

食品製造環境由来の *Bacillus cereus* の菌株タイピング

遠田 昌人, 遠田 智江

Strain Typing of *Bacillus cereus* Isolates from Food Plants

Atsuhito Enda and Tomoe Enda

Bacillus cereus, well known food-borne pathogen, is also possible causal bacteria of aseptically packaged foods and drinks. It is required to assess contaminations by strain typing methods for prevention of spoilage in aseptic food plants. Multilocus sequence typing (MLST) was adopted for phylogenetic analysis of 14 strains of *B. cereus* isolates.

Nine novel sequence types (STs) were found and three pairs of two strains isolated from the same plants were revealed to be very close individually. One strain with cereulide production gene was found to belong to the ST frequently isolated from rice.

The MLST method is evaluated to be useful for control of *B. cereus* in aseptic food plants.

Key words: *Bacillus cereus*, MLST, Food plant, cereulide

Bacillus cereus はよく知られた食中毒菌であるが、ボツリヌス菌 *Clostridium botulinum* やウエルシュ菌 *C. perfringens* と同様に芽胞を形成する。容器包装詰食品での大規模な食中毒事例は知られていないが、土壌、河川水、植物、自然環境、および穀類、食肉製品、牛乳などと食品原料に広く分布しており、汚染機会が多い¹⁾。

B. cereus 芽胞はレトルト殺菌を生存するほどの耐熱性ではないものの、殺菌剤、特に無菌充填で用いられている過酢酸への抵抗性を示すため²⁾、潜在的な危害菌と考えられる。無菌充填は内容物、容器包装、配管、装置、および雰囲気滅菌および無菌性保持を組み合わせた複雑な微生物制御技術に基づいているため、変敗事故発生に際して汚染箇所の特定制が難しく、菌株レベルでの汚染菌識別を用いて汚染菌の動態を詳細に分析することが必要となる。

B. cereus を含むグラム陽性菌においては、一般に血清型における多様性が乏しく、菌株同士を識別するためには PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis; パルスフィールドゲル電気泳動) 法³⁾、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; ランダム増幅多型 DNA) 法⁴⁾、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; 増幅断片長多型) 法⁵⁾ といった、遺伝子を用いたタイピング技術が有効である。本研究においては、多くの食中毒菌について確立されている菌株タイピング技術である MLST (Multilocus Sequence Typing; 多座位配列タイピング)⁶⁾ 法を用い、食品製造環境由来の *B. cereus* について解析を行った。

材料および方法

1. 使用菌株

本研究で使用した *B. cereus* の菌株について表 1 に示した。いずれの菌株も食品製造環境から分離された菌株である。

表 1 *Bacillus cereus* 供試菌株

Strain	Origin	CRS gene
TIFT 114001	Aseptic drink plant	—
TIFT 114002	Aseptic drink plant	—
TIFT 114003		—
TIFT 114004		—
TIFT 114005		—
TIFT 114006		—
TIFT 114007		—
TIFT 114008		—
TIFT 114009		—
TIFT 114010		—
TIFT 114011	Aseptic cooked rice plant	+
TIFT 114012		—
TIFT 114013		—
TIFT 114014		—

2. DNA 抽出

35℃で一晩培養した標準寒天培地より *B. cereus* の集落を一白金耳、釣菌し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 1 ml に懸濁した。懸濁液より DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) を用いて染色体 DNA を抽出した。抽出操作はおのおののキット添付の取扱説明書記載のグラム陽性菌向け手順に従って行った。

3. 供試菌株のセレウリド産生遺伝子

抽出した DNA 溶液を鋳型として、*Bacillus cereus* (CRS gene) PCR Detection Kit (TaKaRa) を用いて、増幅反応を行い、セレウリド (嘔吐毒) 産生遺伝子の有無を調査した。反応スケールは 20 µl とし、反応あたり 0.1 µl の DNA 溶液を用いた。その他の条件はキットの取扱説明書記載の手順に従った。

増幅反応液は TAE (Tris-Acetate-EDTA) 緩衝液中の 3% NuSieve 3:1 Agarose (Lonza) のアガロースゲルで 100V, 30 分間電気泳動した。泳動後、アガロースゲルをエチジウムブロマイド溶液に 15 分間浸漬して染色、流水中で 15 分間洗浄した後、365 nm の紫外線照射下でバンドを確認した。

4. MLST-PCR

MLST の手法は Priest ら⁷⁾ に従い、抽出した DNA を鋳型として、*glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pycA* および *tpi* の 7 つの遺伝子を標的として増幅反応を行った。使用したプライマーの配列を表 2 に示した。増幅反応は 30 サイクルとし、反応スケールは 15 µl, プライマー濃度は終濃度 0.2 mM とした。アニーリング温度は基本的に推奨温度に従い、増幅産物が見いだされなかった場合には 1℃ずつ下げた。

5. 塩基配列解析

PCR 反応液を鋳型として用い、ダイレクトシーケンシングによりシーケンシング反応を行った。鋳型 DNA は ExoSAP-IT (GE Healthcare) で処理し、未反応プライマーおよび dNTP を除去した後、反応あたりおよそ 25 fmol となるよう DNA 溶液を加えた。シーケンシング反応には DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter) を用い、反応条件はおのおののプライマーセットでの推奨アニーリング温度に従い、サイクル数は 30 サイクルとした。シーケンシング反応後、反応液は 95% エタノール 60 µl を用いてエタノール沈殿し、得られた沈殿を 70% エタノール 200 µl で 2 回洗浄後、真空乾燥して精製した。精製後の反応液は CEQ8000 遺伝子解析システム (Beckman Coulter) により塩基配列を解析した。

6. MLST 解析

おのおのの菌株について取得した各遺伝子の塩基配列を用いて MLST 解析を行った。解析には START2 ソフトウェア⁸⁾ を用い、菌株のプロファイルは The *Bacillus cereus* Multi Locus Sequence Typing website (<http://pubmlst.org/bcereus/>) より取得したアレルプロファイルと比較した。

結 果

1. セレウリド産生

当所保有の *B. cereus* 14 菌株についてセレウリド産生遺伝子 (CRS) の有無を調べた結果を表 1 に示した。その結果、TIFT 114011 株のみが陽性で、セレウリド産生株である可能性が示された。他の 13 菌株は陰性であった。

表 2 PCR およびシーケンシングプライマー⁷⁾

Primers	Forward	Reverse	Annealing temperature (°C)
<i>glpF</i>	GCG TTT GTG CTG GTG TAA GT	CTG CAA TCG GAA GGA AGA AG	59
<i>gmk</i>	ATT TAA GTG AGG AAG GGT AGG	GCA ATG TTC ACC AAC CAC AA	56
<i>gmk_F3</i>	GAG AAG TAG AAG AGG ATT GCT CAT C	(same as <i>gmk</i>)	55
<i>ilvD</i>	CGG GGC AAA CAT TAA GAG AA	GGT TCT GGT CGT TTC CAT TC	58
<i>IlvD_2</i>	AGA TCG TAT TAC TGC TAC GG	GTT ACC ATT TGT GCA TAA CGC	58
<i>ilv4F</i>	GCA GAG ATT AAA GAT AAG GA	(same as <i>ilvD_2</i>)	50
<i>pta</i>	GCA GAG CGT TTA GCA AAA GAA	TGC AAT GCG AGT TGC TTC TA	56
<i>pur</i>	CTG CTG CGA AAA ATC ACA AA	CTC ACG ATT CGC TGC AAT AA	56
<i>pycA</i>	GCG TTA GGT GGA AAC GAA AG	CGC GTC CAA GTT TAT GGA AT	57
<i>tpi</i>	GCC CAG TAG CAC TTA GCG AC	CCG AAA CCG TCA AGA ATG AT	58

2. MLST プライマーでの対象遺伝子の増幅

MLST での対象遺伝子のうち, *gmk* 遺伝子および *ilvD* 遺伝子に関しては, プライマー相当部位の多型により, 複数のプライマーセットが提案されている. これらを含め, 供試菌株における各遺伝子の PCR 増幅産物を確認した結果を表 3 に示した. *gmk* 遺伝子のプライマーセット *gmk* および *gmk_F3* ではどちらのプライマーセットでも全ての供試菌株で増幅が得られた. 一方, *ilvD* 遺伝子のプライマーセット *ilvD*, *ilvD_2* および *ilv4F* においては, *ilvD* プライマーセットでは TIFT 114007 および 114011 で増幅が認められず, *ilvD_2* および *ilv4F* ではともに TIFT 114008 および 114010 で増幅が認められなかった.

また, *glp* 遺伝子では TIFT 114008 および 114009 の 2 菌株で増幅産物が認められなかったが, 推奨アニーリング温度である 59℃ から 56℃ まで温度を下げて増幅反応を行ったところ, 目的の増幅産物を生じた.

3. MLST 解析

MLST の配列データベースでは, 各遺伝子について新規に取得した塩基配列を順に番号づけて登録していく. MLST においては, 配列同士を同格とみなし, 基準となる塩基配列を定めない. そのため野生型あるいは変異型という区別がなく, ユニークな配列データをアレル (allele) と呼称している.

解析対象とする未知の株については, その株の塩基配列を配列データベースより検索し, *B. cereus* の場合は *glpf*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pycA*, *tpi* の 7 遺伝子のおおのについて, 配列が合致したアレルの番号を羅列し, これをアレルプロファイルとする. さらに ST (Sequence Type; 配列型) データベースよりその組み合わせに合致した ST を検索する. このような操作により, 同一の ST の帰属となった菌

株同士は, 同一ないしはきわめて類似した菌株と判断する. PCR で得られた増幅産物について, 各々の塩基配列を解析した. 得られた配列を MLST データベースで検索し, 既知のアレルと照合した結果について表 4 に示した.

供試菌株の塩基配列解析では既知アレルとの比較において, わずかに配列が異なる新規のアレルが見出された. 新規アレルについては表 4 に最も類似した既知アレルを括弧内に記載した. 新規アレルの内訳は *gmk* で 2 配列, *ilvD* で 1, *pur* で 2, *tpi* で 1 の計 6 配列であった.

また ST レベルでは, TIFT 114008 と TIFT 114010 (アレルプロファイル; 72-42-69-42-88-41-30), および TIFT 114013 と TIFT 114014 (14-(6)-(23)-9-(4)-7-15) の 2 組が同一の ST に帰属し, 同一の菌株であることが示された. また TIFT 114006 (ST 40) と TIFT 114009 (ST 156) は 7 つの遺伝子のうち 4 つが一致し, 近縁の株であった. これらの 3 組はいずれも同一の製造工場より分離された菌株同士であった.

考 察

1. MLST-PCR

Priest⁷⁾ による *B. cereus* の MLST 系では, *gmk* および *ilvD* の 2 遺伝子で複数のプライマーが提案されているが, 14 菌株での試行の結果, *gmk* は 1 種類のプライマーセットで全ての菌株の増幅が行えたが, *ilvD* では 1 種類のプライマーセットで全ての菌株で増幅産物が得られた組合せが認められず, 少なくとも 2 種類のプライマーセットを用いる必要があった. 1 遺伝子につき複数のプライマーセットを用いるのは多くの菌株を確実に網羅するには有効だが, 操作が煩雑であった. また, 対象遺伝子ごとにアニーリング温度が異なり, PCR およびシーケンシング反応

表 3 *B. cereus* 分離株における MLST-PCR での増幅産物

strains	Primer set									
	<i>glpf</i>	<i>gmk</i>	<i>gmk-F3</i>	<i>ilvD</i>	<i>ilvD_2</i>	<i>ilv4F</i>	<i>pta</i>	<i>pur</i>	<i>pycA</i>	<i>tpi</i>
TIFT 114001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TIFT 114002	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TIFT 114003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TIFT 114004	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TIFT 114005	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TIFT 114006	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TIFT 114007	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
TIFT 114008	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
TIFT 114009	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TIFT 114010	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
TIFT 114011	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
TIFT 114012	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TIFT 114013	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TIFT 114014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: 増幅産物陽性, -: 増幅反応陰性. *: アニーリング温度 56℃で増幅

表4 *B. cereus* 分離株における MLST アレルプロファイル

	Allelic profile							ST
	<i>glpf</i>	<i>gmk</i>	<i>ihvD</i>	<i>pta</i>	<i>pur</i>	<i>pycA</i>	<i>tpi</i>	
TIFT 114001	15	(58)	10	8	4	7	14	-
TIFT 114002	46	9	39	29	29	25	7	166
TIFT 114003	15	20	23	8	4	64	39	-
TIFT 114004	33	8	40	19	60	17	7	143
TIFT 114005	47	9	14	26	2	36	7	-
TIFT 114006	39	9	14	12	24	14	7	40
TIFT 114007	19	2	31	17	19	3	(2)	-
TIFT 114008	72	42	69	42	88	41	30	-
TIFT 114009	40	9	14	12	12	25	7	156
TIFT 114010	72	42	69	42	88	41	30	-
TIFT 114011	3	2	31	5	16	3	4	26
TIFT 114012	33	8	47	19	(8)	17	17	-
TIFT 114013	14	(6)	(23)	9	(4)	7	15	-
TIFT 114014	14	(6)	(23)	9	(4)	7	15	-

(); 新規アレルに最も類似した既知アレル

を複数回に分けて行う必要があり、作業時間が長くなった。*B. cereus* 以外の菌種について新規に MLST 系を構築する場合には、できる限り標的遺伝子につきプライマー 1 セットとし、アニーリング温度を統一するのが好ましいと考えられた。

2. MLST 解析

食中毒菌 *B. cereus* での MLST 系を用いて、当所保有の無菌包装食品製造環境由来の *B. cereus* 菌株について適用を試み、MLST 解析の有効性を検証した。

MLST 法は (1) 全ての菌株で保持されていると考えられるハウスキーピング遺伝子を標的とし、(2) 通常 7 つ程度の複数の遺伝子について、(3) 由来の異なる菌株同士に認められる塩基配列の相違に基づいて菌株間の同一性あるいは類縁関係を評価する。

MLST 法と競合する系統識別技術としては PFGE 法、RAPD 法、AFLP 法などがあるが、それらと比較して MLST 法は (1) 塩基配列解析を外注で行えばサーマルサイクラー程度の機器だけで実施可能で、専用設備や特殊な技能が不要、(2) ごく近縁の菌株同士を識別できる高い識別能、(3) 電気泳動でのフラグメントパターンを用いる他の手法と異なり、塩基配列をデータとするため長期的なデータ運用が容易で、(4) 一週間以上を要する PFGE に対

し、数日で実施でき、(5) 装置や試薬が異なっても再現性に影響しない、といった利点がある。

B. cereus の MLST 法による解析結果は、主に食中毒関連菌株での系統識別を目的として構築された系ではあるが、本報での解析結果は変敗原因菌や製造環境由来の当所保有株についても菌株間の識別が可能であることを支持し、MLST は変敗事故防止や製造環境評価においても有用な手法と考えられた。

容器包装詰食品分野において *B. cereus* は主に PET ボトル飲料やカップ詰米飯などの無菌包装食品および製造環境からの分離例が多く、製造環境における長期的な汚染状況把握による、汚染菌の残留の検出あるいはサニテーション後の清浄度の検証といった用途での利用が有効なものと考えられる。

一方で、当所保有株においてわずかな変異ながらも新規アレルが見出され、少なくない数の新規 ST が認められたことから、単に食中毒関連の疫学調査の蓄積を利用するだけでは十分でなく、容器包装詰食品分野においても独自にデータを収集することが必要であることも示唆された。

当所保有株が帰属した既知の ST のうち、ST 40, 143, 156 および 166 は、各々 1-2 件の分離例が報告されているのみのマイナーな ST であるが、ST 26 は 33 件の分離例が報告されている。ST 26 と同定された菌株 TIFT 114011

は無菌米飯から分離された菌株で、セレウリド産生遺伝子陽性であることが判明している。既報 33 例も、その多くは日本で、詳細は不明ながら分離源が米とされているケースが多い。この結果は、米をしばしば汚染しているセレウリド産生株が無菌包装食品において潜在的な危害要因であることを示しているものと考えられる。

参考文献

- 1) 上田成子, 食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法 [12] セレウス菌, 防菌防黴, **35**(11), 761-777 (2007).
- 2) 勝野仁智, 茂呂 昇, 唐沢真知子, 新谷英晴, 過酢酸による PET ボトルの殺菌に対するアルキルジカルボン酸ジエステル類添加の効果, 防菌防黴, **33**(4), 161-166 (2005).
- 3) Liu, P. Y., Ke, S. C. and Chen, S. L., Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate a pseudo-outbreak of *Bacillus cereus* in a pediatric unit., *J. Clin. Microbiol.*, **35**(6), 1533-1535 (1997).
- 4) 山口敬治, 葛間明美, 森本洋, 池田徹也, DNA フラグメント多型解析法による食中毒事例等分離 *Bacillus cereus* 菌株の系統分析, 道衛研所報, **57**, 69-72 (2007).
- 5) Hill, K. K., Ticknor, L. O., Okinaka, R. T., Asay, M., Blair H., Bliss, K. A., Laker M., Pardington, P.E., Richardson, A., P., Tonks, M., Beecher D. J., Kemp, J. D., Kolstø, A.-B., Wong A. C. L., Keim P. and Jackson P. J., Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**(2), 1068-1080 (2004).
- 6) 木村 凡, これからの細菌ゲノムタイピングとしての MLST 法, モダンメディア, **52**(7), 209-216 (2006).
- 7) Priest, F. G., Barker, M., Baillie, L.W., Holmes, E. C. and Maiden, M. C., Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group, *J. Bacteriol.*, **186**(23), 7959-7970 (2004).
- 8) Jolley K. A., Feil E. J., Chan M. S. and Maiden, M. C., Sequence type analysis and recombinational tests (START), *Bioinformatics*, **17**, 1230-1231 (2001).