

令和4～6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)

総合研究報告書

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

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 (SE/SE1)、特に SEA は、嘔吐型食中毒の主要な原因物質である。本研究では、(1) 食中毒の原因食品中の SEA 検出性の解析、(2) 加熱が SEA の抗原性および嘔吐活性に与える影響の解析、(3) 食中毒事例由来株の遺伝的背景の解析を通じて、ブドウ球菌食中毒の実態解明と検査法の信頼性評価を目的とした。まず、過去 22 年間の統計から食中毒原因食品を 15 群に分類し、各食品の事例数・摂食者数・患者数を抽出した結果、主要な原因食品群は米飯、和菓子、肉類、魚介類であった。アタックレートに有意差はなかった。SEA の食品中での検出性を評価するため、米飯、求肥、粒餡、鮭フレーク、加熱牛肉を用いた添加回収試験を実施した。米飯および加熱牛肉では回収率約 100% だったが、他の 3 食品では 50～70% に低下し、食品成分が SEA 検出性に影響する可能性が示唆された。さらに市販キット (VIDAS) を用いた評価では、求肥、粒餡、鮭フレーク中の低濃度 SEA の検出性が米飯や牛肉より劣ることが確認された。次に 100℃ で加熱処理した SEA を SDS-PAGE および VIDAS で分析した結果、30 分加熱で抗原性は約 1/3 に、2 時間では約 1/800 に低下した。4 時間加熱後も SDS-PAGE ではバンドが確認されたが、VIDAS では検出限界以下となった。コモンマーモセットへの経口投与試験では、30 分および 60 分加熱 SEA を投与しても嘔吐は認められなかった。食中毒事例株の遺伝的背景の解析のため、食中毒事例株 44 株を対象にコアグラマーゼ型別、SE/SE1 遺伝子の multiplex PCR、全ゲノム解析、core genome SNP 解析を実施した。そ

の結果、ST6・コアグラゼ IV 型の *sea*、*selx*、*sel26* 保有株が最も多く、次いで ST1 および ST81 の株が多いことが示された。食品、ヒト、動物由来株との比較では、食中毒株の SEA 遺伝子保有率が突出して高く、SEA が日本国内の食中毒原因毒素として重要であることが再確認された。また、SEA 遺伝子をコードするプロフェージ ϕ Sa3 配列は、特定の ST・コアグラゼ型および毒素遺伝子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示唆された。本研究により、SEA は食品成分や加熱条件により検出性・活性が大きく変動すること、また特定の遺伝子型に由来する高食中毒原性株群の存在が示唆された。

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 (SE/SEs) は、嘔吐型食中毒の原因物質であり、抗原性の違いにより 30 種類以上が報告されている。日本におけるブドウ球菌食中毒では、SEA によ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 であると正確に同定するためには、食品検体からの SEs の検出が有効であるが、食

品成分が SEs の検出性や嘔吐活性に与える影響については明らかになっていない。そこで本研究では、ブドウ球菌食中毒の主要な原因食品を特定し、各食品中における SEA の検出性および食品の成分が市販の SEs 検出キット (VIDAS) による検出に与える影響を明らかにすることを目的とした。また、SEA は高い耐熱性を有するとされるが、加熱処理による抗原性の失活と嘔吐活

性の消失との相関については不明であることから、市販の検出キットおよび動物モデルを用いて、加熱処理の影響を詳細に解析することも目的とした。加えて、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の存在が指摘されており、これらを特定するために、食中毒事例由来株のコアグラマーゼ型、SE/SEI 遺伝子保有パターンおよび全ゲノム解析に基づく遺伝的背景を横断的に解析し、由来ごとの傾向と高食中毒原性黄色ブドウ球菌株群の同定を目指した。

B. 研究方法

(1) 1. 食中毒原因食品およびSEA 検出性の評価

2000年～2021年までの22年間の食中毒統計を用いて、ブドウ球菌食中毒の原因食品を15種類に分類し、各食品群ごとの事例数、摂食者数、患者数を抽出した。また、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、食品群間で比較した。また、主要な原因食品（米飯、求肥、粒餡、鮭フレーク、加熱牛肉）を用いて、SEAの検出性に対する食品の影響を評価するため、組換え大腸菌で精製したリコンビナントSEAを各食品に添加し、

VIDAS SET2キットを用いてSEAの回収率およびTV値を測定した。食品ごとの抽出条件（pH調整、酵素処理など）を最適化し、添加濃度ごとの検出限界や回収効率を評価した。

(2) 加熱後SEAの抗原性および構造安定性の評価

SEAを100℃で最大12時間まで加熱し、加熱後の抗原性をVIDASで、構造安定性をSDS-PAGEで評価した。VIDASでは、TV値から作成した検量線を用いて濃度を算出し、加熱による抗原性低下の程度を定量的に評価した。検出下限値は、キットの下限TV値（0.13）と最小希釈倍率から算出した。

(3) SEAの嘔吐活性の評価

100℃で30分間および60分間加熱したSEAおよび非加熱のSEA（各100μg）を小型霊長類コモンマーモセットに経口投与し、投与後5時間まで嘔吐の有無を観察し、嘔吐活性の有無を判定した。

(4) 食中毒事例由来株の生化学性状解析および全ゲノム解析

食中毒事例に関与した黄色ブドウ球菌の遺伝的背景を明らかにするため、令和4～6年度に収集された食中毒事例株について生化学的性状および全ゲノム配列に基づく比較解析を実施した。コアグラマーゼ

型の判定には、免疫ウサギ血清（デンカ）および正常ウサギ血漿を用いた凝固反応試験を行い、コアグラゼ I 型から VIII 型 (CoaI~CoaVIII) までの型別を実施した。また、供試菌株をブレインハートインフュージョン (BHI) 培地に接種し、37°C で 18 時間培養したのち、QIAamp DNA mini kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。得られた DNA は、Illumina 社の MiniSeq を用いて全ゲノム配列を取得し、CLC Genomics Workbench (Qiagen) にてアセンブリを行った。各株の sequence type (ST) は、Center for Genomic Epidemiology

(<https://www.genomicepidemiology.org/>) を用いて決定した。SE/SE1 遺伝子の解析では、blastn によって *sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see* などの古典的エンテロトキシン遺伝子に加え、*sel33* までの新規または多様な SE/SE1 遺伝子および *tst* (トキシンショック症候群毒素) の病原因子遺伝子の保有状況を網羅的に解析した。SE/SE1 遺伝子配列は、Dicks らの配列を採用した (Dicks et al, J Bacteriol, 2021)。令和 4 年度には multiplex PCR も併用し、PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動で確認した。得られた遺伝子型保有情報等をもとに、各 ST に

基づいた Minimum Spanning Tree (MST) の作成、core genome SNP 解析 (cgSNP)、IQ-TREE により系統樹構築を実施した。さらに、比較解析として、pubMLST データベースから収集した食品由来株 (158 株)、ヒト由来株 (2,649 株)、動物由来株 (1,390 株) のドラフトゲノム情報を用いて、各由来株における SE/SE1 遺伝子の保有率を横断的に評価し、食中毒事例株の特徴を明らかにした。加えて、SEA 遺伝子がコードされているとされるプロフェージ領域 ϕ Sa3 について、食中毒事例株 (26 株) から対応するゲノム領域を抽出し、NJ 法により系統樹を構築した。各株の ϕ Sa3 配列間の相同性は Easyfig により図示し、遺伝子伝播の系統的な傾向を評価した。

C. 研究結果

(1) 食品中における SEA の検出性に関する検討

過去の食中毒統計に基づき、ブドウ球菌食中毒の主要な原因食品群として、米飯、和菓子類、肉類、魚介類が抽出された。これらの食品に SEA を添加し、市販の検出キット (VIDAS) によって回収率を評価したところ、米飯および加熱牛肉では SEA の回収率が約 100%であった。一

方、求肥、粒餡、鮭フレークなどの食品では回収率が 50~70%と低下し、食品の種類によって SEA の検出性に差があることが明らかとなった。さらに、0.125~0.5 ng/g の濃度で SEA を各食品に添加し、VIDAS での検出性を確認結果、低濃度では求肥、粒餡、鮭フレーク検体において非検出が認められ、特に 0.125 ng/g 濃度では、米飯以外の食品で非検出が多数認められた。

(2) 加熱後 SEA の市販キットにおける検出性

加熱処理後の SEA における構造安定性および市販キットによる定量値の変化を評価した。100℃で 30 分間加熱した SEA は SDS-PAGE において明瞭なバンドが確認されたが、VIDAS での定量値は未加熱時の約 1/3 に低下し、2 時間加熱後には約 1/800 まで低下した。令和 6 年度の実験では、100℃で 4 時間加熱した SEA でも SDS-PAGE 上にバンドは認められたものの、VIDAS での定量値は検出限界以下となった。また、4℃で 12 時間静置した SEA では、SDS-PAGE および VIDAS の定量値に変化はなく、抗原性が保持されていることが確認された。

(3) 加熱後 SEA の嘔吐活性

加熱処理により抗原性の変化が認められた SEA について、コモン

マーモセットを用いた経口投与試験により嘔吐活性を評価した。その結果、100℃で 30 分および 60 分加熱した SEA を投与されたマーモセットにおいて、嘔吐は認められなかった。

(4) 食中毒事例株の生化学的、遺伝学的特徴の解析

食中毒事例由来株 44 株についてコアグラゼ型別および ST 解析を実施した結果、CoaIV および CoaVII が多く、遺伝子型では ST6、ST81、ST1 が多かった。cgSNP 解析では、食中毒事例株は複数のクレードに分類され、各クレード内で ST、コアグラゼ型、SE/SE1 遺伝子の保有パターンが概ね一致していた。特に、ST6・CoaIV で *sea*、*selx*、*sel26* 保有株が最も多く、次いで ST1・CoaVII 型、ST81・CoaVII 型が多く、それぞれ特徴的な SE/SE1 遺伝子保有パターンを示した。さらに、SE/SE1 遺伝子保有率を菌株由来別に比較した結果、食中毒事例株では SEA の保有率が著しく高く、SEG、SEI、SEM、SEN、SEO、SE1U、SE1V および SE1W 遺伝子の保有率は低いことが明らかとなった。また、SEA 遺伝子をコードするプロフェージ ϕ Sa3 配列に基づく系統解析では、同一 ST の菌株群が概ね同一のクレードに分布していた。食中毒事例株に

において ϕ Sa3 配列においても共通した遺伝的背景が存在することが示唆された。

D. 考察

本研究では、黄色ブドウ球菌が産生する SEA に着目し、食品中における検出性、耐熱性、加熱後嘔吐活性および食中毒事例由来株の遺伝学的特徴を解析した。まず、主要な原因食品群である米飯、和菓子類、肉類、魚介類に SEA を添加し市販の検出キット (VIDAS) を用いて評価した結果、米飯および加熱牛肉では SEA の回収率が高かったのに対し、求肥、粒餡、鮭フレークでは低濃度での検出率が低下し、食品成分による吸着や抗原抗体反応への干渉が検出性に影響する可能性が示唆された。次に、SEA の加熱安定性を評価したところ、100°C で 30 分間の加熱後も SDS-PAGE 上で明瞭なバンドが認められたが、VIDAS による定量値は約 1/3 に低下し、2 時間の加熱で約 1/800、4 時間加熱では検出限界以下となった。これにより、SEA は構造を保持していても抗原性が損なわれることが明らかとなり、特に抗原決定基の熱変性が市販キットでの検出性の低下に寄与していると推測された。一方、

4°C で 12 時間保存した SEA では抗原性の変化は見られず、SEA の低温安定性が確認された。さらに、加熱 SEA の嘔吐活性についてコモンマーモセットを用いて評価したところ、100°C で 30 分以上加熱された SEA ではマーモセットで嘔吐が確認されなかった。過去に報告されたネコでの嘔吐活性残存との結果の乖離は、溶媒条件や実験動物の感受性の差、試験個体数の不足によるものと推測された。食中毒事例株の遺伝学的解析では、CoaIV および CoaVII、ST6・ST1・ST81 の遺伝子型が多数を占め、特に ST6-CoaIV では *sea*、*selx*、*sel26* の毒素遺伝子を共通して保有する株が多く、cgSNP 解析においても同様のクレード内に分類された。これらの特徴的な遺伝子プロファイルを有する株が高食中毒原性菌株群であることが示唆された。また、SE/SE1 遺伝子保有率の菌株由来別比較では、食中毒事例株における SEA 遺伝子の保有率が著しく高かった。一方で、SEG、SEI、SEM、SEN、SEO、SE1U、SE1V および SE1W 遺伝子保有率は食品、ヒトおよび動物由来株よりも低く、日本の食中毒事例株は SEA 遺伝子保有株の偏りが強いことがあらためて確認された。さら

に、SEA 遺伝子をコードするプロファージ ϕ Sa3 配列の解析では、同一 ST 内で配列の類似性が高く、系統的な遺伝子伝播が示唆された。以上の結果から、食品の種類や保存・加熱条件が SEA の検出や活性に影響すること、また食中毒事例株において優勢な特定の遺伝子型の黄色ブドウ球菌株の存在が明らかとなった。今後、ブドウ球菌食中毒リスクを更に詳細に把握するため、食中毒事例株の横断的解析を継続することが重要であると考えられた。

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