

図9 抗ブドウ球菌エンテロトキシン A を添加した時の周波数の変動

赤線は IgG 抗体を吸着させたセンサーへ、高濃度のエンテロトキシン A ( $1.57 \mu\text{g/ml}$ ) を添加した時の水晶発振子マイクロバランス(QCM)法における周波数の変動を示す。

他の色の線は、抗体は吸着させていないセンサーに同濃度のエンテロトキシン A を添加した時の周波数の変動を示す。

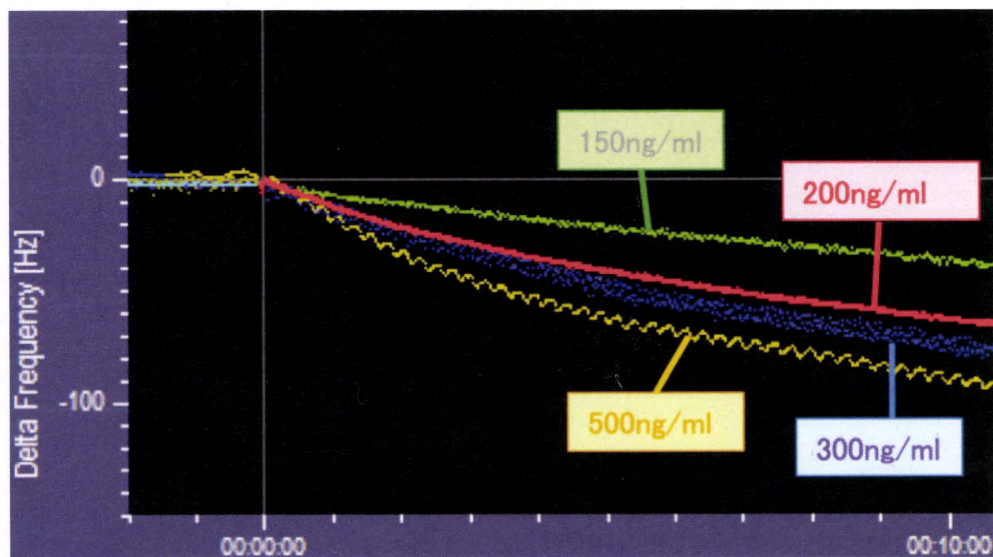


図10 抗SEAポリクローナルIgG抗体 第2ロットを用いた時の  
水晶発振子マイクロバランス(QCM)法システムの周波数の変動

添加したSEA濃度に従い、周波数の減少が認められた。

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

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20 - 22年度 分担研究報告

ウエルシュ菌およびウエルシュ菌が産生する

エンテロトキシンに関する研究

宮原 美知子      山本 茂貴      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

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

分担研究報告書（平成20 - 22年度）

ウエルシュ菌およびウエルシュ菌が産生するエンテロトキシンに関する研究

分担研究者

宮原 美知子	国立医薬品食品衛生研究所	衛生微生物部	室長
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
鎌田 洋一	国立医薬品食品衛生研究所	衛生微生物部	室長

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
山本 茂一	株式会社カイノス研究所	開発部
宇治家 武史	株式会社カイノス研究所	開発部
林 司	株式会社カイノス研究所	開発部
三宅 眞実	大阪府立大学大学院	応用生命科学研究科
星 英之	大阪府立大学大学院	応用生命科学研究科

研究要旨：ウエルシュ菌および同菌が産生する嘔吐毒素に関して、PCR法によるエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の検出法、エンテロトキシン遺伝子保有ウエルシュ菌の核酸クロマト法による検出法開発、エンテロトキシンと毒素受容体との結合反応、エンテロトキシンの三次元立体構造、ならびにウエルシュ菌の腸管内増殖機構について検討した。また、新型エンテロトキシンのタンパク質精製および遺伝子同定を試みた。

ウエルシュ菌のエンテロトキシン遺伝子の検出は培養液では確立している。同法を食材に応用した場合、一部の食材には適応できないことがわかった。適応できる食材として、食肉があるが、21検体中にはPCR法陽性の検体はなく、食中毒原性のウエルシュ菌の食品汚染の頻度は低いと考えられた。

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。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。カレー試料へのウエルシュ菌添加試験から、目標とする  $1 \times 10^6$  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  $1.7 \times 10^7$  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。

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。

エンテロトキシン分子は受容体であるクローディン分子の第 2 ループ、さらに第 2 ループ内の 149 から 160 番のアミノ酸領域を認識した。またエンテロトキシンとその受容体クローディンは、静電的な相互認識結合反応をもって、リガンド-受容体結合を形成すると考えられる。

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、 $\beta$  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。

新型エンテロトキシンを、硫酸アンモニウム沈殿法とゲルろ過を組み合わせて部分精製した。同毒素は細胞毒性を保持したまま、10 数種類のタンパク質バンドまで部分精製された。新型エンテロトキシン産生株が持ち、既知エンテロトキシン産生株が保有しない contig は 21 種存在した。それらの contig の塩基配列について、タンパク質に翻訳させる遺伝子かどうか検索したところ 54 の配列が同定され、この中に新型エンテロトキシン遺伝子が存在する可能性がある。



## A. 目的

ウエルシュ菌食中毒は下痢腹痛を主徴とし、1事件あたりの患者数が多い大規模型発生を特徴とする。潜伏期間が平均12時間で、毒素による食中毒とするには長く、感染し、胃腸炎の症状として食中毒症状がでるタイプのものとしては短い潜伏期を示す。本食中毒は、生体内毒素型食中毒に分類されている。本食中毒発生の要因として、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、があげられ、結果として、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<sup>1)</sup>。本食中毒は、非常に複雑な機序を経て発生することとなり、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は必要となる。

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<sup>2)</sup>。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支持する。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い。何十人分を調整する大きな調理機器が用いられて製造されている。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<sup>1)</sup>。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 $10^8$ cfu以上のウエルシュ菌生菌が検出されることが、原因食品が示すウエルシュ菌食中毒発生の条件になっている。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。

毒素はエンテロトキシンと呼ばれるタンパク質で、319個のアミノ酸からなり、1993年にその遺伝子がクローニング、塩基配列が報告された(GenBank accession No. M98037)<sup>3)</sup>。エンテロトキシンに関する研究は古くから展開されており、ウサギ腸管ループテストで、顕著に液体貯留とループの腫脹を示し、典型的な腸管攻撃毒素である。エンテロトキシンはまた、腎臓、肝臓などに由来する上皮系培養細胞に毒性を示すことが知られている。それら細胞の

なかで、アフリカミドリザル腎臓上皮細胞シンの検出と、毒性メカニズムの解析によく用いられている<sup>4, 5)</sup>。エンテロトキシンの受容体は1997年に発見された<sup>5)</sup>。各種細胞におけるエンテロトキシンの感受性を解析する研究から、同毒素に非感受性の細胞があることが見いだされている。マウス由来の繊維芽細胞であるL929細胞がそうである。L929細胞はエンテロトキシン受容体を持たない<sup>5)</sup>。

毒素は糖や脂質の修飾を受けていない。上述したように、エンテロトキシンは芽胞形成の際に合成されることがわかっている。エンテロトキシンは、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、5から6分子が集合したオリゴマーとなって細胞膜に強く結合する。細胞膜に埋まる状態になる。その際、集合したエンテロトキシン分子の中央に小さな穴が形成される。小孔、ポアー、あるいはチャネルと称される構造物で、小孔部分から、細胞質内の電解質が水分子と共に漏出する。これが下痢になり、症状が誘発される状態になる<sup>3)</sup>。

1997年、門間らにより症状や原因食品の特徴からウエルシュ菌食中毒と推定され、原因食からのウエルシュ菌の分離があるにもかかわらず、同分離菌がエンテロトキシン遺伝子を持たず、便中にエンテロトキシンも検出されない事例に遭遇した。同分離菌株に対して種々の検討がなされ、その性状が報告されている<sup>6)</sup>。分離菌株は毒素産生用培地で培養してもエンテロトキシンを産生しない。しかしながら、培養ろ

Vero細胞で、エンテロトキ液について腸管ループ試験を実施すると、液体の貯留とループの腫脹が認められた。ろ液中にエンテロトキシン活性のある物質があると推定されることから、ろ液に対し、60°C5分の加熱、pH11.5の強アルカリ曝露、およびプロナーゼ処理が行われ、いずれの処理によっても腸管ループテスト陰性になっている。これらの事から、門間らはウエルシュ菌が新しいタンパク質性の下痢原性を有する毒素を分泌するのではないかと推察している。同じような事例は2003年<sup>7)</sup>にも報告されている。事例の培養液は、Vero細胞に対して、既知のエンテロトキシンとは異なる変性状態を誘発する。また、既知エンテロトキシンが毒性を示さないL929細胞にも毒性を示す。新型エンテロトキシンの分離精製および遺伝子の同定がなされれば、ウエルシュ菌の病原性への理解が深まるとともに、より正確なウエルシュ菌食中毒疫学の実体が把握される。

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。大量の生菌の存在は、大量のエンテロトキシン遺伝子の存在を示す。このことから、喫食直前に食品中からウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子を検出すれば、ウエルシュ菌食中毒を予防できる可能性が考えられる。特定遺伝子を検出する方法には、ポリメラーゼチェーン反応(Polymerase Chain Reaction, PCR)がある。ウエルシュ菌食中毒の原因食

品供される食材についての調査研究が少ない。一方、PCR 法には遺伝子を増幅させる過程があり、そのために時間を要するという、喫食直前の検査には不適切な部分がある。特定遺伝子を検出する方法に核酸クロマトという手法がある<sup>4)</sup>。検体から核酸を抽出後、10 分程度で反応を終了させ、目的遺伝子が検出されるかを見る。特異性は核酸の 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。本法はノロウイルスの検出キットとして、すでに市販されている方法で、市場の信頼性もある。しかし、ノロウイルスはその遺伝子が RNA であって、核酸クロマト法が DNA についても適応できるかは検討されていない。同法の細菌毒素遺伝子の適応性についても、何ら研究がなされていない。

本研究はまた、エンテロトキシンの作用機構解析の解明を目的とする。ウエルシュ菌生菌、およびエンテロトキシンの、ウエルシュ菌食中毒全体の発生機序を明確にし、同食中毒の予防法に貢献するものである。

本研究は以下の項目について検討した。

第一はウエルシュ菌食中毒の原因食品供される食材について、PCR 法によってエンテロトキシン遺伝子保有ウエルシュ菌の調査を行った。

第二は核酸クロマト法によって、エンテロトキシン遺伝子保有ウエルシュ菌の検出法を開発した。

第三はウエルシュ菌の腸管内増殖メカニズムを解析するため、ヒト腸管上皮培養細胞を用いて実験モデルを開発し、増殖に

必要な条件を探索した。

第四はウエルシュ菌エンテロトキシンの構造解析、受容体の毒素結合部位と結合様式の解析を行う。

第五は新型エンテロトキシタンパク質の精製およびその遺伝子の探索を行った。

## B. 方法

### 1 PCR 法によるエンテロトキシン遺伝子保有ウエルシュ菌の食材からの検出

培養液、あるいは卵黄反応の見られる集落より、DNA を採取し、ウエルシュ菌毒素遺伝子検出用プライマー (TaKaRa CPE-1/2, 456bp Amplicon) と Positive control template (S041) 667bp を使用した PCR を試みた。Negative control と Positive control も入れて検出反応を行った。

#### 1.1 培養液の場合

1ml 採取、5,000 rpm, 2 分間遠心後に上清を除去し、滅菌水を 100  $\mu$ l 加えて、よく攪拌後に 96 $^{\circ}$ C, 5 分間で熱抽出を行い、13,000 rpm, 10 分間遠心後、上清を DNA 溶液として分離した。この液を PCR にて検討した。

#### 1.2 集落の場合

マイクロチューブに 50  $\mu$ l の滅菌水を入れ、滅菌楊枝等で採取した菌の DNA を分離した。培養液の場合と同様に熱抽出を行って、13,000 rpm, 10 分間遠心後、上清を DNA 溶液として分離した。

#### 1.3 検討香辛料



黒胡椒 6 検体  
ターメリック 6 検体  
赤唐辛子類 6 検体  
フェネグリーク 3 検体  
クミン 1 検体  
コリアンダー 10 検体  
スターアニス 1 検体 (ホール)  
ローレル 1 検体 (ホール)  
ナツメグ 1 検体 (パウダー)  
カルダモン 1 検体 (パウダー)  
シナモン 1 検体 (パウダー)  
オールスパイス 1 検体 (ホール)  
フェンネル 1 検体 (パウダー)  
市販品を用いた。香辛料については、  
原産国はほとんどが外国産であった。

#### 1.4 検討食品

豚肉 7 検体  
鶏挽肉 13 検体  
牛肉 1 検体  
市販品を用いた。

## 2 核酸クロマト法によるエンテロトキシン遺伝子陽性ウエルシュ菌の検出法開発

### 2.1 NASBA 法に用いる鋳型核酸

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<sup>7)</sup>。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 260 nm の吸光値より算出した。

### 2.2 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。

### 2.3 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。

### 2.4 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。

### 2.5 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。

## 2.6 擬似試料の調製

レトルトカレー25 g と生理食塩水 225 ml 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。

## 3 ウエルシュ菌の腸管内増殖機構の解析

### 3.1 実験モデル

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。細胞はおおよそ80%コンフルエントに達するごとに継代した。

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日間培養を行った。この間に Caco-2 細胞は腸管上皮細胞のもつ形態を示し始める。すなわち、メンブレンフィルターに接した基底膜側と反対側の管腔側に分化する。細胞間にはタイトジャンクションが構成され、物質の移動が制限される。このため、基底膜側と管腔側を通电した場合、電気抵抗が発生する。その抵抗値を上皮間電気抵抗値 (TER) といい、タイトジャンクションの健全性、換言すれば細胞間のバリア機能を完全性の指標となる。バリア機能が障害を受けた場合、電気抵抗値が減弱する。

接種するウエルシュ菌株の由来に注目した。食中毒あるいは感染症由来に分類し、

菌増殖と TER の変化を同時に測定した。

### 3.2 ウエルシュ菌の増殖の測定

ウエルシュ菌の増殖に、細胞への菌の接着が必要か否か、検討した。6 ウェルプレート内のウェル内に細胞を播種し、コンフルエントの状態まで培養した。その中に、トランスウェルを設置し、ウェル内部にウエルシュ菌生菌を接種した。摂取量は上記と同様である。プレートを 37°C 5% CO<sub>2</sub> インキュベータ内に設置し、培養、経時的に培地の濁度を測定し、ウエルシュ菌の増殖の程度を計測した。

## 4 分子レベルにおけるウエルシュ菌エンテロトキシンの構造と作用

### 4.1 エンテロトキシンの調製と受容体遺伝子導入、エンテロトキシン感受性検定

ウエルシュ菌 NCTC8239 株をヒートショック後、クックトミート培地で 37°C 一晚静置培養後、培養液を TGC 培地に植え 37°C で4時間静置培養した。その培養液を芽胞産生用のダンカン-ストロング培地に植えさらに8時間培養を続けた。芽胞を回収、音波処理して芽胞を破碎した後遠心分離し、その上清に40%になるように硫酸アンモニウムを加えてタンパク質を沈殿させた。20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.7) に沈殿を溶解後、同緩衝液を用いてセファクリル S-200 カラムによるゲルろ過を行った。分画したフラクションを SDS 電気泳動して、分子量約 35 kDa のタンパク質バンドを持つフラクションを回収した。毒素は Vero 細胞を用いての毒素活性の検定を行った後、凍結して保存した。

EK293 細胞を、クローディン 1、4、1 の前半部分と 4 の後半部分、およびその逆のパターンで調整したプラスミドでトランスフェクトし、恒常的にクローディンあるいはクローディンキメラを発現した細胞を調整した。各細胞を 96 ウェルプレートに播種し、37°C5%CO<sub>2</sub> 下で 24 時間培養後、エンテロトキシンを添加した。毒素活性は細胞の生死で判定した。

#### 4.2 クローディン第 2 ループ内のアミノ酸変異と、変異クローディン導入細胞の調製

HEK 細胞はエンテロトキシンに感受性を示さない細胞である。この細胞にクローディン遺伝子を導入し発現させると、毒素感受性となる。様々な形状のキメラ状態の第 2 ループを持つクローディンを発現しているエンテロトキシン非感受性 HEK293 細胞を用意し、それらのエンテロトキシン感受性を調べた。キメラ構造は、変異させるアミノ酸の種類によって、陰性、陽性、および非電荷状態になるように設計した。

### 5 ウェルシュ菌新型エンテロトキシンの精製

#### 5.1 培養

東京都健康安全研究センターで、当該事例から分離された W5052 株を用いた。W5052 株をクックトミート培地に接種し、37°C で 2 日間培養した。75°C 15 分加熱した。その後、Brain Heart Infusion 培地に接種し、37°C で一晚培養した。変法 DS 培地を調製した<sup>8)</sup>。同培地の液量の、1% の上記 BHI 一晚培養液を接種した。37°C で 1

〜4 日間培養した。

#### 5.2 段階的濃度を設定しての硫酸アンモニウム沈殿による分画

変法 DS 培地での培養液を PBS で 10 倍に希釈した。40% w/v となるよう硫酸アンモニウムを加え、沈殿を形成させた。遠心分離によって沈殿を回収、元の液量の PBS で溶解した。遠心分離上清に、最終濃度が 50% w/v になるよう硫酸アンモニウムを加え、沈殿を形成させ、遠心分離で回収した。添加した硫酸アンモニウムは 10% w/v に相当する。以後、60% および 70% w/v と同様な操作を繰り返した。PBS 溶解物は、4°C で透析し、タンパク質濃度と細胞毒性力価を測定した。

#### 5.3 ゲルろ過

上記の段階的硫酸アンモニウム沈殿分画で、細胞毒性の確認された画分に対し、ゲルろ過を行った。カラムは SUPERDEX 200 10/300 GL (GE HealthCare) を用いた。送液した緩衝液は PBS で、流速は 0.5 ml/分、溶出液を 1 フラクション当り 0.5 ml の割合で回収した。溶出液に含まれるタンパク質濃度は、280 nm の吸光値として測定した。得られたフラクション中のタンパク質を SDS 電気泳動解析した。

#### 5.4 細胞毒性力価測定

Vero 細胞と L929 細胞を用いた。Vero 細胞は、国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部に保管中のものを、L929 細胞はニューマンサイエンス財団より購入した。細胞培養は、10% 非働化ウシ胎児血清 (以下 FBS) および Non-essential amino acid (NEAA) を含んだ Dulbecco's modified Eagle's

medium (DMEM)を用いて、37°C CO<sub>2</sub>インキュベーター内で行った。両細胞の細胞懸濁液(1 x 10<sup>5</sup> cells/ml)を調製した。これを0.2 ml/wellの割合で96 wellプレートに播種し、一晚1% FBS-NEAA-DMEMを用いて培養した。新鮮な培地に交換後、さらに1時間培養した。

毒素の希釈段階を、別のプレートで作製した。各wellに70 µlの培地を加え、2倍段階希釈列を11段作製した。陰性コントロールには培地のみを用いた。

1時間経過後の細胞入りのwellに、上記毒素希釈液を50 µl添加した。その後24時間培養を続けた。生細胞数測定キット(Cell Counting Kit-8、同仁)を10 µl/well添加し、さらに1時間培養後、培養液の450 nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio-Rad)で測定した。毒素に細胞毒性があった場合、吸光値が低下し、最大吸光値の50%の値を示す毒素の希釈段階の逆数を毒素力価とした。力価はU/mlの単位で表示した。

#### 5.5 次世代シーケンシングと新型エンテロトキシン遺伝子の探査

W5052株のゲノムを次世代シーケンシング技術によって解析した。W5052株からのDNA抽出にはDneasy Blood & Tissue Kitsを用いた。塩基配列のシーケンスにはRoche Genome Sequencer FLXを用いた。決定できた塩基配列をリードとし、リード内の重複部分を連結(アッセンブル)させ、contigを得た。contig中のOpen Reading Frame(ORF)を求めた。既知のエンテロトキシンを産生するウエルシュ菌SM101株の

ゲノム情報はPublic databaseに登録されている。W5052株にあって、SM101株に無い遺伝子が目的の新型エンテロトキシン遺伝子の候補となる可能性がある。両株のORFの比較を行った。

#### C. 結果と考察

##### 1 エンテロトキシン遺伝子保有ウエルシュ菌調査

検討香辛料および食肉より、ウエルシュ菌を検出できたが、エンテロトキシン産生のウエルシュ菌を検出することはできなかった。

TGC培養後のcpe遺伝子産生検出について、コリアンダー、ナツメグ、カルダモン、シナモンやオールスパイスにおいては、PCRが進行しなかった。

##### 2 核酸クロマト法によるエンテロトキシン遺伝子陽性ウエルシュ菌の検出法開発

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。CPE陽性ウエルシュ菌から抽出した、1.4 µg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1)。

一方、CPE陰性のウエルシュ菌から抽出した同量(1.4 µg)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つ

た (図 1)。

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 2)。

TGC 培地で培養した CPE 陽性ウエルシュ菌 ( $2.4 \times 10^6$  cfu/g または  $1.7 \times 10^7$  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、 $2.4 \times 10^6$  cfu/g 添加では、菌は検出できず、 $1.7 \times 10^7$  cfu/g の添加で菌が検出可能であった (図 3)。

### 3 ウエルシュ菌の腸管内増殖機構の解析

CaCO-2 細胞を培養したトランスウエルに、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。

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エ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 4)。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 4)。

### 4 ウエルシュ菌エンテロトキシンの受容体認識機構、結合様式、ならびに立体構造

Vero 細胞や MCF-7 細胞など、エンテロトキシン感受性の細胞では、毒素濃度が  $10 \mu\text{g/ml}$  もあれば、全細胞が死滅する。一方 HEK293 細胞は同毒素濃度でも 10% 以下の細胞障害にとどまることが既に知られている。HEK293 細胞にクローディン 1 あるいは 4 を持続発現する細胞を調整した。毒素処理後の細胞致死率は、前者が 5%、後者の細胞が 75% だった。クローディンが持つ 2 つの細胞膜外ループ部分をつなぐ部分について遺伝子工学的工夫を施し、クローディン 1 と 4 とのキメラを作製、持続発現細胞を調整した。第 1 ループをクローディン 1、第 2 ループをクローディン 4 由来の物と、その逆のクローディンキメラ保有細胞に対して、毒素処理を行った。前者の第 2 ループがクローティン 4 の場合、第 1 ループがクローディン 1 であるのに細胞致死率は 70% を示した。一方、第 2 ループにクローディン 1 のアミノ酸配列を配備すると第 1 ループがクローディン 4 であるにもかかわらず、毒素処理後の細胞致死率は 3% を示すに過ぎなかった。以上の結果はクローディン分子中に 2 カ所ある細胞外領域としてのループのうち、その第 2 ループ、すなわち、より C 末端に近

いループがエンテロトキシンによって認識される事を示している。そこで、さらに第2細胞外ループでクローディン1(毒素非感受性)とクローディン4(毒素感受性)のキメラ受容体を構築し、持続発現させる細胞を樹立した。各キメラ受容体持続発現細胞が示す毒素に対する50%効果濃度( $EC_{50}$ )を比較した。オリジナルのクローディン4を発現した細胞の $EC_{50}$ は0.176  $\mu\text{g/ml}$ だった。クローディン4のアミノ酸配列をもとにして、その149位のアスパラギンから160位のメチオニンをクローディン4の配列にし、残りをクローディン1の配列としたキメラの場合、その $EC_{50}$ は0.456  $\text{mg/ml}$ を示した。149位から160位までを1アミノ酸でも変換すると1.74  $\mu\text{g/ml}$ の $EC_{50}$ を示した。以上の結果から、エンテロトキシンが認識する受容体であるクローディン4のうち、第2細胞外ループ中の149から160番までのアミノ酸領域が、毒素がクローディンを認識することを示している。

派生的クローディン4、クローディン4<sub>NRDY</sub>はクローディン5と等しい等電点のエンテロトキシン感受性領域を持ち、派生的クローディン5、クローディン5<sub>DYNR</sub>はクローディン4と等しい等電点のエンテロトキシン感受性領域を持つようにエンテロトキシン感受性領域を変化させた(表1)。これらのクローディンはL929細胞膜上で発現しており、それぞれのエンテロトキシン感受性を調べた(図5)。予想通り、エンテロトキシン感受性領域の等電点を上昇させる変異はクローディン5を感受性に

し、等電点を低下させるような変異はクローディン4を1/100以下の低感受性にした(図5)。以上の結果から、エンテロトキシンは、クローディンの細胞外第2ループのうち、等電点の高い、すなわち、塩基性アミノ酸が並んでいる部分を認識すると考えられた。

エンテロトキシンとその受容体であるクローディンとの相互認識反応は、それぞれのアミノ酸由来の静電氣的結合で成り立っていること、その実態は、クローディン分子の細胞外第2ループの塩基性アミノ酸と、エンテロトキシンのアミノ酸番号300付近の、酸性の溝との間での反応であると考えられた(図6)。

エンテロトキシンの結晶は、2.0 Åの回折度を示した。エンテロトキシン分子は3つの独立したドメインで構成されていた(図7)。ドメインIは、エンテロトキシンの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 $\epsilon$ 毒素、*Laetiporus sulphureus*溶血性レクチンが共通に持つ、 $\beta$ 型小孔形成毒素の特徴を示した(図8)<sup>9-11)</sup>。ドメインIIとIIIはそれぞれ3ヶ所の短い $\beta$ ストランドを持っており、ドメインIIは $\beta$ ストランドのあとに、 $\alpha$ ヘリックスが続いていた。 $\alpha$ ヘリックスと $\beta$ ストランドのアミノ酸配列は、 $\beta$ 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、エンテロトキシンが $\beta$



小孔形成毒素の特徴を有することを証明した(図8)。エンテロトキシンの立体構造から、エンテロトキシン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。

## 5 ウエルシュ菌新型エンテロトキシンの部分精製と同遺伝子の探査

### 5.1 生化学的手法による新型エンテロトキシンの精製

目的の新型エンテロトキシンを産生していると推定している W5052 株を変法 DS 培地で経日的に培養し細胞毒性を L929 細胞で求めた。回収できるタンパク質量と、比活性の程度から、今後の新型エンテロトキシンの精製には2日培養物を用いることとした。

段階的硫酸アンモニウム沈殿法を適応し、新型エンテロトキシンの部分精製を試みた。表2に、0-40%、40-50%、50-60%、および60-70%分画の毒性を比較した結果を示す。0-40%および60-70%の分画はL929細胞に毒性を示さなかった。一方、40-50%および50-60%の分画は、L929およびVero細胞の両種に毒性を示した。以上の毒性試験の結果は、新型エンテロトキシンは、40-60%の硫酸アンモニウム分画中に存在する事を示している。同画分を濃縮後、ゲルろ過を行った。図9に示すように、同画分は多くのタンパク質ピークを示し、分子量の異なる多くのタンパク質の混合物だった。ゲルろ過して得た各フラクションのVeroおよびL929細胞への毒性を検定した。両細胞に毒性を示すことが新型エンテ

ロトキシンの特徴であるので、毒性ピークが重なるフラクション28から31の中に、新型エンテロトキシンが含まれるものと考えられる。各フラクションをSDS-電気泳動で解析した。フラクションの28から31に注目すると、同フラクション中には、本数は少ないものの、複数のタンパク質バンドが確認された(図10)。

### 5.2 次世代シーケンシング技術による新型エンテロトキシン遺伝子の探査

最終的に比較解析に用いることが出来たのは220,012リードとなった。リードの総塩基数は3,330,997 bpだった。有効なリードをアッセンブルし、contigを形成させた結果、W5052株のゲノム解析からは、132のcontigが得られた。塩基数は3,336,496 bpだった。132 contigのうち、その塩基長が500 bpを越える、遺伝子解析に有用なcontigは112だった。

W5052株のcontigと、すでにゲノム情報が公開されているSM101株のそれとを比較した。contigの比較とその結果のまとめを図11に示す。W5052株が持ち、SM101株が保有しないcontigは21種存在した。それらのcontigの塩基配列について、タンパク質に翻訳可能かどうか、すなわち機能を持つ遺伝子かどうか検索したところ54の配列が同定された。この中に目的の新型エンテロトキシン遺伝子が存在する可能性があり、PCR法などを用い、今後同定を進めて行く。

## D. 結論

ウエルシュ菌のエンテロトキシン遺伝子の検出は培養液では確立している。同法を食材に応用した場合、一部の食材には適応できないことがわかった。適応できる食材として、食肉があるが、21 検体中には PCR 法陽性の検体はなく、食中毒原性のウエルシュ菌の食品汚染の頻度は低いと考えられた。

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。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。カレー試料へのウエルシュ菌添加試験から、目標とする  $1 \times 10^6$  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  $1.7 \times 10^7$  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。

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。

エンテロトキシン分子は受容体であるクローディン分子の第 2 ループ、さらに第 2 ループ内の 149 から 160 番のアミノ酸領域を認識した。またエンテロトキシンとその受容体クローディンは、静電的な相互認識結合反応をもって、リガンド-受容体結合を形成すると考えられる。

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、 $\beta$  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。

新型エンテロトキシンを、硫酸アンモニウム沈殿法とゲルろ過を組み合わせて部分精製した。同毒素は細胞毒性を保持したまま、10 数種類のタンパク質バンドまで部分精製された。

新型エンテロトキシン産生株が持ち、既知エンテロトキシン産生株が保有しない contig は 21 種存在した。それらの contig の塩基配列について、タンパク質に翻訳さえる遺伝子かどうか検索したところ 54 の配列が同定され、この中に新型エンテロトキシン遺伝子が存在する可能性がある。

#### E. 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) Miwa, et al. (1998) Amount of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat detected by nested PCR. Inter. J. Food Microbiol., 42, 195-200.
- 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 Boil.* 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) 門間千枝、柳川義勢、畠山薫、尾畑浩魅、横山敬子、新垣正夫、甲斐明美、諸角聖、五十嵐英夫、伊藤武。新型エンテロトキシンを産生すると推定されたウェルシュ菌とその下痢原性毒素について。日本細菌学雑誌54:120 (1999)
- 7) 門間千枝、柴田幹良、下島優香子、小西典子、小畑浩魅、甲斐明美、山田澄夫、諸角 聖。既知エンテロトキシン非産生ウェルシュ菌によると推定された食中毒事例 (第2例)、日本細菌学雑誌 59:283 (2004)
- 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)
- F. 健康危害情報  
なし。
- G. 研究発表
1. 論文
- 1) Kamiya, J., Abe, H., Kamiani, S., Toshima, H., Fukui, A., Miyake M., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., Yamamoto, Y., Horiguchi, Y. (2010) *Clostridium perfringens* enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction. *J. Boil. Chem.* 285: 401-408.
- 2) Kitadokoro, K., Nishimura, K., Kamitani, S., Fukui-Miyazaki, A., Toshima, H., Abe, H., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., Yamamoto, Y., Karatani, H., Horiguchi, Y. Crystal structure of *Clostridium perfringens*

enterotoxin displays features of  $\beta$ -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.

#### 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

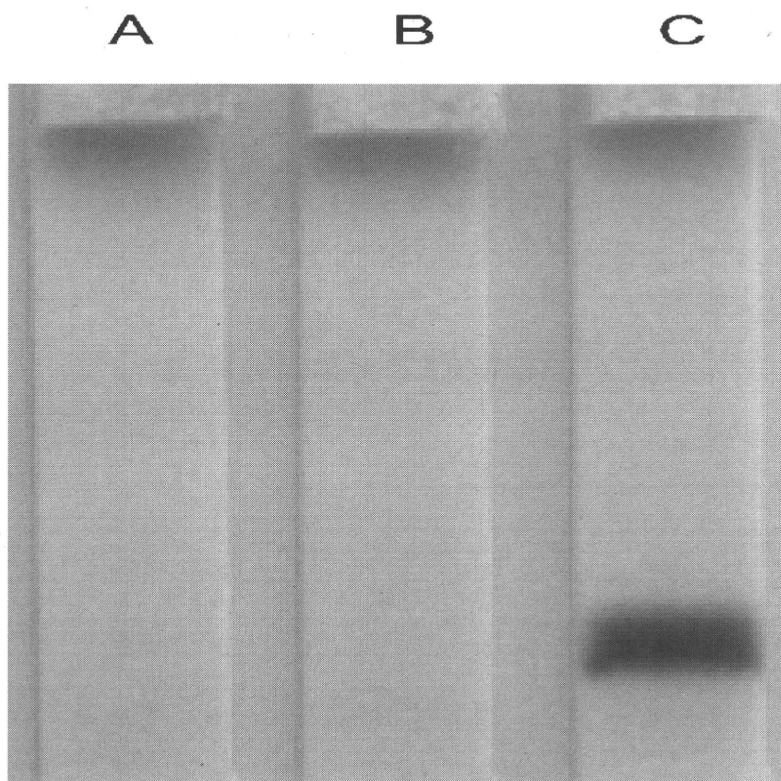


図1. ウエルシュ菌の NASBA-核酸クロマト検出

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

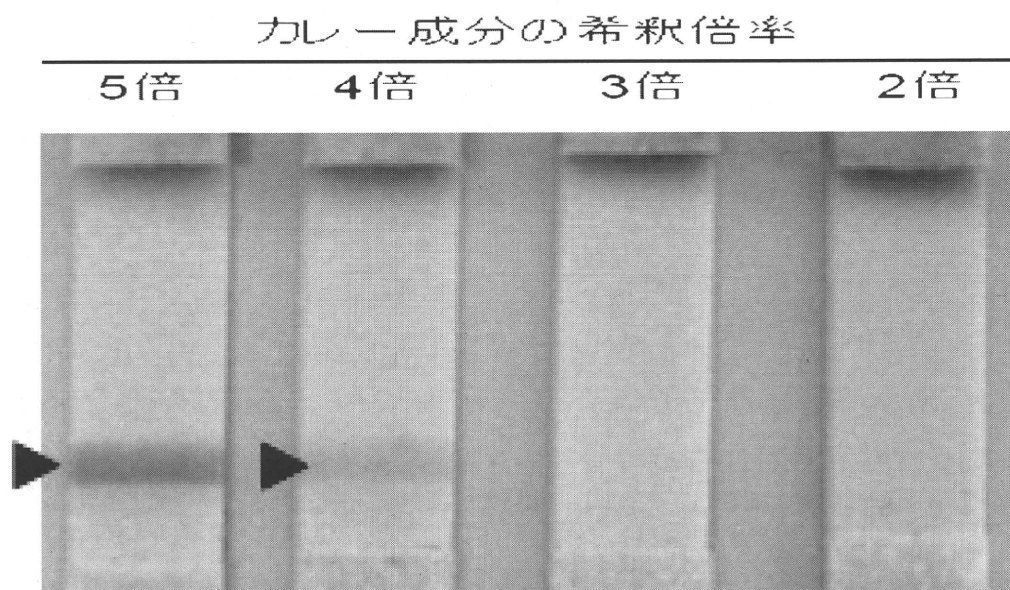


図2. カレー成分の影響

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。