



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

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 年香川県老人福祉施設における O157 集団感染の疫学調査から－

研究分担者 吉田 真一 九州大学教授  
共同研究者 藤井 潤 九州大学准教授

研究要旨：

平成 17 年 10 月、香川県老人福祉 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。

A. 研究目的

平成 17 年 10 月、2つの香川県の老人福祉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。425 名が同一食材（白菜の浅漬け）を喫食して、39 名が下痢や出血性下痢をきたし、このうち 7 名が重症化して死亡した。今回、この 39 名の有所見者に無症状保菌者 13 名を加えて臨床疫学研究・観察研究を行い、O157 感染症の重症化要因を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 問診および検便実施によって O157 感染が成立したと考えられた 52 名の性、年齢、Activities of Daily Living (ADL) の程度、下痢または血便の発症日、死亡有無とその日時、基礎疾患の有無（高血圧、慢性腎不全、心疾患、脳梗塞、血液疾患など）、血液検査データ（1施設 26 名のみ）を患者カルテから調べ、コホートによる解析を行った。この研究は、平成 18 年 11 月 9 日付けで九州大学医学研究院等倫理委員会に

承認された。

2) 倫理規定

カルテ等から得られた個人情報適切に保護することとし、具体的には転記した調査票は鍵をかけて保管した。分析に使用するデータは整理番号で取り扱い、氏名など個人識別できるデータは付けないこととした。さらには電子情報を扱う PC にはパスワードを設定する、発表は統計的な処理をした結果のみを示すこととした。香川県の協力が得られていること、カルテ情報や既に調べられている研究情報など既存資料に基づくこと、既に死亡している患者も含まれることにより、疫学倫理指針「観察研究で、既存資料による研究」に該当し、対象者からのインフォームドコンセントは不要と判断した。

C. 研究結果

1) Figure 1 に 39 名有所見者の性、年齢分布を示す。  
2) Figure 2 に 39 名有所見者と死亡者の発生動向を示す。原因食の提供は 10 月 1

2日の朝食および夕食である (Figure 2 矢印)。

3) 死亡に対しては ADL が有意な関連を認め、ADL が寝たきりの場合(C1,C2)では年齢と独立して死亡のオッズ比が 7.23 倍に上昇していた。血便の有無は死亡に有意に関連したが (Table 1、 $p=0.002$ )、年齢や検便検査での O157 の分離の有無については関連しなかった (Table 1)。死亡例は女性のみで、男性では認められなかったことから、女性が O157 感染のリスクファクターとして考えられ、今回の調査で統計学的に顕著な有意差を認めなかったものの、有意傾向を示した (Table 1、 $p=0.085$ )。

4) 入院時の白血球数増加は死亡と有意な関連を示した (Table 2、 $p=0.039$ )。しかし C-reactive protein (CRP) の増加や貧血は死亡と有意な関連を示さなかった (Table 2)。腎機能の悪化 (クレアチニン、BUN) と血小板の低下は有意傾向を示した (Table 2、 $p=0.096$ )。

5) 抗生物質 (Levofloxacin, Fosfomycin) の使用は死亡と有意な関連は認めなかった。

#### D. 考察

O157 集団感染時に何を基準として重症と判断し、検査治療方針をどのように決定するかはよくわかっていない。今回の集団感染においても大腸内視鏡所見や腹部 CT から虚血性大腸炎と診断されたケースがある。それは検便検査によって O157 が検出されていないというエビデンスに引っ張られて、O157 による出血性腸炎を早期に否定してしまったことによると考えられた。O157 集団感染において抗生物質はほとんどの症例に用いられる場合が多く、検便検査によって O157 が検出されていない場合がある。今回の調査によって臨床家は、検査データか

ら下血の程度と白血球増加によって患者の重症度を判断しなければならない。さらに今回明らかとなったことは、高齢者に O157 集団感染が発生した場合、高齢ほど重症化するのではなく、寝たきりであることが死亡に深く関連することである。また女性であることも危険因子の可能性がある。1996年の大阪堺市での学校給食による大規模 O157 集団感染において、溶血性尿毒症症候群 (不完全型も含む) の発症に男女差はなかったことが報告されている。しかし、私達の再解析によって完全型溶血性尿毒症症候群 (溶血性貧血、血小板減少、腎不全) の発症は女兒に多く、オッズ比は 3.63 倍 ( $p=0.073$ ) に達することが判明している (未発表)。今回の集団感染死亡例に意識障害や痙攣が頻発したのにもかかわらず、頭部 CT や MRI は撮影されてなかった。緊急の臨床現場では O157 感染における急性脳症の発症への注意と認識が低いことが推測された。また透析も行われなかったことから、特に老人の O157 集団感染における透析の適応について今後議論する必要がある。

#### E. 結論

O157 集団感染が高齢者に発生した場合、寝たきりで、女性、血便を認め、入院時の白血球数の増加は死亡につながる危険性があり、集中治療や透析などの適応を考える必要がある。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

1) 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.

2) 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.

3) 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.

4) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

#### 参考資料

堺市学童集団感染下痢症報告書 堺市学童  
集団感染症対策本部 平成9年8月

**Table 1.** Demographic features, clinical signs, stool culture, and bedridden status for 52 patients infected with *Escherichia* O157:H7.

Factor	No. (%) of patients		Fisher's exact test
	Who survived	Who died	
Numbers of patients analyzed	45 (87)	7 (13)	
Demographic data			
Age, years <sup>b</sup>			
≤ 85	20 (38)	4 (7.7)	<i>p</i> = 0.69
>86	25 (48)	3 (5.8)	
Sex <sup>b</sup>			
Male	16 (31)	0 (0)	<i>p</i> = 0.085
Female	29 (56)	7 (13)	
Bloody diarrhea <sup>b</sup>			
Yes	16 (31)	7 (13)	* <i>p</i> = 0.002 <sup>a</sup>
No	29 (56)	0 (0)	
Stool culture of O157:H7 <sup>b</sup>			
positive	32 (62)	5 (9.6)	<i>p</i> = 1.0
negative	13 (25)	2 (3.8)	
Logistic regression analysis			OR (95% CL)
No. of home for the aged <sup>b</sup>			
no. 1	35 (67)	4 (7.7)	1.00 (baseline)
no. 2	10 (19)	3 (5.8)	2.62 (0.5-13.7)
Bedridden status <sup>b</sup>			
Independent or partially <sup>c</sup>	38 (73)	3 (5.9)	1.00 (baseline)
Completely (C1-2)	7 (13)	4 (7.7)	7.23 (1.32-39.6)

NOTE. <sup>a</sup>Fisher's two-tailed exact test, \**p* < 0.05, <sup>b</sup>Logistic regression analysis, <sup>c</sup>Independent or partially bedridden status level include J1-2, A1-2, B1-2 of Activity of Daily Living (ADL) level. Fisher's two-tailed exact test and logistic regression analysis shows the association between these factors and death.

**Table 2.** Laboratory test results obtained on admission to the hospital in no.1 of home for the aged.

Test result	No. (%) of patients		
	Who survived	Who died	Fisher's exact test
Numbers of patients analyzed (no. 1)	22 (85)	4 (15)	
WBC count > 10.2 x 10 <sup>9</sup> cells/L <sup>a</sup>			
Yes	8 (30)	4 (15)	* <i>p</i> = 0.039
No	13 (50)	0 (0)	
Platelet count < 186 x10 <sup>9</sup> cells/L <sup>a</sup>			
Yes	9 (35)	4 (15)	<i>p</i> = 0.096
No	12 (46)	0 (0)	
Hemoglobin level < 12.1 g/dL <sup>a</sup>			
Yes	12 (46)	1 (8)	<i>p</i> = 0.32
No	9 (35)	3 (12)	
C reactive protein > 1.8 mg/dL <sup>a</sup>			
Yes	10 (38)	2 (7.7)	<i>p</i> = 1.0
No	11 (42)	2 (7.7)	
Creatinine level > 0.91 mg/dL			
Yes	9 (35)	4 (15)	<i>p</i> = 0.096
No	13 (50)	0 (0)	
Urea concentration > 19.3 mg/dL			
Yes	9 (35)	4 (15)	<i>p</i> = 0.096
No	13 (50)	0 (0)	

**Table 3.** Admission treatment of 26 patients infected with *Escherichia* O157:H7 who were hospitalized in no.1 of home for the aged.

Treatment receive	No. (%) of patients		
	Who survived	Who died	Fisher's exact
Numbers of patients analyzed (no.1)	22 (100)	4 (15)	
Levofloxacin			
Yes	16 (62)	3 (12)	<i>p</i> = 1.0
No	6 (23)	1 (3.8)	
Fosfomycin			
Yes	16 (62)	3 (12)	<i>p</i> = 1.0
No	6 (23)	1 (3.8)	

Fisher's exact test analysis shows the association between these factors and death.

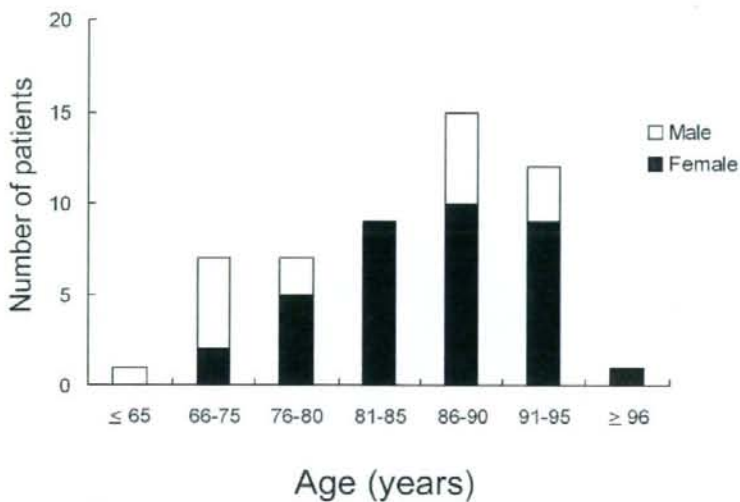


Figure 1.  
Age distribution of patients infected with *Escherichia coli* 157:H7.

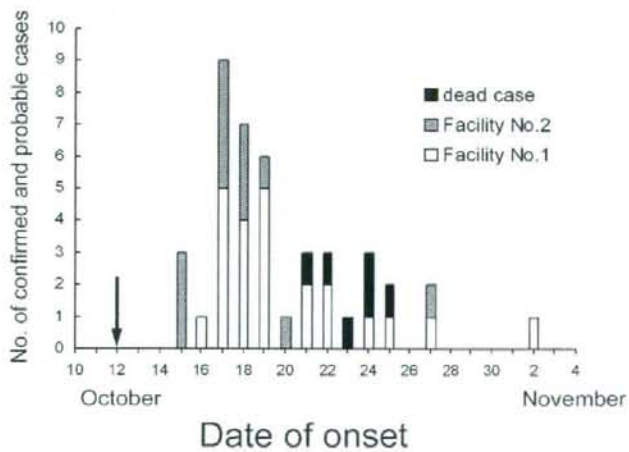


Figure 2.  
Cases of *Escherichia coli* O157 infection, by date of primary infection, in Japan (12 October through 2 November). The arrow indicates date of onset of the outbreak.

アエロモナスの菌体外毒素の産生と活性に関する研究

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教授

研究要旨：

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。

A. 研究目的

*Aeromonas* (アエロモナス) は0.3~1.0  $\mu$ m $\times$ 1.0~3.5  $\mu$ m 大のグラム陰性、無芽胞の通性嫌気性桿菌で、菌体の一端に1ないし数本の鞭毛を有している細菌で、ブドウ糖、白糖、乳糖を分解する。生化学的性状の違いによって種に分かれている。オキシダーゼ試験は陽性を呈し、大腸菌などの重要な鑑別点となっている。アエロモナスは淡水中に常在する細菌で、世界各国で河川や沿岸地域の水、泥水から分離され、淡水魚病の原因菌のみならず、両生類、爬虫類の病原菌としても知られている。日本での調査でも下水、河川水、冷凍エビ、海産魚介類、カキなどから高頻度に分離され、とくにウナギの鱗赤病の原因菌として水産業上問題にされてきた菌である。

近年、人に対する病原性も調べられ、下痢症、敗血症、創傷感染症、髄膜炎、肺炎などの原因菌としても分離されている。その病原性には菌体外毒素が関与していると

言われている。アエロモナスの菌体外毒素としてヘモリジン (ALH)、セリンプロテアーゼ (ASP)、メタロプロテアーゼ (AMP) がよく知られている。ALH は溶血活性を有することはもちろんであるが、腸管内では下痢毒素としても機能することも証明されている。ASP は哺乳動物のフーリンに類似したプロテアーゼであり、皮内では浮腫を引き起こすことが明らかにされている。これに対して AMP については解析が行われてなく、その性状は十分にはわかっていない。

分担研究者は、一般に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事、また述べたようにアエロモナスは淡水では多数生息しているが、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てきた。その結果、溶血毒は培地中の食塩濃度に関係なく産生されるが、プロテアーゼは ASP, AMP とともに食塩濃度が上昇（3%）すると産生が抑制される事を明らかにしてきた。そこで



さらに食塩で産生が影響されるタンパク質(毒素)があるのではと考え、今回調べた。

## B. 研究方法

### 1) 培地中の食塩で産生が影響を受けるタンパク質の検出

一般にアエロモナスは菌体外のプロテアーゼ活性が強く、菌体外に放出されたタンパク質の多くはこのプロテアーゼで分解される。培養中に菌体外に放出されたタンパク質の量を調べるためには、このプロテアーゼの分解を受けない状態で調べることが望まれる。そこでアエロモナスの代表的なプロテアーゼであるメタロプロテアーゼとセリンプロテアーゼの遺伝子を破壊した菌株である *A. sobria* 288 (ser<sup>-</sup>, met<sup>-</sup>) を *A. sobria* 288 株から作製し、本実験に使用した。

この変異菌株を 0.5% 食塩、あるいは 3.0% 食塩を含むブイヨン培地にて培養し、遠心分離にて菌体と培養上清に分けた。培養上清は 80% 飽和硫酸で塩析し、得た画分を透析後、SDS-PAGE にて分析した。

### 2) タンパク質の精製

1) で見出した塩濃度で産生が抑制されるタンパク質を精製した。精製には、硫酸塩析、HPLC システムでのハイドロキシアパタイトからむ、ゲルろ過カラム、を用いたクロマトグラフィーを利用した。

### 3) タンパク質の解析

精製したタンパク質を SDS-PAGE で分離し、膜に転写後、該当するタンパクバンドを切り出し、緩衝液で抽出した。抽出液中のたんぱく質のアミノ末端の配列決定、ならびに分子量の測定を行った。

### 4) リパーゼの活性測定

リパーゼ活性は p-ニトロフェノール パルミチン酸エステル(p-NPP)を基質に用い

る方法にて測定した。3 mg p-NPP/ mL (イソプロパノールの溶解) の溶液と、9 倍量の「0.01g アラビアガム、0.04 mL Triton X-100 を 50 mM Tris HCl (pH 8.0) に溶解した液」を混合した溶液を基質溶液とした。その基質溶液と被検溶液を 9:1 の割合で混合し、37°C で 15 分間保温する。反応溶液量は 200  $\mu$ リットルとした。保温後基質より遊離した 4-ニトロフェノールを、同化合物の最大吸収波長である 405 nm で測定した。1 ユニット (U) は本反応条件で O.D.<sub>405</sub> を 0.2 上昇させる酵素量とした。

### 5) リパーゼ遺伝子のクローニングと形質転換株の作製

報告されている lipase-like protein の遺伝子塩基配列を基に、PCR を利用し、pSA19-CP-MCS のプラスミド(アエロモナスで複製可能なプラスミド) にクローニングした。クローニングしたプラスミド (pSA-ALIP) をエレクトロポレーションにより、*A. sobria* 104 株に形質転換した。この *A. sobria* 104 株は対象としているリパーゼ活性は示さない菌株である。

### 6) 細胞毒性の測定

培養した CHO (chinese hamster ovary) 細胞の培養液に、部分精製したリパーゼを添加し、細胞の変性を観察した。

## C. 研究成果

### 1) 3.0% 食塩存在下で産生が抑制されるタンパク質の検出

*A. sobria* 288 (ser<sup>-</sup>, met<sup>-</sup>) を普通ブイヨン(栄研)(本培地の食塩濃度は 0.5% である) および普通ブイヨン培地に食塩濃度が 3.0% になるように食塩を添加した培地で、37°C で振とう培養し、培養開始 4 時間後(初期対数増殖期)、12 時間後(定常期)、24 時間後(減衰期)に培養液の一部を回収

した。回収後遠心分離にて、菌体と培養上清に分離し、菌体からは外膜画分を調整した。

培養上清は80%飽和硫酸での塩析処理でタンパク質を回収し、SDS-PAGE用の可溶性溶液で処理した。

菌体は超音波処理を行い、遠心分離にて可溶性画分を回収し、SDS-PAGE用の可溶性溶液で処理した。

外膜画分はSDS-PAGE用の可溶性溶液で処理した。結果を図1に示した。

培養上清中のタンパク質の多くは3.0%食塩下での培養で培養上清中に存在する量が増大した。これには2つの理由があると考えている。その一つはプロテアーゼの影響である。使用した菌株ではセリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼは欠損しているが、その他のプロテアーゼは産生されている。この「その他のプロテアーゼ」も、セリンプロテアーゼやメタロプロテアーゼと同様に、3.0%食塩存在下では産生が低下し、0.5%食塩存在下では産生された。0.5%食塩存在下で産生されたタンパク質はこのプロテアーゼで分解されたが、3.0%ではプロテアーゼが産生されなく、多くのタンパク質はそのまま残存した。そのため、タンパク質の存在量が増える結果となったと、推察される。

他の一つは菌の増殖と産生されるタンパク質の種類である。3.0%食塩存在下では菌の増殖が抑制されるので、タンパク質合成系が菌体構成タンパク質の合成ではなく、菌体外に放出されるタンパク質の合成に使用され、そのため菌体外に放出されるタンパク質の量が増加した。これらの理由が考えられるが、いずれも結論を得るには至っていない。今後検討が必要である。

一方四角で示した70kDaのタンパク質は、3%食塩存在下の培養で、培地中での存在量が低下していた。量の低下は12時間後、

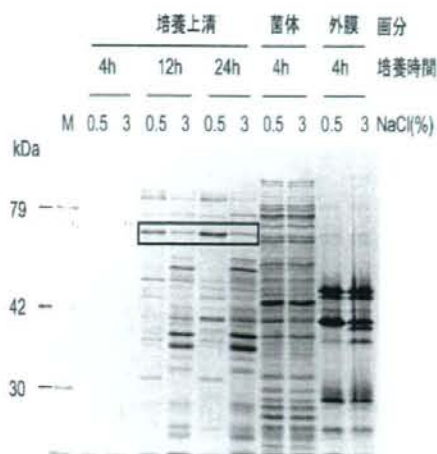


図1: アエロモナスのタンパク質産生に及ぼす培地中の食塩の影響

24時間後の両方のサンプルでみられた。他の多くの菌体外タンパク質が3%食塩存在下で存在量が増加したのに比べ、特徴的なことである。

菌体中ならびに外膜タンパク質の解析を行った。図には初期増殖期中のタンパク質の解析結果を示している。菌体タンパク質の種類や組成への培地中の食塩濃度による影響は観察されなかった。またこれらのタンパク質の挙動は12時間、24時間培養したサンプルでも同じであった。

## 2) タンパク質の精製

1)で見出した、3%食塩存在下で産生が抑制される菌体外タンパク質の精製をすすめた。精製段階での目的タンパク質の検出はSDS-PAGEにて行った。

硫酸塩析で回収したサンプルをHPLCシステムでのハイドロキシアパタイトカラム(CHT10-I, BIO RAD) (移動相; 0-100 mM リン酸Na 緩衝液 (pH7.4), 流速; ml/min) で分離し、該当タンパク質を含む画分をAmicon Ultra 遠心フィルター (分子量5000で分画) で濃縮した、濃縮した検液をHPLCシステムでのSuperdex75によるゲルろ過

カラム (GE ヘルスケア) (溶出液; 0.05M リン酸 Na 緩衝液 (pH7.4) / 0.15M NaCl、流速; 0.5mL/min) でさらに精製した。このゲルろ過で精製したサンプルを SDS-PAGE で解析した結果、一つの濃いバンドが検出され、ほぼ単一まで精製されていることが分かった。

SDS-PAGE での該当するタンパク質のバンドを転写膜に移し、転写膜に転写したタンパク質のアミノ末端の配列、およびその配列の blast 検索を行った。その結果このタンパク質はアエロモナスのリパーゼ様タンパク質であると予測された。

### 3) 精製タンパク質のリパーゼ活性

精製したタンパク質のリパーゼ活性を p-ニトロフェノール パルミチン酸エステル (p-NPP) を基質にして測定した。反応液 200μリットル中には精製タンパク質は 12μグラムを含む。結果を図2に示す。精製タンパク質はリパーゼ活性を示し、この活性は 100℃で加熱すると消失した。このことは本タンパク質がリパーゼであることを示している。

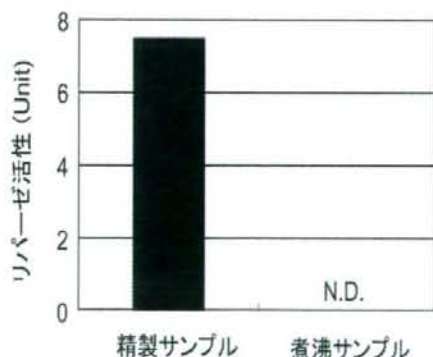


図2: 精製品のリパーゼ活性 (N.D.: 活性なし)

### 4) 形質転換菌での食塩によるリパーゼの産生抑制

より詳細な解析を行うため、lipase-like protein の遺伝子をクローニングし、本遺伝子を保有するプラスミドで *A. sobria* 104 株を形質転換し、その形質転換株で解析を行った。対照としてベクターである pSA19-CP-MCS で形質添加した菌を用いた。1) と同様に 0.5% および 3.0% 食塩を含む培地で培養し、培養 12 時間後、24 時間後の培養上清のリパーゼ活性を測定した。本系においても、3.0% 食塩中ではリパーゼの産生が抑制されていた。

### 5) 他の菌株でのリパーゼ産生に及ぼす食塩の影響

上記の結果より、*A. sobria* 288 株の lipase-like protein 遺伝子からのリパーゼの産生は、菌周辺の食塩濃度が 3.0% に上昇すれば、産生が抑制されることが示された。この現象は他のアエロモナスの菌株でも生じるかを調べるため、*A. sobria* の 3 菌株 (111 株、121 株、および 288 株 (変異株の作製に用いた親株))、*A. hydrophila* の 3 株 (413 株、441 株、446 株) を 0.5% 食塩、3.0% 食塩を含むブイヨン培地で培養し、12 時間後、24 時間後の培養上清のリパーゼ活性を、研究方法の項で述べた方法にて測定した。調べた 6 菌株のうち 5 菌株では、3.0% 食塩を含む培地での培養では、上清にリパーゼ活性は認められなかった (0.5% 食塩培地の培養ではリパーゼは認められた)。また残りの 1 菌株である 413 株でも、3.0% 食塩存在下での培養でのリパーゼ活性は 0.5% のそれと比べて減少した。しかし僅かではあるが、検出できた。これは本研究で対象としているリパーゼとは異なるリパーゼが、この 413 株では産生されている、あるいはここで検出された活性は測定誤差である、などの原因が考えられる。

以上の結果からアエロモナスにおいては

対象としているリパーゼの産生は環境の食塩で抑制されることが確実となった。

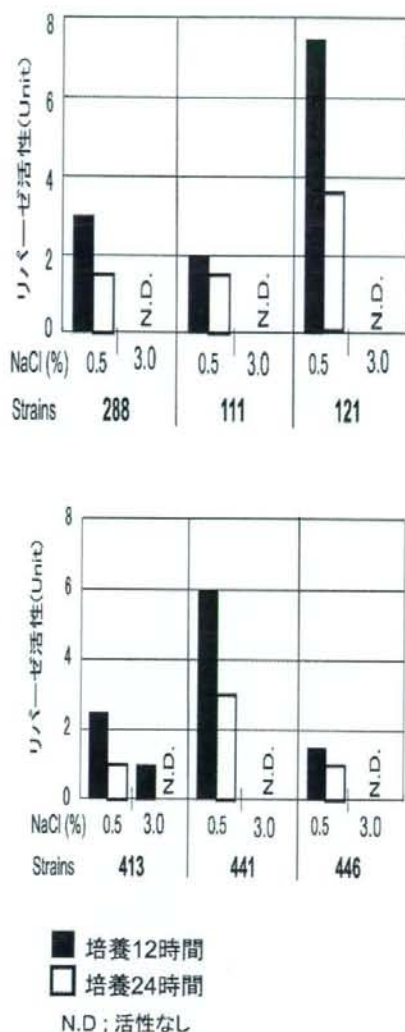


図3: 各種アエロモナス菌株の培養上清のリパーゼ活性

#### 6) 精製リパーゼの細胞毒性

精製したリパーゼを CHO 細胞の培養液中に添加した。5 μg/ml の添加で、添加後 3 時間後で細胞は萎縮し、紐状の形態へと変形した。

#### D. 考察

以上の結果より、アエロモナスのリパーゼの産生は、菌が生存している環境中の食塩により抑制されることがわかった。

述べたようにアエロモナスは河川や湖などの淡水には多く生存しているが、海水中では生存菌数が低下する。しかしアエロモナスは試験管内では 3.0% 食塩中でも増殖できる。このことは自然界では何らかの因子が作用し、海水中的のアエロモナスの菌数を減少させていると思われる。本研究では「3.0% 食塩中ではアエロモナスのリパーゼの産生が抑制される」ことをみいだした。一方すでに私たちは、アエロモナスは 3.0% 食塩中ではセリンプロテアーゼやメタロプロテアーゼの産生も抑制されることを見出している。

ある種の菌体外のリパーゼは、ウエルシュ菌に見られるように、強力な毒素として作用する。すでに我々は、本研究で取り扱っているリパーゼも細胞毒性作用を有していることを見出している。またアエロモナスのプロテアーゼの毒性も証明してきた。

これらの結果から、アエロモナスは淡水中ではプロテアーゼやリパーゼの菌体外毒素を産生し、生息できる条件を作り出すが、海水中ではこれらの菌体外毒素を産生できなくなり、死滅するのではないかと思える。

この結果は、今後菌体外毒素の持つ生理的役割を解明する上で貴重なデータを提供するとともに、自然界での菌の生態系形成の研究に寄与する。

#### E. 結論

アエロモナスにおいて、培地中の食塩で産生が抑制されるタンパク質について解析した。菌体外の蛋白の量は菌体外に放出されたプロテアーゼによって大きく影響を受ける。そこでアエロモナスの代表的な菌体外プロテアーゼであるセリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼを欠損させたアエロモ

ナス株で解析した。その結果、培養上清中に食塩により産生が抑制される1種類のタンパク質を見出した。このタンパク質を精製し、アミノ酸配列や活性の測定から、本タンパク質はリパーゼであることを証明した。また他のアエロモナス菌株や遺伝子形質転換菌の解析からも本リパーゼの産生が食塩により抑制されること証明した。

#### F. 健康危険情報

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。また以前に報告者たちはアエロモナスのプロテアーゼも淡水中ではよく産生され、海水中では産生が抑制されることを報告した。このことはおそらくこれらのプロテアーゼやリパーゼはアエロモナスが宿主となる魚やプランクトンとの殺菌-抵抗作用との関係で重要な役割を演じていると考えられる。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。それだけにこの汽水領域のアエロモナスは病原性が高い可能性がある。

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。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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.

2) 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.

3) 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

##### 2. 学会発表

1) Eizo Takahashi, Keinosuke Okamoto, Factors of *Aeromonas* involved in sepsis, United States-Japan Cooperative Medical Science program, Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel, Fukuoka, 2008年11月17日、Proceeding 196 ページ。

2) 高橋栄造、岡本敬の介、*Aeromonas sobria* の菌体外毒素リパーゼの食塩による産生抑制、第61回日本細菌学会中国・四国支部総会、松山市、2008年10月18日講演要旨集 19 ページ。

3) 岡本敬の介、アエロモナスの菌体外毒素の生合成および成熟化過程、第20回微生物シンポジウム、岐阜市、2008年9月3日、講演要旨集 12-13 ページ。

4) 高橋栄造、小野裕子、田村謙吾、岡本敬の介、*Aeromonas sobria* の生息環境に関する研究、第55回毒素シンポジウム、山梨、2008年7月2日、講演要旨集 38ページ。

## II. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. 登録 無

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

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

研究分担者	西瀨 光昭	京都大学 東南アジア研究所 教授
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

研究要旨：

感染症の世界的大流行をおこしている腸炎ピ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 領域を標的とする PCR 法が最も特異性が高いことが示された。

A. 研究目的

腸炎ピブリオ感染症は、これまで散発的か小規模に発生し、地域に局在しているケースがほとんどであると理解されていた。しかし、1996 年以後、腸炎ピブリオ新型クローンによる感染症がアジアから世界の他地域に広がって世界的大流行を起こしている。ごく最近になって我が国では、腸炎ピブリオ感染症が激減しているが、これは厚生労働省が中心となって推進した魚介類の衛生監視徹底政策によるところが大きいと考えられる。しかし、世界の他地域では、このクローンによる感染症の勢いは衰えることなく、1 万人規模の大規模なアウトブレイクも発生している。我々は 2008 年にタイ南部で新型クローンによる感染症が従来

どおり多発していることを確認した。したがって、新型クローンによる感染症を見逃すことはできない状況にある。新型クローンによる感染症の診断において、確定診断のために、分離菌が新型クローンに属するか否かについて、確実にかつ簡便・迅速に同定できる検査法が必要である。このクローンは、最初は 03:K6 型に属すると思われたが、その後多数の血清型バリエーションが出現していることが知られているので、同定には血清型はあまり有用ではない。毒素遺伝子型 (*tdh*、*trh*) および DNA フィンガープリントの組み合わせは信頼がおける同定法であるが、後者は手間と時間がかかるので現実的な検査法とは言い難い。新型クローン特異的な遺伝子マーカーを標的にし

た PCR 法がより現実的である。

我々のグループは世界で初めてそのような PCR 法を考案した。これは *toxRS* 遺伝子中の新型クローンに特異的な塩基置換を利用した方法で、GS-PCR (group-specific PCR) 法と命名した。GS-PCR 法検査陽性であるが、*tdh* 遺伝子陰性菌株が希に存在することから、我々は臨床的意義を重視し、GS-PCR 法は DNA フィンガープリント法に代わる方法として位置づけ、GS-PCR 法検査陽性かつ *tdh* 遺伝子陽性菌株を新型クローン菌株と定義している。GS-PCR 法は、世界中の研究者に利用されているが、塩基置換がベースにあるので不安定かも知れないという心配がある。他の研究者らは、新型クローンに特異性が高いと思われる遺伝子または挿入配列の有無を検査する PCR 法を報告している。これらが特異的であれば、GS-PCR 法を補完する方法として有用である。先行研究 (平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業) 「アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視に関する研究 (課題番号 H19-新興-一般-019)」) において、我々は系統関係を明らかにした 61 菌株 (新型クローンおよび関連菌株) および世界各地で分離された 579 菌株を対象にした網羅的検査を実施して、新型クローン検出用 PCR 法を比較・評価した。その結果、GS-PCR 陽性を検出 (必ずしも必要ではないが、あわせて *tdh* 遺伝子陽性も検査するのが理想的) する方法が最も適していると判定された。この方法では、擬陰性を示す 1 株が検出されたが、特異性はこの方法が最も高く、23 kb 挿入配列検出 PCR 法 (擬陰性 2 株)、16 kb 挿入配列検出 PCR 法 (擬陰性 4 株)、ORF8 検出 PCR 法 (擬陰性 25 株) の順であった。ただし、23 kb 挿入配列検出 PCR 法では 29 菌株が擬陽性を示

したので、この挿入配列中の他の領域を標的とするプライマーの探索が今後の課題であると考えられた。

本研究では、世界各地で分離された菌株を整理し、新たに菌株を追加して、597 菌株を対象にして上記の結果を確認した後に、23 kb 挿入配列の系統発生的進化を考察し、この挿入配列中で新型クローンに最も特異性が高い領域を標的とする PCR 法の開発を目指した。

## B. 研究方法

1) 供試菌株: 1995~2007 年にアジア 15 カ国 (インド、インドネシア、カンボジア、韓国、シンガポール、タイ、中国、台湾、日本、ネパール、バングラディッシュ、フィリピン、ベトナム、香港、ミャンマー)、およびその他の地域 (アメリカ、スペイン、ペルー、チリ、エチオピア) (検疫所による推定感染国名を含む) において感染したと考えられる患者から分離された腸炎ピブリオ 597 菌株を被検菌株とした。これらは、研究分担者の研究室の保存菌株で、関西空港検疫所と大阪府公衆衛生研究所から分与を受けた菌株を含む。

2) 遺伝子検出用 PCR 法: 被検菌株は、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存されていたストック菌株を TCBS 寒天培地上で  $37^{\circ}\text{C}$  にて一夜培養した後、1% NaCl を含む 2 ml の Luria-Bertani 培地中で一夜振とう培養した ( $37^{\circ}\text{C}$ 、160 rpm)。遠心分離法により 1 ml の培養液から菌体を回収し、1 ml の 0.85% NaCl 溶液に懸濁した後、懸濁液を  $100^{\circ}\text{C}$  で 10 分間加熱し、氷上で冷却した。遠心分離により得られた上清を滅菌蒸留水で 10 倍に希釈したものを DNA 溶液として PCR 検査に供した。

上記の DNA 溶液を用いて既報に従い *toxR* (菌種同定用)、*tdh* および *trh* 遺伝子 (病



原性菌株同定用)の有無を確認するためのPCR検査を実施した(Tada, J. et al. 1992; Kim, Y. B. et al. 1999)。新型クローン検出用PCR法として報告されている4種類の方法(表1)は既報に従って実施した。新たに開発した23 kb挿入配列中の3箇所(VP0383, VP0395, VP0400)を標的としたPCR法のための3種類のプライマーペアは23 kb挿入配列内のVP0388以外の領域(図1)を標的とするよう設計した。PCR反応条件は、既報の23 kb挿入配列検出用PCR法に従った。PCR産物は、1.2%アガロース電気泳動法により検出した。

3) AP-PCR法: フェノール・クロロホルム法により被検菌株から抽出・精製したゲノムDNAをDNAテンプレートとしたゲノムDNAを鋳型とした。プライマーおよびPCR反応条件は既報(Okuda, J. et al. 1997)に従い、1.5%アガロースゲル電気泳動法を行ってバンドパターンを比較した。

4) DNAの塩基配列の解析: DNAの塩基配列は、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer(アプライドバイオシステム、USA)を用いて、サイクルシーケンス法によって決定した。ホモロジー検索は、BLASTプログラム([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))、塩基配列のアラインメント解析は、DNASIS software for Windows ver. 2.1(日立ソフトウェア)を用いて実施した。

## C. 研究結果

### 1) 既知のPCR法による被検菌株の検査

全被検菌株597株が腸炎ピブリオであることは、PCRに基づく種特異的同定法によって確認した。これらの菌株を*tdh*遺伝子検出用PCR、*trh*遺伝子検出用PCR、GS-PCR法および新型クローン特異的遺伝子マーカー検出用PCR法(表1)を用いて検査した。

このうちGS-PCR法による検査結果と*tdh*遺伝子の検査結果に着目して、結果をまとめると表2のようになった。GS-PCR陽性かつ*tdh*遺伝子陽性を示した370株を新型クローンと定義した。このうちの340菌株(91.9%)がGS-PCR以外の新型クローン遺伝子マーカー全てを保有していたが、30株(8.1%)は、GS-PCR以外のいずれかの新型クローン遺伝子マーカーが陰性であった。その中ではORF8陰性株が最も多く24菌株(80.0%)、次いで16 kb挿入配列陰性株の4菌株(13.3%)、23 kb挿入配列陰性株の2菌株(6.7%)の順であった。

また、16 kb挿入配列検出用PCR法において、特異的増幅DNAより約1.2 kb大きい増幅DNAを呈した1株が確認され、この増幅DNAの塩基配列を決定して解析したところ、増幅DNA中にISVpa2(Kamruzzaman, M. et al. 2008)の挿入が起きていることが確認できた。この結果は、このPCR法の増幅領域がISVpa2のホットスポットとなっており、擬陰性の原因となることを示唆している。これらの結果から、23 kb挿入配列検出用PCR法が*tdh*遺伝子陽性かつGS-PCR陽性菌株の検出法を補完する最も特異性の高いPCR法であるといえる。ただし、GS-PCR陰性を呈した菌株中に、23 kb挿入配列検出用PCR法と16 kb挿入配列検出用PCR法で擬陽性を示したと判断された菌株がそれぞれ28株、2株検出された。

### 2) 23-kb挿入配列の系統発生

最近、バイオインフォマティックス的手法を用いた塩基配列の構造解析により、新型クローンに特有のDNA領域があることが明らかになりつつあり、23 kb挿入配列もその1つに含まれている(Hurley, C. C. et al. 2006.)。23 kb挿入配列内には24のopen reading frame(VP0380 - VP0403)

が含まれている。23 kb 挿入配列についてホモロジー検索をしたところ、restriction modification 関係の機能をコードすると思われる領域 (VP0387 - VP0395) のホモログが *Vibrio vulnificus* CMCP6 株と *Schewanella* sp. MR7 株に検出された。周辺領域を含めたこれらの塩基配列が高い近似性を示すのに対して、16SrRNA の塩基配列に基づくこれらの菌種間の系統関係の距離がそれほど近くないというギャップがあることや、上記 2 菌種内の特別な菌株にのみ相同配列が認められることは、23 kb 挿入配列は複数回の構造変化のステップを経てできあがった後に、23 kb のユニットとして菌種間で水平移動をして、腸炎ピブリオでは、新型クローンにのみ挿入したことを示唆している。23 kb のユニットが可動性であるという仮定により、23 kb 挿入配列がまれに GS-PCR 陰性株中に検出された (擬陽性) あるいは GS-PCR 陽性菌株中に検出できないケースがある (擬陰性) ことが説明できる。複数回の構造変化のステップを経てできあがったことは、23 kb 塩基配列内では領域により塩基配列の置換の蓄積頻度が異なる可能性があるため、より保存された (最近獲得した) 領域が PCR の標的として相応しいと言える。

### 3) 23-kb 挿入配列内の異なる領域を標的とした PCR 法の開発・評価

上記のような理由により、23 kb 挿入配列検出用 PCR 法において使用したプライマーペアとは異なる 3 領域を標的とするプライマーペア (図 1) を設計し PCR 検査を行った:restriction modification 関係の機能をコードすると思われる領域内ではあるが、先に使用したもの (VP0388) とは異なる領域を標的としたプライマーペア (VP395、971 bp を増幅); restriction modification

領域より下流域内 (VP0383、516 bp を増幅) および上流域内 (VP0400、1135 bp を増幅)。これらのプライマーペアを用いて PCR 検査を実施した結果、23 kb 挿入配列陽性菌株 (表 3 で GS-PCR 以外で、4 種のプライマーペアのいずれかに陽性反応を示した菌株) では、菌株間で 23 kb 挿入配列にばらつきがあることを示唆する結果が得られた。そこで、これらの菌株を PCR プロフィールに基づいて A ~ D および F のグループに分類し、GS-PCR 陽性で他の 4 種の PCR 陰性株を E グループとした (表 3)。23 kb 挿入配列内の領域を標的としたプライマーペアの中では VP0400 を標的とした PCR 法の結果が GS-PCR 法の結果と最も良く一致していた (一致していないのはプロフィール D、E の 4 株、一致率 99.5%)。次に PCR プロフィールグループ A ~ F から代表菌株を選び、それらの AP-PCR パターンを比較したところ、図 2 に示したような結果が得られた。プロフィール F は新型クローン菌株、プロフィール E は GS-PCR 陽性であるが 23 kb 挿入配列内の 4 種の PCR 結果で全て陰性を示した株、プロフィール D は GS-PCR 陰性であるが 23 kb 挿入配列全体を保有している株である。これらは同一の AP-PCR パターンを示した。一方、23 kb 挿入配列を部分的に保有しているプロフィール群 A、B、C の AP-PCR パターンにはさまざまなバリエーションがみられた。

### D. 考察

本研究では、大規模な評価試験を実施した。腸炎ピブリオ新型クローンとして定義した *tdh* 陽性かつ GS-PCR 陽性菌株を検出する方法を補完するための DNA フラグメントを標的とする方法として、すでに報告されている方法 (表 1) の中では、23 kb 挿入配列検

出用 PCR 法が最も特異性が高いことが確認できた。

さらに、今まで採用していた 23 kb 挿入配列検出用 PCR 法より、本研究で新たに開発した 23 kb 挿入配列内の VP0400 領域を標的とした PCR 法のほうが特異性が高いことが示された。VP0400 領域を有している菌株は新型クローン菌株と同一の AP-PCR パターンを示すことから、VP0400 を有している株は新型クローン菌株と同一または近似する遺伝的背景を有している、すなわち系統発生的に近似していると考えられる。また今回、23 kb 挿入配列を部分的に保有する GS-PCR 陰性菌株が多数確認された。この結果は、23 kb 挿入配列が 1 単位の DNA フラグメントとして存在する以前には、複数のサブフラグメントとして存在していたものが集合して 23 kb 挿入配列ができあがったという仮説 (Nishioka et al., 2008) を支持している。おそらく VP0400 領域は、23 kb 挿入配列の中では比較的最近獲得された領域であるため塩基配列の変異が少なく、GS-PCR 陽性株のほとんどに検出されたと思われる。一方、その他の領域はより古い時代に獲得されたため、ある程度塩基置換を蓄積した菌株が存在し、これらを標的にする PCR 検査で陰性を呈する可能性が高いと考えられる。23 kb 挿入配列を部分的に保有する菌株を含めて新型クローン関連菌株の系統解析を実施することにより、新型クローンがどのようにして 23 kb 挿入配列を獲得してきたのかを明らかにすることができるかもしれないので、現在この系統解析を実施中である。

本研究において、頻度はあまり高くないものの 16 kb 挿入配列中には ISVpa2 の飛び込みやすいスポットが存在することが確認でき、この特性は 16 kb 挿入配列を標的に

した PCR 検査法の特異性が低下する 1 つの要因になるといえる。

また、GS-PCR で陰性を示したにもかかわらず、23 kb、16 kb、ORF8 検出用 PCR の全てで陽性の結果を示す菌株が 1 株検出された (表 3)。この菌株の *toxRS* 遺伝子の塩基配列を決定したところ、新型クローンに特有の 7 箇所の塩基置換のいずれも起こっておらず、この菌株の *toxRS* 遺伝子は 1996 年以前の非新型クローンの遺伝子であることを確認した。この菌株は、新型クローンが非新型クローン菌株から homologous recombination を介して、別の *toxRS* 遺伝子を置換によって獲得した可能性が考えられる。*toxRS* 遺伝子は、多くの遺伝子の発現調節に関与するハウスキーピング遺伝子の 1 つである (Lin, Z. et al. 1993; Okuda, J. et al. 2001)。一般にハウスキーピング遺伝子はゲノム中で安定に維持されていると考えられている。しかし、新型クローンには、ハウスキーピング遺伝子の 1 つである 16S rRNA 遺伝子が 11 コピー存在し、そのうちの一部が置換を介して、非新型クローン菌株から 16S rDNA 遺伝子を獲得した可能性を示唆する結果が報告されている (Gonzalez-Escalona, N. et al. 2005; Harth, E. et al. 2007)。このように腸炎ピブリオでは、DNA フラグメントレベル (ハウスキーピング遺伝子を含む) でもゲノムの変化が非常に活発に起こっているという前提で、PCR 検査の標的配列を選出する必要がある。そのためには、本研究のように可能な限り多数の菌株を対象にしたスクリーニング法が最も有効であると言える。

## E. 結論

新型クローン同定法としては、*tdh* 陽性かつ GS-PCR 陽性が第一選択肢であるが、さ

らに GS-PCR の結果を補完するための、より安定した方法としては、研究分担者が開発した 23 kb 挿入配列内の VP0400 を標的とした PCR 法が有用であると言える。

#### F. 健康危険情報

研究目的の項に記載したように、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。

#### G. 研究発表（発表誌名巻号・頁・発行年等）

##### 1. 論文発表

Nishioka, T., M. Kamruzzaman, M. Nishibuchi, and Y. Satta. 2008. On the origin and function of an insertion element VPal-1 specific to post-1995 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Genes & Genetic Systems* 83 (2) :101-110.

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.

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.

西淵光昭. 2008. アジアの環境と食品の安全. *食衛誌* 48 (6) : J-414-416.

中口義次、小板橋努、西淵光昭. 2008. ビブリオ感染症の疫学 - 海外におけるトピックス. *化学療法の領域* 24 (6) :63-71.

西淵光昭. 2008. 食中毒の変遷と現状 : 発生要因および発生状況の多様化と対策. *化学療法の領域* 24 (7) :18-19.

##### 2. 学会発表

瀬尾 晃司、Pharanai Sukhumungoon、Varaporn Vuddhakul、山崎 渉、中口 義次、西淵 光昭. タイ南部ハジャイ市で市販されている二枚貝の腸炎ビブリオ世界的大流行株の汚染調査. 第42回腸炎ビブリオシンポジウム. 平成20年10月23日. 富山市.

清水理香、Djamal, A. A.、Vuddhakul, V.、瀬尾晃司、中口義次、西淵光昭. インドネシア・パダン市および周辺地区の腸炎ビブリオ感染症調査. 第42回腸炎ビブリオシンポジウム. 平成20年10月23日. 富山市.

中口 義次、西淵 光昭. 腸炎ビブリオ生菌に由来する毒素遺伝子の mRNA を標的とした TRC 法による魚介類検査への応用に向けて. 第42回腸炎ビブリオシンポジウム. 平成20年10月23日. 富山市.

清水 理香、Kamruzzaman, M.、山崎 渉、中口義次、西淵光昭. 腸炎ビブリオ新型クローン同定用 PCR 法の特異性の比較・検討. 第61回日本細菌学会関西支部総会. 平成