

luxS-相補株を分離した。

5. *H. pylori luxS*変異株 HPKY08 株の細菌学的性状の解析および電子顕微鏡的形態観察

*luxS*変異株の細胞増殖能、胃上皮細胞への付着能、VacA サイトトキシン産生能、運動性について親株 TK1402 株と比較検討した。運動性については軟寒天培地上での遊走性を観察するとともにビデオ観察に基づく菌株の運動速度を測定した。*luxS*変異株および親株の形態については走査型電子顕微鏡観察を行って評価した。

6. スナネズミ胃内定着性と病原性

被験菌株 10^9 CFU をスナネズミに 2 日間連日経口投与した。感染後経時的に屠殺し、胃内菌数の測定および病理組織学的観察を行った。胃内定着菌数の評価は分離培養法および RT-PCR 法により行った。

C. 研究成果

1. *luxS* 変異株の作製とその AI-2 産生性の解析

luxS 変異株 HPKY08 株および野生株の AI-2 産生量を比較した結果、*luxS* 変異株の AI-2 産生量は野生株 TK1402 の 1/100 以下であった (Fig. 1)。この結果から、HPKY08 株では *luxS* 遺伝子の不活化が起こり、AI-2 の産生が行われていないことが明らかとなった。

2. *H. pylori* の *luxS* 遺伝子の *H. pylori* の発現

コントロール (*luxS* 遺伝子を組み込まない *H. pylori* 菌株) に比較して *luxS* 遺伝子を発現させた *H. pylori* 菌株では約 100 倍

の発光が検出された。この結果から、*H. pylori* 1029 株の *luxS* が大腸菌内で発現し LuxS として機能することを明らかとなった。

3. *H. pylori* TK1402 株由来 *luxS* 遺伝子の塩基配列の決定

塩基配列の決定を行った結果、*luxS* のサイズは 465bp であり、アミノ酸 155 残基をコードしていた。得られた配列をゲノムの配列が公開されている *H. pylori* H105 株および J99 株の HP105 および jhp97 と比較したところ、塩基配列ではそれぞれ 96.1% および 96.2%、アミノ酸では 98.0% および 96.8% の相同性を示した。

4. *luxS* 相補株の作製とその性状

既述の方法に基づき、HPKY08 株の *luxS*-complemented 株である HPKY21 株を分離した。Southern blotting の結果より本菌株への *luxS* 遺伝子の挿入が確認された。また、bioluminescence assay により HPKY21 株の AI-2 産生性が確認され、その産生量は親株 TK1402 株よりも多かった (Fig. 1)。

5. *luxS* 変異株 HPKY08 の細菌学的性状

HPKY08 株の対数増殖期における世代時間は 4.0 ± 0.8 hr は野生株 TK1402 のそれ (3.1 ± 0.3 hr) と比べ有意な差は認めなかった。対数増殖期から静止期における細胞数は HPKY08 株および TK1402 株ではそれぞれ $10^{7.05} \pm 10^{0.82}$ および $10^{8.33} \pm 10^{0.68}$ であり、両者に有意な差は認めなかったが、HPKY08 株での増殖は野生株に比べ低下している傾向がみられた。HPKY08 株および TK1402

株の運動性を軟寒天培地での遊走性およびビデオ観察による速度測定により比較した。軟寒天培地における遊走円の直径は HPKY08 株および TK1402 株ではそれぞれ 8.0 ± 1.4 mm および 12.3 ± 2.0 mm であり、HPKY08 株の遊走性は野生株のそれに比べ有意に低下していた (Fig. 2)。一方、*luxS* 相補株 HPKY21 株の遊走性は親株レベルまで復帰していた (Fig. 2)。HPKY08 株および TK1402 株の速度はそれぞれ 6.57 ± 2.62 μ m/sec および 12.02 ± 3.88 μ m/sec であり、有意に HPKY08 株の速度は野生株のそれに比べ低値であった。加えて HPKY08 株の遊走性は 0.5% glucose 存在下で顕著な低下を示したが、野生株のそれは亢進した。HPKY08 株および TK1402 株の VacA サイトトキシン産生性、酸抵抗性および胃上皮細胞への付着性については両者に有意な差は認めなかった。

4. *luxS* 変異株のスナネズミへの感染性および定着性

luxS 変異株 HPKY08 および野生株 TK1402 株のスナネズミへの感染性および定着性を調べた。TK1402 株は感染 1-12 wk において 10^1 - 10^3 cfu/g mucus の菌数が胃粘膜より分離培養されたが、HPKY08 株の分離培養は成功しなかった。リアルタイム RT-PCR 法により本菌の半定量を行った。感染 12 wk での HPKY08 株および TK1402 株の胃内定着菌数はそれぞれ $10^{2.94 \pm 1.18}$ /g mucus および $10^{3.86 \pm 0.43}$ /g mucus であり *luxS* 変異株において有意に低値であった。誘導される胃炎に関しては TK1402 株

感染スナネズミにおいては顕著な炎症所見が検出されたのに対して HPKY08 株感染スナネズミ胃粘膜では軽度の炎症所見が認められたにすぎなかった。また *luxS* 相補株 HPKY21 株感染スナネズミの胃内定着菌数と野生株感染スナネズミの胃内定着菌数に有意な差は認められなかった。

5. *luxS* 変異株の電子顕微鏡による形態観察

luxS 変異株 HPKY08 株および野生株 TK1402 株の形態を電子顕微鏡により観察した結果、いずれの菌株においても単在性の有鞘性鞭毛が観察された (Fig. 3)。

D. 考察

H. pylori の QS が本菌の病原性発現に関連するかどうかを明らかにする目的で *luxS* 変異株 HPKY08 株を作製して、その細菌学的性状およびスナネズミへの感染性・定着性を検討した。HPKY08 株では野生株に比べその増殖性に軽度の低下が認められることが明らかにされた。また、HPKY08 株では運動性の低下が認められ、この現象は glucose 存在下で顕著となることが示された。HPKY08 株感染スナネズミ胃粘膜での定着菌数は野生株感染スナネズミのそれに比べ低値 (リアルタイム RT-PCR によるデータより) であった。この現象は *luxS* 変異株の運動性の低下に基づくものと推察されたが、野生株に比べ増殖性や glucose 利用性などの点で劣っていることも関与している可能性がある。*luxS* 変異株の鞭毛構

造が形態的に野生株のそれと差が認められないことより、*luxS*変異株において鞭毛関連遺伝子の転写制御が障害されていることも想定され、今後の検討課題と考えられる。

E. 結論

本研究の結果、*H. pylori*のQSは菌の運動性や感染動物への定着性に関連することが初めて明らかにされ、QSを制御することは本菌の除菌にも関連することが示唆された。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. Osaki T, Hanawa T, Manzoku T, Fukuda M, Kawakami H, Suzuki H, Yamaguchi H, Yen X, Taguchi H, Kurata S, Kamiya S: Mutation of *luxS* affects motility and infectivity of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of Mongolian gerbil model. *J Med Microbiol* 55 (11):1477-1485, 2006.
2. Kamoda O, Anzai K, Mizoguchi J, Yanagi T, Shioiri M, Nishio T, Kamiya S: *In vitro* antibacterial activity of a novel antimicrobial agent TG44 for treatment of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 50 (9):3062-3069, 2006.
3. Yamanishi S, Iizumi T, Watanabe E, Shimizu M, Kamiya S, Nagata K, Kumagai Y, Fukunaga Y & Takahashi H: Implication of induction of autoimmunity via activation of B-1 cells by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 74 (1): 248-256, 2006.
4. Toyoda A, Osaki T, Yamaguchi H, Hanawa T, Taguchi H, Hasegawa M & Kamiya S: Effect of *Helicobacter pylori* on DNA synthesis of human epithelial cells. *J Infect Chemother* 11 (3): 129-135, 2005.
5. Iizumi T, Yamanishi S, Kumagai Y, Nagata K, Kamiya S, Hirota K, Watanabe E, Sakamoto C & Takahashi H: Augmentation of *Helicobacter pylori* urease activity by its specific IgG antibody: implication for bacterial colonization enhancement. *Biomed Res* 26 (1):35-42, 2005.
6. Nakagawa S, Osaki T, Fujioka Y, Yamaguchi H & Kamiya S: Long-term infection of Mongolian gerbils with *Helicobacter pylori*: Microbiological, histopathological and serological analyses. *Clin Diag Lab Immunol* 12 (2):347-353, 2005.

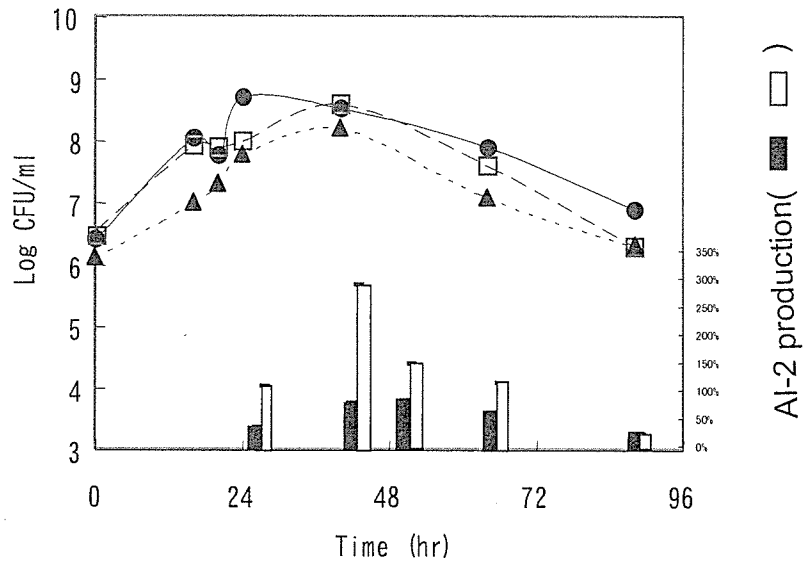
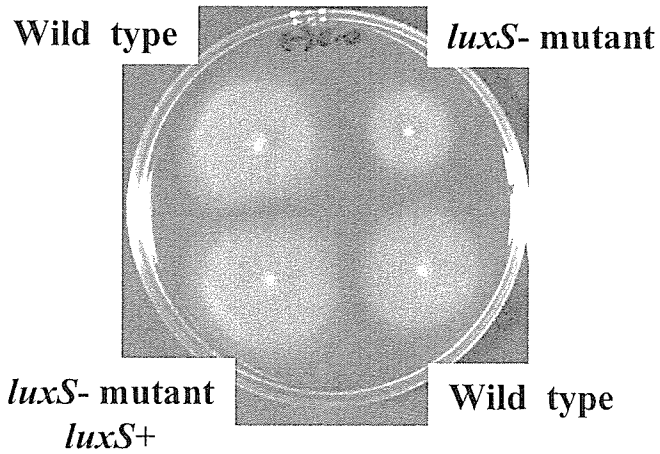


Fig.1 Growth and AI-2 production of *luxS* mutant strains in Brucella-serum broth.
 ● :TK1402; ▲ :HPKY08 *LuxS*- , □ :HPKY21

A. glucose(-)



B. 0.5% glucose

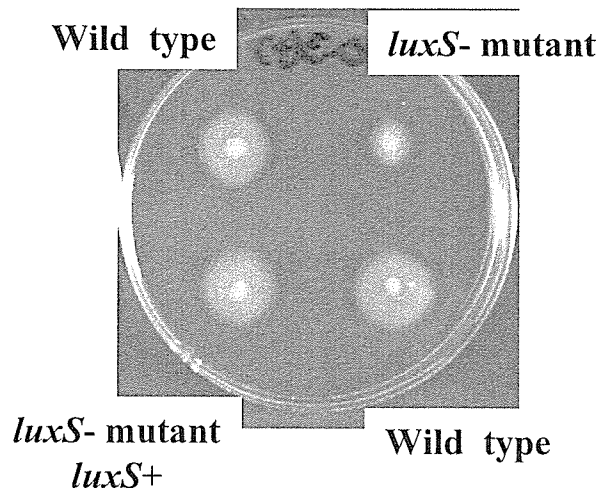
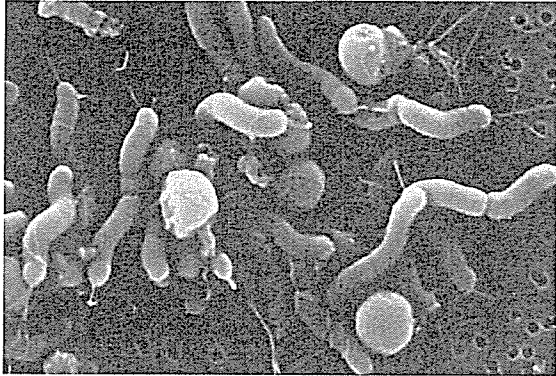


Fig. 2. Motility of HPKY08(*luxS*-mutant), HPKY21 (*luxS*-complemented) and TK1402(wild type) strains on Brucella-serum semisolid agar containing 0 % (A) and 0.5% glucose (B) for 5 days culture.

A. HPKY08 (*LuxS*-)



B. TK1402

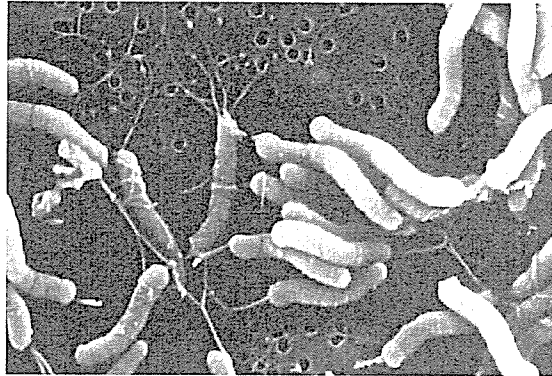


Fig. 3. Flagella formations of HPKY08 (A) and TK1402 (B). Both strains were inoculated in Brucell-serum broth, and the morphology of these strains was analyzed by scanning electron microscope (SEM) after 24 hr incubation.

課題名： マウスモデルにおける志賀毒素感受性規定要因の解析

分担研究者： 喜多 英二（所属： 奈良県立医大、細菌学）

協力研究者： 岡山 明子、東 伸山岳、笠原 一規（奈良県立医大、細菌学）

研究要旨：

β 2microglobulin 欠損 (β 2mgK0) マウスは志賀毒素産生大腸菌 (STEC) の経口感染に高い感受性を呈する。我々は、STEC 感染重篤化の原因を探るため、本変異マウスの STEC 高感受性要因の解明をこころみ、以下の事実を確認した。

- 1) STEC N-9 株 (2×10^6 cfu) の経口感染において、低蛋白飼育野生型マウスに比して β 2mgK0 マウスの平均生存日数は 2 日短く、顕著な腎臓病変（メサンギウムの増殖、血漿蛋白のポウマン空内への貯留、尿管上皮の空胞変性）が確認された。
- 2) 腎機能検査においてクレアチニン・尿素窒素の上昇が認められた。同時に血液中には、IFN- γ , TNF- α , MIP-2 α , KC の顕著な上昇と、白血球増加が進行した。腎臓内においても、TNF- α 産生亢進と白血球の著しい浸潤が観察された。
- 3) FACS 解析で、肝臓内の単核球中に IFN- γ 産生性 CD3-NK1+(NK cell) の顕著な増加を認め、内毒素に対する反応性の高さが確認された。
- 4) 同マウスから分離したメサンギウム細胞を IFN- γ (25 U/ml) で 2 4 時間刺激することで、同細胞からの TNF- α 及び KC の産生亢進が確認された。また、同マウスから分離した尿管細胞を IFN- γ (25 U/ml) と Stx2 (20 pg/ml) 共存下で 4 8 時間培養することで、NO 産生亢進と同時に同細胞のアポトーシスが誘導されることが認められた。
- 5) 脳内においては、免疫染色で Stx が paraventricular area に強染色され、近辺の細胞においては iNOs 及び nitrotyrosine 陽性細胞が顕著に増加していた。

A. 研究目的：

既に、STEC 感染における基礎病態は、本菌の主要病原因子である志賀毒素の生物活性に基づくと考えられている。しかし、HUS の発症頻度は、年齢や栄養状態により大きく異なり、実験系においても、低蛋白飼育マウス

(PCM)や β 2mgK0 マウスが、STEC 経口感染に高い感受性をしめすことも明らかになっている。

本研究は、STEC 感染後にヒトにおける HUS と類似した病態を呈する β 2mgK0 マウスでの STEC 感染病態を解析することで、ヒトにおける本症の

重篤化要因を解明しようとするものである。

B. 研究方法と結果

1) 供試菌株: *E. coli* 0157:H7 (SM 耐性、Stx1, Stx2 産生) NMU9 株を全ての実験で使用。

2) マウス: 低蛋白栄養 (PCM) C57BL/6 マウス (WT), β 2-microglobulin 欠損 C57BL/6(β 2mgK0)マウスを使用。

3) 平均生存日数比較: 2×10^6 cfu 量の NMU-9 株経口感染後の 50% 生存日数を、WT と β 2mgK0 マウス群で比較したところ、 β 2mgK0 マウス群 6.8 日 (9 病日迄に全マウス死亡)、WT 群 8.6 日 (13 病日迄に全マウス死亡) と、約 2 日の差異が認められた。

4) 感染病態解析: a) blood brain barrier (BBB) の透過性亢進 (Fig.1)。感染後 4, 6 - 8 日目に尾静脈から 0.5% Evans blue (500 μ l) を投与したところ、感染 4 日目から BBB の透過性亢進による、脳実質内への Evans blue 漏出が確認された。

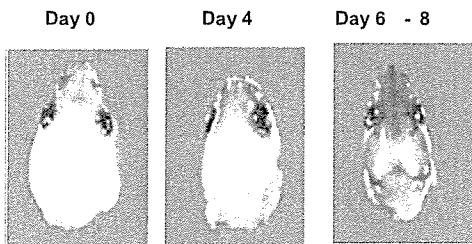


Fig. 1. Increased permeability of BBB after infection with STEC.

b) 脳内 Stx2 免疫染色 (Fig. 2)。感染 6

日目のマウス脳 (海馬部) 切片において、抗 Stx2 モノクロン抗体による免疫染色で、Stx2 の免疫沈降所見が確認された (左: 感染 6 日、右: day 0 マウス)。

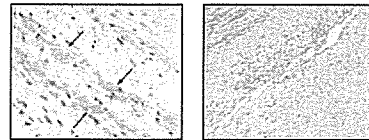


Fig. 2. Immunostaining of Stx2 in the brain of infected mouse (day 6).

c) 脳内細胞の変性 (Fig. 3)。脳実質内の神経細胞の変性を amino-cupric silver 染色により確認したところ、感染 6 日目の脳切片では、濃染される部位が顕著に増加し、神経細胞の脱髄変性が脳室周辺部や後野部に確認された。

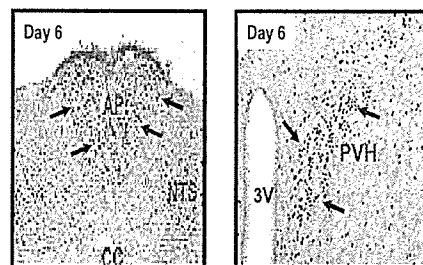


Fig.3. Demonstration of degenerative neurons in the brain of infected mice.

→ darkly-stained neurons, 3V: third ventricle, PVH: paraventricular nucleus of the hypothalamus, AP: area postrema, NTS: nucleus of the solitary tract, CC: central canal

d) 脳実質内の NO 産生細胞検出 (Fig. 4)。感染 5 日目の脳切片を用いて、iNOs, nitrotyrosine 産生細胞を、特

異抗体を用いて免疫染色で検出した。感染5日目には、subarachnoid space下の側頭部領域で、これらの分子を産生細胞数が顕著に増加していることが、免疫染色陽性細胞数の増加から、確認された。尚、感染4日目以降には、同時に血漿中の nitrite/nitrate が有意に増加することも確認できた。

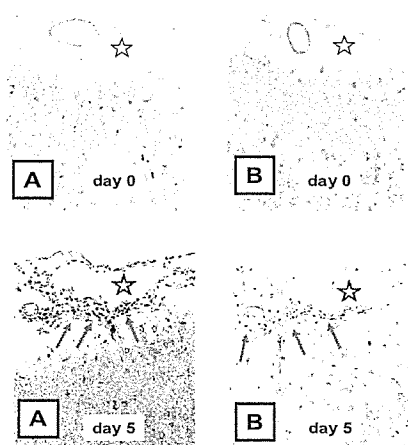
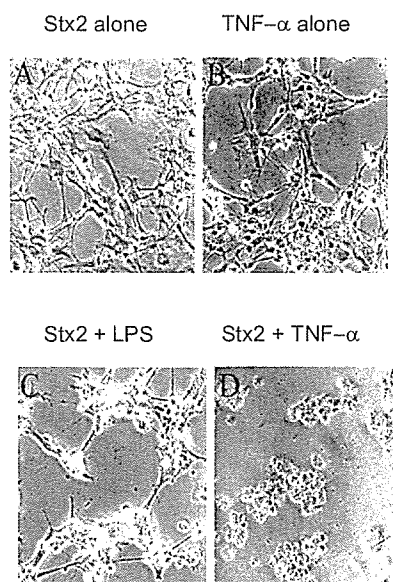


Fig. 4. Induction of NO-producing cells in the temporal lobe of the brain of infected mice. A: stained with Ab to mouse nitrotyrosine, B: stained with Ab to mouse NO synthase. ☆: subarachnoid space

e) Stx の神経細胞への作用(Fig. 5)。新生児 $\beta 2\text{mgKO}$ マウスの脳から、neuronal-glia を分離し培養系で Stx の神経細胞への作用を検討した。neuronal-glia 混合培養系に、Stx2 (20 pg/ml) 単独で、もしくは、TNF- α (50 u/ml) や LPS (10 ng/ml) との共存刺激で、24時間培養後の細胞所見を観察すると、Stx2 と TNF- α 共存で最も顕著な細胞変性が認められた。Stx2 と LPS との共刺激においても変性効果

が確認されたが、24時間以上の培養時間を要した。これは、LPS 刺激による TNF- α 産生誘導に時間を要したためと推測された。これらの培養系で、上清中の NO 量を測定したところ、Stx+TNF- α の刺激時に、上清中に最も NO 量が高値であることが確認された。尚、LPS 共存刺激でも上清中の NO 量の増加と細胞変性が認められ、これは産生される TNF- α 量に依存していることが、上清中の TNF- α 量の測定から推察された。尚、TNF- α 単独や Stx2 単独では細胞変性や NO 産生亢進は認められなかったが、抗 TNF- α 抗体や抗 Stx2 抗体の添加で、Stx2 と TNF- α や LPS との共刺激による変化は抑制された。このことから、neuronal-glia 混合培養系における NO 産生亢進には両因子 (Stx2 と TNF- α) が必要であると推測された。

i. morphological change:



ii. TUNEL assay

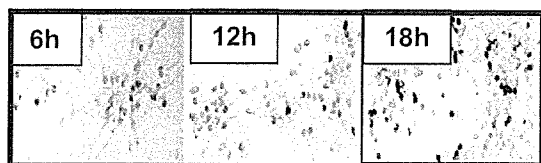
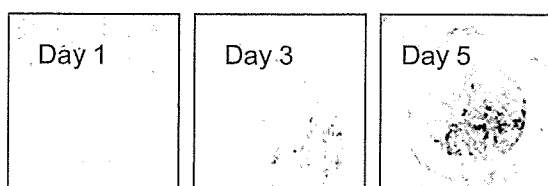


Fig. 5. Neurotoxicity of Stx 2 in the presence of TNF- α . i) morphological changes of mixed neuronal-glial culture after 24 h incubation with Stx2 alone or the combination of LPS or TNF- α , ii) TUNEL-positive cells during incubation of the cells with Stx2 and TNF- α .

f) 腎臓内白血球浸潤解析(Fig. 6.& 7)。腎臓内への白血球浸潤を、腎凍結切片を用いての in situ elastine zymography により、腎臓内への白血球浸潤を、経日的に観察した。感染5日目から、腎糸球体内での elastinolytic activity が上昇し、同時に施行した免疫染色で、腎糸球体内の血管内皮に ICAM-1 発現増強も観察された。

i) in situ elastine zymography



ii) immunostaining of ICAM-1

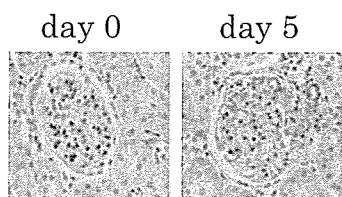


Fig. 6. Demonstration of PMN infiltration in the kidney by in situ elastine zymography and histochemistry showing the expression of ICAM-1 in the kidney.

さらに腎抽出液中の myeloperoxidase (MPO) 活性を定量することで、野生型マウスに比して明らかに白血球の強い浸潤が $\beta 2\text{mgKO}$ マウスで生じていることが確認された。

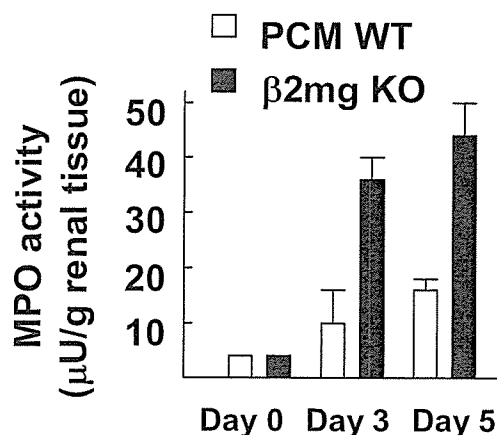


Fig. 7. Assessment of PMN infiltration in the kidney by measurement of MPO activity in renal extract.

g) 腎臓病理所見および血中パラメーター(Fi.g. 8)。感染5日目には、メサンギウムの増殖、糸球体内での血漿蛋白漏出、尿細管上皮細胞の空胞化変性、等が認められ、野生型マウスには見られない病変が確立されていた。さらには一部の糸球体においてフィブリン様物質の沈着も観察された。腎機

能検査では、クレアチニンや尿素窒素の上昇、血中の炎症性サイトカイン・ケモカインの測定においては、IFN- γ や TNF- α , KC, MIP-2 α の上昇が確認された。また、血中白血球増加、血小板減少も確認され、ヒトの HUS に類似した所見が、 β 2mgKO マウスで得られることが示された。

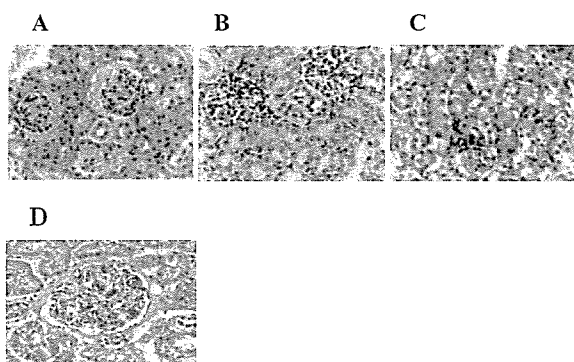


Fig. 8. Histopathology of the kidney in β 2mgKO mice 5 days after infection. A: plasma retention in glomeruli, B: proliferation of mesangial cells in glomeruli, C: vacuolated degeneration of tubular epithelial cells, D: fibrin deposit in the glomerulus of autopsied kidney (original magnification: x 400, HE staining)

C) 考察：

野生型マウスと異なり、 β 2 ミクログロブリン欠損マウスでは、グラム陰性菌感染後、早期に内毒素刺激により、NK 細胞からの IFN- γ 産生が亢進する。本サイトカインによる単球（マクロファージ）や血管内皮細胞の刺激・活性化は強い炎症反応を誘導する。特に、マクロファージ由来 TNF- α , IL-1 β

の誘導産生は血管内皮のみならず、粘膜上皮における透過性亢進の誘導が知られている。STEC 感染においては、腸管内からの志賀毒素の血中への移行を介して GB3 発現標的細胞への到達が、HUS 発症の重要な初期過程であり、この過程におけるサイトカインの役割は極めて重要と考えられる。本変異マウスにおける STEC 感染感受性亢進の第一段階は、NK 細胞の内毒素感受性亢進に基づくサイトカイン・ケモカインカスケードの活性化と考えられた。

次に、志賀毒素による標的細胞障害について、本変異マウスではサイトカイン・ケモカインカスケードの活性化により、極めて効率的に志賀毒素が中枢に到達し得ること、またケモカイン産生亢進による好中球の腎臓内への集積が生じること、この2点が脳・腎臓での病態形成に深く関与している。サイトカイン・ケモカインの作用により、両臓器において NO 産生細胞が増加することは、志賀毒素の標的細胞への毒性発現を亢進させており、NO の存在（量的関係は本研究で明らかにしえなかったが）が、in vitro での神経細胞への毒性発現に不可欠であると考えられた。

標的細胞への毒素活性発現においては、志賀毒素と TNF- α の共存が最も効果てきであったが、同時にこの反応系で生成される NO の阻害も、細胞障害を有意に軽減させたことから、両因子（志賀毒素と TNF- α ）存在下における NO 産生機序の解明が重要と考

えられた。特に、ヒトにおいても shear-stress 下における血小板凝集・活性化に NO の関与を既に我々は報告しており、志賀毒素による HUS 病態成立において、サイトカイン・ケモカインと並び NO の関与が無視できないものと考えられた。

F. 健康危機情報

STEC 感染の合併症として HUS は致死的な病態であり、未だに特異的治療法が確立していない。さらに本合併症の標的は、小児や高齢者と抵抗性の弱い年齢層である。このことは、HUS 発症要因が志賀毒素のみならず、本毒素に対する宿主応答性の差異に起因すると考えられる。本研究で明らかにし得た 1) 内毒素に対する NK 細胞の感受性の差異、2) その差異に基づくサイトカイン・ケモカインカスケードの活性化や NO 産生レベルの差異、これら 2 点の差異が生体の何に起因するかを明確にすることで、STEC 感染による HUS 発症リスクの低減化や治療法開発に結びつくものと期待される。

G. 研究発表

1) Nishikawa K, Watanabe M, Kita E, Igai K, Omata K, Yaffe B. M, Natori Y.

A multivalent peptide-library approach identifies a novel Shiga toxin-inhibitor that induces aberrant cellular transport of the toxin

FASEB J.20:,E2077-E2086, 2006

2) Denda A, Kitayama Kita E, et al. Expression of inducible nitric oxide (NO) synthase but not prevention by its gene ablation of hepatocarcinogenesis with fibrosis caused by a choline-deficient, L-amino acid-defined diet in rats and mice. Nitric Oxide 16: 164-176, 2007

3) その他の平成 18 年度の本研究成果は現在投稿中。

課題名：腸管細菌の毒素の作用機序に関する研究

分担研究者名：平山壽哉

長崎大学熱帯医学研究所病原因子機能解析分野（病原細菌学）

研究要旨

ヘリコバクター・ピロリが産生する空胞化毒素（VacA）は胃粘膜障害のみならず下痢原性を示すことなど、胃・腸管粘膜及び免疫細胞などへの広範な毒性が報告されている。そこで、VacAの胃・腸管粘膜及び免疫細胞に対する毒性発現のメカニズムの詳細を明らかにするために、VacAの初期効果を最初に宿主に伝える受容体の構造と機能及び毒性発現の機序を中心にVacAの作用解析を行った。VacAによりシグナル伝達系においてp38及びErk1/2を活性化すること、加えて、VacAはp38の活性化を介して転写因子であるATF-2を活性化することを明らかにした。そこで、p38の活性化を介して発現することが知られ宿主の炎症反応に重要な役割を担うCyclooxygenase-2 (COX-2) に着目し、VacA処理によってCOX-2が発現誘導されることを明らかにした。

A. 研究目的

ヘリコバクター・ピロリは胃炎、消化性潰瘍、MALT リンパ腫などの消化器疾患の原因菌であり、胃癌発症にも関連することが示唆されている。ヘリコバクター・ピロリは、種々の細胞に空胞を形成し、死滅させる空胞化毒素（VacA）を産生する。これまでに、本

菌の感染にともない、胃上皮組織では種々のサイトカインの過剰産生及び細胞死が報告されている。この炎症等の病態を引き起すメカニズムには p38 MAPK などが関連していることが示唆されているが、関連する病原因子については不明である。そこでヒト胃癌由来株化細胞 AZ-521 細胞を用いて、細

胞膜上の脂質ラフトに注目して VacA と受容体との結合及び毒性発現の詳細について p38 MAPK/ATF-2 経路とその下流の代謝産物に及ぼす VacA の影響を中心に調べた。

B. 研究方法

1) p38 MAPK に及ぼす VacA の影響 : AZ-521 細胞を VacA 処理 (120 nM, 0-120 min) し、p38 MAPK および転写因子 ATF-2 のリン酸化を、p38 MAPK 及び ATF-2 特異的リン酸化抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。また、*in vitro* での p38 MAPK のリン酸化活性は ATF-2 を基質にして測定した。さらに、ATF-2 特異的リン酸化抗体を用いた免疫蛍光染色法により、細胞内の VacA による ATF-2 のリン酸化亢進を観察した。

2) VacA 毒素活性に及ぼす種々の阻害剤の影響 : p38 リン酸化阻害剤 SB203580、陰イオンチャネル阻害剤 NPPB、脂質ラフトの機能を失わせる methyl- β -cyclodextrin (MCD) および GPI アンカー蛋白質の phosphatidylinositol を切断する

PI-PLC を加えて、VacA の空胞化活性に及ぼす影響を調べた。空胞化活性は、ニュートラルレッドの空胞への取り込み量を測定して評価した。

3) VacA によるミトコンドリアからの cytochrome *c* の遊離と p38 MAPK との関連 : SB203580 で AZ-521 細胞を処理し、VacA による cytochrome *c* の遊離に及ぼす p38 MAPK の影響をしらべた。cytochrome *c* の遊離はミトコンドリア遠心分画後に cytochrome *c* 抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。4) VacA および RPTP β の細胞膜における局在 : VacA 処理した AZ-521 細胞を可溶化し、ショ糖密度勾配超遠心にて脂質ラフトを調製した。VacA および RPTP β の局在はウェスタンブロット法で調べた。

5) COX-2 mRNA の産生誘導 ; AZ-521 細胞に VacA を種々の時間、あるいは、種々の濃度で処理し、細胞から total RNA を抽出して Oligo-dT 及び COX-2 primer を用いて、RT-PCR 及びリアルタイム-PCR にて解析した。

6) COX-2 プロモーター領域における

転写活性測定; COX-2 プロモーター遺伝子を挿入した plasmid、または、変異 plasmid を細胞に transfection し、VacA を処理して、ルシフェラーゼ活性により解析した。COX-2 mRNA 産生誘導における SB203580 および Erk1/2 の上流である MEK1/2 の阻害剤 PD98059 で細胞を前処理して解析した。

C. 結果

AZ-521 細胞における VacA 処理により経時的かつ濃度依存的な p38 MAPK のリン酸化の活性亢進が認められた。この p38 MAPK のリン酸化活性の亢進に並行して、転写因子 ATF-2 のリン酸化が増化した。

免疫蛍光染色法を用いて細胞内での VacA による ATF-2 の活性化を調べたところ、上記のウェスタンブロット法の結果と一致して、核内のリン酸化 ATF-2 の量が著しく増加していた。

抗 VacA 抗体や SB203580 を加えることにより、VacA による p38 MAPK 及び ATF-2 のリン酸化が阻害された。しかし、VacA の AZ-521 細胞に対する空胞化活性及びミトコンドリアからの

cytochrome *c* の遊離は、SB203580 によって阻害されなかった。

一方、AZ-521 細胞に作用させた VacA は RPTPβ と結合後、脂質ラフトへ集積した。NPPB、MCD 及び PI-PLC 処理した細胞では、VacA の細胞内取込み及び空胞化活性が著明に抑制された。MCD および PI-PLC 処理した細胞では VacA と RPTPβ の脂質ラフトへの集積、p38 の活性化が阻害されたが、NPPB 処理では阻害されなかった。従って、VacA の空胞化活性には脂質ラフトを介した細胞内への取り込みが必須であるが、VacA による p38MAPK の活性化には脂質ラフトへの集積が必須であるものの細胞内への移行は必要ないことが判明した。

VacA で処理した細胞では COX-2 mRNA が、空胞活性とは無関係に処理時間及び VacA 濃度依存的に産生が誘導されることが分かった。VacA による COX-2 mRNA の発現誘導は、主に p38 MAP kinase シグナル伝達系を介することがわかった。転写活性測定において、-327/+59 で VacA 処理により、転写活性が顕著に増加した。NF-κB、または、

NF-IL6 の結合部位を変異させたりポーター遺伝子KBMでは有意な低下は認められなかった。しかしながら、ATF-2 の結合領域 (CRE) を変異させたりポーター遺伝子 CRM では著しく減少した。したがって、VacA により活性化した ATF-2 が CRE 配列に結合して転写反応が亢進するものと考えられた。

D. 考察

VacA は AZ-521 細胞において、主として p38 MAPK/ATF-2 のシグナル伝達経路を活性化することが判明した。しかし、p38 MAPK 阻害剤 SB203580 を用いた実験から、VacA による p38 MAPK の活性化は、細胞の空胞形成、及びミトコンドリアからの cytochrome *c* の遊離とは関連しない。この事実は、VacA による細胞空胞化形成、cytochrome *c* の遊離とは異なる毒性発現機序の存在を示している。VacA が宿主の転写因子の機能を変化させることから、VacA による p38 MAPK/ATF-2 シグナル伝達経路の活性化が、如何なる物質の発現に影響を及ぼすのかを調べるのが今後の重要な課題であり、その一つと

して今回の研究から VacA が p38 MAPK/ATF-2 シグナル伝達経路を活性化し、COX-2 などの発現を介してプロスタグランディンなどの合成が亢進し、これにより、宿主炎症反応に影響することが示唆された。かかる VacA の作用は、VacA が胃粘膜上皮に定着増殖したヘリコバクターの持続感染が、VacA の産生によって小腸、大腸などの下部消化管における炎症などに影響する可能性を示唆していることから、今後、下部消化管での VacA の作用を究明する必要がある。

E. 結論

ヘリコバクターピロリが産生する VacA が宿主の p38 MAPK/ATF-2 シグナル伝達経路を活性化し、COX-2 の発現を促すことが証明された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. Yamasaki E., Wada A., Kumatori A., Nakagawa I., Funao J., Nakayama M., Hisatsune J., Kimura M., Moss J.,

- Hirayama T. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic protein Bax, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 11250-11259
2. Isomoto H., Urata M, Kawazoe K, Matsuda J, Nishi Y, Wada A, Ohnita K, Hirakata Y, Matsuo N, Inoue K, Hirayama T, Kamihira S, Kohno S. Endoscope disinfection using chlorine dioxide in an automated washer-disinfector. (2006) *J. Hosp. Infect.* 63, 298-305
3. Nakayama M, Hisatsune J, Yamasaki E, Nishi Y, Wada A, Kurazono H, Sap J, Yahiro K, Moss J, Hirayama T: *Helicobacter pylori* VacA clustering in lipid rafts, mediated by receptor, RPTP β , is required for intoxication in AZ-521 cells. (2006) *Infect Immun.* 74, 6571-6580

研究課題名：

細菌性腸管感染症の病原因子の解析と診断・治療への応用に関する研究

分担研究課題名：

-Cytotolethal distending toxin 産生性大腸菌の分子疫学-

分担研究者：山崎伸二

大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 感染症制御学講座

研究要旨：我が国の小児下痢症と細胞膨化致死毒素（Cdt: cytolethal distending toxin）産生性大腸菌の関係について調べた。腸管出血性大腸菌感染症が疑われ、血性下痢あるいは水様下痢を呈した患者から分離された大腸菌について遡り調査を行ったところ、血性下痢を呈した患者から分離された大腸菌 02:H12、1 株で *cdtI* 遺伝子が陽性となった。また、合計 406 検体の下痢症患者便の増菌培養液を用いて *cdtB* 遺伝子を PCR で検出したところ、37 検体で陽性となり、そのうち 32 株の Cdt 産生性大腸菌を分離した。我が国で分離された Cdt 産生性大腸菌は、その細菌学的性状や保有する病原因子の特徴が開発途上国やヨーロッパで分離される株と異なっていた。

A. 研究目的

細胞膨化致死毒素（Cdt: cytolethal distending toxin）産生性大腸菌は、開発途上国において下痢症患者からの分離報告例が多数あるが、先進国においてはあまり報告がない。現在までに大腸菌の産生する Cdt には少なくとも 5 種類が報告されている。開発途上国から分離される Cdt はそのほとんどが CdtI で、細菌学的性状において腸管病原性大腸菌（EPEC: enteropathogenic *E. coli*）の血清型に属し、*eaeA*、*bfp* および EAF 遺伝子等腸管病原性大腸菌の保有する病原因子を保持している割合が高く、Cdt 産生性大腸菌は、EPEC の垂型と考えられ

ている。インドとの共同研究で、Cdt 産生性大腸菌が血性下痢に関わっている可能性について報告した。しなしながら、我が国の小児下痢症と Cdt 産生性大腸菌との関係については全く報告がない。本研究では、我が国の小児下痢症に Cdt 産生性大腸菌が関わっているのか、もし、関わっているとすればどの程度の割合で関わっているのか、さらに、分離される Cdt 産生性大腸菌の細菌学的性状について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) Cdt 産生性大腸菌の遡り調査

1990-1991 年に、血性下痢および水様

性下痢症患者から分離され、腸管出血性大腸菌として疑われたが志賀毒素 (*stx*) 遺伝子およびその産生性が PCR あるいは Bead-ELISA で陰性であった 8 株について、*cdtIB* 遺伝子の存在を PCR で調べた。

2) 小児下痢症患者便増菌培養液における *cdtB* 遺伝子の検出

小児下痢症患者便を 3 ml の Tryptic Soy Broth (TSB) に添加し 37°C で増菌培養した後、50 ul の培養液を 450 ul の TE に加え、100°C で 10 分間加熱し鋳型 DNA を調整した。Cdt の型別は、PCR-RFLP で行った。すなわち、5 種類の *cdt* 遺伝子を増幅できる共通プライマーを用いて PCR を行い、*EcoRI*、*EcoRV* および *MspI* で消化し、得られた切断パターンから Cdt の型別を行った。本 PCR-RFLP で型別できない *cdtIII* と *cdtV* は、*cdtV* に対する特異プライマーを用いて型別した。

3) *cdt* 遺伝子陽性菌の分離と同定

cdt 遺伝子が陽性となった増菌培養液をマッコンキー寒天培地上に塗布し、37°C で培養した。得られたコロニーをナイロン膜に転写し、*cdtB* 遺伝子を DNA プローブとしたコロニーハイブリダイゼーションを行い、*cdt* 遺伝子陽性菌を同定した。*cdt* 遺伝子が陽性となった菌については、生化学的性状解析を行い大腸菌であることを確認した。

4) 細菌学的性状解析

大腸菌の血清型別は、173 種類の O 抗原に対する抗血清と、56 種類の H 抗原に

対する抗血清を用いて行った。また、大腸菌の病原因子については、*eaeA*、*bfp*、EAF、*invE*、*est*、*elt*、*astA*、EAgg、*stx1*、*stx2*、*saa*、*cnf1*、*cnf2* について PCR あるいはそれぞれの DNA 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解析した。

C. 研究結果

1) 遡り調査

調べた 8 株の大腸菌のうち、持続性の血性下痢を呈した 8 ヶ月齢の小児から分離された大腸菌で *cdtIB* 遺伝子が陽性となった。血清型は、02:H12 と同定された。病原因子は、*astA* 遺伝子が陽性となったが、その他については全て陰性であった。

2) 小児下痢症患者便からの *cdt B* 遺伝子の検出と *cdtB* 遺伝子陽性菌の単離

調べた 406 検体中、37 検体で *cdtB* 遺伝子が陽性となった。さらに PCR-RFLP および PCR で Cdt の型別を行ったところ、*cdtI*、*cdtII*、*cdtIII*、*cdtIV* および *cdtV* がそれぞれ 21、3、4、4 および 5 検体で陽性となった。*cdtB* 遺伝子が陽性となった検体から *cdtB* 遺伝子陽性菌の単離を試みたところ、*cdtI*、*cdtII*、*cdtIII*、*cdtIV* および *cdtV* 遺伝子が陽性の大腸菌を、それぞれ 19、1、3、4 および 5 株単離した。これらの大腸菌の血清型について調べた結果、02 が 41% と最も多く、その他 039、0112ab、0133、0142 と 0166 が存在した。病原因子については、*astA*

が最も多く 17 株 (53%) で陽性となった。次いで、*cnf1*、*eaeA*、*cnf2* と *bfp* が続き、それぞれ 10 (31%)、4 (13%)、3 (9.4%)、および 1 株 (3.1%) で陽性となった。また、血性下痢を呈した患者便、合計 2 検体から *cdtB* 遺伝子が陽性となり、それぞれから *cdtB* 遺伝子陽性の大腸菌が 2 株単離された。

D. 考察

先進国での下痢症患者からの Cdt 産生性大腸菌の分離報告例は、カナダと米国から若干の報告例があるのとヨーロッパでいくつかあるのみであった。我が国における分離報告例は今までになく、今回の分離例が我が国では初めての報告である。ヨーロッパで分離される Cdt 産生性大腸菌の多くは、*cdtIII* あるいは *cdtV* 遺伝子が陽性の腸管出血性大腸菌がほとんどである。その他、敗血症や尿路感染症患者検体から *cdtI* や *cdtIV* 遺伝子が陽性の大腸菌も分離されている。今回我が国の小児下痢症患者から 5 種類の *cdt* 遺伝子を有する大腸菌が分離され、中でも *cdtI* 遺伝子が陽性の大腸菌が最も多かった。保有する病原因子の特徴として *stxI* や *stxII* 遺伝子のみならず、下痢原性大腸菌が通常保持しているほとんどの病原因子を保持していない。また、我が国で分離された Cdt 産生性大腸菌の性状は、ヨーロッパや開発途上国で分離されるタイプと異なっていた。

一方、インドとの共同研究で見いだしたように、我が国においても血性下痢を呈した小児下痢症患者から CdtI 産生性大腸菌が分離されていたことが遡り調査で明らかとなった。この患者からは、少なくとも血性下痢の原因となるサルモネラ、カンピロバクター、赤痢や腸管出血性大腸菌等は分離されていないことからこの CdtI 産生性大腸菌が血性下痢に関わっていた可能性が考えられる。さらに、*cdtIII* 遺伝子陽性の大腸菌 0166:H49 や *cdtIV* 遺伝子陽性の大腸菌 Orough:H11 も血性下痢を呈した患者から分離されている。今後、Cdt 産生性大腸菌と血性下痢との関係について、検体数を増やして検証することと、動物モデルを確立し病態発症機構を解析していくことが重要である。

また、Cdt 産生性大腸菌の感染源が何であるかという点も大きな問題となる。我々の予備的な実験結果では、ウシやブタなどの家畜での陽性率が高く、家畜が感染源となっている可能性が考えられる。感染源についても今後詳細な検討を行う必要がある。

E. 結論

今まで我が国において報告のなかった Cdt 産生性大腸菌が、我が国の小児下痢症患者から分離された。大腸菌が産生する Cdt のタイプは、CdtI が最も多かったが、CdtII から CdtV の全てを産生する

大腸菌が分離された。細菌学的性状や病原因子のタイプから、我が国で分離された Cdt 産生性大腸菌は、開発途上国やヨーロッパで分離されているタイプとは異なっていた。本研究においても、Cdt 産生性大腸菌が血性下痢に関わっている可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

我が国の小児下痢症、特に血性下痢に関わっている可能性が示唆された。血性下痢を呈している患者については、腸管出血性大腸菌、サルモネラ、赤痢、エルシニア、カンピロバクターのみならず Cdt 産生性大腸菌を疑った検査を行う必要がある。

G. 研究発表

- (1) S. Yamasaki, M. Asakura, T. Tsukamoto, R. Deb, S. M. Faruque and T. Ramamurthy. Cytolethal distending toxin (CDT): genetic diversity, structure and role in diarrheal disease. *Toxin Rev.*, 25: 61-88, 2006.
- (2) A. Hinenoya, A. Nagita, M. Asakura, T. Tsukamoto, T. Ramamurthy, G. Balakrish Nair, Y. Takeda, and S. Yamasaki. Cytolethal distending toxin (Cdt)-producing *Escherichia coli* isolated from a child with bloody diarrhea in Japan. *Microbiol. Immunol.*, in press.