

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 甲谷 秀子

論 文 名 膣内細菌環境におけるヒト $\beta$ -デフェンシン2の重要性について

---

### 学位論文要旨

<はじめに>膣細菌叢は女性生殖器における最初の防御機構であり、特に乳酸桿菌は重要な役割を担うことが知られている。以前より、細菌性膣症の臨床診断には Nugent score (NS) が広く使われているが、必ずしも症状や程度を正確に反映するとは言えないと報告されている。さらに、乳酸桿菌の構成は人種により異なると指摘されていることから、乳酸桿菌やある種の膣内細菌、あるいは NS だけにに基づく細菌性膣症の診断は望ましくない。抗菌ペプチドは、自然免疫機構において複数の役割を果たし、女性生殖器の感染防御にも関与している。主要な抗菌ペプチドであるヒト $\beta$ -defensin (HBD) は HBD1~4 の種で構成され、HBD 1~3 は膣上皮に発現している。HBD1 は上皮細胞で恒常的に発現しているが、HBD2・3 は微生物の感染や炎症反応によって誘導される。本研究では膣内環境を評価するための生化学的マーカーとして、NS と HBD2 を測定し、種々の微生物感染との関連性について検討した。対象は、愛媛大学と NTT 西日本松山病院を受診した女性 98 人であり、全員から書面による同意を得た。この研究は愛媛大学医学部臨床研究倫理審査委員会によって承認されている (No. 1206212) 。<方法>a) NS 評価：膣分泌液を綿棒で採取してスライドガラスに塗抹し、グラム染色して顕微鏡下に観察する。Lactobacillus・Gardnerella・Mobiluncus の菌数を計測したスコアから NS を評価した。b) 膣 HBD2・IL-6 濃度：生理食塩水 4mL で膣内を洗浄し採取した膣洗浄液中の HBD2・IL-6 濃度を ELISA を用いて測定した。c) 微生物解析：膣洗浄液に対して、t-RFLP および PCR を用いて微生物解析を行った。t-RFLP の結果については DNA バンドの本数により解析を行い、バンド数 3 本未満、3~5 本、6 本以上に分類し、NS と比較した。Mycoplasma hominis・Mycoplasma genitalium・Ureaplasma urealyticum・Chlamydia trachomatis を PCR を用いて解析した。d) 膣上皮細胞株培養：HBD2 とカンジダの関連性を検討するため、ヒト膣上皮細胞株 (VK2/E6E7) を培養し、カンジダ抗原刺激による培養上清中の HBD2 濃度の変化について検討を行った。VK2/E6E7 細胞に HKCA (heat-killed *Candida albicans*) あるいは LPS を添加し、24 時間 incubation し、上清中の HBD2 濃度を ELISA 法によって測定した。e) 受容体発現解析：Candida albicans による HBD2 刺

氏名 甲谷秀子

激には Dectin-1 受容体が関与することが知られている。そこで、VK2/E6E7 を HKCA によって刺激し、Dectin-2・Mincle・Mannose 受容体と Dectin-1 の発現を real-time PCR・免疫染色・ルシフェラーゼアッセイを用いて比較した。＜結果＞a) NS の結果は、正常群 (NS:0-3) 60.2%、中間群 (NS:4-6) 22.4%、膣炎群 (NS:7-10) 17.3%であった。b) NS 正常群、中間群、膣炎群の膣洗浄液中 HBD2 濃度はそれぞれ  $84.7 \pm 147.5$  ng/ml (平均±SE) ,  $53.4 \pm 53.7$  ng/ml,  $37.6 \pm 36.2$  ng/ml であった。NS の増加ともなつて HBD2 が低値をとる傾向があつたが統計学的に有意ではなかつた。膣分泌液中の Lactobacillus に限定して検討すると、Lactobacillus が  $\geq 1$ /視野存在する場合、HBD2 濃度は  $88.0 \pm 140.0$  ng/ml と  $< 1$ /視野の場合 ( $30.6 \pm 32.7$  ng/ml) に比し有意に高値を示した ( $p < 0.01$ )。IL-6 については有意な変化を認めなかつた。c) バンド数と NS との間に高い相関を示した ( $kappa$  係数 0.76)。さらに、Mycoplasma hominis・Mycoplasma genitalium・Ureaplasma urealyticum・Chlamydia trachomatis と HBD2 との間には相関を認めなかつたが、Candida の存在下で HBD2 は有意に高い濃度を示した ( $311.4 \pm 617.5$  ng/ml vs.  $58.1 \pm 99.7$  ng/ml;  $p < 0.05$ )。また、Candida 陽性例に対して治療を行った後、HBD2 濃度は治療前に比べ有意に低下した ( $37.7 \pm 12.7$  ng/ml;  $p < 0.05$ )。d) LPS 刺激では HBD2 濃度に変化はなかつたが ( $44.2 \pm 11.5$  ng/ml vs.  $57.8 \pm 24.6$  ng/ml [control])、HKCA 刺激によって有意な高値を示した ( $128.2 \pm 54.5$  ng/ml,  $p < 0.05$ )。e) HKCA による刺激によって、Dectin-2・Mincle・Mannose・Dectin-1 受容体のうち Dectin-1 mRNA 発現のみが増強された。また、Dectin-1 の発現は、Triton X で膜処理後に免疫蛍光染色を行うことでさらに確認することができた。さらに、ルシフェラーゼアッセイにより、HKCA 存在下では NF- $\kappa$ B シグナル活性の誘導を認めた。＜考察＞以上のように、HBD2 は IL-6 や NS とは無関係に Lactobacillus の菌数と相関することが明らかになった。NS 分類では Lactobacillus は重要であるが、他の菌の存在も影響している。今回の分析で NS と t-RFLP が強い相関を示したように、NS は実際の細菌全体を反映することが明らかである。一方、HBD2 は Lactobacillus の増加を強く反映することがわかつた。また、HBD2 は膣内の Candida 存在下で増加するが、今回検討を行った他の微生物の影響を受けないことを示した。本研究において膣内の Candida 陽性例の 69%は NS 正常であつたように、Candida は Lactobacillus と共存し、HBD2 はこれら二つの因子の影響を膣分泌液中で受けていると考えられた。真菌は Toll 受容体や C 型レクチン受容体などのパターン認識受容体を介して認識され、Dectin-1 および Dectin-2 は、上皮細胞 (肺上皮細胞、角膜上皮細胞、腸上皮細胞など) に発現していると報告されているが、今回初めて膣上皮細胞での Dectin-1 の発現を証明した。また、HBD2 は膣上皮細胞を Candida で刺激することによってその産生が有意に増加することを示した。また、その signaling pathway には NF- $\kappa$ B が重要な役割を果たしていることが考えられた。これらの結果から、HBD2 は膣内の微生物による感染を防御する重要な因子であると考えられた。

キーワード (3~5)	Bacterial vaginosis Human $\beta$ -defensin 2 Vaginal Candidiasis Vaginal environment
-------------	--