

Title	腸管上皮細胞に対する腸炎ビブリオの定着性及び侵入性に関する研究
Author(s)	明田, 幸宏
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41663
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	あけ 明 だ 田 ゆき 幸 ひろ 宏
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 4 6 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科病理系専攻
学 位 論 文 名	腸管上皮細胞に対する腸炎ビブリオの定着性及び侵入性に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 本 田 武 司 (副査) 教 授 品 川 日 出 夫 教 授 木 下 タ ロ ウ

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

腸炎ビブリオ感染症は日本における代表的な食中毒原因菌であり、常に食中毒件数の上位にあげられる。これまでその病原性の解析は、溶血毒である thermostable direct hemolysin (TDH) や TDH-related hemolysin (TRH) などの毒素を中心としたものであった。一方、細菌感染の初期段階である宿主細胞に対する定着性あるいは侵入性といった性質に関しては明らかにされていないところが多く、いまだ腸炎ビブリオ感染症の全貌は解明されていない。そこで本研究においては腸管上皮細胞に対する腸炎ビブリオの定着性、侵入性を検討し、これらの性質に関する細菌側の因子を同定することを目的とした。

【方法ならびに成績】

腸炎ビブリオ臨床分離株ならびに環境分離株を用いて、腸管上皮培養細胞 (Caco-2) への定着性、侵入性を検討した。定着性は計21株の試験菌を Caco-2 細胞にチャレンジ後、Giemsa 染色を行い顕微鏡観察、あるいはマイクロプレートに培養した Caco-2 細胞に試験菌を加え、これを一定時間インキュベーション後洗浄し、whole cell を可溶化し寒天培地上での colony forming unit (CFU) を測定した。侵入性についても感染細胞の洗浄後、宿主細胞外の試験菌を除く目的でカナマイシンを含む培地を加えて培養を続け、これを洗浄、可溶化して寒天培地上での CFU を測定することでおこなった。その結果、用いた全ての臨床分離株において Caco-2 細胞に対する強い定着性が確認された。一方、環境分離株は全く定着性を示さなかった。また種々の処理をおこなった試験菌体を用いた定着性試験から、この定着性を担う因子はタンパク性の物質である可能性が考えられた。一方、細胞侵入性については17株中4株の臨床分離株で細胞侵入性が確認された。特に高い侵入性を示した株は細胞侵入性菌である *Salmonella typhimurium* と同程度の細胞侵入性を有しており、この腸管上皮細胞に対する細胞侵入性が腸炎ビブリオによって稀に引き起こされる菌血症の原因因子である可能性が示された。

次に定着性や侵入性を担う遺伝子のクローニングを試みた。定着性、侵入性のどちらの性質をも有する AQ4023 株のゲノムライブラリーを作製し、大腸菌 DH5 α を形質転換し、Caco-2 細胞に感染させ、一定時間後洗浄、whole cell を可溶化し、寒天培地上で一晩培養することで大腸菌を回収した。この操作を数回繰り返すことにより Caco-2 細胞に対して定着性を有するクローンを得た。得られたクローンの塩基配列を解析した結果、およそ1.4kbp の

ORF が一つ確認された。この ORF について相同性検索をおこなったところ既知のタンパク質との間に高い相同性はみられなかったが、いくつかの膜タンパク質に若干の相同性が確認された。TMpred プログラムを用いてその構造を検討したところ、11個の transmembrane helices を有する膜タンパク質であると予想された。一般に細菌の定着因子や侵入因子は細胞外との接触を必要とするため膜タンパク質であることが多く、今回得られた ORF が定着因子である可能性が示唆された。この ORF を含む大腸菌クローンを用いて侵入性試験を行ったところ、細胞侵入性は認められなかった。相同組み換えを用いて AQ4023株染色体上のこの ORF を遺伝子破壊したところ、wild type に比べてその定着性が減少した。これらのことより、今回得られた ORF は腸炎ビブリオの定着因子として機能していると考えられた。

【総括】

食中毒原因菌である腸炎ビブリオの腸管上皮細胞に対する定着性、侵入性を検討した。その結果、全ての臨床分離株において Caco-2 細胞に対する定着性が確認され、環境分離株には定着性は観察されなかった。また臨床分離株の中に細胞侵入性の phenotype を示すものがあることを初めて見いだした。さらに Caco-2 細胞に対する定着性を担う因子についてクローニングを行い、大腸菌に定着性を付与するおよそ 1.4kbp の ORF を見いだした。この ORF は膜タンパク質であると予想された。さらにこの ORF を遺伝子破壊した腸炎ビブリオは定着性が減少したことから、この ORF は定着因子をコードしていると考えられた。

論文審査の結果の要旨

腸炎ビブリオは代表的な食中毒原因菌であり、これまで本菌の産生する溶血毒を中心として病原性の解析がおこなわれてきた。一方、細菌感染の初期段階である定着性や侵入性については本菌においてほとんど研究されていない。

本研究は腸炎ビブリオの腸管上皮細胞に対する定着性、侵入性を検討し、それらに関与する因子を同定することを目的としたものである。ヒト腸管上皮培養細胞 Caco-2 に対する腸炎ビブリオの定着性、侵入性を検討したところ、臨床分離株の全てにおいて定着性がみられ、さらにそのうちの数株において侵入性が認められることを明らかにした。非病原性菌である環境分離株ではいずれの菌株においても定着性や侵入性が認められなかった。この定着性を担う因子を検索した結果、膜タンパク質であると予想される 1377bp の ORF が同定された。この ORF がコードするタンパク質は大腸菌での発現系や遺伝子破壊された腸炎ビブリオ変異株を用いた実験から、定着因子であることを明らかにした。

以上の知見は腸炎ビブリオの病原性を理解する上で興味深い知見であり、また腸炎ビブリオのみならず腸管感染症の発症機序解明にも大いに貢献するもので、学位の授与に値すると思われる。