

「新興する細菌性腸管感染症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究」
腸炎ビブリオの病態解明とそれに基く診断・治療法の開発

分担研究者 本田武司 大阪大学微生物病研究所細菌感染分野・教授

研究要旨

米国からの報告を見ると敗血症を含む腸管外感染症からの腸炎ビブリオの分離頻度が30%強に及ぶ。これは、腸炎ビブリオが細胞侵入性を持つ可能性を示唆する。そこで、我が国での分離株についてCaco-2細胞に対する侵入性を調べると、数%の菌株が細胞侵入性を示した。この侵入性は、Cytochalasin Dで阻害され、アクチン重合との関連が示唆された。しかし、サルモネラや赤痢菌の侵入に関与するRho familyのG蛋白の活性化と腸炎ビブリオの細胞内侵入性は異なった挙動を示した。腸炎ビブリオは、サルモネラや赤痢菌とは異なった機構で、細胞内に侵入すると思われる。

A. 研究目的

腸炎ビブリオによる様々な病態を解析することで理解を深め、腸炎ビブリオ感染症に対する新しい治療法と診断法の開発に寄与する基礎的知見を与えること。

B. 研究方法

1) 菌株：18株は患者分離株、3株は環境分離株であり、Marine brothで18時間、37℃で培養した。これを3%食塩加 Marine brothで3時間、37℃で振とう培養した菌を用いた。

2) 侵入性試験：Caco-2細胞を定法に従いマイクロプレートでDMEMで培養し、上に調整した菌の 10^6 を3時間チャレンジし、3回洗浄後、さらにカナマイシン(100ug/ml)を含むDMEM培地で1時間培養した。1回洗浄後、0.1%Triton X-100で細胞を溶解し、LB寒天平板上で菌数を測定した。侵入の定量には、(回収された菌数) / (チャレンジした菌数) でとめた。

3) Dominant-negative Rho, Rac, Cdc42の作成：既報に従いRhoN19, RacN17, Cdc42N17にFLAG遺伝子を組み込んだプラスミドを構築した。これらのプラスミドをCaco-2細胞にLipofectamine Plusを用いて導入した。

4) cytochalasin D, nocodazole, genisteinを、それぞれアクチン重合、微小管、チロシンキナーゼ(PKC)阻害剤として用いた。

C. 研究結果

1) 腸炎ビブリオの細胞侵入性

21株について調べたところ、4株が侵入性を

示した。これらは、いずれも臨床分離株で、環境分離株(3株)には侵入性を示したものはなかった。

2) 侵入性への阻害薬の影響

赤痢菌やサルモネラの細胞内への侵入作用は、細胞骨格や tyrosine protein kinase が関与し、これらの阻害剤で細胞侵入性が阻害される。そこで、cytochalasin D, nocodazole, genisteinの侵入性への影響を調べたところ、いずれの阻害剤でも腸炎ビブリオのCaco-2細胞への侵入性が阻害された。

3) 腸炎ビブリオの細胞侵入性への細胞骨格蛋白の関与が疑われたので、Rho, Rac, Cdc42のsmall GTPase分子の関与をdominant-negative発現系で調べたところ、SalmonellaやShigellaと異なり、細胞侵入性はかえって促進された。逆に、dominant-active Rhoファミリー蛋白を発現させる系では、腸炎ビブリオの細胞侵入性は阻害された。

D. 考察

我が国での腸炎ビブリオの分離情報のほとんどは、下痢便由来であり、敗血症や創傷感染からの分離例はほとんどない。これに対して米国での分離状況を見ると、腸管外病変からの分離率がかなりある。そこで、我が国の下痢便由来の腸炎ビブリオの細胞侵入性をしらべたところ、約20%(4/18)の菌株でCaco-2細胞に対する細胞侵入性を有していた。この細胞侵入性は、細胞骨格蛋白が関与していると考えられるが、サルモネラや赤痢菌の侵入性と異なり、Rho family GTPaseの関与の仕方が異なる。

り、既知の侵入経路とは別の侵入機構を有している可能性が示唆された。腸炎ビブリオの感染部位が日米間で違うのは、侵入能を持つ菌株の自然界での分布の違いによるのかもしれない。また、日本人は早くから腸炎ビブリオに曝され（生菌・無毒菌・死菌）、何らかの基礎免疫があるからかもしれない。

E. 結論

腸炎ビブリオの1部の菌株は、既知の侵入性細菌（サルモネラ、赤痢菌）とは異なる細胞侵入性を持つ。これが、米国で腸管外感染症からの腸炎ビブリオの分離率が高い理由かもしれない。

F. 健康危険情報

我が国でも腸炎ビブリオが腸管外感染を起こす可能性があることを認識する必要がある。

G. 研究発表

1. Akeda Y., T. Kodama, T. Kashimoto, V. Cantarelli, Y. Horiguchi, K. Nagayama, T. Iida and T. Honda : Dominant-negative Rho, Rac, and Cdc42 facilitate the invasion process of *Vibrio parahemolyticus* into Caco-2 Cells. *Infect. Immun.* 70: 970-973, 2002

2. Tagomori K., T. Iida and T. Honda : Comparison of genome structures of vibrios, bacteria possessing two chromosomes. *J. Bacteriology* 184: 4351-4358, 2002
 3. Iida T., K. Makino, H. Nasu, K. Yokoyama, K. Tagomori, A. Hattori, T. Okuno, H. Shinagawa and T. Honda: Filamentous bacteriophages of vibrios are integrated into the dif-Like site of the host chromosome. *J. Bacteriology* 184: 4933-4935, 2002
 4. Makino K., K. Oshima, K. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Uda, K. Tagomori, Y. Iijima, M. Najima, M. Nakano, A. Yamashita, Y. Kubota, S. Kimura, T. Yasunaga, T. Honda, H. Shinagawa, M. Hattori, T. Iida: Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 361: 743-749, 2003
 5. 本田武司（分担）：細菌学 「腸炎ビブリオ」、（竹田美文、林 英夫 編）朝倉書店 p409-418, 2002年
- #### H. 知的財産の出願・登録状況
- なし

研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者 名取泰博

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	Proc Natl Acad Sci USA	99	7669-7674	2002

分担研究者 荒川英二

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Osawa R, Iguchi A, Arakawa E, Watanabe H	Genotyping of pandemic <i>Vibrio parahaemolyticus</i> O3:K6 still open to question	J Clin Microbiol	40(7)	2708-2709	2002

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, Fujihashi, K, Koga, T, Shirai, Y, Kawamura, YI, Ejima, C, Kato, R, Saitoh, K, Mcghee, JR	T Helper Type-2 Cells Induce Ileal Villus Atrophy, Goblet Cell Metaplasia And Wasting Disease In T Cell-Deficient Mice	Gastroenterology		in press	2003
Hashimoto, M, Kirikae, F, Dohi, T, Adachi, S, Kusumoto, S, Suda, Y, Fujita, T, Naoki, H, Kirikae, T	Structural study on lipid A and the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide from a clinical isolate of <i>Bacteroides vulgatus</i> from a patient with Crohn's disease	Eur J Biochem	269	3715-3721	2002

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
Chhotray GP, Pal BB, Khuntia HK, Chowdhury NR, Chakraborty S, Yamasaki S, Ramamurthy T, Takeda Y, Bhattacharya SK, Nair GB	Incidence and molecular analysis of <i>Vibrio cholerae</i> associated with cholera outbreak subsequent to the super cyclone in Orissa, India	Epidemiol. Infect.	128	131-138	2002
Ramamurthy T, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB	<i>Vibrio cholerae</i> O139 Bengal: Odyssey of a fortuitous variant	Microbiol. Infect.		in press	2003

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
Akeda Y, Kodama T, Kashimoto T, Cantarelli V, Horiguchi Y, Nagayama K, Iida T, Honda T	Dominant-negative Rho, Rac, and Cdc42 facilitate the invasion process of <i>Vibrio parahemolyticus</i> into Caco-2 Cells	Infect. Immun.	70	970-973	2002
Tagomori K, Iida T, Honda T	Comparison of genome structures of vibrios, bacteria possessing two chromosomes	J. Bacteriol.	184	4351-4358	2002
Iida T, Makino K, Nasu H, Yokoyama K, Tagomori K, Hattori A, Okuno T, Shinagawa H, Honda T	Filamentous bacteriophages of vibrios are integrated into the dif-Like site of the host chromosome	J. Bacteriol.	184	4933-4935	2002
Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, Iijima Y, Najima M, Nakano M, Yamashita A, Kubota Y, Kimura S, Yasunaga T, Honda T, Shinagawa H, Hattori M, Iida T	Genome sequence of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> : a pathogenic mechanism distinct from that of <i>V. cholerae</i>	Lancet	361	743-749	2003

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版年	ページ
本田武司	腸炎ビブリオ	竹田美文 林英夫	細菌学	朝倉書店	2002	409-418