

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

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

### 分担研究者

- |                  |            |        |
|------------------|------------|--------|
| (1) 国立医薬品食品衛生研究所 | 衛生微生物部     | 小西 良子  |
| (2) 国立医薬品食品衛生研究所 | 衛生微生物部     | 工藤 由起子 |
| (3) 東京農工大学       | 農学部        | 服部 誠   |
| (4) 栄研化学株式会社     | 生物化学研究所    | 池戸 正成  |
| (5) 太陽化学株式会社     | NF 事業部研究開発 | 大久保 勉  |

### 要旨

糖ペプチドの検索を行い、近年問題になっている食中毒起因菌に特異的に結合する糖ペプチドを数種見い出した。さらにこの糖ペプチドを用いた検査法の実用化に向けて糖ペプチドの支持体選定の為の基礎研究、最新の検査法との比較評価を行った。

#### 1. 研究目的

通常、一般的に行われている食中毒菌の検査法としては、特異抗体を用いる免疫ビーズ法である。この方法は、特異性が高く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。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を目的とした。また、近年開発された最新の検出方法について感度や使用方法、検出までの所要時間も含めてその長所短所を検討し、本研究で考案の新規検出方法の評価に役立てることを目的とした。

#### 2. 研究方法

##### [糖ペプチドの調製]

オボムチンは新鮮な鶏卵（産卵後 24 時間以内）の卵白から単離した。牛乳グリコマクロペプチド (GMP) は明治乳業から提供を受けたものを使用した。それぞれのタンパク質を種々のタンパク分解酵素とインキュベートした。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℃で遠心分離（12,000 rpm、30 分間）を行った後、上清をゲルろ過に供した。タンパク質およびペプチ

ドの検出は 280 nm の吸光度により、糖の検出はフェノール硫酸法による 490 nm の吸光度により行った。

#### [菌体のビオチン化]

食中毒細菌および食品由来細菌から 20 種の菌体を実験に供した。代表的な食中毒菌として、*Salmonella Enteritidis*、*Listeria monocytogenes*、*Clostridium perfringens*、*Aeromonas hydrophila*、*Staphylococcus aureus*、*E.coli O157*、*Vibrio parahaemolyticus* を用いた。すべての菌は、培養後、加熱処理し、その後 PBS に懸濁した。まず、種々の菌体を PBS で希釈し、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 濃度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 3 回遠心分離 (3,000 rpm, 4°C, 20 min) することにより除去し、ビオチン化菌体を得た。なお、*Vibrio parahaemolyticus* と *E.coli O157* のビオチン化は、 $1 \times 10^{10}$  cells/10 ml PBS の菌体に対し、10 mg の EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin を添加し、室温で 2 時間インキュベートを行った後、上述のように洗浄し、ビオチン化菌体を得た。

#### [ビオチン化菌体を用いた糖ペプチドとの binding assay]

菌体に対する糖ペプチドの結合能は、96 well イムノプレート (Nunc) を用いて測定した。まず、種々の糖ペプチドを 1 mg/ml 濃度となるように、PBS に溶解後、順次 2 倍希釈し、100  $\mu$ l 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。また、ブランクとして PBS を 100  $\mu$ l ずつ分注した well も設けた。インキュベート終了後、PBS (200  $\mu$ l) で 3 回洗浄し、1%BSA/PBS もしくは Blocking reagent for ELISA (Roche Biochemicals) を 200  $\mu$ l 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  $\mu$ l) で 3 回洗浄後、ビオチン化菌体/PBS 懸濁液を 100  $\mu$ l ずつ分注し、室温で 1 時間インキュベートした。次に、PBS (200  $\mu$ l) で 3 回洗浄後、1%BSA/PBS もしくは Blocking reagent for ELISA で 2,000 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  $\mu$ l ずつ分注し、室温で 1 時間インキュベートした。PBS (200  $\mu$ l) 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  $\mu$ l ずつ分注し、室温でインキュベートした。5 M NaOH 溶液を 20  $\mu$ l ずつ分注することにより、酵素反応を停止した後、microplate reader を用いて、405 nm の吸光度を測定した。

#### [オボムチン糖ペプチド中の *E.coli O157* 結合部位の同定]

オボムチン糖ペプチドを SDS-PAGE 後、PVDF 膜にブロッキングした。膜を Blocking reagent for ELISA 溶液に浸し、室温で 1 時間インキュベートすることによりブロッキングした。PBS で 3 回洗浄後、 $1 \times 10^{10}$  cells/10 ml のビオチン化 *E.coli O157*/PBS 溶液と 4°C で一晩インキュベートした。PBS で 3 回洗浄後、Blocking reagent for ELISA 溶液で 1,000 倍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と室温で 1 時間インキュベートした。PBS で 3 回、Mili Q 水で 1 回洗浄後、Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (Promega) で発色させた。

#### [糖分析]

糖ペプチドの糖組成分析 (Gal, Man, Sia, GlcNAc, GalNAc, Fuc) は、ABEE 糖組成分析キットプラス S (Honen) とホーネンパック C18 カラム (Honen) を用いて行った。

#### [レクチン染色]

糖ペプチドを SDS-PAGE 後、PVDF 膜にブロッキングした。膜を 1%BSA/PBS 溶液に浸し、室温で 1 時間インキュベートすることによりブロッキングした。0.05% Tween20 を含む PBS (PBST) で 3

回洗浄後、5~20 µg/ml 濃度の種々のビオチン化レクチン (Vector Laboratories, Inc. or EY Laboratories, Inc.)/PBST 溶液と室温で 1 時間インキュベートした。PBST で 3 回洗浄後、PBST で 1,000 倍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と室温で 1 時間インキュベートした。PBST で 3 回、Mili Q 水で 1 回洗浄後、Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase で発色させた。なお、ビオチン化 LPA の場合は、PBST の代わりに、0.01 M 塩化カルシウムと 0.15M 塩化ナトリウムを含む 0.5 M トリス塩酸 buffer (pH 8.0) を用いた。

#### [支持体の検討]

糖ペプチドを検査法として実用化するためにこれらを結合させる支持体の選択が今後の課題となってくる。支持体の重要な条件としては食品中に含まれる一般細菌が非特異的に吸着しないことがあげられる。そこで現在抗体の支持体として良く使用されるポリアミド系樹脂とポリイミド系樹脂の非特異的細菌の吸着性を検討した。非特異的生菌の吸着性は野菜に生息する一般細菌を一晩培養した後、10<sup>7</sup> 7 乗/ml になるように希釈しそれぞれの支持体と 1 時間 37℃ で反応させた。その後支持体を PBS で 3 回洗浄しさらに滅菌培地を加え 1 8 時間培養し、その培地の濁度を測定した。

#### [非特異的生菌の増殖抑制効果の有る低分子の検索]

*Clostridium botulinum* を 1,000、500、250、100 および 0 µg/ml 濃度の粗カテキン液に接種後、0、8、24 および 48 時間目に CFU を計測した。また、*C. butyricum* および *C. botulinum* を GAM 寒天培地に塗抹後、嫌気培養しコロニーを形成させた。コロニーをかきとり蒸留水に懸濁後、遠心分離および超音波処理により芽胞を収集した。6 種の精製カテキン液に芽胞を接種後 15℃ で静置し、*C. butyricum* は 1、2、4、8 および 12 週目に、*C. botulinum* に関しては 2、4、8、12 および 16 週目に CFU を計測した。*B. cereus* を 6 種の精製カテキン液に接種後 37℃ で培養し、0、3、6、24 および 48 時間目に CFU を計測した。また、*B. cereus* においては毒素産生抑制効果を検討した。

さらに *Salmonella Enteritidis*、*Vibrio parahaemolyticus*、*Streptococcus aureus*、*E.coli* O157:H7、*Listeria monocytogenes* の 5 菌種を用いて 33 種の食葉の抗菌性をスクリーニングした。10<sup>3</sup> 倍希釈した一晚培養菌液を摂取菌液と 30℃ で 24 時間培養を行った後、自動塗布装置で寒天培地に塗抹後、培養し菌数の測定を行った。また抗菌性が認められた食葉については経時的に作用を調べた。

#### [検査評価法の確立]

最新の検査法と本研究課題で開発する検査法を比較評価する目的で、サルモネラ自然汚染のタンパク質飼料 15 検体を対象とし、培養法、PCR 法、最近開発された LAMP 法を用いてサルモネラの検出を行った。飼料を 10 g 量り採り BPW 90 ml を加え、これを原液として MPN 法を行った。ただし、RV 培地および TT 培地によって 2 段階増菌を行った。増菌液は XLD 培地にて培養し、形成された典型コロニーをサルモネララテックス凝集テストによって同定を行った。この時の BPW 増菌液、RV 増菌液、TT 増菌液を PCR 法および LAMP 法サンプルとした。両方法とも増幅ターゲットを病原因子の遺伝子である *invA* とした。LAMP 法は、検体を添加して 65℃ の等温で 60 分間という短時間で増幅でき、増幅産物は反応後生成されるピロリン酸マグネシウムを濁度計で測定することにより即座に検出できるものである。

### 3. 研究成果

#### [各糖ペプチドと種々の菌体との結合能]

オボムチン由来糖ペプチドは *E.coli* O157 ならびに *V. parahaemolyticus* と結合能があることが明ら

かになった。GMP は *S. Enteritidis* および *E. coli* O157 に対する結合性が見い出された。乳ラクトフェリン由来糖ペプチドはコレラトキシンに対して結合能が有ることが確認できた。これらの結合能は種々の糖分析の結果、すべて糖部分が関与していることが示唆された。

[オボムチン糖ペプチドに対する *E. coli* O157 の結合部位]

オボムチン糖ペプチドを SDS-PAGE 後、糖染色を行ったところ、広範囲にブロードなバンドが認められた。そこで、オボムチン糖ペプチドを SDS-PAGE 後、PVDF 膜にブロットイングし、オボムチン糖ペプチドのどの部位に *E. coli* O157 が結合するのかを調べた。その結果、分子量 200 kDa、40 kDa、30 kDa、20 kDa、7 kDa 付近に *E. coli* O157 が結合することを示すバンドが認められた。

[過ヨウ素酸処理したオボムチン糖ペプチドと *E. coli* O157 との結合能]

*E. coli* O157 がオボムチン糖ペプチドに結合する際、オボムチン糖ペプチドの糖鎖部分を認識しているか否かを明らかにするため、オボムチン糖ペプチドを過ヨウ素酸処理し、その糖構造を開裂させた後、ピオチン化 *E. coli* O157 との binding assay を行った。その結果、過ヨウ素酸処理することにより、オボムチン糖ペプチドと *E. coli* O157 との結合能は大きく低下することが示された。したがって、*E. coli* O157 とオボムチン糖ペプチドの結合には、糖鎖が関与していると考えられた。

[GMP との結合部位]

GMP と *E. coli* O157 の結合性は、GMP のシアリダーゼ処理、過ヨウ素酸処理により大幅に減少したことから、GMP の糖鎖構造、特にシアル酸が重要であると考えられた。さらに *E. coli* O157 に関して、ウエスタンブロットイングを用いて解析した結果、分子量 14,000 付近のバンド (GMP の 2 量体に相当) に結合を認めた。本バンドがシアル酸認識レクチンと反応したことから、結合アッセイにおいて見出されたシアル酸の重要性を支持するものであった (Fig.1)。

[非特異的生菌の増殖抑制効果の有る低分子の検索]

*C. botulinum* に対して粗カテキン濃度 1,000 および 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で増殖抑制効果を確認した。*C. botulinum* に対する 6 種の精製カテキンの効果では、EGCg、GCg において顕著な増殖抑制効果を確認した。*B. cereus* に対しては ECg および GCg で 24 時間目に検出限界以下にまで CFU が減少した。さらに EGCg で増殖抑制効果を確認した。毒素産生抑制効果は認められなかった。また、静菌性については、*C. butyricum* では 4 週間目において ECg および EGCg は検出限界以下にまで CFU が減少し、8 週間目においてはすべての精製カテキンで検出限界以下まで CFU が減少した。*C. botulinum* に関しては、16 週目において ECg、EGC、EGCg および GCg は検出限界以下まで CFU が減少した。33 種の食葉抽出物の食中毒菌に対する抗菌活性のスクリーニングを行ったところ、*Escherichia coli* O157:H7 に対しては 3 種の、*S. Enteritidis* に対しては 3 種の、*L. monocytogenes* に対しては 9 種の、*S. aureus* に対しては 11 種の、*V. parahaemolyticus* に対しては 18 種の食葉に抗菌活性が認められた。抗菌活性が認められた食葉のポリフェノール含量は、認められなかったものに対して有意 ( $p < 0.05$ ) に高値を示した。また、食葉抽出物の各種濃度による経時的効果を検討した濃度範囲において、*E. coli* O157:H7 に対してはナンテンが、*S. Enteritidis* に対してはカキ、ナンテンが、*L. monocytogenes* に対してはヒバが、*S. aureus* に対してはナンテン、ブドウが、*V. parahaemolyticus* に対してはカキ、ナンテン、ブドウが濃度依存的に菌数を減少させた。

[支持体の選択]

一般生菌の増殖を抑える効果に優れていたのはポリイミド酸樹脂であることが分かったので糖ペプチドを結合させる支持体として適当であると考えられた (Fig.2)。この結果を踏まえて、今後糖ペプチドのペプチド部分で共有結合ができる側鎖の加工を行う。

#### [検査評価法の確立]

培養による MPN の結果、15 検体のサルモネラ汚染量は 10 g あたり <3 から 300 であった。培養法、PCR 法、最近開発された LAMP 法を比較したところ、DNA を測定する方法である PCR 法および LAMP 法では、培養法では検出できない感度である 10 g あたり <3 の検体からでも検出できた。その操作性については LAMP 法が簡便で短時間の検出が行えた。しかし、高コストであることから多検体処理は難しいこと、生菌数の測定には適当ではないことが確認された。

#### 4. 考察・まとめ

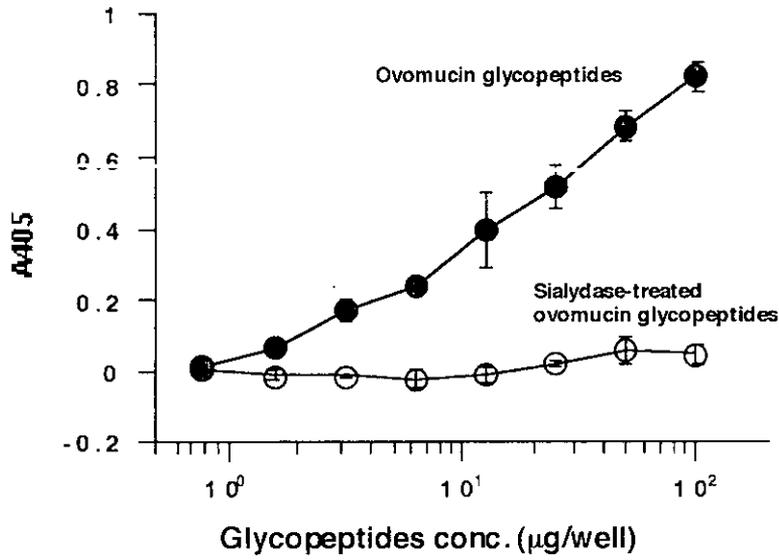
細菌の糖鎖認識機構を利用した食中毒細菌の検査法の開発にはまず、食中毒細菌に特異的な糖ペプチドを探索することが必要である。本研究では現在までに鶏卵由来オボムチン糖ペプチド、牛乳由来グリコマクロペプチドが *E.coli* O157 と、ダイズタンパク由来糖ペプチドが *S. Enteritidis* とそれぞれに結合性を有することを見出した。これは 20 種類の食中毒由来菌と反応を行った結果であることから、これらの結合性の特異性は非常に高いと思われた。種々の糖分析の結果、食中毒菌と糖ペプチドは糖鎖の部分で結合していることが確認された。そこで、つぎに糖ペプチドをペプチド部分の化学反応を用いて不溶性の支持体に結合させ検査法としての実用を図るための基礎実験をおこなった。ポリアミド酸樹脂とポリイミド酸樹脂を比較検討した結果、ポリイミド酸樹脂の方が本研究課題の支持体として優れていることが認められた。非特異的生菌の増殖抑制効果のある低分子としては、カテキンや食葉のポリフェノールが有効であることが見出された。非特異的細菌のコンタミネーションを防止するために支持体にコーティングする素材として有効であると考えられた。本研究で開発される検査法を評価するために、現在最も感度のよい検査法の長所短所を検討した。その結果 LAMP 法が簡便で短時間の検出が可能であったが、DNA を測定する検査法であるため生菌数の把握は困難であること、コスト的に非常に高いため多くの検体を処理できないことから、本研究課題が目的とする食中毒細菌を低コストで生菌として短時間に検出できる検出法は重要な意義があることが改めて確認された。

#### 5. 研究発表

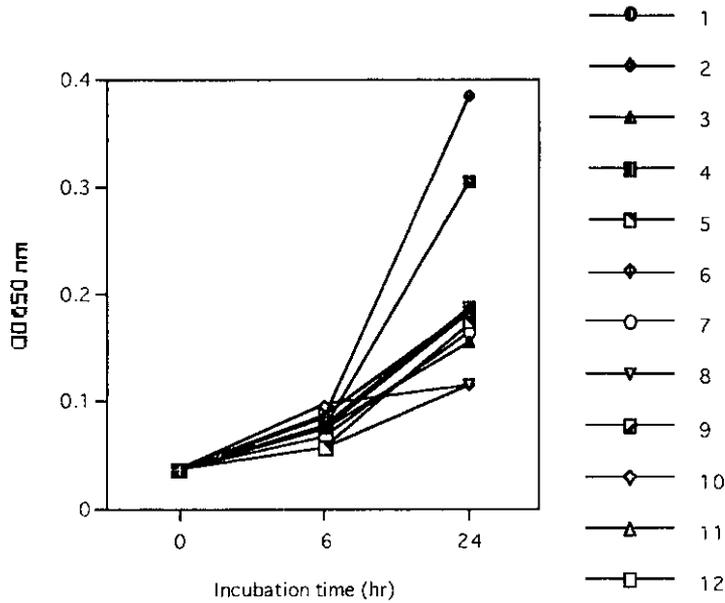
Y.Sugita-Konishi, S. Sakanaka, K.Sasaki L. R. Juneja, T. Noda and F.Amano.: Inhibition of bacterial adhesion and Salmonella infection in BALB/c mice by sialyloligosaccharides and their derivatives from chicken egg yolk. J. Agric. Food Chem., 50 3607-3613. (2002)

#### 6. 知的所有権の取得状況

特になし



**Fig.1 Effect of sialyase treatment on binding ability of ovomucin glycopeptides to *E. coli* O157:H7**



**Fig.2 The growth curve of non-specific bacteria on a carrier**

1. polyamide derivatives A, 2. polyamide derivatives B, 3. polyamide derivatives C
4. polyamide derivatives D, 5. polyamide derivatives E, 6. polyamide derivatives F
7. polyimide derivatives A, 8. polyimide derivatives B, 9. polyimide derivatives C
10. polyimide derivatives D, 11. polyimide derivatives E, 12. polyimide derivatives F