

## B-2. ファージの分離

分離株由来ファージは、mitomycin C (MMC) 0.5 $\mu$ g/ml (終濃度) を添加して O111stx2 分離株を 18 時間培養した遠心上清をフィルター (0.22 $\mu$ m) 濾過して、ファージ液 (分画 1、F1) とした。便検体由来のファージの場合は、便 0.5g に  $\lambda$  希釈液 (10mM Tris · HCl, 10mM MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 0.01%gelatin) 5ml を添加して、乳剤とし、遠心上清のフィルター (0.22 $\mu$ m) 濾過液をファージ液 (分画 1、F1) とした。

このファージ液から  $\lambda$  希釈液を用いて 10 倍希釈系列を作製した。大腸菌 C600 株の培養液 1ml にこれらファージ液を 10 $\mu$ l 混合し、35 $^{\circ}$ C で 20 分静置後、予め融解した軟寒天普通培地 (0.7%寒天、ニッスイ) 3ml を加え、普通寒天平板上に重層し、35 $^{\circ}$ C で一晩培養した。形成された単一プラークから回収したファージは、大腸菌 C600 を用いて軟寒天プレート法で増殖させた。寒天培地上に重層した軟寒天中に形成されたプラークからファージを回収し、必要に応じて、ファージ液の 3/10 量の PEG 溶液 (20%PEG8000-2.5M NaCl) を添加し、氷上 30 分静置後、遠心 (14krpm, 10 分間)、その沈殿を当初ファージ液 1/10 量の  $\lambda$  希釈液に再懸濁してファージ液とした (分画 2、F2)。形成されたプラークが Stx2 ファージによるものかどうかについては、stx2 を検出するプラーク PCR で、遺伝子の有無を調べた。

## B-3. 分離ファージの塩基配列解析

B-3-1. Stx2 ファージの PCR 産物の塩基配列の決定  
stx2 下流域の塩基配列の決定は、単一プラークから回収したファージ液を直接 PCR の鋳型として用い、得られた増幅物は QIAquick PCR Purification Kit (キアゲン) を用いて精製し、これを鋳型として、PCR に用いた同じプライマーを用いて、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオ) と ABI Genetic Analyzer 3130xl (アプライドバイオ) により、塩基配列を決定した。

## B-3-2. ファージゲノムの塩基配列決定

単一プラークから出発し、増幅したファージ液はフィルター濾過前に DNase 工程を加えて F2 を作製し、NucleoSpin Tissue XS (Takara Bio) を用いてファージ粒子から DNA を抽出した。

この DNA を鋳型として、Nextera DNA Sample Preparation Ki (イルミナ株式会社、イルミナ) を用いて、DNA ライブラリーを作製し、MiSeq (イルミナ) により塩基配列を解析した。

得られた塩基配列は、CLC Genomic Workbench (フィルジェン株式会社)、MiGAP(DDBJ)、Artemis Release 14 (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis/>)、Gview (<http://www.gview.ca/>),

G-inforBio V1.88 (DDBJ, 2007) を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者情報を切り離して ID をつけた臨床検体を使用していること、および、解析対象にはヒトゲノム配列情報等は含まれていないため、倫理上の問題は発生しない。

## C. 研究結果

### C-1. 分離株及び血便検体からのファージの検出

検体 TIH395, TIH451 から得られた O111stx2 株を MMC 処理し、大腸菌 C600 を指示菌として用いたとき、得られたファージ液中から多数のプラークが検出された。そこで、得られたファージ液のタイターを測定したところ、TIH395, TIH451 からの MMC 処理後のファージタイターは 3.5 $\times 10^4$  及び 3.3 $\times 10^4$  であった (図 1)。得られたプラークの stx2 の有無をプラーク PCR により各々、ランダムに選択した 8 つのプラークで実施したところ、すべてが PCR 陽性であった。

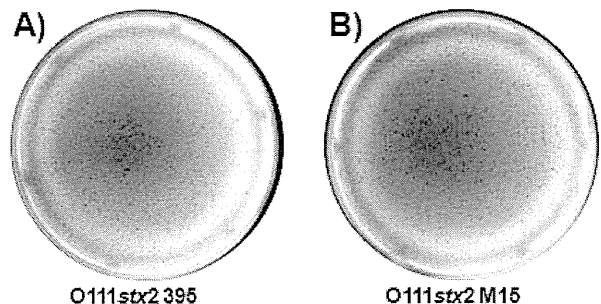


図 1. O111stx2 株から検出した Stx2 ファージにみられた多数のプラーク像  
各々 F1 の 100 倍希釈液 40 $\mu$ l を感染させた

また、血便 9 検体の 10 倍希釈乳剤 (F1) の 5 $\mu$ L を、大腸菌 C600 を含む平板軟寒天上にスポットして、プラーク形成能を検討した。その結果、TIH004 及び TIH034 の 2 検体のみにプラークが確認された (図 2、A)。

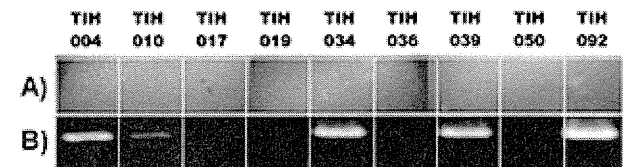


図 2. 便検体中に存在するファージの検出

- A) 便乳剤 (F1) 5 $\mu$ l を用いた E.coli C600 株上のプラーク形成  
B) 便検体 (F2) の stx2 の PCR による検出

このプラーク数は、41 及び 12pfu であった。従って、このプラーク数から便検体に含まれたファージタイターを大腸菌 C600 におけるプラーク形成能で推定すると、各々、便 1g 当たり、8.2 及び 2.4pfu

存在していると思われた。このプラークを軟寒天から回収し、再び C600 に感染させ、プラーク純化を実施した。単一プラークを回収し、*stx2* を持っているかどうか、PCR で確認したところ、PCR 陽性であったプラーク（ファージ）は、各々 8/8 と 7/9 であった。

また、血便検体由来 10 倍希釈乳剤の PEG 沈殿を行い、濃縮した F2 を用いて *stx2* の PCR を実施したところ、TIH004, 010, 034, 039 および 092 で陽性、TIH017 では僅かに陽性、TIH019, 036 及び 050 では陰性であった（図 2、B）。F2 を用いて *stx2* 陽性検体が検出されたことから、先の F1 を用いてプラーク形成が認められなかった検体の TIH010, 017, 019, 036, 039, 050 および 092 の F2 すべてのファージ液を大腸菌 C600 に感染させ、プラークが回収できるかどうか検討した。その結果、ほとんどプラークは得られなかったが、TIH017, 036, 039, 050 および 092 で、それぞれ 11, 2, 10, 7 および 5 つのプラークを検出した。しかし、これらのプラークは非常に小さく、ファージによるプラークかどうか疑われたため、プラークの分離を行い、感染性の有無を再度確認した。その結果、TIH039 からプラークと思われた回収した 10 個のうち、1 つに感染性があることがわかった。そこで、このファージの *stx2* の有無について PCR で確認したところ、陽性であった。

以上、今回ファージの回収を試みた 9 つの血便検体のうち、3 検体から、Stx2 ファージを検出し、それぞれ F004, F034 および F039 とした（表 1）。

表 1. 血便検体からファージの検出

検体 ID	分離菌の検出状況	Stx2 phage プラークの検出			Stx2 phage
		PCR for <i>stx2</i> (F2)	StoIIysate (F1, 5µl)	PEG ppt (F2, 100µl)	
TIH004	O111:sec-	+	41 pfu (PCR-, 5.6 plaque)	NT	F004
TIH010	O157:sec1&2, O111:sec2, O111:sec-	±	ND	ND	ND
TIH017	ND	ND	ND	ND	ND
TIH019	O157:sec1&2, O111:sec2, O111:sec-	ND	ND	ND	ND
TIH034	O111:sec2	+	12 pfu (PCR-, 7.9 plaque)	NT	F034
TIH036	O157:sec1, O157:sec1&2, O111:sec-	ND	ND	ND	ND
TIH039	O157:sec1&2, O111:sec2, O111:sec-	+	ND	1/1 (PCR-, 1.1 plaque)	F039
TIH050	O111:sec-	ND	ND	ND	ND
TIH092	ND	+	ND	ND	ND

ND, not detected; NT, not tested

### C-2. 血便検体から分離した Stx2 ファージの由来

今回の事例では、EHEC として、血清群 O111 と O157 の菌が検出されているため、血便から検出されたファージの由来を決定する必要がある。そこで、*stx2* の下流領域の多型配列を利用して調べた。

本食中毒事例から分離された EHEC O111*stx2* と EHEC O157 *stx1&stx2* 株のゲノム DNA を鋳型として、*stx2* およびその下流域を特異的に検出す

るプライマーを用いて PCR を実施した。得られた産物を鋳型として、PCR のプライマーを利用して塩基配列を決定した。また、便から分離した Stx2 ファージ DNA を鋳型として同じく塩基配列を決定した。この場合の解析は、TIH039 は単一プラークからスタートしているため、1 検体とし、TIH004 および TIH034 は、便乳剤から複数のプラークを検出しているため、各 2 プラークを用いた。その結果、得られた配列を比較したものが図 3 である。

図 3 では、今回得られた配列のうち、607 塩基を比較対象とし、一塩基変異多型 (SNP, single nucleotide polymorphisms) を示した部位をその番号とともに示した。この結果、TIH004 から分離したプラークのうち、F004-1 は O157 の多型と一致した。その他のファージ由来の配列は O111 の多型と一致した。

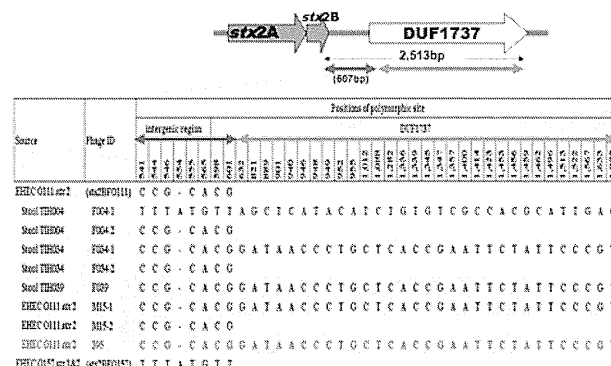


図 3. Stx2 ファージの *stx2* 下流域の多型配列解析

### C-3. Stx2 ファージゲノムの塩基配列決定

O111*stx2* 株を MMC 添加培養して回収した Stx2 ファージである 395 および M-15 ファージと便検体から分離したファージである F004-1, F034, F039 の塩基配列を決定した。塩基配列決定に用いる鋳型 DNA の調製は以下のように実施した。これらのファージを寒天平板上の軟寒天培地を用いてファージを増幅させ、プラークを平板培地上でほぼ融合する密度となるように大腸菌 C600 に感染させた (confluent lysis)。この状態の軟寒天から、ファージを回収した。溶菌の結果放出された宿主大腸菌由来の DNA を分解するために DNase 処理、つづいて PEG 沈殿を行い、ファージ粒子を精製した。精製したファージ粒子から塩基配列決定のための DNA を抽出した。この DNA を、Nextera DNA Sample Preparation Kit を用いて、DNA ライブラリーを作製し、MiSeq で塩基配列を決定した。得られた配列情報は、CLC Genomic Workbench を用いて、アセンブルし、コンティグ (以後、contig) を得た。各ファージの最大の contig 長は、約 60kb 前後であり、その他の contig については、1,000 塩基以下であり、ほぼ Stx2 のゲノ

ムサイズに相当するため、ファージ粒子中に存在するゲノムを読んでいると推定した。以後、この配列をファージゲノム構造解析のために用いた。

#### C-4. Stx2 ファージの塩基配列解析

得られた配列は、MiGap を用いて、アノテーション（注釈づけ）を行い、タンパク質に翻訳されるコーディング領域（CDS）を得て、Gview にてゲノム全体の構造を可視化した。また、個別の CDS については Artemis14 を用いて、主要な遺伝子のアノテーションを実施した。その結果は図 4 に示した。

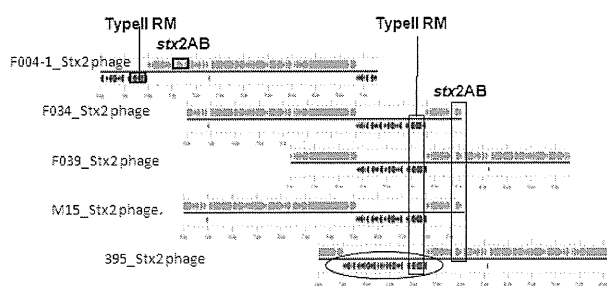


図 4. Stx2 ファージの構造

TypeII RM, typeII restriction-modification system; ○で囲んだ部分は、他のファージよりも構造が異なる領域であることを示している。

これらの結果から、今回得られたファージの構造は、395 ファージの一部に組換えが起こった結果と思われる遺伝子変化を検出したが、ほかについては、各々のドットプロット解析により、極めて類似していることが示された（図 5）。この 395 ファージは、O111stx2 株から分離したファージであり、図 3 で示した *stx2* 下流域の配列と同一の配列を示したことから、F004-1 のゲノム解析の結果、*stx2* 下流域の多型とともに、そのさらに下流の SNP も検出したが、その配列は O111 から検出されたファージの配列と異なっており、図 3 で示した PCR による検討結果と矛盾しなかった。

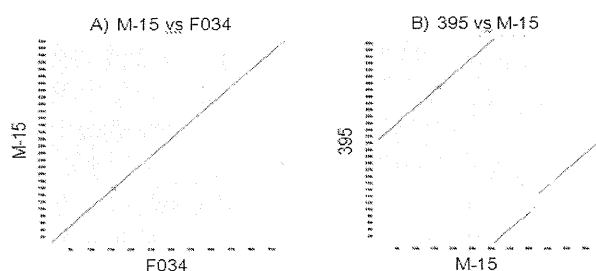


図 5. Stx2 ファージのドット・プロット解析

### D. 考察

#### D-1. Stx2 ファージの検出

本食中毒の概要は既に報告されており、重症となった多数の患者が報告されている一方で、細菌

学的には、血清群 O111 と O157 の二種類が検出されていること、および O111stx2 が分離される一方で、O111stx- も多くの患者から分離されていることが特徴である（厚労省特別研究事業 平成 23 年度 総括・分担研究報告、平成 24 年 3 月、以後 特別研究報告書）。重症患者の発生と菌が分離されないことと、Stx2 プロファージの溶菌現象との間に関連が示唆されているが、患者の消化管内で起こった事象として、溶菌現象だけで前述した特徴を説明することは未だに困難である。しかし、今回の食中毒事例では、Stx2 プロファージあるいはファージが重要な役割を果たしていることが推定され、Stx2 ファージの解析は本食中毒の原因究明のために必要なアプローチである。従って、患者便から分離された O111stx2 株を MMC 処理して得られた溶菌液から、ファージの検出を試みた。その結果、TIH395 と TIH451 検体からは大腸菌 C600 を指示菌として、容易にプラークが得られた（約  $10^4$  pfu/ml）。一方で、ほとんどプラークが得られない O111stx2 株（TIH084 由来）も存在することが判明している（データ未提示）。このプラーク形成能という表現系の違いはこれらの株の遺伝的背景はほとんど同じであること（PFGE パターン一致）から、興味がある現象であるが、今後の課題である。

便検体からのファージ分離の試みは、重症患者からの便 9 検体を用いて実施した。うち、2 検体からプラークが検出された。また、残り 7 検体については、便乳剤を 10 倍に濃縮して、そのすべてを C600 に感染させて、ファージが検出できるかどうか検討した。その結果、TIH039 から検出され、最終的には 9 検体のうち、3 検体からファージが検出された。*stx2* を保有しているかどうかプラーク PCR で調べたところ、MMC 処理により O111stx2 株から得られたプラークと便から得られたプラークのほとんどが PCR 陽性となり、Stx2 ファージであることが判明した。また、便から得られたファージについては、プラーク形成能はないが PCR では陽性となっていることから、少なくとも C600 株ではプラーク形成能を示さない Stx2 ファージが存在することが示唆された。従って、今回の食中毒では、患者の消化管内で感染性のある Stx2 ファージが溶菌により多数放出されている可能性が否定できないと考えられ、このような現象と重症化との関連性に興味を持たれる。また、9 検体のうち、PCR もプラーク形成についても陰性の検体が存在したが、今回の患者についてはいずれも重症（血便以上）を示しており、このような結果の差は、搬入された便検体毎の違い等考えられるが、少なくとも重症患者であれば、ファージ粒子が検出されていると考えられ、多くの患者で EHEC は溶菌しているものと推定した。

## D-2. Stx2 フェージの構造

今回、MMC 処理で、便検体から分離された O111stx2 株のうち、C600 株で多数のプラークを形成した Stx2 フェージ 2 株 (395 および M-15 フェージ) と便から単離した 3 株の Stx2 フェージの計 5 株のフェージ粒子から DNA を抽出し、塩基配列を決定した。この配列は、次世代型シーケンサーである MiSeq を用いて解析したものであるが、Stx2 フェージのゲノムサイズと 60kbp とほぼ相当する contig が得られたため、それ以後の解析に使用した。その結果は、図 4 に示した。これらの構造から、今回、解析した Stx2 フェージは、これまで報告されている Stx2 フェージと基本的に共通の構造をしていると考えられた。得られたフェージゲノムのドットプロットの結果、395 フェージについては、組換えによる遺伝子交換が起こっていることが示唆された。ほかの 4 つのフェージはほぼ同じ構造であった。また、フェージの構造で特徴的なことは、λフェージの免疫に関与するとされる cI 遺伝子の下流に II 型制限修飾遺伝子が挿入されていたことである。Blastn による検索では、この遺伝子は *BsuBI* 制限修飾遺伝子の配列とほぼ一致していた。最近、細菌の制限修飾遺伝子の新たな機能として、利己的な遺伝子として、プラスミドやフェージに組み込まれていることが報告されており、ポスト・セグレーション・キリング (post-segregational killing) 現象を起こすことが報告されており [Kobayashi, I. Nuc. Acids Res., 29:3742(2001)]、今回の食中毒による重症患者において菌が検出されないこととの関連性について今後検討する必要がある。

## D-3. 便から分離した Stx2 フェージの宿主

血便検体から検出された Stx2 フェージは Stx2 プロフェージより SOS 誘導を介して、宿主大腸菌の溶菌の結果として、毒素と一緒に環境中に放出される。今回の食中毒事例では EHEC の血清群 O111 と O157 が分離されていることから、フェージの宿主を決定することは重要である。今回の食中毒事例では O111stx2 株が重症化に関係していると考えられていることから (特別研究報告書)、その結果を補強する結果となろう。

便検体から抽出したフェージのうち、F004 と F034 については、2 つのプラーク、F039 については、単一プラーク由来のため 1 プラークを選択して解析した。その結果、*stx2* 下流領域 607bp について、比較したところ、F004-1 については、O157 の多型配列と一致し、さらに今回解析した 5 つのフェージのゲノム解析で得られた配列から、さらに下流域の多型配列 (先の 607bp を含めた 2,513bp) が存在することが判明し、その配列を比

較したところ、先の 607bp 領域に存在する PCR 産物による多型解析の結果と矛盾するものではなかったこと、さらに PCR 産物による 607bp 配列の多型解析をしていない 395 フェージの該当部分は、血清群 O111 の配列と一致していた。以上の結果からも、F004-1 は血清群 O157 由来のフェージであることが示唆される。しかし、この患者からは O111stx-株のみしか検出されておらず (表 1)、便のメタ解析でも大腸菌のリード配列として、O157 はほとんど検出されていないと報告されており (特別研究報告書)、今後さらに検討が必要と思われる。TIH004 からは複数のプラークが検出されており、今後、複数のプラークを対象としてポピュレーション解析し、定量的に評価する必要がある。

## E. 結論

食中毒事例で集められた患者血便検体から Stx2 フェージを検出し、O111stx2 分離株から得られた Stx2 フェージとともに塩基配列を決定したところ、いずれもほとんど同じ構造を示していた。これらの配列は次世代シーケンサーを用いた解析結果であるが、当該食中毒事例の Stx2 フェージの基本的な構造が明らかになった。その構造の特徴として、Stx2 フェージの免疫に関係のある cI 遺伝子の下流に II 型制限修飾遺伝子が挿入されており、安定および不安定フェージとの関連性や重症患者で菌不分離との関係に興味を持たれた。今後の検討課題である。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1) 磯部順子、木全恵子、嶋智子、佐多徹太郎、綿引正則 腸管出血性大腸菌による食中毒事例で観察された Stx2 プロフェージの解析 (ミニワークショップ 2、「事例に学ぶ細菌学」) 第 86 回日本細菌学会総会 (平成 25 年 3 月 18~20 日)、千葉市 (幕張メッセ 国際会議場)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究分担者 黒田 誠（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長）  
研究協力者 関塚剛史（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・主任研究官）  
竹内史比古（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・室長）

## 研究要旨

2011年に富山県、福井県および神奈川県で腸管出血性大腸菌（EHEC）血清型 O111 を中心とする重症化の傾向が高い集団食中毒事例が発生した。本事例分離菌株の特徴を俯瞰的かつ包括的にゲノムレベルで解明するため、本事例の富山の溶血性尿毒症症候群(HUS)患者由来分離菌株の完全長ゲノム配列決定を行っている。现阶段で、gap 箇所は stx2 フェージを除く λ フェージおよび、パラログ遺伝子を含む約 20 箇所である。stx2 フェージおよびその近傍の配列決定の結果、Stx2 フェージは O157 clade8 の TW14359 株と同様の位置に存在していたが、その配列構造は異なり、O103:H2 12009 株および O104:H4 2009EL-2071 株の Stx2 フェージに近縁の構造を示していた。

一般的なメタゲノム解析では、解読配列を包括的なデータベース（NCBI nt など）に対して BLASTN にて相同性検索を行い、生物種の特異とその割合を算出する。しかしながら、メタゲノム・リードで検出された細菌種のさらにどの株系統に類縁であるのか特定は困難となる。そこで、次世代シーケンサーの網羅解読配列を用いてサンプル中の大腸菌各系統群の割合を算出する方法を考案した。高度に保存された領域上の、大腸菌各系統群で特徴的な一塩基多型を含む解読配列を抽出し、各系統群の割合を算出するパイプラインを開発し、本事例の解読塩基を用いて検証を行った。本事例患者 5 名(内 1 名からは培養による病原性大腸菌は不検出)の糞便検体とコントロール群（成人健常者および EHEC 感染症ではない小児患者）の糞便のメタゲノム解析を行い、大腸菌各系統群の割合を比較した。コントロール群の便検体からは複数の大腸菌系統群が検出された。本事例の全患者検体からは O111 と O157 の両方が分離されているが、患者糞便中の存在比率を定量的に解析したところ、O157 よりも O111 が圧倒的に多く、主に O111 による食中毒事例であることがメタゲノム解析からも明確となった。更に、各系統群で特有のアクセサリ配列を抽出し、データベースを作製した。これを用いて網羅解読配列の相同性検索を行う事で、検体中の大腸菌各系統群の存在有無が推定出来ると思われる。

## A. 研究目的

2011年4月に富山県、福井県および神奈川県で血清型 O111 を中心とする腸管出血性大腸菌(EHEC)による集団食中毒が発生し、死亡者が出た。国内外において、従来の EHEC 感染症は O157 による発症が多く、本事例ほど重症かつ経過が遷延する例や死亡例が多い事は報告されていない。また、O111 による同様な事例は殆ど無く、詳細な解析が必要であった。更に、本事例では EHEC が分離不可能な検体が多数存在し、一般的な細菌学的検査のみの同定に困難を来した。

本研究では、本事例で分離された O111 の分離菌株の完全長ゲノム配列決定を行い、本事例の菌株が、どのような特徴を有するかをゲノムレベルで理解することを目的としている。また、患者糞便検体の網羅解読配列結果から、特定の病原性大腸菌を効率よ

く検出するための手法を考案し、ゲノム・メタゲノムレベルでの新たな検出系を作製することも目的としている。

## B. 研究方法

### 1. O111 分離菌株のゲノムシーケンス

本食中毒事例の富山県で分離された溶血性尿毒症症候群(HUS)患者由来分離菌株 EHEC O111 VT2 陽性 110512 株を供試した。分離培養された菌体は、溶菌後、フェノール・クロロホルム (PCI) 抽出を行い、ゲノム DNA を回収した。得られたゲノム DNA から genomic DNA Sample Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA)もしくは Nextera™ DNA Sample Prep Kit (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI, USA)を用いて約 600~700 bp のインサート長の Illumina DNA ライブラリーを作製した。Illumina 社 Genome

Analyzer IIx にて、DNA ライブラリーをペアエンド解読し (81 mer を約 1,200 万本以上 x2)、解読リードを取得した。abyss-pe (ABySS) 1.3.1 にて *de novo assemble* を行い、contig を作製後、gap 箇所を PCR およびサンガーシーケンスにて解読を行った。

## 2. 大腸菌系統群の特有変異箇所の抽出

公共データベース (GenBank) から 30 株の完全長配列が決定している大腸菌のゲノム配列を入手した (表 1)。取得したゲノム配列から 80mer の疑似リードを一塩基毎に作製した。これら疑似リードを用いて、30 株の大腸菌の完全長ゲノム配列に対して Megablast による相同性検索を行った。また、各大腸菌株および系統群で固有の配列を UNIX コマンドの `uniq` を用いて抽出した。

完全長配列が決定している O111:H- 11128 株のゲノム配列をレファレンス配列とし、40mer の疑似リードを `maq v0.7.1` マッピングソフトにて比較解析し、single nucleotide polymorphism (SNP) を網羅的に抽出した。重複するプロファイル配列および染色体のリピート配列上の SNP は、解析対象から除外した。各株で得られた SNPs アレルを連結して疑似配列を作製し、アライメント結果を最尤法 (RAxML を使用) にて系統樹作製を行い、高度に保存されている領域上の各系統群で特有の SNP を抽出した。

## 3. 糞便検体の網羅解読解析

本事例の富山県の患者 5 名の糞便検体を用いた (表 2)。比較対象として、成人健常者 1 名および EHEC 感染症ではない小児患者 8 名の糞便検体を供試した。100 mg の糞便を 10 ml の TE に懸濁し、lysozyme および achromopeptidase (精製品) にて酵素的に細菌の細胞壁を破壊後、sodium dodecyl sulfate にて懸濁液が透明になるまで混和し、細菌を溶菌した。溶菌後の検体は、proteinase K 処理および PCI 抽出を行い、除タンパクを行った。DNA をエタノール沈殿で回収し、更に QIAamp DNA Stool Mini kit (QIAGEN) にて糞便由来不純物を除去し、DNA を回収した。得られた DNA を用いて、上記手法と同様に Illumina DNA ライブラリーを作製し、解読リードを取得した。

全取得解読リードからヒトゲノム配列を削除するため、`bwa (v0.6.1)` を用いてヒト・リファレンス配列にマッピングし、マッピングしなかった解読リードを回収した。更に、ヒト・リファレンス配列に MEGABLAST 検索し、ヒト配列を可能な限り削除した。残った解読リードを NCBI nt データベースに対

し MEGABLAST 検索し、MEGAN (v4.61.7) にて類似性が見られた生物種ごとに分類した。

糞便検体中の大腸菌の系統分類およびその割合を解析するために、O111:H- 11128 株のゲノム配列をレファレンス配列とし、全取得解読リードをマッピングし、各検体の SNP 情報を抽出した。その後、大腸菌の各系統および株特異的な SNP を有する配列数を抽出し、それぞれの解読配列のカバー率を算出し、検体中の大腸菌各系統の割合を比較解析した。

(倫理面への配慮)

微生物検査として網羅配列解読による病原体検出等を行った。患者配列を特定する作業は行われず、個人情報に結びつく配列解析は一切行っていない。

## C. 研究結果

### 1. O111 分離菌株のゲノムシーケンス

本食中毒事例の富山県で分離された 110512 株の解読リードを用いて `abyss-pe (ABySS) 1.3.1` にて *de novo assemble* を行った結果、全 contig 本数は、650 本であり、1kb 以上の contig 長は、182 本存在した。これら contig を用いて gap 箇所の PCR とシーケンスを行い、`stx2` フェージを除く `λ` フェージおよび、パラログ遺伝子を含む約 20 領域以外の箇所の gap close を行った。`stx2` フェージおよびその近傍の配列決定の結果、`Stx2` フェージは O157 clade8 の TW14359 株と同様の位置に存在していたが、その配列構造は異なり、O103:H2 12009 株および O104:H4 2009EL-2071 株の `Stx2` フェージに最も近縁の構造を示していた (図 1)。

### 2. 大腸菌系統群の特有変異箇所の抽出

これまで全ゲノム情報が明らかとなっている大腸菌の染色体配列から SNP を抽出した。染色体上に存在するリピート領域 (フェージ領域、リボソームオペロン、パラログ遺伝子等) は、今回の解析で除いた。大腸菌の染色体上で保存された領域は、約 5.4 Mb 中、53.5%であった。その保存された領域中に、142,851 箇所の株固有の SNP を抽出した。系統解析の結果、大腸菌は各系統群に分かれており、それら系統群に特有の SNP 箇所を抽出した (図 2)。

大腸菌のゲノム情報から作製した 80mer の疑似リードの Megablast による相同性検索を 30 株の大腸菌の完全長ゲノム配列に対して行った。全大腸菌で共通する配列は、データベースに存在する配列の最下位にヒットする傾向にあった (図 3)。

### 3. 糞便検体の網羅解読解析

本事例の患者糞便検体(n=5)に含まれる DNA の網羅解読を行った。供試した検体では、分離菌株の陽性および HUS 発症の有無が異なっている(表 2)。本事例の糞便細菌叢中の大腸菌の割合は、0.04~22% (平均 9.13%) であり、コントロール群 (成人健常者および EHEC 感染症を呈していない小児患者 8 名) では 0.002~59.15% (平均 10.33%) であった。大腸菌系統群の存在比率を見ると、本事例患者糞便検体では 8.96~99.36% が O111 の系統に含まれる大腸菌であり、未分類の大腸菌の割合は検出限界以下、もしくは 6.9~23.4% であった (図 4)。TIH092 検体は、分離菌株が不検出であったが、網羅配列解読の結果、O111 の系統に含まれる大腸菌が検出された。また、O157 の系統に含まれる大腸菌の割合は、検出限界以下もしくは 0.07~0.17% と非常に低率であり、O111 の検出率よりも明らかに低かった。一方、対象としたコントロール群では、EHEC O111 および O157 等の配列は殆ど検出されず、多種多様な大腸菌系統群を含み、未分類の大腸菌も多く検出された(図 4)。

#### D. 考察

EHEC O111 110512 株のゲノム解析は現在進行中であり、今年度には完全長を得る事が困難であった。その理由として、大腸菌の染色体上には相同性が高い  $\lambda$  ファージが多数存在し、また、約 5kb 程のパラログ遺伝子(RhsA-H core protein)が 8 箇所含まれており、アセンブルの際に支障を来すことによる。現在、long PCR による gap 箇所の増幅とシークエンス、並びに、mate-pair DNA library (insert size 8-10kb) を作製し、次世代シークエンサーにて gap 箇所を埋めることを計画中である。これらにより、効率よくパラログ遺伝子領域の gap 箇所を解読する事が可能になると期待される。

本事例分離菌株の Stx2 ファージは、O103:H2 12009 株および O104:H4 2009EL-2071 株の Stx2 ファージに近縁の構造を示していた。EHEC O157 の系統 clade8 に感染した患者は、HUS を含む重症例になりやすい事が明らかとなっている。本事例でも重症かつ経過が遷延する例や死亡例が多かった。しかしながら、Stx2 ファージの配列構造は、O157 clade8 と本事例分離菌株とは完全には一致しておらず、Stx2 ファージのみで直接的に重症化へのなり易さを説明する事は難しい。本菌株の完全長配列を取得し、他の EHEC と比較する事で、より詳細な特徴を見いだせる事が期待される。

糞便中の網羅解読配列を BLAST 等の相同性検索

を用いて、検体中の大腸菌の存在有無を確認する事が可能である。しかし、図 2 で示す様に、大腸菌間では完全に相同な配列が存在し、本来の菌株に配列がヒットせず、データベースの最下位の配列が top hit として現れてくる。NCBI で提供されているデータベース nt では、最新の配列情報が最下位に格納されていく為、大腸菌内で高度に保存された配列を query として BLAST をかけた際、2013 年 1 月現在ではヨーロッパで集団発生食中毒を起こした EAEC Stx 陽性 O104:H4 にヒットする。つまり、O104 血清型株でなくても、大腸菌のコアゲノム配列の一部が誤って”EAEC Stx 陽性 O104:H4” であるかのような検索結果になるので細心の注意を払う必要がある。

株および系統群固有の染色体配列は、各染色体につき平均約 13.5% であった。また、株および系統群固有の配列領域が、ゲノムサイズに相関しない事から、大部分の染色体配列が他の株および系統群と少なくとも 1 つは完全に相同な箇所を含むことが強く示唆される。従って、既存の全ての配列が含まれているデータベースを用いた相同性検索では、検体中の大腸菌の正確な検出に困難を来す。大腸菌株および系統群で固有のアクセサリ配列、indel および SNP 箇所をまとめたデータベースを用いることで、網羅解読配列中の大腸菌の種類が存在有無を予測しやすくなると示唆される。

検体中に存在する大腸菌系統群の存在比率を予測するために、高度に保存されている配列上の SNP を用いて、本事例の網羅配列解読配列を解析した。その結果、糞便細菌叢中の大腸菌の存在比率は患者間で類似しており、O111 がコントロール群よりも顕著に検出された。EHEC が分離されていない検体でも O111 がその中に存在する事が示唆され、網羅解読解析から見ても、全検体で同一の汚染源により感染した可能性が予測された。供試した糞便検体から O157 が分離されているが、O157 由来の配列は、検出限界以下もしくは 0.07~0.17% と非常に低率であった。他分担者による血清学的検査でも、本事例において O111 の血中抗体価は O157 のそれよりも高い事が明らかとなっており、今回作製した検出系の有用性が示唆された。

#### E. 結論

本事例が何故これまでの EHEC 感染症よりも重症化するかを完全に解明するまでには至っていないが、分離菌株の完全長配列の決定と、他の EHEC 分離菌株とのゲノム比較解析を行う事で、その糸口が掴めると期待される。今後、病原性大腸菌集団食中毒事



例が発生した際、検体中より分離菌株が増殖により確認が得られなかった時には本解析法により、EHEC (O111, O26, O103, O157 等)のみならず、どの系統群が検体中に存在していたかを予測する事が可能となると思われる。本事例を更に理解する上でも、本事例分菌株の完全長ゲノム配列を決定し、複数の病原性大腸菌感染症患者便の網羅解読比較解析を行い、本事例のみならず、EHEC 感染症の重要な特徴を抽出する必要があると思われる。

F. 健康危険情報

とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

関塚 剛史, 綿引 正則, 磯部 順子, 大西 真, 竹内 史比古, 佐多 徹太郎, 黒田 誠. 糞便メタゲノム解析による大腸菌のポピュレーション解析. 第86回日本細菌学総会 千葉市 2013年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 本研究で用いた完全長ゲノム配列決定株

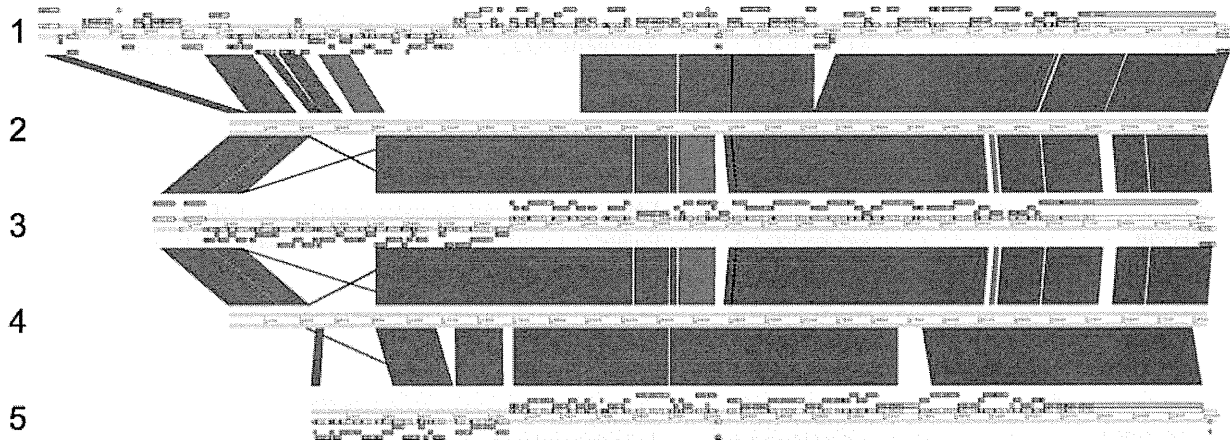
Strain name of <i>Escherichia coli</i>	Accession number	Feature	Serotype	genome size (bp)
UTI89	NC_007946.1	ExPEC	N/A	5,065,740
APEC O1	NC_008563.1	ExPEC	O1	5,082,024
S88	NC_011742.1	Meningitis isolate	O45:K1	5,032,267
ED1a	NC_011745.1	Avirulent strain	O81	5,209,547
CFT073	NC_004431.1	ExPEC	O6:K2:H1	5,231,427
536	NC_008253.1	ExPEC	O6:K15:H31	4,938,919
E2348/69	NC_011601.1	EPEC	O127:H6	4,965,552
SMS-3-5	NC_010498.1	Antibiotic resistant strain	N/A	5,068,388
IAI39	NC_011750.1	ExPEC	O7:K1	5,132,067
UMN026	NC_011751.1	ExPEC	O17:K52:H18	5,202,089
CB9615	NC_013941.1	EPEC	O55:H7	5,386,351
EC4115	NC_011353.1	EHEC	O157:H7	5,572,074
TW14359	NC_013008.1	EHEC	O157:H7	5,528,135
Sakai	NC_002695.1	EHEC	O157:H7	5,498,449
EDL933	NC_002655.2	EHEC	O157:H7	5,528,444
ATCC 8739	NC_010468.1	Avirulent strain	N/A	4,746,217
HS	NC_009800.1	Avirulent strain	O9	4,643,537
BL21-Gold(DE3)pLysS AG	NC_012947.1	laboratory strain	N/A	4,570,937
REL606	NC_012967.1	laboratory strain	N/A	4,629,811
K-12 substr. DH10B	NC_010473.1	laboratory strain	N/A	4,686,136
BW2952	NC_012759.1	laboratory strain	N/A	4,578,158
K-12 substr. W3110	AC_000091.1	laboratory strain	N/A	4,646,331
K-12 substr. MG1655	NC_000913.2	laboratory strain	N/A	4,639,674
12009	NC_013353.1	EHEC	O103:H2	5,449,313
E24377A	NC_009801.1	ETEC	O139:H28	4,979,618
IAI1	NC_011741.1	Avirulent strain	O8	4,700,559
SE11	NC_011415.1	Avirulent strain	O152:H28	4,887,514
55989	NC_011748.1	EAggEC	N/A	5,154,861
11368	NC_013361.1	EHEC	O26:H11	5,697,239
11128	NC_013364.1	EHEC	O111:H-	5,371,076

N/A: データベースに記載されておらず、詳細不明



表2 網羅配列解読に供試した本事例糞便検体

検体番号	HUS	分離菌株
TIH004	+	O111:H- VT-
TIH036	-	O111:H- VT-
		O157:H7 VT1 O157:H- VT12
TIH039	-	O111:H- VT2
		O111:H- VT- O157:H7 VT12
TIH050	-	O111:H- VT-
TIH092	+	菌不検出



- 1: *E. coli* O157:H7 str. TW14359 Stx2 phage (NC\_013008, complement(3188629..3262209))
- 2: *E. coli* O111 str. 110512 Stx2 phage
- 3: *E. coli* O103:H2 str. 12009 Stx2 phage (AP010958, complement(2860699..2926082))
- 4: *E. coli* O111 str. 110512 Stx2 phage
- 5: *E. coli* O104:H4 str. 2009EL-2071 Stx2 phage (CP003301, complement(3305562..3361362))

図1. Stx2 phageの比較結果

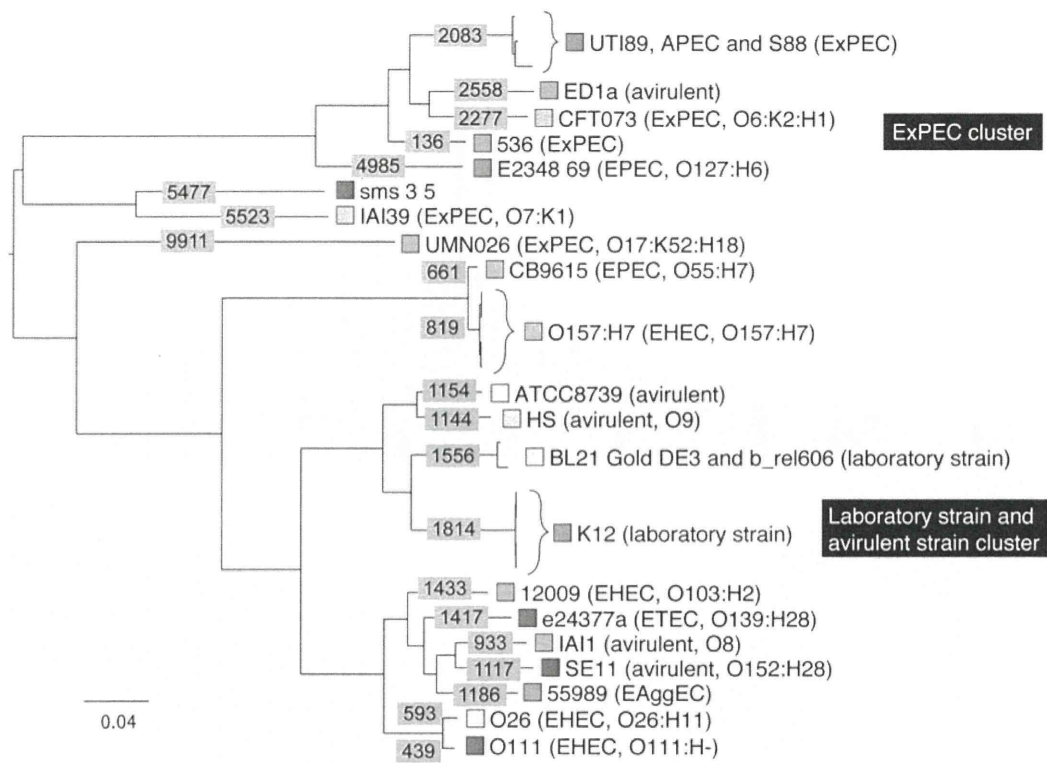


図2. 全ゲノム情報を用いた大腸菌のSNP系統解析  
各枝の数字は、株若しくは系統群特有の塩基置換数

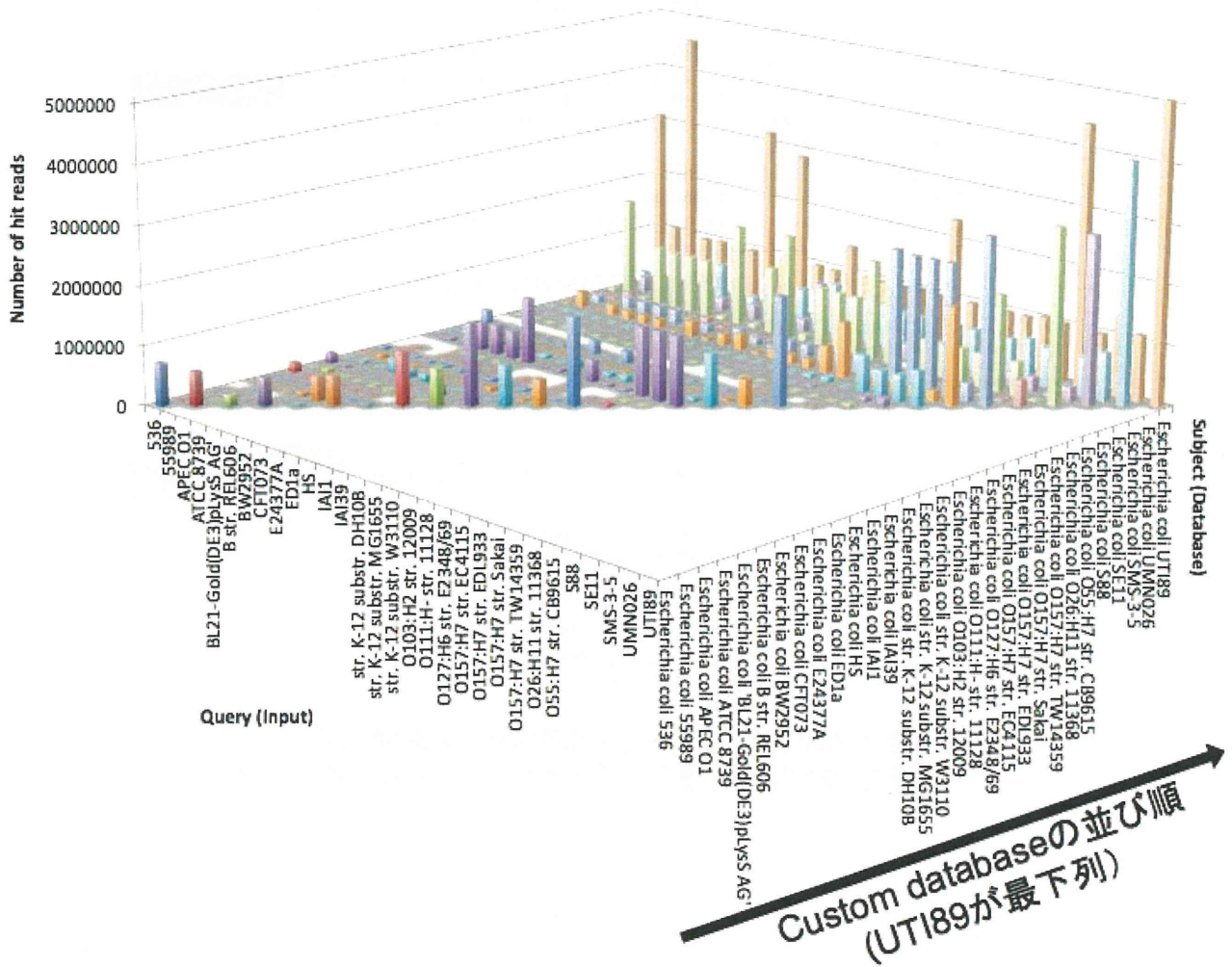


図3. BLASTによる80mer疑似リードの相同性検索結果

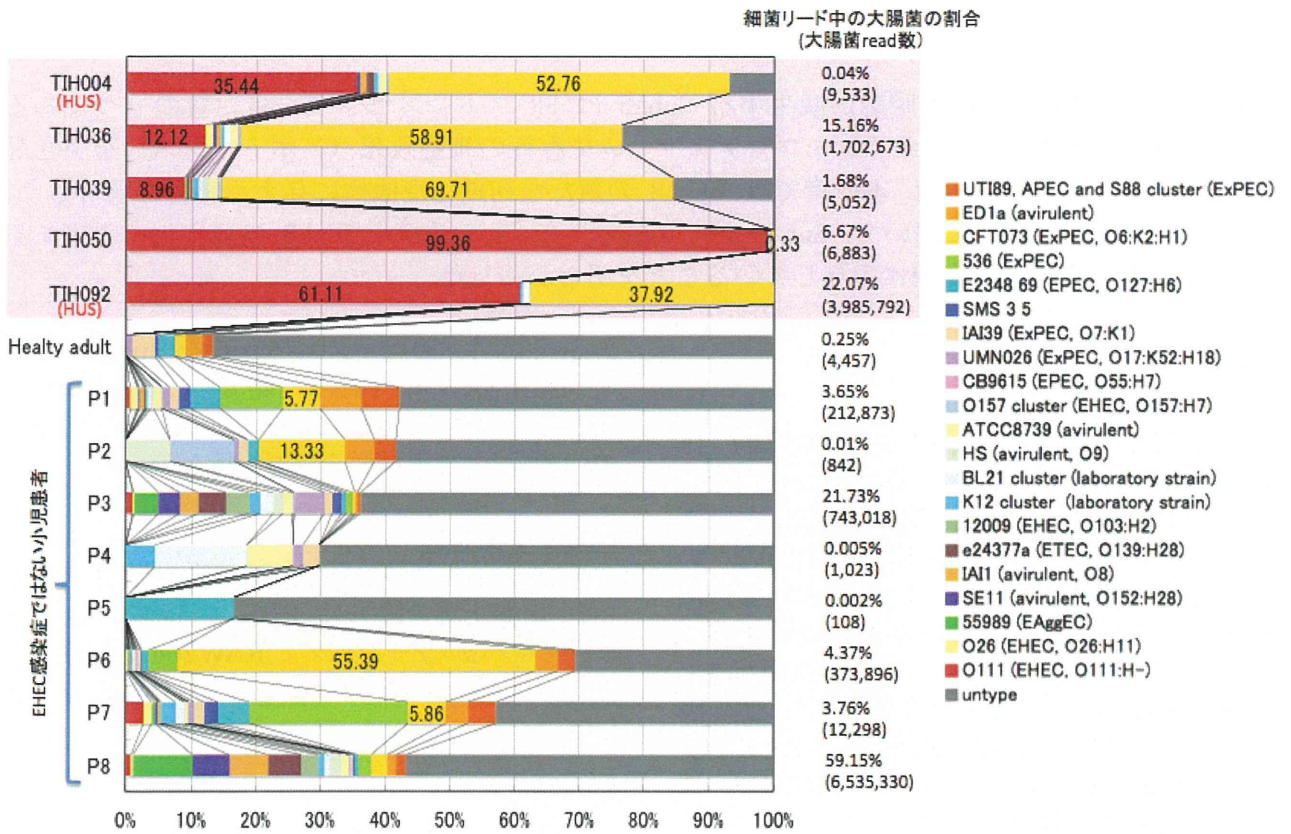


図4. 各検体糞便中の大腸菌の存在比率

Non-O157 STEC の産生する新規毒素 SubAB に関する研究

研究分担者 八尋 錦之助 (千葉大学・病原細菌制御学・特任准教授)  
研究協力者 津々木 博康 (金沢大学・細菌感染症制御学・助教)

研究要旨.

Non-O157 型の腸管出血性大腸菌が産生する 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、ユビキチン・プロテアソーム依存性の細胞致死（アポトーシス）を引き起こすことを明らかにしてきた。本研究では、SubAB の新たな初期免疫機構に与える影響を解析した。つまり、マクロファージにおいて、SubAB が LPS 誘導性の NO の誘導を NF- $\kappa$ B の活性化を阻害することで抑制し、菌の増殖亢進に寄与していることを明らかにした。

A. 研究目的

志賀毒素産生性大腸菌（STEC）は Shiga-toxin (Stx) を産生し、鮮血便を特徴とする出血性の下痢などの食中毒症状を起こす以外に、溶血性尿毒症症候群（HUS）や脳症などの重篤な症状を患者に引き起こす。これまで STEC の病原性に関する研究において Stx が注目され多数の研究が行われているが、Stx の作用だけでは説明がつかない点が多く存在するため、他の因子の関与が示唆されてきた。SubAB は HUS を引き起こした non-O157 型の STEC O113:H21 株が産生する新規の毒素として同定され、その作用として小胞体（ER）に存在するシャペロン蛋白質 BiP を切断することで細胞に ER ストレスを与え、細胞死を誘導することが報告された（1, 2）。

グラム陰性菌の細胞壁外膜を構成するリポ多糖（LPS）やリンパ球から産生されるサイトカインによりマクロファージが活性化されると誘導型一酸化窒素（NO）合成酵素（iNOS）の発現が誘導され、高濃度の NO が産生される。NO は宿主の自然免疫系において強力な殺菌剤となることが知られており、STEC の感染や病原性発揮に対して NO が宿主の感染防御因子として重要であることが示唆されている。そこで本研究では、SubAB がマクロファージからの NO 産生に及ぼす影響を調べることを目的とした。

B. 研究方法

亜硝酸測定

マウスマクロファージ様細胞、RAW264.7 細胞、

あるいはマウス腹腔マクロファージを SubAB 存在下、LPS あるいは IFN- $\gamma$  で刺激し、培養上清を回収した。回収した上清と Griess 試薬を混合し、NO の代謝物として亜硝酸を定量した。

iNOS 発現解析

SubAB 存在下、RAW264.7 細胞を LPS で刺激した。培養上清を除去し、PBS で洗浄後 1xSDS サンプルバッファーを加えて RAW264.7 細胞を可溶化した。Western blotting により iNOS を検出した。

RT-PCR

RAW264.7 細胞あるいはマウス腹腔マクロファージを SubAB 存在下、LPS で刺激した後、細胞を回収し、全 RNA を抽出した。次に、Oligo dT プライマーを用いた逆転写反応により cDNA を得た。得られた cDNA を鋳型として PCR を行い、GAPDH を内部標準として iNOS、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量を解析した。

レポーターアッセイ

ホタルルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとし、マウス iNOS プロモーター及び NF- $\kappa$ B 結合配列を組み込んだプラスミドを RAW264.7 細胞にトランスフェクションし、SubAB 存在下 LPS で刺激した。4 ~ 24 時間後、Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

NF- $\kappa$ B の局在解析

SubAB 存在下、RAW264.7 細胞を LPS で刺激



した。培養上清を除去し、PBS で洗浄後、低張バッファーで細胞を破碎し、NP-40 を加えて可溶化した。次に遠心分離で得られた上清を回収し、細胞質画分とした。一方沈殿に高張バッファーを加え、蛋白質を抽出し、核画分とした。細胞質、核画分に含まれる NF- $\kappa$ B の p65、p50 サブユニットは Western blotting により検出した。

#### 大腸菌のマクロファージ内での生存率解析

大腸菌 BL21 株に pET23b(+)ベクターを導入し、SubAB、mSubAB、NOS 阻害剤である L-NAME 存在下、RAW264.7 細胞に感染させた。2時間後、細胞を PBS で洗浄し、ゲンタマイシンを含む培地に交換した。16時間後、RAW264.7 細胞をデオキシコール酸で溶解し、得られた細胞溶解液を段階希釈し、アンピシリンを含む LB 寒天培地に塗布した。また、pET23b/SubAB あるいは pET23b/mSubAB を導入した BL21 株 (BL21/WT、BL21/MT)を RAW264.7 細胞に感染させ、同様に細胞溶解液を段階希釈し、アンピシリンを含む LB 寒天培地に塗布した。大腸菌のマクロファージ内での生菌数は寒天培地上に形成されたコロニー数(colony forming units; CFU)を数えることで計測した。

### C. 研究結果

RAW264.7 細胞およびマウス腹腔マクロファージを LPS あるいは IFN- $\gamma$ で 24 時間刺激したところ、培養上清中の亜硝酸量が上昇した。SubAB 存在下では、マクロファージ培養上清中の LPS 誘導性の亜硝酸量が低下したことから、SubAB が LPS 誘導性の一酸化窒素(NO)産生を抑制することが明らかとなった。

SubAB による NO 産生の抑制機構を解明するため、LPS 刺激によってマクロファージ内に発現が誘導される iNOS の発現量を調べた結果、SubAB は LPS 刺激による iNOS タンパク質の発現を抑制した。次に、LPS 刺激により誘導される iNOS の mRNA 発現量に及ぼす SubAB の影響を調べた。その結果、SubAB は LPS 刺激 4 時間後の RAW264.7 細胞および LPS 刺激 48 時間後のマウス腹腔マクロファージにおいて誘導される iNOS mRNA の発現量を抑制した。一方、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 の mRNA 発現には影響を及ぼさなかった。これらの結果から SubAB は LPS 刺激によって誘導される iNOS mRNA の発現を抑制することで iNOS 蛋白質の発現を抑制すると考えられ

た。

iNOS は様々な転写因子がプロモーター領域に結合することで転写が制御されている。そこで次に iNOS プロモーターを組み込んだレポータープラスミドを RAW264.7 細胞にトランスフェクションし、レポーターアッセイを行った。LPS 刺激により 24 時間後の iNOS プロモーターの活性化が認められ、SubAB は iNOS プロモーターの活性化を抑制した。更に、iNOS プロモーター領域の様々な欠失変異体を作製し、SubAB の標的となる領域の探索を行った。その結果、SubAB は転写開始点から約 100 bp 上流域に阻害活性を有することが示唆された。そこで、この領域に結合し、iNOS の発現を主に制御していると考えられる NF- $\kappa$ B に着目した。

LPS 刺激を行った RAW264.7 細胞の核内における NF- $\kappa$ B p65、p50 サブユニットの局在を Western blotting により調べたところ、SubAB 存在下では NF- $\kappa$ B p65、p50 サブユニットともに核内における局在が阻害されていた。更に、NF- $\kappa$ B 結合配列を組み込んだレポータープラスミドを RAW264.7 細胞にトランスフェクションし、レポーターアッセイを行った結果、SubAB は LPS 刺激による NF- $\kappa$ B 結合活性化を抑制した。

iNOS 由来する NO はマクロファージの殺菌剤として働くことが知られている。SubAB がマクロファージの NO 産生を抑制することから、SubAB を産生する大腸菌はマクロファージ内での生存率が亢進されることが考えられた。そこで、非病原性大腸菌である BL21 株を SubAB、酵素活性を欠失した変異体 SubAB (mSubAB)、NOS 阻害剤である L-NAME 存在下、RAW264.7 細胞に感染させ、16 時間後に NO 産生量と RAW264.7 細胞内で生存する大腸菌の生菌数を調べた。L-NAME、及び SubAB 存在下では PBS 及び mSubAB 存在下と比べて培養上清中の亜硝酸産生が抑制されており、RAW264.7 細胞の細胞溶解液中の大腸菌の CFU が有意に上昇していた。

次に、大腸菌内で発現する SubAB が大腸菌の生存に及ぼす影響を調べるため、SubAB あるいは mSubAB 発現ベクターを導入した BL21 (BL21/WT、BL21/MT)を用いて同様に生存率を調べた。その結果、BL21/MT より BL21/WT の生存率が有意に上昇した。これらの結果から、マクロファージから産生される NO は大腸菌を殺菌する分子であり、NO 産生を抑制する SubAB は大腸菌のマクロファージ内での生存に貢献することが考えられた。

## D. 考察

本研究において、我々はLPSで活性化されたマクロファージが産生するNOをSubABが抑制することを明らかにした。そしてその作用機序として、SubABはLPS刺激によるNF- $\kappa$ Bの核内移行、あるいはNF- $\kappa$ Bの結合活性を抑制することで、iNOSプロモーターの転写開始点から100 bp上流域へのNF- $\kappa$ Bの結合を阻害すると考えられた。iNOSプロモーターを用いたレポーターアッセイの結果、転写開始点から100 bp上流域を欠失させた変異体では転写活性がほとんど認められず、この領域はiNOS発現に特に重要であることが示唆され、SubABがiNOS発現を強力に抑制する原因の一つと考えられた。また、BiP切断活性をもたない変異体SubAB (mSubAB)がNO産生およびNF- $\kappa$ Bの結合活性を抑制しないことから、SubABはBiPを切断し、ERストレスを与えることでNO産生を抑制していると推察された。

## E. 結論

マクロファージから産生されるNOは宿主の自然免疫系において強力な殺菌剤となることが知られている(3)。本研究において我々は、マクロファージから産生されるNOが大腸菌を殺菌する分子の一つであること、さらにSubABが大腸菌のマクロファージ内での生存率を亢進することを明らかにした。また、これまでにNOがSTECのSOS反応を抑制しStx2の産生を抑制することが報告され(4)、STECの病原性発揮においてもNOが宿主の感染防御因子として特に重要であることが示唆されている。本研究の結果から、SubAB産生STECがマクロファージからのNO産生を抑制することで感染の成立と病原性を高めている可能性が考えられた。

### 【参考文献】

- 1) Paton, A. W., *et al.*, (2004) *J Exp Med*, 200(1): 35-46.
- 2) Paton, A. W., *et al.*, (2006) *Nature*, 443(7111): 548-52.
- 3) Nathan, C., *et al.*, (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16) : 8841-48.
- 4) Varelle *et al.*, (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (24) : 10199-204.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tsutsuki, H., K. Yahiro, K. Suzuki, A. Suto, K. Ogura, S. Nagasawa, H. Ihara, T. Shimizu, H. Nakajima, J.

Moss, and M. Noda. 2012. Subtilase cytotoxin enhances *E. coli* survival in macrophages by suppression of nitric oxide production through the inhibition of NF- $\kappa$ B activation. *Infect Immun* 80:3939-3951.

2. 八尋錦之助. (2012)「腸管出血性大腸菌の病原性発現機構」化学療法の領域 6月号. 28(6):45-52.

### 著書

1. Yahiro, K., J. Moss, and M. Noda(2013) Cytotoxin SubAB (Chapter 694) *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3<sup>rd</sup> Edition, 3155-61.

### 2. 学会発表

1. Inhibitory effect of subtilase cytotoxin on LPS-induced nitric oxide production by macrophages. THE 33rd NAITO CONFERENCE ON Oxygen Biology: Hypoxia, Oxidative Stress and Diseases. 2012. 6-26-29. Hiroyasu Tsutsuki, Kinnosuke Yahiro, Takeshi Shimizu and Masatoshi Noda

2. 腸管出血性大腸菌の産生するSubABのPERKを介したアポトーシス制御機構 第59回トキシシンポジウム 2012. 8. 30-31.

八尋 錦之助、津々木 博康、小倉 康平、野田 公俊

3. Shiga toxin and a novel toxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. The 11<sup>th</sup> Korea-Japan International Symposium on Microbiology 2012.9.14 Masatoshi Noda

4. 腸管出血性大腸菌の産生する志賀毒素以外の毒素 第95回日本細菌学会関東支部総会 2012. 10. 10-12.

八尋 錦之助、津々木 博康、小倉 康平、野田 公俊

5. Inhibitory effect of SubAB cytotoxin



of enterohemorrhagic *Escherichia coli* on  
LPS-induced nitric oxide production by  
macrophages

2012 IEIIS in National Center of Sciences  
Building, Tokyo, Japan

2012, 10-23-26.

Hiroyasu Tsutsuki and Masatoshi Noda

6. Regulation of Subtilase cytotoxin  
(SubAB)-induced cell death by a PKR-like  
endoplasmic reticulum kinase  
(PERK)-dependent proteasome pathway in  
HeLa cells

47th US-Japan Cholera and Other  
Bacterial Enteric Infections Joint Panel  
Meeting. 2012. 12. 12-14.

Kinnosuke Yahiro, Hiroyasu Tsutsuki,  
Kohei Ogura, Sayaka Nagasawa, Takeshi  
Shimizu, Joel Moss, Masatoshi Noda

7. Subtilase cytotoxin enhances *E. coli*  
survival in macrophages by suppression  
of nitric oxide production through the  
inhibition of NF- $\kappa$ B activation.

47th US-Japan Cholera and Other  
Bacterial Enteric Infections Joint Panel  
Meeting. 2012. 12. 12-14.

Hiroyasu Tsutsuki, Kinnosuke Yahiro,  
Takeshi Shimizu, Masatoshi Noda

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

### 別紙 3

## 厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業） 分担研究報告書

### 幼若無菌 BALBc/A マウスを用いた腸管出血性大腸菌の病原性の評価法に関する研究

研究分担者 桑原知己 （香川大学・医学部・教授）  
研究協力者 今大路 治之 （香川大学・医学部・助教）

#### 研究要旨

腸管出血性大腸菌 0157:H7 血清型の病原性を *in vivo* で評価する方法として、幼若無菌マウスを用いた動物モデルが報告されている。幼若無菌 BALBc/A マウスへの経口感染により非典型的腸管出血性大腸菌の病原性が比較可能かを検討するため、0157:H7 血清型 Clade 8 株、0111 血清型の富山株および 0111 血清型 Stx-2 非産生株の 3 株を接種した。その結果、0157:H7 血清型 Clade 8 株を接種したマウスでの死亡率は他 2 群よりも高かったが、0111 血清型については富山株と Stx-2 非産生株との間で差を認めなかった。したがって、幼若無菌 BALBc/A マウスへの接種による非典型的腸管出血性大腸菌株間の病原性の評価は困難であると考えられる。腸管出血性大腸菌感染症後の脳症の発症にはサイトカインストームの影響が示唆されており、炎症感受性の高いマウスモデルによる検討の必要性が考えられた。

#### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌の病原性を *in vivo* で評価するための動物モデルとしてモルモット、ブタ、ウサギなどが報告されているが、近年、幼若無菌マウスを用いた感染モデルの報告もある。これらのマウスを用いたモデルでは高病原性の菌株が用いられており、様々な腸管出血性大腸菌の病原性を比較できる感度の高い動物モデルは未だ報告されていない。そこで本研究では、これらの報告に従い、幼若無菌 BALBc/A マウスにおいて 0157:H7 血清型の Clade 8 に分類される高病原性の菌株と 0111 血清型の菌株（富山県の食中毒事例分離株および Stx-2 非産生株）の病原性が評価できるか検討した。

#### B. 研究方法

離乳直後の 3 週齢の無菌 BALBc/A マウスを 5 匹ずつの 3 群にわけ、それぞれ、0157:H7 血清型 Clade 8 株、0111 血清型富山株、0111 血清型 Stx-2 非産生株を  $1.0 \times 10^8$  cfu をゾンデにて経口投与した。接種後 7 日間観察

し、生存率と腸管および腹部臓器の病理学的変化を比較した。

マウスを用いた実験については香川大学動物実験委員会の承認を受け、当大学における動物実験ガイドラインに従い実験を実施した。

#### C. 研究結果

3 菌株の接種 1 週間後における死亡率は 0157:H7 血清型 Clade 8 株、0111 血清型富山株、0111 血清型 Stx-2 非産生株でそれぞれ 40%、100% および 60% であった。盲腸内容物の菌数はそれぞれ平均 8.88, 8.43 および  $8.85 \log_{10}$  cfu/g であり、0111 血清型富山株が少ない傾向にあった。盲腸重量に関してはそれぞれ平均 0.55 g, 0.76 g および 0.71 g であり、Clade 8 株の接種によって食餌量が低下した可能性が考えられた。0157:H7 血清型 Clade 8 株を接種したマウスでは回腸部分の出血病変が認められたが、他の 2 群では病理学的変化は認められなかった。他の腹部臓器では、Clade 8 株投与

群で平均 116 mg、他の 2 群ではそれぞれ 140 mg (0111 血清型富山株) および 159 mg (0111 血清型 Stx-2 非産生株) であり、Clade 8 株では脾細胞数の減少が起きていると考えられた。

#### D. 考察

今回、腸管出血性大腸菌 0157:H7 血清型の病原性を *in vivo* で評価できるモデルとして報告されている無菌マウスを用いた感染系を非典型的腸管出血性大腸菌の病原性の評価に適用できるか否かを調べた。その結果、高病原性の 0157 血清型 Clade 8 株と 0111 血清型 2 株との病原性については明確な差を確認できた。しかしながら、0111 血清型においては、富山県での食中毒事例から分離された株と 0111 血清型 Stx-2 非産生株については、死亡率に差がなく、腸管、腹部臓器の明らかな病理変化は認められなかった。これらの結果から、単なる幼若無菌マウスへの接種では、非典型的腸管出血性大腸菌の病原性を評価するのは困難であり、使用するマウス個体の炎症反応を亢進させるなどの改良が必要であると考えられた。

#### E. 結論

離乳直後の無菌マウスへの接種のみでは死亡率、組織学的変化による病原性の評価は困難であり、炎症感受性を上昇させる必要があり、SFB などの Th17 誘導細菌との共感染モデルなどの検討が必要である。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takami H, Taniguchi T, Moriya Y, Kuwahara T, Kanehisa M, Goto S. Evaluation method for the potential functionome harbored in the genome and metagenome. *BMC Genomics*, 13: 699, 2012.

- 2) Wakimoto S, Nakayama-Imahiji H, Ichimura M, Morita H, Hirakawa H, Hayashi T, Yasutomo K, Kuwahara T. PhoB regulates the survival of *Bacteroides fragilis* in peritoneal abscesses. *PLoS One*, 8: e53829, 2013.

##### 2. 学会発表

- 1) 市村 穰、今大路 治之、内田 景子、安友 康二、桑原 知己. 腸管内常在菌による *Clostridium difficile* の病原性抑制機構. 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月.
- 2) 桑原知己. 腸管内における宿主微生物間相互作用に関わる分子の検索. 第 86 回日本細菌学会総会、千葉、2013 年 3 月.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

- |           |         |
|-----------|---------|
| 1. 特許取得   | なし。     |
| 2. 実用新案登録 | なし。     |
| 3. その他    | 特記事項なし。 |

厚生労働省科学研究費補助金  
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)  
重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原性因子及び診療の標準化に関する研究  
(代表 大西真班長)  
分担研究報告書

「溶血性尿毒症症候群の診断・治療ガイドラインの作成」

総括責任者：五十嵐隆	国立成育医療研究センター総長
分担研究者：斉藤昭彦	新潟大学医学部小児科教授
伊藤秀一	国立成育医療研究センター腎臓・リウマチ・膠原病科医長
幡谷浩史	東京都小児総合医療センター腎臓内科医長
水口 雅	東京大学大学院医学系研究科国際保健学教授
森島恒雄	岡山大学医学部小児科教授
研究協力者：大西健児	東京都立墨東病院感染症科部長
川村尚久	大阪労災病院小児科部長
北山浩嗣	静岡県立こども病院腎臓科医長
芦田 明	大阪医科大学小児科講師
要 伸也	杏林大学医学部第一内科准教授
種市尋宙	富山大学医学部小児科助教
佐古まゆみ	国立成育医療研究センター治験推進室医員

研究要旨

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染や溶血性尿毒症症候群 (HUS) の診療・研究に造詣の深い日本小児腎臓病学会、日本腎臓病学会、日本小児神経学会、日本小児感染症学会、日本感染症学会などの学会に所属する臨床家・研究者と臨床治験の専門家など 14 名から構成される研究班を組織し、エビデンスに基づく診療ガイドラインとして必要な条件を満たした HUS 診断・治療ガイドライン (案) をわが国で初めて作成した。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) は下痢原性大腸菌の一つで、人の腸管に感染し胃腸炎や下痢症を引き起こす。EHECは志賀毒素 (Shiga toxin: STXあるいはベロ毒素

Verotoxin: VTとも呼ばれる) を産生するため志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: STEC) あるいはベロ毒素産生性大腸菌 (Verotoxin-producing *Escherichia coli*:

VTEC)とも呼ばれる。EHECはO抗原(大腸菌の細胞壁を構成する糖脂質抗原)として約180種類、H抗原(大腸菌の鞭毛を構成する蛋白質抗原)として約70種類の血清型に分類される。わが国ではEHEC感染症は一年を通して発生するが、夏期に多く発生する。最近数年間は年間4,000名前後の患者の届け出がある。

EHEC感染症の一部は下痢出現後4 - 10日に溶血性貧血、血小板減少、急性腎傷害(急性腎不全)を3主徴とする溶血性尿毒症症候群(hemolytic uremic syndrome: HUS)を引き起こす。HUS患者の3割程度が中枢神経症状を合併し、重篤な急性脳症を呈し多場合、死亡することが少なくない。

EHEC感染に伴うHUSの診断・治療のガイドラインは日本小児腎臓病学会が平成12年6月に改訂し公表している。その後、本症の重篤な合併症である急性脳症の治療法について進歩が見られ、さらにEHEC感染が基因しない非典型HUSの病院・病態・治療法が解明されている。

これまでに公表されたHUSに関する内外のエビデンスをしっかりと踏まえた、aHUSを含めたHUSの診断・治療のガイドラインを作成する事を研究目的とした。

## B. 研究方法

日本小児腎臓病学会、日本腎臓病学会、日本小児神経学会、日本小児感染症学会、日本感染症学会などの学会に所属し、EHECやHUSに造詣の深い臨床家・研究者と、臨床治験の専門家からなる14名からなる研究班を組織した。

平成24年5月26日の全体班会議にて本研究班の目的を班員が理解した。平成

24年8月11日に分担研究班の第一回班会議を開催し、ガイドラインの全体像を作成し、執筆の分担を決定した。その際、エビデンスに基づく診療ガイドラインを作成するためには、エビデンスの検索、評価、推奨プロセスが不可欠である。そのため、エビデンスレベル(質)や推奨について分類、決定や構造化抄録の作成などについて記載し「エビデンスに基づく診療ガイドラインの作成」について研究協力者の佐古まゆみが解説(資料1)し、班員全員がガイドライン作成に関する基本方針を共有した。

平成24年12月22日の分担研究班第二回班会議で、佐古まゆみが作成した「HUS診療ガイドライン作成要項案」(資料2)に基づいて各自が分担して作成したHUS診断治療ガイドライン(案)を持ち寄り、全体で討議した。

その後、五十嵐隆、伊藤秀一、佐古まゆみの3名が平成25年1月24日、同29日、2月5日、同7日、同14日、同23日に集まり検討委員会を開催し、班員が分担して作成した項目すべてを見直し、修正した。さらに、HUS診断・治療ガイドライン(案)を班員に返却し、一部修正の後に班員全員からの同意を得た(資料3)。

## C. 研究結果

エビデンスに基づく診療ガイドラインとしての体裁を踏まえた、HUS診断・治療ガイドライン(案)を作成した(別紙)。

## D. 考察

本ガイドライン(案)はエビデンスに