

黄色ブドウ球菌エンテロトキシン濃縮法の検討

鈴木理恵¹⁾ 鈴木裕司 黒澤久美子 鈴木智子 河合高生²⁾ 須釜久美子
 県中支所 ¹⁾微生物課 ²⁾大阪府立公衆衛生研究所

要 旨

黄色ブドウ球菌食中毒の原因食品から微量のエンテロトキシンを検出することを目的に、エンテロトキシン濃縮法を検討した。エンテロトキシンの検出に逆受身ラテックス凝集反応法を用いたところ、トリクロロ酢酸（TCA）濃縮法では食中毒検体からエンテロトキシンをほとんど検出できなかったが、最終濃度 0.01%に牛血清アルブミンを加えた TCA 濃縮法を実施することにより検出することができた。ロータリーエバポレータ濃縮法ではエンテロトキシンを検出することができたものの、0.01%BSA 加 TCA 濃縮法よりも高い希釈で非特異凝集反応が認められた。

キーワード：黄色ブドウ球菌エンテロトキシン，TCA 濃縮法

はじめに

2012 年に福島県県南保健所管内で食中毒が発生した。患者が喫食した貝入りおにぎりから $10^8/g$ の黄色ブドウ球菌が検出されたこと、当該おにぎりおよび患者便からエンテロトキシン（SE）A 産生，コアグラゼIV型の黄色ブドウ球菌が分離されたこと、および患者が喫食後短時間で嘔吐を発症したことから、本事例は黄色ブドウ球菌食中毒であると断定された。しかし、貝入りおにぎりの 10 倍乳剤を用いた逆受身ラテックス凝集反応（RPLA）法では、SEA の有無を判定することが困難であった。その原因として SE の産生量が非常に少ないと考え、貝入りおにぎりから SE を検出・定量するために、SE の濃縮法を検討したので報告する。

材 料

1 添加回収試験用SEA

当該食中毒原因食品由来 SEA 産生黄色ブドウ球菌をブレインハートインフュージョンブイヨンで 37℃ 20 時間振盪培養後に、3,000rpm で 20 分間遠心し、上清を $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過した。このろ過液はエンテロトックス-F「生研」を用いた RPLA 法で SEA が 128 倍まで陽性であったため、本キットの添付文書に記載されている

感度 0.1ng/mL より培養上清の濃度を 12.8ng/mL と算出した。

2 食材

- ・貝入りごはん（模擬検体として自家調理）
- ・食中毒喫食残品の貝入りおにぎり

3 使用器具および検査キット

- ・フィルター付きストマック袋
- ・ポリプロピレン製遠心チューブ
- ・メンブランフィルター（ $0.45\mu\text{m}$ ）
- ・冷却遠心機
- ・ロータリーエバポレータ
- ・滅菌生理食塩水
- ・牛血清アルブミン（BSA）
- ・トリクロロ酢酸（TCA）溶液
- ・0.1M トリス塩酸溶液（pH8.0）
- ・エンテロトックス-F「生研」（デンカ生研）
- ・バイダスアッセイキットスタフエンテロトキシン2（シスメックス・バイオメリュー）

方 法

TCA 濃縮法¹⁾，BSA 加 TCA 濃縮法，エバポレータ濃縮法²⁾については、図 1，図 2 および図 3 に示す。

なお、BSA 加 TCA 濃縮法は、10 倍乳剤遠心上清に BSA を 0.01%添加した。

1 添加回収試験

貝入りごはん 10 g に SEA (12.8 ng/mL) を 7mL 添加し、9 倍量の滅菌生理食塩水を加えてストマッカー処理を行い、フィルター部分より採取した 10 倍乳剤を 3,000rpm で 20 分間遠心した。遠心後の上清 (10 倍乳剤遠心上清) を用いて TCA 濃縮法、BSA 加 TCA 濃縮法およびエバポレータ濃縮法を実施した。

なお、1 つの濃縮法につき 10 倍乳剤遠心上清全量を用い、TCA 濃縮法および BSA 加 TCA 濃縮法では最終の遠心沈渣を 1mL に溶解し、エバポレータ濃縮法では蒸発乾固物を十分に溶解させるために 2mL に溶解し、それぞれを試料液とした。

試料液中の SEA は、RPLA 法を用いて添付文書の方法に従い測定した。

SEA は 12.8ng/mL を 7mL 添加したので、貝入りおにぎり 10g には 89.6ng の SEA が含まれることになる。従って、最終の遠心沈渣を 1mL に溶解すると SEA 濃度は 89.6ng/mL となり、RPLA 法 (感度が 0.1 ng/mL) では、896 倍まで陽性になると考えられた。2 倍段階希釈系列を作製して測定する RPLA 法では、896 倍は 512 ~ 1024 倍の間となり、RPLA 値は 512 倍になると予測された。2mL に溶解した場合は RPLA 法で 448 倍まで陽性となり、この値は 256 ~ 512 倍の間になることから、RPLA 値は 256 倍になると予測された。

2 食中毒喫食残品貝入りおにぎりを用いた SE濃縮法の検討

食中毒検査終了後に凍結保存した貝入りおにぎりを実験に供した。

なお、SE の検出は、RPLA 法とバイダスアッセイキットスタフエンテロトキシン 2 を用いた方法 (VIDAS 法) により行い、それぞれのキット添付文書に従って実施した。VIDAS 法は大阪府立公衆衛生研究所において実施した。

1) 検討 1

貝入りおにぎり 5g に 9 倍量の滅菌生理食塩水を加えてストマッカー処理し、採取した

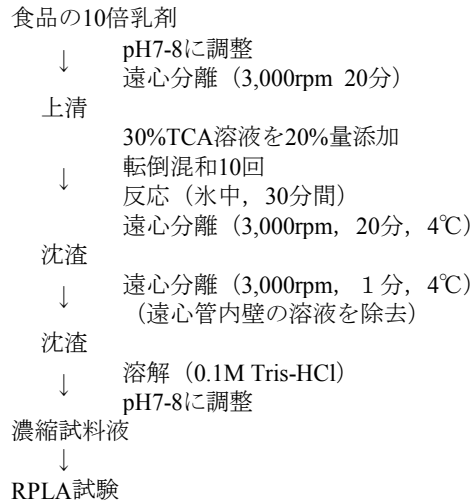


図 1 TCA濃縮法

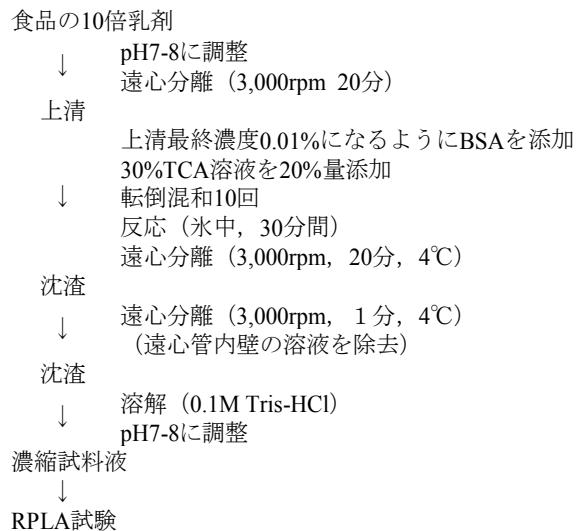


図 2 BSA加TCA濃縮法

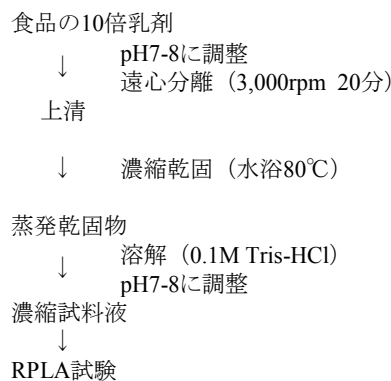


図 3 エバポレータ濃縮法

10 倍乳剤 (43.1mL) を 3,000rpm で 20 分間遠心した。この 10 倍乳剤遠心上清の 10mL ずつを TCA 濃縮法, BSA 加 TCA 濃縮法およびエバポレータ濃縮法に供し, それぞれ最終の遠心沈渣を 1 mL に溶解した。

2) 検討 2

検討 1 より多くの SE を濃縮するために, 貝入りおにぎりの量を 15 g に増加し, 検討 1 と同様の操作を行った。得られた 10 倍乳剤 (132mL) の遠心上清 50mL ずつを, BSA 加 TCA 濃縮法とエバポレータ濃縮法にそれぞれ供し, 最終の遠心沈渣を 1.5mL に溶解した。

また, RPLA 法の希釈系列は 2 倍から作成し, SEB, SEC, SED, SEE の測定も実施した。

結 果

1 添加回収試験

RPLA 法の結果を表 1 に示す。凝集反応を確認できた最高希釈倍数を RPLA 値とした。

SEA の予測 RPLA 値に対する回収率は 10 倍乳剤遠心上清で 100%であった。TCA 濃縮法では回収率は 3.1%であったのに対し, BSA 加 TCA 濃縮法では 100%であった。エバポレータ濃縮法では回収率は 50%で, 非特異凝集反応が 8 倍まで認められた。

表 1 SEA検出結果

試料液	RPLA 値 (予測)	RPLA 値 (実測)	回収率 (%)
10倍乳剤遠心上清	×8	×8	100
TCA濃縮 (全量1mL)	×512	×16	3.1
BSA添加TCA濃縮 (全量1mL)	×512	×512	100
エバポレータ濃縮 (全量2mL)	×256	×128 (≦×8非特異 凝集)	50

2 食中毒喫食残品貝入りおにぎりを用いた SE濃縮法の検討

1) 検討 1

結果を表 2 に示す。

RPLA 法では 10 倍乳剤遠心上清や TCA 濃縮液から SEA を検出できなかったが, BSA

表 2 食中毒喫食残品貝入りおにぎり5gの SEA検出結果

試料液	RPLA 値	VIDAS	
		希釈倍数	TV 値
10倍乳剤遠心上清	<×1	×1	0.49
TCA濃縮 (全量1mL)	<×1	×2	0.21
BSA加TCA濃縮 (全量1mL)	×4	×2	1.29
エバポレータ 濃縮 (全量1mL)	×16 (≦×4非特異 凝集)	×2	0.68

加 TCA 濃縮液およびエバポレータ濃縮液から SEA を検出することができた。RPLA 値は前者で 4 倍, 後者で 16 倍であった。しかし後者では, 4 倍まで非特異凝集反応が認められた。

VIDAS 法では Test Value (TV) 値 0.13 以上を陽性と判定することから, すべての試料液が SE 陽性と判定された。

BSA 加 TCA 濃縮液およびエバポレータ濃縮液の RPLA 値から算出した貝入りおにぎりの SEA 量は, BSA 加 TCA 濃縮法で 0.34ng/g, エバポレータ濃縮法で 1.38ng/g であった。

2) 検討 2

結果を表 3 に示す。

RPLA 法を実施した結果, BSA 加 TCA 濃縮液では RPLA 値は 16 倍で, 非特異凝集反応が 2 倍まで認められた。エバポレータ濃縮液では RPLA 値は 32 倍であったが, 16 倍まで非特異凝集反応が認められた。一方, VIDAS 法ではすべての試料液が陽性と判定された。

BSA 加 TCA 濃縮液, エバポレータ濃縮液の RPLA 値から算出した貝入りおにぎりの SEA 量は, BSA 加 TCA 濃縮法で 0.42ng/g, エバポレータ濃縮法で 0.84ng/g であった。

表には示していないが, RPLA 法による SEB, SEC, SED, SEE の検出においても, SEA の場合と同様に BSA 加 TCA 濃縮液とエバポレータ濃縮液でそれぞれ 2 倍, 16 倍まで非特異凝集反応が認められたものの, それより高い希釈倍数で凝集反応は認められなかった。

表3 食中毒喫食残品おにぎり 15g の SEA 検出結果

試料液	RPLA値	VIDAS	
		希釈倍数	TV値
10倍乳剤遠心上清	<×2	×1	0.46
BSA加TCA濃縮 (全量1.5mL)	×16 (≦×2非特異 凝集)	×2	2.31
		×4	1.52
エバポレータ濃 縮 (全量1.5mL)	×32 (≦×16非特 異凝集)	×2	1.88
		×4	1.56

また、陰性対照として模擬検体の貝入りごはん 15g を使って検討 2 と同様の濃縮操作後に RPLA 法を実施した結果、エバポレータ濃縮液のみ 8 倍まで非特異凝集反応が認められた。一方、VIDAS 法では濃縮操作に関わらずすべての濃縮液で TV 値が 0.0 であった。

考 察

添加回収試験の結果より、10 倍乳剤遠心上清に BSA を 0.01% 添加することで TCA 濃縮法による SEA の回収率が向上することがわかった。BSA を加えることによってタンパク質濃度が高くなり、TCA の濃縮効果が増したと考えられた。

表 3 の VIDAS 法の結果より、BSA 加 TCA 濃縮液を 2 倍から 4 倍に希釈すると TV 値は 66% に低下したが、エバポレータ濃縮液では同様の希釈を行った場合、83% の低下にとどまった。RPLA 法においてもエバポレータ濃縮液は BSA 加 TCA 濃縮液より高い希釈まで非特異凝集反応が認められたことから、エバポレータ濃縮液には RPLA 法や VIDAS 法における抗原抗体反応の阻害物質が存在すると考えられた。従って食品中の SEA の検出に RPLA 法を用いる場合、SEA 濃縮法は BSA 加 TCA 濃縮法が適していると考えられた。

貝入りおにぎり 5g の検討 (表 2) では、エバポレータ濃縮液は BSA 加 TCA 濃縮液よりも RPLA 値が高くなったのに対し、VIDAS 法の TV 値は低くなった。これは、VIDAS 法に用いた濃縮液の希釈が少なかったために、エバポレータ濃縮液に含まれる抗原抗体反応阻害物質が VIDAS 法の抗原抗体反応を阻害

し、TV 値が実際より低くなったと考えられた。

検討 1 および検討 2 の結果より、食中毒喫食残品貝入りおにぎりの SEA 量は 0.34 ~ 1.38ng/g と推測された。黄色ブドウ球菌食中毒の発症毒素量は数 100ng ~ 数 μg/ヒトであると推定されている³⁾。喫食残品貝入りおにぎりの重量は 1 個あたり 150g 程度で、1 個のおにぎりを完食すると 50 ~ 200ng の SEA を摂取したことになり、貝入りおにぎりの喫食により食中毒が発生したことが裏付けられた。

今回の事例では、RPLA キットの添付文書に従い 10 倍乳剤で測定すると SEA を検出できなかったのに対し、VIDAS 法では検出することができた。このことから、VIDAS 法は SE の型別ができない欠点を有するものの、RPLA 法よりも感度よく SE を検出することが可能なので、SE の有無のスクリーニング試験に有用であると考えられた。

今回使用した食品に限らず、他の食品においても抗原抗体反応阻害物質が含まれる可能性は十分に考えられるので、SE の検出で精度の高い結果を得るためには複数の検出キットを併用することが重要であると考えられた。

まとめ

RPLA 法では 10 倍乳剤遠心上清と TCA 濃縮液の両方から SEA を検出できなかったものの、BSA 加 TCA 濃縮液とエバポレータ濃縮液から SEA を検出することができた。しかし、エバポレータ濃縮液では RPLA 法で高い希釈まで非特異凝集反応が認められたこと、VIDAS 法で抗原抗体反応を阻害する物質が存在すると考えられたことから、食品中の SEA を RPLA 法で測定する場合には BSA 加 TCA 濃縮法が適していると考えられた。

引用文献

- 1) 厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長通知 乳等からのエンテロトキシンの検査方法について。平成 14 年 2 月 14 日付食監発第 0214002 号。
- 2) 国立医薬品食品衛生研究所

<http://www.nihs.go.jp/fhm/kensa/staph/sub3%20budoukyuukin.html> 2013/1/31

3) 品川邦汎. 2 黄色ブドウ球菌. 渡邊治雄, 編. 食中毒予防必携第 2 版. 東京: 社団法人日本食品衛生協会 2007; 63-71.