

審査の結果の要旨

氏名 小幡高士

本研究は、哺乳動物の腸管における細菌と宿主粘膜免疫系との相互作用の実態を明らかにするため、16S rRNA 遺伝子クローンライブラリー法（以後、16S rRNA 法）と呼ばれる新規な分子学的細菌解析手法を用い、腸管粘膜関連リンパ組織における細菌プロファイルを精査するとともに、最優勢細菌群と宿主粘膜免疫系との相互作用の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 腸管における主要な免疫誘導組織であるパイエル板 (PP) 内における細菌プロファイル解析の結果、*Alcaligenes* をはじめとする日和見細菌群が PP 内に存在していることが示された。また、これら細菌群は PP と同じく腸管関連リンパ組織 (GALT) の1つである孤立リンパ小節 (ILF) においても認められた。一方、粘膜固有層 (LP) においては全く認められなかった。つまり、これら細菌群は PP をはじめとする粘膜誘導組織に特異的に存在が確認される細菌群であることが示唆された。

以後、*Alcaligenes* をこれら日和見細菌のモデル細菌とし、宿主粘膜免疫系との相互作用に関してさらに詳細な解析を行った。

2. 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用い、PP 内の *Alcaligenes* の存在を視覚的に捉えようと試みたところ、通常マウスの PP 内において *Alcaligenes* と考えられる細菌群が散在的に検出された。これにより、PP 内における *Alcaligenes* の存在が視覚的にも確認された。
3. *Alcaligenes* と宿主免疫系の関係をより詳細に調べるため、パイエル板由来 *Alcaligenes* の単離・培養を試みたが、現段階では実現できなかった。そこで PP 内細菌プロファイリング解析結果に基づき、*Alcaligenes* の中でも最優勢種である *Alcaligenes faecalis* の標準株 (NBRC 13111^T) を用いて種々の免疫学的解析を行った。
4. 通常マウスにおいて *Alcaligenes* に対する宿主粘膜免疫応答ならびに全身免疫応答が恒常的に惹起されているかどうか、糞便中 IgA 抗体および血清中 IgG 抗体を各々の指標として ELISA 法を用いて調べた結果、*Alcaligenes* 特異的な粘膜 IgA 抗体は誘導されている一方、全身 IgG 抗体は全く誘導されていないことが分かった。このことはさ

らに、ELISPOT 法を用いた実験結果からも裏付けられた。すなわち、通常マウスにおいて *Alcaligenes* 特異的な IgA 抗体産生細胞が PP をはじめとする GALT に有意に存在したのに対し、*Alcaligenes* 特異的な IgG 抗体産生細胞は脾臓 (SP) をはじめとする全身系リンパ組織に全く認められなかった。さらに、PP 欠損マウスにおいては *Alcaligenes* 特異的な IgA 抗体が著しく減少したことから、これら *Alcaligenes* に対する宿主粘膜免疫応答は主に PP を介して誘導されていることが明らかとなった。

5. *Alcaligenes* の宿主体内動態を DC に焦点を絞り 16S rRNA 法を用いて精査したところ、PP-DC 中には *Alcaligenes* が多く検出されたにもかかわらず、SP-DC 中には全く認められなかった。また、腸間膜リンパ節 (MLN) -DC 中には、わずかながら *Alcaligenes* が検出された。これらのことは、上記の ELISA ならびに ELISPOT のデータとも完全に対応した結果であった。つまり、*Alcaligenes* は PP に特異的に存在の確認される細菌であり、DC を介し一部は MLN まで輸送されるものの全身系組織には一切侵入せず、それゆえ宿主免疫系は *Alcaligenes* に対し粘膜免疫応答のみを常態的に誘導していることが示唆された。
6. *Alcaligenes* が PP 内に特異的に存在可能な理由について次のような検討をした。通常マウスの PP 組織内 *Alcaligenes* を無菌マウスに単回経口投与し、3 週間後にパイエル板内の *Alcaligenes* の存在を FISH 法で確認したところ、*Alcaligenes* が相当量検出された。それに付随して、*Alcaligenes* 特異的な粘膜 IgA 抗体量ならびに IgA 抗体産生細胞数の有意な増加が確認された。これらの結果から、宿主免疫系から常態的に抗原特異的な粘膜免疫応答を受けながらも *Alcaligenes* は PP 内で生存可能な菌である可能性が示唆された。さらに、B 細胞に欠陥を有し粘膜系抗体産生が著しく低下した *xid* マウスを用いた実験において、PP 内 *Alcaligenes* 数が激減することから、その存在には粘膜免疫系によって誘導される IgA をはじめとする粘膜抗体が関与している可能性が示唆された。

以上、本論文は哺乳動物 GALT 内において日和見細菌が存在することを示唆するはじめてのものであり、宿主免疫系と腸内細菌との相互作用に関するこれまでの知見に新たな視点を投げかけるという点において非常に意義のあるものであると考えられ、学位の授与に値する。