

称号及び氏名 博士(獣医学) 酒井 史彦

学位授与の日付 平成21年2月20日

論文名 黄色ブドウ球菌におけるエンテロトキシン産生性の解析と
Multiplex PCR を用いたコアグラージェ型別法の構築

論文審査委員 主査 小崎 俊司
副査 山崎 伸二
副査 三宅 眞実

論文要旨

緒言

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は自然環境に広く分布するとともに、生息する環境によっては病原性細菌としてヒトや動物に、化膿巣形成、敗血症、院内感染症、および毒素性ショック症候群などの起因菌となる。黄色ブドウ球菌が食品中で増殖するとエンテロトキシン (SE) を産生し、毒素型食中毒であるブドウ球菌食中毒の原因となる。SE は古くから血清学的に SEA、SEB、SEC、SED、SEE (古典的 SE) の 5 種類に分類されてきた。一方、最近新たな SE (新型 SE) やブドウ球菌エンテロトキシン様スーパー抗原 (SEI) の存在が報告された。特に SEG、SEH、SEI については、これらの毒素遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌が食中毒事例を含む様々な環境・検体から検出されること、また、これらの毒素がサルモネラ症を引き起こすことから、食中毒の原因となる可能性が示唆されている。しかし、*seg*、*seh*、*sei* 遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌に関して、その毒素産生性や疫学的な特徴については不明な点が多い。黄色ブドウ球菌を原因とする食中毒の疫学調査には様々な疫学的マーカーが開発されているが、日本ではコアグラージェ型別法が最も一般的に用いられている。コアグラージェ型は、コアグラージェタンパク質の抗原性の違いにより 10 タイプ (I から X 型) に分類される。コアグラージェ型の分布は疾患や動物種により特徴的な分布を示し、例えばブドウ球菌食中毒では VII 型、院内感染で問題となる MRSA では II 型、ウシ乳房炎では VI 型がそれぞれ多く検出される。コアグラージェ型と古典的 SE の産生との間に関連性は認められていない。一方、新型 SE に関しては、それらを検出するための検査キットが市販されていないため、新型 SE の産生とコアグラージェ型別との関連性に関する詳細な報告は少

ない。また、従来のコアグララーゼ型別法は非常に煩雑かつ熟練した技術を要し、判定結果を得るまでに多くの時間を要するという課題があった。

本研究では、SEG、SEH、および SEI を検出するための Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) を構築し、食中毒由来株およびウシ生乳由来株における SEG、SEH、および SEI 産生株の分布とコアグララーゼ型との関連性や、毒素産生性の特性について検討した。また、コアグララーゼ型別を簡便かつ迅速に行うために、Multiplex PCR を用いた遺伝学的型別法の構築を検討した。

第1章 食中毒由来黄色ブドウ球菌株における H 型エンテロトキシンの産生性の解析

最近、食中毒の原因となった食材から SEH が検出される事例が報告されている。しかし、黄色ブドウ球菌の SEH 産生性や疫学マーカーとの関連性に関する知見は少ない。そこで、SEH を定量的に検出するための ELISA を構築し、食中毒由来黄色ブドウ球菌株の SEH 産生性や疫学マーカーであるコアグララーゼ型との関連性について検討した。*seh* 遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌より *seh* 遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させた組換え体 SEH を精製した。精製した組換え体 SEH に対するウサギ抗血清から抗 SEH 抗体を精製し、ELISA を構築した。SEH 検出用 ELISA は他の毒素と交差することなく SEH とのみ特異的に反応し、検出限界は 1 ng/ml であった。日本のブドウ球菌食中毒事例から分離された 144 株の黄色ブドウ球菌株について培地中での SEA、SEB、SEC、SED、SEE、および SEH の産生性を調べた結果、SEA 産生株が 90 株 (63%) と最も多く、次いで SEH 産生株が 86 株 (60%) であった。SEH 産生株のうち 71 株は SEA または SEB、もしくはその両者を同時に産生し、残りの 15 株は SEH のみを産生した。これら黄色ブドウ球菌についてコアグララーゼ型と毒素型の関係を解析した結果、SEA 産生株はコアグララーゼ型が II、III、IV、VI、および VII 型に分散しているのに対して、SEH 産生株は全てがコアグララーゼ VII 型であることが明らかとなった。培地中での SEH 産生量は SEA とほぼ同レベルであったが、SEB 産生量の約 1/10 のレベルであった。SEH と SEA は対数増殖期の後半から検出されたが、SEB の産生は、そのほとんどが定常期であった。培地の水分活性(a_w)を 1.00 から 0.95 に低下させた場合、SEH と SEA の産生は 50~230% の範囲で変動したが、SEB の産生は 2.2% に大きく低下した。これらの結果から、SEH が食中毒の発症に関与している可能性が示唆された。

第2章 黄色ブドウ球菌による G 型および I 型エンテロトキシンの産生性の解析

SEG 遺伝子 (*seg*) および SEI 遺伝子 (*sei*) を保有する黄色ブドウ球菌は様々な環境から検出され、そのほとんどは両遺伝子を同時に保有している。食中毒由来株やウシ生乳由来株からも検出されるが、食中毒の発生に関係するの否かについては不明な点が多い。そこで、食中毒由来株やウシ生乳由来株について、SEG および SEI の産生を調査するとともに、疫学マーカーであるコアグララーゼ型との関係を解析した。まず、分離株から PCR により *seg* と *sei* 保有株を検索した結果、食中毒由来株では 16%、生乳由来株では 51% が同遺伝子を保有していた。*seg* と *sei* 保有株のコアグララーゼ型は、食中毒由来株が II、III、VII 型および型別不能に広く分布していたが、生乳由来株では

67%がVI型に、残りがII型に分類された。次に、新たに構築したSEGとSEIを検出するためのELISAを用いて、培地中でのSEGとSEIの産生を検討した。食中毒由来株では*seg*と*sei*保有株の全てからSEGとSEIが検出された。一方、生乳由来株では、コアグララーゼII型株からはSEGとSEIが検出されたが、VI型株から両毒素は検出されなかった。SEGおよびSEIの産生量は、ほとんどの菌株が0.05 µg/ml以下であり、SEA、SEB、SEC、SEDおよびSEHの産生量(1~30 µg/ml)に比べて低いレベルであった。また、市販の牛乳や脱脂乳中で培養しても、SEGとSEIは検出されなかった。以上の結果から、黄色ブドウ球菌によるSEGとSEIの産生量は他のSEに比べて低いレベルであり、また、生乳中で主要なコアグララーゼVI型株は両毒素をほとんど産生していない可能性が示唆された。

第3章 黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型、およびVI型コアグララーゼのサブタイプを識別するためのMultiplex PCRの構築

黄色ブドウ球菌の産生するコアグララーゼは、抗原性の異なる10タイプの血清型(I~X型)に分類されており、黄色ブドウ球菌を識別する有用な疫学マーカーとして使用されている。IからVIII型については市販の特異抗体を用いた血漿凝固の阻害試験による型別法が実施されているが、その操作は煩雑で迅速性に欠けることから、日本以外での使用実績は低い。本章では、IからVIII型のコアグララーゼ遺伝子の塩基配列の違いに注目して、Multiplex PCRを用いた型別法の構築を検討した。各型を識別するプライマーは、それぞれの型間で相同性の低いD1およびD2領域を標的に設計した。しかし、VI型検出用のプライマーにおいて、VI型標準株(stp12)は検出できるがウシ由来VI型株を検出できない結果が得られた。そこでウシ由来VI型株のコアグララーゼ遺伝子塩基配列を解析した結果、stp12の塩基配列(VIa型)とは一部が異なる2つのタイプの塩基配列(VIb型およびVIc型)が認められた。これら3つのVI型サブタイプを同時に検出する1組のプライマーを新たに設計し、III、IV、VII、VIII型を検出するためのMultiplex PCR A (M-PCR:A)と、I、II、V、VI型を検出するためのM-PCR:Bの2組のPCRセットを構築した。155株の分離株のうち154株において、M-PCR法と従来法により決定されたコアグララーゼ型が一致した。また、VI型の3つのサブタイプをそれぞれ識別するためのM-PCR:Cを構築し、VI型株のサブタイピングを実施した。その結果、食中毒由来株はVIa型に、ウシ由来株はVIb型とVIc型に分類された。各サブタイプの*se*遺伝子(*sea*~*sei*)の保有を調べた結果、VIa型は*sea*を保有しており、VIb型からは*sec*, *sed*, *seg*, および*sei*のいずれかが検出された。一方、VIc型からはいずれの*se*遺伝子も検出されなかった。これらの結果は、VI型コアグララーゼ遺伝子のサブタイプと*se*遺伝子の保有に関係があることを示唆している。本章で開発した3つのMultiplex PCRは、簡便かつ迅速なコアグララーゼ型別法として有用であり、今後黄色ブドウ球菌の疫学的研究の重要なツールと考えられる。

総括

1. 食中毒に由来する黄色ブドウ球菌株のSEH産生性について検討した結果、食中毒由来株の約6割がSEHを産生し、それらは全てコアグララーゼVII型に分類された。

SEHの産生性はSEAの産生性に似た特性を有しており、SEBとは大きく異なった。SEHは、SEAと同様に食中毒の発症に関与している可能性が示唆された。

2. 食中毒由来およびウシ生乳由来黄色ブドウ球菌株のSEGおよびSEIの産生量は、他のSEに比べて非常に少ないことが判明した。また、コアグララーゼVI型株からSEGおよびSEIの産生は認められず、コアグララーゼ型間でSEGおよびSEIの産生は異なることが示唆された。
3. コアグララーゼIからVIII型と、VI型コアグララーゼ遺伝子の3つのサブタイプを識別するためのMultiplex PCRを構築した。さらに、VI型コアグララーゼ遺伝子に3つのサブタイプが存在することを見出し、それらを識別するMultiplex PCRを構築した。Multiplex PCRを用いた型別法は、簡便かつ迅速であり、疫学的研究の有用なツールと考えられる。

審査結果の要旨

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は病原性細菌としてヒトや動物に敗血症、院内感染症などの起因菌となる。本菌が食品中で増殖するとエンテロトキシン (SE) を産生し、ブドウ球菌食中毒の原因となる。SEは古くから5つの血清型 (A-E型) に分類されてきたが、最近新たなSE (新型SE) の存在が報告され、特にSEG、SEH、SEIについては毒素遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌が食中毒事例を含む様々な環境・検体から検出されることから、食中毒の原因となる可能性が示唆されている。一方、食中毒の疫学調査にコアグララーゼ型別法 (I-X型) が最も一般的に用いられ、型別の分布は疾患や動物種により異なるが、SEの産生とコアグララーゼ型別との関連性に関する詳細な報告は少ない。本研究では、新型SEの検出法を構築し、食中毒由来株およびウシ生乳由来株における新型SE産生株の分布とコアグララーゼ型との関連性や、毒素産生性の特性について検討した。また、コアグララーゼ型別を簡便かつ迅速に行うために、Multiplex PCRを用いた遺伝学的型別法の構築を検討した。

SEHを定量的に検出するためのELISAを構築し、食中毒由来黄色ブドウ球菌株のSEH産生性や疫学マーカーであるコアグララーゼ型との関連性について検討した。精製した組換え体SEHに対するウサギ抗血清から抗SEH抗体を精製し、ELISAを構築した。SEH検出用ELISAはSEHとのみ特異的に反応し、検出限界は1 ng/mlであった。

食中毒事例から分離された 144 株について SE の産生性を調べた結果、SEA 産生株が 90 株 (63%) と最も多く、次いで SEH 産生株が 86 株 (60%) であった。SEH 産生株のうち 71 株は SEA または SEB、もしくはその両者を同時に産生し、残りの 15 株は SEH のみを産生した。コアグララーゼ型と毒素型の関係を解析した結果、SEA 産生株はコアグララーゼ型が II、III、IV、VI、および VII 型に分散しているのに対して、SEH 産生株は全てがコアグララーゼ VII 型であった。

食中毒由来株やウシ生乳由来株について、SEG および SEI の産生を調査するとともに、コアグララーゼ型との関係を解析した。分離株から PCR により *seg* と *sei* 保有株を検索した結果、食中毒由来株では 16%、生乳由来株では 51% が同遺伝子を保有していた。コアグララーゼ型は、食中毒由来株が II、III、VII 型に広く分布していたが、生乳由来株では 67% が VI 型に、残りが II 型に分類された。SEG と SEI の検出を ELISA で試みたところ、食中毒由来株は *seg* と *sei* 保有株の全てから SEG と SEI が産生することを確認したが、SE の産生量は少なかった。また、市販の牛乳や脱脂乳中で培養しても、SEG と SEI の産生は認められなかった。

コアグララーゼ遺伝子の塩基配列の違いに注目して、Multiplex PCR を用いた型別法の構築を検討した。ウシ由来 VI 型株のコアグララーゼ遺伝子の塩基配列を解析した結果、*stp12* の塩基配列 (VIa 型) とは一部が異なる 2 つのタイプの塩基配列 (VIb 型および VIc 型) が認められた。これら 3 つの VI 型サブタイプを同時に検出する 1 組のプライマーを新たに設計し、III、IV、VII、VIII 型を検出するための Multiplex PCR A (M-PCR:A) と、I、II、V、VI 型を検出するための M-PCR:B の 2 組の PCR セットを構築した。155 株の分離株のうち 154 株において、M-PCR 法と従来法により決定されたコアグララーゼ型が一致した。また、VI 型の 3 つのサブタイプをそれぞれ識別するための M-PCR:C を構築し、VI 型株のサブタイピングを実施した。その結果、食中毒由来株は VIa 型に、ウシ由来株は VIb 型と VIc 型に分類された。各サブタイプの *se* 遺伝子 (*sea*~*sei*) の保有を調べた結果、VIa 型は *sea* を保有しており、VIb 型からは *sec*, *sed*, *seg*, および *sei* のいずれかが検出された。一方、VIc 型からはいずれの *se* 遺伝子も検出されなかった。これらの結果は、VI 型コアグララーゼ遺伝子のサブタイプと *se* 遺伝子の保有に関係があることを示唆している。開発した 3 つの Multiplex PCR は、簡便かつ迅速なコアグララーゼ型別法として有用な方法になると考えられた。

以上、本研究は、新規 SE の中で SEH は食中毒の発症に関与しているが、SEG および SEI 産生菌の毒素産生性が低いことを明らかにした。また、新規に構築したコアグララーゼ型を識別する Multiplex PCR は簡便かつ迅速な疫学的研究の有用なツールとなることを示した。これらの成果は、応用獣医学、特に感染制御学、食品衛生学の領域で新たな知見を提供するものであり、学力確認の結果と併せて博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める。