

称号及び氏名	博士（獣医学）	坂野上 英世
学位授与の日付	平成30年9月25日	
論文名	ウェルシュ菌芽胞の熱活性化と腸管上皮細胞への接着に関する形態学的研究	
論文審査委員	主査	三宅 眞実
	副査	笹井 和美
	副査	向本 雅郁

## 論文要旨

### はじめに 背景と目的

*Clostridium perfringens* (以下、ウェルシュ菌)はグラム陽性、芽胞形成細菌で、土壌、水環境などの環境中や、人や動物の腸管内などに広く分布する。本菌は少なくとも17種類の毒素を産生するが、特にタイピング毒素と呼ばれる4種の毒素 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\iota$ ) の産生性によって、A~Eの5つの毒素型に分類される。うちA型ウェルシュ菌は、ヒトや動物の様々な疾病から分離され、特にヒトの場合、ガス壊疽という侵襲性感染症の原因になる他は、食中毒 (FBI)、抗生剤誘発性下痢症 (AAD) や、施設内散発性下痢症 (SND) といった、嫌気性菌が原因となる感染性下痢症から頻繁に分離される。これら感染性下痢症を引き起こすウェルシュ菌分離株の共通性状として、*Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) というタンパク毒素を産生することが挙げられる。CPEはウェルシュ菌が芽胞を形成する過程で産生され、これがヒト消化管上皮細胞に作用して粘膜の水分透過性を亢進し、最終的に下痢等の症状を発現させる。

ウェルシュ菌FBIの発生要因として、食材を汚染した芽胞が食品調理過程で加熱され発芽増殖が促進される (これを芽胞の熱活性化と呼ぶ) ことと、その結果、大量に増殖したウェルシュ菌 (栄養型) が食品と共に喫食されることが挙げられる。腸管に達した栄養型菌はここで芽胞を形成し、毒素産生を介して下

痢を発症させる。一般的に、ウェルシュ菌食中毒の下痢症状は特別な治療をしなくとも早期に回復することから、ウェルシュ菌は消化管内では菌が定着できず、下痢とともに体外へ直ちに排出されると考えられている。一方、AAD、SNDという病態においては、FBIの場合と反対に、ウェルシュ菌栄養型あるいはその芽胞が消化管内に定着することが発症に必須と理解されている。このように病態により菌の消化管定着性に矛盾した考え方がある一方で、実際に異なる由来株が異なる接着性を示すことを実験的に証明した研究はない。

本研究では、ウェルシュ菌下痢症の発生に重要な2つの過程、①芽胞の熱活性化、②栄養型菌あるいは芽胞の腸管上皮細胞への接着、に着目し、主に形態学的な解析手法を利用して、それらの過程で生じる生命現象について情報を収集、包括的にウェルシュ菌下痢症を理解するための仮説を提唱することを目的とした。

## 第1章 ウェルシュ菌芽胞の調製と芽胞間での性状の違い

本研究の遂行には、できるだけ表面構造が人為的な操作の影響を受けていない芽胞を実験に供することが求められる。既報の芽胞調製法の内容を検討した結果、中でも水性2層分配法が本研究の目的に最も合致すると判断した。FBI関連株SM101、FBI由来株NCTC8239を本法に供したところ、60～80%という精製度を示す芽胞溶液を得た。SND分離株であるW3493では、同様の手法でも満足できる精製度の芽胞溶液を得ることができなかったが、同じSND株であるW10030では同様の手法で精製度の高い芽胞溶液を得ることができた。電子顕微鏡等を用いた解析によりW3493株は芽胞形成プロセスに何らかの障害があり、少なくとも用いた実験条件下では完全なる成熟芽胞を形成することが難しいことが判明した。これらの結果、用いる菌株の性状により注意すべき点があるものの、水性2層分配法を用いれば十分な精製度の芽胞溶液を調製できることが明らかになり、結果としてSM101株、NCTC8239株、W10030株の精製芽胞溶液を得て、以下の研究に着手した。

## 第2章 ウェルシュ菌芽胞の熱活性化機序に関する研究

ウェルシュ菌FBIの発生には、食品調理時に混入した芽胞が加熱され熱活性化することが重要である。従ってこの熱活性化の機序を理解し、これを阻害する手段を開発できれば、FBIの制御へつながることが期待されるが、そもそもウェルシュ菌の熱活性化の機序についてはほとんど明らかにされていない。ウェルシュ菌同様に芽胞を形成し、その芽胞が同じく熱活性化することの知られるバチラス属細菌では、加熱処理は、発芽を誘導する化学物質（germinant）のレセプター（GR）の構造を変化させ、GRの感受性を亢進させる効果があることが報告されている。

そこで本研究では、ウェルシュ菌でも加熱処理がGRの感受性を上げるのか、あるいは他のプロセスが加熱により影響を受け発芽促進効果が表れるのかについて検討した。

SM101株、NCTC8239株の精製芽胞を位相差顕微鏡下に置き、栄養培地内で発芽初期過程をライブ・セル・イメージングにて経時的に観察した。タイム・ラプス画像中の芽胞の挙動を1細胞解析すると、加熱処理が芽胞の発芽を促進することが確かめられた。さらに異なるgerminantによる発芽誘導を行った結果、いずれの方法で発芽誘導しても、概して熱活性化の程度は同等であった。これらの結果と、ウェルシュ菌の場合多くのgerminantが同じ単一のGRを介して発芽誘導効果を発揮するという先行研究の結果とを考え合わせると、バチラス属細菌と同じく、ウェルシュ菌でも加熱処理がGRの感受性を上げる効果があると結論づけられた。

次に、加熱処理が、GRの感受性亢進とは異なる効果を発揮している可能性についても調べた。この際、特に芽胞の発芽後期過程に焦点を当ててタイム・ラプス画像を詳細に解析したところ、活性化芽胞から栄養型菌が出芽するまでのプロセスが、事前に芽胞を加熱処理した場合に有意に加速していることを見出した。このような変化が観察された原因として、①熱活性化によってGR以外の生体分子の構造・機能にも変化が生じた、あるいは②熱活性化GRから発せられるシグナルの質・強度が、熱活性化していないGRからのシグナルと異なる、という2つの仮説が考えられた。何れにしてもこのような現象はバチラス属細菌を含む芽胞の熱活性化では全く確認されておらず、本研究で新しい現象の発見と、新しい作用仮説の提唱を行うことができたと考えている。

### 第3章 ウェルシュ菌芽胞の消化管定着と病原性に関する研究

本研究ではウェルシュ菌の腸管定着性についても検討を行った。まず食中毒関連株であるSM101株、NCTC8239株の栄養型菌を腸管上皮株化細胞Caco-2に作用させたところ、菌体が細胞へ接着するという証拠は取れなかった。そこで精製芽胞を同様にCaco-2細胞へ作用させたところ、光学顕微鏡および電子顕微鏡下で芽胞と細胞の強固な接着が確認された。さらにSND由来株であるWI0030株でも同様な実験を行うと、本菌株の芽胞もCaco-2細胞へ強く接着することが明らかになった。芽胞とCaco-2細胞の接着面では、細胞の微絨毛が芽胞を取り囲むような像が確認され、特殊なリガンド・レセプター結合を思わせる結合様式が明らかになった。これまで特別な腸管定着が介在しないと考えられていたFBI株でも芽胞が腸管定着性を示したという本研究の結果から、次のような新しい仮説を提唱できると考えている：ウェルシュ菌FBI発症時には菌と腸管上皮細胞との接着は病態の進展に大きな意義を持たないが、回復期にその芽胞が上皮へ定着し、ウェルシュ菌保菌者を生む素地となる。このような保菌者が抗生剤投与を

受けるとAADを発症する可能性があり、さらには保菌者が病院施設内でSNDの感染源になることが懸念される。

## 総括

1. 水性2層分配法を用いることで表面構造に人為的な損傷を受けていないウェルシュ菌芽胞を調製することができた。しかし本手法はすべての菌株に適用可能ではなく、菌株によって利用可能性を確認する必要性が指摘される。
2. ウェルシュ菌芽胞の熱活性について、ライブ・セル・イメージングによる1細胞解析手法により調べたところ、発芽後期過程が熱処理により加速するという、これまで提唱されていない新しい概念の熱活性化機構の発見につながる重要知見を得た。
3. ウェルシュ菌SND株の芽胞が培養腸管上皮細胞（Caco-2）に接着することを初めて実験的に証明し、FBI株の芽胞も同様に接着することを確認した。得られた結果を基に、ウェルシュ菌下痢症の発生メカニズムについて新しい仮説を提唱した。

## 審査結果の要旨

*Clostridium perfringens* (以下、ウェルシュ菌)はグラム陽性、芽胞形成細菌で、土壌、河川などの環境中や、人や動物の腸管内などに、多くの場合芽胞として分布する。本菌はヒトでガス壊疽という侵襲性感染症の原因になる他、食中毒(FBI)、抗生剤誘発性下痢症(AAD)や施設内散発性下痢症(SND)といった異なる病型の感染性下痢症から頻繁に分離される。これら3つの下痢症から分離されるウェルシュ菌は共通して蛋白毒素(エンテロトキシン)を産生する。この毒素は菌が腸管内で芽胞を形成する過程で産生され、これが上皮細胞に作用して下痢症状を引き起こす。

ウェルシュ菌FBIの原因食品はほとんどが加熱調理食品である。これは食品に混入した芽胞が調理過程で加熱されると、熱が芽胞の発芽増殖を促進するためと説明される。その結果、食品中で菌が大量増殖し、これが経口摂取され腸管内腔へ到達すると、菌は芽胞を形成し下痢を発症させる。ウェルシュ菌FBIの症状は短期間に収束することから、菌は腸管内には定着しないと考えられている。一方、AAD、SNDという病型においては、菌が腸管内に定着することが発症に必須と理解されている。なぜ同じ菌種が異なる3種の病型を示すかについては、1つには菌の腸管定着性から説明できる可能性が考えられる。これを明確に証明

することはウェルシュ菌の感染制御にとって重要であるにも関わらず、異なる由来のウェルシュ菌株の上皮細胞への接着性を比較検討するなど、腸管定着性と病型との関連性を示した報告は認められず、未だ統一した見解は得られていない。

このような状況下で本研究では、ウェルシュ菌下痢症の発症に重要な2つの過程、①芽胞の熱活性化と、②芽胞の腸管上皮細胞への接着に着目し、主に形態学的な解析手法を利用して、それらの過程で生じる生命現象について解析した。

第1章では、表面構造が人為的操作の影響を受けていない芽胞調製法を検討した。既報の数種の方法を検討した結果、最終的に水性2層分配法が本研究の目的に最も合致すると判断された。本法を用いると**FBI**関連株**SM101**、**FBI**由来株**NCTC8239**、**SND**株**WI0030**の芽胞が高度に精製された。電子顕微鏡観察により、得られた芽胞は成熟芽胞の特徴を有するとともに、表面構造が無傷で保持されているなど、物理化学的ストレスが最小限に抑えられていることが確認できた。

第2章では精製芽胞を用いて、食中毒発症に重要な意義を持つ芽胞の熱活性化のメカニズムの解析を行った。まず、ウェルシュ菌の芽胞が発芽して増殖に至る全過程を顕微鏡下でライブセルイメージング観察し、視野内の1細胞の発芽動態を解析する技術を確立した。そして同条件下で加熱処理が芽胞の発芽を促進することを定量的に示し、その効果が発芽因子の種類によらないことを明らかにした。さらに、加熱処理がどの発芽過程に変化をもたらすかを検討したところ、発芽の後期過程が加速していることを見出した。従来、熱処理は発芽初期過程において発芽レセプターの活性化を引き起こすという仮説が提唱されていたが、これだけでは説明できない複雑な生物反応が、過熱によって加速していることが本研究により始めて示された。

第3章では芽胞の腸管上皮細胞への接着性について検討した。食中毒関連株である**SM101**株、**NCTC8239**株の芽胞を培養腸管上皮細胞**Caco-2**へ作用させたところ、芽胞と細胞の接着が確認された。電子顕微鏡観察により、芽胞は細胞膜へ直接結合しているわけではなく、上皮細胞の微絨毛が芽胞の周囲を絡めるように結合しており、特殊なリガンド・レセプター相互作用の存在が示唆された。**SND**由来株である**WI0030**株でも同様の特徴的な結合像が確認され、由来の如何に関わらない強い接着性が証明された。これらの結果は、ウェルシュ菌**FBI**を発症した患者では、その回復期に芽胞が腸管上皮へ定着し、ウェルシュ菌保菌者になる可能性を示唆するものである。このような保菌者が抗生剤投与を受けると**AAD**を発症する可能性があり、さらには保菌者が病院施設内で**SND**の感染源になることが懸念される。

以上の結果は、ウェルシュ菌下痢症発症に重要な意義を持つ2つのプロセス、芽胞の熱活性化と芽胞の腸管定着に対し、新たな概念を提唱するものである。これらはウェルシュ菌下痢症の全体像を理解するために役立つ重要な知見であ

り、獣医公衆衛生学の分野のみならず医学の分野においても多大な貢献を  
とされる。従って、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士  
(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。