

201234024A

厚生労働科学研究費補助金

食品の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24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25（2013）年3月

## 目 次

### 総括研究報告書

食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究

鎌田 洋一 . . . . 3

### 分担研究報告書

セレウス菌のリスクプロファイル

. . . . 19

山本 茂貴

米飯中の催吐性 *Bacillus cereus* とその嘔吐毒素の検出

. . . . 91

西川 禎一

水晶発振子マイクロバランス法によるブドウ球菌エンテロトキシンの

. . . . 115

リアルタイム検出法開発の試み

鎌田 洋一

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

. . . . 131

宇治家 武史

ウエルシュ菌食中毒発現機構の考察

. . . . 149

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

. . . . 163

鎌田 洋一

研究成果の刊行に関する一覧表

. . . . 183

研究成果の別刷

. . . . 185

厚生労働科学研究補助金

食品の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24年度 総括研究報告書

国立医薬品食品衛生研究所

鎌田 洋一

厚生労働科学研究補助金

食品安全確保推進研究事業

食品中の毒素産生微生物及び毒素に関する研究

平成24年度 総括研究報告書

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 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。

セレウス菌について、リスクプロファイルを作製した。セレウス菌は食品の腐敗、変敗を起こすと同時に、嘔吐毒（セレウリド）と下痢原性エンテロトキシンを産生する。セレウス菌は様々な食品中に存在する。ほとんどは100芽胞/g以下であるが、ハーブなどで1,000以上になるものも報告されている。嘔吐型食中毒は、セレウス菌に汚染された食品中で産生された嘔吐毒の摂取によって起こる（毒素型食中毒）。一方、下痢型食中毒は食品とともに摂取した本菌がヒトの小腸で増殖し、エンテロトキシンを産生することで引き起こされる（感染型（生体内毒素型）食中毒）。嘔吐型食中毒、下痢型食中毒ともに発症菌量は $10^5 \sim 10^8$ 個/gであり、一般食品で通常見られる程度の菌数（ $10 \sim 10^3$ 個/g程度）では発症しない。欧米では下痢型の食中毒が多く、食肉、牛乳、野菜、魚介類を含む様々な食品によって引き起こされる。嘔吐型食中毒のアウトブレイクは通常米製品によって引き起こされるが、ジャガイモ、パスタ、チーズ、その他デンプン質の食品も要因となる。わが国におけるセレウス菌食中毒は嘔吐型がほとんどで、発生数や患者数はそれほど多くはない。嘔吐型食中毒では、体内に入ったセレウリドが胃から十二指腸に流入する際にセロトニンレセプターに結合し、迷走神経を刺激することで嘔吐を引き起こすと考えられている。治療は下痢や嘔吐に対する水分や栄養補給などの対症療法程度である。リアルタイムPCR法に

よる食品中のセレウス菌総数と嘔吐毒素産生性菌の検出および定量を試みた。16S rRNA 遺伝子とセレウリド合成酵素遺伝子、CRS 遺伝子を標的遺伝子とした。その結果リアルタイム PCR 法により、米飯中のセレウス菌総数および催吐性セレウス菌を定量的に検出可能となった。嘔吐毒素の有無を簡便かつ迅速に測定するために、細菌を用いた新規バイオアッセイ法の開発を試みた。セレウス類縁菌の *B. sporothermodurans* を指標菌として検討を進めた。有機溶媒による抽出と濃縮を行うことで、セレウリドによる抗菌活性が評価できるようになった。本法は、HEp-2 細胞の空胞変性試験に代わるバイオアッセイになる可能性が示唆された。

ブドウ球菌エンテロトキシン A(SEA)のリアルタイムの検出について、水晶発振子マイクロバランス法を応用し、現在まで検討を継続している。本年度は溶質が非常に濃厚で、測定システムを障害しやすいことが予想される牛乳を検体とし、SEA の検出法開発を試みた。直接法、サンドイッチ法、金コロイド標識抗体によるサンドイッチ法を比較検討した。本法は、センサーに結合する物質の重量に比例してシグナルが増加するので、抗体に金コロイド標識を実施することによりシグナルが向上した。金コロイド標識抗体のサンドイッチ法が最も感度が高く、牛乳中に 5 ng/ml の SEA を検出が可能であった。今後も感度の向上を目指す。

ウエルシュ菌食中毒の原因食品中には、エンテロトキシン(CPE)産生性ウエルシュ菌の生菌が  $10^6$  cfu/g 以上含まれている。そこで、生菌に存在する CPE mRNA を指標とし、Nucleic Acid Sequence-based Amplification (NASBA)-核酸クロマト法を用いた遺伝子検出法を開発した。今年度は、本法について操作性の更なる向上と作業手順の簡略化を進めた。フィルター処理工程と核酸希釈工程の省略を可能にした。カレーを含めて、シチュー等、ウエルシュ菌食中毒原因食となっている食品種についても本法の適応を可能にした。また、内部標準を組み込み、反応系の信頼性を向上させた。本年度の検討により、製品を上市した。

ウエルシュ菌食中毒の検査法は確立されているが、食中毒発生メカニズムには不明のことが多い。特に、腸管内での菌増殖、芽胞形成、毒素産生機構はほとんど研究されていない。新領域であるウエルシュ菌の腸管内増殖機構について、研究を進めて来た。本年度は、昨年度に開発した *in vitro* 実験系を発展させ、ウエルシュ菌病原性発現に影響を与える宿主由来因子を探索した。胆汁酸が数  $\mu$ M レベルの濃度で芽胞形成・エンテロトキシン産生を数百倍に亢進させることを見いだした。亢進効果は代表的な 2 次胆汁酸であるデオキシコール酸が最も高かった。ウエルシュ菌は消化管環境を 1 つの niche として認識しており、わずかな濃度の胆汁酸に応答することを介して、適切なタイミングで病原性を発揮するための最大効果を発現するシステムを有することが明らかになった。今後はより様々な消化管環境因子の影響を調べると共に、これら因子がウエルシュ菌の病原性発現を修飾するメカニズムを解析する。

ウエルシュ菌が新規の下痢毒素を産生することを明らかにしてきた。毒素の作用機構や生物活性は、培養細胞を用いて解析されることが多い。本年度は新型エンテロトキシンの細胞への毒性機構を検討するとともに、抗体を用いて培養液中の毒素産生を実証した。L929 細胞は低濃度の毒素添加で球形化し、高濃度では細胞の断片が多数観察された。この時、形態を維持して死滅している細胞が観察されなかったことから、新型エンテロトキシンによって細胞が球形化し、細胞が死滅すると直ちに細胞が崩壊すると考えられた。また、中和試験より毒力面において培養液中に新型エンテロトキシンのコンポーネント a が含まれていることが確認された。

研究分担者

山下茂貴	国立医薬品食品衛生研究所 部長
西川禎一	大阪市立大学大学院 教授
宇治家武史	株式会社カイノス 課長
三宅眞実	大阪府立大学大学院 教授

細菌性の食中毒は三つのタイプに型別される。一つはヒトに感染して炎症を誘発し症状を発現させるタイプで、腸炎ビブリオやサルモネラがこれにあたる。食品とともに、生きたこれらの菌が取り込まれ、胃を通過した後、腸管内に定着・増殖する。組織内に侵入し、炎症反応を惹起し、腹痛・下痢・発熱等の症状発現に至らしめる。感染型の細菌性食中毒がこれにあたる。一方、食品内で症状を発現させる直接の物質、すなわち毒素を産生する細菌があり、これらの細菌による食中毒を、毒素型細菌性食中毒と称する。ボツリヌス菌、ブドウ球菌、セレウス菌などがこれに属する。第三のタイプは、一と二の中間に位置し、生菌として取り込まれて人体内で感染を起こして菌が増殖する際、症状発現に直結する毒素を産生する細菌群で、ウエルシュ菌や腸管出血性大腸菌がこのタイプに属する。中間型の細菌性食中毒と称される。本厚生労働科学研究は、毒素産生性食中毒細菌に特化した研究を展開する。すなわち、セレウス菌、ブドウ球菌、およびウエルシュ菌とそれら細菌群が産生するそれぞれの毒素を研究対象とし、食品の安全性確保のための研究を展開することを目的としている。毒素が症状を誘発する細菌とその毒素は種々の特異的性状を示す。神経症状を誘発するボツリヌス菌の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、下痢を主症状とする細菌と嘔吐を主とする細菌に分類される。前者にはブドウ球菌が産生するエンテロトキシンおよびセレウス菌が産生する嘔吐毒素がある。後者には

ウエルシュ菌が産生するエンテロトキシンがある。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。

セレウス菌とブドウ球菌は食品内に毒素を産生する。ブドウ球菌はエンテロトキシンをセレウス菌は嘔吐毒素を産生する。したがって、各毒素は食品とともに取り込まれる。これらの毒素が標的組織に達し、症状を誘発するためには、加熱に代表される食品の加工・調理時の処置について抵抗性でなければならない。また、胃における非常に低いpHと、タンパク分解酵素の攻撃に耐えなければならない。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は加熱、酸、タンパク分解酵素処理に耐性である。毒素型の食中毒のなかでも、これらブドウ球菌およびセレウス菌は、食品内毒素型と位置づけられている。

ウエルシュ菌は、生体内毒素型食中毒細菌として認知されている。上述したように、食品内に生きたウエルシュ菌が混入しており、食品とともに取り込まれ、胃を通過して腸管に達し、定着・増殖する。さらにウエルシュ菌は、芽胞を腸管内で形成し、その際に毒素を産生する。この毒素は、腸管内で産生され、腸管を攻撃し、下痢を誘発することが明らかになっている。産生部位と侵襲部位がともに腸管であるため、文字通り、毒素は腸管を示す言葉を用いて、“エンテロ”トキシン (enterotoxin) と称される。ウエルシュ菌食中毒の発生には、腸管における酸・分解酵素の殺菌作用を量とするほどの大量の生きたウエルシュ菌が食品中に存在することが必須となる。現在

までの知見から、ウエルシュ菌食中毒の発生には、 $10^8$  cfu の生菌が必要と考えられている。食品衛生における一般基準から、人が 100 グラムを喫食することを想定し、中毒発生に必要な細菌数が推定されるため、同基準をウエルシュ菌に当てはめると、 $10^6$  cfu/g という数値が導き出せる。後述するが、本菌量を検出する方法を確立するのが、ウエルシュ菌の危害を制御する際の食品への観点となる。

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よい。食材食品の保存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、新型エンテロトキシンに関して、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 SEI 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。

上述したように、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。本厚生労働科学研究では、ウエルシュ菌食中毒発生機構の解析に関し、世界で初めての方向性で研究を遂行している。

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、リスクプロファイルを作成し、その危害性を明らかにすることにある。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菌種による食中毒の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、未同定の毒素について分離を試みることも目的となっている。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。

本年度においては、嘔吐毒素産生性セレウス菌の検出法開発を行う。各種ある既存の方法の整合性を取るとともに、簡便迅速な嘔吐毒素検出法の開発を検討した。ならびに、文献調査に基づくセレウス菌のリスクプロファイル作製を実施した。本厚生労働科学研究では、昨年時より、ブドウ球菌の新型エンテロトキシンの、リアルタイム検出法の開発を続けている。本年度は検査対象を牛乳と限定し、牛乳中のエンテロトキシンの、効率のよい検出法開発を検討する。ウエルシュ菌生菌を食品内から迅速に検出する方法の開発を継続している。本法は、核酸クロマト法という新しい原理に基づいてのもので、新規性が高い。検出するのは生菌由来のRNAで、食品中の「毒素産生性ウエルシュ生菌」を検出することとなり、食中毒発生機構を考えても意義があ

る。前年度までの検討で、カレーを対象と選び、基本的な方法を開発し、試作品を作製した。本年度は、対象食品種を増やすとともに、反応システムを改良して内部標準を組み込むとともに、複数の反応段階に要する時間を短縮させた。上述してきたように、ウエルシュ菌食中毒は、生菌が腸管内で増殖、芽胞形成、毒素産生することが発生の必須条件となっている。にもかかわらず、腸管内でのウエルシュ菌の動態は全く解析されてこなかった。本厚生労働科学研究では、食品内を模した実験モデルを作製し、菌の増殖その他に種々の検討をしてきた。本年度は、食品成分および人体側の要因について、菌増殖や芽胞形成、ならびに毒素産生への影響を検討した。ウエルシュ菌の下痢症状は、同菌が芽胞形成時に産生する毒素によって誘発される。疫学的な調査から、エンテロトキシン非産生のウエルシュ菌が食中毒を起こしていることがわかり、さらに、その症状が毒素に由来する可能性が示唆されてきた。本厚生労働科学研究では、新型下痢毒素の分離や性状の解析を続けている。本年度は、細胞への毒性を検討することとし、事例菌の培養液を用い、Vero細胞ならびにL929細胞への影響を調べた。

## 第1章 セレウス菌と同菌嘔吐毒素に関する研究

### 1. セレウス菌の食中毒リスクプロファイル解析

セレウス菌のリスクプロファイル作成のため、以下の項目について検討した。

- ・国内外の疫学的情報（食中毒発生件数、原因食品、患者数 等）
- ・新たに得られた分子生物学的な情報（感染性、発症機序 等）
- ・新たな診断法、予防法、治療法、リスク評価（用量反応 等）

上記についてインターネットからセレウス菌に関する情報を収集した。

GIDEON による検索により、各国のアウトブレイク状況および汚染率等のサーベイランス情報を得た。また、厚生労働省食中毒統計調査および感染症発生動向調査週報 IDWR により、わが国におけるアウトブレイク状況等の情報を得た。

FoodRisk、PubMed では、主に分子生物学的研究や診断・治療法に関する文献を抽出した。以下、その結果の概要を記載する。

#### 菌の性状：

セレウス菌はタンパク質や多糖体など高分子物質の分解性が高く、食品の腐敗、変敗を起こすとともに、嘔吐毒（セレウリド）と下痢原性エンテロトキシンを産生する。発育温度域は 10～50℃（増殖至適温度 28～35℃）であり、10℃以下ではほとんどの菌株が増殖できないものの、一部 7℃以下の低温で増殖する菌株も存在する。セレウス菌は様々な食品中に存在する。ほとんどは 100 芽胞/g 以下であるが、ハーブなどで 1,000 以上になるものも報告されている。食品中ではセレウス菌は芽胞の形で存在するが、セレウス菌にとって適切な環境で食品を保存した場合に芽胞が発芽生育する。

#### 食中毒：

嘔吐型食中毒は、セレウス菌に汚染された食品中で産生された嘔吐毒の摂取によって起こる（毒素型食中毒）。一方、下痢性食中毒は食品とともに摂取した本菌がヒトの小腸で増殖し、エンテロトキシンを産生することで引き起こされる（感染型（生体内毒素型）食中毒）。

嘔吐型食中毒、下痢型食中毒ともに発症菌量は  $10^5 \sim 10^8$  個/g であり、一般食品で通常見られる程度の菌数（ $10 \sim 10^3$  個/g 程度）では発症しない。

嘔吐型食中毒では、体内に入ったセレウリドが胃から十二指腸に流入する際にセロトニンレセプターに結合し、迷走神経を刺激することで嘔吐を引き起こすと考えられている。

欧米では下痢型の食中毒が多く、食肉、牛乳、野菜、魚介類を含む様々な食品によって引き起こされる。嘔吐型食中毒のアウトブレイクは通常米製品によって引き起こされるが、ジャガイモ、パスタ、チーズ、その他デンプン質の食品も要因となる。その他、ソース、プディング、スープ、鍋料理、パン菓子、サラダなどの食品の混合物もしばしば感染源となる。

セレウス菌食中毒は臨床症状、潜伏期間、関係検体からの原因菌検出頻度などによって診断されている。

#### 治療：

通常、治療は下痢や嘔吐に対する水分や栄養補給などの対症療法程度であり、特別な治療は行われたい。

発生状況：

わが国では 1960 年に小学校の学童 354 名が脱脂粉乳によって下痢、腹痛等を主症状とした食中毒事例が初めて報告され、その後セレウス菌による食中毒事例が報告されるようになった。

わが国におけるセレウス菌食中毒は嘔吐型がほとんどであるが、発生数や患者数はそれほど多くはない。1996 年以降、セレウス菌による食中毒発症件数は 5~25 件の間で推移している。

## 2. 米飯中の催吐性 *Bacillus cereus* とその嘔吐毒素の検出

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。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セレウリド合成酵素遺伝子であるところの CRS 遺伝子を検出することにより定量した。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°C で静置すると、接種 12 時間後には  $1 \times 10^5$  cfu/g に、48 時間後には  $1 \times 10^7$  cfu/g に達し芽胞も  $1 \times 10^4$  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。さらに、セレウリドの有無を簡便かつ迅速に測定するために、細菌を用いた新規バイオアッセイ法の開発を試みた。セレウリドに対する感受性スクリーニングを行い、セレウス類縁菌の *B. sporothermodurans* を指標菌として検討を進めた。重層培地に KCl を添加することで、指標菌に対するセレウリドの抗菌活性が増加することを見出した。催吐性セレウス培養上清にはセレウリド以外の抗菌活性物質（セレイン）が含まれることが示唆されたが、有機溶媒による抽出と濃縮を行うことで、セレウリドによる抗菌活性が評価できるようになったと考えられ、同時に検出感度を高めることができた。今後、セレインの関与を否定するためのさらなる検証と、検出感度をより高めるため指標菌を開発・探索することで、HEp-2 細胞の空胞変性試験に代わるバイオアッセイになりうると期待できる。

## 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. 水晶発振子マイクロバランス法によるブドウ球菌エンテロトキシンのリアルタイム検出法開発の試み

ブドウ球菌食中毒は、菌が産生するタンパク質性毒素によって嘔吐が誘起される。この毒素は Staphylococcal Enterotoxin と表記され、SE と略される。SE の食中毒危害物質としての特徴は、菌が増殖する際に産生されること、SE は耐熱性・耐有機溶媒

性を持っており、その毒性が保持されることにある。過去には、加熱殺菌された脱脂粉乳を原因食とした、超大型食中毒事件が発生している。ブドウ球菌食中毒では常に食品中に毒素の有無を検知するシステムが要望される。SEには分子多様性があり、現在まで最も多くの事例が起こっているのがSEAである。本分担研究は、リアルタイムでSEAの検出を可能とする方法を確立することにある。水晶発振子マイクロバランス法を応用し、現在まで検討を継続している。本年度は、溶質が非常に濃厚で、測定システムを障害しやすいことが予想される牛乳を検体とし、SEAの検出法開発を試みた。本法は、センサーに結合する物質の重量に比例してシグナルが増加するので、抗体の重量増加に金コロイドを標識した。予想通り金コロイド標識によりシグナルが向上した。直接法、サンドイッチ法、金コロイド標識抗体によるサンドイッチ法を比較検討した。本法は、牛乳のような、測定系を傷害する可能性のある食品においても応用可能であった。3種の方法の検討の結果、金コロイド標識抗体のサンドイッチ法が最も感度が高く、牛乳中に5 ng/mlのSEAを検出が可能であった。今後感度の向上を目指す。

### 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。

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。これまで、新型毒素の分離や同毒素の遺伝子の単離を行ってきた。本年度は、事例菌の培養液を用い、その細胞毒性発現機構解析のため、毒性の性状を調べることにした。

本年度は以下の3項目について検討した。

#### 1. 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

ウエルシュ菌食中毒の原因食品中には、エンテロトキシン(CPE)産生性ウエルシュ菌の生菌が多く含まれている。従って、喫食前の食品からCPE産生性ウエルシュ菌の生菌を検出できれば、食中毒発生の防止に繋がる可能性が高い。そこで、生菌に存在するCPE mRNAを指標とし、Nucleic Acid Sequence-based Amplification (NASBA)-核酸クロマト法を用いた遺伝子検出法を開発した。この遺伝子検出法を用いれば、増菌培養することなく主要な原因食材であるカレー試料から、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特異的に検出可能であった。今年度は、「操作性の更

なる向上と作業手順の確立」および「食中毒事例検体を含むカレー以外の多種食品への適応性の確認」を目的に研究を進めた。

操作性の改善としては、核酸抽出工程の前後にある「10%乳剤のフィルター処理工程」および「抽出核酸の希釈工程」を省略し、操作性が向上するとともに、検出感度を10倍向上させる作業手順を確立した。食中毒事例検体は入手し難く、疑似試料を調製し代用した。具体的には、カレー試料中でCPE産生ウエルシュ菌を増殖させ、本法で検出可能であることを証明した。また、検出感度のCPE産生ウエルシュ菌を、その100倍量のCPE非産生ウエルシュ菌と共存させた条件下でも、本法でCPE産生ウエルシュ菌を検出可能であることを明らかにした。

本法の多種食品への適応性確認としては、ウエルシュ菌に関して厚生労働省食中毒一覧に記載されている6品目の原因食品にCPE産生ウエルシュ菌を接種し、検出感度の菌量を検出可能であることを確かめた。また、多様な食品成分に起因した増幅反応阻害の有無を把握するためのInternal control (IC)を設計し、本検出系を再構築した。同一チューブ内で標的核酸(本研究ではCPE mRNA)とICを同時に増幅させる共増幅系の場合、増幅反応に必要な酵素や基質を取り合うため、往々にして標的核酸の検出感度は低下するが、本法ではCPE産生ウエルシュ菌の検出感度( $10^5$  cfu/g)を維持したまま、共増幅系に再構築可能だった。

## 2. ウエルシュ菌の腸管内増殖機構

ウエルシュ菌は大規模型の食中毒を起こ

す。検査法は確立されているが、食中毒発生メカニズムには不明のことが多い。特に、腸管内での菌増殖、芽胞形成、毒素産生機構はほとんど研究されていない。本厚生労働科学研究で、新領域であるウエルシュ菌の腸管内増殖機構について、研究を進めて来た。本年度は、昨年度に開発した*in vitro*実験系を発展させ、これを用いたウエルシュ菌病原性発現に影響を与える宿主由来因子を探索した。その結果、まず胆汁酸が数 $\mu$ Mレベルの濃度で芽胞形成・エンテロトキシン産生を数百倍に亢進させることを見いだした。亢進効果は被抱合胆汁酸で高く、特に代表的な2次胆汁酸であるデオキシコール酸で最も高かった。次にこの実験系で宿主細胞がウエルシュ菌の病原性に与える影響を検討した。結果、宿主細胞が何らかの因子を介してウエルシュ菌の病原性を抑制していることが示唆された。しかもこの抑制効果はデオキシコール酸の存在下では解除された。これらの結果から、ウエルシュ菌は消化管環境を1つのnicheとして認識しており、わずかな濃度の胆汁酸に応答することを介して、適切なタイミングで最大効果を発現するシステムを有することが初めて明らかになった。また、このシステムは宿主が菌の病原性を抑えようとする防御反応への対抗手段としての意味も有する可能性が示唆された。今後はより様々な消化管環境因子の影響をさらに調べると共に、これら因子がウエルシュ菌の病原性発現を修飾するメカニズムを解明することで、ウエルシュ菌食中毒の新しい制御法開発を目指したい。

### 3. ウエルシュ菌新型エンテロトキシンの細胞毒性の解析

ウエルシュ菌食中毒は、下痢と腹痛を主症状とする大規模食中毒で、菌が産生するエンテロトキシンが、症状発現の直接の原因物質となっている。近年、新型エンテロトキシンによる食中毒が報告されている。事例菌株の遺伝子解析より、新型エンテロトキシンが、スピロフォルム菌が産生するイオタ毒素様毒素を構成する2つのコンポーネント遺伝子 (Sa および Sb) と相同性を示すことが示唆されている。本分担研究では、新型エンテロトキシンの細胞毒性発現機構の解析を目的とした基礎的研究を

行った。マウス結合組織由来 L929 細胞を用いて、毒素添加後の形態変化と致死毒性を検討した。組み換えコンポーネントタンパク質に対する抗血清による中和試験により、事例株の W5052 株が新型エンテロトキシンを産生されているか検討した。

L929 細胞は低濃度の毒素添加で球形化し、高濃度では細胞の断片が多数観察された。この時、形態を維持して死滅している細胞が観察されなかったことから、新型エンテロトキシンによって細胞が球形化し、細胞が死滅すると直ちに細胞が崩壊すると考えられた。中和試験より毒力面において培養液中に新型エンテロトキシンのコンポーネント a が含まれていることが確認された。

## 発表した研究成果リスト

### 論文発表

1. Kamata, Y., Koanno, S., Mizutani, N., Agata, N., Kawakami, H., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y. (2012) Sensitivity of Hep G2 cells to *Bacillus cereus* emetic toxin. *J. Vet. Med. Sci.* 74:1483-1485.
2. 涌嶋三津子、西川景子、泉 秀実、鎌田洋一、西川禎一 (2012) レトルトパウチ詰コーンスープの原材料から分離されたフラットサワー菌の耐熱性と間欠滅菌法による制御の試み、*日本食品微生物学雑誌*、29:17-174.
3. 中山素一、宮下 隆、細谷幸一、人見 潤、佐藤美紀、須永幸恵、重松康彦、小笠原 準、竹中重幸、濱崎光宏、堀川和美、磯部順子、小西良子、鎌田洋一 (2012) 嘔吐毒素産生性セレウス菌検出イムノクロマトキットの評価、*食衛誌*、53、273-277.
4. Nakashima, R., Kamata, Y., Nishikawa, Y. (2013) Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and guanylin on the barrier integrity of intestinal epithelial T84 cells. *Vet. Immunol. Immunopath.* 152:78-81.

### 学会発表

1. 入倉大祐、門間千枝、甲斐明美、小西良子、渡辺麻衣子、鎌田洋一 (2013) ウエルシュ菌新型下痢毒素の分離と性状 (1) : ゲノム解析による毒素候補遺伝子の探査、第 86 回日本細菌学会総会、千葉市
2. 鎌田洋一、入倉大祐、門間千枝、甲斐明美、渡辺麻衣子、小西良子 (2013) ウエルシュ菌新型下痢毒素の分離と性状 (2) : 毒素遺伝子の同定と組換え毒素タンパク質の作製、第 86 回日本細菌学会総会、千葉市
3. 門間千枝、鈴木康規、入倉大祐、鎌田洋一、小西良子、仲真晶子、甲斐明美 (2013) ウエルシュ菌新型下痢毒素の分離と性状 (3) : 集団食中毒由来株の新型毒素遺伝子の発現と下痢原性の証明、第 86 回日本細菌学会総会、千葉市
4. 鈴木彩葉、大塚朋美、川上 浩、入倉大祐、門間千枝、甲斐明美、小西良子、渡辺麻衣子、大西貴弘、鎌田洋一 (2013) ウエルシュ菌新型下痢毒素の分離と性状 (4) : 培養

液中の毒素産生の検証と細胞毒性の解析、第 86 回日本細菌学会総会、千葉市

5. 宇治家 武史、林 司、山本 茂貴、鎌田 洋一 (2012) 食材からのエンテロトキシン遺伝子保有ウエルシュ菌の直接検出法、第 33 回日本食品微生物学会、福岡市
6. 村上 広和、奈賀 俊人、服部 能英、竹中 宏誌、大田 洋一郎、鎌田 洋一、小西 良子、谷森 紳治、切畑 光統 (2012) セレウリドおよび類縁体の合成と、それらを標準品に用いる *Bacillus cereus* 培養液の LC/MS 分析、第 33 回日本食品微生物学会、福岡市
7. 星 英之、安木真世、近藤香織、門間千枝、甲斐明美、山本茂貴、鎌田洋一、三宅眞実 (2012) 宿主細胞との共培養系におけるウエルシュ菌エンテロトキシンの発現誘導、第 33 回日本食品微生物学会、福岡市

#### 製品の市場化

1. スイフトジーン CPE 産生ウエルシュ菌「カイノス」

標記の製品名で平成 24 年 10 月 1 日より販売を開始した (株式会社 カイノス

厚生労働科学研究補助金

食品の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24年度 分担研究報告書

セレウス菌のリスクプロファイル

国立医薬品食品衛生研究所

山本 茂貴

厚生労働科学研究費補助金

食品の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」

平成24年度 分担研究報告書

セレウス菌のリスクプロファイル

研究分担者 山本 茂貴 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者 長谷川 専 三菱総合研究所

研究要旨:セレウス菌のリスクプロファイル作成のため、以下の項目について検討した。

国内外の疫学的情報（食中毒発生件数、原因食品、患者数 等）

新たに得られた分子生物学的な情報（感染性、発症機序 等）

新たな診断法、予防法、治療法、リスク評価（用量反応 等）についてインターネットからセレウス菌に関する情報を収集した。

GIDEON による検索により、各国のアウトブレイク状況および汚染率等のサーベイランス情報を得た。また、厚生労働省食中毒統計調査および感染症発生動向調査週報 IDWR により、わが国におけるアウトブレイク状況等の情報を得た。

FoodRisk、PubMed では、主に分子生物学的研究や診断・治療法に関する文献を抽出した。

菌の性状、セレウス菌はタンパク質や多糖体など高分子物質の分解性が高く、食品の腐敗、変敗を起こすと同時に、嘔吐毒（セレウリド）と下痢原性エンテロトキシンを産生する。発育温度域は 10～50℃（増殖至適温度 28～35℃）であり、10℃以下ではほとんどの菌株が増殖できないものの、一部 7℃以下の低温で増殖する菌株も存在する。セレウス菌は様々な食品中に存在する。ほとんどは 100 芽胞/g 以下であるが、ハーブなどで 1,000 以上になるものも報告されている。食品中ではセレウス菌は芽胞の形で存在するが、セレウス菌にとって適切な環境で食品を保存した場合に芽胞が発芽生育する。

嘔吐型食中毒は、セレウス菌に汚染された食品中で産生された嘔吐毒の摂取によって起こる（毒素型食中毒）。一方、下痢性食中毒は食品とともに摂取した本菌がヒトの小腸で増殖し、エンテロトキシンを産生することで引き起こされる（感染型（生体内毒素型）食中毒）。

嘔吐型食中毒、下痢型食中毒ともに発症菌量は  $10^5 \sim 10^8$  個/g であり、一般食品で通常見られる程度の菌数（ $10 \sim 10^3$  個/g 程度）では発症しない。

嘔吐型食中毒では、体内に入ったセレウリドが胃から十二指腸に流入する際にセロトニンレセプターに結合し、迷走神経を刺激することで嘔吐を引き起こすと考えられている。

欧米では下痢型の食中毒が多く、食肉、牛乳、野菜、魚介類を含む様々な食品によって引き起こされる。嘔吐型食中毒のアウトブレイクは通常米製品によって引き起こされるが、ジャガイモ、パスタ、チーズ、その他デンプン質の食品も要因となる。その他、ソース、プディング、スープ、鍋料理、パン菓子、サラダなどの食品の混合物もしばしば感染源となる。

セレウス菌食中毒は臨床症状、潜伏期間、関係検体からの原因菌検出頻度などによって診断されている。

通常、治療は下痢や嘔吐に対する水分や栄養補給などの対症療法程度であり、特別な治療は行われない。

わが国では 1960 年に小学校の学童 354 名が脱脂粉乳によって下痢、腹痛等を主症状とした食中毒事例が初めて報告され、その後セレウス菌による食中毒事例が報告されるようになった。

わが国におけるセレウス菌食中毒は嘔吐型がほとんどであるが、発生数や患者数はそれほど多くはない<sup>1</sup>。1996 年以降、セレウス菌による食中毒発症件数は 5～25 件の間で推移している。

<sup>1</sup> 食中毒統計調査によると、食中毒発生件数総数に占めるセレウス菌食中毒の件数は 1%程度となっている（2005 年：1.0%、2006 年：1.2%、2007 年：0.6%、2008 年：1.5%、2009 年：1.2%、2010 年：1.2%）