

称号及び氏名	博士（獣医学）	島 綾香
学位授与の日付	平成25年3月31日	
論文名	<i>Providencia alcalifaciens</i> が産生する細胞膨化致死毒素の毒性および <i>Providencia</i> 属菌の分子疫学に関する研究	
論文審査委員	主査	山崎 伸二
	副査	笹井 和美
	副査	三宅 眞実

論文要旨

緒言

1987年、下痢症患者由来の大腸菌が細胞を伸長・膨化させ、その後致死させる新たな毒素を産生することが発見され、本毒素は細胞膨化致死毒素 (Cytotoxic distending toxin; CDT) と名付けられた。CDTはCdtA、CdtBおよびCdtCの3つのサブユニットからなる蛋白毒素である。CDTはCdtAおよびCdtCを介して細胞のレセプターに結合し、CdtBを細胞内へ取り込ませる。取り込まれたCdtBは核内に移行し、そのDNase I活性に基づきDNAを傷害し、細胞周期をG₂/M期で停止させる。CDTの病原性については不明な点が多いが、*Helicobacter hepaticus* をマウスに感染させると *cdt* 遺伝子にトランスポゾン挿入した変異株では排菌期間が短く、腸管の炎症反応も軽度であること、*Shigella dysenteriae* のCDTが乳のみマウスに水様性下痢を引き起こすことなどが報告されており、CDTが症状の重篤化に関与する可能性が考えられている。我々はCDT産生性大腸菌 (CTEC) と下痢症の関連性に着目し、小児下痢症患者と健常者のCTEC保有調査を行うことで、CTECと小児下痢症との関連性を疫学的に示した。その過程で大腸菌 *cdt* 遺伝子 (*Eccdt*) とは異なる *cdtB* 遺伝子を2検体で検出した。本 *cdt* 遺伝子を保有する菌2株を分離・同定したところ両株とも *Providencia alcalifaciens* であった。*Providencia* 属は、*P. alcalifaciens*、*P. stuartii*、*P. rettgeri* 等の8菌種からなる。この中で、*P. alcalifaciens* はイギリスの旅行者下痢症やバ

ングラデシュの小児下痢症との関連性が示されている。我が国では 1996 年に福井県で有症者 270 人にも上る集団食中毒の原因菌として報告された。*P. alcalifaciens* 以外の菌種は常在細菌叢を構成すると考えられていたが、近年、*P. rettgeri* および *P. heimbachae* も下痢症との関連性が疑われている。*Providencia* 属菌の病原性については *P. alcalifaciens* と *P. rettgeri* の一部の株が細胞侵入性を示すことが唯一報告されている。しかしながら、細胞侵入性を有する *P. alcalifaciens* は臨床分離株の 50% 程度に過ぎず、細胞侵入性だけでは *P. alcalifaciens* の病原性を説明できない。また、*Providencia* 属菌の環境や動物における分布やヒトへの感染源は明らかになっていないが、牛および羊などの家畜からの分離報告があり、家畜が感染源となる可能性が考えられている。

本研究では、*Providencia* 属菌の病原性の一端を明らかにすることを目的に、第一章では *P. alcalifaciens* で見つかった *cdt* 遺伝子および CDT の細胞毒性を解析した。また、第二章では下痢症患者の *Providencia* 属菌の保菌状況、*Providencia* 属菌の感染源の解明を目的に、下痢症患者および食肉より *Providencia* 属菌の検出、分離を行った。第三章では、*P. alcalifaciens* CDT (PaCDT) の細胞毒性発現機構の解明を目的に、PaCDT と大腸菌 CDT (EcCDT) の細胞感受性を決定するサブユニットの同定を試みた。

第一章 *P. alcalifaciens* CDT (PaCDT) の性状解析

cdtB 遺伝子が検出された *P. alcalifaciens* 2 株において *cdt* 遺伝子全長が保存されているかどうかを調べるために、*cdtB* 遺伝子の上下流の塩基配列をゲノムウォーキングにより解析した。その結果、両分離株は *cdtA* (750 bp/249 aa)、*cdtB* (810 bp/269 aa)、*cdtC* (549 bp/182 aa) と考えられる 3 つの ORF からなる *cdt* 遺伝子を保有していた。推定アミノ酸配列には毒素活性に必須なアミノ酸残基が保存されており、*P. alcalifaciens* は活性を有する CDT を産生すると予想された。

次に、分離株の CDT 産生性を解析した。ウサギ抗組換え PaCdtB (rPaCdtB) 血清を作製し、ウエスタンブロッティングにより分離株の CdtB 産生性を確認した。また、分離株および rPaCDT 発現大腸菌の菌体破砕液の添加で CHO 細胞の膨化・伸張が観察され、分離株の毒性は抗 rPaCdtB 血清により中和されたため、分離した *P. alcalifaciens* は活性を有する CDT を産生することが明らかとなった。一方、陽性コントロールとして用いた CTEC-I 株は HeLa 細胞と CHO 細胞の両方に毒性を示したが、PaCDT では HeLa 細胞の形態変化は観察されなかった。

PaCDT が既報の CDT と同様の細胞毒性発現機構を持つかどうか調べる目的で、分離株の破砕液を添加した細胞の細胞周期と DNA 傷害の有無を解析した。その結果、分離株の破砕液を作用させた細胞では G₂/M 期での細胞周期の停止、DNA の二重鎖切断のマーカーである H2AX のリン酸化が確認された。これにより、既報の CDT

と同様に PaCDT は標的細胞の DNA を傷害し、細胞周期を G₂/M 期で停止させることで毒性を発現すると考えられた。

以上のことから、*P. alcalifaciens* が細胞毒性を有する CDT を産生することが初めて明らかとなり、CDT が *P. alcalifaciens* の病原因子となる可能性が示された。また、PaCDT の細胞感受性は EcCDT-I とは異なる可能性が考えられた。

第二章 下痢症患者および食肉から分離した *Providencia* 属菌の分子疫学的解析

下痢症患者の *Providencia* 属菌の保菌状況および *Providencia* 属菌の感染源の解明を目的に、下痢症患者および食肉より *Providencia* 属菌を検出、分離した。

まず、我が国の小児下痢症における *Providencia* 属菌の疫学調査を行った。直腸スワブを Tryptic Soy Broth 培地 (TSB) で培養し、*Providencia* 属菌検出用 PCR (Psp-PCR) により *Providencia* 属菌を検出した。同時に直腸スワブを *Providencia* 属菌の選択培地である PMXMP 寒天培地で培養し、*Providencia* 属菌を分離した。その結果、小児下痢便 345 検体中 5 検体 (1.4%) で Psp-PCR 陽性となり、そのうち 4 検体から *Providencia* 属菌を分離した。分離した株はすべて *P. rettgeri* であった。この結果は、同様の方法で調べたタイの下痢症患者 (0~88 歳) 214 検体における検出率 (7.5%) や、過去に報告された海外 (主に東南アジア) からの帰国者における分離率 (15.4%) よりも低かった。また、バングラデシュでの調査では 2.1% の小児下痢症患者から *P. alcalifaciens* が分離されたという報告があるが、日本の小児下痢症患者からは *P. alcalifaciens* は分離されなかった。今後、日本の他の地域でも同様の傾向を示すかを調べていく必要がある。

Providencia 属菌のヒトへの感染源の解明を目的に、日本、タイ、中国の食肉から *Providencia* 属菌を検出、分離した。日本の検体については食肉 25 g を 225 mL の TSB で揉み出し、培養した。タイ、中国の検体については食肉 25 g を 25 mL の PBS で揉み出し、揉み出し液 1 mL を 4 mL の 1.25×TSB に加え培養した。培養後、Psp-PCR と PMXMP 培地による *Providencia* 属菌の検出、分離を行った。日本、タイ、中国の牛肉、豚肉および鶏肉、各 21~36 検体について調べた結果、20~79% で Psp-PCR 陽性であった。また、*P. alcalifaciens*、*P. rettgeri*、*P. rustigianii* および *P. stuartii* が分離されたが、日本の豚肉を除き、*P. alcalifaciens* の分離率が高かった (58~90%)。日本、タイ、中国の食肉は *Providencia* 属菌により汚染されており、食肉が *Providencia* 属菌のヒトへの感染源となる可能性が考えられた。

Providencia 属菌の *cdt* 遺伝子の保有状況を、³²P 標識 *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により調べた。分離した 107 株 (*P. alcalifaciens* 82 株、*P. rettgeri* 11 株、*P. stuartii* 8 株、*P. rustigianii* 6 株) について調べた結果、タイの患者由来 *P. alcalifaciens* 1 株のみ陽性となったことから *cdt* 遺伝子を保有するのは *P. alcalifaciens* の一部の株であると考えられた。

以上のことから、日本、タイ、中国の食肉は高頻度に *Providencia* 属菌により汚染されているが、*Providencia* 属菌による下痢症は日本よりも、衛生状態が良くないタイなどの発展途上国で多いと考えられた。

第三章 PaCDT と EcCDT-I の細胞感受性の違い

PaCDT の細胞毒性発現機構の解明を目的に、rPaCDT、rEcCDT-I および rPaCDT/rEcCDT-I キメラ毒素を作製し、rPaCDT、rEcCDT-I およびそれぞれのキメラ毒素の細胞毒性を比較した。

8 種類の培養細胞を用いて PaCDT と EcCDT-I の細胞毒性を比較した。細胞に 2 倍段階希釈した CDT を添加し、72 時間後に半数以上の細胞に膨化を引き起こす最大希釈倍率を titer とした。8 種類の細胞の中で PaCDT は CHO 細胞に対する毒性が最も強く、EcCDT-I は HeLa 細胞と Caco-2 細胞に対する毒性が強かったため、以後の実験では細胞感受性の指標として CHO 細胞および HeLa 細胞を使用した。CDT は産生される菌種によりアミノ酸配列が異なる。そこで、CDT の細胞感受性とアミノ酸配列の関連性を検討した。CTEC と *P. alcalifaciens* の菌体破砕液の細胞毒性を比較したところ、PaCDT、EcCDT-III、EcCDT-V 産生株は CHO 細胞に対する毒性が強く、EcCDT-I、EcCDT-IV 産生株は HeLa 細胞に対する毒性が強かった。これらの CDT の遺伝子配列を元に系統解析を行うと、CHO 細胞に対する毒性が強い PaCDT、EcCDT-III、EcCDT-V、HeLa 細胞に対する毒性が強い EcCDT-I、EcCDT-IV がそれぞれ同じグループに分類され、CDT の塩基配列すなわちアミノ酸配列が細胞感受性に関連すると考えられた。

PaCdtB の CHO および HeLa 細胞での細胞内動態を比較するために、rPaCDT 発現大腸菌の破砕液を作用させた細胞を用いて抗 rPaCdtB 血清による免疫染色を行った。その結果、CHO 細胞では添加1時間後には細胞膜周囲へ、2 時間後には核膜周囲への rPaCdtB の集積が確認された。しかし、HeLa 細胞では添加 6 時間後まで観察を続けても rPaCdtB の集積は認められなかった。このことから、PaCDT は HeLa 細胞に対する結合力が弱く、細胞との結合に関与する CdtA および CdtC が細胞感受性を決定する可能性が考えられた。そこで、どのサブユニットが CDT の細胞感受性を決定するかを明らかにするために、PaCDT および EcCDT-I の各サブユニットの組換え蛋白を精製し、rPaCDT/rEcCDT-I のキメラ毒素を作製して HeLa および CHO 細胞に対する細胞毒性試験を行った。HeLa 細胞に対する CHO 細胞での titer の比を CHO 指向性とし、細胞感受性を比較した。その結果、rEcCdtA を rPaCdtA に置き換えると CHO 指向性が大幅に増加したことから、CdtA が細胞感受性に最も影響を及ぼすと考えられた。また、CdtB および CdtC を同様に变化させても CHO 指向性が微増したことから、細胞への結合に関与する CdtA や CdtC だけでなく毒性本態である CdtB も CDT の細胞感受性に影響を及ぼす可能性が考えられた。

総括

1. *Providencia* 属菌で初めての蛋白毒素として *P. alcalifaciens* が活性を有する CDT を産生することを見いだした。
2. 本研究での日本の小児下痢症患者の *Providencia* 属菌の保菌率は、タイや過去に報告されたバングラデシュの小児下痢症患者、海外からの帰国者の保菌率よりも低かった。
3. 日本、タイ、中国の食肉は *Providencia* 属菌により高頻度に汚染されており、食肉が感染源となる可能性が考えられた。
4. CDT を産生するのは *P. alcalifaciens* の一部の限られた菌株であると考えられた。
5. EcCDT-I と PaCDT では細胞感受性が異なり、CdtA が細胞感受性に最も影響を及ぼすと考えられた。細胞への結合に関与する CdtA や CdtC だけでなく毒性本態である CdtB も CDT の細胞感受性に影響を及ぼす可能性が考えられた。

審査結果の要旨

下痢症患者由来の大腸菌が細胞を伸長・膨化させ、その後致死させる毒素を産生することが 1987 年に発見され、その毒素は細胞膨化致死毒素 (CDT) と名付けられた。以後、カンピロバクター属菌や赤痢菌など様々のグラム陰性菌が本毒素を産生することが報告されている。CDT は CdtA、CdtB および CdtC の 3 つのサブユニットからなる蛋白毒素で、CdtA と CdtC がレセプターへの結合活性を担い、CdtB は DNase I 活性を有し、DNA を傷害して細胞周期を G₂/M 期で停止させる毒素活性本態である。CDT の病原性については充分明らかにされていないが、下痢原性、症状の重篤化及び感染の持続性に関わっている可能性が動物実験や疫学データから指摘されている。我々は CDT 産生性大腸菌 (CTEC) と下痢症の関連性に着目し、小児下痢症患者の CTec 保有調査を実施していた過程で、大腸菌の *cdt* 遺伝子 (Eccdt) とは異なる *cdtB* 遺伝子を 2 検体で検出した。本 *cdt* 遺伝子を保有する菌を分離、同定したところ、2 株とも *Providencia alcalifaciens* であった。*P. alcalifaciens* はイギリスの旅行者下痢症やバングラデシュの小児下痢症との関連性が示されている。我が国では 1996 年に福井県で有症者 270 人にも上る集団食中毒の原因菌として報告された。近年、*P. rettgeri* や

*P. heimbachae*も下痢症との関連性が疑われている。しかしながら、*Providencia* 属菌の病原性、環境中での分布やヒトへの感染源は明らかになっていない。

本研究では *Providencia* 属菌の病原性や下痢症における重要性、さらに自然界での分布や感染源の一端を明らかにすることを目的に、1) *P. alcalifaciens* の *cdt* 遺伝子および同菌の産生する CDT (PaCDT) の細胞毒性、2) 下痢症患者の *Providencia* 属菌の保菌状況と食肉の *Providencia* 属菌の汚染状況、3) PaCDT と大腸菌 CDT (EcCDT-I) の細胞感受性の違いを担っているサブユニットを比較検討した。

第一章では、*P. alcalifaciens* の *cdt* 遺伝子の全塩基配列を解析し、*cdtA* (750 bp/249 aa)、*cdtB* (810 bp/269 aa)、*cdtC* (549 bp/182 aa) の 3 つの ORF を有することを明らかとした。推定アミノ酸配列には毒素活性に必須なアミノ酸残基が保存されていた。分離株および組換え PaCDT (rPaCDT) 発現大腸菌の菌体破砕液の添加で CHO 細胞の膨化・伸張及び本細胞毒性が抗 rPaCdtB 血清により中和されたことを観察した。一方、陽性コントロールとして用いた EcCDT-I は HeLa 細胞と CHO 細胞の両方に毒性を示したが PaCDT は HeLa 細胞に毒性を示さなかった。rPaCDT を作用させた細胞では G₂/M 期での細胞周期の停止、DNA の二重鎖切断のマーカーである H2AX のリン酸化を確認した。以上の結果より *P. alcalifaciens* が細胞毒性を有する CDT を産生することを初めて明らかとした。

第二章では、下痢症患者の *Providencia* 属菌の保菌状況および *Providencia* 属菌の感染源の解明を目的に、下痢症患者および食肉より *Providencia* 属菌を検出、分離した。*Providencia* 属菌検出用 PCR (Psp-PCR) を構築し、*Providencia* 属菌の検出及び選択培地で *Providencia* 属菌を分離した。その結果、我が国の小児下痢便 345 検体中 5 検体 (1.4%) で Psp-PCR 陽性となり、4 検体から *P. rettgeri* を分離した。この分離率は、タイの下痢症患者 (0~88 歳) 由来 214 検体における検出率 (7.5%) や、過去に報告された海外 (主に東南アジア) からの帰国者における分離率 (15.4%) よりも低かった。日本、タイ、中国の牛肉、豚肉および鶏肉各 21~36 検体では、20~79% で Psp-PCR 陽性であり、*P. alcalifaciens*、*P. rettgeri*、*P. rustigianii* および *P. stuartii* が分離された。日本の豚肉を除き、*P. alcalifaciens* の分離率が高かった (58~90%)。分離した 107 株について *cdt* 遺伝子の有無を調べた結果、タイの患者由来 *P. alcalifaciens* 1 株のみ陽性となった。以上のことから、日本、タイおよび中国の食肉は高頻度に *Providencia* 属菌により汚染されているが、*Providencia* 属菌による下痢症は日本よりも、衛生状態が良くないタイなどの発展途上国で多いと考えられた。

第三章では、PaCDT の細胞毒性発現機構の解明を目的に rPaCDT/rEcCDT-I のキメラ毒素を作製し、rPaCDT、rEcCDT-I およびそれぞれのキメラ毒素の CHO 細胞と HeLa 細胞に対する細胞感受性を比較した。その結果、CdtA、CdtB、CdtC の全てが

細胞感受性に関わっているが、CdtA が細胞感受性に最も重要な役割を果たしている可能性を明らかとした。興味深いことに毒性本態と考えられていた CdtB も細胞感受性への関与が示唆された。

以上の結果は、*P. alcalifaciens* が新規の CDT を産生することを証明することにより *Providencia* 属菌が蛋白毒素を産生することを初めて明らかとした。また、*P. alcalifaciens* のみならず *P. rettgeri* が小児の下痢症に関わっている可能性、その感染源として食肉に関わっている可能性を示した。これらの成果は、*Providencia* 属菌の病原性と感染源に関して新しい知見を提供したものであり、獣医学の分野のみならず医学領域においても多大な貢献をされると考えられる。従って、最終試験の結果と併せて、博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。