

令和元年6月17日現在

機関番号：84407

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15249

研究課題名(和文) 質量分析計を用いて黄色ブドウ球菌エンテロトキシン食中毒の実態を解明する

研究課題名(英文) Elucidation of the actual situation of Staphylococcal food poisoning using LC-MS/MS-based simultaneous analytical method for quantification of six Staphylococcal enterotoxins

研究代表者

吉光 真人 (Yoshimitsu, Masato)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：70321940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ブドウ球菌エンテロトキシンを消化したペプチドを用いて、6種類の毒素の一斉分析法を確立した。本分析法は、BHI培地培養上清および牛乳に含まれる6毒素の分析が可能で、分析法の妥当性が確認された。また、従来法では検査できなかったH型毒素の定量が可能であり、従来法と同等の性能を持つことが示された。今回、タンパク質を豊富に含む牛乳という試料で分析法を確立できたことから、様々な食品での検査に用いることが可能と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、食中毒原因毒素として報告がある一方、今まで検査が困難であったH型毒素についての検査法を確立した。また、6種類の毒素を一斉分析可能な方法を確立することで、効率的に検査を行うことが可能となった。本分析法で用いたLC-MS/MSは地方衛生研究所等で残留農薬検査等に広く用いられている分析機器である。したがって、今回確立した分析法は、地域の衛生行政を担う地方衛生研究所で実施可能な方法であり、黄色ブドウ球菌食中毒が疑われる事例に他の検査法と共に用いられることで、現在よりも適切に食中毒事例に対応できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Simultaneous analysis of six staphylococcal enterotoxins was established using tryptic digestion coupled with LC-MS/MS. This analysis method was able to analyze 6 toxins contained in the supernatant of brain heart infusion broth and milk, confirming the validity of the analytical method and it was shown to have the same performance as the conventional method. In addition, it was possible to quantify Staphylococcal enterotoxin H which could not be examined by the conventional method. Now that the analysis method has been established using protein-rich milk samples, it could be used for analysis method in a variety of foods.

研究分野：食品化学

キーワード：ブドウ球菌エンテロトキシン 黄色ブドウ球菌 LC-MS/MS ペプチド 一斉分析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ブドウ球菌エンテロトキシン (SEs: Staphylococcal enterotoxins) は黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) が産生する分子量約 27,000 のタンパク毒素である。SEs には食中毒の原因となる 11 種の抗原型毒素 (A 型～E 型、G 型～I 型、R 型～T 型) が存在する。SEs は熱や酵素に対して安定で、2000 年の雪印乳業食中毒事例を含め、大規模食中毒を起こすことがある。

黄色ブドウ球菌は毒素型食中毒の原因菌である。したがって、黄色ブドウ球菌や SEs 遺伝子の検出も重要であるが、食中毒の確定診断には原因食品からの SEs の検出、抗原型の特異性、定量値が最も重要である。現在の検査対象毒素は、免疫学的手法に基づく市販キットの検出対象である A 型～E 型毒素 5 種類である。一方、近年ではキットで検出できない毒素による食中毒事例が発生している。また、食中毒事例の分離株のうち、約 5% は A 型～E 型毒素以外の毒素遺伝子のみを持つとされており、これらの毒素を原因とする食中毒事例に対応するための検査法が必要である。しかし、免疫学的手法を用いてこれらの毒素に対する検査法を作製するためには、抗体の作製やその組み合わせの検討、ブロッキング剤の選定等、半年以上の長期間にわたる煩雑な作業と高額な費用が必要である。さらに、抗体を作製するための動物実験を行う施設および様々な経験を必要とし、検査法構築は容易ではない。また、黄色ブドウ球菌食中毒では複数種類の SEs に対して個別かつ一斉に検査対応するため、高い信頼性と効率性を備えた分析法が求められる。しかし、市販キットを含めた免疫学的手法では、特定の毒素のみを検出する特異的抗体を用いる。そのため、複数種類の SEs を検査する際、多種類のキットを用いる必要があり、操作が煩雑となる。

そこで、毒素を酵素消化して生じるペプチドを測定対象とし、ペプチド固有の質量を指標に測定可能な質量分析計を用い、市販キットのない G 型～I 型、R 型～T 型毒素を含めた、SEs 全 11 種類を一斉分析することを考えた。この手法では、コンピュータ上で毒素の酵素消化後のペプチドの特定、またそのペプチドに対する分析条件の構築が可能である。そのため、免疫学的手法と比較して、市販キットのない毒素に対する分析法を開発することは容易である。また、一回の測定で多数の毒素を定量可能であり、免疫学的手法の操作の煩雑さを解消できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、市販キットのない G 型～I 型、R 型～T 型毒素に対する検査法の構築と合わせて、従来まで免疫学的手法で検査されていた A 型～E 型毒素を含めた全 11 種類の毒素を一斉分析可能な方法を構築し、SEs 食中毒に迅速、適切に対応し、その実態を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 試料: 牛乳は市販品を用いた。

(2) 標準品: A 型～E 型毒素は Toxin Technology 製を用いた。H 型毒素は Cusabio 製を用いた。毒素は水に溶解し、水溶液として実験に用いた。実験に用いるまでは小分けし、-20℃ で冷凍保存した。

(3) 試薬、器具等: brain heart infusion (BHI) 培地は Becton, Dickinson and Company 製を用いた。トリプシンは Thermo Fisher Scientific 製を用いた。塩酸、水酸化ナトリウム、クロロホルム、アセトニトリル、ギ酸は富士フィルム和光純薬株式会社製を用いた。遠心式限外ろ過フィルターは Merck Millipore 製を用いた。固相カートリッジカラムは Waters 製を用いた。遠心エバポレータは東京理化学器械株式会社製を用いた。精製水は Merck Millipore 製 Milli-Q 純水製造装置で精製した水 (比抵抗値 18.2 MΩ・cm) を用いた。

(4) 分析装置 (LC-MS/MS)

ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-S (Waters 製, TQ-S)

NEXERA (LC: 島津製作所製)、4000QTRAP (MS/MS: SCIEX 製, 4000Q)

分析条件

TQ-S: LC カラム: ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 μm, 2.1 mm x 100 mm, Waters 製), カラム温度: 50℃, 注入量: 2 μL, 移動相: A 液 0.1% ギ酸, B 液 0.1% ギ酸アセトニトリル, グラジエント分析, イオン化モード: ESI(+), 測定モード: scheduled MRM

4000Q: LC カラムからイオン化モードまで TQ-S と同じ、測定モード: IDA

(5) 試験液調製: BHI 培地: 遠心式限外ろ過フィルターを用いて、ろ過滅菌した培養上清を濃縮後、還元、アルキル化処理を行い、トリプシンで消化した。消化液を固相カートリッジカラムを用いて精製した。遠心エバポレータを用いて精製液を乾固し、10% アセトニトリル水溶液に再溶解して試験液とした。

牛乳: 牛乳に塩酸を加えた後、遠心上清を水酸化ナトリウムで中和し、クロロホルムで脂質を除去した。その溶液を遠心式限外ろ過フィルターを用いて濃縮した。以降は BHI 培地と同じ操作を行った。

(6) 性能評価: 25, 50, 100, 250 ng/mL の濃度となるように、BHI 培地培養上清へ A 型～E 型および H 型毒素 (6 毒素) を添加した。また、0.5, 1, 2.5, 5, 10 ng/mL の濃度となるように、牛乳へ 6 毒素を添加した。添加回収試験を、1 名の実験者が 1 日 2 併行、5 日間の実験を行う性能評価を計画した。得られたデータから一元配置分散分析を用いて併行精度 (%), 室内精度 (%) を算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) SEs 消化・分析条件の確立

SEs は消化酵素抵抗性の性質を持つため、通常の消化条件では消化されなかった。そこで、消化促進剤を用いる条件で検討したところ、全ての SEs が消化された。その後、毒素水溶液消化物を 4000Q で分析した。分析データを MASCOT Server の MS/MS Ion Search で解析し、得られたペプチドシーケンス情報からそれぞれの毒素のペプチドと分析条件の情報を得た。続いて、NCBI の Protein BLAST でデータベースと照合し、毒素特異的なペプチドを選択した。その後、TQ-S を用いて毒素消化液を分析し、感度の良いペプチドと分析条件を決定した。検量線は 10 ng/mL から 500 ng/mL の範囲で良好な直線性を示した。

##### (2) BHI 培地に含まれる SEs 分析法の検討

BHI 培地培養上清をろ過滅菌後、培地を限外ろ過スピンカラムで 10 倍程度に濃縮し、濃縮液全量をそのまま消化する手法を採用した。この消化物を測定したところ、毒素水溶液消化物の分析値と比較し、毒素の定量下限値が高くなった。これは、培地に含まれる夾雑成分により、毒素由来のペプチドのイオン化が阻害されることが原因と考えられた。そこで、夾雑成分の除去および試験液の再濃縮を目的として、固相カートリッジカラムによる精製と、遠心エバポレータによる精製液の濃縮を検討した。その結果、定量下限値を 10 ng/mL まで下げることができた(図 1)。

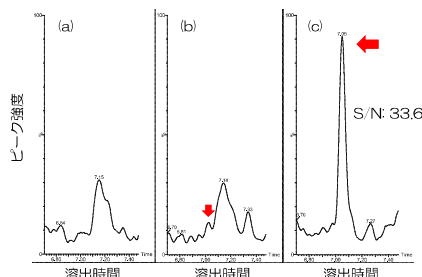


図1. BHI培地培養上清消化物のクロマトグラム  
(a)毒素添加なし (b)A型毒素10 ng/mL添加  
(c)A型毒素10 ng/mL添加し、消化物を精製濃縮した

また、BHI 培地由来成分の影響を受け、測定対象としていたペプチドのピーク面積値が減少し、定量下限値を分析することが困難となる場合があった。そこで、毒素を含まない BHI 培地培養上清から試験液を調製し、その溶液に毒素水溶液消化物を添加、混合したものを用いて、再度、感度の良いペプチドを選定し、分析条件を最適化した。

一方、培地に含まれる夾雑成分の影響により、毒素水溶液消化物と比較し、毒素の消化効率および固相カートリッジカラム精製時の回収率が大幅に低下した。その結果、同一濃度の毒素が含まれる場合でも、毒素水溶液消化物と、培地中毒素の消化物で毒素由来ペプチドのピーク面積値に大きな差が見られ、正確な毒素の定量値算出が困難となることが予想された。そこで、検量線用毒素標準溶液を培地に添加し、試料と同様に処理することで定量値を補正する手法を採用した。この手法で得られた検量線は、10 ng/mL から 500 ng/mL の範囲で良好な直線性を示した(図 2)。

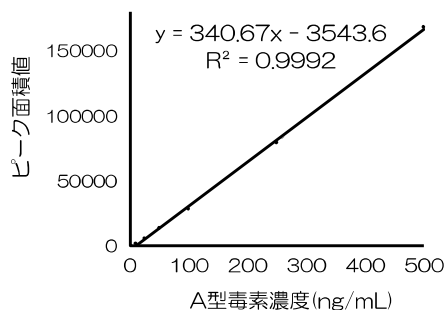


図2. BHI培地培養上清中のA型毒素検量線

BHI 培地培養上清中の 25、50、100、250 ng/mL の濃度で含まれる 6 毒素分析法として本分析法の性能を評価した。その結果、食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン([http://www.nihs.go.jp/food/group3/validation\\_guideline.pdf](http://www.nihs.go.jp/food/group3/validation_guideline.pdf))記載の目標値を満たし、本分析法の妥当性が確認された。A 型毒素の結果を表 1 に示した。また、毒素が含まれる培地について、従来法である逆受身ラテックス凝集反応および本分析法で測定し、定量値を比較したところ、概ね同等の数値であった。さらに、本分析法を用いて培地中の H 型毒素の検出、定量が可能であった。

表1. BHI培地培養上清を用いた分析法性能評価結果

	添加濃度 (ng/mL)	真度 回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
A型毒素	25	108.3	5.1	7.0
	50	97.6	7.1	8.5
	100	94.0	5.4	6.7
	250	93.4	12.2	12.2

以上から、本分析法は従来法と同等の性能を持ち、かつ分析法としての性能が保証された分析法であることが示された。また、従来法では不可能であった、BHI 培地培養上清中の H 型毒素の定量および 6 毒素の一斉分析が可能で、有用な検査法であることが示された。

##### (3) 牛乳に含まれる SEs 分析法の検討

BHI 培地培養上清中の 6 毒素一斉分析法を参考にして、牛乳中の毒素分析法を検討した。牛乳の前処理法は[公衛研法] (<http://www.iph.pref.osaka.jp/report/kenkoukiki/12nendo/4kensahou.pdf>)を参考にした。BHI 培地同様、毒素水溶液消化物と比較して定量下限値の上昇

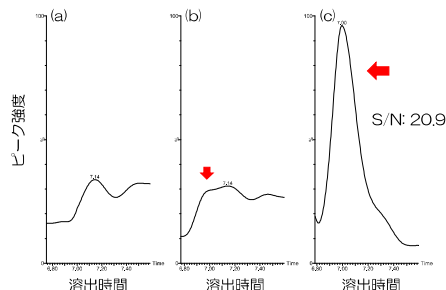


図3. 牛乳消化物のクロマトグラム  
(a)毒素添加なし (b)A型毒素0.25 ng/mL添加  
(c)A型毒素0.25 ng/mL添加し、消化物を精製濃縮

が見られたため、固相カートリッジカラム、遠心エバポレータを用いて消化液の精製、濃縮を実施した。その結果、定量下限値は0.25 ng/mLとなった(図 3)。また、毒素を含まない牛乳から得られた試験液に毒素水溶液消化物を添加、混合した溶液を用いて、ペプチドの再選定と分析条件の最適化を実施した。さらに、検量線用毒素標準溶液を牛乳に添加し、試料と同様の前処理を行うことで定量値を補正した。この手法で得られた検量線は、0.25 ng/mL から 25 ng/mL の範囲で良好な直線性を示した(図 4)。

牛乳に含まれる 0.5、1、2.5、5、10 ng/mL の濃度の 6 毒素分析法として本分析法の性能を評価した。その結果、BHI 培地培養上清と同様にガイドラインの目標値を満たし、添加した 5 濃度(E 型毒素については1、2.5、5、10 ng/mL の 4 濃度)での本分析法の妥当性が確認された。A 型毒素の結果を表 2 に示した。

以上から、本分析法は牛乳を試料とした分析法として性能が保証された。また、その定量下

限値は 0.5 ng/mL(E 型毒素は 1 ng/mL)で、従来法と同程度であった。さらに、従来法では不可能であった、牛乳に含まれる H 型毒素の定量および 6 毒素の一斉分析が可能であり、有用な検査法であることが示された。

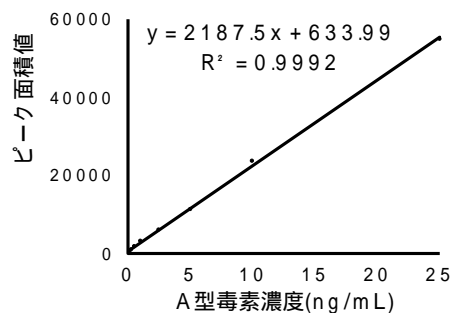


図4. 牛乳中のA型毒素検量線

表2. 牛乳を用いた分析法性能評価結果

	添加濃度 (ng/mL)	真度 回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
A型毒素	0.5	98.5	7.6	10.1
	1.0	95.5	6.8	9.4
	2.5	97.3	5.3	9.3
	5.0	103.3	3.8	8.1
	10.0	100.6	7.8	13.0

## 5 . 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

- (1) 吉光真人、余野木伸哉、川津健太郎、梶村計志、LC-MS/MSを用いたブドウ球菌エンテロトキシン分析法の検討、第113回日本食品衛生学会学術講演会、東京、2017、11月
- (2) 吉光真人、余野木伸哉、川津健太郎、梶村計志、ブドウ球菌エンテロトキシン機器分析法の検討、日本食品衛生学会近畿地区勉強会、大阪、2018、3月
- (3) 吉光真人、余野木伸哉、川津健太郎、角谷直哉、梶村計志、LC-MS/MSを用いたブドウ球菌エンテロトキシン一斉分析法の検討、第55回全国衛生化学技術協議会年会、横浜、2018、11月

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。