

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

「食品中の毒素産生微生物及び試験法の研究」

分担研究報告書

ウエルシュ菌食中毒発現機構の考察

分担研究者 三宅 眞実 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 教授

協力研究者 安木 真世 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 助教

研究要旨：ウエルシュ菌は大規模型の食中毒を起こす。検査法は確立されているが、食中毒発生メカニズムには不明のことが多い。特に、腸管内での菌増殖、芽胞形成、毒素産生機構はほとんど研究されていない。本厚生労働科学研究で、新領域であるウエルシュ菌の腸管内増殖機構について、研究を進めて来た。本年度は、昨年度に開発した *in vitro* 実験系を発展させ、これを用いたウエルシュ菌病原性発現に影響を与える宿主由来因子を探索した。その結果、まず胆汁酸が数 $\mu\text{M}$  レベルの濃度で芽胞形成・エンテロトキシン産生を数百倍に亢進させることを見いだした。亢進効果は被抱合胆汁酸で高く、特に代表的な 2 次胆汁酸であるデオキシコール酸で最も高かった。次にこの実験系で宿主細胞がウエルシュ菌の病原性に与える影響を検討した。結果、宿主細胞が何らかの因子を介してウエルシュ菌の病原性を抑制していることが示唆された。しかもこの抑制効果はデオキシコール酸の存在下では解除された。これらの結果から、ウエルシュ菌は消化管環境を 1 つの niche として認識しており、わずかな濃度の胆汁酸に応答することを介して、適切なタイミングで最大効果を発現するシステムを有することが初めて明らかになった。また、このシステムは宿主が菌の病原性を抑えようとする防御反応への対抗手段としての意味も有する可能性が示唆された。今後はより様々な消化管環境因子の影響をさらに調べると共に、これら因子がウエルシュ菌の病原性発現を修飾するメカニズムを解明することで、ウエルシュ菌食中毒の新しい制御法開発を目指したい。

## A. 研究目的

ウェルシュ菌はガス壊疽など創傷感染症を引き起こす他、経口感染して腸管内感染症をも引き起こす。腸管内感染症としてはトリの壊死性腸炎やウシのエンテロトキセミアが知られるが、ヒトでは本菌は食品媒介性の下痢症を引き起こす。これはウェルシュ菌食中毒と呼ばれ、その原因菌は特に A 型ウェルシュ菌に分類されるエンテロトキシン産生性ウェルシュ菌に限られる。ウェルシュ菌食中毒の原因食品は、カレー、シチューなど加熱加工食品が中心で、また大規模食品調理施設が関与する例が多いため、厚生労働省に指定されている食中毒原因細菌のうち、1 件あたりの患者数をもっとも多いことを特徴とする<sup>1)</sup>。従って、ウェルシュ菌食中毒の制御には、大きな意義がある。

ウェ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。本食中毒の発生機序として、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<sup>1)</sup>。ウェルシュ菌エンテロトキシンの産生は、菌が芽胞形成する過程と共制御されていて、つまり芽胞を形成する条件下でのみエンテロトキシン産生が起こる。これは芽胞形成に至るシグナル伝達系の下流にエンテロトキシン産生の制御系が置かれていることが原因である。つまり芽胞形成を人為的

に制御することができれば食中毒の制御が可能になる。ウェルシュ菌が芽胞形成する際には様々な環境因子がこれを制御していることが、試験管内での研究によって報告されてきた。しかしウェルシュ菌が実際に消化管内環境においてどのような環境因子により芽胞形成するのかについてはほとんど報告が無かった。

本厚生労働科学研究では、特に上記 4) および 5) の過程に着目して研究を展開してきた。前年度までにウェルシュ菌標準株を用いて *in vitro* 感染実験系を構築し、菌は消化管内では宿主細胞の代謝活性や宿主因子を利用して自らが増殖しやすい条件を作りだしていることを明らかにした。さらに食中毒由来株と非食中毒由来株について腸上皮バリア破壊能を比較検討すると、食中毒由来株は同じ条件下ではバリア破壊能を示さないことを明らかにした。さらに、バリア破壊能を示さない食中毒由来株でも、環境（培地）条件を変化させるとバリア破壊を引き起こすことを明らかにした。これはウェルシュ菌の病原性が環境条件に厳密に制御されていること、またウェルシュ菌が下痢症を引き起こすためには、腸管内にある環境因子が非常に重要であることを示している。

本年度は *in vitro* 感染実験系を使用して消化管環境に存在する様々な因子の芽胞形成・毒素産生への影響を調べた。また、この *in vitro* 感染実験系が環境-ウェルシュ菌-腸管上皮細胞の 3 者の相互作用を解析するのに適している利点を活かし、エンテロトキシンがウェルシュ菌感染症に果た

す新たな役割を調べるべく、その解析に必要なとなる材料を作成し、今後の実験に対する準備を完了した。

## B. 実験方法

### 1. ウェルシュ菌と菌数測定

本年後の実験では主に食中毒由来の NCTC8239 株、SM101 株を用いた。菌株は FTG 培地で培養後、PBS で洗浄してから DMEM/SS (後述) に懸濁し下記の種類の実験に用いた。培養後の栄養型菌、芽胞の菌数算出には colony forming unit (CFU) 法を用いた。栄養型菌の算出には培養液をそのまま 10 倍階段希釈し、その 50  $\mu$ l を brain heart infusion 寒天培地へ接種、嫌氣的に 16 ~ 24 時間培養し、培地上のコロニー数を計測した。芽胞数の検出には、培養液を 75°C、20 分間加熱処理後、栄養型と同様に 10 倍階段希釈を行って CFU を算出した。総菌数は栄養型菌数と芽胞数の和とした。

### 2. *In vitro* ウェルシュ菌感染実験 (共培養系)

ヒト結腸由来細胞株 Caco-2 細胞は、10% ウシ胎児血清 (FCS) 含有ダルベッコ MEM (DMEM) を用いて培養した。24 ウェル・プレートに細胞を播種し、3-4 日間培養した。この細胞の培地をグルコース不含 DMEM 培地 + 0.4% 溶性デンプン (DMEM/SS) に換え、1 時間培養した。ここへ FTG 培地で前培養したウェルシュ菌を接種し、様々な時間で培養後のウェルシュ菌栄養型菌数、芽胞数を上述の方法で測定した。

### 3. ウェルシュ菌の試験管培養系

ウェルシュ菌の芽胞形成あるいはエンテロトキシン産生に対する宿主細胞の影響を調べるために、宿主細胞の存在しない培養系として試験管培養系を使用した。共培養系と同様に FTG 培地で前培養した菌を PBS で洗浄し、DMEM/SS に懸濁した。10 ml の DMEM/SS を中試験管に入れ、そこへ上記菌液 1 ml を加え 37°C で静置培養した。培養後の培養液中の栄養型菌数、芽胞数を上述の CFU 法で算出した。

### 4. ウェルシュ菌エンテロトキシンの測定

デンカ生研のラテックス凝集試験法を用いて、培養液中のエンテロトキシン濃度を測定した。また、ウサギ抗エンテロトキシン抗体を用いて、ウエスタンブロット法によりエンテロトキシンを免疫学的に検出した。

### 5. エンテロトキシン遺伝子破壊株の調整

エンテロトキシン遺伝子破壊株の調整には市販のキット (TargeTron Gene Knockout System、Sigma-Aldrich) を使用した。遺伝子破壊に必要なとなるプライマ-の設計には TargeTron Design Site (<http://www.sigma-genosys.com/targetron/>) を利用し、破壊株作成はメーカーの指定する方法に従った。

## C. 結果

### 1. 胆汁酸の芽胞形成促進作用

前年度までに培地中のグルコースが芽胞形成を抑制していることを見出した

ため、グルコースを溶性デンプンに置き換えた DMEM/SS 培地をウェルシュ菌の感染モデル系に使用したが、この条件下では十分な芽胞形成は認められなかった（昨年度の報告書に記載）。これは、消化管環境や芽胞形成培地である Duncan-Strong 培地と比較して、DMEM/SS には芽胞形成を誘導するために必要な因子が欠けていると考え、特に消化管環境に存在する種々の因子に着目し、DMEM/SS 培地中の芽胞形成をさらに促進する因子を探索した。その結果、培地へ胆汁酸の一種、デオキシコール酸を添加すると、芽胞形成が数百倍に上昇することを見出した（図1）。この芽胞形成促進効果はわずか 10  $\mu$ M の濃度で有意に確認でき、ウェルシュ菌がごく僅かな濃度のデオキシコール酸を認識できることが示された。このデオキシコール酸はエンテロトキシン産生も促進することも示された（図2）。

胆汁酸は幾つかの物質の混合物である。そこで胆汁酸成分それぞれの芽胞形成促進効果を比較検討した。デオキシコール酸、コール酸、ケノデオキシコール酸の順に高い誘導能を認めたが、グリココール酸、タウロコール酸は誘導能が低いことがわかった（図3）。また、エンテロトキシン産生誘導能についても、芽胞形成誘導の結果とほぼ一致した（図4）。以上の結果、ウェルシュ菌の芽胞形成・毒素産生は、グルコースによる負の制御を解除しても充分には発現しないが、消化管由来因子である胆汁酸の刺激により、劇的にその形成・産生が誘導されることが明らかになった。

また、その効果は胆汁酸の種類により異なり、抱合型胆汁酸で誘導活性が低い、非抱合型で高い誘導能を有する傾向があること、1次胆汁酸、2次胆汁酸の違いでは明確な誘導活性の差は認められないことが明らかになった。

## 2. 宿主細胞の影響

本研究で開発した *in vitro* 実験系は、初めてウェルシュ菌食中毒の過程を *in vitro* で解析できる新規な実験系である（特許出願済み）。そこで、通常の試験管培養系とこの *in vitro* 感染系とを比較して、宿主細胞がウェルシュ菌感染に具体的にどのような影響を与えているかを調べようとした。まず、試験管培養の系ではデオキシコール酸の有無は芽胞形成・エンテロトキシン産生の経時的変化に大きく影響を与えなかった。一方、細胞の存在する共培養系では、デオキシコール酸を添加しない時の芽胞形成・エンテロトキシン産生は低く抑えられ、デオキシコール酸がこの抑制を解除するという結果が得られた（図5、6）。

## 3. ウェルシュ菌エンテロトキシン遺伝子破壊株の作成

前年度までに食中毒株は環境特異的にバリア破壊能を発現することを明らかにした。この結果は、培地中のグルコースを取り除くことにより芽胞形成とエンテロトキシン誘導が生じ、産生されたエンテロトキシンの作用によって Caco-2 細胞が障害を受け、結果としてバリア機能が低下したと解釈できるが、そのことを明確には証

明できていなかった。バリア破壊という現象は下痢症発症につながる重要な表現形なので、何がバリア破壊を引き起こしたか明確にする必要がある。そこで、アイソジェニックなエンテロトキシン遺伝子破壊株を作成して上記結果の理由を明らかにすることにした。

遺伝子破壊株の作成には市販のキットを用いた。その結果、エンテロトキシン遺伝子中にイントロンが挿入された遺伝子破壊株が得られ（PCR で遺伝子破壊を確認）、これがエンテロトキシンを産生しないことを確認した。さらにこの破壊株に、プラスミドを介してエンテロトキシン遺伝子をトランスに相補した相補株の調製も終了し、これらの菌株と *in vitro* 実験系を使用することで、ウェルシュ菌感染過程におけるエンテロトキシンの影響を検討する準備が整った（図7）。

#### D. 考察

昨年度までにウェルシュ菌の感染現象を *in vitro* で研究するための実験系を作成し、これが消化管内の食中毒発生過程を再現する潜在性を持つことを確認した。このような実験系はこれまでに報告されておらず、これを特許出願して先行性を確保した。

確立した実験系を用いて調べたところ、糖代謝が芽胞形成・エンテロトキシン産生の鍵を握ることが確認できたが、そのみでは十分に芽胞形成を誘導できなかった。今年度は糖以外の何が芽胞形成を促進す

るか調べたところ、胆汁酸が非常に強い芽胞形成・エンテロトキシン産生の誘導因子であることを明らかにした。その効果はわずか数 $\mu\text{M}$ で現れ10 $\mu\text{M}$ 以上で最大に達した。この濃度は胆汁酸の限界ミセル濃度よりかなり低く、単にミセル形成がその効果を司っているのでは無いことが伺われた。おそらくウェルシュ菌は胆汁酸を分子として認識する機構を持ち、環境中の胆汁酸を感知してグローバルな遺伝子発現調節を行うシステムを持っていると考えられる。これは、ウェルシュ菌が消化管環境を1つの niche として捕らえ、ここへ適応し、分化（芽胞形成）しつつ毒素産生することが、菌のライフサイクルの1つになっていることを強く示唆している。

胆汁酸の一部は肝臓で合成される際にアミノ酸により「抱合」される。また胆嚢から消化管へ分泌された後、腸内細菌の作用により修飾を受け、1次胆汁酸から2次胆汁酸へと代謝される。胆汁酸に含まれる様々な分子種について、ウェルシュ菌の芽胞形成・エンテロトキシン産生誘導効果について比較検討したところ、1次胆汁酸、2次胆汁酸による効果に大きな違いはないと思われた。しかし抱合型胆汁酸（グリココール酸、タウロコール酸）で比較的誘導効果が低く、この結果に何らかの生理的な意味があることも示唆された。この点は今後の研究によって明らかにすべき点であると考えている。

過去の研究においてウェルシュ菌の芽胞形成に影響を与える因子が報告されている。しかし実際にウェルシュ菌が芽胞を

形成するのは消化管内で、そこには宿主細胞や宿主由来因子が存在している。にも関わらず、それら宿主由来因子の影響を調べた研究はほとんどない。本研究で開発した実験系は宿主細胞の存在下で芽胞形成を確認する新しい系であり、これまでに知られていない現象を明らかにできると考えた。まず、ウェルシュ菌の芽胞形成における宿主細胞の影響について検討した。同じ培地環境中で、一方は従来法による試験管培養で、他方は宿主細胞の存在下で、両条件下の芽胞形成における違いを調べると、宿主細胞の存在下では芽胞形成が抑制されている結果を得た。しかしここへデオキシコール酸（胆汁酸）を加えると、その抑制効果が消失し、試験管培養と同等の芽胞形成が認められた。宿主細胞による抑制効果は、宿主がウェルシュ菌の芽胞形成を抑え感染による下痢発症を回避しようとしているようにも見える。そしてウェルシュ菌は、その抑制圧力から逃れるために、胆汁酸を利用した芽胞形成促進システムを獲得したと考えることもできる。本研究により初めて、ウェルシュ菌食中毒においてこのような宿主と菌の共進化の過程が見えるようになった。今後本研究をさらに推進することで、これまで認識されてこなかったウェルシュ菌と宿主の相互作用メカニズムが明らかにされることが期待される。得られた情報から、新しいウェルシュ菌食中毒の制御法開発につながるかも知れない。

#### 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、「食品衛生学第二版」恒星社厚生閣、東京（2007）

#### G. 研究発表

なし。

#### H. 学会発表

- 1) 星 英之、安木真世、近藤香織、門間千枝、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ウェルシュ菌エンテロトキシンの発現誘導」第 33 回日本食品微生物学会学術総会、平成 24 年 10 月、福岡
- 2) 安木真世、星英之、山本茂貴、鎌田洋一、三宅眞実、「*In vitro* 感染モデルにおける *Clostridium perfringens* 食中毒株の芽胞形成に対する胆汁酸の影響」第 86 回日本細菌学会総会、平成 25 年 3 月、千葉

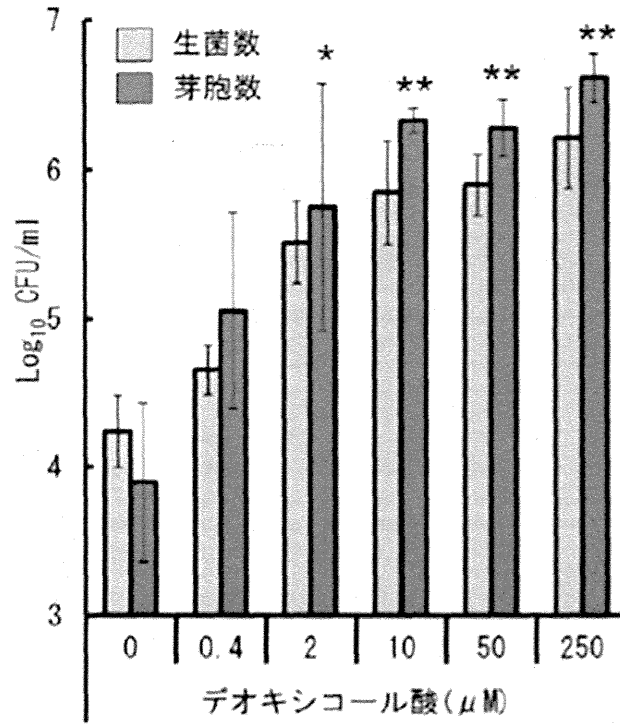
#### I. 知的所有権の取得情報

特許申請

三宅眞実、星 英之、安木真世、鎌田洋一「芽胞形成菌の培養方法」特願

2012-181901、平成 24 年 8 月 20 日出願

図1 デオキシコール酸添加による芽胞形成の促進



\*: p<0.05, \*\*: p<0.01, vs 0 μM

図2 デオキシコール酸添加によるエンテロトキシン産生の亢進

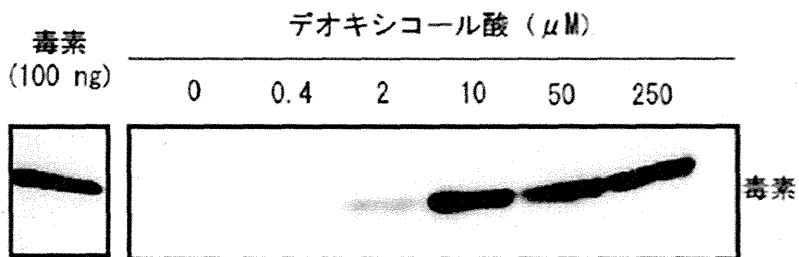




図3 各種胆汁酸の芽胞形成への影響

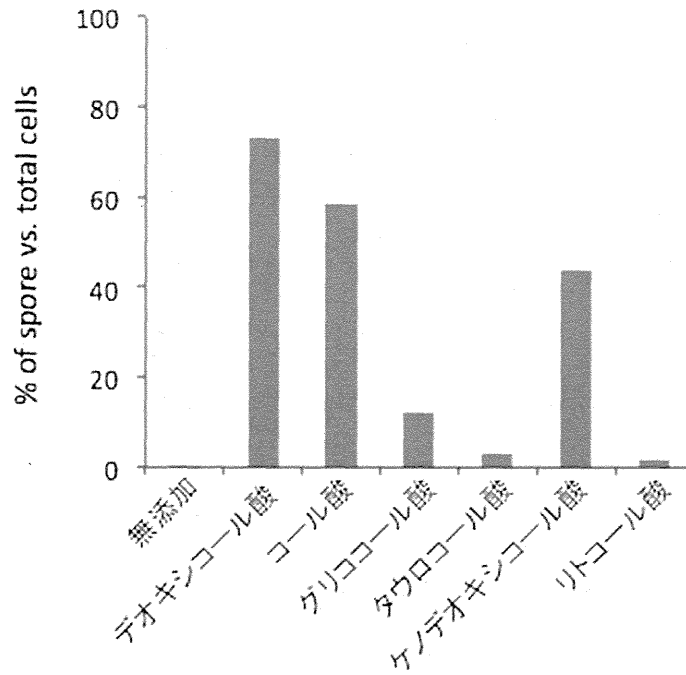


図4 各種胆汁酸の毒素産生への影響

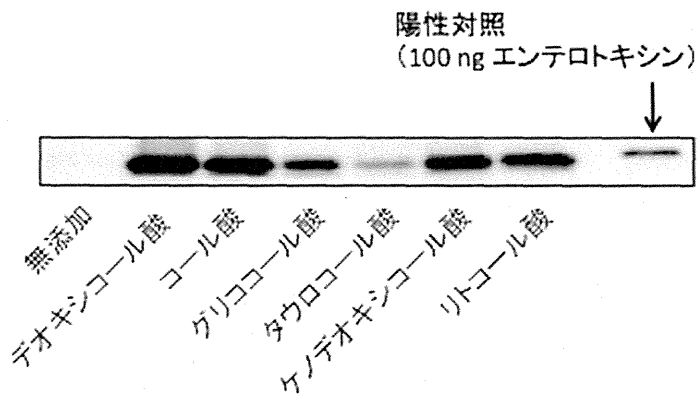


図5 宿主細胞の芽胞形成への影響

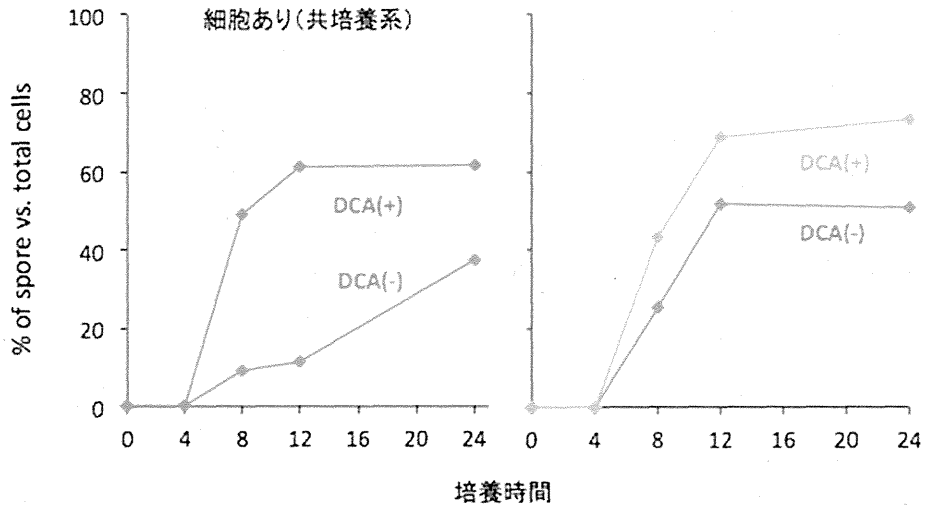
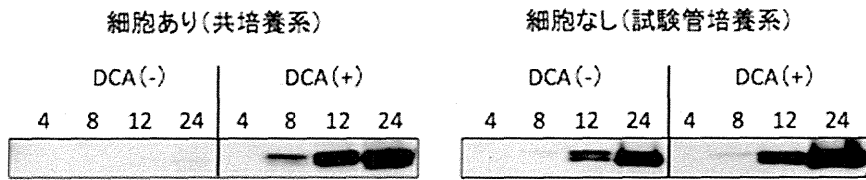


図6 宿主細胞の毒素産生への影響

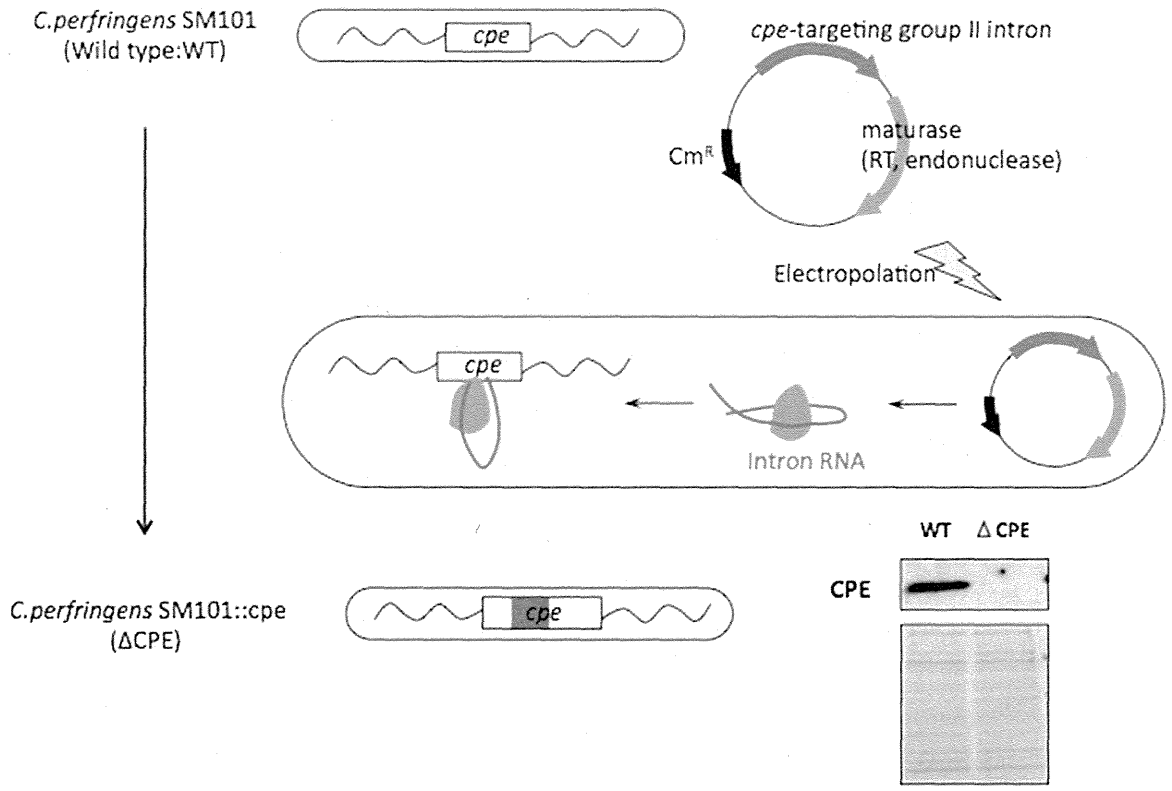
—Western blotによるエンテロトキシンの検出—



DCA, デオキシコール酸

数字は培養時間を表す

図7 Targetronを用いたCPE欠損株の作製



厚生労働科学研究補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究

平成24年度 分担研究報告書

ウエルシュ菌新型エンテロトキシンの細胞毒性の解析

国立医薬品食品衛生研究所

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

「食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究」

分担研究報告書

ウエルシュ菌新型エンテロトキシンの細胞毒性の解析

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 室長

協力研究者 門間 千枝 東京都健康安全研究センター 微生物部 主任研究員  
仲真 晶子 東京都健康安全研究センター 微生物部 科長  
甲斐 明美 東京都健康安全研究センター 微生物部 部長  
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  
川上 浩 共立女子大学 家政学部 教授  
大塚 朋美 共立女子大学 家政学部 学部生

研究要旨：ウエルシュ菌食中毒は、下痢と腹痛を主症状とする大規模食中毒で、菌が産生するエンテロトキシンが、症状発現の直接の原因物質となっている。近年、新型エンテロトキシンによる食中毒が報告されている。事例菌株の遺伝子解析より、新型エンテロトキシンが、スピロフォルム菌が産生するイオタ毒素様毒素を構成する 2 つのコンポーネント遺伝子 (Sa および Sb) と相同性を示すことが示唆されている。本分担研究では、新型エンテロトキシンの細胞毒性発現機構の解析を目的とした基礎的研究を行った。マウス結合組織由来 L929 細胞を用いて、毒素添加後の形態変化と致死毒性を検討した。組み換えコンポーネントタンパク質に対する抗血清による中和試験により、事例株の W5052 株が新型エンテロトキシンを産生されているか検討した。L929 細胞は低濃度の毒素添加で球形化し、高濃度では細胞の断片が多数観察された。この時、形態を維持して死滅している細胞が観察されなかったことから、新型エンテロトキシンによって細胞が球形化し、細胞が死滅すると直ちに細胞が崩壊すると考えられた。中和試験より毒力面において培養液中に新型エンテロトキシンのコンポーネント a が含まれていることが確認された。

## A. 研究目的

ウエルシュ菌食中毒は菌が産生するエンテロトキシンによる生体内毒素型食中毒である。主症状は下痢と腹痛であり、嘔吐や発熱などの症状はほとんど見られない。通常 6~18 時間、平均 10 時間の潜伏期間を経て発病し、1~2 日で症状が回復する程度の軽症であることが多い。ウエルシュ菌食中毒は給食施設やレストラン、病院など大量調理を行う施設で起こることが多く、食肉や魚介類などを使った調理品や大量に加熱調理後にそのまま室温で放置されている食品が主な原因食品である。そのためウエルシュ菌食中毒は発生件数に対して患者数が多いことが特徴である<sup>1)</sup>。

ウエルシュ菌食中毒の原因菌であるウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) はヒトをはじめ多くの動物の大腸内常在菌であり、下水、河川、海、耕地などの自然界にも広く分布する<sup>1)</sup>。同菌はグラム陽性の偏性嫌気性桿菌であり、芽胞を形成する。同菌の増殖至適温度は 43~47°C、増殖至適 pH は 7.2 であり、至適条件下での世代時間は 10~12 分と増殖速度が速い<sup>2)</sup>。ウエルシュ菌は少なくとも 14 種類の毒素を産生することが知られており、そのうち主要な毒素である  $\alpha$ 、

$\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\iota$  毒素の産生能の違いにより A 型から E 型までの 5 型に分類される<sup>3)</sup>。このうちヒト食中毒の原因となるのは主に  $\alpha$  毒素を産生すると定義されている A 型

であり、下痢原性毒素であるエンテロトキシンを産生する菌のみが食中毒の原因菌となる。食品中で大量に増殖したウエルシュ菌が摂取され、腸管内で菌が定着し、増殖後、芽胞を形成する際に産生されたエンテロトキシンによって下痢症状が発現する。毒素そのものは熱に弱く、65°C・10 分間で破壊されるが、芽胞は極めて耐熱性があり 100°C・1~6 時間の加熱にも耐えるといわれている<sup>4)</sup>。

従来のエンテロトキシンとは異なる、新型のエンテロトキシンによると推定されるウエルシュ菌食中毒が、門間らにより報告されている。1997 年 10 月および 2003 年 6 月に東京都内で発生した食中毒事例は、潜伏時間や症状からウエルシュ菌食中毒が疑われた。1997 年 10 月の事例では、29 件中 11 件 (37.9%)、2003 年 6 月の事例では 4 件中 4 件 (100%) から耐熱性 A 型ウエルシュ菌が検出された。分離されたウエルシュ菌は、既知エンテロトキシン産生性およびその遺伝子が、Polymerase Chain Reaction (PCR 法) および Reversed Passive Latex Agglutination Test (RPLA 法) でそれぞれ陰性であった。しかし、ウサギ腸管ループ試験により菌培養上清中に下痢原性が確認され、その活性は  $\alpha$  抗毒素血清では中和されなかった。本毒素は、分子量 50,000~100,000 と推定され、60°C、5 分間の加熱、アルカリ処理 (pH 11.5)、プロナーゼ処理により失活したが、トリプシン処理では失活しなかった<sup>5)</sup>。さらに、野坂による細胞毒性試験では、既知エンテロトキシンに

対して陰性であった L929 細胞が、新型エンテロトキシンに対しては陽性反応を示した。新型エンテロトキシンに 2 種類以上の毒素タンパク質が存在する可能性が示唆された<sup>6)</sup>。また、鈴木による細胞毒性実験より、新型エンテロトキシンは既知エンテロトキシンとは異なる受容体を介して細胞障害を引き起こし、新型エンテロトキシンは既知エンテロトキシンと細胞毒性発現機構が異なることが示唆された<sup>7)</sup>。

国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部の分析から、新型エンテロトキシンの毒素候補遺伝子のうち、2 種はウエルシュ菌と同属のスピロフォルム菌 (*Clostridium spiroforme*) から産生されるイオタ毒素様毒素を構成する 2 つのコンポーネント遺伝子と相同性を示すことが明らかとなり、さらに両コンポーネントの遺伝子のクローニングと組み換えタンパク質が作製された(第 60 回日本細菌学会で発表、2013)。スピロフォルム菌は、ヒトに対しての病原性は確認されていないが、ウサギや齧歯類の実験動物に腸性中毒症を引き起こす。本菌による下痢症は、急激に起こる水様性の下痢であり、発症してからまもなく死亡するケースが多い。腸性中毒症のウサギから単離したスピロフォルム菌は培養液中に下痢を誘発する毒素を産生し、この毒素はウエルシュ菌イオタ毒素に対する抗血清で中和されることから、ウエルシュ菌イオタ毒素に類似していることが明らかになっている<sup>8)</sup>。

新型エンテロトキシンの詳細は不明な点が多く、今後どのような食中毒症状を起こすか把握できていないため、大変危険である。そこで本研究では、事例より分離された新型エンテロトキシンを産生するウエルシュ菌 W5052 株を用いて、新型エンテロトキシンの細胞毒性機構と毒素産生性の解析を目的とした基礎的研究を行った。

組み換えコーポネントタンパク質に対する抗血清による中和試験およびウエスタンプロット法により、ウエルシュ菌 W5052 株から新型エンテロトキシンが産生されているか検討した。同株の部分精製品を用いた細胞毒性実験により L929 細胞の形態変化を解析した。また、ウエルシュ菌 W5052 株の培養日数を変えることにより、同株の培養液中における毒素産生動態を解析した。

## B. 実験方法

### 1. ウエルシュ菌 W5052 株

東京都健康安全研究センター・門間千枝博士より分与を受けた新型エンテロトキシン産生ウエルシュ菌 W5052 株を以下に示す培地と方法で培養し、新型エンテロトキシン部分精製品を調製した。培養上清を 70%飽和硫酸アンモニウム塩析により精製し、実験に用いた。

### 2. ウエルシュ菌 W5052 株新型エンテロトキシンの産生用培地

CW 寒天培地

CW 寒天培地 (日水製薬) 12 g を Milli-Q

水 180 ml に加温融解し、121 °C・15 分間高圧蒸気滅菌をした。溶解滅菌した培地を 50 °C に保ち、無菌卵黄液（極東製薬工業）を 20 ml 加えてよく混合し、滅菌シャーレ（IWAKI）に 20 ml ずつ分注した。これを CW 寒天培地として用いた。

#### Cooked Meat Medium

Milli-Q 水 10 ml あたり、Cooked Meat Medium（以後 CMM と略記：DIFCO）1.25 g を加え、肉片を膨張させるために 15 分間放置した。シリコン栓をし、121 °C・15 分間高圧蒸気滅菌をした。これを CMM 培地として使用した。

#### Brain Heart Infusion

Milli-Q 水 100 ml あたり、Brain Heart Infusion（以後 BHI と略記：BD）を 3.7 g 加え、加温溶解した。試験管に 10 ml ずつ分注し、シリコン栓をして 121 °C・15 分間高圧蒸気滅菌後、流水で急冷した。これを BHI 培地とした。

#### 変法 DS 培地

Milli-Q 水 1080 ml あたり、酵母エキス（BD）4.8 g、バクトペクトン（BD）8 g、可溶性澱粉（DIFCO）4.8 g、リン酸水素二ナトリウム（和光純薬）6 g、チオグリコール酸ナトリウム（関東化学）1.2 g を加えて加温溶解した。手で触れられる温度まで冷却後、pH7.5~7.6 付近に調節した。丸底フラスコに 270 ml ずつ分注後、シリコン栓をして 121 °C・15 分間高圧蒸気滅菌した。また、Milli-Q 水 200 ml あたり炭酸水素ナトリウム（和光純薬）

10 g を混合した 5%炭酸水素ナトリウム溶液も同時に 121 °C・15 分間高圧蒸気滅菌した。高圧蒸気滅菌後、流水にて急冷し、丸底フラスコに 5 %炭酸水素ナトリウム溶液を 30 ml 無菌的に加えた。これを変法 DS 培地とした。

#### 3. 細胞

ヒューマンサイエンス振興財団より購入した、マウス結合組織由来 L929 細胞を使用した。

#### 4. 細胞培養用培地

DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM（以後 DMEM と略記：SIGMA）に 5%非働化ウシ胎児血清（以後 FBS と略記：GIBCO）、1% MEM NON-ESSENTIAL AMINO ACID（以後 NEAA と略記：SIGMA）、1% Penicillin-Streptomycin（以後 P/S と略記：GIBCO）を加え、よく混合した。以後 5% FBS-NEAA-P/S-DMEM と略記する。

#### 5. 新型エンテロトキシン組み換え体とウサギ抗血清

新型エンテロトキシンはコンポーネント a とコンポーネント b から構成されている。国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部で作製されたコンポーネント a とコンポーネント b の組み換え体を実験に用いた。以後コンポーネント a の組み換え体を Ia、コンポーネント b の組み換え体を Ib と略記する。

同様に、国立医薬品食品衛生研究所衛



生微生物部では、組み換え体 Ia および組み換え体 Ib に対してウサギ抗血清を作製してある。以後 Ia のウサギ抗血清を抗血清 a、Ib のウサギ抗血清を抗血清 b と略記する。抗体精製用カラム (GE Healthcare) を用いて、これらのウサギ抗血清から IgG 抗体を調製した。

## 6. 細胞培養

液体窒素に凍結保存中の L929 細胞を 37 °C に調整した湯浴中で融解後、Phosphate buffered saline (以後 PBS) 5 ml で洗浄し 15 ml 遠心管 (Corning) に移し 1,000 rpm で 3 分間遠心分離を行った。上清を除去し、細胞をほぐした後、5% FBS-NEAA-P/S-DMEM 培地を 5 ml 加えた。数回ピペッティングをし、細胞懸濁液をプラスチックディッシュ (60 mm, TPP) に移し、37 °C・5%炭酸ガス条件下で培養した。

細胞がディッシュ底面一杯に増殖した状態まで培養後、培地を除去し、PBS を 5 ml 加えて静かに洗浄後、除去した。同様の操作で洗浄・除去を 3 回繰り返した。0.05%トリプシン-EDTA (GIBCO) 1 ml を加えてよく馴染ませ、37 °C・5%炭酸ガス条件下で 5 分間静置した。ディッシュを軽く揺すり、顕微鏡観察により細胞が剥がれていることを確認し、4 ml の培地を加えてトリプシンの活性を止めた。ディッシュの底面を洗浄するように数回ピペッティングを繰り返した後、15 ml 遠心管 (Corning) に移し 1,000 rpm で 3 分間遠心分離を行った。上清を除去して細胞

をほぐしたあと、培地を 5 ml 加えて再び遠心分離を行った。上清を除去し、培地 5 ml で懸濁したものを試験用細胞とした。

## 7. 毒素産生のためのウエルシュ菌 W5052 株の培養

液体窒素に凍結保存中のウエルシュ菌 W5052 株を取り出し、凍った状態の表面を白金耳で少量削り取り、37 °C 条件下で CW 寒天培地 (日水製薬) に培養した。アネロボックス中で一晚嫌気培養後、CW 寒天培地 (日水製薬) からコロニーを 1 つ採り、CMM 培地 (DIFCO) が入った試験管底に接種、37 °C 条件下で培養した。一晚培養後、濁り・ガス発生を確認し、流動パラフィンを 1 ml 重層した後、37 °C 条件下で保存した。

CMM 培地 (DIFCO) の肉片部分までピペットを差し込み、数回ピペッティング後、懸濁液 0.25 ml を BHI 培地 (BD) が入った試験管の底に接種し、37 °C 条件下で培養した。一晚培養後、BHI 培地 (BD) から懸濁液を 0.5 ml 採り、変法 DS 培地 300 ml が入った丸底フラスコ底に接種し、37 °C 条件下で日数を変えて培養した。培養後、丸底フラスコ内の沈殿と上清をよく混合し、500 ml 遠心管に移し、4 °C・5,000 rpm で 30 分間遠心分離した。遠心終了後、上清を回収した。

## 8. 硫酸アンモニウム沈殿画分の調製

精製した培養上清をメスシリンダーに回収し、容積を量った。培養上清を 1 L

容器に移し、マグネットスターラーで攪拌しながら少量ずつ硫酸アンモニウムを加えた。70%飽和硫酸アンモニウムに調整するために、培養上清 1 L に対して 472 g の割合で硫酸アンモニウムを加えた。全ての硫酸アンモニウムを加えた後、冷蔵庫内に一晚静置した。溶液を軽く混合後、遠心管に移し、8,000 rpm で 30 分間遠心分離をした。遠心終了後、ペレットを崩さないように上清を捨てた。遠心管に PBS 5 ml を入れ、振り動かしながらペレットを溶かした。この時、氷で冷やしながら行った。試料を透析膜 (三光純薬) に移し、PBS 2 L の中に入れ、冷蔵庫中でマグネットスターラーによる攪拌を一晚行った。試料を 50 ml 遠心管に移し、4 °C・8,000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清を滅菌凍結保存チューブ (アシスト) に 1 ml ずつ分注し、硫酸アンモニウム沈殿画分として凍結保存した。

#### 9. 硫酸アンモニウム沈殿画分の濃縮

遠心式フィルターユニット (MILLIPORE) に硫酸アンモニウム沈殿画分を 8 ml 入れ、500  $\mu$ l になるまで 4 °C・4,000 rpm 遠心分離し、濃縮した。濃縮した硫酸アンモニウム沈殿画分のタンパク質濃度は 171.2 mg/ml であった。

#### 10. 細胞毒性試験

$1 \times 10^5$  cells/ml に希釈した細胞懸濁液を 24 well プレート (TPP) の各 well に 500  $\mu$ l ずつ注入し、37 °C・5%炭酸ガス条件下で一晚培養した。ウエルシュ菌

W5052 株の硫酸アンモニウム沈殿画分を 5% FBS-NEAA-P/S-DMEM 培地で 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、32 倍に段階希釈したものを、一晚培養した細胞に 50  $\mu$ l ずつ添加した。またブランクとして 1 つの well には 5% FBS-NEAA-P/S-DMEM 培地を 50  $\mu$ l 添加した。一晚培養後、細胞の形態を顕微鏡下で観察し、写真撮影した。well 内の培地を静かに回収し、トリパンブルー溶液 (WAKO) を 8 倍希釈したものの (PBS で 4 倍希釈した後、さらに 5% FBS-NEAA-P/S-DMEM 培地で 2 倍希釈した) を 550  $\mu$ l 添加した。PBS で 2 回洗浄後、PBS 500  $\mu$ l を添加し、細胞を観察した。

#### 11. ウエルシュ菌新型エンテロトキシンの細胞毒性に対する抗血清による中和試験

$1 \times 10^5$  cells/ml に希釈した L929 細胞懸濁液を 96 well プレート (TPP) の各 well に 100  $\mu$ l ずつ注入し、37 °C・5%炭酸ガス条件下で一晚培養した。

96well プレートの第 1 列から第 4 列に 5%FBS-NEAA-P/S-DMEM 培地を 40  $\mu$ l ずつ注入した。第 1 列にウサギ抗血清 a を 40  $\mu$ l ずつ添加し混合した。これを 2 倍希釈とした。十分にピペッティングした第 1 列を 40  $\mu$ l 取り、第 2 列に加え、混合した。これを 4 倍希釈とした。第 1 列から第 3 列までに濃縮したウエルシュ菌 W5052 株を 5% FBS-NEAA-P/S-DMEM 培地で希釈したものを 40  $\mu$ l ずつ添加し、第 4 列には 5% FBS-NEAA-P/S-DMEM 培地

を 40  $\mu$ l 添加してよく混合し、37  $^{\circ}$ C 条件下で 1 時間静置した。一晚細胞を培養した 96 well プレートに希釈した抗血清を 10  $\mu$ l ずつ添加し、一晚培養した。ウサギ抗血清 b においても同様に行った。生細胞数測定キット（同仁化学）を毒素処理した 96 well プレートの各 well に 10  $\mu$ l ずつ添加し、37  $^{\circ}$ C・5%炭酸ガス条件下で 1 時間静置し発色させた。プレートを 1,800 rpm で 15 分間遠心機にかけ、well 内の泡を消失させた。マイクロプレートリーダー（BIO RAD）を用いて波長 450 nm で吸光度を測定した。細胞の生死に対する添加した抗血清の毒素中和能を検討した。

同様の実験を精製したウサギ抗血清 a、ウサギ抗血清 b でも行った。

## C. 結果

### 1. ウエルシュ菌新型エンテロトキシン処理細胞の観察

L929 細胞に、希釈率が異なる硫酸アンモニウム沈殿画分（以下、画分）を添加し、細胞の形態を観察した。画分を添加しなかった細胞と、16 倍および 32 倍希釈した画分の添加では細胞の形態に差異が見られなかった。8 倍希釈画分添加で一部細胞の形状が球形化し、2 倍および 4 倍希釈添加画分ではほぼ全ての細胞の形状が球形化した。画分の濃度が濃くなるに従い、培養液中に見られる、崩壊した細胞の断片と思われる構造物が増加した（図 1-1）。

死滅した細胞が染色されるトリパンブルー溶液を用いて画分で処理した細胞の観察をした。2 倍および 4 倍希釈画分液を添加した細胞の一部がトリパンブルー溶液により染色されたが、多くの細胞は染色されなかった。また、上述の崩壊した細胞の断片はトリパンブルー染色処理では見られなかった（図 1-2）。

### 2. ウエルシュ菌新型エンテロトキシンの細胞毒性に対する抗血清による中和試験

抗血清を加えた硫酸アンモニウム沈殿画分で細胞を処理し、細胞の生存数を求めた。生存数は生細胞数判定キットの反応液の吸光度で表した。毒素処理も抗血清処理もしなかった well の吸光度は 1.7204、抗血清 a を添加せず、画分を添加した細胞の吸光度は 0.5500 であった。それに対して抗血清 a を添加した細胞の吸光度は 2 倍希釈 0.8546、4 倍希釈 0.8750 であった（図 2-1）。以上の結果は、抗血清 a の添加によって細胞の致死毒性が軽減したことを示している。

同様に抗血清 b の効果も検討した。毒素処理も抗血清処理もしなかった well の吸光度は 1.4934、抗血清 b を添加せず、画分を添加した細胞の吸光度は 0.5712 であった。それに対して抗血清 b を添加した細胞の吸光度は 2 倍希釈 0.2630、4 倍希釈 0.4044 であった（図 2-2）。以上の結果は、抗血清によって細胞の致死毒性は抑制されず、むしろ増加したことを示している。

抗血清中には抗体以外に様々な不純物

も含まれているため、より正確な中和試験の成績を得るために、IgG 抗体を精製し、同様の実験を行った。毒素処理も抗 a IgG 抗体処理もしなかった well の吸光度は 1.3462、抗 a IgG 抗体を添加せず、画分を添加した細胞の吸光度は 0.5008 であった。それに対して精製した抗 a IgG 抗体（濃度 5.8 mg/ml）を添加した細胞の吸光度は IgG 2 倍希釈が 0.6372、4 倍希釈が 0.5324 であった（図 3-1）。以上の結果は、コンポーネント a に対する IgG 抗体が新型エンテロトキシンの細胞致死毒性を軽減させたことを示している。

同様に抗血清 b についても IgG 抗体として検討した。毒素処理も抗 b IgG 抗体処理もしなかった well の吸光度は 1.2928、抗 b IgG 抗体を添加せず、画分を添加した細胞の吸光度は 0.5144 であった。それに対して精製した抗 b IgG 抗体（濃度 3.2 mg/ml）を添加した細胞の吸光度は IgG 2 倍希釈が 0.4934、4 倍希釈が 0.5164 であった（図 3-2）。以上の結果は、コンポーネント b に対する IgG 抗体の添加は新型エンテロトキシンの細胞致死毒性に影響しないことを示している。

### 3. 培養液中でのコンポーネント a と b の存在

ブロットニング用膜に抗 a IgG 抗体を重層し、染色した結果、組み換え体 Ia と同じ移動度のタンパク質バンドがウエルシュ菌 W5052 株培養液中に見られた（図 4-1）。このことより、培養液中のコンポーネント a の存在が確認された。コンポ

ーネント a の分子量を算出した結果、分子量は約 46000 だった。

同様に、ブロットニング用膜に抗 b IgG 抗体を重層し、染色した結果、3 本の主要バンドが確認された（図 4-2）。このうち、中間の移動度を示すバンドが組み換え体活性化 Ib と同じ移動度であったので、培養液中のコンポーネント b の存在が確認された。分子量を算出した結果、移動度が大きい順に約 79000、83000、および 9400 であった。

### D. 考察

ウエルシュ菌はヒトや動物の大腸内常在菌であり、下水、河川、川、耕地など自然界にも広く分布する。食品中で大量に増殖したウエルシュ菌が摂取され、腸管内で菌が定着し、増殖後、芽胞を形成する際に産生されたエンテロトキシンによって下痢症状が発現する。近年、従来のエンテロトキシンとは違う新型エンテロトキシンによる食中毒事例が報告されている。本研究は、新型エンテロトキシンの細胞毒性と毒素産生性の解析を目的とした基礎的研究を行った。

新型エンテロトキシンの細胞毒性を L929 細胞の形態変化を観察することによって検討した。新型エンテロトキシンによって細胞が球形化し、毒素濃度が高くなると培養液中に崩壊した細胞の断片と思われる構造物が増加した。一方、トリパンブルー溶液によって染色した時、染色された細胞はあまり見られなかった。