

腸炎ビブリオの病態解明とそれに基づく診断・治療法の開発

分担研究者 大阪大学微生物病研究所細菌感染分野教授 本田武司

研究要旨

耐熱性溶血毒（TDH）は腸炎ビブリオの主要な病原因子と考えられているが、その作用機序、特にエンテロトキシン作用については、ほとんど分かっていない。今回、主として電気生理学的手法で解析した結果、TDH の持つエンテロトキシン作用のメカニズム（ Ca^{++} -activated Cl^- channel を介する）が明らかになり、TDH の下痢への関与を確定することができた。また、数種の薬剤が、TDH のエンテロトキシン活性を阻害することが分かったので、新しい治療薬へのリードになるかも知れない。一方、疫学的解析から、世界的流行を起こした菌株は例外なく ORF8(機能不明)を持つ線状ファージの感染を受けていることから、ORF8 が病原性(流行性)に関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

腸炎ビブリオによる発症病態の理解に基づいた腸炎ビブリオ感染症の新しい治療法と診断法の開発に寄与する基礎的解析を行う事。

B. 研究方法

- 1) 腸炎ビブリオの産生する耐熱性溶血毒（TDH）を単離し、推定されてきた TDH のエンテロトキシン作用を Ussing-chamber 法を用いて電気生理学的に解析した。標的細胞としてはヒト大腸がん由来の Caco-2 細胞を用い、ブチル酸処理で十分分化させた細胞を用いた。主として、Isc(short-circuit current)を指標として記録した。なお、様々な薬品を用い、TDH の作用が阻害されるか否かを薬理学的にも解析した。
- 2) 主として、関西空港検疫所で旅行者下痢症から分離された腸炎ビブリオの血清型別を行ない、O3K6 を持つ菌株を中心に、

プラスミド解析やパルスフィールド電気泳動法で、異同を解析し、更に、これらの菌株の特徴を主として、分子遺伝学的に詳細に検討した。

なお、これらの研究を行う上でヒト分離株を用いたが、倫理面を配慮し、これらの分離された公的機関から個人の特定できない状態で分与されたものである。

C. 研究結果

- 1) 腸炎ビブリオの主要な病原因子と考えられている耐熱性溶血毒（TDH/TRH）の腸管毒性の発現機構を主として電気生理学的、薬理学的に解析した。その結果、TDH/TRH が腸管上皮細胞に作用すると、TDH は Caco-2 細胞に作用して、Isc を上昇させ、この上昇作用は DIDS(4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid)で、正常化した。また、TDH を Caco-2 細胞に作用させると、細胞内の Ca^{++} 濃

度が上昇し、この上昇は Protein kinase C 阻害剤(staurosporine など)で阻害された。これらの結果から、TDH が腸管上皮細胞に作用すると、①Protein kinase C の活性化、② Ca^{++} の細胞内流入、③ Ca^{++} -activated Cl^- チャンネルを通じて Cl^- (および水) の流失が起こり、下痢を引き起こす事が明らかになった。また、これらの成績から、これらの各ステップの阻害剤 (Monodansylcadaverine, Staurosporine, DIDS など) は、腸炎ビブリオによる下痢の制御薬のシーズとなる可能性も示唆できた。なお、Caco-2 細胞のような腸管上皮細胞の TDH 感受性は、Caco-2 細胞の分化が進むほうが感受性を増すことが分かった。

2) 現在世界的に流行中の腸炎ビブリオは O3K6 血清型の菌であると言われている。近年はこれに加え、O4K68 が流行しだしている。この 2 つの血清型菌株のパルスフィールド電気泳動パターンは極めて類似している(区別がつかない)ので、同一のクローン由来である可能性が高い。さらに、これらの株は例外なく f237 と名付けた線状ファージ (コレラ菌にコレラ毒素遺伝子 *ctx* を運んだと考えられる CTXφ に類似したファージ) に感染していた。このファージは *ctx* を持たない代わりに機能未知の ORF8 をコードする遺伝子を有していた。

D. 考察

本研究で、これまで推定の域が出なかった TDH のエンテロトキシンとしての作用が明らかになった知見は特筆されよう。TDH は、コレラ毒素と同様 Cl^- イオンチャンネルを利用して下痢を引き起こすと言う点では似ているが、TDH は Ca^{++} 濃度に依存する、コレラ毒素は cAMP に依存する Cl^- イオンチャンネルをそれぞれ利用

する点は異なる。また、この結論を出すに至る過程で得た薬理的解析結果から、腸炎ビブリオの下痢に有効である可能性がある薬剤が数種見つかり、今後類似薬を探す事で、ヒトに使える新しい治療薬が開発できるかもしれない。

一方、近年の腸炎ビブリオの世界的な流行の疫学は、同一 (または酷似する) クローンの流行と言う点で、興味深い。特にこれらの菌株は、機能不明な ORF8 を持つことが明らかになり、ORF8 が世界的流行に関与している可能性がある。何らかの病原性と ORF8 が関係している可能性があるが、今後の検討を待たねばならない。

E. 結論

TDH の持つエンテロトキシン活性のメカニズムが解明でき、TDH の下痢への関与が確定できた。また、数種の薬剤が、TDH のエンテロトキシン活性を阻害したので、新しい治療薬開発につながるかも知れない。また、疫学解析から、世界流行を起こした菌株はほぼ例外なく ORF8 を持つ線状ファージの感染を受けており、ORF8 が病原性 (流行性?) に関与している可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

我が国で半世紀前に発見された腸炎ビブリオは、近年アジアはもとより米国でも集団食中毒の原因として分離されており、今や世界的な流行の兆しがある。しかも、同一のクローンの流行と言うかつて無かった流行がみられ、今後注意深く、観察して行く必要がある。また、大流行に備え、理に叶った治療法の開発の努力も続けなければならない。

G. 研究発表

1. Takahashi A, Y.Sato, Y.Shiomi, V.Cantarelli, T.Iida, M.Lee and T. Honda: Mechanisms of chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* in human colonic tissue and a human intestinal epithelial cell line. **J.Med.Microbiol.** 49:1-10, 2001
2. Hayashi T, K.Makino, M.Ohnishi, K.Kurokawa, K.Ishii, K.Yokoyama, C.G.Han, E.Ohtsubo, K.Nakayama, T.Murata, M.Tanaka, T.Tobe, T.Iida, H.Takami, T.Honda, C.Sasakawa, N.Ogasawara, T.Yasunaga, S.Kuhara, T.Shiba, M.Hattori and H.Shinagawa: Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. **DNA Reseach.** 8:11-22, 2001
3. Hayashi T, K.Makino, M.Ohnishi, K.Kurokawa, K.Ishii, K.Yokoyama, C.G.Han, E.Ohtsubo, K.Nakayama, T.Murata, M.Tanaka, T.Tobe, T.Iida, H.Takami, T.Honda, C.Sasakawa, N.Ogasawara, T.Yasunaga, S.Kuhara, T.Shiba, M.Hattori and H.Shinagawa: Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. **DNA Reseach.** 8 Supplement 47-52, 2001
4. Naim R, I.Yanagihara, T.Iida and T.Honda: *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin can induce an apoptotic cell death in Rat-1 cells from inside and outside of the cells. **FEMS. Microbiol.Lett.** 195:237-244, 2001
5. Iida T., A. Hattori, K. K. Tagomori, H. Nasu, R. Naim and T. Honda: Filamentous phage associated with recent pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus*. **Emerging Infectious Diseases** 7: 477-478, 2001
6. Iijima Y., M. Karama, J.O. Oundo and T. Honda: Prevention of bacterial diarrhea by pasteurization of drinking water in Kenya. **Microbiol. Immunol.** 45: 413-416, 2001
7. Naim R., T. Iida, A. Takahashi and T. Honda: Monodansylcadaverine inhibits cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin on cultured rat embryonic fibroblast cells. **FEMS Microbil. Lett.** 196: 99-105, 2001
8. Takahashi A., T. Iida, R. Naim, Y. Nakakaya and T. Honda: Chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* depends on colonic cell maturation. **J.Med. Microbiol** 50: 870-878, 2001
9. Taniguchi T., Y. Akeda, A. Haba, Y. Yasuda, K. Yamamoto, T. Honda and K. Tochikubo: Gene cluster for assembly of pilus colonization factor antigen III of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 69: 5864-5873, 2001
10. Murata T., T. Iida, Y. Shiomi, K. Tagomori, Y. Akeda, I. Yanagihara, S. Mushiake, F. Ishiguro and T. Honda: A Large outbreak of foodborne infection attributed to *Providencia alcalifaciens*. **J. Infect. Dis.** 184: 1050-1055, 2001
11. Vlademir V. C, A. Takahashi, I. Yanagihara, Y. Akeda, K. Imura, T. Kodama, G. Kono, Y. Sato and T. Honda: Talin, a host cell protein, interacts directly with the translocated intimin receptor, Tir,

of enteropathogenic *Escherichia coli*, and is essential for pedestal formation.

Cellular Microbiology 3:1-8, 2001

12. Miyagi K., Y. Takegaki, T. Nakano, Y. Nakano, T. Honda and K. Sano ; Frequency of failure to isolate *Shigella* spp. by the direct plating technique and improvement of isolation by enrichment in selenite broth. **Epidemiol. Infect.** 127: 375-379, 2001
13. 本田武司（分担）：細菌感染症をめぐって---現状と展望、感染症研究の今。（本田武司、生田和良、堀井俊宏 編）、大阪大学出版会、2001年
14. 本田武司（分担）：概説Ⅱ細菌毒素の構造と作用。細菌毒素ハンドブック（櫻井 純、本田武司、小熊恵二 編）、サイエンスフォーラム、2001年

腸炎ビブリオの分子疫学

分担研究者 国立感染症研究所細菌部研究員 荒川英二

研究要旨

1993 年頃から急増した腸炎ビブリオによる食中毒は、1998 年をピークにして 2001 年にかけては減少傾向が見られた。しかし、集団事例での O3:K6 に代表される新型クローンの減少率はそれほどでもなかった。すなわち、全体に占める新型クローンの割合が増加していることになる。新型クローンによる汚染実態を知るためにパルスフィールド電気泳動 (PFGE) 法を用い、菌のゲノム全体を対象とした解析を行った。国内での分離例や海外からの同定依頼株について解析を行ったところ、いずれも新型クローンのパターンを示しており、海外のみならず、国内でも新型クローンが広がっていることが改めて示された。

A. 研究目的

食中毒の原因究明には、まず原因病原体の同定、性状の解析が必要である。また、同定された病原体の特徴により疫学的解析を行うことは、集団事例や昨今問題となっている一見各地域での散発事例に見られる同時多発的発生事例において、それぞれの差異を検討することによって根源を推定するためにも重要である。腸炎ビブリオによる食中毒においても、これまで生化学的性状や血清型別、毒素産生性などによって違いを識別してきたが、近年遺伝学的解析手法が開発され、様々な方法が応用されてきている。

細菌の遺伝学的解析手法としては、これまで主に病原因子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションや rRNA をプローブとしたリボタイピングによって行われていたが、PCR を応用した Arbitrary primed PCR (AP-PCR) 法や、腸管出血性大腸菌の疫学解析で威力を発揮した Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

法が開発され、解析能力の向上が見られるようになってきた。

腸炎ビブリオにおいてもこの PFGE 法を活用し、分子疫学解析を行うことは急増している腸炎ビブリオ食中毒の原因解明にも有用であるものと期待される。

B. 研究方法

PFGE 法は染色体 DNA を比較的切断頻度の少ない制限酵素により切断し、生成した巨大 DNA 断片を通常のアガロースゲル中で移動させるために、電場の方向を頻繁に変化させて分離するものである。染色体全体に散らばっている制限酵素認識部位とそれに挟まれた DNA 断片のサイズの変動を検出することから、特定遺伝子だけを指標とした今までの遺伝子解析よりも広範囲の変化をとらえることができる利点を持つ。

染色体 DNA の調製は菌体の処理を低融点アガロースゲル中で行うことにより、DNA 分子の物理的損傷を少なくすること

が可能であるが、溶菌および、それによって遊離した染色体 DNA の制限酵素切断反応を行う場合、反応液の浸透に時間がかかる。電気泳動も泳動方向を常に変化させるために一定方向に泳動する場合よりも長時間を要する。したがって、手順自体は簡素化されているが、結果が出るまでに時間がかかるという欠点を持つ。また、制限酵素の選択は、電気泳動条件の設定とともに、結果として得られるバンドパターンに大きく影響を与える。すなわち、制限酵素に対する切断点が多すぎると、DNA 断片の数が多くなり同じサイズのもものが重なり合い、また電気泳動条件がその切断 DNA 断片のサイズに適していないと、泳動パターンの解析が困難になる。このような条件検討は染色体 GC 含量からある程度の予測はできるが、試行錯誤に頼らざるを得ない。加えて、電気泳動装置がいまだに高価であることも欠点の一つと言えよう。

1. 供試菌株

近年増加傾向にある O3:K6 株を中心に解析を行った。東京都で 1996 年にヒトから分離された株 7 株、1997 年にヒトから分離された株 11 株、仙台市で 2000 年にヒト、食品から分離された株 10 株、韓国で 1999 年に分離された株 43 株、合計 71 株を供試した。

2. PCR

tdh (thermostable direct hemolysin)、trh (tdh-related hemolysin) 遺伝子の検出は PCR により行った。菌の DNA 調製は蒸留水 100ml に菌を懸濁し、煮沸 5 分を行ったものを使用した。

PCR 用 primer は tdh(伊藤ら) 5'-agcttccatctgtccctttt-3'、5'-attaccactaccactctcata-3'、trh(西淵ら) 5'-ggctcaaaatggtaagcg-3'、5'-catttccgctctcatatgc-3'、PCR 反応液は常

法通りの組成で、耐熱酵素は Taq DNA polymerase (Promega)を使用した。

PCR 反応は GeneAmp PCR System 2400(ABI)により、94℃5 分の後、94℃30 秒-55℃1 分-72℃1 分 30 秒を 25 サイクル行った。PCR 後反応液の一部を 1%アガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色により観察した。

3. ウレアーゼ試験

ウレアーゼ試験は常法通り行った。

4. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

寒天培地上の菌をループにて約 1ml とり、蒸留水 200ml に懸濁した。融解した 1%の低融点アガロースを同量加え、Plug mold (Bio-rad)に約 70ml ずつ 2 穴分注して固め、ゲルブロックを作成した。ゲルブロックを 1mg/ml リゾチーム液(0.5M EDTA, pH8)に浸漬し、37℃一晩反応させた。リゾチーム液を捨てて、1mg/ml プロテイナーゼ K、1% N-ラウロイルサルコシン液(0.5M EDTA, pH8)を加え、50℃一晩反応させた。1mM PMSF (10mM TE, pH8)で 50℃1 時間振盪を 2 回行ってゲルブロックを洗浄し、さらに PMSF を除くため 10mM TE, pH8 で 50℃30 分振盪を 2 回行った。制限酵素反作用緩衝液で氷上 30 分 2 回平衡化した後、制限酵素 NotI(37℃)、または SfiI(50℃)で一晩処理し DNA を切断した。

1%PFGE 用アガロース(Bio-rad)のウェルにゲルブロックを埋め込み、CHEF-DR II (Bio-rad)を用い、0.5 X TBE、6V/cm、4-8 秒/9 時間-8-50 秒/11 時間、約 10℃で電気泳動を行った。泳動後エチジウムブロマイド染色により観察した。

C. 研究結果

最近の世界流行とも言える腸炎ピブリオ

血清型 O3:K6 による食中毒は、過去の発生で検出されたものとは異なる遺伝子型であり、国内例、海外例でも区別できないほど同一の PFGE パターンを示していた。

東京都立衛生研究所に保存されていた 1996、1997 年の O3:K6 の分離株は、解析に供した 18 株すべて新クローンと同一の NotI-A タイプであった。このことは神奈川県衛生研究所の分離株での状況と全く同一であり、1996 年頃からの O3:K6 の増加が新クローンによるものであることをさらに支持するものであった¹⁾。

1999 年の韓国での分離株では、供試した 43 株のうち 37 株が O3:K6 であり、その他 O4:K68 が 1 株 O4:KUK が 1 株、O4:K9 が 1 株、O1:K56 が 2 株であった。O3:K6 はすべて新クローンである tdh+、trh-、NotI-A タイプであった。O4:K68 も新クローンを示す tdh+、trh-、NotI-A タイプであり、O3:K6 とは O 血清型も K 血清型も異なっているのに PFGE では同一のパターンを示し、O3:K6 とは極めて近縁である可能性を強く示唆するものであった。その他の O4 株あるいは O1 株は PFGE では全く異なったパターンを示しており、遺伝子レベルでもかなり異なるものであることがわかった。

仙台市の 2000 年の分離例では、患者から分離されたものとその原因食品と考えられるタラバガニから菌が検出された事例においても、喫食残品のアオヤギから菌が検出された事例においても血清型が同一のものは PFGE パターンが完全に一致し、感染源である可能性を強く支持する結果となった(図 4)。また、それぞれの事例では PFGE のパターンとして NotI-A となり、大別では同じタイプに分類されるが、サブタイプまで検討すると、それぞれ別のサブタイプに属するものであった。さらに、そ

れらは 1999 年の事例のパターンともサブタイプのレベルでは異なっており、事例毎の違いを検出することも可能であった(図 4)。

D. 考察

「食中毒統計」(厚生省生活衛生局食品保健課)によれば、1995 年ころから急増した腸炎ビブリオ食中毒の事例数は 1999、2000 年と続けて減少傾向が見られている。この傾向はサルモネラ食中毒の事例数でも同様に認められており、1999 年にはそれまでの急増が頭打ちとなって、2000 年には減少に転じた(図 1)。

腸炎ビブリオ食中毒の発生患者数においても同様で、1985 年以降では、1992、1993 年に次いで少ない発生数であった(図 2)。発生患者数の激減は腸炎ビブリオ食中毒の特徴でもある、散发事例が多いということによる可能性もある。1999 年からは 2 名以上を報告するようになったため、統計上さらに減少が見られたのかもしれない。

感染研発行の病原微生物検出情報に報告された 1994~2000 年の O3:K6、O4:K8 の割合はそれぞれ(1.2%, 46.3%)、(5.5, 17.6)、(31.2, 16.9)、(66.0, 2.1)、(50.6, 3.2)、(53.1, 3.1)、(81.1, 0)と O3:K6 の割合が徐々に増加し、1996 年を境に O4:K8 を逆転し、今日分離されるものの半数以上を占めるようになった(図 3)。10 名以上の集団事例も総数の減少傾向と同様であるが、O3:K6 の減少傾向はそれほど大きくないようである。そのため 2000 年では O3:K6 の発生が腸炎ビブリオ食中毒の大半を占めるようになった(81.1%)。O3:K6 と PFGE パターンでは区別のつかない O4:K68 も総数の減少のため 2000 年の集団発生例では検出されていないが、10 名に満たない事例では検出されており、引き続きその動

向には注意が必要である。

E. 結論

以上のように、食中毒原因菌である腸炎ピブリオの PFGE 解析を行うことによって、近年増加傾向の新型クローンの O3:K6 株が日本国内において急速に広まりつつあることを明らかにした。すなわち腸炎ピブリオ食中毒の疫学解析においても PFGE 型別は非常に有効な手法であることが確認された。また、新型クローンの O3:K6 株と非常によく似た DNA パターンを示す、新しい血清型 O4:K68 株の流行が国内で引き続き起こっていることは、今後これらの血清型菌に対する監視体制も強化していく事が重要であると考えられる。さらに、それとともに新たな血清型菌の発生に対応するため、血清型別および PFGE 等による遺伝子型別などの調査・研究を遂行していくことが必要である。

今回解析に供した菌株を分与いただきました東京都立衛生研究所、仙台市衛生研究所に感謝いたします。

F. 研究発表

1. 学会発表

荒川英二 PFGE 法による食中毒細菌/腸管感染症菌の疫学への応用, 「PCR の基礎と応用」, 工業技術会, 2002

腸管における細菌感染の抑制

分担研究者：土肥多恵子 国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部長

研究要旨

オリゴ糖腸管内投与による細菌感染症の予防・治療法の開発を目指し、ヒト消化管粘膜由来膜画分に対するコレラ菌細菌粘着能阻害効果を持つオリゴ糖をスクリーニングした結果、フコース含有血液型関連精製オリゴ糖により、O139 型コレラ菌の小腸膜画分への接着を阻害することが出来た。

A. 目的

経口投与されたオリゴ糖は、宿主の腸内の細菌叢やその発酵に影響を及ぼして、宿主側の代謝や消化管免疫能も修飾すると考えられ、様々な生物活性が期待されるため、食品添加物としても加えられているが、腸管感染症への効果は確立していない。本研究は感染症予防・治療対策としてのオリゴ糖経腸投与の効果を解析し、最終的には oral rehydration solution や人工乳に加えたときに腸管感染抑制効果のあるオリゴ糖の種類と量を決定することを目標としている。この治療法が確立すれば、軽症患者から重症患者まで応用することができ、かつ、安価で安全な治療法となると期待される。

B. 研究方法

1. ヒト小腸膜画分への種々のレクチン結合
コレラ菌が認識する消化管上皮では、血液型や部位によって、発現している糖鎖が異なると考えられるため、今回は3例の標本についておおまかな糖鎖発現の種類とその個体差をレクチン結合で比較した。ヒト剖検標本より小腸粘膜を採取し、ホモジナイズした後に核分画を遠心分離し、上清をさらに 100,000g 遠心して膜分画を得た。これ ELISA プレートにコーティングして固相化した。これに、ビオチン化した種々のレクチンを加えて ELISA 法によって結合を判定した。

2. ヒト小腸粘膜へのコレラ菌粘着能アッセイシステム

小腸粘膜膜分画を ELISA プレートにコーティングして固相化した。O139 型コレラ菌株 T16 を CFA broth で overnight culture の後 CFA 寒天培地上で 3 時間培養した。小腸膜蛋白固相化したプレートまたは PVDF 膜に、りん酸緩衝液に浮遊させた T16 菌体を加え、37℃で 15 分間 incubate し菌を粘着させた。プレートを 3 回りりん酸緩衝液で洗浄の後、70%エタノールを加え

て菌体を固定した。非特異反応のブロック後、ウサギ抗 O139 コレラ菌抗体、ビオチン化ヤギ抗ウサギ抗体、HRP-ヤギ抗ビオチン抗体を用いて結合した菌体を定量した。蛋白を固相化しないウェルに菌体を定量的に加えてエタノールで固定し、同様の方法で、検量線を作成し、粘着した菌数を定量した。

3. オリゴ糖による結合阻害アッセイ

上記の粘着能アッセイ系で、菌株を種々血液型物質関連構造を持つオリゴ糖と混合して preincubation を 10 分行ったのちに混合液を膜蛋白固相化プレートに加え、粘着した菌数を定量した。

4. 倫理面での配慮

ヒト小腸粘膜は剖検時に病理医により採取され、患者個人への不利益はない。

C. 結果と考察

腸粘膜へのレクチンの結合は図1に示すように GalNAc を認識する HPA、GlcNAc を認識する WGA レクチンが強く結合した。GalNAc と A 型の血液型物質を認識する DBA、フコースを認識する UEA-I、ガラクトースを中心に認識する PNA

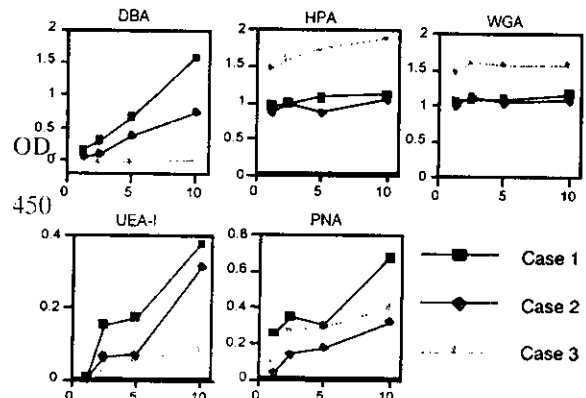


図1. ヒト小腸のレクチン結合活性(横軸はレクチン濃度 (mg/ml))

は3例の間で差が見られた。ヒト小腸においては、コアに GlcNAc を持つ様な糖鎖が多く発現しているが、非還元末端のガラクトース、N アセチルガラクトサミン、フコースの発現に関しては個人差が高いと考えられた。

次に、オリゴ糖 LacNAc (Gal β 1,4 GlcNAc)、Gb3 (Gal α 1,4 Gal β 1,4 Glc)、LEX (Gal β 1,4 [Fuc α 1,3] GlcNAc)、3FL (Gal β 1,4 [Fuc α 1,3] Glc)、2FL (Fuc α 1,2 Gal β 1,4Glc)、FLN (Fuc α 1,2 Gal β 1,4 GlcNAc) をもちいた粘着能阻害活性を3症例で解析し、次のような結果が得られた。

表1. オリゴ糖のコレラ菌粘着阻害活性

	Case1	Case2	Case3
LacNAc	+	+-	-
Gb3	-	-	-
LEX	+-	+	+
3FL	-	+	-
2FL	+	+	+
FLN	+	+	+

このように、ラクトース、ラクトサミンの粘着阻害効果は弱く個人差が見られた。非還元末端に GalNAc 含有糖鎖はコレラ菌の膜面分への接着を促進する傾向がある。このほか、シアル酸含有糖鎖の粘着阻害効果も個人差が大きかった。フコース含有糖鎖のうち FL2 3 症例全例で、濃度依存性の粘着阻害効果を持つことが明かとなった。

D. 考察

ヒト小腸に多く発現している発現している血液型糖鎖と同じ構造のオリゴ糖によって、コレラ菌の粘着が阻害されることがわかった。特にフコース含有糖鎖であるH型血液型糖鎖や LeX 型糖鎖で阻害効果がみられたことは、O139 型コレラ菌が、この構造のヒト糖蛋白・糖脂質糖鎖を認識するレクチン活性を持つことを示唆し、またオリゴ糖経口投与による消化管での感染防御の可能性を示唆している。阻害効果の得られたオリゴ糖濃度は、oral dehydration solution1 リットル中に約 0.1g 加えればよいことになり、オリゴ糖の

安全性などから、投与試験も可能であると考えられる。今後はさらに Type2 糖鎖の繰り返し構造を持つ長鎖オリゴ糖やオリゴ糖混合物の活性についても検討する。また、ヒト消化管上皮細胞株も用いて、粘着阻害効果の生物学的な確認も必要と考えている。

E. 結論

フコース含有糖鎖、特にH型血液型糖鎖が O139 型コレラ菌の粘着阻害に働くことが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Dohi, T., Rennert, P.D., Fujihashi, K., Kiyono, H., Shirai, Y., Kawamura, Y.I., Browning, J.L., McGhee, J.R.: Lymphotoxin- β receptor-immunoglobulin fusion protein inhibits murine colonic patch genesis and Th2-type colitis. *J. Immunol.* 167: 2781-2790, 2001
2. 土肥多恵子: Th1/Th2 型粘膜免疫応答と消化管炎症. *医学のあゆみ.* 199: 75-78, 2001.

学会発表

1. Dohi, T., Rennert, P.D., Fujihashi, K., Kiyono, H., Shirai, Y., Kawamura, Y.I., McGhee, J.R.: Abrogation of lymphotoxin- β receptor signal pathway inhibits colonic patch genesis and Th2-type colitis. Block symposium: Pathogenic mechanism in inflammatory bowel disease. The American Association of Immunologists and Clinical immunology Society Joint Annual Meeting, 2000, May 12, Seattle.
 2. 土肥多恵子, 藤橋浩太郎, 恵谷ゆり, 吉野直人, 白井裕子, 河村由紀, 清野宏, McGhee, J.R.: Adoptive transfer of IL-4 deficient CD4+CD45RBhi T cells to T cell receptor $\beta^{-/-}$ $\alpha\delta^{-/-}$ (TCR $^{-/-}$) mice induced gastritis. 第31回日本免疫学会総会, 2001年12月13日, 大阪
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者 山崎伸二

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
R.K. Mitra, R.K. Nandy, T. Ramamurthy, S.K. Bhattacharya, S. Yamasaki, T. Shimada, Y. Takeda, and G.B. Nair	Molecular characterization of rough variants of <i>Vibrio cholerae</i> isolated from hospitalized diarrhea patients	J. Med. Microbiol.	50	1-9	2001
S. Chakraborty, P. Garg, T. Ramamurthy, J.K. Gautam, C. Sharma, C. Kumar, S. Maiti, S. Yamasaki, T. Shimada, Y. Takeda, A. Ghosh and G.B. Nair	Comparison of antibiogram, virulence genes, ribotypes and DNA fingerprints of <i>Vibrio cholerae</i> of matching serogroups isolated from hospitalized diarrhea cases and from the environment during 1997-98 in Calcutta, India	J. Med. Microbiol.	50	879-888	2001

分担研究者 本田武司

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Takahashi A, Y. Sato, Y. Shiomi, V. Cantarelli, T. Iida, M. Lee and T. Honda	Mechanisms of chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in human colonic tissue and a human intestinal epithelial cell line	J. Med. Microbiol.	49	1-10	2001
Naim R, I. Yanagihara, T. Iida and T. Honda	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> thermostable direct hemolysin can induce an apoptotic cell death in Rat-1 cells from inside and outside	FEMS. Microbiol. Lett	195	237-244	2001
Iida T., A. Hattori, K. K. Tagomori, H. Nasu, R. Naim and T. Honda	Filamentous phage associated with recent pandemic strains of <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Emerging Infectious Diseases	297	123-133	2001
Iijima Y., M. Karama, J.O. Oundo and T. Honda	Prevention of bacterial diarrhea by pasteurization of drinking water in Kenya	Microbiol. Immunol.	45	413-416	2001
Naim R., T. Iida, A. Takahashi and T. Honda	Monodansylcadaverine inhibits cytotoxicity of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> thermostable direct hemolysin on cultured rat embryonic fibroblast cells.	FEMS. Microbiol. Lett.	196	99-105	2001
Takahashi A., T. Iida, R. Naim, Y. Nakakaya and T. Honda	Chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> depends on colonic cell maturation	J. Med. Microbiol.	50	870-878	2001

分担研究者 土肥多恵子

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Dohi, T., Rennert, P.D., Fujihashi, K., Kiyono, H., Shirai, Y., Kawamura, Y.I., Browning, J.L., McGhee, J.R	Lymphotoxin- β receptor-immunoglobulin fusion protein inhibits murine colonic patch genesis and Th2-type colitis	J. Immunol.	167	2781-2790	2001
土肥多恵子	Th1/Th2 型粘膜免疫応答と消化管 炎症	医学のあゆ み	199	75-78	2001