

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19592091

研究課題名 (和文) 有明海における細菌感染防止のための抗体検査法確立

研究課題名 (英文)

Establishment of antibody titer measurement against *Vibrio vulnificus*

研究代表者

荒木 和邦 (ARAKI KAZUKUNI)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：50193066

研究成果の概要 (和文) : *Vibrio vulnificus* 感染症患者及び未発症者 (ハイリスク群として肝機能障害者、及びローリスク群として肝機能正常者) の血清を用い、*Vibrio vulnificus* 菌に対する血清抗体価を測定した。また抗原の詳細な解析のため二次元電気泳動+Western blot 解析を施行した。*Vibrio vulnificus* 感染後の抗体価の変化や、特異的な抗原を確認した。本症に罹患しやすい住民の発見 (ハイリスク者スクリーニング) 法の開発には至らなかったが、血清抗体価測定が、発症後の転帰を予測できる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : We studied blood plasma IgG antibody (IgG Ab) titer in *Vibrio vulnificus* patients and two control groups (chronic liver dysfunction group and normal liver function group). To determine the *Vibrio vulnificus* antigens, we investigated two-dimensional gel electrophoresis and western blot. We discovered the time course of IgG Ab titer and specific antigen. Although we could not conclude that the IgG Ab titer analysis system is useful for screening for people who are susceptible to *Vibrio vulnificus* infection, it seems possible to predict the prognosis of the patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
H19 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
H20 年度	800,000	240,000	1,040,000
H21 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：集中治療医学、*Vibrio vulnificus*、Micro-IF、血清抗体価

## 1. 研究開始当初の背景

佐賀県を中心に有明海沿岸地域で多くみられる「人食いバクテリア」*Vibrio vulnificus* による感染症は、生の魚介類摂取を介して、主に肝機能障害を有する中年男性が感染し、その7割が死亡するという深刻な健康被害を

もたらす。予防が非常に重要ではあるが、肝機能障害者のなかでも特に本症に罹患しやすい患者 (ハイリスク者) スクリーニングに関する研究がこれまでに行われていないため、全ての肝機能障害者に魚介類の摂取を控えるよう指導することとなり、C型肝炎ウイ

ルスによる肝疾患の有病者の多い本県では、肝機能障害者のストレスはもちろん、有明海産の魚介類に対する風評被害による漁業関係者への打撃が懸念された。

## 2. 研究の目的

*Vibrio vulnificus* 菌に対する血清抗体価測定法の確立し、免疫学的な立場から *Vibrio vulnificus* 感染症に罹患しやすい住民の発見（ハイリスク者スクリーニング）が可能か検討する。これにより各肝機能障害者へのきめ細かい生活指導が可能となる。

## 3. 研究の方法

### (1) Micro-IF 法を用いた研究

*Vibrio vulnificus* 患者及び未発症者（ハイリスク群として肝機能障害者、及びローリスク群として肝機能正常者）の血清を用い、*Vibrio vulnificus* 標準株 ATCC27562 に対する血清抗体反応を Micro immunofluorescence (Micro-IF) 法にて測定した。ヒト血清には次の 3 群を用いた。① *Vibrio vulnificus* 患者 (VUL 群) 13 例 (救命 6 例、死亡 6 例、転帰不明 1 例)、② 未発症の肝機能障害者 (CLD 群) 27 例、③ 未発症の肝機能正常者 (NLF 群) 34 例。Micro-IF 法による血清抗体反応測定方法手順を以下に示す。

(a) 上記ヒト保存血清を 10 倍より 2 倍階段希釈し、スライドウェル上で、希釈血清（一次抗体）と、0.001%ホルマリン固定菌液を 37°C 30 分間反応後洗浄。(b) Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 IgG 抗体を 37°C 30 分間反応させ、グリセリンにて封入。(c) 蛍光顕微鏡 (488nm) で蛍光反応を観察、40 倍以上の希釈でも蛍光反応があるものを陽性 (+)、80 倍以上を (++)、160 倍以上を (+++) と判定した。

### (2) 二次元電気泳動+Western blot 解析

Micro-IF 法にて血清抗体価を測定したが、更に詳細に解析するため二次元電気泳動+Western blot 法を用いた。手順を以下に示す。

(a) *Vibrio vulnificus* 標準株 ATCC27562 を用い、等電点電気泳動後、SDS-PAGE を施行する。(b) PVDF 膜に転写後、BODPY にて全蛋白成分を染色する。(c) BSA にてブロッキング後、Micro-IF 法の際に用いた血清の 1000 倍希釈（一次抗体）、Anti Human IgG Biotin conjugate (二次抗体)、Streptavidin を反応させ DDAO にて抗原抗体反応を確認した。

## 4. 研究成果

### (1) Micro-IF 法を用いた研究

① VUL 群における血清抗体反応の計日的推移と転帰の関連について

IgG は抗原刺激後 1 週間程より上昇し始め、

その後持続する。VUL1 や VUL12 においても IgG は数日から 2 週間程で上昇後持続する傾向を示していた (表 1)。

表1.VUL群における抗体反応の計日的推移と転帰

VUL No.	血液採取日(入院後)	抗体反応	転帰
1	1日目	-	
	2日目	-	
	5日目	+	
	7日目	+	
	8日目	+	
	12日目	+++	死亡
	15日目	+++	
	18日目	+++	
	25日目	+	
2	31日目	+	
	33日目	+	
	1日目	+++	
	2日目	+++++	救命
	3日目	+++++	
	3 不明	-	不明
	2日目	+	
	4 1か月後	+++	救命
	2ヶ月後	+	
5	1日目	+	死亡
	4日目	-	
	2日目	+++++	救命
	6 1か月後	+++	
	7 1か月後	+++++	救命
	8 2ヶ月後	+	
	3ヶ月後	+++	救命
	9 2日目	-	死亡
	1日目	+	
10	2日目	+	
	3日目	++	
	4日目	+	
	5日目	-	
	6日目	+	
	7日目	+	救命
	9日目	++	
	11日目	++	
	12日目	++	
11	14日目	++	
	16日目	+	
	17日目	+	
	1日目	+	
	2日目	-	死亡
	3日目	-	
	3日目	-	
	4日目	-	
	5日目	-	
6日目	-		
12	12日目	-	死亡
	13日目	+	
	14日目	++	
	15日目	+	
	13 2日目	+	死亡

*Vibrio vulnificus* 感染症は、菌暴露後、数時間から 2 日程の潜伏期を経て発症し、1~3 日で電撃的な四肢の筋壊死の進行とともに敗血症性ショックとなり約 7 割は死亡する。つまり、多くの患者は抗体を産生する前に死

亡の転帰をたどることになる。この事から、発症後の治療としては、出来るだけ早期の抗生剤投与と循環呼吸器系の維持、血液浄化法、及び早期の壊死組織除去あるいは患肢の切断等積極的な集中治療が必要であると考えられる。また、今回の抗体反応において、死亡群に比し救命群で感染初期より抗体価が高い傾向にあった。これは患者がすでに抗体を有していた可能性を示唆するものであるが、現時点では症例数に乏しく明確ではない。今後さらに調査を継続していく必要がある。

## ② *Vibrio vulnificus* 未発症の2群の血清抗体反応

血清抗体反応に関し、CLD群、NLF群間に統計学的有意差は認められなかったが( $\chi^2$ 検定、 $p=0.126$ )、NLF群の抗体陽性率が85.3%であったのに比し、CLD群が66.7%と比較的低い傾向にあり、肝機能障害者の抗体産生能低下が示唆された(表2)。

表2. CLD群、NLF群の血清抗体反応

CLD No.	抗体反応	NLF No.	抗体反応
1	+++	1	+++
2	-	2	+++
3	+++	3	+
4	-	4	+
5	++	5	+++
6	++	6	+
7	++	7	++
8	++	8	-
9	-	9	++
10	++++	10	++
11	+++	11	+
12	+	12	++++
13	++	13	++
14	-	14	++
15	++	15	++
16	-	16	++
17	-	17	-
18	-	18	+
19	++	19	-
20	-	20	-
21	+++	21	-
22	+	22	++++
23	+	23	+++
24	+	24	++++
25	+++	25	+++
26	++	26	++
27	-	27	++++
		28	+++
		29	++
		30	++
		31	++
		32	++
		33	+
		34	++

抗体陽性率 (%)      66.7                                      85.3

本結果より次の仮説を立てた。海水中に生育している *Vibrio vulnificus* 菌を魚介類等の生食を通して我々は日常的に摂取している。*Vibrio vulnificus* 菌の体内侵入後、抗原提示により肝機能正常者では免疫系がスムーズに発動し抗体を産生する。しかし、肝機能障害者では、抗体産生能が不十分であり、再度暴露の際にも免疫機能がうまく働かない。これに加え以前より指摘されている肝マクロファージのクリアランス機能低下、門脈-大静脈シャント、遊離鉄の上昇など易感染のファクターを有することが、肝機能障害者が *Vibrio vulnificus* 感染症のハイリスク群である原因と考えられる。またVUL群において、救命群に比し死亡群で発症初期の抗体が陰性の傾向にあったことを考えると、CLD群の中でも抗体反応が陰性の患者(CLD2や4など)が *Vibrio vulnificus* 感染症を発症した場合、特に予後不良である事が予想される。今回の結果では、本研究の目的であった、肝機能障害者のなかでも特に本症に罹患しやすい患者(ハイリスク者)スクリーニング法の開発には至っていないが、血清抗体価測定が発症後の転帰を予測する手段となる可能性は示唆された。

## (2) 二次元電気泳動+Western blot 解析

*Vibrio vulnificus* 標準株 ATCC27562 と各血清との抗原抗体反応を検出試薬(DDAO)にて確認したところ、すべてのサンプルに共通して、同部位(図1、○で囲んでいる部分)にスポットが検出された。

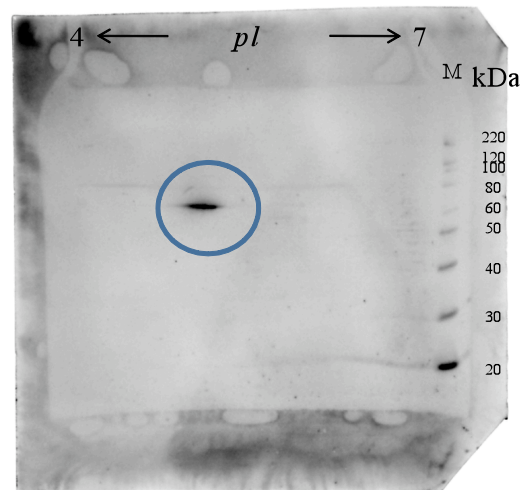


図1.

このスポットの輝度と、Micro-IFの抗体価との間に相関関係は認めなかったが、*Vibrio vulnificus*の重要な抗原である事が示唆された。今後はこのスポットに関してもさらに詳細に解析する予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① 中島幹夫、大石浩隆、松本浩一、富田由紀子、三溝慎次、荒木和邦、ビブリオ・バルニフィカス感染症対策 臨床医学的アプローチ (第四報)、佐賀大学有明海総合研究プロジェクト成果報告集、査読無、第5巻、2009、141-146
- ② 中島幹夫、大石浩隆、富田由紀子、松本浩一、前田祥範、三溝慎次、荒木和邦、ビブリオ・バルニフィカス感染症対策 臨床医学的アプローチ (第三報)、佐賀大学有明海総合研究プロジェクト成果報告集、査読無、第4巻、2008、131-136
- ③ 大石浩隆、中島幹夫、田代幸寛、他4名、ビブリオ・バルニフィカス感染症対策 基礎医学的アプローチ (第三報)、佐賀大学有明海総合研究プロジェクト成果報告集、査読無、第4巻、2008、137-142
- ④ Hiroko Amemori, Masaki Hyakutake, Yoshinori Maeda, Yukiko Tomita, Shinji Mitsumizo, Hirotaka Oishi, Shunzo Koizumi, Mikio Nakashima and Kazukuni Araki, A Survived Case of Vibrio Vulnificus Infections with Multiple Endocrine Neoplasia Type I, Fukuoka Acta Medica, 査読有、98(9), 2007, 346-352
- ⑤ 大石浩隆、中島幹夫、中島由佳理、他3名、ビブリオ・バルニフィカス感染症対策 基礎医学的アプローチ (第二報)、佐賀大学有明海総合研究プロジェクト成果報告集、査読無、第3巻、2007、153-158
- ⑥ 中島幹夫、大石浩隆、浦由紀子、前田祥範、三溝慎次、荒木和邦、ビブリオ・バルニフィカス感染症対策 臨床医学的アプローチ (第二報)、佐賀大学有明海総合研究プロジェクト成果報告集、査読無、第3巻、2007、147-152

[学会発表] (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荒木 和邦 (ARAKI KAZUKUNI)  
佐賀大学・医学部・准教授  
研究者番号：50193066

### (2) 研究分担者

三溝 慎次 (MITHUMIZO SHINJI)  
佐賀大学・医学部・講師  
研究者番号：80159061  
中島 幹夫 (NAKASHIMA MIKIO)  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号：70315191