

法. 総合臨 2006; 55(1): 52-6.

III. 学会発表

- 1) 嶋田和也, 近藤一博. ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) 初期遺伝子 U79/80 のエンハンサー・プロモーター解析. 第 21 回ヘルペスウイルス研究会. 岐阜県大野郡, 6 月.
- 2) 嶋田和也, 近藤一博. ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) 初期遺伝子制御機構の解析. 第 123 回成医学会総会. 東京, 10 月.
- 3) 嶋田和也, 近藤一博. ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) 遺伝子 U79/80 のエンハンサー・プロモーター解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 11 月.
- 4) 鎌田美乃里, 近藤一博. HHV-6 感染 SCID-hu マウスにおける HHV-6 感染様式の解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 11 月.
- 5) 近藤一博, 鎌田美乃里, 小林伸行. ヒトヘルペスウイルス (HHV)-6 と HHV-7 の再活性化の誘導因子としての疲労. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 11 月.
- 6) 清水昭宏, 近藤一博. ヒトヘルペスウイルス 7 (HHV-7) の細胞指向性関連遺伝子領域の同定と機能解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 11 月.
- 7) 船水尚武, 清水昭宏, 近藤一博. 単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子によるヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) 遺伝子治療ベクターの制御. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 11 月.

微生物学講座第 2

教授: 益田 昭吾 細菌学
 助教授: 関 啓子 細菌学, 細胞生物学
 講師: 進士ひとみ 細菌学, 感染免疫学

研究概要

I. 黄色ブドウ球菌の定着を阻害する因子を分泌する *Staphylococcus epidermidis* の解析

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は, 皮膚膿瘍や重篤な感染症である肺炎や敗血症を起こす医学的に重要な細菌である。*S. aureus* は健康人の鼻腔から約 30% の割合で検出される。検出されない残りの約 70% はその定着を免れていると考えられるが, そのメカニズムは明らかではない。我々はこれまで, 鼻腔由来の常在性ブドウ球菌 *S. epidermidis* の約 50% が, *S. aureus* の定着を *in vitro* において有意に阻害することを見出している。そこで, この *S. aureus* の定着を阻害する *S. epidermidis* (阻害性 *S. epidermidis*) についてさらに検討を行った。阻害性 *S. epidermidis* による *S. aureus* の定着阻害作用は, 阻害性 *S. epidermidis* の培養上清に存在することが明らかになった。また, *S. aureus* の定着は, 阻害性 *S. epidermidis* と *S. aureus* との共培養によっても阻害された。さらに, 阻害性 *S. epidermidis* を *S. aureus* の定着しているポランティアの鼻腔に投与したところ, *S. aureus* の定着が大きく阻害された。これらの結果から, *S. aureus* が検出されない健康人では, 阻害性 *S. epidermidis* が大きく関与していることが示唆された。

II. 黄色ブドウ球菌 β -hemolysin による血管内皮細胞 IL-8 産生の抑制と好中球浸潤阻害

黄色ブドウ球菌は, 表在性の感染症から心内膜炎のような深在性感染まで幅広い感染を引き起こし, また近年, 薬剤耐性菌の出現により治療に難渋する症例が増加し問題となっている。黄色ブドウ球菌の感染に対して, 白血球を中心とした生体防御反応が重要な役割を果たしており, 血管内皮細胞は, IL-8 などのサイトカインや様々な接着因子の発現を介して感染部位への白血球浸潤を調節している。我々は, これまでに, 黄色ブドウ球菌の培養上清中に血管内皮細胞の IL-8 産生を抑制する活性があることを報告している。培養上清からその抑制因子を精製し, 黄色ブドウ球菌の β -hemolysin (β -toxin, sphingomyelinase C) であることを同定した。 β -

hemolysin は、細胞膜脂質スフィンゴミエリンを分解する酵素活性を有し、ヒツジ赤血球に対して溶血活性を示すことが知られている毒素であるが、宿主に対する作用についてはあまり明らかになっていなかった。我々は、 β -hemolysin が血管内皮細胞に対して、IL-8 産生を抑制し、好中球の浸潤を阻害すること、さらに接着因子 VCAM-1 発現を抑制することを見出した。EMSA の結果から β -hemolysin は、NF- κ B 活性化を阻害せず他の経路を阻害していると考えられた。現在その抑制機構についてさらに解析を進めている。

III. 増殖時期の異なる菌が培養線維芽細胞に及ぼす影響

早期対数増殖期 (2 時間培養) および静止期 (18 時間培養) の黄色ブドウ球菌が L929 培養線維芽細胞 (L 細胞) に及ぼす影響を検討した。血清存在下で細胞と菌液を 30 分間インキュベートした。洗浄後、lysostaphin を添加した新しい培地に交換してさらに 3 時間培養し、種々の解析を行った。黄色ブドウ球菌は臨床分離株 OK1 と OK11 を用いた。L 細胞は OK1 を殆ど取込まず、OK11 を活発に取込み、また、早期対数増殖期 OK11 の取込み数は静止期の菌数に比べて有意に多かった。対数増殖期の菌取込みにより L 細胞の caspase3 発現、DNA の断片化、および TNF- α 産生が認められ、形態的にはクロマチンの凝縮を伴うアポトーシスを示した。OK11 を取込んだ細胞の中にはネクローシスを起こしている細胞も認められた。OK11 培養上清中の α -hemolysin と leukocidin 活性は OK1 に比べて高値を示した。一方、マウスを用いて *in vivo* での検討を行ったところ、LD₅₀ を病原性の指標とした際に OK11 は OK1 よりもはるかに高い病原性を示した。尾静脈内接種した菌がマウス腎によく定着することは知られているが、定着数および腎内での増殖も OK1、OK11 ともに対数増殖期の菌の場合に著しく高い値を示し、特に OK11 感染マウスでは膿瘍形成が認められるケースもあった。しかし静止期の菌ではそのような所見は得られなかった。以上の結果から、代謝活性の高い菌はその産生物質を介して L 細胞や腎細胞に付着・増殖し、細胞に傷害を与えると考えられた。

IV. *fnbA* 欠損株を用いた黄色ブドウ球菌感染における接着因子 FnBPA の役割

黄色ブドウ球菌には数種類の細胞壁結合型 fibronectin (FN) 結合因子が知られている。この中の

主要な因子である FnBP には *fnbA*・*fnbB* 遺伝子にコードされた 2 つのホモログが存在し、黄色ブドウ球菌の多くは両方を早期対数増殖期に発現する。菌はこの因子を介して細胞外マトリクスに結合し組織に定着する他、上皮細胞・繊維芽細胞・血管内皮細胞などにも取り込まれ、細胞内で増殖あるいは細胞死を誘導する事が報告されている。また、FnBP は *in vivo* 感染実験において心内膜炎の発症を助長させるとの報告がある一方、FnBP 欠損株で肺炎の誘導が顕著である等、病原因子としての作用は複雑である。

我々は以前、黄色ブドウ球菌株 Cowan I 由来の自然発生 FnBPA 欠損株を用いて検討を行い、この変異株を尾静脈内に強制感染させたマウスでは親株に比べて菌の組織定着能が著しく低い事を報告した。昨年度の本報告で、黄色ブドウ球菌株 SH1000 を親株として作成した *fnbA* 欠損株について検討したところ、マクロファージによる食菌数、繊維芽細胞、血管内皮細胞内への取り込み菌数が顕著に減少し、FnBPA が細胞への菌の定着・細胞内感染に関与する事が明らかになった。そこで今回、この変異株と親株をマウス尾静脈に強制感染させた後の生残等について検討を行った。その結果、親株投与群の BALB/c (♀) マウスでは 1 週間以内にはほぼ全頭が死亡したのに対して、変異株投与群では全てが生残した。また、腎臓の膿瘍形成の比較では、親株投与群で顕著な膿瘍形成が認められたのに対して変異株投与群では膿瘍は全く認められなかった。以上の結果から、黄色ブドウ球菌が血中感染した場合、FnBP を介した組織への定着がその後の感染症発症には非常に重要であることが示唆された。

V. 大腸菌のバイオフィーム形成メカニズムの解析

バイオフィーム形成に重要な細胞外構造物である curli は、大腸菌 K-12 株では 30°C 未満でしか産生されないとされてきた。我々は、大腸菌 K-12 がバイオフィーム内で増殖した際には 37°C においても curli を産生し得る事を示した。Curli を発現する菌株は、25°C および 37°C の両条件下においてポリウレタンシート上に curli 欠損株より多くのバイオフィームを形成した。Curli は水チャンネルと柱状の細菌群の形成を特徴とする三次元の成熟したバイオフィームの形成に不可欠である。電子顕微鏡観察により、curli 欠損株のバイオフィーム内での細胞表面には鞭毛や I 型線毛の存在が明らかとなった。Curli を発現する大腸菌野生株は、curli 欠損株より

も著明に数種のヒト尿路上皮細胞に付着した。Curli はバイオフィーム内では 37°C でも発現し、哺乳類の宿主細胞への細菌の付着を増強させるという知見は、curli が病原性に関して重要な役割を持つことを示唆する。

「点検・評価」

1. 教育について

臨床基礎医学 II (生体と微生物, 細菌・真菌と感染) の講義を担当した。細菌学実習は, 100 名を 2 グループに分けて行ったため, 学生に密着して指導が出来, 内容をよく理解させることができた。

2. 研究について

本年度は, 黄色ブドウ球菌の感染機構の解明が前進した。

In vitro で黄色ブドウ球菌の定着を阻害する因子を分泌する常在性表皮ブドウ球菌 (阻害性 *S. epidermidis*) の同定に成功した。さらに, *S. aureus* の定着しているボランティアの鼻腔に阻害性 *S. epidermidis* を投与したところ, *S. aureus* の定着が大きく阻害されることを見いだした。

黄色ブドウ球菌の培養上清から血管内皮細胞の IL-8 産生を抑制する因子を精製し, β -hemolysin (β -toxin, sphingomyelinase C) であることを同定した。 β -hemolysin は血管内皮細胞の IL-8 産生を抑制し, 好中球の浸潤を阻害すること, さらに接着因子 VCAM-1 発現を抑制することを見出した。 β -hemolysin は NF- κ B 活性化を阻害せず他の経路を阻害していると考えられた。

マウス腎における増殖・膿瘍形成および線維芽細胞に対する付着とアポトーシス誘導が静止期に比べて対数増殖期の菌が著しいことから, 菌の産生物質が果たす役割が重要であると考えられた。

フィブロネクチン結合タンパク FnBPA が細胞への菌の定着・細胞内感染に関与する事を明らかにした。FnBPA 変異株と親株をマウス尾静脈に感染させた後の生残等について検討した。その結果, BALB/c (♀) マウスの親株投与群は 1 週間以内にほぼ全頭が死亡したが, 変異株投与群では全てが生残し, FnBPA が病原性に強く関与している事を示した。

大腸菌のバイオフィーム形成において curli が重要な役割を果たす事を示した。また, curli を発現する大腸菌野生株は, 数種のヒト尿路上皮細胞に curli 欠損株よりも著明に付着し, 病原性に関して重要な役割を持つことを示唆した。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Kanamaru S (Kyoto Univ), Kurazono H¹⁾, Mizunoe Y, Terai A¹⁾, Monden K¹⁾, Kumon H¹⁾ (¹Okayama Univ). Increased biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from acute prostatitis. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28: 21-5.
- 2) Sugimoto S¹⁾, Yoshida H¹⁾, Mizunoe Y, Tsuruno K¹⁾, Nakayama J¹⁾, Sonomoto K¹⁾ (¹Kyusyu Univ). Structural and functional conversion of molecular chaperone ClpB from the gram-positive halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* mediated by ATP and stress. *J Bacteriol* 2006; 188: 8070-8.
- 3) Shinji H, Kamada M, Seki K, Tajima A, Iwase T, Masuda S. Expression and distribution of Very Late Antigen-5 in mouse peritoneal macrophages upon ingestion of fibronectin-bound *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* 2007; 51: 63-71.
- 4) Tajima A, Seki K, Shinji H, Masuda S. Inhibition of interleukin-8 production in human endothelial cells by *Staphylococcus aureus* supernatant. *Clin Exp Immunol* 2007; 147(1): 148-54.
- 5) Seki K, Shinji H, Masuda S, Sasaki H. Actin filaments (F-actin) of cultured fibroblast is concerned with the ingestion of *Staphylococcus aureus*. *医学生物学電子顕微鏡技術学会誌* 2006; 20: 93-4.
- 6) 関 啓子, 荒井久子, 益田昭吾, 佐々木博之. 培養線維芽細胞による黄色ブドウ球菌取り込みの機構. *医学生物学電子顕微鏡技術学会誌* 2006; 20: 72.
- 7) Iwase T, Seki K, Shinji H, Tajima A, Masuda S. Inhibition of the colonization of *Staphylococcus aureus* by *Staphylococcus epidermidis*. *Bacterial Adherence & Biofilm* 2007; 20: 78-80.

III. 学会発表

- 1) 関 啓子, 荒井久子, 菊地恵美, 益田昭吾, 佐々木博之. 培養線維芽細胞による黄色ブドウ球菌取り込みへの細胞骨格の関与. *医学生物学電子顕微鏡技術学会* 第 22 回学術講演会. 浜松, 5 月.
- 2) 岩瀬忠行, 関 啓子, 進士ひとみ, 田嶋亜紀子, 益田昭吾. 常在性ブドウ球菌による黄色ブドウ球菌の定着阻害作用. *Bacterial Adherence & Biofilm* 第 20 回学術集会. 東京, 7 月.
- 3) Seki K, Shinji H, Masuda S. Induction of apoptosis in fibroblasts by staphylococcal infection. *12th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections*. Maastricht, Sept.

- 4) Shinji H, Yoshizawa Y, Seki K, Masuda S. Analysis of fibronectin-mediated responses between macrophages and *S. aureus* using a mutant strain lacking *fmbA*. 12th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections. Maastricht, Sept.
- 5) Tajima A, Masuda S. Inhibition of human endothelial cell interleukin-8 production by *Staphylococcus aureus*. 12th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections. Maastricht, Sept.
- 6) Iwase T, Masuda S. Characterization and epidemiologic survey of *Staphylococcus epidermidis*, a bacterium that secretes a factor that inhibits *Staphylococcus aureus* colonization. 12th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections. Maastricht, Sept.
- 7) 田嶋亜紀子, 関 啓子, 進士ひとみ, 岩瀬忠行, 益田昭吾. 黄色ブドウ球菌による血管内皮細胞のケモカイン産生抑制. 第 89 回日本細菌学会関東支部総会. 渋川, 11 月.
- 8) Seki K, Shinji H, Masuda S. Apoptosis of fibroblasts induced by intracellular *Staphylococcus aureus*. American Society for Cell Biology 46th Annual Meeting. San Diego, Dec.
- 9) 杉本真也, 吉田浩之, 水之江義充, 中山二郎, 園元謙二. 乳酸菌分子シャペロン ClpB の構造・機能変換. 日本農芸化学会 2006 年度大会. 京都, 3 月.
- 10) 関 啓子, 進士ひとみ, 益田昭吾. 黄色ブドウ球菌感染による細胞死に関する検討. 第 80 回日本細菌学会総会. 大阪, 3 月. [日細菌誌 2007; 62: 116]
- 11) 石川秀人¹⁾, 高屋明子¹⁾, 水之江義充, 高出明美²⁾, 磯貝恵美子 (北海道医療大), 吉田真一²⁾(²九大), 山本友子¹⁾(¹千葉大). サルモネラの OMV による病原性発現調節. 第 80 回日本細菌学会総会. 大阪, 3 月. [日細菌誌 2007; 62: 78]
- 12) 北川 良¹⁾, 高屋明子¹⁾, 水之江義充, 高出明美²⁾, 吉田真一²⁾(²九大), 山本友子¹⁾(¹千葉大). 腸管出血性大腸菌毒素の分泌調節における AAA+protease の関与. 第 80 回日本細菌学会総会. 大阪, 3 月. [日細菌誌 2007; 62: 110]
- 13) 進士ひとみ, 関 啓子, 吉沢幸夫, 益田昭吾. 黄色ブドウ球菌感染症における近交系マウスの応答性の相違と FnBP の関与について. 第 80 回日本細菌学会総会. 大阪, 3 月. [日細菌誌 2007; 62: 103]
- 14) 岩瀬忠行, 保科定頼, 益田昭吾. 定量 PCR による *S. epidermidis* 群の種特異的検出および定量法の開発. 第 80 回日本細菌学会総会. 大阪, 3 月. [日細菌誌 2007; 62: 177]
- 15) 田嶋亜紀子, 益田昭吾. 黄色ブドウ球菌による血管内皮細胞の IL-8 産生抑制と好中球浸潤阻害. 第 80 回日本細菌学会総会. 大阪, 3 月. [日細菌誌 2007; 62: 179]

IV. 著 書

- 1) 水之江義充. 食中毒検査: 診療のコツと落とし穴. 渡辺治夫. 培養不能状態の腸管出血性大腸菌 O157 の蘇生培養法. 東京: 中山書店, 2006. p. 58-9.