〔シンポジウム 2:「環境と健康」研究における最前線〕

細菌毒素と健康 (病原因子の解析)

鈴木 潤

SUMMARY

The microbial environment is an essential aspect of the discussion of “environment and health”, due to our close coexistence with microorganisms. Furthermore, on a daily basis, bacteria cause food poisoning in humans through food intake, with as many as 90% of food poisoning cases being of bacterial origin. In addition, the Food Hygiene Law classifies etiological agents responsible for food poisoning into 16 types, many of which produce hemolytic toxins as pathogenic factors. Since these toxins are protein toxins, their properties can be determined by electrophoresis analysis. The toxin properties have also been analyzed by conducting osmotic protection and hemolysis inhibition experiments, as well as through determination of their ultrastructure and hemolytic efficiency. Hemolytic efficiency is expressed numerically as a function of streptolysin O (SLO) concentration and hemolysis level, or in other words, the concentration dependency of SLO from the lowest hemolysis level to complete hemolysis. These findings will contribute to the treatment and prevention of food poisoning.

Key words: protein toxins, toxicology for environmental, pI, electron microscopy, assessment.

1. はじめに

「環境と健康」のテーマを扱う上で健康を損なう環境側の要因としては、環境汚染物質である膨大な種類と量の化学物質および金属等が挙げられるが、加えて微生物環境もヒトの健康を考える上で重要である。ここでは感染症の中でも消化器系感染症、さらに感染性腸炎の起炎病原体の一つである細菌に焦点を当て、細菌性食中毒について述べる。

2. 食中毒菌の病原因子

何らかの有毒、有害物質が食品(飲食物)中に混在していて、それを喫食した人が急性胃腸炎(腹痛, 下痢, 嘔吐など)等の急性障害を起こすことを食中毒と定義している。食中毒の原因となる物質にはふぐ毒やキノコ毒のような天然毒やメタノール, 砒素, シアン化物, カドミウム等の有害化学物質がある。特に食中毒の原因物質が細菌そのもの

であるか、または食品中で細菌が増殖する際に産生する毒素である場合を細菌性食中毒と呼称する。このシンポジウムでは細菌性食中毒を扱うが、食中毒の9割以上が細菌性食中毒であり、細菌の増殖しやすい暑い時期をピークに発生が見られる。また、細菌性食中毒の原因菌に指定されているのはサルモネラ属菌, 腸炎ビブリオ菌, 黄色ブドウ球菌, ボツリヌス菌, および病原性大腸菌等を代表とする16種類である。これら原因菌の代謝物質を見るとその多くがヘモリジンを産生する。したがって、主な病原因子の一つとしてヘモリジンを挙げることができる。

また、細菌毒素は「細菌の代謝産物, あるいは構成成分の一つであり微量でヒト生体に不利な反応を引き起こす物質」と定義されている。また、その分布状況から、(菌体)外毒素と(菌体)内毒素に大別され、これらの構成成分から、前者はタンパク毒素, 後者はリポ多糖体毒素と区別できる。タンパク毒素はさらに作用機構より神経毒(neurotoxin), 腸

Protein toxins and health (Analysis of virulence factor).

Jun Suzuki; 麻布大学・環境保健学部・健康環境科学科・健康化学研究室

Correspondence address: Jun Suzuki; Department of Health Care Chemistry, College Environmental Health, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Sagami-hara-shi, Kanagawa 229-8501, Japan.

略号一覧: SLO, ストレプトリジン O; EGCG, エピガロカテキンガレート; SLS, ストレプトリジン S; Hb, ヘモグロビン; HE, 溶血効率; γ -G, γ -グロブリン; PC, リン脂質.

第56回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

(受付 2006 年 3 月 2 日, 受理 2006 年 3 月 2 日, 刊行 2006 年 6 月 15 日)

管毒 (enterotoxin), 細胞毒 (cytotoxin) 等に分類できる. これらの中の細胞毒は孔形成細胞障害毒素とも呼称されているが, 白血球および赤血球膜に孔を形成し, 細胞障害を惹起する. ここでは赤血球膜を障害し, 血色素を遊離させる, いわゆる溶血毒素産生食中毒原因菌, *Streptococcus pyogenes*³⁾, *Staphylococcus aureus*⁴⁾, *Bacillus cereus*⁵⁾, *Aeromonas hydrophila*⁶⁾, *Listeria monocytogenes*⁷⁾, *Vibrio vulnificus*⁸⁾ の 6 菌種の産生するヘモリジンの性状解析の成績について述べる.

3. 孔形成細胞障害毒素

孔形成細胞障害毒素による膜孔形成は浸透圧保護実験¹⁾と超微形態によって確認できる. 浸透圧保護実験はタンパク毒素によって引き起こされる溶血の保護効果を分子径の異なる保護物質を用いて検討した. 毒素は最近, 食中毒の原因菌としても知られるレンサ球菌の産生したストレプトリジン O (SLO) および S (SLS) を用いた. SLO では赤血球からの K^+ , ヘモグロビン (Hb) のいずれのタイムコー

Fig. 1. Effect of osmotic protectants on SLO-induced hemolysis.

Rabbit erythrocyte suspensions (1%, v/v) containing 30 mM sucrose (□), 30 mM raffinose (▲), 30 mM inulin (△), 30 mM dextran 4 (●), 10 mM dextran 8 (■), or no protectant (○) were incubated with the hemolysin (40 HD_{50}) at 25°C. Then the release of K^+ (A) and Hb (B) from the erythrocytes was determined.

ス¹⁾にも保護効果は示されなかった (Fig. 1). 一方, SLS では K^+ 遊離のタイムコースはいずれの物質でも影響が見られなかったが, Hb の遊離では Dextran 8 で 60 分まで, Dextran 4 では 40 分まで溶血が保護された (Fig. 2). この結果より, SLO では Dextran 8, 平均分子径 3.5 nm で溶血保護が見られなかったため, 3.5 nm 以上の孔径が推測され, SLS では Dextran 8 での保護効果より, 膜上の孔径は約 3.5 nm と考えられる. したがって, SLS はコロイド浸透圧変化過程を経る溶血様式に従うことが推測される. 次に, SLO による O リングおよび孔形成を電顕による超微形態^{9,10)}より確認した (Fig. 3). SLO によって形成された孔径は内径 24 nm, 幅 4.9 nm, 外径 34 nm であった. この結果は溶血保護実験による 3.5 nm 以上との成績を支持した. また, Fig. 3 パネル A の矢印は O リングを形成せず不規則な SLO 分子の集合体を示した. また, パネル B の矢印は膜の裏側の集合体を示した.

次に, 溶血毒素のアガロースゲルを用いた pI 分析を行い, 溶血効率 (HE) との関連性²⁾を検討した (Fig. 4). なお, HE は最小溶血量から完全溶血量までの SLO の濃度依存性, すなわち SLO の濃度と溶血量の関数を数値で表した. SLO

Fig. 2. Effect of osmotic protectants on SLS-induced hemolysis, experimental conditions were as described in Fig. 1.

Fig. 3. Electron micrographs of ghost membranes treated with SLO-AC (A) and -NC (B).

A. Many semicircular arcs without pore are seen with a few rings with pores. Arrows indicate irregular shape complexes. B. All the complexes form rings with pore. The length of the arcs and the size of the pores vary, but their radius is almost the same. Arrows indicate pores on back-side membrane.

Fig. 4. Isoelectric point distribution patterns of hemolysin produced by streptococci.

Sample of hemolysin were applied to agarose gel containing 1.5% and focused for 2h; hemolytic activity was detected by overlaying agarose plate containing erythrocytes in the presence of 2-ME. Vertical lines indicate hemolytic band on the overlaid plate. Lane 1; SLO-N, Lane 2; SLO-A, Lane 3; SLS.

および SLS の HE は平均で 6.83 と 3.49 であり、一方、pI 値は主要成分 SLO で 6.0 および 7.5, SLS で 5.4 であった。したがって、pI 値と HE は比例することが確認された。したがって、HE を測定することにより、毒素の種類を推測することができる可能性が示唆された。

次に、各種食中毒原因菌産生溶血毒素の HE および pI 分析を検討した。HE は 2.46 ~ 8.20 であり、pI 値は 5.0 ~ 7.8 であった。各溶血毒素の pI 値および HE は多様性を示した

Table 1. Characterization of various hemolysin

Hemolysin	pI	HE	Pore size ^a	Binding site
SLO-A	6.0	5.90	24	Cho ^c
SLO-N	7.5	8.20	24	Cho
SLS	5.4	3.49	3.5	PC ^d
α -hemolysin	7.4	2.46	2	—
Cereolysin	5.2	3.27	33	Cho
Aerolysin	6.7	3.89	ND	PC
Listeriolysin	ND ^b	3.82	ND	Cho
Hemolysin (<i>Vibrio</i>)	ND	4.51	ND	Cho

a) ND; not done b) Pore size; nm c) Cho; Cholesterol d) PC; phosphatidyl choline

が、SH 基活性化毒素ファミリーでは HE と pI 値との関連性はおおよそ比例関係にあった (Table 1)。なお、*Vibrio vulnificus* の産生する hemolysin では低力価のため pI 分析による検出は不能であった。

4. 病原因子の除去

一方、毒素による影響を防ぐための検討として、溶血毒素の阻害実験を行った。毒素の結合部位はコレステロールおよびリン脂質に大きく大別できた。したがって、多くの毒素はコレステロールおよびリン脂質 (PC) で毒素の中和が可能になる。また、コレステロールに結合する毒素は γ -グロブリン (γ -G) で中和が示された。また、カテキンによる溶血毒素阻害効果を検討したが、SLO, SLS, ビブリオ溶血毒素、および listeriolysin で溶血阻害がみられた。カテキ

Fig. 5. Inhibition of epigallocatechin gallate on the hemolytic activities by various hemolysin (2HD₅₀/ml).

SLO; Streptolysin O, SLS; Streptolysin S, LLO; Listeriolysin O, VVH; *Vibrio vulnificus* hemolysin.

ンによる溶血阻害効果の知見は病原因子除去および食中毒の予防にも応用可能であり、その実用が期待される (Fig. 5).

5. 謝辞

超微形態を知るために電顕像の提供を戴いた北里大学薬学部関矢加智子博士に感謝いたします。

文 献

- 1) 鈴木潤, 菊池佐知子, 吉原英児, 小林貞男. ストレプトリジン S による溶血作用. Jpn J Electroph 1994;38:227-231.
- 2) Suzuki J, Kobayashi S, Kagaya K, Fukazawa Y. Heterogeneity of hemolytic efficiency and isoelectric point streptolysin O. Infect Immun 1988;56:2474-2478.
- 3) 鈴木潤. 電気泳動法の教育ツールとしての活用; 環境保健学教育現場での活用. 生物物理化学 2005;49:51-54.
- 4) Wiseman GM. The hemolysin of *Staphylococcus aureus*. Bacteriol Rev 1975;39:317-344.
- 5) Bernheimer AW, Grushoff P. Cereolysin; production, purification and partial characterization. J Gen Microbiol 1967;46:143-150.
- 6) Asao T, Kinoshita Y, Kozaki S, Uemura T, Sakaguchi G. Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. Infect Immun 1984;46:122-127.
- 7) Geoffroy C, Gaillard JL, Alouf JE, Berche P. Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listriolysin O from *Listeria monocytogenes*. Infect Immun 1987;55:1641-1646.
- 8) Yamanaka H, Satoh T, Katsu T, Shinoda S. Mechanism of hemolysis by *Vibrio vulnificus* hemolysin. J Gen Microbiol 1987;133:2859-2864.
- 9) 関矢加智子, 壇原宏文, 二重作豊. ストレプトリジン O による溶血機構の超微形態的解析. 感染症誌 1993;67:736-740.
- 10) Sekiya K, Satoh R, Danbara H, Futaesaku Y. A ring-shaped structure with a crown formed by streptolysin O on the erythrocyte membrane. J bacteriology 1993;175:5953-5961.