

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700806

研究課題名(和文) 毒素型食中毒に対する植物成分の制御機構の解明とその応用

研究課題名(英文) Investigation of inhibitory effects of plant extracts on toxin type food poisoning and its applications

研究代表者

島村 裕子 (SHIMAMURA, YUKO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：60452025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円、(間接経費) 420,000円

研究成果の概要(和文)：植物抽出物とその含有ポリフェノール類136試料の毒素活性および産生抑制効果を検討した。その結果、136試料中26試料がブドウ球菌エンテロトキシンA (SEA) と結合親和性を有した。また、重合度の高いリンゴ由来プロアントシアニジン (AP) はSEAと結合し、低いAPは結合せずに毒素活性を阻害した。カテキン類では、ガロイル基3位の水酸基がSEAとの結合親和性に関与していた。しかし、ガロイル基4位の水酸基をメチル化したカテキンにおいても毒素産生および活性抑制効果が認められたことから、SEAとの結合がこれら阻害活性に必ずしも関連しているわけではないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aims of the present study are first to investigate the binding activities of plant extracts and its components (n=136) to staphylococcal enterotoxin A (SEA), and second to examine the inhibitory effects of these extracts and components on the production and toxic activity of SEA. As a result, 26 samples inhibited the binding affinity of the anti-SEA antibody to SEA. Although highly polymerized proanthocyanidins in apple extract was bound with SEA directly, lowly polymerized proanthocyanidins inhibited the toxic activity without binding with SEA. Hydroxyl group at position 3 of galloyl group in catechin structure was responsible for binding affinity with the SEA. However methylated-catechins (methyl group at position 3 or 4 of galloyl group) showed inhibitory effect on production and toxic activity of SEA. It was suggested that these inhibitory effects were not necessarily related to the binding affinity of SEA.

研究分野：食品衛生学、食品微生物学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：黄色ブドウ球菌 ポリフェノール エンテロトキシンA

1. 研究開始当初の背景

我が国の衛生環境は近年改善されているが、黄色ブドウ球菌や腸管出血性大腸菌 O-157、O-111 等による食中毒事故が未だに多発し、問題となっている。黄色ブドウ球菌の汚染防止策として抗菌剤の利用が報告されているが、抗菌剤はその濫用により、生態系に大きな影響を及ぼす危険性があり、さらに有益菌である表皮ブドウ球菌等までも殺菌してしまうという問題点がある。したがって、殺菌作用を示さず食中毒菌の毒素の活性のみを阻害する方法が求められている。ブドウ球菌による食中毒は、菌の増殖に伴って産生されるエンテロトキシン (SEs) によって発症する。SEs は、現在 SEA から SEIX まで 23 種類が報告されているが、食中毒起因菌の 8 割以上が SEA によるものであり、ブドウ球菌による食中毒防止の観点から、SEA の産生を抑制または SEA の活性を阻害する素材の開発が望まれている。食中毒菌毒素の活性阻害物質として、茶葉中のカテキン類がコレラ毒素 (Shimamura *et al.*, 2007)、炭疽菌毒素 (Taylor *et al.*, 2005)、志賀毒素およびペロ毒素 (Taguri *et al.*, 2006)、ボツリヌス毒素 (Vuong *et al.*, 2000)、ブドウ球菌エンテロトキシン B (Morinaga *et al.*, 2005) 等を阻害することがこれまでに報告されている。また、ホップ由来のポリフェノールがピロリ菌の毒素を無毒化すること (Rutherford *et al.*, 2012)、リンゴ由来のポリフェノールが SEA の活性を抑制すること (Rasooly *et al.*, 2010) 等が報告されている。しかし、SEA に関して、リンゴ以外のポリフェノールやその他の植物食品について、網羅的に毒素活性阻害成分をスクリーニングした報告はない。さらにブドウ球菌の毒素の産生抑制物質についてもこれまでに報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、植物食品を用いた食中毒の制御法を開発することを目的とし、黄色ブドウ球菌の毒素産生抑制および毒素活性阻害成分を植物食品から探索し、その活性物質の分離・同定を行った。また、それらの植物食品から分離・同定された活性物質に関して、SEA 分子との相互作用を検討し、抗原サイトのコンフォメーションを変化させているのか、また直接抗体の結合部位をブロックしているのかなど、その作用機序についても明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料の抽出および抗菌活性の測定

植物食品 84 試料 (野菜 n=67、茶など飲料 n=14) の熱水またはエタノール抽出物は、各々終濃度 12.5 mg/mL、1.25 mg/mL を添加上限値として試験に供した。36 種の植物由来のポリフェノールの内、茶や果実に含まれているポリフェノール類 (n=23) は、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科の田中隆教授より、

リンゴ由来重合度別プロアントシアニジン画分 (n=6) は、東京薬科大学薬学部柳田顕郎准教授より、テアフラビンおよびその誘導体 (n=4) は、本学食品栄養科学部食品生命科学科の中山勉教授より、メチル化カテキン (n=2) およびノビレチンは、本学薬学部薬学科医薬品製造化学分野の菅敏幸教授より、ポリフェノール系既存食品添加物 (n=16) は、三栄源エフ・エフ・アイ株式会社より供与を受けた。ポリフェノール類は、終濃度 0.5 mg/mL、ポリフェノール系既存食品添加物は、終濃度 5.0 mg/mL を添加上限値として、抗菌活性のない濃度以下で全ての試験に供した。

(2) 菌および毒素と相互作用する物質の探索

Staphylococcus aureus C-29 株 (SEA⁺) の培養液 (10³~10⁴ CFU/mL) 180 μL に (1) で調製した試料 (抗菌活性のない最高濃度) 20 μL を加え、37 °C で 24 時間インキュベートした。培養液中の毒素 (staphylococcal enterotoxin A; SEA) 産生量を Western blot 法を用いて定量した。

(3) 毒素と相互作用する物質の探索

SEA と試料を直接反応させ、相互作用する物質を探索した。SEA 希釈液 (5.0 μg/mL) 180 μL に (1) で調製した試料 (抗菌活性のない最高濃度) を加え、37 °C で 24 時間インキュベートした後、反応液中の SEA 量を Western blot 法を用いて定量した。SEA のバンドの消失が認められた試料を SEA と直接結合している可能性があるかと判断した。

(4) ポリフェノール類と毒素の結合親和性

(3) の Western blot 解析により、SEA のバンド強度が減弱した試料は、SEA の抗体サイトと結合している、抗体サイトのコンフォメーションを変化させている、または抗原抗体反応を阻害している等、いくつかの作用が考えられる。そこで、HPLC 分析を用いて、各試料の SEA との反応前後におけるピーク面積の変化を調べ、各試料が SEA と結合親和性を有するか検討した。SEA と直接結合している可能性があるかと判断したアントシアニン類およびカテキン類を (3) と同様の方法で SEA と反応させた後、アントシアニン類およびカテキン類を HPLC で定量した。未処理の試料と比較して、アントシアニン類およびカテキン類のピーク面積の減少が認められた試料を SEA と直接結合していると判断した。アントシアニン類は 525 nm、カテキン類は 280 nm で解析を行った。

(5) 毒素活性阻害能の検討

C57BL/6J male mice から調製した脾臓細胞希釈液に SEA および各試料を加え、MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay (Promega) を用いて毒素活性阻害能を評価した。+SEA control として試料の代わりに細胞希釈液を、-SEA control として SEA の代わ

りに細胞希釈液を用いた。

(6) 毒素遺伝子発現量の測定

S. aureus C-29 株 (SEA⁺) の培養液 (10³~10⁴ CFU/mL) 180 μL に (1) で調製した試料 (抗菌活性のない最高濃度) 20 μL を加え、37 °C で 3 時間 (lag phase) または 6.5 時間 (early stationary) 培養し、菌体 RNA の抽出を行った。RNA 抽出は RiboPure-Bacteria (Ambion) を用い、PrimeScript RT reagent Kit (Takara Bio.) を用いて cDNA を合成し、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Takara Bio.) を用いてリアルタイム RT-PCR で解析した。

(7) 統計解析

データは control と各サンプル添加群の平均値および標準偏差を算出し、両群間で等分散性の検定 (F 検定) を行い、等分散の場合は Student の *t* 検定、不等分散の場合は Aspin-Welch の検定により統計学的有意差検定を行った。なお、有意水準は 5% とし、両側検定を行った。

4. 研究成果

(1) 試料の抽出および抗菌活性の測定

植物食品、ポリフェノール類およびポリフェノール系食品添加物の抗菌活性を調べた (抗菌活性を示さない濃度の決定)。その結果、ポリフェノール含量が多いまたはカテキン類を多く含む食品添加物は、高濃度では抗菌活性が認められた。各試料は、細菌の生育抑制とタンパク質の結合作用との関連性についても考慮して、求めた抗菌活性を示さない濃度で全ての試験に供した。

(2) 菌および毒素と相互作用する物質の探索 (一次スクリーニング)

抗菌活性を示さない濃度で試料を添加した培地中で黄色ブドウ球菌を培養し、その毒素タンパク質である SEA を Western blot で定量した。その結果、植物食品およびポリフェノール系食品添加物では、25/120 試料、ポリフェノール系食品添加物では、9/16 試料において SEA タンパク質のバンド強度が减弱し、高濃度ではバンドの消失が認められた。これら 34 試料は、毒素産生を抑制している可能性または産生された毒素と相互作用を起こし、毒素活性を阻害する可能性が示唆された。

(3) 毒素と相互作用する物質の探索 (二次スクリーニング)

一次スクリーニングで活性が認められた試料について、SEA タンパク質と試料を直接反応させ、SEA 分子と試料の結合親和性について、Western blot 解析によって調べた。その結果、植物食品およびポリフェノール類では、22/25 試料、ポリフェノール系食品添加物では、4/9 試料で SEA のバンド強度の减弱が認められた (図 1)。

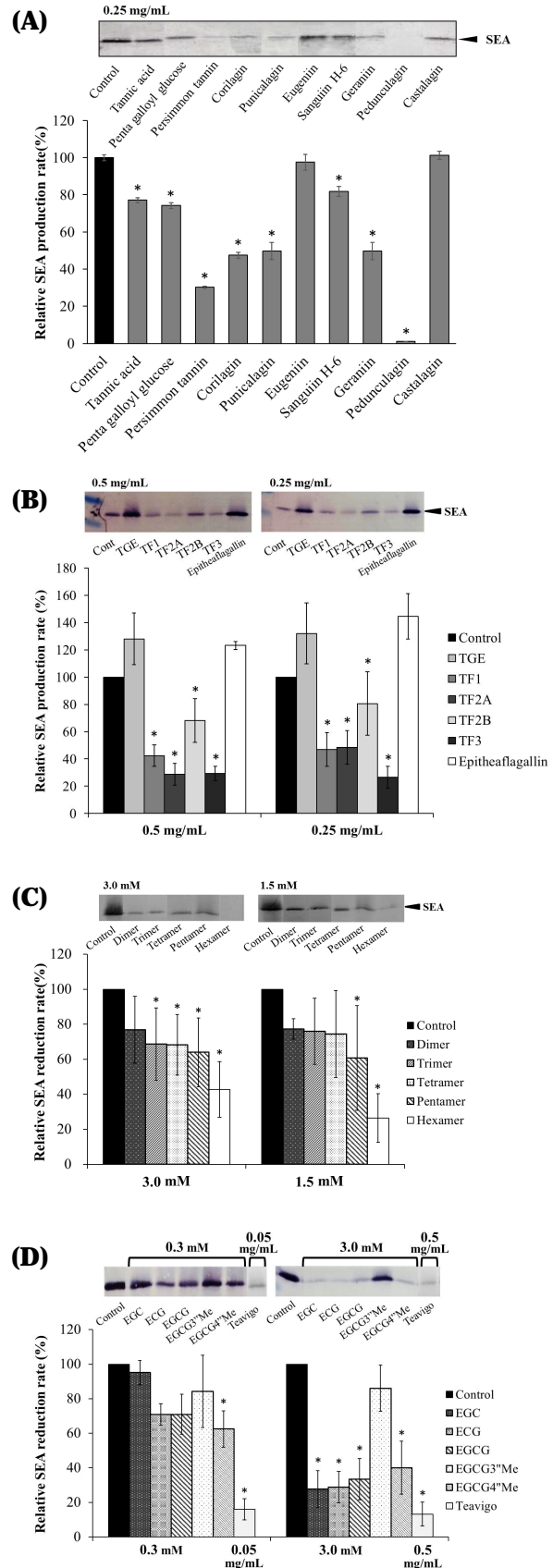


図 1: SEA 分子と試料の結合親和性

(A) タンニン類, (B) テアフラビン類, (C) リンゴプロアントシアニン類 (2~6 量体以上), (D) カテキン類. TGE; theaflavin-rich green tea extracts. Teavigo は EGCG を主成分とする食品添加物. * *p* < 0.05 vs Control

(4) 試料と毒素の結合親和性の検討

試料として、SEA のバンド強度の減弱が認められたリンゴ重合度由来プロアントシアニジン画分 (単量体 ~ 六量体以上) およびカテキン類 (EGCG およびそのメチル化体) を用いた。その結果、リンゴ重合度由来プロアントシアニジン画分においては五量体以上の画分で、カテキン類では EGCG および EGCG4TMMe で HPLC のピーク面積の減少が認められた。これらの結果より、二次スクリーニングにおいて SEA のバンド強度の減弱が認められた試料は、SEA と結合していることが確認された。

(5) 毒素活性阻害能の検討

二次スクリーニングにより SEA 分子と結合親和性を有し、相互作用を起こしている可能性が示唆されたタンニン類 10 試料、リンゴプロアントシアニジン 4 試料 (三量体 ~ 六量体以上の画分)、カテキン類 3 試料、テアフラビン類 6 試料 (テアフラビン類 38% 高含有茶を含む) についてマウス脾臓細胞を用いた毒素活性阻害能の試験を行った結果、全ての試料において毒素活性阻害能が認められた (図 2)。また、リンゴ由来プロアントシアニジンでは、三量体の毒素活性阻害能が最も高く、SEA との結合親和性はプロアントシアニジンの重合度が高いほど強い傾向が認められた (図 2 (C)) ことから、毒素活性阻害能と SEA との結合親和性に関連性がないことが示唆された。さらに、カテキン類では EGCG、EGCG3TMMe、EGCG4TMMe のいずれにおいても毒素活性を阻害しており (図 2 (D))、プロアントシアニジンの結果と同様に、毒素活性阻害能と SEA との結合親和性に関連性がないことが示唆された。

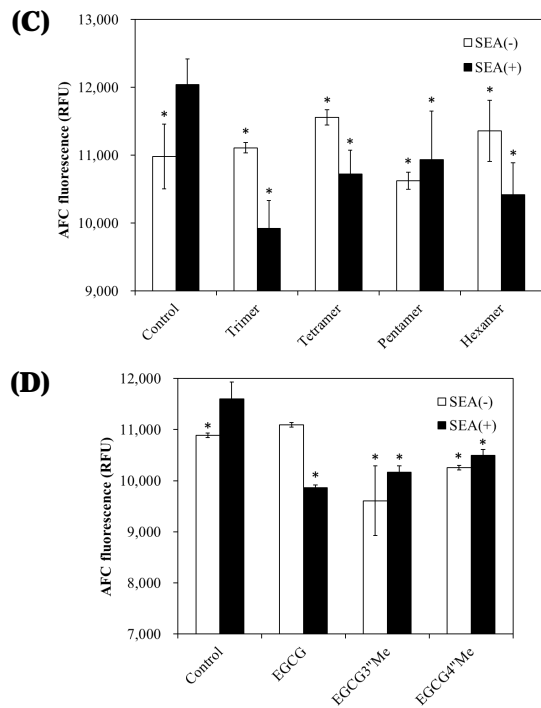
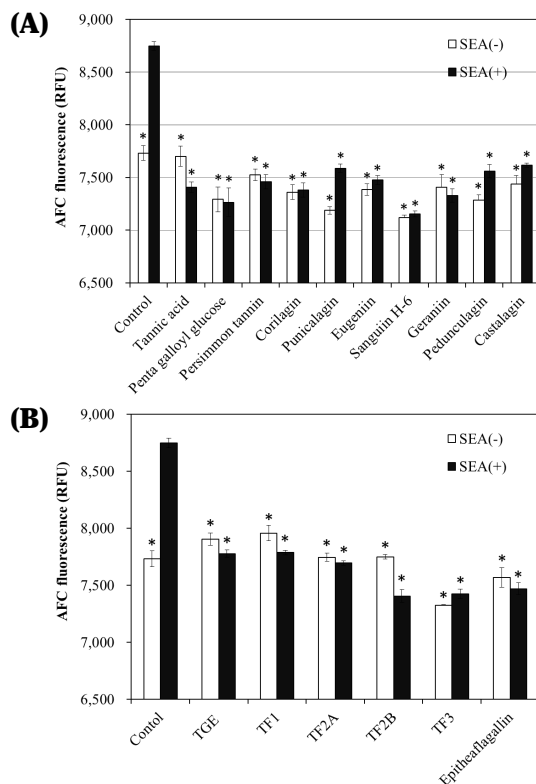
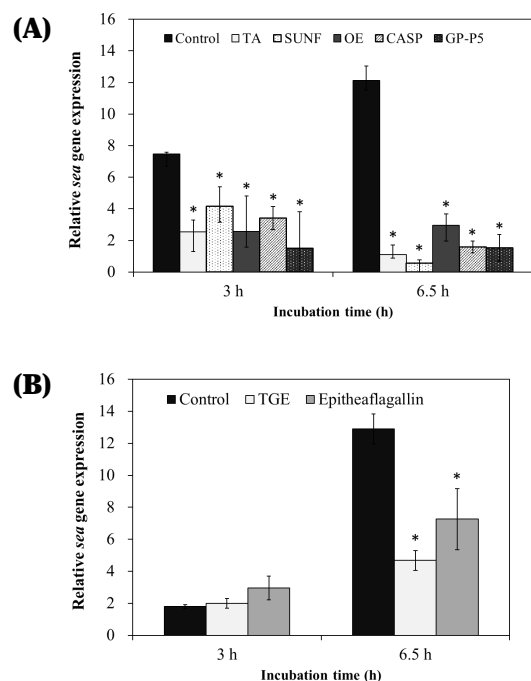


図 2: 試料の毒素活性阻害能

(A) タンニン類, (B) テアフラビン類, (C) リンゴプロアントシアニジン類 (三 ~ 六量体以上), (D) カテキン類. TGE; theaflavin-rich green tea extracts. * $p < 0.05$ vs SEA (+) Control

(6) リアルタイム RT-PCR 法を用いた毒素遺伝子発現量の測定

二次スクリーニングにより SEA 分子と結合親和性を有していなかったポリフェノール含有食品添加物 5 試料、リンゴ由来プロアントシアニジン 3 試料、カテキン類 3 試料において、SEA 遺伝子発現への影響を調べた。その結果、いずれの試料においても SEA 遺伝子発現の抑制が認められた (図 3)。



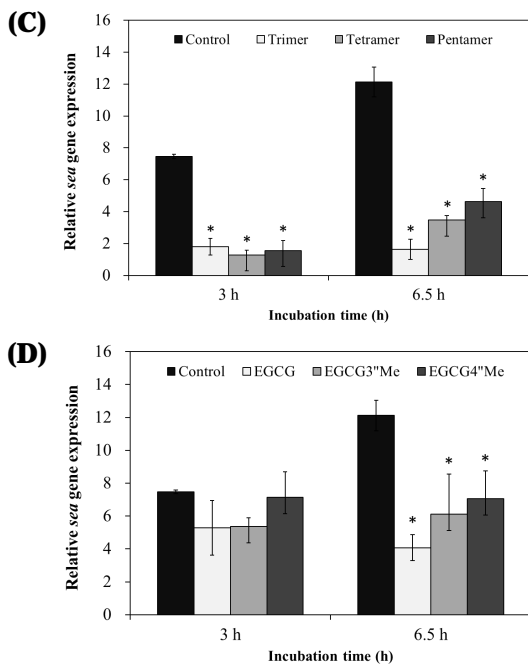


図 3: 試料の毒素遺伝子発現抑制能

(A) ポリフェノール系既存食品添加物, (B) テアフラビン類, (C) リンゴプロアントシアニジン類 (三~五量体), (D) カテキン類. TGE; theaflavin-rich green tea extracts, TA; タンニン酸 AL (富士化学工業株式会社), SUNF; サンフード 100 (三菱化学フーズ株式会社) ,OE; 月見草エキス-P (オリザ油化株式会社), CASP; 明治カシポリフェノール AC10 (株式会社 明治フードマテリア), GP-P5; レスベラトロール P-5 (オリザ油化株式会社). 培養 1 時間後の control の SEA 遺伝子発現量を 1 とした時の各試料の相対値を示す. * $p < 0.05$ vs Control

(7) 研究総括

本研究では、ブドウ球菌食中毒の発生に最も関与している毒素タンパク質 (SEA) をターゲットに、SEA と結合するまた相互作用を示す試料について、植物食品、ポリフェノール系既存食品添加物およびそれらに含まれるポリフェノール類から探索を行い、毒素活性抑制能および毒素産生抑制能について調べた。さらに、その作用機序の解明を目的とし、以下の事を明らかにした。

1. 試料を抗菌活性の示さない濃度で添加した培地中で黄色ブドウ球菌を培養し、その毒素タンパク質である SEA を Western blot で定量した。その結果、34/136 試料において SEA タンパク質のバンド強度が減弱し、高濃度ではバンドの消失が認められた (一次スクリーニング)。
2. 一次スクリーニングで活性が認められた試料について、SEA と試料を直接反応させ、SEA 分子と試料の結合親和性について、Western blot 解析によって調べた (二次スクリーニング)。その結果、26/34 試料において SEA タンパク質のバンド強度が減弱し、高濃度ではバンドの消失が認められた。EGCG3''Me では SEA と結合親和性を有しておらず、EGCG4''Me では SEA と結合親和性を有していたことから、ガロイル基の 3 位の水酸基が SEA との結合に関

与している可能性が示唆された。

3. 二次スクリーニングにより SEA 分子と結合親和性を有した試料の毒素活性抑制能を検討した。その結果、いずれの試料においても毒素活性抑制能が認められた。リンゴ由来プロアントシアニジンでは、三量体の毒素活性阻害能が最も高く、SEA との結合親和性はプロアントシアニジンの重合度が高いほど強い傾向が認められたことから、毒素活性阻害能と SEA との結合親和性に関連性がないことが示唆された。また、カテキン類では EGCG、EGCG3''Me、EGCG4''Me のいずれにおいても毒素活性を阻害しており、プロアントシアニジンの結果と同様に、毒素活性阻害能と SEA との結合親和性に関連性がないことが示唆された。
4. 二次スクリーニングにより SEA 分子と結合親和性を有していなかった 11 試料において、SEA 遺伝子発現への影響を調べた結果、いずれの試料においても SEA 遺伝子発現の抑制が認められた。

本研究の成果より、植物食品、ポリフェノール系既存食品添加物およびそれらに含まれるポリフェノール類は、食中毒菌の毒素活性阻害能または産生抑制能を有することを明らかにした。本研究の成果および今後のさらなる研究により、新たな毒素型食中毒制御法の開発が期待される。

(8) 謝辞

植物食品由来のポリフェノール類を供与してくださった長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 田中隆教授、リンゴ由来重合度別プロアントシアニジン画分を供与してくださった東京薬科大学薬学部 薬物生体分析学教室 柳田顕郎准教授、テアフラビン誘導体を供与してくださった静岡県立大学 食品栄養科学部 食品生命科学科 食品分子工学研究室 中山勉教授、メチル化カテキンおよびノピレチンを供与してくださった静岡県立大学 薬学部 薬学科 医薬品製造化学分野 菅敏幸教授、ポリフェノール系既存食品添加物を供与してくださった三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 品質保証部 浅井以和夫氏に深く感謝申し上げます。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Inui S, Hatano A, Yoshino M, Hosoya T, Shimamura Y, Masuda S, Ahn MR, Tazawa S, Araki Y, Kumazawa S: Identification of the phenolic compounds contributing to antibacterial activity in ethanol extracts of Brazilian red propolis. *Nat Prod Res*. [Epub ahead of print] (2014)

DOI: 10.1080/14786419.2014.898146

Shimamura Y, Yoda M, Sakakibara H,

Matsunaga K, Masuda S: Pu-erh Tea Suppresses Diet-Induced Body Fat Accumulation in C57BL/6J Mice by Down-Regulating SREBP-1c and Related Molecules. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77(7)**: 1145-1160 (2013)

DOI: 10.1271/bbb.130097

Nakanishi Y, Kawamura S, Tsutsuura S, Shimamura Y, Murata M: Reason why food poisoning bacteria attached to shredded cabbage are not efficiently disinfected with sodium hypochlorite. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77(6)**: 1160-1165 (2013)

DOI: 10.1271/bbb.120087

Tsutsuura S, Shimamura Y, Murata M: Temperature Dependence of the production of staphylococcal enterotoxin A by *Staphylococcus aureus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77(1)**: 30-37 (2013)

DOI: 10.1271/bbb.120391

Inui S, Hosoya T, Shimamura Y, Masuda S, Ogawa T, Kobayashi H, Shirafuji K, Moli RT, Kozone I, Shin-Ya K, and Kumazawa S: Solophenols B-d and solomonin: new prenylated polyphenols isolated from propolis collected from the solomon islands and their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.*, **60**: 11765-11770 (2012)

DOI: 10.1021/jf303516w

[学会発表](計8件)

Natsumi Aoki, Yuko Shimamura, Takashi Tanaka, Masatsune Murata, and Shuichi Masuda: Screening of plant extracts for inhibitory effects on the production and biological activity of bacterial toxins. The 1st international conference on pharma and food, (Shizuoka), 2012年11月15-16日

Saori Inui, Takahiro Hosoya, Yuko Shimamura, Shuichi Masuda, Kenichi Shirafuji, Reuben Toli Moli, Shigenori Kumazawa: Solophenols and solomonin; new prenylated polyphenols isolated from propolis collected from the Solomon Islands and their antibacterial activity. The 1st international conference on pharma and food, (Shizuoka), 2012年11月15-16日

青木 菜摘, 島村 裕子, 田中 隆, 村田 容常, 増田 修一: 食中毒菌の毒素産生および活性を抑制する植物食品の探索. 日本農芸化学会 2013 年度大会, (仙台), 2013年3月24日-28日

平石 美季, 島村 裕子, 新家 桃香, 佐藤 勝浩, 青野 博志, 青野 盈瓠, 篠田 和代, 村田 容常, 増田 修一: 食肉中の食中毒菌の分布と電解水による殺菌効果に関する研究. 日本食品衛生学会第106回学術講演会, (沖縄), 2013年11月22日

杉山 由華, 島村 裕子, 柳田 顕郎, 増田 修一: 食中毒菌の毒素産生および活性に対

するリンゴ由来プロアントシアニン画分の抑制効果, 日本農芸化学会中部支部第168回例会, (名古屋), 2013年10月12日

柴田 昌治, 島村 裕子, 増田 修一: 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン A 産生株の溶菌に影響する環境因子の解明. 日本農芸化学会中部支部第168回例会, (名古屋), 2013年10月12日

Sugiyama Y, Shimamura Y, Aoki N, Nakayama T, Masuda S: Screening of tea extract and theaflavins for inhibitory effects on the biological activity and production of staphylococcal enterotoxin A, Shizuoka forum on health and longevity, (Shizuoka), 2013年11月1-2日

杉山 由華, 島村 裕子, 菅 敏幸, 増田 修一: 食中毒菌の毒素産生および活性に対するカテキン類の抑制効果, 日本農芸化学会 2014 年度大会, (東京), 2014年3月

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/foodhygn/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島村 裕子 (SHIMAMURA YUKO)
静岡県立大学・食品栄養科学部・助教
研究者番号: 60452025

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし