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