

IV. 著 書

- 1) Kondo K. Chronic fatigue syndrome and herpesvirus infection. In: Watanabe Y, Evengard B, Natelson BH, Jason LA, Kuratsune H eds. Fatigue Science for Human Health. Tokyo: Springer Japan, 2008. p.137-52.

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，細菌感染学

教育・研究概要

I. *Staphylococcus epidermidis* の分泌するバイオフィーム破壊因子の解析

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。我々はこの常在性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。88名の健康成人男女の鼻腔の常在細菌を、遺伝学的手法を用いて調べた。その結果、我々は被験者の98%に常在性のブドウ球菌 *Staphylococcus epidermidis* が存在することを明らかにした。また *in vitro* 試験により、これらの単離された *S. epidermidis* の性質を解析した。その結果、我々は単離された *S. epidermidis* の50%が黄色ブドウ球菌の定着を阻害することを見出した。これらの結果から、*S. epidermidis* には黄色ブドウ球菌の定着を阻害する株（阻害性 *S. epidermidis*）と阻害しない株の2つのタイプがあることが明らかになった。また、阻害性 *S. epidermidis* が鼻腔に存在するヒトでは、黄色ブドウ球菌の検出率は有意に低いことを疫学調査によって明らかにした。さらに、阻害性 *S. epidermidis* から黄色ブドウ球菌の定着阻害を引き起こす因子を単離したところ、本因子はセリンプロテアーゼファミリーに属する27 kDaのタンパク質であることが判明した。本因子は黄色ブドウ球菌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をも破壊する作用を有していた。

II. 臨床分離ブドウ球菌のバイオフィーム形成

ブドウ球菌によるバイオフィーム感染症は、血管内留置カテーテルや人工関節などの医療用デバイスに関連して生じることが多い。治療に難渋し、デバイスの温存は困難となる。臨床分離ブドウ球菌のバイオフィーム形成に関する詳細な検討は、バイオフィーム感染症の予防と治療法の確立に役立つと考えられる。慈恵医大附属病院の患者から分離されたブドウ球菌について、*in vitro* におけるバイオフィーム

ム形成能、および構成成分の解析を行った。バイオフィーム形成株は MSSA の 29.2% (7/24 株)、MRSA の 29.2% (7/24 株)、表皮ブドウ球菌の 25.0% (7/28 株) に認められた。各菌種とも 7 株の形成株のうち 2 株は NaCl で、5 株がグルコースでバイオフィーム形成が誘導された。形成させたバイオフィームに多糖体分解酵素 (dispersin B) を作用させると表皮ブドウ球菌の 7 株中 4 株のバイオフィームが破壊されたが、黄色ブドウ球菌では 14 株中、1 株 (MRSA) のみだった。一方、タンパク質分解酵素 (proteinase K) では MSSA の 4 株、MRSA の 4 株でバイオフィームが破壊されたが、表皮ブドウ球菌では 2 株だった。これら 10 株の proteinase K に感受性のあるバイオフィームを形成する株のうち、7 株は DNA 分解酵素 (DNase I) でもバイオフィームの破壊が観察された。以上の結果より、臨床分離ブドウ球菌の *in vitro* におけるバイオフィームの形成頻度には菌種間で明らかな差はなかったが、バイオフィームの構成成分については表皮ブドウ球菌では多糖体性、黄色ブドウ球菌ではタンパク性が多いことが判った。またタンパク性のバイオフィームの構成成分には細胞外 DNA も多く含まれることが示唆された。

III. 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「生きているが培養出来ない (VNC: viable but nonculturable) 状態」への誘導および 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。

IV. 黄色ブドウ球菌の 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

た宿主の防御反応が重要な役割を果たしている。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、黄色ブドウ球菌が血管内皮細胞の IL-8 産生を抑制する因子を分泌す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 であることを同定した。

β -hemolysin は、血管内皮細胞に対して、細胞傷害性は示さずに、IL-8 産生を抑制した。 β -hemolysin は、TNF- α 誘導の IL-8 産生を mRNA、タンパクレベルで抑制し、好中球の血管内皮下への浸潤を阻害した。接着因子 ICAM-1 発現には影響しなかった。

これらのことから、黄色ブドウ球菌の産生する β -hemolysin は、血管内皮細胞における炎症シグナリングを阻害し、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。

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

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、次の結果を得た。
① 各種細胞内への取り込み菌数が顕著に減少した。
② マクロファージに対する炎症誘導が顕著に減少した。
③ マウスに感染させた致死率、臓器への定着能、血清 IL-6 濃度が親株に比べ極めて低くなった。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。本年度は FnBPB および FnBPA/B 双方の欠損株を作成した。これらの欠損株を用いて、現在、細胞への感染実験および *in vivo* 感染実験を行っている。

更に上記の欠損株を用い、バイオフィーム形成における FnBPA,B の機能についても検討中である。現在までの結果から、バイオフィーム形成における FnBPB の重要性が示唆されている。

VI. 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。対数増殖期および定常期振盪培養した黄色ブドウ球菌臨床株 OK11 を使用した。フィブロネクチン (FN) 処理した菌を L 細胞培養系に添加し, 1 時間後の細胞内菌数を顕微鏡下で測定した。定常期に比べて対数増殖期の菌は多く取込まれたが, これは FnBP の発現量の違いによると考えられる。菌を取り込む際, L 細胞辺縁部には微小線維の著しい発達認められ, 近隣に存在する菌を迅速に取り込む様子が GFP 標識 actin を発現させた細胞を用いた実験から明らかになった。

「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, 100 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。

3 年次医学生の実験室配属では計 7 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 15 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およびバイオフィーム形成機構の解明が前進した。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 FnBP が細胞への菌の定着・細胞内感染, およびマウスへの病原性に関与する事を明らかにした。また, FnBP はブ

ドウ球菌のバイオフィーム形成に重要な役割を果たしていることを示した。

臨床分離ブドウ球菌の約 30% がバイオフィームを形成することを見出した。

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 *rpoS* 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) O-Uchi J, Sasaki H, Morimoto S, Kusakari Y, Shinji H, Obata T, Hongo K, Komukai K, Kurihara S. Interaction of alpha1-adrenoceptor subtypes with different G proteins induces opposite effects on cardiac L-type Ca²⁺ channel. *Circ Res* 2008; 102(11): 1378-88.
- 2) Tajima A, Iwase T, Shinji H, Seki K, Mizunoe Y. I Inhibition of endothelial interleukin-8 production and neutrophil transmigration by *Staphylococcus aureus* beta-hemolysin. *Infect Immun* 2009; 77(1): 327-34.

III. 学会発表

- 1) Mizunoe Y. Role of curli on biofilm formation and pathogenicity of *Escherichia coli*. Umea and Jikei University Joint Workshop. Umea, June.
- 2) Shinji H, Tajima A, Iwase T, Mizunoe Y. Role of Fibronectin-Binding Protein (FnBP) on the pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. Umea and Jikei University Joint Workshop. Umea, June.
- 3) Tajima A, Iwase T, Shinji H, Mizunoe Y. Inhibition of endothelial IL-8 production and neutrophil transmigration. by *Staphylococcus aureus* β -hemolysin. Umea and Jikei University Joint Workshop. Umea, June.
- 4) Iwase T, Tajima T, Shinji H, Mizunoe Y. Inhibition of *Staphylococcus aureus* nasal colonization via commensalism. Umea and Jikei University Joint Workshop. Umea, June.
- 5) Seki K, Shinji H, Tajima A, Iwase T, Mizunoe Y. Virulence in mouse kidney shown by *Staphylo-*

coccus aureus of different growth stage. 13th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. Cairns, Sept.

- 6) 田嶋亜紀子, 岩瀬忠行, 進士ひとみ, 関 啓子, 水之江義充. 黄色ブドウ球菌による血管内皮細胞のIL-8抑制と好中球浸潤阻害. 第53回ブドウ球菌研究会. 東京, 9月.
- 7) 岩瀬忠行, 関 啓子, 進士ひとみ, 田嶋亜紀子, 水之江義充. 常在細菌による病原細菌の定着阻害機構の解析. 第91回日本細菌学会関東支部総会. 長生郡, 10月.
- 8) 岩瀬忠行, 上原良雄(高知大学), 田嶋亜紀子, 進士ひとみ, 関 啓子, 縣 俊彦, 高田耕司, 益田昭吾, 佐藤文哉, 水之江義充. 常在細菌の分泌するバイオフィルム破壊因子による黄色ブドウ球菌の定着阻害. 第82回日本細菌学会総会. 名古屋, 3月.
- 9) 佐藤文哉, 岩瀬忠行, 田嶋亜紀子, 進士ひとみ, 関 啓子, 水之江義充. 臨床分離ブドウ球菌のバイオフィルム形成能. 第82回日本細菌学会総会. 名古屋, 3月.

環境保健医学講座

- 教授: 柳澤 裕之 生体における必須微量元素の役割, 職業性および環境化学物質の毒性(特に中毒性腎症) / 変異原性 / 発癌性, 磁場の生体影響, 職場のメンタルヘルス
- 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, 必須微量元素の生態影響
- 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. 磁場の抗腫瘍効果に及ぼす影響

我々はこれまでに, 抗がん剤の染色体異常誘発性を静磁場が増強することを明らかにした。本研究では, これまでの知見を応用し, 静磁場が抗がん剤の抗がん効果を増強できるかを検討した。

マウス (Jcl: BDF1) に L1210 細胞を移植し, 直ちに 5 テスラ (T) の超電導磁石内で全マウスが死亡するまで均一磁場中で連続曝露を行った。その結果, 磁場単独で, 16.5%, 静磁場とプレオマイシン (5mg/kg) の複合曝露で 27.9% の延命率が認められた。勾配磁場とプレオマイシンの複合曝露では 34.6% の延命効果が認められた。

2. 磁場の染色体異常誘発亢進作用に及ぼすメカニズム

本研究において, X 線と強静磁場複合曝露により観察される小核誘発と 8-OHdG 産生をアスコルビン酸により低減できるかを検討した。

BALB/c マウスに 1Gy の X 線を照射し, 直ちに 5T の静磁場を 24 時間曝露したところ, X 線単独照射時よりも有意に小核誘発頻度と 8-OHdG 産生が亢進した。アスコルビン酸を前投与してから X 線と静磁場を複合曝露すると, 小核誘発頻度と 8-OHdG 産生が抑制された。以上の結果から, 1) X 線照射により誘発される小核誘発とフリーラジカル産生が強静磁場曝露により亢進し, 2) 抗酸化剤により, それらが抑制されたと考えられる。