

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19119

研究課題名（和文）コモンマーモセットで解き明かすブドウ球菌エンテロトキシン嘔吐メカニズム

研究課題名（英文）Staphylococcal enterotoxin emetic mechanism revealed by newly primate emetic model, common marmoset

研究代表者

小野 久弥 (Ono, Hisaya)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：80704569

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：コモンマーモセットを用いた研究により個体レベルのブドウ球菌エンテロトキシンA (SEA)の嘔吐メカニズムは明らかとなった。すなわち、(1)経口的に摂取されたSEAは消化管内腔に到達すると、消化管組織内に侵入し短時間で粘膜下組織へと移行する。(2)SEAは粘膜下組織の肥満細胞へと強く結合し、SEAが結合した肥満細胞は脱顆粒を起こす。(3)肥満細胞により放出されたヒスタミンが迷走神経を刺激することで嘔吐中枢へと伝わり、嘔吐反射を惹起する。また、この迷走神経から中枢へと至る伝達にはセロトニンも関与している。このように細胞から個体レベルまでの嘔吐メカニズムを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブドウ球菌エンテロトキシン (SE) は嘔吐活性を持ち、黄色ブドウ球菌による嘔吐型食中毒の原因毒素ですが、その嘔吐メカニズムはこれまで不明でした。今回、小型の霊長類であるコモンマーモセットを用いて嘔吐メカニズムを解明を試みました。コモンマーモセットの消化管においてSEと結合する細胞を探したところ、SEが粘膜下組織の肥満細胞を標的としており、さらにSEの作用により肥満細胞が脱顆粒を起こしていました。肥満細胞が放出する物質が嘔吐に関わると考えられたため消化管組織にSEを作用させたところ、ヒスタミンの放出が確認されました。

研究成果の概要（英文）：Staphylococcal enterotoxins (SEs) produced by Staphylococcus aureus are known as causative agents of emetic food poisoning. In the present study, we established common marmosets as an emetic animal model. Histological analysis uncovered that SEA bound with submucosal mast cells and induced mast cell degranulation. Additionally, ex vivo and in vivo pharmacological results showed that SEA-induced histamine release plays a critical role in the vomiting response in common marmosets. The present results suggested that 5-hydroxytryptamine also plays an important role in the transmission of emetic stimulation on the afferent vagus nerve or central nervous system. We conclude that SEA induces histamine release from submucosal mast cells in the gastrointestinal tract and that histamine contributes to the SEA-induced vomiting reflex via the serotonergic nerve and/or other vagus nerve.

研究分野：細菌学

キーワード：ブドウ球菌エンテロトキシン 嘔吐型食中毒 肥満細胞 脱顆粒 消化管 マーモセット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ブドウ球菌食中毒は、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) によって引き起こされる嘔吐、悪心を主徴とする食中毒である。ブドウ球菌食中毒は *S. aureus* が食品内で産生したタンパク質毒素「ブドウ球菌エンテロトキシン (SEs)」により汚染された食品を経口摂取することで引き起こされる。SEs はブドウ球菌食中毒の原因毒素として同定され (Dack *et al.*, J Prev. Med., 1930)、抗原性の違いにより現在までに SEA から SEIY までの 23 種類の SEs が報告されている多様性の高いタンパク質毒素である (Ono *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 2015)。また、SEs はスーパー抗原活性を有し、毒素性ショック症候群の原因にもなる。SEs が抗原提示細胞の MHC クラス II 分子と T 細胞の T 細胞受容体を架橋することで T 細胞の増殖および大量のサイトカイン産生を誘導し、発熱、ショック等、種々の病態を引き起こす。一方、SEs の嘔吐発現の分子機構については発見から 80 年以上経過した現在でも不明な点が多く、SEs による嘔吐発現の分子機構解明は細菌毒素研究において中心的課題である。

2. 研究の目的

ブドウ球菌食中毒は、黄色ブドウ球菌が産生するタンパク質毒素、ブドウ球菌エンテロトキシン(SE)によって起こる公衆衛生領域上重要な食中毒である。SE は 80 年以上前にブドウ球菌食中毒の原因毒素であることが報告されていながら、その嘔吐発現の分子機構は未だ不明である。本研究では、SE の嘔吐発現の分子機構の解明を目的とし、小型霊長類のコモンマーモセットを用いることで宿主側の嘔吐に関わる受容体の同定を行う。さらに、同定された受容体の機能解析を行うとともに、嘔吐惹起に必要な毒素側の構造を解明する。最終的に霊長類における嘔吐発症メカニズムを明らかにし、ブドウ球菌食中毒の全容解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) マーモセット消化管の免疫蛍光染色

マーモセットから消化管を採取し、4%パラホルムアルデヒド加リン酸バッファーに浸漬し固定した。固定した組織は常法に従いコンパウンド包埋し、凍結切片の作製に供した。組織を洗浄後、SEA、および抗 SEA 抗体を反応後、Alexa488 標識二次抗体を反応させ蛍光顕微鏡により SEA の結合する細胞を観察した。また抗 IgE レセプター抗体、抗トリプターゼ抗体、抗ヒスタミン抗体および抗 5-HT 抗体を用いて二重染色を行った。

(2) マーモセット消化管のトルイジンブルー染色

マーモセットの腸管にループを作製し、PBS または SEA を接種した。2 時間反応後、マーモセットを麻酔下で安楽死させ、腸管を摘出した。摘出した腸管はメタノールカルノア固定した後、トルイジンブルー染色を行った。メタクロマジーを示す細胞を顕微鏡下で計測した。

(3) マーモセット腸管からのヒスタミンおよび 5-HT の放出の測定

マーモセットを麻酔下で安楽死させ、腸管を摘出した。腸管を 5 mm 四方に剪断し、培養液に浸した。ここへ SEA、脱顆粒阻害剤を接種し、2 時間反応後の培養液を回収した。培養液中のヒスタミンおよび 5-HT は ELISA で測定した。

(4) マーモセット嘔吐実験

コモンマーモセットは実験前日より絶食した。麻酔下で経口カテーテルにより、SEA を投与し 5 時間嘔吐をビデオ撮影し観察した。脱顆粒阻害剤、ヒスタミン H1 レセプター拮抗薬をマーモセットに投与する際は、SEA 経口投与の 30 分前に阻害剤を腹腔内投与した。

4. 研究成果

(1) マーモセット消化管における SEA の標的細胞は肥満細胞である。

マーモセット消化管において免疫染色を行い、SEA と結合する細胞を精査した。胃、空腸、回腸、および結腸で SEA と結合を示す細胞が見られ、特に空腸と回腸で多数見られた (図 1)。また、SEA と結合する細胞は粘膜下組織にのみ見られ、粘膜面には認められなかった。

つづいて、SEA が結合する細胞を二重染色により同定を試みた。こ SEA 結合細胞は肥満細胞マーカーである抗 IgE レセプター抗体による染色像と重なったことから、肥満細胞であることが示唆された (図 2)。さらに、肥満細胞マーカーである抗トリプターゼ抗体と二重染色を行ったところ、同様に SEA 結合細胞と染色像が重なったため、SEA が結合する細胞は粘膜下組織の肥満細胞であることが明らかとなった (図 3)。

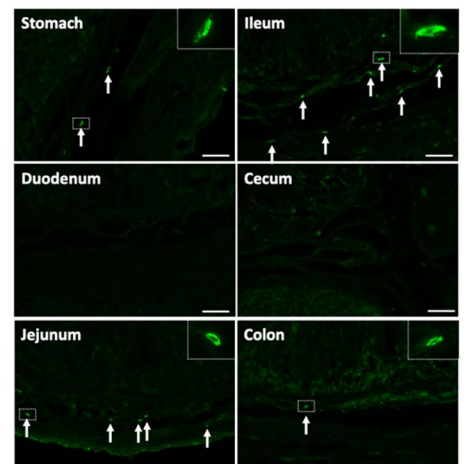


図 1 消化管において SEA と結合する細胞

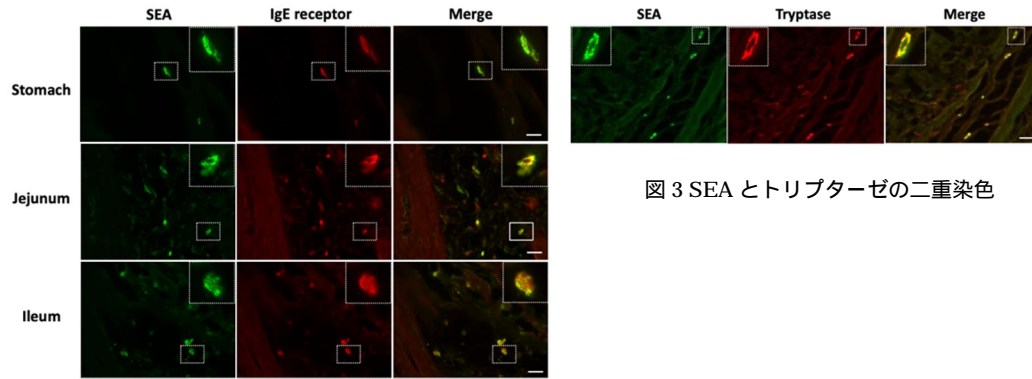


図2 SEA と IgE レセプターの二重染色

(2) SEA は肥満細胞の脱顆粒を誘発する。

SEA が肥満細胞に結合することが明らかとなったため、SEA が脱顆粒を引き起こすかトルイジンブルー染色により確認した。SEA を接種した腸管ではメタクロマジーを示す細胞が陰性対照の腸管よりも有意に減少したため、SEA が肥満細胞に脱顆粒を誘起したことが示唆された(図4)。つづいて、マーモセットから摘出した腸管片に SEA を反応させたところ、SEA の濃度依存的にヒスタミンの放出が認められた(図5A)。このヒスタミンの放出は脱顆粒阻害剤である DSCG の作用により抑制されたことから、SEA が肥満細胞に脱顆粒を誘起することでヒスタミンの放出が起こることが明らかとなった(図5B)。

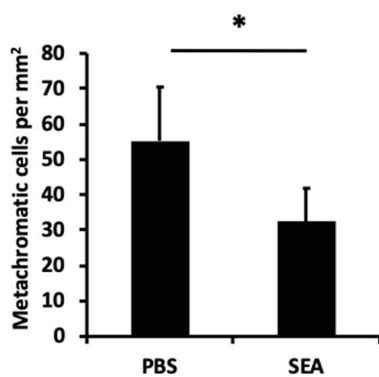


図4 消化管におけるメタクロマジー細胞

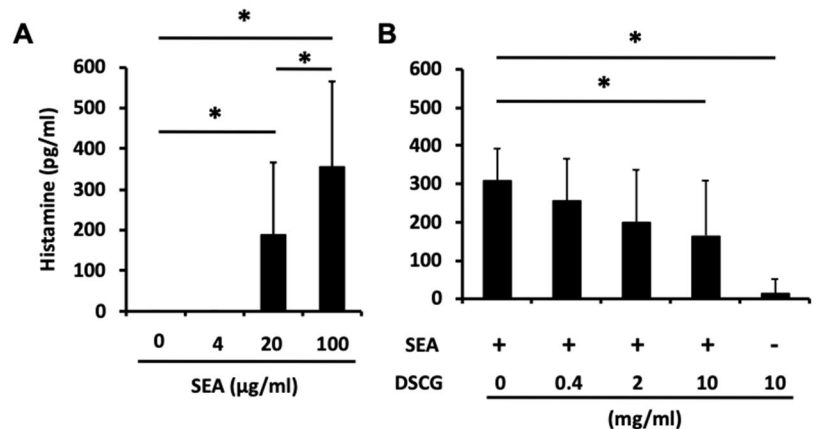


図5 SEA を反応させた腸管片からのヒスタミン放出

(3) SEA による嘔吐反射は脱顆粒阻害剤およびヒスタミンブロッカーの投与により抑制される。コモンマーモセット嘔吐モデルにおいて、SEA を投与する前に脱顆粒阻害剤 DSCG を投与したところ、嘔吐個体数および嘔吐回数が有意に減少した。さらに、ヒスタミンブロッカー(DPH, Cetirizine)を投与したところ、いずれの薬剤でも嘔吐個体数および嘔吐回数が有意に減少した。このため、SEA による嘔吐反射は、SEA が結合した肥満細胞が脱顆粒を起こし、ヒスタミンが放出され、このヒスタミンにより嘔吐反射が起こることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hisaya K. Ono, Shouhei Hirose, Kouji Narita, Makoto Sugiyama, Krisana Asano, Dong-Liang Hu, Akio Nakane	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Histamine release from intestinal mast cells induced by staphylococcal enterotoxin A (SEA) evokes vomiting reflex in common marmoset	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1007803	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ono Hisaya K., Hirose Shouhei, Naito Ikunori, Sato'o Yusuke, Asano Krisana, Hu Dong-Liang, Omoe Katsuhiko, Nakane Akio	4. 巻 61
2. 論文標題 The emetic activity of staphylococcal enterotoxins, SEK, SEL, SEM, SEN and SEO in a small emetic animal model, the house musk shrew	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 12～16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12460	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hu D.-L., Ono H.K., Isayama S., Okada R., Okamura M., Lei L.C., Liu Z.S., Zhang X.-C., Liu M.Y., Cui J.C., Nakane A.	4. 巻 122
2. 論文標題 Biological characteristics of staphylococcal enterotoxin Q and its potential risk for food poisoning	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 1672～1679
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jam.13462	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sato 'o Yusuke, Hisatsune Junzo, Hirakawa Hideki, Ono Hisaya K., Omoe Katsuhiko, Sugai Motoyuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Complete Sequence of a Staphylococcus aureus Clonal Complex 81 Strain, the Dominant Lineage in Food Poisoning Outbreaks in Japan	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genome Announcements	6. 最初と最後の頁 e00853～17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/genomeA.00853-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Yasunori, Kubota Hiroaki, Ono Hisaya K., Kobayashi Makiko, Murauchi Konomi, Kato Rei, Hirai Akihiko, Sadamasu Kenji	4. 巻 262
2. 論文標題 Food poisoning outbreak in Tokyo, Japan caused by Staphylococcus argenteus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Food Microbiology	6. 最初と最後の頁 31～37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小野久弥, 廣瀬昌平, 成田浩司, 杉山真言, 浅野クリスナ, 胡 東良, 中根明夫
2. 発表標題 マーモセット嘔吐モデルの確立およびブドウ球菌エンテロトキシンの嘔吐発現機序の解明
3. 学会等名 第63回日本ブドウ球菌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野 久弥, 胡 東良, 中根明夫.
2. 発表標題 新型ブドウ球菌エンテロトキシンの発見と食中毒へのリスク
3. 学会等名 第62回日本ブドウ球菌研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----