

機関番号：11201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008-2010

課題番号：20580338

研究課題名 (和文) ブドウ球菌食中毒の新しいパラダイムの確立

研究課題名 (英文) New paradigm of staphylococcal food poisoning

研究代表者

重茂 克彦 (OMOE KATSUHIKO)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：60224309

研究成果の概要 (和文)：

ブドウ球菌食中毒の原因毒素であるブドウ球菌エンテロトキシン群の免疫学的検出法の高感度化に成功し、食品中の総毒素量の定量を可能とした。本法を用いて種々の菌株の毒素産生性を解析し、特定の毒素群の産生が通常の培養温度である 37°C に比してより室温に近い温度条件である 25°C で増強される現象を見いだした。これらの成果は、ブドウ球菌食中毒制御に重要な知見となる。さらに、これまで未知であったブドウ球菌エンテロトキシン A 型 (SEA) の標的細胞が、消化管粘膜下組織の肥満細胞であることを解明した。SEA は消化管内腔から速やかに粘膜下組織に移行し、肥満細胞に結合する。SEA が結合した肥満細胞は脱顆粒により細胞内のセロトニンを放出することにより嘔吐を引き起こすことが推測された。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we developed sensitive immunological detection method (chemi-luminescence sandwich ELISA) of staphylococcal enterotoxins (SEs) and staphylococcal enterotoxin-like toxins (SEIs). Using sandwich ELISA, we examined production of SEs/SEIs in several *Staphylococcus aureus* strains and found that production level of certain SEs/SEIs group (SEG, SEI, SEIM, SEIM and SEIO) enhanced in culture condition with low temperature (25°C) than conventional culture condition (37°C). This phenomenon may be important to understand the role of these SEs/SEIs in food poisoning. We also investigated the behavior of SEA in the gastrointestinal (GI) tract *in vivo* using the house musk shrew (*Suncus murinus*). Immunofluorescence of GI sections showed that perorally administered SEA translocated from the lumen to the interior tissues of the GI tract and rapidly accumulated in certain submucosa cells. These SEA-binding cells in the submucosa were both tryptase- and Fc RI -positive, suggesting these SEA-binding cells were mast cells. SEA binding induced degranulation and release of 5-HT from submucosal mast cells. These observations suggest that the target cells of SEA are submucosal mast cells in the GI tract and that 5-HT released from submucosal mast cells plays an important role in SEA-induced emesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：獣医公衆衛生、食中毒、食品衛生学

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌は健康ヒトの約 30-40%に保菌されている、人類にとって最も身近な病原体である。本菌は種々の毒素を産生し、ヒトの食中毒や毒素性ショック症候群、化膿性疾患、院内感染を引き起こすと共に、種々の動物の感染症の原因としても重要視されていることから、精力的な研究が国内外で進められている。申請者は、ブドウ球菌食中毒の原因毒素であるエンテロトキシン (staphylococcal enterotoxins; SEs) を対象に研究を進めている。SEs はヒトに対し嘔吐活性を示し、食中毒を引き起こすと共に、スーパー抗原活性を有し、毒素性ショック症候群の原因毒素でもある。従来、SE は抗原性の異なる 5 種類 (SEA-SEE) が知られていたが、申請者らの研究グループおよびいくつかの海外の研究グループにより、近年多数の SE 遺伝子の存在が報告され、SEs は極めて多様性が高い毒素群であることが明らかになりつつある。2004 年に、国際ブドウ球菌命名委員会から SEs の命名規約が勧告され、霊長類実験モデルで嘔吐活性を示した物のみを SE と称し、霊長類モデルで嘔吐活性を示さないもの、あるいは霊長類モデルで嘔吐活性を確認されていない物については staphylococcal enterotoxin-like toxin (SE1) と称することとなった (2)。現在、SEs および SE1s は SEA-SE1V の 21 種 (SEF は欠番) が報告されている。新型 SEs および SE1s の食中毒、毒素性ショック症候群との関わりや、黄色ブドウ球菌の病原性への関わりを明らかにすることは、公衆衛生上および食品安全確保上極めて重要である。

また、黄色ブドウ球菌が食中毒を引き起こすこと、さらにブドウ球菌食中毒は黄色ブドウ球菌の感染によるものではなく、食品中で産生された SEs を摂取することにより発症する毒素性疾患であることは 1930 年代に明らかにされたが、その後 80 年が経過した現在でも、SEs が如何にして嘔吐を引き起こすかは、不明のままである。SEs の嘔吐発現メカニズムの解明は、ブドウ球菌食中毒の症状発現機構の理解と治療法の開発につながると共に、新型 SE1s の嘔吐活性の有無を推定する上でも重要な知見となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、新型 SEs および SE1s の食中毒への関与を解明し、新しいブドウ球菌食中毒のパラダイムを確立すること、および SEs による嘔吐活性の発現機構を分子レベルで解明することを目的とする。これまでの研究で、申請者は SEs/SE1s は極めて多様性の高い毒素群であること、また多くの食中毒事例由来株が複数の SEs/SE1s 遺伝子を保有していることを明らかにしてきた。さらに申請者らは多くの SE1s が霊長類に対して嘔吐活性を示すことを明らかにしている。本研究では、食品中の SE1s を高感度に定量するための免疫学的検出法を開発し、食品中の SEs/SE1s 量を正確に定量する手法を開発する。さらに、SEs による嘔吐発現のメカニズムを *in vivo* の系で解析する。新型 SEs/SE1s の食中毒原性の解明と危害評価、および SEs の作用機序の分子レベルでの理解は、ブドウ球菌食中毒の防除と制御を進めていく上で極めて有用である。

3. 研究の方法

(1) ブドウ球菌エンテロトキシンおよびエンテロトキシン様毒素の免疫学的高感度定量法の開発

精製した新型 SEs (SEG, SEH, SEI, SER, SES および SET) および SE1s (SE1J, SE1K, SE1L, SE1M, SE1N, SE1O, SE1P および SE1Q) をウサギに免疫し、それぞれの毒素に対する抗血清を得た。さらにこれらの抗血清から、Protein G をリガンドとするアフィニティクロマトグラフィーにより IgG 画分を、あるいはそれぞれの SEs/SE1s をリガンドとするアフィニティクロマトグラフィーにより monospecific polyclonal 抗体を精製した。これらの抗体に HPO を結合させ、標識抗体を作製した。これらの精製抗体と標識抗体を組み合わせ、発光基質を用いることにより高感度な sandwich ELISA を確立した。この検出法を用い、食中毒由来株の *in vitro* および *in food* での毒素産生総量を解析した。

(2) ブドウ球菌エンテロトキシン A (SEA) の嘔吐発現機構の解析

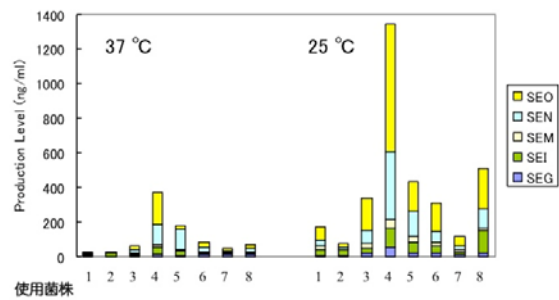
経口的に摂取された SEA の消化管内における動態を解明することを目的として、嘔吐モデル実験動物であるスunks (Suncus murinus) を用い、*in vivo*における SEA の動態および標的細胞について検討した。スunks に精製 SEA を 100 µg/animal で胃内投与し、投与後 15 分、30 分、60 分および 90 分において消化管を摘出し、抗 SEA 抗体を用いた免疫染色に供した。また、SEA 標的細胞の同定は、抗 SEA 抗体と種々の肥満細胞特異的マーカーに対する抗体による二重染色により行った。

4. 研究成果

(1) ブドウ球菌エンテロトキシンおよびエンテロトキシン様毒素の免疫学的高感度定量法の開発

SEs および SEIs の ELISA による検出法の高感度化を図るため、化学発光による検出系の導入を試みた。その結果、対象とする SEs/SEIs の型によるが、SuperSignal[®] ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce) を基質として用い、マイクロプレートリーダー (wallac 1420 ARVO MX/Light、Perkin Elmer) で発光を測定することにより、検出感度 0.1ng/ml-1.0ng/ml で毒素の検出・定量が可能となった。

本法を用い、種々の SEs/SEIs 遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌の培養上清中の毒素量を定量が可能であった。ほとんどの毒素は、培養上清中に 100 ng/ml 以上産生されていたが、ゲノミックアイランド ν Sa β 上に enterotoxin gene cluster (*egc*) を形成してタンデムに遺伝子が存在する SEG, SEI, SEIM, SEIN, SEIO の産生量は他の毒素に比してその産生量が少なく、10 ng/ml 以下であった。*egc*-関連 SEs/SEIs のみを保有する食中毒事例株が存在することから、*egc*-関連 SEs/SEIs の産生動態の解析を試みた。*egc* を保有する菌株を 25°C で培養したところ、37°C に比して毒素産生量の増加がみられた (図 1)。



1: N315, 2: Mu50, 3: Ishikawa2, 4: Hiroshima13, 5: Saga1, 6: Aomor1, 7: IVM-20, 8: IVM-50

図1 温度環境による *egc*-related SEs 産生量の変化 (*in vitro*)

室温に近い培養条件で、特定の毒素群の産生量が増加するという結果は、これらの SEs/SEIs の食中毒への関与を推定する上で重要と考えられる。さらに、にぎりめしに実験的に黄色ブドウ球菌を接種し、25°C 培養で SEs/SEIs 産生量を評価したところ、*egc*-関連 SEs/SEIs はにぎりめし中でも有意な量の毒素が産生されることが明らかになり (図 2)、食品中でも室温に近い状態でこれらの毒素が産生され得ることが証明できた。今後、低温による *egc*-関連 SEs/SEIs の産生増強がどのような機構で制御されているかを明らかにしていく必要がある。

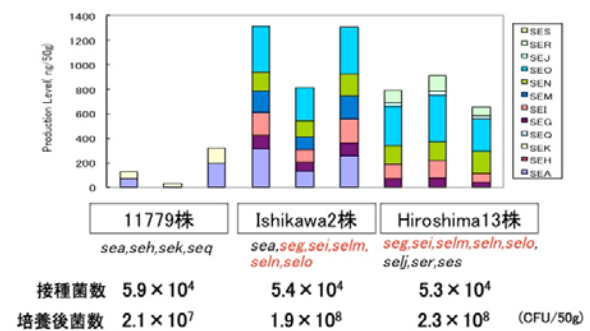


図2 にぎりめし中の SEs 産生総量 (25°C, 12時間)

(2) ブドウ球菌エンテロトキシン A (SEA) の嘔吐発現機構の解析

スunks に SEA を 100 µg/animal で胃内投与し、投与後 15 分、30 分、60 分および 90 分においてそれぞれ 4 頭のスunks から消化管を摘出し免疫染色に供した。抗 SEA 抗体を用いて消化管における SEA の挙動を観察したところ、全ての個体で投与後 15 分から 90 分の胃および小腸上皮あるいは粘膜固有層に SEA 陽性を示す細胞はほとんど認められなかった。しかし、投与後 30 分の粘膜下組織において少数の SEA 陽性細胞が認められ、さらに 60 分、90 分と時間の経過と共に胃および小腸の粘膜下組織に多数の SEA 陽性細胞が観

察された (図 3)。これらの結果より、*in vivo* において消化管内腔に到達した SEA

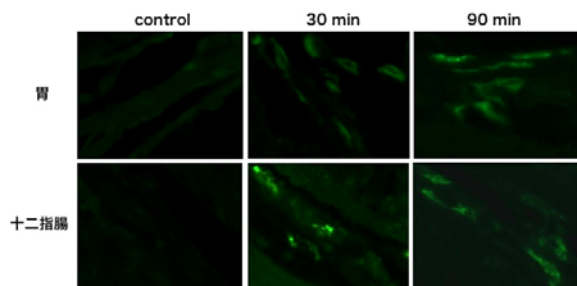


図3 粘膜下組織におけるSEA陽性細胞

は短時間で粘膜下組織に存在する細胞へと集積することが明らかとなった。次いで粘膜下組織でSEAと結合している細胞の同定を試みた。胃および十二指腸において抗SEA抗体、肥満細胞マーカーである抗Tryptase抗体および抗IgE受容体(FcεRI・αサブユニット)抗体を用い二重染色を行ったところ、投与後30-90分の個体の粘膜下組織においてSEAが結合している細胞はTryptase陽性かつFcεRIα陽性の肥満細胞であることが示された。図4に抗SEA抗体と抗Tryptase抗体による二重染色を示す。従来の研究により、SEAの嘔吐発現には、腸管組織内のセロトニンが大きな役割を担っていることが推測されている。抗セロトニン抗体と抗SEA抗体の二重染色により、SEAの標的細胞である粘膜下組織肥満細胞はセロトニン陽性であることが明らかになった。さらに、SEA投与により、経時的に粘膜下組織肥満細胞の顆粒が有意に減少することから、SEAは消化管粘膜下組織の肥満細胞を標的とし、脱顆粒を誘導、セロトニンを放出させることにより嘔吐を引き起こしていることが推測された。

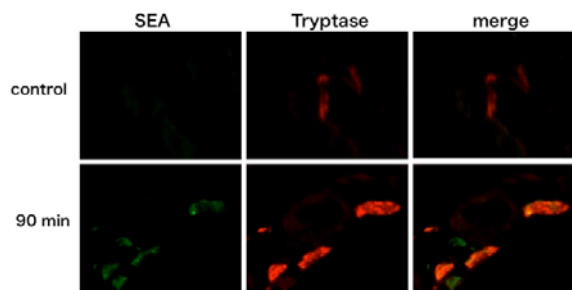


図4 SEAの標的細胞は肥満細胞である

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Omoe, K., Nunomura, W., Kato, H., Li, Z.-J., Igarashi, O., Araake, M., Sano, K., Ono, H.K., Abe, Y., Hu, D.-L., Nakane, A., Kiyono, H., Takakuwa, Y., Shinagawa, K., Uchiyama, T., and Imanishi, K. High affinity of interaction between superantigen and T cell receptor Vβ molecules induces a high level and prolonged expansion of superantigen-reactive CD4⁺ T cells. *J. Biol. Chem.* (査読あり) **285** : 30427-30435, 2010.
- ② Hu, D.-L., Omoe, K., Sashinami, H., Shinagawa, K. and Nakane, A. Immunization with a nontoxic mutant of staphylococcal enterotoxin A, SEAD227A, protects against enterotoxin-induced emesis in house musk shrews. *J. Infect. Dis.* (査読あり) **199**: 302-310, 2009.
- ③ Ono, H. K., Omoe, K., Imanishi, K., Iwakabe, Y., Hu, D.-L., Kato, H., Saito, N., Nakane, A., Uchiyama, T. and Shinagawa, K. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infect. Immun.* (査読あり) **76** : 4999-5005, 2008.

[学会発表] (計9件)

- ① 小野久弥、廣瀬昌平、山本欣郎、胡 東良、中根明夫、品川邦汎、重茂克彦。ブドウ球菌エンテロトキシンAの標的細胞は肥満細胞である。第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7~10日、神戸市・神戸ポートアイランド。
- ② Ono, H.K., Nishizawa, M., Yamamoto, Y., Hu, D.-L., Nakane, A., Shinagawa, K., and Omoe, K. Analysis of staphylococcal enterotoxin type A movement in gastrointestinal tract of house musk shrew and characterization of target cell of toxin. 14th International Symposium on *Staphylococci* and Staphylococcal Infections, 2010.9.7, Bath, UK.
- ③ 小野久弥、重茂克彦、胡 東良、中根明夫、品川邦汎 (2010) ブドウ球菌エンテロトキシンAの消化管における動態と標的細胞の解析。第83回日本細菌学会総会、2010年3月27~29日、横浜市・パシフィコ横浜

- ④ 佐藤祐介、小野久弥、胡 東良、中根明夫、重茂克彦 (2010) ブドウ球菌エンテロトキシン B 遺伝子を保有する新規 pathogenicity islands の解析. 第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 27～29 日、横浜市・パシフィコ横浜.
- ⑤ 小野久弥、重茂克彦、山本欣郎、胡 東良、中根明夫、品川邦汎. ブドウ球菌エンテロトキシン A の消化管における動態. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 10 日、横浜市・パシフィコ横浜.
- ⑥ 長廻ゆりあ、重茂克彦、稲垣華絵、山本裕紀、胡 東良、中根明夫、品川邦汎. 新型ブドウ球菌エンテロトキシン (SEs) の食品中における産生量評価. 第 63 回日本細菌学会東北支部総会、2009 年 8 月 20 日、盛岡市・岩手県歯科医師会館.
- ⑦ 重茂克彦. ブドウ球菌エンテロトキシンファミリーの多様性. 第 53 回ブドウ球菌研究会シンポジウム、2008 年 9 月 18～19 日、東京大学.
- ⑧ Omoe, K., Misu, H., Saito, M., Nukui, T., Hu, D.-L., Nakane, A. and Shinagawa, K. New SEB-encoding *Staphylococcus aureus* pathogenicity island. 13th International Symposium on *Staphylococci* and Staphylococcal Infections, 2008.9.7～10, Cairns, Commonwealth of Australia.
- ⑨ 稲垣華絵、重茂克彦、小野久弥、胡 東良、中根明夫、品川邦汎. ブドウ球菌エンテロトキシン (SEs) の高感度検出法の確立と黄色ブドウ球菌株における SEs 産生量評価. 第 62 回日本細菌学会東北支部会、2008 年 8 月 21～22 日、十和田市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重茂 克彦 (OMOE KATSUHIKO)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号：60224309

(2) 研究分担者

H18 のみ

品川 邦汎 (SHINAGAWA KUNIHIRO)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号：60133906