

ブドウ球菌エンテロトキシンBの精製法と検出法

*柴田 芳実 *金 鉄三郎 *高山 和子
*森田 盛大 **藤宮 芳章 ***天野 保二
****石田 名香雄

I はじめに

細菌性食中毒の中でブドウ球菌による中毒は、いはゆる毒素型食中毒として、ブドウ球菌の産生する腸管毒素(エンテロトキシン)によって起こる。この毒素は、現在、血清学的にA, B, C, D, Eの5型に分類されている。

このブドウ球菌食中毒は、年々増加の傾向のを示しているにも拘わらず、現在の検査法では結果の判明する迄少なくとも48時間要し、スピードと的確性の要求される衛生行政にとって、必ずしも最適であるとはいえない。又、耐熱性というエンテロトキシンの性質上、一旦ブドウ球菌の増殖を許した食品を煮沸などの加熱処理としても、エンテロトキシンの活性は残存し、食中毒を起こし得る。その意味でも、推定原因食品から直接エンテロトキシンを検出することが必要であろう。

本報では、このようなエンテロトキシンを原因食品から迅速且つ的確に検出することを目的として、先ずB型エンテロトキシン(ETB)の精製法及び検出法について検討したので報告したい。

II 実験材料と実験方法

A ETBの精製法と抗毒素血清作成

1. 使用菌株: 都立衛研より分与された *S. aureus* C-243株。菌株は半流動寒天培地に接種し、4°Cに保存。供試する場合はハートインフュージョンブロス(HIB)で18時間培養後、スタヒロ110寒天平板で48時間培養し、S状コロニーを選択分離し、タネ培養に供した。タネ培養はHIBで37°C18時間静置培養。

2. ETB産生培養とETB精製法: 使用培地は3%ポリペプトン(大五栄養化学)、3%ラクトアルブミン水解物(和光)、0.0001%thiamin、0.00005%niacinの液体培地(pH6.8)である。ETB産生培養は液体培地1,500mlにタネ培養菌液10mlを接種し、37°C24時間、振巾5cm、振盪回数110~120回/分の条件で振盪培養し

た。培養後、4°C、5,000 r.p.m., 30分間遠心した上清をザイツ沝過器で沝過滅菌し、これをETB精製の出発材料とした。

精製は三つのステップで行なった。すなわち、ステップIはAmberlite CG-50によるカラムクロマトグラフィー、ステップIIはセファデックスG-75によるゲル沝過、ステップIIIはcarboxy methyl (CM)-セルローズによるカラムクロマトグラフィーである。最終ステップで得られた精製毒素は2mgずつ凍結乾燥保存し、以後の実験に供した。

3. 紫外線連続吸収スペクトルの測定: 東洋科学エビコン540M型を用い、280m μ で測定した。

4. タンパク質の定量: Kabat, E, A, et al(1967¹⁾)のビュレット法によって555m μ で比色定量した。

5. B型抗毒素血清: 都立衛研より分与されたB型毒素家免疫血清1mlを標準抗血清として用いた。自家製の抗ETB血清は次の如く二種類作成した。

a) ETB精製の出発材料(粗毒素)に対する抗血清の作成を以下の方法で行った。粗毒素2mlを Freund の complete adjuvant 2ml でエマルジョン化したものを家兎(体重2.5kg)の皮下に注射し、2, 3, 4週間目に粗毒素2mlずつ皮下に追加免疫した。最終免疫後1週間目に採血し、この抗血清を精製純化の指標に用いた。

b) 前述の方法で精製したETBに対する免疫血清を作製した。すなわち、最終ステップで得た精製ETB 1ml (0.2mg/ml) を Freund の complete adjuvant 1ml でエマルジョン化したものを家兎(体重2.5kg)の足蹠及び皮下に1mlずつ接種後、更に2, 3, 4, 5, 6, 及び7週間目に1ml (0.2mg/ml) ずつ皮下に追加免疫した。最終免疫後1週間目に採血した。抗血清はすべて使用時迄、-20°Cに保存した。

6. 寒天ゲル内沈降反応: Ouchterlony法で行なった。ペロナール緩衝液(pH8.6, $\mu=0.05$)にSpecial Nobel Agar (Difco)を1.5%加えた寒天ゲルを6×7.5cmのスライドグラスに6mlのせて寒天プレートを作っ

*秋田県衛生科学研究所 試験検査部 細菌科
***秋田大学医学部中央機器センター

**秋田大学医学部微生物学教室
****東北大学医学部細菌学教室

た。ウェル間隔は3mm。ゲル内沈降反応は、37°C、24時間及び4°C、72時間行ない、経時的に沈降線を観察した。

7. 免疫電気泳動法：上述の方法で調整した寒天プレートを用いて行なった。泳動条件は2mA/cm、1時間泳動後、37°C、24時間及び4°C、72時間、経時的に沈降線を観察した。

B ETB感作赤血球調製法

Avrameas S. et al (1967²) の方法に従った。すなわち、アルセー液保存の羊赤血球をリン酸緩衝食塩水 (PBS, pH7.2) で3回遠心洗浄した沈渣血球0.8mlをPBS (pH7.2) 10mlに再浮遊し、2.5% glutaraldehyde溶液0.7mlを加え、室温でゆるやかに攪拌。

つづいて、ETB 1ml (2mg/ml) を加え、更に1時間攪拌後、牛血清アルブミン (BSA) を0.1%に添加したPBS (pH7.2) で2,000 r.p.m (670×g)、5分間ずつ3回遠心洗浄。最終遠心後、上清を捨て、0.1%BSA-PBS 10mlに再浮遊し、窒化ナトリウムを終末濃度0.01%にして加えたものをETB感作血球として、4°C、-20°C凍結、又は凍結乾燥状態で保存し以下の実験に供した。

C 間接赤血球凝集 (PHA) 試験法 と間接赤血球凝集阻止 (PHAI) 試験法

1 PHA試験法

すべてマイクロタイター法に従って行なった。すなわち、 Δ U、プレートを用い、0.1%BSA-PBSで抗ETB血清0.025mlを2倍系列希釈した。この抗ETB血清はA-5-b項で作製した、精製ETBに対する抗血清である。続いて、0.1%BSA-PBSを0.025ml添加し、更に1%ETB感作血球液0.05ml加えて振盪し、37°C、2~3時間静置後、PHA価を判定した。

2 PHAI試験法

PHA試験法と同様、 Δ U、プレートを用い、先ず、0.1%BSA-PBSでETB 0.025ml (20 μ g/ml) を2倍系列希釈し、PHA抗体4単位/mlの抗ETB希釈血清を0.025mlずつ添加。振盪後、37°C、1時間放置してから1%ETB感作血球液を0.05ml加えて、振盪し、37°C、2~3時間静置後、PHAI価を判定した。

又、このPHAI試験に用いたETB希釈液と抗ETB血清とで、Ouchterlony法によるゲル内沈降反応を行ない、その力価を比較した。

以上の方法に従って、供試検体 (種々の培地で培養し

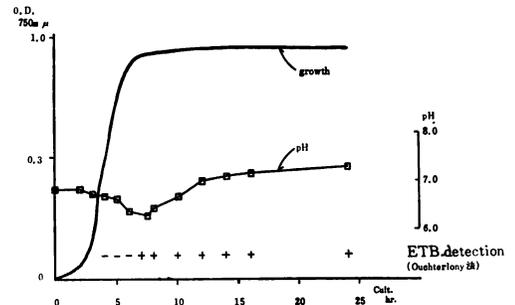
たETB産生培養液) 中からのETBの検出を検討した。

III 実験成績

A ETBの精製

S. aureus C-243株の増殖曲線とETB産生との相関

図1 S. aureus C-243株の増殖曲線とETB産生

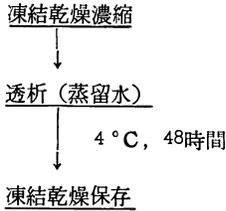


を図1に示した。すなわち、対数増殖期から静止期に入る培養7時間目からETBが検出され始め、少なくとも24時間目まで検出されたので、24時間培養のものを毒素精製の出発材料とした。pHは培養6~7時間後に最も低下し、この時点からETBが検出され始めた。

次にETBの精製ステップは表1に示す如くである。

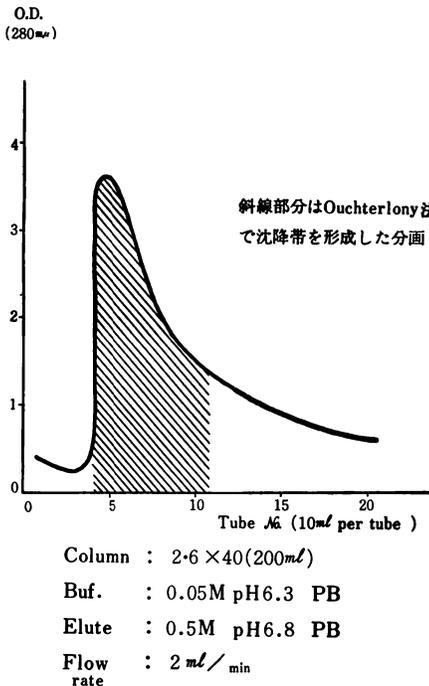
表1 プドウ球菌エンテロトキシンBの精製過程

ステップ I	S. aureus C-243株培養液 ↓ 同量の蒸留水を添加 ↓ H ₃ PO ₄ でpH6.3に調整 ↓ Amberlite CG-50 ↓ 1) 0.05M, リン酸緩衝液 (pH 6.3) で吸着 ↓ 2) 0.25M NaCl 加 0.5M, リン酸緩衝液 (pH6.8) で溶出 ↓ 凍結乾燥濃縮
ステップ II	蒸留水添加 ↓ セファデックスG-75 ↓ 0.01M, リン酸緩衝液 (pH6.2) で溶出
ステップ III	CM-セルロース ↓ 1) 0.01M, リン酸緩衝液 (pH 6.2) で吸着 ↓ 2) 0.1M, リン酸緩衝液 (pH6.8) Linear gradient elution



ステップ I : C243株の培養液1,000mlに蒸留水1,000ml加え, 1Nリン酸でpH6.3に調整した後, 20gのAmberlite CG-50を0.05M, pH 6.3のリン酸緩衝液(PB)で平衡化したレジンに加え, 室温で30分間攪拌し, ETBをレジンに吸着させた。これを2.6×40cmカラムに充填して, 400ml蒸留水で洗浄し, その後, 0.25M NaClを含む0.5MPB (pH6.8)で溶出し, 10mlずつフラクションを採取した結果, 図2に示す如きパターンが得られた。図の斜線部分はOuchterlony法で抗原の

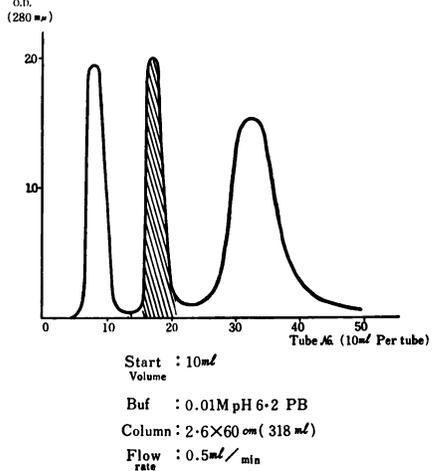
図2 ステップ I Amberlite CG-50カラムクロマトグラフィー



検出されたフラクションであるが, これをステップ I 精製として採取した。このステップで出発材料中のETBの約80%は回収された。採取画分は混合して, 凍結乾燥した後, 10mlの蒸留水に溶解した。

ステップ II : 2.6×60cmカラムにPBS 0.01M, pH 6.2で平衡化したセファデックスG-75をつめ, これにステップ I の画分を添加後, 同緩衝液でゲル濾過し, 10mlずつフラクションを採取した。溶出曲線は図に示す如

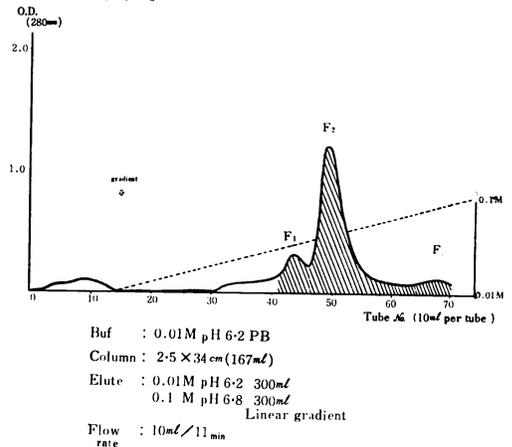
図3 ステップ II セファデックスG-75ゲル濾過



くであるが, このステップで, ETBは約60%回収された。得られた画分はA-5-a項の粗毒素抗毒素血清に対して2~3本の沈降線を形成した。

ステップ III : 2.5×34cmカラムにPB (0.01M, pH

図4 ステップ III CMセルローズカラムクロマトグラフィー



で平衡化したCM-セルローズを充填し, ステップ II 画分の試料を流して, ETBを吸着させ, 同緩衝液で洗い, 280mμによる紫外線吸収が0になったところで, 0.01M, pH6.2のPB 300mlと0.1M, pH 6.8のPB 300mlとでLinear gradient elutionを行なうと, 図4の画分が得られた。三つの画分(F₁, F₂, F₃)をそれぞれ標準抗血清を用いて免疫電気泳動を行なった結果, いずれもわずかず極側にずれて, 1本の沈降線を形成した。又, Ouchterlony法ではこれら画分のバンドは連結した。又, A-5-a項の粗毒素抗毒素血清とのゲル内沈降反応でも1本の沈降線のみを形成した。そこで, 三つの画分をプールし, 凍結乾燥した後, 蒸留水9mlに溶解し, 続いて蒸留水で4°C, 48時間透析した後, 再

び凍結乾燥して、4°Cに保存した。最終標品のETB回収率は出発材料に対して約36%であった。

B PHA及びPHAI試験成績

まずETBの至適感作濃度は表2に示す如くであった

表2 [ETB感作濃度によるPHAパターン]

抗体希釈 抗原濃度/2.5ml	×1,600	3,200	6,400	12,800	25,600	51,200	食塩水
1.2 mg	+	+	-	-	-	-	-
0.8	+	+	+	-	-	-	-
0.4	+	+	+	+	+	-	-
0.2	+	+	+	-	-	-	-
0.08	+	+	+	-	-	-	-
0.0	-	-	-	-	-	-	-

すなわち、ETB0.4mg (per 2.5ml) で羊赤血球を感作した場合、25,600倍のPHA抗体価を得たので、この抗原濃度の感作血球を以後の試験に供した。

次に、ステップⅢで得られたETBとB型抗毒素血清(A-5-6項)とによるPHAIボックスパターンを表3に示した。すなわち、ETB409,600倍希釈液は25,

表3 [PHAI法によるETB検出パターン]

抗原希釈 (※) 抗体希釈	×3,200	6,400	12,800	25,600	51,200	102,400	204,800	409,600	対照 (食塩水)
× 800	-	-	-	+	+	+	+	+	+
1,600	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3,200	-	-	-	-	-	+	+	+	+
6,400	-	-	-	-	-	-	+	+	+
12,800	-	-	-	-	-	-	-	+	+
25,600	-	-	-	-	-	-	-	-	+
51,200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
対照 (食塩水)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

※(抗原原液：精製エンテロトキシンB 2mg/ml)

600倍の抗血清のPHAを完全に阻止し、直線的なPHAIパターンが得られた。すなわち、PHAI法による

ETBの最小検出濃度は409,600倍であり表4に示すOuchterlony法によるETBの最小検出濃度1,600倍と比較

表4 [ゲル内沈降反応(Ouchterlony)によるETB検出パターン]

抗原希釈 抗体希釈	× 100	200	400	800	1,600	3,200	対照 (食塩水)
× 10	+++	++	+	-	-	-	-
20	+++	++	+	-	-	-	-
40	++	+	+	+	-	-	-
80	+	+	+	+	+	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-
160	-	-	-	-	-	-	-
対照 (食塩水)	-	-	-	-	-	-	-

抗原原液：2mg/ml精製エンテロトキシンB

すると、PHA I 試験による E T B の検出感度は明らかに鋭敏であった。

そこで、試料中の E T B 検出を 4 単位の PH A 抗体を用いた PH A I 試験と Ouchterlony 法との二方法で比較検討した結果、表 5 の成績が得られた。すなわち、PH A I 法による E T B の検出感度は Ouchterlony 法より 8~16 倍高かった。

表 5 ゲル内沈降反応法及び PH A I 法による培養液中の E T B 検出感度の比較

試料	Ouchterlony (A)	凝集阻止反応(B)	感度比(B/A)
A	× 80 *	× 1,280 **	16
B	160	2,560	16
C	40	640	16
D	20	160	8
E	40	320	8

* 第 3 表で最適比を示した抗 E T B 血清(×80)に対して沈降線を形成する培養液の最高希釈倍数の逆数

** 4 単位の PH A 抗体を含む抗 E T B 血清に対して PH A I 陽性を示した培養液の最高希釈倍数の逆数

V 考 察

E T B 産生培地について、Schantz, E. J. et al (1965³) は 1% NZ—Amine (Sheffield Chem., Co) と 1% PHP (Meade Johnson & Co.) の液体培地 (pH 6.5), 又, Reiser, R. F. and Weiss, K. F. (1969⁴) は 3% NZ—Amine と 3% PHP の液体培地 (pH 6.8) を報告しているが、我々は上述の方法で E T B の産生を試みた結果、これらに匹敵し得る E T B が産生された。そして、対数増殖期から静止期に移項する時期に E T B が検出され且つこの時期に pH が最も低下した事は Mclean, R. A. et al (1968⁵) や Morse, S. A. et al (1969⁶) の報告と一致していた。また、この培養液中の E T B の量 (85 μ g/ml) は Reiser, R. F. et al (1969⁴) の報告するものに近い値を示した。

E T B 精製方法についてみると、Schantz, E. J. et al (1965³) はクロマトグラフィー法による精製方法を報告しているが、我々はこの方法に若干の改良を加えて行なった結果、上述の如く物理化学的に差異を示す三つの分画 (F₁, F₂, F₃) が得られたが、これらは免疫学的 (免疫電気泳動法及び Ouchterlony 法) には同一と考えられた。この様な事象は寺山 (1971⁷) の報告にも見られ、いわゆる charge isomer と考えられる。

次に E T B の検出方法についてみると、抗原蛋白の赤血球感作方法は、Boyden, S. V. (1951⁸) 等のホルマリン、タンニン酸処理方法や Avrameas et al (1969²) の glutaraldehyde の処理方法など、数多く報告されているが、我々は glutaraldehyde 法を用いて、簡便に、安定した感作血球を作製し得た。この感作血球液は長期的な凍結保存や凍結乾燥保存が可能であり、この間の力価の変動はみられなかった。

PH A I 試験の検出感度は表 5 に見られる様に、Ouchterlony 法と比較して 8~16 倍高かったが、ブロック用の PH A 抗体を 4 単位/ml のかわりに 2 単位で使用すると更に感度が高まる可能性が表 3 に示す PH A I ボックスパターンから示唆された。PH A I 法による E T B の最小検出量は約 0.01 μ g/ml と計算されるが、これは Morse, S. A. and Mah, R. A. (1967⁹) の PH A I 試験成績で得た 0.4 μ g/ml よりも高感度であった。このように PH A I 法はゲル内沈降反応による検出方法 (Fungy, D. Y. C. et al, 1971¹⁰) よりも、迅速且つ鋭敏性という点において優れていることが再確認されたことから、我々は今後実際の食中毒原因食品からの E T B 検出を試みると共に他の A, C, D, E 型エンテロトキシンについても検討していく考えである。

VI ま と め

ブドウ球菌 E T B の精製法と検出法について検討し、次の結論を得た。

1. S. aureus C—243 株の培養液から Amberlite CG 50 カラムクロマトグラフィー法、セファデックス G—75 のゲル濾過法及び CM セルローズのカラムクロマトグラフィー法によって免疫学的に同一な E T B を抽出精製し得た。E T B の最終ステップでの回収率は約 36% であった。

2. 精製 E T B を家兎に免疫し PH A 抗体価 25,600 倍の抗 E T B 家兎免疫血清を作成し得た。

3. PH A 及び PH A I 試験に用いる E T B 感作血球は glutaraldehyde 処理方法の場合、0.4mg/2.5ml の精製 E T B を赤血球に感作して調製する方法が至適であった。又、この感作血球液は凍結あるいは凍結乾燥で長期間保存しても力価は殆んど低下しなかった。

4. PH A I 試験の E T B 最小検出量は約 0.01 μ g/ml で Ouchterlony 法より 8~16 倍高感度であり、本法によって食中毒原因食品中の E T B を検出することが可能と考えられた。

VI 文 献

1. Kabat, E.A. and Mayer, M.M. : Experimental Immunochemistry, 2nd. Ed., Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Illinois, U.S.A., Chap. 27, 559, (1967) .
2. Avrameas, S., Taudou, B. and Chuilon, S. : Glutaraldehyde, cyanuric chloride and tetraazotized o-dianiline as coupling reagents in the passive hemagglutination test, *Immunochemi.*, 6, 67, (1969) ,
3. Schantz, E.J., Roessler, W.G., Wagman, J., Spero, L., Dunny, D.A. and Bergdoll, M. S. : Purification of staphylococcal enterotoxin B, *Biochem.*, 4, 1011, (1965) .
4. Reiser, R.F. and Weiss, K.F. : Production of staphylococcal enterotoxin A, B, and C in various media, *Appl. Microbiol.*, 18, 1041, (1969)
5. Mclean, R.A., Lilly, H.D. and Alford, J.A. . : Effects of meat-curing salts and temperature on production of staphylococcal enterotoxin B, *J. Bacteriol.*, 95, 1207, (1968) .
6. Morse, S.A., Mah, R.A. and Dobrogosz, W. J. : Regulation of staphylococcal enterotoxin B, *J. Bacteriol.*, 98, 4, (1969) .
7. 寺山武 : ブドウ球菌エンテロトキシンに関する最近の知見, *日本細菌学雑誌*, 26, 611, (1971) .
8. Boyden, S.V. : The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by anti-protein sera, *J. Exp. Med.*, 93, 107, (1951)
9. Morse, S.A. and Mah, R.A. : Microtiter hemagglutination-inhibition assay for staphylococcal enterotoxin B, *Appl. Microbiol.*, 15, 58, (1967)
10. Fung, D.Y.C. and Wagner, J. : Capillary tube assay for staphylococcal enterotoxin A, B, and C, *Appl. Microbiol.*, 21, 555, (1971) .