

201327009A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鎌田 洋一

岩手大学 農学部

平成26（2014）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 . . . 3
鎌田 洋一

分担研究報告書

- HPLC による *Bacillus cereus* の嘔吐毒素 (セレウリド) . . . 19
検出法の試行
西川 禎一

- 核酸クロマト法によるセレウリド産生セレウス検出法の . . . 53
開発
宇治家 武史

- 黄色ブドウ球菌のリスクプロファイル . . . 67
山本 茂貴

- ウエルシュ菌食中毒発現機構の解析 . . . 103
三宅 眞実

- 新型下痢毒素産生性ウエルシュ菌による食中毒事例の解析と . . . 123
原因ウエルシュ菌株のゲノム解析
鎌田 洋一

厚生労働科学研究補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品中の毒素産生微生物および毒素に関する研究

平成25年度

総括研究報告書

岩手大学 農学部

鎌田 洋一

厚生労働科学研究補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

平成25年度総括研究報告書

食品中の毒素産生微生物および毒素に関する研究

研究代表者 鎌田 洋一 岩手大学農学部 教授

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について、食品中から直接検出する試験法を開発することを目的とする。また、各細菌の食品危害性に焦点をあてたりスクプロファイルを作製し、食品衛生行政における食中毒発生予防施策作製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。

セレウス菌が産生する嘔吐毒素（セレウリド）を検出する方法として、比較的安価で汎用性の高い理化学分析機器である高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が適応できるかどうか検討した。セレウリドは、今まで用いていた不純物の含まれた、菌培養物からの精製標品ではなく、化学合成した高純度の、標準物として使用に耐える品質のものを用いた。セレウリドについて、UV 検出器による HPLC の測定では、非常に明瞭なピークを検出することができた。しかしながら、同ピークを質量分析器／液体クロマトグラフィーシステムを用いると、セレウリドのピークと一致しなかった。HEp-2 細胞を用いてのセレウリド検出を行い、陽性になった検体では同ピークが検出され、非接種検体には同ピークは認められなかった。これらの知見は、ピークそのものではないが、セレウリド産生と同調して産生される物質について、安価な HPLC で検出できることを示している。今後の検討によって、数千万円の費用が必要となる質量分析器を利用せず、HPLC による、セレウリド検出法の可能性があることが考えられる。

食品中の細菌は、すべて病原性を持っているわけではなく、毒素が症状を誘発する細

菌の場合、食品から「毒素産生性」菌を検出して初めてその危害性が把握される。細菌の場合、菌培養等、検出に時間を要する行程があり、勘案すべき点が多い。そこで、セレウリド産生性セレウス菌を、無培養の、短時間検出法の開発を試みた。まずセレウリド産生菌を特異的に検出するために、セレウリド合成酵素遺伝子を含む *ces* オペロンのポリシストロニック mRNA を標的核酸とした。また、検出法の汎用性を高めるため、専用機器や高額な機器を必要としない Nucleic Acid Sequence-based Amplification (NASBA) -核酸クロマト法を遺伝子検出法として採用した。NASBA 法及び核酸クロマト法に最適化させたプライマーやプローブについて、標的核酸の合成 RNA (10 コピー) を僅か 10 分の増幅時間で検出する能力を持つものを開発した。米飯やチャーハンを含む 5 種の食品への菌接種試験の結果、 10^4 cfu/g の感度でセレウリド産生セレウスを検出した。この感度は、セレウリド食中毒の発症菌量とされる 10^5 cfu/g よりも 10 倍高かった。本検出法は市場投入され、平成 25 年 8 月 1 日より市販された。

黄色ブドウ球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黄色ブドウ球菌に関する情報を収集した。黄色ブドウ球菌はグラム陽性、通性嫌気性球菌で人が保菌している。耐熱性のエンテロトキシンが嘔吐、下痢を引き起こす。わが国において発生したブドウ球菌食中毒の原因食品は、にぎりめし、寿司、肉・卵・乳などの調理加工品及び菓子類など多岐にわたっているが、欧米においては、乳・乳製品やハム等畜産物が原因食品として多くみられる。わが国での食中毒の原因施設としては、飲食店（約 35～45%）、家庭（20%前後）、仕出屋、旅館などで多く発生している。2000 年の加工乳による集団食中毒は突出した患者数を記録した。諸外国では、1991 年から 1992 年にヨーロッパで発生した食中毒のアウトブレイクのうち、黄色ブドウ球菌が関与したものは 3.5% であった(1993 年から 1998 年では 4.1%)。また、1993 年から 1998 年にヨーロッパ諸国で 960 のアウトブレイク(患者数 10,899 名)が確認されている。さらに、2009 年 EU 諸国において 293 のアウトブレイク(患者数 978 名、死者 2 名)が確認された。

ウエルシュ菌は生体内毒素型食中毒を起こし、腸管内での毒素産生と細胞障害で中毒発生機構が説明されているが、腸管内での菌と毒素の挙動は全く不明と言ってよい。同菌の腸管内挙動を解析するモデルを作製し、検討をしてきた。本年度は、胆汁酸の一種であるデオキシコール酸の芽胞形成および毒素産生への影響を検討した。その結果、デオキシコール酸が芽胞形成のマスター・レギュレーターである Spo0A タンパク

に直接、あるいは間接的にその上流に作用した結果、芽胞形成とそれに続く毒素産生を強く誘導していることを明らかにした。また、糞便中に芽胞形成を抑制する因子があることを見出し、今後、腸管内でのウエルシュ菌の挙動を解析する際の、重要な手がかりを得た。

ウエルシュ菌食中毒は、エンテロトキシン産生性のウエルシュ菌によって発生するものと認知されてきた。1997年に起こった事例では、ウエルシュ菌が原因菌の可能性が非常に高いにもかかわらず、分離株はエンテロトキシン遺伝子を持たず、また、産生もしなかった。同様の事例を検証した。現在まで合計4事例が発生しており、いずれもエンテロトキシン遺伝子を持たず、同タンパク質の産生も認められなかった。これらの事例は、現在のウエルシュ菌食中毒の疫学情報は不完全で、今後、検討する必要がある。

事例株のウエルシュ菌 W5052 株は、エンテロトキシン遺伝子を持たず、別種の毒素遺伝子を保有していた。それらは、ウエルシュ菌と属を同じくする、スピロフォルム菌(*Clostridium spiroforme*)の毒素と相同性があった。病因遺伝子の種間移動と、その変異機構を解析するため、事例分離菌株 W5052 株の部分的ゲノム解析を行った。W5052 株は約 3 M bp の大きさの染色体と、少なくとも 2 種類のプラスミドを保有することが明らかになった。ゲノム中にはエンテロトキシン遺伝子は存在しないことを確認した。新種の下痢誘発性毒素遺伝子の種間伝播ならびに毒素遺伝子の変異など、ゲノム解析を通じて明らかにできる可能性が示された。

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。細菌性の食中毒は三つのタイプに型別される。一つは感染型の細菌性食中毒がこれにあたる。ヒトに感染し症状を発現させるタイプで、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。一方、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。食品内で菌の増殖と毒素産生が起こる場合、食品内毒素型細菌性食中毒という。第三のタイプは、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人体内で産生する細菌群で、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。生体内毒素型食中毒というが、タイプ1と2の間にあるため、中間型の細菌性食中毒とも称される。本研究ではセレウス菌、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。

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。

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が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。

両細菌と食品と毒素の関係を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。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。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る。エンテロトキシンは、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。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。

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ある。セレウス菌は、嘔吐を主症状とする食中毒を起こす。セレウス菌の嘔吐毒素は耐熱性の低分子ペプチドでセレウリドとも呼ばれる。セレウリドは、アミノ酸とデプシ酸が合計 12 個環状に連なり、閉環した構造を示す。セレウリドは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非リボソーマルタンパク質合成系と称される分子経路で合成される。毒素遺伝子が存在するのではなく、毒素合成酵素遺伝子が同定されている。その酵素が非リボソーマルタンパク質合成系に関与する。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。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。

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、同時にエンテロトキシン産生が起こる。エンテロトキシンは、隣接している腸管上皮細胞を結合させる装置である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する。最終的に粘膜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、など、腸管内菌増殖機構、芽胞形成および毒素産生動態が全く研究されていなかった。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病機構の解析に関し、未検討の研究課題を遂行している。

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。コロニーを得、純培養とする。分離株を毒素産生培地に接種し、培養後、エンテロトキシンの有無を逆受け身ラテックス凝集反応で検査する。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。免疫抗体を用いての逆受け身ラテックス凝集反応法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。同様の事例の詳細を解析する。また、事例株のゲノム解析を行い、新型のエンテロトキシン遺伝子の伝播と変異メカニズムを、遺伝子情報から解析する。

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。本年度はブドウ球菌を対象とした。また、食品中から、病原性を持つ、すなわち、毒素産生性菌を直接検出する方法を開発する。前年度までの、ウエルシュ菌についての検討成果に基づき、本年度は、セレウリド産生性セレウス菌の、無培養、迅速検査法を開発する。また、安価な化学分析機器である HPLC を用いてのセレウリド検出法を検討する。

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。

第 1 章 セレウス菌と同菌嘔吐毒素に関する研究

本年度は以下の 2 項目について検討した。

1. 食品中嘔吐毒素(セレウリド)の HPLC による検出法開発の検討

セレウス菌の嘔吐毒であるセレウリド検出には、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が、機器が極めて高価である。そこでセレウリドの検出法として HPLC の利用を検討した。HPLC の主な利点は検出にかかる時間が通常数分~数十分と短く、導入済みの検査機関が多く汎用性の高い機器である。また LC-MS に比べて比較的安価であり、メンテナンスの手間も少ないことがあげられる。

本研究は迅速かつ簡便なセレウリド検出法として HPLC の適用の可否について再度検討することを目的とした。

セレウス菌培養液から精製したセレウリドでは、HPLC チャート上で、明瞭なピークが認められた。一方、化学合成したセレウリドを HPLC 分析したところ、精製セレウリドにみられるピークは検出されなかった。合成セレウリドを質量分析器で解析したところ、既定の分子量に相当する質量数が確認された。

セレウスを接種培養した米飯からの検出を検討した。生菌数は24時間の時点では対数増殖途中だが、48時間では定常期に達しており、72時間においても定常期

を維持していた。24時間までの米飯サンプルにおいては HPLC 法、空胞変性試験共にセレウリドを検出できなかったが、48時間、72時間培養サンプルからはセレウリドの検出が見られた。また培養48時間目から72時間までは経時的にセレウリド量が増加した。これらのサンプルを HPLC 分析したところ、上述の明瞭なピークが認められた。

以上の結果を総合すると、セレウリドそのものの検出には HPLC は適応できないことを示している。物質同定という観点からは、やはり質量分析器の利用が重要となるが、分析方法を一般化するには、機器購入等の障害がある。米飯へのセレウス菌接種実験から、セレウリド産生と同調して、HPLC で検出できる明瞭なピークが接種米飯から検出されている。このピークの帰属は明らかにされてはいないが、今後の検討を通して、セレウリド産生と共役している関係が確認できれば、安価な化学分析機器である HPLC で、セレウリド産生を検出できる可能性を考えることができる。

2. 核酸クロマト法によるセレウリド産生セレウス検出法の開発

セレウリドは抗原性を持たないため、抗原抗体反応を利用した検出系は存在しない。セレウリドの検出法として、セレウリドによる HEp-2 細胞(ヒト喉頭がん由来の細胞)の空胞変性試験がある。この方法ではセレウスの培養や HEp-2 細胞の培養が必要であり、結果判定までに3日を要する。また、顕微鏡観察による陽性判定とは、「10個以上の空胞がある細胞が1ウェ

ルあたり 30%以上ある場合」であり、技術的な習熟を必要とする。LC/MS (Liquid Chromatography / Mass Spectrometry: 液体クロマトグラフィー / 質量分析法) を用いたセレウリド検出方法は、食品試料からセレウリドを検出可能だが、食品試料からセレウリドを精製しなければ LC/MS にかげられず、その工程は煩雑で時間がかかる。また、LC/MS という高額な特殊機器も必要である。

セレウリドを食材から簡便に検出する方法がない現状では、セレウリド産生セレウスの検出が、本菌による食中毒の予防に有用な手段と考えられる。セレウリド産生セレウスを検出する方法として、これまでに PCR 法やイムノクロマト法が開発されているが、いずれも食材からの検出には前培養が必要であり、結果判定は翌日まで待つ必要がある。そこで、前培養を経ることなく食品中のセレウリド産生セレウス菌を迅速かつ簡便に検出する遺伝子検出法を構築し、食中毒事件の原因調査のみならずセレウス食中毒予防へ繋げることを目標に研究を行った。

本法は塩基配列依存性の遺伝子増幅法と DNA-DNA ハイブリダイゼーションを原理とする方法を利用し、核酸クロマト法と称する。遺伝子増幅法として、セレウリド合成酵素遺伝子を含む *ces* オペロンのポリシストロニック mRNA を標的核酸とし、NASBA-核酸クロマト法を採用したことで、専用機器や高額機器を必要とせず、セレウリド産生菌を特異的に検出することが可能となった。また、無培養で、かつ、約 1 時間以内に食品試料からセレウリド

産生菌を 10^4 cfu/g の感度で直接検出が可能となった。

本核酸クロマト法が示す感度は、食中毒の発症量とされる 10^5 cfu/g よりも 10 倍高い。そのため、食中毒事件の原因調査のみならず、大量調理施設等における調理前食材検査への本法の適応できる。本法の利用により、セレウス菌食中毒の防止に繋がる事が期待される。

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. 黄色ブドウ球菌のリスクプロファイル

黄色ブドウ球菌のリスクプロファイルはこれまで、作成されていないので、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）について調査した。国際感染症情報（GIDEON）、感染症発生動向調査週報 IDWR、PubMed、FoodRisk、食品安全委員会等の公式資料を参照し、以下にまとめた。

菌の性状等

黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)は、グラム陽性通性嫌気性の球菌である。ヒトをはじめ家畜・家禽の皮膚や気道上部、腸管等の粘膜に常在し、自然界に広く分布している。現在、ブドウ球菌属には 70 以上の種・亜種が含まれるが、黄色ブドウ球菌は最も病原性が高く、ヒトや動物の化膿性疾患や食中毒の原因となる。黄色ブドウ球菌はコア

グラーゼを産生する。5~47.8℃の温度域で増殖（至適増殖温度：30~37℃）し、ヒトの食中毒を引き起こすエンテロトキシン（SEs）が産生されるのは10~46℃の温度域と報告されている。また、食塩濃度16~18%でも増殖し、他の条件が適当であれば食塩濃度10%でもエンテロトキシンを産生する。エンテロトキシンは炭水化物や脂質、核酸を含まない水溶性のタンパク質で、分子量は約27KDaから29KDaである。極めて耐熱性が高く、100℃で30分間加熱しても完全には失活せず、胃酸やタンパク分解酵素にも抵抗性を示す。

黄色ブドウ球菌食中毒は典型的な食品内毒素型食中毒であり、黄色ブドウ球菌が増殖する過程で産生されたエンテロトキシンに汚染された食品を摂食することにより発症する。

エンテロトキシンは神経毒の1種で、その特異的な生物活性が嘔吐中枢を刺激して催吐作用をもたらす。その他、スーパー抗原活性も合わせ持ち、非特異的T細胞を活性化することで炎症性サイトカインの過剰放出を起こし、毒性ショックを引き起こすこともある。

エンテロトキシンは極めて多様性の高い毒素群であり、嘔吐作用の証明されていない「ブドウ球菌エンテロトキシン様毒素（SEI）」も含めると、これまでに23種類の存在が報告されている。

感染源

黄色ブドウ球菌はヒトを取り巻く環境中に広く分布し、健常人の鼻腔、咽頭、腸管等にも生息している。ヒトでの保菌率は

約40%とされ、このうち30~40%のヒト保有菌株がSEまたはSEIを産生する。わが国において発生したブドウ球菌食中毒の原因食品は、にぎりめし、寿司、肉・卵・乳などの調理加工品及び菓子類など多岐にわたっているが、欧米においては、乳・乳製品やハム等畜産物が原因食品として多くみられる。

わが国での食中毒の原因施設としては、飲食店（約35~45%）、家庭（20%前後）、仕出屋、旅館などで多く発生している。

発症機序・用量反応

食中毒における調査で判明した原因食品中のエンテロトキシン量と当該食品の摂取量から、ヒトの発症毒素量は数100ng~数μgと推定されている。黄色ブドウ球菌が食品中で増殖し105~109/g程度になると、その過程で産生されるエンテロトキシンが発症毒素量に達すると考えられている。ただし、2000年にわが国で発生した加工乳を原因とする大規模食中毒では、加工乳から0.08~0.38ng/mlのSEAが検出され、発症者のSEA摂取量は20~100ngと推定されている。この毒素量は従来の発症最小毒素量と比較するときわめて少ない値であった。

症状

潜伏期間と症状の重症度は、エンテロトキシンの摂取量と個人の感受性によって異なる。抑制不能の特徴的な嘔吐・吐き気の初期症状は、汚染食物の摂取後30分~8時間以内（平均3時間）に現れる。他の一般的な症状は、腹痛、下痢、めまい、震え

や全身衰弱があり、中程度の発熱（37℃程度）を起こす場合もある。なお、下痢は約 70%に認め、水様性下痢が多い。ほとんどのケースでは特別な治療をしなくても 24～48 時間で回復するが、その間下痢や全身衰弱が 24 時間以上続く。

検出・診断方法

ブドウ球菌食中毒の検査では、まず原因食品、糞便、吐物、拭き取り等の検査材料から黄色ブドウ球菌を分離する。疫学的にブドウ球菌食中毒を証明するためには、分離菌株のエンテロトキシン産生性を調べ、コアグラゼ型別を実施する必要がある。ブドウ球菌食中毒と判定するためには、分離された菌株が健康保菌者由来でないことを慎重に判断することが重要である。

治療・予防

ブドウ球菌性食中毒は伝播性がなく、健康者が罹患した場合は特別な治療を行わなくても 24 時間程度で回復することが多く、予後も一般的に良好で、抗菌剤による治療の必要性はない。

疫学

日本

ブドウ球菌食中毒は、食品衛生法に基づく届出が義務づけられており、1984 年までは年間 200 事例以上の食中毒の発生が見られたが、1985 年以降徐々に減少し、2000 年以降は年間 100 事例未満の発生状況で事例数は減少している。

2000 年の加工乳による集団食中毒は突出した患者数を記録した。

諸外国

1991 年から 1992 年にヨーロッパで発生した食中毒のアウトブレイクのうち、黄色ブドウ球菌が関与したものは 3.5%であった(1993 年から 1998 年では 4.1%)。また、1993 年から 1998 年にヨーロッパ諸国で 960 のアウトブレイク(患者数 10,899 名)が確認されている。さらに、2009 年 EU 諸国において 293 のアウトブレイク(患者数 978 名、死者 2 名)が確認された。

第 3 章 ウエルシュ菌およびウエルシュ菌下痢毒素研究

ウエルシュ菌食中毒では、腸に達した同菌の増殖、芽胞形成、ならびに芽胞形成に連動するエンテロトキシン産生と、同毒素による細胞障害が必須の事象になっている。現在、腸管内でのウエルシュ菌の共同については不明なことが多く、検討を続けてきた。

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、エンテロトキシン非産生性のウエルシュ菌食中毒事例を詳しく検証するとともに、当該事例菌株の遺伝子情報について、解析を行った。

本年度は以下の 2 項目について検討した。

2. ウエルシュ菌の腸管内増殖機構

ウエルシュ菌食中毒は生体内毒素型食

中毒に分類されている。本食中毒の発生機序として、1) 食品内での大量の生菌の存在、2) 食品を通じて取り込まれた生菌の胃通過、3) 生菌の腸管内での増殖、4) 芽胞とエンテロトキシンの産生、5) 毒素の腸管上皮細胞への攻撃、が認識されており、最終的にエンテロトキシンによる下痢誘発に至るものと理解されている。本厚生労働科学研究では、特に上記(4)および(5)の過程に着目して研究を展開してきた。平成24年度は *in vitro* 感染実験系を使用して消化管環境に存在する様々な因子の芽胞形成・毒素産生への影響を調べた。その結果、デオキシコール酸で最も効果的に(10⁻⁶Mの濃度で確認できた)みられることを証明した。これらの結果は、ウエルシュ菌が腸管内で芽胞形成・毒素産生して下痢を引き起こす際には、胆汁酸が一種の誘導因子となっており、またこれを感知するシステムを菌が持っていることを示している。そこで本年度はこの、ウエルシュ菌の胆汁酸感知システムを解明すべく、胆汁酸の芽胞誘導メカニズムの解明を試みた。

芽胞形成は、芽胞形成のマスター・レギュレーターである Spo0A のリン酸化で始まり、リン酸化 Spo0A が転写因子となって下流のカスケードを活性化することが知られる。デオキシコール酸存在下で強く誘導される遺伝子を解析したところ、誘導直後から Spo0A 下流の遺伝子群が総じて高発現していることが確認された。この結果は、デオキシコール酸の作用点は Spo0A 上流であるか、あるいは Spo0A そのものであることを示唆しており、ウエル

シュ菌では初めて発見された現象だった。

一方、マウス糞便抽出液の芽胞形成への影響を調べたところ、芽胞形成を阻害する活性が確認できた。以上の結果は、芽胞形成を刺激する生体成分と、その形成を阻害する成分が、消化管内でともに作用し、ウエルシュ菌食中毒を発生、あるいは抑制する機構があることを示す。本研究によって、ウエルシュ菌食中毒の発生機構と、その予防法が明らかになる可能性がある。

2. 新型下痢毒素産生性ウエルシュ菌による食中毒事例の解析と原因ウエルシュ菌株のゲノム解析

ウエルシュ菌食中毒と診断する場合、患者便および推定原因食品から、ウエルシュ菌を分離し、菌株がエンテロトキシン遺伝子を保有すること、所定の毒素産生培地に接種し、エンテロトキシン産生性を確認することが必須の検査項目になっている。

1997年に、東京都で発生したウエルシュ菌食中毒がある。患者症状が下痢・腹痛、原因施設が飲食店であること、原因食が弁当であること、平均の潜伏時間が15時間程度であったことは、典型的ウエルシュ菌食中毒を推測させるものであった。患者便から分離した菌株について、エンテロトキシン遺伝子の有無、および培養液中のエンテロトキシンの有無を試験したところ、いずれも陰性を示した。一方、当該菌株を培養し、その濾過滅菌液について、ウサギ腸管ループ試験を行ったところ、陽性反応を示した。濾過滅菌培養液は RPLA テスト陰性で、菌株から抽出した DNA 検体についての、エンテロトキシン遺伝子検査も陰性だ

った。培養ろ液は Vero 細胞および L-929 細胞に毒性を示した。以上の結果は、ウエルシュ菌は、エンテロトキシンでなく、未同定の、新型エンテロトキシンを産生し、食中毒を発生させる可能性を示唆している。

本研究の目的は、上記のような、非エンテロトキシン産生性のウエルシュ菌食中毒事例を収集し、その実態を明らかにすることにある。さらに、事例菌のゲノム解析を行い、毒素遺伝子伝播機構を明らかにすることを目的とする。

詳細な調査を行った結果、1997 年から 2010 年までに、計 4 事例の、エンテロトキシン非産生性による食中毒事例が発生していた。エンテロトキシン非産生性を示す以外は、典型的なウエルシュ菌食中毒の範疇に属した。4 事例から分離された菌株すべては、イオタ毒素に相同性のある、2 成分毒素の存在を示した。新型のウエルシュ菌下痢毒素は、スピロフォルム菌

(*Clostridium spiroforme*) が保有する、ウエルシュ菌イオタ毒素と相同性のあるタンパク質だった。これらの事象は、ウエルシュ菌には新型の下痢毒素を産生するものがあるだけでなく、同毒素遺伝子が、ウエルシュ菌、スピロフォルム菌、エンテロトキシン非産生性ウエルシュ菌と、伝播交雑した可能性を示唆する。種間を越えた毒性物質遺伝子の伝播と、伝播中に生じた毒素遺伝子の変異機構を解析するため、事例菌 W5052 株のゲノム解析を行った。現在解析の途中であるが、同菌株には、染色体 1 種、プラスミドが 2 種以上存在することが明らかになった。新型の下痢毒素は、プラスミドの 1 種にコードされていた。同プラスミドには、詳細が不明の遺伝子がコードされており、塩基配列の分析により、毒素遺伝子の伝播とその変異の関係が明らかになるものと考えられる。

発表した研究成果リスト

論文発表

1. Wang, L., Wakushima, M., Aota, T., Yoshida, Y., Kita, T., Maehara, T., Ogasawara, J., Choi, C., Kamata, Y., Hara-Kudo, Y., Nishikawa, Y. (2013) Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients and comparison to strains from foods and fecal specimens from cattle, swine, and healthy carriers in Osaka City, Japan. *Appl, Environ. Microbiol.* 79, 1232-1240.
2. Hara-Kudo, Y., Konuma, H., Kamata, Y., Miyahara, M., Takatori, K., Onoue, Y., Sugita-Konishi, Y., Ohnishi, T. (2013) Prevalence of the main food-borne pathogens in retail food under the national food surveillance system in Japan. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 30, 1450-1458.
3. 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. Immun. Immunopath.* 152, 78-81.

学会発表

1. Kamata Y, Irikura D, Monma C, Namaka, A, Kai A, Sugita-Konishi, Y. (2013) *Clostridium perfringens* new enterotoxin (1) detection and identification of a new enterotoxin using genome analysis and *in silico* screening. Clostpath 2013. Palm Cove. Qld, Australia, Sep. 2013.
2. Monma C, Suzuki Y, Irikura D, Kamata, Y, Sugita-Konishi Y, Nakama A, Fukui-Miyazaki A, Horiguchi Y, Kai A. (2013) *Clostridium perfringens* new enterotoxin (2) biochemical characterization of an new enterotoxin. Clostpath 2013. Palm Cove. Palm Beach, Qld, Australia, Sep. 2013.
3. 門間千枝、赤瀬 悟、石塚理恵、齋木 大、小西典子、横山敬子、仲間晶子、鎌田洋一、甲斐明美(2013) 人ふん便における新型エンテロトキシン産生ウエルシュ菌の保有状況、第34回日本食品微生物学会。

4. 小松原英介、宇治家武史、林 司、浅野桃子、西川禎一、鎌田洋一. NASBA 核酸クロマト法によるセレウリド産生菌の簡易検出法の確立. 第 34 回 日本食品微生物学会学術総会. 2013 年 10 月. 東京.
5. Mayo Yasugi, Hidenobu Hoshi, Daisuke Okuzaki, Shigeki Yamamoto, Yoichi Kamata, and Masami Miyake. Mechanism of bile acid-mediated sporulation in *Clostridium perfringens*. 第 87 回日本細菌学会総会. 東京. Mar. 2014.

製品の市場化

1. セレウリド産生セレウスの検出試薬の製品化
製品名：スイフトジーンセレウリド産生セレウス「カイノス」
(平成 25 年 8 月 1 日上市)

厚生労働科学研究補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品中の毒素産生微生物および毒素に関する研究

平成25年度

分担研究報告書

HPLCによる*Bacillus cereus*の嘔吐毒素(セレウリド)

検出法の試行

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25年度分担研究報告書

HPLCによる*Bacillus cereus*の嘔吐毒素(セレウリド)検出法の試行

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	浅野 桃子	大阪市立大学大学院
	古澤 直人	大阪市立大学大学院
	池田 高紀	帝塚山学院大学
	切畑 光統	大阪府立大学大学院
	奈賀 俊人	東洋食品工業短期大学

研究要旨：高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は比較的安価で汎用性が高く広く普及している理化学分析装置である。食品中でセレウスが産生した嘔吐毒素セレウリドを、HPLCを用いて検出する可能性について検討した。研究協力者である大阪府立大学切畑教授が合成に成功した合成セレウリドと市販の精製セレウリド、それぞれを標準品として利用した。精製セレウリドも合成セレウリドもHPLCでシャープなUV吸収を示す物質を含んでおり、当初はこれらをセレウリドと考えて測定方法の確立を目指した。しかしながら、LC/MSを用いた確認の結果、UV検出器と反応するこれらの物質はセレウリドではないことが判明した。また、HEp-2細胞の空胞変性試験によって両試料を測定すると、精製セレウリドの力価は合成セレウリドの1/400しかなかった。以上の結果から、HPLC-UV測定系でセレウリドを計測することは不可能と判断した。しかしながら、市販無菌包装米飯や炒飯にセレウスを接種して培養しセレウリドを産生させた試料をHPLCで測定したところ、精製セレウリドや合成セレウリド試料に含まれたUV吸収する物質と類似のピークが、セレウリドが検出されるのと同時期に出現することが判明した。セレウリド自体の定量ではないが、セレウリドの代替指標としてHPLC測定の対象とするべきか見極めるために今少し検討を継続する価値があると考えられる。

A. 研究目的

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℃から 50℃、至適温度は、28℃から 35℃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℃、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℃から 30℃であり、126℃、90 分の加熱や pH2 または pH12 の強酸・強塩基およびトリプシンなどのタンパク分解酵素にも耐性を示す⁷⁾。催吐性セレウスによる食中毒の原因食は、焼き飯、ピラフ、パスタ、麺類、豆腐、弁当などの作り置きのもが多く、とくに米飯の関与が多い。潜伏期間は 30 分から 6 時間で、悪心、嘔吐で発症する。

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