

腸管出血性大腸菌感染症と Vero (志賀) 毒素

山崎 伸二[†]

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 (〒598-8531 泉佐野市りんくう往来北1-58)

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections and Vero Toxin/Shiga ToxinShinji YAMASAKI[†]

Laboratory of International Prevention of Epidemics, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinku Ourai-kita, Izumisano, 598-8531, Japan

1 はじめに

腸管出血性大腸菌 (EHEC) は、1982年米国でのハンバーガー食中毒事件をきっかけに見つかって以来、欧米やわが国などの先進国で流行をくり返している。EHECは主要な病原因子として2種類の志賀毒素 (Stx) を産生し、志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) とも呼ばれている。患者から最も高頻度に分離される EHEC は、*eaeA* 遺伝子陽性の血清型 O157:H7 であるが、*eaeA* 遺伝子陽性の non-O157 や *eaeA* 遺伝子を保持しない non-O157 も重症患者から分離される。2011年、血清型 O111:H8 の EHEC による集団食中毒事件が富山を中心に、また、ほぼ時を同じくして血清型 O104:H4 の EHEC による集団食中毒事件がドイツで発生した。本稿では、腸管出血性大腸菌感染症と Vero (志賀) 毒素について最新の知見を概説する。

2 病原大腸菌

大腸菌は、通常人や動物の腸管内正常細菌叢を構成する細菌の1種である。しかしながら、ある種の大腸菌は人や動物に下痢や敗血症などの腸管内あるいは腸管外感染症を引き起こす (表1)。下痢の原因となる大腸菌は現在少なくとも6種類に分類されている。すなわち、腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *Escherichia coli* : EPEC)、腸管毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *E. coli* : ETEC)、腸管組織侵入性大腸菌 (enteroinvasive *E. coli* : EIEC)、腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *E. coli* : EHEC)、腸管凝集性大腸菌 (enteroaggregative *E. coli* : EAEC)、及び腸管拡散付着性大腸菌 (diffusely adherence *E. coli* : DAEC) がある。一方、腸管外感染症の原因となる大腸菌として尿路感染性大腸

菌 (uropathogenic *E. coli* : UPEC)、髄膜炎/敗血症起因大腸菌 (meningitis *E. coli* : MNEC) や細胞壊死因子産生性大腸菌 (necro-toxigenic *E. coli* : NTEC) 等がある [1, 2]。

3 腸管出血性大腸菌の疫学

腸管出血性大腸菌は、4番目の下痢原性大腸菌として1982年に見つかった。米国のオレゴン州とミシガン州の同一チェーンのハンバーガーレストランで異なる時期に発生した食中毒事件がきっかけであった。この時の患者43名すべてが血便と激しい腹痛を呈し、便性状は「All blood but no stool」と表現された。患者から当時としては珍しい血清型の大腸菌 O157:H7 が分離された。同じ血清型の大腸菌が原因食品として推定されたハンバーガーに使われた挽肉からも分離され、ハンバーガーが原因食品であったと結論づけられた。最終的に、患者の病名は出血性大腸炎、分離された大腸菌は腸管出血性大腸菌と名づけられた [3]。

1982年に米国で見つかって以来、米国、カナダ、英国を中心に EHEC O157 による散発事例や集団事例が相次いで報告された。わが国においては、EHEC O145:H⁻ が原因となる最初の集団事例が1984年に東京都の小学校で発生した [4]。一方、最初の死亡事例は、1986年、EHEC O111:NM が原因となり松山市の乳児院で発生した。EHEC 感染症が世間の大きい注目を集めるようになったのは、1990年浦和市の幼稚園で井戸水が原因となる O157 によって2名の園児が亡くなったことがきっかけである。これを契機に厚生省 (現厚生労働省) は、国内における EHEC のサーベイランスを開始した。しかし、1996年まではほとんど報告がなかった。1996年、学校給食あるいは老人ホームの給食を介

[†] 連絡責任者：山崎伸二 (大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

〒598-8531 泉佐野市りんくう往来北1-58 ☎・FAX 072-463-5653 E-mail : shinji@vet.osakafu-u.ac.jp

表1 病原大腸菌の種類 [1]

大腸菌の種類	疾患または病態	病原因子
腸管内病原性大腸菌／下痢原性大腸菌 (DEC)		
腸管病原性大腸菌 (EPEC)	小児の水様下痢	BFP, Intimin, LPF, CDT, EAST1
腸管組織侵入性大腸菌 (EIEC)	赤痢様の下痢	IcsA, IpaA/B/C/H, ShET1, ShET2
腸管毒素原性大腸菌 (ETEC)	コレラ様の下痢	CFA, LT, ST, EAST1, CDT, ShET2
腸管出血性大腸菌 (EHEC)	血便, 出血性大腸炎 溶血性尿毒症症候群	Stx1, Stx2, Intimin, CDT, Ehx, SubAB, ToxB, Efa1, Saa, LPS
腸管凝集性大腸菌 (EAEC)	水様性下痢	AAF, Pet, EAST1, CDT, ShET1
腸管拡散付着性大腸菌 (DAEC)	水様性下痢	DAF
腸管外病原性大腸菌 (ExPEC)		
尿路病原性大腸菌 (UPEC)	尿路感染症 (膀胱炎, 腎盂腎炎)	DAF, Pap, CDT, CNF, HlyA, Sat, DAF, S-fimbriae, F1C-fimbriae
髄膜炎/敗血症起因大腸菌 (MNTEC)	髄膜炎, 敗血症	CNF, CDT, IbeA, B, C, S-fimbriae
細胞壊死因子産生性大腸菌 (NTEC)		CNF1, CNF2

BFP : bundle forming pili, LPS : lipopolysaccharide, CDT : cytolethal distending toxin, EAST1 : enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin, IcsA : intra- and intercellular spread (autotransporter), Ipa : invasion plasmid antigen, ShET : Shigella enterotoxin, CFA : colonization factor antigen, LT : heat-labile enterotoxin, ST : heat-stable enterotoxin, Stx : shiga toxin, Ehx : EHEC-enterohemolysin, SubAB : subthilase cytotoxin AB, ToxB : a adhesin, Efa : EHEC factor for adherence, Saa : STEC autoagglutinating adhesin, AAF : aggregative adherence fimbriae, Pet : plasmid-encoded toxin, DAF : decay-accelerating factor, Pap : adhesin P, CNF : cytotoxic necrotizing factor, HlyA : alpha-hemolysin A, Sat : secreted autotransporter toxin, IbeA : brain microvascular endothelial cells invasion

表2 2001～2010年にわが国で発生した患者数50名以上のSTEC感染症

発生時期	発生地	発症者数	発生施設	推定伝染経路	血清型	毒素型
2001年3～4月	千葉県等	195	家庭	牛たたき／ローストビーフ	O157:H7	VT1&2
2002年8月	宇都宮市	123 (9)*	病院・老人保健施設	香味和え	O157:H7	VT1&2
2003年9月	横浜市	141	幼稚園	センター方式給食	O26:H11	VT1
2004年6月	千葉市	63	小学校 (酪農施設体験学習)	不明	O121:H19	VT1
7月	石川県	110	高校 (韓国修学旅行)	食品媒介	O111:H ⁻	VT1&2
2005年1～2月	島根県	55	保育所	不明	O26:H11	VT1
10月	香川県	55 (6)*	老人福祉施設	浅漬け	O157:H7	VT1&2
2006年8～9月	富山県	72	保育所	ヒト-ヒト	O157:H7	VT1&2
9月	佐賀県	81	高校 (中国修学旅行)	食品媒介	O157:H7	VT2
2007年5～6月	東京都	467	学校食堂	食品媒介	O157:H7	VT2
9～10月	宮城県等	314	飲食店 (仕出し弁当)	食品媒介	O157:H7	VT1&2
2008年3月	佐賀県	91	豪州修学旅行	食品	O26:H11	VT1
6月	長崎市	67	病院	不明	O111:H ⁻	VT1&2
6月	神奈川県	52	北海道修学旅行	不明	O26:H11	VT1
10月	東京都	61	保育所	ヒト-ヒト	O111:H ⁻	VT1&2
2010年5月	三重県	138	高校	食品媒介 (給食)	O157:H7	VT2
5月	三重県	100	中高一貫校	食品媒介 (給食)	O157:H7	VT2

*括弧内は死者数を示す

したO157:H7による集団事例が岡山県邑久町に端を発し、日本全国で多発した。特筆すべき点は、7月に堺市で発生した患者数5,499名、死者2名の集団食中毒事例である。また、この年の12月スコットランドでもミートパイが原因となる患者数490名、死者18名の集団食中毒事例が発生した。EHEC感染症の問題が世界で再認識される年となった。

1996年以降、学校給食を介したEHECの集団食中毒事例は激減したが、同一のクローンが異なる都道府県の

複数の同一チェーンレストランで発生する広域集団散発事例の食中毒事件が発生していることが明らかとなった[5, 6]。これは、1996年の堺市の事例以降、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) が地方衛生研究所等に導入され、分離菌のDNAフィンガープリントが国立感染症研究所と地方衛生研究所との共同研究で行われるようになった成果である。一方、2001～2010年までのわが国のEHEC感染症による50名以上の集団事例を表2にまとめた。O157:H7による事例が最も多いが、O157:H7

表3 2000～2010年の間にわが国の人から分離される腸管出血性大腸菌の血清型とStx2陽性の割合

年	合計	O157 (%)	Stx2	O26 (%)	Stx2	O111 (%)	Stx2	その他 (%)	Stx2
2000	1,773	1,238 (69.8)	98.2%	388 (21.9)	7.7%	44 (2.5)	9.1%	103 (5.8)	39.8%
2001	2,227	1,670 (75.0)	99.4%	424 (19.0)	5.7%	46 (2.1)	37.0%	87 (3.9)	46.0%
2002	1,797	1,231 (68.5)	99.0%	350 (19.5)	2.6%	108 (6.0)	11.1%	108 (6.0)	59.3%
2003	1,367	972 (71.1)	98.1%	264 (19.3)	7.2%	23 (1.7)	17.4%	108 (7.9)	45.4%
2004	1,810	1,114 (61.5)	97.9%	426 (23.6)	2.6%	149 (8.2)	86.6%	119 (6.6)	46.2%
2005	1,655	1,123 (67.9)	99.0%	358 (21.6)	2.8%	73 (4.4)	61.6%	101 (6.1)	41.6%
2006	2,154	1,466 (68.1)	97.4%	512 (23.8)	4.1%	72 (3.3)	47.2%	104 (4.8)	41.3%
2007	2,587	1,946 (75.3)	98.4%	315 (12.2)	2.5%	156 (6.0)	30.8%	173 (6.7)	46.8%
2008	2,471	1,611 (65.2)	98.8%	581 (23.5)	3.6%	88 (3.6)	63.6%	191 (7.7)	39.8%
2009	2,168	1,396 (64.4)	98.7%	504 (23.2)	11.3%	56 (2.6)	19.6%	212 (9.8)	52.4%
2010	1,384	1,384 (98.5)	98.5%	347 (8.9)	8.9%	36 (1.8)	33.0%	240 (12.0)	44.2%

国立感染症研究所感染症情報センター 病原微生物検出情報に基づく

以外の血清型による事例も増えてきていることがわかる。しかし、死者を伴う事例は、老人施設で発生したO157:H7によるものであった。

4 2011年の富山で発生したEHEC集団食中毒事件

2011年の4月末から5月初旬にかけて富山県を中心にユッケが原因食品となる集団食中毒事件が発生した。最終的に、同一の焼き肉チェーン店を介して富山、福井、石川、神奈川の4県にまたがる有症者数181名、HUS発症者数34名、脳症発症者数21名、死者5名に上る事例にまで発展した。小さな子供に加え成人女性が亡くなったことからマスコミがこの事件を大きく取り上げ、肉の生食の是非が問われる等大きな社会問題となった。患者からStx2産生性のO111とO157が分離されたが、O157に対する患者の抗体価はほとんど上がっておらずO111に対する抗体価が上がっていたことからO111が原因菌と結論づけられた。しかし、本事例でなぜHUSの発症率が高く(約20%)、10%以上もの患者が脳症を発症し、成人を含む5名が亡くなったかについて大きな疑問が残った。わが国の過去の事例として、O157以外の血清型で死亡例を伴う重症患者が多数発生するという事件を引き起こしたことがなかった。突然変異で高病原性のEHECが出現した可能性が指摘されたが、筆者は汚染菌数が多かった可能性を疑った。その根拠としてわが国及び米国を中心とした疫学データからO111はリスクの高い血清型であると考えられるからである。

国立感染症研究所感染症情報センターが報告している病原微生物検出情報に基づく、2000年代に入り人から分離されるSTECの血清型でO157以外のnon-O157の血清型が増加傾向にあった。中でもO26(12～24%)、O111(2～8%)の割合が高かった。さらに特筆すべき点は、O157ではStx2の陽性率が97%以上であるのに対し、O26では11%以下、O111では9～87%であった(表3)。O157では有症率の割合が64.3%とO26やO111の53.7%や54.2%と比べてやや高かったが有症

表4 腸管出血性大腸菌の血清型ごとの有症率及び臨床症状*1

血清型	有症者数/ 報告数	下痢	血便	脳症/ 意識 障害	HUS/ 腎機能 障害	無症 状/ 不詳
O157 (陽性率%)	7,017/10,918 (64.3)*2	5,866 (83.6)	3,791 (54.0)	8 (0.114)*3	215 (3.06)	3,899 (35.7)
O26 (陽性率%)	1,638/3,049 (53.7)*2	1,405 (85.8)	443 (27.0)	0 (0)	4 (0.244)	1,411 (46.3)
O111 (陽性率%)	363/670 (54.2)*2	302 (83.2)	86 (23.7)	3 (0.826)*3	16 (4.41)	307 (45.8)
その他 (陽性率%)	442/917 (48.2)*2	362 (48.2)	168 (38.0)	1 (0.226)	22 (4.98)	475 (51.8)

*1 2000～2007年の病原微生物検出情報に基づく

*2 有症率を表す

*3 $P < 0.0005$

者の中での下痢の発症率に違いはなかった。血便の割合はO157で54%とO26の27%やO111の23.7%と比べて高いが、HUS発症率ではO26が0.244%、O157では3.06%であるのに対し、O111では4.41%とむしろ高い。さらに脳症に関してはO26(0%)やO157(0.114%)と比べてO111では0.826%と有意に高かった(表4)。一方、Brooksら[7]は、1983から2002年までの米国で発生したEHEC感染症の臨床データと分離菌の細菌学的性状をまとめた結果からnon-O157の中でStx2産生性のO111が最も重症化しやすい血清型であると報告している。この報告を裏付けるかのように2008年、オクラホマ州で患者数342名に上るO111(Stx2産生菌)による集団食中毒事例が発生した。特筆すべき点はHUSの発症率が高く(約17%)、HUS発症者の平均年齢が43.5歳、HUS発症者の57.7%が成人であったことである[8]。わが国最初の死亡例がO111であったことから、O111は重症化しやすいO血清型であると考えられる。

5 2011年ドイツで発生したEHEC集団食中毒事件

一方、ほぼ時を同じくしてドイツ北部に位置するリュベックに端を発した野菜サラダが原因となる集団食中毒事件が発生した。感染は瞬く間にドイツ全土に広まり、さらに米国やカナダを含む16カ国にまで広がった。最終的に患者数3,922名、HUS発症者数782名、死亡者47名という過去最大規模の集団食中毒事例となった[9]。本事例の驚くべき特徴は、患者のほとんどが成人で、しかも女性であったこと、さらに、HUS発症率が20%という高さに加え、47名もが死亡したことである。ドイツにおける2010年までのHUS発症年齢は、わが国と同様5歳以下の小児で最も高い割合であった。さらに驚くべきことは、原因菌がO104:H4と非常に珍しい血清型であったこと、分離菌の全ゲノム解析からO104はEAECとEHECの病原因子を有するEAECとEHECのハイブリッド型であったこと、しかもCTX-M-15型のESBL産生性の多剤耐性菌であったことである[10, 11]。ドイツで分離されたO104は1990年代にアフリカで分離されたEAEC O104にStx2ファージが溶源化し、CTX-M-15型のESBLプラスミドが形質転換し出現してきたと考えられている[12]。

レストランで出された野菜サラダが感染源として疑われ、当初はスペイン産のキュウリが原因であると報告された。しかし、キュウリからO104は分離されず疫学的にもキュウリが原因という結論には至らなかった。症例対照研究から、フェネグリークと呼ばれる芽野菜が感染源として疑われた[13]。しかしP値が0.04とかなり有意差がある程度であり、この可能性を疑う声もあった。しかし、その年の6月にフランスのボルドーでもHUS患者を伴うO104の集団食中毒事例が報告され、分離菌のDNAフィンガープリントがドイツ株と同じであったことと両事例でフェネグリークが共通食材であったことから、最終的にフェネグリークが感染源と結論づけられた[14, 15]。stx陽性のO104は、ドイツの事例が初めてでなくすでにくつつかの報告例があった。1994年、米国、モンタナ州で8～63歳の18名に発生した急性胃腸炎患者からstx2陽性のO104:H21が分離されていた[16]。しかし、EAECとEHECのハイブリッド型であるかどうかは不明である。2001年にはドイツで発生した小児のHUS患者からハイブリッド型のO104:H4が分離されていた。2004年にはフランスでO104:H4の分離報告例があるが詳細は不明である。2005年には韓国で腹痛と血性下痢を引き起こした患者からstx陽性のO104:H4が分離されている[17]。2009年には米国で、2010年にはフィンランドでそれぞれHUS患者及び下痢症患者からEAECとEHECのハイブリッド型のO104:H4が分離されていた。

表5 志賀毒素のバリエーション [19]

毒素型	菌種/血清型
Stx	<i>S. dysenteriae</i> type I
Stx1a	<i>E. coli</i> O26:H11
Stx1c	<i>E. coli</i> O174:H8
Stx1d	<i>E. coli</i> ONT:H19
Stx2a	<i>E. coli</i> O157:H7
Stx2b	<i>E. coli</i> O174:H21
Stx2c	<i>E. coli</i> O157:H ⁻
Stx2d	<i>E. coli</i> O91:H21
Stx2e	<i>E. coli</i> O139:H1
Stx2f	<i>E. coli</i> O128ac:H2
Stx2g	<i>E. coli</i> O2:H25

6 腸管出血性大腸菌の病原因子

EHECの最も重要な病原因子はVero毒素（Vero toxin：VT）である。VTは免疫学的に異なる2種類がある。1つは志賀赤痢菌が産生する志賀毒素（Shiga toxin：Stx）と同じか酷似したVT1、もう1つはStxとは免疫学的に異なるVT2である[18]。VTとStxの遺伝学的あるいはアミノ酸配列の相同性からVT1とVT2は、Stx1またはStx2とも呼ばれている。さらにそれぞれのバリエーションが多数報告されているが、表5に示した呼称を用いることが提唱されている[19]。本稿では、Stxという呼称に統一して用いることとする。Stx1、Stx2とともに、細胞表面に存在する中性糖脂質のGb3をレセプターとして結合し、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、トランスゴルジネットワークを逆行輸送され小胞体に到達する。小胞体からStxのAサブユニットが細胞質に送り込まれ、AサブユニットのRNA N-グリコシダーゼ活性に基づき、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-グリコシド結合を切断して1分子のアデニンを遊離させることで細胞の蛋白質合成を阻害し、細胞を致死させる[18]。Stx以外の毒素としてEHECに特有のプラスミド上にコードされたEHECヘモリシン（EHEC-*enterohemolysin*：Ehx）[20]、HUS発症患者から分離され、*eaeA*を保持しないEHECから見つかったサブチラーゼサイトトキシン（SubAB）[21]、細胞膨化致死毒素（cytolethal distending toxin：CDT）[22]、EAECで見つかったEAST（*entero-aggregative heat-stable enterotoxin*）[23]やLPS（lipopolysaccharide）等がある（表1）。

一方、定着因子としてはLEE（Locus of enterocyte effacement）pathogenicity island上にコードされたインチミン（*eaeA*）[24, 25]、HUSの集団発生時に分離され、*eaeA*遺伝子を持たないEHECで見つかったSaa（STEC autoagglutinating adhesin）[26]、STEC

O157のHeLa細胞への接着因子として見つかったIha (IrgA homologue of adhesin) [27], O157:H7と他の一部の血清型のCHO細胞への接着因子として見つかったEfa (EHEC factor for adherence) [28], O157の全ゲノム解析の結果見つかったLpf (long polar fimbriae homologue of *Salmonella* Typhimurium) [29], HUS患者で特異的抗体が検出され人と牛の上皮細胞への接着に関わる4型線毛であるHCP (Hemorrhagic coli pili) [30], O157:H7で見つかったF1 Fimbriaeと塩基配列が類似し, 牛の上皮細胞の接着に関与しているF9 Fimbriae [31], 細胞接着及びバイオフィーム形成に関与しているEhaA (enterohemorrhagic *E. coli* autotransporters) [32] 等が報告されている。

その他の病原因子として3型分泌装置 (type 3 secretion system : T3SS) がある。T3SSは大腸菌の菌体表面から現れた針様の構造物で宿主細胞に突き刺さり, 大腸菌の中で産生されたエフェクター蛋白質を細胞内に打ち込み, 細胞のさまざまな機能を障害することによって病原性を発揮する [33, 34]。EHECで最も重要な病原因子の1つとされるインチミンのレセプターであるTir (translocated intimin receptor) もT3SSによって打ち込まれる蛋白の1つである [35]。その他さまざまなエフェクターがLEE領域あるいはLEE領域以外のラムダ様プロファージ上にコードされていることが見つかった [36]。

7 志賀毒素の病原性

StxがEHECの主要な病原因子であることは疑う余地がない。しかし, 2種類存在するStxのうちStx2の方が重症化に関与するという結果が疫学的に示されている [37, 38]。さらに, Stx2バリエーション (表5) の中でもStx2aとStx2cがより重症化した患者から分離されるとの報告がある [39, 40]。マウスに対するLD₅₀がStx1では30ngである [41] のに対しStx2は1ngである [42] という結果がよく引用される。しかしながら, ウサギに対するLD₅₀はその逆で, Stx2が884 μ g/kgであるのに対しStx1では20 μ g/kgである [43]。果たして人ではどうなのか? これは誰にもわからない。

われわれはStx2産生菌の方が重症化する理由としてStxの産生量, 特に菌が腸管内でのストレス環境下に置かれた時に産生するがStx1量よりもStx2量の方が多いことがその理由ではないかと考えている。通常Stx1はペリプラズマ中に毒素が産生され菌体外すなわち培養上清にはほとんど検出されない。一方, Stx2はペリプラズマ中にも産生されるが多くは培養上清に検出される。われわれはSOS反応を誘導するマイトマイシンC (MMC) 存在下, 非存在下でO157を培養し, 産生されるStx1量とStx2量を比較した。多くのStx1産生株ではMMC存在下では, 非存在下と比べ3倍程度Stx1産

生量が増加した。一方, Stx2はMMC存在下で培養上清中への産生量が大幅に増加し, 総量でも5~235倍増加した。Stx1産生株ではStx1ファージはほとんど検出されないのに対し, Stx2産生株では毒素産生量に比例してStx2ファージも誘導されていた。すなわち, Stx2ファージが誘導されやすい菌のStx2産生性が高く, 高病原性に関係している可能性が考えられた。

8 治療薬開発から見えて来た志賀毒素の新たな病原発現機構

StxのレセプターはGb3であることから, グロボ3糖を有する化合物を合成し, StxとGb3への結合を阻害するEHEC感染症治療薬の開発が試みられた [44]。1998年にStx1の結晶構造が明らかとなり, Stx1のBサブユニット1分子にはグロボ3糖結合部位が3つ (サイト1~3) 存在することが明らかとなった [45]。すなわち, Bサブユニット5量体では15個のグロボ3糖が結合できる。この多価型の相互作用はクラスター効果と呼ばれ, StxとGb3との結合親和性を著しく増強させる。たとえば, 遊離のグロボ3糖とBサブユニット5量体に対する解離定数は10⁻³ M程度であるが, 細胞やGb3を有する糖脂質に対するBサブユニット5量体の解離定数は10⁻⁹ Mに達する。それゆえ, グロボ3糖を高密度に集積させた構造を持つ化合物は, Bサブユニットに強く結合できると考えられる。Kitovら [46] は, グルコースを核としてその5つの水酸基すべてにスパーサーを介してグロボ3糖が結合したSTARFISHという化合物を開発した。STARFISHは, *in vitro*においてStx1とStx2の細胞毒性を低濃度で阻害した。しかし, マウスの皮下にStxと同時投与した場合, Stx1の毒性は阻害できたが, Stx2の毒性はまったく阻害できなかった。

Matsuokaらは, ケイ素原子を分岐点を持つ樹枝状化合物にスパーサーを介してその末端にグロボ3糖を結合させたSUPER TWIGを開発した [47]。Nishikawaら [48] は, 末端にグロボ3糖を6個有するSUPER TWIG(1)6が (図1), Stx1とStx2に対して高い親和性を有し, Stxの細胞毒性を低濃度で抑制し, さらにStx2のマウスに対する致死活性を完全に阻害できることを報告した。また, Watanabeら [49, 50] は, ポリアクリルアミド骨格にスパーサーを介してグロボ3糖を結合させたGb3ポリマーを開発した。このGb3ポリマーはStx1とStx2の両方に高い親和性を有しその細胞毒性を強力に阻害するのにに対し, 短鎖アルキルスパーサーを持つGb3ポリマーではStx1に対しては強い親和性を保持しているが, Stx2に対する結合活性は著しく低下した。このことはStx2がポリマー骨格とグロボ3糖を繋ぐスパーサーの長さを厳密に認識していることを示唆している。

糖鎖を化学合成して治療薬を開発するにはコストが問

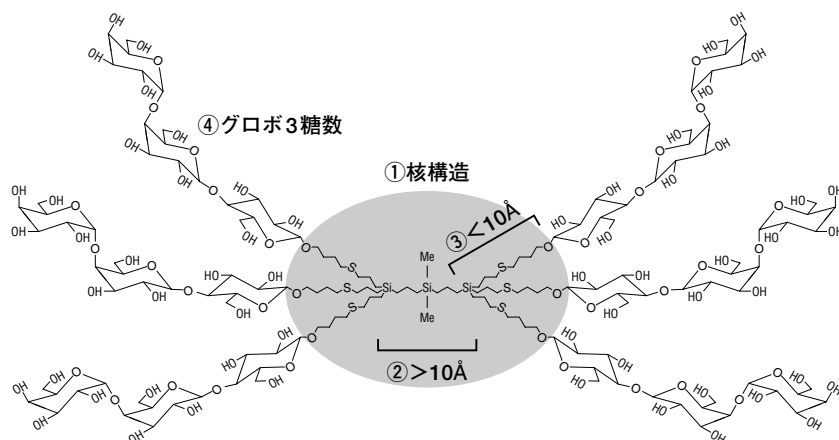


図1 SUPER TWIG(1)6の構造

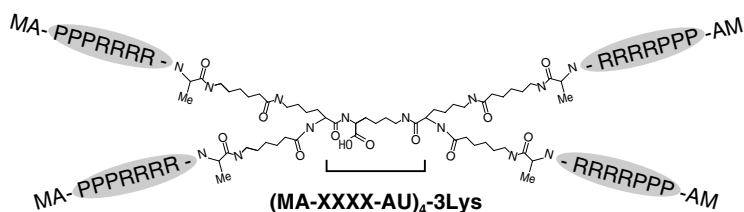


図2 新規Stx阻害薬 (PPP-tet) の構造

題となる。この問題を克服するため、合成が容易な多価型ペプチドライブラリー法で新規のペプチド性Stx結合化合物が開発された。SUPER TWIGを用いた研究からStxに対する阻害薬には以下に示す4つの厳密な構造要求性があることが示されている(図1)。①分子全体として疎水的な各構造の外側にグロボ3糖が集積した構造を有すること、②分岐点となる両末端のSi原子の間の距離は10Å以上あること、③末端Si原子とグロボ3糖の間の距離は糖鎖密度を保つため10Å以内であること、④グロボ3糖は4個以上が必要であること等である[51]。SUPER TWIG(1)6は、Stx2のサイト3に特異的に結合することがわかっているため、リジン残基が3個繋がった構造にスペーサーを介して4個のライブラリーを持つ多価型ペプチドライブラリーを作製し、野生型のStx2Bには結合するがサイト3の変異体には結合しない化合物がスクリーニングされた。その結果、アルギニン残基やアスパラギン残基等が比較的強く選択された。これらのアミノ酸残基をライブラリーの中心部に固定した多価型2次ライブラリーを作製し同様のスクリーニングを行い、最終的にProProProArgArgArgArgという配列を持つPPPペプチドがStx2Bに対して非常に強い結合親和性を有することがわかった(図2)[52]。また、PPPペプチドのArg残基がBサブユニット側の酸性アミノ酸残基と相互作用し、隣り合うBサブユニットの2つのサイト3が占有されるという結合様式を有することも明らかとなった。PPPペプチドを4個持つ4価のペプチド性化合

物(PPP-tet)がStx2Bに対して0.13μMの解離定数を示し、非常に強い結合活性を有することやStx2のVero細胞に対する毒性も強く阻害することがわかった[52]。興味深いことに、PPP-tetはStx2のVero細胞への結合を阻害せず、グロボ3糖とは異なるメカニズムで細胞毒性を阻害すると考えられた。一方、蛍光標識したPPP-tetとStx2の細胞内挙動を観察したところ、Stx2とPPP-tetは複合体を形成し細胞に結合した後、ゴルジ体まで運ばれるが小胞体へは到達しておらず、ゴルジ体から小胞体への移行が阻害されていることがわかった[52]。さらに、細胞内に取り込まれたStx2はリソソームで分解されていることもわかった。また、Stx2Bのサイト1とサイト2の両方が変異している2重変異体では、PPP-tet存在下ではStx2Bの2重変異体はVero細胞内に取り込まれたが、細胞内に分散し、ゴルジ体にも小胞体にも局在しなかった。このことはStx2とPPP-tetがサイト3を介して結合すると同時にサイト1あるいはサイト2にGb3が結合することで複合体がゴルジ体まで運ばれていると考えられる。またサイト3とGb3との結合がStx2のゴルジ体から小胞体への輸送に必須であり、PPP-tetがサイト3と結合することでこの輸送を阻害していると考えられた。すなわち、Stx2のBサブユニットに存在する3つのサイトは同じ役割を果たしているのではなく、それぞれ異なった役割を持っていると考えられる。このPPP-tetは、マウスに感染させたEHEC O157の毒性を感染成立後2日目から投与しても高い治

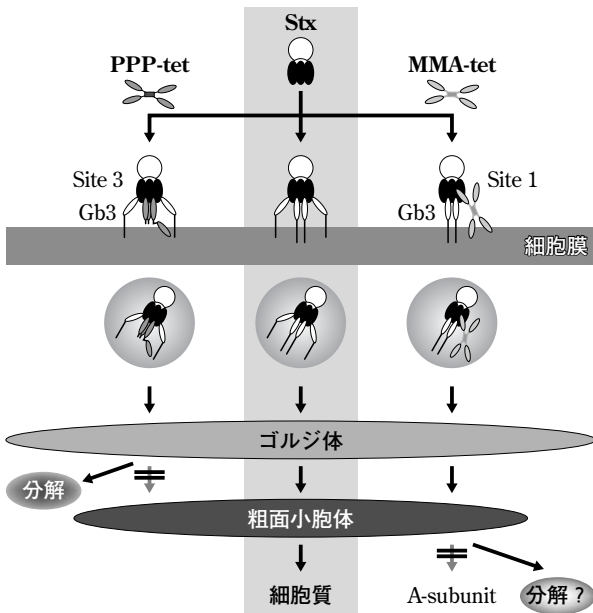


図3 PPP-tet及びMMA-tetによるStx2及びStx1の阻害メカニズム

癒率を示した。

一方、Stx1ではグロボ3糖との結合にサイト1が重要であるとの報告があることから同様の手法を用いてStx1に対するペプチドのスクリーニングが行われた。MMA-tet (MetMetAlaArgArgArg)がStx1に対して非常に強い結合活性を有し、Stx1の細胞毒性を阻害した[53]。また、MMA-tetはサイト1に加えサイト3に結合することによりStx1の毒性を阻害していると考えられている。さらに興味深いことは、Vero細胞にMMA-tetとStx1を同時に添加すると、Stx1とMMM-tetは複合体を形成しゴルジ体のみならず小胞体まで運ばれていた(図3)。しかしながら、Stx1の細胞毒性を阻害した(図3)。MMA-tetはStx1のみならずStx2に対しても非常に強い細胞毒性阻害活性があり、Stx1とStx2の治療薬として期待される。現在、われわれは動物モデルを用いてMMA-tetの治療有効性を評価している。

以上のように、StxのBサブユニットに存在する3つのグロボ3糖と結合できるサイトはそれぞれ異なる役割を担っており、Stx1とStx2の毒性発現機構の違いに大きく関係している可能性がある。StxのAサブユニットの毒性発現機構は1988年に明らかとなった。Bサブユニットの機能の詳細が明らかとなりつつある。今後の研究の発展が期待される。

9 今後の課題

EHEC感染症の疫学研究やStxに関する研究をさらに発展させ、EHEC感染症及びEHEC感染症によって亡くなる人を減らすことに繋がるのが求められる。EHECのリザーブは牛であり、牛が排泄する便中のEHECが

食肉や環境を汚染し人への感染源となっている。①牛に対するプロバイオティクスの開発やEHECの牛への定着因子を見つけ、EHECを保菌しない牛、あるいは保菌数の少ない牛の飼育法を開発する ②肉や野菜の生食は100%安全でないことを消費者に周知させると同時に生肉や生野菜の殺菌法を開発する ③2種類存在するStxのうち、Stx2産生性の特定の血清型に属するEHECがなぜ重症化させるかについて、細菌側、宿主側の両方からの研究を行う ④抗菌薬に依存しない新たな治療法の開発を行っていくこと等、多くの課題が山積している。

引用文献

- [1] Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT : Pathogenic *Escherichia coli*, Nat Rev Microbiol, 2, 123-140 (2004)
- [2] 山崎伸二: エンテロトキシン・ペロ毒素, 家畜診療, 58, 323-330 (2011)
- [3] Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML : Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype, N Engl J Med, 308, 681-685 (1983)
- [4] Yamasaki S, Takeda Y : Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 episode in Japan with a perspective on Vero toxins (Shiga-like toxins), J Toxicol Toxin Rev, 16/4, 229-240 (1997)
- [5] Terajima J, Izumiya H, Iyoda S, Tamura K, Watanabe H : Detection of a multi-prefectural *E coli* O157:H7 outbreak caused by contaminated Ikura-Sushi ingestion, Jpn J Infect Dis, 52, 52-53 (1999)
- [6] Terajima J, Izumiya H, Iyoda S, Mitobe J, Miura M, Watanabe H : Effectiveness of pulsed-field gel electrophoresis for the early detection of diffuse outbreaks due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Japan, Foodborne Pathog Dis, 3, 68-73 (2006)
- [7] Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, Hoekstra RM, Strockbine NA : Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United State, 1983-2002, J Infect Dis, 192, 1422-1429 (2005)
- [8] Piercefield EW, Bradley KK, Coffman RL, Mallonco SM : Hemolytic uremic syndrome after an *Escherichia coli* O111 outbreak, Arch Intern Med, 170, 1656-1663 (2010)
- [9] Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, an der Helden M, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadi M, Zoufaly A, Jordan S, Kemper MJ, Follin P, Muller L, King LA, Rosner B, Buchholz U, Stark K, Krause G, HUS investigation team: Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany, N Engl J Med, 365, 1771-1780 (2011)
- [10] Brzuszkiewicz E, Thürmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer FD, Boelter J, Petersen H, Gottschalk G, Daniel R : Genome sequence analysis of two isolates from the recent *Escherichia coli* out-

- break in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC), Arch Microbiol, 193, 883-891 (2011)
- [11] Scheutz F, Nielsen EM, Frimodt-Møller J, Boisen N, Morabito S, Tozzoli R, Nataro JP, Caprioli A : Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011, Euro Surveill, 16, 1-6 (2011)
- [12] Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, Bashir A, Boisen N, Scheutz F, Paxinos EE, Sebra R, Chin CS, Lliopoulos D, Klammer A, Peluso P, Lee L, Kislyuk AO, Bullard J, Kasarskis A, Wang S, Eid J, Rank D, Redman JC, Steyert SR, Frimodt-Møller J, Struve C, Peterson AM, Krogfelt KA, Nataro JP, Schadt EE, Ealdor MK : Origin of the *E. coli* causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany, N Engl J Med, 365, 709-712 (2011)
- [13] Buchholz U, Bernard H, Weber D, Böhmer MM, Remschmidt C, Wilking H, Deleré Y, an der Heiden M, Adlhoch C, Dreesman J, Ehlers J, Ethelberg S, Faber M, Frank C, Fricke G, Greiner M, Höhle M, Ivarsson S, Jark U, Kirchner M, Koch J, Krause G, Lubber P, Rosner B, Stark K, Kühne M : German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts, N Engl J Med, 365, 1763-1770 (2011)
- [14] King LA, Nogareda F, Weill FX, Mariani-Kurkdjian P, Loukiadis E, Gault G, Jourdan-DaSilva N, Bingen E, Macé M, Thevenot D, Ong N, Castor C, Noël H, Cauteren DV, Charron M, Vaillant V, Aldabe B, Goulet V, Delmas G, Couturier E, Strat YL, Combe C, Delmas Y, Terrier F, Vendrely B, Rolland P, de Valk H : Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 associated with organic fenugreek sprouts, France, June 2011, Clin Infect Dis, 54, 1588-1594 (2011)
- [15] Mariani-Kurkdjian P, Bingen E, Gault G, Jourdan-Da Silva N, Weil FZ : *Escherichia coli* O104:H4 southwest France, June 2011, Lancet Infect Dis, 11, 732-733 (2011)
- [16] Feng P, Weagant SD, Monday SR : Genetic analysis for virulence factors in *Escherichia coli* O104:H21 that was implicated in an outbreak of hemorrhagic colitis, J Clin Microbiol, 39, 24-28 (2001)
- [17] Bee WK, Lee YK, Cho MS, Ma SK, Kim SW, Kim NH, Chol KC : A case of hemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O104:H4, Yonsei Med J, 47, 437-439 (2006)
- [18] 山崎伸二, 竹田美文 : 特集 腸管出血性大腸菌 (Vero 毒素産生性大腸菌), Vero 毒素の構造と生物活性, 臨床と微生物 増刊号, 23, 785-799 (1996)
- [19] Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton-Celsa AR, Sanchez M, Persson S, O'Brien AD : Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature, J Clin Microbiol, 50, 2951-2963 (2012)
- [20] Schmidt H, Beutin L, Karch H : Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933, Infect Immun, 63, 1055-1061 (1995)
- [21] Paton AW, Srimanote P, Talbot UM, Wang H, Paton JC : A new family of potent AB5 cytotoxin produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*, J Exp Med, 200, 35-46 (2004)
- [22] Yamasaki S, Asakura M, Tsukamoto T, Faruque SM, Deb R, Ramamurthy T : Cytotoxic distending toxin (CDT) : genetic diversity, structure and role in diarrheal disease, Toxin Rev, 25, 61-88 (2006)
- [23] Savarino SJ, Fasano A, Robertson DC, Levine MM : Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an *in vitro* rabbit intestinal model, J Clin Invest, 87, 1450-1455 (1991)
- [24] Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB : A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells, Proc Natl Acad Sci USA, 87, 7839-7843 (1990)
- [25] McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB : A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens, Proc Natl Acad Sci USA, 92, 1664-1668 (1995)
- [26] Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC : Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans, Infect Immun, 69, 6999-7009 (2001)
- [27] Tarr PI, Bilge SS, Vary Jr JC., Jelacic S, Habeeb RL, Ward TR, Baylor MR, Besser TE : Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure, Infect Immun, 68, 1400-1407 (2000)
- [28] Nicholls L, Grant TH, Robins-Browne RM : Identification of a novel genetic locus that is required for *in vitro* adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells, Mol Microbiol, 35, 275-288 (2000)
- [29] Torres AG, Giron JA, Perna NT, Burland V, Blattner FR, Avelino-Flores F, Kaper JB : Identification and characterization of *lpfABCC' DE*, a fimbrial operon of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, Infect Immun, 70, 5416-5427 (2002)
- [30] Xicohtencatl-Cortes J, Monteiro-Neto V, Ledesma MA, Jordan DM, Francetic O, Kaper JB, Puente JL, Girón JA : Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, J Clin Invest, 117, 3519-3529 (2007)
- [31] Low AS, Dziva F, Torres AG, Martinez JL, Rosser T, Naylor S, Spears K, Holden N, Mahajan A, Findlay J, Sales J, Smith DGE, Low JC, Stevens MP, Gally DL : Cloning, expression, and characterization of fimbrial operon F9 from enterohaemorrhagic *Escherichia coli*

- O157:H7, *Infect Immun*, 74, 2233–2244 (2006)
- [32] Wells TJ, Sherlock O, Rivas L, Mahajan A, Beatson SA, Torpdahl M, Webb RI, Allsopp LP, Gobius KS, Gally DL, Schembri MA : EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation, *Environ Microbiol*, 10, 589–604 (2008)
- [33] Kenny B, Finlay BB : Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 7991–7995 (1995)
- [34] Jarvis KG, Girón JA, Jerse AE, McDaniel TK, Donnenberg MS, Kaper JB : Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 7996–8000 (1995)
- [35] Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB : Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells, *Cell*, 91, 511–520 (1997)
- [36] Tobe T, Beatson SA, Taniguchi H, Abe H, Bailey CM, Fivian A, Younis R, Matthews S, Marches O, Frankel G, Hayashi T, Pallen MJ : An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 14941–14946 (2006)
- [37] Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL : Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans, *J Clin Microbiol*, 37, 497–503 (1999)
- [38] Ethelberg S, Olsen KE, Scheutz F, Jensen C, Schiellerup P, Enberg J, Petersen AM, Olesen B, Gerner-Smidt P, Mølbak K : Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark, *Emerg Infect Dis*, 10, 842–847 (2004)
- [39] Eklund M, Leino K, Siitonen A : Clinical *Escherichia coli* strains carrying *stx* genes: *stx* variants and *stx*-positive virulence profiles, *J Clin Microbiol*, 40, 4585–4593 (2002)
- [40] Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczus T, Ammon A, Karch H : *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms, *J Infect Dis*, 185, 74–84 (2002)
- [41] Noda M, Yutsudo T, Nakabayashi N, Hirayama T, Takeda Y : Purification and some properties of Shiga-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is immunologically identical to Shiga toxin, *Microb Pathog*, 2, 339–349 (1987)
- [42] Yutsudo T, Nakabayashi N, Hitayama T, Takeda Y : Purification and some properties of a Vero toxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is immunologically unrelated to Shiga toxin, *Microb Pathog*, 3, 21–30 (1987)
- [43] Fujii J, Kinoshita Y, Kita T, Higure A, Takeda T, Tanaka N, Yoshida S : Magnetic resonance imaging and histopathological study of brain lesions in rabbits given intravenous verotoxin 2, *Infect Immun*, 64, 5053–5060 (1996)
- [44] Armstrong GD, Rowe PC, Goodyer P, Orrbine E, Klassen TP, Wells G, MacKenzie A, Lior H, Blanchard C, Auclair F, et al., A phase I study of chemically synthesized verotoxin (Shiga-like toxin) Pk-trisaccharide receptors attached to chromosorb for preventing hemolytic-uremic syndrome, *J Infect Dis*, 171, 1042–1045 (1995)
- [45] Ling H, Boodhoo A, Hazes B, Cummings MD, Armstrong GD, Brunton JL, Read RJ : Structure of the Shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb₃, *Biochemistry*, 37, 1777–1788 (1998)
- [46] Kitov PI, Sadowska JM, Mulvey G, Armstrong GD, Ling H, Pannu NS, Read RJ, Bundle DR : Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands, *Nature*, 403, 669–672 (2000)
- [47] Matsuoka K, Terabatake M, Esumi Y, Terunuma D, Kuzuhara H : Synthetic assembly of trisaccharide moieties of globotriaosyl ceramide using carbosilane dendrimers as cores. A new type of functional glycomaterial, *Tetrahedron Lett*, 40, 7839–7842 (1999)
- [48] Nishikawa K, Matsuoka K, Kita E, Okabe N, Mizuguchi M, Hino K, Miyazawa S, Yamasaki C, Aoki J, Takashima S, Yamakawa Y, Nishijima M, Terunuma D, Kuzuhara H, Natori Y : A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 7669–7674 (2002)
- [49] Watanabe M, Matsuoka K, Kita E, Igai K, Higashi N, Miyagawa A, Watanabe T, Yanoshita R, Samejima Y, Terunuma D, Natori Y, Nishikawa K : Oral therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections, *J Infect Dis*, 189, 360–368 (2004)
- [50] Watanabe M, Igai K, Matsuoka K, Miyagawa A, Watanabe T, Yanoshita R, Samejima Y, Terunuma D, Natori Y, Nishikawa K : Structural analysis of the interaction between Shiga toxin B subunits and linear polymers bearing clustered globotriose residues, *Infect Immun*, 74, 1984–1988 (2006)
- [51] Nishikawa K, Matsuoka K, Watanabe M, Igai K, Hino K, Hatano K, Yamada A, Abe N, Terunuma D, Kuzuhara H, Natori Y : Identification of the optimal structure required for a Shiga toxin neutralizer with oriented carbohydrates to function in the circulation, *J Infect Dis*, 191, 2097–2105 (2005)
- [52] Nishikawa K, Watanabe M, Kita E, Igai K, Omata K, Yaffe MB, Natori Y : A multivalent peptide library approach identifies a novel Shiga toxin inhibitor that induces aberrant cellular transport of the toxin, *FASEB J*, 20, 2597–2599 (2006)
- [53] Tsutsuki K, Watanabe-Takahashi M, Takenaka Y, Kita E, Nishikawa L : Identification of a peptide-based neutralizer that potently inhibits both Shiga toxins 1 and 2 by targeting specific receptor-binding regions, *Infect Immun*, 81, 2133–2138 (2013)