

## 論文の内容の要旨

獣医学 専攻  
平成22年度博士課程 入学  
氏名 原田 知享  
指導教員名 中山 裕之

論文題目 豚丹毒菌の感染経路と組織親和性に関する研究

豚丹毒菌 *Erysipelothrix rhusiopathiae* はグラム陽性、非抗酸性、非芽胞形成性の桿菌で、豚を筆頭にヒトを含む様々な哺乳類、鳥類に病原性を有している。豚丹毒菌は世界中の土壌や水系、海水中など幅広い環境中に分布している。豚丹毒菌の最大のレゼルボアは豚であり、健康豚の30～50%が扁桃などのリンパ組織に保菌し、糞便、唾液、鼻汁中に菌を排出している。養豚場では持続感染豚から排出された菌が飼育環境を汚染し、それが感染源となって豚丹毒が発生すると考えられている。豚への感染経路として、汚染された環境からの創傷感染や、餌や水を介した経口感染が最も一般的とされている。しかし、経口感染において、豚丹毒菌が豚の消化管のどの部位から体内に侵入しているのか、また、正常な粘膜から侵入可能であるかなど未だ不明な点が多い。豚丹毒菌の経口感染では、扁桃や粘膜関連リンパ組織で菌が感染早期から検出されることから、これらの部位が侵入門戸となっていることが予想されている。

豚丹毒は多彩な病態を呈する感染症であり、臨床的に急性型、亜急性型、慢性型に分類される。急性型豚丹毒では敗血症による発熱、横臥、突然死がおこる。病理組織学的には全身の中～小血管の病変が顕著である。腎糸球体では硝子血栓や菌塞栓が頻発し、小動脈や小静脈には血栓、菌塞栓、血管周囲の単核球浸潤が好発する。これらの血管病変は皮膚、心臓、肺、肝臓、中枢神経系、骨格筋など多臓器でみとめられ、それに伴う出血や梗塞巣も散見される。このように、急性型豚丹毒は血管病変の形成が特徴的であり、豚丹毒菌の血管への親和性は病原性の発現機序を考える上で重要な因子となる。

これらの背景をふまえ、本研究では、豚丹毒菌の体内への侵入経路の解明と組織親和性、特に血管に対する親和性を規定する分子機構の解明を目的とし、豚丹毒菌感染豚の病理学的解析および豚丹毒菌体表層の付着因子を遺伝学的、生化学的、細菌学的に検討した。

第一章では、経口感染による豚丹毒菌の侵入門戸として扁桃に着目し、無菌豚を用いた感染実験を実施し、口蓋扁桃を病理組織学的に検索した。その結果、扁桃組織から多数の菌が、血液や関節液からも少数の菌が分離されたことから、豚丹毒菌は扁桃に定着し、一部の菌は全身に移行することが明らかとなった。組織学的には、扁桃陰窩腔内に多数の菌が観察され、一部の菌は陰窩上皮内や実質のマクロファージ内に散見された。豚のパイエル板 M 細胞のマーカであるサイトケラチン (CK 18) に対する免疫組織化学的検索により、扁桃陰窩上皮には CK 18 陽性細胞が散在することがわかった。さらに、二重蛍光染色により CK 18 陽性細胞内に豚丹毒菌抗原が確認された。透過型電子顕微鏡観察では、菌体を細胞質に含む上皮細胞と、その直下で菌を受け取るマクロファージが観察されたが、同上皮細胞には微絨毛や microfold などの M 細胞の特徴はみとめられなかった。これらの結果から、扁桃陰窩腔が豚丹毒菌の持続感染の場であり、扁桃陰窩上皮に存在する CK 18 陽性細胞が豚丹毒菌の侵入門戸となることが明らかとなった。

第二章では、豚丹毒菌の宿主細胞に対する新たな付着因子としてホスホリルコリン (PCho) に着目した。PCho は様々な細菌の菌体表層構造物を修飾する病原因子であり、PCho 残基の生合成には *lic* 遺伝子群が関与している。豚丹毒菌藤沢株のゲノム解析により、豚丹毒菌の *lic* 遺伝子群は莢膜多糖合成に関連する *cps*

遺伝子群の直下流にタンデムに存在することがわかった。このことから豚丹毒菌の菌体表層に PCho が存在し、その生合成と莢膜多糖の生合成が関連することが予想される。そのため、豚丹毒菌莢膜多糖と PCho に関して、遺伝学的、生化学的解析を行った。その結果、*cps* 遺伝子群と *lic* 遺伝子群はオペロンを形成していた。精製した豚丹毒菌莢膜多糖は抗 PCho 抗体に反応する抗原を含んでおり、ゲノム解析から予想された通り、豚丹毒菌莢膜多糖は PCho 残基により修飾されていることが明らかとなった。さらに、*lic* 遺伝子領域へのトランスポゾン挿入によって PCho 欠損変異株が作製可能であった。このことから、PCho は豚丹毒菌の生存に必須ではないことがわかった。また、PCho 欠損変異株では、SDS-PAGE による莢膜多糖抗原の移動度に変化がみとめられ、PCho は莢膜多糖の構造維持に関与することが示唆された。さらに、PCho 欠損変異株はマウスおよび豚に対して病原性が大きく低下していた。これらの結果から、豚丹毒菌の莢膜多糖は PCho で修飾されており、PCho 残基は豚丹毒菌の病原性に重要であることが明らかとなった。

第三章では、豚丹毒菌 PCho 残基の病原性発現機序として、血管内皮細胞との付着について検討した。様々な病原細菌の菌体表層に存在する PCho 残基は、宿主の血管内皮細胞や上皮細胞などに発現する PAFR を認識して結合し、菌体の細胞への付着に関与している。第二章で豚丹毒菌莢膜多糖は PCho で修飾されていること、および PCho 欠損変異株の病原性が低下することが明らかとなったことを受け、PCho 残基が豚丹毒菌の血管内皮細胞への付着に関与することを明らかとするため、豚血管内皮細胞 (PECs) を用いて *in vitro* で付着試験を行った。その結果、PCho 欠損変異株は野生株と比較し PECs への付着能が低下しており、PCho 残基は PECs への付着に重要であることが示された。しかし、アンタゴニストによる付着阻害試験や PAFR 過剰発現細胞に対する付着試験により、豚丹毒菌の PECs への付着には PAFR を介していないことが示された。一方、豚丹毒菌の SpaA タンパク質は PCho 残基に結合するコリン結合タンパク質であり、SpaA タンパク質に対する抗体により豚丹毒菌の PECs への付着が阻害された。これらの結果から、豚丹毒菌 PCho 残基は PECs への付着に重要であるが、他の病原細菌のような PCho 残基と PAFR との直接作用による付着ではなく、PCho 残基と

結合する SpaA タンパク質を介して付着することが明らかとなった。

第四章では、豚丹毒菌 SpaA タンパク質と結合する PECs 上の受容体を探索した。病原細菌の宿主細胞への付着は感染における重要なステップであり、付着因子と宿主細胞上の受容体の特異的な結合は細菌の組織親和性を規定する。第三章で PECs への付着に関与する付着因子であることがわかった SpaA タンパク質に関して、PECs 側の受容体を特定することは豚丹毒菌の血管への親和性を理解するうえで非常に重要となる。本章では、プルダウン法によってリコンビナント SpaA タンパク質と相互作用した PECs のタンパク質を回収し、LC-MS/MS 法によりその同定を行った。その結果、SpaA タンパク質と相互作用するタンパク質として  $\beta$ -アクチンと Y Box binding protein 1 を得た。しかし、どちらのタンパク質も細胞質内に局在するため SpaA タンパク質の受容体ではないと考えられた。また、種々の病原細菌はアクチン線維を細胞への感染に利用しているが、豚丹毒菌が付着した PECs のアクチン線維の走行には変化がみとめられなかったため、豚丹毒菌の PECs への付着にはアクチン線維は無関係と考えられた。

以上の結果より、豚丹毒菌の体内への侵入経路として、扁桃陰窩上皮に存在する CK 18 陽性細胞が侵入門戸となること、および豚丹毒菌莢膜多糖は PCho で修飾されており、PCho 残基は SpaA タンパク質を介して豚丹毒菌の血管内皮細胞への付着に関与していることが明らかとなった。残念ながら本研究では豚丹毒菌の血管内皮細胞への親和性を規定する宿主側の因子を明らかにできなかったが、得られた一連の知見は、豚丹毒菌の感染経路や組織親和性に関わる詳細な分子機序解明の一助となると思われる。