

が関わっていることを示唆する。今後はこの *cesH* に絞ってリアルタイム RT-PCR などを行なうことで、時系列的に毒素産生と本遺伝子発現との相関を観察する予定である。

#### E. 健康危害情報

無し。

#### F. 文献

- 1) 河合高生、浅尾努 (2009): *Bacillus cereus*. p. 439-455. In 仲西寿男, 丸山務, (ed.), 食品由来感染症と食品微生物. 中央法規, 東京.
- 2) Toh, M., Moffitt, M. C., Henrichsen, L., et al. (2004): Cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, is putatively a product of nonribosomal peptide synthesis. J. Appl. Microbiol., 97, 992-1000.
- 3) Agata, N., Mori, M., Ohta, M., et al. (1994): A novel dodecadeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. FEMS Microbiology Letters, 121, 31-34.
- 4) Melling, J. and Capel, B. J. (1978): Characteristics of *Bacillus cereus* emetic toxin. FEMS Microbiol. Lett., 4, 133-135.
- 5) Shinagawa, K., Ueno, Y., Hu, D. L., et al. (1996): Mouse lethal activity of a HEp-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. J. Vet. Med. Sci., 58, 1027-1029.
- 6) Shinagawa, K., Otake, S., Matsusaka, N., et al. (1992): Production of the vacuolation factor of *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. J. Vet. Med. Sci., 54, 443-446.
- 7) Kramer, J. M. and Gilbert, R. J. (1989): *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. p. 21-70. In M. P. Doyle, (ed.), Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker, New York.
- 8) Nishikawa, Y., Kramer, J. M., Hanaoka, M., et al. (1996): Evaluation of serotyping, biotyping, plasmid banding pattern analysis, and HEp-2 vacuolation factor assay in the epidemiological investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. Int. J. Food Microbiol., 31, 149-159.
- 9) Duncan, C. L. (1973): Time of enterotoxin formation and release during sporulation of *Clostridium perfringens* type A. J. Bacteriol., 113, 932-936.
- 10) Duncan, C. L., King, G. J. and Frieben, W. R. (1973): A paracrystalline inclusion formed during sporulation of

- enterotoxin-producing strains of *Clostridium perfringens* type A. J. Bacteriol., 114, 845-859.
- 11) Duncan, C. L., Strong, D. H. and Sebald, M. (1972): Sporulation and enterotoxin production by mutants of *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol., 110, 378-391.
- 12) Scherrer, P., Luthy, P. and Trumpi, B. (1973): Production of  $\alpha$ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentrations. Appl. Microbiol., 25, 644-646.
- 13) Häggblom, M. M., Apetroaie, C., Andersson, M. A., et al. (2002): Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. Appl. Environ. Microbiol., 68, 2479-2483.
- 14) Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., et al. (2008): The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. Plos One, 3,
- 15) Okstad, O. A., Gominet, M., Purnelle, B., et al. (1999): Sequence analysis of three *Bacillus cereus* loci carrying PlcR-regulated genes encoding degradative enzymes and enterotoxin. Microbiology-SGM, 145, 3129-3138.
- 16) Lucking, G., Dommel, M. K., Scherer, S., et al. (2009): Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR. Microbiology-SGM, 155, 922-931.
- 17) Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R., et al. (2000): The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 8063-8068.
- 18) Hamon, M. A. and Lazazzera, B. A. (2001): The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol., 42, 1199-1209.
- 19) Jiang, M., Shao, W. L., Perego, M., et al. (2000): Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol., 38, 535-542.
- 20) Dommel, M. K., Frenzel, E., Strasser, B., et al. (2010): Identification of the main promoter directing cereulide biosynthesis in emetic *Bacillus cereus* and its application for real-time monitoring of *ces* gene expression in foods. Appl. Environ. Microbiol., 76, 1232-1240.

G. 研究発表

無し。

H. 学会発表

- 1) Tanaka H., Kamata Y., Nishikawa, Y.  
Microarray analysis of effects of environmental factors on cereulide production by emetic *Bacillus cereus*.  
IUMS2011. 2011年9月予定。札幌。

I. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得

無し。

- 2) 実用新案取得

無し。

- 3) その他

無し。

表 1 各培養条件における毒素産生

培養温度	時間	培地	空胞変性	阻止円
20°C	15h	BHI	-	-
		BHI-SM	-	-
	24h	BHI	-	-
		BHI-SM	-	-
30°C	8h	BHI	-	-
		BHI-SM	-	-
	15h	BHI	-	-
		BHI-SM	+	+

表 2 2倍以上の変化が観測された遺伝子数

リスト名	プローブ数	説明
C30_15vsC20_15_2dn	1719	C30_15vsC20_15の比較においてFC>=2で抽出した発現抑制遺伝子
C30_15vsC20_15_2up	2469	C30_15vsC20_15の比較においてFC>=2で抽出した発現亢進遺伝子
S20_15vsC20_15_2dn	903	S20_15vsC20_15の比較においてFC>=2で抽出した発現抑制遺伝子
S20_15vsC20_15_2up	264	S20_15vsC20_15の比較においてFC>=2で抽出した発現亢進遺伝子
S20_24vsC20_24_2dn	951	S20_24vsC20_24の比較においてFC>=2で抽出した発現抑制遺伝子
S20_24vsC20_24_2up	543	S20_24vsC20_24の比較においてFC>=2で抽出した発現亢進遺伝子
S30_15vsC30_15_2dn	376	S30_15vsC30_15の比較においてFC>=2で抽出した発現抑制遺伝子
S30_15vsC30_15_2up	782	S30_15vsC30_15の比較においてFC>=2で抽出した発現亢進遺伝子
S30_15vsS20_15_2dn	1698	S30_15vsS20_15の比較においてFC>=2で抽出した発現抑制遺伝子
S30_15vsS20_15_2up	2446	S30_15vsS20_15の比較においてFC>=2で抽出した発現亢進遺伝子
S30_8vsC30_8_2dn	555	S30_8vsC30_8の比較においてFC>=2で抽出した発現抑制遺伝子
S30_8vsC30_8_2up	926	S30_8vsC30_8の比較においてFC>=2で抽出した発現亢進遺伝子

表 3 4倍以上の変化が観測された遺伝子数

リスト名	プローブ数	説明
C30_15vsC20_15_4dn	1197	C30_15vsC20_15の比較においてFC>=4で抽出した発現抑制遺伝子
C30_15vsC20_15_4up	1779	C30_15vsC20_15の比較においてFC>=4で抽出した発現亢進遺伝子
S20_15vsC20_15_4dn	289	S20_15vsC20_15の比較においてFC>=4で抽出した発現抑制遺伝子
S20_15vsC20_15_4up	23	S20_15vsC20_15の比較においてFC>=4で抽出した発現亢進遺伝子
S20_24vsC20_24_4dn	127	S20_24vsC20_24の比較においてFC>=4で抽出した発現抑制遺伝子
S20_24vsC20_24_4up	103	S20_24vsC20_24の比較においてFC>=4で抽出した発現亢進遺伝子
S30_15vsC30_15_4dn	33	S30_15vsC30_15の比較においてFC>=4で抽出した発現抑制遺伝子
S30_15vsC30_15_4up	89	S30_15vsC30_15の比較においてFC>=4で抽出した発現亢進遺伝子
S30_15vsS20_15_4dn	1111	S30_15vsS20_15の比較においてFC>=4で抽出した発現抑制遺伝子
S30_15vsS20_15_4up	1814	S30_15vsS20_15の比較においてFC>=4で抽出した発現亢進遺伝子
S30_8vsC30_8_4dn	32	S30_8vsC30_8の比較においてFC>=4で抽出した発現抑制遺伝子
S30_8vsC30_8_4up	139	S30_8vsC30_8の比較においてFC>=4で抽出した発現亢進遺伝子

表 4 各GOの有意差 (2-fold change)

遺伝子リスト	GO 解析結果		
	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
C30_15vsC20_15_2dn	○	○	○
C30_15vsC20_15_2up	○	○	×
S20_15vsC20_15_2dn	○	×	×
S20_15vsC20_15_2up	○	○	○
S20_24vsC20_24_2dn	○	○	○
S20_24vsC20_24_2up	○	○	×
S30_15vsC30_15_2dn	×	×	×
S30_15vsC30_15_2up	○	○	○
S30_15vsC20_15_2dn	○	○	○
S30_15vsC20_15_2up	○	○	×
S30_8vsC30_8_2dn	○	○	×
S30_8vsC30_8_2up	○	×	×

○ : 有意差あり、× : 有意差なし (corrected p-value <=0.1)

表5 各GOの有意差 (4-fold change)

遺伝子リスト	GO解析結果		
	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
C30_15vsC20_15_4dn	○	○	○
C30_15vsC20_15_4up	○	○	×
S20_15vsC20_15_4dn	○	×	×
S20_15vsC20_15_4up	○	○	×
S20_24vsC20_24_4dn	×	×	×
S20_24vsC20_24_4up	○	○	×
S30_15vsC30_15_4dn	×	×	×
S30_15vsC30_15_4up	○	○	○
S30_15vsC20_15_4dn	○	○	○
S30_15vsC20_15_4up	○	○	×
S30_8vsC30_8_4dn	×	×	×
S30_8vsC30_8_4up	○	○	○

○ : 有意差あり、× : 有意差なし (corrected p-value ≤0.1)

表 6 培地成分によって発現値が上昇した遺伝子群

<b>biological process</b>					
nucleobase, nucleoside and nucleotide metabolic process (GO:0055086)					
ProbeName	Fold change	Regulation	[C-30-15]	[S-30-15]	
BCAH187_A2005	5.29	up	1.24384	1.1602	
BCAH187_A2004	6.84	up	-1.34114	1.43253	
BCAH187_A2002	9.18	up	-2.2528	0.94573	
cation transport (GO:0006812 GO:0006819)					
BCAH187_A0841	12.42	up	0.1353	3.77041	
BCAH187_A0842	5.43	up	-1.85408	0.58632	
ferrous iron transport (GO:0015684)					
BCAH187_A0841	12.42	up	0.1353	3.77041	
BCAH187_A0842	5.43	up	-1.85408	0.58632	
divalent metal ion transport (GO:0070838)					
BCAH187_A0841	12.42	up	0.1353	3.77041	
BCAH187_A0842	5.43	up	-1.85408	0.58632	
<b>molecular function</b>					
inorganic cation transmembrane transporter activity (GO:002289)					
ProbeName	Fold change	Regulation	[C-30-15]	[S-30-15]	
BCAH187_A2003	8.87	up	-1.48082	1.66746	
BCAH187_A0841	12.42	up	0.1353	3.77041	
cation transmembrane transporter activity (GO:0008324)					
BCAH187_A2003	8.87	up	-1.48082	1.66746	
BCAH187_A5375	4.34	up	-0.57284	1.54624	
BCAH187_A2003	8.87	up	-1.48082	1.66746	
BCAH187_A0841	12.42	up	0.1353	3.77041	
ferrous iron transmembrane transporter activity (GO:0015093)					
BCAH187_A0841	12.42	up	0.1353	3.77041	
BCAH187_A0842	5.43	up	-1.85408	0.58632	
ion transmembrane transporter activity (GO:0015075)					
BCAH187_A5375	4.34	up	-0.57284	1.54624	
BCAH187_A2003	8.87	up	-1.48082	1.66746	
BCAH187_A0841	12.42	up	0.1353	3.77041	
BCAH187_A0842	5.43	up	-1.85408	0.58632	
<b>cellular component</b>					
intracellular part (GO:0044424)					
BCAH187_A0565	4.57	up	-1.34473	0.84743	
BCAH187_A2002	9.18	up	-2.2528	0.94573	

表 7 S20\_15 に対する S30\_15 の発現亢進 (4-fold)

<b>biological process</b>
transposition, DNA-mediated (GO:0006313 GO:0006317 GO:0006318)
transposition (GO:0032196)
spore germination (GO:0009847)
RNA-dependent DNA replication (GO:0006278)
<b>molecular function</b>
transposase activity (GO:0004803)
RNA-directed DNA polymerase activity (GO:0003964)



表 8 S20\_15 に対する S30\_15 の発現抑制 (4-fold) (1/3)

biological process
cellular process (GO:0009987 GO:0008151 GO:0050875)
cellular macromolecule metabolic process (GO:0044260 GO:0034960)
gene expression (GO:0010467)
cellular metabolic process (GO:0044237)
cellular biosynthetic process (GO:0044249)
biosynthetic process (GO:0009058)
RNA processing (GO:0006396 GO:0006394)
primary metabolic process (GO:0044238)
macromolecule metabolic process (GO:0043170 GO:0043283)
cellular macromolecule biosynthetic process (GO:0034645 GO:0034961)
macromolecule biosynthetic process (GO:0009059 GO:0043284)
cellular lipid metabolic process (GO:0044255)
ncRNA processing (GO:0034470)
translation (GO:0006412 GO:0006416 GO:0006453 GO:0043037)
RNA metabolic process (GO:0016070)
lipid biosynthetic process (GO:0008610)
nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process (GO:0006139)
ncRNA metabolic process (GO:0034660)
lipid metabolic process (GO:0006629)
tRNA processing (GO:0008033)
metabolic process (GO:0008152)
carbohydrate biosynthetic process (GO:0016051 GO:0006093)
tRNA metabolic process (GO:0006399)
locomotion (GO:0040011)
nitrogen compound metabolic process (GO:0006807)
cellular component movement (GO:0006928)
RNA modification (GO:0009451 GO:0016547)
cellular macromolecule catabolic process (GO:0044265 GO:0034962)
cellular carbohydrate metabolic process (GO:0044262 GO:0006092)
cellular protein metabolic process (GO:0044267)
ciliary or flagellar motility (GO:0001539)
cell motility (GO:0048870)
localization of cell (GO:0051674)
carbohydrate metabolic process (GO:0005975)

表 8 S20\_15 に対する S30\_15 の発現抑制 (4-fold) (2/3)

biological process
monosaccharide metabolic process (GO:0005996)
alcohol metabolic process (GO:0006066)
polysaccharide biosynthetic process (GO:0000271)
ribonucleoprotein complex biogenesis (GO:0022613)
ribosome biogenesis (GO:0042254 GO:0007046)
rRNA metabolic process (GO:0016072)
cellular component biogenesis (GO:0044085)
chemotaxis (GO:0006935)
biological_process (GO:0008150 GO:0000004 GO:0007582)
taxis (GO:0042330)
nucleoside metabolic process (GO:0009116)
glucose catabolic process (GO:0006007)
fatty acid biosynthetic process (GO:0006633 GO:0000037)
cellular carbohydrate catabolic process (GO:0044275)
peptidoglycan-based cell wall biogenesis (GO:0009273)
cell wall biogenesis (GO:0042546)
rRNA processing (GO:0006364 GO:0006365)
protein localization (GO:0008104)
alcohol catabolic process (GO:0046164)
pseudouridine synthesis (GO:0001522)
isoprenoid metabolic process (GO:0006720 GO:0016096)
isoprenoid biosynthetic process (GO:0008299 GO:0009241)
cellular cell wall organization or biogenesis (GO:0070882)
hexose catabolic process (GO:0019320)
establishment of protein localization (GO:0045184)
protein transport (GO:0015031 GO:0015831)
macromolecule localization (GO:0033036)
glycolysis (GO:0006096 GO:0019641 GO:0019642)
monosaccharide catabolic process (GO:0046365)
molecular function
RNA binding (GO:0003723)
structural molecule activity (GO:0005198)
motor activity (GO:0003774)
isomerase activity (GO:0016853)
structural constituent of ribosome (GO:0003735 GO:0003736 GO:0003737 etc.)
RNA methyltransferase activity (GO:0008173)
intramolecular transferase activity (GO:0016866)
nuclease activity (GO:0004518)
GTP binding (GO:0005525)
guanyl ribonucleotide binding (GO:0032561)
guanyl nucleotide binding (GO:0019001)
ligase activity (GO:0016874)
pseudouridine synthase activity (GO:0009982 GO:0016439)
hydrolase activity, acting on ester bonds (GO:0016788)

表 8 S20\_15 に対する S30\_15 の発現抑制 (4-fold) (3/3)

cellular component
intracellular part (GO:0044424)
cytoplasm (GO:0005737)
non-membrane-bounded organelle (GO:0043228)
intracellular non-membrane-bounded organelle (GO:0043232)
cytoplasmic part (GO:0044444)
organelle (GO:0043226)
intracellular organelle (GO:0043229)
intracellular (GO:0005622)
ribonucleoprotein complex (GO:0030529)
macromolecular complex (GO:0032991)
ribosome (GO:0005840)

表9 セレウリド合成酵素遺伝子のヒートマップ

		20°C							
		C-20-15h		C-20-24h		S-20-15h		S-20-24h	
Sample No.		A	B	A	B	A	B	A	B
cesA		-3.28	-2.89	2.01	2.10	-2.84	-3.33	1.29	1.07
cesB		-3.37	-3.06	2.26	1.99	-2.88	-3.15	0.96	0.76
cesC		-3.18	-2.96	2.38	2.30	-2.68	-2.80	1.08	0.83
cesD		-2.73	-2.60	3.31	2.90	-2.58	-2.16	1.54	1.22
cesH		-1.23	-0.51	-0.90	-0.63	0.02	-0.64	0.19	-0.02
cesP		-3.69	-3.55	1.67	1.81	-3.96	-3.85	1.86	1.40
cesT		-3.19	-2.90	2.06	2.28	-3.17	-3.32	2.68	1.64
		30°C							
		C-30-8h		C-30-15h		S-30-8h		S-30-15h	
Sample No.		A	B	A	B	A	B	A	B
cesA		0.62	0.87	-1.53	-0.69	-0.42	0.34	-0.34	1.83
cesB		0.31	0.56	-1.62	-0.87	-0.63	0.07	-0.07	1.45
cesC		0.08	0.57	-1.65	-1.15	-0.93	0.10	-0.08	1.16
cesD		0.05	0.47	-1.65	-1.07	-0.92	0.04	-0.04	0.95
cesH		0.10	0.24	-0.67	-0.13	0.76	1.39	0.11	1.05
cesP		0.07	-0.06	-0.32	-0.31	0.06	-0.12	0.42	0.82
cesT		-0.05	0.05	-0.73	-0.46	0.45	-0.09	0.60	0.45

表10 30°C 15時間培養における芽胞化率

	生菌数	芽胞数	芽胞化率
BHI	1.6E+09	5.1E+04	3.3E-03
BHI-SM	1.0E+09	4.1E+04	3.9E-03

分 担 研 究 報 告 書

新型ブドウ球菌エンテロトキシンの産生量評価

重茂 克彦

## 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

#### 新型ブドウ球菌エンテロトキシンの産生量評価

分担研究者      重茂 克彦      岩手大学 農学部 教授

協力研究者      佐藤 明彦      岩手大学 農学部

品川 邦汎      岩手大学 農学部

研究要旨：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、SEIM、SEIN、SEIO 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  $1 \times 10^8$  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  $1 \times 10^3$  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。

## A. 研究目的

黄色ブドウ球菌は、食品内で増殖する際に嘔吐毒であるエンテロトキシン (Staphylococcal Enterotoxins; SEs) を産生する毒素型食中毒原因菌である。従来、SEs は SEA-SEE の 5 型が存在することが知られていたが、近年新型エンテロトキシンが次々に報告され、現在では SEG-SEIV の 16 種の新型 SEs および Staphylococcal Enterotoxin-like toxins (SEIs) の存在が明らかになっているが、新型 SEs および SEIs の高感度検出法は開発されていなかった。前年度および前々年度の研究で、我々は新型 SEs および SEIs の高感度検出法を確立し、新型 SEs/SEIs の産生量を検討したところ、37°C の培養温度では毒素型によってその産生量に大きな差が存在し、特に SEG、SEI、SEIM、SEIN および SEIO の産生量が極めて低いこと、またこれらの毒素群は 25°C で培養すると産生が増強されることを明らかにした。これらの毒素遺伝子は黄色ブドウ球菌ゲノム上の *vSaβ* という Genomic island にクラスターを形成して存在しており、Enterotoxin gene cluster (*egc*) と命名された領域を形成している。わが国において *egc* 関連毒素群 (SEG、SEI、SEIM、SEIN および SEIO) 遺伝子のみを保有する黄色ブドウ球菌による食中毒が数件報告されているが、室温に近い条件では、これらの毒素が食中毒を引き起こすに十分な量が生産されうる可能性がある。

本年度は、*egc* 関連毒素群の産生量に対する温度の影響を詳細に検討した。

## B. 実験方法

### 1 供試菌株

本研究で用いた、*egc* 関連 SEs 遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌 8 株 (食中毒由来株 7 株、健康ヒト鼻腔由来株 1 株) の性状を表 1 に示す。黄色ブドウ球菌の継代には Difco™ Brain Heart Infusion Agar (Becton, Dickinson and Company) (BHI agar) を用いた。

### 2 Sandwich ELISA

固層抗体には精製 IgG 分画あるいは各 SE に対するウサギ特異抗体を使用し、検出抗体には HRP (Horseradish Peroxidase) 標識特異抗体を用いた。また SE10 検出系については、固層抗体に抗 rSE10 ウサギ特異抗体を、検出抗体には HRP 標識ニワトリ特異抗体を用いた。標準曲線用スタンダードおよび測定サンプルの希釈には Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBO) (以下 Solution 1 と略) を用いた。検出抗体の希釈には Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2 (以下 Solution 2 と略) を用いた。ブロッキングバッファーには Starting Block™ (PBS) Blocking Buffer (PIERCE) を使用した。プレートには 96F Maxisorp White Microwell (nunc) を用いた。基質溶液には SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) を用い、マイクロプレートリーダー (wallac 1420 ARVO MX/Light、Perkin Elmer) で発光測定を行った。

黄色ブドウ球菌は、ウサギを含む多くの

哺乳類の IgG に結合する protein A を産生し、これが Sandwich ELISA における非特異な反応の原因となる。そのため、protein A の影響を除去するために ImmunoPuer Normal Rabbit Serum (PIERCE) (以下 NRS と略) を測定サンプルの 20~100% 量加えて静置した (4°C、16~18 時間)。その後 Solution 1 を加えて 10 倍希釈し、測定サンプルの原液とした。各毒素の産生量に応じて、原液を Solution 1 で適宜希釈するか、または原液を直接測定した。protein A が結合しないニワトリ抗体を用いた SEIO 検出系では、NRS による処理を行わず、培養上清を Solution 1 で適宜希釈して測定した。protein A の影響の有無は、NRS から精製した正常ウサギ IgG 分画を固層した各 Sandwich ELISA で同一サンプルを測定し、非特異な反応がブランクと同等まで低下することにより確認した。

### 3 高密度接種時の 20°C、25°C および 30°C における増殖動態と *egc* 関連毒素群産生量

黄色ブドウ球菌 Aomoril 株および Hiroshima13 株を BHI agar で 2 回継代した後、Yeast Extract を 1% (w/w) 添加した BHI broth (1% Yeast Extract 添加 BHI broth) 5ml に接種し seed culture を行った (37°C、16~18 時間、振盪培養)。培養終了後、seed culture を希釈し、初発菌量  $10^8$  cfu/ml になるように 1% Yeast Extract 添加 BHI broth 60 ml に接種し、20°C、25°C および 30°C で 48 時間の振盪培養を行なった。経時的に定量培養により菌量測定を行うと共に、培養液を採取し 14,000 rpm、

20 分遠心して菌体を沈殿させ、上清を回収して 0.22  $\mu$ m フィルター (Millex GP<sup>®</sup> 0.22  $\mu$ m、Millipore) で濾過処理後、Sandwich ELISA に供した。

また、黄色ブドウ球菌 Fukuoka1 株、Ishikawa2 株、Saga1 株、Oita1 株、Saitama496 株、および Hirosaki4 株を同様に triplicate で培養し、0 時間、24 時間、48 時間時点での菌数と SEIO 産生量を定量した。

### 4 低密度接種時の 20°C、および 30°C における増殖動態と *egc* 関連毒素群産生量

黄色ブドウ球菌 Aomoril 株および Hiroshima13 株を BHI agar で 2 回継代した後、Yeast Extract を 1% (w/w) 添加した BHI broth (1% Yeast Extract 添加 BHI broth) 5 ml に接種し seed culture を行った (37°C、16~18 時間、振盪培養)。培養終了後、seed culture を希釈し、初発菌量  $10^3$  cfu/ml になるように 1% Yeast Extract 添加 BHI broth に接種し、20°C および 30°C で 60 時間の振盪培養を行なった。経時的に定量培養により菌量測定を行い、培養終了時に培養液を 14,000 rpm、20 分遠心して菌体を沈殿させ、上清を回収して 0.22  $\mu$ m フィルター (Millex GP<sup>®</sup> 0.22  $\mu$ m、Millipore) で濾過処理後、Sandwich ELISA に供した。

### 5 にぎりめしにおける 25°C での SE 産生量

Hiroshima13 株および Ishikawa2 株を BHI agar で 2 回継代したのち、Yeast Extract 1% 添加 BHI broth 5 ml に接種し



Seed Culture を行い (37°C、16~18 時間、振盪培養)、にぎりめしへの接種菌数が  $5 \times 10^3$  CFU/50g になるよう培養液を 1% Yeast Extract 添加 BHI broth で希釈し、にぎりめし 1 サンプルにつき菌液 5 ml を接種した。接種菌液に対し、マンニット食塩培地 (ニッスイ) による定量培養を行い、接種菌数を確認した。また、菌液を接種し培養終了後のにぎりめしサンプルについてもマンニット食塩培地による定量培養を行って菌数を測定した。

にぎりめしの作成は、市販の精米 1 合に対し 1.4 倍量の水を加えて 1 時間吸水させた後、米を炊き、10 分間蒸らした後、50 g を用いて作成した。にぎりめし一つを 1 サンプルとしてラップに包み、1 つの培養条件につき 3 サンプルを供した。培養温度は 25°C、培養時間は 6 時間あるいは 12 時間とした。培養後、2 倍量の PBS を加えて 5 分間 ホモジナイズ (STOMACHER Lab-Blender400) した後、ホモジナイズ溶液を 30 ml とり、1%  $\alpha$ -Amylase from *Aspergillus oryzae* (SIGMA) を 30% 量 (v/w) 加え、37°C で 2 時間静置した。その後、8,900 rpm、15 分遠心し、0.22  $\mu$ m フィルター (Millex GP 0.22  $\mu$ m, Millipore) で濾過処理して 4°C で保存した。

黄色ブドウ球菌を摂取したにぎりめしを上記の条件で培養後、米上清中の protein A の影響を除去するため NRS をサンプルの 0~100% 量加えて静置した (4°C、16~18 時間) 後、Sandwich ELISA を用いて SE 測定を行なった。標準曲線用スタンダードと測定サンプルの希釈には、菌液を接種せずにサンプルと同様の処理を行なった SE

free のにぎりめし抽出液を使用した。

なお、にぎりめし 50 g に 2 倍量の PBS (100 ml) を加えてホモジナイズした場合、全体の容量は約 130 ml になることから、以下の式を用いて、Sandwich ELISA により得られた実測値からにぎりめし 50 g 中の各 SE 量を算出した。

SE 量 (ng/50g) = 実測値 (ng/ml)  $\times$  130 ml  $\times$  希釈率  $\times$  回収率

### C. 結果

1 高密度接種時の 20°C、25°C および 30°C における増殖動態と *egc* 関連毒素群産生量

BHI 培地に Aomori 1 株と Hiroshima13 株を約  $1 \times 10^8$  cfu/ml になるように接種し、30°C、25°C および 20°C で培養したところ、*egc* 関連 SEs の産生量は 30°C 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°C でより顕著であった (図 1)。また、Fukuoka1 株、Ishikawa2 株、Saga1 株、Oita1 株、Saitama496 株、および Hirosaki4 株を同様に triplicate で培養し、0 時間、24 時間、48 時間時点での菌数と SEIO 産生量を定量したところ、全ての菌株で Aomori1 株および Hiroshima13 株と同様の傾向を示し、低温での産生増強は *egc* 関連 SEs に普遍的な現象であることが推測された。

2 低密度接種時の 20°C、および 30°C における増殖動態と *egc* 関連毒素群産生量

一方、接種菌数を  $1 \times 10^3$  cfu/ml で 30°C

と20℃における両菌株の増殖動態と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 *egc* 関連 SEs の産生が認められた。24 時間では定常期初期に達し、Aomoiri1 株では 200 ng/ml、Hiroshima13 株では 500 ng/ml の *egc* 関連 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 時間ではさらに SEs 産生量が増加した (図3)。*egc* 関連 SEs は対数増殖期後期に産生がはじまるが、20℃培養では定常期に入っても *egc* 関連 SEs 産生量が持続するのに対し、30℃では定常期に達すると *egc* 関連 SEs 産生は終了すると考えられる。

### 3 にぎりめしにおける 25℃での SE 産生量

低温条件下では、定常期に入ってから *egc* 関連 SEs 産生量が持続することから、初発菌量が少なければ毒素産生量は減少すると考えられる。前年度に、にぎりめしへの接種菌数  $5 \times 10^4$  CFU/50 g で 25℃において有意な *egc* 関連 SEs 産生が認められた食中毒由来菌株 Hiroshima13 株と Ishikawa2 株を接種菌数  $5 \times 10^3$  CFU/50 g となるようににぎりめしに接種し、25℃培養で毒素産生量を評価した。Hiroshima13 株を  $5 \times 10^4$  CFU/50 g 接種したにぎりめしでは 12 時間培養後の菌数は  $2 \times 10^8$  CFU/50 g であり、総毒素産生量の平均値は 657 ng/50 g であ

ったのに対し、 $5 \times 10^3$  CFU/50 g 接種では 12 時間培養後の菌数は  $2 \times 10^6$  CFU/50 g であり、全ての毒素は検出限界以下であった (表2)。Ishikawa2 株を  $5 \times 10^4$  CFU/50 g 接種したにぎりめしでは 12 時間培養後の菌数は  $1 \times 10^8$  CFU/50 g であり、総毒素産生量の平均値は 908 ng/50 g であったのに対し、 $5 \times 10^3$  CFU/50 g 接種では 12 時間培養後の菌数は  $1 \times 10^7$  CFU/50 g であり、総毒素産生量の平均値は 301 ng/50 g であった (表3)。低温条件においては、初発菌数が多く、対数増殖期後期から定常期に早く達すると、*egc* 関連 SEs の総産生量は増加すると考えられた。

### D. 考察および結論

*egc* 関連毒素群について、これらの遺伝子のみを保有する食中毒由来株が存在するにも関わらず、*in vitro* での産生量のごく少量であるという矛盾がある。前年度に 37℃ (従来の培養温度) と 25℃ (室温、食中毒事例を想定) での培養を行い、*egc* 関連毒素群の産生に対する温度の影響を検討した結果、25℃の培養条件においては、37℃の培養よりも産生量が増加する傾向があることを明らかにした。今年度は、低温での *egc* 関連 SEs の産生状況は複数の菌株に見られる普遍的な現象かどうかを明らかにすると共に、これらの SEs 産生の至適温度の検討および増殖動態と毒素産生の関連を解析した。

今回供試した 8 株の *egc* を保有する菌株において、全ての株で低温における毒素産生増強が見られたことから、*egc* の低温における産生増強は普遍的な現象と考えられ、

37℃の培養条件における *egc* 関連毒素群の *in vitro* での産生量はごく微量であっても、食品を室温で長時間放置することによって起こる食中毒事例においては、これらの毒素も相当量産生され食中毒に関与する可能性があることが示唆された。また、20℃、25℃および 30℃における産生量を検討したところ、より低温域で産生が増強される傾向が確認された。

増殖動態と毒素産生の関連を検討したところ、*egc* 関連 SEs は対数増殖期後期に産生がはじまるが、低温での培養では定常期に入っても *egc* 関連 SEs 産生量が持続するのに対し、30℃では定常期に達すると *egc* 関連 SEs 産生は抑制されることが推定された。また、定常期での *egc* 関連 SEs の産生は 25℃に比して 20℃でより増加することが明らかになった。一方で、20℃においては黄色ブドウ球菌の菌株により差があるが、増殖が遅延する傾向が見られる。低温条件下での *egc* 関連 SEs の産生増強は定常期に見られることから、室温で食品が保存された場合、食品の初期汚染菌数が多いほど、*egc* 関連 SEs の蓄積量は増加することが推測された。実際に、にぎりめしに黄色ブドウ球菌を  $5 \times 10^3$  CFU/50 g になるように接種して 25℃で培養すると、*egc* 関連毒素群の産生量は  $5 \times 10^4$  CFU/50 g 接種の場合に比して減少することが確認された。ただし、実際の食中毒事例においては、食品の汚染状況や温度、pH、水分活性をはじめ様々な環境因子や食品の特性により菌の増殖が影響される為、毒素産生が必ずしも本実験の結果と同じようになるとは限らないことから、にぎりめし以外の食品もサンプ

ルに用いて、それぞれの食品の特性における毒素産生状況を把握することが必要であると考えられた。

今後、様々な培養条件における食品中の菌の増殖と毒素の産生状況を把握すると共に、実際の食中毒事例に由来する種々の原因食品の新型 SEs を含めた総毒素産生量を測定することによって全 SEs を対象とした食中毒最少発症毒素量を検討していくことが必要であると考えられる。

#### E. 健康危害情報

特になし。

#### F. 研究発表

- 1) 重茂克彦、黄色ブドウ球菌に関する最近の知見について。全国食肉衛生検査所協議会第 21 回北海道・東北ブロック大会教育講演、2010 年 10 月、鹿角市
- 2) 重茂克彦、ブドウ球菌食中毒の新しいパラダイム。地方衛生研究所全国協議会北海道・東北・新潟支部公衆衛生情報研究部会・微生物研究部会 教育講演、2010 年 11 月、盛岡市
- 3) 重茂克彦、食肉の衛生管理およびブドウ球菌食中毒の新展開。平成 22 年度沖縄県食肉衛生技術研修会 特別講演、2011 年 2 月、那覇

#### G. 学会発表

無し。

#### H. 知的所有権の取得状況

無し。

1) 特許取得

無し。

2) 実用新案取得

無し。

3) その他

無し。