

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：84407
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2016～2019
 課題番号：16K19283
 研究課題名(和文) 新型エンテロトキシン(BEC)産生性ウェルシュ菌による食中毒の発生機序の解明

研究課題名(英文) The mechanism of foodborne outbreak caused by novel enterotoxin (BEC) producing *Clostridium perfringens*

研究代表者
 余野木 伸哉 (Yonogi, Shinya)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主任研究員

研究者番号：20553613

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)： ウエルシュ菌が産生する下痢症を起こす新規毒素であるBECおよびBEC産生性ウェルシュ菌について研究を進めた。

既知のエンテロトキシン(CPE)遺伝子とBEC遺伝子を同時に検出できる遺伝子検出系を構築し、日常の食中毒検査に応用した。本検査法は当所のホームページや論文等で情報発信するとともに、地方衛生研究所を中心とする施設に対して陽生コントロールの配布や技術を支援した。

BECはBECaとBECbの2成分で構成されており、これまでにBECbが下痢症の主因であることが明らかとなっている。本研究ではBECbに対する毒性発現機構の詳細を明らかにする第一段階として、培養細胞アッセイ系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において地方衛生研究所をはじめとする食中毒菌の検査を実施する機関において、簡便にBEC遺伝子を検出できる遺伝子検出系を構築した。この方法は従来のCPE遺伝子保有ウェルシュ菌に対する遺伝子検査と同様の労力でBEC遺伝子保有ウェルシュ菌の確認が同時にできる。2018年には新たに発生したBEC遺伝子保有ウェルシュ菌による食中毒の検査においても利用された。

また、BECの毒性発現機構の詳細は不明であり、本菌による食中毒の全容を明らかにするために、これを解明することが社会的かつ学術的にも必要である。本研究において培養アッセイ系を構築したことは毒性発現機構を解明する第一のステップである。

研究成果の概要(英文)：BEC (Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*) is a novel enterotoxin causing diarrheal disease for human. In this study, BEC and BEC-producing *C. perfringens* were investigate.

CPE (*Clostridium perfringens* Enterotoxin) has been known as a cause of human diarrhea. A simple method detecting becAB genes and cpe gene simultaneously was developed in this study and was applied to routine inspection for foodborne outbreaks in our institute (Osaka Institute of Public Health). This method is opened in home page of our institute. And our institute provided positive control and technical supports of this method to the facilities for clinical examination mostly regional institute of health.

BEC is composed two components, BECa and BECb. We have ever unraveled BECb is the main cause of this diarrheal disease. As the first step to elucidate the action of BECb some assays used cultured cells were developed in this study.

研究分野：食品微生物学、細菌学

キーワード：新型エンテロトキシン ウエルシュ菌 エンテロトキシン 食中毒 BEC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウエルシュ菌は食中毒の原因菌の一種であり、これまでウエルシュ菌エンテロトキシン (CPE: *Clostridium perfringens* Enterotoxin) がヒトに下痢症を起こす必須の毒素と考えられていた。ところが、我々はウエルシュ菌による食中毒が強く疑われるにもかかわらず、CPE が検出されない食中毒事件を経験し、これらの事例から分離されたウエルシュ菌からヒトに下痢症を起こす新規毒素 BEC(Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens* または *Clostridium perfringens* Binary Enterotoxin) を同定した (文献 1)。

BEC は BECa と BECb で構成され、ウエルシュ菌が産生するイオタ毒素やボツリヌス菌が産生する C2 毒素などととも ADP リポシル化 2 成分毒素に分類される。これまでに、下痢症の主な原因となるのは BECb であり、BECa は BECb の液体貯留活性を高めることを明らかにした。一方で、BEC の詳細な毒性発現機序や食中毒事件を発生させるメカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

本研究は新規毒素である BEC の毒性発現機序や食中毒の発生機構を明らかにすることを目的として実験を進めた。

3. 研究の方法

BECb の各種動物の赤血球に対する溶血活性

ヒツジ、ウマ、モルモット、ウサギ、ニワトリの赤血球に対するトリプシン処理した BECb の活性を評価した。各赤血球は PBS を用いて 5% に希釈して使用した。毒素を接種後、37 °C で 1 時間反応させ、540nm で吸光度を測定した。1% Triton X-100 を作用させた赤血球を溶血対照 (100%) とし、PBS を作用させた赤血球を非溶血対照 (0%) として毒素の溶血活性を測定した。

BECb の各種培養細胞に対する生物活性

各種培養細胞 (A431, A549, Caco2, HCT-8, HeLa, Hep2, MDCK, T84, Vero) に対する BECb の活性を評価した。細胞は 96 ウェルプレートで培養し、トリプシン処理した BECb を最終濃度が 1000ng/mL となるように接種した。37 °C、5%CO₂ 条件下で 4 時間反応させたのち、LDH の放出と WST-8 の還元を指標として細胞毒性を評価した。

BECb の Caco2 細胞に対する生物活性

Caco2 細胞に対する BECb の活性について評価した。トリプシン処理した BECb を最終濃度 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 ng/mL となるように細胞へ接種した。37 °C、5%CO₂ 条件下で 4 時間反応させたのち、LDH の放出を指標として細胞毒性を評価した。

4. 研究成果

BECb の各種動物の赤血球に対する溶血活性

5 種類の哺乳動物に対する赤血球溶血性を評価したが、BECb はこれら赤血球に対する溶血性を示さなかった (図 1)。

BECb の各種培養細胞に対する生物活性

BECb は A431, Caco2, MDCK 細胞はに対して非常に強く毒性を示し、これらに次いで T84, HCT-8, Hep2 細胞に対する活性が強かった。一方で、実施した条件において、A549 細胞に対する毒性は弱く、HeLa, Vero 細胞に対する毒性は確認されなかった (図 2)。これらの結果は LDH アッセイおよび WST-8 アッセイでほとんど同様であった。

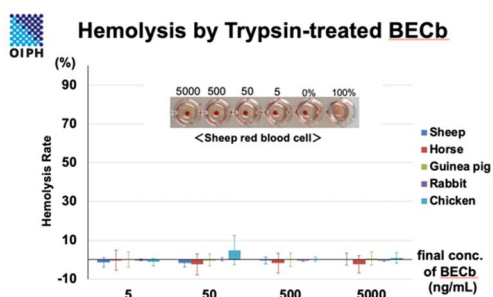


図 1 BECb の赤血球に対する溶血活性

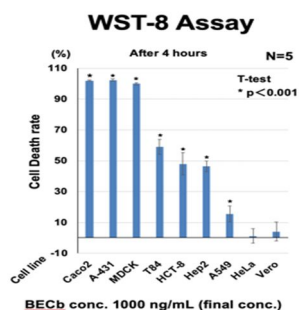


図 2 BECb の培養細胞に対する生物活性

BECの類似毒素であるイオタ毒素のb成分(Ib)は多くの培養細胞に対して生物活性を示さず、A431, A549細胞に対して細胞毒性を示すことが報告されている(文献2)。一方で、今回 BECb は Caco2, MDCK 細胞に対して強い細胞毒性を示したが、A549細胞に対してはほとんど細胞毒性を示さなかった(図3)。この結果により BECb は Ib と異なるメカニズムによって毒性を発現する可能性が示唆された。

BECb の Caco2 細胞に対する生物活性

BECb は Caco2 細胞に対して濃度依存的に活性を示し、その50%効果濃(EC50) はおよそ 300ng/mL と考えられた(図4)。

BECa/b 遺伝子と CPE 遺伝子を同時に検出する遺伝子検出系の構築と食中毒検査への応用

BECa/b 遺伝子と CPE 遺伝子を同時に検出できる遺伝子検出系を構築した(文献3)。この方法は当所での食中毒検査に応用するとともに、その他の地方衛生研究所にも技術支援を実施している。このほかに、分析機器を用いて BEC 毒素を半定量的に検出する系を構築した。

	BECb	Ib *
A-431	+	+
Caco2	+	-
MDCK	+	-
A549	-	+
Vero	-	-

* Nagahama et al. Infect Immun (2011)

図3 BECb と Ib の培養細胞に対する生物活性の比較

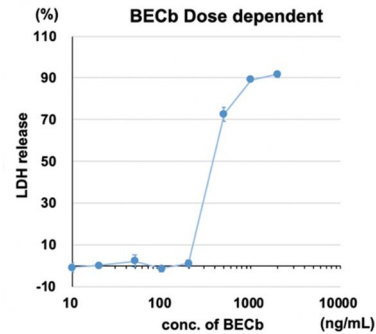


図4 . BECbのCaco2細胞に対する活性の濃度依存性

<引用文献>

- 1、Shinya Yonogi, Shigeaki Matsuda, Takao Kawai et al. BEC, a Novel Enterotoxin of *Clostridium perfringens* Found in Human Clinical Isolates from Acute Gastroenteritis Outbreaks, Infect Immun. 2014, 82(6): 2390-2399.
- 2、Masahiro Nagahama, Mariko Umezaki, Masataka Oda et al. *Clostridium perfringens* Iota-Toxin b Induces Rapid Cell Necrosis, Infect Immun. 2011, 79(11): 4353-4360.
- 3、Shinya Yonogi, Masashi Kanki, Takahiro Ohnishi et al. Development and application of a multiplex PCR assay for detection of the *Clostridium perfringens* enterotoxin-encoding genes *cpe* and *becAB*, J Microbiol Methods. 2016, 127:172-175.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yonogi S, Kanki M, Ohnishi T, Shiono M, Iida T, Kumeda Y.	4. 巻 127
2. 論文標題 Development and application of a multiplex PCR assay for detection of the Clostridium perfringens enterotoxin-encoding genes cpe and becAB.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 172-175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mimet.2016.06.007	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 Kawahara K, Yonogi S, Munetomo R, Oki H, Yoshida T, Kumeda K, Matsuda S, Kodama T, Ohkubo T, Iida T, Nakamura S.	4. 巻 480
2. 論文標題 Crystal structure of the ADP-ribosylating component of BEC, the binary enterotoxin of Clostridium perfringens	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 261-267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2016.10.042	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 Masahide Sakaue, Koshi Ota, Eriko Nakamura, Masahiko Nitta, Masahiro Oka, Yasuo Oishi, Yohei Sano, Shinya Yonogi, Akira Takasu	4. 巻 19
2. 論文標題 Type A Fulminant Clostridium Perfringens Sepsis Indicated RBC/Hb Discrepancy; A Case Report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12879-019-4350-3.	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 本村和嗣、余野木伸哉、川津健太郎
2. 発表標題 ウエルシュ菌新型エンテロトキシンBECに関する研究
3. 学会等名 第38回近畿腸管微生物研究会・研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 余野木伸哉、本村和嗣、川津健太郎
2. 発表標題 BEC産生性ウェルシュ菌およびBECに関する研究
3. 学会等名 平成29年度近畿腸管微生物研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 余野木伸哉、松田重輝、河合高生、依田知子、原田哲也、久米田裕子、後藤和義、日吉大貴、中村昇太、児玉年央、飯田哲也
2. 発表標題 BEC産生性ウェルシュ菌およびBECに関する研究
3. 学会等名 第64回トキシシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 余野木伸哉、松田重輝、河合高生、依田知子、原田哲也、久米田裕子、後藤和義、日吉大貴、河原一樹、棟朝亮太、沖大也、中村昇太、児玉年央、飯田哲也
2. 発表標題 BEC, a novel enterotoxin produced by non-CPE producing Type A Clostridium perfringens, is a cause of human gastroenteritis
3. 学会等名 第16回あわじしま感染症・免疫フォーラム(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 余野木伸哉、久米田裕子
2. 発表標題 ウェルシュ菌新型エンテロトキシン(BEC)に関する研究
3. 学会等名 平成28年度近畿腸管微生物研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 余野木伸哉, 神吉政史, 大西貴弘, 塩野将巳, 飯田哲也, 川津健太郎, 久米田裕子
2. 発表標題 ウェルシュ菌エンテロトキシン遺伝子(cpe、becAおよびbecB)を同時に検出するマルチプレックスPCR法の構築と汚染実態調査
3. 学会等名 第112回 日本食品衛生学会学術講演会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 余野木伸哉	4. 発行年 2017年
2. 出版社 大阪府立公衆衛生研究所	5. 総ページ数 2
3. 書名 大阪府立公衆衛生研究所公衛研ニュースNo61	

1. 著者名 余野木伸哉	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 9
3. 書名 感染制御と予防衛生 2019年9月号 (Vol.3 No.2)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>加熱したからといって安心できないウェルシュ菌食中毒 https://www.iph.osaka.jp/s008/030/010/010/090/20180106184000.html ウェルシュ菌エンテロトキシン遺伝子(cpe、becA、becB)マルチプレックスPCR http://www.iph.osaka.jp/s008/030/010/050/010/20180107044000.html 簡便に使用できるウェルシュ菌エンテロトキシン遺伝子に対するマルチプレックスPCR法 http://www.iph.osaka.jp/food/welchii.html</p>

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
--	---------------------------	-----------------------	----