

## 卵加工品中での新型エンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の 挙動について

麻布大学生命・環境科学部食品生命科学科食品衛生学研究室・講師 石崎 直人

### ■ 緒 言

黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*、ブ菌)は環境中に広く分布し、特にヒトの皮膚、鼻腔などに常在する。ブ菌は嘔吐毒素である黄色ブドウ球菌エンテロトキシン(Staphylococcal enterotoxins:SEs)を産生し、ヒトがSEsに汚染された食品を喫食すると0.5～6h後に悪心、嘔吐を主徴とする食中毒を引き起こす<sup>1)</sup>。従来型SEsであるSEA～SEEの中ではSEAによる食中毒が最も多く発生していたが、近年、多数の新型SEs(SEG～SEIX)が発見されている<sup>2-5)</sup>。2000年6月には大阪を中心に乳製品を原因とする、患者数が13,420人におよぶ大規模なブ菌食中毒事件が発生し、本菌が依然として食品衛生上重要な食中毒起因菌であることが再認識された<sup>6)</sup>。この食中毒の原因食品からは従来型SEsのSEAのみならず、新型SEsも検出された。原因食品中のSEAの産生量は従来の食中毒事例よりも少なかったため、新型SEsの何らかの関与が示唆されている。

そこで我々は、食中毒事例が多い卵加工品における、新型SEs産生黄色ブドウ球菌の二次汚染を想定し、食品内での毒素産生能を含めた挙動を明らかにすることにより衛生管理、食中毒原因物質の検査への応用が可能となると考えた。

新型SEsの中でSEG、SEI、SEM、SEN、SEOのSEs遺伝子はgenomic island( $\nu$ Sa $\beta$  Type I)上にコードされ、enterotoxin gene cluster(*egc*)と呼ばれる遺伝子領域を形成している<sup>7)</sup>。*egc*関連SEsであるSEG、SEIは37°Cよりも室温に近い25°C培養での産生量が多くなるという報告があり、両遺伝子保有黄色ブドウ球菌による食中毒事例も報告されている。SEG、SEIと同様に*egc*関連SEsであるSEM、SEN、SEOについても同様の性質を持つことが考えられる。新型SEsに実施されたカニクイザルを用いた嘔吐試験では、特にSEOが2h後に18回の嘔吐を呈し、SEAに近い嘔吐活性を示した事が報告されているが<sup>8)</sup>、SEOの食品中における産生動態は明確にされていないため食中毒への関与は不明である。現在、食品中におけるSEOの検出方法は確立していないため、我々はSandwich ELISA法を確立し、食品中での挙動を検討した。

### ■ 方 法

#### 1. Sandwich ELISA法の検討

Sandwich ELISA法で用いる固層抗体の抗SEOウサギIgG抗体を1、10、50、100 $\mu$ g/ml、検出抗体のビオチン標識抗SEO IgY抗体(1.0mg/ml)を $\times$ 50、100、200、400、STAV-HRP1.1mg/ml(Thermo)を $\times$ 5,000、10,000、20,000の濃度で至適濃度を検討した。rSEOを0、12.5、25、50、100ng/mlに調整したものを用い標準曲線を作製した。抗SEOウサギIgGの作製はアーク・リソース株式会社に依頼した。抗SEOニワトリIgYとrSEOは岩手大学の鎌田らが作製したものを使用した。IgYのビオチン標識はEZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin(Thermo)を用いて実施した。各反応は37°Cで1h行い、発色基質にはTMB Substrate Reagent(BD)を、反応停止液には1N硫酸(WAKO)を、F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE(Nunc)を用いて、iMark Microplate Reader(Bio-Rad)にて450nmで吸光度を測定した。(図1)

#### 2. 液体培地を用いたseo遺伝子保有黄色ブドウ球菌のSEO産生量および菌数の測定

本実験で用いた供試菌株のSEs遺伝子保有状況を表1に示した。供試菌株の培養液を1%Yeast Extract加BHI broth(YE加BHI、BD社)9mlに $1.0 \times 10^3$  CFU/ml接種し、37°Cと室温に近いと考えられる25°Cで24、48、72、96h培養し、菌数およびSEO産生量をSandwich ELISA法を用いて測定した。各培養液を8,900rpm、10min遠心し、上清をMillex GP 0.22 $\mu$ m(Millipore)で濾過処理した。また、ブ菌はウサギを含む多くの哺乳類のIgGに結合するプロテインAを産生し、これがSandwich ELISAにおける非特異反応となる。そのため、プロテインAの影響を除去するためにPierce<sup>®</sup> ImmunoPure Normal Rabbit Serum(NRS)を測定サンプルの100%量加えて4°Cにて一晩静置しELISA用測定サンプルとした。菌数は培養液を希釈しMSEY寒天培地を用いて算出した。

### 3. rSEO の卵加工品からの添加回収試験

Sandwich ELISA 法を用いて卵加工品中の rSEO の回収試験を行った。卵加工品 1g に rSEO を 25、50ng 添加し 1h 静置後、2 倍量の PBS を加えストマッキングし、8,900rpm、10 分間遠心し、上清液を 0.22 $\mu$ m フィルター (Millex GP<sup>®</sup>0.22 $\mu$ m、Millipore) で濾過処理し、測定サンプルとして Sandwich ELISA 法で吸光度を測定した。

### 4. 卵加工品を用いた *seo* 遺伝子保有黄色ブドウ球菌の SEO 産生量および菌数の測定

塩分濃度 0.5% の液卵を作製後、pH を 5.0、6.0、7.0 および 8.0 に調整し卵加工品を作製した。Hiroshima13 培養液を用いて、各卵加工品 10g に  $2.0 \times 10^3$ CFU 接種し、37°C と 25°C でそれぞれ 24、48、72h 培養した。培養終了後、各卵加工品を添加回収試験の処理と同様に実施した後に、NRS を 100% 量加えて ELISA 用測定サンプルとして測定した。菌数の算出は卵加工品に 2 倍量の PBS を加えたものを試料原液として行った。

## ■ 結果

### 1. Sandwich ELISA 法の検討

rSEO の濃度を 0、12.5、25、50、100 ng/ml で各試薬の濃度を検討した結果、固層抗体 IgG 抗体は 50 $\mu$ g/ml、検出抗体のビオチン標識抗 IgY 抗体は  $\times 100$ 、STAV-HRP は  $\times 5,000$  の濃度が至適濃度であった。(y=0.0038 $\times$ 0.0322、R<sup>2</sup>=0.9925)

### 2. 液体培地を用いた *seo* 遺伝子保有黄色ブドウ球菌の SEO 産生量および菌数の測定

Sandwich ELISA を用いた液体培地中での SEO 産生量および菌数の推移を図 2 に示す。37°C 培養では 3 菌株間における SEO 産生量および菌数の経時的差は認められなかった。24 ~ 48h で 3 供試菌株の菌数は  $1.6 \sim 5.2 \times 10^9$ CFU/ml であり、72h では  $9.7 \times 10^9 \sim 1.2 \times 10^{10}$ CFU/ml に達し 96h では増加が認められなかった。SEO の産生量は 24h で 1.1 ~ 2.8ng/ml でありそれ以降増加は確認できなかった。

25°C 培養 24h での菌数は Hiroshima13 は  $9.5 \times 10^8$ CFU/ml、Saga1 は  $5.5 \times 10^8$ CFU/ml、Ishikawa2 は  $9.4 \times 10^7$ CFU/ml であったが、その後、経時的な増殖が見られ、96h では  $4.2 \sim 5.7 \times 10^{10}$ CFU/ml まで増殖が確認された。SEO の産生は、Hiroshima13 は 24h で 3.2ng/ml、48h で 17.8ng/ml、72h で 15.4 ng/ml の産生が見られた。Ishikawa2 では 72h、96h では共に 13.0ng/ml の産生が見られた。Saga1 は SEO の産生は確認されなかった。

### 3. rSEO の卵加工品からの添加回収試験

各種設定条件における卵加工品中の SEO 測定に先立ち、rSEO の添加回収試験を行った。添加量 25ng では 98.0%、50ng では 96.8% の回収率であった。(表 2)

### 4. 卵加工品を用いた *seo* 遺伝子保有黄色ブドウ球菌の SEO 産生量および菌数の測定

液体培地での結果をもとに、Hiroshima13 を各種設定した卵加工品に接種し、培養した後の SEO 産生量および菌数を図 3 に示す。37°C 培養での菌数は 24h では pH 5 で  $4.0 \times 10^9$ CFU/g、pH 6 ~ 8 で  $6.6 \sim 8.5 \times 10^9$ CFU/g であった。48h 培養では pH 7 で  $1.2 \times 10^{10}$ CFU/g、pH 8 で  $1.1 \times 10^{10}$ CFU/g と増加が認められ、72h では pH 5 で  $5.9 \times 10^9$ CFU/g、pH 6 ~ 8 で  $8.6 \sim 9.0 \times 10^9$ CFU/g であった。SEO 産生量は pH5 では 24h で 39.4ng/ml、48h で 8.0ng/ml、72h で 129.4ng/ml、pH 6 では 86.6ng/ml、130.9ng/ml、172.3ng/ml、pH 7 では 73.7ng/ml、196.6ng/ml、159.4ng/ml、pH 8 では 46.6ng/ml、88.0ng/ml、176.6ng/ml であった。

25°C 培養での菌数は 24h では pH 5 で  $7.3 \times 10^8$ CFU/g、pH 6 ~ 8 で  $2.1 \sim 3.0 \times 10^9$ CFU/g であった。その後、何れの pH 条件においても経時的な増殖が見られ、72h では pH 5 で  $1.1 \times 10^{10}$ CFU/g、pH 6 ~ 8 で  $1.8 \sim 2.7 \times 10^{10}$ CFU/g であった。SEO 産生量は pH 5 では 24h で産生は見られず、48h では 20.9ng/ml、72h では 98.0ng/ml、pH 6 では 15.1ng/ml、138.0ng/ml、246.6ng/ml、pH 7 では 0ng/ml、178.0ng/ml、252.3ng/ml、pH 8 では 19.4ng/ml、149.4ng/ml、263.7ng/ml であった。

## ■ 考察

近年、黄色ブドウ球菌の保有する SEs が多数存在することが明らかになってきた。保有パターンは従来型 SEs のみ、新型 SEs のみおよび従来型と新型 SEs 同時保有の 3 パターンに分けられる。従来型 SEs を産生していないブ菌による食中毒は発生しているが、分離菌株について新型 SEs の遺伝子保有

状況を確認しているのみである。食中毒を引き起こす新型 SEs を産生するブ菌の食品中での挙動を確認する検査法は未だ確立されていない。2000 年に発生した大規模なブ菌による食中毒では、食品から SEA と新型 SEs が検出されたが、SEA の産生量が 0.4 ～ 0.8ng/ml と従来の食中毒事例より非常に低く、新型 SEs の関与が示唆された。

本研究では新型 SEs の中で SEO に着目し、*seo* 遺伝子保有ブ菌の卵加工品中における増殖動向および SEO の産生条件の解明を目的として、Sandwich ELISA 法の確立を目的とした。

Sandwich ELISA 法で 37°C と 25°C における SEO 産生量と菌数の違いを確認するために 1%YE 加 BHI を用いて行った。37°C 培養における菌数の増殖は 72 時間でプラトーに達し、毒素産生も 24h の 1.1 ～ 2.8ng/ml が最大産生量であった。25°C 培養では 37°C よりも菌数、SEO 産生量共に増加する傾向が見られた。Hiroshima13 は 48h で 17.8ng/ml 産生し、24h よりも 5.5 倍もの増加が見られ、72h では 15.45ng/ml であり、他の株と比較して顕著な産生が見られた。Ishikawa2 は 72h で 13.0ng/ml 産生し 96h においてもそれを維持していた。Saga1 は YE 加 BHI を用いた方法では SEO の産生は確認されなかった。株による産生性の違いが大きく見られたことから、今後株数を増やして検討していく必要があると考えられた。

次いで、卵加工品に Sandwich ELISA 法を応用するに当たり、夾雑物の影響を考慮し rSEO の添加回収試験を行った。回収率は添加量 25、50ng/g の両方においてそれぞれ 96 と 98% の回収率が得られ、卵加工品に含まれる夾雑物は Sandwich ELISA に影響を与えないことが確認された。

培地中における SEO の産生性が最も高かったことが確認された Hiroshima13 を用いて、卵加工品中における各種培養条件における SEO 産生量および菌数の測定を経時的に行った。25°C の 48h 培養では 24h 培養と比較し、pH 6 で 9 倍増加の 138.0ng/ml、pH 7 では 84 倍増加の 178.0ng/ml、pH 8 では 7 倍増加の 149.4ng/ml と著しい増加が確認できた。72h 培養では pH 6 ～ 8 何れにおいても 200ng/ml を超える産生量であった。一方、pH 5 においては 48h 迄であれば、pH 6 ～ 8 と比較し SEO の産生を抑制することが出来た。

これらの結果から、*seo* 遺伝子保有ブ菌に汚染された卵加工品を、25°C の室温に放置した場合、pH 6 ～ 8 の条件であれば、同様の傾向で経時的に増殖を続け食品中の SEO の産生量が増加し、食中毒の発生に繋がる可能性が示唆された。今後、確認する株数を増やすと共に、卵加工品の塩分濃度などの条件を設定し検討することにより新型 SEs 産生ブ菌の制御に役立てることができると考える。

## ■ 要 約

卵加工品を原因食品とする新型 SEs 保有黄色ブドウ球菌による食中毒を予防するために、Sandwich ELISA 法を開発した。固層抗体に IgG、検出抗体にビオチン標識 IgY を用い、rSEO の回収率は 97% と夾雑物の影響を受けないことが確認された。*seo* 遺伝子保有黄色ブドウ球菌の培地を用いた温度別 SEO の産生状況を確認したところ、従来型 SEs 産生試験において用いられる 37°C よりも室温の温度に近い 25°C での SEO 産生性が高いことが確認された。卵加工品中における Hiroshima13 の挙動は、37°C と比較し 25°C では 48h 以降に経時的に菌量と SEO が増加し続ける事が確認された。卵加工品による食中毒菌を制御するためには、室温放置をせずに、低温管理が重要であると考えられた。

## ■ 文 献

1. Loir, Y.L., F. Baron, and M. Gautier. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet. Mol. Res. 2 (1): 63-76.
2. Omoe K, Imanishi K, Hu DL, Kato H, Fugane Y, Abe Y, Hamaoka S, Watanabe Y, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K. 2005. Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. Infect and Immun. 73(9):5540-6.
3. Ono, H.K., Omoe, K., Imanishi, K., Iwakabe, Y., Hu, D.L., Kato, H., Saito, N., Nakane, A., Uchiyama, T. and Shinagawa, K. 2008. Identification and Characterization of Two Novel Staphylococcal Enterotoxins, Types S and T. Infect. Immun. 76, 4999-5005.
4. Wilson, G.J., Seo, K.S., Cartwright, R.A., Connelley, T., Chuang-Smith, O.N., Merriman, J.A., Guinane, C.M., Park, J.Y., Bohach, G.A., Schlievert, P.M., Morrison, W.I., Fitzgerald, J.R. 2011. A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. PLoS Pathog., 7(10) 1-16.
5. Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P. 2003. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. Journal of Applied Microbiology. ;95(1):38-43.

6. T.Asao, Y.Kumeda, T.Kawai, T.Shibata, H.Oda, K.Haruki, H.Nakazawa and S.Kozaki.2003. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan:estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.*, 130, 33-40.
7. Hu DL, Omoe K, Inoue F, Kasai T, Yasujima M, Shinagawa K, Nakane A. 2008. Comparative prevalence of superantigenic toxin genes in meticillin-resistant and meticillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 57, 1106-1112.
8. Omoe K, Hu DL, Ono HK, Shimizu S, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K, Imanishi K. 2013. Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. *Infection and Immunity* p.3627-3631

表1 食中毒由来黄色ブドウ球菌の SEs 遺伝子保有状況

供試菌株	保有遺伝子
Hiroshima13	<i>seg sei sem sen <u>seo</u> sej ser ses</i>
Saga1	<i>seg sei sem sen <u>seo</u> sep</i>
Ishikawa2	<i>sea seg sei sem sen <u>seo</u></i>

表2 卵加工品中における rSEO の添加回収率

rSEO 添加量 (ng/g)	rSEO 回収量 (ng/g)	回収率 (%)
50	52	104
	44	89
平均	48	96

rSEO 添加量 (ng/g)	rSEO 回収量 (ng/g)	回収率 (%)
25	22	89
	26	106
平均	24	98

固層抗体 ウサギ IgG を 100  $\mu$ l/well (37°C、1 時間)  
↓  
300  $\mu$ l/well の 0.1% Tween 加 PBS (PBST) で 1 回洗浄  
↓  
10% スキムミルクを 200  $\mu$ l/well (37°C、1 時間)  
↓  
300  $\mu$ l/well の PBST で 1 回洗浄  
↓  
測定サンプルまたは rSEO を 100  $\mu$ l/well (37°C、1 時間)  
↓  
300  $\mu$ l/well の PBST で 5 回洗浄  
↓  
検出抗体 Biotin 標識 IgY 抗体を 100  $\mu$ l/well (37°C、1 時間)  
↓  
300  $\mu$ l/well の PBST で 6 回洗浄  
↓  
STAV-HRP を 100  $\mu$ l/well (37°C、1 時間)  
↓  
300  $\mu$ l/well の PBST で 5 回洗浄  
↓  
TMB 溶液を 100  $\mu$ l/well (37°C 15 分)  
↓  
1N 硫酸を 100  $\mu$ l/well  
↓  
マイクロプレートリーダーで吸光度測定 (450nm)

図 1 Sandwich ELISA 法の操作手順

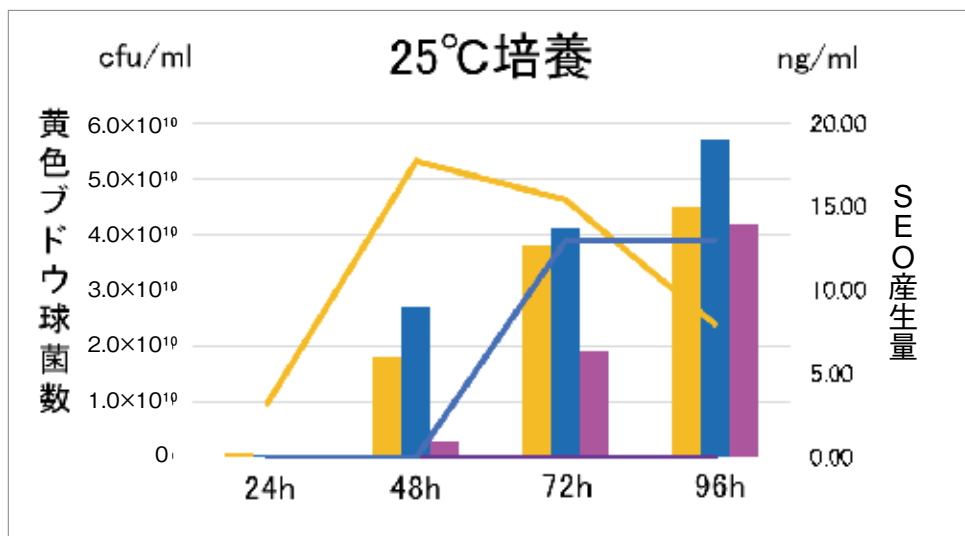
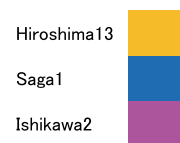
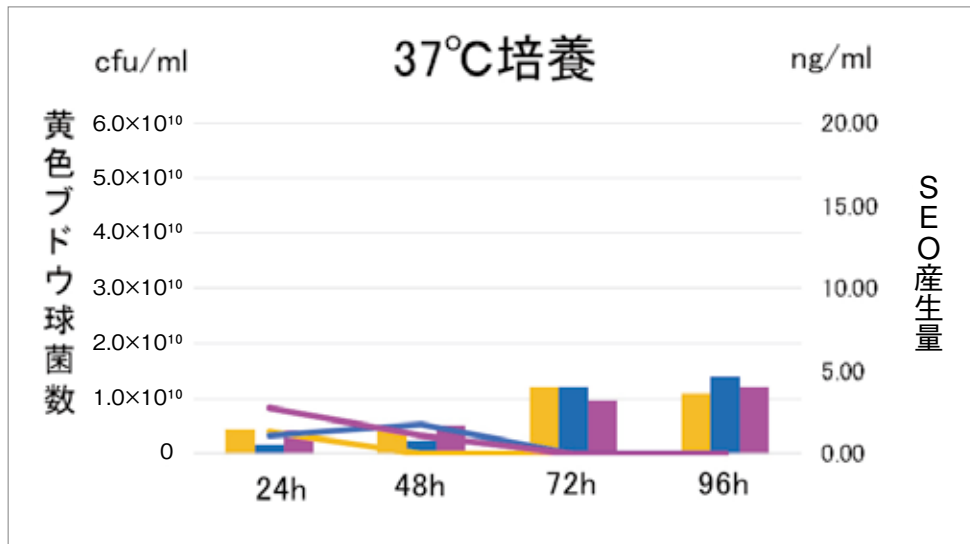


図2 液体培地中における温度別の SEO 産生量および菌数の推移

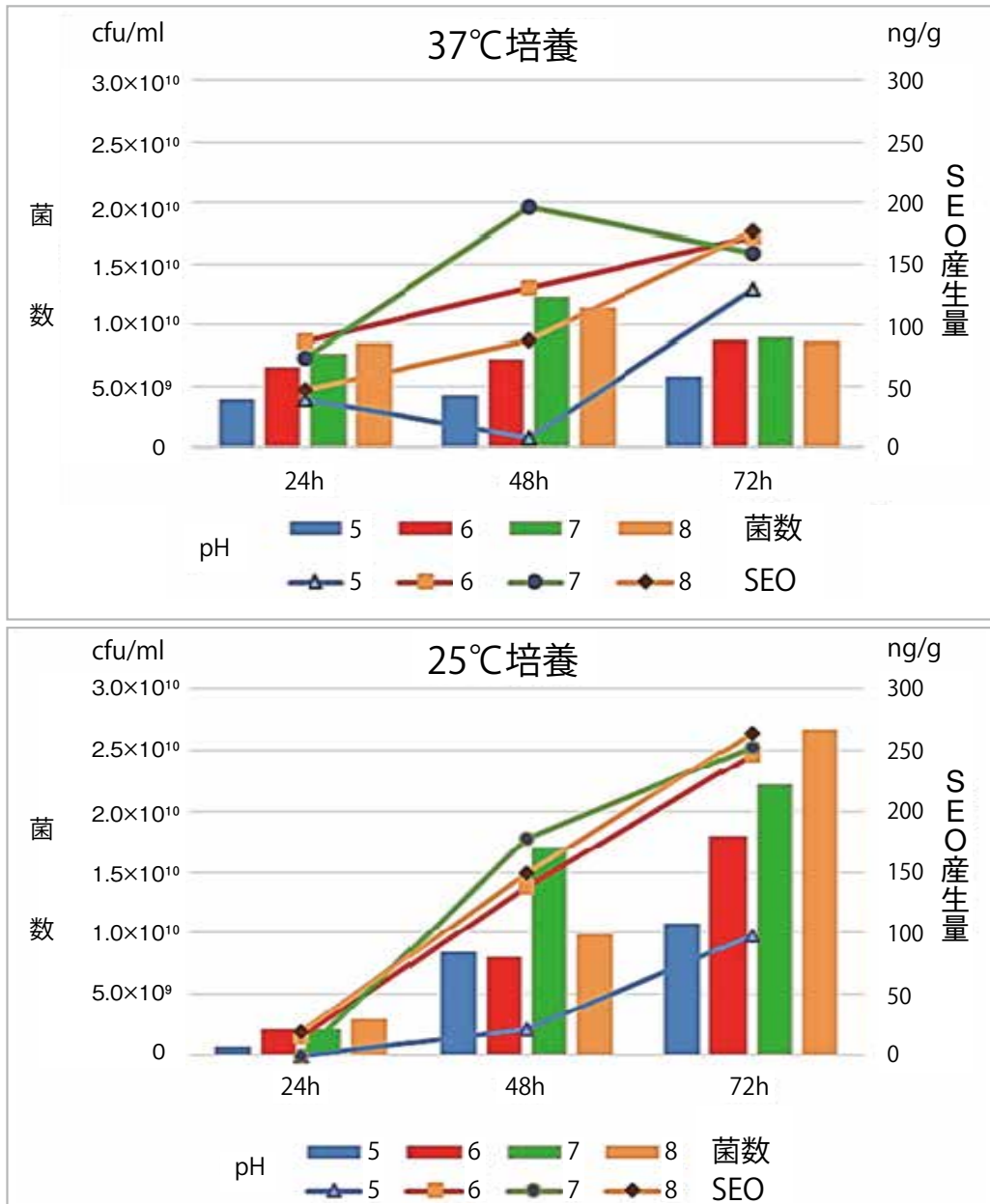


図3 各種条件を設定した卵加工品中における Hiroshima13 の SEO 産生量および菌数の推移