

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試験法に関する研究  
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生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 していると思われた。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 件あたりの患者数がもっとも多いことを特徴とする<sup>1)</sup>。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<sup>1)</sup>。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に制御されていて、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  $\mu$ 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 (NCTC8239 株)または 65 (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)

### 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。

### 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、CO<sub>2</sub> 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、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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l/well でさらに加えた後、37 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る。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させる芽胞形成が *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  $\mu$ 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十分に

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 *spol1AA*, *spol1AB*, *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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。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℃、20 分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った(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  $\mu$ 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、またこれを感じ取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 $\mu\text{M}$ で、10 $\mu\text{M}$ 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 $\mu\text{M}$ 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。

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毒素を産生することが知られるが、食中毒症状における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

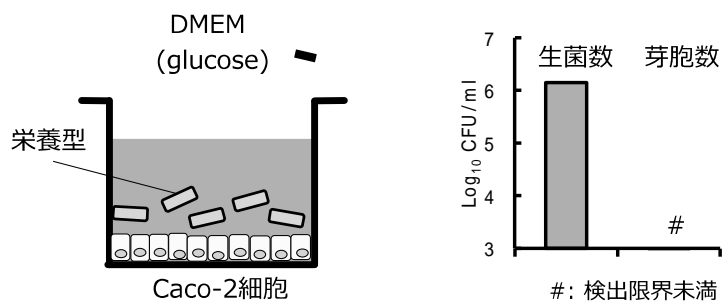


表1 DS培地の組成

Ingredient	Conc.(g/L)
Protepepe peptone	15
Yeast Extract	4
Na · thioglycolate	1.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> 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

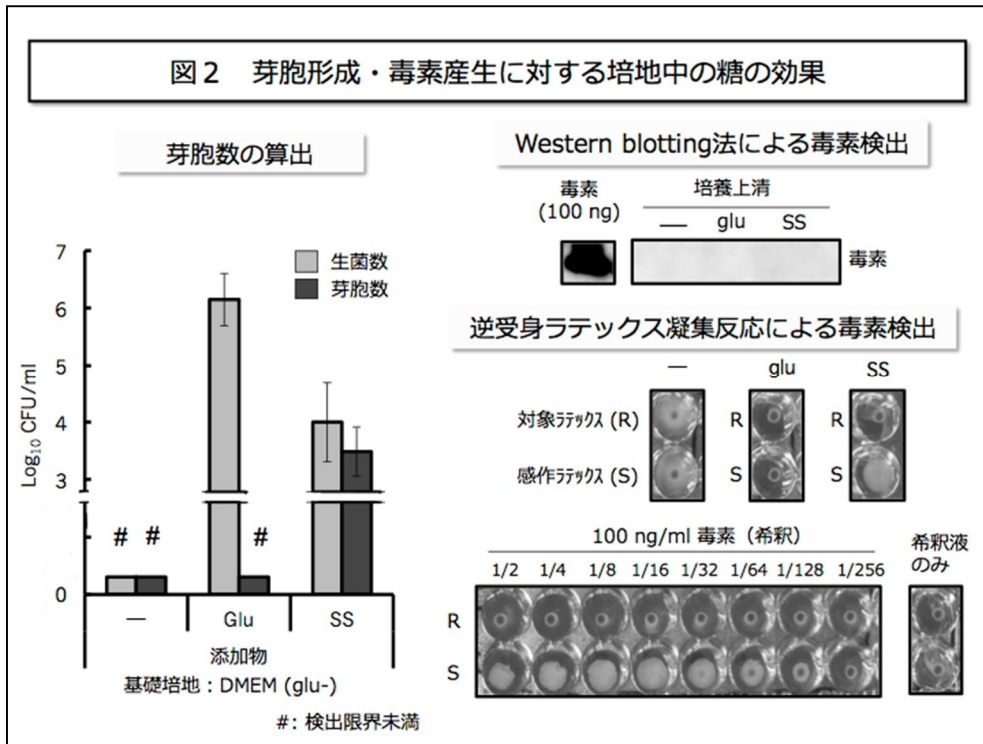


図3 Starch添加によるバリア破壊能発現

異なる培地条件によるバリア破壊能の違い

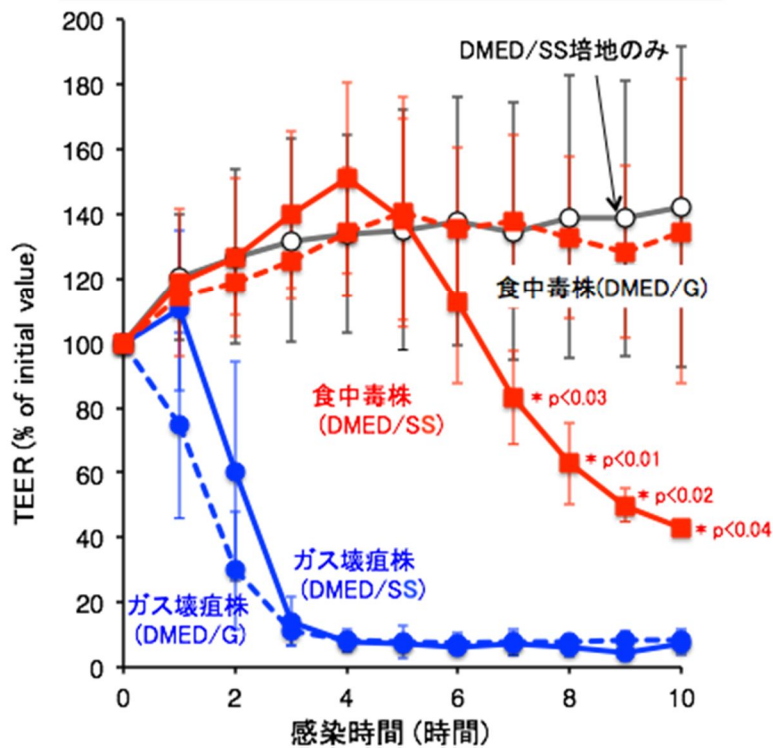






図6 デオキシコール酸添加による芽胞形成の促進

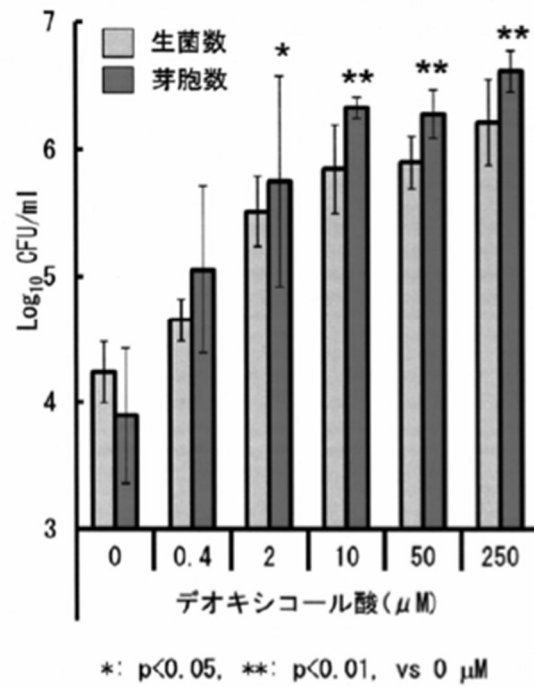


図7 デオキシコール酸添加によるエンテロトキシン産生の亢進

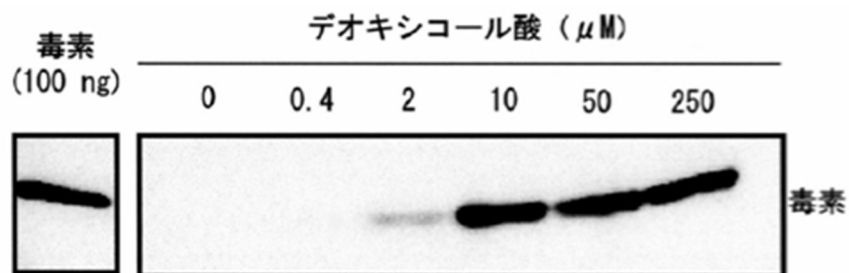


図8 各種胆汁酸の芽胞形成への影響

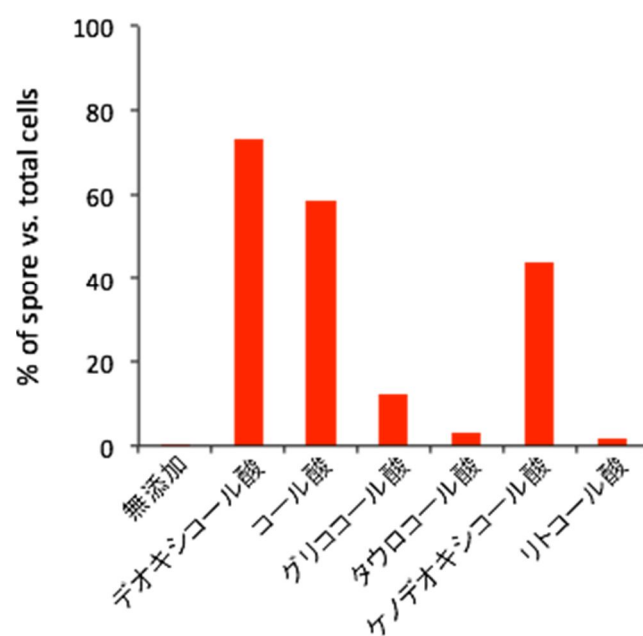


図9 各種胆汁酸の毒素産生への影響

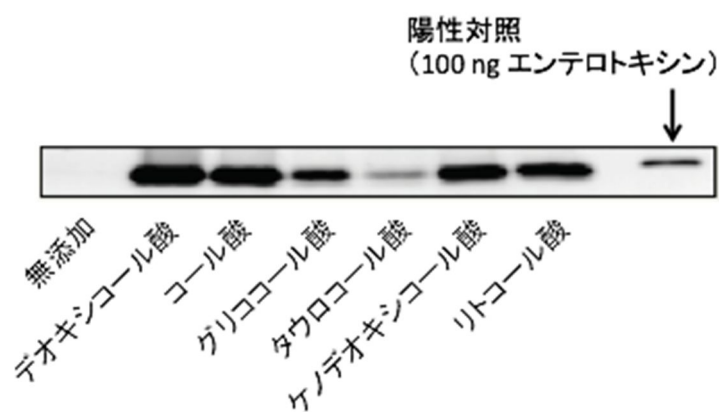


図10 宿主細胞の芽胞形成への影響

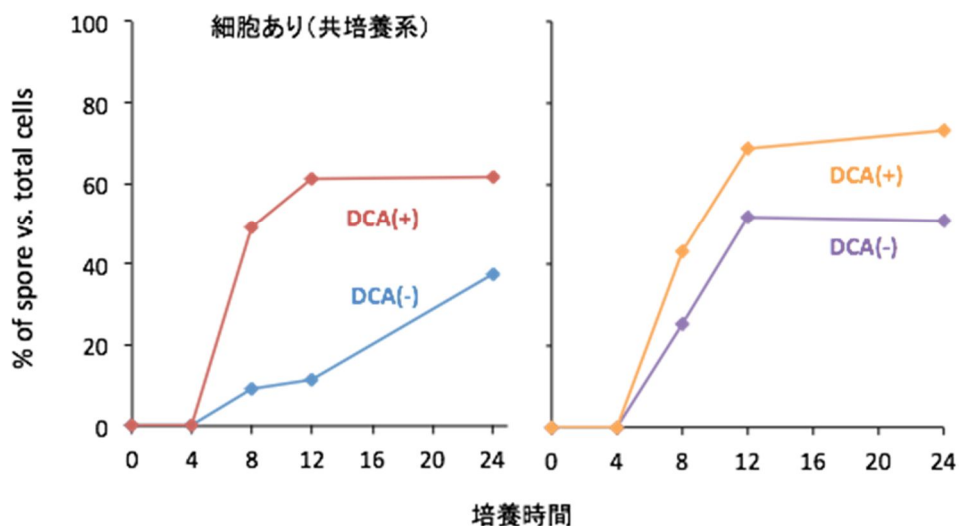


図11 宿主細胞の毒素産生への影響

—Western blotによるエンテロトキシンの検出—

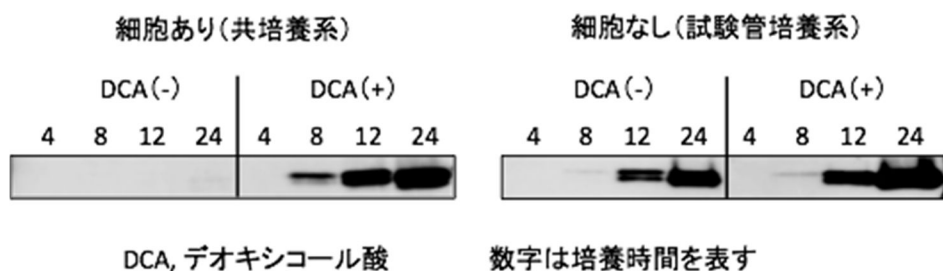


図12 Targetronを用いたCPE欠損株の作製

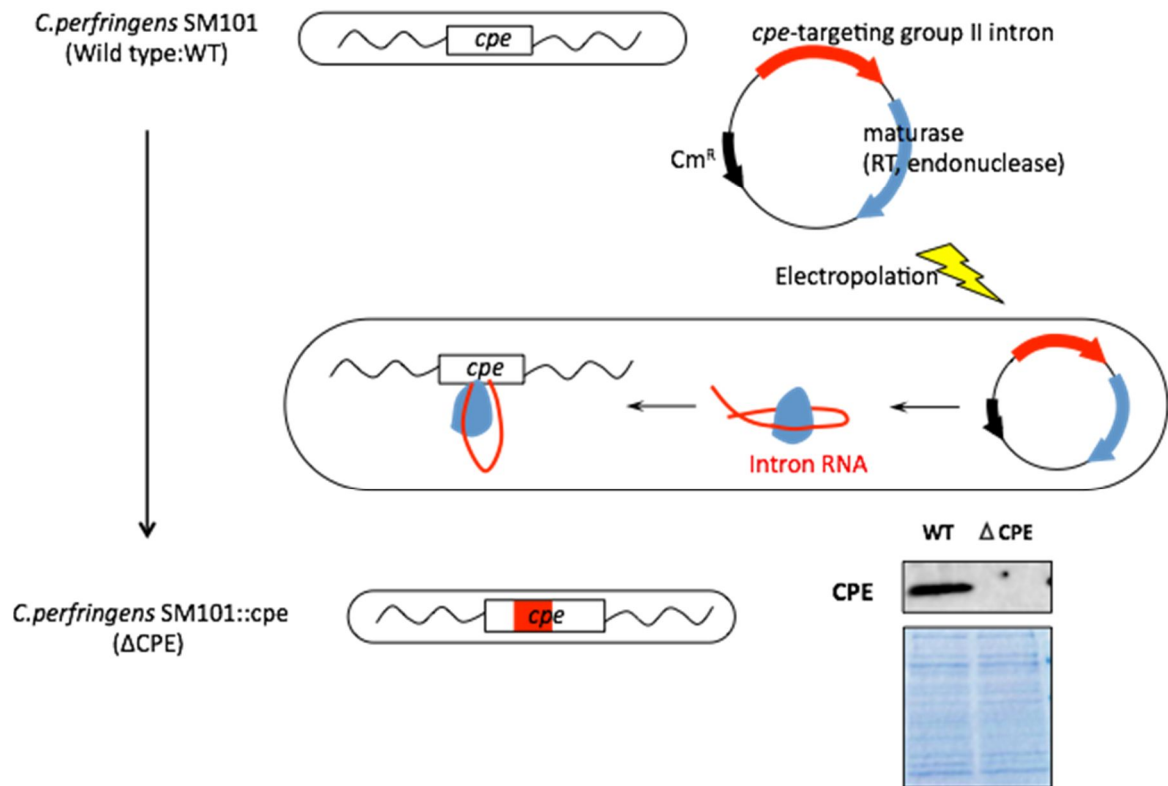
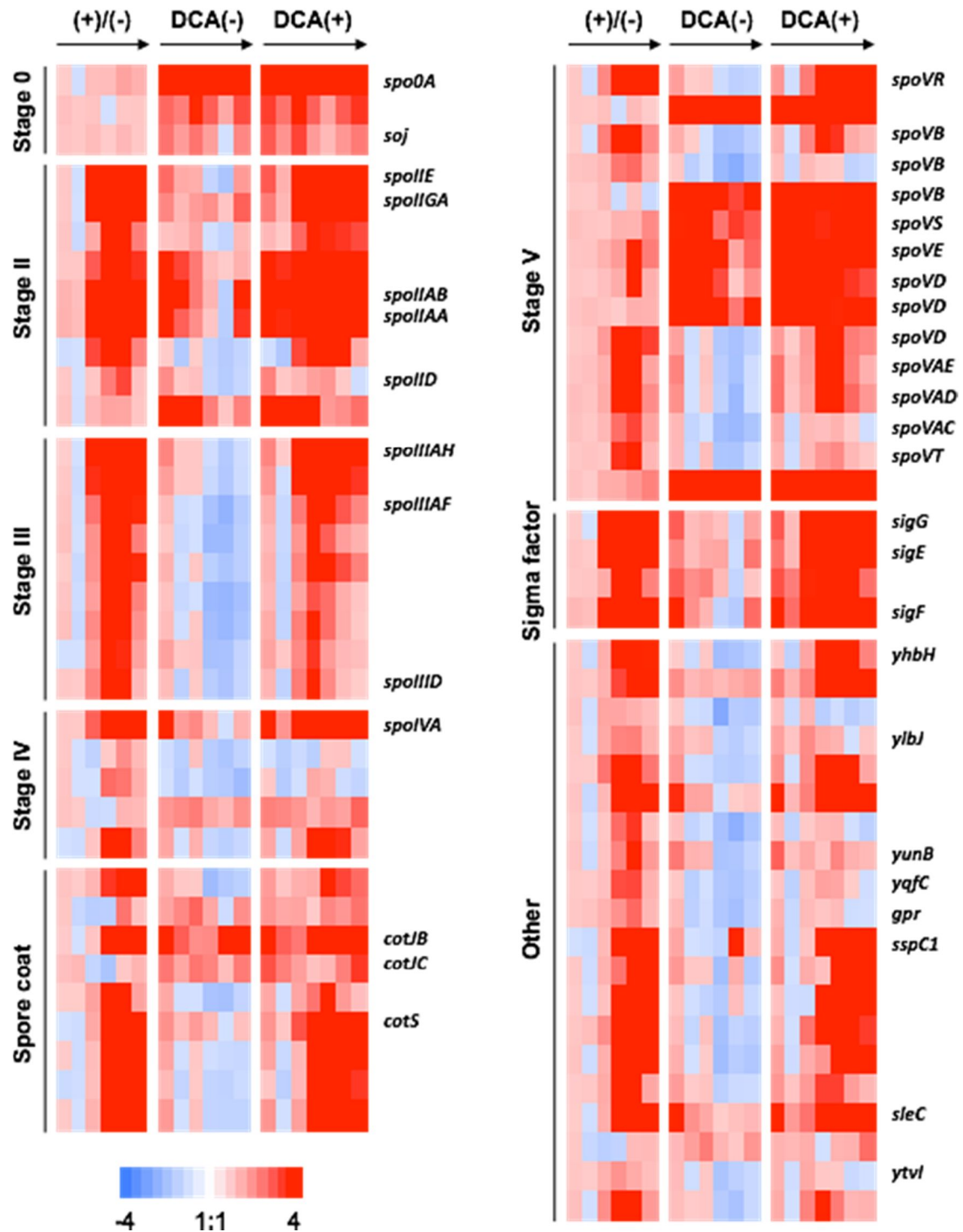
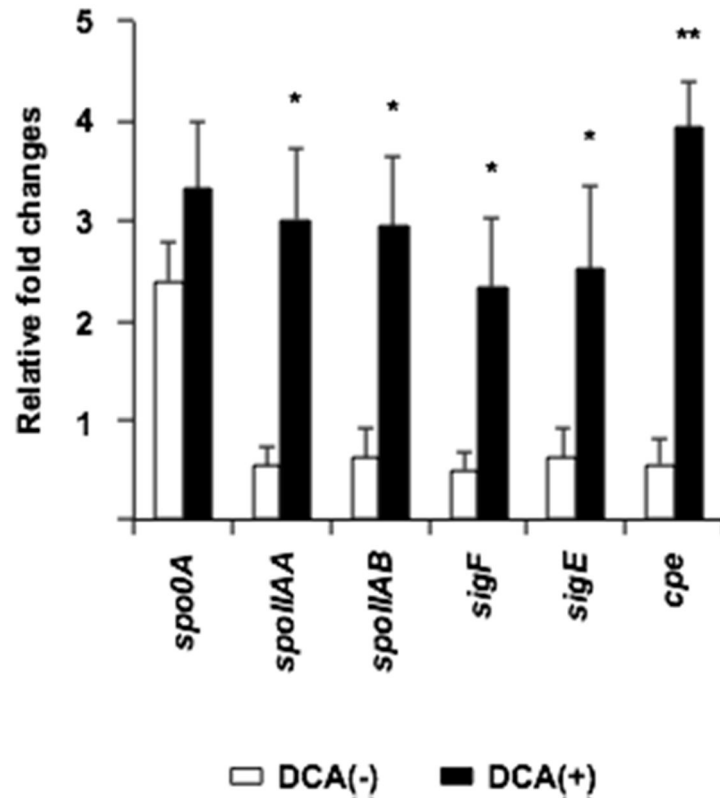


図13 DNAマイクロアレイ解析のヒートマップ



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。

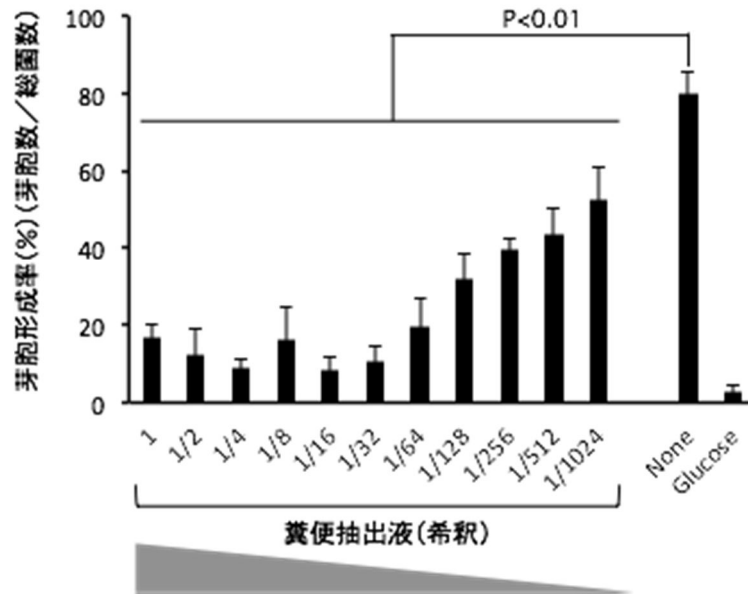
図14 q-PCRによる各遺伝子の発現量解析



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。

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

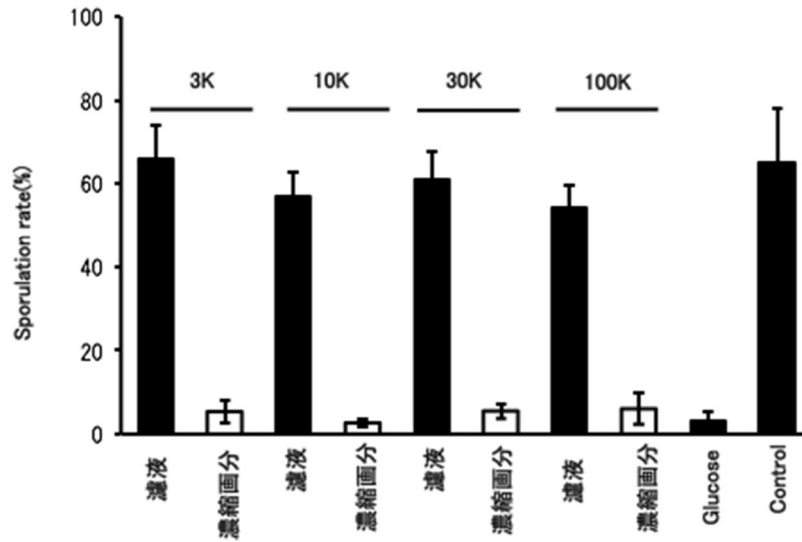
図15 マウス糞便抽出液によるウェルシュ菌芽胞形成抑制



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)。

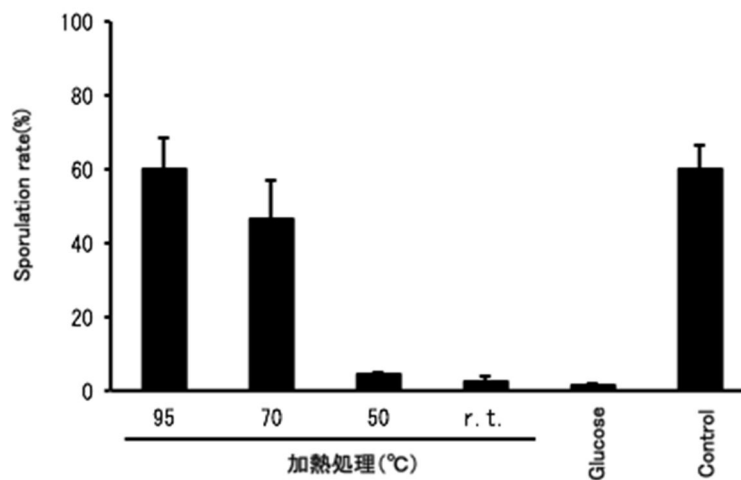


図16 限外濾過によるウェルシュ菌芽胞形成阻害物質の分子量の推定



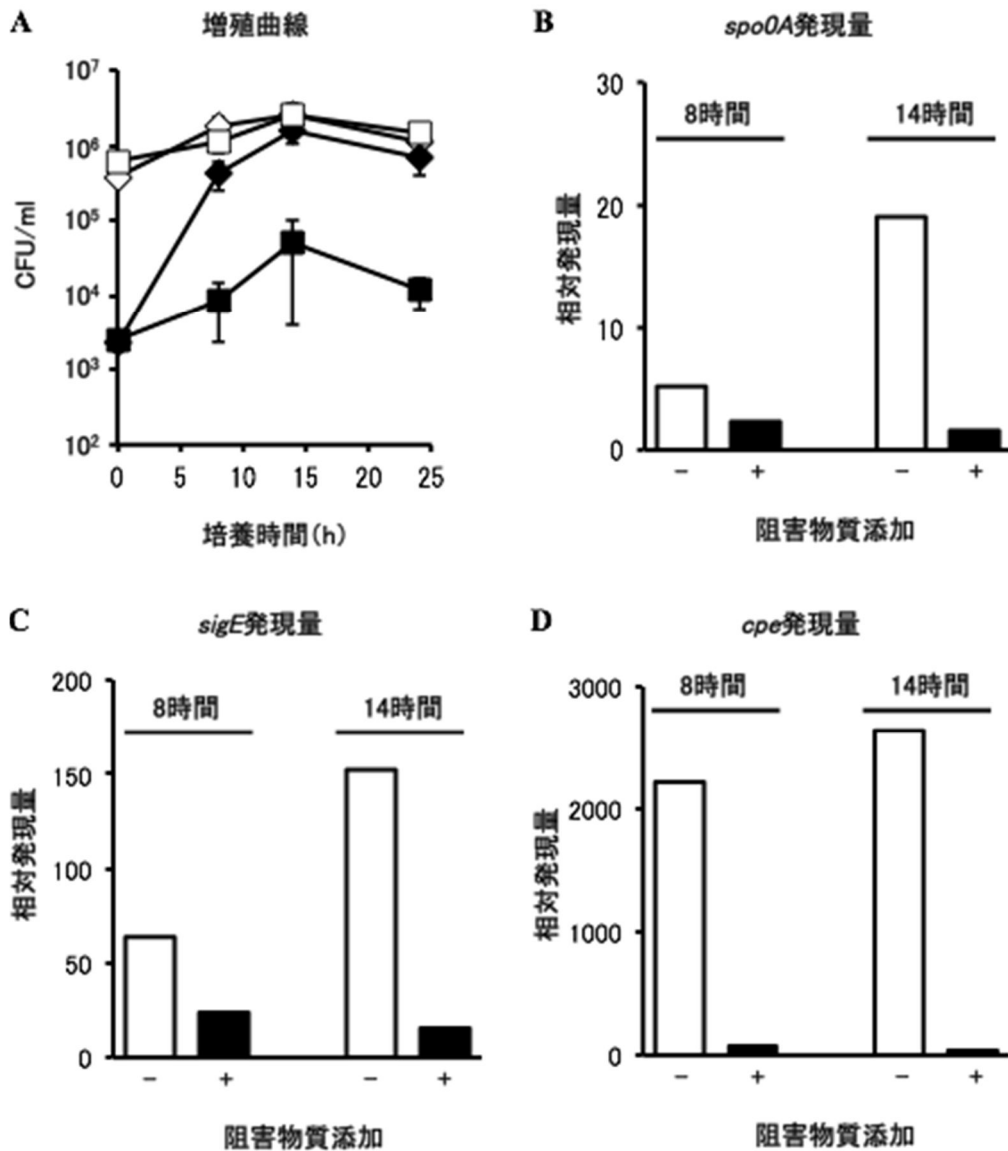
糞便抽出液を限外ろ過膜でろ過後、フィルターを通過した画分（濾液）とフィルター上に濃縮された画分（濃縮画分）のそれぞれについて、芽胞形成に対する効果を評価した。Controlは何も加えない条件での芽胞形成率（陽性対照）、Glucoseは20 mM グルコースを加えたときの芽胞形成率（陰性対照）、3K~100Kはそれぞれ使用したフィルターの分画分子量（分子量3,000~100,000）を示す。

図17 ウェルシュ菌芽胞形成阻害物質の耐熱性の検討



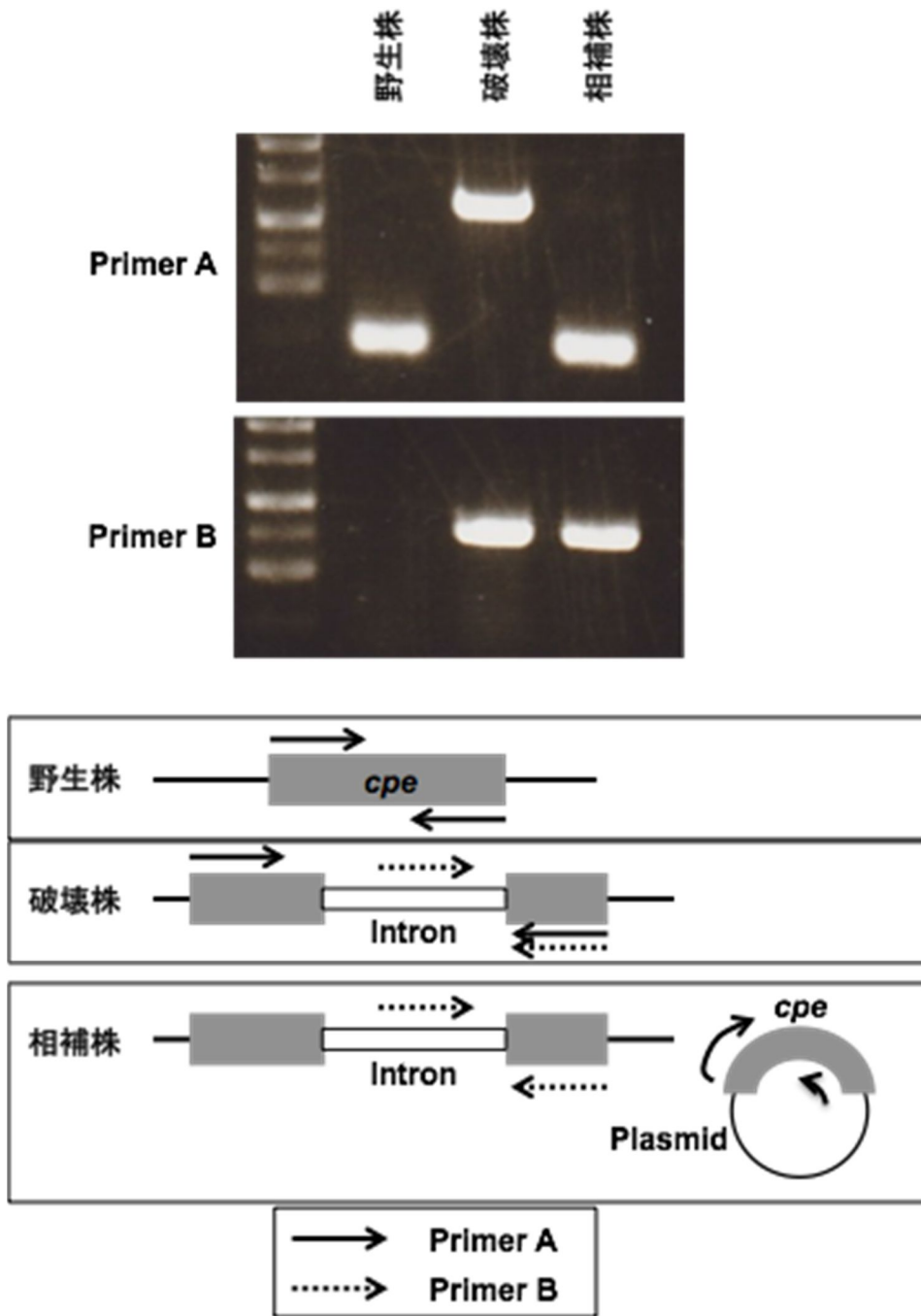
糞便抽出液を100,000 × g、90分間超遠心した上清をさらに分画分子量100,000の限外濾過膜でろ過したものについて、室温（r. t.）、50、70、95で20分間処理後、芽胞形成に対する抑制効果を評価した。Control、Glucoseは図16を参照。

図18 阻害物質の作用機序の検討



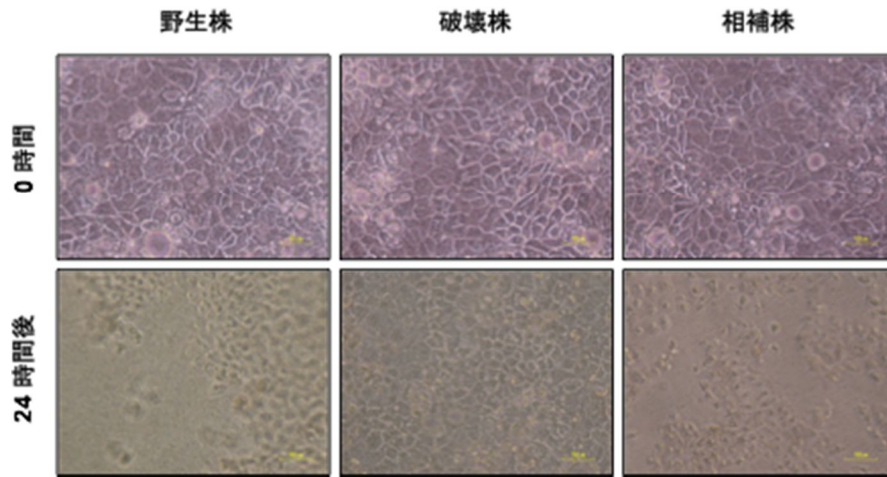
(A) は何も加えないときの栄養型ウエルシュ菌の菌数 (CFU)、 は阻害物質を加えたときの栄養型ウエルシュ菌の菌数、 は何も加えないときのウエルシュ菌の芽胞数 (CFU)、 阻害物質を加えたときのウエルシュ菌の芽胞数 (CFU)。 (B)~(D) 16S リボソーム RNA の発現量に対する各種芽胞形成関連遺伝子の発現量。8 時間および 14 時間後の発現量を、それぞれ何も加えないとき、阻害物質を加えたときで比較した。 (B) *spo0A*、 (C) *sigE*、 (D) *cpe*。

図19 菌株の遺伝子保有状況の確認



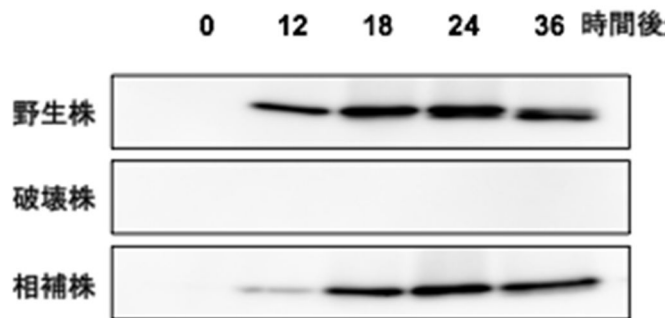
「野生株」は野生型 SM101 株、「破壊株」は *cpe*(-)株、「相補株」は *cpe*(+)株。それぞれの菌株のライゼートをテンプレートとして Primer A、Primer B を用いて PCR を行った。

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。