

- to contaminated hospital linens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011, 30:219-26.
2. Shinagawa K: [Foodborne disease outbreaks reported in Japan, 1952-2009--outbreaks of microbial foodborne disease]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2010, 51:274-8.
 3. Turnbull PC, JM Kramer, K Jorgensen, RJ Gilbert, J Melling: Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. *Am J Clin Nutr* 1979, 32:219-28.
 4. Standish AJ, UH Strocher, JC Paton: The pneumococcal two-component signal transduction system RR/HK06 regulates CbpA and PspA by two distinct mechanisms. *J Bacteriol* 2007, 189:5591-600.
 5. Lamy MC, M Zouine, J Fert, M Vergassola, E Couve, E Pellegrini, P Glaser, F Kunst, T Msadek, P Trieu-Cuot, et al: CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol Microbiol* 2004, 54:1250-68.
 6. Ehling-Schulz M, M Fricker, S Scherer: *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol Nutr Food Res* 2004, 48:479-87.
 7. Shinagawa K, H Konuma, H Sekita, S Sugii: Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 1995, 130:87-90.
 8. Dierick K, E Van Coillie, I Swiecicka, G Meyfroidt, H Devlieger, A Meulemans, G Hoedemaekers, L Fourie, M Heyndrickx, J Mahillon: Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J Clin Microbiol* 2005, 43:4277-9.
 9. Ehling-Schulz M, M Fricker, S Scherer: Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiol Lett* 2004, 232:189-95.
 10. Ehling-Schulz M, MH Guinebretiere, A Monthan, O Berge, M Fricker, B Svensson: Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 2006, 260:232-40.
 11. Priha O, K Hallamaa, M Saarela, L Raaska: Detection of *Bacillus cereus* group bacteria from cardboard and paper with real-time PCR. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2004, 31:161-9.
 12. Martínez-Blanch J, G Sánchez, E Garay, R Aznar: Evaluation of a real-time PCR assay for the detection and quantification of *Bacillus cereus* group spores in food. *J Food Prot.* 2010, 73:1480-5.
 13. Fricker M, U Messelhauser, U Busch, S Scherer, M Ehling-Schulz: Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Appl*

- Environ Microbiol 2007, 73:1892-8.
14. Lucking G, MK Dommel, S Scherer, A Fouet, M Ehling-Schulz: Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR. Microbiology 2009, 155:922-31.
 15. Max M Haggblom, Camelia Apetroaie, Maria A. Andersson, Mirja S. Salkinoja-Salonen : Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. Appl Environ Microbiol 2002 68(5): 2479-83.
 16. 川村久美子, 平間佑美, 安形則雄, 伊藤秀郎, 太田美智男: High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry を用いた *Bacillus cereus* セレウリド(嘔吐毒)検出法の検討, 日本臨床微生物学雑誌 2005, 15(2):68-76.
 17. Biesta-Peters EG, Reij MW, Blaauw RH, In 't Veld PH, Rajkovic A, Ehling-Schulz M, Abee T : Quantification of the emetic toxin cereulide in food products by liquid chromatography-mass spectrometry using synthetic cereulide as a standard. Appl Environ Microbiol 2010 76(22): 7466-72.
 18. 畜産技術協会: 食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書. 内閣府食品安全委員会事務局 平成 21 年度食品安全確保総合調査 2010.
 19. JC Oscariz, AG Pisabarro: Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. J Appl Microbiol 2000, 89:361-9.
 20. D Bizani, AS Motta, JA Morrissy, RM Terra, AA Souto, A Brandelli: Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. Int Microbiol 2005, 8: 125-31.

表1 PCR用プライマー

標的遺伝子	プライマー	塩基配列(5'→3')	PCR産物のサイズ	T _m 値(°C)	文献
16S rRNA	16S rRNA_SYBR_F	GGAGGAAGGTGGGGATGACG	241 bp	83	[14]
	16S rRNA_SYBR_R	ATGGTGTGACGGGCGGTGTG			
CRS	crs_SYBR_F	CACGCCGAAAGTGATTATACCAA	176 bp	80	[13]
	crs_SYBR_R	CACGATAAAACCACTGAGATAGTG			

表2 16S rRNA と CRS 遺伝子の検出結果

Strain	16S rRNA	CRS gene
<i>B.cereus</i> BC1(+)	+	+
<i>B.cereus</i> BC1(-)	+	-
<i>B.cereus</i> 03-137-1	+	+
<i>B.cereus</i> 06-81-16-1	+	+
<i>B.cereus</i> 08-151-3	+	+
<i>B.cereus</i> 08-151-4	+	+
<i>B.cereus</i> 335-11	+	+
<i>B.cereus</i> S0932F-1	+	-
<i>B.cereus</i> 09-59-1	+	-
<i>B.cereus</i> 09-80-9	+	-
<i>B.cereus</i> 09-75-22	+	-
<i>B.cereus</i> 09-112-7	+	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-

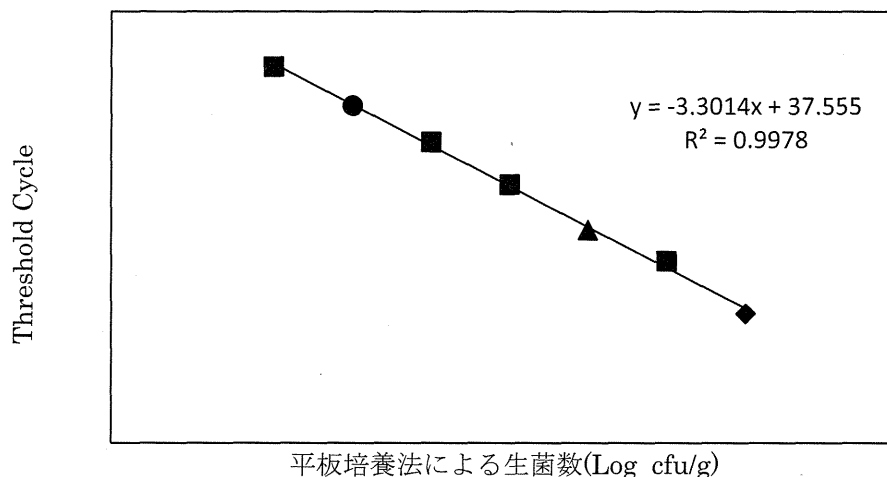


図1 03-137-1株の16SrRNAの検量線

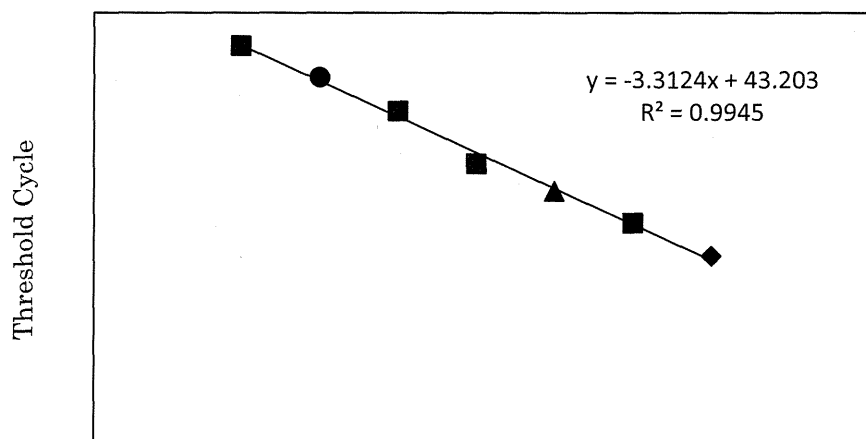


図2 03-137-1株のCRS遺伝子の検量線

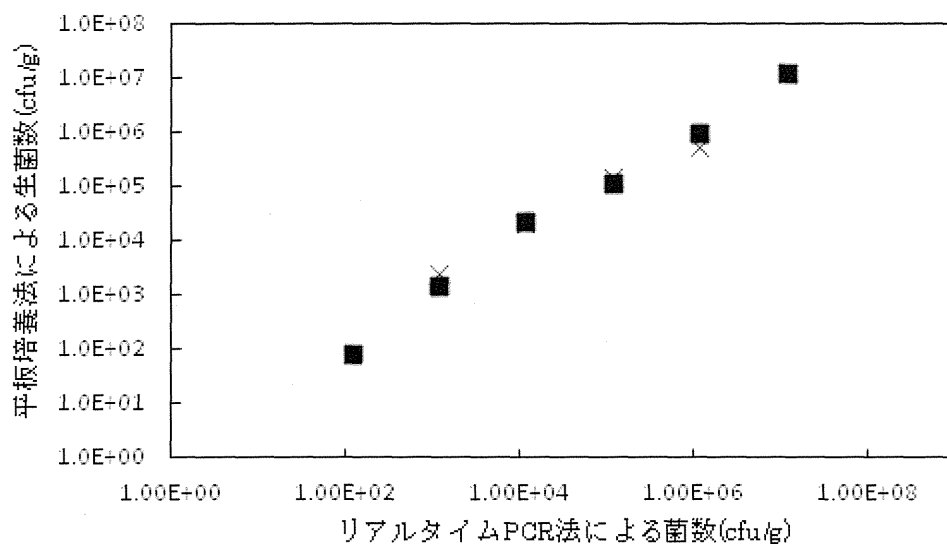


図3 米成分存在下での03-137-1株における生菌数と16SrRNA, CRS遺伝子から定量された菌数の相関
 ×16s rRNA, ■CRS

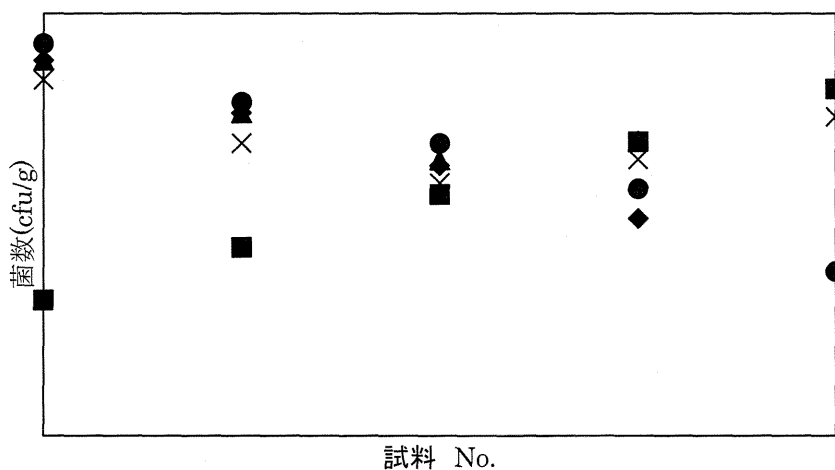


図4 セレウス総数と催吐性セレウスの特異的検出
 ◆03-137-1 (生菌数), ■09-112-7 (生菌数)
 ▲セレウス総数, ×16s rRNA, ●CRS 遺伝子

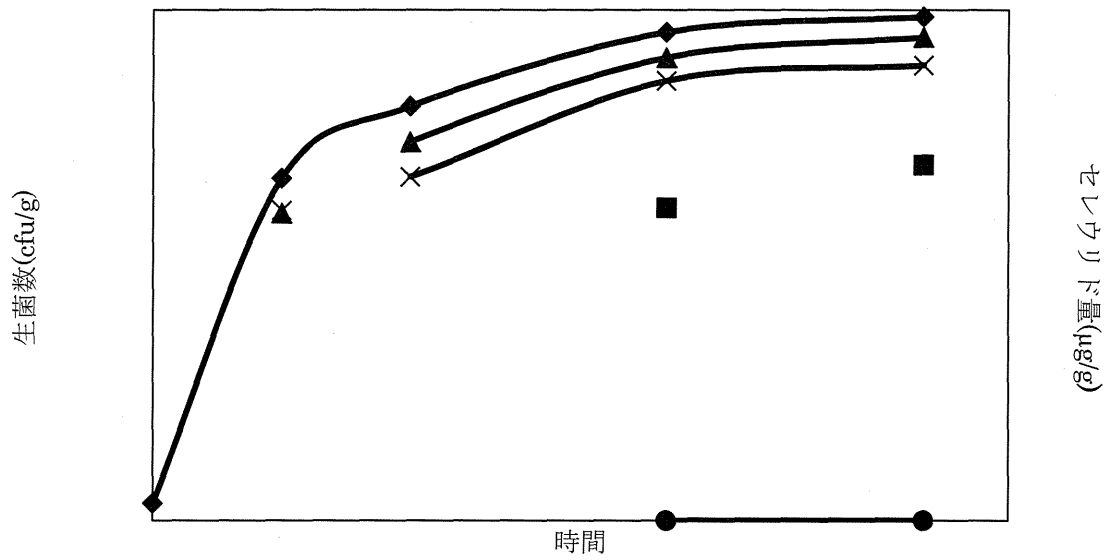


図5 米飯中のセレウス菌数およびセレウリド量の経時変化

◆生菌数 (栄養体+芽胞) , ■芽胞数, ×16s rRNA, ▲CRS 遺伝子, ●セレウリド量

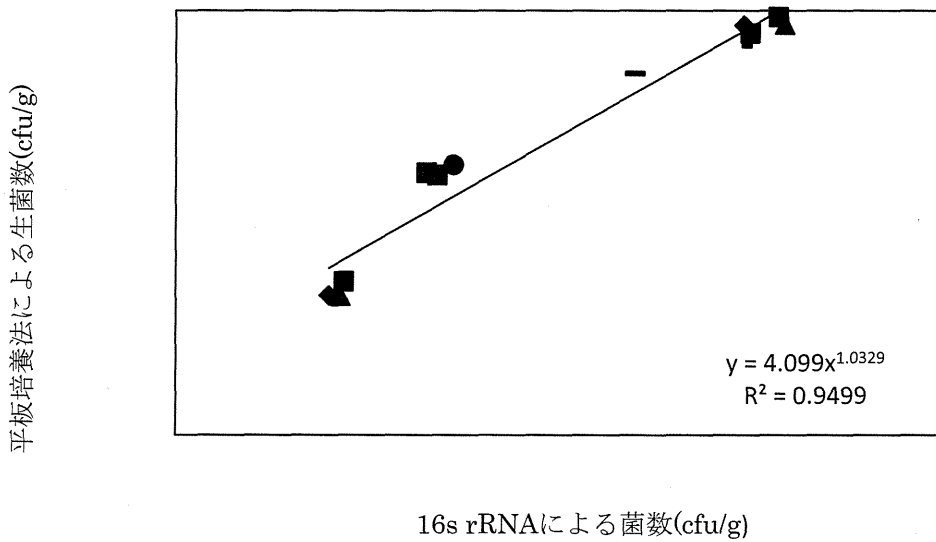


図6 生菌数と 16s RNA の相関関係

平板培養法による生菌数(cfu/g)

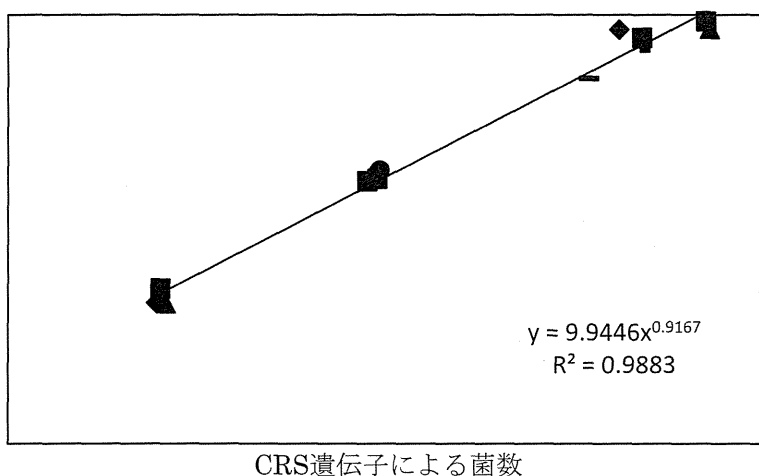


図7 生菌数と CRS 遺伝子の相関関係

表3 各試料に対する指標菌の感受性

指標菌	滴下試料※				
	BHI	BC1 (+) 培養上清	精製セレウリド	バリノマイシン	
<i>Enterococcus hirae</i>	—	—	3	8	
<i>Enterobacter cloacae</i>	—	—	—	—	
<i>Micrococcus luteus</i>	—	0	1	7	
<i>Candida albicans</i>	—	—	0	7	
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	—	—	0	5	
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	—	0	0	6	
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	—	1	2	5	
<i>Bacillus coagulans</i>	—	0	—	5	
<i>Bacillus subtilis</i>	—	—	2	5	
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>natto</i>	MI	—	0	4	
	TA	—	0	5	
	NA	—	0	4	
	OK	—	—	5	
	NI	—	—	0	4
<i>Bacillus cereus</i>	08-151-3	—	2	6	
	08-151-4	—	3	5	
	S0932F-1	—	2	3	6
	09-59-1	—	—	3	7
	09-80-9	—	1	3	7
	09-112-7	—	2	3	7
<i>Escherichia coli</i>	—	—	—	—	

※Log2タイター

表4 精製セレウリドの抗菌活性および空胞変性

	抗菌活性※			空胞変性※		
	未処理	100℃	121℃	未処理	100℃	121℃
精製セレウリド	5	4	5	23	23	22

※Log2タイター

表5 セレウス培養上清の抗菌活性および空胞変性

株	CRS	濃縮	抗菌活性※		空胞変性※	
			未処理	100℃	未処理	100℃
BC1	+	前	2	-	10	10
		後	3	3	14	14
08-151-3	+	前	-	-	-	-
		後	2	1	9	9
09-112-7	-	前	-	-	-	-
		後	-	-	-	-

※Log2タイター

厚生労働科学研究補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究

平成24年度 分担研究報告書

水晶発振子マイクロバランス法によるブドウ球菌
エンテロトキシンのリアルタイム検出法開発の試み

国立医薬品食品衛生研究所

鎌田 洋一

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

「食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究」

分担研究報告書

水晶発振子マイクロバランス法によるブドウ球菌エンテロトキシンの
リアルタイム検出法開発の試み

分担研究者	鎌田 洋一	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
協力研究者	佐伯 和美	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
	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

研究要旨：ブドウ球菌食中毒は、菌が産生するタンパク質性毒素によって嘔吐が誘起される。この毒素は *Staphylococcal Enterotoxin* と表記され、SE と略される。SE の食中毒危害物質としての特徴は、菌が増殖する際に産生されること、SE は耐熱性・耐有機溶媒性を持っており、その毒性が保持されることにある。過去には、加熱殺菌された脱脂粉乳を原因食とした、超大型食中毒事件が発生している。ブドウ球菌食中毒では常に食品中に毒素の有無を検知するシステムが要望される。SE には分子多様性があり、現在まで最も多くの事例が起こっているのが SEA である。本分担研究は、リアルタイムで SEA の検出を可能とする方法を確立することにある。水晶発振子マイクロバランス法を応用し、現在まで検討を継続している。本年度は、溶質が非常に濃厚で、測定システムを障害しやすいことが予想される牛乳を検体とし、SEA の検出法開発を試みた。本法は、センサーに結合する物質の重量に比例してシグナルが増加するので、抗体の重量増加に金コロイドを標識した。予想通り金コロイド標識によりシグナルが向上した。直接法、サンドイッチ法、金コロイド標識抗体によるサンドイッチ法を比較検討した。本法は、牛乳のような、測定系を傷害する可能性のある食品においても応用可能であった。3 種の方法の検討の結果、金コロイド標識抗体のサンドイッチ法が最も感度が高く、牛乳中に 5 ng/ml の SEA を検出が可能であった。今後も感度の向上を目指す。

A. 研究目的

ブドウ球菌食中毒は、食後 30 分から 6 時間（平均 3 時間）くらいで発症する嘔吐を主症状とする食中毒で、我が国では平成 24 年には 44 件患者数 854 人の発生報告がある¹⁾。2000 年には加工乳を原因食とした、12,000 人を超える大規模食中毒が発生した²⁾。推定原因食を喫食した人の数に比べ、発症者の数が少ない。また症状は一日で回復する。このため、医療機関を訪れない人も多く、実態数は把握できていない。ブドウ球菌食中毒の短い潜伏期間を説明するには、菌の定着・増殖・感染・炎症という発症機構でなく、食品中に、症状を直接に誘発させる毒性物質があるというほうが考えやすい。事実、ブドウ球菌は食品内で増殖する際に嘔吐活性を有するタンパク質毒素、エンテロトキシン (Staphylococcal Enterotoxins; SE) を産生する。したがって本食中毒は毒素型食中毒に分類される²⁾。毒素がタンパク質であるという実態は明らかにはされなかったものの、1930 年代に、事例菌の培養液や原因食品中に毒素の存在が示唆され、エンテロトキシンと命名された。「entero」は通常、腸管を示す用語であるが、食中毒と連結させるため、エンテロという文言を用いたと推察される。エンテロトキシンの文言からは、毒素タンパク質が腸管粘膜上皮細胞などの腸管組織を攻撃するイメージを持つが、現在では、SE の直接的な作用は、神経を介して起こると理解されている。最終的に SE は脳内の嘔吐中枢を刺激し、症状発現を惹起するに至るものとされている。

SE がもつ際立った特徴に、タンパク質で

あるにもかかわらず、熱やアルコール、クロロフォルムといった有機溶媒処理でも失活しないという強固さがあるだろう。これらの耐性のうち、食品安全上もっとも重要なのは熱耐性で、100℃はむろん、オートクレーブでも完全に失活しないと言われている³⁾。SE の強度の熱耐性は、食品の加熱時に毒素が失活されないという問題を引き起こす。以下、牛乳を例にとって説明する。生乳は牛より得るもので、牛の皮膚における常在細菌となっているブドウ球菌の、乳への混入は避けられない。搾乳機や人の手指についても、完全な殺菌がなされない場合、乳へのブドウ球菌の混入がある。搾乳後、通常は低温で加工場へと輸送され、所定の温度処理がなされる。この処理でブドウ球菌の菌体は死滅するものの、耐熱性の SE は牛乳内に毒性を保持したまま残存し、喫食により食中毒症状が誘発される。食品内で一度産生されれば加熱によって失活せず、人に摂取されて毒性を発揮する危険性が排除できない。SE は菌の増殖とともに産生される。HACCP に基づいた食品製造工程を順守することにより、菌の増殖を抑制することによってブドウ球菌食中毒の危害を制御できるとはいっても、食品の安全性を確保するには、原因物質の毒素そのものを検出する方が望ましい。とくに牛乳のような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原理をもった毒素検査法の導入が望ましい。

上述の考察から、分子間相互作用測定装置の 1 つである水晶発振子マイクロバランス (Quartz Crystal Microbalance: 以下 QCM) 法⁴⁾ が有用ではないかと考えた。図 1 に QCM 法

を実施する機器と、センサー部分の模式図、およびその原理を示す。センサーに固着させた水晶の薄膜に通電すると、薄膜が一定の周波数で振動する。振動するセンサーが示す周波数は、センサーの重量に比例する。センサー部分に、たとえば抗毒素抗体を結合させておき、反応容器に毒素を加えた場合、センサー上で抗原抗体結合反応が起こる。毒素の結合により、センサーの重量が増加する。また、結合する毒素の量（反応容器中の濃度）が反応速度と比例する。図2に毒素を反応容器に添加した後の、抗体吸着センサーが示す周波数の変化を模式図で示した。毒素の濃度が高ければ高いほど、素早く、かつ、多量にセンサーに結合する。すなわち、毒素の濃度は反応速度（周波数が減少する速さ）と、周波数の減少の程度に比例する。

周波数は電氣的に捕捉することができる。QCM法の利点には、操作が簡便である、検体がクルードであっても対応できるなどがあげられるが、最大の利点は、リアルタイムに測定できる、すなわち毒素が存在すれば直ちに検知できる検査法に應用できることであろう。たとえば、牛乳の製造工程の流路中に抗SE抗体吸着センサーを設置しておけば、エンテロトキシンが捕捉されない限り、牛乳におけるブドウ球菌食中毒の危害性を完全に制御できることとなる。また、迅速に定量測定ができ、ブドウ球菌食中毒診断を容易にすることも可能だろう。

SEには多様性があり、クラシック（旧型）SEとしてAからEの5型が、新型SEも多数報告されている³⁾。QCM法によるSEの検出法の開発は昨年度より実施しているが、本

年度は、社会への応用性を第一義と考え、緩衝液中でなく牛乳を材料としてQCM法の確立を試みた。牛乳は溶質が多く、抗原抗体反応を阻害する物質を多く含むと推察されるが、クルードな検体についても実績のあるQCM法の、牛乳への適応性を期待した。対象の毒素にはSEAを選抜した。SEAによる食中毒事例が報告されていることを選抜の理由とした。本年度はQCM法について、センサーへの抗体の物理吸着および化学吸着、SES添加後に、菌コロイド標識抗体を添加する方式について検討した（図3）。

B. 実験方法

1. ブドウ球菌エンテロトキシンA

組換えSEA(rSEA)を、文献⁵⁾に従い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 β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)を添加した後、37°Cにて3時間培養を続けた。4°C、5000 x g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タンパク質抽出キット溶液（5 ml/g湿菌体重量、TaKaRa）で懸濁した。懸濁液について、4°C、5000 x gの遠心分離を10分間行い、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。Sephacryl S-4Bゲル(GE Healthcare)を上清に加えた。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。ゲル懸濁液をポアサイズ 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 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。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. ポリクローナル抗 SEs 抗体固定化センサー

2-1 抗 SEA ポリクローナル抗体

岩手大学農学部 重茂克彦教授より、ウサギに免疫して得た抗 SEA ポリクローナル抗体の分与を受けた。同抗体は、rSEA を固定化したゲルを用いての、抗原アフィニティークロマトグラフィーにより精製されていた。

別ロットとして、rSEA を抗原としてウサギを免疫して得た抗体を購入した (フナコシ株式会社)。同ウサギの血清から、上述と同様、rSEA を固定化したゲルを用いての抗原アフィニティークロマトグラフィーによって、抗 SEA 精製抗体を得た。

2-2 ポリクローナル抗 SEA 抗体固定化センサーの作製

SAM-Kit (イニシウム) を用いて Protein G。をセンサーに固着させた。センサーセルの金電極上をピランハ溶液 (濃硫酸 : 過酸化水素水 = 3:1) にて洗浄した。50 μl の SAM 溶液 (1mM) を金電極上にマウントした。室温で 1 時間静置後、Milli Q 水にて洗浄した。洗浄

後、50 μl の N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS)/ 1-エチルジメチルプロピルカルボジイミド (EDC) 溶液 (50 mg/ml) を金電極上にマウントした。室温で 15 分間静置後、Milli Q 水にて洗浄し、すぐに 50 μl の Protein G 溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) をマウントした。室温で 1 時間静置後、PBS(-) にて洗浄した。この Protein G 固定化センサーセルに PBS(-) を 500 μl 添加し、装置にセットした。測定を開始し、Protein G 固定化センサーの振動数が安定化後、終濃度 1 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように抗 SEA 抗体を添加し、Protein G と結合させた。Protein G を用いることにより、抗 SEA 抗体の抗原結合部位が障害なく反応液中に配向させることができる。

3. サンドイッチ法による rSEA の検出

3-1 抗 SEA 抗体の金微粒子標識

Mono-sulfo-NHS-NANOGOLD

(Nanoprobe) を用いて抗 SEA 抗体を標識した。Mono-sulfo-NHS-NANOGOLD を 200 μl の Milli Q 水に溶解した。また、抗 SEA 抗体を 1.2 mg/ml となるように 0.02M リン酸ナトリウム/0.15 M 塩化ナトリウム (pH8.0) 溶液で調整した。同抗体溶液と添付バッファーと NANOGOLD 溶液を各 100 μl ずつ混合した。室温で 1 時間反応後、4°C で一晩反応させた。その後、100,000 x g の超遠心を行い、上清を捨てた。沈渣を元の溶液量に懸濁し、金コロイド標識抗体とした。同標識抗体の濃度は、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と規定した。

3-2. 牛乳中における rSEA の検出

抗 SEA 抗体固定化センサーを QCM 装置 (イニシウム) の反応容器に装着した後、容

器内に牛乳(おいしい牛乳、森永乳業)を 500 μl 添加した。センサーの振動数が安定した後、rSEA を添加した。添加量は 5 μl とした。結果は SEA の終濃度で比較した。

rSEA の添加後、抗 SAE 抗体、あるいは、金コロイド標識抗 SAE 抗体を添加した。添加量は 5 μl とした。いずれの場合も、添加後 15 あるいは 30 分間、連続して周波数を観察した。観察結果は、装置付属のソフトウェアで比較した。

C. 結果

1. 牛乳中の SEA 検出のための QCM サンドイッチ法の検討

重茂教授より分与を受けた抗 SEA 抗体 (以下ロット 1 抗体) をセンサーに化学吸着させ、rSEA 添加後、ロット 1 抗 SEA 抗体を添加し、周波数の変動を観察した。追加抗体の添加量を、0.5 から 2.0 $\mu\text{g/ml}$ へと段階的に増加させた。非 SEA 添加の状態、最大約 130Hz の非特異的な周波数の減少が見られた(図 4)。10 ng/ml の SEA の添加量の場合、SEA を添加していない周波数の変動と同様の減少を示した。一方、SEA の添加量を 50 および 100 ng/ml に増加させた場合、周波数が濃度依存的に減少した。検出限界は、10 ~ 50 ng/ml にあると判断された。

国立医薬品食品衛生研究所で調整された抗 SEA 抗体 (以下ロット 2 抗体) を用いて、上述と同様の検討を行ったところ、検出限界が 50~100 ng/ml となった。ロット 1 抗体に比べて検出感度が低下した(図に示していない)。この結果は QCM 法が、抗原抗体反応

に依存していることを明瞭に示しているが、今後の抗体供給を勘案した場合、結合力の弱い抗体であっても、高感度の方法の確立があれば、より汎用性が高くなるため、以下の検討は、ロット 2 抗 SAE 抗体を用いることとした。

2. QCM センサーへの抗体の結合量の検討

センサーにプロテイン G を物理吸着させた効果を検討した。物理吸着においては、SEA を添加しない状態で、非特異的な周波数の減少が見られた。抗 SEA の吸着量を変動させ、かつ、高濃度の SEA を添加し、非特異的な周波数との差を求め、1 と 10 $\mu\text{g/ml}$ の差を比較したところ、10 $\mu\text{g/ml}$ でより大きな差が認められ、今後の抗体のセンサーへの吸着濃度を、10 $\mu\text{g/ml}$ とした(図 5)。

3. QCM 法における抗 SEA サンドイッチ法による SEA 検出感度

抗 SEA 抗体のセンサーへの固着は化学吸着法を用い、センサーへの SEA 添加後の抗 SEA 抗体の添加の影響を検討した。抗体の添加量は 2 $\mu\text{g/ml}$ とした。抗体はロット 2 を用いた。図 6 にその結果を示す。5、10、および 50 ng/ml の rSEA の添加で、周波数の減少が見られた(図 6)。これら 3 条件においては、ブランクからは周波数は減少した。抗 SEA の添加後 30 分において、5 ng/ml の場合、約 20 Hz の減少が見られた。10 ng/ml では 25 Hz、50 ng/ml では 80 Hz の減少が認められた。

4. QCM 法における金コロイド標識抗 SEA 抗体を用いての SEA 検出感度

抗 SEA 抗体に金コロイドを標識し、上記と同様のサンドイッチ法を試みた。rSEA は 5、10、および 50 ng/ml の条件を用いた。こ

れら3条件で金コロイド標識の添加により、周波数の減少が見られた(図7)。ブランクにおいても若干の周波数減少が認められた。金コロイド標識抗SEA抗体の添加濃度を増加させると、周波数の減少が強くなった。2 µg/mlにおける添加後15分の周波数減少の程度を比較した。ブランクにおける周波数との差は、5 ng/mlのSEAでは80 Hz、10 ng/mlでは90 Hz、50 ng/mlの条件では300 Hzの周波数減少が認められた。

5. 考察と結論

過去のブドウ球菌食中毒事例の検討から、食中毒発症毒素量は、ヒト一人当たり100~200 ngとされている³⁾。牛乳の摂取量を200 mlと想定すると、1~2 ng/mlのSEを検出できる感度の検査法が求められる。

本分担研究で検討しているリアルタイムSEA検出法は、QCM法を適用している。QCM法においては、SEAの抗SEA抗体吸着センサーへの結合を感知し、センサーの周波数の減少をシグナルとして、SEAの牛乳中の存在を示すシステムである。牛乳という溶質の濃い検体を用いて検討をしたが、各種の検出システムにおいても、非特異シグナルが検出されたものの、その程度は弱く、本QCM法は、牛乳中のSEAの検出に基本的に適していると判断された。QCM法には各種の検出システムがある。また、抗体を用いるため、抗体の抗原との親和性の影響を受ける。以降、抗体のロットと各システムについて検討した。

2種類のロットの抗体の性能を検証した。その結果、用いる抗体によってSEAの検出

感度が異なり、当然のことながら、抗体の親和力の影響を受けていた。高感度の抗体が供給されない場合を想定し、低感度の抗体を用いて、以下、検討した。

QCM法においては、センサーに抗体を吸着させる方法に、抗体の疎水性結合性を利用した物理吸着法と、官能基を導入した化学吸着法がある。さらに、抗体の抗原捕捉性を向上させるため、センサーにはプロテインGを化学結合させ、その後抗体を添加し、抗原を捕捉する結合部位を反応溶液中に配向する方法がある。SEAの検出において、物理吸着法では50~100 ng/mlの検出感度だった。一方、プロテインGを物理吸着させ、その後10 µg/mlの抗SEA抗体をセンサーに固着させたシステムでは、10~50 ng/mlの間に検出限界があると推定された。プロテインGの物理吸着とその後の高濃度の抗SEA抗体の応用によって、検出感度の向上が見られたが、さらなる高感度が求められる。

検出感度向上のため、サンドイッチ法を検討した。サンドイッチに抗SEA抗体を用いた場合、5 ng/mlにおいてもブランク値より減少した周波数を呈した。しかしながら、その周波数の減少の程度は少なく、30分の測定で、5 ng/mlのSEAでは約20 Hzだった。

更なる検出感度向上のため、金コロイド標識抗体の利用を試みた。QCM法では、センサーに結合する物質の重量が重いほど、周波数の減少が起こる原理に基づいての発想となる。金コロイド標識抗SEA抗体をサンドイッチ法に適応した時、5 ng/mlのSEA存在時に80 Hzの周波数減少が認められ、非標識の抗体に比べ、4倍の周波数減少が起こった。

この結果は、金コロイド標識抗体の利用が、シグナルの強度増加に有効であることを示している。今後、SEA の添加濃度を下げ、検出限界を求める実験を計画している。

一般に QCM 法は検出の定量性にも一定のよい評価がなされている。非標識抗 SEA 抗体、および金コロイド標識抗 SEA 抗体を用いてのサンドイッチ法を検討したなかで、5 と 10 ng/ml の間で、周波数の明らかな減少は認められるものの、大きな周波数の差が検出できなかった。この結果は、SEA を定量するには QCM 法は幾分劣る可能性があることを示している。

結論として、金コロイド標識抗体を用いるサンドイッチ QCM 法を用いることで、牛乳中の SEA をリアルタイムで検出できる可能性が示唆された。今後更なる低濃度の SEA を検出できるように、標識する金コロイドの種類や、標識抗体の濃度等について検討を継続する。また、SEA の定量性についても検討をする必要がある。

E. 健康危害情報

特になし。

F. 文献

- 1) 厚生労働省 食中毒統計
- 2) 山中英明、藤井建夫、塩見一雄(2007) 食品衛生学第三版、恒星社厚生閣、東京
- 3) 重茂克彦(2008)、モダンメディア、54、23-26.
- 4) Sauerbrey, G. (1959) Z. Phys. 155:206.

5) Omoe, K. et al.,(2005) FEMS Microbiol. Lett. 246:191-198.

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

1) 特許取得

なし。

2) 実用新案取得

なし。

3) その他

なし。

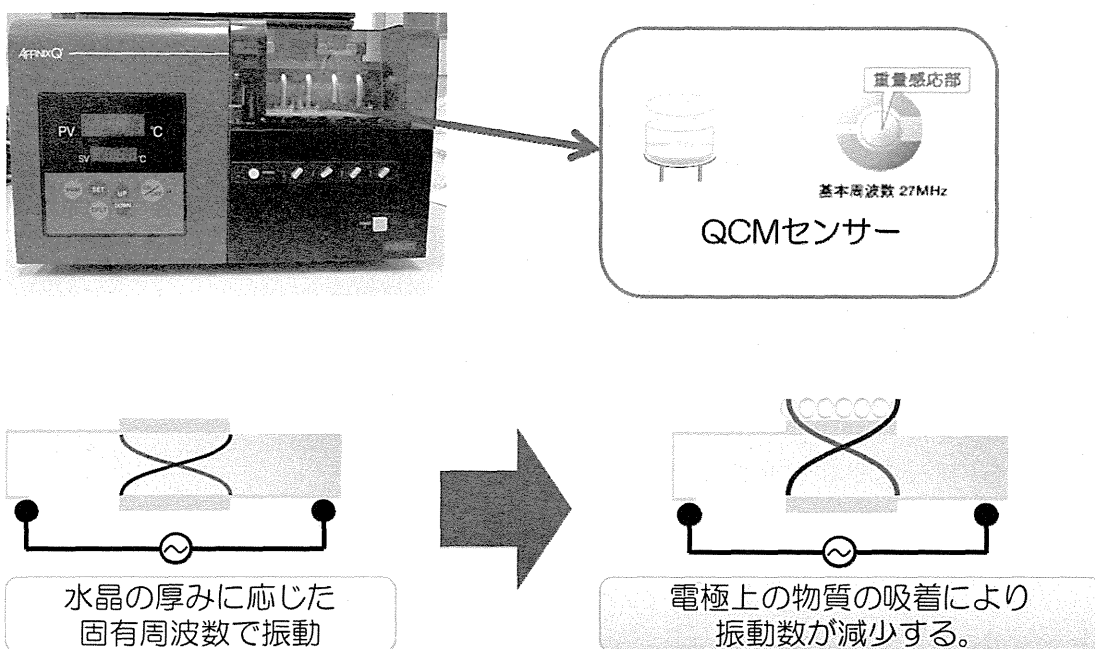


図1 水晶発振マイクロバランス (QCM) 法の原理と機器

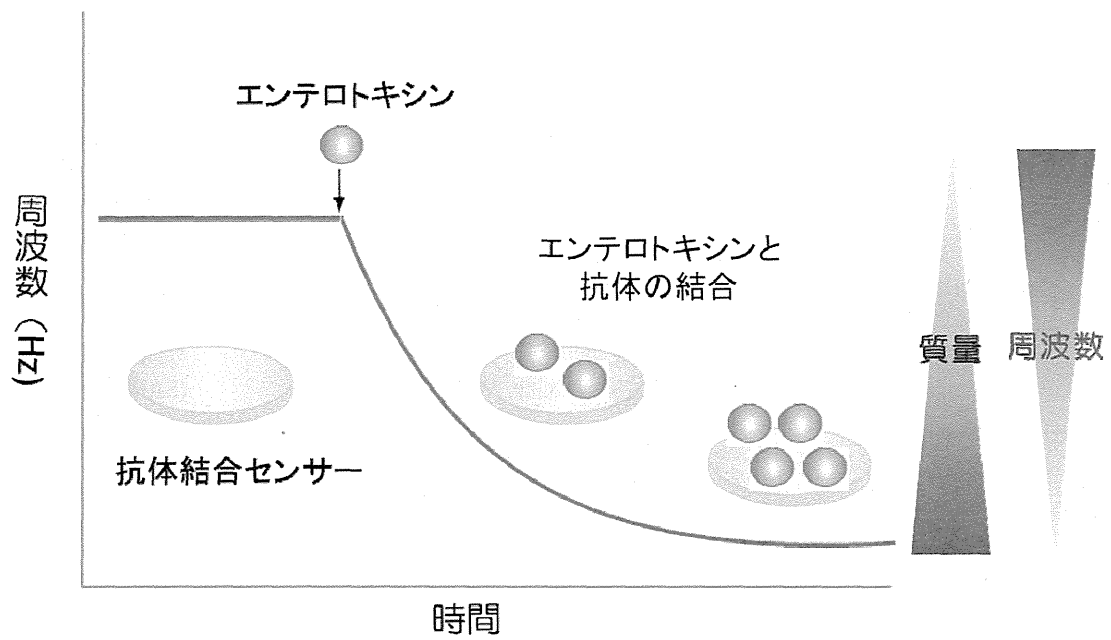


図2 ブドウ球菌エンテロトキシンの検出を目的として実施する水晶発振バランス法から得られる反応シグナルのイメージ

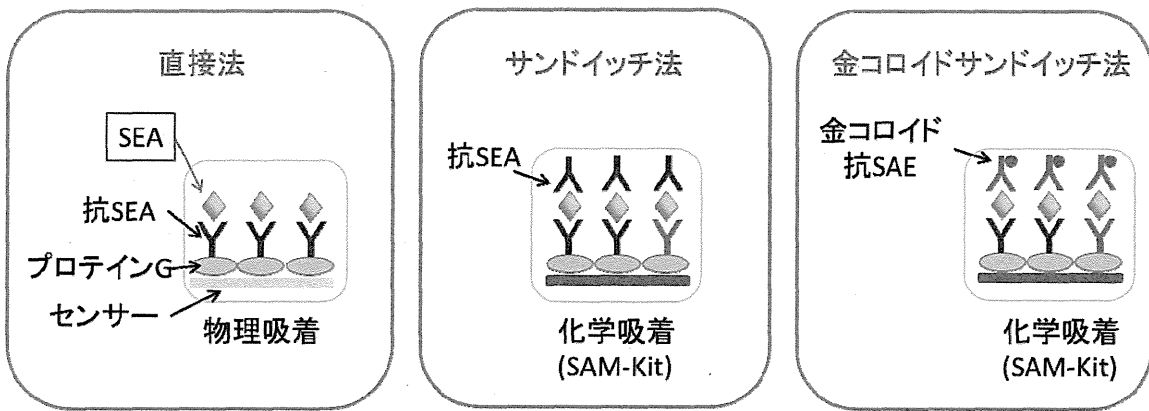


図3 QCM法の各種の反応システム

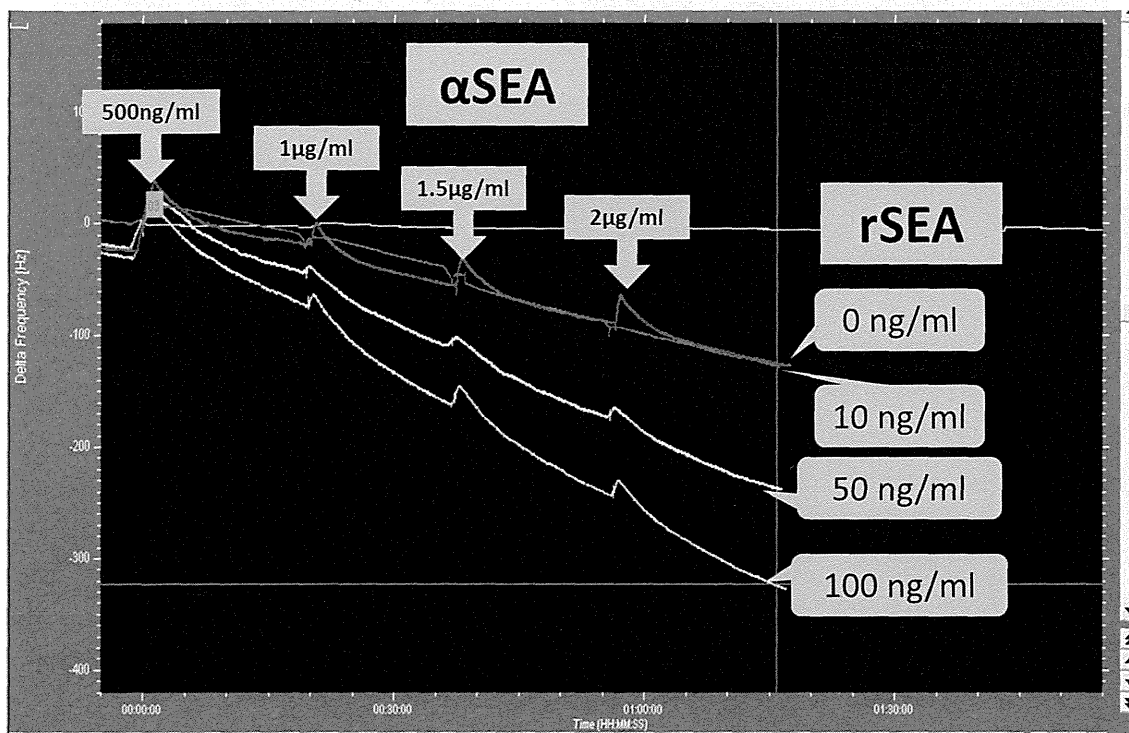


図4 ブドウ球菌エンテロトキシンの QCM 法による検出

岩手大学より分与を受けた抗ブドウ球菌エンテロトキシン（組換えタンパク質、rSAE）を検出するための QCM 反応