

2022年度日本食品微生物学会学会賞受賞総説

食品及び水媒介性腸管感染症の基礎細菌学的研究と原因細菌の検査法の開発

Basic Bacteriological Studies on Food- and Water-borne Enteric Infection and Development of Testing Methods for Enteric Bacteria

山崎 伸二

(大阪公立大学大学院獣医学研究科)

Graduate School of Veterinary Science, Osaka Metropolitan University

はじめに

東京大学医科学研究所の竹田美文先生の研究室に入室し、大腸菌の毒素の構造と機能に関する研究を開始し細菌学の研究者としての第一歩を踏み出した。その後、分子生物学を学びVero毒素遺伝子等の病原因子の遺伝学的解析やPCRによる病原体の検出系の構築など細菌学の分岐点となる研究に携わった。インド国立コレラ及び腸管感染症研究所のG.B. Nair博士やT. Ramamurthy博士との共同研究で新型コレラ菌O139を中心にコレラ菌の分子疫学に関する研究を行い、コレラ毒素産生性のO1コレラ菌とO139コレラ菌の検出系を構築した。大阪府立大学に着任後は、細胞膨化致死毒素(CDT)の研究を開始し、II型のCDTを産生する大腸菌が*Escherichia albertii*であること、*Providencia*属菌の最初のタンパク毒素としてCDTを見出した。*Escherichia albertii*の細菌学的性状を詳細に解析し、腸管病原性大腸菌や腸管出血性大腸菌と誤同定されていた*Escherichia albertii*を特異的に検出できる同定法や培養法の開発を行った。さらに、カンピロバクター属菌では*cdt*遺伝子が菌種特異的かつ普遍的に存在することを見出し、*cdt*遺伝子を標的としたカンピロバクター属菌の菌種特異的検出法を構築した。本総説では、これらの研究成果について紹介する。

大腸菌の産生する毒素の構造と機能

下痢原性大腸菌は現在代表的な6種類とその他3種類の少なくとも9種類に分類されている(表1)。その中の1つである腸管毒素原性大腸菌(ETEC)は、100℃、10分の加熱でも失活しない耐熱性エンテロトキシン(ST)と60℃、10分の加熱で失活する易熱性エンテロトキシン

(LT)の2種類のうち少なくともどちらか1つを産生する。STは、ヒト由来のETECで見つかったSThと下痢を呈した豚から分離されたETECが産生するSTpがある。それぞれ、19あるいは18個のアミノ酸残基からなるペプチドで、活性中心は13個のアミノ酸残基からなる。この13個のアミノ酸残基中に含まれる6個のシステインが3つのジスルフィド結合を形成していることが故下西教授らの研究グループによって明らかにされた(図1)¹⁾。分子内に存在する3つのジスルフィド結合が強固な球状構造を保持し、耐熱性に寄与していると考えられている。この3つのジスルフィド結合がSTの活性発現にどのように関わっているかを明らかにすることを目的に、3つの中の1つあるいは2つしかジスルフィド結合を形成できないSTを化学合成し乳飲みマウスを用いて下痢活性を調べた。

図2に示したように、SThの活性発現には7位と15位のジスルフィド結合が必須であるが十分でなく6位と11位あるいは10位と18位のどちらか1つのジスルフィド結合も存在しないと活性発現できないことがわかった²⁾。さらに、システイン以外の7種類アミノ酸残基の活性発現に及ぼす影響を調べることを目的に、7種類のそれぞれのアミノ酸をアセトアミノメチル化したシステインに置換し、乳飲みマウスを用いて下痢活性を調べた。14位のアラニンを置換した場合、活性が最も低下し、次いで12位のアスパラギン、13位のプロリンであった(表2)。そこで、すべてのSTで保存されているこれら3つのアミノ酸残基を種々のアミノ酸で置換した単アミノ酸置換体を作製し、活性発現に及ぼす影響を調べた。表3に示したように、14位のアラニンの置換体で著しく活性が低下し、側鎖の極性というよりも側鎖の分子が大きくなるに従いSThの活性が低下し、14位のアラニンがSThの活性発現に最も重要なアミノ酸残基である事が明らかとなった³⁾。

* 連絡先

☎598-8531 大阪府泉佐野市りんくう往来北1番地の58

表1. 下痢原性大腸菌の分類

代表的な下痢原性大腸菌	疾患又は病態	代表的な病原因子
1 腸管病原性大腸菌 (EPEC) (定型) 腸管病原性大腸菌 (tEPEC) (非定型) 腸管病原性大腸菌 (aEPEC)	水様下痢 持続性の水様下痢	T3SS, Intimin, BFP T3SS, Intimin,
2 腸管細胞侵入性大腸菌 (EIEC)	水様下痢, 赤痢様の下痢	InvE, IpaA, IpaB, IpaC, IpaD, IpaH, T3SS, ShET2, Pic, SepA
3 腸管毒素原性大腸菌 (ETEC)	コレラ様の水様下痢	ST, LT, CFA
4 腸管出血性大腸菌 (EHEC)/ 志賀毒素産生性大腸菌 (STEC)/ Vero毒素産生性大腸菌 (VTEC)	水様下痢, 血性下痢, 出血性大腸炎, 脳炎, 溶血性尿毒症症候群	Stx1, Stx2, Intimin, SubAB, CDT
5 腸管凝集性大腸菌 (EAEC) (定型) 腸管凝集性大腸菌 (tEAEC)	(持続性) 水様下痢	AagR, AggA, AafA, Agg3A, Agg4A, Pet, EAST-1
(非定型) 腸管凝集性大腸菌 (aEAEC)	無症状	AafA, Agg3A, Agg4A, Pet, EAST-1
6 腸管拡散付着性大腸菌 (DAEC)	(持続性) 水様下痢, 炎症性腸疾患	Afa/Dr family adhesin
その他の下痢原性大腸菌		
7 付着侵入性大腸菌 (AIEC)	炎症性腸疾患	Type I fimbriae, IbeA
8 EAST1産生性大腸菌	水様下痢	EAST1
9 細胞膨化致死毒素産生性大腸菌 (CTEC)	水様下痢	CDTI-CDTV

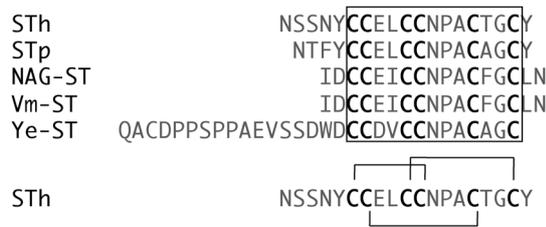


図1. 各種下痢症起因菌が産生するSTのアミノ酸配列の比較
 STh: ヒト由来のETECが産生するST, STp: 豚由来のETECが産生するST, NAG-ST: non-O1コレラ菌が産生するST, Vm-ST: *Vibrio mimicus*が産生するST, Ye-ST: *Yersinia enterocolitica*が産生するST

興味深いことに、グアニリンとウログアニリンは腸管や腎臓での水とNaClの吸収を抑制し、排出を促進する内在性のホルモンとして見つかった^{4,5)}。図3に示したように、グアニリンは15残基から、ウログアニリンは16残基からペプチドで共に分子内に4つのシステイン残基を持ち、2つのジスルフィド結合を有している。また、STと構造類似性があり、STの14位に相当するアラニンも保存されている。ST、グアニリンとウログアニリンともグアニル酸シクラーゼを受容体とし、グアニル酸シクラーゼに結合することで活性化され細胞内のcGMP濃度を上昇させ、下痢や水・電解質の排泄に関わっていると考えられている。すなわち、これらのペプチドにおいてもSTの14位に相当するアラニンが活性発現に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

腸管出血性大腸菌 (EHEC; enterohemorrhagic *Escherichia coli*) は、1982年、米国でのハンバーガー食中毒事件がきっかけで見つかった4番目の下痢原性大腸菌である⁶⁾。主要な病原因子としてVero細胞に致死的に働く

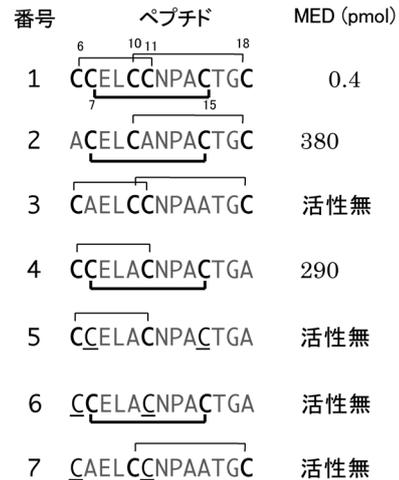


図2. SThのジスルフィド結合が毒性発現に及ぼす影響
 毒性発現には、7位と15位のジスルフィド結合が必須であるが十分でなく、さらに6位と11位のジスルフィド結合または10位と18位のジスルフィド結合の2カ所必要である
 下線を引いたCはシステインのチオール基にアセタミドメチル基を導入したシステイン

Vero毒素 (Vero toxin; VT) がある。VTには生物学的性状や物理化学的性状は類似しているが、免疫学的性状が異なる2種類のVT1とVT2がある⁷⁾。VT1は、当初赤痢菌が産生する志賀毒素 (Shiga toxin; Stx) の抗体で毒性が中和されたことから Shiga-like toxin (SLT) と呼ばれていた。しかしながら、VT1とStxのアミノ酸配列が明らかとなると両者は同一あるいは酷似している事から米国の研究グループを中心にStxと呼ばれるようになった。一方、本毒素はVTとも呼ばれている。その理由は、米国でSLTが見つかる以前の1977年、カナダのKonowalchukらが、ある種の大腸菌がVero細胞に対し

表2. SThの活性発現ドメイン中のシステイン以外のアミノ酸残基をCysAcmで置き換えた場合の毒性

	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	MED (ng)
STh (6-19)	Cys	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Thr	Gly	Cys	Tyr	0.6
// CysAcm ⁸	//	//	CysAcm	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	5.9
// CysAcm ⁹	//	//	//	CysAcm	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	11.6
// CysAcm ¹²	//	//	//	//	//	//	CysAcm	//	//	//	//	//	//	//	417
// CysAcm ¹³	//	//	//	//	//	//	//	CysAcm	//	//	//	//	//	//	370
// CysAcm ¹⁴	//	//	//	//	//	//	//	//	CysAcm	//	//	//	//	//	10,000 <
// CysAcm ¹⁶	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	CysAcm	//	//	//	12.9
// CysAcm ¹⁸	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	CysAcm	//	//	10.9

CysAcm: システインのSH基にacetamidomethyl基を導入

MED: 最小毒性発現量

表3. SThの中で最も保存性の高いアミノ酸残基の単アミノ酸置換体の毒性

STh (6-19)	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	MED (ng)
	Cys	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Thr	Gly	Cys	Tyr	0.6
// Gln ¹²	-	-	-	-	-	-	Gln	-	-	-	-	-	-	-	21
// Asp ¹²	-	-	-	-	-	-	Asp	-	-	-	-	-	-	-	120
// Lys ¹²	-	-	-	-	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-	-	2,000
// Arg ¹²	-	-	-	-	-	-	Arg	-	-	-	-	-	-	-	513
// Glu ¹²	-	-	-	-	-	-	Glu	-	-	-	-	-	-	-	230
// Phe ¹²	-	-	-	-	-	-	Phe	-	-	-	-	-	-	-	12
// Val ¹²	-	-	-	-	-	-	Val	-	-	-	-	-	-	-	0.8
// Ser ¹²	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	-	-	-	-	-	15
// Gly ¹²	-	-	-	-	-	-	Gly	-	-	-	-	-	-	-	46
// Ala ¹²	-	-	-	-	-	-	Ala	-	-	-	-	-	-	-	6.5
// Val ¹³	-	-	-	-	-	-	-	Val	-	-	-	-	-	-	2
// Ala ¹³	-	-	-	-	-	-	-	Ala	-	-	-	-	-	-	10
// Gln ¹³	-	-	-	-	-	-	-	Gln	-	-	-	-	-	-	19
// Ser ¹³	-	-	-	-	-	-	-	Val	-	-	-	-	-	-	22
// Lys ¹³	-	-	-	-	-	-	-	Leu	-	-	-	-	-	-	30
// Arg ¹³	-	-	-	-	-	-	-	Arg	-	-	-	-	-	-	30
// Glu ¹³	-	-	-	-	-	-	-	Glu	-	-	-	-	-	-	143
// Phe ¹³	-	-	-	-	-	-	-	Phe	-	-	-	-	-	-	1,800
// Gly ¹⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	Gly	-	-	-	-	-	15
// Ser ¹⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	-	-	-	21
// Glu ¹⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	Glu	-	-	-	-	-	830
// Gln ¹⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	Gln	-	-	-	-	-	3,200
// Val ¹⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	Val	-	-	-	-	-	10,000 <
// Leu ¹⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	Leu	-	-	-	-	-	10,000 <
// Phe ¹⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	Phe	-	-	-	-	-	10,000 <
// Lys ¹⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	Lys	-	-	-	-	-	10,000 <
// Arg ¹⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	Arg	-	-	-	-	-	10,000 <

MED: 最小毒性発現量

STh NSSNYCCELCNPACTGCGY
STp NTFYCCELCNPAACAGCGY
NAG-ST IDCCEICCNPAFCGGLN
Vm-ST IDCCEICCNPAFCGGLN
Ye-ST QACDPPSPPAEVSSDWDCCDVCCNPAACAGCGY
Guanylin PNTCEICAYAACTGCGY
Uroguanylin NDDCEL CVNVACTGCGY

図3. 各種下痢症起因菌が産生するSTと内在性ホルモンであるグアニリン、ウログアニリンのアミノ酸配列の比較

STh: ヒト由来のETECが産生するST, STp: 豚由来のETECが産生するST, NAG-ST: non-O1 コレラ菌が産生するST, Vm-ST: *Vibrio mimicus*が産生するST, Ye-ST: *Yersinia enterocolitica*が産生するST, 下線を引いたAlanineがすべてで保存されている

て致死的に働く毒素を産生することを報告していた⁸⁾. SLTとVTが同一の毒素であることが明らかとなり、カナダと欧州の研究グループを中心にVTと呼んでいる。我が国でも行政用語としてVTという呼称が用いられている。それゆえ、現在、本毒素はVTあるいはStx, 本毒素を産生する大腸菌は、EHEC, STEC (Shiga toxin-producing

E. coli) あるいはVTEC (Verocytotoxin-producing *E. coli*) と呼ばれている (表1)⁹⁾.

VT1とVT2は分子量約32,000からなるAサブユニット1分子と分子量約7,600からなるBサブユニット5分子からなるホロ毒素である。Bサブユニットはレセプターであるグロボトリオシルセラミド(Gb3)への結合活性を担い、Aサブユニットが毒素活性本態である⁷⁾. VT1とVT2のVero細胞に対する致死活性は、真核細胞のタンパク合成阻害に基づくことが明らかとなり、植物毒として知られるヒマ種子由来のリシンも真核細胞のタンパク合成を阻害することが知られていた。そのメカニズムが明らかとなったのは、当時山梨医科大学の遠藤弥重太教授らの研究成果であった¹²⁾. すなわち、真核細胞の60Sリボソーム亜粒子由来の28S rRNAの5'末端から4,324番目のアデノシンのN-グリコシド結合を加水分解するRNA N-グリコシダーゼ活性に基づくことが報告された。この発見に引き続き、VT1とVT2も同様の作用機序を有することが明らかとなった¹³⁾.

	領域A	領域B	領域C
	49	57 165	173 201 209
VT1	A LFAVDVRGI	TAEALRFHQ	LINWGRLSSV
VT2	A Y-----L	-----	-----I-N-
VT2vp	A YIS-G--L	-----	-----I-N-
VT2vh	A Y-----L	-----	-----I-N-
Ricin	A TTG---HE	IS--A--QY	ENS-----TA

図4. VT1, VT2とそのバリエーションとリシンの保存性の高い3領域のアミノ酸配列の比較
下線を引いたVT1のAサブユニットのN末端から167番目のグルタミン酸(E)と170番目のアルギニン(R)が毒性発現に重要なアミノ酸残基

1990年頃は、VT2には少なくとも豚の浮腫病由来の大腸菌が産生するVT2vp (VT2vp1とVT2vp2遺伝子の2種類)¹⁰⁾と溶血性尿毒症症候群患者由来の大腸菌が産生するVT2vh (VT2vhaとVT2vhb遺伝子の2種類)¹¹⁾など複数のバリエーションが知られていた。そこでVT1の毒性発現に重要なアミノ酸残基を明らかにするために、VT1, VT2とVT2vhのAサブユニットとリシンの毒性発現領域のアミノ酸配列を比較した。全体の相同性は約20%とあまり高くなかったが、局所的に相同性が高い領域を3カ所(領域A-C)見出した(図4)。すなわち、VT1のAサブユニットのN末端から51番目から55番目(領域A)、167番目から172番目(領域B)と202番目から207番目まで(領域C)である。領域Aから最も相同性の高い2つのアミノ酸残基、領域Bからは6つすべてのアミノ酸残基、領域Cからも6つすべてのアミノ酸残基の単アミノ酸置換体をsite-directed mutagenesisの手法を用いて作製し、Vero細胞毒性とウサギ網状赤血球を用いた*in vitro*でのタンパク合成阻害活性を調べた¹⁴⁾。その結果、領域Aでは毒性発現にあまり影響を与えるアミノ酸残基は存在しなかったが、領域Bで最も毒性発現に影響を与えるアミノ酸残基が2つ見つかった。すなわち、VT1のAサブユニットのN末端から167番目のグルタミン酸と170番目のアルギニンがVT1の毒性発現に最も重要なアミノ酸残基として同定された(表4)。領域Cでは203番目のトリプトファンが先の2つアミノ酸残基に次いで毒性発現に重要なアミノ酸残基として同定された。残念ながらハーバード大学のHovdeらによって167番目のグルタミン酸がSLT-1 (Stx1)の毒性発現に重要なアミノ酸残基であると先に報告されてしまった¹⁵⁾。また、これらの研究成果を踏まえ、Ohmuraら¹⁶⁾とCaoら¹⁷⁾はそれぞれVT1とVT-2vp1の167番目のグルタミン酸と170番目のアルギニンをそれぞれグルタミンとロイシンに置換したダブルミュータントを作製した。その結果、VT1では単アミノ酸置換体とほぼ同等の毒素活性を示したが、VT2vp1では*in vitro*でのタンパク合成阻害活性、Vero細胞毒性およびマウス致死活性のいずれにおいても単アミノ酸置換体よりもダブルミュータントの毒性は低下し、特にVero細胞毒性では1/10以下に低下した。これらの研究

表4. VT1の単アミノ酸置換体の毒素活性

領域	変異体	Vero細胞毒性*	<i>In vitro</i> 蛋白合成阻害活性*
		VT1(変異無)	1
1	Asp ⁵³ →Ala ⁵³	2	10
2	A Asp ⁵³ →Lys ⁵³	1/10	1/2
3	Asp ⁵³ →Ile ⁵³	1	1
4	Glu ¹⁶⁷ →Leu ¹⁶⁷	1/10	1/40
5	Glu ¹⁶⁷ →Asn ¹⁶⁷	1/2000	1/400
6	Ala ¹⁶⁸ →Gly ¹⁶⁸	1/3	1/2
7	Leu ¹⁶⁹ →Ile ¹⁶⁹	1/3	1/3
8	B Arg ¹⁷⁰ →His ¹⁷⁰	1/100	1/70
9	Arg ¹⁷⁰ →Lys ¹⁷⁰	1/200	1/100
10	Arg ¹⁷⁰ →Leu ¹⁷⁰	1/1000	1/200
11	Phe ¹⁷¹ →Tyr ¹⁷¹	1	1/3
12	Arg ¹⁷² →Leu ¹⁷²	1/100	1/70
13	Arg ¹⁷² →Lys ¹⁷²	1/5	1/15
14	Asn ²⁰² →Asp ²⁰²	1/8	1/30
15	Trp ²⁰³ →Phe ²⁰³	1/10	1/60
16	Trp ²⁰³ →Leu ²⁰³	1/50	1/25
17	Trp ²⁰³ →His ²⁰³	1/50	1/65
18	C Gly ²⁰⁴ →Ala ²⁰⁴	1	1
19	Arg ²⁰⁵ →Thr ²⁰⁵	1/10	1/10
20	Arg ²⁰⁵ →Lys ²⁰⁵	1	1
21	Leu ²⁰⁶ →Val ²⁰⁶	1	1/6
22	Ser ²⁰⁷ →Ala ²⁰⁷	1/4	1/3

*野生型VT1の毒素活性を1とした時の変異毒素の毒性を示す

成果は、EHEC感染症のワクチン開発研究に繋がるものとして注目を集めた。

腸管出血性大腸菌のVero毒素の免疫学的・遺伝学的検出系の構築

先にも述べたようにEHECの主要な病原因子であるVTには免疫学的に異なるVT1とVT2、そしてVT2には複数のバリエーションが報告されていた。VT1とVT2は免疫学的に異なることから、それぞれの抗体を用いてそれぞれの毒素を特異的に検出することが可能と考えられた。そこで、無毒化したVT1, VT2およびVT2vhをウサギに免疫し、それぞれの抗体を作製後、IgGを精製し、マレイミド法を用いてFab'のSH基にHRP (horse radish peroxidase)を結合させたコンジュゲートとIgGをポリスチレンビーズに固相化した高感度サンドイッチ bead-ELISA法を構築し、ピコグラムオーダーでVT1, VT2とVT2vhを特異的に検出できる系が出来た(図5)¹⁸⁾。さらに、VT2とVT2vhの検出系ではそれぞれ両毒素とも反応性を示すことから、VT2vhをウサギに免疫し、得られた抗血清からIgGを精製後、精製VT2で吸収したIgGを用いてVT2vhを特異的に検出する系も構築した¹⁸⁾。VT1とVT2では、60 pg/mLから検出でき、VT2vhに関しては200 pg/mLから検出できた。京都大学で助手を務めていた当時、PCR法も開発されておらず、VTの検出法はラテックス凝集法、あるいはVero細胞毒性試験しかなく、日本各地の病院、衛生研究所や家畜保健所からEHEC疑いの大腸菌が多数送られてきた。おかげで貴重な菌株を多数入手することがで

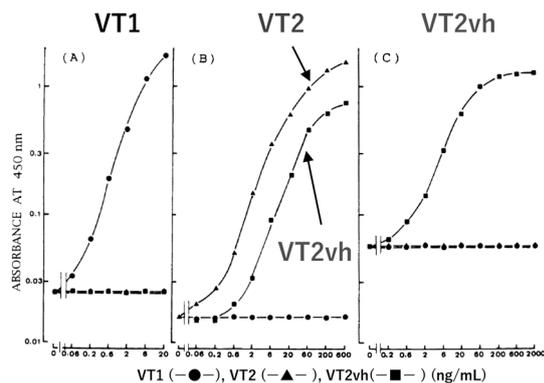


図5. VT1, VT2とVT2vh検出用bead-ELISA (A)VT1検出用, (B)VT2検出用, (C)がVT2vh検出用

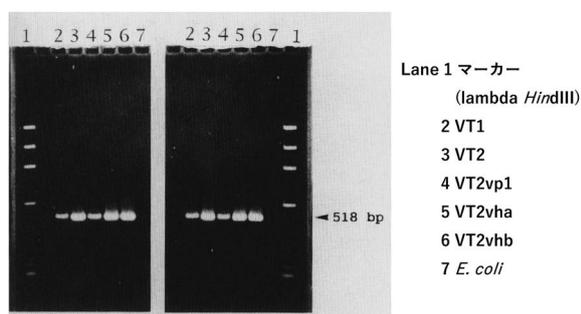


図6. PCR共通プライマーを用いた各種VT遺伝子の検出

き、その後の様々な研究に使わせていただいた。この場をお借りして改めてお礼申し上げたい。

キャリー・マリスが1983年PCR法を開発し、1993年ノーベル化学賞を受賞した。この画期的な技術を用いた病原体の検査法が1980年代後半、京都大学竹田研究室で開発された。最初の標的はコレラ菌が保有するコレラ毒素(*ctx*)遺伝子である¹⁹⁾。小生もVT1とVT2のPCRによる検出系の構築に取り組み1990年に開催された第43回日本細菌学会関西支部総会で、「Vero毒素産生性大腸菌が産生するVero毒素(VT)のPCR(DNA増幅)法をよる型別」として発表した。さらに、VT1, VT2, VT-2vp1, VT2vha, VT2vhb遺伝子のアライメントを作製し保存性の高い領域からすべてのVT遺伝子を特異的に検出できる共通プライマーとそれぞれのバリエーションが検出できる特異プライマーを開発した(図6)¹⁸⁾。当時はDNA合成装置が竹田研究室にあり、PCRプライマーは自ら合成、精製の方が安価かつ直ちに使用することができ、研究室で合成したプライマーを実験に供していた。またPCRに用いる酵素やPCR装置も高額で、今日のようにPCRがSARS-CoV-2やO157をはじめ様々な病原体の検出に幅広く用いられる時代が来るとは全く予想できなかった。

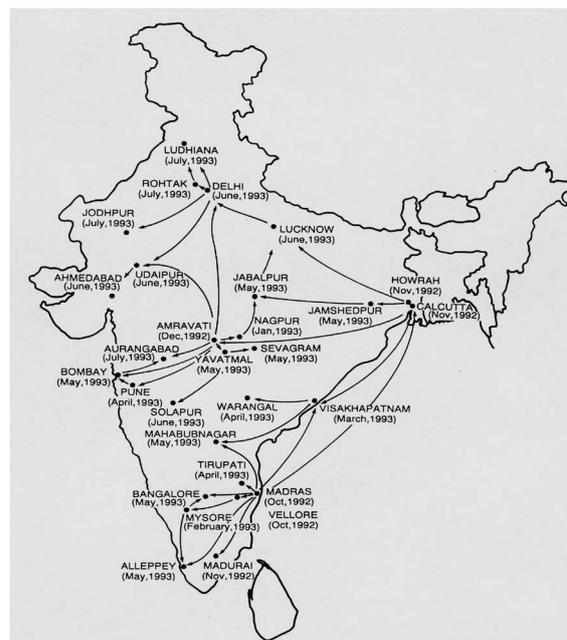


図7. インドマドラスで発生した新型コレラ菌O139のインド国内の伝播様式

新型コレラ菌O139のO抗原合成遺伝子の解析と病原性コレラ菌特異的検出系の構築

1992年までは、いわゆるコレラの原因となるコレラ菌(*Vibrio cholerae*)は、138種類あるO血清型の中でコレラ毒素(CT)を産生するO1コレラ菌のみであった。しかしながら、1992年、インドのマドラス(現チェンナイ)でnon-O1コレラ菌によるコレラ様下痢症が大人を含め大流行し、瞬く間にインド全土、さらには近隣諸国に広がった(図7)²⁰⁾。新型コレラ菌O139によるパンデミックの始まりである。当時、小生はドイツ国立動物ウイルス病研究センターで、故Heiner Niemann教授の下、クロストリジウム神経毒素の作用機序に関する研究を行っていた。ある時、BBCのテレビでDr. G.B. Nairがインドで起こっているコレラの大流行、すなわち大人を含む多くの人々がコレラで死亡していることを悲痛な面持ちで話しているのを見てこの重大事件をドイツで知った。日本に帰国後は、この新型コレラ菌O139がどのように派生したかについての研究に着手した。当時、新型コレラ菌O139はエルトル型O1コレラ菌と性状が酷似しており、エルトル型O1コレラ菌のO抗原合成遺伝子領域が水平伝播によってO139型に置き換わり新型コレラ菌O139が派生した可能性が指摘されていた。

そこで、約20kbあるO1のO抗原合成遺伝子領域を25の領域に分け、それぞれの遺伝子プローブを作製し、O1とO139を含む当時知られていたO155までの155種類のコレラ菌に対するそれぞれの遺伝子の分布をコロニーハイブリダイゼーション法により解析した。その結

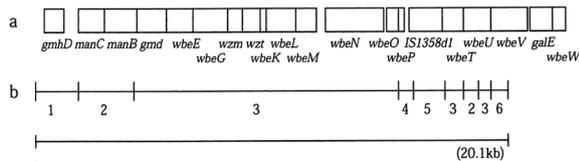


図8. O1抗原合成遺伝子領域の155種類のO血清型コレラ菌との保存性
a: O1抗原合成遺伝子クラスター
b: O1抗原合成遺伝子プローブと155種類のO抗原を持つコレラ菌との反応性に基づき分類された6グループ

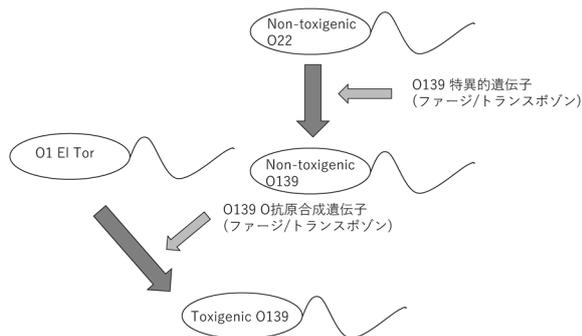


図9. 新型コレラ菌O139の派生メカニズムの仮説
非病原性のコレラ菌O22のO抗原合成遺伝子領域にO139特異遺伝子が挿入され、非病原性のO139コレラ菌が出現し、O139のO抗原合成遺伝子領域がエルトール型O1コレラ菌に挿入され、病原性の新型コレラ菌O139が出現

果、O1 O抗原合成遺伝子領域の25種類の遺伝子プローブは169株すべてのO1コレラ菌と反応し保存性の高いことがわかった。一方、O116はすべての遺伝子プローブと反応せず、O140が11のプローブと反応し、最もO1と近縁であることがわかった。O139とは5つのプローブと反応した。新型コレラ菌O139はO1コレラ菌の痕跡を残しつつ異なる遺伝子が挿入され派生したコレラ菌である可能性が示唆された。最終的に、それぞれのプローブに対する155種類のO抗原を持つコレラ菌との反応性は6つのグループに分かれた(図8)。詳細は割愛するので、文献を参照していただきたい²¹⁾。

O139のO抗原合成遺伝子領域の解析も進めていたが、いくつかの研究グループに先を越され報告されてしまった²²⁻²⁴⁾。そこで、O139のO抗原合成遺伝子領域をクローニングし、先と同様断片化した遺伝子プローブを複製しO1からO155コレラ菌における分布について調べた。その結果、O139のO抗原合成遺伝子領域(一部その両末端の非合成遺伝子領域を含む)は5つのグループに分類された。グループ1はO22を含む29から150種類のO血清型に属するnon-O1/non-O139コレラ菌と反応性を示し、グループ2はO22を含む17種類のO血清型に属するコレラ菌と反応性を示し、グループ3はO22とO139コレラ菌のみと反応性を示した。グループ4はO139コレラ菌のみと反応性を示し、グループ5はO22

を含む21から92種類のO血清型に属するnon-O1/non-O139コレラ菌と反応性を示した。すなわち、O139に特異的なグループ4を除くと、他のグループはすべてO22と反応性を示すという興味深い結果が得られた。以上の結果よりO139のO抗原合成遺伝子領域は、O22のO抗原合成遺伝子領域にO139に特異的な遺伝子が水平伝播で取り込まれ派生した可能性が示された(図9)²⁵⁾。

コレラ菌のO抗原合成遺伝子領域の解析からO1コレラ菌およびO139コレラ菌のO抗原合成遺伝子領域に特異的な遺伝子が存在することが明らかとなった。そこで、コレラ毒素(*ctxA*)遺伝子、O1コレラ菌とO139コレラ菌に特異的なO抗原合成遺伝子(O1-*rfb*/O139-*rfb*)をPCRで増幅し、いわゆるコレラの原因となるCT産生性のO1コレラ菌とO139コレラ菌の特異的な検出系を構築した²⁶⁾。表5に示したようにO1コレラ菌15株、O139コレラ菌36株、O1とO139を除く191種類のO血清型を有するコレラ菌191株とコレラ菌以外8菌種、13株についてその特異性を調べた。その結果、15株のO1コレラ菌すべてからO1特異遺伝子が増幅されたが、*ctxA*遺伝子は11株から増幅された。一方、36株のO139コレラ菌すべてからO139特異遺伝子と*ctxA*遺伝子が増幅された。191種類のO血清型を有するnon-O1/non-O139コレラ菌のうちO37、O105、O141やO191コレラ菌から*ctxA*遺伝子のみが増幅された。しかし、コレラ菌以外の8菌種、13株からはどの遺伝子も増幅されず、非常に特異性が高いことが示された。また、これらの結果からO1コレラ菌でも一部CTを産生しない株が存在することや、non-O1/non-O139コレラ菌の中にも一部CTを産生するコレラ菌が存在することも再確認された。さらに下痢症患者便121検体を用いて培養法でのコレラ菌分離、マルチプレックスPCR法によるコレラ菌の検出結果を比較したところ培養法でコレラ菌が分離できた38検体すべてでマルチプレックスPCR陽性となった。内訳は、34株がO139、4株がO1であった(表6)。一方、培養法でコレラ菌が分離できなかった83検体中、4検体からO139特異遺伝子と*ctxA*遺伝子が増幅された。これらの結果より、マルチプレックスPCR法の方が培養法よりも感度が高い可能性が示された。

コレラ菌、腸炎ビブリオ、ビブリオ・バルニフィカスの特異的検出系

胃腸炎の原因となる重要なビブリオ属細菌としてコレラ菌、腸炎ビブリオ、ビブリオ・バルニフィカスの3菌種ある。コレラ菌と腸炎ビブリオは、それぞれの*toxR*遺伝子を、ビブリオ・バルニフィカスは溶血毒(*vvhA*)遺伝子を標的としたマルチプレックスPCRを構築した²⁷⁾。その結果、古典型O1コレラ菌22株、エルトール型O1コレラ菌72株、O139コレラ菌40株、non-O1/non-O139コレラ菌188株でコレラ菌に特異的な*toxR*遺伝子が、腸炎ビブリオ82株で腸炎ビブリオに特異的な*toxR*遺伝

表5. *ctxA* 遺伝子陽性のO1コレラ菌あるいはO139コレラ菌検出用マルチプレックスPCRの感度と特異性

菌種	菌株数	遺伝子陽性数		
		O1- <i>rfb</i>	O139- <i>rfb</i>	<i>ctxA</i>
<i>Vibrio cholerae</i> O1	15	15	0	11
<i>Vibrio cholerae</i> O139	36	0	36	36
<i>Vibrio cholerae</i> ^a	191	0	0	4 ^b
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2	0	0	0
<i>Salmonella</i> Typhi	1	0	0	0
<i>Salmonella</i> Paratyphi A	1	0	0	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	1	0	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	1	0	0	0
EIEC	1	0	0	0
ETEC	1	0	0	0
EHEC	2	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	0	0

^a O2-O138とO140-O193のコレラ菌

^b O37, O105, O141とO191のコレラ菌

表6. 下痢症患者便検体を用いた*ctxA* 遺伝子陽性のO1コレラ菌あるいはO139コレラ菌検出用マルチプレックスPCR法と培養法の比較

培養法	マルチプレックスPCR		合計
	陽性	陰性	
+	38	0	38
-	4	79	83
合計	42	79	121

子が、ビブリオ・バルニフィカス12株でビブリオ・バルニフィカスに特異的な*vvhA* 遺伝子がそれぞれ増幅された。しかし、それ以外の菌では増幅バンドは得られなかった。また、本マルチプレックスPCRは、3菌種それぞれが単独で、2菌種あるいは3菌種が同時に存在しても検出可能であり、3菌種が同時に存在した場合でも検出下限はPCRチューブあたり10 CFUと非常に高感度であった。かつて、インドのカルカッタからポートブレア行きの船の中でコレラ様の下痢症が発生した。患者便からコレラ菌は分離できなかったが、bead-ELISAでCTが検出されたことからインド政府はこの下痢症をコレラと正式に認めた事例がある²⁸⁾。このように病原体の特異的遺伝子を簡便・迅速に検出することで、コレラの原因となるコレラ菌や病原性ビブリオを分離することができなくとも、病原菌を検出することが食中毒の原因菌の推定や、診断に役立つことが期待される。

カンピロバクター属菌の細胞膨化致死毒素に関する研究と特異的検出系の構築

カンピロバクターは、我が国の細菌性食中毒の中で発生件数、患者数とも常に上位に位置する主要な食中毒の原因細菌である。しかしながら、培養には微好気条件を、培養時間は2日以上を要し、菌種間の性状が酷似していることからカンピロバクター属菌を分離し正確に菌種を同定することは容易でない。病原性についても運動性、

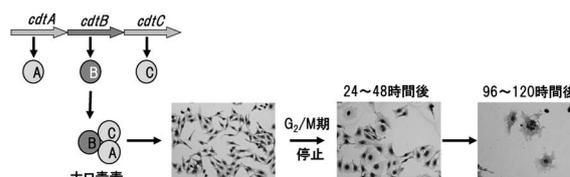


図10. 細胞膨化致死毒素とその細胞毒性発現機構

細胞膨化致死毒素 (CDT) は、A, B, C の3つのサブユニットからなるホロ毒素でA, Cサブユニットがレセプターへの結合活性、Bサブユニットが毒素活性を担う。標的細胞に作用し24~48時間で膨化、96~120時間後に細胞死を引き起こす

組織侵入性、細胞への付着や毒素産生性などが指摘されているが、その詳細は不明な点が多い。我々は、カンピロバクター属細菌の病原因子の中で唯一その実態が明らかとなっている細胞膨化致死毒素 (cytolethal distending toxin: CDT) に着目した。

CDTは、CdtA, CdtB, CdtCの3つのサブユニットからなるホロ毒素で、当初、ETECの産生するLTと似て非なる毒素として見つかった²⁹⁾。すなわち、LTは細胞に添加後、24-48時間後に細胞を伸長させるが細胞を致死させることはない。一方、CDTは細胞に添加後、24-48時間後に細胞を伸長・膨化させ、培養を96-120時間続けると細胞を致死させる点でLTと異なる毒素である (図10)。まず、*cdt* 遺伝子の全長が既に明らかとなっている *Campylobacter jejuni* を10株、*cdt* 遺伝子の全長が明らかとなっていなかった *Campylobacter coli* と *Campylobacter fetus* のそれぞれ10株の *cdt* 遺伝子の全塩基配列を解析した³⁰⁾。その結果、*C. jejuni*, *C. coli* と *C. fetus* の3菌種間で *cdt* 遺伝子の相同性は *cdtA* 遺伝子で50.5-62.3%, *cdtB* 遺伝子で62.2-70.2%, *cdtC* 遺伝子で52.4-61.4%であることがわかった。一方、菌種内の相同性は *C. jejuni* の *cdtA* 遺伝子で98.6-100%, *cdtB* 遺伝子で99.4-100%, *cdtC* 遺伝子で99.4-100%, *C. coli* の *cdtA* 遺伝子で97.0-100%, *cdtB* 遺伝子で99.5-100%, *cdtC* 遺伝子で99.2-100%, *C. fetus* の *cdtA* 遺伝子で97.5-100%, *cdtB* 遺伝子で99.3-100%, *cdtC* 遺伝子で99.3-100%であることがわかった。菌種間の相同性が低く、菌種内の相同性が高いことから *cdt* 遺伝子を標的とすることで *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus* の3菌種を特異的に検出できるのではと考え、それぞれの菌種の *cdtA* 遺伝子、*cdtB* 遺伝子、*cdtC* 遺伝子の3種を標的としたマルチプレックスPCRを構築した³¹⁾。

その結果、3種のマルチプレックスPCRは、33株の *C. jejuni*, 19株の *C. coli*, 20株の *C. fetus* を特異的に検出でき、その他のカンピロバクター属細菌や、カンピロバクター属菌以外で *cdt* 遺伝子を保有している菌、していない菌で非特異的に検出されることはなかった (表7)。また、*C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus* のどれか1菌種、あるいは2菌種、さらには3菌種存在する条件下でもそれぞれに特異的なPCR産物が得られ、特異的に検

表7. *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* 遺伝子を標的とした *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus* 検出用のマルチプレックスPCR法の感度と特異性

菌種 (株数)	<i>cdtA</i>			<i>cdtB</i>			<i>cdtC</i>		
	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>
<i>C. jejuni</i> (33)	33	0	0	33	0	0	33	0	0
<i>C. coli</i> (19)	0	19	0	0	19	0	0	19	0
<i>C. fetus</i> (20)	0	0	20	0	0	20	0	0	20
<i>C. lari</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. hyointestinalis</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. helveticus</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. upsaliensis</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Helicobacter hepaticus</i> (23)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Haemophilus ducrey</i> (23)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (23)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella dysenteriae</i> (13)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella sonnei</i> (3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella flexneri</i> (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella enterica</i> (33)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> [<i>cdt-I</i>] (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> [<i>cdt-II</i>] (2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> [<i>cdt-III</i>] (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> [<i>cdt-IV</i>] (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> [<i>cdt-V</i>] (23)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (28)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vibrio cholerae</i> (23)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表内の数字は、PCRで検出された菌株数を示す

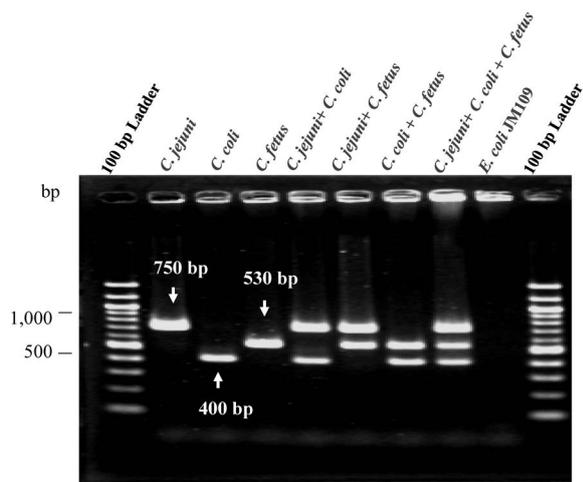


図11. *cdtB* 遺伝子を標的とした *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus* 検出用のマルチプレックスPCR法

出すことができた (図11)。検出下限はPCRチューブあたり、それぞれ10-100 CFUと高感度であった。本PCRはカンピロバクター検出用キットとして扶桑薬品工業(株)との共同研究で開発し、タカラバイオ(株)から販売されている。

ヒトの病原性に関わるカンピロバクター属細菌として *Campylobacter hyointestinalis*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter helveticus* や *Campylobacter upsaliensis* も報告されている。これらのカンピロバクター属細菌も *cdt* 遺伝子を保有していることから、*C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus* の3菌種を含む合計7菌種のカンピロバクター属細菌のPCRによる検出系の構築を試みた。7菌種の検出系はPCR-RFLP (restriction fragment length polymor-

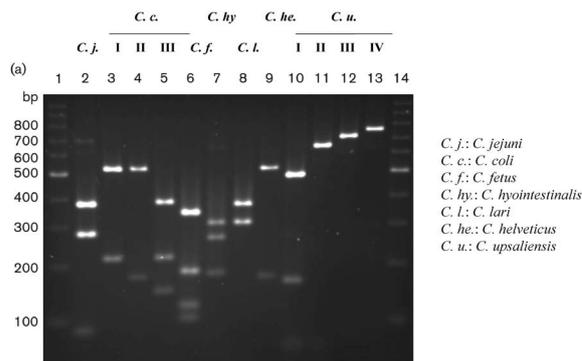


図12. *cdtB* 遺伝子を標的とした *Campylobacter* 7菌種 (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. helveticus*, *C. upsaliensis*) を検出型別するためのPCR-RFLP法

phism)法を用いた³²⁾。すなわち、7菌種が保持する *cdtB* 遺伝子の相同性の高い領域から共通プライマーを製作しPCRを行った後、制限酵素で切断しその切断断片多型で菌種を判定する方法である (図12)。その結果、35株の *C. jejuni*, 19株の *C. coli*, 20株の *C. fetus*, 13株の *C. lari*, 2株の *C. helveticus* と22株の *C. upsaliensis* はすべて正しく菌種が同定された。しかしながら、*C. hyointestinalis* は24株中21株からのみ特異的な増幅断片が得られ、制限酵素処理で *C. hyointestinalis* と型別され、*C. hyointestinalis* の陽性率は88%であった。さらに、本PCR-RFLP法を患者検体、食品検体に適用して評価した結果、患者便21検体中、培養法で7検体から *C. jejuni* 5株、*C. coli* 1株、*C. fetus* 1株が分離され、PCR-RFLP法の結果と完全に一致した。一方、カンピロ

バクテリアが分離されなかった14検体では、PCR-RFLP法でもPCR産物は得られず特異性、感度とも100%であった。牛胆汁10検体を調べた結果では、6検体から*C. jejuni*が分離され、PCR-RFLP法でも6検体は*C. jejuni*と同定された。ただしそのうちの2検体は増菌培養後にPCR-RFLP法で*C. jejuni*と同定された。カンピロバクターが分離されなかった4検体では、PCR-RFLP法でもPCR産物は得られず特異性、感度とも100%であった。以上のように、カンピロバクター属細菌では*cdt*遺伝子が菌種特異的に保持されており*cdt*遺伝子を標的とすることでカンピロバクター属細菌の簡便、迅速な検出・同定法として利用できることが明らかとなった。

また、先に示したPCR産物が得られなかった*C. hyointestinalis* 3株の超音波菌体破碎上精が培養細胞に対してCDT活性を示すことがその後の研究で明らかとなった。この結果は、*C. hyointestinalis*には3種類の*cdt*遺伝子があることの発見に繋がった³³⁾。

大腸菌が産生する細胞膨化致死毒素に関する研究から エッシャーヒア・アルバーティ

先に述べたようにCDTは、LTと似て非なる毒素として見つかった。発見当初は、CLDTとも呼ばれていたが³⁴⁾、その後、CDTという呼称に統一されている³⁵⁾。小生がJICAの専門家としてインド国立コレラ及び腸管感染症研究所(NICED: National Institute of Cholera and Enteric Diseases)で仕事をしていた時、*cdt*遺伝子を検出できるPCR法を構築し、下痢症患者便から*cdt*遺伝子を検出し、*cdt*遺伝子陽性の大腸菌を分離した。その後、Pandeyらが急性下痢症患者便284検体について調べ、4検体で*cdt*遺伝子が陽性となり*cdt*遺伝子陽性となった4検体から*cdt*遺伝子を保有する大腸菌を分離した³⁶⁾。分離菌の病原遺伝子を解析した結果、興味深いことに*cdt*遺伝子陽性大腸菌は*eae*遺伝子と*bfpA*遺伝子を保持するEPECであることが明らかとなった。既にNICEDで分離されていたEPEC 138株を、*cdtB*遺伝子プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション法による廻り調査で調べたところ5株で*cdt*遺伝子陽性となった。PCR法で再確認したところ2株で陰性となったが、3株で陽性となった。これらの3株も*eae*遺伝子と*bfpA*遺伝子の両遺伝子が陽性となった。さらに興味深いことに、CDTの産生量の多いEPECは血性下痢症由来であったのに対し、CDTの産生量の少ないEPECは水様性下痢症由来であった。細菌学の教科書では、EPECが血性下痢症に関わるとは記載されておらず、CDTが血性下痢に関わる可能性を示す結果が得られた。

この結果を受け、1980年代後半から1990年代前半に日本各地の病院や衛生研究所から竹田研究室に送られてきたEHECの可能性が考えられ、実際EHECでなかった大腸菌8株について*cdtB*遺伝子プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション法による廻り調査を行っ

表8. 5種類の大腸菌CDT型とCDT産生性大腸菌が最初に分離された検体の特徴

CDT型	CDT産生性菌が最初に分離された検体あるいは大腸菌の特徴	文献
CDT-I	下痢症患者(2歳児)由来の大腸菌	39
CDT-II	下痢症患者(2歳児)由来の大腸菌	40
CDT-III	敗血症を発症した仔牛由来の大腸菌	41
CDT-IV	敗血症を発症したブタ由来の大腸菌	42
CDT-V	ソルビトール分解性の腸管出血性大腸菌O157:H ⁻ やO157:H7	43

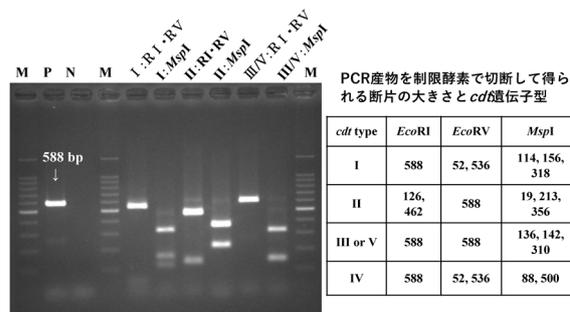


図13. 5種類の大腸菌*cdtB*遺伝子の検出・型別するためのPCR-RFLP法

た³⁷⁾。その結果、当時大阪医科大学の小児科に勤めておられた名木田博士から送られてきた血性下痢症由来の大腸菌で*cdtB*遺伝子が陽性となった。下痢原性大腸菌の病原因子を調べたところ、本菌はEPECの病原遺伝子は保有せず*astA*遺伝子陽性の*E. coli* O2:H12であった。この成果は、我が国における小児下痢症とCDT産生性大腸菌(CTEC; CDT-producing *E. coli*)との関わりを示す初めての報告となった³⁷⁾。しかしながら、アフリカでの研究でCTECは小児下痢症患者から分離されるものの健常者コントロールと比較して有意差がないことから、CTECは下痢症の原因菌とは位置付けられていなかった³⁸⁾。

名木田博士は大阪医科大学から岡山県にある水島中央病院の小児科に移られていることがわかり、その後も名木田博士のご協力を得て我が国における小児下痢症とCTECとの関係を調べることとなった。当時、大腸菌が産生するCDTには、少なくとも5種類報告されていた³⁹⁻⁴³⁾。表8に示したように小児下痢症患者便から分離された大腸菌が産生するCDT-I³⁹⁾とCDT-II⁴⁰⁾、敗血症を発症した仔牛と豚由来の大腸菌が産生するCDT-III⁴¹⁾とCDT-IV⁴²⁾、通常EHEC O157はソルビトール非分解性であるが、ドイツを中心とした欧州でソルビトール分解性のO157が分離され、そのEHECで見つかったCDT-Vがある⁴³⁾。Hinenoyaらは、5種類の大腸菌の*cdt*遺伝子を検出できるPCRプライマーを設計し、得られたPCR産物を制限酵素で切断し型別するPCR-RFLP法を構築し(図13)、小児下痢症患者便362検体について*cdt*遺伝子陽性大腸菌が存在するかどうかについて調べた⁴⁴⁾。その結果、9.7%に相当する35検体で*cdt*遺伝子が陽性と

なり、その内訳は *cdt-I* 遺伝子陽性が21検体、*cdt-II* 遺伝子陽性が3検体、*cdt-III* 遺伝子陽性が4検体、*cdt-IV* 遺伝子陽性が3検体、*cdt-V* 遺伝子陽性が4検体であった。このうち菌分離に成功したのは、*cdt-I* 遺伝子陽性、*cdt-II* 遺伝子陽性、*cdt-III* 遺伝子陽性、*cdt-IV* 遺伝子陽性、*cdt-V* 遺伝子陽性大腸菌がそれぞれ19, 1, 3, 3, 4株であった。さらに型別できない *cdt* 遺伝子が検出され、その菌を分離したところ大腸菌ではなく *Providencia alcalifaciens* であることがわかった。*cdt-III* 遺伝子と *cdt-IV* 遺伝子陽性大腸菌がそれぞれ1株、血性下痢症便由来であった。しかしながらインドの例と異なり、EPECに属する大腸菌は見つからなかったが、*cdt-I*、*cdt-II* と *cdt-V* 遺伝子陽性大腸菌それぞれ1株で *eae* 遺伝子が検出された。

Providencia 属菌も細胞膨化致死毒素を産生する

Shimaらも小児下痢症患者便から *cdt* 遺伝子を検出し、CTECの分離を試みていたところ型別できない *cdt* 遺伝子を検出した。*cdt* 遺伝子陽性菌を分離したところ、*P. alcalifaciens* であった⁴⁵⁾。*P. alcalifaciens* の *cdt* 遺伝子の全長を解析し、*Shigella boydii* で報告されている *cdt* 遺伝子と最も相同性が高いことが明らかとなった。また、本菌培養液の超音波菌体破碎上清を培養細胞に添加するとCHO細胞にのみCDT活性を示し、HeLa細胞にはCDT活性を示さなかった。大腸菌のCDT-IはCHO細胞、HeLa細胞の両細胞にCDT活性を示すことから細胞志向性の異なるCDTであることがわかった。*PacdtB* 遺伝子プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション試験で *P. alcalifaciens* を含む他4菌種 (*P. rettgeri*, *P. rustigianii*, *P. heimbachae*, *P. stuartii*) に対して *cdt* 遺伝子の有無を調べたが、特定の *P. alcalifaciens* 以外で *cdt* 遺伝子は検出されなかった。*cdt* 遺伝子の上流にトランスポゼースと相同性の高い遺伝子が見つかり、*cdt* 遺伝子はファージあるいはプラスミドを介した水平伝播によって他の菌から *P. alcalifaciens* に持ち込まれた可能性が考えられた。我が国の小児下痢症に *Providencia* 属菌

が関わっている可能性が考えられたことから、16S rRNA 遺伝子を標的とし *Providencia* 属菌を特異的に検出できるPCR法を構築し、小児下痢症患者便345検体について調べた。その結果、1.4%に相当する5検体でPCRが陽性となり、そのうち4検体から *P. rettgeri* を分離した。しかしながら、すべての菌株で *cdt* 遺伝子は検出されなかった⁴⁶⁾。

Providencia 属菌と下痢症との関わりをさらに明らかにするために、先と同様のPCR法を用いてタイの下痢症患者便を対象に調べた⁴⁷⁾。その結果、214検体中、16検体(7.5%)で陽性となり、*P. alcalifaciens* 4株、*P. rettgeri* 4株、*P. stuartii* 1株を分離した。さらに、タイで市販されている鶏肉26検体、豚肉25検体、牛肉25検体についても同様に調べた。それぞれ、15検体(58%)、16検体(64%)、17検体(68%)で陽性となり、これら食肉が *Providencia* 属菌のヒトへの感染源となっている可能性が考えられた⁴⁷⁾。一方、Hassanらは、*eae*, *stx*, *Eccdt* (*cdt-I*~*cdt-V*) 遺伝子を検出できるマルチプレックスPCR法を構築し、我が国の小児下痢症患者便検体からPCR-RFLPで型別できない *cdtB* 遺伝子を検出した(図14)。そのPCR-RFLPパターンが *P. alcalifaciens* 由来の *cdtB* 遺伝子と酷似していたことから、当初は *P. alcalifaciens* の *cdtB* 遺伝子と思われた。しかし、*cdtB* 遺伝子陽性菌を単離し、その細菌学的性状を解析すると *P. alcalifaciens* ではなく *P. rustigianii* と同定された⁴⁸⁾。さらに、*P. rustigianii* は活性を有するCDTを産生することも明らかになった。このように大腸菌で見つかった *Eccdt* 遺伝子と類似した遺伝子が同じく腸内細菌科細菌で見つかったことは *Providencia* 属の *cdt* 遺伝子は、水平伝播によって菌種を超えて拡まった可能性が考えられた。

II型細胞膨化致死毒素を産生する大腸菌は エッシェリヒア・アルバーティ

Providencia 属菌の感染源が食肉である可能性が示されたが、EHECなど多くの下痢原性大腸菌の感染源として家畜が知られている。そこで、奈良県の育成牧場で飼育されている健康な家畜でのCTECの保菌状況を患者検体のサーベイランスに用いた同様の方法で調べた⁴⁹⁾。その結果、調べた牛、豚それぞれの102, 45便検体中、90, 14検体から *cdtB* 遺伝子が検出された。しかしながら、鶏45便検体からは *cdtB* 遺伝子は検出されなかった。*cdtB* 遺伝子陽性となった牛90検体の内訳は、2検体で *cdt-I* 遺伝子、87検体で *cdt-III/V* 遺伝子、1検体で *cdt-IV* 遺伝子が陽性となった。*cdtB* 遺伝子陽性となった豚14検体の内訳は、1検体で *cdt-II* 遺伝子、13検体で *cdt-III/V* 遺伝子が陽性となった。最終的に、*cdtB* 遺伝子陽性となった牛90検体から *cdt-I* 遺伝子陽性、*cdt-III* 遺伝子陽性、*cdt-IV* 遺伝子陽性、*cdt-V* 遺伝子陽性大腸菌がそれぞれ2, 35, 1, 52株が、*cdt-III* と *cdt-V* 遺伝子両

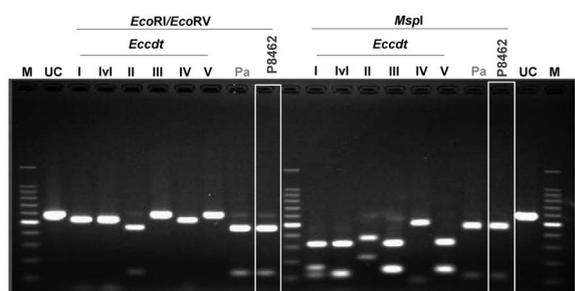


図14. 5種類の大腸菌 *cdtB* 遺伝子の検出・型別するためのPCR-RFLP法で型別できない *cdtB* 遺伝子の検出。M: 分子量マーカー(100bp ladder), UC: 酵素消化無し, I: *Eccdt-I*, Iv; *Eccdt-I* variant, II; *Eccdt-II*, III; *Eccdt-III*, IV; *Eccdt-IV*, V; *Eccdt-V*, Pa; *PacdtB*, P8462; 型別できない *cdt*

表9. *Escherichia albertii* と様々な *Escherichia coli* の生化学的性状の比較⁵¹⁾

生化学的性状	CTEC-II 20株	<i>E. albertii</i>				<i>E. coli</i>	CTEC-I 5株	CTEC-III 4株	CTEC-IV 3株	CTEC-V 5株
		3株	5株	26株	LMG20976 ^T					
インドール	100 ^a	100	0	96.2	—	98	100	100	100	100
運動性	0	0	0	0	—	95	80	1	100	100
クエン酸利用	0	0	0	0	—	1	0	0	0	0
酢酸産生	80	66.7	100	92.3	+	90	100	100	100	100
VP反応	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0
リジン脱炭酸	100	100	100	100	+	90	100	100	100	100
β-グルクロニターゼ	0	0	0	0	—	(+) ^b	100	100	100	100
硫化水素産生 (TSD)	0	0	0	0	—	1	0	0	0	0
グルコース代謝	100	100	100	100	+	100	100	100	100	100
ガス産生	100	100	100	100	+	95	100	100	100	100
各種炭素源代謝										
セロビオース	0	0	0	0	—	2	0	0	0	0
ズルシトール	0	0	0	0	—	60	60	100	100	10
乳糖	0	0	0	3.9	—	95	100	100	100	100
マルトース	100	0	60	88.5	+	95	100	100	100	100
マンニトール	100	100	100	100	+	98	100	100	100	100
D-メリビオース	0	0	0	ND	—	75	100	75	100	100
L-ラムノース	0	0	0	0	—	80	100	100	100	100
D-ソルビトール	55	33.3	0	57.7	—	94	80	100	100	100
白糖	25	0	0	19.2	—	50	80	50	67	80
D-キシロース	0	0	0	0	—	95	100	100	100	100

—, 陰性; +, 陽性; ND, 未完了

^a 陽性株の割合 (%)^b 大部分の株で陽性表10 腸管病原性大腸菌から *Escherichia albertii* と再同定された菌の運動性, 糖の分解性, *E. albertii* 特異的PCRと病原遺伝子プロファイル

菌株	運動性 ^{*1}	糖の分解性 (1% w/v)							<i>E. albertii</i> PCR ^{*2}	病原遺伝子プロファイル
		ズルシ トール	ラク トース	メリビ オース	ラム ノース	ソルビ トール	シュク ロース	キシ ロース		
AKT5	—	— ^{*3}	—	—	—	+ ^{*4}	—	—	+	<i>eae, Eccdt - I, tEacdt*</i> , <i>stx2f</i>
AKT11	—	—	—	—	—	+	+	—	+	<i>eae, Eacdt</i>
AKT22	—	—	—	—	—	+	—	—	+	<i>eae, Eacdt</i>
AKT72	—	—	—	—	—	+	—	—	+	<i>eae, Eacdt</i>
AKT73	—	—	—	—	—	—	—	—	+	<i>eae, Eacdt</i>
AKT80	—	—	—	—	—	+	—	—	+	<i>eae, Eacdt</i>
AKT92	—	—	—	—	—	+	+	—	+	<i>eae, Eacdt</i>
AKT109	—	—	—	—	—	+	—	—	+	<i>eae, Eacdt</i>
AKT123	—	—	—	—	—	+	—	—	+	<i>eae, Eacdt</i>
AKT128	—	—	—	—	—	+	—	—	+	<i>eae, Eacdt</i>
AKT130	—	—	—	—	—	—	—	—	+	<i>eae, Eccdt - I, Eacdt</i>
AKT131	—	—	—	—	—	—	—	—	+	<i>eae, Eacdt</i>
AKT148	—	—	—	—	—	—	—	—	+	<i>eae, Eacdt</i>
AKT152	—	—	—	—	—	—	—	—	+	<i>eae, Eacdt</i>
AKT219	—	—	—	—	—	+	—	—	+	<i>eae, Eacdt</i>
AKT265	—	—	—	—	—	—	—	—	+	<i>eae, Eacdt</i>
AKT294	—	—	—	—	—	—	—	—	+	<i>eae, Eacdt</i>

* 不完全な *Eacdt* 遺伝子*¹ SIM培地での運動性*² OokaらのPCR法 (52)*³ 糖分解性無し*⁴ 糖分解性有り

陽性大腸菌が1株分離された。 *cdtB* 遺伝子陽性となった豚14検体からは, *cdt-II* 遺伝子陽性, *cdt-V* 遺伝子陽性大腸菌がそれぞれ1株と6株が分離された。また, *cdt-V* 遺伝子陽性大腸菌の6株で *stx2* 遺伝子陽性, 16株で *stx1* と *stx2* の両遺伝子陽性であった。 *cdt-II* 遺伝子陽性大腸菌の性状を詳細に調べると大腸菌と類似しているが大腸菌でなく, *Escherichia albertii* である可能性が浮上した。当時宮崎大学医学部の林哲也教授 (現九州大学大学

院医学研究院教授), 大岡唯祐助教 (現鹿児島大学大学院医歯学総合研究科准教授) らの協力を得て, MLS (multi-locus sequence) 解析 (7つのハウスキーピング遺伝子の塩基配列に基づく) によって最終的に *E. albertii* であることが明らかとなった。

Hinenoyaらは, CDT-I, CDT-IIと *Stx2f* の3種類の毒素を産生する可能性のある大腸菌様の菌を小児下痢症患者便から分離した。しかし, この菌もMLS解析によっ

て *E. albertii* であることが明らかとなった⁵⁰⁾。これらの結果から、Hinenoyaらは *cdt-II* 遺伝子陽性と判定された大腸菌は、*E. albertii* である可能性を考え、小児下痢症患者便から *cdt-II* 遺伝子陽性大腸菌として分離・同定された20株について再度詳細に性状解析を行った⁵¹⁾。その結果、*cdt-II* 遺伝子陽性大腸菌20株は大腸菌が利用するズルシトール、ラクトース、メリビオース、ラムノース、キシロースを分解せず(表9)、Ookaらが開発した *E. albertii* 特異的PCR⁵²⁾ でもすべて陽性となり、さらにMLS解析と *rpoB* 遺伝子の塩基配列の系統樹解析から20株の *cdt-II* 遺伝子陽性大腸菌はすべて *E. albertii* と結論づけられた⁵¹⁾。

E. albertii の特徴をまとめると(1)大腸菌が通常利用する特定の糖を分解しない、(2) *eae* 遺伝子を保有している、(3) *E. albertii* 固有の *cdt* 遺伝子 (*cdt-II* 遺伝子と酷似) を保有している、(4) MLS解析で特定の系統に分類される、などがある。我々は、*cdt-II* 遺伝子陽性大腸菌は *E. albertii* と仮定した。しかしこの仮説の信憑性を確認するため、*cdt-II* 遺伝子以外の角度からEPECと誤同定されていた菌を *E. albertii* と同定し、その *E. albertii* が *cdt-II* と相同性の高い *cdt* 遺伝子を保有するかについて調べた。かつてEPECあるいはaEPECと同定された大腸菌373株の中に *E. albertii* が含まれていないか、遡り調査を試みた⁵³⁾。この大腸菌373株は、秋田県衛生科学研究所で下痢症患者を含むヒト、動物、食品および環境から分離されたものである。これらの菌株すべてについて詳細な生化学的性状解析、MLS解析およびOokaらの *E. albertii* 特異的PCR法⁵²⁾ で解析した。その結果、17株が37°Cの条件下で運動性がなく、ズルシトール、ラクトース、メリビオース、ラムノース、キシロースを分解せず、*E. albertii* 特異的PCRで増幅バンドが得られたことから *E. albertii* と再同定した(図10)。また、一部の菌株で *stx2f* 遺伝子も検出された。さらに *E. albertii* 固有の *cdt* 遺伝子(以後、*cdt-II* 遺伝子でなく *Eacdt* 遺伝子)をすべての株が保持しており、*cdt-II* 遺伝子陽性大腸菌は *E. albertii* であることを異なる角度からも裏付ける結果となった。

このように *E. albertii* は生化学的性状が大腸菌と酷似していること、*eae* 遺伝子を保有していること、さらに一部の菌では *stx2a* や *stx2f* 遺伝子を保有していることからaEPEC、EPEC、EHECや *Shigella boydii* O13と誤同定されていた。これらの理由として、*E. albertii* の増菌培地や選択分離培地がないこと、さらには特異的な検出法が確立されていないことが挙げられる。そこで我々は、*Eacdt* 遺伝子を標的とした *E. albertii* の簡便・迅速な同定法を構築した⁵⁴⁾。

エッシェリヒア・アルバーティの特異的検出法

Eacdt 遺伝子を標的としたPCR法は、PCRチューブあたり10 CFUの *E. albertii* が存在すれば *E. albertii* を

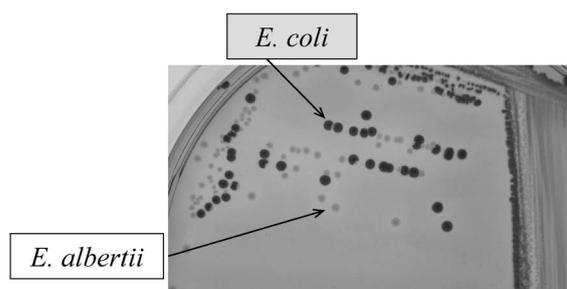


図15. XRM-MacConkey-agar上での大腸菌と *E. albertii* の色調

X: キシロース, R: ラムノース, M: メリビオース, 大腸菌は糖を分解して酸を産生し、赤色コロニーを、*E. albertii* は酸を産生せず白色あるいは無色のコロニーを形成する

表11. 健常者便にスパイクした *E. albertii* の検出下限

スパイクした <i>E. albertii</i> の菌数(CFU/g stool)	XRM-MacConkey (無色)	<i>Eacdt</i> -PCR
2.5×10^7	+	+
2.5×10^6	+	+
2.5×10^5	+	+
2.5×10^4	-	-
2.5×10^3	-	-
2.5×10^2	-	-
0	-	-

検出することができた。さらに特異性、感度を調べたところ、*E. albertii* 65株すべてと *cdt* 遺伝子陽性の *S. boydii* 2株 (*E. albertii* と再同定された) で特異的なバンドが得られた。しかしながら、その他の *S. boydii* 63株では特異的な増幅バンドは得られず、その他の腸内細菌科に属する17菌種、60株、腸内細菌科に属さない20菌種、22株で非特異的な増幅バンドは得られなかった。すでに報告されている、Hyma-PCR⁵⁵⁾、Ooka-PCR⁵²⁾、Lindsey-PCR法⁵⁶⁾ で調べ得られた結果とも比較した。Lindsey-PCRでは *E. albertii* 1株で陰性となり、Ooka-PCRでは *E. albertii* と再同定された1株で予想される増幅産物より大きな産物が得られ陰性となった。また、Maedaら⁵⁷⁾ は、Hyma-PCRでは *Klebsiella varicola*、*Morganella morganii*、*Citrobacter freundii*、*Klebsiella oxytoca* や *Salmonella enterica* で非特異的な増幅産物が得られると報告しており、我々の研究結果でも *K. varicola* や *S. enterica* で非特異的な増幅産物が得られた。以上より、*Eacdt* 遺伝子を標的としたPCR法が特異性、感度とも100%で最もよい結果となった。しかしながら、一部の *E. albertii* で、*Eacdt* 遺伝子の欠失も報告されており、より精度を高めるためには最低2種類以上のPCR法で確認することを勧める。

また、MALDI-TOF MSを用いて菌種特異的な分子を検出し、細菌を菌種レベルで同定する方法が一般的に用いられている。Hatanakaらは、58株の *E. albertii* と36株の *E. coli* をMALDI-TOF MSで解析することで *E. al-*

表12. *Escherichia albertii* 選択培地と腸内細菌科細菌の選択培地を用いた*E. albertii* が分離された下痢症患者便からの*E. albertii*の検出

標本 ID	XRM-MacConkey agar		MacConkey 寒天		DHL 寒天		mEA 寒天		
	無色	赤色	無色	赤色	無色	赤色	無色	赤色/桃色	青色
P2543	50 ^a /50 ^a (100%) ^c	0/50 (0%)	38/50 (76%)	0/4 (0%)	46/50 (92%)	0/12 (0%)	42/43 (98%)	0/38 (0%)	0/5 (0%)
P2855	99/99 (100%)	0/101 (0%)	6/50 (12%)	0/50 (0%)	50/50 (100%)	0/50 (0%)	38/43 (88%)	0/43 (0%)	コロニーなし
P3321	50/50 (100%)	0/50 (0%)	50/50 (100%)	0/50 (0%)	50/50 (100%)	0/40 (0%)	43/43 (100%)	0/12 (0%)	0/31 (0%)
P3662	8/8 (100%)	0/50 (0%)	0/50 (0%)	0/50 (0%)	4/4 (100%)	0/50 (0%)	4/43 (9.3%)	0/33 (0%)	0/10 (0%)
P3502	39/39 (100%)	0/50 (0%)	8/54 (15%)	0/50 (0%)	31/32 (97%)	0/50 (0%)	1/43 (2.3%)	0/42 (0%)	0/43 (0%)
P8790	4/4 (100%)	0/50 (0%)	0/50 (0%)	0/50 (0%)	7/8 (88%)	0/50 (0%)	6/6 (100%)	0/37 (0%)	コロニーなし
P4839	50/50 (100%)	0/50 (0%)	49/49 (100%)	0/50 (0%)	No colony	14/50 (28%)	35/43 (81%)	0/43 (0%)	コロニーなし

^a 試したコロニー数

^b *E. albertii*が陽性となったコロニー数

^c *E. albertii*が陽性となった割合

*bertii*に特異的な2つの質量ピークを新たに見出し、MALDI-TOF MSで*E. albertii*を同定する精度の向上に貢献した⁵⁸⁾。このように、今日では*E. albertii*の簡便な同定法として複数種類のPCR法やMALDI-TOF MSによる質量分析法が利用でき、高い精度で*E. albertii*を同定できるようになった。

エッシャーヒア・アルバーティの選択培地

大腸菌は通常、MacConkey寒天培地やDHL寒天培地で分離される。これらの培地には乳糖や白糖が含まれ大腸菌をはじめとする乳糖や白糖分解性の菌は酸を産生し赤色のコロニーを形成する。しかし、*Shigella*属菌を初め一部の菌は糖を分解できず白色のコロニーを形成する。これらの培地で通常*E. albertii*も白色コロニーを形成するが乳糖や白糖を分解する*E. albertii*も存在し必ずしも白色コロニーを形成するとは限らない。また、白色コロニーを形成したからといって必ずしも*E. albertii*とも限らない。Hinenoyaらは、*E. albertii*がメリビオース(M)、ラムノース(R)、キシロース(X)を分解しないことに着目し、MacConkey寒天培地に含まれる乳糖の代わりにこれら3糖を1種類、2種類、あるいは3種類と加え様々な腸内細菌科に属する細菌、属さない細菌を用いて評価した(図15)⁵⁹⁾。その結果、ラムノースとキシロースの2種類を加えると、*E. albertii* 49株すべてが白色コロニーを形成し、その他23菌種中7菌種が白色コロニーを形成した。さらにメリビオースを加え3種類の糖が存在する場合、*E. albertii*以外の23菌種中で白色コロニーを形成する菌種は6菌種に低下した。白色コロニーを形成した*Salmonella*属菌と白色コロニーを形成する可能性の高い*Shigella*属菌の数を増やして調べたところ*Salmonella*属菌では調べた全ての株で白色コロニーを形成しなかったが、*Shigella*属菌では4菌種すべてのほとんどが白色コロニーを形成した。このように、*E. albertii*を大腸菌と区別して検出できるXRM-MacConkey寒天培地を開発することができた。XRM-MacConkey寒天培地の検出下限を*E. albertii*陰性の健常者便検体を用いたスパイク実験によって調べ得られた結果を*E. albertii*特異的PCRの結果と比較した⁵⁹⁾。表11に示したように

糞便1gあたりに 2.5×10^5 CFUの*E. albertii*が存在するとXRM-MacConkey寒天培地で白色コロニーとして分離され、*E. albertii*特異的PCRで*E. albertii*と同定された。一方、*E. albertii*をスパイクした便からDNAを抽出・精製し、*E. albertii*特異的PCRで*E. albertii*の検出を試みたところ、XRM-MacConkey寒天培地を用いた結果と同様、検出下限は糞便1gあたりに 2.5×10^5 CFUの*E. albertii*であった。

さらに、*E. albertii*が分離された患者便を増菌培養した培地のグリセロールストック7検体を用いて、Hinenoyaらが開発したXRM-MacConkey寒天培地、市販のMacConkey寒天培地とDHL寒天培地、さらにMaheuxらによって開発された*E. albertii*分離用のmEA寒天培地⁶⁰⁾を用いて*E. albertii*の選択性について評価した(表12)。その結果、XRM-MacConkey寒天培地では得られた白色コロニーすべてが*E. albertii*と同定され、赤色コロニーで*E. albertii*は検出されなかった。一方、MacConkey寒天培地では白色コロニーが得られない検体も2つあり、さらに得られた白色コロニーもすべてが*E. albertii*ではなかった。DHL寒天培地では得られた白色コロニーが*E. albertii*である割合は高かったが、7検体中1検体で白色コロニーが得られず、赤色コロニーとして*E. albertii*が分離された。これは白糖分解性の*E. albertii*が存在したことが理由と考えられた。mEA寒天培地では、7検体すべてで白色コロニーが得られたが、2検体で白色コロニーの割合が2.3%(1/43)や9.3%(4/43)となりXRM-MacConkey寒天培地と比べると感度は十分とはいえなかった。

*E. albertii*による集団食中毒は2000年以降我が国で散見されている。Hinenoyaらはアライグマなどの野生動物が高頻度に*E. albertii*を保菌していることを見出している⁶¹⁾。現在、様々な選択増菌培地や特異的検出法も開発され⁶²⁻⁶⁴⁾、今後*E. albertii*がより正確に検出、同定されることで、どの程度の割合でヒトの胃腸炎と関わっているのか、また自然宿主からどのような経路でヒトに感染しているかの実態が明らかになることが期待される。

謝 辞

神戸学院大学薬学部に入學し、故藤野恒三郎先生から微生物学を学んだことがきっかけで、竹田美文先生と巡り会い、細菌学を志すこととなった。その後、東京大学医科学研究所、京都大学医学部、国立国際医療研究センターで15年間竹田美文先生から細菌学・感染症学についてご指導いただいた。両先生に心から感謝申し上げます。大阪府立大学（現大阪公立大学）では、朝倉昌博（現扶桑薬品工業株式会社 上席研究員）、日根野谷淳（現准教授）、Sharda P. Awasthi（現特任講師）、畑中律敏（現助教）が本賞受賞に関わる研究に多大な貢献をしてくれた。以下に述べる多くの方々のご指導・ご鞭撻、並びに貴重な菌株の分与を初めとする様々なご協力のおかげで本研究を上げる事ができた。この場をお借りして厚くお礼を申し上げます。大阪大学蛋白質研究所、故下西康嗣、相本三郎、尾崎 宏、高尾敏文、日高雄二、東京大学医科学研究所、平山壽哉、野田公俊、湯通堂隆、倉園久生、奥 裕一、伊藤秀明、京都大学医学部、故西淵光昭、白井宏政、寺井 章、大村真里、Zaw Lin、曹 春渝、馬場清志、唐澤宏宏、千葉大学薬学部、五十嵐一衛、国立国際医療研究センター研究所、濱端 崇、清水 健、星野克明、佐藤寿男、大阪府立公衆衛生研究所（現大阪健康安全基盤研究所）、小林一寛、塚本定三、勢戸和子、田口真澄、インド国立コレラ及び腸管感染症研究所、G. B. Nair, T. Ramamurthy, S. K. Bhattacharya, A. K. Mukhopadhyay, S. Chakraborty, A. Basu, S. Garg, M. Pandey, インド国立化学生物學研究所、Rupak K. Bhadra, 国際下痢性疾患研究センター、バングラデシユ、Shah M. Faruque, 国立感染症研究所、渡邊治雄、島田俊雄、寺嶋 淳、荒川英二、宮崎大学医学部、林哲也、大岡唯祐、宮崎大学農学部、三澤尚明、水島中央病院小児科、名木田 章、富山県衛生研究所、綿引正則、磯部順子、秋田県衛生科学研究所（現秋田県健康環境センター）、八柳 潤、神戸市健康科学研究所、飯島義雄、熊本県衛生研究所（現熊本県保健環境科学研究所）、原田誠也、愛知県衛生研究所、鈴木匡弘、山田和弘、愛媛県衛生研究所、田中 博、農研機構動物衛生研究部門、秋庭正人、楠本正博、麻布大学保健環境学部、松田基夫、東京大学大気海洋研究所、小暮一啓、華南理工大学軽工与食品学院 石 磊、タイ国立タマサート大学保健学部、Seksun Samosornsuk, アルゼンチン国立海洋研究所 Ruben Jose Lara, Germán A Kopprio, 大阪大学大学院薬学研究所、中川晋作、クエート大学医学部、M. John Albert, 大阪府立大学大学院農学生命科学研究科・生命環境科学研究科（現大阪公立大学大学院獣医学研究科）、西村和彦、嶋 謙介、M. Samiul Alam, Worada Samosornsuk, 岡崎 健一、Nithayananda Chowdhury, Soumya Haldar, Shruti Chatterjee, 呉 育羅, Kabir SM Lutful, 杉本典彦, 四良丸 幸, Sucharit

Basu Neogi, 島 綾香, Sharda Prasad Awasthi, MD, Shamin Hasan Zahid, クアク美智子, 故Sikander Sheikh, Srinuan Somroop, Hoang Hoai Phuong, 安田憲朋, 奥野健太郎, Azimun Nahar, Hassan Jayedul, Goutham B. Manjunath, 新井暢夫, 清水顕範, 竹平京司, 徐 炳婷, 山崎尚美, 常 彦磊, 温 雯, Asmaa Mostafa, Obi Okechukwu John, 西嶋駿弥, Sivlin UNG, Ahmed Abououf, 田口 堯, 市村秀俊, 向澤奈津子, 丹羽裕子, 長野恵吾, 亀井数正（大阪大学大学院薬学研究科）、川端洋輝（大阪大学大学院薬学研究科）、上田 修（ベックマンコールター株式会社）、Rabee Alhossiny（サダト市大学獣医学部）、狄 慧玲（華南理工大学軽工与食品学院）、梁 思思（華南理工大学軽工与食品学院）、李 一鳴（華南理工大学軽工与食品学院）、Tran Thi Thu Soung（ベトナム国立カントー大学・農学部）、Suleiman Mzee Saidi（ケニア国立モンバサ大学）、Nguyen Thi Ann Dao（ベトナム国立公衆衛生研究所、ホーチミンシティー）、Le Quoc Phong（ベトナム国立ニャチャンパスツール研究所）、松久明生（扶桑薬品工業株式会社）、武政二郎（食品微生物科学協会）、梅迫誠一（いかり消毒）、（敬称略）

本研究は、文部科学省、日本学術振興会、厚生労働省、国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）、内閣府食品安全委員会、独立行政法人国際協力機構（JICA）、公益財団法人金原一郎記念医学財団、公益財団法人大山健康財団からの研究助成金及び人材育成奨学金、扶桑薬品工業（株）、タカラバイオ（株）、大日本住友製薬（株）、日水製薬（株）、倉敷紡績（株）、大幸薬品（株）、三慶（株）、（株）カネカ、ベックマン・コールター（株）、イカリ消毒（株）、有限会社さくら薬局の共同研究費、受託研究費、寄付金等で行なったものであり謝意を表します。

最後に本賞受賞にあたり、小職を推薦いただいた三宅眞実前日本食品微生物学会理事長に心からお礼を申し上げます。

引用文献

- 1) 竹田美文, 下西康嗣, 山本達男, 竹田多恵: 毒素原性大腸菌のエンテロトキシン、蛋白質、核酸、酵素. **31**, 324-352 (1986).
- 2) Yamasaki, S., Hidaka, Y., Ito, H., Takeda, Y., and Shimonishi, Y.: Structural requirements for the spatial structure and toxicity of heat-stable enterotoxin (STh) of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Bull. Chem. Soc. Jpn., **61**, 1701-1706 (1988).
- 3) Yamasaki, S., Sato, T., Hidaka, Y., Ozaki, H., Ito, H., Hirayama, T., Takeda, Y., Sugimura, T., Tai, A., and Shimonishi, Y.: Structure-activity relationship of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: Role of Ala residue at position 14 in toxin-receptor interaction. Bull. Chem. Soc. Jpn., **63**, 2063-2070 (1990).
- 4) Currie, M. G., Fok, K. F., Kato, J., Moore, R. J., Hamra,

- F. K., Duffin, K. L., and Smith, C. E.: Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 947–951 (1992).
- 5) Kita, T., Smith, C. E., Fok, K. F., Duffin, K. L., Moore, R. J., Karabatsos, P. J., Kachur, J. F., Hamra, F. K., Pidhorodeckyj, N. V., Forte, L. R., and Currie, M. G.: Characterization of human uroguanylin: A member of the guanylin peptide family. *Am. J. Physiol.*, **266**, F342–348 (1994).
 - 6) Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., Cohen, M. L.: Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.*, **308**, 681–685 (1983).
 - 7) 山崎伸二, 竹田美文: Vero毒素の構造と生物活性. *臨床と微生物*, **23**, 785–799 (1996).
 - 8) Konowalchuk, J., Speirs, J. I., and Stavric, S.: Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **18**, 775–779 (1977).
 - 9) 山崎伸二: 腸管出血性大腸菌感染症とVero(志賀)毒素. *日本獣医師会雑誌*, **67**, 433–441 (2014).
 - 10) Lin, Z., Kurazono, H., Yamasaki, S., and Takeda, Y.: Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.*, **37**, 543–548 (1993).
 - 11) Ito, H., Terai, A., Kurazono, H., Takeda, Y., and Nishibuchi, M.: Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microb. Pathog.*, **8**, 47–60 (1990).
 - 12) Endo, Y., Mitsui, K., Motizuki, M and Tsugugui, K.: The mechanism of action of ricin and related lectins on eukaryotic ribosomes. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5908–5912 (1987).
 - 13) Endo, Y., Tsugugui, K., Yutsudo, T., Takeda Y., Ogasawara, T., and Igarashi, K.: Site of action of Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA *N*-glycosidase activity of the toxins. *Eur. J. Biochem.* **171**, 45–50 (1988).
 - 14) Yamasaki, S., Furutani, M., Ito, K., Igarashi, K., Nishibuchi, M., and Takeda, Y.: Importance of arginine at position 170 of the A subunit of Vero toxin 1 produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* for toxin activity. *Microb. Pathog.*, **11**, 1–9 (1991).
 - 15) Hovde, C. J., Calderwood, S. B., Mekalanos, J. J., and Collier, R. J.: Evidence that glutamic acid 167 is an active-site residue of Shiga-like toxin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2568–2572 (1988).
 - 16) Ohmura, M., Yamasaki, S., Kurazono, H., Kashiwagi, K., Igarashi, K., and Takeda, Y.: Characterization of non-toxic mutant toxins of Vero toxin 1 that were constructed by replacing amino acid in the A subunit. *Microb. Pathog.*, **15**, 169–176 (1993).
 - 17) Cao, C., Kurazono, H., Yamasaki, S., Kashiwagi, K., Igarashi, K., and Takeda, Y.: Construction of mutant genes for a non-toxic verotoxin 2 variant (VT2vp1) of *Escherichia coli* and characterization of purified mutant toxins. *Microbiol. Immunol.*, **38**, 441–447 (1994).
 - 18) Yamasaki, S., Lin, Z., Shirai, H., Terai, A., Oku, Y., Ito, H., Ohmura, M., Karasawa, T., Tsukamoto, T., Kurazono, H., and Takeda, Y.: Typing of verotoxins by DNA colony hybridization with poly- and oligo-nucleotide probes, a bead-enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.*, **40**, 345–352 (1996).
 - 19) Shirai, S., Nishibuchi, M., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S. K., Pal, S. C., and Takeda, Y.: Polymerase chain reaction for detection of cholera enterotoxin operon of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2517–2521 (1991).
 - 20) Ramamurthy, T., Garg, S., Sharma, R., Bhattacharya, S. K., Nair, G. B., Shimada, T., Takeda, T., Karasawa, T., Kurazono, H., Pal, A., and Takeda, Y.: Emergence of a novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. *Lancet*, **341**, 703–704 (1993).
 - 21) Yamasaki, S., Garg, S., Nair, G. B., and Takeda, Y.: Distribution of *Vibrio cholerae* O1 antigen biosynthesis genes among O139 and other non-O1 serogroups of *V. cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **179**, 115–121 (1999).
 - 22) Bik, E. M., Bunschoten, A. E., Willems, R. J. L., Chang, A. C. Y., and Mooi, F. R. Genetic organization and functional analysis of the *otn* DNA essential for cell-wall polysaccharide synthesis in *Vibrio cholerae* O139. *Mol. Microbiol.*, **20**, 799–811 (1996).
 - 23) Comstock, L. E., Johnson, J. A., Michalski, J. M., Morris Jr., J. G., and Kaper, J. B.: Cloning and sequence of a region encoding a surface polysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 and characterization of the insertion site in the chromosome of *Vibrio cholerae* O1. *Mol. Microbiol.*, **219**, 7815–826 (1996).
 - 24) Stroehrer, U. H., Jedani, K. E., Dredge, B. K., Morona, R., Brown, M., Karageorgos, L. E., Albert, M. J., and Manning, P. A.: Genetic rearrangements in the gene responsible for O-antigen biosynthesis regions of *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10374–10378 (1995).
 - 25) Yamasaki, S., Shimizu, T., Hoshino, K., Ho, S., Shimada, T., Nair, G. B., and Takeda, Y.: The genes responsible for O-antigen synthesis of *Vibrio cholerae* O139 are closely related to those of *Vibrio cholerae* O22. *Gene*, **237**, 321–332 (1999).
 - 26) Hoshino, K., Yamasaki, S., Mukhopadhyay, A. K., Chakraborty, S., Basu, A., Bhattacharya, S. K., Nair, G. B., Shimada, T., and Takeda, Y.: Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **20**, 201–207 (1998).
 - 27) Neogi, S. B., Chowdhury, N., Asakura, M., Hinenoya, A., Haldar, S., Saidi, S. M., Kogure, K., Lara, R. J., and Yamasaki, S.: A highly sensitive and specific multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **51**, 293–300 (2010).
 - 28) Ramamurthy, T., Pal, A., Nair, G. B., Takeda, T., and Takeda, Y.: Experience with toxin bead ELISA in cholera.

- era outbreak. *Lancet*, **336**, 375–376 (1990).
- 29) Johnson, W. M., and Lior, H.: Response of Chinese hamster ovary cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible misinterpretation as heat-labile (LT) enterotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.*, **43**, 19–23 (1987).
 - 30) Asakura, M., Samosornsuk, W., Taguchi, M., Kobayashi, K., Misawa, N., Kusumoto, M., Nishimura, K., Matsuhisa, A., and Yamasaki, S.: Comparative analysis of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. *Microb. Pathog.*, **42**, 174–183 (2007).
 - 31) Asakura, M., Samosornsuk, W., Hinenoya, A., Misawa, N., Nishimura, K., Matsuhisa, A., and Yamasaki, S.: Development of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection of *cdt* genes in *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **52**, 260–266 (2008).
 - 32) Kamei, K., Asakura, M., Somroop, S., Hatanaka, N., Hinenoya, A., Nagita, A., Misawa, N., Matsuda, M., Nakagawa, S., and Yamasaki, S.: A PCR-RFLP assay for the detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. helveticus* and *C. upsaliensis*. *J. Med. Microbiol.*, **63**, 659–666 (2014).
 - 33) Kamei[#], K., Hatanaka[#], N., Asakura, M., Somroop, S., Samosornsuk, W., Hinenoya, A., Misawa, N., Nakagawa, S., and Yamasaki, S.: *Campylobacter hyointestinalis* isolated from pigs produce multiple variants of biologically active cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.*, **83**, 4304–4313 (2015). ([#]These authors are equally contributed.)
 - 34) Johnson, W. M., and Lior, H.: A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. *Microb. Pathog.*, **4**, 115–126 (1988).
 - 35) Yamasaki, S., Asakura, M., Tsukamoto, T., Faruque, S. M., Deb, R., and Ramamurthy, T.: Cytolethal distending toxin (CDT): Genetic diversity, structure and role in diarrheal disease. *Toxin Rev.*, **25**, 61–88 (2006).
 - 36) Pandey, M., Khan, A., Dus, S. C., Sarkar, B., Kahali, S., Chakraborty, S., Chattopadhyay, S., Nandy, R. K., Bhattacharya, S. K., Yamasaki, S., Takeda, Y., Nair, G. B., and Ramamurthy, T.: Association of cytolethal distending toxin locus *cdtB* with enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from acute diarrheal patients in Calcutta, India. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 5277–5281 (2003).
 - 37) Hinenoya, A., Nagita, A., Asakura, M., Tsukamoto, T., Ramamurthy, T., Nair, G. B., Takeda, Y., and Yamasaki, S.: Cytolethal distending toxin (Cdt)-producing *Escherichia coli* isolated from a child with bloody diarrhea in Japan. *Microbiol. Immunol.*, **51**, 435–438 (2007).
 - 38) Okeke, I. N., Lamikanra, A., Steinrueck, H., and Kaper, J. B.: Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial southwestern Nigeria. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 7–12 (2000).
 - 39) Scott, D. A., and Kaper, J. B.: Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.*, **62**, 244–251 (1994).
 - 40) Pickett, C. L., Cottle, D. L., Pesci, E. C., and Bikah G.: Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes. *Infect. Immun.*, **62**, 1046–1051 (1994).
 - 41) Pérès, S. Y., Marchès, O., Daigle, F., Nougayrède, J. P., Héroult, F., Tasca, C. De Rycke, J and Oswald, E.: A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.*, **24**, 1095–1107 (1997).
 - 42) Tóth, I., Héroult, F., Beutin, L., and Oswald, E.: Production of cytolethal distending toxin by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: Establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV). *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 4285–4291 (2003).
 - 43) Janka, A., Bielaszewska, M., Dobrindt, U., Greune, L., Schmidt, M. A., and Karch, H.: Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H⁻ and O157: H7: Characterization and evolutionary considerations. *Infect. Immun.*, **71**, 3634–3638 (2003).
 - 44) Hinenoya, A., Nagita, A., Ninomiya, K., Asakura, M., Shima, K., Seto, K., Tsukamoto, T., Ramamurthy, T., Faruque, S. M., and Yamasaki, S.: Prevalence and characteristics of cytolethal distending toxin (Cdt)-producing *Escherichia coli* from children with diarrhea in Japan. *Microbiol. Immunol.*, **53**, 206–215 (2009).
 - 45) Shima, A., Hinenoya, A., Asakura, M., Sugimoto, N., Tsukamoto, T., Ito, H., Nagita, A., Faruque, S. M., and Yamasaki, S.: Molecular characterization of cytolethal distending toxin produced by *Providencia alcalifaciens* isolated from patients with diarrhea. *Infect. Immun.*, **80**, 1323–1332 (2012).
 - 46) Shima, A., Hinenoya, A., Asakura, M., Nagita, A., and Yamasaki, S.: Prevalence of *Providencia* strains among children with diarrhea in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **65**, 545–547 (2012).
 - 47) Shima, A., Hinenoya, A., Samosornsuk, W., Samosornsuk, S., Mungkorakaw, N., and Yamasaki, S.: Prevalence of *Providencia* strains among patients with diarrhea and retail meats in Thailand. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **69**, 323–325 (2016).
 - 48) Hassan, J., Awasthi, S. P., Hatanaka, N., Okuno, K., Hoang, P. H., Nagita, A., Hinenoya, A., and Yamasaki, S.: Development of a multiplex PCR for the simultaneous detection of *eae*, *stx* and *cdt* genes in genus *Escherichia* and detection of a novel *cdtB* gene in *Providencia rustigianii*. *Pathog. Dis.*, **76**, doi: 10.1093/femspd/ftz002. (2018).
 - 49) Hinenoya, A., Shima, K., Asakura, M., Nishimura, K., Tsukamoto, T., Ooka, T., Hayashi, T., Ramamurthy, T., Faruque, S. M., and Yamasaki, S.: Molecular characterization of cytolethal distending toxin gene-positive *Escherichia coli* from healthy cattle and swine in Nara, Japan. *BMC Microbiol.*, **14**, 97 (2014).
 - 50) Hinenoya, A., Yasuda, N., Hibino, T., Shima, A., Nagita,

- A., Tsukamoto, T., and Yamasaki, S.: Isolation and characterization of an *Escherichia albertii* producing three different toxins from a child with diarrhea. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **70**, 252–257 (2017).
- 51) Hinenoya, A[#], Yasuda, N[#], Mukaizawa, N., Sheikh, S., Niwa, Y., Awasthi, S. P., Asakura, M., Tsukamoto, T., Nagita, A., Albert, M. J., and Yamasaki, S.: Association of cytolethal distending toxin-II gene-positive *Escherichia coli* with *Escherichia albertii*, an emerging enteropathogen. *Int. J. Med. Microbiol.*, **307**, 564–571 (2017). (#These authors are equally contributed.)
- 52) Ooka, T., Ogura, Y., Katsura, K., Seto, K., Kobayashi, H., Kawano, K., Tokuoka, E., Furukawa, M., Harada, S., Yoshino, S., Seto, J., Ikeda, T., Yamaguchi, K., Murase, K., Gotoh, Y., Imuta, N., Nishi, J., Gomes, T. A., Beutin, L., and Hayashi, T.: Defining the genome features of *Escherichia albertii*, an emerging enteropathogen closely related to *Escherichia coli*. *Genome Biol. Evol.*, **7**, 3170–3179 (2015).
- 53) Hinenoya, A[#], Ichimura, H[#], Awasthi, S. P., Yasuda, N., Yatsuyanagi, J., and Yamasaki, S.: Phenotypic and molecular characterization of *Escherichia albertii*: Further surrogates to avoid potential laboratory misidentification. *Int. J. Med. Microbiol.*, **309**, 108–115 (2019). (#These authors are equally contributed.)
- 54) Hinenoya, A., Ichimura, H., Yasuda, N., Harada, S., Yamada, K., Suzuki, M., Iijima, Y., Hatanaka, N., Awasthi, S. P., and Yamasaki, S.: Development of a specific cytolethal distending toxin (*cdt*) gene (*Eacd1*)-based PCR for the detection and identification of *Escherichia albertii*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **95**, 119–124 (2019).
- 55) Hyma, K. E., Lacher, D. W., Nelson, A. M., Bumbaugh, A. C., Janda, J. M., Strockbine, N. A., Young, V. B., and Whittam, T. S.: Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains. *J. Bacteriol.*, **187**, 619–628 (2005).
- 56) Lindsey, R. L., Garcia-Toledo, L., Fasulo, D., Gladney, L. M., and Strockbine, N.: Multiplex polymerase chain reaction for identification of *Escherichia coli*, *Escherichia albertii* and *Escherichia fergusonii*. *J. Microbiol. Methods*, **140**, 1–4 (2017).
- 57) Maeda, E., Murakami, K., Okamoto, F., Etoh, Y., Sera, N., Ito, K., and Fujimoto, S.: Nonspecificity of primers for *Escherichia albertii* detection. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **67**, 503–505 (2014).
- 58) Hatanaka, N., Awasthi, S. P., Hinenoya, A., Ueda, O., and Yamasaki, S.: Accurate identification of *Escherichia albertii* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods*, **173**, 105916 (2020).
- 59) Hinenoya, A., Nagano, K., Okuno, K., Nagita, A., Hatanaka, N., Awasthi, S. P., and Yamasaki, S.: Development of XRM-MacConkey agar selective medium for the isolation of *Escherichia albertii*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **97**, 115006 (2020).
- 60) Maheux, A. F., Brodeur, S., Bérubé, È., Boudreau, D. K., Abed, J. Y., Boissinot, M., Bissonnette, L., and Bergeron, M. G.: Method for isolation of both lactose-fermenting and non-fermenting *Escherichia albertii* strains from stool samples. *J. Microbiol. Methods*, **154**, 134–140 (2018).
- 61) Hinenoya, A., Nagano, K., Awasthi, S. P., Hatanaka, N., and Yamasaki, S.: Prevalence of *Escherichia albertii* in raccoons (*Procyon lotor*) in Japan. *Emerg. Infect. Dis.*, **26**, 1304–1307 (2020).
- 62) Hirose, S., Nakamura, Y., Arai, S., and Hara-Kudo, Y.: The development and evaluation of a selective enrichment for the detection of *Escherichia albertii* in Food. *Foodborne Pathog. Dis.*, **19**, 7–4–712 (2022).
- 63) Wakabayashi, Y., Seto, K., Kanki, M., Harada, T., and Kawatsu, K.: Proposal of a novel selective enrichment broth, NCT-mTSB, for isolation of *Escherichia albertii* from poultry samples. *J. Appl. Microbiol.*, **132**, 2121–2130 (2022).
- 64) S. Arai, T. Ooka, M. Shibata, Y. Nagai, Y. Tokoi, H. Nagaoka, R. Maeda, A. Tshuchiya, Y. Kojima, K. Ohya, T. Ohnishi, N. Konishi, K. Ohtsuka, Y. Hara-Kudo. Development of a novel real-time polymerase chain reaction assay to detect *Escherichia albertii* in chicken meat. *Foodborne Pathog. Dis.*, **19**, 823–829 (2022).