

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Isobe J, Shima T, Kanatani JI, Kimata K, Shimizu M, Kobayashi N, Tanaka T, Iyoda S, Ohnishi M, Sata T, Watahiki M.	Serodiagnosis using microagglutination assay during the food-poisoning outbreak in Japan caused by consumption of raw beef contaminated with enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O111 and O157.	J. Clin. Microbiol.			In press
Kobayashi, N., Lee, K., Yamazaki, A., Saito, S., Furukawa, I., Kono, T., Maeda, E., Isobe, J., Sugita-Konishi, Y. and Hara-Kudo, Y.	Virulence gene profiles and population genetic analysis for exploration of pathogenic serogroups of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> .	J. Clin. Microbiol.	51	4022-4028	2013
Hasegawa, A., Hara-Kudo, Y., Ogata, K., Saito, S., Sugita-Konishi, Y. and Kumagai, S.	Differences in the stress tolerances of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> strains due to their source and harboring of virulence genes..	J. Food Prot.	76	1456-1462	2013
Jones, J.L., Benner, R.A., DePaola, A. and Hara-Kudo, Y.	<i>Vibrio</i> densities in the intestinal contents of finfish from coastal Alabama.	Agr. Food Anal. Bacteriol.	3	186-194	2013
小林直樹、工藤由起子	腸管出血性大腸菌の分子生物学的研究と食品での検査法の発展	日本食品微生物学会雑誌	30	147-155	2013

IV. 若手研究者育成活用事業成果

腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) はヒトに下痢症状を引き起こし、時として血便や溶血性尿毒症症候群 (HUS) などの重篤な症状を引き起こす。また、患者を死に至らしめることもあるなど、病原性が強いことが知られている。食品汚染の主要原因微生物であり、毎年 2,000 人前後の EHEC 感染症患者が報告される。EHEC の主要病原因子は志賀毒素 (STX またはベロ毒素、VT) であり、すべての株が STX 遺伝子 (*stx*) を保有する。しかし、血清群間または株間で発症率の高さや臨床症状の重さに違いが見られ、STX 以外にも EHEC の病原性への関与する因子が多数示されている。EHEC の病原性発揮には腸管膜への定着が必要であり、付着因子や III 型分泌装置が重要な役割を果たすことが知られている。多くの EHEC は腸管上皮細胞への定着に必要な遺伝子群を含む LEE 領域 (Locus of enterocyte effacement) を保有する。LEE 領域には付着因子であるインチミン (*eae*)、インチミン受容体である *tir*、III 型分泌装置の構成要素である *esp* 群などがコードされている。また、LEE を保有しない EHEC についても、*saa* や *iha* などの定着に必要な因子を保有し、これらの因子による腸管膜への定着が病原性に関わるとされている。他にもエンテロヘモリシン (*ehxA*) などの毒素および酵素が病原因子として報告されている。これらの因子をコードする遺伝子の多くは、病原性プラスミドなどの外来性ゲノム領域にコードされている。EHEC の病原性に関与する因子は数多く示唆されているが、同じ病原因子を保有する EHEC が重篤な症状を示す患者と健常者の両方から検出され、病原性を決定する因子については不明な点が多い。本研究では同一血清群でありながら臨床症状が異なる株が存在することに着目し、同一血清群に属する複数の株間で比較を行うことで、EHEC の病原性強度に関わる遺伝学的要因を明らかにすることを目的とした。STX 産生量や細胞接着性などの病原性の違いを比較するとともに、病原性遺伝子の保有パターンなどの遺伝型の比較を行い、病原性強度の差を生み出す要因について検討を行った。

血清群 O103 に属する臨床症状のはっきりした株を集め、有症者由来株 8 株 (HUS 患者由来 1 株、血便患者由来 5 株を含む) および無症状者由来株 7 株、合計 15 株を供試した。まず、臨床症状の異なる株間での病原性の違いについて検討を行った。供試した 15 株の内 14 株は *stx2* を保有せず、*stx1* のみを保有する株であった。そこで、EHEC の病原性の指標のひとつとして STX1 の産生量を株間で比較した。有症者由来株および無症状者由来株からそれぞれ 4 株、合計 8 株について、RPLA-VTEC (デンカ生研) を用いて産生量の測定を行った。その結果、株間で STX1 産生性に多様性が検出されたが、臨床症状との相関は見られなかった。次に、細胞への接着性強度を種間で比較した。ヒト結腸癌由来の細胞株である Caco2 細胞を用い、各株の細胞への接着性を検討した。その結果、最も細胞接着性が高かった株は HUS 発症患者由来で、最も接着性の弱かった株は高齢者 (79 歳) の無症状保菌者由来株であり、両者の間の接着性は約 30 倍異な

った。2番目に接着性の高かった株は無症状者由来株であり、最も接着性の弱かった株の約12.4倍の接着性を示した。その他の株は最も接着性の弱かった株の2.7~5.8倍の接着性を示し、株間で接着性強度に多様性が検出されたが、細胞接着性強度と臨床症状との間の明確な相関は検出されなかった。臨床症状には株の病原性だけではなく、感染者側の免疫力などが関与することが考えられ、両者の間の明確な関連を示すためには、より多くの株を用いて解析を行う必要があると考えられた。

臨床症状と株の病原性との関連を示すことはできなかったが、同一血清群においても、株によって病原性強度に違いが存在することが明らかとなった。そこで、株間の病原性強度の差を生み出す遺伝的要因について検討を行うため、供試菌株の遺伝型を調べた。まず、Multi-locus sequence typing (MLST) による解析を行った。MLSTのマーカースとして用いられる7つのハウスキーピング遺伝子 (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* および *recA*) の部分配列を決定し、UCC MLST Database (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) を参照してそれぞれの株のSequence Type (ST) を決定した。その結果、供試した15株は3グループに分類され、ST17が12株、ST343が2株、ST23が1株であった。MLSTによる分類と、STX1産生性およびCaco2細胞への接着性の間に関連は見られなかった。

次に、EHECの病原性への関与が示唆されている遺伝子の保有をPCRにより検出し、株間で比較を行った結果、すべての株が*stx1*, *espB*, *espD*, *eae*, *tir* および *ehxA* を保有し、*stx2a*, *stx2c*, *iha*, *saa*, *espP*, *katP*, *stcE* を一部の株が保有していた。病原遺伝子の保有パターンから供試菌株は9つのグループに分類されたが、病原遺伝子保有パターンとSTX1産生性およびCaco2細胞への接着性の間に関連は見られなかった。

stx1 および *eae* にはそれぞれ塩基配列の異なるサブタイプが知られており、サブタイプの違いが病原性の違いに関与している可能性が考えられた。そこで、これらの遺伝子の部分塩基配列を決定し、サブタイプの特定を行った。その結果、*stx1* は全ての株でサブタイプ *stx1a* であり、病原性との関連は見られなかった。*eae* は12株が *eae*_ε、2株が *eae*_θ、1株が *eae*_λ であった。*eae* サブタイプの違いはMLSTによる分類と一致していたが、病原性との関連は検出されなかった。

最後に、細胞接着性強度と病原遺伝子の発現との関連について検討した。今回供試した0103 EHECの株は全てLEEを保有しており、LEE上の遺伝子がこれらの株の細胞接着性に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、LEE上にコードされる遺伝子の中から*espB*, *espD*, *eae*, *tir* を株間で比較した。*eae* サブタイプが同一であり細胞接着性が7.4倍異なる株間で遺伝子発現を比較したところ、細胞接着性強度が低い株に比べ高い株は*espB*, *espD*, *eae*, *tir* がそれぞれ3.0、3.7、3.9、3.3倍高い発現を示し、これらの遺伝子発現が細胞の接着性強度と相関していた。供試菌株を増やして遺伝子発現の比較を行い細胞接着性強度とLEE上にコードされる遺伝子群の発現との関連を確認する必要があるが、これらの遺伝子発現の差が同一血清群内の株間の細胞接着強度の差に重要である可能性が考えられた。今後、これらの遺伝子発現に関わる要因を明らかにすることができれば、病原性の強い株を効率よく検出するためのマーカーとして使用可能であると考えられ、効率的なEHEC検出法への応用が期待される。

