

スを行っているところであり、この作業が終了した段階で、比較ゲノム解析に進む予定である。

なお、本年度は、次の解析対象に関して本研究班の研究代表らと検討を行った。その結果、重症化率の高い O177 と既知の定着因子が存在しない O115 を解析対象とすることを決定した。感染症研究所からの菌株の提供を待って、そのゲノム解析を開始する予定である。

② *E. albertii* の解析：本菌に関しては、4 株をゲノム解析対象株として選定してゲノム解析を行い、昨年度の段階で全ての株の全ゲノム配列を取得している。また、他の菌株についても、MiSeq を用いて高精度ドラフト配列の取得した。今年度は、上記 4 株の MiSeq を使ったゲノム配列の高精度化を行って最終的なゲノム配列を取得したほか、24 株の高精度ドラフト配列を取得した。

完全長配列を取得した 4 株のうちの 3 株（論文化の都合上、Stx2f 産生株は別途解析を行うことにしたため、今回は除外）について、遺伝子のアノテーション、ファージ領域や IS エlement 等の同定を行った後、詳細なゲノム配列解析を行った。その結果、昨年度の予備的な解析から示唆されていた以下の 3 点を最終的に確認した。

(i) 3 株の染色体は、それぞれ 4.60 Mb、4.66 Mb、4.56 Mb であり、EHEC などの病原性大腸菌に比べるとやや小さい（Stx2f 産生株のみがプラスミドを保有する；200 kb と 100 kb）。

(ii) 染色体構造（遺伝子のシンテニー）は 3 株間で非常によく保存されており、塩基配列の相同性も 98-99% という高い identity を示す。

(iii) 大腸菌 K-12 (MG1655 株) とのゲノム比較では、*E. albertii* と大腸菌との間で大きなゲノムの再編は検出されず、ゲノムシンテニーも 2 菌種間で高度に保存されている。しかし、2 菌種間で保存されている配列の相同性 (nucleotide identity) は 90% 程度であり、ゲノム配列相同性の面からも本菌は大腸菌とは別菌種といえる。

なお、昨年度の段階で、Stx2f 産生株のゲノム配列から、Stx2f ファージが同定できており、このファージも多くの EHEC の Stx ファージと同様にラムダ様 ファージであること、また細胞膨化致死毒素 (Cytolethal dystending toxin, CDT) 遺伝子もコードしていることも明らかになっている。

さらに、アノテーションデータを利用して、完全長配列を決定した 3 株間でのゲノム比較、既にゲノム配列の決定されている 46 株の大腸菌とゲノム比較、ドラフト配列を取得した *E. albertii* 菌株とのゲノム比較を行った。作業がまだ完全には終了していないが、この解析から *E. albertii* のコアゲノム情報（ほぼ全ての菌株に保存されている遺伝子セットなど）が同定できており、さらに、コアゲノムの中から、大腸菌でも保存されている遺伝子セットと本菌種に特異的な（大腸菌にはほとんど存在しない）遺伝子セットが同定できている。その他、以下のような重要な知見も得られている。

(i) 鞭毛の生合成系遺伝子が完全に保存されているにもかかわらず、走化性に係わる遺伝子群が完全に欠失している。

(ii) 大腸菌で ETT2 と呼ばれる第 2 の T3SS をコードするゲノム領域が完全と思われる状態で存在する（大腸菌では、これまで調べられた全ての株で欠失等が存在）。

(iii) LEE 領域の構造は良く保存（大腸菌の LEE との比較において）されているだけでなく、EHEC や EPEC と同様に多数の non-LEE がコードされており、エフェクターレパートリーも EHEC や EPEC のものと良く似ている。ただし、EHEC や EPEC と異なり、ラムダ様ファージ上に存在しないものが多い。

このうち、ETT2 がコードする T3SS については、本菌に特有な病原性との関連で特に注目される。

昨年度の第 1 例（世界初）に続き、大分県および熊本県の地方公衆衛生研究所との共同で、第 2・第 3 の *E. albertii* によるヒト集団感染を同定していることを付記する。また、本菌の動物での保菌状況の解析も進行中であるが、まだ解析途中であるため、現時点では、その詳細を報告する段階に達していない。

#### E. 結論

3 種類の non-O157 EHEC (O121:H19, O145:HUT, O165:H-) の完全長ゲノム配列の決定が終了した。また、プロファージ領域・LEE 領域・病原プラスミドのアノテーションも終了し、各菌株の Stx ファージや LEE がコードする T3SS、病原プラスミドの性状等が明らかとなった。現在、各血清型において、29～47 株の高精度ドラフト配列を取得している途中であり、今回得られた完全長配列をレファレンスとして用いた比較ゲノム解析を行うことにより、それぞれの血清型のゲノム多様性など、基本的なゲノム特性を明らかにすることができる。また、*E. albertii* に関しても 4 株の完全長ゲノム配列の決定が終了し、アノテーション等の作

業も終了した。さらに、24 株の高精度ドラフト配列を取得し、菌株間および大腸菌との間でゲノム比較を行い、大腸菌との共通性や本菌特有の遺伝的特性等が明らかとなってきた。

#### F. 健康危険情報

国民に至急知らせた方がよい情報に該当するものはない。

#### G. 研究発表（発表誌名巻号・頁・発行年等）

##### 1. 論文発表

(1) M. Kusumoto, D. Fukamizu, Y. Ogura, E. Yoshida, F. Yamamoto, T. Iwata, T. Ooka, M. Akiba, T. Hayashi: The lineage-specific distribution of IS-excision enhancer in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from swine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(4): 1394-1402, 2014

(2) N. Sudo, A. Soma, A. Muto, S. Iyoda, M. Suh, N. Kurihara, H. Abe, T. Tobe, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Kurokawa, M. Ohnishi, Y. Sekine: A novel small regulatory RNA accelerates cell motility in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*(in press).

##### 2. 学会発表

(1) 小椋義俊, 桂啓介, 伊藤武彦, Mainil Jacques, 吉野修司, 磯部順子, 勢戸和子, 江藤良樹, 黒木真理子, 木全恵子, 前田詠里子, 楠本正博, 加藤由起, 秋庭正人, 白髭克彦, 後藤恭宏, 大岡唯祐, 林哲也: EHEC O26 におけるゲノムアダプテーション解析. 第17回腸管出血性大腸菌(EHEC)感染症研究会, 7/25-26, 2013, つくば市.

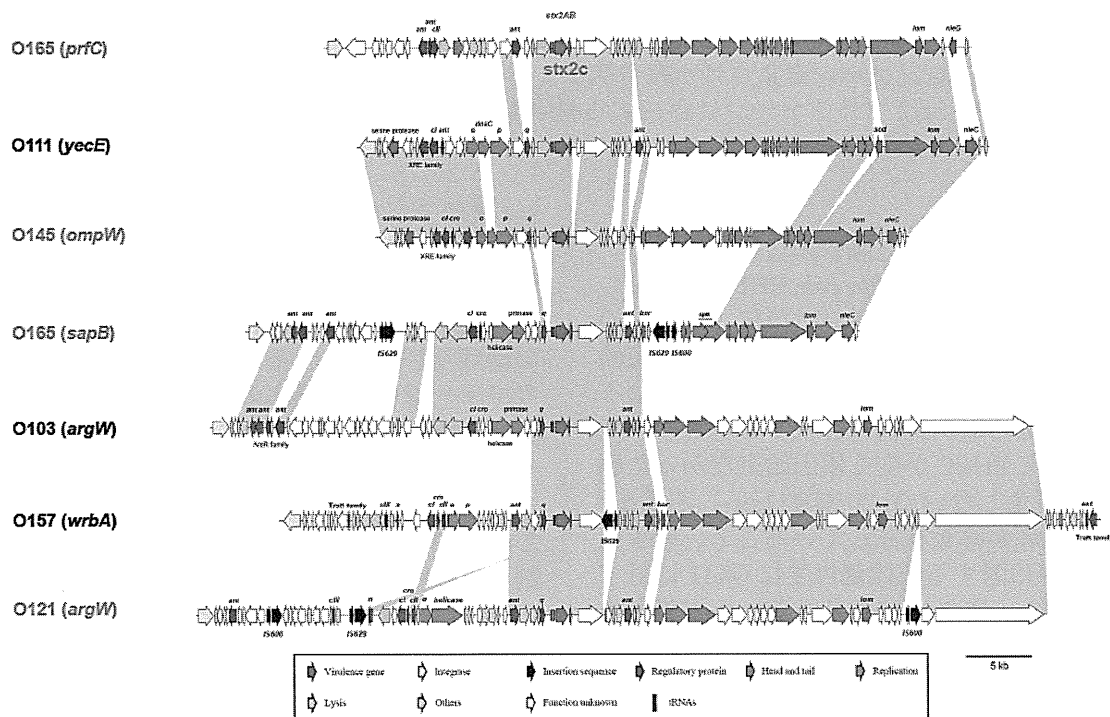
- (2) 大岡唯祐, 勢戸和子, 河野喜美子, 小林秀樹, 井口純, 瀬戸順次, 山口敬治, 古川真斗, 徳岡英亮, 原田誠也, 小野英俊, 吉野修司, Lothar Beutin, 西順一郎, 伊藤武彦, 桂啓介, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也: 新興病原体 *Escherichia albertii* のゲノム及びゲノム比較解析. 第17回腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症研究会, 7/25-26, 2013, つくば市.
- (3) 楠本正博, 小椋義俊, 大岡唯祐, 李謙一, 岩田剛敏, 秋庭正人, 林哲也: EHEC O157 の志賀毒素産生に対する IS629 の影響. 第17回腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症研究会, 7/25-26, 2013, つくば市.
- (4) 林哲也 (特別講演): 細菌病原性の多様性～同一菌種内でのバリエーションをゲノムからみる～. 第37回阿蘇シンポジウム, 8/2-3, 2013, 阿蘇.
- (5) 古川真斗, 福司山郁恵, 奥田将之, 松尾繁, 郷博臣, 大岡唯祐, 林哲也, 原田誠也: 熊本県で発生した *Escherichia albertii* による食中毒事例について. 第34回日本食品微生物学会学術総会, 10/3-4, 2013, 東京.
- (6) 小野英俊, 大岡唯祐, 林哲也: 鶏、豚及び牛における *Escherichia albertii* 保菌調査. 平成25年度獣医学術九州地区学会, 10/12-13, 2013, 大分市.
- (7) 林哲也 (シンポジウム): 細菌のゲノム解析とその臨床応用～次世代シーケンサの時代を迎えて～. 第61回日本化学療法学会西日本支部総会, 11/6-8, 2013, 大阪市.
- (8) 小椋義俊, 桂啓介, 伊藤武彦, Mainil Jacques, 吉野修司, 磯部順子, 勢戸和子, 江藤良樹, 富永潔, 緒方喜久代, 楠本正博, 黒木真理子, 木全恵子, 前田詠里子, 亀山光博, 成松浩志, 秋庭正人, 矢端順子, 後藤恭宏, 大岡唯祐, 林哲也: ファイログenomクスによる腸管出血性大腸菌の優勢系統群および志賀毒素高産生性系統群の同定. 第8回日本ゲノム微生物学会年会, 3/7-9, 東京.
- (9) S. I. Mondal, Y. Ogura, T. Ooka, T. Hayashi: A systematic functional analysis of unknown genes on the Stx2 phage of *E. coli* O157:H7. 第8回日本ゲノム微生物学会年会, 3/7-9, 東京.
- (10) Y. Ogura, T. Hayashi: Extensive phylogenomics revealed a clonal expansion of EHEC O26 in Japan. 第87回日本細菌学会総会, 3-26-28, 2014, 東京.
- (11) 大岡唯祐: 腸管出血性大腸菌 O157 の型別ツール IS-printing system: 開発と実用化までの道のり. 第87回日本細菌学会総会, 3-26-28, 2014, 東京.
- (12) 村瀬一典, 林哲也: O145, O121, O165 EHEC のゲノム解析. 第87回日本細菌学会総会, 3-26-28, 2014, 東京.
- (13) S. I. Mondal, Y. Ogura, T. Ooka, T. Hayashi: A systematic functional analysis of unknown genes on the Stx2 phage of *E. coli* O157:H7. 第87回日本細菌学会総会, 3-26-28, 2014, 東京.
- (14) 緒方喜久代, 大岡唯祐, 成松浩志, 林哲也: 湧き水を原因とした *Escherichia albertii* による食中毒. 第87回日本細菌学会総会 (ワークショップ) 3-26-28, 2014, 東京.

表 1. ゲノム配列を決定した 3 株の non-O157 EHEC のゲノム特性 (K-12 株と O157, O26, O111, O103 EHEC との比較)

	K-12 MG1655	O157 Sakai	O26	O111	O103	O145	O121	O165
Chromosome (kb)	4,639	5,498	5,697	5,371	5,449	5,374	5,390	5,158
Plasmid (kb)	-	93/3	85/63/6/4	205/98/78/8/7	72	92/71	81	76/33
Total genome size (kb)	4,639	5,594	5,856	5,766	5,525	5,537	5,471	5,267
tRNAs	86	105	101	106	98	99	99	107
Prophages	8	18	21	17	15	16	16	19
Integrative elements	2	6	9	7	6	7	5	3
IS elements	59	98	135	119	116	93*	113*	123*

\*既知のISのみ。新規ISについては、現在探索中。

図 1. EHEC での Stx2 フェージの比較



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  
— Stx フェージの多様性についての解析 —

研究分担者 綿引 正則（富山県衛生研究所・細菌部・主幹研究員）  
研究協力者 磯部 順子（富山県衛生研究所・細菌部・副主幹研究員）  
研究協力者 木全 恵子（富山県衛生研究所・細菌部・主任研究員）  
研究協力者 清水美和子（富山県衛生研究所・細菌部・主任研究員）  
研究協力者 増田千恵子（富山県衛生研究所・細菌部・主任研究員）  
研究協力者 金谷 潤一（富山県衛生研究所・細菌部・研究員）

**研究要旨** 平成23年4月に発生した焼肉チェーン店を原因施設とした腸管出血性大腸菌の集団食中毒事例では、細菌学的な特徴として、原因菌が分離されなかった患者群に重症者が多かったこと、血清群 O111 には安定な Stx2 プロフェージと不安定な Stx2 プロフェージが存在することなど、これまでの事例とは異なる特徴を示していた。今回、臨床検体および分離株から分離した5株の Stx2 フェージの構造を比較し、多型領域を検出した。特に領域1、2および3と特定した領域の多型（型別）を血清群 O111 および O157 の混合感染が示唆されたグループの患者分離株の遺伝子型別を実施したところ、*in vivo* で2つの血清群の EHEC 由来の Stx2 フェージが交差感染により、Stx2 プロフェージを2コピー持つ株として存在する可能性が示唆された。また、O111stx2 の Stx2 プロフェージに存在する制限/修飾酵素遺伝子が機能していることを *in vitro* 実験で確認した。

#### A. 研究目的

富山県を中心に発生した腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) O111:H8 (以下、O111) 及び O157:H7 (O157) の混合感染型集団発生事例では、溶血性尿毒症症候群 (HUS) や急性脳症を呈し、内5名が亡くなった。集団食中毒の症例定義に合致する患者の中で、便培養において EHEC が全く検出出来なかった患者や Stx2 を産生しない O111 (O111stx-) が検出された重症患者が多数存在していること、患者血清中の O 抗原に対する抗体価は主に O111 に対するものが上昇し、さらに分離菌を用いた毒素産生性に関する解析から、この重症化症例の原因は主に Stx2 を産生する O111 (O111stx2) であると考えられており、重症化の原因として O157 の関与は低かったと考えている。従来、EHEC 感染症は O157 に因るものが多かったが、最近、O157 以外の血清群 (non-O157) による EHEC 感染症で、しかも重症となる集団あるいは散発事例が世界的に報告されている。従って、本事例の分離株の特徴を解析することは、non-O157 の EHEC 感染症の解明や本事例のような感染症が発生したときの対応に役立つとともに、重症化を細菌学的に説明する重要な証拠を提供すると考える。

EHEC が産生する志賀毒素 (Stx) が本感染症の主要な病原因子の一つであり、特に Stx2 は Stx1 と比べて重症化と関連することが知られている。また、EHEC に存在する  $\lambda$  様フェージゲノム中に

Stx 遺伝子が存在し、通常は宿主大腸菌ゲノム中に組み込まれた状態のプロフェージ（特に、Stx 遺伝子を持つものを Stx プロフェージと呼ぶ）として存在する。毒素産生様式は、溶原菌のフェージの増殖及び溶菌によるフェージ粒子の放出というフェージの生活環に連動して Stx が産生される。特に今回の食中毒では、これまでの EHEC 感染症や食中毒事例と比較すると、Stx2 フェージが異なっている可能性が示唆されている。本研究では、この食中毒事例で分離された Stx2 フェージの役割を解明することを目的とする。

昨年度は、O111stx2 株から分離した Stx2 フェージ2株と患者便から分離された Stx2 フェージ3株の塩基配列を決定した。その結果、典型的な Stx2 フェージの特徴を持っているが一部の領域に多型が存在すること、さらにフェージレプレッサーとして知られる初期蛋白 *cI* 遺伝子下流にその配列から、制限酵素 *PstI* のアイソシゾマーと推定される制限酵素と修飾酵素 (RM) 遺伝子が存在していることが明らかになった。今年度は、これらの構造から、Stx2 フェージの由来やフェージ特異的に検出された遺伝子の機能について解析したので報告する。

#### B. 研究方法

##### B-1. 供試菌株とゲノムDNAの調製

本食中毒事例で分離された6株の O111stx2 株(

TIH084, 031, 057, 023, 395, 451)と 21 株の O157stx 株を用いた (表 2)。

また、非病原性大腸菌である K-12 C600 株を親株として、本食中毒で分離された O111stx2 株のマイトマイシン処理の培養上清 (ファージ溶菌液) 中に存在するファージにより形成したプラーク中に存在する大腸菌を分離し、PCR により Stx2 遺伝子陽性である株を Stx2 ファージ溶原菌 (ISN946-1) として用いた。

また、コントロール株として、EHEC O157 堺株 (Hayashi T, et al. DNA Res. 8:11, 2001) 及び EHEC O111 11128 株 (Ogura Y, et al. PNAS, 106:17939, 2009) を用いた。さらに参照株として、当所保存の O111stx1stx2 株、大分県で分離された 10 株の血清群 O111 株を用いた。

いずれの株も寒天培地上で生育させた新鮮コロニーから Chelex-100 法 (Walsh PS, et al. Biotchniques, 10:506, 1991) を用いて、ゲノム DNA を調製し、終濃度 10ng/μL として PCR の鋳型として用いた。

## B-2. PCRと塩基配列決定

PCR は、KODFX (東洋紡) を用いて、(反応条件) 実施し、検出は、1.5%アガロース電気泳動を行い、臭化エチジウムにより DNA を染色し、ChemiDocXRS (Bio-Rad) で写真撮影した。

EHEC ゲノム中の Stx2 プロファージのインテグレーション部位の決定は、既報に従った

(Serra-Moreno R., J.Bacteriol., 189:6645, 2007)。

塩基配列の決定は、PCR 産物を鋳型として、Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Kit を用いて反応し、ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析した。

## B-3. Stx2 ファージ溶原菌の制限酵素の部分精製

蛋白質の精製には、HiTrap DEAE と HiTrap CM (アマシャム) を用いた。カラム操作は、ディスポシリンジを用いた要手法を用い、溶出液の分画は、96 ウェルタイタープレートを用いた。

制限酵素活性の検定は、基質として、市販の λ ファージ DNA (タカラバイオ) を用い、37°C で 2 時間反応し、1%アガロース電気泳動で行った。制限酵素 *Pst*I および *Pvu*II (ニッポンジーン) は市販品を使用した。

(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. Stx2 プロファージ上の多型を型別するプラ

### イマーの設計と検査方法

本食中毒事例の 2 株の O111stx2 株から分離した Stx2 ファージ及び 3 名の患者便から分離した Stx2 ファージ、計 5 株の Stx2 ファージの解析から、多型が存在すると思われる 3 つの領域 (1, 2 及び 3) を特定し、その多型を検出する PCR 用プライマーを設計した (図 1a)。ただし、Stx2 遺伝子の下流に位置する領域 2 については、約 1.3kb 領域に 38 箇所の単一塩基置換多型が存在することから (未発表)、両端のプライマーを設計し、塩基配列を決定して型別に利用した (図 1b)。また、解析されたすべての Stx2 ファージには RM 遺伝子が存在していた。

### C-2. 集団食中毒分離血清群 O111 及び O157 の Stx2 プロファージ上の多型解析

先に設計したプライマーを用いて、領域 1、3 については、PCR で型別、領域 2 については、塩基配列解析による型別、RM 遺伝子については、その有無を PCR で検査した。対象の株は、本食中毒事例で、血清群 O111 及び O157 の混合感染患者がもっとも発生した店舗を利用した患者からの分離株を中心に検査し、血清群 O111 の結果は表 1 に、O157 の結果は表 2 に示した。

O111stx2 ではいずれも RM 遺伝子は陽性であり、TIH031 株のみ Stx2 プロファージが 2 コピー存在するという結果となった。これらのプロファージのゲノム上の挿入場所は、*wrbA* と *argW* であった。また、領域 1、2 については、TIH031 以外は、すべて 512 型であり、領域 3 については、TIH084 のみ 512 型のみで、その他は 395 型であった。また、当然であるが、本食中毒で分離された *stx2* 陰性の O111 にはいずれも検出されなかった。一方で、参照株として実施した株では、本食中毒菌とは異なるタイプであることがわかった。

血清群 O157 分離株を用いた結果では、プロファージ挿入部位として、*argW* にプロファージが挿入されているという結果と RM 遺伝子の存在が一致すること、領域 1 と領域 3 については、ほとんどが 512 型であり、一部 TIH433 の株の領域 1 についてののみ、2 つの型が存在することがわかった。

### C-3. 制限修飾遺伝子を保有する Stx2 ファージ溶原菌の修飾遺伝子機能の確認と制限酵素の部分精製による酵素活性の検出

Stx2 ファージ溶原大腸菌 ISN946-1 株由来ゲノム DNA を制限酵素 *Pst*I で、切断されるかどうかを確認した。コントロールとして、本溶原菌の親株である C600 株および EHEC O111 11128 株 (プロファージゲノム中に RM 遺伝子は存在しない) 由来のゲノム DNA を用いた。その結果は、図 2

に示した。ISN946-1 株ゲノム DNA は *PstI* (CTGCAG を認識) で切断されないが、親株である C600 株は切断されていること、RM 遺伝子を持たない EHEC O111 11128 株も切断されている。一方で、これら 3 株は制限酵素 *PvuII* (CAGCTG を認識) ではないずれも切断されていることから、ISN946-1 株は、CTGCAG 配列に関連する配列が制限酵素 *PstI* で切断されないため、修飾酵素遺伝子により修飾されて切断されなくなっていることが推定された。

そこで、制限酵素遺伝子の機能を調べる目的で陰イオン交換カラム及び陽イオン交換カラムレジンをを用いて、配列特異的 DNA 分解酵素活性を含む分画の部分精製を試み、成功した。この活性を市販の *PstI* と比較したところ、基質として市販のラムダファージ DNA を用いたときの切断パターンは同一であった (図 3)。

#### D. 考察

平成 23 年 4 月に発生した集団食中毒では、EHEC O111 及び EHEC O157 が複数の患者から、単独、あるいは 2 つの EHEC 株が分離されていた。また、毒素を産生しない血清群 O111 や EHEC O157 においても、基本的には *stx1* と *stx2* 遺伝子を含む株に加えて、*stx1* のみ、あるいは *stx2* 遺伝子のみ O157 も分離されており、多様なタイプ分離株が検出されているが、PFGE 及び MLVA の解析から、血清群 O111 と血清群 O157 は、それぞれ同一の集団発生株であると推定された。さらに、塩基配列解析から、血清群 O111 では 1 株、O157 では複数の株で、*Stx2* 遺伝子周辺の配列が 2 コピー存在することを示唆するデータ (未発表) を観察しており、EHEC O111 と EHEC O157 は、何らかの関係があるのではないかと考えられた。そこで、昨年、複数の *Stx2* ファージの構造を明らかになったことから、その詳細を比較したところ、3 つの領域 (領域 1、2 及び 3) で、多型が存在することが予想された。そこで、この多型がどのように分離株に存在するかを、本食中毒で分離された血清群 O111 及び O157 の分離株のゲノム DNA を抽出して、プロファージ上の遺伝子の多型解析を実施した (表 1、2)。

本食中毒事例で分離された血清群 O111 及び O157 をマイトマイシン処理によりその培養上清からファージによるプラーク形成能力を調べたところ、一部の O111*stx2* 株のみプラーク形成を確認したが、O157*stx* 株からはまったくプラーク形成は観察されなかった (未発表)。従って、これまで明らかにした *Stx2* ファージは、O111*stx2* 由来であると推定され、いずれも RM 遺伝子を保有していた。このことから、表 2 で RM 遺伝子が検出された O157 株について、*argW* 部位に、プロファ

ージの挿入と連動していること、O111*stx2* 株の *stx2* プロファージの挿入部位も *argW* であること (Sekizuka, T., et al. 私信) から、今回の食中毒事例では、血清群 O111 及び O157 の混合感染が疑われる患者から、分離された O111 及び O157 株は、O111 株及び O157 株由来の *Stx2* ファージが交差感染を起こしていることが、今回の結果から示唆されるものと考えた。

また、O111*stx2* 株に保有されている *Stx2* プロファージ中には、RM 遺伝子が存在し、この遺伝子は、機能していることが確認された。活性のある RM 遺伝子が *Stx2* プロファージ中に存在することが、*Stx2* ファージの振る舞いにどのように影響するか、興味を持たれる。

#### E. 結論

EHEC O111 及び O157 を検出した集団食中毒事例で分離された複数の血清群 O111 及び O157 株を解析したところ、お互いの *Stx2* ファージの交差感染が起こっていることが示唆された。また、O111*stx2* 株の *Stx2* プロファージゲノム中に活性のある RM 遺伝子が存在することが確認された。

#### 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) 綿引正則、磯部順子、木全恵子、嶋智子、清水美和子、金谷潤一、増田千恵子、佐多徹太郎 焼肉チェーン店を原因施設として発生した腸管出血性大腸菌食中毒関連事例からのベロ毒素 2 型遺伝子を保有するバクテリオファージの検出 題 4 1 回北陸公衆衛生学会 (平成 25 年 11 月 18 日)、富山市 (富山県民会館)

2) 綿引正則、木全恵子、磯部順子、関塚剛史、黒田誠、大西真、佐多徹太郎 II 型制限修復遺伝子をもつ *Stx2* プロファージを保有する溶原菌が産生する制限酵素の部分精製 第 87 回日本細菌学会総会 (平成 25 年 3 月 26~28 日)、東京都江戸川区 (タワーホール船堀)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 血清群 O111 株の Stx2 プロファージ関連遺伝子の解析

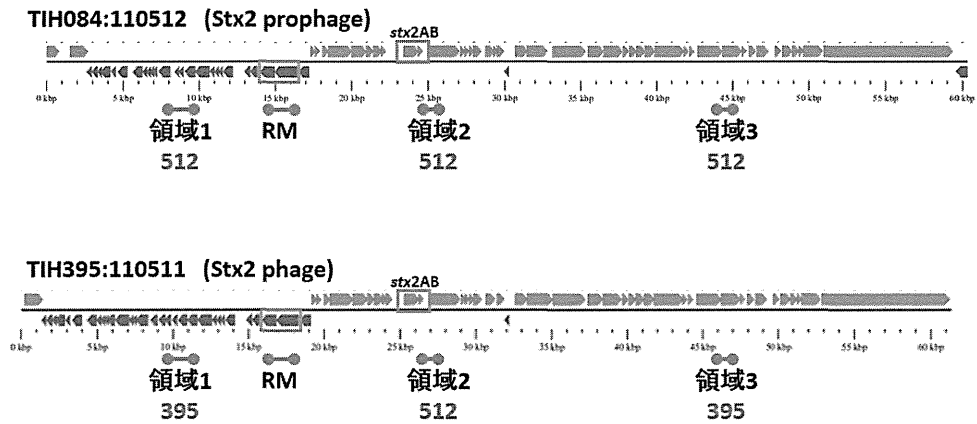
ID	<i>E.coli</i>	Stx2 phage regions				Stx2 phage integration mapping	
		領域1	領域2	領域3	RM		
<b>今回の食中毒事例で分離された血清群O111</b>							
TIH084	O111VT2	512		512		+	wrbA/argW
TIH031	O111VT2	512		512+3		+	
		395				395	
TIH451	O111VT2	512		512		+	
TIH057	O111VT2	512		512		+	
TIH023	O111VT2	395		512		+	
TIH395	O111VT2	395		512		+	
TIH084	O111VT-	-		-		-	
TIH451	O111VT-	-		-		-	
TIH094	O111VT-	-		-		-	
TIH167	O111VT-	-		-		-	
TIH004	O111VT-	-		-		-	
TIH004	O111VT-	-		-		-	
TIH394	O111VT-	-		-		-	
<b>その他の血清群O111株(参照株)</b>							
Ref strain	O111VT1,2	-		-		512	-
EC2429	O111VT1,2	-		512		-	-
EC3298	O111VT1,2	-		1		-	-
EC3299	O111VT1,2	-		1		-	-
EC3300	O111VT1,2	-		1		-	-
Oita(#33)	O111VT1,2	-		512		-	-
Oita(#34)	O111VT1,2	-		-		-	-
Oita(#35)	O111VT1,2	-		512		512	-
Oita(#36)	O111VT1	-		512		-	-
Oita(#37)	O111VT1,2	512		1		512	-
Oita(#38)	O111VT1,2	512		1		512	-
Oita(#39)	O111VT1,2	512		1		512	-
Oita(#40)	O111VT1,2	512		1		512	-
Oita(#41)	O111VT1	-		-		-	-
Oita(#42)	O111VT1,2	512		1		512	-

表 2. 血清群 O157 株の Stx2 プロファージ関連遺伝子の解析

ID	<i>E.coli</i>	Stx2 phage regions				Stx2 phage integration mapping		
		領域1	領域2	領域3	RM			
TIH029	O157VT1,2	512		1		512	-	wrbA/argW
TIH081	O157VT1,2	512		1		512	-	wrbA
TIH090	O157VT1,2	512		512+3		512	-	wrbA
TIH044	O157VT1,2	512		1		512	-	wrbA
TIH036	O157VT1,2	512		512+2		512	+	wrbA/argW
TIH036	O157VT1,2	512		1		512	+	wrbA/argW
TIH036	O157VT1,2	512		512+3		512	+	wrbA/argW
		395						
TIH433	O157VT1,2	512		1		512	+	wrbA/argW
TIH006	O157VT1,2	512		1		512	+	wrbA/argW
TIH019	O157VT1,2	512		1		512	+	wrbA/argW
TIH046	O157VT1,2	512		1		512	+	wrbA/argW
TIH052	O157VT1,2	512		512+4		512	+	wrbA/argW
TIH073	O157VT1,2	512		1		512	+	wrbA/argW
TIH121	O157VT1,2	512		-		512	+	wrbA/argW
TIH019	O157VT1,2	512		1		512	+	wrbA/argW
TIH082	O157VT2	512		1		512	-	wrbA
TIH081	O157VT2	512		1		512	-	wrbA
TIH036	O157VT1	512		-		512	-	wrbA
TIH096	O157VT1	512		-		512	-	wrbA
TIH037	O157VT1	512		-		512	+	wrbA/argW
TIH037	O157VT1	512		-		512	+	wrbA/argW
Sakai	O157VT1,2	512		1		512	-	(wrbA)



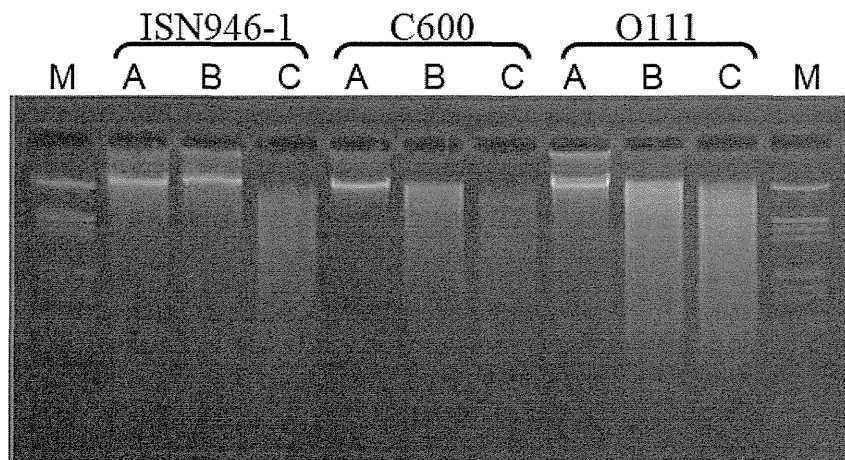
a)



b)

	領域 1	RM	領域 2	領域 3
検査方法	PCR	PCR	Sequencing	PCR
遺伝子型名	395 512	+ or -	1 512 512+2 512+3 512+4	395 512

図 1. プロファージ配列中の PCR 型別領域(a)と型別(b)



M, Marker; A, untreated; B, *Pst*I; C, *Pvu*II

図 2. Stx2 ファージ溶原菌 (ISN946-1) ゲノム DNA の制限酵素 *Pst*I の特異的阻害  
 ISN946-1, E.coli C600 with Stx2 prophage from Stx2 phage of O111stx2 isolate;  
 C600, non-pathogenic E.coli strain ; O111, EHEC O111 str. 11128



図 3. 大腸菌 ISN946-1 株の無細胞抽出分画からの部位特異的核酸分解活性の検出  
 F1, 部分精製標品 ; *Pst*I, 市販制限酵素

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）  
綿引正則（富山県衛生環境研究所・細菌部）

## 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 (EHEC O111 110512 株)の完全長ゲノム配列決定を行っている。現段階で、染色体の gap 箇所は stx2 ファージを除く λファージおよび、パラログ遺伝子を含む 10 箇所である。また、本菌には、plasmid が 7 つ存在する事が明らかとなった。その内、2 つ plasmid 上に、病原因子と予測される 2 つの Type V secretion system 型の protease (EpeA および EspC) がそれぞれ 1 つずつ存在していた。また、EpeA が存在する plasmid には、テトラサイクリン、アンピシリン、ストレプトマイシン耐性に関わる薬剤耐性遺伝子も存在していた。更に、本菌には Colicin-E5 プラスミドも存在していた。本菌の有する plasmid の特徴と、これまで報告されていた薬剤耐性試験およびコリシン活性試験の結果が一致した。染色体配列のみならず、plasmid も含めた包括的な解析を行い、本菌の特徴を解析する必要があると示唆された。

## 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。

## 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) および Nextera Mate Pair Sample Prep Kit (Illumina) を用いて約 500 bp、3.6 kb、5.5 kb、10 kb および 12 kb 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 および Miseq 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 および 300 mer を 520 万本以上 x2)、解読リードを取得した。platanus v1.0.1 にて *de novo* assemble を行い、contig の作製を行った。

(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 分離菌株の染色体配列解析

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 platanus v 1.0.1 にて *de novo* assemble を行った結果、全 contig 本数は、286 本であり、最長 contig 長は 5,305,615 bp、1kb 以上の contig

長は、25 本存在した。最長 contig 長は、染色体配列であった。しかしながら、XbaI を用いた PFGE の制限断片のパターンと一致せず、ミスアセンブルをしている事が示唆された。その為、最もミスアセンブルが生じ易い事が示唆される  $\lambda$  prophage の箇所 contig を分断し、XbaI 制限酵素地図に沿って contig を繋げ、super contig を作製した。得られた super contig と O111 11128 株の完全長染色体配列と比較した結果、synteny は一致した (図 1)。platanus を用いた *de novo assemble* では 4 箇所の  $\lambda$  prophage の箇所でミスアセンブルをしていた事が明らかとなった。現在、配列が未確定な箇所は 10 箇所のみであり、この箇所の gap close を行う事で本菌の染色体配列の完全長配列が取得出来る。

## 2. O111 分離菌株の plasmid 配列解析

配列解読の結果、110512 株には 7 つの plasmid が存在する事が明らかとなった (図 2)。それら plasmid の概要は、以下の通りである。

### 1) pEBS512-01

約 119 kb、IncP、ウシ由来 *E. coli* O111 aEPEC の pO111-CRL-115 およびヒト下痢由来 *E. coli* O26:H- EHEC の p026-CRL-125 に高い相同性を持つ multiple antibiotic resistance and virulence plasmid (図 3)。

### 2) pEBS512-02

77,148 bp、IncFII、*E. coli* strain 11128 pO111\_3 とほぼ同様の virulence plasmid。

### 3) pEBS512-03

46,350 bp、IncX family に属する *S. enterica* Enteritidis strain Sal550 pSE34 に類似した plasmid。

### 4) pEBS512-04

6,795 bp、Inc type は未検出、*Shigella sonnei* pDTP1 と高い相同性を持つ colicin-E5 plasmid (図 4)。

### 5) pEBS512-05

6,674 bp、Inc type は未検出、*E. coli* strain 11128 pO111\_5 とほぼ同様の plasmid。

### 6) pEBS512-06

5,432 bp、Inc type は未検出、*S. enterica* Typhimurium pSe-Kan および *S. enterica* Enteritidis pC に相同性をもち、上記 2 つの plasmid がキメラ様に組み換わった plasmid。

### 7) pEBS512-07

1,546 bp、Inc type は未検出、*E. coli* strain WS8 plasmid pJD8 と 100% 一致の cryptic

plasmid。

## 3. 病原性 plasmid の解析

pEBS512-01 は、ウシ由来 *E. coli* O111 aEPEC の pO111-CRL-115 およびヒト下痢由来 *E. coli* O26:H- EHEC の p026-CRL-125 に高い相同性を持ち、Inc type は IncP であった。一方、pEBS512-02 は *E. coli* O111 11128 株の pO111\_3 と高い相同性を示し、Inc type は IncFII であると推測された。pEBS512-01 および pEBS512-02 に、EpeA および EspC がそれぞれ存在した。EpeA および EspC は、Type V secretion system (T5SS) 型の protease であり、病原性関連因子として報告されている。EpeA および EspC 全体の相同性は 56% であるが、C 末側 280 残基 (autotransporter beta-domain) は 100% 一致し、N 末側には、両者共 peptidase S6, IgA endopeptidase domain を有していた。

## 4. 110512 株の表現形質試験との比較

pEBS512-01 には、病原性関連因子以外にテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tetAR*)、アンピシリン耐性遺伝子 (*bla<sup>TEM-1</sup>*) およびストレプトマイシン耐性遺伝子 (*strAB*) が存在した。富山県衛生研究所・細菌部 綿引らのこれまでの薬剤感受性試験の結果でも、110512 株はテトラシクリン (TC)、アンピシリン (ABPC) およびストレプトマイシン (SM) 耐性であると報告されており、その結果と薬剤耐性遺伝子プロファイルが一致した (図 3)。また、pEBS512-04 は、colicin-E5 plasmid であり、*Shigella sonnei* pDPT1 と高い相同性を持っていた。綿引らが行ったコリシン活性試験では、本菌のコリシン活性は陽性であり、colicin-E5 による事が強く示唆された (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。しかしながら、mate-pair DNA library (insert size 8-10kb) を作製し、*de novo assemble* を行う事で、染色体の contig 長が飛躍的に向上し、1 本の super contig を作製する事が出来た。本菌の染色体配列の gap 箇所は、残り 10 箇所となり、今後は long PCR による gap 箇所の増幅およびサンガーシーケンスが必要となる。

本菌の plasmid の配列および保有する種類が判明した。これにより、本菌が病原性関連因子を 2 つの plasmid 上に保有する事が明らかとなった。T5SS である EpeA および EspC は、本事例以外の大腸菌から報告もされている。しかしながら、両方を同時に持

つ大腸菌はこれまでに報告は無い。分泌型の protease 活性を持つと推測される 2 つの T5SS が、本菌の重要な特徴であると推測されるが、重症化に直接繋がるかは定かではない。

EHEC O157 においても TC, SM および ABPC に対する耐性化が報告されており、近年の EHEC O157 の薬剤耐性は、多様化の傾向に有る。ゲノム解析の結果から、本事例の O111 分離菌株にも薬剤耐性遺伝子が plasmid 上に存在しており、O157 のみならず、EHEC 全般で薬剤耐性の多様化が生じている事が示唆された。

本事で分離された O111 分離菌株には、コリシン活性が認められ、colicin-E5 による事が示唆された。これまで報告された大腸菌の colicin を含む完全長 plasmid 配列には、colicin-E5 を有する plasmid の報告が無く、本事例分離菌株の colicin-E5 plasmid は、*Shigella sonnei* の pDTP1 に高い相同性を示した。よって、colicin-E5 plasmid は、本事例分離株大腸菌の 1 つの特徴であると思われる。一方、本事例の O157 分離菌株ではコリシン活性が認められておらず、O157 では colicin-E5 が存在しないと予測され、本事例の O157 分離菌株のゲノム解析を行う必要がある。仮に、本事例 O157 に colicin-E5 plasmid が認められない場合は、O111 のコリシン活性により殺菌される可能性が考えられ、本事例において、O111 の分離頻度が O157 よりも高かった事に関与するかもしれない。

## 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。特に、plasmid の概要が判明した事で、plasmid から見た本菌の特徴が明らかとなった。今後は、染色体配列上の本菌の特徴を明らかにし、更に、国内の EHEC O111 分離株との比較ゲノム解析を行い、本事例分離菌株が何故重症化し易かったかを解析していく。

## 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  
なし

## 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

## Gapは、10箇所

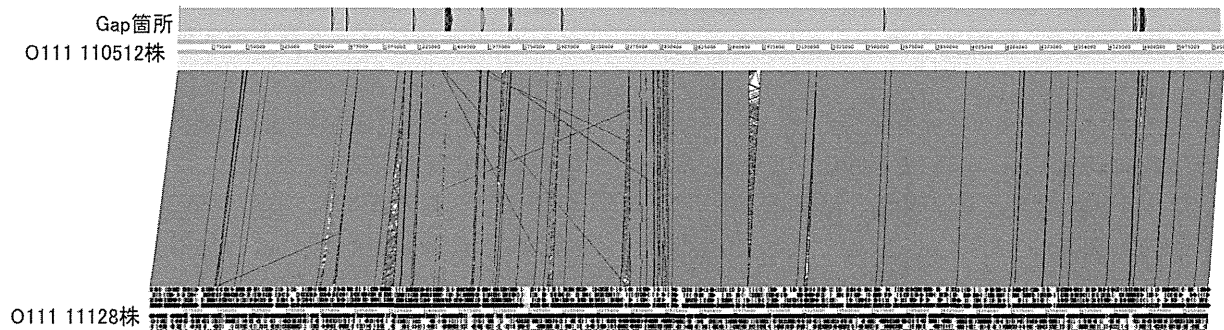


図1. O111 110512株およびO111 11128株の染色体配列の比較解析

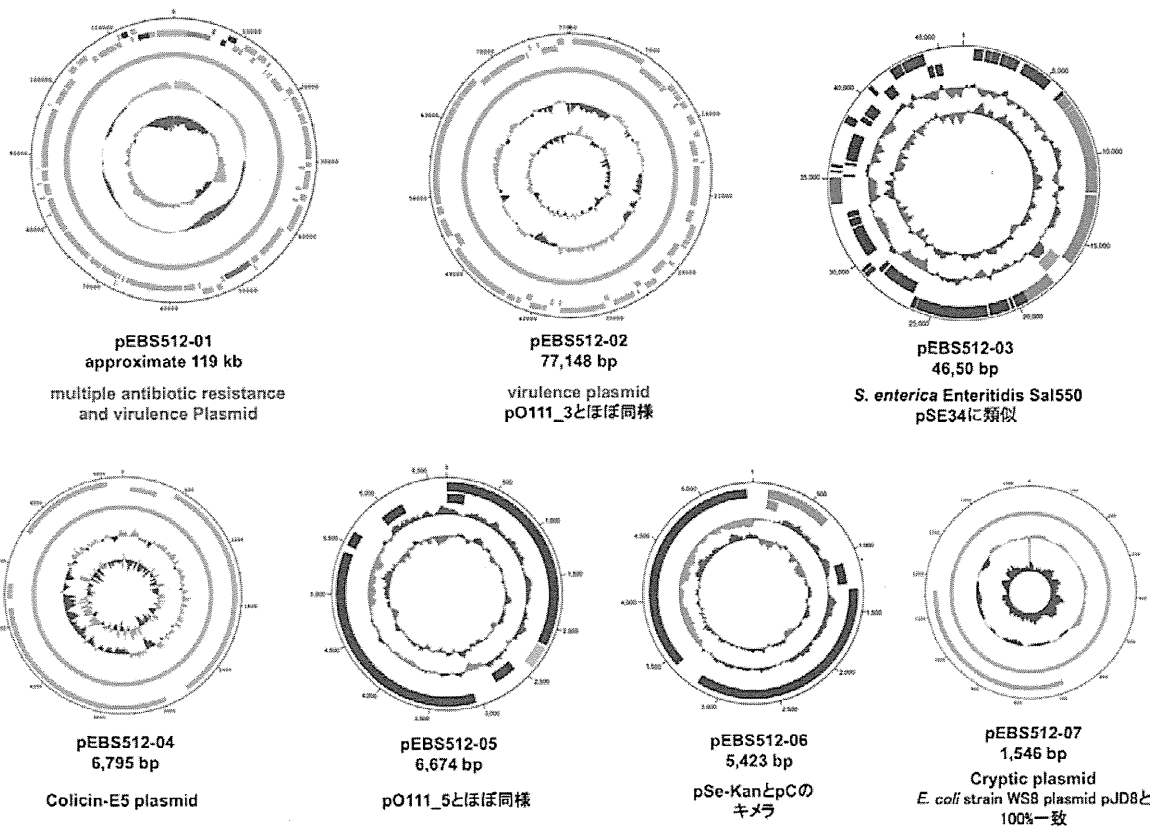


図2. O111 110512株の全plasmidの概要

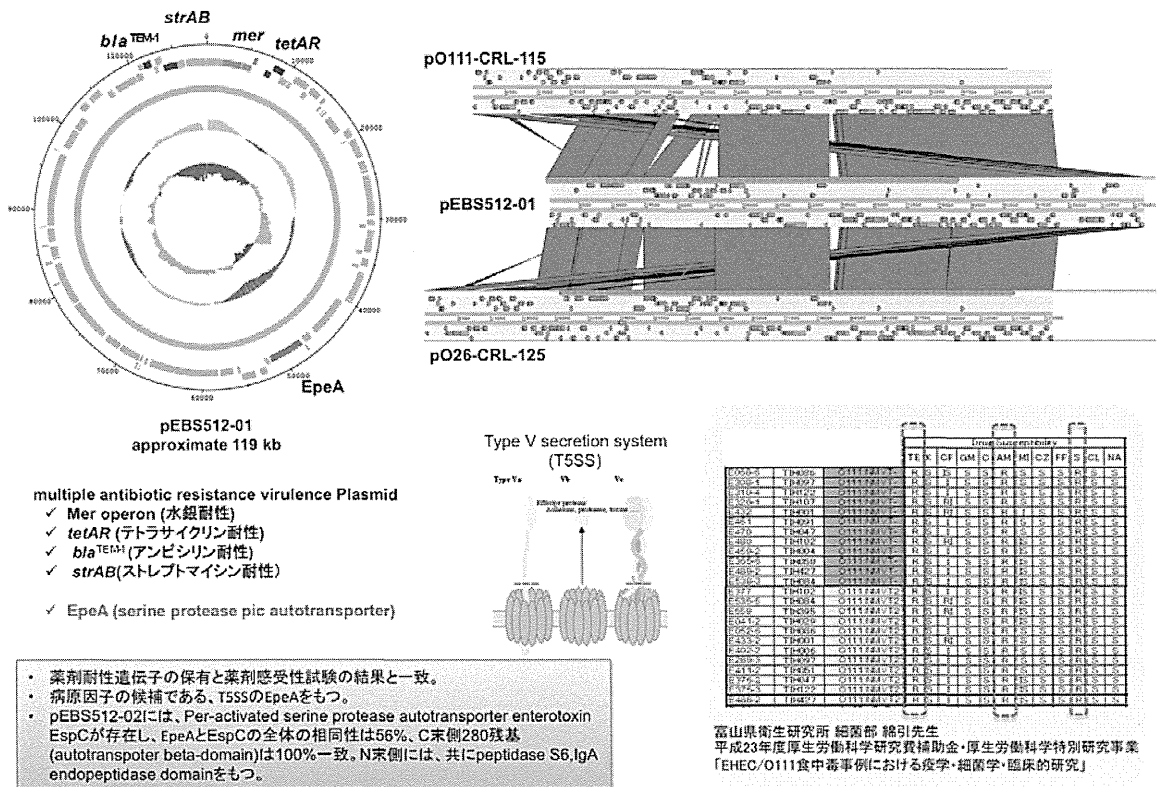
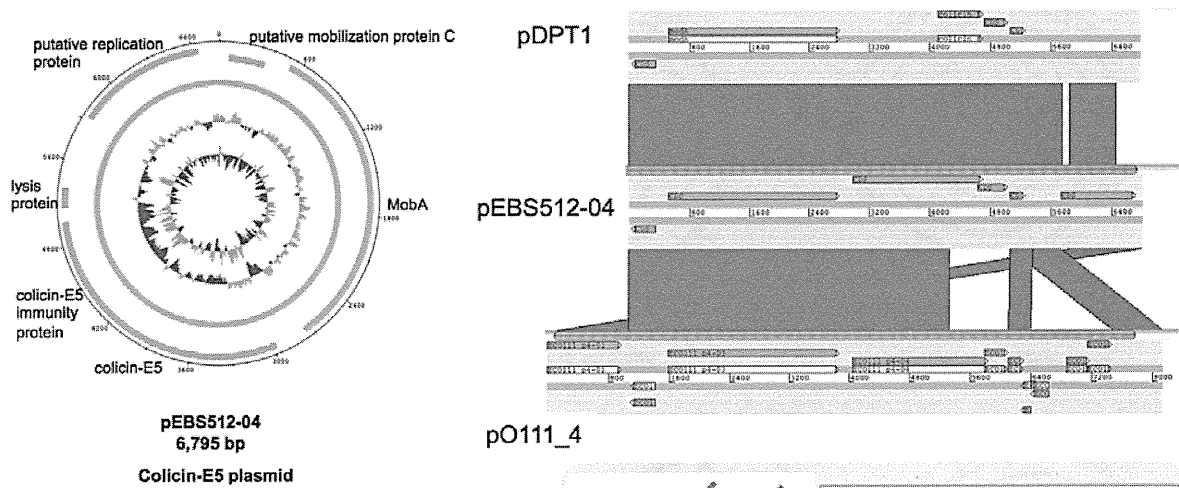


図3. 病原性及び薬剤耐性plasmid pEBS512-01の解析



- ✓ *Shigella sonnei* pDPT1と高い相同性を持つ、Colicin-E5 plasmid。
- ✓ 本事例分離菌株では、C600株へのcolicin活性が認められており、pEBS512-04によるものと示唆される。
- ✓ 現在登録されている大腸菌由来の配列中に、完全な形でcolicin E5、immunity protein、lysis proteinを有するplasmidは無し。

patching test strain

1	2	3	4
5	6	7	8

Target strain: C600

1. *E. coli* C600
2. *E. coli* O111VT2 (本事例分離株)
3. *E. coli* O111VT- (本事例分離株)
4. *E. coli* O111VT1,2 (富山県他事例分離株)
5. *E. coli* O111VT1,2 (豊後県他事例分離株)
6. *E. coli* O157VT1,2 (本事例分離株)
7. *E. coli* O157VT1 (本事例分離株)
8. *E. coli* O157VT2 (本事例分離株)

富山県衛生研究所 細菌部 綿引先生  
平成23年度厚生労働科学研究費補助金・厚生労働科学特別研究事業  
「EHEC/O111食中毒事例における疫学・細菌学・臨床的研究」

図4. colicin-E5 plasmid pEBS512-04の解析

Non-0157 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)

研究要旨.

Non-0157 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）、細胞周期の停止、一過性の蛋白質合成阻害を引き起こすこと、また、LPS 誘導性のマクロファージからの NO 産生を阻害すること等を明らかにしてきた。本研究では、SubAB がどのように宿主細胞に取り込まれているか解析した。SubAB は lipid-raft, actin 依存性に細胞内に取り込まれた。また、取り込まれた SubAB はコレステロールを含んだ膜で細胞内を輸送され小胞体に移行していることが明らかとなった。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) が産生する新たな毒素 Subtilase cytotoxin (SubAB) は、小胞体中に存在するシャペロン蛋白質 BiP を分解し、その活性を阻害することによって ER にストレスを起こし、細胞障害性を誘導すると考えられる。しかし、SubAB がどのように細胞内に取り込まれるのか、阻害剤を使用した報告はあるが、詳細な機構は不明である。そこで、今回、SubAB の宿主細胞への取り込みに関与する蛋白質、脂質を阻害する阻害剤、siRNA によるノックダウンにより、SubAB の取り込み機構を明らかにした。

B. 研究方法

SubAB の精製と蛍光標識

O29 STEC のよりクローニングした SubAB を精製したのち、Alexa555 蛍光標識し実験に用いた。

免疫蛍光染色

カバーガラス状で培養した HeLa 細胞を

種々の阻害剤、siRNA を遺伝子導入した後、蛍光標識した SubAB を添加し、37°C で 1 時間インキュベーションした。4%PFA で固定、ブロッッキングを行った。次いで、SubAB が小胞体に局在するか確認するため、抗 BiP 抗体を用いて、共染色した。退色防止剤入りのマウント剤で固定し、共焦点顕微鏡をもちい観察した。

遺伝子導入

クラスリン、カベオリン、ダイナミン、Pak1 に対する siRNA を HeLa 細胞に RNAiMax transfection reagent を用いて導入し、48 時間後、wild type SubAB あるいは、活性中心に変異を入れた不活化 mutant SubAB を添加し、37°C で 1 時間インキュベーションした。SDS-PAGE 後、BiP の切断をウエスタンブロットングにて検出した。

コレステロール抽出

蛍光標識した SubAB を HeLa 細胞に添加後、37°C で 30~45 分インキュベーションした。細胞を氷冷し、冷却した 1% TritonX-100 を含む緩衝溶液で 20 分処理した。洗浄後、退色防止剤入りのマウント剤で固定し、共焦点顕



微鏡を用い観察した。

### C. 研究結果

SubAB の細胞内への取り込み、BiP の接岸は、クラスリン阻害剤、ダイナミン阻害剤処理では抑制されなかった。同様に、クラスリン、カベオリン、ダイナミンの siRNA による発現抑制細胞においても SubAB の活性を阻害しなかった。

一方、lipid raft の阻害剤である mβCD, filipin 処理では SubAB の細胞内への取り込みが抑制され、BiP の切断も認められなかった。

プロトンポンプ阻害剤である Bafilomycin A1 を前処理した細胞では、SubAB による BiP の切断が抑制された。

SubAB 処理した細胞を固定する直前に蛍光標識したデキストランを添加すると、mutant SubAB を加えた場合と比べ、顕著にデキストランの細胞内への取り込みが増加した。

細胞内カルシウムキレーターである BAPTA-AM を処理した場合、SubAB の細胞内への取り込み、BiP の切断が抑制された。細胞外カルシウムキレーターである EGTA を処理した場合は、阻害活性は認められなかった。また、イオノフォアにより細胞内カルシウムを増加させた場合、SubAB による BiP の切断は亢進した。

アクチンの SubAB の取り込みを調べるため、cytochalasin D で処理した場合、SubAB の細胞内への取り込み、BiP の切断が抑制された。

取り込まれた SubAB を取り囲む輸送膜にコレステロールが含まれているか確認するため、TritonX-100 による抽出を行い共焦点顕微鏡により観察した。トランスフェリンを取り込ませた場合には、本処理により細胞内のトランスフェリンが消失したが、SubAB は消失しなかった。

現在、本結果をまとめ投稿中である。

### D. 考察と結論

今回の結果から、SubAB は lipid raft,

actin 依存性に細胞に取り込まれ、クラスリン、カベオリン、ダイナミン非依存性であることが判った。更に、細胞内侵入にはカルシウムが必須であること、また取り込まれた SubAB を取り囲む輸送膜にはコレステロールが含まれていることが明らかとなった。更に、活性を示すためにはベシクルの酸性化が必要であると推察された。

本取り込み機構が、Shiga toxin の取り込み機構とどのような関係にあるのか今後明らかにする。

### G. 研究発表

#### 1. 学会発表

##### 1)

「Lipid-raft dependent macropinocytosis is the major pathway for endocytosis of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* SubAB into HeLa cells.」

第87回日本細菌学会総会2014. 3. 26-28.

永澤明佳、八尋錦之助、小倉康平、津木博康、野田 公俊

2) 「Inhibition of autophagy by SubAB is regulated by PERK-dependent pathway in HeLa cells」

第87回日本細菌学会総会2014. 3. 26-28.

八尋錦之助、野田 公俊

### 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）

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した。0157:H7 血清型で高病原性とされている Clade 8 に属する株と 0111 血清型の富山株を 5-6 週齢の幼若無菌 BALBc/A マウスへ経口接種した (n=6)。その結果、0157:H7 血清型 Clade 8 株を接種したマウスは 1 週間の観察期間中、接種後 5 日で全例死亡し、富山株は接種後 1 日に 1 匹死亡したのみであった。盲腸内での生菌数には有意差を認めなかったが、0157:H7 血清型 Clade 8 株においては、盲腸内での Stx-2 量が高い傾向にあった。一方、0111 血清型富山株によるマウス致死率は低く、毒素産生量の異なる 0111 血清型菌株を用いた比較検討と腸管内での毒素産生誘導処置が無菌マウスを用いた病原性の評価に今後必要と考えられた。

#### 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について、無菌マウスに経口感染させた場合の致死率および盲腸内生菌数、盲腸内毒素量を比較した。

#### B. 研究方法

5-6 週齢の無菌 BALBc/A マウスを 6 匹ずつの 2 群にわけ、それぞれ、0157:H7 血清型 Clade 8 株と 0111 血清型富山株を  $1.0 \times 10^8 - 10^9$  cfu をゾンデにて経口投与した。接種後 7 日間観察し、生存率と盲腸内での生残菌数と毒素量を比較した。また、富山株を含む 8 株の 0111 血清型腸管出血性大腸菌

（集団食中毒事例分離株と無症状保菌者由来株を含む）について、*in vitro* での Stx-2 産生量とマイトマイシン C に対する反応性を Stx-2 定量にて比較した。Stx-2 量の定量はデンカ生研の VTEC-RPLA を用いて行った。LB 培地で OD<sub>600</sub>=0.5 まで培養し、その後、マイトマイシン C を 0.5 mg/ml の終濃度になるように添加し、添加後 3 および 6 時間培養液を超音波処理し、その遠心上清中の Stx-2 量を定量した。また、得られた培養上清を用いて Vero 細胞を用いた MTT assay を行い、細胞毒性と毒素含量との相関性を調べる条件検討を行った。

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

2 菌株の接種 1 週間後における死亡率 (n=6) は 0157:H7 血清型 Clade 8 株と 0111 血清型富山株でそれぞれ 100 および 17% であった。盲腸内容物の菌数はそれぞれ平均 8.42 および 8.54 log<sub>10</sub> cfu/g であり、差を認めなかった。盲腸内容物を 0.1 g/ml にな

るように生理食塩水に懸濁し、その遠心上清中のStx-2 titerを測定すると0157:H7血清型Clade 8株と0111血清型富山株でそれぞれ  $48.0 \pm 17.9$  および  $26.7 \pm 8.3$  であり、有意な差を認めなかったが、Clade 8株で高い傾向にあった。次に、0111血清株間での病原性の差を無菌マウスでの感染実験で評価するため、評価対象として選択した富山株を含む9株のin vitroでのStx-2産生量を比較したところ、菌株間で差が認められ、マイトマイシンC処理に対する反応性も菌株間で差が認められた。このことから、無菌マウスへの菌接種後のマイトマイシンC投与による毒素産生誘導が0111血清株間での病原性の差を評価する上での一つの手段と考えられた。

#### 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 血清型富山株投与によるマウス致死率には大きな差が認められたが、盲腸内生菌数には差がなく、盲腸内 Stx-2 量については Clade 8 株で高い傾向にあったが、有意な差ではなかった。0157:H7 血清型 Clade 8 株においては、血中への Stx の移行性などに関わる他の因子がマウスへの病原性に関与している可能性が示唆されたが、腸管内での毒素産生量がマウス致死率に影響する一つの要因であると考えられる。0111 血清型富山株によるマウス致死率は低く、毒素産生量の異なる 0111 血清型菌株を用いた比較検討が今後必要と考えられた。0111 血清型によるマウス致死率は低く、菌投与後にマイトマイシン C を投与するなど毒素産生誘導を行う必要性が示唆された。

#### E. 結論

腸管出血性大腸菌感染モデルマウスにおけるマウス致死率は腸管で産生される Stx-2 量によって決定されると報告されている。今回、0157:H7 血清型 Clade 8 株と

0111 血清型富山株でのマウス致死率には大きな差が認められ、盲腸内に残存数する Stx-2 は前者で高い傾向が認められた。現在、盲腸内における qPCR による *stx-2* 遺伝子の発現量の比較を行っている。今後は当初の目的である非 0157 血清型腸管出血性大腸菌のマウス致死率を富山株以外の 0111 血清型 8 株を含めて検討する予定である。これら 9 対象株の in vitro での Stx-2 産生量やマイトマイシン C に対する反応性は菌株間で異なっており、これらの差が in vivo においてどのようにマウスに対する病原性に差をもたらすのかについて調べていく必要がある。特に、腸管内での Stx-2 産生を促すため、菌接種後にマイトマイシン C を腹腔内投与するモデルにおいて 0111 血清型菌株間でのマウス致死率および盲腸内毒素産生量を比較する予定である。また、0157 血清型 Clade 8 株と 0111 血清型富山株によるマウス致死率の差に Stx-2 の血中への移行性の関与の有無を調べるため、感染マウス腸管の透過性についても検討したい。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 今大路治之、堀内功典、桑原知己. 腸管内常在菌が *Clostridium difficile* の病原性に与える影響. 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 83 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、大阪、2013 年 11 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 なし。

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

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理事長・総長
分担研究者：齋藤昭彦	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	東京都立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臨床試験推進室医員
Julian Tang	国立成育医療研究センター研究所研究員
査読委員：服部元史	東京女子医科大学腎臓総合医療センター腎臓小児科教授
本田雅敬	東京都立小児総合医療センター副院長
石倉健司	東京都立小児総合医療センター腎臓内科医長
小林信秋	認定NPO法人難病のこども支援全国ネットワーク代表

研究要旨

Evidence Based Medicine に基づく溶血性尿毒症症候群(HUS)の診断・治療ガイドラインを作成し、日本小児科学会、日本小児腎臓病学会、日本腎臓学会などの関係学会の home page に掲載した。さらに、今年度中に本ガイドラインの英語版を作成したので、次年度に世界に向けて発信する予定である。本ガイドラインは Minds のガイドライン作成基準に則った溶血性尿毒症症候群の診断・治療に関するわが国発のガイドラインである。さらに、今年度中に HUS による死亡患者調査表を作成し、倫理委員会の承認を得た。次年度に調査を行う予定である。

A. 研究目的

以下の3点を目的とする。

- 1) Evidence Based Medicine (EBM) に基づく溶血性尿毒症症候群 (HUS) の診断・治療ガイドラインを作成する。
- 2) 日本小児科学会、日本小児腎臓病学会、日本腎臓学会などの関係学会の home

page に掲載し、関係者に普及する。

- 3) 英語版を作成し、世界に発信する。

さらに、平成 26 年度に実子予定の HUS による死亡患者調査表（案）を作成し、倫理委員会の承認を得た。

B. 研究方法