

氏 名 池 上 裕 美 子
 学位(専攻分野) 博 士 (医 学)
 学 位 記 番 号 論 医 博 第 1684 号
 学位授与の日付 平 成 11 年 3 月 23 日
 学位授与の要件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
 学 位 論 文 題 目 Effects of alkaline protease or restrictocin deficient mutants of *Aspergillus fumigatus* on human polymorphonuclear
 (alkaline protease又はrestrictocin欠損の*Aspergillus fumigatus*変位株の
 ヒト多核白血球機能に及ぼす効果)
 (主査)
 論文調査委員 教 授 光 山 正 雄 教 授 湊 長 博 教 授 泉 孝 英

論 文 内 容 の 要 旨

(目的) *Aspergillus fumigatus* は侵襲性肺アスペルギルス症の原因菌種として最も頻度が高く、多種類のtoxinsやproteasesを産生することが知られている。その中でelastolytic activityを有するalkaline protease, ribonucleotoxinであるrestrictocinなどが有力な病原性因子の候補として挙げられ、これまで種々の検討が行われているが、未だ明確な結論は得られていない。*A. fumigatus* に対するヒトの最も重要な防御機構は、経気道的に侵入した*A. fumigatus* 分生子に対する肺胞マクロファージの貪食殺菌、および*A. fumigatus* の発芽分生子及び菌糸に対する好中球による傷害殺菌機構であることが知られている。一方、*A. fumigatus* が肺胞マクロファージや好中球の機能を抑制する因子を産生することによって、局所の防御機構を免れて自らの定着、増殖を容易にし、局所での病変形成を促している可能性を示唆する知見が我々を含めていくつかの研究グループから既に報告されている。本研究では*A. fumigatus* の病原性因子の有力な候補と考えられているalkaline proteaseとrestrictocinに焦点をあて、これらの物質の単独欠損変異株及びその野生株の培養濾液を用いて、好中球機能に対する抑制効果を比較検討した。

(方法) 臨床分離された*A. fumigatus* 野生株とそれより遺伝子操作により作製されたalkaline protease, restrictocinの単独又は両者欠損変異株の各々の分生子 2×10^7 個を300mlのMedium-199 (M-199) 中で37℃ 5日間振盪培養し、培養濾液を得た。ヒト多核白血球 (PMN) はヘパリン加静脈血からデキストラン及びフィコール比重遠沈により採取した。PMNの遊走能をformyl-methionyl-leucyl-phenylalanineを用いたアガロース法で、phorbol myristate acetateで刺激した時のPMNのO₂-放出量をcytochrome C還元法で、PMNによる菌糸傷害作用をXTT colorimetric assay によって測定し、これらのPMN機能に及ぼす各々の培養濾液の効果を比較検討した。

(結果) 野生株の培養濾液は、M-199 (対照) と比較してPMNの遊走能、O₂-放出量、菌糸傷害作用を有意に抑制した。alkaline protease又はrestrictocin単独欠損株の培養濾液はM-199と比較してPMNの遊走能、O₂-放出量を有意に抑制したが、菌糸傷害作用の抑制効果には有意差を認めなかった。野生株と単独欠損株の比較では、PMNの遊走能に関して野生株の方が有意に強く抑制したが、O₂-放出量、菌糸傷害作用には有意差を認めなかった。alkaline proteaseとrestrictocin両者欠損株のPMN機能に対する抑制効果は著しく減弱し、遊走能に関してのみM-199と比較して有意な抑制効果を認めた。

(考察) 本研究によって、*A. fumigatus* 培養濾液がPMN機能に対する抑制活性を有すること、alkaline protease又はrestrictocinの産生能を欠く変異株の培養濾液ではその抑制活性の一部が減弱することが示され、alkaline proteaseとrestrictocinはPMN機能に対する抑制能の一翼を担っていることが示唆された。これまで分離精製された*A. fumigatus* 産生物質の単独での貪食球に対する抑制効果の検討成績はgliotoxinなどで報告されているが、野生株と単一物質欠損変異株の培養濾液を用いて、当該物質欠損の影響を検討した報告はない。本研究の成績はalkaline proteaseとrestrictocinが病原性因子の一つである可能性を支持するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

アスペルギルス症は深在性真菌症の中で最も頻度が高いものの一つでありかつ難治性とされているが、呼吸器内科領域で経験する肺アスペルギルス症は全身抵抗減弱患者に発症する全身播種性のものより気道や肺の既存傷害をもとに発症し慢性に経過する症例がむしろ多数を占めている。しかしながらこのような状況での発症の様式や機序の解明はこれまで殆どなされていない。

本研究は、アスペルギルスから産生される諸物質がアスペルギルスに対する好中球を主体とするヒトの防御能を局所的に抑制することによってアスペルギルスの局所での定着・増殖をもたらす、ひいては肺アスペルギルス症の発症につながるのではないかという作業仮説のもとに、*Aspergillus fumigatus*の病原性因子の有力候補と想定されているalkaline proteaseとrestrictocinに焦点をあてて行われた。

本研究では*A. fumigatus* 野性株と遺伝子操作により作製されたalkaline proteaseやrestrictocinの単一欠損変異株及び両者欠損変異株の培養濾液を用いて、多核白血球の遊走能、 O_2 -放出量、菌糸傷害作用に対する抑制効果を比較検討している。その結果*A. fumigatus* 培養濾液がこれらの多核白血球の機能に対する抑制活性を有すること、alkaline protease又はrestrictocinの産生能を欠く変異株の培養濾液ではその抑制活性の一部が減弱することを認め、alkaline proteaseとrestrictocinが多核白血球の機能を抑制し、発症に関与している可能性を示した。

A. fumigatus の単一物質欠損株を用いて当該物質の多核白血球に対する影響を検討したのは本研究が初めてであり、以上の研究は*A. fumigatus* の病原性因子の解明に貢献し、肺アスペルギルス症の発症機序と病態の解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 11年 2月 10日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。