

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 孫 家梅

リーシュマニア症は *Leishmania* 属原虫によって引き起こされる感染症であり、皮膚型リーシュマニア症 (CL)、皮膚粘膜型リーシュマニア症、内臓型リーシュマニア症に大別される。CL は *Leishmania major* を主要な病原種として、潰瘍を伴う皮膚病変を主徴とする。抗原抗体複合体 (免疫複合体、IC) はⅢ型アレルギーの原因であり、糸球体腎炎や全身性エリテマトーデス・関節リウマチといった疾患に関与することが知られている。CL の病態形成においても原虫抗原と抗体が IC を形成し、Ⅲ型アレルギー反応が誘導される可能性が考えられるが、CL に関する免疫病理学的研究はほとんど行われていない。そこで本研究では、実験的 *Leishmania major* 感染マウスモデルを用いて、Ⅲ型アレルギー反応が CL の病態形成に関与することを解明した。

第 1 章では、Ⅲ型アレルギー反応であるアルサス反応 (AR) が抗 *L. major* 抗体と *L. major* 抗原により皮膚で惹起されるかを検証した。まず *L. major* 可溶性粗抗原 (SLA) を *L. major* 感染 BALB/c マウス (Lm-i-BALB/c) の背部皮内へ接種したところ、1 時間後に接種部位に浮腫が形成された。病理組織学的解析においては、接種後 1 時間で接種部位に脱顆粒肥満細胞の増加が、投与後 8 時間で好中球の顕著な浸潤が認められた。以上のことから、*L. major* 感染により産生される抗体は抗原特異的に AR を惹起すると考えられた。IgG 抗体は *L. major* 感染においても顕著に増加することから IgG 抗体がこの反応の重要な要因であると考え、抗原虫 peroxiredoxin IgG 抗体 (C11C) および Lm-i-BALB/c 血清より分離した IgG 分画を naïve BALB/c マウスの背部皮内に接種した。IgG は protein G sepharose beads を用いて分離し、SLA との高い反応性が保たれていることおよび IgE 混入が認められないことを確認した。SLA を静脈内投与して 1 時間後、抗体の接種部位において浮腫が認められた。病理組織学的解析においては、SLA 投与後 1 時間で抗体接種部位に脱顆粒肥満細胞の増加が、SLA 投与後 8 時間で好中球の顕著な浸潤が認められた。以上のことから、抗 *L. major* IgG 抗体および SLA は受身 AR を惹起することが明らかになった。

第 2 章では、実験的 CL 皮膚病変におけるⅢ型アレルギー反応を解析した。第 1 章での抗 *L. major* 抗体と *L. major* 抗原により誘導される AR で特徴的であった好中球・肥満細胞および IC の沈着に注目して病理組織学的解析を行った。IgG および補体 C3 は Lm-i-BALB/c の皮膚病変において原虫と共局在しており、IC が形成されていることが示唆された。また皮膚病変において、好中球の顕著な浸潤および脱顆粒肥満細胞が認められた。これらの結果から、実験的 CL の皮膚病変にⅢ型アレルギー反応に関与していることが示唆された。Recombination-activating gene-2 欠損マウス (RAG2^{-/-}) は抗体産生能が欠損しているため、Ⅲ型アレルギー反応が生じない。実験的 CL 皮膚病変におけるⅢ型アレルギー反応をより詳細に解明するため、抗 *L. major* IgG 抗体を豊富に含む IgG 分画を Lm-i-BALB/c 血清から分離し、*L. major* 感染 RAG2^{-/-} マウス (Lm-i-RAG2^{-/-}) へ静脈内接種して病態を解析した。投与後、Lm-i-RAG2^{-/-} の血中抗 *L. major* IgG 抗体は顕著に増加し、皮膚病変において IgG・C3・原虫の共局在により特徴付けられる IC の沈着が認められた。

また、皮膚病変内の脱顆粒肥満細胞および好中球は、IgG を移入していないコントロール *Lm-i-RAG2^{-/-}* と比べて顕著に増加していた。これらの結果から、IgG 抗体の移入により *Lm-i-RAG2^{-/-}* 皮膚病変においてⅢ型アレルギー反応が再現されることが明らかになり、実験的 CL の病態形成にⅢ型アレルギー反応が関与することがより強く示唆された。

第3章では、実験的 CL 皮膚病変の悪化にⅢ型アレルギー反応が関与していることを明らかにするため、*Lm-i-BALB/c* 血清由来 IgG 分画を移入した *Lm-i-RAG2^{-/-}* の皮膚病変の解析を行った。*Lm-i-BALB/c* の皮膚病変は潰瘍を呈するのに対し、*Lm-i-RAG2^{-/-}* の皮膚病変は潰瘍を伴わない。しかし *Lm-i-BALB/c* 血清由来 IgG 分画を移入した *Lm-i-RAG2^{-/-}* では、*Lm-i-BALB/c* と同様な潰瘍を伴う皮膚病変が形成された。*RAG2^{-/-}* マウスは機能的 B 細胞のみならず機能的 T 細胞も欠損しているため、IgG 移入 *Lm-i-RAG2^{-/-}* で再現されたⅢ型アレルギー反応は T 細胞の干渉しない反応であり、これが潰瘍形成の有無に関与することが明らかになった。さらに、*Lm-i-BALB/c* 血清由来 IgG 分画移入 *Lm-i-RAG2^{-/-}* では IgG を移入していない *Lm-i-RAG2^{-/-}* と比べて皮膚結節が大きく、原虫数も増加していた。病理組織学的解析においては、*Lm-i-BALB/c* の皮膚病変と類似して、表皮の崩壊・真皮の巣状壊死および真皮結節における広範な血管炎が認められた。好中球浸潤を伴う血管炎を呈する微小血管の数をカウントすることによりその重症度を評価した。*Lm-i-BALB/c* 血清由来 IgG 分画移入 *Lm-i-RAG2^{-/-}* では IgG を移入していない *Lm-i-RAG2^{-/-}* と比べて血管炎を呈する微小血管数が顕著に多く、この現象は *Lm-i-BALB/c* の皮膚病変での結果と一致していた。おそらく血管炎により血管の機能障害が生じることで潰瘍が誘引されると考えられる。以上のことから、Ⅲ型アレルギー反応は皮膚病変の潰瘍形成に関与することが明らかになった。

本研究では、まず第1章で、抗 *L. major* IgG 抗体および *L. major* 抗原が皮膚にⅢ型アレルギー反応を誘導することが証明された。次に第2章では、実験的 CL の皮膚病変における IC 沈着と脱顆粒肥満細胞・好中球浸潤から、Ⅲ型アレルギー反応の関与が示唆された。また、*Lm-i-RAG2^{-/-}* マウスへの IgG 抗体移入により皮膚病変におけるⅢ型アレルギー反応が再現され、*Lm-i-BALB/c* の皮膚病変と同様な IC 沈着と脱顆粒肥満細胞・好中球浸潤が認められた。さらに第3章では、IgG 移入 *Lm-i-RAG2^{-/-}* に潰瘍形成を伴う皮膚病変悪化が再現されたことから、Ⅲ型アレルギー反応が CL の皮膚病変悪化(潰瘍形成)に関与することが明らかとなった。以上のことから本研究により、実験的 CL の皮膚病変ではⅢ型アレルギー反応が生じていること、そしてこのⅢ型アレルギー反応が潰瘍形成を伴う皮膚病変悪化に関与することが初めて明らかになった。これらの研究成果は、CL の病態発生機序の解明に繋がるばかりでなく、CL の新たな診断法や免疫療法の開発にも発展しうる有意義なものであり、学術上応用上寄与するところが少なくない。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。