

表1 新規P450酵素CYP153A13aによるセレウリドの水酸化変換反応まとめ

実験番号	用いたプラスミド	組換え体の状態	反応系 (容器)	変換
272-001-031-1	pUCRed-Balk/BL21	in vitro	96穴ディープウェルプレート	無
272-001-031-2	pUC18/BL21	in vitro	96穴ディープウェルプレート	無
272-001-031-3	pUCRed-Balk/BL21	in vitro	1.5ml エツペンチューブ	無
272-001-031-4	pUC18/BL21	in vitro	1.5ml エツペンチューブ	無
272-001-031-5	pUCRed-Balk/BL21	in vivo	試験管	無
272-001-031-6	pUC18/BL21	in vivo	試験管	無

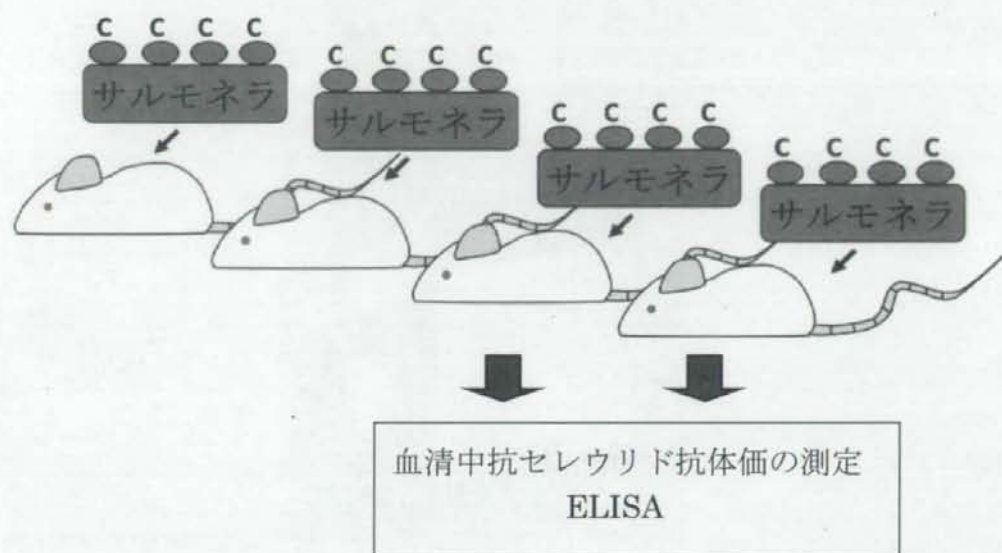


図1 セレウリド吸着サルモネラ抗原によるマウスの免疫イメージ
 C: セレウリド

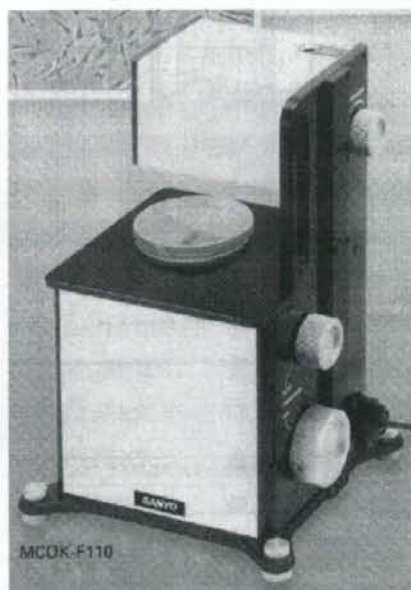
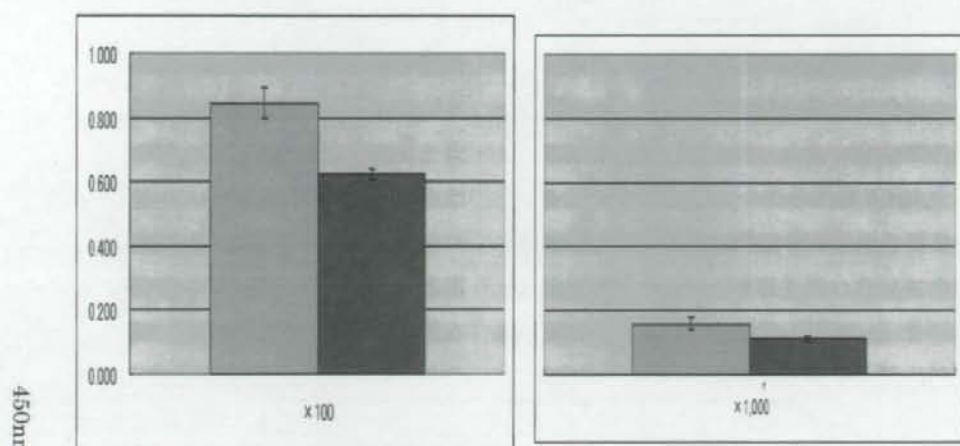


図2 HEp-2細胞によるセレウリドの細胞毒性を
試験する際に用いた連続観察装置MCOK-F110 (SANYO)

免疫71日の血清のセレウリドへの ELISA 抗体価



免疫105日の血清のセレウリドへの ELISA 抗体

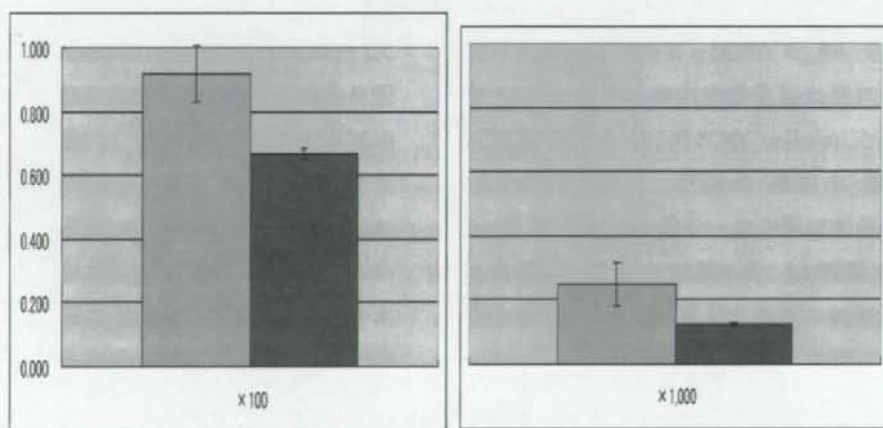


図3 セレウリドに対するマウス免疫血清の抗体価
 灰色カラム：セレウリドを吸着させたウェルへの吸光値
 黒色カラム：メタノール処理した陰性対象ウェルへの吸光値

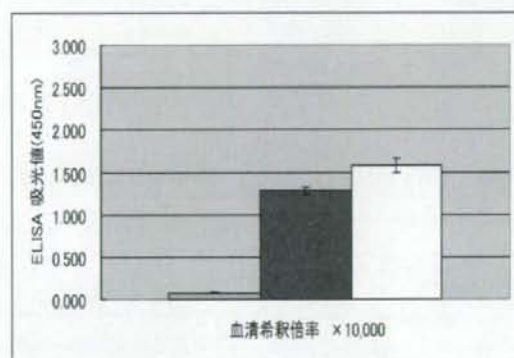
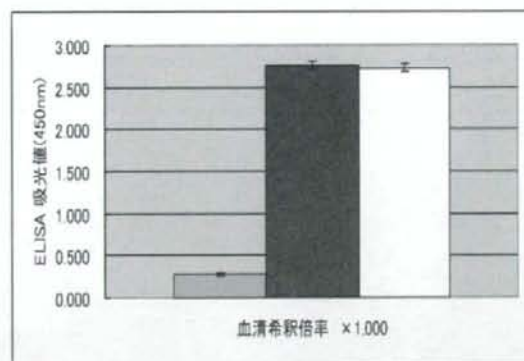


図4 セレウリドに対するウサギ免疫血清の抗体価
 灰色カラム：免疫前の血清
 黒色カラム：免疫43日の血清
 白色カラム：免疫109日の血清
 血清はセレウリドを吸着させたウェルへ反応させた。

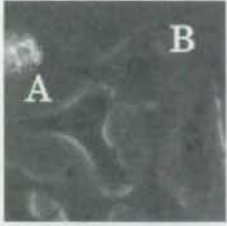











	<p>セレウリド添加直後</p>
	<p>1 時間後： B の細胞質内に白色顆粒状の物質が出現した。</p>
	<p>2 時間後： B の細胞質内に、核を取り囲むようにして白色顆粒状の物質が出現した。</p>
	<p>3 時間後： 2 時間後に A 細胞質内に認められた白色顆粒状の物質が一時消失した。</p>
	<p>4 時間後： A 細胞質内に、再び白色顆粒状の物質が出現した。 B 細胞質内の顆粒状物質はやや膨張した。</p>
	<p>5 時間後： B 内の顆粒物質が、核を取り囲むようにして整列した。空胞が出現した。</p>

図5 同一視野の連続観察法を用いたセレウリドによる HEP-2 細胞の空胞変性

HEP-2 細胞を 1% FC S-MEM 中に 1×10^6 cells/ml となるように希釈し、35 mm dish に播種し、37 °C、5 %CO₂ 条件下で前培養した。一晚培養後、最終濃度 3.2 µg/ml のセレウリドを加えた時点を 0 時間とし、15 分間隔のタイムラプス観察を行った(SANYO, MCOK-F110demo)。

	<p>10 時間後： A、B 共に、細胞質内の空胞が膨張している。</p>
	<p>12 時間後： A、B 共に、空胞は更に膨張している。</p>
	<p>15 時間後： A が分裂した。 B 内の空胞は膨張し続けている。</p>
	<p>17 時間後： 分裂直前の B がフラスコ底面から剥がれた。A は分裂後、再び底面に付着した。分裂後も細胞質内に空胞が認められた。</p>
	<p>19 時間後： B の分裂が完了した。A と同様に、分裂後も細胞質内に空胞が認められた。</p>
	<p>24 時間後： A から分裂した細胞内の空胞が消失した。</p>

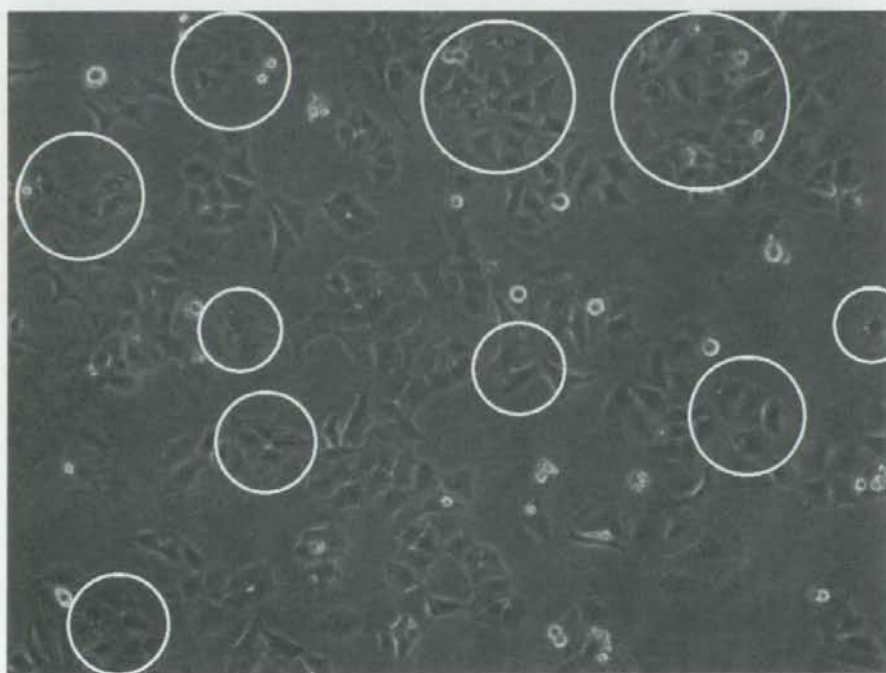
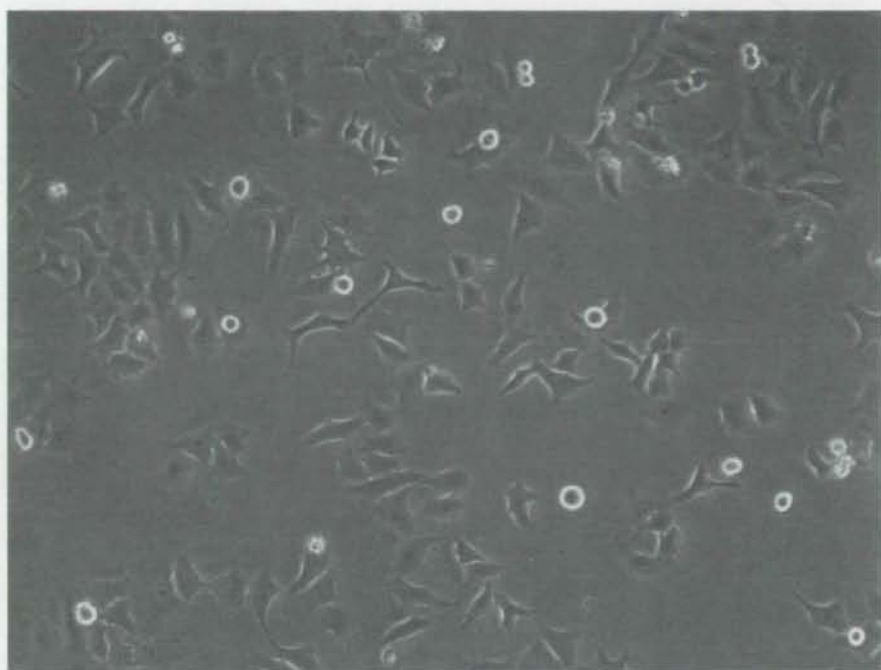


図6 同一視野におけるセレウリドによるHEp-2細胞の空胞変性
上：セレウリド添加前、下：添加24時間後

分 担 研 究 報 告 書

ブドウ球菌新型エンテロトキシンの免疫学的検出法の開発

重茂 克彦

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

「食品中の毒素産生食中毒細菌及び毒素直接試験法の研究」

分担研究報告書

ブドウ球菌新型エンテロトキシンの免疫学的検出法の開発

分担研究者 重茂克彦 岩手大学農学部獣医学課程

研究要旨

黄色ブドウ球菌の産生するエンテロトキシン(SEs)は、食中毒の原因毒素である。近年、多数の新型 SEs および SE 様毒素(SEIs)の存在が報告されつつあることから、これらの新型 SEs の食中毒原性を評価することが必要となっている。本研究では、新型 SEs を免疫学的に検出するための Sandwich ELISA の確立を行った。SEA、SEB、SED、SEH、SE1J、SE1K、SE1P、SE1Q、SER については OPD を基質とする発色系 Sandwich ELISA を、また、産生量が少なく定量が困難であった SEG、SEI、SE1M、SE1N、SE1O のうち、SEG、SEI、SE1M、SE1N 検出については、基質にルミノール系試薬を使用した化学発光を用いる方法を検討した。さらに、SE1O 検出については protein A と反応しない HPO 標識ニワトリ抗体の有用性を検討した。確立した ELISA を用いて食中毒事例由来株の SE 産生性を検討したところ、SEH、SE1J、SE1K、SE1P、SE1Q、SER の産生量は 0.2~0.8 $\mu\text{g/ml}$ であり、一方 SEG、SEI、SE1M、SE1N、SE1O の産生量は 4 ~ 262 ng/ml で、ほとんどが数 ng から数 10 ng/ml 程度と推定された。

A. 研究目的

黄色ブドウ球菌は、食品内で増殖する際に嘔吐毒であるエンテロトキシン(SEs)を産生する毒素型食中毒原因菌である。従来、SEs は SEA-SEE の 5 型が存在することが知られていたが、近年新型エンテロトキシンが次々に報告され、現在では SEG-SE1V の 16 種の新型 SEs の存在が明らかになっている。しかしながら、その毒性などについては未だ不明な点が

多く、またその検出法についても SEA-SEE の検出・型別は可能だが新型 SEs 型別のための試験方法はない。新型 SEs の食中毒原性を明らかにし、その対策をとるためには、高感度な新型 SEs 検出法の確立が必須である。

本研究は、新型 SEs の免疫学的検出法を開発することを目的とし、組換え型 SEs を抗原として特異抗体を作製し、高感度な Sandwich ELISA の系を確立するとともに

に、よりニワトリ抗体の SEs 検出系に対する有用性を検討した。

B. 実験方法

1 組換え型 SEs の調製

SEG, SEH, SEI, SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SER 遺伝子を大腸菌発現ベクター-pGEX-6p-1 にクローニングし、大腸菌 BL21 株に導入して各 SEs を GST 融合蛋白質として発現させた。アフィニティークロマトグラフィーにより融合蛋白質を精製後、プロテアーゼ処理により GST タグを切断し、精製組換え型 SEs を得た。

2 特異抗体の作製

得られた組換え型 SEs をウサギあるいはニワトリに免疫し、抗血清を作製した。ウサギ抗血清からは Protein G カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより IgG 画分を、あるいは SEs を固定したカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより特異抗体を精製した。ニワトリ抗血清からは沈殿法により IgY 画分、あるいは SEs を固定したカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより特異抗体を精製した。

得られた特異抗体は horseradish peroxidase (HPO) で標識し、Sandwich ELISA の detection antibodies として用いた。

3 Sandwich ELISA

固層抗体には精製 IgG 画分あるいは特異抗体を、検出抗体には HRP 標識特異抗

体を用いた。精製 rSE を、0.5、1、2、5、10、20 ng/ml に調整したものを、検出感度および標準曲線の直線性をもっとも高い条件を検討した。標準曲線用スタンダードの希釈に Can Get Signal[®] Immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBO) (以下 Solution 1 と略) を、検出抗体の希釈には同 Solution 2 (以下 Solution 2 と略) を用いた。ブロッキングバッファーには Starting Block[™] (PBS) Blocking Buffer (PIERCE) を使用した。基質溶液には o-phenylenediamine tablets 10 mg (SIGMA)、0.1 M Citrate Buffer (0.1 M Na₂HPO₄、0.5 M Citric acid) 25 ml、H₂O₂ (Santoku Chemical Industries Co.) 15 μ l を混合したものを、2 N H₂SO₄ を用いて反応を停止した。

また、より高感度な検出を行うために、Luminol 系試薬を用いた化学発光系 Sandwich ELISA も検討した。SuperSignal[®] ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce) を基質として用い、マイクロプレートリーダー (Wallac 1420 ARVO MX/Light, Perkin Elmer) で発光を測定した。

4. 新型 SEs 遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌の SEs 産生量評価

SEs 遺伝子を保有する食中毒由来黄色ブドウ球菌株 (28 事例 48 株、表 1) を BHI agar で 2 回継代したのち、Yeast Extract を 1% (w/w) 添加した BHI broth (以下 1% Yeast Extract 添加 BHI broth と略) 5 ml に接種し Seed Culture を行

った (37°C、16~18 時間、振盪培養)。培養液 0.6 ml を 100 倍量の 1% Yeast Extract 添加 BHI broth に接種し振盪培養した (37°C、48 時間)。培養液を 14,000 rpm、10 分遠心して上清を回収し、0.22 μ m フィルター (Millex GP[®] 0.22 μ m、Millipore) で濾過滅菌した。ImmunoPuer Normal Rabbit Serum (PIERCE) (以下 NRS と略) をサンプルの 20~500%量加えて静置 (4°C、一晚) することにより、培養上清中の protein A を除去した。PBST または Solution 1 を加えて 10 倍希釈し、測定サンプル原液とした。各毒素の産生量に応じて、原液を Solution 1 で適宜希釈後、測定に供した。protein A 除去操作の成否を確認するため、ネガティブコントロールとして NRS から精製した正常ウサギ IgG 分画を固層した各 Sandwich ELISA で同一サンプルを測定し、非特異な反応がブランクと同等まで低下することを確認した。

C. 結果および考察

本研究で確立した発色法による SE 検出 Sandwich ELISA (ウサギ抗体) の測定範囲は、SEA、SE1Q 検出系で 0.5~10 ng/ml、SEB 検出系で 1~10 ng/ml、SED、SEH、SE1J、SE1P 検出系で 1~20 ng/ml、SE1K、SE1R 検出系で 0.5~5 ng/ml であった。SE の検出感度は SEA、SE1Q、SE1K、SE1R 検出系で 0.5 ng/ml、SEB、SED、SEH、SE1J、SE1P 検出系で 1 ng/ml 以上であった。また、化学発光法による Sandwich ELISA (ウサギ抗体) では、SEG、SEI 検出系で 0.1

~5 ng/ml、SE1M 検出系で 0.2~5 ng/ml、SE1N 検出系で 1~10 ng/ml であった。これらのウサギ抗体を用いる系では、ウサギ IgG の Fc 部位が黄色ブドウ球菌培養上清中に存在する Protein A に結合するため、NRS の添加後バッファーで希釈するという前処理を行い、Protein A を除去する必要が認められた。そのため、実質的な感度は上記の感度の 1/10 となり、1~10 ng/ml であった。

SE1O 検出系については、ニワトリ抗体を用いた Sandwich ELISA の確立を行った。固層抗体にウサギ特異抗体、検出抗体に HPO 標識ニワトリ特異抗体を用い、化学発光系を用いた結果、1 ng/ml の検出感度が得られ、1~20 ng/ml の範囲で良好な直線性を示した (図 1)。

ついで、確立した検出系を用いて食中毒事例由来黄色ブドウ球菌の SEs 産生量を評価した。表 2 に各 SE の産生量のレンジを示す。従来からその存在が知られていた SEA の産生量は 0.2~3.7 μ g/ml の産生量を示し、その中央値は 1.1 μ g/ml であった。また、SEB の産生量は SEA に比して多く、0.01~112.9 μ g/ml、中央値は 55.3 μ g/ml であった。新型 SEs では、SEA に比して産生量が少ないものの、SEH (22 株)、SE1J (6 株)、SEK (21 株)、SEQ (21 株)、SER (6 株) は、測定したすべての株で μ g オーダーの産生が認められ、SEP は 7 株中 4 株で μ g オーダー産生が認められた。一方、ゲノミックアイランド ν Sa β 上に enterotoxin gene cluster (*egc*) を形成してタンデムに遺伝子が存在する

SEG, SEI, SE1M, SE1N, SE1O (*egc* 関連 SE 群、図 2) のうち、SEG (13 株)、SE1M (11 株)、SE1O (11 株) は測定したすべての株で産生が認められた。産生量は、SEO で 20~262 ng/ml (中央値 45 ng/ml)、SEM で 4~15 ng/ml (中央値 7 ng/ml)、SEG で 4~22 ng/ml (中央値 7 ng/ml) であり、他の新型 SEs に比べて極めて産生量が少ないことが確認された。SE1O 検出系では、ニワトリ抗体が黄色ブドウ球菌の protein A と結合しないことから、培養上清サンプルに NRS 処理を行わず、11 株 10 株は Solution 1 で 2~5 倍希釈して測定した。Hiroshima13 株は SEO 産生量が多く、20 倍に希釈して測定した。また、固層抗体として正常ウサギ IgG を、検出抗体として HPO 標識ニワトリ特異抗体を用いた Sandwich ELISA で、上記の 10 株を測定したところ、ブランクと同等以下の値を示したことから、ニワトリ抗体を用いることで protein A の影響が排除されることが確認された。

SEI および SE1N の測定では、多くの株で、サンプル値とネガティブコントロール (正常ウサギ IgG 固層による Sandwich ELISA) の間に有意差がなく、非特異な反応のみが見られた。こうした反応は培養上清に添加する NRS 量を増やすことで低下する傾向が見られたものの、500% 量まで NRS を増やしても完全に抑制することは出来なかった。こうした株では SEI および SE1N の定量的な値を算出することは出来ず、産生量は非特異な反応値以下であると推定した。その結果、SEI の産生

量は 13 株中 6 株で 10 ng/ml 以下、5 株で 5 ng/ml 以下、1 株で 2 ng/ml 以下と推定された。SE1N の産生量は 13 株中 9 株で 10 ng/ml 以下、2 株で 5 ng/ml 以下と推定され、いずれも極めて少ないことが確認された (表 3)。しかしながら、SEG、SEI、SE1M、SE1N、SE1O 遺伝子のみを保有する食中毒事例由来株も存在することから、これらの SEs が相加的に食中毒に関与している可能性も否定できず、これらの毒素を高感度に測定し、産生量を正確に把握できる系を確立する必要がある。

D. 結論

以上のように、新型 SEs のうち、SEH, SE1J, SE1K, SE1P, SE1Q, SER を検出する発色系 Sandwich ELISA と、SEG, SEI, SE1M, SE1N, SE1O を検出する化学発光系 Sandwich ELISA を構築し、免疫学的に新型 SEs を検出・定量することを可能とし、また SEs 検出系の構築にニワトリ抗体が有用であることを明らかにした。次年度は、産生量の少ない新型 SEs 検出系にニワトリ抗体を適用し、さらなる高感度化を図るとともに、今回確立した測定系を用い、食品中の新型 SEs の検出・定量系の確立を試みる。

E. 健康危害情報

特になし。

F. 研究発表

1. 学会発表

重茂克彦、ブドウ球菌エンテロトキシン

の多様性と食中毒原性、第82回日本細菌学会総会 ワークショップ「食品衛生」、2009年3月13日、名古屋。

2. シンポジウム発表

重茂克彦、新たなブドウ球菌毒素、東京大学 食の安全研究センター国際シンポジウム「食の安全と食品媒介感染症」、2008年12月20日、東京。

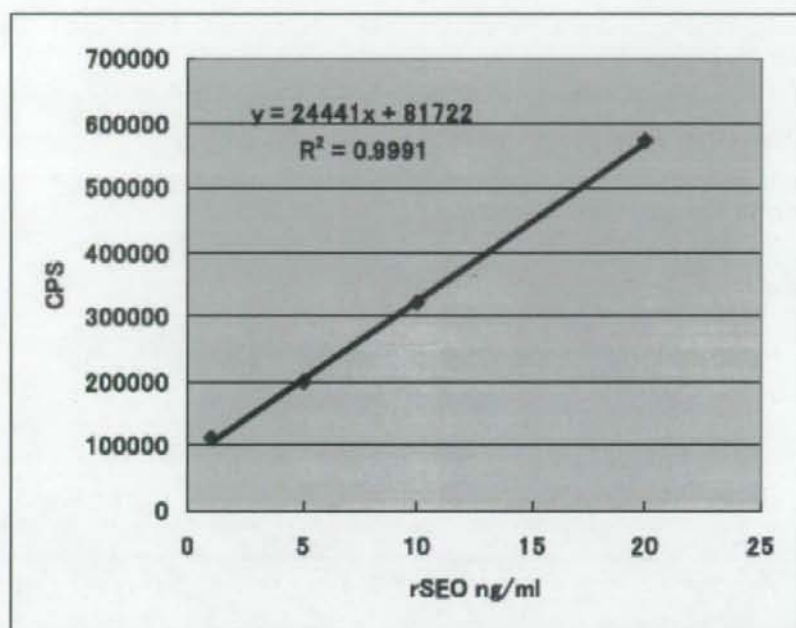


図1 ニワトリ IgY 抗体を用いたブドウ球菌エンテロトキシン SE10 検出のための Sandwich ELISA の標準曲線

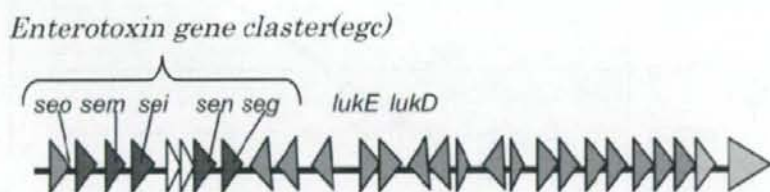


図2. ブドウ球菌エンテロトキシン遺伝子群がコードされる Genomic island ν Sa β (Type I) の模式図

*sei*はブドウ球菌エンテロトキシンを、*lukE*と *lukD*はロイコシジン遺伝子を示す。

表 1 食中毒由来黄色ブドウ球菌株と保有する SE 遺伝子

事例	株名	遺伝子型	事例	株名	遺伝子型
1	Fukuoka 1	<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>	13	11690	<i>sea, seb, sek, seq</i>
	Fukuoka 2	<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>	14	11727	<i>sea, sed, sej, selr</i>
2	Fukuoka 5	<i>sej, selr, ses, set</i>		11746	<i>sea, sed, sej, selr</i>
	Fukuoka 6	<i>sej, selr, ses, set</i>	15	11779	<i>sea, sek, seq, seh</i>
3	Saga 1	<i>seg, sei, sem, sen, seo, sep</i>		11780	<i>sea, sek, seq, seh</i>
	Saga 2	<i>seg, sei, sem, sen, seo, sep</i>	16	11839	<i>sea, sek, seq, seh</i>
4	Aomori 1	<i>seg, sei, sem, sen, seo, sep</i>		11840	<i>sea, sek, seq, seh</i>
	Aomori 2	<i>seg, sei, sem, sen, seo, sep</i>	17	No.1	<i>seb, seh</i>
5	Hiroshima 10	<i>seg, sei, sem, sen, seo, sej, selr, ses, set</i>	18	No.2	<i>seb, seh</i>
	Hiroshima 13	<i>seg, sei, sem, sen, seo, sej, selr, ses, set</i>		No.28	<i>sea, seb, sek, seq, seh</i>
6	Ishikawa 2	<i>sea, seg, sei, sem, sen, seo</i>	19	No.10	<i>sea, seb, sek, seq, seh</i>
	Ishikawa 3	<i>sea, seg, sei, sem, sen, seo</i>	20	No.11	<i>sea, seb, sek, seq, seh</i>
7	Ishikawa 11	<i>sea, seb, sek, seq, seh</i>		No.12	<i>sea, seb, sek, seq, seh</i>
	Ishikawa 17	<i>seb, seh</i>	21	No.13	<i>sea, seb, sek, seq, seh</i>
8	Saitama 496	<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>		No.14	<i>sea, seb, sek, seq, seh</i>
9	11520	<i>sea, seb, sek, seq, seh</i>	22	No.15	<i>sea, seb, sek, seq, seh</i>
	11521	<i>sea, seb, sek, seq, seh</i>	23	No.17	<i>seb, sep</i>
10	11535	<i>sea, seg, sei, sen, tst-I</i>		No.18	<i>seb, sep</i>
	11536	<i>sea, seg, sei, sen, tst-I</i>	24	No.19	<i>seb, sep</i>
11	11621	<i>sea</i>		No.30	<i>sea, seb, sek, seq, seh</i>
	11636	<i>sea</i>	25	No.31	<i>sea, seb, sek, seq, seh</i>
12	11658	<i>sea</i>		No.35	<i>sea, seb, sek, seq, seh</i>
	11660	<i>sea</i>	26	No.35	<i>sea, seb, sek, seq, seh</i>
	11689	<i>sea, seb, sek, seq</i>	27	No.39	<i>sea, sek, seq, seh</i>
13			28	No.45	<i>sea, seb, sek, seq, seh</i>

表2 食中毒事例由来株における SEs ごとの産生量

毒素型	株数	産生量	中央値
SEA	31	0.2~3.7 $\mu\text{g/ml}$	1.1 $\mu\text{g/ml}$
SEB	22	0.01~112.9 $\mu\text{g/ml}$	55.3 $\mu\text{g/ml}$
SED	2	10 ng/ml 以下	—
SEH	22	0.02~0.9 $\mu\text{g/ml}$	0.4 $\mu\text{g/ml}$
SEIJ	6	0.05~3.1 $\mu\text{g/ml}$	0.2 $\mu\text{g/ml}$
SEIK	21	0.4~0.8 $\mu\text{g/ml}$	0.6 $\mu\text{g/ml}$
SEIP	7	0.1~0.4 $\mu\text{g/ml}$	0.2 $\mu\text{g/ml}$
SEIQ	21	0.2~0.6 $\mu\text{g/ml}$	0.4 $\mu\text{g/ml}$
SER	6	0.5~1.3 $\mu\text{g/ml}$	0.8 $\mu\text{g/ml}$
SEI0	11	20~262 ng/ml	45 ng/ml
SEIM	11	4~15 ng/ml	7 ng/ml
SEI	13	<10~24 ng/ml	—
SEIN	13	<10~23 ng/ml	—
SEG	13	4~22 ng/ml	7 ng/ml

表 3. エンテロトキシン遺伝子クラスター *egc* 関連 SEs の産生量

Strain	Production (ng/ml)				
	SE10	SE1M	SEI	SE1N	SEG
11535	-(*)	-	< 10	< 5	7
11536	-	-	< 10	< 5	14
Ishikawa 2	26	5	< 5	11	6
Ishikawa 3	28	5	< 5	< 10	6
Hiroshima 10	59	4	< 5	< 10	4
Hiroshima 13	262	15	24	23	22
Aomori 1	45	7	< 5	< 10	5
Aomori 2	47	7	< 5	< 10	5
Saga 1	64	6	< 10	< 10	8
Saga 2	39	7	< 10	< 10	8
Fukuoka 1	51	15	< 10	< 10	8
Fukuoka 2	23	12	< 10	< 10	6
Saitama 496	20	7	< 2	< 10	7

分 担 研 究 報 告 書

ニワトリ IgY 抗体を用いての
ブドウ球菌エンテロトキシン定量法の開発

小西 良子