

HepG2 cell JC-1 staining

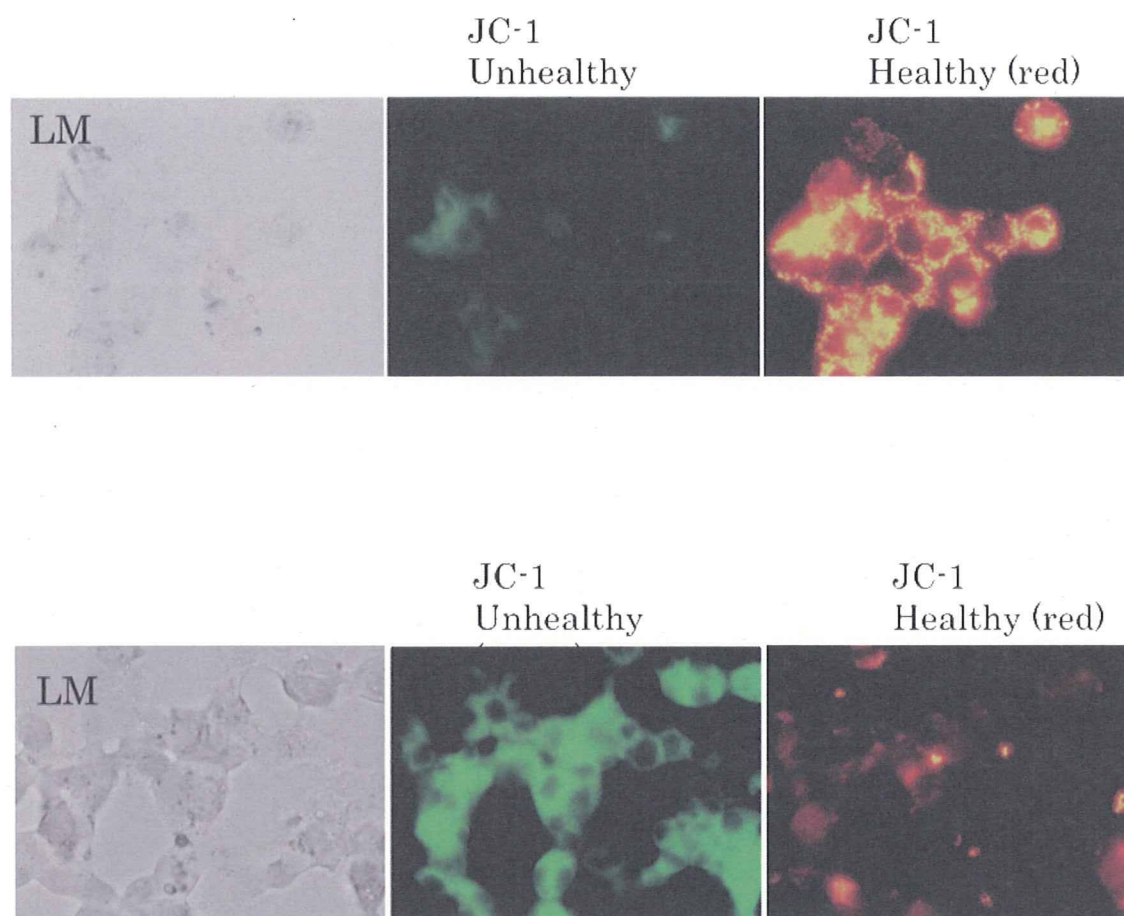


図 1 5 セレウス菌嘔吐毒素処理 Hep G2 細胞の JC-1 染色

嘔吐毒素処理前（上段）および 120 分後（下段）に JC-1 染色を施し、蛍光顕微鏡で観察した。LM は通常の光学顕微鏡による細胞の図を示す。JC-1 色素は細胞内に取り込まれた後、ミトコンドリアが正常で膜電位を保持していた場合、すなわち細胞が健康であった場合、赤色蛍光を発する。ミトコンドリアの膜電位が低下した場合、緑色蛍光を発する。

HepG2 cell JC-1 staining

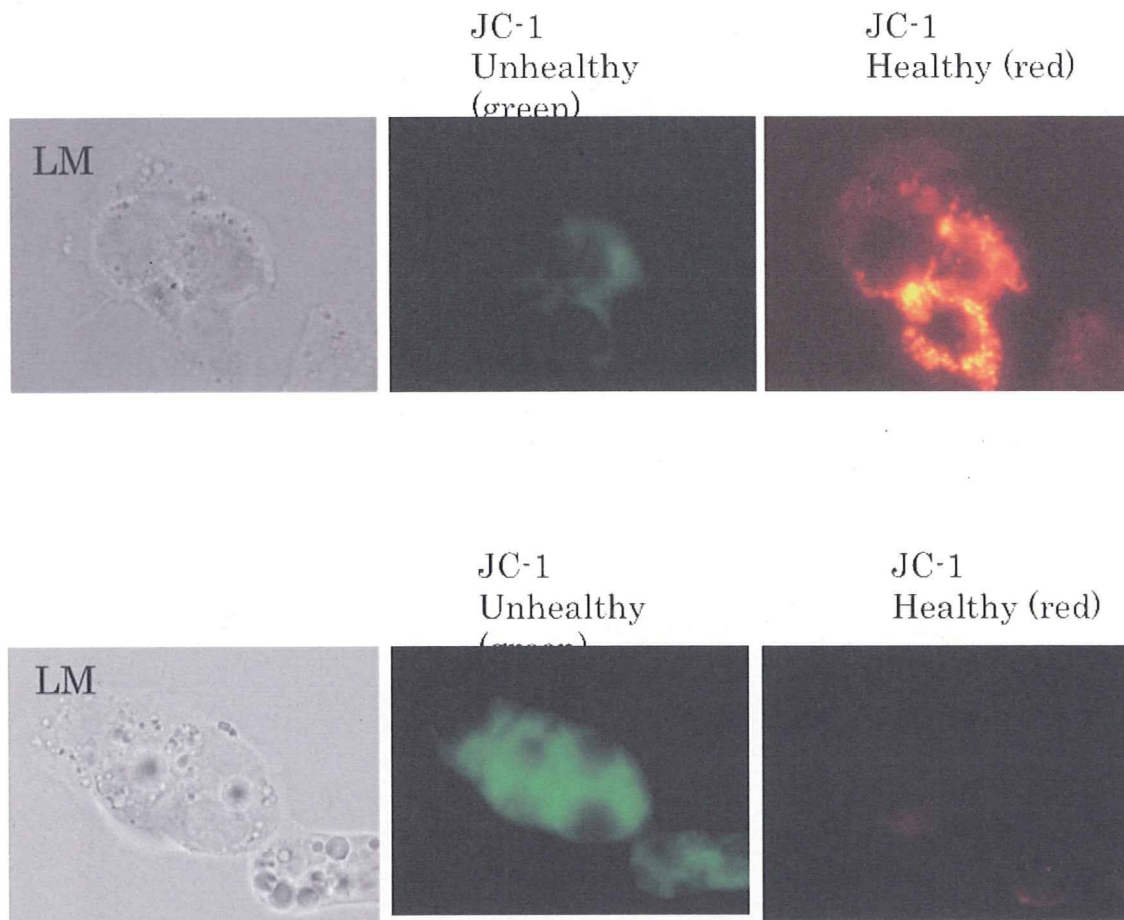
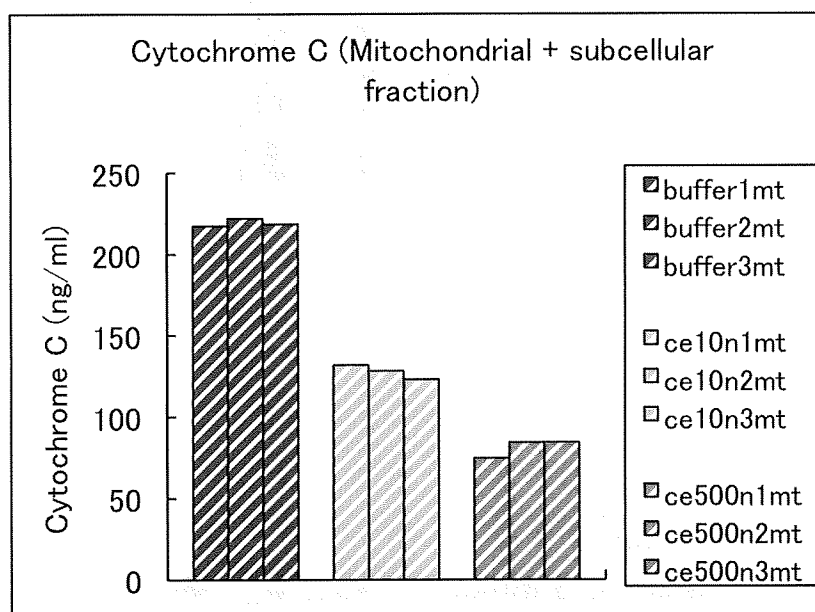
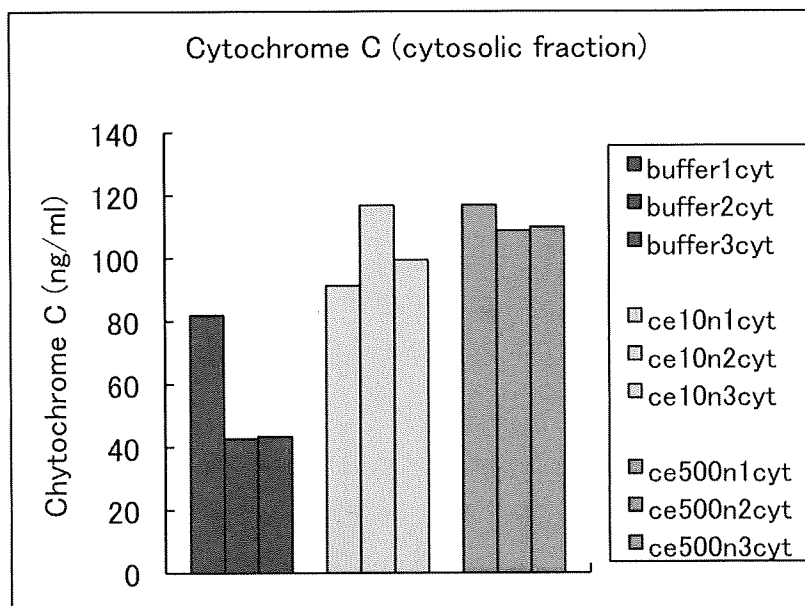


図 1 6 セレウス菌嘔吐毒素処理 Hep G2 細胞の JC-1 染色

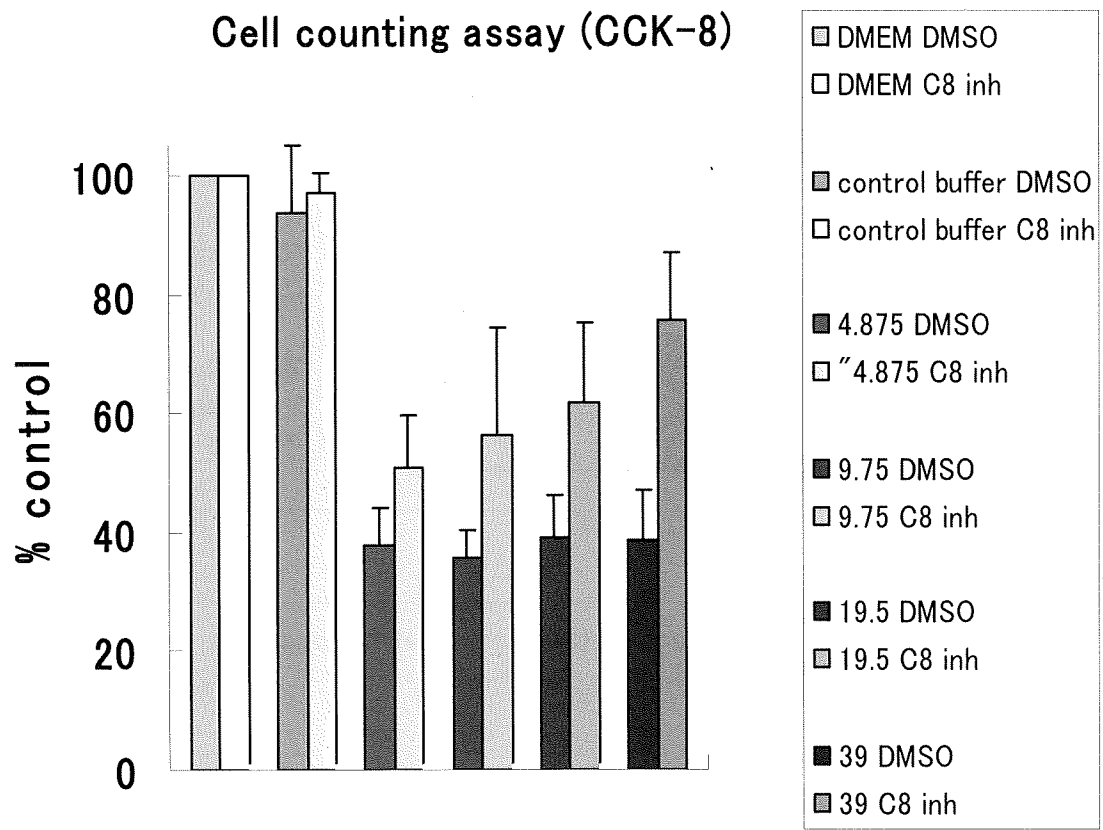
図 1 5 とは別視野の細胞を示す。



■ buffer: control buffer,
 □ ce10n: cereulide 10 ng/ml,
 ■ ce500n: cereulide 500 ng/ml

図 1 7 セレウス菌嘔吐毒素刺激による Hep G2 細胞におけるチトクローム c の細胞内局在

嘔吐毒素(ce)処理後、細胞を分画し、チトクローム c を定量した。



セレウイト 濃度 : ng/ml

* DMSO: inhibitorの溶媒

C8 inh: Caspase 8 inhibitor (40 μ M) Merck Ltd. (Calbiochem)

*セレウイト刺激により細胞が空胞化を起こす濃度を中心としてグラフ化

図 1 8 カスパーゼ 8 阻害剤のセレウス菌嘔吐毒素が示す Hep G2 細胞死への影響

カスパーゼ 8 阻害剤が嘔吐毒素の細胞致死毒性を抑制する。

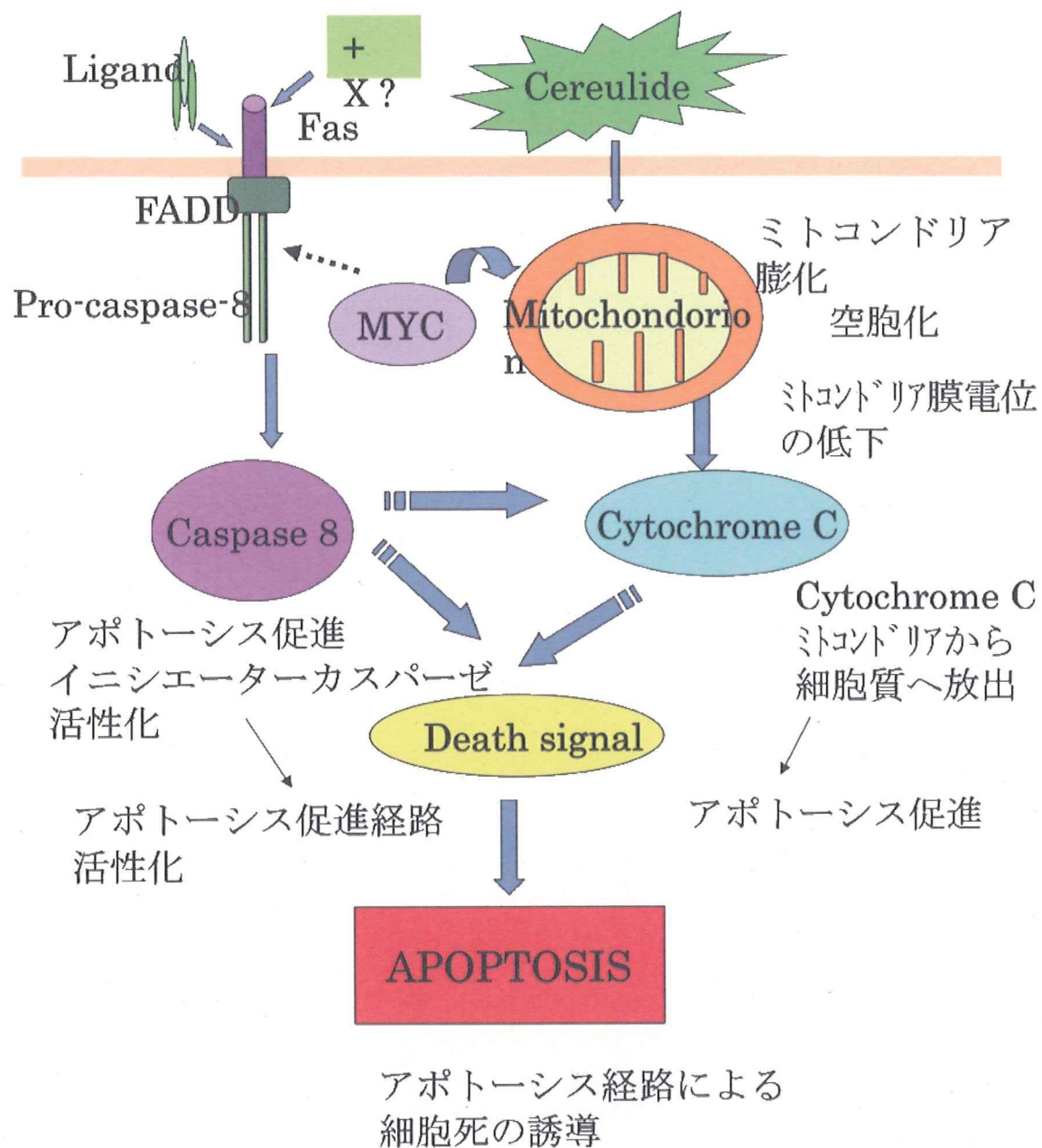


図19 セレウス菌嘔吐毒素が示す肝臓細胞障害の分子メカニズム

Cereulide:セレウス菌嘔吐毒素

ヒト肝臓癌細胞 Hep G2 細胞を用いて解析した。

分 担 研 究 報 告 書

ブドウ球菌エンテロトキシン定量法における

ニワトリ IgY 抗体の有用性

小西 良子

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

ブドウ球菌エンテロトキシン定量法におけるニワトリ IgY 抗体の有用性

分担研究者 小西 良子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部長

協力研究者 水谷 紀子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

要旨：ブドウ球菌エンテロトキシン（SE）を食品や培養菌液から検出するためのサンドイッチ ELISA には、同菌が産生する Protein A が IgG 抗体と結合するため強い非特異反応が起こる。これを解消するため、Protein A には結合しない IgY 抗体の利用を検討した。IgY 抗体は Protein A に対し、IgG 抗体の 100,000 分の 1 の反応性を示した。サンドイッチ ELISA において、IgY 抗体を吸着抗体、IgG 抗体を検出抗体として用いると (IgY-IgG ELISA)、SEA の最少検出濃度は 0.25 ng/ml を示した。検量線の信頼性を示す R^2 値は 0.98 を示した。sea 遺伝子保有ブドウ球菌の培養上清中の SEA 濃度を IgY-IgG ELISA で測定したところ、Protein A の影響を受けない逆受け身ラテックス凝集反応法から計算された SEA 濃度と相関した。一方、IgG-IgG ELISA では、200 から 250 倍の高い数値を示した。これらの結果は、IgY 抗体を SE を定量するサンドイッチ ELISA に応用する有用性を示しており、同法を食品中の SE の定量に応用できる可能性を示している。

A. 研究目的

黄色ブドウ球菌は、健康なヒトの手指、鼻腔、咽喉、腸管内などに分布し、各種動物（食肉産生動物など）も保菌している¹⁾。

わが国における食中毒発生件数は 500～3,000 件ほどで、25,000～45,000 人程度の患者が出ている。このうち、微生物生食中毒は事件数の約 90 %、患者数でも約 90 %

を占める²⁾。その中で、ブドウ球菌食中毒の発生件数は年間約 50～100 件前後、患者数 1,000～3,000 人で、食品衛生の発展に伴い年々減少傾向にある。しかし、発生件数ではカンピロバクター、ノロウイルス、サルモネラ、腸炎ビブリオに次いで 5 番目、患者数でもサルモネラ、腸炎ビブリオ、病原性大腸菌、ノロウイルスに次いで 5 番目

であり、依然と重要な食中毒である²⁾。

黄色ブドウ球菌は、食品中で増殖する際にエンテロトキシンを産生し、これが食品とともに摂取されて嘔吐を引き起こす³⁾。

ブドウ球菌エンテロトキシン Staphylococcal enterotoxin (SE) は、分子量約 28,000 のタンパク質で、毒素産生の至適 pH は 6.8~7.2 にあり、pH5.0 以下または 9.0 以上では産生されない。毒素産生の温度域は 10~48℃ (至適 40~45℃) であり、食塩濃度が 10 %以上ではその産生が著しく抑制される。毒素は耐熱性が強く、120℃、20 分の加熱でも完全に破壊されない³⁾。タンパク質でありながら、高温で失活しないという SE の特異な性状は、ブドウ球菌の幅広い生息域とともに、食品中のブドウ球菌食中毒リスクを高めている。

SE には抗原性の異なる複数の型が存在することが報告されており、1963 年には SEA および SEB が存在することが明らかにされており、1965 年には SEC、1967 年に SED、1971 年に SEE が報告された。現在までに続々と新型毒素の存在が報告されており⁴⁻¹⁴⁾、SE は多様性のある毒素群であることがわかる。

ブドウ球菌検査としては、食品およびその原材料、製造・調理環境などから分離された黄色ブドウ球菌の食中毒原性を調べるため、SE 産生性・型別試験と、食品 (原料) 中の SE 量を調べるための定量試験がある。後者には、感作ラテックス粒子を用いる逆受身ラテックス凝集反応と、標識抗体を用いる Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法の 2 つの方法がある¹⁵⁾。ELISA 法に用いられる

抗体としては、免疫グロブリン G (以下 IgG) があるが、IgG 抗体はブドウ球菌の表層抗原であるプロテイン A と結合する性質を持つ。1 分子のプロテイン A は、IgG 抗体 6 分子と結合する能力があることがわかっている。IgG 抗体を用いて ELISA を構築した場合、特に、サンドイッチ ELISA を構築した場合、プレートに吸着させた抗 SE 抗体にプロテイン A が結合し、SE (検体) 添加後に加える、抗 SE IgG 抗体が、SE と結合せず、プロテイン A に結合してしまい、SE が存在しないのに陽性反応を誘起してしまう危険性がある。

鳥類は機能的に哺乳類の IgG 抗体に相当する主要抗体 IgY 抗体を産生する。IgY 抗体の特徴としては、哺乳類の補体を活性化しない、哺乳類 Fc レセプターと結合しない、哺乳類 IgG 抗体と交差反応しない、プロテイン A および G と結合しない、IgY が選択的に卵黄に移行する、モノクローナル抗体の生成が可能である、などがあげられる¹⁶⁾。IgY 抗体はブドウ球菌が産生するプロテイン A とは結合しないため、上述した IgG 抗体に置き換えると、特異性の高い SE 検出用サンドイッチ ELISA が構築できる可能性がある。昨年度は、IgY 抗体による SE 検出が可能か検討した。本年度は本格的にこの可能性を追求し、培養上清中の SE を測定する、IgY 抗体を用いての ELISA システムを構築したので報告する。

B. 実験方法

1. ブドウ球菌エンテロトキシン

SEA を以下の方法で、文献¹⁶⁾に従い調製した。大腸菌 B L 株を *pGEX-6p-1/sea* で

形質転換した。同菌株を 37°C でアンピシリン含有 YT 培養液にて 1 時間培養した。Isopropyl-thiogalactoside を添加した後、37°C にて 3 時間培養を続けた。4°C、5000xg にて遠心分離を 10 分間行い、菌体を回収した。菌体ペレットを BUGBUSTER 蛋白抽出キット溶液 (5 ml/湿菌体重量, TaKaRa) で懸濁した。懸濁液について、4°C、5000xg の遠心分離を 10 分間行い、組換え SEA (rSEA) とグルタチオン-S-トランスフェラーゼの融合タンパク質を含む上清を回収した。上清に Sepharose-Glutathione ゲル (GE Healthcare) を加えた。そのゲルを塩化ナトリウム 150 mM、エチレンジアミン四酢酸、ジチオスレイトール 1 mM を混合させた 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) にて洗浄した。ゲル懸濁液に Precision タンパク質分解酵素 (Bio-Rad) を添加し、4°C で 18 時間連続的に混合しながら酵素消化を行った。ゲル懸濁液を 0.4 μ m のメンブレンフィルター (Millex) にてろ過してゲルを除去した。回収したろ液中に rSEA の生成物が含まれており、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に透析した。この rSEA のタンパク質濃度はブラッドフォード法にて測定した。rSEA の純度はドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて確認した。

2. 抗体の調製

rSEA でウサギおよびニワトリを免疫し、抗体を作製した。ウサギ (12 週令、Japanese White、日本 SLC) を rSEA で免疫した。rSEA をフロイド完全アジュバンド (Difco) と混合しエマルジョンを作製した。rSEA100 μ g を含むエマルジョン 1 ml をウ

サギの皮下に注入した。2 週間および 4 週間経過後、rSEA を静脈に注射した。最後の注射から 1 週間経過後、血清を採取した。

ニワトリ (10 週齢、WL-M/O、MBL) を rSEA で免疫した。rSEA100 μ g とフロイド完全アジュバンドを含んだエマルジョンをニワトリの皮下に注入した。同様の注射を 1 週間の間隔で 4 回繰り返した。最後の注射から 1 週間後、血清を採取した。

ウサギ免疫抗体 G (IgG) とニワトリ免疫抗体 Y (IgY) の画分を、Thiophilic Absorption キット (Thermo) を用いてウサギおよびニワトリ血清からそれぞれ分離した。分離 Ig 画分は PBS に透析した。最終 Ig 溶液のタンパク質濃度はブラッドフォード法にて測定した。

3. サンドイッチ ELISA

3.1 抗体のビオチン標識

抗 rSEA-IgY と抗 rSEA-IgG をビオチン標識した。方法は試薬に付属したマニュアルに従った。簡潔に示すと、NHC-LS-ビオチン (Pierce) を、ジメチル・スルホキシドを用いて 4.6 mg/ml に溶解させた。ビオチン溶液を、両方の Ig 溶液 (1 mg/ml) 2 ml の Ig 溶液に 27 μ l の割合で添加した。混合液は室温で 30 分間反応させた。反応生成物は PBS に接触させて透析した。最終生成物 (biotin-labeled IgG および IgY) は 50% グリセロール存在下にて -30°C で保存した。

3.2 ELISA 法の詳細

IgG と IgY 抗体を吸着抗体として用いた。IgG を用いる ELISA 法を IgG-ELISA 法と記し、IgY を用いる ELISA 法を IgY-ELISA 法

と記す。両方の Ig を 1 μ g/ml の PBS にて希釈した。IgG と IgY 抗体（いずれも検出抗体として用いた）を、96 ウェル ELISA プレート（Nunc）のウェルに添加した。室温で 1 時間放置後、PBS-0.05% tween 20（PBST）を用いてウェルを洗浄した。非特異反応を効率よく抑制するブロッキング試薬を調べるため、StartingBlock Blocking 緩衝剤（PIERCE）、1% ビニールアルコール、0.5% 魚ゼラチン（BioFX Laboratories, Inc.）を検討した。それぞれ 100 μ l をウェルに加え、一晚 4°C で静置した。精製 rSEA を Can Get Signal Immunoreaction Enhancer solution 溶液 I（SI, Toyobo）で希釈した。ブロッキング溶液の除去後、希釈した SEA サンプルを 1 ウェル当たり 100 μ l 加えた。そのプレートを室温で 1 時間静置した。4 回ウェルを洗浄した後、検出抗体として、solution II（SII, Toyobo）で希釈したビオチン標識化 IgG あるいは IgY を加え、1 時間反応させた。同じように洗浄した後、ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ（Pierce）をウェルに加え、室温で 30 分間反応させた。Opt-EIA（テトラメチルベンジジン基質試薬セット、BD Biosciences）を添加し、発色反応を起こさせた。30 分間の反応の後、1 N 硫酸を加え、発色反応を停止させた。最終生成物について、マイクロプレートリーダー（Model 680、BIO-RAD）を用いて、450 nm の吸光度を求めて定量化した。Protein A（Pierce）、Protein A と rSEA の混合液、rSEA のみの 3 種類を同時かつ別々にウェルに加え、吸着抗体の IgG あるいは IgY 抗体と反応させ、Protein A の ELISA 反応への影響を検討した。

4. 黄色ブドウ球菌株の培養

黄色ブドウ球菌は、食中毒由来の 196E(sea 遺伝子陽性)、11689(sea 遺伝子陽性)、FRI361(sea 遺伝子陰性)、Saga-1(sea 遺伝子陰性)、Aomori 1(sea 遺伝子陰性)株を使用した。SEA 遺伝子の存在は SEA 特異プライマー（Omoe et al., 2004）を利用したポリメラーゼ連鎖反応によって確定した。それぞれの株のグリセロールストックを、1% Yeast Extract（Becton Dickinson）を添加した BHI ブロス（Becton Dickinson）に植菌し、一晚 37°C、150 rpm の条件で震盪培養した。一晚培養液を同じ組成の新鮮なブロスに 1 対 100 の割合で接種した。37°C、150 rpm の条件で 48 時間震盪培養を続けた。培養液を 10000 x g、10 分間遠心分離し上清を得た。SEA を含有する培養上清は 0.45 μ m フィルター（Millex）に通してろ過した。

5. 逆受身ラテックス凝集反応

逆受身ラテックス凝集反応（RPLA）はキットに付属した説明書（デンカ生研）に従って行った¹⁷⁾。

6. 検量線

上述の ELISA で得た SEA の吸光値について、EXCEL（Windows）を用いて、一次線形近似解析により検量線を得た。ブランクとエンテロトキシン添加ウェルの吸光値との間で Student-*t* 検定を行い、有意な最少検出量を求めた。

C. 結果

1. ブドウ球菌エンテロトキシン検出のための ELISA の確立

ELISA における全ての段階の最適化を行った。まず、緩衝液中で SEA の検出を試みた。ウサギ抗 SEA-IgG 抗体もしくはニワトリ抗 SEA-IgY 抗体(1 µg/ml)を 96 ウェルプレートのウェルにコーティングした。プレートは室温で 1 時間保持された。我々は SEA 検出 ELISA 法にて特異的シグナルを得るために遮断試薬を検討した。その結果、魚ゼラチン遮断溶液を使って培養したプレートは分析結果において低いバックグラウンドであることが明らかになった。

抗 SEA-IgG を SEA を検出するために吸着と検出抗体の両方に用い (IgG-IgG ELISA)、用量反応を検討した(図 1)。抗 SEA-IgY をサンドウィッチ ELISA に適用すると、捕捉抗体としての IgY (IgY-IgG ELISA)の使用は、IgG-IgY もしくは IgY-IgY ELISA で得られるよりも適切な反応を示した(図 2)。rSEA の濃度を 0.1 から 1000 ng/ml に変化させ、IgG-IgG 間と IgY-IgG 間での ELISA で標準曲線を作成した。統計的に有意な SEA の最小検出限界は IgG-IgG ELISA を用いた際は 0.5 ng/ml、IgY-IgG ELISA 法を用いた際は 0.25 ng/ml であった。IgY-IgG 間での ELISA で得られた標準曲線の信頼性の指標となる R^2 値は IgG-IgG 間での ELISA で示した値と同じ結果を示した。これらの実験結果は SEA を検出する際の IgY の有用性を示していて、SEA の検出に IgY を用いても支障がないこと、すなわち IgY 抗体の有用性を示している。

2. ブドウ球菌エンテロトキシン A と抗体間の特異的反応における Protein A の影響
IgG-IgG、IgG-IgY、もしくは IgY-IgG 間

での ELISA で、SEA が含まれていないウェルに Protein A を加え、そして反応生成物の吸光度を測定し、Protein A の影響を調べた。図 2 に示すように、0.01 ng/ml の Protein A は、IgG-IgG 間の ELISA において SEA が無いウェルの吸光値を顕著に上昇させた。しかしながら、IgY-IgG 間の ELISA においては、1,000 ng/ml の Protein A が存在したときに吸光度の上昇がみられた(図 3)。この事実は、抗 SEA-IgY と比較すると抗 SEA-IgG は 100,000 倍以上 Protein A により感受性があったことを示している(図 2、3)。具体的に Protein A の IgG 抗体への影響を、数値で比較した成績は現在までなく、本検討の結果は、Protein A は非常に強い反応性を IgG 抗体について示す事を数値化できており、IgY 抗体の有用性を示唆している。

3. ブドウ球菌エンテロトキシン A の濃度を検出する際の IgG-IgG および IgY-IgG ELISA の検量線の検討

ELISA 法において SEA 濃度を算出するための検量線を作製した。どちらの ELISA 法も優れた R^2 値を示した。この結果は、これらの方法が SEA 濃度の測定法として信頼性のあることを示している。SEA の最少検出濃度(検出感度)は IgG-IgG 間と IgY-IgG 間の ELISA 法において、それぞれ 0.1 と 0.25 ng/ml であった(図 4)。

4. ELISA 法と RPLA によってブドウ球菌エンテロトキシン A の濃度の決定

sea 遺伝子陽性黄色ブドウ球菌株(196E および 11689)の培養上清中の SEA 濃度を、

IgG-IgG 間と IgY-IgG 間の ELISA 法によって求めるため、図 4 に示された曲線計算を用いた。同じ上清中の SEA 濃度は RPLA 検定によっても測定した。SEA 濃度は RPLA 検定によって計算された値と近似していた (表 1)。一方で、IgG-IgG 間の ELISA を行うには高度にサンプルを希釈する必要がある、計算された SEA 濃度は 200 から 250 倍に高く算出された。sea 遺伝子陰性株 (FRI-361、Saga-1 および Aomori 1) の培養上清が示す吸光度は、IgY-IgG 間の ELISA を行ったブランクのウェルの吸光度と同じだった。しかし一方で IgG-IgG 間の ELISA では明らかに高い吸光度を示した。IgY-IgG ELISA は、サンプル (培養上清) を高度に希釈することなく、かつ、妥当な濃度の SEA を算出できることを示唆している。

D. 考察

SEA はブドウ球菌食中毒の原因となっているタンパク質である。食品中にブドウ球菌は SE のみならず Protein A も産生している。Protein A の影響を排除するため、免疫していないウサギの血清から分離された Ig、すなわち抗原抗体反応に関与しない Ig を大量に加えるか、検体を大きく希釈することで、IgG を用いての ELISA が行われてきた。そのため、検出限界値が悪くなり、希釈倍率の補正を受け、正確な SEA 濃度が算出されない事態が生じる。多くの黄色ブドウ球菌株が産生する Protein A が原因で偽陽性反応を示してしまう。

SEA 検出方法として確立した IgY-IgG 間の ELISA 法が、培養上清に適応できるかを検討するために、食中毒株である 196E や

11689 から採られた SEA 含有培養サンプルを調整した。結果として、IgY-IgG 間の ELISA 法は RPLA と類似した閾値を検出することが可能であることと IgG-IgG 間の ELISA 法と比較して大幅な希釈が必要でないことが発見された。一方、RPLA 検定は Protein A によって影響はされない。しかしながら、RPLA 検定においては 2 段階連続希釈を行うため、RPLA は半定量法となり、希釈倍率の影響を受ける。さらに、10 時間以上の反応時間が必要である。ELISA 法は RPLA 測定と比べより最新の正確で精緻かつ広範囲に使用できる測定法である。

IgY-IgG 間の ELISA 法は 0.25 ng/ml までの濃度の SEA を検出できる。この検出法ならば Protein A の干渉を受けずに高水準の室間再現精度が実現できる。IgG-IgG 間の ELISA 法の代わりに IgY-IgG 間の ELISA 法を使用すれば、Protein A の干渉は顕著に減少した。この改善された測定方法は SEA 検出に有効である。

E. 結論

ニワトリ IgY 抗体を用いた ELISA 法は反応が早く感知でき、Protein A の影響を受けない方法で、ブドウ球菌培養液中の SE を有効に定量できる。検出感度にも優れ、今後、食物中の SEA 検出にも適応できる可能性がある。

F. 文献

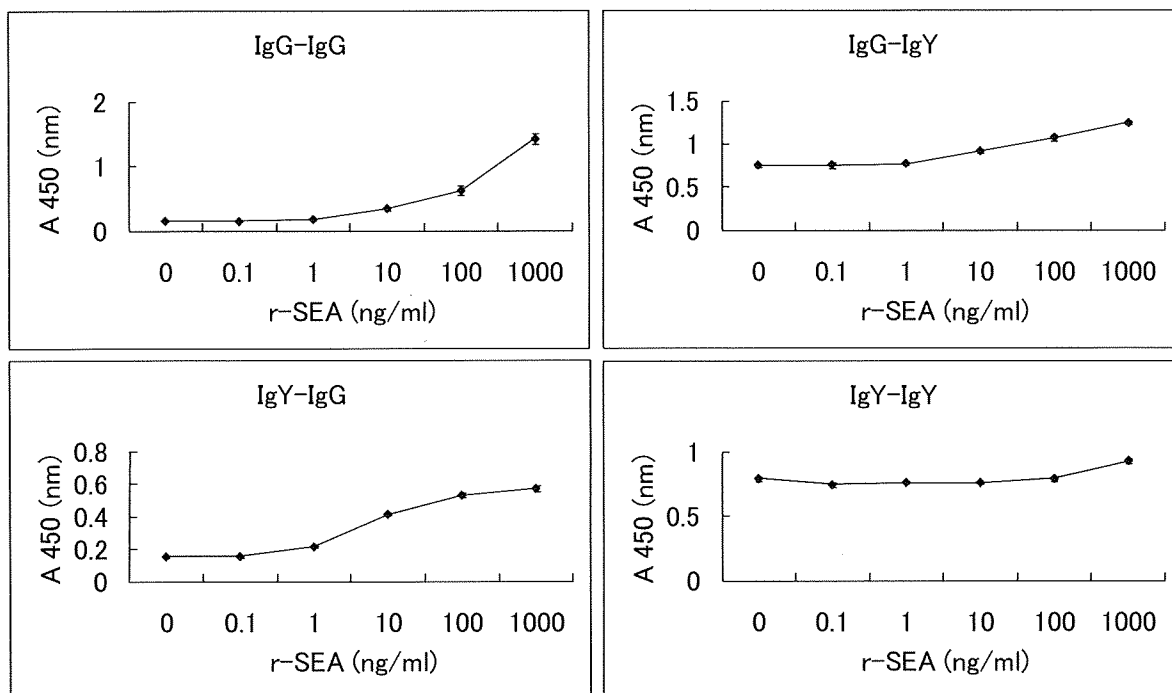
- 1) 山中英明, 藤井建夫, 塩見一雄, 第 3 章 微生物性食中毒 食品衛生学, 恒星社 恒星閣, 東京 (2007)
- 2) 厚生労働省食中毒統計資料

<http://www.mhlw.go.jp/topics/syoku chu/04.html>

- 2) Bergdoll, M. S. : *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne bacterial pathogens (Doyle, M. P. ed.), pp. 463-523, Marcel Dekker, Inc., New York, NY (1989)
- 3) Fitzgerald J. K., Monday S. R., Foster T. J., Bohach G. A., Hartigan P. J., Meaney W. J., and Smyth C. J. : Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. J Bacteriol. 183:63-70 (2001)
- 4) Jarraud S., Peyrat M. A., Lim A., Tristan A., Bes M., Mougél C., Etienne J., Vandenesch F., Bonneville M., and Lina G. : egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. J Immunol. 166:669-677 (2001)
- 5) Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I., Baba T., Yuzawa H., Kobayashi I., Cui L., Oguchi A., Aoki K., Nagai Y., Lian J., Ito T., Kanamori M., Matsumaru H., Maruyama A., Murakami H., Hosoyama A., Mizutani-Ui Y., Takahashi N. K., Sawano T., Inoue R., Kaito C., Sekimizu K., Hirakawa H., Kuhara S., Goto S., Yabuzaki J., Kanehisa, M., Yamashita A., Oshima K., Furuya K., Yoshino C., Shiba T., Hattori M., Ogasawara N., Hayashi H., and Hiramatsu K. : Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 357:1225-1240 (2001)
- 6) Letertre C., Perelle S., Dilasser F., and Fach P. : Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. J Appl. Microbiol. 95:38-43 (2003)
- 7) Munson S. H., Tremaine M. T., Beteley M. J., and Welch R. A. : Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin Type G and I from *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 66:3337-3348 (1998)
- 8) Omoe K., Hu D. -L., Takahashi-Omoe H., Nakane A, and Shinagawa K. : Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin -related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. Infect Immun. 71:6088-6094 (2003)
- 9) Orwin P. M., Leung D. Y. M., Donahue H. L., Novick R. P., and Schlievert P. M. : Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. Infect Immun. 69: 360-366 (2001)
- 10) Orwin P. M., Leung D. Y., Tripp T. J., Bohach G. A., Earhart C. A., Ohlendorf D. H., and Schlievert P. M. : Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like

- superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. Biochemistry 41:14033-14040 (2002)
- 11) Orwin P.M., Fitzgerald J.R., Leung D.Y., Gutierrez J.A., Bohach G.A., and Schlievert P.M. : Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. Infect Immun. 71:2916-2919 (2003)
 - 12) Zhang S., Iandolo J.J., and Stewart G.C. : The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). FEMS Microbiol Lett 168:227-233 (1998)
 - 13) Lina G., Bohana G.A., Nair S.P., Hiramatsu K., Jouvin-March E., and Mariuzza R. : Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. J Infect Dis. 189:2334-2336 (2004)
 - 14) Saunders, G.C. and Bartlett M.J. : Double-antibody solid-phase enzyme immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin A. Applied Environm. Microbiol. 34:518-522 (1977)
 - 15) Sacco E. H. et al. : Human IgA and IgG (Fab')₂ that bind to staphylococcal protein A belong to the V_HIII subgroup. J. Immunol. 147:1877-1883 (1991)
 - 16) Omoe K. et al. : Comprehensive analysis of classical superantigenic toxin gene in *Staphylococcus aureus* isolates. FEMS Microbiol. Lett. 246:191-198 (2005)
 - 17) Shingaki M et al. : Study on reversed passive latex agglutination for detection of Staphylococcal enterotoxin A-C. Annual Report of Tokyo Metropolitan Laboratory of Public Health. 32: 128-131 (1981)
- G. 健康危害情報
特になし。
- H. 研究発表
1. 論文
特になし。
- H. 知的財産権の出願登録状況
特になし。

A



B

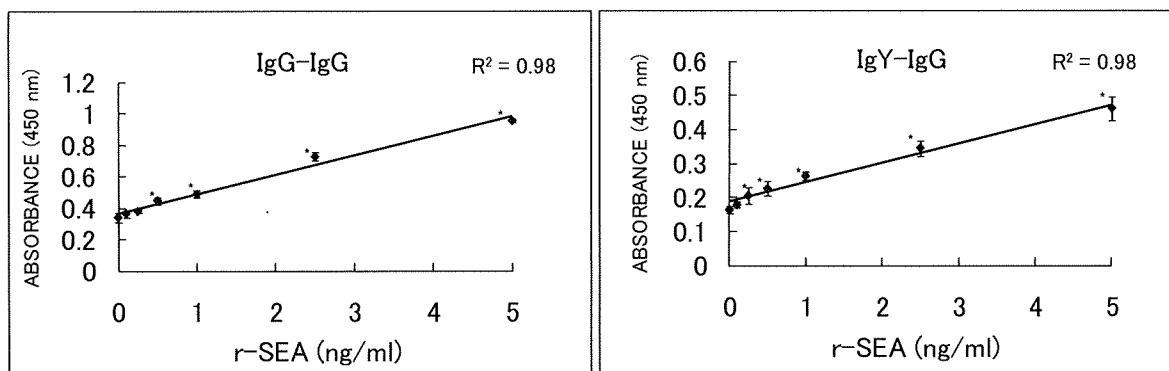


図1 IgG および IgY 抗体を用いての、ブドウ球菌エンテロトキシン A(SEA)定量のための ELISA

IgG-IgY の標記は、前の抗体を吸着に、後ろに記載した抗体を検出抗体に使用した事を示す。パネル A は SEA レンジを 0 から 1,000 ng/ml まで変量にした結果を、パネル B は 0 から 5 ng/ml までの結果を示す。

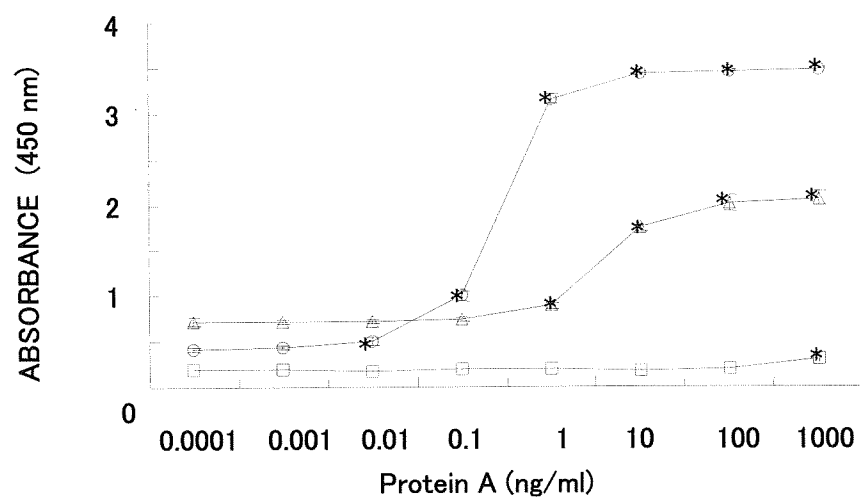


図2 IgG および IgY を用いてのサンドイッチ ELISA の吸光度におよぼす Protein A の影響。SEA が存在しない状態での解析。

○ IgG-IgG ELISA、△ IgG-IgY ELISA、□ IgY-IgG ELISA

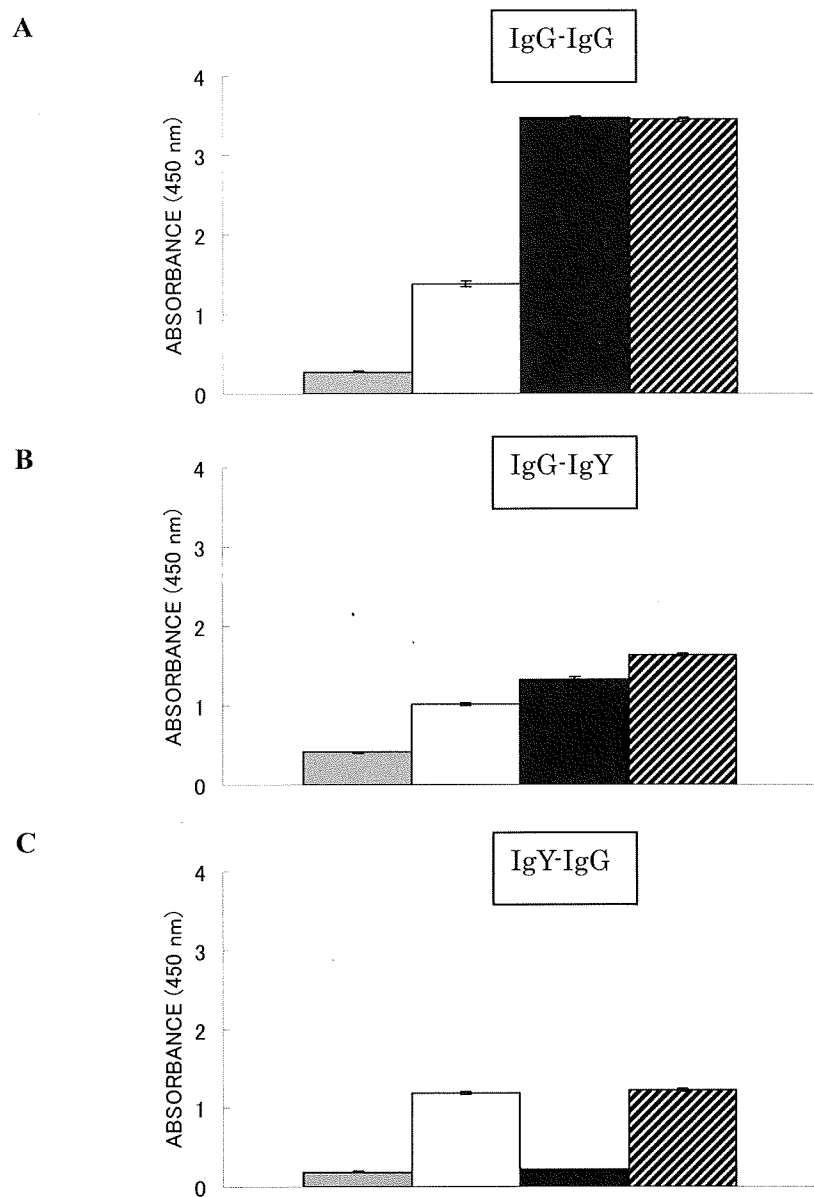
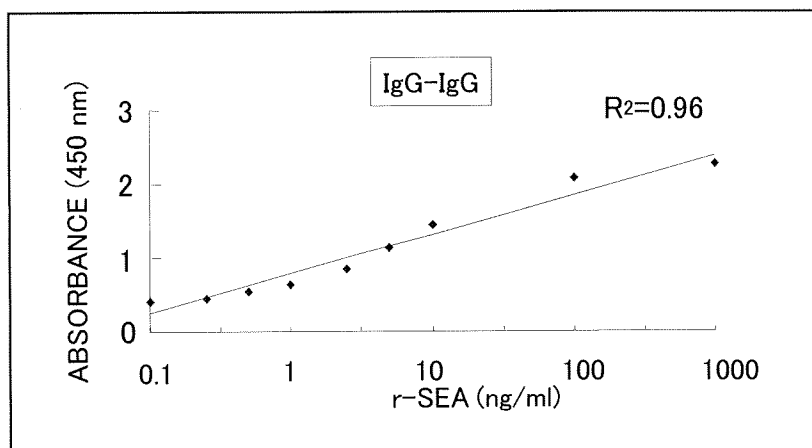


図3 IgG および IgY を用いてのサンドイッチ ELISA の吸光度におよぼす Protein A の影響。SEA と Protein A 共存下での解析。

■ : None, □ : rSEA 1000 ng/ml, ■ : Protein A 1000 ng/ml, ▨ : rSEA 1000 ng/ml および Protein A 1000 ng/ml.

A



B

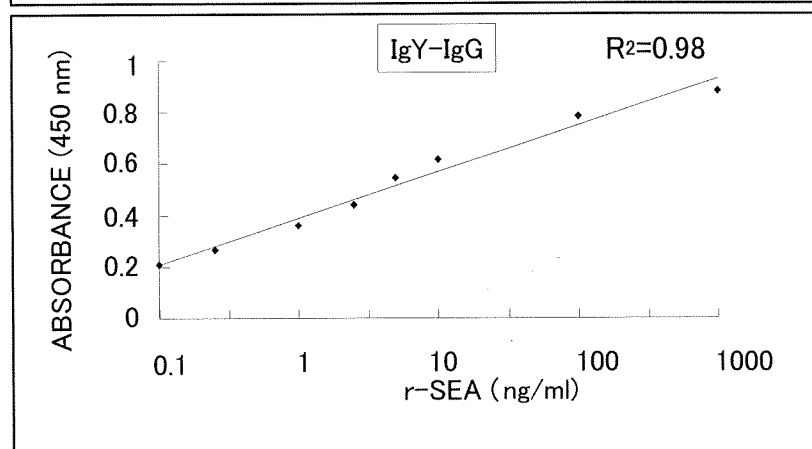


図4 IgG および IgY 抗体を用いてのサンドイッチ ELISA における、ブドウ球菌エンテロトキシン A に対する検量線

表 1 IgG および IgY 抗体を用いての ELISA によるブドウ球菌エンテロトキシン
の定量：食中毒由来菌培養液中の毒素量のラテックス凝集反応法との比較

ブドウ球菌	RPLA ²⁾ で測定した SEA ¹⁾ (ng/ml)	ELISA で測定した SEA ^{1) 3)} (ng/ml)	
		IgG- IgG	IgY-IgG
196E	160	118,593	457
11689	320	63,442	321

1) Staphylococcal enterotoxin A：ブドウ球菌エンテロトキシン A

2) Reversed passive latex agglutination：逆受け身ラテックス凝集反応

3) SEA の濃度は、図 4 の検量線から測定した

分 担 研 究 報 告 書

ブドウ球菌エンテロトキシンの食品中における産生量評価

重茂 克彦