

表 1 供試菌株

由来	菌株名	遺伝子型
食中毒由来株	Aomori1	<i>seg, sei, selm, seln, selo, selp</i>
	Hiroshima13	<i>seg, sei, selm, seln, selo, selj, ser, ses</i>
	Saga1	<i>seg, sei, selm, seln, selo, selp</i>
	Ishikawa2	<i>sea, seg, sei, selm, seln, sleo</i>
	Fukuoka1	<i>seg, sei, selm, seln, selo</i>
	Oita1	<i>seg, sei, selm, seln, selo</i>
ヒト鼻腔由来株	Saitama496	<i>seg, sei, selm, seln, selo</i>
	Hirosaki4	<i>seb, seg, sei, selm, seln, selo</i>

表2 Hiroshima13株のにぎりめし中での  
*egc*-related SEs 産生に対する接種菌数の影響

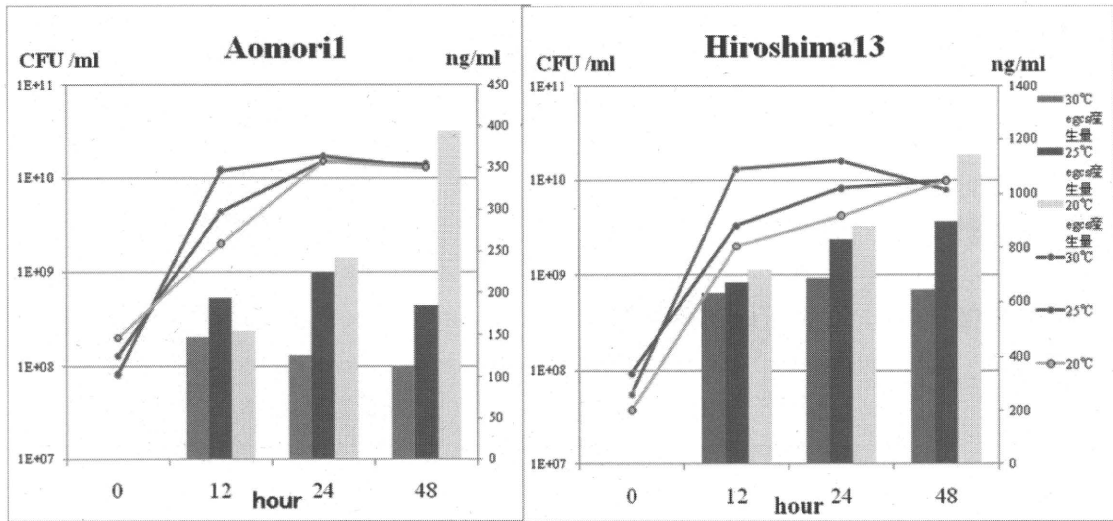
接種菌数	5 × 10 <sup>3</sup> CFU/50g	5 × 10 <sup>4</sup> CFU/50g
培養後菌数	2 × 10 <sup>6</sup> CFU/50g	2 × 10 <sup>8</sup> CFU/50g
	産生量 (ng/ 50g)	産生量 (ng/ 50g)
SEG	<13	63
SEI	<26	110
SEM	<26	<26
SEN	<130	160
SEO	<130	324
total	-	657

(25 °C、12時間培養、のにぎりめし3個の平均を示す)

表3 Ishikawa 2株のにぎりめし中での  
*egc-related* SEs 産生に対する接種菌数の影響

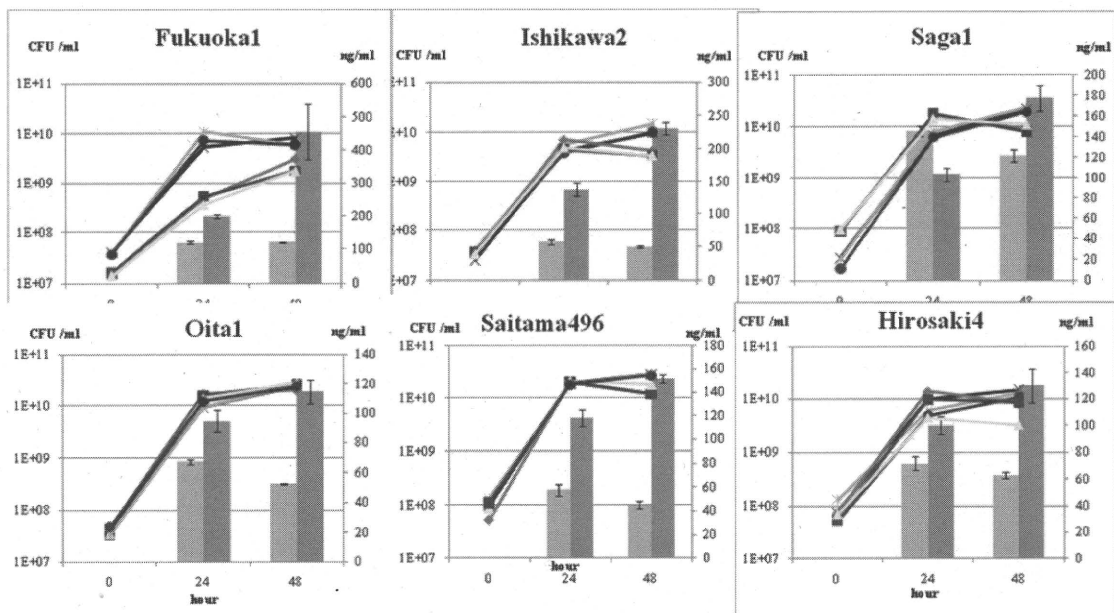
接種菌数	$5 \times 10^3$ CFU/50g	$5 \times 10^4$ CFU/50g	
培養後菌数	$1 \times 10^7$ CFU/50g	$1 \times 10^8$ CFU/50g	
	産生量 (ng/ 50g)	産生量 (ng/ 50g)	
SEG	35	96	
SEI	59	161	SEM
40	156		
SEN	<130	154	
SEO	167	341	
total	301	908	

(25 °C、12時間培養、のにぎりめし3個の平均を示す)



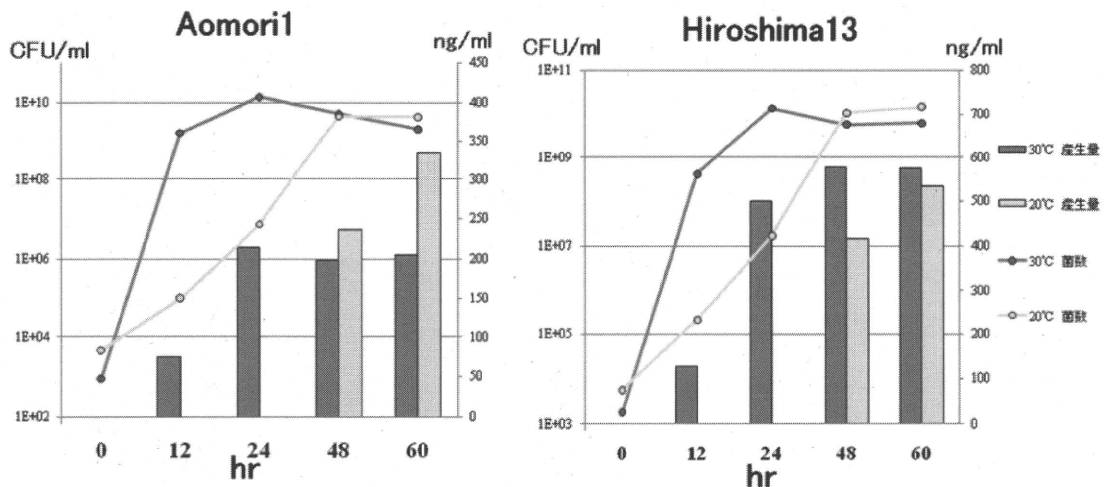
接種菌数 :  $10^7$ - $10^8$  cfu/ml. 培地 : BHI/1% yeast extract

図1 20、25 および 30°Cにおける黄色ブドウ球菌の増殖動態と *egc*-related SEs 総産生量



接種菌数 :  $10^7$ – $10^8$  cfu/ml. 培地 : BHI/1% yeast extract

図2 20 および 30°Cでの黄色ブドウ球菌の増殖動態と SEO の産生量



接種菌数 :  $10^3$  cfu/ml. 培地 : BHI/1% yeast extract

図3 20 および 30°Cにおける黄色ブドウ球菌の増殖動態と *egc*-related SEs (SEO, SEM, SEN, SEG)の総産生量

# 分 担 研 究 報 告 書

水晶発振子マイクロバランス法を原理とする  
ブドウ球菌エンテロトキシン検出法開発の試み

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

#### 水晶発振子マイクロバランス法を原理とする ブドウ球菌エンテロトキシン検出法開発の試み

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 部長
協力研究者	実川 友史	(株) アルバック 技術開発部 部長
	星野 浩美	(株) アルバック 技術開発部 主事
	鎌田 洋一	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 室長

研究要旨：黄色ブドウ球菌の産生するエンテロトキシン(SE)は、嘔吐を誘発する食中毒の原因毒素である。脱脂粉乳を原因とする本菌食中毒に見られるように、殺菌工程のある食品の場合、細菌検査では本菌毒素のリスクを管理できず、毒素そのもののモニタリングが必須となる。消費量の多い食品については、製造段階で連続的にモニタリングできる毒素検査法の導入が望ましい。水晶発振子マイクロバランス(QCM)法は、逆圧電素子である水晶発振子(センサー)に電圧を印加すると水晶発振子(センサー)が一定の周波数で振動し、センサー上に抗原抗体反応物が形成された場合、周波数が減少することにより対象物質を検知する方法である。この方法を、飲料系食品を対象に応用することで、毒素の存在を連続的かつリアルタイムにモニタリングできる可能性がある。SEについて、本法が適応可能か検討した。センサーにプロテインGを介して抗SEA抗体を固定化した。センサーに測定溶液を添加し、装置に装着後シグナルの安定を待ってSEAを添加すると、周波数の減少が直ちに検出された。周波数の減少と、添加SEA濃度との間には容量依存性が認められた。この結果は、本法はSEAに対し検査法として確立できる潜在的可能性を示している。しかしながら現在のところ、検出できる毒素の濃度は150 ng/mlとなっており、今後、感度を向上させる必要がある。



## 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 (Staphylococcal Enterotoxin) を産生する毒素型食中毒原因菌である<sup>1)</sup>。ブドウ球菌は過去に非常に多数の食中毒患者を出した事件を起こしているが、原因食品はいずれも乳飲料である<sup>2)</sup>。殺菌工程がある食品では細菌検査は陰性となるため、ブドウ球菌食中毒防止のためには、毒素を検出する必要がある。消費量の多い食品については、製造段階で連続的にモニタリングできる毒素検査法の導入が望ましい。

物質間の結合反応を連続的かつリアルタイムでモニタリングできる方法に、水晶発振子マイクロバランス Quartz Crystal Microbalance (QCM) 法がある<sup>3)</sup>。現在ではいろいろな物質の検出に応用でき、小型の機器が開発されている((株)イニシウム、モデル AFFINIX Q4、図1)。

本法の原理を以下に説明する。水晶板の両側に金属薄膜を取り付けて二つの電極に接続し、振動電場を印加することにより、水晶発振子は一定の周波数で発振し続け、これをモニタリングする。水晶板上の金属薄膜に、何かの物質が結合した場合、物理的に重量が付加され、振動数、すなわち周波数の減少が起こる。水晶板の金属薄膜上に存在する物質の質量に依存して周波数が変化する。

周波数の変化量と電極上の付着物質の質量との関係は、Sauerbrey 式<sup>3)</sup>と呼ばれる次式で表され、質量が周波数に比例する。図2に測定部を、図3に水晶発振子(セン

サーセル)を示す。センサーセル中央部分が金電極部分で、この上で物質の結合反応を起こさせ、周波数をモニタリングする。

$$\Delta F = -\frac{2Nf_0^2}{A\sqrt{\rho_0\mu_0}}\Delta m$$

$\Delta F$  : 水晶発振子の周波数変化量 (Hz)  
 $f_0$  : 基本周波数 (Hz)  
 $N$  : 倍音数  
 $A$  : 水晶板に取り付けた金属薄膜電極の面積  
 $\mu_0$  : 水晶の弾性率(=2.947×10<sup>13</sup> gm<sup>-1</sup>s<sup>-2</sup>)  
 $\rho_0$  : 水晶の密度(=2.648 g cm<sup>-3</sup>)  
 $\Delta m$  : 電極単位面積当たりに付着した物質の量

QCM センサーは薄い水晶を金電極ではさんだ構造をしており、この中央の金属の丸い部分がセンサーとなっている。図4はセンサー断面を示し、水晶を挟んだ電極に交流電場をかけると、水晶の厚みに応じた固有の周波数で振動する。電極上に物質が吸着すると、その分厚みが増し、波長が大きくなることから、周波数が減少する。

図5は QCM 法の測定過程を模式化したもので、まず、センサーには何も結合していない電極で、溶液中で周波数を安定化させた後、タンパクのような吸着物質を溶液に添加すると、徐々に吸着が起こり質量の増加とともに周波数の減少が見られる。そこにタンパク質分解酵素を加えるとタンパク質が分解されて質量が小さくなるために周波数は増加回復する。QCM 法は以上の変化を、リアルタイム、かつ、連続的にモニタリングできる。また、定量反応にも応用できる。

飲料系の食品を汚染する毒物の一つとして SE を考えたとき、QCM 法には、その簡便性、リアルタイムの連続モニタリングが可

能な事、液状物への適応性など、有利な点が多々考えられる。本研究の目的は、QCM法に抗体を組み込ませ、ブドウ球菌エンテロトキシンの検出法として適応できるか検討することにある。

## B. 実験方法

### 1 供試ブドウ球菌エンテロトキシン

組換えブドウ球菌エンテロトキシン A (以下 rSEA) を以下の方法で調製した。

大腸菌 BL 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 タンパク抽出キット溶液 (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 50 mM 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 µm 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。回収したろ液中に含まれる rSEA を、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 供試抗体

#### 1) ウサギ抗 SEA IgG 抗体

上記 rSEA を Freund の完全アジュバント (Difco) と混合し、1 回 100 µl、rSEA 量として 50 µg をウサギ (9 週齢、オス、日本 SLC) の背部皮下に注射した。2 週間後、同 rSEA-アジュバント混合物を同量注射した。さらに 2 週間後、同じ免疫処理を行った。2 週間後に rSEA 50 µg を皮下に注射した。最終注射の 1 週間後、血液を採取し、血清分離を行った。免疫血清は -30°C で保存した。

Thiophilic Absorption キット (Thermo) を用いて、IgG 画分を上記血清からそれぞれ精製した。精製 IgG 画分は PBS に透析した。最終 IgG 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。

#### 2) 市販ウサギ抗 SEA IgG 抗体

Toxin Technology, Inc. より販売されている抗 SEA 抗体 (IgG 画分) を購入した。取り扱い説明書に従い、凍結乾燥品に水を加え、1 mg/ml の溶液とし、分注して -30°C で保存した。

#### 3) ニワトリ抗 SAE IgY 抗体

ニワトリ (10 週齢、WL-M/O、MBL)

を上記 rSEA で免疫した。rSEA100  $\mu\text{g}$  とフロイン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。血清は $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。

Thiophilic Absorption キット (Thermo) を用いて、IgY 画分を上記血清から精製した。精製 IgY 画分は PBS に透析した。最終 IgY 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 抗体の力価検定 ELISA

rSEA を PBS で 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に希釈し、ELISA プレート (Nunc) の各ウェルに 100  $\mu\text{l}$  添加した。室温で 1 時間静置したのち、抗体溶液を捨て、ウェルを 0.1% Tween-20 を含む PBS (以下 PBS-T) で 5 回 (300  $\mu\text{l}$  / ウェル) 洗浄した。その後 1%ウシ血清アルブミンを添加した PBS 溶液 200  $\mu\text{l}$  をウェルに添加した。プレートを  $4^{\circ}\text{C}$  で一晩静置し、ウェル表面のブロッキングを行った。その後、ウェルは 1 回洗浄した。上述の抗 SEA 抗体各々を 1  $\text{ng}/\text{ml}$  から 1,000  $\text{ng}/\text{ml}$  になるように PBS-T で希釈し、100  $\mu\text{l}/\text{well}$  の割合でウェルに添加した。プレートを室温で 2 時間静置後、ウェルを 5 回洗浄した。

PBS-T で 1,000 倍希釈した Biotin 標識抗ウサギ IgG あるいは IgY 抗体をウェルに添加し、室温で 1 時間静置した。ウェルを洗浄後、10,000 倍希釈した Streptavidin 標識ペルオキシダーゼを添加し、さらに室温で 1 時間静置した。

ウェルを十分に洗浄後、発色試薬 (Opt EIA, BD) 150  $\mu\text{l}$  をウェルに加えた。室温で 30 分静置後、反応物の 630 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Model iMark, Bio-Rad) で測定した。抗体の各希釈段階について、3 ウェルを用い、吸光度の平均を測定値とした。抗体の容量に対する吸光度の反応曲線を描き、最大吸光値の 50% の吸光値を示す抗体濃度を算出した。

### 4 水晶発振子マイクロバランス実験

#### 1) 試験 1

物理的吸着法により、抗体をセンサーに固着させた。抗 SEA IgG 抗体 (Toxin Technology, Inc.) を 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるよう PBS で希釈し、センサーの金電極部分に 100  $\mu\text{l}$  滴下した。乾燥防止のためにシャーレ内にセンサーを保持し、室温で 30 分間静置した。金電極部分に Milli-Q 水を噴射して洗浄した。ブロッキング溶液 (NanobioBlocker MG) を金電極部分に滴下し、センサー表面をブロッキングした。その後、測定部にセンサーを装着した。センサーセルには 495  $\mu\text{l}$  の PBS を充填させた。周波数のモニタリングを開始しシグナルが安定した後、5  $\mu\text{l}$  の rSEA 溶液をセンサーセル内に注入し、周波数をモニタリングした。注入する rSEA の濃度を変化させ、センサーの周波数をモニタリングした。

吸着させる抗体をニワトリ IgY 抗体として同様の実験を行った。

#### 2) 試験 2

センサーに固着させるものをプロテイン G とし、アミノカップリング法を用いてプロテイン G をセンサーに吸着させた。金電極部分に 1 mM の SAM 試薬 (アミンカップリングキット (同仁化学) を 50  $\mu$ l 滴下し乾燥させないようにしながら室温で 1 時間静置した。金電極部分を Milli-Q 水で洗浄した。100 mg/ml の N-ヒドロキシスクシンイミドと 100 mg/ml の 1-エチルジメチルプロピルカルボジイミドの等量混合液 100  $\mu$ l を金電極部分に滴下し試薬の活性化を行った。その後、プロテイン G 溶液を滴下し、室温で 1 時間反応させた。Milli-Q 水で電極を洗浄後、抗 SEA IgG 抗体(100  $\mu$ g/ml)を添加し、同様に室温で 1 時間反応させ、洗浄を行った。1 M エタノールアミンを用いて反応部分のブロッキングを行った。その後抗体を、金電極部分に滴下、室温で 1 時間プロテイン G を介して吸着させたセンサーを測定部に装着し、センサーの周波数をモニタリングした。順次 rSEA を添加し、周波数の変動をリアルタイムでモニタリングした。

### C. 結果と考察

#### 1) 抗 SEA IgG 抗体の力価検定

ウサギを rSEA で免疫して得た血清から分離した IgG 抗体と、市販の抗 SEA IgG 抗体の力価を ELISA で求めた。いずれの抗体も、濃度が増えるにつれ、SEA との反応が強くなり、高い吸光値を示した(図 6)。両者の、SEA との結合力を比較するため、最大吸光値の 50%の吸光値を示す抗体濃度、すなわち IC<sub>50</sub> 値を求めた。その結果、免疫

血清から分離した IgG 抗体の IC<sub>50</sub> 値は 5.5 ng/ml で、市販 IgG 抗体のそれは 0.3 ng/ml を示した。この結果は、市販の抗 SEA IgG 抗体は、免疫して得た IgG 抗体の 18.3 倍の毒素結合力を持つことを意味している。

#### 2) 免疫血清より調製した抗 SEA IgG 抗体の QCM への応用

ウサギ免疫血清より分離した抗 SEA IgG を物理吸着法 (試験 1 の方法) でセンサーに固定化した。PBS 中での周波数が安定した後、SEA を添加し、周波数変化をモニタリングした。最大 1,000 ng/ml の SEA を添加したが周波数に変化は見られなかった (図 7)。

#### 3) ニワトリ抗 SEA IgY 抗体の QCM への応用

抗 SEA IgY を物理吸着法 (試験 1 の方法) でセンサーに固定化した。PBS 中での周波数が安定した後、SEA を添加し、周波数変化をモニタリングした。最大 1,000 ng/ml の SEA を添加したが周波数に変化は見られなかった (図 7)。

#### 4) 市販抗 SEA IgG 抗体の QCM への応用

センサーの金電極部にプロテイン G を吸着し、その後に (試験 2 の方法) 市販の抗 SEA IgG 抗体を添加、固定化した。センサーを測定部に装着、周波数が安定したあとに、高濃度の SEA を添加した (最終濃度 1.57  $\mu$ g/ml)。抗体を吸着させたセンサーに SEA を添加した直後から、周波数が減少し始め、5 分後には平衡に達した (図

8)。一方 SEA が同一濃度になるように、ブロッキングのみを行ったセンサーセルに添加したが、周波数に変化はなかった (図 8)。この結果は、センサーに SEA が抗体を介して結合、センサーの重量が増加し、周波数の減少に至ったと判ぜられる。抗体を固定していないセンサーでは毒素によって周波数の変化がなかったことは、毒素添加によるセンサー周波数減少の反応は毒素特異的であることを示し、反応に信頼性があることを示唆している。

ウサギの免疫血清から分離した IgY 抗体では SEA の添加にもかかわらず周波数の減少が見られなかったことは上述した。市販の抗 SEA IgY 抗体の毒素への結合力が 18 倍高いため、QCM 法で SEA の結合が検知されたと考えられる。

#### 5) 低濃度 SEA の添加における QCM の反応

上記の実験結果から、プロテイン G を介して、市販の抗 SEA IgG 抗体をセンサーに吸着させる方法が適していることがわかったので、本方法で抗体を吸着させ、低濃度の SEA を反応させ、周波数をモニタリングした。図 9 に示すように、SEA の濃度が高い程、周波数の減少が多く、SEA の濃度が低くなるに従って周波数の減少率が低下した。周波数の減少と SEA の濃度におおよその容量依存性が認められた。最終 SEA 濃度が 150 ng/ml で明瞭な周波数の減少が見られたが、100 ng/ml の添加では、10 分間のモニタリング時間中に振動数の減少は観察されなかった。以上の結果は、QCM 法は

SEA の検出に有効である可能性を示すが、感度を向上させ、低濃度の SEA を検知できるよう改良すべきことを示している。

#### D. 結論

ブドウ球菌エンテロトキシンの検出定量に、現在までまったく報告がない、水晶発振子マイクロバランス(QCM)法という原理を持つ新技术を適応し、試験法として開発できる可能性があるかを検討した。センサー部分にプロテイン G を介して高力価の抗 SEA ポリクローナル IgG 抗体を吸着させ、SEA を添加した。その結果、センサー周波数の減少が認められた。この減少は特異的で SEA の容量依存性が認められ、QCM 法の SE 試験法への応用可能性を示唆する。しかしながら、感度の点で不十分で、低濃度の SE を検出できるよう改良する必要がある。

#### E. 健康危害情報

特になし。

#### F. 文献

- 1) 石田和夫ら(2005) イラスト食品衛生学、東京教学社、東京
- 2) 山中英明、藤井建夫、塩見一雄(2007) 食品衛生学第二版、恒星社厚生閣、東京
- 3) G. Sauerbrey, Z. Phys., 155 (1959) p. 206

#### G. 研究発表

なし。

#### H. 学会発表

なし。

#### I. 知的所有権の取得状況

なし。

##### 1) 特許取得

なし。

##### 2) 実用新案取得

なし。

##### 3) その他

なし。



図1 水晶発振子マイクロバランス装置の全景  
機種：(株) イニシウム モデル AFFINIX Q4

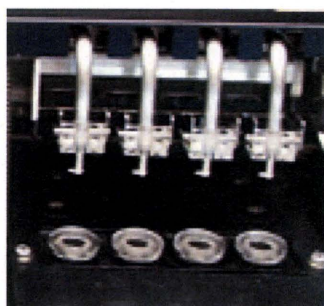


図2 測定部

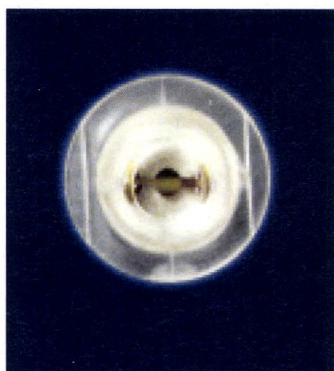


図3 水晶発振子 (センサーセル)。中央が金電極部分。

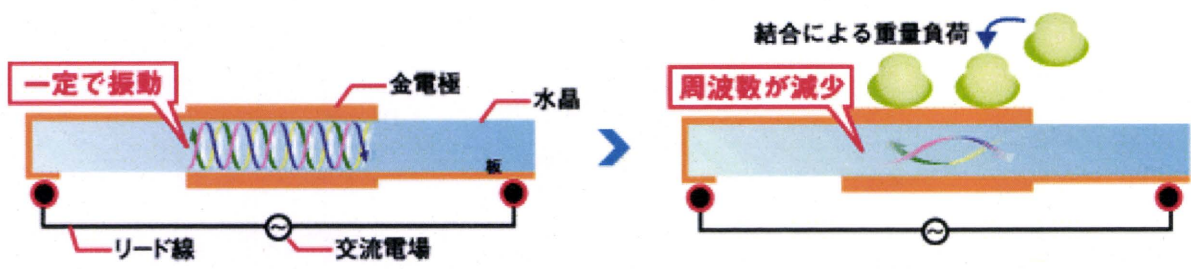


図4 水晶発振子マイクロバランス(QCM)法の測定原理

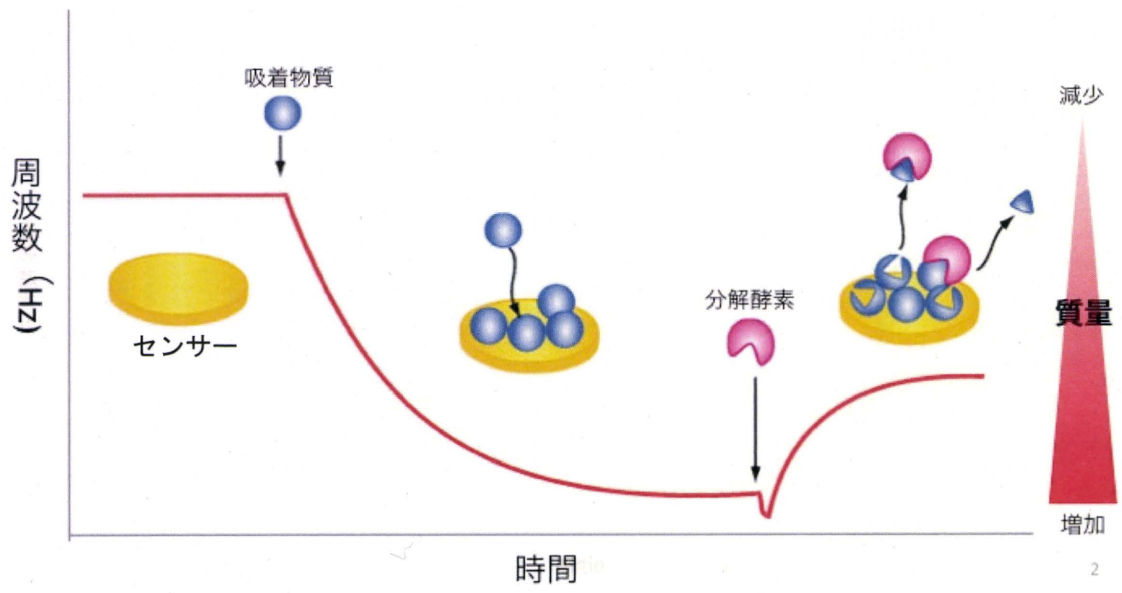


図5 水晶発振子マイクロバランス(QCM)法におけるセンサーへの物質の結合離脱と、センサー振動数との関係図



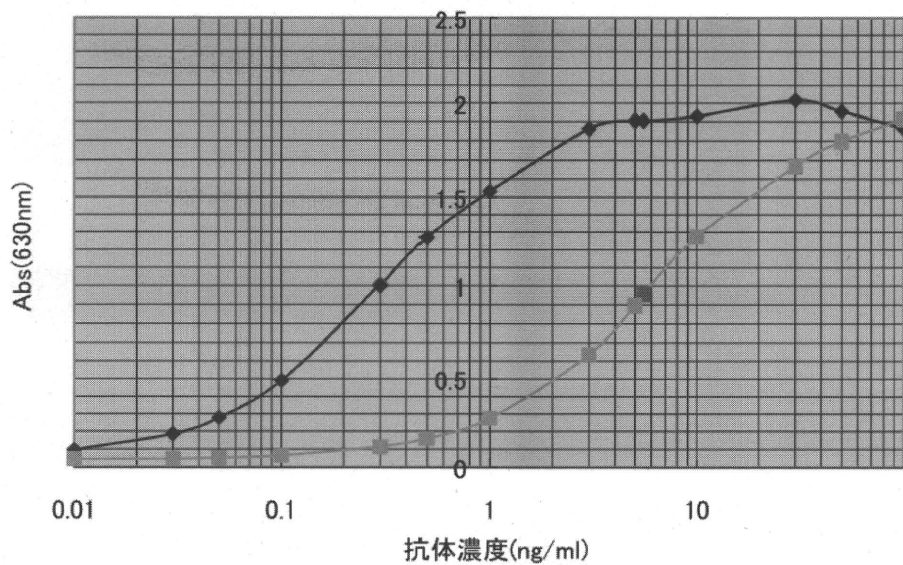


図6 抗ブドウ球菌エンテロトキシン A に対する IgG 抗体の力価検定

濃い青線は市販 IgG 抗体、薄い青線はウサギに免疫して得た IgG 抗体の反応

を示す。赤丸部分はそれぞれの IC<sub>50</sub> 値を示すポイント。

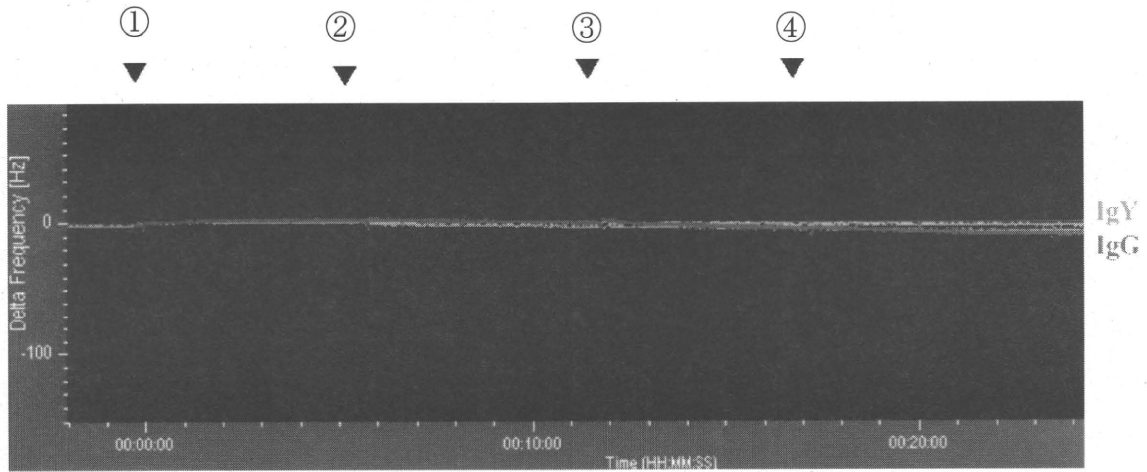


図7 ウサギにブドウ球菌エンテロトキシン A を免疫して得た IgG 抗体  
あるいはニワトリ IgY 抗体をセンサーに吸着させた水晶発振子マイクロバ  
ランス(QCM)法の周波数の変動

SEA をセンサーセルに添加し、センサーの周波数をモニタリングした。

- 添加時期と最終 SEA 濃度：
- ① 10 ng/ml
  - ② 100 ng/ml
  - ③ 500 ng/ml
  - ④ 1,000 ng/ml

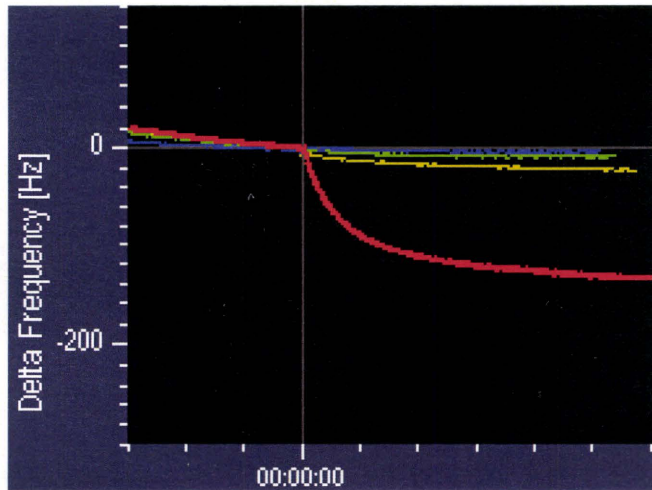


図8 抗ブドウ球菌エンテロトキシン A を添加した時の周波数の変動

赤線は IgG 抗体を吸着させたセンサーへ、高濃度のエンテロトキシン A (1.57  $\mu$ g/ml) を添加した時の水晶発振子マイクロバランス(QCM)法における周波数の変動を示す。他の色の線は、抗体は吸着させていないセンサーに同濃度のエンテロトキシン A を添加した時の周波数の変動を示す。

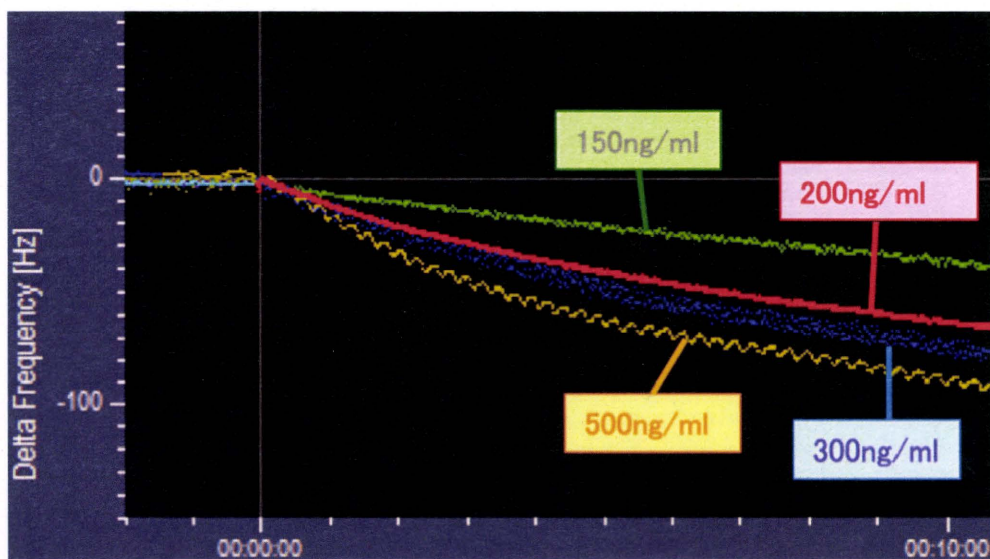


図9 抗SEAポリクローナルIgG抗体 第2ロットを用いた時の  
水晶発振子マイクロバランス(QCM)法システムの周波数の変動

添加したSEA濃度に従い、周波数の減少が認められた。