

令和 6 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

本研究では、黄色ブドウ球菌が産生するブドウ球菌エンテロトキシン A（SEA）の加熱による抗原性および嘔吐活性の変化を解析し、食中毒調査における市販キットの信頼性を評価するとともに、ブドウ球菌食中毒事例株の遺伝的背景を明らかにすることを目的とした。SEA を 100℃ で最大 12 時間加熱し、構造安定性を SDS-PAGE で、検査キットでの検出性を VIDAS で、嘔吐活性をコモンマーモセットへの経口投与試験で評価した。その結果、SDS-PAGE では 4 時間加熱後もバンドが確認されたが、VIDAS での検出値は加熱時間の延長とともに著しく低下し、4 時間加熱後には検出限界以下となった。30 分間加熱した SEA を投与したマーモセットで嘔吐は認められなかった。また、食中毒由来株 44 株のコアグラマーゼ型別・ドラフトゲノム配列に基づく系統解析・SE/SE1 遺伝子の保有パターン解析を実施した。その結果、特定の sequence type (ST)、コアグラマーゼ型および SE/SE1 遺伝子保有パターンの組み合わせが存在することが明らかとなり、特に ST6・コアグラマーゼ IV 型の *sea*、*selx* および *sel26* を保有する株が最も多く、次いで ST1 および ST81 が多かった。食品、ヒトおよび動物由来株と食中毒事例株との SE/SE1 遺伝子保有率の比較では、SEA 遺伝子保有率が食中毒事例株で突出して高かったことから、ブドウ球菌食中毒の原因物質としての SEA の重要性があらためて示された。SEA 遺伝子がコードされるプロファージ ϕ Sa3 配列は、ST、コアグラマーゼ型および SE/SE1 遺伝子保有パターンの組み合わせと強く関連しており、系統的な遺伝子伝播が起きていることが示唆された。

研究協力者

北里大学獣医学部	小野 久弥
島根県保健環境科学研究所	野村 亮二
さいたま市健康科学研究センター	曾根 美紀
沖縄県衛生環境研究所	久手堅 剛
山梨県衛生環境研究所	柳本 恵太
宮城県保健環境センター	山谷 聡子
岐阜県保健環境研究所	水野 卓也
川崎市健康安全研究所	小嶋 由香
横浜市衛生研究所	松本 裕子

A. 研究目的

黄色ブドウ球菌が産生するブドウ球菌エンテロトキシン (SEs/SEIs) は、嘔吐型食中毒を引き起こす。SEs は、抗原性の違いにより SEA から SEI33 まで 30 種類以上が報告されている。日本のブドウ球菌食中毒は、SEA を原因とする事例が最も多い。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 を検出する方法が最も有効である。SEA は耐熱性が高いことが知られているが、抗原性の失活と嘔吐活性の失活の関連性は明らかになっていない。そのため、本研究では、加熱処理による SEA の抗原性の低下と嘔吐活性の消失の相関について、市販の SEs 検出キットと嘔吐モデル動物を用いて解析し、ブドウ球菌食中毒検査の信頼性を確認することを目的とし

た。また、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を明らかにするため、ブドウ球菌食中毒事例由来株のドラフトゲノムを取得し、系統解析を実施した。

B. 研究方法

(1) 加熱後 SEA の市販キットでの検出性

1) 加熱処理

組換え大腸菌を用いて精製した SEA を 200 µg/mL に希釈し、100℃で 1、2、4、6、8 および 12 時間加熱した。易熱性タンパク質の対照として牛血清アルブミン (BSA) を同様に加熱した。SEA を 4℃で静置した検体を陰性対照群とした。各検体は -80℃に保存した。

2) 加熱後 SEA の構造安定性解析

加熱した SEA および BSA を SDS-

PAGE 泳動用のサンプルバッファーと混合し、95℃で5分間加熱し、20 µL を SDS-PAGE で泳動した。泳動後のゲルを Simply Blue SafeStain (Invitrogen) で染色した。

3) 加熱後 SEA の VIDAS での検出性解析

加熱した SEA を VIDAS 抽出緩衝液で 10 倍から 200,000 倍希釈し、VIDAS SET2 試薬ストリップのサンプル用ウェルに注入し、mini VIDAS にセットし TV 値を測定した。また、SEA を VIDAS 抽出緩衝液で 0.5 ng/mL、1.0 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 で測定し、得られた TV 値から検量線を作成した。検量線を用いて TV 値から SEA 濃度を算出した。また、加熱後 SEA の検出下限値を 1 ng/mL とした。加熱後 SEA の検出下限値は、VIDAS SET2 キットの TV 値の検出下限値 (0.13) から検量線を用いて SEA 濃度を算出し、加熱後の検体の最小希釈倍率 10 倍を掛けて算出した。

(2) 加熱後 SEA の嘔吐活性の解析
SEA の嘔吐活性は、小型霊長類コモンマーモセットを用いた経口投与試験で評価した。(1)の方法で SEA 100 µg を 100℃で 30 分間および 60 分間加熱した。加熱後 SEA および非

加熱 SEA 100 µg をマーモセットに経口投与し、投与後 5 時間観察し、嘔吐の有無を評価した。

(3) 食中毒事例由来株の生化学的解析および全ゲノム解析

1) 菌株

ブドウ球菌食中毒事例由来株 44 事例由来 44 株を供試した。

2) コアグララーゼ型別解析

供試菌株をブレインハートインフュージョン培地 (BHI) に接種し、37℃で 18 時間培養した。培養液を遠心して上清を回収し、コアグララーゼ I から VIII 型の免疫ウサギ血清 (デンカ) と 37℃で 1 時間反応させた。正常ウサギ血漿を添加し、37℃で 48 時間まで凝固反応を観察し、供試菌株のコアグララーゼ型を決定した。

3) DNA 抽出

供試菌株を BHI に接種し、37℃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。

4) 全ゲノム配列を用いた系統解析

3) 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 genomics workbench でアセンブリし、Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>) で sequence type (ST) を決定し、各 ST の分布を PHYLOViZ で図示した。また、blastn で SE/SE1 遺伝子 (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser*, *ses*, *set*, *selu*, *selv*, *selw*, *selx*, *sey*, *selz*, *se01*, *se02*, *sel26*, *sel27*, *sel28*, *sel29*, *sel30*, *sel31*, *sel32*, *sel33*, *tst*) の保有パターンを解析した。SE/SE1 遺伝子配列は、Dicks らの配列を採用した (Dicks et al, J Bacteriol, 2021)。更にアセンブリしたドラフトゲノムを用いて core genome SNP 解析を実施した。解析結果を IQ-TREE で系統樹として出力した。

5) 菌株由来間の保有 SE/SE1 遺伝子の保有率の比較

pubMLST から黄色ブドウ球菌食品由来株 (158 株)、ヒト由来株 (2,649 株) および動物由来株 (1,390 株) のドラフトゲノムデータを収集し、4) と同様に SE/SE1 遺伝子の保有状況を検出した。各 SE/SE1 遺伝子の保有率を本研究で収集した食中毒事例株

と比較した。

6) プロファージ ϕ Sa3 配列の系統解析

SEA 遺伝子はプロファージ領域 (ϕ Sa3) にコードされている。SEA 遺伝子周囲のゲノム配列を菌株間で比較するため、SEA 遺伝子を保有する食中毒事例株 (26 株) のドラフトゲノムから ϕ Sa3 配列を抽出し、NJ 法による系統樹を作成した。また、配列の相同性を Easyfig で図示した。

C. 研究結果

(1) 加熱後 SEA の市販キットでの検出性

SEA は、100℃で 30 分間加熱後には SDS-PAGE ではっきりとバンドが確認され (図 1 A)、VIDAS での定量値は 86 $\mu\text{g/mL}$ であった (図 2)。100℃で 1 時間加熱後には、SDS-PAGE ではっきりとバンドが確認されたが (図 1 A)、VIDAS での定量値は 10 $\mu\text{g/mL}$ であった (図 2)。100℃で 4 時間加熱後には、SDS-PAGE ではバンドが確認されたが (図 1 A)、VIDAS では検出限界以下となった (図 2)。4℃条件では、12 時間静置しても SDS-PAGE でのバンドは変化せず、VIDAS での定量値は減少しなかった。BSA は、100℃で 2 時間加熱後には SDS-

PAGE でのバンドが確認されなかった (図 1 B)。

(2) 加熱後 SEA の嘔吐活性失活

30 分間加熱後の SEA を投与したマーモセット 5 匹および 60 分間加熱後の SEA を投与したマーモセット 4 匹は、嘔吐を認めなかった (表 1)。

(3) 食中毒事例由来株の生化学的解析およびゲノム解析

cgSNP による系統解析で食中毒事例株は複数の大まかなクレードに分類された (図 3)。各クレード内では ST とコアグララーゼ型の組み合わせは共通していた。食中毒事例株のうち、最も多い ST は ST6 であり、その全てが CoaIV 型であった。次いで ST81、ST1 および ST8 が多く、ST81 および ST1 は全て CoaVII 型、ST8 は全て CoaIII 型であった。上記の菌株群は cgSNP による系統解析においてそれぞれ同一のクレードに分布した。また、各クレード内の SE/SE1 遺伝子の保有パターンを図示した結果、各クレード内で類似した SE/SE1 遺伝子の保有パターンを示した。ST、コアグララーゼ型および SE/SE1 遺伝子保有パターンの組み合わせとして最も多かったのは ST6・CoaIV 型の *sea*、*selx*、*sel26* 保有株であり、次いで ST1・

CoaVII 型の *sea*、*seh*、*sek*、*seq*、*selx*、*sel26* 保有株および ST81・Coa VII 型の *sea*、*seh*、*sek*、*seq*、*selx*、*sel26* 保有株であった。各クレード内で菌株由来事例の発生年、発生地域、患者数および原因食品に偏りは認められなかった。SE/SE1 遺伝子の菌株由来ごとの比較では、食中毒事例株の SEA 遺伝子保有率がその他由来株に比べて突出して高かった (図 4)。一方で、食中毒事例株の SEG、SEI、SEM、SEN、SEO、SE1U、SE1V および SE1W 遺伝子保有率はその他由来株よりも低かった。また、 ϕ Sa3 配列の相同性に基づいて食中毒事例株の系統樹を作成した結果、同一 ST の菌株群は概ね同一クレードに分布した (図 5)。strain11 の ϕ Sa3 配列はその他の ST1 および ST1slv 群のものとは大きく異なっていた。

D. 考察

本研究により、SEA の熱安定性および検出方法間の感度差異が示された。SEA は 100°C で 30 分間の加熱においても構造が比較的安定であり、SDS-PAGE では明瞭なバンドが検出されたが、市販の免疫測定キット (VIDAS) による定量値は 200 μ g/mL から 86 μ g/mL へ

と低下した。これは、加熱により SEA の抗原性が部分的に失活し、特異抗体との結合能が減弱したためと考えられた。さらに 1 時間の加熱では定量値が大幅に減少し、4 時間の加熱で VIDAS では検出限界以下となったが、SDS-PAGE では引き続きバンドが確認された。このことから、抗原性に依存している市販キットによる検出は、熱変性によって抗原部位が損傷すると定量性が著しく損なわれることが示された。一方、4℃で 12 時間静置した場合には SEA の構造および抗原性は安定していたことから、低温環境では SEA が安定であることが再確認された。また、生物学的活性評価において、100℃で 30 分以上の加熱処理を施した SEA は、コモンマーモセットでの嘔吐活性が認められなかった。過去の報告では、121℃で 28 分間加熱した SEA においてもネコでの嘔吐活性が残存していた (Bennett R et al., 1987)。これらの結果の違いは、SEA 加熱時の溶媒条件、試験個体数の不足あるいは動物モデルにおける感受性の違いなどの影響が考えられた。そのため、加熱後 SEA の残存嘔吐活性の詳細な検討のためには加熱条件および動物実験条件

の再検討が必要と考えられた。食中毒事例株のゲノム解析では、食中毒事例株が一定の ST、コアグラマーゼ型および SE/SE1 遺伝子保有パターンの組み合わせを形成し、各クレード内に類似した組み合わせが多く分布することが明らかとなった。特に、ST6-CoaIV 型の *sea*、*selx*、*sel26* を保有する株が最も多く検出され、次いで ST1 および ST81 において共通の遺伝子セットが認められた。これらの特徴的な遺伝子セットは特定のクレードに分布しているが、地域や食品種類など特定の因子と関連しなかったことから、ST6-CoaIV 型などの食中毒事例を引き起こしやすい菌株群は存在するが日本におけるブドウ球菌食中毒事例は特定の環境や食品に限定されず広く分散して発生していることが示唆された。*selw* および *sel26* の配列は、同遺伝子名で複数の配列がデータベース上に登録されており、混乱が生じている。本研究では Dicks らが登録している配列を採用したが、今後既報と比較・引用する際に留意が必要である。SE/SE1 遺伝子の菌株由来ごとの比較では、食中毒事例株の SEA 遺伝子保有率が著しく高かった。一方で、食中毒事例株の SEG、

SEI、SEM、SEN、SEO、SEIU、SEIV および SEIW 遺伝子保有率がその他由来株よりも低かった。SEG、SEI、SEM、SEN および SEO が霊長類に対する嘔吐活性を有することは報告されており、これらの SE 遺伝子単独保有株による食中毒事例も報告されている。日本で食中毒を引き起こしやすい菌株系統が SEA 産生株に大きく偏っていることが推測されたが、今後も継続して事例株の SE/SEI 遺伝子保有パターンを解析していく必要があると考えられた。φ Sa3 配列は、同一クレード内で概ね共通しており、系統的な遺伝子伝播が起きていることが示唆された。一方で、一部の菌株 (strain11) の φ Sa3 配列が他の ST1 群と明確に異なっていたことから、異なる ST 株からの遺伝子水平伝播や変異の可能性が示唆された。今後、各菌株の SEA 産生量を比較し、遺伝子型プロファイルとの関連を解析する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

廣瀬昌平， 野村亮二， 土井りえ，
曾根美紀， 久手堅剛， 柳本恵太，

山谷聡子， 水野卓也， 小嶋由香，
工藤由起子． 全ゲノム解析を用いたブドウ球菌食中毒事例株の遺伝学的特徴の解明． 第45回日本食品微生物学会学術総会 (2024.9.5, 青森)

Hirose S, Nomura R, Doi R, Sone M, Kudeken T, Yanagimoto K, Yamaya S, Mizuno T, Kojima Y, and Hara-Kudo Y. Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* associated with food poisoning outbreaks in Japan. International Union of Microbiological Society 2024. (2024.10.23-35, フィレンツェ)

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

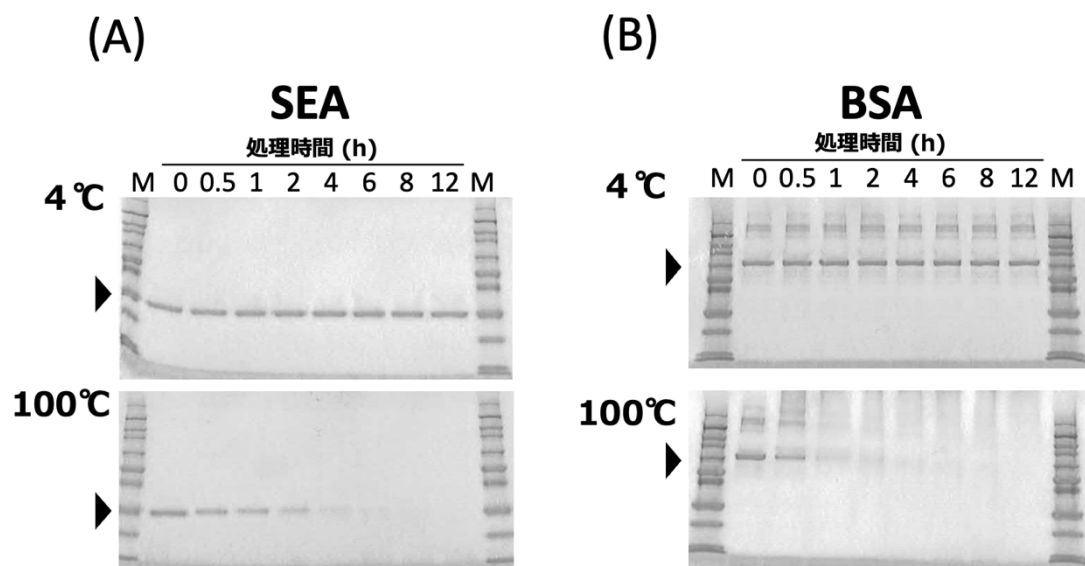


図 1 SEA の耐熱性評価

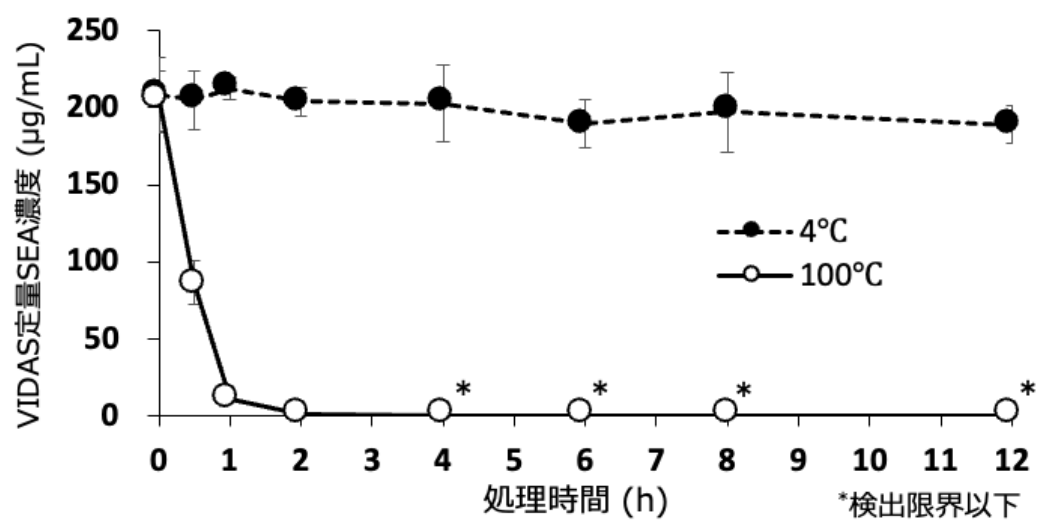
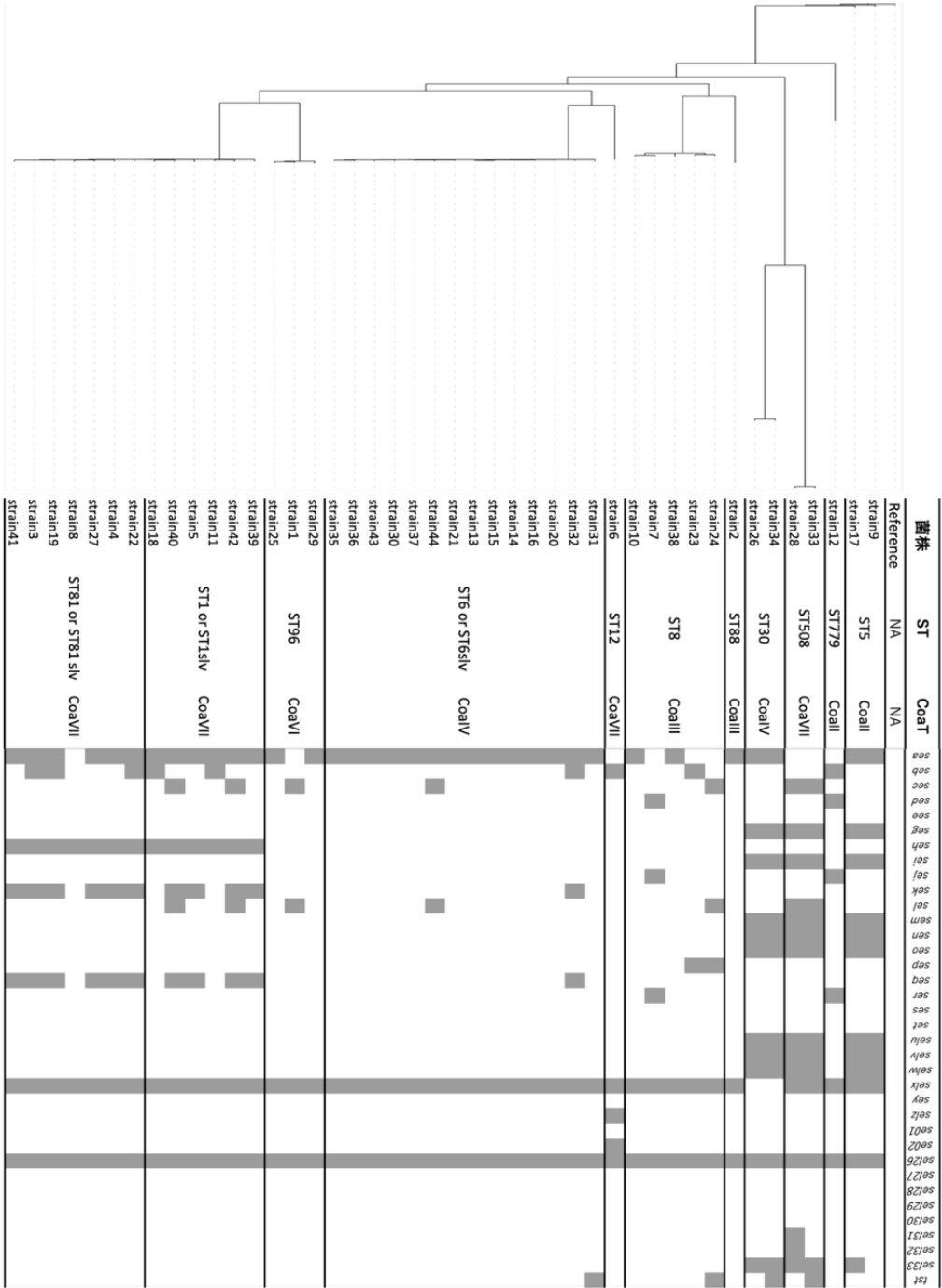


図2 加熱による SEA の抗原性低下



ST: sequence type, CoaT: coagulase type NA: not applicable

図 3 食中毒事例株の系統解析および SE/SE1 遺伝子の保有パターン

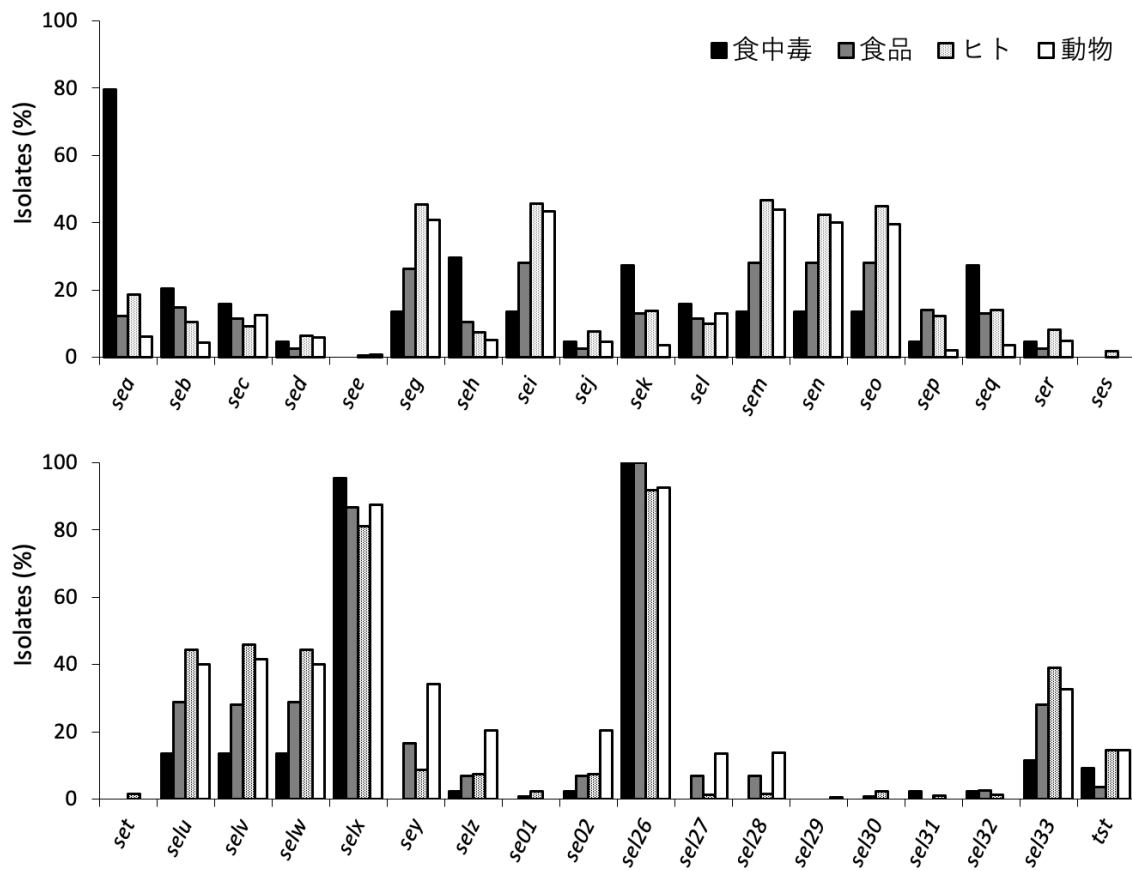


図4 菌株由来ごとの SE/SE1 遺伝子保有率

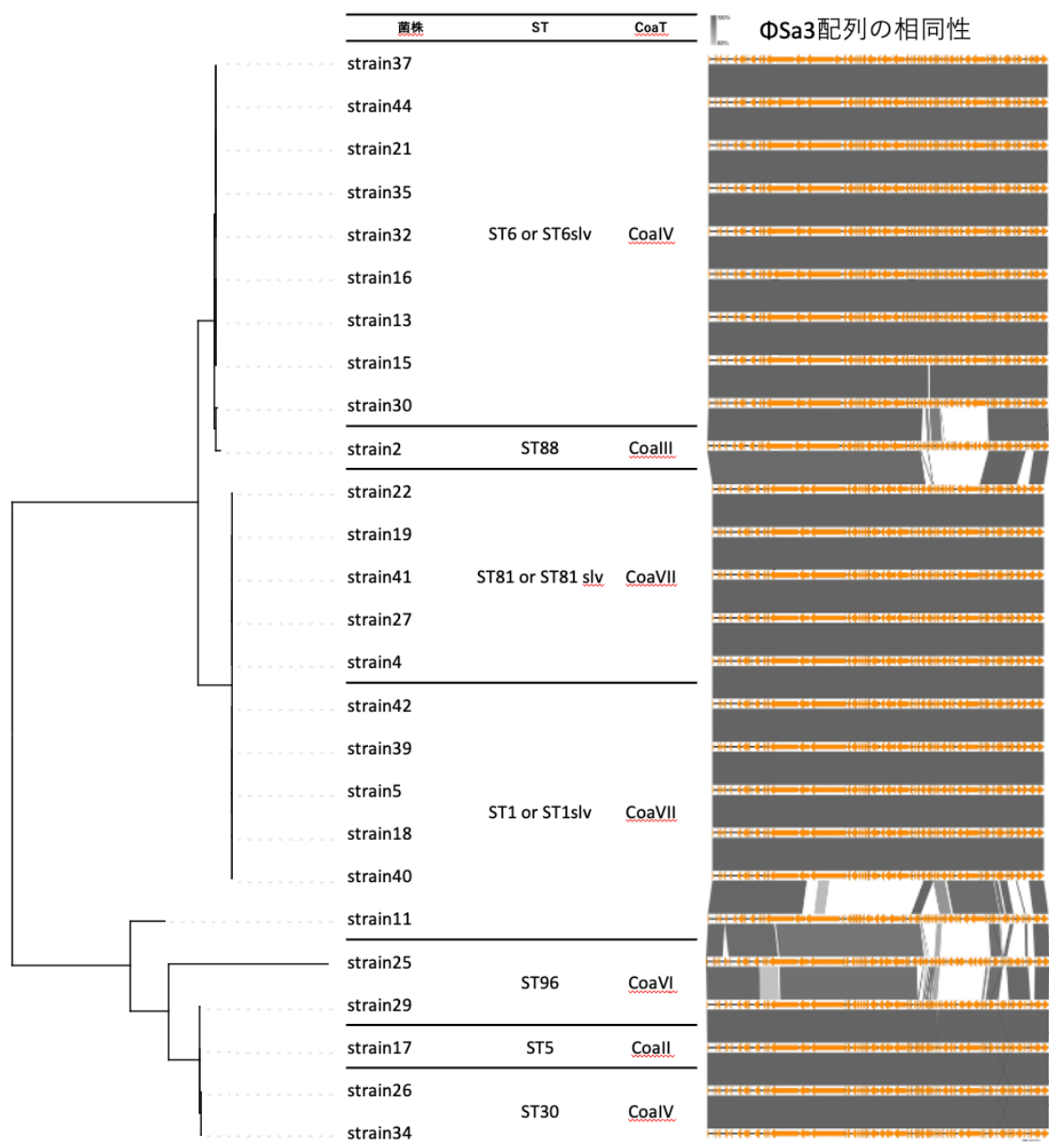


図5 ϕ Sa3 配列の比較

表 1 加熱後 SEA のマーモセットに対する嘔吐活性

100°Cでの 加熱時間 (min)	嘔吐個体数 /供試個体数	嘔吐の 潜伏期間 (min)	嘔吐回数
0	2/3	50, 108	6, 5
30	0/5	NA	NA
60	0/4	NA	NA