Vibrio vulnificus の病原性研究の現状と今後の展望

柏 本 孝 茂¹

¹ 北里大学獣医学部獣医公衆衛生学研究室
〒034-8628 青森県十和田市東二十三番町 35-1

[受理: 2010 年 2 月]

Vibrio vulnificus 感染症は、近年、致死性の感染症として注目度が高まっており、諸外国を含め本菌の調査・研究に参画するグループは着実に増加している。本感染症に関する研究人口の拡がりと共に研究も進展しているが、未だ全体像を描き出せるレベルには至っていない。このように、本感染症の研究は過渡期にあるが、本稿では本菌の病原性研究に焦点を絞り、これまでの成果を整理する意味で現状を取りまとめると共に今後の展望に関しても私見を述べてみたい。

1. *V. vulnificus* 感染症の概要

Vibrio vulnificus (*V. vulnificus*) は海水および汽水中に生息し、海水温の上昇に伴って増殖するため、本菌による感染症は西日本を中心として夏季に発生する(16, 17)。現在、本感染症は敗血症型、創傷感染型および胃腸炎型の3つの感染型に分類されている(2, 3, 30)。このうち特に問題となるのは敗血症型で、肝臓疾患などの基礎疾患を持つヒトが汚染魚介類を生食することにより感染して、発熱、四肢の疼痛、壊死などを引き起こし、初期症状の発現から平均48時間という極短時間のうちに死に至る(46)。致死率は50-70%と極めて高く、魚介類を生食する慣習を持つ我が国においては脅威である(17)。本菌による敗血症に対しては、ドキシサイクリンやセフトラジウムに代表されるテトラサイクリン系および第三世代セフェム系抗生物質の併用療法が行われている。これら本菌に有効な抗生物質の投与時期と救命率の間には関連性が認められており、適切な抗生物質の早期投与は救命率の上昇に直結することが明らかにされている。しかしながら、敗血症型は創傷感染型と異なり目立った外傷が無い上、本感染症に特徴的な初期症状も無いこと、発症から死に至るまでの時間が極めて短時間で、かつ急激な経過を辿ること、本菌の同定には培養が必要で時

間を要すること等の理由から、適切な抗生物質の投与は遅れがちとなり、救命を妨げる大きな要因となっている。したがって、適切な抗生物質の早期投与を実現するために、臨床検体からの本菌の高感度・迅速同定法の開発は重要研究課題の一つである。現在では、LAMP法を用いた本菌の同定法が報告されており(44)、医療現場での実用化が期待される。

本感染症は致死性の感染症であるため注目度は高く、解決すべき謎が多く残されている。まず、ハイリスクグループにおける発症率の低さである。本菌の感染患者の約8割は何らかの肝疾患を抱えており、更にその約8割が肝硬変などの慢性肝疾患患者である(16)。それ故、肝疾患患者は本感染症のハイリスクグループであるとされている。その一方で、慢性肝疾患患者数に比較して本菌の感染者数は極端に少なく、慢性肝疾患というリスクファクターのみではこの隔たりを説明できない。この事実、未だ我々の気付いていない本感染症のリスクファクターが慢性肝疾患患者に存在する可能性を示唆している。

第二に、病原株(臨床分離株)の由来についてである。Buchrieserらは、3個のカキから118株の*V. vulnificus*を分離してゲノムプロファイルを行った結果、1株として同じ株が存在しなかったと報告している(5)。一方で、一人の感染患者から複数の菌株が分離されることはない(62)。ヒトに感染し症状をおこした病原株(臨床分離株)は、元来、環境中に存在していた「環境株」であったはずである。では、環境中に存在する全ての*V. vulnificus*が病原株になり得るのか?あるいは、環境中に存在するある菌株のみが病原株で

Takashige KASHIMOTO
Current status and future prospects in a pathogenic study of *Vibrio vulnificus*
Laboratory of Veterinary Public Health, Kitasato University School of Veterinary Medicine, 35-1, Higashi 23, Towada-shi, Aomori 034-8628

あったのか？また、そうであった場合、何%が病原株で、どのようにしてそれらが生み出されたのか未だ明らかにされていない。これらの疑問に答えるには、病原株の疫学マーカーが有用であるが、現時点では、本菌がヒトに感染して、病気を起こすために必要（あるいは重要）な、病原株にしか存在しない因子は発見されておらず (59, 63), 病原性マーカーとして使用できるものは報告されていない。

本菌は遺伝的多様性を有しているが、その獲得機構は、*Vibrio* 属菌が2本の環状ゲノムを有することから次のように考えられている。*V. vulnificus* を含めた *Vibrio* 属菌の有する2本の環状ゲノムのうち、クロモソーム1には主に生育に必要な遺伝子がコードされており、いずれの菌種でも3 MB 程度とサイズに大きな差は無く、多様性も低いと思われる (15, 36)。一方、クロモソーム2には環境変化への適応や病原性に関する遺伝子がコードされており (36), 各菌種間でサイズに違いが認められる。ゲノムを2本に分割し、一方に生育に必須の遺伝子を集約し、他方には適応等の直接、生育に関与しない遺伝子を集約するという *Vibrio* 属菌に共通のこのゲノム形態は、菌種間の遺伝子のやり取りが成立する可能性を高め、多様性獲得の効率化に役立っているように思える (61)。*Vibrio* 属菌は、いずれも生息域が類似していることから遺伝子のやり取りが起こり易いであろうし、同一菌種間では更にその確率は高くなると思われる。

2. *V. vulnificus* の病原性研究

他の病原細菌と同様、*V. vulnificus* 感染症の有効な治療法を開発する上で、症状に関与する個々の病原因子を同定し、その機能を明らかにして対策を昂めることは重要である。加えて、本感染症は敗血症により死亡することから、本菌がいかにして感染者体内において短時間内に増殖・拡散し得るのか、その機構を明らかにすることも *V. vulnificus* の病

原性解明と本感染症の治療法開発の礎として重要である。ひと口に増殖・拡散機構と言ってもその観点は様々であるが、大きく分けてそのアプローチは *V. vulnificus* の栄養代謝やクオラムセンシング機構、分裂機構など細菌学的見地からの研究と対宿主反応の研究に二分できる。本症の全貌を明らかにするには、最終的にこれらの研究成果が有機的つながりを持って解釈されることが必要である。

本菌の病原因子あるいは病原因子と考えられるものは未だ数少なく、またその役割も明らかでないものが多い。以下に、これまでに明らかにされた病原因子（機構）を出来る限り病態や作用の側面から取りまとめて概説する。

3. 宿主免疫機構に関与する因子

1) Capsular polysaccharide (CPS)

本菌は、感染後短時間内に患者体内で増殖・拡散するという特徴を持つことから、宿主の先天性免疫機構を攪乱あるいは回避する機構を備えていると考えられている。この機構を明らかにし、宿主優位な免疫反応へと傾けることができれば、感染初期における菌の排除に役立つと思われる。

これまでに報告された病原因子および病原因子と目されるもののうち、病原性との関連が最も明らかにされているのが CPS である。CPS は莢膜を構成する多糖で、10 種を超える血清型が報告されている。莢膜の有無は、寒天培地に生育したコロニーから知ることができる。コロニーが不透明である場合は莢膜保有株、半透明である場合は無莢膜株で、前者は病原性を有し、後者には病原性が無いとされている (58, 73)。莢膜保有株は貪食細胞の食作用から逃れることが知られており、この能力は本菌の感染者体内での増殖・拡散機構の大きな部分を占めていると思われる (65, 73)。筆者らは *V. vulnificus* の臨床分離株（莢膜保有株）5 株と環境分離株（無莢膜株）4 株を用いて、マウスマクロ

図1. *In vivo* におけるマクロファージへのアポトーシス誘導

V. vulnificus K44 株（莢膜保有株）、*V. vulnificus* R41（無莢膜株）、大腸菌 DH5α をそれぞれマウスに皮下接種し、一定時間（0, 3, 6 hrs）、マウス体内で菌の増殖を促した後、腹腔マクロファージを回収して TUNEL 法によりアポトーシス細胞を検出した。A は各時間帯における TUNEL 陽性率を、B は菌接種3時間後のマウス腹腔マクロファージの PI および TUNEL 染色像を示している。K44 株を接種したマウスの腹腔マクロファージでは、アポトーシスに特徴的な TUNEL 陽性の断片化した核染色像が認められる。（文献7より改変）（図1～3 オンラインジャーナル J-Stage ではカラー掲載となります）。

ファージ細胞株であるJ774細胞に対するアポトーシス誘導能を比較し、臨床分離株の方が環境分離株よりもマクロファージに対するアポトーシス誘導能が有意に高いことを示した(20)。さらに、臨床分離株と環境分離株をそれぞれマウスに皮下接種し、一定時間マウス体内での増殖を促した後、マウスから腹腔マクロファージを回収して TUNEL 法によりアポトーシス細胞を検出した結果、臨床分離株は *in vivo* においてもマクロファージに対してアポトーシス誘導能を持つことを明らかにした(20)(図1)。土屋らも、マウスを用いた感染実験において、*V. vulnificus* 臨床分離株がマクロファージ数を減少させること、およびマクロファージと *V. vulnificus* 臨床分離株を同時にマウス腹腔へ接種することでマウスの生存率が改善することを示し、*V. vulnificus* 感染におけるマクロファージの重要性を明らかにしている(64)。これらの報告から、*V. vulnificus* は莢膜により食細胞の貪食から逃れるだけでなく、積極的に食細胞をアポトーシスに陥れることで感染者体内での増殖・拡散を有利にし

ているものと考えられる。

また、*V. vulnificus* 臨床分離株は、マクロファージに加えリンパ球の急激なアポトーシスをも引き起こす(21)。筆者らは、マウスに本菌を皮下接種すると T・B リンパ球数が減少すること、およびこのリンパ球数の減少と血中菌数の上昇が時間的に一致することを明らかにした。この際、脾臓および胸腺においては濾胞領域の萎縮が認められ、脾臓および胸腺細胞にアポトーシスに特徴的な DNA ラダーが検出される(図2)。本菌のマウス実験感染モデルにおいて、CPSとLPSの両方がTNF- α の産生を誘導することが明らかにされていることから(49)、マウス実験感染モデルで認められたリンパ球のアポトーシスは、感染に反応して産生されるTNF- α によって引き起こされるものと思われる。

本菌の増殖に伴って認められるリンパ球の急激なアポトーシスはサイトカインの放出および急性炎症を反映していると思われることから、全身状態の悪化へとつながる重要な初期サインである。

図2. *In vivo* におけるリンパ球へのアポトーシス誘導

V. vulnificus K44 株(莢膜保有株)、大腸菌 DH5 α をそれぞれマウスに皮下接種し、3時間おきにリンパ球数と好中球数を計測した(A, B)。□は大腸菌 DH5 α 、●は *V. vulnificus* K44 株接種群を示す。*V. vulnificus* K44 株の接種により、リンパ球数は減少するが(A)、好中球数には影響がない(B)。菌接種9時間後における脾臓のヘマトキシリンエオジン染色像(C)。a, bの点線で囲まれた部分は白脾髄(濾胞)を示している。*V. vulnificus* を接種したマウスにおいて、濾胞の著しい萎縮が認められる。c, dは同切片の高倍率像。dの矢頭は、マクロファージがアポトーシス細胞を貪食した際に認められる starry sky 像を示す。a, bの白線は100 μ m、c, dでは40 μ mを示す。*V. vulnificus* K44 株の接種による胸腺および脾細胞のアポトーシス。菌接種後、3時間から、*V. vulnificus* K44 株を接種したマウスの胸腺および脾細胞にのみ、アポトーシス細胞に特徴的な DNA ラダーが検出される。(文献9より改変)

4. 宿主感受性に関与する因子

1) 鉄獲得機構

本菌による敗血症患者はアルコール依存症、ヘモクロマトーシス、急性・慢性肝炎、肝硬変等の慢性肝疾患を有する例が多く、これらの疾患は体内鉄量を増加させることが知られている。すなわち、本感染症は鉄代謝異常を示す患者に発生が多く認められる日和見感染症であり(68)、本菌の増殖や病原因子の発現は他の菌と比較して鉄への依存性が高いとされている(24)。実験的にも、健康なマウスに本菌を腹腔内接種した場合、半数致死量は 10^6 CFU/匹程度であるが、マウスにデキストラン鉄などの鉄製剤を接種して鉄負荷状態にすると、半数致死量は約1 CFU/匹へと劇的に低下することが知られている(70)。生体内の鉄の99%以上はヘモグロビン、ミオグロビン、フェリチンなどの鉄結合性タンパク質と結合した状態で存在し、自由鉄は極めて少ない。このため、多くの病原細菌はこれらの鉄結合性タンパク質よりも鉄に対する親和性の高い鉄結合性化合物(シデロフォア)を産生し、宿主の鉄結合性タンパク質から鉄を奪い増殖に利用している(45)。本菌においても、ブルニバクチンと呼ばれるシデロフォアを産生してトランスフェリンなどから鉄を奪い、ブルニバクチン受容体であるVuuAを介して鉄を菌体内に取り込んで利用している(67)。健康人の血清(トランスフェリンの鉄飽和度 約30%)およびヘモクロマトーシス患者(トランスフェリンの鉄飽和度 84–95%)の血清中で本菌の増殖性を比較すると、健康人の血清中で本菌は増殖しないが、ヘモクロマトーシス患者の血清中では増殖がみられる(6)。同様に、Morrisら(43)は環境分離株と臨床分離株をそれぞれ8株ずつ集め、30%および100%鉄飽和状態のトランスフェリン存在下で本菌の増殖性を比較した結果、30%飽和トランスフェリンの存在下ではいずれの株も増殖しなかったが、100%飽和トランスフェリン存在下では環境分離株2株と臨床分離株6株が増殖したと報告している。これらの事実が示すように、トランスフェリンの鉄飽和度と本菌の増殖には明らかな関連性が認められ、本菌はトランスフェリンの鉄飽和度がおおよそ50%以上に達すると増殖可能とされている(4)。また、*in vitro*の実験ではあるが、本菌の増殖初期にはトランスフェリンなどの鉄結合性タンパク質に結合した鉄よりも、むしろ自由鉄が利用されとの報告もある(24)。いずれにしても、鉄過剰を呈する疾患では一般的に血清中の自由鉄濃度および鉄結合性タンパク質の鉄飽和度ともに上昇するため、本菌が増殖しやすい環境にあり、体内鉄濃度の上昇が本感染症のハイリスクファクターとなることは間違いない。また、鉄過剰症の治療には鉄キレート剤であるデフェロキサミンが使用されるが、本菌はデフェロキサミン受容体としてDesAを産生分泌し、デフェロキサミンによりキレートされた鉄を菌体内に取り込んで利用することが知られている(26)。鉄過剰症は本感染症のリスクファクターとなるが、デフェロキサミンによる鉄過剰症の鉄

キレート療法もまたリスクファクターとなる可能性がある。

5. 細胞・組織傷害因子

1) *Vibrio vulnificus* hemolysin (VVH)

VVHをコードする遺伝子である*vvhA*は、本菌を同定する際のマーカー遺伝子としても用いられている*V. vulnificus*固有の遺伝子である。VVHは、1981年に米国のKregerとLockwood(31)によって最初の報告がなされた。当初、VVHのマウスにおける半数致死量がi.v.において3 µg/kgと低いため、致死に関与する病原因子としての可能性も指摘されたが(11)、後に、各種哺乳動物の赤血球に対する溶血活性(48, 56, 72)の他、モルモットの皮膚血管透過性の亢進作用(31)、多種多様な細胞への傷害活性(9, 28)やアポトーシス活性(19, 32, 75)等、VVHには多彩な作用が報告され、VVHの病原性への役割は混沌としてきた。そのようなさなか、WrightおよびMorris(69)やFanら(9)は、*V. vulnificus*野生株および*vvhA*遺伝子欠損株をそれぞれマウスの腹腔内に接種した実験において、両株のマウス半数致死量に差が認められないことを見出し、VVHはマウスにおける本菌の病原性に関与しないと結論付けた。しかしながら、この報告は、VVHが*V. vulnificus*の腹腔内投与によるマウスの致死性に関与していないことを明らかにしたものであり、易感染性宿主における致死性やその他の病原性への関与を否定したものではない。VVHの病原性への関与が主張されている理由として、VVHが上述したような多岐にわたる強い毒性を持っていること、実験動物体内でVVHの発現が認められること(13)、および、患者血清中にVVHに対する抗体が検出されること(12)が挙げられる。今以ってVVHの病原性への関与は論争中であるが、本菌のライフサイクルあるいは病原性にVVHが何らかの役割を持っていることは間違いないと思われる。

VVHは細胞膜にモノマーの状態で結合し、細胞膜の流動性によってオリゴマー化して孔を形成する孔形成毒素である(71)。VVHはコレステロールと*in vitro*で混合すると、コレステロールの濃度依存性にオリゴマー化する(23, 27)。コレステロールとプレインキュベートされたVVHは細胞傷害活性を失い不活化されることから、VVHの細胞膜受容体はコレステロールであると考えられている(57, 74)。妹尾ら(51)は、4か所のアミノ酸の相違により、VVHをType I, Type II, およびType II variantに分けてType間のコレステロールによる不活化の程度を比較した結果、438番目のアミノ酸がコレステロールによる不活化に関与することを示唆している。筆者ら(22)は、VVHとアミノ酸レベルで28%の同一性を持ち、既に立体構造が明らかにされている*Vibrio cholera* cytotoxin をテンプレートとしてホモロジーモデリングによりVVHの立体構造を予測し、VVHがβ-トレフォイルレクチンドメインとポアフォーミングドメインの2つのドメインからなり、それらがshort α-helixを介して繋がっていることを明らかにした(図3A)。加えて、この

図3. *V. vulnificus* hemolysin (VVH) の予測立体構造と 334 残基目フェニルアラニンの重要性
ホモロジーモデリングによる VVH の予測立体構造 (A)。VVH は、レクチンドメインとポアフォーミングドメインからなっている。四角の枠は、ドメイン間を繋ぐ short α -helix を示す。334 残基目フェニルアラニンは、short α -helix 上に位置し、その側鎖はポアフォーミングドメインの β -strands の内側に入り込むように存在している (B)。334 残基目フェニルアラニンを側鎖に芳香環を持たないイソロイシン、アラニンに置換すると細胞変性効果および細胞致死活性はほぼ消失するが、側鎖に芳香環を持つチロシンやトリプトファンへの置換では、両活性とも残存する (C, D)。(文献 50 より改変)

short α -helix 上に存在する 334 番目のフェニルアラニン側鎖に存在するベンゼン環が VVH の構造維持に重要で、このフェニルアラニンをイソロイシンやアラニンなどの側鎖に芳香環を持たないアミノ酸に置換すると、VVH は細胞への結合能を保持したまま、オリゴマー化能を完全に失い、結果として細胞致死活性が消失することも見出した (22) (図 3B, C, D)。また、VVH のレクチンドメイン内には糖鎖結合モチーフも保存されており、その働きにも興味を持たれるところである (14, 22)。

VVH の構造機能相関の全貌は未だ明らかにされていないが、上述のように、我々のグループを含めた数グループによりドメイン構造や活性に重要なアミノ酸が報告され始めており、今後の発展が期待される。

2) VvpE

VvpE は Type II 分泌システムにより菌体外に分泌されるサーモリシンファミリーの Zn プロテアーゼで (40, 47), C 末端ドメインには細胞への結合, N 末端ドメインには酵素

作用がそれぞれ担われている (41)。VvpE はハーゲマン因子を活性化し、プレカリクレインからのカリクレインの生成を促進して、ブラジキニンの遊離を引き起こすことにより血管透過性を亢進させ浮腫を生じさせる (38, 42)。ブラジキニンの阻害により *V. vulnificus* の腹腔内から血管内への拡散が抑制されることから、VvpE は本菌の感染者体内での拡散機構に重要とされている (37)。さらに、VvpE は基底膜を構成する主要コラーゲンであるタイプ IV コラーゲンの分解作用も有することから、局所における組織傷害への関与も報告されている (39)。本菌の増殖には鉄を必要とすることから、プロテアーゼである VvpE がヒトヘモグロビンを分解してヘモグロビンからヘムを遊離させ、自ら産生するシデロフォアにより鉄分を獲得するという作用も報告された。しかし、現在では、VvpE の鉄獲得作用への関与は否定的に捉えられている (25, 55)。一方で、*vvpE* の転写と発現は鉄により調節されることが明らかにされており、*vvpE* 発現のタイミングという観点から、体内環境中の鉄濃

度との関連に興味を持たれている (60)。VvpE は VVH と同様、*vvpE* 欠損株の健常マウスへの腹腔内接種実験により、親株の半数致死量と差がないことが示されており、マウス致死性に関与しないと結論付けられている (52)。しかし、この結論は VVH と同様の理由から、現時点では実験事実を受け止めるに留めるべきであると考えられる。

3) RtxA1

RtxA1 は、*vvhA* および *vvpE* のダブルノックアウト株に細胞傷害作用が残っていることからクローニングされた因子である (29)。RtxA1 は 359 アミノ酸からなる分子量 501 kDa の巨大なシングルポリペプチド毒素で、細胞とのコンタクト依存性に分泌され、細胞傷害活性やマウス致死活性を持っている (29, 33)。C 末端には、RTX family 毒素に特徴的な GD (グリシン、アスパラギン酸)-rich repeat が存在する (35)。RTX family 毒素は、本菌以外にも *Vibrio cholerae* を含む多くのグラム陰性菌から分泌される (8)。*V. vulnificus* の RtxA1 は、*V. cholerae* RtxA の 1963–2419 および 3204–4095 アミノ酸残基において類似性を欠いている (54)。これらの類似性を欠いている二つのドメインのうち、N 末端側のドメインは Actin cross rinking domain (ACD) と呼ばれ、宿主細胞の細胞骨格形成タンパク質であるアクチンを共有結合によりクロスリンクし、*V. cholerae* Rtx の持つ細胞のラウンディング活性に関与している (10)。*V. vulnificus* の RtxA1 はこのドメインを欠いているため、宿主細胞のアクチンをクロスリンクする作用は無い (54)。最近、*V. vulnificus* の RtxA1 において、宿主細胞のアクチン重合の調節分子として知られる低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho を不活化する Rho inactivation domain (RID) の存在が明らかにされた (53)。RID による Rho 不活化作用の詳細は解明されていないが、RID は *V. cholerae* Rtx にも保存されているため、細胞ラウンディング活性へどのように関与しているのか報告が待たれている。

Kim ら (29) は、*rtxA1*、*vvhA* および *vvpE* のノックアウト株を用い、LDH の漏出を指標として HeLa 細胞に対する細胞傷害性試験を行った。MOI を 20 とした時、*rtxA1* ノックアウト株の細胞傷害作用は野生株の 20% 程度にまで低下した (29)。*rtxA1* に加え、*vvhA* をノックアウトすると、残存していた 20% の細胞傷害性は完全に消失し、HeLa 細胞へ接種後、少なくとも 5 時間まで LDH の漏出は認められなかった (29)。これらの結果から、RtxA1 は本菌の持つ培養細胞への細胞傷害因子として主要な役割を担っており、VVH は補助的な役割を持つと考えられている。また、*rtxA1* ノックアウト株のマウス半数致死量は親株と比較して 100 倍以上上昇することが報告されており (29)、*in vivo* においても RtxA1 は何らかの働きを持つものと思われる。現在のところ、*in vitro* におけるアクチン細胞骨格のダウンレギュレーションとマウス致死活性を繋ぐ実験的証拠は報告されていない。

6. 細胞への定着

1) Flagella

本菌の Flagella と病原性に関する報告は少ない。しかし、motility は病原性を考える上で無視できないもののひとつであるので、現状を記しておく。

V. vulnificus の Flagella と病原性に関する報告は、Kim らが最初である。Kim らは、*vvhA* と *vvpE* のダブルノックアウト株を親株としたトランスポゾンライブラリーから、1600 株をスクリーニングすることで HeLa 細胞への定着性が低下した変異株を得た (50)。この変異株のトランスポゾン挿入部位を解析した結果、トランスポゾンは Flagella オペロン内に存在する *flgC* の ORF 中に挿入されていた。*Vibrio* 属の Flagella オペロンは高度に保存されており、関連遺伝子は、上流から *flgBCDEFGHIJ* と並んでいる (図 4A)。オペロンの上流から 2 番目に位置している *flgC* へのトランスポゾンの挿入変異は、polar effect により下流の flagella 構成遺伝子の発現にも影響を及ぼしていたと考えられる。*FlgC* は Flagella rod の構成タンパク質ではあるが (図 4B)、彼らの作製した *flgC* 変異株は flagella basal body や hook の構成タンパク質も発現しておらず、Flagella 欠損株であったと思われる。実際、軟寒天上での swimming motility も欠落している (50)。彼らは、*flgC* 変異株の *in vivo* における役割を探索するため乳のみマウスへの感染実験を行い、*flgC* 変異株のマウス半数致死量は野生株と比較して約 1000 倍上昇したと報告している (50)。Lee ら (34) は *flgE* 欠損による Flagella 欠損株を作出し、INT-407 細胞への定着性が低下することを示すとともに、*flgE* 欠損株の鉄過剰負荷マウスに対する半数致死量も算出している。7 週齢マウスにデキストラン鉄を腹腔内接種した後、野生株あるいは *flgE* 変異株を皮下

図 4. *V. vulnificus* Flagella オペロンと各遺伝子の情報
Flagella オペロン内の各遺伝子の配置 (A)。各遺伝子のコードするタンパク質名とアミノ酸残基数、および腸炎ビブリオにおけるホモログとのアミノ酸レベルでの同一性 (B)。(文献 70 より改変)

接種すると、*flgE* 変異株のマウス半数致死量は野生株のそれと比較して約 5000 倍にも上昇している (34)。Kim らと Lee らの報告は、実験系に多少の違いはあるものの、いずれも本菌の Flagella 欠損株が他の多くの細菌と同様、細胞への定着因子として働き、*in vivo* においても細胞や組織への定着性に関与していることを示唆するものである。

2) NanA

NanA は *V. vulnificus* の細胞との相互作用に直接関与するタンパク質ではないが、*nanA* 変異株の INT-407 細胞への定着性は野生株の半数程度に落ちることが知られている (18)。NanA は N-アセチルノイラミン酸をピルビン酸と N-アセチルマンノサミンへ分解する酵素で、生じたピルビン酸はエネルギー源としてクエン酸回路へ、また、N-アセチルマンノサミンは最終的に UDP-GlcNac となってそれぞれ細胞壁合成などに利用される (66)。したがって、NanA は環境中の N-アセチルノイラミン酸を利用するための初発の酵素ということになる。Jeong ら (18) によると、本菌の *nanA* ノックアウト株は、1) 野生株の持つ N-アセチルノイラミン酸分解能をほぼ完全に失う、2) コロニーが半透明化する、3) INT-407 細胞への定着性が落ちる、4) INT-407 細胞への細胞傷害性が低下する、5) マウス半数致死量が野生株と比較し約 1000 倍上昇する、6) マウス腸管でのコロナイゼーションが野生株の 100 倍程度に低下する等の多彩な表現系を示す。*nanA* 変異株は代謝系変異株であるので、あらゆる表現型が影響を受ける事実は理解し難いものではない。腸管上皮細胞の表層は粘液層で覆われており、粘液の主成分は杯細胞から分泌されたムチンと考えられている。腸内細菌は腸管内でムチンを分解することにより糖を得て、エネルギー源として利用していることから (1)、おそらく本菌の *nanA* 変異株においても腸管腔内のムチンに含まれる N-アセチルノイラミン酸を分解することが出来ず、糖代謝に異常をきたしているものと考えられる。本菌の *nanA* 変異株と同様に、大腸菌の *nanA* 変異株においてもマウス腸管でのコロナイゼーションの低下が認められている (7)。*V. vulnificus* では明らかにされていないが、大腸菌の腸管でのコロナイゼーションは、唯一、糖代謝異常のみに影響を受け、リン脂質、アミノ酸、TCA サイクル、ペントースリン酸経路の変異によっては影響を受けないことが明らかにされている (7)。腸管腔は *V. vulnificus* の感染門戸と考えられているため、腸管でのコロナイゼーションに重要なエネルギー源を明らかにすることは、*V. vulnificus* の侵入・感染機構の解明に大きく貢献するだけでなく、侵入以降の感染者体内での動態を予測する手立てにもなると思われる。これまでに、本菌の栄養代謝と病原性の関連を調べた報告はほとんどない。本菌は 2-3% 程度の食塩を至適塩濃度とする低塩好塩細菌であり、海水や汽水域に生息している。これらの生息域から人体へ感染すると、取り巻く環境の変化に合わせ、自らの生存に必要なもの、あるいはより効率的なものを求め、栄養代謝や遺伝子発現を変化させることが充分に考えられる。そのためには、違いを感知す

るセンシング機構、感知したシグナルを伝えるシグナル伝達機構、入ってきたシグナルに合わせて応答する応答機構などが *V. vulnificus* に存在するはずである。本菌が、鉄濃度や菌濃度以外に、本来の生息域とは異なる「何か」を感知し生存のための手を打つとすれば、増殖の要である栄養代謝を病原性に着目しながら解析することも必要と思われる。

7. 病原性研究の問題点と今後の展望

V. vulnificus の病原性研究は、研究に参画するグループの増加とともに進捗速度も速まり、報告数も増えている。しかし、個々の研究成果はそれぞれ特化し独立している感があり、有機的繋がりを持って理解できるまでに至っていないのが現状である。全体像が理解できるようになるには、もう少しばかり時間を要すると思われるが、それに向けて解決しなければならない研究上の問題点も多く残されている。最も大きな問題点は、適切な実験動物モデルが存在しないことである。ヒトの感染例で認められる血腫や四肢の壊死等の特徴的な臨床症状は実験動物を用いて完全に再現できておらず、また、実験動物を用いた経口感染の成功例も一握りである。したがって、それらに関与する菌体因子の同定も困難を極めている。現在、最も多く感染実験に使用されている実験動物はマウスであるが、ヒトの感染例の約 8 割が肝硬変などの慢性肝疾患に付随して起こっているにも関わらず、健康なマウスや健康なマウスに鉄を過剰に接種しての感染実験が繰り返されている。慢性肝疾患が体内鉄濃度の上昇を招くことは周知の事実であるが、健康なマウスへの鉄の過剰負荷はそれだけでフェントン反応を介した細胞傷害や組織傷害等を引き起こすであろうし、少なくとも肝臓は正常であるので肝疾患モデルにはなり得ず、忠実にヒトの感染例を再現出来ているとは思えない。おそらく、*V. vulnificus* 研究に携わっている多くの研究者が動物実験に疑問を持ちながらも、一定の情報を得るために行っているというのが現状ではなかろうか。今後、適切な実験動物モデルが開発されれば、本菌の病原性研究は飛躍的に進むと予想される。

本菌は日和見感染菌であるので、健康なヒトにはほとんど感染せず、強い病原性も発揮しない。しかし、ひとたび基礎疾患を持つヒトが本菌による敗血症に陥った場合、組織の壊死を伴う激しい症状が短時間内に進行し死に至る。筆者の私見ではあるが、この相反するような本菌の特徴のうち、短時間内に進行する激しい症状と高い死亡率とが注目されるあまり、本菌が日和見感染菌であることが置き去りにされはしないか憂慮している。日和見感染菌の研究においては、宿主要因に左右されない強い病原性を持つ他の病原細菌と同様の研究手法では、日和見感染菌に特有の病原因子（機構）を見落としてしまう可能性がある。*V. vulnificus* の病原性研究を行う際には本菌が日和見感染菌であることを常に念頭に置き、病原性研究が誤った方向へ進んでしまうことが無いよう、宿主要因を意識しながら研究に当たるべきと考えている。

表 1. *V. vulnificus* YJ016 株のゲノムおよびプラスミドデータ

	Chromosome 1	Chromosome 2	pYJ016
Size (bp)	3,354,505	1,857,073	48,508
Sequencing reads	52,017	33,810	2,690
G C percentage	46.4	47.2	44.9
Total number of ORFs	3,262	1,697	69
Average ORF size (bp)	912	989	659
Percentage coding	88.7%	90.3%	89.8%
Number of rRNA operons	8	1	0
Number of tRNAs	100	12	0

YJ016株は、3.35 MBと1.85 MBのゲノムおよび48.5 kb プラスミドを持っている。データベース上では、それぞれのシーケンス情報がオープンにされており、BLASTやFASTA searchも可能であるので効果的に活用したい。(文献66より)

補足；ゲノム情報

現在、CMCP6 (Genbank accession numbers NC. 005139, NC. 005140) および YJ016 (Genbank accession numbers NC. 004459, NC. 004460) のゲノム解析が完了し、情報が公開されている(8)。両株ともに、*V. parahaemolyticus* や *V. cholerae* と同様、2本の環状ゲノムを持っており、YJ016ではこれに加えプラスミドも持っている(8)。YJ016のクロモソーム1は3.35 MBで、Open reading frame (ORF) 数は3,262、クロモソーム2は1.86 MBで、1,697のORF数が存在している(8)(表1)。データベースを用いて、各遺伝子のDNA配列や予想アミノ酸配列が入手可能であるほか、BLAST解析やFASTA searchも可能である。これら2株のゲノム情報を有効に活用し、病原性解明に役立てたい。

文 献

- Almagro-Moreno, S., Boyd, E.F. (2009): Sialic acid catabolism confers a competitive advantage to pathogenic *Vibrio cholerae* in the mouse intestine. *Infect. Immun.* **77**, 3807–3816.
- Blake, P.A., Merson, M.H., Weaver, R.E., Hollis, D.G., Heublein, P.C. (1979): Disease caused by a marine vibrio. *Clinical characteristics and epidemiology.* *N. Engl. J. Med.* **300**, 1–5.
- Blake, P.A., Weaver, R.E., Hollis, D.G. (1980): Diseases of humans (other than cholera) caused by *Vibrios*. *Annu. Rev. Microbiol.* **34**, 341–367.
- Brennt, C.E., Wright, A.C., Dutta, S.K., Morris, J.G. Jr. (1991): Growth of *Vibrio vulnificus* in serum from alcoholics: association with high transferrin iron saturation. *J. Infect. Dis.* **164**, 1030–1032.
- Buchrieser, C., Gangar, V.V., Murphree, R.L., Tamplin, M.L., Kaspar, C.W. (1995): Multiple *Vibrio vulnificus* strains in oysters as demonstrated by clamped homogeneous electric field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1163–1168.
- Bullen, J.J., Spalding, P.B., Ward, C.G., Gutteridge, J.M. (1991): Hemochromatosis, iron and septicemia caused by *Vibrio vulnificus*. *Arch. Intern. Med.* **151**, 1606–1609.
- Chang, D.E., Smalley, D.J., Tucker, D.L., Leatham, M.P., Norris, W.E., Stevenson, S.J., Anderson, A.B., Grissom, J.E., Laux, D.C., Cohen, P.S., Conway, T. (2004): Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 7427–7432.
- Chen, C.Y., Wu, K.M., Chang, Y.C., Chang, C.H., Tsai, H.C., Liao, T.L., Liu, Y.M., Chen, H.J., Shen, A.B., Li, J.C., Su, T.L., Shao, C.P., Lee, C.T., Hor, L.I., Tsai, S.F. (2003): Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res.* **13**, 2577–2587.
- Fan, J.J., Shao, C.P., Ho, Y.C., Yu, C.K., Hor, L.I. (2001): Isolation and characterization of a *Vibrio vulnificus* mutant deficient in both extracellular metalloprotease and cytolysin. *Infect. Immun.* **69**, 5943–5948.
- Fullner, K.J., Mekalanos, J.J. (2000): In vivo covalent cross-linking of cellular actin by the *Vibrio cholerae* RTX toxin. *EMBO J.* **19**, 5315–5323.
- Gray, L.D., Kreger, A.S. (1985): Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **48**, 62–72.
- Gray, L.D., Kreger, A.S. (1986): Detection of anti-*Vibrio vulnificus* cytolysin antibodies in sera from mice and a human surviving *V. vulnificus* disease. *Infect. Immun.* **51**, 964–965.
- Gray, L.D., Kreger, A.S. (1989): Detection of *Vibrio vulnificus* cytolysin in *V. vulnificus*-infected mice. *Toxicon.* **27**, 439–464.
- Hazes, B. (1996): The (QxW)3 domain: a flexible lectin scaffold. *Protein Sci.* **5**, 1490–1501.
- Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L., Gill, S.R., Nelson, K.E., Read, T.D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M.D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R.D., Nierman, W.C., White, O. (2000): DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**, 477–483.
- Inoue, Y., Ono, T., Matsui, T., Miyasaka, J., Kinoshita, Y., Ihn, H. (2008): Epidemiological survey of *Vibrio vulnificus* infection in Japan between 1999 and 2003. *J. Dermatol.* **35**, 129–139.
- 石倉宏恭 (1999) : ビブリオ感染症. 救急医学 **23**, 442–443.
- Jeong, H.G., Oh, M.H., Kim, B.S., Lee, M.Y., Han, H.J., Choi, S.H. (2009): The capability of catabolic utilization of N-acetylneuraminic acid, a sialic acid, is essential for *Vibrio vulnificus* pathogenesis. *Infect. Immun.* **77**, 3209–3217.
- Kashimoto, T., Ueno, S., Ehara, H., Fukudome, S., Komai, M., Susa, N. (2009): Oligomerization is essential for apoptotic activity of *Vibrio vulnificus* hemolysin. *J. Vet. Med. Sci.* **71**, 1403–1406.
- Kashimoto, T., Ueno, S., Hanajima, M., Hayashi, H., Akeda, Y., Miyoshi, S., Hongo, T., Honda, T., Susa, N. (2003): *Vibrio vulnificus* induces macrophage apoptosis in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* **71**, 533–535.
- Kashimoto, T., Ueno, S., Hayashi, H., Hanajima, M., Yoshioka, K., Yoshida, K., Mutoh, K., Susa, N. (2005): Depletion of lymphocytes, but not neutrophils, via apoptosis in a murine model of *Vibrio vulnificus* infection. *J. Med. Microbiol.* **54**, 15–22.
- Kashimoto, T., Ueno, S., Koga, T., Fukudome, S., Ehara, H., Komai, M., Sugiyama, H., Susa, N. (2010): The aromatic ring of phenylalanine 334 is essential for oligomerization of *Vibrio vulnificus* hemolysin. *J. Bacteriol.* **192**, 568–574.
- Kim, B.S., Kim, J.S. (2002): Cholesterol induce oligomerization of *Vibrio vulnificus* cytolysin specifically. *Exp. Mol. Med.* **34**, 239–242.
- Kim, C.M., Park, R.Y., Choi, M.H., Sun, H.Y., Shin, S.H. (2007): Ferrophilic characteristics of *Vibrio vulnificus* and potential usefulness of iron chelation therapy. *J. Infect. Dis.* **195**, 90–98.
- Kim, C.M., Park, R.Y., Park, J.H., Sun, H.Y., Bai, Y.H., Ryu, P.Y., Kim, S.Y., Rhee, J.H., Shin, S.H. (2006): *Vibrio vulnificus* vulnibactin, but not metalloprotease VvpE, is essentially

- required for iron-uptake from human holotransferrin. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 911–918.
- 26) Kim, C.M., Park, Y.J., Shin, S.H. (2007): A widespread deferroxamine-mediated iron-uptake system in *Vibrio vulnificus*. *J. Infect. Dis.* **196**, 1537–1545.
 - 27) Kim, H.R., Rho, H.W., Jeong, M.H., Park, J.W., Kim, J.S., Park, B.H., Kim, U.H., Park, S.D. (1993): Hemolytic mechanism of cytolysin produced from *V. vulnificus*. *Life Sci.* **53**, 571–577.
 - 28) Kim, J.S., Chae, M.R., Chang, K., Park, K.H., Rho, H.W., Park, B.H., Park, J.W., Kim, H.R. (1998): Cytotoxicity of *Vibrio vulnificus* cytolysin on rat peritoneal mast cells. *Microbiol. Immunol.* **42**, 837–843.
 - 29) Kim, Y.R., Lee, S.E., Kook, H., Yeom, J.A., Na, H.S., Kim, S.Y., Chung, S.S., Choy, H.E., Rhee, J.H. (2008): *Vibrio vulnificus* RTX toxin kills host cells only after contact of the bacteria with host cells. *Cell. Microbiol.* **10**, 848–862.
 - 30) Klontz, K.C., Lieb, S., Schreiber, M., Janowski, H.T., Baldy, L.M., Gunn, R.A. (1988): Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections. Clinical and epidemiologic features in Florida cases, 1981–1987. *Ann. Intern. Med.* **109**, 318–323.
 - 31) Kreger, A., Lockwood, D. (1981): Detection of extracellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **33**, 583–590.
 - 32) Kwon, K.B., Yang, J.Y., Ryu, D.G., Rho, H.W., Kim, J.S., Park, J.W., Kim, H.R., Park, B.H. (2001): *Vibrio vulnificus* cytolysin induces superoxide anion-initiated apoptotic signaling pathway in human ECV304 cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 47518–47523.
 - 33) Lee, J.H., Kim, M.W., Kim, B.S., Kim, S.M., Lee, B.C., Kim, T.S., Choi, S.H. (2007): Identification and characterization of the *Vibrio vulnificus* rtxA essential for cytotoxicity in vitro and virulence in mice. *J. Microbiol.* **45**, 146–152.
 - 34) Lee, J.H., Rho, J.B., Park, K.J., Kim, C.B., Han, Y.S., Choi, S.H., Lee, K.H., Park, S.J. (2004): Role of flagellum and motility in pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **72**, 4905–4910.
 - 35) Lin, W., Fullner, K.J., Clayton, R., Sexton, J.A., Rogers, M.B., Calia, K.E., Calderwood, S.B., Fraser, C., Mekalanos, J.J. (1999): Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1071–1076.
 - 36) Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M., Iida, T. (2003): Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* **361**, 743–749.
 - 37) Maruo, K., Akaike, T., Ono, T., Maeda, H. (1998): Involvement of bradykinin generation in intravascular dissemination of *Vibrio vulnificus* and prevention of invasion by a bradykinin antagonist. *Infect. Immun.* **66**, 866–869.
 - 38) Miyoshi, N., Miyoshi, S., Sugiyama, K., Suzuki, Y., Furuta, H., Shinoda, S. (1987): Activation of the plasma kallikrein-kinin system by *Vibrio vulnificus* protease. *Infect. Immun.* **55**, 1936–1939.
 - 39) Miyoshi, S., Nakazawa, H., Kawata, K., Tomochika, K., Tobe, K., Shinoda, S. (1998): Characterization of the hemorrhagic reaction caused by *Vibrio vulnificus* metalloprotease, a member of the thermolysin family. *Infect. Immun.* **66**, 4851–4855.
 - 40) Miyoshi, S., Oh, E.G., Hirata, K., Shinoda, S. (1993): Exocellular toxic factors produced by *Vibrio vulnificus*. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **12**, 253–288.
 - 41) Miyoshi, S., Wakae, H., Tomochika, K., Shinoda, S. (1997): Functional domains of a zinc metalloprotease from *Vibrio vulnificus*. *J. Bacteriol.* **179**, 7606–7609.
 - 42) Molla, A., Yamamoto, T., Akaike, T., Miyoshi, S., Maeda, H. (1989): Activation of hageman factor and prekallikrein and generation of kinin by various microbial proteinases. *J. Biol. Chem.* **264**, 10589–10594.
 - 43) Morris, J.G. Jr., Wright, A.C., Roberts, D.M., Wood, P.K., Simpson, L.M., Oliver, J.D. (1987): Identification of environmental *Vibrio vulnificus* isolates with a DNA probe for the cytotoxin-hemolysin gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 193–195.
 - 44) Nemoto, J., Kojima, T., Kusaba, K., Nagasawa, Z., Oishi, H., Nakashima, M. (2008): Rapid detection of *Vibrio vulnificus* using a loop-mediated isothermal amplification method. *Kansenshogaku Zasshi* **82**, 407–413.
 - 45) Okujo, N., Akiyama, T., Miyoshi, S., Shinoda, S., Yamamoto, S. (1996): Involvement of vulnibactin and exocellular protease in utilization of transferrin- and lactoferrin-bound iron by *Vibrio vulnificus*. *Microbiol. Immunol.* **40**, 595–598.
 - 46) 小野友道, 城野昌義, 古城八寿子 (1999) : *Vibrio vulnificus* 感染症—Empiric therapy の重要性— 臨床皮膚科 **53**, 13–16.
 - 47) Park, J., Ryu, S.Y., Kim, C.M., Shin, S.H. (2008): Two forms of *Vibrio vulnificus* metalloprotease VvpE are secreted via the type II general secretion system. *J. Microbiol.* **46**, 338–343.
 - 48) Park, K.H., Yang, H.B., Kim, H.G., Lee, Y.R., Hur, H., Kim, J.S., Koo, B.S., Han, M.K., Kim, J.H., Jeong, Y.J., Kim, J.S. (2005): Low density lipoprotein inactivates *Vibrio vulnificus* cytolysin through the oligomerization of toxin monomer. *Med. Microbiol. Immunol.* **194**, 137–141.
 - 49) Powell, J.L., Wright, A.C., Wasserman, S.S., Hone, D.M., Morris, J.G. Jr. (1997): Release of tumor necrosis factor alpha in response to *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide in vivo and in vitro models. *Infect. Immun.* **65**, 3713–3718.
 - 50) Ran, K.Y., Haeng, R.J. (2003): Flagellar basal body flg operon as a virulence determinant of *Vibrio vulnificus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 405–410.
 - 51) Senoh, M., Okita, Y., Shinoda, S., Miyoshi, S. (2008): The crucial amino acid residue related to inactivation of *Vibrio vulnificus* hemolysin. *Microb. Pathog.* **44**, 78–83.
 - 52) Shao, C.P., Hor, L.I. (2000): Metalloprotease is not essential for *Vibrio vulnificus* virulence in mice. *Infect. Immun.* **68**, 3569–3573.
 - 53) Sheahan, K.L., Satchell, K.J. (2007): Inactivation of small Rho GTPases by the multifunctional RTX toxin from *Vibrio cholerae*. *Cell. Microbiol.* **9**, 1324–1335.
 - 54) Sheahan, K.L., Cordero, C.L., Satchell, K.J. (2004): Identification of a domain within the multifunctional *Vibrio cholerae* RTX toxin that covalently cross-links actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 9798–9803.
 - 55) Shin, S.H., Sun, H.Y., Park, R.Y., Kim, C.M., Kim, S.Y., Rhee, J.H. (2005): *Vibrio vulnificus* metalloprotease VvpE has no direct effect on the iron-assimilation from human holotransferrin. *FEMS Microbiol. Lett.* **247**, 221–229.
 - 56) Shin, S.H., Sun, H.Y., Choi, M.H., Park, R.Y., Bai, Y.H., Kim, C.M., Kim, S.Y., Kim, Y.R., Lee, S.E., Rhee, J.H. (2005): Inactivation of *Vibrio vulnificus* hemolysin by oligomerization but not proteolysis. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 1294–1297.
 - 57) Shinoda, S., Miyoshi, S., Yamanaka, H., Miyoshi-Nakahara, N. (1985): Some properties of *Vibrio vulnificus* hemolysin. *Microbiol. Immunol.* **29**, 583–590.
 - 58) Simpson, L.M., White, V.K., Zane, S.F., Oliver, J.D. (1987): Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **55**, 269–272.

- 59) Stelma, G.N., Reyes, Jr., A.L., Peeler, J.T., Johnson, C.H., Spaulding, P.L. (1992): Virulence characteristics of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus*. Appl. Environ. Microbiol. **58**, 2776–2782.
- 60) Sun, H.Y., Han, S.I., Choi, M.H., Kim, S.J., Kim, C.M., Shin, S.H. (2006): *Vibrio vulnificus* metalloprotease VvpE has no direct effect on iron-uptake from human hemoglobin. J. Microbiol. **44**, 537–547.
- 61) Tagomori, K., Iida, T., Honda, T. (2002): Comparison of genome structures of vibrios, bacteria possessing two chromosomes. J. Bacteriol. **184**, 4351–4358.
- 62) Tamplin, M.L., Jackson, J.K., Buchrieser, C., Murphree, R.L., Portier, K.M., Gangar, V., Miller, L.G., Kaspar, C.W. (1996): Pulsed-field gel electrophoresis and ribotype profiles of clinical and environmental *Vibrio vulnificus* isolates. Appl. Environ. Microbiol. **62**, 3572–3580.
- 63) Tison, D.L., Kelly, M.T. (1986): Virulence of *Vibrio vulnificus* strains from marine environments. Appl. Environ. Microbiol. **52**, 1004–1006.
- 64) Tsuchiya, T., Mitsuo, E., Hayashi, N., Hikita, Y., Nakao, H., Yamamoto, S., Miyamoto, K., Tsujibo, H. (2007): *Vibrio vulnificus* damages macrophages during the early phase of infection. Infect. Immun. **75**, 4592–4596.
- 65) Tsuru, S., Taniguchi, M., Fujisawa, H., Zinnaka, Y., Nomoto, K. (1987): Differing resistance to polymorphonuclear cells of halophilic- and hypotonic-types of *Vibrio vulnificus*. J. Clin. Lab. Immunol. **22**, 185–189.
- 66) Vimr, E.R., Kalivoda, K.A., Deszo, E.L., Steenbergen, S.M. (2004): Diversity of microbial sialic acid metabolism. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **68**, 132–153.
- 67) Webster, A.C., Litwin, C.M. (2000): Cloning and characterization of *vuuA*, a gene encoding the *Vibrio vulnificus* ferric vulnibactin receptor. Infect. Immun. **68**, 526–534.
- 68) Weinberg, E.D. (2000): Microbial pathogens with impaired ability to acquire host iron. BioMetals **13**, 85–89.
- 69) Wright, A.C., Morris, J.G.Jr. (1991): The extracellular cytotoxin of *Vibrio vulnificus*: inactivation and relationship to virulence in mice. Infect. Immun. **59**, 192–197.
- 70) Wright, A.C., Simpson, L.M., Oliver, J.D. (1981): Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. Infect. Immun. **34**, 503–507.
- 71) Yamanaka, H., Satoh, T., Katsu, T., Shinoda, S. (1987): Mechanism of haemolysis by *Vibrio vulnificus* haemolysin. J. Gen. Microbiol. **133**, 2859–2864.
- 72) Yamanaka, H., Shimatani, S., Tanaka, M., Katsu, T., Ono, B., Shinoda, S. (1989): Susceptibility of erythrocytes from several animal species to *Vibrio vulnificus* hemolysin. FEMS Microbiol. Lett. **52**, 251–255.
- 73) Yoshida, S., Ogawa, M., Mizuguchi, Y. (1985): Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. Infect. Immun. **47**, 446–451.
- 74) Yu, H.N., Lee, Y.R., Park, K.H., Rah, S.Y., Noh, E.M., Song, E.K., Han, M.K., Kim, B.S., Lee, S.H., Kim, J.S. (2007): Membrane cholesterol is required for activity of *Vibrio vulnificus* cytotoxin. Arch. Microbiol. **187**, 467–473.
- 75) Zhao, J.F., Sun, A.H., Ruan, P., Zhao, X.H., Lu, M.Q., Yan, J. (2009): *Vibrio vulnificus* cytotoxin induces apoptosis in HUVEC, SGC-7901 and SMMC-7721 cells via caspase-9/3-dependent pathway. Microb. Pathog. **46**, 194–200.

(担当編集委員 高井伸二)