

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 $\mu\text{g/g}$ 検出され、72 時間後には 1.6 $\mu\text{g/g}$ 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思われた。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、試験法の実用化には至らなかった。

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℃ 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考ええる。

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（ 、 、 、 ）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 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。

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、スイフトゾ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、加熱工程があったにしろ、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 していると思われた。

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。