

氏 名 (本籍)	工 藤 由 起 子 (東 京 都)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博乙第 1 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 9 年 9 月 2 6 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	<i>Clostridium sporogenes</i> 出血毒素に関する研究
審 査 委 員	主査 東京農工大学 教授 小 川 益 男 副査 帯広畜産大学 教授 品 川 森 一 副査 岩 手 大 学 教 授 品 川 邦 汎 副査 岐 阜 大 学 教 授 平 井 克 哉 副査 東京農工大学 助教授 金 子 賢 一

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

抗生物質の投与に伴って発生する下痢は人及び動物の化学療法上、極めて重要な問題であるにもかかわらず、下痢の原因菌については不明な部分が多い。

本論文は、抗生物質の投与によるウサギの下痢の発症に関して、発生率と原因菌の研究を行い、下痢発生率の高いセフトラザン投与時の下痢原因菌として新たに疑われた

*Clostridium sporogenes* が産生する出血毒の動物及び培養細胞に対する毒性、物理化学的・酵素化学的性状等について、以下に示すような成果を得たものである。

#### 1. ウサギにおける抗生物質起因性下痢の発生率及び原因菌の検索

ウサギに抗生物質を静脈内投与した場合の下痢の発生率は、抗生物質の種類によって著しく異なり、また、下痢の原因菌は投与抗生物質の種類によって異なる可能性が示された。セフトラザン投与による下痢のほとんどは、*Clostridium difficile* が原因であると考えられたが、セフトラザン投与による下痢では、腸管漿膜面に出血病変が認められ、*C. difficile* を含む既知の病原菌の関与は認められなかった。しかし、腸管内には *Clostridium innocuum* と *Clostridium sporogenes* が高い菌数で含まれていた。両菌種の純培養上清をそれぞれウサギの背部に皮内投与したところ、*C. sporogenes* の培養上清は接種部位に出血を起こしたが、*C. innocuum* は起こさなかった。これらのことから、セフトラザン起因性下痢の発症は *C. sporogenes* と密接にかかわっている可能性が示された。

#### 2. *Clostridium sporogenes* 出血毒素の産生条件及び動物に対する毒性

*C. sporogenes* が産生する出血毒素は、豊富な栄養下で、特に増殖定常期の早期に効率よく産生され、本菌が産生する既知ブローゼンとは異なることが示唆された。ウサギは、マウス、ラット及びモルモットに比べて本出血毒素に対する感受性が高く、皮内投与により、投与部位に出血が起こり、光学顕微鏡下で赤血球の血管外漏洩と多くの炎症細胞の浸潤が認められた。腹腔内投与でウサギは腹腔内臓器に著しい出血を起こし 24 時間以内に死亡し、組織学的には腹腔内臓器の漿膜面に出血がみられたが、それ以外の変化は認められなかった。腸管内投与では、5～20 時間後に腸管壁の出血及び腸管腔内の液体貯留が起こり、組

組織的には赤血球と多くの炎症細胞の侵潤が粘膜及び粘膜下織にみられたが、腸管上皮細胞の変化及び組織の崩壊は認められなかった。従って、*C. sporogenes*出血毒素の毒性はこれら2つの所見を示す既知の腸管出血性細菌毒素とは著しく異なることが示された。

### 3. 培養細胞に対する*Clostridium sporogenes*出血毒素の毒性

本出血毒素は、血管内皮培養細胞に対して増殖阻害活性及び細胞の円形化作用を示したことから、生体の血管内皮細胞に直接的に作用する可能性が示された。しかし、腸管上皮培養細胞等に対してはこれらの作用を示さなかった。これらの実験結果は、ウサギ腸管内投与実験で得られた所見を裏付けているものと考えられる。

### 4. *Clostridium sporogenes*出血毒素の精製及び性状

疎水カラムゲラフィー、ヒドロキシアパタイトゲラフィー及びゲル濾過の組合わせによって精製した本出血毒素は、SDS-PAGE上において、単一バンドのみを示し分子量80kDaと計算された。また本出血毒素の出血活性は、EDTAによって完全に失活したが、 $Zn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 及び $Mg^{2+}$ の添加によって完全に再活性化された。PMSF及びウレイドによる失活はみられなかった。また、本毒素は、アミノ酸及びコラーゲンタイプ I 及び II を分解しなかったが、コラーゲンタイプ III 及び IV を分解したことから、コラーゲナーゼであることが判明した。さらに、本出血毒素はコラーゲンタイプ I、II、III 及び IV から作製されたゼラチンを分解した。また、コラーゲンタイプ III 及び IV は血管の主要構成成分であることから、本出血毒素のコラーゲン分解性が出血機序の重要な因子であると考えられた。

以上のように、本研究はセファマグール投与ウサギから*C. sporogenes*が高い比率と菌数で分離されること、本菌は既知の細菌が産生する出血毒素とは全く異なる性状の出血毒素を産生すること、本出血毒素に対する感受性はウサギで高いこと、本出血毒素は血管内皮細胞への直接作用及び血管構成コラーゲンの分解作用を有し、本菌がウサギのセファマグール起因性下痢に関与している可能性の高いことなどを示したものである。

なお、これらの研究内容は、すでにThe Journal of Medical Microbiology, Microbial Pathogenesis, The Journal of Veterinary Medical Science 及びBiochemical and Biophysical Research Communication の4誌に5編の原著論文として掲載されている。

## 審 査 結 果 の 要 旨

抗生物質の投与に伴って発生する人及び動物の下痢の原因菌については不明な部分が多い。申請者は、国立感染症研究所において、ウサギを用いた注射用抗生物質製剤の安全性試験に関する日常業務の経験からヒントを得て、表題の研究に取り組み、以下に示すように化学療法及び動物を用いた抗生物質の検定上極めて有意義な成果をあげており高く評価できる。

### 1. ウサギにおける抗生物質起因性下痢の発生率の究明及び原因菌の検索

ウサギに抗生物質を静脈内投与した場合の下痢の発生率は、抗生物質の種類によって著しく異なり、また、下痢の原因菌は投与抗生物質の種類によって異なる可能性が示された。スパクトム/セファラジン投与による下痢のほとんどは、*Clostridium difficile*が原因であると考えられたが、セファマグール投与による下痢では、腸管漿膜面に出血病変が認められ、*C. difficile*を含む既知の病原菌の関与は認められなかった。しかし、腸管内には*Clostridium innocuum* と*Clostridium sporogenes*が高い菌数で含まれていた。両菌種の純培養上清をそれぞれウサギの背部に皮内投与したところ、*C. sporogenes*の培養上清は接種部位に出血を起こしたが、*C. innocuum*は起こさなかった。これらのことから、セファ

Ⅱ起因性下痢の発症は *C. sporogenes* と密接にかかわっている可能性が示された。

## 2. *Clostridium sporogenes* 出血毒素の産生条件及び動物に対する毒性

*C. sporogenes* が産生する出血毒素は、豊富な栄養下で、特に増殖定常期の早期に効率よく産生され、本菌が産生する既知プロテアーゼとは異なることが示唆された。ウサギは、マウス、ラット及びモルモットに比べて本出血毒素に対する感受性が高く、皮内投与により、投与部位に出血が起こり、光学顕微鏡下で赤血球の血管外漏洩と多くの炎症細胞の浸潤が認められた。腹腔内投与でウサギは腹腔内臓器に著しい出血を起こし24時間以内に死亡し、組織学的には腹腔内臓器の漿膜面に出血がみられたが、それ以外の変化は認められなかった。腸管内投与では、5～20時間後に腸管壁の出血及び腸管腔内の液体貯留が起こり、組織的には赤血球と多くの炎症細胞の浸潤が粘膜及び粘膜下織にみられたが、腸管上皮細胞の変化及び組織の崩壊は認められなかった。従って、*C. sporogenes* 出血毒素の毒性はこれら2つの所見を示す既知の腸管出血性細菌毒素とは著しく異なることが示された。

## 3. 培養細胞に対する *Clostridium sporogenes* 出血毒素の毒性

本出血毒素は、血管内皮培養細胞に対して増殖阻害活性及び細胞の円形化作用を示したことから、生体の血管内皮細胞に直接的に作用する可能性が示された。しかし、腸管上皮培養細胞等に対してはこれらの作用を示さなかった。これらの実験結果は、ウサギ腸管内投与実験で得られた所見を裏付けているものと考えられる。

## 4. *Clostridium sporogenes* 出血毒素の精製及び性状

疎水カラムゲラフィー、ヒドロキパタイトゲラフィー及びゲル濾過の組合わせによって精製した本出血毒素は、SDS-PAGE上において、単一バンドのみを示し分子量80kDaと計算された。また本出血毒素の出血活性は、EDTAによって完全に失活したが、 $Zn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  及び  $Mg^{2+}$  の添加によって完全に再活性化された。PMSF及びウレドリンによる失活はみられなかった。また、本毒素は、アジカゼイン及びコラーゲンタイプⅠ及びⅡを分解しなかったが、コラーゲンタイプⅢ及びⅣを分解したことから、コラーゲナーゼであることが判明した。さらに、本出血毒素はコラーゲンタイプⅠ、Ⅱ、Ⅲ及びⅣから作製されたゼラチンを分解した。また、コラーゲンタイプⅢ及びⅣは血管の主要構成成分であることから、本出血毒素のコラーゲン分解性が出血機序の重要な因子であると考えられた。

以上のような成果に基づき本論文は、*C. sporogenes* がウサギのセフトグーⅡ起因性下痢に関与している可能性の高いことなどを示したものである。

当審査会は、平成9年8月11日、提出論文等について慎重に審議した結果、本論文は岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文にふさわしい内容のものであることを認めた。