

平成13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3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

食中毒菌および毒素のレセプター結合能を応用した検査法の開発とその評価法の確立

所属 国立感染症研究所

主任研究者 山本 茂貴

分担研究者

- | | |
|-----------------------|-------|
| (1) 東京大学大学院 | 熊谷 進 |
| (2) 太陽化学(株) NF事業部研究開発 | 大久保 勉 |
| (3) 栄研化学(株) | 池戸 正成 |
| (4) 東京農工大学農学部 | 服部 誠 |

要旨

現在主な先進国で採用されている食品検査材料を対象とする公的または準公的な検査方法における欠点をなくした新たな食中毒菌の検査法の開発を目的に、糖鎖認識機構を利用した画期的な検査法の開発及びその評価を行う。本年度は、食中毒菌に対して選択的結合能を持つ糖ペプチドの探索を行った。また、選択性向上のために選択的増殖抑制のある低分子物質の検討も行った。その結果、卵白タンパクであるオボムチンから分離した糖ペプチドにサルモネラには結合せず、病原性大腸菌および腸炎ビブリオに特異的に結合するものを見出した。今後この糖ペプチドをセンサーとして支持体に結合させ、検査法として応用するとともに、新たな糖ペプチドの検索も行う。

1. 研究目的

現在主な先進国で採用されている食品検査材料を対象とする公的または準公的な食中毒菌の検査法の中で感度を高くするために使われている方法として、特異抗体を用いる免疫ビーズ法がある。この方法は、検出率が高く、大量の試料からの分離性に優れているが、抗体の使用による高コスト、低保存性、煩雑な操作性、特殊な器具が必要といった問題点があり、これらの欠点を無くした新たな検査法の開発が必要であると考えられている。実際、免疫ビーズ法を用いた検査法の煩雑な操作性から、操作ミスも報告されており、社会的にも新規の検査法の開発を早急に行う必要がある。そこで本研究では、菌が腸管上皮細胞表面上の特異的なレセプター物質である糖タンパク質および糖脂質の糖鎖構造を認識することに着目し、その糖鎖認識機構を利用した、抗体を用いる手法にかわる画期的な検査法を開発することが目的である。今年度は、卵白由来のオボムチンをプロテアーゼ分解して調製された糖ペプチドと代表的な食中毒菌との結合能をELISAにより測定し、オボムチン糖ペプチドと結合する菌を検索した。また、クロスコンタミネーションの可能性を予測するため、食品に通常汚染している環境汚染菌に対するオボムチン糖ペプチドとの結合性も検討した。さらに、検査法の初期に行う増菌操作の効率を上げるために、選択的増殖抑制のある低分子物質を見いだすことを目的に、抗菌活性が知られているポリフェノールについて病原細菌に対する抗菌効果および毒素産生抑制効果を検討した。

2. 研究方法

1) オボムコイドならびにオボムチン由来糖ペプチドの調製

新鮮な鶏卵(産卵後24時間以内)の卵白よりオボムチンを単離した。すなわち、オボムチン200mgならびにアクチナーゼE(科研製薬)8mgを10mMリン酸緩衝液(pH8.4)40mlに溶解し、37℃で反応させた。反応開始4、8、20時間後にアクチナーゼE8mgを追加して加え、24時間まで反応を行った。反応の停止は、100℃で5分間加熱することにより行った。以上の処理により得られた試料を蒸留水に対して透析、凍結乾燥した。

凍結乾燥した試料を蒸留水に再溶解し、4°Cで遠心分離(12,000rpm、30分間)を行った後、上清をゲルろ過に供した。

2) 菌体のビオチン化

代表的な食中毒菌としては、*Salmonella Enteritidis*、*Listeria monocytogenes*、*Clostridium perfringens*、*Aeromonas hydrophila*、*Staphylococcus aureus*、*E.coli O157*、*Vibrio parahaemolyticus*を用いた。病原性のない食品腐敗菌としては、*Lactobacillus casei*、*Staphylococcus epidermidis*、*Pseudomonas fluorescens*、*Micrococcus lylae*、*Enterobacter cloacae*、*E. coli*、*Citrobacter freundii*、*Klebsiella omithinolytica*、*Proteus vulgaris*を使用した。まず、種々の菌体をPBS(-)に懸濁し、660 nmの吸光度の値が1.0となるように調整した。次に、その菌体懸濁液に、EZ-Link™Sulfo-NHS-LC-Biotin (PIERCE) を1 mg/mlとなるように添加し、室温で2時間インキュベートした。その後、未反応のビオチン化試薬を除去するために、遠心分離(2500-2800rpm、4°C、20-30 min)で上清を除去後、約3mlのPBS(-)に懸濁し、再度遠心分離を行った。さらに上清除去、PBS(-)で再懸濁、遠心分離の行程を2回行った後、遠心分離前の液量と同じ量のPBS(-)を加え、懸濁した菌体をビオチン化菌体とした。なお、*Vibrio parahaemolyticus*と*E.coli O157*のビオチン化は、 1×10^9 cells/10 ml PBS(-)の菌体に対し、10 mgのEZ-Link™Sulfo-NHS-LC-Biotin (PIERCE)を添加し、室温で2時間インキュベートすることにより行った後、上述のように洗浄し、ビオチン化菌体を得た。

3) ELISA法を用いたオボムチン由来糖ペプチドと菌体の結合能測定

菌体に対するオボムチン由来糖ペプチドの結合能は、96well イムノプレート (Nunc) を用いて測定した。まず、オボムチン由来糖ペプチドを1 mg/mlとなるように、0.1 M 炭酸-炭酸ナトリウム buffer (pH 9.6) に溶解後、順次2倍希釈し、100 µl ずつ96well プレートに分注し、4°Cで一晩、あるいは室温で2時間インキュベートした。なお、negative control として、セラチン加水分解物 (TypeA; 平均分子量約9,000; (株)ニッピ) を1 mg/ml濃度となるように、0.1 M 炭酸-炭酸ナトリウム buffer (pH 9.6) に溶解後、順次2倍希釈し、100 µl ずつ分注した。また、ブランクとして0.1 M 炭酸-炭酸ナトリウム buffer (pH 9.6) を100 µl ずつ分注した。インキュベート終了後、PBS (200 µl) で3回洗浄し、1%BSA/PBSを200 µl ずつ96well プレートに分注し、室温で2時間ブロッキングした。PBS (200 µl) で3回洗浄後、ビオチン化菌体/PBS懸濁液を100 µl ずつ分注し、室温で1時間インキュベートした。PBS (200 µl) で3回洗浄後、菌体をwellに固定するために、60°Cで15分間プレートを乾燥した。プレートを自然冷却後、1%BSA/PBSで2000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン (Zymed) を100 µl ずつ分注し、室温で1時間インキュベートした。PBS (200 µl) で3回洗浄後、0.1% p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムジエタノールアミン塩酸 buffer (pH 9.8) を100 µl ずつ分注し、室温でインキュベートした。5 M NaOH 溶液を20 µl ずつ分注することにより、酵素反応を停止した後、microplate reader (MPR-A41, Tosoh) を用いて、405 nmの吸光度を測定し、菌体に対する結合能を評価した。

4) 腸炎ビブリオ菌液、*Clostridium butyricum*、*Clostridium difficile*、*Clostridium botulinum* および *Bacillus cereus* の芽胞液の作製

C. butyricum、*C. difficile* および *C. botulinum* を GAM 寒天培地に塗抹し、嫌気性ガスバックを用いて37°Cで嫌気培養することによりコロニーを形成させた。*B. cereus* は普通寒天培地に塗抹後、37°Cで好気培養しコロニーを形成させた。コロニーの一部を芽胞染色し芽胞の有無を確認した後にコロニーをかきとり滅菌 Milli-Q 水に懸濁後、遠心により洗いを行い、沈殿を滅菌 Milli-Q 水に再懸濁した。4minの超音波処理を2回行うことで、栄養型細胞の除去を行った。遠心分離後、沈殿を滅菌 Milli-Q 水に懸濁しこれを接種芽胞液とした。

5) 腸炎ビブリオ、*C. butyricum*、*C. difficile*、*C. botulinum* および *B. cereus* に対する抗菌作用の測定

腸炎ビブリオは3% NaCl 添加 BPW 培地 10ml で37°Cで一晩培養したものを接種菌液とした。菌液および芽胞液を1000、500、250、100 および0 µg/ml濃度のポリフェノール液に接種した。腸炎ビブリオに関しては、30°Cで静置し3、6 および24時間目に培養液を攪拌後、上清を採取した。培養液を2% NaCl 添加 PBS で希釈後、3%NaCl 添加 TSA 培地に塗抹し37°Cで一晩培養してCFUを計測した。*C. butyricum* および *C. difficile* に関しては、芽胞液を接種後、15°Cで静置し1日、1、2、4週目に、*B. cereus* および *C. botulinum* に関しては、15°Cで静置し1日、1、2、4、8 および12週目に培養液を攪拌後上清を採取した。*C. butyricum*、*C. difficile* および *C. botulinum* は GAM 寒天培地に塗抹後、1~4日嫌気培養しCFUを計測した。*B. cereus* は普通寒天培地に塗抹後、一晩好気培養しCFUを計測した。

6) 腸炎ビブリオおよび *C. difficile* に対する増殖抑制効果の測定

腸炎ビブリオおよび *C. difficile* の菌液を 1000、500、250、100 および 0 $\mu\text{g/ml}$ 濃度のポリフェノール液に接種した。腸炎ビブリオに関しては 30 $^{\circ}\text{C}$ で静置し 0、3、6 および 24 時間目に培養液を攪拌後、上清を採取した。培養液を 2% NaCl 添加 PBS で希釈後 3% NaCl 添加 TSA 培地に塗抹した。37 $^{\circ}\text{C}$ で一晚培養し、CFU を計測した。*C. difficile* についても同様に接種し 0、8、24 および 48 時間目の各培養液 1.2ml について分光光度計 (Pharmacia Biotech) を用いて 650nm における吸光度を測定することによって菌の増殖抑制を検討した。

7) 腸炎ビブリオ、*C. difficile* および *B. cereus* に対する毒素産生抑制効果の測定

腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒 (thermostable direct hemolysin : TDH) は逆受身ラテックス凝集反応である KAP-RPLA キット (デンカ生研、東京) を用いて TDH 産生性を調べた。各ポリフェノール濃度での 24 時間目の培養液 500 μl をエッペンチューブに分注し、5000 \times g、20min の遠心分離後、得られた上清を検体とした。*C. difficile* に関しては、クロストリジウムディフィシルエンテロトキシンの検出試薬である C.D.チェック・D-1 (塩野義製薬株式会社) を用いて、D-1 抗原をラテックススライド凝集法により検出した。各ポリフェノール濃度での 48 時間目の培養液 500 μl を遠心分離後得られた上清を検体とした。*B. cereus* においては逆受身ラテックス凝集反応である CRET-RPLA キット (デンカ生研、東京) を用いてセレウスエンテロトキシンを検出した。各ポリフェノール濃度での 48 時間目の培養液 500 μl を遠心分離後得られた上清を検体とした。

3. 研究成果

1) オボムコイドならびにオボムチン由来糖ペプチドの分取

オボムチンは Peak 1、Peak 2、Peak 3 の 3 フラクシオンに分けて回収したところ、それぞれ、54.3 mg、17.9 mg、18.3 mg が得られた (Fig. 1)。Fr. 1 ならびに Fr. 2 に糖発色が認められた。電気泳動を行った結果、Peak 1 に糖とタンパク質の存在を示すバンドが得られたので、これをオボムチン由来糖ペプチドとして回収した。収率は 27.2% であった。

2) オボムチン由来糖ペプチドと種々の菌体の結合能

本実験はすべて 3 連で行い、結果は、平均値 \pm 標準偏差で示した。*S. Enteritidis*、*L. monocytogenes*、*C. perfringens*、*A. hydrophila*、*S. aureus*、*E. coli* O157、*Vibrio parahaemolyticus* に対する結果を Fig. 2 に示した。横軸は固相のペプチド量、縦軸は菌体の結合程度を表す。*S. Enteritidis*、(A)、*L. monocytogenes* (B)、*C. perfringens*、(C)、*A. hydrophila*、(D)、*S. aureus*、(E) に対しては、固相のオボムチン由来糖ペプチドの濃度を増加しても、A405 nm の値はほぼ 0 であり、negative control として用いたゼラチン加水分解物のものとはほぼ同様であった。したがって、これらの菌体とオボムチン糖ペプチドは結合しないと考えられた。一方、*E. coli* O157 (F)、*Vibrio parahaemolyticus* (G) に対しては、固相のオボムチン由来糖ペプチド濃度が増加するにつれ、A405nm の値が増加したことから、オボムチン由来糖ペプチドが *E. coli* O157 ならびに *Vibrio parahaemolyticus* と結合したと考えられた。

病原性のない汚染菌に対する結果は、Fig. 3 に示した。*L. casei* (A)、*S. epidermidis* (B)、*P. fluorescens* (C)、*M. lylae* (D)、に対しては、固相のオボムチン由来糖ペプチドの濃度を増加しても、A405nm の値はほぼ 0 であり、negative control として用いたゼラチン加水分解物のものとはほぼ同様であった。したがって、これらの菌体とオボムチン糖ペプチドは結合しないと考えられた。一方、*E. cloacae* (E)、*E. coli* (F)、*C. freundii* (G)、*K. ornithinolytica* (H)、*Proteus vulgaris* (I) に対しては、固相のオボムチン由来糖ペプチド濃度が増加するにつれ、A405nm の値が増加したことから、オボムチン由来糖ペプチドが結合したと考えられた。

3) ポリフェノールの腸炎ビブリオ菌液、*Clostridium butyricum*、*C. difficile*、*C. botulinum* および *B. cereus* の芽胞への抗菌性

腸炎ビブリオに関しては 0、1、3、6 および 24 時間目に CFU を計測した。ポリフェノール濃度 1,000 $\mu\text{g/ml}$ では 6 時間目で、500 $\mu\text{g/ml}$ では 24 時間目で検出限界以下までコロニー数が減少した。ポリフェノール濃度 250 $\mu\text{g/ml}$ では顕著な減少はみられず、100 $\mu\text{g/ml}$ と 0 $\mu\text{g/ml}$ の間において顕著な相違はみられなかった。*C. butyricum* に関しては、0 時間、1 日、1、2 および 4 週間目に CFU を計測した。ポリフェノール濃度 1,000 $\mu\text{g/ml}$ では 2 週間目で、500 および 250 $\mu\text{g/ml}$ では 4 週間目で検出限界以下まで CFU が減少した。ポリフェノール濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ においてもわずかな減少がみられた。*C. botulinum* に関しては、0 時間、1 日、1、2、4、8 および 12 週間目に CFU を計測した。ポリフェノール濃度 1,000 $\mu\text{g/ml}$ では 8 週間目で顕著な減少がみられ、12 週

目には1,000 および 500 $\mu\text{g/ml}$ で検出限界以下に至った。*C. difficile* についても同様の時間経過で CFU の計測をおこなった。本芽胞に対しては、1,000 および 500 $\mu\text{g/ml}$ では2 週間目で、250 および 100 $\mu\text{g/ml}$ では4 週間目で検出限界以下までコロニー数が減少した。*B. cereus* についても、0 時間、1 日、1、2、4、8 および 12 週間目に CFU を計測した。ポリフェノール濃度 1,000、500 および 250 $\mu\text{g/ml}$ において1 週間目までに菌数が1桁減少したがその後はそれ以上減少しなかった。ポリフェノールが非添加の場合は若干菌数が増える傾向であったが、100 $\mu\text{g/ml}$ においては菌数は増えることなくほぼ維持された(図省略)。

4) ポリフェノールの *C. butyricum* 芽胞膜への影響

ポリフェノールが芽胞膜に与える影響を調べるために、*C. butyricum* の芽胞液を 0、100 および 250 $\mu\text{g/ml}$ のポリフェノール液に接種し、約4 週間静置したものについて蛍光顕微鏡下で観察した。ポリフェノール濃度 0 $\mu\text{g/ml}$ および 100 $\mu\text{g/ml}$ においては菌体は生菌であることを示す緑色であったが、250 $\mu\text{g/ml}$ では死菌であることを示す赤色であった。

5) 腸炎ビブリオ、*C. difficile* および *B. cereus* に対するポリフェノールの増殖抑制効果

腸炎ビブリオに関しては0、1、3、6 および 24 時間目に CFU を計測した。腸炎ビブリオに対する増殖抑制効果は 1,000 $\mu\text{g/ml}$ で顕著にあらわれ、6 時間目で検出限界以下まで CFU が減少した。また、500 $\mu\text{g/ml}$ においては減少はみられなかったが、菌の増殖抑制が観察された。ポリフェノール濃度 250 および 100 $\mu\text{g/ml}$ においては 24 時間目までに 0 $\mu\text{g/ml}$ とほぼ同じ値まで菌数が増加した。*C. difficile* に関しては、0、8、24 および 48 時間目に CFU を計測し、その変動を Fig 4 に示した。ポリフェノール濃度 0 $\mu\text{g/ml}$ に比べて 100 $\mu\text{g/ml}$ はほぼ同様の増殖を示したが、500 および 250 $\mu\text{g/ml}$ では少し増殖が弱かった。*B. cereus* については 1,000 $\mu\text{g/ml}$ で最も強い抑制効果が認められた。また、250 および 500 $\mu\text{g/ml}$ においても抑制され、48 時間後には検出限界以下までに菌数が減少した。しかし 100 $\mu\text{g/ml}$ においては 0 $\mu\text{g/ml}$ と比べ 24 時間までは増殖が緩やかであったが 48 時間後には 0 $\mu\text{g/ml}$ と同じ程度の菌数までに増殖した(図省略)。

6) 腸炎ビブリオ、*C. difficile* および *B. cereus* に対するポリフェノールの毒素産生抑制効果

腸炎ビブリオはポリフェノール濃度 250 $\mu\text{g/ml}$ において TDH は検出されず、100 $\mu\text{g/ml}$ においては 0 $\mu\text{g/ml}$ の場合の半量しか TDH が検出されなかった。*C. difficile* においては 250 $\mu\text{g/ml}$ では *C. difficile* エンテロトキシンは検出されず、100 $\mu\text{g/ml}$ においては 0 $\mu\text{g/ml}$ の場合の半量しか TDH が検出されなかった。しかし、*B. cereus* においては 100 $\mu\text{g/ml}$ は 0 $\mu\text{g/ml}$ と同様のエンテロトキシン産生量を示し、産生抑制効果は認められなかった(図省略)。

考察

オボムチン由来糖ペプチドと代表的な食中毒菌との結合能を ELISA 法により測定した。*S. Enteritidis*、*L. monocytogenes*、*C. perfringens*、*A. hydrophila*、*St. aureus* に対しては結合しなかった。これは、オボムチン糖ペプチド中に、これらの菌体が認識する特異的な糖鎖が存在しないためであると考えられた。一方、オボムチン糖ペプチドは、*E. coli* O157、*Vibrio parahaemolyticus* に対しては強い結合能を有することが示され、オボムチン糖ペプチド中に、これらの菌が認識する糖鎖が存在すると考えられた。病原性のない食品腐敗汚染菌を食材検体の菌のモデルとして用いた *L. casei*、*St. epidermidis*、*P. fluorescens*、*M. lylae* に対しては結合を示さなかったが、グラム陰性の腸内細菌科に属する *E. cloacae*、*E. coli*、*C. freundii*、*K. ornithinolytica*、*Proteus vulgaris* と結合することが示された。この結果から、食品に共存する腐敗汚染菌に対しての結合能はあまり強くなく、病原性のある菌のみに選択的に結合する可能性が示唆された。今後さらに糖ペプチドをレクチン選択性で精製し、菌への特異性の高い糖ペプチドの精製を行う。なお、検査の初期段階に行う増菌操作の効率を高めるために選択抑制作用がある低分子物質の検索を行った。低分子物質の一つであるポリフェノールは腸炎ビブリオ、または *C. butyricum* および *C. difficile* の芽胞に対するポリフェノールの抗菌性が認められたが、*C. butyricum* および *C. difficile* については効果が及ぶまでにかかりの時間がかかることが明らかになった。さらに *C. botulinum* の芽胞に対する効果は弱く、*B. cereus* の芽胞に対しては無効であった。腸炎ビブリオ、*C. difficile* および *B. cereus* の増殖抑制効果はポリフェノール濃度 1000 および 500 $\mu\text{g/ml}$ で認められ、*B. cereus* では 250 $\mu\text{g/ml}$ でも認められた。さらに、増殖抑制効果がみられなかった 250 $\mu\text{g/ml}$ において、腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒および *C. difficile* エンテロトキシンを抑制したが、*B. cereus* に対しては毒素産生抑制効果は認められなかった。このように、芽胞に対してはポリフェノールの効果が現れるのに時間がかかることが半明したが、他の栄養型の菌については既

に速やかな抗菌性が知られていることから、ポリフェノールを選択的増殖抑制物質として応用できる可能性が示唆された。ポリフェノールの芽胞膜への影響においては特異的蛍光色素染色を行い蛍光顕微鏡下により確認したところ、芽胞膜を通過して菌体内のDNAを染色していることがわかりポリフェノールは芽胞膜に損傷を与えたことが示唆された。以上の結果から、ポリフェノールは芽胞形成細菌を含めた栄養型細胞の増殖を阻止しやすいが、芽胞にたいしては効果が低い場合もあると考えられた。

5. まとめ

既存検査方法についてその欠点を比較検討した結果、総合的にみて検出全体に要する時間が長いという欠点がある。今後、これらの必要性を満たし、なおかつ短時間で検出できる方法が求められる。簡便迅速な方法も、予備的な調査や自主検査としては有効であると考えられ、今後の発展が望まれる。そこで本研究で目的としている糖鎖認識機構を用いた検出法は短期間で感度の高い検出法として期待される。本年度の成果により、オボムチン糖ペプチドは、*S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *A. hydrophila*, *Sta. aureus* に対しては結合しないが、*E. coli* O157, *Vibrio parahaemolyticus* に対しては結合することが示された。このように、調べた7種の食中毒菌に対して2種の菌にのみ結合が認められたことから、オボムチン由来糖ペプチドが食中毒菌に対して、抗体を用いる手法にかわる検査法に応用できる可能性が示唆された。

本年度検討したポリフェノールは、腸炎ピブリオ、クロストリジウム属およびバチルス属への増殖抑制が見られたことから、これらの菌のクロスコンタミネーションを早期の段階で押さえるには有効であることが明らかになった。これらの成果を踏まえ、今後はさらに選択性の高い糖ペプチドの検索を行うと同時に、これをセンサーとして実践的な方法の検討を行う。

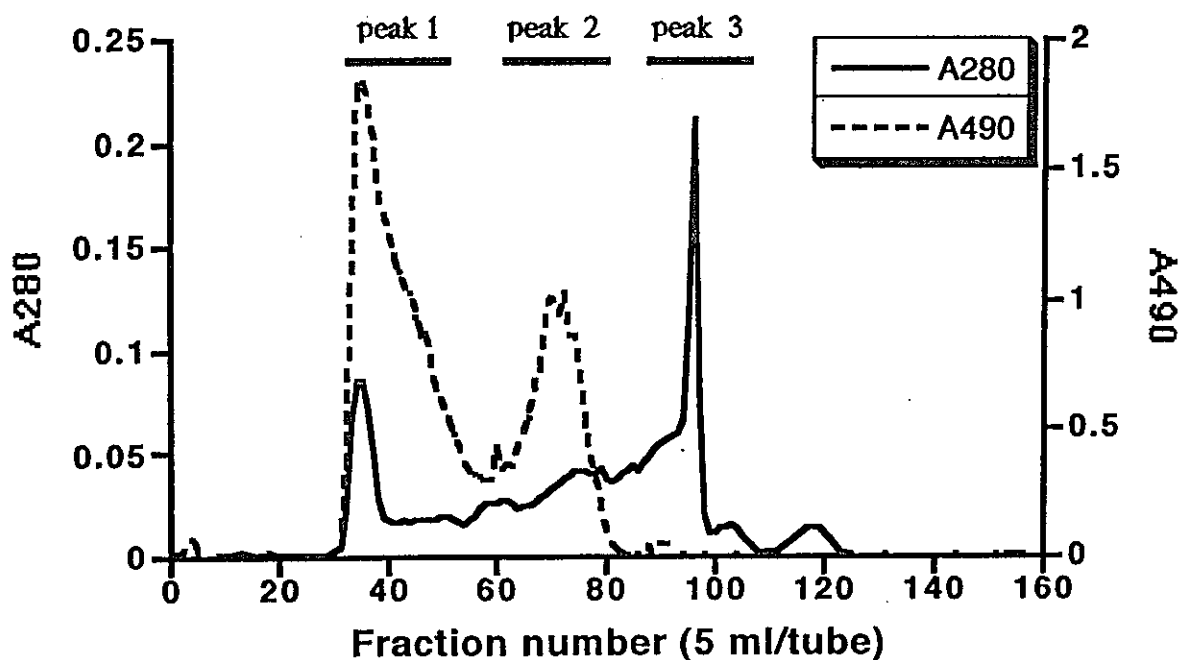


Fig.1 Size exclusion chromatographic pattern of pronase-digested ovomucin.

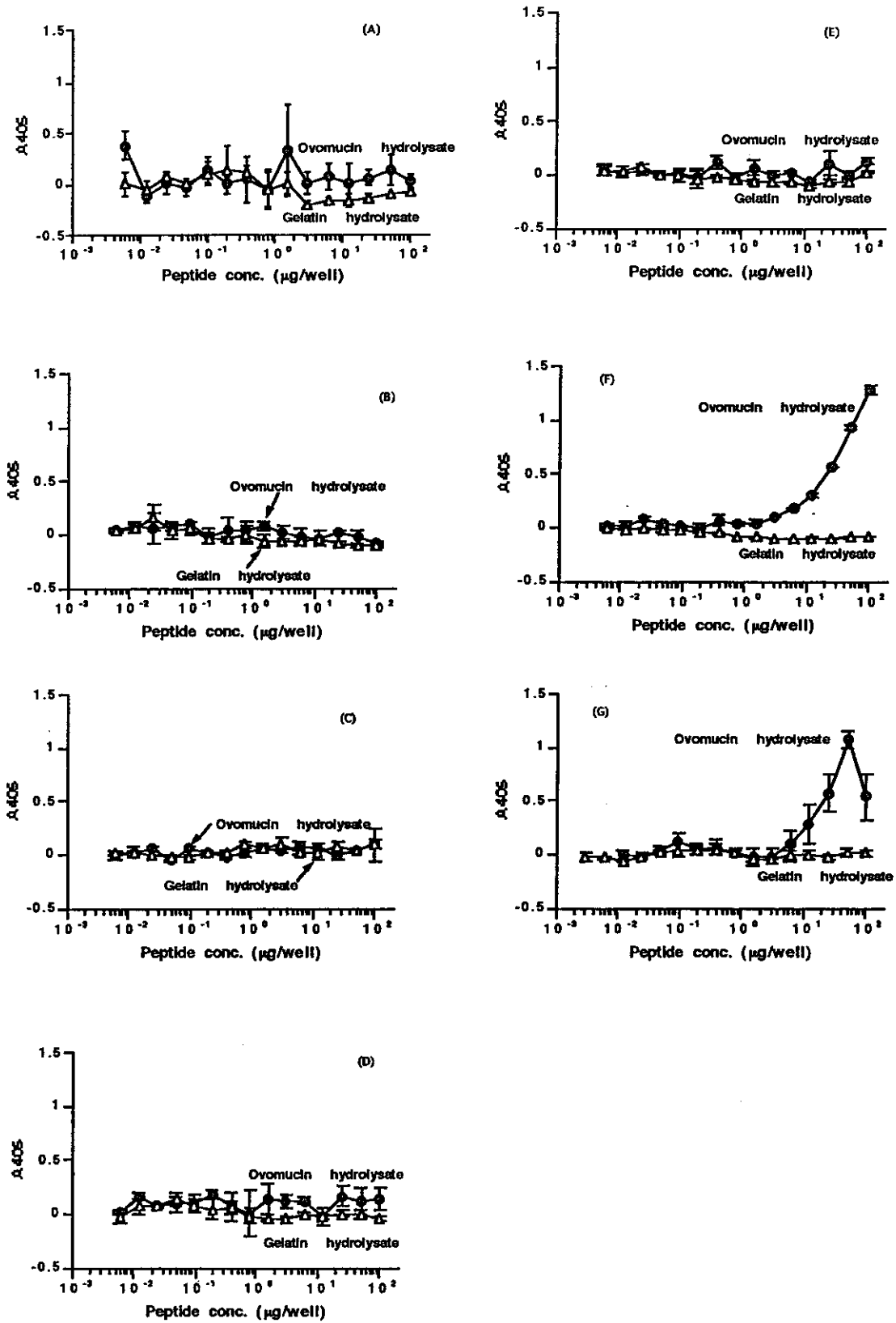


FIG.2 Binding ability of the glycopeptide derived from ovomucin to the pathogenic bacteria

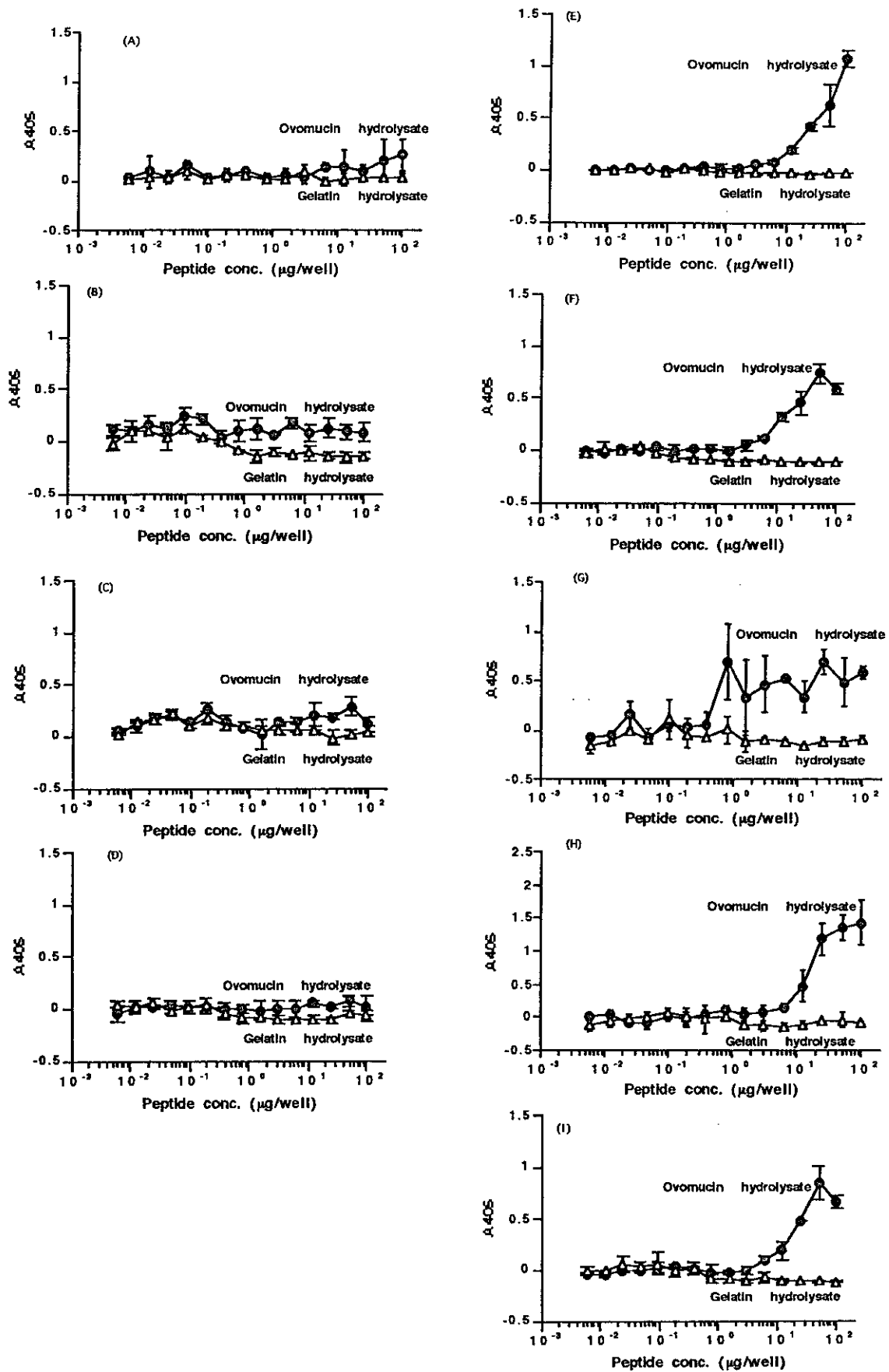


Fig.3 Binding ability of the glycopeptide derived from ovomucin to non-pathogenic bacteria

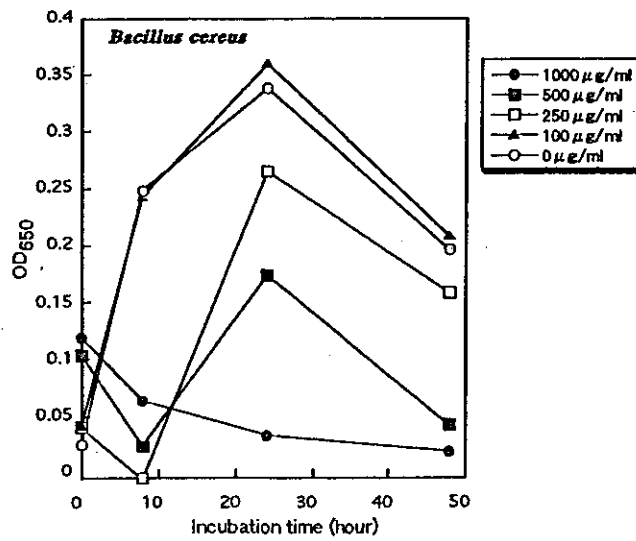
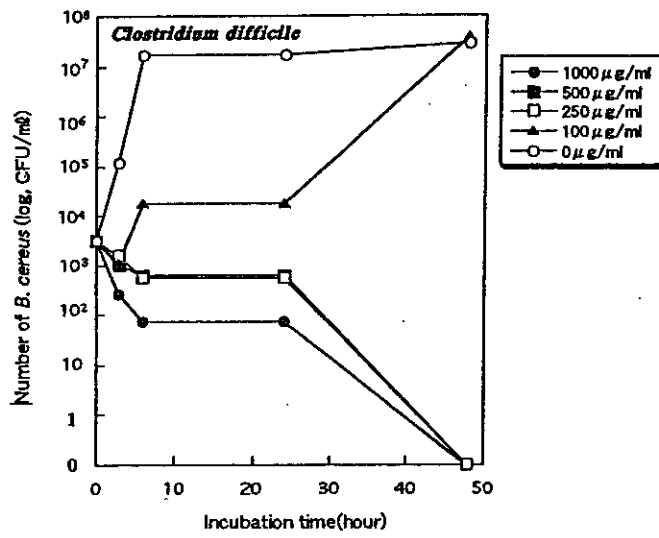
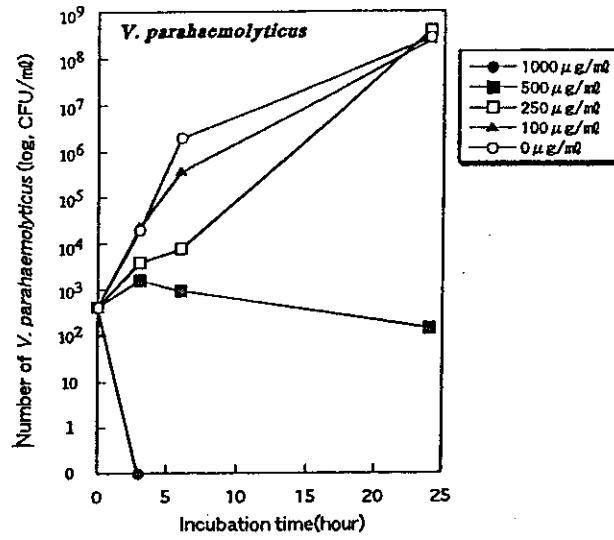


Fig.4 Growth inhibitory activities of catechin against bacterial pathogens

平成13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3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成14年9月10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