

各遺伝子特異的プライマー300 nM、DEPC treated water を混合し、49 μ l に調整した溶液に cDNA 溶液 1 μ l を加え、Mini Opticon (BIO-LAD)を用いて行った。PCR 反応条件は初期変性 (95 °C 3 分間)、変性、アニーリング、伸長反応 40 サイクル (95 °C 30 秒間、60 °C 30 秒間、72 °C 60 秒間)、融解曲線 (60-90 °C) で行い、各伸長サイクルの終わりに SYBR Green I の蛍光強度を測定した。検量線は黄色ブドウ球菌の reference 株であり *egc* を保有する Mu50 より精製した gDNA を 10 倍階段希釈したものを用いて、実験ごとに作成した。10 種類のハウスキーピング遺伝子から、mRNA が安定して発現している 3 つの遺伝子を選抜し内部標準遺伝子とした。内部標準遺伝子の mRNA 発現量から geNorm ソフトウェアを用いて Normalization Factor を求め、各 SEs の mRNA 発現量を標準化し、各サンプルの相対的な mRNA 発現量を求めた。

5. スキムミルクにおける *egc*-関連 SEIs 産生量の評価

スキムミルク粉末 (和光純薬) を滅菌純水に無菌的に溶解して 10% (W/V) 溶液を作成し、検体とした。Aomoril 株、Hiroshima13 株および Saitama496 株を BHI agar で 2 回継代したのち、Yeast Extract 1 % 添加 BHI broth 5 ml に接種し Seed Culture を行い (37 °C、16~18 時間、振盪培養)、スキムミルクに 1.0×10^4 CFU/ml で接種した。培養は 20° C あ

るいは 37° C で 24 時間行い、6、12、24 時間の時点で検体を採取して定量培養により菌数を定量すると共に、上清を採取して SEIs 定量に供した。

14,000 rpm、20 分遠心により上清を回収し、0.22 μ m フィルター (Millex GP[®] 0.22 μ m, Millipore) で濾過処理後、酸沈殿によるカゼインの除去、TCA 沈殿による蛋白質濃縮を行い、最終的に 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 で溶解し、Sandwich ELISA による SEIs 定量に供した。

C. 結果

1. 高密度接種時の 20 °C および 30 °C における増殖動態、*egc* 関連毒素群産生動態および mRNA 動態

BHI 培地に Aomoril 株を約 5×10^7 cfu/ml で接種し、20°C および 30°C で培養したところ、*egc* 関連 SEs の産生量は 30°C において定常期に到達した 12 時間以降ほぼ一定であったが、20° C の培養では 12、24、48 時間で産生総量は増加傾向を示した (図 2)。*egc* 関連 SEs/SEIs mRNA の発現量を比較すると、対数増殖期における mRNA コピー数は 20° C において 30° C よりも多い傾向が確認されたが、対数増殖期後期から定常期においては、両温度において低いレベルで推移した (図 2)。Hiroshima13 株においても Aomoril 株と同様の傾向を示し、30° C において SEs/SEIs 量は定常期に入ってからには一定であるのに対し、20° C 培養

では 48 時間にいたるまで毒素産生は増加傾向にあった。さらに、mRNA 動態についても、対数増殖期においてコピー数が 20° C において増加する傾向を示したが、培養後半では両温度いずれも mRNA コピー数は低いレベルで推移した (図 3)。

2. スkimミルクにおける *egc* 関連 SEs/SEIs 産生量評価

我々はこれまでに、にぎりめしにおける *egc* 関連 SEs 産生を評価しており、BHI broth の場合と同様に 25° C で有意な毒素産生が見られることを明らかにしてきた。今回、炭水化物が多くをしめる米飯と比較するために、蛋白質特にカゼインを多量に含む食品である skimミルクにおける *egc* 関連 SEs 産生量を評価し、さらに低温での産生状況がみられるか否かを検討した。

わが国で分離された食中毒由来株、Saga 株、Hiroshima13 株、および Saitama496 株の skimミルク中での毒素産生動態を図 4 に示す。これらの株を 1.0×10^4 CFU/ml で skimミルクに接種し、37° C および 20° C で 24 時間培養したところ、37° C 培養では、in vitro, BHI broth での産生と同様に、定常期以降の毒素総量は一定あるいは減少傾向を示した。これに対し、20° C 培養では黄色ブドウ球菌の増殖が遅延することから 12 時間まで毒素の産生は確認されなかったが、24 時間の時点の毒素総量は 37° C 培養よりも多量となる傾向がすべての菌株

で認められた。低温での産生量増強は、BHI broth およびにぎりめしのみならず、skimミルクでも認められることが明らかになった。

D. 考察および結論

egc 関連毒素群について、これらの遺伝子のみを保有する食中毒由来株が存在するにも関わらず、in vitro での産生量がごく少量であるという矛盾が示されていたが、我々はこれまでに 37° C (従来の培養温度) 20-25° C (室温、食中毒事例を想定) での培養を比較すると、20-25° C の培養条件において産生量が増加する傾向があることを明らかにしてきた。

増殖動態と毒素産生の関連を検討したところ、*egc* 関連 SEs は対数増殖期に産生が始まるが、低温での培養では定常期に入っても *egc* 関連 SEs 産生量が持続するのに対し、30° C では定常期に達すると *egc* 関連 SEs 産生は抑制されることが推定された。しかしながら、mRNA 動態は、30° C と 20° C における毒素産生量の違いと完全に一致するものではなく、むしろ、両温度においてほぼ同等の傾向を示した。現在のところ、20-25° C における *egc* 関連 SEs/SEIs の産生増強機構は不明な点が多い。しかしながら、本研究で示したように、skimミルクにおいても低温における産生増強は確認されており、室温環境下で毒素産生量が増加する現象

は、ブドウ球菌食中毒の発生を考えるうえで重要な情報である。黄色ブドウ球菌菌株により差がみられるが、一般的に20°Cにおいては増殖が遅延する。低温条件下での *egc* 関連 SEs mRNA の転写のピークは対数増殖期にあり、スキムミルクにおいては検出可能なレベルの毒素が確認されるのは対数増殖期後期以降であることから、室温で食品が保存された場合、食品の初期汚染菌数が多いほど、*egc* 関連 SEs の蓄積量は増加すると考えられる。

E. 健康危害情報

特になし。

F. 文献

- 1) 石田和夫ら (2005) イラスト食品衛生学、東京教学社、東京
- 2) 山中英明、藤井建夫、塩見一雄 (2007) 食品衛生学第二版、恒星社厚生閣、東京
- 3) Sauerbrey, G., Z. Phys. (1959) 155:206.

G. 研究発表

1. Ono, H. K., Nishizawa, M., Yamamoto, Y., Hu, D. -L., Nakane, A., Shinagawa, K., and Omoe, K. (2012) Submucosal mast cells in the gastrointestinal tract are a target of staphylococcal enterotoxin type A. FEMS Immunol. Med.

Microbiol. 64: 392-402.

H. 学会発表

1. Sato, A., Nagasako, Y. Yamamoto, Y. Sato, Y., Ono, H. K., Hu, D. -L., Nakane, A. and Omoe, K. (2011) Temperature dependent regulation of enterotoxin-gene-cluster-related staphylococcal enterotoxins production. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo.
2. 長廻ゆりあ, 稲垣華絵, 山本裕紀, 鎌田洋一, 品川邦汎, 重茂克彦 (2011) 新型ブドウ球菌エンテロトキシンの食品中における産生量評価. 第102回日本食品衛生学会学術講演会, 秋田市.

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

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23 - 25年度
分担研究報告書

水晶発振子マイクロバランス法によるブドウ球菌
エンテロトキシンのリアルタイム検出法開発の試み

岩手大学農学部 共同獣医学科

鎌田 洋一 重茂 克彦

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

水晶発振子マイクロバランス法によるブドウ球菌エンテロトキシンの
リアルタイム検出法開発の試み

分担研究者 鎌田 洋一 岩手大学農学部 共同獣医学科
 重茂 克彦 岩手大学農学部 共同獣医学科

協力研究者 佐伯 和美 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
 実川 友史 (株) アルバック 技術開発部 部長
 星野 浩美 (株) アルバック 技術開発部 主事

研究要旨：ブドウ球菌食中毒は、菌が産生するタンパク質性毒素によって嘔吐が誘起される。この毒素は **Staphylococcal Enterotoxin** と表記される。**SE** の食中毒危害物質としての特徴は、菌が増殖する際に産生されること、**SE** は耐熱性・耐有機溶媒性を持っており、その毒性が保持されることにある。ブドウ球菌食中毒では常に食品中に毒素の有無を検知するシステムが要望される。**SE** には分子多様性があり、現在まで最も多くの事例が起こっているのが **SEA** である。本分担研究の目的は、リアルタイムで食品中の **SEA** の検出を可能とする方法を確立することにある。水晶発振子マイクロバランス法を応用し、現在まで検討を継続している。溶質が非常に濃厚で、測定システムを障害しやすいことが予想される牛乳を検体とし、**SEA** の検出法開発を試みた。抗体の重量増加に金コロイドを標識した。予想通り金コロイド標識によりシグナルが向上した。直接法、サンドイッチ法、金コロイド標識抗体によるサンドイッチ法を比較検討した。本法は、牛乳のような、測定系を傷害する可能性のある食品においても応用可能であった。3 種の方法の検討の結果、金コロイド標識抗体のサンドイッチ法が最も感度が高く、牛乳中に 5 ng/ml の **SEA** を検出が可能であった。今後も感度の向上が必要と考えられた。

A. 研究目的

ブドウ球菌食中毒は、食後 30 分から 6 時間（平均 3 時間）くらいで発症する嘔吐を主症状とする食中毒で、食品中に、嘔吐活性を有するタンパク質毒素、エンテロトキシン (Staphylococcal Enterotoxins; SE) を産生する^{1, 2)}。

SE がもつ際立った特徴に、タンパク質であるにもかかわらず、熱やアルコール、クロロフォルムといった有機溶媒処理でも失活しないという強固さがあるだろう。これらの耐性のうち、食品安全上もっとも重要なのは毒素の熱耐性で、100℃はむろん、オートクレーブでも完全に失活しないと言われている²⁾。SE の強度の熱耐性は、食品の加熱時に毒素が失活されないという問題を引き起こす。以下、牛乳を例にとって説明する。生乳は牛より得るもので、牛の皮膚における常在細菌となっているブドウ球菌の、乳への混入は避けられない。搾乳機や人の手指についても、完全な殺菌がなされない場合、乳へのブドウ球菌の混入がある。搾乳後、通常は低温で加工場へと輸送され、所定の温度処理がなされる。この処理でブドウ球菌の菌体は死滅するものの、耐熱性の SE は牛乳内に毒性を保持したまま残存し、喫食により食中毒症状が誘発される。食品内で一度産生されれば加熱によって失活せず、人に摂取されて毒性を発揮する危険性が排除できない。SE は菌の増殖とともに産生される。食品の安全性を確保するには、原因物質の毒素そのものを検出する方が望ましい。とくに牛乳のような消費量の多い食品については、製造段階で連続的にモニタリングできる原理をもった毒素

検査法の導入が望ましい。

上述の考察から、分子間相互作用測定装置の 1 つである水晶発振子マイクロバランス (Quartz Crystal Microbalance: 以下 QCM) 法³⁾ が有用ではないかと考えた。図 1 に QCM 法を実施する機器と、センサー部分の模式図、およびその原理を示す。センサーに固着させた水晶の薄膜に通電すると、薄膜が一定の周波数で振動する。振動するセンサーが示す周波数は、センサーの重量に比例する。センサー部分に、たとえば抗毒素抗体を結合させておき、反応容器に毒素を加えた場合、センサー上で抗原抗体結合反応が起こる。毒素の結合により、センサーの重量が増加する。また、結合する毒素の量（反応容器中の濃度）が反応速度と比例する。図 2 に毒素を反応容器に添加した後の、抗体吸着センサーが示す周波数の変化を模式図で示した。毒素の濃度が高ければ高いほど、素早く、かつ、多量にセンサーに結合する。すなわち、毒素の濃度は反応速度（周波数が減少する速さ）と、周波数の減少の程度に比例する。

周波数は電氣的に捕捉することができる。QCM 法の利点には、操作が簡便である、検体が牛乳のような濃厚な夾雑物をたくさん含んでいても対応できるなどがあげられるが、最大の利点は、リアルタイムに測定できる、すなわち毒素が存在すれば直ちに検知できる検査法に應用できることであろう。たとえば、牛乳の製造工程の流路中に抗 SE 抗体吸着センサーを設置しておけば、エンテロトキシンが捕捉されない限り、牛乳におけるブドウ球菌食中毒の危害性を完全に制御できることとなる。また、迅速に定量測定ができ、

ブドウ球菌食中毒診断を容易にすることも可能だろう。

社会への応用性を第一義と考え、緩衝液中でなく牛乳を材料として QCM 法の確立を試みた。SE には多様性があり、クラシック (旧型) SE として A から E の 5 型が、新型 SE も多数報告されている³⁾。対象の毒素には SEA を選抜した。SEA による食中毒事例が報告されていることを選抜の理由とした。QCM 法について、センサーへの抗体の物理吸着および化学吸着、SES 添加後に、菌コロイド標識抗体を添加する方式について検討した (図 3)。

B. 実験方法

1. ブドウ球菌エンテロトキシン A

組換え SEA (rSEA) を、文献⁴⁾ に従い以下の方法で調製した。大腸菌 BL 株を *pGEX-6p-1/sea* で形質転換した。同菌株を 37°C でアンピシリン含有 YT 培養液にて 1 時間培養した。Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加した後、37°C にて 3 時間培養を続けた。4°C、5000 x g にて遠心分離を 10 分間行い、菌体を回収した。菌体ペレットを BUGBUSTER タンパク質抽出キット溶液 (5 ml/g 湿菌体重量、TaKaRa) で懸濁した。懸濁液について、4°C、5000 x g の遠心分離を 10 分間行い、rSEA とグルタチオン-S-トランスフェラーゼの融合タンパク質を含む上清を回収した。Sephacryl-S4B 4mG 4R 5000 樹脂 (GE Healthcare) を上清に加えた。そのゲルを塩化ナトリウム 150 mM、エチレンジアミン四酢酸、ジチオ

スレイトール 1 mM を混合させた 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) にて洗浄した。ゲル懸濁液に Precision タンパク質分解酵素 (Bio-Rad) を添加し、4°C で 18 時間連続的に混合しながら酵素消化を行った。ゲル懸濁液をポアサイズ 0.4 μ m のメンブレンフィルター (Millex) にてろ過してゲルを除去した。回収したろ液中に rSEA の生成物が含まれており、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に透析した。rSEA のタンパク質濃度はブラッドフォード法にて測定した。rSEA の純度はドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて確認した。

2. ポリクローナル抗 SEs 抗体固定化センサー

2-1 抗 SEA ポリクローナル抗体

岩手大学農学部 重茂克彦教授より、ウサギに免疫して得た抗 SEA ポリクローナル抗体の分与を受けた。同抗体は、rSEA を固定化したゲルを用いての、抗原アフィニティークロマトグラフィーにより精製されていた。

別ロットとして、rSEA を抗原としてウサギを免疫して得た抗体を購入した (フナコシ株式会社)。同ウサギの血清から、上述と同様、rSEA を固定化したゲルを用いての抗原アフィニティークロマトグラフィーによって、抗 SEA 精製抗体を得た。

2-2 ポリクローナル抗 SEA 抗体固定化センサーの作製

SAM-Kit (イニシウム) を用いて Protein G をセンサーに固着させた。センサーセルの金電極上をピランハ溶液 (濃硫酸 : 過酸化水素水 = 3:1) にて洗浄した。50 μ l の SAM 溶液

(1mM)を金電極上にマウントした。室温で1時間静置後、Milli Q 水にて洗浄した。洗浄後、50 μ l の N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS)/ 1-エチルジメチルプロピルカルボジイミド(EDC)溶液(50 mg/ml)を金電極上にマウントした。室温で15分間静置後、Milli Q 水にて洗浄し、すぐに50 μ l の Protein G 溶液(100 μ g/ml)をマウントした。室温で1時間静置後、PBS(-)にて洗浄した。この Protein G 固定化センサーセルに PBS(-)を500 μ l 添加し、装置にセットした。測定を開始し、Protein G 固定化センサーの振動数が安定化後、終濃度1 ~10 μ g/ml となるように抗 SEA 抗体を添加し、Protein G と結合させた。Protein G を用いることにより、抗 SEA 抗体の抗原結合部位が障害なく反応液中に配向させることができる。

3. サンドイッチ法による rSEA の検出

3-1 抗 SEA 抗体の金微粒子標識

Mono-sulfo-NHS-NANOGOLD

(Nanoprobes)を用いて抗 SEA 抗体を標識した。Mono-sulfo-NHS-NANOGOLD を200 μ l の Milli Q 水に溶解した。また、抗 SEA 抗体を1.2 mg/ml となるように0.02M リン酸ナトリウム/0.15 M 塩化ナトリウム(pH8.0)溶液で調整した。同抗体溶液と添付バッファーと NANOGOLD 溶液を各100 μ l ずつ混合した。室温で1時間反応後、4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。その後、100,000 x g の超遠心を行い、上清を捨てた。沈渣を元の溶液量に懸濁し、金コロイド標識抗体とした。同標識抗体の濃度は、400 μ g/ml と規定した。

3-2. 牛乳中における rSEA の検出

抗 SEA 抗体固定化センサーを QCM 装置 (イニシウム) の反応容器に装着した後、容器内に牛乳(おいしい牛乳、森永乳業)を500 μ l 添加した。センサーの振動数が安定した後、rSEA を添加した。添加液量は5 μ l とした。結果は SEA の終濃度で比較した。

rSEA の添加後、抗 SAE 抗体、あるいは、金コロイド標識抗 SAE 抗体を添加した。添加液量は5 μ l とした。いずれの場合も、添加後15あるいは30分間、連続して周波数を観察した。観察結果は、装置付属のソフトウェアで比較した。

C. 結果

1. 牛乳中の SEA 検出のための QCM サンドイッチ法の検討

岩手大学重茂教授より分与を受けた抗 SEA 抗体をセンサーに化学吸着させ、rSEA 添加後、ロット1抗 SEA 抗体を添加し、周波数の変動を観察した。追加抗体の添加量を、0.5 から2.0 μ g/ml へと段階的に増加させた。非 SEA 添加の状態、最大約130Hz の非特異的な周波数の減少が見られた。10 ng/ml の SEA の添加量の場合、SEA を添加していない周波数の変動と同様の減少を示した。一方、SEA の添加量を50および100 ng/ml に増加させた場合、周波数が濃度依存的に減少した。検出限界は、10~50 ng/ml にあると判断された。

2. QCM センサーへの抗体の結合量の検討

センサーにプロテイン G を物理吸着させた効果を検討した。物理吸着においては、

SEA を添加しない状態で、非特異的な周波数の減少が見られた。抗 SEA の吸着量を変動させ、かつ、高濃度の SEA を添加し、非特異的な周波数との差を求め、1 と 10 $\mu\text{g/ml}$ の差を比較したところ、10 $\mu\text{g/ml}$ でより大きな差が認められ、今後の抗体のセンサーへの吸着濃度を、10 $\mu\text{g/ml}$ とした。

3. QCM 法における抗 SEA サンドイッチ法による SEA 検出感度

抗 SEA 抗体のセンサーへの固着は化学吸着法を用い、センサーへの SEA 添加後の抗 SEA 抗体の添加の影響を検討した。抗体の添加量は 2 $\mu\text{g/ml}$ とした。抗体はロット 2 を用いた。図 6 にその結果を示す。5、10、および 50 ng/ml の rSEA の添加で、周波数の減少が見られた (図 6)。これら 3 条件においては、ブランクからは周波数は減少した。抗 SEA の添加後 30 分において、5 ng/ml の場合、約 20 Hz の減少が見られた。10 ng/ml では 25 Hz、50 ng/ml では 80 Hz の減少が認められた。

4. QCM 法における金コロイド標識抗 SEA 抗体を用いての SEA 検出感度

抗 SEA 抗体に金コロイドを標識し、上記と同様のサンドイッチ法を試みた。rSEA は 5、10、および 50 ng/ml の条件を用いた。これら 3 条件で金コロイド標識の添加により、周波数の減少が見られた (図 4)。ブランクにおいても若干の周波数減少が認められた。金コロイド標識抗 SEA 抗体の添加濃度を増加させると、周波数の減少が強くなった。2 $\mu\text{g/ml}$ における添加後 15 分の周波数減少の程度を比較した。ブランクにおける周波数との差は、5 ng/ml の SEA では 80 Hz、10 ng/ml

では 90 Hz、50 ng/ml の条件では 300 Hz の周波数減少が認められた。

D. 考察と結論

過去のブドウ球菌食中毒事例の検討から、食中毒発症毒素量は、ヒト一人当たり 100~200 ng とされている³⁾。牛乳の摂取量を 200 ml と想定すると、1~2 ng/ml の SE を検出できる感度の検査法が求められる。

QCM 法においては、センサーに抗体を吸着させる方法に、抗体の疎水性結合性を利用した物理吸着法と、官能基を導入した化学吸着法がある。さらに、抗体の抗原捕捉性を向上させるため、センサーにはプロテイン G を化学結合させ、その後抗体を添加し、抗原を捕捉する結合部位を反応溶液中に配向する方法がある。SEA の検出において、物理吸着法では 50~100 ng/ml の検出感度だった。一方、プロテイン G を物理吸着させ、その後 10 $\mu\text{g/ml}$ の抗 SEA 抗体をセンサーに固着させたシステムでは、10~50 ng/ml の間に検出限界があると推定された。プロテイン G の物理吸着とその後の高濃度の抗 SEA 抗体の応用によって、検出感度の向上が見られたが、さらなる高感度が求められる。

検出感度向上のため、サンドイッチ法を検討した。サンドイッチに抗 SEA 抗体を用いた場合、5 ng/ml においてもブランク値より減少した周波数を呈した。しかしながら、その周波数の減少の程度は少なく、30 分の測定で、5 ng/ml の SEA では約 20 Hz だった。

更なる検出感度向上のため、金コロイド標識抗体の利用を試みた。QCM 法では、セン

サーに結合する物質の重量が重いほど、周波数の減少が起こる原理に基づいての発想となる。金コロイド標識抗 SEA 抗体をサンドイッチ法に適応した時、5 ng/ml の SEA 存在時に 80 Hz の周波数減少が認められ、非標識の抗体に比べ、4 倍の周波数減少が起こった。この結果は、金コロイド標識抗体の利用が、シグナルの強度増加に有効であることを示している。

結論として、金コロイド標識抗体を用いるサンドイッチ QCM 法を用いることで、牛乳中の SEA をリアルタイムで検出できる可能性が示唆された。今後更なる低濃度の SEA を検出できるように、標識する金コロイドの種類や、標識抗体の濃度等について検討を継続する。また、SEA の定量性についても検討をする必要がある。

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(2007) 食品衛生学第三版、恒星社厚生閣、東京
- 2) 重茂克彦(2008)、モダンメディア、54、23-26.
- 3) Sauerbrey, G. (1959) Z. Phys. 155:206.
- 4) Omoe, K. et al. (2005) FEMS Microbiol. Lett. 246:191-198.

G. 研究発表

なし。

H. 学会発表

なし。

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。

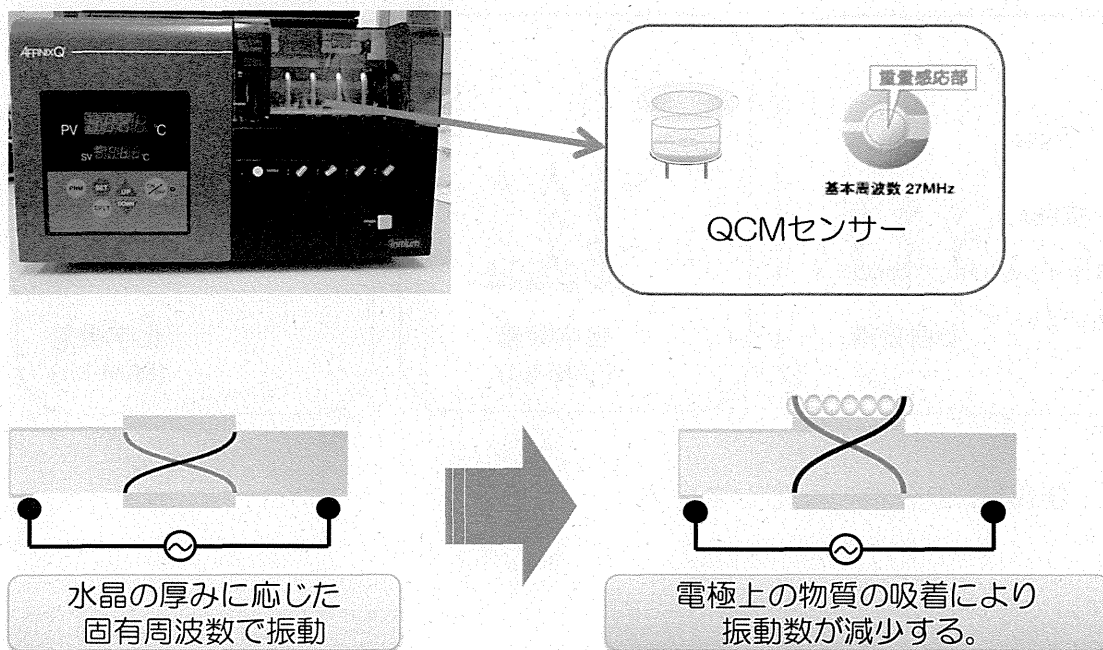


図1 水晶発振マイクロバランス（QCM）法の原理と機器

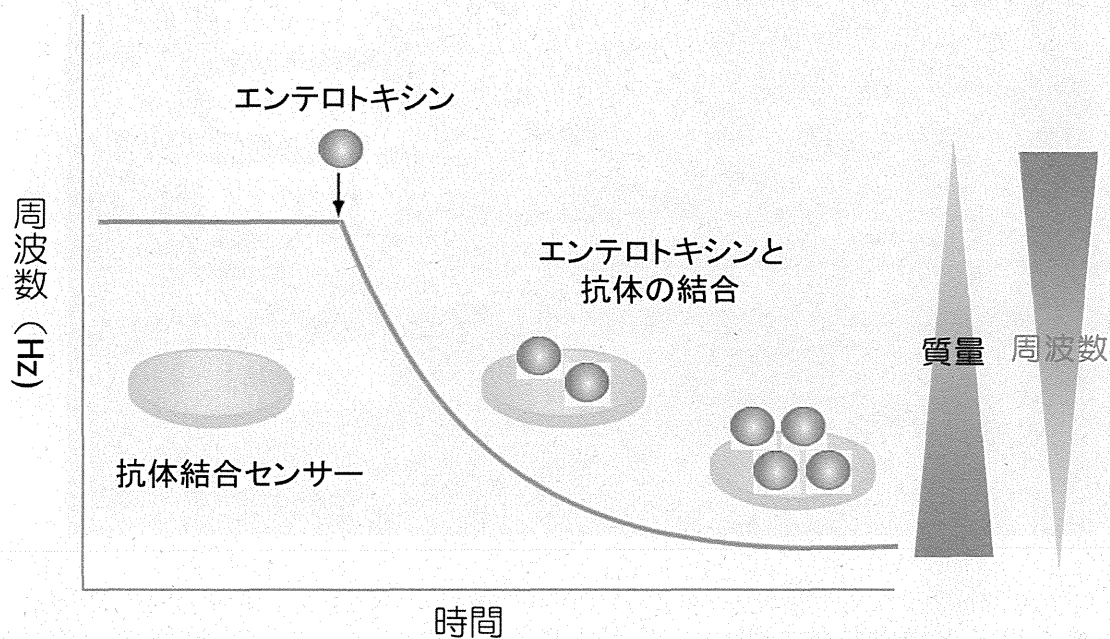


図2 ブドウ球菌エンテロトキシンの検出を目的として実施する水晶発振バランス法から得られる反応シグナルのイメージ

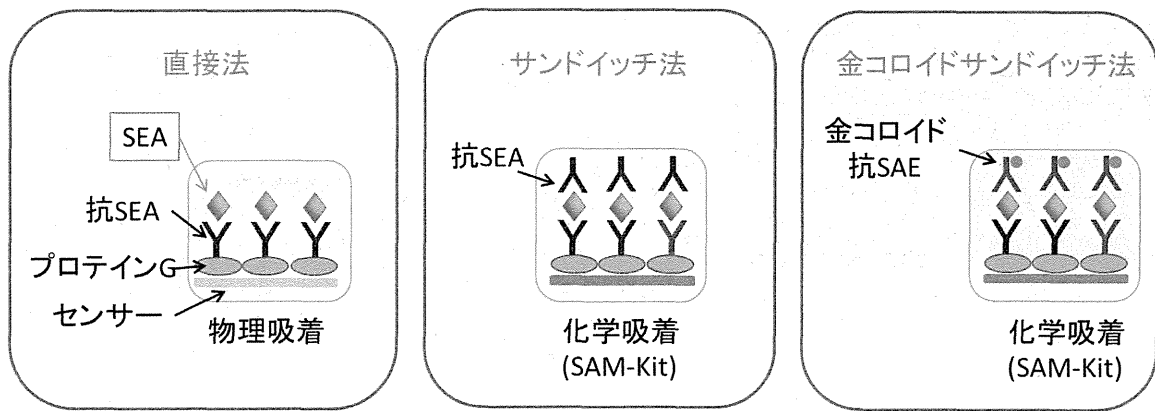


図3 QCM法の各種の反応システム

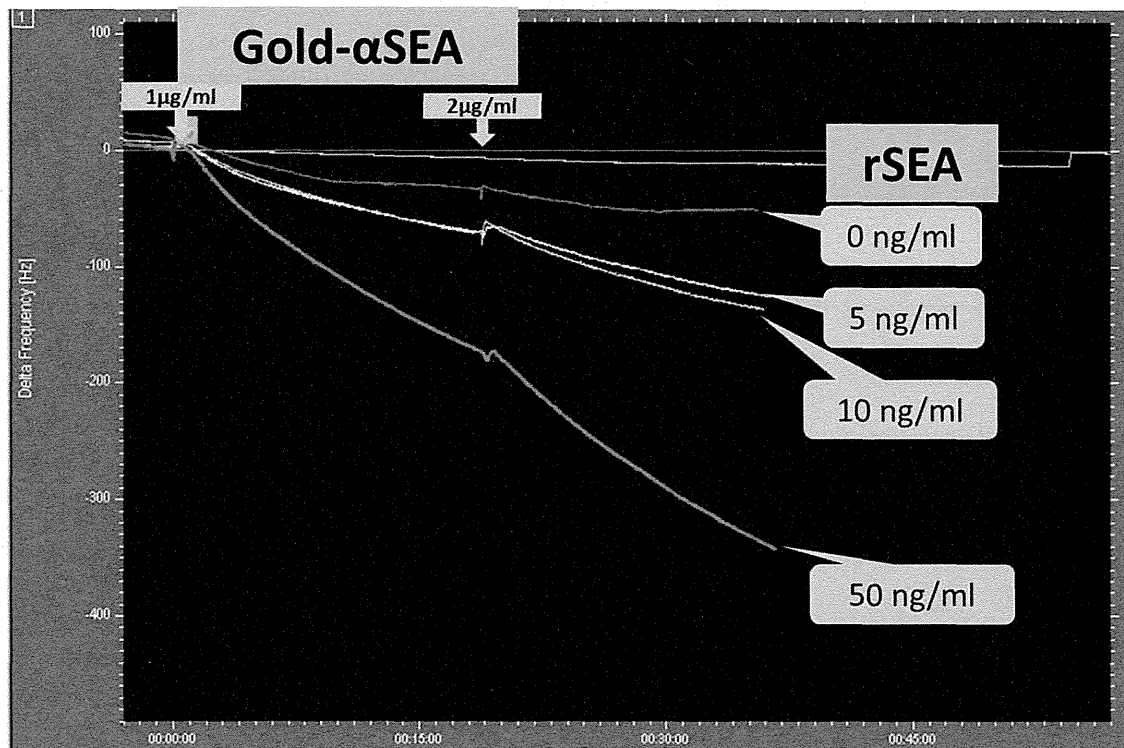


図4 金コロイド標識抗体を用いてのサンドイッチ法によるブドウ球菌エンテロトキシンを検出する QCM 反応

エンテロトキシン添加後、金コロイド標識抗体を、1および2 μg/ml の濃度で反応容器に添加し、センサーの周波数を測定した。

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
食品中の毒素産生微生物および毒素に関する研究
平成23 - 25年度
分担研究報告書

ウエルシュ菌食中毒発現機構の解析

大阪府立大学大学院

三宅 眞実

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に関する研究」

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 星 英之 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 准教授
安木 眞世 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、食中毒発症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はウエルシュ菌の腸管内増殖機構について、特にウエルシュ菌の芽胞形成に着目し研究を展開してきた。それは、芽胞形成は菌のエンテロトキシン産生と共制御されており、芽胞形成を抑制すれば食中毒発症を抑制することに繋がるからである。本研究ではまず、ウエルシュ菌食中毒発症時に消化管内で生じている変化を再現する *in vitro* 実験系を開発した。この系を利用すると、菌は環境中の糖の種類（代謝）、胆汁酸の量変化に対応して病原性発現を制御していることが明らかになった。特に重要な因子はグルコースとデオキシコール酸であるが、さらに消化管には未知の芽胞形成阻害因子が存在する可能性も示された。おそらく消化管内には様々な因子がウエルシュ菌の芽胞形成・毒素産生を制御していて、促進圧力と抑制圧力の量的バランスに応答して菌は病原性発現を ON/OFF していると思われる。メカニズム解析によって、デオキシコール酸は芽胞形成のマスター・レギュレーターである Spo0A の上流か、あるいは Spo0A に直接作用した結果、芽胞形成を強く誘導していることを明らかにした。加えてウエルシュ菌食中毒において最も大きな役割を果たすとされるエンテロトキシンの効果を科学的に評価するための材料も作出した。本研究で得られた知見は、人為的に消化管環境を制御することで新しいウエルシュ菌食中毒のリスク低減手法を開発することができる可能性を示唆しており、また開発した実験系や材料を基にさらに研究を推進することで、さらなる有用な知見が得られることを示している。

A. 研究目的

ウエ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。これはウエルシュ菌食中毒と呼ばれ、その原因菌は特に A 型ウエルシュ菌に分類されるエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌に限られる。ウエ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¹⁾。従って、ウエルシュ菌食中毒の制御には、大きな意義がある。

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¹⁾。ウエ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。ウエ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。しかしウエ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た。それはこの過程がウエルシュ菌食中毒発症の有無を決定する最も初期の段階であると考えたからである。この段階で菌が環境中の何に反応・応答し、一連の病原性発現カスケードを開始するのかを特定できれば、食中毒発症を回避させる新規の制御法を考案できるかもしれない。このように最終的に食中毒制御法の開発を目指すために宿主と菌との情報交換の分子メカニズム解明に取り組んだ。

B. 実験方法

1) ウエルシュ菌と菌数測定

菌株は食中毒由来の NCTC8239 株、SM101 株を用いた。菌は Fluid Thioglycolate Glucose (FTG) 培地で培養後、PBS で洗浄してからグルコース不含ダルベッコ MEM 培地 (DMEM) + 0.4 % soluble starch (DMEM/SS) に懸濁し下記の種々の実験に用いた。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 μ 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 (NCTC8239 株) または 65°C (SM101 株) で 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* ウエルシュ菌感染実験 (共培養系)

① 24 ウェル・プレート共培養系

ヒト結腸由来細胞株 Caco-2 細胞は、10% ウシ胎児血清 (FCS) 含有 DMEM (グルコース含有) を用いて培養した (DMEM/FCS)。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 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エルシュ菌を接種し、様々な時間で培養後のウエルシュ菌栄養型菌数、芽胞数を上述の方法で測定した。また、経時的に菌を採取し、抽出した RNA により菌の遺伝子発現を解析した。

② トランスウェル共培養系

DMEM/FCS を用いて培養した Caco-2 細胞をトランスウェル内に播種し 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上で、トランスウェル内に菌を接種、CO₂ インキュベーターで培養し、経時的に TER を測定した。

3) マウス糞便抽出液の調製

4 週齢の dyd マウスの飼育ケージ内に散乱する糞便を採取し、重量を測定後、MiliQ 水を 5 倍量 (w/v) となるように加え、5 分間 vortex で攪拌した。その後、4°C、9,000 \times g、20 分間遠心処理した遠心上清液を糞便抽出液とした。

4) マウス糞便抽出液中の芽胞形成阻害活性の測定

ウエ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由来因子 (糞便抽出液) 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 96 ウェル・マイク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 (DMEM/SS/DCA で希釈) 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。培養後の培養液の一部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。

8) 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。遺伝子破壊に必要となる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) 芽胞形成培地の検討

食中毒株が宿主に下痢を引き起こすた

めには、宿主体内に摂取された菌が消化管内で芽胞を形成すると共にウエルシュ菌エンテロトキシン (以下、CPE) を産生することが必要である。研究開始当初使用した *in vitro* 実験条件下 (DMEM、グルコースを含む) ではウエルシュ菌は芽胞を形成せず、芽胞形成に伴い産生されることが知られる CPE 産生も見られなかった (図 1)。これは培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium、以下 DMEM) 中に存在するグルコースが芽胞形成や CPE 産生を抑制しているためと思われた。ウエルシュ菌は Duncan-Strong 培地 (以下、DS 培地) と呼ばれる芽胞形成培地中で高率に芽胞形成するが、この培地には糖として soluble starch (以下、starch) (表 1) や raffinose が添加される。そこで DMEM のグルコースを starch (最終濃度 0.4%) に置き換えた培地 (以下、DMEM/SS) を用いたときに芽胞形成が引き起こされるか検討した。その結果、図 2 に示すように DMEM/SS を使用することによって熱処理耐性の芽胞が培養上清中に検出された。同時に培養上清中の CPE 産生も調べたところ、Western blot で確認できるほどの量ではなかったが、逆受身ラテックス凝集反応により 10 ng/ml 程度の CPE 産生が確認できた (図 2)。以上の結果、培地の糖が芽胞形成に決定的な影響を持つこと、DMEM/SS 培地を用いれば宿主細胞との共培養系でウエルシュ菌の芽胞形成を観察することが可能となることが明らかになった。

2) グルコース非存在下での食中毒株によるバリア破壊

培地中の糖をグルコースから starch に置き換えると、宿主消化管内で引き起こせる芽胞形成が *in vitro* でも再現できることから、食中毒株のバリア破壊能を DMEM/SS 培地を用いて再評価した。その結果、通常の DMEM ではまったくバリア破壊能を示さなかった食中毒株も、starch を糖原とした場合には緩やかなバリア破壊能を示すことが明らかになった (図 3)。これは、消化管内に近い環境に置かれると菌が病原性を発現し、一般に下痢原性を評価する指標に用いられるバリア破壊能を菌が獲得することを示している。すなわち食中毒株は特に環境中の糖に病原性が大きく影響を受け、ある種の糖を利用できる環境下で病原性を発揮し、バリア破壊のような宿主への侵襲性を示すようになるということが明らかになった。

3) 未知の芽胞形成・CPE 産生促進因子

上記の実験はすべて DMEM を基礎培とした結果である。一方、DS 培地を同じ共培養系の培地として用いると、より高度にウエルシュ菌の芽胞形成と CPE 産生が確認できた (図 4)。これは DMEM/SS 培地には存在しない芽胞形成・CPE 産生促進因子が DS 培地には存在し、これに応答して菌は高度に芽胞形成・CPE 産生をしたと考えられる。そこでこの芽胞形成促進因子を同定するために、まず、消化管内に存在し宿主細胞と腸内細菌の相互作用に大きな役割を果たしている酪酸に注目し、酪酸が共培

養系でのウエルシュ菌芽胞形成や CPE 産生に影響を与えるのか検討した。酪酸の濃度は宿主細胞である Caco-2 細胞の生存性に影響を与えない最大濃度まで調べたが、今回得られた結果では、酪酸はウエルシュ菌の芽胞形成にも CPE 産生にも有意な影響は示さなかった (図 5)。

4) 胆汁酸の芽胞形成促進作用

消化管内には様々な消化酵素や消化補助物質が供給される。その中に肝臓から分泌される胆汁酸がある。そこで胆汁酸がウエルシュ菌の芽胞形成を促進する可能性を疑いその効果を評価した。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 6)。この芽胞形成促進効果はわずか 10 μ M の濃度で有意に確認でき、ウエ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 7)。

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 8)。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 9)。以上の結果、ウエ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。

5) 宿主細胞の影響

本研究で開発した *in vitro* 実験系は、初めてウエ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)。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、宿主細胞がウエ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10、11)。

6) DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

デオキシコール酸が芽胞形成・毒素産生を亢進させる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、3、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13)。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14)。

7) 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15)。阻害活性は 100,000×g、1時間の超遠心上清に存在し、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16)。また、75°C、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17)。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18)。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。

8) ウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子破壊株の解析

ウエルシュ菌食中毒株は培地の糖の種類に応答してバリア破壊能を発現することは既に述べた(図3)。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(*cpe*(-)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(図12)。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(図19)、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(*cpe*(+)株)の調製も行い、これらの菌株と *in vitro* 実験系を使用することで、ウエ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を整えた(図19)。

次に Caco-2 細胞への細胞傷害性について調べた。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