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

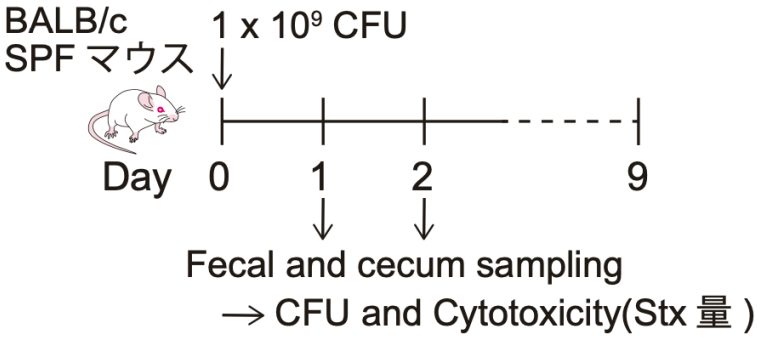
なし

H. 知的財産の出願・登録状況

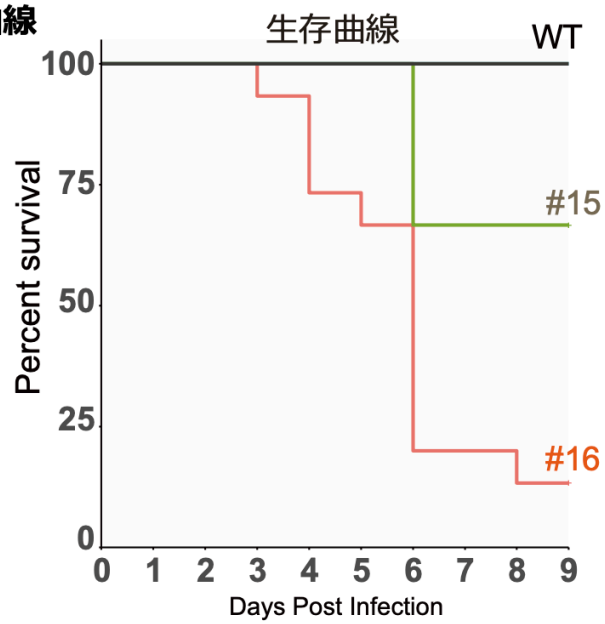
なし

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

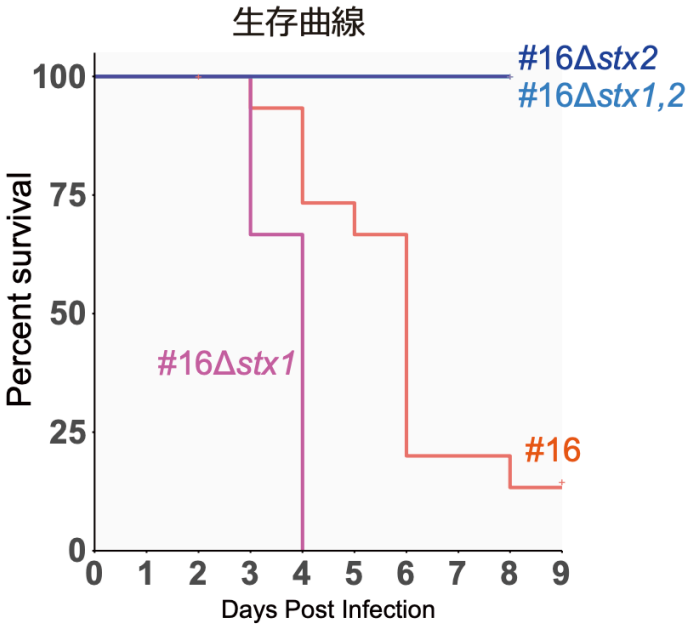
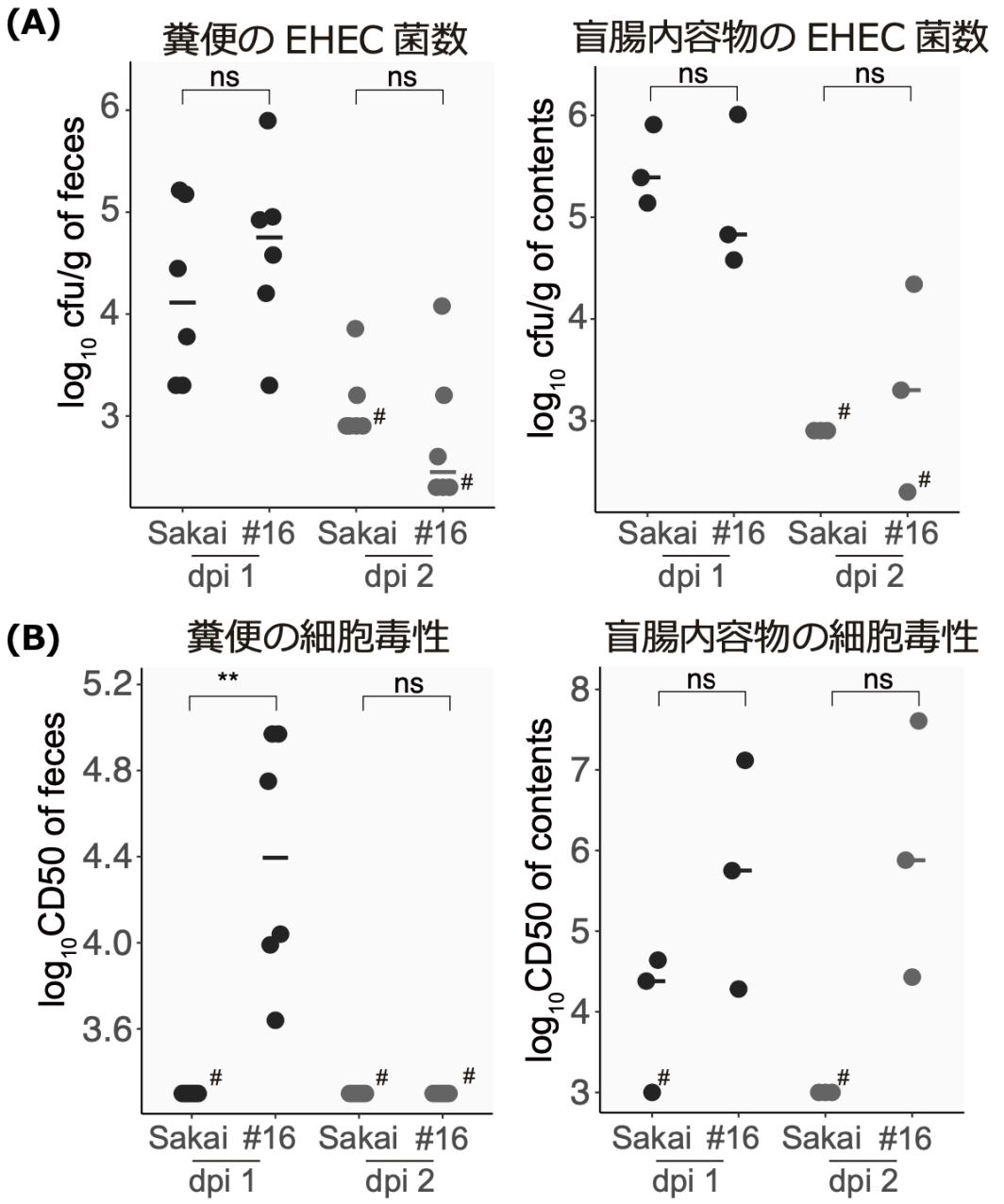


図2. EHEC感染マウスの糞便または盲腸内容物のEHEC菌数(A)及び細胞毒性(B)



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

検出限界以下 (#)