

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（I）

## 目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonics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 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
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 …… 30
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 …… 40
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 …… 100
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 …… 126
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 …… 144
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 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
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 …… 181
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 …… 196
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 …… 208
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 …… 221
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 …… 235
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 …… 247
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 …… 262
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 …… 286
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 …… 300
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 …… 310
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 …… 318

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 …… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非品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 …… 358
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 …… 373
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 …… 390
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 …… 402
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 …… 417
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 …… 435
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的手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 449
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 …… 466
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 …… 481
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 …… 494
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 …… 509
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 …… 525
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 …… 537
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 …… 551
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 龍兒 …… 566
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 …… 576

## 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

研究期間 平成16年6月～平成19年3月

### 研究要旨

食中毒細菌の食品からの検出において迅速性に優れる LAMP 法やリアルタイム PCR 法などの遺伝子検査について、感度の確保に重要な DNA 抽出法を食品の性質に適応した効果的方法を確立した。また、食品の衛生をはかるための迅速な方法として、指標菌である一般生菌数を遺伝子検査によって測定する新たな方法を開発し評価した。

### 分担研究者

- (1) 栄研化学株式会社生物化学研究所  
池戸 正成
- (2) (株)日清製粉グループ本社  
田中 啓子

### A. 研究の目的

食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関して、食品からの検出に特有の問題点に着目して研究を行うことにした。食品の検査において食中毒細菌等の有害細菌の検出には迅速性が求められており、近年優れた遺伝子検出法が報告されていることから食品への応用が有用と考えられる。しかし、食品の成分や加工工程が検出の過程に影響し正確な測定が行えないことが危惧される。このため食品の特徴をふまえた具体的な方法を検討することが急務と考えた。DNA 濃縮・抽出・精製は遺伝子増幅に重要な点となるため、この点に重点を置いた。また、殺菌工程での菌体からの DNA の損失が検出法の精度に影響することが考えられるため検討を行うこととした。

さらに、食品衛生法に基づく成分規格である「食品、添加物等の規格基準」に含ま

れる生菌総数（一般生菌数）は食品の衛生をはかる指標菌として国際的に広く使われているが、48～72 時間培養するため検査に要する時間が長いという欠点がある。カット野菜や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した。

### B. 研究方法

Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キットを用いて、使用方法に従った処理法(Ex-F 法)と Beige らの水酸化ナトリウムによる熱処理法(アルカリ熱抽出法)、それに市販の核酸抽出試薬キット、TaKaRa DEXPAT DNeasy Tissue Kit, PrepMan Ultra Reagent, High Pure PCR Template Preparation Kit などの各種処理法を用いた。対象食材は、牛レバー、鶏レバー、豚レバー、鶏挽き肉、鶏もも肉、全卵、卵黄、マヨネーズ、プロセスチーズ、ゴーダチーズなどを用いた。食材のノボピオシン加 mEC 培地培養液に菌懸濁液を、接種したものを検体として用いた。

生乳における黄色ブドウ球菌を定量するため、菌を未殺菌生乳に接種し、10,000Xgで4℃ 5分間遠心し、脂肪層と液体が取り除き、沈査に0.05% Tween 20 加PBS を加え3回洗浄した。さらに、PBSにて2回洗浄し、蛋白及び脂肪を除去した。その後、沈査に50Uのアクロモペプチダーゼを加え、50℃で30分間インキュベートしDNAを抽出しリアルタイムPCRの鋳型として使用した。また、黄色ブドウ球菌接種牛乳の加熱処理の影響を検討した。滅菌ガラスバイアル中の1mlの黄色ブドウ球菌生乳に菌を接種し、低温殺菌である63℃ 30分とHTST殺菌である72℃15 秒で加熱処理した。

ベロ毒素(VT)検出における LAMP 反応の特異性の確認のために標的遺伝子の配列から、制限酵素の切断部位を検索した。*Hind* IIIと*Eco*T221 を制限酵素として選定した。サブクローニングには*Hind*III、*Pst*I がマルチクロー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 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。*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℃で一夜培養後、白色コロニーを選択し直接 PCR を行った。増幅物はゲル抽出法で精製後、シーケンス解析を行った。

一般生菌数測定法の検討では、市販されているサラダやカットフルーツなどから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。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。精製 16S rDNA は BigDye terminator v. 3. 1 sequencing kit 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 を用いて精製後、ABI 310 Genetic Analyzer 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。

惣菜類から検討対象とすべきモデル食品を選定して、モデル食品から一般生菌数として検出される細菌叢を把握した。モデル細菌叢として *Leuconostoc* 属、*Pseudomonas* 属、*Pantoea* 属、*Corynebacterium* 属を選定した。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ために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した。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し、得られた測定系で実際の食材での生菌数を測定した。また、フローサイトメータは、全自動細胞解析装置 Cytomics FC500 を使用した。細菌の染色には、核酸染色剤 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit を用いた。食品試料としては ほうれん草白和え、キャベツ、キュウリ、タマネギを用いた。食品試料に 9 倍量の滅菌ミリ Q 水を加え、ストマッカー処理して 10%乳剤を調製した。これらに各細菌培養希釈液を添加したものを試料液とした。FCM で得られたデータの解析は、あらかじめ菌液のみで測定した SS-FS サイトグラム上で菌体が検出される領域をゲート設定し、食品試料液の SS-FS サイトグラム上におけるゲート内粒子について、FL1-FL3 サイトグラムを作成して行った。

### C. 研究成果

食品からの食中毒細菌の迅速検査法としての遺伝子検査法については、生鮮魚介類、液卵、鶏挽き肉、モツ(腸)、レバー、チーズ、牛乳など比較的食品成分の影響が強いと予想される食品について汚染の知られている食中毒細菌を組み合わせ、遺伝子増幅法である PCR や近年開発された LAMP 法による検出を行った。その際に供試する鋳型 DNA の精製を検討した結果、アルカリ熱処理では比較的安定した感

度が得られ、市販の精製キットの一部では感度が優れない食品もあったが検出改善効果が認められたものも多かった。牛乳検体では、牛乳検体においては、DNA抽出を行うために0.05% Tween 20 加PBS を加え3回洗浄し、さらにPBSにて2回洗浄し、蛋白及び脂肪を除去し、その後50Uのアクロモペプチダーゼを含むTE100mlを沈査に加え、50℃で30分間インキュベートする方法によって、純菌の検量線とほぼ重なり相関係数も高い検量線を得た( $r^2=0.99$ )。加熱処理が定量に与える影響については、63℃30分の加熱の後に作成した牛乳の検量線では、非加熱検体で作成した検量線に比べ約2サイクルほど上方に位置した。一方、72℃15 秒の加熱は検量線にほとんど影響しなかった。

特異的な遺伝子増幅の確認が必要であるが、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*T22I を用いることで LAMP 反応の特異性の確認が可能であった。

一般生菌数の迅速測定法の開発については、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。また、惣菜類において、ほうれん草白和え、カット野菜(玉ねぎ、キャベツ、キュウリ)のモデル食材に汚染する細菌類の菌叢を確認した。その結果 *Leuconostoc* 属、*Lactococcus* 属、*Lactobacillus* 属、*Pseudomonas* 属、*Pantoea* 属、*Staphylococcus* 属、*Micrococcus* 属等の細菌が確認された。これら細菌を衛生指標菌とし、16s-rDNA 領域の PCR を行い、いずれの菌においても標的遺伝子が増幅されることを確認した。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あり、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。また、FCM による細菌数は各試料液の FL1-FL3 サイトグラムの細菌検出リージョン内粒子数から、食品試料 1g あたりの細菌数を算出した。FCM により求められた細菌数と平板培養法による生菌数の比較としてキュウリにおける結果、いずれの食品においても、FCM による細菌数と平板培養法による生菌数には高い相関があった(相関係数  $r = 0.96 \sim 0.99$ )。また、2 回の試験における再現性も良好であった。

#### D. 考察

Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キットの使用方法に従った処理法(Ex-F 法)では、前培養液に等量の Ex-F を添加、95℃で10分間加熱後遠心した上清を検体として使用できるため、実際の操作はピペティング→加熱→遠心→ピペティング、と非常に簡易といえるが、血液成分や脂肪分が多い検体についてはアルカリの作用が十分でないと考えられる。またアルカリ熱抽出法のように中和処理をする方がより増幅反応に適していることが考えられる。この方法は、遠心操作や試薬の添加操作等が多いが、レバーや脂肪分が多い食材の試験が可能になること、安価な試薬のみで実施できるという経済的な面からも有用な方法であると思われる。また、レバーの影響は胆汁成分が原因と推測しているが、使用する培地を希釈し材料の持ち込み量を減らすことで回避できることがわかった。牛乳では、黄色ブドウ球菌検出の定量リアルタイム PCR により牛乳中の黄色ブドウ球菌の検出感度を調べ、加熱殺菌乳における測定を前提として、それに特異的な DNA 抽出法および測定阻害について検討した。牛乳は DNA 抽出効率にも影響を与えるため、厳しい洗浄工程を取り入れた結果、牛乳検体で  $10^1$  cfu/ml の感度

で黄色ブドウ球菌を検出することができた。洗淨工程が不十分であると再現性がなく本研究の洗淨工程は正確な定量に必須である。また、低温殺菌の加熱処理が検体からの DNA 回収に影響を与えることから、より正確に菌数を定量するためには加熱条件ごとに検量線を作成するべきだと考えられる。

特異的遺伝子の増幅確認では、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。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であり、より確実な確認には配列の解析が有用と思われた。

一般生菌数の迅速測定法の開発については、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。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。本研究でも 1g 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。また、惣菜類において、汚染する細菌類を衛生指標菌とし、16s-rDNA 領域の PCR を行い、いずれの菌においても標的遺伝子が増幅されることを確認した。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ったが、各々の定量値は菌種によりバラツキが有り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。一方、FCM による細菌数の測定は、いずれの食品においても、FCM による細菌数と平板培養法による生菌数には高い相関があった。また、再現性も良好であることから今後の応用が期待される。

## E. 結論

食品からの食中毒細菌の検出においては、迅速性が求められており遺伝子検査法の導入が急がれているが、血液成分や脂肪分など食品由来の成分が遺伝子増幅反応に阻害を及ぼすことから、食材の効果的な前処理について検討し、LAMP 法やリアルタイム PCR 法などの遺伝子検査について、感度の確保に重要な DNA 抽出法を食品の性質に適応した効果的方法を確立した。また、食品の加熱殺菌の工程で DNA の損失を伴う溶菌を引き起こすことを考慮した定量方法が明らかになった。さらに、食品の衛生をはかるための迅速な方法として、指標菌である一般生菌数を遺伝子検査によって測定する新たな方法を開発し食品製造現場における細菌汚染の簡易迅速検査法として応用することが可能である方法も考案できた。これら成果を基に検査試薬の開発食品からの食中毒細菌などの検出について現実により適応した新規の迅速検査法の検討が行われ、今後の応用が期待できると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Hara-Kudo, Y., Kobayashi, A., Sugita-Konishi, Y., Kondo, K. Antibacterial activity of plants used in cocking for aroma and taste. *J. Food Protection*. 67: 2820-2824, 2004.
- 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., Segawa, Y. and Kimura, K. Sanitation of seawater effluent from seaweed processing plants using a photo-catalytic TiO<sub>2</sub> oxidation. *Chemosphere. in press.*
- Kobayashi, K., Hattori M., Hara-Kudo, Y., Okubo, T., Yamamoto, S., Sugita-Konishi, Y. Glycopeptide derived from hen egg ovomucin has the ability to bind enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J., Agri. Food Chem.* 52:5740-5746, 2004.
- 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.
- Nakajima K, Tamura N, Kobayashi-Hattori K, Yoshida T, Hara-Kudo Y, Ikedo M, Sugita-Konishi Y, Hattori M. Prevention of intestinal infection by glycomacropeptide. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69:2294-301, 2005.
- Hara-Kudo, Y., Nemoto, J., Ohtsuka, K., Segawa, Y., Takatori, K. Kojima T., Ikedo, M. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of Vero toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 56: 398-406, 2007.
- Goto, M., Takahashi, H., Segawa, Y., Hayashidani, H., Takatori, K., Hara-Kudo, Y. Real-time PCR method for quantification of *Staphylococcus aureus* in milk. *J. Food Prot.* 70: 90-96, 2007.
- Ikedo, M. Comparison of Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and conventional culture for the detection of *Legionella* species in hot spring water samples in Japan. *Biocontrol Science*, 10: 117-120, 2005
- 池戸正成. レジオネラ症 Update, 診断法の新しい展開 遺伝子診断: 将来展望を含めて. *臨床と微生物*, 32:341-346, 2005.
- 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.
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.
- 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.
- 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.
- 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.
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし



---

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19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