

氏 名	たけ うち おさむ 竹 内 修
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1906 号
学位授与の日付	平 成 18 年 7 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Involvement of the virulence gene products of <i>Yersinia enterocolitica</i> in the immune response of infected mice. (エルシニアエンテロコリテリカ病原遺伝子産物の感染マウスにおける免疫 応答への関与)
論文調査委員	(主 査) 教 授 西 沢 光 昭 教 授 杉 田 昌 彦 教 授 小 柳 義 夫

論 文 内 容 の 要 旨

Yersinia enterocolitica (以下エルシニア) はグラム陰性の桿菌で、本菌に汚染された食物を経口的に摂取することにより胃腸炎、腸間膜リンパ節炎、虫垂炎等の症状を呈する。特に血清型 O:8 は、糖尿病、肝硬変、乳幼児、高齢者などの免疫能が低下した患者で、腸管より血中に侵入した場合、重篤な敗血症を引き起こすことが知られている。

エルシニア自体の病原因子については、エルシニアが保有する70-Kb の病原性プラスミドよりⅢ型分泌装置を介して分泌される6個のエフェクター蛋白 Yop (*Yersinia Outer membrane Protein*) が、宿主の細胞骨格を崩壊させ細胞内シグナル伝達を攪乱させる。また、サイトカインの産生を抑制させて宿主細胞のアポトーシスを誘導することが明らかにされている。

一方で、エルシニアに対する宿主側の免疫応答は、Interferon- γ (IFN- γ) 等のサイトカインによって分化・誘導された細胞性免疫が必須であるとされているが、この防御免疫の誘導には、エルシニアが保有する病原性プラスミドが重要な役割を果たしている可能性が示唆される。そこで本研究では、1型 helper T 細胞 (Th1 細胞) に依存した細胞性免疫の誘導が病原性プラスミドによって担われていることを証明するため、病原性プラスミド保有株とプラスミドを脱落させた非病原性の欠損株を用いて、エルシニア感染後の宿主における免疫応答の違いを検討した。

C57BL/6マウスにおける病原性プラスミド保有株 (P+株) とその脱落株 (P-株) の LD₅₀ はそれぞれ 3.0×10^4 , 2.0×10^9 CFU であった。また、各々の株における1/10 LD₅₀ 量の菌量をマウスに感染させ、経時的に脾臓を採取し臓器内の菌数を観察してみると、P-株においては増殖することなく速やかな菌の排除が見られたが、P+株においては感染2日後まで急激な菌の増殖がおり、その後菌は徐々に減少した。両株とも感染14日目までに菌は検出されなくなった。

次に、Th1 細胞の良いパラメーターとなる IFN- γ を指標とし、P+株または P-株で免疫したマウス脾細胞より誘導される IFN- γ 量を EIA にて測定した。各々の株の0.1LD₅₀ 量をマウスに生菌免疫し、菌が排除された14日後に脾細胞を分離し、エルシニア加熱死菌抗原を用いて刺激すると、両株ともに高いレベルの IFN- γ 値を示した。しかしながら、P+株で免疫したマウス脾細胞の方が、加熱死菌刺激に対してより強い IFN- γ 産生応答を示し、この IFN- γ 産生応答は、CD4⁺T 細胞を除去することにより著明に減少することが明らかになった。また、P+株培養上清より硫酸沈殿法により Yop を回収し、得られた粗精製 Yop に対する免疫マウス脾細胞の IFN- γ 産生応答を観察したところ、P+株で免疫した場合のみに強い産生応答がみられた。さらに、CD4⁺もしくは CD8⁺ の T 細胞を除去すると、IFN- γ の産生はともに減少した。P-株で免疫した脾細胞では Yop に対する反応性が見られなかった。そこで、Yop に対する IFN- γ 産生応答をフローサイトメトリによる細胞内サイトカインで確認したところ、CD4⁺T 細胞のみならず CD8⁺T 細胞も IFN- γ を産生していることが証明された。

以上の結果から、エルシニア感染に対する防御免疫の誘導には本菌が保有する病原性プラスミドが重要な役割を果たしており、宿主にとって病原性を発現するだけでなく、Th1 型の T 細胞応答にも関与することが明らかとなった。また、病原

性プラスミドがコードするエフェクター蛋白である Yop に対する抗原特異的 T 細胞においても、IFN- γ 産生応答が観察され、CD4⁺T 細胞のみならず CD8⁺T 細胞も重要なエフェクター細胞として機能していることが確認された。

論文審査の結果の要旨

エルシニア菌 (*Yersinia enterocolitica*) の病原性発現には、病原性プラスミドがコードするⅢ型分泌装置と Yop タンパクが重要である。一方エルシニアに対する宿主側の免疫応答は、 γ -Interferon (IFN- γ) 依存的細胞性免疫が重要とされるが、細胞性防御免疫の誘導にエルシニアが保有する病原性プラスミドが関わる可能性が示唆される。この研究では、病原性プラスミド保有株 (P+) とプラスミド脱落欠損株 (P-) を用いて、マウスにおけるエルシニア感染後の細胞性免疫応答の違いが検討された。B6 マウスに P+ 株と P- 株それぞれの 0.1 LD₅₀ 量の生菌を感染させ、菌が完全排除された 14 日後に両群マウスの脾細胞をとり、死菌抗原で刺激すると何れも IFN- γ 産生を示したが、P+ 株免疫マウスに有意に高い応答がみられ、CD4⁺T 細胞の除去により著明に減少した。また、P+ 株培養上清より調整した粗精 Yop を抗原として刺激すると、P+ 株で免疫した場合のみに強い IFN- γ 産生応答がみられ、その応答は CD4⁺ 細胞、CD8⁺ 細胞の何れの除去でも低下した。FACS を用いた細胞内サイトカイン解析では、CD4⁺T 細胞のみならず CD8⁺T 細胞も IFN- γ を産生していることが証明された。エルシニア感染に対する防御免疫の誘導には本菌が保有する病原性プラスミドが重要な役割を果たしており、宿主にとって病原性を発現するだけでなく、Th1 型の T 細胞応答にも関与することが明らかとなった。

以上の研究は、エルシニア菌感染において病原プラスミドが単に感染成立における菌側の病原因子として作用するにとどまらず、宿主細胞性免疫応答の誘導にも重要な役割を果たすことを解明することに貢献し、細菌感染における宿主—病原体相互作用のさらなる理解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 18 年 6 月 26 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。