

25. 神戸市中央卸売市場において食品と加工場を汚染するセレウ

ス菌の病原性に関する研究(青果物について)

○田中秀俊、瀧 夏樹（神戸市食品衛生検査所）

西川紘典（旧所属神戸市食品衛生検査所、現所属神戸市東部衛生監視事務所）

薬師神大介（旧所属神戸市食品衛生検査所、現所属神戸市西部衛生監視事務所）

【研究目的】

セレウス菌は食中毒の原因菌であり、食品や食品加工施設の衛生状態を確認する汚染指標菌としても検査意義が高い細菌である。同菌については、食中毒事件の検体から検出された菌株についての病原性の研究報告は数多く認められるが、食中毒事件に未関与な食品や施設などから検出される菌株についての病原性の有無に関する研究は少ない。本研究は神戸市中央卸売市場において流通する青果物について汚染指標菌として検出されるセレウス菌の毒素産生性遺伝子の保有状況を調べることを目的とした。

【研究の必要性】

セレウス菌は食品および食品取扱施設の汚染指標菌で、同菌が検出された場合は、その食品ならびに施設を取り扱う営業者に対して、施設の清掃や消毒の指示を出すことになる。しかしセレウス菌は芽胞菌であるため、一旦環境中に住み着くと、その消毒が困難であるという一面も持っている。食中毒事件に未関与な環境株の病原性の有無に関する調査は汚染指標菌であるセレウス菌の検査の意義をより明確にするためにも必要である。

【研究計画】

検査対象は食品衛生法に基づき収去した青果物 100 検体を想定した。

本研究で検出されたセレウス菌については、ラテックス凝集反応で下痢毒の一つである溶血性毒素の産生があるかどうかを調べ、さらに溶血性毒素（HBL）の産生をコードする遺伝子である *hblA*、*hblC*、*hblD*、非溶血性毒素（NHE）の産生をコードする遺伝子である *nheA*、*nheB*、*nheC*、*Bacillus cereus* エンテロトキシン T（BCET）の産生をコードする遺伝子である *bceT*、および嘔吐型の毒素（CES）の産生をコードする遺伝子である *ces* の検出を試み、同時に溶血性毒素（エンテロトキシン）の産生性を調べた。

【実施内容】

収去した青果物は 52 品目 112 検体であった（表 1）。

セレウス菌の培養は、直接法と MPN 法のどちらか、あるいは両方を用いた。

直接法は検体 25g を細切し、リン酸緩衝液で 10 倍に希釈した液、あるいは検体表面をふきふきチェック（栄研化学）によりふき取った液を直接 NGKG 寒天培地に接種し、35℃で 48 時間培養した。

MPN 法は、細切しリン酸緩衝液で 10 倍に希釈した液から 100 倍希釈、および 1,000 倍希釈液を作製し、これら 3 段階の希釈液 1mL ずつを各々 3 本の 5 万単位/L のポリミキシン B を加えたトリプティックソイブロス 10mL に加えて 35℃で 48 時間培養し、培養液の混濁が認められた

ものを NGKG 寒天培地に接種し、35℃で 48 時間培養した。

セレウス菌の同定については、NGKG 寒天培地上に生えた周囲に卵黄反応によるハローを形成した白色のラフコロニーをグラム染色し、グラム陽性大桿菌であることが確認された場合にセレウス菌陽性とした。

溶血性毒素の産生性は、細菌毒素検出キット CRET-RPLA「生研」（デンカ生研）を用いた。用法は添付の能書に従った。

毒素産生遺伝子検査は、*hblA*、*hblC*、*hblD*、*nheA*、*nheB*、*nheC*、*bceT* および *ces* について各々表 2 に示すプライマーを用いて PCR を実施し、PCR 反応条件は表中の参考文献に従った。

【結果】

収去検査した青果物は 52 品目 112 件で、そのうち 47 件からセレウス菌が検出され、検出率は 42.0%であった。

検出された陽性株についての毒素産生性試験、毒素産生遺伝子の検出状況を表 3 にまとめた。CRET-RPLA での溶血性毒素の産生性試験は 47 の陽性株のうち 32 株について実施した（実施率 68.0%）。毒素産生遺伝子検査はすべての陽性検体について実施した。

CRET-RPLA の結果と溶血性毒素遺伝子の *hblC* との相関関係については、CRET-RPLA でのタイター値を $< \times 64$ と $> \times 128$ の 2 群に分けて *hblC* 遺伝子の保有率を調べたところ、 $< \times 62$ では 25%であったのに対して $> \times 128$ では 75%となった（表 4）。

毒素産生遺伝子の保有状況については、いずれの遺伝子も保有しない株はなかった。HBL については *hblA*、*hblC*、*hblD* のいずれかを保有する確率が 93.6%（44/47）で、その内訳は、*hblA* が 83.0%、*hblC* が 53.2%そして *hblD* が 61.7%であった。NHE については *nheA*、*nheB*、*nheC* のいずれかを保有する確率は 100%（47/47）で、その内訳は、*nheA* が 91.5%、*nheB* が 89.4%、そして *nheC* が 87.2%であった。BCET（*bceT*）の保有率は 70.2%（33/47）で、CES（*ces*）陽性株は 1 株のみで保有率は 2.1%（1/47）であった。

8 種類の毒素産生遺伝子の保有状況を、陽性を「1」、陰性を「0」として、*hblA*、*hblC*、*hblD*、*nheA*、*nheB*、*nheC*、*bceT*、*ces* の順に 8 桁の数字列で表した（表 5）。その結果、セレウス陽性 47 株は 17 種類の遺伝子保有パターンに分類された。保有パターンで最も菌株数が多かったものは、*ces* 以外の遺伝子全てを保有している株で、その数は 18 で全体の 38.3%を占めた。また 2 種類以上の複数の遺伝子を持っている菌株は 46 で全体の 97.9%で、1 種類しか遺伝子を持たない菌株は 1 検体のみで、それは *hblA* のみを持っていた（表 6）。

【考察】

食品細菌の検査に携わる検査員は、通常の商品検査における *B.cereus* の検査では、NGKG 寒天培地上に生えたハローを有する白色のラフコロニーをグラム染色し、グラム陽性大桿菌が認められた場合 *B.cereus* と同定している。しかし *Bacillus* 属する *B.thuringiensis*、*B.mycoides* や *B.anthraxis* は *B.cereus* と遺伝学的に近縁な菌種であり、特に *B.thuringiensis* は生化学的性状ならびに寒天培地上の形態が *B.cereus* と酷似しており、鑑別が非常に困難であるとされている⁴⁾。よって通常の培養検査で *B.cereus* と同定される菌株にはある程度 *B.cereus* 以外の細菌も含まれている可能性があり、同定された *B.cereus* は広義の *B.cereus*であることを示す *B.cereus sensu lato* (*B.c.sl*)と表現すべきである。そこで著者らは、通常の方法で検出される *B.c.sl* 株について毒

毒素産生性と毒素産生遺伝子の保有状況を調べ、その食品衛生上の危害度についての考察を加えることを目的として本調査を実施した。

本調査で検出された *B.c.sl* のすべての株が何らかの毒素産生遺伝子を有しており、遺伝子を保有しない株は検出されなかった。毒素産生遺伝子の保有状況については、本調査と比較できる日本国内で実施された他の報告が見当たらないため、海外の報告との比較をおこなった（表 6）。それによると、NHE、BCET および CES の産生遺伝子については本調査のデータは他の報告と差異がない、あるいは近いものであったが、HBL の産生遺伝子に関しては本調査のデータは他の報告より保有率が高かった。この原因は不明だが、チュニジアの報告では *B.c.sl* が検出された 174 食品のうち本調査で対象とした新鮮な青果物は 5 品目と少なく、メキシコの報告は検査対象がキャッサバのみで、検査対象とした食材の違いが本調査と他の報告との違いに影響している可能性がある。なお韓国の報告における由来食品の詳細は不明であった。今後青果物以外の食材についての調査が必要だと考える。

毒素産生性については、検査実施率が 68.0% と検出された全株についての検査はできなかったが、毒素産生性と溶血毒産生遺伝子の *hblC* の保有率との間に正の相関が認められた。CRET-RPLA は、*hblC* が産生する HBL の L2 コンポーネントを検出していることが分かっている^{8,9)}。しかし一方で、CRET-RPLA でのタイターが×2 未満の検体から *hblC* が検出された株（2/12）や、タイターが×128 以上を示しながら *hblC* が検出されない株（4/16）が存在した。これらの毒素産生性と遺伝子保有状況の不一致が何を示すのかは本調査からは明らかにできないが、前者（遺伝子を保有しながらタイターが低い）の場合は、遺伝子の機能に問題があることが考えられ、後者（高いタイターを示しながらも遺伝子を保有しない）の場合には、CRET-RPLA が他の種類の毒素と交差反応を示している可能性があるのではないかと考えられる。この点については今後さらに研究されることを期待したい。

結論的には、本調査で得られた *B.c.sl* は、全ての株が何らかの毒素産生遺伝子を有していたことから、従来通り食中毒原因菌となり得るとの判断に基づいて衛生指導や食中毒予防対策を講じる必要があることがさらに明らかになった。

【参考文献】

- 1) Hansen B.M. and Hendriksen N.B. (2001). Detection of Enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains by PCR Analysis. Appl. Environ. Microbiol. 67(1), 185-189.
- 2) Caroline C. and Granum P.E. (2002). The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. FEMS Microbiology Letters 217, 115-119.
- 3) Ueda S. Yamaguchi M. Iwase M. and Kuwabara Y. (2013). Detection of Emetic *Bacillus cereus* by Real-Time PCR in Foods. Biocontrol Science 18(4), 227-232.
- 4) 高谷幸. (2013). 8. セレウス. 食中毒予防必携第 3 版. 社団法人日本食品衛生協会発行. P115-125.
- 5) Seon J.S. Ji S.L. Kwang G.L. Seung J. L. and Kwang W.H. (2008). Toxin Gene Profiling of *Bacillus cereus* Food Isolates by PCR. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 51(4), 263-268.
- 6) Maroua G-B.A. Sophie J. Florence B. Noel G. Radhouane G. Michel G. and Clarisse T. (2019). Toxigenic potential and antimicrobial susceptibility of *Bacillus cereus* group bacteria isolated

from Tunisian foodstuffs. BMC Microbiol. 19:196.

- 7) Jannifer S-C. Margarita M.C. Angel E.A-D. and Laura M.C-S.(2021). Enterotoxin Gene Distribution and Genotypes of *Bacillus cereus sensu lato* Isolated from Cassava Starch. Toxins.13.131.
- 8) 河合高生, 浅尾 努 (2009) : *Bacillus cereus*, 仲西寿男, 丸山 努監修, 食品由来感染症と食品微生物, p.439-455, 中央法規出版, 東京.
- 9) Beecher, D. J. and Wong, A. C. (1994). Identification and Analysis of the Antigens Detected by Two Commercial *Bacillus cereus* Diarrheal Enterotoxin Immunoassay Kits, Appl. Environ. Microbiol., 60, 4614-4616.

表 1 収去品目と検査数

品名	検査数	品名	検査数	品名	検査数	品名	検査数
イチゴ	7	ナガイモ	3	イチジク	1	スモモ	1
レタス	6	ナス	3	エンドウマメ	1	セロリ	1
キュウリ	5	リンゴ	3	オオバ	1	ソラマメ	1
スイカ	5	アマナツ	2	オクラ	1	ダイマサキ	1
ブドウ	5	キャベツ	2	カキ	1	チンゲンサイ	1
アスパラガス	4	タマネギ	2	カリフラワー	1	デコボン	1
トマト	4	トウモロコシ	2	サツマイモ	1	ニラ	1
ナシ	4	ナノハナ	2	キヌサヤ	1	ハッサク	1
ブロッコリー	4	ニンジン	2	キンカン	1	ピーマン	1
モモ	4	ネギ	2	サトイモ	1	ホウレンソウ	1
コマツナ	3	ハクサイ	2	シシトウ	1	ミカン	1
ジャガイモ	3	ミズナ	2	シュンギク	1	ミニトマト	1
ダイコン	3	レンコン	2	ズッキーニ	1	メロン	1

表 2 毒素産生遺伝子検査に用いたプライマー

毒素名	遺伝子名	配列	bp	参考文献
HBL	<i>hblA</i>	HBLA1 GTGCAGATGTTGATGCCGAT HBLA2 ATGCCACTCGCTGGACATAT	319	1)
	<i>hblC</i>	HBLC1 AATGGCTACGGAACCTCTAT HBLC2 CTCGCTGTTCTGCTGTTAAT	749	
	<i>hblD</i>	HBLD1 AATCAAGAGCTGTACGAAT HBLD2 CACCAATTGACCATGTAAT	429	
	<i>nheA</i>	nheA 344 S nheA 843 A TACGCTAAGGAGGGGCA GTTTTTATTGCTTCATCGGCT	500	
	<i>nheB</i>	nheB 1500 S nheB 2269 A CTATCAGCACTTATGCGAG ACTCCTAGCGGTGTTC	770	
	<i>nheC</i>	nheC 2820 S nheC 3401 A CGGTAGTGATTGCTGGG CAGCATTGCTACTTGCCAA	582	
BCET	<i>bceT</i>	BECT-N BECT-C TTACATTACGAGGACGTGCTT TGTTTGTGATTGTAATTCAGG	428	2)
CES	<i>ces</i>	ces-F ces-R CACGCCGAAAGTGATTATACCAA CACGATAAAACCCTGAGATAGTG	176	3)

表 3 毒素産生性試験、毒素産生遺伝子の検出状況

Strain No.	食品名	CREAT RPLA	HBL			NHE			BCET	CES
			<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>bceT</i>	<i>ces</i>
23-004	ナノハナ	×256	+	—	+	+	+	+	+	—
23-005	ホウレンソウ	<×2	—	—	—	+	+	+	—	—
23-024	スイカ	×64	+	+	+	+	+	+	—	—
23-025	アマナツ	×64	+	—	+	—	+	+	+	—
23-029	ジャガイモ	×256	+	+	+	+	+	+	+	—
23-030	スイカ	×512	+	+	+	+	+	+	+	—
23-032	アスパラガス	×4	+	+	+	+	+	+	+	—
23-036	レタス	<×2	+	+	+	+	+	+	+	—
23-038	モモ	<×2	+	—	—	—	—	—	+	—
23-040	セロリ	×512	+	+	+	+	+	+	+	—
23-047	モモ	×128	+	—	+	+	+	+	—	—
23-048	リンゴ	×2	+	+	+	+	+	+	+	—
23-049	タマネギ	×512	+	+	—	+	+	+	+	—
23-058	スモモ	×512	+	+	+	+	+	+	+	—
23-097	シュンギク	<×2	+	—	+	+	+	+	—	—
23-098	リンゴ	×512	+	+	+	+	+	+	—	—
23-099	ミズナ	×512	+	+	+	+	+	+	—	—
23-100	サツマイモ	×512	+	+	+	+	+	+	+	—
23-104	ネギ	×512	+	+	+	+	+	+	—	—
23-105	ハクサイ	×1,024	+	+	+	+	+	+	+	—
24-006	キヌサヤ	×256	+	—	—	—	—	—	—	—
24-007	ニラ	×256	+	—	—	+	—	—	—	—
24-008	コマツナ	<×2	+	+	+	+	+	+	+	—
24-009	イチゴ	<×2	+	—	—	+	+	+	+	—
24-010	ブロッコリー	<×2	+	—	—	+	+	—	+	—
24-011	ピーマン	<×2	+	—	—	+	+	—	+	—
24-016	レタス	×512	+	+	+	+	+	+	+	—
24-017	アスパラガス	×256	+	+	+	+	+	+	+	—
24-018	シシトウ	<×2	+	—	—	+	+	+	—	—
24-019	コマツナ	<×2	+	—	—	+	+	+	—	—
24-025	イチゴ	<×2	+	—	—	+	+	+	+	—
R6-026	ナス	NT	—	—	—	+	+	+	+	—
R6-031	トマト	<×2	—	—	—	+	+	+	+	—
R6-032	タマネギ	NT	+	—	+	+	+	+	+	—
R6-033	キュウリ	NT	+	—	+	+	+	+	+	—
R6-035	トマト	NT	—	—	—	+	+	+	+	—
R6-044	ナガイモ	NT	+	+	+	+	+	+	+	—
R6-045	ナス	NT	+	+	+	+	+	+	+	—
R6-046	オオバ	NT	—	—	—	—	—	—	+	—
R6-054	ナシ	NT	—	+	+	+	+	+	+	—
R6-055	キュウリ	NT	+	+	+	+	+	+	+	—
R6-056	イチジク	NT	—	—	—	+	+	+	—	+
R6-057	コマツナ	NT	—	—	—	+	—	+	—	—
R6-058	ナシ	NT	+	+	+	+	+	+	+	—
R6-059	ジャガイモ	NT	+	+	+	+	+	+	+	—
R6-060	ブロッコリー	NT	+	+	—	+	+	+	+	—
R6-061	レタス	NT	+	+	+	+	+	+	+	—

表4 CRET-RPLA のタイターと *hbC* 遺伝子保有状況の比較

CRET-RPLA タイター値	<i>hbC</i>		陽性率(%)
	陽性	陰性	
< ×64	4	12	25
> ×128	12	4	75

表5 陽性株の遺伝子保有パターン

Gene Score	N	Gene Score	N
11111110	18	00000110	1
10011100	4	00010100	1
11111100	4	00011010	1
10111110	3	00011101	1
00011100	2	10000000	1
00011110	2	10000100	1
10011010	2	10010000	1
10111010	2	10101110	1
11011110	2		

表6 遺伝子保有数別の菌株数

No. of gene	N
7	18
6	10
4	7
5	4
2	4
3	3
1	1
計	47

表7 他の報告との比較

国名	由来	N	HBL			NHE			BCET	CES	参考文献
			<i>hb/A</i>	<i>hb/C</i>	<i>hb/D</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>bceT</i>	<i>ces</i>	
韓国	食品	59	32.2	32.2	32.2	100	100	100	69.5	6.8	5)
チュニジア	食品	174	29.9	14.9	54.6	98.9	86.8	97.7	50.6	4.0	6)
メキシコ	キャッサバ	98	13			99			NT	0	7)
日本（神戸）	青果物	47	83.0	53.2	61.7	91.5	89.4	87.2	70.2	2.1	本調査
			93.6			97.9					

【経費使途明細】

使 途	金 額
消耗品費（標準菌株）	16,830 円
消耗品費（DNA プライマー, その他 PCR 試薬等）	42,339 円
消耗品費（細胞毒素検出キット等）	59,400 円
振込手数料	290 円
合 計	118,859 円※
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円

※残金は返金済み