

学 位 論 文 要 旨

氏名 Yussaira Castillo Fortuna

題 目 : Evaluation of Micronutrients Supplementation Effects on a Novel Infection Model with *Listeria monocytogenes*.

(新規リステリア・モノサイトゲネス感染モデルを用いた微量栄養素投与効果の検討)

論文要旨 :

Listeriosis, caused by the gram-positive, facultative intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*, is one of the leading causes of death due to foodborne illness in the industrialized world. *Listeria monocytogenes* had been isolated in humans as early as the 1920. Nevertheless, it was not identified as an important cause of neonatal infection until after World War II in Germany. Over the past 50 years, the human immunodeficiency virus (HIV) epidemic has significantly enlarged the immunodeficient population, with a relative risk of developing listeriosis 500 times higher in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients as compared to the general population. However, globally, human listeriosis remains a rare disease, and its prevalence is declining in industrialized countries in which food control measures have been implemented.

L. monocytogenes infects humans through the ingestion of contaminated food. It is able to cross the intestinal barrier and is thought to disseminate from the mesenteric lymph nodes to the spleen and the liver. *Listeria* has been isolated in a variety of raw foods, such as uncooked meats and vegetables, or food items that become contaminated during their processing, such as soft cheeses and cold cuts at deli counters. Unpasteurized milk or foods made from unpasteurized milk may contain the bacterium. *L. monocytogenes* is killed by pasteurization and cooking. However, in certain ready-to-eat foods such as hot dogs and deli meats, contamination may occur after cooking, before packaging.

There is growing interest in the role of micronutrients (essential trace elements and vitamins) in optimizing health, and in the prevention or treatment of disease, thus, because the nutritional status of an individual is profoundly affected by most disease states (usually by a combination of increasing demand at a time when there is reduced intake). This stems partly from the increase in knowledge and understanding of the biochemical functions of these nutrients, but also from the extensive threat that the growing population of antibiotic resistant organisms pose to public health.

There are many lines of in vitro evidence and human trials that have shown the essential effect of trace elements and vitamins on all aspects of immune function. In a study of tuberculosis in Indonesia, supplementation with zinc and vitamin A led to much earlier resolution of radiological changes and time to sputum negativity. Zinc (Zn) is the second most abundant transition metal after iron. It plays a vital role in living organisms and affects

multiple aspects of the immune system. Vitamin A and related retinoids influence many aspects of immunity. Combined zinc and vitamin A synergistically reduced the prevalence of persistent diarrhoea and dysentery.

In this study I challenged the efficacy of this combination against *Listeria monocytogenes* in a mouse model. I demonstrated that the supplementation with Zn and atRA enhanced resistance against *L. monocytogenes* infection in mice and treatment with both Zn and atRA showed a higher protective effect than treatment with either alone. Supplementation with Zn, atRA or their combination decreased the number of *L. monocytogenes* present in target organs. In vitro, its combination increased the bacterial uptake by macrophage cells and reduced the replication of *L. monocytogenes*.

Animal models have played fundamental roles in elucidating the pathophysiology and immunology of listeriosis, and will almost certainly continue to be integral components of the research on listeriosis. Data derived from animal studies helped for example characterize the importance of cell-mediated immunity in controlling infection, allowed evaluation of chemotherapeutic treatments for listeriosis, and contributed to quantitative assessments of the public health risk associated with *L. monocytogenes* contaminated food commodities. Newly emerging data about species-specific differences have recently raised concern about the validity of most traditional animal models of listeriosis.

Insect infection models have been used increasingly to study various pathogenic agents, including *L. monocytogenes*, in evaluations of pathogenicity and drug efficacy. Although, insect models have been criticized for being “too distant” from human disease processes, silkworms may provide a useful model for analyzing innate immunity because insects and mammals share common innate immune mechanisms.

In this study, I also demonstrated that larvae of the silkworm *Bombyx mori* are useful for studying *Listeria monocytogenes* infections in insects. Infection with the *L. monocytogenes* wild-type strain induced silkworm death. Infection by a listeriolysin O (LLO) deletion mutant also induced silkworm death, but the bacterial numbers in silkworms were lower than those of the wild-type strain. Intracellular growth was observed when the silkworm ovary-derived cell line BmN4 was infected with the wild-type strain. Pretreatment with vitamin A did not affect silkworm mortality after bacterial infection, but the efficiency of infecting the hemocytes and BmN4 cells was decreased with vitamin A treatment. Our results indicate that silkworm larvae are a useful insect infection model for *L. monocytogenes* and that vitamin A has protective effects against bacterial infection in silkworms.

Non-mammalian models have logistical, budgetary, and ethical advantages over mammals. In particular, the ease and low costs required to obtain large numbers of larvae facilitate large-scale screening, which would be prohibitive in mammals. The relevance of *in vivo* studies in so-called animal models have always to be revisited in the light of medical observations and *in vitro* findings. The “model” status of a given animal has constantly to be challenged, in order to uncover its limitation and ultimately propose ways to replace it, or “fix” it by the use of transgenesis or KI approaches.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	YUSSAIRA CASTILLO FORTUNA
審 査 委 員	主 査： 山口大学 教授 度会 雅久
	副 査： 鳥取大学 教授 村瀬 敏之
	副 査： 山口大学 教授 佐藤 宏
	副 査： 山口大学 准教授 清水 隆
	副 査： 山口大学 准教授 高野 愛
題 目	Evaluation of Micronutrients Supplementation Effects on a Novel Infection Model with <i>Listeria monocytogenes</i> . (新規リステリア・モノサイトゲネス感染モデルを用いた微量栄養素投与効果の検討)
<p>審査結果の要旨：</p> <p><i>Listeria monocytogenes</i> (リステリア・モノサイトゲネス) は、グラム陽性の細胞内寄生菌であり、感染により髄膜炎、敗血症、流産などを引き起こす。<i>L. monocytogenes</i> は自然界に広く分布し、汚染された食物を食べることにより感染することが知られている。北米では感染による死者も発生しており、腸管出血性大腸菌と並ぶ重要な食品由来感染症である。治療法として抗生物質の投与が知られているが、<i>L. monocytogenes</i> が細胞内寄生菌であること、薬剤耐性菌の存在、妊婦に対する抗生物質投与の影響などから、抗生物質以外の予防・治療法が求められている。そこで本研究では、免疫制御との関連が報告されているビタミン A あるいはその誘導体である all-trans retinoic acid(atRA)および亜鉛に注目し、マウスおよびカイコ感染モデルを用いて、感染に対する影響の検討を行った。</p> <p>1) マウスにおける atRA および亜鉛の投与によるリステリア感染に対する影響</p> <p>マウスに atRA もしくは亜鉛を投与後、<i>L. monocytogenes</i> を感染させたところ、投与による生存率の上昇が認められた。また、肝臓および脾臓における菌数の有意な減少が認められた。atRA および亜鉛の両方を投与することにより、感染防御効果の増強が認められた。細胞への影響を検討するために、HeLa 細胞および J774 細胞を用いて感染実験を行った。その結果、添加処理により、細菌取り込み能の増強および細胞内増殖の抑制が認められた。また、<i>L. monocytogenes</i> の液体培養時に亜鉛を添加することにより、菌の増殖速度が低下することが認められた。これらの結果から、atRA および亜鉛は免疫賦活化作用を有し、<i>L. monocytogenes</i> 感染に対する抗生物質を用いない新しい予防・治療法として有用であることが示唆された。また、同時に用いることで効果が増強されることが示唆された。</p>	

2) カイコにおけるビタミン A の投与によるリステリア感染に対する影響

昆虫を用いた感染モデルは費用および倫理面での障害が少なく、マウスなどの実験動物に代わる新たな感染モデルとして注目されている。そこで、新たな感染モデルとしてカイコを用いて、菌感染に対する影響を検討した。*L. monocytogenes* の親株である EGD 株を感染させたところ、カイコは死亡することが認められた。一方、主要な病原因子として知られているリステリオリシン O(LLO)の欠損株では、感染によるカイコの死亡は認められず、カイコ体内における菌数の増加も EGD 株に比べ低下することが示された。カイコ由来の BmN4 細胞内では、EGD 株では細胞内増殖が認められたが、LLO 欠損株では認められなかった。ビタミン A の投与は菌感染によるカイコの生死に影響を与えなかった。しかし、ビタミン A の添加により、カイコ血球細胞および BmN4 細胞への菌の感染効率は低下した。これらの結果から、カイコは *L. monocytogenes* の感染モデルとして有用であることが示唆された。さらにビタミン A の投与が菌の昆虫細胞への感染を阻害することが明らかとなった。カイコは人および動物と体温が異なるため、発現する菌の病原因子も異なることが予測される。昆虫への病原性に関与する未知の病原因子の探索にもカイコ感染モデルが有用であると考えられる。

以上により、審査委員一同は博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。