

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 総合研究報告書

研究代表者 鎌田 洋一

岩手大学 農学部

平成26(2014)年3月

目 次

食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究

まとめ

研究代表者 鎌田 洋一 . . . 1

毒素産生食中毒細菌のリスクプロファイル . . . 1 1

分担研究者 山本 茂貴

セレウス菌セレウリドの検出法に関する研究 . . . 1 7

分担研究者 西川 禎一

核酸クロマト法による毒素産生ウエルシュ菌およびセレウス菌の . . . 3 1

検出法に関する研究

分担研究者 宇治家 武史

ブドウ球菌新型エンテロトキシンの食品内産生動態 . . . 4 1

分担研究者 重茂 克彦

水晶発振子マイクロバランス法によるブドウ球菌エンテロ . . . 4 9

トキシンのリアルタイム検出法開発の試み

分担研究者 鎌田 洋一 重茂 克彦

ウエルシュ菌食中毒発現機構の解析 . . . 5 9

分担研究者 三宅 眞実

ウエルシュ菌の新型下痢毒素に関する研究 . . . 8 7

分担研究者 鎌田 洋一

研究成果 . . . 1 0 1

厚生労働科学研究補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究

総 括 研 究 報 告 書

岩手大学 農学部

鎌田 洋一

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

「食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究」

総合研究報告書

代表研究者 鎌田 洋一 岩手大学農学部 共同獣医学科 教授

研究分担者 山本 茂貴 東海大学 海洋学部 教授
西川 禎一 大阪市立大学大学院 教授
宇治家 武史 株式会社 カイノス 課長
重茂 克彦 岩手大学農学部 教授
三宅 眞実 大阪府立大学大学院 教授

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

平成 23 年度はウエルシュ菌、平成 24 年度はセレウス菌、平成 25 年度は黄色ブドウ球菌のリスクプロファイル作成のため、以下の項目について検討した。国内外の疫学的情報（食中毒発生件数、原因食品、患者数 等）、新たに得られた分子生物学的な情報（感染性、発症機序 等）、新たな診断法、予防法、治療法、リスク評価（用量反応等）についてインターネットから各菌に関する情報を収集した。GIDEON による検索により、各国のアウトブレイク状況および汚染率等のサーベイランス情報を得た。また、厚生労働省食中毒統計調査および感染症発生動向調査週報 IDWR により、わが国におけるアウトブレイク状況等の情報を得た。FoodRisk、PubMed では、主に分子生物学的研究や診断・治療法に関する文献を抽出した。

リアルタイム PCR 法による食品中のセレウスの検出および定量を試みた。セレウス総数については 16S rRNA 遺伝子を、催吐性セレウスについては CRS 遺伝子を検出することにより定量した。リアルタイム PCR 法によって得られた測定値は培養法による生菌数と相関を持って推移し、リアルタイム定量 PCR 法の有用性が実証された。芽胞が検出されるのと同時にセレウリドが 0.3 $\mu\text{g/g}$ 検出され、72 時間後には 1.6 $\mu\text{g/g}$ に達した。さらに、セレウリドの有無を簡便かつ迅速に測定するために、細菌を用いた新規バイオアッセイ法の開発を試みた。セレウリドに対する感受性スクリーニングを行い、セレウス類縁菌の *B. sporothermodurans* を指標菌として検討したところ、HEp-2 細胞の空胞変性試験に代わるバイオアッセイになりうると思われた。食品中でセレウスが産生した嘔吐毒素セレウリドを、HPLC を用いて検出する可能性について検討した。精製セレウリドや合成セレウリド試料に含まれた UV 吸収する物質と類似のピークが、セレウリドが検出されるのと同時期に出現することが判明し、試験法の開発には至らなかった。

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

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

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

ウエルシュ菌食中毒は、エンテロトキシン産生性のウエルシュ菌によって発生するものと認知されてきた。1997年に起こった事例では、ウエルシュ菌が原因菌の可能性が非常に高いにもかかわらず、分離株はエンテロトキシン遺伝子を持たず、また、産生もしなかった。同様の事例を検証した。分離菌が新種の下痢誘発性毒素を産生していることの実証が得られた。これらの事例は、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌のみを対象とする試験法には不備があること、したがって、現在のウエルシュ菌食中毒の疫学情報は不完全で、この度の事例も含んだ解析が必要であることを示す。事例分離菌株 W5052 株の部分的ゲノム解析を行った。W5052 株は新型毒素遺伝子をコードしたプラスミドを保有していることが明らかになった。ウエルシュ菌食中毒の分子疫学情報の刷新に貢献できるものと考えられる。

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

1 : リスクプロファイル作製

上記3種の細菌については、リスクプロファイルが作製されていないので、本研究においてまとめた。国内外の疫学的情報(食中毒発生件数、原因食品、患者数等)新たに得られた分子生物学的な情報(感染性、発症機序等)新たな診断法、予防法、治療法、リスク評価(用量反応等)について調査した。

1 - 1 : 黄色ブドウ球菌のリスクプロファイルの概要

黄色ブドウ球菌はグラム陽性、通性嫌気性球菌で人が保菌している。耐熱性のエンテロトキシンが嘔吐、下痢を引き起こす。わが国において発生したブドウ球菌食中毒の原因食品は、にぎりめし、寿司、肉・卵・乳などの調理加工品及び菓

子類など多岐にわたっているが、欧米においては、乳・乳製品やハム等畜産物が原因食品として多くみられる。

わが国での食中毒の原因施設としては、飲食店(約35~45%)、家庭(20%前後)、仕出屋、旅館などで多く発生している。

2000年の加工乳による集団食中毒は突出した患者数を記録した。

諸外国では、1991年から1992年にヨーロッパで発生した食中毒のアウトブレイクのうち、黄色ブドウ球菌が関与したものは3.5%であった(1993年から1998年では4.1%)。また、1993年から1998年にヨーロッパ諸国で960のアウトブレイク(患者数10,899名)が確認されている。さらに、2009年EU諸国において293のアウトブレイク(患者数978名、死者2名)が確認された。

1 - 2 : セレウス菌のリスクプロファイルの概要

セレウス菌はタンパク質や多糖体など高分子物質の分解性が高く、食品の腐敗、変敗を起こすとともに、嘔吐毒(セレウリド)と下痢原性エンテロトキシンを産生する。発育温度域は10~50(増殖至適温度28~35)であり、10以下ではほとんどの菌株が増殖できないものの、一部7以下の低温で増殖する菌株も存在する。セレウス菌は様々な食品中に存在する。ほとんどは100芽胞/g以下であるが、ハーブなどで1,000以上になるものも報告されている。食品中ではセレウス菌は芽胞の形で存在するが、セレウス

菌にとって適切な環境で食品を保存した場合に芽胞が発芽生育する。

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

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

嘔吐型食中毒では、体内に入ったセレウリドが胃から十二指腸に流入する際にセロトニンレセプターに結合し、迷走神経を刺激することで嘔吐を引き起こすと考えられている。

1 - 3 : ウエルシュ菌リスクプロファイルの概要

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

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

CPE 産生型による食中毒のアウトブレイクは、肉製品や鶏肉の不適等な加熱に

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

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

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

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

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

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

2 : セレウス菌とセレウリドに関する研究

2 - 1 : セレウリドの検出法に関する研究

リアルタイム PCR 法による食品中のセレウスの検出および定量を試みた。セレウス総数については 16S rRNA 遺伝子を、催吐性セレウスについては CRS 遺伝子を検出することにより定量した。市販無菌包装米飯に 1.9 cfu/g のセレウスを接種し、30 で静置すると、接種 12 時間後には 105 cfu/g に、48 時間後には 107 cfu/g に達し芽胞も 104 cfu/g 検出された。この間、リアルタイム PCR 法によって得られた測定値は培養法による生菌数と相関を持って推移し、リアルタイム定量 PCR 法の有用性が実証された。芽胞が検出されるのと同時にセレウリドが 0.3 µg/g 検出され、72 時間後には 1.6 µg/g に達した。さらに、セレウリドの有無を簡便かつ迅速に測定するために、細菌を用いた新規バイオアッセイ法の開発を試みた。セレウリドに対する感受性スクリーニングを行い、セレウス類縁菌の *B. sporothermodurans* を指標菌として検討を進めた。HEp-2 細胞の空胞変性試験に代わるバイオアッセイになりうると期待できる。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は比較的安価で汎用性が高く広く普及している理化学分析装置である。食品中でセレウスが産生した嘔吐毒素セレウリドを、HPLC を用いて検出する可能性について検討した。HPLC-UV 測定

系でセレウリドを計測することは不可能と判断した。しかしながら、市販無菌包装米飯や炒飯にセレウスを接種して培養しセレウリドを産生させた試料を HPLC で測定したところ、精製セレウリドや合成セレウリド試料に含まれた UV 吸収する物質と類似のピークが、セレウリドが検出されるのと同時期に出現することが判明した。セレウリド自体の定量ではないが、セレウリドの代替指標として HPLC 測定の対象とするべきか見極めるために今少し検討を継続する価値があると考えられる。

2 - 2 : セレウリド産生セレウス菌の迅速スクリーニング法開発

セレウリド産生菌を特異的に検出するために、セレウリド合成酵素遺伝子を含む *ces* オペロンのポリシストロニック mRNA を標的核酸とした。また、検出法の汎用性を高めるため、専用機器や高額な機器を必要としない Nucleic Acid Sequence-based Amplification (NASBA) -核酸クロマト法を遺伝子検出法として採用した。NASBA 法及び核酸クロマト法に最適化させたプライマーやプローブは、標的核酸の合成 RNA (10 コピー) を僅か 10 分の増幅時間で検出する能力を示した。またセレウリド産生セレウスは 10cfu/t の感度で特異的に検出された。セレウス食中毒の事例食品は入手困難だったため、食品試料からのセレウリド産生セレウスの検出は、食品試料への菌接種試験で確認した。菌を接種する食品は、厚生労働

省の食中毒一覧(2008-2011年)を参照し、米飯やチャーハンを含む5種を用いた。これら食品への菌接種試験の結果、本検出法は全5種食品に対して 10^4 cfu/gの感度でセレウリド産生セレウスを検出した。この感度は、セレウリド食中毒の発症菌量とされる 10^5 cfu/gよりも10倍高かった。以上の研究成果を基に、スイフトゾーンセレウリド産生セレウス「カイノス」という製品名で平成25年8月1日より販売を開始した。

3：黄色ブドウ球菌とそのエンテロトキシンに関する研究

3 - 1：新型エンテロトキシンの毒素産生動態と食中毒原性に関する検討

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

普遍的な現象と考えら、新型エンテロトキシンの食中毒原性が確認された。

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

4：ウエルシュ菌とその下痢毒素に関する研究

4 - 1：ウエルシュ菌の腸管内増殖・芽胞形成・毒素産生機構

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

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

4 - 2 : ウエルシュ菌新型下痢毒素に関する研究

ウエルシュ菌食中毒の原因菌であるウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) はヒトをはじめ多くの動物の大腸内常在菌であり、下水、河川、海、耕地などの自然界にも広く分布する。ウエルシュ菌食中毒は菌が産生するエンテロトキシンによる生体内毒素型食中毒である。ウエルシュ菌食中毒と診断する場合、患者便および推定原因食品から、ウエルシュ菌を分離し、菌株がエンテロトキシン遺伝子を保有すること、所定の毒素産生培地に接種し、エンテロトキシン産生性を確認することが必須の検査項目になっている。遺伝子検査には PCR 法が、エンテロトキシン産生性については、抗体を利用しての逆受け身ラテックス凝集テスト (RPLA テスト) が実施される。

1997 年に、東京都で発生したウエルシ

ュ菌食中毒がある。典型的ウエルシュ菌食中毒を推測させるものであった。患者便から分離した菌株について、エンテロトキシン遺伝子の有無、および培養液中のエンテロトキシンの有無を試験したところ、いずれも陰性を示した。分離株は、エンテロトキシンでなく、未同定の、新型エンテロトキシンを産生し、食中毒を発生させる可能性を示唆している。本研究では、非エンテロトキシン産生性のウエルシュ菌食中毒事例を収集し、その実態を明らかにした。さらに、同菌株を培養し、旧来のエンテロトキシンとは異なる毒素を同定、その性状を調べることを目的とした。

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

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

厚生労働科学研究補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業
食品中の毒素産生微生物および試験法に関する研究
平成23 - 25年度
分担研究報告書

ウエルシュ菌、セレウス菌および黄色ブドウ球菌
リスクプロファイル

東海大学海洋学部

山本 茂貴

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

「食品中の毒素産生食中毒細菌及び毒素の直接試験法の研究」

平成 23 - 25 年度分担研究報告書

ウエルシュ菌、セレウス菌および黄色ブドウ球菌リスクプロファイル

研究分担者 山本茂貴 東海大学海洋学部 教授

研究協力者 長谷川 専 三菱総合研究所
柿沼美智留 三菱総合研究所

研究要旨：平成 23 年度はウエルシュ菌、平成 24 年度はセレウス菌、平成 25 年度は黄色ブドウ球菌のリスクプロファイル作成のため、以下の項目について検討した。

国内外の疫学的情報（食中毒発生件数、原因食品、患者数 等）、新たに得られた分子生物学的な情報（感染性、発症機序 等）、新たな診断法、予防法、治療法、リスク評価（用量反応等）についてインターネットから各菌に関する情報を収集した。

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

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

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

A . 研究目的

ウエルシュ菌、セレウス菌および黄色ブドウ球菌のリスクプロファイルはこれまで、作成されていないので、今回の研究班でまとめた。

ウエルシュ菌、セレウス菌および黄色ブドウ球菌のリスクプロファイル作成のため、国内外の疫学的情報（食中毒発生件数、原因食品、患者数 等）、新たに得られた分子生物学的な情報（感染性、発症機序 等）、新たな診断法、予防法、治療法、リスク評価（用量反応 等）について、国

B . 研究方法

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

C . 研究結果

ウエルシュ菌リスクプロファイルの概要

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

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

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

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

である。

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

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

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

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

セレウス菌のリスクプロファイルの概要

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

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

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

³ IDWR 感染症の話 セレウス菌感染症

http://idsc.nih.gov/idwr/kansen/k03/k03_05/k03_05.html

⁴ PubMed

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

⁵ FoodRisk <http://foodrisk.org/>

在する。ほとんどは 100 芽胞/g 以下であるが、ハーブなどで 1,000 以上になるものも報告されている。食品中ではセレウス菌は芽胞の形で存在するが、セレウス菌にとって適切な環境で食品を保存した場合に芽胞が発芽生育する。

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

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

嘔吐型食中毒では、体内に入ったセレウリドが胃から十二指腸に流入する際にセロトニンレセプターに結合し、迷走神経を刺激することで嘔吐を引き起こすと考えられている。

黄色ブドウ球菌のリスクプロファイルの概要

黄色ブドウ球菌はグラム陽性、通性嫌気性球菌で人が保菌している。耐熱性のエンテロトキシンが嘔吐、下痢を引き起こす。わが国において発生したブドウ球菌食中毒の原因食品は、にぎりめし、寿司、肉・卵・乳などの調理加工品及び菓子類など多岐にわたっているが、欧米においては、乳・乳製品やハム等畜産物が原因食品として多くみられる。

わが国での食中毒の原因施設としては、飲食店(約 35 ~ 45%)、家庭(20%前後)、仕出屋、旅館などで多く発生している。

2000年の加工乳による集団食中毒は突出した患者数を記録した。

諸外国では、1991年から1992年にヨーロッパで発生した食中毒のアウトブレイクのうち、黄色ブドウ球菌が関与したものは3.5%であった(1993年から1998年では4.1%)。また、1993年から1998年にヨーロッパ諸国で960のアウトブレイク(患者数10,899名)が確認されている。さらに、2009年EU諸国において293のアウトブレイク(患者数978名、死者2名)が確認された。

詳細については、別添の委託報告書を参照すること。

D . 健康危機情報

特になし。

E . 研究発表

特になし。

F . 知的財産権取得状況

特になし。

厚生労働科学研究補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業
食品中の毒素産生微生物および試験法に関する研究
平成23 - 25年度
分担研究報告書

セレウス菌セレウリドの検出方法に関する研究

大阪市立大学大学院

西川 禎一

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

「食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究」

平成23 - 25年度分担研究報告書

HPLCによる*Bacillus cereus*の嘔吐毒素(セレウリド)検出法の試行

分担研究者	西川禎一	大阪市立大学大学院生活科学研究科
研究協力者	浅野桃子	大阪市立大学大学院
	古澤直人	大阪市立大学大学院
	池田高紀	帝塚山学院大学
	田中 仁	帝塚山学院大学
	切畑光統	大阪府立大学大学院
	奈賀俊人	東洋食品工業短期大学

研究要旨:リアルタイムPCR法による食品中のセレウスの検出および定量を試みた。セレウス総数については16S rRNA遺伝子を、催吐性セレウスについてはCRS遺伝子を検出することにより定量した。市販無菌包装米飯に1.9 cfu/gのセレウスを接種し、30℃で静置すると、接種12時間後には105 cfu/gに、48時間後には107 cfu/gに達し芽胞も104 cfu/g検出された。この間、リアルタイムPCR法によって得られた測定値は培養法による生菌数と相関を持って推移し、リアルタイム定量PCR法の有用性が実証された。芽胞が検出されるのと同時にセレウリドが0.3 µg/g検出され、72時間後には1.6 µg/gに達した。さらに、セレウリドの有無を簡便かつ迅速に測定するために、細菌を用いた新規バイオアッセイ法の開発を試みた。セレウリドに対する感受性スクリーニングを行い、セレウス類縁菌の*B. sporothermodurans*を指標菌として検討を進めた。HEp-2細胞の空胞変性試験に代わるバイオアッセイになりうると期待できる。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は比較的安価で汎用性が高く広く普及している理化学分析装置である。食品中でセレウスが産生した嘔吐毒素セレウリドを、HPLCを用いて検出する可能性について検討した。HPLC-UV測定系でセレウリドを計測することは不可能と判断した。しかしながら、市販無菌包装米飯や炒飯にセレウスを接種して培養しセレウリドを産生させた試料をHPLCで測定したところ、精製セレウリドや合成セレウリド試料に含まれたUV吸収する物質と類似のピークが、セレウリドが検出されるのと同時期に出現することが判明した。セレウリド自体の定量ではないが、セレウリドの代替指標としてHPLC測定の対象とすべきか見極めるために今少し検討を継続する価値があると考えた。

A . 研究目的

Bacillus cereus (以下セレウス) は、グラム陽性通性嫌気性の芽胞形成桿菌で、べん毛を持ち運動性を有する。土壌や河川などの自然環境¹⁾から、食品、飼料、家畜の腸管内に至るまで広く分布し、健康者の糞便からも検出されることがある。

発育可能温度は 5 から 50 、至適温度は、28 から 35 である。耐熱性の芽胞は、100 、30 分の加熱でも完全に死滅しない。加熱中に生き残った芽胞が、冷却後の食品内で発芽増殖し食中毒を引き起こすことがある。わが国では 1983 年から食中毒菌として統計が取られている²⁾。

セレウス菌食中毒は下痢型と嘔吐型の 2 つのタイプがあり、前者はエンテロトキシン、後者は cereulide (セレウリド) という毒素により発症する³⁻⁶⁾。下痢型食中毒は、食品に付着したエンテロトキシン産生性セレウスが腸管内で増殖し、エンテロトキシンを産生することで発症する生体内毒素型食中毒である。一方、嘔吐型の食中毒は、催吐性セレウスが食品内で産生したセレウリドを摂取することで発症する食品内毒素型食中毒である。

セレウリドは、分子量 1、165 の環状デプシペプチドである。産生至適温度は 25 から 30 であり、126 、90 分の加熱や pH2 または pH12 の強酸・強塩基およびトリプシンなどのタンパク分解酵素にも耐性を示す⁷⁾。催吐性セレウスによる食中毒の原因食は、焼き飯、ピラフ、パスタ、麺類、豆腐、弁当などの作り置きのものが

多く、とくに米飯の関与が多い。潜伏期間は 30 分から 6 時間で、悪心、嘔吐で発症する。

米飯を主食とするわが国のセレウス食中毒は嘔吐型が圧倒的に多く、平成 20 年大阪府において、離乳食を食べた幼児が催吐性セレウス食中毒による国内初の死亡例となったように、致命的にもなりうる食中毒菌である⁸⁾。しかしながら、自然界では催吐性セレウスが検出されることはほとんどなく、常在セレウスとの鑑別測定が重要であり、迅速、簡便かつ正確性に優れた催吐性セレウスおよびセレウリドの検出方法が求められている。

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

食品中のセレウリド産生菌の定量にはリアルタイム PCR 法は好適だが、嘔吐毒素であるセレウリド自体を検出することはできない。セレウリド検出には、HEp-2 細胞空胞変性試験が一般的であるが、熟練した技術が必要であり、結果を得るためには 4 日ほど要するため、簡便かつ迅速な検出法が望まれている。そこでセレウリドの検出法として HPLC の利用を検討した。HPLC の主な利点は検出にかかる時間が通常数分～数十分と短く、導入済みの検査機関が多く汎用性の高い機器である。また LC-MS に比べて比較的安価であり、メンテナンスの手間も少ないことがあげられる。本研究は迅速かつ簡便なセ

レウリド検出法としてHPLCの適用の可否について再度検討することを目的とした。

B. 材料および方法

1. 使用菌株

リアルタイム定量 PCR 法確立のための実験に、臨床分離した催吐性セレウス 03-137-1、BC1(+)、06-81-16-1、335-11、以上4株と、セレウリド非産生セレウス 09-112-7、BC1 (-)、08-151-3、08-151-4、S0932F-1、09-59-1、09-80-9、09-75-22、以上8株、総計12株を供試した。

米飯中における催吐性セレウスの菌数、芽胞数、セレウリド量の経時変化について調べるための実験に、催吐性セレウス 03-137-1 株を供試した。

セレウリド検出のための新規バイオアッセイ法の検討に、セレウリド産生菌株として催吐性セレウス BC1 (+) 株を用いた。指標菌として、セレウリド非産生セレウス 09-112-7、08-151-3、08-151-4、S0932F-1、09-59-1、09-80-9、09-75-22、以上7株、バリノマイシン感受性菌である *Enterococcus hirae*、*Enterobacter cloacae*、*Micorococcus luteus*、*Candida albicans*、以上4株、セレウス類縁菌である *Geobacillus stearothermophilus*、*Geobacillus thermoglucosidasius*、*Bacillus sporothermodurans*、*Bacillus coagulans*、納豆菌標準株 MI、TA、NA、市販納豆より分離した納豆菌 OK、NI、以上9株、バリノマイシン非感受性菌である *Escherichia coli* DH5、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、15分) した。

・精製セレウリド溶液: 精製セレウリド (バイオコントロール研究所、1 mg 当量/ml) を 70%メタノールで 100、50、5 ppm に調製しスタンダードとして用いた。

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

・バリノマイシン溶液: バリノマイシン (和光純薬工業) 10 mg を 75%メタノール 10 ml に溶解した。

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

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

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

3. 実験機材

・HPLC カラム：Inertsil® ODS-4 (4.6 x 250 mm、5 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。

・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。

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

3. 方法

リアルタイム定量 PCR 法：セレウス総数は 16S rRNA により検出を行い、催吐性セレウスの検出はセレウリド合成酵素 (CRS) 遺伝子により検出を行った (表 1)。

PCR 反応液は SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を用いた。

また、予備試験として 16S rRNA の PCR 反応液の検討を行った。すなわち、DNA サンプルを含む PCR 反応液に 5%ジメチルスルホキシド (DMSO)、8%DMSO、8%グリセロール、5%DMSO+5%グリセロール、8%ホルムアミドをそれぞれ加え、PCR 反応後の融解曲線を比較することに

より最適な反応液組成を検討した。その結果、16S rRNA の PCR 反応液には 5%DMSO を添加することとした。

16S rRNA 検出用 PCR 反応液 (1 反応あたり) の組成は以下のとおりである。

SYBR Premix Ex Taq (2×) 10 μl、16S rRNA_SYBR_Forward Primer (15μM)

0.4μl、16S rRNA_SYBR_Reverse Primer (15μM) 0.4 μl、ROX Reference Dye (50×) 0.4 μl、DMSO 1.0 μl、PCR 用滅菌水 6.8 μl、テンプレート 1.0 μl。

CRS 遺伝子検出用 PCR 反応液 (1 反応あたり) の組成は、SYBR Premix Ex Taq (2×) 10 μl、crs_SYBR_Forward Primer (15μM) 0.4 μl、crs_SYBR_Reverse Primer (15μM) 0.4 μl、ROX Reference Dye (50×) 0.4 μl、PCR 用滅菌水 7.8 μl、テンプレート 1.0 μl からなる。

上記の試薬を混合し、96 ウェルプレートに 19 μl ずつ分注した。各ウェルに 1.0 μl DNA 溶液を添加し、シールし、コンプレッションマットを置き、遠心機で軽く遠心した。計測は ABI 7000 Real-time PCR System による PCR 反応ならびに蛍光検出により行った。PCR 反応は、初期変性 95 °C 1 分、1 サイクル、PCR 反応 95 °C 5 秒、66 °C 31 秒、40 サイクルとし、融解曲線解析は 95 °C 15 秒、60 °C 1 分、95 °C 15 秒、1 サイクルで行った。

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

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

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

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 μ l を HPLC サンプルとした。したがって添加サンプルの最終セレウリド濃度は 20 ppm である。

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

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 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 μ l に溶解後、水 250 μ l を加えよく攪拌し、全量を 500 μ l とした。

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 μ l を HPLC サンプルとした。

・細胞培養・継代：HEp-2 細胞を 10 % FBS EMEM または DMEM で 25 cm² のフラスコにフルシートになるまで培養した。フルシート後は PBS で洗浄し、トリプシン処理した後 3 倍に希釈して継代した。

・HEp-2 細胞空胞変性試験：PBS を用いて、セレウス培養上清の 2 倍段階希釈系列を 96 ウェルのタイタープレートに作った。トリプシン処理したフルシートの HEp-2 細胞を空胞化試験用 EMEM 10 ml で懸濁し、各ウェルに 100 μ l ずつ加え、CO₂ インキュベータで 48 時間培養した。その後

上清を除き、細胞をメタノール固定後、10 %ギムザ液で細胞を染色し、位相差顕微鏡で空胞を観察した。

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

・菌数測定：スパイラルプレーター (IUL instrument) の D mode を用いて、スパイラルプレーティング法により Colony forming unit (CFU) として菌数を測定した。

C . 結果

1 . 16S rRNA ・ CRS 遺伝子の検量線

セレウリド産生性の 03-137-1 株では、いずれの濃度においても 16S rRNA、CRS 遺伝子が検出された。両遺伝子において検量線の決定定数 R^2 は 0.99 以上となった。増幅効率は $E=10^{(-1/\text{slope})}-1$ より求められ、両遺伝子においてほぼ 100 %であった。

セレウリド非産生株 09-112-7 では、いずれの濃度においても、16S rRNA が検出されたが CRS 遺伝子は検出されなかった。09-112-7 株の 16S rRNA も検量線の決定定

数 R^2 は 0.99 以上であり、増幅効率はほぼ 100 %であった。

2 . セレウス総数と催吐性セレウス検出の特異性

セレウス 12 株すべてにおいて、16S rRNA が検出された。また CRS 遺伝子は 12 株中 6 株が陽性となり、*Bacillus cereus* PCR detection kit (タカラバイオ)を用いた通常の PCR と同じ結果となった。

03-137-1 株と 09-112-7 株の混合 DNA サンプルにおいて、16S rRNA プライマーによる測定値は 03-137-1 株と 09-112-7 株を合計したセレウス総数の値を示していた。CRS 遺伝子は、CRS 遺伝子保有菌株である 03-137-1 株の菌数と相関を持って推移していた。

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

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

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

収率が 92.7%と最も高かった。この結果に基づき、その後の実験においては限外濾過膜 10K と抽出時のアセトニトリル濃度を 80%とした。

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

次に、セレウスを接種培養した米飯からの検出を検討した。生菌数は 24 時間の時点では対数増殖途中だが、48 時間では定常期に達しており、72 時間においても定常期を維持していた。24 時間までの米飯サンプルにおいては HPLC 法、空胞変性試験共にセレウリドを検出できなかったが、48 時間、72 時間培養サンプルからはセレウリドの検出が見られた (表 5)。また培養 48 時間目から 72 時間までは経時的にセレウリド量が増加した。この時、セレウリドのピークは米飯や菌による妨害ピークと分離していた。

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

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

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

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

セレウリド本体を HPLC-UV 検出系で測定できる濃度を推定するために、セレウリドと構造のよく似たバリノマイシンを東洋食品工業短期大学の LC-MS で測定し

た。測定に使用したバリノマイシンは 380 ppm であり、UV 検出器でピークを確認することが出来た。バリノマイシンは検出波長 226 nm に比べ、214 nm の方が吸収は大きく、ピーク形状も鋭角であった（図 9）。このピークのマススペクトル（図 10）はバリノマイシン特異的であった。380 ppm のバリノマイシンは UV で検出できたが、供試可能な濃度の合成セレウリドでは UV 吸収によるピークの確認は不可能であった。

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

3. セレウス接種米飯および炒飯からのセレウリド検出の試み

合成セレウリドが空胞変性を起こす希釈倍率から算出した有効濃度は 5 ng/ml であり、これをもとにバイオコントロール社の精製セレウリド（1 mg/ml）を用いて空胞変性試験を行ったところ、空胞

変性が観察できる最終希釈倍率が 29 であったことから、同製品に含まれていたセレウリド量は 2.5 µg/ml と判断された。すなわち、表示濃度に比べて実際の力価は極めて低かった。同社が販売を中止したこともあり以後の実験は合成セレウリドによった。

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

D. 考察

DNA 抽出試薬の選定と PCR 至適条件の検討の結果、リアルタイム PCR 法により米飯中のセレウス総菌数と催吐性セレウスを定量的に鑑別測定することが可能になった。

PCR 条件を至適化することで、03-137-1 株では 16S rRNA および CRS 遺伝子が検出され、09-112-7 株では 16S rRNA のみが検出され、検出限界は 10^2 cfu/g 以上であった。両遺伝子において決定係数 0.9 以

上、増幅効率ほぼ 100%の直線的な検量線を得ることができた。

セレウス 12 株を用いてリアルタイム PCR を行い、反応系の特異性について検討した。その結果、16S rRNA についてはセレウス 12 株すべてが陽性でありすべてのセレウスを検出することができ、陰性対照で用いた大腸菌は陰性であった。CRS 遺伝子についてはセレウス 12 株中 6 株が陽性であった。この結果は、*Bacillus cereus* PCR detection kit を用いたコンベンショナルな PCR 法で検出した結果と一致しており、セレウス CRS 遺伝子保有株を特異的に検出できることが示された。

CRS 遺伝子陰性のセレウス 09-112-7 株と陽性の 03-137-1 株から抽出した DNA を混合し、PCR 反応に影響しないか検討した。その結果、平板培養法にて算出した生菌数と、CRS 遺伝子用プライマーを用いて定量した CRS 遺伝子保有株の菌数ならびに 16S rRNA 用プライマーで定量した 2 つの菌株の総数には、高い相関性が認められた。

新たなセレウリド検出法として、セレウリド感受性を示す菌株を用いたバイオアッセイ法の開発を検討した。セレウリド感受性を示す菌株の探索では、いくつかの感受性株を発見した。その中で *B. sporothermodurans* は培養上清試料と精製セレウリドのいずれに対しても感受性であり、この菌株を指標菌としてさらに検討を進めた。

B. sporothermodurans を培養する TSA 重層培地に KCl を添加することによって、

精製セレウリドの抗菌活性が増加することを見出した。これは培地中にカリウムを添加することで、セレウリドのカリウムイオノホアとしての作用が発揮され菌の増殖を阻止したと考えられる。

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

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

発想を変えて、セレウリド自体ではなくセレウリド産生に同期して生じる UV 吸収性の代替物質を HPLC により測定することでセレウリド汚染の指標とできないか検討した。合成セレウリドや精製セレウリド試料に含まれていてセレウリド本体と誤認してしまっていた UV 吸収ピークは、セレウスを接種して培養した米飯試料においても観察できたことから、代替指標となる可能性を期待した。すなわちセレウリドには UV 吸収がみられないが、前駆体あるいは類縁体に UV 吸収能があり、検

出器にピークとして現れている可能性も考えられる。

E . 文献

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

- 2006, 260: 232-40 .
- 11) Priha O, K Hallamaa, M Saarela, L Raaska: Detection of *Bacillus cereus* group bacteria from cardboard and paper with real-time PCR . *J Ind Microbiol Biotechnol* 2004, 31: 161-9 .
- 12) Martínez-Blanch J, G Sánchez, E Garay, R Aznar: Evaluation of a real-time PCR assay for the detection and quantification of *Bacillus cereus* group spores in food . *J Food Prot* . 2010, 73: 1480-5 .
- 13) Fricker M, U Messelhauser, U Busch, S Scherer, M Ehling-Schulz: Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks . *Appl Environ Microbiol* 2007, 73: 1892-8 .
- 14) Lucking G, MK Dommel, S Scherer, A Fouet, M Ehling-Schulz: Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR . *Microbiology* 2009, 155: 922-31 .
- 15) Haggblom MM, C Apetroaie, MA Andersson, MS Salkinoja-Salonen : Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions . *Appl Environ Microbiol* 2002 68: 2479-83 .
- 16) 川村久美子、平間佑美、安形則雄、伊藤秀郎、太田美智男: High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry を用いた *Bacillus cereus* セレウリド(嘔吐毒)検出法の検討、*日本臨床微生物学雑誌* 2005、15: 68-76 .
- 17) Biesta-Peters EG, MW Reij, RH Blaauw, PH In 't Veld, A Rajkovic, M Ehling-Schulz, T Abee : Quantification of the emetic toxin cereulide in food products by liquid chromatography-mass spectrometry using synthetic cereulide as a standard . *Appl Environ Microbiol* 2010, 76: 7466-72 .
- 18) Agata N, M Mori, M Ohta, S Suwan, I Ohtani, M Isobe: A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells . *FEMS Microbiol Lett* . 1994、121: 31-4 .
- 19) 古瀬昭夫、牛嶋正、鶴田元子、又吉由紀子、大塚博史: セレウス菌による集団食中毒 . *小児感染免疫* . 2004、16: 151-5 .
- 20) Rajkovic A, M Uyttendaele, A Vermeulen, M Andjelkovic, I Fitz-James, P Veld, et al . Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide . *Lett Appl Microbiol* . 2008, 46: 536-41 .
- 21) Tempelaars M, S Rodrigues, T

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

厚生労働科学研究補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業
食品中の毒素産生微生物および試験法に関する研究
平成22 - 25年度
分担研究報告書

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

株式会社カイノス

宇治家 武史

厚生労働省科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

「食品中の毒素産生微生物及び毒素の直接試験法の研究」

平成23 - 25年度 分担研究報告書

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

分担研究者 宇治家武史 株式会社カイノス 開発研究部 課長

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

セレウリド産生菌を特異的に検出するために、セレウリド合成酵素遺伝子を含む *ces* オペロンのポリシストロニック mRNA を標的核酸とした。また、検出法の汎用性を高めるため、専用機器や高額な機器を必要としない Nucleic Acid Sequence-based Amplification (NASBA) -核酸クロマト法を遺伝子検出法として採用した。NASBA 法及び核酸クロマト法に最適化させたプライマーやプローブは、標的核酸の合成 RNA (10 コピー) を僅か 10 分の増幅時間で検出する能力を示した。またセレウリド産生セレウスは 10^4 cfu/g の感度で特異的に検出された。セレウス食中毒の事例食品は入手困難だったため、食品試料からのセレウリド産生セレウスの検出は、食品試料への菌接種試験で確認した。菌を接種する食品は、厚生労働省の食中毒一覧（2008-2011 年）を参照し、米飯やチャーハンを含む 5 種を用いた。これら食品への菌接種試験の結果、本検出法は全 5 種食品に対して 10^4 cfu/g の感度でセレウリド産生セレウスを検出した。この感度は、セレウリド食中毒の発症菌量とされる 10^5 cfu/g よりも 10 倍高かった。以上の研究成果を基に、スイフトジーン セレウリド産生セレウス「カイノス」という製品名で平成 25 年 8 月 1 日より販売を開始した。

A . 研究目的

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

セレウス (*Bacillus cereus*) は、土壌や河川などに広く分布しており食品の汚染機会が多いため食材や食品の製造過程から完全に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。

セレウリドを食材から簡便に検出する

方法がない現状では、セレウリド産生セレウスの検出が、本菌による食中毒の予防に有用な手段と考えられる。セレウリド産生セレウスを検出する方法として、これまでに PCR 法やイムノクロマト法が開発されているが、いずれも食材からの検出には前培養が必要であり、結果判定は翌日まで待つ必要がある。

ウエルシュ菌食中毒の発症には、 10^6 cfu/g 以上の CPE 産生性ウエルシュ菌の生菌で汚染された食品の喫食が必要である。即ち、喫食される前に大規模調理施設で製造された食品から CPE 産生性ウエルシュ菌の生菌を検出できれば、大規模食中毒発生の防止に繋がる可能性がある。そこで、カレーやシチューなどの煮込み料理に含まれる CPE 産生性ウエルシュ菌 (10^6 cfu/g) の生菌を、培養することなく迅速かつ簡便に検出する遺伝子検出法の開発を行った。そこで、前培養を経ることなく、食品中の CPE 産生ウエルシュ菌およびセレウリド産生セレウス菌を迅速かつ簡便に検出する遺伝子検出法を構築し、食中毒事件の原因調査のみならずセレウス食中毒予防へ繋げることを目標に研究を行った。

B . 実験方法

1) 菌株

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

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

セレウリド産生セレウス株としては、Type strain No.13 株を使用した。セレウリド非産生株としては、09-75-22 株（大阪府立大の西川先生より供与）を使用した。

2) 培地と菌培養

ウエルシュ菌の培養について、0.2 g のチオグリコレート (TGC) 培地に 10 ml の水を加え、オートクレーブ (121 °C、20 分) したものを液体培地とした。寒天培地は、CW 寒天培地 (栄研化学株式会社) に卵黄液を加えたものを用いた。

TGC 培地にウエルシュ菌を接種し、37 °C ウォーターバスで培養した。ウエルシュ菌培養液の濁度は、DU640 (ベックマン・コールター株式会社) を用い、OD₆₀₀ の値を計測した。本検討では、培養液濁度として 0.3-0.5 Abs のウエルシュ菌を用いた。

セレウス菌の培養について、Brain Heart Infusion (BHI, ベクトン・ディッキンソン社) 培地を用いた。BHI 培地にセレウス菌を接種し、37 °C ウォーターバスで培養した。ウエルシュ菌培養液の濁度は、DU640 (ベックマン・コールター株式会社) を用い、OD₆₀₀ の値を計測した。本検討では、培養液濁度として 0.3-0.5 Abs のセレウス菌を用いた。

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

核酸増幅法である NASBA 法の試薬には、NASBA Amplification キット (株式会社カイノス) を使用した。NASBA 試薬に 55 µL の NASBA 溶解液を加え vortex で混和し、NASBA 反応溶液を調製した。NASBA 酵素試薬に 30 µL の NASBA 酵素溶解液を加え、NASBA 酵素液を調製した。NASBA 反応溶液にフォワードおよびリバースプライマーを加え反応液を調製した。

核酸増幅は以下の手順で実施した：0.5 mL チューブに反応液 5 µL と抽出核酸 2.5 µL を加え混和した後、41 °C のヒートブロックで 5 分保温した。チューブ温度の低下に注意し、ヒートブロック上で NASBA 酵素液を 2.5 µL 加え、素早く 5 回ピペティングした後、41 °C で 30 分保温した。

5) 鋳型核酸の調製

セレウリド合成酵素遺伝子は *ces* オペロンを構成しており、このポリシストロニック mRNA を標的核酸とした。性能評価のため、この *ces* オペロンを基に *in vitro* で RNA を合成した。合成 RNA のコピー数は、260nm の吸光度より算出した。

6) NASBA プライマー

標的核酸と特異性の高い配列を検索し、NASBA 用のフォワードおよびリバースプライマーを設定した。各プライマーは標的核酸とアニール可能な約 20 塩基のオリゴヌクレオチドであり、リバースプライ

マーの 5' 末端側には、T7 RNA polymerase のプロモータ配列を付加した。

6) 核酸クロマトグラフィー (核酸クロマト法)²⁾

核酸クロマト法で使用する検出ストリップには、NASBA 法で増幅したヌクレオチド鎖と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドプローブをメンブレンおよびラテックスパッド中の着色微粒子に結合させている。検出ストリップ上を NASBA 増幅産物が展開すると、これらオリゴヌクレオチドプローブと配列特異的にサンドイッチハイブリダイゼーション結合し、検出ストリップ上に着色微粒子が集積しラインとして目視で識別される。

この核酸クロマト法で NASBA 増幅産物を検出する場合は、NASBA 増幅が終了したチューブに 90 μ L の展開液を加え、検出ストリップを挿入し、NASBA 産物を展開させ、15 分後の着色ラインを目視で確認する。

7) 菌接種試験

ストマフィルターS タイプ (株式会社 GSI クレオス) に、25 g のレトルトカレーおよび 225 ml の生理食塩水を加え 10% 乳剤とした。ここに TGC 培地で培養したウエルシュ菌をレトルトカレー 1 g あたり 10^5 または 10^6 cfu で接種し、直ちに Pulsifier (Microgen Bioproducts Ltd.) で 1 分間混和した。この 10% 乳剤から 1 ml を

1.5 ml チューブに入れ、1,890 x g 以上で 1 分間遠心し、ウエルシュ菌を沈澱させた。上清を除去した沈澱に核酸抽出試薬を 400 μ l 加え、vortex で 10 秒間混和した後、90 のヒートブロックで 5 分間加熱した。加熱チューブは 1,890 x g 以上で 5 秒間遠心し上清と沈殿部に分け、上清部を抽出核酸液とした。抽出核酸液は、NASBA 増幅の試料として使用した。NASBA 増幅産物の検出には、サンドイッチハイブリダイゼーションを原理とする核酸クロマト法を用い、検出ラインの有無を目視判定した。

ストマフィルターS タイプ (株式会社 GSI クレオス) に、25g の米飯および 225mL の生理食塩水を加え 10% 乳剤とした。ここに BHI 培地で培養したセレウスを米飯 1g あたり 10^4 cfu から 10^6 cfu で接種し、直ちに Pulsifier (Microgen Bioproducts Ltd) で 1 分間混和した。この 10% 乳剤から 1mL を 1.5mL チューブに入れ、1890 G 以上で 1 分間遠心し、セレウスを沈澱させた。上清を除去した沈澱に核酸抽出試薬を 200 μ L 加え、vortex で 10 秒間混和した後、90 のヒートブロックで 5 分間加熱した。加熱チューブは 1890 G 以上で 5 秒間遠心し上清と沈殿部に分け、上清部を抽出核酸液とした。抽出核酸液は、NASBA 増幅の試料として使用した。NASBA 増幅産物の検出には、サンドイッチハイブリダイゼーションを原理とする核酸クロマト法を用い、検出ラインの

有無を目視判定した。

C . 結果と考察

1) NASBA 増幅性能

NASBA プライマーの増幅性能を確認するため、10 コピーの合成 RNA を鋳型に用い、増幅時間を 5、10、15、20 および 30 分と変え NASBA 反応を行った。NASBA 産物の検出は核酸クロマト法を用いた。その結果、10 コピーの合成 RNA であれば、10 分の増幅時間で、クロマトストリップ上にラインを検出した。しかし 10 分の増幅時間では核酸クロマトのライン強度は低く、十分なライン強度を得るためには、15 分以上の増幅が必要であった (図 1)。

増幅時間を 15 分に設定し、合成 RNA 10 コピーの増幅再現性を確かめた。5 回連続で評価した結果、全ての試験でラインが検出された。以上の結果より、本法は 15 分増幅で 10 コピーの合成 RNA を増幅する性能を有していると判断された。

2) 菌接種試験

平成 23 年度に CPE 産生ウエルシュ菌をカレー試料から直接検出する方法を開発した。この核酸抽出試液および検出手順を応用し、セレウリド産生セレウスを食品試料から直接検出する方法の構築を試みた。食品試料からのセレウリド産生菌検出試験は、セレウス食中毒の事例食品の入手が困難なため、食品試料への菌接

種試験で代用された。菌を接種する食品は、厚生労働省の食中毒一覧 (2008 年-2011 年掲載情報) から選択し、最初は米飯で確認した。米飯への菌の接種量は、米飯 1g 当たり 10^3 、 10^4 および 10^5 cfu とした。

CEP 産生ウエルシュ菌をカレー試料から検出するために開発した核酸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。

3) Internal control との共増幅系の構築

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

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

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

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

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

D . 結論

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

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

セレウス菌は土壌菌であり、食品の汚染機会も多い。しかし、セレウリドを食材から簡便に検出する方法がない現状では、セレウリド産生セレウス菌の検出が、本菌による食中毒の予防に有用な手段と考えられる。

本法は、遺伝子検出法ながらセレウリド合成酵素遺伝子を含む *ces* オペロンのポリシストロニック mRNA を標的核酸とし、NASBA-核酸クロマト法を採用したことで、専用機器や高額機器を必要とせずに、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。

これら検出法の性能を踏まえ、株式会社カイノスにおいて製品化を進め、平成24年10月1日にスイフトジーン CPE 産生ウエルシュ菌「カイノス」という製品名で上市、販売を開始した。また、本研究成果を基に、スイフトジーン セレウリド産生セレウス「カイノス」という製品名で平成25年8月1日より販売を開始した。

E . 健康危害情報

なし

F . 文献

- 1) Compton J :Nucleic acid sequence-based amplification、 Nature、 350 : 91-92 (1991)
- 2) 宇治家武史、簡便な遺伝子検査のツール「核酸クロマト法」、臨床化学 36 : 19-24 (2007)

G . 研究発表

なし

H . 学会発表

- 1) 宇治家武史、林司、山本茂貴、鎌田洋一. NASBA 核酸クロマト法を用いた新しいウエルシュ菌の検出法. 第32回日本食品微生物学会学術総会. 2011年10月.

東京.

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

- 2) 小松原英介、宇治家武史、林 司、浅野桃子、西川禎一、鎌田洋一. NASBA 核酸クロマト法によるセレウリド産生菌の簡易検出法の確立. 第34回日本食品微生物学会学術総会. 2013年10月. 東京.

I . 学知的所有権の取得状況

- 1) 特許出願
(特願 2001-189796、
特許出願日平成23年8月31日)

- 2) 実用新案取得
なし

- 3) その他

CPE 産生ウエルシュ菌の検出試薬の製品化 (平成24年10月1日上市)

製品名 : スイフトジーン CPE 産生ウエルシュ菌「カイノス」

セレウリド産生セレウスの検出試薬の製品化 (平成25年8月1日上市)

製品名 : スイフトジーンセレウリド産生セレウス「カイノス」

厚生労働科学研究補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業
食品中の毒素産生微生物および試験法に関する研究
平成23 - 25年度
分担研究報告書

ブドウ球菌新型エンテロトキシンの産生動態の解析

岩手大学 農学部

重茂 克彦

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

「食品中の毒素産生食中毒細菌及び毒素の直接試験法の研究」

平成 22 - 25 年度

分担研究報告書

新型ブドウ球菌エンテロトキシンの産生動態の解析と食品中での産生量評価

分担研究者 重茂 克彦 岩手大学農学部獣医学課程 教授

協力研究者 佐藤 明彦 岩手大学農学部
品川 邦汎 岩手大学農学部

研究要旨：黄色ブドウ球菌の産生するエンテロトキシン(SEs)は、ヒトをはじめとする霊長類に嘔吐を引き起こす、食中毒の原因毒素である。近年、多数の新型 SEs および SE 様毒素(SEIs)の存在が報告され、これらの新型 SEs の食中毒原性の解明が必要とされている。本研究では、新型 SEIs (SEG、SEI、SEIM、SEIN、および)SEIO 産生量および mRNA 発現動態の培養温度による変動を詳細に解析し、さらに食品中における産生量評価を行った。SEG、SEI、SEIM、SEIN、SEIO 遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌を BHI 培地に約 0.5×10^7 cfu/ml になるように接種し、20 および 30°C で 48 時間培養して経時的に毒素産生量と菌数動態を解析したところ、SEs の産生量は 30°C において 12 時間、24 時間および 48 時間で両菌株ともほぼ一定であったが、20 °C では 12、24、48 時間で産生総量は増加傾向を示した。このことから、SEG、SEI、SEIM、SEIN、SEIO の産生は対数増殖期に起こるが、30°C では定常期に入ると速やかに毒素産生は抑制されるのに対し、20°C においては定常期の間毒素産生は持続することにより総産生量が増加するものと考えられた。しかしながら、mRNA 動態を比較すると、20°C および 30°C 両者において対数増殖期に mRNA の発現が誘導され、定常期には mRNA コピー数が低下する傾向は同様であることが認められた。なお、スキムミルクにおける SEG、SEI、SEIM、SEIN、SEIO 産生動態も評価したが、in vitro の結果と同様に 20°C において産生総量が増加することが認められた。低温でのこれらの毒素の産生増強は普遍的な現象と考えられるが、その機構については更なる解析が必要である。

A . 研究目的

黄色ブドウ球菌は、食品内で増殖する際にエンテロトキシン (staphylococcal enterotoxins; SEs) を産生する。食品と共に、ヒトが SEs を経口的に摂取することにより、嘔吐を主徴とする毒素型食中毒を引き起こす^{1,2)}。SEs は SEA~SEE の 5 型が存在することが知られていたが、1990 年代半ば以降に新型エンテロトキシンが次々に報告され、現在では SEG~SEIX の 17 種の新型 SEs および staphylococcal enterotoxin-like toxins (SEIs) の存在が明らかになっている。特に、SEG、SEI、SEIM、SEIN および SEI0 遺伝子を保有し、かつ SEA-SEE 遺伝子を保有しない黄色ブドウ球菌による食中毒が日本各地で報告されている。本研究では、新型 SEs/SEIs の産生量を評価し、食中毒への関与を推定することを目的として、新型 SEIs (SEG、SEI、SEIM、SEIN、および)SEI0 産生量および mRNA 発現動態の培養温度による変動を詳細に解析し、さらに食品中における産生量評価を行った。

B . 実験方法

第 1 項 新型エンテロトキシンの産生動態解析と食品内産生の評価

1. 供試菌株

日本で発生した食中毒由来株 Aomori1 (*seg, sei, selm, seln, selo, selp*), Hiroshima13(*seg, sei, selm, seln, selo,*

selj, ser, ses, set)、Saga1 (*seg, sei, selm, seln, selo, selp*) および Saitama496 (*seg, sei, selm, seln, selo*) を実験に供した。黄色ブドウ球菌の継代には Difco™ Brain Heart Infusion Agar (Becton, Dickinson and Company) (BHI agar) を用いた。

2. Sandwich ELISA

固層抗体には精製 IgG 分画あるいは各 SE に対するウサギ特異抗体を使用し、検出抗体には HRP(Horseradish Peroxidase)標識特異抗体を用いた。また SEI0 検出系については、固層抗体に抗 rSEI0 ウサギ特異抗体を、検出抗体には HRP 標識ニワトリ特異抗体を用いた。標準曲線用スタンダードおよび測定サンプルの希釈には Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBO)(以下 Solution 1 と略)を用いた。検出抗体の希釈には Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2 (以下 Solution 2 と略)を用いた。ブロッキングバッファーには Starting Block™ (PBS) Blocking Buffer (PIERCE)を使用した。プレートには 96F Maxisorp White Microwell (nunc) を用いた。基質溶液には SuperSignal ELISA Femo Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) を用い、マイクロプレートリーダー (wallac 1420 ARVO MX/Light, Perkin Elmer) で発光測定を行った。

protein A の影響を除去するために

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

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

黄色ブドウ球菌 Aomori1 株および Hiroshima13 株を BHI agar で 2 回継代した後、Yeast Extract を 1% (w/w) 添加した BHI broth (1% Yeast Extract 添加 BHI broth) 5 ml に接種し seed culture を行った (37、16~18 時間、振盪培養)。培養終了後、seed culture を希釈し、初発菌量 5×10^7 cfu/ml で 1% Yeast Extract 添加 BHI broth 60 ml に接種し、20 および 30 で 48 時間の振盪培養を行なった。経時的に定量培養により菌量測定を行うと共に、培養液を採取し 14,000 rpm、20 分遠心して菌体と上清を

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

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

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

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

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

5. スキムミルクにおける *egc*-関連 SEIs 産生量の評価

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

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

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

C. 結果

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

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

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

2. スキムミルクにおける *egc* 関連 SEs/SEIs 産生量評価

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

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

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

D. 考察および結論

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

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

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

E. 健康危害情報

特になし。

F. 文献

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

G. 研究発表

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

Microbiol.64: 392-402.

H. 学会発表

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

I. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得
なし。
- 2) 実用新案取得
なし。
- 3) その他
なし

厚生労働科学研究補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業
食品中の毒素産生微生物および試験法に関する研究
平成23 - 25年度
分担研究報告書

水晶発振子マイクロバランス法によるブドウ球菌
エンテロトキシンのリアルタイム検出法開発の試み

岩手大学農学部 共同獣医学科

鎌田 洋一 重茂 克彦

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

「食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究」

分担研究報告書

水晶発振子マイクロバランス法によるブドウ球菌エンテロトキシンの
リアルタイム検出法開発の試み

分担研究者	鎌田 洋一	岩手大学農学部 共同獣医学科
	重茂 克彦	岩手大学農学部 共同獣医学科
協力研究者	佐伯 和美	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
	実川 友史	(株)アルバック 技術開発部 部長
	星野 浩美	(株)アルバック 技術開発部 主事

研究要旨：ブドウ球菌食中毒は、菌が産生するタンパク質性毒素によって嘔吐が誘起される。この毒素は Staphylococcal Enterotoxin と表記される。SE の食中毒危害物質としての特徴は、菌が増殖する際に産生されること、SE は耐熱性・耐有機溶媒性を持っており、その毒性が保持されることにある。ブドウ球菌食中毒では常に食品中に毒素の有無を検知するシステムが要望される。SE には分子多様性があり、現在まで最も多くの事例が起こっているのが SEA である。本分担研究の目的は、リアルタイムで食品中の SEA の検出を可能とする方法を確立することにある。水晶発振子マイクロバランス法を応用し、現在まで検討を継続している。溶質が非常に濃厚で、測定システムを障害しやすいことが予想される牛乳を検体とし、SEA の検出法開発を試みた。抗体の重量増加に金コロイドを標識した。予想通り金コロイド標識によりシグナルが向上した。直接法、サンドイッチ法、金コロイド標識抗体によるサンドイッチ法を比較検討した。本法は、牛乳のような、測定系を傷害する可能性のある食品においても応用可能であった。3 種の方法の検討の結果、金コロイド標識抗体のサンドイッチ法が最も感度が高く、牛乳中に 5 ng/ml の SEA を検出が可能であった。今後も感度の向上が必要と考えられた。

A．研究目的

ブドウ球菌食中毒は、食後 30 分から 6 時間(平均 3 時間)くらいで発症する嘔吐を主症状とする食中毒で、食品中に、嘔吐活性を有するタンパク質毒素、エンテロトキシン(Staphylococcal Enterotoxins; SE)を産生する^{1, 2)}。

SE がもつ際立った特徴に、タンパク質であるにもかかわらず、熱やアルコール、クロロフォルムといった有機溶媒処理でも失活しないという強固さがあるだろう。これらの耐性のうち、食品安全上もっとも重要なのは毒素の熱耐性で、100 はむろん、オートクレーブでも完全に失活しないと言われている²⁾。SE の強度の熱耐性は、食品の加熱時に毒素が失活されないという問題を引き起こす。以下、牛乳を例にとって説明する。生乳は牛より得るもので、牛の皮膚における常在細菌となっているブドウ球菌の、乳への混入は避けられない。搾乳機や人の手指についても、完全な殺菌がなされない場合、乳へのブドウ球菌の混入がある。搾乳後、通常は低温で加工場へと輸送され、所定の温度処理がなされる。この処理でブドウ球菌の菌体は死滅するものの、耐熱性の SE は牛乳内に毒性を保持したまま残存し、喫食により食中毒症状が誘発される。食品内で一度産生されれば加熱によって失活せず、人に摂取されて毒性を発揮する危険性が排除できない。SE は菌の増殖とともに産生される。食品の安全性を確保するには、原因物質の毒素そのものを検出する方が望ましい。とくに牛乳のような消費量の多い食品については、製造段階で連続的にモニタリングできる原理をもった毒素

検査法の導入が望ましい。

上述の考察から、分子間相互作用測定装置の 1 つである水晶発振子マイクロバランス(Quartz Crystal Microbalance: 以下 QCM)法³⁾が有用ではないかと考えた。図 1 に QCM 法を実施する機器と、センサー部分の模式図、およびその原理を示す。センサーに固着させた水晶の薄膜に通電すると、薄膜が一定の周波数で振動する。振動するセンサーが示す周波数は、センサーの重量に比例する。センサー部分に、たとえば抗毒素抗体を結合させておき、反応容器に毒素を加えた場合、センサー上で抗原抗体結合反応が起こる。毒素の結合により、センサーの重量が増加する。また、結合する毒素の量(反応容器中の濃度)が反応速度と比例する。図 2 に毒素を反応容器に添加した後の、抗体吸着センサーが示す周波数の変化を模式図で示した。毒素の濃度が高ければ高いほど、素早く、かつ、多量にセンサーに結合する。すなわち、毒素の濃度は反応速度(周波数が減少する速さ)と、周波数の減少の程度に比例する。

周波数は電氣的に捕捉することができる。QCM 法の利点には、操作が簡便である、検体が牛乳のような濃厚な夾雑物をたくさん含んでいても対応できるなどがあげられるが、最大の利点は、リアルタイムに測定できる、すなわち毒素が存在すれば直ちに検知できる検査法に應用できることであろう。たとえば、牛乳の製造工程の流路中に抗 SE 抗体吸着センサーを設置しておけば、エンテロトキシンが捕捉されない限り、牛乳におけるブドウ球菌食中毒の危害性を完全に制御できることとなる。また、迅速に定量測定ができ、

ブドウ球菌食中毒診断を容易にすることも可能だろう。

社会への応用性を第一義と考え、緩衝液中でなく牛乳を材料として QCM 法の確立を試みた。SE には多様性があり、クラシック(旧型) SE として A から E の 5 型が、新型 SE も多数報告されている³⁾。対象の毒素には SEA を選抜した。SEA による食中毒事例が報告されていることを選抜の理由とした。QCM 法について、センサーへの抗体の物理吸着および化学吸着、SES 添加後に、菌コロイド標識抗体を添加する方式について検討した(図 3)。

B. 実験方法

1. ブドウ球菌エンテロトキシン A

組換え SEA(rSEA)を、文献⁴⁾に従い以下の方法で調製した。大腸菌 BL 株を *pGEX-6p-1/sea* で形質転換した。同菌株を 37 でアンピシリン含有 YT 培養液にて 1 時間培養した。Isopropyl -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)を添加した後、37 にて 3 時間培養を続けた。4、5000 x g にて遠心分離を 10 分間行い、菌体を回収した。菌体ペレットを BUGBUSTER タンパク質抽出キット溶液(5 ml / g 湿菌体重量、TaKaRa)で懸濁した。懸濁液について、4、5000 x g の遠心分離を 10 分間行い、rSEA とグルタチオン-S-トランスフェラーゼの融合タンパク質を含む上清を回収した。Sepharose-Glutathione ゲル(GE Healthcare)を上清に加えた。そのゲルを塩化ナトリウム 150 mM、エチレンジアミン四酢酸、ジチオ

スレイトール 1 mM を混合させた 50mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.0)にて洗浄した。ゲル懸濁液に Precision タンパク質分解酵素(Bio-Rad)を添加し、4 で 18 時間連続的に混合しながら酵素消化を行った。ゲル懸濁液をポアサイズ 0.4 μm のメンブレンフィルター(Millex)にてろ過してゲルを除去した。回収したる液中に rSEA の生成物が含まれており、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に透析した。rSEA のタンパク質濃度はブラッドフォード法にて測定した。rSEA の純度はドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて確認した。

2. ポリクローナル抗 SEs 抗体固定化センサー

2-1 抗 SEA ポリクローナル抗体

岩手大学農学部 重茂克彦教授より、ウサギに免疫して得た抗 SEA ポリクローナル抗体の分与を受けた。同抗体は、rSEA を固定化したゲルを用いての、抗原アフィニティークロマトグラフィーにより精製されていた。

別ロットとして、rSEA を抗原としてウサギを免疫して得た抗体を購入した(フナコシ株式会社)。同ウサギの血清から、上述と同様、rSEA を固定化したゲルを用いての抗原アフィニティークロマトグラフィーによって、抗 SEA 精製抗体を得た。

2-2 ポリクローナル抗 SEA 抗体固定化センサーの作製

SAM - Kit(イニシウム)を用いて Protein G_o をセンサーに固着させた。センサーセルの金電極上をピランハ溶液(濃硫酸:過酸化水素水 = 3:1)にて洗浄した。50 μl の SAM 溶液

(1mM)を金電極上にマウントした。室温で1時間静置後、Milli Q 水にて洗浄した。洗浄後、50 μ l の N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS)/ 1-エチルジメチルプロピルカルボジイミド(EDC)溶液(50 mg/ml)を金電極上にマウントした。室温で15分間静置後、Milli Q 水にて洗浄し、すぐに50 μ l の Protein G 溶液(100ug/ml)をマウントした。室温で1時間静置後、PBS(-)にて洗浄した。この Protein G 固定化センサーセルに PBS(-)を500ul 添加し、装置にセットした。測定を開始し、Protein G 固定化センサーの振動数が安定化後、終濃度 1 ~ 10 μ g/ml となるように抗 SEA 抗体を添加し、Protein G と結合させた。Protein G を用いることにより、抗 SEA 抗体の抗原結合部位が障害なく反応液中に配向させることができる。

3. サンドイッチ法による rSEA の検出

3-1 抗 SEA 抗体の金微粒子標識

Mono-sulfo-NHS-NANOGOLD (Nanoprobes)を用いて抗 SEA 抗体を標識した。Mono-sulfo-NHS-NANOGOLD を 200ul の Milli Q 水に溶解した。また、抗 SEA 抗体を 1.2 mg/ml となるように 0.02M リン酸ナトリウム/0.15 M 塩化ナトリウム(pH8.0)溶液で調整した。同抗体溶液と添付バッファーと NANOGOLD 溶液を各 100 μ l ずつ混合した。室温で1時間反応後、4 で一晩反応させた。その後、100,000 x g の超遠心を行い、上清を捨てた。沈渣を元の溶液量に懸濁し、金コロイド標識抗体とした。同標識抗体の濃度は、400 μ g/ml と規定した。

3 - 2. 牛乳中における rSEA の検出

抗 SEA 抗体固定化センサーを QCM 装置 (イニシウム)の反応容器に装着した後、容器内に牛乳(おいしい牛乳、森永乳業)を 500 μ l 添加した。センサーの振動数が安定した後、rSEA を添加した。添加液量は 5 μ l とした。結果は SEA の終濃度で比較した。

rSEA の添加後、抗 SAE 抗体、あるいは、金コロイド標識抗 SAE 抗体を添加した。添加液量は 5 μ l とした。いずれの場合も、添加後 15 あるいは 30 分間、連続して周波数を観察した。観察結果は、装置付属のソフトウェアで比較した。

C . 結果

1. 牛乳中の SEA 検出のための QCM サンドイッチ法の検討

岩手大学重茂教授より分与を受けた抗 SEA 抗体をセンサーに化学吸着させ、rSEA 添加後、ロット 1 抗 SEA 抗体を添加し、周波数の変動を観察した。追加抗体の添加量を、0.5 から 2.0 μ g/ml へと段階的に増加させた。非 SEA 添加の状態、最大約 130Hz の非特異的な周波数の減少が見られた。10 ng/ml の SEA の添加量の場合、SEA を添加していない周波数の変動と同様の減少を示した。一方、SEA の添加量を 50 および 100 ng/ml に増加させた場合、周波数が濃度依存的に減少した。検出限界は、10 ~ 50 ng/ml にあると判断された。

2 . QCM センサーへの抗体の結合量の検討

センサーにプロテイン G を物理吸着させた効果を検討した。物理吸着においては、

SEA を添加しない状態で、非特異的な周波数の減少が見られた。抗 SEA の吸着量を変動させ、かつ、高濃度の SEA を添加し、非特異的な周波数との差を求め、1 と 10 $\mu\text{g/ml}$ の差を比較したところ、10 $\mu\text{g/ml}$ でより大きな差が認められ、今後の抗体のセンサーへの吸着濃度を、10 $\mu\text{g/ml}$ とした。

3 . QCM 法における抗 SEA サンドイッチ法による SEA 検出感度

抗 SEA 抗体のセンサーへの固着は化学吸着法を用い、センサーへの SEA 添加後の抗 SEA 抗体の添加の影響を検討した。抗体の添加量は 2 $\mu\text{g/ml}$ とした。抗体はロット 2 を用いた。図 6 にその結果を示す。5、10、および 50 ng/ml の rSEA の添加で、周波数の減少が見られた（図 6）。これら 3 条件においては、ブランクからは周波数は減少した。抗 SEA の添加後 30 分において、5 ng/ml の場合、約 20 Hz の減少が見られた。10 ng/ml では 25 Hz、50 ng/ml では 80 Hz の減少が認められた。

4 . QCM 法における金コロイド標識抗 SEA 抗体を用いての SEA 検出感度

抗 SEA 抗体に金コロイドを標識し、上記と同様のサンドイッチ法を試みた。rSEA は 5、10、および 50 ng/ml の条件を用いた。これら 3 条件で金コロイド標識の添加により、周波数の減少が見られた（図 4）。ブランクにおいても若干の周波数減少が認められた。金コロイド標識抗 SEA 抗体の添加濃度を増加させると、周波数の減少が強くなった。2 $\mu\text{g/ml}$ における添加後 15 分の周波数減少の程度を比較した。ブランクにおける周波数との差は、5 ng/ml の SEA では 80 Hz、10 ng/ml

では 90 Hz、50 ng/ml の条件では 300 Hz の周波数減少が認められた。

D . 考察と結論

過去のブドウ球菌食中毒事例の検討から、食中毒発症毒素量は、ヒト一人当たり 100 ~ 200 ng とされている³⁾。牛乳の摂取量を 200 ml と想定すると、1 ~ 2 ng/ml の SE を検出できる感度の検査法が求められる。

QCM 法においては、センサーに抗体を吸着させる方法に、抗体の疎水性結合性を利用した物理吸着法と、官能基を導入した化学吸着法がある。さらに、抗体の抗原捕捉性を向上させるため、センサーにはプロテイン G を化学結合させ、その後抗体を添加し、抗原を捕捉する結合部位を反応溶液中に配向する方法がある。SEA の検出において、物理吸着法では 50 ~ 100 ng/ml の検出感度だった。一方、プロテイン G を物理吸着させ、その後 10 $\mu\text{g/ml}$ の抗 SEA 抗体をセンサーに固着させたシステムでは、10 ~ 50 ng/ml の間に検出限界があると推定された。プロテイン G の物理吸着とその後の高濃度の抗 SEA 抗体の応用によって、検出感度の向上が見られたが、さらなる高感度が求められる。

検出感度向上のため、サンドイッチ法を検討した。サンドイッチに抗 SEA 抗体を用いた場合、5 ng/ml においてもブランク値より減少した周波数を呈した。しかしながら、その周波数の減少の程度は少なく、30 分の測定で、5 ng/ml の SEA では約 20 Hz だった。

更なる検出感度向上のため、金コロイド標識抗体の利用を試みた。QCM 法では、セン

サーに結合する物質の重量が重いほど、周波数の減少が起こる原理に基づいての発想となる。金コロイド標識抗 SEA 抗体をサンドイッチ法に適応した時、5 ng/ml の SEA 存在時に 80 Hz の周波数減少が認められ、非標識の抗体に比べ、4 倍の周波数減少が起こった。この結果は、金コロイド標識抗体の利用が、シグナルの強度増加に有効であることを示している。

結論として、金コロイド標識抗体を用いるサンドイッチ QCM 法を用いることで、牛乳中の SEA をリアルタイムで検出できる可能性が示唆された。今後更なる低濃度の SEA を検出できるように、標識する金コロイドの種類や、標識抗体の濃度等について検討を継続する。また、SEA の定量性についても検討をする必要がある。

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(2007) 食品衛生学第三版、恒星社厚生閣、東京
- 2) 重茂克彦(2008)、モダンメディア、54、23 - 26.
- 3) Sauerbrey, G. (1959) Z. Phys. 155:206.
- 4) Omoe, K. et al. (2005) FEMS Microbiol. Lett. 246:191-198.

G. 研究発表

なし。

H. 学会発表

なし。

I. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得
なし。
- 2) 実用新案取得
なし。
- 3) その他
なし。

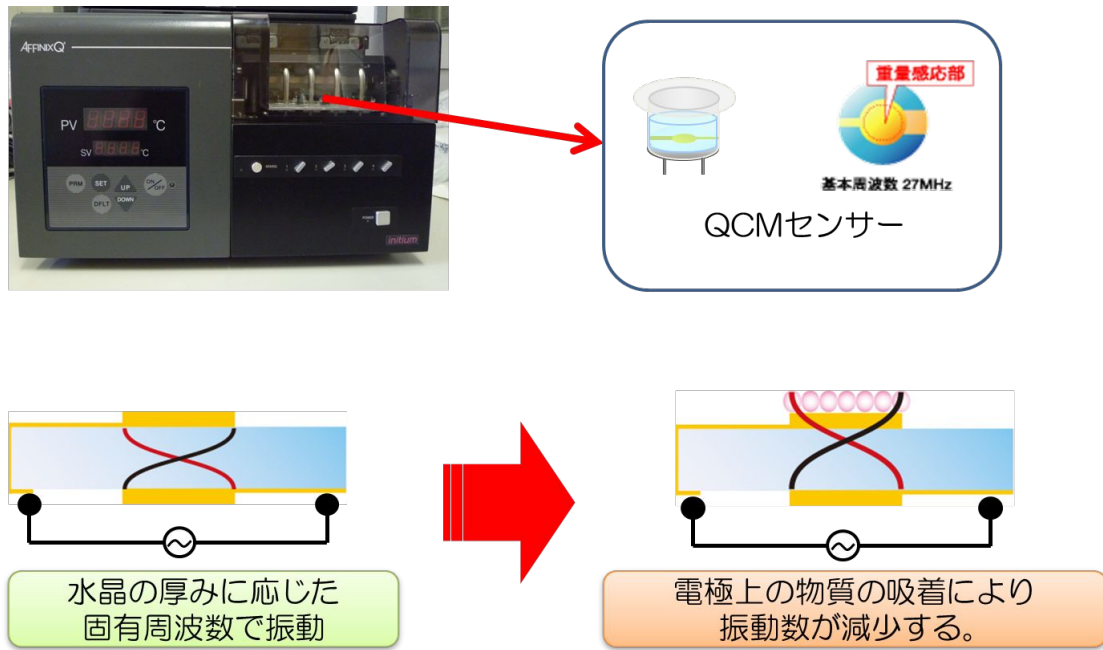


図1 水晶発振マイクロバランス（QCM）法の原理と機器

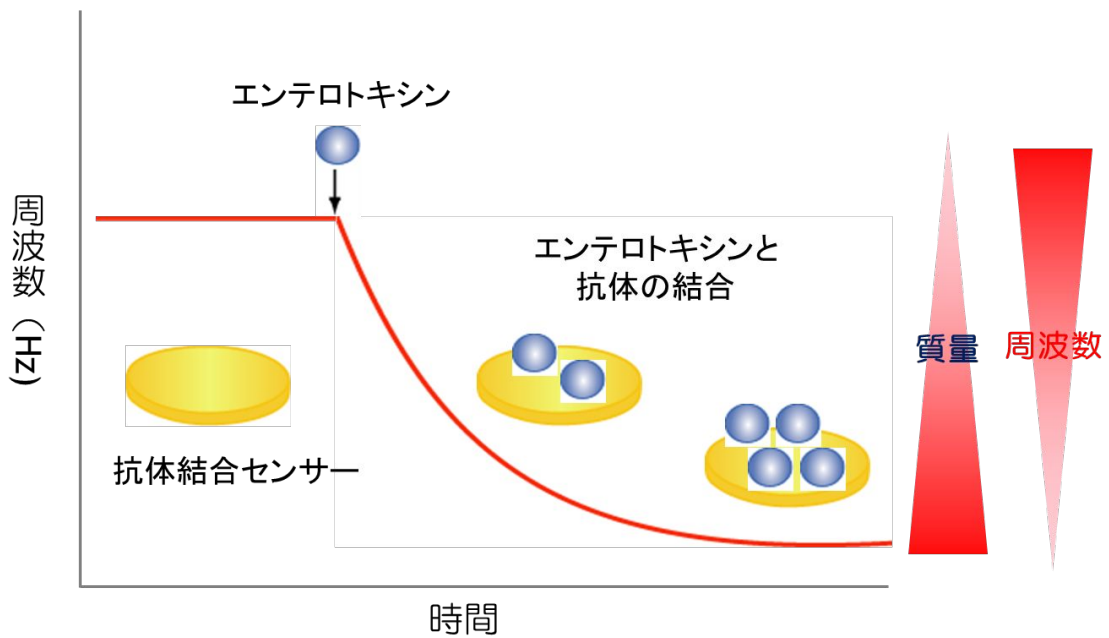


図2 ブドウ球菌エンテロトキシンの検出を目的として実施する水晶発振バランス法から得られる反応シグナルのイメージ

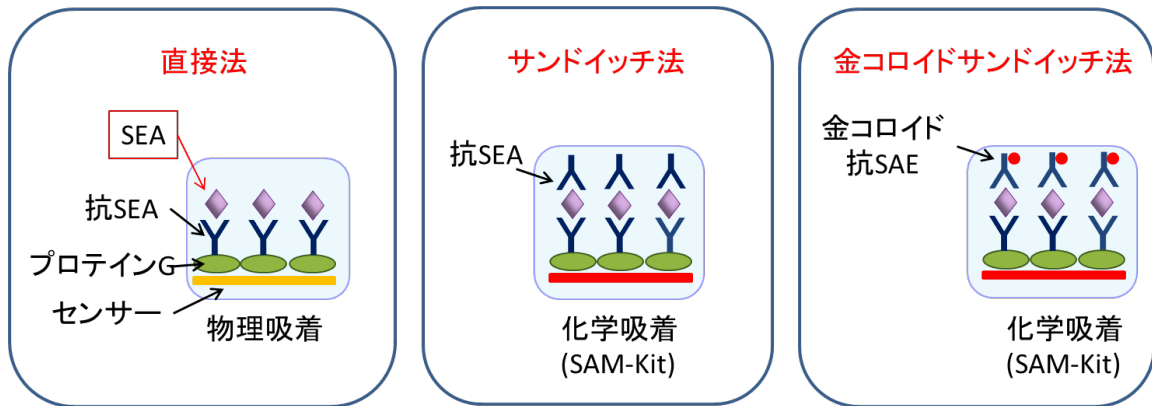


図3 QCM法の各種の反応システム

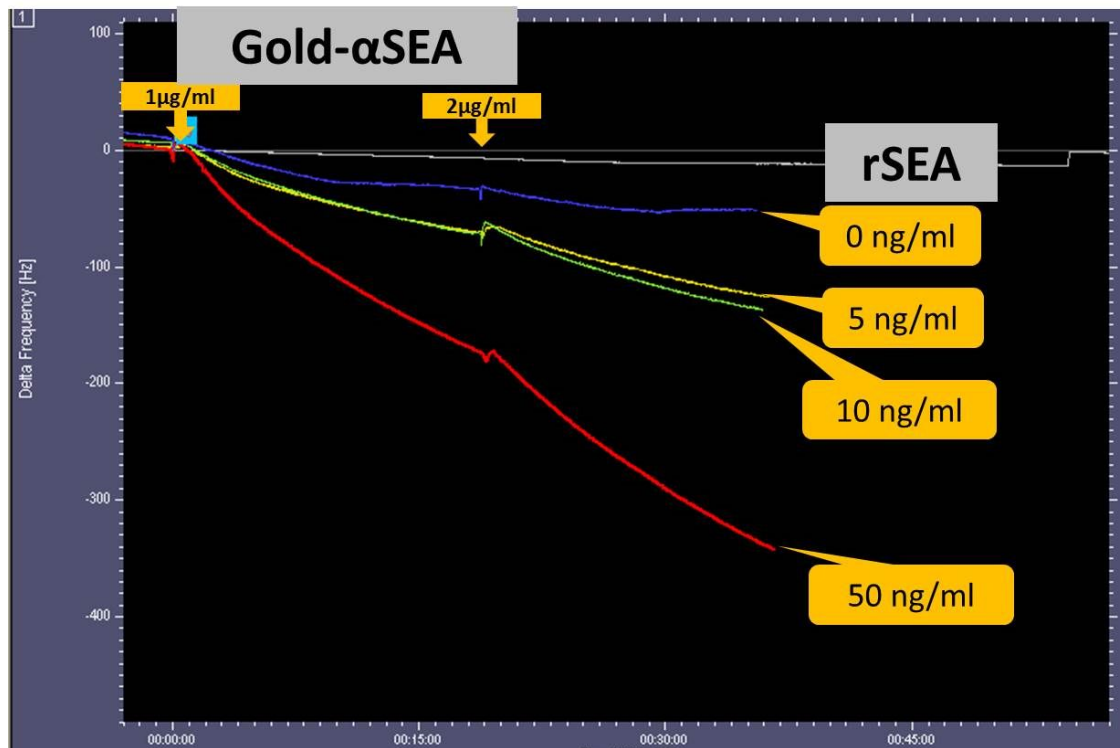


図4 金コロイド標識抗体を用いてのサンドイッチ法によるブドウ球菌エンテロトキシンを検出するQCM反応

エンテロトキシン添加後、金コロイド標識抗体を、1 および 2 μg/ml の濃度で反応容器に添加し、センサーの周波数を測定した。

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23 - 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

ウエルシュ菌食中毒発現機構の考察

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	星 英之	大阪府立大学大学院	生命環境科学研究科	准教授
	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は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。本研究ではまず、ウエルシュ菌食中毒発生時に消化管内で生じている変化を再現する *in vitro* 実験系を開発した。この系を利用すると、菌は環境中の糖の種類（代謝）、胆汁酸の量変化に対応して病原性発現を制御していることが明らかになった。特に重要な因子はグルコースとデオキシコール酸であるが、さらに消化管には未知の芽胞形成阻害因子が存在する可能性も示された。おそらく消化管内には様々な因子がウエルシュ菌の芽胞形成・毒素産生を制御していて、促進圧力と抑制圧力の量的バランスに応答して菌は病原性発現を ON/OFF していると思われた。メカニズム解析によって、デオキシコール酸は芽胞形成のマスター・レギュレーターである Spo0A の上流か、あるいは Spo0A に直接作用した結果、芽胞形成を強く誘導していることを明らかにした。加えて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も作出した。本研究で得られた知見は、人為的に消化管環境を制御することで新しいウエルシュ菌食中毒のリスク低減手法を開発することができる可能性を示唆しており、また開発した実験系や材料を基にさらに研究を推進することで、さらなる有用な知見が得られることを示している。

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¹⁾。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¹⁾。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た。それはこの過程がウエルシュ菌食中毒発症の有無を決定する最も初期の段階であると考えたからである。この段階で菌が環境中の何に反応・応答し、一連の病原性発現カスケードを開始するのかを特定できれば、食中毒発症を回避させる新規の制御法を考案できるかもしれない。このように最終的に食中毒制御法の開発を目指すために宿主と菌との情報交換の分子メカニズム解明に取り組んだ。

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 Fluid Thioglycolate Glucose (FTG) 培地で培養後、PBS で洗浄してからグルコース不含ダルベッコ MEM 培地 (DMEM) + 0.4 % soluble starch (DMEM/SS) 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 μ l 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)

24 ウェル・プレート共培養系

ヒト結腸由来細胞株 Caco-2 細胞は、10% ウシ胎児血清 (FCS) 含有 DMEM (グルコース含有) を用いて培養した (DMEM/FCS)。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 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。

トランスウェル共培養系

DMEM/FCS を用いて培養した Caco-2 細胞をトランスウェル内に播種し 5 日間培養した。タイトジャンクションが形成されると、細胞の基底膜側と管腔側とが遮断され、物質の移動が制限される。基底膜側と管腔側間に通電し、電気抵抗 (TER) が発生していることを確かめた上で、トランスウェル内に菌を接種、CO₂ インキュベーターで培養し、経時的に TER を測定した。

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 \times 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) マウス糞便抽出液中の芽胞形成阻害活性の測定

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 96 ウェル・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 μ 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 μ l/well で 96 ウェル・マイクロプレートへ加え、試験液 (DMEM/SS/DCA で希釈) を 100 μ l/well でさらに加えた後、37 で嫌氣的に静置培養した。培養後の培養液の一部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。

8) 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) 芽胞形成培地の検討

食中毒株が宿主に下痢を引き起こすた

めには、宿主体内に摂取された菌が消化管内で芽胞を形成すると共にウエルシュ菌エンテロトキシン(以下、CPE)を産生することが必要である。研究開始当初使用した *in vitro* 実験条件下(DMEM、グルコースを含む)ではウエルシュ菌は芽胞を形成せず、芽胞形成に伴い産生されることが知られる CPE 産生も見られなかった(図 1)。これは培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium、以下 DMEM)中に存在するグルコースが芽胞形成や CPE 産生を抑制しているためと思われる。ウエルシュ菌は Duncan-Strong 培地(以下、DS 培地)と呼ばれる芽胞形成培地中で高率に芽胞形成するが、この培地には糖として soluble starch(以下、starch)(表 1)や raffinose が添加される。そこで DMEM のグルコースを starch(最終濃度 0.4%)に置き換えた培地(以下、DMEM/SS)を用いたときに芽胞形成が引き起こされるか検討した。その結果、図 2 に示すように DMEM/SS を使用することによって熱処理耐性の芽胞が培養上清中に検出された。同時に培養上清中の CPE 産生も調べたところ、Western blot で確認できるほどの量ではなかったが、逆受身ラテックス凝集反応により 10 ng/ml 程度の CPE 産生が確認できた(図 2)。以上の結果、培地の糖が芽胞形成に決定的な影響を持つこと、DMEM/SS 培地を用いれば宿主細胞との共培養系でウエルシュ菌の芽胞形成を観察することが可能となることが明らかになった。

2) グルコース非存在下での食中毒株によるバリア破壊

培地中の糖をグルコースから starch に置き換えると、宿主消化管内で引き起こさせる芽胞形成が *in vitro* でも再現できることから、食中毒株のバリア破壊能を DMEM/SS 培地を用いて再評価した。その結果、通常の DMEM ではまったくバリア破壊能を示さなかった食中毒株も、starch を糖原とした場合には緩やかなバリア破壊能を示すことが明らかになった(図3)。これは、消化管内に近い環境に置かれると菌が病原性を発現し、一般に下痢原性を評価する指標に用いられるバリア破壊能を菌が獲得することを示している。すなわち食中毒株は特に環境中の糖に病原性が大きく影響を受け、ある種の糖を利用できる環境下で病原性を発揮し、バリア破壊のような宿主への侵襲性を示すようになるということが明らかになった。

3) 未知の芽胞形成・CPE 産生促進因子

上記の実験はすべて DMEM を基礎培とした結果である。一方、DS 培地を同じ共培養系の培地として用いると、より高度にウエルシュ菌の芽胞形成と CPE 産生が確認できた(図4)。これは DMEM/SS 培地には存在しない芽胞形成・CPE 産生促進因子が DS 培地には存在し、これに応答して菌は高度に芽胞形成・CPE 産生をしたと考えられる。そこでこの芽胞形成促進因子を同定するために、まず、消化管内に存在し宿主細胞と腸内細菌の相互作用に大きな役割を果たしている酪酸に注目し、酪酸が共培養系

でのウエルシュ菌芽胞形成や CPE 産生に影響を与えるのか検討した。酪酸の濃度は宿主細胞である Caco-2 細胞の生存性に影響を与えない最大濃度まで調べたが、今回得られた結果では、酪酸はウエルシュ菌の芽胞形成にも CPE 産生にも有意な影響は示さなかった(図5)。

4) 胆汁酸の芽胞形成促進作用

消化管内には様々な消化酵素や消化補助物質が供給される。その中に肝臓から分泌される胆汁酸がある。そこで胆汁酸がウエルシュ菌の芽胞形成を促進する可能性を疑いその効果を評価した。その結果、培地へ胆汁酸の一種、デオキシコール酸を添加すると、芽胞形成が数百倍に上昇することを見出した(図6)。この芽胞形成促進効果はわずか 10 μM の濃度で有意に確認でき、ウエルシュ菌がごく僅かな濃度のデオキシコール酸を認識できることが示された。このデオキシコール酸はエンテロトキシン産生も促進することも示された(図7)。

胆汁酸は幾つかの物質の混合物である。そこで胆汁酸成分それぞれの芽胞形成促進効果を比較検討した。デオキシコール酸、コール酸、ケノデオキシコール酸の順に高い誘導能を認めたが、グリココール酸、タウロコール酸は誘導能が低いことがわかった(図8)。また、エンテロトキシン産生誘導能についても、芽胞形成誘導の結果とほぼ一致した(図9)。以上の結果、ウエルシュ菌の芽胞形成・毒素産生は、グルコースによる負の制御を解除しても十分に

は発現しないが、消化管由来因子である胆汁酸の刺激により、劇的にその形成・産生が誘導されることが明らかになった。また、その効果は胆汁酸の種類により異なり、抱合型胆汁酸で誘導活性が低い、非抱合型で高い誘導能を有する傾向があること、1次胆汁酸、2次胆汁酸の違いでは明確な誘導活性の差は認められないことが明らかになった。

5) 宿主細胞の影響

本研究で開発した *in vitro* 実験系は、初めてウエルシュ菌食中毒の過程を *in vitro* で解析できる新規な実験系である(特許出願)。そこで、通常の試験管培養系とこの *in vitro* 感染系とを比較して、宿主細胞がウエルシュ菌感染に具体的にどのような影響を与えているかを調べようとした。まず、試験管培養の系ではデオキシコールの有無は芽胞形成・エンテロトキシン産生の経時的変化に大きく影響を与えなかった。一方、細胞の存在する共培養系では、デオキシコールを添加しない時の芽胞形成・エンテロトキシン産生は低く抑えられ、デオキシコールがこの抑制を解除するという結果が得られた(図10、11)。

6) DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

デオキシコール酸が芽胞形成・毒素産生を亢進させる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、3、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13)。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になった。一方 *spo0A* 遺伝子の発現レベルはデオキシコール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 *spol1AA*, *spol1AB*, *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14)。

7) 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²⁾。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³⁾。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 1 5)。阻害活性は 100,000 × g、1 時間の超遠心上清に存在し、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 1 6)。また、75℃、20 分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 1 7)。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 1 8)。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。

8)ウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子破壊株の解析

ウエルシュ菌食中毒株は培地の糖の種類に応答してバリア破壊能を発現することは既に述べた(図 3)。この結果は、培地中のグルコースを取り除くことにより芽胞形成とエンテロトキシン誘導が生じ、産生されたエンテロトキシンの作用によって Caco-2 細胞が障害を受け、結果としてバリア機能が低下したと解釈できるが、そのことを明確には証明できていなかった。バリア破壊という現象は下痢症発症につながる重要な表現形なので、何がバリア破壊を引き起こしたか明確にする必要がある。そこで、アイソジェニックなエンテロトキシン遺伝子破壊株(*cpe*(-)株)を作成して上記結果の理由を明らかにすることにした。

遺伝子破壊株の作成には市販のキットを用いた(図 1 2)。その結果、エンテロトキシン遺伝子中にイントロンが挿入された遺伝子破壊株が得られ(図 1 9)、これがエンテロトキシンを産生しないことを確認した。さらにこの破壊株に、プラスミドを介してエンテロトキシン遺伝子をトランスに相補した相補株(*cpe*(+)株)の調製も行い、これらの菌株と *in vitro* 実験系を使用することで、ウエルシュ菌感染過程におけるエンテロトキシンの影響を検討する準備を整えた(図 1 9)。

次に Caco-2 細胞への細胞傷害性について調べた。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。一方 cpe(-)株では同条件下では特に細胞が傷害される像を観察できなかった(図 20)。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 21)。

D. 考察

本厚生労働科学研究では、まず初年度に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(培地中の糖)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 starch 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 μ 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、またこれを感じ取るシステムを菌が持っていることを示している。

これらの結果を受けて最終年度には、ウエルシュ菌の胆汁酸感知システムを解明すべく、デオキシコール酸の芽胞誘導メカニズムの解明を試みた。その結果、デオキシコール酸は芽胞形成のマスター・レギュレーターである Spo0A の上流、あるいは直接 Spo0A に作用してこれを活性化、芽胞形成を促進することを明らかにした。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、糞便中に芽胞形成を阻害する活性を認めた。活性物質は分子量 10,000

以上の易熱性物質で、生体高分子がその本態と思われた。この阻害物質はマウスなど小動物の消化管内にあって、ウエルシュ菌食中毒の実験動物モデルを作成することを困難にしている可能性がある。

消化管内因子の芽胞形成・毒素産生への効果を調べたところ、少なくとも酪酸は本実験系では有意な影響を持たないことが確認された。酪酸は他の短鎖脂肪酸と共に腸管生理に重要な働きを担っており、主に大腸内の腸内フローラによって産生される。ウエルシュ菌が感染して病態を引き起こす部位は主に小腸下部と考えられており、酪酸のような脂肪酸量はこの部位ではウエルシュ菌に作用する機会は少ないのかもしれない。一方、胆汁酸は十二指腸内に分泌され、ウエルシュ菌が小腸下部に至る過程で十分暴露される。おそらくウエルシュ菌は胆汁酸を自らが宿主環境内へ侵入したことを感知するためのシグナルとして利用し、これが引き金となって下痢発症へのカスケードを開始させるものと考えられる。芽胞形成・エンテロトキシン産生を誘導するために必要なデオキシコール酸濃度はわずか数 μM で、10 μM 以上ではその効果は最大に達した(図6)。小腸内の胆汁酸濃度は一般的に0.1~数mMと考えられており、ウエルシュ菌が宿主体内で実際に胆汁酸を感知している可能性は極めて高い。また、10 μM という濃度は胆汁酸の限界ミセル濃度よりかなり低く、単にミセル形成がその効果を司っているのでは無いことが伺われる。おそらくウエルシュ菌は胆汁酸を分子として(界面活性剤の

効果としてではなく)認識する機構を持ち、これに嘔吐してグローバルな遺伝子発現調節を行うシステムを持っていると考えられる。これは、ウエルシュ菌が消化管環境を1つのnicheとして捕らえ、ここへ適応し、分化(芽胞形成)しつつ毒素産生することが、菌のライフサイクルの1つになっていることを強く示唆している。

胆汁酸の一部は肝臓で合成される際にアミノ酸により「抱合」される。また胆嚢から消化管へ分泌された後、腸内細菌の作用により修飾を受け、1次胆汁酸から2次胆汁酸へと代謝される。胆汁酸に含まれる様々な分子種について、ウエルシュ菌の芽胞形成・エンテロトキシン産生誘導効果について比較検討したところ、1次胆汁酸、2次胆汁酸による効果に大きな違いはないと思われた。しかし抱合型胆汁酸(グリココール酸、タウロコール酸)で比較的誘導効果が低く、この結果に何らかの生理的な意味があることも示唆された。この点は今後の研究によって明らかにすべき点であると考えている。

過去の研究においてウエルシュ菌の芽胞形成に影響を与える因子が種々報告されている。しかし実際にウエルシュ菌が芽胞を形成するのは消化管内で、そこには宿主細胞や宿主由来因子が存在している。にも関わらず、それら宿主由来因子の影響を調べた研究はほとんどない。本研究で開発した実験系は宿主細胞の存在下で芽胞形成を確認する新しい系であり、これまでに知られていない現象を明らかにできると考えた。まず、ウエルシュ菌の芽胞形成に

おける宿主細胞の影響について検討した。同じ培地環境中で、一方は従来法による試験管培養で、他方は宿主細胞の存在下で、両条件下の芽胞形成における違いを調べると、宿主細胞の存在下では芽胞形成が抑制されている結果を得た。しかしここへデオキシコール酸（胆汁酸）を加えると、その抑制効果が消失し、試験管培養と同等の芽胞形成が認められた。宿主細胞による抑制効果は、宿主がウエルシュ菌の芽胞形成を抑え感染による下痢発症を回避しようとしているようにも見える。そしてウエルシュ菌は、その抑制圧力から逃れるために、胆汁酸を利用した芽胞形成促進システムを獲得したと考えることもできる。

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メカニズムを解析したところ、デオキシコール酸の作用点は芽胞形成のマスター・レギュレーターである Spo0A 上流であるか、あるいは Spo0A そのものであることが示唆された。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・毒素産生に至る最初の引き金現象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ないことには、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。

トランスウェルを用いたバリア破壊実験系は一般に下痢症のモデルになると解釈されている。この実験系にウエルシュ菌を感染させると、培地中の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た(図2)。これは本バリア破壊実験系がウエルシュ菌食中毒の *in vitro* モデルとなりうることを示しているが、これだけ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い。そこで *cpe(-)*株と *cpe(+)*株を作成し、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を試みた。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と関与し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発見することも期待できる。

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) Hidenobu Hoshi and Masami Miyake. An *in vitro* model system for studying *Clostridium perfringens* type A infection. International Conference on Global Issues Influencing Human and Animal Health for ASEAN; One Health Concept. June 2011. Kohn Kaen, Thailand.
- 2) Hidenobu Hoshi, Kaori Kondo, Masataka Oda, Masahiro Nagahama, Shigeki Yamamoto, Yoichi Kamata, and Masami Miyake. An *in vitro* model system for studying *Clostridium perfringens* type A infection. IUMS2011. Sept. 2011. Sapporo, Japan.
- 3) 星 英之、近藤香織、山本茂貴、鎌田洋一、三宅眞実. ウエルシュ菌食中毒の発症メカニズムを解析するための*in vitro*実験系について. 第32回日本食品微生物学会. 2011年11月. 東京.
- 4) 星 英之、安木真世、近藤香織、門間千枝、山本茂貴、鎌田洋一、三宅眞実. 「宿主細胞との共培養系におけるウエルシュ菌エンテロトキシンの発現誘導」第 33 回日本食品微生物学会学術総会. 2012 年 10 月. 福岡
- 5) 安木真世、星 英之、山本茂貴、鎌田洋一、三宅眞実. *In vitro*感染モデルにおける *Clostridium perfringens* 食

中毒株の芽胞形成に対する胆汁酸の影響. 第 86 回日本細菌学会総会. 2013 年 3 月. 千葉

- 6) 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. Sep. 2013. Palm Beach, Australia.
- 7) 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. Sep. 2013. Palm Beach, Australia.
- 8) 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. 2014 年 3 月. 東京.

I . 知的所有権の取得情報

特許申請

三宅眞実、星 英之、安木真世、鎌田洋一「芽胞形成菌の培養方法」特願 2012-181901、平成 24 年 8 月 20 日出願

図1 芽胞形成に対する培地中の糖の重要性

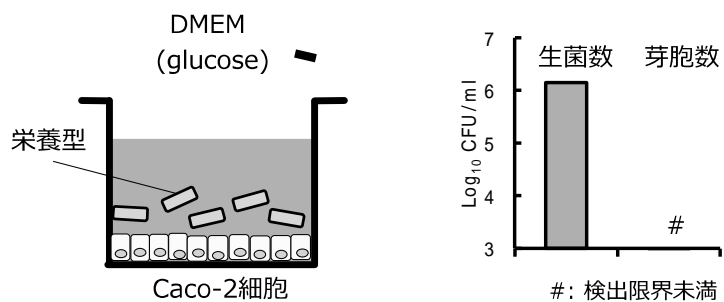


表1 DS培地の組成

Ingredient	Conc.(g/L)
Protepepe peptone	15
Yeast Extract	4
Na · thioglycolate	1.0
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	10.0
Soluble starch	4.0

図2 芽胞形成・毒素産生に対する培地中の糖の効果

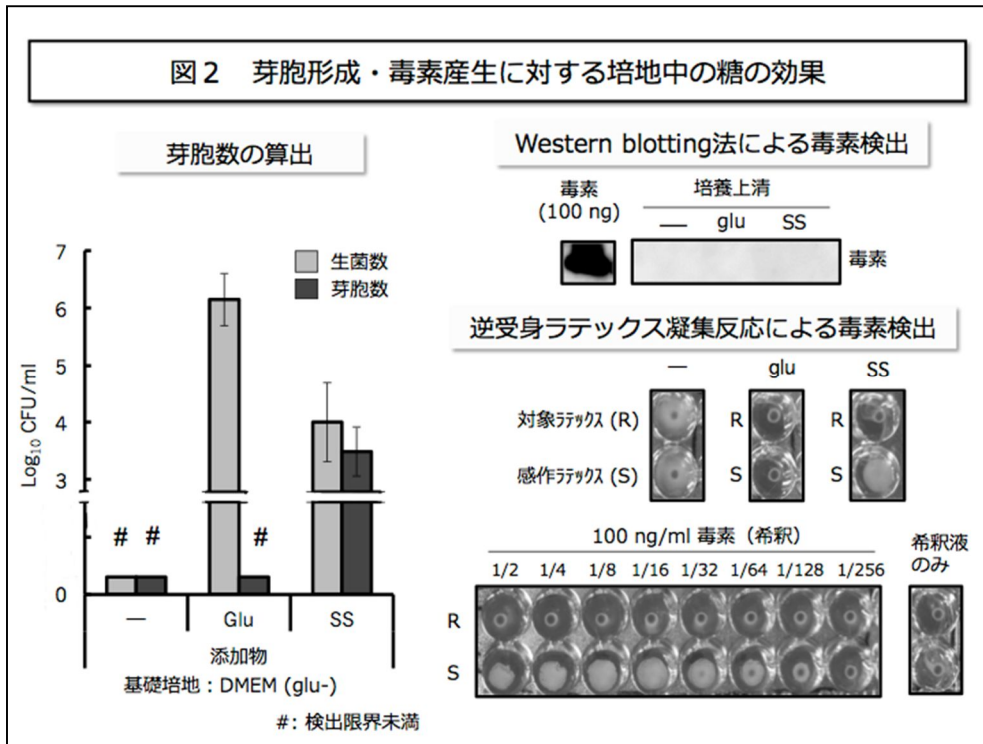


図3 Starch添加によるバリア破壊能発現

異なる培地条件によるバリア破壊能の違い

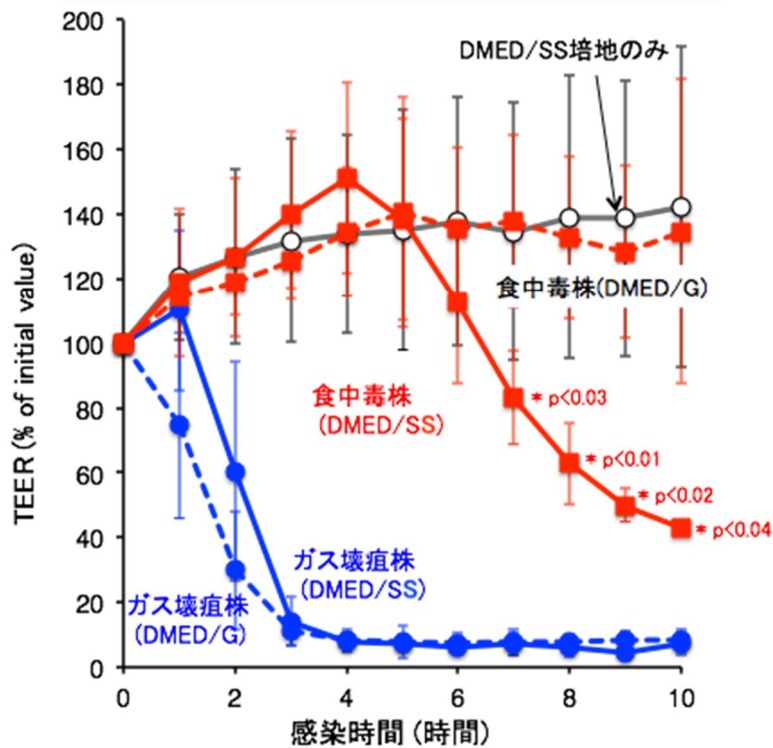


図6 デオキシコール酸添加による芽胞形成の促進

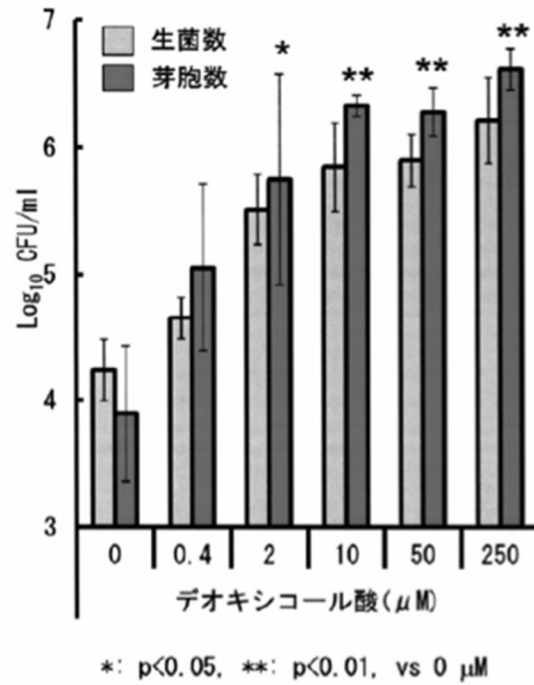


図7 デオキシコール酸添加によるエンテロトキシン産生の亢進

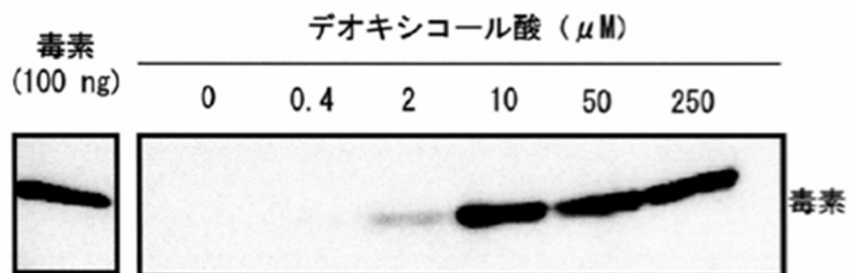


図8 各種胆汁酸の芽胞形成への影響

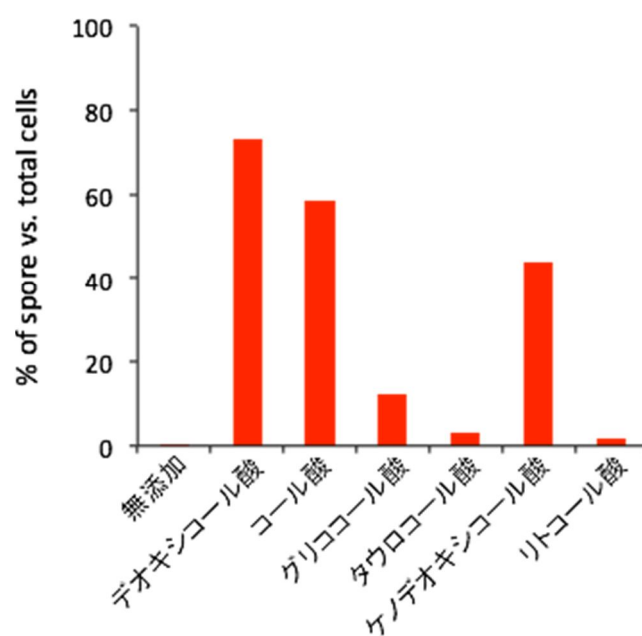


図9 各種胆汁酸の毒素産生への影響

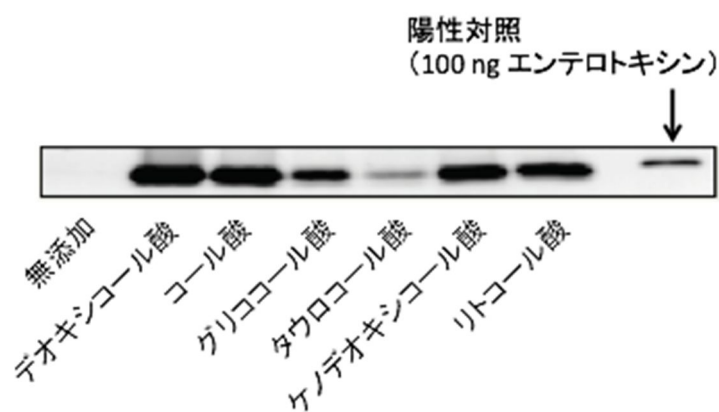


図10 宿主細胞の芽胞形成への影響

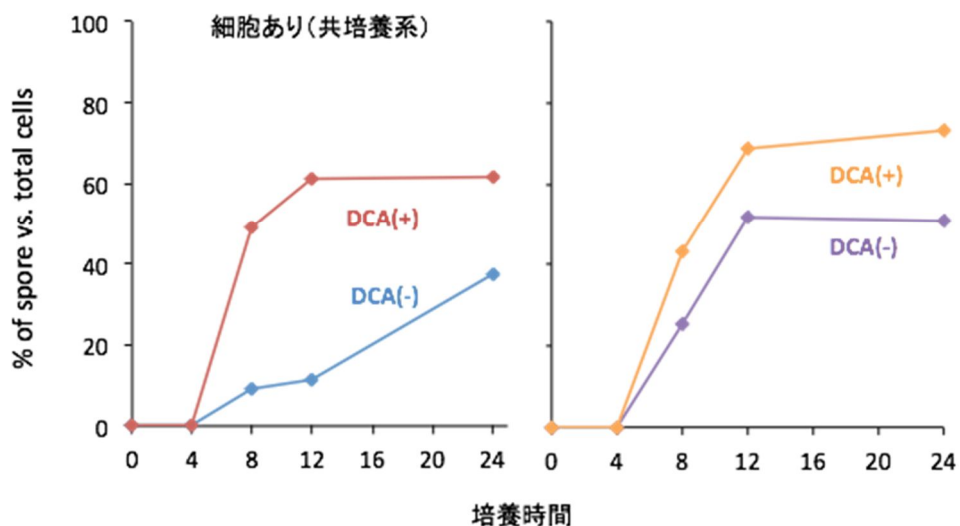


図11 宿主細胞の毒素産生への影響

—Western blotによるエンテロトキシンの検出—

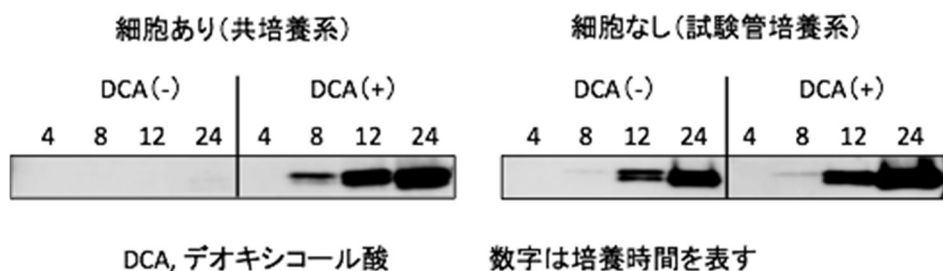


図12 Targetronを用いたCPE欠損株の作製

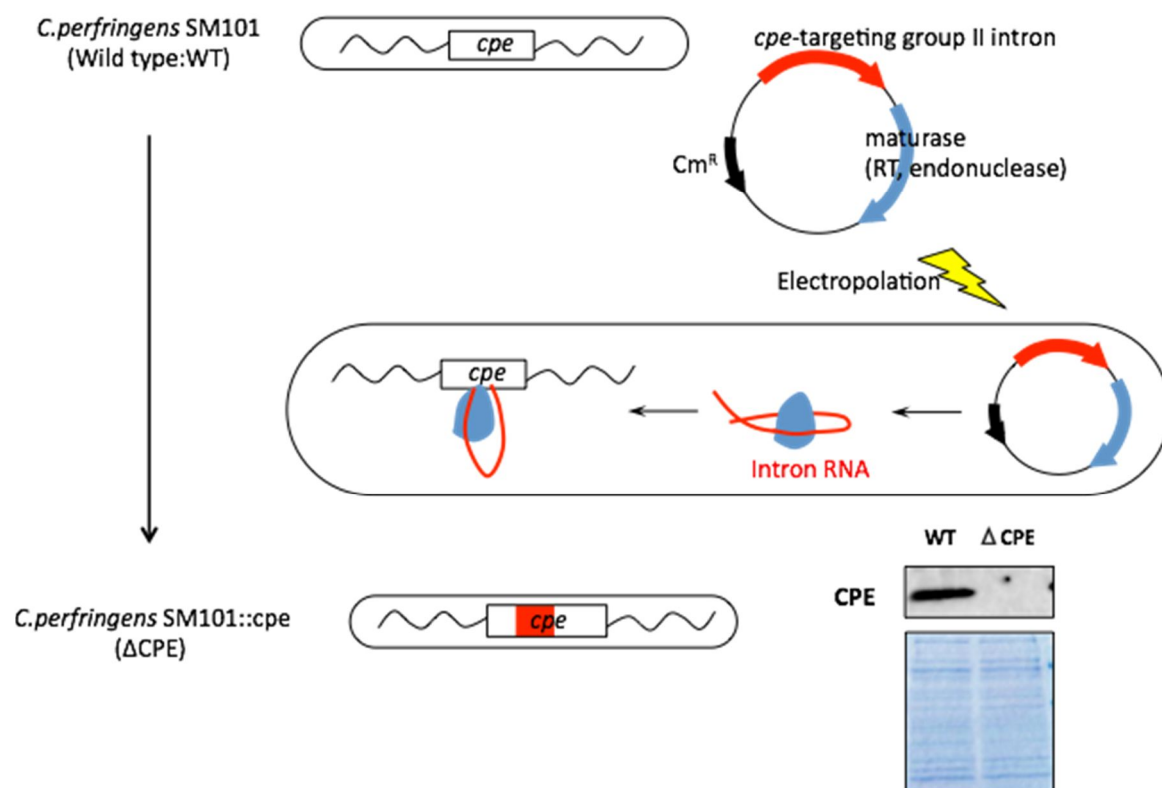
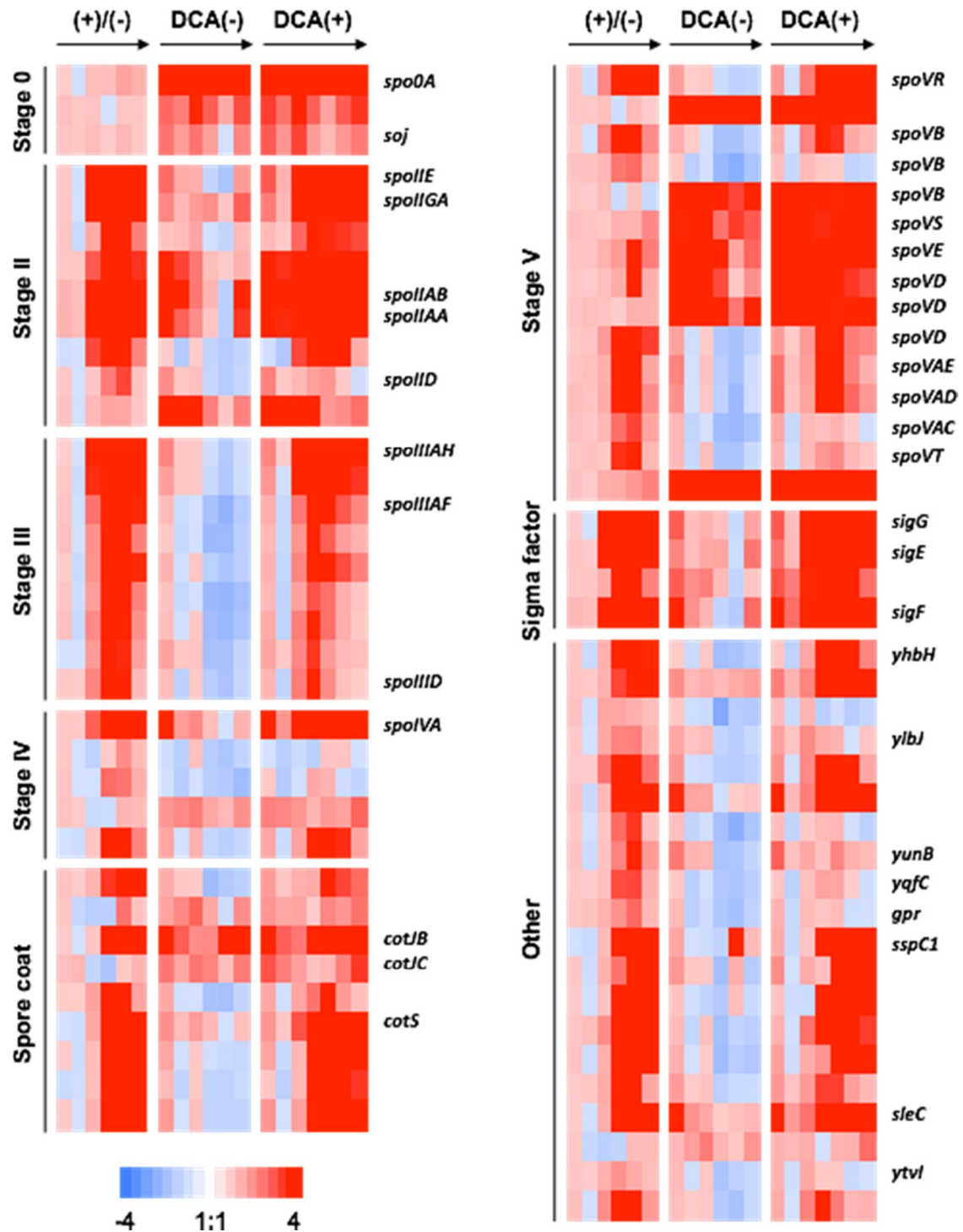
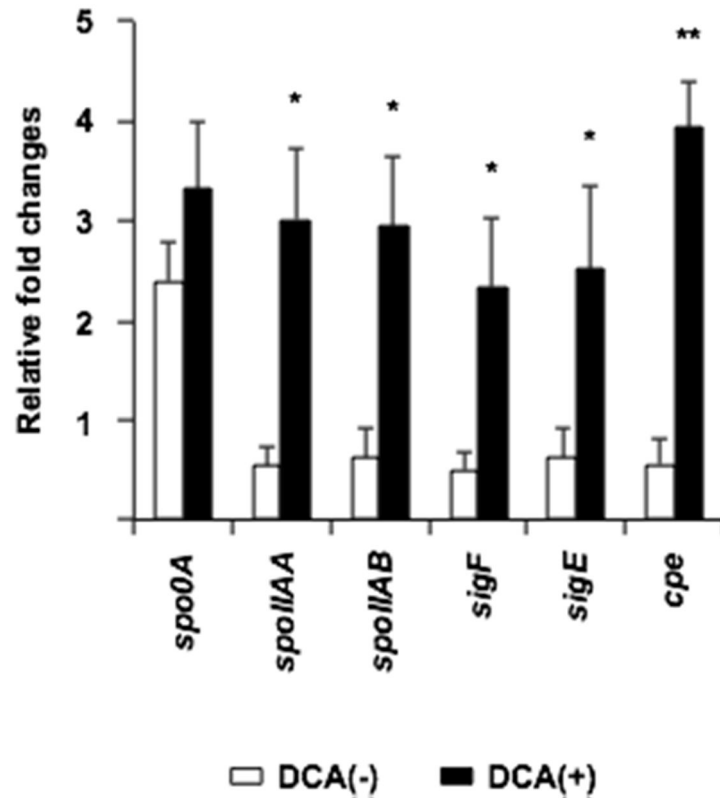


図13 DNAマイクロアレイ解析のヒートマップ



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。

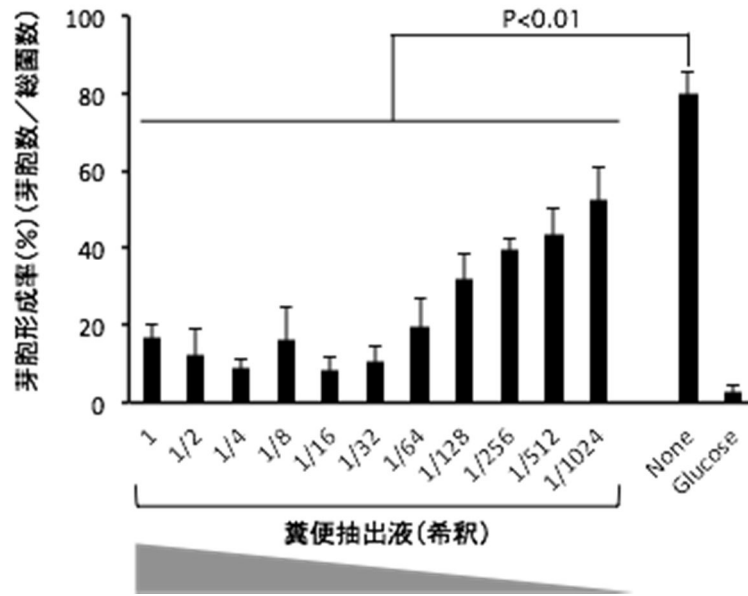
図14 q-PCRによる各遺伝子の発現量解析



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。

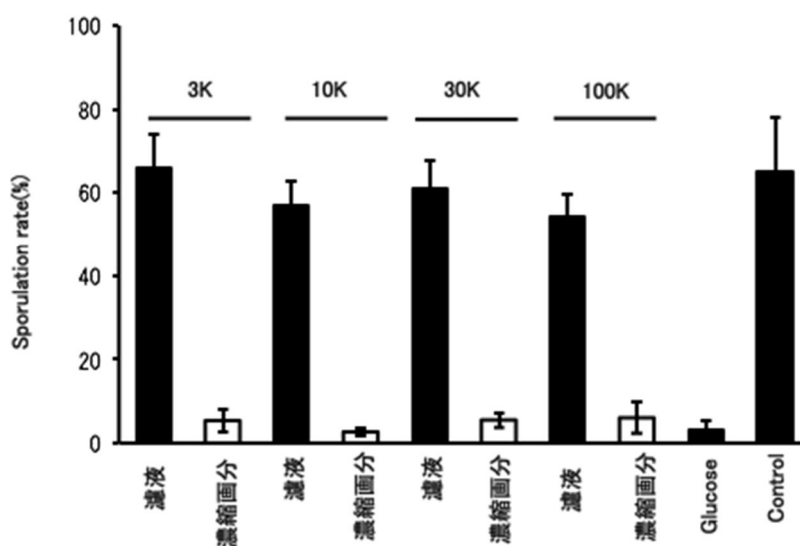
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図15 マウス糞便抽出液によるウェルシュ菌芽胞形成抑制



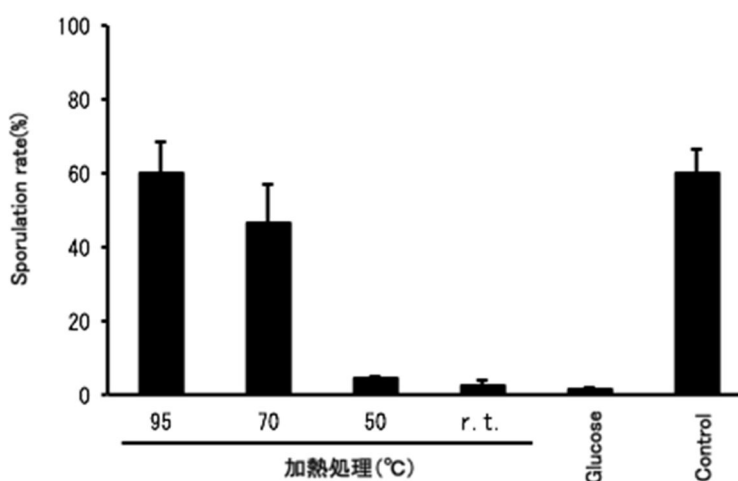
マウス糞便抽出液を2倍段階希釈した後、芽胞形成への影響を評価した。Noneは何も加えないときの芽胞形成率(陽性対照)、Glucoseは20 mMグルコースを加えたときの芽胞形成率(陰性対照)。

図16 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



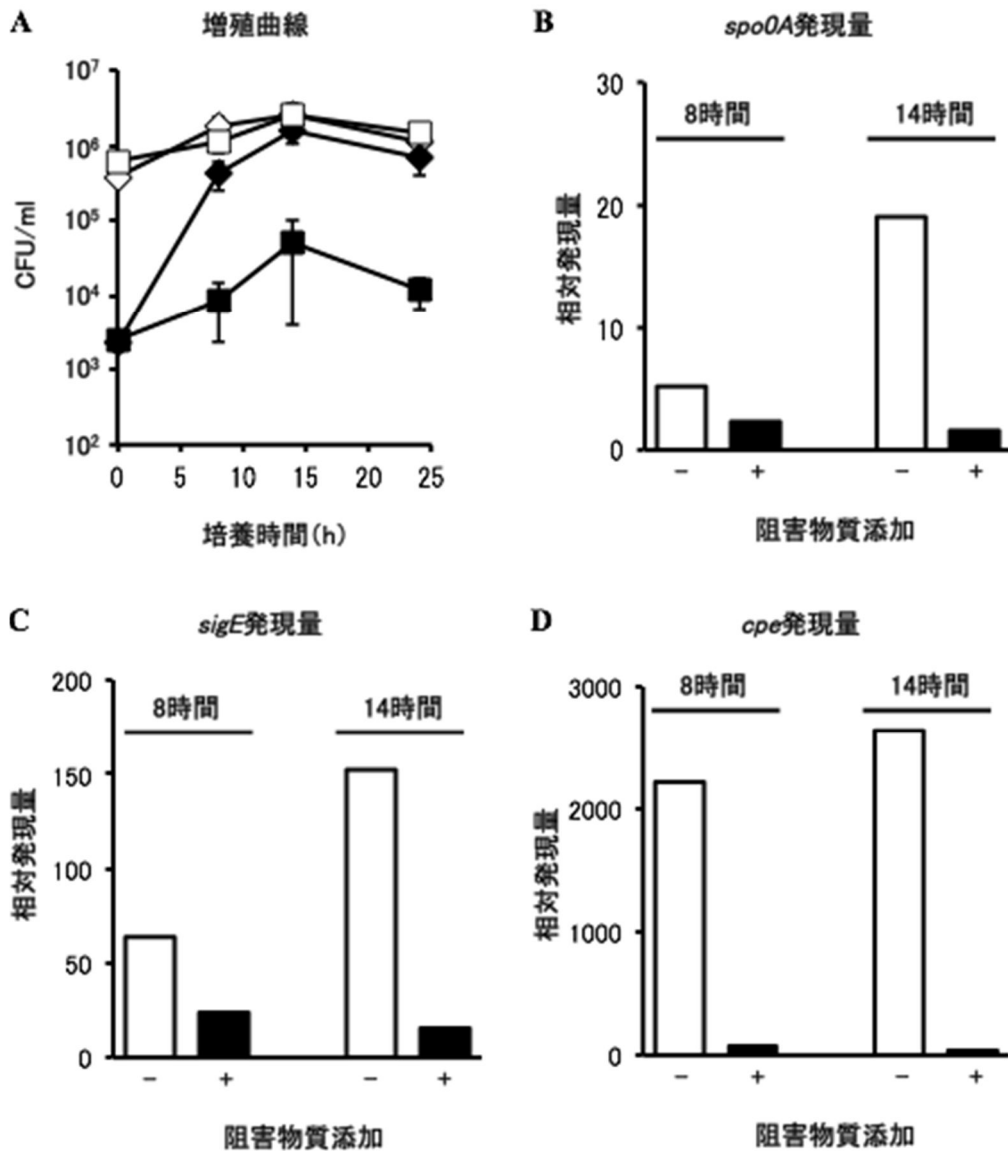
糞便抽出液を限外ろ過膜でろ過後、フィルターを通過した画分（濾液）とフィルター上に濃縮された画分（濃縮画分）のそれぞれについて、芽胞形成に対する効果を評価した。Controlは何も加えない条件での芽胞形成率（陽性対照）、Glucoseは20 mM グルコースを加えたときの芽胞形成率（陰性対照）、3K~100Kはそれぞれ使用したフィルターの分画分子量（分子量3,000~100,000）を示す。

図17 ウェルシュ菌芽胞形成阻害物質の耐熱性の検討



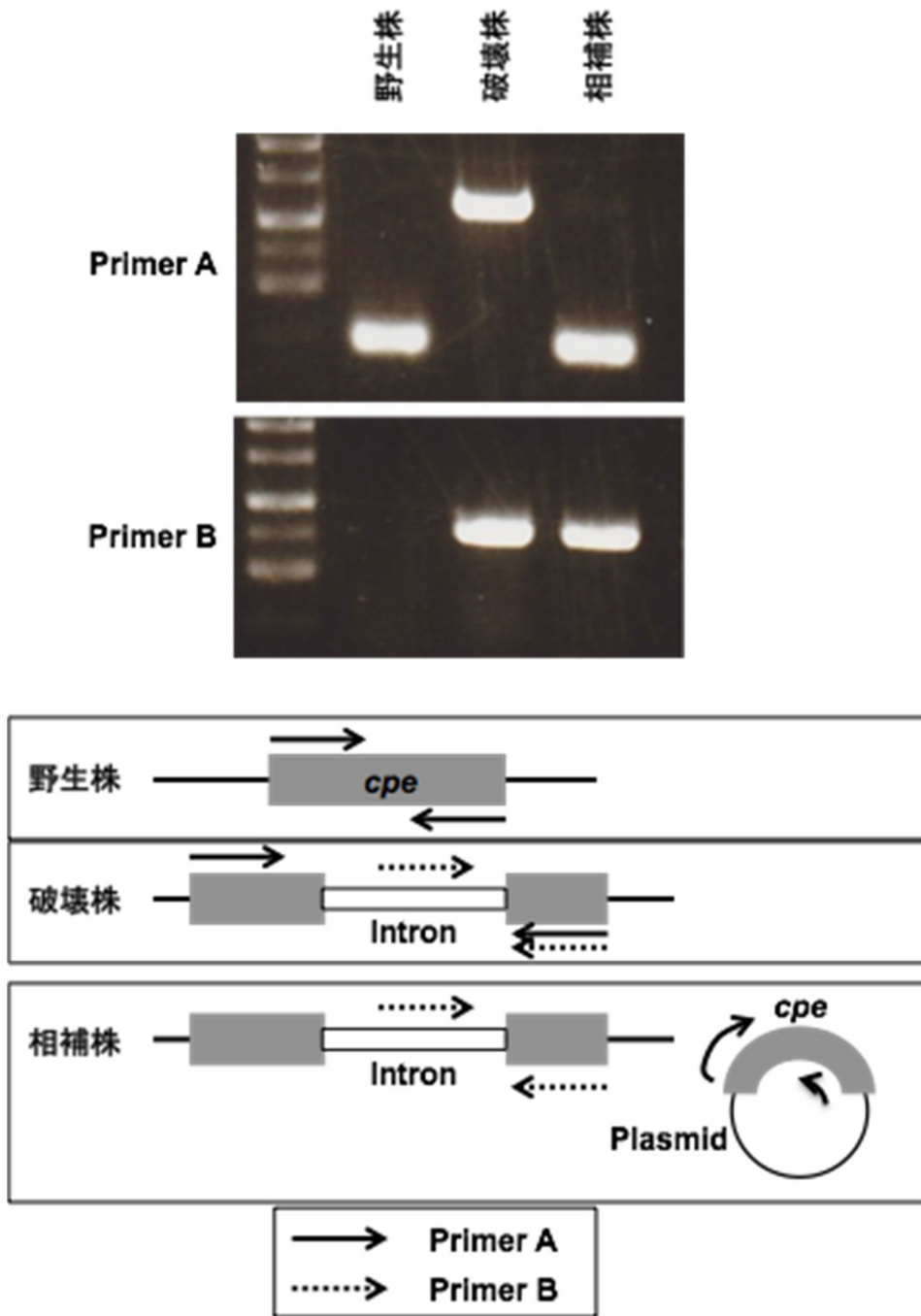
糞便抽出液を100,000 × g、90分間超遠心した上清をさらに分画分子量100,000の限外濾過膜でろ過したものについて、室温（r. t.）、50、70、95で20分間処理後、芽胞形成に対する抑制効果を評価した。Control、Glucoseは図16を参照。

図18 阻害物質の作用機序の検討



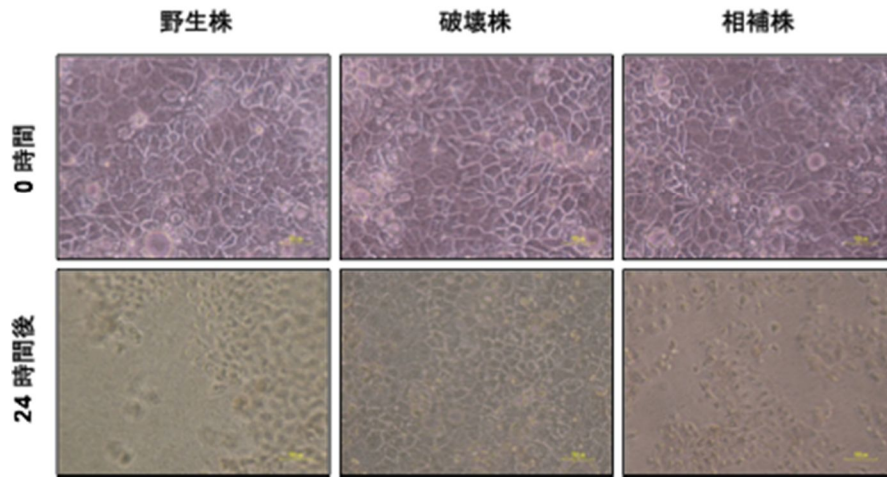
(A) は何も加えないときの栄養型ウエルシュ菌の菌数 (CFU)、 は阻害物質を加えたときの栄養型ウエルシュ菌の菌数、 は何も加えないときのウエルシュ菌の芽胞数 (CFU)、 阻害物質を加えたときのウエルシュ菌の芽胞数 (CFU)。 (B)~(D) 16S リボソーム RNA の発現量に対する各種芽胞形成関連遺伝子の発現量。8 時間および 14 時間後の発現量を、それぞれ何も加えないとき、阻害物質を加えたときで比較した。 (B) *spo0A*、 (C) *sigE*、 (D) *cpe*。

図19 菌株の遺伝子保有状況の確認



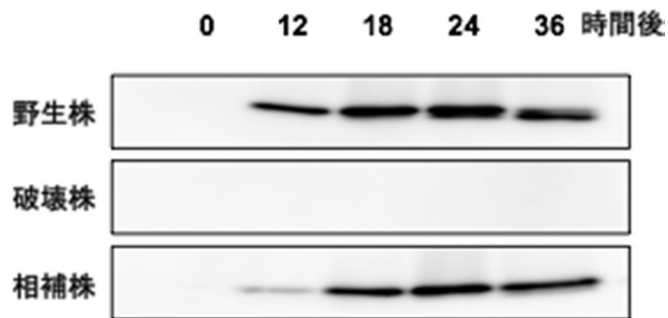
「野生株」は野生型 SM101 株、「破壊株」は *cpe*(-)株、「相補株」は *cpe*(+)株。それぞれの菌株のライゼートをテンプレートとして Primer A、Primer B を用いて PCR を行った。

図20 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21 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22 - 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
の解析と新型下痢毒素の性状解析

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新型下痢毒素の性状解析

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	入倉 大祐	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 研究員
	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
	長井 和哉	岩手大学農学部 技術室 技術員
	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。分離菌が新種の下痢誘発性毒素を産生していることの確証が得られた。これらの事例は、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌のみを対象とする試験法には不備があること、したがって、現在のウエルシュ菌食中毒の疫学情報は不完全で、この度の事例も含んだ解析が必要であることを示す。新型毒素の細胞毒性を観察した。L929細胞は低濃度の毒素添加で球形化し、高濃度では細胞の断片が多数観察された。この時、形態を維持して死滅している細胞が観察されなかったことから、新型エンテロトキシンによって細胞が球形化し、細胞が死滅すると直ちに細胞が崩壊すると考えられた。事例分離菌株 W5052 株の部分的ゲノム解析を行った。W5052 株は新型毒素遺伝子をコードしたプラスミドを保有していることが明らかになった。ウエルシュ菌食中毒の分子疫学情報の刷新に貢献できるものとする。

A . 研究目的

ウエルシュ菌食中毒は菌が産生するエンテロトキシンによる生体内毒素型食中毒である。主症状は下痢と腹痛であり、嘔吐や発熱などの症状はほとんど見られない。通常 6~18 時間、平均 10 時間の潜伏期間を経て発病し、1~2 日で症状が回復する程度の軽症であることが多い。同食中毒は、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¹⁾。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。

ウエルシュ菌食中毒の原因菌であるウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) はヒトをはじめ多くの動物の大腸内常在菌であり、下水、河川、海、耕地などの自然界にも広く分布する¹⁾。

ウエルシュ菌食中毒の研究は長く、その原因物質であるエンテロトキシンは 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、易熱性タンパク質毒素である。エンテロトキシン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、すなわち下痢原性を示す¹⁾。

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。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、同菌株を培養し、旧来のエンテロトキシンとは異なる毒素を同定、その性状を調べることを目的とした。

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

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情報をまとめた。

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⁴⁾で培養し、フィルターろ過滅菌(ポアーサイズ 0.45 μm)し、検体とした。ウサギ(日本在来種、オス、体重 1.5~2.0 Kg)をペントバルビタル麻酔下でかいふく開腹し、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。翌日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。加熱抽出法によって、菌体から DNA を精製し、PCR の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。

4. 分離菌株のエンテロトキシン産生試験

分離菌株を 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²⁾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。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。

5. 新型エンテロトキシンの部分精製

5-1 菌株と培養

当該事例から分離された W5052 株を用いた。W5052 株を上述の方法で 2 日間培養した。培養液を 10,000 rpm、10 分間遠心分離を行い、培養上清を得た。

5-2 硫酸アンモニウム沈殿法による毒素の濃縮

遠心分離した培養上清に、最終濃度が 470% w/v になるよう硫酸アンモニウムを加え、沈殿を形成させ、遠心分離で沈殿を回収した。沈殿物を PBS で溶解し、部分精製毒素溶液とした。PBS 溶解物は、4 で透析し、実験に用いた。

5-3 細胞毒性力価の測定

既知のエンテロトキシンは、和光純薬より購入した。毒性を観察する細胞には、Vero 細胞と L929 細胞を用いた。

Dulbecco 変法 MEM 培地 (DMEM 培地、Sigma) に、10% Fetal Bovine Serum (FBS、Gibco) 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、 1×10^5 cell/ml に培地で希釈し、96 ウェルプレートに 100 μ l/ well の割合で播種した。5 %CO₂ インキュベータ内で1晩培養後、ウェルあたり 10 μ l の割合で、上記毒素濃縮液を添加した。さらに24 時間培養を継続し、その後、細胞の形態を記録し、致死効果を判定した。

6 . 事例菌株のゲノム解析

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⁵⁾。

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 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 事例からの分離株における変法 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 事例からの分離菌株について、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、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エンテロトキシンは Vero 細胞へ毒性を示した。一方、4 事例からの分離菌株の培養液を 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. 毒素処理細胞の形態変化と致死毒性

L929 細胞に、希釈率が異なる硫酸アンモニウム沈殿画分(以下、画分)を添加し、細胞の形態を観察した。画分を添加しなかった細胞と、16 倍および 32 倍希釈した画分の添加では細胞の形態に差異が見られなかった。8 倍希釈画分添加で一部細胞の形状が球形化し、2 倍および 4 倍希釈添加画分ではほぼ全ての細胞の形状が球形化した。画分の濃度が濃くなるに従い、培養液中に見られる、崩壊した細胞の断片と思われる構造物が増加した(図 1)。

死滅した細胞が染色されるトリパンブルー溶液を用いて画分で処理した細胞の観察をした。2 倍および 4 倍希釈画分液

を添加した細胞の一部がトリパンブルー溶液により染色されたが、多くの細胞は染色されなかった。また、上述の崩壊した細胞の断片はトリパンブルー染色処理では見られなかった(図 2)。

6. 事例株 W5052 株のゲノム解析

Shotgun シークエンシング法で、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。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。約5万4千bpのプラスミドには、新型毒素遺伝子が存在していた。塩基配列のマップを図3に示す。

D. 考察と結論

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。すなわち、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。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³⁾。両細胞に対し、事例分離株の培養ろ液は、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。

新型エンテロトキシンの細胞毒性をL929細胞の形態変化を観察することによ

って検討した。新型エンテロトキシンによって細胞が球形化し、毒素濃度が高くなると培養液中に崩壊した細胞の断片と思われる構造物が増加した。一方、トリパンブルー溶液によって染色した時、染色された細胞はあまり見られなかった。トリパンブルーは死細胞を青染するが生細胞を染色しない⁴⁾ので、染色された細胞が少ないことから、新型エンテロトキシンによって細胞が球形化し、細胞が外来性の色素を排除する能力を失うような機能的障害を受けると直ちに細胞が崩壊すると考えられた。

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、それらのうちの一つ 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⁵⁾。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 も存在した。新型毒素の遺伝子は 12,000 bp の scaffold

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

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) 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 .
- 3) 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.
- 4) 小山秀機：組織培養の技術〔第二版〕日本組織培養学会編、p26、朝倉書店、1988.
- 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.

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

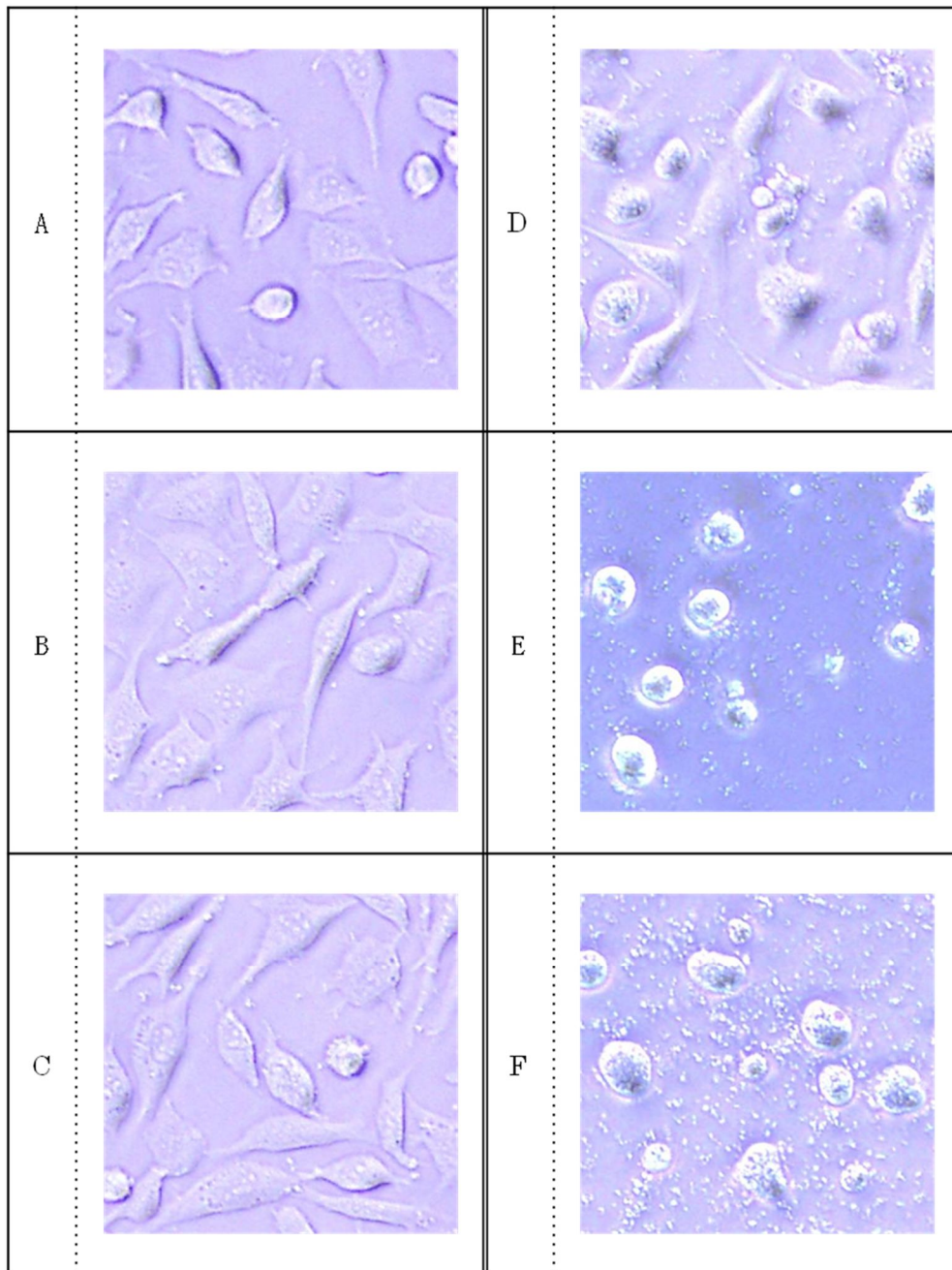


図1 ウエルシュ菌新型エンテロトキシンによる L929 細胞の形態変化

毒素を 2~32 倍に希釈した硫酸アンモニウム沈殿画分を L929 細胞に添加後、細胞の形態変化の様子を観察した。

A : 毒素無処置、B : 毒素 32 倍希釈、C : 毒素 16 倍希釈、D : 毒素 8 倍希釈
E : 毒素 4 倍希釈、F : 毒素 2 倍希釈

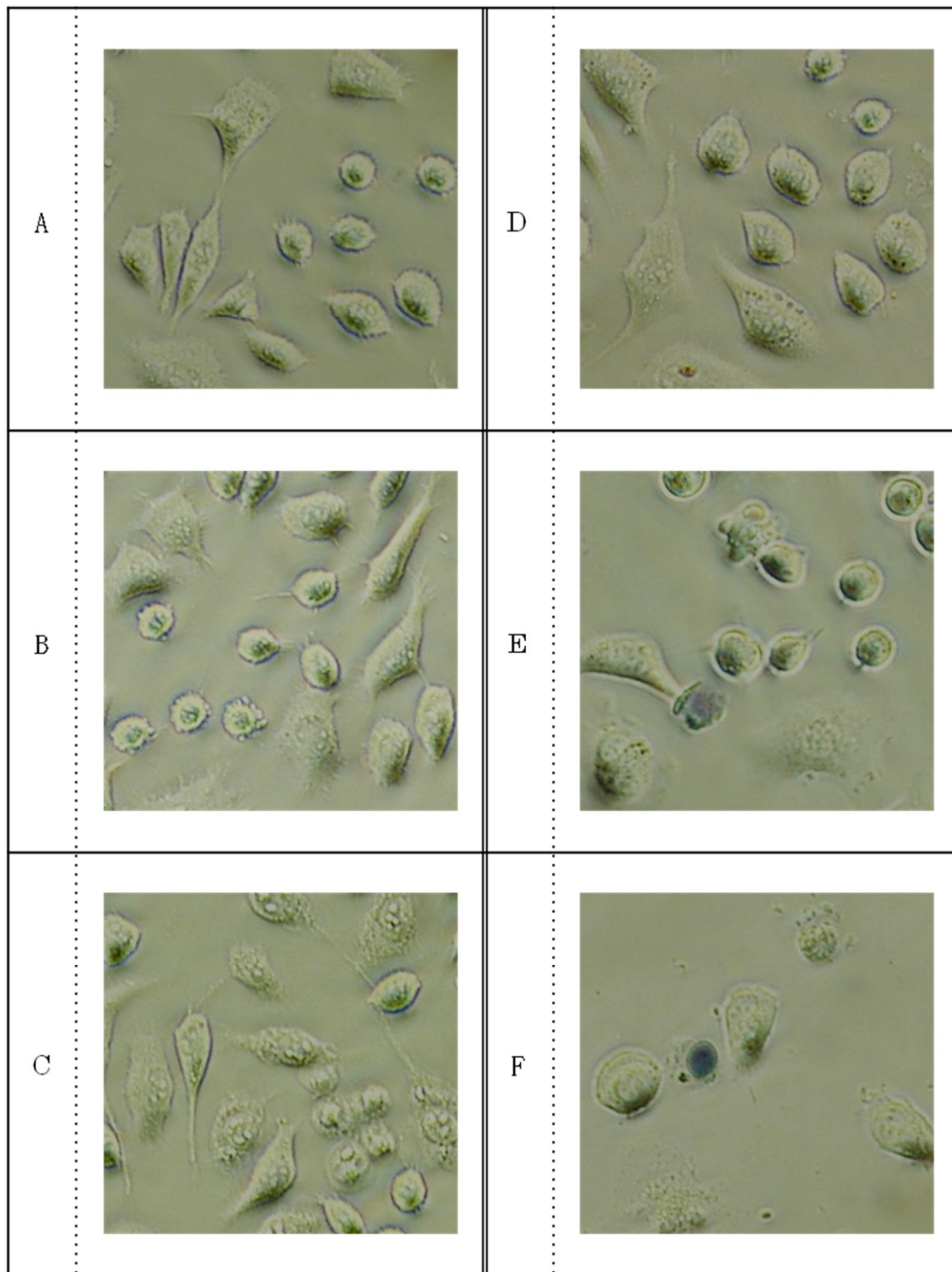


図2 新型エンテロトキシンによる L929 細胞の形態変化(トリパンブルー染色)

毒素を 2~32 倍に希釈した硫酸アンモニウム沈殿画分を L929 細胞に添加後、トリパンブルー染色を施し、細胞の形態変化の様子を観察した。

A：毒素無処置、B：毒素 32 倍希釈、C：毒素 16 倍希釈、D：毒素 8 倍希釈

E：毒素 4 倍希釈、F：毒素 2 倍希釈

E および F に観察される染色された細胞が死細胞と判定される。

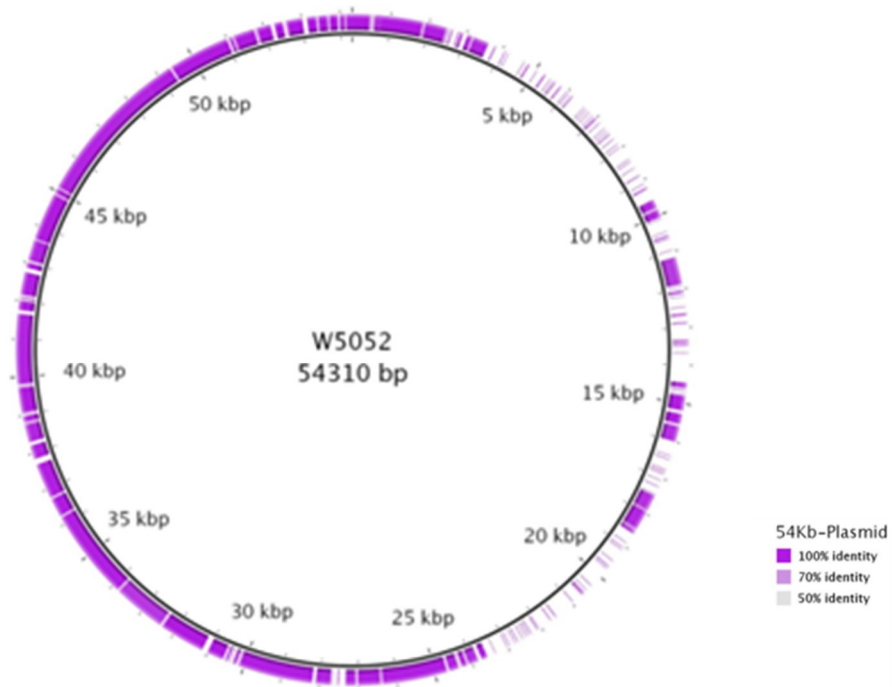


図3 エンテロトキシン非産生性ウエルシュ菌 W5052 株のプラスミドゲノムマップ
 W5052 株のゲノムシーケンスを、公開されているウエルシュ菌 SM101 と比較した。

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. Mizutani, N., Sugita-Konishi, Y., Omoe, K., Shinagawa, K., Kawakami, H., Shinji Kanno, S., Sugiyama K., and Yoichi Kamata, Y. (2011) Advantages of immunoglobulin Y for the detection of Staphylococcal enterotoxin A in a double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, *Int. J. Food Sci. Tech.* 47:155-159.
2. Ono, H.K., Nishizawa, M., Yamamoto, Y., Hu, D.-L., Nakane, A., Shinagawa, K., and Omoe, K. (2012) Submucosal mast cells in the gastrointestinal tract are a target of staphylococcal enterotoxin type A. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 64: 392-402.
3. Kamata, Y., Koanno, S., Mizutani, N., Agata, N., Kawakami, H., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y. (2012) Sensitivity of Hep G2 cells to *Bacillus cereus* emetic toxin. *J. Vet. Med. Sci.* 74:1483-1485.
4. 涌嶋三津子、西川景子、泉 秀実、鎌田洋一、西川禎一 (2012) レトルトパウチ詰コーンスープの原材料から分離されたフラットサワー菌の耐熱性と間欠滅菌法による制御の試み、*日本食品微生物学雑誌*、29:17-174.
5. 中山素一、宮下 隆、細谷幸一、人見 潤、佐藤美紀、須永幸恵、重松康彦、小笠原 準、竹中重幸、濱崎光宏、堀川和美、磯部順子、小西良子、鎌田洋一 (2012) 嘔吐毒素産生性セレウス菌検出イムノクロマトキットの評価、*食衛誌*、53、273-277.
6. 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. Immuno. Immunopath.* 152:78-81.

製品の市場化

1. スイフトジーン CPE 産生ウエルシュ菌「カイノス」
標記の製品名で平成 24 年 10 月 1 日より販売を開始した（株式会社 カイノス）
2. 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」
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）

