

一酸化窒素による腸管出血性大腸菌 O157 の 抗菌メカニズムとベロトキシン産生量

*Antimicrobial mechanism of nitric oxide for verotoxigenic
Escherichia coli O157: H7 and the amount of verotoxins*

森田英利¹, 坂田亮一¹, 加藤行男¹, 久松 伸²

¹麻布大学大学院獣医学研究科

²麻布大学大学院健康環境学研究科

Hidetoshi Morita¹, Ryoichi Sakata¹, Yukio Kato¹, Shin Hisamatsu²

¹Graduate School of Veterinary Science, Azabu University;

²Graduate School of Environmental Health, Azabu University

Abstract: The levels of verotoxin-1 and verotoxin-2 released from verotoxigenic *Escherichia coli* O157: H7 treated *in vitro* with sodium nitrite, sodium chloride and several antibiotics were estimated. Of the three strains of *E. coli* O157: H7 used in this study, two strains produced both verotoxin-1 and verotoxin-2 and one strain produced only verotoxin-2. Treatment of *E. coli* O157: H7 with sodium nitrite (6,000 mg/L, a minimum inhibitory concentration) did not increase the levels of verotoxin-1 and verotoxin-2 compared with treatment by sodium chloride or antibiotics. When the electron paramagnetic resonance spectrum of sodium nitrite-treated bacterial cells was examined at 77K to clarify the mechanism of the anti-bacterial activity of nitric oxide derived from sodium nitrite, electron paramagnetic resonance signals with *g*-values of 2.035 and 2.010 were observed. These were identified as being derived from iron-nitric oxide complexes. It appeared that the dinitrosyl iron complexes in the *E. coli* O157: H7 cells were generated through reaction of iron-sulfur proteins (enzymes) with nitric oxide formed by the reduction of sodium nitrite. These findings indicate that nitric oxide derived from sodium nitrite penetrates the cells and inactivates enzymes related to the respiratory chain.

目 的

腸管出血性大腸菌感染症は、下痢原性大腸菌の中でベロトキシン (VT) を産生する大腸菌 (その代表的なものが大腸菌 O157 : H7) によって引き起こされる。大腸菌 O157 : H7 は、1982 年に米国でハンバーガー食中毒の原因菌として初めて発見された¹⁾。1996 年には関西地区において 6,000 人以上が感染するという世界最大の食中毒事故が発生し、その原因

細菌が大腸菌 O157 : H7 であった。

ウシやブタなど多くの偶蹄類は大腸菌 O157 : H7 を腸管内に保有するので、と畜後の食肉の汚染が懸念される。一方、大腸菌 O157 : H7 の染色体泳動パターンを解析することで、いつ頃・どこで感染症を引き起こしたものが追跡できるようになっており、人への感染症の事故は、家畜に常存する大腸菌 O157 : H7 ではない、との見解も出されている。しかし食肉・食肉製品をはじめとして大腸菌 O157 : H7 感染症が

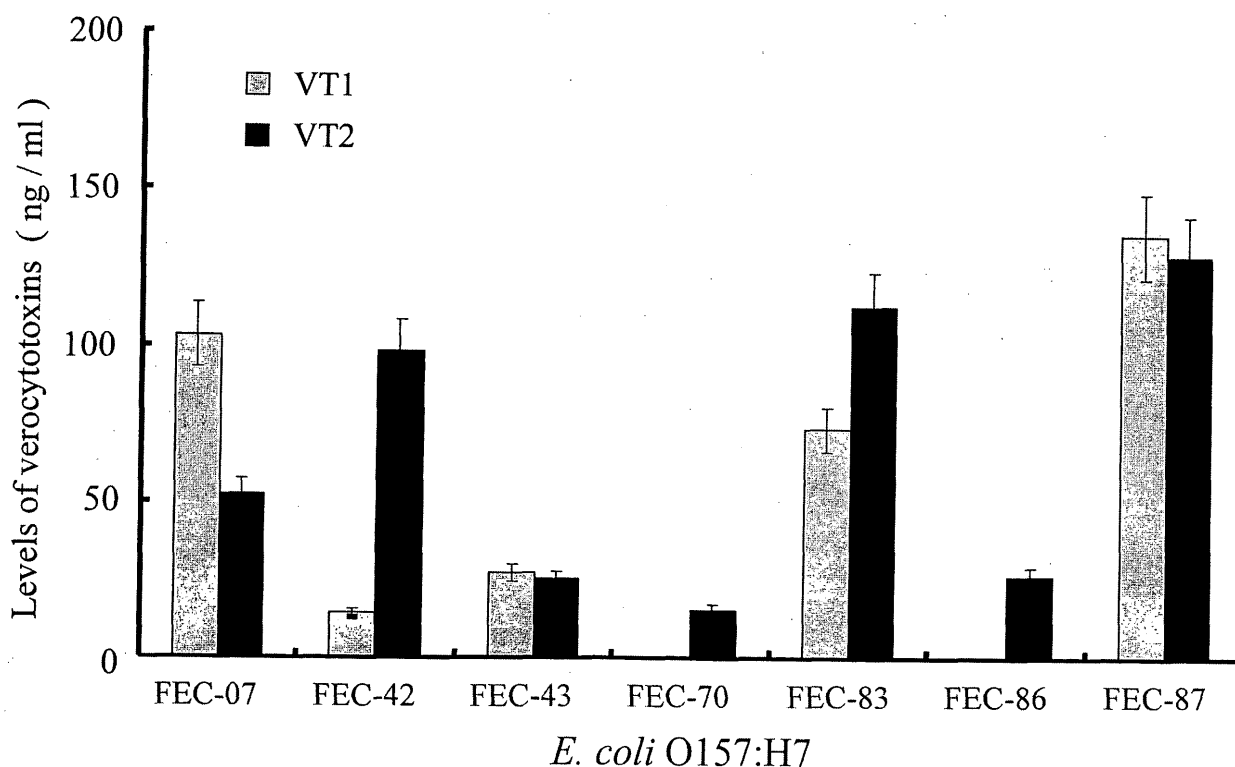


Fig. 1 Quantities of verotoxins (VT1 and VT2) released from *E. coli* O157:H7. The cells (wet weight, ca. 60mg) were suspended in a fresh LB broth, treated with polymixin B, and incubated for 30 minutes at 37 °C.

発症しておるのも事実であり、これらは汚染原材料によって製造されたパティやハンバーガー、「たたき」を十分加熱しなかったことによる事故である。しかし、今までの疫学調査では、発色剤として用いた亜硝酸ナトリウム (NaNO₂) を添加した食肉製品を感染源とする大腸菌 O157:H7 感染症は発生していないという特筆すべき点がある。パティ、ハンバーガー、「たたき」に NaNO₂ は用いられない。食肉製品に添加される NaNO₂ は、発色作用や抗酸化作用などの重要な働きをしているが、抗菌性、特に大腸菌 O157:H7 に対する抗菌性に貢献していることが想定される。

本研究では、NaNO₂ の大腸菌 O157:H7 に対する抗菌性メカニズム、ならびに VT の放出抑制について、他の育成阻害物質や抗生物質の場合と比較して検討した。

方法

本研究では、大腸菌 O157:H7 の 7 菌株を供試した。菌株の同定は、One-Shot PCR Screening and Verotoxin Gene Detection Kit (TaKaRa Biomedicals Co.) によ

て行った。各菌株によって産生・放出される各ベロトキシンは、Escherichia coli Verotoxin Detection Kit (検出限界 1 ng/ml, デンカ生研) により定量した。すなわち、各菌株は 37 °C で 16 時間、LB 液体培地 (Difco) で培養し、BHI 寒天培地 (デンカ生研) 上に塗抹して 37 °C で 20 時間培養した。集菌・洗浄後、湿重量約 60 mg を LB 溶液培地 1 ml に再懸濁 (10⁹ CFU/ml) し 37 °C で 30 分間インキュベートし、VT1 型および VT2 型の量を求めた。

電子常磁性共鳴吸収 (EPR) 測定は、大腸菌 O157:H7 (湿重量約 60 mg) の懸濁液 0.4 ml を EPR チューブに入れ 77K で測定した。測定条件は、microwave power 4 mW, modulation frequency 9.1 GHz, modulation width 0.32 mT, sweep time 4 分間, time constant 0.3 秒で行った。一酸化窒素 (NO) 供与体としては、NOC5 (3-[2-hydroxy-1-(1-methyl)-2-nitrosohydrazinol-1-propanamine], 同仁化学) を用いた。

結果と考察

Fig. 1 に、LB 液体培地 (pH 6.8) にポリミキシン B を添加し 37 °C、30 分間後の各大腸菌 O157:H7 の

Table 1 Minimum inhibitory concentration (MIC) of NaCl, NaNO₂ and several antibiotics on *E. coli* O157: H7 strains cultured in LB broth (pH6.8) for 20- period

Growth inhibitory substances	<i>E. coli</i> O157: H7 strains	MIC
Sodium chloride (NaCl)	FEC-43	6.5 (± 0.15) %
	FEC-70	6.6 (± 0.11) %
	FEC-83	6.6 (± 0.26) %
Sodium nitrite (NaNO ₂)	FEC-43	5,800 (± 200) mg/l
	FEC-70	5,700 (± 350) mg/l
	FEC-83	5,700 (± 150) mg/l
Polymyxin B (Pm)	FEC-43	0.4 (± 0.03) units/ml
	FEC-70	0.4 (± 0.04) units/ml
	FEC-83	0.6 (± 0.04) units/ml
Erythromycin (Em)	FEC-43	285 (± 15) µg/ml
	FEC-70	238 (± 19) µg/ml
	FEC-83	285 (± 24) µg/ml
Streptomycin (Sm)	FEC-43	19.1 (± 2) units/ml
	FEC-70	21.4 (± 5) units/ml
	FEC-83	21.4 (± 3) units/ml
Ampicillin (Ap)	FEC-43	2.0 (± 0.3) µg/ml
	FEC-70	3.0 (± 0.4) µg/ml
	FEC-83	2.0 (± 0.2) µg/ml

Abbreviations of growth inhibitory substances were also used in Fig. 1.
The values are the means of three results ± the standard deviations.

VT1型とVT2型の放出量を示した。5菌株 (FEC-07, -42, -43, -83, -87) にはVT1型とVT2型の両者が存在したが、あとの2菌株 (FEC-70, -86) はVT2型のみでの産生・放出であった。以下、FEC-43, -70, -83の3菌株を選択し実験を行った。

Table1に示したとおり、LB液体培地 (pH 6.8) における37℃でのNaCl, NaNO₂および各種抗生物質に対する上記の大腸菌O157:H7の最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。3菌株についてはほぼ似たようなMICであった。

LB液体培地 (pH 6.8) にMICに基づいてNaCl, NaNO₂あるいは各種抗生物質をそれぞれ添加し、37℃・30分間での大腸菌O157:H7 (湿重量約60mg) からの各VT放出量をFig. 2に示した。NaClあるいは抗生物質で処理した場合、VT1型とVT2型とも著しく放出量が増加した。臨床的な抗生剤の投与において、腸管内で大腸菌O157:H7が死滅する際に菌体内のVTが大量に放出されるために溶血性尿毒症症候群 (HUS) の発症頻度を上昇させるという推察がある。このVT増加の現象は、大腸菌O157:H7感染症の治療に抗生物質が必ずしも有効でないとする見解を裏付けるものである²⁾ が、1996年の関

西地区での抗生剤投与群と非投与群間でのHUS発症頻度が、投与群で15.5%、非投与群では16.7%と有意な差がなかった³⁾ という報告もある。

NaNO₂を添加して大腸菌O157:H7を死滅させた場合は、VT1型とVT2型とも放出量の増加はまったくみられなかった。これは抗菌効果が短時間で進むこと、およびその死滅に関してほとんど溶菌させていないことに起因するものと推察される。NaNO₂の抗菌メカニズムを明らかにするために、NaNO₂あるいはNOC5 (NO供与体) で処理した菌体のEPRスペクトルを77Kで測定した。未処理の菌体にみられるg=1.94シグナル (Fig. 3-A) は、NaNO₂で処理することによって消失し、g=2.035と2.010に新たなシグナルが出現した (Fig. 3-B)。前者のg=1.94シグナルは鉄-硫黄タンパク質に特有のEPRシグナルであり、後者のg=2.035と2.010はジニトロシルジチオラト鉄錯体 (DNIC)⁴⁾ に起因するものである。NaNO₂とL-アスコルビン酸ナトリウムを同時に加えるとDNIC由来のEPRシグナル強度は増大した (Fig. 3-C)。NaNO₂はL-アスコルビン酸ナトリウムで還元されるとNOを生成することが知られている。次に、NaNO₂は添加せず、NO供与体であるNOC5をのみ

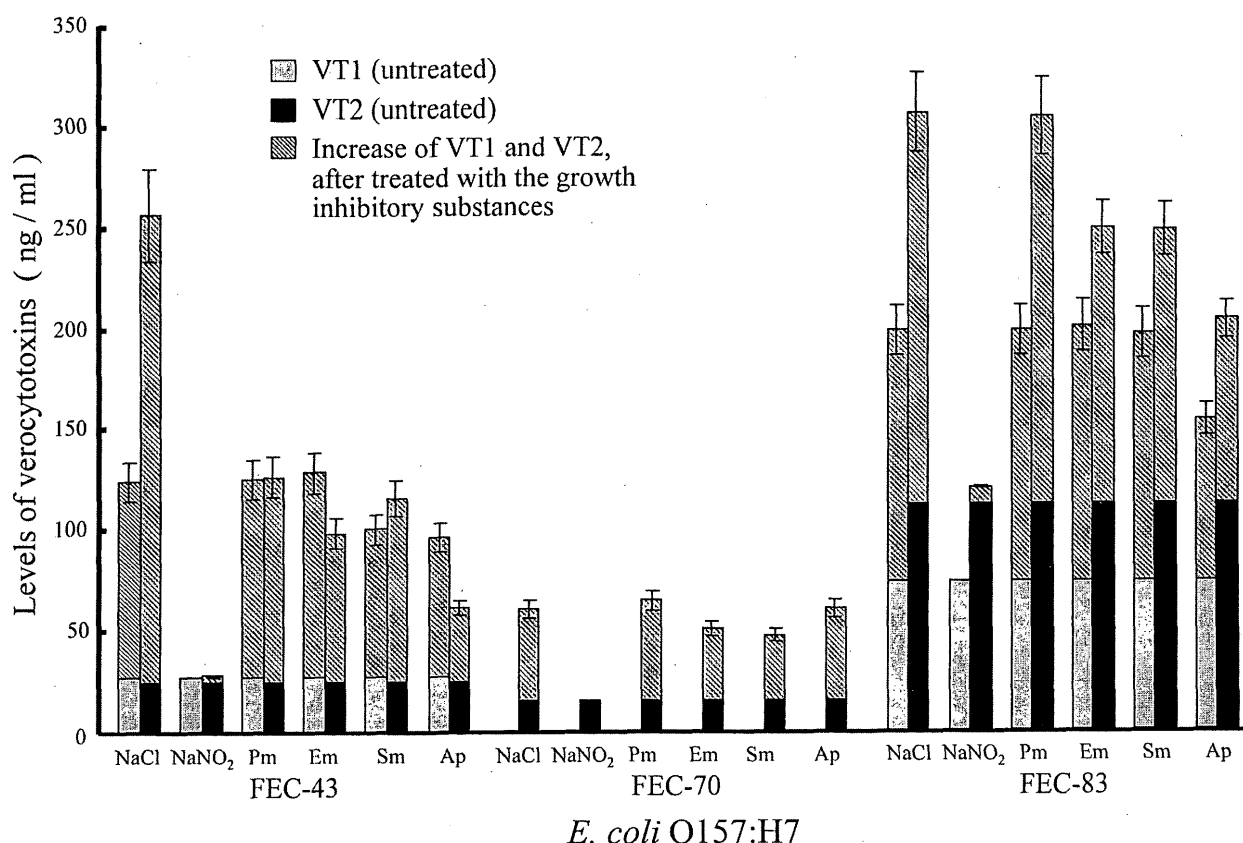


Fig. 2 Quantities of verotoxins (VT1 and VT2) released from *E. coli* O157:H7. The cells (wet weight, ca. 60 mg) were suspended in a fresh LB broth and incubated for 30 minutes at 37 °C. On the other hand, the cells (wet weight, ca. 60 mg) were suspended in a fresh LB broth, to which NaNO₂, NaCl or one of several antibiotics was added at their respective MIC and incubated for 30 min at 37 °C. The values are the means of four determinations (the error bars show confidence limits; P < 0.1). Refer to Table 1 for abbreviations.

を大腸菌 O157:H7 菌体懸濁液に加えた場合も同様に $g=2.035$ と 2.010 のシグナル強度の増大がみられた (Fig. 3-D)。NOC5 の添加により大腸菌 O157:H7 の生育が抑制されることが示された。すなわち、DNIC のシグナルと抗菌性の両者は NO に由来することが認められた。DNIC は、*Clostridium* 属細菌のエネルギー産生系において電子伝達系を構成している鉄・硫黄タンパク質と NO との反応によって生成されると報告されている⁴⁾。本研究結果から、大腸菌 O157:H7 においても菌体由来の還元性物質による NaNO₂ の還元によって生成された NO が、鉄・硫黄タンパク質の機能を阻害することにより本菌が死滅したものと考えられる。

NaNO₂ が、*in vitro* において発癌性物質であるニトロソアミンを生成すること、および草食動物でみられるように植物から大量接種した硝酸由来の NaNO₂ がメトヘモグロビン血症を惹起することは無視でき

ない問題ではある。しかし、残存量に注意を払うという条件付ではあるが、米国で出された Board of Scientific Councilor's Technical Report では、ラットとマウスを用いた動物実験の結果から、NaNO₂ の安全性には問題がないという結論が出されている⁵⁾。正常な食肉は一般に pH 5.5 ~ 5.8 付近で、日本の食品衛生法では最終的な食肉製品の状態で残存亜硝酸根 (NO₂) 量として 70 mg/kg 以下に規制している。そこで、NaNO₂ などの発色剤を添加した食肉製品では大腸菌 O157:H7 感染症の事故が発生していない疫学調査を裏付けるために、LB 液体培地において、pH と NaNO₂ 濃度に培養温度の条件を加えて本菌の生育に及ぼす影響を検討した。

その結果、Table 2 に示したとおり、pH 5.5 で NaNO₂ 濃度 70 ppm、培養温度が 15 °C 以下であれば大腸菌 O157:H7 の生育は完全に抑制された。このことは、規制値以下の NaNO₂ で処理され、低温下に

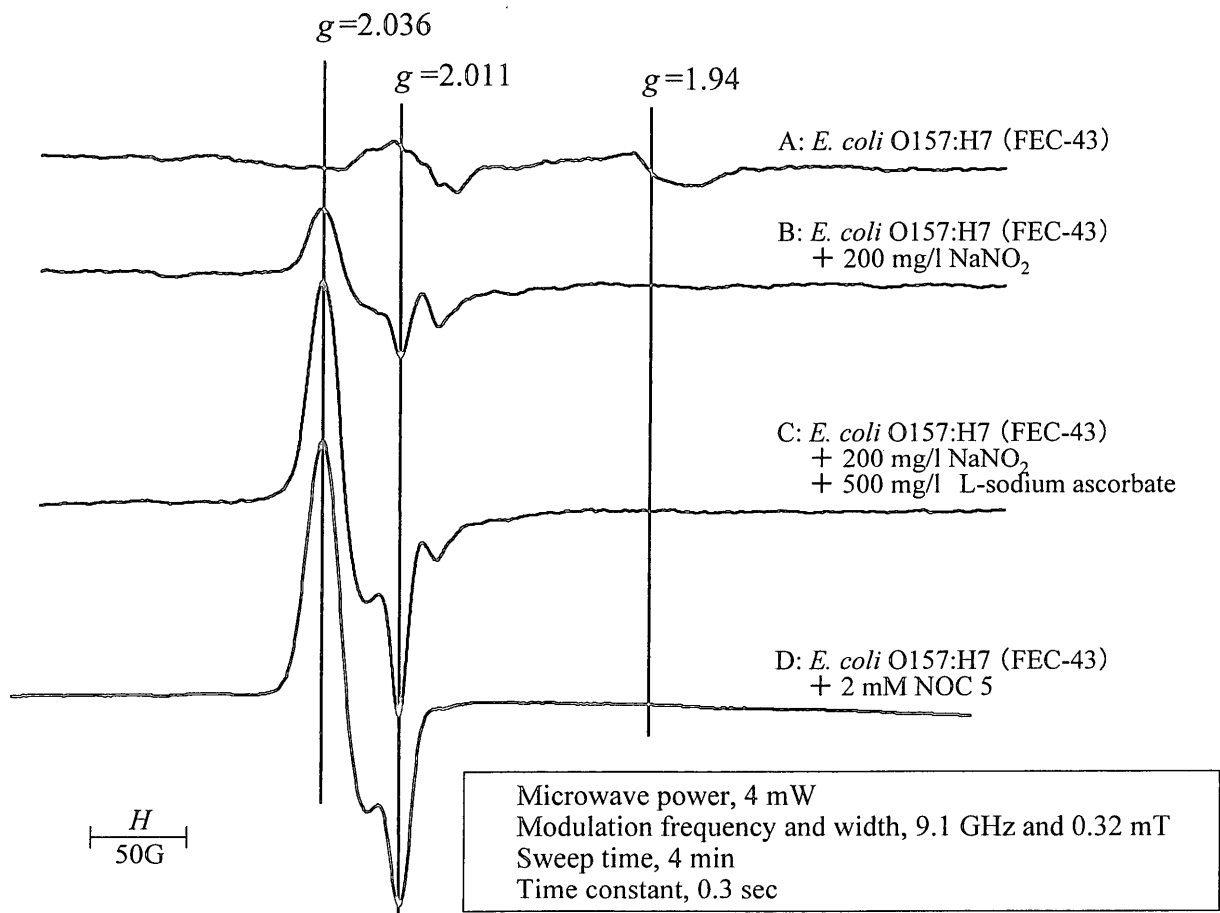


Fig. 3 EPR spectra of cell suspensions of *E. coli* O157: H7 (wet weight, ca. 60 mg) at 77K. A: untreated; B: treated with NaNO_2 (200 mg/L) ; C: treated with both NaNO_2 (200 mg/L) and sodium ascorbate (500 mg/L), D: treated with 2 mM NOC 5, 3-[2-hydroxy-1- (1-methyl) -2-nitrosohydrazinol-1-propanamine], as an NO donor.

Table 2 Effects of NaNO_2 concentration and incubation temperature on the growth of *E. coli* O157: H7 strains after 3-day incubation in LB broth at pH5.5

Incubation Temperature (°C)	NaNO_2 (mg/l)	<i>E. coli</i> O157: H7		
		FEC-43	FEC-70	FEC-83
37	0.0	++	++	++
	103.5	++	++	++
	295.7	++	++	++
20	0.0	++	++	++
	103.5	++	++	++
	295.7	+	+	±
15	0.0	+	+	+
	103.5	—	—	—
	295.7	—	—	—

++ full growth ($\text{OD}_{660} > 1.0$)
± slight growth ($\text{OD}_{660} < 0.3$)

+ weak growth ($\text{OD}_{660} = 0.3 \sim 1.0$)
— no growth

保存された食肉製品においては、 NaNO_2 が効果的に大腸菌 O157 : H7 の生育を抑制することを示唆している。すなわち、本研究の結果は、多くの偶蹄類の

腸管内には大腸菌 O157 : H7 を保有するので原料肉が本菌に汚染される確率が高いにもかかわらず、発色剤を添加した食肉製品では大腸菌 O157 : H7 感染

症の事故が発生していない事実を裏付けるものである。

要 約

亜硝酸ナトリウム (NaNO₂)、塩化ナトリウム (NaCl) あるいは数種類の抗生物質で処理したベロトキシン産生大腸菌 (VTEC) O157:H7 の3株から、ベロトキシン (VT) 1型と2型の放出量を定量した。VTEC O157:H7 のうち、2株がVT1型とVT2型の両者を産出し、1株がVT2型のみ産出した。VTEC O157:H7 を NaNO₂ (最少発育阻止濃度である 6,000 mg/L) で処理したがVT1型およびVT2型の放出量は増加しなかった。NaNO₂ 由来の一酸化窒素 (NO) の抗菌メカニズムを明らかにするために、NaNO₂ で処理した VTEC O157:H7 の細胞を 77K で電子常磁性共鳴吸収 (EPR) 法に供した。その結果、g 値 2.035 と 2.010 の EPR シグナルを検出し、細胞内に鉄硫黄タンパク質と NO が反応して形成されたジニトロシル鉄硫黄錯体が存在した。また ATP の合成も阻害されていた。このことから、NaNO₂ 由来の NO は細胞内に入り、呼吸鎖に関与する酵素を不活化したものと考えられた。

文 献

1) Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Herbert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A. and Cohen, M. L. (1983) Hemorrhagic colitis associated

with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med., 308: 681-685.

- 2) Yoh, M. and Honda, T. (1997) The stimulating effect of fosfomycin, an antibiotic in common use in Japan, on the production/release of verotoxin-1 from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 *in vitro*. Epidemiol. Infect., 119: 101-103.
- 3) 本田武司 (2000) 第IV章 新興感染症, 再興感染症 腸管出血性大腸菌 (O-157: H7), 感染症, 一山 智・丸山征郎 編集, p.203-210, (株)メディカルレビュー社(東京)。
- 4) Reddy, D., Lancaster, J. R. Jr. and Cornforth, D. P. (1983) Nitrite inhibition of *Clostridium botulinum*: Electron spin resonance detection of iron-nitric oxide complexes. Science, 221: 769-770.
- 5) Archer, D. L. (2001) Nitrite and the impact of advisory groups. Food Technol., 55: 26.

この申請内容に関する投稿論文

- 1) 森田英利・吉川 宏・加藤行男・久松 伸・坂田亮一・福岡秀雄・吉村哲彦, 腸管出血性大腸菌 O157 に対する亜硝酸ナトリウム由来一酸化窒素 (NO) の抗菌メカニズムとベロトキシン放出抑制について, 磁気共鳴と医学, 13: 96-100, 2002.
- 2) Morita, H., Yoshikawa, H., Suzuki, T., Hisamatsu, S., Kato, Y., Sakata, R., Nagata, Y., and Yoshimura, T., Anti-microbial mechanism and ATP produce-inhibition for verotoxigenic *Escherichia coli* O157: H7 by nitric oxide (NO) derived from sodium nitrite, Biosci. Biotechnol. Biochem. (レフリーとのやり取りを2回目).