岐阜大学機関リポジトリ
Gifu University Institutional Repository

病原細菌の糖蛋白及び糖脂質ト食細胞内増殖に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-03-12 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 江崎, 孝行 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/407

研究成果の概要

細菌は環境の変化に応じて様々に代謝系を調節して新しい環境に適応しようとする。その際、菌体表面の抗原を変化させたり多糖体を菌体の周囲に生産して生き残りをはかる。本研究では細菌の表層抗原の変化が感染、発病にどのように影響するかを調べるためチフス菌を中心に表層抗原の変化の解析と病原性の関連を解析した。
チフス菌は 25 度の環境中では表面の N-acetyl-galactosamine-uronic acid homopolymer (Vi 抗原)を生産せず鞭毛抗原を大量に生産し活発に運動している。ところが温度が 37C に変化すると Vi 抗原を生産し、この抗原が菌の表面を覆うようになる。チフス菌は塩の濃度が 300mM と高くなると Vi 抗原を発現しなくなる。その際、低温の場合と同様に鞭毛の発現量を増やし活発に動くようになる。さらにこの状態では分泌タンパク質を増加する。この状態では侵入に必要な分泌タンパク質を大量に生産し腸管のパイエル板の上皮から侵入する。Vi の発現を抑制した状態でチフス菌は人の赤血球と良く凝集するようになる。この凝集は A, B, O のすべての血液型と反応し、血液型物質である糖蛋白、及び糖脂質と、細菌外膜の ompC が受容体であることが分かった。Vi の発現を抑制した状態では付着侵入に適した外膜構造を維持している。

一方、チフス菌は血液に入ると様々な生体の防御因子に遭遇する。補体、抗体、職細胞の貪食と殺菌機構が待ちかまえている。Vi を欠損したチフス菌は補体によって速やかに溶解される。また抗体が存在しなくともマクロファージの補食を受ける。
これには血清中の LPS binding protein 、Mannose 結合蛋白、CRP が重要な働きをしている。マクロファージに補食された Vi を欠損したチフス菌は phagolysosomal complex の中で速やかに消化され殺される。
一方、Vi 陽性のチフス菌は異なった行動をとる。正常な血清中で殺菌されない。C3 の付着率は Vi 欠損株の 2/3 に低下する。しかしこの量の補体が付着した Vi 陽性のチフス菌は 30 分の貪食実験では最終的に Vi 欠損株と殆ど同じ程度に食細胞に補食される。では両者の食細胞内での増殖にはどこに違いがあるのであろうか？。今回の研究で分かったことは Vi 陽性と陰性株の違いは食細胞の活性化の方法にあった。
Vi 陽性株は食細胞に貪食されても食細胞の活性化は起こらない。このことは活性酸素の産生を化学発光で確認した。ところが Vi 欠損株を貪食した食細胞は大量の化学発光を発生させる。この両者の違いが貪食後の運命を決定していると考えられる。Vi 欠損は LPS 受容体を欠損しているマクロファージでは増殖できるが LPS 受容体を発現しているマクロファージの中では増殖できなかった。このことから Phagolysozomal fusion をおこし殺菌処理をおこなうのに CR1, CR3 の補体受容体だけでなく LPS 受容体が不可欠であることが推測された。

このように Vi の発現は単に補体抵抗性だけでなく貪食後の食細胞内での増殖にも深く関わり合っていることが証明された。
細菌表層を覆う糖にアミノ糖が存在することは広く知られている。また例は少ないが糖蛋の存在も報告されている。従来 N-Glycan は新核生物に特有で原核細胞には存在しないと考えられていたが原核細胞である Archebacteria を保有することが証明されている。

Table 1. **細菌に見たかったアミノ糖**

N-Glycan (Archaebacteria)
O-Glycan (Thermoanaerobacter)
Polysialyc acid (Escherichia coli K1.)
Polysialyc acid (Neiserria meningitidis.)
Heparan sulfate backbone (Escherichia coli K5.)
Hyaluronan (Streptococcus pyogenes)
Sialyted lactosamines (Streptococcus agalactiae)
Sialyted lactosamines (Neiserria meningitidis)
N-acetyl-galctosamine-uronic acid polymer (Salmonella typhi)

このような細胞表層の多糖は感染した局所の環境に応じて適切に発現調節されている。Vi の発現は血清中では増加する。さらに食細胞のファゴゾーム内で増殖しているチフス菌は Vi を大量に発現し O 抗原を覆っていることが分かった。一方、30 度以下の環境中で Vi を発現していないチフス菌は人の体内で３６度になると本来なら Vi を発現する。ところが腸管の嫌気性条件、300mM の高い塩濃度では Vi の発現は抑制されパイエル坂から体内に侵入しやすい表層抗原を維持している。このように Vi 抗原の発現を巧みに調節して人への感染を成立させている。

人病原菌の多くはしばしばカプセルを保有している。炭素菌、髄膜炎菌、肺炎球菌、インフルザ菌などカプセルの種類とヒトへの病原性は深く関わっている。
これらのカプセルを持つ病原菌もすべてが人に病気を起こすわけではなく、特定の抗原タイプだけが人によく病気を起こすことも疫学的なデータで証明されているが、その理由を系統的に説明できる理由はまだなされていない。

はしがき

椎間板ヘルニアは退行性変化やカ学的影響により椎間板が脊柱管内に偏位することにより生じ、症状として強い腰痛や下肢痛が起きる疾患である。これは青年や中年といった働き盛りに起こりやすく、休業や失業を余儀なくされる。従来、椎間板ヘルニアの治療は長期間の臥床や手術が必要で、治療のためにかかる社会的損失も多大なものであった。よって経皮的髄核摘出術や化学的髄核融解術(chemonucleolysis）といった小侵襲で、できるだけ短期間のうちに社会復帰が可能な治療法に対する期待は年々高まってきている。従来のchemonucleolysisはキモパパインを使って欧米で実施され十分な臨床効果がみられた。しかし、その副作用（アナフィラキシーショック、神経麻痺）のため一時行われなくなった。本法は副作用さえなければ、より一般的な治療法となりうるすぐれた治療法である。そのため、より安全なプロテアーゼを求めて多くの研究者がしのぎを削っている。カルパインは従来、細胞内プロテアーゼとして知られていたが、我々はこれまでマトリックス分解酵素としてのカルパインに注目し研究を進めてきた。平成3年度の研究ではラットを用いた実験的骨折治癒過程で、カルパインが細胞外に発現することを明らかにした（J of Orthop Res 12: 58-69, 1994）。平成4年度の研究ではヒト赤血球から精製したμ-カルパインを家兎の椎間板に注入し、家兎に実用的な化学的髄核融解術が可能であることが明らかになった（Spine 18:159-164, 1993）。この結果はキモパパインによる効果に匹敵しており、十分臨床応用できる可能性があると考えられた。また、平成5年度の研究では変形性関節症の関節液にμ-カルパイン、 m-カルパイン、カルパスタチンが存在し、しかも細胞外にプロテオグリカン分解活性があることがわかった。また慢性関節リウマチの関節液中にもカルパインが存在すること、関節液中のカルパインが滑膜から分泌されることを明らかにした（Biomed Res 15:77-88, 1994）。平成7年度の研究では関節炎の実験モデルであるマウスII型コラーゲン誘発関節炎で、 m-カルパインが発現しており、カルパインの発現が、関節炎急性期の軟骨破壊と関係していること（Ann Rheum Dis 54:477-483, 1995）、成長軟骨細胞遠沈管培養実験系においてカルパインが軟骨基質の石灰化にともなって増加することを明らかにした（Develop Biol, 170:159-168, 1995）。

今回の研究で我々はカルパインの強力な軟骨プロテオグリカン分解作用に注目した。μ-カルパインは少量の赤血球から抽出可能なので、臨床的に使用する場合には治療を受けようとする患者の自己血から同種プロテアーゼとして得ることが可能である。自己血より精製するため、キモパパインなどと違いアレルギー反応が少ないと思われる。我々は、硬膜内にカルパインが注入された場合を想定し、脳脊髄液による酵素活性の阻害について検討した。

その結果、脳脊髄液には通常の濃度でカルパインの活性を阻害する作用が認められた。カルパインによるchemonucleolysis を施行する際に、万一誤って硬膜内にカルパインが注入されたとしても、脳脊髄液によりカルパインの活性が阻害され、重篤な神経合併症の発現が回避できる可能性が示唆された。

椎間板内注射療法はヘルニアの治療だけでなく、脊柱変形の矯正や、脊椎固定術への応用が展開されており、安全なプロテアーゼとしての自己血から精製したカルパインを用いた治療に対する需要は高まっている。