

氏 名	木 本 てるみ
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2635 号
学位授与の日付	平成 15 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科病理系専攻
学位論文題目	Differences in gamma interferon production induced by listeriolysin O and ivanolysin O result in different levels of protective immunity in mice infected with <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Listeria ivanovii</i> (ivanolysin O および ivanolysin O の示す IFN- γ 産生誘導性能の違いに基づく, <i>Listeria monocytogenes</i> および <i>Listeria ivanovii</i> 感染マウスに見られる防御免疫レベルの差異)
論文調査委員	(主 査) 教授 一 山 智 教授 湊 長 博 教授 光山 正 雄

論 文 内 容 の 要 旨

リステリア属の中で、ヒトないし動物に病原性を有するのは、*Listeria monocytogenes* ならびに *Listeria ivanovii* の 2 種類の菌であるが、これらは各々、コレステロール依存性溶血毒素 (cholesterol-dependent cytolysins, CDCs) に属する、リステリオリシン O (LLO) およびイバノリシン O (ILO) を産生する。さらに、LLO と ILO は約 80% のアミノ酸列相同性を有している。これまでの研究から *L. monocytogenes* 生菌感染により得られる感染抵抗免疫には、LLO の有する、インターフェロンガンマ (IFN- γ) など TH1 型免疫に重要なサイトカイン産生誘導能が関与していることが知られている。一方 *L. ivanovii* の産生する ILO については、LLO のようなサイトカイン産生誘導能の生むについては殆ど知られていない。そこで、本研究では、*L. ivanovii* 生菌による感染抵抗性免疫獲得の有無、ならびに、リコンビナント蛋白を用いて、LLO の IFN- γ 産生誘導能について検討を行った。

はじめに、*L. monocytogenes* ならびに *L. ivanovii* 生菌感染による感染抵抗性免疫成立について検討した。*L. monocytogenes* ないし *L. ivanovii* 生菌を、50% 致死菌数 (LD₅₀) の 10 分の 1 量ずつ接種してマウスを免疫し、1 週間後に致死量である 10LD₅₀ の菌を感染させ、マウスの生存率を観察した。*L. monocytogenes* 免疫マウスは全例生存し獲得免疫の成立を認めたが、*L. ivanovii* 免疫では獲得免疫が誘導されず、全数死亡した。菌種によりマウスに対する感染抵抗性が異なったことから、次に、0.1LD₅₀ の *L. monocytogenes* ならびに *L. ivanovii* を感染させたマウス血清中 IFN- γ の測定を行った。0.1LD₅₀ *L. monocytogenes* 感染マウスでは、血清中 IFN- γ の上昇を認めたが、0.1LD₅₀ *L. ivanovii* 感染マウスでは血清中 IFN- γ は認めなかった。

このような菌種による感染抵抗性免疫獲得の違いに、LLO と ILO のサイトカイン産生誘導能の違いが関与するかどうかを調べるため、リコンビナント LLO (rLLO)、リコンビナント ILO (rILO)、さらに、LLO および ILO の第 1 から第 3 ドメインを置換したリコンビナント蛋白を作製し、そのヒツジ赤血球に対する溶血活性、IFN- γ 産生誘導能を比較した。すべてのリコンビナント蛋白は、ほぼ同等に強い溶血活性を示し、溶血素としての活性には差と認めなかった。コレステロール処理を行い、溶血活性を無くしたリコンビナント蛋白でマウス脾臓細胞を刺激したところ、rLLO は強い IFN- γ 産生誘導能を示したのに対し、rILO は強い IFN- γ 産生誘導能を示さなかった。また、ドメイン置換を行ったリコンビナント蛋白では、LLO の第 1 から第 3 ドメインを有する蛋白では IFN- γ 産生誘導能はみられなかった。以上のことから、IFN- γ 産生誘導には LLO の第 1 から第 3 ドメインが重要であり、アミノ酸配列の相同性が高いにもかかわらず、ILO には IFN- γ 産生誘導性が弱いために、*L. ivanovii* 生菌免疫では感染抵抗性免疫が生じ難いことが結論づけられた。

論文審査の結果の要旨

細胞内寄生性を示す *Listeria monocytogenes*(Lm) と *L. ivanovii*(Li) の2種のリステリア属細菌が示すマウスでの感染防御免疫誘導の違いの機序を解析した。LiはLmに比べ感染抵抗性TH1細胞の誘導能が著明に低く、その違いはマクロファージ内増殖能の違いに加え、病原因子遺伝子群の主要蛋白毒素であるLmのLLOとLiのILOのサイトカイン誘導活性の差によることが示唆された。そこで次にこの2つの膜傷害毒素蛋白のリコンビナント標品を作製し、それらの構造と機能を比較した。両者はアミノ酸レベルで高い相同性を示し、毒素としての膜傷害活性はほぼ同等であったが、LLOにみられる *in vitro* での強いIFN- γ 誘導活性はILOには認められなかった。ドメイン置換により作製した変異蛋白の活性を比較したところ、ILOの1-3ドメイン、とくにN末端側のILOのそれとの微妙な違いがサイトカイン誘導活性の違いを規定していることが示された。これらの結果から、ILO分子はマクロファージ内での生存には機能するが、宿主TH1細胞の誘導に必要な活性ドメインのアミノ酸配列の違いによって内因性IFN- γ 誘導活性が弱く、そのために *L. ivanovii* によってはTH1依存性の感染防御免疫の成立が起こり難いことが結論づけられた。

以上の研究は、細胞内寄生菌の病理メカニズムの解明に貢献し、病原細菌学の発展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15年4月28日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。