***Bacillus cereus* 及び *Bacillus thuringiensis* 環境分離株の毒素産生能**

三上 健,*^a 堀川次男,^a 村上知教,^a 佐藤則泰,^a 小野幸栄,^a
松本達二,^a 山川紀子,^b 村山尚子,^b
片桐 進,^b 鈴木益子^a
東北薬科大学微生物学,^a 山形県衛生研究所^b

**Examination of Toxin Production from Environmental
Bacillus cereus and *Bacillus thuringiensis***

Takeshi MIKAMI,*^a Tsuguo HORIKAWA,^a Tomonori MURAKAMI,^a
Noriyasu SATO,^a Yukie ONO,^a Tatsuji MATSUMOTO,^a
Akiko YAMAKAWA,^b Shoko MURAYAMA,^b
Susumu KATAGIRI,^b and Masuko SUZUKI^a

Department of Microbiology, Tohoku College of Pharmacy,^a 4-4-1
Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981, Japan and Yamagata
Prefectural Public Health Laboratories,^b 1-6-6
Tookamachi, Yamagata 990, Japan

(Received March 20, 1995)

Emetic toxin- and entero toxin-producing activities were examined for 524 strains of *Bacillus cereus* and 90 strains of *Bacillus thuringiensis* to determine the distribution and contamination in natural environment, including foods, vegetable, soil and etc. Emetic toxin was assayed by the production of acid from HEp-2 cells induced by the culture supernatants of *Bacillus*, which was developed as an improved method for the detection of *B. cereus* heat-stable emetic-toxin by us.

In the 524 strains of *B. cereus* tested, 11 out of 60 strains obtained from bean paste and 5 out of 20 strains obtained from peach produced emetic toxin which was detected by the HEp-2 cell method. All these emetic toxin-producing isolate strains were classified into H1 serotype. The 90 strains of *B. thuringiensis* did not produce emetic toxin, but the 47 strains produced entero toxin.

Key words—*Bacillus cereus*; *Bacillus thuringiensis*; entero toxin; HEp-2 cell; emetic toxin

緒 言

Bacillus cereus は、土壌、河川水、植物等の自然環境中に広く分布する有芽胞菌である。これらのある菌株は食中毒の原因菌になりうるということが知られている。¹⁾ *B. cereus* による食中毒は臨床症状から下痢型と嘔吐型に分類されて、各々の原因毒素も異なることが知られている。²⁾ 食中毒発生時に原因菌として *B. cereus* が検出されても、その菌が食中毒の真の原因であるか否かの決定には、食べ残しや検食から分離した菌と患者の便から分離された菌が同じ鞭毛血清型の菌であることと、その菌が食中毒の原因となる毒素産生性の菌であることが必要である。下痢型食中毒は *B. cereus* の産生するエンテロトキシンによることが明らかとなっているが、嘔吐型の原因毒素は脂質もしくはペプチドの可能性が示唆されていた。最近、安形らは12個のアミノ

酸が環状に結合した Cereulide が HEp-2 細胞の空胞化変性の原因物質であることを明らかにした。³⁾

一方, *B. cereus* と同属の *Bacillus thuringiensis* が芽胞形成期に菌体内に産生する結晶毒素は, 生物農薬として野菜や果物等の害虫駆除の目的で広く散布されているが, 増殖可能な芽胞が含まれることから, 多くの場合生菌が散布後の環境中で検出される。⁴⁾ *B. cereus* と *B. thuringiensis* の相違は菌体内に結晶毒素を産生するか否かの点で区別されるのみである。*B. thuringiensis* の結晶毒素産生プラスミドの欠損した菌株が *B. cereus* として分類されていることから, 害虫駆除の目的で種々の農作物に散布された *B. thuringiensis* が *B. cereus* の産生するエンテロトキシン又は嘔吐毒を産生する可能性も推定されている。⁵⁾ 既に我々は, *B. cereus* の産生する耐熱性嘔吐毒を HEp-2 細胞の酸産生能を指標として簡便に検出できることを報告している。⁶⁾

本論文では, 我々の開発した HEp-2 細胞の酸産生を測定する簡便な検出方法の改良を行い, 食品及び土壌等から分離した, いわゆる環境分離の *B. cereus* と *B. thuringiensis* のスクリーニングを行い, 嘔吐毒及び下痢毒産生株の割合を検討した。

実 験 の 部

1. *B. cereus* 及び *B. thuringiensis* の分離 種々の野菜, 果物, 穀物, 土壌等の 614 検体より *B. cereus* 又は *B. thuringiensis* を分離した。菌体の分離方法は, 各検体 10 g を 90 ml の滅菌生理食塩水で乳剤とし, その 1 ml を 10 ml の液体培地 (乾燥ブイヨン (日水製薬) 30 g, マルトー

Table 1. Origin of *B. cereus* and *B. thuringiensis*

		No. of isolates	
		<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
Vegetable	Chinese Cabbage	5	0
	Cucumber	20	0
	Leaves of Radish	5	0
	Radish	5	0
	Spinach	15	0
Fruit	Pear	15	0
	Pear (Yonashi)	5	0
	Apple	108	22
	peach	20	0
	Persimmon	5	0
	Pear (LaFrance)	30	10
	Grape	10	5
	Kiwi-Fruit	0	5
	Cherry	5	0
Pulse	Bean curd (Tofu)	0	10
	Bean	30	7
	Bean paste (Miso)	60	0
Grain	Rice	15	0
Soil	Apple orchard	100	5
Leaf	Apple tree	53	10
Grass	Apple orchard	18	16
Total		524	90

ス 1g, 0.2% フェノールレッド 12ml, ポリミキシン B 1 万単位, 蒸留水 1000ml) に接種し, 雑菌の増殖を抑制するため至適温度より高温な 37°C で 24 時間培養した. 培養された菌の 1 白金耳を NGKG 寒天培地 (日水製薬) に移植, 37°C, 24 時間培養後, 形成されたコロニーのうちレシチナーゼ反応陽性でコロニー周縁が不規則なものを釣菌し, BHI 斜面寒天培地 (Difco Laboratories) に純培養した. この分離株を 5% フクシン液により加温染色を行い, 結晶蛋白質の認められたものを *B. thuringiensis* と同定した. *B. cereus* 及び *B. thuringiensis* の分離状況を Table 1 に示した.

2. 血清型別試験 *B. cereus* 菌株をクレーギー管の入った 0.3% 寒天加 Heart Infusion 培地 (HI: 日水製薬) で継代し, 運動性の活発な菌を HI 培地で 32°C で 3—4 時間振とう培養後, ホルマリンをホルムアルデヒドとして終濃度 1% となるように添加後, 4°C で保存した. 菌液 0.5ml に *B. cereus* H 抗原抗血清 (東北食中毒研究会・山形衛生研究所内) を 0.05ml 加え, 53°C で 2 時間反応後, 凝集の有無を判定した.

3. 嘔吐毒の測定 嘔吐毒産生用培地は, 市販の Skim milk (雪印乳業) 20g を 200ml の蒸留水で 500ml の三角フラスコ中で溶解後, 121°C, 20 分間滅菌した. 各菌株は BHI 培地 (日水製薬) で 32°C, 12 時間前培養後, 10% Skim milk 培地に菌を移植, 32°C で振とう培養 (150 rpm/min) した. 培養終了後, 培養液を 121°C, 20 分間加熱滅菌し, 17000×g, 20 分間遠心分離後, 上清をポアサイズ 0.45 µm のフィルター (Steradisc: 倉敷紡績) によりろ過し, 粗毒素液として用いた. 毒性の測定に用いた HEp-2 細胞 (ヒト喉頭癌由来) は 10% ウシ胎児血清 (FBS: Hazleton) 加 Basal Medium Eagle (BME: Sigma Chemical) 培地にペニシリン G 100unit/ml, 硫酸ストレプトマイシン 100 µg/ml の割合で添加, 37°C, 5% CO₂ incubator で培養した. HEp-2 細胞 (3×10⁵ cells/ml) を 96 穴マイクロテストプレート (Becton Dickinson) で 24 時間培養後, 前述の粗毒素液を 1 well あたり 10 µl 加え培養した. 培養終了後, HEp-2 細胞の酸産生により変化する培地の色調を DU-68 spectrophotometer (Beckman) により 350—650 nm の吸光度, 又は Immuno Reader NJ-2000 (Intermed) により 405 nm もしくは 545 nm の吸光度により測定した. 判定は培養上清を 1/10 希釈より 2 段階希釈を行い, 1/160 又は 1/320 の希釈で, 非毒素産生株の培養上清を対照として, 吸光度が 0.1 O.D. 以上の差が認められた場合を陽性と判定した.

4. エンテロトキシン (下痢原性毒素) の測定 分離菌株を BHI 培地で 32°C, 6 時間振とう培養 (110 rpm/min) 後, 3000 rpm で 20 分間遠心分離を行い, その上清を試料とし, *B. cereus* エンテロトキシン検出用キット (CRET-RPLA 「生研」: デンカ生研) により測定した. 結果の判定は, 黒紙上にマイクロプレート置き, ラテックス沈降像により 卐— に分類し, + 以上を陽性と判定した.

5. 生物型の検出 生物型の検出には, 上田の方法に従い, 澱粉分解性, クエン酸塩利用能, 硝酸塩還元能を測定した.⁷⁾

結

果

1. 嘔吐毒による HEp-2 細胞培養上清中への酸産生測定方法の改良

嘔吐毒産生 *B. cereus* No. 277 の粗嘔吐毒素は HEp-2 細胞の酸産生を促す. そこで毒素添加後の HEp-2 細胞培養上清の吸収波長の変化を 350—650 nm の範囲で測定した. Fig. 1 には培養前と 24 時間後の吸収波長を示した. 毒素を加える前の培地の極大吸収は 560 nm で, 毒素添加後は 440 nm に極大吸収を示した. 吸光度は添加した毒素量に依存したが吸収波長には影響しなかった. この結果から, *B. cereus* の産生する毒素活性は, 560 nm の吸収の減少もしくは, 440

Fig. 1. Change of Optical Density of Culture Supernatants of HEp-2 Cells Induced by Emetic Toxin of *B. cereus*

BME medium (—), culture sup. 24h after toxin addition (-----).

Fig. 2. Kinetic Analysis of Toxin Production against HEp-2 Cells Induced by the Addition of *B. cereus* Culture Supernatant

nmの吸収の増加により測定できることが明らかになった。

2. 嘔吐毒素の産生時間

B. cereus の嘔吐毒素産生時間の検討の結果を Fig. 2 に示した。 *B. cereus* を Skim milk 培地で

各時間振盪培養後、得られた粗毒素を 200 倍、400 倍、800 倍に希釈し、HEp-2 細胞と培養を行った。HEp-2 細胞の酸産生により測定される毒素活性は、14—35 時間で毒素産生が最も高く、その後低下した。この結果から、毒素産生のための培養時間を毒素産生の最短時間である 14 時間と設定して以後実験を行った。

3. *B. cereus* 524 菌株並びに *B. thuringiensis* 90 菌株中の嘔吐毒及び下痢毒素産生能

Table 2 に種々の食品及び土壌等由来の *B. cereus* 毒素産生能を HEp-2 細胞の色調変化により測定した嘔吐毒及びエンテロトキシン検出キットで測定した下痢毒の分離菌株数を示した。

B. cereus 由来の嘔吐毒素産生菌株の内訳は、みそ由来菌が 60 菌株中 11 菌株 (18%)、もも由来菌が 20 菌株中 5 菌株 (25%) であった。この結果は、今回検討した *B. cereus* 524 菌株の 3% に嘔吐毒活性が検出されたことを示しており、その力価は 800 倍から 6400 倍と高力価を示した。また、下痢毒素産生能は、*B. cereus* 524 菌株中 347 菌株 (66%) に産生能が認められ、野菜由来 38 菌株 (11%)、果物由来 127 菌株 (37%)、豆類由来 47 菌株 (14%)、その他 135 株 (39%)

Table 2. Number of Diarrheal Toxin and Emetic Toxin Producing Strains in *B. cereus* and *B. thuringiensis*

	<i>B. cereus</i>			<i>B. thuringiensis</i>		
	Emetic toxin	Diarrheal toxin	None ^{a)}	Emetic toxin	Diarrheal toxin	Non
Vegetables	0	38	12	0	0	0
Fruits	5	127	71	0	34	8
Pulse	11	47	52	0	7	10
Others	0	135	51	0	6	25
Total	16	347	161	0	47	43

a) None: No-toxin production.

Table 3. Biological Characteristics of Emetic Toxin Producing *B. cereus* Strains

Sample number	Source of isolates	H serovar	Starch hydrolysis	Citrate utilization	Nitrate reduction	Phenotype	Production of enterotoxin
181	Bean paste	H. 1	—	+	+	V	—
183	Bean paste	H. 1	—	+	+	V	—
187	Bean paste	H. 1	—	+	+	V	—
209	Bean paste	H. 1	—	+	+	V	—
211	Bean paste	H. 1	—	+	+	V	—
213	Bean paste	H. 1	—	+	+	V	—
215	Bean paste	H. 1	—	+	+	V	—
217	Bean paste	H. 1	—	+	+	V	—
239	Bean paste	H. 1	—	+	+	V	—
241	Bean paste	H. 1	—	+	+	V	—
245	Bean paste	H. 1	—	+	+	V	—
269	Peach	H. 1	—	+	+	V	—
271	Peach	H. 1	—	+	+	V	—
273	Peach	H. 1	—	+	+	V	—
275	Peach	H. 1	—	+	+	V	—
277	Peach	H. 1	—	+	+	V	—

に下痢毒素が検出された。嘔吐毒素，下痢毒素のどちらも産生しない菌株は 161 菌株であり，毒素非産生率は 31% であった。

一方，*B. thuringiensis* は 90 菌株について検討を行ったが，嘔吐毒素産生菌株は検出されなかった。下痢毒素産生菌株は 47 菌株 (52%) であり，その内訳は，野菜由来菌株からは検出されず，果物由来 34 菌株 (38%)，豆類由来 7 菌株 (8%)，その他 6 菌株 (7%) であった。非毒素産生株は 43 菌株 (48%) であった。

4. 嘔吐毒素産生菌株の H 血清型及び生物型

Table 3 に嘔吐毒素産生菌株の H 血清型と生化学的性状を示した。嘔吐毒素産生菌株は，みそ及び桃から分離された *B. cereus* で，その H 血清型はいずれも 1 型であった。生物型を決定するために生化学的性状を測定した結果，澱粉分解性は陰性，クエン酸塩利用，硝酸塩還元能はいずれも陽性であった。これらの性状の組み合わせにより，今回検出された *B. cereus* の生物型はいずれも V 型に分類された。また，嘔吐毒素産生菌株には下痢毒素を同時に産生する菌株はなかった。

考 察

B. cereus は環境細菌として普遍的に分布している細菌で，一般的には非病原菌であり，その中の一部の菌が食中毒原因菌となることが知られている。¹⁾ これらの分別を目的として H 抗原による血清型分けが行われ，血清型と食中毒菌との関連が推定されている。²⁾

先に我々は *B. cereus* の H 抗原の共通抗原エピトープの存在を報告した。⁸⁾ さらに *B. cereus* の血清型別に，可溶化 H 抗原を用いた ELISA 法により高感度な検出が可能なことを示した。⁹⁾ *B. cereus* の引き起こす食中毒は臨床的には下痢型と嘔吐型に大別され，それぞれ異なった菌体外毒素による。²⁾ 下痢型食中毒は，易熱性のエンテロトキシンに起因し，腹痛・下痢が主症状であり，毒素は分子量 50000，pI 値 4.9 のタンパク質で，¹⁰⁾ サブユニット構造を有する。¹¹⁾ 品川らは下痢型腸炎由来菌株を用いて単一の易熱性タンパク毒素を分離し，その標品を用いた抗毒

素血清を作製した。¹²⁾ 今回我々の分離した菌株のエントロトキシン産生能は、66%と極めて高かった。この結果はセレウス菌食中毒の発生事例が少ないことと矛盾するが、本菌は通常芽胞として存在することと、産生されるエントロトキシンが易熱性であることが原因と推定される。

一方、悪心・嘔吐を主症状とする嘔吐型食中毒の原因毒素は抗原性が非常に乏しいために現在のところ免疫化学的な検出方法が行われていない。それゆえ嘔吐毒の検出には、サルに経口投与を行い嘔吐を検出する方法以外に確実な方法は未だ開発されていない。Gilbert らによるサルを用いた実験から、嘔吐毒は加熱、酸、アルカリ、タンパク分解酵素などの処理に極めて安定な毒素であることが報告されている。¹³⁾ 嘔吐毒の抗原性は非常に低く、¹⁴⁾ また限外濾過膜を通過することから、分子量 5000 前後の低分子ペプチドであると推測されているが、¹⁵⁾ 化学構造は明らかではない。

1988 年 Hughes らが、ヒト喉頭癌由来の HEp-2 細胞の空胞化変性活性と *B. cereus* の嘔吐毒との間に相関性のあることを示した。¹⁶⁾ Szabo らは空胞化変性活性以外に本毒素が細胞に対して与える影響として、酸の産生、細胞の円形化、細胞質顆粒形成、細胞増殖抑制作用を報告した。¹⁷⁾ 桜井らは *B. cereus* の嘔吐毒による HEp-2 細胞の空胞化変性は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化のアンカップリングによりミトコンドリアの膨張が原因であることを明らかにした。¹⁸⁾ 最近安形らは、HEp-2 細胞の空胞化変性毒素 (cereulide) を *B. cereus* の嘔吐毒素産生菌株より単離し、その構造を明らかにした。³⁾ 現在のところ cereulide が嘔吐毒の本態か否かは明らかとされていないが、最も可能性の高い物質である。

我々は、HEp-2 細胞に対する *B. cereus* の嘔吐毒素の生物活性を検討し、本毒素の HEp-2 細胞に対する作用は直接的な細胞毒として働き死細胞を増加させるわけではなく、増殖抑制活性であることを明らかとした。⁶⁾

本論文では、HEp-2 細胞より産生される酸による培地の色調変化をさらに詳細に検討を行った。その結果 BME 培地に含まれるフェノールレッドは中性で 560 nm に、酸性では 440 nm に極大吸収を持つことが明らかになった。市販のマイクロテストプレートによる吸光度測定器の多くは 405 nm 及び 545 nm のフィルターを標準装備していることから、545 nm の吸収の減少もしくは 405 nm の吸収の増加を測定しても測定結果に特に影響を認めなかった。

今回我々は、*B. cereus* と *B. thuringiensis* の区別を結晶毒素の有無により判定を行ったが、既に我々は、*B. thuringiensis* 及び *B. cereus* H 抗原間の交差反応は凝集反応では検出されないが、ELISA 法を用いた高感度検出では共通抗原性が検出されることを報告した。¹⁹⁾ この原因を *B. cereus* H-1 型菌に対する抗 H 抗体及び *B. cereus* H 共通抗原に対するモノクローナル抗体により検討を行ったところ、*B. cereus* と *B. thuringiensis* に共通な 61 kDa の蛋白抗原が検出された。²⁰⁾ 上田らは、野菜及び土壌より分離した *B. cereus* と *B. thuringiensis* の分布及び下痢毒の産生性を詳細に検討しており、*B. cereus* 275 菌株中 101 菌株、*B. thuringiensis* は 6 菌株中 5 菌株が下痢毒素を有意に産生する菌株であったことを報告しているが、下痢毒産生性 *B. cereus* の多くは H 血清型分け不能であることを報告しているが、²¹⁾ 我々の結果から、高感度な検出方法を用いて H 血清型分けを行うと、共通抗原エピトープを検出することになり型分けが不能になったことが推定される。

さらに上田らは、米穀の生産過程から分離された *B. cereus* の嘔吐毒の産生能を HEp-2 細胞の空胞化活性により測定を行い、でんぷん非分解菌で生物型 V 型の菌が嘔吐型食中毒に関連あることを明らかにしている。⁷⁾ 今回我々が分離した *B. cereus* の嘔吐毒産生株は、いずれも H 鞭

毛型は1型で、生物型はでんぶん非分解性のV型菌であったことは従来の報告と矛盾しない結果である。

引用文献

- 1) 品川邦汎, “食水系感染症と細菌食中毒,” 坂崎利一編, 中央法規出版, 東京, 1991, p. 304.
- 2) Johnson K. M., *J. Food Prot.*, **47**, 145—153 (1984).
- 3) Agata N., Mori M., Ohta M., Suwan S., Ohtani I., Isobe M., *FEMS Microbiol. Lett.*, **121**, 31—34 (1994).
- 4) 大島康平, 加納伸晃, 長谷川幸七郎, 二口欣也, 基礎と臨床, **23**, 147—153 (1989).
- 5) 品川邦汎, 食品と微生物, **9**, 41—42 (1992).
- 6) Mikami T., Horikawa T., Murakami T., Matsumoto T., Yamakawa A., Murayama S., Katagiri S., Shinagawa K., Suzuki M., *FEMS Microbiol. Lett.*, **119**, 53—58 (1994).
- 7) 上田成子, 防菌防黴, **22**, 77—83 (1994).
- 8) Murakami T., Hiraoka K., Mikami T., Matsumoto T., Katagiri S., Suzuki M., *Microbiol. Immunol.*, **35**, 223—234 (1991).
- 9) Mikami T., Hiraoka K., Murakami T., Boon-Long J., Matsumoto T., Suzuki M., *Microbiol. Immunol.*, **34**, 709—714 (1990).
- 10) Turnbull P. C. B., Gilbert R. J., Jorgesen K., Melling J., *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 219—228 (1979).
- 11) Thopson N. E., Ketterhagen M. J., Berdoll M. S., Schantz E. J., *Infect. Immun.*, **43**, 887—894 (1984).
- 12) Shinagawa K., *Int. J. Food Microbiol.*, **10**, 125—142 (1990).
- 13) Girbert R. J., Turnbull P. C. B., Parry J. M., Kramer J. M., “The Aerobic Endospore-forming bacteria: Classification and Identification,” eds. by Berkeley R. C., Goodfellow M., Academic Press, London, 1981, pp. 297—314.
- 14) Melling J., Capel B. J., *FEMS Microbiol. Lett.*, **4**, 133—135 (1978).
- 15) Melling J., Capel B. J., *J. Clin. Path.*, **29**, 938—940 (1976).
- 16) Hauges S., Bartholomew B., Hardy J. C., Kramer J. M., *FEMS Microbiol. Lett.*, **52**, 7—12 (1988).
- 17) Szabo R. A., Speiro J. I., Akhtar M., *J. Food Prot.*, **54**, 272—276 (1991).
- 18) Sakurai N., Koike K. A., Irie Y., Hayashi H., *Microbiol. Immunol.*, **38**, 337—343 (1994).
- 19) Murakami T., Hiraoka K., Mikami T., Matsumoto T., Katagiri S., Shinagawa K., Suzuki M., *FEMS Microbiol. Lett.*, **107**, 179—184 (1993).
- 20) 村上知教, 堀川次男, Boon-Long J., 三上 健, 松本達二, 品川邦汎, 鈴木益子, 防菌防黴, **21**, 597—602 (1993).
- 21) 上田成子, 桑原祥浩, 安形則雄, 徳丸雅一, 小沼博隆, 品川邦汎, 食品と微生物, **7**, 177—182 (1991).