

大部分で *nhe* 遺伝子が同定されていることから、嘔吐型の菌株もエンテロトキシンを産生することで下痢を引き起こすと考えられている。さらに、近年 8°Cでも増殖できる嘔吐型セレウス菌株も同定されている。

3. セレウリドの発現制御

セレウリドの発現は孢子形成レギュレーターである Spo0A および AbrB によって制御されている。なお、これらの因子は主要なエンテロトキシンの調節因子である PlcR とは独立に機能している。AbrB は直接 *ces* 遺伝子の発現を抑制し、Spo0A は AbrB に結合することで *ces* 遺伝子の転写を促進する。

さらに、環境因子として温度や大気組成、栄養状態および食品の特性などが関与している。嘔吐型菌株は 8°Cから 40°Cでセレウリドを産生するが、至適温度は 20°C~30°Cとなっている。また、セレウリドの産生は大気中の酸素レベルが低下すると著しく損なわれる。酸素レベルが 1~2%以下の嫌気下ではセレウリドは産生されない。食品の組成もセレウリド産生に影響し、水分およびデンプンの含有量が多い非酸性の食品において最も多いセレウリドの蓄積がみられる。

4. エンテロトキシン

セレウス菌は様々なエンテロトキシンを産生するが、中でも非溶血性エンテロトキシン (Nhe)、溶血素 BL (Hbl)、サイトトキシン K (CytK)、および溶血素 II (Hly II) が最も重要なエンテロトキシンである。

Nhe および Hbl は相同な 3つのコンポーネントからなり、溶血および細胞障害活性を示す。一方、CytK および Hly II は 1つのコンポーネントからなる β チャネル形成毒素である。

セレウス菌が属する細菌では、嘔吐毒、殺虫毒、炭壊疽毒などはプラスミド上の遺伝子が決定因子となっている。しかし、エンテロトキシン遺伝子については染色体上に存在している。Nhe および Hbl はそれぞれ 3つの遺伝子のオペロン (*nheA/nheB/nheC*, *hblC/hblD/hblA*) にコードされている。また、CytK および Hly II はそれぞれ一つの染色体遺伝子 (*cytK*, *hly II*) にコードされている。その他、エンテロトキシン FM (*entFM*) 遺伝子およびエンテロトキシン T (*bceT*) 遺伝子がそれぞれセレウス菌からクローニングされている。このうち、EntFM は既知のエンテロトキシンと有意な相同性は見られないものの、細胞障害性と溶血性に寄与していることが示されている。一方、BceT は細胞障害性がなく、エンテロトキシンとして位置づけられるかは疑問である。

ces 遺伝子と異なり、エンテロトキシン遺伝子は高度の遺伝子多型を有し、セレウス菌株間で広く保有されている。特に *nhe* および *entFM* は主要なエンテロトキシン遺伝子であり、ほぼ全て (84~100%) のセレウス菌株が保有している。続いて *cytK* 遺伝子が 37~89%、*hbl* 遺伝子が 29~92%、*bceT* が 12~71%、*hly II* が 19~56%となっている。

下痢型の食中毒を引き起こす菌株はほとんどが複数のエンテロトキシンを産生するため、*in vivo*でのエンテロトキシン活性やそれらの相対的な重要性を示すのは非常に困難である。

エンテロトキシンは加熱調理や消化過程に感受性であるため、食品中のエンテロトキシン自体が下痢症状に関与することはおそくないと考えられる。エンテロトキシンは加熱 (55°C 20分)、酸 (pH3.1、37°C 20分)、およびペプシン、トリプシン、ケモトリプシンなどのプロテアーゼ活性により失活する。ただし、これらは実験用培地における結果であることに注意

が必要である。

5. エンテロトキシン遺伝子の発現制御

セレウス菌の細胞密度はホスホリパーゼ C 調節因子 (PlcR) クオラムセンシングシステムによって制御されている。PlcR は多くの毒性因子の発現調整にも関与しており、Hly II 以外のエンテロトキシン (Nhe、Hbl、CytK など) 遺伝子の発現を促進する。PlcR および多数の細菌数はエンテロトキシンの産生を促進するが、エンテロトキシン遺伝子の発現は細菌の増殖率や酸素濃度、栄養状態など様々な環境因子によって影響を受けるため一様ではない。

また、エンテロトキシンの産生レベルは菌株特有のばらつきによって変化する。病原性は菌株によって一義的に決まるわけではない。すなわち、ある特定の遺伝子や遺伝子多型を持たなくとも、高いエンテロトキシン遺伝子発現と細胞毒性を示す菌株が存在している。

下痢毒産生の至適温度は中温性および耐冷性菌ともに 30°C であり、最低温度は耐冷性菌株において 6°C となっている。また、中温性および耐冷性菌ともに培養温度が高いほどよりエンテロトキシンが多く産生される。ただし、温度の毒素産生への影響は一様ではなく、32°C と 10°C で毒素産生量が変わらない菌株も存在する。

嫌気性下では細菌の増殖は抑制されるものの、エンテロトキシンの産生は促進される。これは、*nhe* 遺伝子や *hbl* 遺伝子が酸素によってダウンレギュレートされるからである。エンテロトキシンが最もよく産生されるのは嫌気性下での対数増殖期である。

グルコースはエンテロトキシン産生に必須であり、至適濃度は約 10g/L である。グルコース濃度が 0.1 g/L 以下となるとエンテロトキシンは産生されない。一方、高濃度 (50g/L 以上) のグルコース存在下では、細菌の増殖は影響されないものの、エンテロトキシンの産生が阻害される。

また、pH もエンテロトキシンの産生に影響を及ぼすが、これは増殖率や栄養摂取といった別のパラメータに影響することで間接的に関与している。

6. 食品安全へのインプリケーション

<セレウリド>

セレウリドは非常に安定した毒素で、食品内で増殖した嘔吐型セレウス菌によって食品中に産生される。嘔吐型食中毒を避けるためには、温度管理によって毒素産生を防ぐことが必須である。食品は 55°C 以上に保つか、あるいはできるだけ早く冷却して 10°C 以下、理想的には 4°C 以下で保存することが求められる。それに加え、セレウリドによるコンタミネーションを防ぐことも重要である。pH5.6 以下、水分活性 0.953 以下、酸素濃度 2% 以下の包装、食品添加物ロイシンおよびバリンの除去または置換などが推奨される。

セレウス菌を同定する通常のプレーティング方法 (MYP および PEMBA) は溶血性およびレンチナーゼ活性に基づくため、非溶血性およびレンチナーゼ活性陰性の嘔吐型菌株を同定することができない。代替法として各種関連遺伝子をターゲットとしたリアルタイム PCR 法が確立されているが、全ての嘔吐型菌株共通のプライマー (すなわち *ces* 遺伝子の全ての遺伝子多型を検出できるもの) は現在のところ作られていない。

<エンテロトキシン>

下痢型セレウス菌による食中毒は、食肉、魚介類、シチュー、鶏肉、穀物、RTE食品、乳、サラダ、パスタなど、幅広い食品によって引き起こされる。こうしたことも、毒性やエンテロトキシン発現の制御が複雑であることを示唆している。

これまでセレウス菌によるエンテロトキシン発現に関与する栄養因子や環境因子を制御するための研究が数多くなされてきたが、共通する法則や相関関係は見つかっていない。一般的には、中性からアルカリ性の食品で、デンプンを多く含み、酸化還元能が低いものほど潜在的な脅威となりうる。これらの環境因子は食品あるいは小腸においてエンテロトキシン発現を促進する。ただし、エンテロトキシンは加熱調理や消化過程によって不活化されるため、食品中にあるエンテロトキシンは主要な懸念事項ではない。

耐冷性菌株の中には冷蔵庫内の食品中で大量のエンテロトキシンを産生するものがある。また、4℃で成長できる菌株はないものの、5℃あるいは10℃では成長できるものも存在する。

また、嫌気性下でエンテロトキシン産生が促進されることから、酸素を含まない、あるいは低酸素状態で食品を保存する方法である **modified atmosphere packaging (MAP)** によって、セレウス菌によるエンテロトキシン産生が促進される可能性がある。

7. 今後の課題

セレウリドの制御メカニズムについては十分に解明されていないため、*ces* 遺伝子の転写およびセレウリドの産生についてさらなる研究が求められる。一方、エンテロトキシン発現メカニズムについては転写因子レベルまで解明されている。しかし、食品中での毒素産生はおそらく食中毒とは関連性がないと思われるため、今後はヒトの腸内環境を模した状況下でのエンテロトキシン産生について研究することが求められる。

8. 結論

セレウス菌の毒素発現は複雑な制御を受けており、そのメカニズムは十分には解明されていない。また、菌株間の毒素発現の差についても明らかにされていない。

食品中の毒素産生セレウス菌の増殖を抑えることが嘔吐型、下痢型いずれの食中毒を予防するうえで重要である。冷蔵庫の温度を4℃以下に保つことが最も強力な食品安全管理方法であると推奨されている。さらに、食品を酸性にすることや水分活性を抑えることも細菌の増殖および毒素産生を抑制する方法として有効である。また、嫌気状態での包装はセレウリドの産生を抑えることには有効だが、一方でエンテロトキシンの産生を促進してしまう可能性もある。

Impact of Intestinal Microbiota and Gastrointestinal Condition on the *in vitro* Survival and Growth of *Bacillus cereus*

腸内細菌叢と胃腸管環境がセレウス菌の生体内での生存、増殖に与える影響

Abstract

摂取されたセレウス菌が胃腸管で生き延び、増殖して毒素を産生したときに下痢が引き起こされる。本実験では、*in vitro* で仮想の腸管を作り、そこでセレウス菌がどう生き延びられるか、また細菌叢とどのような関連があるかを調べた。その結果、腸内細菌数に加え、栄養や腸管の微生物群落組成もセレウス菌の増殖阻害に大きく影響を及ぼすことがわかった。

Introduction

セレウス菌が産生する下痢毒は熱や酸などに弱いため、下痢が引き起こされるためには、代謝的にアクティブなセレウス菌が胃の低 pH や消化酵素に耐え、腸内の他の細菌が密集する中で自身のスペースや栄養を獲得するなど様々な障害を乗り越えることで、小腸内でどの程度生き延びられるかが重要である。ヒトの腸管は個人差が大きく、またコストや倫理的な問題もあるが、近年では精巧な腸管モデルが作られているため、*in vivo* ではなく *in vitro* の実験でこれを調べた。

Materials and methods

2つの菌株を用い、仮想の胃・十二指腸空腸・回腸上行結腸・横行結腸・下降結腸の5箇所それぞれで多種の腸内細菌を導入し、それぞれの部位で温度、容積、菌の通過時間、pH、攪拌度合い、栄養組成などありとあらゆる条件を実際の健康なヒト腸管に似せてシミュレーションを行った。選択培地や下痢毒をターゲットとした PCR によってセレウス菌を定量した。

Results

胃環境では2時間当たり約 10^4 減少。約4時間ではほぼ死滅。芽胞は耐性を持った。

十二指腸環境では対数増殖期の菌ではじめに減少が見られたものの、通常は緩やかに増殖した。芽胞は1時間以内に発芽した。

回腸環境ではおそらく腸内細菌の影響でセレウス菌数が顕著に減少した。芽胞は発芽しないか、発芽して死滅した。腸内細菌との関連で、セレウス菌よりそれらが明らかに多い場合、進入したセレウス菌は数時間は増殖するものの、6時間以内には不活化し、24時間以内に消滅することがわかった。

Discussion and Conclusion

in vitro の本実験により、腸内細菌はセレウス菌との菌数の比によって、セレウス菌を死滅させるか、増殖を阻害するか、あるいはまったく影響を及ぼさないかが変わってくるのが明らかになった。したがって腸内細菌は進入した食中毒細菌に対する防御機構として働いている点できわめて重要なものである。このことは *in vivo* の実験ではすでに報告されている。まとめると、セレウス菌の栄養型細胞だけが胃通過時に酸により一部が不活化され、腸

管の物理化学的環境は栄養型も芽胞も増殖に適してはいるが、そうした影響よりも腸内細菌が排除的な圧をかける影響の方がはるかに大きいことが示された。

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

米飯中の催吐性 *Bacillus cereus* とその嘔吐毒素の検出

大阪市立大学大学院

西川 禎一

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 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

研究協力者 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：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℃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。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高感受性指標菌を開発・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。

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 の環状デプシペプチドである。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ので多く、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催吐性セレウスおよびセレウリドの検出方法が求められている。

催吐性セレウスの検出法として、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法は迅速鋭敏な手法として、近年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。

また、嘔吐毒素であるセレウリドを検出するには、HEp-2 細胞空胞変性試験が一般的であるが、熟練した技術が必要であり、結果を得るためには 4 日ほど要するため、簡便かつ迅速な検出法が望まれている。近年、高速液体クロマトグラフィー/質量分析計 (LC/MS) や高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) による高感度かつ定量性の高い検出法が報告されている[15-17]が、機器が高価であり汎用性に乏しいという問題がある。

そこで本研究では、まずリアルタイム 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。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。

B. 方法

1. 使用菌株

リアルタイム定量 PCR 法確立のための実験に、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、セレウリド非産生セレウス 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 株を供試した。

米飯中における催吐性セレウスの菌数、芽胞数、セレウリド量の経時的変化について調べるための実験に、催吐性セレウス 03-137-1 株を供試した。

セレウリド検出のための新規バイオアッセイ法の検討に、セレウリド産生菌株として催吐性セレウス BC1 (+) 株を用いた。指標菌として、セレウリド非産生セレウス 09-112-7、08-151-3、08-151-4、S0932F-1、09-59-1、09-80-9、09-75-22、以上 7 株、バリンマイシン感受性菌である *Enterococcus hirae*、*Enterobacter cloacae*、*Micorococcus luteus*、*Candida albicans*、以上 4 株、セレウス類縁菌である *Geobacillus stearothermophilus*、*Geobacillus thermoglucosidasius*、*Bacillus sporothermodurans*、*Bacillus coagulans*、納豆菌標準株 MI、TA、NA、市販納豆より分離した納豆菌 OK、NI、以上 9 株、バリンマイシン非感受性菌である *Escherichia coli* DH5a、以上 1 株、総計 21 株を供試した。

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。

TSA 重層培地 : トリプトソーヤ寒天培地 (日水製薬) 40 g を 1 l の蒸留水に加え溶解し、中試験管に 5 ml ずつ分注しアルミキャップをかぶせてオートクレーブ滅菌

した。滅菌後の TSA を 20 ml ずつシャーレに分注した平板も作製した。

TSA-KCl 重層培地 : トリプトソーヤ寒天培地 (日水製薬) 40 g を 1 l の蒸留水に加え溶解した後、塩化カリウム (ナカライテスク) を 200 mM、400 mM、600 mM、800 mM、1 M になるようにそれぞれ加え、中試験管に 5 ml ずつ分注しアルミキャップをかぶせてオートクレーブ滅菌した。

EMEM : 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 µl 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 µg/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・4Na 溶液 (フェノールレッド不含) (×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。

精製セレウリド溶液：精製セレウリド (バイオコントロール研究所、1mg 当量/ml) を用いた。

バリノマイシン溶液：バリノマイシン (和光純薬工業) 10 mg を 75%メタノール 10 ml に溶解した。

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・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×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。

水飽和酢酸エチル：酢酸エチル (和光純薬工業) 適量に水を適量加え、分液漏斗を用いて混合放置後、上層の酢酸エチル層を用いた。

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 μ 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 μ l 加え混合し、遠心分離 (15000 rpm、4 °C、10 分) した。

④ 上清 200 μ l にイソプロパノール 200 μ 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 μ 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 °C1 分、1 サイクル、PCR 反応 95 °C5

秒、66 °C31 秒、40 サイクルとし、融解曲

線解析は 95 °C15 秒、60 °C1 分、95 °C15

秒、1 サイクルで行った。

米飯存在下における 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 10⁶ 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

セレウリド溶液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で催吐性セレウスを接種培養した市販無菌包装米飯であり、セレウリドは以下の方法で抽出調製した。

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 µg になるように精製セレウリド溶液を添加した。

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 °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 °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 °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 細胞空胞変性試験に供した。

細胞培養・継代：HEp-2 細胞を 10 % FBS EMEM または DMEM で 25 cm² 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 細胞空胞変性試験：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 µl ずつ加え、CO₂ 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℃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)を行ない、生菌数に対する芽胞数から芽胞化の割合を算出した。

新規バイオアッセイ法の検討に用いるセレウス培養上清試料(セレウリド試料)の作製:

① BHI 液体培地で前培養した BC1 (+)、08-151-3、09-112-7 の 3 株をそれぞれ BHI-SM 培地に 300 μ l 接種し、振とう培養 (120 rpm、30 $^{\circ}$ C、15 時間) した。

② 各培養液を遠心管に移し、遠心分離 (8,000 rpm、室温、5 分) し、上清をフィルター滅菌したものを各菌株の培養上清試料とした。

BC1 (+) 培養上清試料、精製セレウリドおよびバリノマイシンに対する各指標菌の感受性スクリーニングならびに抗菌スペクトルの確認:

① TSA 重層培地 5 ml をボイル溶解し、BHI 培地にて 1 晩前培養した各指標菌液を 1 ml 加えてよく混和した後、TSA 上に流し固めた。

② ①の培地が固まりしだい、培地上に BC1 (+) 培養上清試料、精製セレウリド溶液あるいはバリノマイシン溶液を 5 μ l 滴下し、30 $^{\circ}$ C で一晩培養して各指標菌に対する増殖抑制効果(阻止円)が見られるかを観察した。

培地への KCl 添加による感受性増加作用の検討:

0 M から 1 M の KCl を加えた TSA 重層培地を用いて、精製セレウリドの指標菌に対する増殖抑制効果を観察した。

精製セレウリドおよびセレウス培養上清試料に含まれる抗菌活性物質の性質の確認:

① 精製セレウリドは 100 $^{\circ}$ C 15 分、または 121 $^{\circ}$ C 15 分間オートクレーブで加熱処理し、セレウス培養上清試料は、40 $^{\circ}$ C から 100 $^{\circ}$ C で 15 分間加熱処理した。

② ①の各試料を用いて、指標菌に対する増殖抑制効果を観察するとともに、HEp-2 細胞空胞変性試験を行った。

セレウス培養上清試料の濃縮:

① フィルター滅菌したセレウス培養上清試料に 1.5 倍量の水飽和酢酸エチルを加え、ホモジナイザーにて 1 分ホモジナイズした。

② 遠沈管に移し遠心分離 (12,000 rpm、室温、10 分) した。

③ 酢酸エチル画分である最上層をナス型フラスコに回収した後、エバポレーターを用いて濃縮乾固した。

④ 残渣に 75 %メタノールを 150 μ l 添加し、超音波処理により溶解して回収した。

C. 結果

1. 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。

2. 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 1.3×10^8 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 1.3×10^7 cfu/g、 10^2 倍希釈液では 5.2×10^5 cfu/g、 10^3 倍希釈液では 1.5×10^5 cfu/g、 10^4 倍希釈液では 2.0×10^4 cfu/g、 10^5 倍希釈液では 2.4×10^3 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 1.2×10^7 cfu/g、 10^2 倍希釈液では 9.2×10^5 cfu/g、 10^3 倍希釈液では 1.5×10^5 cfu/g、 10^4 倍希釈液では 2.0×10^4 cfu/g、 10^5 倍希釈液では 1.4×10^3 cfu/g、 10^6 倍希釈液では 7.7×10 cfu/g であった (図 3)。

セレウリド非産生 09-112-7 株を 3.7×10^7 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 6.3×10^6 cfu/g、102 希釈では 3.0×10^5 cfu/g、 10^3 希釈では 3.4×10^4 cfu/g、 10^4 希釈

では 8.7×10^3 cfu/g、 10^5 希釈では 3.6×10^3 cfu/g であった。CRS 遺伝子は検出されなかった。

3. 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)。

4. 平板培養法による生菌数および芽胞数

市販パックライスに 1.9 cfu/g 接種したセレウスは、12 時間後は 2.3×10^5 cfu/g、24 時間後は 3.1×10^6 cfu/g、48 時間後は 4.5×10^7 cfu/g、72 時間後は 7.8×10^7 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 8.0×10^4 cfu/g、72 時間後では 3.8×10^5 cfu/g となった (図 5)。

5. リアルタイム PCR による菌数

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

CRS 遺伝子の測定では、12 時間後は

6.5×10⁴ cfu/g、24 時間後は 8.5×10⁵ cfu/g、48 時間後は 1.8×10⁷ cfu/g、72 時間後は 3.7×10⁷ 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)。

6. 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。

7. 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 μg/g、72 時間後には 1.25 μg/g であった(図 5)。

8. セレウス培養上清試料、精製セレウリドおよびバリノマイシンに対する各指標菌の感受性と抗菌スペクトルの確認ならびに HEp-2 空胞化変性試験との相関性

セレウリド非産生セレウス 7 株を含む、総計 21 株を指標菌として BC1 (+) 培養上清試料を作用させると、21 株中 7 株で抗菌活性 (阻止円) が見られた。セレウリド非産生セレウスは培養上清試料に対して感受性が高い傾向を示したが、培養上清試料と精製セレウリドの抗菌活性が一致し

ない株があることから、類縁菌の中で感受性の高い *B. sporothermodurans* を以後の指標菌とした(表 3)。

9. 培地への KCl 添加による感受性増加作用

精製セレウリドは *B. sporothermodurans* に対して、KCl 無添加の TSA 重層培地に比べ、KCl を 200 mM から 1 M まで添加した TSA 重層培地においてより明確な阻止円を形成した。この結果から、以後の抗菌活性試験は 1M KCl を添加した TSA 重層培地を用いることとした。

10. 精製セレウリドおよびセレウス培養上清試料に含まれる抗菌活性物質の性質

精製セレウリドでは、100 °C 15 分および 121 °C 15 分の加熱処理をしても、*B. sporothermodurans* に対する抗菌活性と、HEp-2 細胞に対する空胞変性活性が認められた (表 4)。

一方セレウス培養上清試料について、BC1 (+) の培養上清試料は、加熱処理により HEp-2 細胞に対する空胞変性活性は残存したが、*B. sporothermodurans* に対する抗菌活性は消失した。08-151-3 は PCR によって CRS 遺伝子の存在が示されているが、その培養上清試料には、HEp-2 細胞に対する空胞変性活性および指標菌に対する抗菌活性がみられなかった。同様に、CRS 遺伝子陰性の 09-112-7 の培養上清では、HEp-2 細胞に対する空胞変性活性および指標菌に対する抗菌活性はみられなかった (表 5)。

BC1 (+) および 08-151-3 の培養上清中にはセレウリド以外の抗菌物質が含まれているか、あるいはセレウリド産生量が少ない可能性が考えられたため、培養上清からのセレウリドの抽出と濃縮を試みた。

1 1. セレウス培養上清試料の濃縮による抗菌活性の増加と性質の変化

BC1 (+) の培養上清濃縮試料には、HEp-2 細胞に対する空胞変性活性および抗菌活性がみられ、それらは 100 °C 15 分の加熱処理を行った後でも残存した。08-151-3 の培養上清濃縮試料についても同様に、HEp-2 細胞に対する空胞変性活性および抗菌活性が確認され、それらは 100 °C 15 分の加熱処理を行った後でもみられた。しかし、CRS 遺伝子陰性である 09-112-7 の培養上清試料は、濃縮しても HEp-2 細胞に対する空胞変性活性および抗菌活性はみられなかった (表 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 °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 Tm 値が 80 °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 °C から 66 °C に変更したところ、融解曲線は 79.3 °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 Tm 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 のプライマーは GC 含量が高いことから、CRS 遺伝子以上に Tm 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 Tm 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。Tm 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 Tm 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 μ g/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 μ g/g であったが、72 時間後には 1.25 μ g/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 $1 \mu\text{g}/\text{人}$ とされているので[18]、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。

新たなセレウリド検出法として、セレウリド感受性を示す菌株を用いたバイオアッセイ法の開発を検討した。セレウリド感受性を示す菌株の探索では、いくつかの感受性株を発見した。その中で *B. sporothermodurans* は培養上清試料と精製セレウリドのいずれに対しても感受性であり、この菌株を指標菌としてさらに検討を進めた。

B. sporothermodurans を培養する TSA 重層培地に KCl を添加することによって、精製セレウリドの抗菌活性が増加することを見出した。これは培地中にカリウムを添加することで、セレウリドのカリウムイオノホアとしての作用が発揮され菌の増殖を阻止したと考えられる。

次に、培養上清試料と精製セレウリドの抗菌活性がセレウリド以外の物質による可能性について検討した。セレウス培養上清にはセレウリド以外の物質が少なからず含まれていると考えられ、また、市販の精製セレウリドは、催吐性セレウスの培養上清を高度に精製・濃縮して作られており、セレウリド以外の不純物が含まれていることが確認されている。セレウスが産生す

る抗菌性物質としてバクテリオシンであるセレインが報告されている。セレウス Bc7、セレウス 8A が産出するセレイン 7、セレイン 8A の化学的な性質の評価によると、セレイン 7 は $100 \text{ }^\circ\text{C}$ の加熱と有機溶媒に対して耐性を持っているが、トリプシン、キモトリプシン、プロテイナーゼ K などのタンパク分解酵素処理を行うと、抗菌活性は不活性化する[19]。同様にセレイン 8A は $75 \text{ }^\circ\text{C}$ の加熱と有機溶媒に対して耐性を持っているが、タンパク分解酵素処理で不活性化する[20]と報告されている。これに対してセレウリドは熱に安定であることから、まず精製セレウリドについて、コンタミネーションの疑いがあるセレインを失活させる条件で加熱処理した後抗菌活性を評価した。その結果、 $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 分の加熱処理後も精製セレウリドは抗菌活性を保持したままであったので、精製セレウリドの抗菌活性はセレウリドによると考えられた。

一方、BC1 (+) 培養上清試料の抗菌活性は $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 加熱処理、消化酵素処理で失活した。しかし、加熱処理後も空胞変性活性は保持されていたので、セレウリド自身の変質による不活化はなかったと考えられる。そこで、BC1 (+) 培養上清の抗菌活性は少なくとも 2 種類の代謝物によって構成されていると考えた。1 つはセレウリド、2 つめは 50°C で失活する新規なセレインである。加熱後の BC1 (+) 培養上清が抗菌活性を示さなかった理由として、培養上清のセレインが加熱により失活したことと、抗菌活性を発揮するためにはより高濃度

のセレウリドが必要であることが挙げられる。そこでセレウス培養上清の濃縮を行った。セレウリドは疎水性であるので、水飽和酢酸エチルを用いて上清中のセレウリドを効率的に抽出し濃縮した。

濃縮した BC1 (+) 培養上清を 100℃で 15 分加熱処理しセレインの不活化を行った後に抗菌活性試験に供した。その結果、加熱処理後も抗菌活性を示した。また、HEp-2 細胞空胞変性活性も認められた。続いて陰性対照として 08-151-3 株および 09-112-7 株の培養上清について同様に調べた。08-151-3 株は CRS 遺伝子保有株ではあるが、HEp-2 細胞空胞変性試験において培養上清中には空胞活性を持つ物質が含まれていなかったため、セレウリド非産生株と判定していた。しかし培養上清の濃縮を行うことで、HEp-2 細胞空胞変性および抗菌活性試験の結果が陽転した。このことから、濃縮前の上清には少量のセレウリドが含まれていたが、HEp-2 細胞空胞変性試験でも検出できないほどの産生能であったと考えられる。一方 09-112-7 株は CRS 遺伝子を保有していないセレウリド非産生株のセレウスであり、濃縮後も HEp-2 細胞に対する空胞変性や、指標菌に対しての抗菌活性を示さなかった。

以上、HEp-2 細胞空胞変性試験と、指標菌に対する抗菌活性能に相関性がみられたことから、セレウリドは抗菌活性を有すると推察された。精製セレウリドの抗菌活性がセレウリドによるものだということがほぼ証明され、セレウス培養上清においても、有機溶媒による抽出と濃縮を行うこ

とにより、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た。今後は、セレインの関与を否定するためのさらなる検証と、より低濃度で抗菌活性を検出できるようにするために、BC1 (+) 培養上清や精製セレウリドに対して *B.sporothermodurans* よりも感受性の高かった、セレウリド非産生セレウスの 09-112-7 株を指標菌として検討することや、遺伝子組換えにより高感受性変異体株を作製することが必要である。これによって、これまでの煩雑な細胞の空胞変性試験によるバイオアッセイを簡便な抗菌活性試験に置き換えることが可能になる。

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。

また、今回検討したセレウリド感受性菌を用いた抗菌活性試験は、HEp-2 細胞の空胞変性試験に代わるバイオアッセイになりうると期待できる。今後その実用化に向けては、セレウリド高感受性菌の開発・探索が必要と考える。

F. 文献

1. Sasahara T, S Hayashi, Y Morisawa, T Sakihama, A Yoshimura, Y Hirai:
Bacillus cereus bacteremia outbreak due