

京都大学	博士（人間健康科学）	氏 名	伊 藤 洋 志
論文題目	Enhancement of neutrophil autophagy by an IVIG preparation against multidrug-resistant bacteria as well as drug-sensitive strains (IVIG 製剤による薬剤感受性菌株および多剤耐性菌株に対する好中球のオートファジーの増強)		
(論文内容の要旨)			
【背景】近年、医療の高度先進化や高齢化により易感染性患者が増加し、起炎菌の多剤耐性化とともに感染症の重症化が大きな問題となっている。重症感染症においては、抗菌薬と静注用免疫グロブリン（Intravenous immunoglobulin：IVIG）製剤併用療法の有効性が報告されているが、その機序の詳細は不明である。好中球は旺盛な食作用によって強力に殺菌し、生体防御の一次機構に中心的な役割を果たしている。そこで、本研究では多剤耐性菌に対する好中球の貪食能、O_2^-の産生能、および殺菌能に及ぼす IVIG 製剤の効果について検討した。さらに、細胞外微生物に対する殺菌機構である neutrophil extracellular traps (NETs) 形成や、細胞内タンパク質分解機構の一つで細胞内寄生細菌の排除にも貢献し、自然免疫機構における役割が注目されるオートファジーについても評価した。 【材料と方法】健常人末梢血から好中球を分離した。被検菌は、大腸菌および緑膿菌の臨床分離株（薬剤感受性株、多剤耐性株）を用いた。補体源として IgG を除去したヒト AB 型血清を用いた。IVIG 製剤は、献血ベニコロン®-I を 1mg/ml の濃度で用いた。殺菌能はコロニー法で、貪食能はサイトスピン標本の鏡検法で、O_2^-産生能は cytochrome c 法でそれぞれ評価した。NETs 形成は、細胞培養上清の myeloperoxidase (MPO) 活性の測定と走査型電子顕微鏡観察で解析した。オートファジーは LC3B-II/I 比の変化をウェスタンブロット法で、好中球細胞質の LC3B および ATG5 のドット形成を免疫蛍光染色標本の共焦点レーザー顕微鏡による観察で、オートファゴソームの観察を透過型電子顕微鏡観察でそれぞれ解析した。 【結果】IVIG 製剤により、好中球の貪食能、O_2^-産生、MPO 放出および殺菌能が増強された。また、NETs 形成の増強も観察された。LC3B-II/I 比は貪食刺激後 3 時間をピークに増大し、以降は減少した。また、LC3B および ATG5 のドット形成が増強し、一部菌との共局在が観察された。さらに、菌を内包するオートファゴソームが有意に増加した。オートファジー阻害薬の bafilomycin により、細胞内生菌数はコントロール比 217% に、また O_2^-産生を約 50%に抑制した条件では同 435%に上昇した。以上の結果は、大腸菌および緑膿菌の薬剤感受性株と多剤耐性株で同等の成績であった。 【考察】IVIG 製剤による好中球の殺菌能増強は、免疫グロブリンのオプソニン作用による菌の貪食促進効果によるものと考えられる。貪食依存性に誘導される O_2^-産生、MPO 放出、NETs 形成、およびオートファジーも増強されることを明らかにした。多剤耐性菌株に対する好中球の殺菌能増強効果を明らかにし、重症感染症において IVIG 製剤が有効である機序のひとつを示した。興味深いことに、本研究で用いた大腸菌は細胞内寄生性を有しないが、IVIG 製剤により菌を内包するオートファゴソーム数が増加した。また細菌のみ、オルガネラのみ、および細菌とオルガネラの両方を内包するオートファゴソームが観察されたが、このような所見はこれまでに報告がなく、好中球に特有なオートファジー機構の存在が示唆される。また、オートファジーを抑制させると好中球の殺菌能が低下したことから、オートファジーは好中球の殺菌能に重要な役割を果たすことが考えられる。			

--