

厚生労働科学研究補助金
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および試験法に関する研究
平成23 - 25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

岩手大学農学部 共同獣医学科

鎌田 洋一 重茂 克彦

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	岩手大学農学部 共同獣医学科
	重茂 克彦	岩手大学農学部 共同獣医学科
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。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。本分担研究の目的は、リアルタイムで食品中の 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。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。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。今後も感度の向上が必要と考えられた。

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、食品中に、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^{1, 2)}。

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毒素の熱耐性で、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²⁾。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。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の方が望ましい。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³⁾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、検体が牛乳のような濃厚な夾雑物をたくさん含んでい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。

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。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⁾。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。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⁴⁾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 でアンピシリン含有 YT 培養液にて 1 時間培養した。Isopropyl -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)を添加した後、37 にて 3 時間培養を続けた。4、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、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。Sepharose-Glutathione 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 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。回収したる液中に 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_o 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 μ l 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 μ l の Protein G 溶液(100ug/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500ul 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 μ g/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 (Nanoprobes)を用いて抗 SEA 抗体を標識した。Mono-sulfo-NHS-NANOGOLD を 200ul 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 μ l ずつ混合した。室温で1時間反応後、4 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 μ g/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 μ l 添加した。センサーの振動数が安定した後、rSEA を添加した。添加液量は 5 μ l 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。添加液量は 5 μ l 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

岩手大学重茂教授より分与を受けた抗 SEA 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 μ 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。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。

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。

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 4）。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 $\mu\text{g/ml}$ 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。

D . 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。

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 $\mu\text{g/ml}$ 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。

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) 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
- 2) 重茂克彦(2008)、モダンメディア、54、23 - 26.
- 3) Sauerbrey, G. (1959) Z. Phys. 155:206.
- 4) 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。

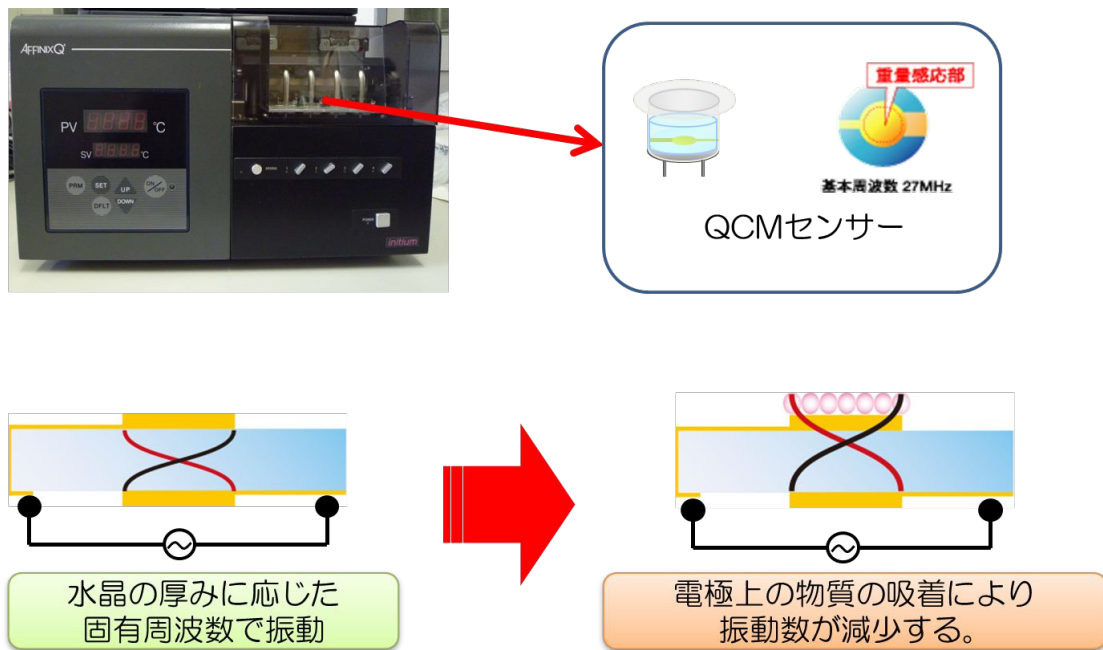


図1 水晶発振マイクロバランス（QCM）法の原理と機器

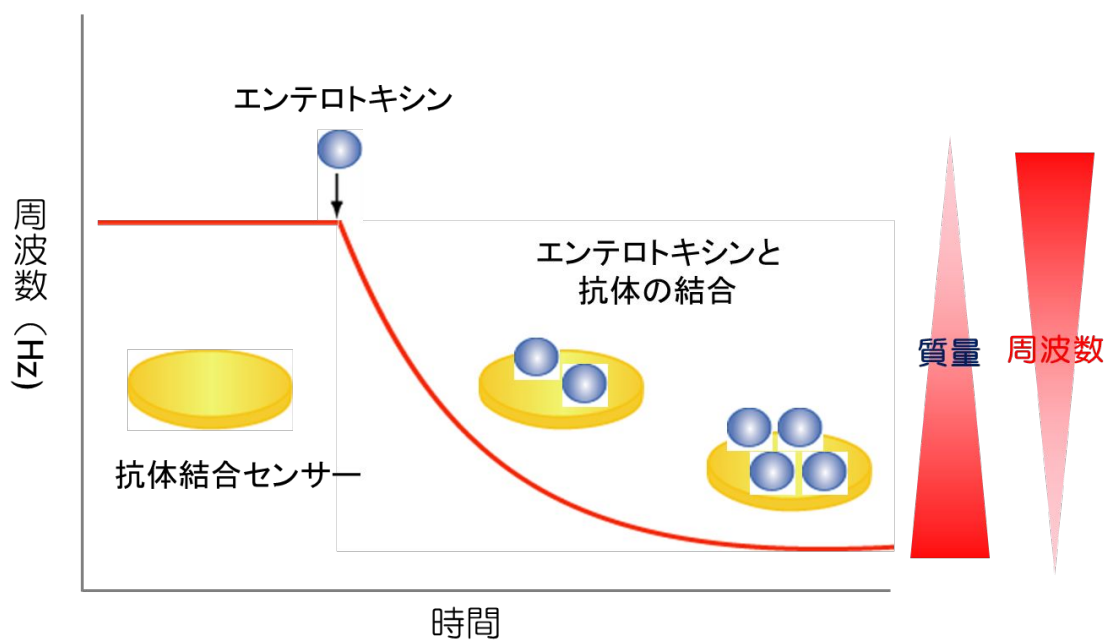


図2 ブドウ球菌エンテロトキシンの検出を目的として実施する水晶発振バランス法から得られる反応シグナルのイメージ

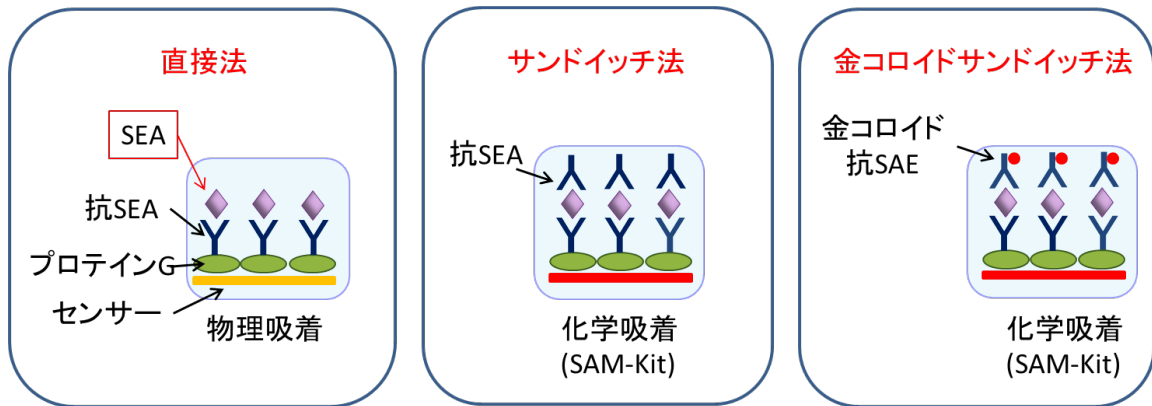


図3 QCM法の各種の反応システム

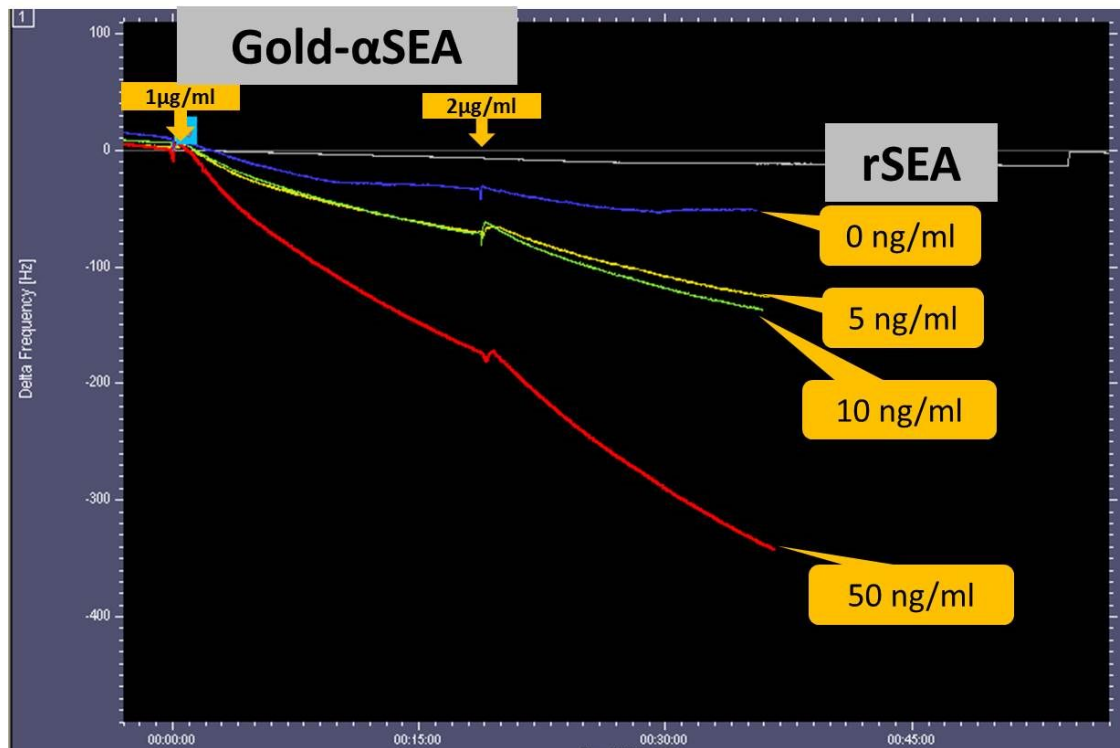


図4 金コロイド標識抗体を用いたサンドイッチ法によるブドウ球菌エンテロトキシンを検出するQCM反応

エンテロトキシン添加後、金コロイド標識抗体を、1 および 2 μg/ml の濃度で反応容器に添加し、センサーの周波数を測定した。