

図-6 : VT2-リボソーム免疫後のサルにおけるVT2中和抗体価

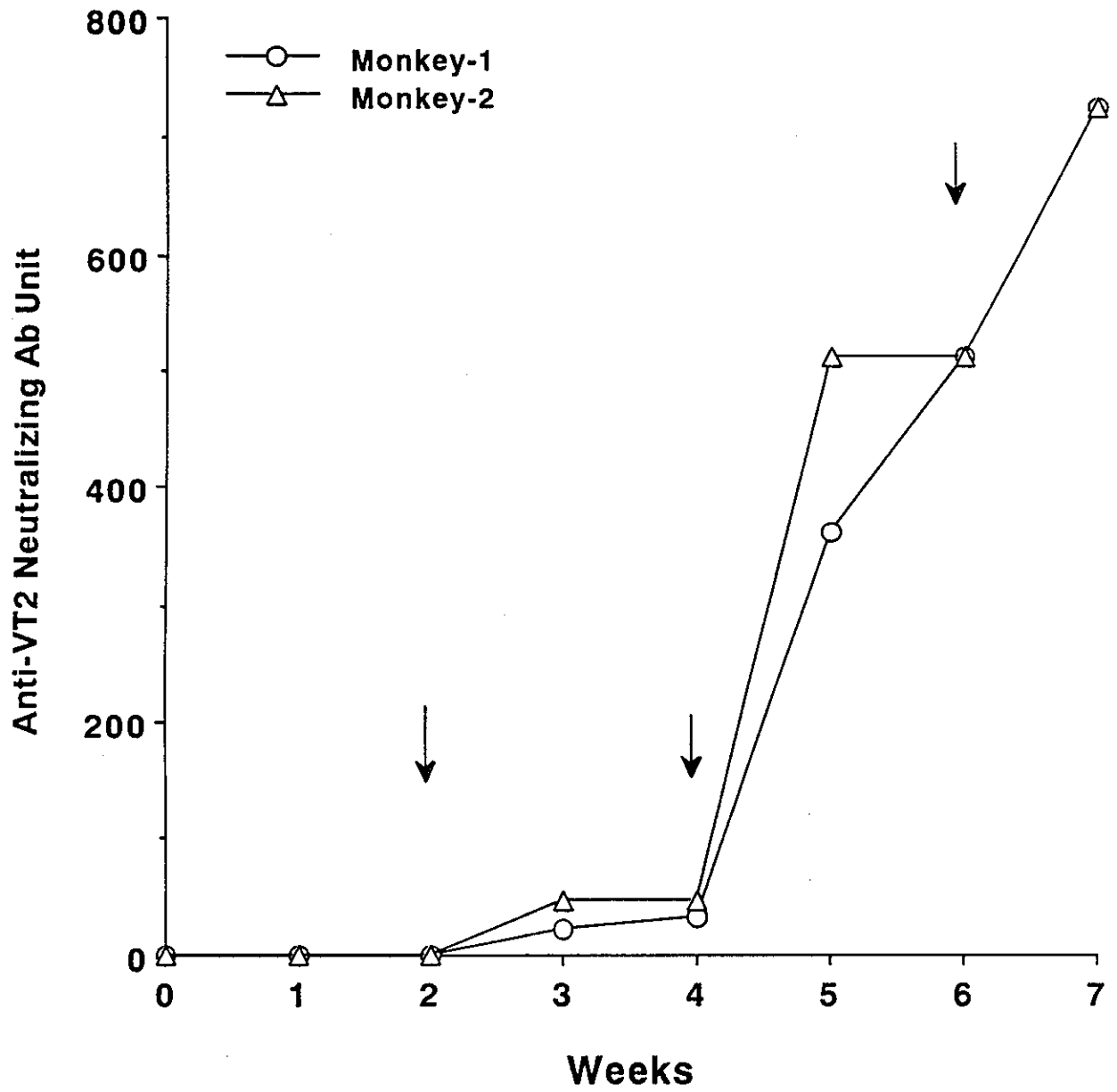


図7 a : OVA-リポソーム免疫マウスにおける抗OVA IgG 抗体産生

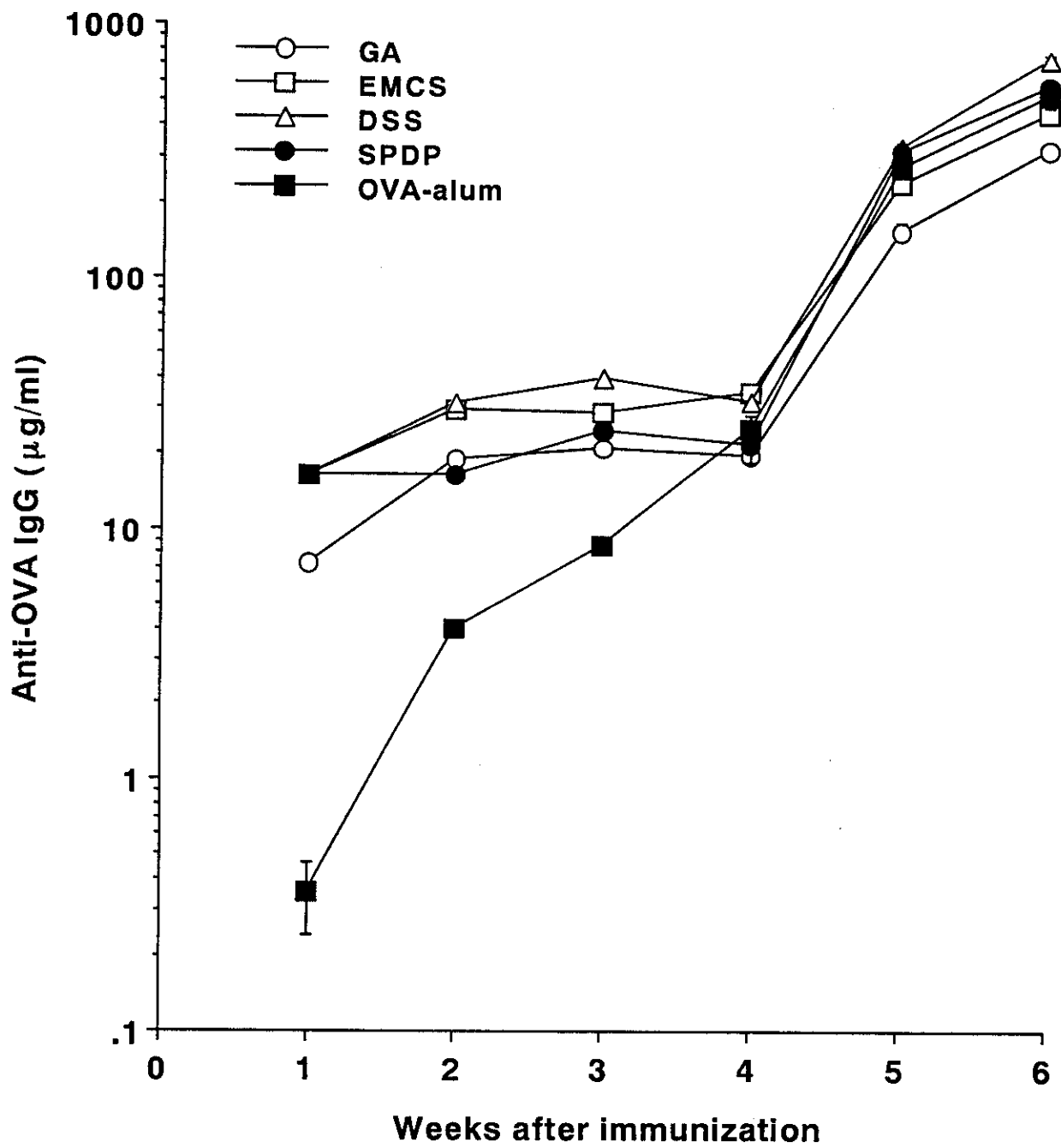


図7b : OVA-リボソーム免疫マウスにおける抗OVA IgE抗体産生

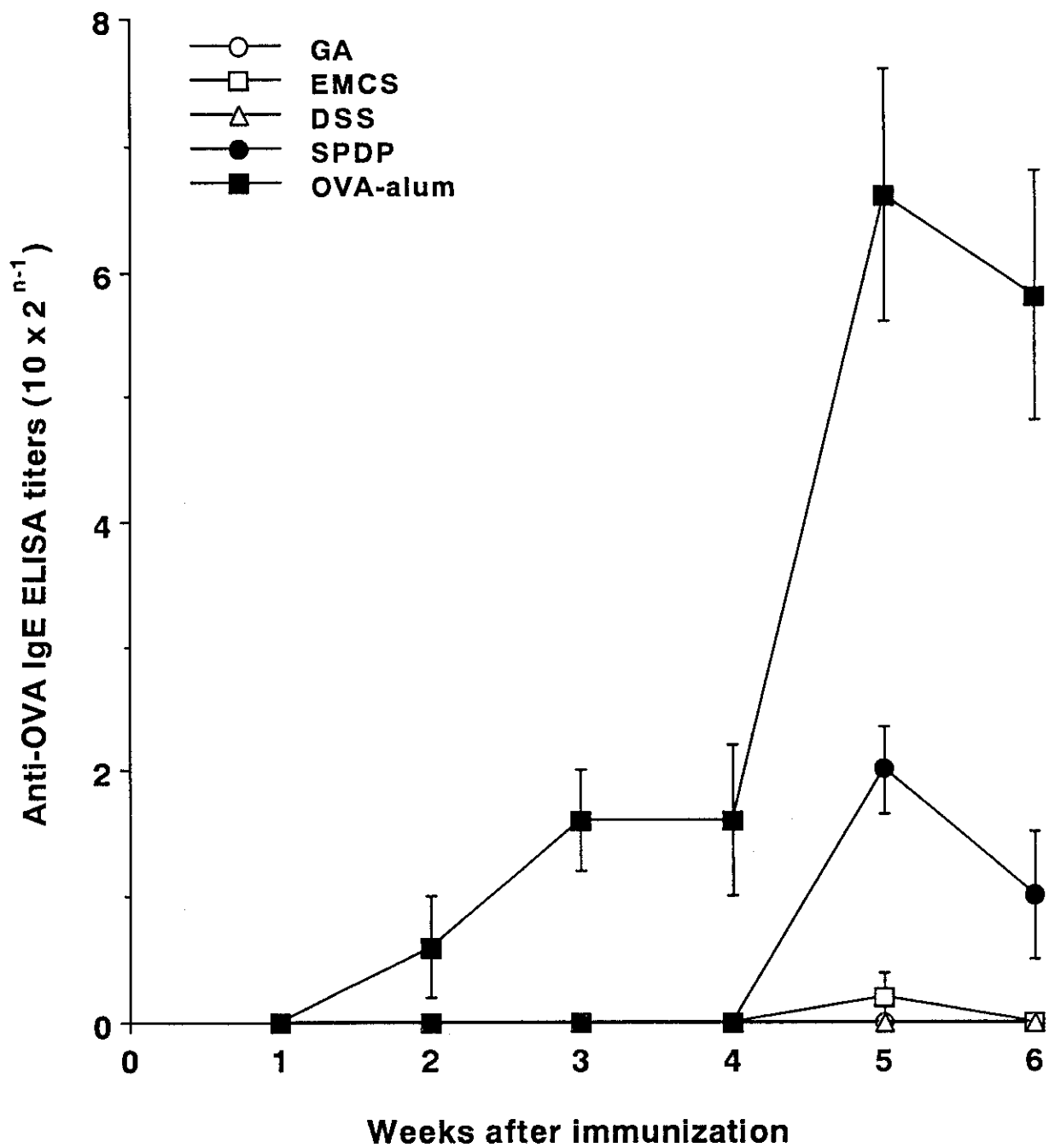


図-7c : OVA-リポソーム免疫マウスにおける抗OVA Igサブクラス産生

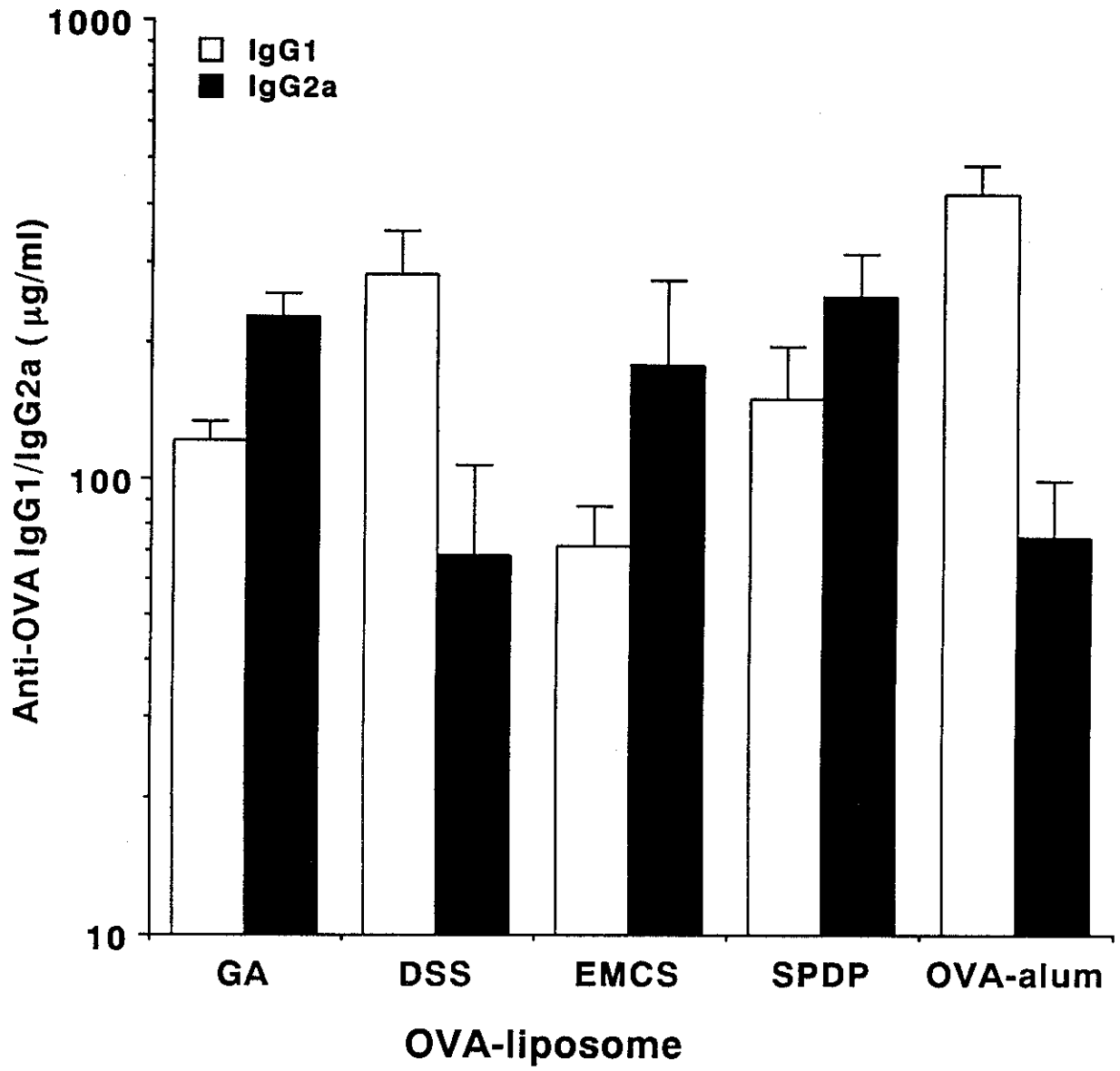


図-8 a : OVA-リポソーム免疫マウス由来脾細胞による IL-4 産生

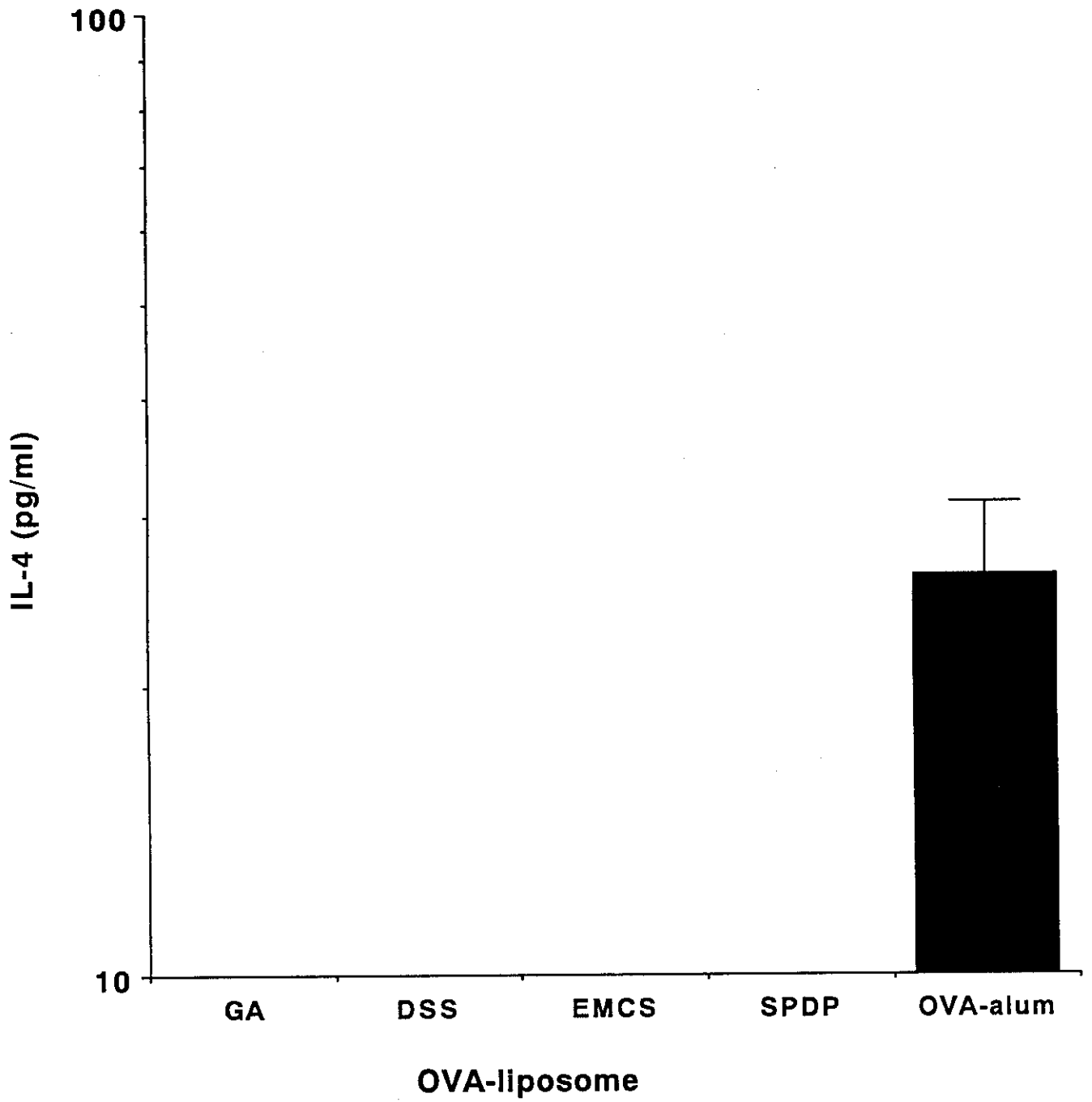


図-8b : OVA-リポソーム免疫マウス由来脾細胞による IFN- γ 産生

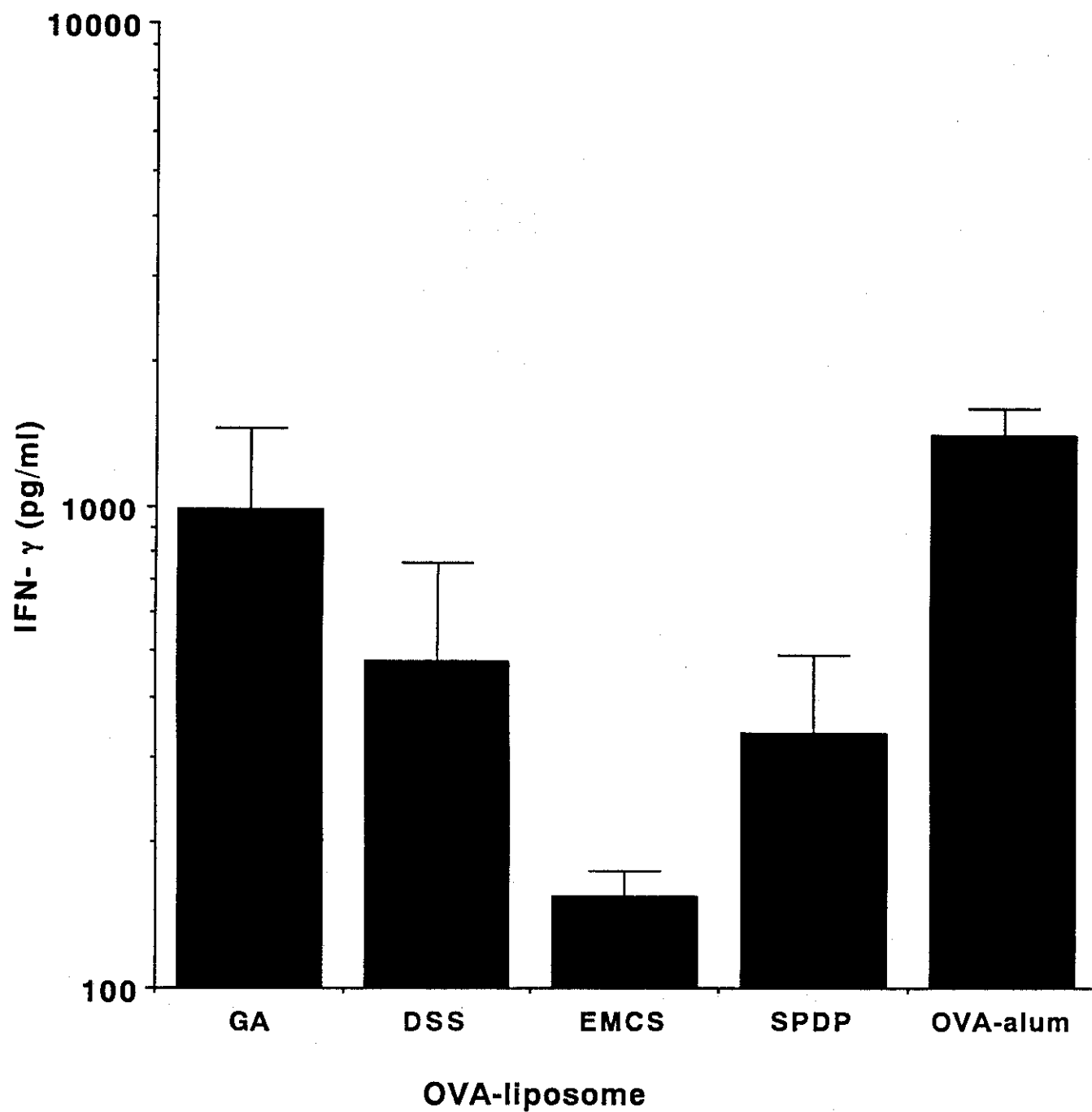
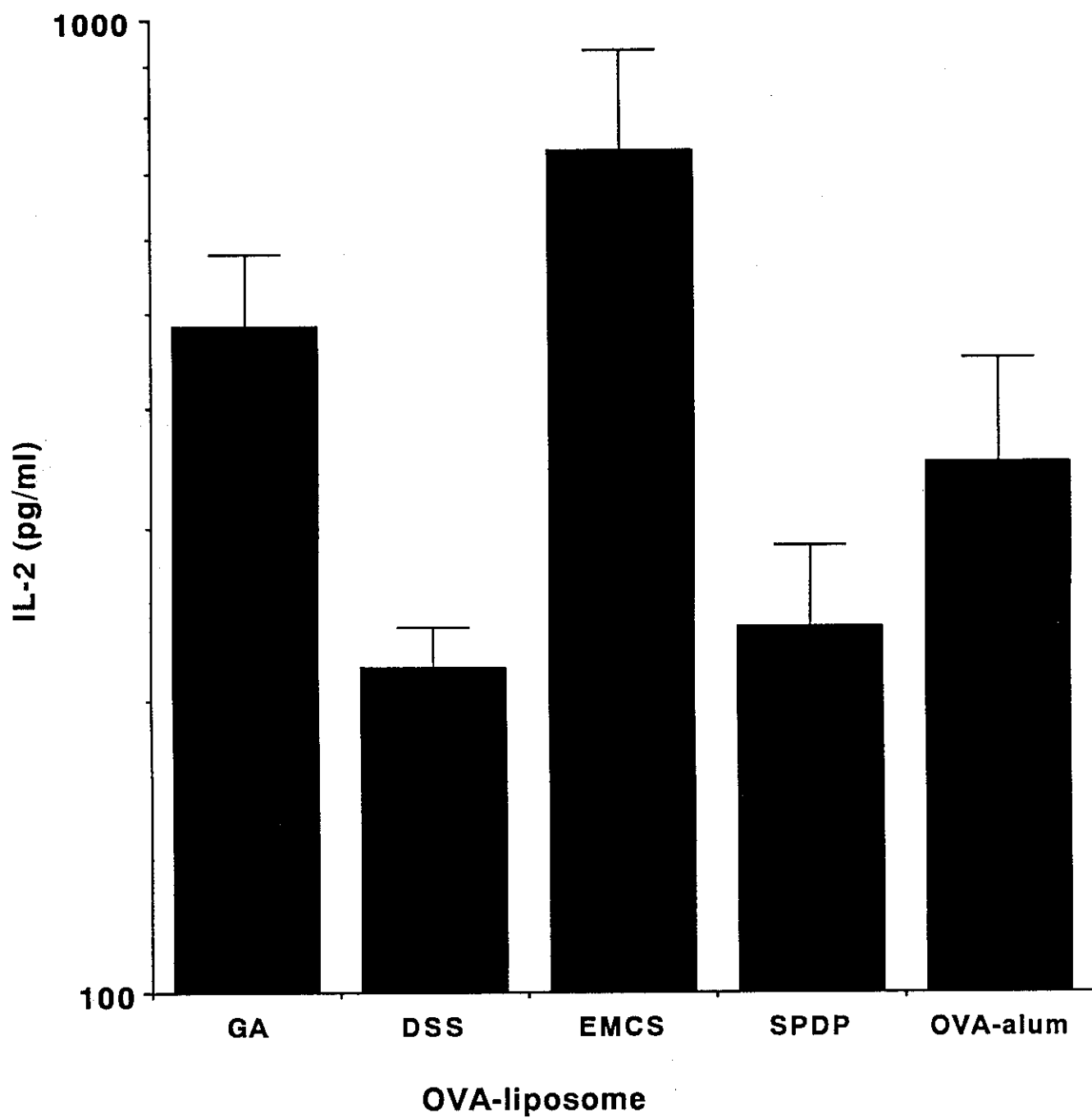
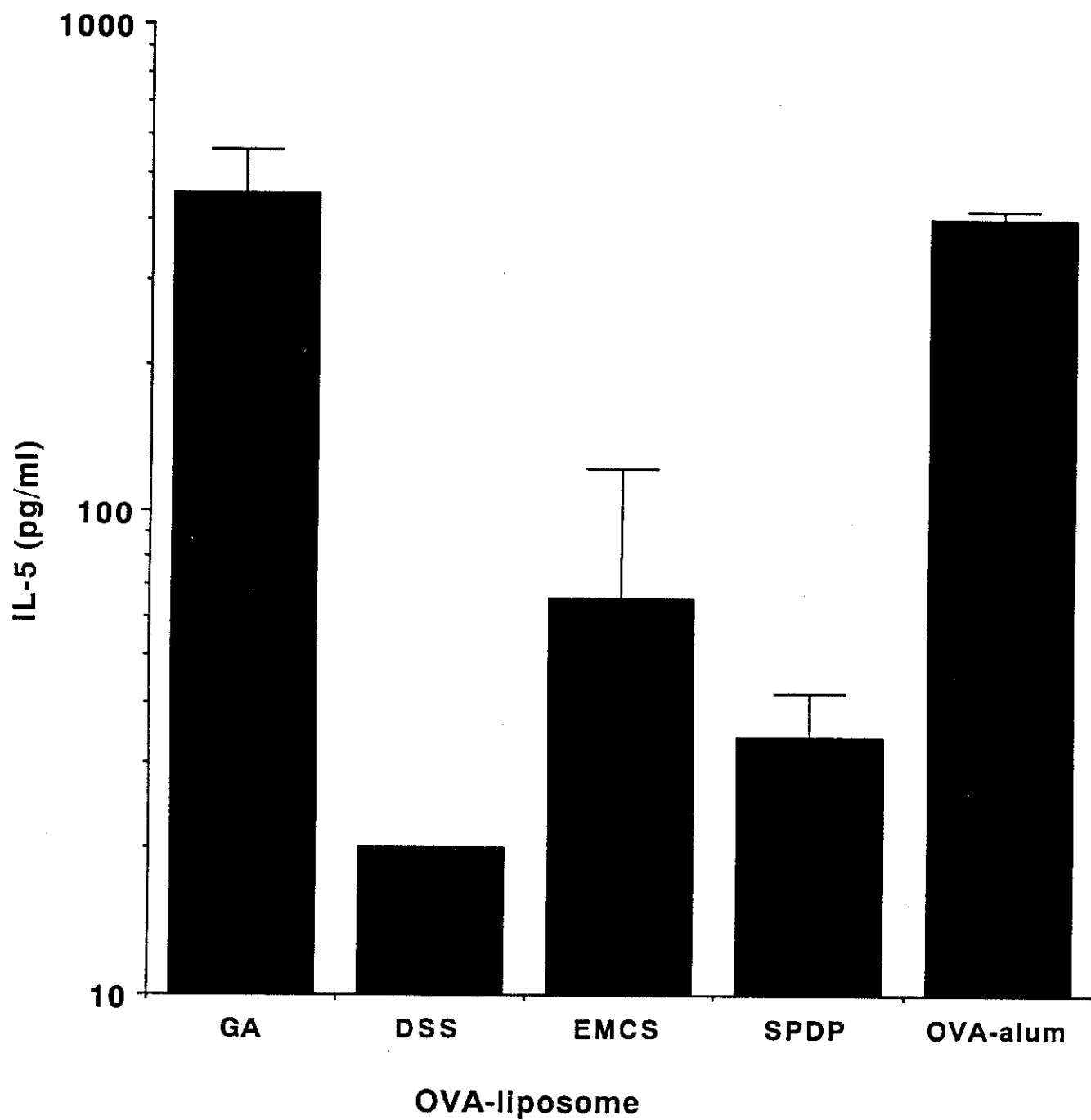


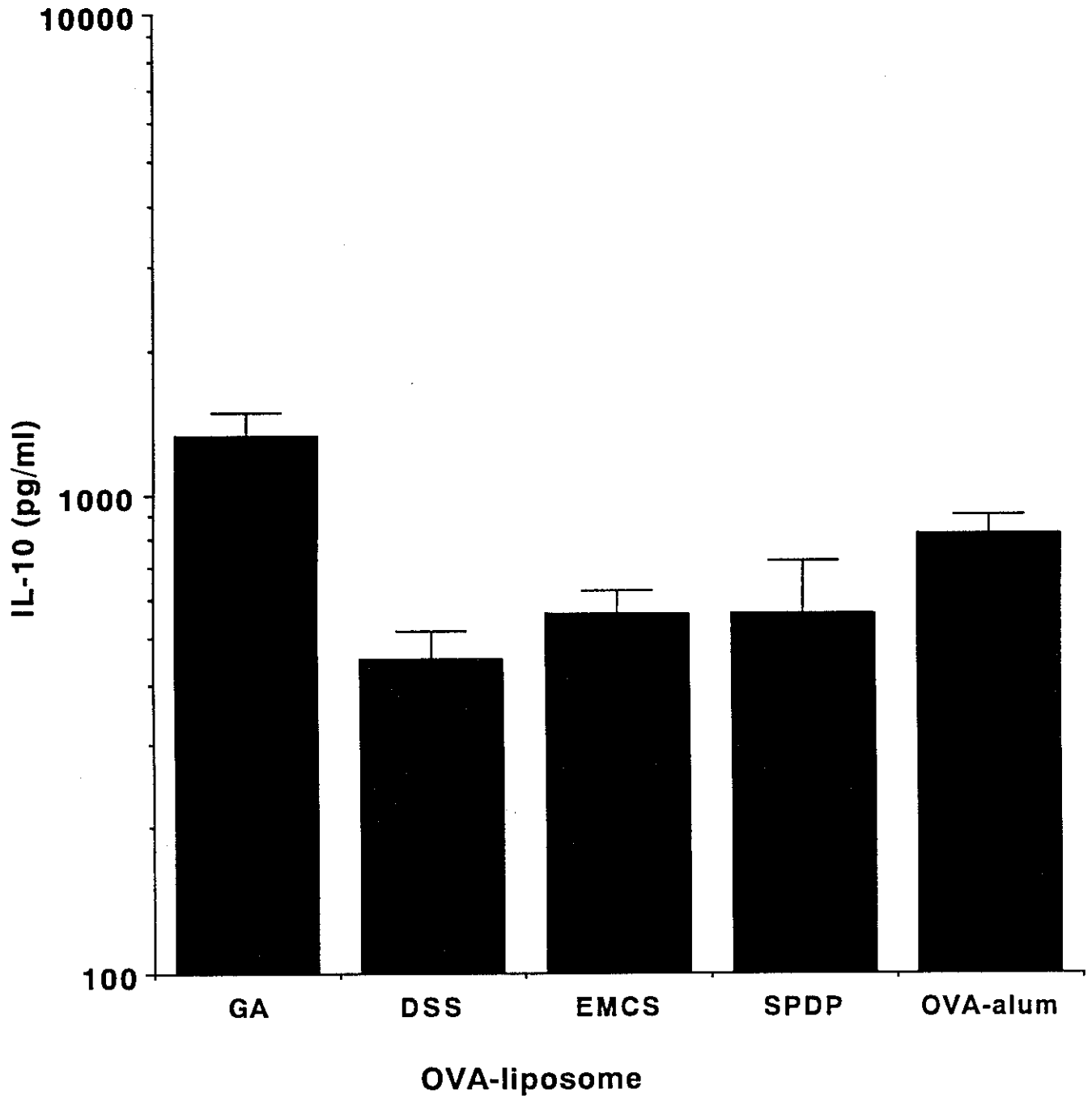
図-8c : OVA-リポソーム免疫マウス由来脾細胞による IL-2 産生



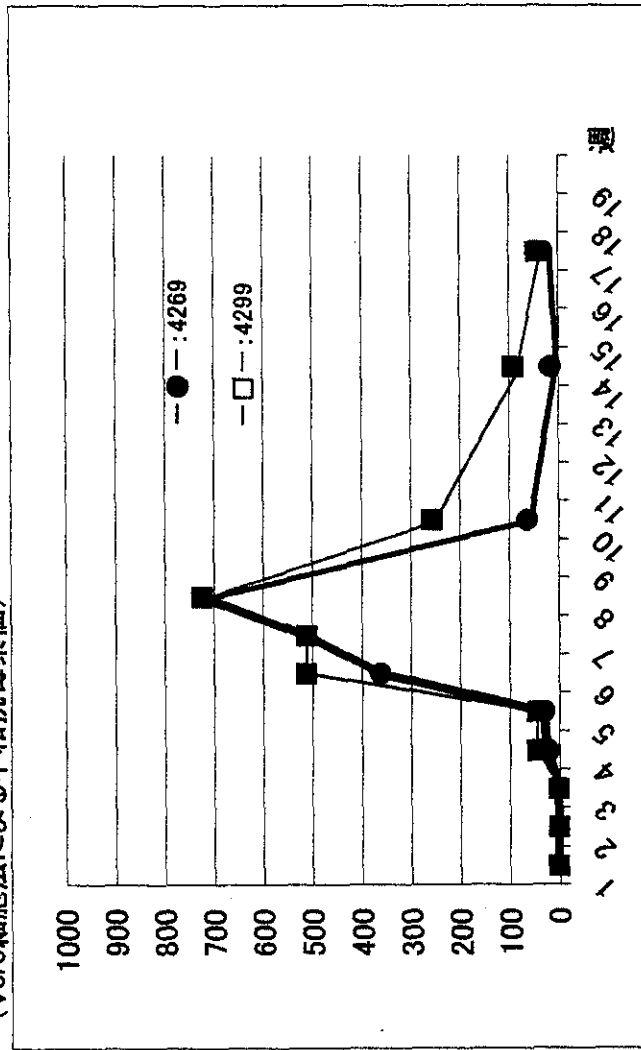
図—8 d ; OVA-リポソーム免疫マウス由来脾細胞による IL-5 産生



図—8 e : OVA-リポソーム免疫マウス由来脾細胞による IL-10 産生



VT2-リポゾームトキソイド免疫サルの抗毒素価推移
 (Vero細胞法による中和抗毒素価)



免疫(週)	抗VT2価(CCM)		採血月日
	No.4269	No.4299	
1	1	1	1999.12.06
2	1	1	1999.12.13
3	1	1	1999.12.20
4	22.6	45	1999.12.27
5	32	45	2000.01.03
6	362	512	2000.01.10
7	512	512	2000.01.17
8	724	724	2000.01.24
9			1.31
10	64	256	2000.02.04
11			2.14
12			2.21
13			2.28
14	16	91	2000.03.06
15			3.13
17			2000.03.20
18	32	45	3.27

19990455

p.63-72 は雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Antigen-specific, IgE-selective unresponsiveness induced by antigen-liposome conjugates: Comparison of four different conjugation methods for the coupling of antigen to liposome

Nakano Y, Mori M, Nishinohara S, Takita Y, Naito S, Horino A, Kato H, Taneichi M, Ami Y, Suzaki Y, Komuro K, Uchida T

Int Arch Allergy Immunol. 1999 Nov;120(3):199-208

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業「Vero 毒素のトキシド
ワクチンの開発と O157 感染症発症防止に関する研究班」）
平成 11 年度分担研究報告書

「HUS 患者から単離された Stx2 産生性大腸菌 O86:HNM の病原因子に関する研究」

分担研究者：伊豫田淳、渡辺治雄、国立感染症研究所・細菌部
（協力研究者：田村和満、泉谷秀昌、国立感染症研究所・細菌部）

研究要旨

1999 年 9 月、鹿児島県において、志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) O86:HNM の感染による死亡例が報告された。血清型として O86 を持つ STEC は、国外において環境由来株または動物由来株としていくつか単離されているものの、患者由来株としては国内外でこれまでに 1 例ずつ報告されているに過ぎず、その病原性の詳細については不明な点が多かった。そこで我々は、この菌株が持つ病原因子の分布について PCR とサザンハイブリダイゼーションを用いて解析した。その結果、この菌株は多くの STEC または腸管病原性大腸菌 (EPEC) で、宿主細胞表層の不可逆的な壊変に必要とされる因子をコードする *eaeA* と、多くの EPEC で宿主細胞への接着因子として機能している繊毛遺伝子 *bfpA* を保持しない一方で、腸管凝集性大腸菌 (EAEC) に特徴的な病原性プラスミドを保有することが明らかとなった。HEp-2 細胞を用いて *in vitro* での宿主細胞への接着様式を調べたところ、EAEC に特徴的な凝集性接着能を示したことから、この菌株は STEC と EAEC の両方の特徴を持つ大腸菌であることが明らかとなった。一方、この菌株に存在する *stx2* 遺伝子が、他の STEC 株と同様にファージにコードされている可能性を検討したところ、STEC O157:H7 の典型的な菌株である EDL933 株に溶原化している *stx2* ファージと、構造的、機能的に相同性のあるファージにコードされていることが判明した。以上の知見は、これまで独立したカテゴリーに属すると考えられていた下痢原性大腸菌が、その特徴をそれぞれ組み合わせたタイプとしても存在し、少なくともその一部のものは、ファージあるいはプラスミドの水平伝達によって病原因子を獲得している可能性が強く示唆された。

A. 研究目的

下痢原性大腸菌は、保有する病原因子の種類によって、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、腸管凝集性大腸菌 (EAEC)、腸管侵入性大腸菌 (EIEC)、毒素原性大腸菌 (ETEC)、腸管出血性大腸菌 (EHEC) (または志賀毒素産生性大腸菌 [STEC]) の 5 つに分類される。

1999 年 9 月、鹿児島県で、STEC O86:HNM の感染による、HUS 発症から死亡に至った事例が報告された。血清型として O86 を持つ大腸菌は、これまでその多くが EPEC または EAEC として報告されてきたが、STEC としての報告例は国内外でそれぞれ 1 例ず

つにとどまっております、その詳細な病原性については解析が進められていなかった。そこで我々は、この菌株が保有する病原因子について解析し、その特徴付けを行うことにした。

B. 研究方法

① 菌株

1999 年鹿児島県で単離された STEC O86:HNM (#990599) と、1996 年山形県で患者血便より単離された、同じ血清型の菌株 (#961081) について解析を行った。同時に、H 抗原として様々なタイプを持つ O86 の 12

株、および STEC O157:H7 の典型的な菌株である EDL933 をレファレンス株として用いた。

② PCR

stx1, *stx2*, *eaeA*, *bfpA*, *aggR* 遺伝子とプラスミド pCVD432 の検出用プライマーについて表 1 にまとめた。PCR の反応条件は、各プライマーのリファレンスに記されているものを使用した。

③ サザンハイブリダイゼーション

eaeA の検出には、*eaeA* の N 末端側領域 (異なる菌株間での相同性が高い領域) を含む約 2.6 kb の DNA 断片を EDL933 からクローニングし、プローブとした。*stx2* プローブは、上記の PCR 反応によって EDL933 から増幅した DNA 断片を用いた。*stx2* ファージのプローブは、EDL933 から調製した *stx2* ファージ DNA を *EcoRI* で切断したものを用いた。これらのプローブを DIG detection and labeling kit (ベーリンガー・マンハイム社) を用いてラベリングした。各菌株の染色体 DNA またはファージ DNA を *EcoRI* で切断し、アガロースゲル電気泳動によって分画した後、ナイロンメンブレンに転写し、上記のプライマーとハイブリダイゼーションを行い、検出を行った。

④ Clump formation assay

プラスチック製チューブ内の Muller-Hinton 液体培養上部に形成される clump (菌膜) 形成能の検定は、Albert ら (J. Clin. Microbiol. 31:1397-1399 [1993]) の方法に従った。

⑤ HEp-2 細胞への接着様式の解析

定法に従って培養した HEp-2 細胞に、供試菌の越夜培養液を加え、37℃で 30 分間、5%の CO₂ を含むインキュベーターで培養した。PBS で 3 回洗浄し、メタノールで固定後、ギムザ染色を施し、光学顕微鏡下で接着様式を観察した。

⑥ *stx2* ファージ DNA の精製

ラムダファージ DNA の調製は、O'Brien

ら (Science 226:694-696, [1984]) の方法に従った。

⑦ *stx2* ファージによる溶原菌の作製

stx2 ファージのライセートを各菌株を非誘導条件下で培養した上清から調製した。これを大腸菌 K-12 株である MC1061 と混合し、37℃で 30 分間インキュベートした後、プレーティングした。得られたプラークを爪楊枝で拾い上げ、シングルコロニーを得た。*stx2* ファージの溶原菌であることを上記の *stx2* を検出する PCR によって確認した。

⑧ Phage superinfection assay

溶原菌をマイトマイシン C 存在下で培養後、high-titre のファージライセートを得た。このうち、10⁵ CFU/ml のファージライセートを各溶原菌および MC1061 の lawn にスポットし、37℃で越夜培養後、プラーク形成能を観察した。

C. 研究結果

① 病原因子の保有状況

PCR またはサザンハイブリダイゼーションによって、各菌株が保有する病原因子の同定を行った (表 2)。HUS 患者由来の O86:HNM 株である 990599 株は、STEC および EPEC に特徴的な宿主細胞表層の壊変を引き起こす因子をコードする *eaeA* 遺伝子と、多くの EPEC が宿主細胞への接着に用いる繊毛のコンポーネントをコードする *bfpA* 遺伝子をいずれも保有しないことが判明した。一方、990599 は *stx2* 遺伝子を保持するに加え、EAEC が保有する病原性プラスミド pCVD432 と、EAEC に特異的な繊毛遺伝子群の転写活性化因子をコードする *aggR* を共に保持していることが明らかとなった。このことは、990599 が STEC のみならず、EAEC のカテゴリーにも属する大腸菌であることを示唆するものである。一方、リファレンス株のうち、6 つの株が 990599 株と同じ特徴を持ち、5 つの株が 961081 と

同様に、*aggR*⁺かつ pCVD432 であることが判明した。また、O86:H34 の血清型を持つ E156 株は、*bfpA* と *eaeA* を共に保有している一方、*stx2* に加え、*aggR* と pCVD432 を保有しないことが判明した。このことは、E156 が典型的な EPEC のカテゴリーに属する株であることを示唆するものである。

② 990599 株の培養細胞への接着様式の解析

pCVD432 を保有する菌株の多くは、Muller-Hinton 培地で液体培養を行うと、プラスチック製のチューブ表面に菌膜 (clump) を形成することが知られている。そこで我々は、すべての O86 株について clump 形成能を検討した (表 2)。pCVD432 の存在と clump 形成能は必ずしも平行ではないことが判明したが、少なくとも 990599 株は clump 形成能を保持することが判明した。

990599, 961081, E156 及び EDL933 株について、HEp-2 細胞を用いた接着様式の解析を行った (図 1)。その結果、990599 株は典型的な凝集性接着能を示したが (図 1A)、pCVD432 を保有せず、clump 形成能も示さない 961081 株は、EPEC が示す接着様式の一つである、diffuse adhesion タイプの接着様式を示すことが判明した。一方、E156, EDL933 株では、今回の条件では、いずれも顕著な接着パターンは観察されなかった。

③ 990599 株及び 961081 株の *stx2* ファージの解析

2 つの O86:HNM 株が保有する *stx2* 遺伝子がファージゲノム上に存在するかどうかを検討した。これまでの多くの研究から、STEC に存在する *stx2* 遺伝子の多くはラムドイドファージゲノム上にコードされていることが明らかとなっている。これらのファージは、UV の照射または DNA に損傷を与えるような薬剤の処理によって誘導されることが知られているが、本研究では、まず、両菌株を非誘導条件下で越夜培養した上清を回収し、MC1061 株を指示菌に用いてプラ

ーク形成能を見た。その結果、この条件においても *stx2* ファージが培地中に誘導されていることが判明した。しかし、STEC から誘導される *stx2* ファージの量は、990599 株からは 1.3×10^2 、961081 株からは 4.6×10^1 であるのに対し、EDL933 株からは 1.8×10^4 (単位はいずれも CFU/ml) であった。さらに、MC1061 の溶原菌では、EDL933 から単離した *stx2* ファージ、933W の溶原菌 MC1061 (933W) では 10^4 CFU/ml 以上のファージが非誘導培養条件下で誘導されているのに対し、O86:HNM の 2 つの菌株から単離された *stx2* ファージの溶原菌、MC1061 (ϕ 990599), MC1061 (ϕ 961081) からは、いずれもファージの誘導は観察されなかった。

④ 溶原菌 DNA の比較

O86:HNM から単離された 2 つのファージと 933W ファージの相同性を解析するため、非誘導培養条件下で単離したファージライゼートを用いて溶原菌を作製し、その総 DNA を比較した。MC1061 株、*stx2* ファージの溶原菌、及びファージ 933W の DNA を *EcoRI* で切断後、*stx2* 及び 933W ファージの DNA をプローブとしてサザンブロッティングを行った (図 2)。*stx2* プローブを用いた場合、933W ファージ、MC1061 (933W)、および MC1061 (ϕ 990599) の DNA では約 5 kb の DNA 断片とハイブリダイズしたが、MC1061 (ϕ 961081) では、約 21 kb 付近の DNA 断片とハイブリダイズした (図 2A)。これらのことから、*stx2* ファージゲノム上における、*stx2* 遺伝子周辺の DNA の構造は、933W と ϕ 990599 では類似しているものと予想される。一方、上記 2 つのファージと ϕ 961081 では、周辺の構造は大きく異なるものと考えられる。

933W ファージをプローブとした場合、MC1061 (ϕ 990599) では、いくつかのバンドがハイブリダイズしたが、MC1061 (ϕ 961081) の DNA では、約 21 kb 付近に存在する弱いシグナル以外、ハイブリダイズす

るバンドは認められなかった(図 2B)。従って、933W は ϕ 990599 と相同性のある DNA 断片をいくつか保有しているものの、 ϕ 961081 とはほとんど相同性がないものと考えられる。

⑤ Superinfection immunity assay

MC1061 で作製した溶原菌を用いて、各溶原菌のそれぞれのファージに対する immunity を調べた(表 3)。各ファージは、それぞれ自身の溶原菌ではプラークを形成しないことが観察された。933W ファージは、MC1061(ϕ 990599)の lawn 上ではプラークを形成するが、MC1061(ϕ 961081)の lawn 上ではプラークを形成しなかった。しかし、990599 ファージは自身の溶原菌を除く他の 2 つの溶原菌でプラークを形成し、逆に、961081 ファージは、すべての溶原菌でプラークを作ることが出来なかった。以上の結果より、3 つのファージは、ファージの immunity の観点から、すべて同じではないが、互いに近縁のものである可能性が示唆された。

D. 考 察

本研究から、1999 年 9 月、鹿児島で HUS 患者から単離された STEC O86:HNM 株である 990599 は、STEC だけではなく、EAEC の特徴も持つ菌株であることが判明した。培養細胞への接着能の検定では、同時に解析した STEC タイプの EDL933、EPEC タイプの E156 株では顕著な接着形態を観察することが出来なかった。一般に、EAEC は、培養細胞を用いた接着実験において、STEC および EPEC よりも高い接着能を示すことが知られている。上記の結果は、このことが確認されたものと考えられ、この高い接着能が患者を重症化させる一要因となった可能性が示唆される。

一方、本研究から、O86:HNM 株が保有する *stx2* が、他の STEC でファージゲノム上にコードされていることが明らかになっ

た。この *stx2* ファージは、STEC O157:H7 の菌株の一つである EDL933 から単離された *stx2* ファージ、933W と構造的、機能的に相関性のあるものであった。しかし、990599 株から単離された *stx2* ファージは、990599 株と MC1061 の溶原株の両方において、933W と比較すると、非誘導培養条件では誘導されるファージの量は極めて少なく、安定な溶原ファージとして存在することが明らかとなった。これまでの研究から、Stx2 の培地上清中への分泌量は、菌体内での *stx2* ファージの複製頻度に比例することが示唆されている。従って、990599 株においても、Stx2 産生量は低く押さえられていることが予想され、この仮定が *in vivo* における現象と平行であるとする、先述した培養細胞への接着効率の解析結果から、990599 株は、宿主細胞との接着効率を高めることで、効率よく Stx2 を宿主細胞へ分泌し、高い病原性を維持していることが予想される。しかし、これらの可能性を証明するには、まだ多くの実験データが必要である。

本研究において、990599 株は志賀毒素産生性の腸管凝集性大腸菌であることが判明したが、このことは、これまで単一のカテゴリと考えられていた下痢原性大腸菌が、ファージあるいはプラスミドの水平伝達によって、様々な病原因子を組み合わせたタイプとしても存在し、実際の病原性発動に相乗的あるいは相補的な働きをしていることを示唆する具体例として注目される。今後は、様々な病原因子の総合的な理解が、STEC の治療及び発症予防に重要であると考えられる。

E. 結 論

1. HUS 患者由来の STEC O86:HNM 株は、STEC に加え、EAEC の特徴を示すことが判明した。
2. HUS 由来の O86:HNM 株に存在する *stx2* は、ファージゲノム上にコードされており、

STEC O157:H7 の菌株に溶原化している *stx2* ファージと、構造的、機能的に類似したものであることが判明した。

F. 3ヶ年の研究成果の要約

1. STEC O157:H7 から単離される *stx* ファージの多様性と Stx2 の産生量について

PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) による STEC O157:H7 のゲノム全体のパリエーションの解析から、多様な DNA 構造を持つ菌株が存在することが明らかとなっている。本研究では、これらゲノム DNA の多様性が、*stx* 遺伝子を運ぶファージの多様性にも反映されているかどうかを検討した。その結果、PFGE の型別に対応して、*stx* ファージの多様性が確認される一方、PFGE のパターンが大きく異なるにも関わらず、単離される *stx2* ファージ DNA の構造が非常に類似した例が存在した。アメリカで 1982 年に単離された *stx2* ファージ (933W) の DNA 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。

DNA の構造が異なるいくつかの *stx2* ファージの溶原菌、およびそれぞれの親株である STEC 株における Stx2 の産生量をウエスタンブロットイングによって解析したところ、大腸菌 K-12 株である MC1061 株では親株の STEC 株での場合と比較して、Stx2 の産生量が著しく上昇していることが判明し、この産生量の上昇は、ファージの複製量の増加に起因することが判明した。

2. HUS 患者から単離された STEC O86:HNM とこの株に溶原化している *stx2* ファージの解析

HUS 由来の STEC O86:HNM 株は、これまで単離された STEC とは異なり、腸管凝

集性大腸菌の保有する宿主細胞への接着因子をプラスミド上に保有していることが判明した。この株に溶原化している *stx2* ファージを単離し、その構造及び機能を解析したところ、STEC O157:H7 の EDL933 株に溶原化している *stx2* ファージ (933W) と相同性を持つことが判明した。1. の解析から、933W ファージは、日本国内で単離される STEC O157:H7 のうち、PFGE タイプ I から単離される *stx2* ファージとその構造が非常に類似していることが明らかとなっている。以上の知見から、同様な *stx2* ファージが水平伝達によって宿主を変え、多種多様な病原性を持つ大腸菌に姿を変化させていることが予想される。

今後、他の下痢原性大腸菌に見られる、多種多様な病原性因子に対する総合的な理解が、STEC による感染症の予防、治療にも重要であることが考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- **Iyoda S., A. Wada, J. Weller, S.J.A. Flood, E. Schreiber, B. Tucker, and H. Watanabe.** 1999. Evaluation of AFLP, a high-resolution DNA fingerprinting method, as a tool for molecular subtyping of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *Microbiol. and Immunol.* **43**:803-806.
- **Osawa R., S. Iyoda, A. Wada, S. Nakayama, S. Yamai, and H. Watanabe.** 2000. Genotypic variations of Shiga toxin-converting phages from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *J. Med. Microbiol.*, in press.
- **Iyoda, S., K. Tamura, K. Itoh, H. Izumiya, N. Ueno, K. Nagata, M. Togo, J. Terajima, and H. Watanabe.** Identification and characterization of Shiga toxin2-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O86:HNM associated

with HUS.

J. Clinical. Microbiol., submitted.

2. 学会発表

- ・ **R. Osawa, S. Iyoda, A. Wada, S. Nakayama, S. Yamai, and H. Watanabe.** Variations of Shiga toxin-converting phages from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates.

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

- ・ 伊豫田淳, 大澤朗, 中山周一, 渡辺治雄
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
日本細菌学雑誌, 54:141 (1999).

G. 知的所有権の取得状況

なし

表 1. PCR primer sets used in this study

Target sequences	Amplicon size(bp)	Primer set	Primer sequences(5'-3')	Reference
stx1	348	LP30 LP31	CAGTTAATGTGGTGGGAAGG CACAGACAATGTAACCGCTG	J. C. M. 33:248-250 (1995)
stx2	584	LP43 LP44	ATCCTATTCCCGGAGTTTACG GCGTCATCGTATACACAGGAGC	J. C. M.33:248-250 (1995)
eaecA	489	EAEK1 EAEK4	GCTTAGTGCTGGTTTAGGAT TCGCCGTTTCAGAGATCGC	J. Jpn. Assoc. Infect. Dis. 69:772-776 (1995)
bfpA	326	EP1 EP2	AATGGTGCTTGGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	J. C. M.33:1375-1377 (1995)
aggR	254	AGGRK1 AGGRK2	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAAATCGTCAGCATCAGC	Bull. Dept. Med. Sci.of NIH -Thailand.39:211-220(1995)
pCVD432	630	pCVD432/start pCVD432/stop	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAAATCCCGCTGTT	J. C. M. 33:701-705 (1995)

表 2. Characteristics of tested strains.

Strain No.	Disease Association or source	Serogroup	stx ¹	PCR results					Hybridization with each probe	Clump formation ²
				eeeA	bfpA	aggR	pCVD432			
961081	Bloody diarrhea	O86:HNM	2	-	-	+	-	-	-	-
990599	HUS	O86:HNM	2	-	-	+	+	-	-	+
E153	Diarrhea	O86:H25	-	-	-	+	+	-	-	+
E154	Diarrhea	O86:H2	-	-	-	+	+	-	-	+
E155	Diarrhea	O86:H36	-	-	-	+	-	-	-	-
E156	Diarrhea	O86:H34	-	+	-	-	-	+	-	+
E157	Diarrhea	O86:H47	-	-	-	+	-	-	-	+
322-85	Diarrhea	O86:H17	-	-	-	+	-	-	-	+
123-83	Diarrhea	O86:H27	-	-	-	+	+	-	-	+
96-84	Diarrhea	O86:H21	-	-	-	+	-	-	-	+
85-84	Diarrhea	O86:H7	-	-	-	+	-	-	-	-
980-87	Diarrhea	O86:H27	-	-	-	+	+	-	-	+
1025-87	Diarrhea	O86:H27	-	-	-	+	+	-	-	+
KB26	Diarrhea	O86:H27	-	-	-	+	+	-	-	+
EDL933	Food	O157:H7	1 + 2	+	-	-	-	+	-	ND

¹ Presence of stx gene: 2, stx2-positive; 1+2, stx1 and stx2-positive.

² Clump formation activity: ++, full; +, partial; -, negative; ND, not done.

表 3. Capability of stx2-converting phages to form plaques on each host.

Host strain	Phage lysate spotted:		
	Φ 933W	Φ 961081	Φ 990599
MC1061	+	+	+
MC1061(Φ 933W)	-	-	+
MC1061(Φ 961081)	+	-	+
MC1061(Φ 990599)	-	-	-

Symbols: +, formation of plaques; -, no plaques.