

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

目 次

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	589
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	636
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	656
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	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄	680
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	691
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	707
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	720
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	728
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	740
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	761
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	772
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	783
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	795
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	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔	826
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	836
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	839
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	919
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	939
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の確立に関する研究	乾 賢一	951
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	966

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	……	979
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	……	1000
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	……	1021
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	……	1042
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	……	1054
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	……	1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹 森 洋	……	1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺 尾 恵 治	……	1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大 隈 邦 夫	……	1090
KHC1204	チオレドキシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井 上 達	……	1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子	……	1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲	……	1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後 藤 雄 一	……	1115

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进行特定し、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討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、黄色ブドウ球菌、リステリアを対象とした。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、二本鎖DNAの特異的塩基配列を認識するZn fingerタンパク質を用いてPCR産物を特異的に迅速検出する方法を開発した。

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。

黄色ブドウ球菌は市販のエンテロトキシンを用い、マウスに免疫して抗体を取得した。リステリアの病原因子であるリステリオリシンO(LL0)は、大腸菌用のベクターを用い、LL0の全長及びその一部の遺伝子を組み込み、his タグ

を付加した蛋白を合成し、マウスの免疫に用いた。

養鶏場から SE を排除する目的で用いたワクチン投与による免疫効果の評価は、鞭毛抗原の SE 特異的なペプチドを固定化した ELISA 法により行った。SE の清浄化の評価はこれまでの培養に方法に加え、迅速法を併用することにより行った。

C. 研究成果

病原細菌の選択と抗体の作成に関して、山本、五十君、矢内原がカンピロバクター、黄色ブドウ球菌エンテロトキシン、リステリアの病原因子である LL0 を用いて検討した。得られた抗体の評価は、精製タンパク質への結合活性、リステリアの LL0 については、精製蛋白と抗体との共存下におけるマクロファージからの $TNF\alpha$ の誘導抑制により行った。結合活性の高いクローンを選択した。これらの抗体は、ペーパークロマト法の抗体として用い簡便迅速検査法としての試作品を作成し実行性を確認した。

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питープと菌の増殖状態や感染性の変化の関連を研究した。

黄色ブドウ球菌エンテロトキシンでは、A 型と B 型で高感度検出可能な抗体を得ることが出来た。その他の血清型のエンテロトキシンでは結合活性が A, B に比べやや劣る結果であった。リステリアの LL0 の免疫では、全長の LL0 で 4 クローン、LL0 の一部を用いた免疫で多数のクローンを得ることが出来た。

天野は、病原性のサルモネラが発現する病原性関連遺伝子 SEp22 の発現が栄養因子および活性酸素によって誘導されることを詳細に検討した。カザミノ酸の特定の画分が誘導活性を示すこと、活性酸素分子種のうち、過酸化水素により特異的に誘導されることを示した。

大田は産卵鶏から SE を排除する目的で、SE 不活化ワクチン投与を行い、その免疫効果の評価する検査法として FliC の一部を合成したペプチドを固定化した ELISA を作成し抗体価をモニターしながら鶏舎の管理を行った。SE と他の菌のモニターは従来の培養による方法と簡便法

を併用し、産卵鶏から SE が完全に排除されていることを確認した。

遺伝子を標的とした検出法については、遺伝子を用いた高感度検出システムとしては、二本鎖 DNA の特異的塩基配列を認識する Zn finger タンパク質を用いて PCR 産物を特異的に迅速検出する方法を開発した。1 塩基対の変異でも大きな蛍光偏光度の変化が確認された。この蛍光偏光度の変化は、1 分程度で飽和に達し、迅速な検出の可能性が観察された。

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、今年度新たにカンピロバクター、黄色ブドウ球菌、リステリアでそれぞれ有効な抗体の取得と迅速法への応用を行った。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。リステリアでは LL0 に対する抗体を検討した。免疫学的方法是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行っており、これまでの結果から系としてはほぼできあがってきたと言える。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い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。病原性のサルモネラが発現する病原性関連遺伝子 SEp22 の発現が栄養因子および活性酸素によって誘導され、カザミノ酸の特定の画分が誘導活性を示すこと、活性酸素分子種のうち、過酸化水素により特異的に誘導されることが示されたことから、サルモネラの衛生対策

としては、次亜塩素酸による鶏卵の洗浄が有効であると思われる。

リスクマネ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、本年度までの結果では、産卵鶏へのワクチン投与とその免疫獲得のチェックにより、SE が培養法および迅速法共に検出されていない。

E. 結論

新たにカンピロバクターおよび黄色ブドウ球菌、リステリアに対する検出用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。遺伝子を用いた高感度検出システムとしては、二本鎖 DNA の特異的塩基配列を認識する Zn finger タンパク質を用いて PCR 産物を特異的に迅速検出する方法を開発した。サルモネラの新規病原因子である SEp22 の性質から、サルモネラの衛生管理として鶏卵の次亜塩素酸による洗浄が有効であることが示された。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、現場での検討が続いている。本年度は、SE ワクチンの免疫効果をモニター可能な ELISA を作成し防御抗体の獲得状況のモニターを行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Igimi S, Yamasaki M, Yamamoto S and 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*. 25(3):117-119.
2. Terai S, Yasuda M and Amano F. (2006) Regulation of Sep22 expression in Salmonella enterica subsp. Enterica serovar Enteritidis by culture medium. *Microbe and Environment*. 21:36-43.
3. 山崎学、五十君静信、山本茂貴。(2006) カンピロバクターの酸素ストレスに対する応答性。日本食品微生物学会雑誌。23(3):114-117.
4. 天野富美夫、川崎友紀子、野原哲矢。マクロファージへのサルモネラ接着に及ぼす

コイダン含有海藻抽出物の阻害効果について。Bacterial Adherence & Biofilm 印刷中

2. 学会発表

1. 花谷有樹子、水本直恵、馬場栄一郎、江川直哉、大田博昭、五十君静信、山本茂貴。サルモネラ（SE）ワクチン接種鶏群について、抗体保持状況から見たSE食中毒発生の危険性の軽減について。第27回日本食品微生物学会学術総会。2006.9.22

2. 天野富美夫、川崎友紀子、野原哲矢。マクロファージへのサルモネラ接着に及ぼすコイダン含有海藻抽出物の阻害効果について。第20回Bacterial Adherence & Biofilm研究会。2006.8。東京

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18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

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