol プライマー(27F, 1492R)、0.2mM dNTPs、0.5 U Taq DNA ポリメラーゼ、50 ng テンプレート DNA、反応条件は 94℃4 分の後、94℃30 秒、58℃1 分、72℃1 分を 30 サイクル、その後 72℃4 分で行った。産物は Montage PCR centrifugal filter unit (Millipore, Bedford, MA)を用いて精製した。精製 16S rDNA は BigDye terminator v. 3.1 sequencing kit (Applied Biosystems)を用いて Dye-Terminator 法によるサイクルシーケンシング反応を行い、AutoSeq G-50 (Amersham)を用いて精製後、ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)により配列を決定した。DDBJ データベースより BLAST 2.0 アルゴリズムを用いて同定を行った。

3. Real-Time PCR 法による一般生菌数測定法の検討

昨年度成果より把握したモデル食品から検出された細菌叢を、本研究におけるモデル細菌叢とした。これら細菌叢全般を検出可能な 16S rDNA 上のユニバーサルプライマーを設計する。このプライマーセットにより増幅領域は 16S rDNA の大部分をカバー可能となる。各々のプライマーセットを用い増幅した DNA 断片をプラスミドに挿入し、スタンダードプラスミドを作成する。各プライマーセットを用い Real-Time PCR を行い、作成したプラスミドを用い、細菌数定量のための検量線を作成する。得られた測定系で実際の食材での生菌数を測定する。

(倫理面での配慮)

本研究で用いた微生物は食品から分離された細菌であり、属種名の同定がなされている。その結果、いずれの細菌も毒素産生、感染性は無く、食品等に常在する細菌であることを確認し使用した。このため、本研究においてはこれら細菌使用により研究者、および研究施設に立ち入る者に対し何ら危害を与えないものと判断した。なお、これら細菌由来 DNA をプラスミド化するにあたり行われた組換え DNA 実験は、当社組換え DNA 実験委員会においてその

安全性を審議され、認可された後実施された。

C. 研究成果

1. 腸管出血性大腸菌のベロ毒素(VT)検出における LAMP 反応の特異性の確認

制限酵素処理で得られた断片の分子量確認のため、VT1 産生株 (*E. coli* EKN 3631)では、*Hind*IIIで消化した結果、図に示すように予測した約 190 と 50 bp に収束したバンドが確認され、*Eco*T221 処理ではラダーパターンのままで消化されないことが確認された。同様に VT2 産生株 (*E. coli* EKN 3632)は、*Eco*T221 の消化パターンでは、推定される約 100 と 120 bp の産物の泳動が確認でき、一方 *Hind*III では消化されないことが確認できた。これにより LAMP 反応は目的とした領域を特異的に増幅していることが確認できた。

制限酵素で得られた断片の配列確認のため、シーケンス解析の結果、ターゲット領域として LAMP で使用しているプライマー領域(B1、B2)とそれには含まれる部分に、想定した配列(3'-TTTTTC - 5')が確認され LAMP 反応が目的とした領域を特異的に増幅していることが確認できた。

2. 食品における細菌叢の解析

34 種類の Ready-to-eat 食品であるサラダやカットフルーツにおける生菌数は、これらの食品の生菌数は培養法で測定したところ、 10^3 から 10^8 であった。このうち、カットフルーツでは 10^3 から 10^5 の比較的低い値を示す検体が多かったが、その他のサラダ類、カット野菜およびスプラウト類では 10^7 から 10^8 の高い値を示す検体が多かった。

16S rDNA シーケンス決定による細菌種の同定によって、検討した 5 種類の検体のうち、大豆スプラウトでは *Acinetobacter junii* が最も優勢であった。サラダ(キャベツ、パプリカ、スプラウト)では *Rahnella aquatilis* 及び *Erwinia persicinus* が、カットほうれん草では *Enterobacter cowanii* が比較的優勢であった。ミックスハーブでは *Pantoea agglomerans* が最も優勢であった。カットパパイアでは、上記サラダと同様に *Rahnella aquatilis* が比較的優勢であった。その他を含め合計

13 種類が同定された

3. Real-Time PCR 法による一般生菌数測定法の検討

惣菜類から一般生菌数として検出される細菌叢である *Leuconostoc* 属、*Pseudomonas* 属、*Pantoea* 属、*Corynebacterium* 属の DNA を鋳型に、選定したプライマーセットを用い PCR を行い各種 DNA を増幅した DNA を pCR4 プラスミドに TA クローニングし、得られた形質転換体より当該プラスミドを単離精製した。これらプラスミドは定量し、希釈後コピー数推定用の標準鋳型 DNA として用いた。まずはこの標準用プラスミドを鋳型に Real-Time PCR の条件を設定した。次に、設定した条件を元に各種モデル細菌からの DNA 抽出法を検討し最適な抽出方法を選定した。決定した各種条件のもと Real-Time PCR を実施したところ、各種細菌数と測定結果は相関した。そこで、これらモデル細菌をモデル食品に添加し、同様に細菌数の推定を行い、平板法により測定した菌数との比較を行ったところ、それぞれ相関することが確認された。しかしながらいくつかの食材では PCR 反応を阻害し、実際の菌数よりも低い測定結果を示す場合、あるいは食材由来の DNA が増幅してしまうケースも散見された。

D. 考察

1. 腸管出血性大腸菌のベロ毒素(VT)検出における LAMP 反応の特異性の確認

LAMP 法は、6 つの領域、4 つのプライマーを必要とし、この 6 つの領域も順番が規定されるため、増幅の特異性は極めて高いとされている。LAMP 反応は、その原理から同一鎖状に目標とした遺伝子領域の互いに相補的な配列が繰り返す構造がいろいろなサイズで合成されるため、産物を電気泳動することで特徴的なラダー状のパターンが得られることから反応の確認が可能である。しかし、PCR 法の産物の電気泳動解析のように想定した領域の分子量による確認は不可能であるため、LAMP 法の産物を制限酵素で切断し、その断片の分子量と配列を解析することで反応の特異性の確認を行った。VT1 産生株と VT2 産生株を用い、それぞれの

LAMP 産物を 2 種の制限酵素(*Hind*Ⅲおよび *Eco*T221)での消化パターンを測定すると、VT1 では *Hind*Ⅲで想定した 189 ~193 bp と 46 bp 付近にバンドが収束し、*Eco*T221 では消化されなかった。一方、VT2 では *Eco*T221 で、105 bp と 122 bp 付近にバンドが確認でき、*Hind*Ⅲでは消化されなかった。この結果により、目的とした遺伝子領域を特異的に増幅していることが確認できた。また *Hind*Ⅲ消化物の遺伝子配列の解析の結果、想定した領域の配列が確認できた。これらの方法を用いることで LAMP 反応の特異性の確認が可能と思われた。

VT1 および VT2 遺伝子の全領域での制限酵素の作用部位の検索の結果、VT1 遺伝子では *Hind*Ⅲおよび *Eco*T221 でそれぞれ 1 カ所、VT2 遺伝子では *Eco*T221 が 1 カ所のみ存在することがわかった。また、VT1 の *Eco*T221 消化部位は LAMP 反応での標的領域から約 200 bp 下流にはずれた部分に存在していることから、これらの 2 種の制限酵素は極めて高い特異性で VT1 および VT2 の LAMP 増幅物に作用することが確認できた。これらの結果から、操作の簡便性からも LAMP 反応の特異性の確認法として LAMP 産物の制限酵素 *Hind*Ⅲおよび *Eco*T221 による消化のみでも可能と思われ、より確実な確認には配列の解析が有用と思われた。

2. 食品における細菌叢の解析

サラダやカットフルーツなど、購入後すぐに食べることの多い、パッケージ済みの Ready-to-eat 食品は、手軽である反面、菌が増殖しやすいことが知られている。本研究で測定した 49 検体についても 1 g あたり 10^7 以上のものが多くあり、衛生面で危惧されるものであった。これら競合する生菌によって目的の食中毒細菌の検出が阻害される事が考えられる。このため、増菌培養および分離培養において競合する細菌を抑制することによって効果的に、さらに正確に食中毒細菌の検出が行えるものと期待される。今回検出した細菌叢について、今後抗生物質等の感受性試験を行い増殖を抑制できる選択剤の選定および用量の決定を行い、増菌培養および分離培養の培地に添加する事によって効果的な培地が確立できるもの

と思われる。また、効果的な増菌方法は遺伝子検出などの迅速検出方法の感度を補えるものと期待できる。

3. Real-Time PCR 法による一般生菌数測定法の検討

惣菜類に汚染するモデル細菌それぞれについて、設計した 16S rDNA ユニバーサルプライマーを用いた Real-Time PCR により細菌毎の定量が可能であることが確認された。しかしながら本方法を一般生菌数測定に適応した場合、細菌種毎の遺伝子量の違い、あるいは膜構造の違いによる遺伝子抽出収量の違いが影響し、種によって定量値にバラツキが存在することが確認された。すなわち、食品に汚染した細菌叢によっては本研究による測定結果と、平板法との相関が得られない事になる。また、rDNA は細菌以外の真核生物細胞にも存在する為、いくつかの食材では菌数以上に測定結果が上乘せされる場合や、逆に PCR を阻害する食材も存在することが確認された。

E. 結論

LAMP 反応の特異性の確認法として LAMP 産物の制限酵素消化パターンの解析およびその配列の確認が有用と思われた。腸管出血性大腸菌のベロ毒素 (VT1、VT2) を対象とした場合、制限酵素として *Hind*Ⅲおよび *Eco*T221 を用いることで LAMP 反応の特異性の確認が可能であった。

また、特定の食品種に絞り生菌数測定および細菌叢の解析を行ったところ、ready-to-eat 食品であるサラダやカットフルーツにおいて、いずれの食品検体においても高い生菌数が認められ主な細菌は *Acinetobacter*, *Rahnella*, *Pantoea* 属菌等であった。これらの競合・生存する菌種を抑制する事によって目的の食中毒細菌が効率的に検出でき迅速検出法の感度を補うものと考えられた。

惣菜類から検出される代表的な細菌について、16s-rDNA 領域の PCR を行い、それぞれ標準用プラスミドを作成し Real-Time PCR を実施したところ、それぞれの細菌に対し定量可能であることを確認した。しかしながら各々の定量値は菌種によりバラツキが有り、設定した測定法では一般生菌数測定は困難であった。食材の影響も低減する

方法も検討する必要性が明確となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Hara-Kudo, Y. and Sugita-Konishi, Y. Antibacterial action on pathogenic bacteria by green tea catechins. Proceedings, The 8th International Symposium on Green Tea, 41-52, 2005.
- Hara-Kudo, Y., Yamasaki, A., Sasaki, M., Okubo, T., Minai, Y., Haga, M., Kondo, K., and Sugita-Konishi, Y. Antibacterial activity of green tea catechin for bacterial spore. J. Sci. Food Agri. 85:2354-2361, 2005.
- Hara-Kudo, Y. Watanabe, H. and Konuma, H. Differences in Survival of *Escherichia coli* O157:H7 under Various Conditions that Reenacts the Cooking of Lunches Implicated in an Outbreak of Hemorrhagic Diarrhea. Epidemiology and Infection 133:1043-8, 2005.
- Hara-Kudo, Y., Yoshino, M., Kojima, T., Ikedo, M. Loop-Mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. FEMS Microbiology Letters. 253:155-161, 2005.
- Hara-Kudo, Y., Segawa, Y. and Kimura, K. Sanitation of seawater effluent from seaweed processing plants using a photo-catalytic TiO₂ oxidation. Chemosphere. 62: 149-154, 2006.
- 田中啓子、本井博文、工藤由起子. 惣菜中のセレウス芽胞制御における加熱処理の効果. 食品衛生学雑誌. 46: 1-7, 2005.
- Hayashidani, H., Hara-Kudo, Y., Kinoshita, S., Saeki, K., Okatani, A. T., Nomura, Y. and Kumagai, S. Differences in heat resistance among pathogenic *Yersinia enterocolitica* depended on growth temperature and serotype. J. Food Prot. 68:1081-1082, 2005.
- Ohtsuka, K., Yanagawa, K., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Salmonella* in unpasteurized liquid egg and typing of the isolates. Applied and Environmental Microbiology. 71: 6730-6735, 2005.
- Nakajima K, Tamura N, Kobayashi-Hattori K, Yoshida T, Hara-Kudo Y, Ikedo M, Sugita-Konishi Y, Hattori M. Prevention of intestinal infection by glycomacropptide. Biosci Biotechnol Biochem. 69:2294-301, 2005.
- Koujitani, E., Horisaka, T., Nomura, Y., Hara-Kudo, Y., Okatani, T. A., Kumagai, S., Iwata, T. and Hayashidani, H. Immuno-magnetic separation and agar layer methods for the Isolation of freeze-injured *Yersinia enterocolitica* O:8 from water. J. Vet. Med. Sci. 68: 195-199, 2006.

2. 学会発表

Hara-Kudo, Y. and Sugita-Konishi, Y. Antibacterial action on pathogenic bacteria by green tea catechins The 8th International Symposium on Green Tea. 2005, May, Soul.

工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 O157 と腸炎ビブリオの食品汚染と制御について. 平成 17 年度食品衛生監視員等研修会. 平成 17 年 6 月 28 日. さいたま市.

工藤由起子. 卵でのサルモネラ汚染とその食中毒について. 静岡県平成 17 年度食中毒処理研修会. 平成 17 年 11 月 16 日. 静岡市.

小林愛子、近藤和雄、小西良子、工藤由起子. 香草や薬味等に用いる植物葉等の抗菌作用について. 日本食品衛生学会第 89 回学術講演会. 平成 17 年 5 月. 東京.

佐々木美穂、近藤和雄、大久保勉、小西良子、工藤由起子. 緑茶カテキンの芽胞形成菌に対する抗菌活性. 日本防菌防黴学会. 平成 17 年 5 月. 大阪.

瀬川優子、工藤由起子、木村邦夫. 三次元微細セル構造磁器質光触媒フィルターによるノリ加工廃水の浄化. 日本防菌防黴学会. 平成 17 年 5 月. 大阪.

谷口裕之、工藤由起子、熊谷進. 絶飲絶食ストレス下のウズラにおけるサルモネラ経口感染. 日本防菌防黴学会. 平成 17 年 5 月. 大阪.

飯渕るり子、工藤由起子、熊谷進. 乾燥環境におけるサルモネラの生存. 日本防菌防黴学会. 平成 17 年 5 月. 大阪.

飯渕るり子、工藤由起子、熊谷進. サルモネラのバイオフィルム形成性と乾燥環境下における生残. 第 140 回日本獣医学会学術集会. 平成 17 年 9 月. 鹿児島.

山路史子、大塚佳代子、古川一郎、尾上洋一、大友良光、工藤由起子. 香料、ハーブ等におけるサルモネラ汚染. 日本食品衛生学会第 91 回学術

- 講演会. 平成 17 年 10 月. 埼玉.
- 山崎省吾、宮坂次郎、三輪憲永、岩出義人、八柳潤、高橋肇、工藤由起子.
魚介類からの *Vibrio vulnificus* の定量検出方法の検討. 日本食品衛生学会第 91 回学術講演会. 平成 17 年 10 月. 埼玉.
- 右井淳子、近藤和雄、澤田拓士、工藤由起子. シリアル、ドライフルーツおよびシード類におけるサルモネラおよび黄色ブドウ球菌の生残に関する研究. 日本食品衛生学会第 91 回学術講演会. 平成 17 年 10 月. 埼玉.
- 後藤元樹、高橋肇、Jagannath、林谷秀樹、高鳥浩介、工藤由起子. 黄色ブドウ球菌の定量 PCR. 第 25 回日本食品微生物学会. 平成 17 年 11 月. 金沢.
- 大塚佳代子、倉園貴之、柳川敬子、工藤由起子、高鳥浩介. 食品および人における *Salmonella* Senftenberg と Weltevreden の分布と細菌学的解析. 第 25 回日本食品微生物学会. 平成 17 年 11 月. 金沢.
- 高橋肇、小沼博隆、工藤由起子. 生菌数の定量 PCR. 第 25 回日本食品微生物学会. 平成 17 年 11 月. 金沢.
- 田久保好慶、後藤元樹、工藤由起子、小沼博隆. リアルタイム PCR 法を用いた魚介類における腸炎ビブリオの部位別分布とその定量. 第 141 回日本獣医学会学術集会. 平成 18 年 3 月. つくば.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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