

- gene clusters in multiple evolutionary lineages of *Escherichia coli*. IUMS 2011, 6 September, 2011, Sapporo.
- (11) T. Ooka, K. Seto, K. Kawano, H. Kobayashi, Y. Etoh, S. Ichihara, M. Bardiau, N. Kaneko, J. Isobe, K. Yamaguchi, K. Horikawa, Y. Ogura, K. Nakayama, J. Mainil, and T. Hayashi: Phylogenetic and intimin-subtyping analysis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. IUMS 2011, 7 September, 2011, Sapporo.
- (12) Y. Ogura, M. Ohnishi, T. Mako, K. Kawano, T. Ooka, and T. Hayashi: Comparative analysis of STX2 prophages in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O-157. IUMS 2011, 7 September, 2011, Sapporo.
- (13) K. Murase, T. Ooka, Y. Ogura, A. Iguchi, K. Nakayama, Md Asadulghani, Md.R. Islam, H. Hiyoshi, T. Kodama, L. Beutin, and T. Hayashi: Hemolysin E-and enterohemolysin-derived hemolytic activities of the O55/O157 and other *Escherichia coli* lineages. IUMS 2011, 7 September, 2011, Sapporo.
- (14) Md.R. Islam, Y. Ogura, Md. Asadulghani, K. Murase, T. Ooka, K. Nakayama, and T. Hayashi: Systematic functional analysis of the genes in SP5, the STX2 phage of O157:H7 Sakai. 7 September, 2011, Sapporo.
- (15) T. Hayashi: Mechanisms for the parallel evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and the genome diversification among O157 EHEC strains. IUMS 2011, 10 September, 2011, Sapporo.
- (16) J.G. Mainil, M. Bardiau, T. Ooka, Y. Etoh, S. Ichihara, K. Horikawa, G. Buvens, D. Pierard, and T. Hayashi: IS621 typing and PFGE of O26:H11 enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated from humans and farms during four outbreaks in Japan and Belgium. IUMS 2011, 10 September, 2011, Sapporo.
- (17) 楠本正博, 深水大, 吉田英二, 山本史子, F. Shahada, 岩田剛敏, 秋庭正人, 大岡唯祐, 小椋義俊, 林哲也: ブタから分離された毒素原性大腸菌における IS-excision enhancer の分布. 第 94 回細菌学会関東支部総会, 10/6-7, 2011, 東京.
- (18) 林哲也 (シンポジスト): 同じ病原菌種内での菌株の違いをゲノムからみる: 病原性大腸菌を例として. 日本神経感染症学会総会, 11/4-5, 2011, 東京.
- (19) 岡安芳, 寺田祥子, 斉藤貴, 楠本正博, 林哲也, 関根靖彦: Iee により引き起こされる大腸菌のトランスポゾンの切り出し反応と融合体形成反応の解析. 第 34 回分子生物学会年会, 12/13-16, 2011, 横浜.

厚生労働科学研究費補助金  
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）  
分担研究報告書

腸管出血性大腸菌感染に併発する急性脳症の治療法に関する研究  
研究分担者 藤井 潤 九州大学大学院医学研究院准教授  
研究協力者 Muhammad Yunus Amran 九州大学医学研究院大学院生  
博士課程（インドネシア国費  
留学生）

研究要旨：

2009年、米国の研究グループから無菌仔ブタに STEC を経口感染させるモデルで、マクロライド系アジスロマイシン (AZM) が急性脳症に有効であることが報告された。この報告を受けて私達の開発した STEC 経口感染マウスモデルを用いて AZM の効果を調べた。その結果、AZM は STEC からのベロ毒素分泌を抑制することにより、体重当たり 1.6 $\mu$ g/g の僅かな量でもマウスは 80%生存した。さらに漢方生薬である大黃を併用することで、AZM の効果をいっそう高めることに成功した。

A. 研究目的

平成9年に厚生省から出された一次、二次医療機関のための腸管出血性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*; STEC 又は enterohemorrhagic *E. coli*; EHEC; ここでは STEC に統一する) 感染症治療の手引きによると、抗菌剤の使用は経口投与を原則とし、小児にはホスホマイシン、ノルフロキサシン、カナマイシン、成人にはニューキノロン、ホスホマイシンが推奨されている。一方、ベロ毒素遺伝子は溶原化したバクテリオファージに存在し、特にニューキノロン系抗生物質によってバクテリオファージ誘導が促され、ベロ毒素、特にベロ毒素 2 型 (Stx2) の産生が高まることが報告されている。ベロ毒素 1 型 (Stx1) は STEC のペリプラズムに留まると考えられ、腸管内で増殖した STEC を殺菌的抗菌薬で菌体を破壊することに

よって、ペリプラズムなどに留まっていたベロ毒素が腸管に放出され、症状が悪化するのではないかという懸念から、米国では抗菌薬は使用されていない。こうした状況の中、無菌仔ブタに STEC を経口感染させるモデルで、小児用量マクロライド系アジスロマイシン (AZM) が STEC 感染による急性脳症に有効であることが示された (J. Infect Dis. 4. 486-93. 2009)。AZM が STEC 感染による脳症に有効である理由として、AZM が STEC からの Stx2 の分泌を抑制することが示された。マクロライドはグラム陰性桿菌に対して抗菌活性が弱く、STEC の排菌を抑制できないのではないという理由で、我が国において AZM が STEC 感染症に用いられることはない。今回、私達が開発した STEC 経口感染マウスモデル (Infect. Immun.

62(8):3447-345, 1994) を用いて、アジスロマイシンと漢方生薬である大黃の効果を調べ、STEC 感染による急性脳症の新規治療法を開発したので報告する。

## B. 研究方法

### 1) 大量菌感染モデル

4 週令、雌の ICR マウスを用いて、STEC O157: H (-) E32511/HSC 株 (Stx2c 産生株) を  $5 \times 10^{10}$ CFU 経口感染させ、さらに mitomycin C (MMC) (2.5mg/kg) 腹腔内投与すると中枢障害によってマウスは 90% 死亡する (Infect. Immun. 64:5053-5060, 1994)。このマウスモデルに E32511/HSC を  $10^{11}$ CFU 経口感染させるとマウスは 100% 死亡した。E32511/HSC を  $10^{11}$ CFU 経口感染させる実験系を大量菌感染モデルと命名した。大量菌感染マウスモデルは、大量の菌を経口感染させ、MMC により、ファージにコードされている Stx2c をさらに増加させたモデルである。ヒトで言えば STEC が大腸内で多量に定着・増殖し、ベロ毒素を多く産生して出血性の下痢を生じている状態と想定できる。このモデルを使って、アジスロマイシン (AZM)、ホスホマイシン (FOM)、ノルフロキサシン (NLFX)、カナマイシン (KM)、オフロキサシン (OFLX)、シプロフロキサシン (CFPX) の効果を調べた。これら抗菌剤の経口投与量は MIC の 25 倍量とし、E32511/HSC/HSC 経口感染 2 時間後にこれら抗菌剤を経口投与した。

### 2) 少量菌感染モデルにおける大黃の効果

少量菌感染モデルとしてストレプトマイシン耐性 STEC O91: H21 B2F1 株を  $10^4$ CFU 経口感染するモデルを用いた。B2F1 株が産生する毒素はマウスに対して致死効果の高い Stx2d と呼ばれる毒素を産生する。B2F1 のマウスに対する LD<sub>50</sub> は 10 CFU 以下であることが報告されている (Infect Immun. 61:3832-3842, 1993)。この少量菌感染モデルは、ヒトにおいて STEC が 10~100 CFU 程度の最少発症菌量によって感染が成立する自然病態に近いモデルである。すなわち経口摂取された極少量の STEC が腸管に定着して増殖し、菌体からベロ毒素が多く放出され、hemolytic Uremic Syndrome (HUS) や急性脳症を発症するモデルである。この少量菌感染モデルを使って、漢方生薬である大黃を感染後 1 日目から 5 日間に渡って、1 日に 1 回経口投与した。投与量はマウス体重あたり 300µg/g とし、大黃の効果を調べた。

### 3) B2F1 の腸管への定着量の測定

B2F1 の腸管への定着量を測定するため、感染させたマウスの大腸および回腸を切り離し、口側断端から 10ml PBS を注入して糞便を洗い流し、腸管の重量の 10 倍量の PBS を加え、multi-beads shocker (安井機会) を用いて、切り取った腸管をホモジナイズした。ホモジナイズした溶液をストレプトマイシン含有普通寒天培地に塗り広げ、腸管に定着していた B2F1 のコロニーカウントを行った。

なお、この動物実験計画「腸管出血性大腸菌に併発する急性脳症の治療法に関する研究」は九州大学の動物実験倫理委員会で承認されている。

### C. 研究結果

#### 大量菌感染マウスモデルにおける AZM 経口投与の効果

E32511/HSC を  $10^{11}$  CFU 経口感染後、2, 6, 24 時間後に AZM をマウス体重あたり  $200\mu\text{g/g}$  経口投与した。その結果、感染後 2 時間に AZM を投与したマウスが 80% 有意に生き残った (Fig. 1A)。この結果から E32511/HSC を経口感染後、2 時間で AZM を経口投与することを決め、AZM の量を変えてマウスに経口投与した。その結果、驚くべきことに体重あたり僅か  $1.6\mu\text{g/g}$  経口投与した群でも 80% 生き残った (Fig. 1B)。 $6.3\mu\text{g/g}$  経口投与以上では、マウスは 100% 生存した (Fig. 1B)。この結果は、AZM の有するタンパク合成阻害活性によって E32511/HSC からの Stx2c の分泌を阻害したことが想定された。これを確かめるために、*in vitro* の系を用いて、各抗菌剤を培養上清に添加して E32511/HSC からの Stx2c の分泌について調べた。具体的には、各抗菌剤の sub-minimum concentration; SMC (MIC の 0.5 倍) 条件下において E32511/HSC を  $37^{\circ}\text{C}$ 、18 時間インキュベートし、培養上清中の Stx2c の濃度を逆受身ラテックス凝集反応で調べた。各抗菌剤の SMC 条件下での 18 時間後の E32511/HSC 菌量を Table 1 に示す。SMC 条件下において E32511/HSC は各抗菌剤によって、殺菌されることなく、すべて増殖した (Table 1)。E32511/HSC からの Stx2c の分泌は AZM 添加によって、まった

く認められなかった (Fig. 2A)。その他の抗菌剤は、抗菌剤が添加されていない陽性コントロールに比べ、同程度か、むしろ Stx2c の産生が増加していた (Fig. 2A)。CFPX は SMC 条件下で、2.18 倍にしか増殖しなかったが、Stx2c の分泌量は抗菌剤が添加されていない陽性コントロールに比べ、100 倍にも達した (Fig. 2A)。次に *in vivo* で各抗菌剤の効果を確かめた。各抗菌剤の MIC 25 倍量を E32511/HSC 感染 2 時間後に経口投与してマウスの生存率を調べた。その結果、マウス生存率は、AZM 投与群で 100%、KM と NLFX 投与群で 80% であり、統計学的に有意であった。FOM 等、その他の抗菌剤は有効でなかった (Fig. 2B)。

#### 少量菌感染マウスモデルにおける AZM と大腸経口投与の効果

B2F1 株を経口感染させた少量感染マウスモデルでは、AZM  $200\mu\text{g/g}$  を B2F1 感染 1 日後に経口投与するとマウスは 52% 生存し、AZM を経口投与されなかった群に比べ有意に生存した (Fig. 3A)。しかし、感染後 1 日目から 3 日間に渡って、AZM を 1 日 1 回経口投与しても、生存率は 65% と僅かに上昇するに留まり、AZM 1 回経口投与群と 3 回群では生存率に有意差は認めなかった ( $p=0.35$ ) (Fig. 3A)。それに対して大腸を感染 1 日後から 5 日間に渡って、1 日 1 回経口投与すると、マウスはすべて生存した (Fig. 3B)。感染 1 日後から 3 日間に渡って、1 日 1 回経口投与された群の生存率は 50% に留まり、未治療群の生存率 34% に比べ有意差を認めなかった (Fig. 3B)。大腸の効果をも、さらに詳しく調べるために、B2F1 感染後 8 日目と 10 日目に大腸と回腸において

B2F1 の定着を調べた。その結果、B2F1 感染後翌日から大黄を1日1回計5回経口投与された群は未治療群に比べて有意に大腸 (colon) と回腸 (ileum) に定着していた菌数が減少していた (Fig. 3C)。

#### 大量菌感染マウスモデルにおける AZM と大黄を併用した新規治療法の開発

E32511/HSC 大量菌感染モデルでは、経口感染後2時間にAZMを経口投与する必要があり、経口感染後6時間後にAZMを投与しても効果がなかった (Fig. 1A)。そこで、AZMと大黄の併用療法を試みた。投与方法として①E32511/HSCを $10^{11}$  CFU経口感染後、2時間で大黄 $300\mu\text{g/g}$ 投与し、6時間後にAZM $200\mu\text{g/g}$ を経口投与する群 (AZM+Daio, once) と、②さらに経口感染1日後に大黄 $300\mu\text{g/g}$ を追加投与する群 (AZM+Daio, twice) で、治療効果を調べた。その結果、②の治療群では、マウスは80%生存した (Fig. 4A)。これに対して、①のAZM経口投与前に1度だけ大黄を追加した群は38%生存した。感染6時間後にAZMのみを投与した群で34%生存した。未治療群においてはすべて死亡した。①の群と未治療群では統計学的有意差は認めなかった (Fig. 4A)。この治療による効果を、さらに詳しく調べるため、糞便中のE32511/HSCの菌量を測定した。その結果、②の治療群では、糞便中の菌量の低下が、AZM単独治療群に比べ、著しく低下しており、特に感染後3日において、糞便中の菌量の低下が顕著であった (Fig. 4B)。

#### D. 考察

腸管出血性大腸菌感染症において、抗菌剤を使用するか否かについては、日本と欧米とは格段の差がある。厚労省はホスホマイシン、カナマイシン、ノルフロキサシンの使用を認めているが、米国では抗菌剤の使用は認められていない (Tarr-PI. Lancet, 365, 1073-86. 2005)。1996年大阪堺市で起きた学校給食による大規模 STEC O157 感染症において、抗生物質の効果を経学的に調査した結果、抗生物質の使用については、2つの異なる見解が示された。一つは大阪堺市の大規模集団感染では、HUS 発症は抗菌薬投与群では15.5%、非投与群では16.7%であり、抗菌薬投与群と非投与群でHUS 発症に有意差はないというものであった。もう一つは、竹田多恵らの報告によるもので下痢発症3日以内にホスホマイシンの投与を開始した群では、そうでない群よりもHUSの発症が抑えられたと報告された。厚労省は竹田多恵らの報告を重視し、我が国ではホスホマイシンを含め、適切な抗菌薬を使うことが推奨されてきた経緯がある。しかしながら、昨年に来たユッケによる STEC O111 による食中毒事件では、重症化して死亡する率がこれまでの STEC による食中毒の事例に比べ3倍を超えていたことが報告され、特に脳症が多発して重症化し、5名が死亡する事態となった。最近の報告では、このユッケによる O111 による感染症で急性脳症を発症した4名にホスホマイシンが早期に投与されたのにも関わらず、2名が亡くなっている (Matano, S et al. Encephalopathy, disseminated intravascular coagulation, and hemolytic-uremic syndrome after

infection with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111. J. Infect. Chmother. 15. 2011)。死因に直結する急性脳症に対する新規抗菌剤治療法の開発は急務であり、今回の研究成果を臨床の現場にぜひ反映していただきたい。無菌仔ブタに STEC を経口感染させるモデルで、小児用量マクロライド系アジスロマイシンが STEC 感染による死亡と脳病変を低下させたことが報告されたのを受け、私達の開発した大量菌感染マウスモデルで追試した。その結果、大量菌感染マウスモデルでは、E32511/HSC 感染後 2 時間に AZM を体重当たり僅か 1.6 $\mu$ g/g 経口投与させるだけで、マウスの生存は 80% となり、未治療群に対して有意に生存した (Fig. 1AB)。この効果は E32511/HSC から Stx2c の分泌を AZM が強力に押さえた結果であることが判明した (Fig. 2A)。

AZM の治療効果をマウスモデルで確認するとともに漢方生薬である大黄の効果についても調べた。その結果、大黄だけでも少量菌感染モデルで効果を認めた (Fig. 3B)。大黄の効果は、B2F1 株の大腸や小腸への定着を押さえることによる (Fig. 3C)。さらには大量菌感染マウスモデルにおいても、AZM のみでは経口感染後 6 時間に効果を認めなかったのに対して、AZM に大黄を併用することで、マウスの生存率を 80% にまで回復させた。

マクロライドはグラム陰性桿菌に対して抗菌活性が弱く、患者の命を救っても STEC の便からの排菌を完全に食い止めることはできない。そこで STEC の排菌を促す目的で、大黄を併

用し、STEC の腸管への定着を阻害し、STEC を腸管から洗い流すという新規治療法を確立することができた。

#### E. 結論

1. AZM 経口投与が、急性脳症発症マウスモデルに有効であった。STEC 感染症による急性脳症の発症を抑えるため、STEC 感染者に対して AZM を使用するべきか検討を要する。
2. 大黄は STEC の腸管への定着を抑えることにより有効であった。給食従事者の検便で発見される無症候性保菌者の除菌には、副作用のより少ない大黄を経口投与することを推奨する。
3. STEC 感染によって重篤化する小児や高齢者、免疫の低下した人には AZM と大黄の併用がより効果的である。

#### F. 健康危機情報

1. 厚生労働科学研究費補助金 行政政策研究分野 地球規模保健課題推進研究 (国際医学協力研究) 多様化・ボーダーレス化する細菌性下痢症を阻止するためのフロンティア研究分担研究報告書「腸管出血性大腸菌 O157 感染症の重症化要因に関する研究」を報告した。この研究は、国立国際医療センター、国際保健医療研究部、栃木県宇都宮保健所、宇都宮市衛生環境試験所、香川県小豆総合事務所、香川県中讃保健福祉事務所、国立感染症研究所感染症情報センターとの他施設共同研究である。我が国において腸管出血性大腸菌感染による溶血性尿毒症症候群 (HUS) を含めた腎機能障害のリスクは成人女性であることが初

めて明らかとなった。この結果は7月16日付朝日新聞朝刊（関西版）に掲載された。

2. この報告書の中で、健康危機情報として記載した箇所がある。以下に記載する。

—中略—「また平成22年6月16日付で全国食品衛生主管課長連絡協議会から厚生労働省医薬食品局に対して、マスメディアの番組内容は国民に対して与える影響が大きいと、マスメディア関係者に対しても、正しい情報を十分に周知することが盛り込まれた。しかし、国民の生肉の好みを助長するテレビ番組も相次いでいる。ある民放番組は2010年2月、レアのハンバーガーを売りにした店を情報番組で紹介し、7月には、お笑いタレントの究極の焼き肉の食べ方と称し、牛肉を生で食べることを紹介した。別の民放も9月に牛ミスジを生で食べることを紹介した。こうした現状を踏まえ、国は不適切な報道に対しては、食の安全を守るために、報道規制するなど対策を講じる必要があると考える。」この記載事項は、朝日新聞朝刊 私の視点「肉の生食は悪しき習慣」（2011年6月3日）に掲載された。

3. 私は子供や高齢者に牛の生食を食べさせないことを主張してきた。このことは朝日新聞朝刊 私の視点「食の安全 牛レバーの生食、危険伝えよ」（2008年8月22日）として掲載されている。この朝日新聞の「私の視点」に

注目した岡崎市長から講演の依頼があった。岡崎市保健所にて、2009年8月10日、「食の安全 食肉の生食がもたらす細菌性食中毒の危険性 0157感染症の現状問題を中心に」という演題で、主に飲食店経営者に対して講演を行った。この講演で特に主張したことは、「我が国では牛の生食を自己責任の範囲としてとらえる人が多い。しかしリスクを認識して自己責任において食べることに、リスクを知らずに小児や高齢者にまで積極的に肉の生食をすすめることは問題点が大きく異なる」と考える。米国においては1996年にパストリゼーション（加熱による滅菌）を行っていなかった生のリンゴジュースによってO157感染症が相次ぎ、2名の幼児が死亡した。こうした緊急事態に際し、生リンゴジュースを提供する場合、WARNING（警告）；  
This product has not been pasteurized and, therefore, may contain harmful bacteria that can cause serious illness in children the elderly, and person with weakened immune system（この産物はパストリゼーションがなされていないので、有害な細菌を含む可能性があり、子供や老人、免疫の低下した人にとっては重大な疾患を起こしうる）と表示することが米国食品医薬品局（FDA）によって2年後の1998年に義務化された。我が国でもタバコの箱に肺ガンや虚血性心疾患のリスク表示を行うことが通例となっており、ユッケや牛レバーを提供する際に、子供や老人には溶

血性尿毒症症候群や急性脳症によって重症化することがあることをメニューに表記することを提案する。」この講演の後、岡崎市は私の意見を取り入れ、全国に先駆けて焼き肉店や居酒屋などの飲食店に対して、メニューにリスク表記するよう行政指導を開始した。具体的には焼き肉や居酒屋店などの飲食店に対して、「レバ刺し、ハツ刺し、ユッケ、センマイは加熱していないため食中毒を含む可能性があります。子供、高齢者、免疫力が低下している方は特に注してください」とメニューに表記させた。昨年のユッケによるSTEC O111集団感染が発生し、岡崎市の「リスク表記」がマスコミに取り上げられるようになり、消費者庁が「リスク表記」を法的に義務づけるため、国民に広く、「リスク表記」に対する意見をパブリックコメントに求めた(食品衛生法施行規定の一部改正案に関するご意見募集 平成23年7月22日)。その結果、平成23年10月1日付けで食品衛生法が改正され、私が主張していた「リスク表記」が飲食店において義務づけられるようになった。

G. 研究発表  
論文  
なし

## 2. 学会発表

1. 藤井 潤、溝上 哲也、北 敏郎、城 宏輔、岸本 宏志、名矢 結香、中村 勤、中田 友里、宇賀神 貞夫、斎藤 京子、丸山 保夫、多田 有希、岡部 信彦、吉田 真一、

わが国において成人女性は腸管出血性大腸菌感染による溶血性尿毒症症候群のリスク要因である、第15回腸管出血性大腸菌感染症研究会、平成23年7月15日、大阪、プログラム・抄録集 p23.

2. Segawa T, Nomura K, Villanueva S, Nomura K, Fujii J, Yoshida S. Proteomic analysis of urine of rats infected with *Leptospira interrogans* serovar Manilae. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sep. 6-7, Sapporo, Final program, P-BR03-9, p168.

3. Segawa T, Nomura K, Villanueva S, Nomura K, Fujii J, Yoshida S. Proteomic analysis of urine of rats infected with *Leptospira interrogans* serovar Manilae. 7<sup>th</sup> International Leptospirosis Society, Merida, Yucatan, Mexico, Sep. 19-22<sup>nd</sup>, P50, 2011.

4. Amran MA, Fujii J, and Yoshida S. Successful azithromycin treatment of a fatal neurological mouse model orally infected with Shiga toxin 2c-producing *Escherichia coli* O157:H-, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sep. 6-7, Sapporo, Final program, P-BA24-12, p217

5. Amran MA, Fujii J, and Yoshida S.



Successful azithromycin and Daiou combination treatment of mouse models orally infected with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. US-Japan cooperative medical science program Cholera and other bacterial enteric infections. 46<sup>th</sup> Conference. Dec 13-15<sup>th</sup>, 2011, Kolkata, India. Abstract p221.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 1. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

月刊誌 公衆衛生情報にエピソードで覚えるリザーバー病原体ガイドを監修した。

監修：「レジオネラ症」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 40 (6) pp24, 2010

監修：「ノロウイルス」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 40 (7) pp31, 2010

監修：「ロタウイルス」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 40 (9) pp28, 2010

監修：「クリプトスポリジウム」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版

社, 40 (10) pp32, 2011

監修：「オウム病」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 40 (11) pp38, 2011

監修：「麻疹 (はしか)」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 40 (12) pp34, 2011

監修：「つつが虫リケッチア」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 41 (1) pp8, 2011

監修：「レプトスピラ」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 41 (2) pp26, 2011

監修：「ウェルシュ菌」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 41 (3) pp37, 2011

監修：「破傷風」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 41 (4) pp18, 2011

監修：「サルモネラ」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 41 (6) pp17, 2011

監修：「腸管出血性大腸菌感染症」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出

版社, 41 (7) pp28, 2011

特別講演

1. 食肉や生食の危険を広く伝えることにより、腸管出血性大腸菌 O157 やカンピロバクターなどの細菌性食中毒の予防を考える。基調講演 食品安全シンポジウム in 北九州 北九州市 2011年1月26日

2. 経口感染症と食中毒～最近のトピックス～、大分県危機管理即応体制強化研修会 大分県 2011年3月23日

3. 食中毒、福岡市急患診療センター看護師研修会 福岡市 2011年7月9日

4. 腸管出血性大腸菌感染症の現状問題—わが国でのユッケによる O111 食中毒とドイツでの O104 大規模集団感

染から—東北大学グローバル COE Network Medicine 創世拠点 NM 高等教育セミナー 2011年8月10日

5. 腸管出血性大腸菌感染症の現状問題、第50回福岡感染症懇話会、2011年12月16日

6. 腸管出血性大腸菌感染症における急性脳症の発症機序・診断と治療の展望、平成23年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会、札幌、2012年2月3日

7. 腸管出血性大腸菌感染症による脳症の病態と診断・治療法の開発、第66回秋田県感染症研究会、2011年2月21日

Fig.1

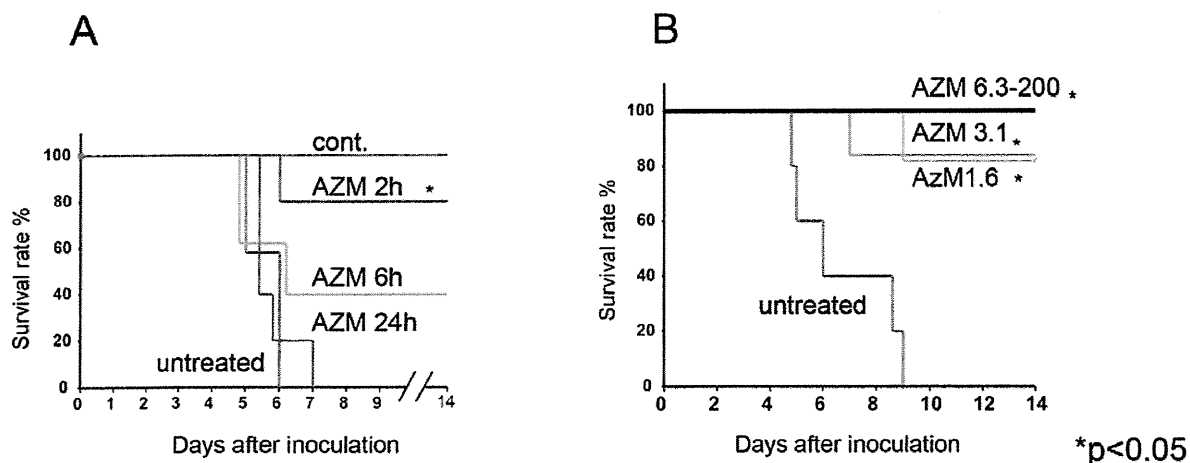


Table 1

Antimicrobial agents	0.5 x MIC sub-minimum inhibitory concentration (µg/ml)	Colony count of E3211 before antimicrobial agent (0h) (CFU/ml)	Colony count at 18h after adding sub-minimum inhibitory antimicrobial agents (0.5xMIC)	Administrative dose of microbial agents to mice (25 x MIC) µg /gram of body weight
Antimicrobial agent (-)	0	$1.0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^9$	0
AZM	4	$1.0 \times 10^5$	$3.0 \times 10^8$	200
FOM	0.78	$1.0 \times 10^5$	$1.53 \times 10^8$	39
NFLX	0.098	$1.0 \times 10^5$	$2,4 \times 10^7$	313
KM	6.25	$1.0 \times 10^5$	$1,17 \times 10^9$	4.9
OFLX	0.1	$1.0 \times 10^5$	$3,56 \times 10^7$	5.0
CPFX	0.015	$1.0 \times 10^5$	$2,18 \times 10^5$	0.75

Fig.2

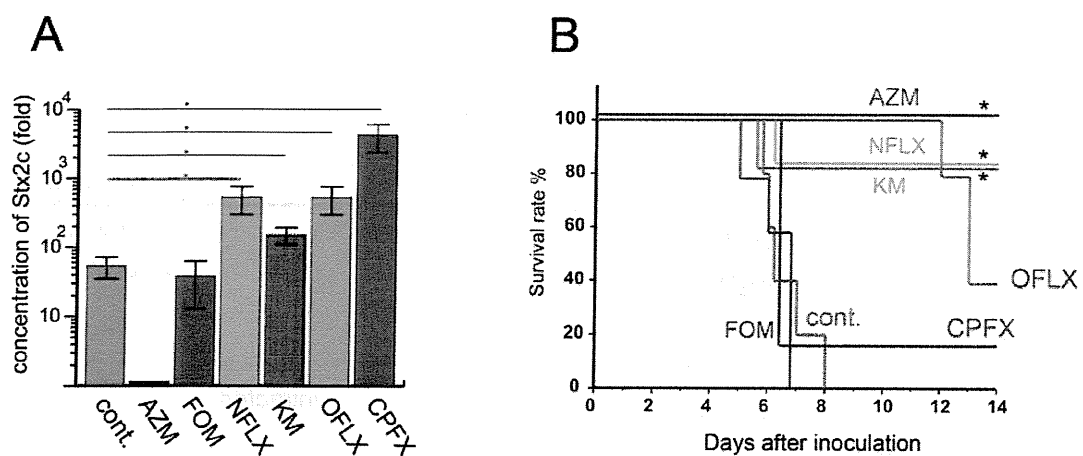


Fig. 3

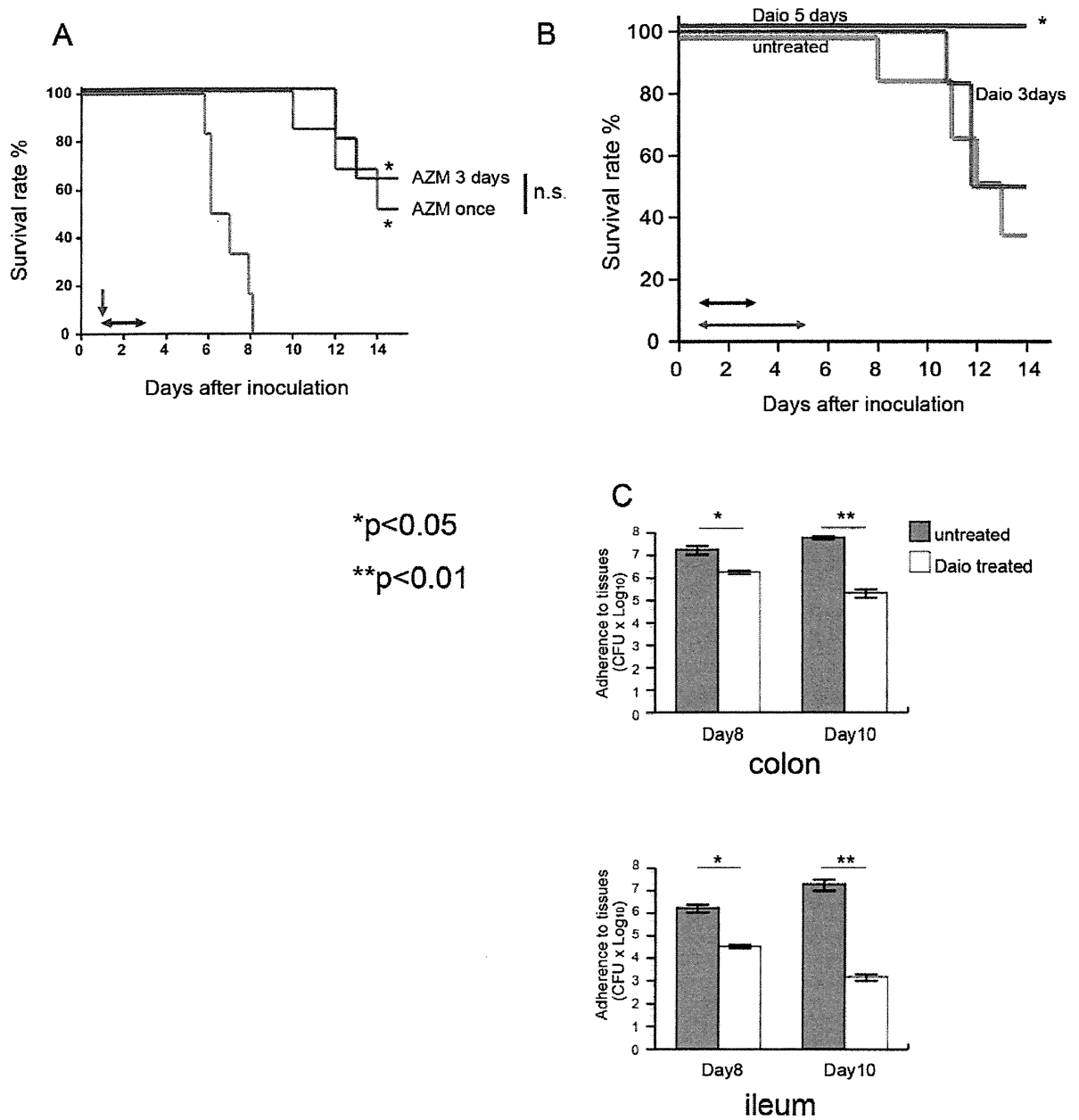
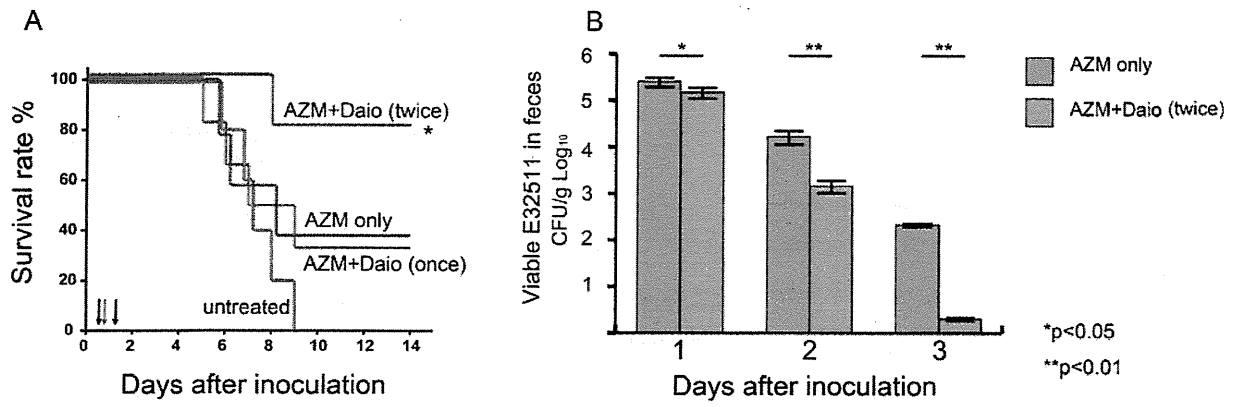


Fig. 4



厚生労働科学研究費補助金  
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）  
分担研究報告書

サルモネラの病原性発現制御機構の解明とその応用に関する  
研究

研究分担者	山本 友子	千葉大学大学院薬学研究院教授
研究協力者	高屋 明子	千葉大学大学院薬学研究院准教授
	佐藤 慶治	千葉大学大学院薬学研究院助教

研究要旨：

サルモネラの病原戦略の分子基盤は、エフェクター（病原分子）と宿主細胞標的分子間の相互作用にあるが、感染後の多岐にわたる変化は未だ同定されていないエフェクターと標的分子の存在を強く示唆している。本研究ではバイオインフォマティクス的手法を導入して新規エフェクターを探索した。本研究で確立したメタアナリシスはエフェクター候補として予測された top-40 に 36 件の既知エフェクターを含む信頼性の高いツールであった。この中で 13 位にランクされた GogA の機能解析を行った結果、GogA は宿主マクロファージの caspase-8 活性化に関わる新規エフェクターであることが明らかとなった。

A. 研究目的

サルモネラの病原戦略の分子基盤は、エフェクター（病原分子）と宿主細胞標的分子間の相互作用であり、これまでに、ランダム遺伝子破壊法やプロテオミクス手法によって約 40 件のサルモネラエフェクターが同定されてきた。しかし感染後の多岐にわたる変化は、未だ同定されていないエフェクターと標的分子の存在を強く示唆している。本研究では、バイオインフォマティクスによるエフェクタースクリーニング法の確立と、新規エフェクターの機能解明を目指した。

B. 研究方法

1) データベース： *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 の 4550 protein-coding genes と

*Pseudomonas syringae* の 5619 protein-coding genes の配列を KEGG GENES database よりダウンロードし annotation data とした。

2) バイオインフォマティクス：サポートマシーンによる機械学習法をとり入れ、1684 のパラメータをサルモネラ全遺伝子に対して算出した。さらに遺伝子共発現解析を行い、判別制度の向上を達成した。

3) エフェクターの検証実験：新規エフェクター候補遺伝子を cya-translational fusion に構築し、感染マクロファージにおける cya (adenylate cyclase) 活性測定並びに共焦点顕微鏡観察から、エフェクターであることを実証した。

C. 研究結果

1) BLAST homology search: バイオ

インフォマティクスによるエフェクター同定の正攻法として BLAST 解析による相同性解析が挙げられる。そこでまず 3SEdb と Uniprot というデータベースより 合計 359 の既知エフェクターの配列データを取得し、4550 件の全サルモネラ遺伝子に対して BLAST 検索を行った。図 1 に BLAST 検索により割り当てられたホモロジーマップを示す。本解析では、青色の丸で示すサルモネラ既知エフェクターと他生物種エフェクターの間の相同性は多数検出されました。しかし、未知エフェクターの候補は本手法では算出されなかった。従って幅広く用いられてきたオーソドックスなバイオインフォマティクス解析のみでは新規エフェクターを同定することは難しく、新しい方法を導入する必要性があると考えた。

2) サポートベクターマシンによる機械学習法：本手法では、40 件の既知エフェクターとランダムに選ばれたエフェクター以外のサルモネラ遺伝子を学習セット(トレーニングセット)とテストセットに 2 分割する。また判別解析の指標として、図 2 に挙げる 1684 のパラメータをサルモネラ全遺伝子に対して算出した。学習セットを用いて判別ベクトルを機械的に学習し、テストセットのエフェクターとネガティブセットを精度良く正解することが出来るかどうかで判別機の精度と各種指標の有効性を検証した。

3) 共発現解析：機械学習に加えて共発現解析を行い、さらなる判別精度の向上を達成した。この方法では、GEO データベースに格納されている 153

の DNA アレイデータを統合して、既知エフェクターとの発現類似度を算出する。本研究ではサルモネラ全遺伝子に対して SPI-1 エフェクター及び SPI-2 エフェクターとの発現類似度を算出し、機械学習後のエフェクター候補のさらなる絞り込みに活用した。

3) エフェクター top-40 のランキング：表 1 に本解析システムで算出された top-40 のランキングを示した。グレーに網かけされた遺伝子はサルモネラの既知エフェクターであり、40 件の既知遺伝子のうち実に 36 件が top-40 にランクインした。新規候補の中で 13 位にランクインした GogA は後述のように新規エフェクターであることを実証した。さらに top-60 のリストの中にも既知エフェクターが含まれていたことは、本手法の信頼性の高さをサポートするものである。

4) GogA は感染細胞の細胞死と炎症応答に関与する新規エフェクターである：gogA-cya-translational fusion を持つサルモネラを RAW264.1 マクロファージ細胞に感染させ、マクロファージ内での cya 活性を測定したところ、有意な活性が検出されたことから、GogA はサルモネラから感染マクロファージの細胞質に輸送されると考えられた。FLAG-tagged GogA を発現するサルモネラを RAW264.1 マクロファージ細胞に感染させ、共焦点顕微鏡下で観察した(図 3)。その結果、GogA は感染細胞の細胞質に輸送されるエフェクターであると結論することができた。その機能を検討し、GogA はマクロファージの Caspase-8 を活性化するエフェクターであることが明らかとなった。さらに GogA が高発現すると

Caspase-8 の活性化が亢進し、Caspase-9 の活性化を経て Caspase-3 が活性化され、マクロファージアポトー

シスが誘導されることを明らかにした。

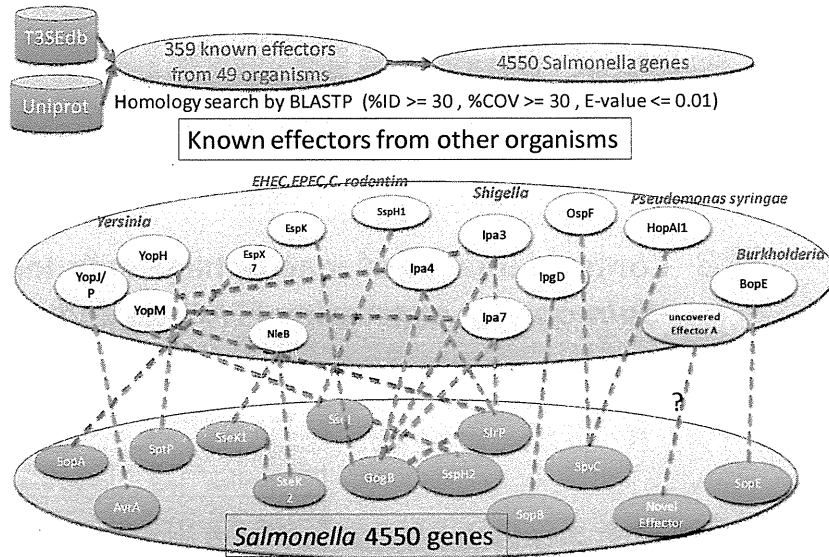
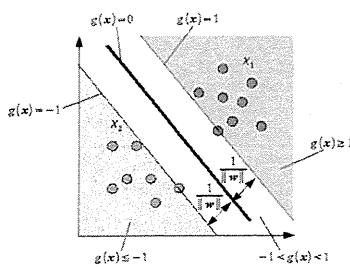


図1 BLAST homology search



New features implemented in our system

Discriminant features used in our prediction system

Index No.	Discriminant Features
1	GC content
2 - 4	Codon Adaptation Index (CAI). (Entire region, CAI for N-terminal 25aa. and the ratio)
5	dN/dS estimated for <i>Salmonella</i> orthologs
6	Flexibility of N-terminal regions (25aa.) estimated by Poodle-S
7-12	7: Molecular weight, 8: charge, 9: pI, 10: Instability index, 11: Aliphatic index, 12: GRAVY score (hydropacy)
13-32	Amino acid composition for first 25aa.
33-512	Position specific matrix for the first 25aa. (except for first Met, 20 x 24 = 480 dimensions)
513-1684	Phylogenetic profiling estimated by 1172 KEGG organisms

Training Set

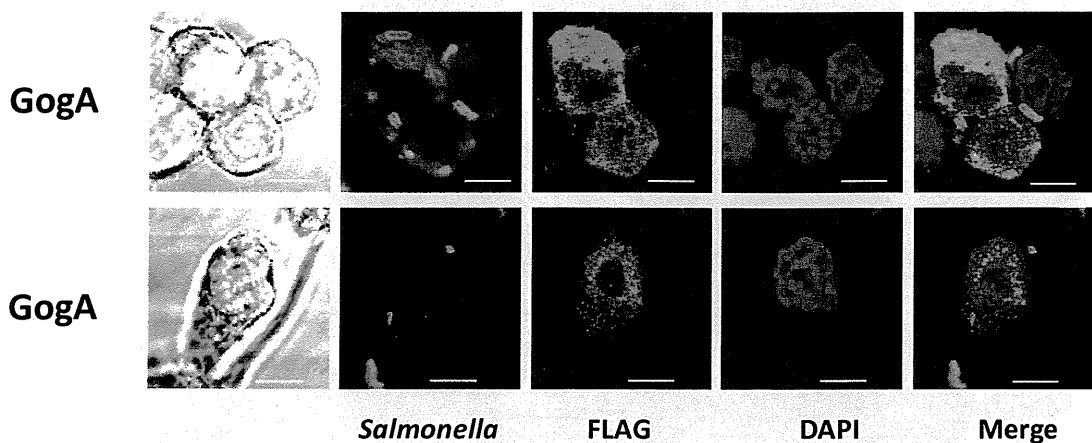
Secretion System	STM-ID	Gene Name
SPI-1	STM1091	sopB
	STM1855	sopE2
	STM2066	sopA
	STM2865	avrA
	STM2882	sipA
	STM2883	sipD
	STM2892	invJ
	STM2945	sopD
	STM1088	pipB
	STM1224	sifA
SPI-2	STM1393	sseB
	STM1398	sseB
	STM1602	sifB
	STM1631	sseJ
	STM1698	atoC
	STM2241	sspH2
	STM2287	sseL
Both	STM2780	pipB-2
	STM1583	steA
	STM2878	sptP

Testing Set

Secretion System	STM-ID	Gene Name
SPI-1	STM2884	sipC
	STM2885	sipB
	STM1026	gagA
	STM2614	gogA
	PSLT037	spvD
	PSLT038	spvC
	PSLT039	spvB
	STM0972	sopD-2
	STM1051	sseI
	STM1400	sseC
SPI-2	STM1401	sseD
	STM0800	sirP
	STM1404	sseF
	STM1405	sseG
	STM2137	sseK-2
	STM2584	gogB
	STM4157	sseK-1
	STM1244	pagD
	STM1668	zirS
	STM2868	orgC
Unknown/both		

図2 Support vector machine based discriminant analysis





**図3** Confocal images of macrophage cells infected with *Salmonella* expressing FLAG-tagged GogA

#### D. 考察

本研究で構築されたメタアナリシスはサルモネラのエフェクターを同定する信頼性の高いツールであるといえる。又、他の菌種にも応用可能な有効性の高い検索法であるといえる。新たに同定された新規エフェクター GogA は、サルモネラ感染細胞の運命（細胞死か炎症反応応答か）を決定するキーエフェクターであると考えられる。

#### E. 結論

サルモネラエフェクター探索のツールを開発した。Top-ranking 13 に予測されたエフェクター候補 GogA は新規のエフェクターであることを実証した。

#### F. 健康危機情報

特記事項なし

Rank	ID	name	Description	Ref.
1	STM1051	sscI	Gifsy-2 prophage, putative type	1,10.
<b>2</b>	<b>STM1055</b>	<b>gtgE</b>	<b>Gifsy-2 prophage</b>	<b>6.</b>
3	STM2780	pipB2	homologue of pipB, putative per	5,10.
4	STM1088	pipB	Pathogenicity island encoded pr	3,10.
5	STM1602	sifB	Salmonella translocated effector	3,5.
<b>6</b>	<b>STM1087</b>	<b>pipA</b>	<b>Pathogenicity island encoded pr</b>	<b>10.</b>
7	STM0972	sopD2	homologous to secreted protein	1,2,5,10.
8	STM2878	sptP	protein tyrosine phosphate	-
9	STM1583	steA	putative cytoplasmic protein	1,2.
10	STM1631	sseJ	Salmonella translocated effector	1,5,10.
11	PSLT037	spvD	Salmonella plasmid virulence hy	-
12	STM1224	sifA	lysosomal glycoprotein (lgs)-cor	2,5,6,7,10.
13	STM2614	gogA	Gifsy-1 prophage	1.
14	STM1698	steC	putative inner membrane protein	3,10.
15	STM2882	sipA	cell invasion protein	2,3.
16	STM2865	avrA	putative inner membrane protein	-
17	STM1401	sseD	Secretion system effector	2,5,6,10.
18	PSLT038	spvC	Salmonella plasmid virulence hy	1.
19	STM1405	sseG	Secretion system effector	5.
20	STM1400	sseC	Secretion system effector	2,3,5,6,7,10.
21	STM2883	sipD	cell invasion protein	1,2,3,4.
22	STM1398	sseB	Secretion system effector	1,6,10.
23	PSLT039	spvB	Salmonella plasmid virulence hy	1,6,7.
<b>24</b>	<b>STM3155</b>		<b>putative cytoplasmic protein</b>	<b>6.</b>
25	STM0800	slrP	leucine-rich repeat protein	-
26	STM2287	sseL	putative cytoplasmic protein	5,10.
27	STM2868	orgC	putative cytoplasmic protein	1.
28	STM2945	sopD	secreted protein in the Sop fam	1.
29	STM1855	sopE2	Typelll-secreted protein effector	1,3.
30	STM2884	sipC	cell invasion protein	3.
31	STM2066	sopA	Secreted effector protein of Sa	-
32	STM4157	sseK1	putative cytoplasmic protein	3,10.
33	STM2137	sseK2	putative cytoplasmic protein	1,2.
34	STM1668	zrS	putative outer membrane or exp	3.
35	STM1244	pagD	PhoP regulated	2,5.
36	STM2584	zogB	Gifsy-1 prophage, leucine-rich r	-
37	STM2241	sspH2	Leucine-rich repeat protein, ind	2,10.
38	STM1404	sseF	Secretion system effector	2,4,5,6,10.
<b>39</b>	<b>STM1239</b>		<b>putative cytoplasmic protein</b>	<b>-</b>
40	STM1393	ssaB	Secretion system apparatus	1,2,3,5,6,7,10.

**表1** Top-ranking putative effectors

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Sato, Y., A. Takaya and T. Yamamoto. 2011. Meta-analytic approach to the acute prediction of secreted virulence effectors in gram-negative bacteria. BMC Bioinformatics 12:442 (12 pages)

Kitagawa, R., A. Takaya and T. Yamamoto. 2011. Dual regulatory pathways of flagellar gene expression by ClpXP protease in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Microbiol. 157: 3094-3103.

山本友子。細胞内寄生性細菌のストレス応答と病原性発現制御機構 2011. 日細菌誌 66 : 517-529.

### 2. 学会発表

Yamamoto, T. 2011. Novel *Salmonella* effectors capable of activating caspase-8 in macrophages, leading to induction of a pro-inflammatory response. UMS 2011. Sapporo.

Samizo, C., Y. Sato, A. Takaya and T. Yamamoto. 2011. Identification of novel *Salmonella* effectors by genome-wide *in silico* screening. IUMS 2011. Sapporo.

Takaya, A., Y. Sato and T. Yamamoto. 2011. Novel *Salmonella* effectors, GogA and GtgA2 are involved in induction of pro-inflammatory response within murine bone marrow-derived macrophage cells. IUMS 2011. Sapporo.

Sato, Y., A. Takaya and T. Yamamoto. 2011. Meta-analysis based prediction system of secreted virulence effectors. IUMS 2011. Sapporo.

Sone, K., A. Takaya and T. Yamamoto. 2011. Combination of *erm* gene and mutation in riboproteins results in high-level telithromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. IUMS 2011, Sapporo.

Ito, M., T., Shibata, A. Takaya, Y. Sato, K. Endo and T. Yamamoto. 2011. Telithromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinically isolated between 2009 and 2010 in Japan. IUMS 2011, Sapporo.

Takaya, A., Y. Sato and T. Yamamoto. 2011. YdiV is a novel adaptor protein for ClpXP protease. 9<sup>th</sup> International Conference on AAA proteins. Kumamoto

Yamamoto, T. 2011. Bacterial strategies hijacking host cell functions for a successful infection. 2<sup>nd</sup> Chiba-Seoul Joint Meeting, Seoul

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

1. 特許取得

なし

厚生労働科学研究費補助金  
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）  
分担報告書

ヘリコバクター・ピロリと口腔内細菌との相互作用に関する研究

研究分担者	神谷 茂	杏林大学教授
研究協力者	大崎 敬子	杏林大学講師
研究協力者	米澤 英雄	杏林大学助教

研究要旨：

口腔はヘリコバクター・ピロリ(*H. pylori*)のリザーバーとしての役割を担っているとされている。口腔内特に歯周病患者のデンタルプラーク中より *H. pylori* が検出されることがその理由である。しかしながらこうした研究において *H. pylori* は PCR による DNA レベルでの検出が主であり、生菌での検出はほとんどがなされていない。そこで *H. pylori* が口腔内に定着しているのかについて、歯周病細菌から受ける影響という点より検討を行った。歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の培養上清は *H. pylori* に抗菌的な作用をもたらした。また培養上清中の酪酸が *H. pylori* に対する抗菌性を示すことが明らかとなった。以上の結果より *H. pylori* が口腔内特に歯周病バイオフィーム中で長期生存することは難しいことが示唆された。

A. 研究目的

*H. pylori* は急性および慢性胃炎を惹起するとともに、胃十二指腸潰瘍の再発因子および胃 MALT リンパ腫や胃癌、特発性血小板減少性紫斑病などの疾患への関与が指摘されており、除菌治療の重要性が認知されている。*H. pylori* は鞭毛、ウレアーゼ、熱ショックタンパク、空胞化毒素 (VacA)、CagA および *cag* pathogenicity island などさまざまな病原因子を有し、胃粘膜にバイオフィーム様構造体を形成して存在している。

*H. pylori* は経口的にヒトに感染する

ことは、ほとんどすべての研究者の一致した考えである。胃に棲息する細菌であること、そして胃を含む消化管の入り口である口腔と排出物である糞便において本菌が検出され、この経路以外で人体内では本菌は検出されないことがその理由である。口腔内にはおおよそ 700 種類、数にして 10 億個以上、個人により 1 兆個を超える場合もある細菌が存在し縄張りを築いている反面、多数の菌種による共同体を形成し、それぞれの細菌が相互にコミュニケーションを取っている。近年口

腔内細菌を含む複数細菌を用いた複合系バイオフィルムの研究が活発に行われ、これまでの単一細菌での研究とは異なる知見が報告されている。

口腔内より *H. pylori* が、主として PCR 法などによる DNA レベルにおいて検出されることがこれまで多くの研究者により報告されている。これらの報告より口腔は *H. pylori* の感染、および除菌後の再感染における *H. pylori* のリザーバーとしての役割を担っていると考えられている。また特に歯周病患者のデンタルプラーク中に本菌が高頻度で検出されることが、多数の論文にて報告されている。しかしながら培養による生菌の検出は、報告が数件しかなく、難しいものであると認識されている。これは *H. pylori* は環境の変化により培養不可能な coccoid form に変化するためであると考えられている。一方、口腔内は唾液や他の口腔内細菌が産生する抗菌物質の存在により、*H. pylori* は口腔内には定着できないという報告も多数されてきている。しかしながらこれらの報告においても詳細なメカニズムは明らかにはされていない。そこで本研究では、*H. pylori* は口腔内に定着できるのかについて解明するために、口腔内細菌、特に歯周病細菌に焦点を当て、代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* と *H. pylori* の相互作用、特に *H. pylori* が受ける影響についての検討を行った。

## B 研究方法

1) 供試菌株：*H. pylori* はリファレンス株として ATCC 49503 株、臨床分離株として日本人胃炎患者由来の TK1402 株を使用した。*H. pylori* 菌株はグリセロール含有 Brucella broth 中にて -70°C にて保存し、実験を行うたびにそこから発育させた。発育は 7% fetal calf serum (FCS) 含有の Brucella 寒天培地にて 37°C 微好気条件下で発育させた。歯周病原細菌である *P. gingivalis* は ATCC 33277 株を使用した。発育は 5 µg/ml のヘミンおよび 0.5 µg/ml のメナジオンを含む血液寒天培地にて 37°C 嫌気条件下で発育させた。

2) 電子顕微鏡による観察：*P. gingivalis* の培養上清が *H. pylori* にどのような影響を与えるかについて、培養上清で処理した後の *H. pylori* 菌体を電子顕微鏡にて観察した。*P. gingivalis* を brain heart infusion broth にて 24 時間嫌気培養した。培養液から遠心および 0.22 µm のフィルターにて菌体を除去し、これを培養上清とした。培養上清を *H. pylori* 培養培地である 7% FCS 含有 Brucella broth に濃度 25% の量で混入した。37°C 微好気条件化で 24 時間培養後に菌を回収し、回収した菌体を走化型電子顕微鏡にて観察した。

3) 酪酸による *H. pylori* 成長抑制の確認：処理を行う酪酸は、pH への影響を考慮して酪酸ナトリウムを使用した。酪酸ナトリウムを 20 mmol、10