

200939031A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品中の毒素産生食中毒細菌および毒素の直接試験法の研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鎌田 洋一

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成22（2010）年3月

目 次

総括研究報告書

- 食品中の毒素産生食中毒細菌および毒素の直接試験法の研究 . . . 1
鎌田 洋一

分担研究報告書

- セレウス菌嘔吐毒素の培養細胞を用いての毒素検出方法の開発、
免疫抗体作製、および毒素の肝臓毒性発現機構解析 . . . 9
鎌田 洋一

- ブドウ球菌エンテロトキシン定量法におけるニワトリ IgY 抗体の有用性 . . . 47
小西良子

- ブドウ球菌エンテロトキシンの食品中における産生量評価 . . . 63
重茂 克彦

- エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の食品からの検出方法の開発に関する研究
宮原 美知子 . . . 77

- ウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子の新原理検出法の基礎的検討、毒素ならびに菌から
考えるウエルシュ菌食中毒発現機構 . . . 91
山本茂貴

総括研究報告書

食品中の毒素産生食中毒細菌および毒素の直接試験法の研究

鎌田 洋一

厚生労働科学研究補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

平成 21 年度総括研究報告書

食品中の毒素産生食中毒細菌および毒素の直接試験法の研究

研究代表者 鎌田 洋一 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 第四室長

研究要旨

本研究は、食品の安全安心を確保するため、ブドウ球菌およびセレウス菌の嘔吐毒素、ならびにウエルシュ菌下痢毒素とそれら毒素産生性細菌を、食品中から直接検出する試験法を開発し、食中毒発生予防に貢献する事を目的とする。

セレウス菌嘔吐毒素のバイオアッセイ法として、HEp-2 細胞を用いる方法があるが、種々の欠点があった。Hep G2 細胞を用いる事により、誘導される細胞毒性（空胞化）がより明確で、空胞化が従来の 24 から 48 時間から数時間で確認されることがわかった。サルモネラ菌体に嘔吐毒素を結合させて免疫することにより、ウサギおよびニワトリで嘔吐毒素に対する抗体作製が可能となった。その抗体を ELISA に用いることにより標準嘔吐毒素を検出でき、今後、菌培養液や食品中の嘔吐毒素に対し免疫学的検査法が開発可能となった。嘔吐毒素はその量が多くなると肝臓障害から死に至る毒性を発揮する。培養肝臓細胞を用いて、毒素の作用機構を解析した。嘔吐毒素はミトコンドリアの膜電位を低下させ、チトクローム C を細胞質へ放出、カスパーゼを刺激するアポトーシス誘導を起こし、細胞死を引き起こした。

ブドウ球菌は嘔吐を引き起こすエンテロトキシン(SE)を産生するが、Protein A も産生し、ELISA の場合、IgG 抗体への結合が原因で擬反応が生じる。Protein A に結合しない IgY 抗体を用いた ELISA 法を開発した。検出感度や検量線など、適切な結果が得られ、今後菌培養液や食品中のエンテロトキシン定量に、IgY 抗体を用いた ELISA が開発可能となった。エンテロトキシンには、新型毒素が多数報告されている。新型毒素の嘔吐毒性や食品中での産生量、その病原性、食中毒発生時の意義が明確でない。ブドウ球菌食中毒を起こした粉乳中の各型エンテロトキシンを定量したところ、従来からの型である SEA ではヒト発症量に達していなかったが、SHE も同定され、両毒素の合計量は 1.1 ng/ml

に達し、ヒト発症量に達していたことが明らかになった。

ウエルシュ菌食中毒の発生には、食品中にエンテロトキシン遺伝子をもった生菌が多数存在することが条件になっている。食品中の同菌を検査する際、ウエルシュ菌増菌用培地であるところの TGC 培地より、毒素遺伝子あるいはその RNA をスクリーニングすれば、食中毒防止が可能と考え、新規遺伝子検出法である核酸クロマト法を検討した。酵素標識ラテックスビーズを用いて発色増幅反応を組み込む事により、 10^6 コピーのエンテロトキシン RNA が検出可能となった。発症毒素遺伝子量は 10^8 コピー/g と認識されているので、改良核酸クロマト法を食品に適応できる可能性が認められた。エンテロトキシンの受容体認識機構を解析した。受容体タンパク質のクローディアンの細胞外第 2 ループを毒素が認識することがわかっていた。クローディアンの第 2 ループのなかで、特に毒素が認識する部位を同定し、感受性領域と名付けた。その領域に分布するアミノ酸を点突然変異させ、細胞に導入、細胞に障害を引き起こす濃度を比較し、アミノ酸変異の影響を見た。その結果、塩基性アミノ酸が重要であるとの結果を得た。一方毒素側の解析から、クローディンとの結合部位には産生アミノ酸が分布しており、以上のことから、ウエルシュ菌エンテロトキシンと受容体クローディンは、静電氣的結合をもって相互認識していることが示唆された。

ブドウ球菌はエンテロトキシンを食品内に産生する。同菌エンテロトキシンは、嘔吐を引き起こす。同菌は毒素産生の際、プロテイン A という物質を産生することが知られている。プロテイン A は免疫学的検出法に利用される IgG 抗体に強く結合する能力を持ち、ブドウ球菌の汚染を受けた検体を免疫学的方法で試験する際、非特異的な反応を起こして結果を混乱させる。

前年度、我々は新型 SEs および SEIs の高感度な検出法を確立し、*in vitro* における新型 SEs および SEIs の産生量を調べたところ、毒素型によってその産生量に大きな差が存在し、特に SEG、SEI、SEIM、SEIN および SEIO の産生量が極めて低いことが明らかになった。これらの毒素遺伝子は黄色ブドウ球菌ゲノム上の *vSaβ* という genomic island にクラスターを形成して存在しており、enterotoxin gene cluster (*egc*) と命名された領域を形成している。これまでに、わが国において *egc* 関連毒素群 (SEG、SEI、SEIM、SEIN および SEIO) のみを保有する黄色ブドウ球菌に夜食中毒が数件報告されているが、これらの毒素が食中毒を引き起こすに十分な量が生産されるかは不明である。

本年度は、*egc* 関連毒素群を中心に新型 SEs および SEIs 遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌の毒素産生量に対する温度の影響を検討し、さらに食品中における毒素産生量評価を行った。

平成 20 年にはセレウス菌食中毒で死亡例が発生している。セレウス菌も食品内に嘔吐を引き起こす毒素を産生する。同菌の

嘔吐毒素はセレウリドとも呼ばれ、アミノ酸に類似したデプシ酸が 12 個環状に配置した低分子耐熱性ペプチドである。分子量が僅かに 1000 程度である事、疎水性デプシ酸が環状構造を取るなど、免疫原性がないと考えられ、事実現在までセレウリドに対する抗体が作製され検出系に応用されたという報告がない。一方、嘔吐毒素の細胞毒性を利用する検出方法があるが、試験結果を得るのに時間を要し、また、細胞毒性の把握に高度の経験が技術が必要で、一般に普及していない。前年度、嘔吐毒素のバイオアッセイ法の現行法について検討した結果、HEp-2 細胞が持つ種々の不適切な点を確認した。

ウエルシュ菌は下痢毒エンテロトキシンを芽胞形成時に産生するが、食品内では毒素産生あるいは非産生ウエルシュ菌芽胞、その栄養型が混在し、非常に複雑な中毒発生様式が想定されている。エンテロトキシンが易熱性で、酸にも弱い事から、仮に食品内で毒素産生があったとしても、中毒症状発生に毒素は寄与しないとされる。食品とともに取り込まれた生菌が胃を通過し、腸管で定着増殖後芽胞を形成、その結果産生されたエンテロトキシンが腸管上皮細胞を攻撃、電解質ともに水分を細胞から放出させ、結果下痢に至らしめるとされている。

本研究では、食品の安全安心を確保するため、食品中からの毒素産生食中毒細菌およびその毒素を直接検出する試験法を開発し、食中毒発生予防に貢献する事を目的とする。本年度は、上記の 3 種の食中毒細

菌およびその毒素に対し、以下の成果を得た。

肝臓癌細胞由来 Hep G2 細胞はセレウス菌嘔吐毒素処理後 2~3 時間で空胞化変性を誘導し、現在バイオアッセイに用いられている HEp-2 細胞よりも短時間で空胞が出現した。生じた空胞は明瞭で、かつ、空胞化を示す細胞数も多かった。継代後の特定の日数から調製した Hep G2 細胞の嘔吐毒素検出感度は非常に良好で、バイオアッセイ法に Hep G2 細胞を用いると、毒素活性検査法の改良が可能と考えられた。酸加熱処理したサルモネラ菌体に嘔吐毒素溶液を吸着させ、ウサギ、ニワトリを免疫した。血中の嘔吐毒素に対する抗体の存在が確認された。精製した IgG および IgY 抗体の力価を調べたところ、IgG 抗体がより高い抗体価を示した。嘔吐毒素の免疫学的検査法の基本的な検討を試みたところ、ウサギ抗体で、開発は可能であるが、さらに安定性の高い、かつ、検出感度の高い ELISA が望まれた。嘔吐毒素が肝臓毒性も示すということで、培養肝細胞を用いてその毒性メカニズム解析を検討した。嘔吐毒素刺激により、肝臓細胞のミトコンドリアの内側の膜電位が消失、ATP の合成が不能となり、ミトコンドリアの膨化、外膜と内膜の間に存在していた下流のカスパーゼ等を活性化する種々のアポトーシス誘導因子（チトクローム c、各種カスパーゼなど）の放出なども起こり、アポトーシスによる細胞死が肝臓で起こることが推察された。

ブドウ菌エンテロトキシン (SE) を食品や培養菌液から検出するためのサンドイ

ッチ ELISA には、同菌が産生する Protein A が IgG 抗体と結合するため強い非特異反応が起こる。これを解消するため、Protein A には結合しない IgY 抗体の利用を検討した。IgY 抗体は Protein A に対し、IgG 抗体の 100,000 分の 1 の反応性を示した。サンドイッチ ELISA において、IgY 抗体を吸着抗体、IgG 抗体を検出抗体として用いると (IgY-IgG ELISA)、SEA の最少検出濃度は 0.25 ng/ml を示した。検量線の信頼性を示す R^2 値は 0.98 を示した。sea 遺伝子保有ブドウ球菌の培養上清中の SEA 濃度を IgY-IgG ELISA で測定したところ、Protein A の影響を受けない逆受け身ラテックス凝集反応法から計算された SEA 濃度と相関した。一方、IgG-IgG ELISA では、200 から 250 倍の高い数値を示した。これらの結果は、IgY 抗体を SE を定量するサンドイッチ ELISA に応用する有用性を示しており、同法を食品中の SE の定量に応用できる可能性を示している。黄色ブドウ球菌の産生するエンテロトキシン (SEs) は、食中毒の原因毒素である。近年、多数の新型 SEs および SE 様毒素 (SEIs) の存在が報告されていることから、これらの新型 SEs の食中毒原性を評価することが必要となっている。本研究では、前年度に確立した Sandwich ELISA を用い、新型 SEs および SEIs 産生量の培養温度による変動を解析し、さらに食品中における産生量評価を行った。37°C における産生量が極めて低い SEG、SEI、SE1M、SE1N、SE1O について、これらの遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌を BHI 培地にて 25°C で 48 時間培養し

たところ、37° C 培養に比して有意に産生量の増加が確認された。これらの毒素の遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌をにぎりめしに接種し、25° C、12 時間培養したところ、有意な毒素産生が確認された。さらに、2000 年に発生した大規模食中毒事件の原因食品となったスキムミルク中の全毒素量を定量したところ、SEA が 0.49 ng/ml、SEH が 0.61 ng/ml の濃度で検出され、200 ml を摂取したと仮定すると総 SE 産生量が 1.1 ng/ml であることから、発症毒素量は 220 ng/ヒトであることが明らかとなった。食中毒原因食品中の総 SE 産生量を把握し、最小発症毒素量を見直すことはブドウ球菌食中毒の制御に重要であると考えられる。

食中毒細菌の中で、発生件数は限られるが、1 件あたりの発生患者数の多い原因菌として、ウエルシュ菌がある。この菌による食中毒は食品摂取後の腸管内で芽胞形成時のエンテロトキシン産生による食中毒発生が知られている。ウエルシュ菌による食中毒は、大量調理施設での発生が多く、高齢者施設等での発生も多く見られる。エンテロトキシン産生のウエルシュ菌を検出できる試験法があれば、これらの大規模調理施設での発生を予防できると考える。新検出法を考案し、接種実験あるいは、食品に実際に適用した。表 1 と表 2 については BPW と TGC 培地の両培地で良好に菌を検出できた。しかし、ブロッコリーと水菜のや再建対の場合には、ウエルシュ菌は TGC 培地でなければ、良好に菌を検出できなかった。また、アサリ検体においては、非接

種の BPW 増菌対照群よりエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が分離できた。TGC 増菌群からは検出できなかった。分離できたエンテロトキシン産生ウエルシュ菌は TW58 の血清型であった。

また、以後に検討したアサリから再びエンテロトキシン産生ウエルシュ菌を分離することができたが、分離した 6 株とも均一な TW62 の血清型であった。さらに、むきみかきよりエンテロトキシン産生ウエルシュ菌を分離した。

ウエルシュ菌食中毒の原因食品中には、ウエルシュ菌の生菌が多く含まれることが一般に認められており、食品中のエンテロトキシン遺伝子を検出すれば、その後のウエルシュ菌食中毒発生を防止できる可能性がある。遺伝子の相補性を利用する核酸クロマト法を検討した。従来の着色ラテックスを用いた手法では、エンテロトキシン RNA が 3×10^9 コピー必要だった。ラテックスに酵素を吸着させた改良核酸クロマトでは、 1×10^6 コピーという少量の RNA で検出が確認され、大幅な感度の向上があった。腸管腔内でのウエルシュ菌生菌の動態を調べる実験モデルを構築した。ヒト由来腸管上皮細胞 Caco-2 をトランスウエル内で培養し、ウエルシュ菌生菌を接種し、その増殖を促進する因子を検討した。その結果、細胞の増殖に伴う代謝によって、培地の酸化還元電位の低下、および菌体あるいは菌体からの分泌物で障害を受けた細胞成分が、生菌増殖の刺激物となり、ウエルシュ菌の増殖を刺激している事が示唆された。食中毒の発生機序を考える際、エンテロト

キシンの行動・動態が重要となる。エンテロトキシンは腸管上皮細胞膜に分布するクロードインタンパク質を認識する際、クロードインの第 2 ループ中で塩基性アミノ酸が配列する部分と、エンテロトキシンの酸性の溝の部分で結合し、両者の結合は静電的なものであることが示唆された。

以上の成績を基に、次年度は、Hep G2 細胞を用いてのセレウス菌嘔吐毒素バイオアッセイ法を確立させるべく検討する。食品中での嘔吐毒素産生動態を、遺伝子レベルから検討する。核酸クロマト法の実用化に努力を傾注する。対象はウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子あるいはその RNA で、食品中から核酸クロマト法の確立を目指す。ブドウ球菌エンテロトキシンの食品中での産生動態を検討する。

分 担 研 究 報 告 書

セレウス菌嘔吐毒素の培養細胞を用いての
毒素検出方法の開発、免疫抗体作製、
および毒素の肝臓毒性発現機構解析

鎌田 洋一

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

「食品中の毒素産生食中毒細菌及び毒素の直接試験法の研究」

分担研究報告書

セレウス菌嘔吐毒素の培養細胞を用いての毒素検出方法の開発、
免疫抗体作製、および毒素の肝臓毒性発現機構解析

分担研究者	鎌田 洋一	国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部 第四室室長
協力研究者	水谷 紀子	国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部
協力研究者	菅野 慎二	国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部
協力研究者	安形 則雄	名古屋市衛生研究所微生物部

研究要旨：肝臓癌細胞由来 Hep G2 細胞はセレウス菌嘔吐毒素処理後 2～3 時間で空胞化変性を誘導し、現在バイオアッセイに用いられている HEp-2 細胞よりも短時間で空胞が出現した。生じた空胞は明瞭で、かつ、空胞化を示す細胞数も多かった。継代後の特定の日数から調製した Hep G2 細胞の嘔吐毒素検出感度は非常に良好で、バイオアッセイ法に Hep G2 細胞を用いると、毒素活性検査法の改良が可能と考えられた。酸加熱処理したサルモネラ菌体に嘔吐毒素溶液を吸着させ、ウサギ、ニワトリを免疫した。血中の嘔吐毒素に対する抗体の存在が確認された。精製した IgG および IgY 抗体の力価を調べたところ、IgG 抗体がより高い抗体価を示した。嘔吐毒素の免疫学的検査法の基本的な検討を試みたところ、ウサギ抗体で、開発は可能であるが、さらに安定性の高い、かつ、検出感度の高い ELISA が望まれた。嘔吐毒素が肝臓毒性も示すということで、培養肝細胞を用いてその毒性メカニズム解析を検討した。嘔吐毒素刺激により、肝臓細胞のミトコンドリアの内膜の膜電位が消失、ATP の合成が不能となり、ミトコンドリアの膨化、外膜と内膜の間に存在していた下流のカスパーゼ等を活性化する種々のアポトーシス誘導因子（チトクローム c、各種カスパーゼなど）の放出なども起こり、アポトーシスによる細胞死が肝臓で起こることが推察された。

A. 研究目的

セレウス菌食中毒には、嘔吐毒であるセレウリドを原因とする嘔吐型と、下痢毒のエンテロトキシンを原因とする下痢型の二つがある。嘔吐型食中毒は、セレウス菌に汚染された食品中にセレウリドが産生されて起こる。したがって、本菌食中毒は食物内毒素型食中毒と呼ばれる。潜伏時間は30分間～6時間、その主な症状は嘔吐である。黄色ブドウ球菌の症状と類似する。下痢型食中毒は原因食品を摂取した後、腸管内で増殖したセレウス菌が毒素を産生することで起きる。一方、セレウス菌エンテロトキシンによる食中毒は、生体内毒素型食中毒と呼ばれている。本食中毒の潜伏時間は6～15時間であり、ウェルシュ菌食中毒と類似した症状を呈する¹⁾。

厚生労働省の食中毒統計資料によると、平成15～19年の過去5年間において、セレウス菌食中毒は、平均発生件数15件/年、平均患者数230名/年の報告がされている²⁾。セレウス菌食中毒の発生率は、細菌性食中毒では、カンピロバクター・ジェジュニ/コリ、サルモネラ属菌、ブドウ球菌、腸炎ビブリオ菌による食中毒に次ぐ。平成20年10月には大阪府において、家庭内で調理された離乳食を食べた幼児1名が死亡する事例が発生した(食品安全委員会、食品安全関係情報第273号)。セレウス菌食中毒の原因食品はチャーハン、焼き飯、ピラフ、弁当類に多く、我が国では嘔吐型食中毒が主である。欧米その他の国では、野菜サラダ、肉料理、魚料理、スパゲ

ティ、チーズも原因食品として挙げられている。

セレウス菌食中毒の診断方法として、菌分離と毒素の検出定量は重要である。嘔吐毒素は、抗体が作製されておらず、したがって、免疫学的検査法がない。嘔吐毒素は分子量が1,165と小さく、疎水性デプシ酸からなる環状ペプチドであり、電荷を持たない⁴⁾。環状に配置され、コンパクトな立体構造を取っている。これらの性質は、嘔吐毒素がほとんど免疫原性を持たないことを説明していると理解されている。現在までに報告されているセレウリドの主な検査法としては、サルへの経口投与試験や、豚精子を用いる方法⁵⁾、ラット肝ミトコンドリアを用いる方法⁶⁾、HEp-2細胞の空胞変性を観察する方法^{3, 8)}、LC/MC(高速液体クロマトグラフィー/質量分析計)による分析法^{9, 10)}、MTTを用いた吸光度法¹¹⁾、WST-8を用いた吸光度法¹²⁾などがある。豚精子やラット肝ミトコンドリアを用いる手法は、材料の入手や調製が難しいため、一般に普及していない。LC/MS法は、直接嘔吐毒素を検出することが可能であり、もっとも正確な検査方法と考えられる。しかし、本検査には特殊で高価な機器とその維持管理が必要となるため、一般的な検査法として普及していない。定量の面では不十分な点が指摘されている。

本分担研究は3つの目的を持って遂行される。第1は嘔吐毒素に対して免疫抗体を作製し、嘔吐毒素検出系に応用、抗体を使つての嘔吐毒素の免疫学的試験法を確

立することにある。嘔吐毒素の疎水性を利用し、非共有的な疎水性結合によってサルモネラ死菌体へ嘔吐毒素を吸着させ、サルモネラ・嘔吐毒素混合物を免疫し、抗体を調製する方法を試みた（図1）。

本分担研究の第1の目的は、バイオアッセイ法である培養細胞における空胞変性を指標としている嘔吐毒素検出法を改良することにある。従来法は、嘔吐毒素がHEp-2細胞（ヒト咽頭がん由来）に対して、空胞変性を誘導することを利用した検出方法であった。同細胞内に出現する空胞は、変性したミトコンドリアとされている。同法は、HEp-2細胞を嘔吐毒素処理し、24あるいは48時間後に、HEp-2細胞中の空胞形成の有無をもって、嘔吐毒素の陽性陰性を判定する。嘔吐毒素はHEp-2細胞への毒性を指標に精製されており、本法は「食品衛生検査指針」に記載されているため、食中毒検査時に用いられている。しかし、空胞形成の確認や同毒素の取り扱いに技術と経験が必要なため、安定した成績が得られず一部の検査機関、技術者に限定されている。嘔吐毒素のバイオアッセイによる検出を広く普及させるため、空胞化変性が明瞭に判断できること、空胞化変性が毒素処理後早期に誘導されること、空胞化を引き起こす毒素濃度が低いことを目標にして、新しい細胞種Hep G2細胞を検討した。

本分担研究の第2の目的は、嘔吐毒素への抗体作製を試みることにある。上述したように、嘔吐毒素に対して抗体は作製されていない。嘔吐毒素の免疫原性に期待がで

きないため、作製できないのか、さくせいが試みられていないのか不明である。低分子物質に対する抗体作製には、キャリアタンパク質を結合させる方法が一般であるが、嘔吐毒素の分子構造はそれも可能とさせない。嘔吐毒素が非常に疎水性が強く、水に溶けないため、免疫細胞に認識され難いことも原因のひとつだろう。そこで、嘔吐毒素の疎水性の強さを利用し、サルモネラ菌体を利用する方法を検討した。

本分担研究の第3の目的は、嘔吐毒素の毒性メカニズムを解析することにある。毒素作用の解析を通じ、セレウス菌食中毒予防、重度の症状からの速やかな改善などへの貢献を目指す。上に記載したように、重度の本菌食中毒で死者が報告されている。死亡原因は嘔吐ではなく、肝臓障害となっている。海外でも、嘔吐毒素の肝臓への障害、最終的に死亡に至った例が報告されている¹⁾。そこで、重症例への対応と位置づけ、培養肝臓細胞を用いて、嘔吐毒素の細胞毒性メカニズムを解析した。

B. 実験方法

1 HEp-2細胞およびHep G2細胞を用いた嘔吐毒素バイオアッセイ法

1. 嘔吐毒素

本研究で用いた嘔吐毒素は、(有)バイオコントロール社より購入した。同嘔吐毒素は、75%メタノール/250mM塩化カリウム溶液に溶解されていた。培養細胞(Hep-2細胞)に空胞化を起こす力価として、本標品は、1mg 当量/ml相当とされている。本

嘔吐毒素濃度を基準とし、随時 75%メタノール/250mM 塩化カリウム溶液に希釈して、実験に用いた。

2. 細胞培養

HEp-2 細胞は、女子栄養大学 上田成子博士より分与を受けた。本実験で用いたヒト肝細胞癌培養細胞株 Hep G2 細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入した。

細胞は、10%非働化ウシ胎児血清（以降 FCS と略記：Valley Biomedical）を含む Dalbecco's Modified Eagle Medium（以降 DMEM と略記：Sigma Aldrich）の培地を使用した。細胞の維持、培養、各種アッセイに応じて組織培養フラスコ、ディッシュでまたは平底プレートを用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

3. HEp-2 細胞のセレウリド処理

HEp-2 細胞を 1% FCS-MEM 中に 1×10^5 cells/ml となるように希釈した。細胞懸濁液を 96 ウェル平板プレート (Techno Plastic Products) に 200 μ l/well の割合で分注し、37 °C、5%CO₂ 条件下で前培養した。

一晚培養後、培養液を除去し、MEM を 50 ml/well の割合で加えた。ポジティブコントロールとして、15 ml 遠心管に MEM と 0.5 μ l/ml のセレウリド（1 mg/ml、バイオコントロール研究所）を加えた溶液を準備し、そのうち 50 μ l を左端のウェルに加えて混合、希釈した。さらに、左端のウェルより右隣のウェルに希釈液 50 μ l を加えて混合

した。同様に 2 行 11 列まで操作を繰り返し、2 段階希釈を行った。このとき、2 行 12 列はネガティブコントロールとして MEM 50 μ l のみとした。1% FCS-MEM を 200 μ l/well 加え、プレートに蓋をし、37 °C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。判定は、1 ウェルにつき、2 個以上の空胞を持つ空胞化細胞が、1 つ以上見られるものを陽性とした。

従来法では、予めセレウリドを 96 ウェルプレートのウェル内で希釈した後に、1% FCS-MEM 中に 1×10^5 cells/ml となるように希釈した HEp-2 細胞を 200 μ l/well 加えた。圧着シールを用いて各ウェルを塞ぎ、37 °C で培養した。24 時間後、上記の条件でセレウリドの存否の判定を行った。

HEp-2 および Hep G2 細胞を、1% FCS-MEM 中に 1×10^5 cells/ml となるように希釈した。35 mm Tissue Culture Dish (IWAKI) に 2 ml/dish ずつ播種した後、37 °C、5% CO₂ 条件下で前培養した。一晚培養後、嘔吐毒素を加えた。37 °C、5% CO₂ 条件の下、1 視野当たり 100 個以上の細胞が明瞭に認識される視野を選択し、視野を固定した。タイムラプスはセレウリド添加時を 0 時間とし、以降 15 分間隔、1024×768 dpi で画像を取り込み、パーソナルコンピューター内に保存した。

2 嘔吐毒素吸着サルモネラ死菌による免疫

1. サルモネラ酸加熱死菌の調製

Salmonella minnesota 株を 37°C 一晚 L broth で前培養した。これをシードカルチ

ヤーとして、1000 ml の L broth に 1 ml 加え、37°C で 18 時間振盪培養した。フェノールを 10 g/L の割合で加えて殺菌した後、培養液を遠心分離し、上清を捨てた。蒸留水で菌体を洗浄後、アセトン、エーテルの順でさらに菌体を洗浄した。そこに 1% 酢酸を 50 ml 添加し、菌体を懸濁後 100°C 2 時間の加熱処理を行った。冷却後、菌懸濁液を遠心分離して沈渣を得、それを蒸留水で洗浄した。さらに遠心して沈渣を得、10 ml の蒸留水に菌体を懸濁し、液体窒素で凍結後、凍結乾燥器にて乾燥させ、-20°C 以下で保存した (図 4)。

2. 嘔吐毒素とサルモネラ菌体の混合液の動物への注射

乾燥サルモネラ菌体粉末 1 mg をガラス試験管にとり、嘔吐毒素溶液 0.1 ml (10 µg) を加え、チソッガスを吹き付けて溶媒を蒸発させた。そこに PBS を 1 ml 加え、1 分間の超音波処理を行い、嘔吐毒素・サルモネラ混合液を調製した (図 5)。体重 2 Kg の日本在来種ウサギの背部皮下に 0.5 ml を注射した。10 週令の白色レグホンに 0.1 ml を皮下注射した。以後、1 週間隔で同じ注射を行った。

3. 抗嘔吐毒素抗体価の測定

嘔吐毒素をメタノールで 10 µg/ml に希釈した。ELISA 用 96 ウェルプレート (Nunc) の各ウェルに 0.1 ml ずつ希釈嘔吐毒素を加えた。対象としてメタノールのみを添加したウェルを設けた。37°C の培養器中でメタノールを蒸発させ、10% スキムミルク PBS 溶液をウェル当り 0.2 ml 加え、ブロッキングを行った。希釈したマウスあ

るいはウサギ血清をウェルに加え、ビオチン標識抗マウスあるいは抗ウサギ IgG 抗体、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン、TMB 発色液の順で反応させ、ペルオキシダーゼ酵素反応を 2 N H₂SO₄ で停止させた後、反応産物の 450 nm の吸光度を読み取り、抗体価を測定した。

4. ウサギポリクローナル抗体を用いての嘔吐毒素検出のための ELISA

図 10 に嘔吐毒素検出のための ELISA の実験フローを示した。メタノールで 0.1 から 10 µg/ml に希釈した嘔吐毒素 0.1 ml をウェルに加え、50°C でメタノールを蒸発させ、嘔吐毒素をウェル表面に吸着させた。ウサギ抗体、ビオチン標識抗ウサギ抗体、ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼを順次反応させ、発色後 450 nm の吸光値を読み取った。

3 培養肝臓細胞を用いてのセレウス菌嘔吐毒素毒性メカニズム解析

1. 細胞培養

本実験で用いたヒト肝細胞癌培養細胞株 HepG2 細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入した。Hep G2 細胞は、10% 非働化ウシ胎児血清 (FCS, Valley Biomedical) を含む Dalbecco' s Modified Eagle Medium (以降 DMEM と略記: Sigma Aldrich) の培地を使用した。細胞の維持、培養、各種アッセイに応じて組織培養フラスコ、ディッシュでまたは平底プレートを用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

HepG2 細胞に対して嘔吐毒素刺激培養を

行う際には、培養液を 1% FCS-DMEM に交換した後に、嘔吐毒素希釈液またはコントロール希釈液 (75%メタノール/250mM 塩化カリウム溶液) を添加した。

2. DNAマイクロアレイ解析

嘔吐毒素の作用メカニズム、細胞毒性を網羅的に解析することを目的として、嘔吐毒素刺激後の肝細胞で発現変動する遺伝子を調べるため、DNAマイクロアレイ解析を行った。

35mmのディッシュに 10%FCS を含む DMEM に懸濁した 2×10^5 個の HepG2 細胞細胞を播種し、一晚付着させた後に、培養液を、1%FCS を含む DMEM に交換し、嘔吐毒素刺激(10 ng/ml) 0、5、60、120 分を行った。刺激時間ごとに 10 検体のサンプルを個別に調整(n=10)し、時間ごとにまとめて RNA 抽出を行い、サンプルとした。

total RNA の抽出は、QIAGEN 社の RNeasy® Plus Mini kit を用いて行った。

RNA は、230、260、280nm の吸光度を測定することにより、純度の高い RNA であることを確認し、さらに RNA サンプルの電気泳動を行うことにより、28S ribosomal (r) RNA/18S r RNA の比を求め、RNA の分解がないことを確認した。これらのサンプルについて株式会社 DNA チップ研究所に送付し、アジレント社製オリゴ DNA マイクロアレイを用いた解析を依頼した。送付後のサンプルは、RNA より cDNA を合成し、T7RNA ポリメラーゼを用いてアンチセンス cRNA を合成した。この時の反応液に、Cyanine3 でラベル化された CTP を入れることにより、

cRNA 合成時に蛍光標識が取り込まれ、ラベル化を行った。ハイブリダイゼーションターゲットの調製はアジレントの標準マニュアルに従い、調製にはアジレント社推奨の試薬類を使用した (Low RNA Fluorecent Liner Amplification kit Plus (1 色用) (5188-5339 : Agilent)。Cy3 の 1 色法により、1つの基盤に 4 サンプル載せられるタイプ (4 パックアレイ) を用いて、各ターゲット DNA からのシグナルをスキャナーで検出して得られたデータを解析し、各遺伝子スポットにおけるコントロール (嘔吐毒素刺激 0 分) と嘔吐毒素刺激時間を変えたサンプルのシグナル強度を比較して、遺伝子の発現差を評価した。

3. 嘔吐毒素によるミトコンドリア障害の検討

嘔吐毒素により引き起こされた細胞の空胞化とともに、ミトコンドリアが障害されているかどうかについて検討するため、ミトコンドリア膜電位の変化について、JC-1 色素染色 kit (Cayman chemicals) を用いて染色を行った。JC-1 は膜電位が低いと J-monomer として存在し、緑色蛍光を発するが、膜電位が高いと色素が蓄積し、J-会合体を形成するため、蛍光が緑色から赤色にシフトする性質がある。この性質を利用して、嘔吐毒素 (10 ng/ml) 2 時間刺激培養を行った HepG2 細胞の JC-1 色素染色を行い、蛍光顕微鏡により観察した。

4. 細胞内チトクローム C 分布の測定

ミトコンドリア膜電位の障害に伴いミ

トコンドリアから細胞質へ放出され、その後のアポトーシス誘導の鍵となる物質、チトクローム c の変化について検討した。嘔吐毒素 (10 ng/ml および 500 ng/ml) 2 時間刺激後の HepG2 細胞を細胞質画分およびミトコンドリアを含む subcellular 画分に分けてタンパクを抽出し、ヒトチトクローム C EIA kit (Assay designs) を用いてチトクローム C 量を測定した。

5. 嘔吐毒素による細胞死誘導における Caspase 阻害剤の効果

細胞死の引き金として重要と考えられた Caspase の中でも、アポトーシスのイニシエーターとして働く Caspase-8 について、嘔吐毒素による細胞死誘導における役割を検討した。HepG2 細胞に 40 μ M の Caspase-8 inhibitor (Calbiochem) を添加し、嘔吐毒素刺激を行い、Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (同仁化学) アッセイを行い、細胞死の割合の変化について評価した。

C. 結果および考察

1 Hep G2 細胞における嘔吐毒素の空胞化誘導

セレウス菌嘔吐毒素を 10 ng/ml になるように培養液中に添加し、HEp-2 細胞および Hep G 細胞と 18 時間反応させた。その結果を図 1 に示す。両方の細胞に空胞形成が誘導された。比較すると、Hep G2 細胞の空胞の方が、明瞭で、その数も多く、大きな空胞が顕著だった。

同一条件で細胞を毒素処理し、処理直後

からタイムラプス撮影を行い、同一視野 (従って同一細胞群) において、空胞が誘導される時間経過を調べた。その結果、Hep-2 細胞では明瞭な空胞形成が認められるのに 10 時間かかるのに対し、Hep G2 細胞では、毒素処理後 2 時間で明らかな空胞変性が認められた。

Hep G2 細胞を 1×10^6 /フラスコの状態で継代し、継代後の毎日細胞懸濁液を調製、嘔吐毒素の空胞化誘導実験に供した。各試験日において、空胞を誘導する最少嘔吐毒素濃度を求めた。その結果、継代第 2 日、細胞数が 2×10^6 /フラスコの時、Hep G2 細胞に空胞を誘導する最少嘔吐毒素濃度は 0.07 ng/ml を占めた (図 3)。

2 ウサギ、およびニワトリへの嘔吐毒素の免疫

嘔吐毒素吸着サルモネラ死菌を免疫原として、ウサギを免疫した。嘔吐毒素を ELISA プレートのウェルに吸着させ、免疫前後の血清中の、抗嘔吐毒素抗体化を測定した。その結果、免疫後のウサギ血清は、2,500 から 12,500 の陽性反応を示した (図 6)。

ニワトリを嘔吐毒素で免疫した。その際、従前より利用されているオイルアジュバントと、サルモネラ死菌を用いる方法を比較した。オイルアジュバントを用いて嘔吐毒素で免疫したが、血中抗体価は上昇しなかった (図 7)。一方、サルモネラ死菌体に嘔吐毒素を吸着させた混合物を注射すると、ニワトリにおいても、嘔吐毒素に対する抗体が、血清中に確認された (図 8)。

ウサギ血清中から IgG 抗体画分を、ニワトリ血清中から IgY 抗体画分を精製し、同一濃度での抗体の、嘔吐毒素の認識力を比較した。ウサギ IgG 抗体の方が、高い力価を示した (図 9)。

嘔吐毒素を 0.1 から 10 $\mu\text{g/ml}$ に調製し、ウサギ抗体を反応させ、検量線を作製した。その時の検出限界と相関係数 (R^2 値) を表 1 に示した。このダイナミックレンジの広い検定では、相関係数が 0.88 から 0.94 の検量線を得た。検出限界は 0.01 から 0.1 ng/ml で、実験誤差が認められた (表 1)。ダイナミックレンジを狭くして検定した結果を図 11 に示す。0.1 から 1 $\mu\text{g/ml}$ では良好な検量線を示した。以上の結果は、ウサギ抗体では嘔吐毒素の ELISA による検出は可能であるが、より安定性のあり、また、検出感度の高いシステムが望ましいことを示唆している。

3 嘔吐毒素刺激後の肝細胞で発現変動する遺伝子-DNA マイクロアレイ解析

嘔吐毒素刺激 5 分において、最も高い発現を示した遺伝子は、SPINLW1 (serine-type endopeptidase inhibitor activity) であり、 $2^{6.86}$ 増加した。一方で、最も低い発現を示した遺伝子は、protein binding に関連する TRIM 72 (triplicate motif-containing 72) であり、 $2^{-6.92}$ 減少した。

また、嘔吐毒素刺激 60 分において最も高い発現を示したものは、negative regulator of cell proliferation の役割を果たす PARRES1 であり、 $2^{7.28}$ 増加した。

一方で最も低い発現を示したものは、TRIM72 であり、 $2^{-6.39}$ 減少した。

嘔吐毒素刺激 120 分において最も高い発現を示したものは、protein binding に関連する LRRC34 であり、 $2^{5.2}$ 増加した。一方で、最も低い発現を示したのは、TRIM72 であり、 $2^{-7.01}$ 減少した。

次に、膨大な遺伝子発現データより、嘔吐毒素刺激を行った HepG2 細胞における遺伝子発現パターンを分類することにより、嘔吐毒素の作用機構を推測することを試みた。発現変動の見られた遺伝子について、便宜上、非階層型クラスタリング (Kmeans) により、遺伝子発現の経時的変化のパターンとして以下の 0 から 5 までの 6 つに分類した (図 12)。K-means 法は遺伝子の階層的関係の抽出はせず、クラスターに分けることだけを考え、あらかじめ K 個に分けることを指定してクラスターに分ける方法である。

Cluster 0: 正方向に定常発現型

Cluster 1: 後期発現上昇型

Cluster 2: 負方向に定常発現型

Cluster 3: 中期発現上昇型

Cluster 4: 発現下降型

Cluster 5: 初期発現上昇型

分類した遺伝子は、さらに生物学的概念 (Gene Ontology term; GO) に基づき、I. Biological process (生物学的プロセス)、II. Molecular function (分子機能)、III. Cellular component (細胞の構成要素) ごとにまとめ (図 13、14)、各 GO のうち、p-value の低いもので、上位より 5 つまでのカテゴリーを抽出し、別表としてまとめ

た(図13、14)。

また、クラスターごと、各GOごとに代表的な遺伝子について以下に記述、図13、14にまとめた。

以下、各クラスターについて記載する。

Cluster 0: 正方向に定常発現型を示した遺伝子のうち、

- I. 生物学的过程としては、1. 生合成過程の調節 (CD27、ZNF547)、2. ヌクレオチド生合成過程の負の調節 (EDN1、PDZD3)、3. 細胞の代謝過程の調節 (ATF3、GCK)、4. 高分子生合成過程の調節 (SCAND2、RFX1)、5. 核酸、塩基、ヌクレオチドと核酸代謝過程の調節 (NHLH2、IRX6) などが該当していた。
- II. 分子機能としては、1. DNA 結合 (CROP、SKIL)、2. セロトニン受容体活性 (HTR1B、HTR3A) などが該当していた。
- III. 細胞の構成要素としては、1. 核 (DYRK1A、SOX1)、2. リソソーム (USP6、ACR)、溶解性液胞 (AZU1、SIAE) などが該当していた。

Cluster 1: 後期発現上昇型を示した遺伝子のうち、

- D. 生物学的过程としては、1. 髄鞘形成 (EGR2、CD)、2. パターン特定過程 (CDX2、CYR61)、3. タンパク-ピリドキ

サル-5' -りん酸結合 (GAD1)、4. 姉妹染色分体の凝集の調節 (ESPL1)、軸索鞘形成 (EGR2、CD9) などが該当していた。

- II. 分子機能としては、1. 転写調節活性 (CDX2、KLF7)、2. 転写因子活性 (JUNB、EGR4)、3. DNA 結合 (ZFP36、SMG6)、4. インスリン様成長因子結合 (CYR61、HTRA3) などが該当していた。
- III. 細胞の構成要素は、該当遺伝子がなかった。

Cluster 2: 負方向に定常発現型を示した遺伝子のうち、

- D. 生物学的过程としては、1. 眼の発達 (FRS2、BHLHB4)、2. 感覚器官の発達 (HES1、FOXC2)、3. 発達過程の負の調節 (TWSG1、FAIM3)、4. 細胞成長 (TWSG1、FRS2)、5. 発達過程の調節 (KLF10、BIK) などが該当していた。

- II. 分子機能としては、タンパク質ホスファターゼ調節活性 (PPP2R2C、SET)、2. 酵素調節活性 (RAPGEFL1、DOCK4)、3. アシルグリセロールキナーゼ活性 (AGK)、4. ベータ3アドレナリン受容体活性 (ADRB3)、5. ホスホパントテノイルシステインデカルボキシラーゼ活性 (PPCDC) などが該当していた。

- III. 細胞の構成要素は、液胞 (CLN5) が該当した。

Cluster 3: 中期発現上昇型を示した遺伝子のうち、

D. 生物学的プロセスとしては、1. システムプロセス (LDLR、ADCY5)、2. 外胚葉と中胚葉の相互作用 (SNA12)、3. 顆粒球分化の調節 (RUNX1)、4. 神経系システム過程 (OR4A15、OR5P3)、5. 陽イオン輸送 (SLC11A1、SLC4A4) などが該当していた。

II. 分子機能としては、1. ファルネシル結合タンパク (A1PL1)、2. アシロキシアシル加水分解酵素活性 (AOAH)、輸送活性 (SVOPL、LDLR) などが該当していた。

III. 細胞の構成要素は、1. 塩素イオンチャンネル複合体 (GLRA3)、2. グリシンゲート塩素イオンチャンネル複合体 (GLRA3) などが該当した。

Cluster 4: 発現下降型を示した遺伝子のうち、

I. 生物学的プロセスとしては、1. カルボン酸の生合成過程 (PRKAG3、PTGS1)、2. 白血球媒介細胞障害の負の調節 (PTPRC)、3. カリウムイオンの恒常性 (BSND)、4. 電圧ゲートカリウムイオンチャンネルのクラスタリング (KCNIP2)、5. 有糸分裂細胞周期の G1/S 移行 (GSPT2、POLE) などが該当していた。

II. 分子機能としては、1. コレステロール7- α -モノオキシゲナーゼ活性 (CYP7A1)、2. AMP 活性化タンパク質キナーゼ活性 (PRKAG3)、3. ヒストンリシン N-メチルトランスフェラーゼ活性 (NSD1)、4. クロマチン結合 (CDY2A、POLE)、5. DNA directed DNA ポリメラーゼ活性 (POLE、KIAA2022) などが該当していた。

III. 細胞の構成要素は、1. 膜の統合 (KCNV1、KCNIP2)、2. 膜の組み込み (MUPCDH、BSND)、染色体外環状 DNA (MUC3A) などが該当していた。

Cluster 5: 初期発現上昇型を示した遺伝子のうち、

I. 生物学的プロセスとしては、1. プロスタノイド代謝過程 (PGDS、ACOX1)、2. グリコシルセラミド異化過程 (GALC)、3. セラミド異化過程 (GALC)、4. 移動調節 (CHRM1)、5. エイコサノイド代謝過程 (PGDS、ACOX1) などが該当していた。

II. 分子機能としては、1. プロテインキナーゼ CK2 調節活性 (LY6G5B、APC)、2. 毛様体神経栄養因子受容体活性 (CNTFR)、3. 高親和性オリゴペプチド輸送活性 (SLC15A2)、4. プロスタグランジン D 合成活性 (PGDS)、5. GKAP/Homer 足場活性