

で順次処理して脱 0-アシル化と脱リン酸化し、さらに還元末端をピリジリアミノ化した後、KOH 処理によって脱 N-アシル化して LPS 多糖鎖を調製した。LPS 多糖鎖は N-アセチル化の後、Sephadex G25 ゲルクロマトグラフィーによって分離し、さらに HPLC (カラム: Capcell Pak ODS-AQ、溶離液: 20mM リン酸アンモニウム溶液) によって精製 LPS 多糖鎖 (WS-PA) を得た。03 LPS の構成糖であるシアル酸類似アミノ糖の分離・精製には、LPS を 5%酢酸で加水分解し、不溶性のリピド A を除去した後、Sephadex G25 ゲルクロマトグラフィーによって調整したリピド A バックボーンを含まない LPS 多糖部 (PS) を用いた。PS をメタノリシス後 N-アセチル化し、上記カラムを用いる HPLC (溶離液: 水) によって精製した。

3) 分析法: 中性糖とアミノ糖は、常法に従いアルジトール・アセテートとして、あるいは試料をメタノリシス後全アセチル-メチルグリコシドとして GC および GC-MS によって定性・定量した。FAB-MS には JMS-700 (日本電子) を使用した。¹H-および ¹³C-NMR は、試料を重水溶液とし A-500 (日本電子) を使用して測定した。シアル酸類似アミノ糖は、LPS をメタノリシス後全アセチル化し、全アセチルメチルケトシド誘導体として GC および GCMS により分析した。

C. 研究結果

1) 腸炎ビブリオ 03 LPS に含まれるシアル酸類似アミノ糖の同定: 03 LPS

をメタノリシス後全アセチル化した産物中の GCMS により、未同定のシアル酸類似のアミノ糖が検出された。03 PS より分離・精製した標品の NMR 解析により本未同定糖は 5, 7, 8-triamino-3, 5, 7, 8, 9-pentadeoxy-non-2-ulosonic acid (Non03) であり、シアル酸に類似した構造をもつものの、従来知られていない糖であることが明らかとなった。さらに Non03 は 5 位と 7 位のアミノ基は N-アセチル化されているが、8 位のアミノ基は置換基をもたない遊離のアミノ基として存在する極めて特徴的な化学的性状を示した。図 1 にシアル酸、腸炎ビブリオ 02 LPS の構成糖として存在する 5, 7-diamino-3, 5, 7, 9-tetradecoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid (Non02) および Non03 の構造を示した。

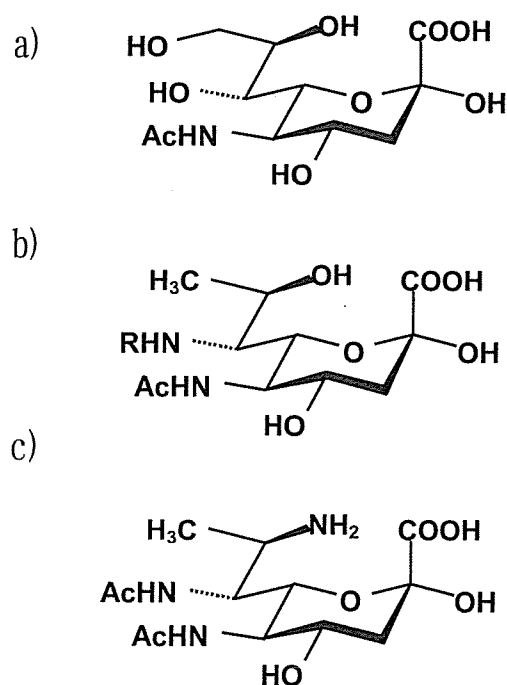


図 1 シアル酸(a)、Non02 (b) および Non03 (c) の構造

2) 03 LPS 多糖鎖の構造

03 LPS の構成糖は D-glucose (D-Glc)、D-galactose (D-Gal)、L-glycero-D-manno-heptose (L, D-Hep)、D-glucuronic acid (D-GlcA)、D-galacturonic acid (D-GalA)、3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) および D-glucosamine (D-GlcN) であった。03 LPS から脱-アシル化、脱-リン酸化およびピリジルアミノ化によって調製した LPS 多糖鎖 (WS-PA) について構造解析を行った。その FAB-MS 分析 (positive ion mode) では、 m/z 2288.7、 m/z 2085.6 および m/z 1769.5 を示す 3 つの主要分子種が観察された。 m/z 2288.7 は、2 分子の N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、4 分

子の hexose (Hex)、2 分子の heptose (Hep)、1 分子ずつの hexuronic acid (HexA)、Kdo および Non03 で構成されるピリジルアミノ化糖鎖 (WPS-PA) の分子量 ($M_w=2287$) と一致していた。後者は、上記の糖鎖から 1 分子ずつの Hex と Non03 が欠損したピリジルアミノ化糖鎖の分子量 ($M_w=1768$) と一致しており、この糖鎖は WS-PA 調製時に Hex-Non03 の disaccharide が Non03 のケトシド結合の切断によって遊離して生じた人工産物であると考えられた。HPLC によって WS-PA をさらに分離精製し、NMR 解析により糖鎖の構造を検討した。図 2 に 03 WS-PA の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示した。

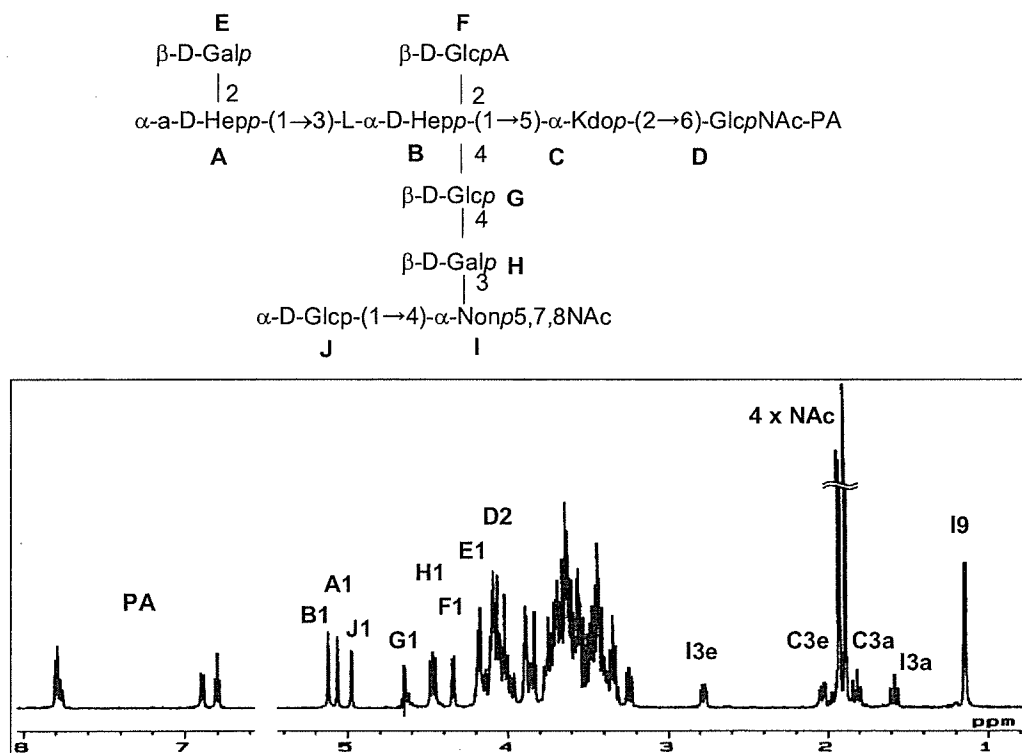


図 2 腸炎ビブリオ 03 LPS 多糖鎖の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

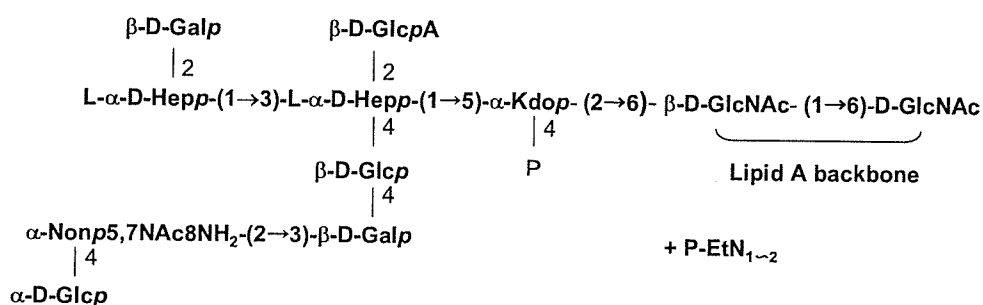


図3 腸炎ビブリオ 03 LPS 多糖鎖の全構造

¹H-NMR 解析の結果、精製された WS-PA は 7 種 10 個の糖で構成される多糖であり、還元末端側にグルコサミン 1 分子が存在していた。03 LPS のリピド A バックボーンは 2 分子のグルコサミン (β-D-GlcN (1-6)-D-GlcN) で構成されることが明らかとされており、本糖鎖は調製過程でリピド A バックボーンの解裂により生じた人工産物であることが明らかとなったが、リピド A バックボーン以外の糖鎖の解析は可能であった。さらに ¹³C-NMR、H, H-および C, H- COSY、HMBC、NOESY 測定などに基づき構造を決定した。本研究によって明らかにされた腸炎ビブリオ 03 LPS 多糖鎖の全構造を図 3 に示した。本糖鎖は、7 種 11 個の単糖で構成されることはすでに報告しているが、それらの立体配置と結合様式が明らかにされた。LPS 分子中では、Kdo の 4 位にはリン酸が結合し、さらに 1~分子のリン-エタノールアミン (P-EtN) が存在する。また、前述のように、03 LPS 多糖鎖では、Non03 の 8 位のアミノ基は置換基をもたず、極めて特徴的であった。

3) 腸炎ビブリオ LPS におけるシアル酸類似アミノ糖の分布

腸炎ビブリオ LPS には、Non02 や Non03 などのシアル酸類似アミノ糖を含む抗原型があるが、本研究では、腸炎ビブリオすべての抗原型 LPS について本アミノ糖の分布を検討した。その結果、Non02 と同じアミノ糖が 02、05、011 の LPS に検出され、一方、Non03 と同じものは 03 と 013 の LPS に含まれることが明らかとなった。腸炎ビブリオの菌体凝集反応に基づく抗原型別においては、02、05 および 011 の間には強い交差反応原性が認められるが、この交差反応はこれら 3 種の LPS に共通して存在する Non02 によって発現されることが強く示唆された。また同様に、03 と 013 の間に見られる強い交差反応原性も、両 LPS に存在する Non03 によって発現されるものと考えられる。また一方、011 と 013 の間の交差反応原性にも、Non02 と Non03 の構造類似性が関与することが示唆された。

D. 考察

腸炎ビブリオ 03 の LPS 多糖鎖は 7 種 11 個の糖で構成される低分子糖鎖であった。その構造は、これまで構造が明らかにされている 02、06、012 の LPS 多糖鎖の構造と部分的に類似はしているものの、Kdo に隣接する内部コア部分にも構造の違いが認められた。03 LPS 糖鎖の構成成分として 5, 7, 8-triamino-3, 5, 7, 8, 9-penta-deoxy-non-2-ulosonic acid (Non03) が存在することが初めて明らかとなった。さらに Non03 は 013 株の LPS 構成糖としても存在することが示され、03 と 013 両菌株の血清学的交差反応原性に関与すると考えられるが、一方で、Non03 は両抗原型の血清学的特異性を決定するエピトープの構成因子であることも強く示唆された。腸炎ビブリオ LPS にはもう一つのシアル酸類似アミノ糖で、Non03 と類似の構造をもつ 5, 7-di-amino-3, 5, 7, 9-tetra-deoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid (Non02) が存在するが、Non02 も 05 と 011 の LPS 構成糖として存在し、これら 3 種の抗原型株間の血清学的交差反応原性に関与するとともに、各抗原型の血清学的特異性にも関与することが強く示唆された。

E. 結論

・腸炎ビブリオ 03 の LPS 多糖鎖は、7 種 11 個の糖で構成される低分子多糖である。

・腸炎ビブリオ 03 の LPS 多糖鎖には、従来報告されていない 5, 7, 8-triamino-3, 5, 7, 8, 9-pentadeoxy-non-

2-ulosonic acid (Non03) が構成糖として存在し、糖鎖中でその 8 位のアミノ基には置換基が存在しない。

・腸炎ビブリオ 03 と 013 の LPS 多糖部にはともに Non03 が存在し、両株の血清学的交差反応原性ととともに、それぞれの特異抗原エピトープを構成すると考えられる。

・腸炎ビブリオ 02、05、011 に共通して存在する Non02 も、これら 3 種の菌株間の血清学的交差反応原性ととともに、個々の特異抗原エピトープを構成すると考えられる。

G. 研究発表 (学会発表)

1) 一色恭徳、近藤誠一：腸炎ビブリオ 03 リポ多糖の糖鎖構造と腸炎ビブリオリポ多糖におけるシアル酸誘導体の分布、第 53 回毒素シンポジウム、2006 年 7 月。

腸管出血性大腸菌の出現と HUS 発症の機構、そして対策

山本達男

新潟大学大学院医歯学総合研究科 国際感染医学講座 細菌学分野

研究要旨

腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC) は経口感染後、腸管粘膜に定着し、志賀毒素 (Shiga toxin, Stx) を産生して水様下痢や出血性大腸炎 (HC) を、さらに重症合併症である溶血性尿毒症症候群 (HUS) を惹起して小児や高齢者では予後不良となる。主要な血清型は O157:H7 で、一般に腸管定着因子としてタイプ III 分泌システム (T3SS) をもつ。志賀毒素サブタイプの中では、Stx2 が Stx1 より HUS に関連する。本研究では、タイプ III 分泌システムをもたないのに小児が HUS を発症して死亡した家族感染例を材料に、血清型 O86:H- EHEC の遺伝学的特性を研究した。血清型 O86:H- EHEC は 120.73 kb のプラスミド (pO86A) をもち、外膜蛋白 HdaA (15.5 kDa) を産生して分散型の粘着 (diffuse adherence) を示し、赤痢菌 *S. flexneri* 型の IgA プロテアーゼ遺伝子 (*ipd*) をコードして粘膜免疫抵抗性を示した。染色体上には、Stx2 をコードする 60.238 kb のファージ (bacteriophage 86) を溶原化していた。Bacteriophage 86 は、既知の血清型 O157 の Stx2 ファージに高い相同性を示す領域と固有の領域を有していた。相同性が高い領域には制御免疫領域や複製領域が含まれていた。固有の領域は、組み替え領域、溶菌領域、Tail 領域であった。組み替え領域は挿入配列 (*gtttcaa*)、*integrase*、*excisionase* から構成される。既知の血清型 O157 の Stx2 ファージではこの領域に高い相同性が確認され、保存領域であることが分かった。しかし、bacteriophage 86 では相同性配列が確認されず、bacteriophage 86 の *integrase* は P4 ファージ由来と考えられた。Bacteriophage 86 の挿入配列は現在検討中である。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC) は経口感染後、腸管粘膜に定着し、志賀毒素 (Shiga toxin, Stx) を産生して水様下痢や出血性大腸炎 (HC) 等の腹部症状を、さらに重症合併症である溶血性尿毒症症候群 (HUS) を惹起し、特に小児や高齢者では予後不良となる。主要な血清型は O157:H7 で、一

般に腸管定着因子としてタイプ III 分泌システム (T3SS) をもつ。志賀毒素サブタイプの中では、Stx2 が Stx1 より強毒性で、より HUS に関連する。本研究では、タイプ III 分泌システムをもたないにもかかわらず小児が HUS を発症して死亡した家族感染例を材料に、血清型 O86:H- EHEC の遺伝学的特性を研究した。腸管出血性大腸菌の出現様式を解明し、対策

の基礎情報とする。また HUS 発症のメカニズムを解明して、HUS 治療に向けた基礎情報を得る。

B. 研究方法

1) PFGE 解析

菌体 DNA を *NotI* で切断し、0.7%アガロースゲル上で電気泳動解析した。

2) 塩基配列決定

プラスミド DNA またはファージ DNA を断片化してベクター pUC118-HincII/BAP に結合し、DNA ライブラリーを作製した。ライブラリーからプラスミド抽出し、ABI PRISM BigDye Terminator Kit を用いてシーケンシング反応を行い、ABI PRISM DNA Analyzer で塩基配列を決定した。ギャップ領域は各 contig の末端でプライマーを設計して PCR、シーケンス解析して塩基配列を決定した。得たデータは Unix Sun コンピューターシステム、phred / phrap / consed でアセンブル解析し、全塩基配列を決定し、Genaris Annotation System を用いたのテーションを行った。

3) 塩基配列解析

ファージ DNA の塩基配列比較は Artemis Comparison Tool (<http://www.sanger.ac.uk/Software/ACT/>) を用い、既知の Stx2 ファージゲノムとして bacteriophage 933W (以下 933W) と bacteriophage VT2-Sa (以下 VT2-Sa) を用いた。また、変異領域の比較は clustalW (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-j.html>) を用い、既知の Stx2 ファージゲノムとして 933W、VT2-Sa、stx2 converting bacteriophage I (以下 okayama)、stx2

converting bacteriophage II (以下 morioka)、*Escherichia coli* O157:H7 genomic DNA、Sakai-VT2 prophage inserted region (以下 Sakai-VT2) を用いた。

C. 研究結果

1) 血清型 O86:H-家族株の解析

血清型 O86:H-大腸菌による家族感染で男児 (3 歳児) 株だけが Stx2 陽性で、HUS を発症して死亡した (図 1 A)。PFGE 解析で、家族株は同一パターンを示したが、男児株では約 50 kb の DNA 挿入が確認され、Stx2 ファージの挿入が考えられた (図 1 B)。

2) 粘着性プラスミド pO86A の解析

男児株は diffuse adherence をコードする 120.73 kb のプラスミド pO86A を保有していた (図 2)。pO86A には diffuse adherence を起こす外膜蛋白 (18.0 kDa、計算上 15.5 kDa) をコードする遺伝子 (*hdaA*; HUS-associated diffuse adherence A) や赤痢菌 (*Shigella flexneri*) の IgA1 プロテアーゼ遺伝子に 99% の相同性を示す IgA1 プロテアーゼ遺伝子 (*ipd*; IgA1 protease of diffusely-adhering enterohemorrhagic *E. coli*) が存在した。

3) Bacteriophage 86 の解析

血清型 O86:H-男児株から Stx2 ファージを調整し、DNA 塩基配列を決定した。サイズは 60.238 kb で、GC 含量が 49.1%、orf が 81、tRNA が 3 であった。

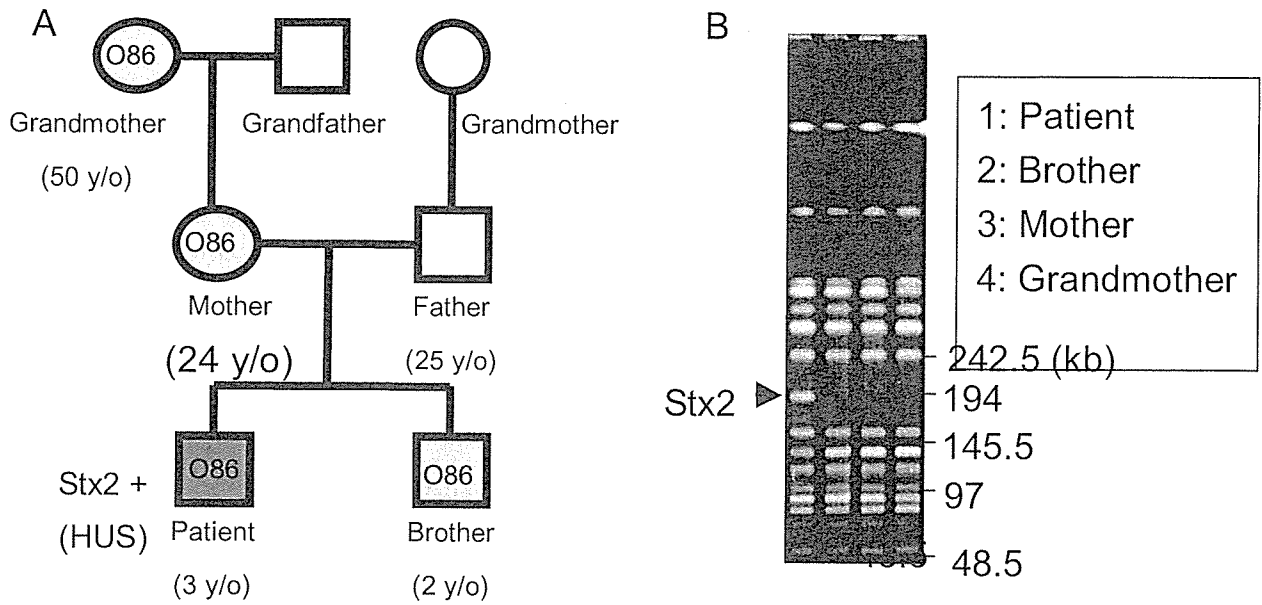


図1 大腸菌血清型 O86:H-による家族感染 (A) と PFGE 解析 (B)

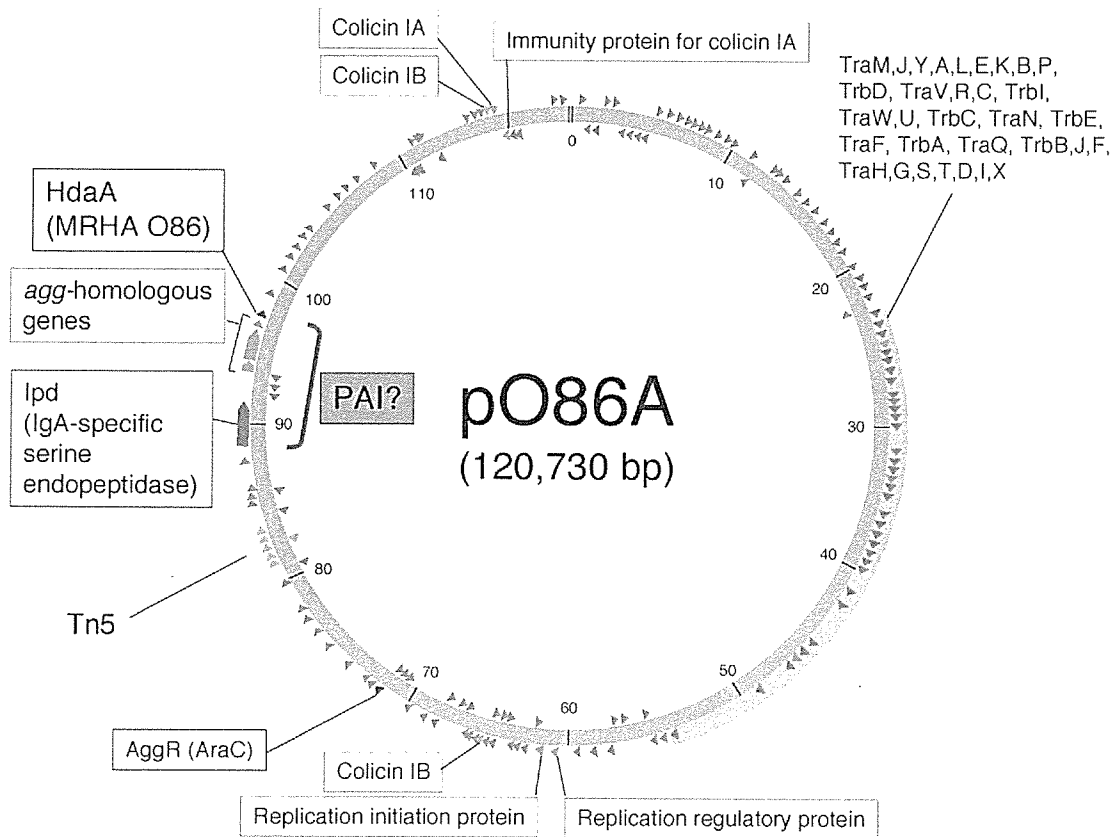


図2 プラスミド pO86A の遺伝子地図 (GenBank accession no: AB255435)

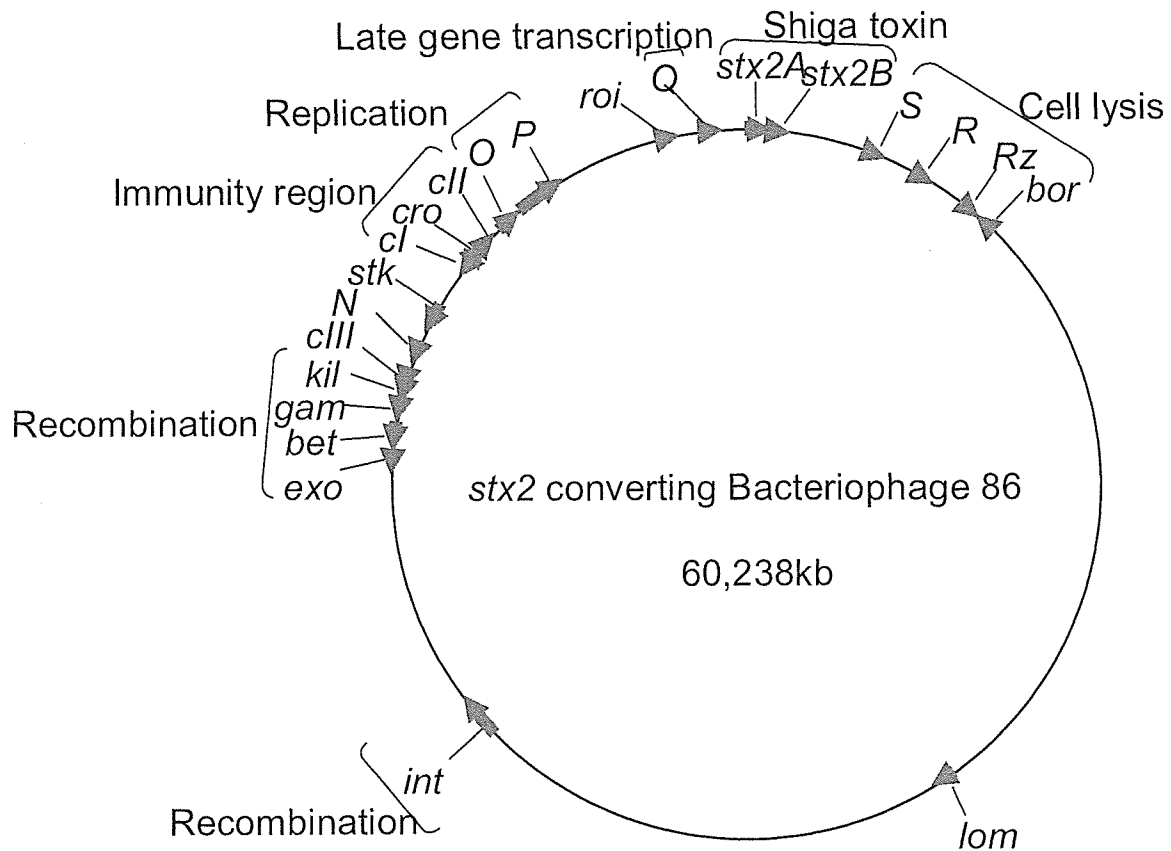


図3 Bacteriophage 86 のゲノム構造 (GenBank accession no: AB255436)

Artemis Comparison Tool により bacteriophage 86 と 933W、VT2-Sa の塩基配列を比較した結果、bacteriophage 86 は 933W と VT2-Sa と多くの領域で相同性を示した。しかし、どちらにも相同性を持たない領域、どちらかのみ相同性を持つ領域が存在する事も明らかとなった。

部分的な相同性を示した領域は制御免疫領域と複製領域で、933W とのみ相同性があった領域は *cl*、*cro* 遺伝子を含む制御免疫領域で、VT2-Sa とのみ相同性があった領域は *O*、*P* 遺伝子を含む複製領域であった (図4)。

Bacteriophage 86 特異的な領域は integrase を含む組換え領域と機能未知の領域、putative long tail fiber protein を含む phage tail 領域であった。Attachment site、integrase、excisionase 遺伝子を含む約 1.7kb の組換え領域では、既知の Stx2 フェージは相互に高い相同性が高く、保存されていたが (図5)、bacteriophage 86 には相同性を示す配列は存在しなかった。

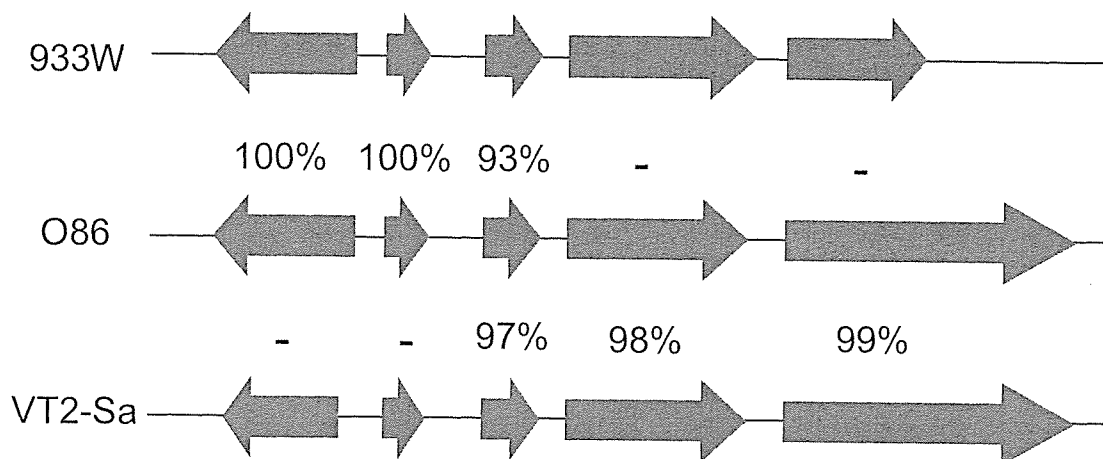


図4 血清型 O86:H-と O157 の間での Stx2 ファージ replication/immunity 領域の比較 (GenBank accession nos: AF125520, AP000363)

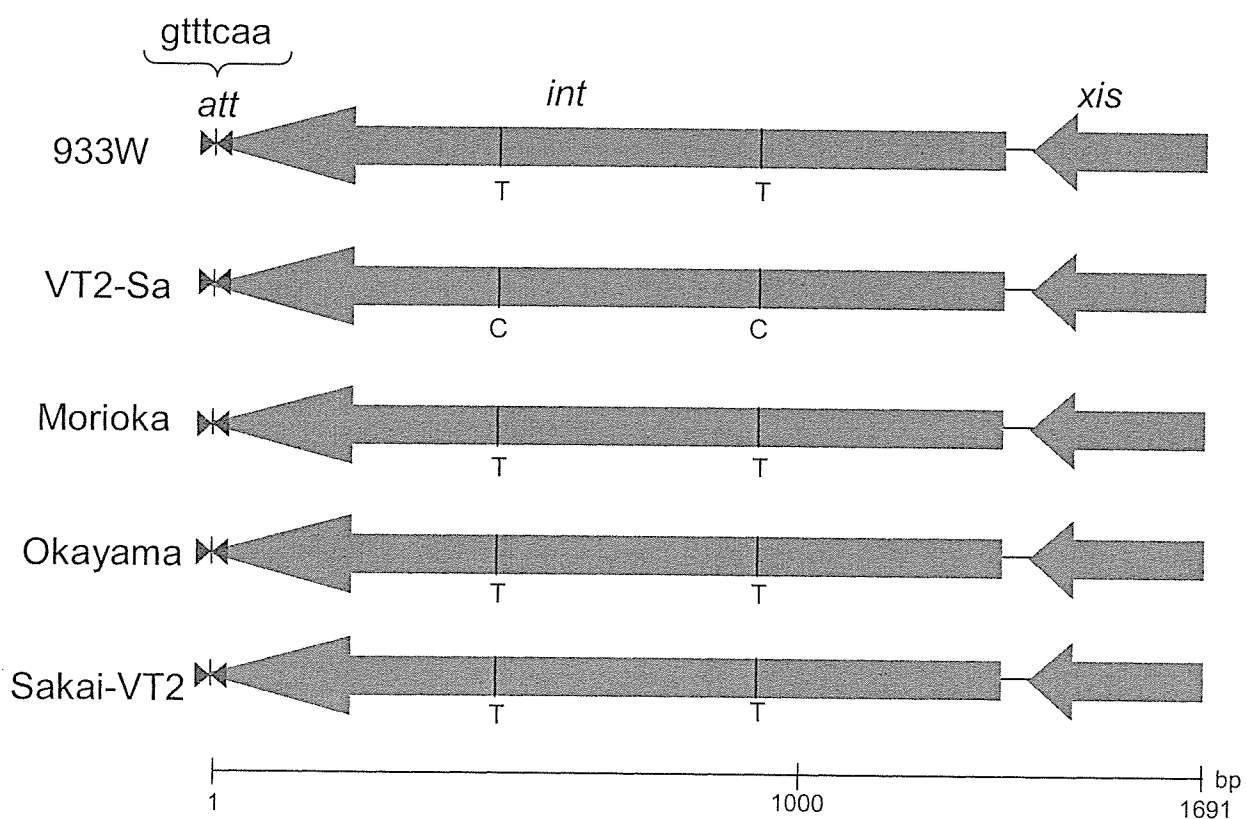


図5 血清型 O157 の Stx2 ファージの integration 領域

(GenBank accession nos: AF125520, AP005154, AP004402, AP000363, AP000422)

D. 考察

家族感染として血清型 O86 でかつ Stx2 産生菌による男児 HUS 死亡例が発生した。この男児株は T3SS 陰性であるにも拘わらず強い腸管定着性を有していて、感染様式は diffuse adherence で、しかも腸管粘膜免疫（分泌型 IgA）に抵抗性を示す IgA1 プロテアーゼを保有した。この IgA1 プロテアーゼは赤痢菌（*S. flexneri*）型で、腸管粘膜免疫抵抗性の観点では赤痢菌と同程度の病原性をもつことになる。

男児株は Stx 2 ファージを保有していたが、この Stx 2 ファージは血清型 O157 腸管出血性大腸菌の Stx2 ファージと異なるファージであった。最も重要な相違箇所は組換え領域で、血清型 O157 ファージ間では高い相同性が認められ保存領域であったが、血清型 O86:H-では全く相同性が認められなかった。むしろ P4 ファージに類似していて、P4 ファージ由来の可能性が考えられた。

以上の成績から、「男児腸管内で O86 型 Stx2 ファージが高定着性 O86:H-大腸菌に溶原化し、血清型 O86:H-腸管出血性大腸菌が出現、致命的な HUS が惹起された」と考えられた。

E. 結論

(1) 腸管出血性大腸菌血清型 O86:H-は、T3SS 陰性にも拘わらず高定着性で、プラスミド性の外膜蛋白による分散粘着性と IgA1 プロテアーゼによる腸管免疫抵抗性を示す。

(2) 腸管出血性大腸菌血清型 O86:H-の Stx2 ファージは、血清型 O157 の Stx2

ファージとは由来が異なり、独自の挿入配列をもち、独自の挿入メカニズムを示す。

(3) 「男児腸管内で O86 型 Stx2 ファージが高定着性 O86:H-大腸菌に溶原化し、血清型 O86:H-腸管出血性大腸菌が出現、致命的な HUS が惹起された」と考えられた。

F. 健康危機情報

Stx2 産生大腸菌の場合には、タイプ III 分泌システムが陰性であっても HUS を惹起することがある。腸管出血性大腸菌の他に、Stx2 ファージの監視も重要である。

G. 研究発表

(1) Yamamoto T, Dohmae S, Nishi J, Baba T, and Mori H. Molecular nature of novel, hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli* emerged in a child. p. 5560. In Abstract (Cholera & Other Bacterial Enteric Infections; Symposium on Vaccine development), 41th U.S.-Japan Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting, Gifu, 2006.

(2) 山本達男. 小児腸管出血性大腸菌感染症とその発症メカニズム. 新潟医学会雑誌 120 : 485-493, 2006.

研究課題名：下痢原性大腸菌の病原因子の解析と診断への応用

分担研究者 東京都健康安全研究センター・微生物部
甲斐 明美

協力研究者 東京都健康安全研究センター・微生物部
小西 典子, 尾畑 浩魅, 下島 優香子, 門間 千枝,
仲真 晶子, 山田 澄夫

研究要旨：

2002 年から 2005 年の間に下痢症患者糞便から分離された大腸菌血清群 01 および 018 合計 395 株について、VT, LT および ST の産生性、そして細胞付着性関連遺伝子、EAST1 関連遺伝子の保有状況を調べた結果、1 株のみが *astA* 陽性になったが、その他全ての菌株では、これまでに知られている病原因子は陰性であった。血清群 01 および 018 は健康人からも高率に検出される。市販の病原大腸菌免疫血清セットにはこれらの 0 群血清が含まれているが、これらの血清群の病原学的意義は非常に低いものと推定された。また、下痢原性大腸菌を血清型別のみで判定することは非常に困難であると考えられた。

A. 研究目的

下痢原性大腸菌は、通常、血清型別を行った後、毒素産生性および組織侵入性試験を行い同定されている。毒素産生性や組織侵入性については検査法もほぼ確立されている。しかし、古典的な血清型別法で決定された病原大腸菌は、その全てが病原因子を持った下痢原性大腸菌であるとは限らない。そのため検査室における診断では、しばしば混乱が生じているという現状がある。特に健康人からも高率に検出される大腸菌血清群 01 および 018 の病原性については不明な点が多いにもかかわらず、血清型別試験だけで

下痢原性大腸菌と決定される場合も多い。そこで今回、下痢症患者から分離された大腸菌のうち血清群 01, 018 を対象に病原因子の保有状況を調べた。

B. 研究方法

1) 供試菌株

2002 年から 2005 年の間に当研究センターに搬入された約 7,000 人の下痢症患者糞便から分離した大腸菌を供試した。糞便は DHL 寒天平板に塗抹、18~24 時間培養を行った。出現した大腸菌様集落について糞便 1 検体あたり 4 集落を性状確認培地 (TSI 寒天, LIM

培地等)に塗抹して性状を確認後、市販の病原大腸菌免疫血清(デンカ生研)0群1および0群18を用い凝集反応を行い、明らかに凝集が認められた菌株を供試した。1検体から複数集落の01および018を検出した場合は、代表1株を選び、病原因子の検出を行った。

供試菌株数は、血清群01では241人から分離された241株、血清群018は154人から分離された154株である。

2) 鞭毛抗原(H抗原)の決定

市販の病原大腸菌免疫血清(デンカ生研)および自家調製した血清を用いて、常法に従い血清型別を行った。

3) 大腸菌病原因子の検出

ベロ毒素(VT):市販のラテックスキット(VTEC-RPLA,デンカ生研)およびPCR法で調べた。

易熱性エンテロトキシン(LT):市販のラテックスキット(セトロキシLT,栄研化学)およびLT遺伝子を対象としたPCR法で調べた。

耐熱性エンテロトキシン(ST):ELISA法(コリストEIA,デンカ生研)およびST遺伝子を対象としたPCR法で調べた。

組織侵入性:侵入因子である*invE*遺伝子を対象としたPCR法で調べた。

接着因子等に関わる遺伝子の検出:大腸菌の細胞付着性関連遺伝子(*eaeA*, *bfpA*, *aggR*)および腸管凝集接着性大腸菌が産生する耐熱性エンテロトキシン EAST1 関連遺伝子

(*astA*)をPCR法で確認した。

C. 研究結果

1) 分離菌株の鞭毛抗原(H抗原)型分離された01および018群菌について鞭毛抗原型別を行い、それらの成績を表1および表2に示した。

血清群01で最も多かったのは01:H7で76株(31.5%),次いで01:H168株(28.2%),01:NM 63株(26.1%),01:H4/17 9株(3.7%),01:H6 4株(1.7%)など、全部で15種類の血清型に分類された。

018群で最も多かった血清型は018:H7 73株(47.4%)で、次いで018:H4/17 48株(31.2%),018:NM 18株(11.7%),018:H1 2株(1.3%)など全部で9種類の血清型に分類された。

2) 病原因子保有状況

大腸菌血清群01の241株および血清群018の154株について各種大腸菌の病原因子保有状況を表3に示した。血清群01では*astA* 1株が陽性であったが、それ以外の株は全てVT, LT, ST, *eaeA*, *aggR*, *bfpA*のいずれの病原因子も陰性であった。*astA* 陽性株の血清型は01:H25であった。

血清群018では、いずれの病原因子も全て陰性であった。

D. 考察

2002年から2005年の間に当研究センターに搬入された下痢症患者395人の糞便から分離された大腸菌血清群01および018について、ベロ毒素, 易

熱性毒素および耐熱性毒素の産生性、組織侵入性、細胞付着性関連遺伝子 (*eaeA*, *bfpA*, *aggR*) および腸管凝集接着性大腸菌が産生する耐熱性エンテロトキシン EAST1 関連遺伝子 (*astA*) の保有状況について調べた。その結果、血清群 01 の 241 株および 018 の 154 株中、1 株 (01:H25) のみが *astA* 遺伝子陽性であったが、その他の病原因子は全て陰性であった。

近年、*astA* 単独保有大腸菌による集団下痢症や食中毒事例がしばしば報告されている。しかし今回分離された *astA* 単独保有株 01:H25 が実際に下痢を惹起させるのに、どのように関与していたかは不明である。この患者からは特記されるべき腸管系病原菌やウイルスは検出されなかった。

今回下痢症患者から分離した大腸菌血清群 01 および 018 は、1 株を除いて既知の病原因子を保有していなかった。また、これらの血清群は健康人からも高率に検出されることから、病原因子の確認をせず、血清型別試験のみで、病原大腸菌であると判定することには大きな問題のあることが示唆された。これらの血清群菌を下痢症の原因と判定するためには、他の病原菌の検出状況等を考慮して判定することも必要である。

E. 結論

2002 年から 2005 年の間に下痢症患者糞便から分離された大腸菌血清群 01 および 018 合計 395 株について、VT、LT および ST の産生性、そして細胞付

着性関連遺伝子、EAST1 関連遺伝子の保有状況を調べた結果、1 株のみが *astA* 陽性になったが、その他全ての菌株では、これまでに知られている病原因子は陰性であった。

血清群 01 および 018 は健康人からも高率に検出される。市販の病原大腸菌免疫血清セットにはこれらの 0 群血清が含まれているが、これらの血清群の病原学的意義は非常に低いものと推定された。また、下痢原性大腸菌を血清型別のみで判定することは非常に困難であると考えられた。

F. 健康危機情報

下痢症患者から検出された大腸菌血清群 01 および 018 について既知の病原因子保有状況を調べた結果、病原因子を保有している株は非常に稀であった。実際の検査室では血清型別でスクリーニングをして病原菌と決定することが多いが、これだけでは不十分であり、病原因子の検討が必要である。

G. 研究発表

(学会発表)

1) 小西典子, 尾畑浩魅, 下島優香子, 石崎直人, 門間千枝, 仲真晶子, 矢野一好, 松下 秀, 甲斐明美, 山田澄夫, 諸角 聖, 工藤泰雄. 過去 40 年間に東京都内で発生した下痢原性大腸菌による集団下痢症の細菌学および疫学的解析. 第 80 回日本感染症学会総会, 2006, 東京

表1 ヒト糞便から分離された大腸菌O1群の
H型と分離菌株数

血清型	菌株数 (%)
O1:H7	76 (31.5)
O1:H1	68 (28.2)
O1:NM	63 (26.1)
O1:H4/17	9 (3.7)
O1:H6	4 (1.7)
O1:H18	2 (0.8)
O1:H45	1
O1:H19	1
O1:H34	1
O1:H9	1
O1:H25 *	1
O1:H30	1
O1:H34	1
O1:H6/19	1
O1:HUT	11
計	241

* *astA* 陽性株

表2 ヒト糞便から分離された大腸菌O18群の
H型と分離菌株数

血清型	菌株数 (%)
O18:H7	73 (47.4)
O18:H4/17	48 (31.2)
O18:NM	18 (11.7)
O18:H1	2 (1.3)
O18:H49	1
O18:H27	1
O18:H14	1
O18:H5	1
O18:HUT	9
計	154

表3 ヒト糞便から分離された大腸菌血清群O1およびO18の
病原因子保有状況

	供試数	陽性数						
		VT	LT	ST	<i>eaeA</i>	<i>aggR</i>	<i>bfpA</i>	<i>astA</i>
血清群O1	241	0	0	0	0	0	0	1*
血清群O18	154	0	0	0	0	0	0	0

* 血清型: O1:H25

課題名：下痢の腸内細菌叢の研究方法の開発

分担研究者 江崎孝行（岐阜大学教授）、大楠清文（岐阜大学助教授）

研究要旨

多数の下痢の病原体を一本のチューブにまとめたカクテルプライマーの作成に成功した。また 96 種類の異なったプライマーを同一増幅効率で増やす方法を作成した。これを実現するために 16S rDNA 配列より、多型のある DnaJ 遺伝子配列の解析を行った。腸内細菌、*Vibrio* 属、*Aeromonas* 属の全基準種と臨床株の dnaJ 配列を決定し、この配列が 16S rDNA の 10 倍の多型があることを解明し、この遺伝子配列を腸内細菌科及び *Vibrio* 属の種の同定と識別に利用した。

A. 研究目的

百種類をこす腸内細菌叢と 40 種類をこす下痢の病原細菌を培養法で定量的に解析するのは容易ではないため、PCR 法を使った解析方法が報告されてきた。しかし異なったプライマーは増幅効率が異なるため、多種類のプライマーを同時に使用すると定量性が犠牲になる。リアルタイム増幅をおこなっても異なったプライマーの増幅感度を合わせることができなかつた。リアルタイム増幅をおこなっても異なったプライマーの増幅感度を合わせることができなかつた。16S rDNA は配列が菌種間で類似するため、菌種に特異的な配列をデザインすることが困難で、しばしば増幅効率を犠牲にしなければならなかつた。

そこで我々は 16S rDNA よりはるかに多型がある DnaJ 配列に着目し、腸内細菌、*Vibrios*, *Aeromonas* など主要な下痢を起こす細菌の DnaJ 配列を網羅的に決定し、この配列をつかって増幅効率を調整する方法をめざした。

B. 研究方法

Enterobacteriaceae, *Aeromonadaceae*, および *Vibrioaceae* のすべての基準株を入手し DnaJ 配列を決定した。さらに *Vibrio*, *Aeromonas* の主要な下痢原性細菌の臨床分離株の DnaJ 配列を決定し、菌種内の株の多型の幅を測定した。これらの配列からカクテルの形成に利用できる領域を選択し、プライマーカクテルを作成した。カクテルの感度は realtime PCR 法で増幅効率を比較する方法をとった。腸内フローラの解析に使用する 96 種類のプライマーは単独で使用するが、増幅効率をそろえるためのプライマーの 5 末端にタグ配列を導入し、増幅効率を整えた。

C. 研究結果

Enterobacteriaceae, *Aeromonadaceae*, および *Vibrioaceae* の dnaJ 配列は 16S rDNA が属内で 5%以内のとどまるのに対し、30%以上の配列の多型があつた。同一菌種内の配列の SNP は通常 1%に収まり、ことなつた菌種では 5%以上の配列の違い

があった。

Vibrio mimicus, *Vibrio cholerae* は 16S rDNA では同じ配列をもっており、識別できないが、DnaJ には配列の違いがあり、プライマーの設計ができた。*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* でも同様に、DnaJ 配列で識別ができた。

腸内フローラの解析に使用する 96 種類のプライマーは 5 末端に Tag 配列を導入することで、増幅効率を一定にすることができ、40 種類のプライマーの混合でも感度を落とさないカクテルを作成した。

D. 考察

下痢の病原体を一本のチューブで増幅するカクテルの作成に成功した。さらに 96 種類の異なったプライマーの増幅効率を一定にすることができた。このことはフローラの解析に DNA の希釈段階を多数準備して定量する従来の方法を 1-2 濃度で解析できる可能性を示している。腸内フローラは 10^6 から 10^{11} cfu/g の領域の菌数の解析が要求される。従来は 4-6 段階の希釈 DNA 液を作成し、定量解を行っていたが、今後は 2 種類程度で定量できる可能性が出てきたため、解析コストが軽減されるため、多数の検体の解析ができるようになった。

E. 結論

DnaJ 配列を使い、下痢の病原体を一本のチューブで増幅するカクテルの作成に成功した。また 96 種類の異なったプライマーを単独で、同時に増幅するための課題であった、増幅効率の均一化に成功した。

F. 研究発表

1) Shah MM, Iihara H, Noda M, Sun X, Nhung PH, Ohkusu K, Kawamura Y, Ezaki T: *dnaJ* gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 25-30, 2007

2) Kitamura T, Kawamura Y, Ohkusu K, Masaki T, Iwashita H, Sawa T, Fujii S, Okamoto T, Akaike T: *Helicobacter cinaedi* cellulitis and bacteremia in immunocompetent hosts after orthopedic surgery. Journal of Clinical Microbiology 45:31-38, 2007

3) Nhung PH, Shah MM, Ohkusu K, Noda M, Hata H, Sun X, Iihara H, Goto K, Masaki T, Ezaki T: *dnaJ* gene as a novel phylogenetic marker for identification of *Vibrio* species. Systematic and Applied Microbiology 30: in press, 2007

4) Nureki S, Miyazaki E, Matsuno O, Takenaka R, Ando M, Kumamoto T, Nakano T, Ohkusu K, Ezaki T: *Corynebacterium ulcerans* infection of the lung mimicking the histology of Churg-Strauss syndrome. Chest 131: in press, 2007

5) Nhung PH, Ohkusu K, Mishima N, Noda M, Shah MM, Sun X, Hayashi M,

Ezaki T: Phylogeny and species identification of the family *Enterobacteriaceae* based on *dnaJ* sequences. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease xx: in press, 2007

6) Kuroki H, Miyamoto H, Fukuda K, Iihara H, Kawamura Y, Ogawa M, Wang Y, Ezaki T, Taniguchi H: *Legionella impletisoli* sp. nov. and *Legionella yabuuchiae* sp. nov., isolated from soils contaminated with industrial wastes in Japan. Systematic and Applied Microbiology 30: in press, 2007

7) Itoh Y, Kawamura Y, Kasai H, Shah MM, Nhung PH, Yamada M, Sun X, Koyama, T, Ohkusu K, Ezaki T: *dnaJ* and *gyrB* gene sequence relationship among species and strains of the genus *Streptococcus*. Systematic and Applied Microbiology 29:368-374, 2006

8) Huang, X, Xu, H, Sha, M.M., Zhao, L, Ohkusu, K, Kawamura, Y, Ezaki, T: Virulence-defective strains of *Salmonella enterica* serovar Typhi as candidates for education at level 2 facilities. Microbiol. Immunol. 50:273-279, 2006

研究発表一覧

1. Vlademir. C., T. Kodama, N. Nijjstad, S. K. Abolghait, T. Iida and T. Honda. : Cortactin is essential for F-actin assembly in enteropathogenic *Escherichia coli*(EHEC)-and enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC)-induced pedestals and the α -helical region is involved in the localization of cortactin to bacterial attachment sites. Cellular Microbiology 8(5) : 769-780, 2006.
2. Ono. T., K. S. Park, M. Ueta, T. Iida and T. Honda. : Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* Type III secretion system 1. Infect. Immun. 74(2) : 1032-1042, 2006.
3. Shime. A. H., T. Iida, M. Arita, K. S. Park, T. Kodama and T. Honda : Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. FEMS Microbiol. Lett. 264 : 89-97, 2006.
4. Miura,M., Jun Terajima, Hidemasa Izumiya, Jiro Mitobe, Teruya Komano and Haruo Watanabe. OspE2 of *Shigella sonnei* is required for the maintenance of cell architecture of bacteria-infected cells. Infect & Immun. 74: 2587-2595. 2006
5. Nakayama,S., and Haruo Watanabe. The mechanism of *hilA* repression by 1,2-propanediol consists of the two distinct pathways; one Dependent on, and the other independent of catabolic production of propionate in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Bacteriol. 188: 3121-3125. 2006.
6. Iyoda,S., Nobuo Koizumi, Hitomi Satou, Yan Lu,Takeshi Saitoh, Makoto Ohnishi, and Haruo Watanabe. The GrlR-GrlA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and Lee-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 188: 5682-5692. 2006.
7. T. Imamura, H. Kobayashi, R. Khan, H. Nitta and K. Okamoto. Induction of vascular leakage and blood pressure lowering through kinin release by a seine protease from *Aeromonas sobria*, J. Immunol., 177:8723-8729, 2006.
8. H. Kobayashi, E. Takahashi, K. Oguma, Y. Fujii, H. Yamanaka, T. Negishi, S. Arimoto-Kobayashi, T. Tsuji, K. Okamoto: Cleavage specificity of the serine protease of *Aeromonas sobria*, a member of the kexin family of subtilases, FEMS Microbiol. Lett., 256(1):165-170, 2006.