

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670208

研究課題名(和文)腸管出血性大腸菌の病原性評価に有用な絶対嫌気バイオロジーの確立

研究課題名(英文)Establishment of absolute anaerobic biology for pathogenic evaluation of EHEC

研究代表者

清水 健 (Shimizu, Takeshi)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70312840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：腸管が感染部位である腸管出血性大腸菌では絶対嫌気環境での病原性、および抵抗性の評価が重要であることは容易に理解される。そこで絶対嫌気環境での腸管出血性大腸菌の増殖性、毒素産生性、抵抗性、遺伝子発現性、薬剤感受性などを嫌気チャンバーを用いて明らかにした。このことによって腸管出血性大腸菌の病原性評価に新たに絶対嫌気環境における評価項目が必要である可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Following the ingestion of contaminated food or water, enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) enters the gastrointestinal tract and is released into the intestine. It is important for estimation of pathogenicity and host immuno resistance of EHEC under absolute anaerobic conditions. Thus, we determined growth rate, production of Shiga toxins, resistance against reactive oxygen species, expression of virulence factors and drug resistance in EHEC under absolute anaerobic conditions using anaerobic chamber.

研究分野：病原細菌学

キーワード：腸管出血性大腸菌 志賀毒素 嫌気状態 活性酸素種 増殖性 病原性 抗菌薬

1. 研究開始当初の背景

EHEC のような下痢原性の病原細菌は経口的に体内に侵入し、食道や胃を通過した後、小腸や大腸の腸管上皮細胞に付着、定着する。この時に各々の病原細菌は特徴的な病原因子を発現して、感染を成立させ、ヒトに下痢などの症状を引き起こす。このように感染成立には小腸や大腸などの腸管上皮細胞への付着、定着、そしてそこでの増殖が重要であるが、この環境はきわめて嫌氣的である。胃の場合には食道を通して大気の混入があるため、微好気環境を維持しているが、腸管内には空気は届かず、また、存在する微量の酸素も腸管内に存在する嫌気性細菌が持つ O_2 スカベンジャーによって速やかに消費される。このようなことから腸管が感染部位である病原細菌では絶対嫌気環境での病原性、および抵抗性の評価が重要であることは容易に理解される。しかしながら、そのことを確認するための方法論の限界や実験の困難さによって、ほとんど行われていない。しかし、我々は最近、嫌気チャンバーを用いて、マクロファージの殺菌物質として知られる一酸化窒素(NO)に対する EHEC の抵抗力獲得方法が絶対嫌気状態と好気状態では全く異なっていることを見出した(1)。このことは EHEC では酸素がある時と無い時は持っている2種類の NO 分解酵素の働きが全く異なっていることを示している。すなわち一般によく知られている NO 分解酵素である NO dioxygenase は酸素がある環境でのみ働き、酸素が全くない状態では NO を分解できない。その代わりに今までほとんど知られていなかった NO reductase が絶対嫌気環境では働く。

2. 研究の目的

腸管が感染部位である病原細菌では絶対嫌気環境での病原性、および抵抗性の評価が重要であることは容易に理解される。しかしながら、そのことを確認するための方法論の限界や実験の困難さによって、ほとんど行われていない。そこで我々はマウスでの病原性を評価した複数の腸管出血性大腸菌(EHEC)株を用いて、絶対嫌気環境での増殖性、薬剤感受性、毒素産生性、抵抗性、遺伝子発現性などを嫌気チャンバーを用いて明らかにし、各々の項目の変動とマウスでの病原性との関連を菌株ごとに比較する。これによって今まで明らかになっていなかった、あるいは注目されていなかった新たな病原性関連要素や病原因子が判明することが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 感染実験での EHEC の病原性評価

複数の EHEC の病原性を低栄養マウス感染モデルを用いる感染実験で評価した。経口接

種した腸管出血性大腸菌の菌数、死亡した割合、死亡までの日数等で病原性を評価した。また、糞便への排菌も確認した。それらの結果から、病原性の強い菌株、中程度の菌株、比較的弱い菌株などを選び、絶対嫌気環境での性状と比較した。

(2) EHEC の絶対嫌気環境での増殖性

動物実験で病原性の評価を行った複数の EHEC 株を用いて、絶対嫌気環境での増殖性を確認した。嫌気チャンバー内にインキュベーターを設置して、絶対嫌気環境で37℃で培養した。菌株が増殖している培養液を計時的に取り出し、平板培地に拡げることによって、生菌数を決定した。培養液は大腸菌培養用の LB、培養細胞用の培地を使用した。これらの結果から、菌株ごとの絶対嫌気環境における増殖性を明らかにした。

(3) EHEC の絶対嫌気環境での活性酸素種に対する抵抗性

動物実験で病原性の評価を行った複数の EHEC 株を用いて、絶対嫌気環境での活性酸素種に対する抵抗性を確認した。一定時間、嫌気チャンバー内で培養した後に、各種活性酸素種を発生する試薬を添加し、それぞれの殺菌効果を生菌数を算出することによって明らかにした。

(4) EHEC の絶対嫌気環境での抗生物質に対する薬剤感受性

動物実験で病原性の評価を行った複数の EHEC 株を用いて、絶対嫌気環境での抗生物質に対する薬剤感受性を MIC 法を用いて確認した。

(5) EHEC の絶対嫌気環境での抗生物質による志賀毒素産生促進効果

動物実験で病原性の評価を行った複数の EHEC 株を用いて、嫌気チャンバー内の絶対嫌気環境における抗生物質による志賀毒素産生促進効果を確認した。一定時間、嫌気チャンバー内で培養した後に、各種抗生物質を添加し、それぞれの菌株における志賀毒素産生量を Gb3-ELISA で確認した。

4. 研究成果

(1) 感染実験での EHEC の病原性評価

EHEC 0157 10 株(表1)を用いて病原性の評価を行なった。各々の菌を 10^{10} cfu 投与して致死活性で病原性を評価したところ、C1, C13, C18 で死亡したが、残りの7株では死亡例はなかった。このことから EHEC 0157 10 株のうち、致死活性で評価して病原性が高いと思われるものが3株存在した。

(2) EHEC の絶対嫌気環境での増殖性

EHEC 0157 10 株を LB 培地を用いて好気条件と嫌気条件で培養を行い、継時的に吸光度を測定して増殖曲線を作成した。その結果、

好気条件で C13 株の増殖が遅かった。一方、嫌気条件での増殖も確認したが、同様に C13 が遅かった。このことから C13 株は好気条件と嫌気条件共に増殖の遅い菌株であった。他の菌株間では差は見出せなかった。

(3) EHEC の絶対嫌気環境での活性酸素種に対する抵抗性

活性酸素種には活性酸素、過酸化水素(H₂O₂)や NO などが含まれる。そこでそれぞれの活性酸素種に対する増殖抑制効果を EHEC 0157 10 株を用いて検討した。まず活性酸素に対する抵抗性を確認するために嫌気チャンバーを用いた絶対嫌気環境で検討した。しかしながら、Paraquat は好気的な状態でないと活性酸素を発生させることができず、嫌気条件での検討はできなかった。一方、好気条件では増殖の遅かった C13 株は Paraquat に感受性があったが、他の 9 株はそれほどでもなかった。次に、H₂O₂ に対する抵抗性を検討したところ、絶対嫌気条件では最小発育阻止濃度は 0.002 - 0.004% と 10 株差はなかった。一方、好気条件でも同様な結果であった。このことから、H₂O₂ に関しては嫌気状態と好気状態で抵抗性に差は認められなかった。さらに NO についても検討した。すでに EHEC 0157 には 2 種類の NO 還元酵素遺伝子(norV)が存在していることが知られており、完全型には NO 除去活性が存在しているが、欠失型には NO 除去活性がない。また、この NO 還元酵素は嫌気条件でのみ NO 除去活性を持つ。そこで嫌気条件と好気条件での NO に対する抵抗性を調べたところ、今までの報告の一致して完全型 NO 還元酵素を持つ EHEC の方が吸光度が上昇した。一方、好気条件ではそのような関連はなかった。しかしながら、これらの結果からはどの菌株が嫌気状態で活性酸素種に明確に抵抗性があるかは明らかにならなかった。

(4) EHEC の絶対嫌気環境での抗生物質に対する薬剤感受性

抗菌薬に対する感受性を嫌気条件と好気条件で検討した。ノルフロキサシンの MIC は好気性でも嫌気性でも 10 株差はなかった。アンピシリンは嫌気条件の方が若干 MIC は下がったがそれほど差はなかった。カルベニシリン、カナマイシンは嫌気条件でも好気条件でも 10 株差はなかった。テトラサイクリンは嫌気状態の方が若干 MIC の値は低かった。ストレプトマイシンは嫌気条件の方が若干効きが悪かった。ナルジクス酸は嫌気状態の方が MIC の値が低かった。ただ、ホスホマイシンの MIC には菌株ごと、条件ごとで比較的バラツキが存在した。

(5) EHEC の絶対嫌気環境での志賀毒素産生嫌気条件、好気条件での志賀毒素 1 (Stx1) と志賀毒素 2 (Stx2) の産生を Gb3-ELISA を用いて定量した。培養するたびに産生量の増減は

存在したが、増殖性が良いため好気条件の方が産生される Stx1, Stx2 ともに多かった。ただその中でも菌株 C2, C13, C15, C18, C19 は Stx1, Stx2 共に産生量が多かった。

(6) EHEC の絶対嫌気環境での抗生物質による志賀毒素産生促進効果

EHEC の主要な病原因子として志賀毒素が知られている。その中でも Stx2 の方が病原性が強いことが示唆されており、疫学的な結果から重症化に關与していることが報告されている。また、Stx2 は抗菌薬投与によって産生量が劇的に増加する可能性が示唆されており、このことが EHEC 感染症に抗菌薬を使うべきではないとの意見の根拠にもなっている。そこでそれぞれの抗菌薬が EHEC の Stx2 産生をどのくらい上昇させるかを嫌気条件と好気条件で検討した。各々の用いた抗菌薬の濃度は 1/8 MIC 濃度を用いた。その結果、Stx2 産生増強はノルフロキサシンで好気条件の方が高い傾向があった。アンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、ストレプトマイシンでは各々の菌株で嫌気条件、好気条件共に多くても 2 ~ 3 倍程度の上昇であった。一方、嫌気条件ではカルベニシリンとホスホマイシンで菌株によっては数千倍に上昇しているものも存在した。好気条件ではホスホマイシン処理による Stx2 の産生増強が強い菌株も存在した。

以上のように嫌気条件における増殖性、活性酸素種に対する抵抗性、抗菌薬に対する感受性、志賀毒素産生量、抗菌薬による Stx2 の産生増強を確認した。病原性が比較的高いと考えられ、増殖が他の菌より遅く、志賀毒素の産生量の多い菌株 C13 は特徴的であり、今後さらなる解析が必要だと思われる。

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 14 件)

Kimitoshi Ichimura, Takeshi Shimizu, Akio Matsumoto, Shinichiro Hirai, Eiji Yokoyama, Hiroki Takeuchi, KinnoSuke Yahiro and Masatoshi Noda. 2017. Nitric oxide-enhanced Shiga toxin production was regulated by Fur and RecA in enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157. *MicrobiologyOpen*, e461, 1-17. doi: 10.1002/mbo3.461 査読有り

Kohei Ogura, Yasuhiro Terasaki, Tohru Miyoshi-Akiyama, Mika Terasaki, Joel Moss, Masatoshi Noda and KinnoSuke Yahiro. 2017. *Vibrio cholerae* Cholix toxin-induced HepG2 cell death is

enhanced by tumor necrosis factor-alpha through ROS and intracellular signal-regulated kinases. Toxicological Sciences 10.1093/toxsci/kfx009. 査読有り

Shimizu, T., K. Ichimura, M. Noda. 2016. The surface sensor NlpE of enterohemorrhagic *Escherichia coli* contributes to regulation of the type III secretion system and flagella by the Cpx response to adhesion. Infect. Immun., 84, 537-549. 査読有り

Tsutsuki, H., K. Yahiro, K. Ogura, K. Ichimura, S. Iyoda, M. Ohnishi, S. Nagasawa, K. Nagasawa, J. Moss, M. Noda. 2016. Subtilase cytotoxin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* induces stress granule formation. Cellular Microbiology, 18(7):1024-40. doi: 10.1111/cmi.12565. 査読有り

Yahiro, K., T. Hirayama, J. Moss, M. Noda. 2016. New Insights into VacA intoxication mediated through its cell surface receptors. Toxins (Review), 8, 152; doi:10.3390/toxins 8050152. 査読無し

Takeshi Shimizu, Shinichiro Hirai, Eiji Yokoyama, Kimitoshi Ichimura and Masatoshi Noda, 2015. An evolutionary analysis of nitric oxide reductase gene *norV* in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. Infect. Genet. Evol., 33, 176-181. 査読有り

Yahiro, K., Y. Akazawa, M. Nakano, H. Suzuki, J. Hisatune, H. Isomoto, J. Sap, M. Noda, J. Moss, T. Hirayama. 2015. *Helicobacter pylori* VacA induces apoptosis by accumulation of connexin 43 in autophagic vesicles via a Rac1/ERK-dependent pathway. Cell Death Discovery. 1:15035. 査読有り

Yahiro, K., T. Hirayama, J. Moss, M. Noda. 2015. *Helicobacter pylori* VacA toxin causes cell death by inducing accumulation of cytoplasmic connexin 43. Cell Death Disease. 6: e1971 査読有り

清水 健、藤永由佳子、高屋明子、芦田浩、児玉年央、畠山昌則「細菌エフェクター・細菌毒素の分子標的と疾病脆弱性」日本細菌学雑誌、2015、70 : 319-328. 査読無し

し

Nagasawa, S., K. Ogura, H. Tsutsuki, H. Saitoh, J. Moss, H. Iwase, M. Noda, K. Yahiro. 2014. Uptake of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* SubAB by HeLa cells requires an actin-and lipid raft-dependent pathway. Cellular Microbiology. 16:1582-1601. 査読有り

11 Yahiro, K., H. Tsutsuki, K. Ogura, S. Nagasawa, J. Moss, M. Noda. 2014. DAP1, a Negative Regulator of Autophagy, Controls SubAB-Mediated Apoptosis and Autophagy. Infect. Immun. 82: 4899-4908. 査読有り

12 清水 健、野田公俊「病原性大腸菌による感染症 -腸管出血性大腸菌を中心に-」千葉医学雑誌、2014、90、47-52. 査読無し

13 清水 健「腸管出血性大腸菌の重症化メカニズム:病原性と志賀毒素」感染症内科、2014、2(4)、377-384. 査読無し

14 清水 健「志賀毒素 2 (Stx2) の病原性発現機構」感染炎症免疫、2014、44、67-69. 査読無し

〔学会発表〕(計9件)

清水 健、松本明郎、野田公俊 NO ストレス環境における腸管出血性大腸菌の NO 代謝酵素の役割 第90回 日本細菌学会総会(2017年3月19-21日、宮城県仙台市、仙台国際センター)

Takeshi Shimizu, Shinichiro Hirai, Eiji Yokoyama, Kimitoshi Ichimura and Masatoshi Noda. An evolutionary analysis of a novel virulence gene *norV* in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (May 20-22, 2016, Sendai, Miyagi, Japan, Sendai International Center)

清水 健、平井 晋一郎、横山 栄二、市村公敏、野田公俊 腸管出血性大腸菌 O157 が保持する新規病原因子一酸化窒素還元酵素遺伝子 *norV* の進化的解析 第89回 日本細菌学会総会(2016年3月23-25日、大阪府大阪市、大阪国際交流センター)

Takeshi Shimizu, Shinichiro Hirai, Eiji Yokoyama, Kimitoshi Ichimura and Masatoshi Noda. An evolutionary

analysis of a novel virulence gene *norV* that encodes nitric oxide reductase in enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 50th Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel (January 13-15, 2016, North Bethesda, Maryland)

Takeshi Shimizu, Shinichiro Hirai, Eiji Yokoyama, Kimitoshi Ichimura and Masatoshi Noda. An evolutionary analysis of a novel virulence gene *norV* that encodes nitric oxide reductase in enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 The 9th Triennial International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* infections (September 13-16, 2015, Boston, MA)

清水 健、平井 晋一郎、横山 栄二、市村公敏、野田公俊 腸管出血性大腸菌 0157 が保持する一酸化窒素還元酵素遺伝子の進化的解析 第19回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2015年7月9-10日、東京都世田谷区、国立医薬品食品衛生研究所)

清水 健、市村公敏、野田公俊 腸管出血性大腸菌の surface sensor NlpE は接着時に Cpx 経路によって病原因子の発現を調節する 第88回 日本細菌学会総会 (2015年3月26-28日、岐阜県岐阜市、長良川国際会議場)

Takeshi Shimizu, Kimitoshi Ichimura and Masatoshi Noda. The surface sensor NlpE of enterohemorrhagic *Escherichia coli* contributes to the regulation of virulence factors via adherence of bacteria to Caco-2 cells 49th Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel (January 14-16, 2015, Gainesville, Florida)

清水 健、市村公敏、野田公俊 腸管出血性大腸菌の接着を認識する病原因子発現機構の解析 第18回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2014年7月15-16日、京都府京都市、同志社大学室町キャンパス)

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称：組換えベクター、該ベクターで形質転換された微生物を利用した一酸化窒素消去

を抑制する化合物のスクリーニング方法及び細胞内一酸化窒素濃度の測定方法
発明者：松本明郎、清水健、野田公俊
権利者：国立大学法人 千葉大学
種類：特許権
番号：特願 2016-114134
出願年月日：2016/06/08
国内外の別：国内

取得状況 (計1件)

名称：一酸化窒素を感知するための形質転換用組換えベクター、およびこれを用いた一酸化窒素センサ細胞
発明者：清水健、津々木博康、野田公俊
権利者：国立大学法人 千葉大学
種類：特許権
番号：特許第 6037259 号
取得年月日：2016/11/11
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chiba-bacteria.jp>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
清水 健 (SHIMIZU, Takeshi)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：70312840
- (2) 研究分担者
濱端 崇 (HAMABATA, Takashi)
独立行政法人国立国際医療研究センター・感染症制御部・室長
研究者番号：40311427
- (3) 研究分担者
野田 公俊 (NODA, Masatoshi)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：60164703