

Fig. 1. Anti-SLT-I (O, Δ) or -SLT-II (●, ▲) antibody production in mice immunized with the mixture of SLT-I-liposome and SLT-II-liposome (O, ●) or ovalbumin-coupled liposome (Δ, ▲). Four and 6 weeks after primary immunization, the mice received a booster injection with the same dose of SLT-liposomes as the primary immunization. **a** IgG antibody production. **b** IgE antibody production. Data represent mean ELISA titer and SE of 15 mice per group.

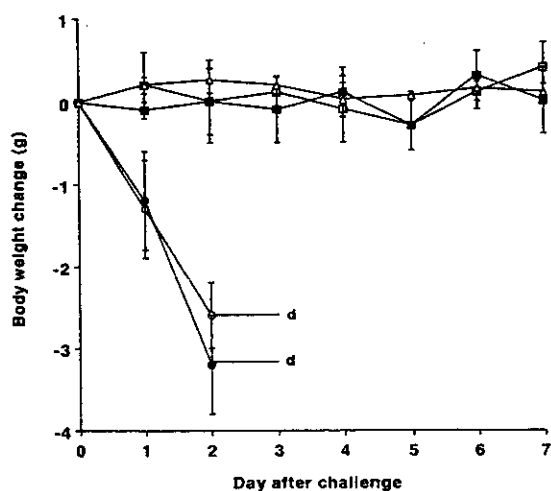


Fig. 2. Protection against intravenous challenge with SLT in SLT-liposome-immune mice. Changes of body weights in mice after intravenous injection with either SLT-I or SLT-II. Eight weeks after the primary immunization, 10 LD_{50} of SLT-I (O, □) or SLT-II (●, ■) was injected i.v. into SLT-liposome-immune mice (□, ■) or age-matched control mice (○, ●) and the body weight of each mouse was measured thereafter. Control mice received no immunization. Changes of body weights of 5 age-matched noninfected mice (Δ) are also shown. Data represent mean body weight change and SE of 5 mice per group. d = Died on the day after.

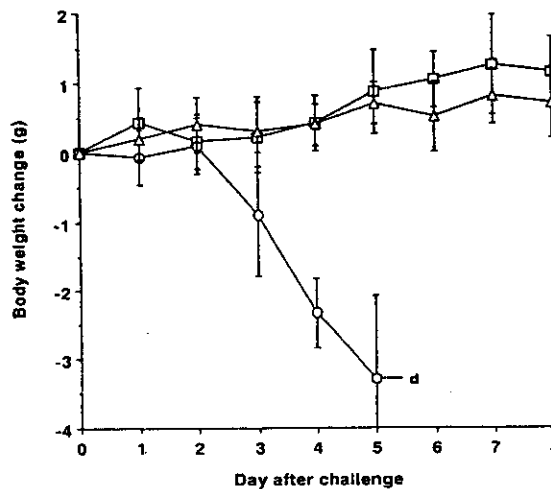


Fig. 3. Protection against intragastric challenge with *E. coli* O157:H7 in SLT-liposome-immune mice. Changes of body weights in mice after oral infection with *E. coli* O157:H7. Nine weeks after primary immunization, 1×10^9 CFU of *E. coli* O157:H7 was inoculated intragastrically into SLT-liposome-immune mice (□) or age-matched control mice (○) and the body weight of each mouse was measured thereafter. Control mice received no immunization. Changes of body weights of 5 age-matched noninfected mice (Δ) are also shown. Data represent mean body weight change and SE of 5 mice per group. d = Died on the day after.

References

- 1 Karmali MA: Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:15-38.
- 2 Smith HW, Green P, Parsell Z: Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: Transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chicken and pigs. *J Gen Microbiol* 1983;129:3121-3137.
- 3 Head SC, Petric M, Richardson SE, Roscoe ME, Karmali MA: Purification and characterization of verocytotoxin 2. *FEMS Microbiol Lett* 1988;51:211-216.
- 4 Naito S, Horino A, Komiya T, Fukuda T, Takahashi M, Ami Y, Suzaki Y, Satoh S, Gondaira F, Sugiyama J, Nakano Y, Mori M, Awai K, Nishinohara S, Komuro K, Uchida T: Protection against verocytotoxin in mice induced by liposome-coupled verocytotoxin. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;114:293-297.
- 5 Ito H, Yutsudo T, Hirayama T, Takeda Y: Isolation and some properties of A and B subunits of Vero toxin 2 and in vitro formation of hybrid toxins between subunits of Vero toxin 1 and Vero toxin 2 from *Escherichia coli* O157:H7. *Microb Pathog* 1988;5:189-195.
- 6 Wadolkowski EA, Burris JA, O'Brien AD: Mouse model for colonization and disease caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 1990;58:2438-2445.
- 7 Wadolkowski EA, Sung LM, Burris JA, Samuel JE, O'Brien AD: Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin type II. *Infect Immun* 1990;58:3959-3965.
- 8 Chart H, Law D, Rowe B, Acheson DWK: Patients with haemolytic uraemic syndrome caused by *Escherichia coli* O157: Absence of antibodies to Vero cytotoxin 1 (VT1) or VT2. *J Clin Pathol* 1993;46:1053-1054.
- 9 Boyd B, Richardson S, Garipey J: Serological responses to the B subunit of Shiga-like toxin 1 and its peptide fragments indicate that the B subunit is a vaccine candidate to counter the action of the toxin. *Infect Immun* 1997;59:750-757.
- 10 Naito S, Horino A, Nakayama M, Nakano Y, Nagai T, Mizuguchi J, Komuro K, Uchida T: Ovalbumin-liposome conjugate induces IgG but not IgE antibody production. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;109:223-228.

分担研究報告書

「O157 に溶原化している *stx*-converting phage の多様性に関する研究」

分担研究者：伊豫田淳、渡邊治雄、国立感染症研究所・細菌部

研究要旨

腸管出血性大腸菌 O157 が産生する志賀様毒素遺伝子 (*stx*) を運ぶファージの構造的、機能的多様性を解析する目的で、PFGE 型が判明しているいくつかの O157 株から *stx* を運ぶファージを単離・精製し、その DNA 構造を RFLP 法で解析した。その結果、PFGE タイプ I の O157 株から単離された *stx2* ファージ間では極めて相同性が高いことが判明した一方、PFGE タイプ II の O157 株からは多種多様な構造を持つ *stx2* ファージが単離されることが判明した。アメリカで 1982 年に単離された O157 株、EDL933 株から精製した *stx2* ファージ DNA の構造を同様にして解析したところ、上記 PFGE タイプ I の O157 株から単離されたファージと極めて相同性の高い構造を持つものであることが判明した。両者の PFGE 型は異なり、その由来も地理的、時間的に大きく異なるが、2 つの菌株は由来が共通のファージに感染している可能性が示唆された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 が産生する志賀様毒素の構造遺伝子 *stx* は、溶原化されたファージ上にコードされている。我々の研究グループでは、これまでに PFGE 法を用いた EHEC O157 の DNA 型別から、種々の異なる DNA 型を持つ株が日本各地から単離されている実態を明らかにしてきた。しかし、個々の菌株が持つ *stx* ファージについて、その構造および水平伝達機構については不明な点が多く、どれくらいの構造的、機能的に異なるファージが *stx* 遺伝子の伝搬に関与しているか、またそれらのファージが *Stx* 産生の制御にどのような役割を果たしているかについて得られている知見は少ない。そこで我々は、*stx* ファージの多様性とその機能的な相関を調べる目的で、日本国内で 1996 年に単離され、すでに PFGE による型別が行われたいくつかの株から *stx* ファージを誘発し、そ

の DNA 構造を解析することにした。

B. 研究方法

①材料

1996 年に日本各地で単離され、すでに PFGE による型別がなされている EHEC O157 (20 株) と、1982 年にアメリカで単離された (EDL933 株)、またはその後アメリカで単離された O157 株 (6 株) から、UV またはマイトマイシン C による誘導でファージ粒子を単離・精製し、PCR による *stx* 遺伝子の確認後、定法に従ってファージ DNA の精製を行った。本研究に用いた EHEC O157 株と単離したファージ DNA のリストを表 1 に示す。

②ファージ DNA の RFLP 解析

精製したファージ DNA を *stx1* ファージは制限酵素 *EcoRI* で、*stx2* ファージは *SmaI* で切断し、アガロースゲル電気泳動で切断パターンの比較を行った。得られた切断パ

ターンの相互比較を行うために、Dice coefficient (Sd) : $Sd = [2A / (2A + B + C)] \times 100$ (A: サイズが同一のバンド数、B, C: 一方に見られるが他方には見られないサイズのバンド数) を算出し、ファージ DNA 間の相同性を便宜上数値で算出した。

③ファージ DNA および染色体 DNA のサザンブロットング解析

精製したファージ DNA およびファージの宿主 DNA を *EcoRI* または *SmaI* で切断し、アガロースゲルで電気泳動した後、*stx1* または *stx2* 遺伝子に特異的なプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。

C. 研究結果

① *stx2* ファージ DNA の RFLP 解析

合計 37 の *stx2* ファージを単離精製し、RFLP による解析を行った。その結果、種々の *stx* ファージが O157 に溶原化している実態が明らかとなった。すなわち、各 PFGE 型 (タイプ I-V) から単離されたファージ DNA は、PFGE タイプ II 株由来のファージを除いて、それぞれ PFGE 型に対応して特徴的な DNA 構造を持つことが判明した (図 1, 2)。

PFGE タイプ I に型別された菌株から単離されたファージは、PFGE 型に若干のバリエーション (表 1 において、各 PFGE 型 I-IV の後ろに小文字のアルファベットで示してある) がある菌株から単離されたファージ間においても、高い相同性を示すことが判明した。一方、PFGE タイプ II 株から単離されたファージ DNA は、同一の PFGE 型を持つ別々の株から単離されたファージ間だけでなく、全く同じ菌株から同じ *stx* 遺伝子を運ぶファージとして単離された場合においても、多様性を示すことが判明した (図 2, 3)。

② EDL933 株由来の *stx2* ファージ DNA の解析

アメリカにおいて 1982 年に単離された O157 株、EDL933 から *stx2* ファージ DNA

を精製し、同様にして構造を比較したところ、日本の株から単離されたファージ DNA のうち、PFGE タイプ I 株から単離されたファージ DNA とその構造が極めて類似していることが明らかとなった。一方、それぞれの親株の PFGE パターンは異なっていた (図 2, 4)。

③ *stx1* ファージ DNA の解析

stx1 を運ぶファージは *stx2* を運ぶファージに比べて少数のファージしか単離出来なかった (合計 14)。特に、*stx1* ファージが単離出来たのは PFGE タイプ II の O157 株のみであった (図 1, 2, 3)。しかし、全く同じ株から単離される *stx1* ファージ DNA 間で、相同性が極めて低いという現象は、同じ PFGE タイプ II から単離された *stx2* ファージの場合と同じであった。

④ファージ DNA および親株染色体 DNA のサザンブロットング解析

単離した *stx2* ファージおよびそれらの親株染色体 DNA を方法③の通り、サザンブロットングで解析したところ、PFGE タイプ II 以外の株由来のファージでは、ハイブリダイズしたバンドのサイズが、親株染色体 DNA の場合と同じであった。一方、PFGE タイプ II 由来の場合には、親株染色体 DNA でハイブリダイズしたバンドが、ファージ DNA の場合と比較して大きくなっている場合のあることが判明した (図 5)。

D. 考 察

ファージ DNA の RFLP 解析の結果、PFGE タイプ II を除く PFGE タイプと、溶原化している *stx2* ファージ DNA の構造との間で相関性があり、構造の異なる複数のファージが *stx2* 遺伝子を運んでいる実態が明らかになった。しかし、これらの構造的バリエーションが機能的なバリエーションを反映するものか否かは現在のところ不明

である。PFGE タイプ II では、同じ菌株から同じ *stx* ファージ DNA を単離した場合においても、構造の異なるファージ DNA が単離された。この原因としては、薬剤または UV を用いてファージを菌株から誘導する際に、ファージの DNA 構造が変化したと予想される。一般に、ラムドイドファージは、ファージ間で相同性の高い領域を多数保持しており、染色体上にこれらのファージが複数存在した場合に、相同領域間で DNA の組換えを起こすことが知られている。最近、他の研究グループで進められている O157 のゲノムプロジェクトによれば、O157 ゲノム上には、複数のラムドイドファージが挿入されているとの報告もあり、PFGE タイプ II 株から単離された *stx2* ファージが多様性を示す一つの理由も、これらファージ DNA 間での組換えによるものと考えられる。

1982 年にアメリカで単離された EDL933 由来の株から単離された *stx2* ファージは、今回の研究から、日本で単離された PFGE タイプ I 株由来の *stx2* ファージと極めて相同性の高いことが判明した。このことが意味する生物学的意義は現在のところ不明だが、親株の由来は地理的、時間的にも大きな隔たりがあり、PFGE 型も異なることから、これら 2 つの株は由来を同じくするファージに、過去のある時期に感染した可能性が考えられる。

stx2 遺伝子内に 1 カ所だけ切断部位がある *SmaI* を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った結果から、PFGE タイプ II から単離された *stx2* ファージ DNA 上では、*stx2* 遺伝子が、染色体への挿入部位と極めて近いに存在することが考えられる。このことは、*stx2* 遺伝子が近い過去のある時期に、ファージの溶原化、溶菌化サイクルを繰り返すうちに、このファージに拾い上げられた可能性があることを示すものと考えられる。

E. 結 論

1. 本研究から、*stx* 遺伝子、中でも *stx2* を運ぶファージ DNA の構造には、かなりの多様性が存在することが判明した。しかし、ファージ DNA のバリエーションが機能的なバリエーション反映しているか否かは今後の研究課題である。
2. アメリカで 1982 年に単離されたファージ DNA の構造が、1996 年日本国内で単離された O157 株 (PFGE タイプ I) 由来のファージ DNA と高い相同性を持つことが判明した。両菌株は、その由来が地理的、時間的に異なり、PFGE 型も違うが、由来を同じくするファージによって過去のある時期に感染した可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Genotypic variations of Shiga toxin-converting phages from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates.

Ro Osawa, Sunao Iyoda, Akihito Wada, Shu-ichi Nakayama, Shiro Yamai and Haruo Watanabe.

J. Clin. Microbiol. 投稿中

2. 学会発表

・ Variations of Shiga toxin-converting phages from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates.

Ro Osawa, Sunao Iyoda, Akihito Wada, Shu-ichi Nakayama, Shiro Yamai and Haruo Watanabe.

Thirty-fourth Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infectious Panel, Dec. 2, 1998.

・ 腸管出血性大腸菌 O157 に溶原化している *stx*-converting phage の多様性について
伊豫田淳, 大澤朗, 中山周一, 渡邊治雄
第 74 回日本細菌学会総会 (1999 年 3 月)

G. 知的所有権の取得状況

なし

表1 本研究で用いた菌株と単離したファージ

ファージ No.	O157 株				
	菌株 No.	由来	年	stx	PFGE type
stx1-converting phage					
Φ CDC1-a	CDC-1	U.S/patient	1993	1,2	ND
Φ CDC1V1					
Φ Yo20-2	Yo-20	Osaka (Sakai) /patient	1996	1,2	IIa
Φ Yo20V1					
Φ Yo20bV1					
Φ 22V1	Yo-22	Osaka (Habikino) /patient	1996	1,2	IIa
Φ 23V1	Yo-23	Kyoto/patient	1996	1,2	IIa
Φ 27V1	Yo-27	Wakayama/patient	1996	1,2	IIa
Φ CDC11	CDC11	U.S/cattle	1993	1,2	IIc
Φ Yo-25	Yo-25	Tokyo/patient	1996	1,2	IIId'
Φ 25V1					
Φ Yo25aV1					
Φ Yo25cV1	Yo-31	Iwate (Morioka) /patient	1996	1,2	IIj
Φ 31V1					
stx2-converting phage					
Φ 933SI	EDL933	U.S/food	1982	1,2	ND
Φ EDL933V2					
Φ EDL933V2'					
Φ CDC-1b	CDC1-b	U.S/patient	1993	1,2	ND
Φ CDC1V2					
Φ Yo-1	Yo-1	Hiroshima/patient	1996	1,2	Ia
Φ Yo-1V2					
Φ Yo-3	Yo-3	Fukuoka/patient	1996	1,2	Ia
Φ Yo-5	Yo-5	Gifu/patient	1996	1,2	Ib
Φ Yo-10	Yo-10	Aichi/patient	1996	1,2	Ib
Φ Yo-12	Yo-12	Okayama (Niimi) /patient	1996	1,2	Ib
Φ Yo-12V2					
Φ Yo-15	Yo-15	Osaka/patient	1996	1,2	Ib
Φ Yo-8	Yo-8	Okayama (Oku) /patient	1996	1,2	Ic
Φ Yo-8V2					
Φ Yo-16	Yo-16	Shiga/patient	1996	1,2	Ic
Φ 19V2	Yo-19	Osaka (Sakai) /patient	1996	1,2	IIa
Φ Yo20-1	Yo-20	Osaka (Sakai) /patient	1996	1,2	IIa
Φ 20V2					
Φ Yo20aV2					
Φ Yo20eV2					
Φ Yo22V2	Yo-22	Osaka (Sakai) /patient	1996	1,2	IIa
Φ 23V2	Yo-23	Kyoto/patient	1996	1,2	IIa
Φ Yo27V2	Yo-27	Wakayama/patient	1996	1,2	IIa
Φ CDC-8	CDC-8	U.S/food	1993	1,2	IIa
Φ CDC-10	CDC-10	U.S/cattle	1993	2	IIa
Φ 25V2	Yo-25	Tokyo/patient	1996	1,2	IIId'
Φ Yo25eV2					
Φ Yo31cV2	Yo-31	Iwate (Morioka) /patient	1996	1,2	IIj
Φ CDC-2	CDC-2	U.S/patient	1993	1,2	III
Φ CDC2V2					
Φ CDC3V2	CDC-3	U.S/patient	1993	1,2	IIIa
Φ Yo-36	Yo-36	Chiba/patient	1996	2	IV
Φ Yo-38	Yo-38	Gunma/patient	1996	2	IV
Φ 40V2	Yo-40	Saga/patient	1996	2	IV
Φ 42V2	Yo-42	Saga/fly	1996	2	IV
Φ KE-1	Yo-43	Kanagawa/patient	1996	2,2vha	Va

図2 ファージDNA間の多型性

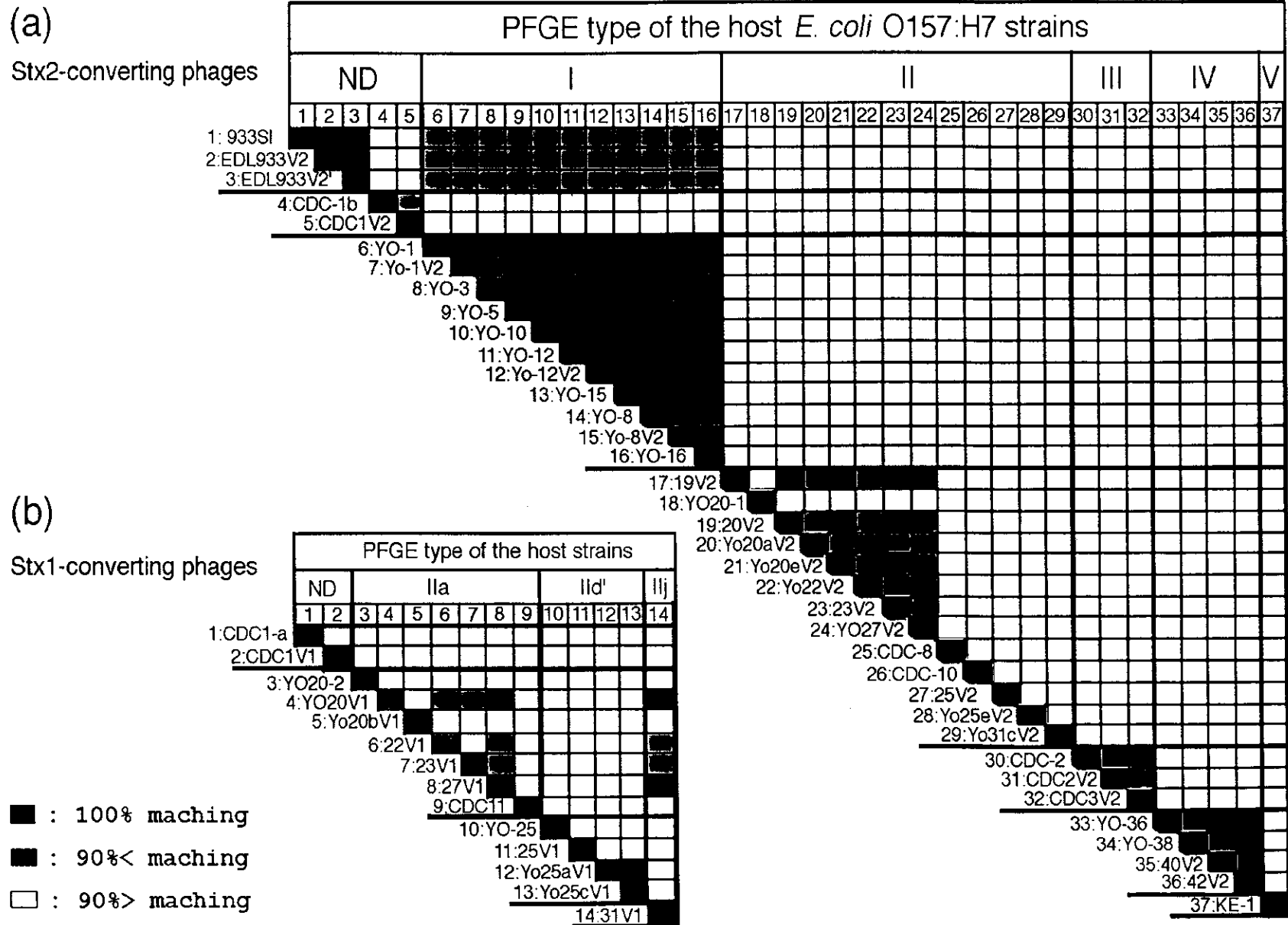
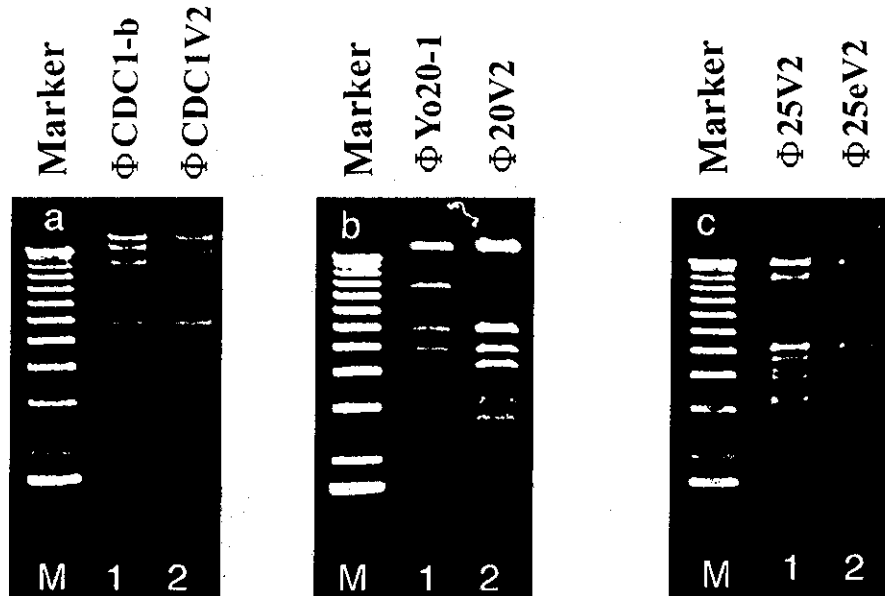


図3 同一株から単離されるファージRFLP解析

stx2-converting phage



stx1-converting phage

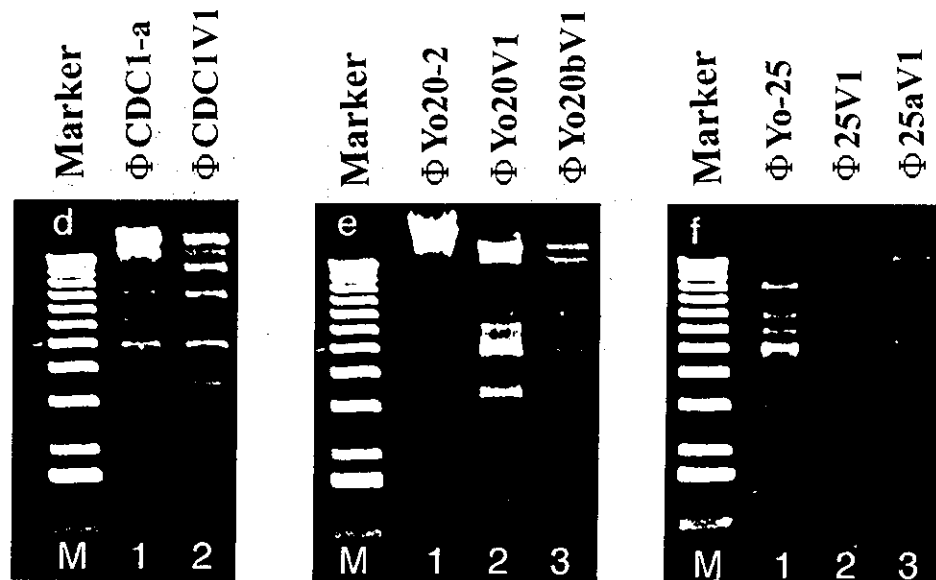


図4 異なるPFGE型を持つ株から単離された
 相同性の高いファージ

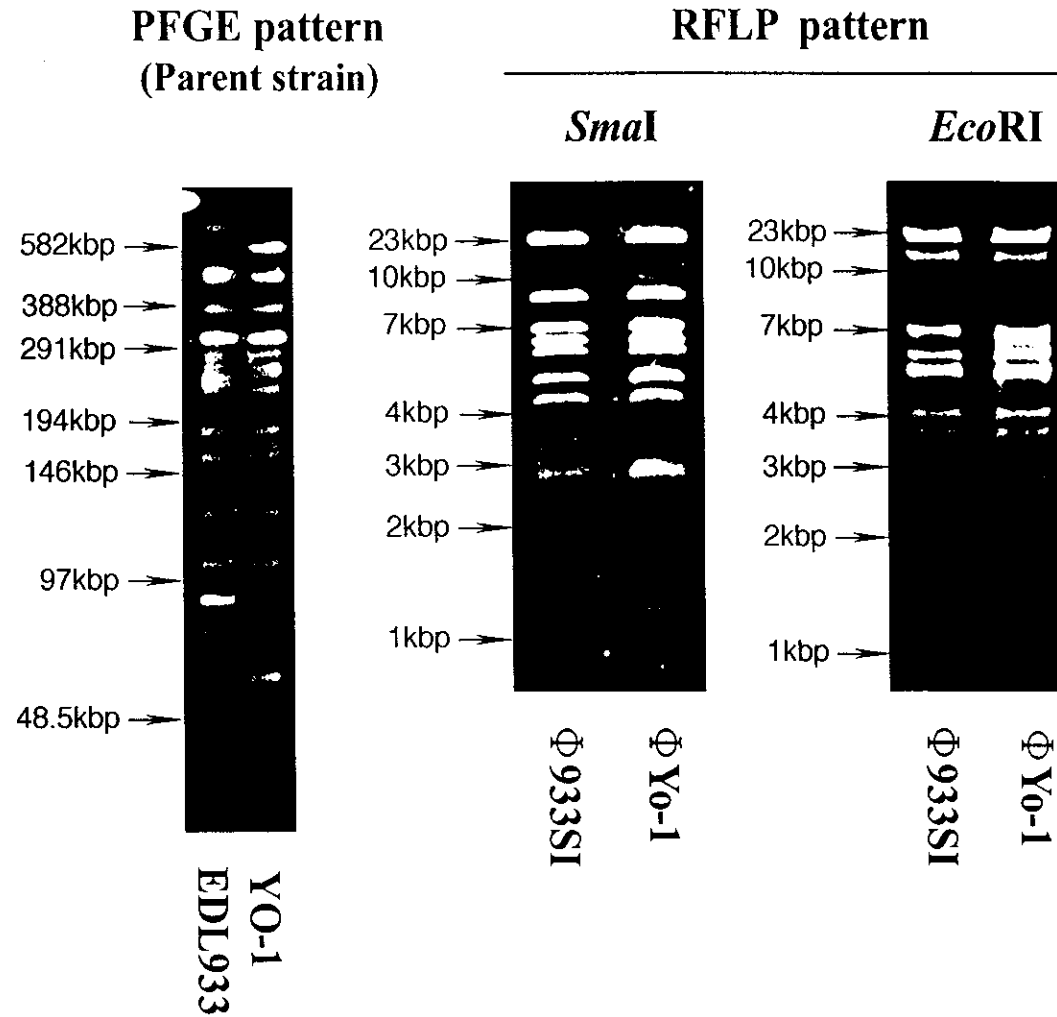
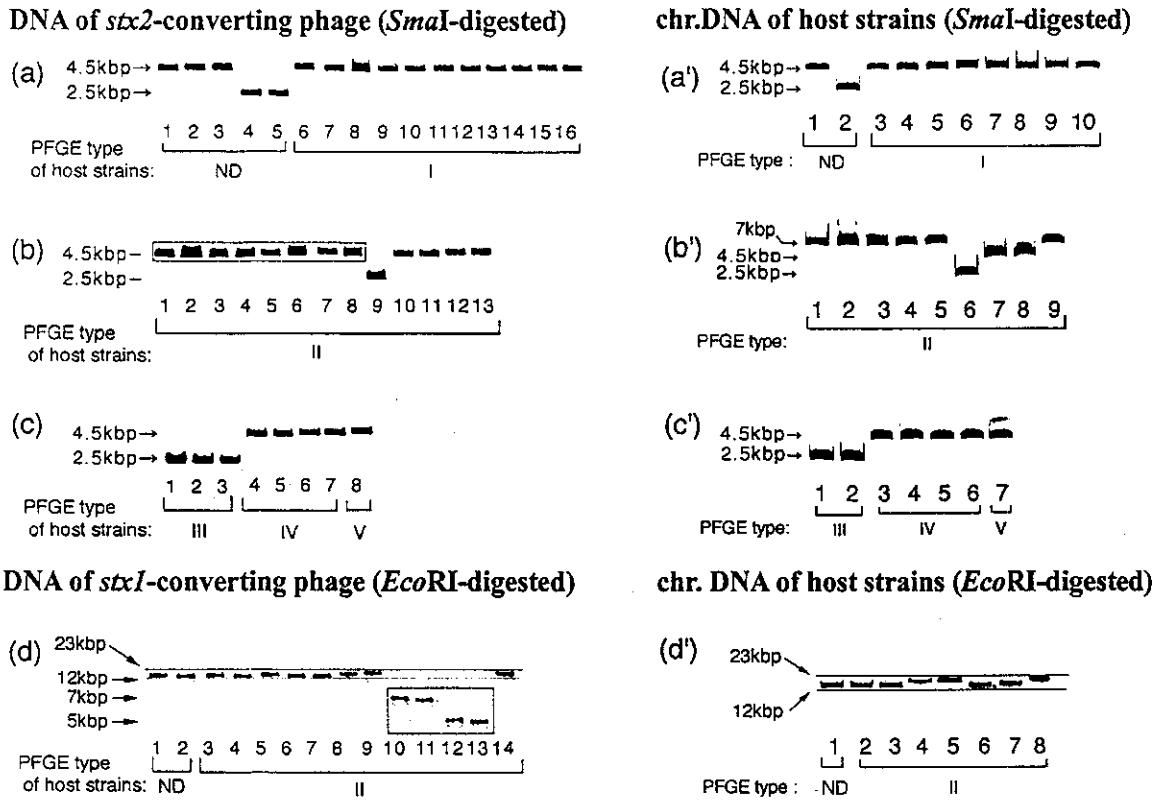


図5 ファージDNAおよび親株染色体DNAのサザンブロッティング解析



(a)	(a')	(b)	(b')
Lane1: Φ 933SI	Lane1: EDL933	Lane1: Φ 19V2	Lane1: Yo-19
2: Φ EDL933V2	2: CDC-1	2: Φ Yo-20-1	2: Yo-20
3: Φ EDL933V2'	3: Yo-1	3: Φ 20V2	3: Yo-22
4: Φ CDC-1b	4: Yo-3	4: Φ Yo20aV2	4: Yo-23
5: Φ CDC1V2	5: Yo-5	5: Φ Yo20eV2	5: Yo-27
6: Φ Yo-1	6: Yo-10	6: Φ Yo22V2	6: CDC-8
7: Φ Yo-1V2	7: Yo-12	7: Φ 23V2	7: CDC-10
8: Φ Yo-3	8: Yo-15	8: Φ Yo27V2	8: Yo-25
9: Φ Yo-5	9: Yo-8	9: Φ CDC-8	9: Yo-31
10: Φ Yo-10	10: Yo-16	10: Φ CDC-10	
11: Φ Yo-12		11: Φ 25V2	
12: Φ Yo-12V2		12: Φ Yo25eV2	
13: Φ Yo-15		13: Φ Yo31cV2	
14: Φ Yo-8			
15: Φ Yo-8V2			
16: Φ Yo-16			
(c)	(c')	(d)	(d')
Lane1: Φ CDC-2	Lane1: CDC-2	Lane1: Φ CDC-1a	Lane1: CDC-1
2: Φ CDCV2	2: CDC-3	2: Φ CDC1V1	2: Yo-20
3: Φ CDC3V2	3: Yo-36	3: Φ Yo-20-2	3: Yo-22
4: Φ Yo-36	4: Yo-38	4: Φ Yo20V1	4: Yo-23
5: Φ Yo-38	5: Yo-40	5: Φ Yo20bV1	5: Yo-27
6: Φ 40V2	6: Yo-42	6: Φ 22V1	6: CDC-11
7: Φ 42V2	7: Yo-43	7: Φ 23V1	7: Yo-25
8: Φ KE-1		8: Φ 27V1	8: Yo-31
		9: Φ CDC11	
		10: Φ Yo25	
		11: Φ 25V1	
		12: Φ Yo25aV1	
		13: Φ Yo25cV1	
		14: Φ Yo31V1	

関連演題学会発表

1. 小宮貴子、福田靖、長岡芳昭、大隈邦夫、杉山純一、荒川宜親、高橋元秀
「腸管出血性大腸菌が産生する毒素 SLT2 に対する標準抗毒素の試作－ウマの免疫応答－」
第 72 回日本細菌学会総会、日本細菌学雑誌 54.1.p235、東京 (1999.3.24-3.26)
2. 五十君静信、高橋元秀、熊谷進
「腸管出血性大腸菌 Vero 毒素無毒化遺伝子の乳酸菌 *Lactococcus lactis* での発現とその評価」
第 72 回日本細菌学会総会、日本細菌学雑誌 54.1.p302、東京 (1999.3.24-3.26)
3. Ro Osawa, Sunao Iyoda, Akihito Wada, Shu-ichi Nakayama, Shiro Yamai and Haruo Watanabe.
Variations of Shiga toxin-converting phages from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates.
Thirty-fourth Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel, Dec. 2, 1998
4. 伊豫田淳、大澤朗、中山周一、渡邊治雄
腸管出血性大腸菌 O157 に溶原化している *stx*-converting phage の多様性について
第 72 回日本細菌学会総会、東京 (1999.3.24-3.26)

掲載論文

1. FUKUDA, Y., KOMIYA, T., TAKAHASHI, M., ARAKAWA, Y., AMI, Y., SUZAKI, Y., NAITO, S., HORINO, A., NAGATA, N., SATOH, S., GONDAIRA, F., SUGIYAMA, J., NAKANO, Y., NISHINOHARA, S., KOMURO, K, and UCHIDA, T.
「Induction of protection against oral infection with cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in mice by shiga-like toxin-liposome conjugate.」
International archives of allergy and immunology. 116:313-317, 1998
2. Ro Osawa, Sunao Iyoda, Akihito Wada, Shu-ichi Nakayama, Shiro Yamai and Haruo Watanabe.
「Genotypic variations of Shiga toxin-converting phages from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates.」
J. clin. Microbiol. 投稿中

班会議開催記録

平成10年度研究報告会議事次第

1. 日時： 平成11年2月22日
午後1:00～3:00
2. 場所： 国立感染症研究所 村山分室 第1会議室
3. 主任研究者 挨拶
国立感染症研究所 高橋元秀
4. 分担研究者 研究報告
 - (1) 細菌・血液製剤部 荒川部長
 - (2) 動物管理室 網 主任研究官
 - (3) 感染病理部 倉田 部長
 - (4) 安全性研究部 小室 部長
 - (5) 細菌部 渡邊 部長
 - (6) 霊長類センター 山田 センター長
5. 今後の研究計画について

参加研究者

1. 細菌・血液製剤部 荒川宜親、高橋元秀、福田 靖
2. 動物管理室 網 康至、須崎百合子
3. 感染病理部 倉田 毅、
4. 安全性研究部 小室勝利、永田典代、内田哲也
5. 細菌部 伊豫田淳
6. 霊長類センター 山田章雄、寺尾恵治

〔 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 〕
〔 研 究 委 託 事 業 〕
(新興・再興感染症研究推進事業)

委託研究報告書

1. 委託申込者

所属機関職名：国立感染症研究所 細菌・血液製剤部
氏 名：高橋元秀

2. 研究委託実施者

所属・職名：タイ国赤十字 研究開発部 部長
Director, Research and Development units, Queen Saovabha
Memorial Institute. The Thai Red Cross Society
氏 名：Dr.Narangsak Chaiyabutr
Narumol Pakmanee

3. 研究委託期間：平成10年4月1日 - 平成11年3月31日

4. 研究委託課題：タイ国におけるヒト血清中の抗 VT1/VT2 抗体の測定及び
腸管出血性大腸菌の感染既往調査 に関する研究

5. 研究委託課題の成果：

今年度の中間報告として別紙

PROTOCOL

"Determination of VT1/VT2 antibodies in human sera collected in Thailand and survey of medical history on enterhemorrhagic E. coli"

Study Facility: Queen Saovabha Memorial Institute,
Thai Red Cross Society,
1871 Rama IV Road, Bangkok 10330,
Thailand

Study Director: Dr. Narongsak Chaiyabutr,
Dupity director of the institute

Research Associate: Motohide Takahashi, V.M.D., Ph.D.
National Institute of Infectious Diseases
4-7-1 Gakuen, Musashimurayama,
Tokyo 208-0011, Japan

Sponsor: Japan Health Sciences Foundation
13-4 Kodenma-cho,
Nihonbashi, Chuo-Ku,
Tokyo 103-0001, Japan

Sponsor's

Representative: Motoyuki Fujii, Ph.D.
Executive Director,
Japan Health Sciences Foundation

Issue Date:

1. OBJECTIVE: Outbreaks of enterohemorrhagic *E. coli* (abbreviated EHEC hereafter) O-157 and O-26 in Japan and USA have been regarded as being caused by verotoxins 1 and 2 (VT1/VT2) or lipopolysaccharides (LPSs).

On the other hand, there have been several reports describing isolation of the causal EHEC in southeast Asia. However, outbreak or clinical case has been not reported in Thailand. The reason of the discrepancy is still obscure. It is possible that some factors are involved in the autoprotection. There has been no study clarifying the discrepancy in the not outbreak countries.

Therefore, study on detection of antibodies against EHEC-toxins in sera collected in Thailand will give us valuable informations on EHEC-outbreaks.

2. STUDY DESIGN: Sera collected at the OPD in Queen Saovabha Memorial Institute are served for the study. Factors such as age, sex and the place of residence will be recorded and analysed. Sera obtained from diarrhoeal patients are also included in the study.

Relationship between the presence of antibodies in sera and LPSs or EHEC-antigens in the patient stools will be examined in the future.

3. TECHNICAL PROCEDURES: The last year, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used for detection of anti-VTs, and unexpected high incidence of anti-VTs titers was obtained with sera from healthy and diarrheal patients donors. However, several parts of the results were inconsistent with currently accepted hypotheses concerning the EHEC-epidemiology. It was suggested that the quality control of ELISA data was not established, or some unknown factor(s) giving false results has been involved in research materials or techniques. Pursuit of such false results-producing factor(s) is not purpose of this project. Therefore, cell culture method (CCM) using vero cell will be introduced in the second year. The method is well known as convincing to evaluate anti-VTs titer. At first the results that gave high anti-VTs titer by ELISA method done in the last year will be confirmed by CCM.

4. REPORT: The Final Report on "Determination of VT1/VT2 antibodies in human sera collected in Thailand abt the termination of the study, results of the study done theretofond survey of medical history on enterohemorrhagic *E. coli*" should be written in English and Japanese and submitted to the sponsor through the associate (researcher) by the end of March 1999.

ACCEPTANCE OF PROTOCOL

Determination of VT1/VT2 antibodies in human sera collected in Thailand
and survey of medical history on enterohemorrhagic E. coli.

Study Facility: Queen Saovabha Memorial Institute,
Thai Red Cross Society,
1871 Rama IV Road, Bangkok 10330,
Thailand

Signature: Nongrak Chanyabun
Date:

Research

Associate:

Signature: Motohide Takahashi

Motohide Takahashi, V.M.D., Ph.D.
National Institute of Infectious Diseases,
4-7-1 Gakuen, Musashimurayama,
Tokyo 208-0011, Japan

Date: November 5, 1998

Sponsor: Japan Health Sciences Foundation

13-4 Kodenma-Cho,
Nihonbashi, Chuo-Ku,
Tokyo 103-0001, Japan

Signature: Motoyuki Fujii

Motoyuki Fujii, Ph.D.
Executive Director

Date: Nov. 24, 1998

Determination of VT1/VT2 antibodies in human sera collected in Thailand and survey of medical history on enterohemorrhagic E. coli (2nd year).

Introduction

Acute diarrhea is one of the most common diseases in Thailand . More than 800,000 cases have been reported per year. *Eschericia coli* is a normal commensal bacterium found in intestine and feces of humans and animals. Several types of E. coli associate with diarrheal diseases. Several enteropathogenic E. coli serogroups produce potent protein toxins related to shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae*, termed Shiga-like toxins (SLTs) or Verotoxins (VTs). E.coli strains producing high level of verotoxins have been considered as epidemiologically link to human diseases , such as hemorrhagic colitis , hemolytic-uremic syndrome (HUS) and thrombotic thrombocytopenic purpura. They have been grouped as enterohemorrhagic E.coli (EHEC). Although E. coli O157:H7 has been implicated in many cases of EHEC outbreak in developed countries, at least 50 other toxin- producing serotypes have also been associated with development of HUS and /or hemorrhagic colitis. Thus , SLTs or VTs production and not only O157:H7 serotype is a better marker of the pathogenic potential of E. coli strain.

In 1982 , VT positive strain of E.coli O157:H7 , a hitherto comparatively rare serotype E.coli , was firstly identified as a human pathogen . It was though to be a vanishing cause of diarrhea in developed countries. It was diagnosed only in travelers. With the emergence and recognition of E. coli O157:H7 , the situation has completely changed. E. coli O157:H7 , an uncommon pathogen a decade ago, was now recognized as a common cause of bloody diarrhea in many countries. Many outbreaks as well as sporadic cases have been documented since with increasing of numbers recognized recent years. This organism has become a very

important cause of food-borne or water-borne infection and person-to-person transmission in developed countries such as USA, Canada , Australia and European countries. From 1982 to 1990 , an average of 2-3 outbreaks per year of E. coli O157:H7 infection were investigated in USA. For 1993, 17 outbreaks were investigated , and 11 outbreaks were investigated for the first half of 1994 (see Fig 1.). The number of cases of diarrhea from E. coli O157:H7 is estimated 10,000 - 20,000 per year. E. coli O157:H7 infection , however, is uncommon in Asia ,and the infection by this organism has become a serious problem for the first time in Japan in 1996. There were many outbreaks with unknown sources of E. coli O157:H7 and O26 infections in that year. There were 9,578 diarrhea cases and died 11 cases. The outbreaks occurred in 62 schools and 160 cases in their family clusters. The latter infection was found in other parts of Japan. There have been several reports isolating the causal EHEC in southeast Asia.

E. coli O157:H7 can produce the entire spectrum of enteric disease. Although bloody diarrhea has frequently been reported, manifestation of non-bloody diarrhea or even asymptomatic infection is also reported. Patients whose stools are not bloody have less severe illness. This may reflect a tendency that these patients do not seek medical care and physicians' tendencies not to perform stool examination for EHEC strains. It has been concerned that asymptomatic cases could unwittingly spread to others. However , long-term asymptomatic carriage (greater than 1 year) of E. coli O157:H7 has never been demonstrated like *Salmonella typhi*. The patients, especilly children, can shed the organism for several weeks (from 13 days up to 124 days) after onset of illness. Colitis caused by EHEC may mimic noninfectious syndromes such as appendicitis , ischemic colitis , imflammatory bowel disease or cotitis caused by *Salmonella*, *Shigilla* , *Campylobacter* or

Clostridium difficile. As a result, the diagnosis may be missed if it is based mainly on clinical symptoms.

In Thailand, Betteheim *et al* (1990) demonstrated that greater variety of serotype of *E. coli* isolated from adults with diarrhea can contain gene coding SLT-I and SLT-II (7 strains), SLT-II only (16 strains) and O157 EHEC fimbriae (35 strains) than has been previously recognized, none of which were O157:H7. Brown *et al* (1990) found 7% of SLT-I or SLT-II producing *E. coli* strain in children with bloody diarrhea in which other enteric pathogens were not identified, at a hospital in Bangkok. Hull *et al* (1993) also demonstrated that a small proportion of Thai children (approximately 2 %) under age 5 years old presenting diarrhea carries SLT-producing organism in their stools, while such strains are present in over 40% in Thai cattle. On the other hand, the report of The Food Sanitation Project of JICA in Thailand (1997) showed that 16% of raw beef obtained from markets in Bangkok was contaminated with enterotoxigenic *E. coli* O157 containing gene that codes SLT-1 or VT-1 and /or SLT-2 or VT-2. These findings confirmed the presence of SLT-producing *E. coli* associated diarrhea in Thailand and the presence of SLT producing organism in cattle and meat products.

It is well known that cattle is the most importance reservoir of *E. coli* O157:H7. However, the bacteria are generally not pathogenic in adult cattle but in the young animal. This serotype has also been isolated from many animals such as sheep, chicken, dog, deer and horse. A recent report from Toronto showed that the incidence of antibodies to O157 lipopolysaccharide in healthy resident on dairy farms was 12.5% compared with 4.7% in resident of urban areas. *E. coli* O157:H7, although low concentration, found in food has been confirmed as responsible for the outbreaks. Drinking water or swimming associated outbreaks have also been