

201327009B (1/2)

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23 - 25年度 総合研究報告書

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

まとめ	
研究代表者 鎌田 洋一	・・・ 3
毒素産生食中毒細菌のリスクプロファイル	・・・ 13
分担研究者 山本 茂貴	
セレウス菌セレウリドの検出法に関する研究	・・・ 19
分担研究者 西川 禎一	
核酸クロマト法による毒素産生ウエルシュ菌およびセレウス菌の	・・・ 33
検出法に関する研究	
分担研究者 宇治家 武史	
ブドウ球菌新型エンテロトキシンの食品内産生動態	・・・ 43
分担研究者 重茂 克彦	
水晶発振子マイクロバランス法によるブドウ球菌エンテロ	・・・ 51
トキシンのリアルタイム検出法開発の試み	
分担研究者 鎌田 洋一 重茂 克彦	
ウエルシュ菌食中毒発現機構の解析	・・・ 61
分担研究者 三宅 眞実	
ウエルシュ菌の新型下痢毒素に関する研究	・・・ 89
分担研究者 鎌田 洋一	
研究成果	・・・ 103

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

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」

総合研究報告書

代表研究者 鎌田 洋一 岩手大学農学部 共同獣医学科 教授

研究分担者 山本 茂貴 東海大学 海洋学部 教授

西川 禎一 大阪市立大学大学院 教授

宇治家 武史 株式会社 カイノス 課長

重茂 克彦 岩手大学農学部 教授

三宅 眞実 大阪府立大学大学院 教授

研究要旨：本研究は、食品の安全確保を推進するため、食品中に混入する毒素産生微生物とその産生毒素に関し、リスクプロファイルの作製、細菌の食品内および生体内増殖機構、毒素産生機構、症状発現機構について解析すること、および食品中毒素および毒素産生細菌の試験法を開発することを目的とし、学術ならびに厚生労働行政に貢献する。本研究では、ブドウ球菌とそのエンテロトキシン、セレウス菌とその嘔吐毒素（セレウリド）、およびウエルシュ菌とその下痢毒素（エンテロトキシン）を対象とした。

平成 23 年度はウエルシュ菌、平成 24 年度はセレウス菌、平成 25 年度は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各菌に関する情報を収集した。GIDEON による検索により、各国のアウトブレイク状況および汚染率等のサーベイランス情報を得た。また、厚生労働省食中毒統計調査および感染症発生動向調査週報 IDWR により、わが国におけるアウトブレイク状況等の情報を得た。FoodRisk、PubMed では、主に分子生物学的研究や診断・治療法に関する文献を抽出した。

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。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したところ、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考えられた。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。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、試験法の開発には至らなかった。

Nucleic Acid Sequence-based Amplification (NASBA) -核酸クロマト法を利用して、食品中の、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌およびセレウリド産生性セレウス菌の検出法を開発した。全工程で 60 分程度の作業時間で、同 2 種の細菌を、カレーやパスタ等から検出できるキットを作出し、市場投入した。

黄色ブドウ球菌の産生するエンテロトキシン(SEs)は、嘔吐を症状とする食中毒の原因毒素である。近年、多数の新型 SEs および SE 様毒素(SEIs)の存在が報告され、これらの新型 SEs の食中毒原性の解明が必要とされている。本研究では、新型 SEIs (SEG、SEI、SEIM、SEIN、および)SEIO 産生量および mRNA 発現動態の培養温度による変動を詳細に解析し、さらに食品中における産生量評価を行った。これらの毒素遺伝子を持つ黄色ブドウ球菌は、20°Cでは、増殖は遅いものの、毒素遺伝子 mRNA 発現ならびに毒素タンパク質産生が確認され、室温程度での食品の放置により、新型エンテロトキシンの食中毒誘発性が確認された。SE は菌の増殖に伴い、食品中で産生され、強い熱抵抗性がある。殺菌工程のある食品においても、一度毒素産生されれば、食品中に SE は残存する。そのため、食品の常時モニタリングが望まれる。牛乳中の SE の存在をリアルタイムで検出する方法として、水晶発振マイクロバランス法を応用した。金コロイドを用いることにより、牛乳中に 5 ng/ml の SE が検出可能となった。

ウエルシュ菌は大規模型の食中毒を起こす。腸管内での菌増殖、芽胞形成、毒素産生機構はほとんど研究されていない。ウエルシュ菌の腸管内増殖機構について、特にウエルシュ菌の芽胞形成に着目した。本研究ではまず、ウエルシュ菌食中毒発生時に消化管内で生じている変化を再現する *in vitro* 実験系を開発した。菌は環境中の糖の種類（代謝）、胆汁酸の量変化に対応して病原性発現を制御していることが明らかになった。消化管内には様々な因子がウエルシュ菌の芽胞形成・毒素産生を制御していて、促進圧力と抑制圧力の量的バランスに応答して菌は病原性発現を ON/OFF していると思われた。

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。分離菌が新種の下痢誘発性毒素を産生していることの確証が得られた。これらの事例は、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌のみを対象とする試験法には不備があること、したがって、現在のウエルシュ菌食中毒の疫学情報は不完全で、この度の事例も含んだ解析が必要であることを示す。事例分離菌株 W5052 株の部分的ゲノム解析を行った。W5052 株は新型毒素遺伝子をコードしたプラスミドを保有していることが明らかになった。ウエルシュ菌食中毒の分子疫学情報の刷新に貢献できるものとする。

本研究は、食品の安全確保を推進するため、食品中に混入する毒素産生微生物とその産生毒素に関し、リスクプロファイルの作製、細菌の食品内および生体内増殖機構、毒素産生機構、症状発現機構について解析すること、および食品中毒素および毒素産生細菌の試験法を開発することを目的とし、学術ならびに厚生労働行政に貢献する。本研究では、ブドウ球菌とそのエンテロトキシン、セレウス菌とその嘔吐毒素（セレウリド）、およびウエルシュ菌とその下痢毒素（エンテロトキシン）を対象とした。

1：リスクプロファイル作製

上記3種の細菌については、リスクプロファイルが作製されていないので、本研究においてまとめた。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）について調査した。

1-1：黄色ブドウ球菌のリスクプロファイルの概要

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。

1-2：セレウス菌のリスクプロファイルの概要

セレウス菌はタンパク質や多糖体など高分子物質の分解性が高く、食品の腐敗、変敗を起こすとともに、嘔吐毒（セレウリド）と下痢原性エンテロトキシンを産生する。発育温度域は10～50℃（増殖至適温度28～35℃）であり、10℃以下ではほとんどの菌株が増殖できないものの、一部7℃以下の低温で増殖する菌株も存在する。セレウス菌は様々な食品中に存在する。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。食品中ではセレウス菌は芽胞の形で存在するが、セレウス

菌にとって適切な環境で食品を保存した場合に芽胞が発芽生育する。

嘔吐型食中毒は、セレウス菌に汚染された食品中で産生された嘔吐毒の摂取によって起こる（毒素型食中毒）。一方、下痢性食中毒は食品とともに摂取した本菌がヒトの小腸で増殖し、エンテロトキシンを産生することで引き起こされる（感染型（生体内毒素型）食中毒）。

嘔吐型食中毒、下痢型食中毒ともに発症菌量は $10^5 \sim 10^8$ 個/g であり、一般食品で通常見られる程度の菌数 ($10 \sim 10^3$ 個/g 程度) では発症しない。

嘔吐型食中毒では、体内に入ったセレウリドが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、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。

1-3：ウエルシュ菌リスクプロファイルの概要

クロストリジウム *Clostridium* 属菌はグラム陽性、芽胞形成能を有する偏性嫌気性の桿菌である。ウエルシュ菌 (*C. Perfringens*) はクロストリジウム属菌の一種であり、ヒトの感染症としては食中毒、ガス壊疽、化膿性感染症、敗血症等の原因菌として知られている。

ウエルシュ菌は産生する主要な 4 つの毒素の種類 (α 、 β 、 ϵ 、 ι) により A~E 型に分類される。このうち A 型菌および C 型菌がヒトの疾病を引き起こす。

CPE 産生型による食中毒のアウトブレイクは、肉製品や鶏肉の不適等な加熱に

よって引き起こされる。日本においては、多種多様の煮込み料理（カレー、煮魚、麺のつけ汁、野菜煮付け）などが原因となるケースが多い。

菌に汚染された食品摂取後約 8~12 時間後腹痛や下痢を催し、24 時間以内に回復することが多い。嘔吐や発熱はまれである。致死率は低いが幼児や高齢者ではリスクが上がる。なお、推定入院率および致死率はそれぞれ 0.3% および 0.05% である。

約 10^8 個の菌を摂取することで発症する。1 食 100g とした場合、発症に至るには少なくとも 10^6 個/g を摂取する必要がある。

食中毒の最も確実な診断は、患者糞便や推定原因食品等からエンテロトキシン産生性のウエルシュ菌を分離することである。食中毒の検査にあたっては、非病原性の常在ウエルシュ菌との区別が重要である。

治療は主に対症療法が中心となる。予防策としては食品中での菌の増殖を防ぐことが重要である。

日本でのウエルシュ菌による食中毒発症件数は毎年 20 例から 40 例で推移しており、1 例あたりの患者数は約 1,000 人から 4,000 人の間で推移している。諸外国でも数多くの食中毒事例が発生している。ほとんどのアウトブレイクは食肉、鶏肉、魚介類由来であり、特に秋から冬にかけて起こることが多い。

2：セレウス菌とセレウリドに関する研究

2-1：セレウリドの検出法に関する研究

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。市販無菌包装米飯に 1.9 cfu/g のセレウスを接種し、30°C で静置すると、接種 12 時間後には 105 cfu/g に、48 時間後には 107 cfu/g に達し芽胞も 104 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。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。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。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た。

2-2：セレウリド産生セレウス菌の迅速スクリーニング法開発

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 10^4 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。以上の研究成果を基に、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。

3：黄色ブドウ球菌とそのエンテロトキシンに関する研究

3-1：新型エンテロトキシンの毒素産生動態と食中毒原性に関する検討

黄色ブドウ球菌の産生するエンテロトキシン(SEs)は、嘔吐型食中毒の原因毒素である。近年、多数の新型SEsおよびSE様毒素(SEIs)の存在が報告され、これらの新型SEsの食中毒原性の解明が必要とされている。新型SEIs(SEG、SEI、SEIM、SEIN、および)SEIO産生量およびmRNA発現動態の培養温度による変動を詳細に解析し、さらに食品中における産生量評価を行った。SEG、SEI、SEIM、SEIN、SEIOの産生は対数増殖期に起こるが、 30°C では定常期に入ると速やかに毒素産生は抑制されるのに対し、 20°C においては定常期の間毒素産生は持続することにより総産生量が増加するものと考えられた。低温でのこれらの毒素の産生増強は

普遍的な現象と考えら、新型エンテロトキシンの食中毒原性が確認された。

SEの食中毒危害物質としての特徴は、菌が増殖する際に産生されること、SEは耐熱性を持っており、一度産生されれば、加熱工程があつたにしろ、食品中に毒性が保持されることにある。この事実は、食品中SEの直接検出法の開発が必要であることを示す。本研究の目的は、リアルタイムで、食品中のSEAの検出を可能とする方法を確立することにある。水晶発振子マイクロバランス法を応用し、検討した。直接法、サンドイッチ法、金コロイド標識抗体によるサンドイッチ法を比較検討した。本法は、牛乳のような、測定系を傷害する可能性のある食品においても応用可能であった。3種の方法の検討の結果、金コロイド標識抗体のサンドイッチ法が最も感度が高く、牛乳中に5ng/mlのSEAを検出が可能であった。今後も感度の向上が必要と考えられた。

4：ウエルシュ菌とその下痢毒素に関する研究

4-1：ウエルシュ菌の腸管内増殖・芽胞形成・毒素産生機構

ウエルシュ菌は大規模型の食中毒を起こす。検査法は確立されているが、食中毒発生メカニズムには不明のことが多い。特に、腸管内での菌増殖、芽胞形成、毒素産生機構はほとんど研究されていない。ウエルシュ菌の腸管内増殖機構について、特にウエルシュ菌の芽胞形成とエンテロ

トキシン産生に着目し研究を展開した。ウエルシュ菌食中毒発生時に消化管内で生じている変化を再現する *in vitro* 実験系を開発した。菌は環境中の糖の種類(代謝)、胆汁酸の量変化に対応して病原性発現を制御していることが明らかになった。消化管には未知の芽胞形成阻害因子が存在する可能性も示された。おそらく消化管内には様々な因子がウエルシュ菌の芽胞形成・毒素産生を制御していて、促進圧力と抑制圧力の量的バランスに応答して菌は病原性発現を ON/OFF していると思われる。

4-2: ウエルシュ菌新型下痢毒素に関する研究

ウエルシュ菌食中毒の原因菌であるウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) はヒトをはじめ多くの動物の大腸内常在菌であり、下水、河川、海、耕地などの自然界にも広く分布する。ウエルシュ菌食中毒は菌が産生するエンテロトキシンによる生体内毒素型食中毒である。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。遺伝子検査には PCR 法が、エンテロトキシン産生性については、抗体を利用しての逆受け身ラテックス凝集テスト (RPLA テスト) が実施される。

1997 年に、東京都で発生したウエルシ

ュ菌食中毒がある。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。分離株は、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。本研究では、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した。さらに、同菌株を培養し、旧来のエンテロトキシンとは異なる毒素を同定、その性状を調べることを目的とした。

1997 年から 2010 年までに、エンテロトキシン非産生性ウエルシュ菌による食中毒が発生していた。同事例からの分離株の培養液は、腸管毒性を示し、新型下痢毒素の存在を示唆した。毒素タンパク質の部分精製、細胞致死作用解析、遺伝子解析等の分析により、毒素の同定を進めた。分離菌株のゲノム解析の結果から、新型下痢毒素の遺伝子があること、毒素遺伝子はプラスミド上に存在することが明らかになった。

以上の知見は、ウエルシュ菌食中毒事例の分子疫学解析に有効な情報となり、ウエルシュ菌食中毒の疫学情報を正確に刷新でき、厚生労働行政へ貢献できるものとなる。

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23 - 25年度
分担研究報告書

ウエルシュ菌、セレウス菌および黄色ブドウ球菌
リスクプロファイル

東海大学海洋学部

山本 茂貴

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

「食品中の毒素産生食中毒細菌及び毒素の直接試験法の研究」

平成23－25年度分担研究報告書

ウエルシュ菌、セレウス菌および黄色ブドウ球菌リスクプロファイル

研究分担者 山本茂貴 東海大学海洋学部 教授

研究協力者 長谷川 専 三菱総合研究所
柿沼美智留 三菱総合研究所

研究要旨：平成23年度はウエルシュ菌、平成24年度はセレウス菌、平成25年度は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各菌に関する情報を収集した。

GIDEON による検索により、各国のアウトブレイク状況および汚染率等のサーベイランス情報を得た。また、厚生労働省食中毒統計調査および感染症発生動向調査週報 IDWR により、わが国におけるアウトブレイク状況等の情報を得た。

FoodRisk、PubMed では、主に分子生物学的研究や診断・治療法に関する文献を抽出した。また、食品安全委員会等の公表資料を参照した。

以上のデータからウエルシュ菌、セレウス菌、黄色ブドウ球菌についてリスクプロファイルをとりまとめた。

A. 研究目的

ウエルシュ菌、セレウス菌および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、今回の研究班でまとめた。

ウエルシュ菌、セレウス菌および黄色ブドウ球菌のリスクプロファイル作成のため、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

B. 研究方法

いて、国際感染症情報 (GIDEON¹) : 国内外の疫学情報、食中毒統計調査²: 国内の疫学情報、感染症発生動向調査週報 IDWR³: 基本情報、PubMed⁴、FoodRisk⁵ 等: その他の情報を収集した。また、食品安全委員会等の公表資料を参照した。

C. 研究結果

ウエルシュ菌リスクプロファイルの概要

クロストリジウム *Clostridium* 属菌はグラム陽性、芽胞形成能を有する偏性嫌気性の桿菌である。ウエルシュ菌 (*C. Perfringens*) はクロストリジウム属菌の一種であり、ヒトの感染症としては食中毒、ガス壊疽、化膿性感染症、敗血症等の原因菌として知られている。

ウエルシュ菌は産生する主要な 4 つの毒素の種類 (α 、 β 、 ϵ 、 ι) により A~E 型に分類される。このうち A 型菌および C 型菌がヒトの疾病を引き起こす。

CPE 産生型による食中毒のアウトブレイクは、肉製品や鶏肉の不適等な加熱によって引き起こされる。日本においては、多種多様の煮込み料理 (カレー、煮魚、麺のつけ汁、野菜煮付け) などが原因となるケースが多い。

菌に汚染された食品摂取後約 8~12 時間後腹痛や下痢を催し、24 時間以内に回復することが多い。嘔吐や発熱はまれで

ある。致死率は低いが幼児や高齢者ではリスクが上がる。なお、推定入院率および致死率はそれぞれ 0.3% および 0.05% である。

約 10^8 個の菌を摂取することで発症する。1 食 100g とした場合、発症に至るには少なくとも 10^6 個/g を摂取する必要がある。

食中毒の最も確実な診断は、患者糞便や推定原因食品等からエンテロトキシン産生性のウエルシュ菌を分離することである。食中毒の検査にあたっては、非病原性の常在ウエルシュ菌との区別が重要である。

治療は主に対症療法が中心となる。予防策としては食品中での菌の増殖を防ぐことが重要である。

日本でのウエルシュ菌による食中毒発症件数は毎年 20 例から 40 例で推移しており、1 例あたりの患者数は約 1,000 人から 4,000 人の間で推移している。諸外国でも数多くの食中毒事例が発生している。ほとんどのアウトブレイクは食肉、鶏肉、魚介類由来であり、特に秋から冬にかけて起こることが多い。

セレウス菌のリスクプロファイルの概要

セレウス菌はタンパク質や多糖体など高分子物質の分解性が高く、食品の腐敗、変敗を起こすとともに、嘔吐毒 (セレウリド) と下痢原性エンテロトキシンを産生する。発育温度域は $10\sim 50^{\circ}\text{C}$ (増殖至適温度 $28\sim 35^{\circ}\text{C}$) であり、 10°C 以下ではほとんどの菌株が増殖できないものの、一部 7°C 以下の低温で増殖する菌株も存在する。セレウス菌は様々な食品中に存在する。ほとんどは 100 芽胞/g 以下であ

¹ GIDEON <http://www.gideononline.com/>

² 厚生労働省 食中毒統計調査 <http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/112-1.html>

³ IDWR 感染症の話 セレウス菌感染症 http://idsc.nih.gov/idwr/kansen/k03/k03_05/k03_05.html

⁴ PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

⁵ FoodRisk <http://foodrisk.org/>

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。食品中ではセレウス菌は芽胞の形で存在するが、セレウス菌にとって適切な環境で食品を保存した場合に芽胞が発芽生育する。

嘔吐型食中毒は、セレウス菌に汚染された食品中で産生された嘔吐毒の摂取によって起こる（毒素型食中毒）。一方、下痢性食中毒は食品とともに摂取した本菌がヒトの小腸で増殖し、エンテロトキシンを産生することで引き起こされる（感染型（生体内毒素型）食中毒）。

嘔吐型食中毒、下痢型食中毒ともに発症菌量は $10^5 \sim 10^8$ 個/g であり、一般食品で通常見られる程度の菌数（ $10 \sim 10^3$ 個/g 程度）では発症しない。

嘔吐型食中毒では、体内に入ったセレウリドが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、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。

黄色ブドウ球菌のリスクプロファイルの概要

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。

詳細については、別添の委託報告書を参照すること。

D. 健康危機情報

特になし。

E. 研究発表

特になし。

F. 知的財産権取得状況

特になし。

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23 - 25年度
分担研究報告書

セレウス菌セレウリドの検出方法に関する研究

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23 - 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
	田中 仁	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：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。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105 cfu/gに、48時間後には107 cfu/gに達し芽胞も104 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。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。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。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。

発育可能温度は 5℃から 50℃、至適温度は、28℃から 35℃である。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⁾。

セレウス菌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、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。

催吐性セレウス菌の検出法として、現在ではリアルタイム PCR 法によるセレウス検出法が報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。本法は、従来法のようなアガロースゲル電気泳動が不要で迅速性と定量性にも優れている。

食品中のセレウリド産生菌の定量にはリアルタイム PCR 法は好適だが、嘔吐毒素であるセレウリド自体を検出することはできない。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。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。

B. 材料および方法

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、バリノ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、バリノマイシン非感受性菌である *Escherichia coli* DH5 α 、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。

・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、1 mg 当量/ml) を 70%メタノールで 100、50、5 ppm に調製しスタンダードとして用いた。

・合成セレウリド : 大阪府立大学の切畑教授から提供された。70%メタノールを加え、1 mg/ml に調製、さらに 100、50、5 ppm に希釈してスタンダードとして用いた。

・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。

・HPLC 用溶媒 : ・高速液体クロマトグラフ用アセトニトリル (和光純薬工業)、高速液体クロマトグラフ用メタノール (和光純薬工業)、高速液体クロマトグラフ用蒸留水 (和光純薬工業)、高速液体クロマトグラフ用リン酸 (和光純薬工業) を用いた。

・市販無菌包装米飯 (米飯) : サトウのごはん 宮城県産ひとめぼれ (佐藤食品工業、愛媛、日本) を購入した。

・炒飯 (冷凍) : ローソンセレクトローソンセレクト 炒飯 (冷凍) (テーブルマーク) を購入し実験に供した。

3. 実験機材

・HPLC カラム : Inertsil® ODS-4 (4.6 x 250 mm、5 μ m) (ジーエルサイエンス、東京、日本) および InertSustain C18 (4.6 x 150mm、5 μ m) (ジーエルサイエンス) を使用した。

・抽出カラム : Inertsep SI (ジーエルサイエンス) を 100%メタノール 300 μ l、50%メタノール 300 μ l で順次洗浄した後、使用した。HLB 3 cc (Oasis) の場合は 100%メタノール 3 ml、50%メタノール 3 ml で順次洗浄した後、使用した。

・高速液体クロマトグラフィー (HPLC) システム : CO-810 Colum oven (東ソー、大阪、日本)、PU-980/D-980-50 degasser (ジャスコインタナショナル、東京、日本)、SPD-M10AVP diode array detector (DAD) (島津製作所、京都、日本) を使用した。合成セレウリド溶液の測定に使用した HPLC の基本条件は表 1 に示した。

3. 方法

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 \times) 10 μ l、16S rRNA_SYBR_Forward Primer (15 μ M)

0.4 μ l、16S rRNA_SYBR_Reverse Primer (15 μ M) 0.4 μ l、ROX Reference Dye (50 \times) 0.4 μ l、DMSO 1.0 μ l、PCR 用滅菌水 6.8 μ l、テンプレート 1.0 μ l。

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 \times) 10 μ l、crs_SYBR_Forward Primer (15 μ M) 0.4 μ l、crs_SYBR_Reverse Primer (15 μ M) 0.4 μ l、ROX Reference Dye (50 \times) 0.4 μ l、PCR 用滅菌水 7.8 μ l、テンプレート 1.0 μ l からなる。

上記の試薬を混合し、96 ウェルプレートに 19 μ l ずつ分注した。各ウェルに 1.0 μ l 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 $^{\circ}$ C 1 分、1 サイクル、PCR 反応 95 $^{\circ}$ C 5 秒、66 $^{\circ}$ C 31 秒、40 サイクルとし、融解曲線解析は 95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 1 分、95 $^{\circ}$ C 15 秒、1 サイクルで行った。

・HPLC 用サンプル調製 :

① 米飯に等量の水を加え、均一になるようブレンダーで攪拌した。