

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（国際医学協力研究事業）

細菌性下痢症の制御を目指した基礎的・応用的研究

（課題番号：H20－国医－指定－001）

平成20年度総括・分担研究報告書

研究代表者 本田武司

大阪大学微生物病研究所 細菌感染分野

平成 21(2009)年 3月

目次

平成 20 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（国際医学協力研究事業）

1. 平成 20 年度総括研究報告書

細菌性下痢症の制御を目指した基礎的・応用的研究	1
研究代表者	本田 武司 大阪大学微生物病研究所

2. 平成 20 年度分担研究報告書

1) 疫学的研究

①下痢症由来大腸菌の病原因子に関する研究	13
研究分担者	甲斐 明美 東京都健康安全研究センター・微生物部
研究協力者	小西 典子 〃
	尾畑 浩魅 〃
	下島 優香子 〃

②腸管出血性大腸菌 0157 感染症の重症化要因に関する研究	19
—平成 17 年香川県老人福祉施設における 0157 集団感染の疫学調査から—	
研究分担者	吉田 真一 九州大学大学院 細菌学
研究協力者	藤井 潤 〃

2) 生態学的研究

①アエロモナスの菌体外毒素の産生と活性に関する研究	25
研究分担者	岡本 敬の介 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

②腸炎ピブリオ病原性菌株の遺伝子のダイナミズムと遺伝子検査に関する研究	32
研究分担者	西瀬 光昭 京都大学 東南アジア研究所
研究協力者	清水 理香 京都大学大学院 医学研究科
研究協力者	Muhammad Kamruzzaman 京都大学大学院 医学研究科
研究協力者	山崎 渉 大阪府公衆衛生研究所 感染症部
研究協力者	西岡 輔 総合研究大学院大学 先端科学研究科
研究協力者	颯田 葉子 総合研究大学院大学 先端科学研究科

3) 病原因子・病原解析

①新規ラムボイドファージの CDT-IΦ の遺伝学的解析に関する研究	41
研究分担者	山崎 伸二 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

②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	46
研究分担者 渡辺 治雄 国立感染症研究所	
研究協力者 三戸部 治郎 "	
③腸炎ピブリオの3型分泌装置の病原性への関与に関する研究	53
研究分担者 本田 武司 大阪大学微生物病研究所	
④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に関する研究	58
研究分担者 倉園 久生 帯広畜産大学	
⑤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	63
研究分担者 林 哲也 宮崎大学	
⑥腸管出血性大腸菌の新規毒素の細胞障害機構の解明	69
研究分担者 野田 公俊 千葉大学大学院医学研究院	
⑦ヘリコバクター・ピロリの毒性発現に関する研究	74
研究分担者 平山 壽哉 長崎大学	

4) 検査法

① <i>Vibrio cholerae</i> の可変DNA領域を標的とした 新規DNAフィンガープリンティング法の開発	79
研究分担者 大澤 朗 神戸大学	
②下痢を起こす細菌性病原体の網羅的な生菌遺伝子検査法の作成に関する研究	85
研究分担者 江崎 孝行 岐阜大学大学院	

5) 治療・予防

①Stx1B, Stx2Bの共通抗原決定基の決定とそれを利用した粘膜ワクチンの開発	89
研究分担者 辻 孝雄 藤田保健衛生大学医学部 微生物学教室	
② <i>Campylobacter jejuni</i> に対する薬剤感受性調査とカルバペネム系抗菌薬の阻害作用	95
研究分担者 山本 達男 新潟大学大学院	
③ <i>Clostridium difficile</i> 腸炎と芽胞発芽率に関する研究	101
研究分担者 神谷 茂 杏林大学医学部感染症学	

3. 研究発表一覧	105
-----------	-----

平成 20 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（国際医学協力研究事業）総括研究報告書

細菌性下痢症の制御を目指した基礎的・応用的研究
（課題番号：H20－国医－指定－001）

研究代表者： 本田武司 大阪大学微生物病研究所教授

研究要旨：

細菌性下痢症研究に関心を持つ、我国の主要な 16 名から成る研究組織で、研究成果を持ち寄り国内で会合（公開）することで成果の共有化をはかると共に、さらに米国側の研究者らとも交流した。その結果、多種類（病原性大腸菌、腸炎ビブリオ、コレラ菌、ヘリコバクター、サルモネラ、エロモナス、クロストリジウムなど）の下痢原因菌について多数の知見を一流の専門誌に発表出来た。我国の一つの強みは、病態解析に関する研究であるが、今年度は疫学、生態学、診断法、治療薬等についても成果を得た。

研究分担者：

甲斐明美：東京都健康安全研究センター
専門副参事

吉田真一：九州大学大学院医学研究院
教授

岡本敬の介：岡山大学 教授

西淵光昭：京都大学東南アジア研究所
教授

山崎伸二：大阪府立大学大学院 教授

渡邊治雄：国立感染症研究所 副所長

倉園久生：帯広畜産大学 教授

林 哲也：宮崎大学 教授

野田公俊：千葉大学大学院医学研究院
教授

平山壽哉：長崎大学熱帯医学研究所
教授

大澤 朗：神戸大学大学院農学研究科
教授

江崎孝行：岐阜大学大学院 教授

辻 孝雄：藤田保健衛生大学 教授

山本達男：新潟大学大学院 教授
神谷 茂：杏林大学医学部 教授

A. 研究目的：

細菌性下痢症は全世界で見ると年間 200 万人以上の犠牲者を出しており、特に発展途上国にとっては脅威となっている。食料の自給率が 40% の我が国にあっても、近年のボーダーレス時代を考えると、「食の安全」確保は必ずしも容易ではない。種々な段階で、下痢症の制御法を考えなければならぬが、本研究班では医学的手法（疫学、生態学、病態生理、治療・予防法など）での制御法を考えるのが目標である。

B. 研究方法：

各研究者が得意な手法を用い、それぞれの研究目的を探索した。つまり生態学、疫学、細胞生物学、免疫学、抗感染症薬

などを用いて各自の目標を達成すべく課題に取り組んだ。下痢原因菌は、基本的な細菌学的手法を用い、菌株の保存、分与などは法律の定めに従い、動物実験では苦痛を与えないなど動物倫理規定に従った。

C. 研究成果：

1) 疫学的研究

①下痢症由来大腸菌の病原因子に関する研究

2007年5月、都内の学生食堂において、腸管出血性大腸菌（EHEC）O157による大規模食中毒が発生した。患者数は445名、内3名が溶血性尿毒症候群（HUS）を発症した。本研究では感染源を明らかにすることを目的として、各種検体からのO157の分離および分離菌株の疫学的性状解析を行った。患者糞便等から分離されたO157の187株についてパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法で解析を行った結果、PFGEパターンはメインのパターンおよび類似パターン合わせて7パターンに分類された。しかしこれらのパターンはバンドが1～3本異なるのみであるため、いずれも同一の感染源による集団事例と推定された。

②腸管出血性大腸菌 O157 感染症の重症化要因に関する研究

平成17年10月、香川県老人福祉施設2ヶ所で腸管出血性大腸菌 O157（O157と略する）の集団感染が発生した。下痢、出血性下痢となった有所見者39名に対してコホートによる調査を行った。その結果、O157集団感染が高齢者に発生した場合、寝たきり、女性、

血便、入院時の白血球数の増加は死亡につながる危険性があることが判明した。

2) 生態学的研究

①アエロモナスの菌体外毒素の産生と活性に関する研究

アエロモナスは試験管内では3%食塩を含む培地中で十分に増殖する。しかし自然界では3%食塩濃度である海水中にはほとんど生息していない。細菌の菌体外毒素は、菌が生息するために、菌の周辺の物質に作用し、菌の生存条件を整える武器(あるいは道具)であると言われている。そこで報告者たちはアエロモナスの毒素産生と食塩濃度の関係を調べ、これまでにプロテアーゼが食塩により産生抑制を受けることを見出した。今年度はプロテアーゼ以外に食塩により産生抑制を受けているタンパク質を調べ、リパーゼが産生抑制を受けていることを見出した。またこのリパーゼが細胞毒の活性を有していることを明らかにした。

②腸炎ビブリオ病原性菌株の遺伝子のダイナミズムと遺伝子検査に関する研究

感染症の世界的大流行をおこしている腸炎ビブリオ新型クローンを検出するためのPCR法を開発し、世界各地で長年にわたり患者から分離された597菌株を被検菌株として検査し、このPCR法の有用性を実証した。まず、このクローンが特異的に保有するDNA領域(大きな挿入配列)に着目して検査し、23 kb 挿入配列が有用であることを確認した。この配列の系統発生的解析により、この挿入配列は、過去に複数回の

ダイナミックな変化(水平移動)を経て形成されたことが示された。そこで、23 kb 挿入配列の中の4領域を標的にするPCR法を考案・比較した結果、VP0400領域を標的にするPCR法が最も特異性が高いことが示された。

3) 病原因子・病原解析

①新規ラムポイドファージのCDT-IΦの遺伝学的解析に関する研究

下痢症患者から分離された大腸菌が保有する細胞膨化致死毒素(CDT-I)をコードしたCDT-Iファージ(CDT-IΦ)の遺伝学的解析を行った。インド、バングラデシュ、ブラジル及び我が国で分離したCDT-I産生性大腸菌を用いてCDT-IΦの誘導能及びゲノムのPCRスキニングとPCR-RFLP解析を行った。その結果、CDT-IΦが誘導されたのは主に腸管病原性大腸菌に属する大腸菌であり、CDT-IΦの誘導能に関わらずcdt1遺伝子の上流・下流には、ラムポイドファージゲノム断片が検出され、cdt1遺伝子はラムポイドファージを介して大腸菌間に拡がったと考えられた。また、CDT-IΦのゲノムには多様性があることもわかった。

②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

赤痢菌の宿主への侵入性に必須なType III secretion system(TTSS)遺伝子群は、生育温度と培地浸透圧によって発現が制御される。TTSSは宿主の体温である37℃や生理的な塩濃度では発現するが、低温や低浸透圧では厳密に抑制され、宿主外での生育に不要なTTSSの発現を抑えることで、環境中での菌の

生存に有利に働いているものと考えられる。当研究は温度による制御の解析に引き続き浸透圧による制御機構を解析し、温度による制御と同様にTTSSの制御因子の一つであるInvE蛋白発現の転写後調節により起きていることを明らかにした。また温度による制御に関わる蛋白因子として同定したRNA結合蛋白HfqとinvE-mRNAの結合が、低塩濃度で変化することを生化学的に解析した。

③腸炎ピブリオの3型分泌装置の病原性への関与に関する研究

腸炎ピブリオは我国の食中毒原因菌の中でも最も発生頻度の高いものの一つで、海産魚介類が原因であることが多い。本菌は我国で発見された食中毒原因菌であり、我国の研究者による知見が蓄積し、病態のかなりの部分が理解されたかに見えたが、我々が全ゲノムを決定した(2003年)ことで新しい病原機構が存在する可能性が出てきた。2つの環状染色体(大及び小染色体)から成る本菌は、各々に1セットの3型分泌装置(T3SS)が存在したからである(前者をT3SS-1、T3SS-とよぶ)。T3SS-1は細胞毒性に関与し、下痢発症にはT3SS-2が関与することが明らかになり、腸炎ピブリオはこれまで外毒素(TDHやTRH)で説明されて来た下痢症の病態に加えてT3SS-2が深く関与していると考えられた。本研究では、T3SS-2により分泌されるトランスロコン(VopB2、VopD2)を見出し、T3SSの機能発現に必要な分子であることを明らかにした。

④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に関する研究

サルモネラエンテロトキシン (Stn) をコードする *stn* 遺伝子はサルモネラ属菌に特異的に存在しており、蛋白として発現していることは Stn のエピトープに対する 2 種類の抗体を用いた Sandwich ELISA を使って既に明らかにした。しかし、発現している Stn が実際にサルモネラ腸炎に関与しているか否かは明らかではなく、この蛋白の病原性を分子レベルで解析するには Stn の精製が不可欠である。昨年度までに確立した精製法は純度的には問題ないが、収量が非常に低かった。今年度は精製法の改良を行い、Stn に対する種々の作用解析や抗血清の作製に十分な量の Stn の精製を目指した。

⑤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

主要な non-O157 腸管出血性大腸菌 (EHEC) である O26、O111、O103 の全ゲノム配列決定と全遺伝子の同定を行い、それぞれの EHEC が持つ病原性関連遺伝子を網羅的に同定した。また、O157 EHEC を含めた他の大腸菌ゲノムとの比較解析から、EHEC の進化の全体像を明らかにした。さらに、腸管病原性大腸菌 (EPEC) E2348/69 株の全ゲノム配列決定、また B171-8 株の菌株特異的配列の同定と配列決定を行い、2 株の EPEC 標準株において病原遺伝子の網羅的な同定を行った。

⑥腸管出血性大腸菌の新規毒素の細胞障害機構の解明

腸管出血性大腸菌の産生する

subtilase cytotoxin (SubAB) は、新規 AB5 タイプの毒素である。その A サブユニットはサブチラーゼタイプのセリンプロテアーゼであり、小胞体に存在する BiP を分解すること、それによって小胞体にストレスが生じ、その回避機構として一過性の蛋白合成障害が起こることを明らかにしてきた。本研究では SubAB による細胞増殖抑制は、SubAB が細胞周期を G1 期で停止することによることを明らかとし、その停止機構は一過性の蛋白合成障害及びプロテアソームによる分解による cyclin D1 の down regulation によることを明らかとした。

⑦ヘリコバクター・ピロリの毒性発現に関する研究

ヘリコバクター・ピロリの空胞化毒素 (VacA) は、標的細胞に空胞を起し死滅させ、胃粘膜障害に深く関わっていると考えられている。また胃・腸管粘膜および免疫細胞に対し、多様な毒素活性を示すことが明らかになりつつある。そこで VacA による新たな毒素活性の発現機序について、ヒト胃上皮株細胞 AZ-521 を用いて VacA による PI3K/Akt の活性化について解析した。VacA は AZ-521 細胞において PI3K/Akt 経路を活性化し、Akt の下流である GSK3 β をリン酸化し、その活性が不活化することを示した。さらに GSK3 β / β -catenin 複合体の解離が起こり、転写活性化因子 β -catenin が核内へ移行し、その転写活性化能を示した。またピロリ菌野生株および VacA 欠損株を用いた感染実験により、野生株において PI3K/Akt 経路の活性化と GSK3 β / β -catenin 複合体の解離が認められた。従って、VacA は PI3K/Akt を活性化

し、 β -cateninの転写活性を誘導することが明らかになった。以上の結果は、VacAがヘリコバクター・ピロリ感染症における胃炎、胃潰瘍、さらには胃癌にも寄与している可能性を示唆する結果である。

4) 検査法

① *Vibrio cholerae* の可変 DNA 領域を標的とした新規 DNA フィンガープリンティング法の開発

コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*)の血清型 O1 および O139 はゲノム DNA が高度に保存されていることから、通常有用な PFGE やリボタイピング法では菌株間の clonality(系統性)の異同の識別は難しいとされている。しかし、最近我々が行ったゲノムサブトラクション法による遺伝子解析で、*V. cholerae* の小染色体上に存在する Integron Island 領域に菌株レベルでの多型性が存在することが示唆された。そこで、我々は本領域に多数散在する *V. cholerae* repeat(VCR)に注目し、この散在性を利用した新規 DNA フィンガープリンティング法の開発を試みた。VCR を利用したプライマーの有用性を検討したところ、VCR-5' +C と VCR-3' +A の組み合わせが最も優れた識別能を示した。また本プライマーセットを用いて得られた泳動図を基に dendrogram を作製したところ、O1 は 1990 年を境に系統的な違いが確認され、異なる 6 つのグループに分類することが可能であった。一方 O139 は、独自のグループを形成するものの、1990 年以後分離された O1 と酷似するパターンを示し、O1 との系統的関連性を示唆する結果とな

った。本手法は、MLST や PFGE と比べ、簡便かつ迅速に結果が得られるため、病原性 *V. cholerae* の疫学解析に有用であることが示唆された。

② 下痢を起こす細菌性病原体の網羅的な生菌遺伝子検査法の作成に関する研究

細菌性食中毒をおこす病原体 10 種類 (大腸菌、セレウス菌、リステリア菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌、赤痢菌、腸炎ピブリオ、コレラ菌、腸炎エルシニア菌、カンピロバクター) を一つの増幅試薬で検査するカクテル試薬を作成し、増幅産物を識別するビーズアレイを作成した。さらにこの方法で食材中の食中毒病原体を一種類の培地で 4 時間培養することで、網羅的に 10 種類の病原体遺伝子の遺伝子を高感度にスクリーニングする方法を作成した。

この方法でサルモネラや大腸菌の検査に求められる 25g の食材に 1 個の病原体がいても検出できる高感度検出方法を作成した。

5) 治療・予防

① Stx1B, Stx2B の共通抗原決定基の決定とそれを利用した粘膜ワクチンの開発

腸管出血性大腸菌の志賀毒素粘膜ワクチンアジュバントとして用いるコレラ毒素 B サブユニットの大腸菌過剰発現系を構築した。発現産物(rCTB)は、CTB 遺伝子全長をクローニングしたプラスミドで形質転換した大腸菌の菌体抽出液から精製され、構造及びガングリオシドに対する結合特異性は、コレラ菌由来のものと同じであった。発現のイン

デューサーであるリンコマイシンは、ラクトースオペロンに作用していたが、IPTG での発現系とは性質を異にすると考えられた。本方法は IPTG の添加が不要で、リンコマイシン添加した培地で培養するだけで発現誘導される、簡便で有用な方法であると考えられた。

② *Campylobacter jejuni* に対する薬剤感受性調査とカルバペネム系抗菌薬の阻害作用

Campylobacter jejuni はグラム陰性のらせん菌で、鶏肉の消費に伴って増加してきた食中毒の主要な起因菌である。本研究では過去 11 年間にわが国で分離された *C. jejuni* 85 株について 35 薬剤に対する受性を調査した。薬剤耐性はキノロン系薬で 58%、テトラサイクリン系薬で 22%であった。マクロライド系薬では耐性は確認できなかった。一方、感受性が高い抗菌薬ではカルバペネム系薬が最も優れていた（例：イミペネムの場合 MIC₉₀, 0.13 µg/ml；メロペネムの場合 MIC₉₀, 0.03 µg/ml）。β-ラクタマーゼ阻害薬のクラブラン酸（MIC₉₀, 2 µg/ml）とフラゾリドン（MIC₉₀, 0.5 µg/ml）も比較的良好な抗菌作用を示した。イミペネムと

D. 考察：

種々な下痢原因菌に関する多方面からの解析結果が次第に充実し、理解が深まった。特に、感染病態に比較的最近明らかになってきた 3 型分泌装置 (T3SS) が病態に広く関与していることが、腸炎

メロペネムはペニシリン結合蛋白 (PBP) への結合を介して阻害作用を現すと考えられるが、誘導する形態変化は異なっていて、イミペネムでは球状菌、メロペネムでは紡錘状のらせん菌であった。*C. jejuni* は極めて高い運動性を示し、遊走速度は >100 µm/s であったが、カルバペネム系薬はこのような運動性に対しても強い阻害作用を示した。

③ *Clostridium difficile* 腸炎と芽胞発芽率に関する研究

C. difficile 腸炎患者より分離された *C. difficile* 菌株 149 株を使用して PCR ribotyping およびパルスフィールド電気泳動 (PFGE) による DNA タイピングを行った。PFGE 法にて 12 種類の Major type に分類された。*C. difficile* 菌株の DNA タイピングは芽胞形成率や発芽率とは関連しなかった。*C. difficile* 菌株の芽胞形成率は再発感染の発生に影響を与えなかったが、再発症例由来の *C. difficile* 菌株は高い発芽率を示した。プロバイオティクスとして使用されている *C. butyricum* MIYAIRI 588 株は高い発芽-増殖率を示すことにより、*C. difficile* の増殖を抑制した。

ピブリオ、赤痢菌、サルモネラなどで見出され、病原性の理解が深化した。

検査法にあっては、分子遺伝子的手法では生菌のみを検出する手法がなかったが、最近これを可能にし、10 種類の下痢原因菌を同時に鑑別し、迅速に検出できる手法を開発できた点は、実用性の

点から特記できる。

また、*C. difficile*の増殖を市販の（実用に供されている）*C. butyricum* MIYAIRI 588株が抑制したことは特記されるべきで、治療法として臨床応用に近い知見である。

E. 結論：

種々な下痢性疾患の病変の理解を深化させるなどのほかに診断法、治療法などに今後有用な示唆を与える事ができた。

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4点を指摘しておきたい。

- 1) キャベツやレタス等の生野菜が、他の食品によってO157に汚染され、原因食品となった可能性（二次汚染）が高いと推定された。特に牛肉はO157に汚染されている可能性が高いので、取り扱いには十分注意が必要である。
- 2) 今回の研究によりアエロモナスは食塩を含まない淡水の条件下でリパーゼを産生するが、海水濃度の塩を含むと産生しなくなることが判明した。またこのリパーゼは細胞毒性を示すことを示した。それゆえ、食塩濃度が高くなる汽水領域では毒素産生能力が高いアエロモナスが生息している可能性がある。

インドネシアを地震源とする津波の被害を受けた地域では、アエロモナスによる感染症が多発した。多発の理由は不明であるが、

海水から汽水領域に生息しているアエロモナスが陸地や河川水と合流して、通常は汽水領域、海水に生息しているアエロモナスが多量に発生したと考えられる。この事が津波被害を受けた地域でのアエロモナス感染症の多発といかなる関係にあるのかは不明であるが、今後津波発生時には考慮すべき点であると考えられる。

- 3) 腸炎ビブリオ新型クローンによる感染症は、我が国では沈静化しているように思えるが、今なお世界中で猛威をふるっている。我々は、昨年の夏、タイ南部で患者が多数発生していることを確認し、また二枚貝から新型クローン菌株を高頻度に分離した。このような地域に旅行する人々は魚介類（特に二枚貝）を喫食する場合は、十分加熱したものであることを確認する必要がある。原因菌の中に血清型の変化したバリエーションが出現しているため、迅速かつ確実な診断には、本研究で開発したようなPCR法が有用であると言える。
- 4) キノロン系薬を中心に *C. jejuni* 薬剤耐性が進んでおり、今後も *C. jejuni* の薬剤感受性動向に注意する必要がある。

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。

G. 研究発表論文

（Peer Review 付き英文のみ）

論文発表

1. Kai A., Konishi N., Obata H., Shimojima Y., Uehara S., Monma

- C, Yokoyama K., Takahashi M., Kawamura M., Yano K. : Bacteriological and epidemiological aspects of a large outbreak caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 at a university in Tokyo, 43rd Annual Joint Panel Meeting, Cholera and Other Bacterial Enteric Infections, Fukuoka, 2008.
2. Barysheva OV, Fujii J, Takaesu G, Yoshida S: Application of unstable Gfp variants to the kinetic study of *Legionella pneumophila* icm gene expression during infection. *Microbiology*, 154(4), 1015-25, 2008.
 3. Fujii J, Wood K, Matsuda F, Carneiro-Filho BA, Schlegel KH, Yutsudo T, Binnington-Boyd B, Lingwood CA, Obata F, Kim KS, Yoshida S, Obrig T: Shiga toxin 2 causes apoptosis in human brain microvascular endothelial cells via C/EBP homologous protein. *Infect Immun*, 76(8), 3679-89, 2008.
 4. Matsuda F, Fujii J, Yoshida S: Autophagy induced by 2-deoxy-D-glucose suppresses intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in A/J mouse macrophages. *Autophagy*, in press, 2009.
 5. Fujii J, Kinoshita Y, Matsukawa A, Villanueva S, Yutsudo T, Yoshida S: Successful steroid pulse therapy for brain lesion caused by Shiga toxin 2 in rabbits, *Microb Pathog*, in press, 2009.
 6. Rasel Khan, Eizo Takahashia, Hironori Nakura, Mohammad Ansaruzzaman, Sukalyani Banik, Thandavarayan Ramamurthy, Keinosuke Okamoto, Toxin production by *Aeromonas sobria* in natural environment: river water vs. seawater, *Acta Medica Okayama*, 62(6): 363-371, 2008.
 7. Hidetoshi Nitta, Takahisa Imamura, Yoshihiro Wada, Atsushi Irie, Hidetomo Kobayashi, Keinosuke Okamoto, Hideo Baba, Production of C5a by ASP, a serine protease released from *Aeromonas sobria*, *The Journal of Immunology*, 181(5):3602-3608, 2008.
 8. Takahisa Imamura, Hidetoshi Nitta, Yoshihiro Wada, Hidetomo Kobayashi, Keinosuke Okamoto, Impaired plasma clottability induction through fibrinogen degradation by ASP, a serine protease released from *Aeromonas sobria*, *FEMS Microbiol Lett*. 284: 35-42, 2008
 9. Nishioka, T., M. Kamruzzaman, M. Nishibuchi, and Y. Satta. 2008. On the origin and function of an insertion element VPai-1 specific to post-1995 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Genes & Genetic Systems* 83(2):101-110.
 10. Yamamoto, A., J. Iwahori, V. Vuddhakul, W. Charernjiratragulc, D. Vose, K. Osaka, M. Shigematsu, H. Toyofuku, S. Yamamoto, M. Nishibuchi, F. Kasuga. 2008. Quantitative modeling for risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in bloody clams in southern Thailand.

- Int. J. Food Microbiol. 124(1):70-78.
11. Kamruzzaman, M., P. Bhoopong, V. Vuddhakul, and M. Nishibuchi. 2008. Detection of a functional insertion sequence responsible for deletion of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) in *Vibrio parahaemolyticus*. *Gene*. 421(1-2):67-73.
 12. Hinenoya, A. Naigita, K. Ninomiya, M. Okuda, K. Shima, M. Asakura, K. Nishimura, K. Seto, T. Tsukamoto, T. Ramamurthy and S. Yamasaki. Prevalence and characteristics of cytolethal distending toxin (Cdt)-producing *Escherichia coli* from children with diarrhea in Japan., *Microbiol. Immunol.*, in press.
 13. Rabindra, B., K.-S. Park, X. Chen, T. Iida, T. Honda, O. Takeuchi and S. Akira : Translocation of VP1686 upregulates RhoB and accelerates phagocytic activity of macrophage through actin remodeling. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18 : 171-175, 2008
 14. Sugiyama, T., T. Iida, K. Izutsu, K.-S. Park and T. Honda : Precise region and the character of the pathogenicity island in clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains. *J. Bacteriol.* 190(5): 1835-1837, 2008
 15. Izutsu, K., K. Kurokawa, K. Tashiro, S. Kuhara, T. Hayashi, T. Honda and T. Iida : Comparative genomic analysis using microarray demonstrates a strong correlation between the presence of the 80-kilobase pathogenicity island and pathogenicity in Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Infect. Immun.* 76(3):1016-1023, 2008
 16. Nakamura, S., N. Maeda, I.M.Miron, M. Yoh, K. Izutsu, C. Kataoka, T. Honda, T. Yasunaga, T. Nakaya, J. Kawai, Y. Hayashizaki, T. Horii and T. Iida : Metagenomic diagnosis of bacterial infections. *Emerging Infectious Diseases* 14(11):1784-1786, 2008
 17. Kodama, T., H. Hiyoshi, K. Gotoh, Y. Akeda, S. Matsuda, K. S. Park, Vladimir V.C, T. Iida and T. Honda : Identification of two translocon proteins of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2. *Infect. Immun.* 76(9):4282-4289, 2008
 18. S. P. Voravuthikunchai, K. Okada, T. Iida and T. Honda : Early diagnosis of infectious diarrhea using lactoferrin and hemoglobin markers. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology.* 16:288-298, 2008
 19. Dryselius, R, K, Izutsu, T, Honda and T, Iida : Differential replication dynamics for large and small *Vibrio* chromosomes affect gene dosage, expression and location. *BMC Genomics.* 9:559, 2008
 20. Okada, N., T. Iida, K. S. Park, N. Goto, T. Yasunaga, H. Hiyoshi, S. Matsuda, T. Kodama and T. Honda : Identification and Characterization of a Novel Type III Secretion System in *trh*-Positive *Vibrio parahaemolyticus* Strain TH3996 Reveal Genetic Lineage and Diversity of Pathogenic Machinery beyond the Species Level. *Infect.*

- Immun. 77(2):904-13, 2008
21. 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.* 180 (7): 5017-5027, 2008.
 22. Tapchaisri, P., Na-Ubol, M., Tiyasuttipan, W., Chaiyaroj, S. C., Yamasaki, S., Wongsaroj, 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.* 26 (1): 79-87, 2008.
 23. Nakayama M, Hisatsune J, Yamasaki E, Isomoto H, Kurazono H, Hatakeyama M, Azuma T, Yamaoka Y, Yahiro K, Moss J, Hirayama T.: *Helicobacter pylori* VacA-induced inhibition of GSK3 through the PI3K/Akt signaling pathway. *J. Biol. Chem.* In press, 2008
 24. Takahashi A, Muratani T, Yasuda M, Takahashi S, Monden K, Ishikawa K, Kiyota H, Arakawa S, Matsumoto T, Shima, H, Kurazono H, Yamamoto S: Genetic profile of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from cystitis: phylogeny, virulence factors, PAI_{usp}-subtypes, and mutation patterns. *J. Clin. Microbiol.* in press, 2009
 25. Nakayama K., Yamashita A., Kurokawa K., Morimoto T., Ogawa M., Fukuhara M., Urakami H., Ohnishi M., Uchiyama I., Ogura Y., Ooka T., Oshima K., Tamura A., Hattori M. and Hayashi T.: The whole-genome sequencing of the obligate intracellular bacterium *Orientia tsutsugamushi* revealed massive gene amplification during reductive genome evolution. *DNA Res.* 15:185-199, 2008.
 26. Naito M., Hirakawa H., Yamashita A., Ohara N., Shoji M., Yukitake H., Nakayama K., Toh H., Yoshimura F., Kuhara S., Hattori M., Hayashi T., and Nakayama K. :Determination of the Genome Sequence of *Porphyromonas gingivalis* Strain ATCC 33277 and Genomic Comparison with Strain W83 Revealed Extensive Genome Rearrangements in *P. gingivalis* *DNA Res.* 15:215-225, 2008
 27. Ogura Y., Abe H., Katsura K., Kurokawa K., Asadulghani, Iguchi A., Ooka T., Nakayama K., Yamashita A., Hattori M., Tobe T. and Hayashi T.: Systematic identification and sequence analysis of the genomic islands of the enteropathogenic *Escherichia coli* strain B171-8 by the combined use of Whole Genome PCR Scanning and fosmid mapping. *J. Bacteriol.* 190:6948-6960, 2008.
 28. Oshima K., Toh H., Ogura Y., Sasamoto H., Morita H., Park S.-H., Ooka T., Iyoda S., Taylor T.D.,

- Hayashi T., Itoh K., and Hattori M.: Complete Genome Sequence and Comparative Analysis of the Wild-type Commensal *Escherichia coli* Strain SE11 Isolated from a Healthy Adult. *DNA Res.* 15:375-386, 2008.
29. Miyahara A., Nakanishi N., Ooka T., Hayashi T., Sugimoto N., and Tobe T.: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector EspL2 induces actin microfilament aggregation through annexin 2 activation. *Cell Microbiol.* doi:10.1111/j-1462-5822.2008.01256.x., 2008.
30. Iguchi A., Thomson N.R., Ogura Y., Saunders D., Ooka T., Henderson I.R., Harris D., Asadulghani, Kurokawa K., Dean P., Kenny B., Quail M.A., Thurston S., Dougan G., Hayashi T., Parkhill J., and Frankel G.: The complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *E. coli* O127:H6 strain E2348/69. *J. Bacteriol.* 191:347-354, 2009.
31. Oana K., Kawakami Y., Hayashi T., and Ohnishi M.: Simple broad-spectrum protocol using labiase for bacterial cell lysis to prepare genomic DNA for pulsed-field gel electrophoresis analysis. *Microbiol. Immunol.* 53:45-48, 2009.
32. Nakanishi N., Tashiro K., Kuhara S., Hayashi T., Sugimoto N. and Tobe T.: Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiol.* (in press)
33. Hanashima, T., Miyake, M., Yahiro, K., Iwamaru, Y., Ando, A., Morinaga, N. and Noda, M. (2008) Effect of Gb3 in lipid rafts in resistance to Shiga-like toxin of mutant Vero cells. *Microb Pathog.* 45: 124-133.
34. Morinaga, N., Yahiro, K., Matsuura, G., 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 induces cell cycle arrest at G1 by downregulation of cyclin D1. *Cell Microbiol.* 10: 921-929.
35. 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-kB activation. (2008) *J. Immunol.* 180: 5017-5027.
36. Mashima H, Suzuki J, Hirayama T, Yoshikumi Y, Ohno H, Ohnishi H, Yasuda H, Fujita T, Omata M. Involvement of VAMP7 in human gastric epithelial cell vacuolation induced by *Helicobacter pylori*-produced VacA. *Infect. Immun* 76: 2296-303.
37. Nakayama M, Hisatsune J, Yamasaki E, Isomoto H, Kurazono H, Hatakeyama M, Azuma T, Yamaoka Y, Yahiro K, Moss J, Hirayama T.: *Helicobacter pylori* VacA-induced inhibition of

- GSK3 through the PI3K/Akt signaling pathway. J Biol Chem. 284(3):1612-1619.
38. Yoshida A, Isomoto H, Hisatsune J, Nakayama M, Nakashima Y, Matsushima K, Mizuta Y, Hayashi T, Yamaoka Y, Azuma T, Moss J, Hirayama T, Kohno S.: Enhanced expression of CCL20 in human *Helicobacter pylori*-associated gastritis. Clin Immunol. in press
39. Tsuji T., Shimizu T., Sasaki K., Shimizu Y., Tsukamoto K., Arimitsu H., Ochi S., Sugiyama S., Taniguchi K., Neri P., Mori H. : Protection of mice from Shiga toxin-2 toxemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin Vaccine 2008;26(4):469-76
40. Tsuji, T., Shimizu, T., Sasaki, K., Tsukamoto, K., Arimitsu, H., Ochi, S., Taniguchi, K., Noda, M., Neri, P., Mori, H. A nasal vaccine comprising B-subunit derivative of Shiga toxin 2 for cross-protection against Shiga toxin types 1 and 2 Vaccine 2008;26(17):2092-9
41. Tsukamoto K., Kozai Y., Ihara H., Kohda T., Mukamoto M., Tsuji T., 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. 2008;44(6):484-493.
42. Arimitsu H., Sakaguchi Y., Lee JC., Ochi S., Tsukamoto K., Yamamoto Y., Ma S., Tsuji T., Oguma K. Molecular properties of each subcomponent in *Clostridium botulinum* type B haemagglutinin complex Microb Pathog. 2008;45(2):142-9.
43. Imase K, Tanaka A, Tokunaga K, Sugano H, Takahashi M, Tanaka M, Ishida H, Kamiya S, Takahashi S: Efficacy of *Clostridium butyricum* preparation concomitantly with *Helicobacter pylori* eradication therapy in relation to changes in the intestinal microbiota. Microbiol Immunol 52(1):1-6, 2008
- H. 知的財産権など：
特になし

平成 20 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（国際医学協力研究事業）分担研究報告書

下痢症由来大腸菌の病原因子に関する研究

研究分担者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター・微生物部
研究協力者	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	〃

研究要旨：

2007年5月、都内の学生食堂において、腸管出血性大腸菌（EHEC）O157による大規模食中毒が発生した。患者数は445名、内3名が溶血性尿毒症症候群（HUS）を発症した。本研究では感染源を明らかにすることを目的として、各種検体からのO157の分離および分離菌株の疫学的性状解析を行った。患者糞便等から分離されたO157の187株についてパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法で解析を行った結果、PFGEパターンはメインのパターンおよび類似パターン合わせて7パターンに分類された。しかしこれらのパターンはバンドが1～3本異なるのみであるため、いずれも同一の感染源による集団事例と推定された。

A. 研究目的

全国におけるEHEC感染症の届出数は毎年3,000件前後であり、ほぼ横ばい状態である。東京都内でも毎年200～300事例の届出があるが、このうち食品媒介が推定され、食中毒と決定される事例は数事例のみである。近年は全国的にも大規模事例の報告は無く、多くは家族内感染や患者数名の小規模事例である。しかし、2007年5月、都内の大学キャンパス内学生食堂において、EHEC O157による患者数445名、内HUS発症者3名の大規模食中毒が発生した。本研究では感染源や発生状況を明らかにすることを目的として、各種検体からのO157の分離および分離菌株の疫学的性状解析を行った。

B. 研究方法

1) 糞便、食品、拭き取り、水検体の細菌学的検査

2007年5月26日～7月31日までに当センターに搬入された糞便1,739検体、食品120検体、拭き取り49検体および水4検体を供試した。糞便検体はCT-SMAC寒天培地への直接分離培養とCT-TSBでの増菌培養後、CT-SMAC寒天培地へ分離培養する方法で行った。一部の検体では増菌培養後、塩酸処理を行い同様に分離培養した。食品、拭き取り、水検体は常法によりO157の検出を行った。

2) 病原因子保有状況

分離されたO157のペロ毒素産生性試験はRPLA法で行った。定着因子の1つであ

る *eae* 遺伝子の保有については Ibekwe, *et al.* (*Appl. Environ. Microbiol.* 68.10.4853-4862) のプライマーおよびプローブを用いたリアルタイム PCR 法で確認した。

3) 分子疫学解析

糞便検体から検出された O157 株および民間検査所等で分離され、当センターに搬入された菌株、合計 187 株について、PFGE 法による分子疫学解析および 14 薬剤 (CP, TC, SM, KM, GM ABPC, ST, NA, FOM, NFLX, CPF, OFLX, CTX, Su) を用いた薬剤感受性試験を KB 法で行った。

C. 研究結果

1) 糞便、食品、拭き取り、水検体からの O157 の検出

糞便 1,739 検体中 147 検体から EHEC O157:H7 (VT2) が、1 検体 (患者) から O157:H7 (VT1+VT2) が検出された (図 1)。内訳は患者 50 検体 (20.7%)、非発症者 35 検体 (3.4%)、調理従事者 10 検体 (27.0%)、経過者 (同一人を含む) 53 検体 (24.3%) であった (表 1)。

O157 が検出された 148 検体のうち、直接分離培養で検出したのは 113 検体 (76.3%)、増菌培養でのみ検出したのは 35 検体 (23.6%) であり、約 4 分の 1 の検体は増菌培養のみの検出であった。また、増菌培養液 114 検体については塩酸処理も行った結果、処理無しで陽性が 24 検体、処理有りでのみ陽性が 27 検体であった。

食品、拭き取り、水検体から O157 は検出されなかった。

2) 病原因子の保有状況

分離された O157 のベロ毒素産生性試験を RPLA 法で行ったところ、147 株が VT2 産生性、1 株は VT1+VT2 産生性であった。

定着因子である *eae* 遺伝子については保有していることが確認された。

3) 分子疫学解析

疫学解析のために 138 名から分離された 186 株の O157:H7 (VT2) 株について PFGE 法で DNA パターンを調べた結果、176 株 (94.6%) が T-0712 型で同一のパターンを示していた。中にはバンドが 1~2 本異なるパターン (サブタイプ b, c, d, f, h, j) の株も 10 株認められたが、これらは同一起源であると推定された (写真 1, 表 2)。供試した 14 薬剤に対しては、全て感受性であった。

4) 経過者糞便の O157 検出状況

今回、一人につき複数回の検査を行い、複数回 O157 が検出された事例が 23 事例あった。一人当たりの検便検査実施回数は 3~9 回 (平均 4 回) で O157 排菌期間は 5~24 日間 (平均 11 日間) であった (図 2)。

D. 考察

2007 年 5 月 25 日、都内の医療機関から EHEC O157 の届出があった。患者は都内大学の学生であった。

保健所の調査の結果、下痢、腹痛等の症状を呈した患者は学内の中学生、高校生、大学生、教職員等であり、調査対象者は学生食堂を利用した可能性のある約 7,700 名に及んだ。本事例は最終的に患者数 445 名、内 HUS 発症者 3 名 (大学生 2 名、中学生 1 名) の大規模食中毒となった。

今回の事例では原因推定食品は保存されておらず、食品から O157 は検出されなかつ

った。しかし、喫食状況から5月14日～25日までの10日間に調理された食事または弁当が原因であると推定された。

糞便からのO157の検出では、検出者のうち約4分の1は増菌培養のみで陽性であったことから、増菌培養の効果が確認された。増菌培養後の塩酸処理については、塩酸処理有りのみで陽性となった検体は3検体のみと多くはなかったが、塩酸処理をした分離平板からの釣菌は、O157以外の菌の発育が抑制されているため、非常に容易であった。

本事例で分離されたO157についてPFGE法で解析を行った結果、PFGEパターンはメインのパターンおよび類似パターン合わせて7パターンに分類された。しかしこれらのパターンはバンドが1～3本異なるのみであるため、いずれも同一の感染源による集団事例と推定された。

喫食調査の結果、共通する食事は学生食堂で調理された食事および弁当のみであった。食品等からO157は検出されなかったが、喫食状況から5月14日～25日までに調理された食事が原因食品であると推定された。特にキャベツやレタス等の生野菜が調理施設内でO157に汚染され、原因食品になった可能性が高いと推定された。

E. 結論

2007年5月、都内大学の学生食堂において、EHEC O157による大規模食中毒が発生した。患者数は445名、内3名がHUSを発症した。各種検体からのO157の分離および分離菌株の疫学的性状解析を行った。患者糞便等から分離されたO157の187株についてPFGE法で解析を行った結果、PFGEパターン7パターンに分類された。しかしこれらのパターンはバンドが1～3

本異なるのみであるため、いずれも同一の感染源による集団事例と推定された。

F. 健康危険情報

本事例は、キャベツやレタス等の生野菜が、他の食品によってO157に汚染され、原因食品となった可能性が高いと推定された。特に牛肉はO157に汚染されている可能性が高いので、取り扱いには十分注意が必要である。

G. 研究発表

1) Kai A., Konishi N., Obata H., Shimojima Y., Uehara S., Monma C, Yokoyama K., Takahashi M., Kawamura M., Yano K. : Bacteriological and epidemiological aspects of a large outbreak caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 at a university in Tokyo, 43rd Annual Joint Panel Meeting, Cholera and Other Bacterial Enteric Infections, Fukuoka, 2008

2) 東京都健康安全研究センター 微生物部 食品微生物研究科: 学生食堂で発生した腸管出血性大腸菌O157による大規模食中毒事例—東京都, 病原微生物検出情報(国立感染症研究所), 29, 5, 4-5, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

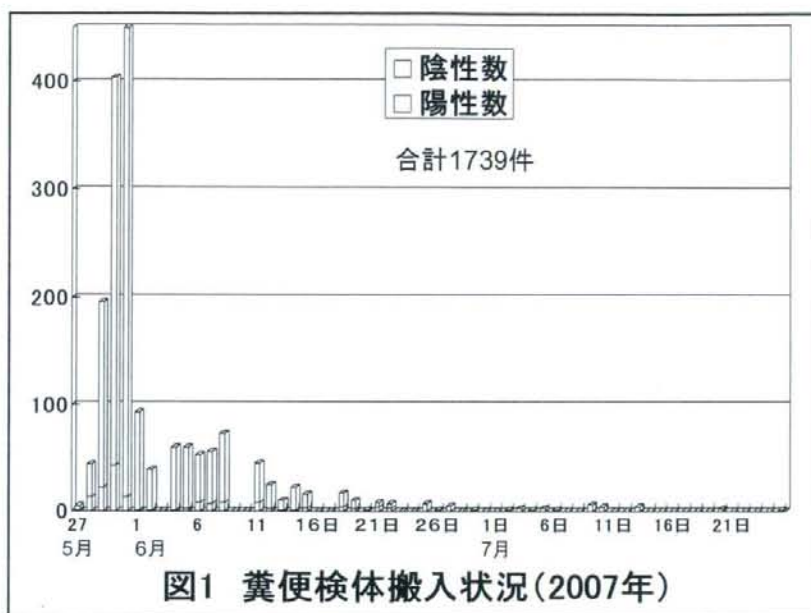


表1 腸管出血性大腸菌O157検査状況

検体		検体数	O157 陽性者 (%)
糞便	患者	241	50 (20.7)
	非発症者	1,021	35 (3.4)
	調理従事者	37	10 (27.0)
	関係者*	222	0
	経過者**	218	53 (24.3)
小計		1,739	148 (8.5)
食品	検食***	106	0
	参考品	14	0
ふきとり		49	0
水		4	0

* 家族・接触者, ** 同一人を含む, *** 5月15日~25日

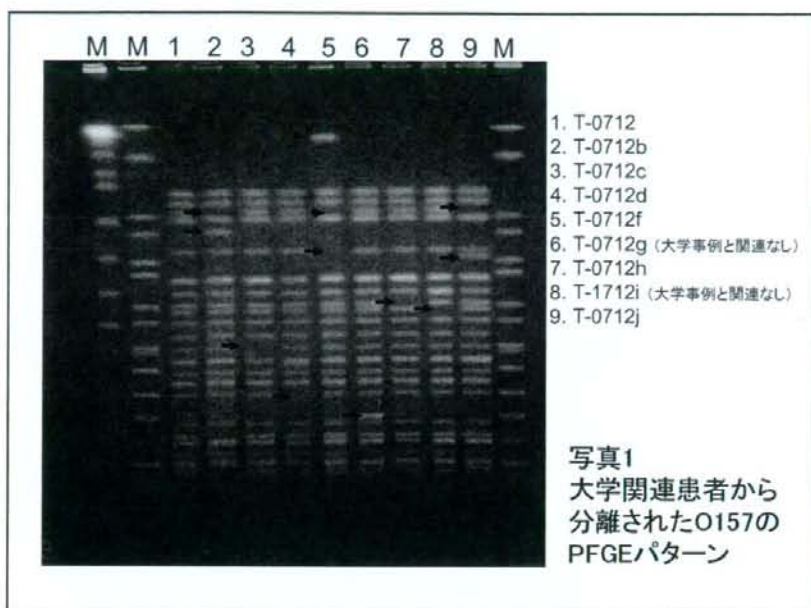


表2 大学関連O157株のPFGEパターン

PFGE型	菌株数
T-0712	176 (94.1%)
T-0712b	2
T-0712c	4
T-0712d	1
T-0712f	1
T-0712h	1
T-0712j	1
<hr/>	
T-0717 *	1
<hr/>	
計	187

} 7パターン

139名から分離された187株についてPFGEを実施
* VT1+VT2産生株