

ビブリオの病原因子—*Vibrio vulnificus* を中心に—

篠田 純男

Pathogenic Factors of Vibrios with Special Emphasis on *Vibrio vulnificus*

Sumio SHINODA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan

(Received March 30, 2005)

Bacteria of the genus *Vibrio* are normal habitants of the aquatic environment and play roles for biocontrol of aquatic ecosystem, but some species are believed to be human pathogens. These species can be classified into two groups according to the types of diseases they cause: the gastrointestinal infections and the extraintestinal infections. The pathogenic species produce various pathogenic factors including enterotoxin, hemolysin, cytotoxin, protease, siderophore, adhesive factor, and hemagglutinin. We studied various pathogenic factors of vibrios with special emphasis on protease and hemolysin of *V. vulnificus*. *V. vulnificus* is now recognized as being among the most rapidly fatal of human pathogens, although the infection is appeared in patients having underlying disease(s) such as liver dysfunction, alcoholic cirrhosis or haemochromatosis. *V. vulnificus* protease (VVP) is thought to be a major toxic factor causing skin damage in the patients having septicemia. VVP is a metalloprotease and degrades a number of biologically important proteins including elastin, fibrinogen, and plasma proteinase inhibitors of complement components. VVP causes skin damages through activation of the Factor XII-plasma kallikrein-kinin cascade and/or exocytotic histamine release from mast cells, and a haemorrhagic lesion through digestion of the vascular basement membrane. Thus, the protease is the most probable candidate for tissue damage and bacterial invasion during an infection. Pathogenic roles and functional mechanism of other factors including hemolysins of *V. vulnificus* and *V. mimicus* are also shown in this review article.

Key words—pathogenic vibrios; *Vibrio vulnificus*; metalloprotease; hemolysin

1. はじめに

ビブリオ属の細菌は自然環境水を本来の生息域としており、特に海水域においては主要な従属栄養細菌の1つで、有機物の分解者として生態系維持に関わっている。したがって、バイオマスの言えば病原性のビブリオよりも非病原性のビブリオの方がはるかに多い。しかし、一部の種は人の感染症の原因となり、そのインパクトが強いので、ビブリオと言えば病原菌であるとの印象が強い。現在ビブリオ属には75菌種が報告されているが、病原種としてはTable 1に示すように11菌種が知られている。^{1,2)}コレラ菌や腸炎ビブリオなど下痢症を引き起こす種が多いが、*Vibrio vulnificus*のように消化器症状より

も重篤な全身症状を示すことで特徴付けられるものもある。筆者は種々のビブリオを、その病原因子と発症機構、表層抗原物質、生態と分子疫学など、様々な角度から取り上げて研究してきたが、病原因子に関する研究はその中心であった。そこで、ここではまず研究の背景としての病原ビブリオについて解説し、ついで *V. vulnificus* を中心としたビブリオの病原因子に関する筆者らの研究成果をまとめてみ

Table 1. Pathogenic Species of Genus *Vibrio*

Gastrointestinal diseases	Extraintestinal diseases
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>V. vulnificus</i>
O1, O139	<i>V. damsela</i>
Non-O1/non-O139	<i>V. alginolyticus</i>
<i>V. mimicus</i>	<i>V. cincinnatiensis</i>
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. metschnikovii</i>
<i>V. fluvialis</i>	
<i>V. furnissii</i>	
<i>V. hollisae</i>	
<i>V. metschnikovii</i>	

岡山大学大学院自然科学研究科・薬学系 (〒700-8530 岡山市津島中 1-1-1)

現住所：岡山理科大学理学部 (〒700-0005 岡山市理大町 1-1)

e-mail: shinoda@dls.ous.ac.jp

本総説は、平成16年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

たい。

2. 病原ビブリオ

上述のようにビブリオ属菌は水生細菌であるが、海水を生息域としているものが多く、これらの菌種の多くは海水の塩分濃度（3%前後）を至的環境とする低度好塩菌である。ちなみに、細菌の中には3—15%程度の食塩を好む中等度好塩菌や15%—飽和濃度の食塩環境を好む高度好塩菌も存在し、塩蔵食品や塩湖等に生息する。このような好塩菌は低張環境にさらされると溶菌死滅してしまうので、淡水中では生息できず、海水性のビブリオもその範疇に入る。しかし、コレラ菌 (*V. cholerae*) や *V. mimicus* などは例外的に淡水環境にも生息するので、飲料水はコレラの感染源になる。

病原ビブリオの代表は *V. cholerae* であり、これがビブリオ属の Type species でもある。*V. cholerae* は200余りのO血清型があるが、このうちO1とO139のみが流行性のコレラを起こし、他の血清型 (non-O1/non-O139) は単発下痢症を起こすものの流行性コレラの原因とはならない。したがって、O1/O139が正しい意味でのコレラ菌と言える。Non-O1/non-O139はO1あるいはO139抗血清による凝集反応を示さないので、ナグビブリオ (NAG vibrio: non-agglutinable vibrio) と呼ばれる。

コレラは有史以前からインド亜大陸、特に東部のガンジス河流域、すなわちベンガル地域に土着していた疾患と考えられており、これが19世紀の初頭になって東西の交流拡大に伴って世界中に広がったもので、現在までに7回のパンデミー（大流行）を繰り返している。第1回から第6回のパンデミーはクラシカル型（アジア型）と呼ばれるタイプによる流行であったが、1960年代から現在に至る第7回パンデミーはエルトール型によるもので、インドネシアのスラベシ島から世界各地に広がった。^{3,4)} クラシカル型とエルトール型は表現形としては溶血性の有無、ポリミキシンB感受性、ニワトリ赤血球凝集性、VP反応、IV型フェージ感受性などで分けられるが、近年の遺伝学的解析により種々の遺伝子の塩基配列の部分的相違が明らかにされている。クラシカル型とエルトール型はいずれもO1血清型に属するもので、上述のように流行性コレラはO1のみによって引き起こされると考えられていたが、1992年にインド亜大陸で新たな血清型による流行が起こ

り、O139が見出された。⁵⁻⁷⁾ O139はO1エルトール型の変異したものと考えられている。コレラはコレラ毒素 (CT) の作用による激しい水様便により特徴付けられる疾患で、劇症の場合は1日10リットルを超す便を排出して脱水症状を示し、適切な水分補給がされない場合には死に至ることが多い。現在下痢症は、世界で年間180万人の死者を記録しており、急性及び慢性呼吸器疾患（肺炎と結核）、エイズ、マラリアなどと並ぶ重大な感染症であるが、コレラはその中でも重要なものの1つである。インド亜大陸やアジア、アフリカの開発途上地域では常に流行が繰り返されており、特に災害発生時には流行が拡大することが多い。

もう1つの主要な病原ビブリオが腸炎ビブリオ (*V. parahaemolyticus*) である。1950年に大阪南部でシラス中毒事件があった際に藤野ら⁸⁾により発見されたもので、沿岸海水の常在菌であり、海産物を好む日本ではこの食中毒が夏季を中心に多発してきた。1990年代の半ばまでは、夏季の海水温が低い例外的な年を除いて常にわが国の食中毒事件数の1位を記録してきたが、近年は海産物の衛生基準の改定、他の食中毒微生物の増加、食中毒の届出システムの変化などの様々な要因により、他の微生物による食中毒の数が上回る年が多くなった。しかし、主要な食中毒原因菌であることは間違いなく、夏から秋にかけての海産物の衛生管理で最も注意しなければならない対象である。腸炎ビブリオによる下痢症はTDH (Thermostable direct hemolysin: 耐熱性直接溶血毒) により引き起こされるが、海水中に生息する腸炎ビブリオのうちでこの毒素を産生するのは一部であり、そのようなTDH陽性か否かが病原性判定の指標となっている（神奈川現象と呼ばれる）。⁹⁻¹¹⁾ 海水中から分離される腸炎ビブリオのうちでTDH陽性株の比率は低いので、陽性株を見出すことは難しいが、筆者らは増菌培養とPCR (polymerase chain reaction) を組み合わせることにより潜在的なTDH陽性株の広い分布を示している。¹²⁾

3. *V. vulnificus*

V. vulnificus も上記の2種に次ぐ主要な病原ビブリオであるが、患者数としては限られている。しかし、敗血症を起こした場合には極めて高い致死率を示すので、注意を要する細菌である。この菌も腸炎ビブリオに似た低度好塩菌であるので、沿岸海水に

生息する病原菌である。本菌による感染症には海産物の摂取により腸管から菌が血流に侵入して重篤な敗血症など全身疾患を起こす場合と、皮膚創傷から侵入して局所の感染を起こす場合とがある。前者は肝障害などの基礎疾患のある場合に起こる日和見感染で、頻度は低いが発症すると致死率が極めて高い。高齢化社会を迎えて易感染性宿主が増加し、かつ海産物を好んで食べるわれわれ日本人にとって、この菌は食品衛生の立場での重要な管理対象である。本菌感染症の初期症状は悪寒、発熱などであり、敗血症を起こした場合には種々の皮膚症状も見られるので、内科、皮膚科領域などで注意すべき感染症である。

3-1. *V. vulnificus* の細菌学的性状 本菌は2—3%の食塩濃度が至適の低度好塩性グラム陰性桿菌で、海水を生息域としている。1970年にRoland¹³⁾により脚の壊疽から分離されたのが、ヒトに対する病原性の最初の報告例であるが、この時点では腸炎ビブリオの腸管外感染例として報告された。その後、この菌が乳糖分解能（大腸菌などと比べると反応が遅いが）を持つこと、8%食塩の存在下では増殖できないことなどが明らかになり、腸炎ビブリオとは区別されることから、一時期 *lactose positive vibrio* (L+ vibrio) と呼ばれた。その後1976年に Reichelt ら¹⁴⁾が *Beneckeia vulnifica* の名を提案したが、*Beneckeia* 属は正式の属名としては成立せず、1979年に Farmer¹⁵⁾により現在の学名に修正された。なお、*V. vulnificus* の名は本菌が創傷感染 (wound=vulnus) を起こすことに由来している。

V. vulnificus は通常は極単毛であるが、食塩濃度が上昇すると極多毛になることがある。上述のように本菌の乳糖分解反応は、大腸菌などとは異なり、非常に進行が遅く、TSI 培地など通常の乳糖分解性検査用の培地では判定しにくい場合がある。しかし、ONPG (*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) の分解性により乳糖分解性を確認することができる。この性状以外では極めて腸炎ビブリオに似た性状である (Table 2)。

本菌の分離には他のビブリオ属菌と同様に TCBS (thiosulfate-citrate-bile salt-sucrose) 寒天培地が使われ、腸炎ビブリオと同様に青緑色集落を形成するが、選択的分離のための種々の培地が報告されている。例えば、SPS agar (SDS-polymixin B sucrose

Table 2. Characteristics of *Vibrio vulnificus* and *V. parahemolyticus*

Traits	<i>Vibrio vulnificus</i> *	<i>V. parahemolyticus</i>
Oxidase	+	+
TSI agar medium		
Slant	N	N
Stab	A	A
Gas	—	—
H ₂ S	—	—
LIM medium		
Lysine decarboxylation	+	+
Indol production	+	+
Motility	+	+
Growth in peptone medium		
0% NaCl	—	—
1	+	+
3	+	+
8	—	+
10	—	—
VP	—	—
Ornithine decarboxylation	+	+
Arginine hydrolysis	—	—
Utilization of		
arabiose	—	+
mannitol	d	+
inositol	—	—
ONPG hydrolysis	+	—

* Biotype 1, A: acid production, N: no acid production, d: varies in strains, ONPG: *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside.

agar) 培地¹⁶⁾は本菌が sulfatase を産生して SDS (sodium dodecyl sulfate) を加水分解し、不溶性の高級アルコール (dodecyl alcohol) を生成することを利用した培地で、*V. vulnificus* 及び *V. cholerae* O1 は dodecyl alcohol のためにコロニーの周辺に不透明環を形成し、*V. cholerae* non-O1 では 30% 程度が不透明環を形成するが、その他のビブリオではこの環はみられない。*V. vulnificus* と *V. cholerae* はショ糖の発酵性で区別できるので、本培地は両菌の選択的分離培地として利用できる。その他、VV 培地、cellobiose-collistin agar¹⁷⁾ などの有効性が報告されている。また、本菌のヘモリジン¹⁸⁾あるいは *toxR*¹⁹⁾ 遺伝子が種特異的であることを利用した PCR などの遺伝学的な同定手法も報告されている。

本菌は生物学的性状から生物型 1 と 2 に分けられていたが、²⁰⁾ 最近新たに生物型 3 が報告されている。²¹⁾ ヒトの感染症から分離されるのは通常は生物型 1 であり、2 は魚の病原菌として分離されるが、

2型によるヒトの感染例も報告されている。²²⁾ 生物型3は1996—1997年にイスラエルの創傷感染及び菌血症患者から分離されたビブリオの解析の結果見出されたものである。²¹⁾ これらのイスラエル分離株は生化学性状では生物型1, 2と異なり、特に乳糖及びONPGの分解性がない点で元来の*V. vulnificus*の性状と大きく異なるが(Table 3), DNA-DNA hybridizationでは*V. vulnificus*のtype strainに極めて近似しており、同じ種と考えられたので、生物型3として分類された。最近Bisharatら²³⁾は生物型1—3のハウスキーピング遺伝子の部分的な塩基配列の違いをコンピュータプログラムで比較解析することにより、生物型3が1及び2のHybrid型であると報告している。

3-2. 臨床 *V. vulnificus*の感染症は、上述のように消化器感染型と皮膚感染型とがあるが、肝疾患を主とする基礎疾患のある場合に消化器感染をすると全身症状を示して致死率の高い重篤な敗血症に至る場合がある。わが国で報告されている症例はほとんどが消化器感染型であるが、欧米では皮膚感染型の症例も多く報告されている。²⁴⁾ 重症例はリンパ節の炎症から血流に菌が侵入して敗血症を起こし、血圧低下を伴うショック症状、血栓症(DIC)を起こして死の転帰を辿る。Tacketら²⁴⁾によると、本菌感染症の症状として、発熱(94%)、悪寒(91%)、皮膚病変(67%)、吐気(58%)、嘔吐(46%)などが挙げられている。わが国での症例では、城野ら²⁵⁾

が1992年までの50症例についてまとめ、藤山と田中²⁶⁾も1996年までの73例のまとめを行っている。城野ら²⁵⁾によると、初期症状として発熱(96%)、血圧低下(70%)、悪寒戦慄(42%)などの敗血症ショックに関連する症状や皮膚症状(92%)、疼痛(56%)、消化器症状(52%)などが挙げられている。皮膚症状としては腫脹、発赤、紅斑、紫斑に始まり、水疱、血疱、壊死へと進行し、下肢あるいは四肢に激しい痛みを訴えることが多い。50%以上は下肢のみに皮疹がみられるが、四肢、上肢、全身にみられるものもある。病理学的所見では皮下脂肪組織を中心に真皮中層に及ぶ浮腫と組織破壊の強い炎症がみられる。潜伏期は0.5—2日と、かなり短い。50例中34例(68%)が死亡しているが、発症から死亡まで1—2日のものが多く、経過が急激である。また、藤山と田中²⁶⁾によれば、73例中69例が基礎疾患として肝疾患を持ち、そのうち原発性敗血症型の56例では1例を除いてすべて肝疾患があり、その大部分は肝硬変となっている。なお、85%が男性の患者であり、年齢的には50歳代及び60歳代が75%を占めており、73例中皮膚感染型は4例のみである。

本菌の感染症では、経口感染でも下痢がみられることは少なく、便から菌は検出されないが、腹痛、悪心、嘔吐などを含めた消化器症状は上述のようにほぼ半数の患者でみられている。なお、竹平ら²⁷⁾は大腸潰瘍を併発して便から本菌が検出された敗血症例を報告している。発症早期に急激なDICやSeptic shockなどを起こすことがあり、その治療には迅速な処置が必要で、本症が疑われた場合にはできるだけ早期に適切な抗生物質を投与すべきである。テトラサイクリン系(特にミノマイシン)や第3世代セフェム系抗生物質が効果を上げているが、症状が進行してからの投与は無効である。血液、血疱、水疱などから菌が検出されるが、発症から死亡までの期間は1—数日であり、半数以上が3日以内に死亡しているので、早期の適切な治療が必要である。抗生物質の乱用は好ましくないが、肝障害を基礎疾患として持つ患者で症状から本菌感染症が疑われた場合には、細菌検査の結果を待たずに抗生物質の投与を行うべきと思われる。Satoら²⁸⁾は本菌敗血症患者の血液を、ポリミキシンBを固定したカラムを用いて環流してエンドトキシンを除くことによっ

Table 3. Differentiation of *Vibrio vulnificus* Biotypes

Traits	Biotypes		
	1	2	3
Oxydase	+	+	+
Arginine hydrolysis	-	-	-
Lysine decarboxylation	+	+	+
Ornithine decarboxylation	+	-	+
Indol production	+	-	+
Utilization of			
sucrose	-	-	-
mannitol	+	-	-
sorbitol	-	+	-
citric acid	+	+	-
salicin	+	+	-
cellobiose	+	+	-
lactose	+	+	-
ONPG hydrolysis	+	+	-

て治療効果が上がることを示している。本菌による敗血症による皮膚病変等に対しては外科的な処置が必要となる場合もある。

なお、Penland ら²⁹⁾はビブリオによる眼の感染症例 17 例を経験し、そのうち 7 例が *V. vulnificus* であったと報告している。

3-3. 疫学 上述のように、わが国で報告されている患者のうちの大部分は基礎疾患として肝障害を持ち、アルコール飲料を多飲する人が多く、その他、糖尿病や悪性腫瘍などもみられる。^{25,26,30)} なお、Lerstloomplephunt ら³¹⁾は 8 例の *V. vulnificus* 感染症患者のうちの 6 例に腎臓の障害がみられたことを報告している。症例の多くが中高齢の男性であることも本菌感染症の特徴である。

V. vulnificus は腸炎ビブリオと同様に夏期の海水中に普遍的に存在して魚介類を汚染している。したがって、経口感染の大部分は生の魚介類に起因しており、わが国では本菌の消化器感染はさしみやすしなどの材料となる多くの魚介類が原因となっているが、欧米の事例では同じく魚介類が原因とは言っても大部分が生かきであり、食生活習慣の違いを反映している。米国ではかきの体内での生態研究がよく行われており、本菌のかきでの普遍的な存在が示されている。^{32,33)}

本菌の感染症は届出の制度がないので、その実態は掴みにくい。Osaka ら³⁴⁾ (2004) は無作為に抽出した医師への質問調査の回答から、年間 400 例余りの患者が発生しているものと推定している。わが国で学術誌などには河野ら³⁵⁾及び Matsuo ら³⁶⁾の報告以来百数十例の *V. vulnificus* 感染症例が報告されているが、当然これ以外に報告されていない多数の軽症例があるはずであるし、病原体不明のまま記録に現れないかなりの数の重症例もあると思われる。城野ら²⁵⁾の文献調査でわが国の症例報告の地域分布をみると、日本海側では秋田、新潟、石川で各々 1 例ずつ、内陸では長野で 1 例が報告されているが、それ以外はいずれも関東以西の太平洋側の都府県である。本菌は海水に生息しているので、海水温がこの地域分布に影響しているであろう。わが国ではかきが原因となる本菌感染症が少ないが、わが国ではかきを食べるのは冬場であり、この時期は海水温が低いので海中の本菌数が非常に減少しているため感染例がみられないと思われる。

3-4. 病原因子 本菌感染症の大部分は肝疾患などの基礎疾患を持つ患者に発生する日和見感染であるので、宿主側の要因が病原性発現に大きく関わっている。特に大部分が肝疾患である事実は、Kupffer cell の食菌能の低下と言う肝機能の直接的関与とともに、後述の α グロブリン、Kallikrein-kinin 系、鉄利用系、補体系など種々の関係因子にも肝障害が影響していることを示唆している。

しかし、当然のことながら菌の側にも種々の病原性発現要因が存在している。本菌感染症ではエンドトキシンによると思われるショック症状を呈するが、McPherson ら³⁷⁾はマウス及びラットに対する本菌エンドトキシンの生理作用を観察している。さらに、タンパク質性の直接的障害因子として溶血毒素³⁸⁾とプロテアーゼ^{38,39)}が挙げられ、筆者らはこの 2 種の因子についての解析を行ってきた。

3-4-1. 溶血毒素 本菌の溶血毒素 (VVH) は当初、溶血作用とともに皮膚血管透過性亢進、チャイニーズハムスター卵巣細胞の形態変化、致死毒性などを示す因子として報告された。本毒素の遺伝子は既にクローニングされて、塩基配列が決定されているが、⁴⁰⁾これに基づいて計算される分子量は 50851 Da である。筆者らは臨床分離株の CDC B3547 株から硫酸分画、3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) 処理と Phenyl-Sepharose HP column chromatography を組合わせて VVH を精製し、その性状解析を行った。⁴¹⁾

精製した VVH はヒツジの赤血球に対して最も高い溶血活性を示し、ついでウマ、ウシ、ウサギ、トリの順で、用いたものの中ではヒトの赤血球に対しての活性が最も低かった。⁴²⁾ VVH の反応系にコレステロールを添加すると溶血が阻止されるので、VVH による溶血の第 1 段階は膜上のコレステロールへの結合であると考えられている。コレステロール結合性はグラム陽性菌により産生されるストレプトリジン O (SLO) やウェルシュ菌 θ 毒素などのチオール活性化溶血毒素 (TAH) に共通した性質であるが、酸化に安定である点などで VVH は TAH とは異なる性状を示す (Table 4)。⁴²⁾

また、作用機構でも VVH は TAH と異なっている。いずれの毒素も赤血球膜上でオリゴマーとなって Pore を形成すると考えられているが、TAH は

Table 4. Characteristics of *V. vulnificus* Hemolysine (VVH) and Thiol-activated Hemolysins (TAHs)

	VVH	TAHs
Binding site on cell membrane	Cholesterol	Cholesterol
Thiol-activation	-	+
Inactivation by oxidation	-	+
Type of cell lysis	Pore formation 3 nm	Pore formation 30-40 nm
Producing bacterium	Gram negative	Gram positive

高分子であるヘモグロビン (Hb) の通過可能な Pore (30-40 nm) を形成する。一方, VVH の場合には, 最初は 3 nm 前後の小さな Pore が形成されて K^+ などの移動が起こるが, Hb は通過できずに膜内に残存し, 結果的に膜内外の浸透圧差が生じて水が流入し, Pore の拡大, そして溶血が起こると考えられる (Colloid osmotic lysis).⁴⁴⁾ このことは以下の実験から明らかにされた。すなわち, VVH と SLO を作用させた赤血球からのヘモグロビン (Hb) と K^+ の溶出を比較すると SLO では Hb と K^+ が同時に溶出するのに対して, VVH では分子サイズの大きな Hb は遅れて溶出した。そこで, 血球浮遊液に種々のサイズの分子 (ショ糖: 有効径 0.9 nm, ラフィノース: 1.1 nm, イヌリン: 2.8 nm, デキストラン 4: 3.5 nm) を浸透圧保護物質として添加して溶血反応を行うと, イヌリンとデキストラン 4 では溶血が阻止されるが, ラフィノースでは阻止されないことから, VVH は 3 nm 程度の孔を血球膜に空けているものと推定した。また, 赤血球と VVH を 4°C で接触させても溶血は起こらないが, この赤血球を遠心洗浄したのち生理食塩水に浮遊させて 37°C で保温すると溶血が起こることから, この溶血は温度非依存性の膜への結合過程と温度依存性の溶血過程に分けられることが明らかになった。その他種々の性状を検討して Table 5 のような結果を得た。

VVH を動物に投与すると本菌の実験的感染の際に生ずる症状と似た症状を示すこと, 本菌感染症から回復した患者血清及び実験的感染マウス血清において VVH に対する抗体価の上昇がみられたこと⁴⁵⁻⁴⁷⁾ などから VVH の感染における関与が示唆されているが, これに対する否定的な報告もある。⁴⁸⁻⁵⁰⁾ 直接的な細胞障害作用よりも, 後述のよ

Table 5. Properties of *V. vulnificus* Hemolysin (VVH)

M. W.	50851 Da, single chain polypeptide
Isoelectric point	7.1
Mechanism of action	Colloid osmotic lysis forming ca. 3 nm pore of oligomer
	Temperature-independent cell binding and temperature-dependent cell lysis
Binding site on membrane	Cholesterol
Susceptible erythrocytes	Sheep>Horse>Bovine>Chicken>Human

うに赤血球破壊により鉄源であるヘモグロビンを供給する意義が大きいかも知れない。しかし, Lee S. E. ら⁵¹⁾ は *in vivo* で VVH の遺伝子である *vvhA* が発現していることを本菌感染マウス体液を用いて RT-PCR を行うことによって証明し, Lee Y. R. ら⁵²⁾ は Calcium-calmodulin antagonist である Trifluoperazine が VVH による血管透過性亢進作用を抑えることによって本菌の致死作用を抑制することを示すなど, VVH の病原因子としての意義を示唆する結果が最近相次いで報告されている。さらに, Kang ら⁵³⁾ は VVH が NO 合成酵素の発現を誘導することによって血圧上昇や血管の拡張を来すことを示し, Kook ら⁵⁴⁾ は, VVH が cyclicGMP レベルを上昇させることによってラットの胸部血管を拡張させること, 血管平滑筋細胞膜に進入して Guanylate cyclase を活性化していることを示した。また, Kwon ら⁵⁵⁾ は血管内皮細胞培養株である ECV304 を用いて細胞溶解活性以下の濃度でアポトーシスを誘導することを示している。したがって, 直接的な傷害作用ではないにしても, 様々な形で VVH が病原性に関与していることは間違いがないであろう。

筆者らの VVH に関する成績の多くは臨床分離株の CDC B3547 株から得た VVH によるものであるが, この株は生物型 2 に属することが分かった。前述のように, 生物型 2 の多くはウナギから分離されたもので, ウナギに対する病原体と考えられてきたが, ヒトの患者からも稀に分離される。その後の解析で, 両生物型が産生する VVH は作用の点で相違はみられないが, タンパク分子としての性状に若干の相違があることが分かった。^{56,57)} すなわち, 生物型 1 の VVH は後述の本菌プロテアーゼを作用させ

て限定分解すると安定性が落ちる。一方、生物型 2 から得られた VVH はそのままでは安定性が悪く、自己凝集を起こして失活し易いが、限定分解することにより親水性を増して自己凝集が抑えられ、安定性が増す。このことはアミノ酸の置換に基づくものと考えられたので、VVH の構造上の違いと菌株の病原性との関連性を検討するため、ウナギに対して病原性を示さないもの (グループ 1) と病原性を示すもの (グループ 2) との VVH を比較した。すなわち、グループ 1 と 2 のヒト臨床分離株 (L-180 株と CDC B3547 株) について VVH の遺伝子 *vvhBA* の塩基配列を決定し、VVH 前駆体 (VvhA) のアミノ酸配列を比較した。その結果、4 番目、301 番目、435 番目、及び 458 番目のアミノ酸に置換が認められた。しかし、4 番目のアミノ酸はシグナルペプチドであるため、成熟 VVH の性状の違いは、残るアミノ酸 3 残基の置換に起因すると結論された。

V. vulnificus の型別は様々な方法でなされているが、その中でも表現型の違いに基づく生物型 1, 2, 3 の分類が最も広く用いられている。しかしながら、上述のようにこの分類では病原性との関連がうまく説明できないことが明らかとなり、新たな型別方法の確立が望まれている。そこで、この菌種の遺伝学的型別方法として、L-180 株と CDC B3547 株の *vvhA* の不一致部分を標的とした PCR を行い、調べた限りにおいては *V. vulnificus* の全菌株を病原性の違いに基づいた上述のグループ分けともよく一致する 2 つのグループに型別することができた。つまり、ウナギに対して病原性を示さないグループ (ヒトにのみ病原性を示すグループ) は、ごく一部の菌株を除いて、すべて L-180 株と同じ型の *vvhA* を保有し、ウナギに病原性を示すグループはすべて CDC B3547 株と同じ型の *vvhA* を保有していた。さらに、この型別結果は 16S rRNA 遺伝子や *recA* に注目した型別方法の結果とも矛盾しなかった。これらの結果より、ヒトの日和見病原菌である *V. vulnificus* が遺伝学的に不均一な菌種であり、ゲノムレベルでいくつかのグループに型別されること、1 つのグループのみがヒトに加えてウナギにも病原性を示すことが強く示唆された。

3-4-2. プロテアーゼ 細菌の産生するプロテアーゼが病原因子として働く事実は、単にタンパク質を加水分解してアミノ酸を供給するだけでなく、

毒素タンパク質のプロセッシング、細菌の組織侵入のための因子、さらに直接的な毒性因子としての作用など、数多く知られるようになってきた。*V. vulnificus* が産生するプロテアーゼ (VVP) は分子量 45 kDa の Zn を活性中心に持つ金属プロテアーゼである。筆者らは VVP 遺伝子をクローニングして塩基配列を決定し、他のビブリオ属菌の金属プロテアーゼとの塩基配列の高い相同性を持ち、Thermolysin family に属するものであることを明らかにした。⁵⁸⁾ 亜鉛金属プロテアーゼは 4 つの Superfamily に分かれるが、このうち Zincin superfamily は亜鉛結合モチーフとして HEXXH の構造を持ち、このうちの Thermolysin family は最初の H から 25 番目の位置に E を持つものである (Fig. 1)。Thermolysin family に属するものとしては同じビブリオ属菌の *V. cholerae* や *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* などのプロテアーゼが知られている。これらはいずれも Fig. 2 に示すように 23 又は 24 のアミノ酸の Signal peptide と 170 余のアミノ酸の N-terminal propeptide を持ち、菌体内で 2 段階のプロセッシングを受けて成熟タンパクとして分泌される。ビブリオ属のものは菌体外で自己分解すると、さらに 10 kDa 程度の C-terminal propeptide を分離した N-terminal domain が残る。この N-terminal domain のみでもタンパク質の分解作用は保有しているが、不溶性タンパク質や赤血球等の細胞への結合能は失われていることを明らかにした。⁵⁹⁾ すなわち、N-terminal domain は触媒作用を担っているのに対して、C-terminal domain は結合作用を担っており、病原因子として作用する場合には両方の Domain が必要である。

VVP を動物の皮膚に接種すると血管の透過性が亢進して浮腫の形成が認められるが、これは炎症の 2 つのメディエーター (ヒスタミン及びブラジキニン) の遊離に起因している。⁶⁰⁻⁶²⁾ Figure 3 はラットとモルモットの皮内に VVP を注射してその反応をみたものであるが、VVP は両者に対して量依存的に血管透過性の亢進及び出血作用を起こしているのが分かる。筆者らは、ラットから分離した肥満細胞の系では開口分泌によるヒスタミン遊離^{60,61)}が、またモルモットの系で Factor XII-plasma kallikrein-kinin cascade の活性化による Bradykinin の遊離⁶²⁾が起こることを明らかにした (Fig. 4)。また、

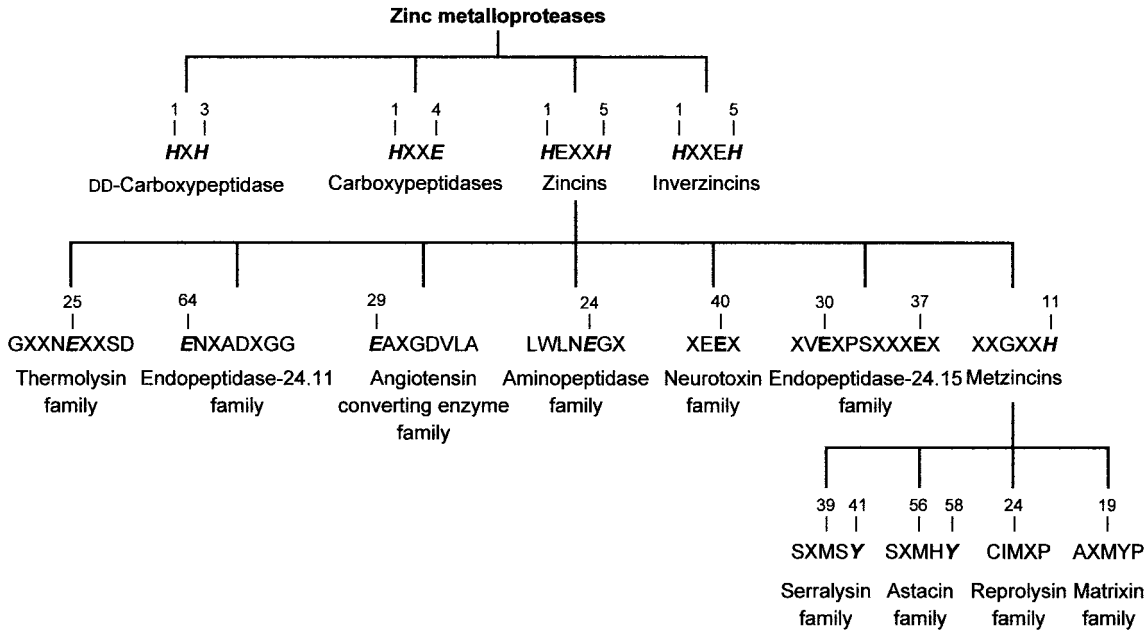


Fig. 1. Metalloprotease Family Based on Sequence around Zn-binding Residues
 Italicized letters represent identified zinc ligands and X stands for any amino acid. Residues in upper line correspond to the first and second ligands; residues in middle line to the third ligand; and residues in bottom line to the fourth and fifth ligands.

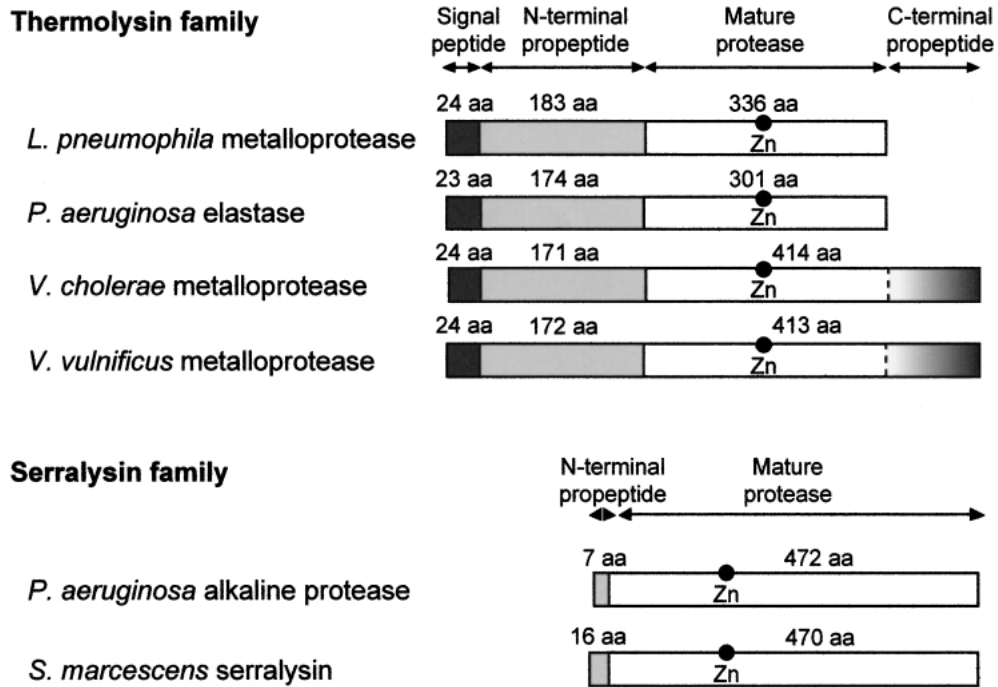


Fig. 2. Schematic Representation of Precursors of Bacterial Zinc Metalloproteases

VVP は菌の組織侵入の際にも重要な働きをしていると考えられる。Maruo ら⁶³⁾は、Bradykinin antagonist を用いた実験で、本菌の播種における Bradykinin の関与を示した。

このように VVP は *V. vulnificus* の重要な病原因

子と考えられるが、動物に投与された VVP は血清中の $\alpha 2$ などの α マクログロブリン (αM) による不活化のため活性の持続時間は極めて短い。 αM は 700 kDa 程度の分子量を持つ巨大なグリコプロテインであり、多くのプロテアーゼと 1:1 の比率で反

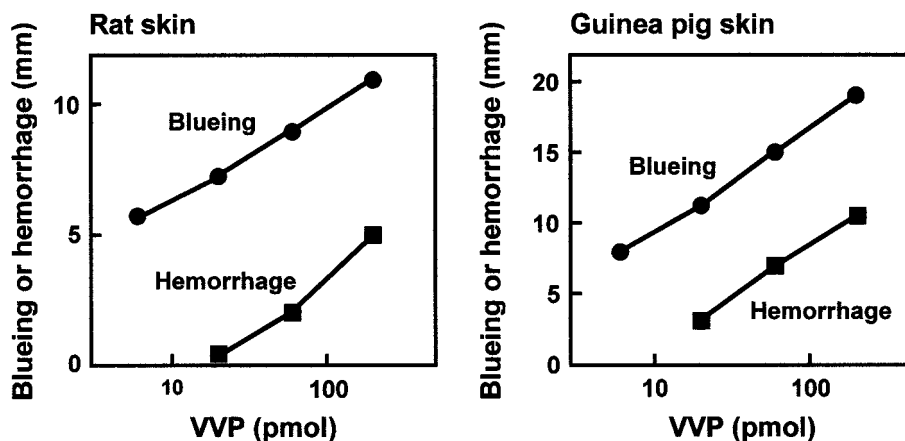


Fig. 3. Vascular Permeability Enhancement and Hemorrhage Caused by *V. vulnificus* Protease (VVP)

VVP was injected intradermally into the dorsal skin of a rat (180–220 g) or guinea pig (400–500 g) into which 5% Evans blue (1 ml/kg) had been injected intravenously. For detection of hemorrhage, injection with Evans blue was omitted. T 30 min postinjection, the animal was sacrificed, the dorsal skin was flayed off, and the diameter of the blueing (vascular permeability enhancement) or the hemorrhagic spots was measured.

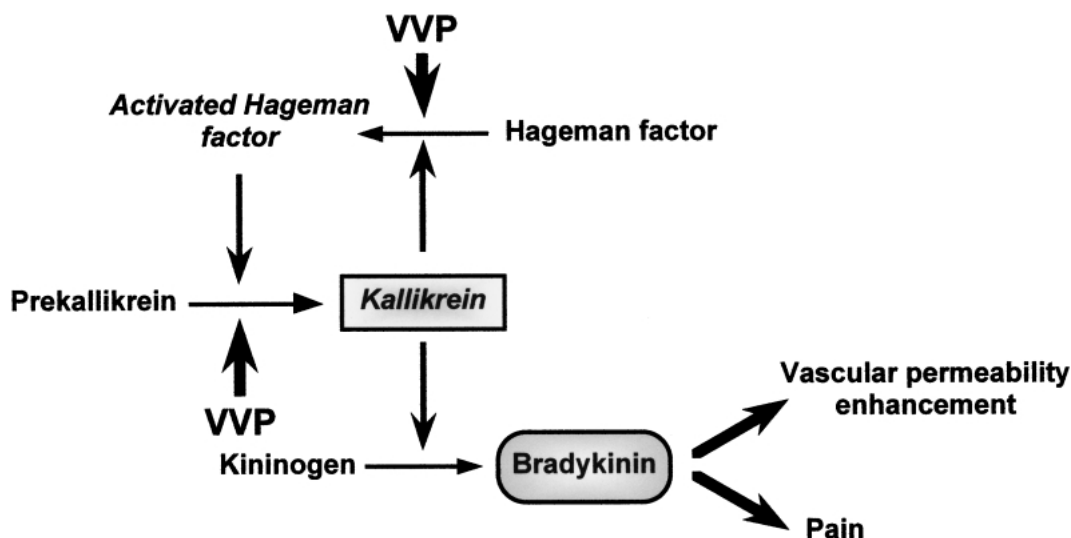


Fig. 4. Scheme for Hageman Factor-plasma Kallikrein-kinin Cascade and the Sites for VVP Action

応して包み込むようにして複合体を形成し、プロテアーゼと基質との接触を立体的に遮ることにより活性を阻害する。皮膚に侵入した *V. vulnificus* から生じた VVP は α M の少ない組織間隙などでは十分な活性を示すが、血流中には通常は十分な α M が存在するので敗血症の際の VVP の関与には疑問が持たれる。しかし、敗血症患者の α M レベルは非常に低くなっているとの報告もあり、生体防御機能が低下して α M レベルが低下したような患者では VVP の血流中での活性が十分発揮されると考えられる。

本菌感染症における皮膚症状では、浮腫形成とともに出血作用も特徴的なものと言える。筆者らは

VVP が血管基底膜の IV 型コラーゲンを加水分解することが出血作用の引き金になっていることを示した。⁶⁴⁾ すなわち、血管基底膜再構成ゲルに対して VVP を作用させると分解が観察された。その構成成分であるラミニンと IV 型コラーゲンに作用させるとラミニンの分解はみられないのに対して、IV 型コラーゲンは VVP の量に応じた分解が認められた (Fig. 5)。さらに VVP による出血作用は抗ラミニン IgG によって抑えられないが、抗 IV 型コラーゲン IgG によって抑えられた。したがって、Fig. 6 に示したように血管基底膜外層の IV 型コラーゲンが VVP により分解され、これが引き金になって内層部分のラミニンのネットワークが崩れて血管の破

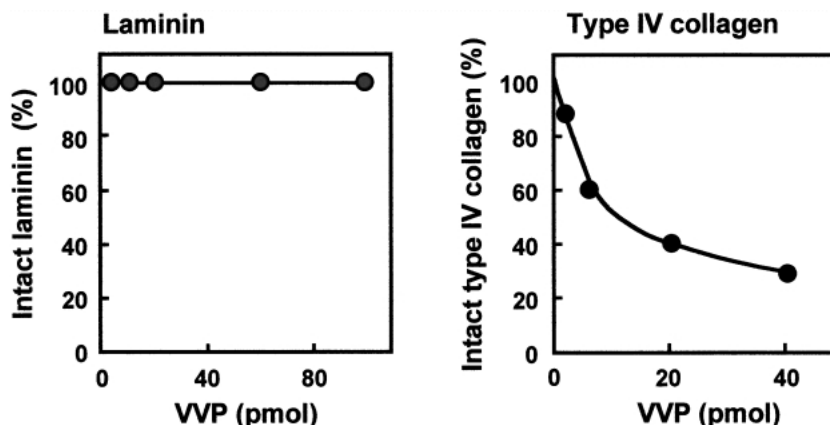


Fig. 5. Effect of VVP on Laminin and Type IV Collagen, the Basement Membrane Proteins

VVP was allowed to act on the reconstituted basement membrane gel (80 μ g of total proteins) at 37°C for 1 hr in a total of 15 μ l of 20 mM Tris-HCl (pH 8.5) containing 0.9% NaCl and 1 mM CaCl₂. After incubation, the gels were taken apart to the components by incubating 4°C for 1 hr, and the amount of intact laminin and type IV collagen was determined by measuring amount of protein precipitated with the specific IgG antibody.

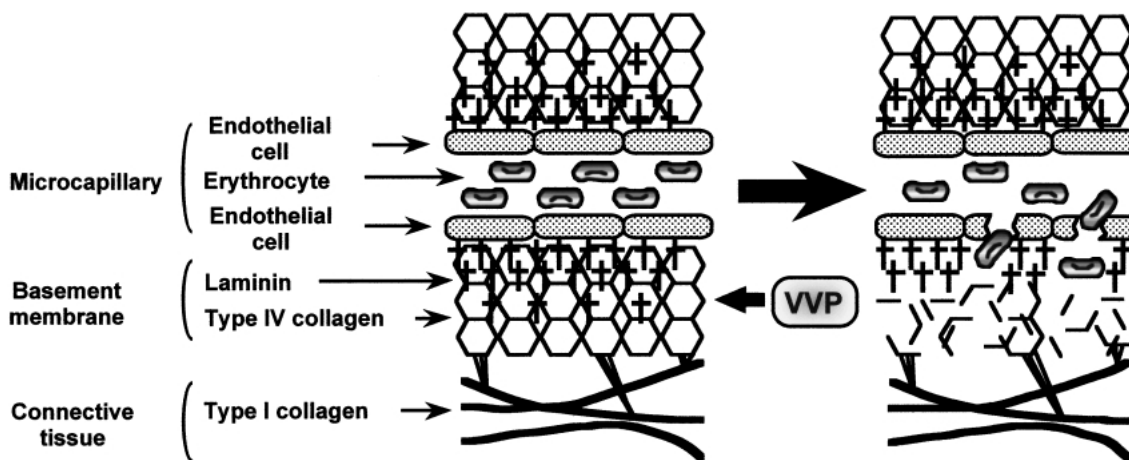


Fig. 6. Scheme of Hemorrhagic Reaction Caused by VVP

壊・出血に繋がるものと思われる。

このような直接的な毒性因子としての作用以外に、ヘム鉄の利用においても VVP が役割を果たしていると考えられる。⁶⁵⁾ 後述のように生体に侵入した病原菌にとって、鉄の利用は感染成立への重要なステップであるが、生体内の鉄はほとんどがタンパク質と結合した状態で存在するので極めて利用しにくい。そのため、病原菌は種々の機構で鉄を獲得することが示されているが、その 1 つとして Hb の鉄の利用が挙げられる。VVP 産生能の弱い変異株では Hb 利用能は低く、これに精製 VVP を添加すると利用能が回復するので、プロテアーゼ活性がヘム鉄利用に有効と考えられる。事実、Hb に VVP を作用させるとヘムの遊離が観察される。⁶⁵⁾ Hb は赤血球内に存在する分子であるが、溶血毒により溶血

すれば血漿中に遊離する。すなわち、VVH と VVP の共同作用が鉄利用に有効に働くと考えられることができる。

Shao と Hor⁶⁶⁾ はプロテアーゼ欠損変異株を作成して、マウスに対する病原性を野生株と比較した場合に両者に差がないことから、プロテアーゼが本菌の病原性に必須のものではないとしている。しかしながら、本菌感染症は日和見感染であるので、病原因子の役割を正確に評価するには易感染状態の動物モデルの工夫が必要である。一方、Maruo ら⁶³⁾ は、マウスを用いてブラジキニンの産生が本菌の血流への進入に働いていることを示しているが、これはプロテアーゼの作用により産生されるものである。さらに、プロテアーゼ阻害剤である Ovomacroglobulin の添加で血流への菌の進入は抑制され

た。これらの事実はプロテアーゼが感染に重要な役割を果たしていることを示唆している。

単細胞生物である細菌は種々の環境に曝されるので、その環境に応じて代謝や物質生産を調節する必要がある。このような調節を行うものとして、Quorum-sensing 調節（密度依存調節：QS）機能の存在が多くの細菌で明らかにされている。これは発光細菌である *V. fischeri* が低密度下では発光現象を示さないが、イカなどの海洋生物に寄生して増殖し、高密度になったときに発光に関与する遺伝子群が発現して発光することから明らかにされたものである。⁶⁷⁾ 病原細菌の産生する病原因子についてもこの QS 調節が働いていることが示されており、VVP の QS も報告されている。⁶⁸⁻⁷⁰⁾ しかしながら、筆者らは海水温を想定した 26°C では QS が働くものの、ヒトの体温である 37°C では QS とは別の機構で VVP 産生が調節されていることを示す成績を得た。⁷¹⁾ これは一見、*V. vulnificus* においては本来の生息域である自然環境水中では QS が働くが、感染の場では働いていないことを示しているように思える。しかし、本菌感染の激しい症状は浮腫や出血など、深部体内に比べると温度の低い皮膚でみられる。したがって、血流中での本菌の増殖には QS は働かないかも知れないが、皮膚傷害作用には働いている可能性が高い。

ところで、VVP は上述のように亜鉛金属プロテアーゼであるが、同様なプロテアーゼは非病原種である *V. proteolyticus*⁷²⁾ や魚病細菌である *V. anguillarum*^{73,74)} など他のビブリオ属菌によっても産生されており、腸炎ビブリオは動物実験では皮膚血管透過性を亢進させるセリンプロテアーゼの存在が知られている。^{75,76)} 腸炎ビブリオなどでも全身感染を起こす症例が知られているが、特に *V. vulnificus* が皮膚障害を伴う重篤な全身感染を起こすのはなぜであろうか？ VVP が皮膚症状の主要な病原因子であるならば、VVP に他のプロテアーゼとは異なる特徴があるのであるであろうか？ 筆者らは *V. proteolyticus* や *V. anguillarum* からプロテアーゼを精製して動物に対する皮膚傷害作用を比較したが VVP との目だった違いは認められなかった。⁷⁷⁾ しかしながら、ヒト血漿の存在下で培養を行うとヒトに病原性を持つ生物型 1 の *V. vulnificus* はよく増殖してプロテアーゼを産生するが、生物型 2 や他の

ビブリオの生育やプロテアーゼ産生能は低かった。⁷⁷⁾ このことは、生物型 1 の *V. vulnificus* は宿主体内での増殖能が高いために結果的に大量の VVP を産生して症状を惹起していることを示唆しているものと思われる。また、腸炎ビブリオのセリンプロテアーゼは動物実験レベルでは VVP と同様な皮膚血管透過性亢進作用を示すものの、ヒトの Factor XII-kallikrein-kinin cascade の酵素タンパク質の分解・活性化能は VVP に比べるとはるかに低かった。⁷⁸⁾ このことは *V. vulnificus* と腸炎ビブリオの皮膚障害作用の強さの違いを示しているのかも知れない。

3-5. その他の病原因子 生物にとって鉄は必須の増殖因子である。地表付近の地殻中では、鉄は酸素、ケイ素、アルミニウムについて存在量の多い元素であるが、利用可能な遊離鉄は極めて少ないので、生物は様々な鉄獲得機構を持っている。このことは生体に侵入した病原菌でも同様であり動物体内では鉄はタンパク質との結合状態であるので、この結合鉄を奪い取る機能が必要である。言い換えると、優れた鉄獲得機構を持つことが敗血症などを引き起こし得る病原細菌の条件の 1 つである。細菌の鉄獲得機構の 1 つとして、鉄キレート剤である Siderophore を産出して微量の鉄を有効に摂取する系があり、種々の Siderophore が報告されており、⁷⁹⁾ ビブリオ属の細菌でも腸炎ビブリオや *V. mimicus* において Aerobactin に関連する遺伝子の解析などが進められている。⁸⁰⁻⁸²⁾

V. vulnificus も感染成立には鉄利用能が重要であり、鉄を過剰投与することによって実験動物に対する本菌の致死活性が大きく上昇することが示されている。⁸³⁾ Starks ら⁸⁴⁾ はデキストラン鉄複合体を投与したマウスを本菌の全身感染のモデルとして開発したが、この鉄複合体の投与により皮膚症状等の感度が 10⁵ 倍上昇することを報告している。鉄取り込みの機構として Siderophore の存在が報告されており、^{85,86)} さらにヘム鉄の利用についても正常人血清では本菌は増殖しにくい、血色素症の患者の血清ではよく増殖するとの報告もあり、血色素症も本菌感染症が成立し易い易感染状態の 1 つと考えることができる。筆者らはヘム鉄の利用の機構を合成ヘム化合物を用いて解析しているが、⁸⁷⁾ Litwin と Bryne⁸⁸⁾ は膜状のヘム鉄レセプタータンパク質 HupA のク

ローニングとその解析を報告している。その他にも本菌には Siderophore を含めて種々の鉄利用経路が示唆されており、⁸⁹⁻⁹¹⁾ いろいろな経路が複合して働いていると思われる。

また、宿主の生体防御反応に対抗するための手段も病原性発現のために重要である。生体内に侵入した病原菌は生体の様々な防御機構に遭遇することになるが、血清の持つ殺菌作用はその1つであり、殺菌作用に対する物理的障壁になる細胞表層の構造も重要な病原因子と言える。*V. vulnificus* では莢膜の存在がコロニー形態と関連して報告されている。⁹²⁾ 筆者らは、この莢膜構造の存在が寒天培地上でのコロニー形態と関係しており、混濁コロニーを形成する株は電顕的に莢膜が認められ、血清の殺菌作用に対しても抵抗性が高いが、半透明コロニーは莢膜がなく、血清に感受性が高いことを示した。⁹³⁾ Musher ら⁹⁴⁾ は血清の殺菌作用を正常血清と本菌感染症から回復した患者の血清で比較し、殺菌作用が主として Classical complement pathway によって起こるのに対して、オプソニン効果は Classical と Alternative の両経路が働いていることを示し、細胞表層の特定のタンパク質に対する IgG が上昇していることを示した。一方、マクロファージによる貪食作用に関しては、本菌はオプソニンのない状態では貪食に強い抵抗性を示すことが観察されている。さらに、莢膜多糖を本菌に対するワクチンとして使用する試みもなされている。⁹⁵⁾

4. その他のビブリオ

病原ビブリオとしては上記3種の注目度が高いが、*V. mimicus* 及び *V. fluvialis* も比較的分離頻度の高い下痢症原因菌である。

V. mimicus は *V. cholerae* に極めて類似した細菌で、大きな違いはショ糖非分解であることで、それゆえかつては *V. cholerae* のショ糖非分解性亜種として扱われていたが、1981年に独立した種として分類されるようになった。⁹⁶⁾ したがって、病原因子も *V. cholerae* に類似しており、*V. cholerae* の CT に極めて近い毒素を産生する株があり、腸炎ビブリオの TDH 類似の毒素や大腸菌耐熱性下痢毒素 (ST) に類似の毒素を産生する株もある。しかし、筆者らが PCR を用いて毒素の遺伝子の分布を調べたところ、CT 遺伝子を持つ株は臨床株のわずか5%に過ぎず、ST 遺伝子を持つ株も臨床株及び環境

Table 6. Distribution of Toxin Genes in *Vibrio mimicus* Isolates

Isolates		Genes detected				No. of strains (%)
Origin	Total No.	<i>ctxA</i>	<i>vmh</i>	<i>tdh</i>	<i>st</i>	
Clinical	42	-	+	+	+	2 (5)
		-	+	+	-	12 (29)
		-	+	-	+	6 (14)
		+	+	-	-	2 (5)
		-	+	-	-	20 (48)
Environmental	58	-	+	+	+	0 (0)
		-	+	+	-	0 (0)
		-	+	-	+	9 (16)
		+	+	-	-	0 (0)
		-	+	-	-	49 (84)

株のそれぞれ 19% 及び 16% であった (Table 6).⁹⁷⁻⁹⁹⁾ 一方 TDH 遺伝子に関しては、臨床株の 34% が陽性であるのに対して、環境株はすべて陰性であった。^{97,98)} このことは、上述のように腸炎ビブリオの臨床株のほとんどが TDH 陽性、環境株のほとんどが陰性で、TDH が病原株の指標であることに類似しており、TDH が *V. mimicus* の主要な病原因子であることを示唆している。しかし、*V. mimicus* の場合は TDH 陽性が臨床株の 34% に過ぎず、残りの 66% の病原性の説明ができない。これに対して、VCH に類似する溶血毒素 (*V. mimicus* hemolysin: VMH) の遺伝子はすべての分離株が保有していた。筆者らは精製 VMH がウサギ結紮腸管ループテストで液体貯留を示すことを観察しており、少なくとも CT, ST, TDH を産生しない株では VMH が主要な病原因子になっていると考えている。⁹⁹⁾ 下痢症の発現機構は明確ではないが、VMH が細胞の Cyclic AMP 産生を促進する事実を観察しており、これが下痢症に繋がっているのかも知れない。¹⁰⁰⁾

VMH は上述のように *V. cholerae* El Tor が産生するに VCH に類似した毒素である。筆者ら¹⁰¹⁾ 及び Kim ら¹⁰²⁾ は VMH の遺伝子 (*vmhA*) をクローニングして 2232 bp の Open reading frame を見出した。これは 744 のアミノ酸残基をコードしており、そこから計算されるタンパク質の分子量は 83903 Da で、VCH と 76% の Homology を示す。このタンパク質はプロセッシングを受けて N 末端 151 アミノ酸が除かれ、65972 Da の成熟タンパク

質となる。成熟 VMH はプロテアーゼによる分解を行って C 末側 13 kDa を解離すると結紮腸管ループレストによる液体貯留反応が消失する。¹⁰³⁾

筆者らは VVH と同様な手法で VMH の作用機構を検討し、約 3 nm の小孔を形成して 1 価の陽イオンなどの低分子と水の移動を起こし、その結果コロイド浸透圧溶血を起こすという機構を明らかにした。¹⁰⁴⁾ しかし、VVH の場合は一定量の毒素の存在下では溶血は頭打ちとなり、それ以上保温を続けても新たな溶血が起こらないが、VMH は大量の赤血球を加えて保温を続けると溶血が半永久的に進行し続ける。また、毒素作用で溶血してゴースト状態になった赤血球膜を洗浄後、新たな赤血球を加えると VVP では新たな溶血は起こらないのに対して、VMH の場合は新たに加えた赤血球が溶血する。¹⁰⁴⁾ したがって、VVH の膜コレステロールとの結合は不可逆的であるのに対して、VMH は可逆的に膜ガングリオシドに結合していると思われる。

V. mimicus は他の多くのビブリオと同様な亜鉛金属プロテアーゼ (VMP) を産生する。筆者らはこの精製を行い、¹⁰⁵⁾ 腸管病原性における補助的役割について報告している。^{106–108)} VMP は *V. cholerae* のプロテアーゼと遺伝学的及び免疫学的に極めて似た酵素である。¹⁰⁶⁾ このようにビブリオ属菌の産生するプロテアーゼは亜鉛金属プロテアーゼとセリンプロテアーゼ (Table 7) に分けることができ、直接・間接に病原性との関わりを持っている。

この他、*V. fluvialis* における VCH に似たヘモリジン¹⁰⁹⁾ や *V. hollisae* における TDH 類似のヘモリジン¹¹⁰⁾ など様々な病原因子が報告されている。

5. おわりに

筆者は 1967 年に、腸炎ビブリオの発見者である藤野恒三郎先生の門下に入って腸炎ビブリオの表層抗原物質 (特に鞭毛と O 抗原) の研究を始めて以来、病原因子や生態・分子疫学など病原ビブリオの研究を中心テーマとして今日に至った。本稿は、このうちの病原因子に関する研究についての成果を他の文献を引用しつつ総説としてまとめたものである。

病原ビブリオの中でもここでは、*V. vulnificus* を中心に取り上げたが、この菌は肝障害などの基礎疾患を持つ患者に対する感染が主体であるので、コレラ菌や腸炎ビブリオ感染症に比べると患者数ははるかに少ない。しかし、全身性の感染を起こした場合

Table 7. Proteases of Vibrios

<i>Vibrio</i> species	Protease
Gastrointestinal disease	
<i>V. cholerae</i>	Zinc metalloprotease ^{a)}
<i>V. fluvialis</i>	Zinc metalloprotease ^{a)}
<i>V. furnissii</i>	Zinc metalloprotease ^{a)}
<i>V. hollisae</i>	?
<i>V. mimicus</i>	Zinc metalloprotease ^{a)}
<i>V. parahaemolyticus</i>	Serine protease Collagenase
Extraintestinal disease	
<i>V. alginolyticus</i>	Serine protease Collagenase
<i>V. cincinnatiensis</i>	?
<i>V. damsela</i>	?
<i>V. metschnikovii</i>	Serine protease
<i>V. vulnificus</i>	Zinc metalloprotease ^{a)}
Non-human pathogen	
<i>V. anguillarum</i>	Zinc metalloprotease ^{a)}
<i>V. proteolyticus</i>	Zinc metalloprotease ^{a)}

a) Thermolysin family.

の致死率は 50% を超えており、危険度の高いものである。この菌は海洋性細菌であるので魚介類からの感染が主体であるが、欧米ではかきによる感染が多い。元来欧米人は魚を生で食べる習慣は持たないが、貝類、特にかきは違うようで、夏場に生がきをよく食べる。したがって、この菌に関しての関心度は高く、多くの論文が報告されている。ちなみに、PubMed で 2004 年の論文数を検索してみると、51 の論文が報告されており、これはコレラ菌の 208 にははるかに及ばないものの、腸炎ビブリオの 63 に迫る数字であり、主要な病原ビブリオとして注目されていることが分かる。*V. vulnificus* は感染症や食品衛生法など法規制の対象になっていないので患者発生状況が掴みにくいが、わが国は高齢化が益々進んで易感染性宿主が増え、しかも海産物を好むので、この菌に注意していかなければならない。

ここで示したような病原因子の研究は、感染発症機構を明らかにし、治療法の開発に繋がるものであるが、病原因子を生理活性物質として有効に利用することにも繋がる。毒性因子は強力な生理活性物質であり、筋硬直性疾患の緩和剤として臨床応用されているボツリヌス毒素のように治療薬への利用が期待できるものが多い。また、毒性因子でない場合でも様々な形で宿主の生理機構に変化を与えている訳

であり、その作用機構が明らかになれば、薬剤としての利用の場が開けてくる。そのような様々な観点での細菌病原因子の研究が薬学領域でも進展することを期待したい。

謝辞 ここに示した筆者らの研究は、三好伸一助教授（現教授）を中心とした岡山大学大学院自然科学研究科・薬学系・衛生微生物化学分野（旧薬学部環境衛生化学講座）のメンバーにより行われたものである。紙面を借りて深甚の謝意を表したい。

REFERENCES

- 1) Jada J. M., Powers C., Bryant R. G., Abbott S., *Clin. Microbiol. Rev.*, **1**, 245–267 (1988).
- 2) Chakraborty S., Nair G. B., Shinoda S., *Rev. Environ. Health*, **12**, 63–80 (1997).
- 3) Craig J. P., *Caduceus*, **12**, 25–42 (1996).
- 4) David K. R. K., Ruiting L., Peter R. R., *J. Bacteriol.*, **177**, 3191–3198 (1995).
- 5) Kaper J. B., Morri J. G., Levine M. M., *Clin. Microbiol. Rev.*, **8**, 48–86 (1995).
- 6) Faruque S. M., Albert M. J., Makalanos J. J., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 1301–1314 (1998).
- 7) Faruque S. M., Nair G. B., *Microbiol. Immunol.*, **46** (2), 59–66 (2002).
- 8) Fujino T., Okuno Y., Nakada D., Aoyama A., Fukai K., Mukai T., Ueho T., *Med. J. Osaka Univ.*, **4**, 299–304 (1953).
- 9) Miyamoto Y., Obara Y., Nikkawa T., Yamai S., Kato T., Yamada Y., Ohashi M., *Infect. Immun.*, **28**, 567–576 (1980).
- 10) Sakazaki R., Iwanami S., Fukumi H., *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **21**, 313–324 (1968).
- 11) Honda T., Iida T., *Rev. Med. Microbiol.*, **4**, 106–113 (1993).
- 12) Alam M. J., Tomochika K., Miyoshi S., Shinoda S., *Biocontrol Sci.*, **7**, 37–41 (2002).
- 13) Roland F. P., *New Engl. J. Med.*, **282**, 1306 (1970).
- 14) Reichelt J. L., Baumann P., Baumann L., *Arch. Microbiol.*, **110**, 101–120 (1976).
- 15) Farmer III J. J., *Lancet*, **ii**, 903 (1979).
- 16) Kitaura T., Doke S., Azuma I., Imaida M., Miyano K., Harada K., Yabuuchi E., *FEMS Microbiol. Lett.*, **17**, 205–209 (1983).
- 17) Hoi L., Dalsgaard I., Dalsgaard A., *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1721–1724 (1998).
- 18) Hill W. E., Keasler S. P., Trucksess M. W., Feng P., Kausner C. A., Lampell K. A., *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 707–711 (1991).
- 19) Takahashi H., Hara-Kudoh Y., Miyasaka J., Kumagai S., Konuma H., *J. Microbiol. Meth.*, **61**, 77–85 (2005).
- 20) Tison D. L., Nishibuchi M., Greenwood J. D., Seidler R. J., *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 640–646 (1982).
- 21) Bisharat N., Agmon V., Finkestein R., Raz R., Ben-Dor G., Lemer L., Soboh S., Colodner R., Cameron D. N., Wykstra D. L., Swerdlow D. L., Farmer III J. J., *Lancet*, **354**, 1421–1424 (2000).
- 22) Amaro C., Biosca E. G., *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1454–1457 (1996).
- 23) Bisharat N., Cohen D. I., Harding R. M., Falush D., Crook D. W., Peto T., Maiden M. C., *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 30–35 (2005).
- 24) Tacket C. O., Brenner F., Blake P. A., *J. Infect. Dis.*, **149**, 558–561 (1984).
- 25) John M., Ono T., Kojo Y., Minamoto K., Nakagawa K., Yoshinaga A., Takeshita Z., Maeda H., *Saishin-igaku*, **47**, 114–119 (1992).
- 26) Fujiyama S., Tanaka M., *Nihon Naikagaku Zasshi*, **87**, 150–156 (1998).
- 27) Takehira Y., Kitagawa M., Tamagoshi K., Yamada M., Nakamura T., Kawamura K., Hirasawa H., Takagi M., Iwaoka Y., Sumiyoshi S., Murohisa T., *Nihon Naikagaku Zasshi*, **87**, 140–142 (1998).
- 28) Sato T., Tadakuma N., Ikezaki N., Hashiguchi A., Masuda K., *Artif. Organs*, **22**, 705–707 (1998).
- 29) Penland R. L., Boniuk M., Wilhelmus K. R., *Cornea*, **19**, 26–29 (2000).
- 30) Tanabe I., Kusaba K., Nagasawa Z., Tajima Y., Tadano J., Fujisawa N., Yamada H., *Kansennshougaku Zasshi*, **69**, 170–174 (1995).
- 31) Lertlooplephunt N., Tantawichien T., Sitprija V., *Ren. Fail.*, **22**, 337–343 (2000).
- 32) Oliver J. D., Warner R. A., Cleland D. R., *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 1404–1414 (1982).
- 33) Oliver J. D., Warner R. A., Cleland D. R., *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 985–998 (1983).
- 34) Osaka K., Komatsuzaki M., Takahashi H.,

- Sakano S., Okabe N., *Epidemiol. Infect.*, **132**, 883–996 (2004).
- 35) Kohno S., Matsuo T., Ikeda T., Saruwatari K., Ninomiya H., *Saisin Igaku*, **33**, 1243–1248 (1978).
- 36) Matsuo T., Kohno S., Ikeda T., Saruwatari K., Ninomiya H., *Acta Pathol. Jpn.*, **28**, 937–948 (1978).
- 37) McPherson V. L., Watts J. A., Mushe D. M., Oliver J. D., *Microbios*, **67**, 272–273 (1991).
- 38) Shinoda S., “The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins,” 2nd ed., eds. by Alouf E., Freer J. H., Academic Press, London, 1999, pp. 373–385.
- 39) Miyoshi S., *Nihon Saikinngaku Zasshi*, **54**, 763–772 (1999).
- 40) Yamamoto K., Wright A. C., Kaper J. B., Morris Jr. J. G., *Infect. Immun.*, **58**, 2706–2709 (1990).
- 41) Oh E. G., Tamanoi Y., Toyoda A., Usui K., Miyoshi S., Chang D. S., Shinoda S., *Microbiol. Immunol.*, **37**, 975–978 (1993).
- 42) Yamanaka H., Shimatani S., Tanaka M., Katsu T., Ono B., Shinoda S., *FEMS Microbiol. Lett.*, **61**, 251–256 (1989).
- 43) Miyoshi S., Yamanaka H., Miyoshi N., Shinoda S., *FEMS Microbiol. Lett.*, **30**, 213–216 (1985).
- 44) Yamanaka H., Satoh T., Katsu T., Shinoda S., *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 2859–2864 (1987).
- 45) Gray L. D., Kreger A. S., *Infect. Immun.*, **48**, 62–72 (1985).
- 46) Gray L. D., Kreger A. S., *J. Infect. Dis.*, **155**, 236–241 (1987).
- 47) Gray L. D., Kreger A. S., *Toxicon*, **27**, 459–464 (1989).
- 48) Morris Jr. J. G., Wright A. C., Simpson L. M., Wood P. K., Johnson D. E., Oliver J. D., *FEMS Microbiol. Lett.*, **40**, 55–59 (1987).
- 49) Massad G., Simpson L. M., Oliver J. D., *FEMS Microbiol. Lett.*, **56**, 295–300 (1988).
- 50) Wright A. C., Morri Jr. J. G., *Infect. Immun.*, **59**, 192–197 (1991).
- 51) Lee S. E., Ryu P. Y., Kim S. Y., Kim Y. R., Koh J. T., Kim O. J., Chung S. S., Choy H. E., Rhee J. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **324**, 86–91 (2004).
- 52) Lee Y. R., Par K. H., Lin Z. Z., Kho Y. J., Park J. W., Rh H. W., Koo B. S., Kim H. R., Son E. K., Yu H. N., Han M. K., Jhee E. C., Kim J. S., *Infect. Immun.*, **72**, 6157–6159 (2004).
- 53) Kang M. K., Jhee E. C., Koo B. S., Yang J. Y., Park B. H., Kim J. S., Rho H. W., Kim H. R., Park J. W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290**, 1090–1095 (2002).
- 54) Kook H., Rhee J. H., Lee S. E., Kang S. Y., Chung S. S., Cho K. W., Baik Y. H., *Eur. J. Pharmacol.*, **365**, 267–272 (1999).
- 55) Kwon K. B., Yang J. Y., Ryu D. G., Rho H. W., Kim J. S., Park J. W., Park B. H., *J. Biol. Chem.*, **276**, 47518–47523 (2001).
- 56) Miyoshi S., Fujii S., Tomochika K., Shinoda S., *Microb. Pathog.*, **23**, 235–239 (1997).
- 57) Miyoshi S., Morita A., Teranishi T., Tomochika K., Yamamoto S., Shinoda S., *J. Toxicol. Toxin Rev.*, **23**, 111–121 (2004).
- 58) Shinoda S., Miyoshi S., Wakae H., Rahman M., Tomochika K., *J. Toxicol. Toxin Rev.*, **15**, 327–339 (1996).
- 59) Miyoshi S., Wakae H., Tomochika K., Shinoda S., *J. Bacteriol.*, **179**, 7606–7609 (1997).
- 60) Miyoshi S., Sugiyama K., Furuta H., Miyoshi N., Shinoda S., *FEMS Microbiol. Lett.*, **34**, 301–304 (1986).
- 61) Miyoshi S., Sugiyama K., Suzuki Y., Furuta H., Miyoshi N., Shinoda S., *FEMS Microbiol. Lett.*, **40**, 95–98 (1987).
- 62) Miyoshi N., Miyoshi S., Sugiyama K., Suzuki Y., Furuta H., Shinoda S., *Infect. Immun.*, **55**, 1936–1939 (1987).
- 63) Maruo K., Akaike T., Ono T., Maeda H., *Infect. Immun.*, **66**, 866–869 (1998).
- 64) Miyoshi S., Nakazawa H., Kawata K., Tomochika K., Tobe K., Shinoda S., *Infect. Immun.*, **66**, 4851–4855 (1998).
- 65) Nishina Y., Miyoshi S., Nagase A., Shinoda S., *Infect. Immun.*, **60**, 2128–2132 (1992).
- 66) Shao C. P., Hor L. I., *Infect. Immun.*, **68**, 3569–3573 (2000).
- 67) Eberhard A., Burlingame A. L., Eberhard C., Kenyon G. L., Nealson K. H., Oppenheimer N. J., *Biochemistry*, **20**, 2444–2449 (1981).
- 68) Mcdougald D., Rice S. A., Kjelleberg S., *J. Bacteriol.*, **183**, 758–762 (2001).
- 69) Shao C. P., Hor L. I., *J. Bacteriol.*, **183**, 1369–1375 (2001).

- 70) Kim S. Y., Lee S. E., Kim Y. R., Kim C. M., Ryu P. Y., Choy H. E., Chung S. S., Rhee J. H., *Mol. Microbiol.*, **48**, 1647–1664 (2003).
- 71) Kawase T., Miyoshi S., Sultan Z., Shinoda S., *FEMS Microbiol. Lett.*, **240**, 55–59 (2004).
- 72) David V. A., Deutch A. H., Sloma A., Pawlyk D., Ally A. H., Durham D. R., *Gene*, **112**, 107–112 (1995).
- 73) Norqvist A., Novrman B., Wolf-Watz H., *Infect. Immun.*, **58**, 3731–3736 (1990).
- 74) Milton D. L., Norqvist A., Wolf-Watz H., *J. Bacteriol.*, **174**, 7235–7244 (1992).
- 75) Ishihara M., Kawanishi A., Watanabe H., Tomochika K., Miyoshi S., Shinoda S., *Microbiol. Immunol.*, **46**, 298–303 (2002).
- 76) Lee C. Y., Cheng M. F., Yu M. S., Pan M. J., *FEMS Microbiol. Lett.*, **209**, 31–37 (2002).
- 77) Watanabe H., Miyoshi S., Kawase T., Tomochika K., Shinoda S., *Microb. Pathog.*, **36**, 117–123 (2004).
- 78) Miyoshi S., Watanabe H., Kawase T., Yamada H., Shinoda S., *Toxicon*, **44**, 887–893 (2004).
- 79) Martinez J. L., Delgado-Iribarren A., Baguero F., *FEMS Microbiol. Rev.*, **75**, 45–56 (1990).
- 80) Funahashi T., Tanabe T., Aso H., Nakao H., Fujii Y., Okamoto K., Narimatsu S., Yamamoto S., *Microbiology*, **149**, 1217–1225 (2003).
- 81) Tanabe T., Funahashi T., Nakao H., Miyoshi S., Shinoda S., Yamamoto S., *J. Bacteriol.*, **185**, 6938–6949 (2003).
- 82) Moon Y. H., Tanabe T., Funahashi T., Shiuchi K., Nakao H., Yamamoto S., *Microbiol. Immunol.*, **48**, 389–398 (2004).
- 83) Bullen J. J., Spalding P. B., Ward C. G., Gutteridge J. M. C., *Arch. Intern. Med.*, **151**, 1606–1609 (1991).
- 84) Starks A. M., Schoeb T. R., Tamplia M. L., Parveen S., Doyle T. J., Bomeis P. E., Escudero G. M., Gulig P. A., *Infect. Immun.*, **68**, 5785–5793 (2000).
- 85) Simpson L. M., Olive J. D., *Infect. Immun.*, **15**, 155–157 (1983).
- 86) Okujo N., Saito M., Yamamoto S., Yoshida T., Miyoshi S., Shinoda S., *BioMetals*, **7**, 109–116 (1994).
- 87) Miyoshi S., Kamei T., Ota Y., Masunaga C., Izuhara Y., Tomochika K., Shinoda S., Yamamoto S., *FEMS Microbiol. Lett.*, **208**, 77–81 (2002).
- 88) Litwin C. M., Bryne B. L., *Infect. Immun.*, **66**, 3134–3141 (1998).
- 89) Wright A. C., Simpson L. M., Oliver J. D., *Infect. Immun.*, **34**, 503–507 (1981).
- 90) Okujo N., Akiyama T., Miyoshi S., Shinoda S., Yamamoto S., *Microbiol. Immunol.*, **40**, 595–598 (1996).
- 91) Aso H., Miyoshi S., Naka H., Okamoto K., Yamamoto S., *FEMS Microbiol. Lett.*, **212**, 65–70 (2002).
- 92) Amako K., Okada K., Miake S., *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 2741–2743 (1984).
- 93) Shinoda S., Kobayashi M., Yamada H., Yoshida S., Ogawa M., Mizuguchi Y., *Microbiol. Immunol.*, **31**, 393–401 (1987).
- 94) Musher D. M., Hansen M. V., Goree A., Gyorkey F., Chapman A. J., Baughn R. E., *J. Clin. Microbiol.*, **23**, 411–415 (1986).
- 95) Devi S. J., Hayat U., Frasc C. E., Kreger A. S., Morris Jr. J. G., *Infect. Immun.*, **63**, 2906–2911 (1995).
- 96) Davis B. R., Fanning G. R., Madden J. M., Steigerwalt A. G., Bradford Jr. H. B., Smith H. L., Brenner D. J., *J. Clin. Microbiol.*, **14**, 631–639 (1981).
- 97) Shi L., Miyoshi S., Bi K., Nakamura M., Hiura M., Tomochika K., Shinoda S., *J. Health Sci.*, **46**, 63–65 (2000).
- 98) Bi K., Miyoshi S., Tomochika K., Shinoda S., *Microbiol. Immunol.*, **45**, 613–616 (2001).
- 99) Shinoda S., Nakagawa T., Shi L., Bi K., Kanoh Y., Tomochika K., Miyoshi S., Shimada T., *Microbiol. Immunol.*, **48**, 547–551 (2004).
- 100) Li Y., Okamoto K., Takahashi E., Miyoshi S., Shinoda S., Tsuji T., Fujii Y., *Microbiol. Immunol.*, **49**, 73–78 (2004).
- 101) Rahman M. M., Miyoshi S., Tomochika K., Wakae H., Shinoda S., *Microbiol. Immunol.*, **41**, 169–173 (1997).
- 102) Kim G. T., Lee J. Y., Hu S. H., Yu J. H., Kong I. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1360**, 102–104 (1997).
- 103) Miyoshi S., Takata N., Sakurai A., Yamamoto S., Shinoda S., *J. Toxicol. Toxin Rev.*, **22**, 726–727 (2003).
- 104) Miyoshi S., Sasahara K., Akamatsu S., Rah-

- man M. M., Katsu T., Tomochika K., Shinoda S., *Infect. Immun.*, **65**, 1830–1835 (1997).
- 105) Chowdhury M. A. R., Miyoshi S., Shinoda S., *Infect. Immun.*, **58**, 4159–4162 (1990).
- 106) Chowdhury M. A. R., Miyoshi S., Shinoda S., *J. Diarrhoeal Dis. Res.*, **4**, 332–334 (1991).
- 107) Chowdhury M. A. R., Miyoshi S., Shinoda S., *Microbiol. Immunol.*, **35**, 1049–1058 (1991).
- 108) Alam M., Miyoshi S., Shinoda S., *Microbiol. Immunol.*, **39**, 67–70 (1995).
- 109) Kothary M. H., Lowman H., McCardell B. A., Tall B. D., *Infect. Immun.*, **71**, 3213–3220 (2003).
- 110) Yoh M., Honda T., Miwatani T., Tsunasawa S., Sakiyama F., *J. Bacteriol.*, **171**, 6859–6861 (1989).