The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Vibrio vulnificusの金属プロテアーゼ : 血管透過性亢進とその制御の機構ならびに感染症における役割
Author(s)	三好, 伸一
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3085283
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【4】

氏名・(本籍)	三好伸一（みよししんいち）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 9511 号
学位授与の日付	平成3年2月15日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	***Vibrio vulnificus* の金属プロテアーゼ：血管透過性亢進とその制御の機構ならびに感染症における役割**
論文審査委員	(主査) 教授 西原 力 (副査) 教授 近藤 雅臣　教授 岩田平太郎　教授 三村 務

論文内容の要旨

水系に棲息している *Vibrio vulnificus* は，傷口周辺に浮腫や潰瘍などの皮膚病変が現われる創傷感染症あるいは汚染された海産物の摂取後敗血症に至る経口感染症の原因細菌である。そして経口感染症では創傷感染症と類似した皮膚の2次病変が出現する。したがって，この細菌は病原因子として血管透過性を亢進し浮腫を形成する因子を分泌していると考えられる。なお，経口感染症は日和見感染症で生体の感染防御能力が低下している高齢者における症例がほとんどである。

プロテアーゼおよびその阻害因子は生体の生理機能の調節に重要であるので，病原微生物のプロテアーゼが侵入しこのバランスがくずれると生体は危機的な状態に陥ると考えられる。ところで，*Pseudomonas aeruginosa* などの日和見病原菌はプロテアーゼを分泌しており，このプロテアーゼが細菌の病原性に関係していると考えられている。さて，*V. vulnificus* も全ての株がプロテアーゼ（*V. vulnificus* protease：ＶＶＰ）を分泌しているので，申請者も病原因子としてＶＶＰに着目した。そして，ＶＶＰが血管透過性を亢進させ皮膚病変の発現に深く関与していること，および血漿中にＶＶＰの不活性化因子が存在しておりＶＶＰの作用を制御していることを明らかにした。

ラットあるいはモルモットの皮内にＶＶＰを投与した結果，ＶＶＰの濃度に依存して血管透過性が亢進した。ラットの皮膚の場合，この作用は抗ヒスタミン剤の同時投与によってほぼ完全に抑えられた。さらに，ヒスタミンの貯蔵細胞である肥満細胞を分離しＶＶＰと37℃で保温したところ，細胞が破壊されることなくヒスタミンが遊離された。よって，ラットの皮膚においては，ＶＶＰの肥満細胞に対する直接作用によってヒスタミン遊離が誘発され，遊離されたヒスタミンの作用で血管透過性が亢進したと考えられた。これに対して，モルモットの皮膚の場合，透過性亢進作用は血漿カリクレインの阻害剤の

同時投与でほぼ完全に阻害され，アンジオテンシン変換酵素（ブラジキニン分解酵素）の阻害剤では3倍増強された。また，モルモットの血漿にＶＶＰを加え37℃で保温したところ，血漿プレカリクレインが活性型へ変換され，血漿カリクレイン（ブラジキニンを切り出す酵素）が産生された。さらに，精製したハーゲマン因子あるいは血漿プレカリクレインをＶＶＰと混合し37℃で保温した結果，両方の前駆体ともＶＶＰによって活性型へ変換された。したがって，モルモットの皮膚においては，ＶＶＰはハーゲマン因子と血漿プレカリクレインの両方を活性型に変換させるという新しい機構でハーゲマン因子－血漿カリクレイン－キニン系を活性化させ，その結果産生されるブラジキニンの作用によって，血管透過性を亢進させていると考えられた。

このようにＶＶＰは血管透過性を亢進させたが，作用の持続時間がわずか数分間であったので，血漿中にＶＶＰの不活性化因子が存在している可能性が示唆された。血漿中には数多くのプロテアーゼ不活性化因子が存在しているが，ＶＶＰのような細菌性金属プロテアーゼに対する特異的な不活性化因子は発見されていない。そこで，多くのプロテアーゼを不活性化できるα－マクログロブリンファミリー（α－macroglobulins：α Ms）がＶＶＰに対する不活性化因子であろうと推測されたので，次の実験を行った。ウシ血漿のαＭであるα_2－マクログロブリン（α_2Ｍ）とＶＶＰを種々の濃度比で，30℃，30分間保温し，残っているＶＶＰの活性を測定した。ＶＶＰの血管透過性亢進活性と蛋白質基質に対する分解活性は等モル量のα_2Ｍで抑制された。しかし，低分子量のペプチド基質に対する分解活性は過剰量のα_2Ｍでも阻害されなかったので，他のプロテアーゼと同様に，α_2Ｍ分子に取り込まれＶＶＰが不活性化されたことが示唆された。さらにαMsが生体内でＶＶＰの作用を制御しているのか検討した。モルモット血漿のαＭであるマクロアルブミン（ＭＡ）に対する抗体をＶＶＰと混合してモルモットの皮内に接種したところ，ＶＶＰの血管透過性亢進作用は10倍増強された。このＭＡはモルモットの皮膚には含まれていなかったが，ＶＶＰを接種すると血管外へ漏出しその場でＶＶＰを分子内に取り込んだ。したがって，生体内に接種されたＶＶＰは，血管透過性亢進作用の結果αＭの血管外への漏出を引き起こし，この蛋白質に取り込まれ不活性化されてしまうことが明らかとなった。

V. vulnificus 感染症の特徴は，手足の皮膚病変特に浮腫の形成である。そこで，血管透過性亢進作用を持つＶＶＰの生菌の浮腫形成作用に対する関与についても検討した。生菌を動物の皮内に投与すると数時間以内に浮腫が形成されたが，この作用はＶＶＰに対する抗体もしくはＶＶＰの透過性亢進作用を阻害する因子の投与によって有意に抑制された。さらに，ＶＶＰの産生が低下した変異株は，浮腫形成能力が野生株よりも明らかに低下していた。よって，ＶＶＰが生菌接種時に形成される浮腫の重要な原因因子であり，皮膚病変の発現と深く関係していると考えられた。

本研究によって，ＶＶＰはヒスタミン遊離を誘発する機構とブラジキニン産生系を活性化する機構の両方によって血管透過性を亢進させ，本菌感染症の特徴である浮腫形成と深く関わっていること，ならびに，血管透過性の亢進によって血管系から漏出してきたαＭ分子に取り込まれ不活性化されることが明らかとなった。これらの知見は，プロテアーゼとその阻害因子のバランスが外来性のプロテアーゼの侵入によってくずれると生体に危機が訪れること，ならびに，生体は外来性のプロテアーゼに対する不活性化因子を生体防御機構として保持していることを示しており，細菌感染症におけるプロテアーゼ

の病原因子としての役割に重要な位置付けを与えたものと思われる。

論文審査の結果の要旨

三好君は，日和見感染症原因菌の一つである *Vibrio vulnificus* の金属プロテアーゼ（VVP）が，ラットにおいては肥満細胞からヒスタミンの遊離を誘発する機構により，モルモットにおいてはハーゲマン因子－血漿カリクレイン－キニン系を活性化してブラジキニンの産生を促進する機構により，血管透過性亢進作用を示すこと，VVPのこの作用は血管外に漏出したα－マクログロブリンにより不活性化されること，生菌の透過性亢進作用は抗VVP抗体により抑制されること，VVP産生能の低下した変異株生菌では浮腫形成能が弱いことなどを明らかにした。そして，VVPが本菌感染症，特に浮腫形成における病原因子であり，本菌による皮膚病変の発現と深く関係していることを示し，日和見感染症原因菌の病原因子として金属プロテアーゼの可能性を示唆した。

以上の研究結果は，薬学博士の学位請求論文として充分価値あるものと認められる。