

分 担 研 究 報 告 書

RNAハイブリダイゼーションを原理とした
エンテロトキシン遺伝子保有ウエルシュ菌の
食品からの検出法の開発と、毒素および菌から考える
ウエルシュ菌食中毒発現機構の解析

山本 茂貴

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

RNAハイブリダイゼーションを原理としたエンテロトキシン遺伝子保有
ウエルシュ菌の食品からの検出法の開発と、
毒素および菌から考えるウエルシュ菌食中毒発現機構の解析

分担研究者 山本 茂貴 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 部長

協力研究者 宇治家 武史 株式会社カイノス研究所 開発部 課長

協力研究者 林 司 株式会社カイノス研究所 開発部 本部長

協力研究者 三宅 眞実 大阪府立大学大学院 応用生命科学研究科 教授

協力研究者 星 英之 大阪府立大学大学院 応用生命科学研究科 助教

協力研究者 堀口 安彦 大阪大学微生物病研究所 分子細菌毒素学領域 教授

研究要旨：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、その後の食中毒発生を防止できる可能性がある。このことから、遺伝子の相補性を利用する核酸クロマト法を検討した。3種のフォワードおよび4種のリバースプライマーの組み合わせを検討し、エンテロトキシンに特異性の高い増幅が可能なプライマーを選抜した。遺伝子増幅法としての Nucleic acid-sequence based amplification (NASBA)法の簡略化を試み、熱変性操作を省略できることを明らかにした。カレーへのウエルシュ菌接種実験を行った結果、作製した核酸クロマト法で、 1.7×10^7 cfu/gの毒素産生ウエルシュ菌の検出を可能にした。ウエルシュ菌食中毒機構の解析のため、トランスウエルとヒト腸管上皮由来培養細胞を用いて、腸管内菌増殖機構を検討した。感染症由来ウエルシュ菌は、細胞間の漿膜から粘膜面への物質輸送の制限機構を障害し急激に増殖すること、食中毒由来ウエルシュ菌は、細胞間物質輸送は混乱させず、細胞から栄養素を得て穏やかに増殖することが示された。菌が産生するエンテロトキシンの全長を結晶化し、X線回折図を得、3次元構造を明らかにした。エンテロトキシンは3種のドメインから構成されていること、 β 型の小孔誘導毒素と構造が類似すること、コレステロール依存性の細胞膜障害性毒素が持つ、膜貫通領域のアミノ酸配列に類似する部分があることを明らかにした。

A. 研究目的

ウエルシュ菌食中毒は生体内毒素型食中毒に分類されている。本食中毒発生の機序として、1) 食品内での大量の生菌の存在、2) 食品を通じて取り込まれた生菌の胃通過、3) 生菌の腸管内での増殖、4) 芽胞とエンテロトキシンの産生、5) 毒素の腸管上皮細胞への攻撃、が認識されており、最終的にエンテロトキシンによる下痢誘発に至るものと理解されている¹⁾。つまり本食中毒は、非常に複雑な機序を経て発生する事から、多方面からの分析調査解析がウエルシュ菌食中毒の予防に必要であることを示している。

ウエルシュ菌は、土壌や動物の腸管内に棲むグラム陽性嫌気性芽胞形成性の桿菌で、種々の毒素を産生する。そのうち、食中毒に関与するのは、エンテロトキシン産生性のものに限られ、したがって、エンテロトキシン遺伝子保有のウエルシュ菌生菌および芽胞が食中毒予防対策の対象となる。ウエルシュ菌の食品への汚染の機会が多いが、毒素遺伝子を保有しているウエルシュ菌は非常に少ない²⁾。この事実は、ウエルシュ菌食中毒が事件数としては多いものでないことを示唆する。一方、事件あたりの患者数が多いという現象は、ウエルシュ菌食中毒の原因食および原因食喫食時の食品の状況が説明する。ウエルシュ菌の原因食には、弁当、惣菜、給食、仕出し食品があげられる。いずれも一度に大量に製造されるもので、家庭で調製されるものとは異なる。具体的なメニューとしては、カレー、シチューなどの煮込み料理が多く、

一度に何十人分と調製する大きな調理機器を用いて製造されている。調理から喫食までに長時間（多くは室温で翌日まで）放置されている場合が多い¹⁾。現在までに集積された知見からは、原因食品中にはグラムあたり 10^6 cfu 以上のウエルシュ菌生菌が検出されることが、ウエルシュ菌食中毒発生の条件になっている。原因食品を喫食することにより、非常に大量のウエルシュ菌生菌が取り込まれ、その大半は死滅するものの、胃を通過して腸に達した生菌が増殖し、その後芽胞が形成される。その際、下痢原性毒素であるエンテロトキシンが合成され、腸管上皮細胞を攻撃し、下痢を引き起こす機構が考えられている。

ウエルシュ菌エンテロトキシン (*Clostridium perfringens* enterotoxin, CPE) はアミノ酸 319 個からなる、分子量が 35 kDa のタンパク質で、糖や脂質の修飾を受けていない。上述したように、CPE は芽胞形成の際に合成されることがわかっている。CPE は、腸管上皮細胞のタイトジャンクションを構成するタンパク質クローディンを受容体として結合し³⁻⁶⁾、5 から 6 分子が集めたオリゴマーとなって細胞膜に強く結合する。その際、集合した CPE 分子の中央に小孔、ポアー、あるいはチャネルと称される小さな穴が形成される。細胞質内の電解質が水分子と共に漏出され、これが下痢となり、症状が誘発される状態になる¹⁾。細胞生物学的な実験から、小孔の存在は指示されているが、電子顕微鏡を用いての形態学的成績は未だ得られていない。毒素分子は小孔の構成要素になって

いると考えられるが、その時の毒素の構造や細胞成分との相関関係も不明である。毒素分子の C 末端半分の立体構造は解明されているが、全長の構造解析はなされていない。

本分担研究においては、平成 22 年度は次の 3 点について検討した。

1：上述したように、ウエルシュ菌食中毒の発生の基本的条件として、喫食した食品中に多量のエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌が存在することがあげられている。平成 21 年度は、検査対象に対する特異性を、核酸の 2 本鎖間におけるハイブリダイゼーションによって担保されている核酸クロマト法について、核酸配列ベース増幅法 (Nucleic acid sequence-based amplification、NASBA) 法を採用し、基礎的な面を検討した。本年度は、同法のエンテロトキシン遺伝子保有ウエルシュ菌検出感度の向上ならびに、食品中に存在するウエルシュ菌を検出できるか、その方法論について検討した。

2：平成 21 年度において、腸管腔内でウエルシュ菌生菌がどのような増殖様式を示すのかを検討するための、培養細胞を用いての実験モデルを構築した²⁾。同モデルを用いて、ウエルシュ菌を培養細胞と共培養すると、好氣的な条件でも菌の増殖が起こることを明らかにした。本年度はウエルシュ菌の腸管内増殖に必要な条件をさらに探査した。

3：平成 21 年度は CPE と CPE 受容体であるクローニン分子の相互反応を解析し、両者が静電氣的結合をすることを明らか

にした。本年度は CPE 分子全長を結晶化、X 線解析を行い、立体構造の解明を試みた。受容体結合する時や、その後の小孔形成する時の、毒素の構造変化を考察した。

B. 実験方法

1 核酸クロマト法によるウエルシュ菌検出

核酸クロマト法の基本的な方法は、既報の論文を参考にした⁷⁾。

1) NASBA 法に用いる鋳型核酸

CPE 陽性のウエルシュ菌から CPE 遺伝子 (DNA) をクローニングし、ここから CPE RNA を合成した。RNA のコピー数は 260nm の吸光値より算出した。

2) NASBA プライマー

CPE 遺伝子領域内で、CPE 遺伝子に特異的な配列を検索し、NASBA 用のフォワードおよびリバースプライマーを設定した。各プライマーは CPE 遺伝子とアニール可能な約 20 塩基のオリゴヌクレオチドで、リバースプライマーの 5' 末端側には、T7 RNA polymerase のプロモータ配列を付加した。

3) NASBA 産物検出用核酸クロマト

NASBA プライマーで増幅する CPE 遺伝子領域内に、サンドイッチハイブリダイゼーションに適した 2 種プローブを設計した。両プローブ長は約 25 塩基であり、公共データベースの検索から CPE 遺伝子が特異

的であることを確認した。プローブの1つは NASBA 産物の捕捉用としてクロマトストリップに結合させ、もう1つは着色ラテックス粒子に結合させ、検出用として使用した。

核酸クロマトによる CPE 遺伝子検出については、専用の展開液を加えた NASBA 産物をクロマトストリップ上で毛細管現象を利用して展開し、10 分後に着色ラインの有無を確認した。

4) ウエルシュ菌の培養

CPE 陽性ウエルシュ菌には NCTC8239 株を、また CPE 陰性ウエルシュ菌株として ATCC13124 株を用いた。

ウエルシュ菌の液体培養にはチオグリコレート (TGC) 培地を用い、37°C で培養した。

5) 菌からの RNA 抽出

TGC 培地で培養した CPE 陽性及び陰性のウエルシュ菌株を、ビーズを用いて物理的に破壊した後、抽出試薬 (EXTRAGEN II) を用いて、各々の核酸を抽出した。ビーズによる破壊はビートビータで1分間実施した。EXTRAGEN II による抽出は、キットに添付の取扱説明書に従って行った。

6) 擬似試料の調製

レトルトカレー25g と生理食塩水 225mL を混合した 10% 乳剤に、TGC 培地で培養したウエルシュ菌を加えた試料をストマフィルターに入れ、ストマッカーで1分間処理した。

2) トランスウェルを用いてのウエルシュ菌腸管内増殖実験モデル

1) Caco-2 細胞の培養と上皮間電気抵抗値の測定

ヒト結腸由来細胞株 Caco-2 細胞は、ウシ胎児血清 (FCS) 含有ダルベッコ MEM (DMEM) を用いて培養した。トランスウェル内側にあたるウェルに Caco-2 細胞を播種し、5日間培養した。タイトジャンクションが形成されると、細胞の基底膜側と管腔側とが遮断され、物質の移動が制限される。基底膜側と管腔側間に通電し、電気抵抗 (TER) が発生していることを確かめた。培地中の血清、その他の条件を変え、TER を測定した。

2) 接種ウエルシュ菌と菌数測定

トランスウェル内に、ガス壊疽由来のウエルシュ菌標準株、および食中毒由来のウエルシュ菌株を接種し、TER を測定した。前者の菌株は、WS203、JCM1290、CPK01 を用いた。食中毒由来株は、W5832、W09-505、NCTC8239、W4232 の4種である。

トランスウェルの、管腔側に相当するウェルに菌を接種した。培養液中のウエルシュ菌数の指標として、650 nm の濁度を測定した。

3) ウエルシュ菌エンテロトキシン全長の結晶化と立体構造解析

1) エンテロトキシンの調製

CPE 遺伝子を pCR2.1-TOPO TA ベクターにクローニングした。大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 株を同ベクターで形質転換した。LB 培地を用いて形質転換大腸菌を培養し、isopropyl- β -D-galactopyranoside で CPE タンパク質の発現を誘導した。菌体を回収後、音波処理によって菌体を破壊、遠心上清中に含まれる組換え CPE を nickel-NTA affinity カラムで精製した。組換え CPE の純度はポリアクリアミド電気泳動で検定した。

2) 組換えエンテロトキシンの結晶化

0.01 M Tris-HCl, pH 8.0 中に 8 mg/ml の組換え CPE を調製した。結晶化のスクリーニングは、sparse-matrix method を原理として開発されたキット (Hampton Research) を用いた。25% Polyethylene glycol 3350 の存在下で結晶化を試みた。数週間後、0.3×0.3×0.2 mm の三角柱型結晶が出現した。

3) X線解析

CPE 結晶の X 線回折データを、Spring-8 の BL44XU ビームラインで、MX225JR CCD 検知器を用いて抽出した。結晶構造の位相は Phaser の方法で計算し、細密化した。電子密度図は Buccaneer の方法で自動的にトレースした。Coot の方法に基づいて、立体構造を構築した。PyMol により、分子構造図を作製した。

C. 結果と考察

1 核酸クロマト法によるウエルシュ菌検出法の開発

1) NASBA プライマーの探索

3 種類のフォワードプライマー (F11、F31、F4111) と 4 種類のリバースプライマー (R71、R81、R91、RA11) を組み合わせ、10 コピーの合成 RNA を鋳型とした場合に最も増幅効率に優れたプライマーセットを選択した。NASBA 増幅時間は 30 分に設定し、増幅産物を電気泳動で解析した結果、F11-R81 プライマーセットが、最も高い増幅効率を示した。また、F11-R81 で増幅した NASBA 産物は核酸クロマトによる配列特異的なサンドイッチハイブリダイゼーションにより検出可能であった (図 1)。

2) NASBA 法における特異性の確認

CPE 陽性ウエルシュ菌から抽出した、1.4 μ g の核酸を NASBA 増幅の鋳型に使用し、核酸クロマトで検出を行った。その結果、クロマトストリップ上に配列特異的な着色ラインが検出された (図 2)。

一方、CPE 陰性のウエルシュ菌から抽出した同量 (1.4 μ g) の核酸を NASBA 後、核酸クロマト法に適応したが、クロマトストリップ上に着色ラインは検出されなかった (図 2)。

以上の結果から、F11-R81 の NASBA プライマーセットはウエルシュ菌の CPE 遺伝子 (RNA) を特異的に増幅し、核酸クロマト法によりその結果を迅速かつ特異的に判定する事が可能である事が確認された。

3) NASBA 操作法の簡略化

通常の NASBA 法では、試料と試薬を混和した後、まず 65°C で 5 分間標的核酸の熱変性を実施するが、操作性の向上を目的に、65°C 処理の必要性について確認した。CPE 陽性ウエルシュ菌から抽出した核酸を鋳型にした検討から、F11-R81 プライマーセットを用いる事で、65°C の熱変性操作を省略しても、ウエルシュ菌の検出が可能であることがわかった (図 3)。

4) カレー成分の影響

カレー成分による NASBA 反応への影響を確かめる為、ストマフィルター等でカレーの固形成分を除いた溶液を一次試料として抽出操作を行った。この抽出液を水で 2、3、4、及び 5 倍に希釈し、TGC 培養ウエルシュ菌の抽出核酸を加え、二次試料として NASB に使用した。その結果、カレー成分は NASBA 増幅反応を阻害する事、また、その阻害効果はカレー成分を 4 倍以上希釈することで回避可能であることが示された (図 4)。

5) ウエルシュ菌の添加試験

TGC 培地で培養した CPE 陽性ウエルシュ菌 (2.4×10^6 cfu/g または 1.7×10^7 cfu/g) をカレー試料の 10% 乳剤に添加し、ストマッカー処理から核酸抽出処理、NASBA、核酸クロマト検出と一連の操作を行い、添加した菌を検出できるか否かを確認した。その結果、 2.4×10^6 cfu/g 添加では、菌は検出できず、 1.7×10^7 cfu/g の添加で菌が検

出可能であった (図 5)。

2 ウエルシュ菌の腸管内増殖機構の解析

1) ウエルシュ菌増殖を支持する栄養成分としての血清の影響

CaCO-2 細胞を培養したトランスウェルに、管腔側に血清を含まない培地、基底膜側に 20% ウシ胎児血清添加培地を加えた。TER を測定したところ、測定開始後徐々に TER が低下した。このとき管腔側に存在したウエルシュ菌が増殖した。以上の結果は、ウエルシュ菌は腸管腔内の微小嫌気環境で増殖し、タイトジャンクションによって形成されている物質通過バリア機能を破壊すること、その結果、基底膜側から栄養成分であるところの血清が漏出すること、さらには、その血清が栄養成分としてウエルシュ菌の増殖を支持し、爆発的な菌増殖を誘発する可能性を示している (図 6)。トランスウェル中での栄養素 (血清) と菌増殖、およびタイトジャンクションの障害に基づく基底膜から管腔側への成分漏出の模式図を図 6 に示す。

2) 供試ウエルシュ菌の由来の影響

ガス壊疽など感染症由来株として、WS203、JCM1290、CPK01 を実験に供した。それぞれの菌株をトランスウェル管腔側に接種した。2 から 4 時間後には TER の減少が認められた (図 8)。一方、食中毒由来株の W5832、W09-505、NCTC8239、W4232

は菌接種後8時間経過後もTERの減少は観察されなかった(図8)。以上の結果から、感染症を起すウエルシュ菌株は、増殖時に積極的に宿主細胞を攻撃し、細胞を分解したり、粘膜下組織から体液を漏出させて栄養を獲得し、さらに組織破壊を進めて感染状態を増強する機構が想像される。一方、食中毒由来株においては、消化管腔内で比較的緩やかに増殖し、宿主細胞に対しては目立った障害性を示さない可能性が認められた。障害性がないことは、ウエルシュ菌食中毒の主徴が水様性下痢であって、細胞成分を含まないことと一致する。CPEの標的は、TERを生じさせ、また維持させるタイトジャンクション構成タンパク質のクローディングであることが分かっている。CPEの細胞への攻撃は、健全なタイトジャンクション、すなわち機能を発揮維持しているクローディング分子であると想像される。

CPEはウエルシュ菌が芽胞形成する際に合成される。食中毒由来の菌株が、CaCO₂-2細胞を用いてのトランスウェル実験モデルにおいて、増殖後芽胞形成の過程を経ることで、ウエルシュ菌食中毒における菌増殖、芽胞形成、毒素産生、毒素の細胞攻撃の過程が解析できる可能性がある。

3 ウエルシュ菌エンテロトキシンの立体構造

CPEの結晶は、2.0 Åの回折度を示した。CPE分子は3つの独立したドメインで構成されていた(図9)。ドメインIは、CPE

のC末端部分として既に解析されていた構造と一致し、受容体であるクローディング分子との結合を担っている部分である。ドメインIIとIIIは、エロモナスの溶血毒であるアエロリジン、ウエルシュ菌ε毒素、*Laetiporus sulphureus*溶血性レクチンが共通に持つ、β型小孔形成毒素の特徴を示した(図10)⁸⁻¹⁰。ドメインIIとIIIはそれぞれ3ヶ所の短いβストランドを持っており、ドメインIIはβストランドのあとに、αヘリックスが続いていた。αヘリックスとβストランドのアミノ酸配列は、βバレル構造を形成して細胞膜を貫通するタンパク質に特有の疎水性残基からなる特徴を有し、CPEがβ小孔形成毒素の特徴を有することを証明した(図10)。CPEの立体構造から、CPEはコレステロール依存性の細胞溶解毒と同様のメカニズムで細胞膜を障害することが示唆された。

D. 結論

CPE陽性ウエルシュ菌を特異的に検出するためのNASBA増幅用プライマーおよび核酸クロマト用プローブを設計した。設計したプライマーは10コピーの合成RNAを30分の短時間でNASBA増幅可能であった。また、TGC培地で培養したCPE陽性のウエルシュ菌を検出する一方、CPE陰性のウエルシュ菌は検出しなかった。さらに、本プライマーセットを用いれば、通常NASBA増幅時に必要とされる65°C処理(鋳型RNAの熱変性反応)を省くことができ、操作性の向上が可能である。カレー成分はNASBA

反応を抑制する負の影響を及ぼすが、4倍以上の試料希釈で回避可能であった。カレー試料へのウエルシュ菌添加試験から、目標とする 1×10^6 cfu/g のウエルシュ菌検出には更なる感度向上の改善が必要であるが、現時点では 1.7×10^7 cfu/g のウエルシュ菌の検出が可能であることが示された。

ヒト腸管上皮細胞の CaCO-2 細胞を用いてのウエルシュ菌腸管内増殖機構の解析から、食中毒事例から分離されたウエルシュ菌は、細胞障害を引き起こす事が少なく、腸管内で緩やかに増殖することが示唆された。今後、芽胞形成やCPEの役割を、トランスウェル培養モデルで解析可能と思われる。

現在まで、CPEの構造については、C末端半分が解析されていたにすぎなかったが、今回CPE分子全長の立体構造を解析した。C末端部分が担う受容体への結合性に加え、全長の解析から、CPEがβ型小孔形成毒素の立体構造の特徴を持ち、コレステロール依存性の毒素に見られるような細胞膜障害機構を持つ事が示唆された。

エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌による下痢を主徴とする食中毒について、腸管内増殖機構や立体構造に基づいての毒素作用機構の解明を通して、その全体像の解明に近づけるとと思われる。

E. 健康危害情報

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、「食品衛生学第二版」恒星社厚生閣、東京（2007）
- 2) 平成20年度厚生労働科学研究 食の安心・安全確保推進事業「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」報告書
- 3) 片平じゅん、ウエルシュ菌エンテロトキシン、細菌毒素ハンドブック、桜井純ら編集、サイエンスフォーラム、東京（2002）
- 4) Furuse, M., Fujita, K., Kiiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* 141: 1539-50 (1998)
- 5) Katahira, J. et al. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin, *J. Cell Biol.* 136: 1239-1247 (1997)
- 6) Fujita, K. et al. *Clostridium perfringens* enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein, *FEBS Lett.* 476: 258-261 (2000)
- 7) McDonel, J.L. and McClane, B.A. Characterization of membrane permeability alterations induced in

- Vero cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Biochim. Biophys. Acta* 600:974-985 (1980)
- 8) 宇治家武史、簡単な遺伝子検査のツール「核酸クロマト法」、*臨床化学* 36: 19-24 (2007)
- 9) Parker, M.W., Buckeley, J.Y., Postma, J.P., Tucker, A.D., Leonard, K., Pattus, F., and Tsernoglou, D. Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states. *Nature* 367:292-295 (1994)
- 10) Cole, A.R., Gibert, M., Popoff, M., Moss, D.S., Titball, R.W. and Basak, A.K. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:797-798 (2004)
- 11) Mancheno, J.M., Tateno, H., Goldstaen, I.J., Martinez-Ripoll, M., and Hermoso, J.S. Structural analysis of the *Laetiporus sulphureus* hemolytic pore-forming lectin in complex with sugars. *J. Biol. Chem.* 280: 17251-17259 (2005)
- Karatani, H., Horiguchi, Y. Crystal structure of *Clostridium perfringens* enterotoxin displays features of β -pore-forming toxins. *J. Biol. Chem.* in press (2011)
- H. 学会発表
- 1) 星 英之、松澤健志、山本茂貴、鎌田洋一、三宅眞実. 宿主細胞との共培養系における A 型ウエルシュ菌の増殖解析. 第 150 回日本獣医学会学術集会. 2010 年 9 月. 帯広.
- 2) 星 英之、近藤香織、堀口安彦、山本茂貴、鎌田洋一、三宅眞実. ウエルシュ菌の消化器感染過程を解析するための in vitro 実験系. 第31回日本食品微生物学会. 2010年11月. 滋賀.
- 3) Hoshi, H., Kondo, K., Oda, M., Horiguchi, Y., Nagahama, M., Yamamoto, Y., Kamata, Y., Miyake, M. An invitro model system for studying *Clostridium perfringens* type A infection. IUMS2011. 2011 年 9 月 (予定). 札幌.
- G. 研究発表
- 1) Kitadokoro, K., Nishimura, K., Kamitani, S., Fukui-Miyazaki, A., Toshima, H., Abe, H., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., Yamamoto, Y.,
- I. 知的所有権の取得状況
- 1) 特許取得
なし。
- 2) 実用新案取得
なし。
- 3) その他
なし。

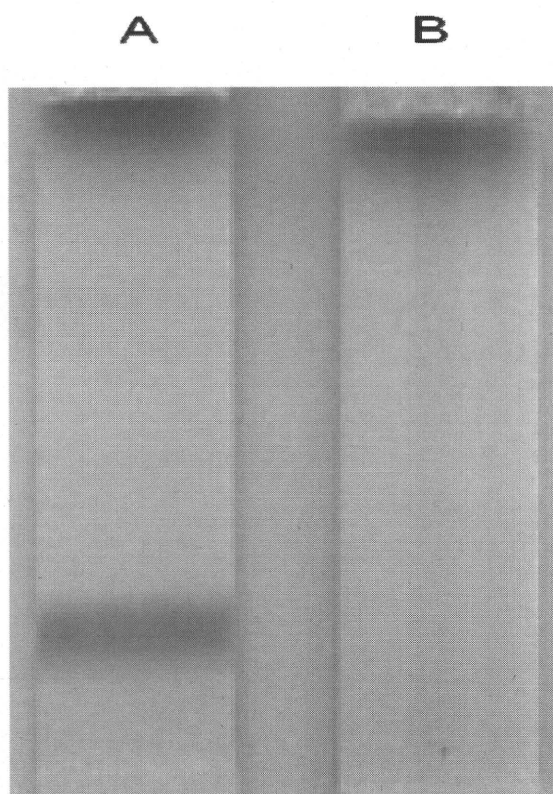


図1. 特異的プライマーおよびプローブの設計

- A: 10 コピーの CPE 合成 RNA を鋳型として増幅した
NASBA 産物を展開させた核酸クロマトストリップ
- B: NASBA 産物なし (展開液のみ)

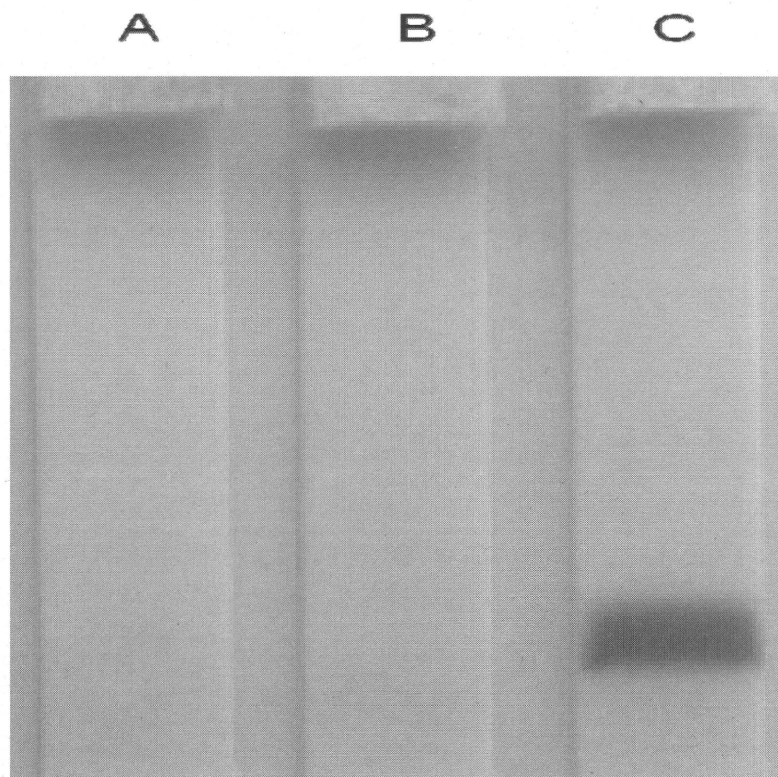


図2. ウエルシュ菌のNASBA-核酸クロマト検出

下記A-Cの各試料をNASBA増幅後、核酸クロマトで展開した。

- A: 水 (陰性コントロール)
- B: CPE 陰性ウエルシュ菌から抽出した核酸
- C: CPE 陽性ウエルシュ菌から抽出した核酸

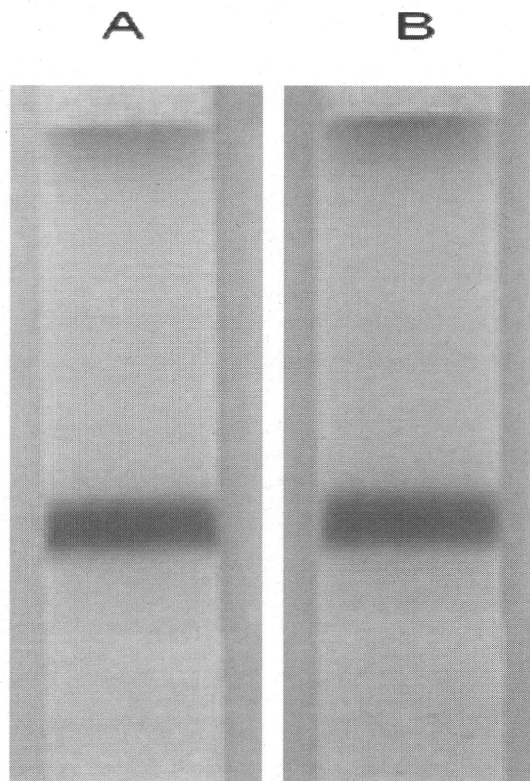


図3. 65°C処理工程の有無

CPE 陽性ウエルシュ菌から抽出した核酸を試料とし、NASBA 増幅における 65°C 処理の必要性を確認した。

A: 通常の NASBA 増幅 (65°C 熱変性反応あり)

B: 65°C 熱変性反応を省略した NASBA 増幅

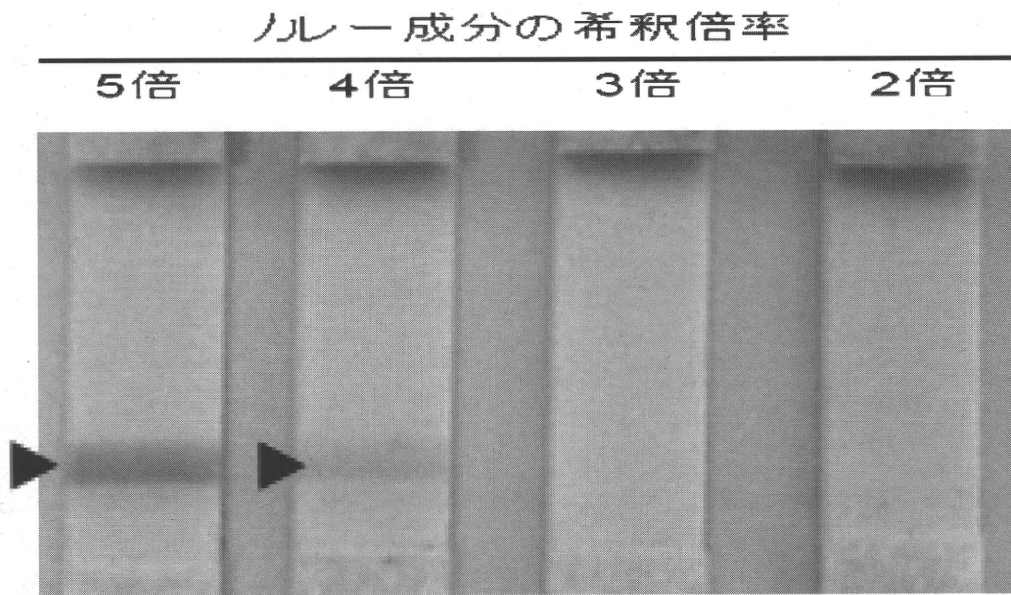


図4. カレー成分の影響

CPE 陽性株のウエルシュ菌から抽出した核酸に、抽出液で2・5倍希釈処理したカレー成分を混合した試料をNASBA増幅後、核酸クロマトで展開した。

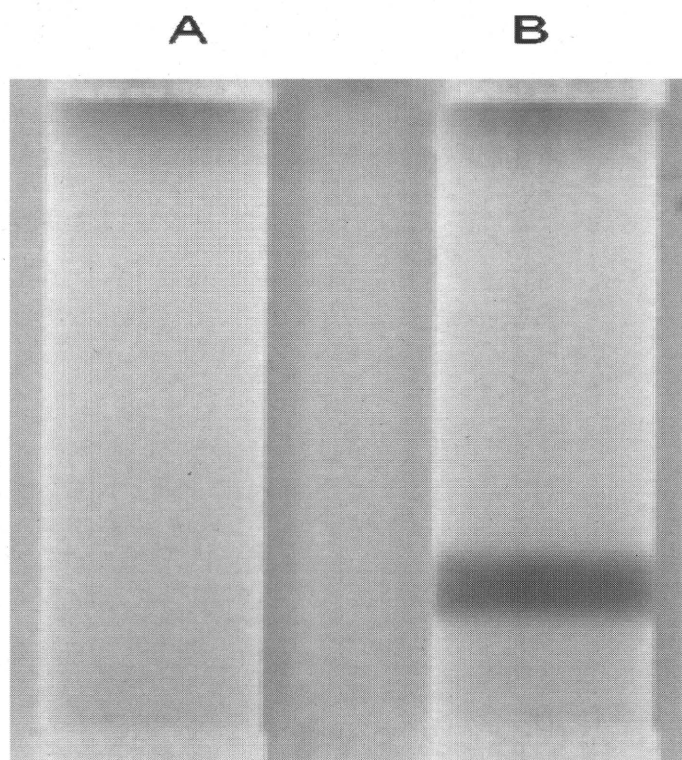


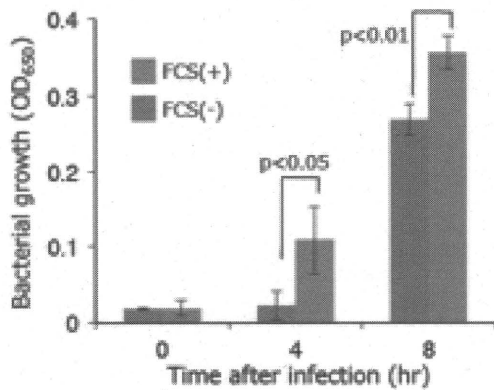
図5. NASBA-核酸クロマト検出

10%カレー乳剤に下記菌数のCPE陽性ウエルシュ菌を添加した試料から核酸を抽出し、NASBA増幅後、核酸クロマトで展開した。

A: 2.4×10^6 cfu/g

B: 1.7×10^7 cfu/g

Bacterial growth differs depending on FCS in the basolateral chamber



TER changes during the infection

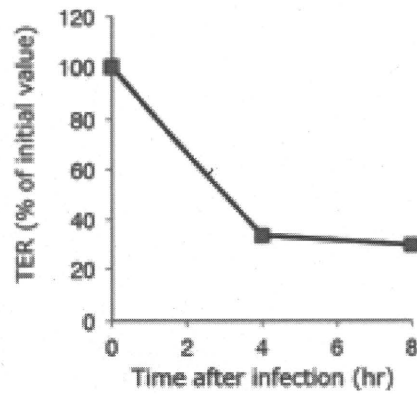


図6 栄養素（血清）ウエルシュ菌増殖への影響と TER

内側トランスウェル内で、栄養素（血清）がなくともウエルシュ菌は緩やかに増殖できるが、外側トランスウェルに栄養素を加えると、菌の増殖が増強される（左パネル）。このとき細胞間の物質透過が制限されていることをモニタリングする TER を測定すると、TER は低下しており（右パネル）、トランスウェルの外側から内側への物質通過が起こっていることを示している。以上の結果は、ウエルシュ菌は腸間上皮細胞バリアの破壊により漿膜面からの栄養を確保できることが示唆される。

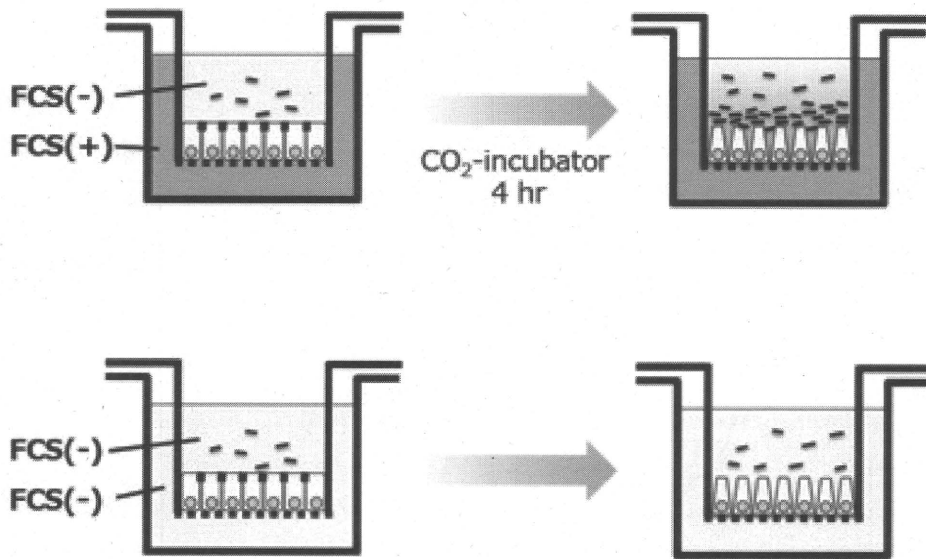
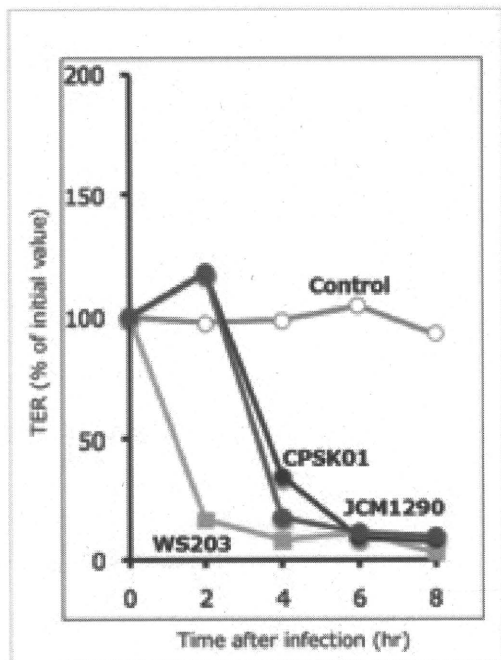


図7 ウエルシュ菌による腸管上皮細胞間バリア破壊の検証実験の概念図

食中毒由来ウエルシュ菌の腸管腔内増殖の状態を示す。CaCO-2細胞を、トランスウェルを用いて培養する。播種後5日経過すると細胞接着部上部にタイトジャンクションが形成される。このときトランスウェルの内外で通電すると、抵抗が発生しており、内外での物質通過が抑制されている。トランスウェルの外に栄養素であるウシ胎児血清（FCS）を添加すると、ウエルシュ菌の増殖によってタイトジャンクションが障害され、物質通過が促進、ウエルシュ菌が急速に増加する。栄養分のFCSが無くとも、細胞由来の栄養物が菌に供給され、緩やかにウエルシュ菌の増殖が刺激される。

ガス壊疽やその他由来の菌株のバリア破壊能



食中毒由来菌株

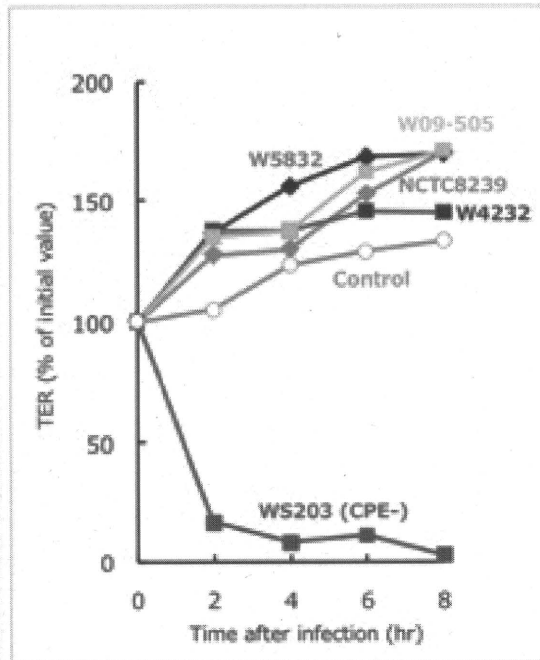


図8 由来の異なるウエルシュ菌株の、CaCo-2細胞TERへの影響

食中毒由来(右パネル)とその他の感染症由来(左パネル)ウエルシュ菌のCaCO-2細胞のTERへの影響をみたところ、感染症由来ウエルシュ菌は2から4時間後には顕著なTERの減少が生じた。一方、食中毒由来ウエルシュ菌ではTERは全く低下せず、感染症由来ウエルシュ菌と大きな違いが見られた。

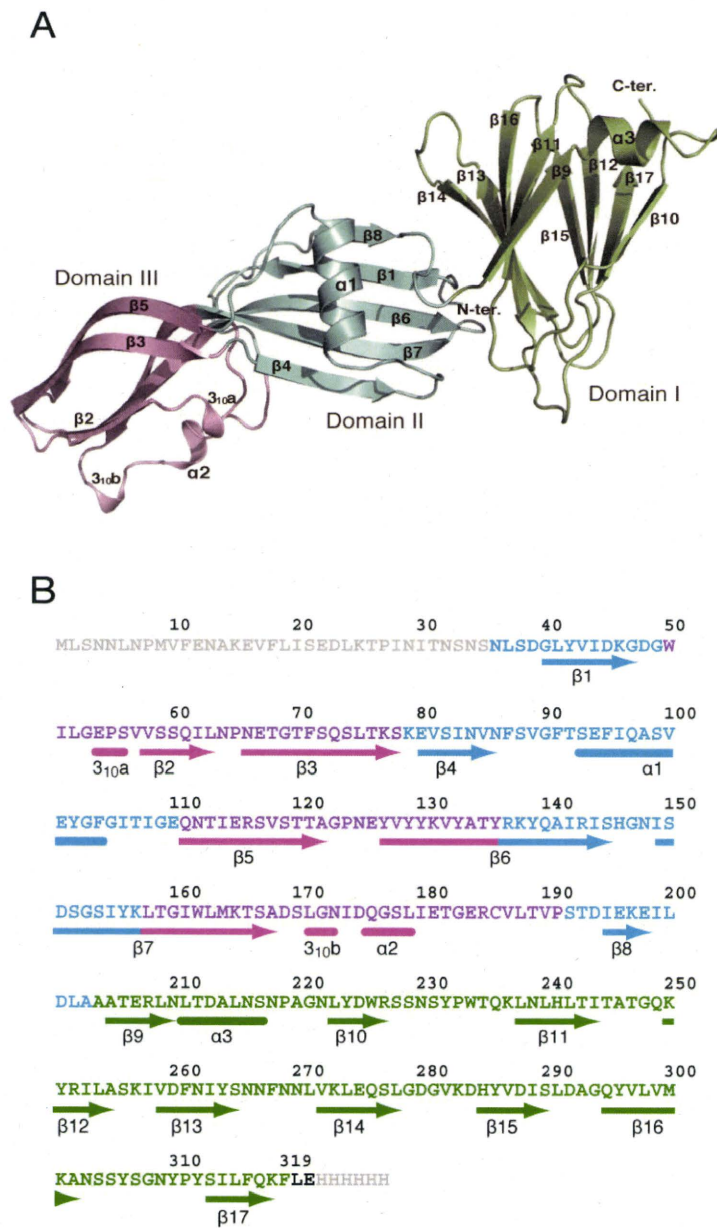


図9 ウエルシュ菌エンテロトキシン全長の3次元構造

A: リボンダイアグラム

N末端からドメインI、II、IIIとした。

B: アミノ酸配列と2次元構造

ドメインIは緑、ドメインIIは青、ドメインIIIはマゼンダで示す。

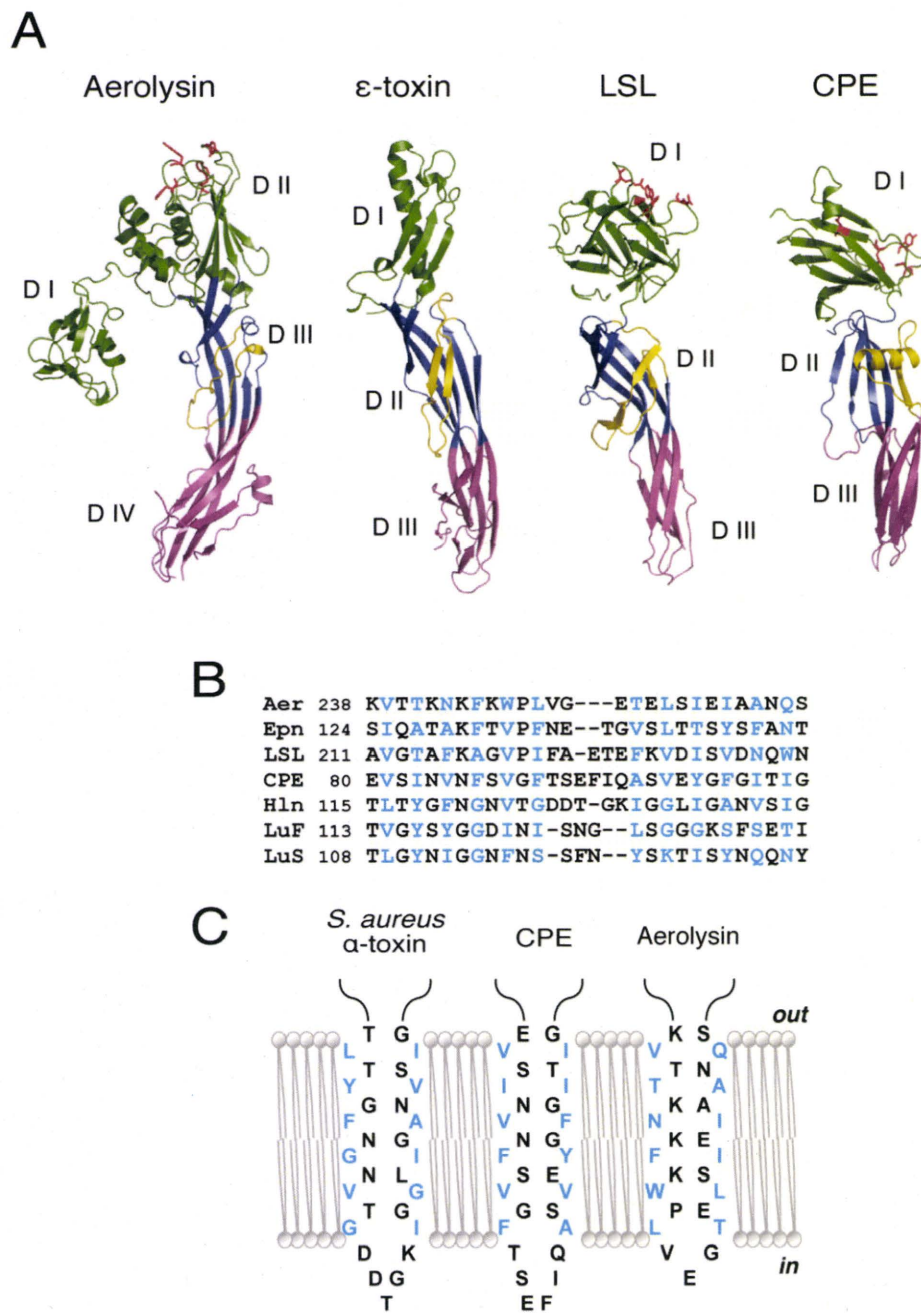


図 10 ウエルシュ菌エンテロトキシン(CPE)、ウエルシュ菌 ε 毒素、*Laetiporus sulphureus* 溶血性レクチン(LSL)、アエロリジンの構造類似性(A)、および細胞膜を標的とする毒素分子とのアミノ酸配列(B)と 2 次元構造の類似性(C)