

(SHANK2)などが該当していた。

- III. 細胞の構成要素は、1. ラミニン3複合体 (LAMA1)、2. プロテインキナーゼ CK2 複合体などが該当した。

一方で、嘔吐毒素刺激による細胞障害の中でも、細胞死誘導メカニズムについて着目し、細胞死に関連する遺伝子について分類すると、細胞死のうちアポトーシスのイニシエーターとして重要な Caspase-8 およびその関連遺伝子の発現が亢進し、また、アポトーシスにおけるミトコンドリア障害の結果として生じるチトクローム C の放出を促進する MYC 遺伝子発現が亢進していた。その他、アポトーシス促進遺伝子発現の亢進とアポトーシス抑制遺伝子発現の低下も見られ(表2)、嘔吐毒素刺激による細胞死の誘導という作用発現が存在することが明らかとなった。

### 3. HepG2 細胞の JC-1 染色によるアポトーシスの検討

嘔吐毒素刺激2時間後の HepG2 細胞について JC-1 染色を行い観察した結果、対照群である溶媒刺激を行った細胞に比べ、細胞のミトコンドリア膜電位の低下を示す緑色蛍光を発するものが多く認められた。一方で赤色色素の凝集があまり見られず、嘔吐毒素により、ミトコンドリア膜電位が障害され、細胞が弱っている状態であることが明らかとなった(図15、16)。

### 4. 嘔吐毒素刺激による HepG2 細胞におけ

るチトクローム C の細胞内局在の変化

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結果、嘔吐毒素(10 ng/ml)刺激2時間の HepG2 細胞では、ミトコンドリアを含む subcellular 画分におけるチトクローム c 量が低下し、細胞質中のチトクローム c 量が増加していた(図17)。

### 5. Caspase 8 インヒビター存在下における嘔吐毒素刺激 HepG2 細胞の細胞死の抑制

細胞死の引き金として重要と考えられた Caspase-8 の嘔吐毒素による細胞死誘導における役割を検討するため、嘔吐毒素刺激とともに Caspase-8 の阻害剤を添加し、Cell Counting Kit-8 (CCK-8) アッセイを行い、細胞死の割合の変化を評価したところ、Caspase-8 の阻害剤添加により、嘔吐毒素刺激による細胞死が抑制されていた(図18)。この結果より、嘔吐毒素による細胞死誘導には、Caspase-8 を介する経路が存在していることが示された。

嘔吐毒素による細胞毒性のメカニズムについては、これまでに細胞に空胞化変性を起こすという現象は報告されていたものの、その詳細については、あまり明らかになってはいなかった。細胞の空胞化の実態は、細胞内のミトコンドリアが膨張していることによるもので、嘔吐毒素はミトコンドリア内に水分貯留を起し膨化させると考えられてきた。

本研究では、このような状態が持続することにより、細胞死が誘導されることが嘔吐毒素の毒性作用発現、特に肝臓毒性において重要なのではないかと捉え、ヒト肝細胞癌培養細胞株 HepG2 細胞を用いて嘔吐毒素刺激を行い、その作用メカニズムについて解析を行ってきた。

DNA マイクロアレイを行い、嘔吐毒素の作用について網羅的な解析を行った結果では、嘔吐毒素刺激を行った HepG2 細胞において発現の変動した遺伝子は多岐にわたり、必ずしも一元的なものではなかった。しかしながら、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が可能となった。嘔吐毒素によるアポトーシス - 細胞死誘導経路について、遺伝子発現の変動を裏付けるため、他のアッセイと組み合わせることにより、嘔吐毒素の刺激により、細胞のミトコンドリアの膜電位が障害され、その結果、チトクローム c の細胞質への放出されることや、Caspase-8 を介するアポトーシス経路が存在することも明らかとなった。

ミトコンドリアにおける細胞死決定の分子機構に関しては、未だ完全には解明されていないが、本研究により、嘔吐毒素刺激により、細胞のミトコンドリアの内膜の膜電位が消失し、細胞の生存に必要なエネルギー源であるアデノシン三リン酸 (ATP) の合成が不能となり、さらに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、細胞死を招くと考えられた。

今後は、図 1 1 に示した予想図のように、嘔吐毒素によるアポトーシス - 細胞死誘導経路について、Caspase-8 の下流の細胞死シグナル分子であり、アポトーシスのエフェクターとして働く Caspase-3 活性の測定や、Caspase-9/6 活性の変化などを含め、細胞死へと向かうシグナルの動態を更に詳細に検討していく予定である。また、今回行った DNA マイクロアレイ解析により、セロトニンの受容体など、嘔吐毒素による他の毒性作用発現として重要な、嘔吐活性に関連すると考えられる遺伝子発現も亢進していたことより、これらの作用メカニズムについても着目して検討していく予定である。

#### D. 結論

Hep G2 細胞における、セレウス菌嘔吐毒素の空胞化形成過程を観察したところ、わずか 2 時間で空胞が出現した。0.07 ng/ml という少量の嘔吐毒素で空胞化が誘導され、毒素のバイオアッセイに、Hep G2 細胞が有効である可能性が示された。

嘔吐毒素をサルモネラ死菌体に吸着させ、免疫原とし、ウサギおよびニワトリに投与したところ、血清中に抗嘔吐毒素抗体が確認された。IgG および IgY 抗体をそれぞれの動物の血清から精製し、力価を比較したところ、IgG 抗体の方が高い抗体価を示した。今までに嘔吐毒素に対する抗体作製が成された報告はなく、今後、嘔吐毒素の免疫学的検出法を開発できることとな

り、その有用性が期待される。

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し、細胞の生存に必要なエネルギー源であるアデノシン三リン酸 (ATP) の合成が不能となり、さらに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、細胞死を招くと考えられた。

#### E. 健康危害情報

特になし。

#### F. 文献

- 1) 山中英明、藤井建夫、塩見一雄、微生物性食中毒、p.15-63、「食品衛生学第二版」恒星社厚生閣、東京(2007)
- 2) 厚生労働省食中毒統計資料 <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokucu/04.html>
- 3) 上田成子：セレウス菌。食品衛生検査指針，p.226-282，日本食品衛生協会(2005)
- 4) Agata, N., Ohta, M., Mori, M. and Isobe, M.: A novel dodecdepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett., 129, 17-20 (1995)
- 5) Andersson, M. A., Jääskeläinen, E. A., Shaheen, R., Pirhonen, T., Wijnands, L. M. and Salkinoja-Salonen, M. S.: Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. Int. J. Food Microbiol., 94, 175-183 (2004)
- 6) Kawamura-Sato, K., Hiramata, Y., Agata, N., Ito, H., Torii, K., Takeno, A., Hasegawa, T., Shimomura, Y., Ohta, M.: Quantitative analysis of cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus* by Using Rat Liver Mitochondria. Microbiol. Immunol., 49, 25-30 (2005)
- 7) 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)
- 8) Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I. and Isobe, M.: A novel dodecdepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells: FEMS Microbiol. Lett., 121, 31-34 (1994)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) Akiba, T., Chiba, T., Arai, T., Ikeuchi, Y., Ibe, A., Yanagawa, Y., Kai, A., Yano, K. and Morozumi, Y.: Comparison and Evaluation of Methods for Detection of *Bacillus cereus* Emetic Toxin. Jpn. J. Food Microbiol., 23, 213-216 (2006)
- 12) Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. evidence for its hemoprotein nature. J. Biol. Chem., 239, 2370-2378 (1964)
- 良子、鎌田洋一 (2010) *Bacillus cereus* cereulide の細胞毒性メカニズムの解析、第 83 回日本細菌学会、横浜。
3. 鎌田洋一、菅野慎二、水谷紀子、小西良子 (2010) ヒト肝臓癌由来 Hep G2 細胞のセレウス菌嘔吐毒素の検出に関する有用性、第 149 回日本獣医学会、東京。

I. 知的所有権の取得状況  
特許出願

1. 新規の抗体作製法。

G. 研究発表

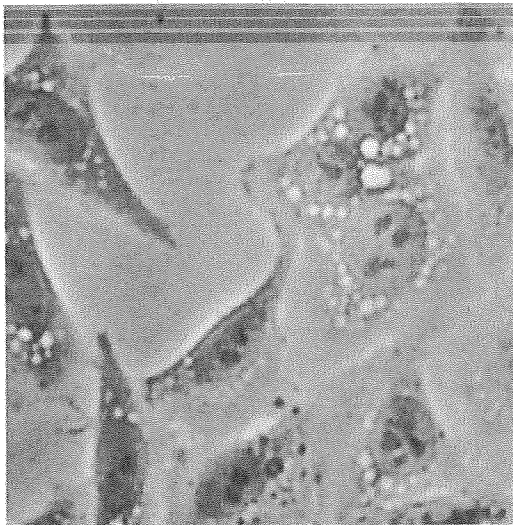
シンポジウム発表

1. 鎌田 洋一 (2010) 毒素による食中毒。平成 21 年度 厚生労働科学研究 (食品の安心・安全確保推進研究) シンポジウム「安全な食品で健やかな暮らし」東京、福島。

H. 学会発表

1. 菅野慎二、安形則雄、川上 浩、小西良子、鎌田 洋一 (2009) 場小用細胞を用いたセレウス菌嘔吐毒素の検出方法の改良、第 98 回日本食品衛生学会、函館。
2. 水谷紀子、菅野慎二、杉山圭一、小西

## HEp-2 細胞



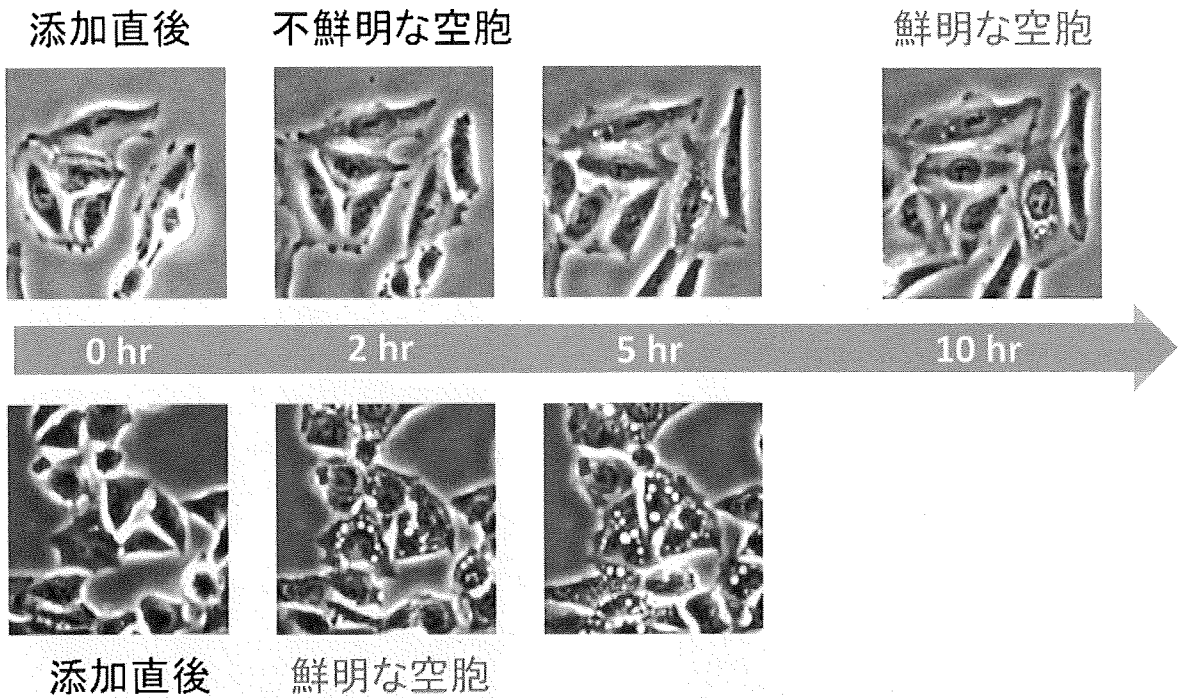
## Hep G2 細胞



図1 セレウス菌嘔吐毒素処理した HEp-2 および Hep G2 細胞の形態変化

両細胞に空胞化が誘導されているが、Hep G2 細胞に見られる空胞は、明瞭でその数も多い。

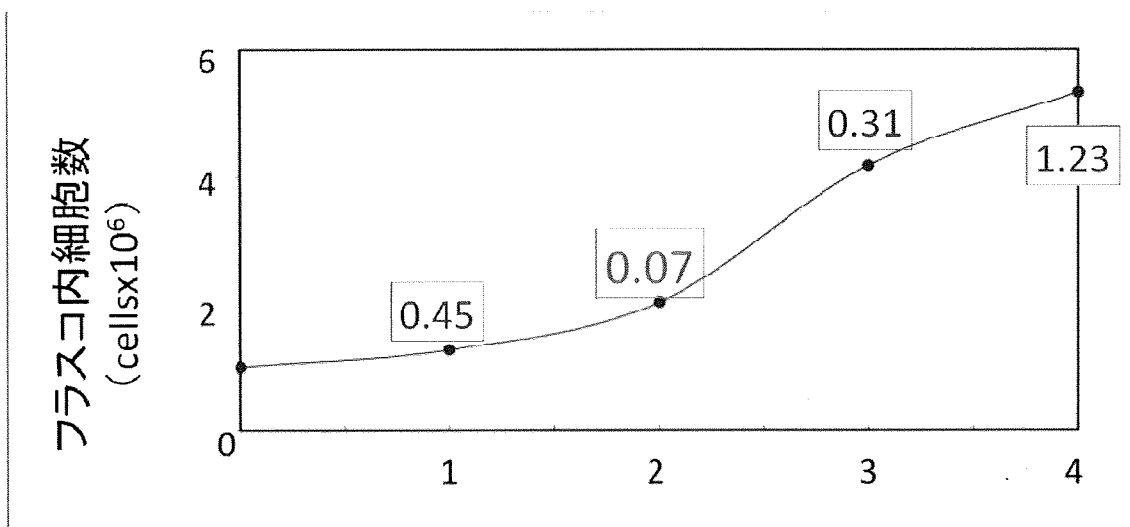
**HEp-2 細胞**



**Hep G2 細胞**

図2 セレウス菌嘔吐毒素によって誘導される HEp-2 および Hep G2 細胞に見られる空胞化。

タイムラプス撮影を行い、空胞化誘導の経時的変化。Hep G2 細胞では、明瞭な空胞が HEp-2 細胞より毒素処理早期に確認される。



### 継代後の日数

図3 Hep G2 細胞の嘔吐毒素に対する感受性の変化

Hep G2 細胞を  $1 \times 10^6$ /フラスコ(25 cm<sup>2</sup>)で播種し、経日的に細胞を回収、嘔吐毒素に対する感受性を検討した。四角内の数値は、細胞に空胞化を誘導する最少嘔吐毒素濃度を示す (ng/ml)。

① サルモネラ死菌体の調製

*Salmonella minnesota* R595

L-brothに接種  
37°Cで一晩培養

前培養液

L-brothに接種  
37°Cで一晩培養

*S. minnesota*培養液

フェノール添加  
遠心分離  
蒸留水、アセトン、エーテル洗淨  
減圧乾固

*S. minnesota*死菌体

1%酢酸で洗淨  
1%酢酸に懸濁後、100°Cで2時間加温  
蒸留水洗淨  
蒸留水に懸濁後、凍結乾燥

酸加熱処理サルモネラ死菌体

図4 サルモネラ酸加熱菌体の調整フローチャート



## ② 嘔吐毒素吸着サルモネラ死菌体の調製

### 酸加熱処理サルモネラ死菌体

メタノール溶解嘔吐毒素を添加  
窒素気流下にて乾固

PBS添加

十分に混和

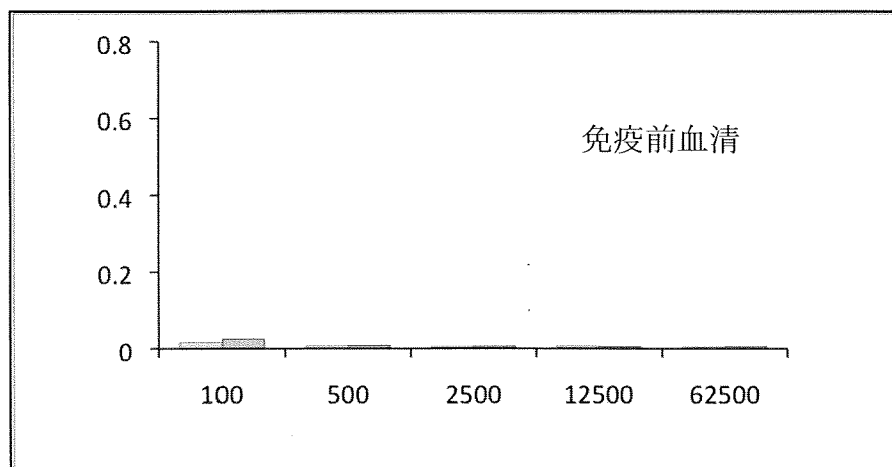
超音波処理

嘔吐毒素吸着サルモネラ死菌体

図5 セレウス菌嘔吐毒素免疫原の調整方法のフローチャート

嘔吐毒素吸着サルモネラ死菌体を免疫原とした。

吸  
光  
値



血清の希釈倍率

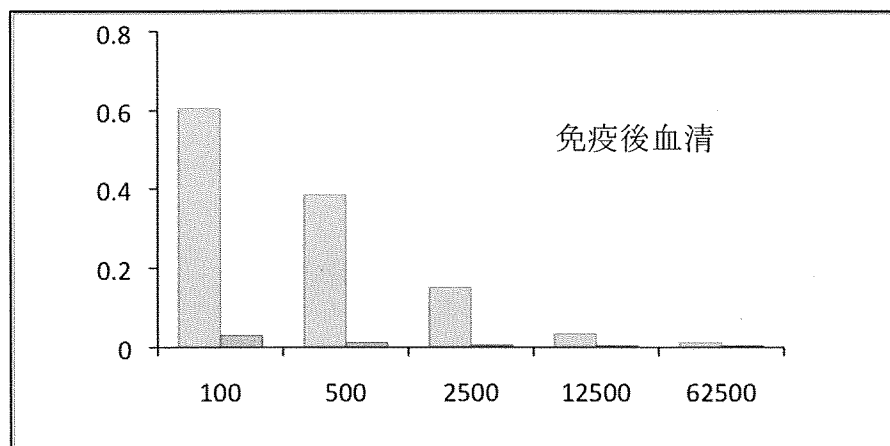
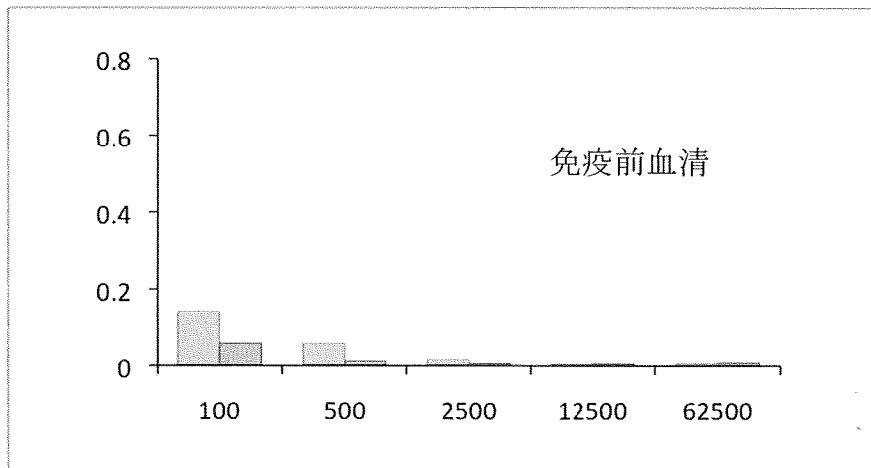


図6 サルモネラ酸加熱菌体を用いて免疫したウサギのセレウス菌嘔吐毒素に対する血中抗体価

吸  
光  
値



血清の希釈倍率

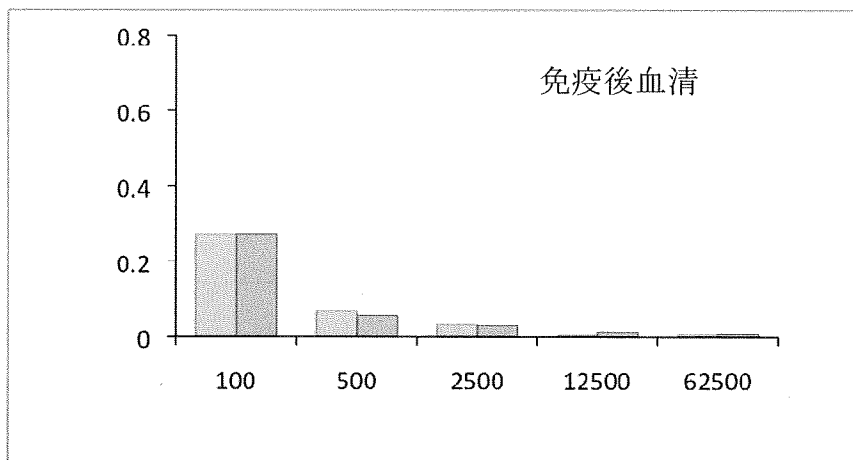
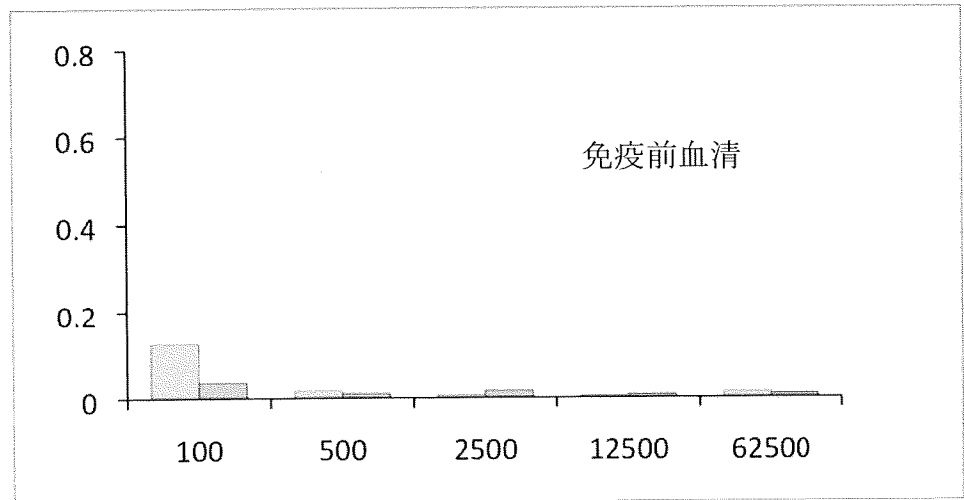


図7 TiterMax を用いて免疫したニワトリの抗セレウス菌嘔吐毒素血清中抗体価

吸  
光  
値



血清の希釈倍率

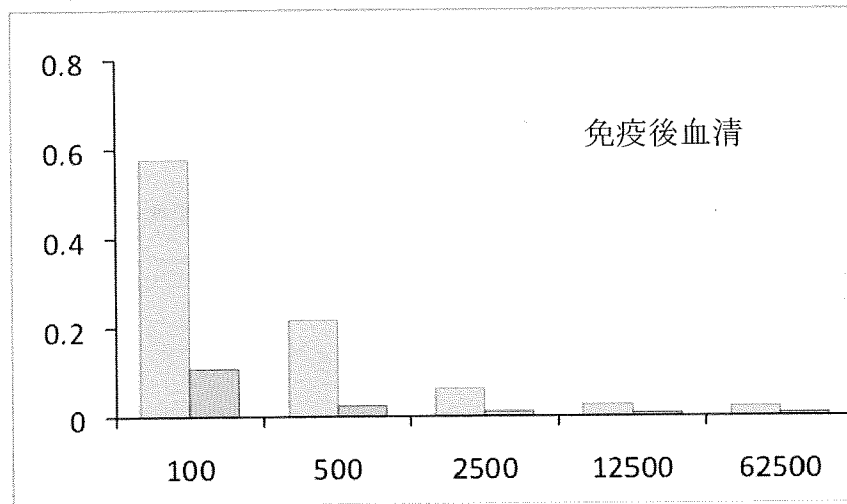


図8 サルモネラ酸加熱菌体を用いて免疫したニワトリのセレウス菌嘔吐毒素に対する血中抗体価

相  
対  
発  
光  
強  
度

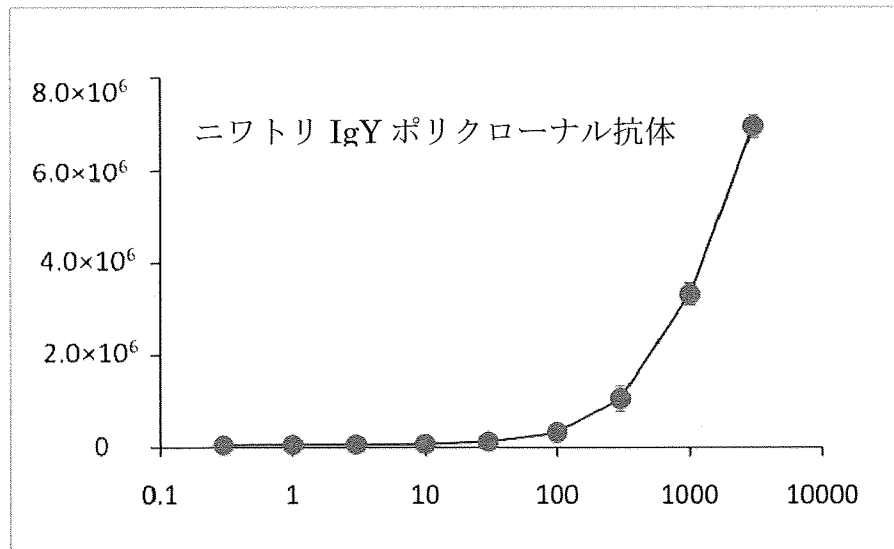
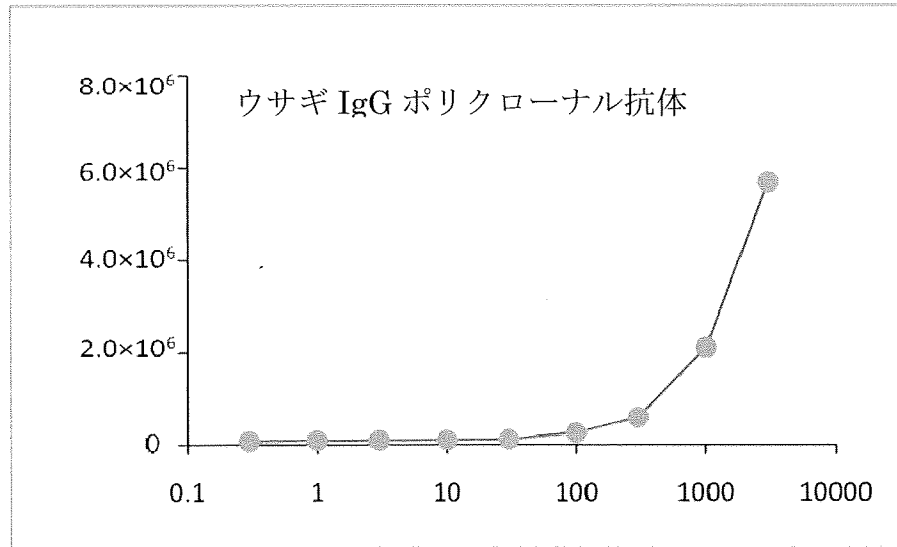


図9 精製抗体のセレウス菌嘔吐毒素抗体価

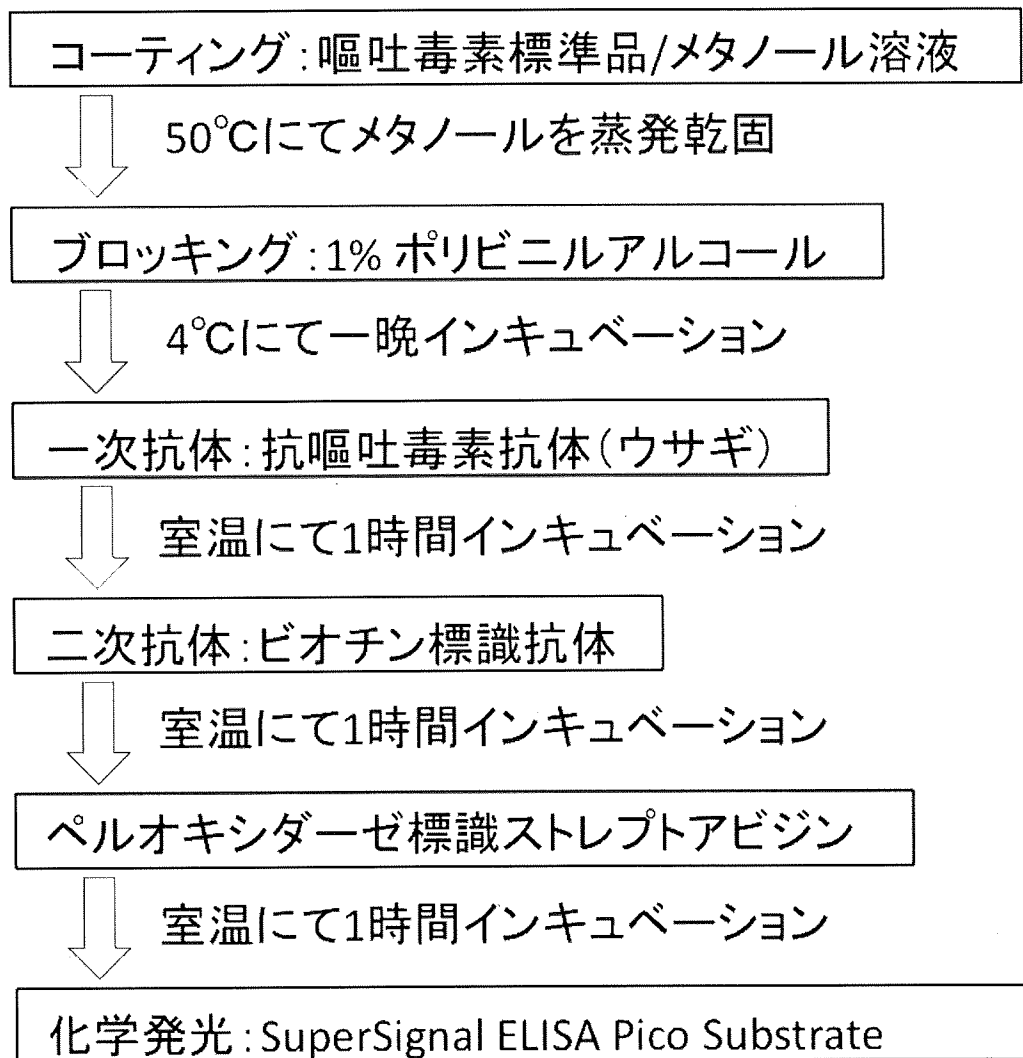


図10 ウサギ抗体を用いての、セレウス菌嘔吐毒素定量方法のフローチャート

表1 抗体によるセレウス菌嘔吐毒素の検出における検量線の検定

	嘔吐毒素 (μg/ml)		相関係数
	直線範囲	検出限界	
Exp. 1	0.1~10	0.1	0.9431
Exp. 2	0.01~10	0.01	0.9481
Exp. 3	0.1~10	0.1	0.9401
Exp. 4	0.1~10	0.1	0.8845

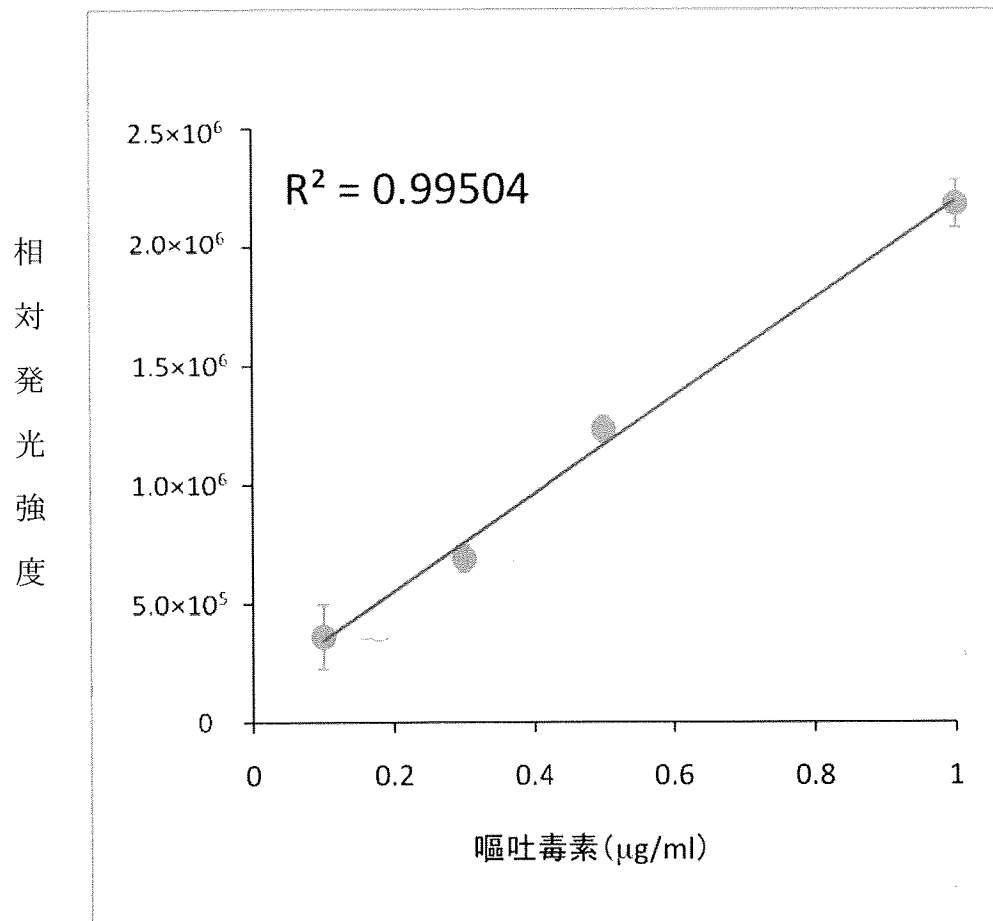
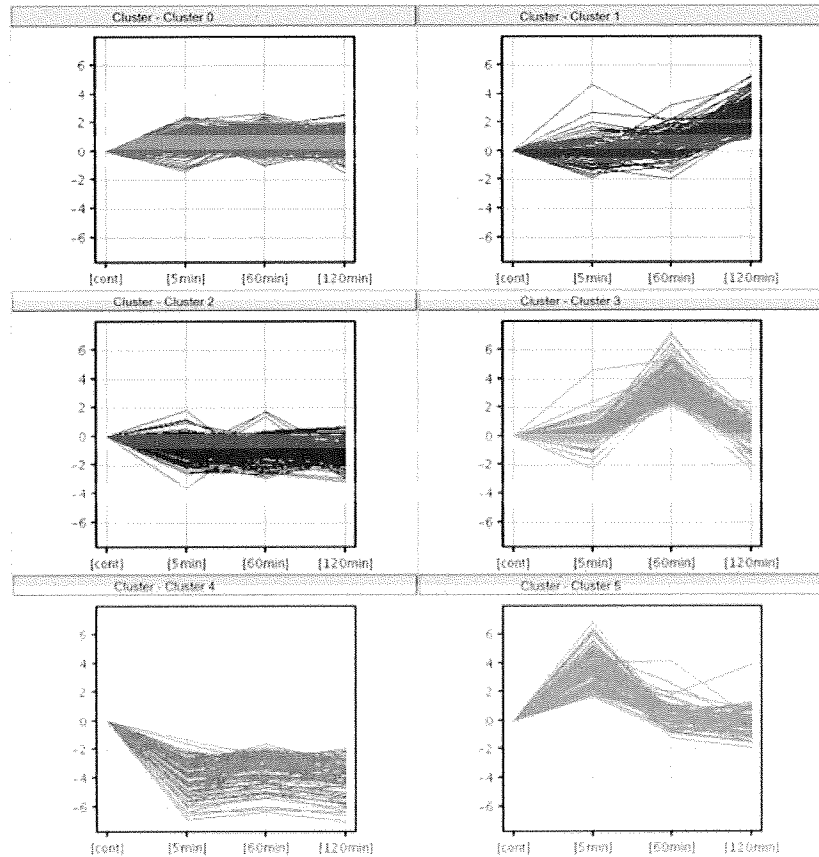


図 1 1 ウサギ免疫血清を用いての、セレウス菌嘔吐毒素定量のための検量線



セレウリド刺激  
 後5, 60, 120分の  
 サンプルのうち、  
 いずれかのポイ  
 ントで変動して  
 いる遺伝子につ  
 いて、非階層ク  
 ラスタリング  
 (K-meansクラ  
 スタ) を行  
 い、6つのクラ  
 スタに分類した。



- 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

図 1 2 セレウス菌嘔吐毒素で Hep G2 細胞を処理した時のマイクロアレイ解析

処理時間が 0、10、30、60、120 分の時の変動する遺伝子群をその発現強度からクラスター分類した。

Cluster 0	Cluster 1	Cluster 2
1. regulation of biosynthetic process	1.myelination	1. eye development
2. negative regulation of nucleotide biosynthetic process	2. pattern specification process	2. sensory organ development
3. regulation of cellular metabolic process	3. protein-pyridoxal-5-phosphate linkage	3. negative regulation of development process
4. regulation of macromolecule biosynthetic process	4. regulation of sister chromatid cohesion	4. cell growth
5. regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	5. axon ensheathment	5. regulation of developmental process

Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5
1. system process	1. carboxylic acid biosynthetic process	1. prostanoid metabolic process
2. ectoderm and mesoderm interaction	2. negative regulation of leukocyte mediated cytotoxicity	2. glycosylceramide catabolic process
3. regulation of granulocyte differentiation	3. potassium ion homeostasis	3. ceramide catabolic process
4. neurological system process	4. clustering of voltage-gated potassium channels	4. regulation of locomotion
5. cation transport	5. G1/S transition of mitotic cell cycle	5. icosanoid metabolic process

**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**

図 13 クラスター 0、1、2 における変動遺伝子

cluster	Gene ontology	Gene symbol
cluster 3 中期発現上昇型	<b>I. biological process</b>	
	1.system process	LDLR ADCY5
	2. ectoderm and mesoderm interaction	SNA12
	3.regulation of granulocyte differentiation	RUNX1
	4. neurological system process	OR4A15 OR5P3
	5. cation transport	SLC11A1 SLC4A4
	<b>II.molecular function</b>	
	1. farnesylated protein binding	A1PL1
	2. acyloxyacyl hydrolase activity	AOAH
	3. transporter activity	SVOPL LDLR
	<b>III.cellular component</b>	
	1. chloride channel complex	GLRA3
	2. glycine-gated chloride channel complex	GLRA3

図14 クラスタ3、4、5における変動遺伝子

表2 アポトーシス現象に関与する遺伝子群のセレウス菌嘔吐毒素刺激による変動

Gene expression (Fold change)				Gene function
Gene symbol	Time after cereulide( 10 ng/ml )stimulation			
	5 min	60 min	120 min	
MYC	1.50	1.52	2.44	→ミトコンドリアからのチトクロームC放出に関連
CASP8	1.74	1.54	1.66	→アポトーシスのイニシエーターカスパーゼ
GZMH	7.78			→カスパーゼ8などのカスパーゼ活性化に関連
ESPL1			3.13	→カスパーゼ様プロテアーゼ
IFT57			4.51	→カスパーゼ8のリクルートを導き、アポトーシスのトリガーとなる
TNFRSF8	1.69		0.74	→アポトーシスのポジティブレギュレーター
DAPK2			2.21	→セリン/スレオニンプロテインキナーゼ アポトーシス誘導
ELMO1		63.68		→アポトーシス、貪食、細胞の形態変化に関連
FAIM3	0.77	0.62	0.38	→Fas, TNF $\alpha$ , FADD誘導アポトーシスからの保護、カスパーゼ8活性の抑制
HIPK3	0.13	0.14	0.17	→FADDリン酸化促進によるアポトーシスの負の調節

1. Caspase 8 および Caspase 8 関連遺伝子発現の亢進
2. アポトーシスおよび Caspase 8 活性に抑制的に働く遺伝子発現の低下
3. MYC 遺伝子発現の亢進