

論文の内容の要旨

論文題目 **Analysis of the pathogenicity of *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen (YPM)**

和訳 エルシニア菌由来スーパー抗原 YPM による
トキシックショック誘導機序の解析

指導教官 五十嵐 隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 狩野 博嗣

エルシニア属の病原性細菌としては、*Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* の 3 種が知られている。このうち、*Yersinia pseudotuberculosis* は、腸間膜リンパ節炎の患者の腫大したリンパ組織から最初に発見されたグラム陰性桿菌で、ノネズミやノウサギに寄生し、これらの動物の糞便によって汚染された飲料水や食肉、野菜を通じて経口感染する。臨床症状としては、腹痛・下痢・嘔吐といった消化器症状を引き起こすのみならず、冠動脈瘤、関節炎、急性腎不全などの続発症をもたらすことがある。これらの急性期症状および続発症の発症機序は不明だが、近年発見された *Yersinia pseudotuberculosis* 由来のスーパー抗原(YPM)が関

与する可能性が論じられている。

細菌由来の主たるスーパー抗原としては、黄色ブドウ球菌の腸内毒素群とトキシックショック症候群毒素、A群β溶連菌の発熱性外毒素群が一つのファミリーを形成しており、いずれもヒトやマウスT細胞に対して強い活性化作用を示し、極めて微量で細胞増殖やサイトカインの産生を誘導する。

今回私は、YPM の病原的意義をより明らかにするために点突然変異を導入した mutant YPM を作製するとともに、YPM のスーパー抗原性が、生体内において、黄色ブドウ球菌や A 群β溶連菌の発熱毒素群と同様に急性のショック誘導作用をもつのか否か、その機序はいかなるものかを明らかにするために、マウスを用いた動物実験モデルを作成した。さらに、抗 YPM モノクローナル抗体を用いてショック誘導の予防効果について検討した。

今回の実験に用いたマウスは、6-12 週の BALB/c マウス、C.B-17/lcr.*scid/scid* マウス、更に BALB/c マウスの T 細胞を移入した C.B-17/lcr.*scid/scid* マウスである。用いた抗原は、wild-type YPM (wYPM) と、ヒト PBMC に対する細胞増殖刺激活性が wild-type の 75% 以上ある L7Q (7 番目のアミノ酸をロイシンからグルタミンに置換した mutant YPM) 、wild-type の 25% 以下である D88G (88 番目のアミノ酸をアスパラギン酸からグリシンに置換した mutant YPM) である。抗 YPM モノクローナル抗体は、ヒト PBMC に対する細胞増殖を完全に抑制する YSA8E3 と、部分的にしか抑制できない YSA12B8 を用いた。

実験プロトコールは、各マウスにまず D-galactosamine を 30mg

腹腔内投与し、その 30 分後に YPM または mutant YPM を 100 μ g 静注した。モノクローナル抗体を用いた実験では、2 種のモノクローナル抗体を、YPM 静注の 2 時間前、同時、2 時間後の計 3 回、各 1 mg ずつ腹腔内投与した。YPM 静注 7 日後まで生存のモニタリングを行うとともに、一部のマウスでは静注後 12 時間時における病理組織の検討を行った。また、静注 2 時間後の血漿 TNF- α 値および 4 時間後の血漿 IFN- γ 値、IL-10 値の測定を行うとともに、末梢血、脾臓、リンパ球において静注後 24 時間以内の T 細胞 V β レパートリーの推移をみた。

BALB/c マウスは、wYPM, L7Q, D88G および PBS 投与により、それぞれ 6/7 (86%), 5/7 (71%), 1/7 (14%), 0/7 (0%) 例が死亡した。中和活性を有する MAb YSA8E3 を用いた時には、死亡は 0/6 例となった。C.B-17/lcr.*scid/scid* マウスは 6 例全例死亡に到らなかったが、BALB/c マウスの T 細胞を移入した C.B-17/lcr.*scid/scid* マウスは、4 例全例死亡した。病理組織学的検索では、wYPM を投与された BALB/c マウスにおいて、肝臓および脾臓の細胞壊死や鬱血、心外膜における石灰化を顕著に認めた。MAb YSA8E3 を同時投与された BALB/c マウスでは、組織変化が軽減されていたが、一方 T 細胞を移入された C.B-17/lcr.*scid/scid* マウスでは、wYPM 投与により BALB/c マウスとほぼ匹敵する組織変化を示した。

BALB/c マウスにおいて静注 4 時間後の血漿 IFN- γ や 2 時間後の血漿 TNF- α の産生は、wYPM で最も亢進しており、以下 L7Q、D88G、PBS の順で、細胞増殖刺激活性の強弱と相関していた。MAb YSA8E3 を同時投与された際には、静注 4 時間後の血漿 IFN- γ や 2 時間後の血

漿 TNF- α の産生は低下した。C.B-17/lcr.*scid/scid* マウスに wYPM を投与した際の血漿 IFN- γ 値および血漿 TNF- α 値は、BALB/c マウスに投与した時に比して有意に低値であり、T 細胞を構築された C.B-17/lcr.*scid/scid* マウスに投与した際の血漿 IFN- γ 値および血漿 TNF- α 値は、T 細胞欠損の C.B-17/lcr.*scid/scid* マウスに投与した時に比して有意に高値であった。また、T 細胞抗原レセプターの可変領域(V β)に YPM に反応する V β 8 遺伝子ファミリーを持つ T 細胞が、YPM 静注後ごく早期から末梢血中より著明に減少するという現象 (very early deletion)がみられ、しかもこの T 細胞は、主として肝臓に移行し、炎症性サイトカインを産生し、組織障害をもたらしたものであると思われた。Very early deletion の程度は、wYPM、MAb YSA12B8 +wYPM、L7Q、MAb YSA8E3 +wYPM、D88G の順に顕著で、この現象が致死作用と強い関連をもつという注目すべき結果が得られた。

結論として、YPM も他の発熱毒素群と同様に急性ショックを誘導することが明らかになり、その機序として T 細胞の存在や T 細胞から産生される IFN γ の関与、更には YPM 反応性活性化 T 細胞の末梢血中から肝臓などの 2 次組織への移行が重要であることが示された。また、感染初期に十分量の中和抗体を投与することで、スーパー抗原によるトキシックショックを回避できることが示され、治療への応用も可能になると思われた。