

## 審査の結果の要旨

氏名 綱嶋 るみ

途上国において治療や予防の対策を求められているリーシュマニア症の原因微生物であるリーシュマニア原虫は、哺乳動物体内においてマクロファージ (MΦ) に侵入し増殖する。宿主である MΦ の細胞内における殺原虫因子を誘導することが、リーシュマニア症の発症防御に重要である。Green らは、マウス腹腔 MΦ へ IFN- $\gamma$  を処置すると共に *Leishmania major* (原虫) を共培養した時、72 時間以降において一酸化窒素 (NO) の産生増強が起こり MΦ の原虫感染率の低下が起こることを報告した。また、Ota らは、IFN- $\gamma$  及び IL-12 (IFN- $\gamma$ /IL-12) を 15 時間前処置したマウス腹腔 MΦ と原虫を共培養した時、NO の産生増強が認められる以前である原虫接種 4 時間後において原虫感染率の低下が起こることを報告した。本研究では、まだ明らかとなっていない IFN- $\gamma$ /IL-12 前処置 MΦ に見られた原虫接種 4 時間後にみられる原虫感染率低下のメカニズムを解明し、ヒト治療への応用の可能性を考察しており、以下の 3 章で構成されている。

### 第一章 蛍光染色原虫を用いた原虫感染の新規解析方法の確立と MΦ への原虫侵入の検討

原虫侵入 4 時間後において原虫生残率の低下する理由として、(1) MΦ への原虫侵入が低下した、(2) MΦ 細胞内での NO 以外による殺原虫能が増強した、という 2 つの理由が考えられる。従来から用いられているギムザ染色法は「生残した原虫を持つ MΦ」を判別できるが、「侵入した原虫を殺傷した MΦ」の検出は困難であった。そこで、赤色蛍光色素 PKH26 で細胞膜を標識した原虫を MΦ と共培養を行い、「侵入した原虫を殺傷した MΦ」を検出することができる新規の解析方法を作成し、IFN- $\gamma$ /IL-12 前処置 MΦ を用いて検討を行った。その結果、共培養 4 時間後の IFN- $\gamma$ /IL-12 前処置 MΦ と未処置 MΦ は共に同レベルの原虫侵入が起きており、また、原虫生残率は Ota らの結果と同様に IFN- $\gamma$ /IL-12 前処置 MΦ において低下した。以上のように、サイトカイン処理により細胞内に原虫侵入が同様に起きているにもかかわらず原虫生残率が減少したことから、MΦ 細胞内での NO 以外による殺原虫能が増強したことが示唆された。

### 第二章 *In vitro* においてリーシュマニア感染初期に原虫殺傷因子として働く活性酸素種 (ROS) の検証

IFN- $\gamma$ による産生誘導の報告や、NO産生よりも早い時間での産生報告がある活性酸素種(ROS)を殺原虫能の因子として推測し検討を行った。IFN- $\gamma$ /IL-12前処置を行い原虫と共培養したM $\Phi$ の細胞外ROS量および細胞内ROS量をLuminol法およびDCFH法でそれぞれ測定した結果、細胞内外ROS量は培養1時間後にIFN- $\gamma$ /IL-12前処置M $\Phi$ が未処置M $\Phi$ に比べて高い傾向を示した。抗酸化物質である $\alpha$ -tocopherol( $\alpha$ -TOC)の添加により細胞内ROS及び細胞外ROS産生量低下および原虫生残率の上昇が認められたが、M $\Phi$ への原虫の侵入には影響しなかったことから、IFN- $\gamma$ /IL-12前処置M $\Phi$ はROSの産生増強と、それによる原虫殺傷増強が起きていることが示唆された。

### 第三章 マウスおよびヒト細胞株を用いたサイトカイン前処置によるリーシュマニア原虫感染制御の基礎検討

動物愛護および倫理的観点から、マウスおよびヒトの細胞株を用いて、IFN- $\gamma$ /IL-12前処置効果の検討を行った。マウス細胞株として検討したRAW264.7及びJ774A.1においては、ともにマウス腹腔M $\Phi$ と同様感染4時間後にサイトカイン前処理において生残原虫数が低下した。一方ヒト細胞株では、U-937ではサイトカイン前処理の効果が認められたが、THP-1では、サイトカイン前処理による原虫生残率の低下は認められなかった。今後、原虫感染4時間にROSを産生するこれらの細胞株を用い、IFN- $\gamma$ /IL-12のみならず、他の刺激を含めROS産生増強に基づくリーシュマニア発症制御法を展開することを期待する。一例として、Toll Like receptor 4(TLR4)リガンドであるリポ多糖(LPS)はNF $\kappa$ Bの活性化を介しROS産生を増強することが知られているが、毒性が強く人体には使用できない。しかし、近年、安全性の高いTLR4リガンドとして、小麦の常在菌である*Pantoea agglomerans*由来リポ多糖であるIP-PA1が注目されている。予備的に、IP-PA1をマウス脾臓M $\Phi$ へ前処置したところ、原虫との共培養後4時間において原虫感染率が低下した。今後は、マウス細胞株およびヒト細胞株を用いてIFN- $\gamma$ /IL-12前処置やIP-PA1前処置のROS産生効果を詳細に解析すると共に、新たな原虫感染制御法の開発研究が進むことを期待する。

本研究により、*in vitro*におけるM $\Phi$ へのIFN- $\gamma$ /IL-12前処置によってM $\Phi$ 細胞内でのROS産生が増強され、殺原虫因子として働くことが示唆された。M $\Phi$ へ原虫が侵入して早い段階でROSによる殺原虫が誘導されることは、M $\Phi$ 内での原虫増殖抑制にも効果があると推測でき、リーシュマニア症の発症抑制へも期待することができる。また、病変形成の抑制に伴う治療薬の軽減や治療期間の短縮、さらにはワクチン効果の増強などを期待でき、リーシュマニア症治療を行う上で問題となっている、治療薬の副作用や金銭的な問題を解決する糸口となる可能性を秘めていると考えられる。以上のように、これらの研究成果は、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。