

論文内容要旨

農学国際専攻

平成 11 年博士課程進学

氏名 奥野孝浩

指導教官 大塚治城

Immunological study on experimental leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis* and analysis of the pathogenicity of the parasite

(*Leishmania amazonensis* を原因とする実験的リーシュマニア症の免疫学的解析と本原虫の病原性に関する研究)

リーシュマニア症とはサシチョウバエに媒介されるリーシュマニア原虫感染を原因とする人獣共通感染症である。本症は、感染原虫の種類と感染後の宿主免疫応答(Th1/Th2)により様々な病態を引き起こす。人で重篤な症状を示す重要な。*L. amazonensis* (*La*)は、同じ皮膚型で詳細に研究されている *L. major* (*Lm*)とは、宿主免疫応答やマウス感染感受性の点で大きく異なるとされる。本研究では *La* 感染による実験的リーシュマニア症の免疫学的解析と宿主免疫応答の解析、Th1 型免疫誘導と *La* 抵抗性の解析、病態悪化に関わる原虫抗原の解析を行った。最後に、標識遺伝子導入原虫の新規抗原虫薬剤選抜試験、原虫病原性解析等への応用可能性を示唆し、4 章構成とした。

第一章：*Lm* 感染に対するマウス系統の感染感受性と宿主免疫応答については、これまでに詳細に調べられて来た。近交系マウスの内、BALB/c や SWR/J では進行性皮膚病変を形成し、その他ほとんどのマウス系統 (CBA、C57BL/6、C3H、DBA/2) では自然治癒する。前者で液性免疫 (Th2)、後者で細胞性免疫 (Th1) の誘導が報告されている。一方、*La* 感染感受性も Th1/Th2 に相関があるとされるが、マウス系統の感染感受性は *Lm* と大きく異なり BALB/c を始め CBA、C57BL/6 を含むほとんどの系統が感受性とされる。しかし、CBA、C57BL/6 については抵抗性という相反する報告もある。そこで本章では、BALB/c、CBA/J、

C57BL/6、C3H/HeN、DBA/2 の5系統を用い、マウス系統間の *La* 感染感受性および宿主免疫応答を比較解析した。各系統のマウス尾根部皮内に *L. amazonensis* MPRO/BR/72/M1845 株の感染型プロマスティゴート原虫 1×10^7 を接種し、病変形成を測定した。BALB/c で最も大きく強い潰瘍形成を伴う病変を認めた。C3H/HeN、C57BL/6、DBA/2 においても病変の形成が認められた。CBA/J の病変進行は非常に緩慢であった。病変部、所属リンパ節である坐骨リンパ節および脾臓での寄生原虫数は BALB/c で最も多く、一方で、CBA/J においては、病変部より少数の寄生原虫が検出されたが、坐骨リンパ節および脾臓においては検出限界以下であった。細胞性免疫の指標として行った *La* の可溶性抗原 (SLA) に対する遅延型過敏反応 (DTH) 試験では、CBA/J で強い反応を認めた。感染 8 週目での SLA に対する脾臓由来リンパ球増殖反応は CBA/J で最も強い反応が得られた。全ての系統で *Lm* 原虫感染初期の主要抗原とされる *Leishmania* homologue for activated C kinase (LACK) に対しては反応しなかった。SLA に対するリンパ球の IFN- γ 産生は、CBA/J において 454.3 ± 60.3 pg/ml と最も高値を示し、C3H/HeN、C57BL/6 でそれぞれ 127.7 ± 121.0 , 137 ± 32.1 pg/ml であり、BALB/c、DBA/2 では検出限界以下であった。血清中の Th2 依存性抗体である IgG 1 と、Th1 依存性抗体である IgG2a の比、IgG 1 / IgG2a 比は、CBA/J で低値を、その他の系統で高値を示した。以上の結果より、CBA/J マウスではその他の系統のマウスより、病変形性が緩慢であり、病変部および所属リンパ節中の原虫数も少数に抑えられており、*La* 感染においても、細胞性免疫の活性化と感染抵抗性が相関することが示唆された。

次に、少数の *Lm* 原虫接種により感受性の BALB/c に Th1 を誘導し抵抗性が付与されるという報告を参考にして、*La* において同様に少数 (1×10^2 , 1×10^3) の原虫接種実験を行った。 1×10^2 接種群では、接種後 30 週目でも病変形成を認めなかったことから感染が成立していないと考えられた。一方、 1×10^3 接種群では、接種後 6 週目より病変形性が認められた。本群の SLA に対する DTH 反応は、接種後 4 週目には陽性であったが、その後 8 週目にかけて反応が低下した。これより病変形成に Th1 低下の関与が考えられた。また、*La* は、少数接種でも病変を引き起こすことから *Lm* とは病原性が大きく異なると考えられた。

第二章：第一章において Th1 型免疫反応の活性化が *La* 感染抵抗性に重要なことが示唆された。そこで、本章では、マウスへのリーシュマニア可溶性抗原 (SLA) 免疫による SLA 特異的 Th1 を誘導することによる、*La* 感染抵抗性への影響を検討した。これまで原虫感染感受性マウスに対する SLA を用いた免疫実験では、抗原の接種経路によって、細胞性免疫と液性免疫の活性化パターンが異なることが報告されている。本実験では、投与が簡便で、近年細胞性免疫の活性化も可能とされている、アジュバントとしてコレラ毒素 (CT) または CT の B サブユニット (CTB) を用いた SLA の経鼻免疫により Th1 誘導を試み、その *La*

感染抵抗性への関与を検討した。SLA+CT (A 群) または SLA+CTB (B 群) 免疫の BALB/c、C3H/HeN、C57BL/6 の全ての系統で抗 CT 血清 IgG の上昇を認めたが、抗 CT 血清 IgA および抗 SLA 血清 IgG の上昇を認めなかった。一方、SLA に対する DTH は全系統の A、B 群で強く認めた。このことから、BALB/c、C3H/HeN、C57BL/6 の全ての系統で経鼻免疫による SLA に対する Th1 誘導が可能であった。また、Th1 誘導群への *La* 接種では、C3H/HeN の A、B 群と C57BL/6 の A 群で、対照群に比較して病変部のサイズの低下を認めた。BALB/c の A、B 群と C57BL/6 の B 群の病変形成は対照群と差が無かった。BALB/c、C3H/HeN の結果から、SLA を用いた Th1 誘導時の *La* 感染抵抗性はマウス系統により異なる事が示唆された。また、C57BL/6 の結果から、CT と CTB のアジュバント効果が異なる可能性が示唆された。本章において BALB/c において SLA の経鼻免疫により誘導された Th1 型の免疫反応が *La* 感染においてなんら効果を示さなかったことは、前章の *La* を 1×10^3 接種した BALB/c において、一度誘導された Th1 が病変の形成に伴い消失したとと相関する結果である。細胞性免疫誘導の *La* 感染防御効果にマウス系統間で差があることは、今後この違いが何に起因しているのかを検討する必要がある。

第三章：LACK は *Lm* において、マウス CD4 陽性 T 細胞の標的分子の一つとして知られている。本研究では人で重篤な臨床症状を示し、*Lm* とは病原性の異なる重要な *La* の病変形成への LACK の関わりを調べた。原虫から得た mRNA を基に RT-nested PCR 法を行い、LACK cDNA の塩基配列を決定した。既知 LACK (*L. major*、*L. braziliensis*、*L. infantum*、*L. chagasi*、*L. donovani*) との比較により、塩基配列で 97.3%、アミノ酸配列で 98.7% 以上の相同性を認め、この蛋白が種内で高度に保存されている事が確認された。*La* に感受性の BALB/c に、精製した組換え LACK 蛋白を接種した群では、PBS (-) 接種群に比べ、その後の原虫接種による病変形成の早期化と病態の悪化が認められた事から、LACK 抗原が、*La* を原因とする本症でも病態の悪化に関わる重要な原虫抗原である事が示唆された。

第四章：*La* に、*egfp* または β -galactosidase 遺伝子を導入し、得られた組換え体、*La/egfp*、*La/lacZ* の応用性について検討した。蛍光強度と基質 (CPRG) 添加後の吸光度を指標とした各々の導入遺伝子産物の活性は細胞外発育型プロマスティゴートで細胞数依存性であった。これら原虫を用いた amphotericin B のプロマスティゴート型に対する原虫増殖阻害活性測定は、細胞数カウント、放射性物質取り込みといった従来法と比しても簡便で、得られた IC_{50} は従来法での測定値とほぼ一致した。宿主マクロファージ感染型アマスティゴートにおける導入遺伝子産物の活性も各々のマクロファージ内の感染原虫数依存性であった事から、従来法の細胞数カウントではほとんど不可能な、アマスティゴート型における多数の

被検物質の選抜を、*La/egfp*、*La/lacZ* を用いて簡便に行うことが可能であると考えられた。また、プロマスティゴートの増殖測定に用いられている従来法では、共存するマクロファージの代謝の影響があり、アマスティゴートの増殖測定では正確な測定結果を得られないことが予想されるので、本研究で得られた外来遺伝子産物の活性を指標とした測定法は非常に有用性が高いと期待される。一方、X-Gal 染色により *La/lacZ* 感染マウス組織からの原虫検出は容易であり、*La/lacZ* は感染原虫の宿主体内動態を知る上でも有効と考えられた。

以上の結果は、*La* の研究に有用な知見を与えられる。