

平成 15 年度農林水産省
食品製造工程管理
情報高度化促進事業

平成 15 年度 病原微生物データ分析実験作業 成果報告書

「生乳及びカマンベールチーズ中の
ブドウ球菌由来エンテロトキシン検査法」

平成 16 年 2 月

岩手大学
品川邦汎教授

生乳及びカマンベールチーズ中のブドウ球菌由来エンテロトキシン検査法

研究分担名 : 品川邦汎 (岩手大学)

要約

生乳及びチーズ(カマンベール)中のエンテロトキシン A 型(SE-A)の検出法を、TCA(トリクロロ酢酸)濃縮法¹⁾を応用し、各製品中での検出感度について VIDAS SET2(日本ビオメリュー)を用いて検討した。SE-A 濃度及び回収率を算出するため検量線についても作成した。TCA 濃縮法を用いた生乳中の SE-A の回収率は、各施設で 10.8~18.2%と低かったが、チーズ中の SE-A の回収率は 50.6~72.6%と良好な結果が得られた。又、TCA 濃縮法のどの調製段階で SE-A の回収の低下を引き起こしているのか検証したところ、TCA の添加後に原因があることが確認された。しかし、特に生乳に強くその傾向が確認されたことから TCA 以外にも SE-A の回収率の低下させる原因があるのではないかと考えられた。生乳の TCA 濃縮法についてはさらに検討が必要である。

研究者名

- ◆ 楠美敬子
小岩井乳業株式会社 小岩井工場
- ◆ 辻本義憲
明治乳業株式会社 食品開発研究所
- ◆ 藤田康弘
キリンビール株式会社 開発研究部 食品安全センター
- ◆ 山縣 尚
日本ビオメリュー株式会社

緒言

ブドウ球菌は人、動物の皮膚、粘膜やそれを取り巻く環境に広く存在する菌である。ブドウ球菌による食中毒は、食品中に含まれる、主に黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)が増殖する際に産生するエンテロトキシンを人が食物と一緒に摂取することで起こる。食中毒を起こす摂取量は個体差によって異なるが約 100ng 以上^{2,4,5,6,7)}からと言われており、主に A 型のエンテロトキシンによるものである。平成 12 年に大手乳業メーカーでエンテロトキシンによる大規模な食中毒事件が発生したが、その時の毒素型も A 型であったことが後に報告された。実際はその時点で検査法が確立されておらず、市販の検査キットで推奨されていた方法をもとに各研究者が独自に手を加え検査が行われた。VIDAS SET(ビオメリュー社)は、その時に用いられた検査キットの 1 つでバイダス(自動免疫蛍光測定装置)を使った全自動測定が行える唯一の方法である。その後、検査法の開発が行われ平成 14 年 2 月 14 日に、厚生労働省から正式に検査法が通達された。本試験で用いられている VIDAS SET2 は、VIDAS SET にさらに改良が加えられ感度・特異性を上げることに成功したもので、従来ではその測定が困難だとされてきた生乳及びチーズの検査に用いることができる可能性がでてきた。本試験では、

検出用キットに VIDAS SET2 を使用し、生乳（未殺菌乳）及びチーズ中のエンテロトキシンの検出を現行法の加工乳（殺菌乳）からのエンテロトキシン検査法と同等の感度で行うことができる検査法の開発に繋げるものである。

材料と方法

【材料】

- 生乳

生乳はタンクローリーで明治乳業（以降 M 社とする）及び小岩井乳業（以降 KW 社とする）に搬入されたものから採取した。M 社の生乳はそれぞれ M 社及び日本ビオメリュー（以降 B 社とする）で、KW 社の生乳はそれぞれ KW 社及びキリンビール（以降 K 社とする）で本実験に使用した。

- チーズ

KW 社製及び M 社製のカマンベールタイプのチーズを使用した。M 社製のチーズはそれぞれ M 社及び B 社で、KW 社製のチーズはそれぞれ KW 社及び K 社で本実験に用いた。

- エンテロトキシン A (SE-A)

本実験に用いたエンテロトキシンは、トキシテクノロジー社製の精製 A 型エンテロトキシン (SE-A、AT101) を使用し、B 社で調製した同一ロット (10 µg/mL を 100 µL) を各検討施設に配布した。

- 0.3M Tris buffer pH8.0

トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Wako 204-07885) 3.7g に滅菌精製水 90ml を加えて溶解し、5N HCl で pH 8.0 ± 0.1 に調製後、滅菌精製水で 100ml に調製したものを使用した。

- TCA 溶液

TCA (トリクロロ酢酸:Wako 204-02405) 90g に滅菌精製水 48ml を加えて室温で 30 分攪拌し、完全に溶解したものを TCA 濃縮法に使用した。

- VIDAS SET2

ブドウ球菌エンテロトキシン A ~ E 型の B 社製の検出用試薬を本実験に使用した。

- VIDAS

B 社製の自動免疫蛍光測定装置を、VIDAS SET2 の測定機器として本実験に使用した。

【方法】

1. 検量線の作成

1-1. 0.3M Tris buffer pH8.0 を用いた SE-A の検量線

0.3M Tris buffer pH8.0 で SE-A を各 0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0ng/mL の濃度に調製し、VIDAS SET2 で 2 重測定した。VIDAS SET2 の測定は、調製試料 500 µL を反応に必要な試薬が封入された試薬ストリップのサンプルウェルに入れバイダスのトレイにセットし、同時にトレイ上部のブロックに抗エンテロトキシン抗体を固相したスパーをセットして測定を開始した。実際の反応過程は、スパーが試験サンプルを吸引して目的の抗原 (SE-A) をスパー内壁の特異抗体で捕らえ、試薬ストリップに予め封入されている洗浄溶液でスパー内部を洗浄し供雑物を除去

後、酵素標識抗体と反応させ、最後に蛍光基質と反応を行った。最終的に蛍光強度(RFV:Relative Fluorescence Value)を読み取ることでSE-Aの有無を確認しその結果が印刷された。このパイダスで抗原抗体反応、洗浄、酵素標識抗体、蛍光基質、結果の判定及び印刷の一連の作業を約70分で自動で行った。得られたRFV値(蛍光強度)で検量線を作成した。

1-2. 生乳を用いたSE-Aの検量線

生乳でSE-Aを各0.4、0.2、0.1、0.05、0.025ng/mLの濃度に調製し、VIDAS SET2で2重測定した。VIDAS SET2の測定方法は、上述の“1-1. 0.3M Tris buffer pH8.0を用いたSE-Aの検量線”の中で述べた方法に従った。

1-3. 生乳のTCA濃縮液を用いたSE-Aの検量線

生乳30mLを以下のTCA濃縮法の手順に従って調製し、得られた沈殿物に約500µLの0.3M Tris buffer pH8.0を加え白濁するまでボルテックスで溶解した。2N NaOHでpH7.5~8.0に調製し(試料は乳濁状態から透明になる)最終容量1.5mLの生乳TCA濃縮液を調製した。以上の操作を何回か繰り返し行い適量を用意し、これを用いてSE-Aを各0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0ng/mLの濃度に調製し、VIDAS SET2で2重測定した。VIDAS SET2の測定方法は、上述の“1-1. 0.3M Tris buffer pH8.0を用いたSE-Aの検量線”の中で述べた方法に従った。

TCA濃縮法

1. 5N HCl (Wako 081-05435)でpHを3.5~4.0に調製した。
2. 3000 - 5000gで15分間遠心分離(18~25)を行った。
3. 滅菌スポイトで上清を回収し、メスシリンダー等で上清の容量を測定した。(Y ml)(酸沈上清)
4. 上清の容量(YmL)の5%容量の90%TCA溶液を添加した。
5. ボルテックスミキサーで3秒間攪拌し、18~25で30分間放置した。
6. 3500~5000gで30分間遠心分離(18~25)を行った。
7. 沈殿(エンテロトキシンを含む)を崩さないように上清(TCA上清)を注意深く除去し、自然乾燥させた。

1-4. チーズ懸濁液を用いたSE-Aの検量線

ストマッカー袋にチーズ25gを取り予め38~40に加熱した滅菌精製水25mLを加えストマッカーで十分ホモジナイズして室温で30分間静置した。フィルター付ストマッカー袋で濾過したものをチーズ懸濁液として用い、これを希釈液としてSE-Aを各0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0ng/mLの濃度に調製し、VIDAS SET2で2重測定した。VIDAS SET2の測定方法は、上述の“1-1. 0.3M Tris buffer pH8.0を用いたSE-Aの検量線”の中で述べた方法に従った。

1-5. チーズのTCA濃縮液を用いたSE-Aの検量線

ストマッカー袋にチーズ25gを取り予め38~40に加熱した滅菌精製水40mLを加えストマッカーで十分ホモジナイズして室温で30分間静置した。フィルター付ストマッカー袋で濾過したものを上述の“1-3. 生乳のTCA濃縮液を希釈液に用いたSE-Aの検量線”中で述べたTCA濃縮法の手順に従って調製し、得られた沈殿物に約1mLの0.3M Tris buffer pH8.0を加え白濁す

るまでボルテックスで溶解した。2N NaOH で pH7.5 ~ 8.0 に調製し (試料は乳濁状態から透明になる) 最終容量 3mL のチーズ TCA 濃縮液を調製した。以上の操作を何回か繰り返し行い適当量を用意し、これを用いて SE-A を各 0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0ng/mL の濃度に調製し、VIDAS SET2 で 2 重測定した。VIDAS SET2 の測定方法は、上述の“ 1-1 . 0.3M Tris buffer pH8.0 を用いた SE-A の検量線 ” の中で述べた方法に従った。

2 . 生乳の熱処理方法と添加した SE-A の添加回収試験

生乳で SE-A を各 0.2、0.1、0ng/mL の濃度に調製したものを 10mL 用意し、80 °C の温水浴中で熱処理を行った。各熱処理時間 (2、4、6、8、10、15 分間) 毎にサンプリングして VIDAS SET2 で 2 重測定した。VIDAS SET2 の測定方法は、上述の“ 1-1 . 0.3M Tris buffer pH8.0 を用いた SE-A の検量線 ” の中で述べた方法に従った。得られた RFV 値から 1-1 . 0.3M Tris buffer pH8.0 を用いた SE-A の検量線を用いて SE-A 濃度を算出した。回収率は、{熱処理後の SE-A 濃度 (ng/mL) / 熱処理 0 分間の時の SE-A 濃度 (ng/mL)} x 100 の式に従って求めた。

3 . TCA 濃縮法による生乳中に添加した SE-A の添加回収試験

生乳 30mL に 0.05ng/mL になるように SE-A を添加した。これを上述の“ 1-3 . 生乳の TCA 濃縮液を希釈液に用いた SE-A の検量線 ” 中で述べた TCA 濃縮法の手順に従って調製し、得られた沈殿物に約 500 μ L の 0.3M Tris buffer pH8.0 を加え白濁するまでボルテックスで溶解した。2N NaOH で pH7.5 ~ 8.0 に調製し (試料は乳濁状態から透明になる) 最終容量 1.5mL に調製した生乳 TCA 濃縮液を VIDAS SET2 で 2 重測定した。VIDAS SET2 の測定方法は、上述の“ 1-1 . 0.3M Tris buffer pH8.0 を用いた SE-A の検量線 ” の中で述べた方法に従った。得られた RFV 値から生乳の TCA 濃縮液を用いた SE-A の検量線を用いて SE-A 濃度を算出した。回収率は、{TCA 濃縮液中の SE-A 濃度 (ng/mL) x TCA 濃縮液容量 (mL) / 30mL 中りの SE-A 添加量 (ng) } x 100 の式に従って求めた。

4 . チーズ中に添加した SE-A の添加回収試験

4-1 . チーズ懸濁抽出液中の SE-A の添加回収試験

チーズ 25g を市販のフィルター付ストマッカー袋に取り、各 0.1ng/g になるように SE-A をチーズ表面に塗抹して十分馴染ませた。予め 38 ~ 40 °C に加温した滅菌精製水 25mL を加え十分ホモジナイズして室温で 30 分間静置した。ストマッカーのフィルターで濾過したものを、VIDAS SET2 で 2 重測定した。VIDAS SET2 の測定方法は、上述の“ 1-1 . 0.3M Tris buffer pH8.0 を用いた SE-A の検量線 ” の中で述べた方法に従った。得られた RFV 値からチーズ懸濁液を用いた SE-A の検量線を用いて SE-A 濃度を算出した。回収率は、{チーズ懸濁抽出溶液中の SE-A 濃度 (ng/mL) / チーズに添加した SE-A 濃度 (ng/g) x 100 の式に従って求めた。

4-2 . TCA 濃縮法によるチーズ中に添加した SE-A の添加回収試験

チーズ 25g を市販のフィルター付ストマッカー袋に取り、各 0.1ng/g になるように SE-A をチーズ表面に塗抹して十分に馴染ませた。予め 38 ~ 40 °C に加温した滅菌精製水 40mL を加え良くホモジナイズして室温で 30 分間静置した。フィルター付ストマッカー袋で濾過したものを上述の“ 1-3 . 生乳の TCA 濃縮液を希釈液に用いた SE-A の検量線 ” 中で述べた TCA 濃縮法の手順に従って調

製し、得られた沈殿物に約 1mL の 0.3M Tris buffer pH8.0 を加え白濁するまでボルテックスで溶解した。2N NaOH で pH7.5 ~ 8.0 に調製し（試料は乳濁状態から透明になる）、最終容量 3mL に調製したチーズ TCA 濃縮液を VIDAS SET2 で 2 重測定した。VIDAS SET2 の測定方法は、上述の“ 1-1 . 0.3M Tris buffer pH8.0 を用いた SE-A の検量線 ” の中で述べた方法に従った。得られた RFV 値からチーズの TCA 濃縮液を用いた SE-A の検量線を用いて SE-A 濃度及を算出した。回収率は、{TCA 濃縮液中の SE-A 濃度(ng/mL) x TCA 濃縮液容量(mL) / 25g 中の SE-A 添加量 (ng) } x 100 の式に従って求めた。

5 . TCA 濃縮法の各ステップでの添加した SE-A の添加回収試験

5-1 . TCA 濃縮法の各ステップでの生乳に添加した SE-A の添加回収試験

生乳 30mL に各 0.2、0.1、0.05、0ng/mL になるように SE-A を添加し、これらを上述の“ 1-3 . 生乳の TCA 濃縮液を希釈液に用いた SE-A の検量線 ” 中で述べた TCA 濃縮法の手順に従って調製した。その際 TCA 濃縮法の各ステップ（SE-A 添加直後、酸沈上清、TCA 上清）で 1mL サンプルし 2N NaOH で pH7.5 ~ 8.0 に調製した。最後に得られた TCA 沈殿物に約 500 μ L の 0.3M Tris buffer pH8.0 を加え白濁するまでボルテックスで溶解した。2N NaOH で pH7.5 ~ 8.0 に調製し（試料は乳濁状態から透明になる）、最終容量 1.5mL に調製した。それぞれ 4 種類のサンプルを VIDAS SET2 で 2 重測定した。VIDAS SET2 の測定方法は、上述の“ 1-1 . 0.3M Tris buffer pH8.0 を用いた SE-A の検量線 ” の中で述べた方法に従った。得られた RFV 値から 0.3M Tris buffer pH8.0 を用いた SE-A の検量線を用いて SE-A 濃度を算出した。回収率は、{TCA 濃縮法の各ステップの SE-A 濃度(ng/mL) x TCA 濃縮法の各ステップの回収容量(mL) / 30mL 中の SE-A 添加量(ng)} x 100 の式に従って求めた。

5-2 . TCA 濃縮法の各ステップでのチーズに添加した SE-A の添加回収試験

チーズ 25g を市販のフィルター付ストマッカー袋に取り 45 ~ 50 の温浴水中で 30 分間静置して溶解した。そこに SE-A を各 0.2、0.1、0.05、0ng/mL になるように添加して良く馴染ませ 4 で一晩冷却したものに予め 38 ~ 40 に加温した滅菌精製水 40mL を加え良くホモジナイズして室温で 30 分間静置した。フィルター付ストマッカー袋で濾過したものを上述の“ 1-3 . 生乳の TCA 濃縮液を希釈液に用いた SE-A の検量線 ” 中で述べた TCA 濃縮法の手順に従って調製した。その際 TCA 濃縮法の各ステップ（SE-A 添加後滅菌精製水で抽出したもの、酸沈上清、TCA 上清）で 1mL サンプルし 2N NaOH で pH7.5 ~ 8.0 に調製した。最後に得られた TCA 沈殿物に約 1mL の 0.3M Tris buffer pH8.0 を加え白濁するまでボルテックスで溶解した。2N NaOH で pH7.5 ~ 8.0 に調製し（試料は乳濁状態から透明になる）、最終容量 3mL に調製した。それぞれ 4 種類のサンプルを VIDAS SET2 で 2 重測定した。VIDAS SET2 の測定方法は、上述の“ 1-1 . 0.3M Tris buffer pH8.0 を用いた SE-A の検量線 ” の中で述べた方法に従った。得られた RFV 値から 0.3M Tris buffer pH8.0 を用いた SE-A の検量線を用いて SE-A 濃度を算出した。回収率は、{TCA 濃縮法の各ステップの SE-A 濃度(ng/mL) x TCA 濃縮法の各ステップの回収容量(mL) / 25g 中の SE-A 添加量(ng)} x 100 の式に従って求めた。

結果と考察

1.検量線の作成

表1で各施設の0.3M Tris buffer pH8.0、生乳、生乳のTCA濃縮液、チーズ懸濁液、チーズのTCA濃縮液を使って検討したSE-A検量線のRFV値と各希釈系列で得られたRFV値のSD値を示した。図1～図5では、表1で示したRFV値を使って検量線を各施設毎及び施設間毎にグラフにし、それぞれ回帰直線式及び相関係数を示した。

1-1 . 0.3M Tris buffer pH8.0 を用いた SE-A の検量線

0.3M Tris buffer pH8.0 の検量線は、施設間の回帰直線式： $y=12645x-140.11$ 、相関係数：0.9942であった。又、用いた各希釈系列のRFV値を施設間で比較すると標準偏差（SD）値：4～290と比較的良好な結果が得られた。

1-2 . 生乳を用いた SE-A の検量線

生乳の検量線は、施設間の回帰直線式： $y=13698x-799.19$ 、相関係数：0.9783であった。又、用いた各希釈系列のRFV値を施設間で比較すると標準偏差（SD）値：161～659と0.3M Tris buffer pH8.0の検量線と比較するとバラツキを示した。特に0.1ng/mL以上でSD値336～659と0.3M Tris buffer pH8.0の検量線で示したSD値よりも大きく、さらに0ng/mL（SE-Aを含まない）でRFV値が453～829、SD値161を示し中にはVIDAS SET2で陽性を報告したものもあった。しかし、図2で示した検量線に直線性が見られることから何らかの処理で減少させることができれば直接測定することも可能であると考え、次項の“2. 熱処理によるSE-A無添加生乳のRFV値の除去”でさらに詳細を述べることにした。

1-3 . 生乳のTCA濃縮液を用いた SE-A の検量線

生乳TCA濃縮液の検量線は、回帰直線式： $y=11186x+799.19$ 、相関係数：0.9804であった。又、用いた各希釈系列のRFV値を施設間で比較すると標準偏差（SD）値：3～654と0.3M Tris buffer pH8.0の検量線と比較するとバラツキを示した。特に0.2ng/mL以上でSD値464～654と0.3M Tris buffer pH8.0の検量線で示したSD値～290よりも大きく、サンプルのマトリクスの違いが影響しているもと考えられた。

1-4 . チーズ懸濁液を用いた SE-A の検量線

チーズ懸濁液の検量線は、回帰直線式： $y=11670x+80.279$ 、相関係数：0.9782であった。又、用いた各希釈系列のRFV値を施設間で比較すると標準偏差（SD）値：2～791と0.3M Tris buffer pH8.0の検量線と比較するとバラツキを示した。特に0.2ng/mL以上でSD値471～791と0.3M Tris buffer pH8.0の検量線で示したSD値～290よりも大きく、サンプルのマトリクスの違いが影響しているもと考えられた。

1-5 . チーズのTCA濃縮液を用いた SE-A の検量線

チーズTCA濃縮液の検量線は、回帰直線式： $y=13536x+176.76$ 、相関係数：0.9807であった。又、用いた各希釈系列のRFV値を施設間で比較すると標準偏差（SD）値：8～768と0.3M Tris buffer pH8.0の検量線と比較するとバラツキを示した。特に0.2ng/mL以上でSD値520～768と0.3M Tris buffer pH8.0の検量線で示したSD値～290よりも大きく、サンプルのマトリクスの違いが影響して

いるもと考えられた。

2. 熱処理による SE-A 無添加生乳の RFV 値の除去

今回実験に用いた生乳は、K 社と KW 社、M 社と B 社間で同一ロット（タンクローリー車毎）のものが使われたが、生乳間の RFV 値のバラツキに相関性は確認できなかった。生乳のマトリクスは、採取後実験が開始されるまでの経過時間によって通常の市販乳よりも変化しやすくこれが原因となっている可能性が考えられた。又一方で、VIDAS SET2 の反応試薬の 1 つにアルカリフォスファターゼを標識した 2 次抗体が使用されているが、これと競合すると思われるサンプル由来のアルカリフォスファターゼの存在が擬陽性反応の原因として考えられた。特にアルカリフォスファターゼを多量に含む非加熱の生鮮食品がその対象になるが生乳もそれに含まれるため、これを熱処理³⁾によって RFV 値を減少させることができるのではないかと考えた。実験結果を表 2 に示した。結果、80 で 2 分間の熱処理条件が SE-A 無添加の生乳中の RFV 値を効率良く減少させ、SE-A を回収できることを示した。しかし、熱処理時間がさらに進むと SE-A の回収率が低下することから、安定した熱処理温度及び時間の検討がさらに必要である。

3. TCA 濃縮法による生乳中に添加した SE-A の添加回収試験

生乳中のエンテロトキシンの検出は以前からの課題であったが、検出キットの性能の向上に伴いエンテロトキシンの高感度検出が期待された。試験に用いた SE-A 濃度は 0.05ng/mL で、仮に 100ng/mL 前後を発症濃度とした場合 1L を接種しても発症に至らないだろうと考えられる毒素量である。実験結果を表 3 に示した。実際の TCA 濃縮後の添加した SE-A の検出濃度は各施設で 0.093 ~ 0.146ng/mL であった。回収率を見ても 10.8 ~ 18.2%（平均回収率：14.0%）と非常に低く、濃縮過程における回収率の低下の原因究明とその対策がさらに必要とされる。

4. チーズ中に添加した SE-A の添加回収試験

4-1. チーズ懸濁抽出液中の SE-A の添加回収試験

実験結果を表 4 に示した。チーズにおいては脂肪分や粘性などの影響で溶液中（滅菌精製水）に SE-A を抽出することが困難になるという懸念があったが、今回のチーズ懸濁抽出液中の SE-A の添加回収試験で 57.4 ~ 100% 以上の高い回収率が得られたことでその懸念は払拭された。しかしながら、施設間でバラツキが目立つことから同じ種類のチーズでもマトリクスの違いや手技などが原因していることが考えられる。

4-2. TCA 濃縮法によるチーズ中に添加した SE-A の添加回収試験

0.1ng/g で SE-A を添加し TCA 濃縮法を行って得たチーズの TCA 濃縮液をそのまま VIDAS SET2 で測定したところ RFV 値が 4000 から 6000 と検量線の直線性が失われた領域にあったため、SE-A を添加していないチーズの TCA 濃縮液を用いて 2 倍に希釈したのから得た RFV 値で算出された SE-A 濃度及び回収率を最終結果とした。（表 5）各施設で回収率：42.3 ~ 61.4%（M 社のデータを除く）と TCA 濃縮法を使った市販乳の場合（52 ~ 69%：厚生労働省の通達より）とほぼ同等の回収率を得ることができた。今後は、チーズの種類を増やしてさらに検討することが必要と思われる。

5. TCA 濃縮法の各ステップでの添加した SE-A の添加回収試験

TCA 濃縮法の各調製段階で添加された SE-A の回収率の低下を引き起こしているのかを検証するため

の実験を行ったところ、TCAを加えた後に原因があることを確認した。TCAは元来タンパク質を変性させる効果をもつが、SE-AのTCA濃縮法もこの原理を用いて弱い変性を与え遠心分離で回収する方法であるため、おそらく一部の变性したSE-Aがもとの状態に戻ることができず回収率の低下の原因ではないかと推測された。食品の種類特に生乳中では極端なSE-A検出の低下が見られることから他にもいくつかの要因が含まれている可能性がある。

5-1 . TCA濃縮法の各ステップでの生乳に添加したSE-Aの添加回収試験

TCA濃縮法による生乳中に添加したSE-Aの添加回収試験の結果、回収率が10.8~18.2%と非常に低く期待された結果とならなかった。そこでSE-Aの回収低下の原因がTCA濃縮法のどの段階(ステップ)で生じているのかを検証したところ、TCAを加えた後のTCA上清で全くSE-Aが検出できなかったことやTCA濃縮液(TCA沈殿物を含む)でやはり回収率が13.2~14.6%と低かったことでTCAを加えた時点で問題が発生していることを確認した。特にTCAを加えることで生乳中の成分と何らかの相互作用を起こしているのではないかと推測されたが、原因の究明と解決にはさらに検討が必要であると思われた。

5-2 . TCA濃縮法の各ステップでのチーズに添加したSE-Aの添加回収試験

4-1 . チーズ懸濁抽出液中のSE-Aの添加回収試験でチーズ懸濁液中からのSE-A回収は57.4~100%以上の高い回収率を示したが、この時のSE-Aの添加方法は25gのチーズ表面に接種されたもので、通常よりも容易に抽出できたものと考えられた。そこで、チーズを一旦温浴水中で溶解し、そこにSE-Aを添加してさらに一晩冷蔵庫で冷却した後抽出及びTCA濃縮法を行い、さらに生乳の時(5-1 . TCA濃縮法の各ステップでの生乳に添加したSE-Aの添加回収試験)と同様に、TCA濃縮法の各調製段階(ステップ)で添加したSE-Aの測定をVIDAS SET2で行ったところ、生乳に比べて明らかにTCAを加えた時点で回収率の低下を引き起こしていることが示された。

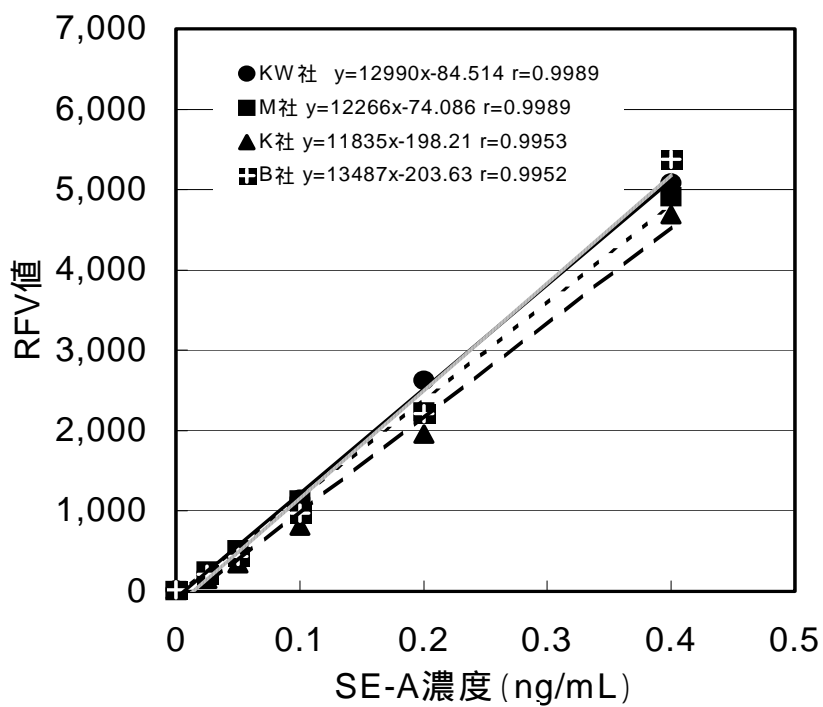
注意事項

- ・VIDAS SET2は日本バイオメリュー株式会社で提供されているもので、保証している検出感度は各エンテロトキシン(A,B,C,D,E)で0.25ng/mL以下である。これは、バイオメリュー社内の品質管理で定められている基準で各ロット毎に検査される。
- ・VIDAS SET2はA~E型のエンテロトキシンを検出できる定性キットである。
- ・本実験で用いた生乳及びカマンベールタイプチーズは、黄色ブドウ球菌が含まれていないことが確認されている。

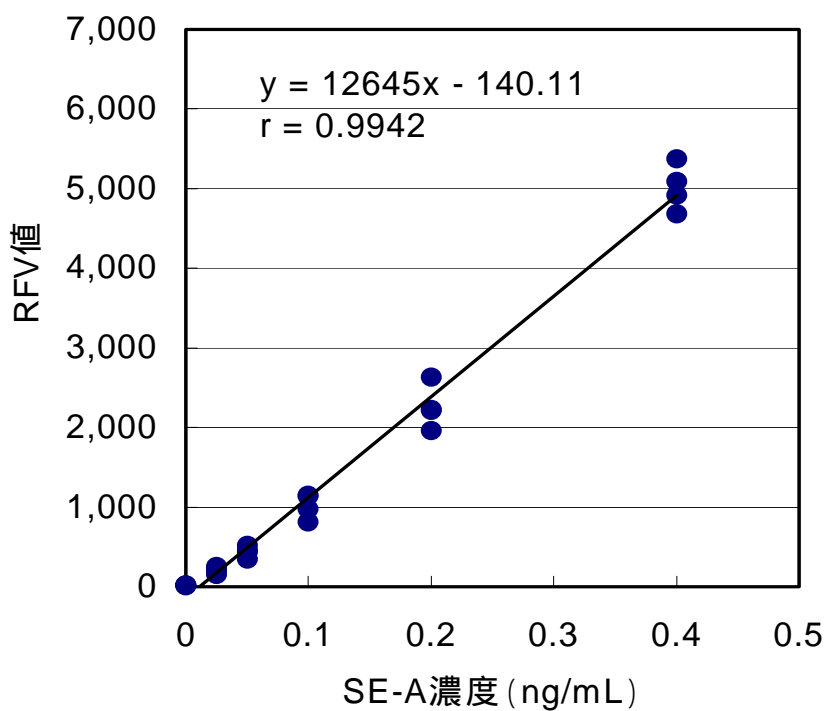
参考文献

- 1.A.Meyrand and V.Atrache, 1999. Evaluation of alternative extraction procedure for enterotoxin determination in dairy products Lett. in Appli. Microbiol. 28. 411-415.
- 2.Naomi B. and Avraham R., 2000. Staphylococcal enterotoxins. Int. J. of Food Microbil. 61. 1-10.
- 3.M.Schwabe, S.Notermans and R.boot, 1990. Inactivation of staphylococcal enterotoxins by heat and reactivation by high pH treatment. Int. J. of Food Microbil. 10. 33-42.
- 4.R.W.Bennett, 1992. The Biomolecular Temperament of Staphylococcal Enterotoxin in Thermally Processed Foods. J. of AOAC Int. 75. No.1.
- 5.Constantin A. Genigeorgis, 1989. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. Int.

- J. of Food Microbil. 9. 327-357.
6. YI-Cheng SU and AMY C. Lee Wong, 1997. Current Perspectives on Detection of Staphylococcal Enterotoxins. 60.2. 195-202.
 7. Jablonski, L.M. and G.A. Bohach. 1997. Staphylococcus aureus. pp.353-375. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville (eds), Food microbiology: fundamentals and frontiers. ASM Press, Washington DC.



(1)

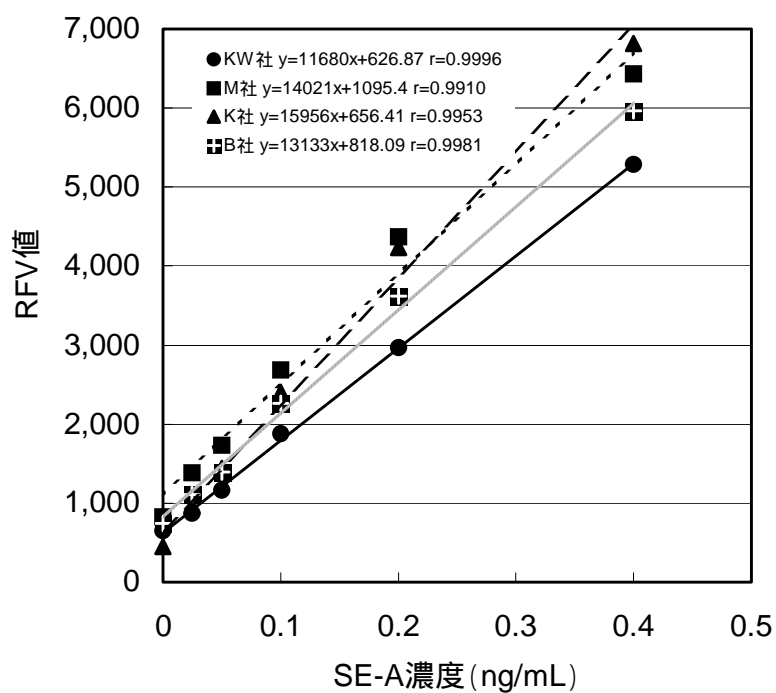


(2)

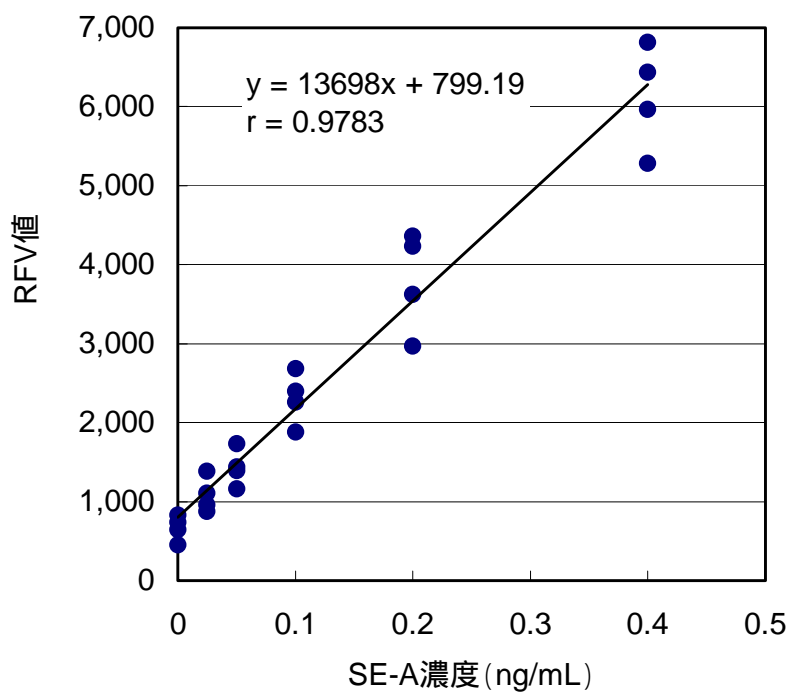
図1 0.3M Tris buffer pH8.0 を用いた SE-A の検量線

(1) : 施設毎

(2) : 施設間



(1)

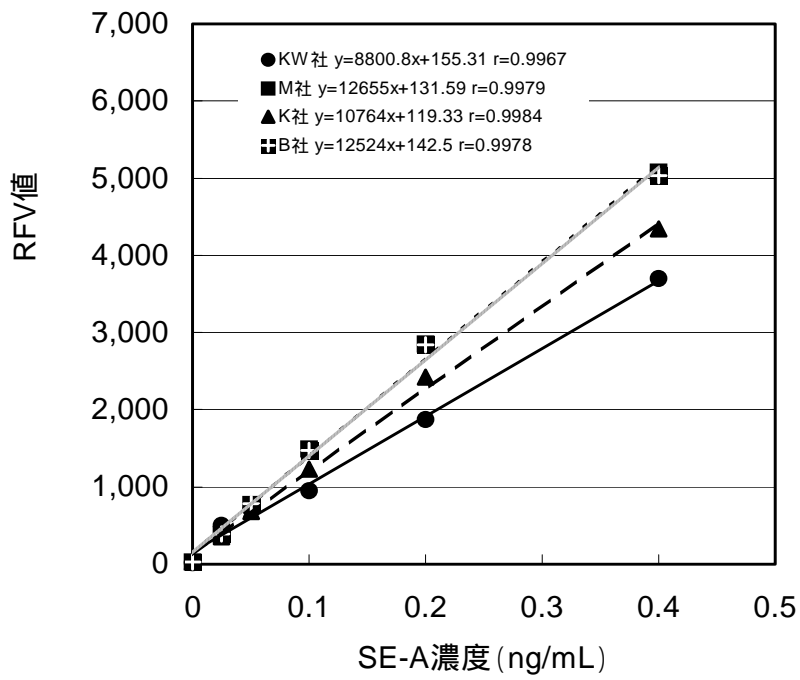


(2)

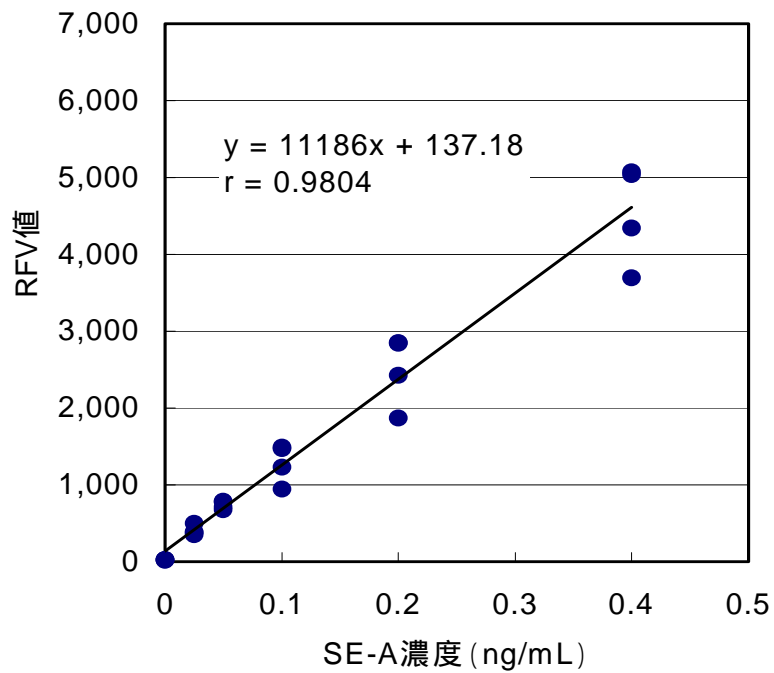
図2 生乳を用いたSE-Aの検量線

(1)：施設毎

(2)：施設間



(1)

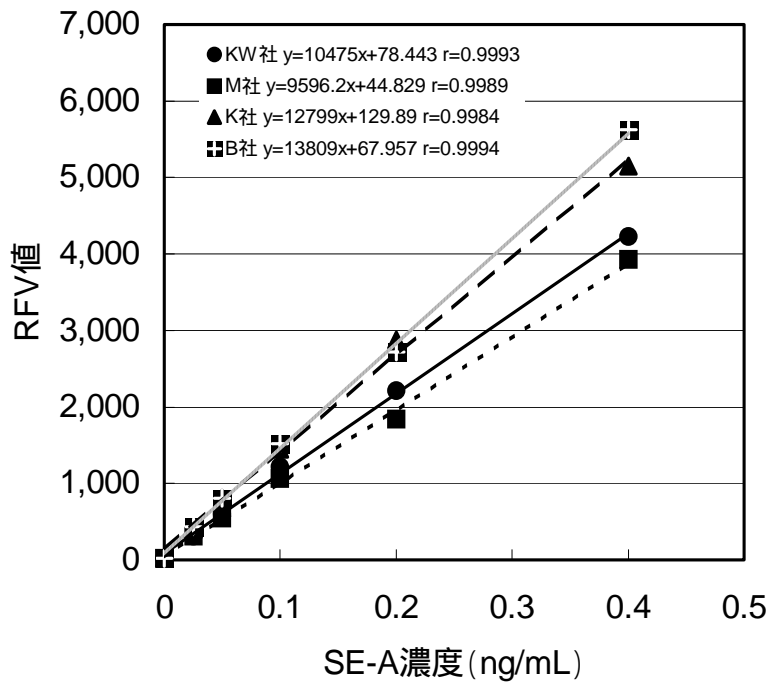


(2)

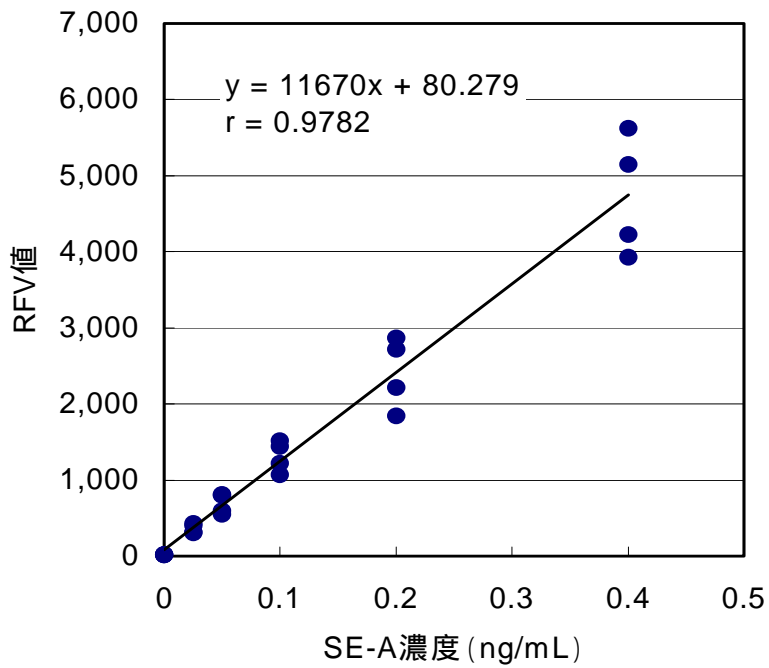
図3 生乳のTCA濃縮液を用いたSE-Aの検量線

(1)：施設毎

(2)：施設間



(1)

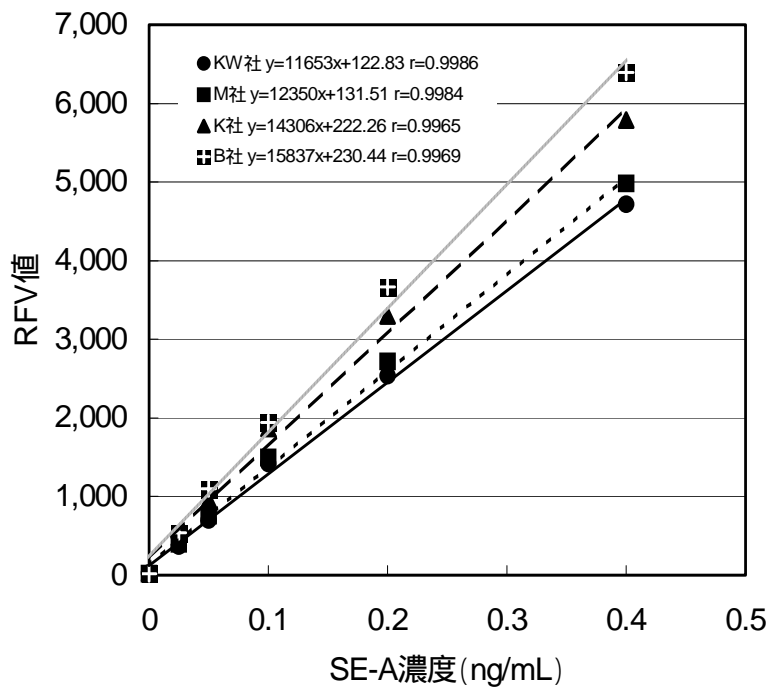


(2)

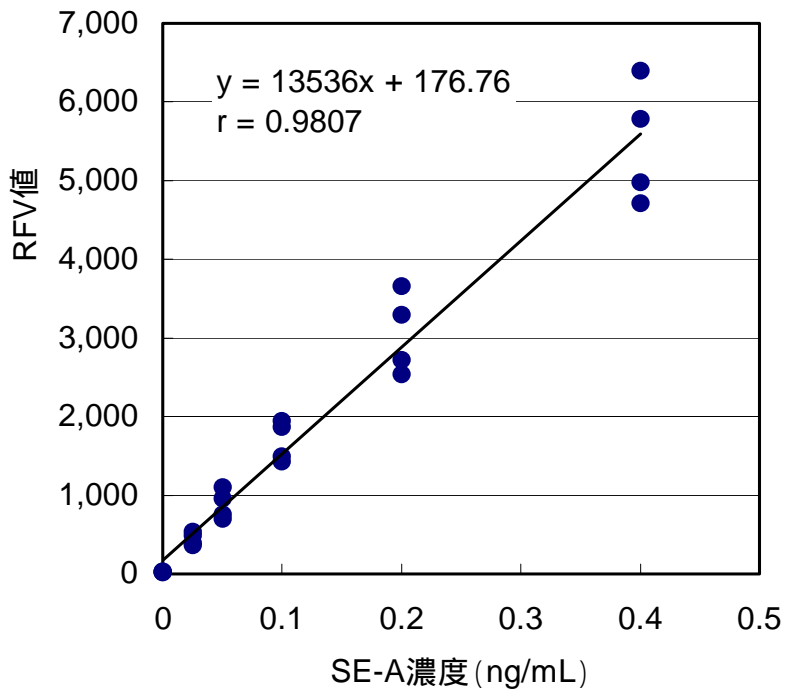
図4 チーズ懸濁液を用いた SE-A の検量線

(1) : 施設毎

(2) : 施設間



(1)



(2)

図5 チーズのTCA濃縮液を用いたSE-Aの検量線

(1) : 施設毎

(2) : 施設間

表 1 各検討施設の検量線データ

希釈サンプル	SE- A 濃度 (ng/mL)	RFV 値 (VIDAS SET2)				SD 値
		KW 社	M 社	K 社	B 社	
0.3M Tris buffer pH8.0	0.4	5,087	4,913	4,685	5,373	290
	0.2	2,627	2,230	1,960	2,215	276
	0.1	1,146	1,136	814	978	156
	0.05	459	518	349	433	70
	0.025	224	253	156	212	41
	0	19	13	20	22	4
生乳	0.4	5,285	6,435	6,816	5,963	659
	0.2	2,968	4,366	4,238	3,624	642
	0.1	1,878	2,687	2,396	2,260	336
	0.05	1,162	1,735	1,440	1,392	236
	0.025	875	1,388	963	1,108	224
	0	647	829	453	742	161
生乳 TCA 濃縮液	0.4	3,697	5,078	4,339	5,035	654
	0.2	1,872	2,855	2,424	2,845	464
	0.1	948	1,487	1,235	1,476	254
	0.05	713	774	680	788	51
	0.025	503	379	353	393	66
	0	22	25	29	26	3
チーズ懸濁液	0.4	4,227	3,924	5,149	5,625	791
	0.2	2,216	1,843	2,870	2,717	471
	0.1	1,216	1,067	1,447	1,516	208
	0.05	600	547	808	804	136
	0.025	313	309	405	431	63
	0	19	17	22	18	2
チーズ TCA 濃縮液	0.4	4,713	4,983	5,789	6,397	768
	0.2	2,535	2,718	3,297	3,662	520
	0.1	1,425	1,496	1,865	1,946	261
	0.05	698	754	957	1,098	185
	0.025	368	395	485	536	78
	0	30	15	29	18	8

表 2 80 で熱処理を行った生乳中の SE-A の回収³⁾

SE-A 添加量 (ng/ml)	熱処理時間 (分間)	RFV 値 (VIDAS SET2)	熱処理後の生乳中 の SE-A 濃度 ^{a)} (ng/mL)	回収率 ^{b)} (%)
0		489	0.029	
0.1	0	1860	0.102	-
0.2		3177	0.173	
0		51	0.005	19%
0.1	2	1575	0.087	85%
0.2		2841	0.155	90%
0		9	0.003	11%
0.1	4	1139	0.064	62%
0.2		2174	0.119	69%
0		9	0.003	11%
0.1	6	1073	0.060	59%
0.2		2046	0.112	65%
0		9	0.003	11%
0.1	8	901	0.051	50%
0.2		1749	0.096	56%
0		8	0.003	11%
0.1	10	867	0.049	48%
0.2		1664	0.092	53%
0		7	0.003	10%
0.1	15	573	0.033	33%
0.2		1093	0.061	35%

a) 0.3M Tris buffer pH8.0 を用いた SE-A の検量線から算出した SE-A 濃度

b) チーズの TCA 濃縮液を用いた SE-A の検量線(図 5)から算出した SE-A 濃度

c) (熱処理後の SE-A 濃度(ng/mL) / 熱処理 0 分間の時の SE-A 濃度(ng/mL)) x 100

表 3 TCA 濃縮法による生乳中に添加した SE-A (0.05ng/mL) の回収

試験施設	試験回数	容量 ^{a)} (mL)	RFV 値 (VIDAS SET2)	TCA 濃縮液中の SE-A 濃度 ^{b)} (ng/mL)	回収率 ^{c)} (%)
KW 社	1 回目	2.5	1,167	0.093	15.6%
M 社	1 回目	2.0	1,671	0.137	18.2%
K 社	1 回目	1.5	1,526	0.124	12.4%
	2 回目	1.5	1,502	0.122	12.2%
	3 回目	1.5	1,336	0.108	10.8%
B 社	1 回目	1.5	1,783	0.146	14.6%

a) TCA 濃縮後の容量

b) 生乳の TCA 濃縮液を用いた SE-A の検量線(図 3)から算出した SE-A 濃度

c) $\{TCA \text{ 濃縮液中の SE-A 濃度}(ng/mL) \times TCA \text{ 濃縮後の容量}(mL) / \text{生乳 } 30mL \text{ 中の SE-A 添加量}(ng)\} \times 100$

表 4 チーズ懸濁抽出液中に添加した SE-A (0.1ng/g) の回収

試験施設	試験回数	RFV 値 (VIDAS SET2)	懸濁抽出液中の SE-A 濃度 ^{a)} (ng/mL)	回収率 ^{b)} (%)
KW 社	1 回目	704	0.057	57.4%
M 社	1 回目	894	0.072	86.7%
K 社	1 回目	729	0.059	79.9%
	2 回目	680	0.054	74.0%
	3 回目	627	0.049	67.2%
B 社	1 回目	1,048	0.082	105.6%

a) チーズ懸濁液を用いた SE-A の検量線(図 4)から算出した SE-A 濃度

b) $\{懸濁抽出溶液中の SE-A \text{ 濃度}(ng/mL) / \text{チーズに添加した SE-A 濃度}(ng/g)\} \times 100$

表5 TCA濃縮法によるチーズ中に添加したSE-A(0.1ng/mL)の回収

試験施設	試験回数	希釈率 ^{a)}	RFV値 (VIDAS SET2)	懸濁抽出液中の SE-A濃度 ^{b)} (ng/mL)	回収率 ^{c)} (%)
KW社	1回目	原液	4,739	0.329	39.5%
		2倍	2,586	0.352	42.3%
M社	1回目	原液	4,412	0.306	36.7%
K社	1回目	原液	6,213	0.434	52.1%
		2倍	3,704	0.511	61.3%
	2回目	原液	6,329	0.442	53.0%
		2倍	3,587	0.494	59.3%
	3回目	原液	5,411	0.377	45.2%
		2倍	3,044	0.417	50.1%
B社	1回目	原液	5,925	0.413	49.6%
		2倍	3,711	0.512	61.4%
		4倍	1,987	0.534	64.1%
		8倍	1,089	0.558	66.9%

a) TCA濃縮液を希釈してVIDAS SET2で測定した。

b) チーズのTCA濃縮液を用いたSE-Aの検量線(図5)から算出したSE-A濃度

b) {TCA濃縮液中のSE-A濃度(ng/mL) x TCA濃縮液容量(mL) / 25g中のSE-A添加量(ng)} x 100

表 6 TCA 濃縮法の各ステップでの添加した SE-A の回収

試料	TCA 濃縮法の各ステップ	容量 ^{a)} (mL)	SE-A 添加量 ^{b)} (ng/mL)	RFV 値 (VIDAS SET2)	SE-A 濃度 ^{c)} (ng/mL)	回収率 ^{d)} (%)
生乳	SE-A 添加直後	30	0	349	0.021	-
			0.05	794	0.045	
			0.1	1470	0.081	
			0.2	2427	0.133	
	酸沈上清	21	0	42	0.005	-
			0.05	844	0.048	74.2
			0.1	1562	0.086	74.2
			0.2	3024	0.165	86.9
	TCA 上清	20	0	19	0.004	-
			0.05	21	0.004	5.5
			0.1	22	0.004	3.1
			0.2	26	0.004	2.0
TCA 沈殿	1.5	0	33	0.004	-	
		0.05	2177	0.119	13.2	
		0.1	4117	0.223	13.7	
		0.2	7158	0.386	14.6	
チーズ	SE-A 添加後の懸濁抽出液	50	0	9	0.003	-
			0.05	334	0.020	82.0
			0.1	740	0.042	84.5
			0.2	1365	0.076	75.7
	酸沈上清	35	0	8	0.003	-
			0.05	461	0.027	96.0
			0.1	940	0.053	91.5
			0.2	1865	0.103	101.5
	TCA 上清	35	0	19	0.004	-
			0.05	24	0.004	13.8
			0.1	96	0.008	13.4
			0.2	145	0.010	10.3
TCA 沈殿	3	0	8	0.003	-	
		0.05	3286	0.179	52.3	
		0.1	7189	0.388	55.1	
		0.2	8760	0.472	37.4	

a) TCA 濃縮法の各ステップで回収した容量

b) 生乳及びチーズに添加した SE-A 濃度

c) 0.3M Tris buffer pH8.0 を用いた SE-A の検量線から算出した SE-A 濃度

d) 生乳: {TCA 濃縮法の各ステップの SE-A 濃度 (ng/mL) x TCA 濃縮法の各ステップの回収容量 (mL) / 30mL 中の SE-A 添加量 (ng)} x 100、チーズ: {TCA 濃縮法の各ステップの SE-A 濃度 (ng/mL) x TCA 濃縮法の各ステップの回収容量 (mL) / 25g 中の SE-A 添加量 (ng)} x 100