＜平成21年度助成＞

食中毒細菌毒素の不活性化に関する研究

宮本　敬久・本城　賢一
（九州大学大学院　農学研究院　生命機能科学部門）

1. 緒　　言

「食」の安全確保、安定供給の問題は、我が国のみならず、世界の食料基地としての役割を果たしつつあるアジア地域にとって最も重要な課題である。食品の製造には衛生管理手法が導入されてきているが、食品流通の国際化など、情勢は大きく変化し続けており、大腸菌O157:H7やサルモネラ等の食中毒細菌による健康危害が絶えず国民の食生活に不安を与えている。このような中、2009年に飲食チェーン店の食事（サイコロステーキ）を原因とする全国的な腸管出血性大腸菌O157食中毒事件が発生して大きな問題となった。腸管出血性大腸菌食中毒の原因となるのはベロ毒素（志賀毒素）遺伝子保有大腸菌（Shiga toxigenic *E.coli*, STECと略す）であるが、STECによる感染症は依然として年間3,500～4,000例の報告が続いている。小児や高齢者においては、本菌の感染により溶血性尿毒症症候群（HUS）などの重症例や死亡例がみられる。食中毒事件としての正式な報告は、2007年には事件数25、患者数928名であったが、感染症事例としては4,617例が報告されている（感染症週報、2009年）。このうちO血清群別では、157が3,431例（74.3%）と最も多く、次いで26が529例（11.5%）、111が255例（5.5%）の順である。これら以外にもO血清型103、121、145、91など異なるO血清型大腸菌による患者が399名報告されている。原因食品としては、肉類を原因とする582例のうち、生肉が266例と多かった。我が国における食品の腸管出血性大腸菌検査法の標準法では、血清型O157の他に血清型O26を検出する方法が定められており、食品の増菌培養後に培養液からDNAを調製してベロ毒素（VT）遺伝子*stx*をPCR法により調べ、「*stx*陽性」の場合には、選択培養、コロニーの分離を行なって同定することとなっている（平成18年11月2日付け食安監発第1102006号別添「食品からの腸管出血性大腸菌O157及びO26の検査法」）。PCR法で「*stx*陰性」の場合には陰性と判定できるが、stx遺伝子を保有していてもヒトへの病原性の無いSTECが生肉には多いため、食肉（内臓を含む）、食肉製品及びチーズについては、PCR法をスクリーニング法として用いることは許されていない。O血清型157および26以外に103、111、145も重篤化を引き起こすため欧米では重要視され、検出および制御のための研究が推進されている。ところが、わが国でも輸入食品の増加などから今後重要になることは明白であるが、STEC汚染が高く、食中毒の原因食品としても報告されることの多い食肉のSTEC検査の簡易迅速化はほとんど進んでいないのが実情である。そこで我々は、食肉に存在するSTECの危険度を判定することで食中毒リスクを低減させるため、これまでに食中毒患者由来の大腸菌O 157約100株についてベロ毒素1型および2型遺伝子（stx1およびstx2）の塩基配列を決定し、遺伝学的な分類を行ってきた（Li, et al., 2010）。しかし、実際に生の食肉には10-25％の確率でSTECが存在するため、分類や検査も重要であるが、これらのベロ毒素を産生するSTECの制御も食品の安全性確保には不可

欠である。

食中毒細菌は、食品中ならびに人の腸管内で、それぞれに特異的な毒素を産生して食中毒を発症させる。食中毒リスク低減のためには、食中毒細菌自体の検査、殺菌および増殖抑制だけではなく、食中毒細菌から産生される毒素の不活性化や生産抑制も重要である。細菌毒素の活性阻害物質については，緑茶の主要ポリフェノール類であるカテキン類がコレラ菌毒素 (Morinaga et al., 2005) ; Shimamura et al., 1986)、炭疽菌毒素 (Friedman et al., 1986; Benelli et al., 2002)、志賀毒素、ベロ毒素 (Okubo et al, 1998; Sugita-Konishi et al., 1999)、ボツリヌス毒素 (Satoh et al., 2002; Sawamura et al., 2002)、黄色ブドウ球菌エンテロトキシン (Hisano et al., 2003) などを阻害することが報告されてきた。2005 年にはホップ由来のポリフェノールがピロリ菌の毒素を阻害することや 2009 年になってブドウ種子や果皮の抽出物中にベロ毒素阻害効果があることが示されている (Quinones et al., 2009)。しかし、天然物や既存添加物などについて、網羅的にベロ毒素の活性および産生阻害効果をスクリーニングした例は無い。

本研究では、毒素の活性を培養細胞の系で検出可能な腸管出血性大腸菌 O 157 のベロ毒素 1 型 (Stx1)、2 型 (Stx2) およびセレウス菌嘔吐毒セレウリドについて、各細菌毒素の不活性化に有効な成分を安全性の高いことが確認されている既存添加物および天然成分から検索した。

2. 実 験 方 法

2.1. 試　料

毒素活性阻害および産生阻害物質のスクリーニングには、市販の食品成分、安全性の高いことが確認されている食品添加物等を用いた。抽出物は、食品重量 1 に対して 9 倍量の熱水を加えて破砕して得た上清をろ過滅菌して調製し、これを試料とした。使用した試験物質 120 種を**表 1** に示す。

表 1　試験物質および組成

番号	試験物質	組成	pH
1	唐辛子水性抽出物 /Capsicum water-soluble extract		5.0
2	モルトエキス /malt Extract	麦芽 など	6.0
3	緑茶エキス /green tea extract	緑茶 など	6.1
4	ウーロン茶エキス /oolong tea extract	ウーロン茶 など	5.9
5	トマトコンクパウダー /tomato concentrated powder	トマト など	5.3
6	大豆胚芽エキス /soy germ extract	大豆胚芽 など	5.9
7	ナツメグ /nutmeg	ナツメグ など	6.6
8	タイム /thyme	タイム など	6.6
9	パセリ /parsley	パセリ など	6.4
10	トウガラシ /capsicum	唐辛子 など	6.6
11	ジンジャー /ginger	生姜 など	6.6
12	セロリー /celery	セロリ など	6.6
13	オニオン /onion	玉ねぎ など	6.5
14	バジル /basil	バジル など	6.6
15	ブルーベリー /blueberry	ブルーベリー など	6.2
16	ブラックベリー /blackberry	ブラックベリー など	6.4
17	キィウィ /kiwi	キウイ など	6.5
18	グレープフルーツ /grapefruit	グレープフルーツ など	6.2
19	ストロベリー /strawberry	苺 など	6.4
20	ピーチ /peach	桃 など	6.4
21	マンゴ /mango	マンゴー など	6.6
22	ライム /lime	ライム など	6.6
23	コーヒー /coffee	コーヒー など	6.2
24	粉末サンブラウン No 2085/San-brown powder NO.2085	タマリンド色素 90%、デキストリン 10%	6.7
25	サンレッド G/San-red G	ブドウ果汁色素 80.5%、プロピレングリコール 10%、クエン酸 (結晶) 9.5%	6.6

番号	試験物質	組成	pH
26	サンレッド ELA	エルダーベリー色素 75%、エタノール 20%、クエン酸（結晶）5%	6.1
27	サンブラウン KA/San-brown KA	コウリャン色素 80%、エタノール 20%	6.7
28	サンレッド NO.5/San-red NO.5	紫コーン色素 83%、プロピレングリコール 15%、クエン酸（結晶）2%	7.0
29	サンエロー NO.3L/San-yellow NO.3 L	クチナシ黄色素 40%、グリセリン 38%、L-アスコルビン酸 1%、ポリリン酸ナトリウム 0.5%、ピロリン酸四ナトリウム（無水）0.5%、水飴 20%	6.1
30	サンブラウン AC/San-brown AC	タマネギ色素 34%、グリセリン 38%、水飴 28%	6.7
31	アナトー AN/annatto AN	アナトー色素 56%、ショ糖脂肪酸エステル 24%、プロピレングリコール 15%、L-アスコルビン酸ナトリウム 5%	6.7
32	サンイエロー NO.2AU/San-yellow NO.2 AU	ベニバナ黄色素（色価 220）70%、エタノール 20%、デキストリン 10%	6.4
33	サンレッド MR/San-red MR	紅麹色素（色価 63.5）50%、エタノール 50%	7.1
34	リコピンベース NO.33644/lycopene base NO.33644	トマト色素 3%、グリセリン 45%、グリセリン脂肪酸エステル 4%、ショ糖脂肪酸エステル 2%、エタノール 0.3%	7.1
35	クルクミン ” サンエイ ”/curcumin “Sanei”	ウコン色素（色価 6900）2%、プロピレングリコール 98%	7.3
36	サンレッド YM	ムラサキイモ色素 78%、エタノール 20%、クエン酸（結晶）2%	7.2
37	サンレッド RCFU/San-red RCFU	赤キャベツ色素 76%、エタノール 20%、クエン酸（結晶）4%	6.6
38	サンビート L/San-beet L	ビートレッド（色価 44）90%、ブロピレングリコール 10%、	7.5
39	アナトー色素 /Annatto Pigment	ベニノキ赤橙色素 など	7.1
40	クルクミン /curcumin	ウコン黄色色素 など	7.1
41	グレープスキン色素 /Grape Skin Pigment	アントシアニン 4%以上、ポリフェノール 16～23%	6.6
42	コーン色素 /Corn Pigment	ムラサキトウモロコシ赤色素	6.9
43	Anthocyanin 粉末 /Anthocyanin powder	アントシアニン など	6.7
44	モナスカス色素 /Monascus Pigment	モナスコルブリン、アンカフラビン 等	6.8
45	ガーディニアイエロー /Gardenia Yellow	クチナシ黄色素 など	6.8
46	パプリカオレオレジン 400/Paprika Oleoresin 400	カプサンチン など	5.7
47	食用赤色２号 アルミニウムレーキ /Food Red No.2 Alminium Lake	3-ヒドロキシ -4-[(スルホナトナフタレン -1- イル) ジアゼニル] ナフタレン -2,7- ジスルホン酸三アルミニウム	7.5
48	食用赤色３号（エリスロシン）/Food Red No.(Erythrosin)	エリスロシン（2-(2,4,5,7- テトラヨード -6- オキシド -3- オキソ -3H- キサンテン -9- イル) 安息香酸二ナトリウム１水和物）	6.4
49	食用赤色３号 アルミニウムレーキ /Food Red No.3 Alminium Lake	2-(2,4,5,7- テトラヨード -6- オキシド -3- オキソ -3H- キサンテン -9- イル) 安息香酸二アルミニウム１水和物	6.4
50	食用赤色 102 号（ニューコクシン）Food Red No.102 (New Coccine)	ニューコクシン (7- ヒドロキシ -8-[(4- スルホナトナフタレン -1- イル) ジアゼニル] ナフタレン -1,3- ジスルホン酸三ナトリウム １・1/2 水和物)	6.4
51	食用赤色 103 号（エオシン）/Food Red No.103 (Eosin)	エオシン（9-（o- カルボキシフェニル）-6- ヒドロキシ -2,4,5,7- テトラブロム -3- イソキサントンニナトリウム）	6.4
52	食用赤色 105 号（ローズベンガル）/Food Red No.105 (Rose Bengal)	ローズベンガル（9-（3',4',5',6'- テトラクロル -o- カルボキシフェニル -6- ヒドロキシ -2,4,5,7- テトラヨード -3- イソキサントンニナトリウム	6.4
53	食用赤色 106 号（アシッドレッド）/Food Red No.106 (Acid Red)	アシッドレッド（6-[3,6- ビス (ジエチルアミノ) キサンテニウム -9- イル] ベンゼン -1,3- ジスルホン酸一ナトリウム）	6.3
54	製剤 食用朱色 NO.1/Food Vermilion No.1	食用赤色２号、食用赤色 102 号、食用黄色５号	6.3
55	製剤 食用朱色 NO.4/Food Vermilion No.4	食用赤色 102 号、食用黄色５号	6.2
56	製剤 食用朱色 NO.101/Food Vermilion No.101	食用赤色２号、食用赤色 102 号、食用黄色５号	6.2

番号	試験物質	組成	pH
57	食用黄色４号（タートラジン）Food Yellow No.4 (Tartrazine)	タートラジン（5- ヒドロキシ -1-(4- スルホナトフェニル)-4-[(4- スルホナトフェニル) ジアゼニル] -1H- ピラゾール -3- カルボン酸三ナトリウム）	6.2
58	食用黄色４号 アルミニウムレーキ /Food Yellow No.4 Alminium Lake	5- ヒドロキシ -1-(4- スルホナトフェニル)-4-[(4- スルホナトフェニル) ジアゼニル]-1H- ピラゾール -3- カルボン酸三アルミニウム	6.4
59	食用黄色５号（サンセットエロー FCF）/Food Yellow No.5 (Sunset Yellow FCF)	サンセットイエロー FCF（6- ヒドロキシ -5-[(4- スルホナトフェニル) ジアゼニル] ナフタレン -2- スルホン酸二ナトリウム）	7.0
60	食用黄色５号 アルミニウムレーキ /Food Yellow No.5 Alminium Lake	6- ヒドロキシ -5-[(4- スルホナトフェニル) ジアゼニル] ナフタレン -2- スルホン酸アルミニウム	6.6
61	製剤 食用黄色 NY/Food Yellow NY	食用黄色４号、食用青色１号	6.8
62	製剤 食用タマゴ色 No.3/Food Egg Color No.3	食用黄色４号、食用赤色 104 号	7.1
63	製剤 食用オレンジ色 AM/Food Orange AM	食用赤色２号、食用黄色４号、食用黄色５号	6.6
64	食用青色１号 アルミニウムレーキ /Food Blue No.1 Alminium Lake	2-(ビス {4-[N- エチル -N-(3- スルホナトフェニルメチル) アミノ] フェニル } メチリウムイル) ベンゼンスルホン酸二アルミニウム	6.6
65	食用青色２号（インジゴカルミン）/Food Blue No.2 (Indigo Carmine)	インジゴカルミン（2,2'- ビ（- オキソ -1H- インドリン -2- イリデン)-5,5'- ジスルホン酸二ナトリウム）	6.4
66	食用青色２号 アルミニウムレーキ /Food Blue No.2 Alminium Lake	2,2'- ビ（- オキソ -1H- インドリン -2- イリデン) -5,5'- ジスルホン酸二アルミニウム	7.2
67	製剤 食用チョコレート色 /Food Chocolate Color	食用赤色２号、食用黄色４号、食用青色２号	6.3
68	製剤 食用メロン色 B/Food Melon Color B	食用黄色４号、食用青色１号	6.8
69	食用紫色１号（アシッドバイオレット６B）/Food Purple No.1 (Acid Violet 6B)	アシッドバイオレット 6B	6.4
70	食用紫色１号 アルミニウムレーキ /Food Purple No.1 Aluminium Lake	4-{〔4-N- エチル -m- スルホンベンジルアミノ）- フェニル〕-〔4-（N- ジメチルアミノ）- フェニル〕- メチレン}-〔1-（N- エチル -N-m- スルホニウムベンジル）-△2.5- シクロヘキサジエンイミン〕ーアルミニウム	7.7
71	サンソフト NO.700 p-2/ モノグリセリンカプリル酸（C8）/Mono Glycerin Caprylic Acid (C8)	モノグリセリンカプリル酸（C8）	7.0
72	サンソフト NO.760/ モノグリセリンカプリン酸（C10）/Mono Glycerin Captic Acid (C10)	モノグリセリンカプリン酸（C10）	7.0
73	サンソフト NO.750/ モノグリセリンラウリン酸（C12）/Mono Glycerin Laurin Acid (C12)	モノグリセリンラウリン酸（C12）	7.0
74	サンソフト NO.8002/ モノグリセリンミリスチン酸（C14）/Mono Glycerin Myristic Acid (C14)	モノグリセリンミリスチン酸（C14）	7.0
75	モノグリセリンパルミチン酸（C16）/Mono Glycerin Palmitic Acid (C16)	モノグリセリンパルミチン酸（C16）	7.0
76	サンソフト NO.8004/ モノグリセリンステアリン酸（18）/Mono Glycerin Stearic Acid (C18)	モノグリセリンステアリン酸（18）	6.7
77	SE-C8 モノエステル / ショ糖カプリル酸エステル（C8）/Sucrose Esters of Caprylic Acids (C8)	ショ糖カプリル酸エステル（C8）	7.4
78	SE-C10 モノエステル / ショ糖カプリン酸エステル (C10)/Sucrose Esters of Capric Acids (C10)	ショ糖カプリン酸エステル（C10）	7.4
79	SE-C12 モノエステル / ショ糖ラウリン酸エステル（C12）/Sucrose Esters of Lauric Acids (C12)	ショ糖ラウリン酸エステル（C12）	7.0
80	SE-C14 モノエステル / ショ糖ミリスチン酸エステル (C14)/Sucrose Esters of Myristic Acids (C14)	ショ糖ミリスチン酸エステル（C14）	6.7
81	SE-C16 モノエステル / ショ糖パルミチン酸エステル（C16）/Sucrose Esters of Palmitic Acids (C16)	ショ糖パルミチン酸エステル（C16）	6.8
82	DK エステル SS/ ショ糖ステアリン酸エステル（C18）/Sucrose Esters of Stearic Acids	ショ糖ステアリン酸エステル（C18）	6.8
83	オレンヂ　ゴールド /Orange Gold		7.5
84	コーヒー　オイル C.D/Coffee Oil C.D		6.3
85	コーヒー　ハイフレーバー 5750/Coffee High Flavor 5750		6.1
86	オニオン　コートン O.G 2/Onion Cortonr O.G 2		6.6
87	シイタケ　コートン No.1/Shiitake Mushroom Cortone No.1		6.6

番号	試験物質	組成	pH
88	コンブ　コートン　No.3/Tangle Weed Cortone No.3		6.8
89	ホワイト　ペツパー　コートン　O.G 5/White Pepper Cortone O.G 5		6.5
90	アツプル エツセンス 6410/Apple Essence 6410		6.4
91	オレンジ フレバー K.D 125/Orange Flavor K.D 125		7.5
92	キャラメル フレバー Y 218/Caramel Flavor Y 218		6.2
93	サイダー エツセンス /Cider Essence		6.9
94	ジンジヤー エール エツセンス /Ginger Ale Essence		7.1
95	チヨコレート ビター タイプ S.N 16/Chocolate Bitter Tipe S.N 16		6.5
96	チヨコレート フレバー K.D/Chocolate Flavor K.D		6.3
97	ナツテイ フレバー 7/Nutty Flavor 7		6.7
98	パイナツプル フレバー 6710/Pineapple Flavor 6710		7.0
99	バナナ エツセンス 850/Banana Oil 850		6.6
100	バナナ オイル 1000/Banana Oil 1000		6.4
101	ポンカン エツセンス /Ponkan Essence		7.3
102	メロン フレバー 77/Melon Flavor 77		6.8
103	レモン オイル K/Lemon Oil K		7.0
104	ワニラ オイル K.Y/Vanilla Oil K.Y		6.7
105	サポニン /Saponin		7.1
106	L- アスコルビンステアレート /L-Ascorbyl Stearate	ビタミン C ステアリン酸塩	7.0
107	ノイペクチン L/Noipectin L	ペクチン分解物 28%、乳酸 14%、食品素材 58%	6.6
108	プロタミン /protamine	プロタミン	6.8
109	ポリリジン 25%溶液 /polylysine 25% solution	$(C_6H_{12}N_2O)n$; Poly[imino [(2S)-2-amino-1-oxo-1,6-hexanediyl]]	8.1
110	ナイスタチン /nystatin	$C_{47}H_{75}NO_{17}$	6.4
111	アンホテリシン B/amphotericin B	$C_{47}H_{73}NO_{17}$	7.3
112	Quercetin dehydrate	$C_{15}H_{10}O_7$	7.3
113	アピゲニン /apigenin	$C_{15}H_{10}O_5$	7.2
114	EGCg (95%)	EGCg	6.6
115	ポリフェノン 70A/polyphenon 70A	ポリフェノン 70A	6.7
116	ケンフェノール /kaempferol	3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4h-1-benzopyran-4-on	7.3
117	ポリガラクツロン酸 /Polygalacturonic Acid	ガラクツロン酸	6.7
118	アミロペクチン /Amylopectin		6.5
119	キシラン /Xylan	$(C_5H_8O_4)_n$	7.1
120	乳清タンパク質 /milk serum protein	血清アルブミン、β- ラクトグロブリン、α- ラクトアルブミン、免疫グロブリン、プロテオース、ペプトン など	6.8

2.2.　供 試 菌 株

ベロ毒素を産生する腸管出血性大腸菌（EHEC）*Escherichia coli* O157:H7 No.33 株（*stx1*+、Stx1 毒素の力価：128）および *E. coli* O157 No.148 株（*stx2*+、Stx2 毒素の力価：128）、ベロ毒素を産生しない *E. coli* O157:H20 No.37 株（*stx1*-、*stx2*-、Stx1-、Stx2-）は研究室保存株を使用した。セレウリド生産菌としては、研究室保有の *Bacillus cereus* BC20 株を使用した。

2.3.　ベロ毒素の調製と力価の測定

EHEC No.33 株および No.148 株を LB broth（Becton & Dickinson）5 ml 中で 37℃一晩振とう培養した。培養液を 1000 倍希釈して 10 µl を新しい LB 培地 5 ml（40 本）に接種してさらに 37℃で一晩振とう培養した。各菌株の培養液 5 ml を 15 ml 遠沈管に入れ、polymixin B を 5000 U/1 ml- 培養液となるように入れて、37℃、1 時間インキュベートして処理した。処理した培養液を集

め、25 ml ずつ 50 ml 遠沈管に入れて、遠心分離（3000 g、15 分間）して、上清をいったんビーカーに集めた後、孔径 0.2 μm のフィルターでろ過滅菌して試料とした。ベロ毒素の力価は VTEC-RPLA「生研」（デンカ生研）を用い、附属のプロトコールに従って VT1 及び VT2 産生性を調べて算出した。RPLA の結果から、No.33（Stx1）は力価 512、No.184（Stx2）は力価 2048 であり、毒素のみの細胞毒性試験の結果から、No.33 は力価 16、No.184 は力価 64 に PBS で希釈したものを試験に用いることにした。No.37 株も同様に培養し、培養上清を調製した。

2.4. ベロ毒素活性阻害物質のスクリーニング法

96 穴プレートにベロ細胞を播種（2×10^4 cells/well、100 μl）、24 時間培養した。これにベロ毒素を含む EHEC 培養上清 220 μl と試験物質（PBS で 1%、0.1%（毒素と反応中の濃度）に調製してろ過滅菌）220 μl を滅菌チューブ中で混合し、37℃で 1 時間インキュベートしたものを、ベロ細胞培養液に添加（200 μl/well）した。48 時間培養後、培地を除去して約 200 μl/well の PBS で 3 回洗浄した。2%ホルマリン含有 PBS を 200 μl/well 添加し、室温で 1 分間静置した後、純水 200 μl/well で 2 回洗浄した。水を除去した後、0.1%クリスタルバイオレット 5%エタノール溶液を 200 μl/well 添加して 10 分染色した。純水で洗浄（約 400 μl/well、2 回）後、水分を除去、風乾させた。乾燥後に、エタノール 200 μl を加え、10 分間静置して色素を抽出し、プレートリーダーで 595 nm の吸光度を測定してベロ細胞の生残を調べた。96 穴プレートの写真も撮影した。細胞が剥がれていない場合に添加物が毒素活性を阻害したと判定した。

陽性コントロールはベロ毒素産生株（No.33、No.148）の培養上清のみ添加した。陰性コントロール 1 は毒素および添加物ともに未添加、陰性コントロール 2 は添加物のみ添加（1%、0.1%）、陰性コントロール 3 はベロ毒素非産生株〔No.37（O157 : H20、*stx1*-、*stx2*-、Stx1-、Stx2-)〕の培養上清を添加した。

2.5. ベロ毒素産生抑制試験法

菌体外にベロ毒素を分泌する Stx2 産生 EHEC No.148 株を LB broth 中、37℃で 24 時間振とう培養した。培養液を希釈して OD_{660} = 0.1 に調製した後、100 μl の希釈菌液を終濃度が 1%、0.1% となるように被験物質を添加した新鮮な 3 ml の LB broth に接種した。37℃で 24 時間培養後、培養液 1ml を 1.5 ml チューブに採取して遠心分離（900 g、15 min）して得た上清をろ過滅菌（孔径 0.2μm）して RPLA 法による毒素力価測定用の試料とした。菌の増殖は培養前後の OD_{660} の測定結果から判定した。陽性コントロールとしては LB broth に No.148 株のみを接種したもの、陰性コントロールとしては LB broth に被験物質（1%）のみ添加して培養したものを試料として毒素の力価を測定した。

2.6. RPLA 法によるベロ毒素力価の測定

ベロ毒素の力価は VTEC-RPLA「生研」（デンカ生研）を用い、附属のプロトコールに従って Stx1 及び Stx2 産生性を調べて算出した。No.148 株の RPLA 法によるベロ毒素の力価は 2048 であったので、試験物質を添加して培養後の培養上清を 1 : 2、1 : 10、1 : 100、1 : 1000 となるように希釈したものについて力価を調べ、ベロ毒素産生に対する試験物質の影響を調べた。試料としては、LB broth と試験物質（1%）のみ（試料調製の陰性コントロール）を培養して調製した試料、0.1%または 1%試験物質添加 LB broth に No.148 を接種して培養した試料を用いた。陰性コントロールには LB broth、陽性コントロールは LB broth に No.148 株を接種して培養後に調製した培養上清を用いた。

2.7. セレウリド細胞空砲化試験法

セレウリド産生菌の培養にはブレインハートイ

ンフュージョン（BHI）培地を用い、30℃で一夜振盪培養した。空胞化活性の検定には、HEp-2 を用いた。細胞は、5%牛胎児血清（FCS）を含む 199 培地（5% FCS-199）で、37 ℃、5% CO_2 存在下で培養した。空胞化活性の測定では、まず、セレウス菌培養上清を 121 ℃、20 分間オートクレーブ滅菌後、滅菌リン酸緩衝生理食塩水で 2 倍希釈列を作り、96 穴培養プレートのウェルに 25 μl づつ添加した。これに 5% FCS-199 で調製した約 5 X 10^4 個 /ml の細胞懸濁液を 1 ウェル当たり 100 μl ずつ添加した。3 日間培養後に検鏡して細胞内の空胞化を調べ、50% 以上の細胞に空胞化が認められた希釈倍率を空胞化活性の力価とした（宮本ら、1994）。

3.　結果及び考察

3.1.　ベロ毒素活性に対する種々の物質及び抽出物の影響

準備した試験物質のうち 100 種の物質について終濃度 0.1 および 1.0％でベロ毒素活性に対する影響を調べた結果を**表 2** に示す。**図 1** に示すようにベロ毒素を含む培養上清を添加した場合には細胞は死滅し、顕微鏡観察の結果でも細胞数が大幅に減少した。クリスタルバイオレット染色後の吸光度も大きく低下し、0.2 未満程度となった。試験物質のみを添加した陰性コントロールでも細胞が死滅する場合もあったため、試験物質のみを添加した陰性コントロールでは吸光度の低下が認められず、試験区においても吸光度の低下が少ない場合を毒素活性が抑制されたと判定した。この結果、試験した物質のうちで効果が認められたのは、ブルーベリー抽出物、粉末サンブラウン、グレープスキン色素、コーヒーフレーバーで、特に効果が高かったのは粉末サンブラウンおよびグレープスキン色素であった。**図 2** にグレープスキン色素添加区における細胞の状態を示す。添加濃度が高いほど、毒素による細胞数の低下が抑制された。EGCg の結果も吸光度が高かったが、これは EGCg 自身の色に起因するものであった。グレープスキン色素については、すでに Quinones ら（2009）もベロ毒素活性阻害を認めており、本研究における毒素活性及び活性阻害測定が適切に行われたことを示すものである。粉末サンブラウンには 90％タマリンド色素が含まれており、これはタマリンドの種子を焙焼し、温時弱アルカリ性水溶液で抽出し、中和して得られたフラボノイドを主成分とする色素であるが、主成分の構造は不明である。今後、有効成分を分離同定してベロ毒素活性阻害機構を解明したい。

3.2.　ベロ毒素産生に対する種々の物質及び抽出物の影響

準備した試験物質のうち 89 種の物質について終濃度 0.1 および 1.0％でベロ毒素 Stx2 の産生および分泌に対する影響を調べた結果を**表 3** に示す。この結果、1％の添加で、Stx2 の産生または分泌を抑制した物質は、タイム抽出物、ジンジャー抽出物、ブルーベリー抽出物、ストロベリー抽出物、マンゴ抽出物、サンイエロー No.3L、サンブラウン AC、コーン色素、キャラメルフレーバー、サイダーエッセンス、バニラオイル、サポニン、ノイペクチン、ポリフェノン 70A および EGCg であった。さらに 0.1％の添加でも抑制したのはブルーベリー抽出物、マンゴ抽出物および EGCg であった。プロタミンは細菌の増殖があまり見られなかったにもかかわらず、毒素を力価 1000 以上産生していたことから、毒素の産生または分泌促進があるのではないかと考えられた。ポリリジンでは細菌の増殖が阻害された結果、毒素の力価が低下した結果となった。0.1％ EGCg 添加区では細菌の増殖は阻害されなかったが、培養上清の毒素の力価は大きく低下した。これはすでに報告されている結果と同様であった。効果のあった色素製剤については、サンイエロー No.3L の成分は、クチナシ黄色素 40％、グリセリン 38％、

表 2 ベロ毒素活性に対する種々の物質及び抽出物の影響

試験物質番号	クリスタルバイオレット染色による吸光度（A_{595}）						活性阻害
	陰性コントロール		Stx1 に対する効果		Stx2 に対する効果		
	1.0%	0.1%	1.0%	0.1%	1.0%	0.1%	
1	0.192	0.434	0.158	0.189	0.183	0.146	×
2	0.949	1.207	0.293	0.225	0.300	0.328	×
3	0.752	1.074	0.287	0.209	0.408	0.254	×
4	3.482	1.162	3.360	0.523	3.363	0.459	×
5	2.256	1.731	0.255	0.244	0.424	0.415	×
6	1.006	0.609	0.212	0.186	0.272	0.264	×
7	1.692	1.507	0.185	0.175	0.330	0.289	×
8	1.447	1.393	0.190	0.182	0.417	0.311	×
9	1.592	1.539	0.189	0.204	0.419	0.397	×
10	1.954	1.891	0.229	0.245	0.442	0.551	×
11	1.288	1.355	0.276	0.265	0.403	0.447	×
12	1.539	1.311	0.258	0.244	0.430	0.532	×
13	1.555	1.443	0.283	0.267	0.441	0.448	×
14	0.952	1.432	0.265	0.285	0.476	0.401	×
15	1.420	1.578	0.590	0.359	0.667	0.441	△
16	1.900	1.781	0.277	0.280	0.459	0.507	×
17	1.829	1.835	0.284	0.274	0.445	0.503	×
18	0.493	1.009	0.217	0.183	0.256	0.329	×
19	1.213	1.387	0.225	0.231	0.337	0.351	×
20	1.072	1.243	0.277	0.260	0.340	0.355	×
21	0.594	1.044	0.212	0.222	0.259	0.364	×
22	1.079	1.178	0.263	0.257	0.396	0.350	×
23	0.873	1.162	0.250	0.251	0.378	0.318	×
24	0.636	1.321	1.753	0.265	1.705	0.432	○
25	0.741	0.872	0.168	0.151	0.235	0.202	×
26	0.937	1.228	0.260	0.173	0.311	0.186	×
27	0.759	1.085	0.462	0.306	0.535	0.534	×
28	0.828	1.140	0.188	0.163	0.324	0.164	×
29	1.027	1.442	0.128	0.124	0.215	0.211	×
30	1.181	0.925	0.448	0.304	0.535	0.351	×
31	0.200	0.429	0.414	0.118	1.722	0.259	×
32	0.977	1.173	0.235	0.221	0.492	0.575	×
33	1.995	1.300	0.300	0.265	0.921	0.705	×
34	－	0.884	－	0.216	－	0.335	×
35	－	1.294	－	0.196	－	0.235	×
36	1.174	1.109	0.330	0.286	0.666	0.604	×
37	0.934	1.205	0.319	0.268	0.539	0.561	×
38	0.947	1.198	0.245	0.214	0.401	0.242	×
39	1.243	1.327	0.334	0.191	0.498	0.415	×
41	0.959	0.921	1.517	0.332	1.299	0.336	○
42	0.973	0.694	0.379	0.289	0.675	0.478	×
43	0.323	0.787	0.333	0.259	0.345	0.441	×
44	0.283	0.358	0.319	0.456	0.293	0.391	×
45	1.157	0.762	0.240	0.225	0.268	0.337	×
47	0.627	0.946	0.226	0.242	0.246	0.257	×
48	0.876	0.392	0.973	0.533	1.077	0.527	×
50	0.689	0.764	0.185	0.203	0.227	0.276	×
51	0.335	0.355	0.209	0.237	0.225	0.228	×
52	1.971	0.776	1.778	1.358	1.985	1.192	×
53	1.057	1.093	0.221	0.221	0.293	0.300	×
54	0.770	1.116	0.221	0.187	0.217	0.261	×
55	0.781	1.144	0.202	0.166	0.185	0.257	×
56	0.581	0.973	0.204	0.215	0.179	0.222	×
57	1.305	1.038	0.222	0.199	0.237	0.249	×
59	0.873	0.631	0.184	0.186	0.179	0.219	×
61	0.990	1.133	0.215	0.193	0.201	0.267	×
62	0.347	1.486	0.315	0.285	0.359	0.540	×
63	0.778	1.161	0.200	0.183	0.225	0.278	×
67	0.823	1.083	0.240	0.178	0.179	0.217	×
68	1.077	1.131	0.211	0.188	0.229	0.263	×
69	－	2.029	－	0.391	－	0.504	×
70	－	1.977	－	0.317	－	0.402	×
71	－	0.219	－	0.216	－	0.174	×
72	－	0.260	－	0.183	－	0.120	×
77	0.139	0.518	0.227	0.134	0.349	0.156	×
78	0.177	0.320	0.098	0.095	0.106	0.078	×
80	0.121	0.104	0.088	0.101	0.111	0.085	×
83	0.754	0.794	0.192	0.238	0.425	0.399	×
84	0.353	0.471	0.229	0.193	0.360	0.226	×
85	1.005	0.925	0.216	0.275	0.460	0.661	△
86	－	1.026	－	0.202	－	0.212	×
87	0.597	1.034	0.202	0.213	0.297	0.227	×
88	－	0.771	－	0.214	－	0.216	×
89	－	0.770	－	0.194	－	0.202	×
90	0.717	0.949	0.209	0.226	0.552	0.539	×
91	0.890	1.210	0.259	0.228	0.379	0.336	×
92	0.470	1.255	0.275	0.281	0.265	0.429	×
93	0.404	0.950	0.174	0.244	0.245	0.375	×
94	0.729	1.116	0.285	0.280	0.410	0.320	×
95	0.779	0.834	0.183	0.181	0.316	0.264	×
96	0.728	0.812	0.195	0.195	0.337	0.198	×
97	1.025	1.062	0.318	0.243	0.445	0.352	×
98	0.925	1.192	0.259	0.267	0.415	0.373	×
99	0.929	1.477	0.254	0.232	0.360	0.369	×
100	1.018	0.857	0.215	0.203	0.396	0.306	×
101	1.141	1.261	0.285	0.278	0.426	0.395	×
102	0.859	1.057	0.205	0.196	0.300	0.263	×
103	0.720	1.122	0.246	0.249	0.323	0.297	×
104	0.246	1.272	0.228	0.235	0.264	0.354	×
105	0.221	0.164	0.131	0.141	0.128	0.092	×
107	0.344	1.016	0.166	0.174	0.179	0.218	×
108	0.108	0.903	0.062	0.132	0.077	0.125	×
109	0.089	0.172	0.061	0.066	0.060	0.067	×
110	－	1.129	－	0.205	－	0.258	×
114	2.333	1.559	2.148	2.066	1.952	1.973	○
115	1.114	2.874	1.000	2.675	1.057	2.474	×
116	0.809	0.843	0.140	0.129	0.215	0.230	×
118	1.152	0.912	0.159	0.159	0.210	0.171	×
119	－	0.781	－	0.198	－	0.197	×
120	1.495	1.239	0.210	0.174	0.245	0.189	×

－：試験未実施

陰性コントロール　陽性コントロール

1 毒素及び試験物質未添加　3. 33株（Stx非産生）培養上清添加　No.33株（Stx1産生）培養上清添加　No.148株（Stx2産生）培養上清添加

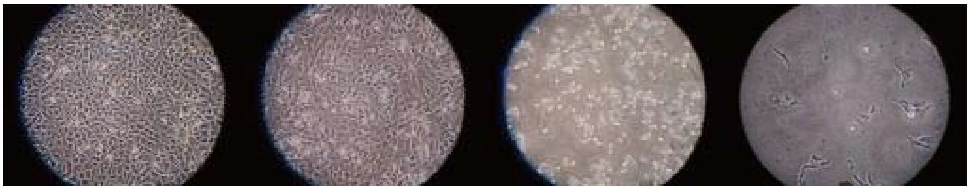

図１　ベロ毒素含有培養上清添加によるベロ細胞の変化

No.33 株（Stx1 産生）培養上清添加　No.148 株（Stx2 産生）培養上清添加

1%試験物質　0.1%試験物質　1%試験物質　0.1%試験物質

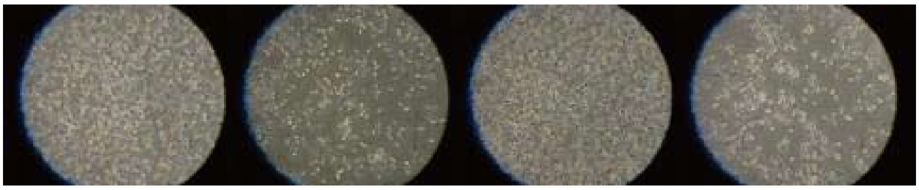

図２　ベロ毒素活性に対するグレープスキン色素の効果

L- アスコルビン酸 1%、ポリリン酸ナトリウム 0.5%、ピロリン酸四ナトリウム（無水）0.5%、水飴 20%、サンブラウン AC では、タマネギ色素 34%、グリセリン 38%、水飴 28%、コーン色素の成分は紫トウモロコシ赤色素であった。しかしながら、クチナシ色素を主成分とするガーデニアイエロー、紫トウモロコシ色素を主成分とするサンレッド No.5 には抑制効果がなかったことから，これらの色素成分単独では抑制効果がないものと推定される。タマネギ色素の成分はケルセチン、ケンフェロールなどであるので、これらのフラボノイドの純品を用いて試験して効果を確認する必要がある。本研究でベロ毒素産生および分泌阻害効果の認められた抽出物については、成分を分離同定して阻害機構を検討したい。

3.1.　セレウリドの HEp-2 細胞空胞化活性に対する種々の物質及び抽出物の影響

B. cereus BC20 株 の BHI 培地培養上清添加後の HEp-2 細胞の形態変化を観察した結果を**図 3** に示す。ある特定の希釈区でのみ空胞化は観察され、より低い希釈での空胞化は認められなかった。毒素の添加濃度が高くなると細胞は死滅した。

調製した試験物質のうち、89 種についてセレウリドの力価に対する影響を調べた。**表 4** にセレウリド活性に対する試験物質の影響を示す。コントロールより力価が低下した場合に、セレウリドの活性を抑制したと判定した結果、セレウリドの力価を低減させたのは、唐辛子水性抽出物、ナツ

コントロール　セレリウド含有培養上清添加

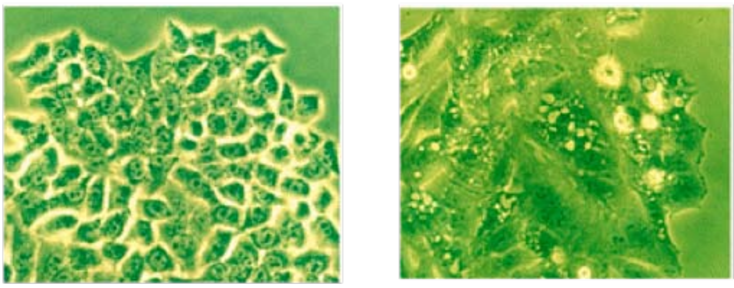

図３　HEp-2 細胞に対するセレリウドの影響

表3　ベロ毒素産生に対する種々の物質及び抽出物の影響

試験物質番号	EHECの増殖（ΔOD$_{660}$）		RPLA法による培養上清中の毒素の力価	
	1%	0.10%	1%	0.10%
1	2.16	2.004	>1000	>1000
2	ND	2.024	ND	>1000
3	ND	2.034	ND	>1000
4	ND	2.001	ND	>1000
5	ND	2.07	ND	>1000
6	ND	2.058	ND	>1000
7	2.084	2.059	>1000	>1000
8	1.775	2.032	100	>1000
9	2.023	1.992	>1000	>1000
10	ND	1.954	ND	>1000
11	1.87	2.048	100	>1000
12	2.104	1.954	>1000	>1000
13	2.11	2.005	>1000	>1000
14	1.906	1.959	>1000	>1000
15	1.582	1.912	10	100
16	1.981	2.011	>1000	>1000
17	1.945	2.031	>1000	>1000
18	1.779	1.923	>1000	>1000
19	1.866	1.924	100	>1000
20	2.098	2.073	>1000	>1000
21	1.467	1.669	100	100
22	1.87	1.944	>1000	>1000
23	1.916	1.974	>1000	>1000
24	1.619	2.045	>1000	>1000
25	2.121	2.024	>1000	>1000
26	2.129	2.026	>1000	>1000
27	1.903	2.003	>1000	>1000
28	2.06	2.012	>1000	>1000
29	2.063	2.026	100	>1000
30	1.987	2.034	100	>1000
31	1.989	1.961	>1000	>1000
32	2.113	2.042	>1000	>1000
33	2.1	2.106	>1000	>1000
36	2.202	1.615	>1000	>1000
37	2.006	2.044	>1000	>1000
38	ND	2.079	ND	>1000
39	ND	2.045	ND	>1000
41	1.953	2.068	>1000	>1000
42	2.071	2.053	100	>1000
43	ND	2.155	ND	>1000
44	1.232	2.054	>1000	>1000
45	2.174	2.026	>1000	>1000
47	ND	2.08	ND	>1000
48	ND	1.873	ND	>1000
50	ND	2.028	ND	>1000
51	ND	2.051	ND	>1000
52	ND	2.214	ND	>1000
53	ND	1.991	ND	>1000
54	ND	2.019	ND	>1000
55	ND	2.009	ND	>1000
56	ND	2.042	ND	>1000
57	ND	1.869	ND	>1000
59	ND	1.985	ND	>1000
61	ND	2.031	ND	>1000
62	ND	2.004	ND	>1000
63	ND	1.988	ND	>1000
67	ND	1.815	ND	>1000
68	ND	0.063	ND	>1000
77	1.068	2.016	>1000	>1000
78	1.211	2.007	>1000	>1000
80	2.027	1.961	>1000	>1000
83	2.115	2.067	>1000	>1000
84	ND	2.031	ND	>1000
85	1.999	2.018	>1000	>1000
87	2.22	2.036	>1000	>1000
90	2.094	1.528	>1000	>1000
91	2.097	2.048	>1000	>1000
92	1.944	2.027	100	>1000
93	1.904	2.008	100	>1000
94	1.983	2.016	>1000	>1000
95	ND	1.993	ND	>1000
96	ND	1.948	ND	>1000
97	1.999	1.652	>1000	>1000
98	1.999	1.897	>1000	>1000
99	1.984	1.979	>1000	>1000
100	1.975	2.036	>1000	>1000
101	2.058	2.059	>1000	>1000
102	2.077	2.054	>1000	>1000
103	1.93	2.025	>1000	>1000
104	1.664	1.968	100	>1000
105	1.857	2.081	100	>1000
107	2.084	2.009	100	>1000
108	no growth	no growth	ND	ND
109	no growth	no growth	ND	ND
114	1.1	1.774	0.5	10
115	1.012	1.416	0.5	>1000
116	ND	2.011	ND	>1000
118	ND	2.031	ND	>1000
120	ND	1.955	ND	>1000

ND：試験未実施

表 4　セレウリドの HEp-2 空胞化活性に対する種々の物質及び抽出物の影響

試験物質番号	セレウリドの力価		
	コントロール	1% 添加区	0.1% 添加区
1	8	×	4
2	8(16)	-	8
3	8(16)	-	8
4	8(16)	-	×
5	8(16)	-	8
6	8(16)	-	8
7	8	4	4
8	8	8	4
9	8	4	4
10	8	8	8
11	8	×	4
12	8	4	4
13	8	4	4
14	8	4	4
15	4	×	4
16	4	4	4
17	4	4	4
18	4	4	4
19	4	4	4
20	4	4	4
21	4	4	4
22	4	4	4
23	8	4	4
24	8	×	×
25	8	×	8
26	8	×	×
27	8	×	8
28	8	×	4
29	8	×	8
30	8	×	×
31	8	×	×
32	8	×	0
33	8	×	×
36	8	×	×
37	8	×	4
38	8(16)	-	8
39	8(16)	-	8
41	8	×	×
42	8	×	8
43	8(16)	-	×
44	8	×	×
45	8	×	×
47	8(16)	-	8
48	8(16)	-	×
50	8(16)	-	×
51	8(16)	-	×
52	8(16)	-	×
53	8(16)	-	8
54	8(16)	-	8
55	8(16)	-	8
56	8	-	8
57	8	-	8
59	8	-	8
61	8	-	8
62	8	-	8
63	8	-	8
67	8	-	8
68	8	-	8
77	8	×	×
78	8	×	×
80	8	×	×
83	8	8	8
84	8	-	8
85	8	×	8
87	8	×	8
90	8	8	8
91	8	8	8
92	8	×	×
93	8	×	8
94	8	×	×
95	8	-	8
96	8	-	8
97	8	×	8
98	8	8	8
99	8	8	8
100	8	8	8
101	8	8	8
102	8	8	8
103	8	×	8
104	8	×	×
105	8	×	×
107	8	16	8
108	8	×	×
109	8	×	×
114	8	×	×
115	8	×	×
116	8	-	8
118	8	-	8
120	8	-	8

×：試験物質の添加により細胞に影響が認められた
ー：試験未実施

メグ抽出物、タイム抽出物、パセリ抽出物、ジンジャー抽出物、セロリ抽出物、オニオン抽出物、バジル抽出物およびサンレッド No.5 であった。しかし、強く活性阻害した試験物質は無く、活性を約 1/2 程度に低下させただけであった。セレウリドはベロ毒素とは異なり低分子量のペプチドであるので、シクロデキストリンやシクロアミロースなどの包摂化合物やリン脂質などについても活性抑制効果について検討する計画である。

4. まとめ

天然物抽出物、天然色素、香料、食品添加物などについてベロ毒素活性阻害、ベロ毒素産生阻害およびセレウス菌嘔吐毒活性阻害効果を調べた。ベロ細胞毒性を指標にしてベロ毒素活性阻害効果を 100 種の試験物質について終濃度 0.1 および 1.0％で調べた結果、活性阻害したのは、ブルーベリー抽出物、粉末サンブラウン、グレープスキン色素、コーヒーフレーバーで、特に効果が高かったのは粉末サンブラウンおよびグレープスキン色素であった。試験物質のうち 89 種の物質について終濃度 0.1 および 1.0％でベロ毒素 Stx2 の産生および分泌に対する影響を調べた結果、1％の添加で，Stx2 の産生または分泌を抑制した物質は、タイム抽出物、ジンジャー抽出物、ブルーベリー抽出物、ストロベリー抽出物、マンゴ抽出物、サンイエロー No.3L、サンブラウン AC、コーン色素、キャラメルフレーバー、サイダーエッセンス、バニラオイル、サポニン、ノイペクチン、ポリフェノン 70A および EGCg であった。さらに 0.1％の添加でも抑制したのはブルーベリー抽出物、マンゴ抽出物および EGCg であった。

EHp-2 細胞内空胞化を指標にして、セレウリドの活性阻害物質のスクリーニングを行った。試験した 89 種の物質中、セレウリドの活性を抑制したのは、唐辛子水性抽出物、ナツメグ抽出物、タイム抽出物、パセリ抽出物、ジンジャー抽出物、セロリ抽出物、オニオン抽出物、バジル抽出物およびサンレッド No.5 であった。しかし、強く活性阻害した試験物質は無く、活性を約 1/2 程度に低下させただけであった。

謝　辞

本研究の遂行にあたり、多大な研究助成金を賜りました浦上食品・食文化振興財団に厚くお礼申し上げます。

文　献

Benelli, R., Vene, R., Bisacchi, D., Garbisa, S., Albini, A., 2002, Anti-invasive effects of green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a natural inhibitor of metallo and serine proteases, *Biol. Chem*. **383**, 101–105.

Friedman, M., Grosjean, O. K., Zahnley, J. C., 1986, Inactivation of metallo-enzymes by food constituents, *Food Chem. Toxicol*. **24**, 897–902.

Hisano, M., Yamaguchi, K., Inoue, Y., Ikeda, Y., 2003, Inhibitory effect of catechin against the superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB), *Arch. Dermatol. Res*. **295**, 183 –189.

感染症週報、2009 年 第 6 週 : 通巻第 11 巻 第 6 号、p16-22,

Li,R., Harada, T., Honjoh, K., Miyamoto, T., 2010, Phylogenetic analysis and Shiga toxin production profiling of Shiga toxin-producing/enterohemorrhagic *Escherichia coli* clinical isolates, *Microbial Pathogenesis*, **49**, 246-251.

宮本敬久 , 都　和美 , 中村　順, 波多野昌二 , 1994, Bacillus cereus の HEp-2 細胞空胞化因子産生機構の検討とその精製 , 日本食品微生物学会雑誌, **11(2)**, 113 – 117.

Morinaga, N., Iwamaru, Y., Yahiro, K., Tagashira, M., 2005, Differential activities of plant polyphenols on the binding and internalization of cholera toxin in vero cells, *J. Biol. Chem*. **280**, 23303 –23309.

Okubo, S., Sasaki, T., Hara, Y., Mori, F., Shimamura, T., 1998, Bactericidal and anti-toxin activities of catechin on enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Kansenshogaku Zasshi*, **72**, 211–217.

Quinones, B., Massey,S.,Friedman,M., Swimley,M.S.,Teter, K, 2009, Novel cell-based method to detect shiga toxin 2 from *Escherichia coli* o157:h7 and inhibitors of toxin activity, *Appl. Envion. Microbiol*., **75**, 1410-1416.

Satoh, E., Ishii, T., Shimizu, Y., Sawamura, S., Nishimura, M., 2002, The mechanism underlying the protective effect of the thearubigin fraction of black tea (*Camellia sinensis*) extract against the neuromuscular blocking action of botulinum neurotoxins, *Pharmacol. Toxicol*. **90**, 199–202.

Sawamura, S., Sakane, I., Satoh, E., Ishii, T., 2002, Isolation and determination of an antidote for botulinum neurotoxin from black tea extract, *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **120**,116P–118P.

Shimamura, T., Watanabe, S., Sasaki, S., 1986, Inhibition of cholera toxin production by thiols in Vibrio cholerae, *Infect. Immun*. **53**, 700–701.

Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y., Amano, F., Okubo, T., 1999, Epigallocatechin gallate and gallocatechin gallate in green tea catechins inhibit extracellular release of Vero toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Biochim. Biophys. Acta*, **1472**, 42–50.

Studies on inactivation of toxins from foodborne pathogen

Takahisa Miyamoto, Ken-ichi Honjoh
Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture
Kyushu University

Several food-poisoning bacteria produce toxins that cause illness to human. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) can cause severe illnesses in humans such as hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome (HUS). Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), a subset of STEC, carries the Shiga toxin (*stx*) gene and some other pathogenic factors such as the *eae* gene. EHEC/STEC isolates belong to the O:H serotypes, and, among them, serotype O157:H7 is the most prevalent serotype associated with human infections in many countries and is also the most prominent serotype of the more than 30 serotypes associated with STEC/EHEC. *Bacillus cereus* is a spore-forming bacterium, and produces diarrheal and emetic toxins causing foodborne illness by powdered milk, and processed foods. Especially, since the emetic toxin is stable against heat, enzymatic digestion and so on, if the toxin was once produced in food, the toxin could not be inactivated by any treatment applied in food processing. As well as control of food poisoning bacteria such as EHEC and *B. cereus*, control of toxins produced by food poisoning bacteria is important to decrease the risk of foodborne illness. To develop a new interventions to decrease the risk of foodborne illness by EHEC and emetic type *B. cereus*, extracts of natural products, natural pigments, food flavor, and food additives were screened for inhibitory activity for verotoxin, verotoxin productivity, and biological activity of cereulide, emetic toxin of *B. cereus*.

By using vero cell toxicity assay, among 100 substances tested, blueberry extract, San-brown powder NO.2085 food color, Grape Skin Pigment and Coffee High Flavor 5750 showed inhibitory effects on verotoxin at 0.1 or 1.0%. Among 89 substances tested for inhibition of verotoxin productivity of enterohaemorrhagic *E. coli*, thyme extract, ginger extract, blueberry extract, strawberry extract, mango extract, San-yellow NO.3 L food color, San-brown AC food color, Corn Pigment, Caramel Flavor Y 218, Cider Essence, Vanilla Oil, Saponin, Noipectin, polyphenon 70A, and EGCg showed inhibitory effects at 0.1 or 1.0%. Inhibitory activity was strongest in blueberry extract, mango extract, and EGCg; they decreased the productivity to less than 1/10 at 0.1%. Inhibitory effect on biological activity of cereulide was determined on 89 substances by using HEp-2 cell vacuolation assay. Capsicum water-soluble extract, nutmeg extract, thyme extract, parsley extract, ginger extract, celery extract, onion extract, basil extract, and San-red NO.5 food color decreased vacuolation activity of cereulide to about 1/2 at 0.1 or 1.0%. Identification and characterization of the anti-Stx components in the extracts may lead to the development of new antitoxin therapeutics or prophylactics.