

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 奥野 孝浩

成績 ・ 合格

本論文は、人で临床上重要な *L. amazonensis* (*La*) 感染を原因とするリーシュマニア症の抵抗性に関わる宿主免疫応答のマウスモデルを用いた解析を目的としている。一章において、*La* 感染マウスモデル確立の為、マウス系統による感受性の違いを明らかにし、抵抗性に関わる宿主免疫応答を検討した。二章では、同じ皮膚型で詳細に研究されている *L. major* (*Lm*) で、細胞性免疫 (Th2) 誘導、細胞性免疫 (Th1) 抑制により、病態を悪化させるとされる *Leishmania* homologue for activated C kinase (LACK) の *La* 感染での病態への関与を調べた。三章では、*La* 感染感受性マウスに経鼻免疫による原虫抗原特異的 Th1 を誘導し、*La* 感染に対する抵抗性付与を試みた。四章では、感染原虫の宿主体内動態を検討し、原虫病原性の解析に寄与する事を目的とし、標識遺伝子導入原虫の作製とその利用可能性を検討した。

第一章：*La* 感染を原因とする本症は皮膚型とされるが、より重篤な皮膚粘膜型、内臓型の患者からも分離報告があり、临床上重要である。本症の免疫学的解析を行うに当り、マウスモデルが非常に重要であるが、*La* 感染に対するマウスモデルについての詳細な検討はなされていない。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の解析を行った。尾根部皮内に *La* の感染型プロマスティゴート原虫を接種し、各マウス系統の病変形成の経過と原虫感染8週目の病変部、所属リンパ節、脾臓の感染原虫数測定を行った。BALB/c, C3H/HeN, C57BL/6, DBA/2 で進行性病変を認め、病変部、所属リンパ節、脾臓で多数の寄生原虫を認めたが、CBA/J の病変進行は非常に緩慢で、所属リンパ節、脾臓の感染原虫は検出限界以下であった事から、前者は *La* 感染感受性、後者は抵抗性と考えた。*La* の可溶性抗原 (SLA) に対する遅延型過敏反応 (DTH) 試験、SLA に対する脾臓由来リンパ球増殖反応、血清 IFN- γ 産生、血清中の Th2/Th1 各々の依存性抗体である IgG1/IgG2a の比等の結果から、*La* 感染抵抗性の CBA/J で Th1 誘導が示唆され、Th1 の活性化と *La* 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* で同様の実験を行った。少数原虫接種に

より、SLA に対する DTH 反応は接種後 4 週目には陽性であったが、6, 8 週目と反応が低下し、それに伴う病変形成性が認められた。これによっても抵抗性と Th1 の関与が示唆された。

第二章：本章では、*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、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* 感染感受性の 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、原虫接種による病変形成早期化と病変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。

第三章：第一章において Th1 の活性化が *La* 感染抵抗性に重要なことが示唆されたことから、本章では、SLA 特異的 Th1 を誘導することで *La* 感染感受性の BALB/c, C3H/HeN, C57BL/6 への抵抗性付与を試みた。Th1 誘導抗原に SLA を、アジュバントとしてコレラ毒素を用いて経鼻により免疫を行った。SLA に対する DTH によりこれら系統の免疫群での Th1 誘導を確認した。Th1 誘導群への *La* 接種では、C3H/HeN, C57BL/6 で対照群と比較して病変の軽減を認めた事から、これら系統では *La* 感染抵抗性に Th1 が重要である事が示唆された。BALB/c の Th1 誘導群では対照群と差が無く、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可能性が示唆された。

第四章：感染原虫の体内動態を知る事は、病態と宿主免疫応答を検討する上で重要であると考えられる。そこで、本章では *egfp* または β -galactosidase 遺伝子を導入 *La* を作製し、その利用可能性について、定性的、定量的解析を行った。マウス組織からの感染原虫の検出が容易である事、導入遺伝子活性を用いたプロマスティゴート、アマスティゴートの細胞数測定が可能である事が示された。

以上本研究は、マウスモデルを用いて、宿主の *La* 感染を原因とする本症の抵抗性には Th1 の誘導が重要である事を明らかにした。また、遺伝子導入原虫の作製とその応用可能性を示し、*La* 病原性解析の一助としている。これらの事は、人の临床上重要な *La* 感染を原因とする本症の免疫学的解析を行うに当り、有益な知見を与えるものと考えられる。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。