

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**

平成 25 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 鎌田 洋一

岩手大学 農学部

平成 25 ( 2014 ) 年 3 月

## 目 次

### 総括研究報告書

食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究 鎌田 洋一	・・・ 1
---------------------------------	-------

### 分担研究報告書

HPLC による <i>Bacillus cereus</i> の嘔吐毒素（セレウリド） 検出法の試行 西川 禎一	・・・ 17
---	--------

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 宇治家 武史	・・・ 51
---	--------

黄色ブドウ球菌のリスクプロファイル 山本 茂貴	・・・ 65
----------------------------	--------

ウエルシュ菌食中毒発現機構の解析 三宅 眞実	・・・ 101
---------------------------	---------

新型下痢毒素産生性ウエルシュ菌による食中毒事例の解析と 原因ウエルシュ菌株のゲノム解析 鎌田 洋一	・・・ 121
---	---------

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25年度

総 括 研 究 報 告 書

岩手大学 農学部

鎌田 洋一



## 厚生労働科学研究補助金

### 食品の安心・安全確保推進研究事業

#### 平成25年度総括研究報告書

#### 食品中の毒素産生微生物および毒素に関する研究

研究代表者 鎌田 洋一 岩手大学農学部 教授

##### 研究要旨：

本研究では、食品の安全確保を推進するため、毒素産生性食中毒細菌のなかで、ブドウ球菌、およびセレウス菌が産生する嘔吐毒素、ならびにウエルシュ菌下痢毒素とそれら毒素産生性細菌について、食品中から直接検出する試験法を開発することを目的とする。また、各細菌の食品危害性に焦点をあてたリスクプロファイルを作製し、食品衛生行政における食中毒発生予防施策作製に貢献することを目的とする。さらには、それぞれの食中毒の発生機構を分子レベルで解析し、学術的な貢献を行うことを目的とする。

セレウス菌が産生する嘔吐毒素（セレウリド）を検出する方法として、比較的安価で汎用性の高い理化学分析機器である高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が適応できるかどうか検討した。セレウリドは、今まで用いていた不純物の含まれた、菌培養物からの精製標品ではなく、化学合成した高純度の、標準物として使用に耐える品質のものを用いた。セレウリドについて、UV 検出器による HPLC の測定では、非常に明瞭なピークを検出することができた。しかしながら、同ピークを質量分析器 / 液体クロマトグラフィーシステムを用いると、セレウリドのピークと一致しなかった。HEp-2 細胞を用いてのセレウリド検出を行い、陽性になった検体では同ピークが検出され、非接種検体には同ピークは認められなかった。これらの知見は、ピークそのものではないが、セレウリド産生と同調して産生される物質について、安価な HPLC で検出できることを示している。今後の検討によって、数千万円の費用が必要となる質量分析器を利用せず、HPLC による、セレウリド検出法の可能性があることが考えられる。

食品中の細菌は、すべて病原性を持っているわけではなく、毒素が症状を誘発する細

菌の場合、食品から「毒素産生性」菌を検出して初めてその危害性が把握される。細菌の場合、菌培養等、検出に時間を要する行程があり、勘案すべき点は多い。そこで、セレウリド産生性セレウス菌を、無培養の、短時間検出法の開発を試みた。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について、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持つものを開発した。米飯やチャーハンを含む 5 種の食品への菌接種試験の結果、 $10^4$ 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。本検出法は市場投入され、平成 25 年 8 月 1 日より市販された。

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黄色ブドウ球菌に関する情報を収集した。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。

ウエルシュ菌は生体内毒素型食中毒を起こし、腸管内での毒素産生と細胞障害で中毒発生機構が説明されているが、腸管内での菌と毒素の挙動は全く不明と言ってよい。同菌の腸管内挙動を解析するモデルを作製し、検討をしてきた。本年度は、胆汁酸の一種であるデオキシコール酸の芽胞形成および毒素産生への影響を検討した。その結果、デオキシコール酸が芽胞形成のマスター・レギュレーターである Spo0A タンパク

に直接、あるいは間接的にその上流に作用した結果、芽胞形成とそれに続く毒素産生を強く誘導していることを明らかにした。また、糞便中に芽胞形成を抑制する因子があることを見出し、今後、腸管内でのウエルシュ菌の挙動を解析する際の、重要な手がかりを得た。

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。現在まで合計4事例が発生しており、いずれもエンテロトキシン遺伝子を持たず、同タンパク質の産生も認められなかった。これらの事例は、現在のウエルシュ菌食中毒の疫学情報は不完全で、今後、検討する必要がある。

事例株のウエルシュ菌 W5052 株は、エンテロトキシン遺伝子を持たず、別種の毒素遺伝子を保有していた。それらは、ウエルシュ菌と属を同じくする、スピロフォルム菌(*Clostridium spiroforme*)の毒素と相同性があった。病因遺伝子の種間移動と、その変異機構を解析するため、事例分離菌株 W5052 株の部分的ゲノム解析を行った。W5052 株は約 3 M bp の大きさの染色体と、少なくとも 2 種類のプラスミドを保有することが明らかになった。ゲノム中にはエンテロトキシン遺伝子は存在しないことを確認した。新種の下痢誘発性毒素遺伝子の種間伝播ならびに毒素遺伝子の変異など、ゲノム解析を通じて明らかにできる可能性が示された。

本厚生労働科学研究は、毒素産生性食中毒細菌に特化した研究を展開する。細菌性の食中毒は三つのタイプに型別される。一つは感染型の細菌性食中毒がこれにあたる。ヒトに感染し症状を発現させるタイプで、食品とともに、生きたこれらの菌が取り込まれ、胃を通過した後、腸管内に定着・増殖する。組織内に侵入し、炎症反応を惹起し、腹痛・下痢・発熱等の症状発現に至らしめる。一方、症状を発現させる直接の物質、すなわち毒素を産生する細菌があり、これらの細菌による食中毒を、毒素型細菌性食中毒と称する。ボツリヌス菌、ブドウ球菌、セレウス菌などがこれに属する。食品内で菌の増殖と毒素産生が起こる場合、食品内毒素型細菌性食中毒という。第三のタイプは、生菌として取り込まれて人体内で感染を起こして菌が増殖する際、症状発現に直結する毒素を人体内で産生する細菌群で、ウエルシュ菌や腸管出血性大腸菌がこのタイプに属する。生体内毒素型食中毒というが、タイプ1と2の間にあるため、中間型の細菌性食中毒とも称される。本研究ではセレウス菌、ブドウ球菌、およびウエルシュ菌とそれら細菌群が産生するそれぞれの毒素を研究対象とし、食品の安全性確保のための研究を展開することを目的としている。

セレウス菌とブドウ球菌は食品内に毒素を産生する。ブドウ球菌はエンテロトキシンをセレウス菌は嘔吐毒素を産生する。したがって、各毒素は食品とともに取り込まれる。これらの毒素が標的組織に達し、症状を誘発するためには、加熱に代表される食品の加工・調理時の処置について抵抗

性でなければならない。また、胃における非常に低い pH と、タンパク分解酵素の攻撃に耐えなければならない。ブドウ球菌エンテロトキシン、およびセレウス菌嘔吐毒素は加熱、酸、タンパク分解酵素処理に耐性である。

ウエルシュ菌は、生体内毒素型食中毒細菌として認知されている。上述したように、食品内に生きたウエルシュ菌が混入しており、食品とともに取り込まれ、胃を通過して腸管に達し、定着・増殖する。さらにウエルシュ菌は、芽胞を腸管内で形成し、その際に毒素を産生する。この毒素は、腸管内で産生され、腸管を攻撃し、下痢を誘発することが明らかになっている。産生部位と侵襲部位がともに腸管であるため、文字通り、毒素は腸管を示す言葉を用いて、“エンテロ”トキシン (enterotoxin) と称される。ウエルシュ菌食中毒の発生には、腸管における酸・分解酵素の殺菌作用を量とするほどの大量の生きたウエルシュ菌が食品中に存在することが必須となる。現在までの知見から、ウエルシュ菌食中毒の発生には、 $10^8$  cfu の生菌が必要と考えられている。食品衛生における一般基準から、人が 100 グラムを喫食することを想定し、中毒発生に必要な細菌数が推定されるため、同基準をウエルシュ菌に当てはめると、 $10^6$  cfu/g という数値が導き出せる。

両細菌と食品と毒素の関係を詳しく記載すると以下になる。両細菌は自然界に広く分布する。ブドウ球菌はヒトの皮膚の正常細菌叢を構成している細菌で、ヒトが生活する空間にもひろく分布する。食品原材料から、生鮮食品、食品加工場での汚染に

基づく加工食品がブドウ球菌の汚染を受ける危険性がある。セレウス菌は耐熱性芽胞を形成する土壌細菌の一種で、穀類を中心に、広く農産物を汚染している。同菌はヒトの生活環境にも容易に持ち込まれている。従って、両細菌が食品を汚染する機会は多く、原材料あるいは加工の時点で、汚染を除外することはできない。基本的にあらゆる食品に両菌の汚染は避けられないと考えた方がよい。食材食品の保存状況が不適切であれば、両細菌の食品内増殖の可能性が出てくる。

ブドウ球菌では過去に乳製品を原因食として大規模の食中毒事件が発生している。殺菌前にブドウ球菌が汚染し、温度管理の不適切のため菌増殖が起こり、それに伴い毒素産生があり、その後加熱を受け殺菌されたが、毒素は耐熱性のため毒性が保持され、嘔吐を引き起こす。毒素はエンテロトキシンと呼ばれる。エンテロトキシンは、アミノ酸配列の違いに基づいたタンパク質化学的性状の違いから、長く A から E の 5 型に分類されてきた。分子生物学的な研究から、非常に多くの亜型があることが明らかになり、それらは新型エンテロトキシンと呼ばれている。A から E のブドウ球菌エンテロトキシンは Staphylococcal Enterotoxin、SE と略されるのであるが、新型エンテロトキシンに関して、その嘔吐毒性を、霊長類を用いての実験で検証されていない毒素は、SE like、すなわち SEI と略記される。合計 20 種類程ある新型 SE および SEL は、食中毒を起す毒性、すなわち食中毒原性が証明されていないものも多い。

我が国におけるセレウス菌食中毒の原因食は、焼き飯、パスタ等であり、いずれも加熱加工食品である。セレウス菌は、嘔吐を主症状とする食中毒を起こす。セレウス菌の嘔吐毒素は耐熱性の低分子ペプチドでセレウリドとも呼ばれる。セレウリドは、アミノ酸とデプシ酸が合計 12 個環状に連なり、閉環した構造を示す。セレウリドはオートクレーブにも耐える高い耐熱性を示す。

セレウス菌嘔吐毒素は非リボソーマルタンパク質合成系と称される分子経路で合成される。毒素遺伝子が存在するのでなく、毒素合成酵素遺伝子が同定されている。その酵素が非リボソーマルタンパク質合成系に関与する。合成酵素遺伝子はクラスターを形成しており、巨大プラスミド状に存在する。毒素産生を調節するメカニズムやそれに関与する遺伝子(群)など全く不明である。

ウエルシュ菌は、生体内で毒素を産生する。ウエルシュ菌の食中毒発生機構は複雑で、現在までの知見から判断し、最も重要なウエルシュ菌食中毒発症要因は、毒素産生能のある生菌が、少なくとも  $10^8$  cfu 以上食品とともに取り込まれることと認識されている。摂食後、胃酸の攻撃を免かれたウエルシュ菌生菌は、腸管内に到達する。菌が増殖後、芽胞形成し、同時にエンテロトキシン産生が起こる。エンテロトキシンは、隣接している腸管上皮細胞を結合させる装置であるデスモゾームの構成タンパク質であるクローディンを受容体として結合する。最終的に粘膜上皮細胞膜に小孔を開け、細胞内成分が流出、下痢を誘発す

るという作用様式が一般に認識されている。以上の作用機序の中で、腸管内に到達したウエルシュ菌生菌がどのように増殖するのか、増殖する条件は何か、どれくらいの時間で増殖するのか、など、腸管内菌増殖機構、芽胞形成および毒素産生動態が全く研究されていなかった。エンテロトキシンは、分子量がおよそ 30 KDa の易熱性タンパク質である。エンテロトキシン分子全長の立体構造は明らかになっていない。本厚生労働科学研究では、ウエルシュ菌食中毒発生機構の解析に関し、未検討の研究課題を遂行している。

ウエルシュ菌食中毒の診断は以下のように行う。患者の腸管内で菌の増殖、芽胞形成があるので、患者便をウエルシュ菌に選択性のある培地で培養する。コロニーを得、純培養とする。分離株を毒素産生培地に接種し、培養後、エンテロトキシンの有無を逆受け身ラテックス凝集反応で検査する。同時に、患者便中のエンテロトキシンを検出する。エンテロトキシンは均一な抗原性を持ち、血清型に分類されるような多型はない。免疫抗体を用いての逆受け身ラテックス凝集反応法エンテロトキシン検出法が確立されている。一方、推定原因食からもウエルシュ菌の検出を試みる。菌分離ができた場合、エンテロトキシン遺伝子の有無を PCR 法で検査する。また、毒素産生に適した培地に接種・培養し毒素産生が起こるか検証する。

1997 年に門間らは、下痢を示した食中毒事例に遭遇し、ウエルシュ菌を分離した。同菌株の遺伝子検査を行ったところ、エンテロトキシン遺伝子は持っていないこと

が示された。一方、同菌株を培養し、ウサギ腸管ループ内に投与すると、液体貯留が認められ、同菌株は下痢原性を示すことがわかった。エンテロトキシンがないにもかかわらず、下痢を誘発することから、同菌株が新種の下痢毒素、すなわち新型エンテロトキシンを産生するという仮説を立てた。同様の事例の詳細を解析する。また、事例株のゲノム解析を行い、新型のエンテロトキシン遺伝子の伝播と変異メカニズムを、遺伝子情報から解析する。

本研究の目的は、上記の 3 菌種およびそれらが産生する毒素について、リスクプロファイルを作成し、その危害性を明らかにすることにある。本年度はブドウ球菌を対象とした。また、食品中から、病原性を持つ、すなわち、毒素産生性菌を直接検出する方法を開発する。前年度までの、ウエルシュ菌についての検討成果に基づき、本年度は、セレウリド産生性セレウス菌の、無培養、迅速検査法を開発する。また、安価な化学分析機器である HPLC を用いてのセレウリド検出法を検討する。

以上の研究を通じ、毒素産生性細菌による食中毒の理解を深め、学術的に貢献するとともに、応用研究を通じて社会に有用な技術を提供し、厚生労働行政の施策に貢献する事を目的とする。

## 第 1 章 セレウス菌と同菌嘔吐毒素に関する研究

本年度は以下の 2 項目について検討した。

## 1 .食品中嘔吐毒素(セレウリド)のHPLCによる検出法開発の検討

セレウス菌の嘔吐毒である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。近年、高速液体クロマトグラフィー/質量分析計(LC/MS)や高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)による高感度かつ定量性の高い検出法が報告されているが、機器が極めて高価である。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。

セレウス菌培養液から精製したセレウリドでは、HPLCチャート上で、明瞭なピークが認められた。一方、化学合成したセレウリドをHPLC分析したところ、精製セレウリドにみられるピークは検出されなかった。合成セレウリドを質量分析器で解析したところ、既定の分子量に相当する質量数が確認された。

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。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。これらのサンプルをHPLC分析したところ、上述の明瞭なピークが認められた。

以上の結果を総合すると、セレウリドそのものの検出にはHPLCは適応できないことを示している。物質同定という観点からは、やはり質量分析器の利用が重要となるが、分析方法を一般化するには、機器購入等の障害がある。米飯へのセレウス菌接種実験から、セレウリド産生と同調して、HPLCで検出できる明瞭なピークが接種米飯から検出されている。このピークの帰属は明らかにされてはいないが、今後の検討を通して、セレウリド産生と共役している関係が確認できれば、安価な化学分析機器であるHPLCで、セレウリド産生を検出できる可能性を考えることができる。

## 2 .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

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ウエ

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 にかげられず、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。

本法は塩基配列依存性の遺伝子増幅法と DNA-DNA ハイブリダイゼーションを原理とする方法を利用し、核酸クロマト法と称する。遺伝子増幅法として、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となった。また、無培養で、かつ、約 1 時間以内に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となった。

本核酸クロマト法が示す感度は、食中毒の発症量とされる  $10^5$  cfu/g よりも 10 倍高い。そのため、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できる。本法の利用により、セレウス菌食中毒の防止に繋がる事が期待される。

## 第 2 章 ブドウ球菌とブドウ球菌エンテロトキシン研究

### 1. 黄色ブドウ球菌のリスクプロファイル

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、国内外の疫学的情報( 食中毒発症件数、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。国際感染症情報( GIDEON )、感染症発生動向調査週報 IDWR、PubMed、FoodRisk、食品安全委員会等の公式資料を参照し、以下にまとめた。

### 菌の性状等

黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)は、グラム陽性通性嫌気性の球菌である。ヒトをはじめ家畜・家禽の皮膚や気道上部、腸管等の粘膜に常在し、自然界に広く分布している。現在、ブドウ球菌属には 70 以上の種・亜種が含まれるが、黄色ブドウ球菌は最も病原性が高く、ヒトや動物の化膿性疾患や食中毒の原因となる。黄色ブドウ球菌はコア

グラーゼを産生する。5～47.8 の温度域で増殖（至適増殖温度：30～37 ）し、ヒトの食中毒を引き起こすエンテロトキシン（SEs）が産生されるのは 10～46 の温度域と報告されている。また、食塩濃度 16～18%でも増殖し、他の条件が適当であれば食塩濃度 10%でもエンテロトキシンを産生する。エンテロトキシンは炭水化物や脂質、核酸を含まない水溶性のタンパク質で、分子量は約 27KDa から 29KDa である。極めて耐熱性が高く、100 で 30 分間加熱しても完全には失活せず、胃酸やタンパク分解酵素にも抵抗性を示す。

黄色ブドウ球菌食中毒は典型的な食品内毒素型食中毒であり、黄色ブドウ球菌が増殖する過程で産生されたエンテロトキシんに汚染された食品を摂食することにより発症する。

エンテロトキシンは神経毒の 1 種で、その特異的な生物活性が嘔吐中枢を刺激して催吐作用をもたらす。その他、スーパー抗原活性も合わせ持ち、非特異的 T 細胞を活性化することで炎症性サイトカインの過剰放出を起こし、毒性ショックを引き起こすこともある。

エンテロトキシンは極めて多様性の高い毒素群であり、嘔吐作用の証明されていない「ブドウ球菌エンテロトキシン様毒素（SEI）」も含めると、これまでに 23 種類の存在が報告されている。

## 感染源

黄色ブドウ球菌はヒトを取り巻く環境中に広く分布し、健康人の鼻腔、咽頭、腸管等にも生息している。ヒトでの保菌率は

約 40%とされ、このうち 30～40%のヒト保有菌株が SE または SEI を産生する。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。

## 発症機序・用量反応

食中毒における調査で判明した原因食品中のエンテロトキシン量と当該食品の摂取量から、ヒトの発症毒素量は数 100ng～数 μg と推定されている。黄色ブドウ球菌が食品中で増殖し 10<sup>5</sup>～10<sup>9</sup>/g 程度になると、その過程で産生されるエンテロトキシンが発症毒素量に達すると考えられている。ただし、2000 年にわが国で発生した加工乳を原因とする大規模食中毒では、加工乳から 0.08～0.38ng/ml の SEA が検出され、発症者の SEA 摂取量は 20～100ng と推定されている。この毒素量は従来の発症最小毒素量と比較するときわめて少ない値であった。

## 症状

潜伏期間と症状の重症度は、エンテロトキシンの摂取量と個人の感受性によって異なる。抑制不能の特徴的な嘔吐・吐き気の初期症状は、汚染食物の摂取後 30 分～8 時間以内（平均 3 時間）に現れる。他の一般的な症状は、腹痛、下痢、めまい、震え

や全身衰弱があり、中程度の発熱（37程度）を起こす場合もある。なお、下痢は約70%に認め、水様性下痢が多い。ほとんどのケースでは特別な治療をしなくても24～48時間で回復するが、その間下痢や全身衰弱が24時間以上続く。

#### 検出・診断方法

ブドウ球菌食中毒の検査では、まず原因食品、糞便、吐物、拭き取り等の検査材料から黄色ブドウ球菌を分離する。疫学的にブドウ球菌食中毒を証明するためには、分離菌株のエンテロトキシン産生性を調べ、コアグラゼ型別を実施する必要がある。ブドウ球菌食中毒と判定するためには、分離された菌株が健康保菌者由来でないことを慎重に判断することが重要である。

#### 治療・予防

ブドウ球菌性食中毒は伝播性がなく、健康者が罹患した場合は特別な治療を行わなくても24時間程度で回復することが多く、予後も一般的に良好で、抗菌剤による治療の必要性はない。

#### 疫学

##### 日本

ブドウ球菌食中毒は、食品衛生法に基づく届出が義務づけられており、1984年までは年間200事例以上の食中毒の発生が見られたが、1985年以降徐々に減少し、2000年以降は年間100事例未満の発生状況で事例数は減少している。

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

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。

#### 第3章 ウエルシュ菌およびウエルシュ菌下痢毒素研究

ウエルシュ菌食中毒では、腸に達した同菌の増殖、芽胞形成、ならびに芽胞形成に連動するエンテロトキシン産生と、同毒素による細胞障害が必須の事象になっている。現在、腸管内でのウエルシュ菌の共同については不明なことが多く、検討が続けてきた。

ウエルシュ菌は従来から認識されている下痢を起す毒素に加え、新しいエンテロトキシンの存在が示唆されている。これまで、新型毒素の分離や同毒素の遺伝子の単離を行ってきた。本年度は、エンテロトキシン非産生性のウエルシュ菌食中毒事例を詳しく検証するとともに、当該事例菌株の遺伝子情報について、解析を行った。

本年度は以下の2項目について検討した。

##### 2. ウエルシュ菌の腸管内増殖機構

ウエルシュ菌食中毒は生体内毒素型食

中毒に分類されている。本食中毒の発生機序として、1)食品内での大量の生菌の存在、2)食品を通じて取り込まれた生菌の胃通過、3)生菌の腸管内での増殖、4)芽胞とエンテロトキシンの産生、5)毒素の腸管上皮細胞への攻撃、が認識されており、最終的にエンテロトキシンによる下痢誘発に至るものと理解されている。本厚生労働科学研究では、特に上記(4)および(5)の過程に着目して研究を展開してきた。平成24年度は *in vitro* 感染実験系を使用して消化管環境に存在する様々な因子の芽胞形成・毒素産生への影響を調べた。その結果、デオキシコール酸で最も効果的に(10<sup>-6</sup>Mの濃度で確認できた)みられることを証明した。これらの結果は、ウエルシュ菌が腸管内で芽胞形成・毒素産生して下痢を引き起こす際には、胆汁酸が一種の誘導因子となっており、またこれを感知するシステムを菌が持っていることを示している。そこで本年度はこの、ウエルシュ菌の胆汁酸感知システムを解明すべく、胆汁酸の芽胞誘導メカニズムの解明を試みた。

芽胞形成は、芽胞形成のマスター・レギュレーターである Spo0A のリン酸化で始まり、リン酸化 Spo0A が転写因子となって下流のカスケードを活性化することが知られる。デオキシコール酸存在下で強く誘導される遺伝子を解析したところ、誘導直後から Spo0A 下流の遺伝子群が総じて高発現していることが確認された。この結果は、デオキシコール酸の作用点は Spo0A 上流であるか、あるいは Spo0A そのものであることを示唆しており、ウエル

シュ菌では初めて発見された現象だった。

一方、マウス糞便抽出液の芽胞形成への影響を調べたところ、芽胞形成を阻害する活性が確認できた。以上の結果は、芽胞形成を刺激する生体成分と、その形成を阻害する成分が、消化管内でともに作用し、ウエルシュ菌食中毒を発生、あるいは抑制する機構があることを示す。本研究によって、ウエルシュ菌食中毒の発生機構と、その予防法が明らかになる可能性がある。

## 2. 新型下痢毒素産生性ウエルシュ菌による食中毒事例の解析と原因ウエルシュ菌株のゲノム解析

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。

1997年に、東京都で発生したウエルシュ菌食中毒がある。患者症状が下痢・腹痛、原因施設が飲食店であること、原因食が弁当であること、平均の潜伏時間が15時間程度であったことは、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。一方、当該菌株を培養し、その濾過滅菌液について、ウサギ腸管ループ試験を行ったところ、陽性反応を示した。濾過滅菌培養液は RPLA テスト陰性で、菌株から抽出した DNA 検体についての、エンテロトキシン遺伝子検査も陰性だ

った。培養ろ液は Vero 細胞および L-929 細胞に毒性を示した。以上の結果は、ウエルシュ菌は、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。

本研究の目的は、上記のような、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することにある。さらに、事例菌のゲノム解析を行い、毒素遺伝子伝播機構を明らかにすることを目的とする。

詳細な調査を行った結果、1997 年から 2010 年までに、計 4 事例の、エンテロトキシン非産生性による食中毒事例が発生していた。エンテロトキシン非産生性を示す以外は、典型的なウエルシュ菌食中毒の範疇に属した。4 事例から分離された菌株すべては、イオタ毒素に相同性のある、2 成分毒素の存在を示した。新型のウエルシュ菌下痢毒素は、スピロフォルム菌

(*Clostridium spiroforme*) が保有する、ウエルシュ菌イオタ毒素と相同性のあるタンパク質だった。これらの事象は、ウエルシュ菌には新型の下痢毒素を産生するものがあるだけでなく、同毒素遺伝子が、ウエルシュ菌、スピロフォルム菌、エンテロトキシン非産生性ウエルシュ菌と、伝播交雑した可能性を示唆する。種間を越えた毒性物質遺伝子の伝播と、伝播中に生じた毒素遺伝子の変異機構を解析するため、事例菌 W5052 株のゲノム解析を行った。現在解析の途中であるが、同菌株には、染色体 1 種、プラスミドが 2 種以上存在することが明らかになった。新型の下痢毒素は、プラスミドの 1 種にコードされていた。同プラスミドには、詳細が不明の遺伝子がコードされており、塩基配列の分析により、毒素遺伝子の伝播とその変異の関係が明らかになるものと考えられる。

## 発表した研究成果リスト

### 論文発表

1. Wang, L., Wakushima, M., Aota, T., Yoshida, Y., Kita, T., Maehara, T., Ogasawara, J., Choi, C., Kamata, Y., Hara-Kudo, Y., Nishikawa, Y. (2013) Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients and comparison to strains from foods and fecal specimens from cattle, swine, and healthy carriers in Osaka City, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1232-1240.
2. Hara-Kudo, Y., Konuma, H., Kamata, Y., Miyahara, M., Takatori, K., Onoue, Y., Sugita-Konishi, Y., Ohnishi, T. (2013) Prevalence of the main food-borne pathogens in retail food under the national food surveillance system in Japan. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 30, 1450-1458.
3. Nakashima, R., Kamata, Y., Nishikawa, Y. (2013) Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and guanylin on the barrier integrity of intestinal epithelial T84 cells. *Vet. Immun. Immunopath.* 152, 78-81.

### 学会発表

1. Kamata Y, Irikura D, Monma C, Namaka, A, Kai A, Sugita-Konishi, Y. (2013) *Clostridium perfringens* new enterotoxin (1) detection and identification of a new enterotoxin using genome analysis and *in silico* screening. Clostpath 2013. Palm Cove. Qld, Australia, Sep. 2013.
2. Monma C, Suzuki Y, Irikura D, Kamata, Y, Sugita-Konishi Y, Nakama A, Fukui-Miyazaki A, Horiguchi Y, Kai A. (2013) *Clostridium perfringens* new enterotoxin (2) biochemical characterization of an new enterotoxin. Clostpath 2013. Palm Cove. Palm Beach, Qld, Australia, Sep. 2013.
3. 門間千枝、赤瀬 悟、石塚理恵、齋木 大、小西典子、横山敬子、仲間晶子、鎌田洋一、甲斐明美(2013) 人ふん便における新型エンテロトキシン産生ウエルシュ菌の保有状況、第 34 回日本食品微生物学会 .

4. 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.
5. Mayo Yasugi, Hidenobu Hoshi, Daisuke Okuzaki, Shigeki Yamamoto, Yoichi Kamata, and Masami Miyake. Mechanism of bile acid-mediated sporulation in *Clostridium perfringens*. 第 87 回日本細菌学会総会. 東京. Mar. 2014.

#### 製品の市場化

1. セレウリド産生セレウスの検出試薬の製品化  
製品名：スィフトジーンセレウリド産生セレウス「カイノス」  
(平成 25 年 8 月 1 日上市)



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**

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
	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：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。研究協力者である大阪府立大学切畑教授が合成に成功した合成セレウリドと市販の精製セレウリド、それぞれを標準品として利用した。精製セレウリドも合成セレウリドもHPLCでシャープなUV吸収を示す物質を含んでおり、当初はこれらをセレウリドと考えて測定方法の確立を目指した。しかしながら、LC/MSを用いた確認の結果、UV検出器と反応するこれらの物質はセレウリドではないことが判明した。また、HEp-2細胞の空胞変性試験によって両試料を測定すると、精製セレウリドの力価は合成セレウリドの1/400しかなかった。以上の結果から、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

続ける価値があると考える。

## 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<sup>1)</sup>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。農作物から頻りに検出される腐敗菌として古くから知られているが、健康被害を引き起こすこともあり、食中毒や、気管支炎、髄膜炎、敗血症などの起因菌となることもある。

発育可能温度は 5 から 50、至適温度は、28 から 35 である。発育可能 pH は 4.4 から 9.3 であり、栄養体は酸性条件に弱い。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<sup>2)</sup>。

セレウス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<sup>3-6)</sup>。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、セレウリド合成酵素 (CRS) と呼ばれる非リボソームペプチド合成酵素 (Nonribosomal peptide synthetase) によって生合成される、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<sup>7)</sup>。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ので多く、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<sup>8)</sup>。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。

催吐性セレウスの検出法として、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法は迅速鋭敏な手法として、近年微生物検査領域で汎用されており、PCR 法を用いたセレウスの定性的な検出法も報告されている<sup>9)</sup>。現在では、PCR 増幅産物をリアルタイム

ムでモニタリング、解析するリアルタイム PCR 法によるセレウス検出法も報告されている<sup>11-14)</sup>。リアルタイム PCR 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。しかし、食品中のセレウリド産生菌の定量には好適だが、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。近年、高速液体クロマトグラフィー/質量分析計 (LC/MS) や高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) による高感度かつ定量性の高い検出法が報告されているが<sup>15-17)</sup>、機器が極めて高価である。

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。HPLC を用いたセレウリド検出は、Agata ら<sup>18)</sup>、古瀬ら<sup>19)</sup>による報告があるが、その抽出方法や検出条件の詳細な記述はなかった。

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变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、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。

・トリプトソーヤ寒天培地 (TSA): トリプトソーヤ寒天培地 (日水製薬) 40 g を 1 l の蒸留水に溶解しオートクレーブ滅菌した後、シャーレに 20 ml ずつ分注して寒天平板とした。

・BHI 培地 (BHI): BHI ブイオンを三角フラスコに 10 ml 分注し、オートクレーブ滅菌した。

・EMEM: イーグル MEM 培地 (日水製薬) 4.7 g を Milli Q 水 500 ml に溶解し、Phenol red solution (SIGMA-ALDRICH Inc) を 500 µl 加えてオートクレーブ滅菌した。これに、炭酸水素ナトリウム (和光純薬工業) の 7.5% (w/v) 水溶液 10 ml と、L-グルタミン (ICN Biomedicals Inc) の 5% (w/v) 水溶液 3 ml を、各々フィルター滅菌した後に加えた。細胞培養用には非働化 (56 °C、30 分加温) した FETAL BOVINE SERUM; FBS (JRH BIOSCIENCES A CSL Company) 50 ml を加え、10% FBS EMEM とした。空胞化試験には FBS 濃度を 1% に調整し、ゲンタマイシン硫酸塩 (和光純薬工業) を 50 µg/ml となるように添加した EMEM を使用した。

・トリプシン: 0.5% (w/v) トリプシン-5.3 mmol/l EDTA・4Na 溶液 (フェノールレッド不含) (×10) (和光純薬工業) を PBS で

10 倍希釈した。

・10%ギムザ染色液: ギムザ液 (和光純薬工業) を純水で 10 倍希釈した。

・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。

・PBS: 塩化ナトリウム (和光純薬工業) 40 g、リン酸水素二ナトリウム・12 水 (和光純薬工業) 14.5 g、塩化カリウム (半井化学薬品) 1 g、リン酸二水素カリウム (和光純薬工業) 1 g を 500 ml の蒸留水に溶解し、オートクレーブ滅菌したものを 10 × PBS とし、使用する際はこれを蒸留水で 10 倍希釈し、オートクレーブ滅菌して用いた。

・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 μm)(ジーエルサイエンス、東京、日本)および InertSustain C18 (4.6 x 150mm、5 μm)(ジーエルサイエンス)を使用した。

・LC/MS カラム:Zorbax Eclipse XDB-C18(2.1\*50 mm、3.5 μm)(アジレント・テクノロジー)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 μl、50%メタノール300 μl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。

・限外濾過膜:Centrifugal Filter Unit 3 Kおよび10 K(Millipore、Billerica、MA)を使用する移動層500 μlで洗浄後、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。

・液体クロマトグラム質量分析計(LC-MS):LCにはProminence 20AD equipped with Photo Diode Array Detector(島津)を、MSとしてmicroTOF-Q2(Bruker)を共同研究者の奈賀俊人博士の監督下で東洋食品工業短期大学において使用させていただいた。

### 4. 実験方法

・抽出カラムの検討(HLB):

既知の量の精製セレウリドを洗浄済みの固相抽出カラムに添加した。

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。

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 μlをHPLCサンプルとした。

・抽出カラムの検討(Monospin SI):

既知量の精製セレウリド100 μlを洗浄済みの固相抽出カラムに添加した。

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

90%メタノール300 μlを添加して遠

心分離(3,000 rpm、1分)にて抽出した。

このうち10 µlをHPLCサンプルとした。

抽出カラムの検討 (Monospin C18)

既知量の精製セレウリド100 µlを洗浄済みの固相抽出カラムに添加した。

50%メタノール300 µlを添加して遠心分離(10,000 rpm、5分)にて洗浄した。

90%メタノール300 µlを添加して遠心分離(10,000 rpm、5分)にて抽出した。

このうち10 µlをHPLCサンプルとした。

・Centrifugal Filter Unit3 K、10 K(限外ろ過膜): 既知量の精製セレウリドを洗浄済みの限外ろ過膜に添加し、遠心分離(3,000 rpm、1分)した。

・HPLC用サンプル調製:

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。

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

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。

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。

集めた上清をエバポレータで乾固さ

せ、メタノール250 µlに溶解後、水250 µlを加えよく攪拌し、全量を500 µlとし、これをMonospin SIに添加して遠心分離(3,000 rpm、1分)した。

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

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

これを限外濾過膜に添加し、遠心分離(3,000 rpm、1分)した。

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 µl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:

セレウス03-137-1株をBHI液体培地に接種し30、12時間培養した。

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。

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。

散布後、再びふたをシールし、30分で保存した。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。

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。

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。

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。

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

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。

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  $\mu$ 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 cm<sup>2</sup> 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  $\mu$ l ずつ加え、CO<sub>2</sub> 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 9.8 ng/ml、211 希釈では 4.9 ng/ml となる。これらの結果から、空胞変性の見られた最終希釈倍率に 5 ng/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<sup>[16]</sup>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 . 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 (図 1)。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 (表 2)。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。

限外濾過膜 10K と抽出時アセトニトリル濃度 80%を使用し、米飯へのセレウリド添加回収実験を行った。クロマトグラフは図 2 に示した。精製セレウリドのピークは米飯由来の妨害ピークと分離していた。この時の HPLC 条件を表 3 に示した。米飯からの精製セレウリド回収率は 80.2%であった(表 4)。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(表 5)。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(図 3)。

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(図 4)。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(図 7)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(図 8)。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(図 4-6)、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(図 11)。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(図 12)。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(図 13)。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  $\mu$ 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(表 7、8)。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

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が、その経緯を以下にまとめる。

まず精製セレウリドをスタンダードとして前処理カラムの選択と HPLC 条件の決定を行った。サンプルの前処理段階におけるセレウリドの流出は限外濾過膜 10 K と抽出時アセトニトリル 80%の組み合わせが最も少なく、鋭いピークを示したので、これを抽出処理条件にした。この方法は溶液を添加して遠心分離するだけであり、他の方法と比較しても簡易な操作でセレウリドの検出ができると判断した。

セレウリドは分子量 1152 であるため<sup>15)</sup>、当初は限外濾過膜 3 K、10 K 共に通過すると考えられた。しかし、限外濾過膜の分子量による比較をすると 3 K に比べ 10 K のほうが高い回収率であることがわかった。この時点で対象としているピークがセレウリドではない可能性に気付くべきだったかもしれないが、これはセレウリドの疎水性が強い<sup>20)</sup>ために、セレウリド同士、あるいは他の物質と結合することにより、分子量が 3,000 を超えたためと考えた。

抽出時のアセトニトリル濃度は 80%と 90%が高く、100%で回収率が下がる結果となった。疎水性物質は有機溶媒の濃度が

増すほど溶出しやすくなるが、セレウリドはアミノ酸とデプシ酸が繋がった環状ペプチドであり、[-Val-D-O-Leu-D-Ala-O-Val-]3 で表すことができる<sup>18)</sup>。この環状構造によりセレウリドは環の内側が親水性となり、カリウムイオンをトラップするイオノフォアとして作用する<sup>21, 22)</sup>。セレウリドが完全な疎水性物質ではないことが、80%、90%のアセトニトリル濃度で最も効率的に抽出できた理由と推察した。

無菌パックライスをを用いた精製セレウリドの添加回収実験では、先の結果でセレウリドの回収率が最も高い分子量 10 K の限外濾過膜と抽出時アセトニトリル濃度 80%を選択して行った。カラムには逆相カラムである ODS-4 を用いた。移動層のアセトニトリル濃度は 30%とした。40%以上であると米飯由来の妨害ピークと重なり、アセトニトリル濃度が低いとピークの形状が崩れることを考慮し、この濃度としていた。

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。同時期に精製セレウリドの販売が停止されたこともあり、合成セレウリドを標準品として検討することにし

た。

精製セレウリドでの失敗を元に、まず合成セレウリドがHPLCのスタンダードとして使用できるか調べた。セレウリド発見者であるAgataらの論文でもUV検出器(210 nm)による検出を行っており<sup>18)</sup>、古瀬ら<sup>19)</sup>もHPLCによる検出を報告していたので参考にしていたのだが、セレウリドのUV吸収は構造の類似したバリノマイシンと比べても低く、100ppmのセレウリドのUV吸収ピークはベースラインのノイズ範囲に収まっており、ピークとして検出することはできなかった。同濃度のセレウリドとバリノマイシンをLC-MSにより測定した場合、セレウリドのピーク面積がバリノマイシンより10.3%高くなるという報告があるが<sup>17)</sup>、LC-MSにおける感度はほぼ同程度と推察される。一方で同濃度のセレウリドとバリノマイシンをHPLCで測定した場合、ピーク面積比が0.18程度であるという報告がなされている<sup>23)</sup>。すなわち、今回測定した380 ppmのバリノマイシンのピークに比べ、同濃度のセレウリドのピーク高は1/5弱程度の高さになると考えられる。

高濃度の合成セレウリド溶液をスタンダードにすることでUV吸収のピークが観察できる可能性はあるが、スタンダードに大量の合成セレウリドを用いることは現実的ではない。実際にセレウス食中毒事件の起こった食品中セレウリド量は、0.02~1.28  $\mu\text{g/g}$ であったと報告されている<sup>24)</sup>。また、食品安全委員会の報告によると、セレウリドの最小発症量は1  $\mu$

g/ヒトとされている。食品200gを摂取した場合を考えると、食品重量あたり5 ng/gで発症する可能性がある。したがってHPLCの検出感度の低さはセレウリド検出法として致命的である。UV吸収によりこれを検出しようとするれば抽出時の濃縮率を上げる必要があるが、濃縮率を上げた場合セレウリドだけでなく食品由来の他の物質も同じく濃縮されるため、妨害ピークが大きくなる可能性がある。また、濃縮するために必要なサンプル量も多くなるためHPLCによるセレウリドのUV検出は困難と判断した。

発想を変えて、セレウリド自身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。

合成セレウリド試料に含まれるUV検出ピークがどのような物質であるかを調べるためにマスクロマトグラムを確認したが、ポジティブ、ネガティブイオン共にピークは検出できなかった。ゆえにこの物質は非常にイオン化しにくい物質であると考えられる。また、HPLCとは異なり、

通常 LC-MS の流速は 0.2 ml 程度と遅い。同一条件で検討するために HPLC における検出条件と揃えたが、その影響で 1 ml の流速ではイオン化が間に合わなかった可能性がある。実際にイオンスプレーにおいては噴霧しきれなかった移動層が漏れだしており、イオン化しにくい物質であることと相まって、マスクロマトグラムでピークが検出できなかった可能性もある。

米飯と炒飯を比較すると、炒飯の方がセレウス菌の増殖速度、定常期の菌量、セレウリド産生量共に増加した。食品成分によってセレウリドの産生量は変化することが知られている。肉や卵に比べ米飯の方がセレウリド産生量は増加する。一種類の市販食品を用いたため単純に結論を述べることはできないが、今回の結果からは米飯だけでなく他の食材がある方がセレウリド産生量は増加することが分かった。特に炒飯は、酢やケチャップ等の pH を低下させて菌の増殖を抑えるような材料が入っていない事も増殖しやすい理由であろう。セレウリドは、セレウスの対数増殖期末期から生産が始まる事が知られている<sup>15)</sup>。本研究の結果においても定常期であると考えられる 48 時間培養サンプルから 72 時間培養サンプルにかけて HPLC、空胞変性試験の両試験においてセレウリドの検出が確認できた。これは既知の見解と一致しており、またセレウリドは検出され始めた 48 時間から 72 時間までに増加する事が判明した。

空胞変性試験は 2 倍段階希釈によって

測定するため、1/2~2 倍の差は想定範囲内であり、LC-MS による測定値と空胞変性試験による値は近似していたと判断する。空胞変性試験は細胞培養液中のセレウリド濃度が 2 ng/ml あれば検出できる高感度な検出法だが、定量性に乏しい。一方で LC-MS は定量性に富むが、機器の購入や維持が高額であるという欠点がある。今回 HPLC (UV 検出器) ではセレウリドを検出できないことが明らかとなったが、検出器をコロナ荷電化粒子検出器 (CAD) にすれば測定できるかもしれない。CAD はカラムからの溶出液を噴霧し、微粒子になった成分にコロナ放電によって電荷を持たせ、電気的に検出する検出器である。UV 吸収のない成分を検出することに優れている。MS よりも廉価でメンテナンスの容易な検出器を検討してみる余地は今後もまだ残っている。

食品衛生法に定められた仕出し弁当の一般生菌数規格は  $1.0 \times 10^5$  cfu/g であり、実際に起こった食中毒事例においても調理後 24 時間以内で食中毒が起きている<sup>25)</sup> ことから、実際の食品におけるセレウス菌量は今回接種した菌量 ( $1.6 \times 10^2$  cfu/ml) より更に多いと考えられる。

## 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 Stroehrer, 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 dodecadeptide, 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。

表 1 合成セレウリド試料を対象とした際の HPLC 条件

カラム	Inertsil® ODS-4 (4 . 6x250mm)
移動相	40% アセトニトリル+0.1%りん酸
カラム温度	55
流速	1.0 ml/min
サンプル量	10 µl

表 2 限外濾過膜と抽出アセトニトリル濃度の検討

分子量	アセトニトリル 濃度(%)	回収率 (%)
3 K	100	73.9
	90	-
	80	89.2
	70	66.4
10 K	100	74.9
	90	90.6
	80	96.3
	70	77.2

表 3 精製セレウリド試料を対象とした際の HPLC 条件

カラム	Inertsil® ODS-4 (4.6x250mm)
移動相	30%アセトニトリル+ 0.1%りん酸
カラム温度	55
流速	1.0 ml/min
検出波長	214 nm
サンプル量	10 µl

表 4 米飯を用いた添加回収実験

精製セレウリド 添加濃度 (ppm)	精製セレウリド 回収濃度 (ppm)	回収率 (%)
20	16.0	80.2

表 5 セレウス接種培養米飯サンプルにおけるセレウリド測定値

時間	生菌数(cfu/g)	セレウリド量 (µg/g)	
		HPLC	空胞変性
0h	1.9	-	-
12h	$2.29 \times 10^5$	-	-
24h	$3.08 \times 10^6$	-	-
48h	$4.45 \times 10^7$	$29.5 \pm 3.7$	0.39
72h	$7.78 \times 10^7$	$257 \pm 33$	1.56

- : 検出限界 (0.5 µg/g) 以下

表 6 測定時の LC-MS 条件

カラム	Zorbax Eclipse XDB-C18(2.1*50 mm)
移動相	A : 蒸留水 + 0.1% ギ酸. B : 100% メタノール + 0.1% ギ酸
カラム温度	55
流速	1.0 ml/min
サンプル量	10 $\mu$ l

MS 条件

MS レンジ	50-3000 m/z
測定モード	ESI ポジティブモード
キャピラリー電圧	-4500V
N <sub>2</sub> ガス流速	10 L/min
N <sub>2</sub> ガス温度	200

表 7 セレウス接種米飯における経時の変化

時間	生菌数 (cfu/ml)	セレウリド量 (ng/g)		Rt=7.8
		空胞変性	LC-MS	HPLC
0 h	1.9	- <sup>1</sup>	ND	ND <sup>2</sup>
12 h	2.3×10 <sup>5</sup>	-	ND	ND
24 h	3.1×10 <sup>6</sup>	-	ND	ND
48 h	4.5×10 <sup>7</sup>	1.6	ND	550
72 h	7.8×10 <sup>7</sup>	6.4	20	1010

1：検出せず

2：検出限界以下 HPLC：<0.5 µg/ml、LC-MS：<5 ng/ml

表 8 セレウス接種炒飯における経時の変化

時間	生菌数 (cfu/ml)	セレウリド量 (ng/g)		Rt=7.8
		空胞変性	LC-MS	HPLC
0 h	0.1×10	- <sup>1</sup>	ND	ND <sup>2</sup>
12 h	1.6×10 <sup>6</sup>	-	ND	ND
24 h	7.4×10 <sup>8</sup>	-	ND	ND
48 h	1.8×10 <sup>9</sup>	1.6	ND	800
72 h	1.8×10 <sup>9</sup>	25.6	27	1300

1：検出せず

2：検出限界以下 HPLC：<0.5 µg/ml、LC-MS:<5 ng/ml

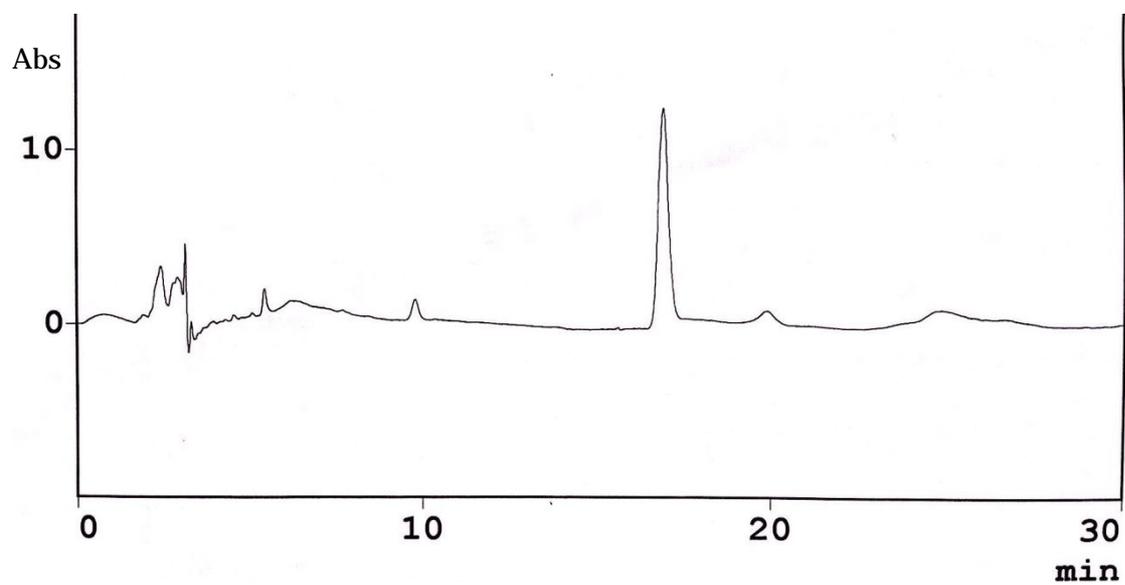


図 1 精製セレウリドのクロマトグラム

精製セレウリド (100ppm) のクロマトグラム.移動層は 40%アセトニトリル+0.1%リン酸を使用した。

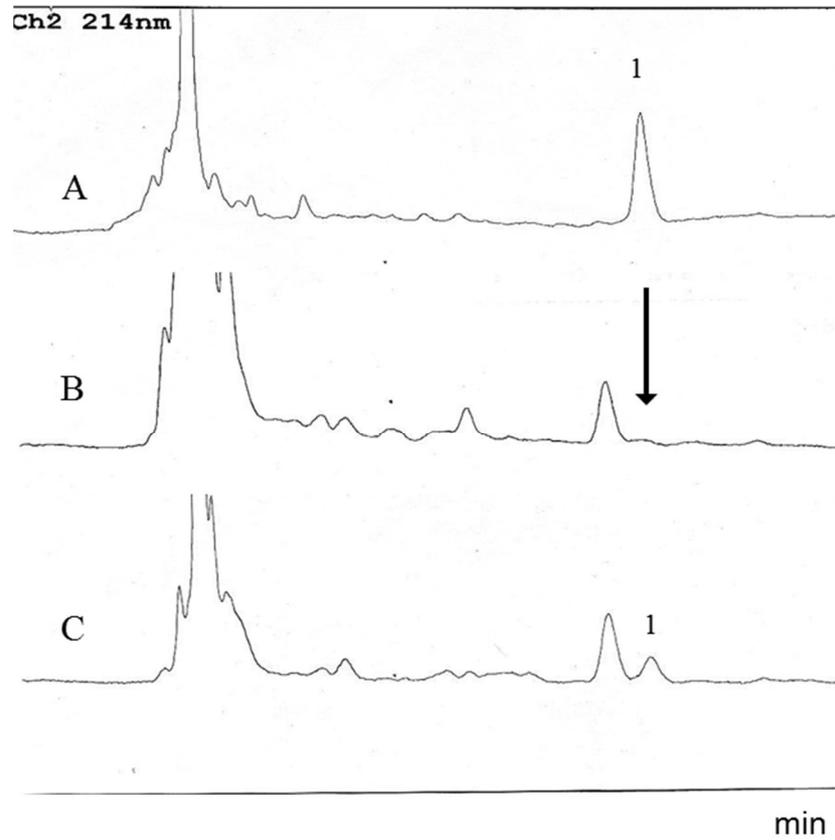


図 2 米飯における精製セレウリド添加回収実験の HPLC クロマトグラフ

A：精製セレウリド (100ppm) 、B：無添加米飯抽出サンプル、C：精製セレウリド添加米飯抽出サンプル

1 はセレウリドのピーク、矢印は精製セレウリドのリテンションタイム ( $R_t=11.4$ ) を示す。

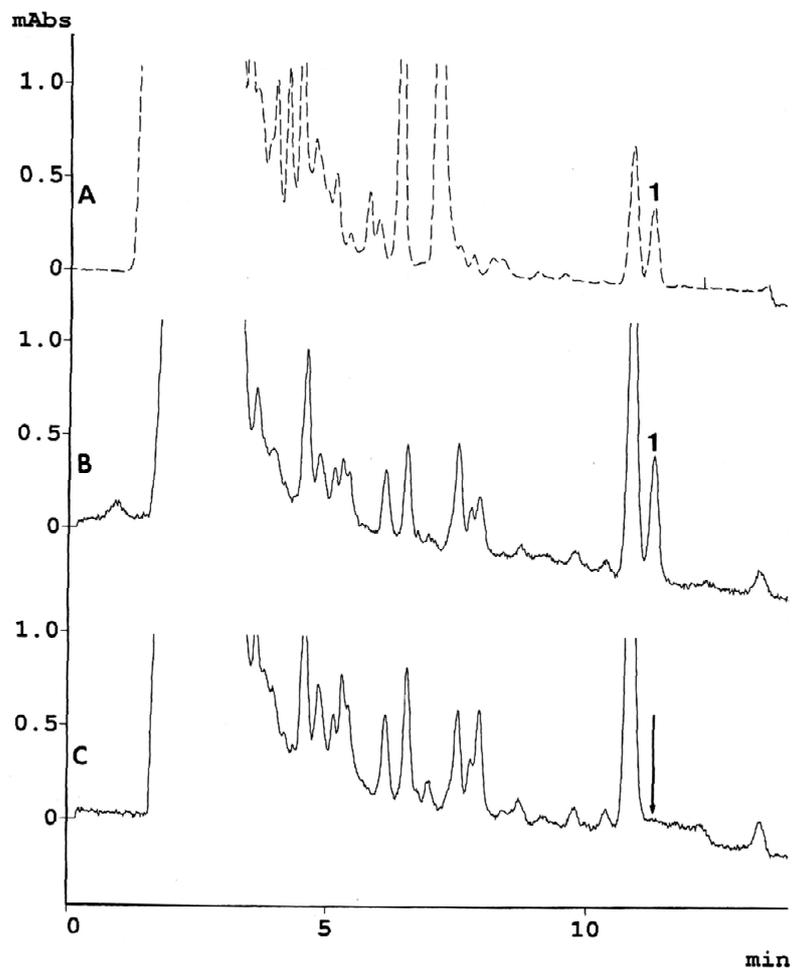


図 3 セレウス接種米飯のクロマトグラム

A : セレウス接種後 48 時間培養サンプル、B : 精製セレウリド添加米飯サンプル、C : 無添加米飯抽出サンプル。1 は精製セレウリドのピーク ( $R_t=11.4$  min) を、矢印は精製セレウリドのリテンションタイムを示す。

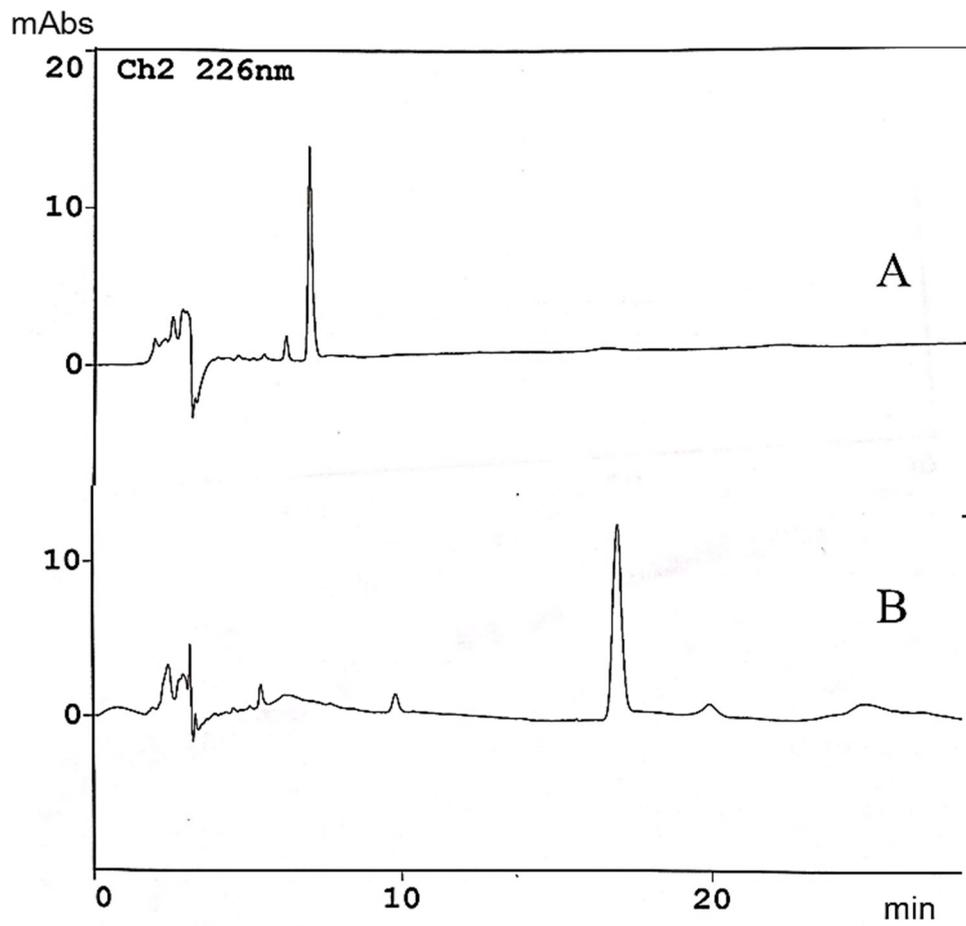


図 4 合成セレウリドと精製セレウリドのクロマトグラム  
A : 合成セレウリド (100 ppm)、B : 精製セレウリド (100 ppm)、移動層は 40%アセトニトリル+0.1%リン酸

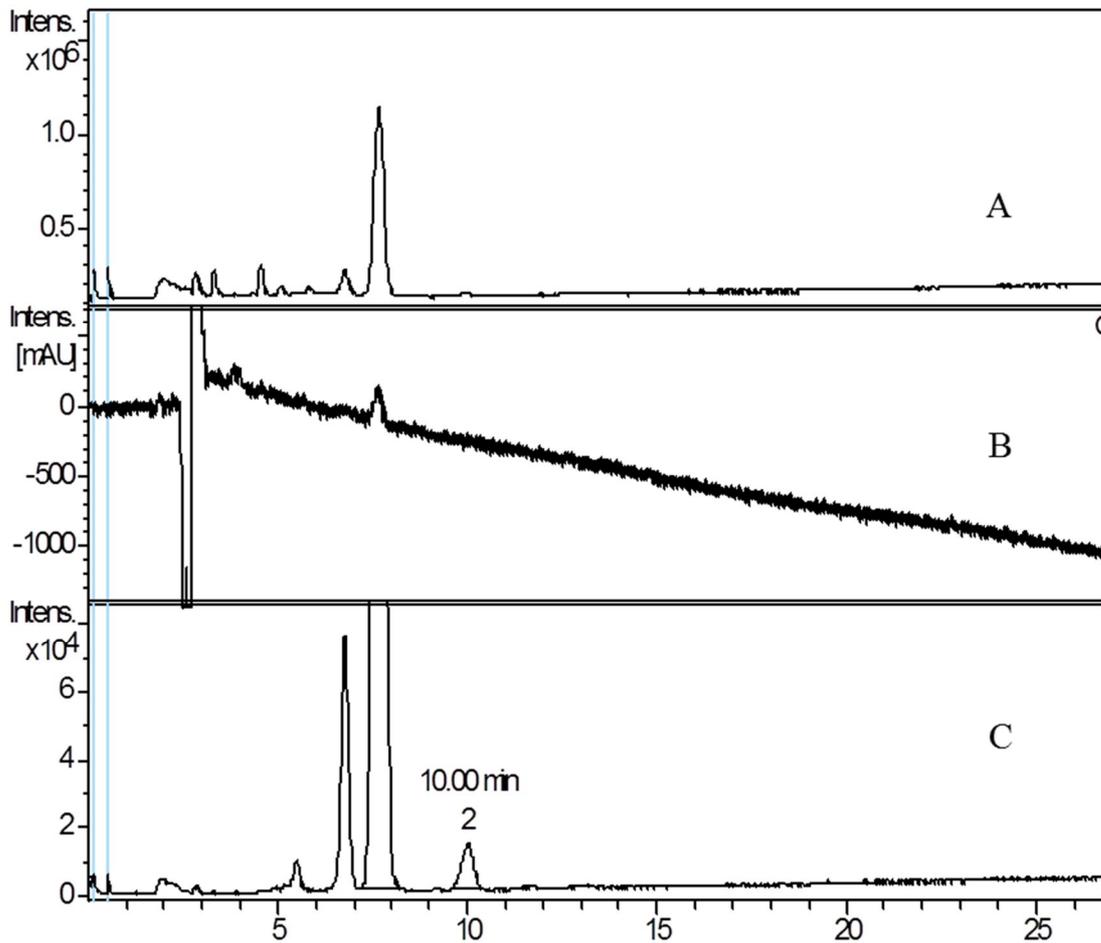


図 5 合成セレウリド (120 ppm) の LC-MS クロマトグラム  
 A : トータルイオンクロマトグラム (TIC)、B : UV 吸収 (190-400 nm) クロマトグラム、  
 C : 分子量 1150-1220 のクロマトグラム、2 : セレウリドのピーク (Rt = 10.0) を示す。移動層は 90%アセトニトリル (A 83.3%、 B 16.7%) +0.1%ギ酸

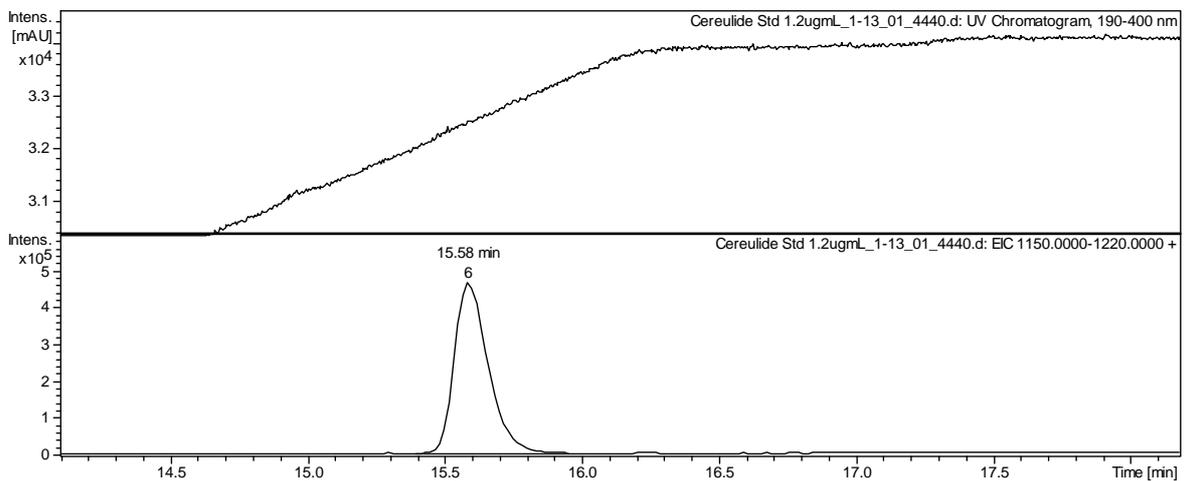


図 6 合成セレウリドの UV クロマトグラム (上) と LC-MS の結果 (下)  
 リテンションタイムは 15.58 min であった。

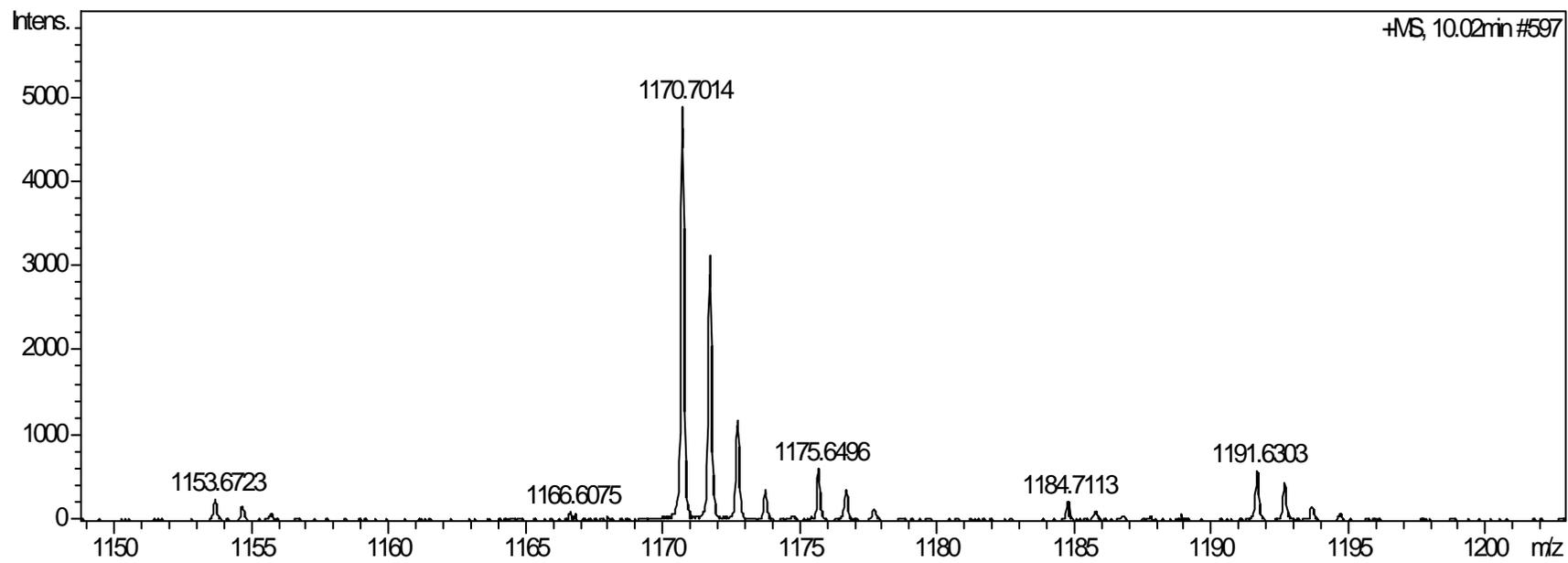


図 7 合成セレウリドに含まれた UV 吸収ピークのマスペクトル

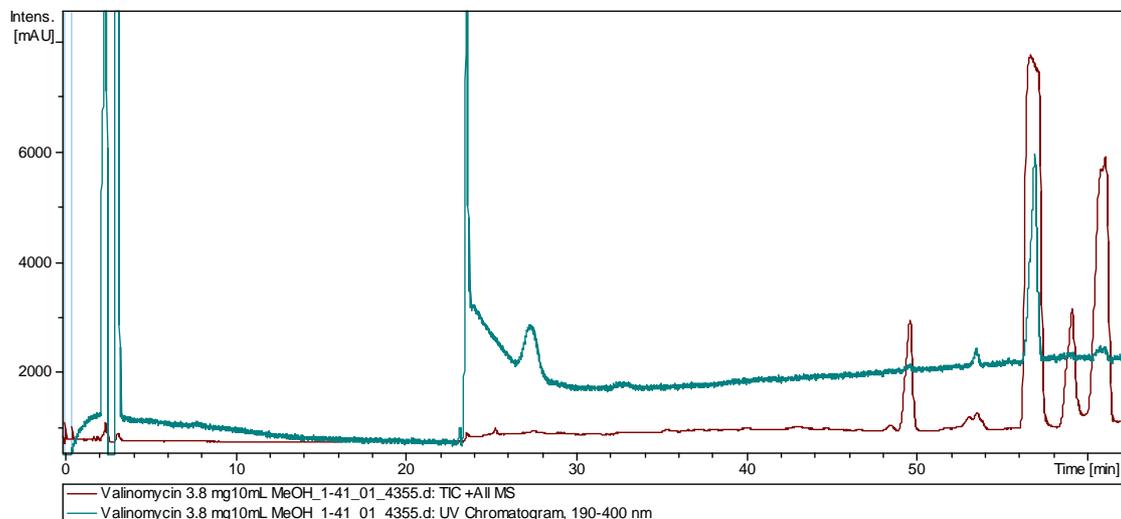


図 8 バリノマイシンのクロマトグラム

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)]

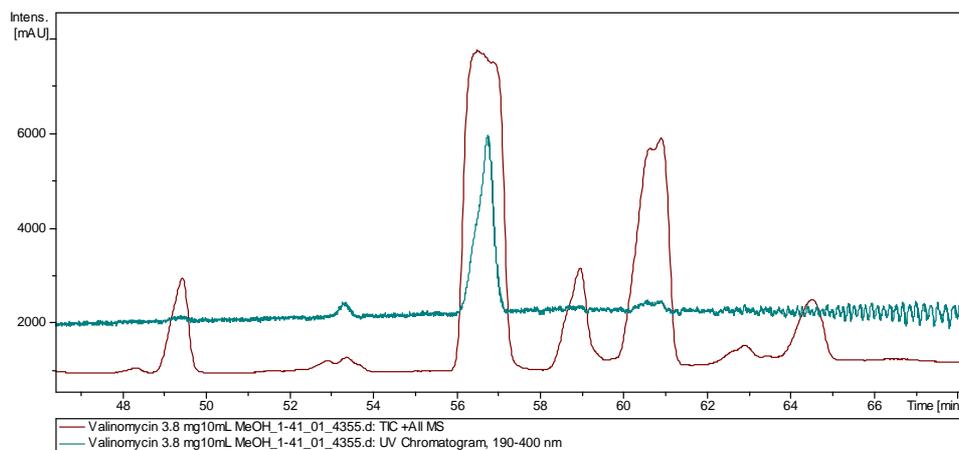


図8-1 バリノマイシンのピーク付近の拡大図

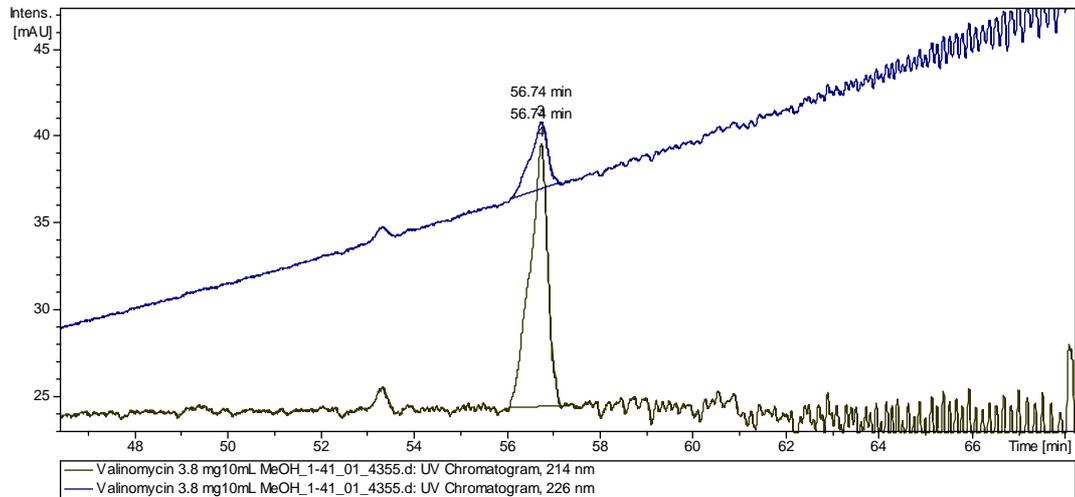


図 9 検出波長の違いによるバリノマイシン UV クロマトグラム  
 青線が検出波長226 nm、黄線が214 nmを示す。

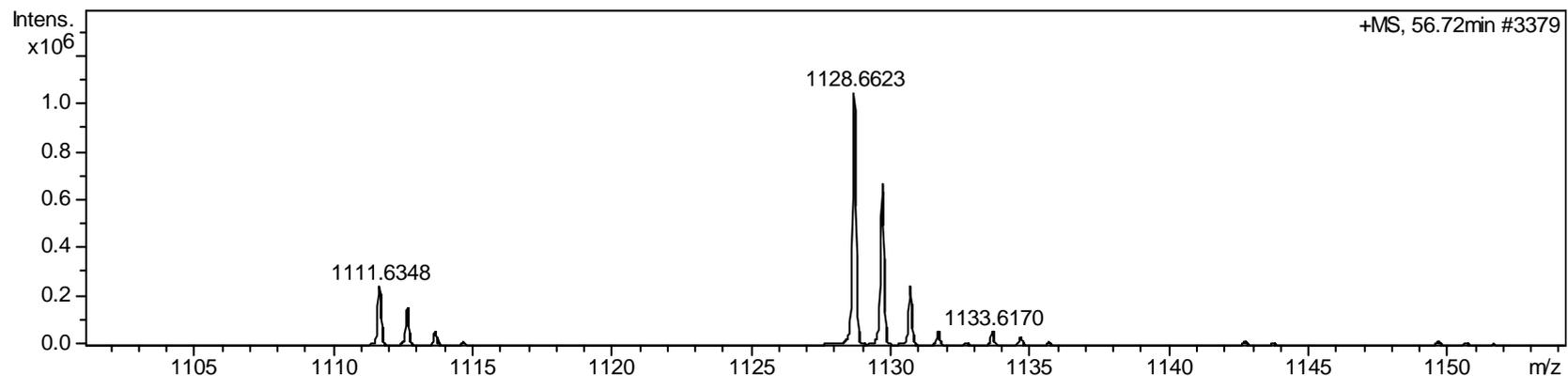


図 10 バリノマイシン試料に含まれた UV 吸収ピークのマスペクトル

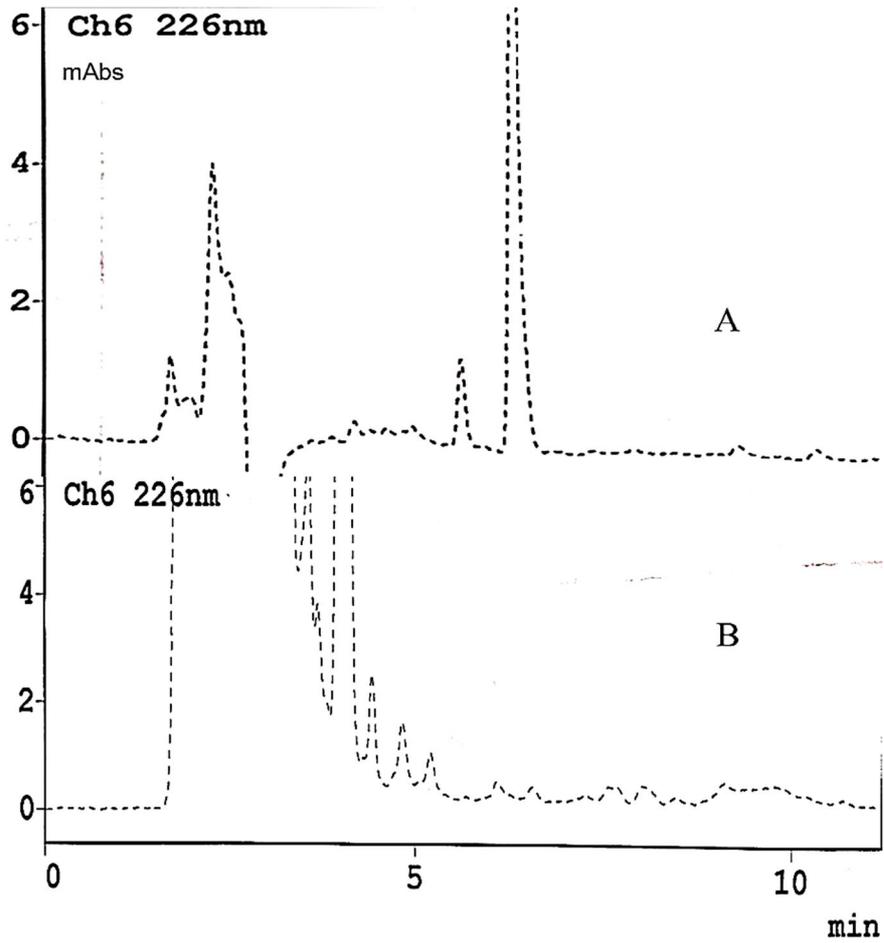


図 1 合成セレウリドに見られるピークが培養サンプル中にも存在する  
 A：合成セレウリド (100 ppm)、B：セレウス摂取米飯 48 時間培養サンプルのクロマトグラム。合成セレウリドに見られる巨大なピークと同じリテンションタイムに小さなピークが確認できる。

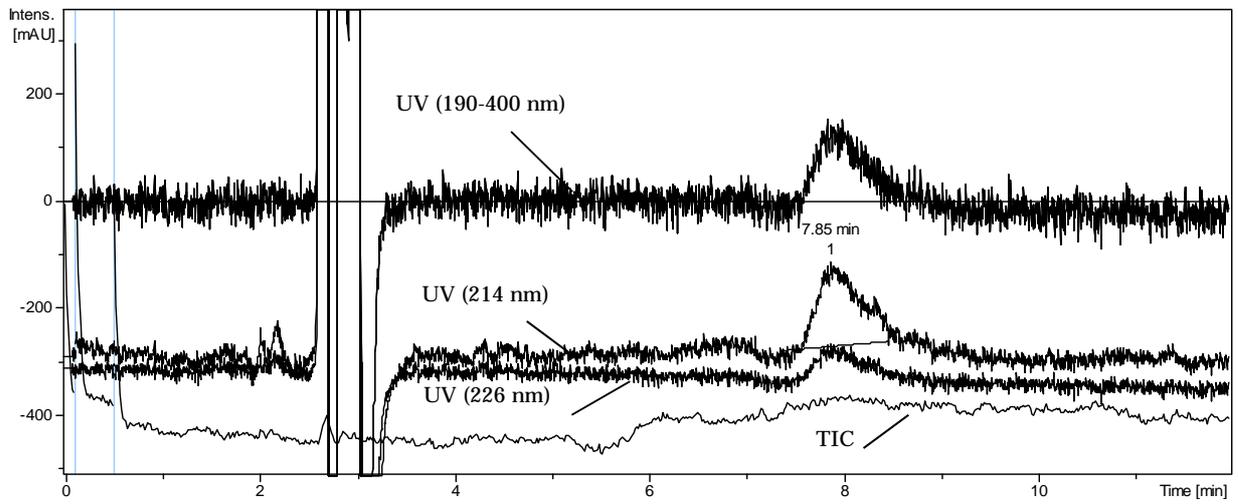


図 2 合成セレウリドに見られるピークのクロマトグラム

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 ( $R_t=7.85$ ) が確認できる。

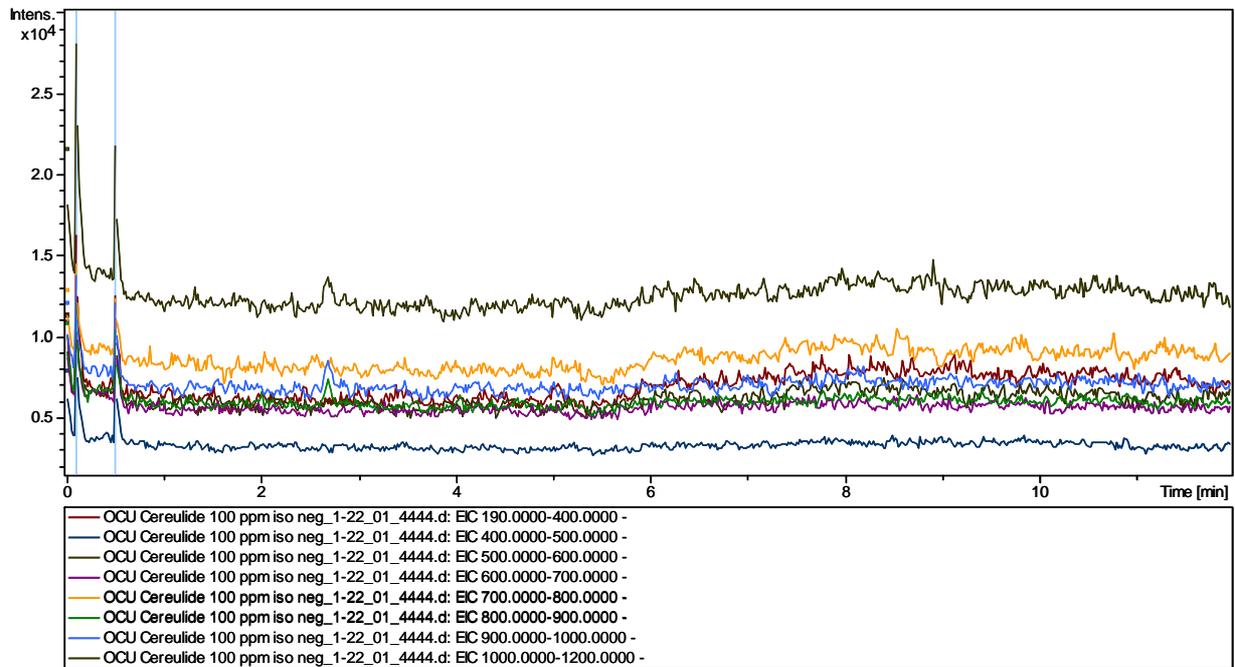


図 3 Rt=7.8 のピークにおけるマスクロマトグラム  
 分子量 400 から 100 刻みでマスクロマトグラムを確認したが、どの分子量においてもピークは確認できなかった。

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試験法に関する研究

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。

## 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 にかげられず、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、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55µL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30µL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5µLと抽出核酸2.5µL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2.5µL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 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) 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に、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」

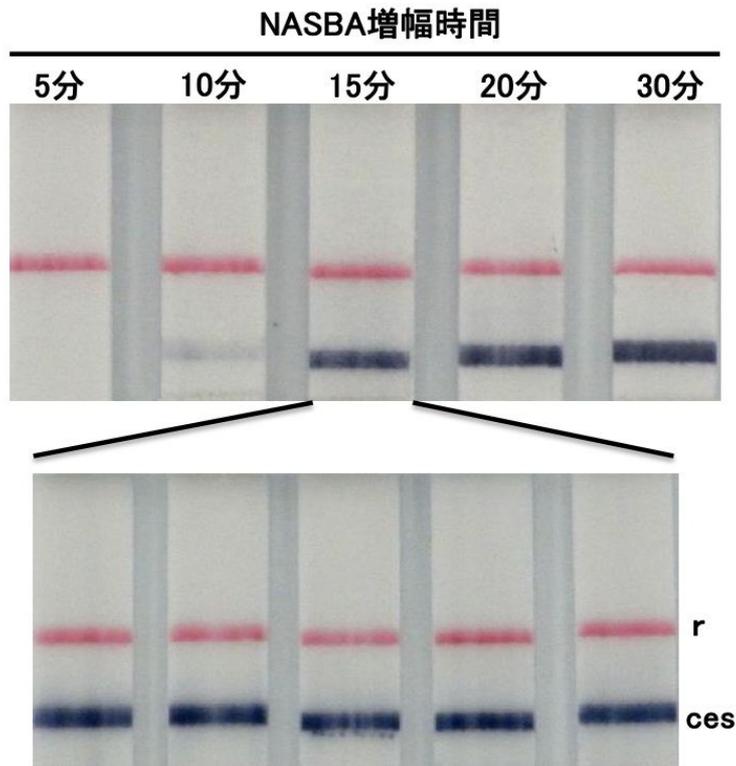


図1 : NASBA増幅時間

合成RNA (10コピー) を鑄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

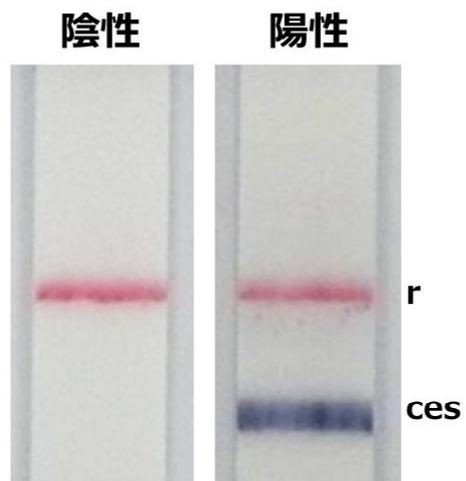


図2: 特異性試験

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

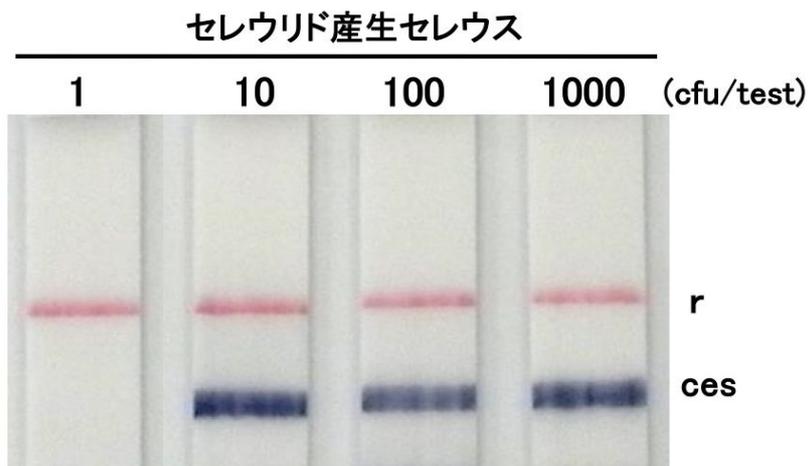


図3: 最小検出感度

r: リファレンス

ces: セレウリド産生菌の陽性ライン

セレウリド産生セレウス

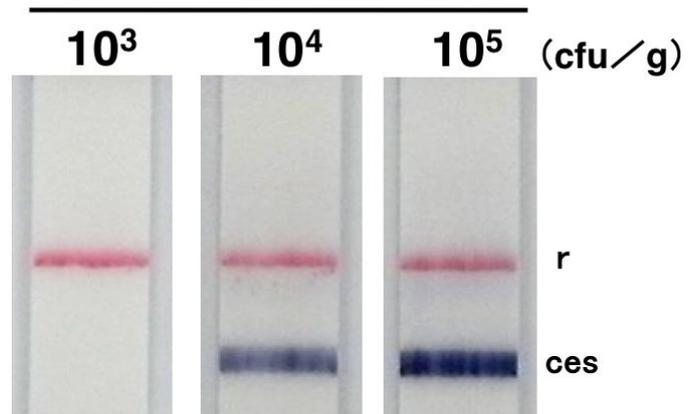


図4:菌接種試験

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

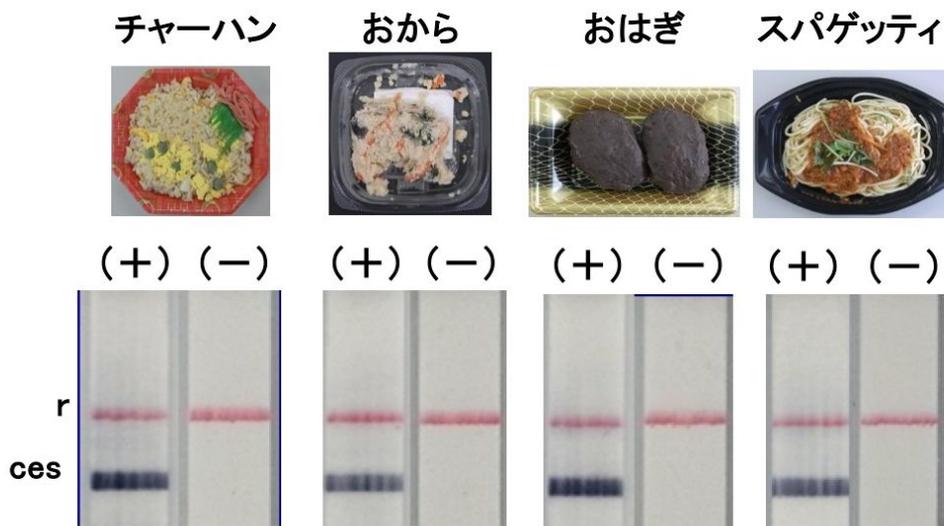


図5:米飯以外の食品試料を用いた菌接種試験

(+)はセレウリド産生菌を接種。

(-)はセレウリド産生菌を非接種。

r:リファレンス

ces:セレウリド産生菌の陽性ライン

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25年度

分担研究報告書

黄色ブドウ球菌の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

平成 25 年度分担研究報告書

「食品中の毒素産生食中毒細菌および毒素の直接試験法の研究」

黄色ブドウ球菌のリスクプロファイル

研究分担者 山本茂貴 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨：

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黄色ブドウ球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。

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。

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

## A . 研究目的

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。

## B . 研究方法

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）について、国際感染症情報（GIDEON<sup>1</sup>）：国内外の疫学情報、食中毒統計調査<sup>2</sup>：国内の疫学情報、感染症発生動向調査週報IDWR<sup>3</sup>：菌の基本情報、PubMed<sup>4</sup>、FoodRisk<sup>5</sup>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

詳細については、別添の委託報告書を参照すること。

### 菌の性状等

黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)は、グラム陽性通性嫌気性の球菌である。ヒトをはじめ家畜・家禽の皮膚や気道上部、腸管等の粘膜に常在し、自然界に広く分布している。現在、ブドウ球菌属には70以上の種・亜種が含まれるが、黄色ブドウ球菌は最も病原性が高く、ヒトや動物の化

膿性疾患や食中毒の原因となる。黄色ブドウ球菌はコアグラーゼを産生する。5~47.8 の温度域で増殖（至適増殖温度：30~37 ）し、ヒトの食中毒を引き起こすエンテロトキシン（SEs）が産生されるのは10~46 の温度域と報告されている。また、食塩濃度16~18%でも増殖し、他の条件が適当であれば食塩濃度10%でもエンテロトキシンを産生する。エンテロトキシンは炭水化物や脂質、核酸を含まない水溶性のタンパク質で、分子量は約27KDaから29KDaである。極めて耐熱性が高く、100 で30分間加熱しても完全には失活せず、胃酸やタンパク分解酵素にも抵抗性を示す。

黄色ブドウ球菌食中毒は典型的な食品内毒素型食中毒であり、黄色ブドウ球菌が増殖する過程で産生されたエンテロトキシんに汚染された食品を摂食することにより発症する。

エンテロトキシンは神経毒の 種で、その特異的な生物活性が嘔吐中枢を刺激して催吐作用をもたらす。その他、スーパー抗原活性も合わせ持ち、非特異的 T細胞を活性化することで炎症性サイトカインの過剰放出を起こし、毒性ショックを引き起こすこともある。

エンテロトキシンは極めて多様性の高い毒素群であり、嘔吐作用の証明されていない「ブドウ球菌エンテロトキシン様毒素（SEI）」も含めると、これまでに23種類の存在が報告されている。

### 感染源

黄色ブドウ球菌はヒトを取り巻く環境中に広く分布し、健常人の鼻腔、咽頭、腸管等にも生息している。ヒトでの保菌率

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

<sup>2</sup> 厚生労働省 食中毒統計調査

<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/112-1.html>

<sup>3</sup> 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](http://idsc.nih.gov/idwr/kansen/k03/k03_05/k03_05.html)

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

<sup>5</sup> FoodRisk <http://foodrisk.org/>

は約 40%とされ、このうち 30～40%のヒト保有菌株が SE または SEI を産生する。

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。

### 発症機序・用量反応

食中毒における調査で判明した原因食品中のエンテロトキシン量と当該食品の摂取量から、ヒトの発症毒素量は数 100ng～数  $\mu\text{g}$  と推定されている。黄色ブドウ球菌が食品中で増殖し 105～109/g 程度になると、その過程で産生されるエンテロトキシンが発症毒素量に達すると考えられている。ただし、2000 年にわが国で発生した加工乳を原因とする大規模食中毒では、加工乳から 0.08～0.38ng/ml の SEA が検出され、発症者の SEA 摂取量は 20～100ng と推定されている。この毒素量は従来の発症最小毒素量と比較するときわめて少ない値であった。

### 症状

潜伏期間と症状の重症度は、エンテロトキシンの摂取量と個人の感受性によって異なる。抑制不能の特徴的な嘔吐・吐き気の初期症状は、汚染食物の摂取後 30 分～8 時間以内（平均 3 時間）に現れる。他の一般的な症状は、腹痛、下痢、めまい、震えや全身衰弱があり、中程度の発熱（37 程度）を起こす場合もある。なお、下痢は約 70%に認め、水様性下痢が多い。

ほとんどのケースでは特別な治療をしなくても 24～48 時間で回復するが、その間下痢や全身衰弱が 24 時間以上続く。

### 検出・診断方法

ブドウ球菌食中毒の検査では、まず原因食品、糞便、吐物、拭き取り等の検査材料から黄色ブドウ球菌を分離する。疫学的にブドウ球菌食中毒を証明するためには、分離菌株のエンテロトキシン産生性を調べ、コアグラージェ型別を実施する必要がある。ブドウ球菌食中毒と判定するためには、分離された菌株が健康保菌者由来でないことを慎重に判断することが重要である。

### 治療・予防

ブドウ球菌性食中毒は伝播性がなく、健常者が罹患した場合は特別な治療を行わなくても 24 時間程度で回復することが多く、予後も一般的に良好で、抗菌剤による治療の必要性はない。

### 疫学

#### 日本

ブドウ球菌食中毒は、食品衛生法に基づく届出が義務づけられており、1984 年までは年間 200 事例以上の食中毒の発生が見られたが、1985 年以降除々に減少し、2000 年以降は年間 100 事例未満の発生状況で事例数は減少している。

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

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。

#### **D . 考 察**

リスクプロファイルのため、考察は省略する

#### **E . 結 論**

リスクプロファイルのため、結論は省略する。

#### **F . 健康危機情報**

特になし

#### **G . 研究発表**

特になし

#### **H . 知的財産権取得状況**

特になし

# 黄色ブドウ球菌リスクプロファイル作成支援業務 報告書

---

2013年12月

**MRI** 株式会社三菱総合研究所  
人間・生活研究本部

# 1 調査の概要

## (1) 調査目的

黄色ブドウ球菌に係るリスクプロファイルの作成を支援するため、黄色ブドウ球菌に関する最新の知見、情報を収集し整理することを目的とする。

## (2) 調査範囲

最新の知見を得るという観点から、本調査では年々アップデートされていると考えられる以下の項目について重点的に情報収集を行った。なお、論文については 2009 年以降に公表されたものを中心に収集した。

- ・ 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（毒素産生性、発症機序 等）
- ・ 新たな検出法、診断法、予防法 等
- ・ リスク評価（用量反応 等）

## (3) 調査方法

以下のサイトから黄色ブドウ球菌に関する情報を収集した。

- ・ 国際感染症情報（GIDEON<sup>1</sup>）：国内外の疫学情報を収集
- ・ 食中毒統計調査<sup>2</sup>：国内の疫学情報を収集
- ・ 感染症発生动向調査週報 IDWR<sup>3</sup>：黄色ブドウ球菌の基本情報を収集
- ・ CiNii Articles<sup>4</sup>、PubMed<sup>5</sup>、FoodRisk<sup>6</sup> 等：その他の情報を収集

その他、以下の公表資料を参考にした。

- ・ 食品安全委員会「黄色ブドウ球菌による食中毒について」<sup>7</sup>
- ・ 食品安全委員会「ブドウ球菌食中毒（Staphylococcal foodborne poisoning）ファクトシート」<sup>8</sup>
- ・ 平成 21 年度食品安全確保総合調査「食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書」（社団法人 畜産技術協会）

---

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

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

<sup>3</sup> IDWR 感染症の話 ブドウ球菌食中毒 [http://idsc.nih.gov/idwr/kansen/k01\\_g1/k01\\_13/k01\\_13.html](http://idsc.nih.gov/idwr/kansen/k01_g1/k01_13/k01_13.html)

<sup>4</sup> CiNii Articles <http://ci.nii.ac.jp/>

<sup>5</sup> PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

<sup>6</sup> FoodRisk <http://foodrisk.org/>

<sup>7</sup> [http://www.fsc.go.jp/sonota/saikin/05\\_staphylo.pdf](http://www.fsc.go.jp/sonota/saikin/05_staphylo.pdf)

<sup>8</sup> <http://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets/09staphylococcal.pdf>

## 2 調査結果

### (1) 調査結果概要

- ・ 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。
- ・ CiNii Articles によるキーワード検索により、日本語によるレビュー論文を中心に収集した。
- ・ FoodRisk、PubMed では、主に毒素に関する分子生物学的研究や検出・診断法に関する文献を中心に抽出した。

### (2) 黄色ブドウ球菌に関する知見の整理

#### 1) 病原体の特徴

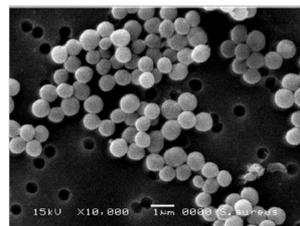
##### ア. 分類

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) は、ブドウ球菌科 (Staphylococcaceae) ブドウ球菌属 (Staphylococci) に分類されるグラム陽性通性嫌気性の球菌である。ヒトをはじめ家畜・家禽の皮膚や気道上部、腸管等の粘膜に常在し、自然界に広く分布している。[1、2]

現在、ブドウ球菌属には 70 以上の種・亜種が含まれるが、黄色ブドウ球菌は最も病原性が高く、ヒトや動物の化膿性疾患や食中毒の原因となる。[1、3]

##### イ. 形態

黄色ブドウ球菌は直径 0.8~1.0  $\mu\text{m}$  のグラム陽性通性嫌気性球菌であり、コロニーを形成して発育する。コアグラーゼ、clumping factor および耐熱性 DNase を産生する点で他のブドウ球菌属と区別される。[1]



出典：食品安全委員会事務局資料 [4]

### ウ. 性状

ブドウ菌属は、コアグララーゼ産生の有無により大きくコアグララーゼ陽性ブドウ球菌（CPS, coagulase positive staphylococci）とコアグララーゼ陰性ブドウ球菌（CNS, coagulase negative staphylococci）の2つのタイプに分類される。[3] 黄色ブドウ球菌はCPSに含まれ、表皮ブドウ球菌（*S. epidermidis*）など多くの菌種はCNSに分類される。[5]

黄色ブドウ球菌は5~47.8℃の温度域で増殖（至適増殖温度：30~37℃）し、ヒトの食中毒を引き起こすエンテロトキシン（SEs）が産生されるのは10~46℃の温度域と報告されている。また、食塩濃度16~18%でも増殖し、他の条件が適当であれば食塩濃度10%でもエンテロトキシンを産生する。[6、7]

エンテロトキシンは炭水化物や脂質、核酸を含まない水溶性のタンパク質で、分子量は約27KDaから29KDaである。極めて耐熱性が高く、100℃で30分間加熱しても完全には失活せず、胃酸やタンパク分解酵素にも抵抗性を示す。[6、7]

また、黄色ブドウ球菌の増殖及びエンテロトキシンの産生は様々な環境因子の影響を受ける。[8]

図表 1 黄色ブドウ球菌及び類似菌の生化学性状

テスト (基質)	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. delphini</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. schleiferi</i>
色素産生	+	-	-	-	+	d	-
V.P	+	-	-	-	-	+	+
硝酸塩還元	+	+	+	+	+	+	+
Alkaline phosphatase	+	+	+	+	+	-	+
Urease	+	+	+	d	d	d	-
Arginine dihydrolase	+	d	+	+	+	-	+
炭水化物 (酸) :							
D-キシロース	-	-	-	-	-	-	-
白糖	+	+	+	+	+	+	-
麦芽糖	+	(+)	+	-	d	+	-
マンノース	+	+	+	+	+	+	+
トレハノース	+	+	-	+	+	+	+
乳糖	+	d	+	+	+	+	-
ガラクトース	+	+	•	+	+	•	•
果糖	+	+	+	+	+	+	+
ツラノース	+	d	•	-	d	d	-
リボース	+	+	•	+	+	-	-
マンニトール	+	+	+	-	d	-	-
Coagulase	+	+	+	d	-	-	-
Clumping factor	+	d	-	-	-	+	+
耐熱性 Dnase	+	+	-	+	-	-	+
溶血性	+	d	+	-	-	+	+
β-Galactosidase	-	d	•	-	-	-	-

出典：[1]

図表 2 黄色ブドウ球菌の増殖及び毒素産生に影響する因子

因子	至適増殖	増殖限界	至適 SE 産生	SE 産生 限界	影響を受ける SE	SE 産生への 影響	対象食品
温度	35-41℃	6-48℃	34-40℃	10-46℃	SEA,SEB, SEC,SED	温度は増殖よりも毒素産生を促進する	乳、ハム、卵製品
pH	6-7	4-10	7-8	5-9.6	SEA,SEB, SEC,SED, SEE	嫌気下に比べ好気下でより耐性あり 乳酸は毒素産生を抑制 アガー依存性 (SEC)	ハム、ソーセージ
水分活性	0.99	0.83 ≥ 0.99	0.99	0.86 ≥ 0.99	SEA,SEB, SEC,SEH	SEB/SEC は SEA/SHE よりも感受性	ベーコン、ソーセージ、塩漬け牛肉・豚肉
NaCl	0%	0-20%	0%	<12%	SEA,SEB, SEC	SEA 産生の限界温度の上昇 低浸透圧は毒素産生を促進 増殖よりも SEB 産生が強く抑制される	ハム、ソーセージ
酸素	好気性	嫌気性 - 好気性	好気性	嫌気性 - 好気性	SEA,SEB, SEC,SEH	SEB 量が 10 倍に増加 10% 酸素溶液が SEB 産生に至適	ハム、エビ、ソーセージ
酸化還元電位 (Eh)	> +200mV	≥ 200 ~ +200mV	> +200mV	≥ 100 ~ > +200mV	-	-	-
乳酸菌	-	-	-	-	<i>sec,sel(sek,seg,she)</i>  <i>sea</i>	<i>sec,sel</i> の転写が顕著に抑制される <i>sek,seg,she</i> の転写が軽微に抑制される 静止期の <i>sea</i> のメンテナンスに有利に働く	チーズ

出典：[8]に基づき、三菱総合研究所作成

図表 2 黄色ブドウ球菌の増殖及び毒素産生に影響する因子

因子	至適増殖	増殖限界	至適 SE 産生	SE 産生 限界	影響を受ける SE	SE 産生への 影響	対象食品
温度	35-41℃	6-48℃	34-40℃	10-46℃	SEA,SEB, SEC,SED	温度は増殖よりも毒素産生を促進する	乳、ハム、卵製品
pH	6-7	4-10	7-8	5-9.6	SEA,SEB, SEC,SED, SEE	嫌気下に比べ好気下でより耐性あり 乳酸は毒素産生を抑制 アガー依存性 (SEC)	ハム、ソーセージ
水分活性	0.99	0.83 ≥ 0.99	0.99	0.86 ≥ 0.99	SEA,SEB, SEC,SEH	SEB/SEC は SEA/SHE よりも感受性	ベーコン、ソーセージ、塩漬け牛肉・豚肉
NaCl	0%	0-20%	0%	<12%	SEA,SEB, SEC	SEA 産生の限界温度の上昇 低浸透圧は毒素産生を促進 増殖よりも SEB 産生が強く抑制される	ハム、ソーセージ
酸素	好気性	嫌気性 - 好気性	好気性	嫌気性 - 好気性	SEA,SEB, SEC,SEH	SEB 量が 10 倍に増加 10% 酸素溶液が SEB 産生に至適	ハム、エビ、ソーセージ
酸化還元電位 (Eh)	> +200mV	≥ 200 ~ +200mV	> +200mV	≥ 100 ~ > +200mV	-	-	-
乳酸菌	-	-	-	-	<i>sec,sel(sek,seg,she)</i>  <i>sea</i>	<i>sec,sel</i> の転写が顕著に抑制される <i>sek,seg,she</i> の転写が軽微に抑制される 静止期の <i>sea</i> のメンテナンスに有利に働く	チーズ

出典：[8]に基づき、三菱総合研究所作成

## エ. 病原性

コアグラゼ陽性ブドウ球菌 (CPS) には 7 種の菌種が属しており、このうち、黄色ブドウ球菌が食中毒で報告される最も主要な菌種である。コアグラゼ陰性ブドウ球菌 (CNS) のエンテロトキシン毒性の有無については、CNS の一部ではエンテロトキシンを産生し、食中毒を引き起こし得るとする報告がある一方で、逆の結果も報告されており、その真偽について議論が続いている。[9]

黄色ブドウ球菌食中毒は典型的な食品内毒素型食中毒であり、黄色ブドウ球菌が増殖する過程で産生されたエンテロトキシンに汚染された食品を摂食することにより発症する。[2]

エンテロトキシンは神経毒の I 種で、その特異的な生物活性が嘔吐中枢を刺激して催吐作用をもたらす。[2] その他、スーパー抗原活性も合わせ持ち、非特異的 T 細胞を活性化することで炎症性サイトカインの過剰放出を起こし、毒性ショックを引き起こすこともある。[2、10]

エンテロトキシンは極めて多様性の高い毒素群であり、嘔吐作用の証明されていない「ブドウ球菌エンテロトキシン様毒素 (SEI)」も含めると、これまでに 23 種類の存在が報告されている。[1、2、3] エンテロトキシンは当初抗原型の違いにより A~E の 5 種類に分けられ、さらに C 型は部分抗原の違いによって C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub> の 3 つの型に分けられたが、その後次々に新規の SE あるいは SEI が発見された。ただし、黄色ブドウ球菌食中毒事例由来株の SE 型は SEA 単独あるいは SEA と他の型の複合型によるものが多数を占めることが明らかにされている。この傾向は欧米でも同様である。[1] なお、新型 SE および SEI については遺伝子レベルの分析が先行しており、検出方法も開発されていないことから、毒素そのものについては不明な点が多く残されている。さらに、ブドウ球菌食中毒のうち数%は SE 型が不明とされており、SEA~SEE 以外の関与を示唆する報告もある。[1]

エンテロトキシンの遺伝子領域は多数存在し、プラスミドやファージ、ゲノムアイランドによって運ばれる。また、Jarraud ら (2001 年) は、SEG, SEI, SEM, SEN, SEO のようないくつかの SE をコードした *egc* (エンテロトキシン遺伝子クラスター) 発現のためのオペロンが存在することを発見した。この遺伝子座が SE 遺伝子の産生場になっており、遺伝子重複や組換えによって共通の祖先遺伝子から新しい毒素が産生することが説明できる。[9]

黄色ブドウ球菌における病原性因子の発現を制御する主な制御システムは、*agr* システム (アクセサリ遺伝子制御因子) であり、ほとんどの SE の発現が *agr* システムによって制御されている。[9]

図表 3 黄色ブドウ球菌エンテロトキシンの特徴

Toxin type	General characteristics		Mode of activity		References
	Molecular weight (Da)	Genetic basis of SE	Superantigenic action*	Emetic action <sup>†</sup>	
SEA	27 100	Prophage	+	+	Betley & Mekalanos (1985) Borst & Betley (1994)
SEB	28 336	Chromosome, plasmid, pathogenicity island	+	+	Jones & Khan (1986) Shafer & landolo (1978) Shalita <i>et al.</i> (1977) Altboum <i>et al.</i> (1985)
SEC <sub>1-2-3</sub>	≈ 27 500	Plasmid	+	+	Bohach & Schlievert (1987) Hovde <i>et al.</i> (1990) Altboum <i>et al.</i> (1985) Fitzgerald <i>et al.</i> (2001)
SED	26 360	Plasmid	+	+	Chang & Bergdoll (1979) Bayles & landolo (1989)
SEE	26 425	Prophage	+	+	Couch <i>et al.</i> (1988)
SEG	27 043	<i>enterotoxin gene cluster (egc)</i> , chromosome	+	+	Munson <i>et al.</i> (1998) Jarraud <i>et al.</i> (2001)
SEH	25 210	Transposon	+	+	Su & Wong (1996) Ren <i>et al.</i> (1994) Noto & Archer (2006)
SEI	24 928	<i>egc</i> , chromosome	+	(+)	Munson <i>et al.</i> (1998) Jarraud <i>et al.</i> (2001)
SEJ	28 565	Plasmids	+	nk	Zhang <i>et al.</i> (1998)
SEK	25 539	Pathogenicity island	+	nk	Orwin <i>et al.</i> (2001)
SEL	25 219	Pathogenicity island	+	- <sup>‡</sup>	Orwin <i>et al.</i> (2003)
SEIM	24 842	<i>egc</i> , chromosome	+	nk	Jarraud <i>et al.</i> (2001)
SEIN	26 067	<i>egc</i> , chromosome	+	nk	Jarraud <i>et al.</i> (2001)
SEIO	26 777	<i>egc</i> , chromosome	+	nk	Jarraud <i>et al.</i> (2001)
SEIP	26 608	Prophage	+	nk <sup>§</sup>	Kuroda <i>et al.</i> (2001) Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEIQ	25 076	Pathogenicity island	+	-	Jarraud <i>et al.</i> (2002) Diep <i>et al.</i> (2006)
SER	27 049	Plasmids	+	+	Omoe <i>et al.</i> (2003)
SES	26 217	Plasmid	+	+	Ono <i>et al.</i> (2008)
SET	22 614	Plasmid	+	(+)	Ono <i>et al.</i> (2008)
SEIU	27 192	<i>egc</i> , chromosome	+	nk	Letertre <i>et al.</i> (2003)
SEIU <sub>2</sub>	26 672	<i>egc</i> , chromosome	+	nk	Thomas <i>et al.</i> (2006)
SEIV	24 997	<i>egc</i> , chromosome	+	nk	Thomas <i>et al.</i> (2006)

\*+, positive reaction.  
<sup>†</sup>+, positive reaction; (+), weak reaction; -, negative reaction; nk, not known.  
<sup>‡</sup>For SEL, emetic activity was not demonstrated in *Macaca nemestrina* monkey.  
<sup>§</sup>For SEIP, emetic activity was demonstrated in *Suncus murinus* but not in primate model.

出典 : [ 9 ]

## 2) 引き起こされる疾病の特徴

### ア. 感染源

黄色ブドウ球菌はヒトを取り巻く環境中に広く分布し、健康人の鼻腔、咽頭、腸管等にも生息している。ヒトでの保菌率は約 40%とされ、このうち 30~40%のヒト保有菌株が SE または SEI を産生する[5]。また、化膿菌の一つとしても知られており、手指等の傷口から感染して化膿巣を形成する。この化膿巣には本菌が多量に存在しているため、食品取扱者を介した食品汚染の機会は高くなっている。本菌は家畜を含むほ乳類、鳥類にも広く分布しており、牛乳房炎の起原因菌の一つでもあることから、生乳又は食肉を汚染する機会も極めて高いことが知られている。[6] なお、ほとんどのケースではヒトによる汚染が原因となっているが、31 件のアウトブレイクに関連した 178 種の黄色ブドウ球菌を検証したところ、うち 2 件のアウトブレイクでは動物の汚染が原因になっていたとの報告もある。[9]

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。[6]

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。[6]

### イ. 発症機序・用量反応

食中毒における調査で判明した原因食品中のエンテロトキシン量と当該食品の摂取量から、ヒトの発症毒素量は数 100ng~数  $\mu$ g と推定されている。黄色ブドウ球菌が食品中で増殖し  $10^5\sim 10^9$ /g 程度になると、その過程で産生されるエンテロトキシンが発症毒素量に達すると考えられている。[6] ただし、2000 年にわが国で発生した加工乳を原因とする大規模食中毒では、加工乳から 0.08~0.38ng/ml の SEA が検出され、発症者の SEA 摂取量は 20~100ng と推定されている。この毒素量は従来の発症最小毒素量と比較するときわめて少ない値であった。[1、2]

SEs のスーパー抗原活性とは異なり、嘔吐活性を引き起こすメカニズムについてはほとんど解明されていない。嘔吐に重要と考えられる SE 内のアミノ酸配列やドメインの特定などの取り組みがなされているものの、確たる結果は得られていない。[9]

他の細菌エンテロトキシンとは対照的に、消化器系の特定の細胞や受容体が SE による食中毒にはっきりと関連付けされていない。Sugiyama & Hayama (1965 年) は、SE が腸の迷走神経を刺激することでシグナルが嘔吐中枢に伝達されるという説を提唱した。この説をサポートするように、迷走神経上に存在する受容体が、SEA による嘔吐作用に必須であることが最近の研究で明らかになっている。さらに、SE が胃壁に浸透することで、局所および全身性免疫応答を活性化することも報告されている。[9]

### ウ. 症状

潜伏期間と症状の重症度は、エンテロトキシンの摂取量と個人の感受性によって異なる。抑制不能の特徴的な嘔吐・吐き気の初期症状は、汚染食物の摂取後 30 分~8 時間以内(平均 3 時間)に現れる。他の一般的な症状は、腹痛、下痢、めまい、震えや全身衰弱があり、中程度

の発熱（37℃程度）も起こす場合もある。なお、下痢は約 70%に認め、水様性下痢が多い。最も重篤なケースでは、頭痛、衰弱、および低血圧が報告されている。ほとんどのケースでは特別な治療をしなくても 24～48 時間で回復するが、その間下痢や全身衰弱が 24 時間以上続く。死亡ケースは非常に稀である(0.02%, Mead et al., 1999)が、幼児や高齢者、基礎疾患を持つ人々といった脱水症状の影響を受けやすい人々で起こる場合がある。[7、9]

#### エ. 検出・診断方法

ブドウ球菌食中毒の検査では、まず原因食品、糞便、吐物、拭き取り等の検査材料から黄色ブドウ球菌を分離する。疫学的にブドウ球菌食中毒を証明するためには、分離菌株のエンテロトキシン産生性を調べ、コアグラウゼ型別を実施する必要がある。ブドウ球菌食中毒と判定するためには、分離された菌株が健康保菌者由来でないことを慎重に判断することが重要である。[11]

また、ブドウ球菌食中毒は毒素型食中毒であり、原因食品から直接エンテロトキシンを検出できる場合もある。雪印ブドウ球菌食中毒事件では、原因食品である加工乳などから黄色ブドウ球菌は検出されず、エンテロトキシン A のみが加工乳 1ml 当たり 0.05ng 以上検出された。このように、黄色ブドウ球菌は加熱により死滅するが、耐熱性であるエンテロトキシンが食品中に検出される食中毒事例もいくつか報告されている。[11]

エンテロトキシンの検出には、抗エンテロトキシン血清を用いる免疫学的検査法と、実験動物（サル、スンス等）への投与による生物学的試験法がある。前者では、近年検出感度の高いキット（RPLA 法・ELISA 法）が市販されるようになってきている。その他、PCR を用いたエンテロトキシン遺伝子の検出も行われるようになってきている。[1]

一方、新たに発見された SE に対して利用可能な抗体が無いことから、代替方法として物理化学的手法に基づく方法がごく最近開発された。特に質量分析(MS) は、エンテロトキシンの量を特異的かつ迅速に、信頼性の高い定量解析することができることから、現在利用可能な技術の中で最も感度の高い技術と言える。しかし、対象範囲が広い場合には、1つの MS 技術を全てのタンパクに適用することはできない。[9]

#### オ. 治療・予防

ブドウ球菌性食中毒は伝播性がなく、健常者が罹患した場合は特別な治療を行わなくても 24 時間程度で回復することが多く、予後も一般的に良好で、抗菌剤による治療の必要性はない。[7]

黄色ブドウ球菌自体の耐熱性は高くないものの、産生されるエンテロトキシンは耐熱性が高く、通常の加熱調理では活性を失わない。従ってブドウ球菌食中毒を予防するには、食品中でエンテロトキシンを産生させないよう黄色ブドウ球菌による食品の汚染や食品中での本菌の増殖を防ぐことが重要となる。[6]

### 3) 疫学（食中毒発生状況）

#### ア. 日本

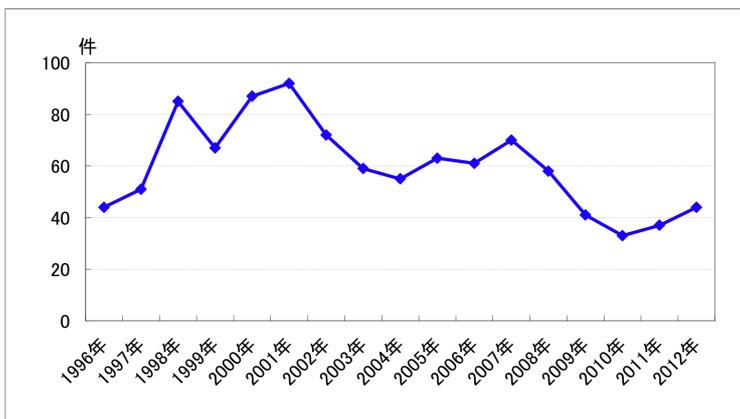
##### ● 食中毒発生件数

ブドウ球菌食中毒は、食品衛生法に基づく届出が義務づけられており、1984年までは年間200事例以上の食中毒の発生が見られたが、1985年以降徐々に減少し、2000年以降は年間100事例未満の発生状況で事例数は減少している。[6]

1996年以降、黄色ブドウ球菌による食中毒発症件数は33～92件の間で推移している（図表4）。年間患者数は2000年に、患者数が13,420人と大規模な発生があったが、その他の年は600～2000人の間で推移している（図表5）。発生規模は1事例あたりの患者数が100～200名前後がほとんどであるが、時に患者数14000名を超える大規模な事例もみられる（図表6）。

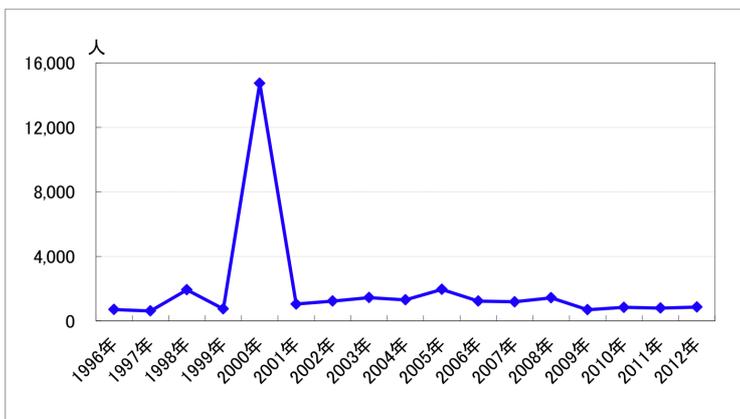
なお、月別発生状況は他の細菌性食中毒と同様に、初夏～秋季（5月～10月）に多く発生している（図表7）。また、1996年から2012年の原因食品別発生状況をみると、「複合調理食品」によるものが最も多く、次いで「乳類及び加工食品」による食中毒が多い傾向にある（図表8）。

図表 4 食中毒発生件数の推移



出典：食中毒統計調査を基に、三菱総合研究所作成

図表 5 年間発症者数の推移



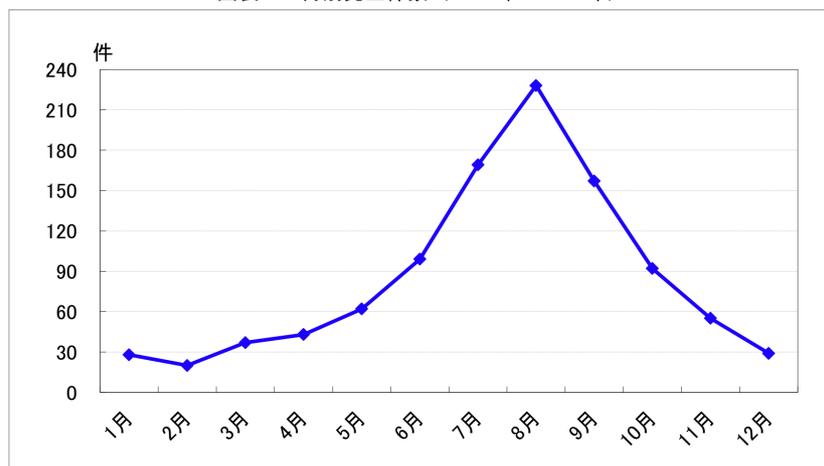
出典：食中毒統計調査を基に、三菱総合研究所作成

図表 6 黄色ブドウ球菌食中毒の大規模事例

発生年月日	患者数	原因食品
2000年6月	13,420	加工乳等
2000年8月	141	イカ焼き（8/16.祭りで提供）
2001年7月	126	オードブル
2002年10月	314	おにぎり
2002年10月	146	弁当
2003年9月	134	十五夜お月見団子
2003年9月	341	不明（折り詰め弁当）
2003年9月	263	不明
2004年2月	333	2月28日及び2月29日昼に提供された弁当
2004年7月	163	不明（7月29日朝食）
2005年6月	150	6/12 幕の内弁当
2005年6月	862	鮭の塩焼き
2005年8月	113	8月14日に提供した卵巻き
2005年8月	121	弁当（8月14日16時配送の地鶏の照り焼き弁当）
2005年12月	112	不明（12月6日の事業所弁当）
2006年7月	152	ささみときゅうりのゴマだれサラダ
2008年5月	460	おむすび弁当
2008年7月	120	不明（おにぎり弁当及び焼きそば弁当）
2009年5月	102	不明（仕出し弁当）
2010年4月	173	不明（仕出し屋）
2010年10月	114	不明（10月5日に提供された支給弁当）
2011年10月	143	かにめし弁当
2011年10月	150	平成23年10月16日製造の鮭おにぎり
2012年8月	106	8月15日に提供されたおにぎり

出典：食中毒統計調査を基に、三菱総合研究所作成

図表 7 月別発生件数 (1996年～2012年)



出典：食中毒統計調査を基に、三菱総合研究所作成

図表 8 原因食品上位3位の推移

順位	1996年	1997年	1998年	1999年	2000年	2001年	2002年	2003年	2004年
1位	複合調理食品	複合調理食品	その他	その他	複合調理食品	その他	複合調理食品	複合調理食品	複合調理食品
2位	乳類及びその加工品	その他	乳類及びその加工品	複合調理食品	その他	菓子類	乳類及びその加工品	その他	乳類及びその加工品
3位	菓子類	菓子類	菓子類	乳類及びその加工品	乳類及びその加工品	乳類及びその加工品	菓子類	菓子類	菓子類

順位	2005年	2006年	2007年	2008年	2009年	2010年	2011年	2012年
1位	複合調理食品	菓子類	複合調理食品	複合調理食品	複合調理食品	複合調理食品	菓子類 複合調理食品	複合調理食品
2位	菓子類	複合調理食品	菓子類	乳類及びその加工品	菓子類	菓子類	-	菓子類
3位	乳類及びその加工品	乳類及びその加工品	乳類及びその加工品	菓子類	乳類及びその加工品	乳類及びその加工品	乳類及びその加工品	乳類及びその加工品

出典：食中毒統計調査を基に、三菱総合研究所作成

- 食品の汚染実態

わが国では、1980年に生乳の約65%から黄色ブドウ球菌を検出し、そこから分離した黄色ブドウ球菌株の約40%がエンテロトキシン産生菌株であったとの報告がある。また2002年には、魚介類、肉類（豚肉、鶏肉、牛肉）及び食肉製品から分離した黄色ブドウ球菌株の10～40%からエンテロトキシン産生性菌株を検出したとの報告がある。[6]

- イ. 諸外国

黄色ブドウ球菌エンテロトキシン(SE)は、耐熱性タンパクであり、胃腸症状の原因となっている。ほとんどの症例は黄色ブドウ球菌と関係があるが、エンテロトキシン産生のコアグラゼ陽性ブドウ球菌(*S. intermedius*)も関係がある。また、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌も黄色ブドウ球菌食中毒に関係がある。黄色ブドウ球菌はヒトの手、鼻や、タンパク質が豊富な食べ物に存在し、まれに犬や猫の鼻咽頭や傷口に存在することもある。

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。[12]

● 主なアウトブレイク事例

**【事例 1】1990 年—アメリカ：フロリダ州の刑務所での事例（215 症例）**

1990 年 10 月 10 日の夜、フロリダ州の刑務所の収容者 474 人の多くが、胃腸症状を訴え始めた。

調査対象は、収容者、キッチンの評価および食物を扱う慣習、残存食物処理、便処理の慣習、食品取扱者の鼻孔および皮膚損傷(skin lesions)にまで及んだ。331 人の収容者のうち、65%にあたる 215 人が下痢、嘔吐、もしくはその両方の症状を患っていた。潜伏期間の平均値は 5 時間(1~41 時間)だった。昼食から 8 時間以上経過しているものには嘔吐はなく、下痢のみだった。10 月 10 日の夕ご飯で、チキンを食べたことと病気のリスクが関連していた。チキンの食べ残しからサルモネラ菌と黄色ブドウ球菌が検出され、このうちサルモネラ菌は 20 の便試料のうちの 18 から検出された。食品取扱者の前鼻孔や皮膚障害組織から黄色ブドウ球菌が検出されたが、ファージタイプではこれらの種とアウトブレイクを結びつけることはできなかった。不適切な食品の取扱がこのようなアウトブレイクを助長させた。このレポートは複数の病原体によるアウトブレイクが起こることを認識するという重要性がある、というも、より多くの場合、予防のための指導は、別個の菌種、およびコンタミネーションしうるものに関連したリスクを知ることに依存しているからである。[13]

**【事例 2】1990 年—タイ：障害者スポーツ大会での事例（485 症例）**

1990 年 8 月 25 日、タイの地方の大学での障害者スポーツ大会に参加した 400 名以上の人々が夕食後に胃腸症状を訴えた。疫学チームは、原因を特定し、食中毒の抑え方を提供したいと考えた。調査は、スポーツ大会に参加した 1210 人に及んだ。加えて、環境評価、食物サンプルの研究解析、そして食品取扱者の直腸、耳、喉、それから鼻腔検査が行われた。症例は、夕食での食物を何か食べ、嘔吐、吐き気、腹痛および下痢を経験した人として定義された。1094 人のうち 485 症例存在し、感染率は 43%であった。インタビューは、485 症例のうち、470 症例が完了した。最も共通して起こった 3 つの症状は、悪心(93%)、嘔吐(88%)、腹痛(81.5%)であり、平均潜伏期間は 3.2 時間であった。3 つの品目と発症に有意な関連性が認められ、そのうちエクレアが最も相対リスクが高かった(RR = 7.0, 95%CI = 4.8, 10.2)。エクレアは、夕食で出されるまでの 12 時間以上室温で保管されていた。エクレアからは黄色ブドウ球菌およびセレウス菌が同定されたが、それらのファージタイプは健康な食品取扱者から同定された菌種とは異なっていた。[14]

**【事例 3】1991 年—アメリカ：アメリカ西部での食中毒の事例（265 症例）**

1991 年の 10 月、アメリカの西部で 265 症例の食中毒が起こった。S. intermedius が原因であることが示唆された。代表的なアウトブレイクが A 型のエンテロトキシンを産生した。4 つのエンドヌクレアーゼによって作られ、パルスフィールドゲル電気泳動によって解析された DNA 断片は、カリフォルニアとネバダの 9 つの異なる州からの分離物はすべて単一の菌種に由来するという決定的な証拠を与えた。これらアウトブレイク分離物のパルスフィールドゲル電気泳動パターンは、家畜由来の 7 つのコアグラージェ陽性ブドウ球菌種および 5 つの無関係な黄色ブドウ球菌研究株の異種混合のコレクションとは全く異なっていた。そのデ

ータは、異なるブドウ球菌種内だけでなく、同じ種、さらには同じエンテロトキシン型でも重要なパルスフィールドゲル電気泳動パターンの異成分を示している。この結果は、パルスフィールドゲル電気泳動が、ブドウ球菌の疫学的特定のための、貴重な、菌種特異的の識別装置であることを示唆している。私たちの知っている限りでは、今回が、*S.intermedius* によって引き起こされた最初の文書化された食物媒介性のアウトブレイクである。これらの発見は、*S.intermedius* および、食物中の *S.hyicus* のような他の種の存在が不安の種であることを示唆している。[15]

**【事例4】1998年—ブラジル：カトリックの聖職者の聖職授任式での食中毒の事例（約3000症例、うち16人死亡）**

1998年の夏、ブラジルのミナスジェライス州でのカトリック聖職者の聖職授任を祝うためにおよそ8000人の人々が集結した。食事数時間内におよそ4000人が激しい胃腸症状を訴え、およそ50%にあたる2000人が26の病院施設に救急搬送された。このうち、およそ20%にあたる396人が継続的な入院を必要とし、このうちおよそ20%の81人が集中治療室で治療を受けた。全部で16人(ICU治療人数のおよそ20%)

が不可逆性多重ショックで治療中に亡くなった。事後調査で、コンタミネーションの原因として黄色ブドウ球菌陽性だった食品取扱者の存在が示唆されている。今回の知見は黄色ブドウ球菌の経口暴露についての情報を与えている。[16]

**【事例5】1998年—ブラジル：野菜サラダにおける食中毒の事例（およそ180症例）**

ブラジルのサンパウロ州のプロドウスキーでおよそ180人を巻き込んだ黄色ブドウ球菌食中毒が起こった。黄色ブドウ球菌は、食物と食物取扱者から、表現型(ファージタイプ、抗菌物質感受性試験、エンテロトキシン産生試験)と遺伝型(ランダム増幅多型DNA法)を調べる両方の検査によって、病気の原因として同定された。マヨネーズ・ソース、焼かれた鶏、トマト・ソース中のパスタの入った野菜サラダと、5人の糧食勤務員の中咽頭の分泌から検出された菌種は、みな同じファージ型および抗生物質耐性を示した。ランダム増幅多型DNA法では、OPE-20とOPA-7のプライマーを用いたところ17箇所の結合箇所が発生した。菌種の類似性は、4個の主なクラスタ(I、II、IIIおよびIV)に対し、59の黄色ブドウ球菌株を分類した樹状図の作成により分析が行われた。マヨネーズ・ソース、焼かれた鶏、トマト・ソース中のパスタの入った野菜サラダと、5人の糧食勤務員の中咽頭の分泌から検出された菌種は同じクラスターに属し、エンテロトキシンAを産生した。従って、これらの食物と食物取扱者が特定された。[17]

**【事例6】2000年—日本：低脂肪牛乳における食中毒の事例（13,420症例、うち180人入院）**

黄色ブドウ球菌による食中毒が日本の関西地方で起こった。13,420人ものが大阪市にある工場によって製造された製品を摂取した。製品の主要な材料は、北海道の工場で生産された脱脂粉乳であった。エンテロトキシンA(SEA)は、低脂肪牛乳で検出(< or = 0.38ng/mL)され、およそ脱脂粉乳中に3.7 ng/g含まれていた。一人当たりのSEAの摂取量の合計は、お

よそ 20-100 ナノグラムと見積もられた。想定した発症率は、以前のアウトブレイクで報告された発症率より少なかった。少なくとも 2 回、130℃の高温に 2~4 秒間処理された SEA は、一部不活性化されたかもしれないが、免疫学的、生物学的活性は保持したままであった。今回のアウトブレイクは、熱処理がミルク中の黄色ブドウ球菌を破壊したが、SEA は、毒性を起こすために十分な活性を保持していた点において特殊だった。後に SEH も検出され、結果的に食中毒は複数のエンテロトキシンによって引き起こされたことが明らかになった。  
[18]

**【事例 7】2005 年—ギリシャ：粉チーズにおける食中毒の事例（600 症例以上）**

今回のアウトブレイクの原因は黄色ブドウ球菌であったことが示唆されている。原因食物は粉チーズで、軍隊において、牛肉と混ざった状態でランチに出されたものであった。このアウトブレイクは、若くて健康な人々に対し、短時間で中程度の強さの症状を引き起こす際のエンテロトキシン産生細菌の許容量を示している。今回のアウトブレイクはさらに、適切な食品取扱習慣の必要性や、適時に認知するという公衆衛生の重要性を強調している。  
[19]

**【事例 8】2007 年—パラグアイ：低温殺菌されていない牛乳における食中毒の事例（400 症例、うち 60 人入院）**

2007 年の 3 月、低温殺菌されていない牛乳の消費に関連した食中毒のアウトブレイクが起こった。400 人が影響を受け、そのうち 60 人が入院を余儀なくされた。黄色ブドウ球菌が 5 人の患者、3 人のオペレーター、3 つの牛乳サンプルから同定された。全ての菌種でエンテロトキシン産生が確認された。3 人の患者、1 人のオペレーター、全ての牛乳サンプルから検出された菌種は、エンテロトキシン C と D をコードした遺伝子を持っていて、区別のつかないパルスフィールドゲル電気泳動パターンを示した。牛乳が毒性の発生源として同定され、製造ラインがコンタミネーションの発生源として同定された。これがパラグアイで報告された最初の食物媒介性のアウトブレイクである。  
[20]

**【事例 9】2007 年—カナダ：フローズンクリームブリュレ(デザート)における食中毒の事例（およそ 190 症例）**

カナダ食品監視局(CFIA)は、冷凍のクリーム・ブリュレがおよそ 190 人を中毒させた疑いがある、とカナダ人に警告しています。ケベックにある「Selection du Pâtisier」によって製造されたクランベリー・クリーム・ブリュレは、黄色ブドウ球菌の毒素を含むのではないかと疑われている。メーカーは、製品がケベックで分配されたと言っているが、国中の商品棚で見つかるかもしれない。「Selection du Pâtisier」は、製品をリコールしていて、CFIA も、購入した人に対し、食べないようにと促している。CFIA は、黄色ブドウ球菌が混入した食物は、見た目においも、腐っているようではなく、また、通常の料理の温度では毒素を破壊するのは難しい、と述べている。  
[21]

《各国の *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌)による食中毒発生状況、汚染状況》

【アジア地域】

日本

○アウトブレイク件数

1996	1997	1998	1999	2000	2001
44	51	85	67	87	92
2002	2003	2004	2005	2006	2007
72	59	55	63	61	70

・1971～1990年の間起きた食中毒のうち24.8%が黄色ブドウ球菌による食中毒。1990年代では2～5%。

・1970年代では、8000症例も報告された。1980年代では、3000～5000件である。

・1984年より前は、毎年およそ200件の黄色ブドウ球菌食中毒事件が起きていた。それは全ての細菌食中毒の25～35%に相当する。

・1995～1999年では、穀物(特におにぎり)とインスタント食品が主に原因となっている。

○アウトブレイクに関わった症例数

1996	1997	1998	1999	2000	2001
698	611	1,924	736	14,722	1,039
2002	2003	2004	2005	2006	2007
1,221	1,438	1,298	1,948	1,220	1,181

○アウトブレイク事例

2000年 — 大阪工場の脱脂粉乳による食中毒(13,420症例、180人入院)

2001年(掲載時) — 建設作業員間で報告された食中毒の事例(21症例)

2009年(掲載時) — 大学祭での食中毒の事例

韓国

○汚染率

黄色ブドウ球菌は、韓国で2番目に多い、細菌性下痢(bacterial diarrhea)の原因(2004～2006年)

・全ての食中毒の14.9%が黄色ブドウ球菌によるもの(1971～1990年)、15.9%(1981～1995年)。

・インスタント食品の4.0%が汚染(2003～2004)

・ベーカリー、喫茶店、サンドイッチバーで提供されるサンドイッチの1.3%が汚染 (2013出版)

・細菌による食中毒の9.7%が黄色ブドウ球菌によるもの(1981～1995年)

・食品関連のアウトブレイクの61.7%、アウトブレイク症例の81.5%がノロウイルスもしくは黄色ブドウ球菌

によるもの(2002～2006年)

○主なアウトブレイク事例

2013年(掲載時) — テジョンのレストランで出されたフライドチキンによる食中毒の事例(8症例)

## 中国

### ○汚染率

- ・浙江省湖州市の病院で治療を受けている下痢の患者数の 15.4%が黄色ブドウ球菌によるもの。
- ・検査を受けた食料品の 7%(生肉の 11%、調理製品の 3.1%、生乳製品の 16.3%を含む)は、黄色ブドウ球菌に汚染されている(Yangzhou, 2007 年出版)

### ○アウトブレイク事例

- 1989 年 — 中国から輸入したマッシュルームの缶詰によるアメリカでの食中毒の事例(4 件、99 症例)
- 2007 年 — 中国南部の結婚披露宴における食中毒の事例(371 症例)

## 台湾

### ○アウトブレイク件数

1996	1997	1998	1999
10	7	8	11

- ・1986 年～1995 年で、169 件の食中毒が報告された(6,651 症例)。全ての食中毒の 30%にあたる。
- ・2001 から 2003 年までに 247 症例が報告された。
- ・1994 年は食品関連食中毒のうち、20.3%が黄色ブドウ球菌によるものだった。

### ○食品関連の全食中毒における黄色ブドウ球菌食中毒の、各年における割合

1995	1996	1997	1998	1999
6%	1%	3%	2%	1%

### ○豚肉の食中毒における黄色ブドウ球菌食中毒の割合

2003	2006	2007	2008	2009	2010
4.8%	6.6%	10.8%	5.1%	6.4%	7.4%

## タイ

- ・発酵ソーセージ(Nham:traditional fermented pork)の 39.3%に黄色ブドウ球菌が混入。しかし、エンテロトキシン陽性は 0%(2009 年出版)
- ・オープンマーケットの食品のうち 39%が汚染

### ○アウトブレイク事例

- 1990 年 — スポーツ大会で出されたエクレアによるセレウス菌、黄色ブドウ球菌食中毒の事例(485 症例)

## マレーシア

### ○アウトブレイク事例

- 1983 年 — カンパルで発生した黄色ブドウ球菌による食中毒の事例

## インド

### ○アウトブレイク事例

- 1965 年 — ニューデリーの航空機で出されたデザート(Trifle dessert)による食中毒の事例(15 症例)

**【オセアニア地域】**

オーストラリア

○アウトブレイク件数

1980-95	95-2000	2002
9	5	2

○アウトブレイクに関わった症例数

1980-95	95-2000	2002
99(1死亡)	78	15

○汚染率

- ・小売りの牛ひき肉の 28.1%、羊肉の角切り(diced lamb)の 22.5%が汚染(2008 出版)
- ・腰肉(striploins)の 7.7%、骨無し牛肉(boneless beef)の 3.4%、プライマルカットの外側の 8.4%が汚染(2011 年)

○アウトブレイク事例

1965 年 — アデレードの航空機で出されたローストチキンによる食中毒の事例 (4 症例)

1997 年 — クイーンズランド州の老人ホームで出されたカレー卵(curried egg)による食中毒の事例 (42 症例)

2000 年 — クラブにおいて、初老の人々(elderly persons)に出されたチキンによる食中毒の事例(18 症例)

2002 年(掲載時) — クイーンズランド州で報告されたアウトブレイクの事例

ニュージーランド

○アウトブレイク件数

1998	1999	2001	2002	2003	2004	2005
8	16	11	4	2	2	5
2007	2008	2009	2010	2011	2012	
2	0	0	2	0	1	

○アウトブレイクに関わった症例数

1998	1999	2001	2002	2003	2004	2005
41	43	23	9	11	6	21
2007	2008	2009	2010	2011	2012	
6	0	0	6	0	3	

### 【ヨーロッパ地域】

#### イギリス (イングランド、ウェールズ)

##### ○アウトブレイク件数

1980	1981	1993	1994	1995	1996
11	10	1	2	3	5
1997	1998	1999	2000	2006	2009
2	0	4	0	1	3

- ・1969年から1990年までで、黄色ブドウ球菌のアウトブレイクは359件起きている。このうち、牛肉と鶏肉が75%、魚が7%、牛乳製品が8%を占める。
- ・黄色ブドウ球菌の食中毒は、1992年から1993年では食品関連アウトブレイク全体の2%、1993年から1998年では1%を占める。
- ・1992年から1999年の間に、イングランドとウェールズで報告されたアウトブレイクは、鶏肉が10件、魚が1件だった。
- ・1992年から1999年の間で、イングランドとウェールズで報告された8件のアウトブレイクは、赤肉(red meat)が原因である。
- ・ウェールズの学校で出されたインスタント食品(ready-to-eat food)の0.17%で黄色ブドウ球菌が見つかった。(2009年)
- ・イングランド、ウェールズ、スコットランド、北アイルランドにおける ready-to-eat specialty meats の0.2%で、黄色ブドウ球菌が見つかった。(2008年)

##### ○アウトブレイク事例

- 1984年 — イタリアから輸入したラザーニャによる食中毒の事例(47症例 in U.K)
- 2009年 — 教会で出されたパエリアによる食中毒の事例(20症例)
- 2009年 — 警察でサンドイッチを食べた職員の食中毒の事例(47症例)

#### ギリシャ

##### ○汚染率

- ・ドライソーセージ(traditional fermented dry sausage)を生産している小規模の設備工場(small-scale facilities)から採取されたサンプルの11.7%が汚染されていた。(2008年)
- ・小売店で売られている新鮮ジュースの3.34%は汚染されていた(2011年)。
- ・クレタ島からのチーズサンプル(Pichtogalo Chanion cheese)の6.45%は汚染されていた(1998年)。
- ・大学食堂で提供されているデザートのカリムの12%は汚染されている(2001年～2010年)

##### ○アウトブレイク事例

- 2005年 — ギリシャ西部にある空軍基地で出された粉チーズによる食中毒の事例(600症例以上)

マケドニア

○アウトブレイク件数

1993	1994	1995	1996	1997	1998
0	1	0	3	1	1
1999	2000				
2	1				

○アウトブレイクに関わった症例数

1993	1994	1995	1996	1997	1998
0	133	0	84	35	28
1999	2000				
28	27				

○アウトブレイク事例

2008年 — スコピエで発生したクリーム入りのパン菓子による食中毒の事例(87症例)

ドイツ

○アウトブレイク件数

1993	1994	1995	1996	1997	1998
8	5	5	4	2	2
1999	2000	2008	2009	2010	2011
1	0	1	3	2	2

○アウトブレイクに関わった症例数

1998	1999	2009
94	6	8

・食品関連のアウトブレイクのうち、2%が黄色ブドウ球菌食中毒(1990年~1992年)。2.8%(1993年~1998年)

・北西ドイツの胃腸症状の1.7%が黄色ブドウ球菌によるもの(2004年)

○アウトブレイク事例

2008年 — バーデン・ヴュルテンベルク州の結婚式で発生した食中毒の事例(12症例)

フランス

○アウトブレイク件数

1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
25	37	35	37	60	32	34	32
1998	1999	2000	2001	2008	2009	2010	2011
48	40	45	43	211	51	220	290

○アウトブレイクに関わった症例数

1993	1997	2001	2009
1298	569	620	457

・死者なし(1997, 1998 or 2001年)

- ・黄色ブドウ球菌による食中毒は、食品関連のアウトブレイク全体の7%を占める(1990～1992年)
- ・1996年から2005年までに報告された食中毒件数は366件で、5750症例、うち2人死亡した。
- ・2006年から2008年では、133件のアウトブレイク、1401症例。

○アウトブレイク事例

2003年—Longeville-sur-le-Doubsでのフットボールの試合で発生した、サラダによる食中毒の事例

2009年—低温殺菌牛乳から作られたソフトチーズによる食中毒の事例(23症例、6クラスター)

2010年—モンパリエでのラグビーの試合において発生した、ハムによる黄色ブドウ球菌とカキによるノロウイルスの食中毒の事例(94症例)

イタリア

○アウトブレイク件数

1998	2008	2009	2010
4	2	3	3

・ピードモント地方の食中毒の6%は黄色ブドウ球菌食中毒が占める(2002年から2009年までの黄色ブドウ球菌食中毒は209件)

・牛肉製品の19.3%、フレッシュチーズの13.3%、焼きものの製品の3.6%、配達製品の7.7%が汚染されている(黄色ブドウ球菌は、16.3%のエンテロトキシン産生型を含んでいる。2011年)

・チーズは汚染されていない(2004年)

○アウトブレイク事例

1973年 — アメリカ行き航空機3便で出されたカスタードによる食中毒の事例(ローマ50症例、リスボン179症例、トータル276症例)

1984年 — イタリアから輸入したラザーニャによる食中毒の事例

ロシア

○アウトブレイク件数

1992	1993	1994	1995	1996	1997
0	3	0	1	1	9
1998	1999	2000			
0	4	4			

○アウトブレイクに関わった症例数

1992	1993	1994	1995	1996	1997
0	112	0	53	25	471
1998	1999	2000			
0	185	109			

## スペイン

### ○アウトブレイク件数

1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999
50	39	24	40	39	36	21
2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
22	27	31	22	33	32	28
2007	2008	2009	2010	2011		
21	32	11	9	22		

- ・全ての食品関連アウトブレイクのうち、6%が黄色ブドウ球菌食中毒によるもの(1990年~1992年)
- ・全ての食品関連アウトブレイクのうち、4.1%が黄色ブドウ球菌食中毒によるもの(1993年~1998年)
- ・301件のアウトブレイクが1994年~2003年で報告された。うち、2003年は22件(216症例)を含む。
- ・2009年のアウトブレイクに関わった症例数は、232症例。

### ○汚染率

- ・バレンシアでの手作りのタイガーナッツ飲料(tiger nut beverages)の汚染率は0%。

### ○アウトブレイク事例

2002年 — アストゥリアスで発生した食中毒の事例(アウトブレイク件数3件)

## スイス

### ○アウトブレイク件数

1999	2000	2008	2009	2010
2	0	1	2	3

### ○アウトブレイク症例数

1999	2000
25	0

## アイスランド

### ○アウトブレイク件数

1993	1994	1995	1996	1997	1999	2000
0	1	1	1	0	1	0

### ○アウトブレイクに関わった症例数

1993	1994	1995	1996	1997	1999	2000
0	7	3	5	0	2	0

- ・全ての食品関連アウトブレイクのうち、1985年~1993年では19%、1993年~1998年では10%が黄色ブドウ球菌食中毒によるものである。

### アイルランド

○アウトブレイク件数

1999	2000	2001	2002	2003	2006
1	1	1	1	1	0
2007	2010	2011	2012		
0	0	0	0		

○アウトブレイクに関わった症例数

1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
62	7	5	7	4	3	6
2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
0	0	1	1	0	0	0

○汚染率

・イングランド、ウェールズ、スコットランド、北アイルランドにおける ready-to-eat の specialty meats のうち 0.2%が汚染されている。(2008年)

### オランダ

○アウトブレイク件数

1999	2000	2008	2009	2010	2011
4	1	6	2	2	1

○アウトブレイクに関わった症例数

1999	2000	2006
12	7	4

・全ての食品関連アウトブレイクのうち、1990年~1992年では10%、1993年~1998年では0.8%が黄色ブドウ球菌による食中毒である。

○アウトブレイク事例

1985年 — ドライソーセージによる食中毒の事例(6症例)

2004年 — バーベキューで食べた麺による食中毒の事例

### リトアニア

○アウトブレイク件数

1996	2008	2009
1	2	2

○アウトブレイクに関わった症例数

1999	2000
104	99

アゼルバイジャン

○アウトブレイク症例数

1999	2000
0	0

ベラルーシ共和国

○アウトブレイク件数

1998	1999
1	1

○アウトブレイクに関わった症例数

1998	1999
11	11

ボスニア・ヘルツェゴビナ

○アウトブレイクに関わった症例数

1993	1994	1995	1996	1997	1999	2000
12	87	36	24	67	0	0

○10万人に対する症例数 (rates per 100,000 (Republic of Srpsca))

1993	1994	1995	1996	1997	1998
1	6	3	2	5	2

ブルガリア

○アウトブレイク件数

1993	1995	1996	1997	1999	2000	2011
2	2	7	2	1	1	4

・38 症例(1999年)、99 症例(2000年)

・10万人あたりの症例数は、0.5人(1999年)、1.3人(2000年)

・1990年~1992年の間に報告された食品関連のアウトブレイクのうち、6%が黄色ブドウ球菌食中毒

クロアチア

○アウトブレイクに関わった症例数

1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
73	14	7	0	84	0	30	12

キプロス

○黄色ブドウ球菌食中毒症例数

1999	2000
0	0

エストニア

○黄色ブドウ球菌食中毒症例数

1999	2000
93	88

・10万人当たりの症例数は、1999年が6.43人、2000年が6.41人

ウズベキスタン

○アウトブレイク件数

1993	1994	1995	1996	1997	1998
3	1	1	1	0	1

○アウトブレイクに関わった症例数

1993	1994	1995	1996	1997	1998
46	34	19	10	0	25

《参考文献》

- [ 1 ] 黄色ブドウ球菌 安形則雄 防菌防黴 38(3), 199-208, 2010-03-10
- [ 2 ] 食中毒における毒素産生細菌とその毒素(3)黄色ブドウ球菌とエンテロトキシン  
重茂 克彦 食品衛生研究 59(12), 17-23, 2009-12-00
- [ 3 ] Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. 2013 Apr  
15;163(1):34-40. Podkowik M, Park JY, Seo KS, Bystroń J, Bania J. Int J  
Food Microbiol.
- [ 4 ] 食品安全委員会「黄色ブドウ球菌による食中毒について」
- [ 5 ] 平成 21 年度食品安全確保総合調査「食品により媒介される感染症等に関する文献  
調査報告書」社団法人 畜産技術協会
- [ 6 ] 食品安全委員会 ファクトシート ブドウ球菌食中毒 (Staphylococcal foodborne  
poisoning)  
<http://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets/09staphylococcal.pdf>
- [ 7 ] ブドウ球菌性食中毒と MRSA 腸炎 (特集 食中毒の基礎と臨床 : 疾患メカニズム  
から予防まで) -- (最新の臨床研究と診療戦略) 奥山 祐右 , 吉田 憲正日本臨床  
70(8), 1362-1365, 2012-08-00
- [ 8 ] The formation of Staphylococcus aureus enterotoxin in food environments and  
advances in risk assessment. Virulence. 2011 Nov-Dec;2(6):580-92. Schelin J,  
Wallin-Carlquist N, Cohn MT, Lindqvist R, Barker GC, Rådström P.
- [ 9 ] Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and  
outbreak investigation. FEMS Microbiol Rev. 2012 Jul;36(4):815-36.  
Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S.
- [ 10 ] Novel platform for the detection of Staphylococcus aureus enterotoxin B in foods.  
Appl Environ Microbiol. 2013 Mar;79(5):1422-7. Tallent SM, Degrasse JA, Wang  
N, Mattis DM, Kranz DM.
- [ 11 ] 感染症発生動向調査週報 IDWR 感染症の話 ブドウ球菌食中毒  
[http://idsc.nih.gov/idwr/kansen/k01\\_g1/k01\\_13/k01\\_13.html](http://idsc.nih.gov/idwr/kansen/k01_g1/k01_13/k01_13.html)
- [ 12 ] 国際感染症情報 GIDEON <http://www.gideononline.com/>
- [ 13 ] A foodborne outbreak of gastroenteritis involving two different pathogens. Am J  
Epidemiol 1992 Sep 1;136(5):611-6. Meehan PJ, Atkeson T, Kepner DE, Melton  
M
- [ 14 ] An unusual outbreak of food poisoning. Southeast Asian J Trop Med Public  
Health 1995 Mar ;26(1):78-85. Thaikruea L, Pataraarechachai J,  
Savanpunyalert P, Naluponjiragul U
- [ 15 ] Application of pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological  
characterization of Staphylococcus intermedius implicated in a food-related  
outbreak. Epidemiol Infect 1994 Aug ;113(1):75-81. Khambaty FM, Bennett RW,  
Shah DB
- [ 16 ] A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. Foodborne

- Pathog Dis 2004 ;1(4):241-6. Do Carmo LS, Cummings C, Linardi VR, Dias RS, De Souza JM, De Sena MJ, Dos Santos DA, Shupp JW, Pereira RK, Jett M
- [17] Foodborne outbreak caused by *Staphylococcus aureus*: phenotypic and genotypic characterization of strains of food and human sources. *J Food Prot* 2007 Feb ;70(2):489-93. Colombari V, Mayer MD, Laicini ZM, Mamizuka E, Franco BD, Destro MT, Landgraf M
- [18] An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol Infect* 2003 Feb ;130(1):33-40. Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H, Kozaki S
- [19] Outbreak of acute gastroenteritis in an air force base in Western Greece. *BMC Public Health* 2006 ;6:254. Jelastopulu E, Venieri D, Komninou G, Kolokotronis T, Constantinidis TC, Bantias C
- [20] [Foodborne outbreak associated with consumption of ultrapasteurized milk in the Republic of Paraguay]. *Rev Argent Microbiol* 2011 Jan-Mar;43(1):33-6. Weiler N, Leotta GA, Zárate MN, Manfredi E, Alvarez ME, Rivas M
- [21] FOOD POISONING, STAPHYLOCOCCAL, DESSERT - CANADA: ALERT, RECALL ProMED-mail. 2007; 22 Feb: 20070222.0653  
<<http://www.promedmail.org>>. Accessed 22 Feb 2007.

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25年度

分担研究報告書

ウエルシュ菌食中毒発現機構の解析

大阪府立大学大学院

三宅 眞実



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」

分担研究報告書

ウエルシュ菌食中毒発現機構の解析

分担研究者 三宅 眞実 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 教授

協力研究者 安木 眞世 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 助教

研究要旨：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。本厚生労働科学研究で、新領域である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研究を展開してきた。それは、芽胞形成は菌のエンテロトキシン産生と共制御されており、芽胞形成を抑制すれば食中毒発症を抑制することに繋がるからである。本年度はまず、昨年度に発見した胆汁酸(デオキシコール酸)による芽胞形成促進作用のメカニズム解析を行った。その結果、デオキシコール酸が芽胞形成のマスター・レギュレーターである Spo0A タンパクに直接、あるいは間接的にその上流に作用した結果、芽胞形成を強く誘導していることを明らかにできた。また、ウエルシュ菌食中毒において最も大きな役割を果たすとされるエンテロトキシンの効果を、科学的に評価するための材料を作出した。さらに、胆汁酸以外の芽胞形成調節因子を探索する過程で、マウス糞便中に芽胞形成を阻害する活性のあることを見いだした。以上の結果は、消化管内には胆汁酸などウエルシュ菌の芽胞形成を促進する圧力と、それを抑制する圧力の両者がバランスをとって存在し、このバランスが促進方向へ傾くことでウエルシュ菌食中毒のリスクが上昇する可能性を示唆するものである。今後さらにこれら成果を基に消化管内の環境因子が菌へ与える影響と、菌が宿主へ与える影響を分子レベルで解析することで、新しいウエルシュ菌食中毒発症リスク低減法を開発することが可能になることが期待される。

## A. 研究目的

ウエルシュ菌はガス壊疽など創傷感染症を引き起こす他、経口感染して腸管内感染症をも引き起こす。腸管内感染症としてはトリの壊死性腸炎やウシのエンテロトキセミアが知られるが、ヒトでは本菌は食品媒介性の下痢症を引き起こす。これはウエルシュ菌食中毒と呼ばれ、その原因菌は特に A 型ウエルシュ菌に分類されるエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌に限られる。ウエルシュ菌食中毒の原因食品は、カレー、シチューなど加熱加工食品が中心で、また大規模食品調理施設が関与する例が多いため、厚生労働省に指定されている食中毒原因細菌のうち、1 件あたりの患者数がもっとも多いことを特徴とする<sup>1)</sup>。従って、ウエルシュ菌食中毒の制御には、大きな意義がある。

ウエルシュ菌食中毒は生体内毒素型食中毒に分類されている。本食中毒の発生機序として、1) 食品内での大量の生菌の存在、2) 食品を通じて取り込まれた生菌の胃通過、3) 生菌の腸管内での増殖、4) 芽胞とエンテロトキシンの産生、5) 毒素の腸管上皮細胞への攻撃、が認識されており、最終的にエンテロトキシンによる下痢誘発に至るものと理解されている<sup>1)</sup>。ウエルシュ菌エンテロトキシンの産生は、菌が芽胞形成する過程と共に制御されていて、つまり芽胞を形成する条件下でのみエンテロトキシン産生が起こる。これは芽胞形成に至るシグナル伝達系の下流にエンテロトキシン産生の制御系が置かれているこ

とが原因である。つまり芽胞形成を人為的に制御することができれば食中毒の制御が可能になる。ウエルシュ菌が芽胞形成する際には様々な環境因子がこれを制御していることが、試験管内での研究によって報告されてきた。しかしウエルシュ菌が実際に消化管内環境においてどのような環境因子により芽胞形成するののかについてはほとんど報告が無かった。

本厚生労働科学研究では、特に上記(4)および(5)の過程に着目して研究を展開してきた。平成23年度にはウエルシュ菌標準株を用いて *in vitro* 感染実験系を構築し、菌は消化管内では宿主細胞の代謝活性や宿主因子を利用して自らが増殖しやすい条件を作りだしていることを明らかにした。また、食中毒由来株と非食中毒由来株について腸上皮バリア破壊能を比較検討すると、食中毒由来株は同じ条件下ではバリア破壊能を示さないことを明らかにした。さらに、バリア破壊能を示さない食中毒由来株でも、環境(培地)条件を変化させるとバリア破壊を引き起こすことを明らかにした。これはウエルシュ菌の病原性が環境条件に厳密に制御されていること、またウエルシュ菌が下痢症を引き起こすためには、腸管内にある環境因子が非常に重要であることを示している。

平成24年度は *in vitro* 感染実験系を使用して消化管環境に存在する様々な因子の芽胞形成・毒素産生への影響を調べた。まず高濃度(5 mM 以上)のグルコースが芽胞形成をほぼ完全に抑制することを確認し、グルコースを溶性デンプン(soluble

starch、SS)に置き換えるとある程度まで芽胞形成・毒素産生性が回復することを確認した。また、この条件下で各種胆汁酸を添加すると芽胞形成・毒素産生が強く誘導されること、誘導効果は胆汁酸の種類により異なり、デオキシコール酸で最も効果的に(10 μM の濃度で確認できた)みられることを証明した。これらの結果は、ウエルシュ菌が腸管内で芽胞形成・毒素産生して下痢を引き起こす際には、胆汁酸が一種の誘導因子となっており、またこれを感じするシステムを菌が持っていることを示している。

そこで本年度はこの、ウエルシュ菌の胆汁酸感知システムを解明すべく、胆汁酸の芽胞誘導メカニズムの解明を試みた。また、胆汁酸以外にもウエルシュ菌の芽胞形成・毒素産生に影響を与える因子が存在することを疑い、マウス糞便中にその存在を求めたところ、芽胞形成・毒素産生を抑制する物質が存在することを見いだした。

## B . 実験方法

### 1) ウエルシュ菌と菌数測定

菌株は食中毒由来の NCTC8239 株、SM101 株を用いた。菌は FTG 培地で培養後、PBS で洗浄してから DMEM/SS (後述) に懸濁し下記の種々の実験に用いた。培養後の栄養型菌、芽胞の菌数算出には colony forming unit (CFU) 法を用いた。栄養型菌の算出には培養液をそのまま 10 倍階段希釈し、その 50 μl を brain heart infusion 寒天培

地へ接種、嫌氣的に 16~24 時間培養し、培地上のコロニー数を計測した。芽胞数の検出には、培養液を 75 (NCTC8239 株) または 65 (SM101 株) で 20 分間加熱処理後、栄養型と同様に 10 倍階段希釈を行って CFU を算出した。総菌数は栄養型菌数と芽胞数の和とした。

### 2) *In vitro* ウエルシュ菌感染実験 (共培養系)

ヒト結腸由来細胞株 Caco-2 細胞は、10% ウシ胎児血清 (FCS) 含有ダルベッコ MEM (DMEM) を用いて培養した。24 ウェル・プレートに細胞を播種し、3-4 日間培養した。この細胞の培地をグルコース不含 DMEM 培地 + 0.4% 可溶性デンプン (DMEM/SS) に換え、1 時間培養した。ここへ FTG 培地で前培養したウエルシュ菌を接種し、様々な時間で培養後のウエルシュ菌栄養型菌数、芽胞数を上述の方法で測定した。また、経時的に菌を採取し、抽出した RNA により菌の遺伝子発現を解析した。

### 3) マウス糞便抽出液の調製

4 週齢の dyd マウスの飼育ケージ内に散乱する糞便を採取し、重量を測定後、MiliQ 水を 5 倍量 (w/v) となるように加え、5 分間 vortex で攪拌した。その後、4、9,000 × g、20 分間遠心処理した遠心上清液を糞便抽出液とした。

### 4) ウエルシュ菌のマイクロプレート培養系

ウエルシュ菌の芽胞形成あるいはエンテロトキシン産生に対する宿主由来因子 (糞便抽出液) の影響を調べるために、宿主細胞の存在しない培養系としてマイク

ロプレート培養系を使用した。FTG 培地で前培養した菌を PBS で洗浄し、50  $\mu$ M デオキシコール酸含有 DMEM/SS (DMEM/SS/DCA) 培地に懸濁した。これを 100  $\mu$ l/well で 96 ウェル・マイクロプレートへ加え、試験液を 100  $\mu$ l/well でさらに加えた後、37 で嫌氣的に静置培養した。培養後の培養液をスライドガラスへ採取し、位相差顕微鏡で各検体について数視野を写真撮影した。写真は画像解析ソフトウェア ImageJ で解析し、視野中の栄養型菌数と芽胞数をその形態で定量し、得られた値から芽胞形成率を計算した。

#### 5) ウエルシュ菌エンテロトキシンの測定

培養液中のエンテロトキシン濃度を、ウサギ抗エンテロトキシン抗体を用いたウエスタンブロット法により免疫学的に検出した。

#### 6) DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

FTG 培地にて前培養した NCTC8239 株を共培養実験に供した。感染 0~12 時間の培養液から菌体 total RNA を抽出し精製後マイクロアレイのサンプルとした。アレイチップは公開されたゲノム情報を基にデザインした。チップ作成はアジレントテクノロジー株式会社に委託し、マイクロアレイの実施と解析は大阪大学微生物病研究所附属感染症 DNA チップ開発センターに委託した。

#### 7) ウエルシュ菌の発現遺伝子量の解析

上記と同様に抽出した菌体 total RNA を DNase にて処理し、ランダムプライマーを用いて逆転写を行った。合成された cDNA

を用い、芽胞形成に關与する遺伝子 (*spo0A*, *spoIIAA*, *spoIIAB*, *sigF*, *sigE*, *cpe*) をターゲットとした qPCR を行った。

#### d) エンテロトキシン遺伝子破壊株の調製

エンテロトキシン遺伝子破壊株の調製には市販のキット (TargeTron Gene Knockout System, Sigma-Aldrich) を使用した。遺伝子破壊に必要となるプライマーの設計には TargeTron Design Site (<http://www.sigma-genosys.com/targetron/>) を利用し、破壊株作成はメーカーの指定する方法に従った。

## C. 結果

### 1. DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

前年度までに、消化管内の環境をある程度反映した *in vitro* 実験系を開発し、その系を用いてデオキシコール酸が芽胞形成・毒素産生を強く誘導することを見いだした。そこでデオキシコール酸の作用機序を解明するために、デオキシコール酸の存在下で特異的に発現する遺伝子を調べた。菌を細胞へ感染させ、0、1、2、4、6、12 時間後に培養液を回収し、菌体 RNA を抽出して各種遺伝子発現状態を DNA マイクロアレイで調べた(図 1)。その結果芽胞形成のマスター・レギュレーターとして知られる転写因子 *spo0A* 遺伝子の下流に位置する遺伝子群が、デオキシコール酸存在下で強く発現誘導されていることが明らか

かになった。一方 *spo0A* 遺伝子の発現レベルはデオキシコール酸の有無で同程度であった。感染 4 時間後に回収した菌体 RNA を用いた q-PCR において *spoIIAA*, *spoIIAB*, *sigF*, *sigE* ならびに *cpe* 遺伝子の発現はデオキシコール酸存在下で有意に上昇した。一方 *spo0A* 遺伝子の発現量に有意な差は認められなかった。これらの結果はマイクロアレイの結果とよく一致した(図 2)。

## 2 . マウス糞便中の芽胞形成阻害因子の同定

本研究により様々な環境因子とウエルシュ菌の病原性発現の関係が明らかになれば、環境を人為的に操作することでウエルシュ菌食中毒発症を制御することが可能になる。これを可能にするには *in vitro* で得られた成果を、動物モデルなどを使用した *in vivo* 実験系で確認する必要がある。しかし現在までにウエルシュ菌食中毒の動物モデルは報告されていない。これまで動物モデルが確立されていない原因として、マウスなど小動物の腸管内ではウエルシュ菌食中毒菌株は十分に芽胞形成しないことが理由の 1 つに挙げられている<sup>2)</sup>。本研究担当者は小動物腸管内にはウエルシュ菌の芽胞形成を阻害する物質が存在するのではないかと考えた。実際、過去の論文がモルモット小腸内にウエルシュ菌芽胞形成を阻害する物質が存在する可能性について言及している<sup>3)</sup>。そこで、マウスの糞便を材料として、そこに含有する物質がウエルシュ菌芽胞形成に対して

影響を与えるか調べた。

マウス糞便抽出液をウエルシュ菌培養系に添加すると、通常 60~80% の芽胞形成率が見られる条件下で、芽胞形成は強くかつ容量依存的に阻害された(図 3)。阻害活性は 100,000 × g、1 時間の超遠心上清に残存し、限外濾過膜を使用してその分子量を推定すると、分子量 100,000 以上であると見積もられた(図 4)。また、75、20 分間以上の加熱でこの阻害活性は失活することが明らかになった(図 5)。これら結果は、マウス糞便中に芽胞形成を阻害する易熱性の高分子物質(以下、阻害物質と称する)が存在することを示唆している。そこでこの阻害物質の作用機序を解析した。芽胞形成が阻害物質添加により強く阻害される条件下でも、ウエルシュ菌の増殖そのものはほとんど影響を受けていなかった。Q-PCR 法により遺伝子発現解析を行うと、阻害物質は rRNA の発現量には大きな影響を与えず、しかし芽胞形成関与する遺伝子 *sigE* や、芽胞形成カスケード下流に存在するエンテロトキシンの遺伝子 *cpe* の発現を有意に抑制していた(図 6)。この結果より阻害物質は芽胞形成を転写レベルで制御していることが明らかになった。

## 3 . エンテロトキシン遺伝子破壊株の解析

昨年度に作成したエンテロトキシン遺伝子破壊株(*cpe*(-)株)の Caco-2 細胞への細胞傷害性について調べた。まず *cpe*(-)株に *cpe* 遺伝子を相補した相補株(*cpe*(+)株)を作成した(図 7)。作製した *cpe*(-)株、*cpe*(+)株を Duncan-strong 培地

にて繰り返し継代して、高率に芽胞を形成するスターター株をそれぞれについて調製した。次に共培養に用いる各菌株の感染価を揃えるため、CFU 法ならびに培養液の濁度を用いて各株における前培養時の増殖曲線を作成した。そして感染価を揃えた野生株、cpe(-)株、cpe(+)株を用いて Caco-2 細胞との共培養実験を行った。DMEM/SS/DCA 培地で感染 24 時間後に野生株ならびに cpe(+)株では広範囲において細胞の円形化ならびに detachment が認められた(図 8)。一方 cpe(-)株では同条件下では感染前と同様の細胞形態を示した(図 6)。この時の栄養型菌数ならびに芽胞数は 3 菌株とも同程度であった。また産生エンテロトキシンは野生株ならびに相補株でのみ確認された(図 9)。

#### D. 考察

昨年度までに胆汁酸がウエルシュ菌芽胞形成・毒素産生を強く誘導すること明らかにした。そこで今年度はまずその誘導メカニズムを解析した。芽胞形成は、芽胞形成のマスター・レギュレーターである Spo0A のリン酸化で始まり、リン酸化 Spo0A が転写因子となって下流のカスケードを活性化することが知られる。デオキシコール酸存在下で強く誘導される遺伝子を解析したところ、誘導直後(4 時間)から Spo0A 下流の遺伝子群が総じて高発現していることが確認できた。結果は、デオキシコール酸の作用点は Spo0A 上流であるか、あるいは Spo0A そのものである

ことを示唆している。細菌が芽胞を形成する際の Spo0A 上流のカスケードについては、*Bacillus* 属細菌で詳細に解析されている。しかしウエルシュ菌など *Clostridium* 属細菌には *Bacillus* 属で同定されたシグナル分子がそもそもゲノム上に存在せず、Spo0A 上流のカスケードの詳細は不明である。本研究を継続することでウエルシュ菌の Spo0A 上流のカスケードに新たな情報が得られれば、多くの病原細菌を含む *Clostridium* 属細菌の芽胞形成に至る未知のカスケード同定が期待される。また、これまでまったく明らかにされてこなかった胆汁酸が芽胞形成を促進するメカニズムが分子レベルで明らかになることが期待できる。本研究の成果は、ウエルシュ菌が宿主体内環境の認識シグナルとして胆汁酸を利用していることを示しているが、菌側がどのようなメカニズムで胆汁酸を感知しているかを明らかにできれば、広く *Clostridium* 属細菌と宿主との共進化の過程まで明らかになることが期待される。さらに、芽胞形成に至る最初の引き金を分子レベルで理解することに繋がり、それを利用したウエルシュ菌食中毒の新しい制御法開発への大きなヒントが得られると考えている。

マウス糞便抽出液の芽胞形成への影響を調べたところ、芽胞形成を阻害する活性が確認できた。性状解析の結果、その阻害物質は易熱性の高分子であると推察された。現在この物質の本態は不明であるが、これまでマウスなど小動物でウエルシュ菌食中毒の動物モデルが作出されてい

いことには、この阻害物質が関与している可能性が疑われる。今後は糞便ではなく、マウスの消化管内容物を用いると共に、ヒト消化管内容物についてもその効果を検討し、この仮説の正当性を検証することが重要である。またこの阻害物質を同定すれば、得られた結果を基に、マウス消化管内でも十分量の芽胞形成を誘導することができるようになるかもしれない。それらの過程を経た先には、将来、マウスを用いたウエルシュ菌食中毒の動物モデルを開発することが期待できる。これは同食中毒のメカニズム解析の有力ツールとなるだけでなく、本食中毒の制御法を開発するため有用なモデルになると期待できる。

既に昨年度までに、ウエルシュ菌下痢症のモデルとなるバリア破壊実験系について報告した。この実験系では培地に含まれるグルコースを枯渇させることで、ウエルシュ菌が消化管上皮のバリア機能破壊を引き起こすことを観察している。バリア破壊は一般に下痢症のモデルになると解釈されていて、本結果はウエルシュ菌下痢症の1つのモデルとして利用可能と考えている。しかし昨年度まではこの腸上皮バリア破壊現象に、菌側のどんな因子が関与するのか明確に示すことはできていなかった。そこで昨年度作成した cpe(-)株と、本年度新たに作成した相補株 cpe(+)株を用いて、バリア破壊に関与する因子がウエルシュ菌エンテロトキシンであるのか検討した。現時点で得られている結果は、同条件下で観察される細胞障害性にはエンテロトキシンが強く関与していることを示

している。今後はエンテロトキシンが細胞障害活性だけでなくバリア破壊現象にも関与することを確認することが必要である。

本研究で得られた cpe(-)株、cpe(+)株を用いることで、ウエルシュ菌が引き起こす生物現象のうち、エンテロトキシンが関与する現象そうでない現象を区別することが可能となる。エンテロトキシンは下痢発症に大きな役割を演じていると理解されているが、これが単独で下痢発症に関与すると断言することはできていない。今後、食中毒発症を再現する動物モデルを開発し(上述)ウエルシュ菌食中毒を実験的に再現することが可能となれば、cpe(-)株、cpe(+)株を利用して、エンテロトキシンの関与についてより科学的(物質的)に論じることが可能となろう。ウエルシュ菌食中毒株はエンテロトキシン以外にも毒素を産生することが知られるが、食中毒症状における毒素の役割についてはまったくわかっていない。本研究の延長線上にはこのように、これまで明らかになっていない因子のウエルシュ菌下痢症に対する役割を明確化することがあり、さらにエンテロトキシンの未知の機能を明確にすることも含まれている。

#### E . 健康危害情報

特になし。

#### F . 文献

- 1) 山中英明、藤井建夫、塩見一雄、微生物性食中毒、「食品衛生学第二版」恒星社厚生閣、東京（2007）
- 2) Uzal FA, McClane BA. Animal models to study the pathogenesis of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* infections. *Microbes Infect.*14:1009-16, 2012.
- 3) 坂本 憲市、森永 信一、山岸 高由、小西 健一、吉国 桂子. モルモット腸内容物培地における *Clostridium perfringens* の発育. *日本細菌学雑誌* 43: 917-926, 1988.

#### G . 研究発表

なし。

#### H . 学会発表

- 1) Mayo Yasugi, Hidenobu Hoshi, Shigeki Yamamoto, Yoichi Kamata, and Masami Miyake. The impact of bile acid on the sporulation of

*Clostridium perfringens* in vitro infection model. *ClosPath* 2013, Palm Beach, Qld, Australia, Sep. 2013.

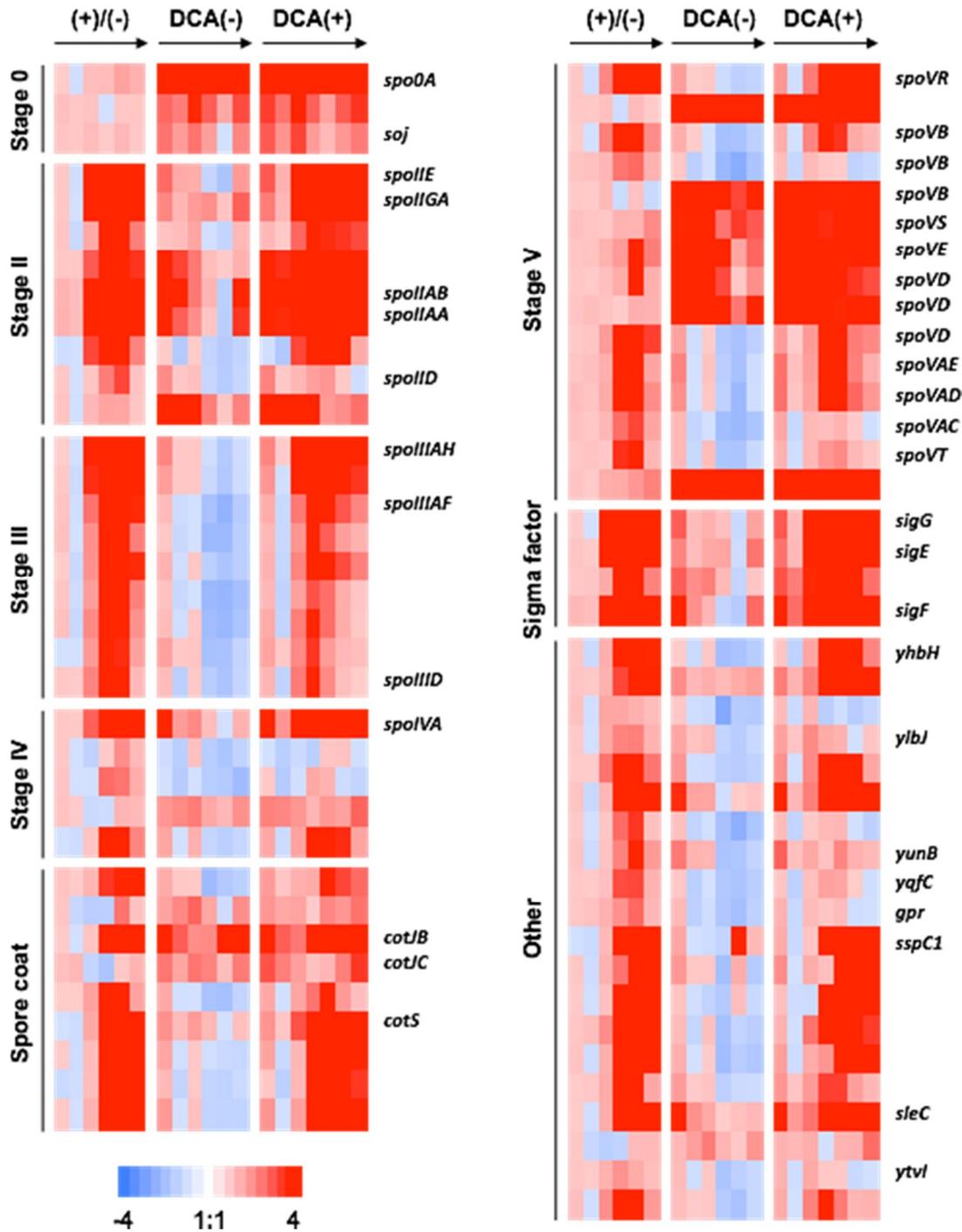
- 2) Masami Miyake, Hidenobu Hoshi, Kaori Kondo, Mayo Yasugi, Shigeki Yamamoto, and Yoichi Kamata. An *in vitro* model system for studying *Clostridium perfringens* type A infection. *ClosPath* 2013, Palm Beach, Qld, Australia, Sep. 2013.
- 3) Mayo Yasugi, Hidenobu Hoshi, Daisuke Okuzaki, Shigeki Yamamoto, Yoichi Kamata, and Masami Miyake. Mechanism of bile acid-mediated sporulation in *Clostridium perfringens*. 第87回日本細菌学会総会. 東京. Mar. 2014.

#### I . 知的所有権の取得情報

特許申請

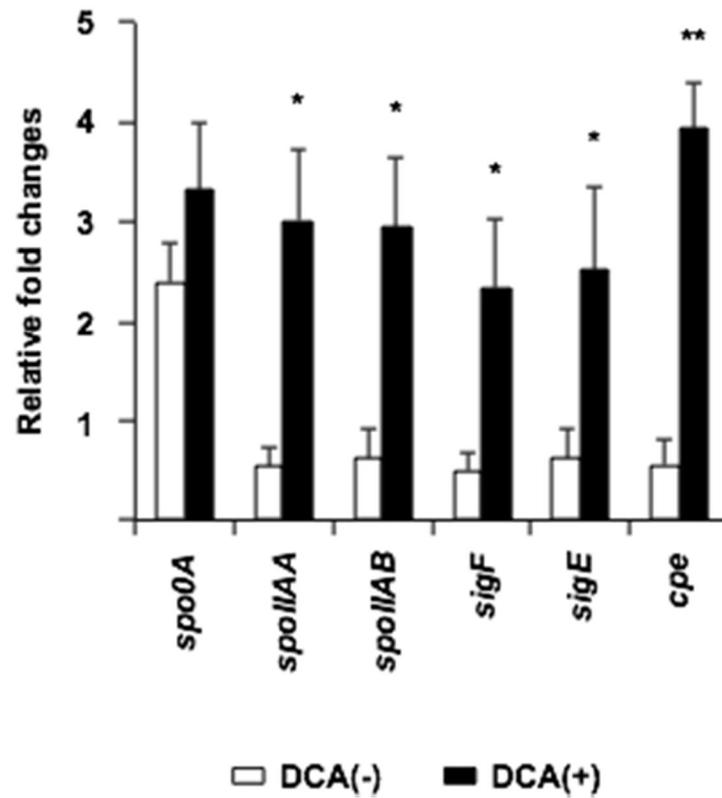
本年度該当するものなし

図1 DNAマイクロアレイ解析のヒートマップ



Stage 0~V は芽胞形成の各ステージで関与する芽胞形成関連遺伝子、Spore coat、Sigma factor も芽胞形成に関与する coat 蛋白、シグマ因子を示す。各遺伝子について 16S リボゾーム RNA 遺伝子の発現量で標準化した後、デオキシコール酸の有無での発現量比を算出したものが (+)/(-) に示されている。 (+)/(-) が高いほど (赤) デオキシコール酸存在下で高く誘導されていることを意味する。

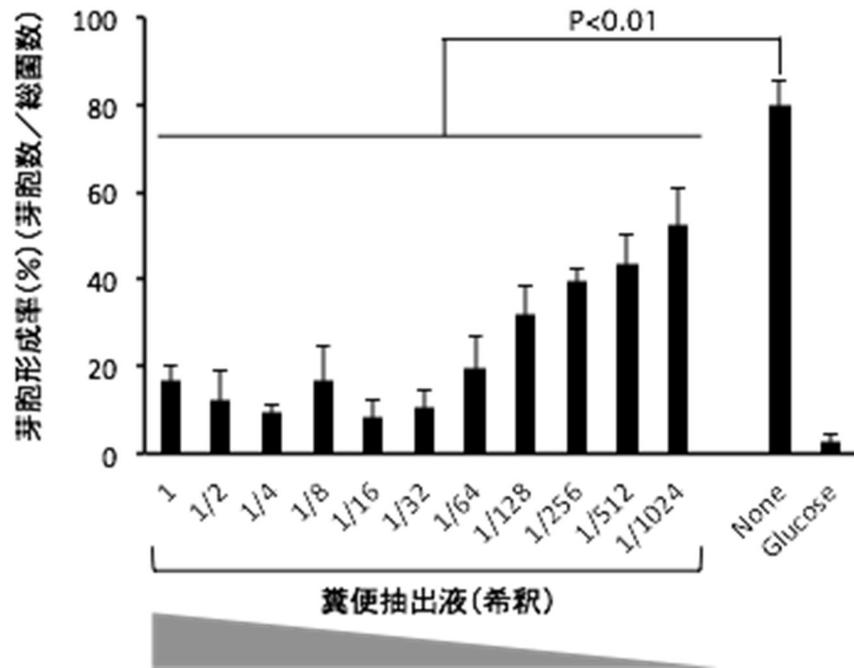
図2 q-PCRによる各遺伝子の発現量解析



DNA マイクロアレイで、デオキシコール酸存在で発現量の高かったいくつかの遺伝子についてリアルタイム PCR でその発現量を確認した。結果は 16S リボゾーム RNA の発現量で標準化して示している。

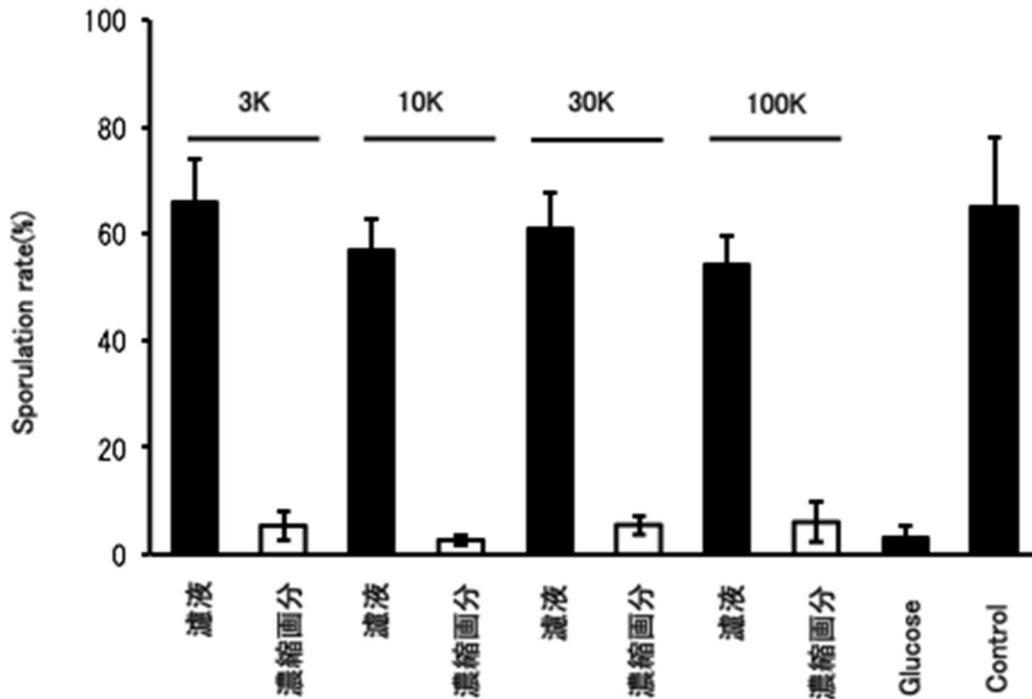
\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$

図3 マウス糞便抽出液によるウェルシュ菌芽胞形成抑制



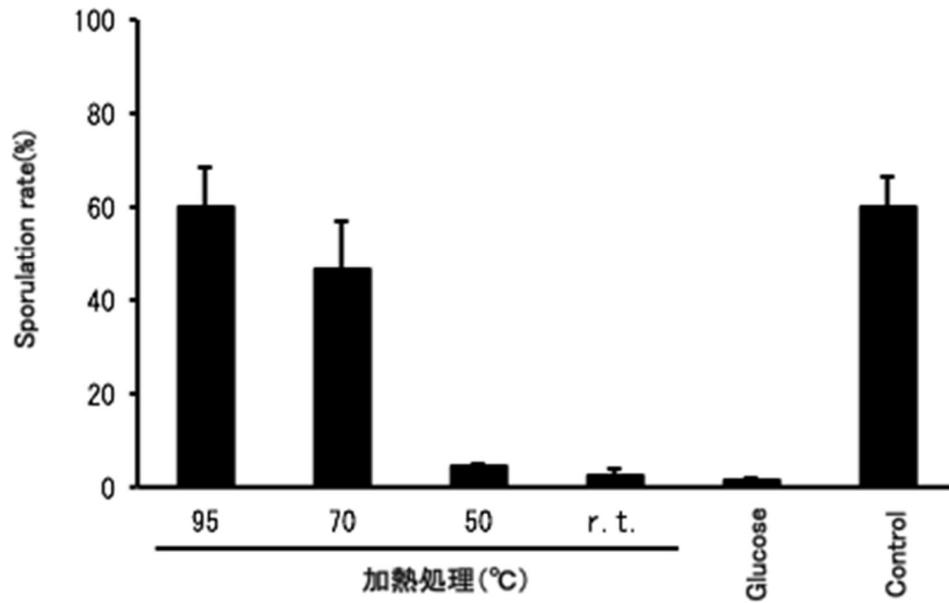
マウス糞便抽出液を2倍段階希釈した後、芽胞形成への影響を評価した。Noneは何も加えないときの芽胞形成率（陽性対照）、Glucoseは20 mM グルコースを加えたときの芽胞形成率（陰性対照）。

図4 限外濾過によるウェルシュ菌芽胞形成阻害物質の分子量の推定



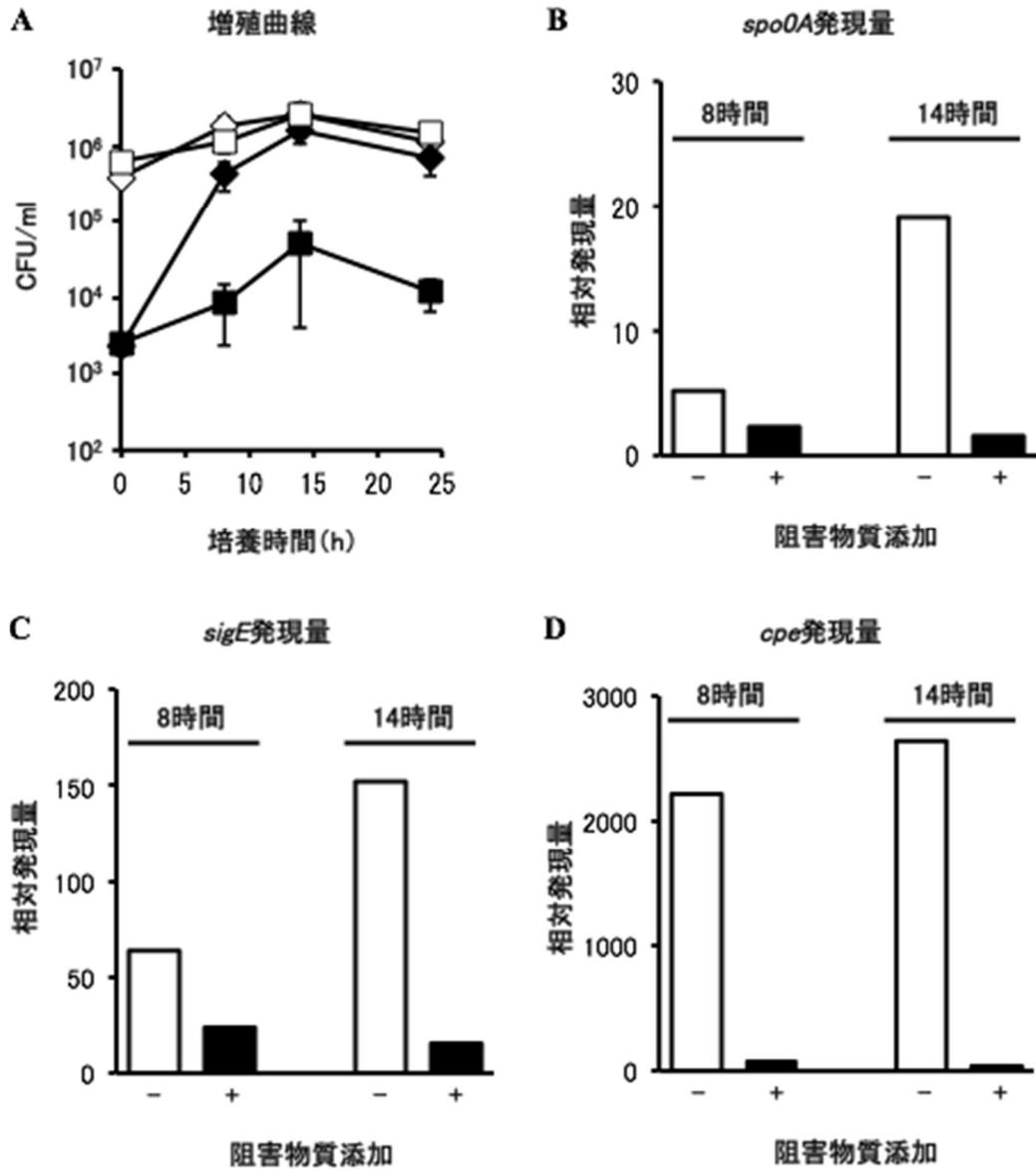
糞便抽出液を限外ろ過膜でろ過後、フィルターを通過した画分（濾液）とフィルター上に濃縮された画分（濃縮画分）のそれぞれについて、芽胞形成に対する効果を評価した。Control は何も加えない条件での芽胞形成率（陽性対照）、Glucose は 20 mM グルコースを加えたときの芽胞形成率（陰性対照）。3K~100K はそれぞれ使用したフィルターの分画分子量（分子量 3,000~100,000）を示す。

図5 ウェルシュ菌芽胞形成阻害物質の耐熱性の検討



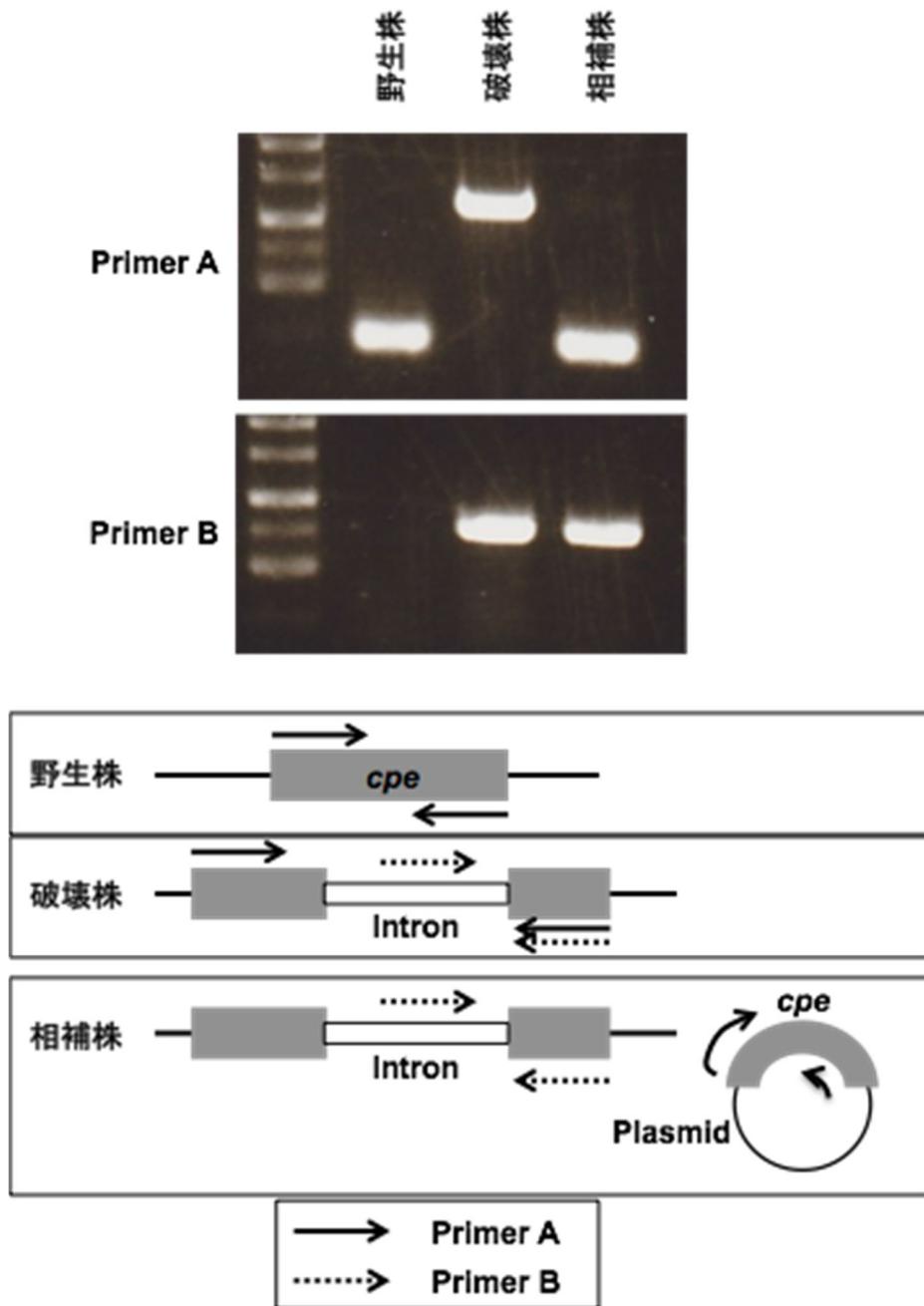
糞便抽出液を 100,000 × g、90 分間超遠心した上清をさらに分画分子量 100,000 の限外濾過膜でろ過したものについて、室温 (r. t. )、50、70、95 で 20 分間処理後、芽胞形成に対する抑制効果を評価した。Control は何も加えない条件での芽胞形成率 (陽性対照)、Glucose は 20 mM グルコースを加えたときの芽胞形成率 (陰性対照)。

図6 阻害物質の作用機序の検討



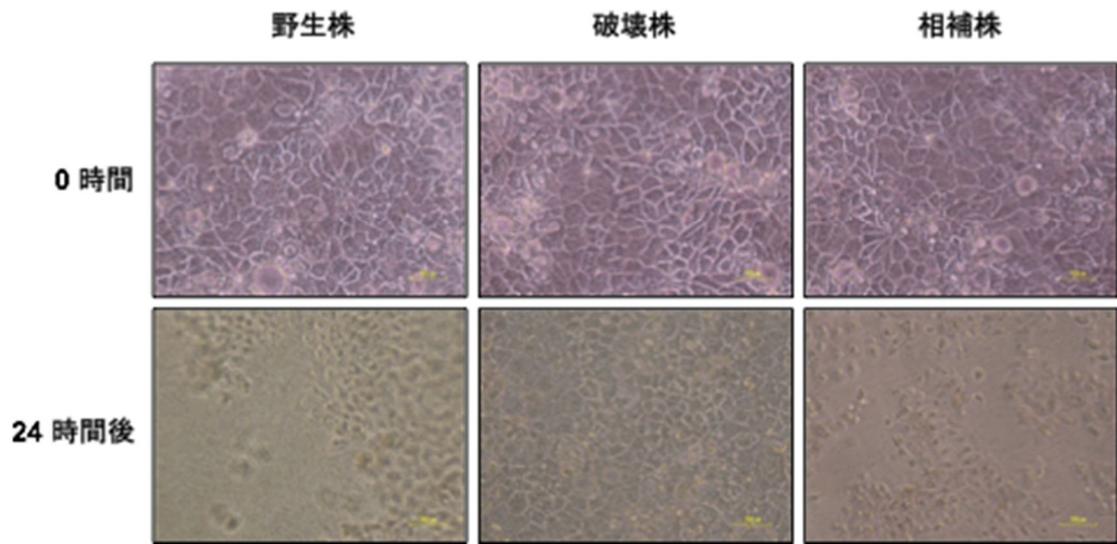
(A) は何も加えないときの栄養型ウエルシュ菌の菌数 (CFU)、 は阻害物質を加えたときの栄養型ウエルシュ菌の菌数、 は何も加えないときのウエルシュ菌の芽胞数 (CFU)、 は阻害物質を加えたときのウエルシュ菌の芽胞数 (CFU)。 (B)~(D) 16S リボソーム RNA の発現量に対する各種芽胞形成関連遺伝子の発現量。 8 時間および 14 時間後の発現量を、それぞれ何も加えないとき、阻害物質を加えたときで比較した。 (B) *spo0A*、 (C) *sigE*、 (D) *cpe*。

図7 3菌株の遺伝子保有状況の確認



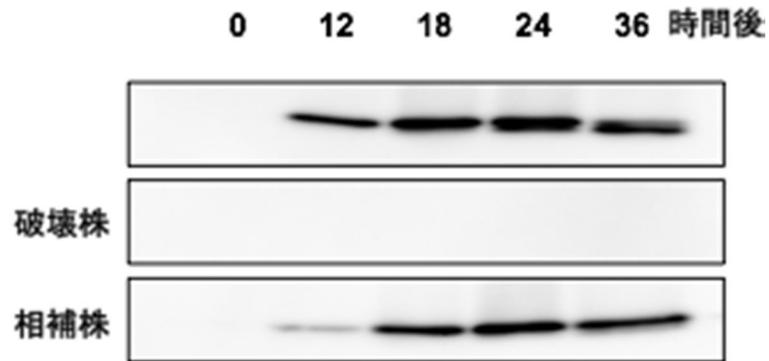
「野生株」は野生型 SM101 株、「破壊株」は *cpe*(-) 株、「相補株」は *cpe*(+) 株。それぞれの菌株のライゼートをテンプレートとして Primer A、Primer B を用いて PCR を行った。

図8 異なる3株を感染させたときの細胞障害性



感染後 24 時間後の細胞を位相差顕微鏡下で写真撮影した。「野生株」は野生型 SM101 株、「破壊株」は cpe(-)株、「相補株」は cpe(+)株。

図9 共培養系の培養上清中のCPE



感染 0、12、18、24、36 時間後の培養上清液を調製し、抗 CPE 抗体でウェスタンブロットを行った。「野生株」は野生型 SM101 株、「破壊株」は cpe(-) 株、「相補株」は cpe(+) 株。

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25年度

分担研究報告書

新型下痢毒素産生性ウエルシュ菌による食中毒事例  
の解析と原因ウエルシュ菌株のゲノム解析

岩手大学農学部

鎌田 洋一



厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・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」

分担研究報告書

新型下痢毒素産生性ウエルシュ菌による食中毒事例の解析と  
原因ウエルシュ菌株のゲノム解析

分担研究者 鎌田 洋一 岩手大学農学部 共同獣医学科 教授

協力研究者 長井 和哉 岩手大学農学部 技術室 技術員  
門間 千枝 東京都健康安全研究センター 微生物部 主任研究員  
仲真 晶子 東京都健康安全研究センター 微生物部 科長  
鈴木 康規 東京都健康安全研究センター 微生物部 研究員  
甲斐 明美 東京都健康安全研究センター 微生物部 部長  
堀口 安彦 大阪大学微生物病研究所 分子細菌毒素学領域 教授

研究要旨: 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。現在まで計4事例発生しており、いずれもエンテロトキシン遺伝子を持たず、同タンパク質の産生も認められなかった。分離菌が、新種の下痢誘発性毒素を産生していることにも確証が得られた。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となる。事例分離菌株 W5052 株の部分的ゲノム解析を行った。W5052 株は約 3 M bp の大きさの染色体と、少なくとも 2 種類のプラスミドを保有することが明らかになった。ゲノム中にはエンテロトキシン遺伝子は存在しなかった。新種の下痢誘発性毒素遺伝子の種間伝播ならびに毒素遺伝子の変異など、ゲノム解析を通じて明らかにできる可能性が示された。

## A . 研究目的

ウエルシュ菌食中毒は、我が国では、年間約 30 件程度発生している。発生件数は多くはないものの、一事件あたりの患者数が多い。過去には 1,000 名を越す患者数を示した事例もある<sup>1)</sup>。原因食は、カレーやシチュー、煮込み料理、惣菜、仕出し弁当などである。これらの原因食には2つの共通点がある。原因施設は、仕出し製造工場や、学校・刑務所などの給食施設の整った施設になっている。原因食品と原因施設の種類の種類は、ウエルシュ菌食中毒発生機構を反映してのものとなる。ウエルシュ菌は芽胞の形態で土壌に広く分布する。そのため、農産品、食品工場、仕出し施設をウエルシュ菌は汚染する。芽胞の食品への付着、施設の持ち込みは、避けることができない。食材を加工する際、加熱するが、ウエルシュ菌芽胞は、調理時の加熱では殺菌できない。周辺の共存菌が殺菌される中、ウエルシュ菌芽胞は、加熱によって発芽が促進される。仕出し工場や給食施設では、大量の調理を一度に行う。大型の調理機器は、高さがあり、機器の底辺部分は嫌気度が増す。ウエルシュ菌は、発育指摘温度が 40 数 で、一般の細菌より高い。「深鍋で加熱され、大量の食材の量で、また、粘性の高い所品で、加熱料理後ゆっくりと冷却されるような食品とその条件が、ウエルシュ菌食中毒発生を生み出す。

ウエルシュ菌食中毒の研究は長く、その原因物質は 1960 年代に明らかにされている。すわなち、分子量が 30 K Da 程度

の、タンパク質毒素で、毒素そのものは易熱性で、80 10 分の加熱で失活する。毒素は事例菌株の培養液中に分泌される。そのため、培養液を、ウサギ腸管ループテストに供すると、強い陽性反応、すなわち下痢原生を示す。この毒素はエンテロトキシンと呼ばれる。エンテロトキシンについても、精力的に研究が行われ、受容体を保持する Vero 細胞では細胞致死毒性を示し、受容体を持たない L929 細胞では、高濃度のエンテロトキシンによっても細胞毒性が見られないことがわかっている<sup>2)</sup>。

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、抗体を利用した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。患者症状が下痢・腹痛、原因施設が飲食店であること、原因食が弁当であること、平均の潜伏時間が 15 時間程度であったことは、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。一方、当該菌株を培養し、その濾過滅菌液につ

いて、ウサギ腸管ループ試験を行ったところ、陽性反応を示した。濾過滅菌培養液は RPLA テスト陰性で、菌株から抽出した DNA 検体についての、エンテロトキシン遺伝子検査も陰性だった。培養液は Vero 細胞および L-929 細胞に毒性を示した。以上の結果は、ウエルシュ菌は、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。

以上の見地から、本厚生労働科学研究では、事例菌株の部分的ゲノム解析、部分精製毒素標品のタンパク質の網羅的検索を通じて、新型毒素を同定した。新型毒素は2種類の成分から構成される、2コンポーネント毒素であることが示されている<sup>3)</sup>。

本研究の目的は、上記のような、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することにある。さらに、事例菌のゲノム解析を行い、毒素遺伝子伝播機構を明らかにすることを目的とする。

## B . 実験方法

### 1 . 東京都における食中毒事例で、ウエルシュ菌が分離された事例

東京都健康安全研究センター食中毒得研究室では、都内で発生した食中毒の、患者材料および推定原因食品からの菌分離を行っている。患者の呈した症状、潜伏期、原因食、患者規模から、ウエルシュ菌食中毒と推定され、上記材料からウエルシュ

菌が分離された例について、その分離株について、エンテロトキシン遺伝子検査および、毒素産生培地中での、エンテロトキシン産生を調べた。その結果、エンテロトキシン遺伝子陰性、エンテロトキシン産生性陰性の事例をまとめた。

### 2 . ウサギ腸管ループ試験

分離ウエルシュ菌株を変法 DS 培地<sup>4)</sup>で培養し、フィルターろ過滅菌(ポアサイズ 0.45  $\mu\text{m}$ )し、検体とした。ウサギ(日本在来種、オス、体重 1.5~2.0 Kg)をペントバルビタール麻酔下で回復し、空腸を体外に取り出した。5~10 cm 程度の間隔で、腸管を結紮し、ループを作製した。各ループに、検体 1.0 ml を接種した。検体は、上記の変法 DS 培地の培養液で、陰性対象に、Phosphate buffered saline (PBS)を、陽性対象にコレラ毒素(Sigma)を使用した。各検体をループ内に接種後、腸管を腹腔内に戻し、閉腹した。約 18 時間後、ペントバルビタール麻酔液の大量静脈内投与でウサギを安楽死させた。接種した腸管ループを取り出し、腸管ループの腫脹や内部の液体貯留の状況を写真にて記録した。

### 3 . ウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子検出

分離したウエルシュ菌を、Brain Heart Infusion 培地 (BHI、BD) に接種し、好気状態で 24 時間培養した。1.5 ml の培養液を、10,000xg、10 分間、遠心分離を行った。上清を捨て、回収した菌体を 100  $\mu$

1 の Milli-Q 水で懸濁し、95℃、10 分間加熱した。10,000xg、10 分間遠心分離を行い、上清を回収し、ウエルシュ菌 DNA テンプレートとした。

エンテロトキシン遺伝子の検出には、ウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子検出キット(タカラバイオ)を用いた。テンプレートの量、および PCR の条件は、キットの取り扱い説明書に準じた。毒素遺伝子の検出にはアガロースゲル電気泳動法を用いた。

#### 4 . 分離菌株のエンテロトキシン産生試験

分離菌は、Cocked Meat Medium に接種して保存した。保存菌液を BHI 培地に接種し、37℃ 24 時間、好氣的条件で培養した。変法 DS 培地に、BHI 培地での培養液を、1 / 10 量接種し、37℃ 24 時間培養した。培養液を 10,000xg、10 分間遠心分離し、上清を回収、毒素検査材料とした。

培養液中のエンテロトキシンタンパク質は、RPLA 反応を利用したキット(デンカ生研)を用いた。培養液の希釈には 96 ウェル(尖底)プレートを用いた。ウェルに培養液を 25  $\mu$ l を加え、さらに、キット添付の希釈液を 25  $\mu$ l 加えて、検体の 2 倍希釈を作製した。同様の操作を繰り返し、段階希釈を 2 列作製した。各ウェルに、キット添付の抗エンテロトキシン抗体結合ラテックスおよび、陰性コントロールとして、未感作(抗体が結合していない)ラテックスを、おのおの 25  $\mu$ l 添加し、混合後、室温にて 24 時間静置した。

希釈液に加えたラテックス粒子を入れたウェルを凝集反応陰性指標に、また、キット中に含まれるエンテロトキシン溶液での反応を凝集反応陽性指標にして、分離菌培養液中のエンテロトキシン産生性を検証した。

#### 5 . 細胞致死試験

研究室保有中の Vero 細胞および L929 細胞を用いた。Dulbecco 変法 MEM 培地(DMEM 培地、Sigma)に、10% Fetal Bovine Serum (FBS、Difco)を加え培地を、両細胞の培養に用いた。通常法方法で継代中のそれぞれの細胞を、1 x 10<sup>5</sup> cell/ml に培地で希釈し、96 ウェルプレートに 100  $\mu$ l / well の割合で播種した。5 %CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 1 晩培養後、ウェルあたり 10  $\mu$ l の割合で、上記変法 DS 培地で培養した検液を添加した。さらに 24 時間培養を継続し、その後、両細胞への、ウエルシュ菌培養上清の効果を判定した。培地添加時に、陽性対象として、ウエルシュ菌エンテロトキシン(Sigma)を用いた。

#### 6 . ゲノム解析

1997 年に発生した事例より分離した株 W5052 株の部分的ゲノム解析を行った。同菌株を BHI 培地で 37℃ 24 時間培養した。培養液について 10,000 rpm10 分の遠心分離を行い、上清を捨て、菌体を回収した。DNA 抽出キットとして、DNeasy Blood&Tissue Kit(Qiagen)を用い、菌体からゲノム DNA を回収した。

解析として、Shotgun 法と Mate-pair 法

を用いた。上記のゲノム DNA について、Mata-pair 用のライブラリーを作製し（Rhche 社に依頼）解析の対象とした。

Rhche 社の GS Junior を用い、W5052 株のゲノムを解析した。シークエンス解析には機器付属のソフトウェア（GS Junior Software 2.7）の一部を利用した。ウエルシュ菌ゲノムの比較を行った。比較対象は、すでにシークエンスデータが公表されているウエルシュ菌 St.13 株とした<sup>5)</sup>。

## C . 結果

### 1. エンテロトキシン非産生性のウエルシュ菌による食中毒事例

1997 年以降、2003、2009、2010 年に事例が発生した。表 1 にその概要を整理した。

事例は、その患者皆 11 名と小規模のものから、84 名と 100 名に近い大規模型食中毒の様式を示した。原因施設は飲食店であることも、ウエルシュ菌食中毒の共通の性状を示した。原因食品はローストビーフおよび煮物と、これらもウエルシュ菌食中毒の代表的原因食品になっていた。

4 事例ともに患者は下痢および腹痛を示し、平均の潜伏時間が約 10 時間から 15 時間と、これらも通常のウエルシュ菌食中毒患者が示すものの特徴を示した。

### 2 . 4 事例株における変法 DS 培地培養液の腸管毒性

4 事例から分離した、各 1 株について、変法 DS 培地における培養液について、腸管ループ試験を実施した。コレラ毒素を接種したループと同様、各事例分離株の培養液は、ループを腫張させた。また、ループ内部に液体を貯留させた。

### 3 . 4 事例からの分離株のエンテロトキシン遺伝子保有とエンテロトキシン産生性

4 事例からは、患者材料から、5~10 株程度の菌株を分離した。おのおのの菌株について、加熱抽出法によってテンプレート DNA を調製し、PCR を実施した。いずれの菌株も、キットが指示するサイズの DNA の増幅を確認できなかった。

分離菌株の変法 DS 培地培養液中のエンテロトキシンの存在を、抗体を用いた RPLA 法で検討したところ、いずれの菌株の培養液においても、RPLA 法 陰性を示し、エンテロトキシンの産生は確認できなかった。

### 4 . 4 事例株における変法 DS 培地培養液の細胞毒性

4 事例から分離した、各 1 菌株について、変法 DS 培地で培養し、その培養液の Vero 細胞および L929 細胞への毒性を検証した。市販のウエルシュ菌は Vero 細胞へ毒性を示した。一方、L929 細胞には変化を与えなかった。この現象はすでに確認されており<sup>2)</sup>、L929 細胞にはエンテロトキシン受容体が存在しないことで、L929 細胞への致死毒性が発現しないと説

明されている。一方、この度の 4 事例からの分離菌株を、変法 DS 培地で培養して得た培養液を、Vero 細胞および L929 細胞の培地中に添加したところ、両細胞への致死作用が観察された。

## 5. 事例株のゲノム解析

Shotgun シーケンシング法で、W5052 株のゲノム情報を得た。平均のリード数（一回あたりに読み取れた塩基配列の数）は 472 bp だった。全読み取り塩基数は 68 Mbp を示した。それらの配列を、付属のソフト GS de novo Assembler で処理をしたところ、17 種類の Scaffold を得た。Scaffold は、信頼性のある塩基配列の固まりを示している。17 種のサイズは、2 Kbp から 3.2 Mbp の間に分布した。Scaffold の塩基サイズが大きいものは染色体を、小さいものはプラスミドを示唆する。

同様の解析を Mate-pair 法で実施した。平均リード数は 451 bp、読み取った全塩基数は 90 Mbp を示した。Mate-pair 法と Shotgun 法の双方で得た配列を合わせて、de novo Assemble で解析したところ、scaffold は 3 種にまで減少した。具体的には約 310 万 bp、約 5 万 4 千 bp、および約 1 万 2 千 bp の Scaffold を示した。

これら 3 種の Scaffold に対し、GS Reference Mapper を用いて、ウエルシュ菌 St.13 株ゲノムとのマッピングを行い、塩基配列の相同性を比較した。それぞれを図に示す（図 1、2、3）。最も塩基数の多い Scaffold は、SM101 株との比較か

ら、染色体であることが推察された。他の 2 種の scaffold は、塩基サイズから、プラスミドと推察された。

## D. 考察

ウエルシュ菌は各種の毒素を産生する。それら毒素のうち、食中毒を誘発する直接の毒素がエンテロトキシンで、腸管粘膜上皮細胞に障害を与え、下痢を誘発することがわかっている。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生菌が、食品とともに人体に取り込まれ、腸管内で増殖し、エンテロトキシンを産生することによって発症する。一方、ウエルシュ菌は環境中や糞便中にも存在する。それらの、食中毒とは無関係のウエルシュ菌では、エンテロトキシン遺伝子は保持せず、毒素産生を誘発しやすい培地に接種してもエンテロトキシン産生は認められない。したがって、ウエルシュ菌食中毒を起こす菌株は、必ずエンテロトキシン遺伝子を保有し、かつ、毒素産生培地でのエンテロトキシン産生が確認できる。

ウエルシュ菌食中毒は、腸管内での増殖と毒素産生のために、ブドウ球菌やセレウス菌毒素性食中毒より長時間の潜伏期を示すのが通常である。前者は早いと喫食後 30 分程度で症状の発現をみるが、ウエルシュ菌では平均的に 10 時間程度の潜伏時間を要するとされている。症状は、水様性下痢、洪り腹と呼ばれる腹痛を主とする。予後はよい。

ウエルシュ菌食中毒は、原因食品に特徴を持つ。ウエルシュ菌は耐熱性の芽胞を産生する。食材に同菌芽胞が含まれて、加工調理される際、加熱により共存菌の死滅、芽胞の加熱による活性化と一斉増殖が起こる。そのため、原因食には肉、野菜等の煮込み料理や、ローストビーフなどの加熱加工食品がある。

ウエルシュ菌食中毒は、原因施設にも特徴がある。家庭での発生は通常みられない。上述のように、加工加熱する食品がウエルシュ菌の原因食となるのであるが、嫌気性菌のウエルシュ菌の食品内増殖を許す条件があり、食品内嫌気度を上昇させる大量調理施設が該当する。同施設では、容量の大きな調理器具を使用する。同器具は高さがあり、大気の器具底部への浸透が弱い。加熱によって排出された酸素が、再び食品内に浸透する際に、深さのある調理器具は食品内嫌気度を高く保つ危険性がある。さらに、カレー、シチュー、煮物のように、粘性の高い食品は、大気の浸透を妨げる。飲食店、給食施設、仕出し弁当をつくる調理施設が、ウエルシュ菌食中毒の原因施設になりやすい条件は、ウエルシュ菌固有の性状が原因になっている。飲食店や給食施設で調理された「同一の食品」は多くの人に提供され、大規模な人数の食中毒に発展することもウエルシュ菌食中毒の大きな特徴となっている。

以上のウエルシュ菌とウエルシュ菌食中毒の特徴は、同食中毒を診断する際に有効に作用する。原因施設、原因食、患者数、潜伏期間、症状、から推測し、原因食

および患者糞便から、ウエルシュ菌を培養する。同菌が耐熱性の芽胞を産生すること、嫌気性菌であることを利用し、菌分離を行う。また、患者下痢便中にはエンテロトキシンが検出されることも多い。

患者材料や推定原因食からウエルシュ菌が分離された場合、菌体 DNA をテンプレートして PCR を行い、エンテロトキシン遺伝子があること、また、毒素産生培地に接種し、エンテロトキシンタンパク質が産生されていることを確認し、ウエルシュ菌食中毒と診断する。

1997 年、ウエルシュ菌食中毒が疑われ、患者材料からウエルシュ菌が分離された事例が発生した。ウエルシュ菌食中毒と診断するため、常法に従い、エンテロトキシン遺伝子と同タンパク質の有無を検査したところ、いずれも陰性だった。同事例から、複数の菌株について検査しても同様だった。以降、2010 年に至るまで、4 例の同様な事例の発生があった。

4 事例から分離された菌株について、その腸管病原性を検証した。ウサギ腸管ループ試験は、対象物が直接に腸組織に接触し、下痢原性を実証する。液体の貯留、すなわち下痢誘発性と、貯留した液体による腸管ループの腫脹が認められた場合、検査対象に下痢誘発性、腸管病原性があり、食中毒を惹起する能力を証明する。4 事例のそれぞれから分離された菌株の、培養液ろ液は、腸管ループテスト陽性を示した。

ウエルシュ菌エンテロトキシンは、細胞膜上の受容体に結合し、細胞膜に小孔

を開け、細胞内容物の流出と、細胞死を誘導することがわかっている。これまでの受容体研究から、ミドリザル腎臓由来 Vero 細胞は同受容体を持ち、したがってエンテロトキシン感受性を示すことが明らかになっている。一方、マウス繊維芽細胞 L929 細胞は、エンテロトキシン受容体を保有せず、したがってエンテロトキシン非感受性細胞になる。両細胞に対し、事例分離株の培養液は、細胞毒性を示した。これらの事実は、4 事例を発生させたウエルシュ菌は、エンテロトキシンではなく、新種の下痢誘発毒素があること、複数の事例が観察され、現状の検査法と、検査者のウエルシュ菌食中毒に対する知識では、同菌食中毒の正確な疫学情報を得ているとは言い難いことを示している。

昨年度までの、本厚生労働科学研究の成果から、上記の新種の腸管毒性物質が、事例菌が産生するタンパク質性の毒素であることが明らかになっている<sup>4)</sup>。本年度は、事例由来の菌株の性状を蓄積して、新型毒素産生ウエルシュ菌の存在が、普遍的である可能性を示すとともに、事例分離菌の、ゲノム情報を解析した。

ウエルシュ菌のゲノムは、数株についてはすでに公開されている、それらのうちのひとつ SM101 株は、エンテロトキシン産生性の菌株として分析され、事実、染色体上にエンテロトキシン遺伝子が存在している<sup>5)</sup>。事例由来株の一つ、W5052 株について、次世代シーケンシング解析を行った。同法では、Mate-pair 法による解析が有効だった。次世代シーケン

シングでは、信頼性ある塩基配列の固まり (scaffold) が大きくなり、その数が少なくなり、一定数の scaffold で収束した場合、ゲノム構成成分が規定される。細菌の場合、数 M bp のレベルの染色体と、菌が保有するプラスミドがゲノム構成成分となる。W5052 株の Mate-pair 解析では、3 種の scaffold に収束し、そのうちのひとつが 3 Mbp と大きく、染色体であることを示す。一方、50,000 bp 程度および 12000 bp 程度の小さな scaffold も存在し、これらはプラスミドであることを示唆する。

昨年度までの解析では、当該腸管毒性物質は、イオタ毒素に相同性のあるタンパク質であることが示されている。イオタ毒素は、ウエルシュ菌で発見されたものであるが<sup>6)</sup>、イオタ毒素に類似の毒素がスピロフォルム菌でも発見され、イオタ毒素様毒素として、ウサギの下痢症に関わることが明らかになっている<sup>6)</sup>。新種の腸管毒素は、ウエルシュ菌のイオタ毒素よりも、スピロフォルム菌のイオタ毒素様毒素に相同性が高かった<sup>4)</sup>。以上のことは、イオタ毒素が、ウエルシュ菌からスピロフォルム菌に伝播し、変異を受け、さらに、エンテロトキシン遺伝子を持たないウエルシュ菌に伝播して、さらに変異をしたことを想像させる。本年度の新型下痢毒素産生性ウエルシュ菌のゲノム解析研究は、ウエルシュ菌食中毒の疫学情報を正確に刷新できるだけでなく、病原性遺伝子の伝播と、同遺伝子を保有する生物種の間関係を明らかにできる可能性がある。

#### E . 文献

- 1 ) 山中英明、藤井建夫、塩見一雄、微生物性食中毒、「食品衛生学第二版」恒星社厚生閣、東京 (2007)
- 2 ) Kimura J, Abe H, Kamitani S, Toshima H, Fukui A, Miyake M, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Yamamoto S, Horiguchi Y. *Clostridium perfringens* enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction. J. Biol. Chem. 2010, 285, 401-408.
- 3 ) 鎌田洋一ら、厚生労働科学研究補助金平成 24 年度食の安全推進研究事業「独資産生微生物及び試験法に関する研究」
- 4 ) 大谷仁己, 氏家淳雄. 1987 . 変法 DS 培地におけるウエルシュ菌の芽胞形成とエンテロトキシン産生性、食衛誌、28、281 - 285 .
- 5 ) Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, Ohshima K, Yamashita A, Shiba T, Ogasawara N, Hattori M, Kuhara S, Hayashi H. 2002. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2002,99, 996-1001.
- 6 ) 桜井淳、本田武史、小熊恵二(編)細菌毒素ハンドブック、Science Forum, 2002 , 東京 .

#### E . 健康危害情報

特になし。

#### F 研究発表

なし。

#### G . 学会発表

- 1) Kamata Y, Irikura D, Monma C, Namaka, A, Kai A, Sugita-Konishi, Y. (2013) *Clostridium perfringens* new enterotoxin (1) detection and identification of a new enterotoxin using genome analysis and *in silico* screening. Clostpath 2013. Palm Cove. Qld, Australia, Sep. 2013.
- 2) Monma C, Suzuki Y, Irikura D, Kamata, Y, Sugita-Konishi Y, Nakama A, Fukui-Miyazaki A, Horiguchi Y, Kai A. (2013) *Clostridium perfringens* new enterotoxin (2) biochemical characterization of an new enterotoxin. Clostpath 2013. Palm Cove. Palm Beach, Qld, Australia, Sep. 2013.
- 3) 門間千枝、赤瀬 悟、石塚理恵、齋木大、小西典子、横山敬子、仲間晶子、鎌田洋一、甲斐明美(2013) 人ふん便における新型エンテロトキシン産生ウエルシュ菌の保有状況、第 34 回日本食品微生物学会 .

#### H . 知的所有権の取得情報

特許申請なし。



表1 ウエルシュ菌が分離されたが、従来と性状の異なる食中毒事例

	事例1	事例2	事例3	事例4
発生年月	1997.1	2003.6	2009.8	2010.1
発生地	東京	東京	大阪	栃木
患者数(人)	39	11	84	79
原因施設	飲食店	飲食店	飲食店	飲食店
原因食品	シラタキと牛肉 の煮物	子羊煮物	ローストビーフ	ローストビーフ
主要症状	下痢・腹痛	下痢・腹痛	下痢・腹痛	下痢・腹痛
平均潜伏時間 (時間)	15.4	10	12.2	9.7

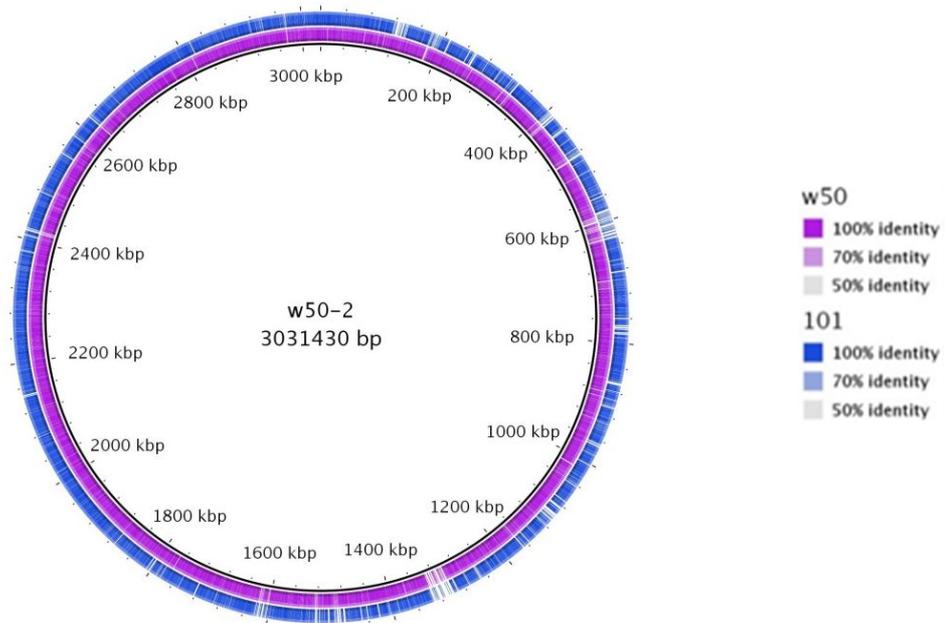


図1 エンテロトキシン非産生性ウエルシュ菌 W5052 株のゲノムマップ  
W5052 株のゲノムシーケンスを、公開されているウエルシュ菌 SM101 と比較した。

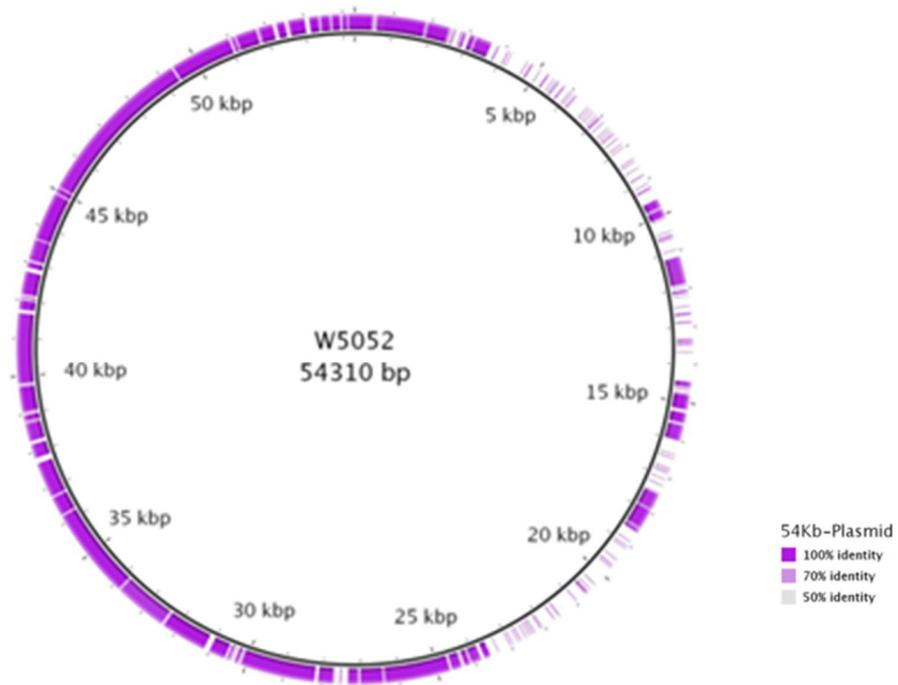


図2 エンテロトキシン非産生性ウエルシュ菌 W5052 株のゲノムマップ  
W5052 株のゲノムシーケンスを、公開されているウエルシュ菌 SM101 と比較した。

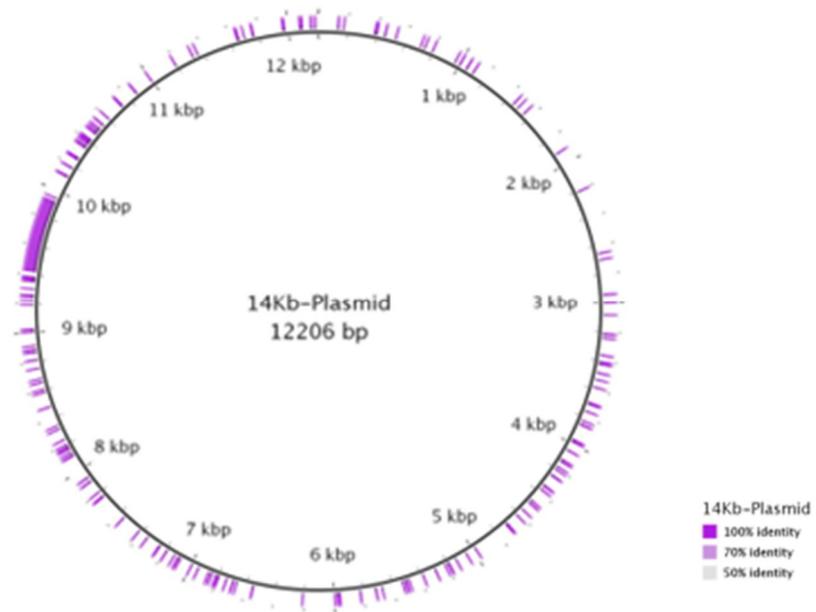


図3 エンテロトキシン非産生性ウエルシュ菌 W5052 株のゲノムマップ

W5052 株のゲノムシーケンスを、公開されているウエルシュ菌 SM101 と比較した。

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**

平成23 - 25年度 研究成果



## 発表した研究成果リスト

### 論文発表

1. Wang, L., Wakushima, M., Aota, T., Yoshida, Y., Kita, T., Maehara, T., Ogasawara, J., Choi, C., Kamata, Y., Hara-Kudo, Y., Nishikawa, Y. (2013) Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients and comparison to strains from foods and fecal specimens from cattle, swine, and healthy carriers in Osaka City, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1232-1240.
2. Hara-Kudo, Y., Konuma, H., Kamata, Y., Miyahara, M., Takatori, K., Onoue, Y., Sugita-Konishi, Y., Ohnishi, T. (2013) Prevalence of the main food-borne pathogens in retail food under the national food surveillance system in Japan. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 30, 1450-1458.
3. Nakashima, R., Kamata, Y., Nishikawa, Y. (2013) Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and guanylin on the barrier integrity of intestinal epithelial T84 cells. *Vet. Immun. Immunopath.* 152, 78-81.

### 学会発表

4. 1. Kamata Y, Irikura D, Monma C, Namaka, A, Kai A, Sugita-Konishi, Y. (2013) Clostridium perfringens new enterotoxin (1) detection and identification of a new enterotoxin using genome analysis and in silico screening. Clostpath 2013. Palm Cove. Qld, Australia, Sep. 2013.
5. 2. Monma C, Suzuki Y, Irikura D, Kamata, Y, Sugita-Konishi Y, Nakama A, Fukui-Miyazaki A, Horiguchi Y, Kai A. (2013) Clostridium perfringens new enterotoxin (2) biochemical characterization of an new enterotoxin. Clostpath 2013. Palm Cove. Palm Beach, Qld, Australia, Sep. 2013.
6. 3. 門間千枝、赤瀬 悟、石塚理恵、齋木 大、小西典子、横山敬子、仲間晶子、鎌田洋一、甲斐明美(2013) 人ふん便における新型エンテロトキシン産生ウエルシュ菌の保有状況、第34回日本食品微生物学会 .
- 7.

8. 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.
9. Mayo Yasugi, Hidenobu Hoshi, Daisuke Okuzaki, Shigeki Yamamoto, Yoichi Kamata, and Masami Miyake. Mechanism of bile acid-mediated sporulation in *Clostridium perfringens*. 第 87 回日本細菌学会総会. 東京. Mar. 2014.

## 製品の市場化

1. 製品名：スィフトジーンセレウリド産生セレウス「カイノス」  
標記の製品名で平成 25 年 8 月 1 日より販売を開始した（株式会社 カイノス）

