

② 攪拌後、0.4 g を 1.5 ml チューブに量り取り、10 μ l の精製セレウリドを添加した。

③ 精製セレウリド添加サンプルにメタノールを 0.8 ml 加え、ハンディタイプのホモジナイザーでよく攪拌した。

④ 遠心分離 (13,000 rpm、5 分) 後、上清を共栓付試験管に回収した。これを 2 回繰り返した。

⑤ 集めた上清をエバポレータで乾固させ、メタノール 250 μ l に溶解後、水 250 μ l を加えよく攪拌し、全量を 500 μ l とし、これを Monospin SI に添加して遠心分離 (3,000 rpm、1 分) した。

⑥ 50%メタノール 300 μ l を添加して遠心分離 (3,000 rpm、1 分) にて洗浄した。

⑦ 90%メタノール 300 μ l を添加して遠心分離 (3,000 rpm、1 分) にて抽出した。

⑧ これを限外濾過膜に添加し、遠心分離 (3,000 rpm、1 分) した。

⑨ これをエバポレータで乾固し、50%メタノール 500 ml に溶解させた。このうち 10 μ l を HPLC サンプルとした。したがって添加サンプルの最終セレウリド濃度は 20 ppm である。

・市販無菌包装米飯および炒飯への催吐性セレウスの接種、培養およびセレウリド測定用サンプルの調整：

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 (1.9 cfu/g) を、米飯接種用菌液とした。

③ 安全キャビネット内にて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。冷凍炒飯についても同様に接種した。

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。

⑤ セレウス接種米飯に当量の水を加え、均一になるようブレンダーで攪拌した。

⑥ これを 5 g 量り取り、1-2 倍量のメタノールを加え、ハンディタイプのホモジナイザーでよく攪拌した。

⑦ 遠心分離 (13,000 rpm、5 分) 後、上清を共栓付試験管に回収した。

⑧ これを 2 回繰り返した。

⑨ 集めた上清をエバポレータで乾固させ、メタノール 250 μ l に溶解後、水 250 μ l を加えよく攪拌し、全量を 500 μ l とした。

⑩ これを洗浄済みの固相抽出カラム (HLB) に添加し、50%メタノール 3 ml、70%メタノール 3 ml で順次洗浄し、100%メタノール 3 ml で抽出した。

⑪ 抽出したものをエバポレータで乾固し、50%メタノール 1 ml に溶解させた。このうち 10 μ l を HPLC サンプルとした。

・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 μ l 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。

・空胞変性試験によるセレウリド量の算出：10 ppm の合成セレウリドは 210~11 希釈された際に HEp-2 細胞に空胞変性を生じさせた。この時のセレウリドの細胞培養液中での濃度は 210 希釈で 9.8ng/ml、211 希釈では 4.9 ng/ml となる。これらの結果から、空胞変性が見られた最終希釈倍率に 5ng/ml を乗じたものを抽出サンプルの濃度とした。この方法は他の文献^[16]でも採用されている。HPLC と空胞試験用に調整したサンプルの濃縮率は 5 倍であるため、これで除して算出した。

・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。

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。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 $E=10^{(-1/\text{slope})}-1$ 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. 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、*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。

3. バイオコントロール社の精製セレウリドが HPLC で示すピークを指標としたセレウリド検出の試み

バイオコントロール社の精製セレウリドを HPLC 分析した結果、Agata et al. の報告と同様の明確なピークを得ることができた。よってこのピークをセレウリドと仮定し検討を継続した。

限外濾過膜の分子量では 10 K が、抽出時のアセトニトリル濃度は 80-90% が最も回収率が高い結果となった。なお限外濾過膜 3K の抽出時アセトニトリル濃度 90% においては先のピークが検出できなかった。限外濾過膜に着目すると、3K では回収率が 71.4%、10K では 84.7% となり、10K

の方が回収率は高かった。同様に抽出時に使用したアセトニトリル濃度に着目すると、アセトニトリル濃度 80%における回収率が 92.7%と最も高かった。この結果に基づき、その後の実験においては限外濾過膜 10K と抽出時のアセトニトリル濃度を 80%とした。

空胞変性試験においては精製セレウリド (10 ppm) が 28 の希釈倍率で空胞化が観察された一方で、添加サンプル (最終セレウリド濃度 20 ppm) では 29 の希釈倍率で空胞化が観察された。したがって、空胞変性試験では回収率は 100%であった。

次に、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 (表 5)。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。この時、セレウリドのピークは米飯や菌による妨害ピークと分離していた。

しかしながら、HPLC の検出値と空胞変性試験から算出される値との結果に大きな差が生じており、HPLC におけるセレウリド測定値 (48 時間 : 29.5 $\mu\text{g/g}$ 、72 時間 : 257 $\mu\text{g/g}$) は空胞変性におけるセレウリド測定値 (48 時間 : 0.39 $\mu\text{g/g}$ 、72 時間 : 1.56 $\mu\text{g/g}$) より 100 倍程度大きな値となった。

2. 合成セレウリドが HPLC で示すピークを指標としたセレウリド検出の試み

バイオコントロール社の精製セレウリドを標準としたときの測定値に矛盾が生じたことから、合成セレウリドと精製セレウリドを同じ HPLC 条件で比較したところ、精製セレウリドで見られたピークが合成セレウリドでは検出できなかった。合成セレウリドが示すピークは精製セレウリドのピークより保持時間が短いことが判明した。したがってスタンダードと見なしていた精製セレウリドのピークはセレウリドとは別の物質である可能性が示された。

精製セレウリドにおける誤認経験に基づき、合成セレウリドが HPLC で示した鋭いピークがセレウリドによるものかどうかを検証するため、東洋食品工業短期大学の LC-MS で測定を行った。測定に使用した LC の条件は表 6 に示した。なお測定時のグラジエントプログラムは以下のとおりである : 0-2 min (20% B)、10 min (80% B)、15 min (95% B)、18 min (95% B)、18.01 min (20% B)、22 min (20% B) (図 5)。米飯の測定に使用したのと同じ条件で合成セレウリドを調べたのが図 6 で、この時のセレウリドのリテンションタイムは 15.58 分であった。分子量とマススペクトルからセレウリドと同定されたピークにおいては UV 吸収がほとんどみられず、ベースラインのノイズに隠れる大きさであった。

セレウリド本体を HPLC-UV 検出系で測

定できる濃度を推定するために、セレウリドと構造のよく似たバリノマイシンを東洋食品工業短期大学の LC-MS で測定した。測定に使用したバリノマイシンは 380 ppm であり、UV 検出器でピークを確認することが出来た。バリノマイシンは検出波長 226 nm に比べ、214 nm の方が吸収は大きく、ピーク形状も鋭角であった (図 9)。このピークのマススペクトル (図 10) はバリノマイシン特異的であった。380 ppm のバリノマイシンは UV で検出できたが、供試可能な濃度の合成セレウリドでは UV 吸収によるピークの確認は不可能であった。

上述のように合成セレウリド溶液にはセレウリドとは別の物質による巨大なピークが確認されたが、このピークはセレウス接種米飯サンプルでも僅かながら確認できた。このピークがどのような物質であるかマスキロマトグラムによって確認したが、UV 吸収は見られるもののトータルイオンクロマトグラムにおいては検出できなかった。検出する分子量を 100 毎に区切って再検出を行ったが、同様にマスキロマトグラムによるピークは確認できなかった。本ピークがセレウリドによるものではないことは明白だが、セレウリドの代替指標として使用できないか検討した。

3. セレウス接種米飯および炒飯からのセレウリド検出の試み

合成セレウリドが空胞変性を起こす希釈倍率から算出した有効濃度は 5 ng/ml

であり、これをもとにバイオコントロール社の精製セレウリド (1 mg/ml) を用いて空胞変性試験を行ったところ、空胞変性が観察できる最終希釈倍率が 29 であったことから、同製品に含まれていたセレウリド量は 2.5 μ g/ml と判断された。すなわち、表示濃度に比べて実際の力価は極めて低かった。同社が販売を中止したこともあり以後の実験は合成セレウリドによった。

セレウス接種米飯や炒飯中のセレウリド量を空胞変性試験と LC-MS 法で比較したところ近似した値が得られた。炒飯においても、米飯同様にセレウスの対数増殖期の末期とみられる 48 時間目からセレウリドが検出されている。しかし炒飯では米飯に比べて菌数の増加量・速度共に増しており、72 時間培養サンプルにおけるセレウリド量は米飯より高かった。HPLC 測定によるセレウリド指標ピークはセレウリドが検出される接種後 48 時間目から検出されたが、そのピーク面積から換算される値とセレウリド量に相関はなかった。

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。

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 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。

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。

市販の精製セレウリドおよび合成セレウリドを標準品として HPLC-UV 系での検出測定を目指したが、結果的には果たせなかった。不成功に終わった理由は、これらの試薬それぞれが示した一つのピークをセレウリドと誤認したことにある。

研究が進む過程で共同研究者の切畑らがセレウリドの合成に成功し、これを試料とする機会を得た。しかしながら、合成セレウリドと精製セレウリドの HPLC クロマトグラムを比較すると、精製セレウリドをスタンダードとして設定したピークが合成セレウリドのクロマトグラムにおいては検出されなかった。ここに至り精製セレウリドを分析した際の最も高いピークがセレウリドではない可能性が明らかになった。

発想を変えて、セレウリド自体ではなくセレウリド産生に同期して生じる UV 吸収性の代替物質を HPLC により測定することでセレウリド汚染の指標とできないか検討した。合成セレウリドや精製セレウリド試料に含まれていてセレウリド本体と誤認してしまっていた UV 吸収ピークは、セレウスを接種して培養した米飯試料においても観察できたことから、代替指標

となる可能性を期待した。すなわちセレウリドにはUV吸収がみられないが、前駆体あるいは類縁体にUV吸収能があり、検出器にピークとして現れている可能性も考えられる。

E. 文献

- 1) Sasahara T, S Hayashi, Y Morisawa, T Sakihama, A Yoshimura, Y Hirai: *Bacillus cereus* bacteremia outbreak due to contaminated hospital linens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011, 30: 219-26.
- 2) Shinagawa K: [Foodborne disease outbreaks reported in Japan, 1952-2009--outbreaks of microbial foodborne disease]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2010, 51: 274-8.
- 3) Turnbull PC, JM Kramer, K Jorgensen, RJ Gilbert, J Melling: Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. *Am J Clin Nutr* 1979, 32: 219-28.
- 4) Standish AJ, UH Stroehner, JC Paton: The pneumococcal two-component signal transduction system RR/HK06 regulates CbpA and PspA by two distinct mechanisms. *J Bacteriol* 2007, 189: 5591-600.
- 5) Lamy MC, M Zouine, J Fert, M Vergassola, E Couve, E Pellegrini, P Glaser, F Kunst, T Msadek, P Trieu-Cuot, et al: CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol Microbiol* 2004, 54: 1250-68.
- 6) Ehling-Schulz M, M Fricker, S Scherer: *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol Nutr Food Res* 2004, 48: 479-87.
- 7) Shinagawa K, H Konuma, H Sekita, S Sugii: Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 1995, 130: 87-90.
- 8) Dierick K, E Van Coillie, I Swiecicka, G Meyfroidt, H Devlieger, A Meulemans, G Hoedemaekers, L Fourie, M Heyndrickx, J Mahillon: Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J Clin Microbiol* 2005, 43: 4277-9.
- 9) Ehling-Schulz M, M Fricker, S Scherer: Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiol Lett* 2004, 232: 189-95.
- 10) Ehling-Schulz M, MH Guinebretiere, A Monthan, O Berge, M Fricker, B Svensson: Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 2006,

- 260: 232-40.
- 11) Priha O, K Hallamaa, M Saarela, L Raaska: Detection of *Bacillus cereus* group bacteria from cardboard and paper with real-time PCR. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2004, 31: 161-9.
- 12) Martínez-Blanch J, G Sánchez, E Garay, R Aznar: Evaluation of a real-time PCR assay for the detection and quantification of *Bacillus cereus* group spores in food. *J Food Prot.* 2010, 73: 1480-5.
- 13) Fricker M, U Messelhauser, U Busch, S Scherer, M Ehling-Schulz: Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Appl Environ Microbiol* 2007, 73: 1892-8.
- 14) Lucking G, MK Dommel, S Scherer, A Fouet, M Ehling-Schulz: Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator *AbrB*, but not by the virulence regulator *PlcR*. *Microbiology* 2009, 155: 922-31.
- 15) Haggblom MM, C Apetroaie, MA Andersson, MS Salkinoja-Salonen : Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. *Appl Environ Microbiol* 2002 68: 2479-83.
- 16) 川村久美子、平間佑美、安形則雄、伊藤秀郎、太田美智男 : High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry を用いた *Bacillus cereus* セレウリド(嘔吐毒)検出法の検討、日本臨床微生物学雑誌 2005、15: 68-76.
- 17) Biesta-Peters EG, MW Reij, RH Blaauw, PH In 't Veld, A Rajkovic, M Ehling-Schulz, T Abee : Quantification of the emetic toxin cereulide in food products by liquid chromatography-mass spectrometry using synthetic cereulide as a standard. *Appl Environ Microbiol* 2010, 76: 7466-72.
- 18) Agata N, M Mori, M Ohta, S Suwan, I Ohtani, M Isobe: A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEP-2 cells. *FEMS Microbiol Lett.* 1994, 121: 31-4.
- 19) 古瀬昭夫、牛嶋正、鶴田元子、又吉由紀子、大塚博史: セレウス菌による集団食中毒. *小児感染免疫.* 2004、16: 151-5.
- 20) Rajkovic A, M Uyttendaele, A Vermeulen, M Andjelkovic, I Fitz-James, P Veld, et al. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Lett Appl Microbiol.* 2008, 46: 536-41.
- 21) Tempelaars M, S Rodrigues, T Abee. Comparative analysis of

- antimicrobial activities of valinomycin and cereulide, the *Bacillus cereus* emetic toxin. *Appl Environ Microbiol.* 2011, 77: 2755-62.
- 22) Mikkola R, N Saris, P Grigoriev, M Andersson, M Salkinoja-Salonen. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide: the emetic toxin of *B. cereus*. *Eur J Biochem.* 1999, 263: 112-7.
- 23) 南谷 臣昭、野田 万希子、原 信行、菅原 吉規*、白木 康一、中村 昌司、永井 宏幸、小林 香夫、大塚 公人. LC-MS/MS による生団子中のセレウリドの定量とその留意点について. *岐阜県保健環境研究所報.* 2011、19: 24-30.
- 24) Agata N, M Ohta, M Mori. Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. *Curr Microbiol.* 1996, 33: 67-9.
- 25) 皆元 みゆき. 熊本市におけるセレウス菌食中毒に対する行政の対応 (緊急事態発生時の医療機関等への都道府県の支援態勢について—全国知事会主催講演会の概要). *都道府県展望. 全国知事会;* 2004、548: 60-3.

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22 - 25年度
分担研究報告書

核酸クロマト法による毒素産生ウエルシュ菌および
セレウス菌の検出法に関する研究

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23 - 25年度 分担研究報告書

核酸クロマト法による毒素産生ウエルシュ菌および
セレウス菌の検出法に関する研究

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：ウエルシュ菌食中毒の原因食品中には、エンテロトキシン（CPE）産生性ウエルシュ菌の生菌が多く含まれているとされている。従って、喫食前の食品からCPE産生性ウエルシュ菌の生菌を検出する事が食中毒発生の防止に繋がる可能性が高い。生菌に存在するCPE mRNAを指標とした遺伝子検査法の開発を行った。Nucleic Acid Sequence-based Amplification（NASBA）-核酸クロマト法を利用して開発した遺伝子検査法は、CPE産生性ウエルシュ菌を特異的に検出するのみならず、10コピー（分子）のRNAを15分の増幅及び20分の検出時間で検出する感度と迅速性を有していた。ウエルシュ菌食中毒の主な原因食材の一つであるカレーを試料とした場合、本遺伝子検査法により食中毒発症菌量に相当する 10^6 cfu/gのCPE産生性ウエルシュ菌を検出した。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24年10月1日より販売を開始した。

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 10 cfu/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。

A. 研究目的

グラム陽性嫌気性桿菌であるウエルシュ菌は、河川や海、土壌などに広く分布しており食品を汚染する機会が多い。食中毒の原因となる下痢原性ウエルシュ菌（CPE 産生性ウエルシュ菌）は、耐熱性芽胞を形成し食品の加熱調理に耐え生き残り、汚染した食品の温度低下に伴い芽胞から出芽し、急速に増殖を開始する。体的な原因食品として、カレーやシチューなどの煮込み料理が多い。ウエルシュ菌食中毒の最も確実な診断は、CPE 産生性ウエルシュ菌を分離することであるが、培地による菌分離法では CPE 産生・非産生菌を鑑別することができない。これらを識別するため PCR 法を用いた方法が開発されているが、PCR 法では遺伝子検出前に菌の増菌培養を必要としており、食中毒防止に寄与する迅速性は有していなかった。

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取り除くことは難しい。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。

ウエルシュ菌食中毒の発症には、 10^6 cfu/g 以上の CPE 産生性ウエルシュ菌の生菌で汚染された食品の喫食が必要である。即ち、喫食される前に大規模調理施設で製造された食品から CPE 産生性ウエルシュ菌の生菌を検出できれば、大規模食中毒発生の防止に繋がる可能性がある。そこで、カレーやシチューなどの煮込み料理に含まれる CPE 産生性ウエルシュ菌 (10^6 cfu/g) の生菌を、培養することなく迅速かつ簡便に検出する遺伝子検出法の開発を行った。そこで、前培養を経ることなく、食品中の CPE 産生ウエルシュ菌および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。

B. 実験方法

1) 菌株

エンテロトキシン（CPE）産生性ウエルシュ菌株として、NCTC8239 株を使

用した。CPE 非産生性ウエルシュ菌株としては、ATCC13124 株を使用した。

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) 培地と菌培養

ウエルシュ菌の培養について、0.2 g のチオグリコレート (TGC) 培地に 10 ml 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。寒天培地は、CW 寒天培地 (栄研化学株式会社) に卵黄液を加えたものを用いた。

TGC 培地にウエルシュ菌を接種し、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 のウエルシュ菌を用いた。

セレウス菌の培養について、Brain Heart Infusion (BHI, ベクトン・ディッキンソン社) 培地を用いた。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 のセレウス菌を用いた。

4) Nucleic Acid Sequence-based Amplification (NASBA) 法¹⁾

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 μ 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 μ 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：0.5 mL チューブに反応液 5 μ L と抽出核酸 2.5 μ 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 μ 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) ²⁾

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 μ 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、25 g のレトルトカレーおよび 225 ml の生理食塩水を加え 10% 乳剤とした。ここに TGC 培地で培養したウエルシュ菌をレトルトカレー 1 g あたり 10^5 または 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 1

ml を 1.5 ml チューブに入れ、1,890 x g 以上で 1 分間遠心し、ウエルシュ菌を沈澱させた。上清を除去した沈澱に核酸抽出試薬を 400 μ 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 1,890 x g 以上で 5 秒間遠心し上清と沈殿部に分け、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。

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 μ 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殿部に分け、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。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) 菌接種試験

平成 23 年度に 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抽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。

3) Internal control との共増幅系の構築

多種多様な食品に本法を適応させる上で、食品成分に由来した増幅反応阻害の把握は必須である。そこで、NASBA 増幅反応時に同一チューブ内で CPE mRNA と共増幅する Internal control (IC) を設計した。IC のヌクレオチド配列は、非特異増幅や非特異検出を防ぐために、既知の配列とは異なる配列であることが望ましい。また、核酸クロマトで検出する場合、CPE 検出ラインとは異なる IC 専用の位置でライン検出させる必要があり、検出ストリップの改良も行った。

まず、Gene Bank に登録されているヌクレオチド配列を確認、比較検討するこ

とで、登録済みの配列とは類似性を有しない新たなヌクレオチド鎖 (IC-テンプレート) を見出した。

IC-テンプレートに対する NASBA 用 IC-プライマーとして、IC-F および IC-R を設計した。CPE mRNA との共増幅系を構築する前に、10 コピーの IC-テンプレートを用いて、IC-プライマーによる NASBA を実施した結果、核酸クロマトで CPE ラインとは異なる位置で IC ラインを検出した。

IC-テンプレートの NASBA 増幅を確認後、CPE の NASBA 増幅系との共増幅試験を行った。共増幅時の性能は、レトルトカレー 25 g に 10^5 cfu/g のウエルシュ菌を加えた菌接種試験で検証した。同一チューブ内で標的核酸 (本研究では CPE mRNA) と IC テンプレートを同時に増幅させる共増幅系の場合、増幅反応に必要な酵素や基質を取り合うため、往々にして標的核酸の検出感度は低下するが、本法では CPE 産生ウエルシュ菌の検出感度 (10^5 cfu/g) を維持しながら共増幅系の再構築に成功した。

D. 結論

多種多様な食品に本法を適応する上で、食品成分に由来した増幅反応阻害の把握は必須であることから、増幅阻害の有無を把握する Internal control (IC) を設計した。データベース登録情報との比較検討から、既存配列とは類似性を有しない新

たなヌクレオチド配列を見出し、IC テンプレートとした。この IC テンプレートが NASBA 法で増幅されることを予め確認した上で、CPE mRNA との共増幅系の構築を行った。この共増幅系では、増幅反応時に同一チューブ内で IC 増幅系と CPE 増幅系が同時並行して動くため、酵素と基質を奪い合う。このため、検出感度の低下が懸念されたが、菌接種試験における検出感度は、非共増幅系と同じ 10^5 cfu/g であった。

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。

これら検出法の性能を踏まえ、株式会社カイノスにおいて製品化を進め、平成24年10月1日にスイフトジーン CPE 産生ウエルシュ菌「カイノス」という製品名で上市、販売を開始した。また、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) 宇治家武史、林司、山本茂貴、鎌田洋一. NASBA 核酸クロマト法を用いた新しいウエルシュ菌の検出法. 第32回日本食品微生物学会学術総会. 2011年10月. 東京.

2) 宇治家武史、林 司、山本茂貴、鎌田洋一. NASBA 核酸クロマト法を用いた新しいウエルシュ菌の検出法. 第33回日本食品微生物学会学術総会. 2012年10月. 福岡.

2) 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) 特許出願
(特願 2001-189796、
特許出願日平成23年8月31日)
- 2) 実用新案取得
なし
- 3) その他
CPE 産生ウエルシュ菌の検出試薬の製品化 (平成24年10月1日上市)
製品名: スイフトジーン CPE 産生ウエルシュ菌「カイノス」

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」

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

ブドウ球菌新型エンテロトキシンの産生動態の解析

岩手大学 農学部

重茂 克彦

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

「食品中の毒素産生食中毒細菌及び毒素の直接試験法の研究」

平成 22 - 25 年度

分担研究報告書

新型ブドウ球菌エンテロトキシンの産生動態の解析と食品中での産生量評価

分担研究者 重茂 克彦 岩手大学農学部獣医学課程 教授

協力研究者 佐藤 明彦 岩手大学農学部

品川 邦汎 岩手大学農学部

研究要旨：黄色ブドウ球菌の産生するエンテロトキシン(SEs)は、ヒトをはじめとする霊長類に嘔吐を引き起こす、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。SEG、SEI、SEIM、SEIN、SEIO 遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌を BHI 培地に約 0.5×10^7 cfu/ml になるように接種し、20 °C および 30°C で 48 時間培養して経時的に毒素産生量と菌数動態を解析したところ、SEs の産生量は 30°C において 12 時間、24 時間および 48 時間で両菌株ともほぼ一定であったが、20 °C では 12、24、48 時間で産生総量は増加傾向を示した。このことから、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。しかしながら、mRNA 動態を比較すると、20°C および 30°C 両者において対数増殖期に mRNA の発現が誘導され、定常期には mRNA コピー数が低下する傾向は同様であることが認められた。なお、スキムミルクにおける SEG、SEI、SEIM、SEIN、SEIO 産生動態も評価したが、in vitro の結果と同様に 20°C において産生総量が増加することが認められた。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れるが、その機構については更なる解析が必要である。

A. 研究目的

黄色ブドウ球菌は、食品内で増殖する際にエンテロトキシン (staphylococcal enterotoxins; SEs) を産生する。食品と共に、ヒトが SEs を経口的に摂取することにより、嘔吐を主徴とする毒素型食中毒を引き起こす^{1,2)}。SEs は SEA~SEE の 5 型が存在することが知られていたが、1990 年代半ば以降に新型エンテロトキシンが次々に報告され、現在では SEG~SE1X の 17 種の新型 SEs および staphylococcal enterotoxin-like toxins (SEls) の存在が明らかになっている。特に、SEG、SEI、SE1M、SE1N および SE10 遺伝子を保有し、かつ SEA~SEE 遺伝子を保有しない黄色ブドウ球菌による食中毒が日本各地で報告されている。本研究では、新型 SEs/SEls の産生量を評価し、食中毒への関与を推定することを目的として、新型 SEls (SEG、SEI、SE1M、SE1N、および)SE10 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。

B. 実験方法

第 1 項 新型エンテロトキシンの産生動態解析と食品内産生の評価

1. 供試菌株

日本で発生した食中毒由来株 Aomoril (*seg, sei, selm, seln, selo, selp*), Hiroshimal3 (*seg, sei, selm, seln, selo,*

selj, ser, ses, set), Sagal (*seg, sei, selm, seln, selo, selp*) および Saitama496 (*seg, sei, selm, seln, selo*) を実験に供した。黄色ブドウ球菌の継代には Difco™ Brain Heart Infusion Agar (Becton, Dickinson and Company) (BHI agar) を用いた。

2. Sandwich ELISA

固層抗体には精製 IgG 分画あるいは各 SE に対するウサギ特異抗体を使用し、検出抗体には HRP (Horseradish Peroxidase) 標識特異抗体を用いた。また SE10 検出系については、固層抗体に抗 rSE10 ウサギ特異抗体を、検出抗体には HRP 標識ニワトリ特異抗体を用いた。標準曲線用スタンダードおよび測定サンプルの希釈には Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBO) (以下 Solution 1 と略) を用いた。検出抗体の希釈には Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2 (以下 Solution 2 と略) を用いた。ブロッキングバッファーには Starting Block™ (PBS) Blocking Buffer (PIERCE) を使用した。プレートには 96F Maxisorp White Microwell (nunc) を用いた。基質溶液には SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) を用い、マイクロプレートリーダー (wallac 1420 ARVO MX/Light, Perkin Elmer) で発光測定を行った。

protein A の影響を除去するために

ImmunoPuer Normal Rabbit Serum (PIERCE) (以下 NRS と略) を被検培養上清の 20~100 %量加えて静置した (4 °C、16~18 時間)。その後 Solution 1 を加えて 10 倍希釈し、被検検体の原液とした。各毒素の産生量に応じて、原液を Solution 1 で適宜希釈するか、または原液を直接測定した。protein A が結合しないニワトリ抗体を用いた SE10 検出系では、NRS による処理を行わず、培養上清を Solution 1 で適宜希釈して測定した。protein A の影響の有無は、NRS から精製した正常ウサギ IgG 分画を固層した各 Sandwich ELISA で同一サンプルを測定し、非特異な反応がブランクと同等まで低下することにより確認した。

3. 高密度接種時の 20 °C および 30 °C における増殖動態と *egc* 関連毒素群産生量

黄色ブドウ球菌 Aomoril 株および Hiroshimal3 株を BHI agar で 2 回継代した後、Yeast Extract を 1% (w/w) 添加した BHI broth (1% Yeast Extract 添加 BHI broth) 5 ml に接種し seed culture を行った (37 °C、16~18 時間、振盪培養)。培養終了後、seed culture を希釈し、初発菌量 5×10^7 cfu/ml で 1% Yeast Extract 添加 BHI broth 60 ml に接種し、20 °C および 30 °C で 48 時間の振盪培養を行なった。経時的に定量培養により菌量測定を行うと共に、培養液を採取し 14,000 rpm、20 分遠心して菌体と上清を

回収した。上清は 0.22 μ m フィルター (Millex GP[®] 0.22 μ m、Millipore) で濾過処理後、Sandwich ELISA に供した。菌体は total RNA 精製に供した (図 1)。

4. Real-time PCR による *egc*-関連毒素群 mRNA 動態の解析

2.0×10^8 CFU 相当の菌体から、RNeasy minikit (QIAGEN) を用いて total RNA を精製した。混入した gDNA は、DNase I recombinant (Roche applied science) 1 μ l、10×DNase I buffer 1 μ l、DEPC treated water 3 μ l、RNA 溶出液 5 μ l を混和し、室温で 40 分間反応させることにより除去した。DNaseI は 75 °C 30 分間の処理により失活させた。逆転写反応は、BRL MuLV reverse transcriptase (Invitrogen) 1 μ l、RNase inhibitor 0.5 μ l、0.1M DTT 2 μ l、random primer (Invitrogen) (100 ng/ml) 1 μ l、2.5mM dNTP mix (Takara Bio) 8 μ l、5×RT buffer 4 μ l、DEPC treated water 0.5 μ l、DNase I 処理 RNA 溶液 3 μ l を加え、42 °C、60 分間で行った。続いて 75 °C、15 分間の処理で反応を停止した。得られた cDNA 溶液を real-time PCR に供した。gDNA コンタミネーションのコントロールとして、逆転写反応(-)の RNA サンプルを real-time PCR に供した。

real-time PCR は、*seg*, *selo*, *seg*mRNA および内部対照遺伝子を標的とし、iQ SYBR Green Supermix (BIO-LAD) 25 μ l、