

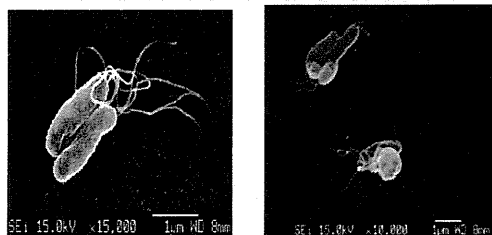
mmol、5 mmol 量加えた培地に、前培養した *H. pylori* を 5×10^6 CFU 加えた。微好気下 37°C 条件下で培養し、24 時間および 48 時間後に吸光度計にて OD600 を測定し、*H. pylori* の成長を測定した。

3) *P. gingivalis* 培養上清の *H. pylori* 抗菌性の解析：*P. gingivalis* 培養上清で処理した *H. pylori* の菌体がどのような影響を受けているのかを調べた。*P. gingivalis* 培養上清で処理した *H. pylori* の培養上清より遠心およびフィルター通過で菌体を除き、上清からフェノール、クロロフォルムにて DNA を回収した。菌体外 DNA 量を *H. pylori* 16S rRNA 特異的プライマーを用いた定量的 PCR により測定した。

C 研究結果

1) *P. gingivalis* 培養上清が及ぼす *H. pylori* 菌体構造への影響：*P. gingivalis* 培養上清で処理した *H. pylori* を走査型電子顕微鏡にて観察した。非処理の *H. pylori* 菌体はらせん状で、一端に 4 本程度の鞭毛が認められ、菌体表層はきれいな像を認めている (図 1a)。その一方で *P. gingivalis* 培養上清で処理した *H. pylori* 菌のほとんどは、菌体表層が破裂し、菌の一部が膨化した像が認められた (図 1b)。このような現象はコントロールの *H. pylori* の観察では認められることはなかった。

図 1(a) (b)

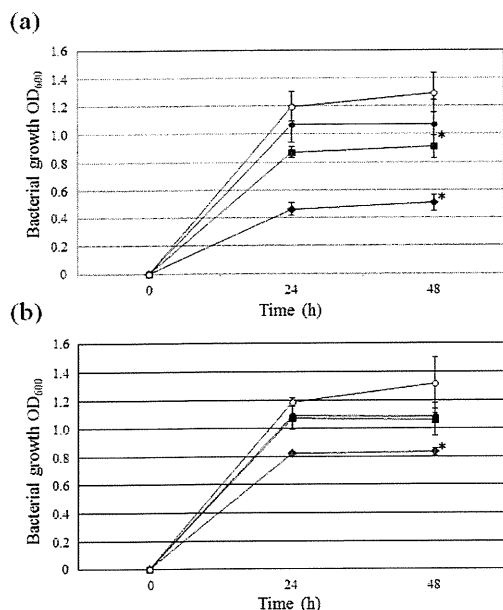


以上より *P. gingivalis* が産生し、菌体外に放出する物質は、*H. pylori* に対する抗菌的な物質を含んでいることが示唆された。

2) *P. gingivalis* 培養上清に含まれる抗菌性物質の検討：以前われわれは、*Clostridium butyricum* が産生する酪酸が *H. pylori* に対して抗菌的に働くことを報告している。*P. gingivalis* も同様に酪酸を産生することが報告されている。*H. pylori* を酪酸で処理すると、*P. gingivalis* 培養上清で処理した際と同様の形態変化を起こすことが確認できた。そこで酪酸を加えた培地での *H. pylori* ATCC 49503 株および TK1402 株の成長への影響について検討を行った。酪酸を 20 mmol、10 mmol、5 mmol の濃度で培地中に加え、24 時間、48 時間での OD600 を測定した。両株とも 20 mmol、10 mmol の酪酸加培地において有意に成長が抑制された (図 2 a:TK1402 株、b:ATCC 49503 株)。以上より *P. gingivalis* 培養上清に含まれる *H. pylori* への抗菌性物質は少なくとも酪酸が関与していることが示唆された。

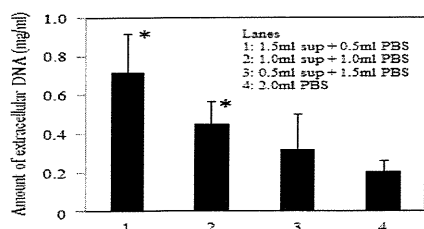
D 考察

図 2



3) 酪酸および *P. gingivalis* 培養上清の *H. pylori* に対する抗菌性の解析: *P. gingivalis* 培養上清で処理した *H. pylori* が受ける影響を、菌体外に放出された DNA 量を指標として調べた。まず *H. pylori* に抗菌性を示した酪酸で処理し、菌体外の DNA 量を測定した。酪酸で処理を行うと、濃度依存的に菌体外 DNA 量は増加した。そこで 2/3、1/2、1/3 vol/vol の *P. gingivalis* 培養上清で *H. pylori* を処理すると、濃度依存的に菌体外 DNA 量は増加した (図 3)。

図 3



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。このような細菌がどのように胃粘膜への定着・感染するのか、どのような疾患を誘導するのかについての研究は、疫学・病態のみならず、診断・治療・予防などの観点から大変興味深い。

口腔は外界より食物・飲料といった外界物を摂取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、無菌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。

口腔内、特に歯周病患者のデンタルプラーク中より *H. pylori* が高頻度で検出されることはこれまで多くの研究者により報告されてきている。結果として口腔、特に歯周病患者口腔は *H. pylori* の感染および除菌後の再感染の際の *H. pylori* リザーバーとしての役割を担っていると考えられている。しかしながら口腔内サンプルよりの *H. pylori* 培養による生菌の検出は、報

告が数件しかないため、本当に *H. pylori* が口腔内に定着しているのかについての証明はなされていない。今回われわれは、歯周病原細菌 *P. gingivalis* が産生する酪酸に注目し、酪酸の *H. pylori* に対する抗菌性について証明した。酪酸は *H. pylori* に対して殺菌的な作用をもち、菌体表層構造を破壊することを、電子顕微鏡による観察および細胞内 DNA の細胞からの遊離により確認した。また結果は標記してはいないものの、*H. pylori* の細胞質内タンパク物質であるウレアーゼの細胞からの遊離においても同様な結果を得ることが出来ている。*P. gingivalis* は実験室環境において、約 20 mmol の酪酸を産生することが明らかとなっている。今回の結果から 20 mmol は *H. pylori* に対する抗菌性を示すのに十分な濃度である。歯周病患者のデンタルプラーク中はやはり 15 から 20 mmol の酪酸が含まれているという報告もされている。これらの結果とわれわれの今回の結果から、歯周病患者のデンタルプラーク中においては *H. pylori* が定着生存するには厳しい環境であることが示唆された。

なぜ歯周病患者で *H. pylori* が高頻度で検出されか？既述したようにこれまで *H. pylori* が口腔より検出されるのは、そのほとんどが PCR によるものである。歯周病原細菌である *P. gingivalis* や *Fusobacterium nucleatum* は *H. pylori* と強い凝集性を持っていることが報告されている。また *Streptococcus mutans* や *S. sanguinis* は

どの口腔内細菌も *H. pylori* と強い凝集性を持つことが明らかとなっている。*H. pylori* が口腔内に入り込むと、こうした凝集性を持つ細菌により *H. pylori* は口腔内細菌性バイオフィルムに速やかに取り込まれることが推測できる。取り込まれた *H. pylori* は、デンタルプラーク中の酪酸などにより殺菌されるものの、その菌体物質や DNA は口腔バイオフィルムの構成物質として利用されている。その結果、生菌では *H. pylori* は検出できないものの、PCR では検出ができると考えられる。口腔内細菌で酪酸を産生する細菌は *P. gingivalis* だけではなく、歯周病原細菌の多くは酪酸を産生する。以上推測より、*H. pylori* は口腔内には定着はしていない、あくまで一時的な存在であると考ええる。

E 結論

- ・酪酸は *H. pylori* に対して殺菌的な抗菌作用を持つ。
- ・歯周病原細菌である *P. gingivalis* の培養上清は *H. pylori* に対して殺菌的な抗菌作用を持つ。

F 健康危機管理

なし

G 研究発表

1. 論文発表

1. Yonezawa, H., T. Osaki, T. Hanawa, S. Kurata, C. Zaman, T. D. Woo, M. Takahashi, S. Matsubara, H. Kawakami, K. Ochiai, S. Kamiya.

2012. The destructive effects of butyrate on the cell envelope of *Helicobacter pylori*. J. Med. Microbiol. in press.
2. Suzuki, M., K. Kiga, D. Kersulyte, J. Cok, C. C. Hooper, H. Mimuro, T. Sanada, S. Suzuki, M. Oyama, H. Kozuka-Hata, S. Kamiya, Q. M. Zou, R. H. Gilman, D. E. Berg, C. Sasakawa. 2011. Attenuated CagA oncoprotein in *Helicobacter pylori* from Amerindians in Peruvian Amazon. J. Biol. Chem. 286: 29964-72.
 3. Ishida, K., T. Yamazaki, K. Motohashi, M. Kobayashi, J. Matsuo, T. Osaki, T. Hanawa, S. Kamiya, Y. Yamamoto, H. Yamaguchi. 2011. Effect of the steroid receptor antagonist RU486 (mifepristone) on an IFN γ -induced persistent *Chlamydomphila pneumoniae* infection model in epithelial HEp-2 cells. J. Infect. Chemother. in press.
 4. Mikura, S., H. Wada, M. Higaki, T. Yasutake, H. Ishii, S. Kamiya, H. Goto. 2011. Erythromycin prevents the pulmonary inflammation induced by exposure to cigarette smoke. Trans. Res. 158: 30-7.
 5. Woo, T. D., K. Oka, M. Takahashi, F. Hojo, T. Osaki, T. Hanawa, S. Kurata, H. Yonezawa, S. Kamiya. 2011. Inhibition of the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* in vitro by *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 strain. J. Med. Microbiol. 60: 1617-25.
 6. Yonezawa, H., T. Osaki, T. D. Woo, S. Kurata, C. Zaman, F. Hojo, T. Hanawa, S. Kato, S. Kamiya. 2011. Analysis of outer membrane vesicle protein involved in biofilm formation of *Helicobacter pylori*. Anaerobe. 17: 388-90.
 7. Hirao, S., H. Wada, K. Nakagaki, T. Saraya, D. Kurai, S. Mikura, T. Yasutake, M. Higaki, T. Yokoyama, H. Ishii, K. Nakata, T. Aakashi, S. Kamiya, H. Goto. 2011. Inflammation provoked by *Mycoplasma pneumoniae* extract: implications for combination treatment with clarithromycin and dexamethasone. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 62: 182-9.
 8. Oguri, S., J. Matsuo, Y. Hayashi, S. Nakamura, T. Hanawa, T. Fukumoto, Y. Mizutani, T. Yao, K. Akizawa, H. Suzuki, C. Shimizu, K. Matsuno, S. Kamiya, H. Yamaguchi. 2011. Ciliates promote the transfer of the gene encoding the extended-spectrum β -lactamase CTX-M-27 between *Escherichia coli* strains. J. Antimicrob. Chemother. 66: 527-30.
2. 学会発表
1. Kamiya, S.: Microbial ecology between *Helicobacter pylori* and microbiota in gastric mucosa. The Joint Meeting of 17th International

- Symposium on Gnotobiology and 34th Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease. Yokohama, Nov. 20-23, 2011. Program: 42-43.
2. Yonezawa, H., S. Kamiya.: Biofilm formation of *Helicobacter pylori*. The Joint Meeting of 17th International Symposium on Gnotobiology and 34th Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease. Yokohama, Nov. 20-23, 2011. Program: 96-97.
 3. Osaki, T., C. Zaman, T. Matsuki, T. Asahara, H. Yonezawa, T. Hanawa, S. Kurata, F. Hojo, H. Taguchi, S. Kamiya.: Comparative analysis of gastric bacterial microbiota in Mongolian gerbil after long-term infection with *Helicobacter pylori*. The Joint Meeting of 17th International Symposium on Gnotobiology and 34th Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease. Yokohama, Nov. 20-23, 2011. Program: 139.
 4. Yonezawa, H., T. Osaki, S. Kurata, C. Zaman, T. Hanawa, S. Kamiya: Oral bacteria affects the virulence of *Helicobacter pylori*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, Sept. 6-16, 2011. Final Program: 239.
 5. Osaki, T., S. Kato, C. Zaman, H. Yonezawa, T. Hanawa, S. Kurata, F. Hojo, S. Kamiya: The characterization of *Helicobacter pylori* strains isolated from the iron deficiency anemia patients. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Sept 6-16, 2011. Final Program: 151.
 6. Osaki, T., S. Kato, H. Yonezawa, S. Kurata, C. Zaman, T. Hanawa, S. Kamiya: Analysis of iron transport and storage gene in *Helicobacter pylori* isolated from iron deficiency anemia patients. The 16th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms. Vancouver, Aug28-Sept1, 2011. CHRO 2011 Final Program and Abstract Book: 83.
 7. Kamiya, S., C. Zaman, H. Yonezawa, F. Hojo, T. Osaki.: Analysis for between *Helicobacter pylori* and gastric microbiota in Mongolian gerbil. The 16th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms. Vancouver, Aug 28 - Sept 1, 2011. CHRO 2011 Final Program and Abstract Book: 195.
 8. 米澤英雄、大崎敬子、花輪智子、Zaman Cynthia、神谷茂：*Helicobacter pylori*のバイオフィルム形成とクラリスロマイシン耐性. 第17回日本ヘリコバクター学会学術集会、富山、平成23年6月24-25日. プログラム抄録集: 145.
 9. 大崎敬子、加藤晴一、米澤英雄、Zaman Cynthia、北条史、花輪智子、神谷茂：*Helicobacter pylori*とCaco-2

細胞の混合培養時の相互作用について. 第17回日本ヘリコバクター学会学術集会富山、平成23年6月24-25日. プログラム抄録集: 149.

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

大腸菌性下痢症に対する粘膜ワクチン開発に向けた新規病原
因子の探索

研究分担者 辻 孝雄 藤田保健衛生大学教授
研究協力者 有満 秀幸 藤田保健衛生大学講師

研究要旨：

腸管出血性大腸菌感染症のワクチン抗原を大量生産し、粘膜ワクチンとして応用するために、リンコマイシンを誘導剤とした志賀毒素（Shiga toxin 2;Stx2）と弱毒変異毒素（mStx2）の大腸菌でのリコンビナント蛋白発現系を作製した。1L培養あたり 50-100mg レベルの高収量で精製された mStx2 で皮下免疫されたマウスの血中には、A、B 両サブユニットに対する IgG の産生が認められた。また、免疫マウスを高致死量の Stx2 で腹腔内チャレンジしたところ、100 倍致死量まで完全防御することができた。本発現系は EHEC 感染症による HUS 予防ワクチンの大量産生系として有用であることが明らかとなった。

A. 研究目的

腸管感染症を予防する上で粘膜 IgA を誘導する粘膜ワクチンの開発は重要課題である。そのためには適切なアジュバントと投与経路を選択する必要がある。コレラ毒素（CT）や毒素原性大腸菌易熱性毒素（LT）は、ワクチン抗原と経鼻ないし経口投与することによって、血中のみならず粘膜 IgA 抗体の産生を誘導する。我々は種々の抗原を用いて CT や LT をアジュバントとした粘膜ワクチン法の開発に取り組むとともに、発展途上国における大腸菌性下痢症の新規病原因子を探索し、ワクチン抗原の開発にも取り組んでいる。一方でワクチン抗原を実用化する上で、我々はその防御効果はさることながら、安価に生産できること、すなわち大量産生系の構築の可否が重要であると考えている。

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症は宿主に出血性腸炎を引き起こし、重症例では溶血性尿毒症症候群（HUS）を引き起こして死にも

至る感染症である。本菌の主要な病原因子は 2 種類の志賀毒素（Shiga toxin;Stx1 及び Stx2）と呼ばれる、1 分子の A サブユニットと 5 分子の B サブユニットで構成される蛋白毒素である。いずれの Stx も B サブユニットを介して宿主細胞のレセプター（Gb3）に結合後、A サブユニットによって 60S リボソームにおける蛋白合成阻害を引き起こすことにより細胞死を誘導する。両毒素の一次構造の相同性は A サブユニット、B サブユニットでそれぞれ 55%、61% 程度であるが、in vitro 及び in vivo レベルでの毒性比較実験で Stx2 の毒性が Stx1 と比較して高いこと、また疫学的にも Stx2 産生株の方がその他の Stx 産生株よりも重篤な症状を起こすことが報告されている。

従って EHEC 感染症を予防するために、毒素の中和抗体を産生させるワクチン抗原の開発は重要である。そのストラテジーとして A サブユニット遺伝子を完全欠失させたリコ

ンビナント B サブユニットワクチン、または A サブユニット遺伝子の活性中心のアミノ酸に変異を施した弱毒ホロ毒素ワクチンがいくつか報告されており、Stx1 については B サブユニットワクチンの優れた効果が示されている (Byun *et al.* 2001, Boyd *et al.* 1991)。しかし Stx2 については、B サブユニットワクチンの抗原性は研究者によって見解が分かれており (Byun *et al.* 2001, Tsuji *et al.* 2008, Marcato *et al.* 2001, Acheson *et al.*)、またホロ変異毒素についても、報告 (Wen *et al.* 2006) はあるものの実用化につながる過剰産生系は報告されていない。

我々は以前、リンコマイシンをインデューサーとして用いる大腸菌でのリコンビナント蛋白発現系を構築し、この手法によってコレラ毒素及びその B サブユニットの大量産生系を確立している。そこで本年度は、この手法を用いて Stx2 及び mStx2 の過剰発現を試み、得られた産物のワクチン抗原としての評価を行うとともに、EHEC 感染症の侵入門戸である腸管における粘膜免疫を誘導させるために、コレラ毒素やその変異毒素をアジュバントとした粘膜投与の系での効果も検

討した。

B. 研究方法

1) Stx2 及び mStx2 の発現・精製

Stx2 発現プラスミドは既報 (Arimitsu *et al.* (2009)) のコレラ毒素の発現方法に準じて作製した。B サブユニット遺伝子の 3' 末端には His タグ遺伝子を融合させた発現プラスミドとして作製した (図 1)。mStx2 発現プラスミドは既報 (Jackson *et al.* (1990), Yamasaki *et al.* (1991)) に準じ、A サブユニットの 167 位のグルタミン酸、170 位のアルギニンをそれぞれグルタミンとロイシンに置換した二重変異体を Site-directed mutagenesis により作製した。これら大腸菌 MV1184 株に形質転換し、リンコマイシンを含む CAYE 培地に接種して、30°C で 48 時間振盪培養を行った。

毒素の精製は His タグ融合蛋白として TALON アフィニティクロマトグラフィーで粗精製後、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーで不純物を除き、さらに新鮮な TALON レジンで再度アフィニティ精製を行った。なお、本遺伝子組み換え実験は、文部科

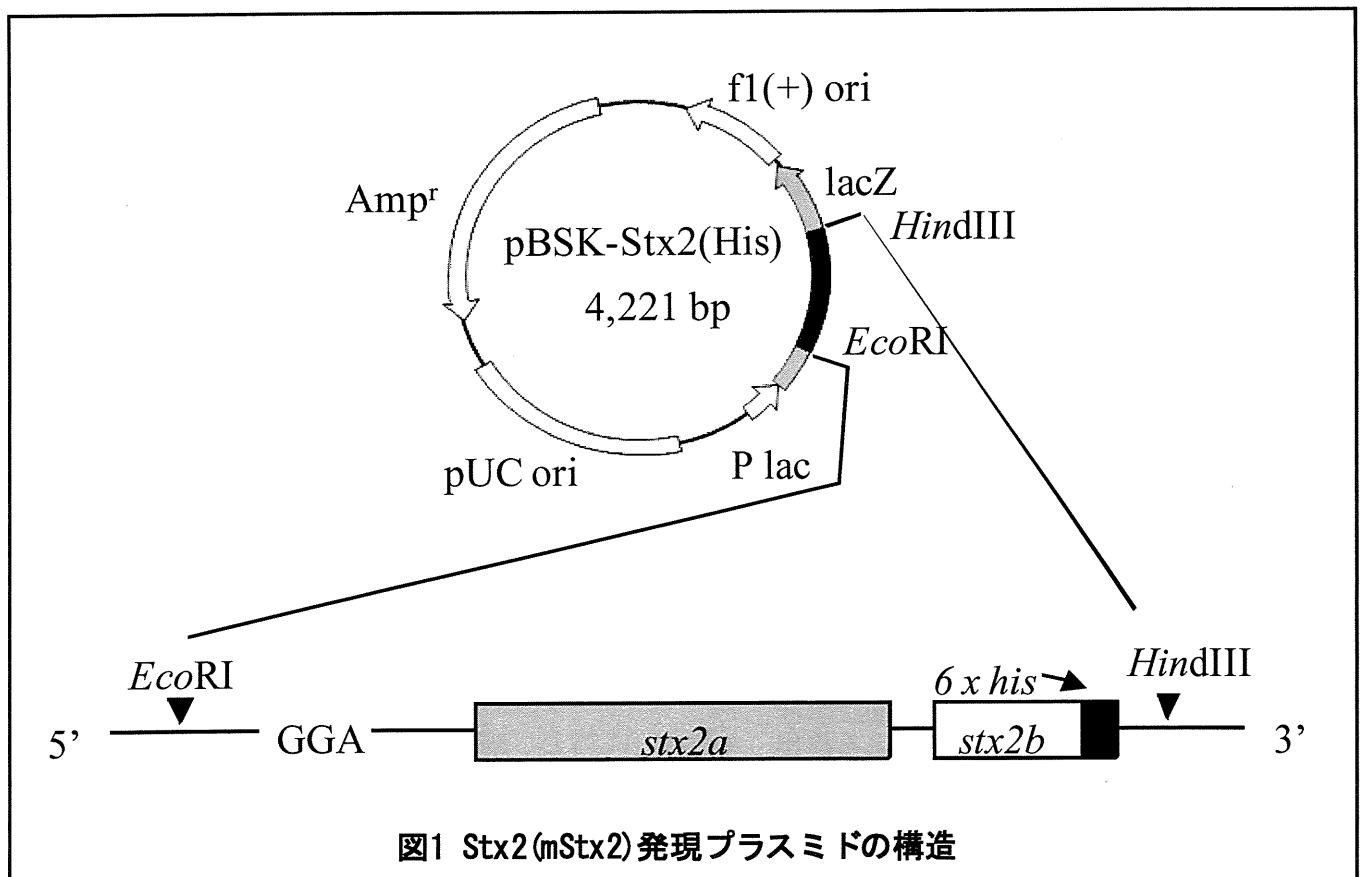


図1 Stx2(mStx2)発現プラスミドの構造

学大臣による、病原体及び遺伝子の拡散防止措置について適合確認を受けた上で実施した。

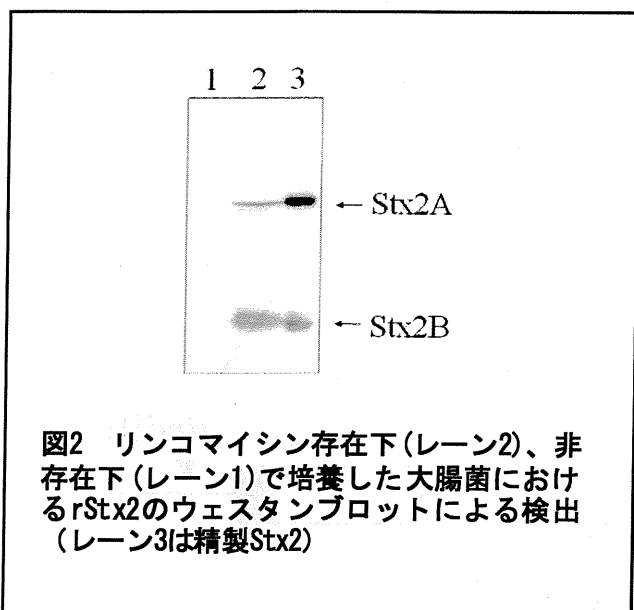
精製毒素の活性は HeLa229 細胞に対する細胞障害活性を元に CD50 値を算出し、また ICR マウスへの腹腔内接種による致死活性に基づいて最小致死量を算出した。

2) mStx2 のワクチン効果の検討

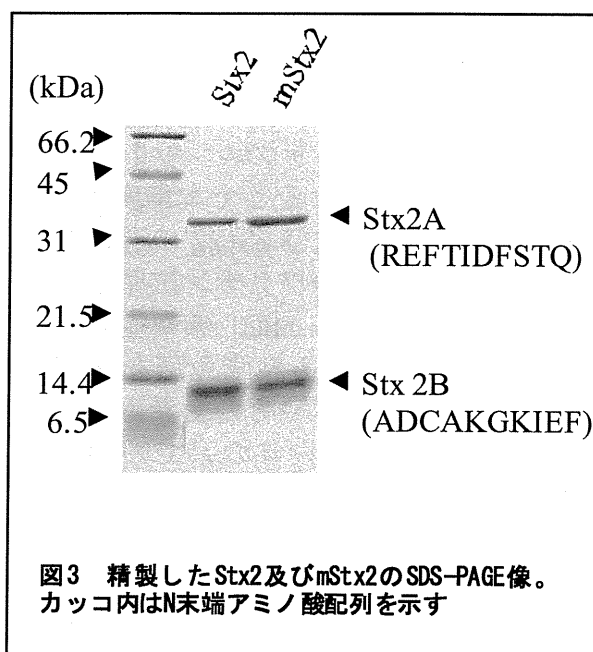
ワクチン効果は①mStx2 を水酸化アルミニウムアジュバントと混合して、ICR マウスに対して 10 µg の mStx2 を 2 週間間隔で 2 回皮下接種する方法、②同用量の mStx2 をコレラ毒素 (CT) とその変異毒素 (mCT) または B サブユニット (CTB) と混合し、経鼻免疫する 2 通りの方法で検討を行った。さらに 2 週間後、尾静脈より部分採血をするとともに、経鼻免疫マウスについては糞便も回収して、抗体価と抗体の特異性をそれぞれ ELISA とウェスタンブロットで解析した。その後、最小致死量の 10~1,000 倍量の Stx2 を腹腔内接種し、生死の観察を 1 週間行った。なお、本動物実験は本学の動物実験規定に則って行った。

C. 研究結果

毒素原性大腸菌易熱性毒素の B サブユニット由来の SD 配列 (図 1 中の GGA) を付加した構造の Stx2 及び mStx2 発現プラスミドを作製した。これらのプラスミドで形質転換



した大腸菌 MV1184 株を、リンコマイシンを含む CAYE 培地にて 30°C で 48 時間培養することにより、菌体内に Stx2 を発現することが明らかとなった(図 2)。菌体の超音波破碎抽出液より His タグ融合蛋白として精製した Stx2 (図 3) は、HeLa229 細胞を用いた細胞障害活性では、1.8pg/ml の CD50 値を示したが、マウスの最小致死量は 100ng と native の Stx2 と比較すると高めであった。mStx2 はこれと比較して 1,000 分の 1 以下に活性が低下したことを確認した。これらの Stx2 の最終収量は、1L の培養あたり約 50-100mg の範囲であった。



次に水酸化アルミニウムをアジュバントとして、mStx2 を 2 週間間隔で 2 回皮下免疫した。最終免疫の 2 週間後の抗体価を測定したところ、高い Stx2 抗体価が得られ(図 4A)、特異性をウェスタンブロットで確認したところ、A サブユニットのみならず、B サブユニットに対しても強い反応が認められた(図 4B)。

さらに、免疫したマウスに最小致死量の 10~1,000 倍量の Stx2 を腹腔内接種したところ、10 倍致死量を接種した対照群 (PBS 免疫) のマウスでは 3 日以内に全例が死亡したのに対し、mStx2 免疫群では 100 倍致死量まで完全に防御し、また 1,000 倍致死量でも数例が生存した(図 5)。

一方、mStx2 を CT や mCT、CTB をアジュバ

れ、アジュバントの効果に有意な差を認めることができなかつた（データ示さず）。

D. 考察

今回、我々の作製した発現系では、1L の培養で50-100mg レベルの Stx2 や mStx2 を最終精製産物として得ることができ、その B サブユニットは、皮下免疫マウスにおいて高い抗原性を持っていることがウェスタンブロットの結果より明らかとなった。Stx2 の B サブユニットの抗原性については、その作製方法や免疫方法によって異なる結果が報告されているが、A サブユニット非存在下では B サブユニットのオリゴマー形成と維持が、発現または精製の条件によっては脆弱になりやすい可能性も考えられる。我々が発現させたホロ毒素には B サブユニットに His タグが付加されているが、これによる抗原性の増強であるのか、ホロ毒素の形成による B サブユニットの複合体として得られた抗原性であるのかは不明である。しかしながら EHEC 由来の Stx2 と比較して、得られた毒素の HeLa229 細胞に対する細胞障害活性は変わらなかったものの、マウスへの致死活性が低かつたことより、His タグ付加が *in vivo* の環境では安定性低下につながる若干のコンホメーションの変化をもたらしている可能性は否定できない。このことから、今回のワクチン実験ではリコンビナント Stx2 のチャレンジ量は、致死活性を元に算出した。

得られた mStx2 で皮下免疫したマウスは、高い致死量の Stx2 チャレンジに対して生存することができたことから、低コストで大量のワクチン抗原を得ることが可能であることが明らかとなった。しかしながら CT とその変異毒素をアジュバントとした経鼻免疫の実験では、mStx2 単独免疫マウスでの血中 IgG、糞便中 IgA 抗体価に個体差が大きく反映され、粘膜アジュバントの有効性は確認できなかった（データ示さず）。Stx1 においては B サブユニットや変異ホロ毒素自身が粘膜アジュバント活性を示すことが報告されていることより、Stx2 自身にも同様の活性があるのかもしれない。今後、粘膜抗体を確実に誘導する投与法の検討が課題である。

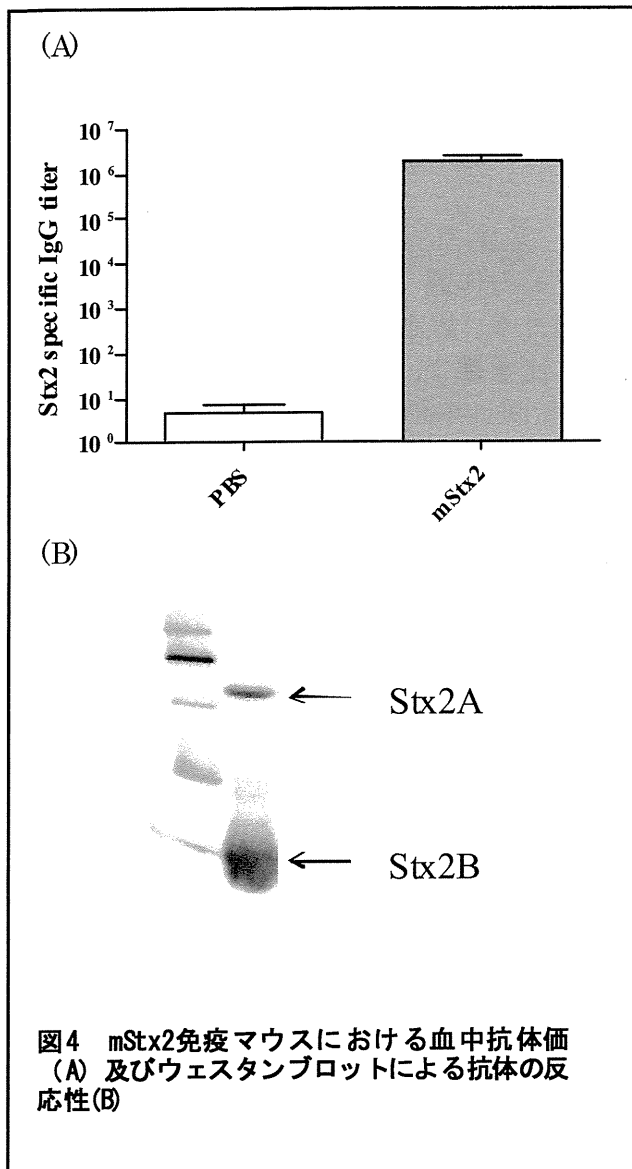


図4 mStx2免疫マウスにおける血中抗体価 (A) 及びウェスタンブロットによる抗体の反応性(B)

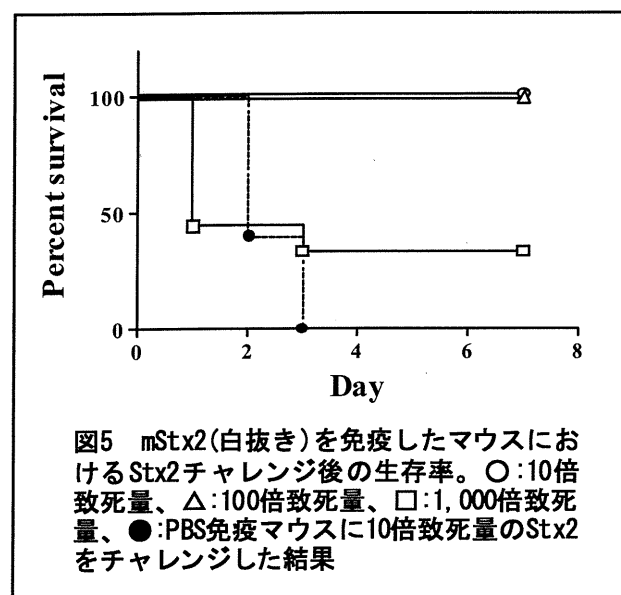


図5 mStx2(白抜き)を免疫したマウスにおける Stx2 チャレンジ後の生存率。○:10倍致死量、△:100倍致死量、□:1,000倍致死量、●:PBS免疫マウスに10倍致死量の Stx2 をチャレンジした結果

ントとして混合経鼻免疫した実験では、血中抗体価、糞便抗体価に個体差が大きく反映さ

今回は、mStx2 を抗原とした検討を行ったが、現在我々はケニアにおいてアウトブレイクした下痢原性大腸菌の遺伝子解析を進めている。患者より分離された菌からは LT や ST 遺伝子が認められない一方で、EAST1 遺伝子が高率に検出されたことより、EAST1 が本菌株によるアウトブレイクの主要な病原因子である可能性に焦点を当てて、将来的に新規ワクチン抗原としての応用も視野に解析を行っている。

E. 結論

Stx2 及び mStx2 の大量発現系を作製した。mStx2 の抗原性はホロ毒素の安定な形成によって A サブユニットのみならず、B サブユニットに対する抗体産生も強く誘導できると考えられた。作製した mStx2 はマウスに対して高い抗体産生及び防御活性を示したが、粘膜ワクチンとしての応用法の確立には至らなかった。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. P. Neri, N. Shigemori, S. Hamada-Tsutsumi, K. Tsukamoto, H. Arimitsu, T. Shimizu, Y. Akahori, Y. Kurosawa, T. Tsuji. 2011. Single chain variable fragment antibodies against Shiga toxins isolated from a human antibody phage display library. *Vaccine* 29:5340-5346.

2. P. Neri, S. Tokoro, R. Kobayashi, T. Sugiyama, K. Umeda, T. Shimizu, T. Tsuji, Y. Kodama, K. Oguma, H. Mori. 2011. Specific Egg Yolk Immunoglobulin as a New Preventive Approach for Shiga-Toxin-Mediated Diseases. *PLoS ONE* 6(10)e26526.

2. 学会発表

1. 変異志賀毒素を抗原としたコレラ毒素

及びその変異体のアジュバント効果の比較
有満秀幸、越智定幸、塚本健太郎、佐々木慶子、清水 健、辻 孝雄
第 58 回トキシシンポジウム(東京) 予稿集
P. 137-138 (2011)

2. 変異 Shiga toxin-2 トキソイドの過剰産生系の作製
有満秀幸、塚本健太郎、越智定幸、佐々木慶子、辻孝雄
第 48 回日本細菌学会中部支部総会(名古屋) 予稿集 A1-03 (2011)

3. Over-expression methods of Shiga toxin 1, Shiga toxin 2 and their mutants in *Escherichia coli* for evaluating toxoid vaccine
H. Arimitsu, K. Tsukamoto, S. Ochi, K. Sasaki, M. Kato, T. Tsuji
IUMS 2011 Sapporo P-BA31-3

4. Structure and activity of receptor binding domain of *Clostridium botulinum* D/C mosaic neurotoxin
K. Tsukamoto, N. Nuemket, Y. Tanaka, H. Arimitsu, S. Ochi, K. Nakamura, S. Kozaki, I. Tanaka, T. Tsuji.
IUMS 2011 Sapporo BA10-1

5. Lincomycin-induced overexpression method of mutant Shiga toxin-2 for vaccine antigen
H. Arimitsu, S. Ochi, K. Tsukamoto, K. Sasaki, T. Tsuji
42nd U. S. - Japan Cholera & Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting-2011 in Kolkata

6. ケニア・マンデラ地方下痢症のアウトブレイクに関連する EAST1 遺伝子保有大腸菌
越智定幸、Martin Bundi、Sora Suka、有満秀幸、塚本健太郎、佐々木慶子、清水利康、一瀬休生、辻孝雄
第 85 回日本細菌学会 (長崎)

7. 胚性腫瘍細胞 P19 を用いたボツリヌス神経毒素の作用機構の解析
塚本健太郎、有満秀幸、越智定幸、中村佳司、
幸田知子、小崎俊司、辻孝雄
第 85 回日本細菌学会（長崎）

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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

赤痢菌の病原遺伝子解析とワクチン開発に関する研究

研究分担者 渡邊 治雄 国立感染症研究所・所長
研究協力者 三戸部治郎 同細菌第一部・主任研究官

研究要旨：

赤痢菌の主要な病原因子Type III 分泌装置(TTSS)は発現が厳密に制御され、環境中での生育には不要な発現を抑えることで、生存に有利に働いている。分担者はTTSS遺伝子群の発現が、そのレギュレータであるInvEの転写後調節で制御されることを証明し、それに関わる因子として細菌の主要なRNA結合蛋白であるHfqと新規の因子RodZを見出した。*hfq*欠損株はTTSSを初めとする病原遺伝子群の発現が増加しているにも関わらず、生体内での生存性が低いため、生ワクチンの候補株として有用な可能性がある。本研究ではこれまで行って来た病原遺伝子群の解析を進めると共に、モルモットの結膜炎モデルを用いてワクチン候補株の評価を行った。

A. 研究目的

病原細菌の病原性発現機構を解明することは、疾患の予防、創薬といった応用面においても重要である。赤痢菌の病原性の本態である細胞侵入性に必須なType III 分泌装置 (TTSS)は外界の温度と浸透圧で発現が厳密に制御されている。これは、赤痢菌が宿主に感染しない時に極めて巨大な輸送装置であるTTSSの発現を抑えることで、環境中での生存に貢献しているものと考えられる。

この発現制御はTTSSのレギュレータである*virF*, *invE*遺伝子の転写レベルで調節されると考えられていたが、発現が抑制される条件でもこれらのmRNAは転写されており、制御の本態は長らく不明であった。分担者はこの調節がInvE発現の転写後制御で調節さ

れることを初めて見出し、細菌の主要なRNA結合蛋白であるHfqが関与することを明らかにしてきた。赤痢菌で*hfq*遺伝子の欠損株を作製したところ、その病原性に必須なType III Secretion system (TTSS)の発現が脱抑制され、通常、TTSSが発現しない低温や低浸透圧条件でも発現が起り、通常発現の起こる37℃では発現量が増大し、HeLa細胞に対する侵入性が野生株の2～30倍以上に増加していることが示された(参考文献1)。

一方、Hfqはストレス応答に作用する遺伝子の制御に関与しており、赤痢菌以外のサルモネラ、コレラ、レジオネラでは*hfq*遺伝子を欠損させると動物実験における病原性が低下することが報告されている。これは病原性よりもストレス条件下での菌の生存性

が低下していることが原因と考えられ、赤痢菌の *hfq* 欠損株でも動物実験系で観察した症状は *hfq* 欠損株ではむしろ低下している（参考文献1）。

こうした、病原性蛋白の発現量が増加するにも関わらず、生存性が低下している *hfq* 欠損株は、貧食細胞で殺菌されやすく、免疫担当細胞に提示される抗原量が多いため、生ワクチンとして効果が高い可能性がある。そのため、*hfq* 欠損株をワクチン候補株として用いた基礎的データの収集を開始した。

また、昨年度に引き続き、Hfqと同様のRNA結合活性を持つRodZ蛋白の解析を進め、専門誌に投稿を行った。

B. 研究方法

1. <赤痢菌の病原遺伝子群の解析>

常法を用いて *S. sonnei* MS390株の *rodZ* 遺伝子のC末端側にHis₆-tagを挿入した。菌株は37°CでOD₆₀₀=0.8まで培養し、12mlずつ大型ガラスシャーレ(φ=15cm)上で氷冷しながらUV-B照射(0.2J/cm²)を行い、遠心後-80°Cで保存した。リゾチーム存在下、超音波破碎した菌体にDynabeads TALON 12.5μlを加え、RodZ::his₆蛋白を精製した。精製した蛋白を52°C 2時間、RNase free Proteinase Kで消化後、フェノール・クロロホルム抽出しエタノール沈殿で核酸を回収した。サンプルはRNase free DNase (Ambion DNase turbo)で処理した後、*invE*並びに*virF*特異的なプライマーとcDNA合成キットを用いてcDNAを合成しreal-time PCRのテンプレートとして用いた。real-time PCRは*invE*, *virF*に対するTaqman probe法（参考文献1）で行い、ABI7000で解析した。

2. <赤痢菌のワクチン候補株の解析>

赤痢菌をモルモット眼球に接種すと角結膜炎を惹起することで個体に免疫応答を惹起し、ワクチンの評価系として用いることができることが報告されている（参考文献2）。

ワクチン候補株である *S. flexneri* 2a 2457T株の *hfq* 欠損変異株、コントロールとして野生型2457T株、およびPBSを3群計12匹の2週齢モルモット(Hartley, Male)に、二週間隔で5×10⁸個を計4回、両側眼球に投与した(図1)。二回目免疫終了後、3週目に血清の赤痢菌のエフェクター蛋白に対する抗体価を調べるため採血を行い、眼球症状は投与後2日目、3日目、5日目にデジタルカメラで接写し記録した。

4週目、血清型の異なる *S. sonnei* HW383株を5×10⁸個を計2回両側眼球に投与し、効果の判定を行った。接種後1週間で殺処分した個体から眼球を摘出し、ホルマリン固定後、HE染色で組織を観察した。

C. 研究結果

1. <赤痢菌の病原遺伝子の解析>

Hfqと同様に赤痢菌のType III分泌装置発現に関与するRNA結合蛋白RodZの解析を行った。

Type III分泌装置遺伝子群のレギュレータである *invE* の mRNA と RodZ が *in vivo* で結合することを示すため、UVでクロスリンクした菌体から図1Aのウエスタンブロットで示したように、RodZ::his₆蛋白を沈降し、RNA-蛋白複合体をプロテアーゼで消化後、残ったRNAからcDNAを合成し、リアルタイムPCRで増幅し増幅曲線から結合量を比較した。

図1Aの赤い曲線で示されるように、

invE-mRNAは有意にRodZと結合しており、コントロールとして同じサンプルから増幅した*invE*の上流のレギュレーターである*virF*に比べて早いサイクルで増幅が開始した(図1B曲線:赤)。コントロールとしてtotal RNAで行ったRT-PCT(図1AとB曲線:青)ではほぼ同じサイクルで増幅されるため、RodZに結合する*invE*-mRNAの量はサイクル数から16倍から32倍と考えられた。(発表論文1)。

2. 赤痢菌のワクチン候補株の解析

初めにワクチンの弱毒性を調べるために、ワクチン候補株と野生株との間で角結膜炎の症状を比較した。初回免疫後、ワクチン候補株として用いた*hfq*欠損変異株も角結膜炎を惹起したが、野性型と比較してワクチン候補株は角膜、上下眼瞼の炎症性肥厚、膿汁分泌等の症状は有意に軽く治癒期間も、野性型で平均9日のところ5日と短期であった(図2)。これは赤痢菌でも*hfq*欠損株は動物体内から排除されやすいことを示唆した。角膜炎は周囲から角膜中心に治癒が進行し、約二週間で角膜は完全に透明に回復した。二回目免疫では全群で症状が認められなかった。

次にワクチン効果(後述)が血清型抗原に依存していないことを示すために、免疫後のモルモット血清を用いて赤痢菌株の凝集反応を行った。

S. flexneri 2457T株とその*hfq*欠損変異株で免疫しているため、ワクチン接種群と野生型菌接種群の血清は全て*S. flexneri* 2457T株の菌体を凝集した。一方、攻撃株として用いた*S. sonnei* HW383株の菌体は凝集せず、*S. sonnei*に対する血清型抗体は誘導されていないことが示された。

最終的に、血清型に依存しないワクチン効果を調べるために、免疫終了後、血清型が異なる攻撃株である*S. sonnei*を眼球に投与し効果判定を行った。PBSを投与した対照群では角膜炎優位の症状を示した(図3-1)。ワクチン株である*hfq*欠損変異株で免疫した個体では有意な感染症状は認められなかった(図3-2)。対照群と比較して野性型*S. flexneri*投与群は、有意に軽い角膜炎を発症した。角膜の混濁は有意であったが、眼瞼周囲の症状は認められなかった(図3-3)。

チャレンジ後一週間目の眼球組織のHE染色像は、PBS投与群では角膜が強度に肥厚し正常な上皮の組織構造が完全に破壊されていた(図3-4)。*hfq*欠損株投与群は有意な病変は認められないと考えられた(図3-5)。野性株免疫群では同様の空包構造が認められた上に、角膜層が有意に薄く、エオジンで強く染色され、その下層にエオジンで弱く染色される層が認められた(図3-6)。

また一週間後、無症状であった個体の眼球に*S. sonnei*とも*S. flexneri* 2a 2457Tとも異なる*S. flexneri* 6型の9268株を接種したが有意な症状は認められなかった。

D. 考察 1. 紫外線によるRNA-蛋白複合体の解析から、*invE*-mRNAは*in vivo*でもRodZと結合することが示された。

2. *hfq*欠損変異株を用いたワクチン候補株は野生型と比較して有意に動物より排除されやすく、弱毒化されていることが示された。赤痢ワクチンの候補株として弱毒化のため代謝系

遺伝子の変異体等が提唱されているが、Hfqは前述のように病原遺伝子の発現の抑制因子であると同時にストレス応答遺伝子群発現に正に作用していることから、その欠損株はより有利に作用することが考えられる。また、血清型に依存しないワクチン効果をモルモットの角結膜炎モデルで評価したところ*S. sonnei*で攻撃した実験では血清型の異なる株に対しても一定の免疫効果が認められた。

実際の感染部位と異なる角結膜炎モデルでは最終的なワクチン効果を判定することは困難であるため、現在、インドNICEDのDr. Hamanta Koleyと共同研究を進めている。

インドでの実験系はH2ブロッカーを投与したモルモットに経口でワクチネーションを行い、開腹下で個体の大腸に直接感染させる系が確立している。すでにワクチン候補株を送付し現地での予備実験が進行中である。

日米医学会コレラ部会はDr. Koleyも出席するため、直接プロジェクトに関して協議する場となっている。今年度の総会はインド・コルカタで行われたことからNICEDの動物実験施設を訪問し、実験手技の説明と今後の方針のディスカッションを行った。

E. 結論

・桿菌の細胞骨格蛋白としても知られるRodZはHfqと同様にRNA結合能を持ち、*invE*-mRNAと結合することで、Type III分泌装置の発現に関与する。

・赤痢菌の病原性発現に作用するHfqの欠損株は弱毒生ワクチンとして利用でき、赤痢菌群に共通した病原蛋白

の発現量が増えていることから、血清型に無関係なユニバーサルなワクチンとして利用できる可能性がある。

F. 健康危機情報

緊急性をもって報告すべき内容は特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Jiro Mitobe, Itaru Yanagihara, Kiyuhisa Ohnishi, Shouji Yamamoto, Makoto Ohnishi, Akira Ishihama and Haruo Watanabe, 2011. RodZ regulates the posttranscriptional processing of the *Shigella sonnei* type III secretion system. EMBO report 12(9) 911-916.

2. 学会発表

Jiro Mitobe, Shouji Yamamoto, Makoto Ohnishi and Haruo Watanabe. Bacterial cytoskeleton protein RodZ is involved in post-transcriptional processing of *Shigella* type III secretion system. 2011, Sept. 6-10, P-BA27-31, XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Sapporo Convention Center. Sapporo, Japan.

Jiro Mitobe, Hemanta Koley, Ritam Shinha, Ken Shimuta, Nobuo Koizumi, Jun Terajima, Makoto Ohnishi, G. Balakrish Nair and Haruo Watanabe. An attempt to develop experimental *Shigella* vaccine based on virulence gene expression. 2011, Dec. 13-15 US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Annual Joint

Panel Meeting for Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. Kolkata. India

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

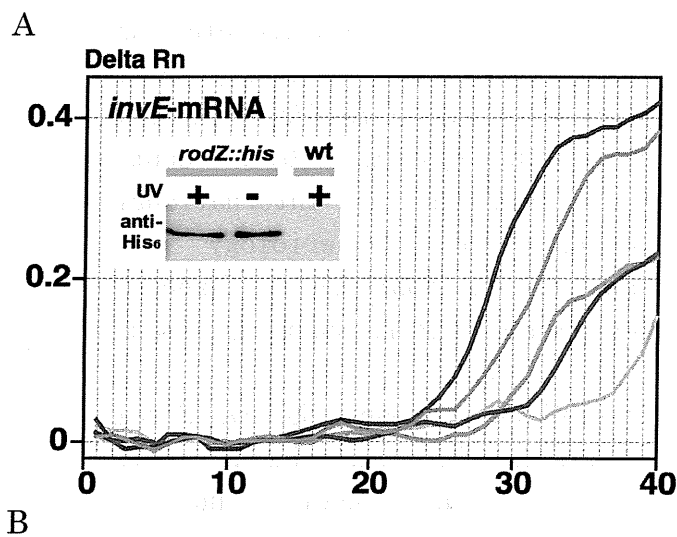
<参考文献>

1. Mitobe J, Morita-Ishihara T, Ishihama A, Watanabe H. 2009 Involvement of RNA-binding protein Hfq in the osmotic-response regulation of *invE* gene expression in *Shigella sonnei*. BMC Microbiol. 9:110.

2. Hartman, A.B., et al., *Small-animal model to measure efficacy and immunogenicity of Shigella vaccine strains*. Infect Immun, 1991. **59**(11): p. 4075-83.

3. Kotloff, K.L., et al., *Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies*. Bull World Health Organ, 1999. **77**(8): p. 651-66.

図 1



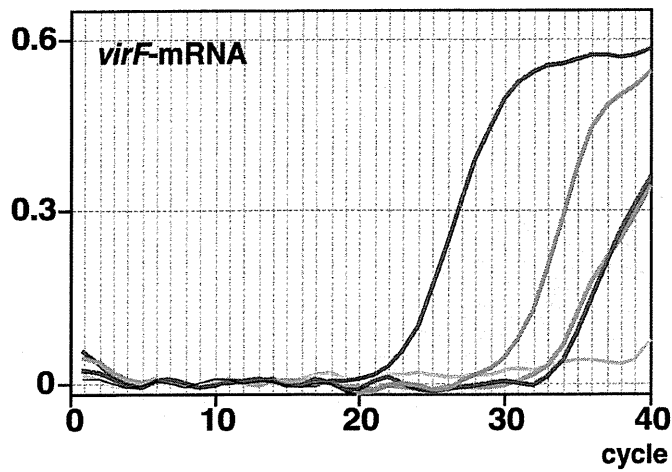
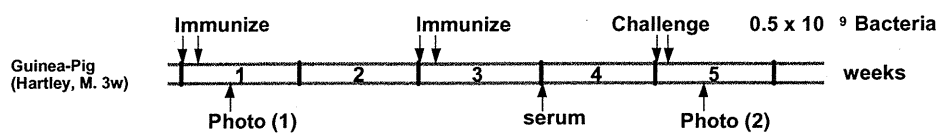


図 2



#		HW383
6	Vaccine strain	HW383
6	Wild-type (control)	HW383
3	2457T Δhfq	HW383
3	LB (control)	HW383

Vaccine strain : *S. flexneri* 2a 2457T Δhfq (pACYC177-*ipgC*-*ipaD*)
 Wild-type (control): *S. flexneri* 2a 2457T
 Challenge strain : *S. sonnei* HW383

図 3

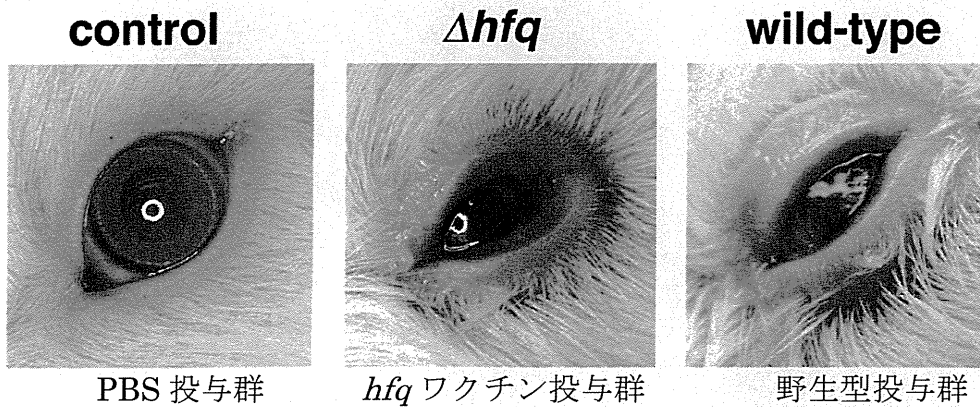
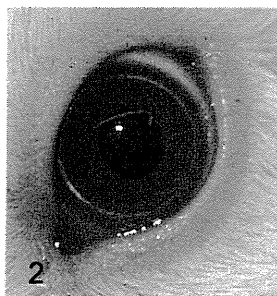


図 4

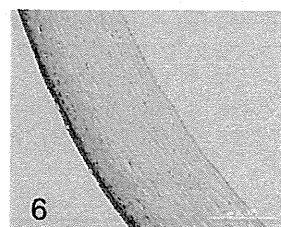
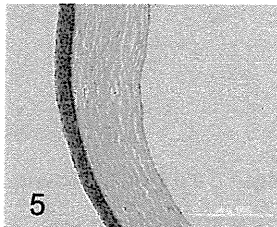
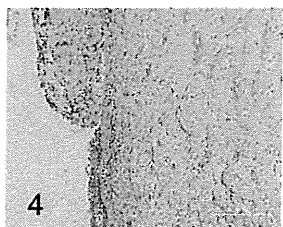
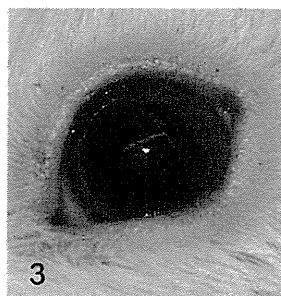
Control (PBS)



Vaccine



Control (野生型)



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

Campylobacter 属菌がもつ高速運動関連構造 (CHSDU) の解析、阻害剤の探索、
およびその応用

分担研究者 山本達男 新潟大学大学院教授

研究要旨

Campylobacter 感染症は鶏肉の消費に伴って世界中で急増し、近年細菌性下痢症（食中毒）の主要な位置を占めるに至った。わが国でも、*Campylobacter* 食中毒は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 年以来細菌性食中毒の一位を占める（2010 年）。多くの場合腸炎と関連するが、深部感染症である菌血症や Guillan-Barré syndrome (GBS) あるいは Miller Fisher syndrome (MFS) と関連することがある。食中毒の大部分は *C. jejuni* が原因で、*C. coli* がそれに次いで 1-25% を占める。*Campylobacter* 属菌はらせん菌で、両菌端にそれぞれ 1 本の鞭毛をもち、強い運動性を示す。強い運動性は腸管への定着や侵入過程に重要な働きをされると考えられている。従来の研究で、*C. jejuni* と *C. coli* が鞭毛の回転運動を支える特異な骨格構造 (*Campylobacter* high-speed-driving unit, CHSDU) をもつことを見いだした。本研究では、この構造が食中毒由来の *C. fetus* と *C. lari* にも存在すること、つまり *Campylobacter* 属に共通する構造であることを確認した。また、透過型と走査型電子顕微鏡解析の結果から、駆動部、鞭毛を支える筒構造、カップ様構造から構成された CHSDU 構造モデルを構築した。*Campylobacter* 属菌は、他の細菌とは異なって極めて特異な運動装置をもち、最も早い運動速度（秒速 100 μm 以上）を可能としている。

A. 研究目的

Campylobacter 感染症は鶏肉の消費に伴って世界中で増加しており、細菌性食中毒（下痢症）の主要な位置を占める。旅行者下痢症の側面も注目されている。多くの場合腸炎と関連する。主症状は下

痢、腹痛、発熱で、小児では血便を伴い、サルモネラや細菌性赤痢との鑑別は一般に難しい。また、深部感染症である菌血症や Guillan-Barré syndrome (GBS) あるいは Miller Fisher syndrome (MFS) と関連することがある。わが国