

分離された HUS 発症患者由来 O111 EHEC 082426 株でも *stx2AB* の上流領域が高度に保存されていることが明らかとなった。国内分離株では HUS 発症患者由来の株数が少ないため、臨床情報が明記されている 2002～2012 年にデンマークで分離された non-O157 EHEC 株のゲノムデータ(n=96, BioSample ID: SAMEA2593950～SAMEA2593983)を用いて、Stx2 prophage の比較解析を同様に行った(図 8)。HUS 発症 non-O157 の 19 株中、8 株(O26: 3 株, O86: 1 株, O103: 3 株および O111: 1 株)においても、同様に *stx2AB* の上流領域が保存されていた。*stx2AB* を有する国内分離 O111 株およびデンマーク non-O157 EHEC 株の HUS 発症患者由来株(n=20)および未発症由来株(n=79)の *stx2AB* 上流領域上の ORF の保有率を Fisher の正確確率統計で検定を行った(図 9)。その結果、HUS 発症患者由来 *stx2* 陽性 non-O157 EHEC 株に於いて、*nin* region 内の *ninG* から general recombination region の recombinase *bet* の領域、antirepressor および adenine methylase の保有率が有意に高かった。

本事例に特徴的であり、他の O111 分離株およびその他の血清型大腸菌は存在しない ORF は認められなかった。

O111 110512 株には、7 つの plasmid が存在しているため、供試した国内分離株間のそれら plasmid の保有パターンの比較も行った(図 10)。pEBS512-01 (multiple antibiotic resistance virulence plasmid)、-02 (virulence plasmid)、-05 および pEBS512-06 の保有率は全体的に高い傾向を示していた。本事例に特徴的および重症患者由来特徴的 plasmid の存在は、確認されなかった。

6. 大腸菌系統群の特有変異箇所抽出

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(ファージ領域、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 を検出した。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 11)。

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 12)。

7. 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 13)。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 14)。

D. 考察

EHEC O111 110512 株のゲノム解析は、gap 箇所が λ prophage 内で 3 箇所存在するものの、本菌株のゲノム配列の全体像がほぼ確定できた。この菌株のゲノム情報と多数の分離菌株ゲノム情報を用いた俯瞰的な配列比較解析により、1) 患者の重症度、年代、地域でクラスターを形成する傾向は低い 2) Stx2 prophage 上の *stx2* 上流領域に存在する特徴的な ORF の存在が、HUS 発症患者由来 non-O157 EHEC 分離株で保有率が高いという重要な知見を得ることができた。

O157:H7 EHEC では、SNP 解析により clade へ細分化する手法が考案され、そのうち clade8 は高病原性を示す遺伝系統であると推測されている。国内分離 O111 の SNVs 系統解析では、HUS 発症患者由来分離株が同一の系統樹の枝に属する傾向はなく、O157:H7 clade8 の様な状況とは異なり、特徴的な高病原性を示す遺伝系統が存在する可能性は低いと推測される。今回供試した HUS 発症患者由来 O111 分離株の標本数も少ないため、今後大規模な HUS 発症患者由来 O111 株の解析が行えれば、特徴的な遺伝系統が存在するかの確認が可能になると期待される。

BLAST atlas 解析から、HUS 発症患者由来 *stx2* 陽性 non-O157 EHEC 株は、Stx2 prophage の *nin* region

内の *ninG* から general recombination region の recombinase *bet* の領域、antirepressor および adenine methylase の保有率が有意に高い事が示された。これら領域は、ファージの early left operon および early right operon に該当し、ファージの溶源化および溶菌化に大きく影響する。また、Stx2 は、Stx1 とは異なり、独自のプロモーターを有せず、ファージの early right operon に乗じて発現を行うことが報告されている。特徴的な early left operon および early right operon を持つファージに *stx2AB* が存在することで、毒素産生量が上昇し、高病原性株になっている事が予測される。更に、early left operon 側には、II 型制限酵素 BsuBI の制限修飾系の遺伝子および adenine methylase が存在し、これら遺伝子の保有率も HUS 発症患者由来 *stx2* 陽性 non-O157 EHEC 株で有意に高かった。一般的に、DNA メチル化は遺伝子転写の重要な調節機構である。高病原性 EHEC non-O157 では、DNA のメチル化が物理的に転写タンパク質の DNA への結合を妨げることで、Stx2 prophage 上の ORF の発現調節を行っていることも推測できる。

Stx2 prophage 上の特徴的な ORF が抽出できたものの、今回行った比較解析は、これら ORF の存在有無が明らかとなったのみであり、Stx2 prophage 上に存在しているかの確認までは至っていない。今後は、Stx2 prophage 領域の完全長配列を決定し、詳細な比較解析をする必要があると思われる。

本事例分離菌株の Stx2 prophage は、O103:H2 12009 株およびヨーロッパでアウトブレイクを起した EHEC O104:H4 2009EL-2071 株の Stx2 prophage に近縁の遺伝子構造を示していた。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いない。O157 clade8 は高病原性を示す遺伝系統であるが、O111 では高病原性を示す遺伝系統が存在する可能性が低いことから、O157 および non-O157 EHEC の重症化に関わる因子は、切り分けて考える必要もあるかもしれない。

O111 110512 株の plasmid 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。O111 分離菌株の大規模比較解析の結果、これら両方の T5SS

を有する plasmid を保有する O111 株は、本事例以外にも存在することが明らかとなった。分泌型の protease 活性を持つと推測される 2 つの T5SS が、本菌の病原性に寄与すると推測されるが、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。比較解析の結果から、本事例の O111 分離菌株以外の O111 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、O111 でも薬剤耐性株の出現が問題になっていると示唆された。

本事例で分離された 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 の報告が無いが、本事例以外の高病原性株ではない O111 分離株にも存在していた。したがって、colicin-E5 を含む plasmid の保有が高病原性に重要である可能性は低いと示唆される。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た。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。

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、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 月時点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

ゲノム生物学的解析、細菌学的解析および血清学的解析結果から、本事例は主に EHEC O111 により発生した集団食中毒事例であることが強く示唆される。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。今回抽出された、HUS 発症患者由来 non-O157 株の Stx2 prophage の特徴的な配列構造とそれに含まれる ORF が、高病原性に少なからず寄与していることが示唆され、今回の研究で重症化に関与する遺伝子の候補

が抽出できたと考えられる。今後、複数の HUS 発症由来株 Stx2 prophage 領域の完全長配列を明らかにし、高病原性に係る Stx2 phage の溶源・溶菌化および、*stx2AB* 遺伝子の転写にどのように影響を与えているか等の分子生物学的な解析を実施する必要があると思われる。

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メタゲノム解析法により、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った。

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

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- O111:H- VT-
TIH036	-	O157:H7 VT1 O157:H- VT12 O111:H- VT2
TIH039	-	O111:H- VT- O157:H7 VT12
TIH050	-	O111:H- VT-
TIH092	+	菌不検出

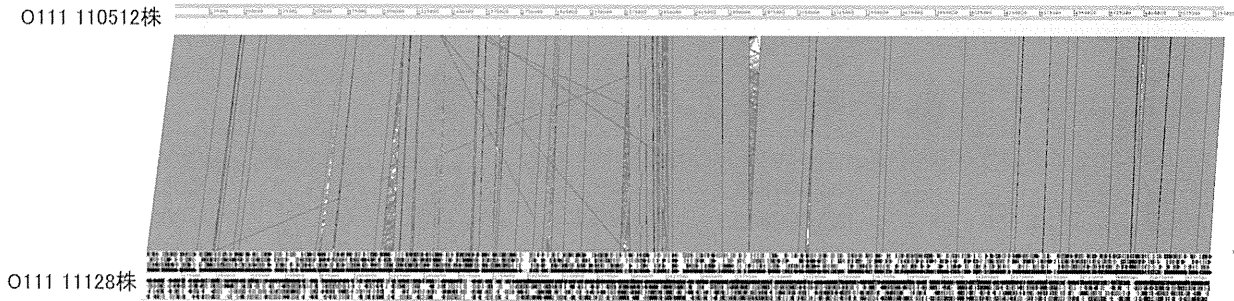
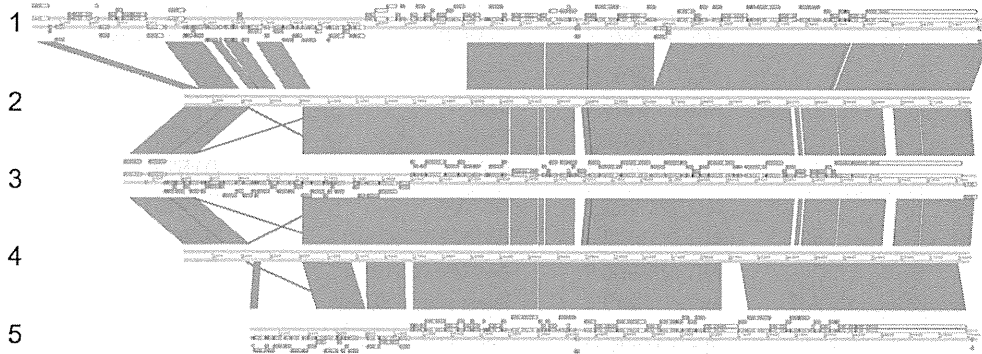


図1 O111 110512 株および 11128 株の染色体配列の比較解析



- 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2 Stx2 prophage の比較解析

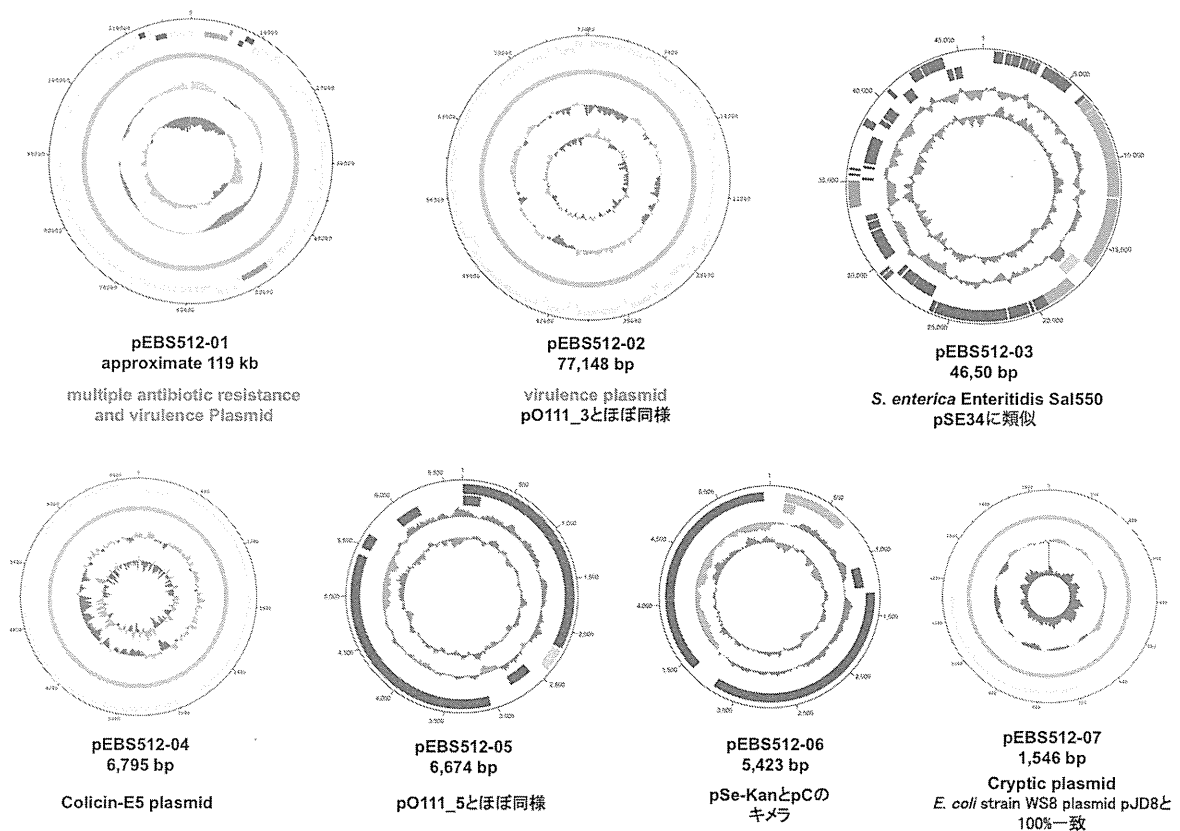
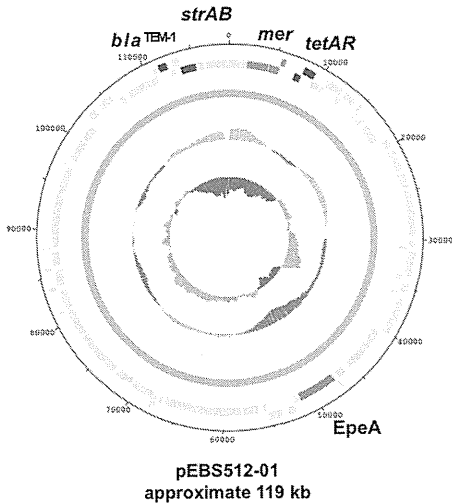


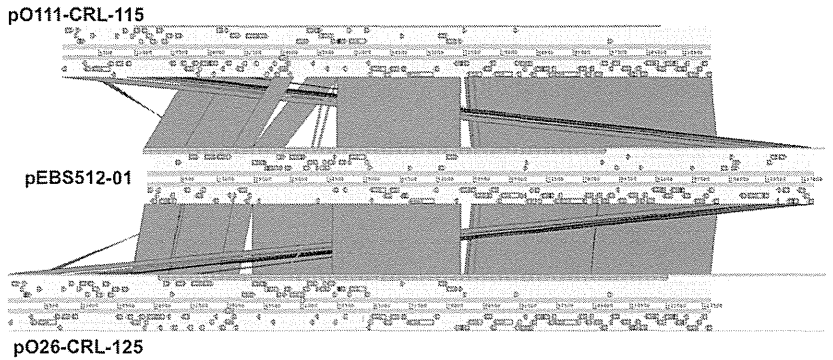
図3 O111 110512 株の全プラスミドの概要



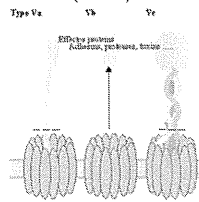
multiple antibiotic resistance virulence Plasmid

- ✓ Mer operon (水銀耐性)
- ✓ tetAR (テトラサイクリン耐性)
- ✓ bla^{TEM1} (アンピシリン耐性)
- ✓ strAB(ストレプトマイシン耐性)
- ✓ EpeA (serine protease pic autotransporter)

- 薬剤耐性遺伝子の保有と薬剤感受性試験の結果と一致。
- 病原因子の候補である、T5SSのEpeAをもつ。
- pEBS512-02には、Per-activated serine protease autotransporter enterotoxin EspCが存在し、EpeAとEspCの全体の相同性は56%、C末側280残基 (autotransporter beta-domain)は100%一致。N末側には、共にpeptidase S6,IgA endopeptidase domainをもつ。



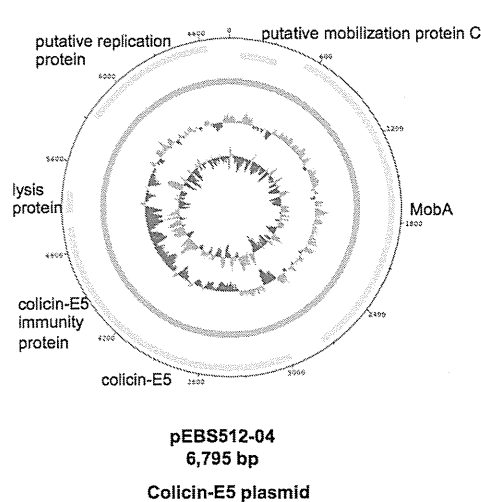
Type V secretion system (T5SS)



	Type	Accession	Urease Susceptibility											
			TE	K	OF	OM	C	AM	M	OZ	FF	S	OL	NA
E039-6	YH866	O111TNAV1	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
E208-1	YH867	O111TNAV1	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E310-4	YH127	O111TNAV1	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E300-1	YH107	O111TNAV1	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E432	YH801	O111TNAV1	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E241	YH821	O111TNAV1	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E470	YH847	O111TNAV1	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E260	YH102	O111TNAV1	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E45-2	YH804	O111TNAV1	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E25-8	YH850	O111TNAV1	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E488-2	YH427	O111TNAV1	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E335-5	YH404	O111TNAV1	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E377	YH102	O111TNAV1	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E35-5	YH864	O111TNAV1	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E659	YH395	O111TNAV1	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E247-2	YH828	O111TNAV1	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E052-8	YH866	O111TNAV1	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E435-2	YH801	O111TNAV1	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E400-2	YH806	O111TNAV1	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E288-5	YH867	O111TNAV1	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E411-2	YH851	O111TNAV1	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E275-2	YH447	O111TNAV1	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E272-2	YH122	O111TNAV1	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E352-2	YH427	O111TNAV1	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S

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」

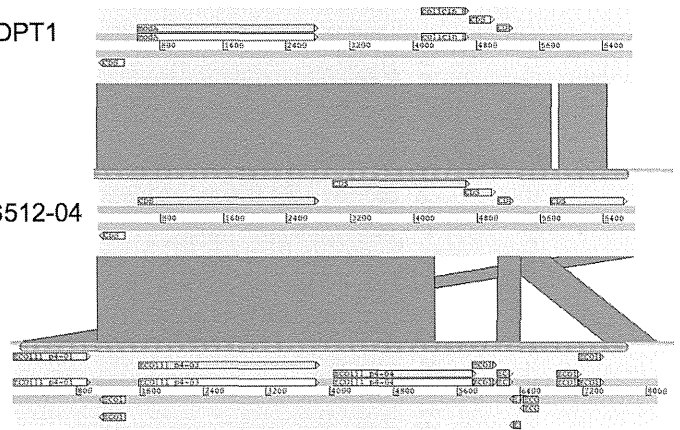
図4 病原性および薬剤耐性 plasmid pEBS512-01 の解析



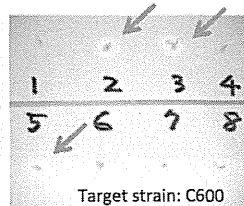
pDPT1

pEBS512-04

pO111_4



- ✓ *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.	<i>E. coli</i> C600
2.	<i>E. coli</i> O111VT2 (本事例分離株)
3.	<i>E. coli</i> O111VT- (本事例分離株)
4.	<i>E. coli</i> O111VT-1,2 (富山県他事例分離株)
5.	<i>E. coli</i> O111VT1,2 (愛媛県他事例分離株)
6.	<i>E. coli</i> O157VT1,2 (本事例分離株)
7.	<i>E. coli</i> O157VT1 (本事例分離株)
8.	<i>E. coli</i> 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5 colicin-E5 plasmid pEBS512-04 の解析

O111のcore genome上のSNV系統解析

O111 11128株をreferenceとし、全解読リードをmappingし、SNVを抽出。
RAxMLにて系統解析。

H抗原ごとでクラスターを形成。O111:H-は、更に4つのクラスターを形成
2011年富山・福井事例(赤ラベル)は、O111:H-の大きなクラスター内に存在。

患者の重症度、年代、地域でクラスターを形成する傾向は少ない。

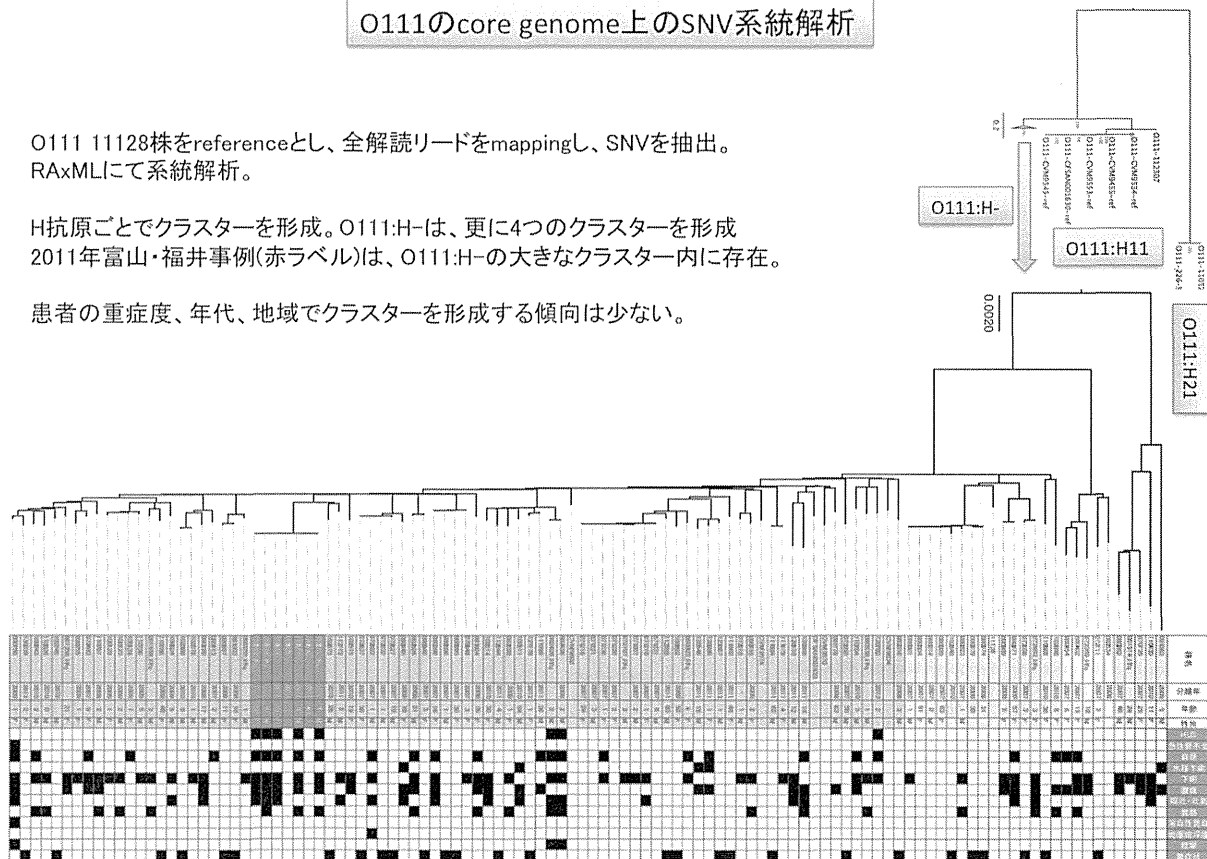


図6 O111 大腸菌 core genome 上 SNVs の系統解析

O111 BLAST atlas (アクセサリ遺伝子の解析)

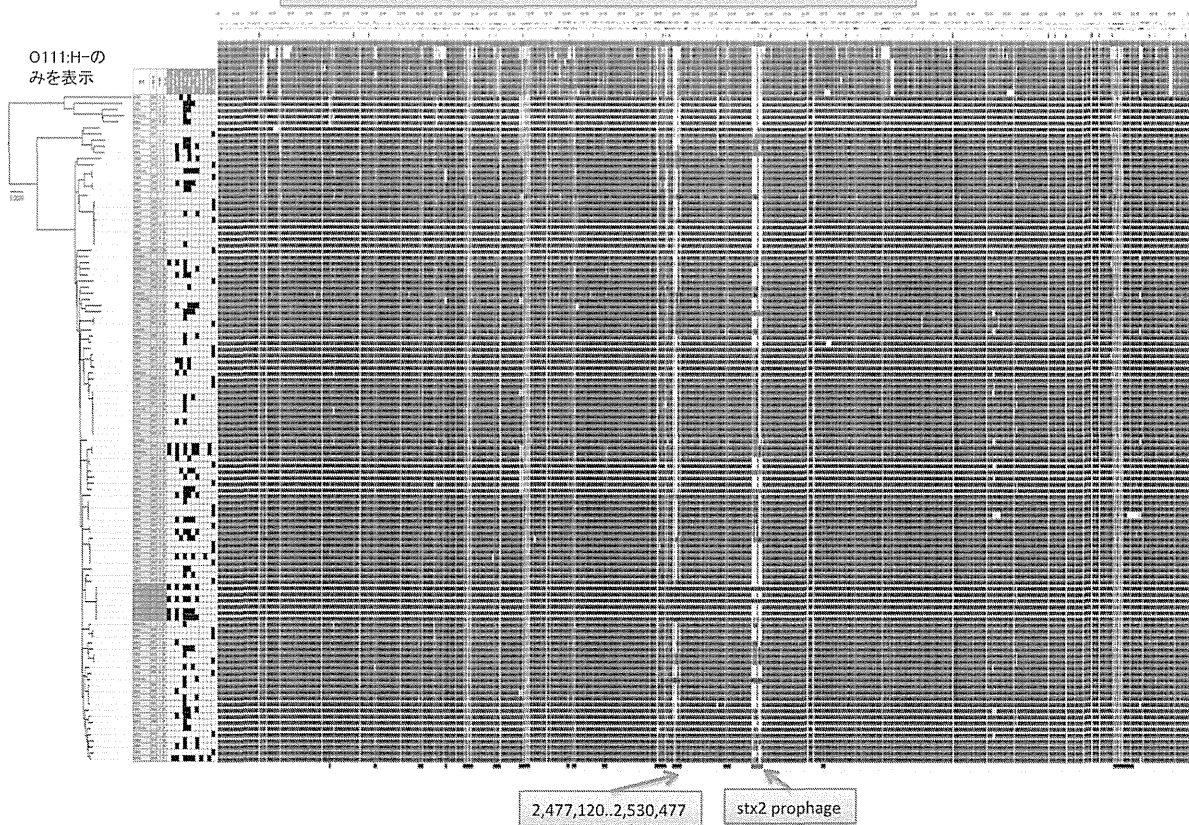
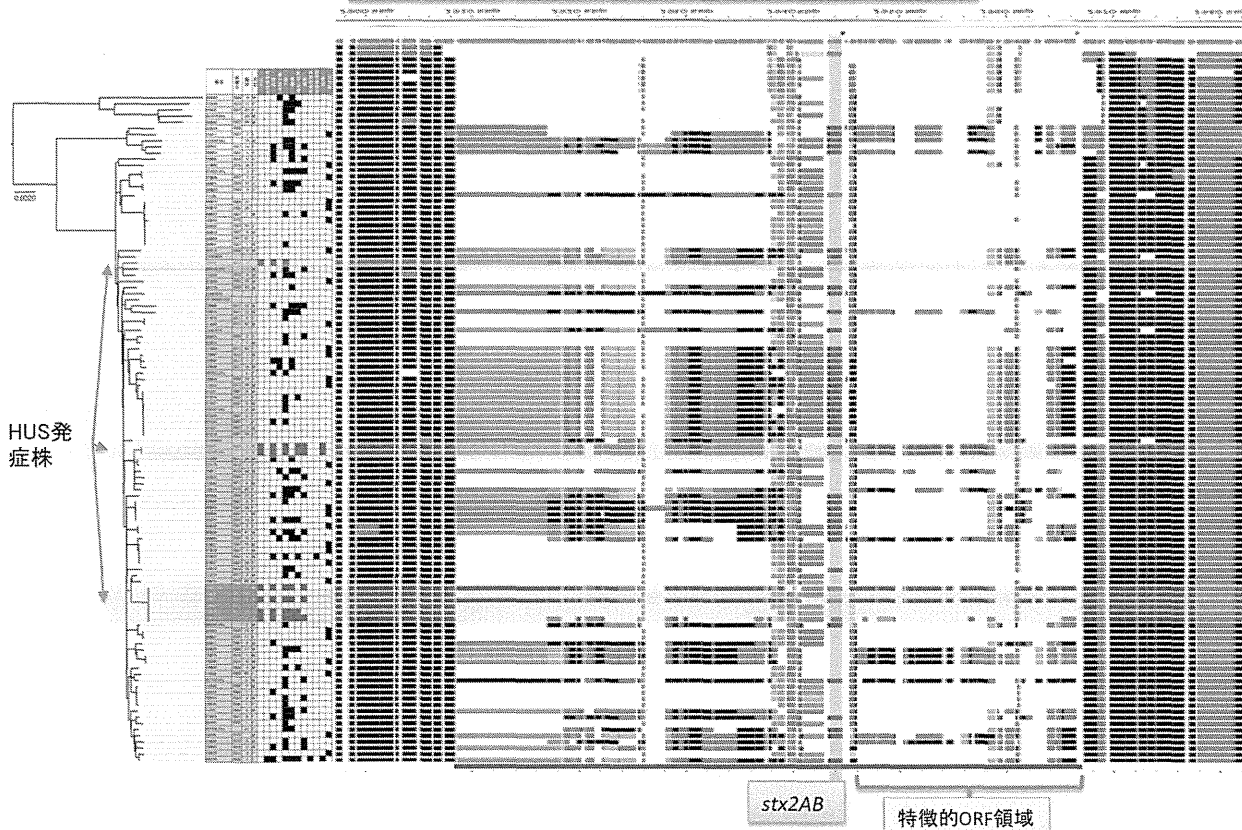


図7 O111 大腸菌 BLAST atlas 解析 (アクセサリ遺伝子解析)
O111 110512株の Stx2 prophage を含む2箇所 の prophage 領域上の ORF で保存性が低い。

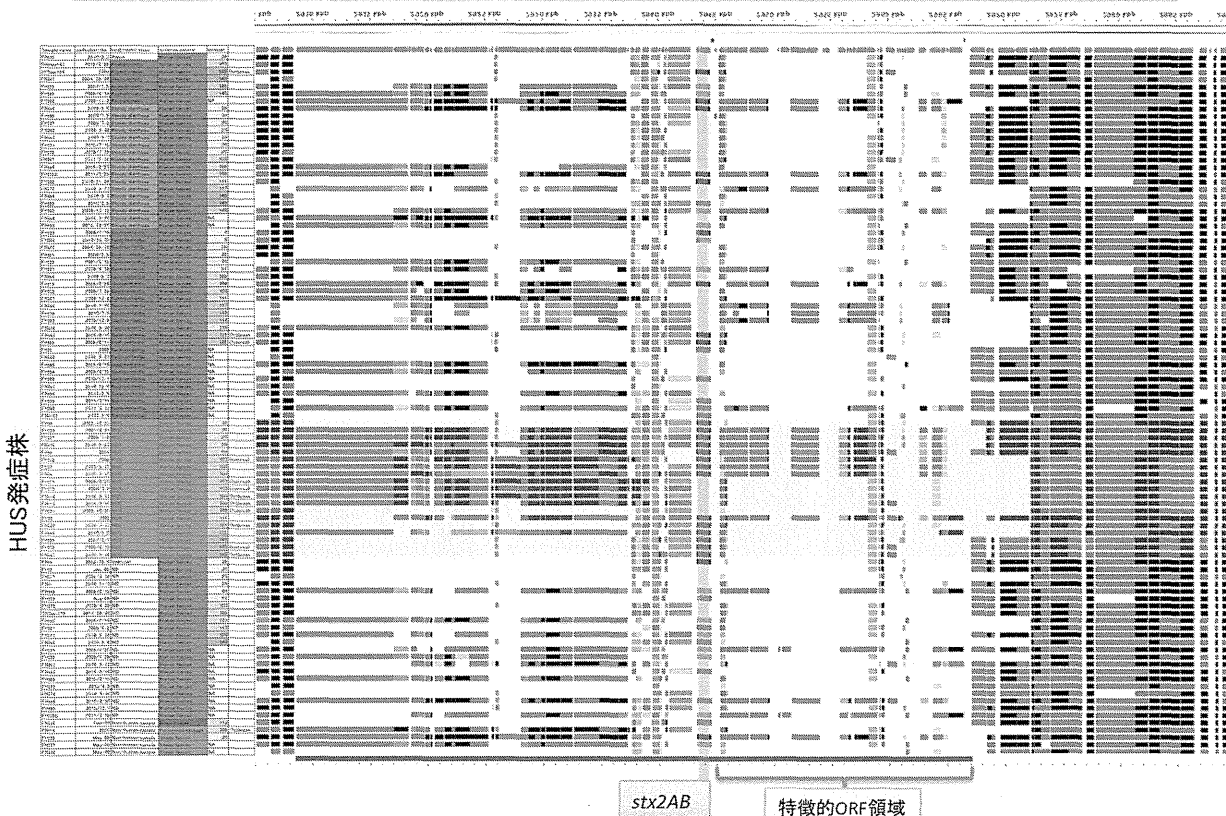
O111 BLAST atlas (stx2 prophage領域拡大)



HUS発症株で存在し、大部分のHUS未発症株で存在していないORFは、stx2ABの上流側に存在。

図8 O111分離株のみのStx2 prophage BLAST atlas解析
横線で塗られた株は、HUS発症患者由来分離株。

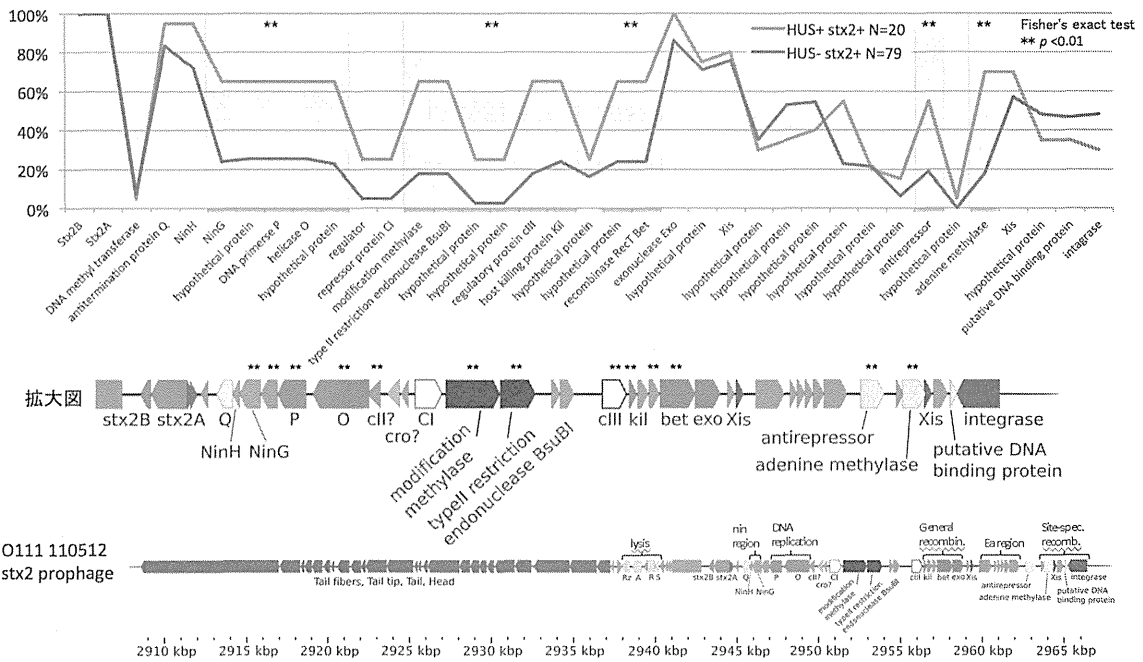
2002~2012年デンマーク株non-O157 (臨床情報明記されたプロジェクトサンプル)



O111とは異なる血清型のHUS発症株でも同様に、stx2ABの上流側が保存されている傾向が高い。

図9 臨床情報が明記されているnon-O157 EHECのStx2 prophage BLAST atlas解析
横線で塗られた株は、HUS発症患者由来分離株。

国内O111およびデンマークnon-O157株のstx2保有株におけるstx2 prophage ORF保有率



HUS発症患者由来stx2 positiveのnon O-157 EHECは、O111 110512株のstx2 prophageのnin region ~ general recombination内のORF、Ea region下流のantirepressorおよび、site-specific recombination region内のadenine methylaseの保有率が高い。

図 1 O stx2AB を有する国内分離 O111 株およびデンマーク non-O157 EHEC 株の HUS 発症患者由来株 (n=20)および未発症由来株(n=79)の stx2AB 上流領域上の ORF の保有率

O111 plasmid比較解析

str. 110512の7個のplasmid中のORFを基にした比較
 ⇒ 2011年富山・福井事例に特徴的、重傷患者由来特徴的plasmidではない。



図 1 1 O111 110512 株が有する 7つの plasmid の保有パターン
 各 plasmid の ORF を用いて BLAST atlas 解析を行っている。本事例特徴的、HUS 発症患者特徴的 plasmid は認められない。

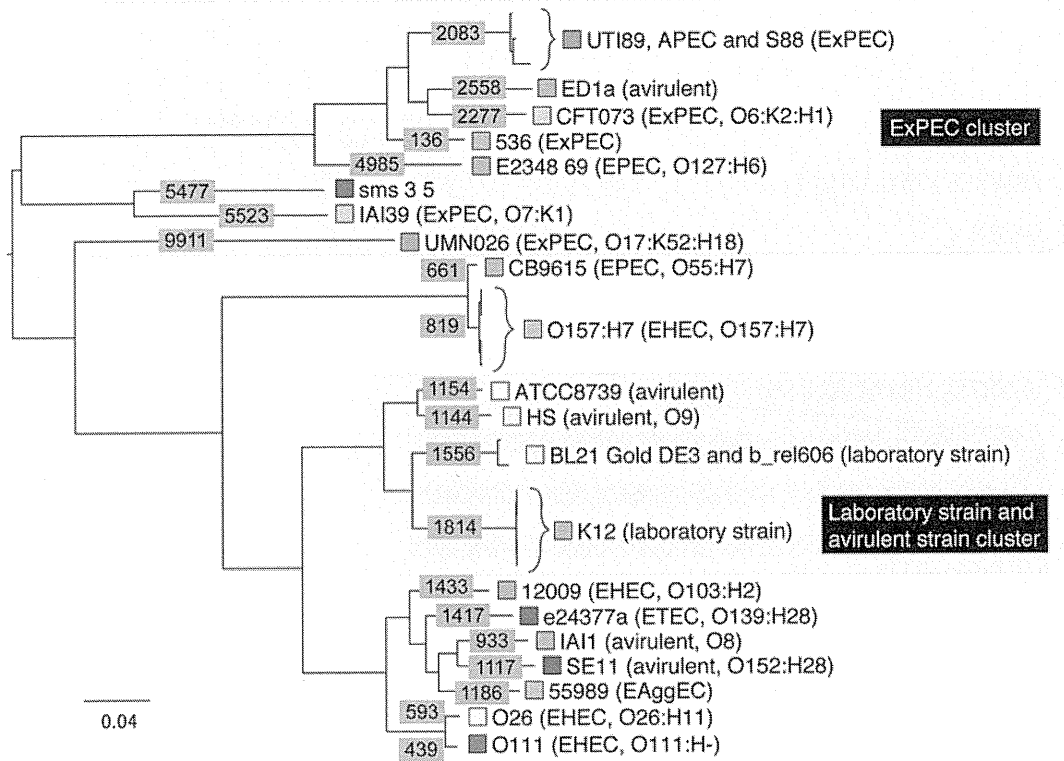


図1 2 全ゲノム情報を用いた SNV 系統解析
 各枝の数字は、株若しくは系統群特有の塩基置換数

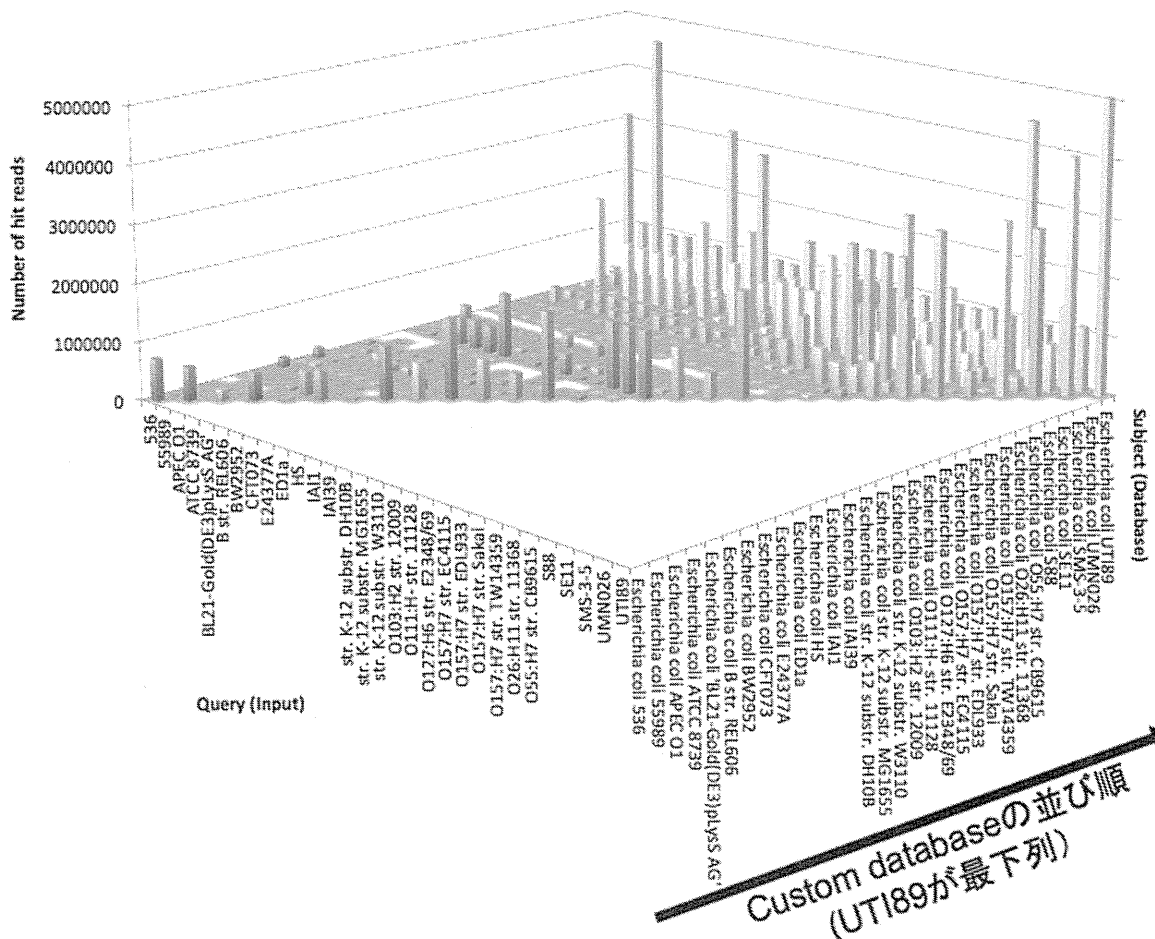


図1 3 BLASTによる 80mer 擬似リードの相同性検索結果

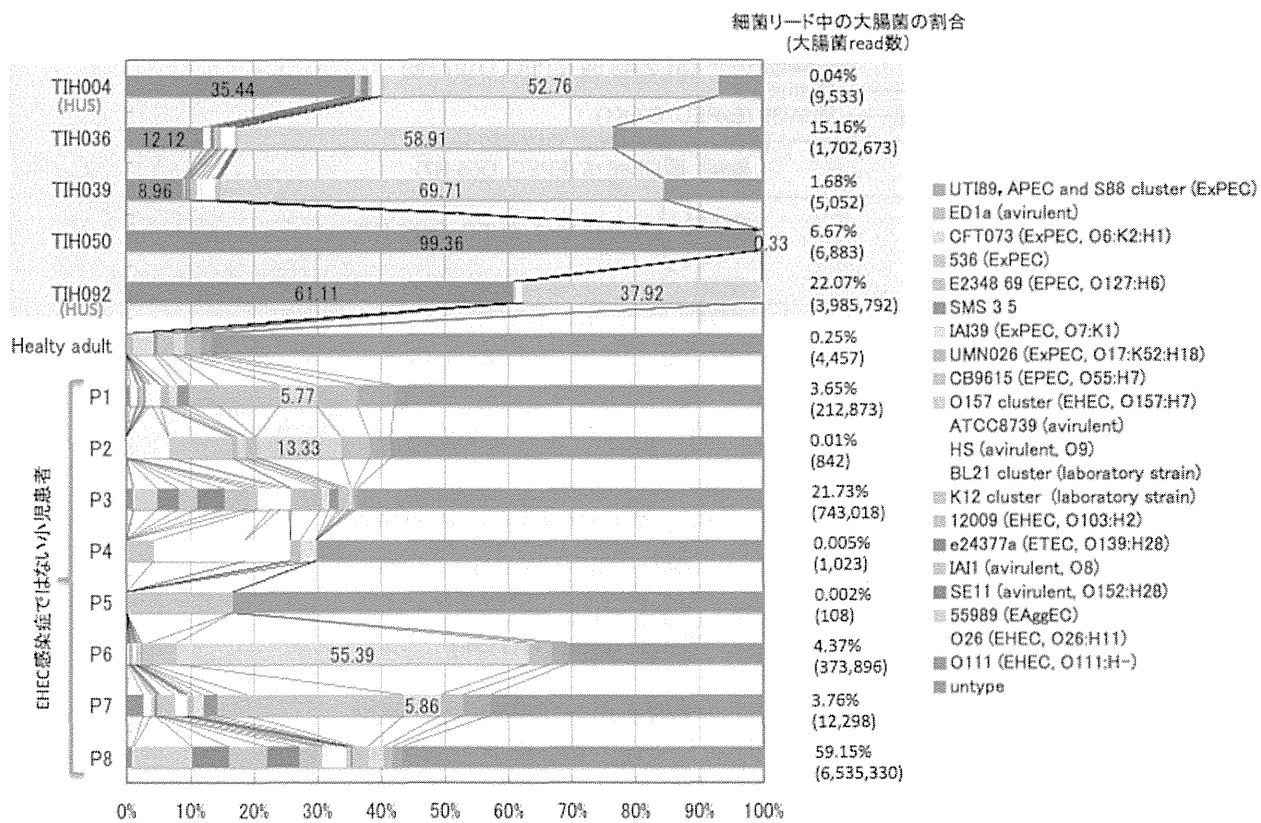


図 1 4 各検体糞便中の大腸菌の存在比率

別紙

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業
（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業））
平成 24-26 年度 分担研究総合報告書

重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原因子及び診療の標準化に関する研究

分担課題 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・准教授)

研究要旨

この研究では、Non-0157 型の腸管出血性大腸菌感染症における、Subtilase cytotoxin (SubAB) の病態における役割を理解するため、培養細胞を用い、SubAB に対する宿主応答機構の解析を行った。本研究期間において、我々は SubAB の細胞致死機構、取り込み機構の一端を明らかにした。又、SubAB が宿主の自然免疫系において重要な役割を果たす NO の産生抑制能を有しているおり、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

0157 型に代表される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を引き起こし、重症化すると、溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症など症状を引き起こす。

Non-0157 型 STEC による重症化例が増加傾向にあり、Stx 以外の病原因子の寄与が示唆されている。

SubAB は Non-0157 型 STEC が主に産生する毒素であり、Stx と相乗的に宿主に作用し、病態の重篤化に関与すると考えられている。しかし、その詳細に細胞障害機構は不明であることから、本研究では、SubAB の細胞致死機構、取り込み機構、宿主防御機構への作用機序を解析した。

B. 研究方法

SubAB の精製と蛍光標識

大腸菌で発現させた His-Tag SubAB と、酵素活性中心アミノ酸を置換した変異体 mSubA(S272A) B を Ni-NTA カラム により精製して実験に用いた。また、細胞内局在を観察するため SubAB を 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

種々の 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。

ミトコンドリアから放出されたチトクローム c の検出

HeLa 細胞を SubAB (0.2 μ g/ml) で一定時間処理した後、細胞を回収し、50 μ g/ml digitonin と protease inhibitor を含んだホモジェネートバッファーで細胞を

処理した。遠心後、上清（サイトソル画分）を回収し、Western blotting によりチトクローム *c* を検出した

免疫沈降法

既に、報告した方法で行った。つまり、HeLa 細胞を SubAB あるいは mSubAB で一定時間処理した後、細胞を回収した。細胞を 2% CHAPS を含む細胞可溶化溶液で処理し、遠心後、上清を回収した。この上清に抗 Bax 抗体 (clone3, BD)、あるいは抗 Bak 抗体 (Ab-2, Calbiochem) を添加し、構造変化した Bax/Bak の免疫沈降を行った

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- γ 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 β 、IL-6、TNF- α 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- κ 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。

倫理面への配慮

動物実験に関して、千葉大学の倫理委員会の承認をえた。

C. 研究結果

1) 腸管出血性大腸菌が産生する SubAB トによる NO 産生抑制機構の解析.

LPS および IFN- γ で刺激した RAW264.7 において、SubAB が培養上清中の亜硝酸量を低下させたことから、SubAB が NO 産生を抑制することが明らかとなった。イムノブロットニングの結果、LPS によって誘導された iNOS の発現は、SubAB により抑制された。さらに RT-PCR の結果、SubAB は LPS 刺激により合成される iNOS mRNA を減少させた。

LPS 刺激を行った RAW264.7 細胞の核内における NF- κ 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- κ B p65、p50 サブユニットとともに閼内における局在が阻害されていた。更に、NF- κ 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- κ B 結合活性化を抑制した。

次に、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。以上の結果から、SubAB は RAW264.7 において誘導される iNOS の発現を抑制することで、NO 産生を低下させることが明らかとなった。

2) 腸管出血性大腸菌が産生する SubAB トの細胞内侵入機構

SubAB の細胞内への取り込みは、クラスリン、カベオリン、ダイナミン非依存性であった。

一方、lipid raft の阻害剤 $m\beta$ CD, filipin III で SubAB の細胞内への取り込みが抑制された。

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。

SubAB の取り込みにおけるアクチンの影響を調べるため、cytochalasin D で処理した。結果、SubAB の細胞内への取り込み、BiP の切断が抑制された。

Na^+/H^+ membrane exchanger が SubAB の取り込みに関与することを、阻害剤 EIPA と Na^+/K^+ free メディウムを用い明らかにした。

また、PI3K の阻害剤である LY294002, Wortmannin により SubAB による BiP の切断が阻害されたことから、PI3K の関与が示唆された。

SubAB を取り込まれさせた細胞を 1% TritonX-100 により処理した。結果、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。以上のことから、取り込まれた SubAB はコレステロールリッチなベシクルに囲まれていることが示唆された。

3) SubAB のオートファジー形成抑制機構の解析

細胞の恒常性維持にアポトーシスやオートファジーは重要な制御機構である。HeLa 細胞への SubAB の添加は、オートファジーのマーカー蛋白質 LC3-II の生成を阻害した。また、オートファジー形成グナルで重要な役割を果たす蛋白質を詳細に調べたところ ULK1 の発現抑制が認められた。しかし、ULK1 強発現下においても SubAB による LC3-II 生成阻害は抑制されなかった。

ER ストレスセンサー蛋白質 PERK の発現抑制は LC3-II 生成減少が阻害された。PERK の活性化がオートファジー抑制に関与していることが示唆された。

次に、オートファジー形成阻害がアポトーシスに影響を有するか調べた。オートファジー形成に必須な Atg16L1 の発現抑制細胞に SubAB を添加し 3 時間後の Caspase-7, PARP の切断を調べた。結果、Atg16L1 の発現抑制は SubAB のアポトーシスに影響しなかった。興味深いことに、オートファジー形成に関与することが知られている Atg7 の発現抑制は、SubAB による Caspase-7, PARP の切断を亢進した。Atg7 はオートファジー形成だけでなく、アポトーシス制御にも関与していると考えられた。

更に、オートファジー抑制蛋白質が SubAB のオートファジー抑制活性に関与するか調べた。結果、death associated-protein 1 (DAP1) の発現抑制により SubAB の活性を抑制した。興味深いことにアポトーシスも抑制した。PERK の活性化、eIF2 α のリン酸化は DAP1 の発現抑制で阻害されなかったことから、これらのシグナル伝達の下流で DAP1 は機能していることが示唆された。

D. 考察と結論

本研究において、SubAB が宿主防御機構の攪乱を引き起こすことが明らかとなった。

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。SubAB 処理により NO の産生が転写レベルから抑制されることから、STEC の宿主免疫系からの回避、生存に重要な役割を果たしていると考えられ

る。

SubAB の取り込み機構の解析から SubAB はマクロピノサイトーシス様の、即ち、アクチン、lipid raft、Na⁺/H⁺ membrane exchanger を介して細胞内に侵入し、細胞障害を引き起こすことが明らかとなった。この機構が、STEC 感染において障害を引き起こす組織（腸管、腎臓）においても使用されているか不明で有ることから、今後、これらの組織に由来する細胞を用いて確認する必要があると考えられる。また、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必要があると考えられる。

SubAB のオートファジー抑制機構・アポトーシス誘導において、新たに DAP1 が関与することが明らかとなった。SubAB による小胞体ストレス下、DAP1 が相互作用する因子を同定し、DAP1 がどのようにこれらの機構制御を行っている明らかにする。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yahiro, K., Tsutsuki, H., Ogura, K., Nagasawa, S., Moss, J., and Noda, M. (2014) DAP1, a Negative Regulator of Autophagy, Controls SubAB-Mediated Apoptosis and Autophagy. *Infect Immun* **82**, 4899-4908
- 2) Nagasawa, S., Ogura, K., Tsutsuki, H., Saitoh, H., Moss, J., Iwase, H., Noda, M., and Yahiro, K. (2014) Uptake of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* SubAB by HeLa cells requires an actin- and lipid raft-dependent pathway. *Cellular microbiology* **16**, 1582-1601
- 3) Tsutsuki, H., Yahiro, K., Suzuki, K., Suto, A., Ogura, K., Nagasawa, S., Ihara, H., Shimizu, T., Nakajima, H., Moss, J., and Noda, M. (2012) Subtilase cytotoxin enhances *E. coli* survival in macrophages by suppression of nitric oxide

production through the inhibition of NF- κ B activation. *Infect Immun* **80**, 3939-3951

- 4) 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, 3rd Edition, 3155-61.

2. 学会発表

- 1) 「腸管出血性大腸菌の産生する SubAB の細胞障害機構の解明」第61回トキシシンポジウム 2014. 9. 3-5. 八尋 錦之助、野田 公俊
- 2) 「腸管出血性大腸菌の産生する Subtilase cytotoxin (SubAB)はアクチン及び脂質ラフト依存的に細胞内に取り込まれる」(若手奨励賞受賞) 第61回トキシシンポジウム 2014. 9. 3-5. 永澤明佳、小倉康平、津木博康、岩瀬博太郎、野田 公俊八尋錦之助、
- 3) 「腸管出血性大腸菌の産生する Subtilase cytotoxin の細胞侵入機構の解析」第 97 回日本細菌学会関東支部総会 2014. 10. 30-31. 永澤 明佳, 八尋 錦之助, 齋藤 久子, 岩瀬 博太郎, 野田 公俊
- 4) 「Shiga-toxigenic *Escherichia coli* produced SubAB enters via lipid-raft- and an actin-dependent endocytosis in HeLa cells.」49th U.S.-Japan Conference on Cholera and Other Enteric Bacterial Infections □Jan. 14. 2015. Gainesville, FL, USA. □ Kinnosuke Yahiro, Sayaka Nagasawa,

Kohei Ogura, Hiroyasu Tsutsuki,
Hisako Saitoh, Hirotaro Iwase,
Masatoshi Noda

- 5) 「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、
津々木博康、野田 公俊
- 6) 「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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) Shiga toxin and a novel toxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. The 11th Korea-Japan International Symposium on Microbiology 2012. 9. 14
Masatoshi Noda
- 10) 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

- 11) 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
- 12) 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
- 13) Subtilase cytotoxin enhances *E. coli* survival in macrophages by suppression of nitric oxide production through the inhibition of NF- κ 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

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原因子及び診療の標準化に関する研究
分担課題 幼若無菌 BALB/cA 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 知巳（香川大学医学部・分子微生物学・教授）

研究協力者 今大路 治之（香川大学医学部・分子微生物学・助教）

研究要旨

この研究では、近年増加傾向にある non-O157 EHEC の中で、富山県や福井県で集団食中毒を起こした菌株 (Ty-1) を含む O111 血清型を中心に、Stx の産生を誘導する生体内因子を検索するとともに、菌株間でのヒト白血球活性化能の違いを調べ、さらには重症化を起こす菌株の特徴と EHEC に対する炎症反応の強さが個人間でどの程度異なるのかを調べた。3 mM 過酸化水素を添加して静置培養を行うと、全ての菌株で Stx2 量が増加した。以上から、感染部位に集積した好中球などの炎症細胞が産生する過酸化水素などの活性酸素種が、EHEC 感染による大腸粘膜での炎症を誘導し Stx2 産生を促すことで組織傷害を増強すると考えられた。そこで、マウスにおいて大腸粘膜に炎症を惹起し、大腸に定着した EHEC に酸化ストレスを与えることにより、病原性を評価できるのではないかと考え、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を用いた EHEC 感染モデルを検討した。すると、Ty-1 株を接種後、滅菌水道水を与えたマウスでは大腸粘膜および腎臓にはほとんど組織障害を認めず、一方、Ty-1 株を接種後 2% DSS を飲料水として与えると、大腸粘膜の著しい破壊と腎臓における顕著な急性尿細管壊死を示す尿細管の拡張を認めた。以上から、大腸局所の炎症反応の強弱が Stx2 産生量に影響し、重症化への移行に重要な因子となると考えられた。本研究で検討した DSS 処理 EHEC 感染モデルマウスは、重症 EHEC 感染例に対する治療法の開発等において有用な研究ツールとなることが期待される。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌感染症は「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）」における第3類感染症であり、本邦では年間3,000～4,000例の患者が報告されている。腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC）の最も重要な病原因子は志賀毒素（Shiga toxin: Stx）であり、本毒素は 28S rRNA を N-glycosidase 活性により分解し、タンパク質の合成を阻害して宿主細胞死を誘導する。Stx には抗原性の違いから Stx1 と Stx2 の 2 種が存在し、両者を産生する菌株（Stx1 と Stx2）と、どちらか一方の毒素を産生する菌株が存在する。Stx は AB₅ 型毒素であり、B サブユニットは globotriaosylceramid (Gb3/CD77) と呼ばれる細胞表面上の糖脂質を受容体とするため、Gb3 を

高発現する組織は Stx に対する感受性が高く、本毒素による傷害を受けやすい。Gb3 は血管内皮細胞にも発現しており、Stx による血管内皮細胞の傷害が、全身組織での微小血管内凝固を引き起こし、溶血性貧血、血小板減少および急性腎不全を 3 主徴とする溶血性尿毒症症候群（HUS）を引き起こす。HUS は EHEC 感染後に出血性大腸炎を発症した患者の 3～4% に発生する。HUS は死亡率の高い合併症であり、一部は脳症へと移行する。

本邦における EHEC 食中毒事例は O157 血清型を原因とするものが約 70% を占めるが、近年 O157 以外の血清型による食中毒事例が増加傾向にあり、HUS の合併率が高い事例が報告されている。その例として 2011 年に発生したドイツの O104:H4 血清型（患者数 3,922 人、HUS 発生率

20%、死者47人)や2011年4~5月に本邦の富山県や福井県で発生したO111:H8血清型(患者数181人、HUS発生率20%、死者5人)が挙げられる。これら食中毒事例でHUS合併率が高かった要因は同定されておらず、これらの集団感染事例において分離されたO104:H4やO111:H8血清型のEHECがO157:H7血清型と比較して、どの程度の病原性を有するのかについても明らかにされていない。その原因として、ヒトにおけるEHECの感染病態を再現できる感染モデル動物が確立されていないことにある。EHEC各菌株での病原性を比較するには、EHECに感受性の高い小動物モデルが必要である。

ヒトにおけるEHEC感染症の感染過程を再現できる感染動物モデルは存在しないが、無菌マウスや抗菌薬であるストレプトマイシン処理で常在菌叢を抑制したマウスモデルがよく使用されている。しかしながら、これらのマウスモデルにおける死亡率は単にマウス腸管におけるStx産生量に依存するため、ヒトの重症例から分離された菌株を接種してもマウス腸管内でのStx産生量が低く、その臨床を反映できないことが多い。これは、ヒトのEHEC感染症においてはStxの産生を誘導する内因性因子が感染局所に存在するのに対して、マウス腸管には存在しないことによると考えられる。したがって、EHECのマウス感染実験では*stx* phageを誘導するMitomycin Cを腹腔内に投与して、腸管でのStx産生量を増加させ、マウスへの毒性を高める工夫も試みられている。最近、キレート剤であるEDTAや炎症細胞が産生する過酸化水素がEHECからのStx産生を誘導することが報告されている。

無菌マウスモデルでは、大腸における炎症性変化が少ないことが病原性比較のための感度を大きく低下させているのではないかを考えている。EHECの病原因子として、(i) 粘膜上皮細胞へのアクセスに関連する鞭毛(TLR5を介して炎症を誘導)、(ii) 粘膜上皮細胞への接着に寄与する線毛やintimin、また、台座形成(A/E病変)と呼ばれる特有の病理変化を起こすための3型分泌装置(T3SS: その構成タンパク質はlocus of enterocyte attaching and effacing: LEE領域にコード)とT3SSによって宿主細胞内へ注入されるTir, EspA, EspBなどのエフェクター、および(iii) 志賀毒素(Stx)が挙げられる。マウスモデルでは大腸粘膜を傷害し、炎症反応を強く誘導する上記病原因子の(i)および(ii)が関与する感染過程を再現することが困難である。よって、マウスモデルにおける各菌株の病原性の比

較はマウス腸管内でのStx基本産生量に依存せざるを得ない。

EHEC感染症の重症化(HUS、急性脳症)に関わる要因については菌側、宿主側双方で未だ不明であるが、マクロファージや好中球の異常な活性化の関与が示唆されている。事実、重症化例では白血球数が有意に高く、IL-8, IL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインレベルが高いことが知られている。また、血液型との関連も報告されており、重症化例ではO型の血液型の患者が多いという報告がある。富山県でのO111:H8集団感染において入院を必要とした患者の血液型は、O型12名、B型9名、A型7名AB型3名であったと報告されており、O型の患者が多い。しかしながら、その理由やその他の重症化に関わる遺伝的背景の解明には、今後さらなる研究が必要である。

上記のような背景から、腸管における炎症惹起性が強いEHECでは腸管上皮細胞やマクロファージからTNF- α , IL-8やケモカイン等の分泌を強く誘導し、感染局所に好中球を多数集積させると考えられる。その結果、好中球より産生される活性酸素種(過酸化水素など)が多量のStx産生を誘導するのではないかと仮説を立て、本研究を計画した。すなわち、(i) 内因性誘導因子によるStx産生量の増加率、(ii) 腸管上皮細胞に対する傷害性および炎症性サイトカイン誘導能、(iii) マクロファージや好中球の活性化能の評価により、EHEC各菌株の病原性の比較ができるのではないかと考えている。そこで本研究では、近年、増加傾向にあるnon-O157 EHECの中で、富山県や福井県で集団食中毒を起こした菌株を含むO111血清型を中心に、Stxの産生を誘導する生体内因子を検索するとともに、菌株間でのヒト白血球活性化能の違いを調べ、さらには重症化を起こす菌株の特徴とEHECに対する炎症反応の強さが個人間でどの程度異なるのかを調べた。

B. 研究方法

1. 使用菌株

本研究で使用した腸管出血性大腸菌(EHEC)の血清型はO157:H7(KU1およびSakai)、O111:H8(Ty-1およびTy-3)およびO111:HNM(NIID6~13)である。Ty-3株はTy-1株から*stx2*ファージが脱落したStx非産生株である。

2. 培地および培養条件

-80°Cで保存していた各菌株のグリセロールストックを一白金耳分、BHI寒天平板培地(栄

研化学)に塗抹し、37°Cで一晩好気培養した。BHI 寒天平板上に増殖したコロニーを CAYE 培地 (Merck KGaA) または LB 培地に接種し、一晩前培養した。前培養液を 10 ml の CAYE 培地または LB 培地に 1/50 量 (0.2 ml) 接種し、対数増殖中期 ($OD_{590}=0.6$) になるまで 37°C で静置または振盪培養した。培養液を 5 ml ずつに 2 分し、一方に Mitomycin C (Sigma) を終濃度が 500 ng/ml になるように添加した。これらの菌液を遮光して 37°C でさらに培養し、3、6 および 24 時間後に 0.5 ml ずつ培養液を回収した。回収した菌液は Bioruptor (コスモバイオ) で超音波破碎処理 (出力 High, 1 分を 3 サイクル) を行った後、遠心分離 (8,000 rpm, 5 分, 4°C) した。遠心上清をポアサイズ 0.22 μm の滅菌フィルター (ADVANTEC) で濾過し、-20°C で保存した。

3. 志賀毒素 (Stx) の定量

-20°C で保存していた各試料を室温で溶解した後、LB 培地または CAYE 培地で 2 倍段階希釈系列を作製し、試料中の Stx 量を VTEC-RPLA (デンカ生研) を使用して逆受身ラテックス凝集反応により測定した。測定及び判定は、メーカーが推奨するプロトコールに従った。

4. 過酸化水素による腸管出血性大腸菌の *stx* フェージ誘導

各菌株を CAYE 培地で一晩前培養した (振盪培養)。新鮮な CAYE 培地 (10 ml) に前培養液を 1/50 量 (0.2 ml) 接種し、 $OD_{590}=0.6$ に達するまで 37°C で静置培養した。培養液を 5 ml ずつに 2 分し、一方に H_2O_2 を終濃度が 3 mM になるように添加した。他方の培養液にはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.4) を H_2O_2 と同量添加した。これらの培養液を 37°C でさらに静置培養し、2、3、4、6 および 24 時間後に培養液をそれぞれ 0.5 mL ずつ回収した。回収した菌液は Bioruptor (コスモバイオ) で超音波破碎処理 (出力 High, 1 分を 3 サイクル) を行った後、遠心分離 (8,000 rpm, 5 分, 4°C) した。遠心上清を回収し、培養上清として -20°C で保存した。

5. 定量的 PCR 法による *stx2* 転写量の比較

EHEC の培養液は上記と同様に作製し、 H_2O_2 添加 3 時間後に培養液を 1 ml 回収した。回収した培養液を遠心し (15,000 rpm, 5 分, 4°C)、集めた菌体を 0.5 ml の Solution A (20 mM sodium acetate (pH=5.0), 1 mM EDTA, 0.5% SDS, pH5.0) で懸濁した。懸濁液に TE 飽和フェノール (pH5.0) を等量加え、60°C に保温したウォーターバス中で 5 分間振盪した後、遠心した (15,000 rpm, 5 分, 4°C)。上層を約 0.4 ml 回収し、99% エタノールを 1 ml 加えて転倒混和した後、

遠心し (15,000 rpm, 5 分, 室温)、沈殿を 80% エタノール 1 ml で洗浄した。再度、遠心した後 (15,000 rpm, 5 分, 室温)、上清を捨て、壁面の 80% エタノールを全て除去するため、さらに遠心した (15,000 rpm, 30 秒, 室温)。上清を完全に除き、沈殿を 0.1 ml の RNase-Free H_2O に溶解した。この粗抽出 RNA 溶液を RNeasy MinElute Clean up Kit (Qiagen) を用いて精製した後、精製 RNA サンプル 5 μl と 2 \times denaturation buffer (0.4 \times TBE, 1.69% ficoll, 0.01% bromophenol blue, 7M urea) 5 μl を混和し、65°C で 5 分間加熱後、1 分以上氷上に置いた。アガロース電気泳動法により、RNA サンプルの品質を評価した。その後、DNase 処理を行い、*stx2* 遺伝子増幅用のプライマーを用いた PCR 法により染色体 DNA が混入していないことを確認した。Qubit (Invitrogen) を用いて RNA 濃度を測定し、RNase-Free H_2O で濃度を 40~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整した。濃度調整後の RNA サンプルを鋳型にして、PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa) を使用して逆転写を行い、cDNA を EASY Dilution (TaKaRa) で終濃度が 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように希釈した。その後、*stx2* 遺伝子の転写量を ABI StepOne Plus によって測定した。Real Time-PCR の条件は、参考資料 2 に記した。タンパク伸長因子 EF-Tu をコードする *tufA* 遺伝子の転写量を内部標準として使用した。

6. EHEC 菌体成分による THP-1 細胞からの TNF- α 産生誘導

ヒト単球由来 THP-1 細胞を 10% のウシ胎児血清 (FBS) を含む RPMI1640 培地で 5×10^5 cells/ml に調整後、1 ml ずつ 24 well plate に分注した。THP-1 細胞を CO_2 インキュベーター (37°C、5% CO_2) で 1 時間培養した後、各 EHEC の超音波破碎物を 10 μl ずつ添加して、さらに 24 時間培養した。培養液を回収して遠心し (2,000 rpm, 5 分, 4°C)、上清を回収した。回収した上清中の TNF- α を、Human TNF alpha ELISA Ready-SET-Go! (e-bioscience) を用いた ELISA 法で定量した。測定方法はメーカーが推奨するプロトコールに従った。

7. ヒト白血球の調整

赤血球溶解試薬である Vitalyse (BioE) 30 ml にヘパリン処理をした全血 3 ml を加え、室温で 30 分間振盪した。遠心後 (500 g, 2 分, 室温)、沈殿を 2 ml の PBS で洗浄し、再度遠心した (500 g, 2 分, 室温)。沈殿を 0.75 ml の PBS で懸濁し、チュルク液 (Merck KGaA) で 10 倍希釈して白血球数を測定した。白血球懸濁液の一部を遠心し (2,000 rpm, 2 分, 4°C)、0.5~1.0 ml の

PBS に再懸濁後、フローサイトメーター (Merck Milipore) を用いて FACS 解析を行い、白血球が分画できていることを確認した。

8. EHEC 菌体成分に対するヒト白血球の反応性の比較

上記で分画したヒト白血球を、10%の自己血清を含む DMEM 培地を用いて細胞数が 5×10^5 cells/ml になるように調整した。細胞数を調整した白血球を 0.2 ml ずつ、96 well plate に分注し、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) で 1 時間培養した。その後、50 倍希釈した各 EHEC の菌体超音波破碎物をそれぞれ 2 μ l ずつ添加し、さらに CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した。24 時間後に回収した培養液を遠心し (2,000 rpm、2 分、4°C)、上清中の TNF- α を、Human TNF alpha ELISA Ready-SET-Go! (e-Bioscience) を用いた ELISA 法で定量した。測定方法はメーカーが推奨するプロトコールに従った。

9. DSS モデルマウスの作製

15 匹の 4~6 週齢の雄性 BALB/c A 無菌マウスのうち、10 匹に EHEC Ty-1 株 (O111:H8) の菌液 0.2 ml (4.88×10^8 CFU/ml) をゾンデで経口接種した。残りの 5 匹には Ty-1 株の *stx2* フェージ脱落株である Ty-3 株の菌液 0.2 ml (4.5×10^8 CFU/ml) をゾンデで経口接種した。マウスは無菌エアが供給されたビニールアイソレーター内で飼育し、放射線滅菌飼料および滅菌水は自由摂取とした。菌液接種 0、3 および 7 日後に自然排出便を採取し、各マウス腸管における各菌株の増殖状態を BHI 寒天培地を用いた標準寒天平板法で調べた。接種 1 週間後に 5 匹の Ty-1 株接種マウスおよび 5 匹の Ty-3 株接種マウスについては、滅菌水に代えて、フィルター滅菌した 2% デキストラン硫酸ナトリウム水溶液 (2% DSS) を飲料水として与えた。マウスは毎日血便の有無や生存状況を観察した。2% DSS 投与 1 週間後にすべてのマウスを犠死させ、左側腎臓と大腸を摘出し、中性ホルマリンで固定後、HE 標本を作製した。また、大腸内容物を回収し、PBS で 0.1 g/ml になるよう PBS で懸濁した。懸濁液中の生存大腸菌数を BHI 寒天培地を用いた標準寒天平板法で測定するとともに、懸濁液を遠心後 (12,000 rpm、5 分、室温)、上清中の Stx2 量を VTEC-RPLA (デンカ生研) を使用して逆受身ラテックス凝集反応により測定した。

倫理面への配慮

動物実験については動物愛護の観点から必

要最低限のマウスを使用し、実験計画については事前に香川大学動物実験委員会の審査を受け、承認を受けた上で実験を行った。ヒト血液を用いる実験については、香川大学医学部臨床研究倫理委員会の審査を受け、承認を受けた上で実施した。検体提供者には書面を用いた十分なインフォームドコンセントを行い、検体提供に関する同意を取得している。

C. 研究結果

1. 各種培養条件における Stx 産生量の比較

1) 振盪培養および静置培養時の Stx2 産生量

本研究では、EHEC 各菌株を LB 培地及び CAYE 培地を用いて、静置培養、または振盪培養し、培養上清中に産生された Stx2 を、逆受身ラテックス凝集反応により定量した。Stx2 量が多い場合は、LB 培地及び CAYE 培地で各サンプルを希釈して測定した。その結果、LB 培地及び CAYE 培地のいずれの場合も、振盪培養を行った方が静置培養に比べて Stx2 量が増加した。LB 培地での振盪培養時の Stx2 産生量は静置培養時と比べ、Ty-1 株で 10~40 倍、KU1 株で 8~16 倍、Sakai 株では、8~16 倍に増加した。また、CAYE 培地での培養では、Ty-1 株で 5~40 倍、KU1 株では 5~10 倍、Sakai 株では 5~20 倍に増加した。以上のことから、好氣的環境が Stx2 の産生量を増加させることが明らかになった。

2) Mitomycin C (MMC) による Stx2 産生誘導

MMC は、EHEC からの Stx の産生量を増加させることが知られており、毒素産生能を評価する場合によく使用される。そこで、各 EHEC 株の MMC に対する反応性を、Stx2 産生量の変化で評価した。その結果、MMC 添加により、全ての菌株で Stx2 量が増加し、さらに振盪培養することでより Stx2 量が増加した。また静置培養で LB 培地を用いたときには、MMC を添加することで Ty-1 株では 2~20 倍、KU1 株では 8~32 倍、Sakai 株では 64~100 倍に増加した。さらに、LB 培地で振盪培養をした場合には、MMC を添加することで、Ty-1 株では 200~800 倍に増加し、KU-1 株と Sakai 株では 50~100 倍に増加した。

また、静置培養で CAYE 培地を用いて、MMC を添加すると、添加しなかった場合と比べて Ty-1 株では、50~100 倍に増加し、KU1 株では 25~50 倍、Sakai 株では 30~50 倍 Stx2 量が増加した。CAYE 培地を用いて振盪培養をしたときは、Ty-1 株では 160~200 倍、KU1 株では 20~40 倍、Sakai 株では 100~160 倍に Stx2 量が増加し