

20120400/A

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)

**アジアのコレラ・腸管感染症の現状掌握と問題解決の
ための研究:国際共同研究との連携を介した
日-アジアネットワーク形成を目指して**

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西淵 光昭

平成 25(2013)年 3月

目 次

1. 総括研究報告

- アジアのコレラ・腸管感染症の現状掌握と問題解決のための研究：
国際共同研究との連携を介した日-アジアネットワーク形成
を目指して・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
西淵 光昭 京都大学・教授

2. 分担研究報告

I. 検査法の開発：アジアの途上国でも使用可能な簡便・高感度検査法の開発

- (1) 重要な食中毒菌種検出法開発と食材汚染調査のためのアジア4カ国との
共同研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 21
西淵 光昭 京都大学・教授
- (2) 短時間培養と遺伝子検査を組み合わせたCampylobacterの迅速検査法
の構築・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 28
江崎 伸二 岐阜大学・教授
- (3) 食品からの下痢症起因菌の効率的検査法に関する研究・・・・・・・・ 32
甲斐 明美 東京都健康安全研究センター・部長
- (4) LAMP法による *trh* 検出法と魚介類由来主要病原因子の包括的検出法
の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 39
山崎 渉 宮崎大学・准教授

II. 生態学・疫学の解明：アジア諸国での病原性菌株のダイナミズム

- (1) ヘリコバクター・ピロリと口腔内細菌との相互作用・・・・・・・・ 44
神谷 茂 杏林大学・教授
- (2) カンピロバクタージェジュニ・コリ以外の関連細菌の
タイにおける分子疫学調査・・・・・・・・・・・・・・・・ 52
山崎 伸二 大阪府立大学・教授
- (3) 東南アジア地域の環境水や魚介類等における下痢原性コレラ菌および
同様の病原因子を保有するファージの動態に関する研究・・・・・・・・ 58
大澤 朗 神戸大学・教授
- (4) 下痢原性大腸菌に関するインド・韓国との共同疫学調査・・・・・・・・ 64
西川 禎一 大阪市立大学・教授

III. 病原性の解明：検査法・ワクチン開発・治療法開発の礎を築く

- (1) 赤痢菌の病原性に関与する因子の解析とワクチン開発・・・・・・・・・・ 70
渡邊 治雄 国立感染症研究所・所長
- (2) 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・・・・・・・・ 76
山本 友子 千葉大学・教授
- (3) 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と
迅速同定法の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 82
倉園 久生 帯広畜産大学・教授
- (4) 腸管出血性大腸菌の SubAB 毒素の宿主応答メカニズムの解析に関する研究・ 88
野田 公俊 千葉大学・教授
- (5) 粘膜ワクチンへの応用を目指した下痢原性大腸菌における新規病原因子
の探索・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 93
辻 孝雄 藤田保健衛生大学・教授
- (6) 腸管出血性大腸菌感染に併発する急性脳症の発症メカニズムと
組織学的アジスロマシンの治療効果に関する研究・・・・・・・・・・ 98
藤井 潤 九州大学・准教授

3. 研究発表一覧・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 106

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）
アジアのコレラ・腸管感染症の現状掌握と問題解決のための研究：国際共同研究との連携を介した日－アジアネットワーク形成を目指して
（H24－国医－指定－001）

平成 24 年度 総括研究報告書

代表研究者： 西渕光昭 京都大学東南アジア研究所教授

平成 25 年 3 月

研究要旨：

アジア各地の研究者と本研究チームとの国際共同研究（現場での共同作業またはカウンターパートの日本への招聘を通じた情報交換と成果のインプット）に重きを置き、研究内容をシェアするサブグループの形成により研究者間の情報交換と連携促進のチャンスを増大させるよう配慮した 14 名のメンバーからなる国内研究チームを組織した。

病原細菌の検査法に関するサブグループでは、腸炎ビブリオ、腸管出血性大腸菌、コレラ菌、主要な下痢症病原体すべて、下痢症起因菌、あるいはサルモネラ属菌検査を標的とした、迅速、高感度、簡便な病原細菌の検査法に関する研究を開始あるいは継続した。いずれにおいても研究に大きな進展が認められた。特に魚介類中の腸炎ビブリオの検査法に関する検査法（*tdh* 遺伝子および *trh* 遺伝子を標的とした、LAMP 法）は、validation の段階に入り FAO 主催のワークショップにおいて良い評価を得た。

生態学・疫学の解明に関するサブグループでは、アジアにおいて感染率が高いヘリコバクター・ピロリ、あるいはアジアを含めて世界的に感染率・汚染率が高いことが明らかになり、重視されるようになった *Campylobacter* 属菌・*Arcobacter* 属菌について研究が進められた。また、アジアでは意外な食品に病原細菌が分布（野菜・穀類の *Klebsiella pneumoniae*、*Bacillus cereus*、*Bacillus thuringiensis*、および大腸菌 O157:H7 による汚染、肉類の *Listeria monocytogenes* による汚染）することが明らかになった。さらに本研究では、コレラ菌の最重要病原因子であるコレラ毒素遺伝子を運ぶバクテリオファージのアジアの熱帯環境の環境水中での多彩な動態に関する研究、先進国では注目され初めているが、アジアの発展途上国では不明な点が多い非定型腸管病原性大腸菌 (atypical EPEC,

aEPEC) の生態学・疫学に関する研究が遂行された。これらの研究の成果は、今後これらの細菌による感染症の予防・治療に役立つと期待できる。

病原性の解明に関するサブグループでは、チフス・非チフス侵襲性サルモネラ症、および近縁種の赤痢菌による細菌性赤痢の原因細菌の複雑な病原性メカニズムを解明する研究（III 型分泌装置に関する研究など）が活発に行われた。また、腸管出血性大腸菌 O157 による急性脳症の予防の基礎になる病原性メカニズムおよび腸管出血性大腸菌の産生する新しい毒素 SubAB の作用メカニズムに関する研究では、メカニズムがかなり明らかになった。これらの研究成果は、これらの疾病の予防に役立ち、アジアの人々の保健・衛生に大きく貢献する貴重な研究であると考えられる。

分担研究者：

西泷 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薬学研究科教授
西川 禎一：大阪市立大学大学院生活科学研究科教授
大澤 朗：神戸大学大学院農学研究科教授
江崎 孝行：岐阜大学大学院医学系研究科教授
山崎 渉：宮崎大学農学部獣医学科准教授
甲斐 明美：東京都健康安全研究センター部長
倉園 久生：帯広畜産大学畜産衛生学研究部門教授
藤井 潤：九州大学大学院医学研究院准教授
山本 友子：千葉大学大学院薬学研究科教授
神谷 茂：杏林大学医学部感染症学教授
辻 孝雄：藤田保健衛生大学医学部

教授

渡邊 治雄：国立感染症研究所所長
野田 公俊：千葉大学大学院医学研究院教授

A. 研究目的：

以下は、H24 年度交付申請書に記載した「研究の目的、必要性及び特色・独創的な点」である（ただし誤植などを修正）。

本研究事業の本来の目的（アジアの発展途上国 [場合によっては、新興発展国に定義される国を含む] の人々の健康改善）を堅持しつつ、アジアのコレラ・腸管感染症の現状に即した貢献をより現実的な目標として、アジアの様々な状況に明るい研究代表者を中心とした 20 名弱のチームが 3 年前にスタートした。チームメンバーは、我が国の腸管感染症研究の第一線で活躍する専門家であり、(1) 下痢症の多発するアジア諸国で、現地研究者と共同で疫学・生態学研究を進め、情報交換をすすめるフロントライン研究、(2) 共同研究

現場で活用できる実用的研究（検査法、診断法、治療法）、(3) 治療・予防の基礎となる病原性・ゲノム解析のグループに大別される。これまで、アジアの「グローバル化、多様化、ボーダーレス化、変容（東・西アジアの台頭）」に対応した「多角的研究、フロントライン/フロンティア研究」をキーワードとして、臨地研究に漸次ウエイトをシフトしながら布陣を変更してきた。

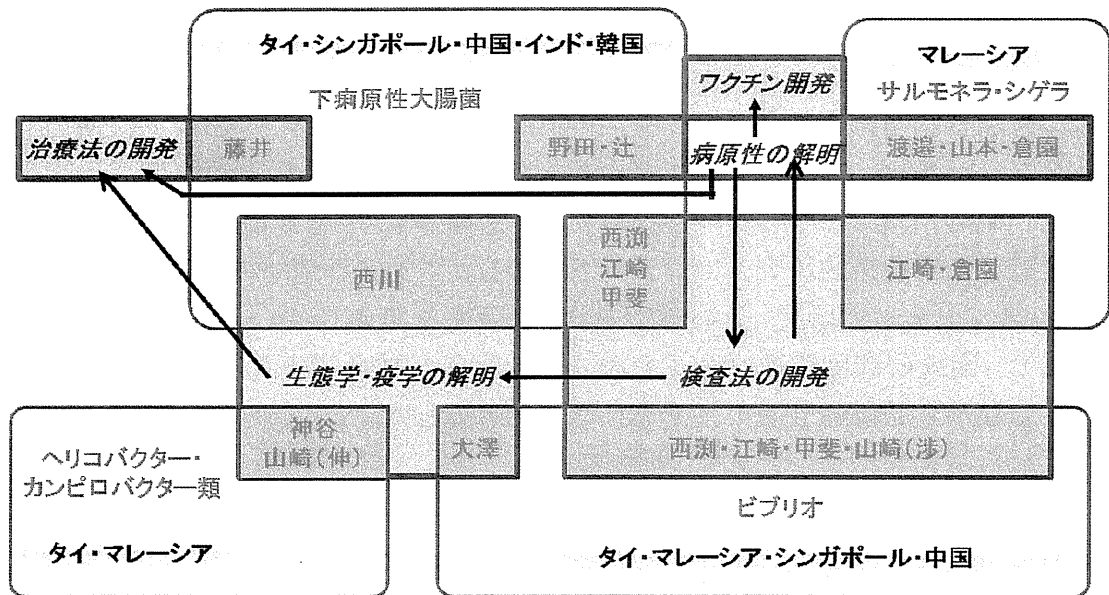
これらは好評であったので、平成 24 年度は、それ以外のご批判に対する修正を加え、研究をさらに展開する計画を立てた。すなわち本年度は特に、アジア各地の研究者と本研究チームとの国際共同研究（現場での共同作業またはカウンターパートの日本への招聘を通じた情報交換と成果のインプット）に重きを置く。一方国内 14 名のメンバーは、組織のスリム化と研究内容をシェアするサブグループの形成（流れ図参照、対象菌種群と研究目的項目）により研究者間の情報交換と連携促進のチャンスを増大させるよう配慮した（個々の具体的研究内容は流れ図および項目 10 [研究計画・方法] にまとめた）。本年度は、これらのアジア各地の研究者との連携および国内チーム間の連携とをベースとする、日 - アジアネットワーク形成を目標とする。このように、国内のしっかりとした基礎研究に支えられた実用的研究と疫学・生態学を草の根的共同研究に反映させて得られる貴重な成果をアジア的感覚を共有する多国間で適宜共有し、またそれらをアジア

の研究者も参加する日米合同会議で発表することにより、米国を含む先進諸国とも共有する。このようにして、情報交換をこれまで以上に活性化することを通して地球規模での保健推進事業に大きく貢献できると期待する。アジア各地での情報交換に資する研究を実施している有望な研究者を、将来の試金石として重視する布陣を準備した。

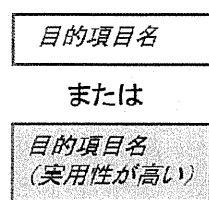
B. 研究方法：

研究分担者それぞれが、申請した内容に合致した成果を得るために専門性（分子遺伝学、分子疫学、細胞化学、免疫学、環境生態学、生理学、病理学などの分野）を生かして、必要な技術を適宜組み合わせるそれぞれの研究室単独で、あるいは研究協力者と役割を分担して、研究を遂行した。具体的には、交付申請書に記載した流れ図（下記）に示した方法を用いて研究を実施した。

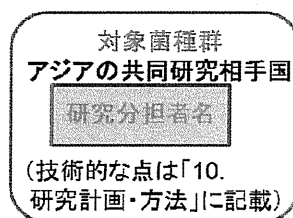
なお、病原性細菌はそれぞれのセーフティーレベルに合致した実験施設で取り扱われ、菌の移動や分与は規則に従って行われた。動物実験は、動物に不要な苦痛を与えないように配慮し、それぞれの研究者の所属する機関の倫理規定を遵守した。人体に由来するサンプルを取り扱う場合は、所属機関の倫理委員会の承認を得て、規定に従って実験を実施した。組換え DNA 実験を含む遺伝子解析は、指針に従って遂行した。



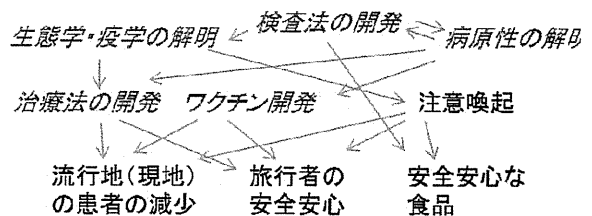
目的(上図に記載)



方法(上図に記載)



期待される効果



C. 研究結果：

各研究者（上記の流れ図に記載した順）について、申請書に記載した研究計画（以下「計画」と省略）および見込まれる研究成果（以下「成果」と省略）を以下にまとめた。

C-1. 検査法の開発：アジアの途上国でも使用可能な簡便・高感度検査法の開発

[西淵]

計画：免疫磁気ビーズ（IMS）法と LAMP（PCR 変）法を組み合わせた新

検査法を腸炎ビブリオ、腸管出血性大腸菌、およびコレラ菌に適用し、タイ・マレーシア・シンガポールおよび中国（山東省）との共同研究で実用性を検証する。；マレーシアでカンピロバクターとサルモネラ食材汚染調査を継続する。

成果：1) 腸炎ビブリオ:二枚貝からアルカリペプトン増菌培養を経由して、腸炎ビブリオの病原性菌株 (*tdh+*、*trh+*、または *tdh+*かつ *trh+*) を検出するための方法（MPN 法を含めた定量検査法を含む）として考案した新検査法（免疫磁気ビーズ[IMS]法と LAMP[PCR

変]法を組み合わせた方法) と従来の PCR 法、リアルタイム検査法などと比較した。春の高温時にタイ南部の市販ハマグリを検査した結果と、我が国(三重県)で夏場を中心に市販されているアサリとハマグリの検査結果の比較から、病原性株が比較的高濃度に二枚貝に分布する時期の熱帯環境では、高感度の新検査法が必要ではなく、従来の PCR 法でも陽性検体との検出感度にあまり差が認められなかった。一方、我が国のような温帯地域のサンプルでは、夏場でも貝中の病原性菌株濃度が比較的低く、従来の PCR 法では陰性(偽陽性)で新法では陽性になるサンプルが存在することが確認された。シンガポールで 2012 年 11 月にアジア諸国を対象に実施した市販二枚貝の検査法評価(FAO 主催のワークショップにおける検査法の validation に協力)の結果、リアルタイム検査法を用いた場合、信頼のおける定量結果を得るには、やはり MPN 法を含める必要があり(新法と同じ)、LAMP 法より偽陰性(おそらく DNA 増幅酵素の阻害)が生じやすいサンプルもある(新法が有利)ことが示された。したがって LAMP 法に IMS 法(標的菌を洗浄し阻害物質を除去可能)を組み合わせた新法がさらに有利であると考えられる。また最近、LAMP 法に使用する酵素を凍結乾燥したキットが販売されているので、これの酵素部分のみを、従来の液体培地の代わりに使用しても結果は変わらず、むしろ DNA の特異的増幅結果を肉眼で判定する

ことが容易になったので、高い評価を得た(2012 年 11 月シンガポールでの FAO のワークショップにおける validation でアジア諸国の代表者も確認)。このように、キットを室温で輸送・保管することへの道が開け、電気泳動検査や光学検査が省けると言える。さらに、その後 LAMP 法による *trh* 遺伝子検出用のプライマーが改良されて、1 セットのプライマーで *trh1* 遺伝子と *trh2* 遺伝子を同時に検査できるようになった(山崎渉グループとの共同研究[下記]; 2013 年 2 月マレーシアでのジョイント・ワークショップで確認)。このプライマーセットを用いると、魚介類を汚染する 2 大 *Vibrio* 属菌種を同時に検出 multiplex LAMP 法が確立できる。これにさらに IMS 法を追加したより高感度かつ特異的な方法として、タイと日本の比較で検証した結果について、世界各国を対象にして validation の獲得を続けたい。中国での validation は延期して、2013 年 7 月に上海海洋大学とのジョイント・ワークショップで実施することにした。

2) 腸管出血性大腸菌: 腸管出血性大腸菌に特に重要な O 抗原 7 種(国内)または 12 種(世界)の O 抗原を対象にした IMS 法と *stx* 遺伝子を標的とした LAMP 法を組み合わせた方法について、それぞれの特異性と感度を評価するために市販の肉サンプルを対象に検査を実施した。先に国内のサンプルを対象に検査した結果、陽性菌が検出できなかったため、本研究ではタイ南部の市場で市販されていた汚染度

が高いと考えられるサンプルから目的菌の分離を試みた。IMS 法を含めた増菌培養のスクリーニング段階では陽性であったが、その後分離培養法によって目的菌が単離できなかつたので、原因を解明中である。

3) コレラ菌：O1 抗原および O139 抗原を、対象にした IMS 法の特異性と *ctx* 遺伝子を標的とした LAMP 法の感度を *in vitro* 試験で評価した。O1 抗原は特異性が確認できたが、O139 菌株の場合確認が困難であった。O139 菌株に特有な菌体最外層の莢膜用物質による阻害作用が考えられるので、今後この点を改良することが重要であると考えられる。マレーシアにおいて、春期に市販の養殖エビを対象にして *ctx* 遺伝子を標的とした LAMP 法と従来の PCR 法の感度の比較を試みたが、両方法とも *ctx* 遺伝子を保有する *Vibrio cholerae* を検出できなかったため、検出感度の比較に至らなかった。今後は、*ctx* 遺伝子を保有する *V. cholerae* を含むサンプルを対象にして、検証したい。

4) その他：上記以外の食中毒原因菌について、マレーシアでの食材の汚染に関する共同研究を継続した。その結果、野菜・穀類の *Klebsiella pneumoniae*、*Bacillus cereus*、*Bacillus thuringiensis*、および大腸菌 O157:H7 による汚染、肉類の *Listeria monocytogenes* による汚染が明らかになった。

[江崎]

計画：継続中の食材中の主要な下痢症

病原体すべてを検出するための新法（開発途上国においても実施可能、5 時間で目的菌を検出）を完成させるためクロマト法を追加する。あわせて、ポータブル法（核酸の精製不要）も開発する。

成果：多種類の食中毒原因菌をスクリーニングする共通の増菌培地（Food Pathogen Enrichment; 以下 FPE 培地）を開発し、その利用法を検証した。本培地はカンピロバクターの増菌培養について好気条件および血液無添加にもかかわらず、従来使用されている Bolton 培地および Preston 培地と同等の発育を示した。さらに、PCR によって増幅した増幅産物を迅速かつ簡便に検出・識別するデバイスとして、DNA クロマトグラフィーの構築を試みた。カンピロバクター検出用 DNA クロマトについての基礎検討を実施した結果、既存法よりも高感度に検出することができた。本検査法は、従来法に比べ、高感度かつ短時間に結果が得られるためカンピロバクターの検査法として有用であることが示唆された。

[甲斐]

計画：食品から下痢症起因菌を効率的に検出する分子生物学的手法を開発する。；分離菌の同定について検討する。

成果：通常、食品から食中毒の原因菌を検出することは困難である。そこで食品から原因菌を効率良く検出する方法について検討した。食品に mEC

培地を加え①37℃18時間培養，②37℃18時間培養後，一部を mEC 培地へ接種し 42℃18時間培養，③42℃18時間培養の3種類の条件で増菌培養を行い，リアルタイム PCR 法でスクリーニングする方法で実施した。その結果，①および②の方法で小さい CT 値が得られ，効率良く増菌することが確認された。食品の培養液中には，目的とする大腸菌の他，大腸菌群も多数存在する。DHL 寒天では，両者とも似たようなピンク色集落を形成するが，酵素基質培地である XM-G 寒天では大腸菌が青色，大腸菌群がピンク色を示し，釣菌が容易となった。

[山崎渉]

計画：アジア地域において腸炎ビブリオ・コレラ菌を迅速に検出する LAMP 法の開発を継続する。特に塩基配列の多様性に完全に対応できる *trh* 検出用 LAMP 法を構築する。すでに開発済みの LAMP 法とともに、魚介類に由来する主要食中毒菌の主要病原遺伝子の包括的検出法を開発する。

成果：腸炎ビブリオの主要な病原因子の一つである *trh* の LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法による迅速検出法を開発した。亜型 (*trh1*・*trh2*) に関わらず包括的な検出が可能であった。さらに multiplex LAMP 法への応用を試みたところ、コレラ菌ならびに腸炎ビブリオの主要な病原遺伝子である *ctx*、*tdh* ならびに *trh* の 3 遺伝子の包括的な検出も可能であった。211 株のビブリ

オ属菌コロニーを使用して、従来法との定性試験における比較により LAMP 法の特異性を検討した結果、両者の結果は完全に一致した。LAMP 法は既存の PCR 法よりも迅速であり、DNA 抽出開始から 90 分以内に判定が可能であった。

[倉園]

計画：サルモネラ属菌のエンテロトキシン (Stn) を指標とすることでサルモネラ属菌の下痢原性の評価が可能であるかを検討するために、Stn に対する高感度抗体の作製および免疫学的迅速同定法の開発を行う。

成果：サルモネラ属菌の血清型別は本菌の最も基本的な分類方法であり、WHO の Global Foodborne Infection Network Country Databank においても国際的なサルモネラ属菌感染症のコントロールを目的として、血清型ごとに、各国および地域のサルモネラ属菌検出数が取りまとめられている。また、本邦においては血清型によって分離株の法律上の取り扱いが異なるなど、本菌感染症のコントロールにおいて血清型別は非常に重要な情報となる。Stn は、現在使用されている血清型別の抗原とは異なるが、過去の PCR 法を用いた様々な報告において、調査された全てのサルモネラ属菌に *stn* 遺伝子が存在し、加えてサルモネラ属菌以外の菌種で *stn* 遺伝子が検出されない事が報告され、*stn* 遺伝子がサルモネラ属菌特異的に存在する遺伝子である事が明らかにされており、興味深い

抗原となる可能性がある。研究分担者らは本研究において *stn* 遺伝子配列が由来及び血清型の異なるサルモネラ属菌間でもその全長に渡って高く保存されている事を明らかにした。本結果は *stn* 遺伝子のサルモネラ属菌検出の際のターゲット遺伝子としての有用性を証明するものであった。一方で、*stn* 遺伝子の配列多様性が血清型と非常に良く相関する事を明らかにした。本年度の解析により得られた結果は、*stn* 遺伝子の配列多様性を指標としたサルモネラ属菌の迅速血清型別法開発の可能性を示唆するものであり、本可能性に関して来年度以降、詳細な解析を進めたい。

C-2. 生態学・疫学の解明：アジア諸国での病原性菌株のダイナミズム

[神谷]

計画：*H. pylori* の新たな診断法の評価や治療法の開発を目指して、この菌に共凝集性を示す口腔細菌の *H. pylori* の病原性発現や定着性への影響を評価する。

成果：ヘリコバクター・ピロリ (*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いる。さらに WHO により胃がんの確実性発がん因子グループ 1 として認定されており、除菌治療の重要性が認知されている。*H. pylori* の我が国や他のアジア地域に

おける感染率は、中高齢者を中心に高い。*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ことが示唆されているが、詳しいことはわかっていない。*H. pylori* のスナネズミ感染モデルは、ヒトの慢性持続性胃炎および胃がん発症モデルとして汎用されている。しかしスナネズミ胃内への本菌の持続感染は、1回のみ *H. pylori* 投与では全検体への定着が成立しないこと、感染の長期化により時に *H. pylori* が自然消失することが知られている。この事例はこれまでヒトでは報告がなされていない。これらの事実はスナネズミの胃内細菌叢または口腔内細菌層が *H. pylori* 自然消失に関与している可能性を示唆している。しかしながらスナネズミ口腔内細菌叢に関する研究はこれまで何もなされていない。*H. pylori* と口腔内細菌の相互作用について検討を行うために、本研究では、スナネズミ胃内細菌叢構成細菌の解析を行った。*H. pylori* 感染および非感染スナネズミの胃内フローラに違いを認めたと、*Prevotella* 属菌が *H. pylori* 自然消失群スナネズミ胃内でのみ検出された。このことは *Prevotella* 属菌が本菌の定着に抑制的に働いていることを示唆している。

[山崎伸二]

計画：タイにおいて、分子疫学的手法を用いて *C. jejuni/coli* 以外の *Campylobacter* 属菌や *Arcobacter* 属菌の下痢原性を調べる。

成果：タイの食肉から種々の培地を用いて *Campylobacter* 属菌とその関連細菌を分離して菌種を同定し薬剤感受性について調べた。鶏肉では *C. jejuni* の汚染率が 58%であったがその他の肉では分離されなかった。牛、豚、鳥の全ての食肉で *A. butzleri* の汚染率が 80%以上と極めて高かった。豚肉からは *C. hyointestinalis* も分離した。*C. jejuni* と *C. coli* ではキノロン系に対する耐性率が 60%から 100%、*A. butzleri* ではマクロライドとセフェム系に対する耐性率が 60%から 90%と高かった。*A. butzleri* について今後注意を払う必要がある。

[大澤]

計画：昨年までにインドネシアの環境からコレラ菌や *V. mimicus* 以外の菌種でコレラ毒素遺伝子を保有する菌株を分離した。これらを解析し、環境中には多様なコレラ毒素遺伝子を含むファージが存在するという仮説を検証する。

成果：El Tor 型コレラ菌の発祥地とされるインドネシアの環境水より、コレラ毒素遺伝子 *ctxAB* を保有した El Tor 型コレラ菌の分離を試みた。その結果、計 9 株分離され、そのうち 1 株は *Vibrio cholerae* で、残りの 8 株は他の *Vibrio* 属菌、*Aeromonas* 属菌、腸内細菌科の *Klebsiella* 属菌、*Enterobacter*

属菌と疑われる菌であった。また、この 9 株の内、CTX ファージ上の *ctxAB* 以外の遺伝子(*zot*, *cep*, *rstR* 等) を全て保有している株は *Enterobacter* 属菌と疑われる 1 株のみであった。これらの所見より既知の CTX ファージとは異なる遺伝子構成のファージが環境中で宿主細菌の種や属、科を越えて伝播していることが示唆された。

[西川]

計画：下痢原性大腸菌 (DEC) は、途上国で大規模な流行性下痢症の原因であるか否かを明らかにするため、パキスタンとインドの研究者を招へいし、菌の検出分離法を習得してもらい、現地での調査を支援する。

成果：人に下痢症を起こす大腸菌を総じて下痢原性大腸菌 (*Diarrheagenic Escherichia coli*、以後 DEC と略す) と呼び、その中に発病メカニズムが異なる 5 種類が知られている。その中の 1 種である腸管病原性大腸菌 (*Enteropathogenic E. coli*, EPEC) は昔から良く知られ、性質がかなり明らかになっている。しかし、近年先進国において従来の EPEC とは異なり、重要な病原因子の 1 つと考えられる集束線毛を保有しない非定型腸管病原性大腸菌 (atypical EPEC, aEPEC) が近年臨床材料から検出されるようになり注目されている。途上国でも従来の定型的な EPEC (typical EPEC, tEPEC) のみならず aEPEC が検出されるようになってきた。途上国でも従来の定型的な EPEC (typical EPEC, tEPEC) の

みならず aEPEC が検出されるようになってきた。tEPEC は、発展途上国の主要病原体と見なされてきたが、aEPEC の汚染源や下痢原性については不明な点が多く、臨床現場では aEPEC が検出された場合に病因学的意義の判断に苦しむことが多い。臨床環境の異なる先進国と発展途上国で aEPEC の汚染源・汚染経路とその病原性を比較解析することは、本菌の病原性や生態学の理解に大いに役立つと考えられる。本研究分担者は、パキスタンとインドの研究者を招へいし、菌の検出法・分離法等を習得してもらい、その後の現地での調査の基礎を培うことを計画した。H24 年度に渡日を期待し、支援体制を準備していたが、渡日は H25 年度に先送りされ確定した。そこで、H24 年度の研究では、これらの研究者が訪問したときに、ラボとして効率的に研究指導が行えるように、入手可能な国産の検査サンプルを対象に aEPEC の汚染源・汚染経路とその病原性を探ための一連の実験を実施した。さらにこれまでの分離菌を含めて、これらの菌の系統学的位置を明らかにした。

家畜が非定型腸管病原性大腸菌 (aEPEC) の汚染源となっている可能性を検証するため、由来の異なる 159 株について、系統発生群別、病原性プロフィール、インチミン型別および付着性試験を実施した。その結果、患者株の 50%、ウシ由来株の 79% が系統発生 B1 群に分類されたのに対し健康者とブタ由来株では各々 16% と 23% であっ

た。B1 群にはインチミン $\beta 1$ 型が多く、ウシと患者由来株の 26% および 25% を占めた。病原性プロフィールでは Ia と Ib 型がブタよりウシに多く、Ia は健康者より患者由来株に多かった。これらの成績は、病因学的に重要な患者由来株はウシ由来株と共通点が多く (B1, Ia, $\beta 1/\gamma 1$)、健康者やブタに見られる株と識別できることを示唆している。

C-3. 病原性の解明：検査法・ワクチン開発・治療法開発の礎を築く、

[渡邊]

計画：赤痢菌の Type III 分泌装置の発現調節に関わる因子の解析を進め、得られた知見を応用したワクチン候補株の試験をアジアの研究者と共同で進める。

成果：細菌性赤痢は、出血性の下痢や発熱を主症状とし、しばしばしづり腹を伴う重篤な症状を伴う伝染性の下痢症である。衛生状態の悪い発展途上国では、汚染した環境水や食品を介して伝播するため、依然重要な下痢症である。先進国では、衛生環境の改善により、発生件数がかなり現象し、むしろ非侵襲性サルモネラ症 (食中毒) が多発し、重視されている。細菌性赤痢は菌の侵襲型病原メカニズムの解明に基づく

赤痢菌の主要な病原因子である III 型分泌装置 (TTSS) は温度と浸透圧によって発現が厳密に制御されている。我々は TTSS の発現が、そのレギュレ

ータである *InvE* の転写後調節で制御されることを証明し、*invE* の発現調節に関わる因子として桿菌の細胞骨格蛋白として同定されている *RodZ* を見出した。驚くべきことに *RodZ* は形態形成以外の機能として RNA 結合活性を持ち *invE* 遺伝子の転写後調節に作用することが分かった。TTSS 遺伝子群の調節因子で *RodZ* とほぼ同様の機能を持つ RNA 結合蛋白 *Hfq* は、その欠損株が弱毒ワクチンとして実験が進行中であり、同様の応用のため *RodZ* 蛋白の解析を行った。

[山本]

計画：チフス性・非チフス侵襲性サルモネラ症で全身感染症発症の中心となるマクロファージ細胞内寄生の分子機構とその制御機構の解明に取り組む（ワクチン開発に資する）。

成果：下記（3-4. 考察）のように、*Salmonella* 属に分類されるヒトの病原菌による感染症の中で、先進国では食中毒型（非チフス型・非侵襲型）のサルモネラ菌による食中毒が中心である。一方、発展途上国では、非衛生的な環境水を介して、発熱を伴う重篤な全身症のチフス性・非チフス侵襲性サルモネラ症が伝播・多発し、より良いワクチン開発の必要性が叫ばれている。そのためには、複雑でまだ未解明の病原性メカニズムを明らかにせねばならない。サルモネラ属菌は、高度に進化した蛋白質輸送装置（Type 3 secretion system:T3SS）を使って多数のエフェクターを標的細胞へ直接注入

し、それらを持って宿主の高次機能を攪乱することで病原性を発揮している。病原戦略の発現は感染過程で遭遇する生育環境の変化や宿主の感染防御機構に対応して厳密に制御されている。

研究分担者らはこれまでにサルモネラの 2 つの T3SS の発現が環境シグナルに応答して共役的に制御されることさらにこの制御が全身感染に必須であることを明らかにしてきた。最近我々は、2 つの T3SS をコードする SPI1 (*Salmonella* Pathogenicity Island 1) と Flagellar regulon を共役制御する新規のレギュレータを見出した。本研究では新規レギュレータ *YdiV* による制御の分子機構を解明する。サルモネラ属菌は、高度に進化した蛋白質輸送装置（Type 3 secretion system:T3SS）を使って多数のエフェクターを標的細胞へ輸送し、病原性を発揮している。一方べん毛の基部体も T3SS である。本研究では、2 つの T3SS をコードする SPI1 と Flagellar regulon を共役制御する新規のレギュレータ *YdiV* を見出し、その機能を解明した。*YdiV* は二つの異なる機能を有していたすなわち Flagellar regulon の最上位に位置する転写因子 *FlhD₄C₂* 複合体に結合し (i) *ClpXP* による特異的認識分解を促進、又(ii)すでに結合した promoter DNA から引きはがすことにより *FlhD₄C₂* の活性を抑制して Flagellar regulon 全体の発現を負に調節した。SPI1 の発現は Flagellar regulon 内の *fliZ* 産物により活性化されることから、*YdiV* は、SPI1

病原関連蛋白質とべん毛の数を適切なレベルに調節することでサルモネラ病原戦略に関わっている。

[倉園]

計画：サルモネラ属菌の Stn を検出するための、高感度免疫学的迅速同定法を開発し、分離菌の検査に供して病原性との関与を明らかにする。

成果：サルモネラエンテロトキシン (Stn) はサルモネラ属菌の下痢原性を担う毒素タンパク質であると考えられてきたが、その病原性への寄与は報告によって様々であり現在も不明な点が多い。我々は本年度の研究において *stn* 遺伝子の多様性について検討を行い、一部の血清型では in frame 終止コドンの保存により、一次構造が大きく異なる Stn がコードされている事を明らかにした。本結果は、Stn の寄与が血清型により異なる可能性を示唆するものであり、今後 Stn の作用を考察する上で血清型への注意が不可欠である事を示した。上記のように（3-1. 検査法の開発も参照）遺伝子レベルの情報によれば、今後 Stn の免疫学的解析結果が複雑なサルモネラ属菌の分類の補助となる可能性があり、また病原性とも関係する因子であることは、極めて興味深い。

[野田]

計画：Non-O157 志賀毒素産生型腸管出血性大腸菌の新規病原毒素である SubAB の細胞致死メカニズムとそのシグナル伝達機構を明らかにする。;

免疫系に対する本毒素の影響を明らかにし、ワクチン開発・評価に資する。
成果：研究分担者らは、腸管出血性大腸菌の産生する新しい毒素 subtilase cytotoxin (SubAB) を発見し、この毒素に関する研究を展開している。SubAB は低濃度(ng) で培養細胞に対して、アポトーシスを引き起こす。その作用機序として、本毒素の毒性発現領域である A サブユニットが、小胞体に存在するシャペロン BiP を基質として分解し、その結果 ER stress に起因する細胞致死に至ると考えられる。本研究において、さらに詳細な SubAB の作用機構（細胞致死に寄与する ER ストレスセンサータンパク質とそのシグナル伝達機構、マクロファージ細胞で、LPS 誘導性 NO 産生機構への影響）を明らかにした。すなわち SubAB は ER ストレスセンサー蛋白質の一つである PERK の活性化を促し、アポトーシスシグナルを誘導すること、26S プロテアソーム阻害剤で初期アポトーシスシグナルが阻害されることから、ユビキチン・プロテアソーム系で分解を受ける細胞致死責任蛋白質が重要な因子であることが示唆された。また、マクロファージにおいて、SubAB は LPS 誘導性の NO の誘導を NF-kB の活性化を阻害することで抑制し、菌の増殖充進に寄与していることが判った。

[辻]

計画：下痢原性大腸菌のプラスミドの塩基配列解析から未知の病原因子を探索しワクチンの抗原開発を検討す

る一方で、毒素原性大腸菌の易熱性毒素やコレラ毒素を用いた低侵襲性粘膜ワクチンアジュバントとしての効果を検討する。

成果: リンコサミド系抗生剤は、主にグラム陽性球菌や嫌気性菌に対して、50S リボソームにおけるペプチド転移を阻害することにより、蛋白合成を阻害する薬剤であり、現在リンコマイシン(LCM)とクリンダマイシン(CLDM)が存在する。一方、これらは菌交代症による偽膜性大腸炎を誘発する因子の一つとしても知られている。また本剤非感受性の毒素原性大腸菌やコレラ菌では、LCM を添加した CAYE 培地で培養を行うと、それぞれのエンテロトキシンである易熱性下痢毒素(LT)やコレラ毒素 (CT) の産生が増加することが古くから知られている。

研究分担者らは LCM を発現の誘導剤に用いるリコンビナント蛋白の発現系を作製し、これまでコレラ毒素 (CT) やその B サブユニット (CTB) の他、ワクチン抗原として腸管出血性大腸菌の変異志賀毒素 2 (mStx2) の大量発現系を確立してきた。この発現系は、*lac* プロモーターを介して目的遺伝子を発現することを既に見出している。しかしながら LCM がどのようにして MV1184 株の *lac* プロモーターを活性化するのかについては不明であった。本研究では蛋白合成阻害剤であるリンコマイシン(LCM)が、本剤を誘導剤とした大腸菌 MV1184 株を用いたリコンビナント蛋白発現系においてどのように作用しているのかを

明らかにした。D-ガラクトシダーゼ活性を指標にして、糖骨格にリン酸基が結合したクリンダマイシンと比較を行ったところ、LCM の糖骨格の構造が IPTG と類似していることに起因した、アロクトース作用を示すことによるものである可能性が考えられた。毒素原性大腸菌株やコレラ菌においてはこの活性は今回の条件では見出されなかったが、今回 MV1184 株で得られた結果は、リンコサミド投与により、ラクトース代謝を更新させる病原菌の存在の可能性が考えられた。

[藤井]

計画: 腸管出血性大腸菌感染症について、マウスモデルでの骨髄間葉系細胞の抗炎症反応に注目し、急性脳症およびその後遺症に対する再生医療の実現を目指す基礎情報を得る。

成果: 研究分担者らはかつて、腸管出血性大腸菌 O157 を経口感染させ、急性脳症を発症するマウスモデルを開発した。このマウスモデルは、血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)が、破壊されており、BBB の破綻が死因であると報告した。今回、研究分担者らは、このマウスモデルを使って、さらに詳細に BBB の破壊のメカニズムを解明することを目的とした。さらに前回報告したアジスロマイシンの有効性を組織学的に検討した。すなわち、研究分担者らは、ベロ毒素 2c 型産生大腸菌 (E32511 株) を経口感染させて血液脳関門 (BBB) が障害されるモデルを用い、ベロ毒素レセプター合成酵素の

in situ hybridization と免疫組織学的研究を行った。その結果、ベロ毒素の標的細胞は延髄網様体神経細胞と脊髄全角運動神経細胞であった。また、このモデルではアストロサイトの活性化を認め、それに伴って脳血管周囲の aquaporin 4 が消失していた。ミクログリアの活性は認めなかった。アジスロマイシンを投与された E32511 マウスモデルでは、HE 染色で病変を認めず、アジスロマイシン有効性が組織学的に明らかとなった

D. 考察

「アジアのコレラ・腸管感染症の現状掌握と問題解決のための研究：国際共同研究との連携を介した日－アジアネットワーク形成を目指して」に関する本研究では、3つの大項目を設定し、14名の研究者で分担して実施した研究において、研究課題名およびそれぞれの大項目のサブタイトル中のキーワードに関連する研究の成果が得られた。

D-1. 検査法の開発：アジアの途上国でも使用可能な簡便・高感度検査法の開発；

D-2. 生態学・疫学の解明：アジア諸国での病原性菌株のダイナミズム

D-3. 病原性の解明：検査法・ワクチン開発・治療法開発の礎を築く

D-1. 検査法の開発

本研究において検査の標的とした病原細菌（腸炎ビブリオ、腸管出血性大

腸菌、コレラ菌 [西渕、山崎渉]；主要な下痢症病原体すべて [江崎]；下痢症起因菌 [甲斐]；サルモネラ属菌 [倉園]) は、いずれもアジア地域で重要な病原細菌である。成果を報告したいずれの研究においても、迅速、高感度、簡便な方法の開発を目指している。こればアジアに限らず、発展途上国を視野に入れた研究では重要である。例えば、輸出入魚介類のフェアな貿易の基礎となる微生物学的安全性に関する世界的な規範を作成する作業が、WHO/FAO 傘下の CODEX 委員会で進行中である。現在は、世界各地で定量リスクアセスメントを実施するための定量データを得るために必要な世界標準検査法の選定のための validation の段階にあり、昨年 11 月に FAO がアジア諸国の検査機関の代表を招集して実施した魚介類中の腸炎ビブリオの検査法に関するワークショップでは、本研究代表者が報告した検査法 (*tdh* 遺伝子および *trh* 遺伝子を標的とした、LAMP 法 [上記]) が最も良い評価を得た。本年 11 月にチリで開催予定の第 2 回ワークショップでは、上記のような改良法 (*trh* プライマーの改良と multiplex 化 [西渕、山崎渉] および IMS 法の併用) を提案予定である。

D-2. 生態学・疫学の解明

本研究で対象とした病原細菌は、アジアにおいて感染率が高い菌（ヘリコバクター・ピロリ [神谷]）、アジアを含めて世界的に感染率・汚染率が高いこ

とが明らかになり、重視されるようになった菌（*Campylobacter* 属菌・*Arcobacter* 属菌 [山崎]）、これまでほとんど報告がなかったアジアの意外な食品に分布する病原細菌（野菜・穀類の *Klebsiella pneumoniae*、*Bacillus cereus*、*Bacillus thuringiensis*、および大腸菌 O157:H7 による汚染、肉類の *Listeria monocytogenes* による汚染 [西淵]）を含む。さらに本研究では、コレラ菌の最重要病原因子であるコレラ毒素遺伝子を運ぶバクテリオファージのアジアの熱帯環境の環境水中での多彩な動態に関する研究（大澤）、先進国では注目され初めているが、アジアの発展途上国では、不明な点が多い非定型腸管病原性大腸菌（atypical EPEC, aEPEC）に関する成果（西川）も報告する。これらの細菌の生態学・疫学に関する本研究の成果は、今後これらの細菌による感染症の予防・治療に役立つと期待できる。

D-3. 病原性の解明

サルモネラ症の中では、チフス・非チフス侵襲性サルモネラ症、および近縁種の赤痢菌による細菌性赤痢は腸管感染症の中でも重篤な症状を伴う感染症であり、古い時代からアジアでは重要な感染症であるとされている。最近では、衛生環境が改善されたアジアの先進国では、これらの発生・伝播が減少し、むしろ食料の大量生産システム化にともなって発生する大規模食中毒型サルモネラ症（*Salmonella enteritidis* 等による食中毒）が注目を集

めている。しかし、発展途上国では、チフス・非チフス侵襲性サルモネラ症、および細菌性赤痢が相変わらず多発し、ワクチンの開発が重要であると指摘され、そのような活動が活発化している（Mike Levine. 8th International Conference on Typhoid Fever and Other Invasive Salmonellosis. Dhaka, Bangladesh. 2013年3月2日）。そのためは、これらの細菌の複雑な病原性メカニズムを解明することが重要であり、現在 III 型分泌装置に関する研究が活発に行われている。本研究における[渡邊][山本]の研究成果は、このような観点からアジアの人々の保健・衛生に大きく貢献すると言える。

腸管出血性大腸菌 O157 による急性脳症は致命的な疾患であるので、その予防の基礎になる病原性メカニズムの研究は重要であるが、この研究に従事する研究者は少ない。腸管出血性大腸菌の産生する新しい毒素 SubAB は、標的細胞を致死させる細胞毒である。したがって SubAB は、この菌の病原性発現に重要な役割を果たしているかも知れない。本研究で得られた成果は、SubAB 毒素の作用メカニズムをかなり明らかにし、患者症状との関連において、SubAB 毒素の重要性を支持する。下痢原性大腸菌感染症は発展途上国で比較的多発するためか、この毒素産生調節機構に取り組む研究者が少ない。したがって、[藤井][野田][辻] の研究成果はたいへん貴重であると考えられる。

E. 結論

それぞれのサブグループの各研究者の多くは、アジアの研究者との情報交換と連携ををベースとして実施した研究により、研究の展開が見られた。PCR をベースにする各種病原菌の検出法の有効性がアジアでの validation によって証明されはじめた。またこれらの遺伝学的検査法がアジア諸国における食品を含む環境サンプルや患者サンプルの調査において有効に活用され、これらのサンプルが腸管感染症原因細菌種によって汚染している実態の詳細が明らかになった。生態学・疫学の解明に関する研究においては、アジアにおいて感染率・汚染率が高い胃・腸管感染症病原菌、意外な食品に分布する腸管病原細菌、コレラ菌の病原性のメカニズムの本質に迫る研究など、将来これらの感染症の予防・治療に役立つと期待できる研究が進行中である。病原性の解明に関するサブグループでは、チフス・非チフス侵襲性サルモネラ症、および赤痢菌、腸管出血性大腸菌など重篤な疾病の病原性メカニズムの解明は、ワクチン開発や治療法に繋がる重要な研究である。

F. 健康危険情報

本研究において検査の標的とした病原細菌のうち、腸炎ビブリオについては、世界標準検査法の選定のための validation で高い評価を得たので、健康

被害情報獲得の基礎となるであろう。

マレーシアで継続している食品の汚染検査で新たな情報が得られた(野菜・穀類の *Klebsiella pneumoniae*、*Bacillus cereus*、*Bacillus thuringiensis*、および大腸菌 O157:H7 による汚染、肉類の *Listeria monocytogenes* による汚染)。

タイの食肉から *Campylobacter* 属菌とその関連細菌の分布および薬剤感受性を明らかにした。特に *Arcobacter* 属菌による下痢症について今後注意を払う必要がある。

平成23年に起きたO111による食中毒事件で溶血性尿毒症症候群を起こした34名の約61.8%にあたる21人が脳症を起こしたことが、報告されている。本研究から、腸管出血性大腸菌感染症に併発する急性脳症発症のメカニズムが明らかになり、診断や治療法の開発に寄与するものと考えられた。またアジスロマイシンは腸管出血性大腸菌感染による脳症に有効であることが組織学的にも証明された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sandra, A., Afsah-Hejri, L., Tunung, R., Tuan Zainazor, T.C., Tang, J.Y.H., Ghazali, F.M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M. Son, R. 2012. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat cooked rice in Malaysia. *International Food Research Journal* 19(3): 829-836.

- 2) Loo, Y. Y., B. W. Chieng, M. Nishibuchi, and S. Radu. 2012. Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from *Camellia sinensis*. *Int. J. Nanomedicine* 7:4263-4267.
- 3) Wong, W. C., Pui, C. F., Tunung, R., Cheah, Y. K., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M. and Son, R. 2012. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in frozen burger patties in Malaysia. *International Food Research Journal* 19(4): 1751-1756.
- 4) Puspanadan, S., Afsah-Hejri, L., Loo, Y.Y, Nillian, E., Kuan, C.H., Goh, S.G., Chang, .S., Lye, Y.L., John, Y.H.T., Rukayadi, Y., Yoshitsugu, N., Nishibuchi, M. and Son, R. 2012. Detection of *Klebsiella pneumoniae* in raw vegetables using Most Probable Number-Polymerase Chain Reaction (MPN-PCR). *International Food Research Journal* 19(4): 1757-1762.
- 5) Patrick, G. B., Nishibuchi, M., Tunung, R. and Son, R. 2012. Molecular characterization of clinical isolate of *Vibrio cholerae* isolated from outbreaks cases in Malaysia. *International Food Research Journal* 19(3): 1267-1274.
- 6) Chang, W.S., Afsah-Hejri, L., Rukayadi, Y., Khatib, A., Lye, Y. L., Loo, Y. Y., Mohd Shahril, N., Puspanadan, S., Kuan, C.H., Goh, S.G., John, Y.H.T., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M. and Son, R. 2013. Prevalence and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in organic vegetables and chickens. *International Food Research Journal* 20:1023-1029.
- 7) Lye, Y. L., Afsah-Hejri, L., Chang, W. S., Loo, Y. Y., Puspanadan, S., Kuan, C. H., Goh, S. G., Shahril, N., Rukayadi, Y., Khatib, A., John, Y.H.T., Nishibuchi, M., Nakaguchi, Y. and Son, R. 2013. Risk of *Escherichia coli* O157:H7 transmission linked to the consumption of raw milk. *International Food Research Journal* 20:1001-1005.
- 8) Goh, S. G., C. H. Kuan, Y. Y. Loo, W. S. Chang, Y. L. Lye, P. Soopna, J. Y. Tang, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, L. Afsah-Hejri, and R. Son. 2012. *Listeria monocytogenes* in retailed raw chicken meat in Malaysia. *Poult. Sci.* 91(10):2686-2690.
- 9) Kurai, D., K. Nakagaki, H. Wada, T. Saraya, S. Kamiya, Y. Fujioka, K. Nakata, H. Takizawa, H. GotoH. *Mycoplasma pneumoniae* Extract Induces an IL-17-Associated Inflammatory Reaction in Murine Lung: Implication for Mycoplasma