

- 9) Shiota M, Saitou K, Mizumoto H, Matsusaka M, Agata N, Nakayama M, Kage M, Tatsumi S, Okamoto A, Yamaguchi S, Ohta M, Hata D. Rapid detoxication of cereulide in *Bacillus cereus* food poisoning. *Pediatrics*. 125, e951-955.

1. 新規の抗体作製法。
- 2) 実用新案取得無し。

F. 研究発表

シンポジウム発表

1. 鎌田 洋一(2010) 毒素による食中毒。平成 21 年度 厚生労働科学研究(食品の安心・安全確保推進研究) シンポジウム「安全な食品で健やかな暮らし」東京、福島。

G. 学会発表

1. 菅野慎二、安形則雄、川上 浩、小西良子、鎌田 洋一 (2009) 場小用細胞を用いたセレウス菌嘔吐毒素の検出方法の改良、第 98 回日本食品衛生学会、函館。
2. 水谷紀子、菅野慎二、杉山圭一、小西良子、鎌田洋一 (2010) *Bacillus cereus* cereulide の細胞毒性メカニズムの解析、第 83 回日本細菌学会、横浜。
3. 鎌田洋一、菅野慎二、水谷紀子、小西良子 (2010) ヒト肝臓癌由来 Hep G2 細胞のセレウス菌嘔吐毒素の検出に関する有用性、第 149 回日本獣医学会、東京。
4. 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。

H. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許出願

① サルモネラ死菌体の調製

Salmonella minnesota R595

L-brothに接種
37°Cで一晩培養

前培養液

L-brothに接種
37°Cで一晩培養

*S. minnesota*培養液

フェノール添加
遠心分離
蒸留水、アセトン、エーテル洗浄
減圧乾固

*S. minnesota*死菌体

1%酢酸で洗浄
1%酢酸に懸濁後、100°Cで2時間加温
蒸留水洗浄
蒸留水に懸濁後、凍結乾燥

酸加熱処理サルモネラ死菌体

図1 サルモネラ死菌体の調製法

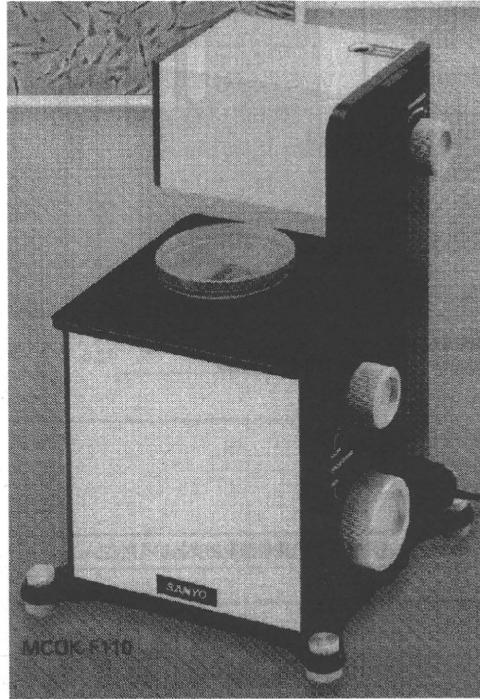


図 2 HEp-2 細胞によるセレウリドの細胞毒性を試験する際に用いた連続観察装置
MCOK-F110 (SANYO)

免疫71日の血清のセレウリドへの ELISA

450nm に対する吸光値

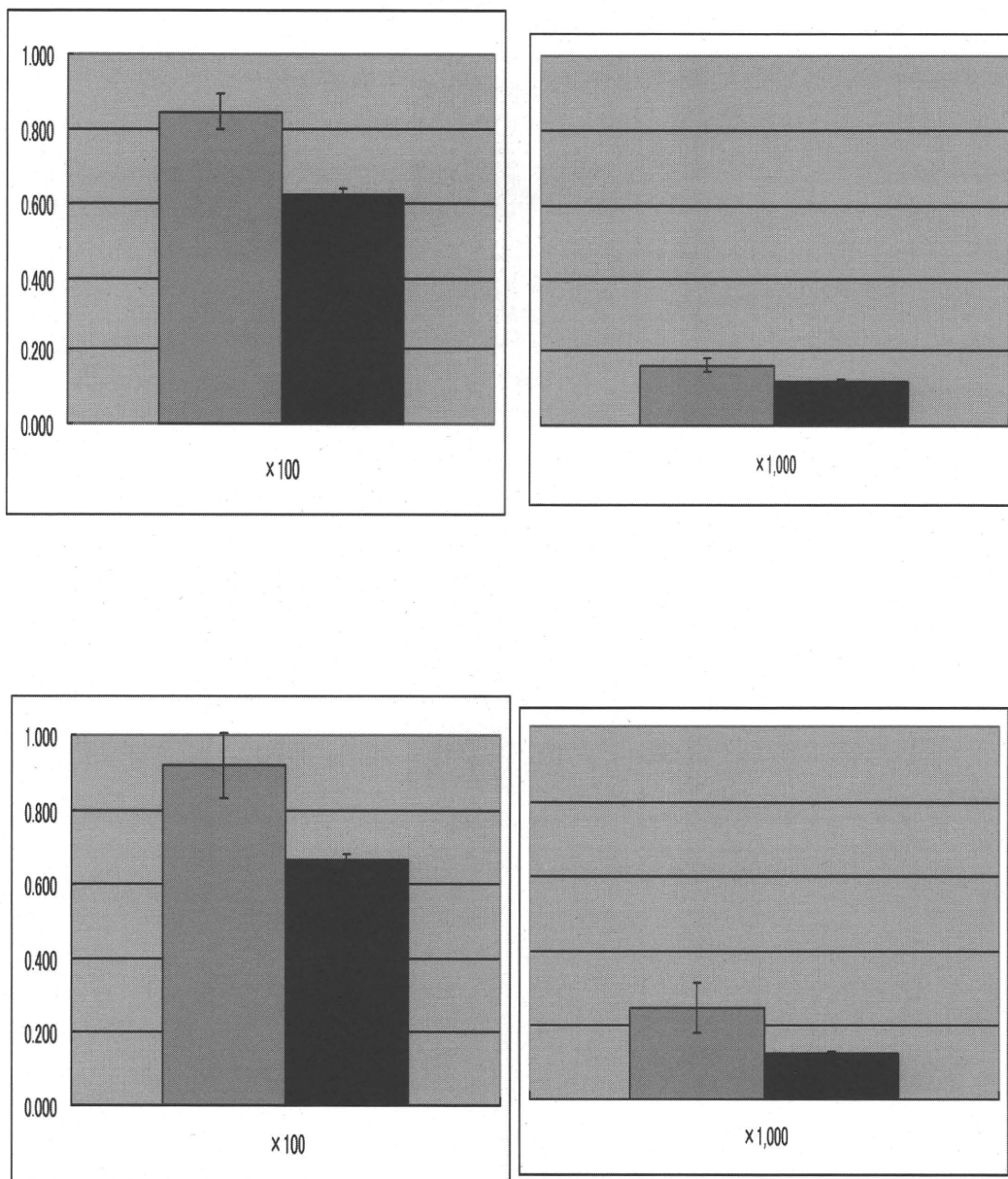


図3 セレウリドに対するマウス免疫血清の抗体価

灰色カラム：セレウリドを吸着させたウェルへの吸光値

黒色カラム：メタノール処理した陰性対象ウェルへの吸光値

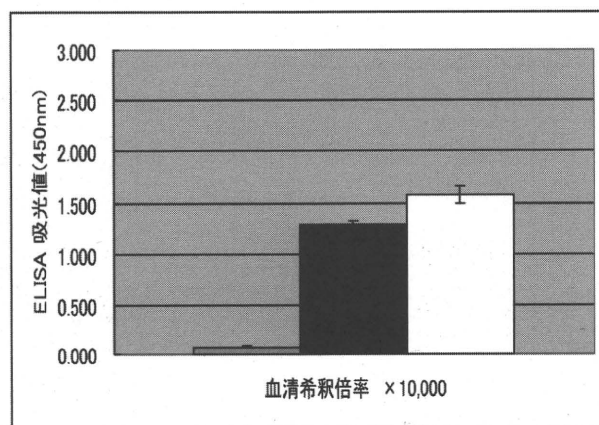
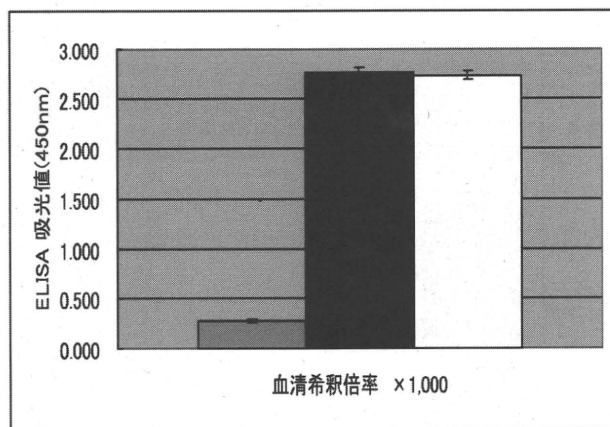


図4 セレウリドに対するウサギ免疫血清の抗体価
 灰色カラム：免疫前の血清
 黒色カラム：免疫43日の血清
 白色カラム：免疫109日の血清
 血清はセレウリドを吸着させたウェルへ反応させた。

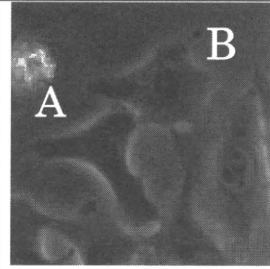
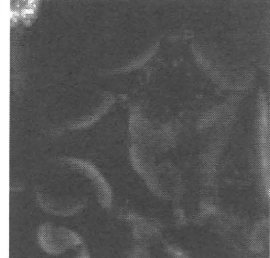
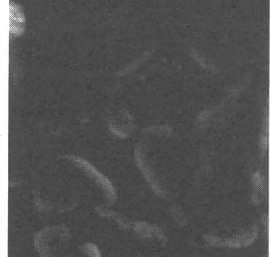


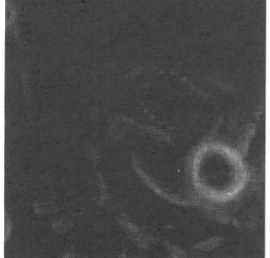
	<p>セレウリド添加直後</p>
	<p>1 時間後： B の細胞質内に白色顆粒状の物質が出現した。</p>
	<p>2 時間後： B の細胞質内に、核を取り囲むようにして白色顆粒状の物質が出現した。</p>
	<p>3 時間後： 2 時間後に A 細胞質内に認められた白色顆粒状の物質が一時消失した。</p>
	<p>4 時間後： A 細胞質内に、再び白色顆粒状の物質が出現した。 B 細胞質内の顆粒状物質はやや膨張した。</p>
	<p>5 時間後： B 内の顆粒物質が、核を取り囲むようにして整列した。空胞が出現した。</p>

図 5—1 同一視野の連続観察法を用いた嘔吐毒素による HEp-2 細胞の空胞変性

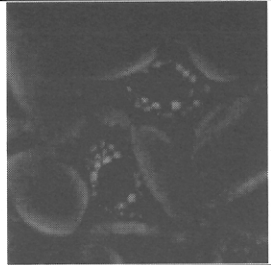





	<p>10 時間後： A、B 共に、細胞質内の空胞が膨張している。</p>
	<p>12 時間後： A、B 共に、空胞は更に膨張している。</p>
	<p>15 時間後： A が分裂した。 B 内の空胞は膨張し続けている。</p>
	<p>17 時間後： 分裂直前の B がフラスコ底面から剥がれた。A は分裂後、再び底面に付着した。分裂後も細胞質内に空胞が認められた。</p>
	<p>19 時間後： B の分裂が完了した。A と同様に、分裂後も細胞質内に空胞が認められた。</p>
	<p>24 時間後： A から分裂した細胞内の空胞が消失した。</p>

図 5—2 同一視野の連続観察法を用いた嘔吐毒素による HEp-2 細胞の空胞変性

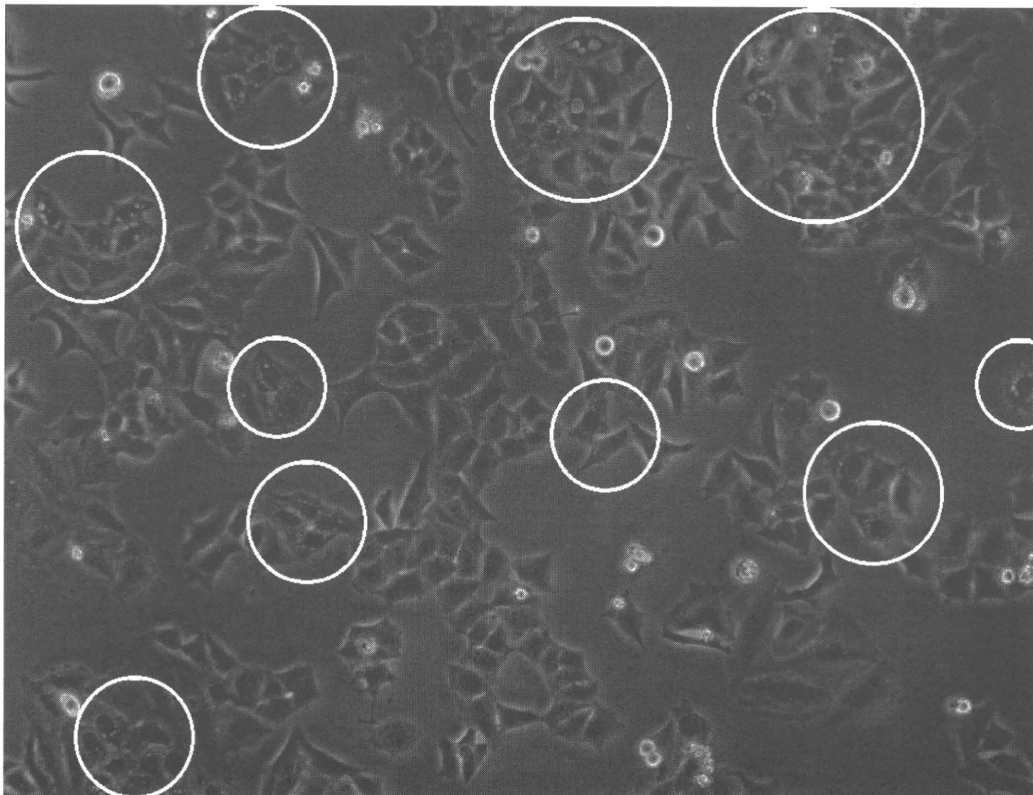
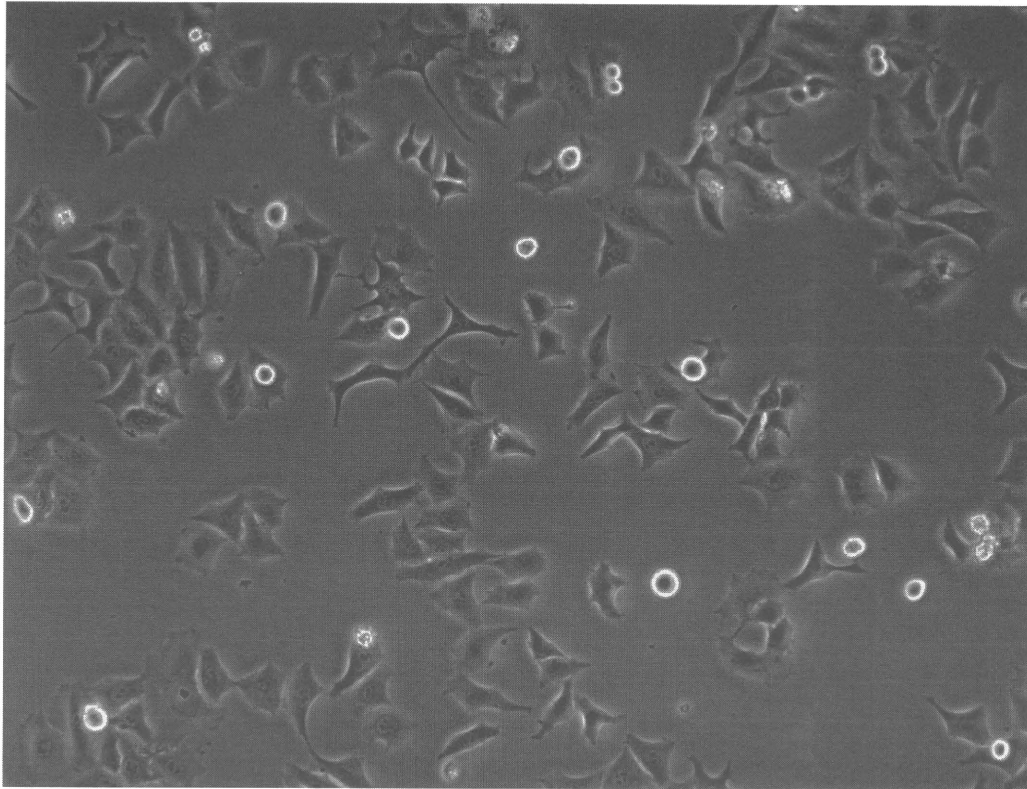


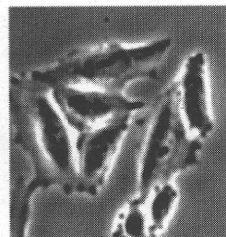
図6 同一視野におけるセレウリドによる HEp-2 細胞の空胞変性
上：セレウリド添加前、下：添加 24 時間後

HEp-2 細胞

添加直後

不鮮明な空胞

鮮明な空胞

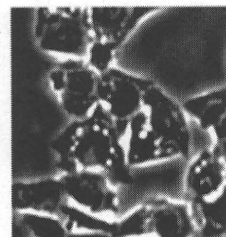
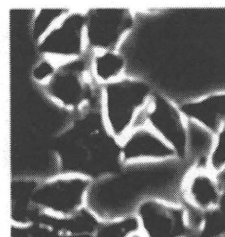


0 hr

2 hr

5 hr

10 hr



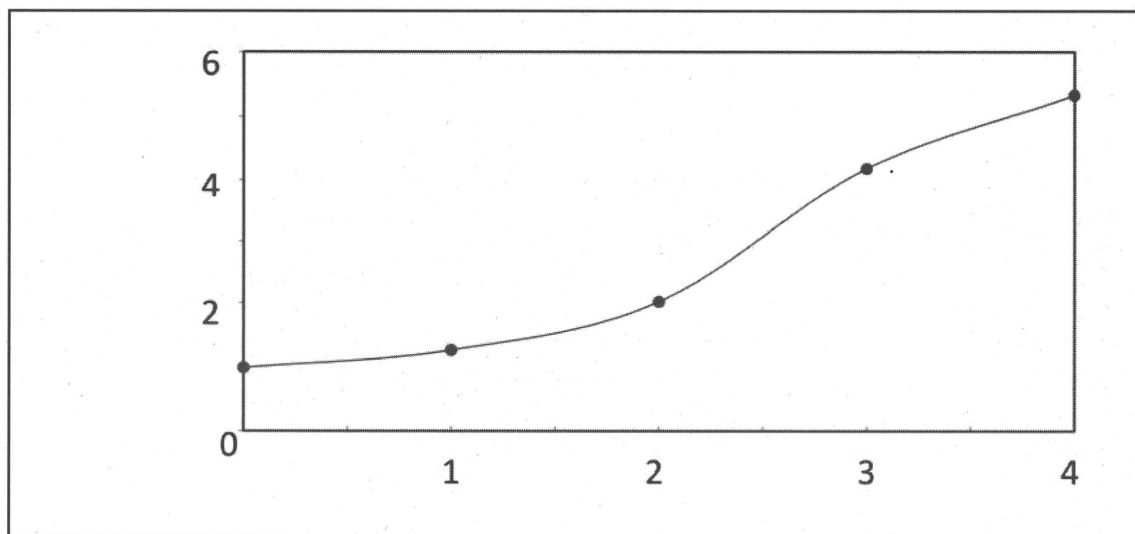
添加直後

鮮明な空胞

Hep G2 細胞

図7 セレウス菌嘔吐毒素によって誘導される HEp-2 および Hep G2 細胞に見られる空胞化。

タイムラプス撮影を行い、空胞化誘導の経時的変化。Hep G2 細胞では、明瞭な空胞が HEp-2 細胞より毒素処理早期に確認される。



継代後の日数

図8 Hep G2細胞の嘔吐毒素に対する感受性の変化

Hep G2細胞を 1×10^6 /フラスコ(25 cm²)で播種し、経日的に細胞を回収、嘔吐毒素に対する感受性を検討した。四角内の数値は、細胞に空胞化を誘導する最少嘔吐毒素濃度を示す (ng/ml)。

表1 アポトーシス現象に関与する遺伝子群のセレウス菌嘔吐毒素刺激による変動

Gene expression (Fold change)

Gene symbol	Time after cereulide(10 ng/ml)stimulation			Gene function
	5 min	60 min	120 min	
MYC	1.50	1.52	2.44	→ミトコンドリアからのチトクロームC放出に関連
CASP8	1.74	1.54	1.66	→アポトーシスのイニシエーターカスパーゼ
GZMH	7.78			→カスパーゼ8などのカスパーゼ活性化に関連
ESPL1			3.13	→カスパーゼ様プロテアーゼ
IFT57			4.51	→カスパーゼ8のリクルートを導き、アポトーシスのトリガーとなる
TNFRSF8	1.69		0.74	→アポトーシスのポジティブレギュレーター
DAPK2			2.21	→セリン/スレオニンプロテインキナーゼ アポトーシス誘導
ELMO1		63.68		→アポトーシス、貪食、細胞の形態変化に関連
FAIM3	0.77	0.62	0.38	→Fas, TNFa, FADD誘導アポトーシスからの保護、カスパーゼ8活性の抑制
HIPK3	0.13	0.14	0.17	→FADDリン酸化促進によるアポトーシスの負の調節

HepG2 cell JC-1 staining

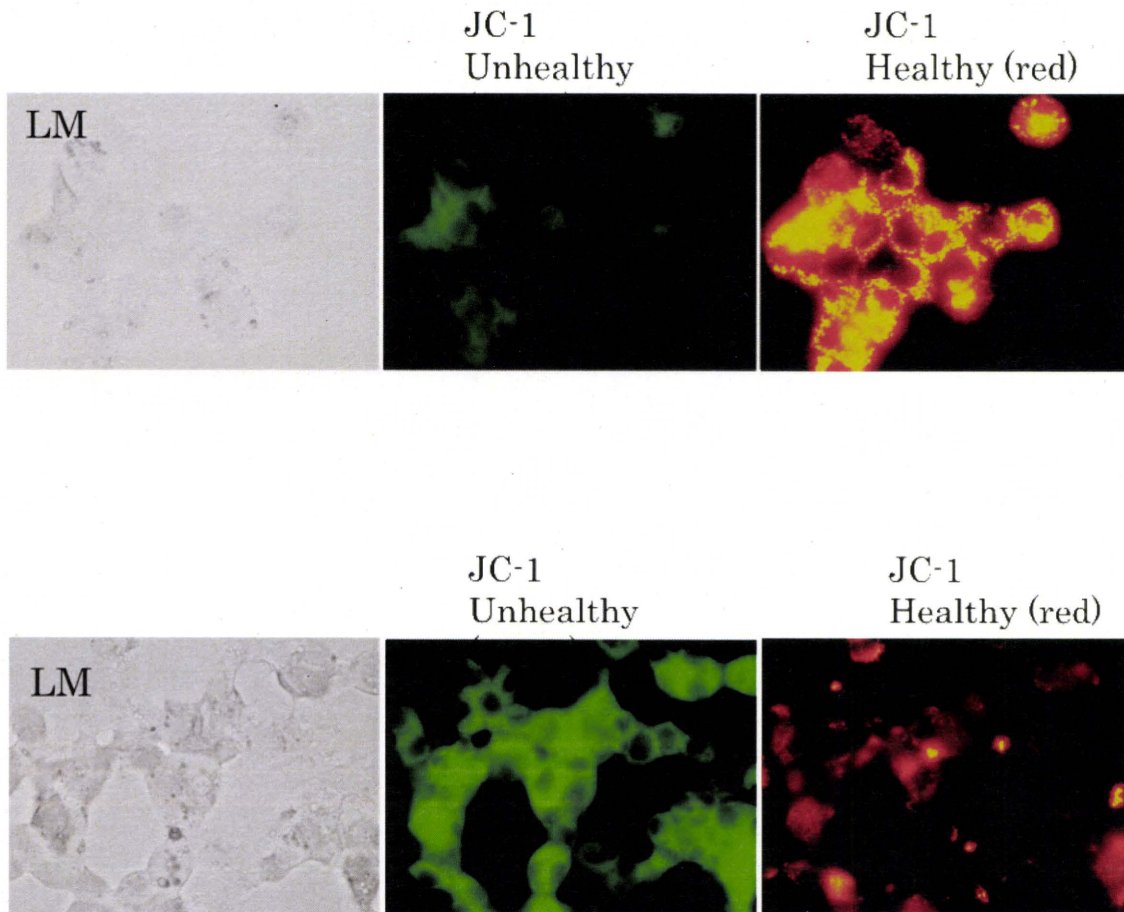
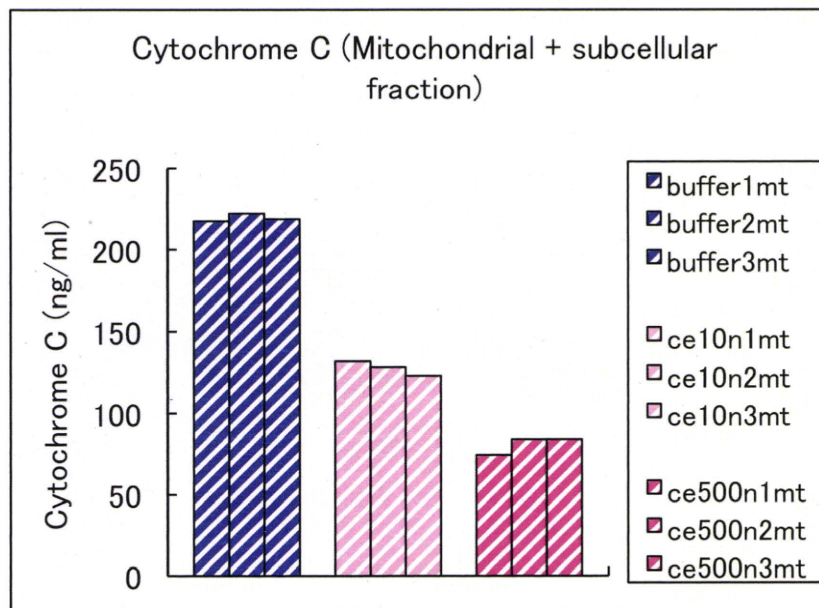
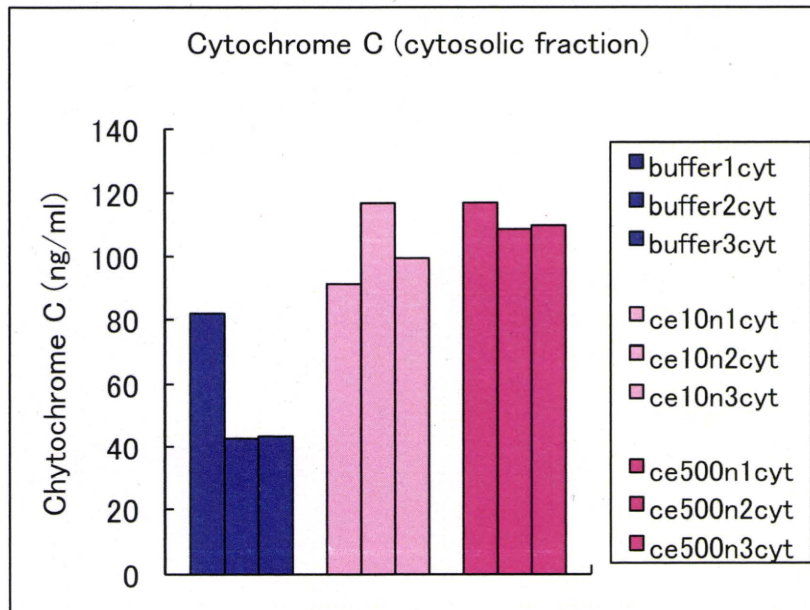


図9 セレウス菌嘔吐毒素処理 Hep G2 細胞の JC-1 染色

嘔吐毒素処理前（上段）および 120 分後（下段）に JC-1 染色を施し、蛍光顕微鏡で観察した。LM は通常の光学顕微鏡による細胞の図を示す。JC-1 色素は細胞内に取り込まれた後、ミトコンドリアが正常で膜電位を保持していた場合、すなわち細胞が健康であった場合、赤色蛍光を発する。ミトコンドリアの膜電位が低下した場合、緑色蛍光を発する。



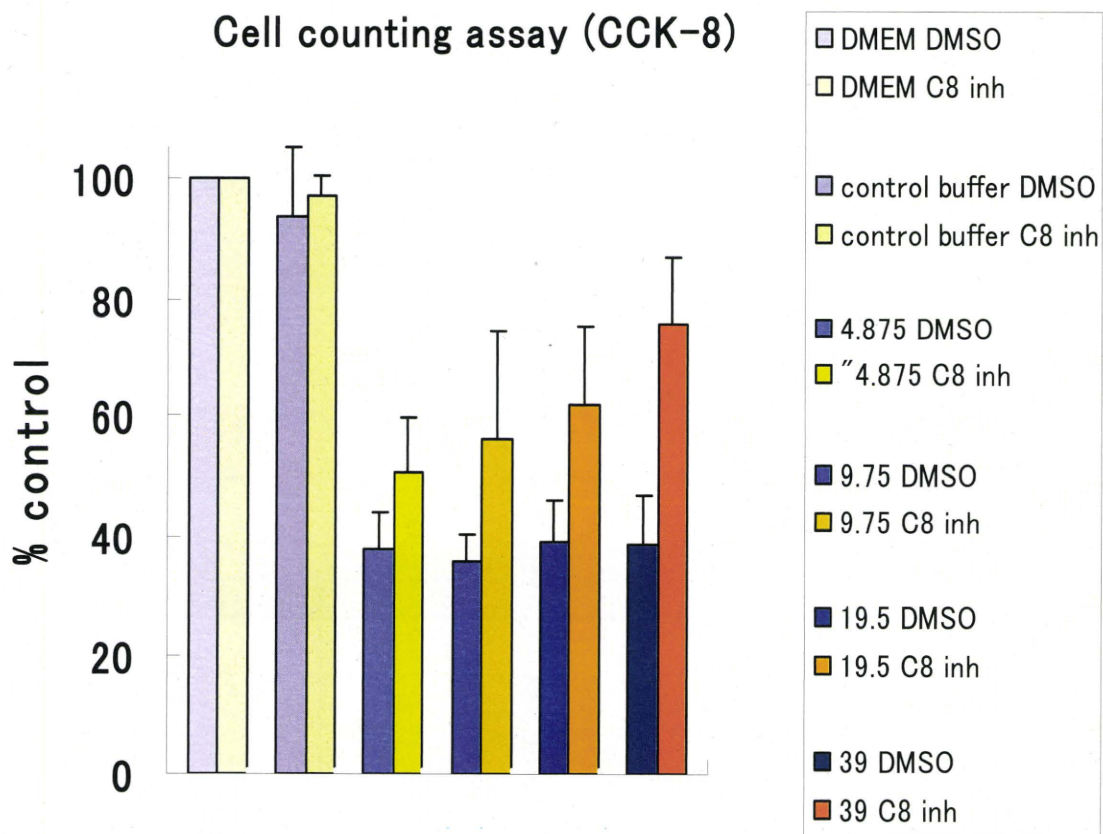
buffer: control buffer,

 ce10n: cereulide 10 ng/ml,

 ce500n: cereulide 500 ng/ml

図10 セレウス菌嘔吐毒素刺激による Hep G2 細胞におけるチトクローム c の細胞内局在

嘔吐毒素(ce)処理後、細胞を分画し、チトクローム c を定量した。



セウリト濃度 : ng/ml

図 1 1 カスパーゼ 8 阻害剤のセレウス菌嘔吐毒素が示す Hep G2 細胞死への影響

カスパーゼ 8 阻害剤が嘔吐毒素の細胞致死毒性を抑制する。

表2 培養条件の影響を受けたセレウリド合成酵素遺伝子の変動

		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	2.61	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	1.88	1.40
cesT		-3.19	-2.90	2.08	2.28	-3.17	-3.32	2.08	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

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

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

重茂 克彦 小西 良子

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

ブドウ球菌およびブドウ球菌が産生する毒素に関する研究

研究分担者	重茂 克彦	岩手大学農学部 教授
	小西 良子	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 部長
研究協力者	品川 邦汎	岩手大学農学部 教授
	長廻 ゆりあ	岩手大学農学部
	佐藤 明彦	岩手大学 農学部
	鎌田 洋一	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 室長
	水谷 紀子	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
	実川 友史	(株) アルバック 技術開発部 部長
	星野 浩美	(株) アルバック 技術開発部 主事

研究要旨：ブドウ球菌および同菌が産生するエンテロトキシン (SE) について、新型 SE に対する抗体作製、ニワトリ IgY による SE の定量法開発、種々の培養条および食品中での新型 SE 産生動態、ならびに、新原理による SE 検出法について検討した。

新型 SEs のうち、SEH, SE1J, SE1K, SE1P, SE1Q, SER を検出する発色系 Sandwich ELISA と、SEG, SEI, SE1M, SE1N, SE1O を検出する化学発光系 Sandwich ELISA を構築し、免疫学的に新型 SEs を検出・定量することを可能とした。

ニワトリ IgY 抗体を用いた ELISA 法はき、Protein A の影響を受けない方法で、ブドウ球菌培養液中の SE を有効に定量できる。検出感度にも優れ、今後、食物中の SEA 検出にも適応できる可能性がある。

37 °C (従来 of 培養温度) と 25 °C (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。その結果、ブドウ球菌食中毒の主要な原因毒素であるとされる SEA の産生量には変化が見られなかったが、25 °C の培養条件においては、37 °C の培養よりも産生量が増加する傾向が見られた。にぎりめしにおいても、25 °C の培養条件において *egc* 関連毒素群の産生が証明された。

ブドウ球菌エンテロトキシンの検出定量に、新技術 QCM 法を適応し、試験法として開発できる可能性があるかを検討した。センサー部分にプロテイン G を介して高力価の抗 SEA ポリクローナル IgG 抗体を吸着させ、SEA を添加した結果、センサー周波数の減少が認められた。この減少は特異的で SEA の容量依存性が認められ、QCM 法の SE 試験法への応用可能性を示唆する。

A. 目的

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。ブドウ球菌エンテロトキシン Staphylococcal enterotoxin (SE) は、分子量約 28,000 のタンパク質で、毒素産生の至適 pH は 6.8~7.2 にあり、pH 5.0 以下または 9.0 以上では産生されない。毒素産生の温度域は 10~48℃ (至適 40~45℃) であり、食塩 10% 以上では著しく抑制される。毒素は耐熱性が強く、120℃20 分の加熱でも完全に破壊されない¹⁾。

SE には抗原性の異なる複数の型が存在することが報告されており、1963 年に抗原性が確認された順に SEA、SEB、SEC~とアルファベット順に命名することが提唱された。この時点で SEA および SEB が存在することが明らかにされており、1965 年には SEC、1967 年に SED、1971 年に SEE が報告された。さらに、SEC には抗原性は同一だが、物理化学的性状が異なる亜型 (SEC1、SEC2、SEC3) が存在することも明らかになっている³⁾。現在までに SEG、SHE、SEI、SEJ、SEK、SEL、SEM、SEN、SEO、SEP、SEQ、SER、SEU の存在が報告されており³~¹²⁾、SE は極めて多様性のある毒素群であることがわかる。2004 年に International Nomenclature Committee for

Staphylococcal Super antigen (INCSS) が提唱した命名規約によると¹³⁾、SE と命名するには、サルへの経口投与による嘔吐活性の証明が義務付けられている。構造上 SE と近縁と考えられるスーパー抗原であっても、サルでの嘔吐実験で嘔吐活性陰性のもの、あるいはまだサルでの嘔吐実験が行われていないものについては”staphylococcal enterotoxin-like (SE1) ブドウ球菌エンテロトキシン様毒素”と命名され、サルにおける嘔吐活性が証明された時点で、like の”1”をはずし、SE とする。多くの新型 SE の嘔吐活性は十分に調べられておらず、これらの新型 SE の食中毒に対する危害評価は、いまだ十分になされていないため、新型 SE の嘔吐活性の解析は急務である。また、厚生労働行政の側面からは、新型 SE を効率よく特異的に検出し定量する方法の開発が急務となる。

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 IgY 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。

科学技術の進歩が激しい今、新しい技術の導入は画期的な成果を生む可能性がある。水晶子発振子マイクロバランス (Quartz Crystal Microbalance, QCM) 法は、一定の周波数で振動する水晶センサーに抗体を固着させると、反応系に添加された抗原の抗体への結合を重量の増加ととらえ、周波数の減少で抗原抗体反応をモニタリングできる原理で、抗原の添加直後からリアルタイムでシグナルを得る原理を持つ¹⁴⁾。本法は SE の検出系に応用すると有効に開発できる可能性がある。

本分担研究では以下の 4 項目を実施した。

第一は SE の新型エンテロトキシンに関して抗体を作製し、従前の SEA から SEE 以外にもエンテロトキシン検出系を開発する。

第二は SE の免疫学的定量法に関して、ニワトリ IgY 抗体を用いて、ブドウ球菌が毒素と同時に産生するプロテイン A の反応阻害を受けずに、高感度の定量を開発する。

第三は SE、とくに新型 SE の、各種培養条件、および食品中における毒素産生状態と菌増殖状態の関連性を検討する。

第四は、QCM 法を SE の検出に応用し、液状の食品に適した、リアルタイムモニタリング可能な SE 検査法を開発する。

B. 実験方法

1 新型エンテロトキシンに対する抗体作製

1.1 組換え新型 SE

SEG, SEH, SEI, SE1J, SE1K, SE1L, SE1M, SE1N, SE1O, SE1P, SE1Q, SER 遺伝子を大腸菌発現ベクター pGEX-6p-1 にクローニングし、大腸菌 BL21 株に導入して各 SEs を GST 融合蛋白質として発現させた。アフィニティークロマトグラフィーにより融合蛋白質を精製後、プロテアーゼ処理により GST タグを切断し、精製組換え型 SEs を得た。

1.2 抗体作製

得られた組換え型 SEs をウサギに免疫し、抗血清を作製した。ウサギ抗血清からは Protein G カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより IgG 画分を、あるいは SEs を固定したカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより特異抗体を精製した。得られた特異抗体は horseradish peroxidase (HPO) で標識し、Sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay (以下 ELISA) の detection antibodies として用いた。

1.3 Sandwich ELISA

固層抗体には精製 IgG 画分あるいは特異抗体を、検出抗体には HRP 標識特異抗体を用いた。精製 rSE を、0.5、1、2、5、10、20 ng/ml に調整したものを用い、検出感度および標準曲線の直線性をもっとも高い条件を検討した。標準曲線用スタンダードの希釈に Can Get Signal[®]