

9752 魚介類における好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌の研究
- 食品中の分布とその毒性の検討 -

助成研究者：小林 とよ子 (東海学園女子短期大学)
共同研究者：上野 一恵 (岐阜医療技術短期大学)

海産生鮮魚介類から好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌(以下、好塩性の嫌気性菌と省略)を分離する試みは諸外国においても極めて少なく、我が国では演者ら以外では全く検討されていない。演者らは、これまでに海産生鮮魚介類における好塩性の嫌気性菌の分布について詳細に検討し、海産魚介類から2%NaCl濃度の培地で至適発育する好塩性の嫌気性菌を高率に分離し、これらの好塩性の嫌気性菌は、海産魚介類の腸管内で腸管細菌叢を形成する重要な菌種であることが推定されることを報告してきた。

また、演者らが分離した好塩性の嫌気性菌は、*Haloanaerobium butyricum* JCM 9809 として新種登録し、その研究成果をあげてきた。しかし、好塩性の嫌気性菌の毒素産生性に関してはいまだ不明である。そこで本研究では、新種の *H. butyricum* JCM 9809 を始めとして、これまで著者らが分離した新種と推定される好塩性の嫌気性菌100株のヒトに対する病原性の一つのマーカーとして細胞毒性と腸管毒素産生性について、2種類の培養細胞を用いて検討した。

細胞毒性の検討では、HeLa 細胞を用いてcytotoxicityを観察した。また、下痢原性毒素の産生能の有無については、腸管毒素に感受性を持つHT29/C₁ 細胞を用いた。HT29/C₁ 細胞はヒト結腸ガン由来の細胞であり、フランス、パスツール研究所の Dr. Louvard から分与を受けた。

好塩性の嫌気性菌100株は、BHI ブロースで 37°C、7日間嫌気培養後、各培養液から0.5 ml 宛て採取し、5菌株毎に混合した培養混液(2.5 ml)を 20本作成した。これらの培養混液は培地中に添加した2%NaClの影響を除くため、一夜透析した。ついで、Molcut II 10,000 (Millipore) で限外濾過することにより、20倍濃縮した被検液を作成した。HeLa 細胞およびHT29/C₁ 細胞の培養は、ウイルスの組織培養の手技に準じて行った。限外濾過により濃縮した被検液を、24時間培養した HeLa細胞およびHT29/C₁ 細胞に接種した。培養細胞の形態変化は、いずれの細胞も5%CO₂環境内で、37°C、24時間培養後、陰性コントロールにおける細胞形態と比較しながら、細胞変性(cytopathic effect ; CPE) の程度を弱拡大の顕微鏡(100×)で観察した。

好塩性の嫌気性菌100株のヒトに対する病原性について、HeLa 細胞を用いた細胞変性毒素産生の有無および腸管毒素産生能の有無についてHT29/C₁ 細胞を用いて検討した結果、これらの方法では毒素の産生性は証明されなかった。

9752 魚介類における好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌の研究 - 食品中の分布とその毒性の検討 -

助成研究者：小林 とよ子 (東海学園女子短期大学)

共同研究者：上野 一恵 (岐阜医療技術短期大学)

1. 研究目的

海産魚介類から好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌(以下、好塩性の嫌気性菌と省略)を分離する試みは 諸外国¹⁾でも極めて少なく、我が国では著者ら²⁻⁴⁾以外では全く検討されていない。著者らはこれまでに、海産魚介類における好塩性の嫌気性菌の分布について詳細に検討し、海産魚介類から2%NaCl濃度で至適発育する好塩性の嫌気性菌を高率に分離し、これらの好塩性の嫌気性菌は、海産魚介類の消化管内で腸管細菌叢を形成する重要な菌種であることが推定されることを平成6年度のソルト・サイエンス助成研究報告Ⅱ²⁾で報告した。ついで、平成8年度の助成研究報告Ⅱ⁵⁾では、著者らが分離した好塩性の嫌気性菌は、*Haloanaerobium butyricum* JCM 9809 として新種登録し、その研究成果をあげてきた。しかし、好塩性の嫌気性菌の毒素産生性に関してはいまだ不明である。

そこで本研究では、新種の *H. butyricum* JCM 9809を始めとして、これまで著者らが分離した新種と推定される好塩性の嫌気性菌100株のヒトに対する病原性の一つのマーカーとして細胞毒性と腸管毒素産生性について、2種類の培養細胞を用いて検討した。細胞毒性の検討については、HeLa 細胞を用いて cytotoxicity を観察した。また、下痢原性毒素の産生能の有無については、腸管毒素に感受性を持つHT29/C₁細胞⁶⁻⁸⁾を用いた。HT29/C₁細胞はヒト結腸ガン由来の細胞であり、フランス、パスツール研究所の Dr. Louvardから分与を受けた。

2. 研究方法

2. 1. 使用菌株

使用菌株は、*Haloanaerobium butyricum* JCM 9809を始めとして、著者らがこれまでに海産の生鮮魚介類から分離した新種と推定される好塩性の嫌気性菌100株を用いた。

2. 2. 被検液の作製

好塩性の嫌気性菌100株は、2%NaClを添加したGAM半流動高層培地で24時間前培養した。ついで、2%NaCl添加 BHI broth (BBL)の約 5ml宛分注した試験管を滅菌急冷後、直ちに24時間培養菌を接種し、37°C、7日間嫌気培養した。各培養液から 0.5 ml 宛て採取し、5菌株毎に混合した培養混液 (2.5 ml) を 20本作成した。これらの培養混液は透析膜(三光純薬)を用いて、培地中に添加した2%NaClの影響を除くため、滅菌蒸留水500 mlで一晩透析した。ついで、Molcut II 10,000 (Millipore) で限外濾過することにより、20倍濃縮した被検液を作成した。

2. 3. HeLa 細胞による細胞変性毒素の検出

HeLa 細胞の調整⁹⁾は、ウイルスの組織培養の手技に準じて行った。すなわち、MEM (minimum essential medium; 最小基礎培地)にYLM を等量加え、これに牛胎児血清 (Gibco)10%、7.5%重炭酸ナトリウム0.75%および少量の必須アミノ酸、非必須アミノ酸およびビタミンを加えた growth medium を用い、25 ml 容のTissue Culture Flask (IWAKI GLASS)で5日間培養した。この培養液を吸引除去した後、0.25%トリプシン溶液と0.02% EDTA溶液を1:9の割合で混合した混合液を加えて、4~5分清置し、容器の壁面に付着している細胞をはがした。トリプシンとEDTAを除去するため、細胞浮遊液は growth medium で2回洗浄し、growth medium に HeLa 細胞が $1\sim 2 \times 10^5$ コ/mlとなるように調整した。この細胞浮遊液をパスツール・ピペットにて1 ml宛 multiwell(24穴ウエル; Falcon)の各ウエルに分注した。multiwellは5%炭酸ガス環境下で37°C、2日間培養し、これを細胞障害性試験用細胞に用いた。限外濾過により20倍濃縮した被検培養液の各100 μ 宛をウエルに分注し、ついで MEM maintenance medium 0.9 mlを各ウエルに加えて混合した。5%炭酸ガス環境下で、37°C、2日間培養後、陰性コントロールにおける細胞形態と比較しながら、細胞変性(cytopathic effect ; CPE)の程度を弱拡大の顕微鏡(100 \times)で観察した。細胞変性が起これば、細胞の脱落或いは屈折性の変化した円形の細胞がみられる。

2. 4. HT29/C₁ 細胞を用いたエンテロトキシンの検出

エンテロトキシンの検出にはHT29/C₁ 細胞を用いた。HT29/C₁ 細胞の培養は加藤ら⁶⁾の方法で行った。すなわち、牛胎児血清10%、1 m M pyruvate(Gibco)、10 μ g/ml human transferrin (Sigma)、50 U/ml penicillin G (万有)および50 μ g/ml streptomycin (Sigma) を添加した Dulbecco's modified Eagle MEM(Gibco)により行った。

被検培養液のHT29/C₁ 細胞への接種および判定は、HeLa 細胞に用いた方法と同様に行い、24穴の multiwellで24時間培養した HT29/C₁ 細胞に、その100 μ l と maintenance medium 0.9 mlを接種した。培養細胞の形態変化は5%炭酸ガス環境下で、37°C、24時間培養後、細胞変性(CPE)の程度を弱拡大の顕微鏡(100 \times)で観察した。

3. 研究結果

好塩性の嫌気性菌100株のヒトに対する病原性について、HeLa 細胞を用いた細胞変性毒素の産生の有無および腸管毒素産生能の有無についてHT29/C₁ 細胞を用いて検討した結果、これらの方法では毒素の産生性は証明されなかった (Table 1)。

4. 考察

ヒト結腸ガン由来の HT29/C₁ 細胞は、腸管毒素に感受性をもつことが明らかとなつて以後、エンテロトキシンの検出に多用されている。従来、エンテロトキシンの検出には、De¹⁰⁾ らが開発した腸管の結紮ループ法に依っていた。しかし、ウサギやラット等の実験動物を利用する方法は手技が複雑で、かつ数多くの未知の菌株について検討するには問題があった。そこで、ヒト結腸ガン由来のHT29/C₁細胞がエンテロトキシンの感受

性をもつことが証明されて以降、比較的容易にエンテロトキシンの検出が可能となった。

Meiselら⁷⁾は、小児科領域において入院した120人の小児(2週令~3.5歳児)の糞便検体を検査し、うち56検体が下痢便で、分離したグラム陰性嫌気性桿菌45株のうち、Bacteroides fragilis 2株からエンテロトキシンをHT29/C₁細胞を用いて証明した。また、Katoら⁶⁾は菌血症を伴う腸管毒素産生性の B. fragilis との関連において、Polymerase chain reaction (PCR)法とHT29/C₁細胞とを比較検討し、エンテロトキシンの検出に高い一致率を示した。Meiselらおよび Katoらの研究で、エンテロトキシンの産生能を証明された B. fragilis は、無芽胞グラム陰性の嫌気性桿菌である。しかし、好塩性は全く認められず、著者らの分離菌株とは好塩性において相違する菌種である。

今回、著者らは好塩性の嫌気性菌100株のヒトに対する病原性について、HeLa細胞に対する細胞障害性毒素および Dr. Louvardから分与を受けた腸管毒素に感受性を示すT29/C₁細胞を用いて、エンテロトキシンの検出を実施したが、これらの方法ではいずれの毒素の産生性も証明することはできなかった。

5. 今後の課題

好塩性の嫌気性菌に関する報告は少なく、いまだ不明な点が多く、さらなる研究方法の開拓が望まれる。著者らが新菌種として登録した Haloanaerobium butyricum JCM 9809 以外にも、新菌種と考えられる複数の好塩性の嫌気性菌株の存在が推定されている。

国際交流の活発化にともない、我が国へ輸入される食品材料は年々急増している。特に我が国では、海産魚介類を多用する国民性からも、魚介類から高い頻度で分離される好塩性の嫌気性菌に関する研究は今後さらに拡大、検討される事が必要と思われる。また、好塩性の嫌気性菌に関する未知の病原性に対する検討は、ヒトに対する食中毒予防の基礎的対策へとつながるものであるため、早急な研究対策が望まれる。

6. 文献

- 1 Ollivier B., Caumette P., Garcia J. and Mah R.A.: Anaerobic Bacteria from Hypersaline Enviroments. Microbiological Reviews, 58(1), 27-38, 1994
- 2 小林とよ子、上野一恵：魚介類における好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌の研究 ソルト・サイエンス助成研究報告集II、355-366、1994
- 3 小林とよ子、上野一恵：市販の魚介類における好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌の分布、日本食品微生物学雑誌、14(3)、155-162、1997
- 4 小林とよ子：魚介類における好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌の研究 - 好塩性嫌気性桿菌の新菌種について - 東海学園女子短期大学紀要、32、53-61、1997
- 5 小林とよ子、上野一恵：魚介類における好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌の研究 ソルト・サイエンス助成研究報告集II、355-366、1996
- 6 Kato N., kato H., Watanabe K., Ueno K.: Association of enterotoxigenic Bact-

- eroides fragilis with bacteremia. Clin. Infect. Dis., 23, 83-86, 1996
- 7 Meisel-Mikolajczyk F., Sebald M., Torbicka E., Rafalowaka K., Zielinska U. : Isolation of enterotoxigenic Bacteroides fragilis strains in Poland. Acta. Microbiol Pol., 43(3-4), 389-392, 1994
 - 8 Donelli G., Fabbri A., Fiorentini C. : Bacteroides fragilis enterotoxin induces cytoskeletal changes and surface blebbing in HT-29 cells. infect. Immun., 64(1), 113-119, 1996
 - 9 小林とよ子、上野一恵 : Clostridium difficile とその外毒素の証明、Medical Technology, 10(3), 214-218, 1982
 - 10 De Ley, J., Cattoir, H. and Reynaerts, A. : The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates, Eur. J. Biochem., 12, 133-142, 1970

Table 1. Detection of cytotoxin and enterotoxin from the anaerobes used by the cell lines

n=100

Cell line	Cytotoxin	Enterotoxin
HeLa cell	0/100	—
HT29/C1 cell	—	0/100

positive / number of strains

On halophilic non-sporeforming anaerobic Gram negative rods
in sea fish and shellfishes

— Detection of toxin from the isolates of halophilic
non-sporeforming anaerobic Gram negative rods —

Toyoko Kobayashi (Tokai Gakuen Women's College)

Kazue Ueno (Gifu College of Medical Technology)

A total of 100 unselected strains of halophilic non-sporeforming anaerobic Gram negative rods organisms were obtained from sea shellfish and fish between 1994 - 1997 at our laboratory. Organisms were identified by the ID ANA System and our special techniques at our laboratory.

Cell culture assay to detect the halophilic non-sporeforming anaerobic Gram negative rods organisms enterotoxin was performed with use of HT29/C₁ cells as described previously. Cell culture assay of each isolate was performed in duplicate. Cell culture assay to detect the cytotoxicity was performed with use of HeLa cells as described previously.

We also tested on the type strains of Haloanaerobium praevalens DMS 2228 (Type strain of genus Haloanaerobium) and Haloanaerobium butyricum JCM 9809 which we isolated it from sea shellfish. A total of 100 isolates of halophilic non-sporeforming anaerobic Gram negative rods organisms were assayed for enterotoxin and cytotoxicity using HT29/C₁ cells and HeLa cells.

None of 100 isolates of the organisms were positive for cell culture assay.