

ブドウ球菌エンテロトキシン研究の最近の進展

Recent advances in staphylococcal enterotoxin study

おも え かつ ひこ
重 茂 克 彦
Katsuhiko OMOE

はじめに

ブドウ球菌エンテロトキシン staphylococcal enterotoxins (SEs) は、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* が産生する蛋白毒素である。ブドウ球菌属 *Staphylococci* の多くはヒトあるいは動物の常在菌であるにもかかわらず、時としてヒトや動物に病原性を示すが、*S. aureus* はブドウ球菌属菌の中でも、とりわけ病原性が強いとされる。*S. aureus* は、ヒトに対しては皮膚の化膿性疾患（せつ：furuncle, よう：carbuncle, 蜂巣炎：phlegmone）、化膿性の肺炎や膿胸、心内膜炎、髄膜炎、関節炎等の炎症性疾患、毒素性ショック症候群（toxic shock syndrome：TSS）、新生児TSS様発疹症、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群（staphylococcal scalded skin syndrome：SSSS）等を引き起こす。また、ブドウ球菌が食品中で増殖する際に産生されたSEsは、嘔吐を主徴とする食中毒を引き起こすことから、食品衛生学上重要視されている。さらに、ウシの乳房炎、ニワトリの関節炎の起原因菌でもあり、獣医学領域においても重要な病原体である。*S. aureus* により引き起こされる疾病は極めて多彩である。*S. aureus* は溶血毒、ロイコシジンといった細胞毒、スーパー抗原活性を有するToxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) およびSEs (SEsは嘔吐毒であるとともにスーパー抗原でもある)、表皮剥奪毒素 (exfoliative toxin：ET)、表皮細胞分化抑制因子 (epidermal cell differentiation inhibitor：EDIN) といった外毒素、血液凝固・繊維系を修飾するコアグラーゼとスタフィロキナーゼ、IgGのFC領域と特異的

に結合するプロテインAといった病原因子を産生し（毒素のデパートとも形容される）、これらの毒素・病原因子が単独で、あるいは協調して、多彩な*S. aureus*による疾病を引き起こすと考えられている。

本稿では、嘔吐活性とスーパー抗原活性を合わせ持ち、食中毒と毒素性ショック症候群を引き起こすエンテロトキシンとその類縁毒素について、最近の知見を解説したい。

I. SEsの研究史

1. ブドウ球菌食中毒原因毒素としてのSEs

SEsの研究は、*S. aureus*による食中毒の原因解明から始まった（表1）。1930年、Dackらはブドウ球菌自体の感染が食中毒を引き起こすのではなく、食品中でブドウ球菌の増殖に伴って産生される未知の物質により食中毒が引き起こされることを実験的に証明し、この毒素をエンテロトキシンと命名した。その後、SEsには抗原性の異なる複数の型が存在することが報告され、1963年に抗原型が確認された順にSEA, SEB, SEC～とアルファベット順に命名することが提唱された。この時点でSEAおよびSEBが存在することが明らかにされていた。その後、1965年にSEC, 1967年にSED, 1971年にSEEが報告され、さらにSECには抗原性は同一であるが物理化学的性状が異なる亜型（SEC1, SEC2, SEC3）が存在することが明らかになった⁵⁾。

SEsは極めて耐熱性が高く、種々の蛋白質分解酵素に対しても抵抗性を示すこと、食中毒事例はSEA単独、あるいはSEAを含むいくつかの毒素の

表1 ブドウ球菌エンテロトキシン研究史

1914	Baber	ミルクによる食中毒の研究。牛乳房に定着していた <i>S. aureus</i> が原因菌であることを明らかにした。
1930	Dack et al.	<i>S. aureus</i> が食中毒を起こし得ること、および食中毒は菌自身によるものではなく、その産生毒素によるものであることを実験的に証明し、毒素をエンテロトキシン (SE) と命名。
1955	Thatcher and Matheson	SE は抗原性の異なる複数の型があることを証明。
1963	Casman et al.	SE の命名法を提唱。抗原型が認められた順に SEA, SEB, SEC ~ とアルファベット順に命名することとする。この時点で SEA および SEB が知られていた。
1965	Bergdoll et al.	SEC ₁ , SEC ₂ を報告。これらの毒素は、抗原性は同一だが物理化学的性状が異なる。
1967	Casman et al.	SED を報告。
1971	Bergdoll et al.	SEE を報告。
1981	Bergdoll et al.	毒素性ショック症候群 (TSS) 患者由来株より SE 様毒素を精製し、SEF と命名。
1984	Bergdoll and Scheliever	SEF を TSST-1 (toxic shock syndrome toxin 1) と呼ぶことを提唱。国際的に承認され、以来 SEF は欠番となる。
1984	Reiser et al.	SEC ₃ を報告。
1987	Uchiyama et al.	TSST-1 によるサイトカインの過剰産生が TSS の病態に関与することを示唆。
1989	White et al.	「スーパー抗原」概念の提唱。
1994	Ren et al.	新型 SE 遺伝子をクローニングし、SEH と命名。
1995	Su and Wong	サルに対する嘔吐活性を指標に新型 SE を精製、SEH と命名。Ren et al. の SEH と同一のものである。
1998	Munson et al.	SEG および SEI 遺伝子のクローニング。
1998	Lindsay et al.	毒素性ショック症候群由来株の pathogenicity island SaPI1 の塩基配列を解析し、SE によく似た遺伝子を発見。Ent と命名。
1998	Zhang et al.	SED が存在するプラスミドの塩基配列を解析し、SE に高い相同性を示す配列を同定。SEJ と命名。
2001	Orwin et al.	Lindsay et al. が報告した Ent を大腸菌で発現させ、スーパー抗原活性を有することを証明。Ent は新たに SEK と命名された。
2001	Fitzgerald et al.	ウシ由来株の pathogenicity island SaPIbov の塩基配列を解析し、SE によく似た遺伝子を同定。SEL と命名。
2001	Jarraud et al.	SEG, SEI 保有株の遺伝子解析により、SEG および SEI 遺伝子周辺には、さらに3種類 SE-like な配列 (SEM, SEN, SEO) および2種類の偽遺伝子が存在することを報告。このクラスターを enterotoxin gene cluster (<i>egc</i>) と命名。
2001	Kuroda et al.	黄色ブドウ球菌全ゲノム塩基配列の決定。これに伴い、SEP 遺伝子を報告。
2002	Yarwood et al.	pathogenicity island SaPI3 を解析し、SEQ を報告。
2003	Orwin et al.	SEQ および SEL の生物活性を検討。両毒素ともスーパー抗原活性を有するが、サルに対する嘔吐活性を欠くことを報告。
2003	Omoe et al.	SE 型別不明食中毒分離株より、新型 SE 遺伝子をクローニングし、SER と命名。
2003	Letertre et al.	<i>egc</i> にあらたな SE 遺伝子が存在することを報告。SEU と命名。
2004	Lina et al.	International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigen (INCSS) による命名規約の制定。
2004	Omoe et al.	SER がスーパー抗原活性を有することを報告。サルに対する嘔吐活性は検討していないことから、SEIR と再命名。

複合 (例えば SEA + SEB など) によるものが多数を占めることが明らかにされている。しかしながら、ブドウ球菌食中毒の約 5% が型別不明とされており、SEA ~ SEE 以外の SEs の存在が示唆されていた。

2. 毒素性ショック症候群の出現

毒素性ショック症候群 (TSS) は、1978 年に米国で発熱、皮膚発疹、ショック等の全身症状を示す新しい黄色ブドウ球菌感染症として見いだされた。TSS の原因毒素として、1981 年に Bergdoll らが SEF を報告した。この毒素の物理化学的性状が SEs に類似することから SEF と命名されたが、その後この毒素は嘔吐活性を示さないことが明らかになり、1984 年に toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1)

と再命名された。これに伴い、SEF は欠番となり、現在に至っている²⁰⁾。

3. スーパー抗原

TSS の発症機序解明の過程で、TSST-1 は MHC class II と TCR を架橋することによって多数の T 細胞を活性化し、過度のサイトカイン産生が起き、その結果として TSS が発症するというモデルが提唱された³³⁾。さらに、SEs も同様の活性を有することが明らかとなり、これらの毒素の活性に対して 1989 年に「スーパー抗原」という概念が提唱された^{19, 34)}。通常の抗原提示は、MHC class II 分子によって提示された抗原ペプチドを特異的に TCR が認識することによって特定の T 細胞が活性化されるのに対し、スーパー抗原性毒素は MHC class II

分子が提示しているペプチドの種類にかかわらず MHC class II 分子に結合し、そのスーパー抗原毒素が結合し得る TCR V β エレメントを有する T 細胞を活性化する。その後、SEs も TSST-1 と同様に TSS の原因となり得ることも明らかにされた。

4. 新型ブドウ球菌エンテロトキシンの発見

1990 年代に入って、種々の新型 SEs の存在が明らかにされ始めた。1994 年、Ren らは TSS 由来株 (TSST-1 非産生) から新規のスーパー抗原性毒素を精製し、さらにその遺伝子もクローニングして SEH と命名した³⁰⁾。その翌年、Su and Wang もサルに対する嘔吐活性を指標として新型 SE を精製し、やはり SEH と命名した³¹⁾。その後の解析で、Ren の SEH と Su and Wang の SEH は同一の物質であることが確認された。その後、既知の SE 遺伝子をプローブとした *S. aureus* genomic DNA ライブラリーのスクリーニング、pathogenicity islands やプラスミドの遺伝子解析、あるいは *S. aureus* の全ゲノム塩基配列決定により、現在までに SEG, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU の存在が報告されている^{8, 13~15, 22, 24, 26~28, 38)}。SEs は極めて多様性に富んだ毒素群であることが明らかになりつつある。

5. 新型ブドウ球菌エンテロトキシンの命名規約

このように、従来から知られている SEA ~ SEE (classical SEs) に加えて 13 種類の SEs (new SEs) が報告され、現在 18 種類の SEs の存在が知られている。しかしながら、これらの new SEs のほとんどは、そのアミノ酸配列の classical SEs に対する類似性から命名されたものであり、生物活性に基づいたものではない。また、極めて短い期間に多数の SEs が報告されたため、その命名について混乱が生じていた。2001 年に Orwin ら²⁶⁾ は SEK を、Fitzgerald ら⁸⁾ は SEL を報告した。同時期に Jarraud ら¹³⁾ も SEK, SEL, SEM を報告したが、これらの SEK, SEL は Orwin および Fitzgerald らが報告した分子とは異なるものであったため、後に SEK を SEN に、SEL を SEO に名称変更している。今後、ゲノムバイオロジーの進展により、さらに多数のスーパー抗原性毒素の発見も考えられ、Genomics の時代にも通用する命名規約が必要とされ、

2004 年に International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigen (INCSS) によって新しく発見されたスーパー抗原性毒素の命名規約が提唱された¹⁶⁾。

SEs は代表的なスーパー抗原性毒素であり、TSS を引き起こし得ることも明らかにされているが、その名称は本来食中毒を引き起こす嘔吐活性にちなんで名付けられたものである。INCSS の命名規約も食中毒への関連 (嘔吐活性) を重視しており、SE と命名するためには、サルへの経口投与による嘔吐活性の証明を義務づけている。構造上 SEs と近縁と考えられるスーパー抗原でも、サルでの嘔吐実験で嘔吐活性陰性のもの、あるいはいまだサルでの嘔吐実験が行われていないものについては、“staphylococcal enterotoxin-like (SEI) ブドウ球菌エンテロトキシン様毒素”と命名する。型別に関しては、SEZ までは発見された順に SE の後にアルファベットを付けるが、このシステムでは 25 種類の型しか命名できないので、26 番目以降は SE + 数字で、SE26, SE27, SE28 ~ と命名する。このルールは SEI にも同列に適用され、それぞれの SEs のサルにおける嘔吐活性が証明された時点で“1”をはずし、SE とする。詳細については、文献 15 を参照していただきたいが、例を挙げれば、Orwin ら²⁷⁾ によって報告された SEQ は、pig tail monkey に対して 50 μ g/kg を経口投与しても嘔吐活性が認められなかったことから、INCSS の規約に従い SEIQ と再命名される必要がある。また、筆者らが報告した SER²⁴⁾ は、いまだサルの嘔吐実験により嘔吐活性が証明されていないことから、SEIR と再命名した²⁵⁾。SEIR の嘔吐実験を行い、その嘔吐活性が証明されれば、“1”がはずれて SEs の一員となり、SER と呼称されることになる。今後報告される新型 SEs は、すべてこの規約に従って命名されることとなるが、すでに報告された新型 SEs 群については、その生物活性に応じて再度命名を見直すことが必要とされている。

II. ブドウ球菌エンテロトキシンの多様性

図 1 に現在までに報告されている SEs の分子系統樹を、表 2 に SEs 間の塩基配列とアミノ酸配列の相同性を示す。SEs は大きく 3 つのクラスターを

形成し、それぞれSEAに近縁と考えられるグループ、SEBに近縁と考えられるグループ、SEIに近縁と考えられるグループに分けられる。従来、SEAとSEEは、ゲル内沈降反応により共通抗原が検出されることが知られていた。さらに、モノクローナル抗体を用いた解析では、SEA、SED、SEEに共通するエピトープが、またSEBとSECに共通するエピトープが存在することが報告されている⁵⁾。これらの抗原解析の結果は、系統樹で示されたSEsの類縁関係とよく一致する。

表3に17種類のSEsおよびSEIsの各種性状を示す。なお、本稿では、各毒素の名称については、SEIRを除いて便宜的にSEと表記しているが、INCSSの規約に従えば、新型SEの多くはSEIと呼称されるべきであると考えられる。表3に示すように、SELおよびSEQはサルに対する嘔吐活性を持たず、それぞれSEIL、SEIQと呼称されるべきである。また、SEK、SEM、SEN、SEOはスーパー抗原活性を有することは明らかにされているが、サルを用いた嘔吐活性の検討は行われておらず、これらの毒素も現在のところはSEIK、SEIM、SEIN、SEIOとすべきであると考えられる。さらにSEJおよびSEUについては、その塩基配列が明らかになっているのみであり、スーパー抗原活性の有無についてもいまだ明らかにされていない。SEJおよびSEUは、系統樹上ではそれぞれSEAグループとSEBグループに属し、明らかにSEsと近縁な毒素

と考えられるが、生物活性の解析によりSEあるいはSEIであるか否かを明らかにする必要がある。なお、SEPは筆者らの研究グループによりスーパー抗原活性を有することが確認されたが、サルの嘔吐実験を行っていないため、現段階ではSEIPと呼ぶことが妥当であると考えている(投稿中)。

図2にX線回析により決定されたSEAの三次構造を示す。現在までにブドウ球菌の産生するスーパー抗原性毒素ではSEA、SEB、SEC、SED、SEH、TSST-1の三次構造が決定されている。表2に示すように、SEAとSEBはアミノ酸配列の相同性は33%程度であるが、その三次構造は極めて類似したA-Bドメイン構造を取ることが明らかにされている。スーパー抗原としてのMHC class IIおよびTCR V β との結合様式は毒素ごとに若干の違いが認められている²⁰⁾。また、SEHはそのスーパー抗原活性の発現様式において他の毒素群と際だった違いがある。SEHはMHC class II分子と結合する点では他のスーパー抗原と同様であるが、TCR V β ではなく、TCRV α を特異的に認識、結合することによりT細胞を活性化する²⁹⁾。

III. SEs 遺伝子の存在様式

いくつかのSEs 遺伝子が mobile genetic elements (可動性遺伝因子) にコードされることが知られており、これらの因子によりSEs 遺伝子は株間で移

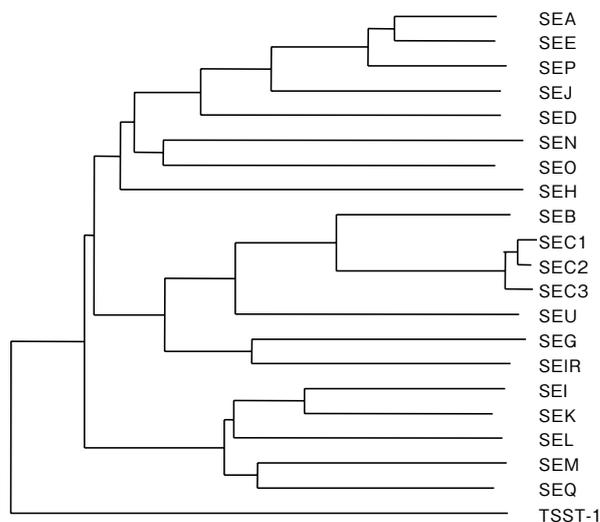


図1 ブドウ球菌エンテロトキシンの分子系統樹
エンテロトキシン前駆体のアミノ酸配列を用い、近隣結合法により系統樹を作成した。

表2 ブドウ球菌エンテロトキシンの核酸およびアミノ酸配列相同性

toxin	%相同性																	
	SEA	SEB	SEC1	SED	SEE	SEG	SEH	SEI	SEJ	SEK	SEL	SEM	SEN	SEO	SEP	SEQ	SEIR	SEU
SEA		54.3	50.9	61.8	84.2	51.3	54.8	50.9	71.2	53.4	50.5	50.7	56.4	56.0	84.8	50.8	50.6	52.0
SEB	33.6		74.8	53.0	50.9	58.8	54.3	46.6	52.3	50.5	50.9	48.5	51.5	54.7	52.9	49.6	59.0	65.5
SEC1	28.2	67.9		52.0	50.4	57.0	51.7	51.9	53.2	51.1	52.6	48.3	49.8	52.8	51.2	51.0	58.1	65.1
SED	50.4	36.0	30.9		62.1	50.3	51.7	51.4	62.9	53.1	53.5	51.9	56.9	57.2	62.8	51.3	51.4	53.7
SEE	83.3	32.1	28.2	52.7		50.2	54.5	51.1	71.1	49.8	51.5	50.8	56.3	56.5	82.6	51.5	50.6	51.8
SEG	25.8	43.9	40.5	27.3	27.0		52.2	51.0	52.5	50.6	51.6	49.6	49.2	51.8	50.4	50.7	65.9	56.0
SEH	36.7	31.3	26.1	37.0	37.6	28.5		51.6	53.7	49.9	51.9	49.2	56.6	54.8	54.1	50.6	51.7	52.6
SEI	39.2	32.9	21.8	35.2	36.9	24.0	26.3		54.0	72.0	65.3	65.0	53.5	53.3	52.5	66.9	50.8	49.7
SEJ	64.6	31.9	28.3	51.2	63.4	28.6	36.3	39.2		52.2	52.3	52.4	56.6	56.3	69.1	52.1	53.8	52.8
SEK	32.4	26.4	23.0	30.1	32.7	24.1	24.8	67.8	32.3		66.5	64.7	52.5	52.2	51.8	65.8	50.8	50.5
SEL	36.4	23.6	30.9	40.3	38.1	27.5	29.2	56.5	32.2	57.0		61.4	50.6	54.0	50.5	63.7	50.1	49.5
SEM	32.6	32.4	25.1	40.4	36.2	28.4	28.5	57.2	33.2	56.3	54.9		51.7	52.2	53.9	70.0	51.2	50.5
SEN	39.1	32.6	26.2	38.5	39.4	30.4	37.6	29.9	37.5	31.3	29.8	31.6		58.2	56.7	49.5	50.4	52.9
SEO	36.9	35.6	32.7	38.1	37.5	30.0	34.9	32.0	39.7	34.4	37.9	31.5	42.3		57.5	50.7	53.5	53.9
SEP	77.4	33.8	27.3	49.6	78.6	28.2	35.0	36.9	60.3	32.4	35.8	31.0	40.8	37.6		52.2	49.2	52.7
SEQ	32.8	32.1	30.4	36.1	33.3	29.6	28.2	59.7	36.7	55.4	55.3	61.1	30.9	34.7	39.8		51.2	51.2
SEIR	30.0	43.0	40.9	28.8	28.3	56.4	31.3	25.9	29.7	28.0	29.8	28.4	31.1	34.0	28.5	29.2		58.4
SEU	29.9	51.9	52.9	29.1	28.0	38.8	29.3	23.3	30.7	23.9	27.5	24.4	27.9	32.3	30.5	32.8	41.1	

SE 遺伝子 ORF および SE 前駆体の全配列を用いて比較

上段：塩基配列

下段：アミノ酸配列

表3 ブドウ球菌エンテロトキシンおよびブドウ球菌エンテロトキシン様毒素の性状

	SEA	SEB	SEC1	SEC2	SEC3	SED	SEE	SEG	SEH	SEI
分子量 (kDa)	27.1	28.4	27.5	27.6	27.6	26.9	26.4	27.0	25.1	24.9
成熟型アミノ酸残基数	233	239	239	239	239	233	230	233	217	218
ED50($\mu\text{g}/\text{サル}$, 経口投与)	5	5	5	5	5	5	10 ~ 20	ND**	ND	ND
最小嘔吐量 (サル)								160	30	300
経口投与 ($\mu\text{g}/\text{サル}$)	1	0.9	1	ND	<10	ND	ND	~ 320		~ 600
食中毒への関与	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND
スーパー抗原活性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SEJ	SEK	SEL	SEM	SEN	SEO	SEP	SEQ	SEIR	SEU
分子量 (kDa)	28.6	25.3*	24.7*	24.8*	26.1*	26.8*	26.7	25.2	27.0	27.2
成熟型アミノ酸残基数	245	219*	216*	217*	227*	232*	233	216*	233	232*
ED50($\mu\text{g}/\text{サル}$, 経口投与)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
最小嘔吐量 (サル)			not emetic	ND	ND	ND	ND	not emetic	ND	ND
経口投与 ($\mu\text{g}/\text{サル}$)	ND	ND		ND	ND	ND	ND		ND	ND
食中毒への関与	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
スーパー抗原活性	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	ND

* 推定値

** not determined

動する可能性があることが示唆されていた。2001年, Kuroda ら¹⁴⁾ により, MRSA N315 株と VRSA Mu50 株の全ゲノム配列が報告され, *S. aureus* ゲノムの全貌が明らかになった。2005年1月現在では7株の全塩基配列が DNA データベースに登録されている。これらの全ゲノム解析により, また, patho-

genicity islands やプロファージ (genomic islands と総称される) およびプラスミドの塩基配列解析により, SEs 遺伝子がどのような組み合わせで mobile genetic elements にコードされているかが明らかになりつつある^{2, 8, 13, 14, 17, 24, 37, 38)}。図3に, これまでに明らかにされている SEs 遺伝子をコードする

各種の mobile genetic elements の模式図を示す。SEs 遺伝子をコードする mobile genetic elements は、ここに挙げた種類以外にも存在する可能性がある。mobile genetic elements による病原因子遺伝子の水平移動は、*S. aureus* の病原体としての進化に大きく関わっていると考えられるため、さらなる解析が必要である。

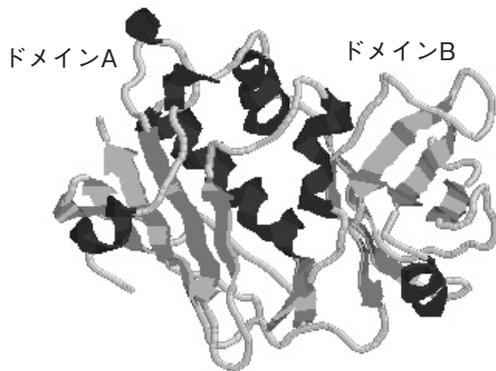


図2 SEAの三次構造

X線回折により決定されたSEAの三次構造を示す。SEsおよびTSST-1は、いずれも類似するABドメイン構造を有する。ドメインAはアミノ酸配列のN末端部の一部とC末端側ほぼ全域からなり、ドメインBはN末端側ほぼ全域より構成されている。

IV. SEsの嘔吐活性

SEsの嘔吐活性は、SEs研究の端緒を開いた生物活性であるにもかかわらず、嘔吐発現のメカニズムとその分子基盤については、現在のところほとんど明らかにされていない。嘔吐活性とスーパー抗原活性の関連については、人為的に変異を導入したSEを用いた解析が行われており、スーパー抗原活性を失活させた変異体でもサルに対する嘔吐活性を示すことから、嘔吐活性はスーパー抗原活性による二次的なものではないと考えられている¹⁰⁾。1960年代、サルを用いた嘔吐実験により、SEsの標的は腹腔臓器であることが示されている。また、腹腔交感神経および迷走神経を切断し、腹腔臓器の求心性刺激伝達を遮断したサルにSEsを投与しても嘔吐の発現は見られないことから、標的臓器に到達した毒素は何らかの機構により上行性の交感神経および迷走神経を刺激することにより嘔吐を引き起こすと考えられる³²⁾。しかしながら、SEsを静脈内あるいは腹腔内に投与しても嘔吐を起こすことも明らかにされており、腸管に到達したSEsが、どのようにして嘔吐反射を引き起こすのかはいまだ明らかでない。

SEsによる嘔吐機構の解明は、これから明らかに

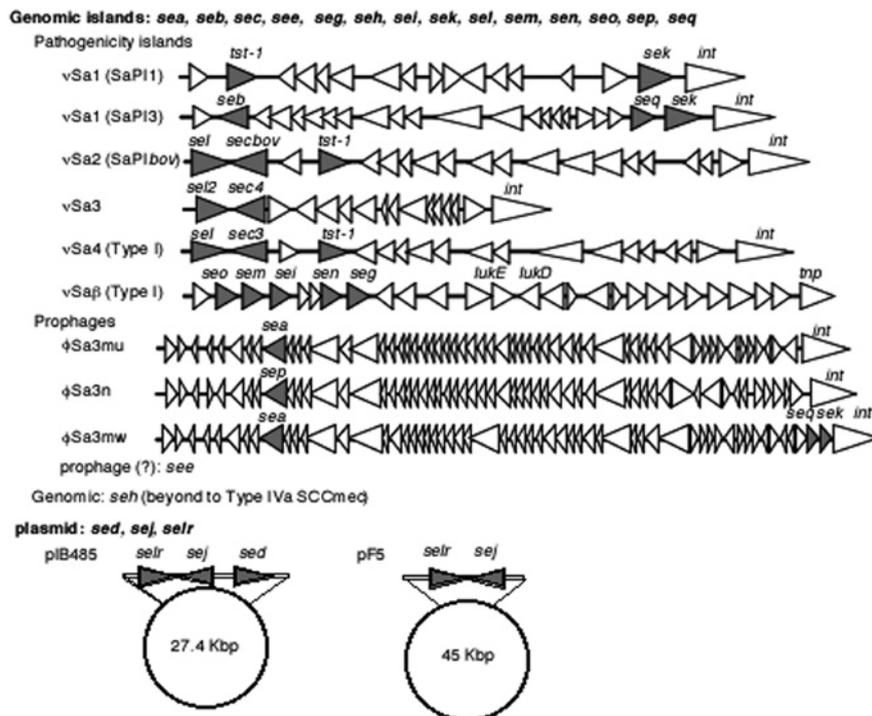


図3 ブドウ球菌エンテロトキシン遺伝子の存在様式

していかなければならない、生物学的にも興味深い課題である。嘔吐活性の解析にはサルが最も適しており、現在でも嘔吐活性の証明および解析のスタンダードとされている。しかしながら、サルを実験動物として用いることは厳しく制限されており、また相当の費用と労力を有することから、サルを用いた嘔吐実験の実施は困難になってきている。近年、嘔吐活性に利用できる実験動物の探索も行われており、WrightらはSEBの投与によりフェレットが嘔吐することを報告した³⁶⁾。また、筆者らの研究グループも、トガリネズミ (*Suncus murinus*) にSEA～SEIを腹腔内投与することにより嘔吐を引き起こすことが可能であることを明らかにしている^{11,12)}。サルを用いた研究とともに、SEs投与によるフェレットあるいはトガリネズミの嘔吐がサルにおける嘔吐と同様の分子基盤を有しているか否かを解析することも、SEsの嘔吐活性解明の一助になると考えられる。

V. 新型 SEs と食の安全

わが国においては、過去10年間でブドウ球菌食中毒の事件数は減少傾向にある。しかしながら、2001年6月～7月にかけて発生した加工乳を原因とする大規模な食中毒事件（有症者数は14,000人以上とされる）は、本食中毒の社会的インパクトの大きさを改めて印象づけた。ブドウ球菌食中毒のコントロールは食の安全・安心を守るうえで極めて重要な課題である。近年多数の新型SEs（あるいはSEIs）が報告されたことにより、これらのSEsの食中毒への関与を評価する必要が出てきた。

PCR法を用いることにより、簡便にSE遺伝子を検出することが可能であり、多くの研究グループが黄色ブドウ球菌のSE遺伝子保有状況を報告している。これらの報告によると、食中毒事例株を含む多くの黄色ブドウ球菌菌株が新型SEを含む複数のSE遺伝子を保有しており、さらに新型SEの保有頻度も低くはない^{3,4,6)}。しかしながら、多くの新型SEsの嘔吐活性は十分に調べられておらず、これらの新型SEsの食中毒における危害評価はいまだ十分になされていない。

上記のように、サルを用いた嘔吐実験は困難であるが、ブドウ球菌食中毒のリスクアナリシスを進

め、食の安全を確立するためにも、新型SEsおよびSEIsの嘔吐活性の解析は急務である。新型SEsの食中毒原性を評価するためには、サルを用いた嘔吐実験で嘔吐活性を有するSEsを明らかにし、さらに新型SEsの嘔吐活性がclassical SEsの嘔吐活性と同程度か否かを定量的に比較することが必要である。これらの解析を行い、classical SEsと同等に食中毒に関与し得る新型SEsを同定する必要がある。また、新型SEsの食中毒への関与を評価するためには、その嘔吐活性の評価と並んで、SEs遺伝子保有株における毒素産生性を明らかにすることも重要であり、そのためには信頼できる新型SEs検出・定量法を確立することが必要である。classical SEsの検出・定量法には、ゲル内沈降反応、ELISAおよびreverse passive latex agglutination (RPLA)等の免疫学的手法が用いられている。PCR法による分離菌株からのSEs遺伝子の検出も、classicalおよびnew SEsに対して汎用されているが、PCR法による遺伝子の検出は、その菌株がSEs遺伝子を保有していることを証明するものであり、そのSEs遺伝子産物が発現していることを証明するものではないことを注意する必要がある。また、筆者らは、reverse transcriptase (RT)-PCRを用いてSEGおよびSEI mRNAが転写されていることを確認したが、実際に培地中に産生されているSEGおよびSEIは極めて微量あるいは検出限界以下であることを見いだしている²³⁾。SEsの産生量評価には、免疫学的手法によるSEs蛋白の定量が必須である。

一般に、ある毒素がある疾病を引き起こすためには、1) その毒素が必要な生物活性を有すること、2) その毒素が発症するための必要量産生されること、の2つを満たす必要がある。新型SEsの嘔吐活性と産生量を評価することによりこの条件を満たすことができ、それぞれの新型SEsの食中毒への関与を評価することができる。しかしながら、多くの*S. aureus*菌株は複数のSEs遺伝子を保有することが報告されていることから、ブドウ球菌食中毒発症毒素量は、これら複数のSEsの存在を考慮する必要がある。例えば、SEA、SEHの2つの遺伝子を保有するブドウ球菌により食中毒が発生した場合、従来の解析であれば、この事例はSEAによる食中毒と判断されることになる。さらに、発症毒素量を明らかにするために原因食中のSEAを定量すれば、

実際には SEA 量プラス SEH 量によって食中毒が発生したにもかかわらず、定量可能である SEA 量をもって発症毒素量と判断することになる。実際、Evenson らは米国で発生したチョコレートミルクによる食中毒事例を調査し、SEA の発症毒素量は 144 ng/ヒトと報告した⁷⁾。しかしながら、この事例の原因になった菌株の正確な SE genotype は明らかでなく、他の SE 遺伝子を保有していた可能性も否定はできない。もちろん、個々の新型 SEs の嘔吐活性と産生性を評価したうえでのこととなるが、複数の SEs 遺伝子を保有するブドウ球菌による食中毒を考える場合、起因株が産生する、食中毒原性を有する SEs の量の総和を発症毒素量と考える必要があるかもしれない。このように、新型 SEs の発見により従来のブドウ球菌食中毒像も見直す必要が出てくると考えられる。今後、ブドウ球菌食中毒リスクアナリシスの基盤となる、新型 SEs に関する種々のデータを蓄積することが必要である。

VI. SEs と近縁な毒素群

黄色ブドウ球菌以外の *Staphylococci* も、スーパー抗原関連毒素を保有することが報告されている。*S. intermedius* の一部の株は SEC の variant を産生することが報告されている。INCSS の勧告によれば、この毒素は“S(int)EC”と呼ばれるべきである。また、Futagawa-Saito らは、*S. intermedius* が SEC と 60% 程度の相同性を示すエンテロトキシン様毒素の遺伝子を保有することを明らかにし、se-int と命名した。この遺伝子産物がスーパー抗原活性を有するか、あるいは嘔吐活性を有するかははまだ明らかにされていない⁹⁾。

さらに、レンサ球菌属もスーパー抗原性毒素を産生することが明らかになっており、*Streptococcus pyogenes* は streptococcal pyrogenic exotoxins (SPEs), streptococcal mitogenic exotoxin Z (SMEZ), Streptococcal superantigen (SSA) といった毒素を産生する²⁰⁾。それぞれの毒素にも複数の型が存在し、ブドウ球菌の場合と同様に、レンサ球菌も多様なスーパー抗原性毒素を保有している。これらスーパー抗原性毒素は、レンサ球菌性 TSS, 猩紅熱, 壊死性筋膜炎等の発症に関与していると考えられている。また、最近、*Streptococcus dysgalactiae* も新規

のスーパー抗原, *Streptococcus dysgalactiae*-derived mitogen (SDM) を産生することが報告されている²¹⁾。これらのブドウ球菌およびレンサ球菌が保有するスーパー抗原性毒素は進化学的に類縁関係にあり、その三次構造も極めてよく類似していることから、これらスーパー抗原性毒素は極めて多数の毒素群からなるスーパーファミリーを形成していると考えられている。

一方、Williams らは、2000 年に SEs および TSST-1 と共通のモチーフ配列を有する蛋白の遺伝子クラスターを発見し、これらの遺伝子を“Staphylococcal exotoxin-like (SETs)”と命名した³⁵⁾。SETs 遺伝子にも多様性がみられ、類似した paralog がタンデムに並んで、特定の genomic island にコードされている。SETs の三次構造は SEs と同様に A-B ドメイン構造を有し、極めて類似している。当初、SET1 はスーパー抗原活性を有するとされたが、その後の解析により多くの SETs はスーパー抗原活性を持たないと考えられている。INCSS は、“SE”という名称は staphylococcal enterotoxin に用いるべきであり、SETs という名称は混乱を招くとして、現在は staphylococcal superantigen-like (SSLs) と呼称することを勧告している。また、Al-Shangiti らは、SSL5 と SSL9 は単球および樹状細胞に特異的に結合することにより、スーパー抗原とは違った様式で免疫系を攪乱する可能性を示している¹⁾。

おわりに

ブドウ球菌エンテロトキシンは極めて多様な毒素群であり、さらに種を超えて *Streptococci* とも共通するスーパー抗原性毒素スーパーファミリーを構成している。なぜ、黄色ブドウ球菌はこのように多様なスーパー抗原性毒素をそのゲノム上あるいはプラスミド上に維持する必要があるのだろうか。また、SEs の嘔吐活性はブドウ球菌の生存に対して、何らかの利益はあるのだろうか。SEs, TSST-1, SSL は、同一の祖先遺伝子から進化してきたと考えられるが、嘔吐活性、スーパー抗原活性、あるいは単球および樹状細胞上の未知の分子への結合能といった、種々の生物活性を共有あるいは分担するようになってきている。これらの SEs および SEs 関連毒素群のブドウ球菌における本来の役割の解明は、生物学

的にも極めて興味深い問題である。

なお、私たちの研究グループでは、SEA～SEIR および TSST-1 の multiplex PCR による網羅的検出法と、SEJ および SEU 以外の SE 蛋白の免疫学的検出法を確立しています。*S. aureus* の SE genotype の決定および毒素産生性評価が可能ですので、興味がありましたら、岩手大学農学部獣医学科応用獣医学講座食品安全学研究室（phone：019-621-6221, e-mail：omo@iwate-u.ac.jp）までお問い合わせください。

文 献

- 1) Al-Shangiti A.M., Naylor C.E., Nair S.P., Briggs D.C., Henderson B., and Chain B.M. : Structural relationships and cellular tropism of staphylococcal superantigen-like proteins. *Infect Immun.* **72** : 4261-4270, 2004.
- 2) Baba T., Takeuchi F., Kuroda M., Yuzawa H., Aoki K., Oguchi A., Nagai Y., Iwama N., Asano K., Naimi T., Kuroda H., Cui L., Yamamoto K., and Hiramatsu K. : Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* **359** : 1819-1827, 2002.
- 3) Becker K., Roth R., and Peters G. : Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin1 gene. *J Clin Microbiol.* **36** : 2548-2553, 1998.
- 4) Becker K., Friedrich A.W., Peters G., and von Eiff C. : Systematic survey on the prevalence of genes coding for staphylococcal enterotoxins SEIM, SEIO, and SEIN. *Mol Nutr Food Res.* **48** : 488-495, 2004.
- 5) Bergdoll, M. S. : *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne bacterial pathogens (Doyle, M. P. ed.), pp. 463-523. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1989.
- 6) Chen T.-R., Chiou C.-S., and Tsen H.-Y. : Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. *Int J Food Microbiol.* **92** : 189-197, 2004.
- 7) Evenson M.L., Hinds M.W., Bernstein R.S., and Bergdoll M.S. : Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int J Food Microbiol.* **7** : 311-316, 1988.
- 8) Fitzgerald J.R., Monday S.R., Foster T.J., Bohach G.A., Hartigan P.J., Meaney W.J., and Smyth C. J. : Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J Bacteriol.* **183** : 63-70, 2001.
- 9) Futagawa-Saito K., Suzuki M., Ohsawa M., Ohshima S., Sakurai N., Ba-Thein W., and Fukuyasu T. : Identification and prevalence of an enterotoxin-related gene, *se-int*, in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. *J Appl Microbiol.* **96** : 1361-1366, 2004.
- 10) Harris T.O., Grossman D., Kappler J.W., Marrack P., Rich R.R., and Betley M.J. : Lack of complete correlation between emetic and T-cell-stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins. *Infect Immun.* **61** : 3175-3183, 1993.
- 11) Hu D.-L., Omoe K., Shimura, H., Ono, K., Sugii, S., and Shinagawa K. : Emesis in the shrew mouse (*Suncus murinus*) induced by peroral and intraperitoneal administration of staphylococcal enterotoxin A. *J Food Prot.* **62** : 1350-1353, 1999.
- 12) Hu D.-L., Omoe K., Shimoda Y., Nakane A., and Shinagawa K. : Induction of emetic response to staphylococcal enterotoxins in the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Infect Immun.* **71** : 567-570, 2003.
- 13) Jarraud S., Peyrat M.A., Lim A., Tristan A., Bes M., Mougel C., Etienne J., Vandenesch F., Bonneville M., and Lina G. : *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* **166** : 669-677, 2001.
- 14) Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I., Baba T., Yuzawa H., Kobayashi I., Cui L., Oguchi A., Aoki K., Nagai Y., Lian J., Ito T., Kanamori M., Matsumaru H., Maruyama A., Murakami H., Hosoyama A., Mizutani-Ui Y., Takahashi N. K., Sawano T., Inoue R., Kaito C., Sekimizu K., Hirakawa H., Kuhara S., Goto S., Yabuzaki J., Kanehisa, M., Yamashita A., Oshima K., Furuya K., Yoshino C., Shiba T., Hattori M., Ogasawara N., Hayashi H., and Hiramatsu K. : Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357** : 1225-1240, 2001.
- 15) Letertre C., Perelle S., Dilasser F., and Fach P. : Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol.* **95** : 38-43, 2003.
- 16) Lina G., Bohach G.A., Nair S.P., Hiramatsu K., Jouvin-Marche E., and Mariuzza R. : Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J Infect Dis.* **189** : 2334-2336, 2004.
- 17) Lindsay J.A., Ruzin A., Ross H. F., Kurepina N., and Novick R.P. : The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* **29** : 527-543, 1998.
- 18) Løvseth A., Loncarevic S., and Berdal K.G. : Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. *J Clin Microbiol.* **42** : 3869-3872, 2004.
- 19) Marrack P. and Kappler J. : The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* **248** : 705-711, 1990.
- 20) McCormick J.K., Yarwood J.M., and Schlievert P.M. : Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol.* **55** : 77-104, 2001.
- 21) Miyoshi-Akiyama T., Zhao J., Kato H., Kikuchi K., Totsu

- ka K., Kataoka Y., Katsumi M., and Uchiyama T. : *Streptococcus dysgalactiae*-derived mitogen (SDM), a novel bacterial superantigen: Characterization of its biological activity and predicted tertiary structure. *Mol Microbiol.* **47** : 1589-1599, 2003.
- 22) Munson S.H., Tremaine M.T., Beteley M.J., and Welch R.A. : Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin type G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* **66** : 3337-3348, 1998.
- 23) Omoe K., Ishikawa M., Shimoda Y., Hu D.-L., Ueda S., and Shinagawa K. : Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, and *sei* genes. *J Clin Microbiol.* **40** : 857-862, 2002.
- 24) Omoe K., Hu D.-L., Takahashi-Omoe H., Nakane A., and Shinagawa K. : Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect Immun.* **71** : 6088-6094, 2003.
- 25) Omoe K., Imanishi K., Hu D.-L., Kato H., Takahashi-Omoe H., Nakane A., Uchiyama T., and Shinagawa K. : Biological properties of staphylococcal enterotoxin-like toxin type R. *Infect Immun.* **72** : 3664-3667, 2004.
- 26) Orwin P.M., Leung D.Y.M., Donahue H.L., Novick R.P., and Schlievert P.M. : Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect Immun.* **69** : 360-366, 2001.
- 27) Orwin P.M., Leung D.Y., Tripp T.J., Bohach G.A., Earhart C.A., Ohlendorf D.H., and Schlievert P.M. : Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. *Biochemistry* **41** : 14033-14040, 2002.
- 28) Orwin P.M., Fitzgerald J.R., Leung D.Y., Gutierrez J.A., Bohach G.A., and Schlievert P.M. : Characterization of staphylococcus aureus enterotoxin L. *Infect Immun.* **71** : 2916-2919, 2003.
- 29) Pettersson K., Pettersson H., Skartved N.J.m Walse B.m and Forsberg G. : Staphylococcal enterotoxin H induces V α -specific expansion of T cells. *J Immunol.* **170** : 4148-4154, 2003.
- 30) Ren K., Bannan J.D., Pancholi V., Cheung A.L., Robbins J.C., Fischetti V.A., and Zabriskie J.B. : Characterization and biological properties of a new staphylococcal enterotoxin. *J. Exp. Med.* **180** : 1675-1683, 1994.
- 31) Su Y.-C., and Wong A.C.L. : Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Appl Environ Microbiol.* **61** : 1438-1443, 1995.
- 32) Sugiyama H. and Hayama T. : Abdominal viscera as site of emetic action for staphylococcal enterotoxin in the monkey. *J Infect Dis.* **115** : 330-336, 1965.
- 33) Uchiyama T., Kamagata Y., Yan X.-J., Kohno M., Yoshikawa M., Fujikawa H., Igarashi H., Okubo M., Awano F., Saito-Taki T., and Nakano M. : Study of the biological activities of toxic shock syndrome toxin-1: II. Induction of the proliferative response and the interleukin 2 production by T cells from human peripheral blood mononuclear cells stimulated with the toxin. *Clin Exp Immunol.* **68** : 638-647, 1987.
- 34) Uchiyama T., Yan X.-J., Imanishi K., and Yagi J. : Bacterial superantigens-Mechanism of T cell activation by superantigens and their role in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbiol Immunol.* **38** : 245-256, 1994.
- 35) Williams R.J., Ward J.M., Henderson B., Poole S., O'hara B.P., Wilson M., and Nair S.P. : Identification of a novel gene cluster encoding staphylococcal exotoxin-like proteins: Characterization of the prototypic gene and its protein product, SET1. *Infect Immun.* **68** : 4407-4415, 2000.
- 36) Wright A., Andrews P.L.R., and Titball R.W. : Induction of emetic, pyrexia, and behavioral effects of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in the ferret. *Infect Immun.* **68** : 2386-2389, 2000.
- 37) Yarwood J.M., McCormick J.K., Paustian M.L., Orwin P.M., Kapur V., and Schlievert P.M. : Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J Biol Chem.* **277** : 13138-13147, 2002.
- 38) Zhang S., Iandolo J.J., and Stewart G.C. : The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). *FEMS Microbiol Lett* **168** : 227-233, 1998.