

審査の結果の要旨

氏名 櫻井信豪

百日咳の感染防御の誘導を目的として従来から全菌体ワクチンと精製ワクチンが用いられている。しかし、これら2つのワクチンの感染防御機構の詳細については未だ不明の点が多い。本研究では全菌体ワクチンを免疫したマウスから採取した脾細胞を全菌体ワクチンで刺激した場合、著しい IFN- γ の産生が見られることを見いだした。また、マウスを用いた百日咳菌の脳内攻撃法において、全菌体ワクチンと一緒に IFN- γ を投与するとマウスの生存率が上昇することを見いだした。その機構を考察するにあたり、本研究では細菌に対する細胞毒性を示すマクロファージによる NO 産生に着目し、マウスにおける百日咳の感染防御に対する IFN- γ の役割を検討し、下記の結果を得ている。

1. 全菌体ワクチンあるいは精製ワクチンを投与・免疫後3週目に百日咳菌をマウス脳内にチャレンジした。いずれもワクチン投与量依存的に生存率が上昇したが、完全に発症を防御する全菌体ワクチンの投与量である 5U の免疫によっても百日咳菌の主な毒素である Pertussis toxin (PT) や Filamentous Hemagglutinin (FHA) に対する抗体は検出されなかった。一方、精製ワクチンでは顕著に抗 PT 抗体価の上昇が観察された。このことより、全菌体ワクチンで免疫されたマウスは抗体以外の別の因子が発症防御に関与しているのではないかと示唆された。
2. 全菌体ワクチンあるいは精製ワクチンで免疫して3週間後のマウスより採取した脾細胞を *in vitro* で全菌体ワクチンあるいは精製ワクチンで刺激し、サイトカイン産生を検討した。全菌体ワクチンで免疫および抗原2次刺激した群では著しい IFN- γ の産生が見られたものの、精製ワクチンで免疫および2次刺激した群では免疫を行っていない対照群と変わりがなかった。これとは対照的に IL-4 の産生は全菌体ワクチン免疫した群より精製ワクチン免疫群の方が高かった。全菌体ワクチンを免疫したマウス由来脾細胞はいわゆる Th1 タイプのサイトカイン産生パターンを示し、百日咳菌の感染防御に IFN- γ が介在することが示唆された。
3. 全菌体ワクチンの免疫によって誘導される百日咳菌の感染防御に IFN- γ の投与がどのように影響するかを検討した。マウスに百日咳菌を脳内接種した後の感染防御能は IFN- γ 単独投与群では対照群と差がみられなかったが、IFN- γ と全菌体ワクチン(1U)との同時免疫群で全菌体ワクチン(1U)の単独投与群と比較して生存率が上昇した。
4. PT あるいは PT の構成成分である A-protomer、B-oligomer あるいは FHA でマウス脾細胞を刺激し、NO 産生を検討した。PT、A-protomer、B-oligomer はそれぞれ 10nM、FHA は 5nM の

- 濃度で脾細胞と共に培養し、培養開始後 2 日目と 5 日目の上清中の NO 量を測定した。PT あるいは B-oligomer により培養開始 5 日目の上清中に同レベルの NO が検出された。また、A-protomer あるいは FHA による刺激によって NO 産生は観察されなかった。
5. マウス腹腔マクロファージの培養中に PT、A-protomer、B-oligomer あるいは FHA を添加し、NO 産生を検討したが、いずれの場合にも全く産生が観察されなかった。一方、マウス由来 IFN- γ をマクロファージの培養中に添加すると IFN- γ の濃度依存的に NO 産生が観察された。
 6. PT と B-oligomer はマクロファージに NO 産生を誘導しなかったが、脾細胞に対しては NO 産生を誘導した。一方、IFN- γ はマクロファージの NO 産生を誘導することが示された。そこで百日咳菌体由来構成成分が脾細胞の IFN- γ 産生を誘導するか否かを検討した。その結果、PT と B-oligomer は脾細胞による IFN- γ 産生を誘導し、A-protomer と FHA にはその働きは見られなかった。
 7. 脾細胞による NO 産生に IFN- γ が介在することが示された。抗マウス IFN- γ 抗体を PT と脾細胞との培養中に添加したところ、NO 産生は抗体の添加により抑制された。すなわち、PT が脾細胞に誘導する NO 産生は抗 IFN- γ 抗体により完全に抑制された。
 8. 脾細胞を PT で刺激する前に抗 Thy-1.2 と補体で処理すると、IFN- γ 及び NO ともに産生されなくなった。このことより、IFN- γ の産生に寄与していた細胞は T 細胞であることが示された。

以上、本論文では百日咳菌の全菌体ワクチンはタイプ 1 の免疫応答を誘導することが示された。また、細菌に対する細胞毒性を示すマクロファージによる NO 産生に着目したところ、脾細胞を PT および B-oligomer で刺激した時に NO 産生が観察された。また、PT および B-oligomer で刺激した脾細胞の培養上清には IFN- γ が検出されたが、このとき、脾細胞から T 細胞を除去すると、培養上清に IFN- γ は検出されなくなり、同時に NO 産生も検出されなくなった。このことから、PT を構成する B-oligomer が T 細胞の IFN- γ を誘導していると考えられた。PT あるいは B-oligomer による刺激によって T 細胞が IFN- γ を産生し、マクロファージは IFN- γ 刺激により活性化し、NO 産生を誘導すると考えられた。本研究で観察された、IFN- γ の *in vivo* 投与による百日咳菌感染後のマウスの生存率の上昇は、IFN- γ の有する多面的作用の結果であると考えられた。このように本研究では百日咳菌に対する感染防御に IFN- γ が重要な働きをしていることが示され、百日咳菌の感染防御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。