

# *Campylobacter jejuni* の 肝障害性に関する研究

奈良県立医科大学細菌学教室

安 井 浩 一

## STUDIES OF THE HEPATOPATHOGENESIS OF *CAMPYLOBACTER JEJUNI*

KOICHI YASUI

Department of Bacteriology, Nara Medical University

Received April 24, 1990

**Summary:** Mice orally infected *Campylobacter jejuni* developed focal infiltrative necrotic lesions in the liver, as determined by both histology and liver function tests. Histopathological feature of the liver, a focal infiltrative necrosis, was seen between days 30 and 60 postinoculation, and it became gradually more profound with time, despite the fact that liver functions of infected mice were most affected at 2 months postinoculation. The capacity of *C. jejuni* to induce hepatic lesions seemed to be related to that of organisms to persist in the gall bladder. Hepatic lesions following *C. jejuni* infection was attributable to the hepatotoxic factor which was isolated from the subcellular components of bacteria by two series of chromatographic separations. This factor was able to induce hepatitis after it was injected intravenously into mice at a dose of 10  $\mu$ g. Hepatotoxic activity of this factor was confirmed by incubating several doses of this factor with mouse hepatocytes: at low concentrations (<5  $\mu$ g/ml) hepatocytes became rounding-up, while at high concentrations (>20  $\mu$ g/ml) they exhibited cytolytic changes. Among 20 clinical isolates of *C. jejuni*, only four strains evoked hepatitis in mice and produced the hepatotoxic factor.

### Index Terms

*Campylobacter jejuni*, hepatitis, hepatotoxic factor(s), mouse hepatocytes

### 緒 言

*Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* (*C. jejuni*)は、感染性腸炎の起因菌として分離頻度の高い細菌の一つである。ヒトの *Campylobacter* 感染症には、流産、敗血症、心内膜炎、肺炎あるいは脳炎等のさまざまな病像をとる disseminated type と、時に発熱を伴う下痢と腹痛を主徴とする enteritis type の二つの病型があるとされている (1, 2)。

*C. jejuni* 感染の臨床像は主として enteritis type であるが、enteritis に引き続き血行性に他臓器への播種性感

染も臨床像から確認され、肝炎や関節炎の発症を認めた臨床報告がなされている (3)。*C. jejuni* による enteritis の発症には、*Vibrio cholerae* や enterotoxigenic *Escherichia coli* の産出する enterotoxin (ET) と共通抗原性を有する ET (4, 5, 6) の存在と、*Salmonella* や *Shigella* にみられる細胞内侵入能 (7, 8, 9) が関与していると考えられている。しかし、現在も尚明確な下痢の発症機序は確立されていない。

一方、肝炎や関節炎の発症もある種の HLA 型と関連し host の要因が大きいとされるも、その成因機序については解析されていない。

教室の喜多らは、マウスに *C. jejuni* を経口投与してから一カ月後に肝炎が発症し数ヶ月後に感染マウスが消耗していくことを認め報告している(10)。そこで、今回著者は、*C. jejuni* をマウスに経口投与することにより、惹起される肝障害の発生機序を解析するため *C. jejuni* の reference strain から肝毒性因子を分離することを試み更に臨床分離株についても同様の検討を行なった。

## 方法及び材料

1. 動物：ddY マウス(4～5週令, SPF, 雌)を SLC (浜松静岡実験動物研究所)より購入し、固形飼料(CMF, オリエンタル酵母工業株式会社：東京)及び水により飼育した。

2. 使用菌株：*Campylobacter jejuni* GIFU 8734 (血清型：PEN 18) 及び当教室において分離・同定した臨床株20株を用いた(詳細については表5に記載)。

3. 菌の培養：gelatin disc (11)にて $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した菌株を $37^{\circ}\text{C}$ で tryptic soy broth (BBL Microbiology systems) 1 ml にて溶解した後、溶解液の一部を10%馬血液含有の Brucella agar (Difco) に塗抹し、 $42^{\circ}\text{C}$ で24時間嫌気ジャー内で Gas-Pak (触媒無し, BBL) を用いて培養した。寒天培地上に生育した菌の一部を液体培地(2% w/v tryptose, 0.2% w/v  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.6% w/v NaCl, 1% w/v soluble starch, 0.02% w/v L-cysteine, 1% w/v yeast extract, 0.01% w/v sodium bicarbonate) に接種し、平板培地の時と同環境下で48時間培養した。

4. 感染実験： $10^7$  colony-forming units (cfu)/ml に調整した菌液 0.1 ml を経口ゾンデにてマウス胃内に直接投与した。投与後経日的に肛門より白金耳を投入し、Skirrow 培地に塗抹し腸管内定着性を確認した。接種2日目より糞便中に持続排菌が認められるマウスについて、投与後7日毎に一カ月間マウスの retro-orbital venous plexus より採血し、血清を分離した後肝機能検査を行なった。同時に肝臓・胆のう・腸管を摘出し以下の如く菌数測定を行なった。肝臓は4 ml の0.02% L-cysteine 含有生食水(cyst-saline)中で、胆のうは1 ml の同溶液中で、テフロンホモゲナイザーを用いて homogenate した後、その20  $\mu\text{l}$  を Skirrow 培地にて培養し、48時間後の生菌数を測定した。

腸管は回盲部より上部2 cm, 下部2 cm 及び回盲部を摘出し、長軸方向に切り開いた後腸内容物を5 ml の cyst-saline (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  vancomycin, 2.5 IU/ml polymixin B, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  trimethoprim 含有) で腸内容物を洗浄後、1 ml の cyst-saline 中で homogenate し、その20  $\mu\text{l}$  を

Skirrow 培地にて培養した。各臓器内菌数は、1 gr の組織重量当たりの  $\log_{10}$  cfu で表示した。この後六ヶ月の間、一ヶ月毎に同様にして臓器内菌数の測定、肝機能検査、及び組織学的検索を行なった。

5. 肝毒性因子の分離：十分に洗浄した菌体を10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNase type I (Sigma 社), 及び0.05% sodium dodecyl sulphate (SDS) 含有の10 mM Tris-HCl (pH7.2) に懸濁し、超音波破砕器(海上電機社)で20分間(plate current: 300 mA) 菌体破砕を行なった。破砕液を330 xg 20分, 4,200 xg 60分, さらに12,000 xg 60分遠沈後その上清をさらに90,000 xg 90分の超遠沈して得られた沈殿を蒸留水で2回洗浄し、蒸留水に懸濁後、十分に透析し、凍結乾燥し重量を測定した。

乾燥標品を10 mM sodium phosphate buffer (pH7.2: PB) に10 mg/ml の割合に懸濁した後、硫酸を30%飽和になる様に加え、生じた沈殿を13,000 xg 30分の遠沈で除去した後、さらに上清に65%飽和になる様に硫酸を加え、一夜 $4^{\circ}\text{C}$ に放置した後、沈殿物を遠沈にて回収し、蒸留水に懸濁後、十分に透析し再び凍結乾燥し粗毒素標品(P65)とした。

P65 を0.05M NaCl 含有 PB に10 mg/ml の濃度に懸濁した後、同 buffer で平衡化した Sepharose 4B (Pharmacia 社, 1.6 $\times$ 40 cm) カラムに1 ml を apply し、同 buffer にて溶出した。

5 ml ずつの画分を集め各画分の280 nm における吸光度と肝細胞に対する毒性を測定した。毒性を示した画分を集め同 buffer で平衡化した DEAE Sepharose CL6B (Pharmacia 社, 2 $\times$ 50 cm) に吸着せしめた。200 ml の buffer で洗浄した後、0.05～0.8M の NaCl の直線的濃度勾配下で吸着物質を溶出した。5 ml ずつの画分を集め、各画分の280 nm における吸光度を測定し、各画分を Hanks' balanced salt solution (HBSS, フェノールレッド不含) で十分透析した後、肝細胞に対する毒性を検定した。

6. 肝細胞培養：マウス肝細胞を Berry & Friend (12) らの方法に従い collagenase perfusion 法により分離した。麻酔下で開腹したマウスの肝臓を50 ml の  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  不含の Hanks 氏液 (CMFS) で灌流後、100 ml の0.05% collagenase (type IV, Sigma 社), 0.1% bovine serum albumin 及び 4 mM  $\text{CaCl}_2$  含有 CMFS で灌流した。灌流液は全て使用前に $37^{\circ}\text{C}$ で保温し、95%  $\text{O}_2$ ・5%  $\text{CO}_2$  混合ガスを30分間通気させたものを使用した。

2回目の灌流後肝臓全体を摘出し、cold CMFS ですすいだ後、cold CMFS 50 ml 入りのビーカーに入れ、周

胆の支持組織を完全に除去し、別のピーカー内でスライドグラスを使用して軽く組織を圧迫することにより肝細胞浮遊液を得た。これを滅菌ガーゼで濾過した後、50xg 90秒の遠沈にて肝細胞を回収した。この遠沈操作を3回繰り返して得た肝細胞の viability は95%以上であった。

肝細胞は $2 \times 10^6$  /ml の濃度に Williams E 培地 ( $10^{-7}$  M インシュリン,  $10^{-8}$  M デキサメサゾン及び5%牛胎児血清含有) にて調整した浮遊液200 $\mu$ l をコラーゲンコートプレート (Falcon 3047, Nippon Becton, Dickinson Co., Ltd. Tokyo Japan) にまき、さらに500 $\mu$ l の Williams E 培地を加え、37°C 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で2時間培養し、非付着性細胞を除去し、新鮮な培養液を1 ml 加え、さらに24時間培養した。再び培養液交換後24時間培養し肝細胞単層が安定したのを確かめてから、実験に供した。

7. 肝細胞障害試験: *C. jejuni* より分離した標品50  $\mu$ l を肝細胞培養ウェル (450 $\mu$ l/well) に加え、48時間培養後に上清中に放出された酵素量及びアルブミン量を後述の方法に従って測定した。培養液除去後、CMFS にてウェル底の肝細胞単層を十分に洗浄し、0.1% trypsin 及び 0.02% EDTA 含有 CMFS にて肝細胞を浮遊させ、残存生細胞数を trypan blue exclusion test にて測定した。

尚、培養上清中の GOT は Henley & Pollard (13) らの方法で、LDH は Wroblewski & Ladue (14) らの方法にて行い、1.9 ml の反応系に0.1 ml の培養上清を加え、340nm における吸光度の変化を測定した。

酵素単位は mU/ml で現し、1 mU は1分間に基質 1 n mole を転換させる酵素量として表現した。

8. 組織学的検索: 生菌経口感染マウス及び毒性因子投与マウスの肝は常法に従って作製した組織切片の Haematoxylin Eosin (HE) 染色標本を観察した。

9. 肝機能検査: マウス血清中の GOT (glutamic-oxaloacetic transaminase), GPT (glutamic-pyruvic transaminase), ALP (alkaline phosphatase) 及び LDH (lactic dehydrogenase) について測定した。GOT, GPT は Karmen らの方法 (15), ALP は Kind & King の方法 (16) に従って、LDH は Amador (17) の方法に従って、比色法により測定した。比色反応は日立706D-自動分析計により測定した。血清アルブミン及び培養上清中のアルブミン量は電気泳動法 (18) により測定した。

## 結 果

### 1. *C. jejuni* の臓器内定着性

*C. jejuni* GIFU 8734 株  $10^6$  cfu を経口投与後、1, 3, 5, 7日目及び1, 2, 3, 4, 5, 6ヶ月後の臓器内菌数を Table 1 に示した。投与5日目から肝及び胆のうちにも *C. jejuni* の定着が確認されたが、両臓器内の生菌数は投与一ヶ月から二ヶ月目にかけて最大となった。肝内からは六ヶ月目以降 *C. jejuni* の回収は認められなかったが、胆のうちからは、六ヶ月目以降も生菌が回収された。

又、投与二ヶ月目迄は大腸内に *C. jejuni* の定着は認められたが、それ以降は大腸内から *C. jejuni* は消失した。一方回盲部には投与五ヶ月目迄 *C. jejuni* の定着が観察された。

一方小腸内には他臓器に比して、より多くの生菌が定着し、投与六ヶ月目においてもその存在が確認された。

### 2. *C. jejuni* の肝障害性

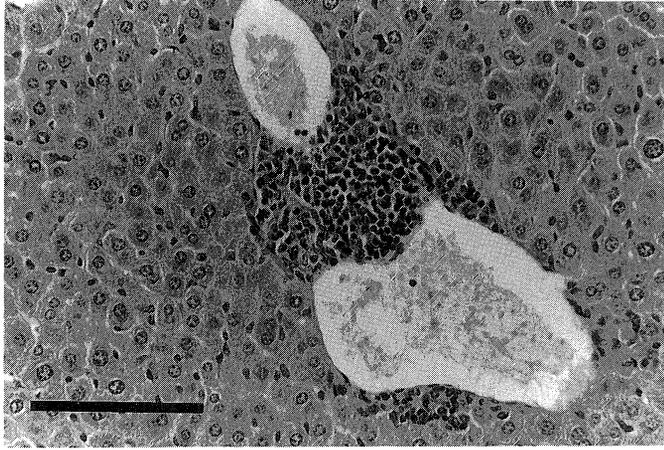
生菌投与三週目迄は、感染マウス群と非感染マウス群の肝機能には有意の差は認められなかった。感染マウス群ではその後徐々に GOT, LDH 及び ALP が上昇し、一ヶ月目に有意の上昇を認めた (Table 2)。GPT は GOT より少し遅れて上昇する傾向があり、GOT, LDH.

Table 1. Quantitative recovery of *C. jejuni* in mice after oral inoculation of strain GIFU

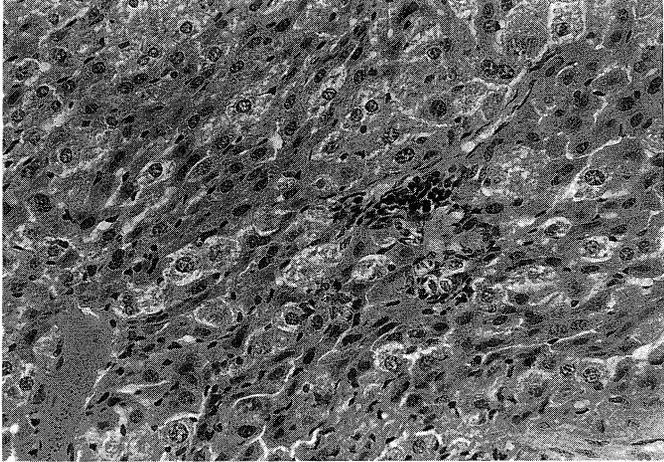
Site	Viable counts [ $\log_{10}$ (cfu per gr tissue)]									
	Days				Months					
	1	3	5	7	1	2	3	4	5	6
Small intestine	7.6	6.2	5.3	5.2	4.8	4.5	3.6	4.6	3.2	2.3
Caecum	3.8	3.4	2.5	2.0	2.6	2.0	1.2	1.0	1.0	—
Colon	3.3	4.0	3.4	3.2	1.7	—	—	—	—	—
Liver	—	—	1.0	1.4	3.4	3.3	2.6	2.3	2.2	—
Gall bladder	—	—	1.5	1.8	2.0	3.5	2.8	2.5	2.7	1.6

Mice were orally infected with  $10^6$  cfu. At intervals eight mice were killed and the intestines and organs processed (see Methods) to obtain colony counts. The figures represent the mean values for eight mice at each sampling time, —, No colonies formed on Skirrow's medium at 72 h.

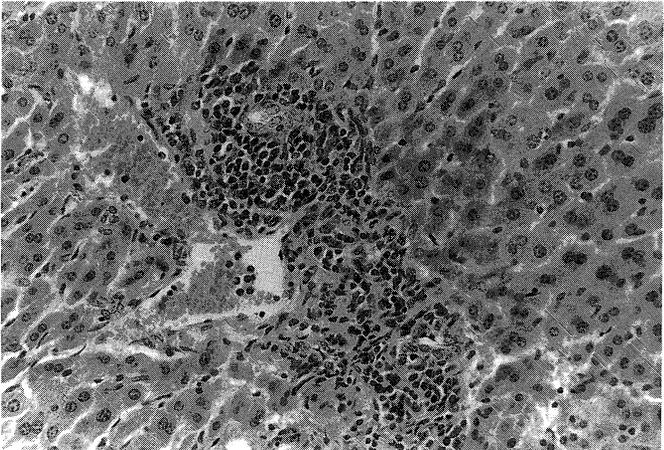
Fig. 1. a



b



c



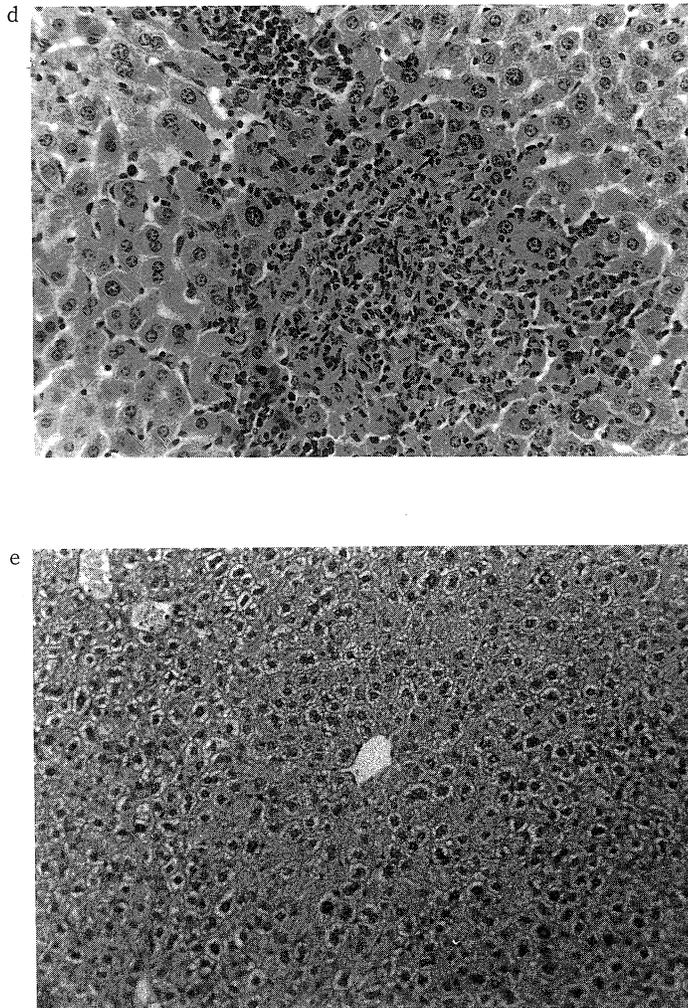


Fig. 1. Histological changes in the liver of mice orally infected with *C. jejuni* GIFU 8745. a) Inflammatory cell infiltrate in the vicinity of the central vein at 2 weeks postinfection. b) Focal cellular changes of the parenchyma at 1 month postinfection. c) Increased intensity of infiltrative changes at 3 months postinfection. d) Formation of focal infiltrative necrosis in the parenchyma at 6 months postinfection. e) Control liver of the uninfected 10-month-old mouse. (The bar represents 100  $\mu$ m)

ALP は投与二ヶ月目に最も高い値を示したが、GPT は投与四ヶ月目に最高値を示した。二ヶ月目以降、GOT, ALP, LDH が、四ヶ月目以降には GPT が徐々に低下傾向を示したが、GOT, LDH は六ヶ月目においても非感染群のそれらの値より高値を示していた。特徴的な変化は、血清アルブミンが投与後漸次低下し、六ヶ月目には非感染マウスの約50%にまで低下したことである。

### 3. 組織変化

生菌投与二週目から、中心静脈周辺に炎症細胞の浸潤が認められ Kupffer 細胞の増加も同時に観察された (Fig. 1-a)。投与一ヶ月目には、肝実質部に限局性の壊死性変化が認められ (Fig. 1-b)、この変化は投与三ヶ月目には炎症細胞を伴い肝実質中に慢性に広がっているのが観察された (Fig. 1-c)。投与六ヶ月目には肝病変は限局性の細胞浸潤を伴った壊死性変化となって認められた (Fig. 1-d)。

### 4. *C. jejuni* の肝毒性因子の分離

*C. jejuni* GIFU 8734株の P65 画分と P30 画分のそれぞれ100 $\mu$ g をマウス尾静脈内に投与したところ、P65 画

分のみ肝機能検査で異常が認められたので、以後 P65 画分より肝毒性因子の分離を試みた。対照には enterotoxigenic *Escherichia coli* 271-6より調整した P65 画分を用いた。

*C. jejuni* の P65 画分を10 $\mu$ g~200 $\mu$ g の濃度でマウス尾静脈に投与後5日目の血清中 GOT 量を測定したところ、50 $\mu$ g 以上の投与で濃度依存的に GOT の上昇を認めた (Fig. 2)、しかし、*E. coli* の P65 画分では GOT の有意の上昇は認められなかった。

P65 を *in vitro* 肝細胞培養系に10, 50, 100 $\mu$ g/ml の濃度で添加し、24時間後の上清中の GOT, LDH 量を測定したところ、10 $\mu$ g/ml 以上で両酵素の有意の放出が認められた (Table 3)。しかし、アルブミン放出量の低下は、100 $\mu$ g/ml でのみ認められた。*E. coli* の P65 画分では *in vitro* における肝細胞障害性は認められなかった。P65 画分を Sepharose 4B によるゲル濾過を行なったところ、void volume より少し遅れて溶出される 280 nm のピークに一致して肝細胞障害性が認められ (Fig. 3-a) たので、この画分をブールし DEAE-Sepharose CL-6B

Table 2. Liver function tests in mice orally inoculated with 10<sup>6</sup> cfu of strain GIFU

Test	Liver functions					
	Months					
	1	2	3	4	5	6
GOT	130±21	150±18	110±16	100±24	100±13	95±12
GPT	50±6	80±12	90±16	130±14	75±9	38±6
ALP	24.8±1.5	18.9±2.7	16.4±1.8	15.6±2.0	14.3±1.7	13.2±2.4
LDH	400±21	450±32	380±18	300±24	275±32	200±16
Albumin	4.5±0.8	4.0±0.4	3.0±0.3	2.8±0.2	2.6±0.1	2.4±0.2
Albumin/globulin	1.4±0.2	1.1±0.3	0.9±0.2	0.7±0.2	0.6±0.1	0.4±0.2

Data were obtained from four mice and are expressed as the mean of four samples  $\pm$  SD. GOT, GPT and LDH are expressed in IU L<sup>-1</sup>, ALP in LAU and serum albumin in mg L<sup>-1</sup>.

Mean control values; GOT (58.9), GPT (30.3), ALP (15.9), LDH (123.0), Albumin (5.0), Albumin / globulin (1.9).

Table 3. Enzyme leakage and albumin synthesis in cultures of mouse hepatocytes incubated with P65 preparations

Samples <sup>a</sup>	Dose ( $\mu$ g/ml)	Released enzymes (mU/ml)		Albumin synthesis ( $\mu$ g/ml)
		GOT	LDH	
P65 of <i>C. jejuni</i>	10	14±3 ( $P<0.1$ ) <sup>b</sup>	26±7 ( $P<0.1$ )	2.1±0.1
	50	24±8 ( $P<0.05$ )	57±0 ( $P<0.05$ )	2.0±1.0
	100	59±7 ( $P<0.01$ )	116±10 ( $P<0.01$ )	1.6±0.2 ( $P<0.1$ )
P65 of <i>E. coli</i>	50	6±3	19±5	2.2±0.2
	100	8±2	20±4	2.1±0.1
Medium control	—	6±2	18±6	2.2±0.2

a. The hepatocytes were cultured with the doses of samples indicated for 24 h. Each culture was done in triplicate and data were obtained from three different experiments. The results are expressed as the mean  $\pm$  SD for the nine cultures.

b. The levels of significance for the observed frequencies, compared to the controls, were determined by Student's *t*-test.

に吸着させ、0.05~0.8 M NaCl の直線的濃度勾配下で吸着物質の溶出を行なった (Fig. 3-b)。非吸着画分 (A), 0.1M NaCl 溶出画分 (B), 0.3M NaCl 溶出画分 (C), 0.5M NaCl 溶出画分 (D) の4つの画分を得た。この各画分を Williams E medium にて十分に透析後、肝細胞に対する毒性試験を行なった。

各画分10 $\mu$ g/ml の濃度では、C画分添加肝細胞培養系の上清中のみ GOT, LDH の有意の上昇が認められ、同時にアルブミン産生も50%に低下した (Table 4)。C画分の細胞毒性を肝細胞膜の障害性で調べるため

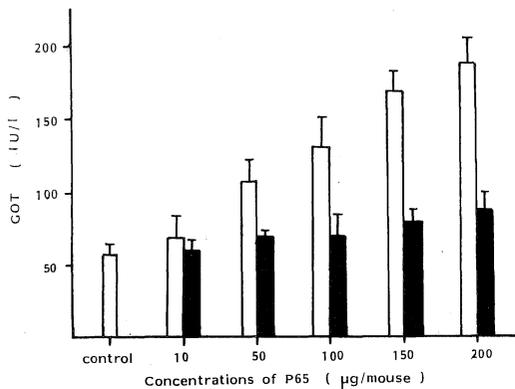


Fig. 2. Liver function in mice injected with the P65 fraction from *C. jejuni* GIFU 8734 (□) or *E. coli* 271-6 (■). Groups of five mice were injected intravenously with indicated doses of P65 material and bled at five days post-injection. Data were obtained from two separate experiments and expressed as the mean  $\pm$  SD for the ten mice.

trypan blue exclusion テストで調べたところ0.1 $\mu$ g/ml の濃度から膜障害性が観察され、濃度依存的に障害性は増加した (Fig. 4)。肝細胞膜の障害性に伴って放出される GOT 量は、4 $\mu$ g/ml のC画分添加時から顕著になり、膜障害性と GOT 放出量に相関性があると思われた。特に1~5 $\mu$ g/ml の濃度でC画分を肝細胞培養系に添加した時には、24時間で肝細胞の変化は“rounding-up”のみであった (Fig. 5-a) のに対して、20 $\mu$ g/ml 以上では“cell lysis”をおこす (Fig. 5-b) ことが確認された。マウスリンパ球、マクロファージ及び赤血球に対して同様の毒性試験を行なったところ、これらの細胞に対してはC画分100 $\mu$ g/ml の濃度で10~15%の膜障害性が認められただけで、cell lysis は観察されなかった。尚データには示さなかったが、C画分の肝毒性は、抗 ET 抗体や抗 LPS 抗体によって中和し得なかった。

5. 肝毒性因子の in vivo における肝障害性

C画分10 $\mu$ g をマウス尾静脈内に投与後12日目迄2日毎に、又投与30日後に血清中のGOT, GPT, LDH 及びALP 量を測定した。Fig. 6 に示す如く、投与後経日的に各酵素レベルは上昇し、30日後も有意の上昇を示していた。一方 *E. coli* より調整した P65 100 $\mu$ g 投与マウスでは肝機能の有意の変化は認められなかった。

組織学的には、C画分投与48時間以内に肝細胞質及び核の濃染が認められ (Fig. 7-a)、この変化は徐々に進行し、投与21日目では、限局性の壊死性変化となって観察された (Fig. 7-b)

6. 臨床分離株の肝毒性

臨床分離株20株のマウス腸管内定着性、肝定着性及び肝炎誘発能について検討した。各株5匹のマウスに 10<sup>6</sup> cfu の生菌を経口投与し、30日目に採血し血清中のGO

Table 4. Enzyme leakage and albumin synthesis by cultures of mouse hepatocytes following incubation with hepatotoxic factor(s)

Samples <sup>a</sup>	Released enzymes (mU/ml)		Albumin synthesis ( $\mu$ g/ml)
	GOT	LDH	
<i>C. jejuni</i>			
P65 (10 $\mu$ g/ml)	15 $\pm$ 2 (P<0.1) <sup>b</sup>	27 $\pm$ 5 (P<0.1)	2.1 $\pm$ 0.2
Peak A (10 $\mu$ g/ml)	7 $\pm$ 1	15 $\pm$ 3	2.2 $\pm$ 0.3
Peak B (10 $\mu$ g/ml)	7 $\pm$ 2	17 $\pm$ 2	2.1 $\pm$ 0.1
Peak C (10 $\mu$ g/ml)	70 $\pm$ 3 (P<0.01)	164 $\pm$ 15 (P<0.01)	1.2 $\pm$ 0.2 (P<0.05)
Peak D (10 $\mu$ g/ml)	8 $\pm$ 3	17 $\pm$ 3	2.2 $\pm$ 0.2
Control			
Medium	7 $\pm$ 1	16 $\pm$ 2	2.3 $\pm$ 0.2

a. Hepatocytes were cultured with the doses of samples indicated for 24 h. Each culture was grown in triplicate and data were obtained from three different experiments. Results are expressed as the mean  $\pm$  SD for the nine cultures.  
 b. The levels of significance were determined by Student's *t*-test.

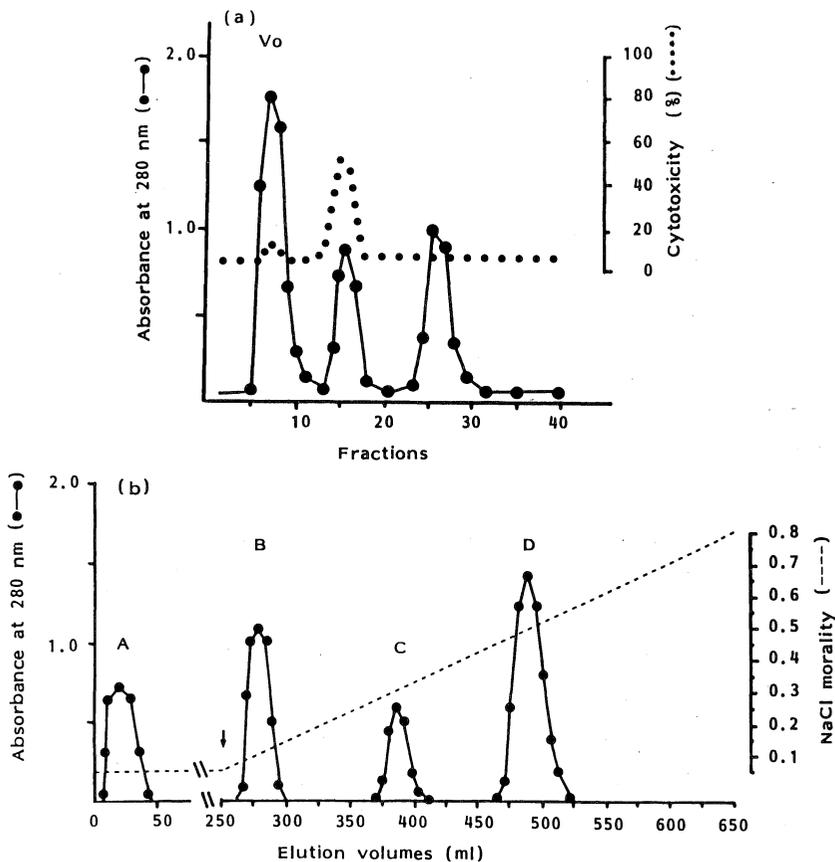


Fig. 3. Chromatographic separation of hepatotoxic factor(s). (a) P65 material from *C. jejuni* GIFU 8734 was chromatographed on Sepharose 4B. (●—●) optical density at 280 nm, (●●●) % cytotoxicity: Vo; void volume. (b) The second peak obtained during Sepharose 4B chromatography was applied to a column of DEAE-Sepharose 4B and eluted with an increasing NaCl gradient. ↓; initiation of gradient elution.

T レベルの測定 (血清 GOT  $\geq 100$  IU/L を示すマウスが80%以上を肝炎発症株, 小腸内定着性 (生菌数  $\geq 10^3$  cfu/gr tissue) を示すマウスが80%以上を小腸定着陽性株) 及び肝内定着性 (生菌数  $10^8$  cfu  $\geq$  gr tissue を示すマウスが80%以上を肝内定着陽性株) について検討した (Table 5). 20株のうち, 肝内定着株は8株, そして肝炎誘発株は Nara-24, KZ-6, MT-7 及び DK-13 の4株であった. 肝炎発症株は全て小腸・肝内定着陽性であったが, 小腸・肝に定着できても肝炎を発症できない株も4株認められた.

次に肝内定着株8株から P65 画分を調整し, *in vivo* における肝炎誘発能及び *in vitro* の肝細胞培養系での肝細胞障害性を判定した (Table 6).

生菌投与時に確認されたと同様に, Nara-24, KZ-6,

MT-7 及び DK-13 由来の P65 画分のみが  $100\mu\text{g}$  の静脈内投与で肝障害を,  $75\mu\text{g/ml}$  を肝細胞培養系添加で細胞障害を誘発し得た.

## 考 察

*Campylobacter* 腸炎の臨床像は多彩であり, 水様性下痢で終わるものから, 赤痢症状を呈するもの, さらには腸チフス様症状を呈するもの迄存在する (19), 近年腸炎から菌血症を呈する症例が関心を集め (20), 中でも関節炎 (21) や肝炎 (22) を併発する症例が増加している. 腸炎症状を呈しているものは全て経口感染であると考えられるが, 発症の主因が enterotoxin であるか, *Shigella* や *Salmonella* の様に細胞内侵入によるものか尚不明とされている. しかし, Butzler (19) が *C. jejuni* をワ

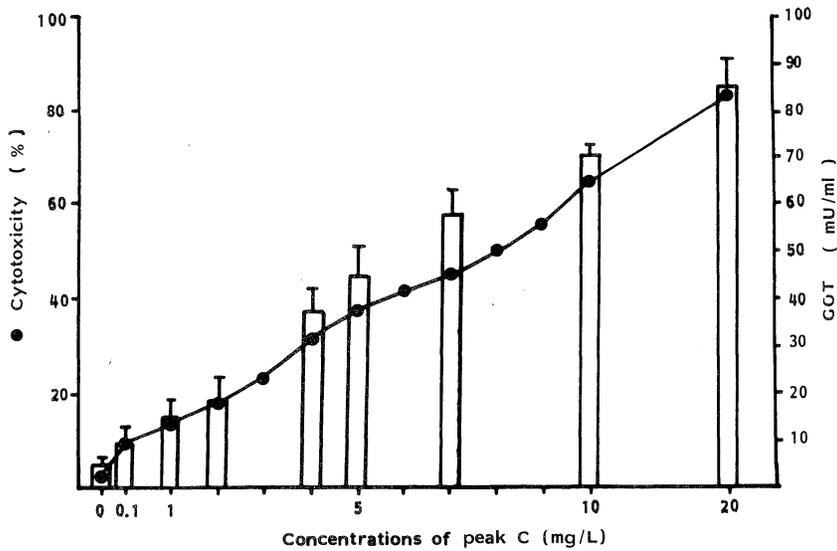


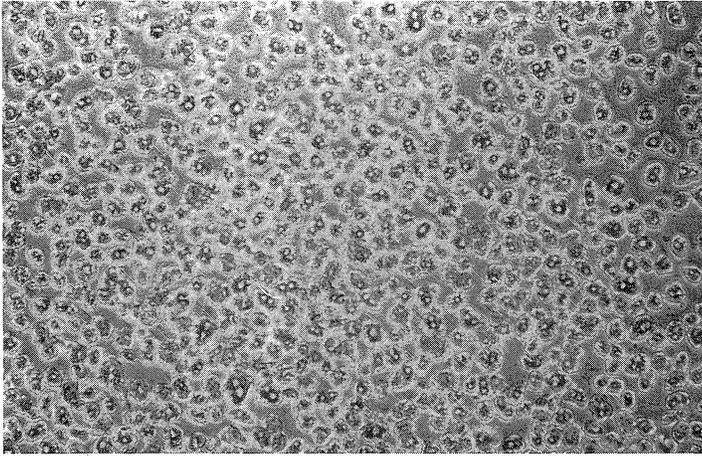
Fig. 4. Hepatotoxicity of peak C. Mouse Hepatocytes were cultured with graded doses of peak C material for 24 h. GOT leakage in the supernatant fluid and cytotoxicity of hepatocytes were assayed for triplicate cultures. Data were obtained from three separate experiments, and expressed as the mean  $\pm$  SD for the 15 cultures: (●) % Cytotoxicity, (□) GOT (mU/ml).

Table 5. Source details and pathogenicity of the 20 clinical isolates of *C. jejuni*

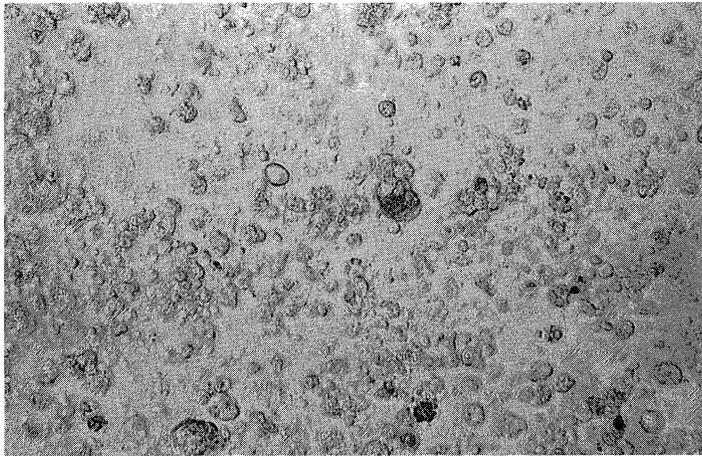
Strain	Clinical manifestation		Pathogenicity in mice <sup>a</sup>		
	Stool	Fever	Intestinal <sup>b</sup> colonisation	Liver <sup>c</sup> colonisation	Hapatitis <sup>d</sup>
GIFU 8734		Reference strain	+	+	+
KZ-4	Watery	-	-	-	-
KZ-6	Watery	-	+	+	+
KZ-9	Watery	+	+	+	-
KZ-12	Bloody	+	+	+	-
KZ-14	Watery	-	+	-	-
MT-6	Watery	+	-	-	-
MT-7		Asymptomatic	+	+	+
MT-9		Asymptomatic	+	+	-
MT-10	Watery	-	-	-	-
Nara-3	Watery	+	+	-	-
Nara-5	Watery	+	-	-	-
Nara-6	Watery	-	+	-	-
Nara-24	Bloody	+	+	+	+
Nara-42	Watery	-	-	-	-
Nara-68	Watery	+	-	-	-
Nara-69	Bloody	+	+	+	-
Nara-73	Bloody	-	+	-	-
Nara-77	Watery	+	+	-	-
Nara-79	Watery	-	+	-	-
DK-13	Bloody	+	+	+	+

a. Groups of five mice were infected orally with  $10^6$  cfu of each strain and bled 30 days post-infection.  
 b. +; more than four mice per group, carrying 1,000 cfu/gr intestinal tissue.  
 c. +; more than four mice per group, carrying 1,000 cfu/gr liver tissue.  
 d. +; more than four mice per group, exhibiting serum GOT levels higher than 100 IU/L.

Fig. 5. a



b



c

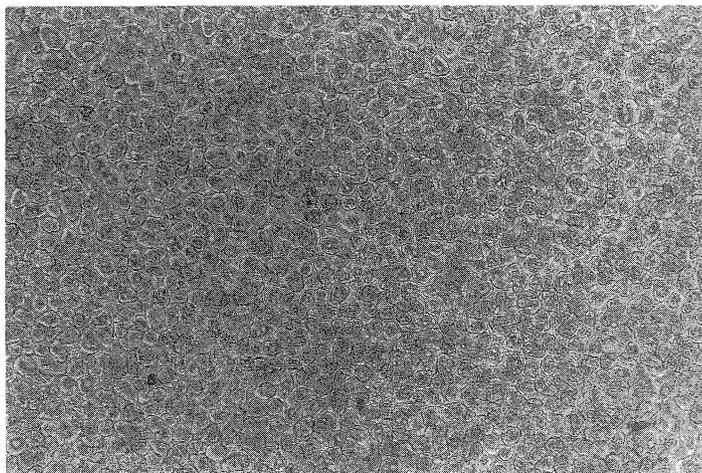
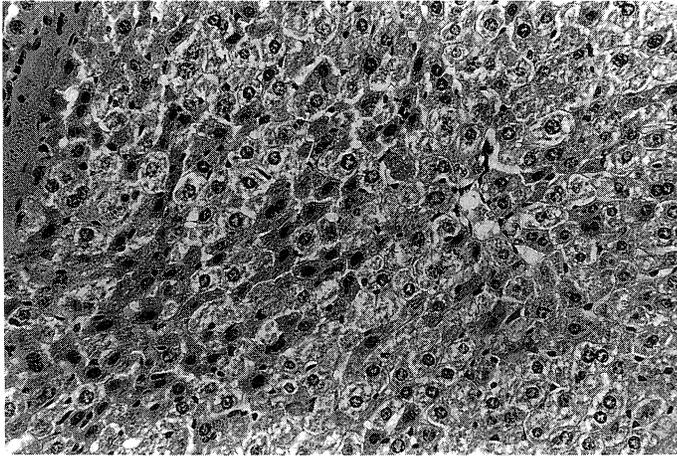


Fig. 7. a



b

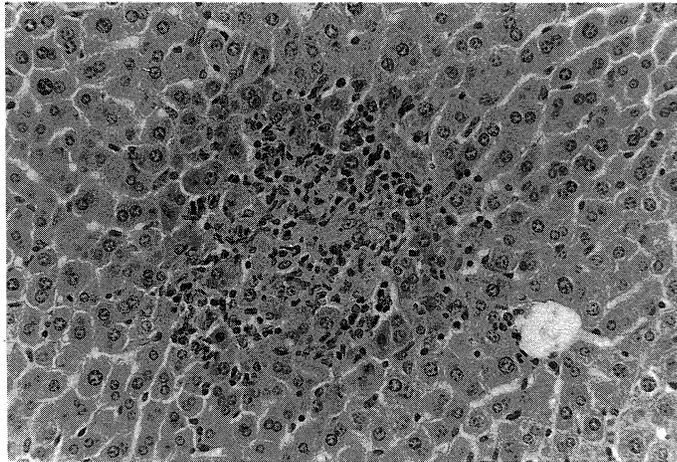


Fig. 5. Morphological changes of mouse hepatocytes cultured for 24 h with peak C. a) 5  $\mu\text{g/ml}$  of peak C, b) 20  $\mu\text{g/ml}$  of peak C, c) control cultures (Magnification x 125).

Fig. 7. Histological changes in the liver of mice intravenously injected with 10  $\mu\text{g}$  of peak C. a) 48 h after injection, b) 20 days after injection (Magnification as for Fig. 1).

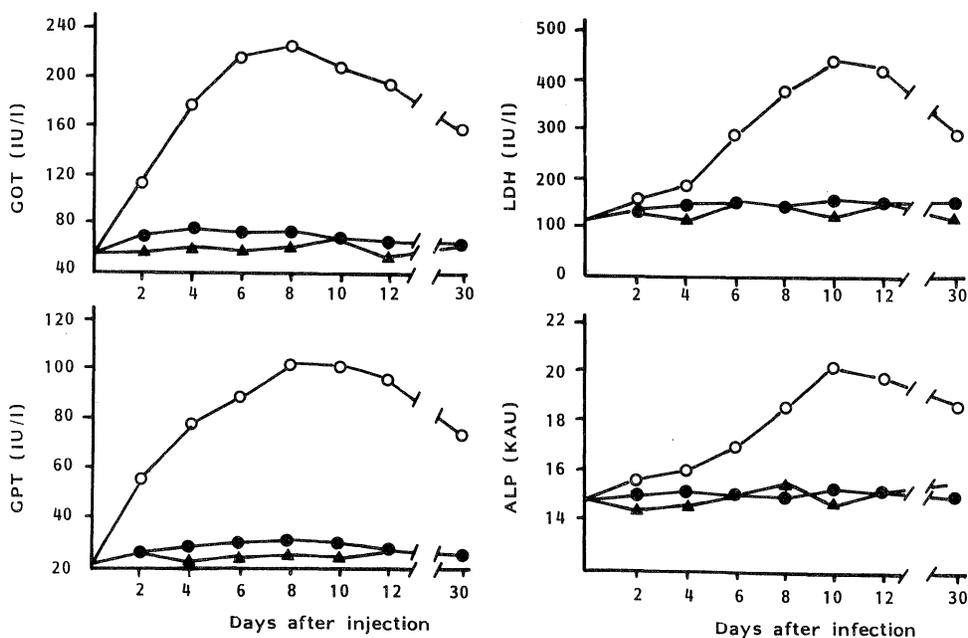


Fig. 6. Liver function tests in mice intravenously injected with 10  $\mu$ g of peak C material. Each group consisted of three mice at each time point. Results are expressed as the mean of three samples  $\pm$  SD. GOT, GPT, and LDH are expressed in IU/L and ALP in KAU. Data are for: (○) mice injected with peak C material (10  $\mu$ g); (●) mice injected with LPS from *C. jejuni* GIFU 8734 (10  $\mu$ g), and (▲) mice injected with PB as controls.

Table 6. Hepatotoxicity of P65 fractions prepared from eight strains of *C. jejuni* capable of colonising the liver

Strain <sup>a</sup>	Serum enzymes (IU/L) <sup>b</sup>		% Cyto <sup>c</sup> toxicity
	GOT	LDH	
GIFU 8734	158 $\pm$ 22	394 $\pm$ 46	58.4 $\pm$ 6.2
KZ-6	162 $\pm$ 31	402 $\pm$ 36	60.3 $\pm$ 2.2
KZ-9	62 $\pm$ 15	131 $\pm$ 20	10.2 $\pm$ 3.6
KZ-12	58 $\pm$ 9	126 $\pm$ 18	9.8 $\pm$ 3.4
MT-7	155 $\pm$ 18	379 $\pm$ 26	57.8 $\pm$ 4.2
MT-9	56 $\pm$ 11	125 $\pm$ 42	8.6 $\pm$ 2.5
Nara-24	142 $\pm$ 16	400 $\pm$ 33	56.5 $\pm$ 5.3
Nara-69	60 $\pm$ 13	128 $\pm$ 19	9.8 $\pm$ 2.2
DK-13	212 $\pm$ 32	416 $\pm$ 42	67.7 $\pm$ 5.9

- a. Groups of five mice were injected intravenously with 100  $\mu$ g of P65 fraction prepared from each test strain.
- b. Mice were bled five days post-injection and the levels of GOT and LDH in the serum were measured. Data were obtained from two separate experiments and are expressed as the mean  $\pm$  SD. Control levels of GOT and LDH were 52  $\pm$  11 IU/L and 110  $\pm$  14 IU/L, respectively.
- c. Cytotoxicity was assayed by the exclusion of trypan blue after a 24-h culture of mouse hepatocytes with 75 mg/L of P65 material. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD for seven cultures. Control samples (HBSS) exhibited 5.6  $\pm$  2.2 % cytotoxicity.

トりに感染させた実験では *C. jejuni* が侵入性を有する菌であることが認められており、また臨床症状や空・回腸にみられる出血壊死あるいは潰瘍などの病理学的変化から *Campylobacter* 腸炎は *Salmonella* と同様、細胞への侵入が基盤となっているというのが妥当である。

本研究において、経口感染させた *C. jejuni* が腸管のみならず、肝・胆のうから分離されたことは、本菌が上行性に肝・胆道系に侵入していくことも否定はし得ないが、Blaser らの報告 (25) で、経口投与数時間以内に菌が血中から回収されることからみて、腸管粘膜侵入後に血行性に肝・胆道系に移行したものである。

本菌の培養上清濃縮液や内毒素を静脈内投与しても肝障害を発症し得ないという喜多らの報告 (26) から、本菌の菌体内成分に肝障害因子が存在するのではないかと考えられ、本菌の subcellular components の毒性について検索したところ、菌体破砕液の 90,000 xg 90 分の超遠沈にて得られる画分を更に硫酸分画し、30%~65% 飽和画分に肝毒性が見い出された。この画分の肝毒性は、抗 ET 抗血清や抗 LPS 抗血清で中和されないことから既知の enterotoxin や内毒素活性を含有しないものであることが確認された。又、この肝毒性は trypsin に感受性を有し、80  $^{\circ}$ C 30 分の熱処理で不活化されるも 60  $^{\circ}$ C 30 分

の熱処理では完全には失活しなかった。

本物質の肝細胞に対する作用は低濃度 (<5 $\mu\text{g/ml}$ ) では膜障害にとどまるが、高濃度 (>20 $\mu\text{g/ml}$ ) では細胞溶解につながる。この様な濃度による肝細胞に対する作用の差は、 $\text{CCl}_4$  の肝細胞に対する毒性作用と同じで興味深いものである(27)。さらに生菌投与時にみられる肝障害が比較的ゆっくりと進行すること、又肝障害の程度が軽いことは、肝内で急速に *C. jejuni* が増殖するのではなくゆっくりと増殖するため放出される毒性物質の量も少量であるものと推察される。

臨床分離株20株のうち、生菌投与で肝に定着し得たものは8株でそのうち肝炎を発症し得たのは4株であった。しかもこれら4株から分離したP65画分は全て肝細胞障害活性を有していた。このことから、肝に到達し得る株であってもこの毒性物質を有さないものは肝障害を起こさず、胆のうに保菌状態となっていく可能性が示唆された。実際に *C. jejuni* の健康保菌者は *C. jejuni* 検出者の1~5%におよぶといわれている(28)。諸外国の報告では、*C. jejuni* 腸炎後の肝炎は一過性であるとみられているが、これは追跡調査がなされていないことによるものか、マウスとヒトでの差異であるのか今後の研究調査が待たれるものである。

現在のところ、*C. jejuni* は腸炎の起原因菌として臨床の場で関心を持たれているが、*C. pyroli* が十二指腸潰瘍の原因菌として臨床家の関心を集めるに至った如く、*C. jejuni* の血行転移型の肝炎や関節炎に対しても十分な注意を払う必要があると思われる。さらに本研究で分離したP65画分が単に肝毒性因子にとどまるのか、本菌の細胞内侵入能・下痢原性にも関与しているのか、今後明らかにしていく必要があると思われる。

## 結 語

*C. jejuni* の標準株(8734)及び臨床分離株を用いて本菌の肝毒性について解析を進め、以下の知見を得た。

1. *C. jejuni* 8734を $10^6$  cfu 経口投与することにより、血清学的にも組織学的にも肝障害を誘発することを確認できた。
2. 肝障害を誘発する因子は、菌体内に存在し、菌体破砕液を90,000 xg 90分超遠沈することにより回収することができた。
3. 肝毒性因子は、90,000 xg 90分超遠沈で得た標品から硫酸30~65%飽和により濃縮することができ、ゲル濾過とイオン交換クロマトによりさらに精製することができた。
4. 肝毒性因子は、低濃度 (<5 $\mu\text{g/ml}$ ) では肝細胞の

膜障害のみであったが、高濃度 (>20 $\mu\text{g/ml}$ ) では細胞溶解を生じた。さらにマウス尾静脈内に10 $\mu\text{g}$  投与することにより生菌投与時と同様肝機能異常及び組織学的にも異常を認めた。

5. 臨床分離株20株のうち、経口投与にて肝炎を発症し得たものは4株で、4株全てから肝毒性因子を分離し得たが、肝に定着し得たものでも、毒性因子を産生し得ないものは肝炎を発症し得なかった。

## 謝 辞

本論文の要旨は、第39回日本細菌学会関西支部総会及び第59回日本感染症学会総会に於いて発表した。

稿を終えるにあたり、御指導賜った榎葉周三教授に深謝いたします。また、種々の御援助をいただいた喜多英二講師をはじめ細菌学教室の諸兄姉に謝意を表します。

## 文 献

- 1) Butzler, J. P., Dekeyser, P., Dertain, M. and Dehaen, F.: J. Pediat. 82: 493-495, 1973.
- 2) Skirrow, M. B.: Brit. Med. J. ii: 9-11, 1977.
- 3) Guerrant, R. J., Robert, R. G., Winn, W. C., Jr. and Roberts, R. B.: Amer. J. Med. 65: 584-592, 1978.
- 4) Ruiz-Palacios, G. M., Torres, J., Torres, N. I., Escamilla, E., Ruiz-Palacios, B. R. and Tamayo, J.: Lancet ii: 250-253, 1983.
- 5) Blaser, M. W., Berpowitz, I. D., LaForce, F. M., Cravens, J., Reller, L. B. and Wang, W. -L. L.: Ann. Intern. Med. 91: 179-185, 1979.
- 6) Klipstein, F. A. and Engert, R. F.: Infect. Immun. 45: 314-319, 1984.
- 7) Lambert, M. E., Schofield, P. F., Ironside, A. G. and Mandel, B. K.: Brit. Med. J. 1: 857-859, 1979.
- 8) Drake, A. A., Gilchrist, M. J. R., Washington, J. A., Huizenga, K. A. and VanScoy, R. E.: Mayo Clin. Proc. 56: 414-423, 1981.
- 9) Ruiz-Palacios, G. M., Escamilla, E. and Torres, N.: Infect. Immun. 34: 250-255, 1981.
- 10) Kita, E., Yanagase, Y., Katsui, N. and Kashiba, S.: Proceedings of International Workshop on *Campylobacter jejuni* ii: 69, 1983.
- 11) Yamai S., Obara, Y., Nikkawa, T., Shimoda, Y. and Miyamoto, Y.: Brit. J. Vener. Dis. 55: 90-93, 1979.
- 12) Berry, M. N. and Friend, D. S.: J. Cell. Biol. 43:

- 506-520, 1969.
- 13) **Henley, K. S.** and **Pollard, H. N.** : J. Lab. Clin. Med. **46** : 785-789, 1955.
- 14) **Wróbleski, F.** and **LaDue, J. S.** : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **90** : 210-213, 1955.
- 15) **Karmen, A., Wróbleski, F.** and **LaDue, J. S.** : J. Clin. Invest. **34** : 126-133, 1955.
- 16) **Kind, P. R. N.** and **King, E. J.** : J. Clin. Pathol. **7** : 322-326, 1954.
- 17) **Amador, E., Dorfman, L.E.** and **Wacker, W. E.** C. : Clin. Chem. **9** : 391-399, 1963.
- 18) **Kohn, J.** : Clin. Chim. Acta **3** : 450-454, 1958.
- 19) **Butzler, J. P.** and **Skirrow, M. B.** : Clinics in Gastroenterology **8** : 737-765, 1979.
- 20) **Wite, F. H.** and **Walsh, A. F.** : J. Infect. Dis. **121** : 471-474, 1970.
- 21) **Berden, J. H. M., Muytjens, H. L.** and **Putte, L. B. A.** : Brit. Med. J. **1** : 380-381, 1979.
- 22) **Ampelas, M., Perz, C., Jourdan, J., Nalet, B., Raynaud, A., Emberger, J. M.** and **Michel, H.** : Nouvelle Press Medicale **11** : 593-595, 1982.
- 23) **Reddy, K. R.** and **Thomas, E.** : Gastroenterology **82** : 1156, 1982.
- 24) **Pitkänen, T., Pönkä, A., Pettersson, R.** and **Kosunen, T. U.** : Arch. Intern. Med. **143** : 215-219, 1983.
- 25) **Blaser, M. J., Duncan, D. J., Warren G. H.** and **Wang, W.-L. L.** : Infect. Immun. **39** : 908-916, 1983.
- 26) **Kita, E., Yanagase, Y., Tsukao, N., Katsui, N.** and **Kashiba, S.** : Proceedings of International Workshop on *Campylobacter jejuni* **iii** : 58-62, 1985.
- 27) **Nakamura, T., Fujii, T.** and **Ichihara, A.** : Cell. Biol. Toxicol. **1** : 285-295, 1985.
- 28) **Guerrand, R. L., Lahita, R. G., Winn, W. C.** and **Roberts, R. B.** : Amer. J. Med. **65** : 584-592, 1978.