

氏 名	の 野 村 卓 正
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2479 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 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 微 生 物 感 染 症 学 専 攻
学位論文題目	Essential role of interleukin-12 (IL-12) and IL-18 for gamma interferon production induced by listeriolysin O in mouse spleen cells (リステリオリシン O によるマウス脾細胞からのガンマインターフェロンの 産生誘導におけるインターロイキン12とインターロイキン18の重要な役割)
論文調査委員	(主 査) 教 授 武 藤 誠 教 授 一 山 智 教 授 光 山 正 雄

論 文 内 容 の 要 旨

Listeria monocytogenes は、グラム陽性の通性細胞内寄生性細菌で、しばしばヒトにリステリア症（髄膜炎，敗血症）を引き起こす。Listeriolysin O（以下 LLO）は、コレステロール結合型細胞傷害毒素ファミリーの一つで，本菌の産生する主要な病原因子である。宿主食細胞に貪食された *L. monocytogenes* は，LLO の細胞膜傷害活性により食胞から細胞質にエスケープすることで殺菌に抵抗性を示すことが知られている。さらに精製した LLO が細胞傷害活性を示すのみならず，マウスマクロファージからの IL-1 産生や，脾細胞からの IFN- γ 産生を誘導する活性も有することが明らかになっている。*Listeria* 感染マウスを用いた研究から，宿主の内因性 IFN- γ が *Listeria* 感染防御に必須であることが知られているが，上記の知見は，LLO が菌の細胞内寄生戦略にとって不可欠な因子であると同時に，宿主の免疫機構を活性化させる因子でもあることを示唆している。そこで本研究では，LLO によってマウス脾細胞に誘導される INF- γ 産生におけるマクロファージ及びマクロファージの産生する炎症性サイトカインの関与をしらべ，LLO による IFN- γ 産生誘導の機序を解析した。

L. monocytogenes 培養上清より陰イオン交換カラムを用いて LLO を精製し，SDS-PAGE 上単一バンドを示す標品を得た。コレステロール処理により細胞傷害活性を阻害した LLO でマウス脾細胞を刺激すると，培養上清中に高濃度の INF- γ 産生が認められた。この IFN- γ 産生は，LLO 標品を 94°C で加熱することにより低下する一方，ポリミキシン B 添加によっては抑制されないことから，標品中に極微量に存在するエンドトキシンの関与は否定された。脾細胞から DX5 陽性細胞（主に NK 細胞）あるいは CD11b 陽性細胞（主にマクロファージ）を除去すると，LLO 刺激による IFN- γ 産生が著しく減少したことから，IFN- γ 産生には，これらの細胞が関与していることが示唆された。RT-PCR 解析によって，LLO で刺激された脾細胞の CD11b 陽性画分に IL-1，IL-12（p40，p35），TNF α の遺伝子発現誘導が認められた。一方，IL-18 遺伝子の発現に変化はなかった。また CD11b 陰性画分におけるサイトカインの遺伝子発現に変化はなかったため，LLO はまずマクロファージ系の細胞を刺激していることが明らかになった。そこで，これらのサイトカインに対する特異的中和抗体を添加して LLO によって誘導される IFN- γ 産生への影響を調べた結果，抗 IL-12p70 抗体及び抗 IL-18 抗体を添加した場合に IFN- γ 産生の低下が認められた。さらに IL-12 欠損，あるいは IL-18 欠損マウス由来の脾細胞における LLO 刺激に対する IFN- γ 産生応答は，野生型マウス由来の脾細胞に比べ著明に低値を示した。

以上の結果より，LLO によってマウス脾細胞に誘導される IFN- γ 産生には，IL-12 と IL-18 が重要な役割を果たしており，これらのマクロファージに由来するサイトカインが NK 細胞を刺激して IFN- γ 産生が誘導されることが明らかとなった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

リステリア菌は TH1 型感染防御免疫を強く誘導する細胞内寄生菌であり，その産生する Listeriolysin O（LLO）はマクロファージ内寄生を可能にする主要な病原因子である一方，サイトカイン誘導活性を示し宿主防御免疫の誘導にも重要な役

割を示す。申請者は、LLOによってマウス脾細胞に誘導される INF- γ 産生の機序を解析した。

リステリア菌培養上清より LLO を精製し、コレステロール処理により細胞傷害活性を阻害した標品でマウス脾細胞を刺激すると、強い INF- γ 産生応答が認められた。脾細胞から DX5 陽性細胞や CD11b 陽性細胞（主にマクロファージ）を除去すると、LLO 刺激による INF- γ 産生は著しく減少した。RT-PCR 解析において、LLO で刺激された脾細胞の CD11b 陽性画分に IL-1, IL-12, TNF α の遺伝子発現誘導が認められ、IL-18 の発現には変化がなかった。次に LLO によって誘導される INF- γ 産生における各サイトカインに対する中和抗体添加の影響を調べた結果、抗 IL-12p70 抗体及び抗 IL-18 抗体の添加により INF- γ 産生の低下が認められた。さらに IL-12 欠損、IL-18 欠損マウス由来の脾細胞は野生型マウス脾細胞に比べ、LLO 刺激に対する INF- γ 産生応答が著明に低値を示した。以上の結果より、LLO によってマウス脾細胞に誘導される INF- γ 産生には、IL-12 と IL-18 が重要な役割を果たしており、これらのマクロファージに由来するサイトカインが主に NK 細胞を刺激して INF- γ 産生が誘導されることが明らかとなった。

本研究は、細菌の病原因子と宿主防御免疫の連関の一部を解明し、細菌学および感染免疫学の発展に寄与するところが大い。従って、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14年2月22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。