

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500499

研究課題名(和文) ヒト疾患モデルへの応用を目指したコモンマーモセットの腸管病原性大腸菌症の病態解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of Enteropathogenic Escherichia coli infection in the common marmosets aimed at application to human disease model

研究代表者

林元 展人 (Hayashimoto, Nobuhito)

公益財団法人実験動物中央研究所・その他部局等・センター長

研究者番号：30332208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マーモセットの腸管病原性大腸菌感染症の病態を解明することを目的に実験を行った。当該動物の様々な状態の糞便609検体に対して実施した疫学調査では、正常便の13.2%(41検体)、下痢便の19.5%(39検体)、血便の53%(52検体)で本菌が分離され、当該動物の血便症状に本菌が関与していることが示唆された。次に本菌は当該動物の出血性大腸炎の起因になるかを明らかにするために感染実験を実施した。2群(10匹らびに10LFU/ml)、各群4匹の動物を設定した。その結果、高濃度群では2日目までに全個体に血便が確認された。このことから本菌は当該動物の出血性大腸炎の起因菌となることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to reveal the pathology of intestinal pathogenic E. coli (EPEC) infection in common marmosets. The survey for the various state fecal samples revealed relatively high positive rate of EPEC in bloody stool samples (53%, 52 samples) compared with those of other fecal samples (normal 13.2%; 41 samples, diarrhea 19.5%; 39 samples). Then experimental infection study was performed to 8 animals. The infection groups were set 4 animals for high dose group (108 CFU/ml) and low dose group (104 CFU/ml), respectively. As the results, all animals in the high dose group showed bloody stool till post inoculation days 2. These results suggested that EPEC is a causative agent of hemorrhagic colitis in common marmosets.

研究分野：実験動物感染症学

キーワード：腸管病原性大腸菌 コモンマーモセット 病態解明

### 1. 研究開始当初の背景

病原性大腸菌のうち、腸管病原性大腸菌(EPEC)は感染により、乳幼児を中心に重篤な下痢、嘔吐を引き起こす。EPECは毒素を産生せず、3型分泌装置という注射針状の構造物を持ち、この装置により宿主の細胞膜に穴を開け、エフェクターと呼ばれる病原蛋白を注入することにより細胞の生理機能に影響を与える。しかし、病原発生のメカニズムの概略は判明しているものの、実際はどのように細胞に作用し、最終的に宿主に下痢を発症させるかは未だ不明である。このように病原メカニズムの解明が不十分である理由の一つとしてEPEC感染は極めてヒトに特異的であり、他種の動物では感染が成立しないため、実験動物を用いたin vivo感染モデルが確立できていないという点が挙げられる。有効なin vivo感染モデルを確立することにより、EPECのさらなる病原メカニズムの解明、そして新薬の開発につながることを期待される。

### 2. 研究の目的

わが国のコモンマーモセットに散見される腸管病原性大腸菌の病態を疫学的、微生物学的、組織病理学的、そして分子生物学的に解明することにより、未だ適切な実験動物モデルが存在しない本菌のヒト疾患モデルとしての応用を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) わが国のコモンマーモセットコロニーにおける腸管病原性大腸菌の疫学調査：

実験者所属施設における状態の異なるコモンマーモセット由来糞便サンプル609検体(正常便310検体、下痢便200検体、血便99検体)を集め、DHL寒天培地による菌分離、既知の病原性因子をコードする遺伝子(eae, EAF, bfp, ST, LT, STx)の検出を行った。また同時にEPECスクリーニング検査の簡便化を目的に分離株318株を用い、市販の出血性大腸菌用酵素基質培地(XM-EHEC培地、日本製薬)を評価し、その有用性を探った。

(2) 腸管病原性大腸菌分離株の分子生物学的性状解析：

血便サンプル由来分離株10株、正常便サンプル由来分離株14株の遺伝学的な特徴を明らかにするために、分離株に対しパルスフィールド電気泳動法によるタイピングを行った。条件は検討の結果、Xba I digestion, 6.0v/cm, 2.2-52.25, 19hrsに設定した。

(3) 腸管病原性大腸菌分離株を用いたコモンマーモセットへの感染実験：

疫学調査で得られた知見に基づき、EPECがコモンマーモセットの出血性大腸炎の起因となるかを明らかにするために、感染実験を行う。菌液濃度の異なる感染群を2群(10<sup>8</sup>

ならびに10<sup>4</sup>CFU/ml、各4匹)設定し、2mlの菌液を経口投与した。

### 4. 研究成果

(1) わが国のコモンマーモセットコロニーにおける腸管病原性大腸菌の疫学調査：

疫学調査の結果、正常便では13.2%(41検体)、下痢便では19.5%(39検体)、血便では53%(52検体)の割合でEPECが陽性となった。血便とそれ以外(正常便、下痢便)と比較すると前者が53%の陽性率であるのに対し、後者は15.7%の陽性率で、血便からの分離陽性率が高いことが明らかとなった。

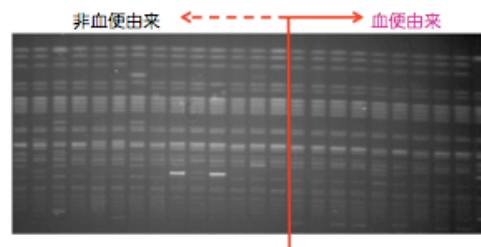
また本実験と並行して実施した出血性大腸菌分離用の酵素基質培地であるXM-EHEC培地の評価において、調べた318株のうち従来法でEPECと同定された132株の分離株は本培地上で特徴的なターコイズブルーのコロニーを形成し、他種腸内細菌と容易に区別されることが明らかとなった。



以上の結果から、EPECはコモンマーモセットの出血性大腸炎に関与していることが強く示唆されると同時に、XM-EHEC培地はEPECの分離に有用であることが明らかとなった。

(2) 腸管病原性大腸菌分離株の分子生物学的性状解析：

パルスフィールド電気泳動法を用いた血便由来EPEC分離株10株ならびに正常便由来分離株14株におけるタイピングでは全て同じバンドパターンが得られた。このことから、血便ならびに正常便由来EPEC分離株は遺伝学的な差がなく、その由来は同一の株である可能性が示唆された。



PFGEによる分離株の遺伝子型別

(3) 腸管病原性大腸菌分離株を用いたコモンマーモセットへの感染実験：

高濃度菌液感染群のうち2匹に軽度の元気消失がみられ、感染後1日、2日でそれぞれ血便を排出した。残りの2匹は元気消失が認められないものの、感染後2日で血便を排

出した。

### 血便の例



高濃度菌液接種群、  
個体1: 感染後1日目



高濃度菌液接種群、  
個体2: 感染後2日目

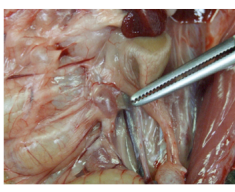
軽度の元気消失が見られた個体2匹において、接種後3日に剖検した結果、大腸全長において弛緩が認められた他、大腸内の泥状内容物貯留、結腸粘膜面の点状出血が認められた。元気消失が認められなかった2個体において、1匹は接種後4日で、もう1匹は接種後7日で血便症状が退行した。感染後14日のこれら2個体の剖検の結果、腸間膜ならびに回盲部リンパ節の腫大が認められたものの、大腸の弛緩、粘膜面の出血等は認められなかった。低濃度菌液感染群の個体2匹(他2匹は無症状の感染後3日目に剖検、著変なし)においては、感染後7日目以降に下痢が認められたものの、血便の排出は見られなかった。

### 剖検所見 (高濃度菌液接種群: 個体2)

大腸の弛緩

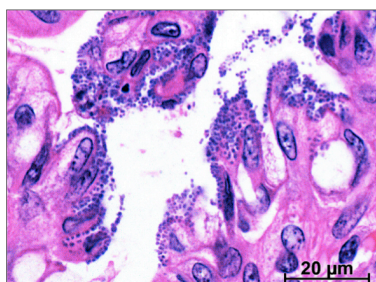


腸間膜リンパ節腫大



また、全ての感染群の個体の盲腸、結腸においてEPECが再分離された。また組織病理学的検査では菌の盲腸粘膜への付着像が確認された。

### 組織病理学的所見 (高濃度菌液接種群: 個体1、盲腸) ⇒ 菌の粘膜への付着



陰性対象群の2匹においては消化器症状とEPECの分離は認められなかった。これらの結果から、EPECはマーモセットの出血性大腸炎の原因の一つとなることが明らかになった。また、その血便症状は一過性であり、経過とともに退行することが明らかになった。

### 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0件)

[学会発表] (計4件)

1. 林元展人、森田華子、井上貴史、保田昌彦、内田立樹、佐藤弘康、清水明子、小嶋由香、岩瀬耕一、岡部信彦、伊藤豊志雄、2013、腸管病原性大腸菌はコモンマーモセットの出血性下痢症に関与する、第60回日本実験動物学会総会
2. 森田華子、井上貴史、保田昌彦、内田立樹、佐藤梓、林元展人、2013、マーモセット由来EPEC簡易検出のためのXM-EHEC培地の応用、第60回日本実験動物学会総会
3. Hayashimoto, N., Morita, H., Inoue, T., Yasuda, M., Sato, H., Shimizu, A., Kojima, Y., Iwase, K., Okabe, N., Itoh, T. 2013, Enteropathogenic *Escherichia coli* infection with gastrointestinal hemorrhage in the common marmosets, 12<sup>th</sup> FELASA-SEACAL Congress
4. 林元展人、井上貴史、保田昌彦、森田華子、伊藤豊志雄、2014、コモンマーモセット血便由来 *eae* 遺伝子保有大腸菌の当該宿主への実験感染、第61回日本実験動物学会総会

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.iclasmonic.jp/jigyou/confere  
nce/confpresen14.html](http://www.iclasmonic.jp/jigyou/confere<br/>nce/confpresen14.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林元 展人 (HAYASHIMOTO, Nobuhito)

公財) 実験動物中央研究所・ICLAS モニ  
タリングセンター・センター長

研究者番号：30332208

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

保田昌彦 (YASUDA Masahiko)

公財) 実験動物中央研究所・病理解析セ  
ンター・主任

研究者番号：40353479

井上貴史 (INOUE Takashi)

公財) 実験動物中央研究所・マーモセッ  
ト研究部・室長

研究者番号：60465937