

令和4年度 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）

総括研究報告書

食品中のブドウ球菌エンテロトキシンの検出および嘔吐活性の解明 に関する研究

研究代表者 廣瀬昌平 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ブドウ球菌食中毒の主要な原因食品を明らかにするために過去22年間の食中毒統計から原因食品を15種類（米飯、鶏肉・豚肉・牛肉、魚介類、寿司、卵料理、パン、麺類、和菓子、洋菓子、ソース・タレ、牛乳、飲料その他、食品その他、弁当等複合食品、不明）に分類し、各食品群ごとの事例数、摂食者数および患者数を抽出した。事例数の多いブドウ球菌食中毒の主要な原因食品群は米飯、和菓子類、肉類（鶏肉、豚肉、牛肉）、魚介類であった。各事例ごとに摂食者に対する患者数の割合をアタックレートとして算出した結果、食品群別のアタックレートに差は認められなかった。また、食品中のブドウ球菌エンテロトキシンA(SEA)の検出性を確認するため、主要な原因食品のうち、米飯、求肥、粒餡、鮭フレークおよび加熱牛肉を用いてSEAの添加回収試験を行った。米飯および加熱牛肉では、SEA回収率は約100%であったが、求肥、粒餡および鮭フレークでは、SEA回収率が約50%から70%であり、食品の種類によっては、食品がSEAの検出性に影響することが示唆された。また、黄色ブドウ球菌食中毒事例株の遺伝的背景を明らかにするため、食品由来株4株および食中毒事例株4株をブドウ球菌エンテロトキシンのmultiplex PCRおよび全ゲノム解析に供試した。SEs遺伝子および主要な病原因子関連遺伝子の保有状況に一定の傾向は認められなかったが、全ゲノム解析の結果から、食品由来株および食中毒事例株は別のクラスターに分かれることが推測された。

研究協力者

北里大学獣医学部

小野久弥

A. 研究目的

ブドウ球菌食中毒は、黄色ブドウ球菌が産生する嘔吐毒素であるブドウ球菌エンテロトキシン(SEs)により引き起こされる。SEsは、抗原性の違いによりSEAからSE27までの計29種類が報告されている。日本のブドウ球菌食中毒では、SEAを原因とする事例が最も多いとされている。食中毒事例の原因物質をSEsであると同定するためには、食品検体からSEsを検出する方法がもっと有効であるが、食品自体がSEsの検出性および嘔吐活性に与える影響は明らかになっていない。そのため、本研究では、まず、ブドウ球菌食中毒の主要な原因食品を過去の事例から抽出し、それらの食品中でのSEAの検出性を明らかにすることを目的とした。また、黄色ブドウ球菌の中には食中毒を高頻度に発生し得る遺伝的背景を有する高食中毒原性菌株群が存在するとされている。この高食中毒原性菌株群を特定するためには、ブドウ球菌食中毒事例由来株を収集し横断的な遺伝子解析が必須である。そのため、本研究では黄色ブドウ球菌食品由来株と食中毒事例由来株の遺伝的背景を解析し、由来ごとの傾向を明らかにすることを目的と

した。

B. 研究方法

(1) ブドウ球菌食中毒の主要な原因食品の抽出

ブドウ球菌食中毒の主要な原因食品を明らかにするため、2000年から2021年までの食中毒統計から原因食品を15種類(米飯、鶏肉・豚肉・牛肉、魚介類、寿司、卵料理、パン、麺類、和菓子、洋菓子、ソース・タレ、牛乳、飲料その他、食品その他、弁当等複合食品、不明)に分類し、各食品群ごとの事例数、摂食者数および患者数を抽出した。また、摂食者数が明らかになっている事例では、摂食者数に対する患者数の割合をアタックレートとして算出し、原因食品群間で比較した。

(2) 食品中でのSEA添加回収試験

1) リコンビナントSEAの作製
タンパク質作製用組換え大腸菌用の基礎培地にリコンビナントSEA(rSEA)発現用の遺伝子組換え大腸菌を接種し、37℃で一晩培養した。菌液を遠沈管に移し、4℃で30分間遠心した後、上清を捨て、各遠沈管にB-PER solution(Thermo Scientific)を加えてピペティングで菌を溶解した。還元剤であるジチオトレ

イトールを加え、ローテーターで 10 分間室温で転倒混和し、4°C で 20 分間遠心した。上清を濾過滅菌し、Glutathione Sepharose 4B (Cytiva) と混合した後、Glutathione elution buffer にて glutathione-S-transferase 結合 rSEA を溶出させた。PreScission Protease (Sigma) で glutathione-S-transferase を切断し、再度 Glutathione Sepharose 4B を用いて rSEA を精製した。限外ろ過フィルター付きカラムを用いて rSEA を濃縮し、ブラッドフォード法で濃度を計測した。

2) 市販キットの SEA 定量性

上記 1) で精製した rSEA を VIDAS SET2 キット (バイオメリュール) 付属の VIDAS 抽出緩衝液で 0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、1.5 ng/mL および 2.0 ng/mL に希釈した。これらの希釈液を VIDAS SET2 キットを用いて mini VIDAS (バイオメリュール) で測定し、得られた相対蛍光強度 (RFV) から検量線を作成し、本キットの定量性を確認した。

3) 添加回収試験

(1) で明らかにしたブドウ球菌食中毒の主要な原因食品群のうち、添加回収試験の食品検体として市販の米飯、求肥、粒餡、鮭フレークおよび牛肉を供試した。

米飯は、ストマッカー袋に 10g ずつ分取し、SEA を 40 ng 添加した。ストマッカー袋を手で揉み込み、検体を混合した後、VIDAS 抽出緩衝液を 30 mL 添加した。ストマッカー処理を 3 分間行った後、懸濁液をチューブへ移し、懸濁液の pH を測定し、pH 7.0 から 8.0 の範囲に収まっていることを確認した。室温で 5000g 15 分間遠心し、VIDAS SET2 試薬ストリップのサンプル用ウェルに上清を 500 μ L 注入し、mini VIDAS (バイオメリュール) にセットし RFV を測定した。求肥、粒餡、鮭フレークは、ストマッカー袋に 10g ずつ分取し、SEA を 20 ng 添加した。ストマッカー袋を手で揉み込み、検体を混合した後、VIDAS 抽出緩衝液を 10 mL 添加した。ストマッカー処理を 3 分間行った後、懸濁液をチューブへ移し、懸濁液の pH を測定し、pH 7.0 から 8.0 の範囲に収まっていることを確認した。室温で 5000g 15 分間遠心し、VIDAS SET2 試薬ストリップのサンプル用ウェルに上清を 500 μ L 注入し、mini VIDAS にセットし RFV を測定した。牛肉は、ストマッカー袋に 10g ずつ分取し、60°C で 30 分加熱した後 (加熱牛肉)、SEA を 20 ng 添加した。ストマッカー袋を手で揉

み込み、検体を混合した後、VIDAS 抽出緩衝液を 10 mL 添加した。ストマッカー処理を 3 分間行った後、5N HCL を加えて pH4.0 に調整し、室温に 15 分静置した。その後、室温で 5000g 15 分間遠心し、上清を新しい 15 mL チューブへ移し、1 N NaOH を添加して pH を 8.0 に調整した。再度、室温で 5000g 15 分遠心し、SET2 試薬ストリップのサンプル用ウェルに上清を 500 μ L 注入し、mini VIDAS にセットし RFV を測定した。2) で得られた検量線を用いて RFV 値を SEA 濃度に換算し、食品懸濁液中の上清（液体成分）の量を掛け合わせて食品懸濁液中の SEA 量を算出した。添加した SEA 量に対する検出された SEA 量の割合を回収率として算出し、各食品ごとの SEA の検出性を解析した。

(3) 食品由来株および食中毒事例株の遺伝子解析

1) 菌株

食品由来株 4 株および食中毒事例株 4 株を供試した。

2) DNA 抽出

供試菌株をブレインハートインフュージョンブイヨン（日水製薬）に接種し、37°C で 18 時間培養した。QIAamp DNA mini kit (Qiagen) を用いて培養液から DNA を抽出した。

3) multiplex PCR

抽出した DNA を SEs 遺伝子 (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser*, *ses*, *set*) 検出用の multiplex PCR に供試した (狩野ら, 2009)。PCR 試薬には、QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen) を用いた。各 SEs 遺伝子に対する Forward プライマーと Reverse プライマーを表 1 に示す。各プライマーは終濃度 0.2 μ M となるよう調製して用いた。反応条件は 95°C 15 分の熱変性ののち、94°C 90 秒 - 57°C 90 秒 - 72°C 30 秒を 35 サイクル繰り返し増幅反応させ、最後に 72°C 10 分とした。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、バンドを確認した。

4) 全ゲノムシーケンス解析

2) で抽出した DNA から Illumina DNA Prep Tagmentation (Illumina) を用いてライブラリーを調整し、miniSeq (Illumina) で全ゲノム配列を取得した。得られた配列データを CLC genomic workbench でアセンブリし、Center for Genomic Epidemiology

(<http://www.genomicepidemiology.org/>) で sequence type (ST) を決定し、SEs 遺伝子 (*sea* から *seu*) を含めた主要病原因子関連遺伝子

の保有を解析した。また、ST に基づいて Minimum spanning tree を作成した。

C. 研究結果

(1) ブドウ球菌食中毒の主要な原因食品の抽出

過去 22 年間の食中毒統計からブドウ球菌食中毒の原因食品のうち報告数の多い食品群を抽出した。主要な原因食品群として、米飯で 155 事例、和菓子類で 42 事例、肉類（鶏肉、豚肉、牛肉）で 34 事例、魚介類で 33 事例が認められた。また、食品群別にアタックレートを算出して比較した結果、和菓子でやや高い傾向が認められたが、主食品群間に有意な差は認められなかった（図 1）。

(2) 食品中での SEA 添加回収試験

VIDAS 抽出緩衝液で希釈した SEA は、0.5 ng/mL から 2.0 ng/mL の範囲で RVF の測定値に直線性が得られた（図 2）。各食品に添加した SEA を VIDAS で検出した結果、陰性対照である VIDAS 抽出緩衝液では添加量 20 ng に対し 18.2 ng/検体（91%）、米飯では添加量 40 ng に対し 46.2 ng/検体（116%）、求肥では添加量 20 ng に対し 9.6 ng/検体（48%）、粒餡では添加量 20 ng に対し 11.2 ng/検体（56%）、鮭フレークでは添加量

20 ng に対し 13.2 ng/検体（66%）、加熱牛肉では添加量 20 ng に対し 20.9 ng/検体（104%）となった（図 3）。

(3) 食中毒事例株の遺伝子解析
SEs 遺伝子は、食品由来株 4 株のうち 1 株は *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *seu* を、1 株は *sea*, *seb*, *sek*, *seq* を保有しており、2 株は multiplex PCR および全ゲノム解析で SEs 遺伝子が検出されなかった。食中毒事例株 4 株のうち、1 株は *sec* および *sel* を、1 株は *sea* を、1 株は *sea*, *seb*, *seh*, *sek*, *seq* を保有しており、1 株は multiplex PCR および全ゲノム解析で SEs 遺伝子が検出されなかった。

病原因子関連遺伝子は、食品由来株 4 株のうち 3 株は *aur*, *splA*, *splB*, *splE*, *hlgA*, *hlgB*, *hlgC*, *lukD*, *lukE* を、1 株は *aur*, *hlgA*, *hlgB*, *hlgC*, *sak*, *scn* を保有していた。食中毒事例株 4 株のうち、1 株は *aur*, *splA*, *splB*, *splE*, *hlgA*, *hlgB*, *hlgC*, *lukD*, *lukE* を、1 株は *aur*, *splA*, *splB*, *hlgA*, *hlgB*, *hlgC*, *lukD*, *lukE*, *sak*, *scn* を、1 株は *aur*, *splA*, *splB*, *splE*, *hlgA*, *hlgB*, *hlgC*, *lukD*, *lukE*, *scn* を、1 株は *aur*, *splA*, *splB*, *splE*, *hlgA*, *hlgB*, *hlgC*, *lukD*, *lukE*, *sak*, *scn* を保有していた。ST に基

づいて Minimum spanning tree を作成した結果、食品由来株 4 株および食中毒事例株 4 株は由来ごとに大まかに 2 つのクラスターに分かれることが示された (図 4)。

D. 考察

過去 22 年間のブドウ球菌食中毒の原因食品のうち、事例報数の多い主要な原因食品群は米飯、和菓子類、肉類 (鶏肉、豚肉、牛肉)、魚介類であった。これらの食品群別にアタックレートを算出して比較した結果、和菓子でやや高い傾向が認められたが、主要な食品群間に有意な差は認められなかったことから、嘔吐を引き起こしやすい食品は確認されなかった。今後は、食品中での黄色ブドウ球菌の増殖および SEs 産生について解析をする必要がある。

精製した SEA を用いて VIDAS の定量性を解析した結果、0.5 ng/mL から 2.0 ng/mL の濃度で SEA を定量的に測定できることが明らかになった。SEA の最小発症毒素量は 1985 年に発生した殺菌処理されたチョコレートミルクが原因の米国の事例から約 100 ng/ヒトであるとされているため、食中毒を引き起こす濃度の SEA を VIDAS で十分に検出可能であることが示された。また、食品での SEA の添加回収試験の結果、

米飯および加熱牛肉では、概ね添加量が検出されたが、求肥、粒餡および鮭フレークでは、回収率が 48% から 66% とやや低い値となった。食品の種類によっては、食品が SEA の検出性に影響することが示唆された。今後、これらの食品が SEA の嘔吐活性に与える影響について明らかにする必要がある。

食品由来株 4 株および食中毒事例株 4 株のゲノム解析の結果、SEs 遺伝子および主要な病原因子関連遺伝子の保有状況に一定の傾向は認められなかったが、由来ごとに大まかに 2 つのクラスターに分かれることが示された。今後、食中毒事例株および食品由来株のデータを追加し、詳細なクラスター解析を行う必要がある。また、食中毒事例株にもかかわらず、SEs 遺伝子の保有が認められなかった菌株については、今回検出対象としなかった SE1V、SE1W、SE1X、SE1Y、SE1Z、SE01、SE02、SE26 および SE27 や新型 SEs を保有する可能性が考えられた。

E. 結論

ブドウ球菌食中毒の主要な原因食品群は米飯、和菓子類、肉類 (鶏肉、豚肉、牛肉)、魚介類であった。これらの食品群別のアタックレートに有意な差は認められなかった。

VIDAS の SEA 検出性は、米飯および
加熱牛肉中では約 100%であったが、
求肥、粒餡および鮭フレーク中では
約 50%から 70%とやや低かったこ
とから食品の種類によっては、食品
が SEA の検出性に影響することが
示唆された。食品由来株 4 株および
食中毒事例株 4 株は、SEs 遺伝子お
よび主要な病原因子関連遺伝子の
保有状況に一定の傾向は認められ
なかったが、由来ごとに別のクラ
スターに分かれることが推測された。

なし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

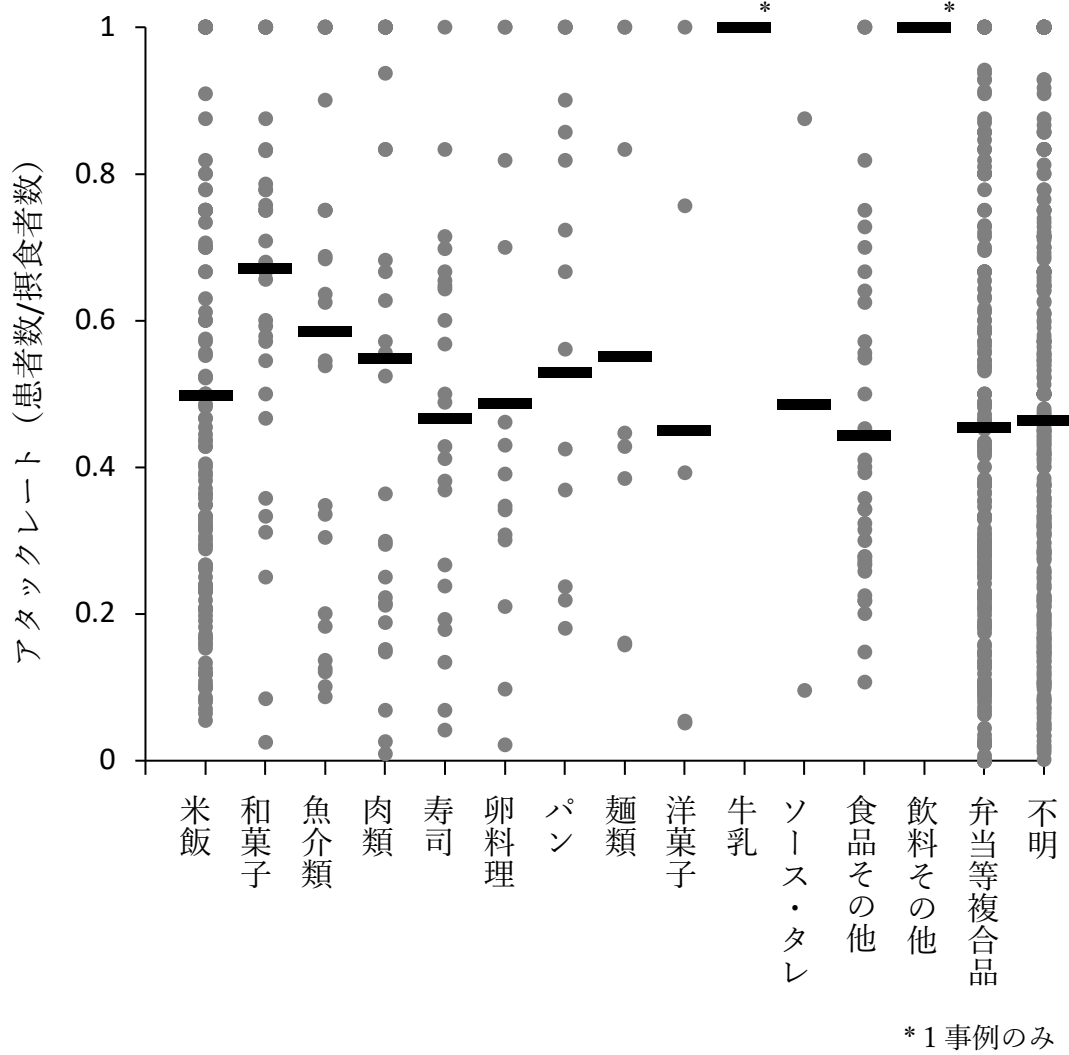


図1 原因食品ごとの摂食者数に対する患者の割合

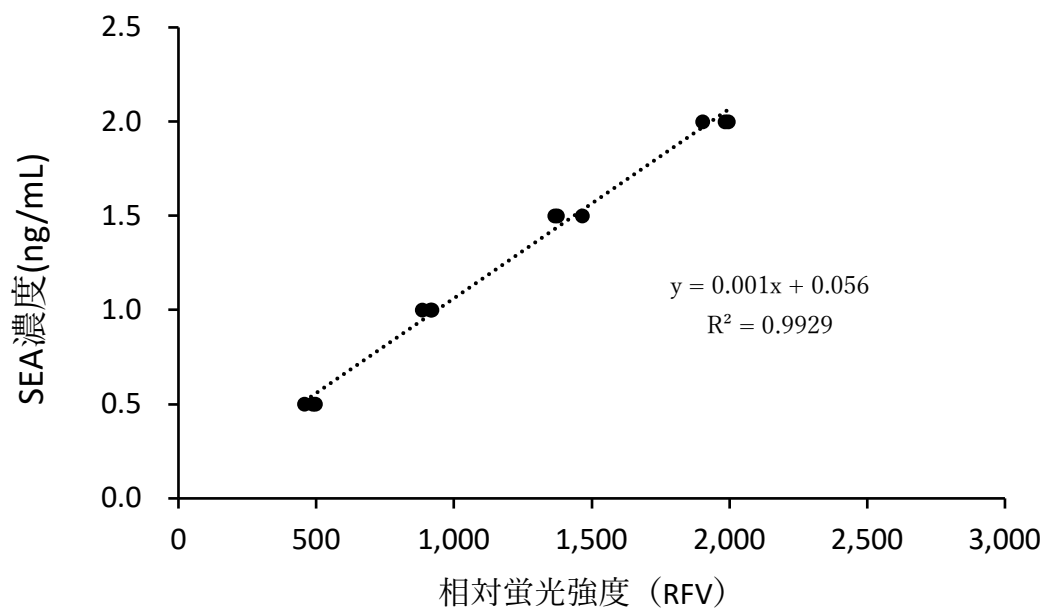


図2 mini VIDAS で測定した SEA の検量線

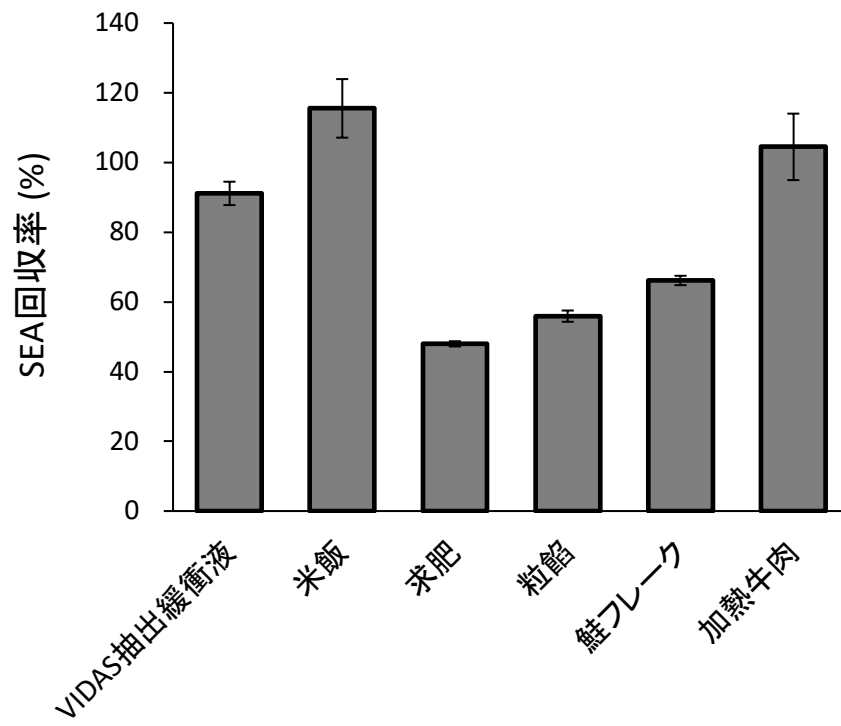


図3 各食品中でのSEA回収率

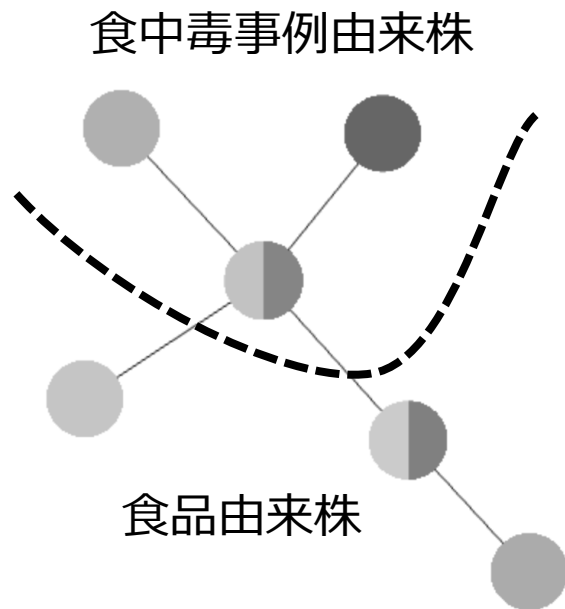


図4 黄色ブドウ球菌株の sequence type に基づく Minimum spanning tree

(論文化のため、詳細略)

表 1 SEs multiplex PCR 用プライマー

SEs遺伝子	Primer	sequences
<i>sea</i>	Foward	CCTTTGGAAACGGTTAAAACG
	Reverse	TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC
<i>seb</i>	Foward	TCGCATCAAACGACAAAACG
	Reverse	GCAGGTACTCTATAAGTGCCTGC
<i>sec</i>	Foward	CTCAAGAAGTAGACATAAAAGCTAGG
	Reverse	TCAAAATCGGATTAACATTATCC
<i>sed</i>	Foward	CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAACG
	Reverse	TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC
<i>see</i>	Foward	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC
	Reverse	TAACCTACCGTGGACCCTTC
<i>seg</i>	Foward	AAGTAGACATTTTTGGCGTTCC
	Reverse	AGAACCATCAAACGATATAGC
<i>seh</i>	Foward	GTCTATATGGAGGTACAACACT
	Reverse	GACCTTTACTTATTTGCTGTC
<i>sei</i>	Foward	GGTGATATTGGTGTAGGTAAC
	Reverse	ATCCATATTCTTTGCCTTACCAG
<i>selj</i>	Foward	ATAGCATCAGAACTGTTGTTCCG
	Reverse	CTTTCTGAATTTTACCACCAAAGG
<i>sek</i>	Foward	TAGGTGTCTCTAATAATGCCA
	Reverse	TAGATATTCGTTAGTAGCTG
<i>sel</i>	Foward	TAACGGCGATGTAGGTCCAGG
	Reverse	CATCTATTTCTTGTGCGGTAAC
<i>sem</i>	Foward	GGATAATTCGACAGTAACAG
	Reverse	TCCTGCATTAATCCAGAAC
<i>sen</i>	Foward	GCTTATGAGATTGTTCTACATAGCTGC
	Reverse	CATTAACGCCTATAACTTTCTCTTCATC
<i>seo</i>	Foward	TGTGTAAGAAGTCAAGTGTAG
	Reverse	TCTTTAGAAATCGCTGATGA
<i>sep</i>	Foward	TGATTTATTAGTAGACCTTGG
	Reverse	ATAACCAACCGAATCACCAG
<i>seq</i>	Foward	AATCTCTGGGTCAATGGTAAGC
	Reverse	TTGTATTCGTTTTGTAGGTATTTTCG
<i>ser</i>	Foward	GGATAAAGCGGTAATAGCAG
	Reverse	GTATTCCAAACACATCTAAC
<i>ses</i>	Foward	TCGGAATATACTATGGGGCAA
	Reverse	GGTCTAACTCTTGAATTGTAGGTTT
<i>set</i>	Foward	GGTTGGTGATTATGTAGATGCTTG
	Reverse	GTAGGCTTGTCTAAAGGGCTATG
<i>tst-1</i>	Foward	AAGCCCTTTGTTGCTTGCG
	Reverse	ATCGAACTTTGGCCATACTTT
<i>femA</i>	Foward	AAAAAAGCACATAACAAGCG
	Reverse	GATAAAGAAGAAACCAGCAG
<i>femB</i>	Foward	CACATGGTTACGAGCATCAT
	Reverse	TGTTTCGGGTGTTTTACCTT