

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19590444

研究課題名 (和文) ブドウ球菌エンテロトキシンによる嘔吐機構の病態生理学的解析

研究課題名 (英文) Pathophysiological analysis of the emesis induced by Staphyrococcal enterotoxin

研究代表者

杉本 央 (SUGIMOTO NAKABA)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20142317

研究成果の概要 (和文) : マウスの小腸のフィールド電気刺激に対する張力応答は刺激開始後約 1 秒後にピークを持つ早い収縮応答とそれに続く短い弛緩の後刺激開始後約 2.5 秒後にピークを持つ第二の収縮応答が見られる。ブドウ球菌エンテロトキシン A を組織液に添加すると第二の収縮応答の張力に著しい増大が認められた。この第二収縮応答は、モノアミン系の興奮性伝達物質によって惹起されているものと推察されたが、ザリガニの中樞神経系における運動系 CPG 活動に対してはほとんど影響しないことが明らかになった。

研究成果の概要 (英文) : Mouse small intestine twitch in response to electrical field stimulation. The response were composed of two peaks, a fast peak which appears after ca. 1 sec and the second slow peak which appears after ca. 2.5 sec. The amplitude of the second peak increased remarkably after the treatment of the intestinal preparation with staphyrococcal enterotoxin A. Monoamine seemed to mediate the second peak but CPG activity in CNS of the crayfish which is reported to be mediated by monoamines showed no obvious change by the enterotoxin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：感染免疫

## 1. 研究開始当初の背景

わが国のブドウ球菌食中毒症は、平成 16 年度の事件数が 55 件でのべ患者数が 1298 名 (厚生労働省 保健衛生 食中毒統計調査) と報告されている。ブドウ球菌食中毒症は一件当たりの患者数は 20 人前後で集団

発生することが特徴の一つであり、重症化することはまれであるが、激しい悪心嘔吐を主症状とする重要な感染症である。しかし、ブドウ球菌食中毒症の発症メカニズムに関する研究は世界的に見ても多くない。Surgalla ら (Surgalla, M. J., Bargdoll, M. S., and

Dack, G. M.: Some observation of the assay to staphylococcal enterotoxin by the monkey-feeding test. *J. Lab. Clin. Med.*; 41, 782-788, 1953) によって、ブドウ球菌が産生する耐熱性蛋白質エンテロトキシンが同菌による食中毒の原因物質であることが証明された。以来、ブドウ球菌から多くの類似蛋白質が分離精製され、現在ブドウ球菌エンテロトキシンはその抗原性の違いによってAからRまで知られているが、これらの全てがブドウ球菌食中毒の発症に関係しているかについては、疑問が多い。1989年 White ら (White, J., Herman, A., Pullen A. M., Kubo, R., Kappler, J. W., and Marrack P.: The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell*; 56, 27-35) によってSEがスーパー抗原活性を有することが明らかにされたが、スーパー抗原活性と催嘔吐作用との関係については現在なお不明である (Schlievert PM, Jablonski LM, Roggiani M, Sadler I, Callantine S, Mitchell DT, Ohlendorf DH, Bohach GA.: Pyrogenic toxin superantigen site specificity in toxic shock syndrome and food poisoning in animals. *Infect. Immun.*; 68, 3630-3634, 2000)。Hu ら (Hu, D-L, Omoe, K., Shimoda, Y., Nakane, A., and Shinagawa, K.: Induction of emetic response to staphylococcal enterotoxins in the house musk shrew (*Suncus*). *Infect. Immune.* 71, 567-570, 2003) は食虫目動物スunksがSE投与によって嘔吐することを報告したが、内容は定性的な結果に止まっている。本研究では、嘔吐そのものを指標とするのではなく、嘔吐に伴う上部消化管運動を指標とすることで、SE用量と嘔吐運動との定量関係をより明確にできると期待できる。また、迷走神経の役割については、五十嵐ら (五十嵐英夫、三栗谷久敏、金沢寛明、藤田恒夫、松本則夫; ブドウ球菌エンテロトキシンの催嘔吐および腸液分泌の作用機序に関する研究。国際学院埼玉短期大学研究紀要。21, 53-61, 2003) が腹部迷走神経切断によってSEによる嘔吐が消失することを報告しているが、延髄嘔吐中枢からの嘔吐運動指令の抑制によるものか、あるいは消化管からの刺激伝達の遮断によるものかは明らかでない。本研究では一側の迷走神経断端から神経活動を記録することによって、SEの刺激遮断が迷走神経の遠心路と求心路のいずれに生じているのかを明らかにすることができると考えている。さらに、SEの標的組織・細胞について、金沢ら (金沢寛明、藤田恒夫、星治; 黄色ブドウ球菌エンテロトキシンAによる腸液分泌と腸クロム親和性細胞 (EC細胞。消化性ホルモン

(XIII) 別冊 医学図書出版株式会社、73-80, 1995) は、SEを腸管内腔に投与するとEC細胞内の顆粒が著しく減少することを報告している。しかし彼らの報告からはSEが直接エンテロクロマフィン細胞に作用してセロトニンを放出させているのか、あるいはSEの作用による消化管運動亢進の結果であるのかが不明である。本研究では、消化管を構成する粘膜・粘膜下層・筋層と消化管神経叢との情報伝達を通じて、SEの標的組織・細胞を明らかにし、かつSE刺激の伝達物質を検討することによってセロトニンの役割を明らかにしようとした。

## 2. 研究の目的

ブドウ球菌エンテロトキシンの催嘔吐作用についてのこれまでの研究はすべて、実験動物が嘔吐するか否か、および投与から嘔吐までの経過時間の長短のみ、が検討されてきた。しかし、嘔吐運動には横隔膜の挙上や腹直筋の収縮などの随意運動も関係しており、嘔吐の有無や誘発時間は必ずしも毒素作用の強さと相関しない、と考えられる。今回の研究においては、SEに対する生体反応として上部消化管運動を指標とすることにまず独創性がある。消化管運動は純粋な自律活動であることから、毒素用量と生体反応との間に高い相関が得られるものと期待される。次に毒素作用によって誘発される嘔吐運動における迷走神経の役割についての解析である。これまでも迷走神経の切断によって嘔吐誘発が抑制されると報告されているが、この嘔吐誘発の抑制が迷走神経の求心性経路の障害によるものか、あるいは遠心性経路の遮断によるものかについては全く明らかにされていない。本研究では左右迷走神経の一側のみを切断し、神経断端の神経活動を記録する計画である。SE投与の影響を迷走神経の遠位部および近位部の両側について検討することによって、迷走神経求心路と遠心路のいずれがSE誘発嘔吐運動において重要であるかが解明できると期待される。また、消化管神経叢は、ガングリオン間における水平方向の神経連絡網のみならず、粘膜直下のエンテロクロマフィン細胞やエンテロクロマフィン様細胞また粘膜下層のMeissner神経叢から垂直方向のシグナル伝達も受けている。本研究では消化管の各層部分剥離標本を用いて、SEの消化管神経叢の活動に対する影響を検討する。これによってSEの直接標的組織が消化管を構成する粘膜・粘膜下層・筋層のいずれに存在するかを明らかにすることができる。SEによって誘発される嘔吐反応がセロトニン受容体拮抗剤投与によって抑制されるとの報告がある。そこで本研究では、受容体阻害剤や様々な伝達物質候補化合物をイオントフォレティックに神経叢に与える

ことによって、セロトニンとその受容体が SE 誘発嘔吐運動においてはたず役割についても検討する。この実験結果によって、セロトニン受容体拮抗剤の働きが直接 SE 作用自体を抑制するのか、あるいは SE シグナルの伝達系に対する作用であるのかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 嘔吐にともなう特徴的上部消化管運動と投与 SE 用量との定量関係の解析

#### 方法

実験動物の胃内にバルーンカテーテルを挿入し、圧力トランスデューサーを用いて胃蠕動運動に伴う内圧変化を経時的に記録する。また、動物を開腹し、直視下にバルーンカテーテルを胃幽門前庭部あるいは十二指腸に固定して、上部消化管内腔圧を経時的に記録する。実験に必要な圧力トランスデューサー、アンプ、データレコーダー等は現有の物がそのまま利用できる。

#### 実験動物

スunks、Balb/c マウス、SD ラット、モルモット

#### 陽性対照実験

嘔吐に伴う胃および十二指腸内圧変化が最も顕著に測定できる条件(胃内・十二指腸灌流液成分、灌流速度、バルーン内圧)を決定することを目的に以下の方法による陽性対照実験を行なう。嘔吐反応を示すスunksの胃内あるいは十二指腸内に留置したバルーンカテーテルを通じて胃・十二指腸内を灌流し、催嘔吐作用を有する Apomorphine の静脈内に投与前後における胃・十二指腸の内圧変化を記録する。特に投与後 3-5 分で生じる胃内圧変化が最も顕著に現れる条件を検索する。

次いで、他の催嘔吐物質 (Emetine, 吐根シロップ, 硫酸銅, 酒石酸カリウムアンチモン) の胃内投与による胃・十二指腸の内圧変化を記録し、催嘔吐物質の投与方法の違いによる差異を明らかにする。

#### SE 投与による上部消化管運動変化の測定

Hu ら (Hu, D-L., Omoe, K., Shimoda, Y., Nakane, A., and Shinagawa, K.; Infect. Immune. 71, 567-570. 2003) の報告では、スunksはエンテロトキシン血清型 A (SEA) に対して最も感受性が高いとされている。そこで、SEA の静脈内投与および胃内投与によってもたらされる胃・十二指腸の内圧変化を記録し、陽性対照実験で得られた記録と比較する。さらに、様々な SEA 量について上部消化管

運動に見られる変化を記録し、投与 SEA 量と最も良く相関する消化管運動変化成分を明らかにする。

#### 実験動物の検討

実験動物としてのスunksはまだ入手可能な匹数が限られておりかつ高価であることから、SE の致死活性に対して感受性を示す Balb/c マウス、また SD ラットやモルモットで SE による胃・十二指腸の内圧変化が再現できる否かについての検討を行なう。

(2) SE によって誘発される嘔吐運動における迷走神経の役割の解明方法

実験動物の迷走神経の一例について、頸部で切断し、断端にカフ電極を装着して神経活動電位を記録する。神経活動を記録するのに必要なアンプやデータ収録に必要なコンピュータおよびソフトウェアは現有のものがそのまま使える。

#### 実験動物

スunks、Balb/c マウス、SD ラット、モルモット

#### 陽性対照実験

嘔吐に伴う胃および十二指腸内圧変化が最も顕著に測定できる条件の下に、胃内あるいは十二指腸内に留置したバルーンカテーテルを通じて胃・十二指腸内を灌流し、催嘔吐作用を有する Apomorphine の静脈内に投与前後における求心性および遠心性迷走神経活動を記録する。さらに同時に記録した胃・十二指腸の内圧変化との時間関係についても検討する。

#### SE 投与による迷走神経活動変化の記録

SEA の静脈内投与および胃内投与によってもたらされる迷走神経活動の変化を記録し、陽性対照実験で得られた記録と比較する。

(3) 消化管神経叢活動に対する SE 作用の解析方法

消化管神経叢の自律活動については、縦走筋層と輪状筋層との間を剥離して作製した漿膜-縦走筋-神経叢標本の自律収縮運動を張力トランスデューサーを用いて経時的に記録する。粘膜層や粘膜下層また Meissner 神経叢などからの Auerbach 神経叢への入力については、以下の標本を用いて検討する。実験動物の消化管から、1 × 2 cm の組織を切りだし、その半側について粘膜層から内輪状筋層までを剥離除去して消化管神経叢を露出した標本を作成する。露出された神経叢のガングリオン神経細胞にガラス微小電極を刺入して、シナプス伝達に伴う膜電位変化を記録する。実験に必要な張力トランスデューサー・張力アン

プ・細胞内電位記録用微小電極アンプ・マイクロマニピュレータなどは現有のものが使える。

#### 消化管神経叢の自律活動に対する SE の作用

漿膜-縦走筋-神経叢標本の自律収縮運動に対する SE の直接作用については、組織外液に直接様々な濃度の SE を加え、張力変化を記録するとともにセロトニン・ドーパミン・ATP などに対する組織の反応性についても検討する。また、SE のスーパー抗原によって免疫担当細胞によって産生される TNF $\alpha$  や IL-1 などについても、直接組織外液に加えて漿膜-縦走筋-神経叢標本の自律収縮運動に対する影響を検討する。

#### SE 作用による消化管神経叢活動の変化

半側の消化管神経叢を露出した消化管標本を胃体部・胃幽門前庭部・十二指腸・空腸上部のそれぞれの部位について作製する。神経叢が露出していない半側に SEA を灌流し、ガングリオン神経細胞に対するのシナプス伝達の変化を記録することによって、SEA の直接作用部位を検索する。

#### 神経伝達物質受容体拮抗剤の影響についての検討

セロトニン受容体・ドーパミン受容体・プリン受容体など各種神経伝達物質受容体に対する拮抗剤が、SE によってもたらされる消化管神経叢活動の変化におよぼす影響について検討する。

#### 4. 研究成果

ブドウ球菌食中毒症は毎年夏季を中心に多数の患者が報告される重要な消化器疾患である。主症状は激しい嘔吐であるという特徴を持つにもかかわらず、その病態の解明はほとんど進んでいない。

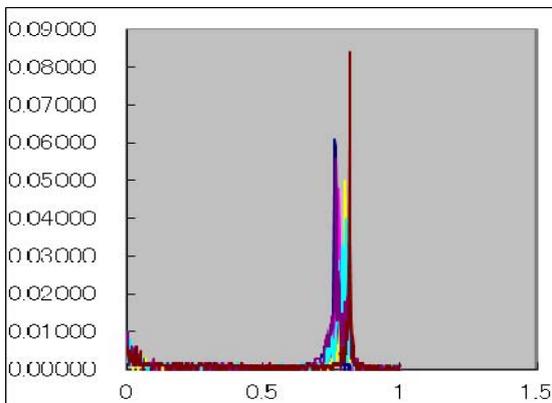


図1. マウス小腸の蠕動運動のパワースペクトル

平成19年度から21年度にかけての研究を通じて、フィールド電気刺激

(frequency:10-500 Hz, duration: 0.5 msec, intensity: 10-40 volt, 10-100 trains) に対する BALB/c マウスの小腸の張力応答は多相性を示すこと、全ての小腸領域において刺激開始後約1秒後に peak を持つ早い収縮応答とそれに続く短い弛緩の後刺激開始後約2.5秒後に peak を持つ第二の収縮応答が見られることを見出した。またブドウ球菌エンテロトキシン A (1  $\mu$ g/ml) を組織液に添加すると第二の収縮応答の張力に著しい増大が認められた。この第二収縮応答は、モノアミン系の興奮性伝達物質によって惹起されているものと推察されたが、誘発収縮張力と毒素濃度の間には用量依存関係はなく、Auerbach 神経叢の神経活動にも明確なパターン変化は見られないことが解った。

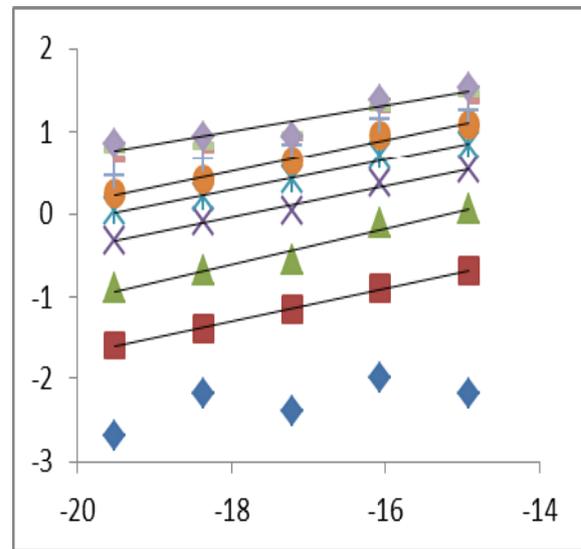


図2. ザリガニ腹部神経節の自発放電に対する 5HT の影響

平成22年度においては、より単純な中枢神経系パターンジェネレーター (CPG) として、ザリガニの遊泳脚 CPG 活動に焦点を絞って毒素作用の解析を行った。その結果、同一神経節における power stroke と return stroke のタンデム活動および左右の power stroke の同期性、更には神経節間の活動位相のずれ、のいずれにおいても毒素濃度  $1E-5$  g/ml においても明瞭な変化を認めることはできなかった。以上の結果よりブドウ球菌エンテロトキシンは中枢神経系における CPG 活動に対してはほとんど影響することなく、蠕動運動に関する PG 活動にのみ作用する極めて特異な作用を有することが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

①Torii, Y., N. Kiyota, N. Sugimoto, Y. Mori, Y. Goto, T. Harakawa, S. Nakahira, R. Kaji, S. Kozaki, and A. Ginnaga. 2011. Comparison of effects of botulinum toxin subtype A1 and A2 using twitch tension assay and rat grip strength test. *Toxicon* 57, 93-99.

②Isegawa, Y., C. Matsumoto, K. Nishinaka, K. Nakano, N. Sugimoto, and A. Oshima. 2010. PCR with quenching probes enables the rapid detection and identification of ganciclovir-resistance causing U69 gene mutations in human herpesvirus 6. *Molecular and Cellular Probes*, 24, 167-177.

③Tobe, T., N. Nakanishi, and N. Sugimoto. 2010. Activation of motility by sensing short-chain fatty acids via two steps in a flagellar gene regulatory cascade in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 79, 1016-1024.

④ Yen, H., T. Ooka, A. Iguchi, T. Hayashi, N. Sugimoto, and T. Tobe. 2010. NleC, a type III secretion protease, compromises NF- $\kappa$ B activation by targeting p65/RelA. *PLoS Pathogens*, 2010 Dec 16, 6(12): e1001231.

⑤Kazushi Nakano, Kazuko Nishinaka, Tatsuya Tanaka, Atsushi Ohshima, Nakaba Sugimoto, Yuji Isegawa. 2009. Detection and identification of U69 gene mutations encoded by ganciclovir-resistant human herpesvirus 6 using denaturing high-performance liquid chromatography. *Journal of Virological Methods*, 161, 223-230.

⑥A. Miyahara, N. Nakanishi, T. Ooka, T. Hayashi, N. Sugimoto, and T. Tobe. 2009. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector EspL2 induces actin microfilament aggregation through annexin 2 activation. *Cellular Microbiology*, 11, 2, 337-350.

⑦N. Nakanishi, K. Tashiro, S. Kuhara, T. Hayashi, N. Sugimoto, and T. Tobe. 2009. Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohemorrhagic *Escherichia*

*coli*. *Microbiology*, 155, 2, 521-530.

⑧Yuji Isegawa, Yoichi Miyamoto, Yoshinari Yasuda, Katsunori Semi, Kenji Tsujimura, Rikiro Fukunaga, Atsushi Ohshima, Yasuhiro Horiguchi, Yoshihiro Yoneda, and Nakaba Sugimoto. 2008. Characterization of the human herpesvirus 6 U69 gene product and identification of its nuclear localization signal. *Journal of Virology*, 82, No. 2, 710-718.

⑨Y. Isegawa, J. Katahira, K. Yamanishi, and N. Sugimoto. 2007. Reactivation of latent human immunodeficiency virus 1 by human herpesvirus 6 infection. *Acta Virologica*, 51, 13-20.

⑩Hiroki Ando, Hiroyuki Abe, N. Sugimoto, and Toru Tobe. 2007. Maturation of functional type III secretion machinery by activation of anaerobic respiration in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology*, 153, 464-473.

⑪Yuji Isegawa, Masaya Takemoto, Koichi Yamanishi, Atsushi Ohshima, and Nakaba Sugimoto. 2007. Real-time PCR determination of human herpes virus 6 antiviral drug susceptibility. *Journal of Virological Methods*, 140, 25-31.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉本 央 (SUGIMOTO NAKABA)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20142317

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：