

たことから、本遺伝子の検出のみで、毒素産生の強弱を判断するには至らないことが示された。

このことは、*q* 遺伝子の転写活性を検出することで、明らかとなった。すなわち、本遺伝子の mRNA レベルを real-time RT-PCR により検討したところ、毒素産生量と極めて高い相関性を示した(表 3)。一方で、毒素遺伝子の mRNA レベルは毒素産生量と関連していない結果を示した(表 3)。これらの結果は、毒素産生性は近傍領域の遺伝子による多様な調節を受けており、毒素遺伝子の定量的検出によっては、毒素産生量を比較できないことを示している。しかしながら、本研究において認めた、*q* 遺伝子の mRNA 検出は、毒素産生性を示す手法として有用と考えられる。

D. 考察

本研究では O157 をはじめとする EHEC において、最も主要な病原因子である志賀毒素、特に Stx2 についてその定量的モニタリングを行い、ウシ由来株における病原性の強弱を判定することで、ヒトへの感染源となりうるか検討した。結果として、一部の株では明らかな毒素産生を認めたが、多くではヒト由来株に比べて低い産生量を示したことから、これらは直接的にヒトへの感染源とはなりにくいと考えられた。更に、こうした表

現形質を遺伝学的手法により明らかにするため、毒素遺伝子の転写調節を行う、*q* 遺伝子の保有状況と比較した。毒素産生量の高い株はいずれも本遺伝子を共通に保有しており、本遺伝子の検出は少なくとも、毒素産生の高い株の選択的検出方には有用と思われた。しかしながら、毒素産生量の低い株においても、一部では本遺伝子が認められていた。このことは本遺伝子が不検出であったからとって、リスクが低い株であることを示すには至らないことを示していた。そこで、我々は当該遺伝子の転写活性を明らかにすることで、その機能性と毒素産生性との相対的検証を行うこととした。結果として、これらは極めて高い相関性を示し、本遺伝子の mRNA 定量により、毒素産生量をモニタリングする手法として有用であることを示した。

E. 結論

本研究では、以下の結論を得た。

- 1) ウシ由来株とヒト由来株の間で、有意な違いを認めた Stx2(c)毒素産生性について、ELISA 系を構築し、定量的に解析し、ウシ由来株における毒素産生性の多様性を数値として、評価できた。
- 2) Stx2 産生量は *q* 遺伝子の保有状況と高い相関性を示したが、一部の毒素低産生性株も同遺伝子を保有していたことか

ら、本遺伝子の検出による毒素産生のモニタリングは困難と考えられた。

3) リアルタイム RTPCR による q 遺伝子の mRNA レベルは、Stx2 産生量と極めて高い相関性を示し、毒素の定量に際する Biomarker として有用と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

1) 朝倉宏、藤田美幸、秋山奈美、牧野壮一、倉園久夫、中澤宗生、山本茂貴、五十君静信. 志賀毒素 (Stx) 産生を指標としたウシ腸管出血性大腸菌 O157 の検出法に関する研究. 第 141 回日本獣医学会学術集会. 2006 年 3 月. 茨城県つくば市.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

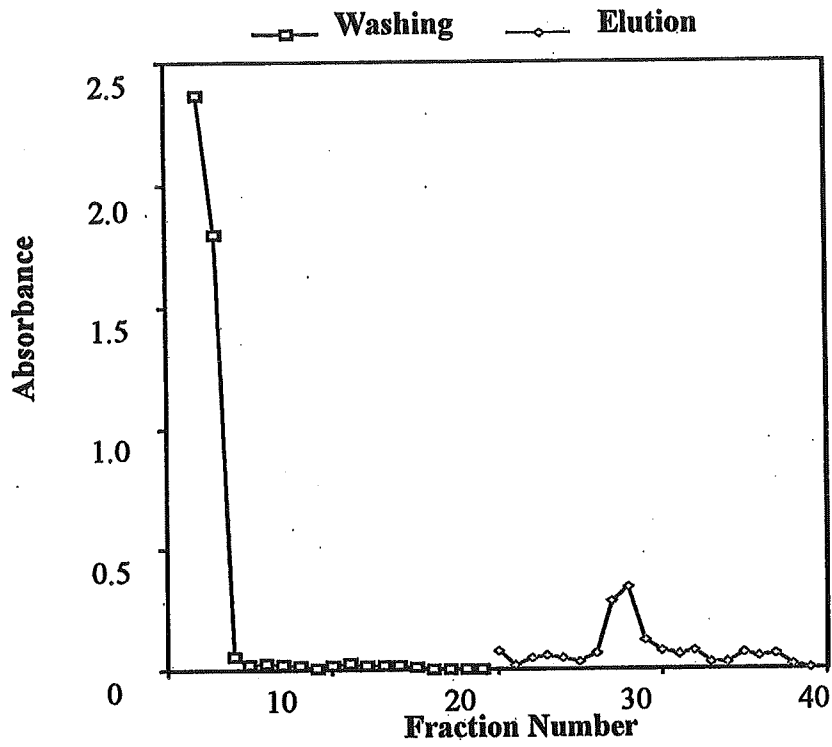
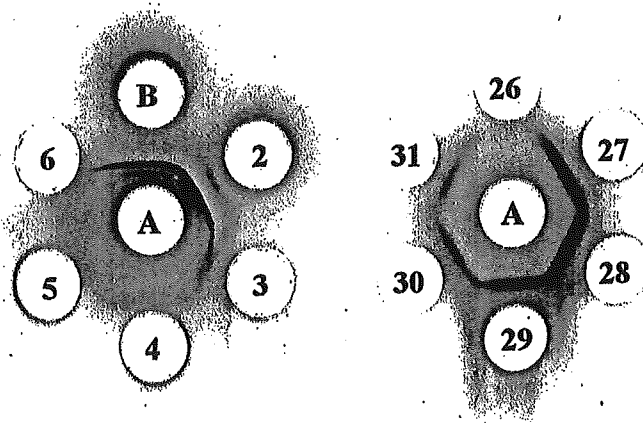


図1 アフィニティークロマトグラフィーによる Stx2 毒素の溶出



A: α -Stx2 rabbit serum

B: Through-out from the column

Fraction No.2-6: Washed fraction

Fraction No.26-31: Elute

図2 ゲル内沈降反応

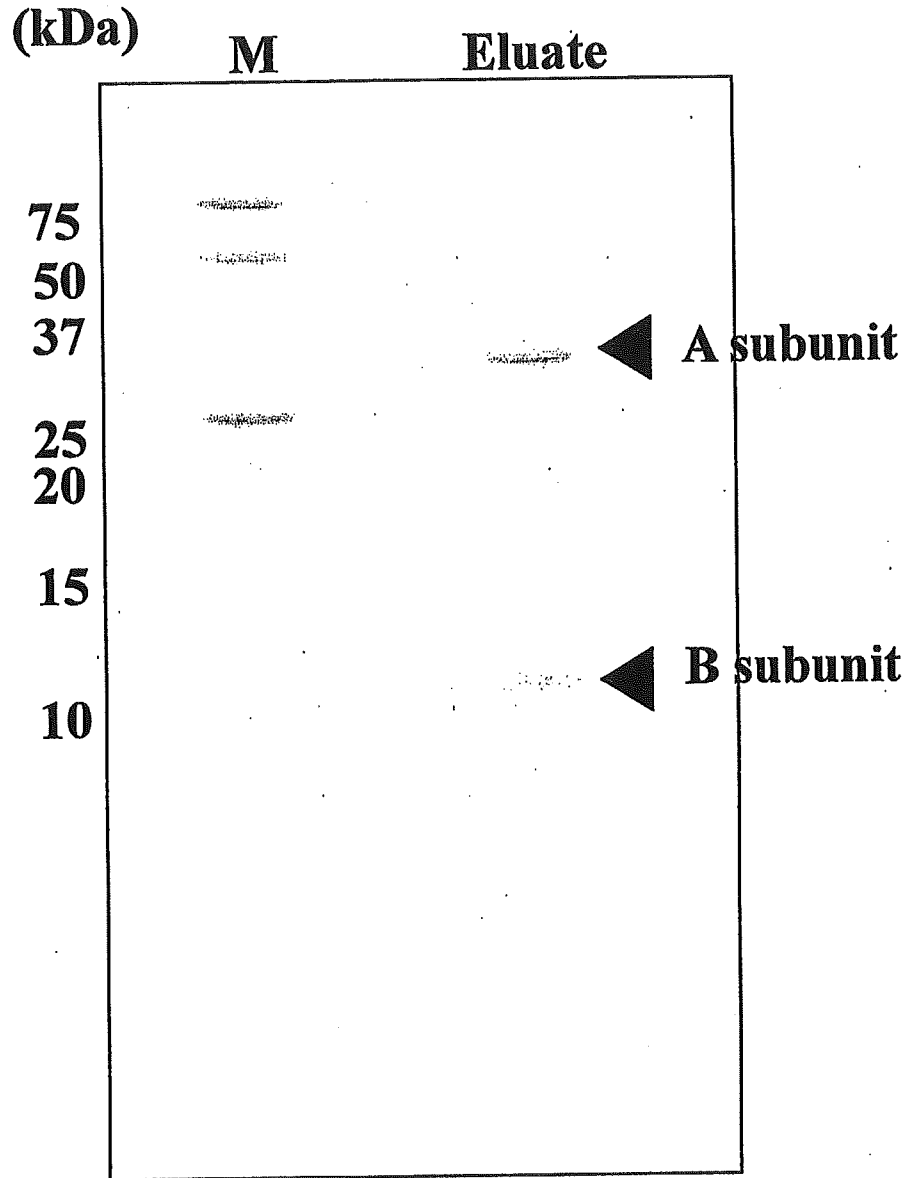


図3 Stx2 毒素の SDS-PAGE 像

精製 Stx2 を SDS-ポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE) 電気泳動を行った。
矢印は A および B サブユニットを示している。

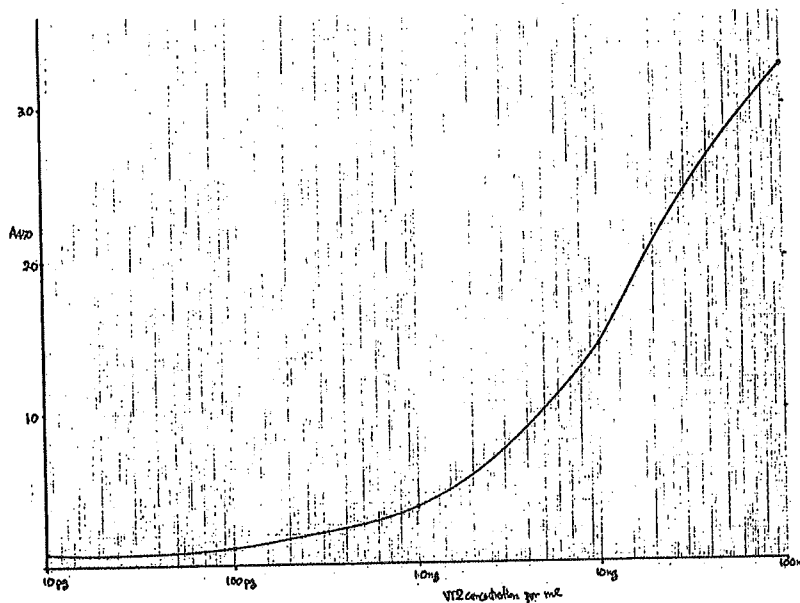


図4 精製毒素に対する ELISA 活性測定の結果

精製毒素について、10 倍段階希釈液(1.0 μ g/ml~10pg/ml)を作成し、作成した ELISA 系での反応性を確認した。吸光度に基づいて検量線を作成した結果、検出限界は 100 pg/ml であった。

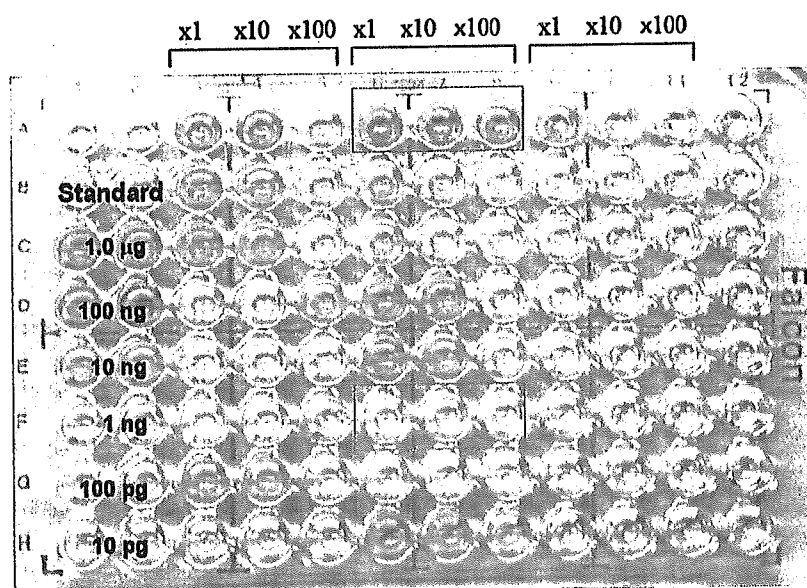


図5 Stx2 に対する ELISA の一例

O157 菌体由来サンプルは x 1、x10、x100 倍希釈を行い、試験に供した (Lane3-11)。Standard には 6 段階希釈(1.0 mg-10 pg)を行った Stx2 を用いた。

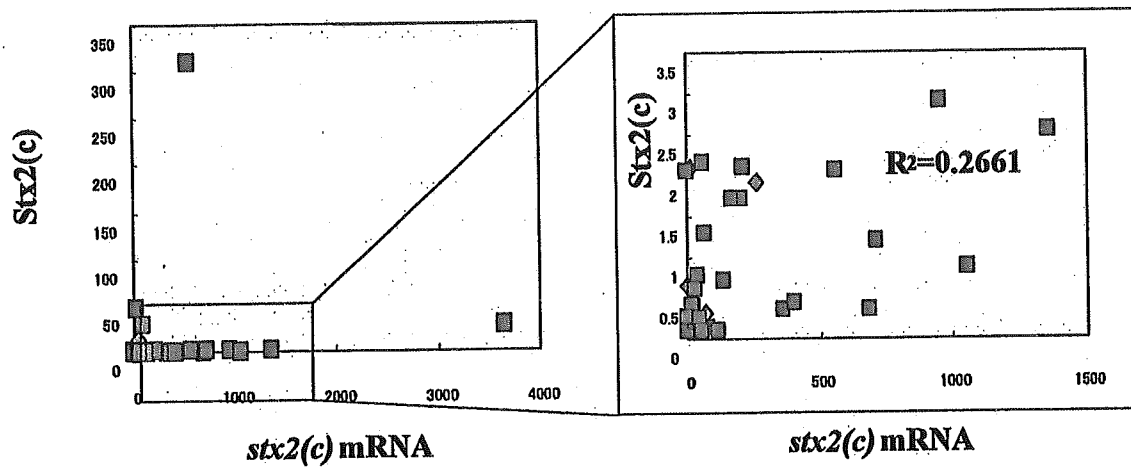


図7 毒素産生と *stx2* 遺伝子発現の相関性

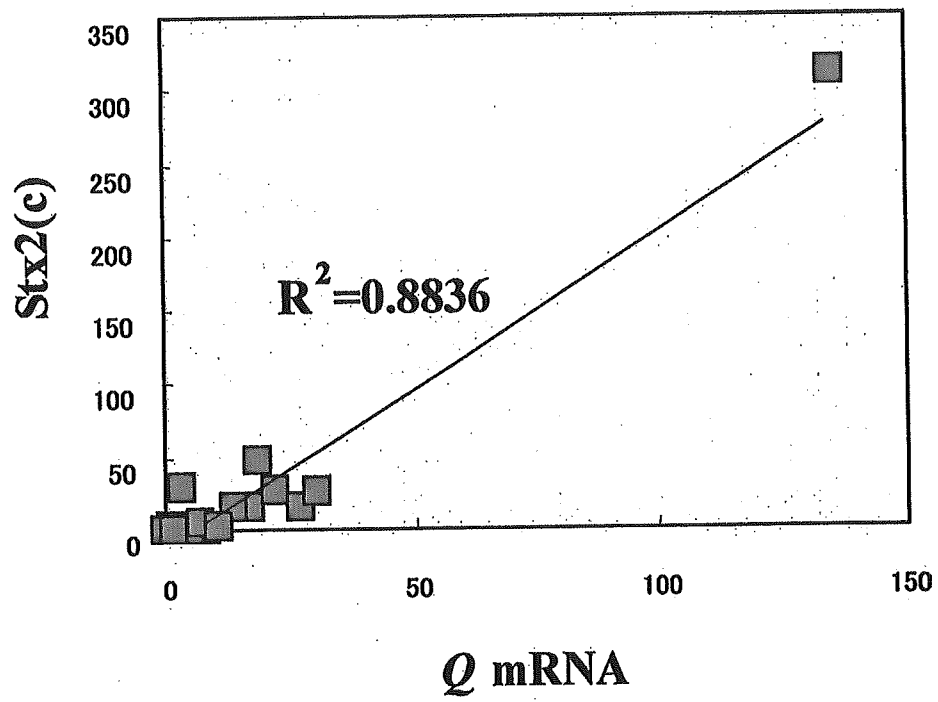


図8 毒素産生と *Q* 遺伝子の相関

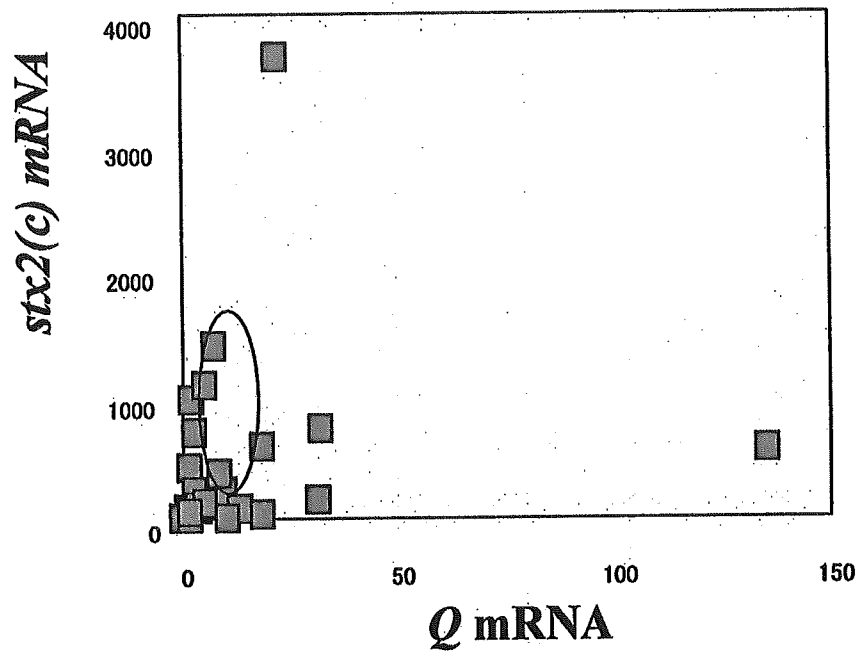


図9 *stx2* 遺伝子および *Q* 遺伝子の発現比較

表 1 Stx2 産生量と q 遺伝子の保有状況

stx 型	菌株	ELISA	PCR		
			stx	q ₉₃₃	q ₂₈₅₁
2	364	0.044	0.003	+	-
	369	0.047	0.002	-	-
	442	0.041	0.003	-	-
	119	0.087	0.194	-	-
	120	1.911	260.409	-	-
2c	330	1.716	203.000	+	+
	331	0.141	74.056	+	+
	332	0.144	5.667	-	+
	353	0.718	134.000	-	+
	354	2.544	1357.778	+	+
	355	0.354	362.333	-	+
	356	0.781	36.833	+	-
	358	0.403	20.000	+	+
	359	0.137	7.889	+	+
	360	0.434	406.232	+	+
	365	0.355	687.449	+	-
	397	0.270	5.155	+	+
	418	1.730	170.667	-	+
	264	2.907	952.167	+	-
	266	2.057	560.000	+	+
	267	2.167	58.889	-	+
	122	27.718	3644.500	-	-
	118	1.203	715.556	-	small
	476	0.629	27.667	-	+
	465	2.091	215.333	-	+

次のページに続く

	173	0.879	1051.000	+	+
1, 2	357		2653.956	+	-
	361	0.116	37.542	+	-
	362	2.105	12.651	+	-
	363		159.576	+	-
	387	0.659	2.467	-	-
	438	0.125	1.000	-	?
	174	0.327	65.128	+	-
	175	13.877	51.222	+	-
1, 2c	350	0.255	24.667	+	+
	414	1.306	64.208	-	-
	416	0.429	18.095	-	+
	268	0.100	0.469	-	-
	474	0.222	28.800	-	-
	84	29.070	99.096	-	+
	81	309.989	548.333	-	+
2, 2c	367	0.099	116.414	+	+
	392	47.816	28.979	-	+
	265	2.057	0.003	+	+
	206	0.278	0.004	-	-
	208	0.270	41.417	+	+
1, 2, 2c	384	0.088	53.889	-	+

表 2 *q* 遺伝子の保有状況

由来	Stx2,2c (ng/ml)	<i>q</i> 遺伝子の保有状況(%)	
		<i>q</i> ₉₃₃	<i>q</i> ₂₈₅₁
ウシ(n=56)	< 1	30	47
	1~10	33	67
	10~100	100	100
	> 100	100	-

*q*₉₃₃ および *q*₂₈₅₁ はそれぞれ *stx2* および *stx2c*-ファージである EDL933W および phi2851 の DNA 配列を元に作成したプライマーを用いた PCR 検出結果を示している。

表 3 *stx* 遺伝子, *q* 遺伝子の相対検出値

<i>stx</i> 型	菌株	ELISA	real time RT-PCR		
			<i>stx</i>	<i>q</i> ₉₃₃	<i>q</i> ₂₈₅₁
2	364	0.044	0.003	0.000	ND
	369	0.047	0.002	0.002	ND
	442	0.041	0.003	0.002	ND
	119	0.087	0.194	0.004	ND
	120	1.911	260.409	5.676	ND
2c	330	1.716	203.000	ND	9.868
	331	0.141	74.056	ND	4.042
	332	0.144	5.667	ND	0.821
	353	0.718	134.000	ND	31.254
	354	2.544	1357.778	ND	7.293
	355	0.354	362.333	ND	8.558
	356	0.781	36.833	ND	1.633
	358	0.403	20.000	ND	0.964
	359	0.137	7.889	ND	0.130
	360	0.434	406.232	ND	1.782
	365	0.355	687.449	ND	2.781
	397	0.270	5.155	ND	0.002
	418	1.730	170.667	ND	2.654
	264	2.907	952.167	ND	2.302
	266	2.057	560.000	ND	18.282
	267	2.167	58.889	ND	1.000
	122	27.718	3644.500	ND	21.849
118	1.203	715.556	ND	31.624	

続次頁

	476	0.629	27.667	ND	1.902
	465	2.091	215.333	ND	2.958
	173	0.879	1051.000	ND	5.152
1, 2	357		2653.956	0.680	ND
	361	0.116	37.542	0.225	ND
	362	2.105	12.651	0.684	ND
	363		159.576	0.825	ND
	367	0.659	2.467	0.056	ND
	438	0.125	1.000	0.190	ND
	174	0.327	65.128	0.827	ND
	175	13.877	51.222	1.000	ND
1, 2c	350	0.255	24.667	ND	1.306
	414	1.306	64.208	ND	13.260
	416	0.429	18.095	ND	1.955
	268	0.100	0.469	ND	0.000
	474	0.222	28.800	ND	1.708
	84	29.070	99.096	ND	3.619
	81	309.989	548.333	ND	135.620
2, 2c	367	0.099	116.414	0.024	4.932
	392	47.816	28.979	0.002	18.784
	265	2.057	0.003	0.002	10.534
	206	0.278	0.004	0.067	1.879
	208	0.270	41.417	0.074	1.557
1, 2, 2c	384	0.088	53.889	0.010	1.810

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)

「ウシ由来腸管出血性大腸菌 O157 の食品汚染制御に関する研究」

(4) EHEC O157 および *C. rodentium* における ETT2 保有状況に関する研究

主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 朝倉宏

研究要旨

腸管出血性大腸菌 O157(以下、EHEC O157)は動物あるいは環境など広範囲に分布しており、個々の病原性は多様であると考えられる。一方で EHEC O157 の病原性を評価するための動物モデルとしては、志賀毒素 (Stx) による毒性発現によってしか見ることができず、ヒトにおける病態を明らかにする目的で用いることはできないのが現状である。前年度の研究により、我々は *E. coli* Type III secretion system 2 (ETT2) 領域が O157 株はほぼ共通に保有しているものの、*E. coli* O55 あるいは *Salmonella* Typhimurium はこれらの一部分しか有していないことを明らかにした。本研究では、本菌の代替的病態モデルとして有用と考えられている、*Citrobacter rodentium* における当該遺伝子領域の保有状況を明らかにした。結果として、当該菌はこれを有しておらず、*C. rodentium* による病態の検証は、O157 による生体応答とは何らかの違いがあることを示唆している。

協力研究者

帯広畜産大学

牧野壮一

帯広畜産大学

川本恵子

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌の中でも、とりわけ血清型 O157 はヒトに重篤な腸管病原性を顕すことから、その制御は公衆衛生上、重要である。

本菌の病原性の評価は培養細胞系あるいは無菌マウスや幼弱ウサギを用いた動物実験により行われているが、これらは本菌の産生する志賀毒素 (Stx) による毒性発現によるものであり、ヒトにおける腸管感染モデルとはなりえない。近年、これを代替する菌種として、*Citrobacter rodentium* が報告されており、当該菌は正常マウスに腸管感染性を示すことからその有用性が考察されている。

以前の研究において、われわれは *Salmonella* の SPI-2 と高い相同性を有し、ヒト由来 EHEC O157 株においてほぼ共通に保有する遺伝子領域として、*E. coli* Type III Secretion System 2 (ETT2) の存在を明らかにした。さらに、サザンブロットを用いた DNA 相同性解析により、ウシ由来株の一部では *eivF* 遺伝子の多形性を有することを示した。

本研究では ETT2 の生体に対する病原性への関与を *C. rodentium* 感染モデルを用いて検討することが可能か明らかにするため、*C. rodentium* における ETT2 遺伝子群の保有状況を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 菌株ならびに培地

本研究には、腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 株として、98 年に生じたイクラ醤油漬を原因食品とする F2 株を用いた。また、*Citrobacter rodentium* XX 株をあわせて用いた。特に記載のない限り、本菌は L-broth (10g Trypton, 5g Yeast extract, 5g NaCl / liter) 中において 37°C で培養をおこなった。

2. PCR

一夜培養液 1ml より、DNA extraction キット (Qiagen) を用いて、DNA を抽出・精製した。DNA 溶液 1 μ l を鋳型として、反応液 (5 μ l 10x EX Taq, 4 μ l dNTP mixture, 0.5 μ l EX Taq, 1 μ l primer sets (each 20 μ M), 38.5 μ l DDW) を作成した。反応条件およびプライマー (表 1) は、Ren らの報告に従って調整した。PTS-200 cycloer (Bio-Rad Laboratories) を用いて PCR 反応を実施した後、1% アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色により増幅遺伝子の検出を行った。

C. 研究結果

1. O157 における ETT2 の保有状況
O157 菌株間における ETT2 遺伝子領域の多様性について検討するため、計 10 種のプライマーセットを用いて、検出を試みた。

供試8株の中で、1株(F2)のみ、領域3が検出されなかったが、そのほかの領域についてはいずれも検出され(図1および2)、本遺伝子領域がO157株間で保持されていることが明らかになった。

また、この結果は、前年度行ったサザンブロットによる*eivF* 遺伝子検出結果と同様であり、

2. *C. rodentium* におけるETT2の検出

C. rodentium におけるETT2遺伝子群の検出を試みたが、いずれの領域も検出されなかった。このことから、ETT2遺伝子領域は、*E. coli* に特有であることが示唆された。

D. 考察

Type III secretion system(TTSS)は、多くの病原細菌において、病原性を顕すために必要な機構である。ETT2は*Salmonella*のSPI-2と高い相同性を有することが明らかとなっているがその機能についてはまだ明らかでない。ETT2がEHECと類似した病原性を有すると考えられている。*C. rodentium* に認められなかったことから、*C. rodentium* はEHECが生じる前に派生したと推察される。また、O157菌株間におけるETT2領域の多様性については、前年度も検討したが、本年度は対象遺伝子群を拡大し、ETT2領域と目される全領域のスクリーニングを行った。血清型O157でのこのような多様性が病原性に関与しているか、

今後、検討する必要があると思われる。

E. 結論

本研究では、以下の結論を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 引用文献

- 1) Ren CP, Chaudhuri RR, Fivian A, Bailey CM, Antonio M, Barnes WM, Pallen MJ. The ETT2 Gene Cluster, Encoding a Second Type III Secretion System from *Escherichia coli*, Is Present in the Majority of Strains but Has Undergone Widespread Mutational Attrition. *J Bacteriol.* 2004. 186(11): 3547-6

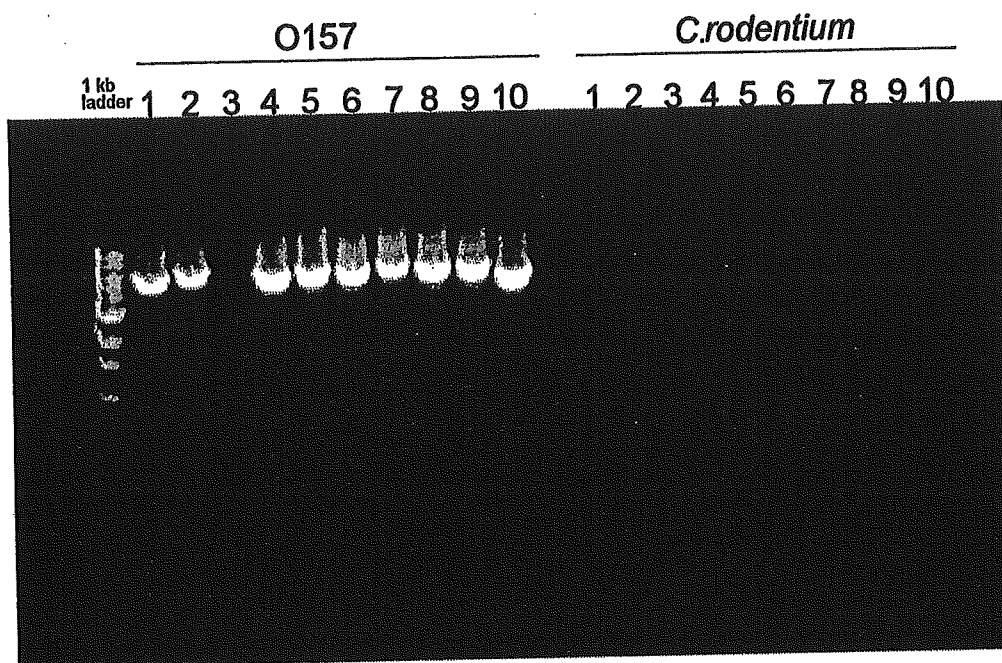


図1. EHEC O157および*C.rodentium*におけるETT2遺伝子群の検出結果

表1 PCRプライマー

Primer	Annealintg site	Sequence
ETT2-1F	ECs3693	GACCCAGCGCACCTGAGTAAGT
ETT2-1R	ECs3697	AAGAGCGCAGTGTTTTGCCTGT
ETT2-2F	ECs3696	GTGTGTTACCTCCGGGTCATCC
ETT2-2R	ECs3701	CGCCGGACGATTTAAAGATGAG
ETT2-3F	ECs3700	CGCACTGTGGATGCTCTGTCTT
ETT2-3R	ECs3706	CGACTCATGGATTTGCACCAGA
ETT2-4F	ECs3705	AATGACCAGGGACGAGCAAATC
ETT2-4R	ECs3711	TATCCATTGCAAAACCCGCATT
ETT2-5F	ECs3709	ATGTGCCTAACCCGCTCAAAA
ETT2-5R	Intergenic	ACCGACCCTGATCTGGTTGTAA
ETT2-6F	ECs3719	GGGAAATTATCAGCAAGCCATGA
ETT2-6R	ECs3726	GCAGAAGAGAGTGGCAGCTGGT
ETT2-7F	ECs3726	AGCGCGCCATTTACACGTATCT
ETT2-7R	ECs3732	TGCACTTGATGCGAGTTGTTCA
ETT2-8F	ECs3731	GGTGGGCAATGGAATTATGAGC
ETT2-8R	ECs3737	AAACAGCGGCAGAAACCCACTA
ETT2-9F	ECs3736	TCGGTCACCTTTTTGCCAATCT
ETT2-9R	ECs3741	TCCCGTTAATGGTGCATTCGAT
ETT2-10F	ECs3740	AATTACGCCTGGCATTGTTGT
ETT2-10R	ECs3744	TCAGGCGAACGGTATCGTCATA