＝原 著＝

セレウス菌嘔吐毒検査法の比較検討

秋場哲哉^{*1,†}・千葉隆司^{*1}・新井輝義^{*1}・池内容子^{*1}
井部明広^{*2}・柳川義勢^{*1}・甲斐明美^{*1}
矢野一好^{*1}・諸角 聖^{*1}

(東京都健康安全研究センター・^{*1}微生物部, ^{*2}食品化学部)

(受付: 平成 18 年 3 月 13 日)

(受理: 平成 18 年 7 月 25 日)

Comparison and Evaluation of Methods for Detection of *Bacillus cereus* Emetic Toxin

Tetsuya AKIBA^{*1,†}, Takashi CHIBA^{*1}, Teruyoshi ARAI^{*1}, Yoko IKEUCHI^{*1},
Akihiro IBE^{*2}, Yoshitoki YANAGAWA^{*1}, Akemi KAI^{*1},
Kazuyoshi YANO^{*1} and Satoshi MOROZUMI^{*1}

(^{*1} Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073; [†] Corresponding author)

(^{*2} Department of Food Safety, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073)

Bacillus cereus sometimes causes food poisoning, known as the diarrhoeal type associated with enterotoxin, and the emetic type associated with emetic toxin “Cereulide”. Standard methods for detection of cereulide are oral challenge in mammals, microscopic assessment of vacuole formation in HEP-2 cells and liquid chromatography-mass spectrometry assay; however, each method has some difficulties requiring specific facilities, skilled techniques or an expensive analyzer, respectively. We previously reported a colorimetric cell metabolic assay in HEP-2 cells using 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2*H*-tetrazolium, monosodium salt (WST-8), as a simple way to detect cereulide. In the present study, we compared and evaluated four methods: vacuolation, MTT, WST-8, and LC/MS using *B. cereus* strains isolated from retail foods. Colorimetric cell metabolic assay in HEP-2 cells using WST-8 was confirmed as sensitive and useful for a general laboratory.

Key words: Cereulide, WST-8, HEP-2

緒 言

セレウス菌 (*Bacillus cereus*) は、土壌や農産物など自然界に広く分布する通性嫌気性菌であり、時に吐気や嘔吐を主症状とする嘔吐型あるいは腹痛や下痢を主症状とする下痢型の食中毒を引き起こす。嘔吐型食中毒は同菌によって産生される嘔吐毒 (Cereulide) を摂取すること

により発症し、その検査法は動物を用いた経口投与試験^{2,9)}や HEP-2 細胞に対する空胞化変性を顕微鏡下で観察するバイオアッセイ (以下、HEP-2 細胞の空胞化を指標とした検査法とする)^{6,9)}、液体クロマトグラフィー/質量分析法 (以下、LC/MS 法とする)^{5,9)} による検出が標準的な手法とされている。しかし、これらの検査法は特殊な施設や熟練した手技、あるいは高価な機器を必要とするため、すべての検査施設で実施することは難しいと思われる。我々は、Finlay らの報告⁴⁾ をもとに Cereulide による HEP-2 細胞の代謝活性の低下をテ

[†] 連絡先

^{*1,2} ☎169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

ラゾリウム塩の一種である 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-8)⁸⁾ から産生されるホルマザン量の減少として光学的に測定する方法を検討し、HEp-2 細胞の空胞化を指標とした検査法に代わる簡易検査法として報告した³⁾。テトラゾリウム塩は細胞内の脱水素酵素によって還元されホルマザン色素を形成することから、産生された色素量を光学的に測定することにより、細胞数の変化や代謝活性を計測することにより利用されている。WST-8 は、Finlay らが使用した 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) に比べ、産生されるホルマザンが水溶性であるため溶出操作を必要としないため、操作が簡便であるという利点を有している。今回、我々は過去 5 年間に当センターにおいて市販食品から分離された *B. cereus* 株 391 株を用いて HEp-2 細胞の WST-8 還元量を指標とした検査法（以下、WST-8 を用いた吸光度法とする）による Cereulide 産生性の検査を行った。得られた結果を HEp-2 細胞の空胞化を指標とした検査法、HEp-2 細胞の MTT 還元量を指標とした検査法（以下、MTT を用いた吸光度法とする）、および LC/MS 法による検査結果と比較し、WST-8 を用いた吸光度法の通常業務における有用性について検討した。

材料および方法

1. 供試菌株

平成 11 年～16 年に東京都健康安全研究センターにおいて市販食品から分離され、デンプン分解能陰性であった *B. cereus* 株 391 株について、WST-8 を用いた吸光度法と HEp-2 細胞の空胞化を指標とした検査法に供試した。さらに、両検査法によって嘔吐毒産生性陽性と判定された *B. cereus* 株 63 株（以下、陽性株とする）と、陰性と判定された *B. cereus* 株のうち 10 株を任意に抽出し（以下、陰性株とする）、MTT を用いた吸光度法と LC/MS 法による検査を行った。

2. HEp-2 細胞浮遊液の調整

HEp-2 細胞を 1×10^5 /ml に浮遊させた 10% ウシ胎児血清加 Eagle's minimum essential medium (MEM ②: 日水製薬) を Cereulide 検査用細胞液（以下、HEp-2 細胞液とする）とした。

3. 検査試料の作製

各菌株を接種した BHI ブロス (Difco) 5 ml と陰性対照用として菌の接種を行わない BHI ブロスを 35℃ で 24 時間振とう培養（120 往復/分）し、さらにこの培養液 50 μ l を 10% スkimミルク培地 (Difco) 50 ml に接種し 30℃ で 24 時間振とう培養（100 往復/分）を行った。培養液を 3000 回転 (2000G) 10 分間遠心分離後、上清をメンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過し、

100℃ で 10 分間加熱処理したものを被検液とした。

4. 検査用マイクロプレートの作成

96 穴マイクロプレート (TC MICROWELL 96 F: Nunc) でリン酸緩衝生理食塩水 (Dulbecco's PBS(-): 日水製薬) を 2 倍段階希釈して 1～128 倍に希釈した被検液各 25 μ l を作製し、これに HEp-2 細胞液 100 μ l をそれぞれ加え（被検液の最終希釈倍率は 5～640 倍となる）、検査用マイクロプレートとした。

5. HEp-2 細胞の空胞化を指標とした検査法

検査用マイクロプレートを 37℃、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養した後、倒立型顕微鏡にて HEp-2 細胞の空胞化変性の有無を判定した。1 個の細胞質内に 5 個以上の空胞化変性を有する細胞が 30% 以上認められたウェルを陽性とし、陽性を示した最高希釈倍数をその菌株の毒素力価とした。

6. MTT を用いた吸光度法

Finlay らの報告⁴⁾に従い、検査用マイクロプレートを 37℃、5% CO₂ 存在下で 40 時間培養後、各ウェル内の上清を除去し、0.5% MTT (同仁科学) 加 MEM② 50 μ l を添加した。37℃、5% CO₂ 存在下で 3 時間反応させた後 MEM②を除去し、dimethyl sulfoxide (DMSO: 関東化学) 50 μ l を加え、振とう機で 30 秒間溶解し、570 nm における吸光度を測定した。陰性対照のすべてのウェルの吸光度の平均値 ($\bar{x}$) から Cut off 値 (C.O.) = $0.8 \bar{x}$ を求め、Cut off 値以下の吸光度を示したウェルを毒素陽性とし、陽性と判定された最高希釈倍数をその菌株の毒素力価とした。

7. WST-8 を用いた吸光度法

検査用マイクロプレートを 37℃、5% CO₂ 存在下で 40 時間培養した後、各ウェルに 5 mM の WST-8 溶液 (Cell Counting Kit-8: 同仁科学) 10 μ l を添加した。37℃、5% CO₂ 存在下で 4 時間反応させた後、450 nm (参照波長 650 nm) における吸光度を測定した。Cut off 値の設定および毒素力価の判定は、MTT を用いた吸光度法と同様に行った。

8. LC/MS 法

川村らの方法⁷⁾に準じて、被検液 5 ml にアセトニトリル-*n*-ヘキサン混液 (1:1) 10 ml を加えて振とう抽出を行った。静置後、上層抽出液をエバポレータにて蒸発乾固し、アセトニトリル 1 ml にて再溶解後（被検液は 5 倍濃縮となる）、メンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過したものを分析用試料とした。この分析用試料を Häggblom らの手法⁵⁾をもとに以下の条件で分析した。

LC/MS; 2695 セパレーションモジュール (Waters) Quattro Ultima Pt (Micro Mass)

カラム; COSMOSIL 5C18-MSII (2.0×150 mm ナカライテクス)

移動相; アセトニトリル-0.1% リフロル酢酸 (90:10)

流速; 0.2 ml/min

カラム温度; 40°C

注入量; 2 μ l

イオン化モード; ESI Positive

キャピラリー電圧; 3.00 kV

コーン電圧; 70 V

イオン源温度; 120°C

脱溶媒ガス温度; 400°C

スキャン範囲; m/z 800~1200

標準物質として, Cereulide と化学構造が酷似した Valinomycin (和光純薬) を使用し, S/N 比 5 以上を陽性とした。

結 果

供試した *B. cereus* 株 391 株のうち 63 株は, WST-8

を用いた吸光度法と HEp-2 細胞の空胞化を指標とした検査法のいずれの方法によっても陽性と判定された。残る 328 株のうち, 2 株は WST-8 を用いた吸光度法では陽性 (いずれも毒素力価は 5 倍) と判定されたが, HEp-2 細胞の空胞化を指標とした検査法では陰性と判定された。逆に HEp-2 細胞の空胞化を指標とした検査法では陽性で WST-8 を用いた吸光度法で陰性と判定された株はなかった。陽性株 63 株について MTT を用いた吸光度法と LC/MS 法による検査を行った結果, MTT を用いた吸光度法で 1 株, LC/MS 法で 6 株が陰性と判定された。陰性となった株は HEp-2 細胞の空胞化を指標とした検査法, WST-8 を用いた吸光度法において 5 倍から 20 倍と判定された比較的毒素力価の低い株であった。対照として実験に供した陰性株 10 株はいずれの方法によっても陰性と判定された。

陽性株について, 各検査法によって得られた毒素力価および測定値の相関を Fig. 1 に示した。最も高い相関を示した組み合わせは HEp-2 細胞の空胞化を指標とし

Fig. 1. Correlation between each method. a: vacuolation and MTT, b: vacuolation and WST-8, c: vacuolation and LC/MS, d: MTT and WST-8, e: MTT and LC/MS, f: WST-8 and LC/MS

た検査法と WST-8 を用いた吸光度法であり ($R^2 = 0.869$), 最も低値であったのは MTT を用いた吸光度法と LC/MS 法の相関 ($R^2 = 0.678$) であった.

考 察

嘔吐型食中毒を引き起こす *B. cereus* によって産生される Cereulide は, 抗原性がないため多くの毒素検査に用いられている抗原抗体反応を利用した免疫学的検査法が確立されていない. 今回, 我々は実際の市販食品検査において分離された *B. cereus* 株 391 株を用いて, 標準的な手法とされている HEp-2 細胞の空胞化を指標とした検査法と WST-8 を用いた吸光度法によって Cereulide 産生能検査を行った. その結果, 毒素力価に若干の差はみられたが, Cereulide 産生能の判定結果は 391 株中 389 株 (99.5%) で一致し, WST-8 を用いた吸光度法は実際の検査に応用可能と思われた. また, HEp-2 細胞の空胞化を指標とした検査法は, 24 時間後の判定において毒素が高濃度に含まれるウェルでは空胞化変性がみられず, 適度な希釈濃度のウェルでのみ確認できた. これに対し WST-8 を用いた吸光度法では高濃度部分でもすべて陽性と判定された. したがって, Cereulide 産生性のスクリーニング検査を目的とする場合には, 希釈系列を作製しなくとも培養上清のみを直接検査し判定することが可能と思われた. 陽性株 63 株について MTT を用いた吸光度法と LC/MS 法による検査を行い, 各手法で得られた検査結果を比較検討した結果, Cereulide 産生性の低い株の一部に LC/MS 法と他の方法との判定の不一致がみられたが, 各検査法における Cereulide 濃度や力価には高い相関が認められた. LC/MS 法は, HEp-2 細胞を指標とする検査法のように細胞の状態や濃度に影響を受けることがなく, 直接 Cereulide の濃度が測定できるため, 最も正確で確実な検査法と考えられる. しかし, 高価な機器が必要であり, その維持管理等も考慮すると一般的検査法とは言いがたい. Agata らの報告¹⁾では, HEp-2 細胞の空胞化を指標とした検査法によって得られる毒素力価に 5 ng/ml を乗じた値が LC/MS 法による Cereulide 濃度とされている. 今回, 我々が用いた LC/MS 法によって得られた測定値はそれと大きく乖離し, また, 毒素産生能が低いと思われる株の中には HEp-2 細胞を用いる検査法との判定結果に違いが生じていた. これらの理由については今後のさらなる検討が必要であろう. HEp-2 細胞の空胞化を指標とした検査法は, Cereulide 検査用被検液と HEp-2 細胞液を混合した後 24 時間で判定可能であり, 細胞の形態変化のみを指標とするため他の試薬類や特殊な施設, 機器を必要としないという利点を有しているが, 判定に熟練を要し個人誤差が生じる点是否定できな

い. MTT を用いた吸光度法は特殊な施設や機器を必要とせず, 判定に個人的誤差が生じることがない優れた手法であるが, ホルマザンを溶解する操作が必要となるため検査工程がやや煩雑となる. また, 産生されたホルマザンを完全に溶解することは難しいとされている. WST-8 を用いた吸光度法は, MTT を用いた吸光度法の特徴を維持しつつ操作を簡素化した手法であるが, 他の検査法と同等の感度を有し, 相関も良好であった. 以上のことから, セレウス菌嘔吐毒の検査を行う場合には, 目的や検体数, 各検査法の感度や操作性を考慮して検査法を選択することが必要であるが, WST-8 を用いた吸光度法はセレウス菌の Cereulide 産生能を定性または定量的に確認することを目的とした試験法として, 一般的検査施設に適した手法であると考えられた.

文 献

- 1) Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I. and Isobe, M.: A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. FEMS Microbiol. Lett., **121**, 31-34 (1994).
- 2) Agata, N., Ohta, M., Mori, M. and Isobe, M.: A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett., **129**, 17-20 (1995).
- 3) 秋場哲哉, 千葉隆司, 新井輝義, 柴田幹良, 井部明広, 柳川義勢, 甲斐明美, 矢野一好, 諸角 聖: 比色法を用いたセレウス菌嘔吐毒のバイオアッセイ法に関する検討. 日食微誌, **22**, 112-115 (2005).
- 4) Finlay, W. J. J., Logan, N. A. and Sutherland, A. D.: Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. Appl. Environ. Microbiol., **65**, 1811-1812 (1999).
- 5) Häggblom, M. M., Apetroaie, C., Andersson, M. A. and Salkinoja-Salonen, M. S.: Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. Appl. Environ. Microbiol., **68**, 2479-2483 (2002).
- 6) Hughes, S., Bartholomew, B., Hardy, J. C. and Kramer, J. M.: Potential application of a HEp-2 cell assay in the investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. FEMS Microbiol. Lett., **52**, 7-12 (1988).
- 7) 川村久美子ら: HEp-2 細胞空胞化試験による *Bacillus cereus* 嘔吐毒素測定法の改良の試み. 日食微誌, **14**(3), 146-152 (2004).
- 8) Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K. and Watanabe, M.: A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. Anal. Commun., **36**, 47-50 (1999).
- 9) 上田成子: セレウス菌. 食品衛生検査指針, p. 226-282, 日本食品微生物協会, 東京 (2004).