

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Suvamoy Datta

病原微生物は種々のシステムを利用して宿主細胞のバリアー機構を破壊し、宿主を病気へと導く。*Campylobacter jejuni* は下痢症の重要な起因菌であるが、その病原性の分子生物学的メカニズムについては不明な点が多い。本論文では *C. jejuni* の宿主腸内定着、上皮細胞への侵入、Bacterial translocation に関する病原性因子の分子生物学的メカニズムを検討した。本論文は四つの章で構成されている。

第1章では、すでに病原性因子として認識されている遺伝子から細胞への付着や腸内定着に関与する遺伝子として *flaA*, *cadF*, *racR*, *dnaJ*、細胞侵入性に関与する遺伝子として *virB11*, *ciaB*, *pldA*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* は cytotoxin 産生に関与する遺伝子として、ギランバレー症候群に関与する遺伝子として *wlaN* を選択し、病原性因子の保有率が *C. jejuni* の分離源により違いがあるかどうかをプライマーを用いて PCR によりヒトの臨床材料、鶏肉、ブロイラーと牛の糞便からの分離株合計 111 株について検討した。その結果 11 の病原性遺伝子の保有状態の違いから 10 のタイプに分けられた。しかし、分離株の由来による病原性遺伝子の保有状況に大きな違いはみられなかった。検査した 111 株は 107 株 (96.4%) で 8~10 の病原性遺伝子を保有していた。

第2章ではニワトリの孵化後 *C. jejuni* が徐々に腸内に定着するが、それらの分離菌株において上記 11 病原性遺伝子の保有率がどのように変化するかを検討した。約 3,000 羽を飼育する鶏舎から孵化後 21、28、42、56 日に約 50 羽ずつ、総排泄口より滅菌綿棒で糞便材料を採取した。その結果全体で 235 株を分離し、日齢が進むにつれ 11、8、5、3 タイプの *C. jejuni* が分離され、しだいに分離株のタイプが減少した。最も多く分離されたタイプは *virB11* と *wlaN* 以外の 9 つの遺伝子を保有しており、日齢が進むにつれこのタイプは分離率は上昇した。*pldA* は日齢が進につれ分離株の保有率は 87.9% (21 日齢)、94.3% (28 日齢)、85.1% (42 日齢)、100% (56 日齢) の分離株で保有されていた。

第3章では第1章で分離した 111 株に新たなタイプ 1 株を加えて 12 のタイプに分け、それぞれの INF-407 細胞への付着性と侵入性について検討した。その結果、*pldA* を保有する菌株は保有しない株に比べて細胞侵入性が強く、*pldA* が *C. jejuni* の細胞侵入性に強く関与していることが示唆された。これまでに INT-407 細胞への侵入性に強く関与していると

報告されている *virB11* と *ciaB* 保有と細胞侵入性とは今回の結果では相関はみられなかった。

そこで、*pldA* の欠損変異株ならびに補完株を作製し INT-407 細胞への付着性と侵入性を野生株と比較した。その結果、細胞付着性には欠損株 (*pldA*⁻)、補完株 (*pldA*⁺) 欠損株 + プラスミド (*pldA*⁻)、野生株間に差はみられなかったが、欠損株と欠損株 + プラスミド株では著しい細胞侵入性の違いがみられ、*pldA*⁻ の株では侵入性が著しく低下した。これらの成績は *pldA* が *C. jejuni* の細胞侵入性に強く関与していることが示唆した。

さらに上記 4 株を無菌 CF#1 マウスに経口投与して腸内定着性と腸管以外の臓器への Bacterial translocation を比較した。その結果、*pldA* 欠損株では小腸下部と盲腸での定着した菌数が低くなった。また脾臓と肝臓へ Bacterial translocation する菌数は投与 3 日目でいずれの株も違いはみられなかったが、6 日目では *pldA* 欠損株ではすでに脾臓と肝臓での菌は検出されなかった。これに反して野生株と補完株では 3 日目同様の菌数で検出された。*pldA* は細胞侵入性ばかりでなく、マウスの腸内定着や脾臓、肝臓での生存性に影響を与えることが明らかにされた。

第 4 章では *pldA* 遺伝子の細胞侵入に関わるメカニズムを各種インヒビターと上記 4 株、*pldA* 欠損株、補完株、欠損株 + プラスミド、野生株の組み合わせによる INT-407 細胞での侵入性を比較した。今回は cytochalasin-D, G-strophanthin と monodansylcadaverin, monansin, staurosporine を inhibitor として用いた。結果として cytochalasin-D と monansin では *pldA* 欠損株の細胞侵入阻止がみられなかった。野生株ではいずれの inhibitor でも侵入阻止がみられた。以上の結果から *pldA* は *C. jejuni* の microfilament depolymerization と endosome acidification を利用した細胞侵入に関与していることが明らかとなった。

以上本研究では *C. jejuni* の病原因子として *pldA* が極めて重要な働きをしていることを明らかにしたことにより、今後の予防手段を検討し、病原菌と非病原菌を識別する上で重要な知見を与えるものと考えられる。よって審査委員一同は、本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。