

201131048A

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

## 食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究

平成23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24（2012）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

- 米飯中の催吐性 *Bacillus cereus* とその嘔吐毒素の検出 . . . . 27  
西川 禎一

- ブドウ球菌新型エンテロトキシンの産生動態の解析と食品中での産生量評価および水晶発振子マイクロバランス法を原理とするエンテロトキシン検出法開発の試み . . . . 47  
重茂 克彦

- ウエルシュ菌のリスクプロファイル . . . . 67  
山本 茂貴

- 核酸クロマト法によるエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌検出法の開発 . . . . 81  
宇治家 武史

- ウエルシュ菌食中毒発現機構の考察 . . . . 93  
三宅 眞実

- ウエルシュ菌新型エンテロトキシンの分離と精製の検討 . . . . 105  
鎌田 洋一

- 別添 . . . . 119

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

総 括 研 究 報 告 書

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23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：

本研究では、食品の安全確保を推進するため、毒素産生性食中毒細菌のなかで、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する。また、各細菌の食品危害性に焦点をあてたリスクプロファイルを作製し、食中毒発生予防に貢献することを目的とする。さらには、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。

嘔吐毒素性セレウス菌を検出する方法として、リアルタイム PCR 法を選抜し、同菌検出法の開発を試みた。同時に、食品内の毒素産生動態を解析した。米飯中のデンプンがセレウス菌 DNA の抽出を妨げていたが、DNA 抽出バッファーである「DNA すいすい-F」を用いることにより、定量的に菌体由来 DNA が回収できた。同抽出 DNA をテンプレートとして、リアルタイム PCR 法を確立できた。米飯に接種し増殖した菌数と、産生された嘔吐毒素に時間的相関が見られ、リアルタイム PCR 法の利用が適正であることが確かめられた。

黄色ブドウ球菌を BHI 培地に約  $0.5 \times 10^7$  cfu/ml になるように接種し、20 °C および 30 °C 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°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、20 °C では 12、24、48 時間で産生総量は増加傾向を示した。20°C においては定常期の間毒素産生は持続することにより総産生量が増加するものと考えられた。

水晶発振子マイクロバランス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（周波数）をモニターした。抗体の種類等を検討したところ、少なく

とも 2 種類の抗体をセンサーに固定化すること、サンドイッチ法を用いること、標識抗体として  $\phi 1.4$  nm の金微粒子を吸着させることにより、検出感度の向上があり、牛乳への添加試験では 10 ng/ml の SEA の検出が可能となった。

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。開発した遺伝子検査法の迅速性改善を目的とし、NASBA 増幅反応時間 (30 分) の短縮化をはかった。また、TGC 培地で培養したエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の濁度と菌数の関係を特定するため、再現性高くコロニーを計測可能な培養法を検討した。さらに、ウエルシュ菌食中毒の主な原因食材の一つであるカレーを試料として、食中毒発症菌量 ( $10^6$  cfu/g) の CPE 産生性ウエルシュ菌を検出する方法を検討した。

NASBA-核酸クロマト法を利用して開発した遺伝子検査法は、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌を特異的に検出するのみならず、10 コピー (分子) の RNA を 15 分の増幅及び 20 分の検出時間で検出する感度と迅速性を有していた。ウエルシュ菌食中毒の主な原因食材の一つであるカレーを試料とした場合、本遺伝子検査法により食中毒発症菌量に相当する  $10^6$  cfu/g の CPE 産生性ウエルシュ菌を検出した。この結果は、食中毒発症菌量のウエルシュ菌を検出できることを示しており、試作品作製等、次のレベルの研究にステップアップできると判断された。

ウエルシュ菌の腸管内増殖機構に関して、ヒト腸管上皮培養細胞を用いてのモデルを開発し、解析を進めて来た。食中毒由来株が消化管内でどんな環境因子に应答して表現性を変化させ、最終的に宿主を下痢に導くのかを明らかにすることを目的に研究を進めた。ウエルシュ菌の芽胞形成とウエルシュ菌エンテロトキシン産生を引き起こす共培養系培地条件を検討した。その結果、まず培地中の糖が菌の挙動に大きな影響を与えることを再確認し、これまで使用してきた DMEM 培地のグルコースを可溶性デンプンに代替した DMEM-S 培地を使用したときに、ある程度の芽胞形成とエンテロトキシンの産生が引き起こされることを確認した。しかしこの時の芽胞形成とエンテロトキシン産生は、古くからの細菌学的研究によって確立された DS 培地中で見られるものと比べると弱く、相加的・相乗的に作用しうる何らかの因子が DS 培地中に存在することが示唆された。

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。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。事例株である W5052 株を培養し、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。活性を保持した部分精製標品を得、同標品についての質量分析機によるタンパク質消化ペプチドの分析と生物情報学的手法を組み合わせ

せ、また、前年度のゲノム解析結果を利用し、新型エンテロトキシン遺伝子の同定を試みた。

事例株 W5052 は、現在までウエルシュ菌がその遺伝子を持っていると報告されている毒素のなかで 2 種類の毒素と相同性のある毒素遺伝子を持っている可能性が示された。ただし、その相同性は低く、毒素遺伝子のクローニング、組換え体の作製等を通じ、新型エンテロトキシンの存在を確実なものとする必要がある。

ウエルシュ菌のリスクプロファイルを作成した。日本での食中毒発生件数は 1996 年～2010 年の間に 20～40 件で患者数は 1000～4000 人で細菌性食中毒ではカンピロバクターに次いで多かった。発症菌数は  $10^8$  個で、カレー、食肉製品、総菜、大量調理食品が原因食となっている。下痢を主症状とするウエルシュ菌食中毒は、同菌が産生するエンテロトキシンが直接の病因物質になっており、腸管上皮細胞に結合し、水分の流出を起させる。本食中毒の予後は良好であるため、重要視されてこなかったが、毎年集団事例が一定数の発生を見ていることから大量調理施設等での対策が必要と考えられた。ウエルシュ菌のリスクはさほど高くないが、集団食中毒事例の対応が必要と考えられた。

食中毒を惹起する細菌には、ヒトに感染し炎症を誘発し症状を発現させるタイプと、菌が毒素を産生し、その毒素が消化器や神経組織を攻撃し、特有の症状を発現させるタイプの2分類がある。毒素は、神経症状を誘発するボツリヌス毒素以外は消化器症状を誘発する。消化器症状においても、嘔吐を主とする細菌、下痢を主症状とするものに分類される。前者にはウエルシユ菌が産生する下痢毒素、エンテロトキシン、後者にはブドウ球菌エンテロトキシンおよびセレウス菌嘔吐毒素がある。これら3種の毒素産生食中毒菌とその毒素が本研究の対象となる。

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る。毒素は直接的に標的組織の細胞を攻撃するため、摂取後短時間に症状が発現のが常である。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。従って、食品原材料から、生鮮食品、食品加工場での汚染に基づく加工食品がブドウ球菌の汚染を受ける危険性がある。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。基本的にあらゆる食品に両菌の汚染は避けられないと考えた方が

良い。食材食品の保管状況が不適切であれば、両細菌の食品内増殖の可能性が出てくる。

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。エンテロトキシン研究の歴史は長く、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。AからEのブドウ球菌エンテロトキシンは Staphylococcal Enterotoxin、SE と略されるのであるが、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。合計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。特に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、低分子量、構成アミノ酸およびデプシ酸が疎水性であること、構造が単純で分子の揺らぎが無い、側鎖に電荷を持った官能基がないことなど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ていない。

セレウス菌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。すなわち、リボソーム上でアミノ酸が結合し、ペプチドとして伸長してゆく様式で合成されないのである。すなわち嘔吐毒素は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。一方、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。

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生機構は複雑で、現在までの知見から判断し、最も重要なウエルシュ菌食中毒発症要因は、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。

ウエルシュ菌食中毒の診断は以下のように行う。患者の腸管内で菌の増殖、芽胞形成があるので、患者便をウエルシュ菌に選択性のある培地で培養する。同時に患者便中のエンテロトキシンを検出する。エンテロトキシンは均一な抗原性を持ち、血清型に分類されるような多型はない。そのため、免疫抗体を用いてのエンテロトキシン検出法が確立されている。一方、推定原因食からもウエルシュ菌の検出を試みる。菌分離ができた場合、エンテロトキシン遺伝子の有無をPCR法で検査する。また、毒素産生に適した培地に接種・培養し毒素産生が起こるか検証する。

1997年に門間らは、下痢を示した食中



毒事例に遭遇し、ウエルシュ菌を分離した。同菌株の遺伝子検査を行ったところ、エンテロトキシン遺伝子は持っていないことが示された。一方、同菌株を培養し、ウサギ腸管ループ内に投与すると、液体貯留が認められ、同菌株は下痢原性を示すことがわかった。エンテロトキシンがないにもかかわらず、下痢を誘発することから、同菌株が新種の下痢毒素、すなわち新型エンテロトキシンを産生するという仮説を立てた。同様の事例は 2003 年にも発生し、新型エンテロトキシン存在の可能性は高まった。現在まで新型エンテロトキシンは分離精製されていない。その遺伝子の同定もなされていない。

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生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。また、各毒素産生食中毒菌のリスクプロファイルを作製することにある。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。具体的には、嘔吐毒素産生性セレウス菌の検出法開発と、食品内毒素産生動態の解析、ブドウ球菌の新型エンテロトキシンの食品内産生動態解析ならびに新原理によるエンテロトキシン検出法開発、ウエルシュ菌の新型エンテロトキシン遺伝子同定、さらには、文献調査に基づくウエルシュ菌のリス

クプロファイル作製を実施した。

第 1 章 セレウス菌とセレウス菌嘔吐毒素研究:嘔吐毒素産生性セレウス菌の検出法の開発と、セレウス菌接種食品への応用、ならびに毒素産生性吐の関係

リアルタイム PCR 法を用いて、催吐性セレウス食中毒の主な原因食である米飯から常在セレウスと催吐性セレウスを同時に鑑別定量する検出方法の確立を目指した。実際に原因食を想定した米飯を調製し、米飯中における菌数、芽胞数、セレウリド量の経時的変化について調べるとともに、確立したリアルタイム定量 PCR 法の有用性を検証した。

米飯中のデンプン粒子はセレウスの DNA 抽出を困難にしていたが、DNA 抽出バッファーである DNA すいすい-F を用いることで、リアルタイム PCR で利用可能な純度の DNA を容易に抽出できた。セレウス総数については 16S rRNA 遺伝子を、催吐性セレウスについては CRS 遺伝子を検出することにより定量した。PCR 条件の最適化を図った結果、米飯中のセレウス総数および催吐性セレウスを定量的に検出できたことから、本法は嘔吐型のみならず下痢型セレウス食中毒事件の検査にも利用可能である。市販無菌包装米飯に 1.9 cfu/g のセレウスを接種し、30℃で静置すると、接種 12 時間後には  $10^5$  cfu/g に、48 時間後には  $10^7$  cfu/g に達し芽胞も  $10^4$  cfu/g 検出された。この間、リアルタイム PCR 法によって得られた測定値は培養法による生菌数と相関を持って推移し、リアルタ

イム定量 PCR 法の有用性が実証された。芽胞が検出されるのと同時にセレウリドが 0.3 µg/g 検出され、72 時間後には 1.6 µg/g に達した。

## 第 2 章 ブドウ球菌とブドウ球菌エンテロトキシン研究：

### 1. 新型エンテロトキシンの食品内産生動態の解析

黄色ブドウ球菌は、食品内で増殖する際にエンテロトキシン (staphylococcal enterotoxins; SEs) を産生する。食品と共に、ヒトが SEs を経口的に摂取することにより、嘔吐を主徴とする毒素型食中毒を引き起こす。SEs は SEA~SEE の 5 型が存在することが知られていたが、1990 年代半ば以降に新型エンテロトキシンが次々に報告され、現在では SEG~SEIX の 17 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。特に、SEG、SEI、SEIM、SEIN および SEIO 遺伝子を保有し、かつ SEA-SEE 遺伝子を保有しない黄色ブドウ球菌による食中毒が日本各地で報告されていることから、新型 SEs/SEIs の産生量を評価し、食中毒への関与を推定することを目的として、以下を実施する。

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、さらにこれらの毒素の mRNA 動態を解析した。

SEG、SEI、SEIM、SEIN、SEIO 遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌を BHI 培地に約  $0.5 \times 10^7$  cfu/ml になるように接種し、20 °C および 30°C 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°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、20 °C では 12、24、48 時間で産生総量は増加傾向を示した。このことから、SEG、SEI、SEIM、SEIN、SEIO の産生は対数増殖期に起こるが、30°C では定常期に入ると速やかに毒素産生は抑制されるのに対し、20°C においては定常期の間毒素産生は持続することにより総産生量が増加するものと考えられた。しかしながら、mRNA 動態を比較すると、20°C および 30°C 両者において対数増殖期に mRNA の発現が誘導され、定常期には mRNA コピー数が低下する傾向は同様であることが認められた。なお、スキムミルクにおける SEG、SEI、SEIM、SEIN、SEIO 産生動態も評価したが、in vitro の結果と同様に 20°C において産生総量が増加することが認められた。低温でのこれらの毒素の産生増強は普遍的な現象と考えられるが、その機構については更なる解析が必要である。

### 2. 水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法を用いたエンテロトキシン検出法開発

ブドウ球菌エンテロトキシンは、耐熱性毒素で、食品内で一度産生されれば加熱によって失活せず、人に摂取される可能性がたかい。食品安全を確保するには、毒素そのものを検出する方が望ましい。とくに、消費量の多い食品については、製造段階で連続的にモニタリングできる原理をもった毒素検査法の導入が望ましい。そこで、分子間相互作用測定装置の 1 つである水

晶発振子マイクロバランス (Quartz Crystal Microbalance:QCM) 法<sup>3</sup>の応用を提案した。QCM法の利点には、操作が簡便である、検体がクルードであっても対応できる、リアルタイムに測定できる、定量測定ができるなどがある。流動性のある食品や、牛乳のような液状食品の連続リアルタイムのエンテロトキシンモニタリングを目指すため、以下の検討を行った。

エンテロトキシンの検出に関して、連続的かつリアルタイムでモニタリングできる水晶発振子マイクロバランス法(QCM)の開発を継続している。SEAの検出感度が150 ng/mlからの改良を目指した。抗体の種類等を検討したところ、少なくとも2種類の抗体をセンサーに固定化すること、サンドイッチ法を用いること、標識抗体として $\phi 1.4$  nmの金微粒子を吸着させることにより、検出感度の向上があり、牛乳への添加試験では10 ng/mlのSEAの検出が可能となった。今後も、感度の改善に取り組む。

### 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。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。ウエルシュ菌食中毒には幾つか特徴がある。まず、食中毒の発症には、多量の生菌の喫食が必要である。原因食品のグラムあたり $10^6$  cfu以上の生菌検出が、ウエルシュ菌食中毒の発生条件となっている。また、ウエルシュ菌食中毒事例では事件あたりの患者数が多いという特徴も認められる。これは、原因食品に弁当や給食など大規模調理施設で製造された食品が含まれるためである。具体的な原因食品として、カレーやシチューなどの煮込み料理が多い。

上述したように、ウエルシュ菌食中毒の発症には、 $10^6$  cfu/g以上のCPE産生性ウ

ウエルシュ菌の生菌で汚染された食品の喫食が必要である。即ち、喫食される前に大規模調理施設で製造された食品から CPE 産生性ウエルシュ菌を検出できれば、大規模食中毒発生の防止に繋がる可能性がある。そこで、カレーやシチューなどの煮込み料理から、 $10^6$  cfu/g の CPE 産生性ウエルシュ菌を、迅速かつ簡便に検出する遺伝子検査法の開発を行った。平成 23 年度の本分担研究では、開発した遺伝子検査法の迅速性改善を目的とし、NASBA 増幅反応時間 (30 分) の短縮化をはかった。また、TGC 培地で培養した CPE 産生性ウエルシュ菌の濁度と菌数の関係を特定するため、再現性高くコロニーを計測可能な培養法を検討した。さらに、ウエルシュ菌食中毒の主な原因食材の一つであるカレーを試料として、食中毒発症菌量 ( $10^6$  cfu/g) の CPE 産生性ウエルシュ菌を検出する方法を検討した。

NASBA-核酸クロマト法を利用して開発した遺伝子検査法は、CPE 産生性ウエルシュ菌を特異的に検出するのみならず、10 コピー (分子) の RNA を 15 分の増幅及び 20 分の検出時間で検出する感度と迅速性を有していた。ウエルシュ菌食中毒の主な原因食材の一つであるカレーを試料とした場合、本遺伝子検査法により食中毒発症菌量に相当する  $10^6$  cfu/g の CPE 産生性ウエルシュ菌を検出した。この結果は、食中毒発症菌量のウエルシュ菌を検出できることを示しており、今後、試作品の作製、菌接種擬似原因食品などへの応用の段階に進むことができる。

## 2. ウエルシュ菌の腸管内増殖機構

ウエルシュ菌の食中毒症状発生機構は複雑である。その中で、エンテロトキシン産生性の生菌が、腸管内でいかに増殖し、芽胞形成し、毒素産生するかについては、まったくの未検討だった。ウエルシュ菌増殖機構に関して、ヒト腸管上皮培養細胞を用いてのモデルを開発し、解析を進めて来た。前年度までに、菌は消化管内では宿主細胞の代謝活性や宿主因子を利用して自らが増殖しやすい条件を作りだしていること、食中毒由来株と非食中毒由来株について腸上皮バリア破壊能を比較検討すると、食中毒由来株はバリア破壊能を示さないことを明らかにしてきた。これらの結果は、ウエルシュ菌が宿主に感染して病原性を発揮するには宿主因子・環境に応答することが非常に重要であること、そしてその環境応答性は菌株によりばらつきがあることを示唆するものである。食中毒症状を引き起こす菌株は共通の環境応答性を獲得していて、腸管内にある特異的な環境因子を認識・応答する能力を保持して病原性を発揮していることが強く疑われる。そこで本年度は、食中毒由来株が消化管内でどんな環境因子に応答して表現性を変化させ、最終的に宿主を下痢に導くのかを明らかにすることを目的に研究を進めた。

消化管内に到達したウエルシュ菌に作用して食中毒発症の誘因となる宿主環境因子を同定すべく、ウエルシュ菌の芽胞形成とウエルシュ菌エンテロトキシン (CPE) 産生を引き起こす共培養系培地条件を検討した。その結果、まず培地中の糖が菌の挙動に大きな影響を与えることを再確認

し、これまで使用してきた DMEM 培地のグルコースを starch に代替した DMEM-S 培地を使用したときに、ある程度の芽胞形成と CPE の産生が引き起こされることを確認した。しかしこの時の芽胞形成・CPE 産生は、古くからの細菌学的研究によって確立された DS 培地中で見られるものと比べると弱く、相加的・相乗的に作用しうる何らかの因子が DS 培地中に存在することが示唆された。今後はこの相加的・相乗的に作用する因子についてさらに検討を加えると共に、消化管内に存在する因子についても、菌の芽胞形成・CPE 産生を亢進させるものがないか探索を行う予定である。少なくとも酪酸は本実験系では有意な影響を持たないことが確認されたが、今後はその他の因子について詳細に検討を加えたい。

### 3. 新型エンテロトキシンの分離とその遺伝子同定の試み

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。

事例株である W5052 株を培養し、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。活性を保持した部分精製標品を得、同標品についての質量分析機によるタンパク質消化ペプチドと生物情報学

的手法を組み合わせ、また、前年度のゲノム解析結果を利用し、新型エンテロトキシン遺伝子の選抜を試みた。

事例株 W5052 は、現在までウエルシュ菌がその遺伝子を持っていると報告されている毒素のなかで 2 種類の毒素と相同性のある毒素遺伝子を持っている可能性が示された。ただし、その相同性は低く、毒素遺伝子のクローニング、組換え体の作製等を通じ、新型エンテロトキシンの存在を確実なものとする必要がある。

### 4. ウエルシュ菌の食中毒リスクプロファイル解析

ウエルシュ菌とウエルシュ菌食中毒に関して文献情報を収集し、リスクプロファイルを作製した。ウエルシュ菌食中毒発生のリスク要因の分析を目的とした。

#### 1) 情報源

国際感染症情報 GIDEON (<http://www.gideononline.com/>)によると、2000 年以降のウエルシュ菌食中毒アウトブレイクの文献は 26 件、ウエルシュ菌のサーベイランスに関する文献は 11 件、食中毒の診断に関する文献は 2 件であった。FoodRisk (<http://foodrisk.org/>) より 13 件の文献を抽出した。Ready-to-Eat 食品及び一部加熱した食肉・家禽製品によるリスク評価の文献があった。

#### 2) ウエルシュ菌に関する収集情報

*Clostridium* 属菌はグラム陽性、芽胞形成能を有する偏性嫌気性の桿菌でほとんどの菌は運動性を示すが、ウエルシュ菌 (*C. perfringens*) にはない。土壌や河川、海洋の泥に広く分布している。ウエ

ルシ菌は人の感染症としては食中毒、ガス壊疽、化膿性感染症、敗血症等の原因となる。

一般的に増殖至適 pH は 6.5~7.0 であり、5.1~9.9 の間で芽胞形成が行われる。発育して気温度は 43~47℃ と高い。最低水分活性は 0.93、芽胞は耐熱性であるが、98.9℃・26~31 分間で不活化される。殺菌剤・消毒剤で不活化される。芽胞もグルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、塩素、ヨード、過酸化水素、オゾンなどを高濃度で長時間作用させると不活化される。

ウエルシ菌は産生する主要な 4 つの毒素（ウエルシ菌エンテロトキシン：CPE）の種類（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\iota$ ）により A~E 型に分類される。食中毒やガス壊疽の原因になるウエルシ菌はほとんどが A 型菌である。A 型菌の内 5% 未満が毒素を産生し、食中毒を引き起こす。

## 2) ウエルシ菌食中毒に関する収集情報

### 2-1 食中毒の発生に関して

ウエルシ菌食中毒の原因食品は加熱不足の食肉製品や鶏肉である。日本では煮込み料理（カレー、煮魚、麺のつけ汁、野菜煮付けなど）が原因となる。動物が保菌していることも考えられるがヒトも保菌している可能性がある。

本疾病の特徴は、予後が良好で 8~12 時間で発症し、24 時間以内に回復する。嘔吐や発熱はまれであるが、幼児や高齢者ではリスクが上がる。リスク要因として重要な情報として、発症菌数があるが、本職中毒の発症菌量は約  $10^8$  個と高い。

### 2-2 原因毒素に関して

ウエルシ菌の主症状の下痢は、同菌が産生するタンパク質性の毒素によって誘発される。*Clostridium perfringens* enterotoxin と呼称され、CPE と省略される。CPE をコードする遺伝子は染色体あるいはプラスミド上に位置する。しかし近年未知の cpe 遺伝子型を持つ株が同定され、その CPE に生物学的活性も報告されている。芽胞形成と CPE 産生は密接に関連している。

CPE は腸管上皮細胞のタイトジャンクションにある claudin-3,4 レセプターと結合して複合体を形成し、原形質膜の膜透過性を変化させて細胞内にカルシウムが流入することで病態が生じる。病態とは細胞内からの水分の排出のことで、下痢に直結する。

### 2-3 食中毒診断に関して

食中毒の診断は、患者糞便や推定原因食品等からエンテロトキシン産生性のウエルシ菌を分離すること、非病原性の常在ウエルシ菌との区別が重要となる。これまでの分離法が必ずしも感度のよい方法とは言えない。病勢の強い時期には、下痢便中に菌と毒素が大量に排出されるため、比較的診断は容易である。病勢が強い機関が短く、時期を逸すると診断は難しくなる。腸管内で激しい菌増殖と芽胞形成、また、芽胞形成に連動する毒素産生が起こっているものと推察される。腸管内でのウエルシ菌の挙動については、情報が少ない。分離菌にエンテロトキシンをコードする遺伝子があるかを検査するのが一般である。推定原因食から、

同一性状のウエルシュ菌が分離された場合、非常に確実性の高い診断となる。腸管内で菌の増殖が起こっているものの、患者には免疫学的記憶、すなわち抗体の産生が起こらない。

#### 2-4 食中毒の治療、予防に関して

治療は対症療法で行う。予防策として、食品中での菌の増殖を阻止すること、加熱調理後の食品の冷却を速やかに行う。保存温度を10℃以下または55℃以上を保ち、残存芽胞の食品内増殖をさせないことが肝要である。

#### 3) リスク評価モデルにおける情報

USDA が構築した食肉、家禽肉の Ready-To-Eat 食品および一部加熱した製品におけるウエルシュ菌のリスク評価モデルでは以下の用量反応曲線が採用されている。

$p1=1-\exp(-eZdi)$  :  $p1$  は用量  $di$  時の発症確率

この反応曲線を用いてのリスク評価の結果、アメリカにおけるウエルシュ菌食中毒について以下のことが示されている。

- ・食肉、家禽肉の RTE 食品および一部加熱した製品の喫食によるウエルシュ菌食中毒患者は、年間約 79,000 名と推定される。
- ・ウエルシュ菌増殖を 1-log10 (10 倍) から 2-log10 (100 倍) または 3-log10 (1,000 倍) に変化させた場合、それぞれ年間食中毒発症者数は中央値で 1.23、1.59 倍上昇した。
- ・小売店または家庭での食肉、家禽肉の

RTE 食品および一部加熱した製品の不適切な冷蔵保存は、ウエルシュ菌による食中毒要因の約 90% を占めた。また、不適切な高温保存はウエルシュ菌による食中毒要因の約 8% を占めた (ただし、過少評価されている可能性がある)。

・加工工場における 1-log10 (10 倍) および 2-log10 (100 倍) の菌の増殖による食中毒は、それぞれ 0.05%、0.4% を占めた。

・実験室での試験結果、ボツリヌス菌の方がウエルシュ菌よりも低温での増殖率が高かった。

#### 4) 食中毒発生状況

・日本: 我が国でのウエルシュ菌による食中毒発症件数は毎年 20 例から 40 例で推移しており、1 例あたりの患者数は約 1,000 人から 4,000 人の間で推移している。また、汚染率については小売店の食肉サンプルの 70% (2008 年) との報告がある。日本は諸外国に比べてウエルシュ菌による食中毒件数、発症者数ともに多い傾向がある。

・諸外国: *Clostridium perfringens* type A はヒトを含む健康な哺乳類の消化管から同定されている。

芽胞は土壌および汚染された食品中で出芽し、熱不安定性の毒素を遊離する。これらの毒素が回腸および回腸の輸送機構を障害する。

ほとんどのアウトブレイクは食肉、鶏肉、魚介類由来であり、特に秋から冬にかけて起こることが多い。

ウエルシュ菌のリスクを解析した結果、結論として、そのリスクはさほど高くはないが、大量調理、大量流通するフードチェ

ーンに基づく集団色中毒事例への対策が必要と考えられる。



## 発表した研究成果リスト

### 論文発表

1. Mizutani, N., Sugita-Konishi, Y., Omoie, K., Shinagawa, K., Kawakami, H., Shinji Kanno, S., Sugiyama K., and Yoichi Kamata, Y. (2011) Advantages of immunoglobulin Y for the detection of Staphylococcal enterotoxin A in a double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, *Int. J. Food Sci. Tech.* 47:155-159.
2. Ono, H.K., Nishizawa, M., Yamamoto, Y., Hu, D.-L., Nakane, A., Shinagawa, K., and Omoie, K. (2012) Submucosal mast cells in the gastrointestinal tract are a target of staphylococcal enterotoxin type A. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 64: 392-402.

### 学会発表

1. Sato, A., Nagasako, Y. Yamamoto, Y. Sato, Y., Ono, H.K., Hu, D.-L., Nakane, A. and Omoie, K. (2011) Temperature dependent regulation of enterotoxin-gene-cluster-related staphylococcal enterotoxins production. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo.
2. 長廻ゆりあ, 稲垣華絵, 山本裕紀, 鎌田洋一, 品川邦汎, 重茂克彦 (2011) 新型ブドウ球菌エンテロトキシンの食品中における産生量評価. 第 102 回日本食品衛生学会学術講演会, 秋田市.
3. Hidenobu Hoshi and Masami Miyake. An *in vitro* model system for studying *Clostridium perfringens* type A infection. International Conference on Global Issues Influencing Human and Animal Health for ASEAN; One Health Concept. June, 2011. Kohn Kaen, Thailand.
4. Hidenobu Hoshi, Kaori Kondo, Masataka Oda, Masahiro Nagahama, Shigeki Yamamoto, Yoichi Kamata, and Masami Miyake. An *in vitro* model system for studying *Clostridium perfringens* type A infection. IUMS2011. Sept., 2011. Sapporo, Japan.
5. 星 英之、近藤香織、山本茂貴、鎌田洋一、三宅眞実. ウエルシュ菌食中毒の発症メカニズムを解析するための *in vitro* 実験系について. 第 32 回日本食品微生物学会. 2011 年 11 月. 東京.

6. 宇治家武史、林司、山本茂貴、鎌田洋一. NASBA 核酸クロマト法を用いた新しいウエルシュ菌の検出法. 第 32 回 日本食品微生物学会学術総会. 2011 年 10 月. 東京.

知的財産

1. 特許出願

宇治家武史、林 司、鎌田洋一

特願 2011-189796 ウエルシュ菌の検査法。

出願日 平成 23 年 8 月 31 日

Original article

## Advantages of immunoglobulin Y for the detection of Staphylococcal enterotoxin A in a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay

Noriko Mizutani,<sup>1</sup> Yoshiko Sugita-Konishi,<sup>1</sup> Katsuhiko Omoe,<sup>2</sup> Kunihiro Shinagawa,<sup>2</sup> Hiroshi Kawakami,<sup>3</sup> Shinji Kanno,<sup>1</sup> Kei-ichi Sugiyama<sup>1</sup> & Yoichi Kamata<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>2</sup> Iwate University, 3-18-8 Ueda, Morioka, Iwate 020-8550, Japan

<sup>3</sup> Kyoritsu Woman's University, 2-2-1 Hitotsubashi, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8437, Japan

(Received 8 February 2011; Accepted in revised form 14 September 2011)

**Summary** To determine the amounts of staphylococcal enterotoxin A (SEA), a novel and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed. Protein A, which is produced by *Staphylococcus aureus*, interferes with the reaction between SEA and anti-SEA immunoglobulin G (IgG), resulting in a false-positive reaction. Chicken IgY was introduced as a capture antibody in the sandwich ELISA system, as IgY binds less efficiently to protein A. When the anti-SEA IgG antibody was used as the capture and detection antibodies (IgG-IgG ELISA), the background levels of protein A increased, thus resulting in a false-positive reaction. A 0.01 ng mL<sup>-1</sup> concentration of protein A significantly increased the absorbance value of the blank wells. When the anti-SEA IgY antibody was used as the capture antibody, 1000 ng mL<sup>-1</sup> of protein A did not affect the absorbance value. The ELISA system using anti-SEA IgY as a capture antibody and anti-SEA IgG as a detection antibody (IgY-IgG ELISA) showed a detection limit of <0.25 ng mL<sup>-1</sup> and a creditability of  $R^2 = 0.98$ . These findings demonstrate the advantage of chicken IgY for the detection of SEA by means of double-antibody sandwich ELISA.

**Keywords** Detection, enzyme-linked immunosorbent assay, enterotoxin, IgY, protein A, *Staphylococcus aureus*.

### Introduction

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) are useful immunological techniques, and are widely used to detect many kinds of bacterial toxins (Saunders & Bartlett, 1977; Stiffler-Rosenberg & Fey, 1978; Fey *et al.*, 1984). Among the many of techniques, the double-antibody sandwich ELISA is popular, and involves one antibody to capture the antigen, and another labelled antibody is used to detect the bound antigen. Both these antibodies are usually of mammalian origin. Commonly, rabbits are used for the production of sera from which specific antibodies can be purified. Immunoglobulin (IgG) is well established for its properties, and it has high specificity and binding affinity to antigens. However, there are certain limitations in using mammalian IgG alone in immunoassays. The Fc domain of IgG is the site for binding to protein A, and it may yield a false-positive reaction in sandwich ELISA. Protein A also

binds to the Fab region in 15–20% of IgG, IgA and IgM antibodies of human (Sasso *et al.*, 1989, 1991).

Staphylococcal enterotoxin A (SEA) is a causative toxin for food poisoning by *Staphylococcus aureus*. Most strains of *S. aureus* also secrete protein A. The existence of protein A in culture broth and food causes false-positive results in the immunoassay using IgG. Immunoglobulin Y (IgY) found in birds is the equivalent of IgG found in mammals. IgY is found in the egg yolk and serum of birds (Warr *et al.*, 1995). IgY antibodies exhibit higher antigen-binding affinities. IgY has two heavy chains and two light chains. The IgY heavy chain has one variable and four constant region domains, whereas, the light chains of IgG have one variable and three constant region domains (Chiou, 2003). These IgY molecules can reduce interferences with protein A and may provide an added advantage in immunoassays (Hoffman *et al.*, 1996). However, IgY-based methods have not yet been completely established.

We herein report the development of a sensitive and specific chicken IgY-based indirect double-antibody sandwich ELISA system for the detection of SEA with

\*Correspondent: Fax: +81 3 3700 9852;  
e-mail: ykamata@nihns.go.jp

no interference due to protein A. The present study describes the advantages of the chicken IgY antibody to detect and quantify SEA.

## Materials and methods

### Staphylococcal enterotoxin A

The purified SEA standard was prepared according to the methodology described in a previous report (Hu *et al.*, 2003). The protein concentration of the rSEA was determined using Bradford's method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA; Bradford, 1976). The purity of the rSEA was confirmed using sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmli, 1970).

### Antibodies

Rabbits (Japanese White; Japan SLC, Hamatatsu, Shizuoka, Japan) were immunized with rSEA. Freund's complete adjuvant (Difco) was mixed with 100 µg of rSEA, and rabbits were injected subcutaneously with the emulsion. Two or four weeks later, the same injection was performed. One more week later, rSEA was intravenously injected. The serum was collected 1 week after the final injection. Chickens (10 weeks of age, WL-M/O, Medical and Biological Laboratories Co., Ltd., Nagoya, Aichi, Japan) were immunized with rSEA. An emulsion of rSEA (100 µg) with Freund's complete adjuvant was injected subcutaneously into a chicken. The same injection procedures were repeated four times with an interval of 1 week. The serum was collected 1 week after the final injection. IgG and IgY fractions were isolated from the serum of the respective species by the use of Thiophilic Adsorption Kit (Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama, Kanagawa, Japan). The purified Ig fraction was dialysed against PBS, and its protein concentration was determined using the Bradford's method as previously described.

### Double-antibody sandwich ELISA

Anti-rSEA IgY and IgG were labelled with NHS-LC-biotin (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacture's instruction. The reaction products were dialysed against PBS, and the final products (biotin-labelled IgG/IgY) were stored at -30 °C in the presence of 50% of glycerol.

Both IgG and IgY were used as a capture antibody. The ELISA system using IgG was designated as IgG ELISA, and the system using IgY was designated as IgY ELISA. Both IgG and IgY (as a capture antibody) were added into a 96-well ELISA plate (Thermo Fisher Scientific) at 0.1 µg per well. After 1 h, the wells were washed by addition of 0.05% Tween-20 in PBS (PBST). To evaluate the suitable blocking reagent, 100 µL of

StartingBlock BlockingBuffers (Pierce), 1% polyvinyl alcohol and 0.5% fish gelatin blocking solution in PBS (BioFX Laboratories, Inc. Owings Mills, MA, USA) were added into wells and incubated at 4 °C overnight. The purified rSEA was diluted in Can Get Signal Immnoreaction Enhancer Solution I (Toyobo). After removing the blocking solution, SEA samples were added into the wells at 100 µL per well. The plate was incubated at room temperature for 1 h. After washing the wells four times, the biotin-labelled IgG and/or IgY (as a detection antibody) diluted in an added diluent (solution II; Toyobo), and allowed to react for 1 h. After washing as the same way, streptavidin-labelled peroxidase (Pierce) was added into wells, and then incubated for 30 min at room temperature. Colour development was carried out by the use of Opt-EIA, tetramethylbenzidine substrate reagent set (BD Biosciences), and was stopped by the addition of 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The final product was quantified for the absorbance at 450 nm using a microplate reader (Model 680; Bio-Rad). Protein A (Pierce), a mixture of protein A and rSEA, and rSEA alone were simultaneously allowed to react with the capture antibody coated on the surface of the wells.

Staphylococcal enterotoxin A (0–1000 ng mL<sup>-1</sup>) was applied to evaluate the dynamic range of the ELISAs, and a small amount of SEA (0–5 ng mL<sup>-1</sup>) was used to determine the minimum concentration that could be detected.

### Culture of *Staphylococcus aureus* isolates

*Staphylococcus aureus* isolates, 196E (*sea* gene +), 11689 (*sea* gene +), FRI361 (*sea* gene -), Saga-1 (*sea* gene -) and Aomori 1 (*sea* gene -), which originated from cases of food poisoning, were used. The presence of the *sea* gene was determined by a polymerase chain reaction using *sea*-specific primers (Omoe *et al.*, 2005). A stock culture of each isolate was inoculated into a BHI broth (Becton-Dickinson, Tokyo, Japan) supplemented with 1% yeast extract (Becton-Dickinson) and cultured overnight at 37 °C with shaking (150 rpm). The overnight culture was added into fresh medium of the same composition at a ratio of 1–100. The cultivation was continued for 48 h at 37 °C with shaking (150 rpm). The supernatant was obtained by the centrifugation at 10 000 g for 10 min. The culture supernatant containing SEA was clarified by filtration through a 0.45-µm filter (Millex).

### Statistics

The statistical significance of the differences in the absorbance values between the blank well and individual wells were measured using Student's *t*-test. Differences with a *P*-value of <0.05 were considered to be statistically significant.