

トリパンブルーは死細胞を青染するが生細胞を染色しない⁹⁾ので、染色された細胞が少ないことから、新型エンテロトキシンによって細胞が球形化し、細胞が外来性の色素を排除する能力を失うような機能的障害を受けると直ちに細胞が崩壊すると考えられた。

スピロフォルム菌が産生するイオタ毒素様毒素はSaとSbから成り立っている。Saは細胞質内に存在するG-アクチンの177位Arg残基をADPリボシル化することにより、アクチンフィラメントの形成を阻害し、細胞を円形化すると考えられている¹⁰⁾。国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部の解析により、コンポーネントaの作用によりニコチンアミドヌクレオチド(NAD⁺)からニコチンアミドが切断されることが分かっている。本研究での細胞毒性実験より、新型エンテロトキシンを添加すると細胞は球形化した後に細胞が崩壊する様子が観察された。従って、コンポーネントaの作用はアクチンフィラメントの形成を阻害し、細胞を円形化すると考えられる。細胞内アクチンを染色する等の実験を実施し、コンポーネントaの作用を明らかにさせる研究が望まれる。

組み換えコンポーネントaおよびコンポーネントbに対する抗血清を用いて、ウエスタンブロット解析をしたところ、W5052株の培養液中に、抗体が反応するタンパク質を確認した。さらに、新型エンテロトキシンの細胞致死毒性に対する中和試験を行った。抗血清aおよび抗a

精製IgG抗体によって、毒素の致死毒性が中和された。この結果は、W5052株は組み換えコンポーネントaと抗原的に同一のものを、産生していることを示し、毒力の面からもイオタ毒素様毒素の存在を証明したことを意味する。しかしながら、細胞毒性の中和には高濃度の血清およびIgG抗体が必要だった。一方抗血清bは、血清および精製IgG抗体を用いても、明瞭には細胞致死毒性中和を示さなかった。上述したように、毒素の作用は、まず細胞を球形化するところから始まる。抗体の効果を観察するには細胞致死毒性だけでなく毒素の球形化を誘導する作用について検討することが望まれる。

スピロフォルム菌が産生するイオタ毒素様毒素のSbは細胞に結合後、細胞膜上で7量体オリゴマーを形成し、これにSaが結合することによって生体内における毒素作用が開始される¹⁰⁾。ウエルシュ菌新型エンテロトキシンのコンポーネントbの作用もSbと同様である可能性があると考えられる。今回の実験では抗血清bを加えても抗体の効果が見られなかった。ウエスタンブロット法で抗血清bが結合するタンパク質が確認されていることから、中和効果が見られなかった原因として、コンポーネントbの作用機構が複雑なため抗体の作用を受け付けなかったことが考える。

ウエスタンブロット法よりウエルシュ菌W5052株にコンポーネントaとコンポーネントbタンパク質が含まれていることが明らかになった。コンポーネントa

は培養日数を変えてもバンドの濃さと太さがほぼ同じだった。また、コンポーネント a のバンドより下にバンドが見られなかった。抗体は分解物にも反応するため、コンポーネント a は培養 1 日ですでに産生が終了しており、その後分解されずに同じ濃度を保つことが考えられる。

コンポーネント b への抗体を用いてのブロッティング解析から、培養液には 3 本の主要バンドが確認された。中間の移動度を示すバンドは、活性化した組み換えコンポーネント b と同じ移動度（分子量 83000）を示した。このことは、培養液中に活性化したコンポーネント b タンパク質が含まれることを示している。

ウエルシュ菌は主要な毒素である α 、 β 、 ϵ 、 ι 毒素の産生能の違いにより A 型から E 型までの 5 型に分類されているが、ヒトに対して食中毒を起こすのは A 型だけである。しかし、A 型からはイオタ毒素は産生されない。さらに、新型エンテロトキシンのコンポーネント a および b は、スピロフォルム菌から産生されるイオタ毒素様毒素を構成する 2 つのコンポーネント a および b に相同性を示したが、ウエルシュ菌イオタ毒素には相同性を示さなかった（国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物室の解析による）。このことから新型エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌（W5052 株）は A から E の型のどこにも属さない新しい型のウエルシュ菌であると考えられる。

本研究により、当該のウエルシュ菌事例株が新型エンテロトキシンを産生して

いることが証明され、その細胞毒性として、細胞の球形化後に致死毒性を発揮する機構が推察された。各コンポーネントの組み換え体やその抗体を用いることにより、新型エンテロトキシンの細胞毒性発現メカニズムが明らかにされてゆくと考えられる。

食中毒検査時に、ウエルシュ菌が分離されたにもかかわらず、既知のエンテロトキシンが検出されないため、ウエルシュ菌食中毒と断定できなかった事例があることは想像に難しくない。本研究の成果などを基にして、新型エンテロトキシンの検出方法が開発され、ウエルシュ菌食中毒の疫学情報が刷新されることが望まれる。

E. 健康危害情報
なし。

F. 文献

- 1) 一色賢司(編)：食品衛生学 第3版、p69-70、東京化学同人、2010.
- 2) 山中英明、藤井建夫、塩見一雄(共著)：食品衛生学第三版、p47-50、恒星社厚生閣、2012.
- 3) 片平じゅん：細菌毒素ハンドブック、P167、(櫻井純、本田武司、小熊恵二編)、サイエンスフォーラム、2002.
- 4) 小久保彌太郎(編)：現場で役立つ食品微生物 Q&A 第2版、中央法規出版、2007.

- 5) 門間千枝:食品衛生研究 Vol.60 No.3、P15-23、2010.
- 6) 平成22年度厚生労働科学研究補助金「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」2011.
- 7) 平成23年度厚生労働科学研究補助金「食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究」2012.
- 8) 永浜政博、櫻井純:細菌毒素ハンドブック、P183、(櫻井純、本田武司、小熊恵二編)、サイエンスフォーラム、2002.
- 9) 小山秀機:組織培養の技術〔第二版〕日本組織培養学会編、p26、朝倉書店、1988.
- 10) 永浜政博・櫻井純:細菌毒素ハンドブック、P149-154、(櫻井純、本田武司、小熊恵二編)、サイエンスフォーラム、2002.

G. 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. 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. 2013年10月. 千葉.
- 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. 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. 2013

年10月. 千葉.

- 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. 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. 2013年10月. 千葉.
- 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. 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. 2013年10月. 千葉.

H. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得
なし。
- 2) 実用新案取得
なし。
- 3) その他
なし。

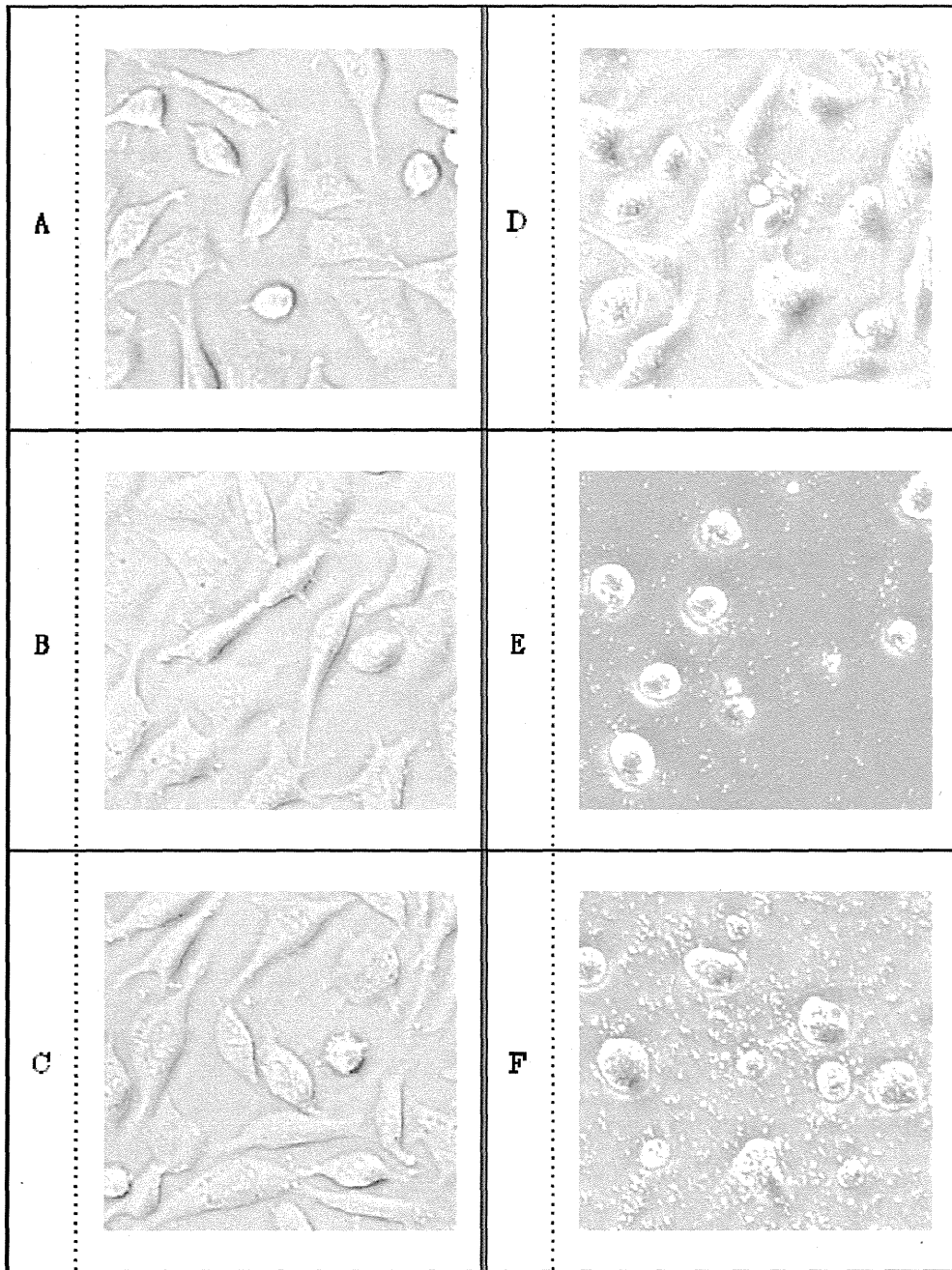


図1-1 ウエルシュ菌新型エンテロトキシンによるL929細胞の形態変化
 毒素を2~32倍に希釈した硫酸アンモニウム沈殿画分をL929細胞に添加後、細胞の
 形態変化の様子を観察した。

A: 毒素無処置、B: 毒素32倍希釈、C: 毒素16倍希釈、D: 毒素8倍希釈
 E: 毒素4倍希釈、F: 毒素2倍希釈

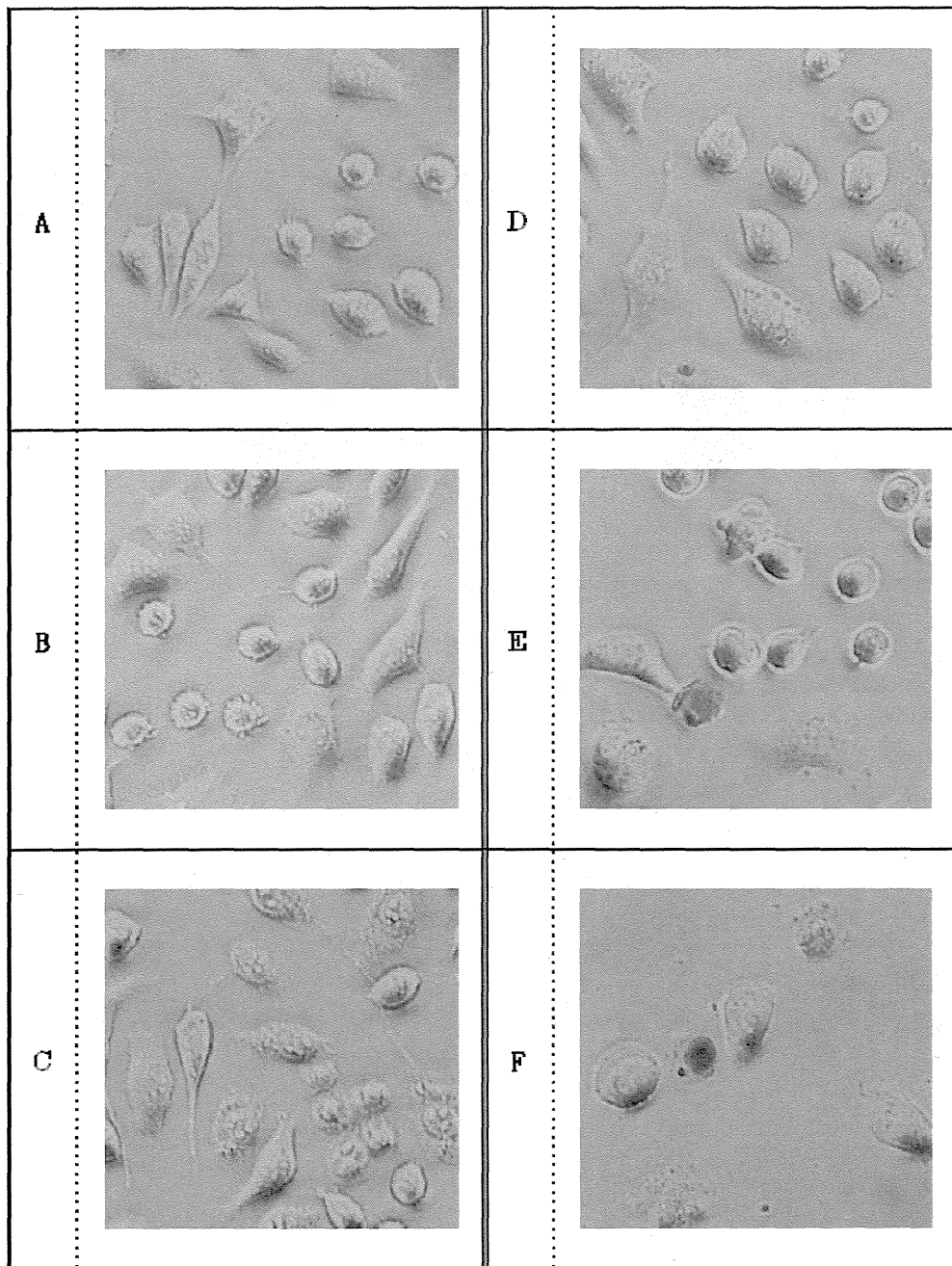


図1-2 新型エンテロトキシンによるL929細胞の形態変化(トリパンプルー染色)
 毒素を2~32倍に希釈した硫酸アンモニウム沈殿画分をL929細胞に添加後、トリパ
 ンプルー染色を施し、細胞の形態変化の様子を観察した。

A: 毒素無処置、B: 毒素32倍希釈、C: 毒素16倍希釈、D: 毒素8倍希釈

E: 毒素4倍希釈、F: 毒素2倍希釈

EおよびFに観察される染色された細胞が死細胞と判定される。

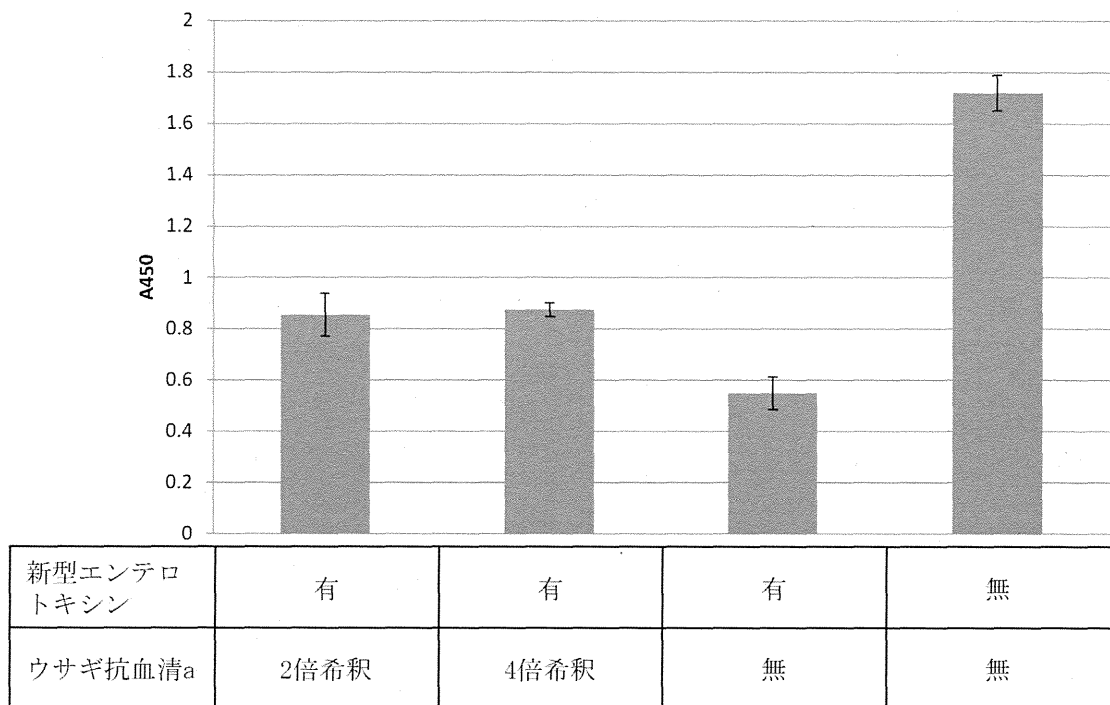


図 2-1 ウェルシュ菌新型エンテロトキシンの細胞毒性に対する中和試験:抗 a 血清の効果

L929 細胞に上記のように新型エンテロトキシンとウサギ抗血清 a を添加し、生細胞数判定キットの反応液の吸光度により細胞の生存数を表した。

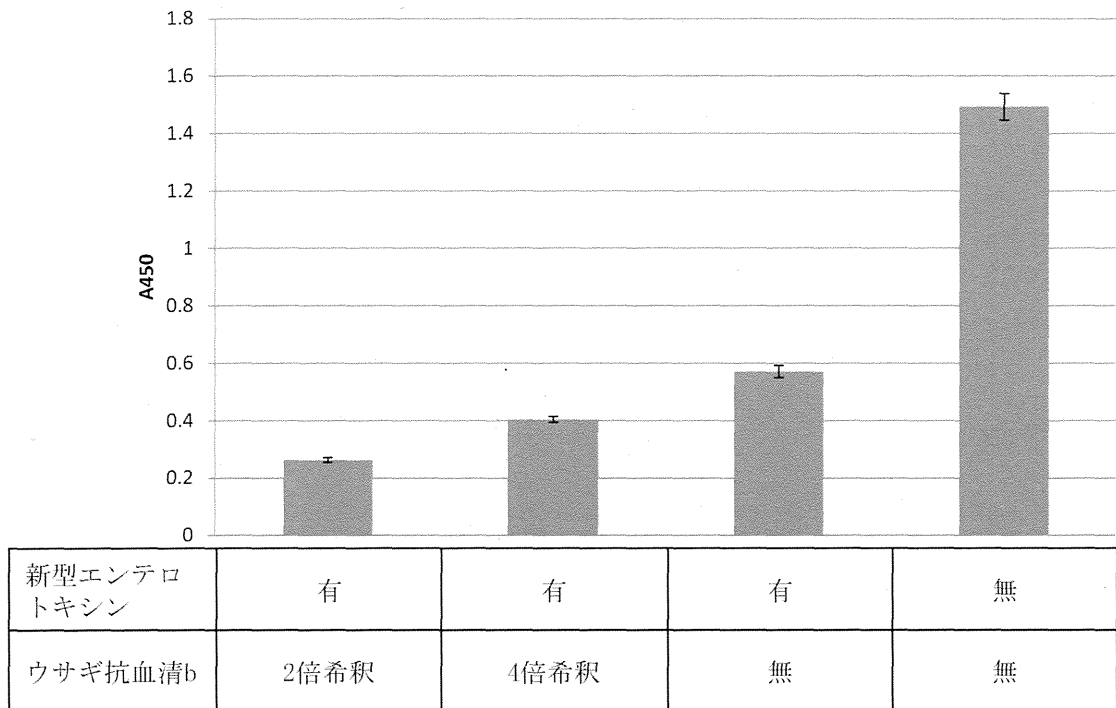


図2-2 ウェルシュ菌新型エンテロトキシンの細胞毒性に対する中和試験:抗b血清の効果

L929細胞に上記のように新型エンテロトキシンとウサギ抗血清bを添加し、生細胞数判定キットの反応液の吸光度により細胞の生存数を表した。

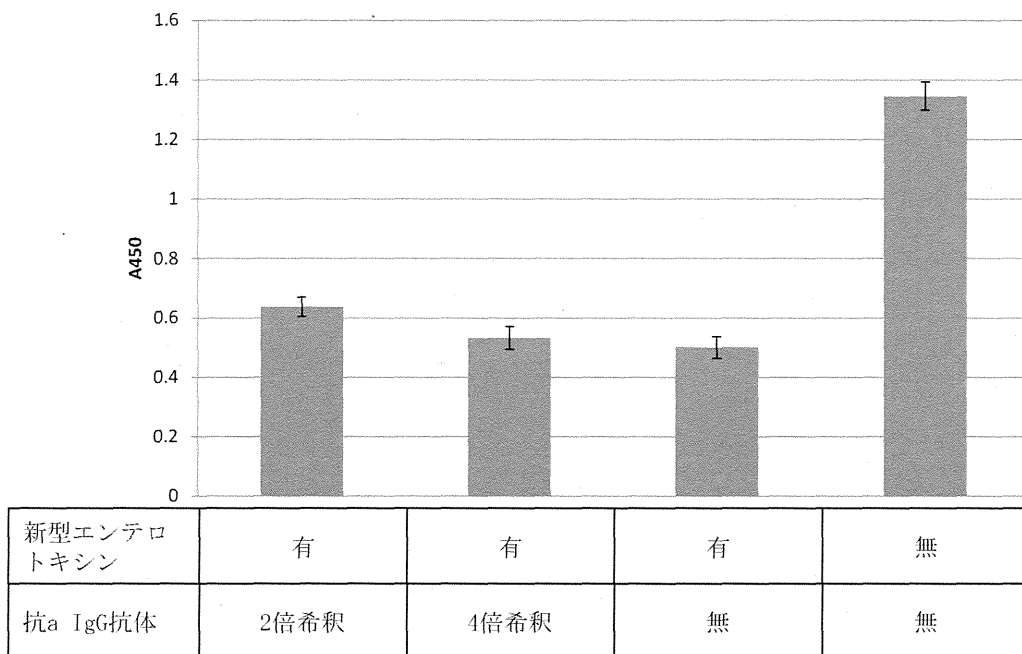


図3-1 ウェルシュ菌新型エンテロトキシンの細胞毒性に対する中和試験:抗 a IgG 抗体の効果

L929 細胞に上記のように新型エンテロトキシンと抗 a IgG を添加し、生細胞数判定キットの反応液の吸光度により細胞の生存数を表した。

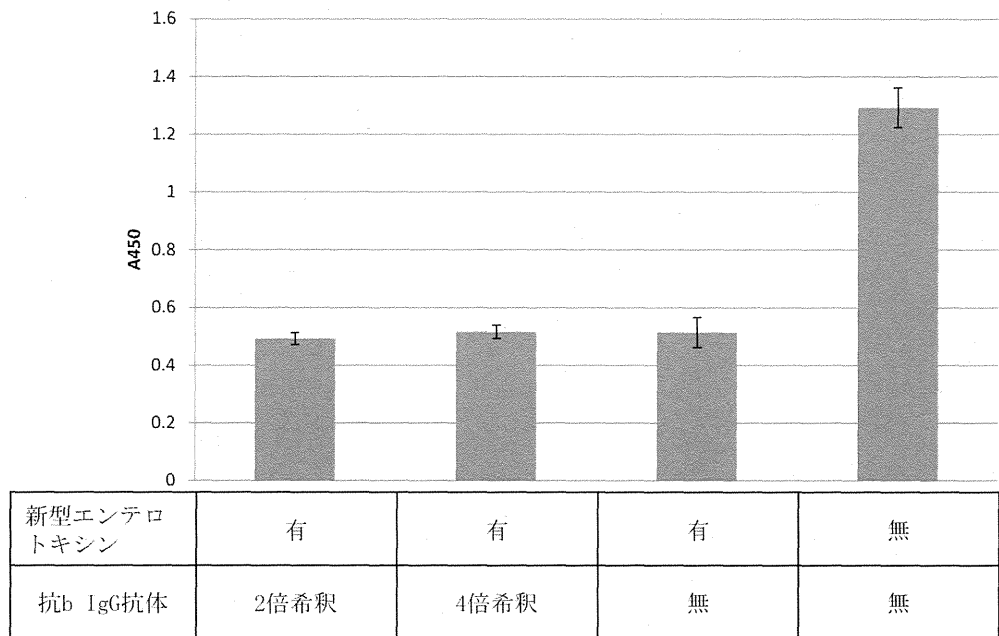


図3-2 ウェルシュ菌新型エンテロトキシンの細胞毒性に対する中和試験:抗b IgG 抗体の効果

L929 細胞に上記のように新型エンテロトキシンと抗b IgG を添加し、生細胞数判定キットの反応液の吸光度により細胞の生存数を表した。

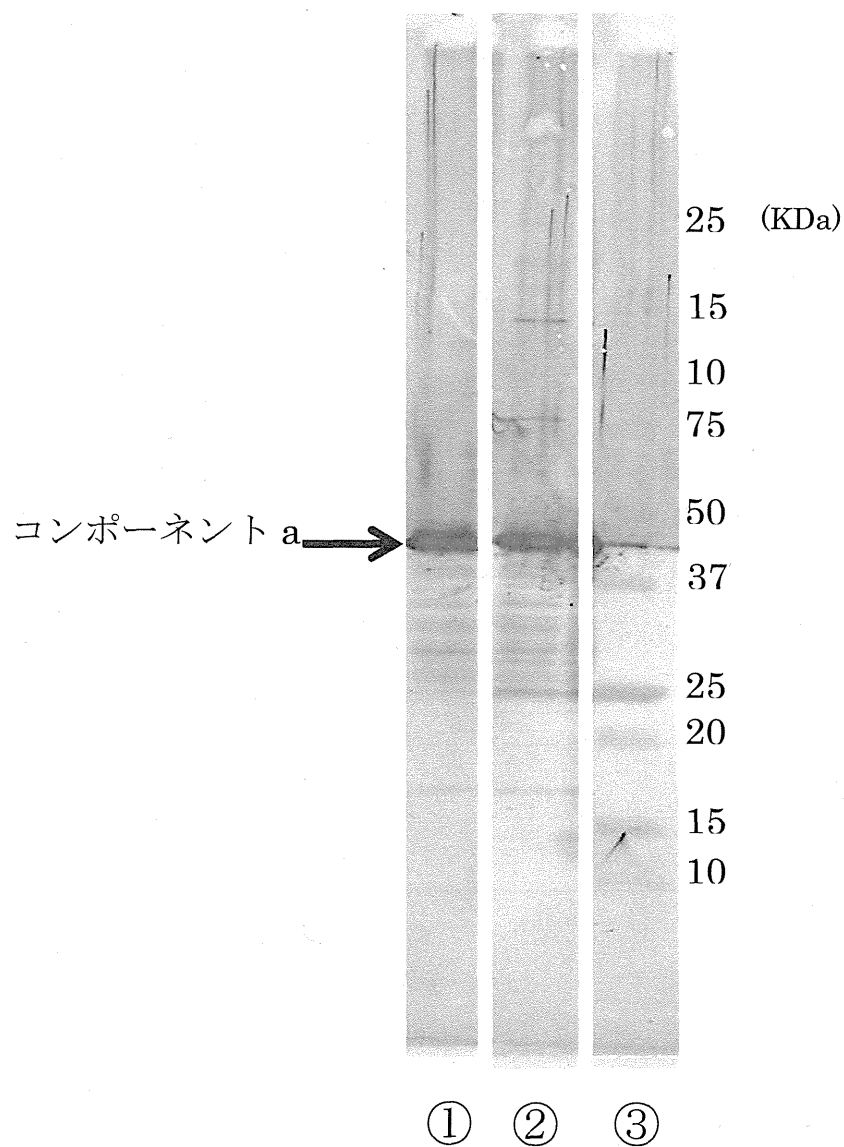


図4-1 ウェルシュ菌 W5052 株のコンポーネント a のウエスタンブロット像

方法6に従って、SDS 電気泳動を行った。分子量マーカとコンポーネント a の移動度からコンポーネント a の分子量を算出した。

- ①組み換え体 a、②ウェルシュ菌 W5052 株硫酸アンモニウム沈殿画分
- ③分子量マーカ

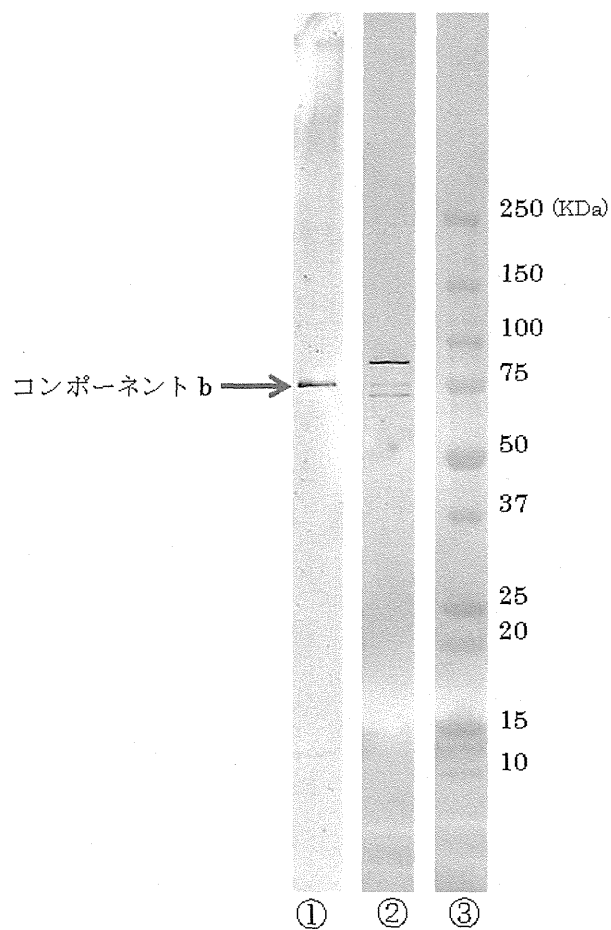


図4-2 ウェルシュ菌 W5052 株のコンポーネント b のウェスタンブロット像

方法6に従って、SDS 電気泳動を行った。分子量マーカーとコンポーネント b の移動度からコンポーネント b の分子量を算出した。

- ①組み換え体活性化 b、②ウェルシュ菌 W5052 株硫酸アンモニウム沈殿画分
- ③分子量マーカー

研究成果の刊行に関する一覧表

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.

Sensitivity of Hep G2 Cells to *Bacillus cereus* Emetic Toxin

Yoichi KAMATA^{1)*}, Shinji KANNO¹⁾, Noriko MIZUTANI¹⁾, Norio AGATA²⁾, Hiroshi KAWAKAMI³⁾, Kei-ichi SUGIYAMA¹⁾ and Yoshiko SUGITA-KONISHI¹⁾

¹⁾National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

²⁾Nagoya-city Public Health Research Institute, 1-11 Hagiyama-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8615, Japan

³⁾Kyoritsu Women's University, 2-2-1 Hitotubashi, Chiyoda-Ku, Tokyo 101-8437, Japan

(Received 31 December 2011/Accepted 26 May 2012/Published online in J-STAGE 8 June 2012)

ABSTRACT. We herein examined the sensitivity of Hep G2 human hepatoma cells to *Bacillus cereus* emetic toxin. Hep G2 cells were treated with the emetic toxin, and the cell shape was observed. The same experiments were performed for comparison purposes, using HEP-2 cells, which are currently used by most laboratories for a bioassay of the emetic toxin. Hep G2 cells showed clearer vacuolation in the cytosol within 2 hr and required a shorter incubation period than HEP-2 cells (10 hr). The number of vacuoles in the Hep G2 cells was greater, and the size of the vacuoles was larger than those observed in HEP-2 cells. The minimal concentration of the emetic toxin required to induce the vacuolation of Hep G2 cells was 0.04 ng/ml. The concentration for the HEP-2 cells was 1 ng/ml. These findings indicate that Hep G2 cells show higher sensitivity to the emetic toxin. Hep G2 cells may be superior to the currently used HEP-2 cells for the bioassay of the emetic toxin.

KEY WORDS: *Bacillus cereus*, emetic toxin, hep G2 cell, vacuolation.

doi: 10.1292/jvms.11-0581; *J. Vet. Med. Sci.* 74(11): 1483-1485, 2012

Bacillus cereus food poisoning is classified into two types; one presents diarrheal, and the other emetic syndromes. Diarrheal syndrome in *B. cereus* food poisoning is caused by enterotoxin, and vomiting is triggered by an emetic toxin [16]. Several fatal cases of the emetic type of food poisoning have been reported in Switzerland (1997, [11]), Japan (2009, [17]), and Belgium (2011, [13]). The emetic toxin is a dodecapeptide, with a molecular weight of 1153 [1]. The emetic toxin is a circular peptide and is heat stable, i.e. resistant to cooking.

HEP-2 is a human cell line derived from a larynx carcinoma [12]. Hughes *et al.* reported that the emetic toxin caused vacuolation in the cytosol of HEP-2 cells [8]. Agata *et al.* isolated and purified the emetic toxin, using the vacuolation phenomenon in the HEP-2 cells as a marker indicating the active toxic fractions [1]. Because of the ease of cell culture, the use of the vacuolation assay employing HEP-2 cells has become wide-spread [2, 14, 18]. Although a color-developing assay monitoring the cell-death ratio has been proposed, non-specific cell-death was noted due to mitochondrial damages, when using this assay [6]. However, the HEP-2 cell assay also has many disadvantages. For instance, long-term personal experience is needed to recognize the vacuoles in the cytosol. Vacuolation does not occur in all of the cells treated, even those treated with higher concentration of the emetic toxin: only 10 to 30% of the cells show vacuolation. These characteristics of the HEP-2 cell assay suggest that the protocol requires improvement to be clearer, to provide

more rapid results, and to be more convenient.

A direct cause of the fatal cases of *B. cereus* food poisoning was liver failure [11, 13, 17]. This finding indicated that the emetic toxin is hepato-toxic. The Hep G2 cell line is of human hepatoma origin [5]. We hypothesized that these liver cells would be useful for detecting the emetic toxin, and herein examined the sensitivity of Hep G2 cells to the emetic toxin.

The emetic toxin was purchased from Biocontrol Inc. (Nagoya, Japan), and the manufacturer indicated that the titer of the emetic toxin required to induce the vacuolation in HEP-2 cells was 1 ng/ml. The minimal effective concentration of the emetic toxin to induce vacuoles in HEP-2 cells was 0.5 to 2.0 ng/ml under our experimental conditions. The HEP-2 cells used in our study were kindly provided by Dr. Shigeo Ueda (Kagawa Nutrition University, Saitama, Japan). Hep G2 cells were purchased from the Human Science Foundation (Tokyo, Japan). HEP-2 cells were maintained in Basal Medium Eagle (BME, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Valley Biomedical, Winchester, VA, U.S.A.) and non-essential amino acids (Sigma). Hep G2 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle MEM (DMEM, Sigma) containing 10% FBS. Both cell lines were seeded into 25-cm² flasks at 1×10^6 cells/flask, and then were incubated in a CO₂-incubator. The cells were used 2 days after seeding.

The bioassays using HEP-2 cells or Hep G2 cells were performed according to the previously reported method [1, 18]. Briefly, 25 μ l of BME or DMEM was placed in every well of 96-well culture plates. A 1- μ l aliquot of the emetic toxin (1 mg/ml in 75% methanol containing 250 mM KCl) was added into the first well containing 49 μ l of the medium, and the solutions were mixed. Thereafter, 25 μ l of the mixture was transferred to the neighboring well, mixed,

*CORRESPONDENCE TO: KAMATA, Y., National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. e-mail: ykamata@nihs.go.jp

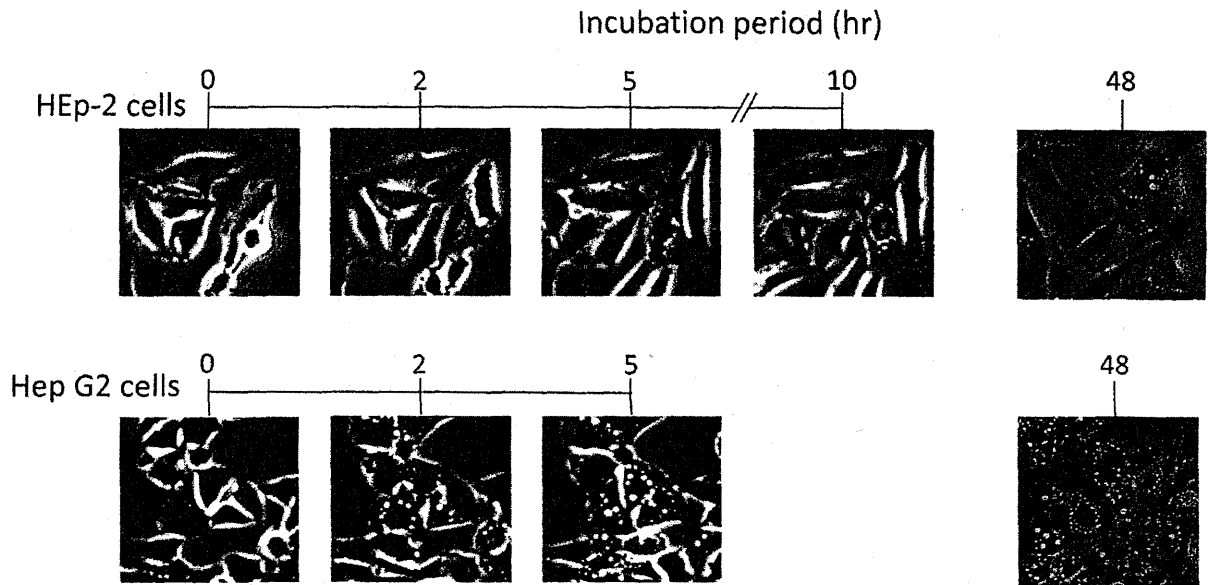


Fig. 1. The time course of the morphological changes of the HEP-2 and Hep G2 cells after treatment with *B. cereus* emetic toxin at 10 ng/ml. The suspended cells were seeded into 35-mm culture dishes, and incubated overnight. After *B. cereus* emetic toxin was added, the cells were recorded for changes in their shape every 15 min. Because the microscopic angle was fixed, individual cells could be consistently identified. The vacuolation caused by exposure to *B. cereus* emetic toxin (10 ng/ml) was independently recorded in HEP-2 (Panel A) and Hep G2 cells (Panel B) 48 hr after treatment. The bar shows 50 μ m.

Table 1. Sensitivity of Hep G2 cells to *Bacillus cereus* emetic toxin

Day after Seeding	Cell conc. ($\times 10^6$ cells/flask)		Minimal Dose of Toxin* (ng/ml)	
	Range	Median	Range	Median
1	1.0-1.3	1.1	2.4-9.8	4.4
2	1.9-2.2	2.0	0.01-0.08	0.04
3	3.1-4.1	3.8	0.6-2.4	1.4
4	5.3-6.5	5.8	2.0-4.9	3.0

Hep G2 cells were seeded into a 25-cm² flask at 1.0×10^6 cells/flask. Five flasks were used for each experiment day. * The minimal effective dose of *B. cereus* emetic toxin inducing vacuolation in Hep G2 cells.

and transferred repeatedly in the same way. The cells were harvested daily after seeding, the cellular concentration was counted, and then the cells were used for a bioassay to evaluate the sensitivity of the cells to the emetic toxin. Freshly suspended Hep G2 or HEP-2 cells (1×10^5 cells/ml) in BME or DMEM containing 1% FBS were added into wells at 100 μ l/well. The plates were then incubated in a CO₂ incubator at 37°C. The cells were photographed 24 or 48 hr after toxin treatment. More than 100 cells were counted, and their vacuoles were identified on the photographs.

The HEP-2 and Hep G2 cells treated with the emetic toxin were observed under a Cell Observation Module (Model MCOK-F110-AS, Sanyo, Osaka, Japan), which has a fixed microscopic view. The module was placed in a CO₂ incubator, and was controlled with the software program provided by the manufacturer.

The emetic toxin was added into the 35-mm culture dishes containing attached HEP-2 and Hep G2 cells. Next, the

shape of both cell lines was recorded every 15 min at a fixed angle. Small and unclear vacuoles appeared in the cytosol of HEP-2 cells 5 hr after toxin treatment. The vacuoles became clearer and typical after a 10-hr treatment period (Fig. 1). On the other hand, the shape of the Hep G2 cells changed more quickly. Clear and distinctive vacuoles were found only 2 hr after addition of the toxin. The vacuoles in the Hep G2 cells were larger, and the number of vacuoles was increased in comparison to those of the HEP-2 cell. Only 2 to 5% of the HEP-2 cells were vacuolated after 12 hr of treatment, while 25 to 60% of the Hep G2 cells were vacuolated after 12 hr. After a 24-hr incubation, the vacuolation rate of the HEP-2 cells was 20 to 30%, and that of the Hep G2 was 60% or more. The number of vacuole-bearing cells in the well containing Hep G2 cells was also higher than that in the HEP-2 cells 48 hr after toxin treatment (Fig. 1, panels A and B). Therefore, at all time points examined, the number of vacuoles in the Hep G2 cells was higher, and the vacuoles

were larger and more clearly distinguishable than those of HEp-2 cells.

The minimal concentration of the emetic toxin required to induce vacuoles in the HEp-2 cells prepared 2 days after seeding ranged from 0.5 to 2 ng/ml. The minimal effective concentration for Hep G2 cells was examined every day after the seeding of the cells. The concentrations were changed, depending on the cell number (Table 1). On day 2 after seeding, the cell concentration reached 2×10^6 cells/flask, and a small amount of the toxin was observed to induce vacuoles in the Hep G-2 cells: namely, a concentration range from 0.01 to 0.08 ng/ml, with a median of 0.04 ng/ml, was able to induce vacuoles formation. On days 3 and 4, the cells proliferated, and the minimal effective concentrations were found to be higher than those on day 2.

There are several methods that can be used to detect and quantify the concentration of emetic toxin, such as LC/MS [4, 7], bore sperm [3, 9, 15], isolated mitochondria [10], and cultured cells [2, 14, 18]. Each method has advantages and disadvantages; cost, required skill level of the technician, maintenance, difficulty to perform, time required for results, etc. For example, LC/MS instruments are expensive, rats have to be sacrificed to prepare isolated mitochondria, and bore sperms are generally unfamiliar to inspectors working in the laboratories examining food poisoning. Due to the ease of performing, and to the low cost, bioassays using cultured cells should be considered. The Hep G2 cells were found to show useful properties to detect and quantify the emetic toxin. The higher sensitivity of Hep G2 cells to the emetic toxin might contribute to the development of a new bioassay. Furthermore, because the Hep G2 cell line was established from human hepatoma, these cells might be useful to study liver failure resulting from exposure to the emetic toxin.

ACKNOWLEDGMENT. This study was supported by a Health Sciences Research Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

REFERENCES

1. Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwa, S., Ohtani, I. and Isobe, M. 1994. A novel dodecapeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**: 31–34. [Medline]
2. Agata, N., Ohta, M. and Yokoyama, K. 2002. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *Int. J. Food Microbiol.* **73**: 23–27. [Medline] [CrossRef]
3. Andersson, M. A., Jääskeläinen, E. L., Shaheen, R., Pirhonen, T., Wijnands, J. M. and Salkinoja-Salonen, M. S. 2004. Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. *Int. J. Food Microbiol.* **94**: 175–183. [Medline] [CrossRef]
4. Biesta-Peters, E. G., Reji, M. W., Blaauw, R. H., In 't Velt, P. H., Rajkovic, A., Ehling-Schulz, M. and Abee, T. 2010. Quantification of the emetic toxin cereulide in food products by liquid chromatography-mass spectrometry using synthetic cereulide as a standard. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 7466–7472. [Medline] [CrossRef]
5. Diamond, L., Kruszewski, F., Aden, D. P., Knowles, B. B. and Baird, W. M. 1980. Metabolic activation of benzo(a)pyrene by a human hepatoma cell line. *Carcinogenesis* **1**: 871–875. [Medline] [CrossRef]
6. Finley, W. J., Logan, N. A. and Sutherland, A. D. 1999. Semi-automated Metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1811–1812. [Medline]
7. Hormazábal, V., Østenvik, Ø., O'Sullivan, K. and Granum, P. E. 2004. Quantification of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in figs using LC/MS. *J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol.* **27**: 2531–2538. [CrossRef]
8. Hughes, S., Bartholomew, B., Hardy, J. C. and Kramer, J. M. 1988. Potential application of a HEp-2 cell assay in the investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. *FEMS Microbiol. Lett.* **52**: 7–11. [CrossRef]
9. Jääskeläinen, E. L., Teplova, V., Andersson, M. A., Andersson, L. C., Tammela, P., Andersson, M. C., Pirhonen, T. I., Saris, N.E. L., Vuorela, P. and Salkinoja-Salonen, M. S. 2003. *In vitro* assay for human toxicity of cereulide, the emetic mitochondrial toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*. *Toxicol. In Vitro* **17**: 737–744. [Medline] [CrossRef]
10. Kawamura-Sato, K., Hiramata, Y., Agata, N., Ito, H., Torii, K., Takano, A., Hasegawa, T., Shimomura, Y. and Ohta, M. 2005. Quantitative analysis of cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, by using rat liver mitochondria. *Microbiol. Immunol.* **49**: 25–30. [Medline]
11. Mahler, H., Pasi, A., Kramer, J. M., Schulte, P., Scoging, A. C., Bar, W. and Krahenbuhl, S. 1997. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *N. Engl. J. Med.* **336**: 1142–1148. [Medline] [CrossRef]
12. Moore, A. E., Sabachewsky, L. and Toolan, H. W. 1955. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.* **15**: 598–602. [Medline]
13. Naranjo, M., Denayer, S., Botteldoorn, N., Delfrassinne, L., Veys, J., Waegenaere, J., Sirtaine, N., Driesen, R. B., Mahillon, J. and Dierick, K. 2011. Sudden death of a young adult associate with *Bacillus cereus* food poisoning. *J. Clin. Microbiol.* **49**: 4379–4381. [Medline] [CrossRef]
14. Nishikawa, Y., Kramer, J. M., Hanaoka, M. and Yasukawa, A. 1996. Evaluation of serotyping, biotyping, plasmid banding pattern analysis, and HEp-2 vacuolation factor assay in the epidemiological investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* **31**: 149–159. [Medline] [CrossRef]
15. Rajkovic, A., Uyttendaele, M. and Debevere, J. 2007. Computer aided boar semen motility analysis for cereulide detection in different food matrices. *Int. J. Food Microbiol.* **114**: 92–99. [Medline] [CrossRef]
16. Schoeni, J. L. and Wong, A. C. L. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning. *J. Food Prot.* **68**: 636–648. [Medline]
17. Shiota, M., Saitou, K., Mizumoto, H., Matsusaka, M., Agata, N., Nakayama, M., Kage, M., Tatsumi, S., Okamoto, A., Yamaguchi, S., Ohta, M. and Hata, D. 2010. Rapid detoxication of cereulide in *Bacillus cereus* food poisoning. *Pediatrics* **125**: e951–e955. [Medline] [CrossRef]
18. Szabo, R. A., Speirs, J. I. and Akhtar, M. 1991. Cell culture detection and conditions for production of a *Bacillus cereus* heat-stable toxin. *J. Food Prot.* **54**: 272–276.

＝調 査＝

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

涌嶋三津子^{*1,†}・西川景子^{*1}・泉 秀実^{*2}
鎌田洋一^{*3}・西川禎一^{*1}

(^{*1} 大阪市立大学大学院生活科学研究科, ^{*2} 近畿大学生物理工学部,

^{*3} 国立医薬品食品衛生研究所)

(受付: 平成24年6月20日)

(受理: 平成24年7月 3日)

Thermal Resistance of Flat Sour Spoilage Bacteria Isolated from Food Ingredient of Retortable Pouched Corn Soup and the Control by Intermittent Sterilization

Mitsuko WAKUSHIMA^{*1}, Keiko NISHIKAWA^{*1}, Hidemi IZUMI^{*2},
Yoichi KAMATA^{*3} and Yoshikazu NISHIKAWA^{*1}

(^{*1} Graduate School of Human Life Science, Osaka City University, Sugimoto, Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8585; [†] Corresponding author)

(^{*2} Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Nishimitani, Kinokawa, Wakayama 649-6493)

(^{*3} National Institute of Health Sciences, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501)

緒 言

レトルト食品は缶詰に代わる簡便な保存食品として1950年代に研究開発が始まり、普及してきた。その国内生産量は年間約30万トンで、右肩上がりが増加しており今後も伸び続けると予想される。レトルト食品には「そのpHが4.6を超え、かつ、水分活性が0.94を超える容器包装詰加圧加熱殺菌食品にあっては、中心部の温度を120℃で4分間加熱する方法又はこれと同等以上の効力を有する方法であること」が食品衛生法で定められている。しかしながら、残存する耐熱性細菌芽胞が保管中に発芽増殖し、ガスを産生せずに酸を産生することで、酸味を呈するフラットサワー型変敗（以下フラットサワー）を引き起こすことをCameronらが報告した¹⁾。以後、アスパラガス缶詰や濃縮牛乳において発生の報告が

ある^{3,4)}。原因菌としては低酸性食品の場合は *Geobacillus stearothermophilus* が、酸性食品の場合は *Bacillus coagulans* が知られている⁵⁾。すなわち、上記の加熱殺菌条件だけでは、食品衛生法の容器包装詰加圧加熱殺菌食品の製造基準の「原材料に由来して当該食品中に存在し、かつ、発育しうる微生物を死滅させるのに十分な効力を有する方法であること」を達成できない場合があることが判明している。

A食品会社が試験的に自社製レトルトパウチ詰コーンスープ製品（以下コーンスープ）を、夏季には室温が極めて高くなるトタン張り簡易建屋に半年以上保管していたところ、コーンスープは官能試験で酸味を呈し、フラットサワーが発生した。そこで、本研究ではフラットサワーが発生したコーンスープの原材料についてフラットサワー菌芽胞数の測定と分離菌の同定を試みた。また、分離菌株の芽胞の耐熱性を調べ、間欠滅菌法³⁾を併用することにより、加圧加熱殺菌条件を厳しくすることなくフラットサワーのリスクを低減できるか否かについて、基礎的検討を行った。

[†] 連絡先

^{*1} ☎ 558-8585 大阪市住吉区杉本3-3-138

^{*2} ☎ 649-6493 和歌山県紀の川市西三谷930

^{*3} ☎ 158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

材料および方法

1. 供試材料

フラットサワーが発生したコーンスープ（容器外寸法：120×190 mm, pH 6.4）と同一ロットの原材料であるコーンペースト（ペースト状液体）、てりやき粉（粉末）およびホワイトルウ（ペースト状）を用いた。

2. 使用培地および希釈液の調製

1) Dextrose Tryptone Agar（以下DTA）

Bacto Tryptone Pancreatic Digest of Casein (Becton Dickinson, 以下BD) 10 g, ブドウ糖（無水, 和光純薬工業）5 g, プロモクレゾールパープル（和光純薬工業）0.04 g, 寒天粉末（和光純薬工業）12 gを純水1,000 mlに混合した後、オートクレーブで滅菌（121℃, 15分, 以下同じ）した。

2) Dextrose Tryptone Broth培地（以下DTB）

DTAと同組成で寒天を加えずに調製し、中試験管に10 mlずつ分注しアルミキャップで栓をして、オートクレーブで滅菌した。

3) 0.3% 酵母エキス添加普通寒天培地（以下YNA）

Nutrient broth (OXOID) 10 g, 酵母エキス (OXOID) 3 g, 寒天粉末（和光純薬工業）20 gを純水980 mlに混合し、オートクレーブで滅菌した後、以下のA液およびB液を各10 mlずつ加え、よく混合してから20 mlずつシャーレに分注し、平板にした。

A液：塩化マンガン(II) 四水和物（和光純薬工業）2.5 g, 硫酸マグネシウム七水和物（ナカライテスク）25 g, 硫酸鉄(II) 七水和物（和光純薬工業）30 mgを0.01 N塩酸（和光純薬工業）1,000 mlに混合し、オートクレーブで滅菌した。

B液：塩化カルシウム二水和物（和光純薬工業）15 gを0.01 N塩酸（和光純薬工業）1,000 mlに混合し、オートクレーブで滅菌した。

4) リン酸緩衝生理食塩水（以下PBS）

リン酸二水素カリウム（和光純薬工業）34 gを純水500 mlに溶解後、1 N水酸化ナトリウム（和光純薬工業）溶液175 mlを加え、純水で全量を1,000 mlとして、pH 7.2に調整した。これを原液として冷蔵保管し、使用時には原液1 mlを純水800 mlに混合し、塩化ナトリウム（和光純薬工業）を0.85% (w/v) となるように加えてオートクレーブで滅菌した。

3. 供試材料のフラットサワー菌芽胞数の測定

供試材料約10 gを滅菌ストマフィルター（Sタイプ：GSIクレオス）に採り、System Diluter (IUL, S.A Barcelona, Spain)でPBSを10倍希釈量加えた。これをマステイケーター (IUL) で90秒間よく混和させ、沸騰水中で30分間加熱処理し、試料液とした。試料液は以下の測定に供した。

1) 平板培養法

試料液2 mlずつを滅菌シャーレ10枚に加えDTA

18 mlで混積し、平板にした。これら平板10枚は5枚を37℃で、残りの5枚を55℃で3日間培養した。培養後、平板5枚当たりの黄色集落を計数し、供試材料1 gに含有するフラットサワー菌芽胞数とした。

2) MPN法

試料液10 ml, 1 ml, 0.1 mlを各3本のDTBに接種し、55℃で3日間培養した。ただし、10 mlを接種する場合には2倍濃縮のDTBを用いた。DTBが黄変した場合にはその1白金耳をDTAに画線し、55℃で3日間培養した。黄変した集落が形成された場合を陽性とした。希釈3段階の各3本のDTBの陽性本数から最確数表により供試材料1 g当たりのフラットサワー菌芽胞数を求めた。

4. 供試材料からのフラットサワー菌の分離と同定

フラットサワー菌が検出された供試材料のDTA平板から1菌株ずつ分離し、DTBで純培養した。分離菌株の菌種の同定はMicroSeq法⁹⁾で行い、MicroSeq Microbial Identificationを使用して、供試菌株の16S rRNA遺伝子の5'末端側500 bpの塩基配列を決定した。得られたデータは、MicroSeqシステム (Applied Biosystems: MicroSeq[®] ID Analysis v2.0) でホモロジー検索を行った。

5. 供試材料から分離した菌株の芽胞形成と耐熱性

1) 供試菌株の芽胞懸濁液の作製

供試菌株をDTBに接種し、55℃で1日間培養した後、その培養液0.3 mlをYNAに添加し滅菌コンラージ棒で塗抹した。これらの平板は55℃で4日間培養した後、平板表面の菌苔を白金耳で回収しYNA 1枚分を0.5 mlのPBSに懸濁し、20分間煮沸して栄養細胞を死滅させ、芽胞懸濁液とした。芽胞懸濁液の10⁶倍までの10段階希釈液をPBSで希釈して作製し、各段階希釈液を2枚の平板に1 mlずつ分注し、それぞれをDTA 19 mlで混積した。これら平板は55℃で3日間培養し、集落を30～300 CFU計数できた希釈段階における平板2枚の集落数平均値を生残芽胞数とした。この集落計数の方法を以下、混積平板法と示す。芽胞懸濁液の初発芽胞数は、コーンペースト由来株が2.0×10⁸ CFU/ml、てりやき粉由来株が1.1×10⁸ CFU/mlであった。芽胞懸濁液は-45℃で凍結保存した。

2) 芽胞の耐熱性の測定

供試菌株の芽胞懸濁液をPBS 15 mlで10⁶ CFU/mlになるよう希釈し、その1 mlずつをTDTチューブ（内径4 mm, 外径7 mm, 長さ100 mm; マルエム）に分注した。開口部は回転式自動アンプル溶封器（マルエム）を用いて溶封した。これらは恒温油槽（EYELA OHB-2000, シリコンオイル）を用いて、コーンペースト由来株については115℃で15, 30, 45, 60, 75, 90分間、118℃で10, 20, 30, 40, 50, 60分間および120℃で5, 10, 15, 20, 25, 30分間の加熱処理を行い、てりやき粉由来株については120℃で1, 2, 3, 4, 5, 6分間の加熱処理を行った。加熱処理後のTDTチューブはガラス管切で切断し、混積平

板法で生残芽胞数を求め、生残曲線を作成した。なお、加熱処理をしていないものを加熱時間0分のデータとした。生残曲線からD値を、加熱致死時間曲線からz値を求めた⁷⁾。

6. 供試菌株の芽胞の発芽時間の検討

分離菌株の間欠煮沸による滅菌を検討するうえで、最も発芽率が高い培養時間を検討した。供試菌株の芽胞数が 10^6 CFU/mlになるよう芽胞懸濁液をDTB 10 mlに添加し1 mlずつマイクロチューブ (greiner bio-one, 1.5 ml容) に分注して55°Cで12, 18, 24時間培養した。所定の条件で培養したチューブは直ちに沸騰水中で20分間煮沸し栄養細胞を死滅させた後、混釈平板法で集落を計数し生残芽胞数を求めた。初発芽胞数と加熱後の生残芽胞数の差をもって発芽芽胞数とした。また、各培養条件のチューブは2本ずつ用意し、その平均値を結果に用いた。

7. 供試菌株の間欠煮沸による芽胞の滅菌法の検討

芽胞数が 10^6 CFU/mlになるよう供試菌株の芽胞懸濁液をDTBおよびコーンスープ (フラットサワーが発生した製品と別ロットの製品) 15 mlに添加し、1 mlずつをマイクロチューブに分注した。これらのチューブは発芽促進のため沸騰水中で20分間加熱処理して55°Cで24時間培養し、さらに培養後沸騰水中で20分間加熱処理する間欠煮沸を3日間繰り返した。各加熱処理後の試料の生残芽胞数を、混釈平板法を用いて調べた。

結 果

1. 供試材料中のフラットサワー菌芽胞数測定

供試材料のフラットサワー菌芽胞数の測定結果をTable 1に示した。供試材料中のフラットサワー菌芽胞は55°C培養でのみ検出された。コーンペーストおよびてりやき粉中の芽胞数は、平板培養法ではそれぞれ11 CFU/g, 3 CFU/gで、MPN法ではいずれも2.3 MPN/gであった。ホワイトルウからフラットサワー菌芽胞は検出されなかった。

2. 供試材料から分離したフラットサワー菌の同定

フラットサワー菌が検出されたコーンペーストおよびてりやき粉のDTA平板から1株ずつを分離し、コーンペースト由来株をCP株、てりやき粉由来株をTK株

Table 1. Number of flat sour bacteria spores found in corn paste, teriyaki powder and white roux by method of aerobic plate count and MPN

	Aerobic plate counts (CFU/g)		MPN method (MPN/g)
	37°C	55°C	55°C
Corn paste	0	11	2.3 (0.4-12) *1
Teriyaki powder	0	3	2.3 (0.4-12) *1
White roux	0	0	0

*1 95% confidence limit

とした。CP株およびTK株について、16S rRNA遺伝子解析で同定を行ったところ、CP株は相同性99.26%で*G. stearothermophilus*と、TK株は相同性97.32%で*G. thermoglucosidasius*と同定された。

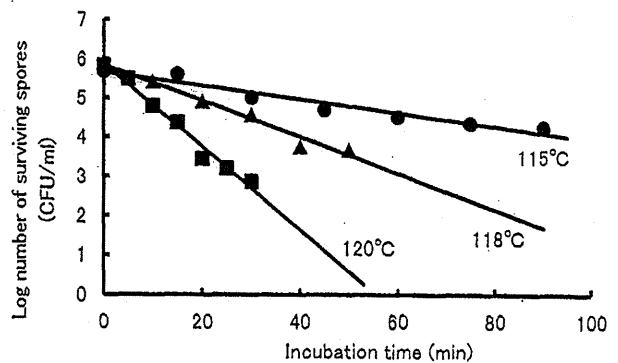


Fig. 1. Survival curve for bacterial spores of *G. stearothermophilus* of CP strain heated in PBS (pH 7.2). Their heating temperatures and regression equations were ●, 115°C, $y = -0.017x + 5.655$ ($R^2 = 0.937$), ▲, 118°C, $y = -0.046x + 5.860$ ($R^2 = 0.984$), ■, 120°C, $y = -0.105x + 5.876$ ($R^2 = 0.980$).

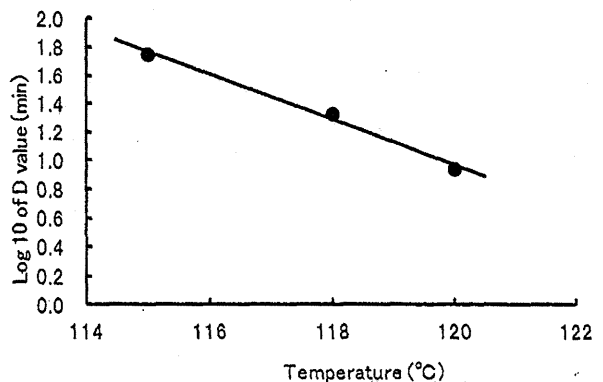


Fig. 2. The z value of spores of *G. stearothermophilus* of CP strain in PBS (pH 7.2). The regression equation: $y = -0.159x + 20.11$ ($R^2 = 0.992$)

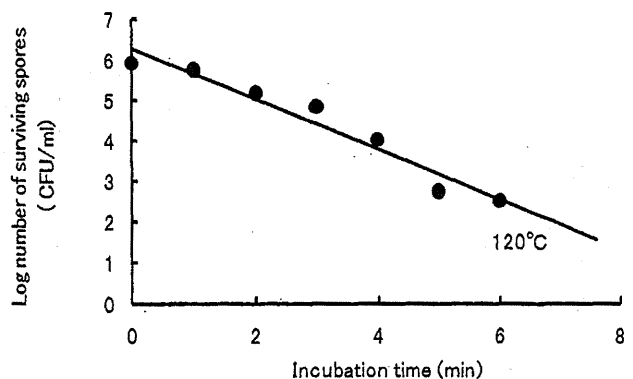


Fig. 3. Survival curve for bacterial spores of *G. thermoglucosidasius* of TK strain heated in PBS (pH 7.2) at 120°C. The regression equation: $y = -0.619x + 6.285$ ($R^2 = 0.949$).

3. 供試材料から分離した菌株の芽胞の耐熱性

CP株のPBS (pH 7.2)中における耐熱性試験結果をFig. 1およびFig. 2に、TK株のPBS (pH 7.2)中における120℃の生残曲線をFig. 3に示した。またこれらの試験結果をTable 2に示した。CP株のPBS (pH 7.2)中における $D_{115^\circ\text{C}}$ 値は56.2分、 $D_{118^\circ\text{C}}$ 値は21.4分および $D_{120^\circ\text{C}}$ 値は9.3分で、 z 値は6.3℃であった。TK株のPBS (pH 7.2)中における $D_{120^\circ\text{C}}$ 値は1.6分であった。フラットサワーが発生した製品は製造工程において120℃で16分間の加熱殺菌が施されていたことから、 $D_{120^\circ\text{C}}$ 値が1.6分のTK株がフラットサワーを引き起こした可能性は低いと判断し、以後の実験はCP株に限定して実施した。

4. 供試菌株の芽胞の発芽に及ぼす培養時間の影響

CP株芽胞のDTB中における55℃培養での芽胞数を測定した結果をFig. 4に示した。煮沸によって減少する菌数を発芽数とした。CP株は55℃では12時間後までほとんど発芽せず生芽胞数は 3.3×10^6 CFU/mlであったが、18時間および24時間後には 8.0×10^5 CFU/mlになり、初発芽胞数の約76%が発芽した。

5. 供試菌株の芽胞の発芽に及ぼす間欠煮沸の影響

CP株芽胞を添加したDTBおよびコーンスープ中における間欠煮沸による生芽胞数の変化をFig. 5に示した。初発芽胞数はいずれの試料とも 7.1×10^6 CFU/mlであったが、3回目の煮沸後にはDTB中では生芽胞数は 1.3×10^6 CFU/mlと初発芽胞数より約98%減少した。一方、

Table 2. Thermal resistance of bacterial spores of *G. stearothermophilus* of CP strain and *G. thermoglucosidasius* of TK strain in PBS (pH 7.2)

Isolates	D value (min)			z (°C)
	115°C	118°C	120°C	
CP	56.2	21.4	9.3	6.3
TK	NT	NT	1.6	NT

NT: Not tested

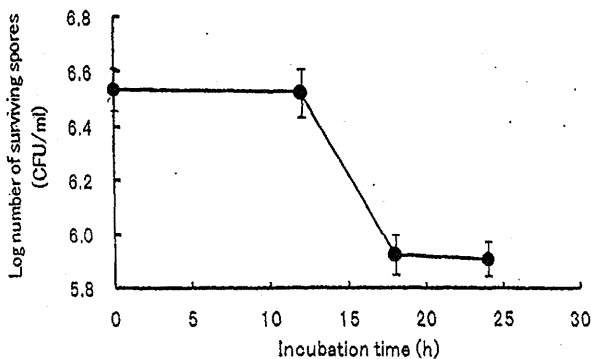


Fig. 4. Number of surviving bacterial spores of *G. stearothermophilus* of CP strain subjected to boiling after the incubation in Dextrose Tryptone Broth for 12, 18, and 24 h at 55°C. It took more than 18 h for the CP strain spores to germinate in the broth.

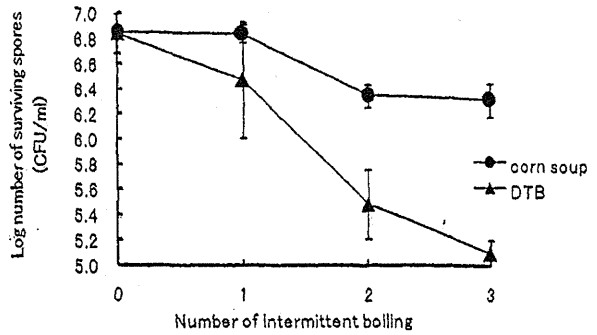


Fig. 5. Survival curve for bacterial spores subjected of *G. stearothermophilus* of CP strain under intermittent boiling at Dextrose Tryptone Broth and corn soup (pH 6.4).

コーンスープ中では 2.1×10^6 CFU/mlまでの減少にとどまった。

考 察

フラットサワーが発生したレトルトパウチ詰コーンスープについて使用原材料を調べたところ、コーンペーストとてりやき粉から耐熱性芽胞を有する高温菌が検出された。16S rRNA遺伝子の塩基配列をもとに同定したところ、コーンペースト由来CP株は*G. stearothermophilus*、てりやき粉由来TK株は*G. thermoglucosidasius*と同定された。

今回フラットサワーが発見されたコーンスープは120℃で16分間の加熱工程を経ていた。てりやき粉由来TK株の120℃における D 値が1.6分であったことから判断して、同株が当該コーンスープのフラットサワーに関与していた可能性は低い。また、コーンペースト由来CP株を別ロットのコーンスープに接種し、55℃で3日間培養したところ、コーンスープのpHが6.4から4.6に低下した(データは示さず)。以上のことから、コーンペースト由来CP株の*G. stearothermophilus*がフラットサワーの原因と考えられる。

A食品会社が試験的にコーンスープを保管していたトタン張り簡易建屋は、断熱性がある建築素材を使っておらず、夏季は50℃前後の高温になっていたと考えられる。そのため高温菌である*G. stearothermophilus*が発育可能な条件になったと推察される。実際には保管温度を40℃以下にすることで本菌によるフラットサワーを阻止できると考える。しかし、偶発的に保管温度が40℃以上になる可能性もあり、その場合のフラットサワーを防止するために間欠滅菌法の適用を試みた。

本製品において官能試験を合格できる最長の加熱殺菌条件は120℃で16分間以内であり、これ以上の加熱殺菌を実施することは難しい。そこで、間欠滅菌法が古くから実験器具などの芽胞菌の滅菌に使用されていた²⁾ので、今回は同法を食品に応用し、中心温度120℃で4分間以上の加圧加熱殺菌と併用することによるフラットサワー

菌の抑制を試みた。3回目の煮沸後に、培地中では生芽胞数は約98%減少し、間欠滅菌法の併用により *G. stearothermophilus* の芽胞を除去する可能性が見られた。しかし、コーンスープ中では約70%の減少にとどまった。これは、コーンスープ中での芽胞の発芽効率が、培地中よりも低いためと考えられる。芽胞の発芽はアミノ酸、グルコースやヌクレオシドなどの栄養成分の存在に影響されるという報告があり⁶⁾、本実験で用いたコーンスープはDTBよりも発芽を促進させる栄養成分の含有が少なかつたためと推察される。したがって本製品の栄養成分を大きく変えることなく加圧加熱殺菌と間欠滅菌法を併用してフラットサワーのリスク低減するためには、食品中での芽胞の発芽効率を上げる方策が開発されない限り適用は難しいと判断される。

レトルト食品は、常温での保存および流通条件下で食品に発育しうる微生物を死滅させた商業的無菌状態である。そのため、高温で発育する菌が、レトルト食品中に存在する可能性はある。そこで、流通過程の保管時における温度管理を徹底し、高温菌の増殖を防ぐことを当面のフラットサワー防止策の基本としていくべきである。

文 献

- 1) Cameron, E. J. and Esty, J. R.: The examination of spoiled canned foods. 2. Classification of flat-sour spoilage organisms from non-acid foods. *J. Infect. Dis.*, **39**, 89-105 (1926).
- 2) 医科学研究所学会: 第2章 器具, 装置, 基本操作. 改訂5版 細菌学実習提要, p.15-42, 丸善, 東京 (1976).
- 3) Kalogridou-Vassiliadou, D.: Biochemical activities of *Bacillus* species isolated from flat sour evaporated milk. *J. Dairy Sci.*, **75**, 2681-2686 (1992).
- 4) Lin, C. C., Wu, B. K. and Lin, D. K.: Spoilage bacteria in canned foods. I. Flat sour spoilage bacteria in canned asparagus and the thermal death time. *Appl. Microbiol.*, **16**, 45-47 (1968).
- 5) Fields, M. L.: The flat sour bacteria. *Adv. Food Res.*, **18**, 163-217 (1970).
- 6) Paidhungat, M., Ragkousi, K., Setlow, P.: Genetic requirements for induction of germination of spores of *Bacillus subtilis* by Ca^{2+} -dipicolinate. *J. Bacteriol.*, **16**, 4886-4893 (2001).
- 7) 佐藤 順: 第2節 加熱殺菌理論の基礎知識. 現場必携・微生物殺菌実用データ集. 山本茂貴監修, p.31-44, サイエンスフォーラム, 東京 (2005).
- 8) Tang, Y. W., Ellis, N. M., Hopkins, M. K., Smith, D. H., Dodge, D. E. and Persing, D. H.: Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic Gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 3674-3679 (1998).