

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

新型下痢毒素産生性ウエルシュ菌による食中毒事例の解析と新型下痢毒素の性状解析

分担研究者	鎌田 洋一	岩手大学農学部 共同獣医学科 教授
協力研究者	入倉 大祐	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 研究員
	門間 千枝	東京都健康安全研究センター 微生物部 主任研究員
	仲真 晶子	東京都健康安全研究センター 微生物部 科長
	鈴木 康規	東京都健康安全研究センター 微生物部 研究員
	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター 微生物部 部長
	長井 和哉	岩手大学農学部 技術室 技術員
	堀口 安彦	大阪大学微生物病研究所 分子細菌毒素学領域 教授

研究要旨：ウエルシュ菌食中毒は、エンテロトキシン産生性のウエルシュ菌によって発生するものと認知されてきた。1997年に起こった事例では、ウエルシュ菌が原因菌の可能性が非常に高いにもかかわらず、分離株はエンテロトキシン遺伝子を持たず、また、産生もしなかった。同様の事例を検証した。分離菌が新種の下痢誘発性毒素を産生していることの確証が得られた。これらの事例は、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌のみを対象とする試験法には不備があること、したがって、現在のウエルシュ菌食中毒の疫学情報は不完全で、この度の事例も含んだ解析が必要であることを示す。新型毒素の細胞毒性を観察した。L929細胞は低濃度の毒素添加で球形化し、高濃度では細胞の断片が多数観察された。この時、形態を維持して死滅している細胞が観察されなかったことから、新型エンテロトキシンによって細胞が球形化し、細胞が死滅すると直ちに細胞が崩壊すると考えられた。事例分離菌株 W5052 株の部分的ゲノム解析を行った。W5052 株は新型毒素遺伝子をコードしたプラスミドを保有していることが明らかになった。ウエルシュ菌食中毒の分子疫学情報の刷新に貢献できるものとする。

A. 研究目的

ウエルシュ菌食中毒は菌が産生するエンテロトキシンによる生体内毒素型食中毒である。主症状は下痢と腹痛であり、嘔吐や発熱などの症状はほとんど見られない。通常 6~18 時間、平均 10 時間の潜伏期間を経て発病し、1~2 日で症状が回復する程度の軽症であることが多い。同食中毒は、我が国では、年間約 30 件程度発生している。発生件数は多くはないものの、一事件あたりの患者数が多い。過去には 1,000 名を越す患者数を示した事例もある¹⁾。原因食は、カレーやシチュー、煮込み料理、惣菜、仕出し弁当などである。

ウエルシュ菌食中毒の原因菌であるウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) はヒトをはじめ多くの動物の大腸内常在菌であり、下水、河川、海、耕地などの自然界にも広く分布する¹⁾。

ウエルシュ菌食中毒の研究は長く、その原因物質であるエンテロトキシンは 1960 年代に明らかにされている。すなわち、分子量が 30 K Da 程度の、易熱性タンパク質毒素である。エンテロトキシンは事例菌株の培養液中に分泌される。そのため、培養液を、ウサギ腸管ループテストに供すると、強い陽性反応、すなわち下痢原性を示す¹⁾。

ウエルシュ菌食中毒と診断する場合、患者便および推定原因食品から、ウエルシュ菌を分離し、菌株がエンテロトキシン遺伝子を保有すること、所定の毒素産生培地に接種し、エンテロトキシン産生

性を確認することが必須の検査項目になっている。遺伝子検査には PCR 法が、エンテロトキシン産生性については、抗体を利用した逆受け身ラテックス凝集テスト (RPLA テスト) が実施される。

1997 年に、東京都で発生したウエルシュ菌食中毒がある。患者症状が下痢・腹痛、原因施設が飲食店であること、原因食が弁当であること、平均の潜伏時間が 15 時間程度であったことは、典型的ウエルシュ菌食中毒を推測させるものであった。患者便から分離した菌株について、エンテロトキシン遺伝子の有無、および培養液中のエンテロトキシンの有無を試験したところ、いずれも陰性を示した。一方、当該菌株を培養し、その濾過滅菌液について、ウサギ腸管ループ試験を行ったところ、陽性反応を示した。濾過滅菌培養液は RPLA テスト陰性で、菌株から抽出した DNA 検体についての、エンテロトキシン遺伝子検査も陰性だった。以上の結果は、ウエルシュ菌は、エンテロトキシンでなく、未同定の、新型エンテロトキシンを産生し、食中毒を発生させる可能性を示唆している。

本研究の目的は、上記のような、非エンテロトキシン産生性のウエルシュ菌食中毒事例を収集し、その実態を明らかにすることにある。さらに、同菌株を培養し、旧来のエンテロトキシンとは異なる毒素を同定、その性状を調べることを目的とした。

B. 実験方法

1. 東京都における食中毒事例で、ウエルシュ菌が分離された事例

患者の呈した症状、潜伏期、原因食、患者規模から、ウエルシュ菌食中毒と推定され、上記材料からウエルシュ菌が分離された例について、その分離株について、エンテロトキシン遺伝子検査および、毒素産生培地中での、エンテロトキシン産生を調べた。その結果、エンテロトキシン遺伝子陰性、エンテロトキシン産生性陰性の事例情報をまとめた。

2. ウサギ腸管ループ試験

分離ウエルシュ菌株を変法 DS 培地⁴⁾で培養し、フィルターろ過滅菌（ポアサイズ 0.45 μm ）し、検体とした。ウサギ（日本在来種、オス、体重 1.5~2.0 Kg）をペントバルビタル麻酔下でかいふく開腹し、空腸を体外に取り出した。5~10 cm 程度の間隔で、腸管を結紮し、ループを作製した。各ループに、検体 1.0 ml を接種した。翌日腸管ループを取り出し、腸管ループの腫脹や内部の液体貯留の状況を記録した。

3. ウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子検出

分離したウエルシュ菌を、Brain Heart Infusion 培地（BHI、BD）に接種し、好気状態で 24 時間培養した。加熱抽出法によって、菌体から DNA を精製し、PCR のテンプレートとした。

エンテロトキシン遺伝子の検出には、

ウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子検出キット（タカラバイオ）を用いた。

4. 分離菌株のエンテロトキシン産生試験

分離菌株を BHI 培地に接種し、37°C24 時間、好气的条件で培養した。変法 DS 培地²⁾に、BHI 培地での培養液を、1 / 10 量接種し、37°C24 時間培養した。培養液を 10,000xg、10 分間遠心分離し、上清を回収、毒素検査材料とした。エンテロトキシタンパク質は、RPLA 反応を利用したキット（デンカ生研）を用いた。

5. 新型エンテロトキシンの部分精製

5-1 菌株と培養

当該事例から分離された W5052 株を用いた。W5052 株を上述の方法で 2 日間培養した。培養液を 10,000 rpm、10 分間遠心分離を行い、培養上清を得た。

5-2 硫酸アンモニウム沈殿法による毒素の濃縮

遠心分離した培養上清に、最終濃度が 470% w/v になるよう硫酸アンモニウムを加え、沈殿を形成させ、遠心分離で沈殿を回収した。沈殿物を PBS で溶解し、部分精製毒素溶液とした。PBS 溶解物は、4°C で透析し、実験に用いた。

5-3 細胞毒性力価の測定

既知のエンテロトキシンは、和光純薬より購入した。毒性を観察する細胞には、Vero 細胞と L929 細胞を用いた。

Dulbecco 変法 MEM 培地（DMEM 培地、Sigma）に、10% Fetal Bovine Serum（FBS、Gibco）

を加え培地を、両細胞の培養に用いた。通常法方法で継代中のそれぞれの細胞を、 1×10^5 cell/ml に培地で希釈し、96 ウェルプレートに $100 \mu\text{l}/\text{well}$ の割合で播種した。5%CO₂ インキュベータ内で1晩培養後、ウェルあたり $10 \mu\text{l}$ の割合で、上記毒素濃縮液を添加した。さらに24時間培養を継続し、その後、細胞の形態を記録し、致死効果を判定した。

6. 事例菌株のゲノム解析

1997年に発生した事例より分離した株 W5052 株の部分的ゲノム解析を行った。同菌株を BHI 培地で 37°C 24 時間培養した。培養液について 10,000 rpm 10 分の遠心分離を行い、上清を捨て、菌体を回収した。DNA 抽出キットとして、DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen) を用い、菌体からゲノム DNA を回収した。

解析として、Shotgun 法と Mate-pair 法を用いた。上記のゲノム DNA について、Mate-pair 用のライブラリーを作製し (Rhche 社に依頼)、解析の対象とした。

Rhche 社の GS Junior を用い、W5052 株のゲノムを解析した。シークエンス解析には機器付属のソフトウェア (GS Junior Software 2.7) の一部を利用した。ウエルシュ菌ゲノムの比較を行った。比較対象は、すでにシークエンスデータが公表されているウエルシュ菌 St.13 株とした⁵⁾。

C. 結果

1. エンテロトキシン非産生性のウエルシュ菌による食中毒事例

1997年以降、2003、2009、2010年に事例が発生した。表1にその概要を整理した。

事例は、その患者皆 11 名と小規模のものから、84 名と 100 名に近い大規模型食中毒の様式を示した。原因施設は飲食店であることも、ウエルシュ菌食中毒の共通の性状を示した。原因食品はローストビーフおよび煮物と、これらもウエルシュ菌食中毒の代表的原因食品になっていた。

4 事例ともに患者は下痢および腹痛を示し、平均の潜伏時間が約 10 時間から 15 時間と、これらも通常のウエルシュ菌食中毒患者が示すものの特徴を示した。

2. 4 事例からの分離株における変法 DS 培地培養液の腸管毒性

4 事例から分離した、各 1 株について、変法 DS 培地における培養液について、腸管ループ試験を実施した。コレラ毒素を接種したループと同様、各事例分離株の培養液は、ループを腫張させた。また、ループ内部に液体を貯留させた。

3. 4 事例からの分離株のエンテロトキシン遺伝子保有とエンテロトキシン産生性

4 事例からの分離菌株について、加熱抽出法によってテンプレート DNA を調製し、PCR を実施した。いずれの菌株も、キットが指示するサイズの DNA の増幅を確

認できなかった。

分離菌株の変法 DS 培地培養液中のエンテロトキシンの存在を、RPLA 法で検討したところ、いずれの菌株の培養液においても、RPLA 法 陰性を示し、エンテロトキシンの産生は確認できなかった。

4. 4 事例株における変法 DS 培地培養液の細胞毒性

4 事例から分離した、各 1 菌株について、変法 DS 培地で培養し、その培養液の Vero 細胞および L929 細胞への毒性を検証した。市販のウエルシュ菌エンテロトキシンは Vero 細胞へ毒性を示した。一方、4 事例からの分離菌株の培養液ろ液を Vero 細胞および L929 細胞の培地中に添加したところ、両細胞への致死作用が観察された。

5. 毒素処理細胞の形態変化と致死毒性

L929 細胞に、希釈率が異なる硫酸アンモニウム沈殿画分（以下、画分）を添加し、細胞の形態を観察した。画分を添加しなかった細胞と、16 倍および 32 倍希釈した画分の添加では細胞の形態に差異が見られなかった。8 倍希釈画分添加で一部細胞の形状が球形化し、2 倍および 4 倍希釈添加画分ではほぼ全ての細胞の形状が球形化した。画分の濃度が濃くなるに従い、培養液中に見られる、崩壊した細胞の断片と思われる構造物が増加した（図 1）。

死滅した細胞が染色されるトリパンブルー溶液を用いて画分で処理した細胞の

観察をした。2 倍および 4 倍希釈画分液を添加した細胞の一部がトリパンブルー溶液により染色されたが、多くの細胞は染色されなかった。また、上述の崩壊した細胞の断片はトリパンブルー染色処理では見られなかった（図 2）。

6. 事例株 W5052 株のゲノム解析

Shotgun シーケンシング法で、W5052 株のゲノム情報を得た。平均のリード数（一回あたりに読み取れた塩基配列の数）は 472 bp だった。全読み取り塩基数は 68 Mbp を示した。それらの配列を、付属のソフト GS de novo Assembler で処理をしたところ、17 種類の Scaffold を得た。Scaffold は、信頼性のある塩基配列の固まりを示している。17 種のサイズは、2 Kbp から 3.2 Mbp の間に分布した。Scaffold の塩基サイズが大きいものは染色体を、小さいものはプラスミドを示唆する。

同様の解析を Mate-pair 法で実施した。平均リード数は 451 bp、読み取った全塩基数は 90 Mbp を示した。Mate-pair 法と Shotgun 法の双方で得た配列を合わせて、de novo Assemble で解析したところ、scaffold は 3 種にまで減少した。具体的には約 310 万 bp、約 5 万 4 千 bp、および約 1 万 2 千 bp の Scaffold を示した。

これら 3 種の Scaffold に対し、GS Reference Mapper を用いて、ウエルシュ菌 St. 13 株ゲノムとのマッピングを行い、塩基配列の相同性を比較した。最も塩基数の多い Scaffold は、SM101 株との比較

から、染色体であることが推察された。他の2種の scaffold は、塩基サイズから、プラスミドと推察された。約5万4千bpのプラスミドには、新型毒素遺伝子が存在していた。塩基配列のマップを図3に示す。

D. 考察と結論

ウエルシュ菌は各種の毒素を産生する。それら毒素のうち、食中毒を誘発する直接の毒素がエンテロトキシンで、腸管粘膜上皮細胞に障害を与え、下痢を誘発することがわかっている。ウエルシュ菌食中毒は、エンテロトキシン産生性のウエルシュ菌生菌が、食品とともに人体に取り込まれ、腸管内で増殖し、エンテロトキシンを産生することによって発症する。一方、ウエルシュ菌は環境中や糞便中にも存在する。それらの、食中毒とは無関係のウエルシュ菌では、エンテロトキシン遺伝子は保持せず、毒素産生を誘発しやすい培地に接種してもエンテロトキシン産生は認められない。したがって、ウエルシュ菌食中毒を起こす菌株は、必ずエンテロトキシン遺伝子を保有し、かつ、毒素産生培地でのエンテロトキシン産生が確認できる。すなわち、患者材料や推定原因食からウエルシュ菌が分離された場合、菌体DNAをテンプレートしてPCRを行い、エンテロトキシン遺伝子があること、また、毒素産生培地に接種し、エンテロトキシンタンパク質が産生されていることを確認し、ウエルシュ菌食中

毒と診断する。

1997年、ウエルシュ菌食中毒が疑われ、患者材料からウエルシュ菌が分離された事例が発生した。ウエルシュ菌食中毒と診断するため、常法に従い、エンテロトキシン遺伝子と同タンパク質の有無を検査したところ、いずれも陰性だった。同事例から、複数の菌株について検査しても同様だった。以降、2010年に至るまで、4例の同様な事例の発生があった。4事例から分離された菌株について、その腸管病原性を検証した。4事例のそれぞれから分離された菌株の、培養液ろ液は、腸管ループテスト陽性を示した。

ウエルシュ菌エンテロトキシンは、細胞膜上の受容体に結合し、細胞膜に小孔を開け、細胞内容物の流出と、細胞死を誘導することがわかっている。これまでの受容体研究から、ミドリザル腎臓由来Vero細胞は同受容体を持ち、したがってエンテロトキシン感受性を示すことが明らかになっている。一方、マウス繊維芽細胞L929細胞は、エンテロトキシン受容体を保有せず、したがってエンテロトキシン非感受性細胞になる³⁾。両細胞に対し、事例分離株の培養ろ液は、細胞毒性を示した。これらの事実は、4事例を発生させたウエルシュ菌は、エンテロトキシンではなく、新種の下痢誘発毒素があること、複数の事例が観察され、現状の検査法と、検査者のウエルシュ菌食中毒に対する知識では、同菌食中毒の正確な疫学情報を得ているとは言い難いことを示している。

新型エンテロトキシンの細胞毒性を L929 細胞の形態変化を観察することによって検討した。新型エンテロトキシンによって細胞が球形化し、毒素濃度が高くなると培養液中に崩壊した細胞の断片と思われる構造物が増加した。一方、トリパンブルー溶液によって染色した時、染色された細胞はあまり見られなかった。

トリパンブルーは死細胞を青染するが生細胞を染色しない⁴⁾ ので、染色された細胞が少ないことから、新型エンテロトキシンによって細胞が球形化し、細胞が外来性の色素を排除する能力を失うような機能的障害を受けると直ちに細胞が崩壊すると考えられた。

ウエルシュ菌のゲノムは、数株についてはすでに公開されている、それらのうちのひとつ SM101 株は、エンテロトキシン産生性の菌株として分析され、事実、染色体上にエンテロトキシン遺伝子が存在している⁵⁾。事例由来株の一つ、W5052 株について、次世代シーケンシング解析を行った。同法では、Mate-pair 法による解析が有効だった。次世代シーケンシングでは、信頼性ある塩基配列の固まり (scaffold) が大きくなり、その数が少なくなり、一定数の scaffold で収束した場合、ゲノム構成成分が規定される。細菌の場合、数 Mbp のレベルの染色体と、菌が保有するプラスミドがゲノム構成成分となる。W5052 株の Mate-pair 解析では、3 種の scaffold に収束し、そのうちのひとつが 3 Mbp と大きく、染色体であることを示す。一方、50,000 bp 程度および 12000

bp 程度の小さな scaffold も存在した。新型毒素の遺伝子は 12,000 bp の scaffold 上に存在していた。以上の知見は、ウエルシュ菌食中毒事例の分子疫学解析に有効な情報となり、ウエルシュ菌食中毒の疫学情報を正確に刷新でき、厚生労働行政へ貢献できるものとなる。

E. 文献

- 1) 山中英明、藤井建夫、塩見一雄、微生物性食中毒、「食品衛生学第二版」恒星社厚生閣、東京 (2007)
- 2) 大谷仁己、氏家淳雄. 1987. 変法 DS 培地におけるウエルシュ菌の芽胞形成とエンテロトキシン産生性、食衛誌、28、281-285.
- 3) Kimura J, Abe H, Kamitani S, Toshima H, Fukui A, Miyake M, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Yamamoto S, Horiguchi Y. *Clostridium perfringens* enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction. *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 401-408.
- 4) 小山秀機：組織培養の技術〔第二版〕日本組織培養学会編、p26、朝倉書店、1988.
- 5) Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, Ohshima K, Yamashita A, Shiba T, Ogasawara N, Hattori M, Kuhara S, Hayashi H. 2002. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2002, 99, 996-1001.

表1 ウエルシュ菌が分離されたが、従来と性状の異なる食中毒事例

	事例1	事例2	事例3	事例4
発生年月	1997.1	2003.6	2009.8	2010.1
発生地	東京	東京	大阪	栃木
患者数(人)	39	11	84	79
原因施設	飲食店	飲食店	飲食店	飲食店
原因食品	シラタキと牛肉 の煮物	子羊煮物	ローストビーフ	ローストビーフ
主要症状	下痢・腹痛	下痢・腹痛	下痢・腹痛	下痢・腹痛
平均潜伏時間 (時間)	15.4	10	12.2	9.7

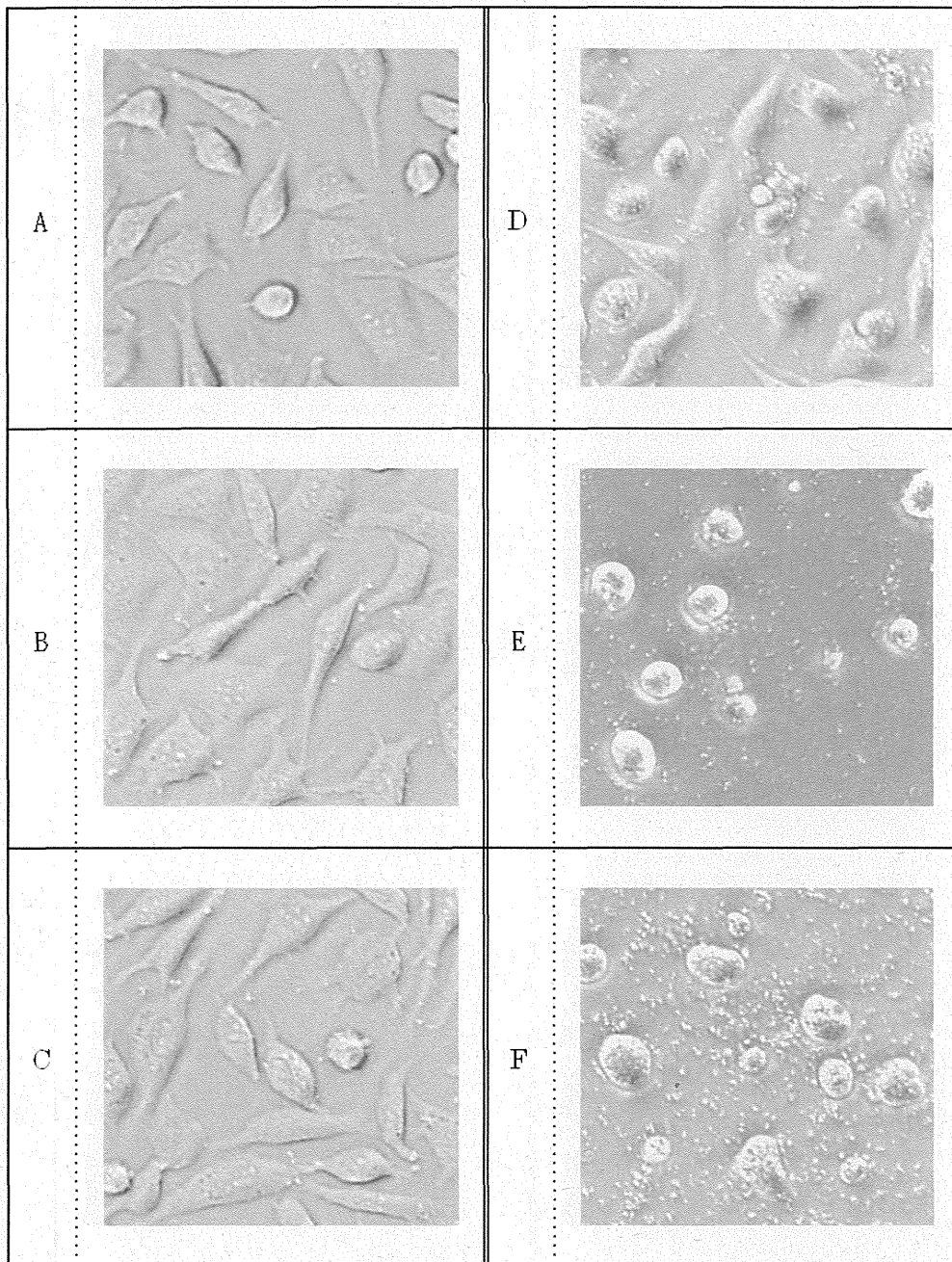


図1 ウエルシュ菌新型エンテロトキシンによる L929 細胞の形態変化

毒素を 2~32 倍に希釈した硫酸アンモニウム沈殿画分を L929 細胞に添加後、細胞の形態変化の様子を観察した。

A : 毒素無処置、B : 毒素 32 倍希釈、C : 毒素 16 倍希釈、D : 毒素 8 倍希釈

E : 毒素 4 倍希釈、F : 毒素 2 倍希釈

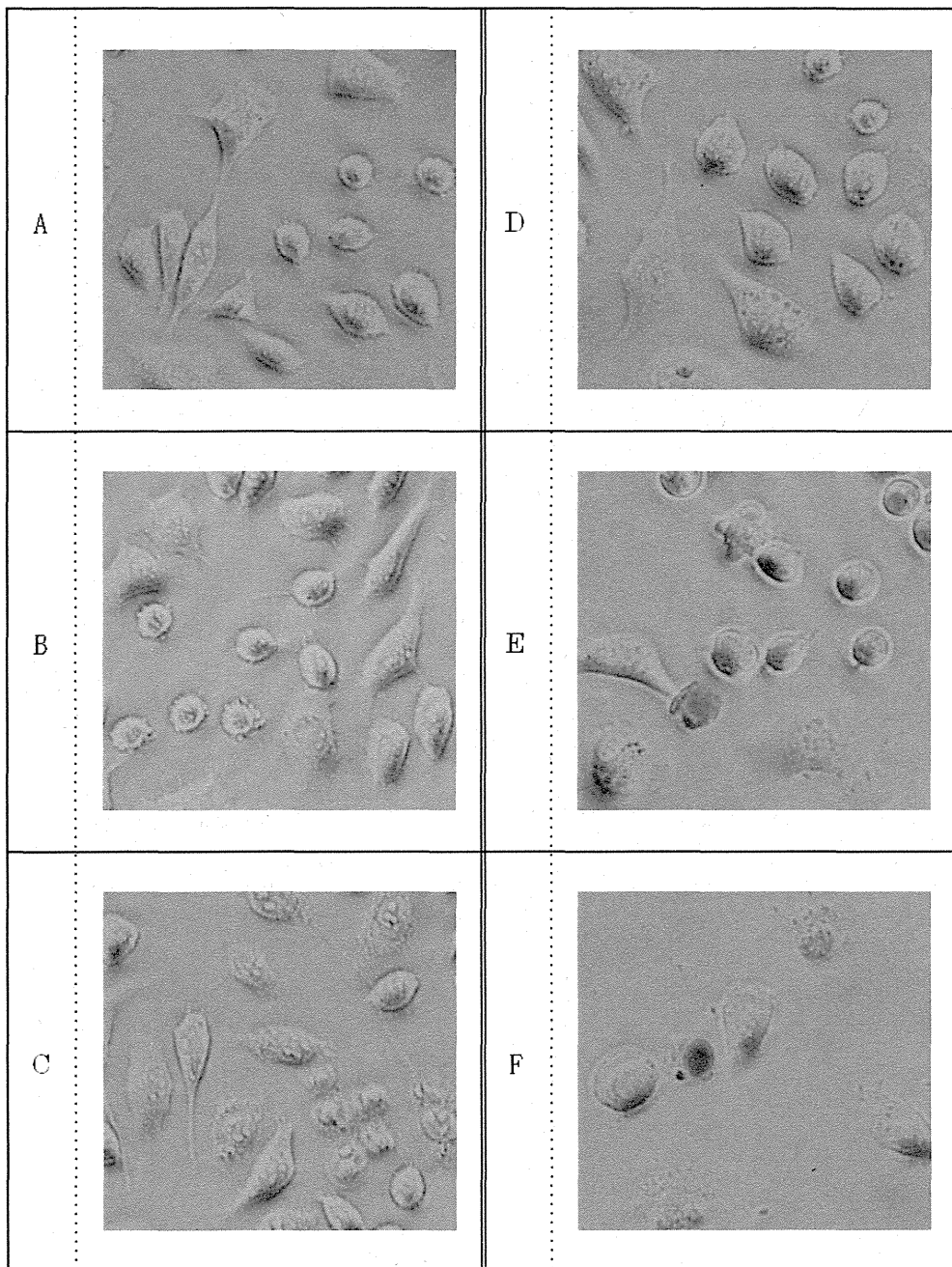


図2 新型エンテロトキシンによる L929 細胞の形態変化(トリパンブルー染色)

毒素を 2~32 倍に希釈した硫酸アンモニウム沈殿画分を L929 細胞に添加後、トリパンブルー染色を施し、細胞の形態変化の様子を観察した。

A : 毒素無処置、B : 毒素 32 倍希釈、C : 毒素 16 倍希釈、D : 毒素 8 倍希釈

E : 毒素 4 倍希釈、F : 毒素 2 倍希釈

E および F に観察される染色された細胞が死細胞と判定される。

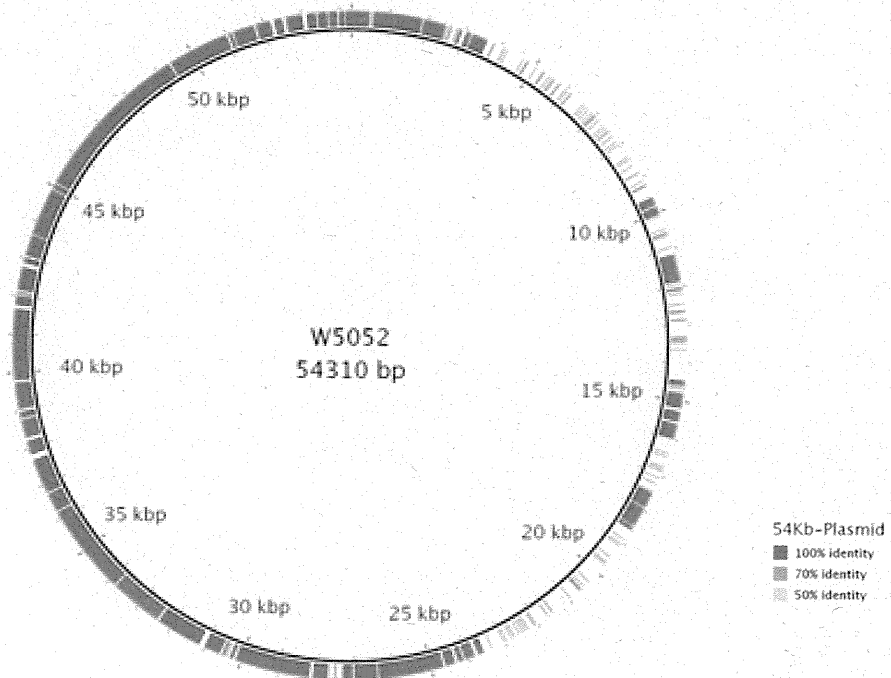


図3 エンテロトキシン非産生性ウエルシュ菌 W5052 株のプラスミドゲノムマップ

W5052株のゲノムシーケンスを、公開されているウエルシュ菌SM101と比較した。

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23－25年度 研究成果

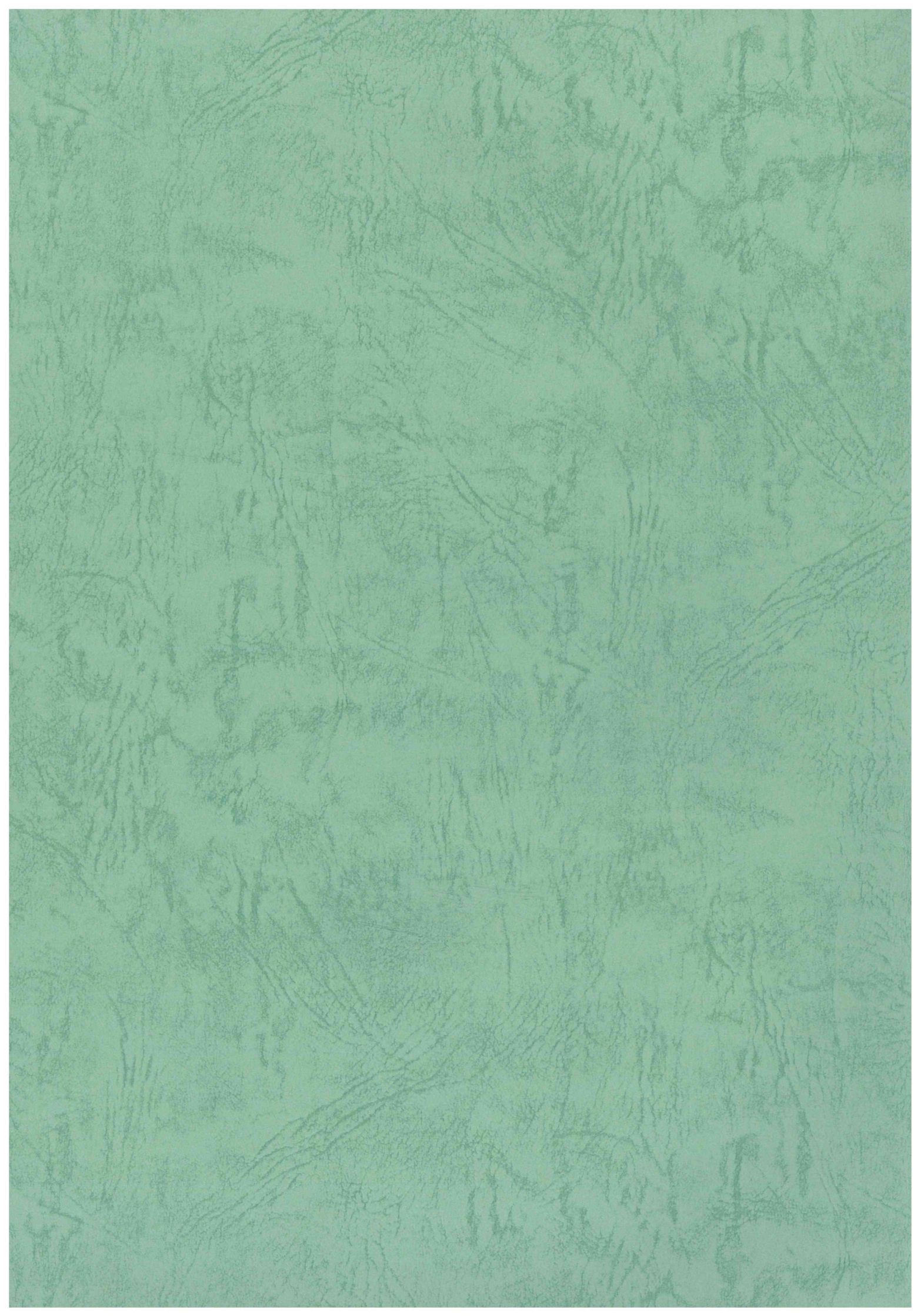
発表した研究成果リスト

論文発表

1. Mizutani, N., Sugita-Konishi, Y., Omoe, K., Shinagawa, K., Kawakami, H., Shinji Kanno, S., Sugiyama K., and Yoichi Kamata, Y. (2011) Advantages of immunoglobulin Y for the detection of Staphylococcal enterotoxin A in a double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, *Int. J. Food Sci. Tech.* 47:155-159.
2. Ono, H.K., Nishizawa, M., Yamamoto, Y., Hu, D.-L., Nakane, A., Shinagawa, K., and Omoe, K. (2012) Submucosal mast cells in the gastrointestinal tract are a target of staphylococcal enterotoxin type A. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 64: 392-402.
3. Kamata, Y., Koanno, S., Mizutani, N., Agata, N., Kawakami, H., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y. (2012) Sensitivity of Hep G2 cells to *Bacillus cereus* emetic toxin. *J. Vet. Med. Sci.* 74:1483-1485.
4. 涌嶋三津子、西川景子、泉 秀実、鎌田洋一、西川禎一 (2012) レトルトパウチ詰コーンスープの原材料から分離されたフラットサワー菌の耐熱性と間欠滅菌法による制御の試み、*日本食品微生物学雑誌*、29:17-174.
5. 中山素一、宮下 隆、細谷幸一、人見 潤、佐藤美紀、須永幸恵、重松康彦、小笠原 準、竹中重幸、濱崎光宏、堀川和美、磯部順子、小西良子、鎌田洋一 (2012) 嘔吐毒素産生性セレウス菌検出イムノクロマトキットの評価、*食衛誌*、53、273-277.
6. Nakashima, R., Kamata, Y., Nishikawa, Y. (2013) Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and guanylin on the barrier integrity of intestinal epithelial T84 cells. *Vet. Immuno. Immunopath.* 152:78-81.

製品の市場化

1. スイフトジーン CPE 産生ウエルシュ菌「カインス」
標記の製品名で平成 24 年 10 月 1 日より販売を開始した（株式会社 カインス）
2. 製品名：スイフトジーンセレウリド産生セレウス「カインス」
標記の製品名で平成 25 年 8 月 1 日より販売を開始した（株式会社 カインス）



201327009B(2/2)

2/2

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23-25年度 総合研究報告書

研究代表者 鎌田 洋一

岩手大学 農学部

平成26(2014)年3月

発表した研究成果リスト

論文発表

1. Mizutani, N., Sugita-Konishi, Y., Omoe, K., Shinagawa, K., Kawakami, H., Shinji Kanno, S., Sugiyama K., and Yoichi Kamata, Y. (2011) Advantages of immunoglobulin Y for the detection of Staphylococcal enterotoxin A in a double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, *Int. J. Food Sci. Tech.* 47:155-159.
2. Ono, H.K., Nishizawa, M., Yamamoto, Y., Hu, D.-L., Nakane, A., Shinagawa, K., and Omoe, K. (2012) Submucosal mast cells in the gastrointestinal tract are a target of staphylococcal enterotoxin type A. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 64: 392-402.
3. Kamata, Y., Koanno, S., Mizutani, N., Agata, N., Kawakami, H., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y. (2012) Sensitivity of Hep G2 cells to *Bacillus cereus* emetic toxin. *J. Vet. Med. Sci.* 74:1483-1485.
4. 涌嶋三津子、西川景子、泉 秀実、鎌田洋一、西川禎一 (2012) レトルトパウチ詰コーンスープの原材料から分離されたフラットサワー菌の耐熱性と間欠滅菌法による制御の試み、*日本食品微生物学雑誌*、29:17-174.
5. 中山素一、宮下 隆、細谷幸一、人見 潤、佐藤美紀、須永幸恵、重松康彦、小笠原 準、竹中重幸、濱崎光宏、堀川和美、磯部順子、小西良子、鎌田洋一 (2012) 嘔吐毒素産生性セレウス菌検出イムノクロマトキットの評価、*食衛誌*、53、273-277.
6. Nakashima, R., Kamata, Y., Nishikawa, Y. (2013) Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and guanylin on the barrier integrity of intestinal epithelial T84 cells. *Vet. Immuno. Immunopath.* 152:78-81.

Original article

Advantages of immunoglobulin Y for the detection of Staphylococcal enterotoxin A in a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay

Noriko Mizutani,¹ Yoshiko Sugita-Konishi,¹ Katsuhiko Omoe,² Kunihiro Shinagawa,² Hiroshi Kawakami,³ Shinji Kanno,¹ Kei-ichi Sugiyama¹ & Yoichi Kamata^{1*}

1 National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

2 Iwate University, 3-18-8 Ueda, Morioka, Iwate 020-8550, Japan

3 Kyoritsu Woman's University, 2-2-1 Hitotsubashi, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8437, Japan

(Received 8 February 2011; Accepted in revised form 14 September 2011)

Summary To determine the amounts of staphylococcal enterotoxin A (SEA), a novel and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed. Protein A, which is produced by *Staphylococcus aureus*, interferes with the reaction between SEA and anti-SEA immunoglobulin G (IgG), resulting in a false-positive reaction. Chicken IgY was introduced as a capture antibody in the sandwich ELISA system, as IgY binds less efficiently to protein A. When the anti-SEA IgG antibody was used as the capture and detection antibodies (IgG-IgG ELISA), the background levels of protein A increased, thus resulting in a false-positive reaction. A 0.01 ng mL⁻¹ concentration of protein A significantly increased the absorbance value of the blank wells. When the anti-SEA IgY antibody was used as the capture antibody, 1000 ng mL⁻¹ of protein A did not affect the absorbance value. The ELISA system using anti-SEA IgY as a capture antibody and anti-SEA IgG as a detection antibody (IgY-IgG ELISA) showed a detection limit of <0.25 ng mL⁻¹ and a creditability of $R^2 = 0.98$. These findings demonstrate the advantage of chicken IgY for the detection of SEA by means of double-antibody sandwich ELISA.

Keywords Detection, enzyme-linked immunosorbent assay, enterotoxin, IgY, protein A, *Staphylococcus aureus*.

Introduction

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) are useful immunological techniques, and are widely used to detect many kinds of bacterial toxins (Saunders & Bartlett, 1977; Stiffler-Rosenberg & Fey, 1978; Fey *et al.*, 1984). Among the many of techniques, the double-antibody sandwich ELISA is popular, and involves one antibody to capture the antigen, and another labelled antibody is used to detect the bound antigen. Both these antibodies are usually of mammalian origin. Commonly, rabbits are used for the production of sera from which specific antibodies can be purified. Immunoglobulin (IgG) is well established for its properties, and it has high specificity and binding affinity to antigens. However, there are certain limitations in using mammalian IgG alone in immunoassays. The Fc domain of IgG is the site for binding to protein A, and it may yield a false-positive reaction in sandwich ELISA. Protein A also

binds to the Fab region in 15–20% of IgG, IgA and IgM antibodies of human (Sasso *et al.*, 1989, 1991).

Staphylococcal enterotoxin A (SEA) is a causative toxin for food poisoning by *Staphylococcus aureus*. Most strains of *S. aureus* also secrete protein A. The existence of protein A in culture broth and food causes false-positive results in the immunoassay using IgG. Immunoglobulin Y (IgY) found in birds is the equivalent of IgG found in mammals. IgY is found in the egg yolk and serum of birds (Warr *et al.*, 1995). IgY antibodies exhibit higher antigen-binding affinities. IgY has two heavy chains and two light chains. The IgY heavy chain has one variable and four constant region domains, whereas, the light chains of IgG have one variable and three constant region domains (Chiou, 2003). These IgY molecules can reduce interferences with protein A and may provide an added advantage in immunoassays (Hoffman *et al.*, 1996). However, IgY-based methods have not yet been completely established.

We herein report the development of a sensitive and specific chicken IgY-based indirect double-antibody sandwich ELISA system for the detection of SEA with

*Correspondent: Fax: +81 3 3700 9852;
e-mail: ykamata@nihs.go.jp

no interference due to protein A. The present study describes the advantages of the chicken IgY antibody to detect and quantify SEA.

Materials and methods

Staphylococcal enterotoxin A

The purified SEA standard was prepared according to the methodology described in a previous report (Hu *et al.*, 2003). The protein concentration of the rSEA was determined using Bradford's method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA; Bradford, 1976). The purity of the rSEA was confirmed using sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmli, 1970).

Antibodies

Rabbits (Japanese White; Japan SLC, Hamatatsu, Shizuoka, Japan) were immunized with rSEA. Freund's complete adjuvant (Difco) was mixed with 100 µg of rSEA, and rabbits were injected subcutaneously with the emulsion. Two or four weeks later, the same injection was performed. One more week later, rSEA was intravenously injected. The serum was collected 1 week after the final injection. Chickens (10 weeks of age, WL-M/O, Medical and Biological Laboratories Co., Ltd., Nagoya, Aichi, Japan) were immunized with rSEA. An emulsion of rSEA (100 µg) with Freund's complete adjuvant was injected subcutaneously into a chicken. The same injection procedures were repeated four times with an interval of 1 week. The serum was collected 1 week after the final injection. IgG and IgY fractions were isolated from the serum of the respective species by the use of Thiophilic Adsorption Kit (Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama, Kanagawa, Japan). The purified Ig fraction was dialysed against PBS, and its protein concentration was determined using the Bradford's method as previously described.

Double-antibody sandwich ELISA

Anti-rSEA IgY and IgG were labelled with NHS-LC-biotin (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instruction. The reaction products were dialysed against PBS, and the final products (biotin-labelled IgG/IgY) were stored at -30 °C in the presence of 50% of glycerol.

Both IgG and IgY were used as a capture antibody. The ELISA system using IgG was designated as IgG ELISA, and the system using IgY was designated as IgY ELISA. Both IgG and IgY (as a capture antibody) were added into a 96-well ELISA plate (Thermo Fisher Scientific) at 0.1 µg per well. After 1 h, the wells were washed by addition of 0.05% Tween-20 in PBS (PBST). To evaluate the suitable blocking reagent, 100 µL of

StartingBlock BlockingBuffers (Pierce), 1% polyvinyl alcohol and 0.5% fish gelatin blocking solution in PBS (BioFX Laboratories, Inc. Owings Mills, MA, USA) were added into wells and incubated at 4 °C overnight. The purified rSEA was diluted in Can Get Signal Immnoreaction Enhancer Solution I (Toyobo). After removing the blocking solution, SEA samples were added into the wells at 100 µL per well. The plate was incubated at room temperature for 1 h. After washing the wells four times, the biotin-labelled IgG and/or IgY (as a detection antibody) diluted in an added diluent (solution II; Toyobo), and allowed to react for 1 h. After washing as the same way, streptavidin-labelled peroxidase (Pierce) was added into wells, and then incubated for 30 min at room temperature. Colour development was carried out by the use of Opt-EIA, tetramethylbenzidine substrate reagent set (BD Biosciences), and was stopped by the addition of 1 N H₂SO₄. The final product was quantified for the absorbance at 450 nm using a microplate reader (Model 680; Bio-Rad). Protein A (Pierce), a mixture of protein A and rSEA, and rSEA alone were simultaneously allowed to react with the capture antibody coated on the surface of the wells.

Staphylococcal enterotoxin A (0–1000 ng mL⁻¹) was applied to evaluate the dynamic range of the ELISAs, and a small amount of SEA (0–5 ng mL⁻¹) was used to determine the minimum concentration that could be detected.

Culture of *Staphylococcus aureus* isolates

Staphylococcus aureus isolates, 196E (*sea* gene +), 11689 (*sea* gene +), FRI361 (*sea* gene -), Saga-1 (*sea* gene -) and Aomori 1 (*sea* gene -), which originated from cases of food poisoning, were used. The presence of the *sea* gene was determined by a polymerase chain reaction using *sea*-specific primers (Omoe *et al.*, 2005). A stock culture of each isolate was inoculated into a BHI broth (Becton-Dickinson, Tokyo, Japan) supplemented with 1% yeast extract (Becton-Dickinson) and cultured overnight at 37 °C with shaking (150 rpm). The overnight culture was added into fresh medium of the same composition at a ratio of 1–100. The cultivation was continued for 48 h at 37 °C with shaking (150 rpm). The supernatant was obtained by the centrifugation at 10 000 *g* for 10 min. The culture supernatant containing SEA was clarified by filtration through a 0.45-µm filter (Millex).

Statistics

The statistical significance of the differences in the absorbance values between the blank well and individual wells were measured using Student's *t*-test. Differences with a *P*-value of <0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Establishment of ELISA system to detect staphylococcal enterotoxin

The standardisation of the conditions for each step of the ELISA was performed. Rabbit anti-SEA IgG or chicken anti-SEA IgY ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) was used to coat the wells of a 96-well plate. The plate was incubated at room temperature for 1 h. We evaluated blocking reagents to obtain specific signals in our SEA-detecting ELISA system, and we found that the plates incubated with a fish gelatin blocking solution demonstrated a lower background in the assay (data not shown). We also evaluated the combination of the capture and detection antibodies. When anti-SEA IgG was used as both a capture and a detection antibody (IgG-IgG ELISA), the absorbance value started to increase at 1 ng mL^{-1} of SEA, and a high absorption value was observed at 1000 ng mL^{-1} . The increase in the absorbance value depended on the concentration of SEA. When anti-SEA IgY was used as both a capture and detection antibody, no remarkable increase in the absorbance was observed at higher concentrations of SEA. This finding therefore indicates that the usage of IgY as a capture and detection antibody is not suitable to detect SEA. In the case of IgY-IgG ELISA, the absorbance value started to increase at 1 ng mL^{-1} , and the absorbance value increased gradually, depending on the concentration of SEA. The absorbance value in IgY-IgG ELISA at 1000 ng mL^{-1} of SEA was somehow lower than that in IgG-IgG ELISA, but the increase of the absorbance value in IgY-IgG ELISA was sufficient to detect SEA.

Influence of protein A on the specific reaction between staphylococcal enterotoxin A and the antibodies

Protein A was added into the well that did not contain SEA on the IgG-IgG, IgG-IgY or IgY-IgG ELISA, and the absorbance of the reaction products was measured to determine the influence of protein A. As shown in Fig. 1, the presence of protein A at 0.01 ng mL^{-1} significantly increased the absorbance value on the IgG-IgG ELISA without SEA. On the IgY-IgG ELISA, however, 1000 ng mL^{-1} of protein A increased the absorbance, but the increase was minimal.

Specificity of the binding of chicken IgY to staphylococcal enterotoxin A

The effects of protein A were determined by measuring the absorbance with the three kinds of ELISA systems in the presence or absence of SEA. On the IgG-IgG ELISA, the absorbance value of the wells with SEA and protein A was threefold higher than in the wells containing SEA alone (Fig. 2a). Furthermore, the wells

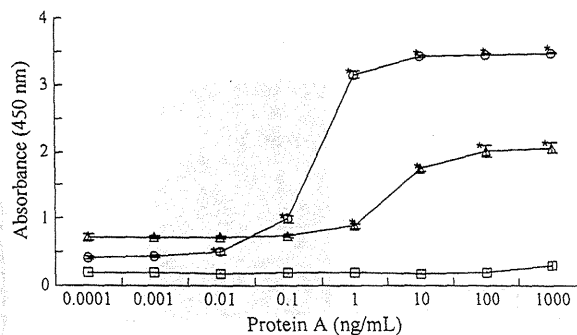


Figure 1 The influence of protein A on the absorbance of ELISA using IgG and IgY antibodies against Staphylococcal enterotoxin A. O: IgG-IgG ELISA, Δ : IgG-IgY ELISA and \square : IgY-IgG ELISA. Statistically significant differences were observed compared with the blank control (Protein A 0 ng mL^{-1}). * $P < 0.05$.

containing protein A alone showed an absorbance value equivalent to that of the wells containing both SEA and protein A, thus suggesting that the higher absorbance in the well containing both SEA and protein A was due to the presence of protein A. When the IgG-IgY ELISA was performed, the trend of the absorbance value was the similar to that of the IgG-IgG ELISA (Fig. 2b). Conversely, the absorbance of the wells containing protein A was similar to that of the blank wells on the IgY-IgG ELISA (Fig. 2c). The wells containing both SEA and protein A exhibited an absorbance equivalent to that from the wells containing SEA alone. These findings demonstrate that protein A does not interfere with the reaction between SEA and anti-SEA IgY, but does interfere with the reaction between SEA and anti-SEA IgG.

Calculation curve of IgG-IgG and IgY-IgG ELISA to determine the concentration of staphylococcal enterotoxin A

For the determination of SEA in the culture supernatant, a calculation curve with a wide dynamic range was prepared by IgG-IgG and IgY-IgG ELISAs. Both ELISA systems yielded an excellent R^2 value, namely up to 1000 ng mL^{-1} of SEA, thus suggesting that these methods are accurate indicators of the SEA levels (Fig. 3).

The minimal detection threshold for SEA was determined by the addition of a small amount of SEA in the wells. The absorbance value was determined, and statistical analysis between the blank well (0 ng mL^{-1} of SEA) and individual wells of SEA added was performed. The minimum concentration of SEA that could be detected was 0.5 and 0.25 ng mL^{-1} with the IgG-IgG and IgY-IgG ELISAs respectively (Fig. 4).