

学位論文要旨

Vibrio vulnificus による健康宿主における壊死性軟部組織感染症
発症機構の解明

Elucidation of the mechanisms by which *Vibrio vulnificus*
causes necrotizing soft-tissue infections in healthy hosts.

北里大学大学院獣医学系研究科

獣医学専攻 博士課程

山崎 浩平

Kohei Yamazaki

指導教授 上野 俊治

平成 29 年度

2017

Vibrio vulnificus は、水や食物を介した経口感染、あるいは開放創への海水の接触等による創傷感染により生体内に侵入する。本菌は、経口感染において、主に肝硬変などの基礎疾患を持つ人に感染し、軟部組織壊死や敗血症を引き起こすことから日和見感染症起因菌として知られている。しかしながら、近年、疫学調査の結果、創傷感染患者に限ってはその多くが基礎疾患をもたない健常人であることが報告された。

これまでに、健康な宿主体内における *V. vulnificus* の増殖機構は全く解明されていない。そこで著者は *V. vulnificus* が創傷感染において健常人の宿主体内での増殖に必須とする因子を同定し、その感染における役割の解明を試みた。

第一章 *V. vulnificus* 創傷感染モデルの確立

V. vulnificus がヒトに創傷感染した場合、感染局所に腫脹、水腫、蜂窩織炎、および壊死性筋膜炎を引き起こす。マウスの大腿部皮下に *V. vulnificus* を接種すると接種局所に腫脹が認められた。Evans Blue を静脈内に投与したところ、血管から感染軟部組織中へ Evans Blue が漏出し、血管透過性の亢進により水腫が引き起こされていることが判明した。病理組織検査では、蜂窩織炎、壊死性筋膜炎、および筋肉壊死が確認できた。血清検査において組織傷害の指標となる項目の上昇が認められた。以上の結果から、マウス大腿部皮下へ *V. vulnificus* を接種することにより、ヒトの創傷感染で認められる病態を再現できることが示された。

第二章 *V. vulnificus* の生体内増殖必須因子の同定

第一章で確立した *V. vulnificus* 創傷感染モデルに Signature-tagged transposon mutagenesis (STM)法を適用した。STM 法は識別可能な塩基配列を内部に配置したトランスポゾンを用いて変異株を作出し、それらをまとめて生体に接種することで複数の変異株の中から生体内での生存能力が低下した株を選抜可能な方法である。STM 法により選抜した 71 クローンの弱毒株のトランスポゾン挿入遺伝子を解析した結果、①鞭毛、細胞膜、線毛、あるいはファージに関与する細菌の細胞構造、②糖や鉄の代謝、および③細胞分裂や鞭毛回転の制御が、健常な宿主体内での生存に関与することが示唆された。

第三章 *V. vulnificus* の創傷感染機構における鞭毛運動の役割

第二章の STM 法によって鞭毛による運動性が健常な宿主体内での増殖に重要であることが示唆された。鞭毛の欠損は *in vitro* においても増殖性や分泌系に影響を及ぼすことから、本章では、鞭毛を発現するが、回転制御不可能な運動性変異株を作出し、以下の解析を行なった。

1) 軟部組織内での増殖性および拡散能力の解析

V. vulnificus に発光遺伝子を導入後、マウスの大腿部皮下に接種した。In vivo imaging system を用いて、体内動態を解析した結果、野生株は時間依存性に軟部組織中で拡散したが、運動性変異株の拡散効率は低下していた。

2) 筋肉内侵入性の解析

感染局所における病理組織検査の結果、野生株では筋肉組織の

深部に及ぶ広範な好中球の遊走と壊死が確認されたが、運動性変異株では、筋膜上への好中球の集積と筋肉組織の浅層部に限局した壊死が認められるのみであった。*V. vulnificus* 特異抗体を用いた免疫組織染色により、野生株は筋肉の深部にまで侵入していたのに対し、運動性変異株は筋膜上に留まっていることが明らかとなった。これらの結果を反映するように、運動性変異株の筋肉内菌数は、野生株と比較して少なかった。すなわち、鞭毛の適切な回転制御が皮下から筋肉内への侵入および生体内での増殖に必須であることが明らかとなった。

3) 自然免疫回避機構の解析

V. vulnificus の運動性変異株は筋肉内に侵入できず、皮下に留まることで、好中球に殺菌されることが示唆された。そこで、好中球減少マウスを作成して *V. vulnificus* を感染させ、感染動態に及ぼす影響を解析した。筋肉内へ侵入可能な野生株の筋肉内菌数は好中球減少の影響を受けなかった。一方で、運動性変異株の筋肉内菌数は好中球の減少により増加した。さらに野生株および運動性変異株を筋肉内に接種した結果、全ての株が好中球の影響を受けず、コントロールマウスと好中球減少マウスにおける筋肉内菌数に差は認められなかった。

以上の結果から、創傷感染した *V. vulnificus* は皮下から筋肉内に侵入することにより、好中球による殺菌を逃れ、増殖することができる結論した。

第四章 創傷感染局所における *V. vulnificus* 菌数抑制法の開発

第二章および第三章の結果から、*V. vulnificus* の創傷感染にお

いては、菌の鞭毛運動が筋肉内への侵入および増殖に必須であることが明らかとなった。*V. vulnificus* 鞭毛の主要構成蛋白質である FlaB は Toll-like receptor 5 (TLR5) によって認識され、強力な免疫応答を誘導することが知られている。著者は FlaB を抗原としたワクチンにより *V. vulnificus* 創傷感染における病態進行を抑えられるか否かを調べた。精製 FlaB を免疫したマウスの抗 FlaB 抗体価は対照マウスのそれと比較して上昇していることを確認した。免疫マウスと対照マウスに *V. vulnificus* を皮下接種し、筋肉内菌数、脾臓中菌数、および生存時間を比較した結果、筋肉内菌数に有意差が認められたものの、脾臓中菌数と生存時間に差は認められなかった。以上の結果から FlaB ワクチンは、全身感染は抑えられないものの、感染局所における *V. vulnificus* の増殖を抑えられることが明らかとなった。

本論文において著者は *V. vulnificus* の筋肉内への侵入が自然免疫の回避、生体内での増殖、そして壊死性軟部組織感染症の発症に極めて重要であることを示した。この知見は、急速に進行する本感染症の新規制御法の開発に大いに寄与するものと考えられる。