

201033012B

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 - 22年度 総合研究報告書

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

まとめ	
研究代表者 鎌田 洋一	.. 3
セレウス菌およびセレウス菌が産生する嘔吐毒素に関する研究	
分担研究者 鎌田 洋一 西川 禎一	.. 11
ブドウ球菌およびブドウ球菌が産生するエンテロトキシン に関する研究	
分担研究者 重茂 克彦 小西 良子	.. 39
ウエルシュ菌およびウエルシュ菌が産生するエンテロトキシン に関する研究	
分担研究者 宮原 美知子 山本 茂貴 鎌田 洋一	.. 67

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および毒素の直接試験法の研究

平成20 - 22年度 総合研究報告

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

#### 総合研究報告書

#### 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

研究分担者 小西 良子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 部長

研究分担者 重茂 克彦 岩手大学農学部 教授

研究分担者 宮原 美智子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 室長

研究分担者 山下 茂貴 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 部長

研究分担者 西川 禎一 大阪市立大学大学院 生活科学研究科 教授

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、 $1.7 \times 10^7$  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。えブドウ球菌の多くは、SE を食品内および培地中に産生する際、プロテイン A を同時に産生する。免疫抗体を用いて SE を検出定量する際、とくに、Enzyme-linked immunoassay を行うとき、SE が存在しないにもかかわらず、IgG 抗体がプロテイン A に結合し、SE が検出されたかのような結果を招来する場合がある。この擬陽性反応を避けるため、従来は、抗原抗体反応に関与しない正常免疫グロブリンを添加したり、極端な希釈によって問題解決してきた。SE に対する検出感度を上げるには、不利な行程が組み込まれている。免疫抗体に Ig Y 抗体を用いれば、この不利な条件を解消できる可能性がある。報告者が調べる限

り、ELISA によって SE 検出系を開発した際、プロテイン A の反応障害を定量的にとらえ、解析することは成されておらず、IgY 抗体の応用も検討されていない。

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プシ酸が合計 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。当然嘔吐毒素の検出のための免疫学的方法は開発されていない。

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や、豚精子を用いる方法、ラット肝ミトコンドリアを用いる方法、HEp-2 細胞の空胞変性を観察する方法、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、MTT を用いた吸光度法、WST-8 を用いた吸光度法などがある。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。嘔吐毒素検出法として、もっとも妥当性があり、普及もできるのは、HEp-2 細胞を用いた方法だろう。嘔吐毒素処理を受けた HEp-2 細胞は、細胞質内に空胞を示す。空胞は膨化したミトコンドリアで、嘔吐毒素が直接毒作用を発揮する。本方法は細胞培養用の機器と技術があれば実施可能な方法であるが、普及度は低い。「食品衛生検査指針」に記載された方法では、毒素処理後 24 から 48 時間の観察時間が必要である。具体的な細胞の変化を捉えるのは簡単ではない。嘔吐毒素処理した細胞全てに空胞が誘導されない。希釈段階の浅い、すなわち濃い濃度で毒素を処理しても空胞は観察されず、一定範囲の毒素濃度のときに空胞が誘導され、さらに毒素濃度が薄くなると空胞の確認ができなくなる。空胞を確認する客観的方法はなく、ヒトが目で判断している。これらの事実は、利用しやすいとされる HEp-2 細胞による毒素検出法においても、改良すべき点が多々あることを示している。

セレウス菌食中毒は一般に病期が短く、比較的軽症であることが特徴になっている。しかし、海外では死者が発生しており、決して本食中毒、嘔吐毒素を軽視できない。ついに 2008 年には我が国においてもセレウス菌食中毒で死者が発生した。海外および我が国の死者の例では、肝臓機能障害が報告されている。嘔吐毒素に肝臓障害作用があることになるが、作用の詳細は解析されていない。

嘔吐毒素は一般的な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、非リボソーム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、下痢が誘発されるメカニズムが一般に信じられている。また、分子レベルではウエルシュ菌が産生する毒素、エンテロトキシンは、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し、芽胞形成し、エンテロトキシンを産生し、エンテロトキシンが腸管上皮細胞を攻撃するのか、その全体像が分かっていない。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、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。

本研究は平成 20 年度から 22 年度に亘って実施した。以下、次節よりセレウス菌、ブドウ球菌、ウエルシュ菌とそれらが産生する毒素について、それぞれの分担研究を総合して報告する。



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および毒素の直接試験法の研究

平成20 - 22年度 分担研究報告

セレウス菌およびセレウス菌が産生する

嘔吐毒素に関する研究

鎌田 洋一

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および毒素の直接試験法の研究

分担研究報告書（平成20 - 22年度）

セレウス菌およびセレウス菌が産生する嘔吐毒素に関する研究

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 室長
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

切畑 光統	大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科
安形 則雄	名古屋市衛生研究所 微生物部
中島 喜一郎	神戸天然物化学株式会社 KNC バイオリサーチセンター
稲見 薫	神戸天然物化学株式会社 KNC バイオリサーチセンター
藤田 尚也	神戸天然物化学株式会社 KNC バイオリサーチセンター
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
水谷 紀子	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
菅野 慎二	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
田中 仁	大阪市立大学大学院 生活科学研究科

研究要旨：セレウス菌および同菌が産生する嘔吐毒素について、キャリアタンパク質付加用の水酸基導入、抗体作製、嘔吐毒素のバイオアッセイ法改良、嘔吐毒素の肝臓障害機構解析、嘔吐毒素産生による SE の定量法開発、種々の培養条件と嘔吐毒素産生に関する遺伝子調節について検討した。

セレウス菌嘔吐毒素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モノオキシゲナーゼ CYP153A13a 処理を行ったが、CYP153A13a は嘔吐毒素を基質とせず、したがって嘔吐毒素には水酸基は導入されなかった。Hep G2 細胞における、セレウス菌嘔吐毒素の空胞化形成過程を観察したところ、わずか 2 時間で空胞が出現した。0.07 ng/ml という少量の嘔吐毒素で空胞化が誘導され、毒素のバイオアッセイに、Hep G2 細胞が有効である可能性が示された。嘔吐毒素をサルモネラ死菌体に吸着させ、免疫原とし、ウサギおよびニワトリに投与したところ、血清中に抗嘔吐毒素抗体が確認された。IgG および IgY 抗体をそれぞれの動物の血清から精製し、力価を比較したところ、IgG 抗体の方が高い抗体価を示した。今までに嘔吐毒素に対する抗体作製が成された報告はなく、今後、嘔吐毒素の免疫学的検出法を開発できることとなり、その有用性が期待される。嘔吐毒素刺激により、肝臓細胞のミトコンドリアの内膜の膜電位が消失し、細胞の生存に必要なエネルギー源であるアデノシン三リン酸 (ATP) の合成が不能となり、さらにミトコンドリアの膨化、外膜と内膜の間に存在していた下流のカスパーゼ等を活性化する種々のアポトーシス誘導因子 (チトクローム c、各種カスパーゼなど) の放出なども起こり、細胞死を招くと考えられた。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

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。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<sup>1)</sup>。環状に配置され、コンパクトな立体構造を取っている。低分子であるため、有機合成の立場からは対象として容易であると思われるが、現在までこれらの性質は、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<sup>2)</sup> や、豚精子を用いる方法<sup>3)</sup>、ラット肝ミトコンドリアを用いる方法<sup>4)</sup>、HEp-2 細胞の空胞変性を観察する方法<sup>2, 5)</sup>、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<sup>6)</sup>、MTT を用いた吸光度法<sup>7)</sup>、WST-8 を用いた吸光度法<sup>8)</sup>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。

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にとして培養し、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。

本分担研究は以下の目的を持って遂行される。

第 1 は嘔吐毒素へのキャリアータンパク質の結合について検討した。嘔吐毒素に水酸基を導入できれば、キャリアータンパク質を結合させることができる。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。

第2はセレウリドに対して免疫抗体を製し、セレウリド検出系に応用、抗体を用いたセレウリドの免疫学的試験法を確立することにある。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。

第3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<sup>2)</sup>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立することを目的に、細胞形態の観察機器及を導入した基礎研究を行った。

第4は嘔吐毒素の毒性メカニズムを解析することにある。毒素作用の解析を通じ、セレウス菌食中毒予防、重度の症状からの速やかな改善などへの貢献を目指す。上に記載し

たように、重度の本菌食中毒で死者が報告されている。死亡原因は嘔吐ではなく、肝臓障害となっている。我が国でも、嘔吐毒素の肝臓への障害、最終的に死亡に至った例が報告されている<sup>9)</sup>。そこで、重症例への対応と位置づけ、培養肝臓細胞を用いて、嘔吐毒素の細胞毒性メカニズムを解析した。

第5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にある。

## B. 方法

### 1 嘔吐毒素へのキャリアータンパク質結合の検討

#### 1.1 嘔吐毒素への水酸基の導入

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-Ba1k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 $\mu$ g/ml)を含むLB培地上に播種し、37 $^{\circ}$ 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、3mlのAmpicillin(100 $\mu$ g/ml)を含むLB培地に加え、16時間振盪培養した(25 $^{\circ}$ C、170rpm)。次に、2本の300mlバツフル付マイヤーフラスコに50mlのLB培地、Ampicillin(100 $\mu$ g/ml)、Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(0.1mM)、及び500 $\mu$ lの培養液を加え、OD<sub>600</sub>が約0.8になるまで振盪培養(120rpm、30 $^{\circ}$ C)後、IPTG(0.5mM)、5ALA(80 $\mu$ g/ml)を加え、20時間振盪培養を続けた(120rpm、20 $^{\circ}$ C)。培養液を遠心分離(8000rpm、4 $^{\circ}$ C、10min)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、1.5 ml 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 穴ディープウェルプレート、1.5 ml エッペンチューブ) に供した。

### 1.2 *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  $\mu$ 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。

### 1.3 *in vitro* 変換反応

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。50  $\mu$ l の可溶タンパク質画分と、250  $\mu$ l の *in vitro* 反応バッファー ( $\beta$ -NADP (13 mM)、G-6-P (33 mM)、G-6-PDH (4 Units/ml)、MgCl<sub>2</sub> (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 にて嘔吐毒素の 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 嘔吐毒素吸着サルモネラ死菌による免疫と抗体作製

*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°C 2 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 (図 1)。

バイオコントロール研究所 (名古屋市) より精製嘔吐毒素を購入した。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、嘔吐毒素・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。ニワトリを嘔吐毒素で免疫した。

嘔吐毒素をメタノールで 10  $\mu$ g/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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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と Hep G2 細胞を用いての嘔吐毒素バイオアッセイ法

HEp-2 細胞を 1% FCS-MEM 中に  $1 \times 10^5$  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  $\mu$ l/well の割合で分注し、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で前培養した。ヒト肝細胞癌培養細胞株 Hep G2 細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入した。

一晚培養後、培養液を除去し、MEM を 50  $\mu$ 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  $\mu$ l/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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l のみとした。1% FCS-MEM を 200  $\mu$ l/well 加え、プレートに蓋をし、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 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  $1 \times 10^5$  cells/ml となるように希釈した HEp-2 細胞を 200  $\mu$ l/well 加えた。

圧着シールを用いて各ウェルを塞ぎ、37 $^{\circ}$ 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。

HEp-2 細胞を、1% FCS-MEM 中に  $1 \times 10^5$  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  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で前培養した。一晚培養後、最終濃度 3.2  $\mu$ g/ml のセレウリド (女子栄養大学 上田成子博士 分与) を加えた。37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件の下、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 $\times$ 768 dpi で画像を取り込み、パーソナルコンピューター内に保存した (SANYO、MCOK-F110demo、図 2)。

### 4 セレウス菌嘔吐毒素の肝臓細胞毒性機構の解析

#### 4.1 DNA マイクロアレイによる幹細胞遺伝子変動解析

35 mm のディッシュに 10% FCS を含む DMEM に懸濁した  $2 \times 10^5$  個の HepG2 細胞細胞を播種し、一晚付着させた後に、培養液を、1% FCS を含む DMEM に交換し、嘔吐毒素刺激 (10 ng/ml) 0、5、60、120 分を行った。刺激時間ごとに 10 検体のサンプルを個別に調整 (n=10) し、時間ごとにまとめて RNA 抽出を行い、サンプルとした。total RNA の抽出は、QIAGEN 社の RNeasy<sup>®</sup> Plus Mini kit を用いて行った。

RNA は、230、260、280nm の吸光度を測定することにより、純度の高い RNA であることを確認し、さらに RNA サンプルの電気泳動を行うことにより、28S ribosomal (r) RNA/18S r RNA の比を求め、RNA の分解がないことを確認した。これらのサンプルについて株式会社 DNA チップ研究所に送付し、アジレント社

製オリゴ DNA マイクロアレイを用いた解析を依頼した。送付後のサンプルは、RNA より cDNA を合成し、T7RNA ポリメラーゼを用いてアンチセンス cRNA を合成した。この時の反応液に、Cyanine3 でラベル化された CTP を入れることにより、cRNA 合成時に蛍光標識が取り込まれ、ラベル化を行った。ハイブリダイゼーションターゲットの調製はアジレントの標準マニュアルに従い、調製にはアジレント社推奨の試薬類を使用した (Low RNA Fluorecent Liner Amplification kit Plus (1 色用) (5188-5339 : Agilent)。Cy3 の 1 色法により、1 つの基盤に 4 サンプル載せられるタイプ (4 パックアレイ) を用いて、各ターゲット DNA からのシグナルをスキャナーで検出して得られたデータを解析し、各遺伝子スポットにおけるコントロール (嘔吐毒素刺激 0 分) と嘔吐毒素刺激時間を変えたサンプルのシグナル強度を比較して、遺伝子の発現差を評価した。

#### 4.2 嘔吐毒素によるミトコンドリア障害の検討

嘔吐毒素により引き起こされた細胞の空胞化とともに、ミトコンドリアが障害されているかどうかについて検討するため、ミトコンドリア膜電位の変化について、JC-1 色素染色 kit (Cayman chemicals) を用いて染色を行った。JC-1 は膜電位が低いと J-monomer として存在し、緑色蛍光を発するが、膜電位が高いと色素が蓄積し、J-会合体を形成するため、蛍光が緑色から赤色にシフトする性質がある。この性質を利用して、嘔吐毒素 (10 ng/ml) 2 時間刺激培養を行った HepG2 細胞の JC-1 色素染色を行い、蛍光顕微鏡により観察した。

ミトコンドリア膜電位の障害に伴いミトコンドリアから細胞質へ放出され、その後のアポトーシス誘導の鍵となる物質、チトクロ

ーム c の変化について検討した。嘔吐毒素 (10 ng/ml および 500 ng/ml) 2 時間刺激後の HepG2 細胞を細胞質画分およびミトコンドリアを含む subcellular 画分に分けてタンパクを抽出し、ヒトチトクローム C EIA kit (Assay designs) を用いてチトクローム C 量を測定した。

細胞死の引き金として重要と考えられた Caspase の中でも、アポトーシスのイニシエーターとして働く Caspase-8 について、嘔吐毒素による細胞死誘導における役割を検討した。HepG2 細胞に 40  $\mu$ M の Caspase-8 inhibitor (Calbiochem) を添加し、嘔吐毒素刺激を行い、Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (同仁化学) アッセイを行い、細胞死の割合の変化について評価した。

#### 5 セレウス菌嘔吐毒素産生を調節する遺伝子の網羅的解析

##### 5.1 セレウス菌からの DNA 抽出

各種条件で振盪培養したセレウス菌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。TE で 100 mg/ml に調整した LYSOZYME (MP BIOMEDICALS) 450  $\mu$ 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、2 ml のチューブに 150  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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°C 12,000×g で 10 分遠心し、上清を捨てた。ペレットに DEPC 処理水 600 μl、5 M NaCl 100 μl、10% CTAB-0.7M NaCl 80 μl を加えて 65°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 μl を加えて 4°C 12,000×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 μl 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°C で凍結保存した。

## 5.2 DNA マイクロアレイ

Agilent 社製のチップ (8×15 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。解析ソフト、Agilent 社製 GeneSpring GX v. 11.0.2 を用いて、遺伝子変動を多変量解析した。

## C. 結果と考察

### 1 嘔吐毒素へのキャリアータンパク質付加

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、嘔吐毒素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。以上は、モノオキシゲナーゼでは嘔吐毒素に水酸基は導入できず、したがってキャリアータンパク質の付加も不可能であることを示している。

### 2 マウスおよびウサギへの嘔吐毒素の免疫

嘔吐毒素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、嘔吐毒素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嘔吐毒素処理 HEp-2 細胞の形態変化

嘔吐毒素添加直後から、細胞質内に空胞が出現するまでの形態変化を観察した。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 (図 5)。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 (図 5)。

### 4 嘔吐毒素処理 HEp-2 細胞の空胞形成を確認する際の不適切さ

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、嘔吐毒素の希釈液を加えた。既にプレート底面に細胞が付着しているため、嘔吐毒素添加後、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、嘔吐毒素処理した 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)。

5 Hep G2 細胞の嘔吐毒素に対する感受性  
セレウス菌嘔吐毒素を 10 ng/ml になるように培養液中に添加し、HEp-2 細胞および Hep G 細胞と 18 時間反応させた。その結果を図 7 に示す。両方の細胞に空胞形成が誘導された。比較すると、Hep G2 細胞の空胞の方が、明瞭で、その数も多く、大きな空胞が顕著だった。

同一条件で細胞を毒素処理し、処理直後からタイムラプス撮影を行い、同一視野 (従って同一細胞群) において、空胞が誘導される時間経過を調べた。その結果、Hep-2 細胞では明瞭な空胞形成が認められるのに 10 時間かかるのに対し、Hep G2 細胞では、毒素処理後 2 時間で明らかな空胞変性が認められた。

Hep G2 細胞を  $1 \times 10^6$ /フラスコの状態で継代し、継代後の毎日細胞懸濁液を調製、嘔吐毒素の空胞化誘導実験に供した。各試験日において、空胞を誘導する最少嘔吐毒素濃度を求めた。その結果、継代第 2 日、細胞数が  $2 \times 10^6$ /フラスコの時、Hep G2 細胞に空胞を誘導する最少嘔吐毒素濃度は 0.07 ng/ml を占めた (図 8)。

6 嘔吐毒素刺激後の肝細胞で発現変動する遺伝子-DNA マイクロアレイ解析

嘔吐毒素刺激 5 分において、最も高い発現を示した遺伝子は、SPINLW1 (serine-type endopeptidase inhibitor activity) であり、 $2^{6.86}$  増加した。一方で、最も低い発現を示した遺伝子は、protein binding に関連する TRIM 72 (triplicate motif-containing 72) であり、 $2^{-6.92}$  減少した。また、嘔吐毒素刺激 60 分において最も高い発現を示したものは、negative regulator of cell proliferation の役割を果たす PARRES1 であり、 $2^{7.28}$  増加した。一方で最も低い発現を示したものは、TRIM72 であり、 $2^{-6.39}$  減少した。

嘔吐毒素刺激 120 分において最も高い発現を示したものは、protein binding に関連する LRRC34 であり、 $2^{5.2}$  増加した。一方で、最も低い発現を示したのは、TRIM72 であり、 $2^{-7.01}$  減少した。

一方で、嘔吐毒素刺激による細胞障害の中でも、細胞死誘導メカニズムについて着目し、細胞死に関連する遺伝子について分類すると、細胞死のうちアポトーシスのイニシエーターとして重要な Caspase-8 およびその関連遺伝子の発現が亢進し、また、アポトーシスにおけるミトコンドリア障害の結果として生じるチトクローム C の放出を促進する MYC 遺伝子発現が亢進していた。その他、アポトーシス促進遺伝子発現の亢進とアポトーシス抑制遺伝子発現の低下も見られ (表 1)、嘔吐毒素刺激による細胞死の誘導という作用発現が存在することが明らかとなった。

7 HepG2 細胞の JC-1 染色によるアポトーシスの検討

嘔吐毒素刺激 2 時間後の HepG2 細胞について JC-1 染色を行い観察した結果、対照群である溶媒刺激を行った細胞に比べ、細胞のミ

トコンドリア膜電位の低下を示す緑色蛍光を発するものが多く認められた。一方で赤色素の凝集があまり見られず、嘔吐毒素により、ミトコンドリア膜電位が障害され、細胞が弱っている状態であることが明らかとなった(図9)。

#### 8 嘔吐毒素刺激による HepG2 細胞におけるチトクローム c の細胞内局在の変化

ミトコンドリア膜電位の障害に伴いミトコンドリアから細胞質へ放出され、その後のアポトーシス誘導の鍵となる物質、チトクローム c の変化について検討した結果、嘔吐毒素(10 ng/ml)刺激 2 時間の HepG2 細胞では、ミトコンドリアを含む subcellular 画分におけるチトクローム c 量が低下し、細胞質中のチトクローム c 量が増加していた(図10)。

#### 9 Caspase 8 インヒビター存在下における嘔吐毒素刺激 HepG2 細胞の細胞死の抑制

細胞死の引き金として重要と考えられた Caspase-8 の嘔吐毒素による細胞死誘導における役割を検討するため、嘔吐毒素刺激とともに Caspase-8 の阻害剤を添加し、Cell Counting Kit-8 (CCK-8) アッセイを行い、細胞死の割合の変化を評価したところ、Caspase-8 の阻害剤添加により、嘔吐毒素刺激による細胞死が抑制されていた(図11)。この結果より、嘔吐毒素による細胞死誘導には、Caspase-8 を介する経路が存在していることが示された。

嘔吐毒素による細胞毒性のメカニズムについては、これまでに細胞に空胞化変性を起こすという現象は報告されていたものの、その詳細については、あまり明らかになってはいなかった。細胞の空胞化の実態は、細胞内のミトコンドリアが膨張していることによ

るもので、嘔吐毒素はミトコンドリア内に水分貯留を起こし膨化させると考えられてきた。

#### 10 嘔吐毒素産生に与える種々の刺激が誘導する遺伝子変動の解析

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した。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。

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。

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2)。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。

#### D. 結論

セレウス菌嘔吐毒素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モノオキシゲナーゼ CYP153A13a 処理を行ったが、CYP153A13a は嘔吐毒素を基質とせず、したがって嘔吐毒素には水酸基は導入されなかった。Hep G2 細胞における、セレウス菌嘔吐毒素の空胞化形成過程を観察したところ、わずか 2 時間で空胞が出現した。0.07 ng/ml という少量の嘔吐毒素で空胞化が誘導され、毒

素のバイオアッセイに、Hep G2 細胞が有効である可能性が示された。嘔吐毒素をサルモネラ死菌体に吸着させ、免疫原とし、ウサギおよびニワトリに投与したところ、血清中に抗嘔吐毒素抗体が確認された。IgG および IgY 抗体をそれぞれの動物の血清から精製し、力価を比較したところ、IgG 抗体の方が高い抗体価を示した。今までに嘔吐毒素に対する抗体作製が成された報告はなく、今後、嘔吐毒素の免疫学的検出法を開発できることとなり、その有用性が期待される。嘔吐毒素刺激により、肝臓細胞のミトコンドリアの内膜の膜電位が消失し、細胞の生存に必要なエネルギー源であるアデノシン三リン酸 (ATP) の合成が不能となり、さらにミトコンドリアの膨化、外膜と内膜の間に存在していた下流のカスパーゼ等を活性化する種々のアポトーシス誘導因子 (チトクローム c、各種カスパーゼなど) の放出なども起こり、細胞死を招くと考えられた。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。

#### E. 文献

- 1) Agata, N., Ohta, M., Mori, M. and Isobe, M.: A novel dodeca- depsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett., 129, 17-20 (1995)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) Kawamura-Sato, K., Hirama, 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)
  - 5) Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I. and Isobe, M.: A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. FEMS Microbiol. Lett., 121, 31-34 (1994)
  - 6) 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)
  - 7) 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)
  - 8) 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)