P77

B-1 cell activation by *Toxoplasma gondii* HSP70

OCHEN Mei, AOSAI Fumie, NOROSE Kazumi,
MUN Hye-seong, HATA Hidekazu, YANO Akihiko (Dept.
Parasitol., Chiba Univ. Sch. Med.)

We have demonstrated the anti-mouse HSP70 (anti-mHSP70) autoantibody formation in *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*)-infected mice and have revealed that B-1 cells are responsible for anti-self HSP70 autoantibody formation because 1) B-1 cells in peritoneal exudate cells (PEC) increased in *T.gondii*-infected mice and 2) B-1 cells cultured with recombinant (r) *T.g.HSP70* preferentially produced anti-mHSP70 IgM autoantibodies in the culture supernatant. In order to analyze the biological function of *T.g.HSP70*, proliferation responses of spleen cells of C57BL/6 (B6), a susceptible strain, and BALB/c, a resistant strain mice were examined. Responding to r*T.g.HSP70*, spleen cells, B-1 cells as well as B-2 cells but not T cells, from not only *T.gondii*-infected but also uninfected B6 and BALB/c mice strongly proliferated. The proliferation reached a peak at 3 to 4 days and subsided within 5 to 6 days. These data suggest the mitogenic effects of *T.g.HSP70* on B cells. Furthermore, compared with the stimulation of LPS, *T.g.HSP70* was revealed to induce the production of TNF α , IL-6 and IL-10 from B cells, indicating that *T.g.HSP70* is a B cell mitogen which differed from LPS. Precise analysis of the mechanism of B-1 cell activation by *T.g.HSP70* is under investigation.

P78W1-4

Nippostrongylus brasiliensis (Nb) ES 抗原による interferon (IFN)- γ 産生抑制

○内川隆一¹、松田信二²、
有菌直樹¹ (¹京都府立医大・医動物、²秋田大・医・寄生虫)

我々はこれまでに Nb 感染により所属リンパ節で強い Th2 性細胞反応が誘導されること、線虫の ES 抗原が感染リンパ球による IL-4 産生を増強することなどを報告した。今回、ES 抗原が非特異的に刺激された非感染 T 細胞による IFN- γ の産生を直接抑制することを見出したので報告する。

ES 抗原は Nb 成虫の 24 時間培養上清を濃縮し用いた。非感染ラットの腸管膜リンパ節細胞を培養し、上清中のサイトカイン量を ELISA で、細胞の mRNA 発現は RT-PCR により測定した。Con A あるいは抗 CD3/抗 CD28 抗体刺激によるリンパ節細胞の IFN- γ 産生と mRNA の発現はともに 10 μ g/ml の ES 抗原添加により抑制された。細胞数の変化と細胞増殖活性の測定からこの濃度での ES 抗原による細胞毒性は認められなかった。抗 IL-4、抗 IL-10、抗 TGF- β 抗体を添加しても ES 抗原による IFN- γ 産生抑制は回復されず、IL-10 産生に ES 抗原の有無は影響を与えなかった。リンパ節細胞を ES 抗原と 6 時間前培養すると、その後の Con A 刺激による IFN- γ 産生誘導は完全に阻止された。また Con A 刺激後に ES 抗原を添加してもリンパ節細胞の IFN- γ 産生は抑制された。抗 CD3/抗 CD28 抗体で刺激した CD4 および CD8 T 細胞による IFN- γ 産生は、いずれも ES 抗原により抑制された。

これらは ES 抗原が T 細胞での TCR を介した IFN- γ 産生誘導を抑制すること、IFN- γ 産生細胞の活性を低下させることを示している。またこの IFN- γ 産生抑制は、寄生虫感染における Th2 性反応誘導に寄与するとともに、局所における細菌・ウイルス感染を直接的に助長している可能性を示唆したものである。

P79W1-7

マンソン裂頭条虫擬充尾虫の ES 産物によるマウス腹腔マクロファージ TNF- α 遺伝子発現抑制機構の検討
○三浦 憲豊、パラマサリ・ディルガハユ、福本宗嗣、平井和光 (鳥取大・医・医動物)

我々はマンソン裂頭条虫擬充尾虫の ES 中に、LPS 刺激されたマウス腹腔マクロファージ (M ϕ) の TNF- α 遺伝子発現を抑制する因子が存在することを報告してきた。今回、その抑制機構を解明するため (1) nuclear factor- κ B (NF- κ B) (2) MAP kinase (MAPK) cascade (3) mRNA の stability の 3 点について検討を行った。(1) LPS (100 ng/ml) と ES (5 μ g/ml) を同時に添加し、60 または 90 分後に核蛋白を回収し、gel shift assay により解析した。いずれの時間においても ES は NF- κ B の核内移行に影響を与えず、ES を投与しても核内移行した NF- κ B は p50 の homodimer ではなく、p50/p65 の heterodimer であった。(2) LPS 刺激 1 時間前に MAPK inhibitor (SB203580; 10 μ g/ml, PD98059; 50 μ g/ml, Ro318220; 5 μ g/ml) を添加し、LPS 刺激 6 時間後に total RNA を回収し、Northern blot にて解析した。MAPK inhibitor をそれぞれ単独に添加すると LPS 刺激された M ϕ の TNF- α 遺伝子発現は抑制された。また、2 種類の MAPK inhibitor を用いると相加的にその遺伝子発現が抑制され、そして ES と MAPK inhibitor を同時に添加した場合も相加的に TNF- α 遺伝子の発現が抑制された。(3) TNF- α mRNA の stability については、LPS または LPS と ES を添加し 2 時間後に Actinomycin D (10 μ g/ml) を加え、0、15、30、45、60、90 分後の total RNA を回収し Northern blot にて解析した。ES によりわずかに mRNA の stability は低下する傾向が見られた。以上の結果より、ES による TNF- α 遺伝子発現抑制機構には NF- κ B ではなく MAPK cascade が関係していることが示唆された。

P80W5-1

IL-4, IFN- γ , IL-18 欠損マウスにおける日本住血吸虫虫卵の排出
○平田瑞城¹、原 樹¹、米田 豊¹、中島敏郎²、
福岡利英¹ (¹久留米大、医、寄生虫、²CRC 久留米研究所)

日本住血吸虫感染における虫卵排出の機序は不明である。我々は今回ノックアウトマウスを用いてサイトカインと虫卵排出との関係について検討し、IFN- γ が虫卵排出に関与することを認めた。材料および方法。マウスには IL-4, IFN- γ , IL-18 KO マウス、コントロールとして C57BL/6 を用いた。感染では経皮的に 30 隻のセルカリアを感染させ、その後、7、10 週に感染虫体数 (還流法と顕微鏡的検査による)、糞便内虫卵数 (クエン酸緩衝液法による) 組織内虫卵数 (アルカリ消化による) を調べた。組織学的検査では通常の HE 染色の他、顆粒球の観察を行った。好酸球は eosin Y により染色し、好中球は免疫組織学的 (山形大より供与) に検討した。結果; 感染虫体数はいずれの KO マウスでも対照と同様な値を示した。糞便内虫卵数を IL-4, IFN- γ KO マウスで調べたとき、感染 7、10 週でいずれも低いことを認めた。egg no./100mg 糞便/female を求め、詳細に検討したところ、IFN- γ KO マウスで有意に低いことを認めた。また、IFN- γ を IFN- γ KO マウスに投与したとき、投与マウスで虫卵排出が増加することを認めた。IL-18 KO マウスでは感染 7 週で有意に高い虫卵排出数を示したが、更に繰り返して検討する予定である。虫卵排出過程を検討したとき、虫卵は顆粒球に取り囲まれて絨毛より脱出することを認めた。好酸球と好中球の関与が示唆されたため、細胞染色を行ったところ虫卵周囲浸潤細胞は殆ど好中球であることを認めた。各 KO マウス間で好中球浸潤に差異を認めなかったが、好酸球の場合 IL-18 KO マウスで少ないことを認めた。更に、NO の関与についても検討する予定である。