

氏名(本(国)籍)	小野久弥(宮城県)
主指導教員名	岩手大学 教授 原澤 亮
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博甲第369号
学位授与年月日	平成24年9月18日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岩手大学
学位論文題目	ブドウ球菌エンテロトキシンA型の嘔吐発現機構の解明
審査委員	主査 岐阜大学 教授 石黒直隆 副査 帯広畜産大学 教授 鈴木宏志 副査 岩手大学 教授 原澤 亮 副査 東京農工大学 教授 藤川 浩 副査 岐阜大学 教授 杉山 誠

論文の内容の要旨

黄色ブドウ球菌の産生するブドウ球菌エンテロトキシンA (SEA) は、嘔吐活性を有する嘔吐型食中毒の原因毒素であり、約80年以上前にその存在が明らかにされているにもかかわらず、SEA嘔吐活性の発現機序については不明な点が多い。これまでに、霊長類およびジャコウネズミ (スunks: *Suncus murinus*) を用いた研究で、経口的に摂取されたSEAが胃または十二指腸に作用し迷走神経を刺激して、腸管においてセロトニン (5-HT) の放出を誘導して嘔吐が誘発されることが示されている。本研究では、経口的に摂取されたSEAの消化管内における動態および5-HT放出を誘導するメカニズムを解明すべく、ジャコウネズミを用いて消化管におけるSEAの動態と標的細胞の同定を形態学的に解析した。また、同定した標的細胞に対する形態学的解析および薬理的解析によりSEAの嘔吐発現機構を解明した。

第1章では、ジャコウネズミの消化管におけるSEAの動態を形態学的に解析した。ジャコウネズミにSEAを100 µg/動物で胃内投与し、経時的にジャコウネズミから消化管を摘出し免疫学的に解析した。抗SEA抗体を用いて消化管におけるSEAの挙動を観察したところ、粘膜上皮にはSEA陽性細胞はみられなかったが、小腸の粘膜下組織に多数のSEA陽性細胞を確認した。これらの結果より、*in vivo*において消化管内腔に到達したSEAは粘膜上皮バリアを通過し、短時間で粘膜下組織の細胞内に集積することが明らかとなった。ジャコウネズミにおいてSEAが嘔吐を引き起こすまでの潜伏時間は30分から120分であることから、粘膜下組織にてSEAと結合している細胞がSEAの標的細胞である可能性が高いと考えられた。

第2章では、SEAが結合した粘膜下組織の細胞の同定を行った。胃および小腸において抗SEA抗体および肥満細胞マーカーを用いた二重染色により、SEAが結合している細胞は

肥満細胞であることが明らかとなった。また SEA 陽性細胞において 5-HT の染色性が、SEA 投与後低下することが観察された。さらにトルイジンブルー染色により、SEA 非投与群では粘膜固有層および粘膜下組織において多数のメタクロマジー陽性細胞（肥満細胞）が確認されたが、SEA 投与した個体では粘膜下組織に存在するメタクロマジー陽性細胞数は時間とともに減少した。一方、粘膜固有層のメタクロマジー陽性細胞には変化は認められなかった。このことから SEA は粘膜下組織の肥満細胞に結合して、脱顆粒を誘導することが示唆された。さらに、肥満細胞の脱顆粒を脱顆粒阻害剤クロモグリク酸ナトリウムでおさせることにより嘔吐が抑制されることを確認した。また、SEA を経口投与する 30 分前に脱顆粒阻害剤であるクロモグリク酸ナトリウムを腹腔内投与したところ、SEA による嘔吐惹起が抑制された。以上の結果から、SEA による嘔吐発現機序において粘膜下組織に存在する肥満細胞が標的細胞であり、肥満細胞の脱顆粒によって嘔吐が引き起こされることが明らかとなった。

SEA は嘔吐活性とともに、スーパー抗原活性を有し大量のサイトカイン放出により毒性性ショック症候群を引き起こす。SEA の嘔吐活性がスーパー抗原活性による二次的なものかどうかを確認する目的で、第 3 章では、嘔吐活性を持たないスーパー抗原性毒素である毒素性ショック症候群毒素 (TSST-1) の消化管内動態を SEA の場合と比較した。TSST-1 をジャコウネズミに経口投与し、経時的に組織を採取した。抗 TSST-1 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、TSST-1 は SEA と同様に投与後粘膜下組織において陽性細胞が確認された。しかし、二重染色を行ったところ TSST-1 が結合している細胞は MHC クラス II 分子陽性細胞であり、肥満細胞ではないことが明らかとなった。このことから SEA の肥満細胞への結合はスーパー抗原性毒素に共通するものではなく、嘔吐活性を有する毒素に特有の現象であることが明らかとなった。

SEA は嘔吐モデル動物において腹腔内投与によっても嘔吐を引き起こすことが知られている。SEA の経口投与時の嘔吐発現機序と腹腔内投与時の嘔吐発現機序が同じものであるかは明らかではない。このため、第 4 章では、腹腔内投与時の SEA の生体内動態と標的細胞を同定し、経口投与と比較した。脱顆粒阻害剤を投与後、SEA を腹腔内投与し嘔吐を観察した結果、脱顆粒阻害剤投与により SEA による嘔吐が抑制された。また、SEA 腹腔内投与後、胃および腸管において抗 SEA 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、SEA は胃内投与と同様に粘膜下組織に集積しており、その標的細胞は肥満細胞であった。これらの結果から、SEA は腹腔内投与時も胃および腸管の粘膜下組織へと移行し、肥満細胞に脱顆粒を引き起こして嘔吐を惹起することが明らかとなった。

本研究は、SEA は短時間で消化管の粘膜下組織へと移行し、肥満細胞に脱顆粒を引き起こすことから嘔吐が惹起されることを明らかにした。また、SEA による肥満細胞への結合は、TSST-1 にはみられなかったことから、嘔吐を引き起こす SEA 特有の活性であり、スーパー抗原活性によるものでないことを明らかにした。本研究はブドウ球菌食中毒の防除と制御を考える上で極めて重要な知見であるとともに、細菌毒素の生体内輸送および肥満細胞の機能において大変興味深い情報を提供した。

審 査 結 果 の 要 旨

黄色ブドウ球菌が産生するブドウ球菌エンテロトキシン A (SEA) は、嘔吐活性を有する嘔吐型食中毒の原因毒素であるが、SEA の嘔吐の発現機序については、現在まで不明な点が多い。これまでに、嘔吐実験モデルである霊長類およびジャコウネズミ (*Suncus murinus*) を用いて、経口的に摂取された SEA が腸管においてセロトニン (5-HT) の放出を誘導することで嘔吐を誘発することが示されている。そこで本研究では経口的に摂取した SEA の消化管内における動態および 5-HT 放出を誘導するメカニズムの解明を目的に、ジャコウネズミ嘔吐モデルを用いた SEA の消化管における標的細胞の同定を行った。さらに SEA の嘔吐発現機構についても解析した。

第1章では、ジャコウネズミの消化管におけるSEAの動態を、形態学的に検討し、ジャコウネズミにSEA 100 µgを胃内に投与して、消化管内での動態を解析した。抗SEA投与後粘膜上皮にはSEAは観察されなかったが、胃および小腸の粘膜下組織に多数のSEA陽性細胞が存在した。これは、消化管内腔に到達したSEAが粘膜上皮バリアを通過し、粘膜下組織に存在する細胞へと集積することを明らかとしたものであり、粘膜下組織にてSEAが標的細胞に結合して嘔吐発現を引き起こしたことを示す結果といえる。

第2章では、SEAを投与後粘膜下組織にて結合した細胞の同定を行った。抗SEA抗体および肥満細胞マーカーを用いて二重染色を行ったところ、SEAが結合している細胞は肥満細胞であった。さらにトルイジンブルー染色により、粘膜固有層および粘膜下組織において多数のメタクロマジー陽性細胞（肥満細胞）が確認されたが、SEA投与後時間とともにメタクロマジー陽性細胞数は減少した。一方、粘膜固有層のメタクロマジー陽性細胞は変化が認められなかった。この結果は、SEAは粘膜下組織の肥満細胞に作用し脱顆粒を誘導することを示したものである。さらに、SEAを経口投与前に脱顆粒阻害剤クロモグリク酸ナトリウムを腹腔内投与したところ、SEAによる嘔吐惹起が抑制された。第2章では、SEAの標的細胞は肥満細胞であり、肥満細胞の脱顆粒により嘔吐が引き起こされることを示した。

第3章では、SEAの肥満細胞への結合が嘔吐発現に必須であることを確認する目的で、嘔吐活性を持たないスーパー抗原性毒素である毒素性ショック症候群毒素（TSST-1）の消化管内動態をSEAの場合と比較した。その結果、TSST-1はSEAと同様に投与後粘膜下組織において陽性細胞が確認されたが、二重染色を行ったところTSST-1が結合している細胞はMHCクラスII分子陽性細胞であり、肥満細胞ではないことが明らかとなった。第3章では、SEAの肥満細胞への結合はスーパー抗原性毒素に共通するものではなく、嘔吐活性を有する毒素に特有の現象であることを明らかにした。

第4章では、SEAの経口投与時の嘔吐発現機序と腹腔内投与時の嘔吐発現機序が同じものであるかを明らかにする目的で、腹腔内投与時のSEAの生体内動態と標的細胞を同定して、経口投与の場合と比較した。脱顆粒阻害剤を投与後、SEAを腹腔内投与し嘔吐を観察した結果、脱顆粒阻害剤投与によりSEAによる嘔吐惹起が抑制された。またSEA抗体を用いた免疫染色では、SEAは胃内投与と同様に粘膜下組織に集積しており、その標的細胞は肥満細胞であることを明らかにした。このことからSEAは腹腔内投与時も胃および腸管の粘膜下組織へと移行し、肥満細胞に脱顆粒を引き起こして嘔吐を惹起することが示された。

本論文は、SEAが経口的に摂取された後、短時間で消化管の粘膜下組織へと移行し標的細胞の肥満細胞で脱顆粒が起こることにより嘔吐が惹起されることを分子レベルで示したものである。本研究の結果は、ブドウ球菌食中毒の防除と制御を進めていく上で極めて重要な知見といえる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

1) 題 目 : Submucosal mast cells in the gastrointestinal tract are a target of staphylococcal enterotoxin type A

著 者 名 : Ono, H. K., Nishizawa, M., Yamamoto, Y., Hu, D.-L., Nakane, A., Shinagawa, K. and Omoe, K.

学術雑誌名 : FEMS Immunology & Medical Microbiology

巻・号・頁・発行年 : 64 (3) : 392-402, 2012

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, Type S and T
著 者 名 : Ono, H. K., Omoe, K., Imanishi, K., Iwakabe, Y., Hu, D. L., Kato, H., Saito, N., Nakane, A., Uchiyama, T. and Shinagawa, K.
学術雑誌名 : Infection and Immunity
卷・号・頁・発行年 : 76 (11) : 4999-5005, 2008

- 2) 題 目 : High affinity of interaction between superantigen and T cell receptor V β molecules induces a high level and prolonged expansion of superantigen-reactive CD4⁺ T cells
著 者 名 : Omoe, K., Nunomura, W., Kato, H., Li, Z. J., Igarashi, O., Araake, M., Sano, K., Ono, H. K., Abe, Y., Hu, D. L., Nakane, A., Kiyono, H., Takakuwa, Y., Shinagawa, K., Uchiyama, T. and Imanishi, K.
学術雑誌名 : The Journal of Biological Chemistry
卷・号・頁・発行年 : 285 (40) : 30427-30435, 2010

- 3) 題 目 : A feline hemoplasma, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', detected in dog in Japan
著 者 名 : Obara, H., Fujihara, M., Watanabe, Y., Ono, H. K. and Harasawa, R.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
卷・号・頁・発行年 : 73 (6) : 841-843, 2011

- 4) 題 目 : Acidic environments induce differentiation of *Proteus mirabilis* into swarmer morphotypes
著 者 名 : Fujihara, M., Obara, H., Watanabe, Y., Ono, H. K., Sasaki, J., Goryo, M. and Harasawa, R.
学術雑誌名 : Microbiology and Immunology
卷・号・頁・発行年 : 55 (7) : 489-493, 2011