食品中の衛生微生物の迅速・安全評価法に関する研究

品　川　邦　汎（岩手大学農学部助教授）

食品の安全性および品質を確保するためには，食品の原料，製造・加工および流通過程で汚染する微生物の種類，菌量およびその危害性（病原性，食中毒原性毒素の産生性）を的確に評価し，適切な衛生管理（取り扱い）を行なうことが重要である。

本研究は，食品中の汚染頻度が高く，食中毒菌である黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) およびセレウス菌 (*Bacillus cereus*) について，本菌の産生する食中毒原性毒素（嘔吐毒および下痢原性毒素）の高感度・迅速検出法の開発を目的とする。他方，生物農薬として野菜，お茶，果樹等の作物に散布されており，セレウス菌性状に極めて似ている *B. thuringiensis* (Bt 菌）について，食品からの検査法を確立する。また，本菌の食中毒原性（下痢原性毒素の産生）試験法についても検討を行う。

Ⅰ．材料および方法

高感度毒素検出法として，ブドウ球菌エンテロトキシン (SE) についてはモノクローナル抗体を用いる sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)，セレウス菌下痢原性毒素（エンテロトキシン：BCET）については逆受身ラテックス凝集反応法 (Reversed Passive Latex Agglutination: RPLA test) の開発を試みた。他方，セレウス菌嘔吐毒検出の有効な方法としてはサルへの経口投与試験しかなく，本毒素の検出法を確立することが急務とされている。近年，セレウス菌「嘔吐型」食中毒由来菌株は，HEp-2 細胞に対して空胞化変性活性を有する物質を産生し，本活性物質は嘔吐毒の物理化学的性状によく似ていることが報告された[1]。そこで本変性活性について，セレウス菌「嘔吐型」および「下痢型」食中毒由来株を対象にその産生性を調査し，食中毒診断および食品の安全性評価に本検査法が有効であるかどうかを検討した。

実験に用いた材料および方法は，以下の通りである。

1．ブドウ球菌エンテロトキシン，セレウス菌エンテロトキシンおよび嘔吐毒（細胞空胞化変性物質）の検出法

1）モノクローナル抗体 (MAb) を用いるブドウ球菌エンテロトキシンA (SEA) の検出法

SEA に反応するモノクローナル抗体 3 種 (SEA のみに反応する MAb A-111，A-211 および SEA と SEE の両方に反応する MAb AE-32)[2] を用いて，ポリスチレンマイクロプレートへの吸着抗体と horse-radish peroxidase (PO) の標識抗体の組み合わせによる sandwich ELISA について検討した。各濃度（10，20，50μg/ml）の MAb をプレートへ各々吸着後，一定量（1，2.5，5，10 μg/ml）の SEA を反応（37℃，2 時間）させ，ついで PO 標識 MAb を各々反応（37℃，1 時間）させた後，基質を添加し，反応（37℃，30分）させた。反応終了後，2 NH_2SO_4を添加して反応を停止させ，吸光度 (OD 492 nm) を測定した[3]。なお，標識抗体の作成は Nakane and Kawaoi[4] の方法に従って行なった。

2)　RPLA 法によるセレウス菌エンテロトキシン (BCET) の検出法

精製 BCET で作戦したウサギポリクローナル抗体から affinity chromatography で抗 BCET-IgG を精製し，その精製抗体（20μg/m*l*）をポリスチレンラテックス（0.75μm）に吸着させて抗体感作ラテックスを作製した。RPLA 法はブドウ球菌エンテロトキシン検出 RPLA 法[5] に準じて行なった。

3)　食中毒由来菌株の産生する HEp-2 細胞変性活性試験

「嘔吐型」食中毒由来菌110株および「下痢型」由来菌11株を，各々米飯培地〔米粉1：水2 (w/v) の割合で混合後，加熱滅菌し，この1gを滅菌水10m*l*に濁したもの〕で32℃，35時間培養し，その遠心上清を試料とした。2倍階段希釈した各試料25μ*l* を96穴マイクロプレートに接種し，ついで HEp-2 細胞（3.0×10^5/m*l*）100μ*l* を接種後，37℃，35時間培養した。培養終了後，細胞内の空胞化変性を倒立顕微鏡下で観察し，HEp-2 細胞質内に10個以上の空胞を有するものが1ウエル中25%以上を占める場合を陽性と判定した[6]。

2.　Bt 菌検査のための DNA ハイブリダイゼーション法および Bt 菌の下痢原性毒素産生試験

1)　DNA コロニーハイブリダイゼーション

Bt 菌は細胞内に結晶様タンパク質顆粒 (crystalline protein body: CPB) を形成する以外，セレウス菌の性状と同じである。この CPB にはダイヤモンド型，立方体および不定型等があり，その検査は，菌を培養後，加温染色し，鏡検によって CPB を確認する方法が行なわれている。しかし，本方法では判別しにくいものあり，より確実な検査法が望まれている。そこで今回，CPB 産性遺伝子に対する DNA プローブを用いるコロニーハイブリダイゼーション法による検査法について検討した。

ハイブリダイゼーションには，CPB 産生遺伝子 (Cry-a, Cry-Ⅳ D)[7] に対する DNA プローブ2種類を用いた。これらのプローブを DIG-ELISA 標準用キット (Boehringer Mannheim, Germany) を用いてジゴキシゲニンラベルし，Moseley et al.[8] の方法により，コロニーハイブリダイゼーションを行なった。

2)　Bt 菌の下痢原性毒素産生性試験

輸入穀類（大豆，トウモロコシ）から分離した Bt 菌83株および野菜から分離した Bt 菌6株について，BCET 検出法として開発した RPLA 法により，下痢原性毒素の産生性を調べた。なお Bt 菌の毒素産生は，セレウス菌と同様な方法（0.1%ブドウ糖加 BHI 培地で32℃，6時間培養）[9] で行なった。

II.　結果および考察

1.　ブドウ球菌エンテロトキシン (SE)，セレウス菌エンテロトキシンおよび嘔吐毒の高感度検出法

1)　モノクローナル抗体を用いる sandwich ELISA による SEA の検出法

各 MAb（3種）を用いてプレートへの吸着抗体（10ng/m*l*）と PO 標識抗体の組み合わせ（6通り）による ELISA について SEA の検出感度を検討した。吸着抗体 A-211 と標識抗体 A-111（A-211/A-111^{+PO}と略），および A-111/AE-32^{+PO}の組み合わせにより SEA 1ng/m*l* を検出することができた。他の組み合わせでは検出感度は低い (2.5ng/m*l*以上) か，全く検出することができなかった（**Table 1**）。それゆえ，SE 検出に用いる MAb としては，毒素分子上で異なった epitope を認識している特異性の高いものを用いることが重要であると考えられる。

次いで，吸着抗体濃度を5，10，20，および50

Table 1 Effective combinations of monoclonal antibodies (MAbs) in sandwich ELISA systems for the detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA)

ELISA		Minimun amount (ng/ml) of SEA detectable by sandwich ELISA
Coating MAb[1)]	Probing MAb	
A-111	A-211	2.5
A-111	AE-32	1
A-211	A-111	1
A-211	AE-32	(−)[2)]
AE-32	A-111	2.5
AE-32	A-211	(−)

1) MAb at 10μg/ml was coated in each well of ELISA plate.
2) (−) repersented ineffective MAbs pairs used.

μg/ml と変化させた場合，A-211/A-111^{+PO} ELISA では，吸着抗体濃度が高いほど SEA の検出感度も高くなることが判った。しかし，A-111/AE-32^{+PO} ELISA では，抗体濃度を変化させても検出感度には変らなかった。そこでA-211/A-111^{+PO} ELISA について，吸着抗体濃度を20および50μg/ml を用い，SEA の最少検出感度を調べた。吸着抗体 50μg/ml の場合，SEA 0.25ng/ml

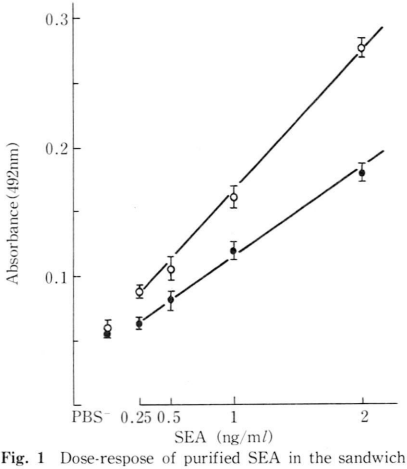

Fig. 1 Dose-respose of purified SEA in the sandwich ELISA with MAb A-211/A-111^{+PO}.
(—●—) and (—○—) showed 20 and 50 μg/ml of MAb A-211 as the coating antibody.

まで検出でき，20μg/ml では 0.5ng/ml まで検出することができた（**Fig. 1**）。本 ELISA の特異性について，他の型の粗 SE（毒素産生菌の培養遠心上清）に対する反応性を調べた結果，SEAのみと特異的に反応し，他型 SE とは反応しなかった[10)]。

以上の結果から，MAb を用いる sandwich ELISA は，ポリクローナル抗体を用いる従来の ELISA に比べ同等，もしくはそれ以上の検出感度を

Table 2 Sensitivity and specificity of RPLA test.

Toxin	Toxin (ng/ml)	RPLA test
(Purified toxin)		
B. cereus enterotoxin	10	+++
B. cereus enterotoxin	1-2	+
B. cereus enterotoxin	0.1	−
E. coli enterotoxin		
Heat-labile	1,000	−
Heat-stable	1,000	−
C. perfringens enterotoxin	64,000	−
S. aureus		
enterotoxin A	128,000	−
enterotoxin B	25,000	−
enterotoxin C	6,400	−
enterotoxin D	3,200	−
V. cholerae enterotoxin	128,000	−
V. parahaemolyticus thermostable hemolysin	2,000	−
(Culture supernatant)		
B. thuringiensis, kurstaki		+++
B. licheniformis IAM 11054		−
B. subtilis IAM 1069		−
B. megaterium IFO 3003		−
B. pumilis IFO 3813		−
S. aureus FRI-722 (ET-A)		−
S. aureus 243 (ET-B)		−
S. aureus FRI-361 (ET-C)		−
E. coli 240-3 (LT)		−
C. perfringens NCTC 8798		−
V. cholerae 569 B		−

示し，しかもその特異性は高く，SE 検出に有効な方法であることが証明できた。今後，他の型の SE 検出法についても MAb を用いる ELISA 法を確立する必要があり，現在検討中である。

2) セレウス菌エンテロトキシン(BCET)検出のための RPLA 法

RPLA 法についてまず最初，抗 BCET-IgG 感作ラテックスを作製し，BCET の最少検出量およびその特異性を調べた結果，BCET 1～2ng/m*l* を12～16時間で検出できた。さらに他の食中毒原性毒素（1～128μg/m*l*）および溶血素（2μg/m*l*）に対しては全く反応を示さず，特異性の高いことがわかった（**Table 2**）。またセレウス菌と同属の他菌種および食中毒菌の培養遠心上清（粗毒素）に対しても全く反応しなかった。しかし，セレウス菌性状に極めて類似する *B. thuringiensis*, Kurstaki 培養遠心上清に対しては強い反応を示し，BCET と同じ抗原性の毒素を産生することが判った（**Table 2**）。そこで，本検査法を用いてセレウス菌「下痢型」食中毒由来菌19株および「嘔吐型」由来菌105株の BCET 産生性を調べた結果，「下痢型」由来菌株は全て高い毒素産生性を示した（1.6～3.2μg/m*l*）。これに対し，「嘔吐型」由来菌株ではわずか2株（1.9%）しか認められなかった[11]。

以上の結果から，セレウス菌エンテロトキシン検査法として，RPLA 法は有効な手段であると考えられる。今後，本方法を活用し食品中のセレウス菌の衛生管理を行なうことが必要となるであろう。

3) 「嘔吐型」食中毒診断のための HEp-2 細胞変性活性試験

「嘔吐型」食中毒分離菌株（*B. cereus* No.27）を用いて，米飯培養による HEp-2 細胞変性活性(HEp -2 活性）物質の産生状況について検討した。芽胞形成は培養10時間から形成し始め，15時間で最高（log 6.7/m*l*）に達し，それ以後は一定であった。HEp-2活性は培養15時間以後から産生が見られ，30～35 時間でほぼ一定（160unit/m*l*；unit/m*l*：変性活性を示す最少希釈倍数）となっ

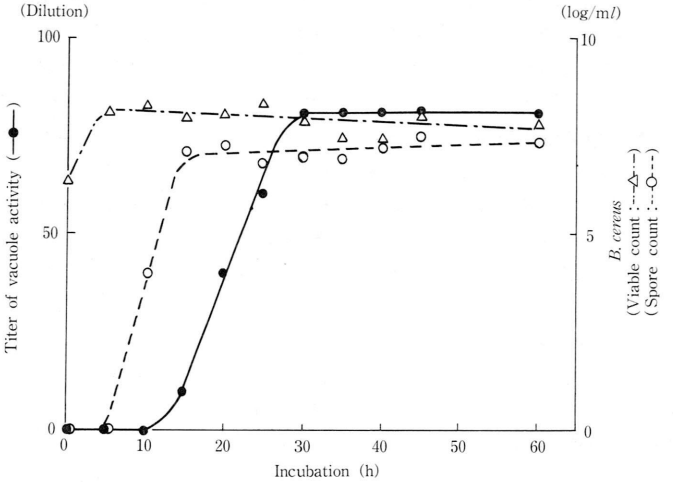

Fig. 2 Time cource of vacuole factor production in cooked rice suspension at 30℃

Table 3 The vacuole activity of *B. cereus* strains isolated from vomiting and diarrheal-type food poisoning

Type of food poisoning	H-serotpe	Number of strains	Titer of vacuole activity (unit/m*l*)					
			<10[a]	10	20	40	80	160
Vomiting-type	1	76	20	5	15	26	5	5
	8	15	8	1	3	1	2	-
	14	2	2	-	-	-	-	-
	3	1	1	-	-	-	-	-
	19	1	1	-	-	-	-	-
	ut[b]	15	10	-	1	1	1	2
	Total	110	42	6	19	28	8	7
Diarrheal-type	6	4	4	-	-	-	-	-
	2	2	2	-	-	-	-	-
	ut	8	8	-	-	-	-	-
	Total	14	14	0	0	0	0	0

a) <10 : No vacuole activity was obtained with 10-fold or less diluted culture supernatant.
b) UT : Untypable

た（**Fig. 2**）。本結果から HEp-2 活性物質の産生としては米飯培地で32℃，35時間培養が有効であると決定された。なお本活性物質は121℃，10分の加熱，pH 2 および11で 2 時間処理，トリプシン，ペプシン等のタンパク質分解酵素処理に対して，全く影響を受けず活性の低下は見られなかった[1]。これらの性状はセレウス菌嘔吐毒の性状に極めて似ており，HEp-2 活性物質は嘔吐毒の可能性が示唆された。

次いで「嘔吐型」食中毒由来菌110株および「下痢型」食中毒由来菌14株について，HEp-2 活性を調べた結果，嘔吐型由来菌株では80～160unit/m*l*の活性を示すものが15株（13.6%）見られ，活性陰性（10unit/m*l*未満）のものが42株（38.2%）であった。これに対し，下痢由来菌株では全て活性陰性であった（**Table 3**）。

以上の結果から，HEp-2 活性試験は「嘔吐型」食中毒の診断に有効な方法であると考えられる。今後，本活性物質の分離・精製，およびその嘔吐活性等を調べ，その本態を明らかにすることが重要である。また，嘔吐毒（HEp-2 活性物質）の検出法を確立することも急務の課題である。

2. Bt 菌検査のための DNA ハイブリダイゼーション法および Bt 菌の下痢原性毒素産生性

1) DNA コロニーハイブリダイゼーション

野菜および輸入穀類から分離された Bt 菌69株（鏡検法で CPB が確認されたもの）について，鏡検による結晶様タンパク質顆粒(CPB)検査および DNA-プローブ (Cry-aおよび Cry-Ⅳ D) を用いるコロニーハイブリダイゼーション法による検査法を比較した。鏡検法ではダイヤモンド型 CPB 形成のものが最も多く 59 株（85.5%），次いで立方体型が 3 株，ダイヤモンド型と立方体型の両方を形成するものが 3 株であった（**Table 4**）。他方，コロニーハイブリダイゼーション法では，Cry-a プローブで陽性反応を示すものが 63 株，Cry-Ⅳ D プローブで陽性を示すものが 3 株であった（**Table 4**）。

以上の結果から，DNA ハイブリダイゼーション法は Bt 菌鑑別に有効な検査法であることが証明できた。特に，多数のセレウス菌汚染の中から

Table 4 Comparison of microscopic and hybridization methods for detection of crystalline protein body (CPB) of *B. thuringiensis* in vegetables and grain imported

Source	Number of sample[1)]	Number of CPB-positive strains							
		CPB form by Microscopic method						Hybridization method	
		B[1)]	C[1)]	G[1)]	B+C	B+G	C+G	cry-a probe	cry-Ⅳ D probe
Vegetables	4	2			1	1		4	0
Grains imported	65	57	3	1	2	1	1	59	3
Total	69	59	3	1	3	2	1	63	3

1) CPB-positive strains by microscopic method
2) B : Bipyramidal form
3) C : Cubic form
4) G : Granula (irregula) form

Table 5 Enterotoxin production by strains of *B. thuringiensis* isolated from vegetables and imported grains determined by RPLA test

Source	Number of strains tested	Number of strains produced enterotoxin (μg/m*l*)						
		<0.01	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2
Vegetables	6						2	4
Grains	83	26	4	2	12	16	14	9
Total	89	26	4	2	12	16	16	13

Bt 菌を鑑別する場合，鏡検法では極めて困難であるのに対し，本方法は迅速・簡易に行なうことができる。それゆえ，本検査法は食品中の Bt 菌汚染調査等の検査に有効であると考えられる。

2) Bt 菌の下痢原性毒素産生性

野菜および輸入穀類から分離された Bt 菌89株の下痢原性毒素（エンテロトキシン）産生性について，BCET 検査法として開発した RPLA 法を用いて検討した。エンテロトキシン1.6～3.2μg/m*l*と産生性の高いものが19株（21.3%），非産生性（10ng/m*l*未満）のものが26株（29.2%）認められた（**Table 5**）。本結果から，Bt 菌の多くは BCET と同じ抗原性を示す毒素を産生することが明らかとなった。今日，Bt 菌（芽胞を含む生菌）は生物農薬として使用され，農産物に散布されている[12)]。それゆえ食品の衛生管理面から，その使用方法および取り扱いについて十分注意する必要があると考えられる。しかし，下痢原性毒素産生以外の生物活性については，これまでほとんど検討されておらず，今後これらの活性についてもを調査し，それらの結果を含めて Bt 菌の安全性を総合的に評価する必要があろう。

以上，食品中の衛生微生物（食中毒菌）の迅速，安全性評価法に関する研究として，自然界に広く分布し，しかも食品への汚染が高い食中毒菌（黄色ブドウ球菌，セレウス菌および Bt 菌）毒素の検査法および Bt 菌検出法（食中毒原性試験を含む）について検討を行なった。今回確立された方法は，今後広く活用されることにより改良，修正され，食品検査法として用いられることが期待される。さらにこれらの検査法を応用して，食品の的確な安全性評価を行ない，十分な衛生管理が行なわれるようになることが望まれる。

本研究は，浦上食品・食文化振興財団からの援助を受けて行なわれたものであり，ここに記して

深謝の意を表します。また，本研究は国立衛生試験所　小沼博隆室長，女子栄養大学　桑原祥浩教授および山形県衛生研究所　片桐進所長等の共同によって行なわれたものであることを付記し，感謝致します。

文　献

1) Hughes, S., et al. (1988): FEMS Microbiol. Lett., 52 : 7-12.
2) Shinagawa, K., et al. (1991): Can. J. Microbiol., 37 : 581-585.
3) Shinagawa, K., et al. (1991): Vpn. J. Vet. Sci., 52 : 847-850.
4) Nakane, P.K. and Kawaoi, A (1974): J. Histochem. Cytochem. 22 : 1084-1091.
5) 五十嵐英夫，新垣正夫 (1982)：メディヤ・サークル，27 : 72-81.
6) Shinagawa, K., et al. (1992): J. Vet. Med. Sci., 54 : 443-446.
7) Herman, H. and Whiteley, H.R. (1989): Microbiol. Rev., 53 : 242-255.
8) Moseley, S.L., et al. (1980): J. Infect. Dis., 142 : 892-898.
9) Shinagawa, K., et al. (1985): Jpn. J. Vet. Sci., 47 : 557-565.
10) Shinagawa, K., et al. (1991): J. Vet. Med. Sci., 53 : 1093-109.
11) Shinagawa, K. (1990): In Microbial Toxins in Foods and Feeds (Eds. Pohland, A.E. et al.) p.181-193. Plenum pub USA.
12) 品川邦汎 (1988)：臨床検査，32 : 1559-1563.

Rapid, simplified, and high sensitive assays for detection of enterotoxigenic and emetic toxins to assess microbiological safety of foods

Kunihiro Shinagawa (Faculty of Agriculture, Iwate University)

Examination of bacteria organisms and detection of toxins in foods and food materials which are responsible for food poisoning are very important for assess-ment of the safety of foods.

We have developed on rapid, simplified, and high sensitive immunological assays for Staphylococcal enterotoxin (SE) and *Bacilus cereus* enterotoxin (BCET) using anti-enterotoxins.

These results obtained are as follow;

1. Sandwich ELISA using two different monoclonal antibodies (coating MAb: A-211, prbing MAb: A-111) was developed for detection of the SE-A. The sensitivity of the ELISA was 0.25-0.5ng/m*l*.
2. We have developed the reversed passive latex aggulutination (RPLA) assay to detect BCET at 1 to 2ng/m*l*. No enterotoxin in culture supernatants of food-poisoning-bacteria and other *Bacillus* spp. strains except *B. thuringiensis* were detected by the RPLA test. Sixty-three (70.8%) out of 89 *B. thuringiensis* strains isolated from vegetables and grains imported were positive for production of ET by RPLA test. They produced ET at 0.01-3.2μg/m*l*.

   On the other hand, *B. cereus* and *B. thuringiensis* are very similar in biochemical characteristics. *B. thuringiensis* produces crystal protein bodies (crystal toxins) in bacteria cells, whereas *B. cereus* does not. The identification of *B. cereus* and *B. thuringiensis* by colony hybridization method using DNA prcbe to crystal toxins were studied.
3. *B. cereus* and *B. thuringiensis* were identified by colony hybridization method with two kinds of DNA-probes (cry-a and cry-Ⅳ D probe) to crystal toxins. Sixty-six (95.7%) out of 69 *B. thuringiensis* strains possessing crystal toxins by microscopic method were positive in the colony hybridization methods.