



Title	Disruption of the epithelial barrier by botulinum haemagglutinin(HA) proteins - differences in cell tropism and the mechanism of action between HA proteins of types A or B, and HA proteins of type C
Author(s)	竹ヶ原, 夕紀
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54225
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	たけがはらゆき 竹ヶ原 夕紀
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 6 2 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学 位 論 文 名	Disruption of the epithelial barrier by botulinum haemagglutinin (HA) proteins—differences in cell tropism and the mechanism of action between HA proteins of types A or B, and HA proteins of type C(各血清型 のボツリヌスHAは互いに異なるメカニズムで上皮細胞バリアを破壊す る)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 目加田英輔 (副査) 教 授 杉本 央 教 授 月田早智子

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

ボツリヌス毒素（150kDa、血清型A～G型）は、メタロプロテアーゼ活性を有する神経毒素である。本毒素に起因するボツリヌス食中毒は、ヒトではA、B、E（稀にF）型毒素で、家畜や家禽ではC、D型毒素で多数報告されている。本食中毒の発症には神経毒素が腸管から吸収される過程が必須であるが、本毒素の腸管吸収機構並びに血清型により発症する生物種に偏りがある理由については、不明な点が多かった。

天然に存在する神経毒素は、常に無毒成分と会合した複合体としてボツリヌス菌により産生される。無毒成分には、赤血球凝集活性を示すhaemagglutinin (HA)と、赤血球凝集活性を示さないnon-toxic non-HA (NTNH) の二種類が存在する。我々はこれまでに、B型神経毒素複合体中のHAが、上皮細胞バリアの一つである細胞間バリアを破壊し、神経毒素の腸管上皮細胞バリア通過を促進することを明らかにした。また、HAの作用点は上皮細胞の基底膜側に存在することが示唆された。しかし、B型以外の血清型のHAに関しては、上皮細胞バリアとの相互作用に関する解析が成されていなかった。そこで本研究では、A～C型神経毒素複合体中のHAが、上皮細胞バリアに及ぼす影響を比較解析した。

〔 方 法 な ら び に 成 績 〕

ヒト結腸ガン由来Caco-2細胞及びT84細胞、並びに、イヌ腎上皮由来MDCK I 細胞をそれぞれtranswell中で培養し、

*in vitro*での上皮細胞バリアモデルとした。このバリアモデルに、A、B、C型ボツリヌス菌培養上清より精製したHA含有或いは非含有神経毒素複合体（HA(+)Tc 及び HA(-)Tc）を作用させ、細胞間バリア破壊活性を、細胞間電気抵抗値 (transepithelial electrical resistance : TER) 測定並びにFITC-dextran透過試験により定量化した。この結果、A及びB型神経毒素複合体中のHAは、Caco-2、T84及びMDCK Iの上皮細胞間バリアを破壊することが明らかになった。また、C型神経毒素複合体（300nM）中のHAは、Caco-2及びT84には細胞間バリア破壊活性を示さないが、MDCK Iの細胞間バリアを破壊することが明らかになった。

更に、これら毒素複合体の細胞障害性をMTT法に準じた手法で測定したところ、A及びB型神経毒素複合体中のHAはCaco-2、T84及びMDCK IIには細胞障害性を示さないが、C型神経毒素複合体中のHAはMDCK IIに対し細胞障害性を示すことが明らかになった。

〔 総 括 〕

本研究により、A、B、C型HAはいずれも上皮細胞バリア破壊活性を有すること、C型HAはA及びB型HAの細胞間バリア破壊作用とは異なる作用機構を有し、ヒト由来細胞（Caco-2、T84）には活性を示さないが、動物由来の特定の感受性細胞に細胞障害性を示すことにより上皮細胞バリア機能を破壊することが明らかになった。従って、ボツリヌスHAは感受性細胞の上皮細胞バリアを破壊する、「上皮細胞バリア破壊因子」であることが示された。また、C型HAがCaco-2及びT84細胞に対して上皮細胞バリア破壊活性を示さないことから、少なくともヒトの場合には、ボツリヌスHAの上皮細胞バリア破壊作活性が食中毒の発症を決定付ける因子の一つである可能性が示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ボツリヌス神経毒素（A～G型）に起因する食餌性ボツリヌス中毒は、ヒトではA、B、E（稀にF）型毒素で、家畜ではC、D型毒素で多数確認されている。本中毒の発症には神経毒素が腸管から吸収される過程が必須であるが、その腸管吸収機構並びに血清型により発症する生物種に偏りがある理由については、不明な点が多い。自然界の神経毒素は、無毒成分と会合した複合体として存在する。申請者のグループは、B型神経毒素複合体の無毒成分の一つであるHAが上皮細胞の細胞間バリアを破壊し、神経毒素の腸管上皮細胞バリア通過を促進することを明らかにした。本研究では、各血清型ボツリヌスHAの上皮細胞バリア破壊作用を比較解析した。この結果、A、B、C型HAはいずれも上皮細胞バリア破壊活性を有すること、C型HAはA及びB型HAの細胞間バリア破壊作用とは異なり、動物由来の特定の感受性細胞を障害しバリア機能を破壊することが明らかになった。

以上の結果より、A～C型ボツリヌスHAは、感受性細胞の上皮細胞バリアを破壊する活性を有する「上皮細胞バリア破壊因子」であることが明らかになった。本研究により、ボツリヌスHAの上皮細胞バリア破壊作用が中毒の発症を決定する因子の一つである新たな可能性が提示されたことから、本論文は学位の授与に値すると考えられる。