

学 位 論 文 要 旨

氏 名 新井 達



論 文 題 目

「Mycostatic effect of recombinant-dermcidin against *Trichophyton rubrum* and reduced dermcidin expression in the sweat of tinea pedis patients.」

(組み換えダーミシジンの *T.rubrum* に対する増殖抑制効果と白癬患者における汗中ダーミシジン量の低下)

指 導 教 授 承 認 印

天羽 康之



「Mycostatic effect of recombinant-dermcidin against *Trichophyton rubrum* and reduced dermcidin expression in the sweat of tinea pedis patients.」

(組み換えダーミシジンの *T.rubrum* に対する増殖抑制効果と白癬患者における汗中ダーミシジン量の低下)

氏 名：新井 達

学位論文要旨

背景：白癬はもっともありふれた皮膚糸状菌感染症であり、全世界人口の 20%-25% が罹患しているといわれている。感染成立後に白癬菌に対する遅延型過敏反応が誘導され、皮膚病変の拡大防止に機能していることが明らかとなっている。しかし、感染成立前、即ち皮膚に付着した白癬菌の生着阻止に関する機構についてはほとんど解明されていない。

目的：人の皮膚に恒常発現している抗菌ペプチドであるダーミシジン (DCD) が、宿主側の防御因子として白癬菌の生着にどのように関与しているのかを明らかにするため、組換え型の DCD (r-DCD) を作成し、白癬菌のなかでもっとも代表的な皮膚糸状菌である *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) に対する r-DCD の抗菌活性を検討すると共に、白癬患者の汗中 DCD 濃度についても併せ検討した。

方法：r-DCD は、ヒト DCD 遺伝子領域のシグナル配列を除いた 91 アミノ酸配列に相当する領域を三菱化学生命科学研究所より供与された pTKK19ubinew vector の *EcoT22I*/ *SalI* サイトに組み込み、大腸菌 BL-21(DE3)株に導入してヒスチジン融合蛋白として発現させた。タロンセファロースを用いたクロマトグラフィーにより粗精製した後、ユビキチン加水分解酵素 1 によりヒスチジントグ部を除去し、実験に用いた。抗菌活性の検討は、10mM ナトリウムリン酸液にて各々一定数に調整した *Escherichia coli* (*E. coli*)、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)、及び *T. rubrum* を 3～4 時間一定濃度の r-DCD と反応させ、10 段階希釈した後、それぞれの菌に適した平板培地に培養しコロニー数を数えた。抗菌活性は次式により算出し、殺菌率で示した [1 - DCD 中における (各菌の) 生菌数 / 10mM ナトリウムリン酸液中の生菌数] × 100。

次に r-DCD 存在下における *T.rubrum* の代謝活性の変化を NADH 法にて経時的に検討した。さらに北里大学医学部倫理委員会の承認を得た上で、足白癬患者 (15 名、平均年齢 43 歳±8 歳, 32～59 歳) と健常人 (33 名、平均年齢 41 歳±8 歳, 31～59 歳) の汗をエルゴメーターを用いた運動負荷により採取し、汗中に含まれるダーミシジン濃度を抗 DCD 抗体を用いた固層 ELISA 法により比較検討した。

結果および考察：r-DCD は *E. coli* に対し 97%、*S. aureus* に対し 100% の殺菌率を示したことから、活性型に精製できたことが示された。コロニー形成法を用いた *T. rubrum* に対する抗菌活性は、健常人の平均 DCD 濃度である 50 μ g/ml では殺菌率は、40.5%であったが、270 μ g/ml では 93.4%となり、濃度依存性に殺菌率は増加した。また、r-DCD 存在下における *T. rubrum* の代謝活性は、有意に低下していた。以上の結果から DCD は、白癬菌に対して静菌的に作用して増殖を抑制することが考えられたため、実際に足白癬患者と健常人の汗中 DCD 濃度を比較検討した。足白癬患者の DCD 濃度は平均 4.57 μ g/ml で、健常人のそれは平均 23.15 μ g/ml であり、足白癬患者の汗中 DCD 濃度は健常人と比較して有意に減少していた。

以上の結果から、DCD は皮膚における自然免疫の一因子として *S. aureus* や *E. coli* などの細菌に対して殺菌的に作用するが、*T. rubrum* に代表される白癬菌に対しては静菌的に作用して *T. rubrum* の増殖を抑制し、表皮のターンオーバーによる角層の脱落とともに *T. rubrum* を排除していることが考えられた。

今回の研究結果に、これまでの諸家の研究結果を加え、白癬菌に対する生体防御機構を総括すると 1. 通常は DCD が白癬菌の増殖を抑制し、表皮のターンオーバーと共に白癬菌を物理的に排除する方向に働いている、2. 白癬菌が皮膚に定着して炎症を惹起した場合は、炎症刺激により表皮角化細胞がカテリシジン等の白癬菌に抗菌活性を有する他の抗菌蛋白を発現し、殺菌に働くとともに、炎症性細胞の走化を誘導して獲得免疫を誘導し、細胞性免疫により感染菌を排除するといった連続的な防御メカニズムが考えられる。

足白癬の感染率に関与する因子として、季節やブーツの着用などが知られているが、これらは菌の増殖に関わる菌側の増強因子と考えられる。一方で、糖尿病患者では自律神経障害により汗の分泌量が減少すると共に足白癬の罹患率が増加することが知られており、今回の研究結果から考えると絶対的な DCD の不足が一因と考えられる。今後 DCD の発現や機能をさらに詳細に検討することで、DCD 感受性微生物による皮膚感染症の発症や易感染性の制御につなげたい。