

Fig.1.

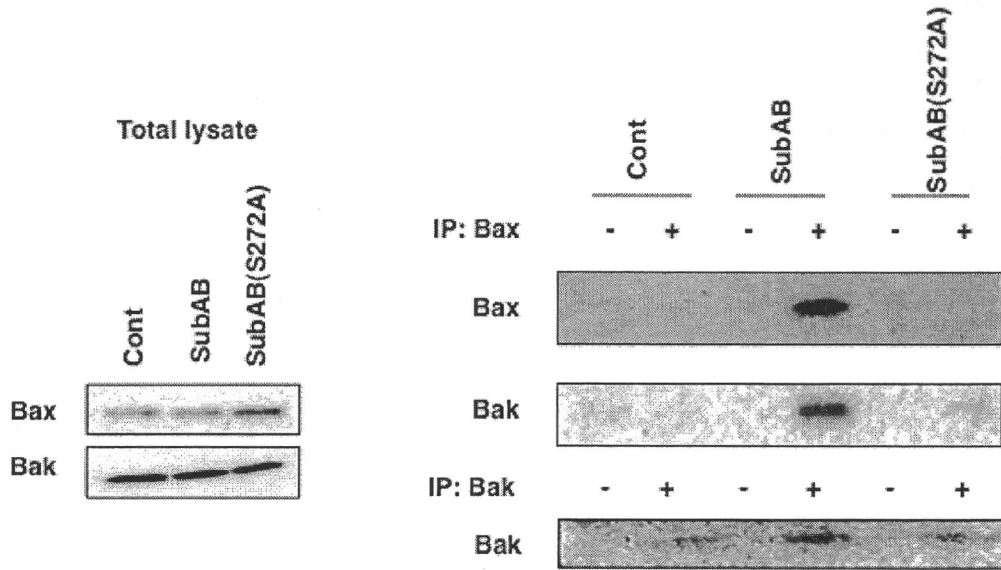


Fig.2.

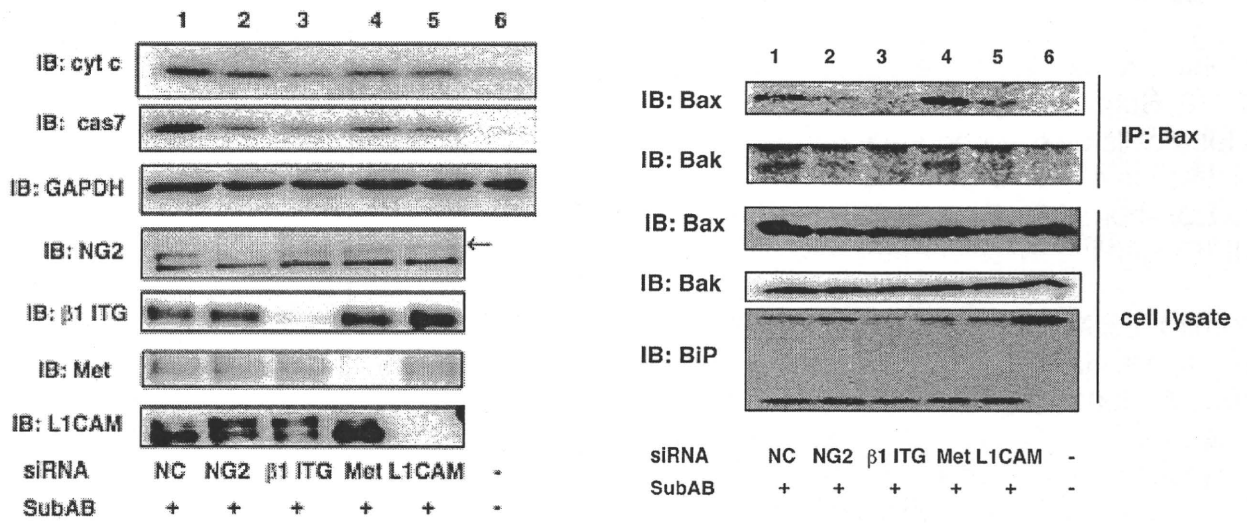
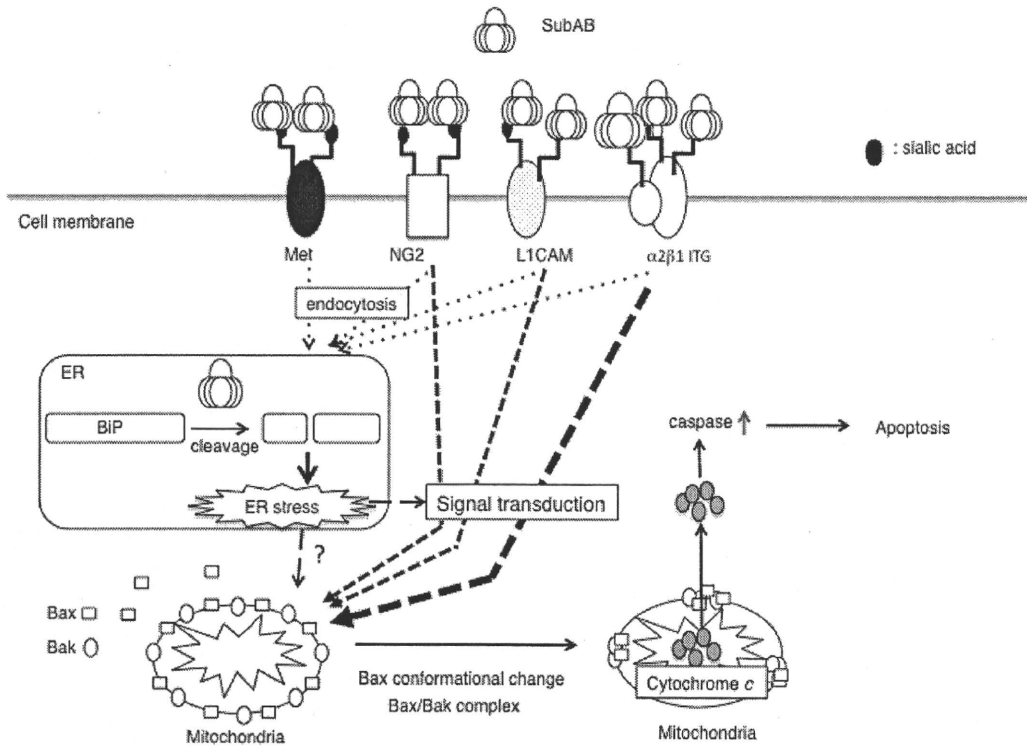


Fig.3.



厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）
分担報告書

ヘリコバクター・ピロリと口腔内細菌との相互作用に関する研究

研究分担者	神谷 茂	杏林大学教授
研究協力者	大崎 敬子	杏林大学講師
研究協力者	米澤 英雄	杏林大学助教

研究要旨：

ヘリコバクター・ピロリ(*H. pylori*)が経口的によりヒトに侵入してからヒト胃内に定着し胃炎を発症する過程において、口腔内細菌より影響を受けているかについて検討した。*H. pylori*はう蝕原因細菌である *Streptococcus mutans* などの口腔内細菌と非常に強い凝集性を示し、これら共凝集状態において *H. pylori* の主要な病原性であるウレアーゼの発現が上昇していることが明らかとなった。以上から *H. pylori* が経口感染する際に、*S. mutans* のような口腔内細菌と出会うことで、病原性が強められる可能性が示唆された。

A. 研究目的

H. pylori は急性および慢性胃炎を惹起するとともに、胃十二指腸潰瘍の再発因子および胃癌のリスクファクターである。*H. pylori* は鞭毛、ウレアーゼ、空胞化毒素 (VacA)、CagA および Cag pathogenicity island などさまざまな病原因子を有し、胃粘膜にバイオフィーム様構造体を形成して存在している。

本菌は経口感染することは、ほとんどすべての研究者の一致した考えである。胃に棲息する細菌であること、そして胃を含む消化管の入り口である口腔と排出物である糞便において本菌が検出され、この経路以外で人体内では本菌は検出されないことがそ

の理由である。感染経路は口から口、糞便から口が挙げられる。口腔内への *H. pylori* の侵入でもっとも主流であると考えられるのは母から子への垂直感染である。また環境、特に井戸水などの水を介した感染、家族内（特に兄妹から弟妹）・保育施設・心身障害者施設などの水平感染などが、感染様式として挙げられる。しかしながら夫婦間での伝播に関してはその可能性は低いという見解が得られている。このことは多くの *H. pylori* 感染は、小児期に起こりやすいことを示唆している。胃が未熟である小児期では、ごく少量の *H. pylori* の侵入で感染が成立してしまうことが考えられる。一方成人領域では適当な *H. pylori* 菌数が感染成

立には要求されるものの、一度感染が成立すると自然に除菌されるケースは非常にまれとなる。小児期の感染においては成長とともに胃酸分泌や免疫応答が成熟することで自然消失する可能性があるものの、それらを潜り抜けた *H. pylori* は自然消滅することなく感染者として除菌するまで本菌を保有し続ける。こうした見解より *H. pylori* の主要な感染時期は2歳までという結論が得られている。

H. pylori の主要な感染時期である2歳という時期は、口腔内において乳歯萌出が起こり、口腔内の細菌叢に変化が起きる時期と重なる。これまで口腔内には存在しなかったう蝕原因菌や歯周病原菌が口腔内に定着、感染する時期である。口腔内細菌はデンタルプラークと呼ばれる菌塊に代表されるように非常に凝集しやすいという性質を持つ細菌が多数存在している。さらに口腔内の微生物持続感染症の新しい概念としてバイオフィーム感染症が提唱され、口腔バイオフィーム形成細菌に関する研究が多数報告されてきている。これらバイオフィームはう蝕や歯周病発症の誘導のみならず、一部のはがれた細菌が口腔を通じて気道、食道、そして胃粘膜に運ばれ、その局所における持続感染症の誘導に関与していることが示唆されている。実際、歯周病原菌は循環障害、呼吸器感染、糖尿病などの全身疾患の誘因となっていることが多く報告されている。口腔内細菌は唾液とともに絶えず胃内へと流入するものであり、

H. pylori が経口感染する際には、口腔内細菌と凝集状態もしくはバイオフィームに取り込まれた状態となって、その状態を保ちながら胃内に到達すると強く推測できる。

H. pylori の病原因子の1つにウレアーゼがあげられる。ウレアーゼは尿素を分解することでアンモニアを産生し、胃酸を中和することで、本菌の胃内への定着を可能としている。さらに産生されたアンモニアは胃粘膜障害作用も持つ。そこで本研究では口腔内細菌が *H. pylori* のウレアーゼ発現にどのような影響を与えるかに焦点をあて、*in vitro* における解析を行った。

B 研究方法

- 1) 供試菌株：日本人由来の *H. pylori* 臨床分離株 TK1402 株を使用した。口腔内常在細菌として *S. salivarius* HT9R、JCM5707 株、*S. sanguinis* ATCC 10556 株、*S. gordonii* Challis 株を、う蝕原因菌として *S. mutans* GS5、UA159 株、*S. sobrinus* 6715 株を使用した。
- 2) 凝集試験：*H. pylori* TK1402 株および口腔内細菌の菌数を 1×10^4 CFU にそろえた後、BHI broth に 7% ウマ血清を加えた培地において微好気環境下で、振盪培養した。24 時間後、共凝集性を観察した。共凝集値は培養後の液体培地の上澄みの A_{600} 値と懸濁した後の A_{600} の値を用いて、計算式；
$$\text{Aggregation rate} = 100 - (\text{上澄みの } A_{600} \text{ 値} / \text{懸濁後の } A_{600} \text{ 値}) \times 100$$
 にて表した。
- 3) Real-time RT-PCR：*H. pylori* 単独

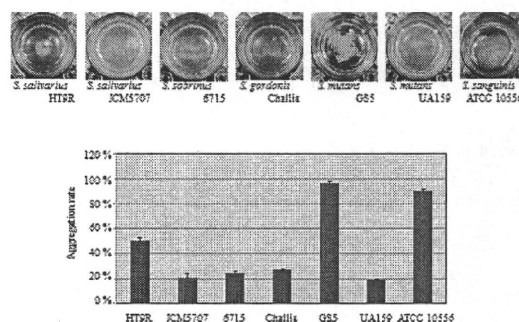
で凝集した状態、および *S. mutans* GS5 と共凝集させた状態において Total RNA を採取し、Reverse-transcript 反応を行った。得られた cDNA を template とし *ureA*-specific primers pair にて Real-time PCR を行った。同時に 16S rRNA を測定することで、*ureA* 測定値は 16S rRNA に対する相対値として表した。

C 研究結果

1) *H. pylori* と凝集能の強い口腔内細菌のスクリーニング: 共凝集試験より *S. mutans* GS5 株は、*H. pylori* TK1402 株と Aggregation rate 96% と非常に強い共凝集性を示した (図 1)。さらに *S. sanguinis* ATCC 10556 株も Aggregation rate 91% と強い共凝集性を示した。*S. salivarius* HT9R 株が 50% とやや強い凝集性を示し、他の菌株については 20% 前後の Aggregation rate であった。

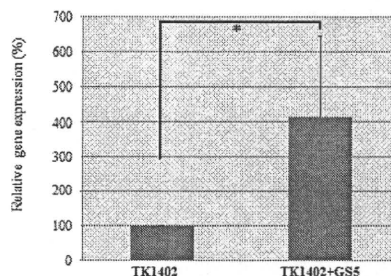
これら凝集状態における *H. pylori* の Growth の状態を調べるために、*S. mutans* GS5 株は *H. pylori* TK1402 株および *S. sanguinis* ATCC 10556 株と *H. pylori* TK1402 株での共凝集状態におけるそれぞれの菌数を培養法にて測定した。すると *H. pylori* は *S. mutans* GS5 株との共凝集状態においては 6×10^9 CFU レベルの菌数が、*S. sanguinis* ATCC 10556 株との共凝集状態では 4×10^8 CFU レベルの菌数が確認できた。なおその際の *S. mutans* GS5 株は 3×10^9 、*S. sanguinis* ATCC 10556 株は 3×10^9 レベルの菌数であった。

図1. *H. pylori* と口腔内細菌との凝集試験



2) 共凝集状態における *H. pylori* ウレアーゼ発現の確認: 次に *H. pylori* TK1402 株単独における凝集状態および *S. mutans* GS5 株との共凝集状態より Total RNA を採取し、*H. pylori* ウレアーゼの遺伝子発現を Real-time RT-PCR にて、ウレアーゼ特異的プライマーセットを用いて確認した。*H. pylori* 特異的な 16S rRNA 部位のプライマーを用いた量で RNA より作成した *H. pylori* cDNA 量を標準化した。結果よりバイオフィルム状細菌では浮遊状細菌と比較して約 4 倍近くウレアーゼが発現していることが明らかとなった (図 2)。

図2. Expression of *ureAB*



D 考察

H. pylori は世界人口の約半数に

感染しており、これら感染者は除菌をしない限りは一生本菌を胃内に持ち続ける。このような細菌の胃粘膜への定着・感染、どのような疾患を誘導するのか、こうした研究についての疫学・病態のみならず、診断・治療・予防的な観点からの研究に大変興味を持たれている。*H. pylori* の主要な感染時期である2歳は、口腔内環境においては乳歯が生えそろう時期と重なる。そこでこうした口腔内細菌が *H. pylori* 感染において何かしら影響を与えている可能性が考えられることから、本菌の主要な病原因子の1つであるウレアーゼをターゲットとして、口腔内細菌が及ぼす影響について検討を行った。

S. mutans GS5 株は *H. pylori* TK1402 株と非常に強い共凝集性を示した。*S. mutans* は最も重要な齲蝕原因菌である。本菌は硬組織表面に定着できる細菌であり、軟組織には定着ができない。つまり歯が萌出した後に口腔内に存在できるようになる。本菌と *H. pylori* の定着時期は重なっている。そこで本菌との凝集状態における *H. pylori* ウレアーゼ発現を調べると、単独の時と比較して非常に高いウレアーゼ発現が確認できた。*H. pylori* はウレアーゼを産生し、それがヒトの胃内において胃上皮細胞由来の尿素を利用してアンモニアを作り出す。アンモニアはアルカリ性であり、胃酸を中和することで本菌の周囲は中性に保たれる。結果として本菌は胃内という強酸下において定着を可能としている。つまり

S. mutans との共凝集状態においては、ウレアーゼ発現が高く、結果として胃内環境への適応力が上昇している可能性が示唆された。これは *H. pylori* の経口感染時、口腔を通過する際に口腔内細菌と出会い、そこでウレアーゼ発現上昇が起き、結果として胃内定着性が上昇しているというモデルが考えられる。現在ウレアーゼ発現上昇のメカニズムの解明、および動物感染モデルを用いた解析を行っているところである。

口腔は外界より食物・飲料といった外界物を接種するための開口部であり、細菌学的にも消化管に匹敵するような多種類の常在細菌が棲息している。口腔に定着する細菌種やその菌数に関しては、新生児、乳歯の萌出後、永久歯列の完成後、口腔疾患の有無、無歯顎などの膨大な数の研究がなされてきている。しかし細菌の種類が700種以上にわたること、それらの細菌の生態が変化に富むことなどの理由から必ずしも口腔内細菌の全貌が明らかにされているわけではない。口腔内細菌の中にはいまだ培養不可能な細菌も存在していることから、齲蝕原因菌 *S. mutans* と *H. pylori* の凝集以外にも、*H. pylori* と強く相互作用する細菌が存在している可能性も考えられる。さらに多くの感染症、特に食中毒を引き起こす細菌などは、やはり感染症の入り口は口腔である。口腔を通過する際には必ず口腔内細菌と出会っていることから、これら細菌間で何かしら相互作用があってもおかし

くはない。口腔内細菌との複合系における他細菌への影響を解析することで、新しい知見が得られるかもしれない。また口腔内細菌を用いた新たなマーカーの検出や、感染予防方法の開発などに繋がる可能性が期待される。

E 結論

- ・ *H. pylori* は口腔内細菌である *S. mutans* や *S. sanguinis*、*S. salivarius* といった細菌と強い凝集性を持つ。
- ・ *S. mutans* と *H. pylori* の共凝集状態においては、*H. pylori* 単独培養と比較してウレアーゼの発現が上昇していた。
- ・ *S. mutans* と *H. pylori* の共凝集状態においてマウス胃内へ投与することは、*H. pylori* 単独投与と比較して *H. pylori* の定着性が上昇した。

F 健康危機管理 なし

G 研究発表

1. 論文発表
1. Yonezawa H, Osaki T, Kurata S, Zaman C, Hanawa T, Kamiya S.
Assessment of in vitro biofilm formation by *Helicobacter pylori*.
J Gastroenterol Hepatol. 25 (Suppl 1):S90-94. 2010
2. Zaman C, Osaki T, Hanawa T, Yonezawa H, Kurata S, Kamiya S.
Analysis of the microflora in the stomach of Mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori*.

J Gastroenterol Hepatol. 25 (Suppl 1):S11-14, 2010

3. Bai CL, Osaki T, Yonezawa H, Hanawa T, Zaman C, Kurata S, Kamiya S, Tanaka H.

In vitro and in vivo effects of the Mongolian drug Amu-ru 7 on *Helicobacter pylori* growth and viability.

Microbiol Immunol. 54(9):508-515, 2010

4. Hanawa T, Osaki T, Manzoku M, Kawakami H, Tomoda A, Kamiya S:
In vitro antibacterial activity of Phx-3 against *Helicobacter pylori*.

Biol Pharm Bull 33(2):188-191, 2010

2. 学会発表

1. 米澤英雄、神谷茂：口腔内細菌がおよぼすピロリ菌感染への影響。第 83 回日本細菌学会総会、平成 22 年 3 月 27-29 日、横浜
2. 米澤英雄、大崎敬子、花輪智子、Zaman Cynthia、神谷茂：
Helicobacter pylori のバイオフィルムにおける遺伝子発現制御の解析。第 16 回日本ヘリコバクター学会学術集会、平成 22 年 6 月 24-25 日、京都
3. 米澤英雄、大崎敬子、花輪智子、Zaman Cynthia、Woo Timothy、蔵田訓、神谷茂：
Helicobacter pylori のバイオフィルム形成における CsrA の機能解析。Bacterial Adherence and Biofilm 第 23 回学術

集会、平成22年7月9日、東京

4. 神谷 茂：バイオフィルム感染症
ー病態発現メカニズムと新たなる
治療法の開発、日本整形外科学会
教育研修講演(第103回ICD講習会)、
平成22年6月19日、京王プラザホテ
ル、東京
5. 神谷 茂：ヘリコバクター・ピロ
リ感染症の基礎と臨床、山梨県医
師会、日本医師会生涯教育講座、
平成22年9月4日、甲府
6. Kamiya S, Yonezawa H, Woo T,
Kurata S, Zaman C, Hanawa T, Kato
S, Osaki T: Biofilm formation by
Helicobacter pylori and its
pathogenesis. The 33rd International
Congress on Microbial Ecology in
health and Disease, 6-10 Sept., 2010,
Greece

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

鶏株、ヒト腸炎株、ヒト Guillan-Barre syndrome (GBS) 株に関する比較プロテオーム解析および比較ゲノム解析
- 高運動性関連構造の解析 -
分担研究者 山本達男 新潟大学大学院教授

研究要旨

Campylobacter 感染症（件数で細菌性食中毒一位、2009年）は主に腸炎と関連するが、深部感染症（菌血症、Guillan-Barré syndrome [GBS] など）とも関連する。原因菌は主に *C. jejuni*/*C. coli* で、両端に1本ずつ長い鞭毛をもち、強い運動性を示す。本研究では、*C. jejuni*/*C. coli* の運動特性を調べ、関連する超微細菌体構造を解析した。遊走性は 20°C では動かず、人体温（37°C）/鶏体温（42°C）で高速遊走（>100 μm/s）した。菌体両端の広い細胞間隙に内膜の運動駆動部と鞭毛に連結し、外膜内側の特異なカップ様構造と一体をなした、高速運動をつくり出す特異構造が存在。この極構造を *Campylobacter* high-speed-driving unit (CHSDU) と命名、遺伝学的・蛋白化学的解析を進めている。一方、GBS 株（Penner 19 型）では、解析した5株のうち2株が非らせん菌で、そのうち1株は高運動性の有鞭毛株、もう1株は非運動性の鞭毛欠落株であった。GBS 株のゲノム解析を進めている。以上、腸炎例ではらせん形菌体と高速運動が *Campylobacter* の病原因子であると考えられた。高速運動を可能にする CHSDU 構造を明らかにした。一方、GBS 例では運動性/非運動性の非らせん菌が発症により関与する可能性がある。

A. 研究目的

Campylobacter 感染症は鶏肉の消費に伴って増加してきた食中毒である。*Campylobacter* 食中毒は多くの国で頻度が高く、わが国でも発生件数で見るとサルモネラや腸炎ビブリオによる食中毒を凌ぎ、2003年以來細菌性食中毒の一位を占める（2009年）。

Campylobacter は鶏の腸管内では常在菌で、鶏には病原性を示さない。ヒトの

場合には、汚染された鶏肉などを経口摂取すると腸炎（水様下痢、発熱を伴った血性下痢、腹痛）を発症する。さらに深部感染症である菌血症や Guillan-Barré syndrome (GBS) あるいは Miller Fisher syndrome (MFS) を患うことがある。後者は特定の血清型 [Penner heat-stable (HS) serotype] と関連することが多い。

原因菌は主に *C. jejuni* で、*C. coli* も分離される。ともにグラム陰性のらせ

ん菌で、両端に1本ずつ鞭毛をもつ双毛性菌で強い運動性を示す。*Campylobacter* は侵入性細菌と理解されていて、*C. jejuni* の鞭毛が菌の侵入過程で重要な働きをされると考えられるようになってきた。

従来の研究で、わが国の *C. jejuni* と *C. coli* について multilocus sequence typing (MLST) による ST 型別解析とパルスドフィールドゲル電気泳動解析を併用して、分子疫学解析を行った。本研究では、課題①分子疫学的に性状解析を行った腸炎由来の *C. jejuni* と *C. coli* 株について液体中での運動特性を調べ、関連する超微細菌体構造を解析した。課題②同様に GBS 由来 *C. jejuni* 株の運動性、菌体構造を解析した。

B. 研究方法

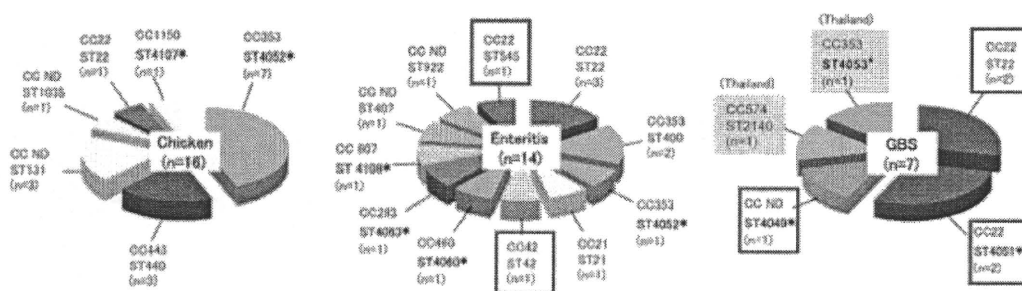
1) 菌株

課題 1. 腸炎由来 *C. jejuni* および *C. coli* の運動性および関連する特異な菌端構造の解析

2001 年から 2007 年にかけて千葉および新潟で分離されたヒト腸炎由来 *C. jejuni* 3 株 (ST42、ST545、不明) およびヒト腸炎由来 *C. coli* 2 株 (ST4059) を用いた。また、*C. jejuni* ATCC33560 を用いた。また対照として、運動解析と電子顕微鏡解析には *Campylobacter* と同様にらせん菌であるヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori* [C7M]) とコレラ菌 (*Vibrio cholerae* 01 [E08 株]/0139 [T16 株]) を用いた。

課題 2. GBS 由来 *C. jejuni* の性状解析

(A) *C. jejuni*



(B) *C. coli*

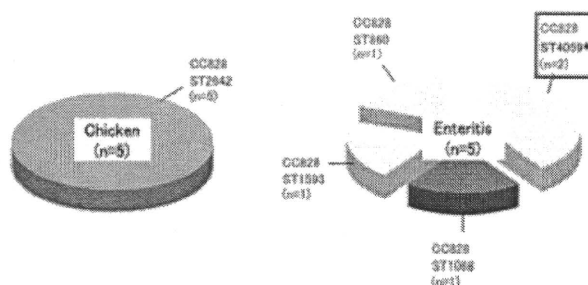


Fig. 1. わが国およびタイで分離された分離されたヒト腸炎、Guillan-Barré syndrome、および鶏由来の *C. jejuni* (A) および *C. coli* 株 (B) の ST 型分布状況

1997年に京都府の病院から分与されたGBS患者由来 *C. jejuni* 5株を用いた。ST型の内訳はST22が2株、ST4051が2株、ST4049が1株であった (Fig. 1)。

2) 運動性解析

10%血清 (Fatal bovine serum) ブレインハートインフュージョン (BHI) 液体培地で培養し、運動解析装置を用いて解析した。

3) 電子顕微鏡解析

C. jejuni を plastic coverslips 及び HEp-2 cell に粘着・感染させ、グルタルアルデヒドとオスミウム酸で固定し、脱水後、臨界点乾燥を行い、金属蒸着しサンプルとした。サンプルは走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した。透過型電子顕微鏡 (TEM) 解析用には、上記の脱水処理資料を EPOK812 処理し、超薄切片化した後、酢酸ウラニウム・クエン酸鉛で染色して解析に供した。

4) *motA* 遺伝子のクラスター解析

C. jejuni の *motA* 遺伝子の塩基配列を決定し、他の細菌の *motA* 遺伝子と比較解析した。解析には GenBank に登録されたサルモネラ (NC_011294)、大腸菌 (NC_002695)、腸炎ビブリオ (NC_004605)、*C. jejuni* (NC_009707)、*H. pylori* (NC_000921)、*V. cholerae* (NC_012668) の *motA* 遺伝子を用いた。塩基配列のアライメントは ClustalX (version 2.0) を用い、系統樹の表示は TreeViewX (version 0.5.0)

(<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) を使用した。

5) *C. jejuni* GBS 株 (ST22) のゲノム

解析

染色体 DNA を精製し、pyrosequencing 法 (assembler software GS De Novo Assamblar version 2.0 を使った genome sequencer FLX system) で解析した。Mummer software を使ってコンティグを既知のゲノム構造に対比し、当該菌のゲノムを推定した (コンティグマップを作る)。Open reading frame (*orf*) は silico MolecularCloning (version 4.2) を使って探索した。

C. 研究結果

課題 1. 腸炎由来 *C. jejuni* および *C. coli* の運動性および関連する超微細菌体構造の解析

1) 運動性解析

解析に用いた *C. jejuni* および *C. coli* の液体中での運動性は、*V. cholerae* 01/0139 の場合とは異なり、温度によって厳しく制御されていた (Fig. 2)。環境温度 (25°C以下) では、*H. pylori* の場合と同様に、*C. jejuni* および *C. coli* の運動性は 37°C (人体温度) と比べて著しく低下した。一方で *H. pylori* とは異なり、*C. jejuni* および *C. coli* は鶏体温 (42°C) でも 37°C の場合と同様に激しく運動した。

37°C および 42°C での遊走速度は *C. jejuni*、*C. coli* とともに >100 $\mu\text{m/s}$ であった (Fig. 2)。この速度は *H. pylori* や *V. cholerae* 01/0139 の速度 (70 $\mu\text{m/s}$ 前後) を上回った。

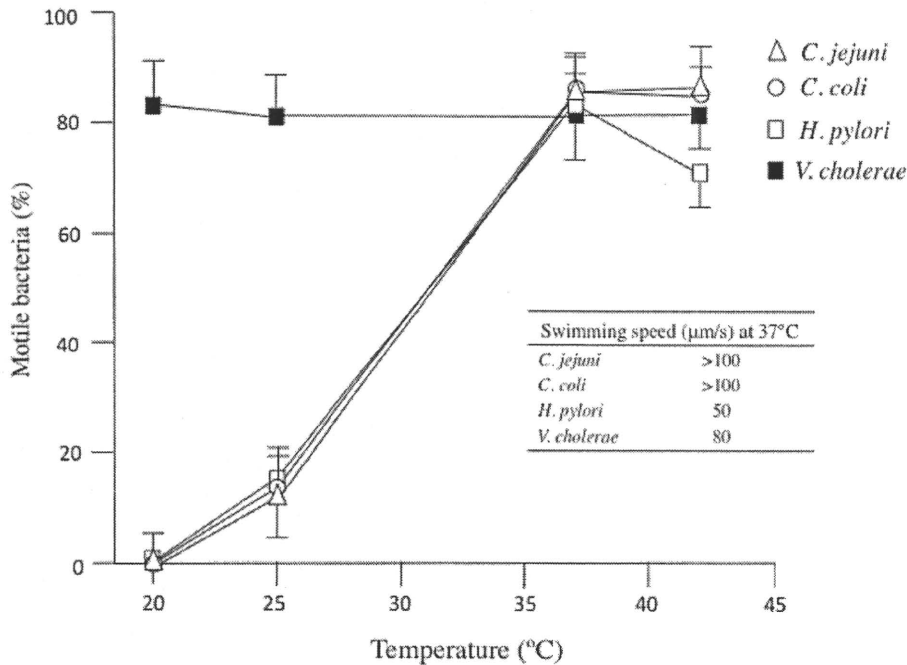


Fig. 2. *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Helicobacter pylori*, および *Vibrio cholerae* の運動性解析。グラフは運動性を示した菌体の割合 (%) を示し、表は遊走速度を示す。

2) 運動性に関連する特異な菌端構造の解析

C. jejuni あるいは *C. coli* の両菌端には、高速運動をつくり出す特異な構造が存在した (Fig. 3)。内膜の極 (運動駆動部) から筒状構造が伸び、菌体表面でロート状に開き、そこから菌体外へと鞭毛を放っていた。この長い運動駆動部筒構造は、外膜の内側の細胞間隙に位置し、かつ菌端だけに存在する特異なカップ様構造と一体をなしていた。このカップ様構造は厚さ約 38 nm でタンパク質で構成されると考えられた。*C. jejuni* と *C. coli* がもつ運動に関連した上記の極構造を *Campylobacter* high-speed-driving unit (CHSDU) と命名した。菌株によっては、外膜を被った CHSDU が菌体から遊離し、鞭毛を持った小さな球状構造として観察された (Fig.

4)。

3) *motA* 遺伝子のクラスター解析

MotA は細菌の鞭毛モーターの固定子蛋白質で、陽イオンチャンネルを形成し、鞭毛モーターのイオン特異性を決定している。*C. jejuni* の *motA* 遺伝子配列を決定し、既報の他の細菌由来の H⁺駆動型または Na⁺駆動型の *motA* 遺伝子の配列と比較した。クラスター解析の結果、*C. jejuni* の *motA* 遺伝子は既知の H⁺駆動型または Na⁺駆動型の *motA* 遺伝子とは異なるクラスターに分類された。一方で *H. pylori* の *motA* 遺伝子とクラスターを形成したが、*H. pylori* と異なる新しいタイプの陽イオンチャンネルであることが示唆された (Fig. 5)。

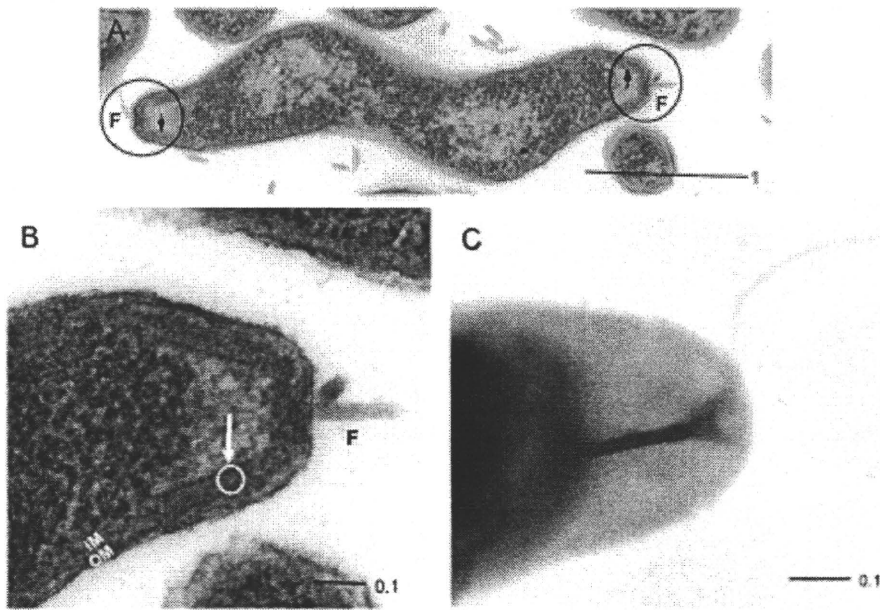


Fig. 3. *Campylobacter jejuni* ATCC33560 の超微細菌体構造の透過型電子顕微鏡解析。A および B. *Campylobacter jejuni* ATCC33560 の透過型電子顕微鏡像。B は A の図の F の部分を拡大したもの。黒と白の矢印はカップ様構造を示す。C. ネガティブ染色

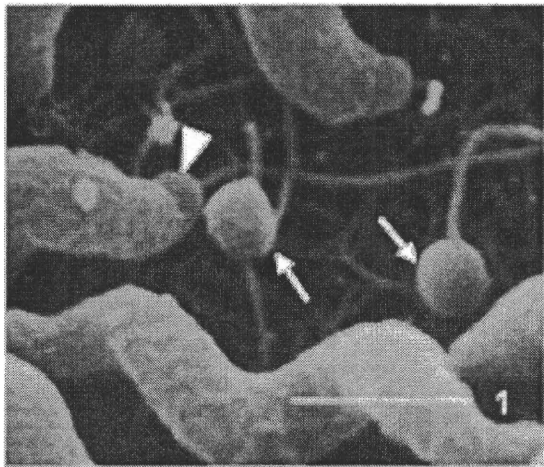


Fig. 4. *Campylobacter jejuni* ATCC33560 の走査型電子顕微鏡解析。矢頭、カップ様構造。矢印、菌体から遊離したカップ様構造

課題 2. GBS 由来 *C. jejuni* 株の運動性および菌体構造の解析

1) 運動性および菌体構造の解析

一方、GBS 株 (Penner 19 型) についても解析を行った。解析した 5 株のうち 3 株 (ST22 型、STST4049 型、ST4051 型) は上記の腸炎株と同様にらせん菌であったが、2 株は非らせん菌 (大腸菌状の桿菌) であった (Table 1、Fig. 6)。

非らせん菌 2 株のうち、1 株 (ST22 型) は鞭毛をもち、腸炎株と同様の運動性を示した ($>100 \mu\text{m/s}$ 、Table 1、Fig. 6)。従って、高速運動に菌体のらせん形は必須でない。残りの 1 株 (ST4051 型) は鞭毛が欠落していた (Fig. 6)。この鞭毛欠落株は運動性を示さなかった ($>4 \mu\text{m/s}$ 、Table 1)。鞭毛が運動性に必須

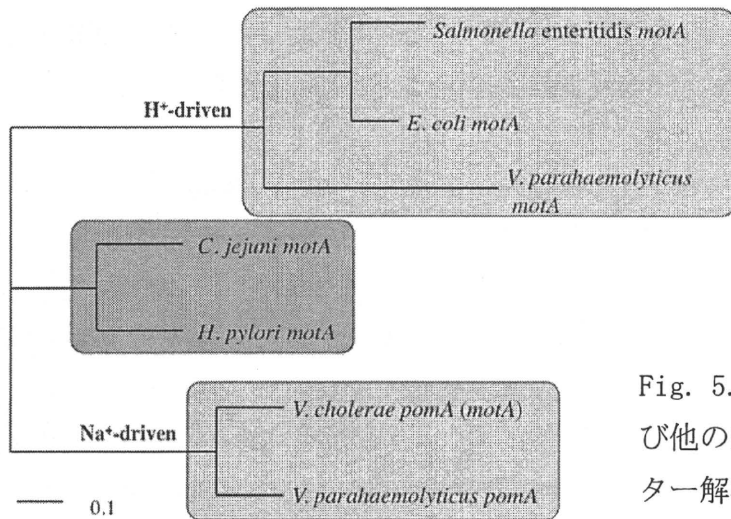


Fig. 5. *Campylobacter jejuni* および他の細菌の *motA* 遺伝子のクラスター解析

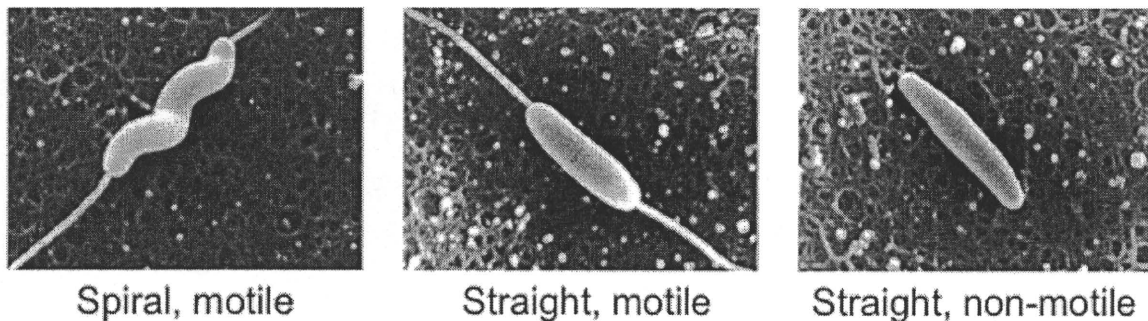


Fig. 6. Guillan-Barré syndrome 由来 *Campylobacter jejuni* の走査型電子顕微鏡解析

Table 1. Guillan-Barré syndrome 由来 *Campylobacter jejuni* (Penner serotype 19) の性状解析

Strain (Isolation year)	Age	Sex	Clinical form (anti-GM1 Abs)	ST (CC) type	Bacterial shape (flagellum)	Motility (Swimming speed)
KB2749 (1985)	Child	Male		ST4049 (no CC)	Spiral (+)	+ (>100 μm/S)
KB3160 (1988)	Child	Male	Axonal (nt)	ST22 (CC22)	Spiral (+)	+ (>100 μm/S)
KB3439 (1989)	Child	Male		ST22 (CC22)	Straight (+)	+ (>100 μm/S)
KB3445 (1990)	Child	Male	Axonal (+)	ST4051 (CC22)	Spiral (+)	+ (>100 μm/S)
KB3449 (1996)	Adult	Male	Axonal (+)	ST4051 (CC22)	Straight (-)	- (<4 μm/S)

であることを明らかにした。

2) ゲノム解析

C. jejuni GBS 株 (ST22、らせん形) のゲノムを pyrosequencing 法により解析した。総コンティグ塩基数は 1,639,885 塩基で、GC 含量は 30.5%であった。現在、annotation を行っている。

D. 考察

1) 運動性の温度依存性について

C. jejuni および *C. coli* は両菌端に 1 本ずつ長い鞭毛をもち、高速運動するらせん菌であり、ヒトでは侵入性細菌と理解されている。鞭毛を介した腸管の M 細胞からの侵入が示唆されている。

本研究の結果、*C. jejuni* および *C. coli* は環境温度 (25°C 以下) で運動せず、人体温度 (37°C) および鶏体温 (42°C) で激しく高速運動することを明らかにした。運動性が *C. jejuni* および *C. coli* の生育環境の温度に一致していたことから、運動性がヒトおよび鶏への定着に重要な役割を果たしていることを示唆している。

一方、低温で運動を停止する現象は、*Campylobacter* が低温で増殖できない事

実と一致する。これは、低温下で菌体のエネルギー産生が著しく低下する可能性を示唆している。もう一つ考えられるメカニズムとしては、赤痢菌等に見られる低温下での鞭毛モーター関連遺伝子の発現抑制が考えられる。

2) 腸炎由来 *Campylobacter* の超微細菌体構造と高速運動との関連について

本研究において *Campylobacter* が *Campylobacter* high-speed-driving unit (CHSDU) と命名した鞭毛高速駆動装置をもつことを明らかにした (Fig. 7)。本構造は *H. pylori* や *V. cholerae* のような他の細菌では見られず、*Campylobacter* に極めて特異的な構造である。

本構造の特徴はカップ様構造に保持され、特異な細胞間隙に存在する長い駆動部筒構造をもつことである。この駆動部筒構造が長い鞭毛の回転とその高速運動を可能にしていると考えられる。メカニズムとしては第一に、この特異な細胞間隙に濃縮したイオンによる化学ポテンシャルが長い駆動部筒構造で回転エネルギーに変換され、高速回転を生み出していると考えられる。第二に、長い鞭毛を安定に回転させるために、カップ

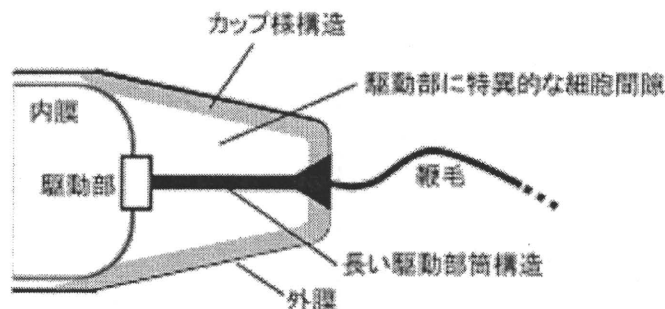


Fig. 7. *Campylobacter* の鞭毛高速駆動ユニット (CHSDU) の構造モデル

様構造と長い駆動部筒構造で鞭毛の回転を支えていると考えられる。

細胞間隙に存在する鞭毛構造の例としては、スピロヘータの鞭毛がある（細胞間隙に鞭毛が存在し、運動性を付与する）が、*Campylobacter* の CHSDU 構造はこれとは全く異なり、新規の構造である可能性が高い。

今回、細菌の鞭毛モーターのチャンネル蛋白である MotA の遺伝子 (*motA*) のクラスター解析を行い、*Campylobacter* の *motA* が、*H. pylori* の *motA* とともに既知の H⁺駆動型または Na⁺駆動型の *motA* とは異なるクラスターに分類されること、さらに *H. pylori* の *motA* とも異なることを明らかにした。この結果も、CHSDU 構造が *Campylobacter* 特異的な新規の鞭毛高速駆動装置であることを支持している。

3) GBS 由来 *C. jejuni* 株の運動性と菌体構造について

本研究では、GBS を例に、*C. jejuni* の深部感染と菌体構造および運動性との関連も検討した。解析を行った GBS 由来 (Penner 19 型) 5 株のうち 3 株の菌体形状は上記の腸炎株と同様にらせん形あったが、2 株は非らせん菌（大腸菌状の桿菌）であった。このことは、菌体のらせん形が GBS に対する病原性に関連しないことを示唆している。

また、非らせん菌のうち 1 株は鞭毛をもち、腸炎株と同様の運動性を示した。一方で、残りの 1 株は鞭毛欠落株で、運動性を示さなかった。この結果は、らせん形の菌体構造が運動に必須ではないこと、および鞭毛が運動性に必須な因子

であることを示している。GBS においてこのような運動性のある有鞭毛非らせん菌、および鞭毛欠落非らせん菌が選択されることは、発病の段階によって、これらの表現型が有利に働く場合がある可能性を示唆している。

以上、腸炎例ではらせん形菌体と高速運動が *Campylobacter* の病原因子であると考えられた。高速運動を可能にする CHSDU 構造を明らかにした。しかし、深部感染症である GBS の場合には運動性あるいは非運動性の非らせん菌が選択される（発症により関与する）場合があるのかもしれない。

E. 結論

(1) 本研究において、高速運動を可能にする *Campylobacter* に特異的な CHSDU 構造を明らかにした。

(2) ヒト腸炎ではらせん形菌体と高速運動が *Campylobacter* の病原因子であると考えられた。

(3) 一方、GBS では発病過程によっては、有鞭毛非らせん菌、および鞭毛欠落非らせん菌が病原性に関連する可能性が示唆された。

(4) *Campylobacter* の運動性および定着の阻害薬の発見・開発は、新規のカンピロバクター感染症治療薬の開発につながる可能性がある。

F. 健康危機情報

近年、カンピロバクター食中毒は発生件数で見ると細菌性食中毒で最も重要

である。原因菌には世界分布型株も存在するが、土着株も存在する。鶏に由来する深刻な GBS 発症も認めた。さらに感染動向に注意する必要がある。

また、*Campylobacter* は液体中で他の細菌には見られない激しい運動性を有するため、鶏肉の解体過程で水等の液体を使用する場合は特に注意を要する。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Yabe S, Higuchi W, Takano T, Razvina O, Iwao Y, Isobe H, Yamamoto T. In vitro susceptibility to antimicrobial agents and ultrastructural characteristics related to swimming motility and drug action in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. J Infect Chemother. 16:174-85, 2010

(2) Yabe S, Higuchi W, Iwao Y, Takano T, Razvina O, Reva I, Nishiyama A, Yamamoto T. Molecular typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from chickens and patients with gastritis or Guillain-Barré syndrome based on multilocus sequence types and pulsed-field gel electrophoresis patterns. Microbiol Immunol. 54:362-7, 2010

(3) 矢部 静、高野智洋、西山晃史、山本達男。トピックス-最新疫学情報(海外)、最新疫学情報(国内)、Journal club-。日本カンピロバクター研究会誌 vol. 3:

34-38, 2010

2. 学会発表

(1) Wataru Higuchi, Shizuka Yabe, Tomomi Takano, Tatsuo Yamamoto. The characteristics of *Campylobacter jejuni* motility and structures. 45th US-Japan Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections (Kyoto, Japan), 2010 (12月)

(2) 矢部 静、高野智洋、岩尾泰久、西山晃史、山本達男。非らせん形 *Campylobacter jejuni* の臨床分離と性状解析。第3回日本カンピロバクター研究会(宮崎)、2010(12月)

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

腸炎ビブリオ3型分泌装置の発現制御機構の解明と
予防・治療への応用

研究分担者 飯田 哲也 大阪大学特任教授

研究要旨：

食中毒原因菌である腸炎ビブリオの病原性に重要な役割を果たしている3型分泌装置（T3SS2）の発現制御機構について解析をおこなった。その結果、T3SS2 遺伝子群は本菌のもつ VtrA, VtrB により正に発現制御されていることを明らかにした。さらに T3SS2 遺伝子群の宿主における発現誘導因子が胆汁酸であることを見出し、コレスチラミンのような胆汁酸吸着剤が腸炎ビブリオによる下痢発症を制御できる可能性を示した。コレスチラミンは高脂血症治療薬として既に臨床的に用いられている薬剤であり、細菌性下痢症に対する新しい制御法の可能性が示された。

A. 研究目的

腸炎ビブリオはパンデミッククローム出現以降世界的な流行をみせている下痢原因細菌である。汚染された魚介類を経口摂取することにより感染し、下痢、腹痛、嘔吐といった急性胃腸炎を引き起こす。従来、日本や東南アジア、南アジアを中心とするアジア各国で本菌による感染症が報告されてきたが、近年では南米、北米地域でも大規模なアウトブレイクが発生しており、世界的にみても重要な細菌感染症である。我々は本菌による下痢発症に、本菌のもつ2種類の3型分泌装置、T3SS1およびT3SS2のうち、T3SS2

が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。本研究では腸炎ビブリオの3型分泌装置、特にT3SS2の発現制御機構を明らかにし、それに基づいた新たな予防法・治療法へとつなげることを目的とした。

B. 研究方法

1) 供試菌株：全ゲノム配列を我々が報告（Lancet 361:743-749, 2003）した腸炎ビブリオRIMD2210633株を用いた。
2) 遺伝子破壊株の作成：suicide vector pYAK1 を用い、homologous recombination により既報（Infect. Immun. 72: 6659-6665, 2004）に従った。遺伝子破壊の確認はPCR およ

びサザンブロットィングにより行った。

3) 病原性試験：下痢原性はウサギ腸管結紮ループ試験における液体貯留活性および腸管上皮組織の病理像により評価した (Infect. Immun. 72: 6659-6665, 2004)。

4) 遺伝子発現解析：DNA マイクロアレイを用いた腸炎ビブリオ遺伝子の発現解析は既報 (PLoS ONE 5: e8678, 2010) に依った。

C. 研究結果

1) T3SS2 遺伝子群の発現調節因子の同定

T3SS2 遺伝子群がコードされる pathogenicity island (Vp-PAI) 上に存在する遺伝子群を精査した結果、DNA 結合モチーフを有する *vtrA* および *vtrB* を見出した。これら遺伝子の欠失変異株を作成し解析することにより、T3SS2 依存的な細胞毒性および腸管毒性が顕著に低下することが明らかとなった。DNA マイクロアレイを用いて *vtrA* および *vtrB* 欠損株の遺伝子発現プロファイルを野生株と比較した結果、*vtrA* および *vtrB* 株では T3SS2 遺伝子群を含む Vp-PAI 上の遺伝子群の発現が有意に低下していた。以上の結果より、*vtrA* および *vtrB* は Vp-PAI 上の遺伝子群を特異的に正に発現制御する発現調節因子であることが明らかになった。

2) T3SS2 遺伝子群の宿主側発現誘導因子の同定

さらに T3SS2 遺伝子群を発現誘導する宿主 (ヒト) 側の因子の検索を行った。まず、*in vitro* において環境因子 (温度および浸透圧) が T3SS2 遺伝子群の発現に与える影響を検討したと

ころ、T3SS2 関連タンパク質の発現はヒトの体温に近い 37-42°C で誘導された。一方、浸透圧に関してはヒト腸管腔の浸透圧である 0.3 M NaCl よりも高い浸透圧においてはむしろ抑制された。このことから宿主内で T3SS2 の発現が効率的に誘導されるには、腸管内の浸透圧を克服して発現誘導する宿主因子が必要であると予測された。

そこで腸管に存在する様々な因子について発現誘導を検討した結果、ヒト腸管内に豊富に存在する胆汁が 0.3 M NaCl 以上の浸透圧条件下においても T3SS2 関連タンパク質の発現を強力に誘導することを見出した。DNA マイクロアレイによる全遺伝子発現解析の結果、胆汁は T3SS2 遺伝子群がコードされる Vp-PAI 領域の遺伝子群を特異的に発現誘導することが明らかとなった。さらに T3SS2 関連遺伝子群の発現に必須の転写調節因子である VtrA と VtrB の遺伝子破壊株では胆汁による T3SS2 遺伝子群の発現誘導は全く認められなかったこと、および胆汁刺激により *vtrB* 遺伝子の転写活性が VtrA タンパク質依存的に誘導されたことから、胆汁刺激は VtrA を介して *vtrB* 遺伝子の転写を誘導していることが示唆された。

胆汁は無機、および有機化合物の混合物であることから、次に胆汁中の T3SS2 遺伝子群発現誘導因子の同定を試みた。胆汁の *vtrB* 遺伝子発現誘導活性は胆汁酸吸着剤であるコレステラミン処理によって完全に消失したこと、消失した誘導活性は胆汁酸の添加で回復したこと、およびある種の胆汁酸は単独で誘導活性を示したことから、胆汁中の胆汁酸が発現誘導活性物質であることが明らかとなった。

胆汁酸による T3SS2 遺伝子群の発現誘導が、腸炎ビブリオにより誘導される下痢発症に寄与しているかどうかをウサギ腸管結紮ループ試験で検討した。その結果、ウサギ腸管内の内在性胆汁酸をコレステラミンで吸着除去することにより、腸炎ビブリオ感染によって誘導される液体貯留が有意に減少した。また低下した液体貯留活性は胆汁酸添加により復活した。これらのことにより、胆汁中の胆汁酸は宿主体内における T3SS2 遺伝子群発現誘導因子の（すくなくとも）ひとつであり、腸炎ビブリオの下痢発症機構において重要であると考えられた。

D. 考察

経口感染した腸炎ビブリオが、病態形成器官であるヒト腸管に到達したことを胆汁酸を感知することにより認識し、T3SS2 遺伝子群の発現転写調節因子である VtrA と VtrB を介して T3SS2 遺伝子群の発現を誘導、その結果、効率的に宿主に下痢を誘導するという巧妙な病原性発現機構が明らかとなった。

E. 結論

T3SS2 遺伝子群は本菌のもつ VtrA, VtrB により正に発現制御されていることを明らかにした。さらに T3SS2 遺伝子群の宿主における発現誘導因子が胆汁酸であることを見出し、コレステラミンのような胆汁酸吸着剤が腸炎ビブリオによる下痢発症を制御できる可能性を示した。コレステラミンは高脂血症治療薬として既に臨床的に用いられている薬剤であり、安全性は確認されている。本研究により細菌性下痢症に対する新しい制御法の可能性が示された。T3SS2 と類似の 3 型

分泌装置はコレラ毒素非産生性のコレラ菌 (non-O1, non-O139 コレラ菌) にも保有されている。今回見出された新しい制御法は腸炎ビブリオのみならず他の細菌性下痢症の制御にも寄与する可能性がある。

F. 健康危機情報

研究成果で、国民の健康被害等を考慮したとき国民に至急知らせた方がよい情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kodama, T., Gotoh, K., Hiyoshi, H., Morita, M., Izutsu, K., Akeda, Y., Park, K.-S., Cantarelli, V.V., Dryselius, R., Iida, T., and Honda, T. 2010. Two regulators of *Vibrio parahaemolyticus* play important roles in enterotoxicity by controlling the expression of genes in the Vp-PAI region. PLoS One 5: e8678.

Hiyoshi, H., Kodama, T., Iida, T., and Honda, T. 2010. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity and mice lethality. Infect. Immun. 78: 1772-1780.

Kodama, T., Yamazaki, C., Park, K.-S., Akeda, Y., Iida, T., and Honda, T. 2010. Transcriptional regulation of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS1 genes by ExsACDE regulatory cascade and H-NS.