

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07733

研究課題名(和文) 乳児用粉乳汚染細菌 *Cronobacter* spp. の新分類と病原機構に関する研究研究課題名(英文) Studies on the taxonomy and mechanism of virulence of *Cronobacter* spp

研究代表者

岡田 由美子 (OKADA, Yumiko)

国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部・室長

研究者番号：50232137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：2008年に新分類となったクロノバクター属菌について、5菌種3亜種の病原性を比較検討した。スナネズミによる5菌種3亜種の検討では、44 での増殖性が低い1亜種を含めいずれも体内移行性を示した。抗生剤の前投与により腸内細菌叢を除去したマウスによる検討では、用いた4菌種はいずれも腸管定着性及び体内移行性を示した。体内侵入性が標準菌株より有意に高い体内侵入性を示した食品由来株のMLST解析結果を国際データベースに登録した。本研究から、今回検討した5菌種3亜種については全て経口感染後の腸管内定着、腸管バリアの突破及び腸間膜リンパ節への移行が可能であり、ヒトへの感染リスクを排除すべきではないと思われた。

研究成果の概要(英文)： *Cronobacter* spp., former *Enterobacter sakazakii*, was re-classified, and divided into 7 species and 3 subspecies. These species have the differences in their morphology and stress tolerance, however, their difference in virulence is still unknown. *Cronobacter* spp. transfer to infants via contaminated powdered milk. In this study, 5 species and 3 subspecies of *Cronobacter* spp. were examined their pathogenicities using established animal models. Male MGW gerbils were inoculated the bacterium, and bacterial numbers in mesenteric lymph node after 4days of infection were compared. In another model, mice were administrated with Penicillin G and streptomycin prior to bacterial infection to remove intestinal microflora. From these results, all 5 species tested in this study have the ability of colonization in gut, breakthrough of intestinal barrier, and translocation into abdominal organ, suggesting they have the similar levels of risk to human *Cronobacter* infection per oral.

研究分野：微生物学

キーワード：クロノバクター属菌 病原性 新分類 乳幼児調製粉乳

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) *Cronobacter* 感染症は、発生はまれであるが、新生児に髄膜炎や敗血症、壊死性腸炎を引き起こした場合の致死率は40から80%とされる。乳幼児への主要な感染経路は調整粉乳とされており、2006年に本菌の国際微生物規格が設定された。一方、その栄養成分を損なうことなく乾燥に強い本菌を完全に失活させる製造法は未だない。(2) *Cronobacter* 属菌は2008年以降 *Enterobacter sakazakii* 1菌種から *C. sakazakii* をはじめとする7菌種に分けられたが、コロニー形状や分離環境、発育可能温度等菌種間に差異が大きく見られる。研究開始当時の国際標準試験法である ISO/TS 22967:2006 は *E. sakazakii* をターゲットとし、新分類での全ての菌種を同等に検出できない可能性がある。また、病原性については未解明な部分が多い。

2. 研究の目的

Cronobacter spp. の7菌種は、その病原機構や菌種間の病原性の違いが未解明である。本菌感染症の原因物質は主に乳児用調製粉乳であり、粉乳に媒介される感染症は社会的インパクトが極めて強いいため、その病原機構の解明や菌種ごとのリスクを把握し、本菌感染症を制御することは大変重要性が高い。本研究では、実験動物を使った病原性評価手法を確立し、菌株間の病原性の差異を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

クロノバクター属菌標準菌株間の高温下増殖性の検討

C. sakazakii (Cs)、*C. malonaticus* (Cmal)、*C. muytjensii* (Cmuy)、*C. turisensis* (Ct)、*C. dublinensis* subsp. *dublinensis* (Cdd)、*C. dublinensis* subsp. *lausannensis* (Cdlau)、*C. dublinensis* subsp. *lactaridi* (Cdlac) の5菌種3亜種の標準菌株を用い、クロノバクター用選択分離培地4種及び非選択培地 (Tryptic Soy Agar) 上での44における増殖性を比較した。

スナネズミを用いた病原性評価系の確立

Cs 及び Cmal 標準菌株(約 10^9 CFU)を ICR マウス及び MGW スナネズミ (国立研究開発法人医薬基盤研究所より分与されたものから自家繁殖して使用) に経口投与し、4日後の腸間膜リンパ節内菌数を比較した。

スナネズミを用いた病原性評価系によるクロノバクター属菌の病原性の検討

で作出した評価系を用い、*Cronobacter* 属菌5種3亜種の標準菌株(約 10^9 CFU)をスナネズミに経口的に投与して感染4日目の腸間膜リンパ節内菌数を比較検討した。

免疫抑制剤投与による免疫不全スナネズミを用いた病原性評価系の検討

クロノバクター属菌の経口投与前日に、T細胞系の免疫抑制剤であるシクロスポリンAを用い、免疫不全スナネズミによる実験系を作成して、感染実験を実施した。菌液の経口投与の約20時間前にスナネズミの腹腔内に0.5mlのシクロスポリンA(和光純薬)溶液を60mg/kg BWとなるように投与することで作成した。スナネズミは免疫抑制剤非投与群10匹、投与群9匹を用い、0.2mLのCs菌液(約 4×10^8 CFU)を投与され、4日目の腸間膜リンパ節及び脾臓内の接種菌の菌数を測定した。

マウスを用いた病原性評価系の確立

Bergらの方法に基づき抗生剤を事前に投与し、腸内細菌叢を除去することによりクロノバクター属菌の腸管定着性及び体内移行性を高める病原性評価系を作成した。マウスは1群5匹を

用いた。クロノバクター属菌の経口投与 4 日前に、ペニシリン G 1500U/mL 溶液及びストレプトマイシン (777U/mg)2g/L 溶液の等量混合液 0.2mL をマウスに投与したのち抗生剤を加えた飲水による継続的投与を行った。Cs 菌液 0.2mL (約 10^9 CFU) を経口投与し、経口投与 3 及び 4 日後の盲腸内及び腸間膜リンパ節内に移行した菌数を計測した。

マウスを用いた評価手法による標準菌株及び食品由来株の病原性評価

Cs、Ct、Cdlau 及び Cmal の標準菌株及び食品由来株 HT 株を用いて、マウス経口感染による体内移行性の比較を行った。マウスは 1 群 5 匹を用いた。

研究室保有株の再分類

研究室保有の食品由来クロノバクター属菌 11 菌株について、7 つの house-keeping 遺伝子座(*atpD*, *fusA*, *glnS*, *gltB*, *gyrB*, *infB*, *pps*)を用いた Multilocus Sequence Typing (MLST) 解析 (Baldwin et al. 2009) を実施した。

4. 研究成果

クロノバクター属菌標準菌株間の高温度下増殖性の検討

5 菌種 3 亜種について標準菌株を用い、44 における増殖性を比較した。その結果、Cdlau のみが非選択培地を含むすべての培地上で他の菌種よりも有意に増殖性が低い結果を示し、検討したクロノバクター属菌の中で異なる高温下での増殖性を示していた (雑誌論文 1)。

スナネズミを用いたクロノバクター属菌病原性評価系の確立

予備検討として、スナネズミとマウスを用いたクロノバクター属菌経口投与後の腸間膜リンパ節への移行性を調べた。Cs 投与スナネズミでは 8 匹/9 匹、Cmal 投与スナネズミでは全 9 匹で経口投与後の腸間膜リンパ節への菌の移行が見られたが、マウスでは Cs 投与群、Cmal 投与群共に 2/9 匹のみ移行が見られた。スナネズミでは性別や月齢による経口投与後の腸間膜リンパ節への接種菌の移行性に差は見られなかったため、以後オス 3 か月齢を用いた。一方、脾臓からは菌の回収は見られなかった。

クロノバクター属菌標準菌株及び食品由来株のスナネズミを用いた病原性評価

の評価系を用いて、標準菌株及び食品由来株の病原性評価を行った (図 2-1 及び 2)。Cs (10 匹中 7 匹で移行) と Cmal (9 匹中 4 匹)、Ct (9 匹中 3 匹) 及び Cmuy (9 匹中 8 匹) の間には、経口投与後の体内移行性に有意な差は見られなかったが、Cdd (10 匹中 10 匹) と Cdlac (10 匹中 9 匹) は Cs (10 匹中 5 匹) よりも体内移行性が有意に高い結果を示した (Cdd: $p=0.0014$, Cdlac: $p=0.01$)。他のクロノバクター属菌よりも高温下での増殖性が有意に低かった Cdlau (9 匹中 3 匹) も、経口投与後にスナネズミ体内へ侵入が可能であることが示された。各菌株のスナネズミへの投与実験は 2 回反復して行い、同様の結果が得られた。

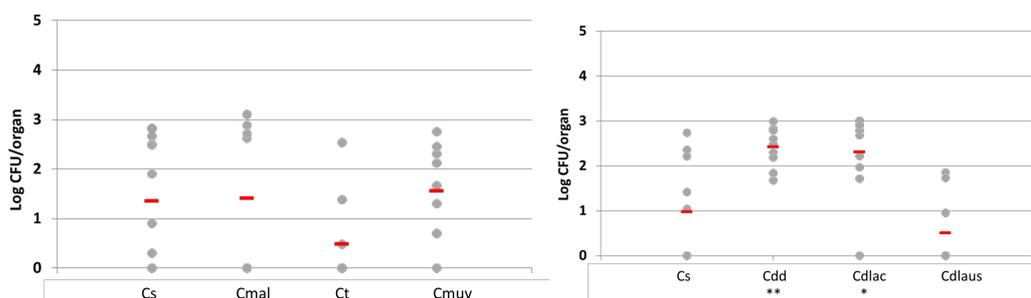


図 1. スナネズミを用いた経口投与後の体内移行性

免疫抑制剤投与スナネズミを用いた免疫不全モデルによる検討

腸間膜リンパ節への移行は非投与群で 10 匹中 1 匹、投与群では 9 匹中 5 匹で見られた。一方、いずれの群でも脾臓への移行は見られず、腸管バリアを突破後の Cs は免疫不全モデルにおいても全身への移行は示さず、腸間膜リンパ節内で除去されることが示唆された。同様のモデル系を用いた病原菌 *Listeria monocytogenes* の解析では、シクロスポリン A の投与により、脾臓に移行、増殖する接種菌の数は非投与群の約 100 倍となっており、髄膜炎を発症する個体が多く見られたことから、クロノバクター属菌の病原性はリステリアより弱く、免疫不全状態にあっても感染が成立しにくいことが明らかとなった。

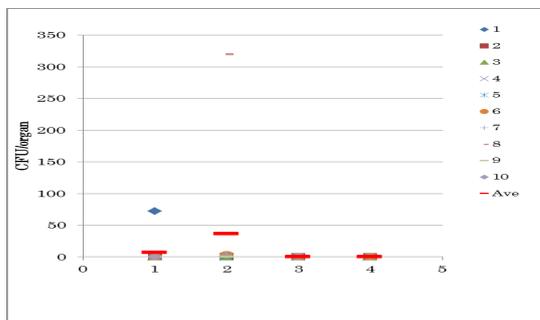


図 2. シクロスポリン A 投与スナネズミにおける Cs の体内移行性

- 1: シクロスポリン A 投与群の MLN 内菌数、2: 非投与群の MLN 内菌数
 3: 投与群の脾臓内菌数、4: 非投与群の脾臓内菌数

マウスを用いた病原性評価系の確立

菌感染当日から 4 日目までの盲腸内容物と腸間膜リンパ節内の一般細菌と接種菌の菌数を測定した結果、感染当日のマウスからは、5 匹中 3 匹の盲腸内容物から微量の一般細菌が検出され、事前の抗生剤投与による腸内細菌の除去が成功したことが確認された。感染 1 日目には、5 匹中 4 匹の盲腸内容物から前日の $10^2 \sim 10^9$ 倍の一般細菌が検出されており、抗生剤投与の中止により速やかに腸内細菌叢の復活が起こり始めた一方、接種菌の腸管内定着は見られなかった。感染 2 日目には、1 匹で接種菌の腸管内定着が観察され、同個体で腸間膜リンパ節への移行も確認された。過去の研究で本菌感染により Caco-2 細胞のタイトジャンクションが破壊されることが示されており (Emami et al. 2011)、本研究の結果でも感染 3 日目以降のクロノバクター属菌の腸管定着と平行して、腸間膜リンパ節への一般細菌の移行が見られ、腸管バリアの破壊が示唆された。一方で、Cs は感染 3 日目をピークとして速やかに盲腸内容物から減少していき、腸内細菌叢の回復により腸管内から排除されていくことが推察された。

表 1. 抗生剤投与マウスにおける Cs 腸管定着性及び体内移行性

	接種後日数				
	0 日目	1 日目	2 日目	3 日目	4 日目
盲腸内容物中の一般細菌陽性個体数	3/5	4/5	5/5	5/5	5/5

盲腸内容物中の接種菌陽性個体数	0/5	0/5	1/5 ^a	5/5	2/5
MLN 中の一般細菌陽性個体数	0/5	0/5	2/5	5/5	5/5
MLN 中の接種菌陽性個体数	0/5	0/5	1/5 ^a	5/5	0/5

a: 同一個体

マウスを用いた評価手法による標準菌株及び食品由来株の病原性評価

C. sakazakii (Cs)、*C. turicensis* (Ct)、*C. dublinensis* subsp. *lausanensis* (Cd)及び *C. malonaticus* (Cmal)の標準菌株を用いてマウス経口感染による体内移行性の比較を行った。その結果、Cmal と Ct 間での体内移行性を除き、いずれも有意差はないことが示された。食品由来の Cs である HT 株は、腸管内定着性は Cs 標準菌株より若干高い傾向を示す一方で、体内侵入性については t 検定で有意に高い ($p=0.0132$) 結果を示した。

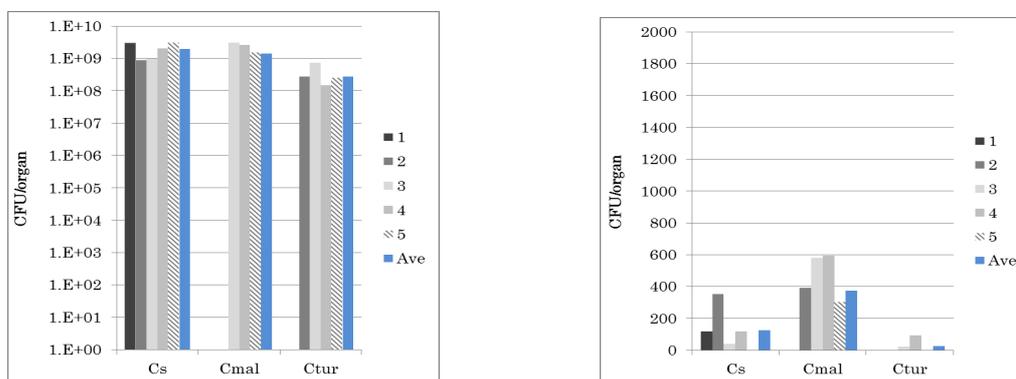


図 3-1 . 腸内細菌除去マウスにおけるクロノバクター属菌の盲腸内容物内 (左) 及び腸間膜リンパ節内菌数 (右) (Cs, Cmal, Ct)

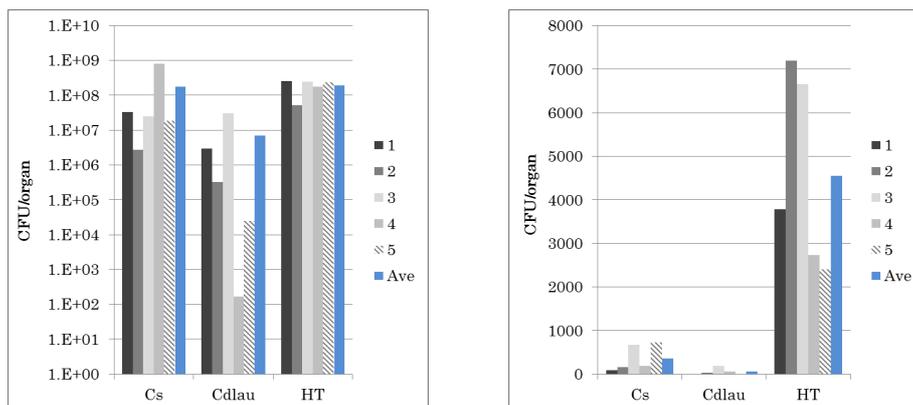


図 3-2 . 腸内細菌除去マウスにおけるクロノバクター属菌の盲腸内容物内 (左) 及び腸間膜リンパ節内菌数 (右) (Cs, Cdlau, 食品由来株 HT)

食品由来株の MLST 解析及び国際データベースへの登録

国内で販売されていた山芋から分離された Cs である HT 株について MLST を行い、その結果は日本国内分離株として初めて、*Cronobacter* MSLT Database

(<https://pubmlst.org/cronobacter/>) に登録された (ID2553, ST656) 。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

H TERAMURA, N FUKUDA, Y OKADA, H OGIHARA, Comparison of Chromogenic Selective Media for the Detection of Cronobacter spp. (Enterobacter sakazakii). Biocontrol Science, 2018. vol. 23, No. 1, p. 27-33 (査読有)

岡田由美子 , *Cronobacter* 属菌について . 日本食品微生物学会雑誌. 2017 vol.34, p65-75. (査読無、総説)

[学会発表] (計 1 件)

岡田由美子、鈴木穂高、百瀬愛佳、吉田麻利江、荻原博和 . クロノバクター属菌の病原性評価 . 第 160 回日本細菌学会 (2017.9)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 由美子 (OKADA, Yumiko)

国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部・室長

研究者番号 : 50232137

(2) 研究分担者

鈴木 穂高 (SUZUKI, Hodaka)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号 : 70342904

荻原 博和 (OGIHARA, Hirokazu)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号 : 70139054

(3) 研究協力者

寺村 哉 (TERAMURA, Hajime)

福田 典子 (FUKUDA, Noriko)

吉田 麻利江 (YOSHIDA, Marie)

百瀬 愛佳 (MOMOSE, Yoshika)