

を持つ株はパターンが若干異なっていた。例えば、*S. sonnei*では、唯一クラス1インテグロンが検出されたSh02002株や異なる遺伝子構成のクラス2インテグロンが検出されたSh04005株、今回薬剤耐性遺伝子が検出されなかったSh02003株では、他の株と明らかに異なるPFGEバンドパターンを示していた。また、*S. flexneri*でも薬剤耐性遺伝子が検出されなかったSh00006株が異なるバンドパターンを示した。

#### D. 考察

今回の解析結果から、近年分離された赤痢菌 (*Shigella* spp.) では、薬剤耐性化が進んでおり、特定の薬剤耐性遺伝子が広く分布していることが明らかになった。特にインテグロンでは、クラス1が稀であったのに対してクラス2は大部分の赤痢菌が保有していた。

また、*S. flexneri*において見つかったESBL遺伝子の一種 *bla*<sub>OXA-30</sub> は、報告例が少なく、2000年に初めて報告された遺伝子である。今回唯一 *bla*<sub>OXA-30</sub> が検出されなかった *S. flexneri* であるSh00006株は、唯一の2000年分離株であり、それ以外の7株は2001年以降の分離株である。この結果は、*bla*<sub>OXA-30</sub> 遺伝子が近年 *S. flexneri* に獲得された遺伝子であることを示唆している。

#### E. 結論

・調べた26株の中で1株のみ (*S.*

*sonnei*) がクラス1インテグロンを保有していた。

・クラス2インテグロンは、26株中20株が保有しており、赤痢菌に広く分布していることがわかった。また、検出されたクラス2インテグロンは、ほとんどが典型的な3つの耐性遺伝子カセットを含んでいたが、1つは例外的に2つの遺伝子カセットのみを含んでいた。

・*S. flexneri*では、ほとんどの株がESBL遺伝子の一種である *bla*<sub>OXA-30</sub> 遺伝子を保有していた。また、サザンハイブリダーゼーションの結果、*bla*<sub>OXA-30</sub> 遺伝子は染色体DNA上に存在していることがわかった。

・PFGEの結果、異なるタイプの薬剤耐性遺伝子が検出された株は、バンドパターンが異なっていることが明らかになった。

#### F. 健康危機情報

*S. flexneri* の間に *bla*<sub>OXA-30</sub> 遺伝子がかかなり広がっている。治療の際に抗生物質 (特にβ-ラクタム剤) を用いる場合は注意を要する。

#### G. 研究発表

1. Ahmed, A. M., Furuta, K., Shimomura, K., Kawamoto, H., and Shimamoto, T.: Characterization of a multidrug-resistant isolate of *Salmonella* Paratyphi B from Japan. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56(1): 250-250a, 2005.
2. Ahmed, A. M., Kawamoto, H.,

Inouye, K., Hashiwata, Y., Sasaki, M., Seno, M., and Shimamoto, T.: Genomic analysis of a multidrug-resistant strain of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 causing a family outbreak in Japan. *J. Med. Microbiol.*, 54(9): 867-872, 2005.

3. Ahmed, A. M., Kawaguchi, F., and Shimamoto, T.: Class 2 integrons in *Vibrio cholerae*. *J. Med. Microbiol.*, in press.

表2 *S. sonnei* の結果のまとめ

No.	Strain Name	Species	Class 1 Integron	Class 2 Integron	CTX-M	CMY	OXA	TEM
1	Sh00005	sonnei	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	Negative	Negative
2	Sh00008	sonnei	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	Negative	Negative
3	Sh00010	sonnei	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	Negative	Negative
4	Sh01003	sonnei	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	Negative	Negative
5	Sh01007	sonnei	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	Negative	Negative
6	Sh01008	sonnei	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	Negative	Negative
7	Sh01009	sonnei	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	Negative	Negative
8	Sh01010	sonnei	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	Negative	Negative
9	Sh01011	sonnei	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	Negative	Negative
10	Sh01012	sonnei	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	Negative	Negative
11	Sh02002	sonnei	<i>sat, aadA2</i>	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
12	Sh03001	sonnei	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	Negative	Negative
13	Sh03002	sonnei	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	Negative	Negative
14	Sh04005	sonnei	Negative	<i>dfrA1, sat1</i>	Negative	Negative	Negative	Negative
15	Sh04010	sonnei	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	Negative	Negative
16	Sh02001	sonnei	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	Negative	Negative
17	Sh02003	sonnei	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative

表3 *S. flexneri* と *S. boydii* の結果のまとめ

No.	Strain Name	Species	Class 1 Integron	Class 2 Integron	CTX-M	CMY	OXA	TEM
18	Sh01002	flexneri	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	OXA-30	Negative
19	Sh04006	flexneri	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	OXA-30	Negative
20	Sh04007	flexneri	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	OXA-30	Negative
21	Sh04008	flexneri	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	OXA-30	Negative
22	Sh04009	flexneri	Negative	<i>dfrA1, sat1, aadA1</i>	Negative	Negative	OXA-30	Negative
23	Sh00006	flexneri	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
24	Sh01005	flexneri	Negative	Negative	Negative	Negative	OXA-30	Negative
25	Sh01006	flexneri	Negative	Negative	Negative	Negative	OXA-30	Negative
26	Sh00007	boydii	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative

課題名：腸管出血性大腸菌の産生する志賀様毒素の受容体親和性と病原性の解析

分担研究者 清水 健・筑波大学大学院・人間総合科学研究科

協力研究者 濱端 崇・国立国際医療センター研究所

研究要旨：

腸管出血性大腸菌が産生する志賀様毒素には志賀様毒素1 (Stx1)と志賀様毒素2 (Stx2)が存在しており、Stx2の方がStx1よりもマウスに対する病原性が高いことが知られている。しかしながら、Stx1の方がStx2よりも受容体に対する親和性は高い。そこで我々はStx1とStx2の病原性と受容体に対する親和性との関係を明らかにするために、Bサブユニットの置換変異ホロ毒素を作製し、検討をおこなった。その結果、受容体との親和性が上昇した置換変異Stx2の病原性はStx2と比較して大幅に低下した。このことから、志賀様毒素の病原性と受容体親和性との間には逆相関の関係が存在することを明らかにした。

研究目的

腸管出血性大腸菌(EHEC)の主要な病原因子は志賀様毒素であり、志賀様毒素には志賀様毒素1 (Stx1)と志賀様毒素2 (Stx2)の2種類が存在している。これらの毒素は構造的にも機能的にも非常によく似ており、アミノ酸レベルにおいて60%程度の相同性が存在する。各々の毒素は共に1つのAサブユニットと5つのBサブユニットより構成されており、AサブユニットはRNA N グルコシダーゼ活性を持ち、リボゾームを失活させることによってタンパク質合成を阻害する。一方、Bサブユニットは5量体を形成する

ことによって毒素受容体であるGb3に結合する活性を保持する。

疫学的な研究から、Stx2を産生するEHECの方がStx1を産生するEHECよりも重症化に関係していることが示唆されている。このことは病原因子としてStx2の方が重要であることを示している。また、Stx2の方がStx1よりもマウスに対する致死活性が約400倍強いことも報告されている。しかしながら、Stxの受容体であるGb3に対する親和性はStx1の方がStx2よりも10倍ほど高いことが知られている。これらの結果からStx2のより高い病原性にはStx1よりも低

い受容体に対する親和性が関与していることが考えられた。

そこで我々は Stx1 と同様な受容体に対する親和性を持った変異 Stx2 を作製し、その病原性を検討することによって、志賀様毒素の病原性と受容体親和性との関係を明らかにする。

## 研究方法

### キメラ Stx2B 遺伝子およびキメラ Stx2 遺伝子の作製

Stx2B のある領域を Stx1B のものに置換したキメラ Stx2B 遺伝子の作製には二段階 PCR 法を用いた。

### Gb3 に対する親和性の解析

キメラ Stx2B の Gb3 に対する親和性の解析には Gb3 を ELISA plate に固層化して行う Gb3-ELISA 法を用いた。

### 細胞結合性解析

Vero 細胞あるいは Caco-2 細胞と各種 B サブユニットおよびホロ毒素を反応させ、細胞表面に結合している B サブユニットあるいはホロ毒素を一次抗体として anti Stx1BH+Stx2BH antiserum あるいは anti Stx2 antiserum、二次抗体として anti rabbit IgG Alexa 488 を用いて検出し、共焦点レーザー顕微鏡によって観察する。

### マウスを用いた致死活性の測定

マウスにいろいろな濃度の毒素を腹腔内投与し、半数のマウスの死亡する濃度を算出し、LD50 とする。

## 研究結果

Stx2 の B サブユニットを基本として、Stx1B と同様な結合活性を示す変異 Stx2B を作製するために、Stx2B の特定領域を Stx1B のものに置換し、C 末端に HisTag を付加したキメラ Stx2BH の作製を行った (図 1)。

Stx2BH(I)は 1-8 残基を Stx1B のものに置換した。同様に、Stx2BH(II), Stx2BH(III), Stx2BH(IV), Stx2BH(V)はそれぞれ 9-16 残基、17-31 残基、36-45 残基、48-70 残基を Stx1B のものに置換した。また、Stx2BH(III V)は 17-31 残基と 48-70 残基を Stx1B のものに置換した。

まず最初に、これらのキメラ Stx2BH が Stx1BH および Stx2BH と同様な立体構造を形成しているかを確認するために、Stx1BH と Stx2BH を抗原とした作製した抗血清との反応性を検討した (図 2)。その結果、Stx2BH(IV)と Stx2BH(V)は有為に反応性が低下していた。このことはキメラ作製によって Stx2BH(IV)と Stx2BH(V)は共通の立体構造の構築が行われなかったことを示していた。

次に、キメラ作製による五量体形成の確認を行うために、各々のキメラ Stx2BH 分子の大きさをゲル濾過法によって測定した (図 3)。その結果、Stx1BH(I)は五量体を形成していないことが示唆された。ただし、Stx1BH と Stx2BH を含めた B サブユニットのみでは五量体形成は安定でないことも示唆された。

次に、キメラ作製による受容体分子である Gb3 との親和性について、Gb3 を ELISA plate に固相化して行う Gb3-ELISA 法によって確認した (図 4)。その結果、Stx2BH(I) と Stx2BH(II)は Gb3 結合活性を失っていた。Stx2BH(III), Stx2BH(IV), Stx2BH(V)は共に Gb3 に対する結合活性は保持していたが、Stx1BH のレベルには達していなかった。しかしながら、I の領域と III の領域両方を置換した Stx2BH(III V)は Stx1BH とほぼ同じレベルの親和性を示した。そこで、Stx2BH(III V)が細胞表面にも Stx1BH と同様に結合するかどうかを確認した。

その結果、Gb3 との親和性と同様に Stx2BH(III V)は Stx1BH と同程度に細胞表面に結合していることが確認できた。このように、Stx2B を基本として領域の置換によって Stx1B と同様な結合性を示す変異 B サブユニットを作製することができた。

そこで、この B サブユニットを持ったホロ毒素の毒素活性を明らかにするために、Stx2 の A サブユニットと Stx2B(III V)を同時に発現させた変異 Stx2 を作製した。また、Stx2 の A サブユニットと Stx1 の B サブユニットの組み合わせのハイブリッドホロ毒素(Stx2A1B)も作製した。これらのホロ毒素と Stx1 および Stx2 の Gb3 に対する親和性を Gb3-ELISA によって比較した (図 5)。その結果、すでに報告されているように Stx1 がこの中では最も Gb3 に対する親和性が高く、その次が Stx2A1B と Stx2A2B(III V)であった。Gb3 に対する結合を司る B サブユニットが同じでも Stx1 と Stx2A1B では親和性に違いがあった。このことは Stx2 の A サブユニットが B サブユニットの結合性に影響を与えていることを示唆している。また、Stx2 はこの中では一番 Gb3 に対する親和性は低かった。

Vero 細胞表面への結合性を検討したところ、Gb3 の親和性と同様な結果であった。また、Caco-2 細胞表面への結合性を解析したところ、Stx2A1B と Stx2A2B(III V)は同じ結合特性を保持していることが明らかになった。

このような結果から、Stx1 の B サブユニットを保持したホロ毒素と同様な結合活性を保持した変異 Stx2 を作製できたことが示された。そこでこ

れら結合性の異なるホロ毒素の病原性をマウスを用いた致死活性を基にして解析した(表1)。

その結果、Stx2 が最も病原性が高く、LD50 はおよそ 3 ng、それ以外のホロ毒素の LD50 は少なくとも 300 ng 以上であることが明らかになった。これらの結果から、志賀様毒素の病原性は受容体である Gb3 への親和性と逆相関の関係があることが明らかになった。

#### 考察

Stx1 と Stx2 はすでに詳細な立体構造が報告されており、構造的に非常によく似ていることが知られている。今回、B サブユニットのキメラを作製したが、領域の設定には報告されている立体構造の情報に基づいて2次構造単位ごとに行った。しかしながら、抗 Stx1BH+Stx2BH 抗血清との反応性から、IV と V の領域を Stx1 のものに置換した Stx2BH(IV)と Stx2BH(V) は全体的な共通の立体構造が保持されていなかったことが示されている。また、結果には示さなかったが Stx2B(V)と Stx2A との組み合わせのホロ毒素は精製することができなかった。このことは Stx2B(V)の A サブユニットとの結合部位に置換変異によって構造的な変化が生じていたことを示すものである。

ゲル濾過によって作製した B サブユニットの分子量を測定したが、いくつかの分子量が混在していた。このことは五量体形成がそれほど安定でないことを示していた。精製したホロ毒素はゲル濾過では一つのピークとして検出された。このことから、志賀様毒素における A サブユニットの役割はホロ毒素形成の安定化に参与していることが考えられた。

Stx2BH(I)と Stx2BH(II)はともに Gb3 に対する結合活性を失っていた。おそらく、Stx2BH(I)は五量体を形成することができなかつたために結合活性を完全に失ったと思われる。しかしながら、Stx2BH(II)に関しては明確な理由は推測できなかった。

III, IV, V の領域を置換した B サブユニットは Stx1BH の Gb3 に対する結合のレベルには達しなかったが、III と V の領域を置換した Stx2BH(III V) は Stx1BH と同様な結合性を示した。X線解析の結果から、Gb3 アナログと B サブユニットとの結合様式は詳細に検討されており、III と V の領域が Gb3 アナログと接していることが明らかになっている。したがって、Stx1BHと同様な結合レベルを保持するには少なくとも二ヶ所の領域に変異を導入することが必要だと思われる。

Stx1 と Stx2A1B では Gb3 に対す

る親和性は異なっていた。このことはすでに Stx2 の詳細な立体構造の解析から予想されるとおりであった。解析結果は Stx2 の A サブユニットの C 末端が B サブユニットの受容体結合部位の一つをふさいでしまうことを明らかにしており、このことが Stx1 と Stx2 の親和性の違いに関与していることを示唆していた。Stx1 の A サブユニットではその様なことは起きていないことは明らかになっている。

Stx1 は Gb3 カラムなどのアフィニティークロマトグラフィーで精製できるが、Stx2 は同様な方法では精製できないことが知られている。今回作製した変異ホロ毒素 Stx2A2B(III V) とハイブリッド Stx2A1B もアフィニティークロマトグラフィーで精製することが可能であった。

Caco-2 細胞を用いることによって受容体に対する親和性と特異性の違いを明らかにすることが可能であることを見いだした。これは Caco-2 細胞には異種性が存在することにより、同一集団中の細胞に置いても受容体の発現に関しても異なっているからである。この系を使用しても Stx2A1B と Stx2A2B(III V) は同一の結合性を示したことから、Stx2A2B(III V) の受容体に対する親和性と特異性は Stx2A1B と同一であることが示された。

動物実験の結果から、志賀様毒素では親和性の低い Stx2 の方がマウスに対する病原性は高い。親和性を低下させた変異 Stx2, Stx2A2B(III V), では大きく病原性が低下していた。このことに関して以下のような考え方が現在の主流である。すなわち、Stx1 はその高い受容体への親和性によって感染部位である腸管上皮細胞に強く結合し、腸管上皮細胞にダメージを与え、その結果出血性の下痢を生じさせる。一方、Stx2 はそのそれほど高くない受容体への親和性によって、腸管上皮細胞にそれほど結合しなく、血流に入り、単球に結合することによって、受容体を高度に発現している腎臓に運ばれ、そこに傷害を起こすことによって、溶血性尿毒症症候群(HUS)を引き起こすことが考えられている。ただ、HUS などの重症化には LPS の関与等も指摘されていることから、他の要因も考えられる。しかしながら、少なくとも志賀様毒素のマウスにおける病原性には受容体への親和性に関して逆相関の関係があることが明らかになった。

#### 結論

マウスを用いた動物実験から、Stx2 のより高い病原性には Stx1 よりも低い受容体に対する親和性に関与していることが明らかになった。おそらく、

この結果は人における Stx2 を産生する EHEC がより高い病原性を保持していることに関しての有用な情報の一つになると思われる。

研究発表

Takeshi Shimizu, Satomi Kawakami, Takashi Hamabata, Toshiko Ohta and Hideo Hayashi  
 Analysis of binding between Shiga-like toxin 1 and 2 by B-subunit chimeras  
 Fortieth Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections  
 (Boston University, Boston, November 30 - December 2, 2005)

清水 健、濱端 崇、川上怜美、林 英生、太田敏子  
 志賀様毒素の受容体認識決定領域の解析  
 第52回毒素シンポジウム(2005年7月、宮城、秋保温泉)

清水 健、濱端 崇、竹田美文、林 英生、太田敏子  
 腸管出血性大腸菌が産生する志賀様毒素の認識性の解析  
 第78回 日本細菌学会総会(2005年4月、東京、タワーホール船堀)

表1 マウスを用いた各々のホロ毒素の病原性の比較

Toxin	LD50 (ng)
Stx1	>300
Stx2A1B	>300
Stx2A2B(III V)	>300
Stx2	3

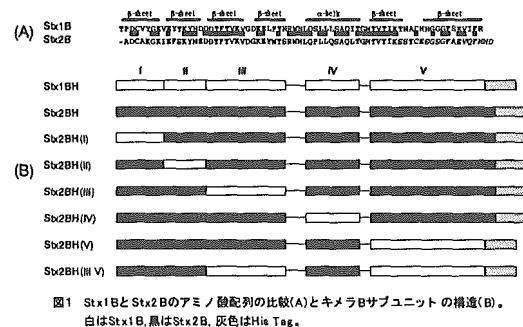


図1 Stx1BとStx2Bのアミノ酸配列の比較(A)とキメラBサブユニットの構造(B)。白はStx1B、黒はStx2B、灰色はHis Tag。





図2 キメラBサブユニットと抗Stx1BH+Stx2BH抗血清との反応性

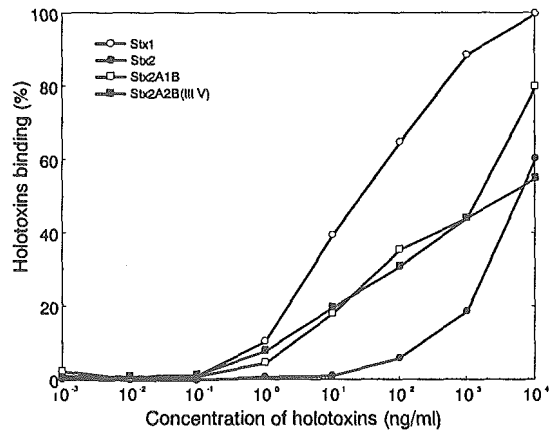


図5 キメラホロ毒素のGb3との親和性の比較

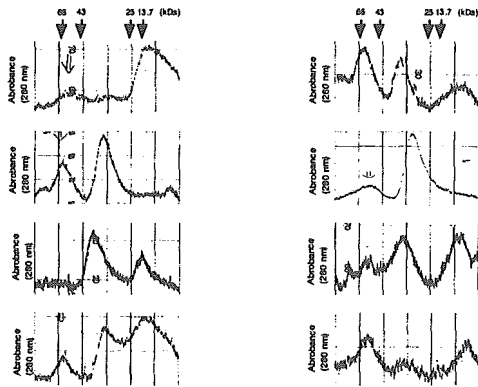


図3 キメラBサブユニットの分子量の測定

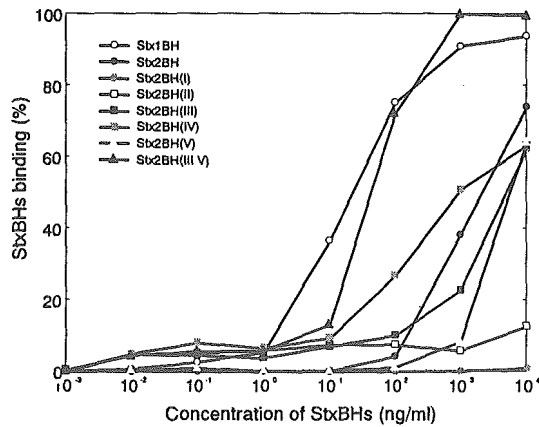


図4 キメラBサブユニットのGb3との親和性の比較

## 毒素原性大腸菌のLTの変異毒素と死菌BCGの経鼻投与によるBCGに対する細胞性免疫の誘導の解析

辻 孝雄

藤田保健衛生大学医学部微生物学教室

### 研究要旨

毒素原性大腸菌の産生する下痢毒素(heat-labile enterotoxin; LT)は他の抗原と同時に経鼻投与すると粘膜アジュバント効果を発揮する。我々の作成した変異毒素(mLT)は他の抗原に対するTh1/Th2バランスをTh1に傾倒させる。そこで、細胞性免疫が感染防御に重要とされるBCGに対し、mLTが死菌BCG(killed BCG;k-BCG)併用で有効なBCGに対する細胞性免疫を誘導するか検索した。その結果以下の点を明らかにした。

mLTはk-BCGに対する細胞性免疫を増強した。しかも感染防御に重要なT細胞からのIFN $\gamma$ 産生と、肉芽腫形成に重要なTFN $\gamma$ 産生が増強した。従って、mLTとk-BCGの同時経鼻投与により結核に対する有効なサブユニット経鼻ワクチン効果を惹起できる可能性が示唆された。しかし、BCGの不活化に伴いBCGの重要抗原のAg85Bが欠落した。

### A. 研究目的

毒素原性大腸菌の産生する下痢毒素(heat-labile enterotoxin;LT)はコレラ毒素と同様に激しい下痢活性を持っている。さらに、他の抗原と同時にマウスなどに経鼻投与すると粘膜アジュバント効果を発揮する。我々の既に報告したLTの変異毒素(mLT)は水痘ウイルスワクチン、岡株に対し、細胞性免疫を優位に上昇させる。これは、mLTが、水痘ウイルスワクチンなどの他の抗原に対し特異的に反応するT細胞のTh1/Th2バランスをTh1に傾倒させることを示している。すなわち、同時投与抗原に対する細胞性免疫をmLTは増強すると考えられる。

そこで、細胞性免疫が感染防御に重要とされる細胞内寄生菌の結核の生ワクチン株BCGに対し、細胞性免疫を増強するかを検索した。

しかしながら、一般に生BCGワクチンを経鼻投与するとcompromised hostの場合、重症の肺感染症が起こると報告されている。そこで、将来経鼻投与を目的とする場合、生BCGは経鼻ワクチンとして適さない。そこで、熱処理して死菌化したBCG(killed BCG;k-BCG)に対して、mLTが経鼻同時投与で有効な細胞性免疫を誘導するか検索することにより、経鼻BCGワクチンの可能性を検索した。さらには、すでにBCGを熱処理するとAg85B

などの重要抗原が欠失するといわれているが、同抗原に対して経鼻 k-BCG ワクチンが細胞性免疫を惹起できるかを検索した。

## B. 研究方法ならびに結果

### 1) Footpad test による細胞性免疫の誘導の検索

Footpad test は既に報告されている方法に準じて行なった。経鼻免疫した ICR マウスに1ヶ月後 footpad に BCG を投与して、24 時間後に footpad の厚みを測定した。

その結果、mLT+生菌 (live BCG (l-BCG),  $10^5$  PFU) または死菌 BCG (k-BCG,  $10^6$  PFU) で1回経鼻投与したマウスは、k-BCG に対し Footpad 試験で陽性を示した。mLT+live BCG 免疫は mLT+killed-BCG に比べ高い DTH を示した (表1)。

表 1

Immunization	antigen BCG (PFU)	adjuvant mutant (mg)	Thickness of footpads (mm)
PBS	-	-	2.75±0.44 a
Mutant (mLT)	-	10	2.70±0.37 a
Killed BCG	$10^5$	-	2.67±0.20 a
	$10^6$	-	2.76±0.11 a
	$10^7$	-	2.84±0.20 a
Killed-BCG+mLT	$10^5$	10	3.16±0.38 a
	$10^6$	10	3.97±0.47 a *
	$10^7$	10	4.04±0.41 a *
Live BCG	$10^5$	-	2.75 ± 0.38 b
	$10^6$	-	2.90 ± 0.24 b
Live BCG+mLT	$10^5$	10	3.06 ± 0.43 b
	$10^6$	10	4.79±0.31 b *

a,  $10^6$  killed BCG was injected into footpads.  
b,  $10^6$  live BCG was injected into footpads.  
\* <0.05

### 2) mLT+killed-BCG 免疫で惹起された l-BCG に対する細胞性免疫は l-BCG に対する感染予防効果があるか

感染予防実験は既に報告されてい

る方法に準じて行なった。C3H/He マウスを経鼻免疫して1ヶ月後  $10^5$  個の BCG を静脈注射して、2週間後の脾臓の BCG 菌数を測定した。培養は 5 mg/ml bovine albumin, 4 mg/ml catalase, 0.2 % glycerol, 2mg/ml glucose, 0.85 % NaCl と 0.05 mg/ml oleic acid を含む Middlebrook 7H11 agar plates で行なった。その結果、表2に示すように、mLT+l-BCG および mLT+k-BCG で免疫した C3H/He マウスでは感染が低下した。

表 2

Nasal immunization	antigen	adjuvant	amount of bacteria in spleen ( $\times 10^4$ ) <sup>a</sup>
	BCG (PFU)	mutant (mg)	
PBS	-	-	6.13±2.87
Mutant (mLT)	-	10	5.02±0.47
Killed BCG	$10^6$	-	4.86±1.86
	$10^6$	10	2.25±2.36 *
Live BCG	$10^6$	-	4.55 ± 1.87
	$10^6$	10	2.57 ± 1.15 **

a, values are means for 6 or 8 mice.

\*, a value (mean±SD) significantly smaller than for killed BCG alone ( $p < 0.05$ ).

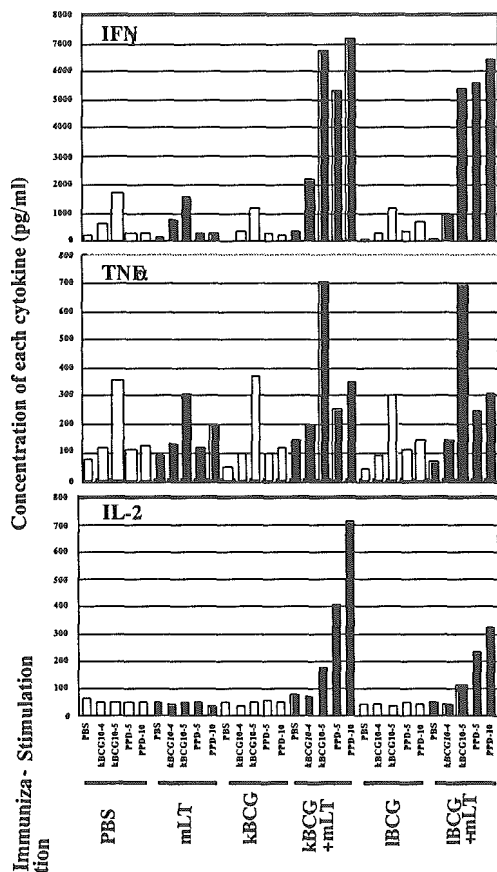
\*\*, a value (mean±SD) significantly smaller than for live BCG alone ( $p < 0.05$ ).

### 3) mLT+生 (l-) または死菌 (k-) BCG で免疫した C3H/He マウスの脾臓細胞を k-BCG, PPD で in vitro で刺激した場合の IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ 産生

生または死菌 BCG+mLT で免疫した C3H/He マウスから既報に従い脾臓細胞をとり、in vitro で k-BCG, PPD で刺激した。24 時間後の培養上澄み液のサイトカイン産生を ELISA-kit で測定した。その結果、mLT + l- または k- BCG で免疫したマウスの両方の脾臓細胞は、k-BCG, PPD 共に反応して IL-2, IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  産生した (図1)。これは、mLT+ l- または k-BCG で免疫したマウス共に細胞性免疫が惹起されていることを示し、しかも結

核感染予防に重要な IL-2, IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  産生が認められた。しかしながら IL-4 の産生は認められなかった。

図 1



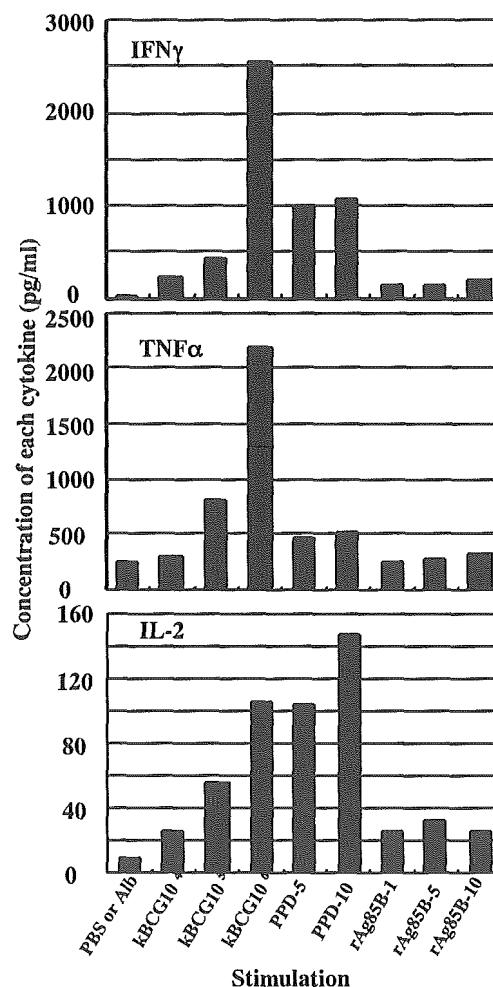
4) 結核抗原 Ag85B の recombinant 作成  
結核抗原として重要な Ag85B の遺伝子をサブクローニングして GEX vector に挿入し、BL21 菌に形質転換後、IPTG 存在下で過剰産生した。そして、recombinant Ag85B の精製を行なった。精製標品は SDS-PAGE で1本のバンドを示した。

5) mLT+k-BCG で免疫した C3H/He マウスの脾臓細胞から精製した CD4+ T 細胞を k-BCG, PPD, Ag85B で in vitro で刺激し

た場合の IL-2, IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  産生の検索

図 2 に示すように、kit で精製した CD4+T 細胞を in vitro で各々の抗原刺激した結果、k-BCG, PPD の場合、明らかに IL-2, IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  産生が認められた。しかしながら、Ag85B に対してはほとんど反応が認められなかった。

図 2

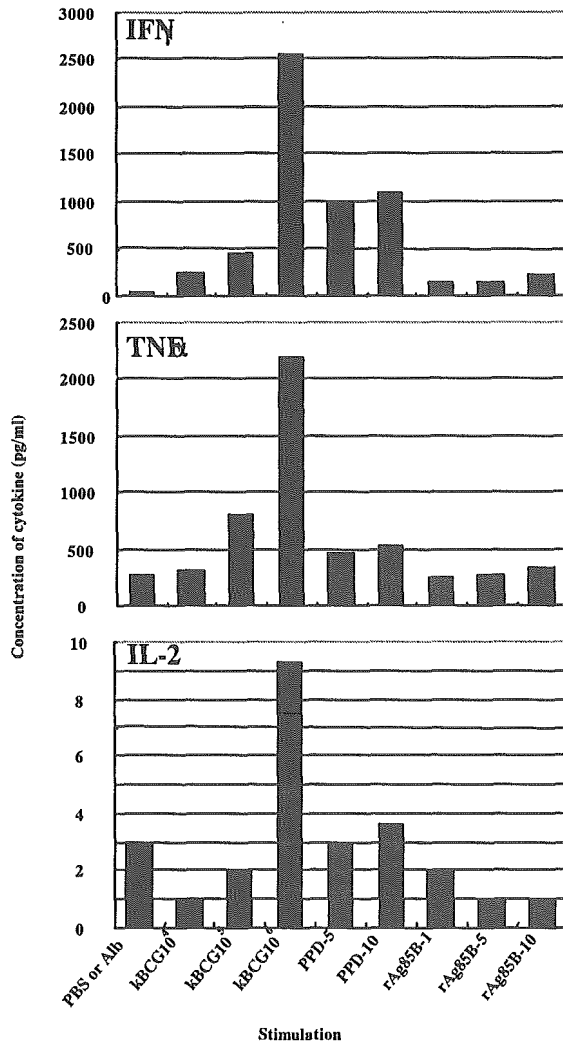


6) mLT+k-BCG で免疫した C3H/He マウスの脾臓細胞から精製した CD8+ T 細胞を k-BCG, PPD, Ag85B で in vitro で刺激した場合の IL-2, IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  産生

CD4+T 細胞と同様に kit で CD8+ T 細胞を精製し、in vitro で k-BCG, PPD,

Ag85B で刺激した。図 3 が示すように明らかに IFN  $\gamma$ 、TNF  $\alpha$  産生が認められた。

図 3



#### 7) IFN $\gamma$ 産生性 CD8+ T 細胞の perforin, Fas L 産生性について

FACS を用いて、CD8+ T 細胞の perforin 及び FasL 産生性を調べたところ、IFN  $\gamma$  産生性の CD8+T 細胞はほとんどが perforin 非産生性であった。しかしながら、IFN  $\gamma$  産生性の CD8+T 細胞の一部は FasL の陽性を示した。

#### C. 考察

mLT は同時経鼻投与した抗原に対し細胞性免疫を増強すると報告してきた。そこで、今回細胞性免疫が感染防御に重要とされる細胞内寄生菌の結核に対する生ワクチン、BCG に対し、細胞性免疫を増強するかを検索した。しかし、1-BCG ワクチンを経鼻投与すると compromised host では、重症の肺感染症を起こすことがある。そこで、熱処理して死菌化した BCG に対して、mLT が経鼻同時投与で有効な細胞性免疫を誘導するかを検索した。

その結果、感染防御可能な細胞性免疫が経鼻 mLT+k-BCG ワクチンで惹起されることを明らかにした。しかも、経鼻 mLT+k-BCG ワクチンにより感染防御に重要な IFN  $\gamma$  及び TNF  $\alpha$  産生性 CD4, CD8 陽性細胞が惹起していることを明らかにした。一方、結核抗原として重要な Ag85B が熱処理で欠損していた。従って、熱処理により欠損した重要抗原を mLT+k-BCG ワクチンに補うことによりより一層有効な経鼻 mLT+k-BCG ワクチンの作成の可能性が示唆された。

#### D. 結論

mLT を粘膜アジュバントとして用いた経鼻 k-BCG ワクチンにより、結核感染予防に有効な細胞性免疫を惹起することができる。但し、熱処理により Ag85B などの重要抗原が欠失する。そこで、これらの補填によりより有効な経鼻 mLT+k-BCG ワクチンの可能性が示唆される。

#### E. 健康危機情報

最近、生 BCG ワクチンの有効性が疑問視されている。そこで、感染防御に重要な抗原を補填した経鼻 mLT+k-BCG ワクチンを頻回、手軽に投与することにより、感染防御に必要な細胞性免疫を常に高い状態に保てるかも知れない。

#### F. 研究発表

(1) Li Y, Okamoto K, Takahashi E, Miyoshi S, Shinoda S, Tsuji T, and Fujii Y. A hemolysin of *Vibrio mimicus* (VMH) stimulates cells to produce ATP and cyclic AMP which appear to be secretory mediators, *Microbiology and Immunology*, 49(1):73-78, 2005

(2) Shimizu T, Sasaki K, Kato M, Arimitsu H, Ochi S, Shigemori N, Wasito E.B, Yokochi T, Tsuji T. Induction of thymus-derived  $\gamma \delta$  T cells by *Escherichia coli* enterotoxin B-subunit in peritoneal cavity of mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 12.157-164. 2005.

(3) Shimizu T, Sasaki K, Kato M, Arimitsu H, Ochi S, Yano T, Oguma K, Yokochi T, Tsuji T. A mutant of *Escherichia coli* enterotoxin inducing a specific Th1-type of T cells to varicella-zoster vaccine enhances the production of IL-12 by IFN $\gamma$ -stimulated macrophages. *Vaccine*. 19; [Epub ahead of print], 2005

(4) Yamanaka H, Ishibashi D, Yamaguchi N,

Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Arakawa T, Tsuji T, Katamine S, Sakaguchi S. Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Vaccine*. Jan 17; [Epub ahead of print], 2006

(5) Takahashi H, Sasaki K, Takahashi M, Shigemori N, Honda S, Arimitsu H, Ochi S, Ohara N and Tsuji T. Mutant *Escherichia coli* enterotoxin as a mucosal adjuvant induces specific Th1 responses of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells to nasal killed-Bacillus Catmette-Guerin in mice. *Vaccine*. in press 2006.

平成17年度厚生労働科学研究費国際医学協力研究事業分担研究報告書

課題名：同一下痢患者から分離される腸炎ビブリオ菌株の多様性

分担研究者 西淵光昭 京都大学 東南アジア研究所  
協力研究者 Phuangthip Bhoopong ソンクラ大学理学部、京都大学 東南アジア研究所  
協力研究者 Prasit Palittapongarnpim マヒドン大学理学部  
協力研究者 Muhammad Kamruzzaman 京都大学大学院 医学研究科  
協力研究者 石橋正憲 大阪府立公衆衛生研究所  
協力研究者 中口義次 京都大学 東南アジア研究所  
協力研究者 Varaporn Vuddhakul ソンクラ大学理学部

研究要旨：

タイ南部ハジャイ市内のハジャイ病院にて 2003 年から 2004 年の期間に下痢患者の rectal swab（綿棒）を 63 検体入手し、1 検体から腸炎ビブリオ菌株をランダムに 10 株分離し、性状（GS-PCR、ORF 8、*tdh* 遺伝子型、*trh* 遺伝子型、血清型）を検査した。同一検体から分離した 10 菌株とも同一性状を示した検体数は 42、異なる性状を示す菌株が含まれていた検体数は 21 であった。DNA フィンガープリント解析の結果も含めると、同一検体中に病原性菌株と非病原性菌株が混在する可能性および病原性菌株からの病原遺伝子（*tdh* または *trh*）の脱落の可能性を支持する結果が得られた

A. 研究目的

海産物の摂食を介して発生する腸炎ビブリオ感染症は、我が国では重要な食中毒の 1 つである。研究分担者らは、1995 年頃にアジアで腸炎ビブリオ新型クローンが出現し、このクローンに属する菌株による感染症がアジア諸国や米国で発生し、世界的大流行が起こっていることを報告した。現在でも流行の勢いは衰えず、最近になって南米、ヨーロッパ、およびアフリカでも同じクローンに属すると思われる

菌株による感染症が報告された。分担研究者らは、特にタイ南部で新型クローンに属する菌株による感染症が多発していることを重視し、現地で魚介類の調査を行うとともに、患者の発生動向に関する調査も継続している。その結果、分担研究者らは、最近の患者分離菌株の一部に腸炎ビブリオの主たる病原遺伝子である *tdh*（耐熱性溶血毒）遺伝子または *trh*（*tdh* 類似）遺伝子を保有しない菌株が存在し、そのような菌株が増加しつつあること

に気づいた。このような菌株が患者から分離される理由としては、以下の可能性が考えられる。(1) 患者のサンプル（糞便）中に病原性菌株（*tdh* 遺伝子、*trh* 遺伝子、あるいは両遺伝子を保有）と非病原性菌株（*tdh* 遺伝子も *trh* 遺伝子も保有しない）が混在し、非病原性菌株のみが分離される。(2) 患者中の病原性菌株から病原遺伝子（*tdh* または *trh*）が脱落する。(3) 既知の病原遺伝子（*tdh*、*trh*）以外の重要な病原遺伝子を保有する菌株が存在する。

分担研究者らは、(1) または (2) の可能性が高いと考え、本研究ではこの点を明らかにすることを目的として研究を実施した。

## B. 研究方法

1) 菌の分離・同定： タイ南部ハジャイ市内のハジャイ病院にて 2003 年から 2004 年の期間に下痢患者の rectal swab（綿棒）を入手し、TCBS 寒天培地上に接種（画線）した。37 度で培養し、生育してきた緑色の腸炎ビブリオ様集落をランダムに 10 個分離して、それぞれを生化学性状検査に供して、菌種の確認をした。さらに、*toxR* 遺伝子を標的とした PCR 法によって菌種の同定を再確認した<sup>1)</sup>。

2) 遺伝子型別： 各分離菌株について、PCR 法によって病原遺伝子（*tdh* または *trh*）の有無を調べた<sup>2)</sup>。新型クローンに属するか否かを GS-PCR 法（*toxRS* オペロン中で、新型クローンに

特性的な塩基置換を標的)<sup>3)</sup> および ORF8（ファージ f237 ゲノムの ORF の 1 つで、新型クローンに特性が高いとされる）<sup>4-6)</sup> について検査した。

3) 血清型別： 定法（特異抗血清との凝集試験）によって O:K 血清型を決定した。

4) DNA フィンガープリント： 必要に応じて、代表菌株の DNA フィンガープリントを arbitrarily primed PCR (AP-PCR) 法<sup>7)</sup> およびパルスフィールドゲル電気泳動法<sup>8)</sup> によって比較解析した。

## C. 研究結果

検査した総検体数は 63 で、そのうち同一検体から分離した 10 菌株とも同一性状を示した検体数は 42、同一検体から分離した 10 菌株中に異なる性状を示す菌株が含まれていた検体数は 21 であった。

10 菌株とも同一性状を示した 42 検体から分離した菌株の 83% はパンデミッククローンに属する菌株 (GS-PCR +) で、そのうち O3:K6 血清型が最も多く、ORF8 陰性株も多かった (40%)。また 3 検体からは、非病原性菌株 (*tdh*-, *trh*-) のみで、すべて同一の血清型 (O11:KUT) に属する菌株が分離された。

同一検体から分離した 10 菌株中に異なる性状を示す菌株が含まれていた 21 検体の中には、表 1 に示したように様々な性状について異なる菌株が混在していた。要点をまとめると以



下のようになる。

- 1) GS-PCR の結果のみが異なる菌株
- 2) GS-PCR の結果および血清型(2~4種類)が異なる菌株
- 3) ORF 8 の結果のみが異なる菌株
- 4) *tdh* 遺伝子型または *trh* 遺伝子型が異なる菌株：*tdh*<sup>+</sup> *trh*<sup>-</sup> 株および *tdh*<sup>-</sup> *trh*<sup>-</sup> 株が混在；*tdh*<sup>-</sup> *trh*<sup>+</sup> 株および *tdh*<sup>+</sup> *trh*<sup>+</sup> 株が混在；*tdh*<sup>+</sup> *trh*<sup>+</sup> 株および *tdh*<sup>+</sup> *trh*<sup>-</sup> 株が混在
- 5) 血清型のみが異なる

これらの組み合わせを示すものから代表検体を選び、分離菌株の DNA フィンガープリントを比較した。2) については、分離菌株の血清型にかかわらず GS-PCR の結果とフィンガープリントが一致した。したがって、*in vivo* で血清型が変化した可能性が示唆された。3) については、ORF8 の有無にかかわらずすべて同一のフィンガープリントを示した。したがって、*in vivo* で ORF8 が脱落した可能性が考えられる。4) については、*tdh* 遺伝子の有無にかかわらずすべて同一のフィンガープリントを示した。このことから、*in vivo* で *tdh* 遺伝子が脱落した可能性が示唆された。5) については、血清型の違いにかかわらずすべて同一のフィンガープリントを示した(図1)。したがって、*in vivo* で血清型が変化した可能性が考えられる。

#### D. 考察

21 検体の中には、様々な性状について異なる菌株が混在していたが、そのうち、血清型も遺伝子型も異なる菌株が混在していた検体では、異なる種類の腸炎ビブリオ菌株による多重感染の可能性を強く示唆している。

単一の性状についてのみ異なる菌株については、DNA フィンガープリントを確認することにより、同一の菌株から *in vivo* で派生型が生じたという可能性を検証した。*tdh* 遺伝子または ORF8 の有無についてのみ異なる菌株の混在していた検体では、*in vivo* で *tdh* 遺伝子または ORF8 の脱落の可能性が考えられるのは、これらの遺伝学的ユニットは染色体中の不安定な構造(前者はトランスポゾン様構造中、後者はバクテリオファージのゲノム中に含まれている)ためである。血清型のみ異なる菌株が混在していたケースでは、*in vivo* で宿主免疫から逃れるために血清型が変化した可能性が考えられる。

3 検体から非病原性菌株のみが分離されたことを説明できる理由としては、1) 患者は他の腸管病原体に感染していた、2) これらの菌株は *tdh*, *trh* 以外の病原因子を産生する、3) 患者の体内で *tdh*, *trh* 遺伝子が脱落したなどが考えられる。

#### E. 結論

同一検体から分離した 10 菌株中に異

なる性状（血清型、毒素遺伝子型、DNAフィンガープリントなど）を示す菌株が含まれていたケースが全検体の33%もあったという結果は、従来の臨床検体から原因細菌を分離する場合の仮定（純培養の菌が得られる）に反するもので、本研究の意義を支持している。研究目的中に記載した可能性(1)（病原性菌株と非病原性菌株が混在する）および(2)（病原性菌株からの病原遺伝子[*tdh*または*trh*]の脱落）を支持する結果が得られた。この結果は、1検体から少数の菌株を分離した場合、疫学調査では注意を要するということを警告している。すなわち、必ずしもその発症要因となっている病原性菌株を特定できない可能性あるいは性状の異なる病原性菌株をすべて特定できない可能性があり、感染症の実態を正確に把握できないことになる。

#### F. 健康危機情報

細菌感染症の診断においては、一般的に患者の検体および推定原因食品から感染症の原因となる病原体を分離・同定することによって確定診断を行う。この検査結果は gold standard となるわけであるが、少なくとも腸炎ピブリオ感染症においては、少数の菌株のみを分離して検査すると、必ずしも実際の原因病原菌株をとらえることができない可能性がある。疫学調査において推定原因食品などの関連する検体を検査する場合にはこの可能

性はさらに強くなる。したがって、診断および疫学調査を目的として細菌の分離を行う場合、検体からは純培養状に原因菌が分離できないかも知れないという仮定のもとに、可能な限り多くの菌株を分離して検査することが重要であると言える。

#### G. 引用文献

- 1) Kim, Y. B., J. Okuda, C. Matsumoto, N. Takahashi, S. Hashimoto, and M. Nishibuchi. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.* 37:1173-1177.
- 2) Tada, J., T. Ohashi, N. Nishimura, Y. Shirasaki, H. Ozaki, S. Fukushima, J. Takano, M. Nishibuchi, and Y. Takeda. 1992. Detection of thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes* 6:477-487.
- 3) Matsumoto, C., J. Okuda, M. Ishibashi, M. Iwanaga, P. Garg, T. Rammamurthy, H. C. Wong, A. DePaola, Y. B. Kim, M. J. Albert, and M. Nishibuchi. 2000. Pandemic spread of an O3:K6 clone

- of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. *J. Clin. Microbiol.* 38:578-585.
- 4) Nasu, H., T. Iida, T. Sugahara, Y. Yamaichi, K. Park, K. Yokoyama, K. Makino, H. Shinagawa, and, T. Honda. 2000. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *J. Clin. Microbiol.* 38:2156-2161.
- 5) Iida, T., A. Hattori, K. Tagomori, H. Nasu, R. Naim, and T. Honda. 2001. Filamentous phage associated with recent pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Emerg. Infect. Dis.* 7:477-478.
- 6) Chowdhury, A., M. Ishibashi, V. D. Thiem, D. T. N. Tuyet, T. V. Tung, B. T. Chien, L. von Seidlein, D. G. Canh, J. Clemens, D. D. Trach, and M. Nishibuchi. 2004. Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999. *Microbiol. Immunol.* 48:319-327.
- 7) Okuda, J., M. Ishibashi, E. Hayakawa, T. Nishino, Y. Takeda, A. K. Mukhopadhyay, S. Garg, S. K. Bhattacharya, G. B. Nair, and M. Nishibuchi. 1997. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 35:3150-3155.
- H. 研究発表
- 1) Wong, H. C., Chen, C. H., Chung, Y. J., Liu, S. H., Wang, T. K., Lee, C. L., Chiou, C. S., Nishibuchi, M., and Lee, B. K.: Characterization of new O3:K6 strains and phylogenetically related strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Taiwan and other countries. *J. Appl. Microbiol.* 98:572-80, 2005.
- 2) Martinez-Urtaza, J., Simental, L., Velasco, D., Depaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Carrera-Flores, D., Rey-Alvarez, C., and Pousa, A.: Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 11:1319-1320, 2005.
- 3) Tanil, G. B., Radu, S., Nishibuchi, M., Rahim, R. A., Napis, S., Maurice, L., and Gunsalam, J. W.: Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from coastal seawater in

peninsular Malaysia. Southeast Asian J. Trop. Med. 36:940-945, 2005.

- 4) Gopal, S., Otta, S. K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M., and Karunasagar, I.: The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. Int. J. Food Microbiol. 102:151-159, 2005.