

tent infection and identification of HHV-6 latent cells. 14th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infection. Kobe, Oct.

- 8) Shimizu A, Kondo K. Application of human herpesvirus 6 (HHV-6) for the gene therapy vector. 14th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infection. Kobe, Oct.
- 9) Kondo K. (Late-breaking Symposium) Identification of a novel molecular mechanism and a major cause of fatigue. 36th International Congress of Physiological Sciences. Kyoto, Aug.
- 10) 小林伸行, 中山和彦, 近藤一博. ヒトヘルペスウイルス (HHV)-6 潜伏感染特異的タンパク (SITH-1) と気分障害発症との関連. 第105回日本精神神経学会学術総会. 神戸, 8月.
- 11) 鎌田美乃里, 近藤一博. SCID-hu マウスを用いたヒトヘルペスウイルス6感染モデル動物の作成と潜伏感染・再活性化細胞の検討. 第27回日本ヒト細胞学会. 東京, 8月.
- 12) 嶋田和也, 近藤一博. ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) 前初期遺伝子産物 IE2 とスプライシング関連因子 SART3 の相互作用による ie1/ie2 領域の選択的スプライシング調節. 第24回ヘルペスウイルス研究会. 裾野, 7月.

細菌学講座

教授：水之江義充 細菌学, 分子生物学

講師：進士ひとみ 細菌学, 細菌感染学

教育・研究概要

I. *fnb* 欠損株を用いた黄色ブドウ球菌接着因子 FnBP の機能の解析

黄色ブドウ球菌は複数の細胞壁結合型の接着因子を保有している。その一つである Fibronectin-Binding Protein (FnBP) には *fnbA*, *fnbB* にコードされた2つのホモログが存在し、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接着する他、上皮細胞・繊維芽細胞・血管内皮細胞など種々の細胞に侵入することが報告されている。我々は、野生型株 SH1000 を親株として *fnbA*, *fnbB*, *fnbA/fnbB* 変異株を作成し、*in vivo* および *in vitro* 感染におけるそれぞれの病原性、細胞侵入性の相違等について検討した。

5×10^7 CFU の菌をマウス (n=10) の尾静脈内に投与した場合、親株投与群では著しい体重減少が認められ6日以内に全頭が死亡した。一方変異株投与群では、いずれも体重減少は緩慢であり、*fnbB* 変異株で感染12日目に1頭が死亡した以外、死亡例は認められなかった。また、腎臓への菌の接着と接着後の増殖について検討したところ、親株で顕著な接着と増殖が認められたのに対して、変異株ではいずれも著しく減少した。更に感染後の血中 IL-6 濃度も親株感染群で有意に高値を示した。このことから、*in vivo* 血中感染における病原性の発現には FnBPA と FnBPB の両因子が必要であると考えられる。

次に、*in vitro* 培養系で各種細胞への菌の侵入を検討した。上皮細胞、血管内皮細胞、繊維芽細胞への侵入性、炎症性マクロファージによる食菌性はいずれも親株 \geq *fnbB* 変異株 \gg *fnbA* 変異株 \geq *fnbA/fnbB* 変異株の順に高く、細胞との相互作用においては *fnbA* が不可欠であることが示された。

以上より *in vivo*, *in vitro* いずれにおいても、感染には FnBP が重要であることが明らかになった。*fnbB* 機能における *in vivo* と *in vitro* の相違は、2つの実験系における剪断力（血流の有無）の差に由来する可能性が考えられる。

II. 常在細菌による病原細菌の定着阻害メカニズムの解明

黄色ブドウ球菌は健常人の鼻腔から約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。一般的に、常在性細菌の存在により病原細菌の定着が阻止されていると考えられているが、その詳細は不明である。我々はこの常在細菌による黄色ブドウ球菌に対する定着阻害を明らかにするため、以下の検討を行った。

ヒト鼻腔における優先的な常在細菌である表皮ブドウ球菌に焦点を絞って、88名の健康成人男女の鼻腔から960株の表皮ブドウ球菌を単離した。単離した表皮ブドウ球菌の性質を*in vitro*で検討したところ、約50%の表皮ブドウ球菌が黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成を阻害することが明らかになった。これらの結果から、表皮ブドウ球菌には、黄色ブドウ球菌の定着を阻害する株（阻害性表皮ブドウ球菌）と阻害しない株の2つのタイプがあることが判明した。

また疫学調査によって、この阻害性表皮ブドウ球菌が鼻腔に存在する場合、黄色ブドウ球菌の検出率が有意に低いことが明らかになった。

阻害性表皮ブドウ球菌からその特性を与える因子の単離を試みた。その結果、本因子はセリンプロテアーゼファミリーに属する27kDaのタンパク質Espであることが判明した。EspはMRSAおよびVISA（バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌）を含む様々な黄色ブドウ球菌株のバイオフィーム形成を阻害するだけでなく、既に形成された強固なバイオフィームも破壊した。またEspは、バイオフィーム内の黄色ブドウ球菌のヒト抗菌ペプチドに対する感受性を高めた。さらにEspは鼻腔に定着している黄色ブドウ球菌を除去した。

これらの知見は、常在細菌による病原細菌の定着阻害メカニズムをより深く理解することに貢献すると思われる。また本因子の作用機序の解明は、黄色ブドウ球菌の定着ならびに感染症を防ぐ新規治療法の開発に繋がると考えられる。

Ⅲ. ヒトおよびマウスからの ATP 分泌細菌の単離と同定

腸管内のATPがTh17細胞を分化し、大腸炎を起こす事が2008年に報告された。おそらく腸内の何らかの細菌がATPを分泌していると示唆されたが、これまでその単離・同定はなされていなかった。今回、我々はヒトとマウスからATPを分泌する株を単離した。同定の結果、腸球菌の一種であることが分かった。エネルギー通貨としてのATPを細菌が細胞外に分泌することは意外であった。細胞外にATPを分泌することは、その分泌細菌にとって何

らかの意味があるのかも知れない。現在、ATP分泌メカニズムの解析を行っている。

Ⅳ. 黄色ブドウ球菌由来のバイオフィーム破壊因子の解析

バイオフィームは、細菌が作る集合体であり、河川の岩や医療器具、家庭、工場の水道管など様々な物の表面で見られ、除去困難なぬめりや汚染の原因となっている。特に医療現場において、医療素材上に形成されるバイオフィームは、治療を困難にしている。バイオフィームを形成することで、細菌は薬剤に対し抵抗性をもつとともに、感染源となっており、そこから新たな部位に感染が広がると考えられている。そのため、バイオフィームを破壊する物質の探索・開発が求められている。

黄色ブドウ球菌は、院内感染の主要な原因菌であり、バイオフィームと関連して体内にある医療素材上での感染を引き起こす。我々は、黄色ブドウ球菌が自身のバイオフィームを破壊する因子を分泌することを見出した。菌の培養上清を用いてこの因子の生化学的特性を調べたところ、バイオフィームに対して、数分で破壊効果を示すこと、100℃で5分処理しても失活しない耐熱性をもつものであること、1kDa以下の水溶性の低分子であることが明らかになった。これまでに、このような短時間にバイオフィームを破壊する因子の報告はなく、新奇の分子であると考えられる。現在、因子の同定を進めている。

「点検・評価」

1. 教育について

教育に関しては、臨床基礎医学Ⅱ（細菌・真菌と感染、感染症総論）の講義を担当した。細菌学実習は、90余名を数班に分け、学生に密着して指導を行い、カリキュラムをよく理解させることができた。また、演習として感染・免疫テュートリアルを担当した。

3年次医学生の実習室配属では7名、6年時選択実習では2名を受け入れ多岐にわたる研究指導を行った。学生にとっても好評であった。

スウェーデン王国・ウメオ大学より医学部学生5名、リンショッピング大学より医学生2名を研究室配属として受け入れた。本学の国際交流に少しく貢献できたと思われる。

看護学科（国領校）2年次学生に微生物学、看護専門学校（西新橋校）1年次学生に感染と免疫の講義を行った。

2. 研究について

本年度は、従来から取り組んでいる黄色ブドウ球菌の感染機構の解明およびバイオフィーム形成および破壊機構の解明が前進した。また、新たなテーマとして潰瘍性大腸炎発症のメカニズムの解明に取り組んだ。*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*）の同定および阻害因子の単離・同定に成功した。

黄色ブドウ球菌のファイブロネクチン結合タンパク FnBP には *fnbA*, *fnbB* にコードされた2つのホモログが存在し、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接着する他、上皮細胞・繊維芽細胞・血管内皮細胞など種々の細胞に侵入することが報告されている。我々は、野生型株 SH1000 を親株として *fnbA*, *fnbB*, *fnbA/fnbB* 変異株を作成し、*in vivo* および *in vitro* 感染におけるそれぞれの病原性、細胞侵入性の相違等について検討した。

腸管内の ATP が Th17 細胞を分化し、大腸炎を起こす事が 2008 年に報告され、おそらく腸内の何らかの細菌が ATP を分泌していると示唆されたが、これまでその単離・同定はなされていなかった。今回、我々はヒトとマウスから ATP を分泌する株を単離した。同定の結果、腸球菌の一種であることが判明した。

黄色ブドウ球菌が自身のバイオフィームを破壊する因子を分泌することを見出した。菌の培養上清を用いてこの因子の生化学的特性を調べたところ、バイオフィームに対して、数分で破壊効果を示すこと、100℃で5分処理しても失活しない耐熱性をもつものであること、1kDa 以下の水溶性の低分子であることが明らかになった。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Piao H¹⁾, Minohara M¹⁾, Kawamura N¹⁾, Li W¹⁾, Mizunoe Y, Umehara F¹⁾, Goto Y¹⁾, Kusunoki S¹⁾, Matsushita T¹⁾, Ikenaka K¹⁾, Maejima T¹⁾, Nabekura J¹⁾, Yamasaki R¹⁾, Kira J¹⁾ (Kyushu University). Induction of paranodal myelin detachment and sodium channel loss in vivo by *Campylobacter jejuni* DNA-binding protein from starved cells (C-Dps) in myelinated nerve fibers. *J Neurol Sci* 2010; 288 (1-2): 54-62.
- 2) Lindmark B¹⁾, Rompikuntal PK¹⁾, Vaitkevicius K¹⁾, Song T¹⁾, Mizunoe Y, Uhlin BE¹⁾, Guerry P¹⁾, Wai SN¹⁾ (Umea University). Outer membrane vesicle-

mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol* 2009; 9: 220.

III. 学会発表

- 1) 岩瀬忠行, 進士ひとみ, 田嶋亜紀子, 佐藤文哉, 田村 卓¹⁾, 米田 稯¹⁾ (東京大学), 水之江義充. マウスおよびヒトからの ATP 分泌細菌の単離と同定. 第 83 回日本細菌学会総会. 横浜, 3 月.
- 2) 進士ひとみ, 田嶋亜紀子, 岩瀬忠行, 吉沢幸夫, 水之江義充. 黄色ブドウ球菌の接着因子 FnBPA および FnBPB の宿主細胞侵入性および *in vivo* 感染の成立における役割. 第 83 回日本細菌学会総会. 横浜, 3 月.
- 3) Iwase T, Shinji H, Tajima A, Sato F, Tamura T¹⁾, Yoneda M¹⁾ (Tokyo University), Mizunoe Y. Isolation and identification of ATP-secreting bacteria from mice and humans. 3rd International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology. Lisbon, Dec.
- 4) Tajima A, Iwase T, Sato F, Shinji H, Mizunoe Y. Inhibition of endothelial interleukin-8 production and neutrophil transmigration by *Staphylococcus aureus* beta-Hemolysin. 3rd International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology. Lisbon, Dec.
- 5) 佐藤文哉, 岩瀬忠行, 田嶋亜紀子, 進士ひとみ, 水之江義充. Biofilm formation of *Staphylococcus* species isolated from patients at the Jikei University Hospital. 第 126 回成医会総会. 東京, 10 月.
- 6) 佐藤文哉, 岩瀬忠行, 田嶋亜紀子, 進士ひとみ, 水之江義充. 臨床分離ブドウ球菌のバイオフィーム形成能と構成成分の解析. 第 54 回日本ブドウ球菌研究会. 倉敷, 9 月.
- 7) Tajima A, Iwase T, Shinji H, Sato F, Mizunoe Y. Inhibition of endothelial Interleukin-8 production and neutrophil transmigration by *Staphylococcus aureus* beta-hemolysin. 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Sept.
- 8) 進士ひとみ, 田嶋亜紀子, 岩瀬忠行, 吉沢幸夫, 水之江義充. 黄色ブドウ球菌の病原性発現における Fibronectin-Binding Protein (FnBP) の役割. 第 27 回日本ヒト細胞学会学術集会. 東京, 8 月.