



Master's Lectures - 4

腸炎ビブリオ・毒素原性大腸菌・ 腸管出血性大腸菌・コレラ菌

国立感染症研究所 名誉所員

たけ だ よし ふみ
竹 田 美 文
Yoshifumi TAKEDA

I. 腸炎ビブリオの研究

昭和36(1961)年4月、私は大阪大学大学院医学研究科の学生として、腸炎ビブリオを昭和25(1950)年に発見した藤野恒三郎先生の研究室で研究を始めた(写真1)。そのころ、腸炎ビブリオは、藤野先生が命名した *Pasteurella parahaemolytica* という学名では呼ばれていなかった。横浜国立病院の滝川巖先生が昭和33(1958)年に報告した菌の好塩性を利用する培養法が非常に有効であったことから、「病原性好塩菌」という名称が広く用いられていた。大学院学生としての私の最初の研究テーマは、藤野先生が発見した時に分離した株の分類学的研究であった。細菌分類学の進歩に伴って、「病原性好塩菌」は、*Pasteurella* 属から *Vibrio* 属に移すべきであるという

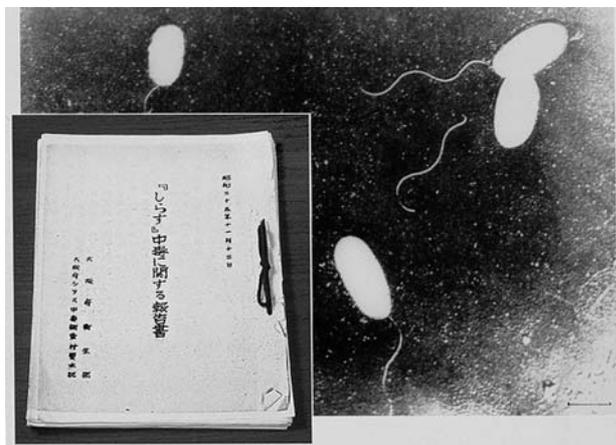


写真1 Medical J. Osaka University (4: 299-304, 1953) に掲載された *Pasteurella parahaemolytica* の電子顕微鏡写真と腸炎ビブリオを藤野先生が発見したシラス中毒事件(昭和25年)の公式報告書の表紙

考え方が一般的になりつつあったことを検証する実験をした。

大学院を修了した後すぐ、2年間米国へ留学した。留学先は当時“旬”の学問であった分子生物学の研究室を選んだ。帰国が迫った1966(昭和41)年の6月、ニューヨークで開かれた米国微生物学会総会に出席した。帰国してから、分子生物学の研究を続けるのか、腸炎ビブリオの研究にもう一度挑戦するのか、迷いながらの出席であった。ところが、プログラムに腸炎ビブリオの演題があるのを見つけて驚いた。実はそれまで、腸炎ビブリオを研究テーマにしている研究者は日本人に限られていて、外国人は皆無だった。腸炎ビブリオそのものが日本以外には存在しないものと思い込んでいた。

発表者は若い女性研究者、後年レーガン大統領の科学顧問、National Science Foundation 長官を長年務めた Rita Colwell 博士(現 Maryland 大学教授)だった(写真2)。彼女の発表が終わった後、演壇の裾で「私は Dr. Fujino の弟子です」と自己紹介を



写真2 出合った頃の Rita Colwell 博士(右端)
左隣りは J. B. Kaper 博士(現 Maryland 大学教授)

した。それ以来今日まで、親しく交流を重ねているが、「日本の研究者は *Vibrio parahemolyticus* の研究をする責任があります」と初対面の時彼女に言われた言葉が、帰国後、再び腸炎ビブリオを研究テーマに選んだきっかけになった。

腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒の研究を始めたのは、藤野先生が定年退官し、三輪谷俊夫先生（故人）が後任教授に決まった昭和45（1970）年頃である。まず、神奈川現象陽性物質の精製から始めた。細菌毒素の精製は初めてのことであったが、幸い短期間で精製に成功した。精製がほぼ最終段階になった頃、後に三輪谷先生の後任教授になった本田武司博士が助手として三輪谷研究室に入って来た。本田博士は、研究を初めて間もなく、精製耐熱性溶血毒をマウスの尾静脈に注入すると微量でマウスが急死することを見出し、心臓に作用する可能性を指摘した。耐熱性溶血毒の心臓毒性を証明するため、いろいろの実験を試みたが、圧巻は、五島喜与太博士（当時武田製薬研究所）の協力を得て行った心臓の培養細胞を使った実験だった。マウス胎児の心臓を摘出して作成した初代培養細胞が、顕微鏡下で規則正しく拍動するのを観察した時の感動は今でも忘れられない。

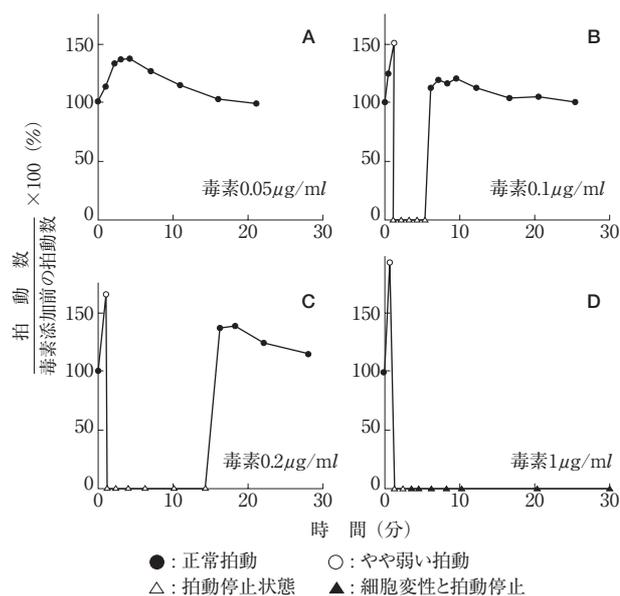


図1 精製耐熱性溶血毒による培養心筋細胞の拍動停止 (Infect. Immun. 13: 163-171, 1976)

顕微鏡下で培養心筋細胞が規則正しく拍動するのを観察しながら、0分の時点で精製耐熱性溶血毒を添加し、細胞の拍動数を測定した。

顕微鏡下で拍動する培養心筋細胞の培地に、精製耐熱性溶血毒を添加すると、添加濃度に応じて拍動が停止した（図1）。

II. 毒素原性大腸菌の研究

毒素原性大腸菌の研究を始めたのは、1976（昭和51）年に *New England J. Medicine* に M. Merson 博士らが発表した論文を読んだのがきっかけだった。メキシコ市で開催された国際消化器病学会に出席したアメリカの医師と家族に同行して、旅行中はもちろん旅行前から旅行後に至るまで、下痢の有無と下痢の原因菌について調査したところ、一行107人のうち旅行中に下痢症に罹ったのが51人、下痢原因菌を調べた結果、毒素原性大腸菌の分離が最も頻度が高く、23人（45.1%）から分離されたという報告だった。

大阪空港検疫所（当時伊丹空港の中にあった）の阿部久夫博士（故人）の研究グループと一緒に、わが国の海外旅行者の旅行者下痢症の実態を調べた。昭和55（1980）年の1月から昭和57（1982）年末までの3年間、大阪空港に来航した4,185,122人の旅行者のうち、下痢を自己申告した11,111人について、申告順番で3人に1人ずつ下痢便を採取し、3,380件について下痢原因菌の検査をした。その結果、対象とした毒素原性大腸菌、サルモネラ属菌、腸炎ビブリオ、赤痢菌、コレラ菌の中で、毒素原性大腸菌の検出件数が最も多く723件（21.4%）であった。

毒素原性大腸菌は、下痢の原因毒素として易熱性エンテロトキシン（heat-labile enterotoxin, LT）と耐熱性エンテロトキシン（heat-stable enterotoxin, ST）の2種類のエンテロトキシンを産生することがわかっていたので、これらのエンテロトキシンの研究にも取り組んだ。LTについては、精製毒素の寒天ゲル内沈降反応で、ヒトの毒素原性大腸菌の産生するLTとブタの毒素原性大腸菌が産生するLTとが異なることを見つけ、それぞれをLTh, LTpと名付けた。後に、それぞれの毒素の一次構造が異なることが明らかになった。

STの研究は、大阪大学蛋白質研究所の下西康嗣教授（現大阪大学名誉教授）に共同研究をお願いし

表1 STn と STp の一次構造 (Eur. J. Biochem. 129 : 257-263, 1982)

STh : Asn-Ser-Ser-Asn-Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-Tyr
 STp : Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-Tyr

た。そして、STにもウシ、ブタ、ヒツジおよびヒトから分離される毒素原性大腸菌が産生するSTpとヒト由来の毒素原性大腸菌しか産生しないSThの2種類が存在することを見つけ、アミノ酸配列を決定した(表1)。さらに、有機合成が専門の下西教授は、STの合成を試み、乳飲マウスに対する活性が天然のSTh、STpと同じSTh、STpの合成に成功した。

昭和60(1985)年11月、当時私が在籍していた東京大学医科学研究所の小高健所長(故人)の推薦をいただいて、「毒素原性大腸菌が産生するエンテロトキシンの研究」に対して、第21回小島三郎記念文化賞を受賞した。

モダンメディアに掲載された受賞記念講演の記録(32 : 46-61, 1985)の末尾に、「私は昭和36年4月、大学院学生として大阪大学微生物病研究所細菌血清学部門・藤野恒三郎教授の門に入りました。私が今日まで、細菌学者としての途を歩むことができましたのは、ひとえに藤野先生の御指導のおかげであります。心より感謝いたします。今日私の受賞の対象となりました「毒素原性大腸菌の産生するエンテロトキシンの研究」は、私が大阪大学微生物病研究所在籍中、三輪谷俊夫教授の御指導の下で行ったものであります。多数の共同研究者に恵まれ、1つ1つ積み重ねてきた研究に、私が代表して小島三郎記念文化賞をいただくことになりました。以下のすべての共同研究者と今日の栄誉を分かちたいと思います。」と、恩師藤野先生はじめ多くの共同研究者への私の心からの謝辞を書いた(写真3)。

Ⅲ. 腸管出血性大腸菌の研究

昭和57(1982)年の3月から4月にかけて、米国オレゴン州のハンバーガーレストランで鮮血の下血を主症状とする食中毒が発生し、CDCの研究者が原因菌として*E. coli* O157:H7を分離したという情報をカナダのHermy Lior博士が教えてくれたのは、

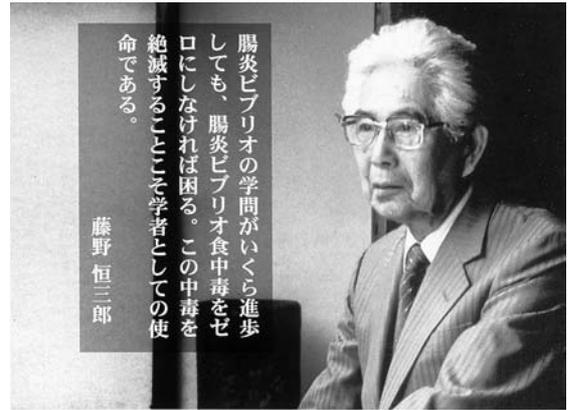


写真3 晩年の藤野恒三郎先生

5月のゴールデンウィークの頃だった。さらに5月から6月にかけて、ミシガン州の同じ系列のハンバーガーレストランの店で同様の食中毒が起り、ハンバーガーのパテから*E. coli* O157:H7が分離されたということを知った。

その頃、米国のAlison O'Brien博士が、*E. coli* O26が産生するHeLa細胞に対する致死毒素の活性が、赤痢菌の産生する志賀毒素の抗体で中和されることを証明していたことは本人から聞いていた。まもなく、CDCが分離した*E. coli* O157:H7が、Alison O'Brien博士が研究している毒素と同じであることが発表された。

昭和58(1983)年2月、東京大学医科学研究所細菌感染研究部の加藤巖教授の後任として着任した時、enterohemorrhagic *E. coli* (腸管出血性大腸菌)と名付けられた*E. coli* O157:H7の研究を始めた。菌株はHermy Lior博士がトロントでの分離株を送ってくれた(写真4)。

研究を始めるに際して大変幸運であったのは、阪大微研時代に、岡本敬の介博士(現岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授)、ヤノトモサ博士(現ブラジルキャンピナス大学教授)、湯通堂隆博士(現塩野義製薬)らが作成した赤痢菌の精製志賀毒素の抗体を手元にあったことと、下痢原性大腸菌



写真4 東京大学医科学研究所細菌感染研究部の仲間達（昭和60年頃）

の血清型について大阪府立公衆衛生研究所の塚本定三博士と共同研究をしていたことであった。東京へ移る荷物の中に、志賀毒素の抗体と、塚本博士に作成してもらった大腸菌の O157 と H7 の血清を入れた。東大医科研に移って直ぐ、医科研病院検査室の技師、安達房代さんをお願いして、在京の病院の検査技師の人たちに集ってもらい、O157 と H7 の血清を配布し、*E. coli* O157 : H7 の患者からの分離を始めてもらった。ほどなく昭和 58 (1983) 年の初夏の頃、東京都下の病院へ緊急入院した患者から、佐久一枝さんが *E. coli* O157 : H7 を分離した。J-2 と番号を付けたこの菌株は、おそらくわが国で患者から直接分離した初めての腸管出血性大腸菌であったと思う（写真5）。

その頃までに、腸管出血性大腸菌が産生する毒素



写真5 EHEC O157 : H7 の検出を試みた臨床検査技師の仲間達と日光旅行をした時のスナップ（昭和60年頃）

は、A. O'Brien 博士が命名した Shiga-like toxin と呼ぶ名前と同時に、Vero 毒素とも呼ばれていた。ところが、J-2 が産生する Vero 毒素が志賀毒素の抗体で中和されないという信じられないデータが出た（写真6）。早速、VT2 と名付けた新しい Vero 毒素の精製に取りかかった。順調に VT2 の精製が進んでいた頃、ビルマ（現ミャンマー）のラングーン（現ヤンゴン）で WHO が主催する腸管感染症のシンポジウムがあった。世界に先駆けて VT2 を発見したという興奮から、未発表の VT2 発見について発表した。その席に居た英国の腸管感染症研究の大御所 B. Rowe 博士が腸管出血性大腸菌の研究をしていたことを知らなかった。シンポジウムの数カ月後、わずか数百語の VT2 発見を報じる Rowe の論文が *Lancet* の短報欄に掲載された。現在、この Rowe の論文が VT2 の発見論文となっている。

VT1 の精製はすでに A. O'Brien 博士らが報告していたが、私たちは、一次構造を決めることを目的として精製に取り組んだ。すでに赤痢菌の志賀毒素の精製を報告していたので、比較的短期間で精製標品を得ることができた。精製 VT1 の一次構造の解析は、下西康嗣教授（現大阪大学名誉教授）をお願いした。古典的なエドマン分解法と、当時の最先端技術であった FAB 質量分析法を組み合わせることで一次構造を決定した。その結果、VT1 の一次構造は赤痢菌の志賀毒素と全く同一であることが分かった。ほぼ全配列が決まった頃、米国の研究者が塩基配列の解析結果から VT1 の一次構造を発表した。私たちの結果とアミノ酸が一残基（N 末端から 45 番目のアミノ酸）異なっていて、結論も志賀毒素と一残基異なるようになっていた。しかし後になって、この研究者は VT1 と志賀毒素が同一の一次構造であることを認めた。ところが、その後に発表されたほとんどの Review は、VT1 と志賀毒素の一次構造は一残基異なるという論文を引用しているため、一残基異なるという間違っただけの説が、残念ながら現在の定説になっている。

VT2 の精製は、世界に先駆けて発表することができた。精製 VT2 は、VT1 と同じように、A, B2 つのサブユニットから構成されているが、両サブユニットの分子量は VT1 の対応するサブユニットの分子

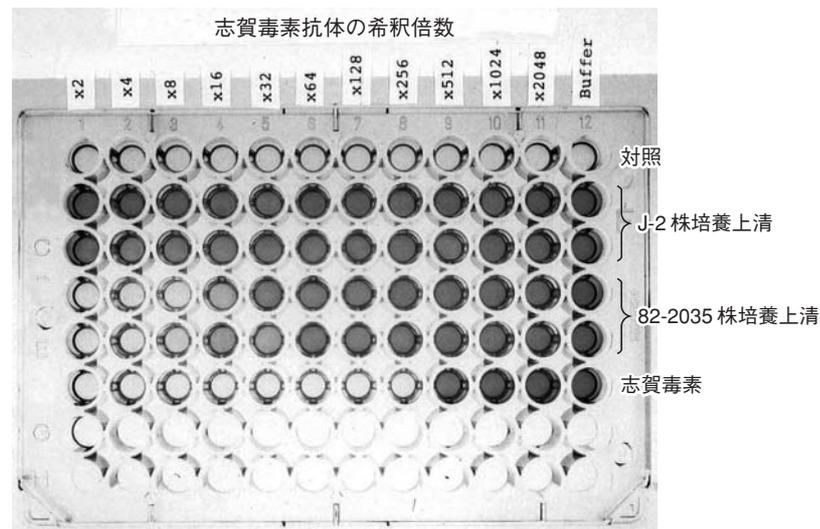


写真6 VT2の発見を示す実験成績

Vero細胞が増殖していないウエルの培地の色はピンク色であるが、増殖するとpHの変化で黄色に変わる。J-2株の培養上清を添加したウエルでは、志賀毒素の抗体濃度が高い場合でも培地の色がピンク色である。すなわち、抗体によってVero毒素活性が中和されていない。一方、VT1産生株（82-2035株）の培養上清を添加したウエルでは、志賀毒素の抗体濃度が高い場合、Vero毒素活性が抗体で中和されるため細胞が増殖し、培地の色が黄色に変化する。

量より大きいことが分かった。その後、毒素遺伝子の塩基配列の解析から、VT2の一次構造も決定した。

Vero毒素の作用機序の研究は、山梨医科大学（当時）の遠藤弥重太博士（現愛媛大学名誉教授）と五十嵐一衛博士（現千葉大学名誉教授）にお願いした。赤痢菌の志賀毒素が、真核細胞の60Sリボソーム亜粒子に作用して蛋白合成を阻害することは、早くからわかっていた。一方、植物が産生するリボソーム不活化蛋白質も真核細胞の60Sリボソーム亜粒子を失活させ蛋白合成を阻害することが分かっていた。1987（昭和62）年、遠藤弥重太博士は、ヒマの種子由来のRicinの蛋白合成阻害は真核細胞の60Sリボソーム亜粒子由来の28SリボソームRNAの5'末端から4,324番目のアデノシンのN-グリコシド結合を加水分解するRNA N-glycosidase活性に基づくことを報告していた。志賀毒素も2種のVero毒素もRicinと同じように、真核細胞の60Sリボソーム亜粒子を構成している28SリボソームRNAの5'末端から4,324番目のアデノシンのN-グリコシド結合を加水分解するRNA N-glycosidaseであり、その結果EF-1依存アミノアシルtRNAの60Sリボソーム亜粒子への結合を阻害することを明ら

かにすることができた。

IV. コレラ菌の研究

1980（昭和55）年に、WHOのDiarrheal Diseases Control Program（下痢性疾患制御プログラム）の運営委員会でインドの国立コレラおよび腸管感染症研究所（National Institute of Cholera and Enteric Diseases, NICED）のS. C. Pal所長と知己となったのをきっかけにコレラの研究を始めた。初めてカルカッタ（現コルカタ）を訪れた時、ウサギ結紮腸管ループ試験（De試験）を開発したS. N. De博士に会って大いに啓発された（写真7）。

NICEDのG. B. Nair博士と共同研究を始めたのは昭和55（1980）年頃からである。今では共著論文が130篇余りになる。共同研究のハイライトは新型コレラ菌O139の発見である（写真8）。

1990年代の始め頃、コレラ菌（*Vibrio cholerae*）はO抗原の違いによってO1～O138の138種類の血清型に分けられていた（現在は208種類）。このうち、コレラ流行の原因となるのはO1血清型に属するコレラ毒素産生性コレラ菌（toxigenic *V. cholerae*）

O1)と定義されていた。一方、O2～O138の血清型に属するコレラ菌は、一括してnon-O1コレラ菌と呼び、コレラ流行の原因菌とは考えられていなかった。当時のわが国では、行政上、NAGビブリオと呼ばれて食中毒の原因菌として扱われていた。



写真7 De博士とのツーショット
背景はコルカタのCholera Temple
(昭和55年)

ところが1992(平成4)年10月から11月にかけて、インド南部のマドラス市(現チェンナイ市)でnon-O1コレラ菌によるコレラ様疾患の大流行が発生した。10月19日に初発患者が出て以来、患者が続々と発生し、翌年1月になると近隣のマドライやベロアにも流行が広がった。分離菌の性状を調べたNair博士は、典型的なコレラ菌であるがO1抗血清に凝集しないnon-O1コレラ菌であることを確認した。

早速菌株を送ってもらい、*Vibrio cholerae*の血清型研究の世界の第一人者で、次々と新しい血清型を報告していた国立予防衛生研究所(現・国立感染症研究所)の島田俊雄博士に血清型別をお願いした。島田博士の手元にある138種類の抗血清のいずれかと凝集するであろうと予想しての依頼であった。ところが結果は、島田博士がそれまでに発表していた138種類の血清型のどれにも当てはまらないことが分かった。O1血清型コレラ菌と同じようにコレラ毒素を産生することも確認した(従来、コレラ毒素を産生するnon-O1コレラ菌はほとんど分離されていなかった)。新しい血清型のコレラ毒素産生性コレラ菌の発見であった。

一方インドの隣国バングラデシュの南部でも、

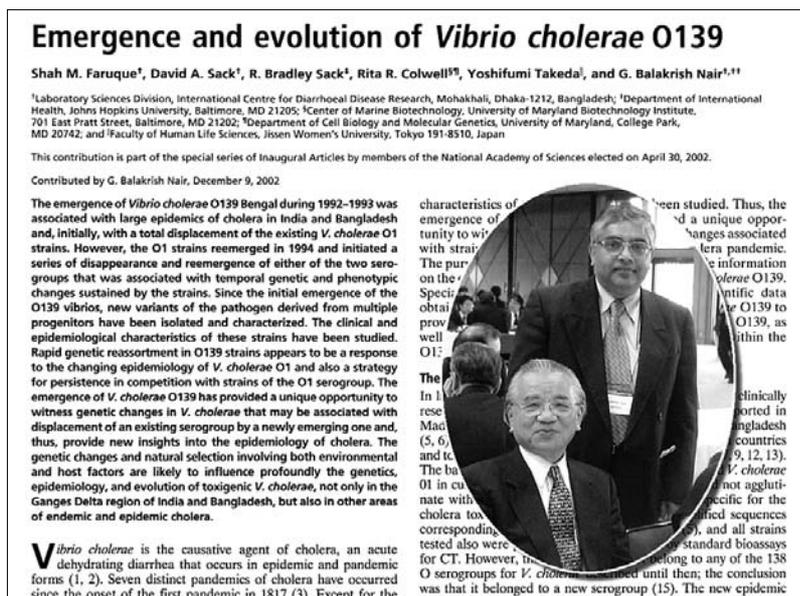


写真8 米国科学学士院の外国人会員に選ばれたNair博士が、Proceedings of the National Academy of Sciences US (100: 1304-1309, 2003)に登載したInaugural Articleの1頁目と新会員に選ばれた後すぐ、京都の学会で会った時に写した私とのツーショット(平成5年)

1993 (平成5)年1月中旬に、non-O1 コレラ菌によるコレラ様急性下痢症の大流行が発生した。International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh (ICDDR,B ; バングラデシュ国際下痢症研究センター)の研究者から送られてきた菌株を調べた島田博士は、バングラデシュの菌株がインドの菌株と同一であることを確認した。

V. cholerae O139 Bengalと名付けた新型コレラ菌の発見論文は、Lancetの1993 (平成5)年3月13日号(341:703-704, 1993)に、私たちの論文とICDDR,Bの研究者の論文が並んで掲載された。WHOは、1993 (平成5)年5月14日発行のWeekly Epidemiological Recordに、O139 コレラ菌による下痢をO1 コレラ菌によるコレラに準ずる扱いにすることを発表した。すなわち、コレラ流行の原因菌をO1 コレラ菌に限らず、O139 コレラ菌も含めることにした。

Vibrio cholerae O1は、生物型によってClassical (古典型またはアジア型)とEl Tor (エルトル型)に分類されている。それぞれの生物型が産生するコレラ毒素(CT)のBサブユニット(CTB)の一次構造は、それぞれに特異的である。すなわちClassical コレラ菌はClassical CTBを、El Tor コレラ菌はEl Tor CTBを産生する。

ところが2006 (平成8)年、G. B. Nair 博士らはバングラデシュでClassical CTBを産生するEl Tor コレラ菌を分離した。この報告はしばらくの間広く注目を集めることはなかったが、2008 (平成10)年に国立感染症研究所の渡邊治雄博士の研究グループが、Classical CTBとEl Tor CTBの型別のためのmismatch amplification mutation PCR assay (MAMA-PCR)を報告して以来、Classical CTBを産生するEl Tor コレラ菌の分離が、アジア・アフリカの各国から相次いで報告されるようになった。

私どもは、Classical CTB 遺伝子を持つEl Tor コレラ菌をEl Tor variantと命名し、1989 (平成元)年以降にコルカタで分離されたEl Tor コレラ菌について、El Tor variant がいつ出現したかを調べた。その結果、コルカタにおいては、El Tor variantはすでに1990 (平成2)年に分離されていて、1995 (平成7)年以降の分離菌はすべてこの型であることを明らかにした。El Tor variantは、おそらくコル

カタでの分離が最も古いと考えられる。コルカタあるいはインドのどこかで出現したEl Tor variantが、まずはアジアで広がり、やがてアフリカ大陸に拡散し、Zimbabweなどの中央アフリカ諸国で大流行を起こしている。

Classical コレラ菌とEl Tor コレラ菌は、分類の基準になっている性状の違いの他にも、それぞれに以下のような特徴がある。まず、Classical コレラ菌によるコレラは、El Tor コレラ菌によるコレラより重症例が多い。そのことと関連すると思われる特徴として、El Tor コレラ菌の感染の場合がClassical コレラ菌による感染の場合より、不顕性感染がはるかに多い。したがって、El Tor コレラ菌によるコレラ患者の周辺には、Classical コレラ菌によるコレラ患者の周辺に比べて、はるかに多い保菌者が存在する。保菌者は当然のこととして感染源となるので、この特徴はコレラの流行を考える場合、大変重要なことである。さらに重要な特徴は、El Tor コレラ菌はClassical コレラ菌に比べると環境への順応力が高く、環境でより長く生存しやすい。またCTの産生量についても、Classical型とEl Tor型のコレラ菌で顕著な差がある。すなわち、Classical コレラ菌の方がEl Tor型よりもCT産生量のはるかに多い。

El Tor variantのコレラ菌は、Classical型とEl Tor型の両者の特徴を兼ね備えた特徴を持つことが考えられる。すなわち、環境への順応が高く、感染した場合の症状が重く、患者の周辺に多くの保菌者が存在するようになる。さらに私どもがEl Tor variant コレラ菌のCT産生量を調べたところ、El Tor コレラ菌より著明に多く、Classical コレラ菌の産生量に匹敵することが明らかになった(図2)。WHOによると、最近のコレラは従来のコレラより重症である。コレラの症状は、コレラ菌側の要因のみで決まるのではなく、宿主側の要因も考慮しなければならない。しかし一方で、Classical型コレラ菌によるコレラの症状がEl Tor型コレラ菌によるコレラより重症であるのは、産生する毒素の量に起因すると説明されることがあることから、El Tor variant コレラ菌のCT産生量が多いことと、症状が重いこととは関係していると考えられる。

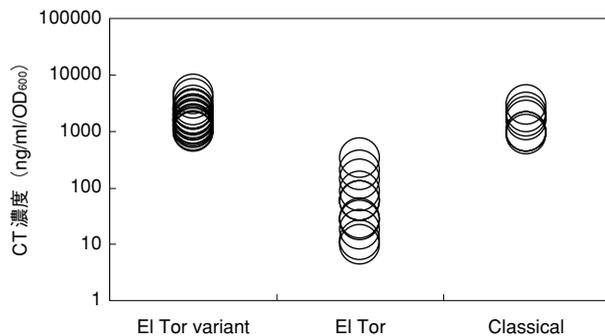


図2 El Tor variant コレラ菌が産生するコレラ毒素量 (J. Clin. Microbiol. 48 : 4283-4286, 2010)

生物型がEl Torで、コレラ毒素のBサブユニットの遺伝子型がClassicalのEl Tor variantコレラ菌は、Classical型とEl Tor型の両者の特徴を兼ね備えた特徴を持つ。El Tor variant コレラ菌の培養上清のコレラ毒素量を高感度ビーズELISAで測定したところ、El Torコレラ菌の産生量より著明に多く、Classicalコレラ菌の産生量に匹敵することがわかった。

V. 岡山大学インド感染症 共同研究センター

平成 19 (2007) 年に、岡山大学が文部科学省の新興・再興感染症研究拠点プログラムに基づいて、NICEDに Collaborative Research Center of Okayama University for Infectious Diseases in India (岡山大学インド感染症共同研究センター)を設置した時、私はセンター長としてコルカタに移住した。そして、今年の3月末まで足掛け5年間、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科特任助教の妹尾充敏博士と一緒に、NICEDの若い優秀な研究者達と共同研究を展開した。センターの設立、運営にはNICEDのG. B. Nair 所長 (現 Translational Health Research and Biotechnology Institute 機構長)と、当時のインド医学評議会議長のN. K. Ganguly 博士から物心両面で全面的な支援を受けた (写真9)。

共同研究のテーマとしては、VBNCコレラ菌の研究、赤痢菌死菌ワクチンの開発、Probioticsの急性下痢症の予防効果 (写真10)等や、上述のEl Tor variantの研究を選び、それぞれに成果を挙げることができたが、なかでもVBNCコレラ菌に関する研究は、若い頃から温めていたテーマであっただけに、強い思い入れがある。

ある種の細菌がviable but nonculturable (VBNC、生きてはいるが培養できない)状態であるということ

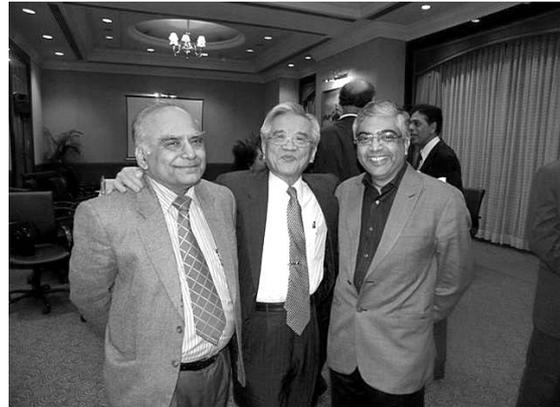


写真9 Dr. N. K. Ganguly, Dr. G. B. Nair とのスナップ (平成 21 年)



写真10 コルカタのスラム地域で行った Probiotic Shirota 株の急性下痢予防効果試験の際の現地調査のスナップ。私の後は Dr. G. B. Nair (平成 20 年)

は、通常臨床検査室で用いる培地に植菌しても増殖しないけれども、死滅しているのではなく生きている状態である、と定義されている。細菌学のゴールドスタンダードは、液体培地に植菌した場合に増殖する、すなわち液体培地が濁る、あるいは固形培地上でコロニーを作る、ということである。したがって「培養できない」状態のVBNCは、Rita Colwell博士が1982(昭和57)年に初めて報告した当初から、学界で広く認められなかった。現在でも、その存在に懐疑的な研究者は決して少なくない。

VBNCコレラ菌を培養可能にする方法を模索した結果、培養動物細胞と共培養することによって、通常の培地で培養できるようにすることに成功した。すなわち、試験管内でVBNC状態にしたコレラ菌 (写真11)、腸炎ビブリオ、毒素原性大腸菌、腸管出

血性大腸菌、赤痢菌、サルモネラ属菌などを HT-29 細胞などの培養細胞と共培養すると、通常の培地で培養できる状態になった。この現象をさらに詳しく解析した結果、VBNC コレラ菌を培養可能にする因子 (Factor converting VBNC to culturable, FCVC と名付けた) が、HT-29 細胞に内在する易熱性の蛋白性分子であることが分かった。そこで、HT-29 細胞を破碎して得た FCVC の crude 標品を、陰イオン交換樹脂、ゲル濾過等のカラムクロマトグラフィーで精製を行い、精製 FCVC の同定を試みたところ、catalase であることが明らかになった。catalase が VBNC を培養可能状態に変換するという報告は慈恵会医科大学の水之江義充教授らの研究グループがすでに報告している (FEMS Microbiol. Lett. **186** : 115-120, 2000)。私どもの研究結果は、catalase が *in vivo* での VBNC の培養可能状態への変換に関与していることを示唆していると考えられる。

また、HT-29 細胞を破碎して得た FCVC を TCBS 培地に添加した培地で VBNC コレラ菌を培養すると、典型的なコレラ菌のコロニーが形成されることも分かった。上述のように、もし VBNC 状態の下痢原因細菌が腸管内で培養可能状態になるならば、環境や食品中に存在すると考えられる VBNC コレラ菌をはじめ各種の下痢原因菌の VBNC が、腸管感染症の原因になることを意味し、腸管感染症学や食品微生物学の観点から、重要な問題提起となるの

ではないかと考える。

VI. 野口英世記念会

平成 24 (2012) 年 7 月から、私は野口英世記念会の常勤理事を務めている。野口英世記念会は、野口英世がアフリカのアクラで黄熱病によって生涯を閉じた昭和 3 (1928) 年 5 月の翌月、東京丸の内の日本工業倶楽部で開かれた野口博士追悼会の際に設立が決定した。野口英世の生涯と業績を顕彰することを目的とし、野口英世記念医学賞の授賞をはじめ、数々の事業を長年にわたって展開している。

福島県猪苗代町にある野口英世博士の生家の保存と野口英世記念館の運営も野口英世記念会の重要な事業である。昭和 31 (1956) 年、大阪大学の 2 年生の夏休み、私は初めて生家と記念館を訪れた。そして、磐梯山の麓、猪苗代湖の畔の寒村に生まれた野口清作が、東京大学伝染病研究所 (現東京大学医学研究所) を経て、ペンシルヴァニア大学、さらにはロックフェラー研究所で医学研究に励んだ諸々の展示資料に感動した。

小中学校や高等学校の児童・生徒、さらには大学の医学部やその関連分野の学部の学生が一人でも多く、猪苗代の生家と記念館で、60 年前に私が味わったのと同じような感動を味わってもらえる環境作りに、後数年、専念したいと思う。

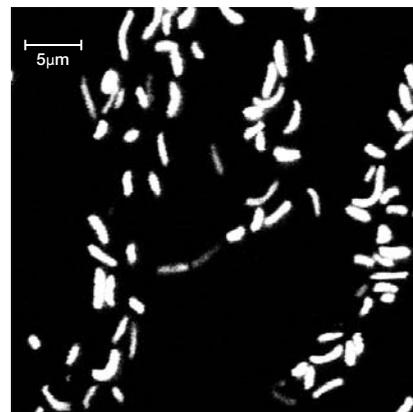
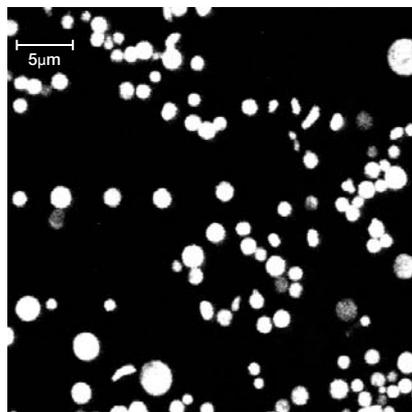


写真 11 VBNC コレラ菌の形態
(Microbiol. Immunol. **54** : 502-507, 2010)

培養可能な新鮮培養コレラ菌 (写真右) を人工海水液 (Instant Ocean) に懸濁し、4°C で約 12 週間静置すると、形態の異なる VBNC コレラ菌 (写真左) になる。写真はコレラ菌を Green Fluorescent Protein (GFP, 緑色蛍光蛋白質) でラベルして撮影した。