

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。一方 cpe(-)株では同条件下では特に細胞が傷害される像を観察できなかつた (図 20)。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 21)。

D. 考察

本厚生労働科学研究では、まず初年度にウエ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。また、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(培地中の糖)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。これはウエ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、またウエルシュ菌

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。

平成 24 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。まず高濃度 (5 mM 以上) のグルコースが芽胞形成をほぼ完全に抑制することを確認し、グルコースを starch に置き換えるとある程度まで芽胞形成・毒素産生性が回復することを確認した。また、この条件下で各種胆汁酸を添加すると芽胞形成・毒素産生が強く誘導されること、誘導効果は胆汁酸の種類により異なり、デオキシコール酸で最も効果的に (10 μ M の濃度で確認できた) みられることを証明した。これらの結果は、ウエルシュ菌が腸管内で芽胞形成・毒素産生して下痢を引き起こす際には、胆汁酸が一種の誘導因子となっており、またこれを感知するシステムを菌が持っていることを示している。

これらの結果を受けて最終年度には、ウエルシュ菌の胆汁酸感知システムを解明すべく、デオキシコール酸の芽胞誘導メカニズムの解明を試みた。その結果、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、あるいは直接 Spo0A に作用してこれを活性化、芽胞形成を促進することを明らかにした。また、胆汁酸以外にもウエルシュ菌の芽胞形成・毒素産生に影響を与える因子が存在することを疑い、マウス糞便中にその存在を求めたところ、糞便中に芽胞形成を阻害する活性を認めた。活性物質は分子量 10,000

以上の易熱性物質で、生体高分子がその本態と思われた。この阻害物質はマウスなど小動物の消化管内にあって、ウエルシュ菌食中毒の実験動物モデルを作成することを困難にしている可能性がある。

消化管内因子の芽胞形成・毒素産生への効果を調べたところ、少なくとも酪酸は本実験系では有意な影響を持たないことが確認された。酪酸は他の短鎖脂肪酸と共に腸管生理に重要な働きを担っており、主に大腸内の腸内フローラによって産生される。ウエルシュ菌が感染して病態を引き起こす部位は主に小腸下部と考えられており、酪酸のような脂肪酸量はこの部位ではウエルシュ菌に作用する機会は少ないのかもしれない。一方、胆汁酸は十二指腸内に分泌され、ウエルシュ菌が小腸下部に至る過程で十分暴露される。おそらくウエルシュ菌は胆汁酸を自らが宿主環境内へ侵入したことを感知するためのシグナルとして利用し、これが引き金となって下痢発症へのカスケードを開始させるものと考えられる。芽胞形成・エンテロトキシン産生を誘導するために必要なデオキシコール酸濃度はわずか数 μM で、10 μM 以上ではその効果は最大に達した(図6)。小腸内の胆汁酸濃度は一般的に0.1~数 mM と考えられており、ウエルシュ菌が宿主体内で実際に胆汁酸を感知している可能性は極めて高い。また、10 μM という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る。おそらくウエルシュ菌は胆汁酸を分子として(界面活性剤

の効果としてではなく)認識する機構を持ち、これに嘔吐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、ウエ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、ウエ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エルシュ菌の芽胞形成に影響を与える因子が種々報告されている。しかし実際にウエ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、ウエ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、宿主がウエ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。そしてウエルシュ菌は、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。

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メカニズムを解析したところ、デオキシコール酸の作用点は芽胞形成のマスター・レギュレーターである Spo0A 上流であるか、あるいは Spo0A そのものであることが示唆された。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・毒素産生に至る最初の引き金現象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ないことには、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カツールとなるだけ

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。

トランスウェルを用いたバリア破壊実験系は一般に下痢症のモデルになると解釈されている。この実験系にウエルシュ菌を感染させると、培地中の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た(図2)。これは本バリア破壊実験系がウエルシュ菌食中毒の *in vitro* モデルとなりうることを示しているが、これだけ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い。そこで *cpe(-)* 株と *cpe(+)* 株を作成し、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を試みた。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と関与し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発見することも期待できる。

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.

G. 研究発表

なし。

H. 学会発表

- 1) Hidenobu Hoshi and Masami Miyake. An *in vitro* model system for studying *Clostridium perfringens* type A infection. International Conference on Global Issues Influencing Human and Animal Health for ASEAN; One Health Concept. June 2011. Kohn Kaen, Thailand.
- 2) Hidenobu Hoshi, Kaori Kondo, Masataka Oda, Masahiro Nagahama, Shigeki Yamamoto, Yoichi Kamata, and Masami Miyake. An *in vitro* model system for studying *Clostridium perfringens* type A infection. IUMS2011. Sept. 2011. Sapporo, Japan.
- 3) 星 英之、近藤香織、山本茂貴、鎌田洋一、三宅眞実. ウエルシュ菌食中毒の発症メカニズムを解析するための *in vitro* 実験系について. 第32回日本食品微生物学会. 2011年11月. 東京.
- 4) 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エ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. 2012年10月. 福岡
- 5) 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. 2013年3月. 千葉

- 6) Mayo Yasugi, Hidenobu Hoshi, Shigeki Yamamoto, Yoichi Kamata, and Masami Miyake. The impact of bile acid on the sporulation of *Clostridium perfringens* *in vitro* infection model. ClosPath 2013. Sep. 2013. Palm Beach, Australia.
- 7) 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. Sep. 2013. Palm Beach, Australia.
- 8) 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. 2014年3月. 東京.

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 芽胞形成に対する培地中の糖の重要性

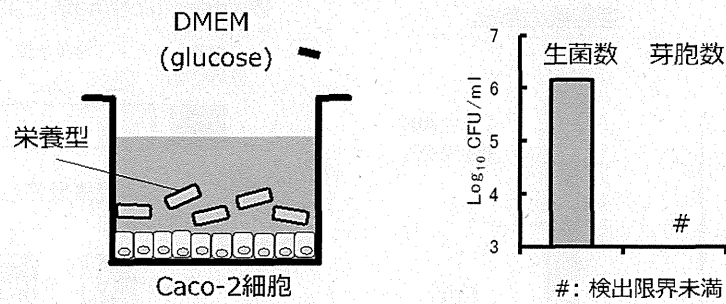


表1 DS培地の組成

Ingredient	Conc.(g/L)
Proteose peptone	15
Yeast Extract	4
Na · thioglycolate	1.0
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	10.0
Soluble starch	4.0

図2 芽胞形成・毒素産生に対する培地中の糖の効果

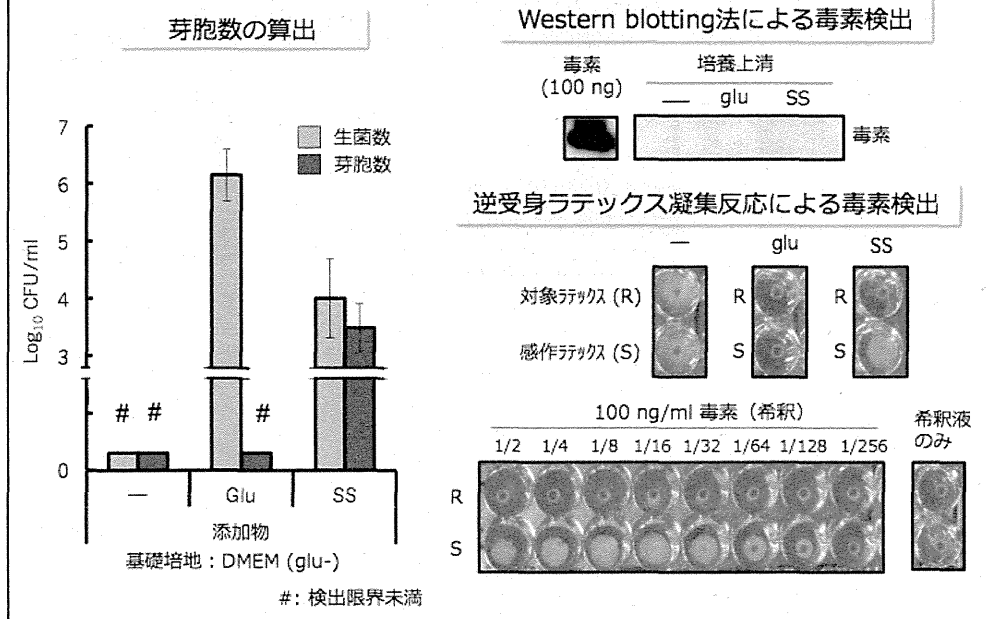


図3 Starch添加によるバリア破壊能発現

異なる培地条件によるバリア破壊能の違い

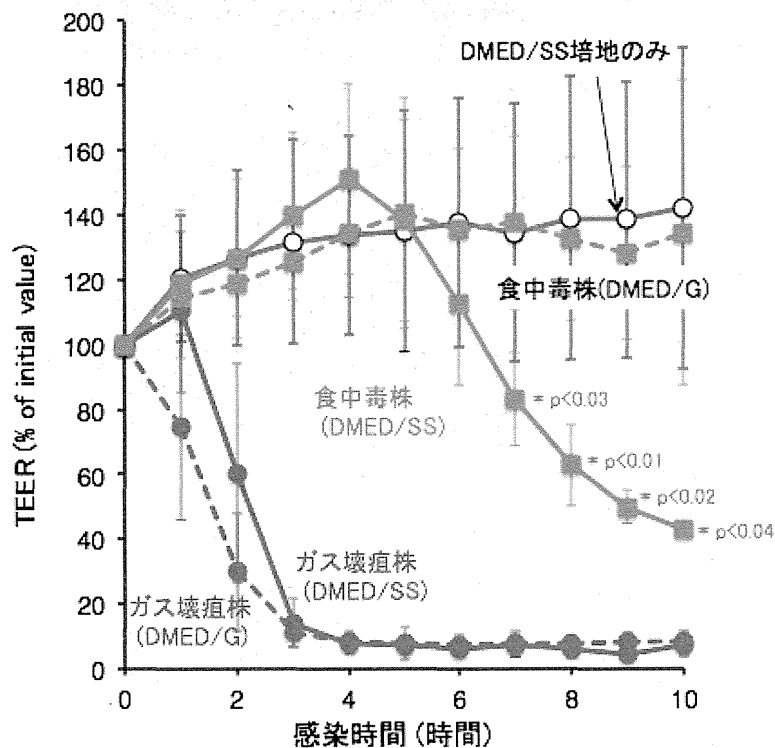


図4 DMEM-Sでは芽胞形成が不十分

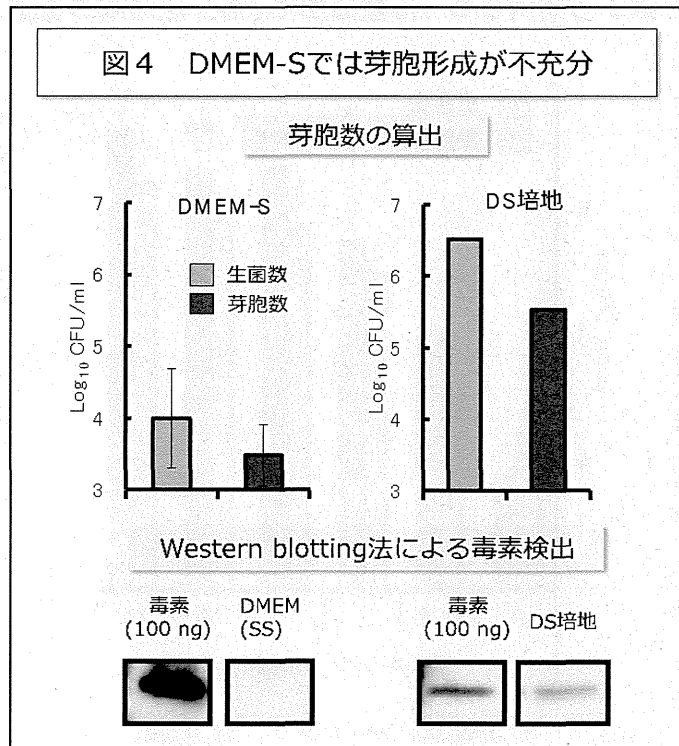


図5 芽胞形成・毒素産生に対する酪酸の効果

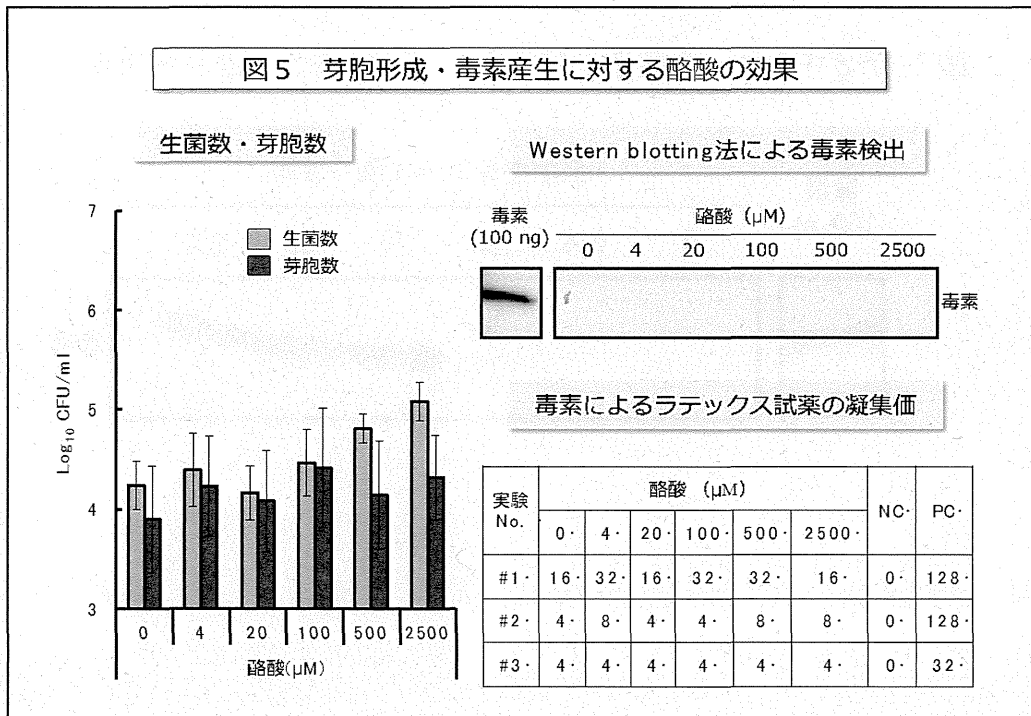


図6 デオキシコール酸添加による芽胞形成の促進

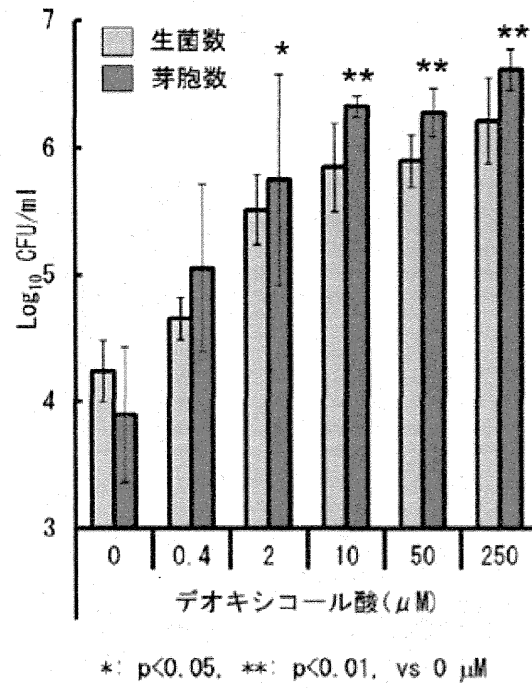


図7 デオキシコール酸添加によるエンテロトキシン産生の亢進

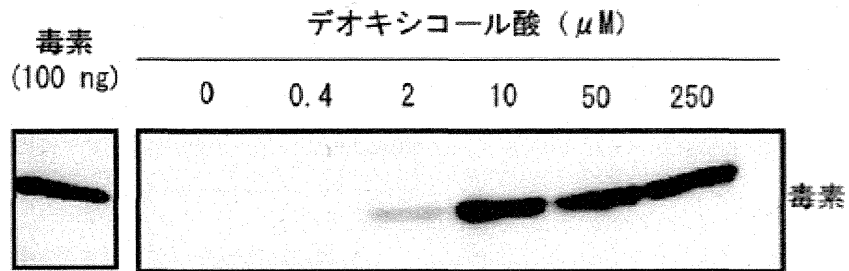


図8 各種胆汁酸の芽胞形成への影響

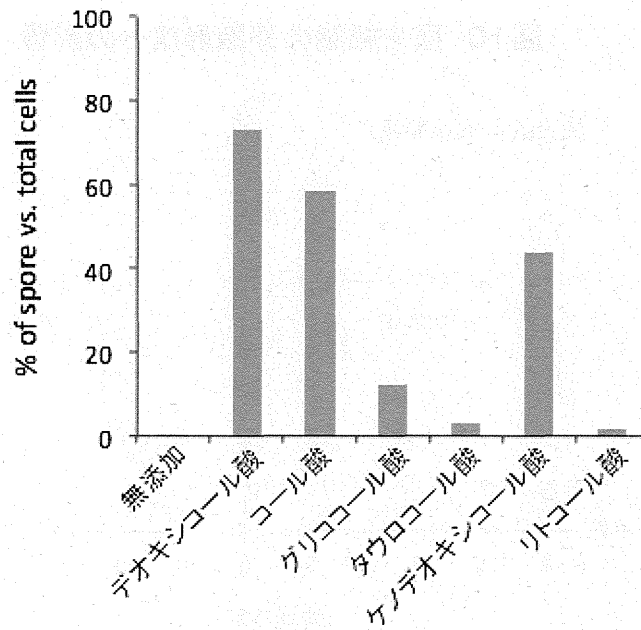


図9 各種胆汁酸の毒素産生への影響

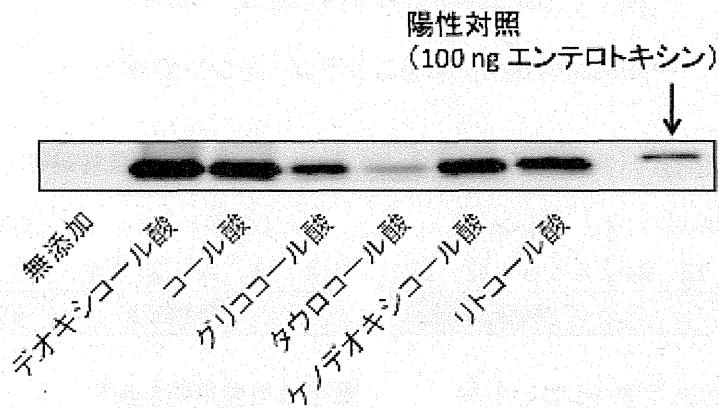


図10 宿主細胞の芽胞形成への影響

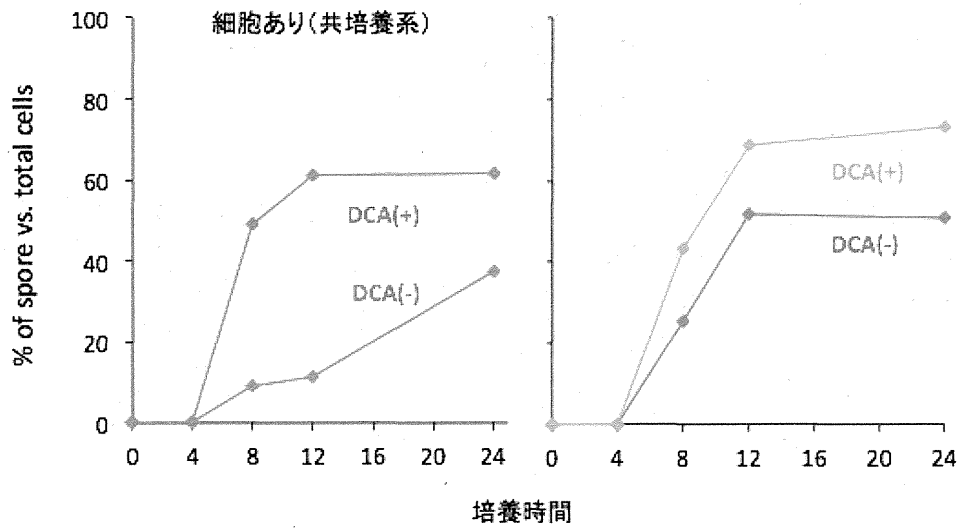
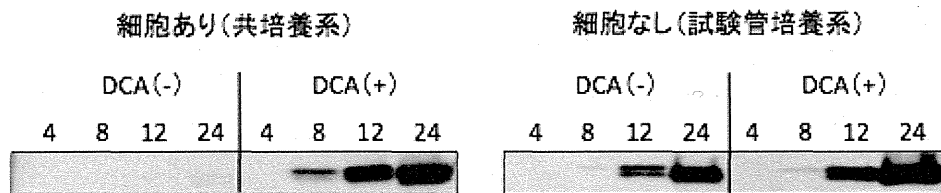


図11 宿主細胞の毒素産生への影響

—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12 Targetronを用いたCPE欠損株の作製

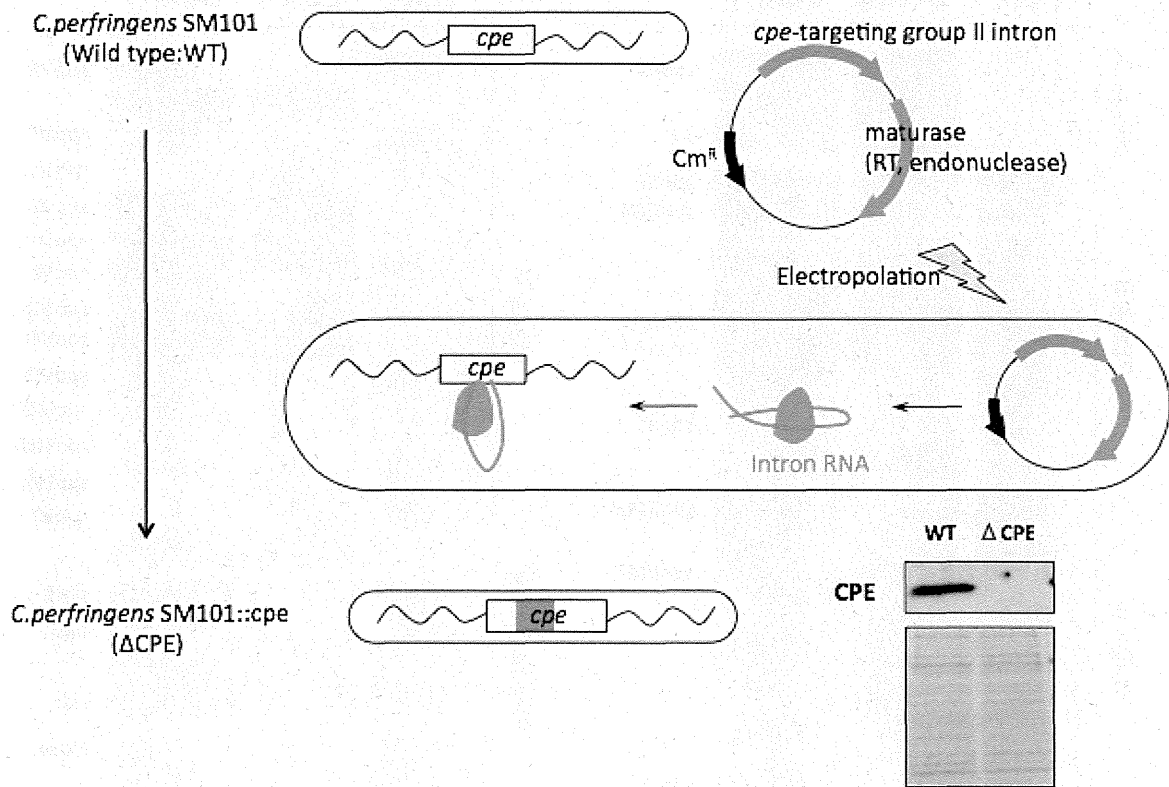
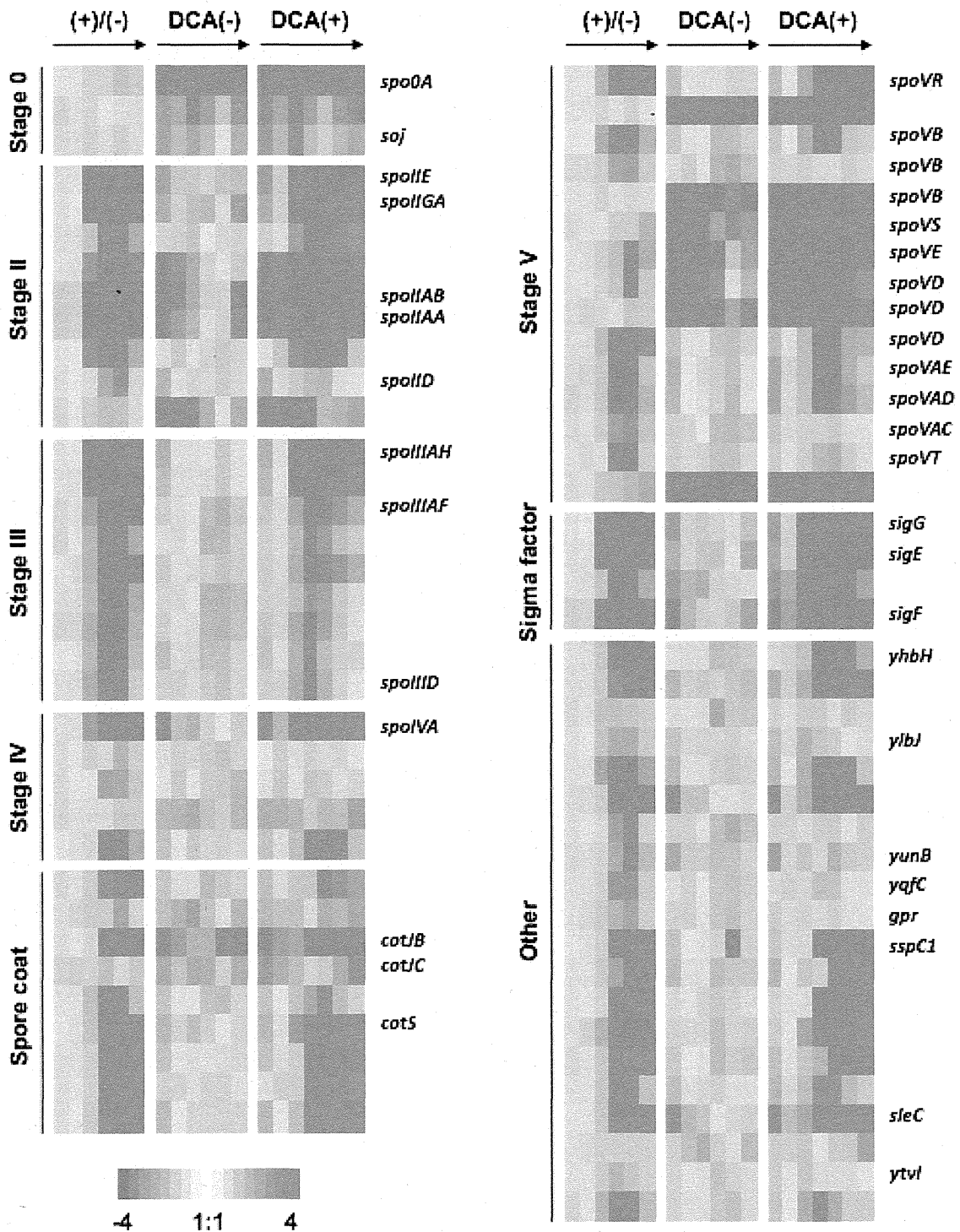
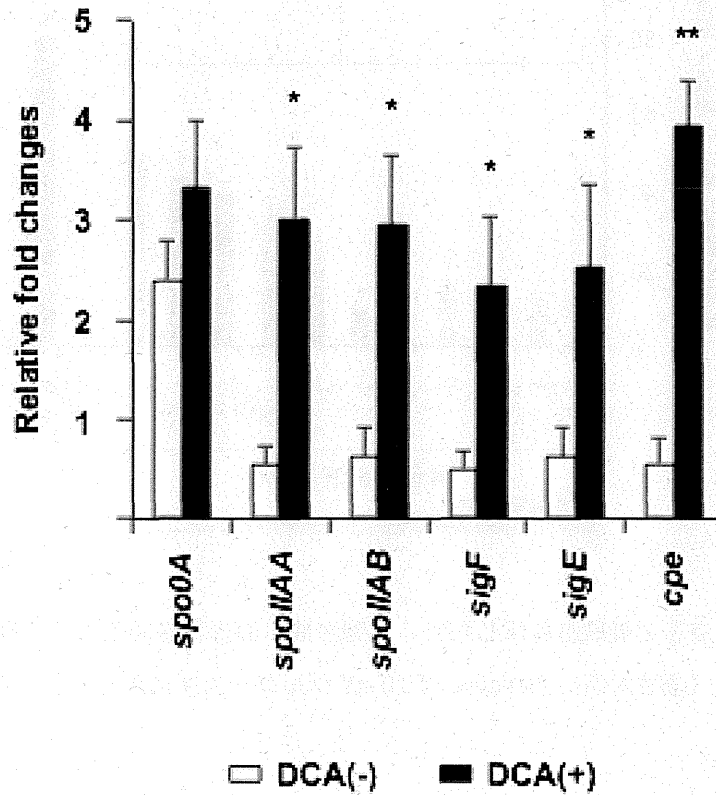


図13 DNAマイクロアレイ解析のヒートマップ



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 リボソーム 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。

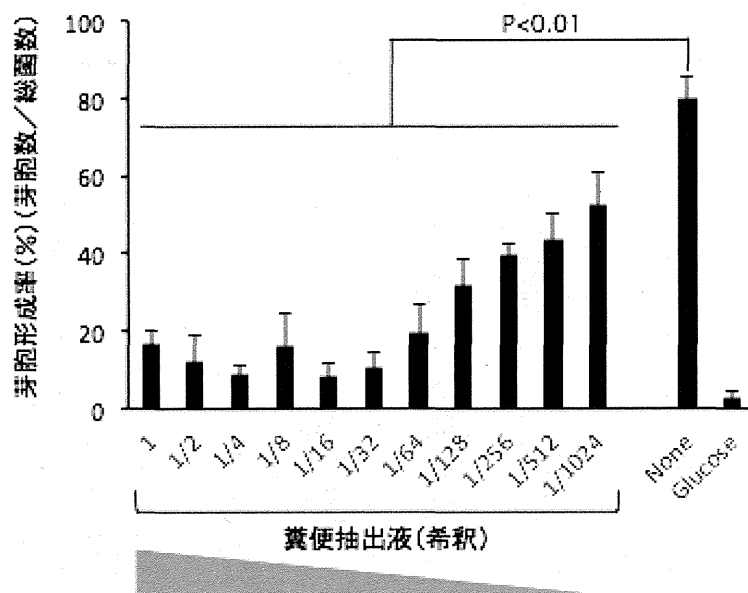
図14 q-PCRによる各遺伝子の発現量解析



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 リボソーム RNA の発現量で標準化して示している。

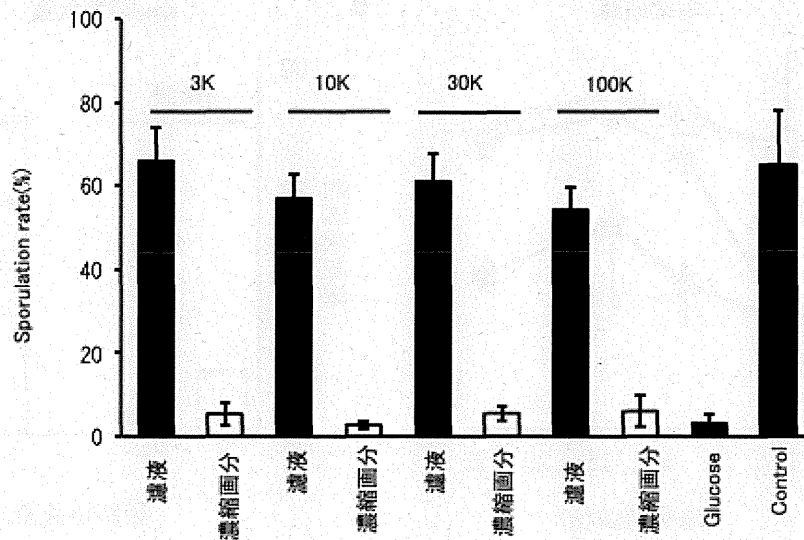
* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

図15 マウス糞便抽出液によるウェルシュ菌芽胞形成抑制



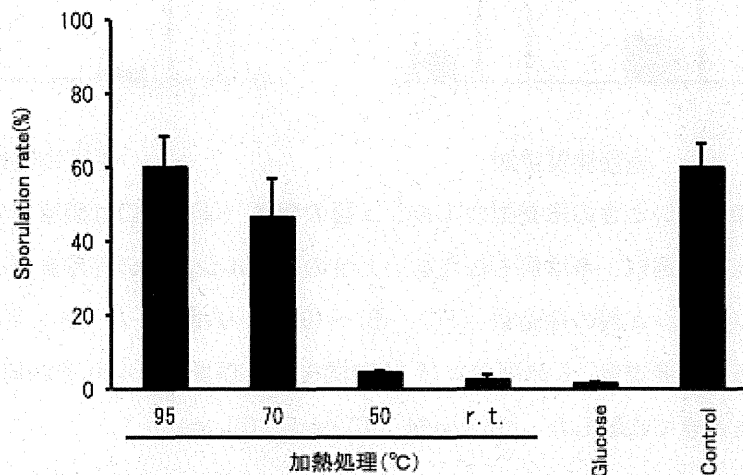
マウス糞便抽出液を2倍段階希釈した後、芽胞形成への影響を評価した。Noneは何も加えないときの芽胞形成率（陽性対照）、Glucoseは20 mM グルコースを加えたときの芽胞形成率（陰性対照）。

図16 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



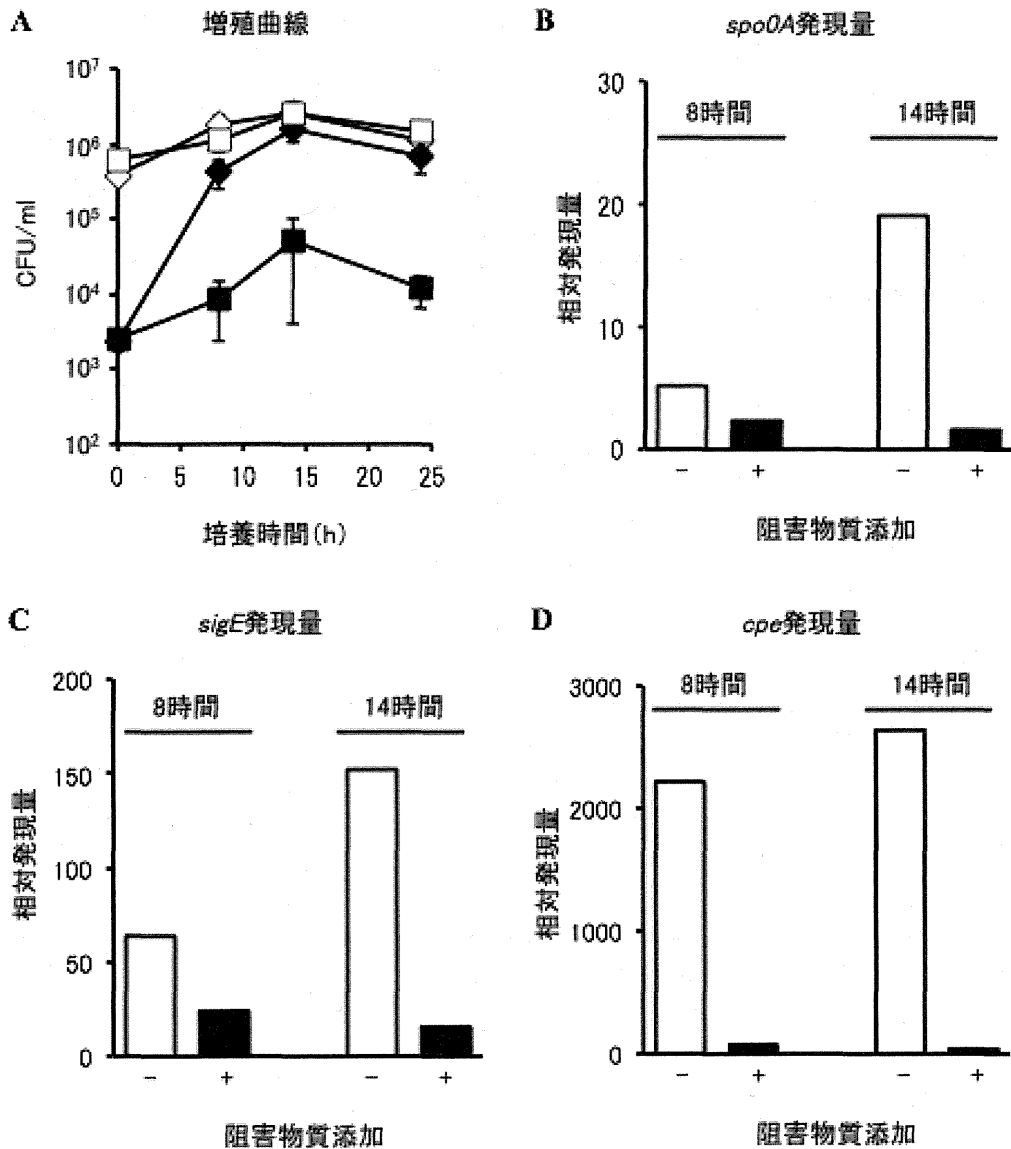
糞便抽出液を限外ろ過膜でろ過後、フィルターを通過した画分（濾液）とフィルター上に濃縮された画分（濃縮画分）のそれぞれについて、芽胞形成に対する効果を評価した。Controlは何も加えない条件での芽胞形成率（陽性対照）、Glucoseは20 mM グルコースを加えたときの芽胞形成率（陰性対照）。3K~100Kはそれぞれ使用したフィルターの分画分子量（分子量3,000~100,000）を示す。

図17 ウェルシュ菌芽胞形成阻害物質の耐熱性の検討



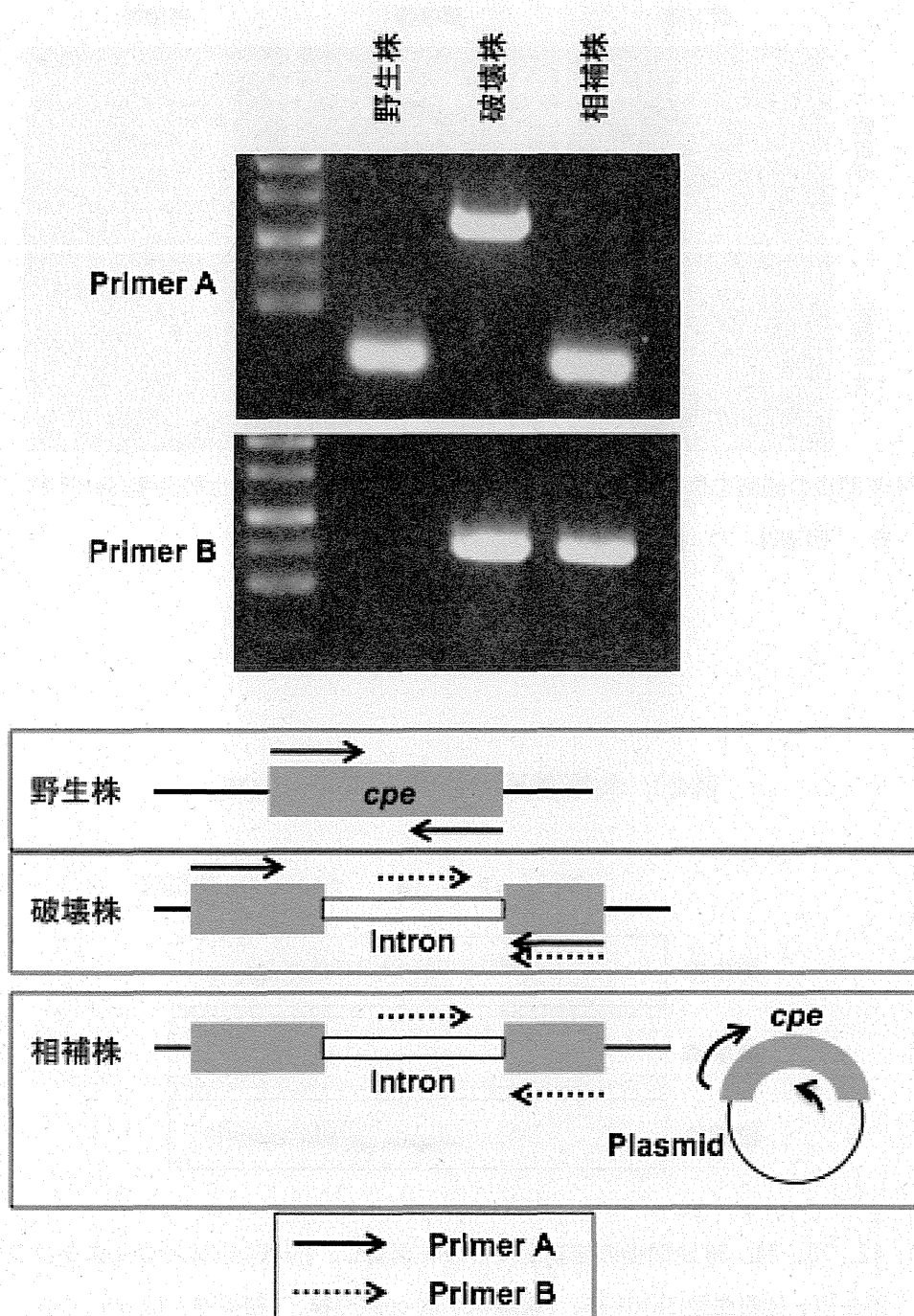
糞便抽出液を100,000×g、90分間超遠心した上清をさらに分画分子量100,000の限外濾過膜でろ過したものについて、室温（r.t.）、50°C、70°C、95°Cで20分間処理後、芽胞形成に対する抑制効果を評価した。Control、Glucoseは図16を参照。

図18 阻害物質の作用機序の検討



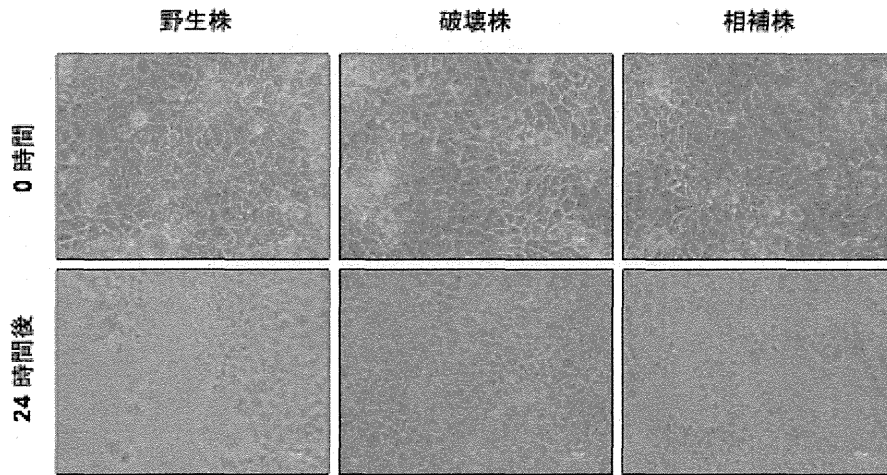
(A) ◇は何も加えないときの栄養型ウエルシュ菌の菌数 (CFU)、□は阻害物質を加えたときの栄養型ウエルシュ菌の菌数、◆は何も加えないときのウエルシュ菌の芽胞数 (CFU)、■阻害物質を加えたときのウエルシュ菌の芽胞数 (CFU)。 (B)~(D) 16S リボゾーム RNA の発現量に対する各種芽胞形成関連遺伝子の発現量。8 時間および 14 時間後の発現量を、それぞれ何も加えないとき、阻害物質を加えたときで比較した。 (B) *spo0A*、(C) *sigE*、(D) *cpe*。

図19 菌株の遺伝子保有状況の確認



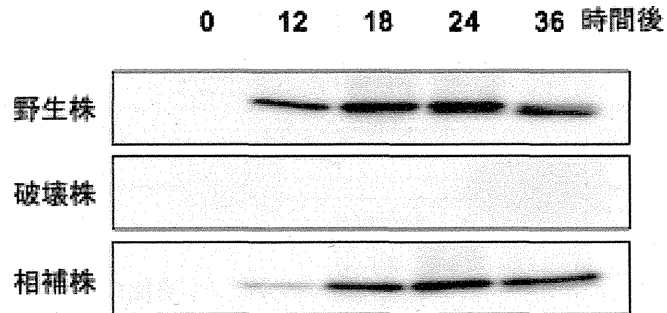
「野生株」は野生型 SM101 株、「破壊株」は *cpe*(-) 株、「相補株」は *cpe*(+) 株。それぞれの菌株のライゼートをテンプレートとして Primer A、Primer B を用いて PCR を行った。

図20 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21 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22 - 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
の解析と新型下痢毒素の性状解析

岩手大学 農学部

鎌田 洋一