

201033012A

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22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23（2011）年3月

目 次

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 . . . 3

鎌田 洋一

分担研究報告書

セレウスの嘔吐毒素産生に与える環境要因の影響に関するマイクロアレイ解析 . . 13

西川 禎一

新型ブドウ球菌エンテロトキシンの産生量評価 . . . 37

重茂 克彦

水晶発振子マイクロバランス法を原理とするブドウ球菌エンテロ
トキシン検出法開発の試み . . . 53

小西 良子

RNAハイブリダイゼーションを原理としたエンテロトキシン遺伝子保有
ウエルシュ菌の食品からの検出法の開発と、毒素および菌から考える
ウエルシュ菌食中毒発現機構の解析 . . . 69

山本 茂貴

ウエルシュ菌新型エンテロトキシン精製の試み . . . 91

鎌田 洋一

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22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 室長

研究要旨：本研究は、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が産生する嘔吐毒素、ならびにウエ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、また食品内毒素産生動態を解析し、食中毒発生予防に貢献することを目的とする。また、それぞれの食中毒の発生機構を分子レベルで解析し、学術的な貢献を行うことを目的とする。

セレウス菌嘔吐毒素の食品内での産生の動態を解析することを目的に、培養温度、培養時間、および食品成分の代替えとしてのスキムミルクの有無を実験条件として、嘔吐毒素産生セレウス菌を培養し、それぞれの RNA を抽出した。マイクロアレイ法を用いて、網羅的に発現遺伝子の変動を調べた。遺伝子群の変動が最も大きかったのは、培養温度で、次に培養時間、食品成分は第3の因子だった。スキムミルク添加の影響を最も強く受けたのは *cesH* という嘔吐毒素合成酵素遺伝子の一つで、*cesH* の変動が嘔吐毒素の産生と関連する可能性が示唆された。

ブドウ球菌の新型エンテロトキシンの毒素産生性について検討した。室温を想定した 20℃から 30℃においては、ブドウ球菌は対数増殖期の後期から定常期にかけて新型エンテロトキシンを産生した。培養時間が長くなると 20℃での毒素産生量も増加した。ブドウ球菌はゲノム中に新型エンテロトキシン遺伝子クラスターを形成する。それら新型エンテロトキシンの産生量の総和は、食中毒発症量と想定される量にまで達しており、新型エンテロトキシンの食中毒原性が確認された。水晶発振子マイクロバランス法という質量変化を原理とする方法で、ブドウ球菌エンテロトキシン検出法を開発しようと試みた。同法は抗原抗体反応後の毒素の結合量をリアルタイムで測定出来る方法で、センサーに抗エンテロトキシン A 抗体を吸着させ、毒素を添加、センサーの発振の程度（周波数）をモニターした。その結果、150 ng/ml のエンテロトキシン A

が有意に検出された。今後の実用化を考えると感度向上の必要がある。

食品中のエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌を、核酸クロマト法で検出する方法の開発を継続した。3種類のフォーワードプライマー、および4種類のリバースプライマーを設計し、エンテロトキシン遺伝子を Nucleic acid-sequence based amplification (NASBA)法で増幅した。熱変性行程を省略化できることが明らかになった。カレーへのウエルシュ菌接種実験を行い、開発した方法で検出感度を求めた。この度の方法では、 1.7×10^7 cfu/g のエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の検出が可能となった。前年度はウエルシュ菌の腸管内増殖機構を明らかにするために、培養腸管上皮細胞を用いた実験モデルを開発し、嫌気性、栄養素、ならびに細胞の存在が菌の増殖に必要であることを明らかにした。今年度は感染症由来のウエルシュ菌と、食中毒由来菌とを比較した。感染症株は腸管の漿膜面から粘膜面への物質輸送制御を障害し、かつ急激な増殖を示した。一方食中毒株は緩やかに増殖し、物質輸送制御機構へ障害を与えないことが明らかになり、食中毒株の腸管内増殖はゆっくりと進行することが推察された。ウエルシュ菌エンテロトキシン全長の結晶化に成功した。X線回折図を得、3次元構造を解析した。エンテロトキシンは3つのドメインで構成されていた。細胞膜に小孔を開ける毒素タンパク質と類似の立体構造を示した。さらに膜貫通領域の類似性も確認され、構造的にエンテロトキシンが細胞膜に貫入し、小孔を開ける機能があることが推察された。食中毒事例からの分離ウエルシュ菌のなかに、従来とは性状の異なるエンテロトキシンを産生する株があることが示されている。同事例株を培養し、生化学的手法で新型エンテロトキシンの部分精製を試みた。硫酸アンモニウム沈殿法とゲルろ過法を組み合わせ、活性を保持させたまま、SDD電気泳動上10数種のタンパク質群のなかに新型エンテロトキシンが回収されることがわかった。同菌株のゲノム塩基配列を、次世代シーケンサーを用いて解析した。既知エンテロトキシン産生株が保有せず、新型毒素産生株のみが保有する遺伝子の中には新型エンテロトキシンをコードする遺伝子があると考えられる。ゲノム比較の結果、54遺伝子が新型毒素産生株特異的だった。遺伝子解析情報とタンパク質情報を組み合わせ、目的の新型エンテロトキシン遺伝子の分離、同タンパク質の精製を進める。

嘔吐・下痢といった症状、場合によっては神経症状といった病態を誘発する細菌毒素がある。前者にはブドウ球菌エンテロトキシン、ウエルシュ菌エンテロトキシン、セレウス菌嘔吐毒素、後者にはボツリヌス菌毒素が有名である。本研究では前者の嘔吐を引き起こすブドウ球菌およびセレウス菌が産生する毒素、また、ウエルシュ菌が産生する下痢を誘発する毒素と、それら毒素産生細菌を研究対象とする。

ブドウ球菌とセレウス菌は食品内に、それぞれエンテロトキシン、および嘔吐毒素を産生し、それらは食品とともに取り込まれて、比較的短時間に症状を誘発する。両細菌と食品と毒素の関係をもう少し詳しく記載すると以下になる。両細菌は自然界に広く分布する。ブドウ球菌はヒトの皮膚の正常細菌叢を構成している細菌で、ヒトが生活する空間にもひろく分布する。セレウス菌は耐熱性芽胞を形成する土壌細菌の一種で、穀類を中心に、広く農産物を汚染している。同菌はヒトの生活環境にも容易に持ち込まれている。従って、両細菌が食品を汚染する機会は多く、原材料あるいは加工の時点で、汚染を除外することはできない。

ブドウ球菌では過去に乳製品を原因食として大規模の食中毒事件が発生している。製造過程の中で、殺菌工程があるにもかかわらず、食中毒が起こっている。殺菌前にブドウ球菌が汚染し、温度管理の不適切のため菌増殖が起こり、それに伴い毒素産生があり、その後加熱を受け殺菌されたが、毒素は耐熱性のため毒性が保持され、

嘔吐を引き起こす。毒素はエンテロトキシンと呼ばれ、分子量が 30 KDa 程度のタンパク質である。毒素研究の歴史は長く、アミノ酸配列の違いに基づいたタンパク質化学的性状の違いから、長く A から E の 5 型に分類されてきた。徐々に新しい型のエンテロトキシンが発見されていったが、分子生物学的な研究から、非常に多くの亜型があることが明らかになり、それらは新型エンテロトキシンと呼ばれている。Staphylococcal Enterotoxin、SE と略される毒素であるが、新型毒素に関して、その嘔吐毒性を、霊長類を用いての実験で検証されていない毒素は、SE like、すなわち SE1 と略記される。20 種類程ある新型 SE および SEL は、食中毒を起す毒性、すなわち食中毒原性が証明されていないものも多い。食品内での産生動態、菌増殖と毒素産生との関連性なども不明である。

我が国におけるセレウス菌食中毒の原因食は、焼き飯、パスタ等であり、いずれも加熱加工食品で、嘔吐を主症状とする食中毒を起こす。ブドウ球菌と同様、セレウス菌が食品内で増殖後、毒素産生が引き続いて起こり、毒素は食品内に蓄積する。毒素は耐熱性の低分子ペプチドで、1995 年に日本人研究者によって発見され、構造決定された。セレウリドとも呼ばれる嘔吐毒素は、アミノ酸と、アミノ酸によく似たデブシ酸が合計 12 個環状に連なり、閉環した構造の毒素で、オートクレーブにも耐える高い耐熱性を示す。セレウス菌嘔吐毒素は、分子の特性から抗原性がないと予想され、事実長く抗体作製がなされなかった。

前年度までの本研究において、嘔吐毒素に対する抗体作製が可能なことを示した。嘔吐毒素は一般のタンパク質合成系を経て産生されない。ゲノムあるいはプラスミド上に毒素遺伝子があり、mRNA に転写され、リボソームタンパク質でアミノ酸が重合し、ペプチドあるいはタンパク質となる経路で毒素の合成は起こらず、非リボソーマルタンパク質合成系と称される分子経路で合成される。嘔吐毒素合成酵素とその遺伝子が同定されている。合成酵素遺伝子はクラスターを形成しており、巨大プラスミド状に存在する。特殊な合成経路のため、毒素産生を調節するメカニズムやそれに関与する遺伝子(群)など全く不明である。

セレウス菌およびブドウ球菌は食品内に毒素を産生する。一方ウエルシュ菌は、生体内で毒素を産生する。ウエルシュ菌の食中毒発症機構は複雑で、最も重要な発症要因は、毒素産生能のある生菌が、少なくとも 10^8 cfu 以上食品とともに取り込まれることと認識されている。摂食後、胃酸の攻撃を免かれたウエルシュ菌生菌は、腸管内に到達する。菌が増殖後、芽胞形成し、エンテロトキシン産生が誘導される。毒素は隣接している腸管上皮細胞を結合させる装置、デスモゾームの構成タンパク質であるクローディンを受容体として結合し、上皮細胞膜に小孔を開け、細胞内成分が流出、下痢を誘発するという作用様式が一般に認識されている。以上の作用機序の中で、腸管内に到達したウエルシュ菌生菌がどのように増殖するのか、増殖する条件は何か、どれくらいの時間で増殖するのか、分

かっていない。エンテロトキシンは芽胞形成時に産生されると認識されている。しかし、腸管内での増殖、芽胞形成、毒素産生を解析した報告はなく、一般的理解に留まる。エンテロトキシンは、分子量がおよそ 30 KDa の易熱性タンパク質である。エンテロトキシン分子全長の立体構造は明らかになっていない。

本研究の目的は、上記の 3 菌種およびそれらが産生する毒素について、食品中から直接検出する方法を開発することにある。食品中の毒素産生動態を解析することにある。さらには、3 菌種による食中毒発症メカニズムを分子レベル、器官レベルで明らかにすることにある。以上の研究を通じ、毒素産生性細菌による食中毒の理解を深め、学術的に貢献するとともに、応用研究を通じて社会に有用な技術を提供し、厚生労働行政の施策に貢献する事を目的とする。

第 1 章 セレウス菌とセレウス菌嘔吐毒素研究

セレウス菌は嘔吐毒素を食品内で産生し、食品内毒素型食中毒を起こす。嘔吐毒素はタンパク質の設計図とされる mRNA を介して合成されない。非リボソーム合成ペプチドと称されている。嘔吐毒素が一般的なタンパク質(ペプチド)合成系を経ずして合成されることから、毒素ペプチドの合成過程がどのような調節を受け、いかなる代謝経路を介して毒素を産生するのか、また、いかなる遺伝子群が毒素の合成に関与するのか、ほとんど明らかにされていない。

本年度は、この課題の解決にアプローチするため、マイクロアレイを用いて各種培養条件下での遺伝子発現と毒素産生の相関を検討した。具体的には、食中毒事例由来毒素産生セレウス菌の培養温度、培養時間、食品成分の変わりとしてスキムミルクの有無を条件として培養し、菌体から Total RNA を抽出した。公共データベースにあるセレウス菌ゲノム情報から、マイクロアレイ用のオリゴ DNA を合成、マイクロアレイのプラットフォームに固着させた。菌体から抽出した Total RNA から cDNA を作製し、プラットフォームに添加、ハイブリダイゼーションさせた。その後、スキャナーでハイブリダイズされる強度を読み取り、また、強度変動のあった遺伝子を同定した。遺伝子群の変動が最も大きく起こったのは、20℃と 30℃の培養温度の違いだった。次に遺伝子群の変動が大きかったのは、培養時間で、スキムミルクの有無は、遺伝子群変動を誘起する第 3 の変動要因であることがわかった。食品成分の代替えとしてのスキムミルクの影響を最も大きく受けたのは、嘔吐毒素合成酵素遺伝子の一つで、独立したプロモーター制御を受けているとされる *cesH* と無機陽イオンの輸送に関わる遺伝子の発現だった。*cesH* が培地成分によって変化し、嘔吐毒素産生と関連している可能性が示唆された。

第 2 章 ブドウ球菌とブドウ球菌エンテロトキシン研究

本年度は新型エンテロトキシンの食品

内産生動態、とくに菌増殖と毒素産生動態の関係、培養温度の菌増殖および毒素産生への影響について検討した。さらに、水晶発振子マイクロバランス法という新原理の測定法をエンテロトキシン A に応用し、新しい検出方法を開発する、の 2 項目について検討した。

1：ブドウ球菌新型エンテロトキシンの食品内動態の解析

黄色ブドウ球菌の産生するエンテロトキシン (SEs) は、食中毒の原因毒素である。近年、多数の新型 SEs および SE 様毒素 (SEIs) の存在が報告されていることから、これらの新型 SEs の食中毒原性を評価することが必要となっている。本研究では、前年度に報告した新型 SEs 産生量の培養温度による変動を詳細に解析し、さらに食品中における産生量評価を行った。37℃における産生量が極めて低い SEG、SEI、SE1M、SE1N、SE1O について、これらの遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌を BHI 培地に約 1×10^8 cfu/ml になるように接種し、20℃、25℃および 30℃で 48 時間培養して経時的に毒素産生量と菌数動態を解析したところ、SEs の産生量は 30℃において 12 時間、24 時間および 48 時間で両菌株ともほぼ一定であったが、培養温度を低下させると 12、24、48 時間で産生総量は増加傾向を示し、さらにこの傾向は 20℃でより顕著であった。一方、接種菌数 1×10^3 cfu/ml で 30℃と 20℃における増殖動態と SEs 産生動態を解析したところ、30℃においては 12 時間で増殖は対数増殖期後期に達し、少ないながらも SEs の産生が認められ、24

時間では定常期初期に達し有意な SEs の産生が確認されたが、その後 48 時間、60 時間の時点では定常期を維持し、また SEs 産生量は 24 時間の時点と変化が認められなかった。これに対し、20℃では定常期初期に達する 48 時間まで SEs 産生は認められなかったが、60 時間では SEs 産生量が増加した。これらの結果から、SEG、SEI、SEIM、SEIN、SEIO の産生は対数増殖期後期から定常期に起こるが、30℃では速やかに毒素産生は抑制される。しかしながら、25℃および 20℃においては定常期の間毒素産生は持続するため、結果的に総産生量が増加するものと考えられ、室温においてこれらの毒素が食中毒発症に十分量産性する可能性が示唆された。

2 : 水晶発振子マイクロバランス法を用いたブドウ球菌エンテロトキシン検出法開発

黄色ブドウ球菌の産生するエンテロトキシン(SE)は、嘔吐を誘発する食中毒の原因毒素である。脱脂粉乳を原因とする本菌食中毒に見られるように、殺菌工程のある食品の場合、細菌検査では本菌毒素のリスクを管理できず、毒素そのもののモニタリングが必須となる。水晶発振子マイクロバランス(QCM)法は、逆圧電素子である水晶発振子(センサー)に電圧を印加すると水晶発振子(センサー)が一定の周波数で振動し、センサー上に抗原抗体反応物が形成された場合、周波数が減少することにより対象物質を検知する方法である。この方法を応用することにより、毒素の存在を連続

的かつリアルタイムにモニタリングできる可能性がある。SE について、本法が適応可能か検討した。センサーにプロテイン G を介して抗 SEA 抗体を固定化した。センサーを装置に装着後、シグナルの安定を待って SEA を添加すると、周波数の減少が直ちに検出された。周波数の減少と、添加 SEA 濃度との間には容量依存性が認められた。この結果は、本法は SEA に対し検査法として確立できる潜在的可能性を示している。しかしながら現在のところ、検出できる毒素の濃度は 150 ng/ml となっており、今後、感度を向上させる必要がある。

第 3 章 ウエルシュ菌およびウエルシュ菌エンテロトキシン研究

ウエルシュ菌食中毒は、食品中に大量のエンテロトキシン産生性生菌が存在する事が、中毒発生の重要な要因となっている。この事実は、喫食前に食品中からエンテロトキシン遺伝子保有ウエルシュ菌を検出できれば、中毒発生を予防できる可能性がある。前年度までに検討してきた核酸クロマト法の開発に向け、実験を継続した。ウエルシュ菌食中毒では生菌の消化管腔内での増殖が必須の事象になっているが、生菌増殖の条件等、全く分かっておらず、実験モデルを構築し、検討を加えた。また、分子レベルでの毒素作用機構を解明するため、毒素の立体構造を明らかにした。毒素は細胞膜に小孔を開け、細胞質成分を細胞外、すなわち腸管腔内に流出させるとされているが、ウエルシュ菌ではその小孔の科学的証左が見いだされていない。そのた

めにも、毒素の立体構造の解析が重要と考える。一方、ウエルシュ菌は従来から認識されている下痢を起す毒素に加え、新しいエンテロトキシンの存在が示唆されている。ある下痢患者および食品からの分離ウエルシュ菌株が、培養上清中に下痢を誘発する活性物質を産生するものの、従来からのエンテロトキシンタンパク質が存在せず、また、当該菌株もエンテロトキシン遺伝子を保有していなかった。新型エンテロトキシンの精製の必要がある。本年度は以下の4項目について検討した。

1：エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の食品からの検出法の開発

ウエルシュ菌食中毒の原因食品中には、ウエルシュ菌の生菌が多く含まれることが一般に認められており、食品中のエンテロトキシン遺伝子を検出すれば、その後の食中毒発生を防止できる可能性がある。このことから、遺伝子の相補性を利用する核酸クロマト法を検討した。3種のフォワードおよび4種のリバースプライマーの組み合わせを検討し、エンテロトキシンに特異性の高い増幅が可能なプライマーを選抜した。遺伝子増幅法としての Nucleic acid-sequence based amplification (NASBA)法の簡略化を試み、熱変性操作を省略できることを明らかにした。カレーへのウエルシュ菌接種実験を行った結果、作製した核酸クロマト法で、 1.7×10^7 cfu/gの毒素産生ウエルシュ菌の検出が可能となった。

2：ウエルシュ菌の腸管内増殖機構

ウエルシュ菌食中毒機構の解析のため、トランスウエルとヒト腸管上皮由来培養細胞である Caco-2 細胞を用いて、腸管内菌増殖機構を検討した。前年度の検討で、ウエルシュ菌の腸管内増殖には、嫌気性と血清のような栄養素、ならびに、細胞の存在が必要であることがわかっている。トランスウエル内で培養した Caco-2 細胞は、細胞間接着を起して腸管上皮と同様の機能を持つ状態に分化する。分化後は細胞の接着によって、腸管腔内の粘膜面側と漿膜面側に相当する部分の物質輸送が制限される状態になる。分化後の Caco-2 細胞に感染症由来ウエルシュ菌を接種すると、同菌は細胞間の漿膜から粘膜面への物質輸送の制限機構を障害し、かつ、急激に増殖した。感染症成立時に作用を発揮している菌が産生する細胞障害性の毒素の関与が考えられた。一方、食中毒由来ウエルシュ菌の接種によっても漿膜から粘膜への物質輸送には大きな変化が認められなかった。接種後、同菌は徐々に増殖していた。物質輸送は障害されておらず、また、細胞も健全であったことから、食中毒由来ウエルシュ菌は細胞から栄養素を得て穏やかに増殖することが示された。

3：ウエルシュ菌エンテロトキシンの立体構造解析

ウエルシュ菌が産生するエンテロトキシンの全長を結晶化した。エンテロトキシンは大腸菌で調製した組換え体を用いた。Spring-8の利用によってX線回折図を得、エンテロトキシンの3次元構造を明らか

にした。結晶中ではエンテロトキシンは3量体を形成していた。エンテロトキシンは3種のドメインから構成されていた。このうちの2つのドメインがβ型の小孔誘導毒素と構造の類似性を示した。β型小孔誘導毒素はコレステロール依存性の細胞膜障害性毒素で、膜貫通領域のアミノ酸配列が同定されている。ウエルシュ菌エンテロトキシンにも類似する部分があることを明らかにした。この結果は、エンテロトキシン分子が疎水性相互作用で脂質細胞膜中に侵入し、膜内に構造物を形成させる可能性を示唆している。

4：ウエルシュ菌新型エンテロトキシンの単離

ウエルシュ菌食中毒は腸管上皮細胞を標的とするエンテロトキシンが下痢を誘発することで成立している。食品内および病勢初期の患者下痢便中から分離されたウエルシュ菌で、既知のエンテロトキシンが検出されないのに、下痢を誘発する能力がある事例菌株が分離されている。当該菌は新しい種類のエンテロトキシンを産生していると考えられる。Vero および L929 細胞を用いて、培養上清中の毒素の力価を定量的に示す方法を確立した。生化学的および分子生物学的手法を用いて、新型エンテロトキシンの精製を試みた。当該事例株である W5052 株を変法 DS 培地で培養し、生化学的手法を用いて新型エンテロトキシンの精製を試みた。段階的に濃度を調整した硫酸アンモニウム沈殿法と、分子量の違いでタンパク質を分離解析するゲルろ

過法を組み合わせ、活性を保持したままで、SDS-電気泳動上 10 数種のタンパク質群中に目的毒素タンパク質を回収できることを明らかにした。同 W5052 株のゲノム塩基配列を、次世代シーケンサーを用いて解析した。既知エンテロトキシン産生ウエルシュ菌 SM101 株には存在せず、W5052 株のみが保有する遺伝子は 54 種類で、この中に新型エンテロトキシン遺伝子が存在する可能性がある。部分精製毒素タンパク質の解析から得られる情報と、遺伝子解析から得られる情報を組み合わせ、新型エンテロトキシンの遺伝子およびそのタンパク質を同定できる可能性が認められた。

分 担 研 究 報 告 書

セレウスの嘔吐毒素産生に与える環境要因の影響に
関するマイクロアレイ解析

西川 禎一

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

「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

セレウスの嘔吐毒素産生に与える環境要因の影響に関するマイクロアレイ解析

分担研究者 西川 禎一 大阪市立大学大学院 生活科学研究科 教授

協力研究者 田中 仁 大阪市立大学大学院 生活科学研究科

研究要旨：食中毒菌のセレウスは嘔吐毒素のセレウリドを食品内で産生し、食品内毒素型食中毒を起こす。セレウリドはタンパク質の設計図とされる mRNA を介して合成されるペプチドではない非リボソーム合成ペプチドである。そのためセレウリド合成酵素がどのような調節を受け、いかなる代謝経路を介して毒素を産生するのか、その産生メカニズムについてはほとんど明らかにされていなかった。今回、マイクロアレイを用いて各種培養条件下での遺伝子発現と毒素産生の相関を検討したところ、セレウリド合成酵素遺伝子の一つで独立したプロモーター制御を受けているとされる *cesH* と無機陽イオンの輸送に関わる遺伝子の発現が培地成分によって変化し、セレウリド産生と関連している可能性が示唆された。

A. 目的

Bacillus cereus (以下セレウス) はグラム陽性通性嫌気性の桿菌で、土壌に広く分布している¹⁾。本菌による食中毒は下

痢型と嘔吐型の2種類に分類され、下痢型食中毒は食品に付着したセレウスが体内に取り込まれ、宿主の体の中で増殖、エンテロトキシンを産生することで発症

する（生体内毒素型）。一方、嘔吐型食中毒は食品内で産生された嘔吐毒素のセレウリドを摂取することで発症する（食品内毒素型）。セレウスを分離培養して調べると、セレウリド産生菌よりもエンテロトキシン産生菌株が圧倒的に多い。にもかかわらず、わが国ではセレウスによる食中毒事件のほとんどが嘔吐型食中毒である。これはセレウスによる嘔吐型食中毒の原因食品としてチャーハンやピラフといった米飯が挙げられることと、日本では米飯が主食であることが関連していると推察される。セレウスによる食中毒は厚生労働省の統計によると、発生件数・患者数、共に全事件に占める割合が1%程度と非常に少ないが、平成20年大阪府において、離乳食を食べた幼児がセレウス食中毒により死亡するなど、致命的にもなりうる。

セレウリドは、セレウリド合成酵素と呼ばれる非リボソームペプチド合成酵素（Nonribosomal peptide synthetase）によって生合成され²⁾、分子量が1,165の疎水性デプシ酸からなる環状ペプチドである³⁾。126°Cで90分の加熱、pH2または11の強酸・強塩基およびトリプシンへの曝露にも耐性を持っている⁴⁻⁶⁾。セレウスによる下痢型食中毒の多い欧米でも、原因食品が米飯の場合にはセレウスによる嘔吐型食中毒が起こっている⁷⁾。また、セレウリドの検査においても、米を添加した培地で培養することでセレウリド産生が検出されるようになる場合があり^{6,8)}、米の成分がセレウリド産生に何らかの影響

を及ぼしていることはほぼ明らかである。しかし外的要因がいかなる影響を及ぼしているか未だ明らかにされておらず、毒素産生が促進されるメカニズムについては依然として不明なままである。

本研究は、DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析によって、セレウリド産生・非産生条件下での遺伝子動態を観察し、セレウリド産生に関連している遺伝子を抽出することで毒素産生のメカニズムを明らかにし、嘔吐型食中毒の発生に関わる要因を明らかにすることを目的とする。

B. 方法

1 使用菌株

臨床分離した *Bacillus cereus*（以下セレウス）BC1 株を実験に供試した。

2 培地・試薬類

1) BRAIN HEART INFUSION BROTH (BHI ブイヨン)

BRAIN HEART INFUSION (OXOID) 37 g を1Lの蒸留水に溶解し、中試験管に10ml ずつ分注し、オートクレーブ滅菌（121°Cで15分）した。

2) トリプトソーヤ寒天培地 (TSA)

トリプトソーヤ寒天培地（日水製薬）40g を1Lの蒸留水に溶解しオートクレーブ滅菌した後、シャーレに20 ml ずつ分注して寒天平板とした。

3) BHI 培地 (BHI)

BRAIN HEART INFUSION 37 g を 1 L の蒸留水に溶解した。三角フラスコに 10 ml 分注後、オートクレーブ滅菌した。

4) スキムミルク BHI (BHI-SM)

BRAIN HEART INFUSION 37 g とセレウリド産生の促進用に Skim milk (Becton, Dickinson) 30g を 1 L の蒸留水に溶解し、50ml 三角フラスコに 10ml 分注し、シリコン栓をしてオートクレーブ滅菌した。

5) MEM

イーグル MEM 培地③ (日水製薬) 4.7g を Milli Q 水 500 ml に溶解し、Phenol red solution (SIGMA-ALDRICH Inc) を 500 μ l 加えてオートクレーブ滅菌した。これに、炭酸水素ナトリウム (和光純薬工業) の 7.5% (w/v) 水溶液 10 ml と、L-グルタミン (ICN Biomedicals Inc) の 5% (w/v) 水溶液 3 ml を、各々フィルター滅菌した後に加えた。細胞培養用には非働化 (56°C で 30 分加温) した FETAL BOVINE SERUM ; FBS (JRH BIOSCIENCES A CSL Company) 50 ml を加え、10% FBS EMEM とした。空胞化試験には FBS 濃度を 1% に調整し、ゲンタマイシン硫酸塩 (和光純薬工業) を 50 μ g/ml となるように添加した EMEM を使用した。

6) トリプシン

0.5% (w/v) トリプシン - 5.3 mM EDTA \cdot 4Na 溶液 (フェノールレッド不含) ($\times 10$) (和光純薬工業) を PBS で 10 倍

希釈した。

7) 10% ギムザ染色液

ギムザ液 (和光純薬工業) を純水で 10 倍希釈した。

8) 0.08 M Tris-HCl

2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol 999 (和光純薬工業) 12.1 g を Milli Q 水で溶解し、10 N HCl (和光純薬工業) で pH を 7.5 に調整後、全量が 100ml となるように Milli Q 水でメスアップして調製した 1 M Tris-HCl を 12.5 倍希釈した。

9) 5 \times TBE バッファー

Tris 10.8g、ほう酸 (和光純薬工業) 5.5g、EDTA \cdot 2Na (和光純薬工業) 0.83g を Milli Q 水に溶解し 1 L にメスアップした。

10) 2% アガロースゲル

Agarose HE (和光純薬工業) 2 g を 100 ml の 0.5 \times TBE バッファーに加温溶解し、泳動ゲルの型に流し入れ、コームを挿して固めた。

11) エチジウムブロマイド溶液

臭化エチジウム (和光純薬工業) を 0.5 μ g/ml となるように 0.5 \times TBE バッファーで調整した。

12) PBS

塩化ナトリウム (和光純薬工業) 40 g、リン酸水素二ナトリウム \cdot 12 水 (和光純薬工業) 14.5 g、塩化カリウム (半井化

学薬品) 1 g、リン酸二水素カリウム (和光純薬工業) 1 g を 500 ml の蒸留水に溶解し、オートクレーブ滅菌したものを 10 × PBS とし、使用する際はこれを蒸留水で 10 倍希釈し、オートクレーブ滅菌して用いた。

13) TE

Tris-HCl が 10 mM、0.5 M EDTA (和光純薬工業) が 1 mM となるように DEPC 処理水 (和光純薬工業) で調整した。

14) 5 M NaCl

塩化ナトリウムを 5 M となるように DEPC 処理水で調整した。

15) 10% CTAB-0.7 M NaCl

Cetyltrimethylammonium Bromide (CALBIOCHEM) が 10%(w/v)、塩化ナトリウムが 0.7 M となるように DEPC 処理水で調整した。

3 実験方法

1) セレウスのデンプン分解性

BHI で前培養したセレウスを BHI デンプン培地上にスポットし、30°C で一晩培養した。形成されたコロニーを白金耳で除去した後、ルゴール液をスポイトで滴下し、ヨウ素デンプン反応でデンプン分解性を確認し、各株のアミラーゼ産生性を確認した。

2) セレウリド合成酵素遺伝子の有無

①テンプレートの作製

BHI で前培養したセレウスを TSA 上に画線し 30°C で一晩培養した。シングルコロニーを 25 μ l のオートクレーブ滅菌 Milli Q 水に懸濁し、等量の 50 mM NaOH を加え、95°C で 10 分間加熱処理した。0.08M Tris-HCl を 50 μ l 加えてアルカリを中和し、PCR の DNA テンプレートとした。
②セレウリド合成酵素 (CRS) 遺伝子の確認

CRS 遺伝子は *Bacillus cereus* PCR detection kit (タカラバイオ) のマニュアルにしたがって PCR によって検出した。0.5 × TBE を泳動バッファーとして 3% アガロースゲルにプロダクトを電気泳動した。泳動後、エチジウムブロマイド溶液に 20 分、蒸留水に 10 分浸した後 UV 照射して目的のアンプリコンを検出した。なおセレウス菌であることを確認するために lecithinase 遺伝子も同時に検出した。

3) 細胞培養・継代

HEp-2 細胞および Hep-G2 細胞を 10% FBS EMEM または DMEM で 25 cm² のフラスコにフルシートになるまで培養した。フルシート後は PBS で洗浄し、トリプシン処理した後 3 倍に希釈して継代した。

4) 培養上清試料の作成

BHI で前培養したセレウスを各三角フラスコ培地に 100 μ l 接種し、30°C で 15 時間、毎分 120 回の速さで振盪培養した。この培養液を 50ml の遠沈管に移し、8000rpm で 5 分遠心して得られた上清をフィルター滅菌したものをセレウスの培

養上清とした。

5) HEp-2 細胞空胞化試験

PBS を用いて、セレウス培養上清の 2 倍段階希釈系列を 96 ウェルのタイタープレートに作った。トリプシン処理したフルシートの HEp-2 細胞を空胞化試験用 EMEM 10ml で懸濁し、各ウェルに 100 μ l ずつ加え、CO₂ インキュベータで 48 時間培養した。その後上清を除き、細胞をメタノール固定後、10%ギムザ液で細胞を染色し、相差顕微鏡で空胞を観察した。お空胞とは、図 1 のような像が全体的に見られることを示す。

6) RNA 抽出

振盪培養したセレウスを一度遠沈して菌体を得、RNAprotect Bacteria Reagent (QIAGEN) で処理し、室温で 5 分放置後 5000 \times g で 10 分遠心して上清を完全に除去した (ここで-80 $^{\circ}$ Cでの凍結保存が可能)。

TE で 100 mg/ml に調整した LYSOZYME (MP BIOMEDICALS) 450 μ l を沈渣に加え、ボルテックスで適宜混和して室温で 10 分放置し、2ml のチューブに 150 μ l ずつ 3 等分した後、10,000 rpm で 5 分遠心した。

沈渣に 50 $^{\circ}$ C に温めた Sepasol (ナカライテスク) 1 ml を加えて溶菌させ、50 $^{\circ}$ C で 10 分放置後、室温で 5 分放置した。

200 μ l のクロロホルム (和光純薬工業) を加えて転倒混和し、室温で 3 分放置後 4 $^{\circ}$ C 12,000 \times g で 15 分遠心した。この際、新たな 2 ml のチューブにあらかじめ 500

μ l のイソプロパノールを加えておき、遠心後の水層を加え、よく混和して室温で 10 分放置後 4 $^{\circ}$ C 12,000 \times g で 10 分遠心し、上清を捨てた。

ペレットに DEPC 処理水 600 μ l、5 M NaCl 100 μ l、10% CTAB-0.7M NaCl 80 μ l を加えて 65 $^{\circ}$ C で 10 分放置後した後、CI (クロロホルム : イソアミルアルコール=24:1) 700 μ l を加えて 4 $^{\circ}$ C 12,000 \times g で 10 分遠心した。この際、新たな 2 ml のチューブにあらかじめ 500 μ l のイソプロパノールを加えておき、遠心後の水層を加え、よく混和して室温で 10 分放置後、QIAGEN の RNeasy Mini kit のカラムに吸着させ、kit のマニュアル通りに RNA 抽出を行ない、抽出後はマイクロアレイ解析に用いるまで-80 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

7) 菌数測定

スパイラルプレーター (IUL instrument) の D mode を用いて、スパイラルプレーティング法により Colony forming unit (CFU) として菌数を測定した。

8) 芽胞化率測定

培養サンプルの生菌数を測定すると同時に、62 $^{\circ}$ C で 30 分加温処理したサンプルの菌数測定 (これを芽胞数とした) を行ない、生菌数に対する芽胞数から芽胞化の割合を算出した。

9) DNA マイクロアレイ

Agilent 社製のチップ (8 \times 15 k) を

Bacillus cereus AH187 用にカスタム化して用いた。1色法により、各培養条件におけるセレウスの遺伝子発現値を比較した。なお発現値の比較として、蛍光値の解析には Agilent 社の Feature Extraction Ver. 9.5.3 を用いた。

10) 遺伝子解析

解析ソフト、Agilent 社製 GeneSpring GX v. 11.0.2 を用いた。

C. 結果

セレウリド産生性を調べるために、培養条件として 20℃で 15 時間および 24 時間培養、30℃では 8 時間および 15 時間培養した。その結果 30℃、15 時間 BHI-SM で培養したサンプルでのみセレウリドが検出された(表 1)。

毒素産生・非産生条件において培養温度および培地成分の違いがいかなる影響を遺伝子発現と毒素産生に及ぼしているかを検討するため、これらの各サンプルから mRNA を抽出して cDNA に逆転写した後、マイクロアレイによってトランスクリプトーム解析を行なった。なお RNA 抽出は、RNAprotect Bacteria Reagent による mRNA の保護処理後、凍結保存せずにそのまま抽出作業に入ることで、質の良い RNA の抽出を試みた。

最初にマイクロアレイのスキヤンイメージを DNA Microarray

Scanner G2505C (Agilent) によって撮影し(図 1)、蛍光強度を測定した。30℃培養のサンプルと 20℃培養のサンプル間で、蛍光イメージがわずかに異なる結果となった。しかしながら、データ正規化後の解析に影響を与えるほどではなく、培地の相違、および培養温度の相違に基づいて比較を行なった。

階層的クラスタリングの結果(図 2)、線①下でクラスターを分けると 20℃培養と 30℃培養のサンプルで 2 つのクラスターに分かれた。さらに線②下では「20℃で 15 時間培養」と「20℃で 24 時間培養」に分かれ、線③下でクラスターを分けると「30℃で 15 時間培養」と「30℃で 8 時間培養」に分かれた。以上の結果から、培養温度の相違が発現変動に最も大きく影響し、続いて培養時間の相違が影響していることが示された。また毒素産生が見られた 30℃ 15 時間培養の BHI-SM の A および B で遺伝子発現値のクラスター分布が類似していないため、全遺伝子を観察しても毒素産生関連遺伝子を把握できなかった。

次に、有効遺伝子セットによる全サンプルの主成分分析を行ない、各サンプルの類似度を比較した(図 3)。クラスター解析の結果と同様、第一主成分である X 軸の示す値が 30℃と 20℃のサンプルで大きく分かれた。すなわち、クラスター解析

および主成分分析によると（図 8、9）、30℃と20℃における変動遺伝子数が多く、温度変化によって大きく分類され、毒素産生と特異的に関連した分類には至らなかった。

全遺伝子を網羅的に把握しようとする、毒素産生・非産生に影響を及ぼした遺伝子を検出することができなかつたため、毒素が検出された 30℃で 15 時間培養の BHI-SM を基準とし、その他の培養条件と遺伝子発現に差が見られたものを比較し、どのような機能を持った遺伝子と毒素産生が関連性を示すかを検討した。遺伝子の発現値に 2 倍以上の差が得られたもの（表 2）および 4 倍以上の差が得られたものを挙げ（表 3）、その各遺伝子群に関して塩基配列等から、統計的な評価に基づいて特徴的な GO term を抽出し、毒素産生と生物学的な現象を関連付け、各 GO term ごとの有意差の算出を試みた（表 4、5）。

2 倍以上の発現値の差は遺伝子数が多すぎたため、4 倍以上の発現差が見られた遺伝子に絞り、培地成分の影響が毒素産生を亢進させた 30℃、15 時間培養の BHI-SM と、コントロールの BHI の発現値を比較した図をヒートマップで示した（表 6）。また、BHI-SM の 15 時間培養で 30℃と 20℃の違いについては、遺伝子群ではなく GO term で示した（表 7、8）。その結果、毒素産生が

亢進した培養条件下では金属イオンや陽イオンの輸送に関連する遺伝子の発現上昇が確認された。温度条件の違いは全遺伝子の網羅的解析と同様に菌の成長・増殖に関わる遺伝子を大きく変動させていた。

次に、毒素産生に関わっている遺伝子に絞って検討したところ、セレウリド合成酵素については 20℃で 24 時間培養のサンプルで BHI および BHI-SM とともに発現値の上昇が認められた（表 9）。しかし、セレウリド合成酵素遺伝子の中の *cesH* 遺伝子については、30℃培養の BHI-SM における 8 および 15 時間培養で発現上昇が確認された。

さらに、ウェルシュ菌などと同様に芽胞化と毒素産生との関連を疑ったが、その関連は認められなかった（表 10、図 4、5）。

D. 考察

今回検討した培養条件では、スキムミルクを添加した BHI を用いて 30℃で 15 時間培養した場合にのみセレウリドの産生が検出され、無添加の BHI を使用した場合や、20℃で培養した場合にはセレウリドは検出されなかった。そこで、これらの培養菌液から回収した菌体に含まれる mRNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行う事でセレウリド産生

に関連する遺伝子発現の変動を網羅的に捕捉できると期待し実験を行った。

網羅的解析では培養温度が影響を及ぼした遺伝子群の数が圧倒的に多く、次いで培養時間が影響しており、いずれも菌の増殖および成長に関わっていると考えられる遺伝子を中心とする変動が数多く確認された。しかしながら、今回の解析ソフトではセレウリド産生条件下に特異的な発現変動を捕捉することはできなかった。そこで、同じ30℃での15時間培養でもスキムミルク添加が無ければセレウリドが産生されなかったことに着目し、培地成分による影響を中心に検討した。

ウェルシュなどの食中毒菌は芽胞化時に毒素が放出される⁹⁻¹¹⁾。*Bacillus thuringiensis*も芽胞形成時に殺虫毒素を産生することから¹²⁾、セレウリドについても芽胞化および発芽関連遺伝子との関連に焦点を当てたが、これらの遺伝子群の挙動は温度間での変動が大きく、スキムミルクを添加することによる影響は認められず(図4、5)、セレウリド産生と芽胞化は影響しないという先行研究と一致した¹³⁾。また、表10の結果からもスキムミルクの添加によって芽胞化が促進された傾向は認められなかった。

さらに、セレウスの転写因子であ

りエンテロトキシンなどの病原因子発現に関連していると報告されているPlcR遺伝子^{14,15)}、セレウリド合成酵素遺伝子のリプレッサーとして働くとの報告があるAbrB遺伝子¹⁶⁾、そしてAbrBを抑制したり直接的に遺伝子発現を調整したりすることで芽胞化など様々な機能を調整している因子であるSpo0Aの遺伝子¹⁷⁻¹⁹⁾等について検討したが、毒素産生条件とそれ以外の条件で、発現値に差は認められなかった。

セレウリドはセレウリド合成酵素によって生産されるが、その酵素をコードする*ces*は、ポリシストロン性の*cesPTABCD*と独自のプロモーターを持つ*cesH*で構成されている²⁰⁾。セレウリド合成酵素としては*cesPTABCD*のプロモーターが主な役割を担っていると報告されているが、今回の解析では*cesH*遺伝子が30℃培養のBHI-SMにおいて8、15時間培養ともに発現値の上昇傾向が認められたことから、*cesH*がスキムミルク(食品成分)に反応して毒素産生を調節している可能性が考えられる。*cesH*のプロモーター制御に着目して食品成分や培地成分によるセレウリド産生の調節を検討する価値はある。毒素自体は培養後15時間経過しないと検出されなかったが、8時間での*cesH*の発現値が相対的に高かったこともセレウリド産生の制御に本遺伝子