

食品からのブドウ球菌エンテロトキシンAの検出法について

Detection and identification of staphylococcal enterotoxins in food

赤石 準一 山田 慶子 白石圭四郎
前田 博之 林 英夫

Jiunichi Akaishi Keiko Yamada Keishiro Shiroishi
Hiroyuki Maeda and Hideo Hayashi

I はじめに

ブドウ球菌食中毒はエンテロトキシン(以下Entと略)を含んだ食品をヒトが摂取すると2~5時間の短い潜伏期ののちに発症する急性中毒でボツリヌス食中毒とともに毒素型食中毒の代表的なものである。本症による症状は一過性に経過し比較的軽症で致命率も極めて低いため軽視されがちである。しかしブドウ球菌はヒト動物その他広く分布しているため食品は絶えず本菌汚染の機会にさらされている。他の細菌食中毒は食品衛生意識の向上とともに減少しているのに対しブドウ球菌食中毒は増加の傾向を示している。このため本菌食中毒の確実な診断と予防は公衆衛生上重要な課題となっている。また本食中毒発生に際してその汚染源及び経路を明らかにするために推定原因食品患者吐物及び便、食品取扱者の手脂、鼻咽頭より分離されたブドウ球菌からフェージあるいはコアグラーゼ型別が行われているのが現状である。しかし本食中毒の確実な診断は原因物質であるEntを食品中から証明することであり、とくにEntが産生されている様な食品が加熱調理された様な場合は菌の検出が不可能となる。こういう食品が原因食となった場合はEntの検出が唯一の診断となる。そこで我々は特異抗Ent血清を用いたRPHA法(逆受身赤血球凝集反応)による検出法を試

みたのでその成績を報告する。

II 材料及び方法

使用毒素エンテロトキシンAは東京都衛生研究所より分与していただいたS. aureus B-N-2909を用い、柴田らが用いた培地の培養上清8ℓを出発材料として図1, step I, Amberlite CG-50, 図2, step II CM-Cellulose, 図3 step III Sephadex G-100, これらを用いて精製し最終製品をコロジオンバックで濃縮した。最後にディスク電気泳動で検定した結果単一の蛋白であることを確認した蛋白量はOD₂₈₀ = 0.268 mg/mlであった。

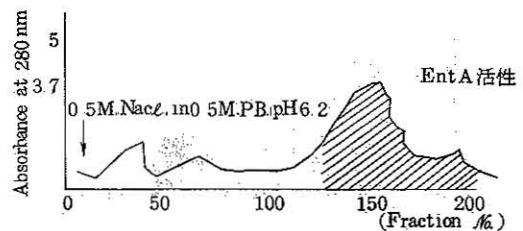


図1 Step I. Amberlite CG-50

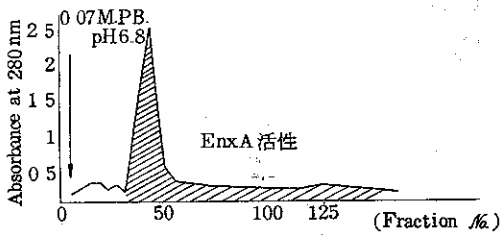


図2 Step II. CM-cellulose

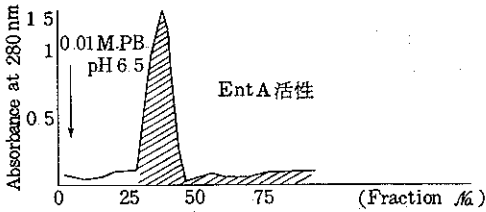


図3 Step III. Sephadex G-100

免疫及び γ -グロブリンの作製については精製 Ent A 20 mg/ml 0.5 ml 及び Complete, Adjuvant 0.5 ml とを混合し一回の注射量とした。これを用いてウサギの左右大腿部に一週間間隔で計6回投与し、抗血清の力価がフラット (Semimicro Slide gel diffusion で Ent A. OD₂₈₀ = 0.013 mg/ml に対し抗血清32倍希釈まで明瞭な沈降線を形成) になってから booster を行い、一週間後全採血した。得られた抗毒素血清から Cautrecases と Anfinsen の方法に準じ精製 Ent A を CNBr-actinated sephavose 4B にカップリングし、アフィニティークロマトグラフィーを行

った。図4この方法で特異性の高い免疫グロブリンを得ることが出来た。免疫グロブリン感作血球

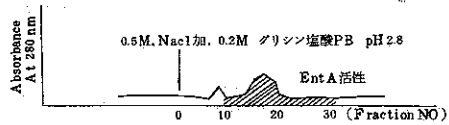


図4 Affinity Chromatography

の調製と RPHA 法についてはアフィニティーにより得られた免疫グロブリンを一夜透析後コロジョンバックを用いて OD₂₈₀ = 0.08 ~ 0.1 mg/ml まで濃縮した。RPHA 法は U 型マイクロプレートによるマイクロタイター法によった。免疫グロブリン 100 mg/ml で感作した血球を用いて Ent A との凝集反応を試みた結果 0.033 μ g/ml まで判定可能な凝集像を示した。表 I、用いた感作血球にはホルマリンタンニン酸処理綿羊血球 1 Vial に等量の 100 μ g/ml の免疫グロブリンを加えて 37°C の water bath 中で 30 分感作しその後生食で 2 回洗浄したものを担体とした。

III 実験結果

以上の担体を用いて本年 6 月下旬に札幌市豊平区管内で発生したクリームパンによるものと思われる食中毒で本法を試みた結果、食品の 10% 乳剤

表1 PureのEntAとの凝集反応

感作赤血球 (100 μ g/ml) 0.025 ml	陰性 対称
pure Ent A (Absorbance at 280 nm) 0.025 ml	PBS のみ	0.134 μ g/ml	0.067 μ g/ml	0.033 μ g/ml	0.0033 μ g/ml	0.00165 μ g/ml	0.000825 μ g/ml	0.000412 μ g/ml
判 定	-	+	+	+	±	-	-	-

の 10^3 希釈まで明瞭な凝集像を認めた(食品の希釈液にはPH7.2のPBSにアラビアゴム 0.01%, Tween 80 0.1%を加えた陰性対象はPH7.2のPBSのみとした)他の一例は同じく6月下旬西区管内で発生した食中毒で自家製おにぎりよりその10%乳剤の 10^4 希釈まで凝集像を認めた。

IV 考 察

以上の2例からEnt Aのみに関してRPHA法は試料を濃縮せずに微量のEnt含有で短時間に特異的反応が見られることが出来た。しかし種々の食品構成成分がRPHA法にどのような影響があるか米飯と玉子焼で試みた結果、食品の10%乳剤9mlに $10\mu\text{g/ml}$ のEnt A 1mlを加えた所その 10^4 希釈まで陽性像を呈した。これはPureのEntで行った実験結果とほぼ同様の価で回収されることを示した。

V ま と め

今回はEnt Aについてのみ精製及びRPHA法を試みた。その結果食品からのEnt Aの検出については、ほぼ適用しうるものと考えられる。しかしA以外のB~Fについての精製及びそれぞれの物理化学特性等に関しては今後に残された課題である。

VI 文 献

- 1) Bergdoll, M. S.: The Staphylococcal Enterotoxin, Japan, J. Microbiol. Vol(4) (1967)
- 2) Kunihiro Shinagawa: A consideration to immune doses of staphylococcal enterotoxin B to Rabbits. Japan. J. Med. Sci. Biol., 27. (1974)
- 3) Cuatrecasas, P., Anfinsen, C. B.: Affinity Chromatography. Ann. Rev. Biochem 40, 259 - 278 (1971)
- 4) Genigeorgis, C. and Kuo, J. K.: Recovery of staphylococcal enterotoxin from food by Affinity Chromatography, American Society for Microbiology (1975)
- 5) 山田澄夫, 五十嵐英夫, 寺山武: 日本細菌学雑誌, 31, (1976)
- 6) Stephen V. Boyden; The adsorption of Proteins on Erythrocytes Treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera, Received for publication, September 13. (1950)