

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試験法に関する研究
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 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~SEIX の 17 種の新型 SEs および staphylococcal enterotoxin-like toxins (SEIs) の存在が明らかになっている。特に、SEG、SEI、SEIM、SEIN および SEI0 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/SEIs 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 SEIs (SEG、SEI、SEIM、SEIN、および)SEI0 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 Aomori1 (*seg, sei, selm, seln, selo, selp*), Hiroshima13(*seg, sei, selm, seln, selo,*

selj, ser, ses, set)、Saga1 (*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 SEI0 検出系については、固層抗体に抗 rSEI0 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 (TOYOB0)(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、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 および 30 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 Aomori1 株および Hiroshima13 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、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 および 30 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 recombinant (Roche applied science) 1 μ l、10 \times DNase 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、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 \times RT buffer 4 μ l、DEPC treated water 0.5 μ l、DNase 処理 RNA 溶液 3 μ l を加え、42、60 分間で行った。続いて 75、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*、*se/o*、*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、

各遺伝子特異的プライマー300 nM、DEPC treated water を混合し、49 μ l に調整した溶液に cDNA 溶液 1 μ l を加え、Mini Opticon (BIO-LAD)を用いて行った。PCR 反応条件は初期変性 (95 3 分間)、変性、アニーリング、伸長反応 40 サイクル (95 30 秒間、60 30 秒間、72 60 秒間)、融解曲線 (60-90)で行い、各伸長サイクルの終わりに SYBR Green の蛍光強度を測定した。検量線は黄色ブドウ球菌の reference 株であり *egc* を保有する Mu50 より精製した gDNA を 10 倍階段希釈したものをを用いて、実験ごとに作成した。10 種類のハウスキーピング遺伝子から、mRNA が安定して発現している 3 つの遺伝子を選抜し内部標準遺伝子とした。内部標準遺伝子の mRNA 発現量から geNorm ソフトウェアを用いて Normalization Factor を求め、各 SEs の mRNA 発現量を標準化し、各サンプルの相対的な mRNA 発現量を求めた。

5. スキムミルクにおける *egc*-関連 SEIs 産生量の評価

スキムミルク粉末 (和光純薬) を滅菌純水に無菌的に溶解して 10% (W/V) 溶液を作成し、検体とした。Aomori1 株、Hiroshima13 株および Saitama496 株を BHI agar で 2 回継代したのち、Yeast Extract 1 %添加 BHI broth 5 ml に接種し Seed Culture を行い (37 、16~18 時間、振盪培養) スキムミルクに 1.0×10^4 CFU/ml で接種した。培養は 20 °C あ

るいは 37 °C で 24 時間行い、6、12、24 時間の時点で検体を採取して定量培養により菌数を定量すると共に、上清を採取して SEIs 定量に供した。

14,000 rpm、20 分遠心により上清を回収し、0.22 μ m フィルター (Millex GP[®] 0.22 μ m, Millipore) で濾過処理後、酸沈殿によるカゼインの除去、TCA 沈殿による蛋白質濃縮を行い、最終的に 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 で溶解し、Sandwich ELISA による SEIs 定量に供した。

C. 結果

1. 高密度接種時の 20 および 30 における増殖動態、*egc* 関連毒素群産生動態および mRNA 動態

BHI 培地に Aomori 1 株を約 5×10^7 cfu/ml で接種し、20°C および 30°C で培養したところ、*egc* 関連 SEs の産生量は 30°C において定常期に到達した 12 時間以降ほぼ一定であったが、20 °C の培養では 12、24、48 時間で産生総量は増加傾向を示した (図 2)。*egc* 関連 SEs/SEIs mRNA の発現量を比較すると、対数増殖期における mRNA コピー数は 20 °C において 30 °C よりも多い傾向が確認されたが、対数増殖期後期から定常期においては、両温度において低いレベルで推移した (図 2)。Hiroshima13 株においても Aomori1 株と同様の傾向を示し、30 °C において SEs/SEIs 量は定常期に入ってからには一定であるのに対し、20 °C 培養

では 48 時間にいたるまで毒素産生は増加傾向にあった。さらに、mRNA 動態についても、対数増殖期においてコピー数が 20 °C において増加する傾向を示したが、培養後半では両温度いずれも mRNA コピー数は低いレベルで推移した (図 3)。

2. スkimミルクにおける *egc* 関連 SEs/SEIs 産生量評価

我々はこれまでに、にぎりめしにおける *egc* 関連 SEs 産生を評価しており、BHI broth の場合と同様に 25 °C で有意な毒素産生が見られることを明らかにしてきた。今回、炭水化物が多くをしめる米飯と比較するために、蛋白質特にカゼインを多量に含む食品である skim ミルクにおける *egc* 関連 SEs 産生量を評価し、さらに低温での産生状況がみられるか否かを検討した。

わが国で分離された食中毒由来株、Saga 株、Hiroshima13 株、および Saitama496 株の skim ミルク中での毒素産生動態を図 4 に示す。これらの株を 1.0×10^4 CFU/ml で skim ミルクに接種し、37 °C および 20 °C で 24 時間培養したところ、37 °C 培養では、*in vitro*, BHI broth での産生と同様に、定常期以降の毒素総量は一定あるいは減少傾向を示した。これに対し、20 °C 培養では黄色ブドウ球菌の増殖が遅延することから 12 時間まで毒素の産生は確認されなかったが、24 時間の時点の毒素総量は 37 °C 培養よりも多量となる傾向がすべての菌株

で認められた。低温での産生量増強は、BHI broth およびにぎりめしのみならず、skim ミルクでも認められることが明らかになった。

D. 考察および結論

egc 関連毒素群について、これらの遺伝子のみを保有する食中毒由来株が存在するにも関わらず、*in vitro* での産生量がごく少量であるという矛盾が示されていたが、我々はこれまでに 37 °C (従来の培養温度) 20-25 °C (室温、食中毒事例を想定) での培養を比較すると、20-25 °C の培養条件において産生量が増加する傾向があることを明らかにしてきた。

増殖動態と毒素産生の関連を検討したところ、*egc* 関連 SEs は対数増殖期に産生がはじまるが、低温での培養では定常期に入っても *egc* 関連 SEs 産生量が持続するのに対し、30 °C では定常期に達すると *egc* 関連 SEs 産生は抑制されることが推定された。しかしながら、mRNA 動態は、30 °C と 20 °C における毒素産生量の違いと完全に一致するものではなく、むしろ、両温度においてほぼ同等の傾向を示した。現在のところ、20-25 °C における *egc* 関連 SEs/SEIs の産生増強機構は不明な点が多い。しかしながら、本研究で示したように、skim ミルクにおいても低温における産生増強は確認されており、室温環境下で毒素産生量が増加する現象

は、ブドウ球菌食中毒の発生を考えるうえで重要な情報である。黄色ブドウ球菌菌株により差がみられるが、一般的に20°Cにおいては増殖が遅延する。低温条件下での *egc* 関連 SEs mRNA の転写のピークは対数増殖期にあり、スキムミルクにおいては検出可能なレベルの毒素が確認されるのは対数増殖期後期以降であることから、室温で食品が保存された場合、食品の初期汚染菌数が多いほど、*egc* 関連 SEs の蓄積量は増加すると考えられる。

E. 健康危害情報

特になし。

F. 文献

- 1) 石田和夫ら (2005) イラスト食品衛生学、東京教学社、東京
- 2) 山中英明、藤井建夫、塩見一雄 (2007) 食品衛生学第二版、恒星社厚生閣、東京
- 3) Sauerbrey, G., Z.Phys. (1959) 155:206.

G. 研究発表

1. Ono, H.K., Nishizawa, M., Yamamoto, Y., Hu, D.-L., Nakane, A., Shinagawa, K., and Omoe, K. (2012) Submucosal mast cells in the gastrointestinal tract are a target of staphylococcal enterotoxin type A. FEMS Immunol. Med.

Microbiol.64: 392-402.

H. 学会発表

1. Sato, A., Nagasako, Y. Yamamoto, Y. Sato, Y., Ono, H.K., Hu, D.-L., Nakane, A. and Omoe, K. (2011) Temperature dependent regulation of enterotoxin-gene-cluster-related staphylococcal enterotoxins production. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo.
2. 長廻ゆりあ, 稲垣華絵, 山本裕紀, 鎌田洋一, 品川邦汎, 重茂克彦 (2011) 新型ブドウ球菌エンテロトキシンの食品中における産生量評価. 第102回日本食品衛生学会学術講演会, 秋田市.

I. 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
なし

