

ABSTRACT

Pathological study of the producing reaction of α -defensin (antimicrobial peptide) against pathogenic microorganisms in eosinophils

好酸球における、病原微生物に対する α -ディフェンシン産生反応の病理学的研究

Khatun Afia

論文要旨：

好酸球増多症（血液中の好酸球増加）は、蠕虫感染やアレルギーで引き起こされることは良く知られている。他の疾患においても好酸球増多症を示すものが知られており、腫瘍や内分泌疾患、また人においては結核などの抗酸菌感染症などがあげられる。抗酸菌感染時には、感染病巣周辺へ好酸球の浸潤が認められることが知られてはいるものの、その理由に関して全く不明である。近年、抗酸菌感染患者から採取した末梢血中の好酸球では、正常時には見られない、抗酸菌に対して強い作用を有する抗菌ペプチドである α -ディフェンシンの遺伝子発現が確認され、好酸球が α -ディフェンシンを介して抗酸菌に対して強い抗菌作用を有していることが示唆されている。しかし、この報告が唯一であり、他の報告は認められない。 α -ディフェンシンは、低分子の水溶性のペプチドであり、組織中での蛋白同定は定法の組織作成方法では困難であることが予想され、同定方法が確立していないことも研究が進んでいない理由であると考えられる。マウスでの抗酸菌感染モデルでは、組織への好酸球浸潤は認められるものの、好酸球増多症の報告は検索した範囲では認められず、他の好酸球浸潤を示すモデルに比べても、数が少ないことが報告されている。 α -ディフェンシンは抗酸菌等の細菌以外にも、真菌や寄生虫に対しても強い作用を有していることも知られている。また、マウス消化管寄生蠕虫感染モデルは好酸球増多症を示すとともに、組織浸潤好酸球は著明であることが知られている。

そこで、第1章では、マウス消化管寄生蠕虫感染モデルを用いて、低分子の水溶性のペプチドの固定に適しているザンボニ固定法により組織標本を作製し、 α -ディフェンシンの産生細胞の同定、ならびに産生細胞の動態を病理学的に解析し、また腸管での α -ディフェンシン遺伝子発現量を解析し、マウス好酸球の α -ディフェンシンの産生能、ならびに蠕虫に対する α -ディフェンシンの作用に関して検討した。腸管での α -ディフェンシン遺伝子発現量は非感染時の約50倍にまで増加し、組織浸潤した好酸球のほぼすべてが α -ディフェンシン陽性であり。腸管においては、他の産生細胞であるパネート細胞より多数を占めていた。これらの所見より、マウスにおいても好酸球が α -ディフェンシンを産生し、また、 α -ディフェンシンが蠕虫に対しても防御的に作用していることが示唆された。

第2章では、抗酸菌 (*Mycobacterium avium* strain 104) の濃度や感染ルートの解析、また、前章で確立した α -ディフェンシン検出方法を用いて抗酸菌感染での好酸球の α -ディフェンシン産生を解析し、好酸球機能解析のためのマウス抗酸菌感染モデルの作成を試みた。細菌の濃度としては 1.0×10^9 (high), 1.0×10^8 (middle), and 1.0×10^7 cells (low) cells in 0.5 mlと、過去の報告よりも高濃度で実験を行った。経口投与では、病変の形成は全く認められなかった。腹腔投与により、すべての濃度で、細菌巣とそれを取り囲む好酸球組織浸潤が認められたが、**high**投与群では顕著な好酸球集塊を認めた。一方、血中好酸球数は、**middle**と**high**投与群で有意に上昇した。好酸球集塊では、ほとんどの細胞が α -ディフェンシン陽性であった。**high**投与群では、人での抗酸菌感染症と同じように、好酸球増多症と組織での好酸球集塊を示すモデルを作成することが出来た。また、浸潤好酸球が α -ディフェンシンを産生していることを示した。

今回確立できた、好酸球での α -ディフェンシン検出方法、ならびにマウスでの好酸球増多症を伴う抗酸菌感染モデルは、人での抗酸菌感染における好酸球の役割を解析する上で有用なツールとなると考えられる。また、獣医学領域においても、ヨーネ病など、好酸球の病変部への浸潤を伴う疾患における好酸球の機能解析にも有用と考えられる。

学位論文審査の結果の要旨

氏名	KHATUN AFIA
審査委員	主査：山口大学 教授 森本 将弘
	副査：鹿児島大学 教授 三好 宣彰
	副査：山口大学 教授 度会 雅久
	副査：山口大学 教授 日下部 健
	副査：山口大学 准教授 下田 宙
題目	Pathological study of the producing reaction of α -defensin against pathogenic microorganisms in eosinophils (好酸球における、病原微生物に対する α -ディフェンシン 産生反応の病理学的研究)
審査結果の要旨： KHATUN AFIA 氏の博士課程における研究は、好酸球が抗酸菌に対して強い作用を有する抗菌ペプチドである α -ディフェンシンを産生しているのかをマウスモデルにおいて確認するとともに、抗酸菌感染での好酸球を介した防御機構を解析できるマウスでのモデル系の作成である。 好酸球増多症（血液中の好酸球増加）は、蠕虫感染やアレルギーで引き起こされることは良く知られている。他の疾患においても、特に結核などの抗酸菌感染症などがあげられる。抗酸菌感染時には、感染病巣周辺へ好酸球の浸潤が認められることが知られてはいるものの、その理由に関して全く不明である。近年、抗酸菌感染患者から採取した末梢血中の好酸球では、正常時には見られない、 α -ディフェンシンの遺伝子発現が確認され、好酸球が α -ディフェンシンを介して抗酸菌に対して強い抗菌作用を有していることが示唆されている。しかし、この報告が唯一であり、他の報告は認められない。 α -ディフェンシンは、低分子の水溶性のペプチドであり、組織中での蛋白同定は定法の組織作成方法では困難であることが予想され、同定方法が確立していないことも研究が進んでいない理由であると考えられる。 そこで、第 1 章では、好酸球反応が著明なマウス消化管寄生蠕虫感染モデルを用いて、低分子の水溶性のペプチドの固定に適しているザンボニ固定法により組織標本を作製し、 α -ディフェンシンの産生細胞の同定、ならびに産生細胞の動態を病理学的に解析し、また腸管での α -ディフェンシン遺伝子発現量を解析し、マウス好酸球の α -ディフェンシンの産生能、ならびに蠕虫に対する α -ディフェンシンの作用に関して検討した。腸管で	

の α -ディフェンシン遺伝子発現量は非感染時の約 50 倍にまで増加し、組織浸潤した好酸球のほぼすべてが α -ディフェンシン陽性であった。腸管においては、他の産生細胞であるパネート細胞より多数を占めていた。これらの所見より、マウスにおいても好酸球が α -ディフェンシンを産生し、また、 α -ディフェンシンが蠕虫に対しても防御的に作用していることが示唆された。

第 2 章では、抗酸菌 (*Mycobacterium avium* strain 104) の濃度や感染ルートの解析、また、前章で確立した α -ディフェンシン検出方法を用いて抗酸菌感染での好酸球の α -ディフェンシン産生を解析し、好酸球機能解析のためのマウス抗酸菌感染モデルの作成を試みた。細菌の濃度としては 1.0×10^9 (high), 1.0×10^8 (middle), and 1.0×10^7 cells (low) cells in 0.5 ml と、過去の報告よりも高濃度で実験を行った。経口投与では、病変の形成は全く認められなかった。腹腔投与により、すべての濃度で、細菌巣とそれを取り囲む好酸球組織浸潤が認められたが、high 投与群では顕著な好酸球集塊を認めた。一方、血中好酸球数は、middle, と high 投与群で有意に上昇した。好酸球集塊では、ほとんどの細胞が α -ディフェンシン陽性であった。high 投与群では、人での抗酸菌感染症と同じように、好酸球増多症と組織での好酸球集塊を示すモデルを作成することが出来た。また、浸潤好酸球が抗酸菌に対して α -ディフェンシンを産生していることを示した。

以上の結果は、好酸球の新たな機能を示すとともに、人の抗酸菌感染の病態に類似した新しいモデルを作成したことを示しており、人での抗酸菌感染における好酸球の役割を解析する上で有用なツールとなると考えられる。また、獣医学領域においても、ヨーネ病など、好酸球の病変部への浸潤を伴う疾患における好酸球の機能解析にも有用と考えられる。

以上により本論文は、博士 (獣医学) の学位論文にふさわしい価値があると認める。