

ロプレート培養系を使用した。FTG 培地で前培養した菌を PBS で洗浄し、50 μ M デオキシコール酸含有 DMEM/SS (DMEM/SS/DCA) 培地に懸濁した。これを 100 μ l/well で 96 ウェル・マイクロプレートへ加え、試験液を 100 μ l/well でさらに加えた後、37°C で嫌氣的に静置培養した。培養後の培養液をスライドガラスへ採取し、位相差顕微鏡で各検体について数視野を写真撮影した。写真は画像解析ソフトウェア ImageJ で解析し、視野中の栄養型菌数と芽胞数をその形態で定量し、得られた値から芽胞形成率を計算した。

5) ウエルシュ菌エンテロトキシンの測定

培養液中のエンテロトキシン濃度を、ウサギ抗エンテロトキシン抗体を用いたウエスタンブロット法により免疫学的に検出した。

6) DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

FTG 培地にて前培養した NCTC8239 株を共培養実験に供した。感染 0~12 時間の培養液から菌体 total RNA を抽出し精製後マイクロアレイのサンプルとした。アレイチップは公開されたゲノム情報を基にデザインした。チップ作成はアジレントテクノロジー株式会社に委託し、マイクロアレイの実施と解析は大阪大学微生物病研究所附属感染症 DNA チップ開発センターに委託した。

7) ウエルシュ菌の発現遺伝子量の解析

上記と同様に抽出した菌体 total RNA を DNase にて処理し、ランダムプライマーを用いて逆転写を行った。合成された cDNA

を用い、芽胞形成に関与する遺伝子 (*spo0A*, *spoIIAA*, *spoIIAB*, *sigF*, *sigE*, *cpe*) をターゲットとした qPCR を行った。

d) エンテロトキシン遺伝子破壊株の調製

エンテロトキシン遺伝子破壊株の調製には市販のキット (TargeTron Gene Knockout System, Sigma-Aldrich) を使用した。遺伝子破壊に必要なプライマーの設計には 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. DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

前年度までに、消化管内の環境をある程度反映した *in vitro* 実験系を開発し、その系を用いてデオキシコール酸が芽胞形成・毒素産生を強く誘導することを見いだした。そこでデオキシコール酸の作用機序を解明するために、デオキシコール酸の存在下で特異的に発現する遺伝子を調べた。菌を細胞へ感染させ、0、1、2、4、6、12 時間後に培養液を回収し、菌体 RNA を抽出して各種遺伝子発現状態を DNA マイクロアレイで調べた (図 1)。その結果芽胞形成のマスター・レギュレーターとして知られる転写因子 *spo0A* 遺伝子の下流に位置する遺伝子群が、デオキシコール酸存在下で強く発現誘導されていることが明らかになった。一方 *spo0A* 遺伝子の発現レ

ベルはデオキシコール酸の有無で同程度であった。感染 4 時間後に回収した菌体 RNA を用いた q-PCR において *spoIIAA*, *spoIIAB*, *sigF*, *sigE* ならびに *cpe* 遺伝子の発現はデオキシコール酸存在下で有意に上昇した。一方 *spo0A* 遺伝子の発現量に有意な差は認められなかった。これらの結果はマイクロアレイの結果とよく一致した(図 2)。

2. マウス糞便中の芽胞形成阻害因子の同定

本研究により様々な環境因子とウエルシュ菌の病原性発現の関係が明らかになれば、環境を人為的に操作することでウエルシュ菌食中毒発症を制御することが可能になる。これを可能にするには *in vitro* で得られた成果を、動物モデルなどを使用した *in vivo* 実験系で確認する必要がある。しかし現在までにウエルシュ菌食中毒の動物モデルは報告されていない。これまで動物モデルが確立されていない原因として、マウスなど小動物の腸管内ではウエルシュ菌食中毒菌株は十分に芽胞形成しないことが理由の 1 つに挙げられている²⁾。本研究担当者は小動物腸管内にはウエルシュ菌の芽胞形成を阻害する物質が存在するのではないかと考えた。実際、過去の論文がモルモット小腸内にウエルシュ菌芽胞形成を阻害する物質が存在する可能性について言及している³⁾。そこで、マウスの糞便を材料として、そこに含有する物質がウエルシュ菌芽胞形成に対して影響を与えるか調べた。

マウス糞便抽出液をウエルシュ菌培養系に添加すると、通常 60~80%の芽胞形成率が見られる条件下で、芽胞形成は強くかつ容量依存的に阻害された(図 3)。阻害活性は 100,000×g、1 時間の超遠心上清に残存し、限外濾過膜を使用してその分子量を推定すると、分子量 100,000 以上であると見積もられた(図 4)。また、75℃、20 分間以上の加熱でこの阻害活性は失活することが明らかになった(図 5)。これら結果は、マウス糞便中に芽胞形成を阻害する易熱性の高分子物質(以下、阻害物質と称する)が存在することを示唆している。そこでこの阻害物質の作用機序を解析した。芽胞形成が阻害物質添加により強く阻害される条件下でも、ウエルシュ菌の増殖そのものはほとんど影響を受けていなかった。Q-PCR 法により遺伝子発現解析を行うと、阻害物質は rRNA の発現量には大きな影響を与えず、しかし芽胞形成関与する遺伝子 *sigE* や、芽胞形成カスケード下流に存在するエンテロトキシンの遺伝子 *cpe* の発現を有意に抑制していた(図 6)。この結果より阻害物質は芽胞形成を転写レベルで制御していることが明らかになった。

3. エンテロトキシン遺伝子破壊株の解析

昨年度に作成したエンテロトキシン遺伝子破壊株(*cpe*(-)株)の Caco-2 細胞への細胞傷害性について調べた。まず *cpe*(-)株に *cpe* 遺伝子を相補した相補株(*cpe*(+)株)を作成した(図 7)。作製した *cpe*(-)株、*cpe*(+)株を Duncan-strong

培地にて繰り返し継代して、高率に芽胞を形成するスターター株をそれぞれについて調製した。次に共培養に用いる各菌株の感染価を揃えるため、CFU 法ならびに培養液の濁度を用いて各株における前培養時の増殖曲線を作成した。そして感染価を揃えた野生株、cpe(-)株、cpe(+)株を用いて Caco-2 細胞との共培養実験を行った。DMEM/SS/DCA 培地で感染 24 時間後に野生株ならびに cpe(+)株では広範囲において細胞の円形化ならびに detachment が認められた (図 8)。一方 cpe(-)株では同条件下では感染前と同様の細胞形態を示した (図 6)。この時の栄養型菌数ならびに芽胞数は 3 菌株とも同程度であった。また産生エンテロトキシンは野生株ならびに相補株でのみ確認された (図 9)。

D. 考察

昨年度までに胆汁酸がウエルシュ菌芽胞形成・毒素産生を強く誘導すること明らかにした。そこで今年度はまずその誘導メカニズムを解析した。芽胞形成は、芽胞形成のマスター・レギュレーターである Spo0A のリン酸化で始まり、リン酸化 Spo0A が転写因子となって下流のカスケードを活性化することが知られる。デオキシコール酸存在下で強く誘導される遺伝子を解析したところ、誘導直後 (4 時間) から Spo0A 下流の遺伝子群が総じて高発現していることが確認できた。結果は、デオキシコール酸の作用点は Spo0A 上流であるか、あるいは Spo0A そのものである

ことを示唆している。細菌が芽胞を形成する際の Spo0A 上流のカスケードについては、*Bacillus* 属細菌で詳細に解析されている。しかしウエルシュ菌など *Clostridium* 属細菌には *Bacillus* 属で同定されたシグナル分子がそもそもゲノム上に存在せず、Spo0A 上流のカスケードの詳細は不明である。本研究を継続することでウエルシュ菌の Spo0A 上流のカスケードに新たな情報が得られれば、多くの病原細菌を含む *Clostridium* 属細菌の芽胞形成に至る未知のカスケード同定が期待される。また、これまでまったく明らかにされてこなかった胆汁酸が芽胞形成を促進するメカニズムが分子レベルで明らかになることが期待できる。本研究の成果は、ウエルシュ菌が宿主体内環境の認識シグナルとして胆汁酸を利用していることを示しているが、菌側がどのようなメカニズムで胆汁酸を感知しているかを明らかにできれば、広く *Clostridium* 属細菌と宿主との共進化の過程まで明らかになることが期待される。さらに、芽胞形成に至る最初の引き金を分子レベルで理解することに繋がり、それを利用したウエルシュ菌食中毒の新しい制御法開発への大きなヒントが得られると考えている。

マウス糞便抽出液の芽胞形成への影響を調べたところ、芽胞形成を阻害する活性が確認できた。性状解析の結果、その阻害物質は易熱性の高分子であると推察された。現在この物質の本態は不明であるが、これまでマウスなど小動物でウエルシュ菌食中毒の動物モデルが作出されてい

いことには、この阻害物質が関与している可能性が疑われる。今後は糞便ではなく、マウスの消化管内容物を用いると共に、ヒト消化管内容物についてもその効果を検討し、この仮説の正当性を検証することが重要である。またこの阻害物質を同定すれば、得られた結果を基に、マウス消化管内でも十分量の芽胞形成を誘導することができるようになるかもしれない。それらの過程を経た先には、将来、マウスを用いたウエルシュ菌食中毒の動物モデルを開発することが期待できる。これは同食中毒のメカニズム解析の有力ツールとなるだけでなく、本食中毒の制御法を開発するため有用なモデルになると期待できる。

既に昨年度までに、ウエルシュ菌下痢症のモデルとなるバリア破壊実験系について報告した。この実験系では培地に含まれるグルコースを枯渇させることで、ウエルシュ菌が消化管上皮のバリア機能破壊を引き起こすことを観察している。バリア破壊は一般に下痢症のモデルになると解釈されていて、本結果はウエルシュ菌下痢症の1つのモデルとして利用可能と考えている。しかし昨年度まではこの腸上皮バリア破壊現象に、菌側のどんな因子が関与するのか明確に示すことはできていなかった。そこで昨年度作成した *cpe(-)*株と、本年度新たに作成した相補株 *cpe(+)*株を用いて、バリア破壊に関与する因子がウエルシュ菌エンテロトキシンであるのか検討した。現時点で得られている結果は、同条件下で観察される細胞障害性にはエンテロトキシンが強く関与していることを示

している。今後はエンテロトキシンが細胞障害活性だけでなくバリア破壊現象にも関与することを確認することが必要である。

本研究で得られた *cpe(-)*株、*cpe(+)*株を用いることで、ウエルシュ菌が引き起こす生物現象のうち、エンテロトキシンが関与する現象そうでない現象を区別することが可能となる。エンテロトキシンは下痢発症に大きな役割を演じていると理解されているが、これが単独で下痢発症に関与すると断言することはできていない。今後、食中毒発症を再現する動物モデルを開発し（上述）、ウエルシュ菌食中毒を実験的に再現することが可能となれば、*cpe(-)*株、*cpe(+)*株を利用して、エンテロトキシンの関与についてより科学的（物質的）に論じることが可能となろう。ウエルシュ菌食中毒株はエンテロトキシン以外にも α 毒素を産生することが知られるが、食中毒症状における α 毒素の役割についてはまったくわかっていない。本研究の延長線上にはこのように、これまで明らかになっていない因子のウエルシュ菌下痢症に対する役割を明確化することがあり、さらにエンテロトキシンの未知の機能を明確にすることも含まれている。

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)
 - 2) Uzal FA, McClane BA. Animal models to study the pathogenesis of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* infections. *Microbes Infect.* 14:1009-16, 2012.
 - 3) 坂本 憲市、森永 信一、山岸 高由、小西 健一、吉国 桂子. モルモット腸内容物培地における *Clostridium perfringens* の発育. *日本細菌学雑誌* 43: 917-926, 1988.
- sporulation of *Clostridium perfringens* *in vitro* infection model. CloSPATH 2013, Palm Beach, Qld, Australia, Sep. 2013.
 - 2) Masami Miyake, Hidenobu Hoshi, Kaori Kondo, Mayo Yasugi, Shigeki Yamamoto, and Yoichi Kamata. An *in vitro* model system for studying *Clostridium perfringens* type A infection. CloSPATH 2013, Palm Beach, Qld, Australia, Sep. 2013.
 - 3) Mayo Yasugi, Hidenobu Hoshi, Daisuke Okuzaki, Shigeki Yamamoto, Yoichi Kamata, and Masami Miyake. Mechanism of bile acid-mediated sporulation in *Clostridium perfringens*. 第 87 回日本細菌学会総会. 東京. Mar. 2014.

G. 研究発表

なし。

H. 学会発表

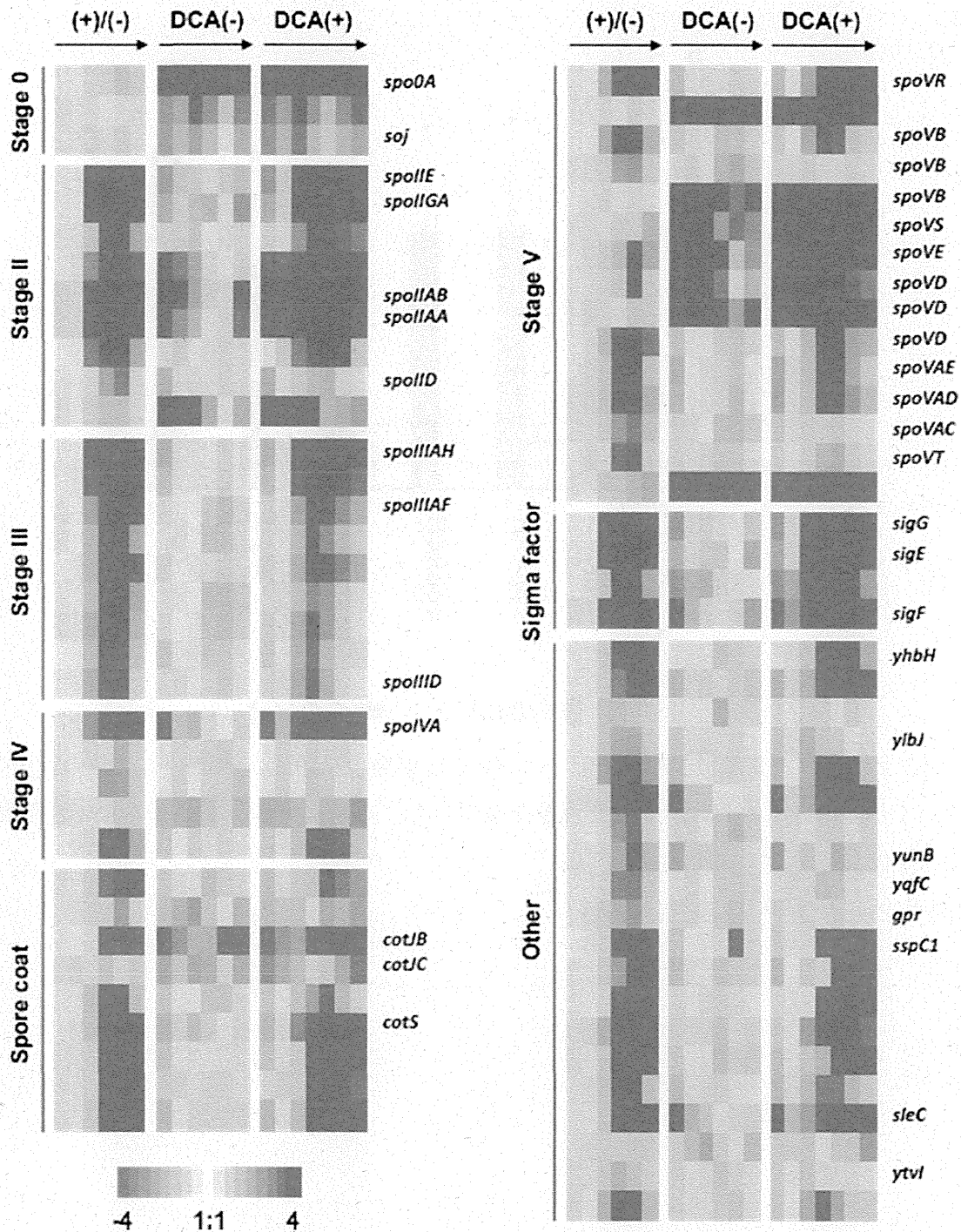
- 1) Mayo Yasugi, Hidenobu Hoshi, Shigeki Yamamoto, Yoichi Kamata, and Masami Miyake. The impact of bile acid on the

I. 知的所有権の取得情報

特許申請

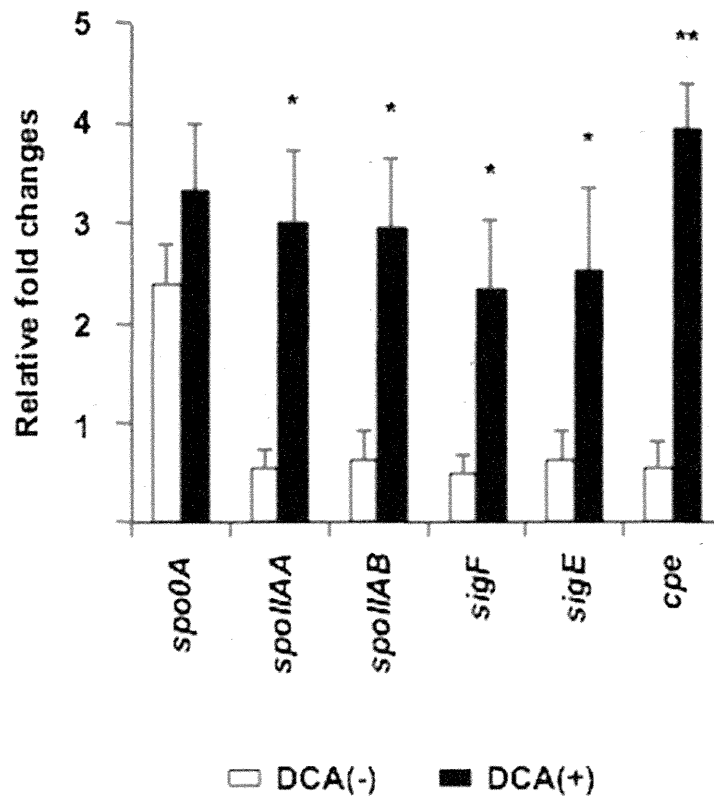
本年度該当するものなし

図1 DNAマイクロアレイ解析のヒートマップ



Stage 0~V は芽胞形成の各ステージで関与する芽胞形成関連遺伝子、Spore coat、Sigma factor も芽胞形成に関与する coat 蛋白、シグマ因子を示す。各遺伝子について 16S リボゾーム RNA 遺伝子の発現量で標準化した後、デオキシコール酸の有無での発現量比を算出したものが (+)/(-) に示されている。(+)/(-) が高いほど (赤) デオキシコール酸存在下で高く誘導されていることを意味する。

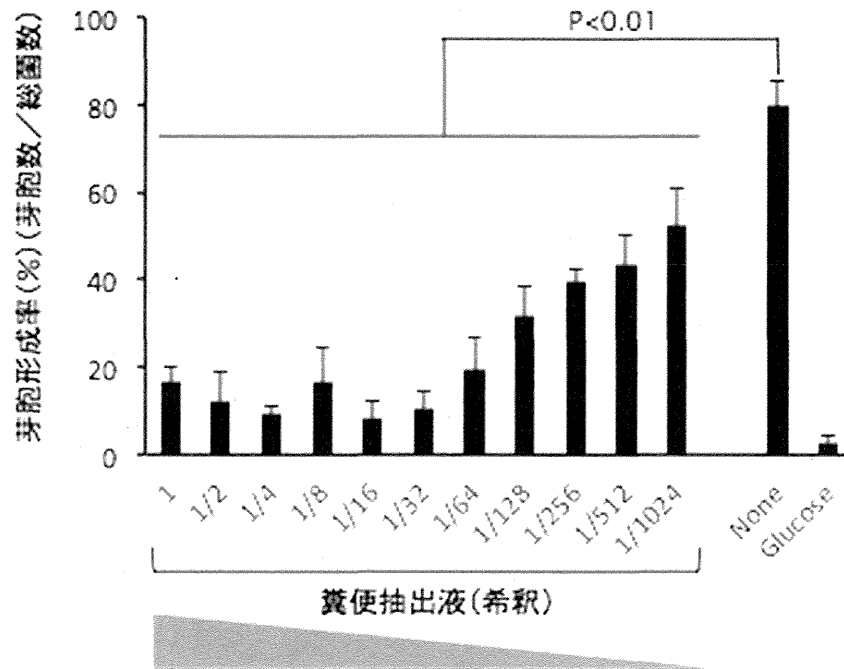
図2 q-PCRによる各遺伝子の発現量解析



DNA マイクロアレイで、デオキシコール酸存在で発現量の高かったいくつかの遺伝子についてリアルタイム PCR でその発現量を確認した。結果は 16S リボゾーム RNA の発現量で標準化して示している。

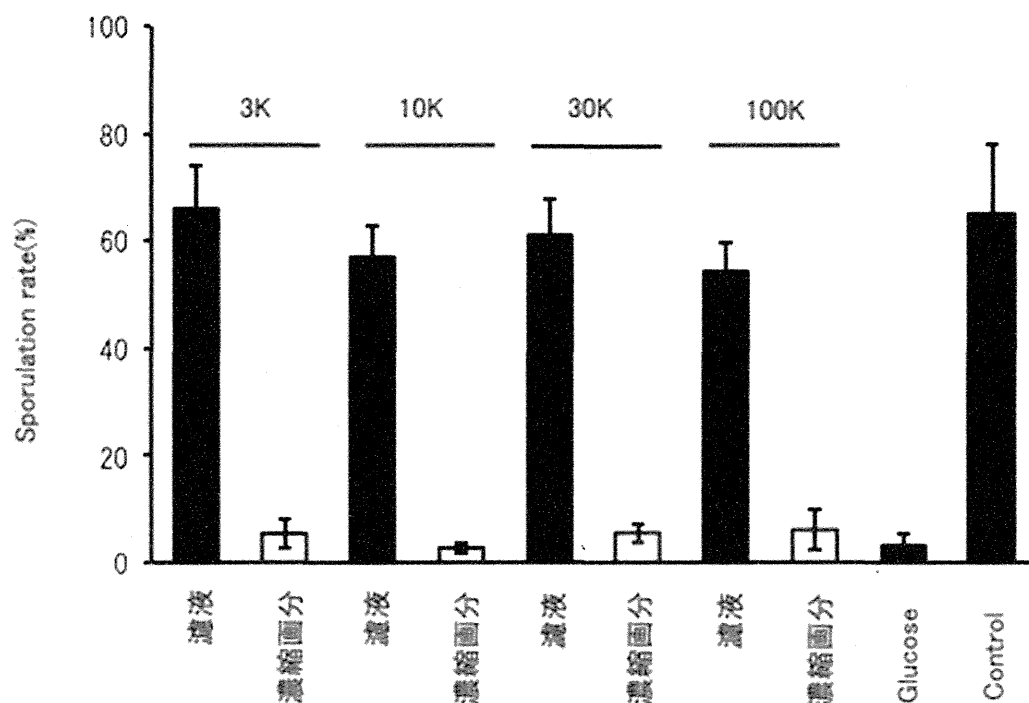
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図3 マウス糞便抽出液によるウェルシュ菌芽胞形成抑制



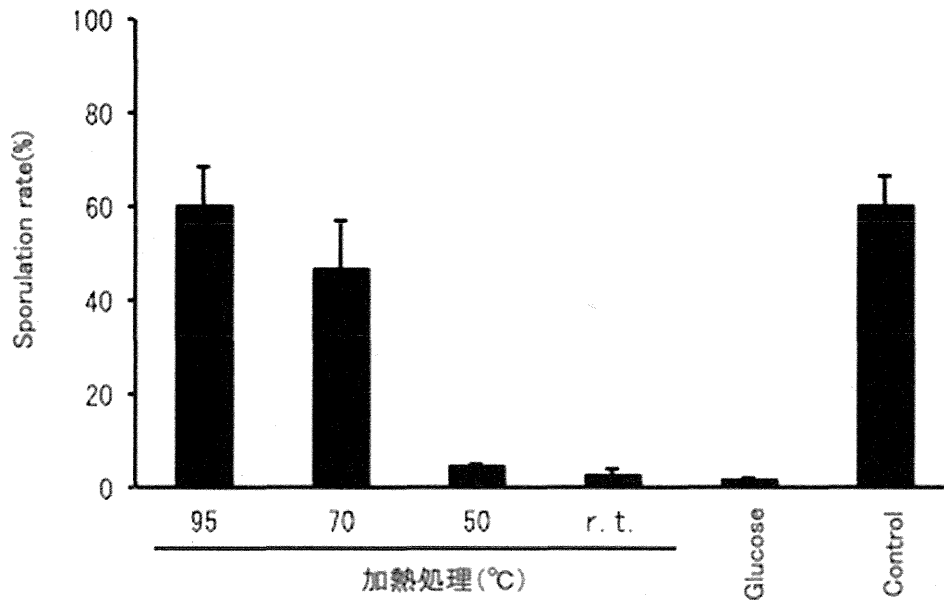
マウス糞便抽出液を2倍段階希釈した後、芽胞形成への影響を評価した。Noneは何も加えないときの芽胞形成率（陽性対照）、Glucoseは20 mMグルコースを加えたときの芽胞形成率（陰性対照）。

図4 限外濾過によるウェルシュ菌芽胞形成阻害物質の分子量の推定



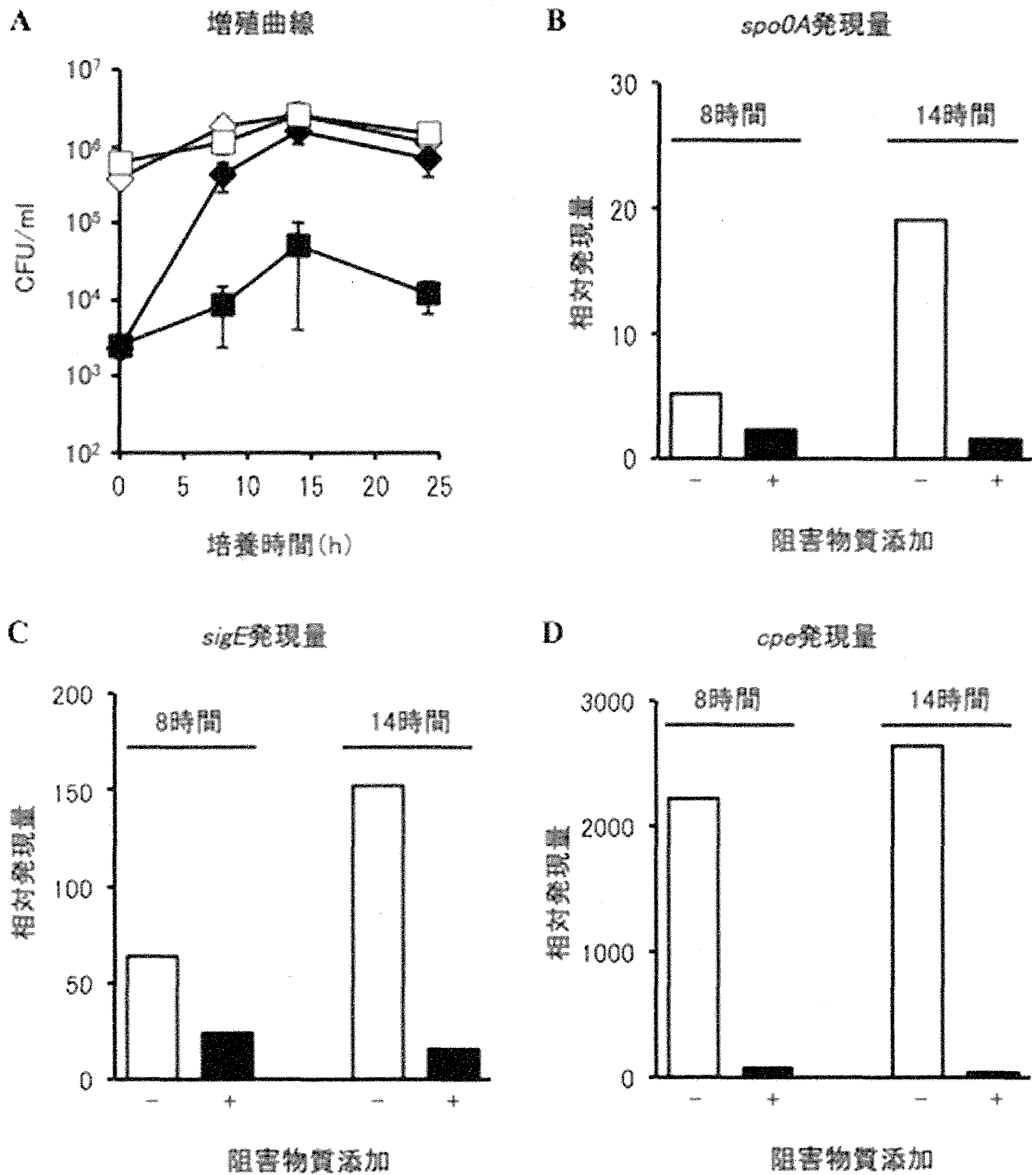
糞便抽出液を限外ろ過膜でろ過後、フィルターを通過した画分（濾液）とフィルター上に濃縮された画分（濃縮画分）のそれぞれについて、芽胞形成に対する効果を評価した。Controlは何も加えない条件での芽胞形成率（陽性対照）、Glucoseは20 mM グルコースを加えたときの芽胞形成率（陰性対照）。3K~100Kはそれぞれ使用したフィルターの分画分子量（分子量3,000~100,000）を示す。

図5 ウェルシュ菌芽胞形成阻害物質の耐熱性の検討



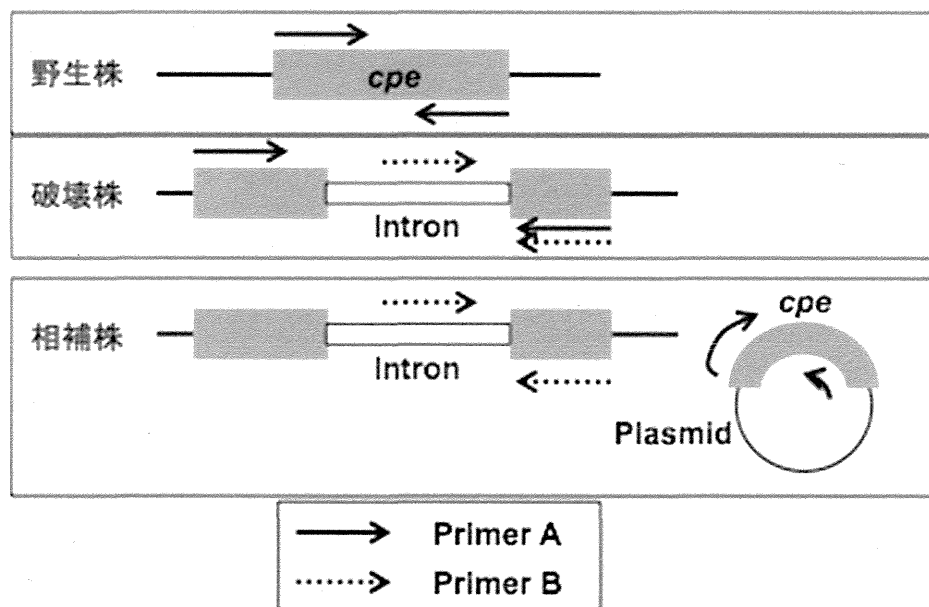
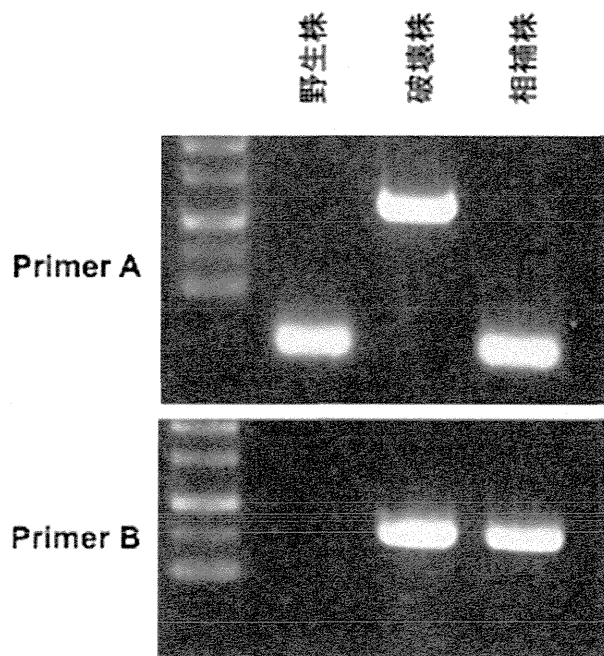
糞便抽出液を 100,000×g、90 分間超遠心した上清をさらに分画分子量 100,000 の限外濾過膜でろ過したものについて、室温 (r. t.)、50°C、70°C、95°C で 20 分間処理後、芽胞形成に対する抑制効果を評価した。Control は何も加えない条件での芽胞形成率 (陽性対照)、Glucose は 20 mM グルコースを加えたときの芽胞形成率 (陰性対照)。

図6 阻害物質の作用機序の検討



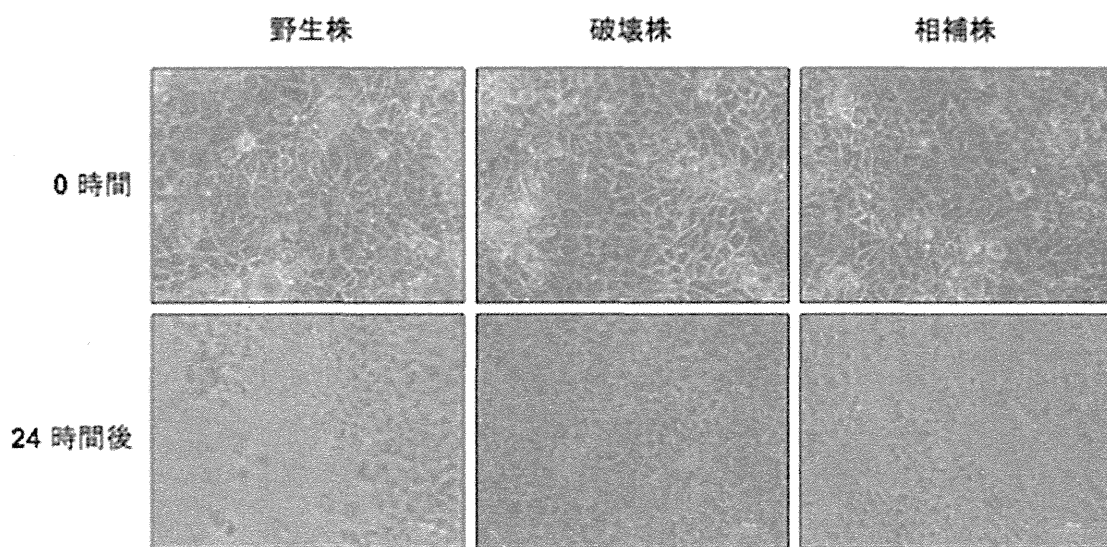
(A) ◇は何も加えないときの栄養型ウエルシュ菌の菌数 (CFU)、□は阻害物質を加えたときの栄養型ウエルシュ菌の菌数、◆は何も加えないときのウエルシュ菌の芽胞数 (CFU)、■阻害物質を加えたときのウエルシュ菌の芽胞数 (CFU)。(B)~(D) 16S リボソーム RNA の発現量に対する各種芽胞形成関連遺伝子の発現量。8 時間および 14 時間後の発現量を、それぞれ何も加えないとき、阻害物質を加えたときで比較した。(B) *spo0A*、(C) *sigE*、(D) *cpe*。

図7 3菌株の遺伝子保有状況の確認



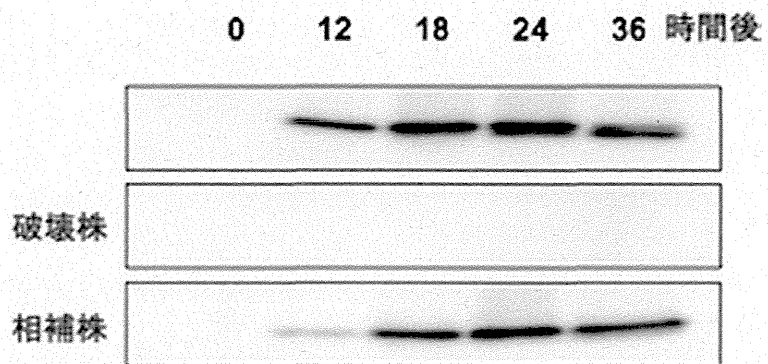
「野生株」は野生型 SM101 株、「破壊株」は *cpe*(-)株、「相補株」は *cpe*(+)株。それぞれの菌株のライゼートをテンプレートとして Primer A、Primer B を用いて PCR を行った。

図8 異なる3株を感染させたときの細胞障害性



感染後 24 時間後の細胞を位相差顕微鏡下で写真撮影した。「野生株」は野生型 SM101 株、「破壊株」は cpe(-) 株、「相補株」は cpe(+) 株。

図9 共培養系の培養上清中のCPE



感染 0、12、18、24、36 時間後の培養上清ろ液を調製し、抗 CPE 抗体でウェスタンブロットを行った。「野生株」は野生型 SM101 株、「破壊株」は *cpe* (-) 株、「相補株」は *cpe* (+) 株。

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

食品中の毒素産生微生物および毒素に関する研究

平成25年度

分担研究報告書

新型下痢毒素産生性ウエルシュ菌による食中毒事例

の解析と原因ウエルシュ菌株のゲノム解析

岩手大学農学部

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

新型下痢毒素産生性ウエルシュ菌による食中毒事例の解析と
原因ウエルシュ菌株のゲノム解析

分担研究者 鎌田 洋一 岩手大学農学部 共同獣医学科 教授

協力研究者 長井 和哉 岩手大学農学部 技術室 技術員

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

鈴木 康規 東京都健康安全研究センター 微生物部 研究員

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

研究要旨：ウエルシュ菌食中毒は、エンテロトキシン産生性のウエルシュ菌によって発生するものと認知されてきた。1997年に起こった事例では、ウエルシュ菌が原因菌の可能性が非常に高いにもかかわらず、分離株はエンテロトキシン遺伝子を持たず、また、産生もしなかった。同様の事例を検証した。現在まで計4事例発生しており、いずれもエンテロトキシン遺伝子を持たず、同タンパク質の産生も認められなかった。分離菌が、新種の下痢誘発性毒素を産生していることにも確証が得られた。これらの事例は、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌のみを対象とする試験法には不備があること、したがって、現在のウエルシュ菌食中毒の疫学情報は不完全で、この度の事例も含んだ解析が必要となる。事例分離菌株 W5052 株の部分的ゲノム解析を行った。W5052 株は約 3 M bp の大きさの染色体と、少なくとも 2 種類のプラスミドを保有することが明らかになった。ゲノム中にはエンテロトキシン遺伝子は存在しなかった。新種の下痢誘発性毒素遺伝子の種間伝播ならびに毒素遺伝子の変異など、ゲノム解析を通じて明らかにできる可能性が示された。

A. 研究目的

ウエルシュ菌食中毒は、我が国では、年間約 30 件程度発生している。発生件数は多くはないものの、一事件あたりの患者数が多い。過去には 1,000 名を越す患者数を示した事例もある¹⁾。原因食は、カレーやシチュー、煮込み料理、惣菜、仕出し弁当などである。これらの原因食には 2 つの共通点がある。原因施設は、仕出し製造工場や、学校・刑務所などの給食施設の整った施設になっている。原因食品と原因施設の種類の、ウエルシュ菌食中毒発生機構を反映してのものとなる。ウエルシュ菌は芽胞の形態で土壤に広く分布する。そのため、農産品、食品工場、仕出し施設をウエルシュ菌は汚染する。芽胞の食品への付着、施設の持ち込みは、避けることができない。食材を加工する際、加熱するが、ウエルシュ菌芽胞は、調理時の加熱では殺菌できない。周辺の共存菌が殺菌される中、ウエルシュ菌芽胞は、加熱によって発芽が促進される。仕出し工場や給食施設では、大量の調理を一度に行う。大型の調理機器は、高さがあり、機器の底辺部分は嫌気度が増す。ウエルシュ菌は、発育指摘温度が 40 数°C で、一般の細菌より高い。「深鍋で加熱され、大量の食材の量で、また、粘性の高い所品で、加熱料理後ゆっくりと冷却されるような食品とその条件が、ウエルシュ菌食中毒発生を生み出す。

ウエルシュ菌食中毒の研究は長く、その原因物質は 1960 年代に明らかにされて

いる。すわなち、分子量が 30 K Da 程度の、タンパク質毒素で、毒素そのものは易熱性で、80°C 10 分の加熱で失活する。毒素は事例菌株の培養液中に分泌される。そのため、培養液を、ウサギ腸管ループテストに供すると、強い陽性反応、すなわち下痢原性を示す。この毒素はエンテロトキシンと呼ばれる。エンテロトキシンについても、精力的に研究が行われ、受容体を保持する Vero 細胞では細胞致死毒性を示し、受容体を持たない L929 細胞では、高濃度のエンテロトキシンによっても細胞毒性が見られないことがわかっている²⁾。

ウエルシュ菌食中毒と診断する場合、患者便および推定原因食品から、ウエルシュ菌を分離し、菌株がエンテロトキシン遺伝子を保有すること、所定の毒素産生培地に接種し、エンテロトキシン産生性を確認することが必須の検査項目になっている。遺伝子検査には PCR 法が、エンテロトキシン産生性については、抗体を利用しての逆受け身ラテックス凝集テスト (RPLA テスト) が実施される。

1997 年に、東京都で発生したウエルシュ菌食中毒がある。患者症状が下痢・腹痛、原因施設が飲食店であること、原因食が弁当であること、平均の潜伏時間が 15 時間程度であったことは、典型的ウエルシュ菌食中毒を推測させるものであった。患者便から分離した菌株について、エンテロトキシン遺伝子の有無、および培養液中のエンテロトキシンの有無を試験したところ、いずれも陰性を示した。

一方、当該菌株を培養し、その濾過滅菌液について、ウサギ腸管ループ試験を行ったところ、陽性反応を示した。濾過滅菌培養液は RPLA テスト陰性で、菌株から抽出した DNA 検体についての、エンテロトキシン遺伝子検査も陰性だった。培養液は Vero 細胞および L-929 細胞に毒性を示した。以上の結果は、ウエルシュ菌は、エンテロトキシンでなく、未同定の、新型エンテロトキシンを産生し、食中毒を発生させる可能性を示唆している。

以上の見地から、本厚生労働科学研究では、事例菌株の部分的ゲノム解析、部分精製毒素標品のタンパク質の網羅的検索を通じて、新型毒素を同定した。新型毒素は 2 種類の成分から構成される、2 コンポーネント毒素であることが示されている³⁾。

本研究の目的は、上記のような、非エンテロトキシン産生性のウエルシュ菌食中毒事例を収集し、その実態を明らかにすることにある。さらに、事例菌のゲノム解析を行い、毒素遺伝子伝播機構を明らかにすることを目的とする。

B. 実験方法

1. 東京都における食中毒事例で、ウエルシュ菌が分離された事例

東京都健康安全研究センター食中毒得研究室では、都内で発生した食中毒の、患者材料および推定原因食品からの菌分離を行っている。患者の呈した症状、潜伏期、原因食、患者規模から、ウエルシ

ュ菌食中毒と推定され、上記材料からウエルシュ菌が分離された例について、その分離株について、エンテロトキシン遺伝子検査および、毒素産生培地中での、エンテロトキシン産生を調べた。その結果、エンテロトキシン遺伝子陰性、エンテロトキシン産生性陰性の事例をまとめた。

2. ウサギ腸管ループ試験

分離ウエルシュ菌株を変法 DS 培地⁴⁾で培養し、フィルターろ過滅菌（ポアサイズ 0.45 μm ）し、検体とした。ウサギ（日本在来種、オス、体重 1.5~2.0 Kg）をペントバルビタル麻酔下で回復し、空腸を体外に取り出した。5~10 cm 程度の間隔で、腸管を結紮し、ループを作製した。各ループに、検体 1.0 ml を接種した。検体は、上記の変法 DS 培地の培養液で、陰性対象に、Phosphate buffered saline (PBS) を、陽性対象にコレラ毒素 (Sigma) を使用した。各検体をループ内に接種後、腸管を腹腔内に戻し、閉腹した。約 18 時間後、ペントバルビタル麻酔液の大量静脈内投与でウサギを安楽死させた。接種した腸管ループを取り出し、腸管ループの腫脹や内部の液体貯留の状況を写真にて記録した。

3. ウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子検出

分離したウエルシュ菌を、Brain Heart Infusion 培地 (BHI, BD) に接種し、好気状態で 24 時間培養した。1.5 ml の培養液

を、10,000xg、10 分間、遠心分離を行った。上清を捨て、回収した菌体を 100 μ l の Milli-Q 水で懸濁し、95°C、10 分間加熱した。10,000xg、10 分間遠心分離を行い、上清を回収し、ウエルシュ菌 DNA テンプレートとした。

エンテロトキシン遺伝子の検出には、ウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子検出キット（タカラバイオ）を用いた。テンプレートの量、および PCR の条件は、キットの取り扱い説明書に準じた。毒素遺伝子の検出にはアガロースゲル電気泳動法を用いた。

4. 分離菌株のエンテロトキシン産生試験

分離菌は、Cocked Meat Medium に接種して保存した。保存菌液を BHI 培地に接種し、37°C24 時間、好氣的条件で培養した。変法 DS 培地に、BHI 培地での培養液を、1/10 量接種し、37°C24 時間培養した。培養液を 10,000xg、10 分間遠心分離し、上清を回収、毒素検査材料とした。

培養液中のエンテロトキシンタンパク質は、RPLA 反応を利用したキット（デンカ生研）を用いた。培養液の希釈には 96 ウェル（尖底）プレートを用いた。ウェルに培養液を 25 μ l を加え、さらに、キット添付の希釈液を 25 μ l 加えて、検体の 2 倍希釈を作製した。同様の操作を繰り返して、段階希釈を 2 列作製した。各ウェルに、キット添付の抗エンテロトキシン抗体結合ラテックスおよび、陰性コントロールとして、未感作（抗体が結合し

ていない）ラテックスを、おのこの 25 μ l 添加し、混合後、室温にて 24 時間静置した。希釈液に加えたラテックス粒子を入れたウェルを凝集反応陰性指標に、また、キット中に含まれるエンテロトキシン溶液での反応を凝集反応陽性指標にして、分離菌培養液中のエンテロトキシン産生性を検証した。

5. 細胞致死試験

研究室保有中の Vero 細胞および L929 細胞を用いた。Dulbecco 変法 MEM 培地（DMEM 培地、Sigma）に、10% Fetal Bovine Serum（FBS、Difco）を加え培地を、両細胞の培養に用いた。通常法方法で継代中のそれぞれの細胞を、 1×10^5 cell/ml に培地で希釈し、96 ウェルプレートに 100 μ l/well の割合で播種した。5%CO₂ インキュベータ内で 1 晩培養後、ウェルあたり 10 μ l の割合で、上記変法 DS 培地で培養した検液を添加した。さらに 24 時間培養を継続し、その後、両細胞への、ウエルシュ菌培養上清の効果を判定した。培地添加時に、陽性対象として、ウエルシュ菌エンテロトキシン（Sigma）を用いた。

6. ゲノム解析

1997 年に発生した事例より分離した株 W5052 株の部分的ゲノム解析を行った。同菌株を BHI 培地で 37°C24 時間培養した。培養液について 10,000 rpm10 分の遠心分離を行い、上清を捨て、菌体を回収した。DNA 抽出キットとして、DNeasy

Blood&Tissue Kit(Qiagen)を用い、菌体からゲノム DNA を回収した。

解析として、Shotgun 法と Mate-pair 法を用いた。上記のゲノム DNA について、Mate-pair 用のライブラリーを作製し (Rhche 社に依頼)、解析の対象とした。

Rhche 社の GS Junior を用い、W5052 株のゲノムを解析した。シーケンス解析には機器付属のソフトウェア (GS Junior Software 2.7) の一部を利用した。ウエルシュ菌ゲノムの比較を行った。比較対象は、すでにシーケンスデータが公表されているウエルシュ菌 St. 13 株とした⁵⁾。

C. 結果

1. エンテロトキシン非産生性のウエルシュ菌による食中毒事例

1997 年以降、2003、2009、2010 年に事例が発生した。表 1 にその概要を整理した。

事例は、その患者皆 11 名と小規模のものから、84 名と 100 名に近い大規模型食中毒の様式を示した。原因施設は飲食店であることも、ウエルシュ菌食中毒の共通の性状を示した。原因食品はローストビーフおよび煮物と、これらもウエルシュ菌食中毒の代表的原因食品になっていた。

4 事例ともに患者は下痢および腹痛を示し、平均の潜伏時間が約 10 時間から 15 時間と、これらも通常のウエルシュ菌食中毒患者が示すものの特徴を示した。

2. 4 事例株における変法 DS 培地培養液の腸管毒性

4 事例から分離した、各 1 株について、変法 DS 培地における培養液について、腸管ループ試験を実施した。コレラ毒素を接種したループと同様、各事例分離株の培養液は、ループを腫張させた。また、ループ内部に液体を貯留させた。

3. 4 事例からの分離株のエンテロトキシン遺伝子保有とエンテロトキシン産生性

4 事例からは、患者材料から、5~10 株程度の菌株を分離した。おのおのの菌株について、加熱抽出法によってテンプレート DNA を調製し、PCR を実施した。いずれの菌株も、キットが指示するサイズの DNA の増幅を確認できなかった。

分離菌株の変法 DS 培地培養液中のエンテロトキシンの存在を、抗体を用いた RPLA 法で検討したところ、いずれの菌株の培養液においても、RPLA 法 陰性を示し、エンテロトキシンの産生は確認できなかった。

4. 4 事例株における変法 DS 培地培養液の細胞毒性

4 事例から分離した、各 1 菌株について、変法 DS 培地で培養し、その培養液の Vero 細胞および L929 細胞への毒性を検証した。市販のウエルシュ菌は Vero 細胞へ毒性を示した。一方、L929 細胞には変化を与えなかった。この現象はすでに確