

氏 名 よしむら みちのぶ
吉村 芳修

学位の種類 博士（医学）

報告番号 甲第 1607 号

学位授与の日付 平成 28 年 3 月 22 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）

学位論文題目

Hydrogen peroxide causes *Vibrio vulnificus* bacteriolysis accelerated by sulfonyl fluoride compounds
(過酸化水素による *Vibrio vulnificus* の溶菌と sulfonyl fluoride 化合物による促進)

論文審査委員（主査）	福岡大学	教授	田村 和夫
（副査）	福岡大学	教授	廣松 賢治
	福岡大学	教授	内尾 英一
	福岡大学	准教授	高田 徹

博士学位申請論文内容の要旨

博士学位申請論文名

Hydrogen peroxide causes *Vibrio vulnificus* bacteriolysis accelerated by sulfonyl
fluoride compounds

(日本語訳)

過酸化水素による *Vibrio vulnificus* の溶菌と sulfonyl fluoride 化合物による促進

博士学位申請論文キーワード

<i>Vibrio vulnificus</i>	Bacteriolysis
Hydrogen peroxide	Sulfonyl fluoride compounds
Fenton reaction	

博士学位申請者氏名

吉村 芳修

(平成 年 月 日提出)

【目的】

Vibrio vulnificus は海洋に生息する好塩性のグラム陰性桿菌で魚介類やカキを汚染し、肝硬変等を有する免疫不全者に経口感染して菌血症と壊死性の軟部組織感染症を引き起こす。その致死率と患部切断の可能性は極めて高く「人食いバクテリア」の一つである。この軟部組織感染症に高圧酸素療法が有効であったとの症例報告がある。基礎的な研究でも、マウスの *V. vulnificus* 軟部組織感染モデルを用いて高圧酸素療法の有効性が示されている。また、*V. vulnificus* は同じ通性嫌気性菌である大腸菌と比較して高圧酸素に対する感受性が高く、代表的な活性酸素種のひとつである過酸化水素(H_2O_2)にも高い感受性を示した。*V. vulnificus* は 10mM の H_2O_2 を含む溶液中で溶菌を起こすことが観察されたので、この溶菌現象の機序についての研究を行った。

【材料と方法】

研究の材料として *V. vulnificus* JCM3725 株を用いた。初めに *Vibrio* 属以外の細菌、続いて *Vibrio* 属の細菌を用いて 10mM の H_2O_2 による溶菌の有無と程度を調べた。次に溶菌が起こるために細菌細胞によるエネルギーの産生やタンパクの合成が必要か否かについて、それぞれの阻害薬を用いて検討した。続いて、溶菌の機序としてよく知られているバクテリオファージの誘導と autolysis の可能性について検討した。前者では mitomycin C (MMC) によるバクテリオファージ誘導の有無を検討した。後者に対しては *V. vulnificus* の Autolysin である VvpS をコードする *vvpS* 遺伝子の破壊株を作成し溶菌実験を行った。また、VvpS の阻害剤である phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) を含むプロテアーゼインヒビターによる溶菌の阻害作用を検討した。偶然にも PMSF と 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) によって溶菌が促進されたため、この現象に着目した。以降の実験には溶菌促進効果がより強かった AEBSF を用いた。「AEBSF は H_2O_2 と反応して反応性の高い活性酸素種である hydroxyl radical を産生している」という仮説を立て、それを検証するために hydroxyl radical の測定を行った。測定には *p*-nitrosodimethylaniline の脱色法を用いた。上記実験で溶菌の促進が hydroxyl radical によって起こっていることが判明したので、実際の溶菌も hydroxyl radical によって起こっているという仮説を立てた。Hydroxyl radical は Fenton 反応によって産生されていると考えた。Fenton 反応は 2 価の鉄イオンと H_2O_2 が反応して hydroxyl radical が産生される反応である。これは鉄キレート剤であるデフェロキサミンによって阻害されることが知られており、溶菌がデフェロキサミンによって阻害されるか否かについて検証した。

【結果】

10mM の H_2O_2 による溶菌は菌種によって違いがあり、*Vibrio* 属以外の細菌では溶菌は起こらなかった。また、*Vibrio* 属の菌種間でも溶菌の程度に差がみられた。溶菌は液体培地中でも、栄養を含まないバッファー溶液中でも同様に観察され、栄養源の有無に無関係であった。 H_2O_2 による溶菌はシアン化カリウムもしくはクロラムフェニコールで処理した場合も観察され ATP の産生やタンパクの合成は溶菌に必須ではなかった。バクテリオファージの溶原化株である大腸菌 ME9012 株では MMC を作用させることによって溶菌が起こり、電子顕

微鏡でバクテリオファージ粒子が確認された。しかし、*V. vulnificus* は MMC によって溶菌せず、 H_2O_2 による溶菌後の上清中にファージ粒子を確認することはできなかった。*vvpS* 遺伝子の破壊株では培養上清中の VvpS 蛋白の消失がウエスタンブロット法により確認されたが、野生株と同様に H_2O_2 により溶菌した。また、セリンプロテアーゼである VvpS を阻害するプロテアーゼインヒビター (PMSF, AEBSF, Leupeptin, aprotinin) を用いた溶菌実験では溶菌は阻害されなかったため、 H_2O_2 による溶菌は autolysis ではないと考えられた。逆に、PMSF または AEBSF を加えた溶菌実験では予想に反して溶菌現象が促進された。「溶菌の促進は活性酸素種が産生されたことによる」という仮説を立て、反応性の高い活性酸素種である hydroxyl radical を *p*-nitrosodimethylaniline の脱色法を用いて測定した。 H_2O_2 に AEBSF を加えると継時的に *p*-nitrosodimethylaniline の A440 の酸化による脱色が起こり、約 15 分間にわたり hydroxyl radical の産生が見られた。反応を開始した 15 分後に反応液中に *V. vulnificus* を加えたところ溶菌は認められたものの、その促進効果は認めなかった。この結果から、溶菌の促進効果は hydroxyl radical によるものであると結論付けた。デフェロキサミンは濃度依存的に H_2O_2 による溶菌反応を抑制したので、 H_2O_2 による溶菌自体も hydroxyl radical によるものであると考えられた。さらに、デフェロキサミンは AEBSF と H_2O_2 による hydroxyl radical の産生と AEBSF の溶菌促進効果も濃度依存的に抑制した。

【結論】

V. vulnificus は H_2O_2 と hydroxyl radical に高い感受性を持ち、それらによって溶菌することが分かった。この hydroxyl radical は Fenton 反応によって産生されていた。 H_2O_2 による溶菌現象はビブリオ属の細菌に特異的な現象であり、ビブリオ属の細菌は実験に用いた他属の細菌と比較して活性酸素に高い感受性を有していることが考えられた。*V. vulnificus* 感染症において細菌の排除には貪食細胞による処理が重要であるとする報告がみられる。貪食された細菌は貪食細胞によって産生された superoxide anion や H_2O_2 などの活性酸素により殺菌される。今回の我々のデータはこれらの報告を支持するものである。この研究では *V. vulnificus* が hydroxyl radical に高い感受性を有する事を明らかにしたが、hydroxyl radical の標的分子については明らかになっておらず、この点は今後の課題である。

審査結果の要旨

本研究は、致死率の高い *Vibrio vulnificus* による壊死性筋膜炎の症例が、抗菌薬と高圧酸素療法にて下肢切断を免れ治癒したという報告（八木ら、感染症学雑誌 77:167-173,2003）に端を発している。さらに、Tamura et al (Microbiol Immunol,56:673-679,2012) の先行研究によって示された *V. vulnificus* が H_2O_2 に感受性が高いという実験結果を受けて、本研究では、活性酸素等が本細菌による感染症のコントロールに有効だったのではないかと考え、その機序の解明に取り組んだ。その結果、*V. vulnificus* が H_2O_2 によって溶菌し、その作用の本体が hydroxyl radical によるものであることを証明した。Hydroxyl radical は、鉄イオン(Fe^{2+})と H_2O_2 との反応である Fenton 反応によって産生されていた。また、実験中に偶然に見つかった現象であるが、4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF)によって溶菌は促進され、その機序の検討から同物質が H_2O_2 と反応して hydroxyl radical を産生することを証明した。

さらに、この H_2O_2 による溶菌現象は *Vibrio* 属の細菌に特異的な現象であり、*Vibrio* 属の細菌は活性酸素種に高い感受性を有していることを示した。

1. 斬新さ

Tamura らの先行研究によって *V. vulnificus* が大腸菌と比較して H_2O_2 に感受性が高いことが示されていたが、その機序については不明であった。本研究により、その機序が Fenton 反応で産生された hydroxyl radical であることをはじめて証明した。

2. 重要性

V. vulnificus は時に致死的な軟部組織感染症を引き起こす。本研究によって *V. vulnificus* が活性酸素種に高感受性を有していることが明らかになった。本研究は活性酸素種を介した貪食細胞による感染防御と、感染症の補助治療としての高圧酸素療法が *V. vulnificus* 感染症に対して有用である可能性を支持する基礎的なデータを示したことは重要である。従来、高圧酸素は嫌気性菌以外の菌（*V. vulnificus* は通性嫌気性菌）には静菌的にのみ作用するということが通説であり、本菌に殺菌的に作用するとは考えられていなかった。今回の研究結果は、治療方針を決定する際に、単に酸素の有無による増殖様式の違いによってのみ適用を判断するのではなく、活性酸素に対する感受性の程度から高圧酸素療法の適用を検討すべきである事を示唆した点が重要である。

3. 研究方法の正確性

本研究で使用された細菌株はこれまでの研究で使われてきたものである。また、各実験は複数回繰り返し、再現性を確かめており正確性は担保できる。

4. 表現の明確さ

本論文は正確な用語を用いて記載されており、peer review のある英文誌、Archives of Microbiology 誌に掲載されている。また、審査公聴会においても適切な用語・表現でプレゼンテ

ーションがなされた。

5. 主な質疑応答

Q1. 肝硬変患者において *V. vulnificus* 感染症が重症化する病態と今回の研究の活性酸素による溶菌とどう結びつくのか。

A1. 肝硬変の状態では門脈圧亢進による腸管のバリア機能の低下があり、腸管から血中への細菌の侵入が容易であるということがあります。肝臓のクッパー細胞は門脈から侵入する異物の除去に重要ですが、肝硬変ではクッパー細胞の貪食能が低下していますので、肝臓で除去されず、血液中にとどまって体内を循環します。末梢血管に定着した菌に対しては貪食細胞によって殺菌されますが主に NADPH オキシダーゼにより産生される活性酸素が重要です。今回の研究の結果は *V. vulnificus* が活性酸素に高い感受性を有していることから、貪食細胞による殺菌が本菌の排除には重要であるが、肝硬変等の病態ではクッパー細胞の排除能が健常人と比較して低下していることが重症化の原因と考えられます。

Q2. H₂O₂ と鉄イオンがフェントン反応を起こして hydroxyl radical が産生されるということだったが、肝硬変の場合トランスフェリン産生が低下し、むしろ血清鉄は上がると思われる。この場合、細菌が死にやすくなってそれがむしろ劇症化の原因となっている可能性はないか。溶菌された菌から LPS のような菌体成分が放出されて劇症化している可能性はないか。

A2. ご指摘の可能性は無いとは言えません。しかし、*V. vulnificus* は動物実験レベルでは鉄剤を投与すると病原性が高まることが報告されており、菌が死にやすくなるというよりも増殖が促進されることが知られています。また、鉄獲得のために溶血毒である *vvhA* や、ジデロフォアとしてブルニバクチンを産生し、積極的に鉄を獲得するような機構を有しています。このような事実から鉄過剰の状態は本菌が死にやすい環境であるより、菌の増殖を促進していると考えられます。

Q3. 肝障害における貪食能の低下が重症化の一因になっているという話であったが、臓器移植等で免疫抑制剤を使用している患者ではこの菌による劇症型感染症を発症したという報告はほとんどないと思う。貪食細胞の機能低下に加えて鉄の過剰状態など肝硬変によって引き起こる病態の関与が大きいのか。

A3. 免疫抑制剤による免疫低下はリンパ球の障害がメインではありますが、本菌の排除に重要なのはマクロファージや好中球であると考えられます。好中球が減るような骨髄抑制を引き起こす化学療法の場合は問題になってくるかもしれません。

Q4. 教科書的には、この菌による感染症の治療にはあまり選択肢がなく、テトラサイクリン系抗菌薬等が投与されているようであるが、既存の抗菌薬治療と比較して活性酸素種（高圧酸素療法）による治療はどの程度効果があって、実際にどのように使用されているのか。

A4. 高圧酸素療法はあくまでも補助療法ですので感染症に対して単独で用いるということはありません。必ず抗菌薬治療や外科的なデブリードマン等を十分に行ったうえでそれらに組み合わせて行

うことが原則です。よって抗菌薬治療との治療効果の比較はできません。

Q5. 先行研究であるマウスの *V. vulnificus* 感染症に対する研究は、肝硬変の状態での感染のモデルなのか、そうでないとすると壊死性筋膜炎を動物実験で再現できるのか。

A5. 先行研究は肝硬変の状態のマウスを用いてはならず、皮下に菌液を投与しています。厳密には軟部組織感染と呼ぶ方が正しいです。現段階で肝硬変における壊死性筋膜炎のモデルは確立されていません。

Q6. 最初の症例報告は菌血症を伴っていたのか。

A6. 敗血症の状態でした。

Q7. 外毒素などが病態に関与していると思われるが、最近の研究ではどのようなことが言われているだろうか。

A7. 溶血毒である *vvhA* やメタロプロテアーゼである *vvpE* などが知られています。*vvpE* はIV型コラーゲンを破壊します、また組織の壊死などを生じます。細胞毒性と病原性に最も関与していると考えられているのは *RtxA1 toxin* です。病変がなぜ皮下や筋肉・筋膜に生じるかということについては十分解明されていません。

Q8. 肝硬変の患者の条件でこのような病原因子の発現がどのように変化しているかといった趣旨の研究はなされていないのか。

A8. 自分が知る限りはありません。

Q9. 今回作成した *vvpS* 遺伝子のミュータントの病原性はどうなっているのか。

A9. 自分が作成したミュータントでの確認は出来ていませんが、*vvpS* の存在が報告された論文では *vvpS* 遺伝子のミュータントではマウスに対する病原性が低下することが報告されています。これは *autolysis* の機能低下によるものであると考えられています。

Q10. この菌は壊死性筋膜炎を引き起こし感染部位は嫌気的な条件になると考えられるが、そのような環境はこの菌にとって増殖に有利な条件といえるだろうか。

A10. 嫌気性菌であればそのような環境が有利な可能性が高いと考えられます。しかし、*V. vulnificus* は通性菌であり、酸素があればそれを利用して発育し、酸素がなくても発育が可能です。通常の培地中での培養条件では振とうによる *aeration* をした方が発育が早いので嫌気状態でない方が良いと考えられます。ただし、宿主の活性酸素を介した殺菌から逃れるという点では嫌気的環境が有利であると考えられます。

以上のように申請者はすべての質問に対し的確に回答した。本論文は、*V. vulnificus* が H_2O_2 によって溶菌し、作用の本体が *hydroxyl radical* によるものであることをはじめて証明した臨床的にも示唆

に富む論文であり、学位論文に値するものと評価された。