

学 位 論 文 題 名

リステリア経口感染における腸管感染防御と

内在性インターフェロン - γ

学位論文内容の要旨

【目的】

リステリア（*Listeria monocytogenes*）は、野菜や乳製品などの食品を介して immunocompromized host に髄膜炎、敗血症などをひきおこす。細胞内寄生性細菌であるリステリアに対する宿主の感染防御反応はT細胞依存性で抗体の関与はみられず、静注感染の場合、脾臓、肝臓などの感染局所に誘導されるインターフェロン（IFN）- γ が、感染防御に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。しかし、リステリアの自然感染経路にあたる腸管局所における防御反応についてはよく知られていない。腸管においては、パイエル板とならび腸管上皮内リンパ球（IEL）が感染防御に重要な働きを有するといわれている。そこで、本研究では、リステリア経口感染における腸管局所、特に、IELでの感染防御反応について検討した。

【材料および方法】

- 1) リステリア感染： 5×10^8 CFU の *Listeria monocytogenes* 1b-1684 株を、金属ゾンデを用いて4～6週齢の ddY、あるいは、C57BL/6マウスに胃内投与した。
- 2) 菌の検出：臓器中の菌数は、臓器を homogenize 後、脾臓、腸間膜リンパ節（MLN）はトリプティケース・ソイ寒天培地、パイエル板、糞便はパルカム培地で培養して算出した。さらに、腸管のグラム染色をおこない、組織中のリステリアを検出した。
- 3) 抗体投与：抗マウス IFN- γ 単クローン抗体（mAb）は感染2時間前に腹腔内投与した。抗 TCR- $\alpha\beta$ mAb、抗 CD8 mAb、抗 CD4 mAb は感染7日前に、抗 Thy1.2 mAb、抗 NK1.1 mAb は感染3日前に静脈内投与した。なお、対照として正常ラットグロブリンを投与した。
- 4) 内在性 IFN- γ の検出：血清および臓器抽出液中の IFN- γ は ELISA 法により測定し、腸管組織中の IFN- γ は免疫組織染色法により検出した。
- 5) IEL の調製と解析：摘出腸管より、EDTA を用いて分離した IEL は、ナイロンウールカラムおよびパーコール比重遠心法で精製した。採取した IEL を用い、FACSscan により表面マーカーを解析し、ELISASPOT（ELISPOT）法により感染前・後の IFN- γ 産生細胞を算出した。さらに、reverse transcription-polymerase chain reaction analysis（RT-PCR）法により、IEL 中の IFN- γ mRNA を検出した。

【結果】

1) 経口感染後の脾臓、MLN中の菌数は、脾臓では移行が遅れたものの、その後は同様の値で推移し、感染3日目にピークを示した。一方、パイエル板、糞便中の菌数は共に感染1日目に最大となり、感染5日目以降は消失した。感染1日目の腸管のグラム染色では、腸管粘膜上皮、特に陰窩部を中心に多数のリステリアのコロニーが存在した。

2) 臓器中のIFN- γ は、脾臓、MLNでは、臓器内菌数と同様の経過で産生されたが、パイエル板では、感染による誘導は認められなかった。一方、感染1日目の腸管の免疫組織染色では、粘膜上皮や固有層内にIFN- γ 陽性細胞が散在していた。

3) 抗IFN- γ mAb投与により、脾臓、MLN、糞便中の菌数は、感染翌日から有意に増加したが、パイエル板の菌数は変動しなかった。

4) 感染前には、CD3⁺T細胞はIEL中の約75%を占め、大部分はCD8⁺T細胞であった。TCR- $\gamma\delta$ ⁺T細胞はT細胞中の約44%を占め、残りの大部分はTCR- $\alpha\beta$ ⁺T細胞と考えられた。感染1日目には、CD3⁺細胞、CD8⁺細胞の割合が増加したが、IEL総細胞数の減少が認められた。

5) ELISPOT法では、非感染マウスでも、IEL中に、非特異刺激に応答してIFN- γ を産生する細胞が存在し、一部は、非刺激でもIFN- γ を産生した。一方、感染1日目では、これらのIFN- γ 産生細胞数が減少していた。

6) RT-PCR法では、感染により、IELでIFN- γ mRNAの発現が誘導された。さらに、抗Thy-1.2mAb、抗CD8mAbの投与により、著明なIFN- γ mRNA発現の抑制が認められたが、抗TCR- $\alpha\beta$ mAb、抗CD4mAb、抗NK1.1mAb投与では、IFN- γ mRNAの発現は抑制されなかった。

7) 抗TCR- $\alpha\beta$ mAbおよび抗CD8mAb投与により、感染1日目の糞便中の菌数は著明に増加したが、抗CD4mAb投与では変化が認められなかった。

【考察】

1) 臓器内菌数の経時的変化から、パイエル板を通過したリステリアは、MLN、脾臓で増殖することが示された。さらに、グラム染色から腸管粘膜内でリステリアの増殖していることが示され、感染初期において、腸管粘膜内に存在する細胞による感染防御の可能性が考えられた。

2) 脾臓、MLNでは感染の程度と一致して内在性IFN- γ が産生され、抗IFN- γ mAb投与によってこれらの臓器における防御反応が抑制されたが、パイエル板では、感染によるIFN- γ の誘導は認められず、IFN- γ mAb投与の効果も認められなかった。一方、リステリア感染後、腸管粘膜内の細胞には免疫組織染色でIFN- γ が検出され、腸管粘膜内ではリステリア感染後にIFN- γ 応答の惹起されていることが示された。

3) ELISPOT法による検討では、IELには種々の抗原刺激に対してIFN- γ を産生する細胞の存在することが示された。感染1日目には、IFN- γ 産生細胞数の減少がみられたが、同時にIELの減少、T細胞サブセットの変動も認められ、経口感染後、TCR- $\gamma\delta$ +T細胞を中心としてアポトーシスを起こしている可能性が考えられた。

4) RT-PCR法による解析では、経口感染後にIELでIFN- γ mRNAが検出され、感染によりIFN- γ 産生の誘導される可能性が示唆された。しかし、ELISPOT法によるIFN- γ 産生細胞の動きとは一致せず、感染により個々の産生細胞では、IFN- γ が著しく産生されている可能性が考えられた。

5) 感染前に各種mAbを投与した結果、IEL中のIFN- γ mRNAの発現は、抗CD8mAbおよび抗Thy1.2mAbの投与により著明な低下が認められたが、抗TCR- $\alpha\beta$ mAbおよび抗CD4mAb投与では抑制は認められなかった。これらの結果から、リステリア感染後にIELで誘導されるIFN- γ の産生は、主にThy-1+CD8+TCR- $\gamma\delta$ +T細胞に担われていることが示唆された。

6) 抗IFN- γ mAbあるいは抗CD8mAbの投与によって、腸管粘膜上皮内でのリステリア増殖が亢進し、糞便中への排泄が促進することから、IELで産生される内在性IFN- γ が、腸管粘膜内でのリステリアに対する感染防御に関与していることが示唆された。

7) 抗TCR- $\alpha\beta$ mAb投与マウスでは、IEL中のIFN- γ mRNAの抑制はみられなかったが、腸管感染防御は抑制されていた。この結果から、CD8+TCR- $\alpha\beta$ +T細胞は、CD8+TCR- $\gamma\delta$ +T細胞とは異なり、IFN- γ 産生以外の機構により、腸管感染防御に関与している可能性が示唆された。

【結語】

以上の結果から、リステリア経口感染における腸管局所での感染防御には、CD8+TCR- $\gamma\delta$ +T細胞がIFN- γ 産生を介して働いていることが示唆された。一方、CD8+TCR- $\alpha\beta$ +T細胞は、IFN- γ 産生を介さない機構により腸管感染防御に関与している可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 ・ 教 授 宮 崎 保
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 皆 川 知 紀

学 位 論 文 題 名

リステリア経口感染における腸管感染防御と 内在性インターフェロン - γ

【目的】

リステリア (*Listeria monocytogenes*) は、乳製品などを介して経口感染する細胞内寄生性細菌で、宿主の感染防御反応はT細胞依存性におこなわれ、抗体の関与はみられず、静注感染実験では、脾臓、肝臓などの感染局所に誘導されるインターフェロン (IFN) - γ が、感染防御に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。一方、リステリアの自然感染経路にあたる腸管局所では、常に抗原刺激にさらされている腸管上皮内リンパ球 (IEL) が感染防御に重要と考えられるため、本研究では、リステリア経口感染における腸管局所、特に、IELでの感染防御反応について検討した。

【材料および方法】

1) リステリア感染： 5×10^8 CFUの *Listeria monocytogenes* 1b-1684 株を、4～6週齢の ddY、あるいは、C57BL/6マウスに胃内投与した。

2) 菌の検出：臓器中の菌数は、臓器をhomogenize後、脾臓、腸間膜リンパ節 (MLN) はトリプティケース・ソイ寒天培地、パイエル板、糞便はパルカム培地で培養して算出した。さらに、腸管のグラム染色をおこない、組織中のリステリアを検出した。

3) 抗体投与：抗マウスIFN- γ 単クローン抗体 (mAb) を感染2時間前に腹腔内投与した。抗TCR- $\alpha\beta$ mAb、抗CD8mAb、抗CD4mAbは感染7日前に、抗Thy1.2mAb、抗NK1.1mAbは感染3日前に静脈内投与した。なお、対照として正常ラットグロブリンを投与した。

4) IFN- γ の検出：腸管組織中のIFN- γ は免疫組織染色法により検出した。

5) IELの調製と解析：摘出腸管より、EDTAを用いて分離したIELを、ナイロンウールカラムおよびパーコール比重遠心法で精製した。採取したIELを用い、FACSscanにより表面マーカーを解析し、reverse transcription-polymerase chain reaction analysis (RT-PCR) 法により、IEL中のIFN- γ mRNAを検出した。

【結果】

1) 経口感染後の脾臓、MLN中の菌数は、脾臓では移行が遅れたものの、その後は同様の値で推移し、感染3日目にピークを示した。一方、パイエル板、糞便中の菌数は共

に感染1日目に最大となり、感染5日目以降は消失した。感染1日目の腸管のグラム染色では、腸管粘膜上皮、特に陰窩部を中心に多数のリステリアのコロニーが存在した。

2) 腸管の免疫組織染色では、粘膜上皮や固有層内にIFN- γ 陽性細胞が散在していた。

3) 抗IFN- γ mAb投与により、糞便中の菌数は、感染翌日から有意に増加した。

4) 感染前には、IEL中の約75%がCD3⁺T細胞で、その大部分はCD8⁺T細胞であった。TCR- $\gamma\delta$ ⁺T細胞はT細胞中の約44%を占め、残りのT細胞はTCR- $\alpha\beta$ ⁺T細胞と考えられた。感染1日目には、CD3⁺細胞、CD8⁺細胞の割合が増加していた。

5) RT-PCR法では、感染により、IELでIFN- γ mRNAの発現が誘導された。さらに、抗Thy-1.2mAb、抗CD8mAbの投与により、著明なIFN- γ mRNA発現の抑制が認められたが、抗TCR- $\alpha\beta$ mAb、抗CD4mAb、抗NK1.1mAb投与では、IFN- γ mRNAの発現は抑制されなかった。

6) 抗TCR- $\alpha\beta$ mAbおよび抗CD8mAb投与により、感染1日目の糞便中の菌数は著明に増加したが、抗CD4mAb投与では変化が認められなかった。

【考察】

1) 脾臓、MLNの菌数は静注感染とほぼ同様に増加し、容易に全身感染に移行することが示された。グラム染色では、腸管粘膜でのリステリアの増殖が示され、感染初期には、腸管粘膜内に存在する細胞による感染防御の可能性が考えられた。

2) リステリア感染後、腸管の免疫組織染色でIFN- γ 陽性細胞が検出され、腸管粘膜内ではリステリア感染後にIFN- γ 応答の惹起されていることが示された。

3) RT-PCR法による解析では、経口感染後にIELでIFN- γ mRNAが検出され、感染によりIFN- γ 産生の誘導される可能性が示唆された。

4) 抗CD8mAbおよび抗Thy1.2mAbの投与によりIEL中のIFN- γ mRNAの発現は著明に抑制されたが、抗TCR- $\alpha\beta$ mAbおよび抗CD4mAb投与では抑制されなかった。これらの結果から、リステリア感染後にIELで誘導されるIFN- γ の産生は、主にThy-1⁺CD8⁺TCR- $\gamma\delta$ ⁺T細胞に担われていることが示唆された。

5) 抗IFN- γ mAbあるいは抗CD8mAbの投与によって、腸管粘膜上皮内でのリステリア増殖が亢進し、糞便中への排泄が促進することから、IELで産生される内在性IFN- γ が、腸管粘膜内でのリステリアに対する感染防御に関与していることが示唆された。

6) 抗TCR- $\alpha\beta$ mAb投与マウスでは、IEL中のIFN- γ mRNAの抑制はみられなかったが、腸管感染防御は抑制されていた。この結果から、CD8⁺TCR- $\alpha\beta$ ⁺T細胞は、IFN- γ 産生以外の機構により腸管感染防御に関与している可能性が示唆された。

【結語】

リステリア経口感染により、IFN- γ は腸管局所で誘導され、感染防御に働くことが示された。さらに、IELでのIFN- γ 産生は、主としてThy-1⁺CD8⁺TCR- $\gamma\delta$ ⁺T細胞に担われ、CD8⁺TCR- $\gamma\delta$ ⁺T細胞はIFN- γ 産生を介して腸管感染防御に働いていることが示唆された。

以上により、本研究は博士（医学）の学位論文として妥当なものと判断される。