

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Debabrata Biswas

世界的なヒト腸管感染症の主要な病原菌の1つである *Campylobacter jejuni* の感染、発病のメカニズムについては未だに明らかにされていない。本研究では *C. jejuni* の病原性のメカニズムを明らかにするため、*C. jejuni* と細胞の関係を種々の方向から検討した。

第1章ではヒト臨床株27株と健康な動物由来株5株の細胞付着性ならびに細胞侵入性を INT-407 細胞を用いて検査し、さらに細胞侵入メカニズムを明らかにする目的で各種細胞侵入阻害物質を用いて細胞侵入経路を検討した。

その結果、32株中26株(81%)は投与菌数の0.0203~0.5%以下で、6株(19%)は0.7416~2.1714%の菌が細胞に付着した。INT-407細胞への侵入性は投与菌数の0.0012~0.4226%のはばでみられ、2/32株(6%)では0.02%以下の低いレベルで、3/32株(9%)では高いレベル(0.20%以上)で侵入した。残り27株(85%)は中程度の0.0028~0.1825%が侵入した。動物由来株には高度侵入性株はなく、高度侵入性株は全てヒト臨床株であった。細胞侵入性とトキシン産生性には特別な相関性はみられなかった。代表的な10株の *C. jejuni* の INT-407細胞への侵入性は5/10株でサイトカラシン D (マイクロフィラメント:MFの脱重合物質)により50~78%の高いレベルで、2/10株では40%以下の低いレベルでの侵入阻止がみられた。

一方、*C. jejuni* の7/10株の細胞侵入性はコルヒチン、デメコルシン、ノコダゾール(マイクロチューブル:MTの脱重合物質)では40%以下の低いレベルで阻止されたが残りの3/10株は40~66%で阻止された。コートピットフォーメーション阻害物質であるG-ストロファンチンとモノダンシルカダベリン、さらにエンドゾームアシディフィケーション阻害物質であるモネンシンでは *C. jejuni* の細胞侵入は著しく減少した。また、走査電子顕微鏡の観察では、菌が細胞に接触した後 INT-407細胞表面からシユードポッドの伸長が菌を囲むようにみられた。

第2章では3株の高度侵入性の *C. jejuni* を用いて INT-407細胞への *C. jejuni* の侵入における MF と MT の関与を詳細に検討した。MF と MT の脱重合物質による細胞侵入阻止の濃度依存性、さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いて INT-407細胞への *C. jejuni* 感染を観察した。

その結果、サイトカラシン D とコルヒチン、ノコダゾールの濃度の上昇に反比例して *C. jejuni* の侵入が減少した。*C. jejuni* は感染1時間後には細胞周辺で観察された。菌は時間の経過とともに細胞内に移動し核周囲に接近した。また、MF と MT は *C. jejuni* による INT-407細胞の侵入の間、菌と極めて近接した位置で観察された。

第3章において、高度侵入性、中程度侵入性、低度侵入性の *C. jejuni* を用いて *C. jejuni* の細胞侵入

時のチロシンリン酸化蛋白の役割について検討した。

その結果、*C. jejuni*の細胞侵入はチロシンプロテインキナーゼ (TPK) とプロテインキナーゼCの広範な阻害物質であるスタウロスポリンで67~80%減少した。TPKに特異的な阻害物質であるトリフオスチン46とゲネスティンではそれぞれ84~86%、95%以上の侵入阻止効果がみられた。しかし*S. Typhimurium*ではこのような侵入阻止効果はみられなかった。*C. jejuni*感染細胞ではチロシンリン酸化が誘導され、分子量170, 145, 90, 60, 55KDのトライトンX-100可溶性の蛋白が出現した。この蛋白はゲネスティンの存在下では消失した。さらにチロシンリン酸化蛋白は付着した菌体に近接して存在した。

以上の知見から、*C. jejuni*の細胞内への侵入はいくつかの要因、つまり菌の活性化、菌の分泌する蛋白、ならびに活性化した細胞が関与していることが強く示唆された。*C. jejuni*の細胞侵入におけるメカニズムは以下のように考えられた。*C. jejuni*の細胞への付着により分泌される菌の蛋白は細胞のレセプターとの相互作用により細胞を活性化する。この相互作用はTPKを活性化し、細胞内にチロシンリン酸化蛋白を誘導することで、細胞骨格の重合を助長する。これらはレセプター蛋白と結合し、その結果、細胞膜蛋白が*C. jejuni*の糸胞内侵入を誘導する。

以上水研究は、*C. jejuni*細胞内侵入性のメカニズムが他の腸管感染菌に比べて複雑であることを明らかにし、*C. jejuni*の病原性メカニズムの解明により学術上、応用面での*C. jejuni*の感染防御に寄与するものである。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値のあるものと認めた。