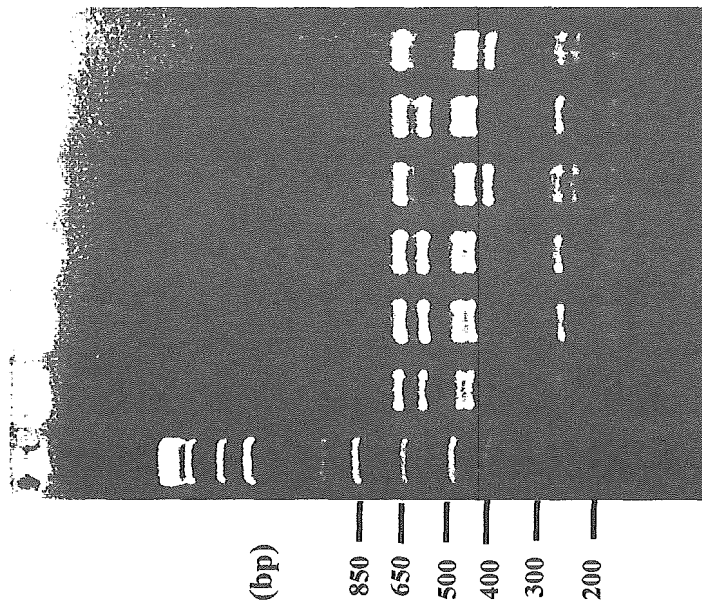


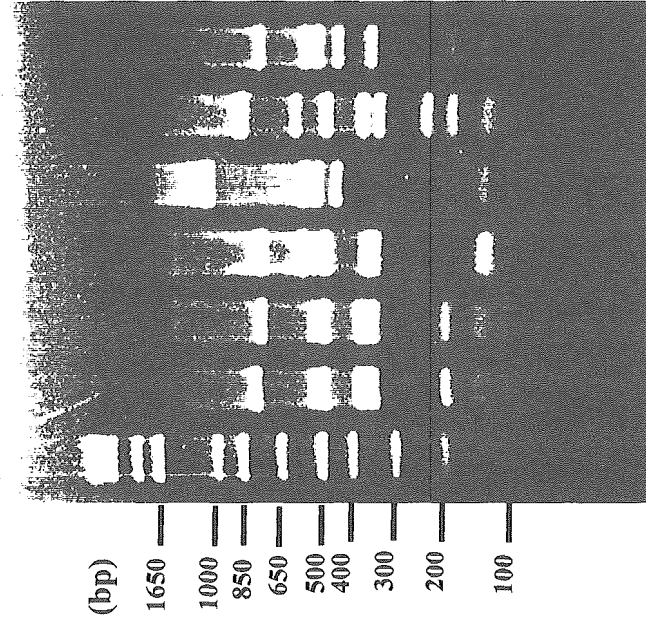
Sau3A I



M 1 2 3 4 5 6

Clinical strains
Environmental strains

Hha I



M 1 2 3 4 5 6

Clinical strains
Environmental strains

図5 *Sid1*プライマーを用いたPCR産物のRFLP解析結果

Mは分子量マーカー (1Kb PLUS DNA LADDER) を示す。

Vibrio vulnificus の病原性と化学療法

分担研究者 山本茂貴 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究協力者 山本達男 新潟大学大学院医歯学総合研究科

国際感染医学講座 細菌学分野

【目的】V. vulnificus は温暖な海水に生息する環境細菌である。しかし、肝硬変患者やアルコール多飲者などが V. vulnificus で汚染された刺身、カキなど(海産魚介類)を喫食すると、あるいは海水などの汚染を伴う創傷感染を受けると、軟部組織の壊死、敗血症、ショックなどを惹起する。肝に基礎疾患をもつリスクグループにとっては V. vulnificus はビブリオ属最強の病原菌で、ヒト喰いバクテリアとも呼ばれているが、主要な病原性因子は依然特定されていない。本研究では、壊死を再現する動物モデル(V. vulnificus footpad model; VVFP)を開発し、V. vulnificus の病原性を検討するとともに、抗菌薬による治療効果を評価した。

【方法】使用した菌株:患者由来株として新潟株を含む 17 株を、環境由来株として 10 株を使用した。マウス感染実験:7 週齢のオスの ICR を用い、足の裏(footpad)に V. vulnificus を皮内注射の要領で接種した。その後、生死を経時的に判定した。病理学的解析:HE 染色所見、TUNEL 染色所見、CPK 値、血中菌数などを求めた。化学療法:V. vulnificus 接種後、3時間～9時間後に抗菌薬を腹腔および経口投与した。

【結果と考察】(1) VVFP 法の開発:ICR マウスの footpad に V. vulnificus (患者株)を接種すると、3時間前後で浮腫が、6時間までに壊死が観察され、12～18 時間目に全匹が死亡した。白血球数の減少、H T 値の上昇、血中 Fe 値の上昇、血中菌数の上昇、CPK 値の上昇が確認され、死亡直前の 12 時間目の肝臓にはアポトーシス誘導が確認された。(2) 患者株と環境株の病原性:VVFP 法で検討した結果、患者株では 12～18 時間目に全匹が死亡したが、環境株で保存株の場合には壊死発生とマウスの死亡は全く観察されなかった。しかしながら、新鮮分離の環境株を使った場合には、患者同様の死亡が観察される例があった。環境株と患者株に病原性に差異がなく、環境保存株はその病原性を脱落させている可能性が考えられるが、さらに多くも新鮮分離株について検討する必要がある。V. vulnificus のカスパーゼ活性化能でも同様の結果が得られた。(3) マウス V. vulnificus 感染症の化学療法:ミノサイクリンの場合には、壊死発症後の 7 時間目投与でも 100%の感染防御が確認され、アポトーシス誘導も抑制した。9 時間目投与でも 25%の感染防御が確認された。他の抗菌薬ではこのような高

い感染防御効果は得られなかった。また、キノロンとの併用はミノサイクリンの治療効果が顕著に減少した。化学療法の改良によって治療の改善が可能である。

【発表】

1. Iwakura N, Kojio S, Taneike I, Nakagawa S, Yamamoto T: Caspase activation by Vibrio vulnificus, 38th US-Japan Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections (Bethesda), 2003
2. 中山照子、岩倉信弘、小塩精一、山本達男: Vibrio vulnificus による caspase-3 の活性化。第40回日本細菌学会中部支部総会、2003年
3. 岩倉信弘、小塩精一、山本達男: Vibrio vulnificus 培養上清中のカスパーゼ活性化。第52回日本感染症学会東日本地方会、2003
4. Iwakura N, Nakayama S, Shibuya M, Yamamoto T: Superior virulence potential of Vibrio vulnificus clinical isolates over environmental isolates as demonstrated in a mouse footpad infection model, 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy [Washington, DC], 2004
5. Iwakura N, Nakagawa S, Nakayama T, Yamamoto T: Fatal infection model in mice for Vibrio vulnificus that distinguishes clinical and environmental isolates, 39th US-Japan Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections (Kyoto), 2004
6. 山本達男、種池郁恵、中川沙織、岩倉信弘: Vibrio vulnificus: 形態と細胞感染メカニズム。第77回日本細菌学会総会、2004
7. 岩倉信弘、小塩精一、中山照子、山本達男: Vibrio vulnificus の病原性の解析(2): 感染動物モデル footpad 法の開発とカスパーゼ活性化。第78回日本感染症学会総会、2004
8. 中山照子、種池郁恵、中川沙織、岩倉信弘、山本達男: Vibrio vulnificus の病原性の解析(1): 感染形態と初期感染様式。第78回日本感染症学会総会、2004
9. 岩倉信弘、渋谷倫子、中山照子、山本達男: Vibrio vulnificus の病原性解析。第53回日本感染症学会 東日本地方会総会、2004
10. 岩倉信弘、中山照子、山本達男: Vibrio vulnificus 臨床分離株と環境由来株の病原性を区別するためのマウスモデルの開発。第41回日本細菌学会中部支部総会、2004

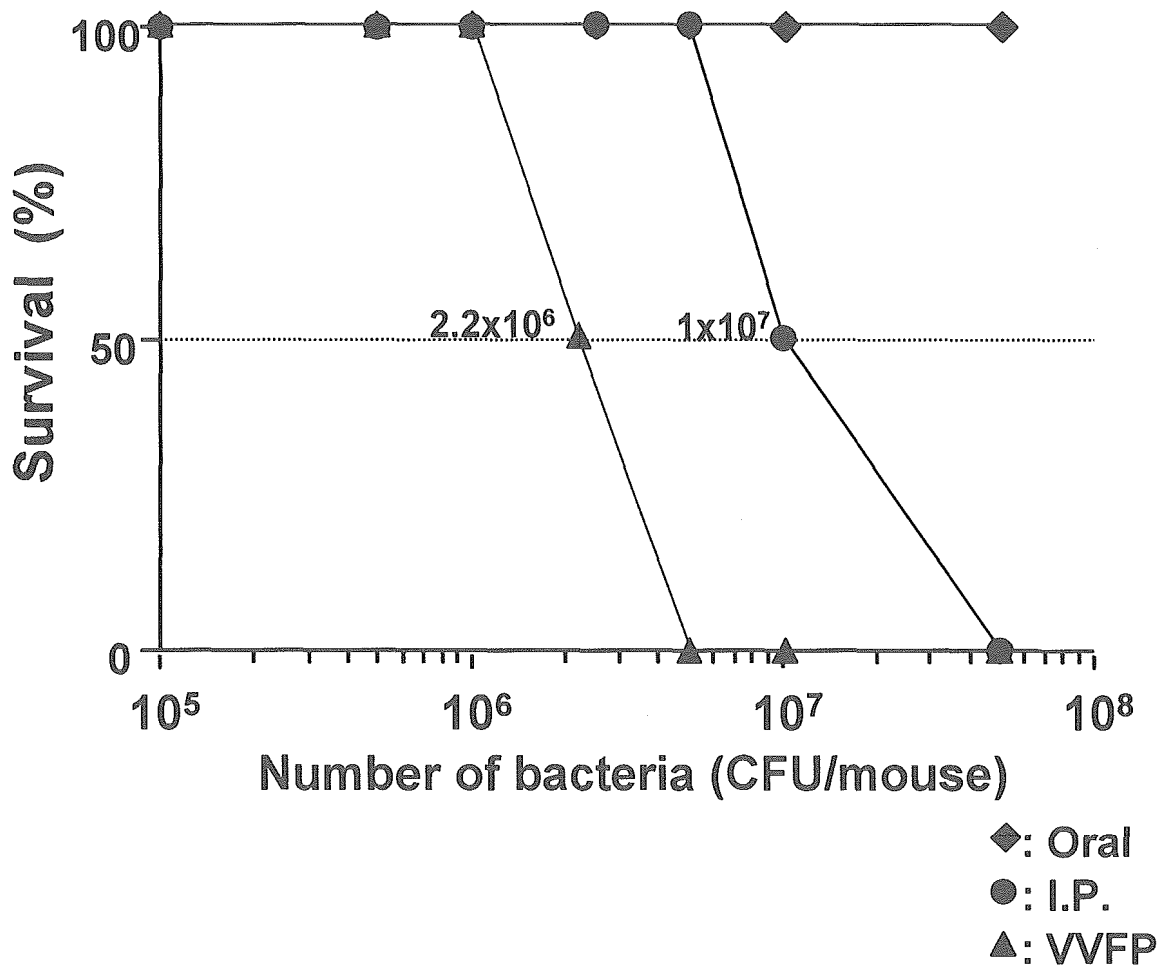


図1 V. vulnificusのマウス感染モデル：感染経路による病原性の違い

経口投与した場合にはマウスの死亡は観察されなかった。死亡は腹腔投与、footpad投与の順に顕著となった。Footpad法でのLD₅₀は2.2 X 10⁶ CFUであった。

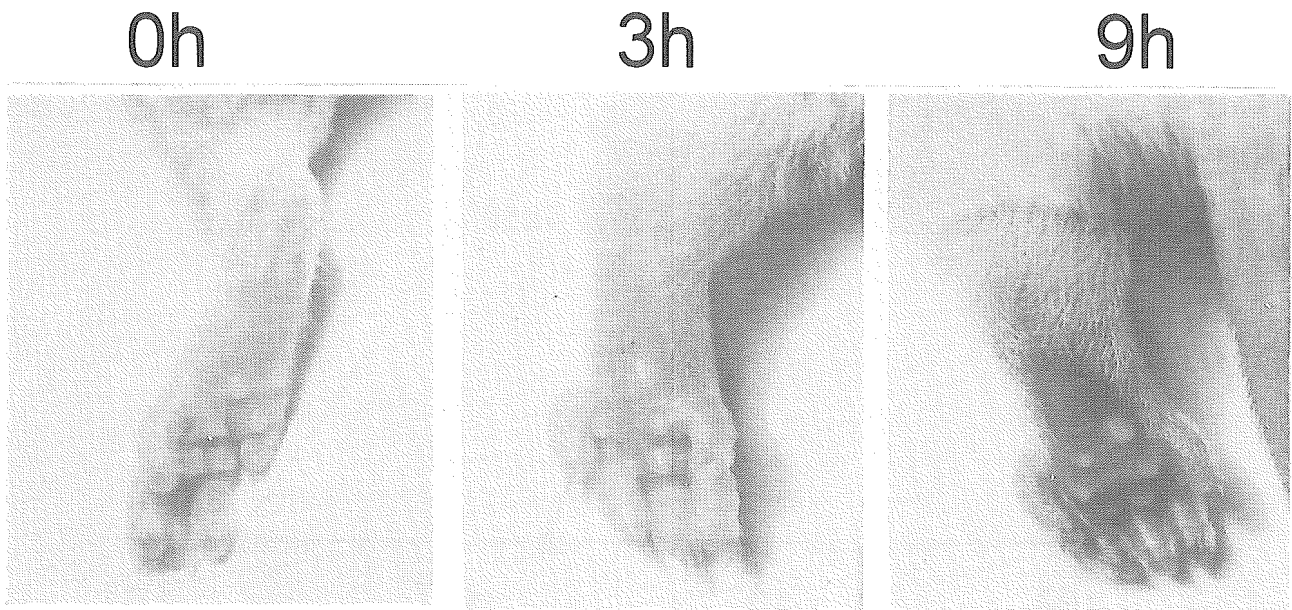


図2 Footpad法による V. vulnificus 感染像

V. vulnificus を footpad に投与後 3 時間すると浮腫が現れ、9 時間後には壊死が出現した。

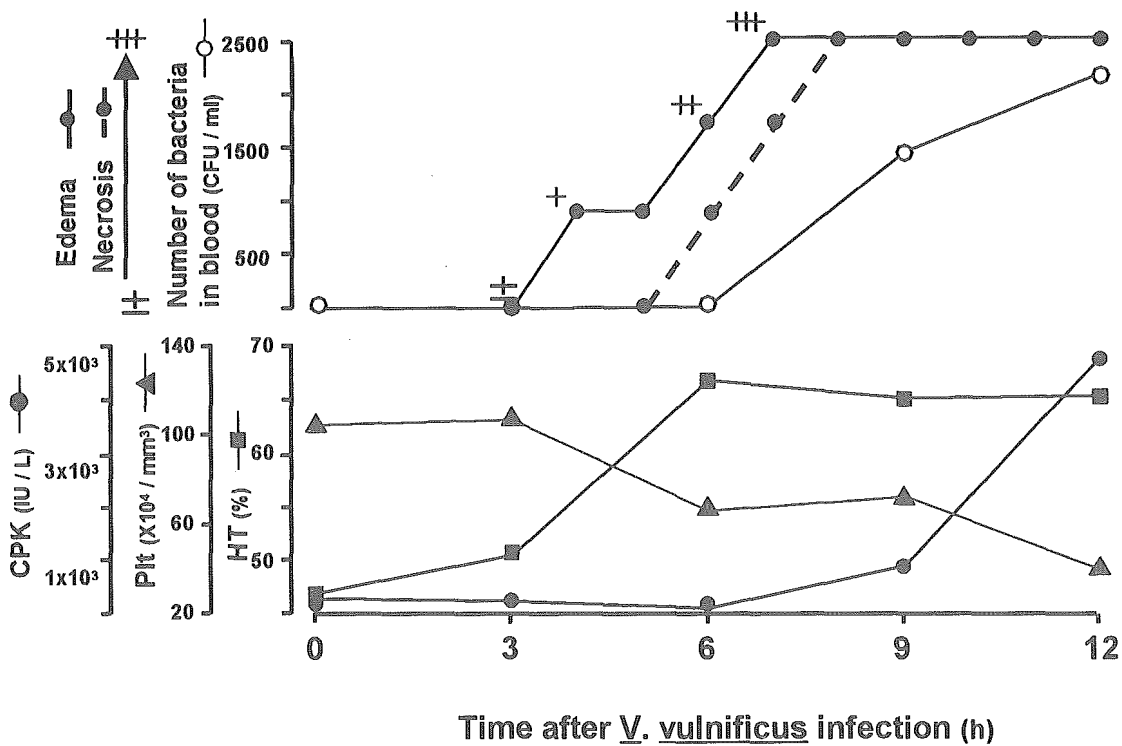


図3 Footpad法による*V. vulnificus*感染での性状変化

浮腫が出現する段階で、ヘマトクリット (HT) 値の上昇、白血球の減少が観察された。壊死の発現後に、血中菌数の増加とCPK値の上昇が観察された。

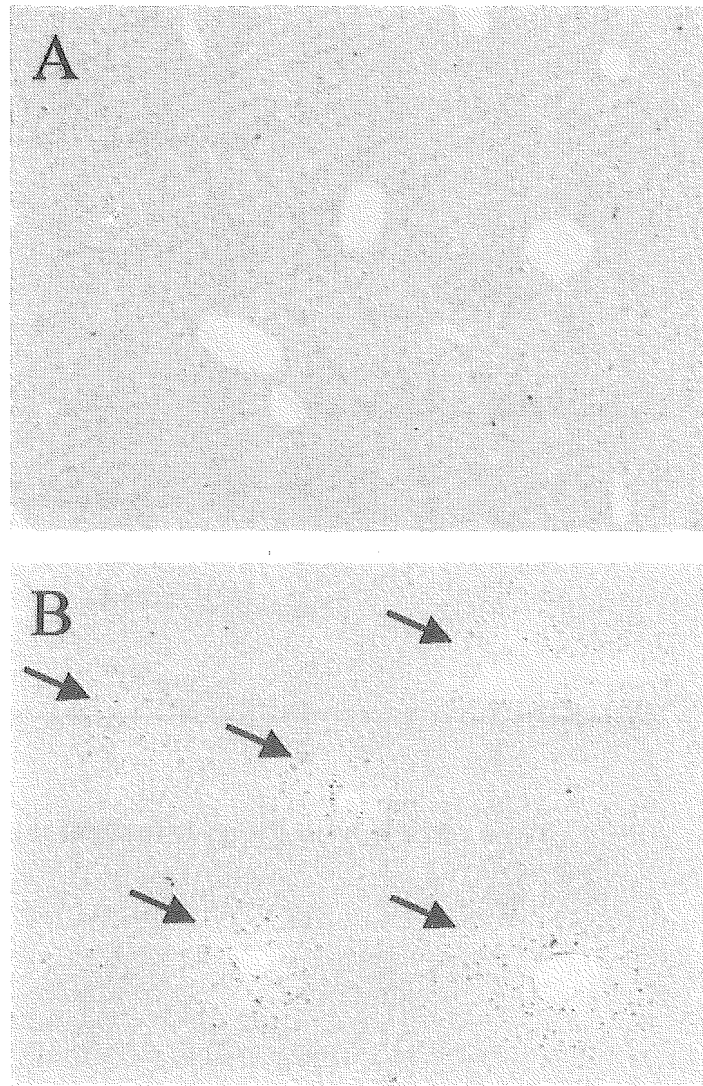


図4 V. vulnificus感染による肝アポトーシスの誘導

感染後9時間になると、タネル染色によって肝臓にアポトーシスが検出された。他の臓器では観察されなかった。

A コントロール

B V. vulnificus感染マウス

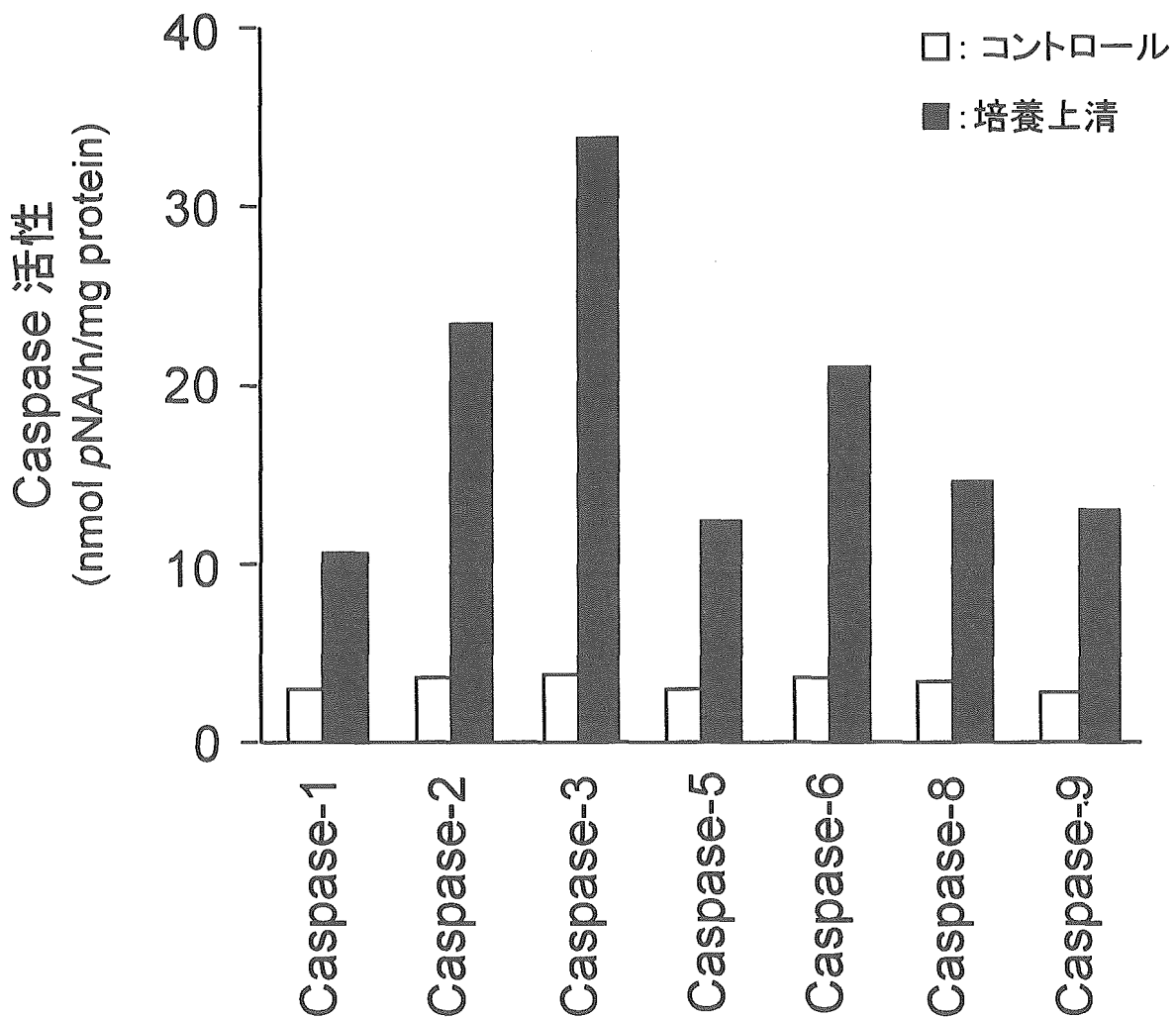


図5 V. vulnificus培養上清によるカスパーゼの活性化

V. vulnificus培養上清中にカスパーゼの活性化因子が存在した。この因子は、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼ3を最も強く活性化した。

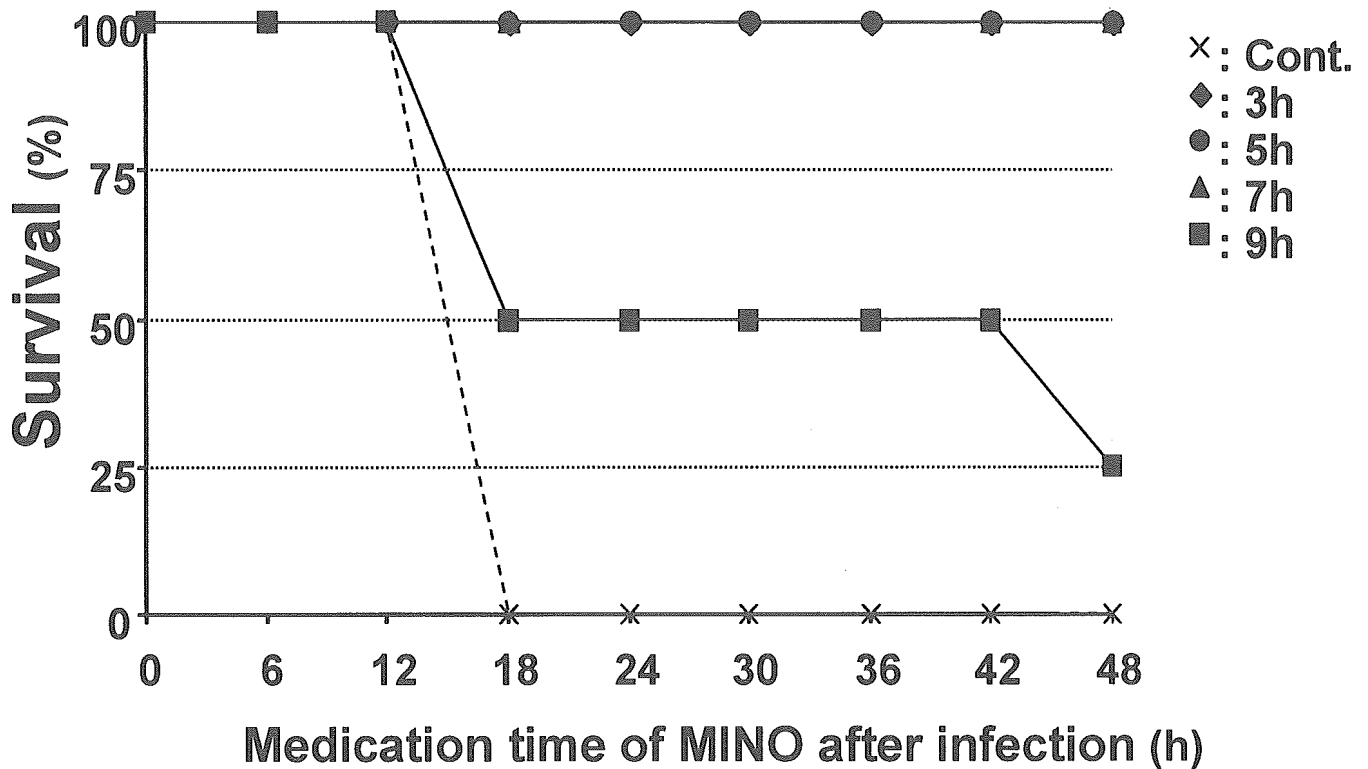


図6 ミノサイクリン投与による *V. vulnificus* 感染の治療

V. vulnificus 投与後にミノサイクリンを投与しなかった場合には、18時間後に全匹が死亡した。一方、浮腫が出現する3時間目にミノサイクリンを投与した場合には、全匹が生存した。浮腫がひどくなる5時間目から7時間目でも同様であった。壊死が出現する9時間目投与では、48時間後でも25%の生存が観察された。