別紙１

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

嫌気条件下における腸管出血性大腸菌の病原性制御因子、及び重症化因子に関する基礎研究

令和７年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　須藤　直樹

令和８（２０２６）年５月

別紙２

目次

Ⅰ．総括研究報告

嫌気条件下における腸管出血性大腸菌の病原性制御因子、
及び重症化因子に関する基礎研究 ------- 1
研究代表者　須藤　直樹

Ⅱ．分担研究報告

１．志賀毒素産生の恒常化と高病原性の解析、及び臨床分離株の解析
分担代表者　須藤　直樹 ------- 4

２．志賀毒素発現が恒常化した腸管出血性大腸菌のマウスを用いた病原性評価
分担代表者　北条　史 -------13

Ⅲ．研究成果の刊行に関する一覧表 -------18

厚生労働科学研究費補助金　食品の安全確保推進研究事業

総括研究報告書

「嫌気条件下における腸管出血性大腸菌の病原性制御因子、及び重症化因子に関する基礎研究」

（24KA3003）

研究代表者 須藤　直樹 （杏林大学　医学部）

研究要旨

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *E. coli*：EHEC）は、国内で年間約 3,000 例の感染報告があり、感染者の一部は血便、溶血性尿毒症症候群、脳症などの重篤な合併症を呈する。志賀毒素（Stx）の産生量や産生制御機構の違いが重症化に関与すると考えられているが、その詳細は未解明である。そこで本研究では、Stx 産生量が変動する変異株を用いて、Stx 産生制御機構の解析およびマウス感染モデルを用いた病原性評価を行った。その結果、SOS 応答の恒常的活性化やファージ活性化制御領域への変異により、持続的なファージ活性化と Stx 産生量の増加が生じることを明らかにした。また、SOS 応答活性化には細菌集団内で不均一性が存在することが示唆された。これらの変異株は、通常の腸内細菌叢を有するマウスに対して高い致死性を示した。さらに、臨床分離株を用いた解析により、高 Stx 産生株が特定の系統に偏在することを明らかにした。これらの知見は、EHEC 感染症の重症化機構の理解や、高病原性株のリスク評価に寄与すると考えられる。

研究分担者

須藤　直樹（杏林大学　医学部・講師）

北条　史（杏林大学　医学部・助教）

A．研究目的

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *E. coli*：以下、EHEC）感染症は出血性大腸炎を引き起こし、重症例では溶血性尿毒症症候群（hemolytic uremic syndrome：以下、HUS）や脳症などの重篤な合併症を続発する。近年 20 年間、国内では EHEC 感染症の有症者数は年間 2,000～3,000 人程度で推移しており、そのうち約 3%が HUS を合併している。HUS は特に 10 歳未満の小児で発症率が高く、腸内細菌叢や腸管免疫の未成熟が発症に関与すると考えられている。一方で、EHEC 側の重症化要因については未解明な点が多い。感染者数の減少がみられず、一定数の重症例が継続して発生している現状において、感染および重症化予防法の確立や、高病原性 EHEC による集団感染を迅速に把握・制御するサーベイランス体制の構築は重要である。本研究は、厚生労働行政が推進する食中毒の未然防止、発生時の健康被害拡大防止、および原因究明に貢献し得るものである。

EHEC の主要な病原因子は、HUS や脳症の原因となる志賀毒素（Shiga toxin：Stx）である。Stx 遺伝子は染色体上の溶原化ファージ領域にコードされており、DNA 損傷などのストレスに応答して発現が上昇する。このため、少なくとも欧米では、EHEC 感染症に対する抗菌薬使用は推奨されていない。これまでの Stx 発現制御機構に関する知見の多くは、好気条件下の純培養系における遺伝学的解析から得られている。一方で、EHEC 感染の生じる大腸内環境に近い嫌気条件下での病原性制御機構については、依然として知見が限られている。

そこで本研究では、嫌気条件下で機能する病原性発現制御因子に着目し、その制御機構と重症化との関連を明らかにすることを目的とした。令和 6 年度に実施した研究では、Stx 産生量が変動する変異株を取

得し、その解析から、SOS 応答の恒常的活性化やファージ活性化制御領域への変異が、持続的なファージ活性化と Stx 産生量の増加を引き起こすことを明らかにした。さらに、これらの変異株がマウス感染モデルにおいて高い致死性を示すことを見出した。これらの知見から令和 7 年度は、（1）Stx 産生恒常化と高病原性との関連解析および臨床分離株解析、ならびに（2）Stx 発現が恒常化した EHEC 株のマウス病原性評価を実施した。

B．研究方法

各分担研究報告書に記載

C．研究結果

（１）Stx 産生恒常化と高病原性との関連解析および臨床分離株解析

トランスポゾン挿入変異法により取得した EHEC 変異株を解析した結果、SOS 応答関連遺伝子への変異では RecA 量の増加とともに Stx2 発現量が上昇し、両者には強い正の相関（$R^2 = 0.9075$）が認められた。一方、Stx2 をコードするファージ Sp5 内の遺伝子変異株では、多くで Stx2 発現量が低下したが、ファージ活性化制御領域に変異を有する変異株では Stx2 発現量の上昇が認められた。さらに、SOS 応答恒常活性化株では、細菌集団の一部細胞のみで細胞伸長が認められ、SOS 応答活性化に不均一性が存在することが示唆された。また、Gb3 を用いた ELISA により、培養上清中の Stx2 量はレポーター解析による発現量と概ね一致した。さらに、480 株の臨床分離株を解析した結果、Sakai 株より高い Stx 産生性を示す株が多数認められ、それらは主に Clade 3 に分類されたことから、系統背景と Stx 産生性との関連が示唆された。

（２）Stx 発現が恒常化した EHEC 株のマウス病原性評価

通常の腸内細菌叢を有するマウスを用いて、高 Stx 産生変異株の病原性を評価した。Stx 恒常的発現株を BALB/c マウスへ経口感染させた結果、感染後 6 日目までに約 75%のマウスが死亡し、野生株と比較して有意な致死性が認められた。さらに、この変異株における致死性への Stx の寄与を解析するため、*stx1* および *stx2* 欠失株を構築して感染実験を行った結果、*stx2* 欠失株においてのみ致死性が消失したことから、本病態の主要因が Stx2 であることが明らかとなった。感染後の糞便中 EHEC 菌数は野生株および変異株のいずれも感染後 1 日目をピークとして速やかに減少し、株間差は認められなかった。一方、Stx 量を反映する Vero 細胞毒性は、変異株感染群において感染後 1 日目にのみ検出された。盲腸内容物でも同様の傾向が認められた。以上の結果から、Stx 恒常的発現株は腸管内へ持続的に定着しなくとも、感染極初期に大量の Stx を放出することで致死的病態を引き起こすことが示唆された。

D．考察

本研究では、Stx 産生制御機構と病原性との関連について解析を行った。その結果、SOS 応答の恒常的活性化が Stx2 発現量の増加と強く相関することが明らかとなり、SOS 応答が高 Stx 産生化の主要因であることが示唆された。また、ファージ活性化制御領域への変異によっても Stx2 発現量の増加が認められたことから、Stx 産生亢進には宿主側の SOS 応答異常だけでなく、Stx ファージ側の制御異常も関与することが示された。さらに、SOS 応答恒常活性化株では、一部細胞のみで細胞伸長が認められたことから、細菌集団内で SOS 応答活性化に不均一性が存在することが示唆された。このような不均一性は、一部細胞が溶菌を伴いながら Stx を放出し、残りの細胞が集団維持を担うことで、高い毒素産生と生存性を両立している可能性が考えられる。

また、臨床分離株解析では、高 Stx 産生株が主に Clade 3 に分類されたことから、系統背景が Stx 産生性に影響を与える可能性が示唆された。さらに、通常腸内細菌叢を有するマウスにおいても、高 Stx 産生株は高い致死性を示した。一方で、腸管内菌数は速やかに減少していたことから、病原性の差異は定着能ではなく、感染極初期における Stx 放出量の違いによって規定されていると考えられた。これらの知見は、EHEC 感染症における重症化機構の理解や、高病原性株のリスク評価に重要であると考えられる。

E. 結論

本研究により、非誘導条件下における Stx 産生量がマウス致死性と関連することが明らかとなった。また、臨床分離株の中には、非誘導条件下でも高い Stx 産生性を示す系統が存在することが示された。

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) 須藤直樹、北条史、三戸部治郎. 志賀毒素産生が変動する変異株の取得とマウスを用いた病原性評価. 第 27 回 腸管出血性大腸菌研究会. 久留米, 2025.
2) 須藤直樹、北条史、三戸部治郎. 腸管出血性大腸菌における志賀毒素産生が変動する変異株の取得とその病原性解析. 第 108 回 日本細菌学会関東支部総会. 前橋, 2025.
3) 須藤直樹、北条史、三戸部治郎. 志賀毒素産生性が変動する腸管出血性大腸菌変異株の病原性解析. 第 99 回 日本細菌学会総会. 広島, 2026.
4) 北条史，大崎敬子：無菌マウス消化管内容物における *Helicobacter pylori* の生態と形態について．第 59 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会．三鷹．2026.
5) 北条史，大崎敬子：無菌マウス消化管内および消化管内容物内における *Helicobacter pylori* の生態と形態について．第 99 回日本細菌学会総会．広島．2026.

３．その他

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金　食品の安全確保推進研究事業

「嫌気条件下における腸管出血性大腸菌の病原性制御因子、及び重症化因子に関する基礎研究」

（24KA3003）

分担研究報告書

分担研究課題「志賀毒素産生の恒常化と高病原性の解析、及び臨床分離株の解析」

研究分担者 須藤　直樹（杏林大学　医学部）

研究要旨

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *E. coli* : EHEC）感染症では溶血性尿毒症症候群や脳症など重症の合併症が存在し、これらの主な原因は EHEC が産生する志賀毒素である。志賀毒素の産生量や産生機構の違いが重症化と関連すると予想されるがその詳細は未解明である。本研究では、志賀毒素産生量が変動する変異株を用いて志賀毒素産生制御機構の解析を行った。その結果、SOS 応答の恒常的活性化やファージ活性化制御領域の変異により、持続的なファージ活性化と Stx 産生量の増加が生じることを明らかにした。また、SOS 応答活性化には細菌集団内で不均一性が存在することが示唆された。さらに、臨床分離株を用いた解析により、高 Stx 産生株が特定の系統に偏在することを明らかにした。これらの知見は、EHEC 感染症の重症化機構の理解や高病原性株のリスク評価につながると考えられる。

A．研究目的

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *E. coli*：以下、EHEC）は、ヒトに感染すると出血性大腸炎を引き起こし、重症例では溶血性尿毒症症候群や脳症などの重篤な合併症を続発する。これらの病態の主因となる EHEC の病原因子は志賀毒素（Shiga toxin：Stx）であり、Stx は真核細胞に受容体（Gb3）を介して取り込まれ、タンパク質合成を阻害することで毒性を発揮する。EHEC の中には重症化率の高い株も存在し、その Stx 産生量や遺伝子発現様式が感染症の重症化に関与すると考えられているが、その詳細な機構は未解明である。このため、Stx 産生機構を理解することは、EHEC 感染症の病態解明および対策において重要である。

Stx 遺伝子は溶原化ファージ（Stx ファージ）上にコードされている。EHEC が DNA 損傷ストレスなどに曝露されると、SOS 応答と呼ばれる制御機構が活性化され、それに伴って Stx ファージが誘導される。この過程で Stx 発現は上昇し、さらにファージによる溶菌に伴って Stx が細胞外へ放出されることが知られている。ヒト腸管内では、宿主免疫由来の活性酸素種や抗菌ペプチド、さらには抗菌薬などによって Stx 産生が誘導される。

令和 6 年度に実施した本研究課題では、Stx 産生量が変動する変異株を取得し、その解析を行った。その結果、SOS 応答の恒常的な活性化が持続的なファージ活性化と Stx 産生量の増加を引き起こすこと、さらにファージ活性化制御領域への変異によっても同様に持続的なファージ活性化と Stx 産生量の増加が生じることを明らかにした。加えて、マウス感染実験により、これらの変異株が高い致死性を示すことを明らかにした。本年度は、（1）取得した変異株の解析をさらに深化させ、その分子機構を明らかにすることを目的とした。さらに、（2）市中において同様の機構により Stx 発現が上昇した株が存在する可能性を検証するため、臨床分離株を用いた解析を実施した。

B．研究方法

（１）志賀毒素産生が変動する変異株の分子機構の解析

本研究ではゲノム情報が整備され研究実績が豊富な EHEC O157:H7 Sakai 株（Sakai 株）を野生株として用いた。Sakai 株は免疫学的に異なる２種類の Stx(Stx1、及び Stx2)を持つ。また Stx 発現の定量的解析のため、Stx2 遺伝子のプロモーター配列の直下にレポーター遺伝子として β-ガラクトシダーゼ（LacZ）遺伝子を組換えた株(P*stx2-lacZ* 株)を用いた。

Stx 発現量の解析には、P*stx2-lacZ* 株を用いた LacZ 活性測定を行った。SOS 応答活性の解析には、SOS 応答により発現が誘導される RecA について、ウェスタンブロッティングを用いて解析した。さらに定量解析のため、精製 RecA タンパク質を用いて検量線を作成し、菌体濁度当たりの RecA 量を算出した。加えて、SOS 応答活性化を細胞レベルで評価するため、位相差顕微鏡観察による細胞長径の測定を行った。Stx 放出量の定量には、Stx 受容体である globotriaosylceramide（Gb3）を固相化して行う ELISA を用いた。

（２）臨床分離株を用いた解析

2024 年から 2025 年に分離された、MLVA（multi-locus variable-number tandem-repeat analysis）型の異なる血清型 O157 株 480 株を用いた。これらの菌株について、培養上清中の Stx2 濃度を ELISA により測定した。さらに、ゲノム解析に基づく系統分類を行い、各菌株の Clade を決定した。

C．研究結果

（１）志賀毒素産生が変動する変異株の分子機構の解析

トランスポゾン（Tn5）挿入変異法により取得した変異株について変異部位を解析した結果、変異は Stx2 をコードする溶原化ファージ Sp5 上の遺伝子（図 1A：Sp5 遺伝子）、既報において変異により SOS 応答が惹起されることが知られている遺伝子（図 1A：SOS 応答）、あるいはそのいずれにも該当しない遺伝子（図 1A：その他）に分類された。これらの変異株について、Stx2 発現量および SOS 応答活性の指標となる RecA 量を定量した。その結果、SOS 応答に分類される変異株では RecA 量の増加とともに Stx2 発現量の増加が認められた。さらに、「その他」に分類された変異株においても、RecA 量と Stx2 発現量との間に相関が認められた。実際に、SOS 応答および「その他」に分類された変異株全体において、RecA 量と Stx2 発現量の間には強い正の相関が認められた（図 1B, R^2 = 0.9075）。

一方、Sp5 遺伝子に分類された変異株では、mutant-#15 を除き Stx2 発現量の低下が認められた。これは、Sp5 内のファージ活性化やファージ複製に重要な遺伝子に変異が挿入されたことで、ファージ活性化が阻害されたためと考えられる。一方で、mutant-#15 はファージ活性化制御領域に変異を有しており、その結果として恒常的なファージ活性化が生じていると考えられた。

次に、細胞レベルでの SOS 応答活性化を評価するため、SOS 応答の指標として知られる細胞長径の伸長を位相差顕微鏡観察により解析した。野生株をマイトマイシン C（MMC）に曝露して SOS 応答を誘導すると、細胞長径の顕著な伸長が認められた（図 2 左）。そこで細胞長径を定量し、その分布を解析した結果、MMC 処理した野生株ではほぼ全ての細胞で伸長が認められた。一方、SOS 応答が恒常的に活性化している mutant-#16 では、全細胞の約 5%においてのみ細胞長径の伸長が認められた（図 2 右）。この結果は、SOS 応答恒常活性化株では細菌集団内の一部の細胞のみで SOS 応答が活性化していることを示しており、このような不均一性によっ

て、細菌集団全体としての増殖と、溶菌を伴う Stx 産生とが両立している可能性が示唆された。
次に各変異株の志賀毒素産生性を評価するため、Stx 受容体である Gb3 を固相化した ELISA を実施した。各変異株の一晩培養後の培養上清中 Stx2 濃度を測定した結果、その傾向は図 1 に示したレポーター遺伝子による Stx2 発現解析の結果と概ね一致していた（図 3）。

（2）臨床分離株を用いた解析

変異株の解析から SOS 応答やファージ活性化の恒常化が Stx 産生を上昇させることが明らかとなった。このような機序で Stx 産生性が高い株が市中に存在するか確認するため、臨床分離株を用いた解析を行った。480 株の臨床分離株の培養上清中の Stx2 濃度を ELISA により解析した結果、Sakai 株より高い Stx 産生性を示す株が 137 株あり、取得した変異株と同程度かそれ以上の Stx 産生性を示す株も多数存在した。さらに、臨床分離株のゲノム情報を取得し、系統分類を行った結果、Stx 産生性の高い株は Clade 3 に分類された。このことから、系統により Stx 産生性に特徴があることが明らかとなった。

D. 考察

本研究では、EHEC における Stx 産生制御機構について、変異株および臨床分離株を用いて解析を行った。その結果、SOS 応答の恒常的活性化や Stx ファージ活性化制御領域の変異が、持続的なファージ活性化と Stx 産生量の増加を引き起こすことが示された。さらに、これらの変異株は高いマウス致死性を示したことから、Stx 産生制御機構の変化が病原性の増強に直結することが示唆された。
変異株解析では、RecA 量と Stx2 発現量との間に強い正の相関が認められた。この結果は、SOS 応答活性化の程度が Stx 発現量を規定する重要な因子であることを支持している。従来、Stx 産生は DNA 損傷などによる一過的な SOS 応答誘導によって生じると考えられてきたが、本研究の結果から、SOS 応答が恒常的に活性化した状態においても Stx 産生が持続的に亢進しうることが明らかとなった。また、「その他」に分類された変異株においても RecA 量と Stx2 発現量に相関が認められたことから、SOS 応答制御に直接関与すると知られていない遺伝子群も、間接的に SOS 応答やファージ活性化に影響を与えている可能性が考えられる。
一方、Sp5 遺伝子群に変異を有する株の多くでは Stx2 発現量が低下した。このことは、Stx 産生においてファージ活性化およびファージ複製機構が必須であることを改めて示している。一方で、mutant-#15 ではファージ活性化制御領域への変異によって Stx2 発現量が増加していたことから、ファージ誘導の制御異常のみでも高 Stx 産生性が成立することが示唆された。これは、EHEC の病原性が細菌染色体側の SOS 応答異常だけでなく、Stx ファージ自身の制御変異によっても増強されうることを示す重要な知見である。
さらに、細胞長径解析の結果から、SOS 応答恒常活性化株では全細胞が一様に SOS 応答を活性化しているのではなく、一部の細胞のみが強い SOS 応答を示すことが明らかとなった。このことは、細菌集団内での表現型不均一性の存在を示唆している。Stx 産生は最終的にファージ誘導と溶菌を伴うため、全細胞が同時に SOS 応答を活性化すると集団全体が崩壊する可能性がある。一方で、本研究で観察されたように一部細胞のみが SOS 応答を活性化することで、集団全体としては増殖能を維持しながら、高い Stx 産生を両立している可能性が考えられる。このような細胞集団レベルでの役割分担は、EHEC が病原性と生存性を両立する戦略として重要である可能性がある。
臨床分離株解析では、Sakai 株より高い Stx 産生性を示す株が多数存在し、その中には本研究で取得し

た高 Stx 産生変異株と同程度、あるいはそれ以上の産生性を示す株も認められた。このことは、本研究で明らかとなった SOS 応答やファージ活性化の恒常化による高 Stx 産生機構が、市中分離株においても存在する可能性を示唆している。さらに、高 Stx 産生株が特定の Clade に偏在していたことから、EHEC の系統的背景が Stx 産生能に影響することが示唆された。今後は、高 Stx 産生株に共通する遺伝学的特徴やファージ制御機構を詳細に解析することで、重症化リスク株の予測や新たな制御標的の同定につながることが期待される。

E. 結論

本研究により、SOS 応答の恒常的活性化や Stx ファージ活性化制御領域の変異が、持続的なファージ活性化と Stx 産生量の増加を引き起こすことが明らかとなった。また、SOS 応答活性化には細菌集団内で不均一性が存在することが示唆された。さらに、臨床分離株解析から、高 Stx 産生性を示す株が特定の系統に偏在することが明らかとなり、EHEC 重症化機構の理解につながる知見が得られた。

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) 須藤直樹、北条史、三戸部治郎. 志賀毒素産生が変動する変異株の取得とマウスを用いた病原性評価. 第 27 回 腸管出血性大腸菌研究会. 久留米, 2025 年.
2) 須藤直樹、北条史、三戸部治郎. 腸管出血性大腸菌における志賀毒素産生が変動する変異株の取得とその病原性解析. 第 108 回 日本細菌学会関東支部総会. 前橋, 2025
3) 須藤直樹、北条史、三戸部治郎. 志賀毒素産生性が変動する腸管出血性大腸菌変異株の病原性解析. 第 99 回 日本細菌学会総会. 広島, 2026 年

３．その他

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

図1. 取得した変異株の志賀毒素発現とSOS応答の関係

(A) 変異株の遺伝子変異の位置とRecA量とStx発現量

Strain name	Tn5 insrtion site_gene ID (gene name)	Categoly	RecA (ng/OD)		Pstx2-LacZ活性	
			平均	標準偏差	平均	標準偏差
mutant-#1	ECs_1186 (cro)_Sp5	Sp5遺伝子	196.7	118.2	2.9	2.6
mutant-#2	ECs_1189 (o)_Sp5	Sp5遺伝子	161.2	58.1	4.5	2.6
mutant-#3	ECs_1190 (p)_Sp5	Sp5遺伝子	124.9	14.7	4.6	2.2
mutant-#4	ECs_1202_Sp5	Sp5遺伝子	163.0	23.4	10.2	3.2
mutant-#5	ECs_1193_Sp5	Sp5遺伝子	128.6	44.3	47.1	2.7
Wild-type		Wild-type	79.9	15.9	81.1	26.8
mutant-#6	ECs_4783(dsbA)	その他	91.1	20.6	124.7	49.7
mutant-#7	ECs_1304	その他	73.0	4.2	151.6	18.5
mutant-#8	ECs_1046 (helD)	その他	103.6	16.3	157.6	29.0
mutant-#9	Immediatlry upstream of ECs_5215(nrdD)	その他	115.4	49.0	177.3	22.3
mutant-#10	ECs_2575(nudB)	その他	101.6	31.9	231.3	14.1
mutant-#11	ECs_1953	その他	87.9	7.5	273.2	37.8
mutant-#12	Intergenic region between ECs_2872(dcd) and ECs_2873(udk)	SOS応答	147.7	19.8	480.7	51.7
mutant-#13	ECs_2571 (ruvA)	SOS応答	267.3	23.7	943.7	60.9
mutant-#14	ECs_0975 (ftsK)	SOS応答	330.1	39.4	1195.5	104.1
mutant-#15	Intergenic region between ECs_1185(cI) and Ecs_1186(cro)_Sp5	Sp5遺伝子	98.5	24.7	1421.4	6.3
mutant-#16	ECs_3766 (xerD)	SOS応答	414.1	46.1	2039.8	110.3
mutant-#17	ECs_4741 (xerC)	SOS応答	321.1	51.6	2062.3	204.9

(B) 変異株におけるRecA量とStx発現量の相関

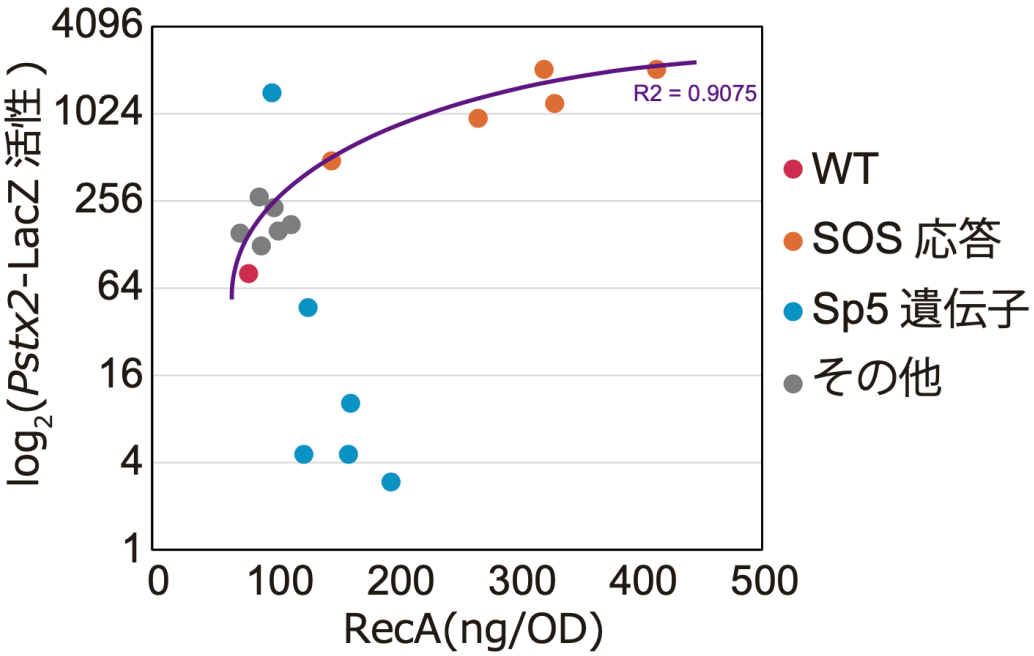


図2. 変異株における細胞長径の分布

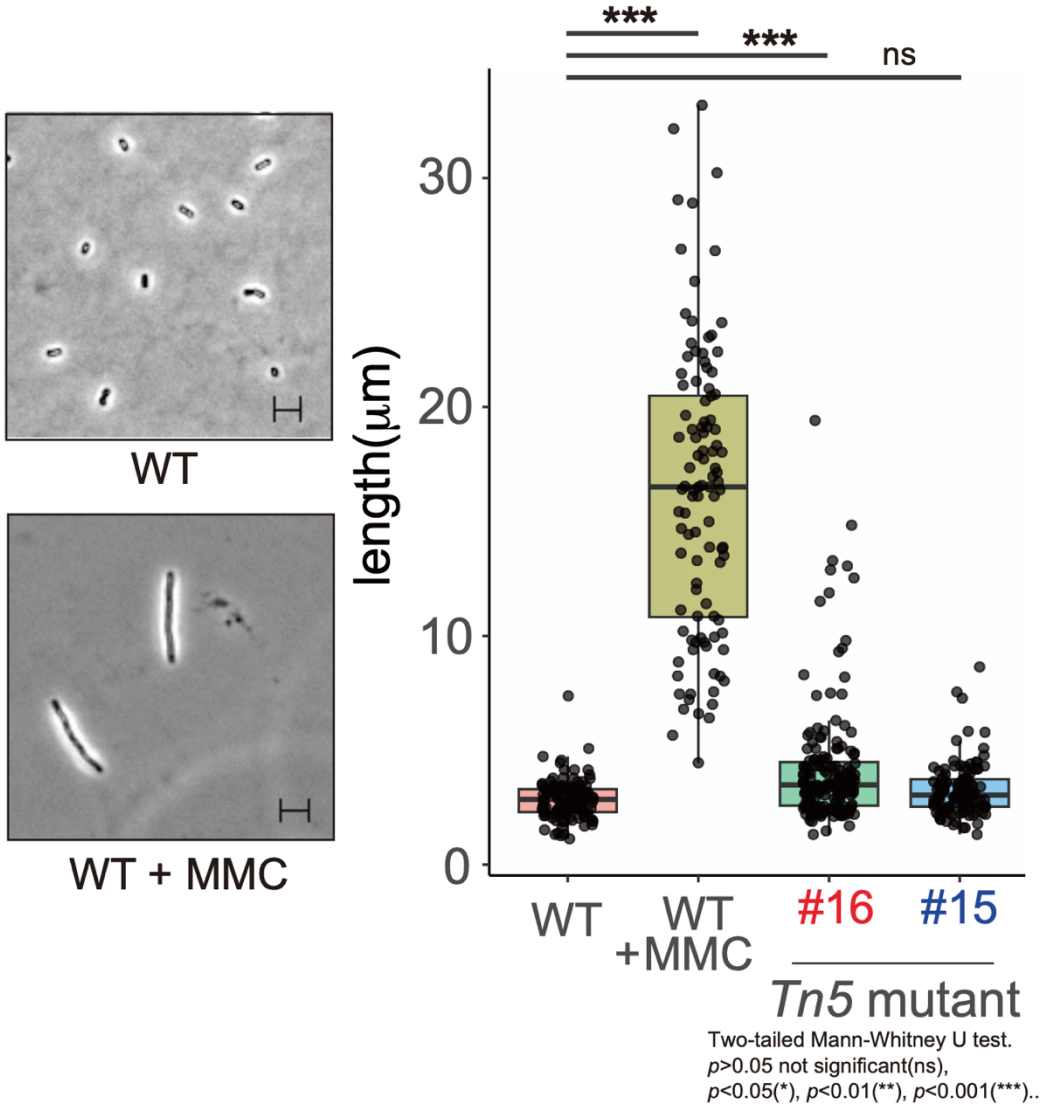


図3. 各変異株の志賀毒素産生性

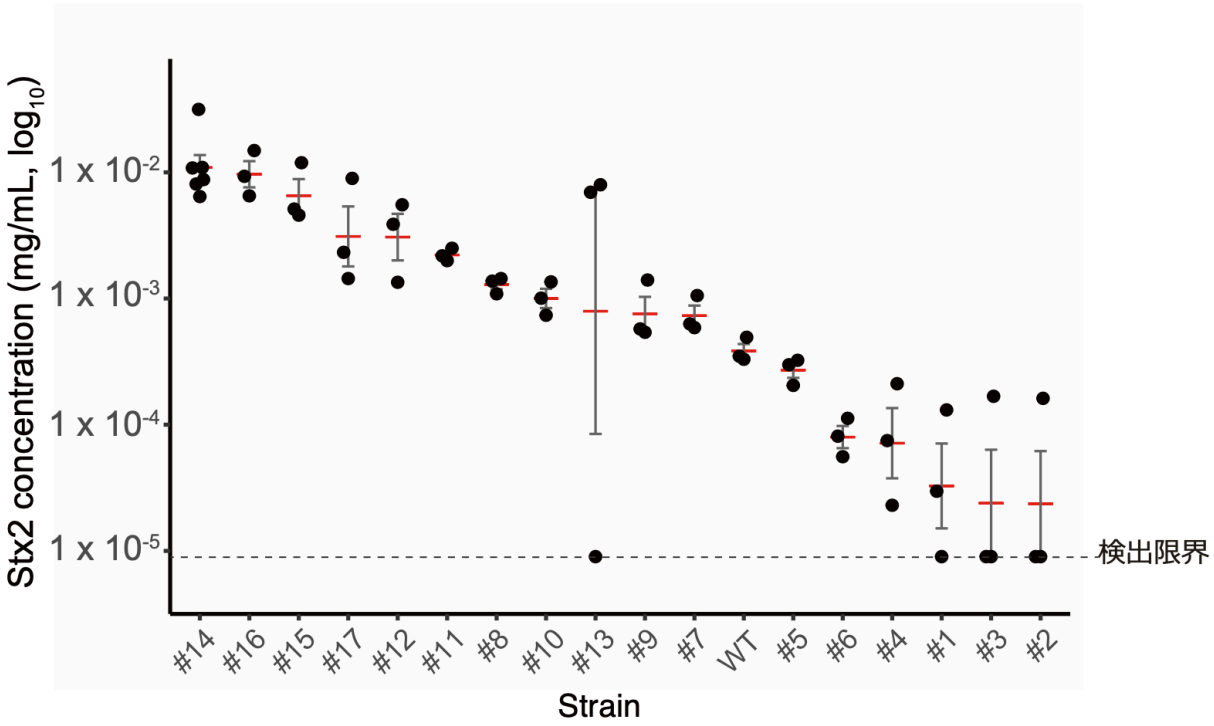


図4. 臨床分離株の志賀毒素産生性

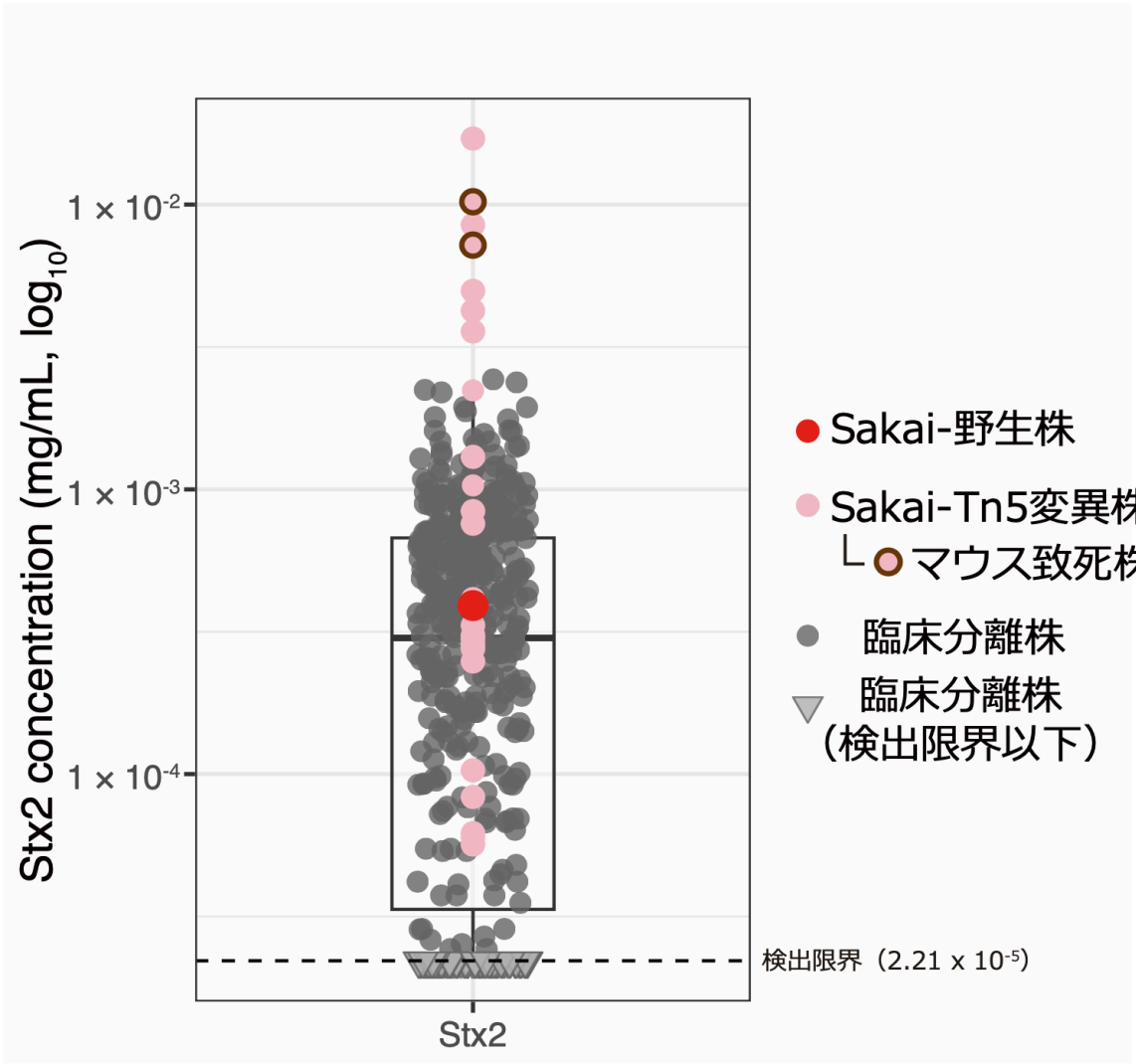
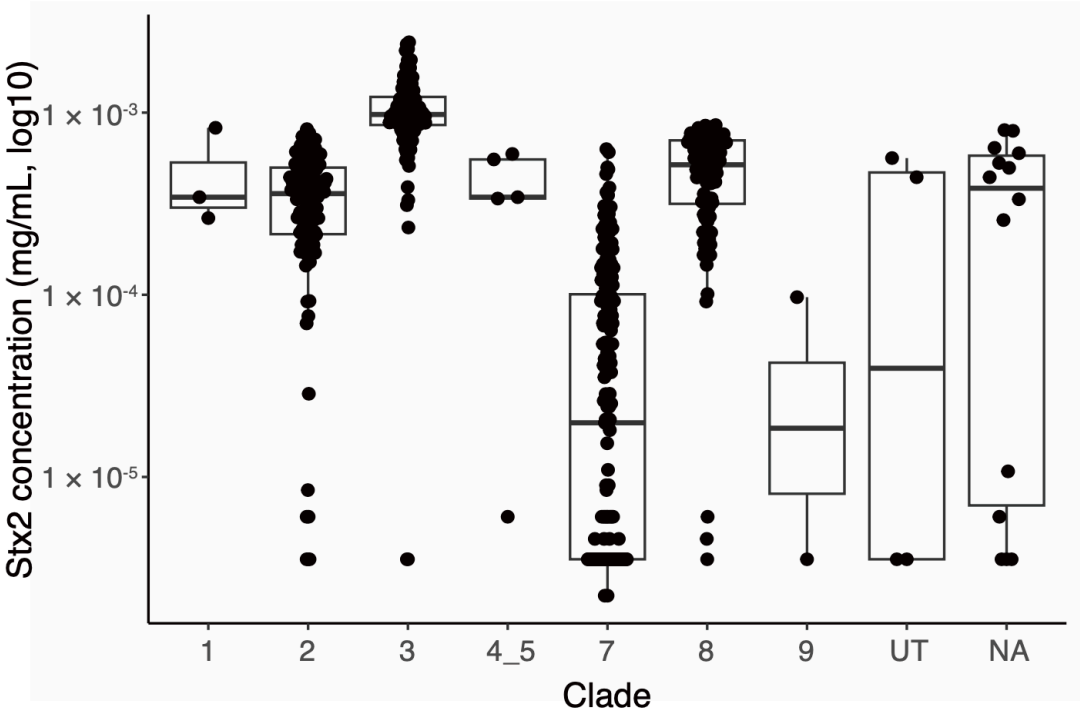


図5. 臨床分離株のClade別の志賀毒素産生性の分布



厚生労働科学研究費補助金　食品の安全確保推進研究事業

「嫌気条件下における腸管出血性大腸菌の病原性制御因子、及び重症化因子に関する基礎研究」

（24KA3003）

分担研究報告書

分担研究課題「志賀毒素発現が恒常化した腸管出血性大腸菌のマウスを用いた病原性評価」

研究分担者 北条　史（杏林大学　医学部）

研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）は志賀毒素（Stx）を主要病原因子とし、ヒトで重篤な合併症を引き起こす。一方、通常の腸内細菌叢を有するマウスでは EHEC が腸管内へ定着しにくく、病原性評価には制約がある。本研究では、取得した変異株の一つである Stx 恒常的発現株の病原性を通常腸内細菌叢マウスで解析した。その結果、この変異株は高い致死性を示し、この致死性は *stx2* 欠失により消失した。また、感染後の菌数は速やかに減少した一方、感染初期にのみ高い Stx 活性が検出された。これらの結果から、高 Stx 産生株は腸管内へ持続的に定着しなくとも、感染初期に大量の Stx を放出することで致死的病態を引き起こすことが示唆された。

A．研究目的

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *E. coli*：以下、EHEC）の自然宿主は主にウシであり、ヒトに感染した際に病原性を発揮する。一方、他の動物、特に代表的な実験動物においてヒトと同様の病態を再現することは困難である。EHEC の in vivo 感染実験では主にマウスが用いられるが、その際には無菌マウスや、抗菌薬投与によって腸内細菌叢を攪乱したマウスが用いられることが多い。これは、通常の腸内細菌叢を有するマウスでは EHEC が腸管内へ定着しにくいためである。マウスモデルでは志賀毒素による病原性評価は可能であるものの、ヒト感染で重要とされる III 型分泌装置などの接着因子を介した病原性については十分に評価できないという制約がある。これらの制約はあるものの、実験動物を用いた病原性の評価はヒトへの感染における病原性の評価のために極めて重要である。令和 6 年度に実施した本研究課題では、ノトバイオートマウス構築を目的として、ラボスケールでの無菌マウス飼育・繁殖環境の構築を行った。一方で、取得した高 Stx 産生変異株を通常腸内細菌叢を有するマウスへ感染させたところ、致死性が認められた。そこで本年度は、引き続き通常腸内細菌叢を有するマウスを用いた感染実験を行い、これら変異株が致死性を示す要因について解析することを目的とした。

B．研究方法

研究分担者と連携して実施した。

取得した変異株のうち、志賀毒素（Stx）産生量が高い株を、SPF（specific pathogen free）環境下で飼育した BALB/c マウス（6 週齢、雄）に対し、1×10^9 CFU（colony forming units）経口接種した。感染後は経時的に生存率および体重変化を評価するとともに、糞便を採取した。さらに、感染マウスおよび非感染マウスから盲腸を摘出し、盲腸内容物を回収した。糞便および盲腸内容物中の EHEC 菌数は、EHEC 選択培地への塗抹培養により測定した。また、濾過滅菌した糞便および盲腸内容物中

に含まれる Stx 量については、Vero 細胞を用いた細胞毒性試験により評価した（図 1A）。
なお、感染後の体重が感染初日の 80%未満に減少した場合を人道的エンドポイントと定め、その時点で安楽死処置を実施した。

C．研究結果

マウス感染モデルを用いて、志賀毒素（Stx）発現を上昇させる因子（遺伝子変異）が病原性へ与える影響を評価した。令和 6 年度の研究において、Stx 恒常的発現株を通常の腸内細菌叢を有するマウスへ感染させたところ、高頻度に致死性を示すことを見出していた。本年度は、この結果の再現性確認および統計学的解析を目的として感染個体数を増やし、同様の感染実験を実施した（図 1A）。その結果、Stx 恒常的発現株（mutant-#16 株）では、感染後 6 日目までに約 75%のマウスが死亡し、野生株と比較して有意な致死性が認められた（図 1B）。
さらに、mutant-#16 株における Stx 産生と致死性との関係を明らかにするため、本株が保有する 2 種類の志賀毒素遺伝子（*stx1* および *stx2*）について、それぞれ単独欠失株および二重欠失株を構築し、同様の感染実験を行った。その結果、*stx2* 欠失株においてのみ致死性が消失したことから、本感染モデルにおける致死性の主要因が Stx2 であることが明らかとなった（図 1C）。
次に、mutant-#16 株または野生株（Sakai 株）を感染させたマウス由来糞便を解析した。その結果、両株とも感染後 1 日目に EHEC 菌数が最大となり、2 日目以降には 1 日目の 10 分の 1 以下まで減少し、どちらも株間に有差はなかった（図 2A）。一方、Stx 量を反映する Vero 細胞毒性は、mutant-#16 株感染群の感染後 1 日目にのみ検出された。さらに、盲腸内容物についても同様の解析を行ったところ、糞便解析と概ね一致する結果が得られた。
以上の結果から、Stx 恒常的発現株は感染極初期（感染後 1 日目まで）に腸管内で大量の Stx を放出し、宿主に致死的障害を与える一方で、腸管内へ持続的に定着するわけではないことが示唆された。

D．考察

本研究では、通常の腸内細菌叢を有するマウスを用いて、高 Stx 産生変異株の病原性解析を行った。その結果、Stx 恒常的発現株は、通常腸内細菌叢を有するマウスに対して高い致死性を示すことが再現性をもって確認された。感染後の菌数解析では、野生株および Stx 恒常的発現株のいずれも感染後 1 日目をピークとして急速に減少し、株間差は認められなかった。一方で、Vero 細胞毒性は Stx 恒常的発現株感染群においてのみ感染初期に検出された。これらの結果は、病原性の差異が腸管内定着能の違いではなく、感染極初期における Stx 産生量の違いによって規定されていることを示唆している。つまり、Stx 恒常的発現株では腸管内への定着が成立する以前、あるいは宿主による排除を受けるまでの短期間に大量の Stx を放出することで、不可逆的な宿主障害を引き起こしている可能性が考えられる。

E．結論

本研究により、恒常的 Stx 産生株は、通常の腸内細菌叢を有するマウスに対しても高い致死性を示すことが明らかとなった。また、その致死性は Stx2 に依存しており、感染極初期に腸管内で大量の Stx を放出することが病態形成に重要であることが示唆された。これらの知見は、EHEC 感染症における重症化機構の理解に寄与するとともに、高病原性株のリスク評価につながることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

１．誌上発表

なし

２．学会発表

1) 北条史，大崎敬子：無菌マウス消化管内容物における *Helicobacter pylori* の生態と形態について．第 59 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会．東京, 2026 年
2) 北条史，大崎敬子：無菌マウス消化管内および消化管内容物内における *Helicobacter pylori* の生態と形態について．第 99 回日本細菌学会総会．広島, 2026 年

３．その他

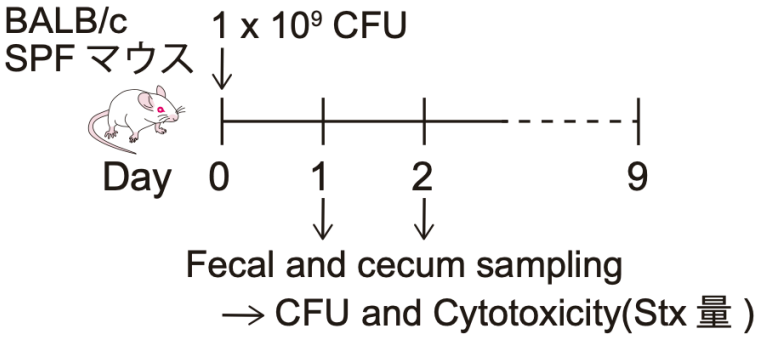
なし

H. 知的財産の出願・登録状況

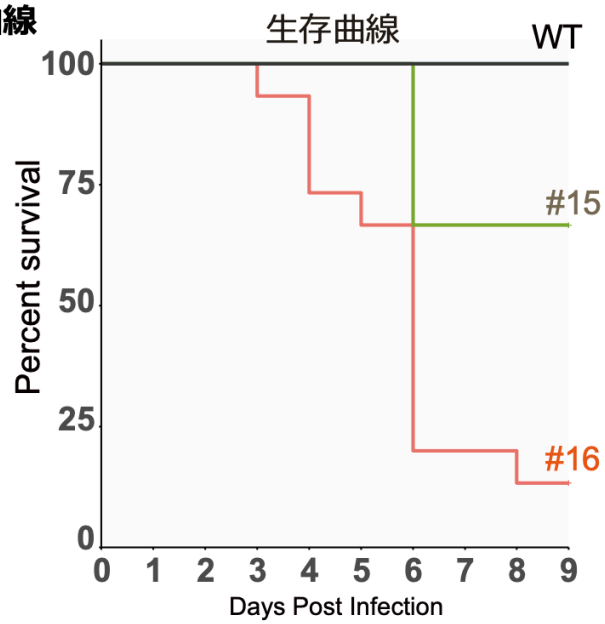
なし

図1. マウス感染モデルにおける変異株の病原性評価

(A) 感染スケジュール



(B) 変異株の生存曲線



(C) 志賀毒素遺伝子欠失株における生存曲線

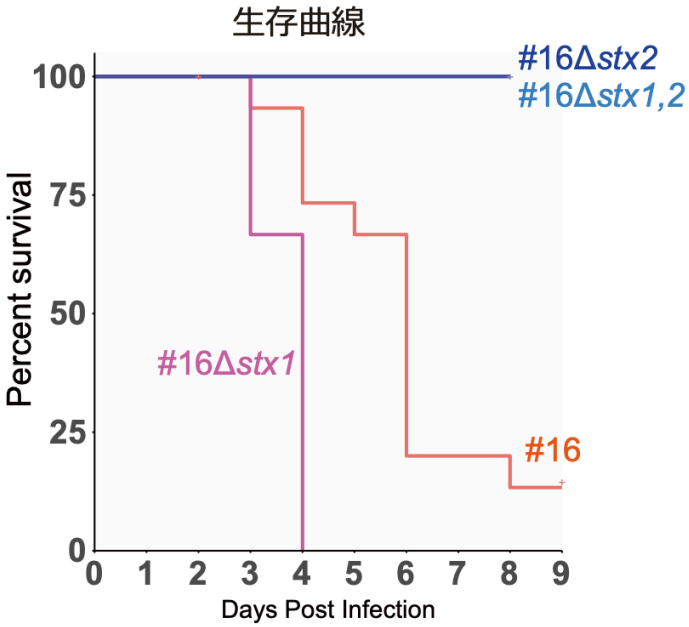
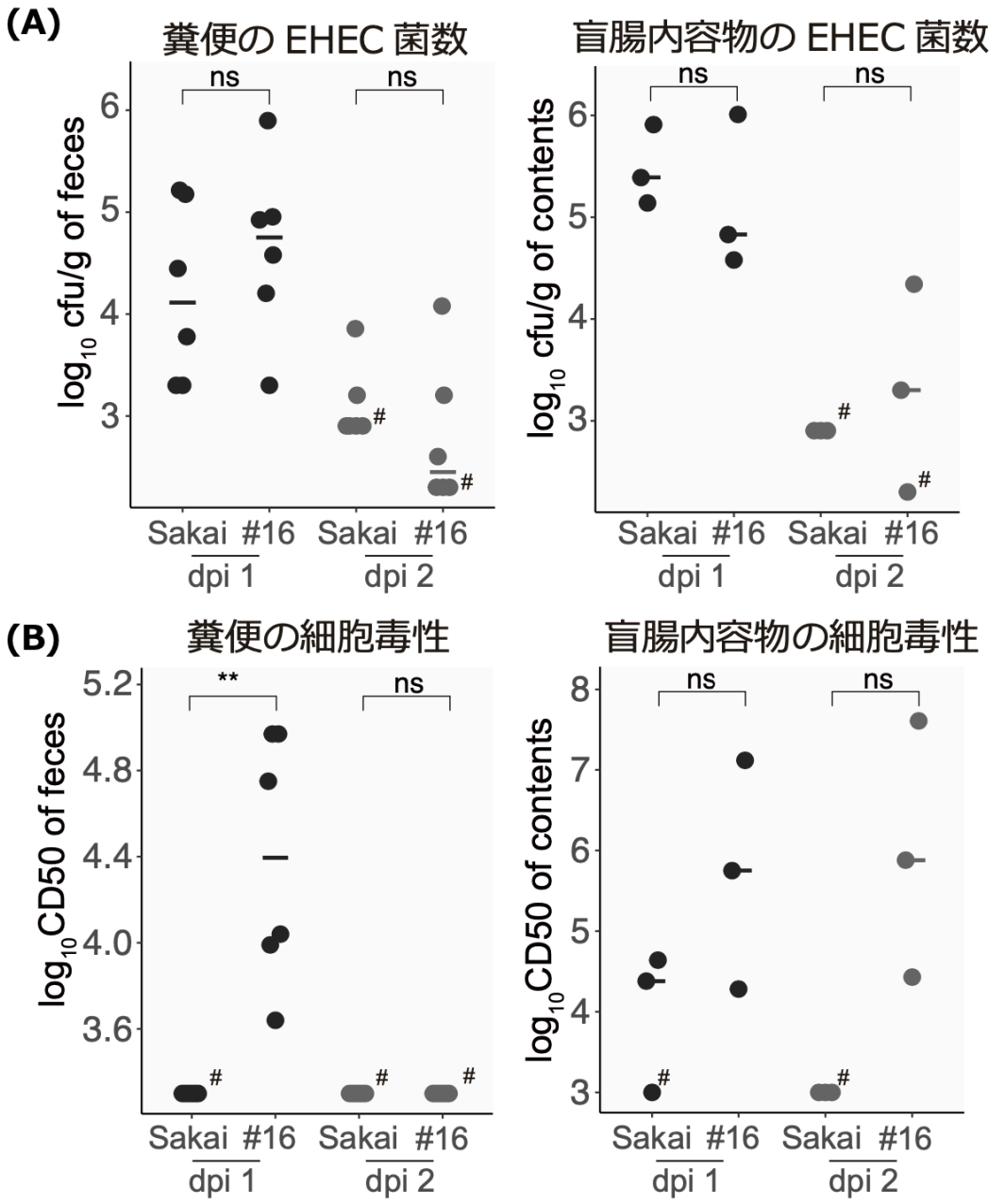


図2. EHEC感染マウスの糞便または盲腸内容物のEHEC菌数(A)及び細胞毒性(B)



Two-tailed Mann-Whitney U test. $p>0.05$ not significant(ns), $p<0.05$(*), $p<0.01$(**).

検出限界以下 (#)

別紙４

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書　籍　名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					

令和８年５月２５日

厚生労働大臣
~~（国立医薬品食品衛生研究所長）~~　殿
~~（国立保健医療科学院長）~~

機関名　杏林大学

所属研究機関長　職　名　学長

氏　名　渡邊　卓

次の職員の令和７年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　食品の安全確保推進研究事業

２．研究課題名　嫌気条件下における腸管出血性大腸菌の病原性制御因子、及び重症化因子に関する基礎研究

３．研究者名　（所属部署・職名）　医学部・講師

（氏名・フリガナ）　須藤　直樹・スドウ　ナオキ

４．倫理審査の状況

	該当性の有無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有　無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	□　■	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□　■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□　■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　）	□　■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ■　無 □（無の場合は委託先機関：　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ■（有の場合はその内容：　）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和８年５月２５日

厚生労働大臣
~~（国立医薬品食品衛生研究所長）~~　殿
~~（国立保健医療科学院長）~~

機関名　杏林大学

所属研究機関長　職　名　学長

氏　名　渡邊　卓

次の職員の令和７年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　食品の安全確保推進研究事業

２．研究課題名　嫌気条件下における腸管出血性大腸菌の病原性制御因子、及び重症化因子に関する基礎研究

３．研究者名　（所属部署・職名）　医学部・助教

（氏名・フリガナ）　北条　史・ホウジョウ　フヒト

４．倫理審査の状況

	該当性の有無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有　無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	□　■	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□　■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□　■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　　）	□　■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ■　無 □（無の場合は委託先機関：　　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ■（有の場合はその内容：　　）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。