

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590438  
 研究課題名（和文） ブドウ球菌エンテロトキシンの催吐分子メカニズムと細胞レセプターの  
 究明  
 研究課題名（英文） Studies on the molecular mechanism of emesis and emetic receptor  
 of staphylococcal enterotoxin  
 研究代表者  
 胡 東良 (HU DONG-LIANG)  
 弘前大学・大学院医学研究科・准教授  
 研究者番号：10333733

研究成果の概要：黄色ブドウ球菌の産生するエンテロトキシン（SE）は菌体外タンパク毒素で嘔吐誘導活性を示す一方、スーパー抗原活性を有することが知られている。しかし、SE による食中毒のメカニズムはまだ明らかにされていない。本研究では、小型嘔吐動物モデル・スunksを用いSEAの催吐メカニズム及び細胞レセプターを検討した。これらの結果により、小腸の5-HTの産生と放出、迷走神経求心性ニューロンの5-HT<sub>3</sub>レセプターはSEAによる嘔吐反応に重要であり、またCB1レセプターは5-HTの産生と放出を抑制することによりSEAによる嘔吐反応を制御することが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：病原性、エンテロトキシン

## 1. 研究開始当初の背景

ブドウ球菌エンテロトキシン A (SEA) は嘔吐を主症状とする食中毒の重要な原因毒素である。しかし、SEA による嘔吐メカニズムはまだ明らかにされていない。ブドウ球菌エンテロトキシンによる食中毒に関する研究は、従来、サルを用いて経口または静脈内投与で、嘔吐の有無を観察することにより行われてきた。しかし、サルは動物倫理、経済及

び操作などの視点で簡単に本動物実験を行うことが出来ない。我々はこれまで、SEA 分子上の抗原認識部位及び IFN- $\gamma$ 産生誘導活性部位を明らかにしたとともに、新たに小型嘔吐実験動物モデル（スunks）を確立した。

## 2. 研究の目的

本研究では、recombinant SEA 及びスーパー抗原活性を欠損する mutant SEA を作製・

精製し、開発したスンス嘔吐モデル、腸管上皮細胞及び神経細胞を用い、SEA の嘔吐誘導メカニズムを検討した。また、SEA に対する細胞の嘔吐関連レセプターを検索すると同時に、SEA による催吐シグナル伝達経路とその分子メカニズムを検討した。

### 3. 研究の方法

セロトニン (5-HT) 受容体アンタゴニスト、5-HT 合成阻害剤、周囲迷走神経阻害剤 (5,7-DHT) 及び神経切断による SEA の嘔吐活性に対する影響を調べた。SEA 刺激による腸管細胞の5-HT の産生はHPLCにより測定した。また、カンナビノイド (CB) レセプターがSEAによる嘔吐への関与を検討した。さらに、5-HT の産生と CB1 レセプターの発現は免疫組織染色により調べた。

### 4. 研究成果

5-HT<sub>3</sub> レセプターのアンタゴニストと5-HT 合成阻害剤の前投与はSEAによるスンスの嘔吐を抑制した (Fig. 1). SEA による腸

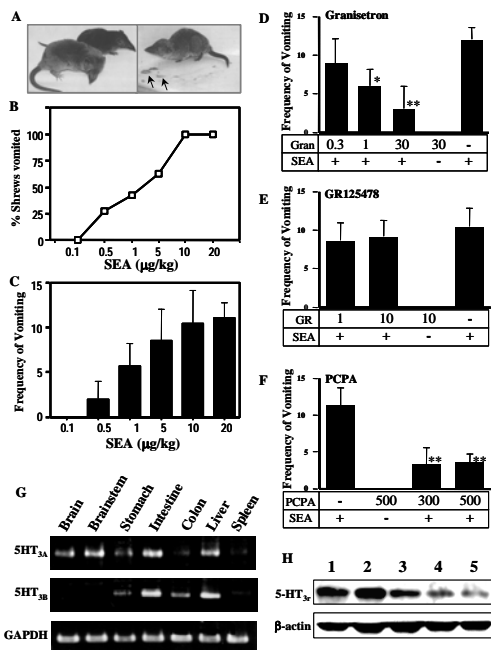


Fig. 1 SEA induced emesis in house musk shrews as a dose-dependent manner (A-C). Effects of 5-HT<sub>3</sub> (D) and 5-HT<sub>4</sub> (E) receptor antagonists, and 5-HT synthesis inhibitor (F) on suppression against vomiting elicited by SEA. Expression of 5-HT receptors in the tissues of house musk shrews (G, H).

管、脳、脳幹の神経伝達物の変化を HPLC により測定した結果、SEA 刺激により小腸の5-HT の産生または放出を促進した (Fig. 2). 5,7-DHT 投与と迷走神経切断も SEA による嘔吐を抑制した。また、CB1 レセプターアゴニストはSEAによる嘔吐を抑制し、この抑制効果が CB1 アンタゴニストにより解除された

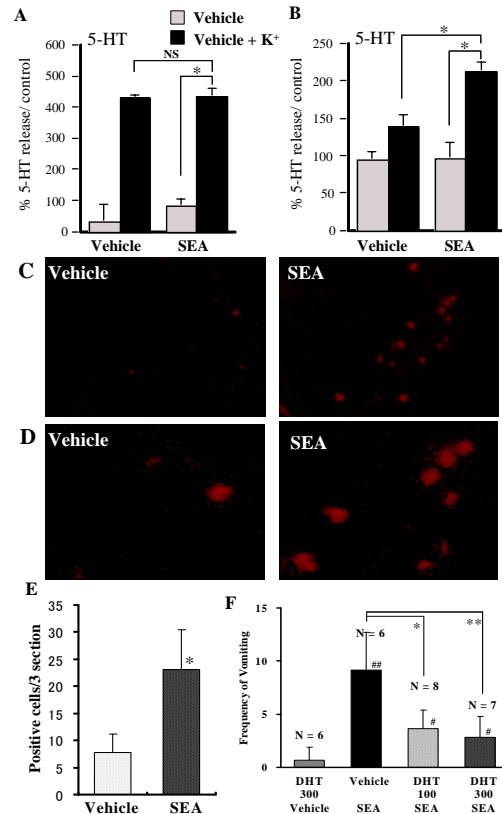


Fig. 2. Neurotransmitter production in intestine of house musk shrews stimulated with SEA (A, B). 5-HT positive cells in the submucosalplexus in the small intestine of house musk shrews after administration of SEA (C-E). Effect of IP administration of 5,7-DHT on emetic responses induced by SEA in house musk shrews (F).

(Fig. 3). 免疫組織染色により小腸粘膜と腸筋層間神経叢には5-HT の産生と CB1 レセプ

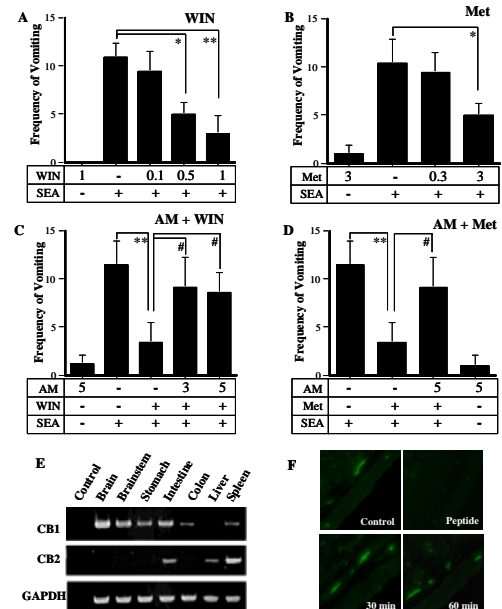


Fig. 3. WIN 55,212-2 and methandamide, CB receptor agonists, suppressed vomiting elicited by SEA (A, B). AM251, a CB1 receptor specific antagonist, reversed the suppression by WIN and Met of vomiting induced by SEA (C, D). Expression of CB1 and CB2 receptors in the tissues of house musk shrew (E, F).

ターの発現を確認した。さらに、CB1 アゴニストは SEA による小腸の 5-HT の産生を抑制した (Fig. 4)。これらの結果により、小腸の 5-HT の産生と放出、迷走神経求心性ニューロンの 5-HT<sub>3</sub> レセプターは SEA による嘔吐反応に重要であり、また CB1 レセプターは 5-HT の産生と放出を抑制することにより SEA による嘔吐反応を制御することが示唆された。

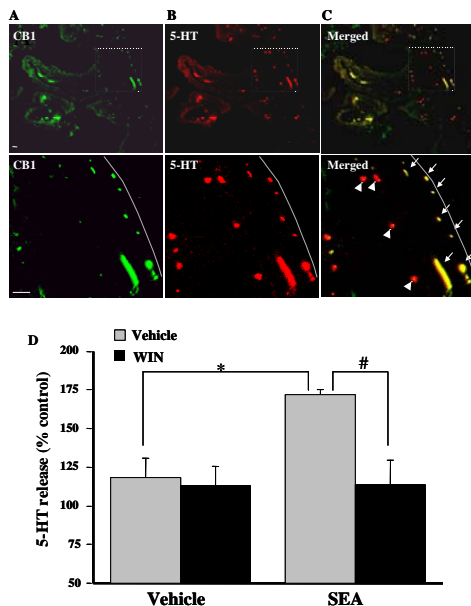


Fig. 4. Immunoreactivity to CB1 receptor and 5-HT were observed in the small intestine of house musk shrew administrated with SEA (A-C). Effect of CB1 receptor agonist on SEA-induced 5-HT release in the small intestine of house musk shrews (D).

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- Hu, D.-L., Omoe, K., Shinagawa, K. and Nakane, A. Immunization with nontoxic mutant staphylococcal enterotoxin A, D227A, protects against enterotoxin-induced emesis in house musk shrews. *J. Infect. Dis.* 査読有, 199(3): 302-310. 2009.
- Hu, D.-L., Narita, K., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Nakane, A. and Karaolis, D. K. c-di-GMP as a vaccine adjuvant protects against systemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. *Vaccine* 査読有, 2009. In press.
- Narita, K., Hu, D.-L., Tsuji, T. and Nakane, A. Protective effect of intranasal vaccination with nontoxic mutant toxic shock syndrome toxin 1 against systemic and local *Staphylo-*

*coccus aureus* infection. *Hirosaki Med. J.* 査読有, 59 (2): 71-82. 2008.

- 胡 東良. ブドウ球菌エンテロトキシンの分子構造とその機能解析に関する研究. *弘前医学*. 59 (2): 136-139, 2008.
- Narita, K., Hu, D.-L., Tsuji, T. and Nakane, A. Intranasal immunization of mutant toxic shock syndrome toxin 1 elicit systemic and mucosal immune response against *Staphylococcus aureus* infection. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 査読有, 52(3): 389-396. 2008.
- Hu, D.-L., Omoe, K., Inoue, F., Kasai, T., Yasujima, M., Shinagawa, K. and Nakane, A. Comparative prevalence of superantigenic toxin genes in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Med. Microbiol.* 査読有, 57 (9): 1106-1112. 2008.
- Ono, H., Omoe, K., Imanishi, K., Iwakabe, Y., Hu, D.-L., Kato, H., Saito, N., Nakane, A., Uchiyama, T. and Shinagawa, K. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins types S and T. *Infect. Immun.* 査読有, 76(11): 4999-5005. 2008.
- 中根明夫, 成田浩司, 胡 東良. 黄色ブドウ球菌に対するワクチンの開発. *臨床免疫・アレルギー科*. 50 (5): 543-550, 2008.
- Hu, D.-L., Zhu, G., Mori, F., Omoe, K., Kaneko, S., Wakabayashi, K., Shinagawa, K. and Nakane, A. Staphylococcal enterotoxin induces emesis through increasing serotonin release in intestine and it is down-regulated by cannabinoid receptor 1. *Cell. Microbiol.* 査読有, 9(9): 2267-2277. 2007.
- Hu, D.-L., Omoe, K., Narita, K., Shinagawa, K., and Nakane, A. Vaccination with a mutant of staphylococcal enterotoxin C elicits Th2 immune response for protection against *Staphylococcus aureus* infection. *Hirosaki Med. J.* 59 (S): 210-218. 2007.
- Hu, D.-L., Suga, Y., Omoe, K., Abe, Y., Shinagawa, K., Wakui, M. and Nakane, A. Staphylococcal enterotoxin A modulates intracellular Ca<sup>2+</sup> signal pathway in human intestinal epithelial cells. *Hirosaki Med. J.* 59 (S): 219-226. 2007.

12. Narita, K., Hu, D.-L., Tsuji, T. and Nakane, A. Protective effect of intranasal vaccination with nontoxic mutant TSST-1 against *Staphylococcus aureus* infection. *Hirosaki Med. J.* 査読有, 59 (S): 227-234. 2007.
13. Hu, D.-L., Qian, A.-D., San, X.-F., Narita, K., Sashinami, H., Osanai, A., Abe, Y., Hiraga, Kudou, K., Liu, Y. and Nakane, A. Pollution of enteropathogenic bacteria in meats and egg in Japan and China. *Hirosaki Med. J.* 査読有, 59 (1): 1-6. 2007.

[学会発表] (計 20 件)

1. Hu, D.-L., Omoe, K., Sashinami, H., Shinagawa, K., Nakane, A. A nontoxic mutant staphylococcal enterotoxin A protects against enterotoxin-induced emesis. 第82回日本細菌学会総会, 名古屋. 2009. 3. 12-14.
2. Hu, D.-L., Omoe, K., Sashinami, H., Shinagawa, K., Nakane, A. Immunization with nontoxic mutant staphylococcal enterotoxin A protects against enterotoxin-induced emesis in house musk shrews. The 11th Meeting Hirosaki International Forum of Medical Science. Hirosaki, Japan. Mar. 27-28, 2009.
3. Narita, K., Hu, D.-L., Nakane, A. An immunization with fibrinogen binding domain of clumping factor A enhances IL-17 production and protects against *Staphylococcus aureus* infection. (クラumpingファクターAによる免疫はIL-17産生を促進し黄色ブドウ球菌感染防御効果を示す). 第38回日本免疫学会総会. 京都. 2008. 12. 1-3.
4. Hu, D.-L., Omoe, K., Sashinami, H., Shinagawa, K., Nakane, A. Vaccination with nontoxic mutant staphylococcal enterotoxin A, D227A, protects against enterotoxin-induced emesis in house musk shrews. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会. 神戸. 2008. 12. 9-12.
5. Hu, D.-L., Omoe, K., Shinagawa, K., Nakane, A. Staphylococcal enterotoxin A induces emesis through increasing serotonin release in intestine and endogenous cannabinoid system protects against the emetic response. 13th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections (ISSSI). Carens, Australia. Sep. 7-10, 2008.
6. 胡 東良, 重茂 克彦, 品川 邦汎, 中根 明夫. ブドウ球菌エンテロトキシンの嘔吐誘導とその制御機序. 第2回日本細菌学・若手コロッセウム. 湘南. 2008. 8. 3-5.
7. 胡 東良, 重茂 克彦, 品川 邦汎, 中根 明夫. 臨床由来のMRSAとMSSA分離株のブドウ球菌スーパー抗原毒素遺伝子の解析. 第62回日本細菌学会東北支部総会, 十和田. 2008. 8. 21-22.
8. 成田 浩司, 胡 東良, 重茂 克彦, 品川 邦汎, 中根 明夫. 黄色ブドウ球菌接着因子による感染予防効果. 第62回日本細菌学会東北支部総会, 十和田. 2008. 8. 21-22.
9. 成田 浩司, 胡 東良, 重茂 克彦, 品川 邦汎, 中根 明夫. 黄色ブドウ球菌接着因子による感染予防効果. 第73回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会／第19回日本生体防御学会学術総会／第45回補体シンポジウム合同学会, 札幌. 2008. 7. 10-12.
10. 胡 東良, 重茂 克彦, 井上文緒, 葛西 猛, 保嶋 実, 品川邦汎, 中根明夫. MRSAとMSSA分離株のスーパー抗原毒素遺伝子の解析. 第28回青森感染症研究会, 弘前. 2008. 6. 28.

11. 胡 東良, 重茂克彦, 品川邦汎, 中根明夫. ブドウ球菌エンテロトキシンの嘔吐誘導活性とスーパー抗原活性の関連性. 第81回日本細菌学会総会, 京都. 2008. 3. 24-26. (ワークショップ).
12. 成田 浩司, 胡 東良, 重茂 克彦, 品川邦汎, 中根 明夫. 黄色ブドウ球菌接着因子による感染予防効果. 第81回日本細菌学会総会, 京都. 2008. 3. 24-26.
13. 胡 東良. ブドウ球菌エンテロトキシンの分子構造とその機能解析に関する研究. 第 144 回弘前医学会. 弘前. 2008. 2. 1. (学術賞特別賞記念講演)
14. 胡 東良. 黄色ブドウ球菌エンテロトキシンファミリーの多様性とその機能. 第12回弘前大学遺伝子実験施設シンポジウム. 弘前. 2007. 11. 16.
15. 成田浩司, 胡 東良, 辻 孝雄, 中根明夫. 黄色ブドウ球菌局所感染および全身感染に対する無毒変異TSST-1経鼻粘膜ワクチンの防御効果. 第37回日本免疫学会総会. 東京. 2007. 11. 13-15.
16. 胡 東良, 重茂克彦, 品川邦汎, 中根明夫. ブドウ球菌エンテロトキシンの嘔吐誘導機序. 第54回日本毒素シンポジウム, 大阪. 2007. 9. 5-7.
17. 胡 東良, 重茂克彦, 品川邦汎, 中根明夫. ブドウ球菌エンテロトキシンAの嘔吐誘導とその制御機序. 第61回日本細菌学会東北支部総会, 仙台. 2007. 8. 23-24.
18. 成田浩司, 胡 東良, 辻 孝雄, 中根明夫. 無毒変異TSST-1経鼻粘膜ワクチンによる黄色ブドウ球菌感染防御効果. 第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会. 京都. 2007. 7. 5-6.
19. 胡 東良, 銭 愛東, 差波拓志, 単 暁風, 成田浩司, 長内理大, 阿部由紀子, 平賀寛人, 工藤幸清, 劉 勇, 中根明夫.

日本と中国における急性胃腸炎起因微生物の汚染調査. 青森感染症研究会, 青森. 2007. 6. 23.

20. 胡 東良, 中根明夫. 黄色ブドウ球菌感染に対する無毒変異ワクチンの開発. 第91回弘前医学会総会, 大館. 2007. 6. 9.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

胡 東良 (HU DONG-LIANG)  
弘前大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 10333733

##### (2)研究分担者

中根 明夫 (NAKANE AKIO)  
弘前大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 30164239