

のメカニズムに関する研究も進み、疲労による疾患誘導の研究も成果をあげつつある。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Nagata T, Kobayashi N, Shinagawa S, Yamada H, Kondo K, Nakayama K. Plasma BDNF levels are correlated with aggressiveness in patients with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. *J Neural Transm* 2013; 121(4): 433-41. Epub 2013 Nov 20.
- 2) 玉井将人, 南波広行, 大坪主税, 和田靖之, 久保政勝, 井田博幸, 小林伸行, 近藤一博. HHV-6 再活性化を伴ったけいれん重積型急性脳症の1例. *日小児会誌* 2013; 117(9): 1459-63.

III. 学会発表

- 1) 嶋田和也, 小林伸行, 岡直美, 清水昭宏, 近藤一博. ヒトサイトメガロウイルス潜伏感染遺伝子 ORF152 が免疫機能と細胞分化に与える影響. 第28回ヘルペスウイルス研究会. 淡路, 5月.
- 2) 嶋田和也, 小林伸行, 岡直美, 近藤一博. ヒトサイトメガロウイルスの潜伏感染遺伝子産物 ORF152 が免疫機能と細胞分化に与える影響. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 11月.
- 3) 小林伸行, 岡直美, 嶋田和也, 近藤一博. 唾液中ヒトヘルペスウイルス (HHV-) 6, 7 による客観的疲労評価に関する検討. 第130回成医会総会. 東京, 10月.
- 4) 小林伸行, 岡直美, 嶋田和也, 近藤一博. アルツハイマー型認知症の前駆段階において単純ヘルペスウイルス1型再活性化が発症に与える影響. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 11月.

細菌学講座

教授: 水之江義充	細菌学, 分子生物学
講師: 田寫亜紀子	細菌学, 分子生物学
講師: 岩瀬 忠行	細菌学, 分子生物学
講師: 杉本 真也	細菌学, 分子生物学

教育・研究概要

I. 迅速な非侵襲的細胞外マトリクス抽出法の開発

バイオフィーム形成細菌は、タンパク質、多糖、DNAなどで構成される細胞外マトリクス (ECM) に覆われることで、免疫系や抗菌物質に対して高い抵抗力を獲得する。そのため、バイオフィームに関連した感染症は難治性となる。バイオフィームは菌種のみならず菌株でその形質が異なり、個々のバイオフィームのECM成分の正確な理解はその性質に合わせた柔軟なバイオフィーム感染症対策につながると考えられる。本研究では、主要なバイオフィーム感染症の起炎菌である黄色ブドウ球菌のバイオフィームをモデルとして、ECM抽出の最適な条件を検討した。その結果、1.5 M NaClを用いた数分間の処理により、ECM中のタンパク質のみならず、多糖やDNAも効率的に抽出することができ、溶菌による細胞質成分の流出を伴わないことがわかった。また、黄色ブドウ球菌以外の細菌 (表皮ブドウ球菌、緑膿菌、大腸菌) のバイオフィームからECMを抽出することも可能であった。今後、本手法を基盤として、バイオフィーム形成のメカニズムやバイオフィーム阻害剤の作用機序の解明が期待される。

II. 大気圧走査電子顕微鏡によるバイオフィームの液中高分解能観察

大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM) は、解放環境の水溶液中で細胞を直接観察できる電子顕微鏡である。薄膜窓を底に備えた3.5cm径のサンプルdishを特徴とし、薄膜を透して内部の細胞を観察する。本研究では、ASEMを用いて種々の細菌の形態やバイオフィームの内部の微細構造を観察した。重金属ラベル法、正・負電荷を帯びたナノゴールドラベル法、抗体ラベル法などにより、バイオフィーム内部の細胞や細胞外マトリクス (タンパク質、DNA、多糖、分泌小胞) の時空間的動態を明らかにすることができた。同様の手法を用いて、大腸菌や表皮ブドウ球菌のバイオフィームと乳酸菌の細胞分裂の観察も可能であった。以上より、ASEMは様々な細菌によって形成されるバイオフィームの内部の微細構造とマ

トリクス成分を特異的かつ生の状態で観察するのに有用であることが示された。

Ⅲ. ペースメーカーから分離された *Propionibacterium acnes* のバイオフィーム形成能評価

心臓外科学講座との共同研究により、ペースメーカー交換術において感染兆候のない患者から摘出されたジェネレーター培養試験を行ったところ、31検体のうち8検体において細菌の増殖を認めた。16S rDNA シーケンスにより分離された細菌の菌種同定を行ったところ、*Propionibacterium acnes* (アクネ菌) と同定された。分離された *P. acnes* のバイオフィーム形成能を評価したところ、グルコースの添加によってバイオフィーム形成能が亢進することが明らかになった。大気圧走査電子顕微鏡と透過電子顕微鏡を用いた高分解能観察によって、溶菌による細胞内物質の漏出がバイオフィーム形成に寄与していることが示唆された。本研究は、平成24年度私立大学戦略的研究基盤形成事業「バイオフィーム感染症制圧研究拠点の形成」の支援を受け行われている。

Ⅳ. バイオフィーム阻害剤の大規模スクリーニング

臨床で問題となるバイオフィーム感染症に対する根本的な治療法は未だ確立されておらず、その開発が急務である。我々は、東京大学創薬オープンイノベーションセンターと連携し、バイオフィーム感染症に対する新たな予防法および治療法の開発を目指したバイオフィーム形成を阻害する化合物のスクリーニングを行っている。多孔プレートを使用して高精度のスクリーニングが可能なアッセイ系を確立し、アッセイプレートへの分注操作、培養操作、阻害活性評価を自動化可能なロボットシステムを構築することで数万におよぶ化合物からハイスループットスクリーニングを行う体制を整えた。これまでに、黄色ブドウ球菌の2菌種をターゲットとして59,600化合物(119,200アッセイ)のスクリーニングを完了した。得られた化合物の一つであるABC-JK1は、バイオフィームマトリクスに多糖を多く分泌する菌株のバイオフィーム形成を特に強く抑制し、生化学的試験により細胞外多糖の合成を負に制御することが示唆された。今後はトランスクリプトーム解析やプロテオーム解析の手法を用いてABC-JK1の作用機序を分子レベルで解明し、バイオフィーム感染症治療薬の開発に繋がる重要な知見を得ることを目指す。本研究は、平成24年度私立大学戦略的研究基盤形成事業「バイオフィーム感染症制圧研究拠点

の形成」の支援を受け行われている。

Ⅴ. バイオフィーム破壊因子の解析

我々は、バイオフィーム感染症を引き起こす黄色ブドウ球菌が、自身の多糖性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、その因子の同定や性質の解析を試みた。破壊因子は耐熱性で121度20分処理しても失活せず、また500Da以下の低分子であった。黄色ブドウ球菌の培養上清をHPLCにてゲルろ過カラムで分画後、逆相カラムの非吸着画分を回収し、親水性相互作用カラムで分画した。バイオフィーム破壊作用をもつ活性画分についてメタボローム解析を行い現在因子の同定を進めている。さらに黄色ブドウ球菌の培養上清は緑膿菌のバイオフィームに対する破壊作用も示した。活性は10kDa以上の画分に見られたことから黄色ブドウ球菌に対するのとは別の因子であると考えられた。

Ⅵ. 病原細菌ならびにヒトがん細胞カタラーゼの簡便な測定方法の開発

酸素呼吸を行う過程で活性酸素が発生するが、これは多くの生体分子にとって有害である。代表的な過酸化物質である過酸化水素は、カタラーゼにより水と酸素に分解され、無害化される。酸素呼吸を行うほとんどの細菌は、カタラーゼを有している。カタラーゼと病原性との関連性を示す報告もあり、カタラーゼ活性の強弱が、宿主への侵入や感染にどのような影響を及ぼしているのかは興味深い課題である。カタラーゼは極めて高い触媒活性を有しているため、多数のサンプルのカタラーゼ活性を測定する場合、その最初と最後で大きな測定誤差が生じることが知られている。そこで、本研究において、過酸化水素と界面活性剤を用いた簡便で安定的な結果を産出するカタラーゼ活性測定法を開発した。標品カタラーゼを用いて検討したところ、20ユニットから200ユニットの間で直線的反応が見られ、その反応はおよそ5分以内に収束した。本法を用いて、大腸菌(野生株)とカタラーゼ欠損株を用いて検討したところ、野生株では高いカタラーゼ活性が観察されたが、欠損株では観察されなかった。また本法を用いて、臨床分離株である腸管出血性大腸菌O157株を調べたところ、その酵素活性は株によって様々であること、そしてストレス応答遺伝子 *rhoS* の機能欠損株においてはカタラーゼ活性が低下することが確認された。また本法をホルモン依存性前立腺癌細胞株LNCaPとホルモン抵抗性前立腺癌細胞株PC-3に適用したところ、LNCaPのカタラーゼ活性は、

PC-3よりも高いことが確認された。本研究において、病原性細菌ならびにヒトがん細胞のカタラーゼ活性の簡便な測定法が開発された。

Ⅶ. Viable but nonculturable (VBNC) 細菌の解析

大腸菌においてシグマS因子の不活性化が、生きているが培養できないVBNC状態への移行に関与することがこれまでの研究から明らかになった。シグマS因子欠損変異株 ($\Delta rpoS$) では、VBNC状態に移行しコロニーが形成できなくなるが、カタラーゼやチオウレアなどの添加培地では蘇生した。このことから、培養時のROS産生によってコロニー形成ができなくなることが考えられた。野生株と変異株 ($\Delta rpoS$) を用いて、VBNC誘導処理後、LB培地又はカタラーゼ含有LB培地に添加し37度で培養した後、菌のDNAダメージについてFACS解析した。野生株では、培養1時間でDNA切断がみられたが2時間後でほとんど消失した。変異株ではDNA切断は2時間後においても1時間後と同レベルみられた。カタラーゼ存在下では両菌株ともDNA切断は抑制された。このことからVBNC状態に移行する変異株では培養時のROS産生によるDNA切断によってコロニー形成ができなくなる可能性が示唆された。

「点検・評価」

1. 教育について

教育に関しては、臨床基礎医学(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、112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年次医学生の実験室配属では7名を、6年次医学生の実験実習では4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。

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、柏看護専門学校1年次学生に微生物学の講義を行った。

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バイオフィーム形成機構の解明およびバイオフィーム形成阻害因子のスクリーニングが大きく前進した。また、臨床との共同研究も成果を上げつつある。具体的な成果として、1) 迅速なバイオフィームマトリクス抽出法の開発、2) 大気圧走査電子

顕微鏡によるバイオフィームの液中高分解能観察技術の開発、3) ペースメーカーのバイオフィーム細菌叢の解析、4) バイオフィーム阻害剤の大規模スクリーニングによる候補化合物の取得、5) 病原細菌ならびにヒトがん細胞カタラーゼの簡便な測定方法の開発などがあげられる。さらに、黄色ブドウ球菌が産生するバイオフィーム破壊因子の解析を進展させたいと考えている。また、生きているが培養できない(VBNC: viable but nonculturable)細菌の病原性を示すことが出来、現在、論文準備中である。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Okuda K, Zendo T¹⁾, Sugimoto S, Iwase T, Tajima A, Yamada S, Sonomoto K¹⁾ (¹Kyushu Univ), Mizunoe Y. Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(11): 5572-9.
- 2) Iwase T, Tajima A, Sugimoto S, Okuda K, Hironaka I, Kamata Y, Takada K, Mizunoe Y. A simple assay for measuring catalase activity: a visual approach. *Sci Rep* 2013; 3: 3081.
- 3) Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K, Okuda K, Tajima A, Iwase T, Mizunoe Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J Bacteriol* 2013; 195(8): 1645-55.
- 4) Hironaka I, Iwase T, Sugimoto S, Okuda K, Tajima A, Yanaga K, Mizunoe Y. Glucose triggers ATP secretion from bacteria in a growth-phase-dependent manner. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79(7): 2328-35.

II. 総説

- 1) 岩瀬忠行, 水之江義充. 複雑系における細菌-細菌間, 細菌-宿主間の相互作用. *生化学* 2013; 85(9): 803-6.
- 2) 水之江義充. 院内感染とバイオフィーム. *耳鼻展望* 2013; 56(4): 199-203.
- 3) 水之江義充. コレラ菌のバイオフィーム形成と生きているが培養できない(VNC)状態への移行. *顕微鏡* 2013; 48(1): 47-50.

III. 学会発表

- 1) 水之江義充. (ランチョンセミナー1) バイオフィーム感染症の制圧をめざして. 第36回日本骨・関節感染症学会. 横浜, 7月.

- 2) 奥田賢一, 杉本真也, 岩瀬忠行, 田嶋亜紀子, 水之江義充. Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. 第87回日本細菌学会総会, 東京, 3月.
- 3) 千葉明生, 佐藤文哉, 水之江義充, 杉本真也. 迅速な非侵襲的バイオフィルムマトリクス抽出法の開発. 第87回日本細菌学会総会. 東京, 3月.
- 4) 小山亮太¹⁾, 松下和彦¹⁾, 別府諸兄¹⁾ (¹⁾聖マリアンナ医科大), 奥田賢一, 水之江義充. (主題3:骨・関節感染症の基礎, 臨床における最近の進歩) オゾン水の整形外科領域への応用-殺菌力の検討-. 第36回日本骨・関節感染症学会. 横浜, 7月.
- 5) 水之江義充. (学際シンポジウム-バイオフィルム: 私たちをとりまく環境と健康との関わり) バイオフィルム感染症制圧の新たな試み. 第27回 Bacterial Adherence & Biofilm. 東京, 7月.
- 6) 奥田賢一, 杉本真也, 岩瀬忠行, 田嶋亜紀子, 水之江義充. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌バイオフィルムに対するバクテリオシンの殺菌効果. 第27回 Bacterial Adherence & Biofilm. 東京, 7月.
- 7) Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K, Okuda K, Tajima A, Iwase T, Chiba S, Mizunoe Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. FEMS 2013: 5th Congress of European Microbiologists. Leipzig, July.
- 8) 水之江義充. (特別講演)細菌の多細胞的振る舞い“バイオフィルム”の形成機構の解明と制圧に向けた試み. 第23回日本病態生理学学会. 東京, 8月.
- 9) 杉本真也, 奥田賢一, 千葉明生, 佐藤主税(産総研), 水之江義充. 大気圧走査電子顕微鏡によるバクテリアの多細胞的形態“バイオフィルム”の液中高分解能観察. 第36回日本分子生物学会年会. 神戸, 12月.
- 10) 水之江義充. バイオフィルム感染症の予防・治療法の開発. 第48回緑膿菌感染症研究会. 長崎, 1月.

IV. 著 書

- 1) 水之江義充, 岩瀬忠行, 杉本真也, 奥田賢一, 千葉明生. 【感染症症候群(第2版)-症候群から感染性単一疾患までを含めて-[上]】細菌感染症 グラム陽性球菌感染症 ブドウ球菌感染症 コアグラゼ陰性ブドウ球菌(MRCNSを含む)感染症. 日本臨床:別冊感染症症候群(上). 大阪:日本臨社社, 2013. p.44-7.
- 2) 水之江義充. Ⅲ. 細菌学各論 11. ピブリオ属とエロモナス属の細菌 A. ピブリオ属 1. コレラ菌, 2. 非O1コレラ菌. 吉田眞一¹⁾, 柳 雄介¹⁾, 吉開泰信¹⁾ (¹⁾九州大). 戸田新細菌学. 改訂34版. 東京:南山堂, 2013. p.352-60.

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, 産業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, 職場のメンタルヘルス
- 准教授: 須賀 万智 疫学, 予防医学
- 講師: 与五沢真吾 癌予防医学, 細胞生物学, 分子生物学

教育・研究概要

I. 実験医学

1. ナノ物質のCHL/IU細胞を用いた*in vitro*染色体異常試験および小核試験に関する検討
ナノ物質の安全性を評価する為に, 単層カーボンナノチューブに引き続き, 酸化亜鉛(ZnO₂)ナノ粒子について, チャイニーズハムスター肺由来繊維芽細胞(CHL/IU細胞)を用いて*in vitro*染色体異常試験および小核試験を行った。その結果, 連続処理法および短時間処理法のいずれにおいても溶媒対照と比較して小核の誘発が認められたが, 染色体異常試験は陰性であった。以上より, 酸化亜鉛ナノ粒子には変異原性があると考えられた。現在, 酸化セレンウム(CeO₂)ナノ粒子についても検討中である。
2. 亜鉛過剰摂取の血液凝固への影響
現在の日本人は亜鉛の摂取不足が問題となっており, それを補うためのサプリメント等も販売されている。一方で, 亜鉛サプリメントの適正な用量を守らずに摂取することが危惧される。これまで亜鉛過剰摂取に関する研究報告は少ないが, 我々の先行研究でラットに亜鉛過剰食を摂取させた時に, 出血傾向を示すことを見出している。そこで本研究では, 血液凝固に焦点を当て亜鉛過剰モデルラットの血液凝固系の検討を行った。

3. 環境汚染物質-フッ素における間質性腎症の進展機序の解明

フッ素による環境汚染が問題となっている。フッ素は体内に摂取されると腎臓から排出されるが, 腎機能が低下している場合には排出が低下し毒性が強まる。これまでに糸球体腎炎マウスにフッ素を与えると, 腎臓の病変が悪化することを見出している。しかし, 他の腎障害及び腎臓の部位別のフッ素の毒性の検討は行っておらず報告もない。そこで我々は閉塞性腎症モデルに着目した。このモデルは, 間質性腎症のメカニズムの解明に良く用いられるモデル