

## セレウス菌のリザーバー

土壌は  $10^{3-5}$  個/g のセレウス菌芽胞を含んでいるが、気候により土壌中の菌量は変化する。ある菌株は植物の根圏やミミズの腸内で増殖する。

## 食糧生産における暴露

野菜や穀物など食糧の汚染は土壌からの侵入がほとんどである。食糧加工過程では機械や器具に付着しているバイオフィルムが汚染源となっている場合（ミルクのタンクなど）もある。したがって、生の食糧にセレウス菌が付着しているのは避けられないが、加工過程でのさらなる汚染を防ぐべきである。

## さまざまな食品の調理中の暴露

さまざまな食品中にセレウス菌は存在し、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。食品中では芽胞の形で存在する。食品の保存時にセレウス菌にとって適切な環境に置いておくと発芽生育して食中毒の危険を招くが、乾燥や酸に弱いセレウス菌がそのような環境で保存されていることはあまりない。増殖は冷蔵によって抑えられ、 $10^{\circ}\text{C}$  以下だとほとんどの菌株は増殖できないが、 $55^{\circ}\text{C}$  の高温で増殖する菌株は存在する。 $10^{\circ}\text{C}$  以下でも増殖できる嘔吐型のセレウス菌はこれまで報告されたことがないため、冷蔵はセレウス菌による嘔吐型食中毒を予防できると考えられる。 $4^{\circ}\text{C}$  以下でも増殖できる下痢型セレウス菌はこれまで報告されたことはないが、 $7^{\circ}\text{C}$  で増殖する菌株は存在する。

## 食品中での毒素産生

### (i) 下痢毒

小腸内でセレウス菌が産生する毒素が影響を及ぼす。食品中でも産生されている場合もあるが、それらが下痢症状を引き起こすには至らない。

### (ii) 嘔吐毒

嘔吐は摂取前に食品中で産生されたセレウリドによって起こる。セレウリドが産生されるかどうかは食品の状態によって決まり、それはリスクアセスメント上重要である。セレウリドは熱に強く、 $126^{\circ}\text{C}$  90 分でも耐え、酸性下にも強い。セレウリドはそれが作られた食品から他に伝播することはない。セレウリドの他の性状としては、

セレウリドはセレウス菌が増殖した後に検出可能である。

セレウリドが産生されうる環境はセレウス菌の増殖する環境より狭い。嫌気下と  $37^{\circ}\text{C}$  以上では産生されない。

すべての食品中でセレウリドが産生されるわけではないが、ミルクやパスタなどでよく産生される。 $10^{\circ}\text{C}$  以下では産生されない。

## <食中毒原因食品の分類>

セレウス菌食中毒は、菌が広範に分布しているためどの食品が汚染されていたのか判断するのは難しい。レストランやケータリング店で食中毒が起りやすいが、これは不適切な冷蔵や調理後消費されるまでに時間が経ってしまったのが原因とされる。嘔吐を起こすセレウス菌食中毒はしばしば米やパスタが原因となる。とくに炊飯米を冷蔵せずに再加熱するまで何時間も放置しておいたことがセレウリドの蓄積につながり、またセレウリドは熱では壊れないため、いくつかの嘔吐型のア

ウトブレイクにつながったケースがある。他のバシラス属に関してもさまざまな食品が原因となっている。

#### (IV) セレウス菌のコントロール基準

##### <食品中のセレウス菌の増殖制限>

###### 温度の影響

中温性の菌株のセレウス菌は10～42℃で増殖でき（一部は50～55℃で増殖可）、耐冷性の菌株は10℃以下最低4℃まで増殖できる。冷蔵により世代時間や生育開始までに要する時間を増大させることができ、菌の増殖を抑えられる。

###### pHの影響

セレウス菌は特に酸耐性微生物ではない。25℃では、増殖率はpH7～5.5で一定であるが、これよりpHが低下すると急激に増殖率は落ちる。

###### 水分活性の影響

0.92以上でないと生育できない。

###### 食塩の影響

過去の数々の実験結果は一致していない。ただし、10%以上の濃度中では増殖できないと考えられている。

##### <食品中のバシラス属の不活化>

###### 加熱

加熱は細菌の芽胞を殺す最も一般的な方法だが、セレウス菌芽胞の耐熱性は幅広く、一貫した調理法や殺菌法を定めにくい。よって完全にセレウス菌を加熱によって除去するのは難しい。

###### 他の工程

加圧も一つの方法である。加圧によって発芽を促し、その後加熱によって殺滅する。放射線は芽胞には効果が無い。

###### 食品添加物

乳酸菌が産生するバクテリオシンのナイシンはセレウス菌の栄養型を不活化する。

##### <芽胞の増加防止>

加工工場の機械器具の洗浄はセレウス菌の増殖を防ぐためにかかせないステップである。次亜塩素酸の使用が推奨される。これは芽胞の数を消滅もしくは飛躍的に減少させる。セレウス菌の芽胞は機械器具にバイオフィームを作ってリザーバーになりやすいためコントロールが難しい。

##### <セレウス菌のコントロール基準>

3分105℃の加熱で芽胞の数を $10^5$ 減少させることができるが、完全に死滅させることはできない。一般家庭で滅菌することは難しいため、素早く冷蔵して菌の増殖を防ぐほかない。4℃以下なら増殖

はしないが、それ以上の場合、例えば 6°C からたった 2°C 温度を上げただけで、セレウス菌の密度は大きく上昇する。しかしながら、もともとのセレウス菌の数が少ないことがやはり重要で、食品加工場での洗浄を徹底することが最も重要である。

#### (V) セレウス菌による食中毒を防ぐために・・・

食べる段階で大量のセレウス菌が存在しないように、調理した料理はすぐに食べるか、数日間なら暖めておく (63°C 以上) かすぐ冷やしておく (7°C 以下、4°C 以下が望ましい) かすべきである。

食品加工業者は消費者がどのように保存やハンドリングを行うかを考え、消費者が食べる段階でセレウス菌が  $10^3 \sim 5$  個/g に至らないようにすべきである。

食品加工業者は HACCP システムを構築し、微生物学的な基準を定めるべきである。

セレウス菌の知見を深めるためにも、他のバシラス属の研究も行っていくべきである。

いくつかの国はバシラス属の食中毒のモニタリングを改善する努力をすべきである。

セレウス菌関連菌株の単一進化菌株でのみ嘔吐毒が形成される

**Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains**

**Introduction**

セレウス菌は嘔吐型と下痢型という 2 つのタイプの食中毒を引き起こす。嘔吐型は汚染された食品を喫食した後数時間で嘔吐がみられるという特徴がある。一方、下痢型では喫食から 8~16 時間後に腹痛や下痢が引き起こされる。

これまでに下痢型の食中毒を引き起こす 3 つのエンテロトキシン (溶血素 BL (Hbl)、非溶血性エンテロトキシン (Nhe)、細胞毒 CytK) が同定されている。これらの毒素は熱に不安定であり、セレウス菌が小腸で増殖する際に産生される。一方、嘔吐型の食中毒はセレウリドと呼ばれる熱や酸に安定な毒素によって引き起こされる。セレウリドは *ces* 遺伝子によりコードされており、動物モデルにおいては細胞障害性を有することが確認されている。さらに、セレウリドはヒトのNK細胞を阻害することから、免疫調節性を有する可能性があることが示されている。

本研究では、食中毒を引き起こすセレウス菌株の遺伝子型および表現型について詳細に解析した。患者や食中毒原因食品、および通常の商品から網羅的に菌株を分離し、セレウス菌の多様性を評価した。

**Methods**

90 の菌株について、遺伝子型の評価 (M13-PCR、RAPD 法、MLST 法) および表現型の評価 (FTIR 分析、タンパク質プロファイリング、バイオケミカルアッセイ) を行った。

**Results**

遺伝子型および表現型の分析結果から、下痢型および非嘔吐型のセレウス菌株では高い多様性がみられたが、嘔吐型の菌株では多様性が非常に低いことが示された。評価結果をクラスター分析したところ、嘔吐型の菌株は単一の異なるクラスターに属することが明らかとなった。このクラスターに属する菌株はデンプン分解性およびサリシン発酵性を有さなかった。さらに *hbl* 遺伝子を持たず、溶血性をほとんど示さなかった。一方、溶血性エンテロトキシン産生菌株は高い異種性を示し、複数のクラスターにまたがって存在していた。

**Conclusion**

以上の結果から、セレウリド産生嘔吐型菌株はクローナルな集団であることが示唆された。また、これらの菌株はセレウリド合成遺伝子のような毒性因子を獲得することで最近生じたものと考えられる。

## [4]

### 土壌から腸まで：セレウス菌とその毒素

#### From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins

#### 0. イントロダクション

セレウス菌は自然中に広く存在する。昆虫や哺乳類の腸内でよく増殖し、また、熱や乾燥などさまざまな環境に耐える芽胞状態をとることもある。このような特徴から、一般に食品中に存在し、嘔吐型や下痢型の食中毒を引き起こす。食中毒の症状は比較的穏やかだが、主要な食中毒の原因の一つとなっている。嘔吐型食中毒はプラスミド遺伝子由来のセレウリドと呼ばれる環状ペプチドからなる毒素によって引き起こされる。また、下痢型食中毒は小腸内で産生される細胞毒 (Hbl, Nhe, cytotoxinK) 菌株が原因となる。これらの細胞毒は腸管上皮の細胞膜を破壊することで下痢を引き起こす。

本論文は、これらの食中毒を引き起こす本菌の毒素に焦点を当てた。

#### 1. セレウス菌の特徴と同定

セレウス菌グループとは、遺伝的に非常に似通った6種のバチラス属 (*B. cereus sensu stricto* (狭義のセレウス菌), *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*) のことを指し、各種の中でもそれぞれ多様な菌株を持つ。本菌は大型のグラム陽性桿菌で芽胞を形成し、そのコロニーの外観は培地の組成によって変化するため菌の同定に用いられる。他に、運動性、溶血性、様々な物質の分解性などの性質を有する。特殊な培地を使うことによって、同定、単離、菌体数の計算などがおこなわれる。

#### 2. セレウス菌グループの分類学

*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* は表現形質や病毒性で区別はできるが、遺伝的に非常に似通っていて (例えば 16 s RNA 配列は 99%以上同一)、後者2つを区別する根拠は分類学的に存在せず、また前者2つはクローン関係だとみなすことができる。また、セレウス菌グループには様々なプラスミドを持つ菌株もあり、核様体の DNA が同一でも、これが表現形質に影響することもある。さらに、プラスミドはグループ内の菌体間や菌体内で核様体 DNA へ移動しうる DNA であるため、突然変異とも相まってセレウス菌のゲノムは常に変化し多様化し続けている。しかも、炭疽菌 (*B. anthracis*) の炭疽を引き起こす毒やセレウス菌の嘔吐毒など、プラスミドの DNA 上に毒素の遺伝子が存在する場合も多い。それゆえグループ内でのゲノム解析による種の分類は非常に曖昧であり、ナンセンスであるといえるかもしれない。しかし、ゲノム解析は種がどのように進化し、多様な表現形質を持つに至ったかを分かりやすく示しているため、セレウス菌グループ全体への理解を深めることになる。

### 3. リザーバーと生活スタイル

セレウス菌は、さまざまな土壌、ほこり、植物など自然環境に幅広く存在している。土壌中では主に芽胞として存在し、何らかの有機物中や動物の体内に入った際に発芽増殖する。健康なヒトの糞便中にも少量ではあるが検出されることから、ヒトの腸内もセレウス菌の通常の生活の場の一つであることがわかる。

### 4. 土壌から食品へ

セレウス菌は米や野菜からスパイスまで幅広い食品中から検出される。土壌のセレウス菌が作物に移り、さらに作物から横たわる牛の乳房に移ることで牛乳を汚染するなど、あらゆる経路であらゆる食品が汚染される可能性がある。また、熱や乾燥などさまざまな過酷な条件に耐える芽胞や食品工場の金属器具にも接着できるバイオフィームなどの形態をとるため、汚染を防ぐことは簡単ではない。しかも耐冷性を持つ種まで現れたため、汚染を防ぐことがさらに困難となった。

### 5. 食中毒の症状の特徴

セレウス菌が引き起こす食中毒には嘔吐型と下痢型とがあり、一般に症状は穏やかであるが、まれにより重篤な症状を示し、場合によっては死亡するケースも報告されている。嘔吐型の食中毒は食品中のセレウス菌が産生するセレウリドと呼ばれる毒素によるものであり、摂取後数時間で悪心や吐き気を示したあと 6~24 時間症状が継続する。また、下痢を伴う場合も多い。下痢型の食中毒は、芽胞や栄養型の形で摂取されたセレウス菌が小腸内で産生する腸管毒によるものであり、摂取後半日以上で腹痛や下痢を示したあと半日以上症状が継続する。

#### 感染用量

感染の原因となった食品中には大量のセレウス菌が検出される。下痢型では、一般に  $10^{5-8}$  個の菌体が検出される。芽胞の方が小腸まで到達しやすいため、感染に必要な菌量が少ない。嘔吐型を引き起こすために十分な嘔吐毒を産生するための菌量は確定されていないが、実際の症例の多くは  $10^5$  個~である。

#### セレウス菌によるアウトブレイク

セレウス菌は全世界において食中毒の主要原因であり、各国でその集計結果が報告されている。しかし、その症状が短期的で穏やかであることや、他の下痢型食中毒を起こす細菌による食中毒との区別が難しいことからその報告数は実際よりもかなり下回っていると考えられる。嘔吐型は米や小麦などの穀物が、下痢型は乳肉製品や野菜がその食中毒の主な原因食品となっている。

### 6. 嘔吐毒、セレウリド

セレウリドは環状の 12 のアミノ酸からなるペプチドであり、その遺伝子は大型のプラスミド上に存在する。この毒素は抵抗性が強く、胃酸や消化管内の消化酵素や食品の再加熱によって破壊されることはない。体内に入ったセレウリドは、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て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。セレウリドは他にもミトコンドリアに障害を与える、肝細胞を変性させる、NK 細胞の働きを阻害させるなどの生理活性を持つ。

セレウリドは対数増殖期を終えたセレウス菌が 12~22°C でよく産生するが、8°C の低温で産生するものもある。食品によってセレウリド産生量は異なり、米などでんぷん質の食品は、その産生を維持する能力が高い。また、菌の菌株や、温度、pH などの環境条件によってもその産生能は大きく異なる。

### セレウリドの同定

セレウリドの同定は、ある特殊な細胞がセレウリドの存在下で空胞形成することや、ブタの精子がその存在下で運動性を失うことなどを用いたアッセイによって行われていたが、どれも特異的にセレウリドを同定するものとは言えなかった。しかし、セレウリドの遺伝子が発見されて以降は、それをターゲットにした PCR によって特異的な同定が可能となった。

## 7. セレウス菌食中毒に関わる細胞毒

セレウス菌は、小腸上皮細胞膜の結合を破壊することで下痢を引き起こす何種類もの細胞毒を産生するが、それらの毒素の同定はいまだに困難な課題である。Hbl, Nhe, CytK が現在下痢の原因とみなされている毒素で、他にもいくつかの毒素が下痢症状に関与しているとされる。nhe 遺伝子はすべてのセレウス菌グループが持っていると言われるが、他の 2 つの遺伝子を持っている菌株はそれぞれ 50% 以下とされる。しかし、実際の症例から単離されたセレウス菌はこれらの遺伝子を持っているものが多く、この 3 つの毒素は互いに相乗効果でその毒性を高めるようである。

## 8. 3 つのコンポーネントからなる下痢毒 : Hbl と Nhe

Hbl と Nhe はセレウス菌グループにだけみられ、共に 3 つのコンポーネントからなる毒素であり、そのアミノ酸配列にある程度の相同性がみられる。計 6 つのコンポーネントは遺伝的に相同関係にあり、これらの遺伝子はもともと 1 つの共通の遺伝子が由来となっていることが示唆されるが、Hbl と Nhe 相互作用は限定的である。

## 9. セレウス菌 $\beta$ - バレルポア形成毒素

セレウス菌は  $\beta$  - バレルポア形成毒素の一種であるタンパク質毒素、CytK および Hly II をそれぞれ産生する。 $\beta$  - バレルポア形成毒素ファミリーにはウェルシュ菌の  $\beta$  毒や黄色ブドウ球菌の  $\alpha$  -

溶血素が属する。

CytK は皮膚壊死性、細胞障害性、および溶血性を有する 34kD のタンパク質で、Hbl や Nhe と同様の細胞毒性を示す。一方、Hly II はヒトの細胞株に溶血性および細胞毒性を示すものの、セレウス菌による下痢を引き起こす原因であることはまだ示されていない。

## 1 0. 細胞毒の分泌

CytK、Hbl および Nhe とともに分泌シグナルペプチドを有しており、通常の分泌経路を介して分泌されることが示唆されている。

## 1 1. 細胞毒の同定

これまで知られている主要な食中毒原因毒素であるセレウリド、Hbl、Nhe、cytK について概観する。

Nhe および Hbl については抗体が作成されており、キットとしてはそれぞれ BCET-RPLA kit (Oxoid Ltd.,UK)および TECRA-BDE kit(Tecra International Pty Ltd.,Australia)がある。前者は Hbl の L<sub>2</sub> コンポーネントに対する抗体で、半定量的アッセイが可能である。なお、感度は 2ng/mL である。また、後者は Nhe の NheA コンポーネントに対する ELISA サンドイッチテストであり、感度は 1ng/mL 以下となっている。いずれもコンポーネントに対する抗体であるため、毒素の生物学的活性については確認できない。また、CytK に対する抗体については、現在のところ市販のキットはない。

セレウス菌のエンテロトキシンに対する非特異的な同定方法としては、実験動物および培養細胞を用いた方法が確立されている。前者にはウサギの回腸を用いた RIL 試験やモルモットの皮膚反応および血管透過性アッセイなどがある。また、後者では CHO 細胞や McCoy 細胞、Caco-2 細胞、Vero 細胞などの細胞株が用いられている。

特異的な同定方法としては、Hbl、Nhe、CytK に対するマルチプレックス PCR 法が確立されている。ただし、エンテロトキシン遺伝子の発現が毒素産生のレベルを表すわけではなく、したがって PCR 法では菌株の病原性を予測できないため、食品安全を目的とする菌同定においてはこの方法はほとんど使用されていない。

## 1 2. 細胞毒の発現調整

セレウス菌の細胞毒の大部分は転写活性化因子 PlcR によって制御される遺伝子群だが、それ以外の調節メカニズムも関与することが明らかとなりつつある。

PlcR は Hbl、Nhe、CytK、分解酵素（ホスホリパーゼ、プロテアーゼ）、および表面タンパク質を含むいくつかの細胞外病原因子の発現を活性化する。一方、Hly II は PlcR によって制御されないことが示されている。

その他、毒素の活性は pH や温度、グルコース濃度、酸素分圧など環境因子に依存する。近年で



は、さらに Hbl と Nhe の発現が細胞の代謝ステージに関係することが示されている。たとえば、発酵（嫌気性）増殖段階のセレウス菌はより多くの Hbl を産生することが知られている。

### 13. 結論

セレウス菌は幅広い表現型と毒性タイプを有する。プラスミド由来の毒性因子を持つ嘔吐型セレウス菌はクローナルな菌株である一方、その他のセレウス菌はより多様性に富んでいる。また、菌株間の毒性レベルも非常に多様であり、無害なものから死に至るものまでさまざまである。嘔吐を引き起こすセレウリドの機能については明らかにされているが、下痢を引き起こすエンテロトキシンの機能はより複雑である。これまでに Hbl、Nhe、CytK 細胞毒素が食品由来の下痢を引き起こす主要な因子であることが示されているものの、これらの因子の最終的な機能はまだ明らかにされていない。

## Biofilm Formation and Cell Surface Properties among Pathogenic and Nonpathogenic Strains of the *Bacillus cereus* Group

### セレウス菌グループにおける病原性菌株と非病原性菌株の バイオフィーム形成および細胞表面の性質

#### Abstract

セレウス菌グループの 102 の菌株について、そのバイオフィーム形成を調べた。土壌中の菌株や消化管感染症に関わる菌株ではバイオフィーム形成が見られた一方、その他の疾病に関わる菌株ではあまり見られなかった。また、細胞表面の疎水性や S 層（一般に細菌に認められることのある細胞外皮の一部）の有無、および上皮細胞への接着性もあわせて調べた。

#### Introduction

セレウス菌グループとは *B.cereus sensu stricto*, *B.anthraxis*, *B.thuringiensis* の 3 つの遺伝的に近縁な病原微生物である。これらは人に眼内炎や歯周炎など様々な疾病をもたらすが、最も良く知られているのは腸管進入時における嘔吐や下痢である。腸管進入の機会が多いのは、これらの細菌が芽胞やバイオフィームといった非常に耐性の高い形態をとる場合があるためであり、特に後者は宿主の腸管内上皮細胞で形成されるため、直接病原性に大きく関わりと予想される。そこで、本実験ではセレウス菌グループの 102 の菌株について、バイオフィーム形成とそれに関与すると考えられる細胞表面の疎水性、S 層の有無、および上皮細胞への接着性を調べた。

#### <Biofilm-forming capacity> バイオフィーム形成能

土壌から採った菌株と下痢を起こした人から採った菌株の約 40%がバイオフィームを形成した一方で、嘔吐を起こした人から採った菌株と口腔の疾病（ほとんどが歯周炎）を起こした人から採った菌株では全く形成しなかった。バイオフィームの形成は体内の様々な抗生物質から自らを守り、消化管内に留まるのに有利であるが、嘔吐菌株は腸内にコロニーを作る必要がなく（原因のセレウリドは体内に入る前に食品中に放出されるため）、歯周病菌株もその必要はない。これらのことから、上記の菌株のみがバイオフィームを形成することは合理的である。

#### <Presence of an S layer> S 層の有無

*B.thuringiensis* のすべての菌株は S 層を持たず、*B.anthraxis* のすべての菌株は S 層を持つことがわかった。*B.cereus* に関しては、口腔内に疾病を起こす 12 の菌株のうち、歯周炎に関わる菌株だけが S 層を持つことがわかった。S 層が病原性にどうかかわるかは不明であるが、S 層の有無とバイオフィーム形成能に関係がないことが示された。

#### <Cell surface hydrophobicity> 細胞表面の疎水性

70%の下痢菌株および 17%の嘔吐菌株が細胞表面の高い疎水性を示した。この疎水性と S 層の有無に関係があることは既に報告されているが、バイオフィーム形成能の結果と比較すると、疎水性

はバイオフィルム形成能に関係がないことが示唆された。

**<Adhesion of *B.cereus* and *B.thuringiensis* strains to epithelial cells> 上皮細胞への接着性**

嘔吐菌株では接着性が無く、土壌から採ったものや下痢菌株の約 65%に顕著な接着性が見られた。また、接着性はバイオフィルム形成能に関係がないことが示された。しかし、統計学的に S 層の有無や細胞表面の疎水性とは相関が見られた。

以上の結果から、バイオフィルム形成能はセレウス菌の個々の菌株の物理的性質とは無関係であることがわかり、公衆衛生上さらなる調査が求められる。

## [6]

*Bacillus cereus*, さまざまな病態を示すヒトの病原菌

### *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen

#### 1. イントロダクション

*B. cereus* の胃腸管以外での感染症は実に多様である。したがって、*Bacillus* 属の中でも *B. cereus* に臨床で遭遇した際は、特に注意しなければならない。本菌はグラム陽性、通性好気性、芽胞形成桿菌で、環境に広く存在し、他の *Bacillus* 属(特に炭疽菌 *Bacillus anthracis*)に近い表現型・遺伝子型を持ち、ヒト体内でコロニーを形成する際は栄養型となるといった性状を持つ。代謝を行っていない芽胞は、熱、氷冷、乾燥および放射線などに耐えることができ、この芽胞が感染に関与している。

#### 2. 疫学

腐敗した有機物、淡水海水中、野菜や媒介生物など本菌は芽胞としてどこにでも存在する。様々な土壌や堆積物に最も一般的に見られる好気性芽胞細菌の一つである。その生活環は、節足動物に取り込まれ、その腸内で出芽、増殖したのちに、排便や宿主の死によって自然界に再び放出され、芽胞を形成したのち次の宿主に取り込まれるのを待つといったものである。土壌中を、本菌の栄養型同士が鎖状につながって移動することもある。

#### 3. 形態的微生物学

環境によって、菌体はさまざまな形態を示す。グラム染色して観察すると、シャーレの培地中では、直線か少し曲がった桿状で、鎖状につながっているように見受けられる。ただ、アガロース培地上などでは、ビーズ状につながってそれらが繊維様の形状をとることもあり、この場合は本菌の判別は困難である。

#### 4. 病原性

本菌の病原は腸管毒性、非腸管毒性に関わらず、組織破壊性・反応性を持つ細胞外酵素生成物によるものである。具体的には、4つの溶血毒、3つのホスホリパーゼ、1つの嘔吐(誘発)毒、3つの(膜孔形成)腸管毒(Hbl, Nhe, CytotoxinK)である。腸管毒は、腸管で本菌が産生分泌して下痢性症候群を引き起こすものである一方、嘔吐毒(プラスミドにコードされており、セレウリドと呼ばれる)は、食品中(パスタ、牛乳、米など)で既に作られ、それをヒトが体内に摂取することで引き起こされる。

## 5. 非腸管性感染症

本菌は食中毒だけでなく、全身・局所的な感染を引き起こす。感染症は様々で、劇症型菌血症や髄膜炎、肺炎などである。

### <呼吸器感染症>

1997年、Millerらによって、炭疽に類似した、急激に進行する肺炎患者が報告された。患者は何らかの細菌に汚染されたほこりを吸入したと考えられるが、炭疽菌 *B. anthracis* の遺伝子は検出されなかった。2004年、Hoffmasterらによって、同様の症状の患者の痰と血液から炭疽菌が持つ2つのプラスミドのうちの1つ(pX01)と類似したものを持つ *B. cereus* が発見された。2007年、Avashiaらによって、本菌による肺炎と敗血症で2人が死亡し、その患者からは、PCRによって pX01 が検出されたと報告された。Strauss のある報告によれば、偽膜性気管支炎を患った再生不良性貧血患者の口腔内から、本菌のコロニーが見つかった。貧血による免疫の低下が口腔内への細菌の接着コロニー化を許してしまい、そこから気管支に感染が広がったのだろう。このように口腔内に本菌のコロニーができ、これが気管支炎や肺炎ひいては全身症状である敗血症を引き起こすケースは多い。

### <院内感染症>

本菌により免疫不全の入院患者に対して院内アウトブレイクが引き起こされるケースが数年に1度報告されている。汚染された人工呼吸器や内視鏡、リネン、さらには病院スタッフの手など、あらゆるものが原因となる可能性がある。とくに医療器具に付着した本菌のバイオフィルムは入念に洗浄せねば除菌できず、非常に危険である。

## 6. 眼内炎

ある白内障患者が、手術を受けた3日後、眼の充血と痛みを訴え、その硝子体液からは数多くのグラム陽性桿菌が検出された。抗生物質による治療は手遅れで、即日眼球摘出せざるをえなかった。眼内炎は感染する細菌によって、進行の速さや症状の重さが異なるが、本菌によるそれは最悪のものであり、感染すれば患者の70%は完全に視力が奪われる結果となる。本菌による眼内炎は外在性と内在性があり、前者はコンタクトレンズを介して、後者は汚染された注射針等によって菌が血流を介して眼内で繁殖してしまう例がある。治療に関しては、バンコマイシンとアミカシンの兼用が有効であるが、投与後すぐには硝子体液に浸透しないいうえ、本菌感染後半日ほど経過すると眼の組織は破壊し尽くされ、その後はどんな治療をほどこしてもほとんどの場合視力を失ってしまうこととなる。眼内炎には本菌の4つの毒素が関与していることが実験的に明らかになっていて、そのうちPC-PLCは直接眼の組織を障害する。またある毒素は、血液成分の自由な眼への拡散を密接結合により阻止している眼血液関門の密接結合を破壊し、血液からの浸透度を上昇させて眼の正常な機能を失わせる。

## 7. 中枢神経系感染症

鼻と歯茎からの挫傷・出血と水様性下痢便を訴えたある患者が急性白血病と診断され、化学療法を始めた5日後から熱感を訴え、その2日後に悪寒を訴え死亡した。血液からは本菌が検出され、脳の両側は出血性壊死を起こしていて、その部分からも大量の本菌が検出された。本菌による中枢神経系への感染は、髄膜炎やクモ膜下出血などとしても見られる。この感染はほとんどが骨髄腔内へ注射する何らかの処置（白血病患者に対する腰椎穿刺など）に続いて起こっていて、この患者もその際に本菌が侵入していたと考えられる。敗血症が中枢神経系に移行するケースもある。本菌の侵入経路はさまざまだが、一番の侵入口はやはり腸管からであり、粘膜を通して血管に入り血流を介して眼や神経に移行する 경우가ほとんどという説もある。すなわち、白血病患者が細菌感染を恐れて隔離されていても、食事中の微量の本菌による感染を許してしまうかもしれない。

## 8. ガス壊疽様感染症

本菌は、ウェルシュ菌 *C. perfringens* が引き起こすことで知られているガス壊疽様の症状を引き起こす場合があり、ガス壊疽だと思われていた患部から本菌が検出された例が多々ある。どの細菌が感染しているかで投与する抗生物質が異なるため、迅速に判定せねばならない。

## 9. ウェルシュ菌 (*C. perfringens*) との区別

インドインクという色素で細菌の莢膜を染色できる。ウェルシュ菌には莢膜があり、セレウス菌には莢膜が無い。このようにガス壊疽の原因菌を確定し、治療法を決定する。

## 10. 外傷による皮膚感染症

本菌は環境中のさまざまな場所に存在しているため、手術や外傷といったものはすべて感染の原因となりうる。なお、免疫不全の人もそうでない人も感染する。

## 11. 皮膚感染症

本菌の感染は、他の主要な皮膚感染症と異なり、免疫不全者だけに起こりやすい。ある病院では1983年から5年間で10件の本菌による皮膚感染症が報告された。その病変は主に四肢であり、最初は水泡が見られるだけであるが、そのうち化膿が見られ急速に広がっていったが、患者らには皮膚のけがは見られなかった。10件の発症は季節的であり、それは西アフリカでの炭疽の季節的な流行に似ていて、病変の外見も似ていた。炭疽と同じように、本菌の土壌中の芽胞がほんのかすかな擦り傷から手足の皮膚に侵入したと考えられる。病変の外見は皮膚の黒変だが、これは本菌の外毒素、とくに皮膚壊死性毒のためである。

## 12. 心内膜炎

珍しいケースであるが、心臓への本菌の感染が報告されている。ヘロイン中毒者で心房中隔欠損症、三尖弁の異常を患っていた患者が、異常な心音と白血球数の上昇が見られたため血液を調べると、本菌が検出された。ヘロインと心臓の異常と汚染されたヘロイン注射針がリスクファクターになりえたとされている。心臓の弁に異常がある患者は、心内膜炎の罹患率死亡率が高く、過去に報告された10件の心内膜炎のうち、6人が薬物中毒、1人がペースメーカー使用者、残りは弁に異常があった。しかし、どのような条件で本菌による心内膜炎が起きるかは解明されていない。

## 13. 骨髄炎

本菌の骨への感染は珍しいが、静脈内薬物中毒者か外科的外傷者が患者の大半である。患者の全員がアルコール中毒や貧血症など何らかのリスクファクターとなりうるようなものを持っていた。なお、黄色ブドウ球菌などと混合感染しているケースが多い。

## 14. 泌尿器系感染症

膀胱がんを患っていた女性が感染したケースなど報告された例はごくわずかだが、この患者は高熱、ふるえ、膿尿を示し、腎炎と診断され、尿中から本菌が検出された。汚染された尿道カテーテルから泌尿器系全体に本菌が感染したと考えられる。

## 15. 抗菌薬感受性

本菌による感染症は様々であり、その治療法は単離された本菌の菌株の抗菌薬感受性により決定される。一般的には、本菌はペニシリン・セファロスポリン耐性であり、エリスロマイシン・テトラサイクリン耐性のもも報告されていて、抗菌薬の選択は非常に難しい。多くの研究者が抗菌薬と本菌の菌株とで各々の感受性を調べる実験を行っているが、一概にどの抗菌薬が一番よいかといった答えはでていない。

## 16. まとめ

一般的には腸管にいる細菌だが、さまざまな部位に感染して重篤な症状を起こす細菌であり、臨床の現場にいる者たちは重要視せねばならない。とくに免疫不全者に対してはさらなる注意が必要である。

## [7]

### セレウス菌グループの芽胞の発芽増殖：多様性と発芽レセプターの役割 Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: Diversity and role of germinant receptors

#### 1. はじめに

セレウス菌の芽胞は、熱や乾燥などあらゆる物理的なストレスに耐えるための高度に特殊化して代謝を休止させた細胞の形態であり、この芽胞が適切な環境下に置かれると発芽し増殖をはじめ。食品中の芽胞を完全に破壊することは極めて困難であり、食中毒を防ぐためには芽胞の発芽を促して破壊しやすい栄養型にするか、芽胞の発芽を抑制して毒性を示すほど増殖させないかのどちらかの方法を取るべきである。

したがって、本論文では本菌の芽胞の発芽に焦点を当てて研究を行った。

#### 2. 食中毒をもたらすセレウス菌

本菌は主に嘔吐型と下痢型の2つのタイプの食中毒や、食品の腐敗の原因となることでよく知られている。本菌の芽胞の高度なストレス耐性は、結果的にヒトに対する食中毒に寄与するため、芽胞に対する知識を深めることは、食品中の本菌をコントロールするうえで必要不可欠である。

#### 3. 環境中でのニッチ（生態学的地位）

セレウス菌グループは、土壌から昆虫の腸内までありとあらゆる環境に生息している。したがって、食品加工の過程において、さまざまなポイントで本菌芽胞が入って来うが、そこでの温度やpHなど様々な理化学的な環境要因はその芽胞の特性に影響を与える。特に、「湿度と熱に関する耐性」と「発芽できる環境の範囲」は食品の衛生と安全に関わる最も重要な特性だと言える。

#### 4. 芽胞の構造とその要素

芽胞がどれほど耐性を持つかは、コアとそれを取り囲む数層の防御壁からなる芽胞の構造によるものであり、芽胞がどれほど寿命を持つかは、代謝の不活性レベルによる。中心にあるコア内では、いくつかの酵素がコアからの脱水を促す作用を持っており、その結果コア内は微粘性環境にあり、タンパク質がところどころに固定化されて熱で凝集されるのを防いでいる。これが耐熱性の原因であることが示された。発芽の際にコア外の構造は壊れるが、これは芽胞特有の分厚いペプチドグリカンからなる皮質（コアの外側を覆っている）を、間接的に分解するCa-DPAがコアに保持されており、これが放出されるためである。その後内膜は1.5倍に広がり、これがセレウス菌栄養型の細胞膜となる。内膜上のNa/Kポンプは、イオンの組成や浸透圧を正常に戻し、細胞代謝の開始時に機能する。また、一番外側にある被



膜上で働く物質には、栄養素などを選択的に透過させて発芽を引き起こすものや、栄養素を分解することで発芽を抑制するものもある。

## 5. バシラス属の発芽レセプター

栄養素はバシラス属の発芽を引き起こすものの一つであり、内膜のレセプターと結合してトランスポーターを活性化し、芽胞を構成する皮質構造を壊す物質が核内から皮質内に放出されることで発芽を引き起こすというのが現在の最も有力な仮説である。発芽を引き起こすものは他にもあり、しかもそれらの条件は複雑に絡みあっていると考えられているが、本論文では特に栄養素によって引き起こされる発芽に焦点を当てた。

*B. subtilis* は GerA, B, C の3つのコンポーネントからなる発芽レセプターを持ち、協同して機能する。また、5つの発芽レセプター遺伝子を含む発芽オペロンを持ち、それらの配列を調べて他のセレウス菌グループと比較すると系統樹が描くことができる。その結果、いくつかの菌株は、他と非常に異なるレセプターを持つコンポーネントを有していた。ただし、これらの菌株の多くは GerB を持ち、また GerB に点突然変異が起きると発芽誘因物質に対する特異性や親和性が変化することから、GerB は非常に重要なコンポーネントであることがわかった。しかし、一般的にレセプターは非常に多様性に富むため、よく知られているような発芽誘因物質に加えて、種特異的なユニークな発芽誘因物質も存在すると考えられる。

## 6. 発芽レセプターの役割

*B. cereus* ATCC14579 株は7つのレセプターを持っているが、それらのうち1つを欠損させた7種類の菌を用いて、各々のレセプター (GerR, GerG など) に対してどの栄養素 (グルタミン、フェニルアラニンなど) がどのような反応をするかを調べた。例えばイノシンによる発芽には、GerQ と GerI の両方が必要なことがわかった。また、レセプターのいくつかは協同して働くことが多いこともわかった。

炭疽菌 (*B. anthracis*) はそのプラスミドに一つのレセプター遺伝子をもっており、この欠損変異体は病原性が弱まる。炭疽菌はヒト体内に侵入後マクロファージで発芽し、リンパ節に移動して増殖することが知られていることから、このレセプターはマクロファージで分泌されるイノシン他いくつかのアミノ酸と反応して発芽を引き起こしていると考えられる。

## 7. セレウス菌グループの発芽増殖の多様性

発芽の特徴や発芽誘引物質の役割は、菌株や芽胞形成時あるいは発芽時の状況などさまざまな条件によって異なる。例えば、栄養に富む培地で形成された芽胞はそうでない芽胞より3~4倍発芽しやすい。

嘔吐を引き起こすセレウス菌とそうでないものの比較はよくされているが、後者の方がよく発芽する。また、耐冷性と中温性のセレウス菌を比較すると後者の方がよく発芽する。このように栄養素やその他の環境因子の発芽への影響は菌株によって非常に様々であるが、これはそれぞれの菌が異なるいくつかのレセプターを持ち、またそれらの機能がそれぞれ異なる

るためである。

## 8. 栄養型⇔芽胞の戦略

芽胞の発芽は、食品の腐敗や食中毒への最初のステップである。発芽を食い止めることがこれらの危害を避ける方法であるが、これを防ぐ普遍的かつ現実的な物質や環境条件はいまだかつて報告されていない。発芽を促して、芽胞を殺菌しやすい栄養型に変えるというのが現実的な策である。

芽胞は食品や食品器具中で接着し合ってバイオフィームという形で存在することが多く、これは通常の芽胞よりさらに抵抗性が強い。

## 9. 酸性ストレス条件下でのセレウス菌の発芽

酸は微生物の増殖をコントロールするために食品工業で広く用いられており、とくに芽胞の発芽・増殖を抑制する効果はよく知られている。

## 10. 展望

芽胞の発芽に関して、まだ解明すべき事柄が多く残っている。発芽レセプターはどのように活性化され、その結果どうなるのか、レセプターから出されたシグナルはどうトランスポーターに伝達されるのかといったことである。これらの答えが将来解明されるとき、それは食の安全に直接の価値をもたらすだろう。

## Rapid Identification of Emetic *Bacillus cereus* by Immunochromatography 嘔吐を引き起こすセレウス菌の免疫クロマトグラフィー試験による迅速な同定法

### Abstract

セレウリドと共に発現するマーカートンパク質をターゲットにした免疫クロマトグラフィー試験により、簡便、迅速、特異的に嘔吐型食中毒を引き起こすセレウス菌の菌株を同定できる。さまざまな食材、食品中の嘔吐菌株のみを、特別な技術や道具なしで 30 分以内に簡便に検出できる優れた方法である。

### The text

セレウス菌は嘔吐型と下痢型の 2 種類の食中毒を引き起こすが、日本では汚染された米による嘔吐型のアウトブレイクが多くなっている。嘔吐型の毒素であるセレウリドの検出は、Hep-2 細胞の空胞形成を見るものや、セレウリド遺伝子の PCR などさまざまな方法が用いられてきた。モノクローナル抗体を用いた免疫クロマトグラフィー試験は、様々な微生物や微生物由来の毒素の検出に用いられてきた。本実験では、セレウリド合成と同時に発現することが知られているマーカートンパク質をターゲットにした免疫クロマトグラフィー試験を利用して嘔吐型セレウス菌の検出を試みた。

Hep-2 細胞に空胞形成することが確認されている 50 のセレウス菌の嘔吐菌株と、セレウス菌非嘔吐菌株や他の様々な細菌 50 株とを免疫クロマトグラフィー試験の対象とした。マーカートンパク質が存在すると導入後 30 分以内にバンドが見られる。また、嘔吐菌株が確実にセレウリドを産生するために、いくつかの嘔吐菌株で 4 種類の培地を試し、最も適したスキムミルクを培地として使用した。

比較的強く Hep-2 細胞に空胞形成を起こす菌株を培養し、各一定時間後に免疫クロマトグラフィー試験を行ったところ、培養液中で増殖して  $10^8$ cfu/ml で陽性が出たため、この量がこの同定試験に必要なことが確認された。また、培養液に様々な食材を加えて培養したところ、菌数はすべて  $10^9$  を超えたが、スパゲッティなどを加えたときに陰性が出たため、セレウリドの産生には適切なタンパク質やアミノ酸が必要だということもわかった。

この試験の特異性を調べるために、50 のセレウス菌嘔吐菌株と非嘔吐菌株、またその他様々な細菌について試験を行った。その結果、すべての嘔吐菌株は陽性、非嘔吐菌株は陰性を示したことで、この試験は特異的にセレウス菌の嘔吐菌株を検出できることが示された。他の様々な細菌 (30 以上の様々な食中毒細菌) については、黄色ブドウ球菌の毒素 A と B を産生する 2 つの菌株以外はすべて陰性であった。この偽陽性に関してはさらに検証していく必要があるが、現実的にはセレウス菌は黄色ブドウ球菌と選択寒天培地で容易に区別できるため問題はない。

以上をまとめると、免疫クロマトグラフィー試験によって簡便、迅速、特異的にセレウス菌の嘔吐菌株を同定することができた。現在の同定方法のより良い代替法としてこの試験法を利用していくべきである。

[9]

## Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications.

### セレウス菌による毒素産生の制御および食品安全へのインプリケーション

#### 1. イントロダクション

セレウス菌はグラム陽性の芽胞形成細菌であり、全身性あるいは局所的な感染によって劇症菌血症、髄膜炎、脳腫瘍、眼内炎、肺炎、ガス壊疽様皮膚感染症、および嘔吐型と下痢型の2つのタイプの食中毒を引き起こす。嘔吐型の食中毒は嘔吐型セレウス菌あるいは嘔吐毒セレウリドに汚染された食品を喫食してから1~5時間後に発症する。一方、下痢型の食中毒は増殖型のセレウス菌が小腸で産生したエンテロトキシンによって引き起こされ、セレウス菌あるいはその芽胞によって汚染された食品を喫食してから8~16時間後に発症する。

#### 2. 嘔吐毒セレウリド

セレウリドは環状ドデカデプシペプチドで、非常に安定的である。121°C、pH 7下で2時間の熱処理、フライ、ロースト、電子レンジ調理にも抵抗性を示す。さらに、pH2~11やペプシンやトリプシンなどの酵素活性への暴露に対しても抵抗性を示す。こうした特徴により食品加工や調理、また消化過程において不活化されないため、食品中のセレウリドは健康危害の要因となりうる。

セレウリドは胃および十二指腸においてセロトニン 5-HT<sub>3</sub> レセプターに結合し、求心性の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。その他、脳浮腫や肝不全など致死性の疾患を引き起こす。食中毒患者の胃液 (0.004µg/mL)、血清 (0-0.004µg/mL)、尿 (0-0.008µg/mL)、糞便 (0.16-0.80µg/mL) にセレウス菌の存在が確認されている。また、嘔吐型食中毒を引き起こす食品中のセレウリドは0.01~1.28µg/gであることが示されている。対数増殖期の嘔吐型セレウス菌株は10<sup>6</sup>個あたり0.004~0.13µgのセレウリドを産生するため、食品中において10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup>cfu/gの量で食中毒を引き起こすことが可能である。ただし、セレウリドの産生にはさまざまな環境因子が関与するため、この限りではない。

セレウリド産生菌株は *ces* プラスミド遺伝子を有するサブグループを構成する。嘔吐型セレウス菌株は全体の1.5%程度であるが、非ランダムな食品や患者からのサンプルにおける有病率はより高く、32.8%となっている。このように比較的低い有病率にも関わらず、嘔吐型の菌株は様々な患者や食品、環境中に広く分布している。たとえば、アイスクリームから分離されたセレウス菌の4.7%が嘔吐型であり、同様に魚介類では1.6%、RTE食品では11.0%、食中毒原因食品ではないその他の食品では3.9%、土壌では1.7%、牛乳では1.5%、牛の床敷きでは1.2%、水洗用水では3.9%であったとの報告がある。

嘔吐型の菌株は溶血性を持たないあるいは弱い、デンプンおよびサリシンを加水分解できない、10°C以下では増殖できない、芽胞の熱耐性が高いなどその他の菌株と区別されるいくつかの特徴がある。

嘔吐型の菌株はクローナルな菌株であると考えられていたが、近年新たに別菌株の嘔吐型菌株も見つかっている。また、近年の研究で約7.5%の嘔吐型菌株でデンプン加水分解能、サリシン発酵能、およびエンテロトキシン Hbl 産生能が確認されており、さらに嘔吐型菌株の