

図 4 合成セレウリドと精製セレウリドのクロマトグラム  
A : 合成セレウリド (100 ppm)、B : 精製セレウリド (100 ppm)、移動層は 40%アセトニトリル+0.1%リン酸

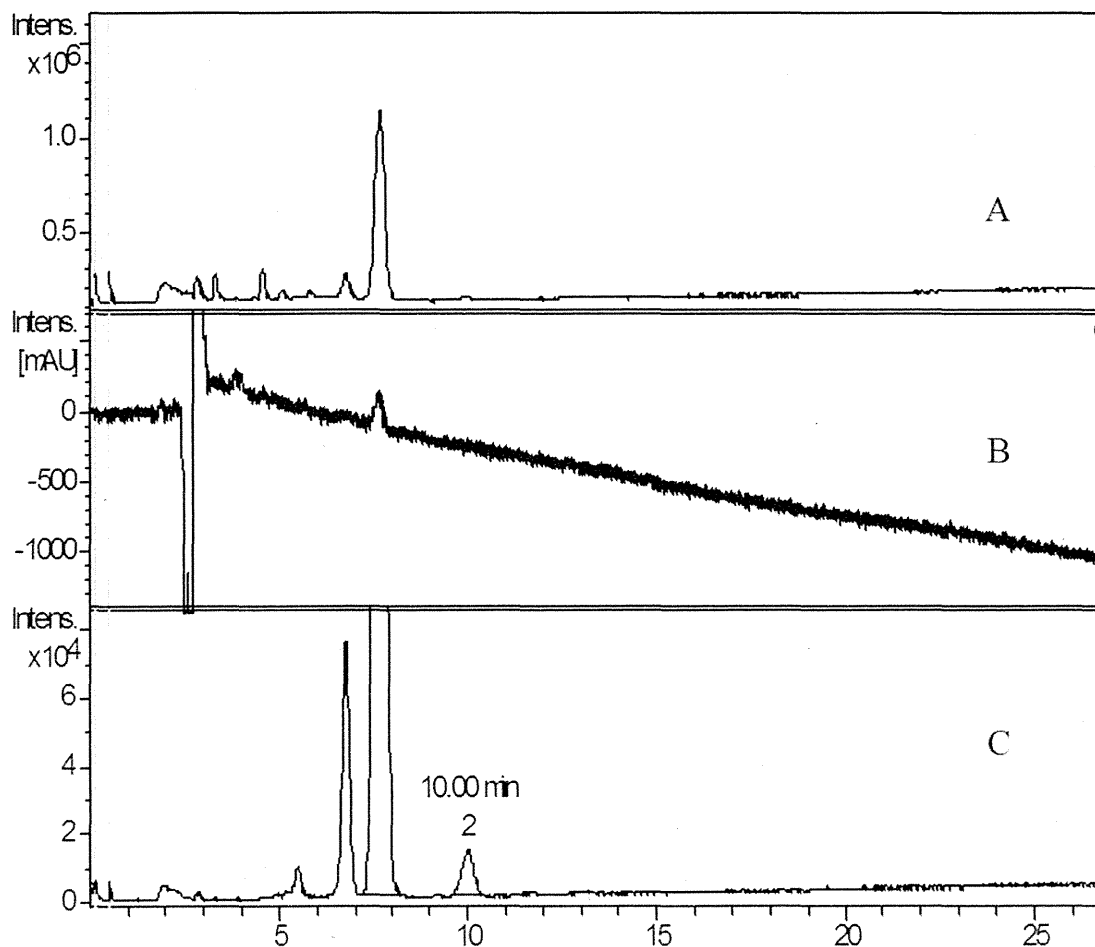


図 5 合成セレウリド (120 ppm) の LC-MS クロマトグラム  
 A: トータルイオンクロマトグラム (TIC)、B: UV 吸収 (190-400 nm) クロマトグラム、C :  
 分子量 1150-1220 のクロマトグラム、2: セレウリドのピーク ( $R_t = 10.0$ ) を示す。移動層は  
 90%アセトニトリル (A 83.3%、 B 16.7%) +0.1%ギ酸

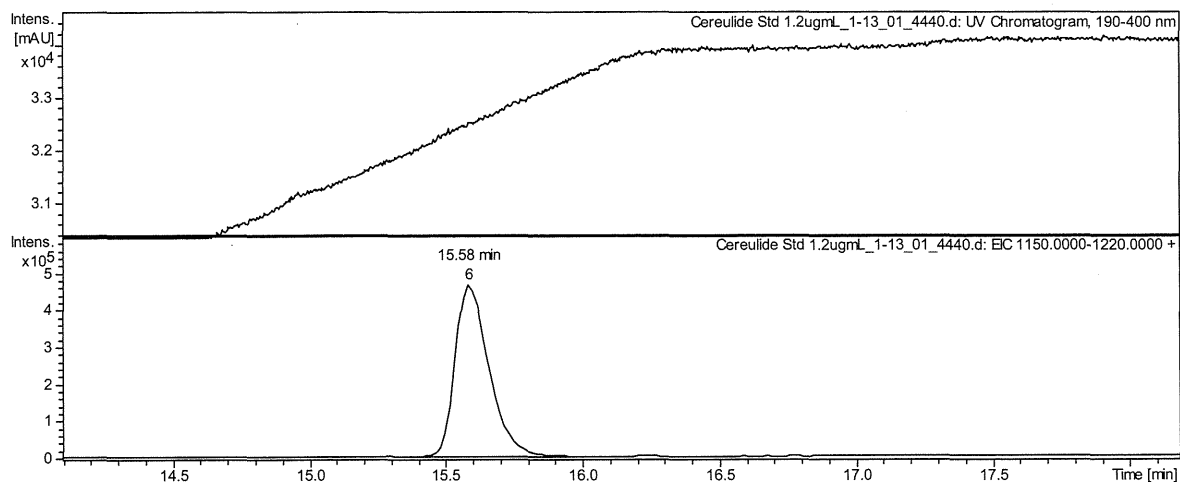


図 6 合成セレウリドの UV クロマトグラム (上) と LC-MS の結果 (下)  
 リテンションタイムは 15.58 min であった。

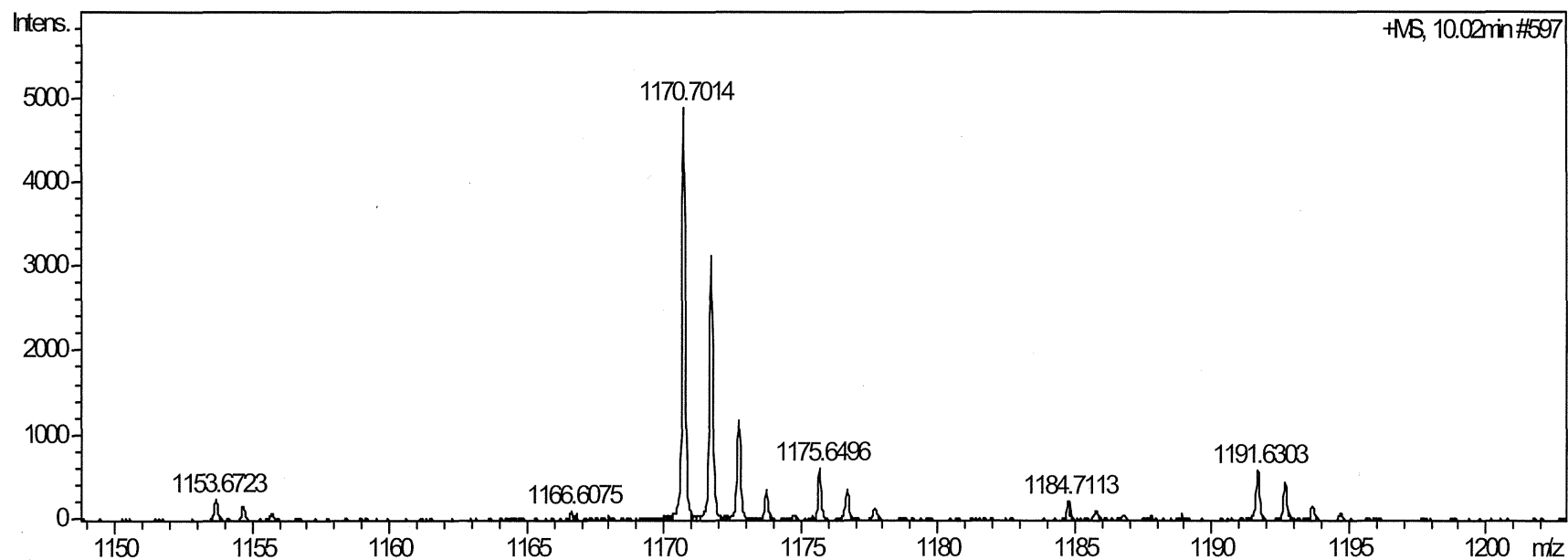


図 7 合成セレウリドに含まれた UV 吸収ピークのマススペクトル

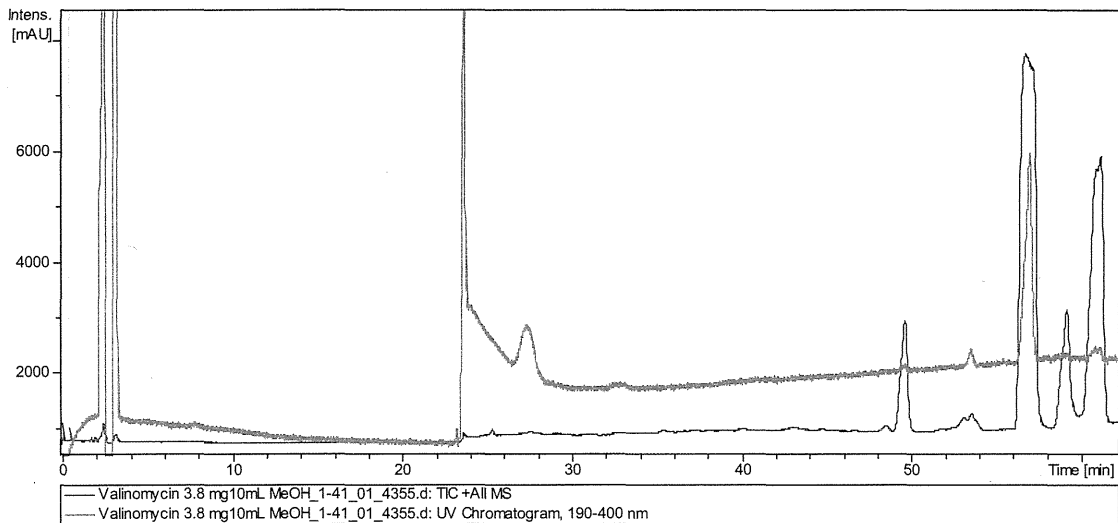


図 8 バリノマイシンのクロマトグラム

青線はUVクロマトグラム、茶線はトータルイオンクロマトグラムを示す。移動層のグラジエント条件は以下のとおりである。バリノマイシンのリテンションタイムは56.74分であった。  
 [0-20 min (0%B)、25 min (55%B)、65 min (95%B)、70 min (95%B)、70.01 min (0%B)、75 min (0%B)]

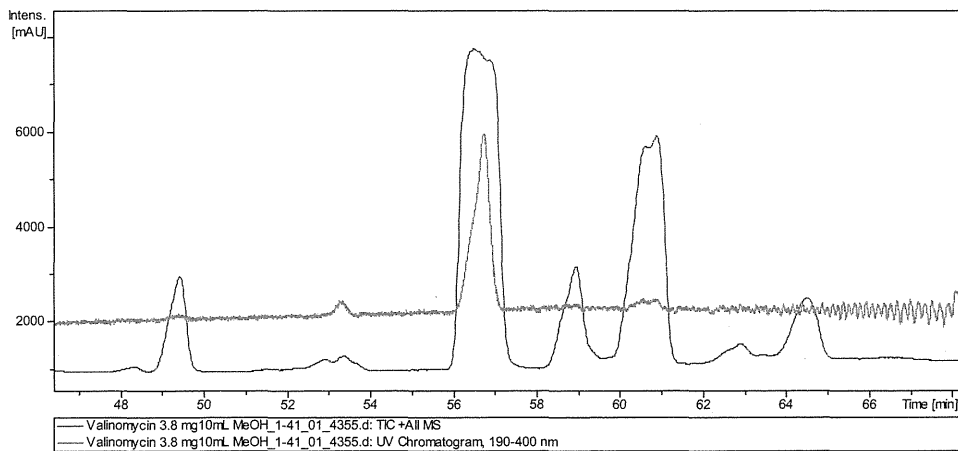


図8-1 バリノマイシンのピーク付近の拡大図

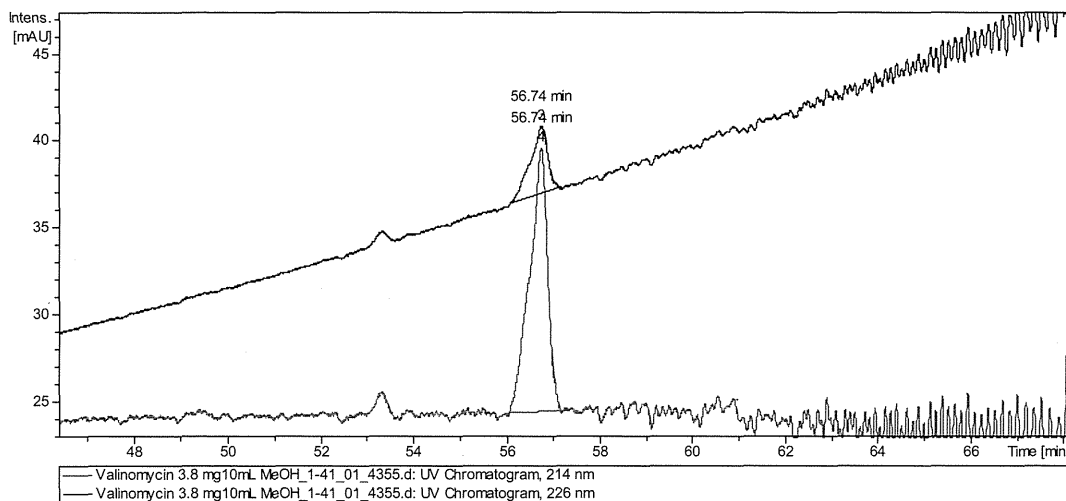


図 9 検出波長の違いによるバリノマイシン UV クロマトグラム  
 青線が検出波長226 nm、黄線が214 nmを示す。

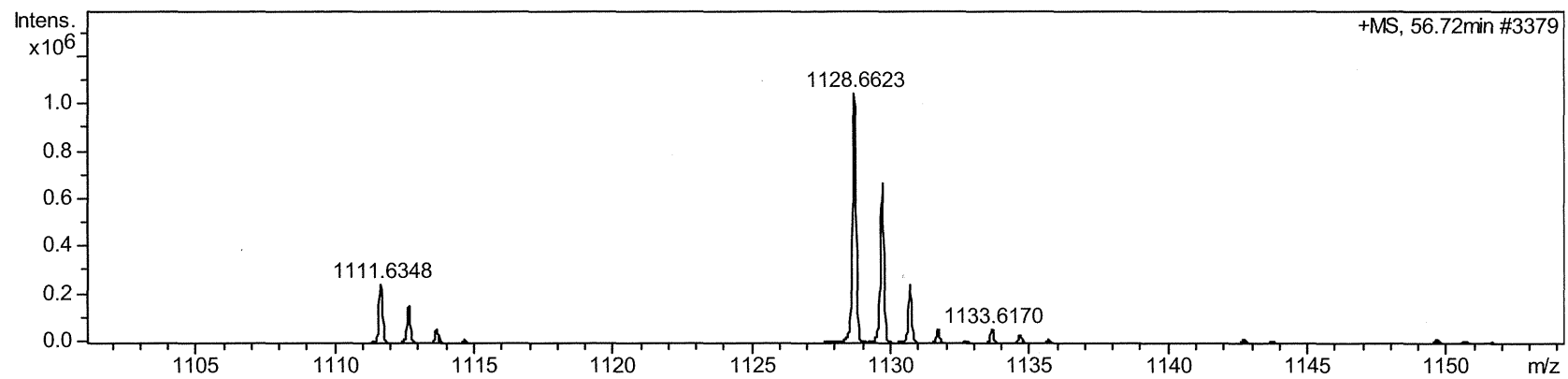


図 10 バリノマイシン試料に含まれた UV 吸収ピークのマススペクトル

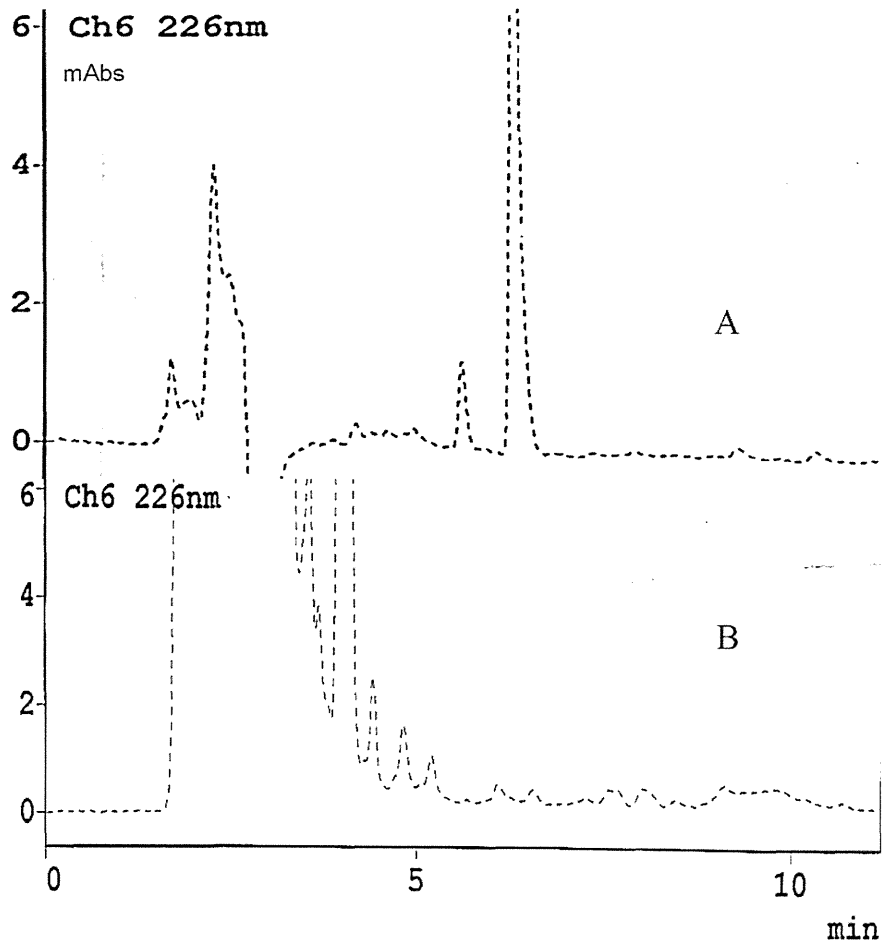


図 1 合成セレウリドに見られるピークが培養サンプル中にも存在する  
 A : 合成セレウリド (100 ppm)、B : セレウス摂取米飯 48 時間培養サンプルのクロマトグラム。合成セレウリドに見られる巨大なピークと同じリテンションタイムに小さなピークが確認できる。

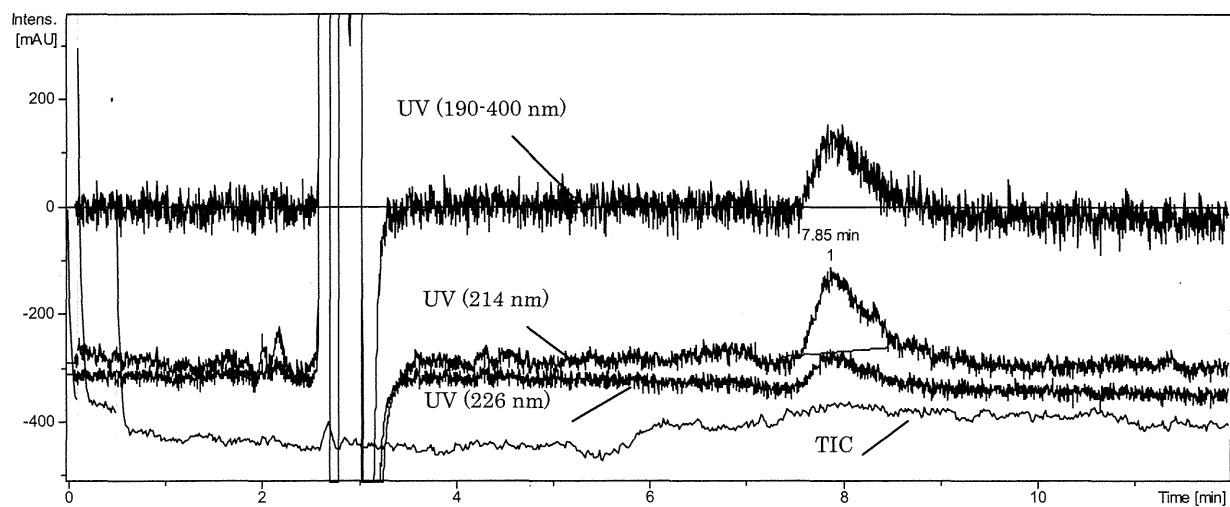


図 2 合成セレウリドに見られるピークのクロマトグラム  
 移動層は 40%アセトニトリル+0.1%ギ酸。トータルイオンクロマトグラム (TIC) によるピークの検出は見られないが、UV クロマトグラムにおけるピーク (Rt=7.85) が確認できる。



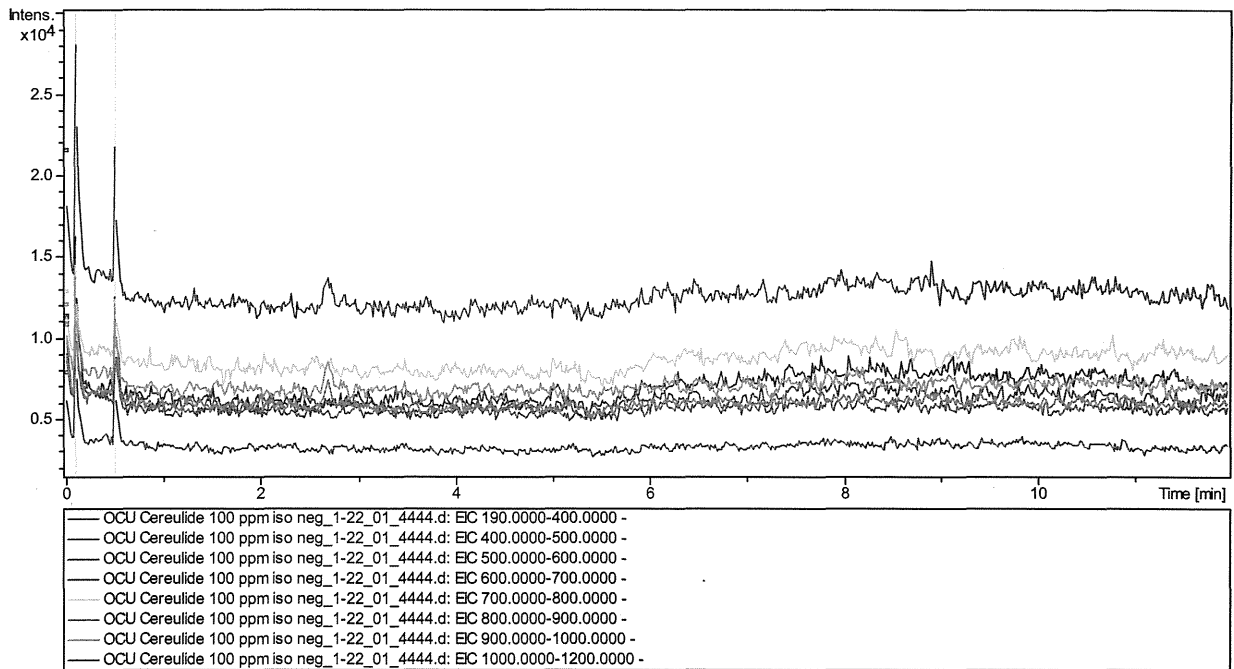


図 3 Rt=7.8 のピークにおけるマスクロマトグラム  
 分子量 400 から 100 刻みでマスクロマトグラムを確認したが、どの分子量においてもピークは確認できなかった。

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

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

株式会社カイノス

宇治家 武史

厚生労働省科学研究費補助金

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毒素の直接試験法の研究」

平成 25 年度 分担研究報告書

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

分担研究者 宇治家武史 株式会社カイノス 開発研究部 課長

#### 研究要旨

セレウス菌嘔吐型食中毒は、菌が産生する嘔吐毒（以下セレウリド）を含んだ食品を喫食する事で発症する。セレウリドの検出法には HEp-2 細胞の空胞化変性試験や LC/MS (Liquid Chromatography / Mass Spectrometry: 液体クロマトグラフィー / 質量分析法) 分析法があるが、技術の習熟や特殊機器を必要とし簡便ではない。一方、セレウリドを産生するセレウス菌を検出する方法としては、PCR 法やイムノクロマト法があるが、いずれも食品からの検出には前培養が必要であり、食中毒予防への貢献度は低い。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。

具体的には、平成 24 年度に開発した CPE 産生ウエルシュ菌の直接検出法を参考に、核酸抽出から検出まで約 1 時間で実施可能な方法を構築した。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は、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示した。またセレウリド産生セレウスは 10cfu/t の感度で特異的に検出された。セレウス食中毒の事例食品は入手困難だったため、食品試料からのセレウリド産生セレウスの検出は、食品試料への菌接種試験で確認した。菌を接種する食品は、厚生労働省の食中毒一覧 (2008-2011 年) を参照し、米飯やチャーハンを含む 5 種を用いた。これら食品への菌接種試験の結果、本検出法は全 5 種食品に対して 10<sup>4</sup>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<sup>5</sup>cfu/g よりも 10 倍高かった。

上記研究成果を基に、スイフトジーン セレウリド産生セレウス「カイノス」という製品名で平成 25 年 8 月 1 日より販売を開始した。

## A. 研究目的

セレウス (*Bacillus cereus*) は、土壌や河川などに広く分布しており食品の汚染機会が多いため食材や食品の製造過程から完全に除去することは難しい。セレウスによる食中毒には嘔吐型と下痢型の2種類があるが、日本における食中毒の大部分は嘔吐型である。嘔吐型食中毒を引き起こす嘔吐毒(セレウリド)は耐熱性を有しているため、加熱調理で毒性を失う事はなく、加熱殺菌による食中毒予防は困難である。

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 にかかれず、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。

平成25年度内での製品化を最終目標とし、本年度は食品試料から培養を経ることなくセレウリド産生セレウスを、食中毒の発症菌量とされる  $10^5$  cfu/g の感度で、且つ約1時間程度で特異的に検出する方法の構築を行った。

## B. 実験方法

### 1) 菌株

セレウリド産生セレウス株としては、Type strain No. 13 株を使用した。セレウリド非産生株としては、09-75-22 株(大阪府立大の西川先生より供与)を使用した。

### 2) 培地の調製

3.75g の Brain Heart Infusion (BHI,

ベクトン・ディッキンソン社) 培地に 100mLの水を加え、オートクレーブ(121°C、20分)したものを液体培地とした。

### 3) 液体培養

BHI 培地にセレウスを接種し、37°C ウォーターバスで培養した。ウエルシュ菌培養液の濁度は、DU640 (ベックマン・コールター株式会社) を用い、OD600 の値を計測した。本検討では、培養液濁度として 0.3-0.5 Abs のセレウスを用いた。

### 4) Nucleic Acid Sequence-based Amplification (NASBA) 法<sup>1)</sup>

核酸増幅法である NASBA 法の試薬には、NASBA Amplification キット (株式会社カイノス) を使用した。NASBA 試薬に 55  $\mu$ L の NASBA 溶解液を加え vortex で混和し、NASBA 反応溶液を調製した。NASBA 酵素試薬に 30  $\mu$ L の NASBA 酵素溶解液を加え、NASBA 酵素液を調製した。NASBA 反応溶液にフォワードおよびリバースプライマーを加え反応液を調製した。

核酸増幅は以下の手順で実施した：0.5mL チューブに反応液 5  $\mu$ L と抽出核酸 2.5  $\mu$ L を加え混和した後、41°C のヒートブロックで 5 分保温した。チューブ温度の低下に注意し、ヒートブロック上で NASBA 酵素液を 2.5  $\mu$ L 加え、素早く 5 回ピペティングした後、41°C で 30 分保温した。

### 5) 鋳型核酸の調製

セレウリド合成酵素遺伝子は *ces* オペロンを構成しており、このポリシストロニック mRNA を標的核酸とした。性能評価のため、この *ces* オペロンを基に *in vitro* で RNA を合成した。合成 RNA のコピー数は、260nm の吸光度より算出した。

### 6) NASBA プライマー

標的核酸と特異性の高い配列を検索し、NASBA 用のフォワードおよびリバースプライマーを設定した。各プライマーは標的核酸とアニール可能な約 20 塩基のオリゴヌクレオチドであり、リバースプライマーの 5' 末端側には、T7 RNA polymerase のプロモータ配列を付加した。

### 6) 核酸クロマトグラフィー (核酸クロマト法)<sup>2)</sup>

核酸クロマト法で使用する検出ストリップには、NASBA 法で増幅したヌクレオチド鎖と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドプローブをメンブレンおよびラテックスパッド中の着色微粒子に結合させている。検出ストリップ上を NASBA 増幅産物が展開すると、これらオリゴヌクレオチドプローブと配列特異的にサンドイッチハイブリダイゼーション結合し、検出ストリップ上に着色微粒子が集積しラインとして目視で識別される。

この核酸クロマト法で NASBA 増幅産物を検出する場合は、NASBA 増幅が終了し

たチューブに 90  $\mu$ L の展開液を加え、検出ストリップを挿入し、NASBA 産物を展開させ、15 分後の着色ラインを目視で確認する。

#### 7) 菌接種試験

ストマフィルターS タイプ (株式会社 GSI クレオス) に、25g の米飯および 225mL の生理食塩水を加え 10% 乳剤とした。ここに BHI 培地で培養したセレウスを米飯 1g あたり  $10^4$  cfu から  $10^6$  cfu で接種し、直ちに Pulsifier (Microgen Bioproducts Ltd) で 1 分間混和した。この 10% 乳剤から 1mL を 1.5mL チューブに入れ、1890 G 以上で 1 分間遠心し、セレウスを沈澱させた。上清を除去した沈澱に核酸抽出試薬を 200  $\mu$ L 加え、vortex で 10 秒間混和した後、90°C のヒートブロックで 5 分間加熱した。加熱チューブは 1890 G 以上で 5 秒間遠心し上清と沈澱部に分け、上清部を抽出核酸液とした。抽出核酸液は、NASBA 増幅の試料として使用した。NASBA 増幅産物の検出には、サンドイッチハイブリダイゼーションを原理とする核酸クロマト法を用い、検出ラインの有無を目視判定した。

### C. 結果と考察

#### 1) NASBA 増幅性能

NASBA プライマーの増幅性能を確認するため、10 コピーの合成 RNA を鋳型に用

い、増幅時間を 5、10、15、20 および 30 分と変え NASBA 反応を行った。NASBA 産物の検出は核酸クロマト法を用いた。その結果、10 コピーの合成 RNA であれば、10 分の増幅時間で、クロマトストリップ上にラインを検出した。しかし 10 分の増幅時間では核酸クロマトのライン強度は低く、十分なライン強度を得るためには、15 分以上の増幅が必要であった (図 1)。

増幅時間を 15 分に設定し、合成 RNA 10 コピーの増幅再現性を確かめた。5 回連続で評価した結果、全ての試験でラインが検出された (図 1)。以上の結果より、本法は 15 分増幅で 10 コピーの合成 RNA を増幅する性能を有していると判断された。

#### 2) 特異性試験

*Ces* オペロンのポリシストロニック mRNA を標的核酸とする NASBA-核酸クロマト検出系の特異性を確かめるため、セレウリド産生株 (Type strain No. 13 株) とセレウリド非産生株 (09-75-22 株) から抽出した核酸を用いて試験した。各菌株からの抽出核酸は、核酸抽出試薬 (Extragen II) を用いて調製した。1  $\mu$ g の抽出核酸を試料として NASBA 増幅した結果、セレウリド産生株は検出されたが、セレウリド陰性株は検出されなかった (図 2)。本法は、セレウリド産生菌を選択的に検出し得る能力があると判断された。

### 3) 最小検出感度

セレウリド産生株に対する本法の最小検出感度を調べるため、セレウリド産生株の抽出核酸の希釈系列(1、10、100 および 1000 cfu/t) を調製した。これら希釈核酸で NASBA 増幅した結果、10 cfu/t 以上で核酸クロマトのラインが検出された(図 3)。この結果から、本法の最小検出感度は、10 cfu/t と判明した。

### 4) 米飯への菌接種試験

昨年度、CPE 産生ウエルシュ菌をカレー試料から直接検出する方法を開発した。この核酸抽出試液および検出手順を応用し、セレウリド産生セレウスを食品試料から直接検出する方法の構築を試みた。食品試料からのセレウリド産生菌検出試験は、セレウス食中毒の事例食品の入手が困難なため、食品試料への菌接種試験で代用された。菌を接種する食品は、厚生労働省の食中毒一覧(2008年-2011年掲載情報)から選択し、最初は米飯で確認した。米飯への菌の接種量は、米飯 1g 当たり  $10^3$ 、 $10^4$  および  $10^5$  cfu とした。

CEP 産生ウエルシュ菌をカレー試料から検出するために開発した核酸検出試液および検出手順は、セレウリド産生セレウスを米飯から検出上でも有用であり、 $10^4$  cfu/g の菌を検出した(図 4)。この検出感度は、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。また、

核酸抽出から検出までの所用時間は約 1 時間であり、本法が迅速かつ高感度な方法であることが示された。

### 5) 米飯以外の食品への菌接種試験

セレウス食中毒の原因食品としては、米飯以外にもチャーハンやスパゲティー等の食品がある(厚生労働省 食中毒一覧, 2008-2011 年掲載情報)。そこで、米飯以外の食品に対する本法の適応性を調べるため、チャーハン、おから、おはぎ、スパゲティーの 4 種に対し菌種試験を実施した。米飯同様に各食品から 25g を採取し、 $10^4$  cfu/g のセレウリド産生セレウスを接種した。その結果、全ての食品で米飯と同じ検出感度で菌を検出した(図 5)。

## D. 結論

セレウス菌は土壌菌であり、食品の汚染機会も多い。しかし、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菌の検出が、本菌による食中毒の予防に有用な手段と考えられる。

本法は、遺伝子検出法ながら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

ることが可能である。また、約1時間で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である。この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が、セレウス菌食中毒の防止に繋がる事が期待される。

本法は、これら本研究成果を基に、スイフトジーン セレウリド産生セレウス「カイノス」という製品名で平成25年8月1日より販売を開始した。

#### E. 健康危害情報

なし

#### F. 文献

- 1) Compton J :Nucleic acid sequence-based amplification、Nature、350 : 91-92 (1991)
- 2) 宇治家武史、簡便な遺伝子検査のツール「核酸クロマト法」、臨床化学 36 : 19-24 (2007)

#### G. 研究発表

なし

#### H. 学会発表

- 1) 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.

#### I. 学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

セレウリド産生セレウスの検出試薬の製品化 (平成25年8月1日上市)

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」



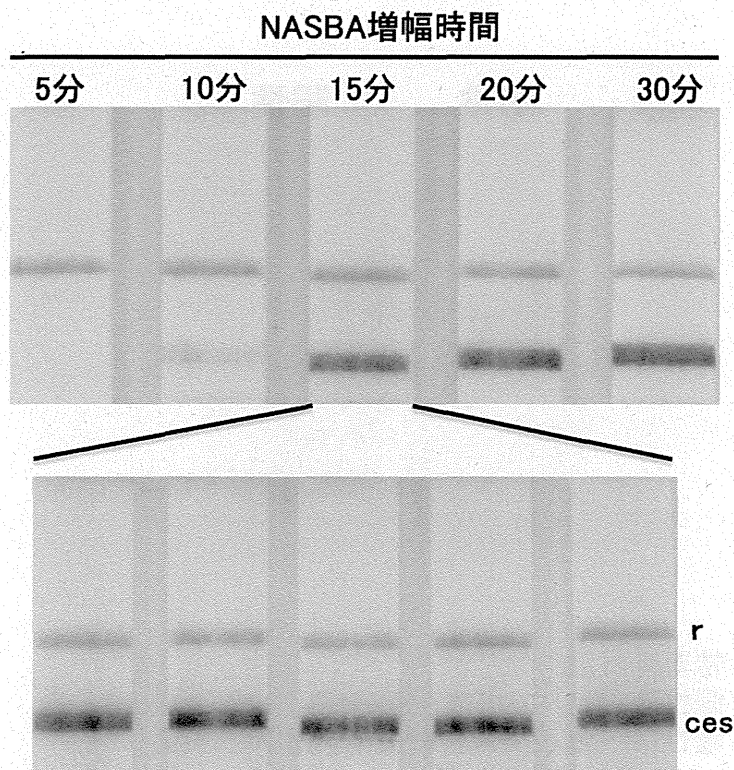


図1: NASBA増幅時間  
 合成RNA(10コピー)を鋳型に増幅時間を変えてNASBA反応を行った  
 NASBA産物を核酸クロマト法で検出した  
 r: リファレンス  
 ces: セレウリド産生菌の陽性ライン

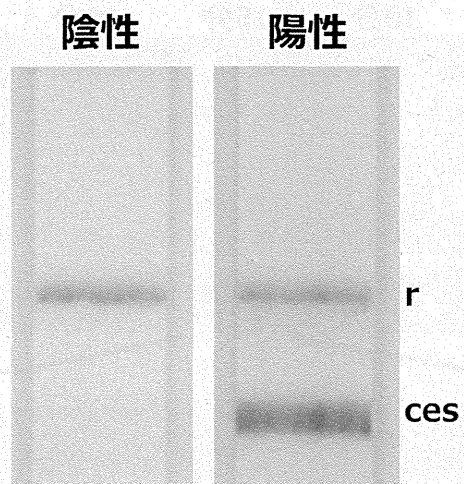


図2:特異性試験

陽性は、セレウリド産生菌を用いた場合

陰性は、セレウリド非産生菌を用いた場合

r:リファレンス

ces:セレウリド産生菌の陽性ライン

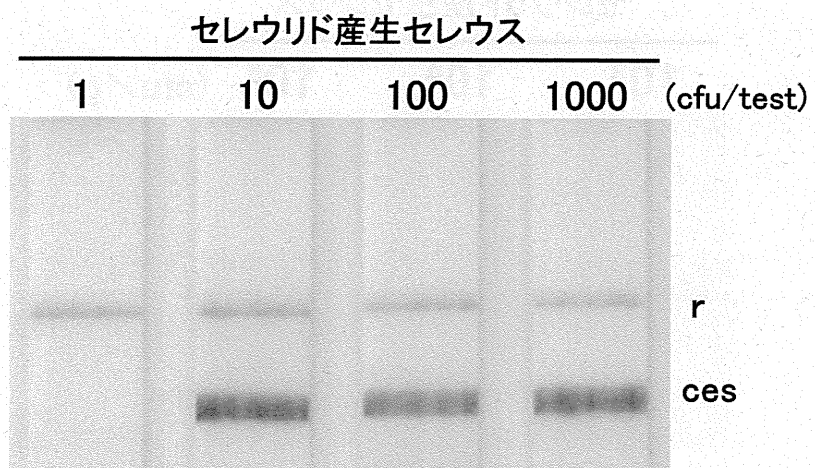


図3:最小検出感度  
 r:リファレンス  
 ces:セレウリド産生菌の陽性ライン

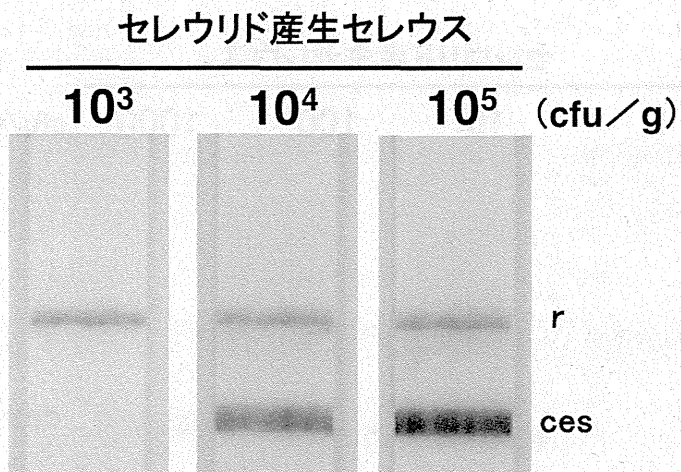


図4:菌接種試験  
 食品試料として米飯を使用。  
 r:リファレンス  
 ces:セレウリド産生菌の陽性ライン