

氏名(本籍)	桜井直美(東京都)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第1,945号
学位授与年月日	平成10年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	<i>Bacillus cereus</i> の産生する耐熱毒素の細胞毒性に関する研究
主査	筑波大学教授 理学博士 入江勇治
副査	筑波大学教授 医学博士 中内啓光
副査	筑波大学教授 医学博士 濱口秀夫
副査	筑波大学教授 医学博士 小山哲夫
副査	筑波大学教授 医学博士 村上正孝

## 論文の内容の要旨

### (目的)

*Bacillus cereus* は土壌・水などの環境中に広く分布しており、根菜類・香辛料・乾燥食品などから高頻度に分離される。本菌による食中毒の病態は「下痢型」と「嘔吐型」があり、日本では米飯が原因物質とされる嘔吐型食中毒が多く発生している。その毒素は耐熱性で、pHや蛋白質分解酵素にも安定な低分子量の物質であると考えられてきたが、その本態は不明のままであった。そこで、本研究では嘔吐毒の本態を明らかにするため、嘔吐型食中毒由来SA-50株より毒素を精製し、ミトコンドリアに対する障害機序の解明を試みた。さらに、精製毒素の各種細菌に対する増殖抑制効果について検討し、また、食中毒の予防医学的・食品衛生学的観点から、*B. cereus* が食品中でどのように増殖し、食品を分解していくのかを低真空走査型電子顕微鏡(チルドSEM)により観察した。

### (材料及び方法)

**細胞毒の精製**：*B. cereus* SA-50株培養上清より、ヘキササン抽出法・アセトン沈澱法・薄層クロマトグラフィ・高速液体クロマトグラフィ・キャピラリー電気泳動法・MALDI-TOF MS法を用いて毒素を精製した。

**ミトコンドリアに対する障害機序の解析**：嘔吐型食中毒由来*B. cereus*の培養上清により引き起こされるHEp-2細胞の空胞化はミトコンドリアの膨化であり、脱共役作用に類似したものであることはすでに明らかにしていたので、精製毒素が同様な作用を持つか否かをネコ肝臓ミトコンドリアを用いて検索した。

**細胞毒による抗菌作用の検討**：脱共役作用を持つ物質は同時に何らかの抗菌作用を示すことが多いため、研究室保存株より無作為に17菌株を選び、細胞毒の抗菌活性を検討した。

**チルドSEMによる食品中での増殖過程の観察**：嘔吐型由来食SA-50株と下痢型由来6株をそれぞれ接種した生米と米飯を材料として、前処理の不要なチルドSEMによりその中における*B. cereus*の増殖過程を観察した。

### (結果)

精製された毒素の分子量は1067で、加熱・pHの変化・プロテアーゼ(トリプシン、パパイン、プロナーゼ)処理によっても活性はほとんど低下しなかった。MALDI-TOF MS法を用いたPDS MS/MS法によりアミノ酸配列の分析を試みたが、分子量200以下のアミノ酸に相当するフラグメントイオンが検出されなかったこと、ペプチ

ドの開裂で生じる代表的なフラグメントイオンが検出されなかったことにより、アミノ酸配列の推定は不可能であった。しかし、分子量1067をもつプロダクトイオンから開裂したと思われるフラグメントイオンは検出されており、この細胞毒は糖や脂質による修飾を受けている可能性が示唆された。

ネコ肝臓ミトコンドリアを含む反応液に培養上清・粗精製毒素・精製毒素を添加して、酸素電極により溶存酸素量を測定した結果、いずれの場合も酸素消費量は増加し、呼吸が促進されていることが確かめられた。

平板培地を用いた阻止円の観察で、精製毒素による増殖抑制が認められたのは、*Bacillus subtilis* (natto)・*Serratia marcescens*・*Vibrio parahaemolyticus*であったが、24時間以降の培養では阻止円が観察できなくなった。これら3菌種の対数増殖期における毒素の影響を調べたところ、培養1.5時間後の*Bacillus subtilis* (natto)でのみ毒素による顕著な増殖抑制が観察された。しかし、どの時点で毒素を添加した場合でも、8時間以降の増殖はほぼ同様であった。

生米をチルドSEMで観察した結果、嘔吐型では分泌物中で増殖すること、下痢型は胚乳細胞中で増殖しながらデンプン粒を分解していることがわかった。また、米飯では両型とも表面の保水膜に潜行した状態で増殖するが、下痢型は嘔吐型よりも細長い形態を示していた。

(考察)

嘔吐型食中毒由来*B. cereus*の培養上清から精製された耐熱毒素は、そのアミノ酸配列の推定こそできなかったものの、分子両1067を持つプロダクトイオンから開裂したと思われるフラグメントイオンが検出されたことから、糖や脂質による修飾を受けているペプチドである可能性が示唆された。また、この毒素はミトコンドリアの電子伝達系における脱共役作用を持ち、*B. subtilis* (natto)の菌体に対しては殺菌的に作用するが、その増殖に対しては静菌的に作用するものと考えられた。さらに、食中毒の主な原因食品である米飯中での下痢型及び嘔吐型毒素産生*B. cereus*の増殖過程には特徴的な傾向のあることが明らかとなった。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文で著者は、嘔吐型食中毒由来*Bacillus cereus*培養上清より毒素を精製し、その物理化学的性状と生物学的活性を同定している。この分子量1067の細胞毒は耐熱性で、pHの変化や蛋白質分解酵素にも安定であり、糖や脂質の修飾を受けたペプチドである可能性が示唆された。生物学的活性としては、ミトコンドリアの電子伝達系における脱共役作用を持ち、*B. subtilis* (natto)に対しては著明な抗菌作用があることを明らかにした。また、食中毒の主な原因食品である米飯中での本菌の増殖過程のチルドSEMによる知見を初めて記載した。細胞毒の精製は極めて厳密に行われ、物理化学的性状及び生物学的活性の検定も精緻である。*Bacillus cereus*の産生する細胞毒の特徴がここまで解明されたことの意義は大きく、質の高い医学研究論文である。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。