

200704001A

細菌性腸管感染症の病態解析とその応用的研究

(課題番号 : H19-国医-指定-001)

平成19年度総括・分担研究報告書

(厚生労働科学研究費補助金社会保障国際協力推進研究事業)

主任研究者 本田武司

大阪大学微生物病研究所 細菌感染分野

目次

厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業）

1. 平成 19 年度総括研究報告書

細菌性腸管感染症の病態解析とその応用的研究	1	
主任研究者	本田 武司	大阪大学微生物病研究所

2. 平成 19 年度分担研究報告書

1) 病原性大腸菌に関する成果

(1) 毒素原性大腸菌（ETEC）に関する成果

①下痢症患者から分離される大腸菌の病原因子解析	11	
分担研究者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター・微生物部
協力研究者	小西 典子	〃
	尾畑 浩魅	〃
	下島 優香子	〃
	門間 千枝	〃
	仲真 晶子	〃
	矢野 一好	〃

②毒素原性大腸菌の Ent プラスミドの解析	17	
分担研究者	辻 孝雄	藤田保健衛生大学医学部 微生物学教室

(2) 腸管出血性大腸菌（EHEC/STEC）に関する成果

①志賀毒素産生性大腸菌の分子遺伝学的研究	21	
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	Muhammad Kamruzzaman	京都大学大学院 医学研究科
	小坂橋 努	京都大学 東南アジア研究所
	崔 山	青島誠誉食品安全研究所

②腸管出血性大腸菌血清型 O86:H-による 溶血性尿毒症症候群（HUS）発症の分子遺伝学に関する研究	27	
分担研究者	山本 達男	新潟大学大学院

③腸管出血性大腸菌感染に関する併発する急性脳症の解明	34	
分担研究者	吉田 真一	九州大学大学院 細菌学
協力研究者	藤井 潤	〃

④腸管感染症起因菌における病原性のゲノム情報基盤とゲノム多様性の解明…………… 38
分担研究者 林 哲也 宮崎大学

⑤腸管出血性大腸菌の新規毒素の作用機構に関する研究…………… 43
分担研究者 野田 公俊 千葉大学大学院医学研究院

⑥腸管出血性大腸菌 O157 感染症の病態に及ぼす腸内常在菌の影響とその利用…………… 46
分担研究者 西川 禎一 大阪市立大学
協力研究者 戸嶋 ひろ野 大阪大学微生物病研究所特任研究員

2) コレラ菌に関する成果

①環境水中の *Vibrio cholerae* の病原学的解析…………… 55
分担研究者 篠田 純男 岡山理科大学

②古典型コレラ菌が産生する VCH 様タンパク質の発現機構に関する研究…………… 61
分担研究者 島村 忠勝 昭和大学
協力研究者 生貝 初 鈴鹿工業高等専門学校

3) 腸炎ビブリオに関する成果

①腸炎ビブリオのエフェクター因子の解析…………… 67
分担研究者 本田 武司 大阪大学微生物病研究所
協力研究者 飯田 哲也 “
児玉 年央 “

②新興型腸炎ビブリオの抗原変換メカニズムの解明…………… 70
分担研究者 大澤 朗 神戸大学

4) ヘリコバクターピロリに関する成果

① *Helicobacter pylori* の胃粘膜定着性に関する生態学的研究…………… 75
分担研究者 神谷 茂 杏林大学医学部感染症学教授

②ヘリコバクター・ピロリの毒性発現に関する研究…………… 80
分担研究者 平山 壽哉 長崎大学

5) 赤痢菌に関する成果

①赤痢菌病原性遺伝子の転写後制御機構の解析に関する研究…………… 84
分担研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所

6) サルモネラに関する成果

①サルモネラ属菌の産生するエンテロトキシンの作用解析…………… 89
分担研究者 倉園 久生 帯広畜産大学

7) カンピロバクターに関する成果			
① <i>Campylobacter</i> 属細菌の分子疫学的解析に関する研究	94		
分担研究者	山崎 伸二	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科	
8) エロモナスに関する成果			
① アエロモナスの病原因子の機能解析	97		
分担研究者	岡本 敬の介	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科	
9) 細菌の検出法の開発			
① プライマーカクテルを使用した			
多種類の下痢原性細菌のモニターと腸内菌叢の同時定量解析	102		
分担研究者	江崎 孝行	岐阜大学大学院	
3. 研究発表一覧	104		

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (社会保障国際協力推進研究事業) 総括研究報告書
細菌性腸管感染症の病態解析とその応用的研究
(課題番号 : H19-国医-指定-001)

主任研究者 : 本田武司 大阪大学微生物病研究所教授

研究要旨 :

本研究班は、我国の細菌性腸管感染症を種々な角度から研究している主要メンバーから構成されている。つまり、疫学、生態学、病態学、検査学、さらには生物進化にまで広がるテーマに取り組んでおり、対象菌種も病原性大腸菌、腸炎ビブリオ、コレラ菌、ヘリコバクター、カンピロバクター、赤痢菌、サルモネラ、エロモナスと多彩である。これらの研究を通じて得られた情報を持ち寄り討議することで情報の共有化をはかり、世界の一流の専門誌等に、多数発表できた。疫学的知見も次第に蓄積すると共に、迅速診断法への応用的研究にも進歩があった。

分担研究者 :

甲斐明美 : 東京都健康安全研究センター
微生物部 細菌学

辻孝雄 : 藤田保健衛生大学 細菌学

西淵光昭 : 京都大学東南アジア研究所
病原微生物学

山本達男 : 新潟大学大学院 細菌学

吉田真一 : 九州大学大学院 細菌学

林哲也 : 宮崎大学 微生物学

野田公俊 : 千葉大学大学院医学研究院
病原分子制御学

西川禎一 : 大阪市立大学大学院
食品微生物学

篠田純男 : 岡山理科大学
環境病原微生物学

島村忠勝 : 昭和大学医学部
微生物学・免疫学

大澤朗 : 神戸大学大学院農学研究科
資源生命科学

神谷茂 : 杏林大学医学部 細菌学

平山壽哉 : 長崎大学熱帯医学研究所
病原細菌学

渡邊治雄 : 国立感染症研究所 細菌学

倉園久生 : 帯広畜産大学 病原微生物学

山崎伸二 : 大阪府立大学大学院
生命環境科学研究科 細菌学

岡本敬の介 : 岡山大学 病原微生物学

江崎孝行 : 岐阜大学大学院医学系研究科
病原体制御学

A. 研究目的 :

経口感染する腸管感染症は当然汚染食品、水が原因となり、「食の安全」に関心が寄せられている現今の事情を考えると、本研究班の役割は大きい。実際、世界的に見ると下痢性疾患は、呼吸器感染症とともに 2 大死因となっている。この傾向は発展途上国で見られるのみならず、いわゆる O157 のように先進国で問題となりやすい下痢原因菌も存在し、我国も大きな集団発生を経験してきた。特に我国は東南アジア等の発展途上国に近いうえに、食料の 60% を輸入に頼っていることを考えると、下痢症の侵入の危険が迫っていると考えた方がよい。本研究班は、細菌性下痢症の制御をめざし、食の安全を守るためにも、生態から病態ま

での幅広い研究を展開し、制御しやすいポイントを考え出そうとする基盤的研究を行うことが目標である。

B. 研究方法：

種々な研究目的により、それぞれに適した研究手法を用いた。たとえば、分子疫学、生態学、細胞生物学、分子遺伝学、生化学、病理学、免疫学、統計学などを用いて、各自の課題に取り組んだ。病原細菌を用いる場合は基本的な細菌学的手法を用いた。菌株の保存、分与、等は法律の定め、動物実験では、苦痛を与えないよう配慮し、動物倫理規定に従った。ヒト材料を用いる場合は、人権に十分配慮し、各施設の倫理委員会の許可を得て実施した。

C. 研究成果：

1) 病原性大腸菌に関する成果

(1) 毒素原性大腸菌 (ETEC) に関する成果

① ETEC の疫学：

東京都内で発生した毒素原性大腸菌 (ETEC) の発生状況を明らかにすることを目的として、ETEC による集団下痢症および散発下痢症事例について細菌学的、疫学的解析を行った。1966 年から 2006 年までに東京都内で発生した集団下痢症事例の発生状況をまとめた結果、ETEC による事例が 125 事例と全体の 66.1% を占め、最も多く発生していた。ETEC による集団下痢症の推定原因は、国内旅行中の食事、集団給食、仕出し弁当、井戸水・飲料水、会席料理等であったが、近年は海外旅行中の食事によると推定される事例が増加傾向にあった。

ETEC による集団下痢症事例の原因として複数血清型菌が検出された事例が、これまでに 13 事例確認された。これらは 1970

年代に 1 事例、1980 年代 2 事例、1990 年代 4 事例、2001 年以降に 6 事例と、近年増加傾向にある。日本で発生した集団下痢症患者と海外旅行者下痢症患者から分離された ETEC の血清型および毒素型が、同じような傾向を示したことから、日本で発生している集団下痢症事例は、海外の影響を受けている可能性も推定された。

② ETEC の病原性プラスミド：

ETEC の病原性獲得機構、そして、Ent プラスミドの進化について解析するため、ETEC H10407 株の Ent プラスミド (pEntH10407) を単離し、その全塩基配列を決定した。その結果、pEntH10407 の LT 遺伝子 (*elt*)、STIa 遺伝子 (*est*) は、挿入配列を介した獲得機構が推察された。また、pEntH10407 は、少なくとも 3 つの領域からなるモザイク状プラスミドとして進化してきたことが明らかになった。

2) 腸管出血性大腸菌 (EHEC/STEC) に関する成果

① 中国で分離した EHEC：

中国青島市で、免疫磁気ビーズ法を利用して、牛肉から 8 菌株の O157 を分離した。菌株はすべて *stx2* 遺伝子を保持し、TNP-PCR 陽性株で、Stx2 非産生性あるいは低産生性であった。これらの菌株から *stx2* ファージを分離し、代表ファージのゲノムの全塩基配列を解析することができた。この *stx2* ファージは既知の *stx1* ファージや *stx2* ファージを部分的に組み合わせたモザイク状構造から成るユニークな塩基配列を持っている。今までに分離した TNP-PCR 陽性株も 2 領域 (可変領域) 以外の配列をすべて保有している。可変領域の変化ある

いは宿主菌の補助的要因の違いが *stx₂* フェージの増殖を低下あるいは阻止し、Stx2 非産生性あるいは低産生性に関連する重要な要因になっていると考えられる。

②O86:H-による HUS :

(1) EHEC 血清型 O86:H-は、type III 分泌システムが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) EHEC 血清型 O86:H-の Stx2 フェージは、血清型 O157:H7 の Stx2 フェージとは由来が異なり、独自の挿入配列と独自の挿入メカニズムをもつ。

(3) EHEC 血清型 O86:H-のゲノムの血清型 O157:H7 ゲノムへの相同性は約 50%にすぎず、特異な領域が多い。

③Stx2 のアポトーシス誘導 :

ベロ毒素 2 型は脳血管内皮細胞に対して、CHOP 依存的な小胞体ストレスを誘導し、この CHOP 誘導には BiP シャペロンを使うことなく、かつ Ire1/XBP-1 の経路をも伴わないベロ毒素 2 型独特の経路であった。ベロ毒素によって誘導される小胞体ストレスは caspase-3 依存的に細胞死の方向に向かわせる。

④EHEC のゲノム解析 :

O157 EHEC のゲノム多様性解析の結果を基に開発した迅速菌株識別システムの実用化に成功した。主要な non-O157 EHEC (O26・O111・O103) の全ゲノム配列を決定し、全遺伝子の同定、プロフェージと IS エレメントの網羅的な同定を行った。

⑤EHEC の新規毒素 :

SubAB による蛋白合成阻害機構は、BiP が分解されたことによる ER ストレスからの解除として一過性に起こっていることを明らかとした。さらに SubAB で処理すると cyclin D1 の down regulation により、細胞周期が G1 期で停止することが明らかとなった。

⑥EHEC へのコリシンの作用 :

O157 の志賀毒素産生性に及ぼすコリシンの影響を調べたところ、期待に反して毒素産生の低下は認められず、DNase 型のコリシンの場合はむしろ志賀毒素産生を亢進させることが明らかとなった。その機構としては、SOS 応答を介したフェージ誘導によることが示唆された。

2) コレラ菌に関する成果

①日本の環境水中からの分離 :

岡山県下の 2 か所の水域で *V. cholerae* の分子疫学的調査を行い、O1 血清型株 2 株を得たが、いずれもコレラ毒素遺伝子および TCP 遺伝子を保有しておらず、流行性のコレラを引き起こす強毒株ではなかった。一方 non-O1/non-O139 株 31 株では大腸菌耐熱性毒素類似毒素遺伝子 *nag-st* を持つ株が 2 株得られ、エルトール溶血毒素遺伝子 *hlyA* や RTX 毒素 *rtx* は多くの株に見られたが、いずれの病原因子遺伝子も保有しない株も検出され、病原学的な意義の解析が必要である。

②古典型コレラ菌の産生する溶血毒類似タンパク :

古典型コレラ菌 569B 株から分子量の異なる 2 種類(58kDa と 80kDa)の VCH 様タンパク質が産生されていることが分かった。

これらのタンパク質は、569B株をグリセロール添加培地で培養した方が産生量が増大する傾向がみられた。VCHを認識する領域が異なる3種類の抗体を使った実験結果から、古典型コレラ菌569B株の*cl-hlyA*の終始コドンを読みスルーし、その塩基配列から予想されていた24kDaよりも大きい分子量を持つタンパク質が発現していることが示唆された。

3) 腸炎ビブリオに関する成果

(1) T3SS-1のエフェクターの同定:

腸炎ビブリオの大小2つの環状染色体上に各1セットの3型分泌装置(T3SS-1およびT3SS-2)が存在していることが明らかになっているが、それによる分泌タンパクとその機能については十分明らかになっていない。そこで、T3SS-1のエフェクタータンパクを検索したところVP1680、VP1686、VPA450の各遺伝子産物が得られた。このうち、VP1680がT3SS-1の示す細胞毒性に関与していることが明らかになった。また、このVP1680は標的細胞をApoptosis死させることも分った。

(2) 抗原変換メカニズムの解明:

新興型腸炎ビブリオのO:K抗原変換の詳細を明らかにするため、新興型O3:K6株のゲノム配列と既知の*Vibrio cholerae*のlipopolysaccharide (LPS)合成に関連する遺伝子群と比較・解析することにより、O:K血清型に関連する遺伝子群を推定した。さらに、新興型腸炎ビブリオO4:K68株の同遺伝子群の塩基配列を決定し、O3:K6株と比較した結果、O4:K68株はこの遺伝子領域が全く異なっており、大規模なDNA配列の変換が起こっていることが明らかになった。以上から、次々に出現する異なる新

興型の新興型腸炎ビブリオはこの遺伝子領域が入れ替わる事により出現したと考えられた。

4) ヘリコバクターピロリに関する成果

(1) 胃内フローラとヘリコバクターの定着:

*H. pylori*感染と関連するスナネズミ胃内フローラ構成細菌を特定するために、*H. pylori*感染スナネズミモデルを作成し、16SrRNAをターゲットとした、定量的PCR法を用いて定量解析を行った。スナネズミの胃から検出されたのは*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium coccooides* group, *Clostridium leptum* subgroup, *Prevotella*, *E. cylindroides* groupで、そのうち最も優勢な菌数を示したのが*Lactobacillus*であった。*H. pylori*感染10週群と比べて感染1年半群において*E. cylindroides* groupの定着菌数は長期感染群に有意な菌数の低下が観察された。

(2) 空砲化毒素のIL-8誘導:

ヘリコバクター・ピロリが産生するVacAが宿主の単球系を中心に細胞内のCa²⁺濃度を上昇させ、NF- κ B, ATF-2, CREBなどの転写因子を活性化し、IL-8の発現を直接促すことが証明された。

5) 赤痢菌に関する成果

(1) T3SSの発現に関与する転写後調節:

赤痢菌の病原性を規定するType III secretion systemは温度によってその発現が厳密に制御され、その調節はレギュレーター分子InvEの発現の転写後調節によって制御されることを明らかにした。

6) サルモネラに関する成果

(1) エンテロトキシン:

S. enteritidis の臨床分離株 (171 株) から Stn の精製を試み、1) 最終的に SDS-PAGE で 2 本のバンドまで精製し、2) その生物活性を CHO 細胞の形態変化で証明した。

7) カンピロバクターに関する成果

(1) *cdt* を利用した同定法:

cdt 遺伝子を標的としたマルチプレックス PCR 法は簡便、迅速かつ正確な *C. jejuni*, *C. coli* 及び *C. fetus* の菌種同定法として有用である。

8) エロモナスに関する成果

(1) 食塩濃度とメタロプロテアーゼ:

アエロモナスが淡水中では多数分離され

るのに対し、海水中ではその生存数が減少する事に着目し、アエロモナスの毒素産生と食塩濃度の関係を調べた。アエロモナスのメタロプロテアーゼ遺伝子の転写は 3% 食塩下では阻害され、メタロプロテアーゼの産生が停止することを明らかにした。

9) 細菌の検出法の開発

(1) 多種類の下痢症細菌の同時定量解析:

細菌性下痢症を起こす 11 種類の病原体を同時にスクリーニングするカクテル増幅法を創成し、食材や糞便中の病原体の生死を判定しながらスクリーニングする生菌の遺伝子検査手法を作成した。また糞便内の正常細菌を市販の 96well で PCR を行い定量解析する手法をあわせて下痢症の腸内フローラの解析を遺伝子で短時間で検出同定基本的な手法を確立した。

として海外の影響が推察される例が増えていること。

2) 日本の自然界でコレラ菌が生息可能なこと。

これらは、「食の安全」確保の上からも今後注意する必要がある。

D. 考察:

種々な角度から種々な腸管感染原因菌に関する知見を深化させることができた。特に、国内環境水中からのコレラ菌 (毒素遺伝子を持たないが) が検出されたことは、病原性コレラ菌が我国の環境水中で生息する可能性が考えられ、注目される。また、多くの病原体を同時に生死を区別して鑑別検出同定できるシステムの基本が構築できたのも、今後期待できる。

E. 結論:

種々な視点から、種々な腸管感染病原菌についての知見を深化させた。

F. 健康危険情報

特に国民に早急に知らせるべき情報ではないが、次の 2 点を指摘しておきたい。

1) 日本で発生している集団下痢症の原因

G. 研究発表論文

(Peer Review 付き英文のみ)

論文発表

1. Lee, J.C., Hwang, H.J., Sakaguchi, Y., Yamamoto, Y., Arimitsu, H., Tsuji, T., Watanabe, T., Ohyama, T., Tsuchiya, T. and Oguma, K. C terminal half fragment (50 kDa) of heavy chain components of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins can be used as an effective vaccine, *Microbiol. Immunol.* 51:445-455, 2007

2. Tsuji, T., Shimizu, T., Sasaki, K., Shimizu, Y., Tsukamoto, K., Arimitsu, H., Ochi, S., Sugiyama, S., Taniguchi, K., Neri, P. and Mori, H. Protection of mice from Shiga toxin-2 toxemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin, Vaccine 26:469-476, 2008
3. Tsukamoto, K., Kozai, Y., Ihara, H., Kohda, T., Mukamoto, M., Tsuji, T. and Kozaki, S. Identification of the receptor-binding sites in the carboxyl-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin types C and D, Microb. Pathog. *in press*
4. Kalnauwakul, S., M. Phengmak, U. Kongmuang, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. 2007. Examination of diarrheal stools in Hat Yai City, southern Thailand, for *Escherichia coli* using immunomagnetic separation and PCR method. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 38(5):871-850.
5. Koitabashi, T., S. Cui, K. Muhammad, and M. Nishibuchi. Isolation and characterization of the Shiga toxin gene (*stx*)-bearing *Escherichia coli* O157 and non-O157 from retail meats in Shandong Province, China and characterization of the O157-derived *stx*₂ phages. J. Food Prot., *in press*.
6. Ogura, Y., Ooka, T., Whale, A., Garmendia, J., Beutin, L., Tennant, S., Krause, G., Morabito, S., Chinen, I., Tobe, T., Abe, H., Tozzoli, R., Caprioli, A., Rivas, M., Browne, R. R., Hayashi, T., and Frankel, G. TccP2 of O157:H7 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): challenging the dogma of EHEC-induced actin polymerization Infect. Immun. 75(2) :604-612, 2007
7. Ooka, T., Vieira, M.A., Ogura, Y., Beutin, L., Ragine, R.L., van Diemen, P.M., Stevens, M.P., Aktan, I., Cawthraw, S., Best, A., Hernandez, R.T., Krause, G., Gomes, T.A.T., Hayashi, T., and Frankel, G. Characterization of tccP2 carried by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 271:126-135, 2007
8. Whale, A., Hernandez, R.T., Ooka, T., Krause, G., Schuller, S., Garmendia, J., Crowther, L., Vieira, M.A., Ogura, Y., Phillips, A.D., Beutin, L., Gomes, T.A., Hayashi, T., and Frankel, G. TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2 - a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. Microbiology 153: 1743-1755, 2007
9. Morita, H., Kuwahara, T., Okushima, K., Sasamoto, H., Itoh, K., Hattori, M., Hayashi, T., and Takami, H. An improved DNA isolation method for metagenomic analysis of the microbial flora of the human intestine. Microbes Environ. 22(3):214-222, 2007
10. Ogura, Y., Ooka, T., Asadulghani, Terajima, J., Nougayrède, J-P., Kurokawa, K., Tashiro, K., Tobe, T., Nakayama, K., Kuhara, S., Oswald, E., Watanabe, H., and Hayashi, T. Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. Genome Biol. 8(7):R138, 2007
11. Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., Takami, H., Morita, H., Sharma, V.K., Srivastava, T.P.,

- Taylor, T.D., Noguchi, H., Mori, H., Ogura, Y., Ehrlich, D.S., Itoh, K., Takagi, T., Sakaki, Y., Hayashi, T., and Hattori, M. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.* 14:169-181, 2007
12. Loukiadis, E., Nobe, R., Herold, S., Tramuta, C., Ogura, Y., Ooka, T., Morabito, S., Kerouredan, M., Brugere, H., Schmidt, H., Hayashi, T., and Oswald, E. Distribution, functional expression genetic organization of Cif, a phage-encoded type III-secreted effector from enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190(1) :275-285, 2008
 13. Iguchi, A., Ooka, T., Ogura, Y., Asadulghani, Nakayama, K., Frankel, G., and Hayashi, T. Genomic comparison of the O-antigen biosynthesis gene clusters of *Escherichia coli* O55 strains belonging to three distinct lineages. *Microbiology* 154(2): 559-570, 2008
 14. Abe, H., Miyahara, A., Oshima, T., Tashiro, K., Ogura, Y., Kuhara, S., Ogasawara, N., Hayashi, T., and Tobe, T. Global regulation by horizontally transferred regulators establishes the pathogenicity of *Escherichia coli*. *DNA Res.* 2008; doi:10.1093/dnares/dsm033.
 15. Izutsu, K., Kurokawa, K., Tashiro, K., Kuhara, S., Hayashi, T., Honda, T., and Iida, T. Comparative genomic analysis using microarray demonstrates strong correlation between presence of Vp-PAI and pathogenicity in Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 2008 :IAI.01535-07v1.
 16. Eguchi, H., Kuwahara, T., Miyamoto, T., Nakayama-Imahiji, H., Ichimura, M., Hayashi, T., and Shiota, H. High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J. Clin. Microbiol.* 46:527-532, 2008.
 17. Hayashi T., Ooka T., Ogura Y. and Asadulghani :Genomic view on the evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In *Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens*. pp.407-419, Edited by Baquero, F., Nombela C., Cassell, C.H. and Gutierrez, J.A..(2007) ASM Press. Washington, D.C.
 18. Morinaga, N., Yahiro, K., Matsuura, G., Watanabe, M., Nomura, F., Moss, J., and Noda, M. (2007) Two distinct cytotoxic activities of subtilase cytotoxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 75: 488-496.
 19. Morinaga, N., Yahiro, K., Matsuura, G., Watanabe, M., Nomura, F., Moss, J., and Noda, M. (2008) Subtilase cytotoxin, produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*, transiently inhibits protein synthesis of Vero cells via degradation of BiP and induced cell cycle arrest at G1 by down-regulation of cyclin D1. *Cell Microbiol.*(in press)
 20. Toshima, H., Hachio, M., Ikemoto, Y., Ogasawara, J., Hase, A., Takahashi, K., Masaki, H., and Nishikawa, Y. Prevalence of enteric bacteria that inhibit growth of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 in humans. *Epidemiol. Infect.* 135: 110-117,

2007

21. Toshima, H., Yoshimura, A., Arikawa, K., Hidaka, A., Ogasawara, J., Hase, A., Masaki, H., and Nishikawa, Y. Enhancement of Shiga-toxin production in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7 by DNase colicins. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7582-7588, 2007
22. Shinoda, S., Nakagawa, T., Hirakawa, N., Miyoshi, S., Arakawa, E., Tamamurthy, T., Dutta, B., Faruque, S., Nair, G. B. (2008) Molecular epidemiological studies of *Vibrio cholerae* in Bengal region. *Biocontrol Sci.*, in press.
23. Anai, S., Yasunobu Tagami, Y., Narita, T., Ikigai, H., and Oishi, Y. Morphological and mechanical studies of cholesterol monolayer on aqueous solution of *Vibrio cholerae* hemolysin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, in press, 2008.
24. D. Hamada, T. Higurashi, K. Mayanagi, T. Miyata, T. Fukui, T. Iida, T. Honda and I. Yanagihara : Tetrameric structure of thermostable direct hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* revealed by ultracentrifugation, small-angle x-ray scattering and electron microscopy. *J. Mol. Biol* 365 : 187-195, 2007.
25. G. Feng, T. Kodama, X. Chen, K. Okada, and T. Honda : A targeting approach for delivery of polymer microparticle-antibody conjugate against *Vibrio parahaemolyticus*-induced cytotoxicity to human intestinal epithelial cells. *Journal of Drug Targeting* 15(6) : 428-436, 2007.
26. B., Rabindra N., Kwon-Sam Park, X. Chen, T. Iida, T. Honda, O. Takeuchi, and . Akira : Translocation of VP1686 Upregulates RhoB and Accelerates Phagocytic Activity of Macrophage Through Actin Remodeling. *J. Microbiol. Biotechnol.* (in press)
27. Okura, M., Osawa, R., Tokunaga, A., Morita, M., Arkawa, E., and Watanabe, H. Genetic analyses of the putative O- and K-antigen gene clusters of pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol. Immunol.* In press
28. Osaki T., Hanawa T., Manzoku T., Fukuda M., Kawakami H., Suzuki H., Yamaguchi H., Yan X., Taguchi H., Kurata S. and Kamiya S. 2006. Mutation of luxS affects motility and infectivity of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of a Mongolian gerbil model. *J. Med. Microbiol.* 55(11):1477-85.
29. Kamoda O., Anzai K, Mizoguchi J., Yanagi T., Shioiri M., Nishio T. and Kamiya S. 2006. In vitro antibacterial activity of a novel antimicrobial agent TG44 for treatment of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 50(9):3062-3069.
30. Yamanishi S, Iizumi T, Watanabe E, Shimizu M, Kamiya S, Nagata K, Kumagai Y, Fukunaga Y & Takahashi H: Implication of induction of autoimmunity via activation of B-1 cells by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 74(1): 248-256, 2006.
31. Hisatsune J, Yamasaki E, Nakayama M, Shirasaka D, Kurazono H, Katagata Y, Inoue H, Han J, Sap J, Yahiro K, Moss J, Hirayama T.: *Helicobacter pylori* VacA enhances PGE2 production through induction of COX-2 expression via a p38 MAP kinase/ATF-2 cascade in AZ-521 cells.

- Infect. Immun. 75, 4472-4481, 2007.
32. Katagata Y, Hirayama T.: Unexpected expression of Hsp47, Q1 a replacement of one amino acid (Val 7 Leu) in the amino terminal region, in cultured human tumorigenic cell lines. *J Dermatol. Sci.* 49:33-38, 2008.
 33. Hisatsune J, Nakayama M, Isomoto H, Kurazono H, Mukaida N, Mukhopadhyay AK, Azuma T, Yamaoka Y, Sap J, Yamasaki E, Yahiro K, Moss J, Hirayama T. Molecular characterization of *Helicobacter pylori* VacA-induction of IL-8 in U937 cells reveals a prominent role for p38MAP kinase in ATF-2, CREB and NF- κ B activation. *J. Immunology.* in press.
 34. Mitobe. J., Morita-Ishihara. T., Ishihama. A., Watanabe. H., 2007 Dec 21. *J. Biol. Chem.* [Epub ahead of print]
 35. Hisatsune, J., Yamasaki, E., Nakayama, M., Shirasaka, D., Kurazono, H., Katagata, Y., Inoue, H., Han, J., Sap, J., Yahiro, K., Moss, J., Hirayama, T.: *Helicobacter pylori* VacA Enhances Prostaglandin E2 Production through Induction of Cyclooxygenase 2 Expression via a p38 Mitogen-Activated Protein Kinase/Activating Transcription Factor 2 Cascade in AZ-521 Cells. *Infect Immun.* 75:4472-4481, 2007.
 36. Tapchaisri, P., Na-Ubol, M., Jaipaew, J., Srimanote, P., Chongsa-Nguan, M., Yamasaki, S., Hayashi, H., Kurazono, H., Chaicumpa, W.: Virulence genes of clinical *Vibrio cholerae* O1 isolates in Thailand and their ribotypes. *J. Infect.:* 55: 557-565, 2007.
 37. Hisatsune, J., Nakayama, M., Isomoto. H., Kurazono, H., Mukaida, N., Mukhopadhyay, A. K., Sap, J., Yamasaki, E., Yahiro, Y., Moss, J., and Hirayama, T.: Molecular characterization of *Helicobacter pylori* VacA-induction of IL-8 in U937 cells reveals a prominent role for p38MAP kinase in ATF-2, CREB and NF- κ B activation. *J. Immunol.* In press, 2008.
 38. Tapchaisri, P., Na-Ubol, M., Tiyasuttipan, W., Chaiyaraj, S. C., Yamasaki, S., Wongsaraj, T., Hayashi, H., Nair, G.B., Chongsa-nguan, M., Kurazono, H., Chaicumpa, W.: Molecular typing of *Vibrio cholerae* O1 isolates from Thailand by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Health Popul. Nutr.* In press, 2008.
 39. M. Asakura, W. Samosornsuk, A. Hinenoya, N. Misawa, K. Nishimura, A. Matsuhisa, and S. Yamasaki. Development of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection of *cdt* genes in *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, in press.
 40. W. Samosornsuk, M. Asakura, E. Yoshida, T. Taguchi, K. Nishimura, B. Eampokalap, V. Phongsisay, W. Chaicumpa and S. Yamasaki. Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from poultry in Thailand. *Microbiol. Immunol.*, 51: 909-917, 2007.
 41. Khan, R., Takahashi, E., Ramamurthy, T., Takeda, Y., and Okamoto, K. Salt in Surroundings Influences the Production of

Serine Protease into Milieu by *Aeromonas sobria*. Microbiol. Immunol. 51(10):963-976, 2007

42. Fujii, Y., Tsurumi, K., Sato, M., Takahashi, E., and Okamoto K., Fluid Secretion Caused by Aerolysin-like Hemolysin of *Aeromonas sobria* in the Intestines Is Due to Stimulation of Production of Prostaglandin E2 via Cyclooxygenase-2 by the Intestinal Cells. Infect. Immun., in press
43. 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: 309-315, 2007
44. Nhung PH, Ohkusu K, Miyasaka J, Sun XS, Ezaki T: Rapid and specific identification of 5 human pathogenic *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction targeted to dnaJ gene. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 59: 271-275, 2007

H. 知的財産権など：

なし（本研究に関連したもの）

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (社会保障国際協力推進研究事業)
分担研究報告書

下痢症患者から分離される大腸菌の病原因子解析

分担研究者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター・微生物部
協力研究者	小西 典子	東京都健康安全研究センター・微生物部
	尾畑 浩魅	〃
	下島 優香子	〃
	門間 千枝	〃
	仲真 晶子	〃
	矢野 一好	〃

研究要旨：

東京都内で発生した毒素原性大腸菌 (ETEC) の発生状況を明らかにすることを目的として、ETEC による集団下痢症および散発下痢症事例について細菌学的、疫学的解析を行った。1966 年から 2006 年までに東京都内で発生した集団下痢症事例の発生状況をまとめた結果、ETEC による事例が 125 事例と全体の 66.1% を占め、最も多く発生していた。ETEC による集団下痢症の推定原因は、国内旅行中の食事、集団給食、仕出し弁当、井戸水・飲料水、会席料理等であったが、近年は海外旅行中の食事によると推定される事例が増加傾向にあった。

ETEC による集団下痢症事例の原因として複数血清型菌が検出された事例が、これまでに 13 事例確認された。これらは 1970 年代に 1 事例、1980 年代 2 事例、1990 年代 4 事例、2001 年以降に 6 事例と、近年増加傾向にある。日本で発生した集団下痢症患者と海外旅行者下痢症患者から分離された ETEC の血清型および毒素型が、同じような傾向を示したことから、日本で発生している集団下痢症事例は、海外の影響を受けている可能性も推定された。

A. 研究目的

下痢原性大腸菌は、その発生機序により病原血清型大腸菌 (EPEC)、毒素原性大腸菌 (ETEC)、腸管出血性大腸菌 (EHEC)、組織侵入性大腸菌 (EIEC)、腸管凝集接着性大腸菌 (EAEC) の 5 つのカテゴリーに分類されている。ETEC は、発展途上国においては小児下痢症の起原菌として重要な菌であるが、わが国においては、海外旅行者下痢症の原因菌として最も多く検出されている。本研究では、東京都内で発生した ETEC による下痢症の発生状況を明らかにすることを目的として、集団

下痢症および散発下痢症事例について細菌学的、疫学的解析を行った。

B. 研究方法

1) 供試菌株

1966 年から 2006 年までの過去 41 年間に発生した下痢原性大腸菌によると推定された集団下痢症事例 189 事例について解析を行った。更に、2006 年 1 月～2007 年 7 月までに、主に都立病院で分離された散発事例由来株 82 株を供試し解析を行った。

2) 大腸菌病原因子の検出

易熱性エンテロトキシン (LT) : 市販のラテックスキット (セロトキシ LT : 栄研化学および VET-RPLA : デンカ生研) および LT 毒素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。

C. 研究結果

1) 下痢原性大腸菌集団事例の発生状況

1966 年から 2006 年に発生した下痢原性大腸菌による集団下痢症事例 189 事例について、大腸菌のカテゴリー別に発生状況をまとめた結果、ETEC 125 事例 (66.1%), EPEC 30 事例 (15.8%), EHEC 26 事例 (13.8%), EIEC 3 事例 (1.6%), その他の大腸菌 5 事例 (2.6%) であった (図 1)。

2) ETEC による集団下痢症の推定原因食品

ETEC による集団下痢症事例 (125 事例) の推定原因食品についてまとめた (図 2)。最も多かったのは国内旅行中の食事で 25 事例 (20%), 次いで集団給食および仕出し弁当 15 事例 (12%), 井戸水・飲料水および会食料理 10 事例 (8%), 飲食店の食事 6 事例 (5%) 海外旅行中の食事 3 件 (2%) 等であった。近年は海外旅行中の食事を原因とした事例が増加傾向であった。

3) 原因となった ETEC の血清型および毒素型

集団下痢症事例の原因となった ETEC の血清型および毒素型についてまとめた。主な血清型は 06 : H16 / NM (LT, ST) 36 事例 (23.7%), 0169 : H41 / NM (ST) 31 事例 (20.4%), 027 : H7 / H20 (ST) 23 事例 (15.1%), 0148 : H28 (ST) 17 事例 (11.2%), 025 : NM (ST) 9 事例 (5.9%), 025 : NM (LT) 4 事例 (2.6%),

0159 : H20 / 34 / NM (ST) 11 事例 (6.6%) であった (表 1)。

4) 複数血清型菌が検出された ETEC による集団下痢症事例

ETEC による集団下痢症事例では、複数の血清型・毒素型の大腸菌が原因となることが多い。このような事例が都内では 13 事例認められた。これらは 1970 年代に 1 事例, 1980 年代 2 事例, 1990 年代 4 事例, 2001 年以降に 6 事例と、近年増加傾向であった。検出された血清型・毒素型は 2 種類が最も多く 7 事例であったが、6 血清型・毒素型が検出された事例 (1982 年および 2003 年) や 7 血清型が検出された事例 (1999 年) もあった。

複数の血清型・毒素型が検出された事例のうち 10 事例 (76.9%) は、旅行先での食事が原因と推定された。特に近年では海外旅行中の食事が原因と推定される事例が多く、これらの食事の中には飲料水の関与が疑われた事例の多いことが推定された。

5) 散発事例由来 ETEC の血清型と毒素型

散発事例由来 82 株の血清型と毒素型を表 3 に示した。ST 単独産生株は 60 株 (73.1%) で、0169 : H41 / NM が 26 株 (31.7%), 027 : H7 が 12 株 (14.6%), 015 : H11, 025 : NM, 0148 : H28 が各 4 株等、15 種類の血清型菌に分類された。LT 単独産生株および LT, ST 両毒素産生株は各 11 株 (13.4%) で、LT 単独産生株は 0167 : H15, 025 : NM 等 6 種類の血清型に、LT, ST 両毒素産生株は 06 : H16 等 4 種類の血清型に分類された。

6) 散発事例由来 ETEC の推定感染地

散発事例由来 ETEC の推定感染地は輸入事例が 61 事例 (74.4%), 国内事例が 2 事例 (2.4%), 不明 19 事例 (23.2%) であり、多くは海外旅

行先で感染したと推定される事例であった。主な渡航先はインド、中国、タイ、ベトナム、フィリピン、インドネシア等の南アジア・東南アジアであった。

D. 考察

1966年から2006年までに東京都内で発生した集団下痢症事例の発生状況をまとめた結果、ETECによる事例が125事例と全体の66.1%を占めていた。ETECによる集団下痢症の推定原因として多いものは国内旅行中の食事、集団給食、仕出し弁当、井戸水・飲料水、会食料理等であったが、近年は海外旅行中の食事によると推定される事例が増加している。

ETECによる集団下痢症では、複数の血清型および毒素型が原因となることがある。都内ではこの様な事例が、これまでに13事例確認された。これらの推定原因食品としては、旅行中の食事、特に飲料水の関与が疑われた事例が多い。

散発事例由来ETECの推定感染地は、74.4%が輸入事例であり、主な渡航先はインド、中国、タイ、ベトナム等のアジア地域であった。散発事例由来株で多く分離された血清型および毒素型は0169 (ST)、027 (ST)、06 (LT+ST)、025 (STまたはLT) 等であった。これらの血清型は集団事例由来株でも多く検出される血清型であった。日本で発生した集団下痢症事例と海外旅行者下痢症患者から分離されるETECの血清型および毒素型が、同じような傾向を示したことから、日本で発生している集団下痢症事例は、海外の影響を受けている可能性も推定された。

E. 結論

1966年から2006年に発生した下痢原性大腸菌による集団下痢症事例189事例について、大腸菌のカテゴリー別に発生状況をまとめた

結果、ETEC 125事例 (66.1%) と最も多く次いでEPEC 30事例 (15.8%)、EHEC 26事例 (13.8%)、EIEC 3事例 (1.6%)、その他の大腸菌5事例 (2.6%) であった。

集団下痢症事例の原因となったETECの血清型は06、0169、027、0148、025、0159等であった。一方、散発事例由来株で多く分離された血清型は0169、027、06、025等であり、集団事例由来株でも多く検出される血清型と同じ傾向であった。ETECによる集団下痢症の推定原因として多いものは国内旅行中の食事、集団給食、仕出し弁当、井戸水・飲料水、会食料理等であったが、近年は海外旅行中の食事によると推定される事例も増加している。

F. 健康危機情報

ETECによる散発事例の多くは、海外旅行先での感染、特にアジア地域での感染が疑われた事例が多かった。これらの地域へ旅行する場合は飲料水等十分な注意が必要である。

G. 研究発表

(学会発表)

- 1) Kai A., Konishi N., Obata H., Shimojima Y., Uehara S., Monma C., Nakama A., Yano K.; Bacteriological analysis of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from diarrheal disease in Tokyo, 42nd Annual Joint Panel Meeting Cholera and Other Bacterial Enteric Infections, Austin, 2007.
- 2) 小西典子, 尾畑浩魅, 下島優香子, 上原さとみ, 門間千枝, 仲真晶子, 甲斐明美, 矢野一好. 東京都内で分離された毒素原性大腸菌の性状. 第90回日本細菌学会関東支部総会, 東京2007.

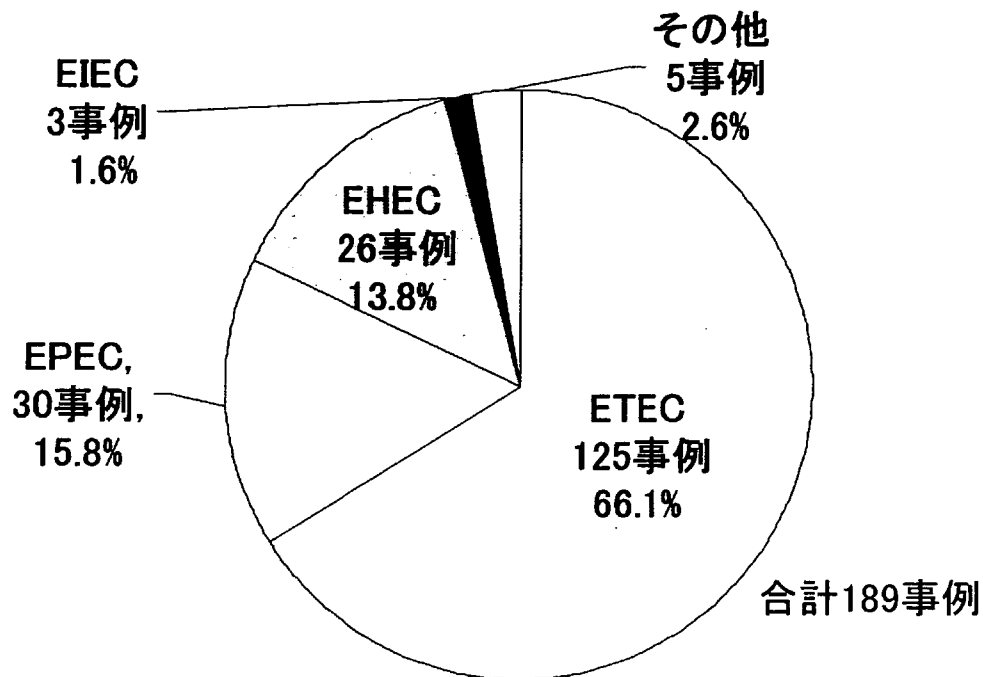


図1. 東京都で発生した下痢原性大腸菌による集団下痢症の
 カテゴリー別発生状況, 1966年~2006年

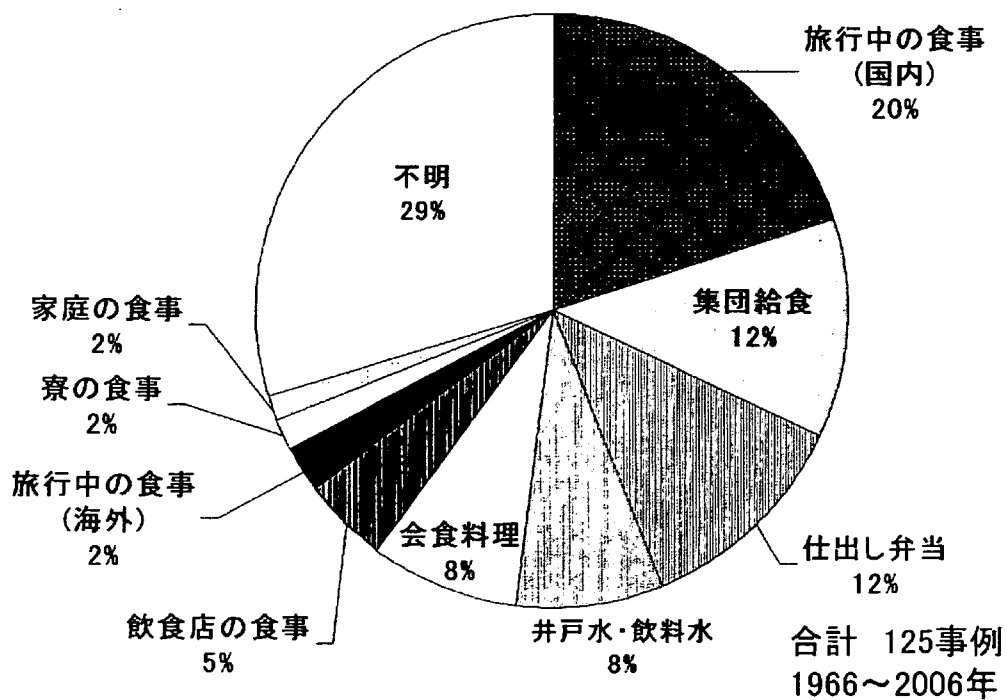


図2. 毒素原性大腸菌による集団下痢症の推定原因食品

表1 集団下痢症由来毒素原性大腸菌の血清型および毒素型 1966年～2006年, 東京都

O6:H11	LT+ST	31 (20.4)	} 23.7%
O6:NM	LT+ST	5 (3.3)	
O169:H41	ST	22 (14.5)	} 20.4%
O169:NM	ST	9 (5.9)	
O27:H20	ST	17 (11.2)	} 15.1%
O27:H28	ST	6 (3.9)	
O148:H28	ST	17 (11.2)	} 6.0%
O25:NM	ST	3 (1.9)	
O25:NM	ST	2 (1.3)	
O159:H20	ST	7 (4.6)	} 6.0%
O159:NM	ST	2 (1.3)	
O159:H34	ST	2 (1.3)	
その他		21 (13.8)	

*1事例から複数血清型が検出された事例もあり, 事例数とは一致せず

表2 複数血清型菌が検出された毒素原性大腸菌による集団下痢症事例, 東京都

No.	発生年	患者数	原因食品	旅行先	検出血清群数	検出血清群						
						O6	O148	O27	O159	O25	O169	その他
1	1979	19	旅館の食事	香川県	2	●	●					
2	1982	23	不明(旅行の食事?)	神奈川県	6		●	●				●
3	1985	都内54	旅館の食事	神奈川県	2	●			●			
4	1990	129	ホテルの食事	千葉県	2	●	●					
5	1992	391	旅館の食事	群馬県	2	●		●				
6	1992	385	旅館の食事	福島県	2	●						●
7	1999	342	事業所の給食		7	●	●	●			●	●
8	2001	107	旅行中の食事	中国	4	●						●
9	2001	219	飲料水		2			●			●	
10	2002	不明	旅行中の食事	上海	4	●				●	●	●
11	2003	都内130	仕出し弁当		6		●	●		●		●
12	2004	不明	旅行中の食事	上海	4			●		●	●	●
13	2005	都内1	旅行中の食事	大阪	2				●		●	

表3 散発事例由来 毒素原性大腸菌の血清型と毒素型

毒素型	血清型	分離数	毒素型	血清型	分離数	
ST	O169:H41	24	LT	O167:H5	3	
	O169:NM	2		O167:HUT	1	
	O27:H7	12		O25:NM	3	
	O15:H11	4		O8:HUT	1	
	O25:NM	4		OUT:NM	2	
	O148:H28	4		OUT:HUT	1	
	O6:H16	2		小計 11(13.4%)		
	O28:H10	1		LT+ST	O6:H16	7
	O63:NM	1			O6:HUT	1
	O126:HUT	1			O8:H9	2
	O148:H20	1	O8:HUT		1	
	O159:H34	1				
	O167:H41	1				
	OUT:H11	1				
	OUT:NM	1				
小計 60 (73.1%)			小計 11(13.4%)			

供試菌株: 2006~2007年7月 都立病院分離株 82株

表4 散発事例由来 毒素原性大腸菌の推定感染地

輸入事例 61 (74.4%)			
インド	13	パキスタン	1
中国	11	シンガポール	1
タイ(プーケット他)	8	エジプト	4
ベトナム	6	ルワンダ	1
フィリピン	4	トルコ	1
インドネシア(バリ島他)	5	南アメリカ	1
スリランカ	1	エクアドル	1
ネパール	1	アルゼンチン	1
ミャンマー	1		
国内事例 2 (2.4%)			
不明	19 (23.2%)		
合計 82			