

称号及び氏名	博士(獣医学) 瀬戸 幸路
学位授与の日付	平成20年3月31日
論文名	「Characterization of <i>Corynebacterium ulcerans</i> isolated in Japan and its diphtheria-like toxin (わが国で分離された <i>Corynebacterium ulcerans</i> の性状とジフテリア様毒素の解析)」
論文審査委員	主査 小崎 俊司 副査 馬場 栄一郎 副査 山崎 伸二

論文要旨

緒言

グラム陽性短桿菌である *Corynebacterium ulcerans* はジフテリア様毒素 (DLT) を産生し、ヒトにジフテリア様疾患を引き起こす。1990年代後半からヨーロッパを中心に *C. ulcerans* 感染症が散発的に発生し、関心が高まっている。一方、ジフテリアは *C. diphtheriae* によって起こる偽膜や咽頭炎を主症状とする急性呼吸器感染症で、ジフテリア毒素 (DT) により重篤な心筋炎や神経炎などを引き起こし、その強い感染性から二類感染症に指定されている。DT は分子量約 58 kDa のシングルペプチドで、酵素活性を持つ fragment A と毒素の受容体結合と細胞内移行を行う fragment B から構成されている A-B 毒素である。*C. diphtheriae* はヒトにのみ感染するが、*C. ulcerans* はヒト以外の動物にも感染し呼吸器感染症 (霊長類、ネコ)、乳房炎 (乳牛)、乾酪性壊死 (ヒツジ、ヤギ) や化膿性皮膚炎 (イヌ) などを引き起こすことが報告されている。ジフテリア様疾患を呈した患者のペットから患者と同一の DLT 産生性 *C. ulcerans* が分離されたことから、*C. ulcerans* 感染症が人獣共通感染症として無視できない状況であると考えられる。わが国では 2001 年に初めて菌が分離されて以来、2006 年までにヒトで 5 例、動物で 4 例の事例が報告されている。*C. ulcerans* は 1926 年に Gulbert らによって初めて分離されたが、1995 年に遺伝学的に異なる菌であることが示されるまで *C. diphtheriae* との区別が明確になされておらず、DLT の性状も含め十分な解析が行われていなかった。本研究では国内で分離された *C. ulcerans* を分子疫学的手法により解析するとともに、精製 DLT が DT と異なる免疫学的性状及び毒素活性を保持している可能性について検討した。

第1章 国内分離株の性状と遺伝子解析

*C. ulcerans*はDLT遺伝子(*dlt*)を保持するCorynephageの溶原化によりDLT産生能を獲得すると言われている。病原因子としてPhospholipase D (PLD)を産生することも知られており、毒素産生性の違いによりDLTまたはPLDの一方のみ、もしくはDLTとPLDの両方を産生する3グループに分類される。わが国で分離されたヒト患者由来5株(0102, 0210, 0509, 0510, 0607)と動物由来株3株(Ran, 0-9, lion)を用いて分子疫学的解析および毒素産生性とその遺伝子解析を行った。敗血症で死亡したライオンから分離されたlion株は*dlt*を保有していなかったが、他の7株はすべてDLTを産生した。国内で分離された8株はすべてPLDを産生した。Ranおよび0-9株は2004年に化膿性肺炎で死亡した番のシャチからそれぞれ分離されたが、死後採血された血液中からもDLTが検出された。これまでに海洋性ほ乳類からのDLT産生性*C. ulcerans*分離例の報告はなく、新規の症例であると考えられた。国内分離株を用いてリボタイピングとPulsed-field gel electrophoresis (PFGE)を行った結果、リボタイピングでは5タイプ、PFGEでは3タイプに分類することができた。シャチ由来2株のリボタイプ及びPFGEタイプはほぼ一致した。死亡したシャチと同一動物飼育施設で飼育されていたライオンから分離されたlion株は、リボタイピングおよびPFGEタイプにおいてシャチ由来株よりもヒト患者由来株に近縁であることが示された。毒素遺伝子解析から、国内分離株の持つ*dlt* (1,683塩基)はすべて98.5%以上の相同性を示した。特に患者分離株5株のうち4株(0102, 0210, 0509, 0607)は、ドイツで分離されたA6361株の持つ*dlt*と一致していた。Ranおよび0-9株は同一の*dlt*を持ち、その推定アミノ酸配列はA6361株のDLT(560残基)と一致した。毒素遺伝子解析で明らかになったDTと異なるアミノ酸残基は、受容体結合領域(R domain)に多数存在しDLTの特徴であると考えられた。国内分離株の産生するPLD遺伝子(*pld*) (924塩基)は、*C. ulcerans*標準株であるATCC®51799の*pld*と96.9%以上の相同性を示した。これらの結果からPCRによる判別法を検討したところ、現在行われている生化学的性状を用いた鑑別法より早くDLT産生性*C. ulcerans*を検出できることが示唆された。Corynephageはphageの保持するphage attachment (*attP*) siteと菌の染色体上に存在するbacterial attachment (*attB*) siteが、site-specific recombinationを起こし溶原化することが知られている。ジフテリア毒素遺伝子特異的probeと*attB* site特異的probeを用いてSouthern hybridizationを行ったところ、*dlt*と*attB* siteが同一fragment上に存在することが示唆された。シーケンス解析により*dlt*の下流に*attB* siteが存在していることから、*C. ulcerans*においても*C. diphtheriae*と同様な機構でCorynephageの溶原化が起こると考えられた。

第2章 DLTとDTの免疫学的差異

DLTは抗DT抗体で中和されることが知られているが、抗原性の差異について詳細な研究は行われていない。遺伝子解析の結果からDLTのR domainにDTとは異なるアミノ酸残基が集中して存在していることが示され、両毒素の抗原性に違いがあると考えられた。免疫学的差異を明らかにするために、精製DLTおよび抗DLTポリクローナル抗体および抗DLT R domainモノクローナル抗体を作製し反応性を調べた。0102株をC-Y培地(1% Casamino acid, 2% Yeast extract, 2% maltose)で培養し、培養上清の酸沈殿物からDLTを精製した。精製DLTはVero細胞に対する細胞致死活性とモルモット致死活性において、DTとほぼ同一の毒

素活性を示した。標準抗毒素(ST-AT)に対する反応性を ELISA と細胞培養法 (CCM) により検討したところ、ST-AT は DT と比べて DLT に対する結合力が弱く、同程度の毒力を中和するためには多くの抗体が必要であった。作製したポリクローナル抗体を用いて吸収実験を行ったところ、各毒素を特異的に中和する抗体の存在が明らかになった。overlap extension PCR法により DLT と DT のキメラ fragment B を作製し、特異抗体の認識部位の特定を試みた。その結果、DLT 特異抗体は DLT の 527 残基から 560 残基間を認識し、DT 特異抗体は DT の 490 残基から 526 残基間を認識した。抗 DLT 抗体のみが、DT と異なるアミノ酸残基が集中している領域のペプチド R-1 (CEKIHSDETPLS; 522 残基-532 残基) および R-2 (DDATTFCRPKTP; 490 残基-501 残基) に反応することも明らかになった。リコンビナント DLT R domain を抗原として作製した DLT のみに反応するモノクローナル抗体 (mAb 15-1) は、414 残基から 490 残基間の DLT に特異的なアミノ酸残基を認識した。これら一連の成績から DLT には DT と異なる抗原決定基が存在すると考えられた。

第 3 章 DLT の作用機序

DT はシグナルペプチド (1-25 残基) が切断された 535 残基のシングルペプチドとして菌体外に分泌され、標的細胞上の膜結合型ヘパリン結合性 EGF 様成長因子 (HB-EGF) と CD9 の複合体である受容体に R domain (412-560 残基) を介して結合する。DT はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、エンドソーム内の酸性化により構造変化を起こし、膜に挿入された細胞内移行領域 (T domain, 219-411 残基) を介して酵素活性領域 (C domain, 26-218 残基) が細胞質内に移行する。C domain は真核生物のペプチド伸長因子を ADP リボシル化することによりタンパク質合成阻害を行い、細胞死を引き起こす。DT の感受性には HB-EGF 内に存在する DT 結合領域 (EGF-like domain) の一次構造が重要であることが知られている。種々の細胞を用いて精製 DLT と DT の細胞致死活性を比較したところ、アフリカミドリザル腎臓由来 Vero 細胞やネコ腎臓由来 CRFK 細胞では両毒素が同程度の細胞致死活性を示したのに対して、チャイニーズハムスター卵巣由来 CHO-K1 細胞やシリアンハムスター腎臓由来 BHK-21 細胞では、DLT の細胞致死活性は 10 倍程度低い結果が得られた。Human HB-EGF を過剰発現させた Ltk⁻細胞 (LH 細胞) や CHO-K1 細胞 (CHO-K1H 細胞) では、DLT と DT の細胞致死活性の差は 2 倍程度に縮まり、¹²⁵I 標識した毒素の結合活性にも大きな違いが見られなかった。一方 Hamster HB-EGF を過剰発現させた Ltk⁻細胞 (LhamH 細胞) や CHO-K1 細胞 (CHO-K1hamH 細胞) では、DLT の細胞致死活性は DT に比べて 100 倍低く、感受性の差異はハムスターの EGF-like domain にヒトと異なるアミノ酸を 4 残基もつことに起因していると考えられた。

総括

1. わが国で分離された *C. ulcerans* のうち本研究で用いた 8 株はすべて PLD を産生していたが、DLT 産生性は株により異なっていた。今回調べた 7 つの DLT 産生性株において、DLT はそれぞれ 99% 以上の相同性を示したが DT と比較すると 95% 程度の相同性しか示さず、DT とは異なる性質を持つことが示唆された。
2. DLT を精製し ST-AT、抗 DLT 抗体、抗 DT 抗体および抗 DLT モノクローナル抗体との反応性を調べた結果、DLT に特異的な抗体は R domain に存在する DLT のアミノ酸残基を認識していることから、DLT には DT と異なる抗原決定基が存在していると考えられた。

- DLT は細胞種により DT と異なる毒素活性を示すことが明らかとなった。ハムスター由来細胞で見られた感受性の差異は、HB-EGF の一次構造に依存していることが示唆された。

審査結果の要旨

グラム陽性短桿菌である *Corynebacterium ulcerans* はジフテリア様毒素 (DLT) を産生し、ヒトにジフテリア様疾患を引き起こす。1990 年代後半からヨーロッパを中心に *C. ulcerans* 感染症が散発的に発生し、動物由来感染症として無視できない状況にある。ジフテリアはヒトのみ *C. diphtheriae* により起こる偽膜や咽頭炎を主症状とする急性呼吸器感染症で、主要な病原因子であるジフテリア毒素 (DT) は分子量約 58 kDa の酵素活性を持つ fragment A と毒素の受容体結合と細胞内移行を行う fragment B から構成されている A-B 毒素である。*C. ulcerans* は呼吸器感染症 (霊長類、ネコ)、乳房炎 (乳牛)、乾酪性壊死 (ヒツジ、ヤギ) や化膿性皮膚炎 (イヌ) などを引き起こすことが報告されている。わが国では 2001 年に初めて本菌が分離され、これまでヒトで 5 例、動物で 4 例の事例が報告されている。本研究ではこれら分離株を分子疫学的手法により解析するとともに、DLT が DT と異なる免疫学的性状及び毒素活性を保持している可能性について検討した。

第 1 章では分離株の分子疫学的解析、毒素産生性とその遺伝子解析を行った。敗血症で死亡したライオンからの分離株以外はすべて DLT を産生した。化膿性肺炎で死亡した番のシャチから菌を分離できたが、海洋性ほ乳類から DLT 産生性 *C. ulcerans* 分離例の報告はなく、新規の症例であると考えられた。リボタイピングと Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) を行った結果、リボタイピングでは 5 タイプ、PFGE では 3 タイプに分類することができた。毒素遺伝子解析から、患者分離株 5 株のうち 4 株は、ドイツの分離株の持つ *dlt* と一致した。PCR による判別法を検討したところ、生化学的鑑別法より早く DLT 産生性 *C. ulcerans* を検出できることが示唆された。ジフテリア毒素遺伝子特異的 probe と *attB* site 特異的 probe を用いて Southern hybridization を行ったところ、*dlt* と *attB* site が同一 fragment 上に存在することが示唆されたことから、*C. ulcerans* においても *C. diphtheriae* と同様な機構で Corynephage の溶原化が起こると考えられた。

第 2 章では DLT の受容体認識部位 (R domain) に DT とは異なるアミノ酸残基が集中して存在していることから、DLT と DT 間の抗原性の差異について検討を行った。ヒト患者由来 0102 株を C-Y 培地で培養し、培養上清の酸沈殿物から DLT を精製した。精製 DLT は DT とほぼ同一の毒素活性を示した。ポリクローナル抗体を用いて吸収実験を行い、DLT を特異的に中和する抗体の存在を明らかにした。DLT と DT のキメラ fragment B の反応性から、DLT 特異抗体は DLT の 527 残基から 560 残基間を認識していた。リコンビナント DLT R domain モノクローナル抗体 (mAb 15-1) は、414 残基から 490 残基間の DLT に特異的なアミノ酸残基を認識した。これらの成績から DLT には DT と異なる抗原決定基が存在すると考えられた。

第 3 章では DLT の作用機序を明らかにするために種々の細胞を用いて精製 DLT と DT の細胞致死活性を比較した。アフリカミドリザル腎臓由来 Vero 細胞やネコ腎臓由来 CRFK 細胞では

両毒素が同程度の細胞致死活性を示したが、チャイニーズハムスター卵巢由来CHO-K1 細胞やシリアンハムスター腎臓由来BHK-21 細胞では、DLTの細胞致死活性は 10 倍程度低い結果が得られた。Human HB-EGFを過剰発現させたLtk⁻細胞(LH細胞)やCHO-K1 細胞(CHO-K1H細胞)では、DLTとDTの細胞致死活性の差は 2 倍程度に縮まり、¹²⁵I標識した毒素の結合活性にも大きな違いが見られなかった。一方、Hamster HB-EGFを過剰発現させたLtk⁻細胞(LhamH細胞)やCHO-K1 細胞(CHO-K1hamH細胞)では、DLTの細胞致死活性はDTに比べて 100 倍低く、感受性の差異はハムスターのEGF-like domainがヒトと異なるアミノ酸を 4 残基持つことに起因していると考えられた。

以上の結果は、新規動物由来感染症としての *C. ulcerans* の産生する DLT の特異検出法の開発に繋がるばかりでなく、DT との性状比較は、本毒素の作用機序の解明に重要な手がかりとなる。さらに、本論文の成績はわが国における *C. ulcerans* による動物由来感染症としての対策に有用な知見を提供するものであり、獣医感染症学ばかりでなく医学領域にも大きく貢献すると考えられる。したがって、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。