

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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.5 M Citric acid) 25 ml、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Santoku Chemical Industries Co.) 15 μl を混合したものを、2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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。

### 1.3 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 μm フィルター (Millex GP® 0.22 μm、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。

## 2 IgY 抗体を用いてのブドウ球菌エンテロトキシンの検出法

### 2.1 SE のニワトリへの免疫と IgY 抗体の精製、ならびに ウサギへの免疫と IgG 抗体の調製

ニワトリ (WL-M/0) に、1 mg/ml の組換え SE 溶液 0.1 ml と、フロイントアジュバント (SIGMA) 0.1 ml でエマルジョンにした混合物を、10 週齢時より 1 週間間隔で 4 回腹腔注射した。5 回目はアジュバントを用いず、抗原 0.1 ml を鶏翼下静脈に注射した。最終免疫の 1 週間後に、翼下静脈から採血し、抗血清を分離した。

ニワトリ抗血清 1 ml に対し、71 mg の割合で硫酸ナトリウム (Wako) を加え、4°C、15,000×g、20 min 遠心分離した。得た上清を 0.45 μm のフィルターに通し、不溶物を除いたものを Thiophilic Adsorbent Columns (Pierce Thiophilic Adsorption

Kit;Thermo) に全量添加した。カラムを洗浄後、キット中の溶出液をカラム内に添加した。溶出液を 3 ml ずつ試験管に分画し、Nano Drop (LMS) を用いて波長 280 nm における吸光度を測定、吸光度 0.1 以上のフラクションを回収した。PBS 中で 4°C、一晩透析を行い、精製 IgY 抗体として使用時まで -30°C で保存した。IgY 抗体のタンパク濃度は BCA 法で Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo SCIENTIFIC 社) を用いて測定した。IgY 抗体の純度は SDS-PAGE で確認した。

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 µg 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 µg 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。

NHS-LC-ビオチン (Pierce 社) を Diethyl

sulfoxide (DMSO、Wako) に溶かし、ビオチン試薬とした。各抗体にビオチン試薬を加え (最終添加濃度は 62 µg/ml)、室温で 30 分間反応させた。反応液を 4°C の PBS 中で一晩透析した。回収した反応物と同容量のグリセリンを加え -30°C で保存した。

## 2.2 サンドイッチ ELISA

ELISA のプレートは Nunc 社のものを用いた。以下、吸着用 IgY 抗体の濃度、ブロッキング剤、毒素や抗体の希釈液、ビオチン標識 IgY 抗体濃度、Streptoavidin-HRP (Pierce 社) の希釈濃度について検討した。各反応は室温で 1 時間行い、その後 5 回ウェルを洗浄し、次の試薬を反応させた。発色には TMB Substrate Reagent (BD Biosciences 社) を用いた。2 N 硫酸添加によって発色を停止させ、Trister (LB 941、BERTHOLD TECHNOLOGIES) を用い、波長 450 nm における吸光度を測定した。

## 2.3 プロテイン A の影響

プロテイン A (Pierce)、プロテイン 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、プロテイン A の ELISA 反応への影響を検討した。

## 2.4 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<sup>15)</sup>。

## 3 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

### 3.1 供試菌株

本研究で用いた黄色ブドウ球菌 9 株 (リ

ファレンス株 2 株、食中毒由来株 5 株、健康ヒト鼻腔由来株 2 株) の性状を表 1 に示す。黄色ブドウ球菌の継代には Difco™ Brain Heart Infusion Agar (Becton, Dickinson and Company) (BHI agar) を用いた。

### 3.2 毒素の定量方法

上述したサンドイッチ ELISA を用いて、産生された SE の量を測定した。

### 3.3 37 °C と 25 °C における *egc* 関連毒素群産生量の測定

黄色ブドウ球菌を BHI agar で 2 回継代した後、Yeast Extract を 1% (w/w) 添加した BHI broth (1% Yeast Extract 添加 BHI broth) 5 ml に接種し Seed Culture を行った (37 °C、16~18 時間、振盪培養)。続いて、培養液 0.6 ml を 100 倍量の 1% Yeast Extract 添加 BHI broth に接種し、37 °C あるいは 25 °C で 48 時間の振盪培養を行なった。培養液を 14,000 rpm、20 分遠心して菌体を沈殿させ、上清を回収して 0.22 μm フィルター (Millex GP® 0.22 μm, Millipore) で濾過処理後、サンドイッチ ELISA に供した。

### 3.4 にぎりめしにおける総 SE 産生量の測定

菌株を BHI agar で 2 回継代したのち、Yeast Extract 1% 添加 BHI broth 5 ml に接種し Seed Culture を行い (37 °C、16~18 時間、振盪培養)、にぎりめしへの接種菌数が  $5 \times 10^4$  CFU/50g になるよう培養液を 1% Yeast Extract 添加 BHI broth で  $10^6$  倍希釈し、にぎりめし 1 サンプルにつき菌液 5 ml を接種した。接種菌液に対し、

マンニット食塩培地 (ニッスイ) による定量培養を行い、実際の接種菌数を確認した。また、菌液を接種し培養終了後のにぎりめしサンプルについてもマンニット食塩培地による定量培養を行って菌数を測定した。

にぎりめしの作成は、市販の精米 1 合に対し 1.4 倍量の水を加えて 1 時間吸水させた後、米を炊き、10 分間蒸らした後、50 g を用いて作成した。にぎりめし一つを 1 サンプルとしてラップに包み、1 つの培養条件につき 3 サンプルを供した。培養温度は 25 °C、培養時間は 6 時間あるいは 12 時間とした。培養後、2 倍量の PBS を加えて 5 分間ホモジナイズ (STOMACHER Lab-Blender400) した後、ホモジナイズ溶液を 30 ml とり、1% α-Amylase from *Aspergillus oryzae* (SIGMA) を 30% 量 (v/w) 加え、37 °C で 2 時間静置した。その後、8900 rpm、15 分遠心し、0.22 μm フィルター (Millex GP 0.22 μm, Millipore) で濾過処理して 4 °C 保存した。

黄色ブドウ球菌を摂取したにぎりめしを上記の条件で培養後、米上清中の protein A の影響を除去するため正常ウサギ血清 (Normal rabbit serum, NRS) をサンプルの 0~100% 量加えて静置した (4 °C、16~18 時間) 後、Sandwich ELISA を用いて SE 測定を行なった。標準曲線用スタンダードと測定サンプルの希釈には、菌液を接種せずにサンプルと同様の処理を行なった SE free のにぎりめし抽出液を使用した。

にぎりめし 50 g に 2 倍量の PBS (100 ml)

を加えてホモジナイズした場合、全体の容量は約 130 ml になることから、以下の式を用いて、Sandwich ELISA により得られた実測値からにぎりめし 50 g 中の各 SE 量を算出した。

$$\text{SE 量 (ng/50g)} = \text{実測値 (ng/ml)} \times 130 \text{ ml} \\ \times \text{希釈率} \times \text{回収率}$$

#### 4 水晶発振子マイクロバランス (QCM) 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

##### 4.1 SE と抗体

組換え SEA を用いた。抗体はウサギを組換え SEA で免疫、血清から抽出した IgG 抗体、および市販の抗 SEA ウサギポリクローナル抗体 (Toxin Technology, Inc.) を用いた。また、ニワトリを組換え SEA で免疫してえた IgY 抗体も用いた。

##### 4.2 QCM 実験

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 mg/ml となるよう PBS で希釈し、センサーの金電極部分に 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

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 新型 SE に対する抗体作製と検出法、ならびに新型 SE の産生量評価

###### 1.1 新型 SE に対する抗体作製と、同抗体

を用いての検出法の開発

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 を除去する必要性が認められた。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。

## 1.2 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

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 µg/ml の産生量を示し、その中央値は 1.1 µg/ml であった。また、SEB の産生量は SEA に比して多く、0.01-112.9 µg/ml、中央値は 55.3 µg/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 µg オーダーの産生が認められ、SEP は 7 株中 4 株で µg オーダー産生が認められた。一方、ゲノミックアイランド  $\nu$  Sa  $\beta$  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 1) 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。

## 2 IgY 抗体を用いてのブドウ球菌エンテロトキシンの検出法

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 2)。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 3)。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<sup>2</sup> 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。

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 3 に示すように、0.01 ng/ml の Protein A は、IgG-IgG 間の ELISA において SEA がいな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 3、4)。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。

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 5 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 3)。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。

### 3 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

#### 3.1 *egc* 関連毒素群産生に対する温度の影響の検討

*in vitro* において産生量がごく少量であることが明らかにされている *egc* 関連毒素群の食中毒への関与を検討するため、従来の培養温度である 37 °C と室温に近い条件である 25 °C での培養を行い、毒素産生量を測定、比較した結果を図 6 に示す。25 °C では、37 °C の場合と比較して産生量が増加した株が殆どで、SEG では 0.9~5.0 倍、SEI では 2.0~13.9 倍、SEM では 2.5~5.0 倍、SEN では 1.1~4.6 倍、SEO では 4.0~24.0 倍の増加がみられた。なお、Ishikawa2 株は *egc* 関連毒素群遺伝子に加えて SEA 遺伝子を保有するが、Ishikawa2

株の SEA の産生量は 37 °C で 409 ng/ml、25 °C では 404 ng/ml と、温度による産生量の変化はみられなかった。 *egc* 関連毒素群は、食中毒発生条件に近いと考えられる 25 °C の条件下において産生量が増加することが明らかとなった。

### 3.2 にぎりめしにおける総毒素産生量評価

にぎりめしへの SEA の添加・回収試験を 4 回行ったところ、20 µg 添加の場合は 4 回とも 100 % の回収率、200 ng 添加した場合は 91.0~97.5 % (平均 94.5 %) の回収率であった。食中毒由来菌株で、*egc* を保有せず SEA 遺伝子を保有する 11779 株、SEA 遺伝子と *egc* を保有する Ishikawa2 株、*egc* を含む新型 SE 遺伝子のみを保有する Hiroshima13 株の 3 株を用いてにぎりめし中の毒素産生量を評価した。25 °C、6 時間および 12 時間培養後に毒素量を測定し、各条件当たり 3 サンプルを供した。50 g のにぎりめしに対し、11779 株で  $5.9 \times 10^4$  CFU/50 g、Ishikawa2 株で  $5.3 \times 10^4$ 、Hiroshima13 株では  $5.3 \times 10^4$  CFU/50 g を接種した。6 時間の培養では、Hiroshima13 株を接種した 3 サンプル中 1 サンプルでのみ SE10 が 178 ng 検出され、他のサンプルの SE 産生量は全て検出限界以下であった。

12 時間培養後の菌株ごとの各 SE の測定値を図 7 に示す。培養後の菌数はいずれも  $10^7$  CFU/50 g 以上になり、全てのサンプルで毒素産生が確認された。11779 株については SEA 以外にも SEK の産生がみられ、総 SE 産生量の平均値は 167 ng/50 g であった。Ishikawa2 株については SEA のみの

産生量の平均値は 236 ng/50 g であるのに対して総 SE 産生量の平均値は 1,144 ng/50 g と大幅に増加することが確認された。SEA を産生しない Hiroshima13 株の総 SE 産生量の平均値は 784 ng/50 g であった。この結果から、にぎりめしにおいて、25 °C、12 時間培養の条件下で新型 SEs が相当量産生されること、およびその産生総量は SEA 産生量を上まわることが明らかとなった。

### 4 QCM 法によるブドウ球菌エンテロトキシン検出法開発の試み

ウサギを免疫して得た SEA に対する IgG 抗体および ニワトリ IgY 抗体を物理吸着法でセンサーに固定化させた。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 8)。

センサーの金電極部にプロテイン G を吸着し、その後に市販の抗 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 µg/ml)。抗体を吸着させたセンサーセルに 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 9)。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 10)。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。

の SE 試験法への応用可能性を示唆する。

#### D. 結論

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た。

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。

37 °C (従来の培養温度) と 25 °C (室温、食中毒事例を想定) での培養を行い、*egc* 関連毒素群の産生に対する温度の影響を検討した。その結果、ブドウ球菌食中毒の主要な原因毒素であるとされる SEA の産生量には変化が見られなかったが、25 °C の培養条件においては、37 °C の培養よりも産生量が増加する傾向が見られた。にぎりめしにおいても、25 °C の培養条件において *egc* 関連毒素群の産生が証明された。

ブドウ球菌エンテロトキシンの検出定量に、新技術 QCM 法を適応し、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

#### E. 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) 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., Mougel 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) Sauerbrey, G. *Z. Phys.*, 155 (1959) p. 206
- 15) 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)

F. 健康危害情報

特になし。

G. 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. シンポジウム他発表

重茂克彦、新たなブドウ球菌毒素、東京

H. 知的所有権の取得状況

なし。

1) 特許取得

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。

1) 重茂克彦、黄色ブドウ球菌に関する最近の知見について。全国食肉衛生検査所協議会第 21 回北海道・東北ブロック大会 教育講演、2010 年 10 月、鹿角市

2) 重茂克彦、ブドウ球菌食中毒の新しいパラダイム。地方衛生研究所全国協議会北海道・東北・新潟支部公衆衛生情報研究部会・微生物研究部会 教育講演、2010 年 11 月、盛岡市

3) 重茂克彦、食肉の衛生管理およびブドウ球菌食中毒の新展開。平成 22 年度沖縄県食肉衛生技術研修会 特別講演、2011 年 2 月、那覇  
なし。

2) 実用新案取得

なし。

3) その他

なし。

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-1</i>		No.18	<i>seb, sep</i>
	11536	<i>sea, seg, sei, sen, tst-1</i>	24	No.19	<i>seb, sep</i>
11	11621	<i>sea</i>	25	No.30	<i>sea, seb, sek, seq, seh</i>
	11636	<i>sea</i>		No.31	<i>sea, seb, sek, seq, seh</i>
12	11658	<i>sea</i>	26	No.35	<i>sea, seb, sek, seq, seh</i>
	11660	<i>sea</i>	27	No.39	<i>sea, sek, seq, seh</i>
13	11689	<i>sea, seb, sek, seq</i>	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 $\mu\text{g/ml}$
SELJ	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 $\mu\text{g/ml}$
SE10	11	20~262 ng/ml	45 ng/ml
SE1M	11	4~15 ng/ml	7 ng/ml
SEI	13	<10~24 ng/ml	—
SE1N	13	<10~23 ng/ml	—
SEG	13	4~22 ng/ml	7 ng/ml

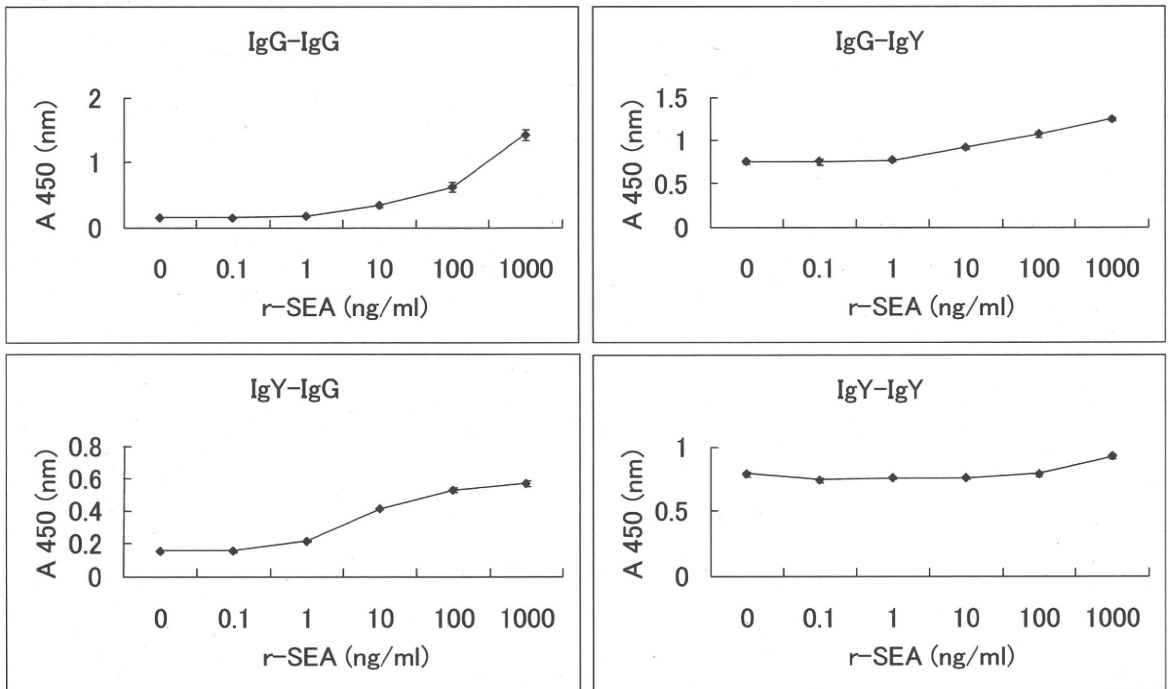
*Enterotoxin gene cluster(egc)*



図1 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  $\nu$  Sa  $\beta$  (Type I) の模式図

*se*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。

A



B

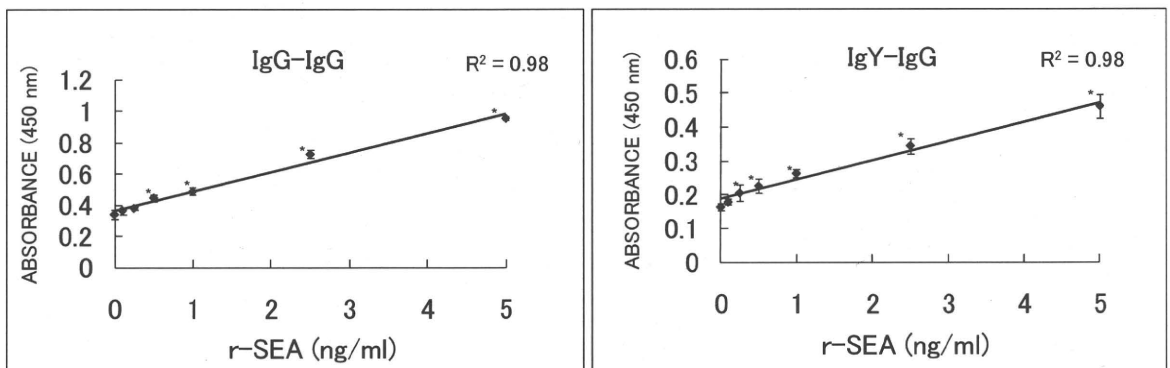


図2 IgG および IgY 抗体を用いての、ブドウ球菌エンテロトキシン A(SEA)定量のための ELISA

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。

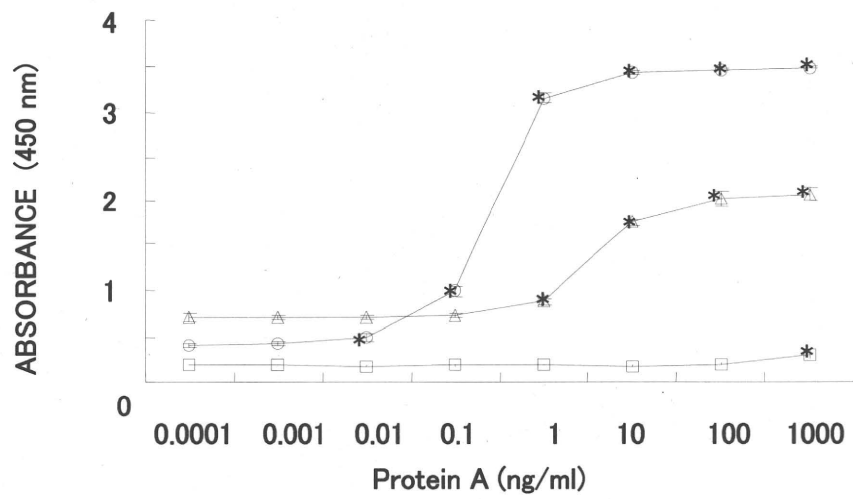


図3 IgGおよびIgYを用いてのサンドイッチ ELISA の吸光度におよぼす Protein A の影響。SEA が存在しない状態での解析。

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

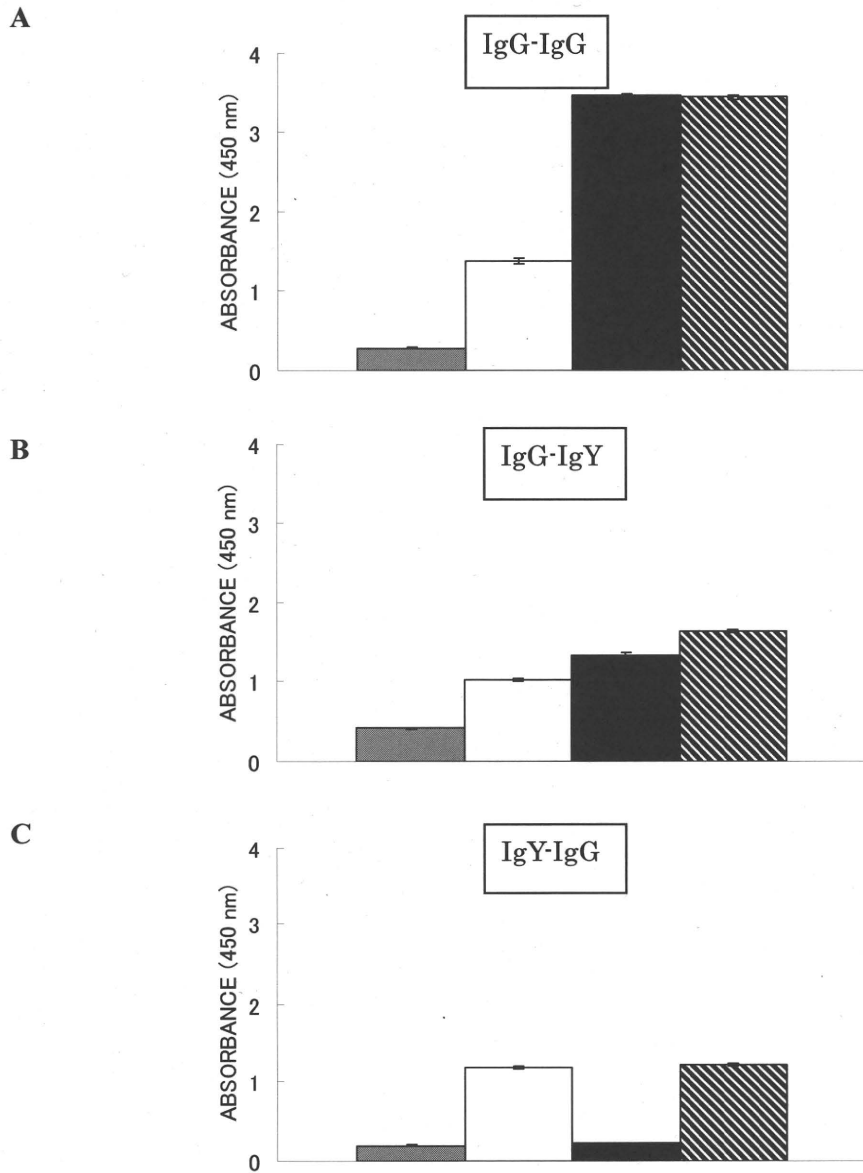
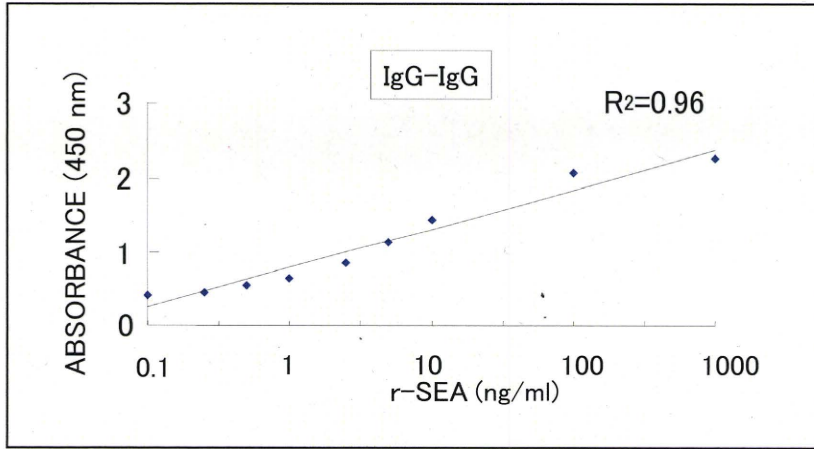


図4 IgGおよびIgYを用いてのサンドイッチELISAの吸光度におよぼすProtein Aの影響。SEAとProtein A共存下での解析。

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





B

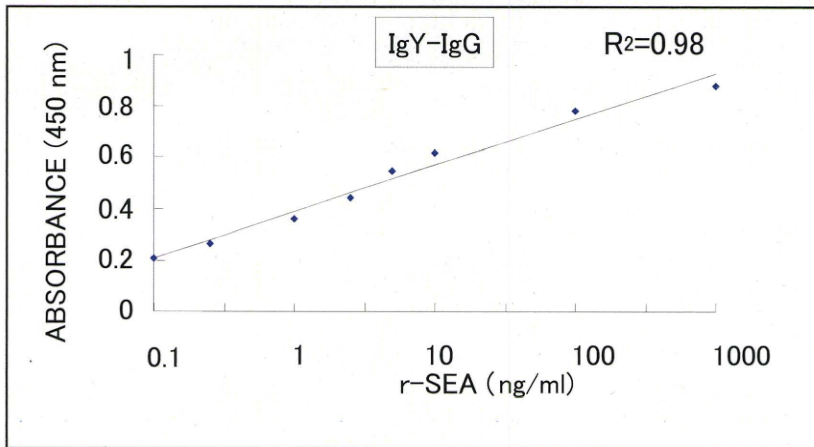


図5 IgG および IgY 抗体を用いてのサンドイッチ ELISA における、ブドウ球菌エンテロトキシン A に対する検量線

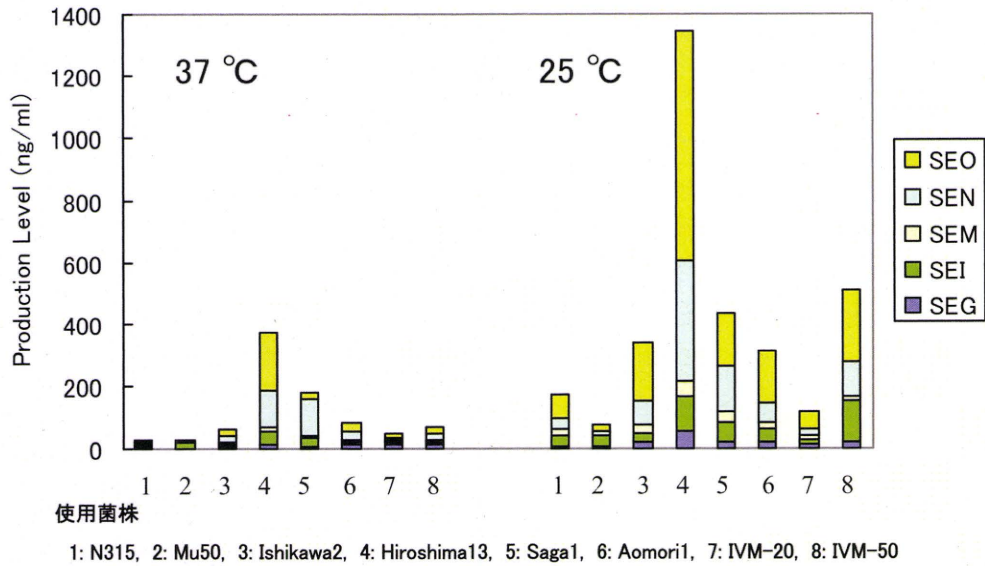


図6 In vitro における温度によるブドウ球菌 *egc* 関連毒素群産生量の変化

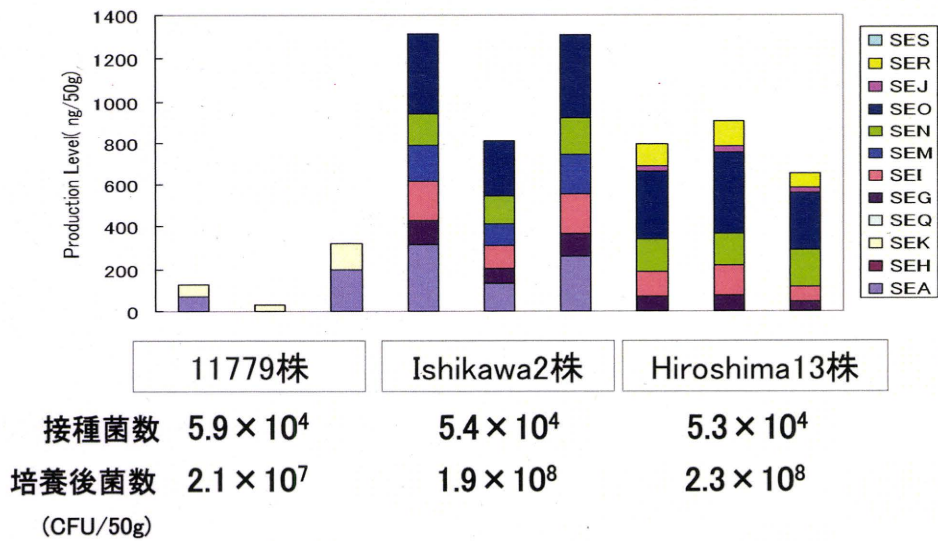


図7 にぎりめしにおけるブドウ球菌 *egc* 関連群毒素群の総生産量

25°Cで12時間放置後の菌数および毒素量を測定した。

表3 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 株	RPLA <sup>2)</sup> で測定した SEA <sup>1)</sup> (ng/ml)	ELISA で測定した SEA <sup>1) 3)</sup> (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。

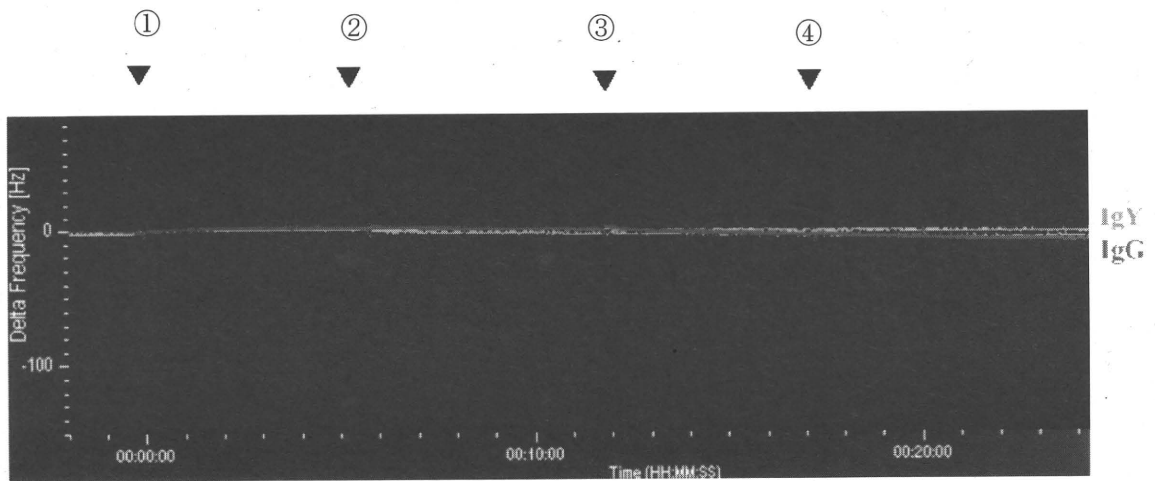


図8 ウサギにブドウ球菌エンテロトキシン A を免疫して得た IgG 抗体  
あるいはニワトリ IgY 抗体をセンサーに吸着させた水晶発振子マイクロバランス  
(QCM)法の周波数の変動

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