

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19128

研究課題名(和文) マウスを用いたStx2f産生Escherichia albertiiの病原性評価

研究課題名(英文) Evaluation of mice virulence of Stx2f-producing Escherichia albertii

研究代表者

日根野谷 淳(Hinenoya, Atsushi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：20548490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、新興腸管感染症菌Stx2f産生E. albertiiの病原性をin vivoレベルで評価することを目的とした。抗菌薬により腸内細菌を攪乱させたマウスに本菌を10個程度経口的に感染させることで、感染マウスが元気消失・体重減少の後、最終的に致死する感染モデルを構築できた。更に、致死の責任因子がStx2fであり、本菌がStx2fを産生することにより、腸管出血性大腸菌と同様に腎臓に傷害(尿細管上皮の萎縮・脱落)が起こすことを見出した。本マウス感染モデルは、Stx2f産生E. albertiiの詳細な感染および病態発症メカニズムの解明に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We tried to evaluate the virulence property of Stx2f-producing Escherichia albertii. Successfully, we could establish an animal experimental model. Mice infected by ~10 CFU of bacteria were not active, decreased their weights dramatically and eventually died. Further analysis using mutant strains lacking in their virulence genes revealed that causative factor of mice death is Stx2f produced by the bacteria. Atrophied and desquamated epithelium was observed in the tubules of kidneys of the mice, similar to those of mice infected by enterohemorrhagic Escherichia coli. This animal model could be utilized to clarify the in-depth mechanisms of infection and pathogenicity of Stx2f-producing E. albertii.

研究分野：細菌学

キーワード：Escherichia albertii shiga toxin Stx2f mice animal model

## 1. 研究開始当初の背景

*Escherichia albertii* は、腸内細菌科に属する通性嫌気性のグラム陰性桿菌である。本菌は、バングラデシュの沿岸地域において風土病として発生していた魚介類を原因食品とする腸管感染症の原因菌として知られ、元々は下痢原性 *Hafnia alvei* (通常は非病原性細菌) と同定されていた。しかしながら、遺伝学的解析手法の進歩に伴って分離菌の詳細な解析が可能になり、2003年 *Escherichia* 属菌の新種細菌 *E. albertii* と再分類された経緯がある。新興食中毒細菌 *E. albertii* は、ヒトに下痢、腹痛、嘔吐、発熱等の症状を引き起こす。以降、我が国を中心に集団食中毒事例の報告があり、最近では、2016年に沖縄および静岡においてそれぞれ219人および154人の患者が罹患した。本菌は獣医学的にも注目すべき重要な人獣共通感染症菌であり、野鳥の大量死や鶏蜂窩織炎の原因菌となることが疫学的に示唆されている。

本菌の細菌学的性状は腸管病原性大腸菌 (EPEC) と類似し、EPEC 同様に定着因子として *eae* 遺伝子にコードされるインチミンを有する。一方、EPEC が発展途上国における乳幼児下痢症の原因菌であるのに対し、*E. albertii* は我が国で発生した食中毒事例に見るように乳幼児だけでなく成人にも病原性を示したことから、EPEC よりも病原性が強い可能性がある。また、本菌は外毒素として細胞膨化致死毒素 (CDT) を産生する。更に一部の菌株が腸管出血性大腸菌 (EHEC) の主要病原因子である 2 型志賀毒素遺伝子 (*stx2a*, *stx2f*) を保有することも確認されていることから、本菌が EHEC と同様、ヒトに致死的な病態〔出血性大腸炎、溶血性尿毒症症候群 (HUS)、脳症〕を引き起こす危険性もある。しかしながら、本菌の感染症発生の実態および病態発症機構を解明する糸口を全く見出せない状況にあった。これらの原因として、国内外問わず *E. albertii* の有用な疫学解析ツールがなく、EPEC や *Shigella boydii* といった別の菌種に誤同定される等により、正確な疫学情報が蓄積されないこと、また動物実験モデルも確立されていないことが挙げられる。そんな中、申請者は、*E. albertii* の簡便・迅速な検出・同定法を確立し、更に *E. albertii* 感染症の下痢症起因菌としての重要性を疫学的に明らかにしてきた。その過程で分離した *E. albertii* の中に *Stx2f* を産生する菌株を発見した。予備実験として抗菌薬により腸内細菌を攪乱したマウスに本菌株を経口感染させたところ、感染 10 日目以降にマウスが元気消失・削瘦の後、死亡するという現象を見出した。これらの知見は、未だ不明な本菌の病態発症機構解明の突破口になると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、*Stx2f* 産生 *E. albertii* の腸管感染症細菌としての位置づけを明確に

し、更に腸管感染および死に至るまでの病態発症機構の解明に向けた基礎的検討を行うことを目的として、以下のことを行った。

- 1) *Stx2f* 産生 *E. albertii* のマウス経口感染致死モデルを構築する。
- 2) マウス致死の原因因子を同定する。
- 3) 発症マウスの病理学的解析を行う。

## 3. 研究の方法

### 1) マウス感染条件の検討

3 週齢の Balb/c あるいは ICR マウスに対し (1 群 5 匹) 感染前に抗菌薬 A を経胃投与し、同時に抗菌薬 B を含む水を自由飲水給与を開始した。各群に *Stx2f* 産生 *E. albertii* AKT5 株、*Stx2f* 非産生 9194 株 (*stx* 遺伝子陰性) を経胃投与した後 ( $10^{0.8}$  CFU/匹)、0.5  $\mu$ g/g 体重の mitomycin C (MMC) を 3 時間おきに 3 回 (感染 18、21、24 時間後) 腹腔内投与した。培養法により投与菌の糞便中排菌数、体重および生存率を経日的に観察した。尚、実験に使用したマウスは、ケージ毎に個別換気システムによる飼育を行った。

### 2) マウス致死の責任因子の同定

Suicide vector を用いた相同組換えにより、AKT5 株から既知の病原遺伝子を欠失させた 3 種類の変異株を作製した ( $\Delta$ *stx2f*,  $\Delta$ *cdt-I*,  $\Delta$ *eae*) を作製した。欠損株の毒素産生性について、抗 *Stx2fA* 血清および抗 *Cdt-IB* 血清を用いたウエスタンブロッティング、および Vero 細胞および CHO 細胞を用いた細胞毒性試験により、*Stx2f* および *CDT-I* 産生性の消失を確認した。作製した変異株を用いて (1) で確立したマウス感染実験を行った。

### 3) 腎臓の病理学的観察

人道的エンドポイントに達したマウスについては、安楽死の後、腎臓を採取した。ホルマリン固定、組織切片を作製した後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、顕微鏡下で観察を行った。

## 4. 研究成果

### 1) マウスに対する感染条件の最適化

1-1) マウス系統：近交系 (Balb/c) およびクローズドコロニー (ICR) のマウスにそれぞれ AKT5 株 ( $10^8$  CFU) 感染させたところ、いずれの感染群においても 80% 以上の個体が元気消失、被毛粗剛、削瘦、多尿が疑われる床敷きの湿潤が確認された後に死亡した。即ち、マウスの系統は AKT5 株の病態発症に影響を与えないことが明らかになった。以降の実験では、ICR マウスを使用した。

1-2) 感染菌数の決定：マウスを 5 群に分け、 $10^0$ 、 $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^8$  CFU/匹となるようにそれぞれ AKT5 株を感染させた。 $10^0$  CFU 投与群では、感染翌日に 1 個体のみ AKT5 株の糞便中への排菌が認められ (約  $10^8$  CFU/g 糞便)、致死率は 20% (1/5 匹) であった。その他の 4 群では、感染翌日から全ての個体がおおよそ  $10^8$  CFU/g 糞便の AKT5 株を持続的に糞便中へ排菌し、以降観察期間を

通して同等の排菌を続けた。そして、いずれの群においても感染3週間以内に80%以上の個体が死亡した。即ち、10個程度の菌数で感染が成立し、それ以上菌数を増やしても病態に影響しないことが明らかになった。

## 2) マウス致死の原因因子の同定

2-1) 病原遺伝子欠損株の作製: *E. albertii* の病原因子として報告されている *stx2f*, *cdt-I* および *eae* の欠損変異株 (*stx2f*, *cdt-I*, *eae*) をそれぞれ作製した。*E. albertii* では2種類のCDT (*Eacdt*, *cdt-I*) が知られているが、AKT5株が保有する *Eacdt* 遺伝子は一塩基欠損により、その機能を消失していることから、本研究では除外した。*stx2f* および *cdt-I* では、それぞれ *Stx2f* および CDT-I 産生能が完全に消失していることが確認できた。*eae* ではどちらの毒素産生能も影響を受けていないことも確認できた。また、3種類の欠損株は、野生株と同等の増殖能を有することも確認でき、マウス感染実験において各種病原因子の影響を解析できるものと判断した。

2-2) 病原遺伝子欠損株を用いたマウス感染実験: 作製した3種類の病原遺伝子欠損株 (*stx2f*, *cdt-I* および *eae*) を1)の条件でマウスに感染させたところ、*cdt-I* および *eae* 感染群では、全ての個体が野生株と同等の糞便中排菌数を示し、野生株と同様の症状を示した後に死亡した。一方、*stx2f* 感染群では、野生株と同等の糞便中排菌数(約10<sup>8</sup> CFU/g 糞便)が認められたものの、観察期間を通して、非病原性大腸菌を感染させた陰性コントロール群と同様、臨床症状は全く認められず、体重増加を続けた。以上のことから、マウス致死の原因因子は *Stx2f* であり、本感染モデルにおいては、その他の CDT-I および インチミンは無関係であることが明らかとなった。

## 3) 腎臓の病理学的観察

マウス致死の責任因子が *Stx2f* であったことから、*Stx2* の主要標的臓器である腎臓の病理学的観察を行った。

野生株感染個体から採取した腎臓においては、近位尿細管内にデブリ(細胞片、核片)が認められ、尿細管上皮が脱落している像が観察できた。また、尿細管の管腔壁の菲薄化や肥大、尿細管上皮細胞質内に空胞化も認められた。また、*cdt-I* および *eae* 感染個体においても、野生株感染個体と同様の腎臓病変が認められた。一方、*stx2f* 感染個体においては、陰性コントロール感染群と同様に、尿細管上皮細胞に形態異常はなく、管腔内への細胞の脱落も認められなかった。

以上のことから、EHEC 同様、AKT5 株もまた、マウスに感染後、産生する *Stx2f* により腎臓に傷害を起こしていることが明らかとなった。

これまで、*E. albertii* の動物感染モデルはなく、*in vivo* レベルでの本菌の病原性については、全く不明であった。さらに、*Stx2* の新

規サブタイプとして発見された *Stx2f* についても、培養細胞への毒性が示されたのみで、病態との関係については、全く情報がないのが現状であった。本研究では、*Stx2f* を産生する *E. albertii* の実験動物モデルを構築し、本菌の病原性を *in vivo* レベルで観察することに初めて成功した。また、感染マウスは HUS の3主徴(溶血性貧血、血小板減少、急性腎障害)のうちの1つである腎障害を呈していた。本動物モデルを用いた更なる病原性評価を行っていくことで、*Stx2f* 産生 *E. albertii* の病原性解明、延いては新規 HUS 起因菌としての位置づけを明確にできるものと考えられる。

## 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11件)

1. Arai N, Sekizuka T, Tamamura Y, Tanaka K, Barco L, Izumiya H, Kusumoto M, Hinenoya A, Yamasaki S, Iwata T, Watanabe A, Kuroda M, Uchida I, Akiba M. Phylogenetic characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its monophasic variant isolated from food animals in Japan revealed replacement of major epidemic clones in the last four decades. *J Clin Microbiol*. 2018. 56(5). pii: e01758-17. 査読有
2. Nahar A, Awasthi SP, Hatanaka N, Okuno K, Hoang PH, Hassan J, Hinenoya A, Yamasaki S. Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *Escherichia coli* in domestic and imported chicken meats in Japan. *J Vet Med Sci*. 2018. 80(3):510-517. 査読有
3. Hinenoya A, Tran Thi Thu S, Nguyen NT, Nguyen HC, Le Nguyen DD, Hoang PH, Awasthi SP, Hassan J, Sumimura Y, Yamamoto Y, Yamasaki S. Isolation and molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* from industrial food animals in Mekong Delta, Vietnam. *Jpn J Vet Res*. 2018. 66:1-12. 査読有
4. Ombarak RA, Hinenoya A, Elbagory AM, Yamasaki S. Prevalence and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from raw milk and raw milk cheese in Egypt. *J Food Prot*. 2018. 81(2):226-232. 査読有
5. Hinenoya A, Yasuda N, Mukaizawa N, Sheikh S, Niwa Y, Awasthi SP, Asakura M, Tsukamoto T, Nagita A, Albert MJ, Yamasaki S. Association of cytolethal distending toxin-II gene-positive *Escherichia coli* with *Escherichia albertii*,

an emerging zoonotic pathogen. *Int J Med Microbiol.* 2017. 307(8):564-571. 査読有

6. Hatanaka N, Shimizu A, Somroop S, Li Y, Asakura M, Nagita A, Awasthi SP, Hinenoya A, Yamasaki S. High prevalence of *Campylobacter ureolyticus* in stool specimens of children with diarrhea in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2017. 70(4):455-457. 査読有

7. Somroop S, Hatanaka N, Awasthi SP, Okuno K, Asakura M, Hinenoya A, Yamasaki S. *Campylobacter upsaliensis* isolated from dog produces high titer of cytolethal distending toxin. *J Vet Med Sci.* 2017. 79(3):683-691. 査読有

8. Hoang PH, Awasthi SP, DO Nguyen P, Nguyen NL, Nguyen DT, LE NH, VAN Dang C, Hinenoya A, Yamasaki S\*. Antimicrobial resistance profiles and molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from healthy adults in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J Vet Med Sci.* 2017. 79(3):479-485. 査読有

9. Nakayama T, Tuyet Hoa TT, Harada K, Warisaya M, Asayama M, Hinenoya A, Lee JW, Phu TM, Ueda S, Sumimura Y, Hirata K, Phuong NT, Yamamoto Y. Water metagenomic analysis reveals low bacterial diversity and the presence of antimicrobial residues and resistance genes in a river containing wastewater from backyard aquacultures in the Mekong Delta, Vietnam. *Environ Pollut.* 2017. 222:294-306. 査読有

10. Hatanaka N, Kamei K, Somroop S, Awasthi SP, Asakura M, Misawa N, Hinenoya A, Yamasaki S. A PCR-RFLP assay to detect and type cytolethal distending toxin (*cdt*) genes in *Campylobacter hyointestinalis*. *J Vet Med Sci.* 2017. 79(2):336-342. 査読有

11. Hinenoya A, Yasuda N, Hibino T, Shima A, Nagita A, Tsukamoto T, Yamasaki S. Isolation and characterization of an *Escherichia albertii* producing three different toxins from a child with diarrhea. *Jpn J Infect Dis.* 2017. 70(3):252-257. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

1. Hinenoya A, Shimomura Y, Yasuda N, Awasthi SP, Yatsuyanagi J, Yamasaki S. Stx2f-producing *Escherichia albertii* infection causes mice death. ASM microbe 2017. 1-5 June, 2017. New Orleans, USA.

2. 清水懸範, 畑中律敏, 名木田章, 朝倉昌博, Awasthi SP, 日根野谷淳, 山崎伸二. 我が国の小児下痢症を対象とした *Campylobacter ureolyticus* の保菌調査. 2017年3月19-21日. 第90回日本細菌学

会総会(宮城県仙台市)

3. Hinenoya A, Shimomura Y, Yasuda N, Awasthi SP, Yatsuyanagi, Yamasaki S. Evaluation of Stx2f-producing *Escherichia albertii* virulence in mice model. 2017年3月19-21日. 第90回日本細菌学会総会(宮城県仙台市)

4. 日根野谷淳, 下村義雄, 安田憲朋, 八柳潤, 山崎伸二. Stx2f産生 *Escherichia albertii* のマウスに対する病原性評価. 2016年11月10-11日. 第20回腸管出血性大腸菌感染症研究会(富山県富山市)

5. Awasthi SP, Saidi SM, Chowdhury N, Asakura M, Hinenoya A, Iijima Y, Yamasaki S. Serotype switching and emergence of multidrug resistance in *V. cholerae* during subsequent cholera outbreaks in cholera endemic zones of Kenya. 2016年10月20-21日. 第50回腸炎ピブリオンシンポジウム(大阪府吹田市)

6. 日根野谷淳, 下村義雄, 安田憲朋, 八柳潤, 山崎伸二. マウスを用いた Stx2f 産生 *Escherichia albertii* の病原性評価. 2016年7月14-16日. 第63回トキシシンポジウム(山形県天童市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/intpre/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

日根野谷 淳 (HINENOYA ATSUSHI)

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号: 20548490

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし