

200837050A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品中の毒素産生食中毒細菌および毒素の直接試験法の研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鎌田 洋一

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成21(2009)年3月

目 次

総括研究報告書

- 食品中の毒素産生細菌および毒素の直接試験法の研究 . . . 1
鎌田 洋一

分担研究報告書

- セレウス菌嘔吐毒素に対する免疫抗体作製ならびに培養細胞を用いての毒素検出方法改良の試み . . . 9

鎌田 洋一

- ブドウ球菌エンテロトキシンの免疫学的検出法の開発 . . . 31

重茂 克彦

- ニワトリ IgY 抗体を用いてのブドウ球菌エンテロトキシン定量法の開発 . . . 45

小西 良子

- ウェルシュ菌食中毒統計の解析と各種食材におけるエンテロトキシン産生性ウェルシュ菌汚染調査 . . . 65

宮原 美知子

- ウェルシュ菌食中毒予防のためのエンテロトキシン遺伝子検出法の基礎的検討と毒素作用から考えるウェルシュ菌食中毒発現機構の解析 . . . 81

山本 茂貴

総括研究報告書

食品中の毒素産生食中毒細菌および毒素の直接試験法の研究

鎌田 洋一

厚生労働科学研究補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

平成20年度総括研究報告書

食品中の毒素産生食中毒細菌および毒素の直接試験法の研究

研究代表者 鎌田 洋一 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 第四室長

食品の安全安心を確保するため、ブドウ球菌およびセレウス菌の嘔吐毒素、ならびにウェルシュ菌下痢毒素とそれら毒素産生性細菌を、食品中から直接検出する試験法を開発し、食中毒発生子防に貢献する事を目的とする。ブドウ球菌の組換え新型エンテロトキシン (SE) でウサギおよびニワトリを免疫、抗体を得、サンドイッチ ELISA を構築した。セレウス菌嘔吐毒素 (セレウリド) と、*Salmonella minnesota* 株の酸加熱死菌を混合、マウスおよびウサギを免疫した。セレウリド処理後の HEp-2 細胞を、連続観察撮影装置によってその形態変化を追跡した。カレーの食材について、ウェルシュ菌、特にエンテロトキシン遺伝子保有菌について調査した。食品中の毒素遺伝子を迅速に検出するため、核酸クロマト法の検出感度について検討した。オルトフェニレンジアミン発色系 ELISA において、0.5 から 1.0 ng/ml を検出限界として、新型エンテロトキシンである SEH、SEIJ、SEIK、SER の検出が可能となった。化学発光系 ELISA では 0.1 ng/ml の検出限界をもって、SEG、SEI、SEIM、SEIN を検出できた。ニワトリ IgY 抗体による発色系 ELISA を検討したところ、10 ng/ml の検出感度を示した。セレウリドを免疫したウサギ血清およびマウス血清は、セレウリドに対し、陰性コントロール血清より高い ELISA 吸光値を示した。セレウリド処理後の HEp-2 細胞の形態を連続観察したところ、従来よりも短時間で、かつ特殊な技術や経験なくセレウリドの細胞毒性を検出できた。カレーの食材となる肉 3 種 19 検体と香辛料 6 種 25 検体について、ウェルシュ菌分離とともに、エンテロトキシン遺伝子について PCR 法による検出を試みたが遺伝子陽性のウェルシュ菌は検出されなかった。食品中の毒素遺伝子を検出する新しい方法としての核酸クロマトでは検出コピー数として、 10^9 から 10^{10} コピーが必要だった。

ブドウ球菌新型エンテロトキシンの ELSA による定量が可能なこと、セレウス菌セレウリドについては抗体作製の可能性とバイオアッセイ法を改良できる可能性が示された。エンテロトキシン産生性ウェルシュ菌の食材汚染は少ないことがわかった。同菌エンテロトキシン遺伝子の食品中からの直接検出には大幅な感度の改良が必要と判断された。

ブドウ球菌はエンテロトキシンを食品内に産生する。同菌エンテロトキシンは、嘔吐を引き起こす。エンテロトキシンには分子多型があり、AからEの5型が知られていて、それらには免疫抗体を用いての検出方法がそれぞれ確立されていた。最近の分子生物学的研究から、同菌エンテロトキシンには20種類を越す遺伝子多型があることがわかってきた。それらの新型エンテロトキシン遺伝子をもつブドウ球菌が分離され、かつ嘔吐を示す食中毒が報告されている。現在は新型エンテロトキシンへの検出方法が確立も、従って普及もしていない状況である。そのため同様の食中毒はエンテロトキシンの型別ができない状況にある。また、同菌は毒素産生の際、プロテインAという物質を産生することが知られている。プロテインAは免疫学的検出法に利用されるIgG抗体に強く結合する能力を持ち、ブドウ球菌の汚染を受けた検体を免疫学的方法で試験する際、非特異的な反応を起こして結果を混乱させる。平成20年にはセレウス菌食中毒で死亡例が発生している。セレウス菌も食品内に嘔吐を引き起こす毒素を産生する。同菌の嘔吐毒素はセレウリドと呼ばれ、アミノ酸に類似したデブシ酸が12個環状に配置した低分子耐熱性ペプチドである。分子量が僅かに1000程度である事、疎水性デブシ酸が環状構造を取るなど、免疫原性がないと考えられ、事実現在までセレウリドに対する抗体が作製され検出系に応用されたという報告がない。一方、セレウリドの細胞毒性を利用する検出方法があるが、試験結果を

得るのに時間を要し、また、細胞毒性の把握に高度の経験を技術が必要で、一般に普及していない。ウェルシュ菌は下痢毒エンテロトキシンを芽胞形成時に産生するが、食品内では毒素産生あるいは非産生ウェルシュ菌芽胞、その栄養型が混在し、非常に複雑な中毒発生様式が想定されている。エンテロトキシンが易熱性で、酸にも弱い事から、仮に食品内で毒素産生があったとしても、中毒症状発生に毒素は寄与しないとされる。食品とともに取り込まれた生菌が胃を通過し、腸管で定着増殖後芽胞を形成、その結果産生されたエンテロトキシンが腸管上皮細胞を攻撃、電解質ともに水分を細胞から放出させ、結果下痢に至らしめるとされている。本研究では、食品の安全安心を確保するため、食品中からの毒素産生食中毒細菌およびその毒素を直接検出する試験法を開発し、食中毒発生予防に貢献する事を目的とする。本年度は、上記の3種の食中毒細菌およびその毒素に対し、以下の成果を得た。

ブドウ球菌の産生する新型を含めたエンテロトキシン(以下SE)に対し、ウサギポリクローナル抗体を作製した。各抗体をペルオキシダーゼ標識し、オルトフェニレンジアミンを発色剤とした発色系サンドイッチELISA、あるいは、ルミノール系試薬による化学発光系サンドイッチELISAを構築した。その結果、発色系ELISAにおいて0.5から1.0ng/mlを検出限界として、SEA、SEB、SED、SEH、SE1J、SE1K、SERの検出が可能となった。これらのSEについては、精製SEのみならず、食中毒事例か

らの分離菌で、それぞれの SE 遺伝子をもつブドウ球菌の産生した培養液中の SE の検出も可能だった。一方、化学発光系 ELISA では 0.1 ng/ml の検出限界をもって、精製 SEG、SEI、SEIM、SEIN を検出できた。培養液からのエンテロトキシンの検出には、ブドウ球菌が産生するプロテイン A の妨害を避けるため、正常ウサギ血清処理が必要で、このためサンプルが希釈された。プロテイン A の影響は菌株によって様々の程度で、最終的な SE 濃度を知るのには多くの行程を要した。これを改善するために、プロテイン A とは結合しない IgY 抗体を SE10 について作製してサンドイッチ ELISA を構築し、検出感度および検出範囲について検討を加えた。発色系 ELISA におけるニワトリ IgY 抗体による ELISA では、10 ng/ml の検出感度を示した。検出範囲は 1,000 ng/ml まで良好な検量線が得られた。ニワトリ抗 SE10-IgY は、SEA に対して、100 ng/ml ではまったく交差反応を示さなかった。1,000 ng/ml の SEA には 3% の交差率で、実質上交差反応は無視できることがわかった。

セレウス菌セレウリドは疎水性低分子で、かつ、分子中にキャリアタンパク質を結合させる官能基を持たない。セレウリドに対して抗体を作製する試みとして、1) セレウリド分子の改変、2) 非共有型キャリアーの応用を取り上げた。セレウリド分子を構成するアミノ酸およびデブシ酸のうち、イソプロピル基を持つバリン、およびイソブチル基を持つロイジンがある。近年、薬物代謝酵素 P-450 モノオキシ

ゲナーゼの分子種の中に、これらのアルカンの末端を攻撃し、水酸基を導入する新酵素 CYP153A13a が発見されている。組換え酵素を発現している状態の大腸菌株懸濁液および精製酵素でセレウリドを処理し、産物を LC/MS/MS 分析に供した。水酸基に置換されて分子量が小さくなったピークは検出されず、CYP153A13a はセレウリドを基質とせず、したがってセレウリドには水酸基は導入されていないと考えられた。次に、セレウリドを非共有型キャリアーに結合させる免疫原調整法を試みた。酸加熱処理したサルモネラ菌体 (*Salmonella minnesota*) に、メチルアルコールで溶解したセレウリド溶液を加え、溶媒を蒸発させた。PBS を加え音波処理して菌体を分散させ、セレウリド吸着菌体懸濁液とし、マウスおよびウサギの皮下に注射した。毎週 1 回、8~10 回の接種後採血し、血中のセレウリドに対する抗体価を ELISA で測定した。ウサギにおいては免疫前の血清に比べ、マウスにおいてはセレウリドを吸着させていないサルモネラ死菌免疫マウスに比較して、セレウリド吸着サルモネラ死菌の注射後の血清は、セレウリドに対して高い ELISA 吸光値を示した。この結果は、従来抗原性がないと考えられていたセレウリドにおいても、抗体が作製できる可能性を示している。

セレウリドを検出する良い方法は、その特異的な活性すなわち毒性を検出することで、そのため、現行の HEp-2 細胞への空胞化を指標とするアッセイ法は重要になる。培養細胞を用いるので、現在の検査施

設で簡便に行えるはずであるが、普及していない。セレウリド処理後の細胞を経時撮影し記録する装置を用いて、その原因を調べた。その装置は視野を固定されているため、100~200個の細胞をそれぞれ識別し、観察記録分析することが出来る。セレウリドは5 ng/mlで空胞化を引き起こすとされている¹⁾。500 ng/mlになるようにセレウリドを培養液に加え、HEp-2細胞の形態を連続観察した。非常に高濃度のセレウリド存在下にもかかわらず、約40%の細胞に空胞が観察されたにすぎなかった。生じた空胞が大きくなると同時に空胞の数が減少する様子も観察された。一度空胞が誘導されたにもかかわらず、空胞の消失する細胞も見られた。一方、セレウリドの定量試験においては、24時間後に空胞の有無を判断するが、固定視野で連続観察すると、5~8時間後には空胞が形成されることがわかった。以上の成果は、連続観察撮影装置を利用してセレウリドの細胞毒性の観察法を改良し、長い経験や高度な技術がなくとも、セレウリドのバイオアッセイ法を開発できる可能性があることを示している。

大規模型発生をされるといわれるウェルシュ菌食中毒の発生率や原因食品などについて、平成14年から19年にかけての統計を解析した。6年間のウェルシュ菌食中毒事件数は177件で14,914人の患者数を示した。事件一件当りの患者数は84.2人で、我が国の食中毒のなかで、最も大きい規模を示した。第2の規模数を示すのはノロウイルス食中毒で、事件一件あたりの患者数は44.3人となっており、ウェルシュ

菌の規模が非常に大きいことを示している。原因食品をみると、具体的に喫食物を特定できた物で最も多いのはカレーの11件で6.2%を占める。シチューやローストビーフ煮込み、肉・野菜の煮物を加え、煮込み料理でまとめると19件となり10.7%となる。ウェルシュ菌は土壤に分布する芽胞形成菌で食品の汚染率は高い。人の腸管内の常在菌でもある。その中で食中毒に関与するのは下痢を誘発する能力のあるウェルシュ菌であるので、煮込み料理に用いられる食材中における、エンテロトキシン遺伝子保有ウェルシュ菌の検索を行った。培養法の検討とともに、エンテロトキシン遺伝子保有ウェルシュ菌を検出する方法を検討した。パウチ法、CW寒天培地への直接塗抹法、TGC培地による増菌培養後の塗抹法を比較検討した。また、芽胞の検出のため75°C10分の加熱を一部の検体について行った。いずれの検出法においても、グラム当たり数十cfuのウェルシュ菌を検出する事が可能だった。検査法の妥当性を検討するため、スライスハムについて、エンテロトキシン遺伝子保有ウェルシュ菌の接種回収実験を行った。グラム当たり440CFUの菌量を接種し、パウチ法およびTGC培地を用いて培養し、菌数とエンテロトキシン遺伝子の検出を試みたところ、良好な回収率を示し、かつPCRによるエンテロトキシン遺伝子の存在が確認された。香辛料6種25検体、肉3種19検体について、ウェルシュ菌分離とともにエンテロトキシン遺伝子をPCR法による検出を試みたが遺伝子陽性のウ菌は検出され

なかった。

ウ菌食中毒の原因食品中には、ウ菌生菌が多く含まれることが一般に認められている。ウ菌食中毒の症状を誘起するのがエンテロトキシンであるので、原因食品中にはエンテロトキシン遺伝子も多く含まれると推定される。食品中のエンテロトキシン遺伝子を検出すれば、その後のウ菌食中毒発生を防止できる可能性があることから、食品中のエンテロトキシンの検出法を検討する事とした。遺伝子の相補性を利用する簡易迅速遺伝子検査法に核酸クロマト法がある。核酸クロマト法における、検出感度および検出核酸種について検討した。その結果、核酸種としてはRNAがよく、次に変性したDNA断片、変性した直線状プラスミドDNAの順で核酸クロマト法に応用できた。検出コピー数としては、 10^9 から 10^{10} コピーが必要で、食品中の遺伝子を検出するには大幅な感度向上が必要であることが明らかにされた。

ウェルシュ菌食中毒の発生機序を考える際、エンテロトキシンの行動・動態が重要となる。その解析は同菌食中毒発生予防に還元できると考える。エンテロトキシンは腸管上皮細胞膜に分布するクローディンタンパク質を受容体とすることがわかっている。クローディンには、細胞外領域として2カ所のループがあり、その第2ループがエンテロトキシンによって認識される事が明らかにされた。さらに第2ループ内の149から160番のアミノ酸領域が、毒素を受容体としてのクローディンを認識するのに重要な部分である実験結果が

得られた。

以上を総括すると、ブドウ球菌新型エンテロトキシンのELISAによる定量が可能なのが、セレウス菌セレウリドについては抗体作製とバイオアッセイ法を改良できる可能性が示され、ウェルシュ菌については、食品中のエンテロトキシン遺伝子迅速検出の可能性について、また同菌エンテロトキシンの作用機構から食中毒予防へアプローチするための基礎学術情報を得た。次年度はこれらの可能性の実現に注力する。

分 担 研 究 報 告 書

セレウス菌嘔吐毒素に対する免疫抗体作製ならびに
培養細胞を用いての毒素検出方法改良の試み

鎌田 洋一

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

「食品中の毒素産生食中毒細菌及び毒素の直接試験法の研究」

分担研究報告書

セレウス菌嘔吐毒素に対する免疫抗体作製ならびに
培養細胞を用いての毒素検出方法改良の試み

分担研究者 鎌田 洋一 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部 第四室室長
協力研究者 切畑 光統 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科
協力研究者 安形 則雄 名古屋市衛生研究所微生物部
協力研究者 中島 喜一郎、稲見 薫、藤田 尚也、音松 利彦
神戸天然物化学株式会社 KNC バイオリサーチセンター

要旨：セレウス菌セレウリドは疎水性低分子で、かつ、分子中にキャリアータンパク質を結合させうる官能基を持たない。セレウリドに対して抗体を作製する試みとして、1) セレウリド分子の改変、2) 非共有型キャリアーの応用を取り上げた。P-450 モノオキシゲナーゼ CYP153A13a はセレウリド分子中のイソプロピル基およびイソブチル基を水酸化する可能性が考えられた。組換え同酵素でセレウリドを処理し、産物を LC/MS/MS 分析を行った。酵素処理前後でセレウリドのチャートに変化がなく、CYP153A13a はセレウリドには水酸基は導入しないと考えられた。酸加熱処理したサルモネラ菌体 (*Salmonella minnesota*) に、メチルアルコールで溶解したセレウリド溶液を加え、溶媒を蒸発させた。PBS を加え音波処理して菌体を分散させセレウリド吸着菌体懸濁液とし、マウスおよびウサギを免疫、血中のセレウリドに対する抗体価を ELISA で測定した。ウサギにおいては免疫前の血清に比べ、マウスにおいてはセレウリドを吸着させていないサルモネラ死菌免疫マウスに比較して、セレウリド吸着サルモネラ死菌の注射後の血清は、セレウリドに対して高い ELISA 吸光値を示した。この結果は、従来抗原性がないと考えられていたセレウリドにおいても、抗体が作製できる可能性を示している。セレウリドを検出する良い方法は、

その特異的な毒性を検出することで、そのため、現行の HEp-2 細胞への空胞化を指標とするアッセイ法は重要になる。同法は培養細胞を用いるので、現在の検査施設で簡便に行えるはずであるが、普及していない。セレウリド処理後の細胞を経時撮影し記録する装置を用いて、その原因を調べた。その装置は視野が固定されているため、同一細胞を観察記録分析することが出来る。非常な高濃度のセレウリド存在下にもかかわらず、約 40%の HEp-2 細胞に空胞が誘導されたにすぎなかった。生じた空胞が大きくなると同時に空胞の数が減少する様子も観察された。一度空胞が誘導されたにもかかわらず、空胞の消失する細胞も見られた。現行のセレウリド定量試験においては、24 時間後に空胞の有無を判断するが、固定視野で連続観察すると 5～8 時間後には空胞が形成されることがわかった。以上の成果は、連続観察撮影装置を利用してセレウリドの細胞毒性の観察法を改良し、長い経験や高度な技術がなくとも、セレウリドのバイオアッセイ法を開発できる可能性があることを示している。

A. 研究目的

セレウス菌(*Bacillus cereus*)は、土壌、空気、河川水などの環境から、農産物、水産物および畜産物などの食料、飼料などにも分布する好気性の芽胞形成桿菌である。本菌は、ヒトや動物の消化管内にも存在しており、その多くは病原性をもたないと考えられているが、食中毒の病原菌や日和見感染症の原因菌となることがある。

本菌食中毒には、嘔吐毒であるセレウリドを原因とする嘔吐型と、下痢毒のエンテロトキシンを原因とする下痢型の二つがある。嘔吐型食中毒は、セレウス菌に汚染された食品中にセレウリドが産生されて起こる。したがって、本菌食中毒は食物内毒素型食中毒と呼ばれる。潜伏時間は 30 分間～6 時間、その症状は嘔吐と腹痛であり、ブドウ球菌食中毒と類似している。下痢型食中毒は原因食品を摂取した後、腸管内で増殖したセレウス菌が毒素を産生することで起きる。一方、セレウス菌エンテ

ロトキシンによる食中毒は、生体内毒素型食中毒と呼ばれている。本食中毒の潜伏時間は 6～15 時間であり、ウェルシュ菌食中毒と類似した症状を呈する¹⁾。

日本における嘔吐型セレウス菌食中毒は、1960 年に岡山県の小学校で発生した。下痢や腹痛を主徴とする食中毒発生事例として初めての報告となっている¹⁾。厚生労働省の食中毒統計資料によると、平成 15～19 年の過去 5 年間において、本食中毒について平均発生件数は 15 件/年、平均患者数 230 名/年の報告がされている²⁾。セレウス菌食中毒の発生率は、細菌性食中毒では、カンピロバクター・ジェジュニ/コリ、サルモネラ属菌、ブドウ球菌、腸炎ビブリオ菌による食中毒に次ぐ。平成 20 年度においては、12 月現在で発生件数 8 件、患者数 91 名と報告されている(厚生労働省 食中毒発生事例速報)。10 月には大阪府において、家庭内で調理された離乳食を食べた幼児 1 名が死亡する事例が発

生した（食品安全委員会，食品安全関係情報第 273 号）。セレウス菌食中毒の原因食品はチャーハン、焼き飯、ピラフ、弁当類に多く、我が国では嘔吐型食中毒が主である。欧米その他の国では、野菜サラダ、肉料理、魚料理、スパゲティ、チーズも原因食品として挙げられている。

セレウス菌食中毒の検査方法として、下痢毒素であるエンテロトキシンの検出には、逆受身ラテックス凝集反応を用いた免疫学的試験法や、ウサギ皮内反応による血管透過性亢進試験がある³⁾。しかしながら、嘔吐毒であるセレウリドは、抗体が作製されていないため、免疫学的検査法が確立されていない。セレウリドは分子量 1,165 と小さく、疎水性デプシ酸からなる環状ペプチドであり、電荷を持たない⁴⁾。環状に配置され、コンパクトな立体構造を取っている。これらの性質は、セレウリドがほとんど免疫原性を持たないことを説明していると理解される。現在までに報告されているセレウリドの主な検査法としては、サルへの経口投与試験⁵⁾ や、豚精子を用いる方法⁶⁾、ラット肝ミトコンドリアを用いる方法⁷⁾、HEp-2 細胞の空胞変性を観察する方法^{3, 8)}、LC/MC（高速液体クロマトグラフィー/質量分析計）による分析法^{9, 10)}、MTT を用いた吸光度法¹¹⁾、WST-8 を用いた吸光度法¹²⁾などがある。豚精子やラット肝ミトコンドリアを用いる手法は、材料の入手や調製が難しいため、一般に普及していない。LC/MS 法は、直接セレウリド濃度を測定することが可能であり、もっとも正確な検査方法と考えられる。しかし、本

検査には特殊で高価な機器とその維持管理が必要となるため、一般的な検査法として普及していない。MTT を用いた吸光度法は、培養細胞のミトコンドリアの脱水素酵素により還元された、ホルマザンの色素量を測定する手法である。本吸光度法は、LC/MS 法に比べて特殊な機器を必要としない点や、HEp-2 細胞を用いた検査法と比べて判定が容易である点で優れている。しかし、ホルマザンを溶解するため、検査工程がやや煩雑であり、実験開始から判定までに 40 時間以上を要する。また、MTT 法や MST-8 法は、培養細胞毒性のある物質の毒性評価にしばしば用いられる方法で、その毒性はセレウリドに特異的なものではない。したがって、検討サンプル中のセレウリド以外の毒性物質を誤って検出してしまう危険性がある。

本分担研究は 2 つの目的を持って遂行される。第 1 はセレウリドに対して免疫抗体を作製し、セレウリド検出系に応用、抗体を使ってのセレウリドの免疫学的試験法を確立することにある。近年、薬物代謝酵素 P-450 モノオキシゲナーゼの分子種の中に、炭素が連結した有機化合物の CH 末端を攻撃し COH とする、水酸基導入酵素 CYP153A13a が発見されている。水酸基が導入されれば、酸化還元反応を利用し、セレウリドにキャリアータンパク質を標識することができる。セレウリドがこの水酸化酵素の基質となりうるか検討した。さらに、セレウリドの疎水性を利用し、非共有的な疎水性結合によってサルモネラ死菌体へセレウリドを吸着させ、サルモネラ・

セレウリド混合物を免疫し、抗体を調製する方法を試みた(図1)。

本分担研究のもう一つの目的は、バイオアッセイ法である HEp-2 細胞の空胞変性を用いた検出法を改良するため、その欠点や不備な点を検索する事にある。従来法は、セレウリドが HEp-2 細胞(ヒト咽頭がん由来)に対して、空胞変性を誘導することを利用した検出方法である。細胞内に出現する空胞は、変性したミトコンドリアとされている。同法は、HEp-2 細胞をセレウリド処理し、24 時間後に、HEp-2 細胞中の空胞形成の有無をもって、セレウリドの陽性陰性を判定する。セレウリドは HEp-2 細胞への毒性を指標に精製されており、本法は「食品衛生検査指針」に記載されているため、食中毒検査時に用いられている。しかし、空胞形成の確認や同毒素の取り扱いに技術と経験が必要なため、一般的に普及していないのが現状である。また、セレウス菌食中毒の診断には、セレウリド合成酵素遺伝子の有無を調べる遺伝子検査³⁾が行われ、症状を誘発する直接の原因物質であるセレウリドを検出せずに、食中毒検査が実行されている。HEp-2 細胞を用いたセレウリド検出法を広く普及させるため、簡便で誰もが実施できる方法を確認することを目的に、細胞形態の観察機器及を導入した基礎研究を行った。

B. 実験方法

1 セレウリドへの水酸基導入

1) セレウリドのモノオキシゲナーゼ処理と質量分析

本実験では、野館らの pRED ベクターをさらに改良した pUCRED ベクターを用いた。pUCRed-Balk プラスミド及びネガティブコントロールとして pUC18(TaKaRa) にて大腸菌宿主 BL21(TaKaRa)を形質転換した組換え体を、Ampicillin(100 μ g/ml)を含む LBplate 上に播種し、37°C で 16 時間培養した。それぞれ形成したシングルコロニーを掻き取り、3 ml の Ampicillin (100 μ g/ml)を含む LB 培地に加え、16 時間振盪培養した(25°C、170 rpm)。次に、2 本の 300 ml バッフル付マイヤーフラスコに 50ml の LB 培地、Ampicillin(100 μ g/ml)、 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (0.1 mM)、及び 500 μ l の培養液を加え、OD₆₀₀ が約 0.8 になるまで振盪培養(120 rpm、30°C)後、IPTG (0.5 mM)、5ALA (80 μ g/ml)を加え、20 時間振盪培養を続けた(120 rpm、20°C)。培養液を遠心分離(8000 rpm、4°C、10 min)し、上清をデカンテーションにより除いた菌体に 5 ml の 5%グリセロールを含む 50 mM リン酸バッファーを加えて再懸濁し、2 本を合わせた。この内、2 ml を CO 差スペクトル測定に、1.5ml を *in vivo* 変換反応に、2 ml をタンパク質抽出した後 *in vitro* 変換反応(96 穴ディーブウェノプレート、1.5 ml エッペンチューブ)に供した。

2) CO 差スペクトル測定

再懸濁した 2 ml の菌液を 15 ml フェルコンチューブに移し、200 μ l の 10 \times BugBuster (Novagen)、1 μ l の

Benzonase Nuclease (Novagen)、DTT (2 mM)、30 KUnits の rLysozyme (Novagen) を加え、ローテーターを用いて、室温で 20 分間転倒混和した。その後、遠心分離 (8000 rpm、4°C、10 min) を行い、氷水上で上清を新しい 15 ml ファルコンチューブに移した。これを 2 等分し、1 本をプランクとして Sodium hydrosulfate を加え溶解させ、もう 1 本を CO バブリング後、Sodium hydrosulfate を加え、溶解させた。これらの液を用いて、分光光度計を用いて 300 nm から 600 nm にわたり CO 差スペクトルを測定した。その後、Omura と Sato の方法¹²⁾を用いて、CO 差スペクトル測定値からのタンパク質発現量を換算した。CO 差スペクトル測定の結果、機能的な CYP153A13a は 78.9 nM の濃度で発現されていることを確認した。

3) *in vivo* 変換反応

再懸濁した 1.5 ml の菌液を試験管に移し、終濃度 1 mM にてセレウリドの Dimethyl sulfoxide 溶液を加え 10 秒間ボルテックス攪拌後、25°C で 24 時間振盪した。次に、100 μ l の飽和食塩水及び 0.5 ml の酢酸エチルを加え、1 分間ボルテックスで攪拌した。その後、遠心分離 (8000 rpm、4°C、10 min) を行い、得られた酢酸エチル層を LC-MS 分析に供した。Shimadzu LCMS-2010A Liquid Chromatograph Mass Spectrometer を使用した。

4) P450 タンパク質の抽出

再懸濁した菌液 2 ml を 15 ml ファノレコンチューブに移し、ソニケーターを用いて超音波破碎を行った。その後、遠心分離 (8000 rpm、4°C、10 min) を行い、上清の可溶タンパク質画分を *in vitro* 変換反応 (96 穴ディープウェルプレート、1.5 ml エッペンチューブ) に供した。

5) *in vitro* 変換反応

250 μ l の可溶タンパク質画分と、250 μ l の *in vitro* 反応バッファー (β -NADP (13 mM)、G-6-P (33 mM)、G-6-PDH (4 Units/ml)、MgCl₂ (33 mM)) とを混ぜ合わせ、96 穴ディープウェルプレート及び 1.5 ml エッペンチューブに移した。これに終濃度 1 mM にてセレウリドの Dimethyl sulfoxide を添加し、10 秒間ボルテックス攪拌後、25°C で 24 時間振盪した (振盪条件: 96 穴ディープウェルプレート; 1700 rpm、25°C、24 時間、1.5 ml エッペンチューブ; ローテーター使用、25°C、24 時間)。反応終了後、*in vivo* 反応と同様に抽出した液を LC-MS 分析に供した。

2 セレウリド吸着サルモネラ死菌による免疫

1) サルモネラ酸加熱死菌の調製

Salmonella minnesota 株を 37°C 一晩 L broth で前培養した。これをシードカルチャーとして、1000 ml の L broth に 1 ml 加え、37°C で 18 時間振盪培養した。フェノールを 10 g/L の割合で加えて殺菌した後、培養液を遠心分離し、上清を捨てた。

蒸留水で菌体を洗浄後、アセトン、エーテルの順でさらに菌体を洗浄した。そこに1%酢酸を50 ml 添加し、菌体を懸濁後100°C2時間の加熱処理を行った。冷却後、菌懸濁液を遠心分離して沈渣を得、それを蒸留水で洗浄した。さらに遠心して沈渣を得、10 mlの蒸留水に菌体を懸濁し、液体窒素で凍結後、凍結乾燥器にて乾燥させ、-20°C以下で保存した。

2) セレウリドとサルモネラ菌体の混合液の動物への注射

バイオコントロール研究所(名古屋市)より精製セレウリドを購入した。本精製セレウリドは1 mg/mlの濃度で、250 mM 塩化カリウム・75%メタノール溶液に溶解されていた。乾燥サルモネラ菌体粉末1 mgをガラス試験管にとり、セレウリド溶液0.1 mlを加え、チソガスを吹き付けて溶媒を蒸発させた。そこにPBSを1 ml加え、1分間の超音波処理を行い、セレウリド・サルモネラ混合液を調製した。8週令のBALB/c オスマウスの背部皮下に0.1 ml、体重2 Kgの日本在来種ウサギの背部皮下に0.5 mlを注射した。以後、1週間隔で同じ注射を行った。

3) 抗セレウリド抗体価の測定

セレウリドをメタノールで10 µg/mlに希釈した。ELISA用96ウェルプレート(Nunc)の各ウェルに0.1 mlずつ希釈セレウリドを加えた。対象としてメタノールのみを添加したウェルを設けた。37°Cの培養器中でメタノールを蒸発させ、10%スキムミルクPBS溶液をウェル当り0.2 ml加え、ブロッキングを行った。希釈したマウ

スあるいはウサギ血清をウェルに加え、ビオチン標識抗マウスあるいは抗ウサギIgG抗体、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン、TMB発色液の順で反応させ、ペルオキシダーゼ酵素反応を2 N H₂SO₄で停止させた後、反応産物の450 nmの吸光度を読み取り、抗体価を測定した。

3 HEp-2細胞のセレウリド処理

1) セレウリド

実験に用いたセレウリドは、女子栄養大学上田成子博士より分与頂いた。同セレウリドは、95%メタノール溶液に溶解されていた。HEp-2細胞に空胞化を起こす力価として、本標品は640倍の力価を示した。セレウリドは5 ng/mlでHEp-2細胞に空胞化を誘導するとされている⁸⁾。このため、本溶液のセレウリド濃度は3.2 mg/mlと換算された。

2) 細胞培養

本実験で用いたHEp-2細胞は、女子栄養大学上田成子博士より供与された。HEp-2細胞は、10%非働化ウシ胎児血清(以後FCSと略記: Valley Biomedical)を含むMinimum Essential Medium Eagle(以後MEMと略記: SIGMA-ALDRICH)の培地を使用した。

液体窒素中に凍結保存中のHEp-2細胞を37°Cの温水で溶解後、予めMEM 9 mlを加えた15 ml遠心管(Techno Plastic Products)に移し、800 rpm、25°C、5分間で遠心分離した。上清を除去した後、MEM 10 mlを加えて細胞を懸濁し、再び

遠心分離した。同様の操作を 3 回繰り返した後、MEM 5 ml を加え、25 cm² 組織培養フラスコで、37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。

細胞がフラスコ底面一杯に増殖した状態（コンフルエントと称す）まで培養した後、培養液を除去し、0.05 % トリプシン・EDTA (GIBCO) を 2.5 ml 加えた。容器底面が白濁し、さらに細胞の剥離が確認されたら、セルスクレイパー (Techno Plastic Products) でフラスコ底面から細胞を収集した。細胞懸濁液を 15 ml 遠心管に回収し、D-PBS 緩衝液 (WAKO) でフラスコ内を洗浄した洗浄液とともに遠心分離 (800 rpm、25 °C、5 分間) した。上清を除去し、D-PBS 緩衝液を 6 ml 加えて攪拌し、再び遠心分離した。同様の操作を合計 3 回繰り返した後に、上清を除去し、MEM 5 ml を加えたものを試験用細胞とした。

細胞の継代は、上記トリプシン処理した細胞懸濁液を、5~7 日間でコンフルエントとなるように、25 cm² 組織培養フラスコに播種し、10 % FCS-MEM を加え、37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。

3) HEp-2 細胞のセレウリド処理

HEp-2 細胞を 1 % FCS-MEM 中に 1×10^5 cells/ml となるように希釈した。細胞懸濁液を 96 ウェル平板プレート (Techno Plastic Products) に 200 μ l/well の割合で分注し、37 °C、5 % CO₂ 条件下で前培養した。

一晚培養後、培養液を除去し、MEM を 50 μ l/well の割合で加えた。ポジティブコ

ントロールとして、15 ml 遠心管に MEM と 0.5 μ g/ml のセレウリド (1 mg/ml、バイオコントロール研究所) を加えた溶液を準備し、そのうち 50 μ l を左端のウェルに加えて混合、希釈した。さらに、左端のウェルより右隣のウェルに希釈液 50 μ l を加えて混合した。同様に 2 行 11 列まで操作を繰り返し、2 段階希釈を行った。このとき、2 行 12 列はネガティブコントロールとして MEM 50 μ l のみとした。1 % FCS-MEM を 200 μ l/well 加え、プレートに蓋をし、37 °C、5 % CO₂ 条件下で 24 時間培養した。判定は、1 ウェルにつき、2 個以上の空胞を持つ空胞化細胞が、1 つ以上見られるものを陽性とした。

従来法では、予めセレウリドを 96 ウェルプレートのウェル内で希釈した後に、1 % FCS-MEM 中に 1×10^5 cells/ml となるように希釈した HEp-2 細胞を 200 μ l/well 加えた。圧着シールを用いて各ウェルを塞ぎ、37 °C で培養した。24 時間後、上記の条件でセレウリドの存否の判定を行った。

4) タイムラプス観察

HEp-2 細胞を、1 % FCS-MEM 中に 1×10^5 cells/ml となるように希釈した。35 mm Tissue Culture Dish (IWAKI) に 2 ml/dish ずつ播種した後、37 °C、5 % CO₂ 条件下で前培養した。一晚培養後、最終濃度 3.2 μ g/ml のセレウリド (上田成子博士分与) を加えた。37 °C、5 % CO₂ 条件下、1 視野当たり 100 個以上の細胞が明瞭に認識される視野を選択し、視野を固定

した。タイムラプスはセレウリド添加時を 0 時間とし、以降 15 分間隔、1024×768 dpi で画像を取り込み、パーソナルコンピュータ内に保存した (SANYO、MCOK-F110demo、図 2)。

C. 結果および考察

1 P-450 モノオキシゲナーゼ処理のセレウリドへの影響

得られた結果を表 1 に示す。いずれの酵素処理においても処理後に新たなピーク、すなわち酵素処理によるセレウリド由来修飾産物は得る事ができなかった。分析結果の一覧を表 1 に示す。以上から、新規に発見された P-450 モノオキシゲナーゼ CYP153A13a 処理においても、セレウリドが持つバリンのイソプロピル基、ならびにロイシンが持つイソブチル基の水酸基導入修飾反応は起こらなかったものと考えられた。

2 マウスおよびウサギへのセレウリドの免疫

セレウリドとサルモネラの混合液の免疫後 71 日および 105 日のマウス血清を希釈し、セレウリド吸着ウェルおよび非吸着ウェルで吸光値を比較した。マウス抗血清は非吸着ウェルに対して高い吸光値すなわち非特異反応を示したものの、各希釈段階で、セレウリドとサルモネラ混合液で免疫したマウス血清の方が、サルモネラ単独免疫マウス血清より高い吸光値を示した。また、免疫回数が増えるにつれ、特異的な

反応が増える傾向が認められた (図 3)。

ウサギへのセレウリドの免疫では、免疫前の血清と、セレウリドとサルモネラ混合液で免疫した後の血清について、セレウリド吸着ウェルにおける吸光値を比較した。免疫前の血清に比べ、免疫後の血清の吸光値は有意に高い値を示した。免疫回数が多くなるにつれ、免疫前後の吸光値の差が大きくなり、セレウリドに対する特異抗体が産生されている可能性が示唆された (図 4)。

3 連続観察装置を利用したセレウリド処理 HEp-2 細胞の形態変化および空胞形成を確認する際の不適切さの把握

セレウリド添加直後から、細胞質内に空胞が出現するまでの形態変化を観察した (図 5)。空胞出現の前兆として、毒素添加後 2 時間で細胞質内に白色顆粒状物質が現れた。約 5 時間後には、核を囲むようにして空胞が出現した。15 時間後には空胞化細胞が分裂、増殖した。さらに 24 時間後、一度出現した空胞が消失することが観察された。HEp-2 細胞の空胞変性を用いた従来法では、希釈したセレウリドに HEp-2 細胞浮遊液を加え、24 時間後に空胞の有無を判定する。本検出法では、予めウェルプレートで細胞を培養した後、セレウリドの希釈液を加えた。既にプレート底面に細胞が附着しているため、セレウリド添加後、最短 5 時間で空胞の有無の判定を可能とすることが確認された。また、セレウリド処理した HEp-2 細胞が、1%

FCS-MEM 環境下で増殖すること、毒素処理した細胞の全てが、空胞化を起こすとは限らないことが確認された (図 6)。

D. 結論

セレウリド分子を構成する官能基のうち、イソプロピル基およびイソブチル基を水酸化できる可能性のある薬物代謝酵素 CYP153A13aP-450 モノオキシゲナーゼ処理を行った。処理産物を LC/MS/MS 分析に供した。水酸基に置換されて分子量が小さくなったピークは検出されず、CYP153A13a はセレウリドを基質とせず、したがってセレウリドには水酸基は導入されていないと考えられた。セレウリドを非共有型キャリアーに結合させる免疫原調整法を試みた。酸加熱処理したサルモネラ菌体 (*Salmonella minnesota*) に、メチルアルコールで溶解したセレウリド溶液を加え、セレウリド吸着菌体懸濁液とし、マウスおよびウサギの皮下に注射した。血中のセレウリドに対する抗体価を ELISA で測定した。ウサギにおいては免疫前の血清に比べ、マウスにおいてはセレウリドを吸着させていないサルモネラ死菌免疫マウスと比較して、セレウリド吸着サルモネラ死菌の注射後の血清は、セレウリドに対して高い ELISA 吸光値を示した。この結果は、従来抗原性がないと考えられていたセレウリドにおいても、抗体が作製できる可能性を示している。セレウリドを検出する良い方法は、その特異的な活性すなわち毒性を検出することで、そのため、現行の HEp-2 細胞への空胞化を指標とするアッセイ法は

重要になる。培養細胞を用いるので、現在の検査施設で簡便に行えるはずであるが、普及していない。セレウリド処理後の細胞を経時撮影し記録する装置を用いて、その原因を調べた。その装置は視野を固定されているため、100~200 個の細胞をそれぞれ識別し、観察記録分析することが出来る。空胞化を引き起こす 100 倍の濃度の 500 ng/ml になるようにセレウリドを培養液に加え、HEp-2 細胞の形態を連続観察した。非常に高濃度のセレウリド存在下にもかかわらず、約 40% の細胞に空胞が観察されたにすぎなかった。生じた空胞が大きくなると同時に空胞の数が減少する様子も観察された。一度空胞が誘導されたにもかかわらず、空胞の消失する細胞も見られた。一方、セレウリドの定量試験においては、24 時間後に空胞の有無を判断するが、固定視野で連続観察すると、5~8 時間後には空胞が形成されることがわかった。以上の成果は、連続観察撮影装置を利用してセレウリドの細胞毒性の観察法を改良し、長い経験や高度な技術がなくとも、セレウリドのバイオアッセイ法を開発できる可能性があることを示している。

E. 健康危害情報

特になし。

F. 文献

- 1) 山中英明、藤井建夫、塩見一雄、微生物性食中毒、p. 15-63、「食品衛生学第二版」恒星社厚生閣、東京 (2007)
- 2) 厚生労働省食中毒統計資料

- <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokucu/04.html>
- 3) 上田成子: セレウス菌. 食品衛生検査指針, p. 226-282. 日本食品衛生協会(2005)
 - 4) Agata, N., Ohta, M., Mori, M. and Isobe, M.: A novel dodecdepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett., 129, 17-20 (1995)
 - 5) Andersson, M. A., Jääskeläinen, E. A., Shaheen, R., Pirhonen, T., Wijnands, L. M. and Salkinoja-Salonen, M. S.: Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. Int. J. Food Microbiol., 94, 175-183 (2004)
 - 6) Kawamura-Sato, K., Hiramata, Y., Agata, N., Ito, H., Torii, K., Takeno, A., Hasegawa, T., Shimomura, Y., Ohta, M.: Quantitative analysis of cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus* by Using Rat Liver Mitochondria. Microbiol. Immunol., 49, 25-30 (2005)
 - 7) Hughes, S., Bartholomew, B., Hardy, J. C. and Kramer, J. M.: Potential application of a HEp-2 cell assay in the investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. FEMS Microbiol. Lett., 52, 7-12 (1988)
 - 8) Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I. and Isobe, M.: A novel dodecdepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. FEMS Microbiol. Lett., 121, 31-34 (1994)
 - 9) Häggblom, M. M., Apetroaie, C., Andersson, M. A. and Salkinoja-Salonen, M. S.: Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. Appl. Environ. Microbiol., 68, 2479-2483 (2002)
 - 10) Finlay, W. J. J., Logan, N. A. and Sutherland, A. D.: Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. Appl. Environ. Microbiol., 65, 1811-1812 (1999)
 - 11) Akiba, T., Chiba, T., Arai, T., Ikeuchi, Y., Ibe, A., Yanagawa, Y., Kai, A., Yano, K. and Morozumi, Y.: Comparison and Evaluation of Methods for Detection of *Bacillus cereus* Emetic Toxin. Jpn. J. Food Microbiol., 23, 213-216 (2006)
 - 12) Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. evidence for its hemoprotein nature. J. Biol. Chem., 239, 2370-2378 (1964)

G. 研究発表

無し。

H. 学会発表

無し。

I. 知的所有権の取得状況

J. 特許取得

無し。

2. 実用新案取得

無し。

3. その他

無し。