

[別 紙 2]

論文審査の結果の要旨

はらだ ともゆき

申請者氏名 原田 知享

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、豚丹毒の原因菌である。豚丹毒菌は健康豚の 30～50 %において扁桃などのリンパ組織に常在し、糞便、唾液、鼻汁中に排出されている。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～小血管に血栓、菌塞栓、血管周囲の単核球浸潤が好発する。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により口蓋帆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分離され、豚丹毒菌は扁桃に定着していることがわかった。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マクロファージ内に散見された。また、豚の扁桃陰窩上皮には CK 18 陽性細胞が散在しており、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。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。豚丹毒菌のゲノムには PCho 残基の生合成に関与する *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存在している。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おり、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いた。また、*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。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。PCho 残基は宿主の血管内皮細胞などに発現する PAFR を認識して、細胞付着に関与することが知られている。そのため、豚血管内皮細胞 (PECs) を用いて *in vitro* で豚丹毒菌の付着試験を行った。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いた。しかし、PAFR アンタゴニストで豚丹毒菌の付着は阻害されず、PAFR 過剰発現細胞に対する特異的付着はみられなかった。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、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。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 β -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 PECs への付着に関する直接の受容体ではないと考えられた。

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。

本研究で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。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位を授与するに値すると認めた。