

## Results

### Establishment of ELISA system to detect staphylococcal enterotoxin

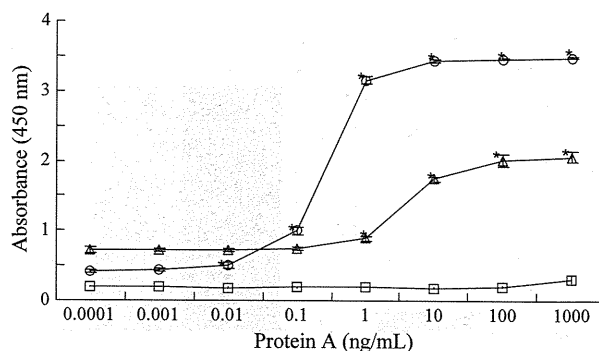
The standardisation of the conditions for each step of the ELISA was performed. Rabbit anti-SEA IgG or chicken anti-SEA IgY ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was used to coat the wells of a 96-well plate. The plate was incubated at room temperature for 1 h. We evaluated blocking reagents to obtain specific signals in our SEA-detecting ELISA system, and we found that the plates incubated with a fish gelatin blocking solution demonstrated a lower background in the assay (data not shown). We also evaluated the combination of the capture and detection antibodies. When anti-SEA IgG was used as both a capture and a detection antibody (IgG-IgG ELISA), the absorbance value started to increase at  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  of SEA, and a high absorption value was observed at  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$ . The increase in the absorbance value depended on the concentration of SEA. When anti-SEA IgY was used as both a capture and detection antibody, no remarkable increase in the absorbance was observed at higher concentrations of SEA. This finding therefore indicates that the usage of IgY as a capture and detection antibody is not suitable to detect SEA. In the case of IgY-IgG ELISA, the absorbance value started to increase at  $1 \text{ ng mL}^{-1}$ , and the absorbance value increased gradually, depending on the concentration of SEA. The absorbance value in IgY-IgG ELISA at  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$  of SEA was somehow lower than that in IgG-IgG ELISA, but the increase of the absorbance value in IgY-IgG ELISA was sufficient to detect SEA.

### Influence of protein A on the specific reaction between staphylococcal enterotoxin A and the antibodies

Protein A was added into the well that did not contain SEA on the IgG-IgG, IgG-IgY or IgY-IgG ELISA, and the absorbance of the reaction products was measured to determine the influence of protein A. As shown in Fig. 1, the presence of protein A at  $0.01 \text{ ng mL}^{-1}$  significantly increased the absorbance value on the IgG-IgG ELISA without SEA. On the IgY-IgG ELISA, however,  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$  of protein A increased the absorbance, but the increase was minimal.

### Specificity of the binding of chicken IgY to staphylococcal enterotoxin A

The effects of protein A were determined by measuring the absorbance with the three kinds of ELISA systems in the presence or absence of SEA. On the IgG-IgG ELISA, the absorbance value of the wells with SEA and protein A was threefold higher than in the wells containing SEA alone (Fig. 2a). Furthermore, the wells



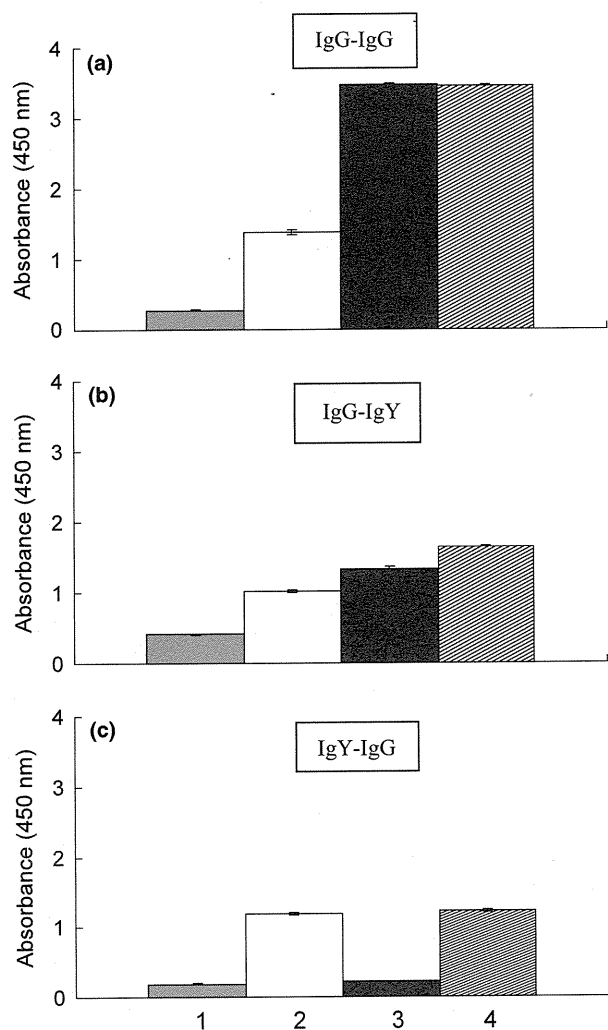
**Figure 1** The influence of protein A on the absorbance of ELISA using IgG and IgY antibodies against Staphylococcal enterotoxin A. ○: IgG-IgG ELISA, △: IgG-IgY ELISA and □: IgY-IgG ELISA. Statistically significant differences were observed compared with the blank control (Protein A  $0 \text{ ng mL}^{-1}$ ). \* $P < 0.05$ .

containing protein A alone showed an absorbance value equivalent to that of the wells containing both SEA and protein A, thus suggesting that the higher absorbance in the well containing both SEA and protein A was due to the presence of protein A. When the IgG-IgY ELISA was performed, the trend of the absorbance value was similar to that of the IgG-IgG ELISA (Fig. 2b). Conversely, the absorbance of the wells containing protein A was similar to that of the blank wells on the IgY-IgG ELISA (Fig. 2c). The wells containing both SEA and protein A exhibited an absorbance equivalent to that from the wells containing SEA alone. These findings demonstrate that protein A does not interfere with the reaction between SEA and anti-SEA IgY, but does interfere with the reaction between SEA and anti-SEA IgG.

### Calculation curve of IgG-IgG and IgY-IgG ELISA to determine the concentration of staphylococcal enterotoxin A

For the determination of SEA in the culture supernatant, a calculation curve with a wide dynamic range was prepared by IgG-IgG and IgY-IgG ELISAs. Both ELISA systems yielded an excellent  $R^2$  value, namely up to  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$  of SEA, thus suggesting that these methods are accurate indicators of the SEA levels (Fig. 3).

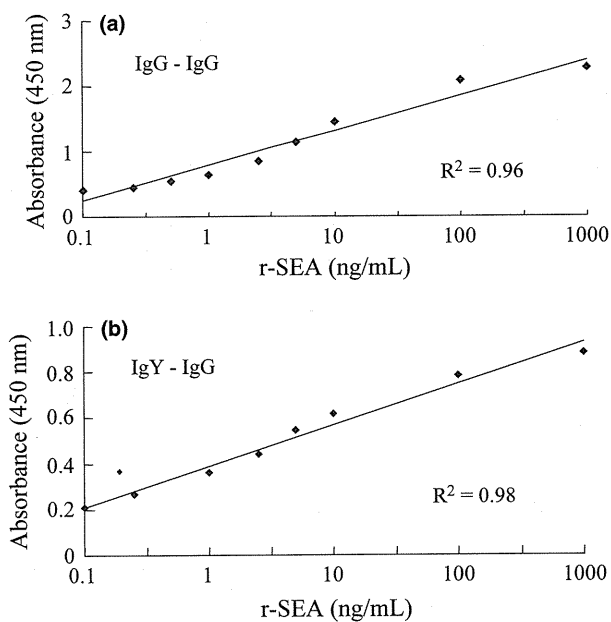
The minimal detection threshold for SEA was determined by the addition of a small amount of SEA in the wells. The absorbance value was determined, and statistical analysis between the blank well ( $0 \text{ ng mL}^{-1}$  of SEA) and individual wells of SEA added was performed. The minimum concentration of SEA that could be detected was  $0.5$  and  $0.25 \text{ ng mL}^{-1}$  with the IgG-IgG and IgY-IgG ELISAs respectively (Fig. 4).



**Figure 2** Effects of protein A on the absorption of the double-antibody sandwich ELISAs. IgG (Panels a and b) and IgY (Panel c) antibodies at 0.1  $\mu\text{g}$  per well were coated in each well of ELISA plate. Column 1 : None, 2 : rSEA 1000  $\text{ng mL}^{-1}$ , 3 : Protein A 1000  $\text{ng mL}^{-1}$ , and 4 : rSEA 1000  $\text{ng mL}^{-1}$  and Protein A 1000  $\text{ng mL}^{-1}$ .

#### Determination of the concentration of Staphylococcal enterotoxin A using the ELISAs

Using the calculation curve shown in Fig. 4, the concentration of SEA in the supernatant cultured with sea gene positive *S. aureus* strains (196E and 11689) was determined using an IgG-IgG or IgY-IgG ELISA. When the IgG-IgG ELISA was used, a 10 000-fold dilution of the supernatant was necessary to adapt the calculation curve. In the case of the IgY-IgG ELISA, only a 300-fold dilution of the supernatant was necessary. The SEA concentration in the supernatants determined using IgG-IgG ELISA was dramatically higher than that



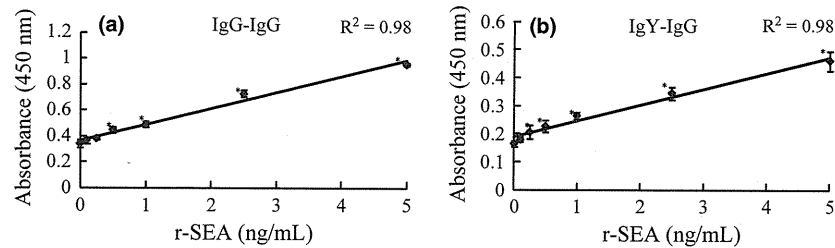
**Figure 3** Calculation curve for determination of Staphylococcal enterotoxin A in the culture supernatant using the IgG-IgG (Panel a) and IgY-IgG (Panel b) ELISAs.

determined using the IgY-IgG ELISA (Table 1). The supernatant cultured with the strains lacking the sea gene (FRI-361, Saga-1 and Aomori 1) revealed an absorbance equal to that of the blank wells using the IgY-IgG ELISA, but that showed a markedly higher absorbance in the IgG-IgG ELISA (data not shown).

#### Discussion

Staphylococcal enterotoxin A is a protein responsible for staphylococcal food poisoning. Several immunoassays have been described for the detection of the enterotoxins in food extracts and culture supernatant fluids (Freed *et al.*, 1982). The authors mentioned that Ig isolated from the serum of non-immunized rabbits can resolve the interference in the ELISA reactions, because protein A binds to normal IgG. This adsorption method with normal IgG has been available, but the detection limits will be compromised, because the test materials must be diluted with normal IgG. However, these methods are frequently hampered by false-positive results due to protein A, which is produced by most strains of *S. aureus*. The binding of protein A to the Fc region of the IgGs of many species can lead to false-positive results in the ELISAs (Koper *et al.*, 1980).

To confirm the adaptation of our established IgY-IgG ELISA system as an SEA detection method, SEA-containing culture samples from the food poisoning strains 196E and 11689 were used for the detection of SEA.



**Figure 4** Determination of minimum concentration of Staphylococcal enterotoxin A that could be detected in the double-antibody sandwich ELISA using the IgG and IgY antibodies. Panel a: IgG-IgG ELISA, Panel b: IgY-IgG ELISA. Statistically significant differences were observed compared with the blank control (SEA 0 ng mL<sup>-1</sup>). \**P* < 0.05.

**Table 1** Detection of staphylococcal enterotoxin A by ELISAs using IgG and IgY antibodies in culture supernatants of *Staphylococcus aureus* isolated from food poisoning cases

Staphylococcus aureus isolate	SEA (ng mL <sup>-1</sup> ) on the ELISA of	
	IgG-IgG	IgY-IgG
196E	118 593	457
11689	63 442	321

SEA, Staphylococcal enterotoxin A.

The SEA concentration was determined from the calculation curve as shown in Fig. 3.

The IgY-IgG ELISA system described in this communication can reliably detect SEA at concentrations as low as 0.25 ng mL<sup>-1</sup>. This assay appeared to have a good level of reproducibility with minimal interference from protein A. The interference by protein A was markedly reduced using our established IgY-IgG ELISA instead of the IgG-IgG ELISA. This improved method is useful for SEA detection. In conclusion, the ELISA system we have developed is rapid, sensitive and not subject to protein A levels. It may be useful for the detection of SEA in culture supernatant fluids, and may be applied for detection of SEA in food extracts.

### Acknowledgments

This study was supported by a Health and Labour Science Research Grant. We thank Ms. Yuka Suzuki for her valuable technical supports of assistance and Ms. Minori Akiyama for her excellent secretary support.

### References

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 2367–2376.

- Chiou, V. (2003). Process for selectively isolating IgY antibodies from egg yolk of an anseriform bird and IgY antibodies obtained thereby. United States Patent Application Publication.
- Fey, H., Pfister, H. & Ruegg, O. (1984). Comparative evaluation of different enzyme-linked immunosorbent assay systems for the detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, and D. *Journal of Clinical Microbiology*, **19**, 34–38.
- Freed, R.C., Evenson, M.L., Reiser, R.F. & Bergdoll, M.S. (1982). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in food. *Applied Environmental Microbiology*, **44**, 1349–1355.
- Hoffman, W.L., Ruggles, A.O. & Tabarya, D. (1996). Chicken anti-protein A prevents *Staphylococcus aureus* protein A from binding to human and rabbit IgG in immunoassay and eliminates most false positive results. *Journal of Immunological Methods*, **198**, 67–77.
- Hu, D.-L., Omoe, K., Shimoda, Y., Nakane, A. & Shinagawa, K. (2003). Induction of emetic response to staphylococcal enterotoxins in the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Infection & Immunity*, **71**, 567–570.
- Koper, S.W., Hangenaars, A.M. & Notermans, S. (1980). Prevention of cross-reactions in the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in culture filtrates and foods. *Journal of Food Safety*, **2**, 35–45.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Omoe, K., Hu, D.-L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A. & Shinagawa, K. (2005). Comprehensive analysis of classical superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Microbiological Letters*, **246**, 191–198.
- Sasso, E.H., Silverman, G.J. & Mannik, M. (1989). Human IgM molecules that bind staphylococcal protein A contain V<sub>H</sub>III H chains. *Journal of Immunology*, **142**, 2778–2783.
- Sasso, E.H., Silverman, G.J. & Mannik, M. (1991). Human IgA and IgG F(ab')<sub>2</sub> that bind to staphylococcal protein A belong to the V<sub>H</sub>III subgroup. *Journal of Immunology*, **147**, 1877–1883.
- Saunders, G.C. & Bartlett, M.L. (1977). Double-antibody solid-phase enzyme immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin A. *Applied Environmental Microbiology*, **34**, 518–522.
- Stiffler-Rosenberg, G. & Fey, H. (1978). Simple assay for staphylococcal enterotoxins A, B, and C: modification of enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **8**, 473–479.
- Warr, G.W., Magor, K.E. & Higgins, D.A. (1995). IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunological Today*, **16**, 392–398.

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

西川 禎一

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

米飯中の催吐性 *Bacillus cereus* とその嘔吐毒素の検出

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

協力研究者 池田 高紀 帝塚山学院大学  
田中 仁 帝塚山学院大学

研究要旨：セレウスとセレウリド合成酵素（CRS）遺伝子に特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR 法による食品中のセレウスの検出および定量を試みた。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  $\mu$ g/g 検出され、72 時間後には 1.6  $\mu$ g/g に達した。

## A. 目的

*Bacillus cereus* (以下セレウス) は、グラム陽性通性嫌気性の芽胞形成桿菌で、べん毛を持ち運動性を有する。土壌や河川などの自然環境[1]から、食品、飼料、家畜の腸管内に至るまで広く分布し、健康者の糞便からも検出されることがある。農作物から頻繁に検出される腐敗菌として古くから知られているが、健康被害を引き起こすこともあり、食中毒や、気管支炎、髄膜炎、敗血症などの起因菌となることもある。

発育可能温度は 5 °C から 50 °C、至適温度は、28 °C から 35 °C である。発育可能 pH は 4.4 から 9.3 であり、栄養体は酸性条件に弱い。耐熱性の芽胞は、100 °C、30 分の加熱でも完全に死滅しない。加熱中に生き残った芽胞が、冷却後の食品内で発芽増殖し食中毒を引き起こすことがある。わが国では 1983 年から食中毒菌として統計が取られている[2]。

セレウス食中毒は下痢型と嘔吐型の 2 つのタイプがあり、前者はエンテロトキシン、後者は cereulide (セレウリド) という毒素により発症する[3-6]。下痢型食中毒は、食品に付着したエンテロトキシン産生性セレウスが腸管内で増殖し、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食中毒である。一方、嘔吐型の食中毒は、催吐性セレウスが食品内で産生したセレウリドを摂取することで発症する食品内毒素型食中毒である。

セレウリドは、セレウリド合成酵素 (CRS) 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る、分子量 1,165 の疎水性デプシ酸からなる環状ペプチドである。産生至適温度は 25 °C から 30 °C であり、126 °C、90 分の加熱や pH2 または pH12 の強酸・強塩基およびトリプシンなどのタンパク分解酵素にも耐性を示す[7]。催吐性セレウスによる食中毒の原因食は、焼き飯、ピラフ、パスタ、麺類、豆腐、弁当などの作り置きのもが多く、とくに米飯の関与が多い。潜伏期間は 30 分から 6 時間で、悪心、嘔吐で発症する。

米飯を主食とするわが国のセレウス食中毒は嘔吐型が圧倒的に多く、平成 20 年大阪府において、離乳食を食べた幼児が催吐性セレウス食中毒による国内初の死亡例となったように、致命的にもなりうる食中毒菌である[8]。しかしながら、自然界では催吐性セレウスが検出されることはほとんどなく、常在セレウスとの鑑別測定が重要であり、迅速、簡便かつ正確性に優れた検出方法が求められている。

近年、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法は迅速鋭敏な手法として、微生物検査領域で汎用されており、PCR 法を用いたセレウスの定性的な検出法も報告されている[9, 10]。しかし、従来使われてきた PCR 法では、PCR 反応に加え、アガロースゲル電気泳動法を用いて PCR 産物を確認するため煩雑で定量性に乏しい。現在では、PCR 増幅産物をリアルタイムでモニタリング、解析するリアルタイム PCR 法によるセレウス検出法も報告されている

[11-14]。リアルタイム PCR 法は、電気泳動が不要で迅速性と定量性に優れている。しかし、食品中の細菌を定量する場合、食品に含まれる種々の物質が PCR を阻害すること、セレウスのような芽胞形成菌の場合は芽胞からの DNA 抽出が難しいこと等の問題があり、未だ定量的な検査にはほとんど用いられていない。

本研究は、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。

## B. 方法

### 1. 使用菌株

臨床分離した催吐性セレウス 03-137-1、BC1(+)、06-81-16-1、335-11、以上 4 株と、セレウリド非産生株である 09-112-7、BC1(-)、08-151-3、08-151-4、S0932F-1、09-59-1、09-80-9、09-75-22、以上 8 株、総計 12 株を実験に供試した。

### 2. 培地・試薬類

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

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) 40 g を 1 l 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。

BHI 培地 (BHI) : BHI ブイオンを三角フラスコに 10 ml 分注し、オートクレーブ滅菌した。

NGKG 寒天培地 : NGKG 寒天基礎培地 (日水製薬) 26 g を蒸留水 900 ml に溶解し、オートクレーブ滅菌し、50 °C に保ち、無菌卵黄液 (アテクト) を用いて 20 % となるように調製し、全量を 1 l としたものを、シャーレに 20 ml ずつ分注した。

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) 30 g を 1 l の蒸留水に溶解し、50 ml 三角フラスコに 10 ml 分注し、シリコン栓をしてオートクレーブ滅菌した。

MEM : イーグル MEM 培地③ (日水製薬) 4.7 g を Milli Q 水 500 ml に溶解し、Phenol red solution (SIGMA-ALDRICH Inc) を 500  $\mu$ 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、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  $\mu$ g/ml となるように添加した EMEM を使用した。

トリプシン : 0.5 % (w/v) トリプシン -5.3 mmol/l 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。

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。

1 M トリス-HCl (pH8.0)

トリス塩基 (関東化学) 60.55 g を 400 ml の蒸留水に溶解し、6 N 塩酸 (和光純薬工業) で pH を調整し、500 ml にメスアップした。

TE : 1 M トリス-HCl (pH8.0) 5 ml、0.5 M EDTA (pH8.0) (ニッポンジーン) 1 ml、蒸留水 494 ml を混合し、オートクレーブ滅菌した。

TE 飽和フェノール : 65 °C で加温溶解したフェノール結晶 (和光純薬工業) 400 ml、滅菌水 400 ml、1 M トリス-HCl 32 ml を滅菌した遮光瓶容器に加え、激しく混合し一晩放置した。

フェノール/クロロホルム : TE 飽和フェ

ノールと等量のクロロホルム (和光純薬工業) を加え、激しく混合し、一晩 4 °C で放置し、層に分かれてから使用した。

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 $\times$ 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。

### 3. 実験方法

DNA の抽出 :

① 試料 1 ml をマイクロチューブに移し、遠心分離 (10,000 rpm、4 °C、5 分) し、沈渣を DNA 抽出試料とした。

② DNA 抽出試料に DNA すいすい-F (リーゾ) 400  $\mu$ l 加え混合し、25 °C で 1 時間静置した。

③ フェノール/クロロホルムを 400  $\mu$ l 加え混合し、遠心分離 (15000 rpm、4 °C、10 分) した。

④ 上清 200  $\mu$ l にイソプロパノール 200  $\mu$ l を加え混合し、遠心分離 (15000 rpm、4 °C、10 分) した。

⑤ 上清を除去した後、70% エタノールを 1ml 加え洗浄し、遠心分離 (15000rpm、4 °C、10 分) した。

⑥ 上清を除去した後、5 分風乾し、50  $\mu$ l の TE に溶解させたものを DNA サン



プルとした。DNA サンプルは使用するまで -45 °C で保存した。

リアルタイム定量 PCR 法：セレウス総数は 16S rRNA により検出を行い、催吐性セレウスの検出はセレウリド合成酵素 (CRS) 遺伝子により検出を行った (表 1)。

PCR 反応液は SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を用いた。

また、予備試験として 16S rRNA の PCR 反応液の検討を行った。すなわち、DNA サンプルを含む PCR 反応液に 5%ジメチルスルホキシド (DMSO)、8 %DMSO、8 %グリセロール、5 %DMSO+5 %グリセロール、8 %ホルムアミドをそれぞれ加え、PCR 反応後の融解曲線を比較することにより最適な反応液組成を検討した。その結果、16S rRNA の PCR 反応液には 5 %DMSO を添加することとした。

16S rRNA 検出用 PCR 反応液 (1 反応あたり) の組成は以下のとおりである。SYBR Premix Ex Taq (2×) 10 µl、16S rRNA\_SYBR\_Forward Primer (15µM)

0.4µl、16S rRNA\_SYBR\_Reverse Primer (15µM) 0.4 µl、ROX Reference Dye (50×) 0.4 µl、DMSO 1.0 µl、PCR 用滅菌水 6.8 µl、テンプレート 1.0 µl。

CRS 遺伝子検出用 PCR 反応液 (1 反応あたり) の組成は、SYBR Premix Ex Taq (2×) 10 µl、crs\_SYBR\_Forward Primer (15µM) 0.4 µl、crs\_SYBR\_Reverse Primer (15µM) 0.4 µl、ROX Reference Dye (50×) 0.4 µl、PCR 用滅菌水 7.8 µl、テンプレート 1.0 µl

からなる。

上記の試薬を混合し、96 ウェルプレートに 19 µl ずつ分注した。各ウェルに 1.0 µl DNA 溶液を添加し、シールし、コンプレッションマットを置き、遠心機で軽く遠心した。計測は ABI 7000 Real-time PCR System による PCR 反応ならびに蛍光検出により行った。PCR 反応は、初期変性 95 °C 1 分、1 サイクル、PCR 反応 95 °C 5 秒、66 °C 31 秒、40 サイクルとし、融解曲線解析は 95 °C 15 秒、60 °C 1 分、95 °C 15 秒、1 サイクルで行った。

米成分存在下における DNA 抽出の効率：無菌包装米飯 10 g および食品希釈用 PBS 80 ml と、03-137-1 株および 09-112-7 株の希釈菌液各 10 ml をストマッカー袋に加え、ストマッカーにて 1 分間ホモジナイズした。ホモジナイズ後の各試料を、菌数測定と DNA 抽出に用いた。

市販無菌包装米飯への催吐性セレウスの接種および培養：

① セレウス 03-137-1 株を BHI 液体培地に接種し 30 °C、12 時間培養した。

② 前培養した菌液を 10<sup>6</sup> 希釈したものの (1.9 cfu/g) を、米飯接種用菌液とした。

③ 米飯の包装をはがし、接種用菌液 5 ml を米飯上に均一に散布した。

④ 散布後、再びふたをシールし、30 °C で保存した。培養から 0、12、24、48、72 時間後にサンプリングし、実験に供した。

セレウリド標準試料とセレウリド抽出試料の調製：セレウリド標準試料は、精製セレウリド（バイオコントロール）と無菌米飯を混合した試料からセレウリドを抽出し調製した。セレウリド抽出試料は上記の方法、催吐性セレウスを接種培養した市販無菌包装米飯からセレウリドを抽出し調製した。操作は以下のとおりである。

① セレウリド標準試料は米飯を 5 g 精秤し、シャーレにとり、セレウリド量が米飯 1 g あたり 20  $\mu\text{g}$  になるように精製セレウリドを添加した。

② セレウリド標準試料、ならびにセレウリド抽出試料を 121  $^{\circ}\text{C}$ 、15 分オートクレーブで滅菌処理し、約 5 g を精秤し、ポッター型ガラスホモジナイザーにとった。

③ 蒸留水を等量加え、ホモミキサーにてホモジナイズ（250 rpm、室温、1 分）した。

④ ホモジナイズ後 5.0 g 精秤し、50 ml 遠沈管に採取した。

⑤ メタノールを 20 ml 加え、振とう抽出（200 rpm/回転、室温、10 分）した。

⑥ 抽出後、遠心分離（3,000 rpm、室温、10 分）し、上清の全量をナス型フラスコに採取した。

⑦ ⑤、⑥の操作は 2 回行った。

⑧ 回収した上清をロータリーエバポレーターにて 40  $^{\circ}\text{C}$  で減圧濃縮し、メタノールを留去した。

⑨ 乾固物に、50%メタノールを 2 ml 添加し、超音波処理により乾固物を 50%

メタノールに溶解させやすくし回収した。乾固物に水分が残っていた場合、メタノールを等量混合し回収した後、さらに 50%メタノールを 2 ml 加えて回収した。

⑩ ⑧、⑨の操作を 2 回行った。

⑪ 回収液は直接、洗浄済みの Oasis HLB に負荷した。

⑫ 試料を負荷した Oasis HLB を、50%メタノール 3 ml、80%メタノール 3 ml で順次洗浄し、95%メタノール 3 ml で溶出した。

⑬ 溶出液を 50  $^{\circ}\text{C}$ 、窒素気流化で濃縮し、95%メタノールで 1 ml に定容した。

これをセレウリド標準試料、セレウリド抽出試料とし、HEp-2 細胞空胞化試験に供した。

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  $\text{cm}^2$  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。

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 10 ml で懸濁し、各ウェルに 100  $\mu\text{l}$  ずつ加え、 $\text{CO}_2$  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、位相差顕微鏡で空胞を観察した。

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。

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°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）を行い、生菌数に対する芽胞数から芽胞化の割合を算出した。

### C. 結果

16S rRNA・CRS 遺伝子の検量線：

セレウリド産生性の 03-137-1 株では、いずれの濃度においても 16S rRNA、CRS 遺伝子が検出された (図 1、2)。両遺伝子において検量線の決定定数  $R^2$  は 0.99 以上となった。増幅効率は  $E=10^{(-1/\text{slope})}-1$  より求められ、両遺伝子においてほぼ 100% であった。

セレウリド非産生株 09-112-7 では、いずれの濃度においても、16S rRNA が検出されたが CRS 遺伝子は検出されなかった。09-112-7 株の 16S rRNA も検量線の決定定数  $R^2$  は 0.99 以上であり、増幅効率はほぼ 100% であった。

米飯成分存在下における DNA 抽出の効率：

米飯に 03-137-1 株を  $1.3 \times 10^8$  cfu/ml 添加して測定したところ、16S rRNA のプライマーを用いて算出した菌数は、10 倍

希釈液では  $1.3 \times 10^7$  cfu/g、 $10^2$  倍希釈液では  $5.2 \times 10^5$  cfu/g、 $10^3$  倍希釈液では  $1.5 \times 10^5$  cfu/g、 $10^4$  倍希釈液では  $2.0 \times 10^4$  cfu/g、 $10^5$  倍希釈液では  $2.4 \times 10^3$  cfu/g となった。CRS 遺伝子のプライマーを用いて算出した菌数は、10 倍希釈液では  $1.2 \times 10^7$  cfu/g、 $10^2$  倍希釈液では  $9.2 \times 10^5$  cfu/g、 $10^3$  倍希釈液では  $1.5 \times 10^5$  cfu/g、 $10^4$  倍希釈液では  $2.0 \times 10^4$  cfu/g、 $10^5$  倍希釈液では  $1.4 \times 10^3$  cfu/g、 $10^6$  倍希釈液では  $7.7 \times 10$  cfu/g であった (図 3)。

セレウリド非産生 09-112-7 株を  $3.7 \times 10^7$  cfu/ml 添加した米飯で 16S rRNA のプライマーを用いて算出した菌数は、10 倍希釈では  $6.3 \times 10^6$  cfu/g、 $10^2$  希釈では  $3.0 \times 10^5$  cfu/g、 $10^3$  希釈では  $3.4 \times 10^4$  cfu/g、 $10^4$  希釈では  $8.7 \times 10^3$  cfu/g、 $10^5$  希釈では  $3.6 \times 10^3$  cfu/g であった。CRS 遺伝子は検出されなかった。

セレウス総数と催吐性セレウス検出の特異性：

セレウス 12 株すべてにおいて、16S rRNA が検出された。また CRS 遺伝子は 12 株中 6 株が陽性となり (表 2)、*Bacillus cereus* PCR detection kit (タカラバイオ) を用いた通常の PCR と同じ結果となった。

03-137-1 株と 09-112-7 株の混合 DNA サンプルにおいて、16S rRNA プライマーによる測定値は 03-137-1 株と 09-112-7 株を合計したセレウス総数の値を示していた。CRS 遺伝子は、CRS 遺伝子保有菌株である 03-137-1 株の菌数と相関を持って

推移していた (図 4)。

平板培養法による生菌数および芽胞数 (図 5) :

市販パックスライスに 1.9 cfu/g 接種したセレウスは、12 時間後は  $2.3 \times 10^5$  cfu/g、24 時間後は  $3.1 \times 10^6$  cfu/g、48 時間後は  $4.5 \times 10^7$  cfu/g、72 時間後は  $7.8 \times 10^7$  cfu/g まで増殖した。芽胞は接種後 24 時間は検出されなかったが 48 時間では  $8.0 \times 10^4$  cfu/g、72 時間後では  $3.8 \times 10^5$  cfu/g となった。

リアルタイム PCR による菌数 (図 5) :

16S rRNA の検出では、12 時間後は  $7.2 \times 10^4$  cfu/g、24 時間後は  $2.4 \times 10^5$  cfu/g、48 時間後は  $7.7 \times 10^6$  cfu/g、72 時間後は  $1.4 \times 10^7$  cfu/g となった。

CRS 遺伝子の測定では、12 時間後は  $6.5 \times 10^4$  cfu/g、24 時間後は  $8.5 \times 10^5$  cfu/g、48 時間後は  $1.8 \times 10^7$  cfu/g、72 時間後は  $3.7 \times 10^7$  cfu/g となった。

12、24、48、72 時間各々 3 パックを用いて行ったが、すべてにおいて目的となる産物の増幅を確認することができた。平板培養法による生菌数と 16S rRNA および CRS 遺伝子の測定による菌数はいずれも決定係数 0.9 以上の相関を示した (図 6、7)。

PCR によるセレウリド合成酵素 (CRS) 遺伝子の確認 :

接種 12 時間後の 3 サンプルのうち 1 サンプルのみで CRS 遺伝子のバンドを確認

できた。48、72 時間後のサンプルはすべて CRS 遺伝子の増幅が認められた。

HEp-2 細胞空胞変性試験による試料中のセレウリド :

接種 24 時間後までは検出されなかったが、48 時間後では、0.15 から 0.63  $\mu$ g/g、72 時間後には 1.25  $\mu$ g/g であった (図 5)。

#### D. 考察

DNA 抽出試薬の選定と PCR 至適条件の検討の結果、リアルタイム PCR 法により米飯中のセレウス総菌数と催吐性セレウスを定量的に鑑別測定することが可能になった。

CRS 遺伝子の検出では、標準プロトコールのアニーリング・エクステンション温度 60  $^{\circ}$ C で PCR 反応を行うと、融解曲線において複数のピークが見られた。今回用いたプライマーが報告されていた論文によると  $T_m$  値が 80  $^{\circ}$ C であったため [14]、プロトコール通りでは、PCR 反応の特異性が低下していると考えられた。そこで、初期変性の時間を 30 秒延長し 1 分とし、アニーリング・エクステンション温度を 60  $^{\circ}$ C から 66  $^{\circ}$ C に変更したところ、融解曲線は 79.3  $^{\circ}$ C で単一のスペクトルを示した。

16S rRNA の PCR においても添付プロトコールおよび改変プロトコールでは、融解曲線による  $T_m$  値が定まらず、非特異的産物あるいはプライマーダイマーの発生が示された。今回用いた 16S rRNA のプラ

プライマーは GC 含量が高いことから、CRS 遺伝子以上に  $T_m$  値が高いと考えた。一般的に、プライマーの GC 含量が 60%以上になると  $T_m$  値は高くなり、非特異的にアニールして、特異的増幅を阻害する。 $T_m$  値を下げる物質として、DMSO、グリセロール、ホルムアミド、ベタインが知られているが、本実験では 5%DMSO、8%DMSO、8%グリセロール、5%DMSO+5%グリセロール、8%ホルムアミドを PCR 反応液に加えて検討した。5%DMSO、8%グリセロール、5%DMSO+5%グリセロールにて  $T_m$  値 83°C の単一の融解曲線が現れ、PCR の感度を高めることができた。

PCR 条件を至適化することで、03-137-1 株では 16S rRNA および CRS 遺伝子が検出され、09-112-7 株では 16S rRNA のみが検出され、検出限界は  $10^2$  cfu/g 以上であった。両遺伝子において決定係数 0.9 以上、増幅効率ほぼ 100%の直線的な検量線を得ることができた。

セレウス食中毒では米飯が利用されている食品が原因となることが多い。そこで米成分存在下で定量的にセレウスが検出できるか検討した結果、リアルタイム PCR により算出した菌数は、平板培養法による生菌数と高い相関性を示した。セレウスの DNA を抽出する際に米飯サンプルのデンプン粒子が細菌の挙動と近いため、抽出操作を困難にしていた。抽出試薬を種々検討した結果、本研究で用いた DNA 抽出バッファーは、米成分存在下においてもリアルタイム PCR の試料として利用できるセレウス DNA の調製を可能にし、

平板培養法との相関が得られた。

16S rRNA プライマーによる測定では菌数が  $10^3$  cfu/ml のサンプル未満、CRS 遺伝子では  $10^2$  cfu/ml 未満になると検出されなかった。16S rRNA では PCR 反応液中に 20 cfu 相当の DNA が含まれていると計算上は推定され、測定可能と期待したが検出できなかった。CRS 遺伝子では、PCR 反応液中の DNA 量が 2 cfu 相当以下になるため検出できなかった。

コンベンショナルな PCR による CRS 遺伝子の検出を行ったところ、接種 12 時間後のサンプルでは、リアルタイム PCR 法で 3 サンプルすべてにおいて検出および定量が可能であったのに対し、コンベンショナル PCR 法では CRS 遺伝子が検出されたのは 1 検体のみであった。このことから米飯中のセレウス検出限界は  $10^5$  cfu/g 以上であると考えられ、リアルタイム PCR 法の感度の高さが示された。

次に、セレウス 12 株を用いてリアルタイム PCR を行い、反応系の特異性について検討した。その結果、16S rRNA についてはセレウス 12 株すべてが陽性でありすべてのセレウスを検出することができ、陰性対照で用いた大腸菌は陰性であった。CRS 遺伝子についてはセレウス 12 株中 6 株が陽性であった。この結果は、*Bacillus cereus* PCR detection kit を用いたコンベンショナルな PCR 法で検出した結果と一致しており、セレウス CRS 遺伝子保有株を特異的に検出できることが示された。

CRS 遺伝子陰性のセレウス 09-112-7 株と陽性の 03-137-1 株から抽出した DNA を

混合し、PCR 反応に影響しないか検討した。その結果、平板培養法にて算出した生菌数と、CRS 遺伝子用プライマーを用いて定量した CRS 遺伝子保有株の菌数ならびに 16S rRNA 用プライマーで定量した 2 つの菌株の総数には、高い相関性が認められた。

芽胞は 48 時間後から検出できた。菌数がプラトーに達した 48 時間後から芽胞が形成されてきたことを考えると、対数増殖期末期から定常期に差し掛かる際に芽胞形成することが示された。セレウリドも対数増殖期末期から定常期にかけて産生されたことから、芽胞形成と毒素産生が関連している可能性もある。

市販の精製セレウリドを陽性対照として用いた HEp-2 細胞空胞変性試験による定量では、最低検出濃度は 1 ng/ml であり米飯中濃度が 0.15 µg/g でも検出が可能であった。3 サンプルの平均セレウリド量は、48 時間目には 0.31 µg/g であったが、72 時間後には 1.25 µg/g となりセレウリド量は経時的に増加した。セレウリドの最小催吐量は 1 µg/人 とされているので[15]、48 時間後以降のサンプル米飯中のセレウリドは、催吐活性を発揮するに十分な量である。嘔吐型セレウス食中毒の発症菌数は  $10^5$  から  $10^8$  cfu/g とされており、今回の実験でも  $10^6$  から  $10^7$  cfu/g に推移する際にセレウリドが検出されており、菌数と毒素産生は相関していた。

以上、DNA 抽出法および PCR 条件の検討により、16S rRNA 用プライマーを用いたリアルタイム PCR 法では平板培養法と同

様にセレウス総数を、CRS 遺伝子用プライマーでは催吐性セレウスの菌数のみの分別定量を可能にした。セレウリド量と菌数には関連があることから、本法はセレウス食中毒の有用な調査手段である。

#### F. 文献

1. Sasahara T, S Hayashi, Y Morisawa, T Sakihama, A Yoshimura, Y Hirai: *Bacillus cereus* bacteremia outbreak due to contaminated hospital linens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011, 30:219-26
2. Shinagawa K: [Foodborne disease outbreaks reported in Japan, 1952-2009—outbreaks of microbial foodborne disease] *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2010, 51:274-8
3. Turnbull PC, JM Kramer, K Jorgensen, RJ Gilbert, J Melling: Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. *Am J Clin Nutr* 1979, 32:219-28
4. Standish AJ, UH Stroehler, JC Paton: The pneumococcal two-component signal transduction system RR/HK06 regulates CbpA and PspA by two distinct mechanisms. *J Bacteriol* 2007, 189:5591-600
5. Lamy MC, M Zouine, J Fert, M Vergassola, E Couve, E Pellegrini,

- P Glaser, F Kunst, T Msadek, P Trieu-Cuot, et al: CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol Microbiol* 2004, 54:1250-68
6. Ehling-Schulz M, M Fricker, S Scherer: *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol Nutr Food Res* 2004, 48:479-87
  7. Shinagawa K, H Konuma, H Sekita, S Sugii: Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 1995, 130:87-90.
  8. Dierick K, E Van Coillie, I Swiecicka, G Meyfroidt, H Devlieger, A Meulemans, G Hoedemaekers, L Fourie, M Heyndrickx, J Mahillon: Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J Clin Microbiol* 2005, 43:4277-9.
  9. Ehling-Schulz M, M Fricker, S Scherer: Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiol Lett* 2004, 232:189-95.
  10. Ehling-Schulz M, MH Guinebretiere, A Monthan, O Berge, M Fricker, B Svensson: Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 2006, 260:232-40.
  11. Priha O, K Hallamaa, M Saarela, L Raaska: Detection of *Bacillus cereus* group bacteria from cardboard and paper with real-time PCR. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2004, 31:161-9.
  12. Martínez-Blanch J, G Sánchez, E Garay, R Aznar: Evaluation of a real-time PCR assay for the detection and quantification of *Bacillus cereus* group spores in food. *J Food Prot.* 2010, 73:1480-5.
  13. Fricker M, U Messelhauser, U Busch, S Scherer, M Ehling-Schulz: Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Appl Environ Microbiol* 2007, 73:1892-8.
  14. Lucking G, MK Dommel, S Scherer, A Fouet, M Ehling-Schulz: Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR. *Microbiology* 2009, 155:922-31.
  15. 社畜産技術協会: 食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書。内閣府食品安全委員会事務局平成21年度食品安全確保総合調査2010

表 1 PCR 用プライマー

標的遺伝子	プライマー	塩基配列(5'→3')	PCR 産物のサイズ	T <sub>m</sub> 値 (°C)	文献
16S rRNA	16S rRNA_SYBR_F	GGAGGAAGGTGGGGATGACG	241 bp	83	[14]
	16S rRNA_SYBR_R	ATGGTGTGACGGGCGGTGTG			
CRS	crs_SYBR_F	CACGCCGAAAGTGATTATACCAA	176 bp	80	[13]
	crs_SYBR_R	CACGATAAAACCACTGAGATAGTG			



表 2 16S rRNA と CRS 遺伝子の検出結果

Strain	16S rRNA	CRS gene
<i>B.cereus</i> BC1(+)	+	+
<i>B.cereus</i> BC1(-)	+	-
<i>B.cereus</i> 03-137-1	+	+
<i>B.cereus</i> 06-81-16-1	+	+
<i>B.cereus</i> 08-151-3	+	+
<i>B.cereus</i> 08-151-4	+	+
<i>B.cereus</i> 335-11	+	+
<i>B.cereus</i> S0932F-1	+	-
<i>B.cereus</i> 09-59-1	+	-
<i>B.cereus</i> 09-80-9	+	-
<i>B.cereus</i> 09-75-22	+	-
<i>B.cereus</i> 09-112-7	+	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-

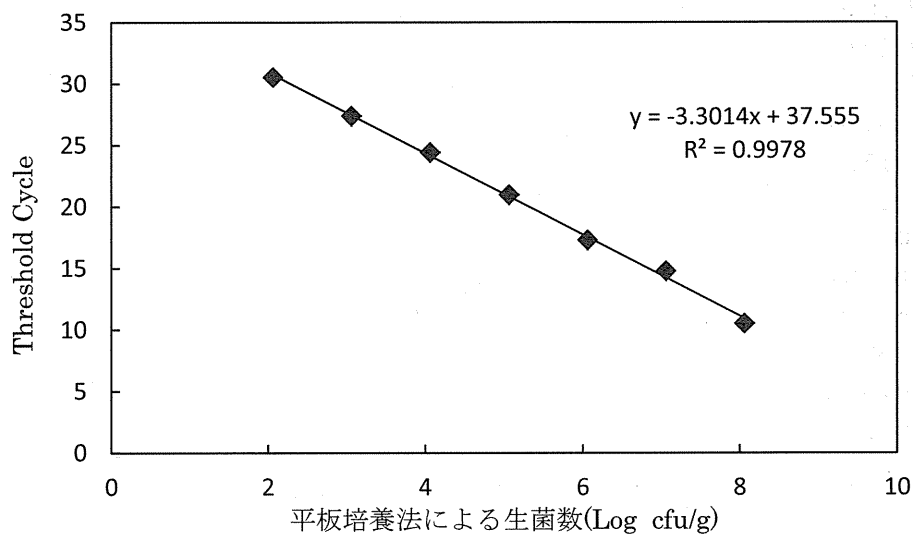


図 1 03-137-1 株の 16SrRNA の検量線

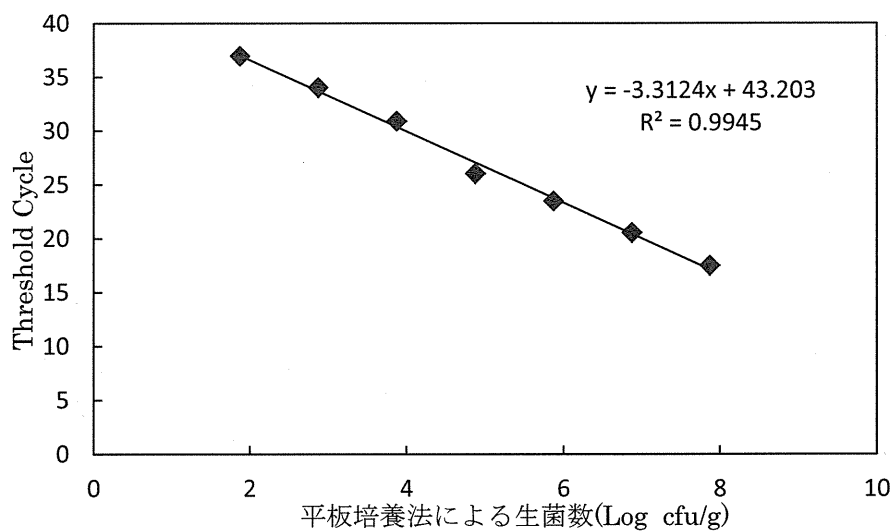


図 2 03-137-1 株の CRS 遺伝子の検量線

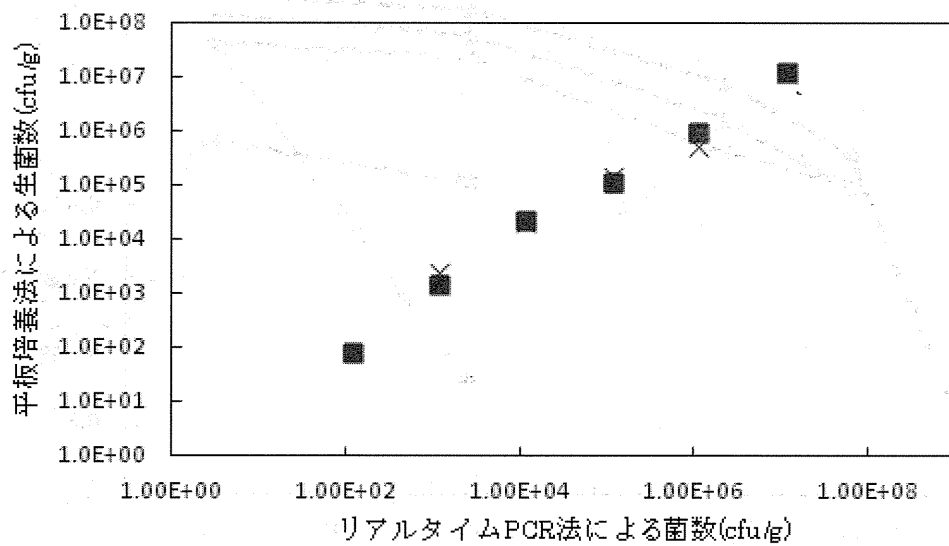


図3 米成分存在下での03-137-1株における生菌数と16SrRNA, CRS 遺伝子から定量された菌数の相関  
×16s rRNA, ■CRS

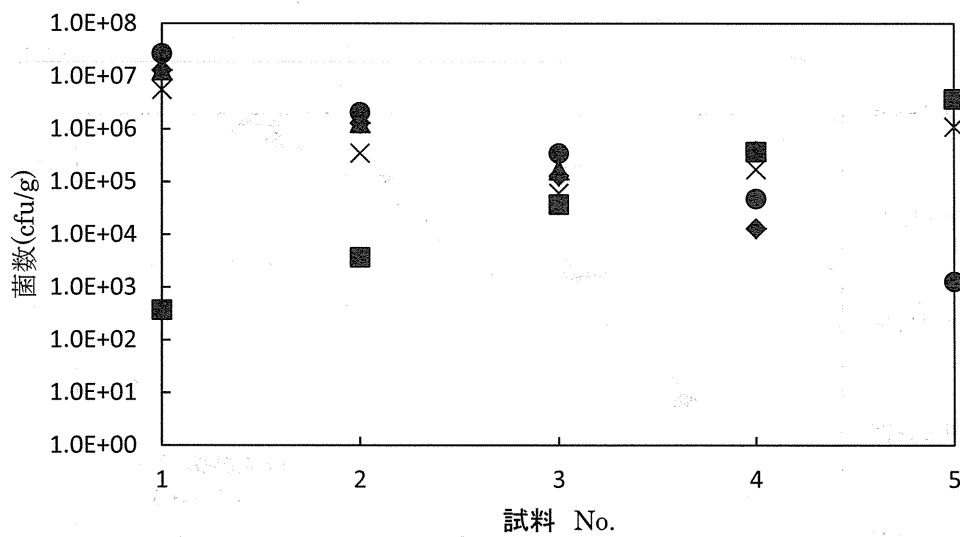


図4 セレウス総数と催吐性セレウスの特異的検出  
◆03-137-1(生菌数), ■09-112-7(生菌数)  
▲セレウス総数, ×16s rRNA, ●CRS 遺伝子

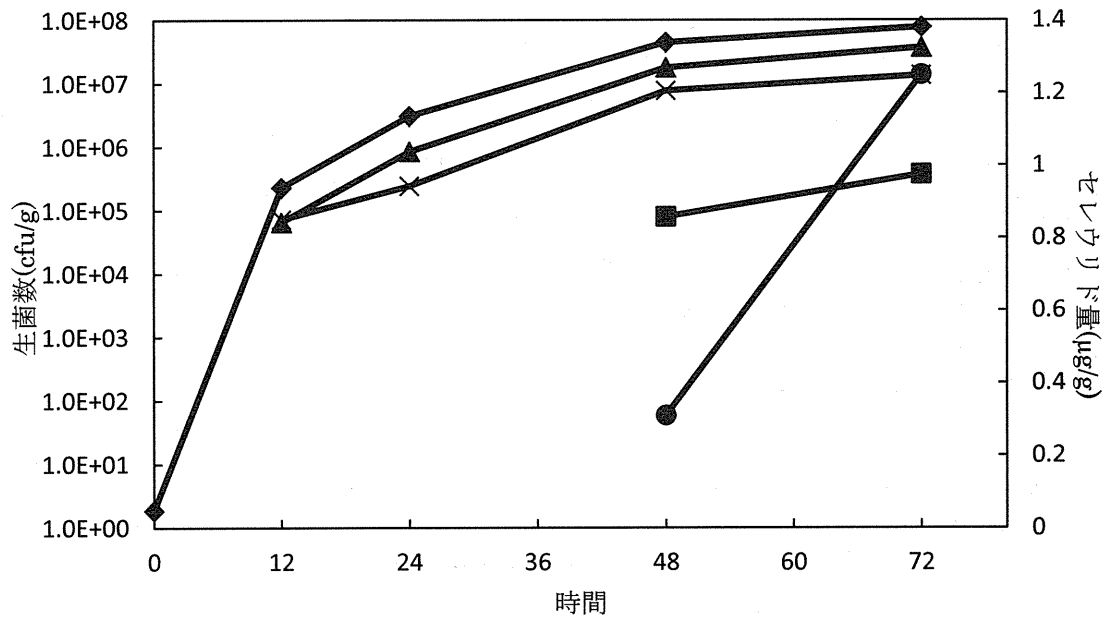


図5 米飯中のセレウス菌数およびセレウリド量の経時変化

◆生菌数 (栄養体+芽胞) , ■芽胞数, ×16s rRNA, ▲CRS 遺伝子, ●セレウリド量

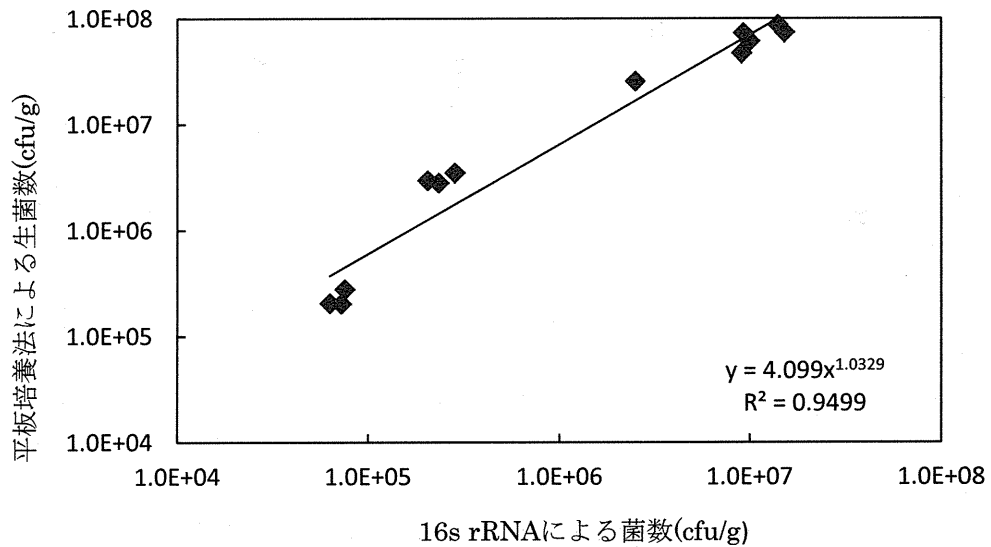


図6 生菌数と 16s RNA の相関関係