

日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 10月.

- 4) 清水昭宏, 小林伸行, 近藤一博. ヒトヘルペスウイルス6(HHV-6)の細胞指向性に関するウイルス遺伝子の同定と解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 10月.
- 5) 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IE2とスプライシング関連因子SART3の相互作用によるウイルス遺伝子の転写調節. 第22回ヘルペスウイルス研究会. 福岡, 6月.
- 6) 鎌田美乃里, 近藤一博. HHV-6感染SCID-huマウスを用いたHHV-6潜伏感染細胞の同定. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 10月.
- 7) 清水昭宏, 小林伸行, 鎌田美乃里, 近藤一博. AIDS治療を目的とした, ヒトヘルペスウイルス6ベクターによる末梢血T細胞へのshort hairpin RNA(shRNA)の導入. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 10月.

IV. 著 書

- 1) Kondo K, Yamanishi K. HHV-6A, 6B, and 7: molecular basis of latency and reactivation. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K eds. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. p. 843-9.

細菌学講座

教授: 水之江義充 細菌学, 分子生物学
 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

教育・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 (*S. 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。そこで今回、この *S. aureus* の定着を阻害する *S. epidermidis* (阻害性 *S. epidermidis*) の阻害作用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27kDaの外分泌タンパク質Espによってもたらされることが明らかになった。Espはメチシリン感受性黄色ブドウ球菌だけではなく、メチシリン耐性・バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌の定着も阻害した。この定着阻害作用は、殺菌作用ではなく、バイオフィーム破壊作用によっていることを明らかにした。この阻害メカニズムの発見は、*in vivo* における *S. aureus* を制御する新たな薬剤開発に繋がる可能性がある。

II. 黄色ブドウ球菌が産生する 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。IL-8は、好中球のケモアトラクタントであり好中球を活性化する働きを持つ。

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、細胞傷害性は示さずに、IL-8 産生を mRNA/タンパクレベルで抑制し、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。また β -hemolysin は、NF- κ B 活性化を阻害しなかったが、ERK 活性化を阻害した。

以上より、黄色ブドウ球菌の産生する β -hemolysin は、炎症反応を阻害し、菌が宿主の免疫応答から回避するのに寄与している可能性が考えられる。

III. 増殖時期の異なる黄色ブドウ球菌が培養線維芽細胞に及ぼす影響

L929 培養線維芽細胞 (L 細胞) による黄色ブドウ球菌の取込みを、フィブロネクチン結合タンパク質 (FnBP) との関連性において検討した。

Brain heart infusion broth 中で 37°C 2 時間 (対数増殖期) および 18 時間 (定常期) 振盪培養した OK11 株を使用した。精製フィブロネクチン (FN) でそれぞれの菌を処理し、L 細胞が接着した培養皿に添加し、1 時間後の細胞内菌数を顕微鏡下で測定した。コントロールとして PBS 処理菌を用いた。対数増殖期 OK11 は菌体表面に FnBP を大量に発現し、定常期 OK11 の FnBP の発現は非常に少ないことを進士らが既に報告している。FnBP を発現している対数増殖期の菌は多く取込まれたが、FN 処理菌の取込み数は減少した。L 細胞がその表面に FN のネットワークを形成していることから、この結果は FN がアドヘジンとして作用していることを示唆する。また、FN 処理した定常期の菌の取込み数はコントロールより増加し、その値は FN 処理対数増殖期菌と同程度であったことから、FN とは別のアドヘジンの存在が考えられた。

静脈内接種した菌のマウス腎への定着およびその後の増殖を検討したところ、対数増殖期の菌がはるかに高値を示した。L 細胞による取込みにも腎定着にも FN が強く関与していると考えられた。

IV. 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。

我々は以前、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。更に昨年度、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し、*fnbA* 欠損株は感染後の致死活性、臓器への定着性、および IL-6 誘導性において親株に比べ極めて低い事を報告した。従って、黄色ブドウ球菌感染において、FnBPA は非常に重要な定着因子であると考えられる。

一方、*in vitro*, *in vivo* において FnBPB の作用については報告も無く、判っていない。塩基配列から *fnbB* は、*fnbA* にある fibronectin binding domain の 1~2 個と fibrinogen binding domain の 1 個を欠いていると考えられるので、定着因子としての活性は FnBPA よりも弱い可能性はあるが、上記したように FnBPA の欠損により感染における FnBP の機能がほぼ失われてしまうのは意外である。

そこで、FnBPB の欠損株および A/B 双方の欠損株を作成し検討したいと考え、現在欠損株を作成中である。

V. 腸管出血性大腸菌の培養不能状態への移行に関与する分子機構の解析

腸管出血性大腸菌の生きていたが培養出来ない (VNC: viable but nonculturable) 状態へ誘導および VNC からの蘇生 (培養能回復) に関するメカニズムの解析を行った。

VNC 状態へ移行した菌は、通常の培地では増殖しないがカタラーゼ添加培地で蘇生された (増殖能を回復した)。VNC へ移行する株では *rpoS* の活性が低下していた。VNC に移行する株に *rpoS* 遺伝子を有するプラスミドを導入すると VNC に移行しなくなった。シグマ S 因子が VNC への移行に重要な役割を果たしていることが判明した。以上の結果より、VNC 細菌は酸化ストレスに感受性になっており、VNC への移行にはシグマ S 因子支配下のいくつかの遺伝子が関与していると考えられる。今後担

当遺伝子の特定のため、ダブル・トリプル遺伝子欠損株の作製を行いつつ、VNC細菌の病原性の検討を計画している。

「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(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、カリキュラムをよく理解させることができた。

3年次医学生の研究室配属では計11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10名、生命科学科学生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。

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進んだ。また、VNC細菌の分子メカニズムの解明を行った。

*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。

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。

ファイ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。さらに、FnBPAが感染細胞のアポトーシスに関与している事を見いだした。

腸管出血性大腸菌の生きているが培養出来ない(VNC: viable but nonculturable)状態へ誘導およびVNCからの蘇生(培養能回復)に関するメカニズムの解析を行った。

VNC状態へ移行した菌は、通常の培地では増殖しないがカタラーゼ添加培地で蘇生された(増殖能を回復した)。VNCへ移行する株では*rhoS*の活性が低下していた。VNC細菌は酸化ストレスに感受性になっており、VNCへの移行にはシグマS因子支配下のいくつかの遺伝子が関与していると考えら

れる。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Iwase T, Hoshina S, Seki K, Shinji H, Masuda S, Mizunoe Y. Rapid identification and specific quantification of *Staphylococcus epidermidis* by 5' nuclease real-time polymerase chain reaction with a minor groove binder probe. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60(2): 217-9.
- 2) Iwase T, Seki K, Shinji H, Mizunoe Y, Masuda S. Development of a real-time PCR assay for the detection and identification of *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri*. *J Med Microbiol* 2007; 56 (Pt 10): 1346-9.

III. 学会発表

- 1) 田嶋亜紀子, 岩瀬忠行, 進士ひとみ, 関 啓子, 水之江義充. 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. 第90回日本細菌学会関東支部総会. 東京, 10月.
- 2) 関 啓子, 進士ひとみ, 田嶋亜紀子, 水之江義充. 黄色ブドウ球菌取込みに伴う線維芽細胞の変化. 第52回日本ブドウ球菌研究会. 徳島, 9月.
- 3) Seki K, Sasaki H, Shinji H, Mizunoe Y. Staphylococcal adhesion and subsequent changes in fibroblasts. 47th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. Washington, DC, Dec.
- 4) 関 啓子, 荒井久子, 菊地恵美, 佐々木博之. 黄色ブドウ球菌感染 L929 線維芽細胞に誘導されたアポトーシス. 医学生物学電子顕微鏡技術学会第23回学術講演会および総会. 北九州, 5月. [医学生物学電子顕微鏡技術学会誌 2008; 22: 37]
- 5) 田嶋亜紀子, 水之江義充. 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. 第81回日本細菌学会総会. 京都, 3月.
- 6) Iwase T, Maeyama R, Egashira T, Kikuchi T, Matsuda T, Mizunoe Y. Pathogenicity of curli expressed in *Escherichia coli* biofilm. 42nd U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Meeting. Austin, Nov.
- 7) 関 啓子. (宿題報告)黄色ブドウ球菌と宿主細胞との関わり. 第123回成医会総会. 東京, 2006年10月. [慈恵医大誌 2007; 122(3): 123-35]
- 8) 関 啓子, 進士ひとみ, 水之江義充. 培養時間の異なる黄色ブドウ球菌のマウスに対する病原性. 第81回日本細菌学会総会. 京都, 3月. [日細菌誌 2008; 63

(1) : 90]

9) 進士ひとみ, 関 啓子, 吉沢幸夫, 水之江義. 黄色ブドウ球菌の病原性発現における FnBP の関与について. 第 81 回日本細菌学会総会. 京都, 3 月. [日細菌誌 2008 ; 63(1) : 73]

IV. 著 書

1) 水之江義充. コレラ菌. 吉田眞一, 柳 雄介, 吉開泰信編. 戸田新細菌学. 改訂 33 版. 東京 : 南山堂, 2007. p. 563-72.

環境保健医学講座

| | |
|-------------|---|
| 教 授 : 柳澤 裕之 | エージングと必須微量元素, 職業性および環境化学物質の発癌性, 変異原性, 磁場の生体影響 |
| 准教授 : 鈴木 勇司 | 環境化学物質の変異原性 |
| 准教授 : 縣 俊彦 | 疫学方法論, 医療情報処理, 地域保健, EBM |
| 講 師 : 宮越 雄一 | 電磁場と化学物質の複合曝露による変異原性 |
| 講 師 : 小林 浩 | 高気圧障害の予防, 酸化ストレスの生体影響 |

教育・研究概要

I. 実験医学

1. 共同研究「抗酸化活性をもつ新規ビタミン E (VE) 類縁体の創薬研究」

活性酸素は発癌, 老化, 梗塞後の虚血再灌流傷害などに関与していることから, 安全で強力な抗酸化剤の開発が望まれている。昨年度に引き続き, 生体内で抗酸化活性を発現するビタミン E (VE) を規範として, より優れた抗酸化剤の創製を目的として本年度も研究を行った。本研究では, 合成した VE, Me₃, H₃ および VE の chroman 環の π 電子系を拡大したビタミン K (VK) の誘導体である VKH, およびそれらのアセチル化体について, CHL/IU 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った結果, 変異原性陰性であった。これらの創薬の抗酸化活性は現在検討中である。

2. インジウム化合物の変異原性

近年, インジウム化合物は液晶やプラズマのフラットパネルディスプレイ用透明導電膜製造用セラミックスや医学分野で骨髓造血機能診断に使用されるようになり, その毒性が注目されるようになった。今回は塩化インジウムの変異原性について検討した。BALB/c マウスを用いた *in vivo* 小核試験において, 小核誘発頻度が有意に高くなった。CHL/IU 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験では陰性であったが, 小核試験では陽性となった。本研究において塩化インジウムに変異原性がある可能性を示唆する知見を得た。

3. 磁場の染色体異常誘発亢進作用に及ぼすメカニズム

我々は職場環境や日常生活環境中において磁場に曝露する機会が多い。これまでに強静磁場が小核を