

—総説—

腸管出血性大腸菌経口感染マウスに誘導される 腸管内特異免疫応答

永野 恵司^{a)*}、横山 慎一郎^{b)}、森 裕志^{b)}

要約：腸管粘膜感染菌である腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) O157:H7 の経口感染マウスを用い、粘膜免疫応答の誘導機構の解析を行った。特異抗体は、EHEC O157:H7 菌体 (Whole cell) を抗原とした酵素免疫測定法 (Filtration ELISA) を用い、菌体表面に対する抗体価として評価した。EHEC 野生株を ICR マウスに経胃接種した場合、本菌は盲腸上皮細胞に接着して 4 週間以上定着し、接種 4 週後の糞便中に EHEC 菌体に対する IgA 抗体の著明な上昇がみられた。一方、EHEC の上皮細胞への接着に関わる因子の遺伝子を変異させた菌株はマウス腸管への定着性を示さず、糞便中 IgA 抗体の誘導もみられなかった。変異株は繰り返し接種しても血中抗体は誘導されるものの糞便中 IgA 抗体は誘導されなかった。さらに、マウスを抗生物質処置することによって変異株を腸管内に長期定着させた場合も、糞便中 IgA 抗体は誘導されなかった。以上のように、EHEC の上皮細胞への接着は全身性免疫応答の誘導には必ずしも必要ではないが、粘膜免疫応答の誘導には必須であることが示された。

索引用語：粘膜免疫応答、IgA、腸管出血性大腸菌、接着、マウス、研究総説

Intestinal immune responses in mice infected orally with enterohemorrhagic *Escherichia coli*

Keiji NAGANO^{a)*}, Shin-ichiro Yokoyama^{b)}, Hiroshi Mori^{b)}

Abstract: The induction mechanism of mucosal immune responses was examined in mice infected orally with an intestinal pathogen, enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7. Antibodies were evaluated as those specific to EHEC O157:H7 cell surface by enzyme linked-immunosorbent assay using EHEC O157:H7 whole cells as an antigen (Filtration ELISA). When the EHEC wild type was inoculated intragastrically into ICR mice, the bacteria adhered on the cecal epithelia and colonized over four weeks, and fecal IgA antibody to the EHEC whole cells markedly increased at four weeks after the inoculation. On the other hand, mutants deleted adherent factors of the EHEC did not colonize in the intestine and did not induce fecal IgA antibody. When the mutant was inoculated repeatedly, fecal IgA antibody was not induced although the serum antibodies were induced. Furthermore, the fecal IgA antibody was not induced even when the mutants resided persistently in the intestine of mice by treatment with an antibiotic. Thus, the adhesion of EHEC to epithelial cells was indispensable to induce the mucosal immune responses but not systemic immune responses.

Keyphrases: mucosal immune response, IgA, enterohemorrhagic *Escherichia coli*, adhesion, mice, research review

1. 緒言

腸管、鼻腔、肺および膈のような粘膜組織は病原微生物

の侵入門戸となっており、多くの病原微生物は粘膜に定着、あるいは粘膜を介して生体内に侵入して感染する¹⁾。したがって、粘膜免疫応答は生体にとって病原微生物と最初に

a) 愛知学院大学歯学部微生物学教室 (〒464 - 8650 名古屋市千種区楠元町 1 - 100)

Department of Microbiology, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University (1 - 100 Kusumoto-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464 - 8650, JAPAN)

b) 岐阜薬科大学微生物学教室

Laboratory of Microbiology, Gifu Pharmaceutical University (5 - 6 - 1 Mitahora - higashi, Gifu 502 - 8585, JAPAN)

遭遇する場での生体防御機構であり、病原体の定着および侵入を防いでいる。粘膜免疫応答の主要な機能分子は粘膜面に分泌される分泌型 IgA (secretory IgA, S-IgA) 抗体である。S-IgA 抗体は病原体の粘膜上皮細胞への接着を阻害することによって病原体を排除すると考えられており²⁾、粘膜面に病原体特異的 S-IgA 抗体を誘導できるようなワクチンは感染防御に有効な薬剤となり得る^{3,4)}。しかし、血中抗体産生のような全身性免疫応答の誘導機構は解明が進んでいるのに対し、S-IgA 抗体の産生を含む粘膜免疫応答の誘導機構は十分には解明されていない³⁾。その理由として、S-IgA 抗体の産生を示すような動物モデルが十分に開発されていないことが挙げられる。そこで本研究では、腸管粘膜感染菌である腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) を用いて、本菌の経口感染マウスモデルを構築し、その粘膜免疫応答の誘導機構の検討を行った。

EHEC 感染症は下痢や出血性大腸炎にとどまらず、乳幼児や高齢者では溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome, HUS) や脳症を続発し、死亡する例もある⁵⁾。ヒトにおける EHEC の感染および発症過程は、Fig. 1 のように考えられている。すなわち、EHEC は経口摂取されると大腸に定着して増殖し、感染が成立する。本菌の定着には腸管上皮細胞への接着が必須であるとされ、EHEC は上皮細胞に強固に接着して微絨毛が消失する、いわゆる attaching-and-effacing (A/E) 病変と呼ばれる細胞傷害を引き起こす⁶⁻⁸⁾。また、EHEC は腸管内でベロ毒素とも呼ばれる外毒素、Stx (Shiga toxin) を産生し分泌する⁹⁻¹³⁾。Stx は血中に移行して血管内皮細胞、腎糸球体および尿管を傷害し、EHEC 感染症における HUS 発症などの重篤化の主要な病原因子となっている。本感染症に対する予防および治療法の研究において Stx を標的とした薬剤の開発に加えて、本菌の腸管上皮細胞への接着を抑制して感染を阻止することを目的としたワクチン等の開発に関する研究も行われている^{12,13)}。

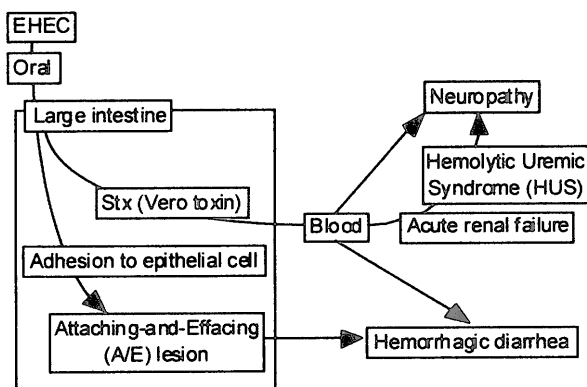


Fig. 1 Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) infection and diseases.

EHEC の上皮細胞への接着および A/E 病変の形成過程は Fig. 2 のように考えられており、この過程に関わるすべての遺伝子は、locus of enterocyte effacement (LEE) と呼ばれるゲノム領域にクラスターとして存在する。Intimin は *eae* 遺伝子によってコードされ、EHEC の外膜に発現する。一方、EspA は菌体表面に突起するニードル様構造体を形成して EHEC と宿主細胞を架橋し、EHEC はこのニードル様構造体内を通して Esp (*E. coli* secreted protein) タンパク質群や Tir (translocated intimin receptor) などの病原因子を宿主細胞に移入する。Tir は宿主細胞内に移入されたのち細胞表面に発現し、intimin と結合する^{14,15)}。このようにして宿主細胞に病原因子を移入する機構は、type III 分泌機構 (type III secretion system, TTSS) と呼ばれ¹⁶⁾、多くの病原菌が TTSS を介して病原性を発現することが知られている。LEE に存在する *espA*¹⁷⁾、*sepL*^{18,19)}、*tir*¹⁹⁾あるいは *eae*^{6,19)} 遺伝子を変異させると、*in vitro* および *in vivo* において上皮細胞への接着能および A/E 病変の形成が消失する。

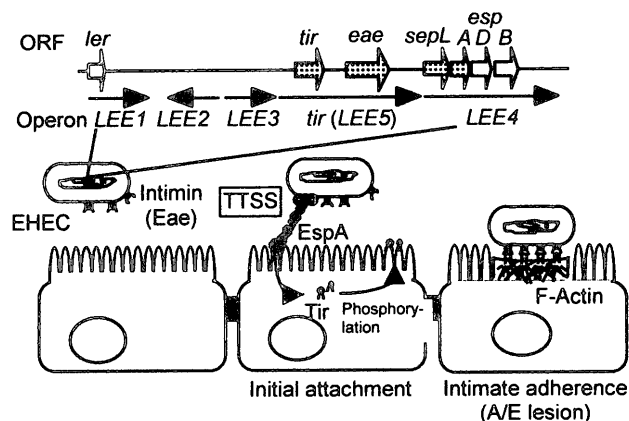


Fig. 2 Model of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) adherence to epithelial cells. TTSS: type III secretion system.

本総説では、EHEC 経口感染マウスモデルの構築および腸管内免疫応答の誘導機構の解析により得られた成績について述べる。

2. 腸管出血性大腸菌のマウス腸管上皮細胞への接着および腸管内定着に関する検討

EHEC 感染による病態発現の研究にしばしばマウスの経口感染モデルが用いられてきた。Lindgren *et al.*²⁰⁾ は、EHEC は抗生物質非処置の SPF マウスには定着しないとしており、腸管内定着性を高めるため多くの研究で無菌マウス²¹⁾あるいは抗生物質を経口投与したマウス^{20,22,23)}が使用されてきた。一方、Conlan and Perry²⁴⁾は抗生物質非処置の conventional マウスの腸管に EHEC O157:H7 が定着した

と報告している。しかし、これらの研究はいずれも腸管組織のホモジネートあるいは糞便中に EHEC を検出することによって EHEC の腸管内定着性を評価しており、EHEC がマウスの腸管上皮細胞に接着して A/E 病変を引き起こすか否かについてはこれまでに報告がない。そこで本研究では EHEC O157:H7 がマウス腸管上皮細胞に F-アクチンの凝集を伴う接着を示すか否かについて検討した。

マウス：4 週齢の SPF 雌性 ICR マウスを 1 週間の馴化飼育後実験に供した。マウスには滅菌した飼料および水を与え、糞便捕食による再感染を防ぐためステンレスワイアメッシュ上で飼育した。感染実験は岐阜薬科大学動物飼育舎にある感染実験用小動物アイソレーションチャンバー内で行なった。

菌株：1996 年 6 月に岐阜市で発生した集団食中毒で出血性腸炎を発症した患者の糞便から単離された Stx-1 および Stx-2 産生性 EHEC O157:H7 (GPU96MM 株) を用いた²⁵⁾。また、GPU96MM を親株として作成した *espA* 欠失変異株の GPU991 および *sepL* 欠失変異株の GPU992 を用いた²⁶⁾。これらの菌株は実験に供するまで -80°C に保存した。

供試菌の経胃接種：普通培地にて 37°C で静置培養し、対数増殖期にある菌を 2,000×g で 20 分間遠心集菌し、PBS に再懸濁した。マウスは 8 時間絶食後、25 mg/kg の cimetidine を腹腔内投与し、その 15 分後に細菌懸濁液の 10 ml/kg を経胃接種した。

糞便中排出菌数の測定：マウス新鮮便を 10 倍量の PBS に懸濁して検体とした。GPU96MM の検出には、20 µg/ml novobiocin および 0.1 µg/ml cefixime 加ソルビトール・マッコンキー寒天培地 (sorbitol MacConkey agar : SMAC) を用い、GPU991 および GPU992 の検出には、50 µg/ml のカナマイシン (Km) 加 SMAC を用いた。糞便懸濁液を塗抹して 37°C で 24 時間培養後、形成する白色半透明のコロニーを計数した。

GPU96MM 接種マウス腸管の免疫染色：GPU96MM 接種マウスの小腸上部および下部、盲腸、結腸上部および下部を摘出して洗浄後、4%パラホルムアルデヒド加リン酸緩衝液 (pH 7.4) で固定した。各腸管断片を 2 分割 (小腸および盲腸はリンパ様組織が両断片に含まれるように分割) し、一方は粘膜表面を共焦点レーザー走査顕微鏡 (confocal laser scanning microscopy, CLSM) で観察し、もう一方は、パラフィン包埋して切片を作成した。粘膜表面の CLSM による観察では、各腸管断片を PBS で洗浄し、0.5% Triton X-100 加 PBS で 37°C、30 分間処理した後、1% 牛血清アルブミン、5% 牛血清、0.1% Tween 20 および 0.1% NaN₃ を含む PBS で 37°C、30 分間ブロッキングを行なった。その後、1 µg/ml の FITC-labeled affinity purified antibody to *E. coli* O157:H7 (FITC-anti O157) および 0.5 µg/ml の TRITC-labeled phalloidin (TRITC-Pha) と室温で 2 時間反応させ、二重染色を行なった。PBS で洗浄後、浸水レン

ズを用いて CLSM で観察した。

6 µm の切片は同様の方法で FITC-anti O157 および TRITC-Pha で二重染色し、CLSM で観察した。

GPU96MM、GPU991 および GPU992 の腸管内定着：^{10¹¹} CFU/kg の GPU96MM、GPU991 および GPU992 をマウスに接種し、糞便中排出菌数の経時変動を観察した (Fig. 3)。

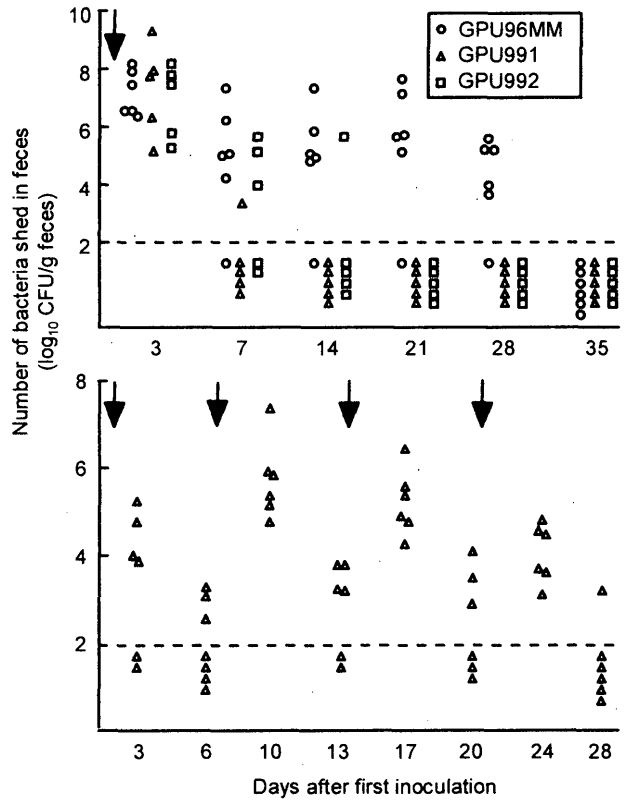


Fig. 3 Time course of fecal shedding of GPU96MM (wild type), GPU991 (*espA*-deletion mutant) and GPU992 (*sepL*-deletion mutant). The bacteria were inoculated intragastrically into mice at a dose of 10^{11} CFU/kg. Arrows indicate the inoculations. Data represent individual mice. Broken lines show detection limits.

GPU96MM はほとんどのマウスで接種 28 日後まで持続的に検出され、接種 35 日後には著しく減少してすべてのマウスで検出限度以下 (10^2 CFU/g feces) となった (Fig. 3 上段)。GPU991 および GPU992 は接種 3 日後では GPU96MM 接種群と同程度の菌数が検出されたが、その後急激に減少して、GPU991 接種群は接種 14 日後に、GPU992 接種群は接種 21 日後に全てのマウスで検出限度以下となった。また、GPU991 を 1 週間おきに 4 回接種した場合、この場合も各回の接種 3 日後には高濃度の菌が検出されたが、それぞれ 6 日後には著しく減少した (Fig. 3 下段)。

以上のように、マウスに *espA* (GPU991) あるいは *sepL* (GPU992) 欠失変異株を接種すると、野生株である GPU96MM に比して糞便中排出期間が短縮した。EspA お

よび SepL はそれぞれ LEE にある *espA* および *sepL* 遺伝子の産物であり TTSS を構築する上で重要な分子である^{17,18)}。成績には示さないが、これらの変異株は HeLa 細胞への接着能が著しく低下し、この成績は他の研究報告^{17,18)}とも一致する。ニードル様構造を構成する EspA は EHEC の上皮細胞への接着における初期の散在性の接着に関与することが報告されている¹⁹⁾。*sepL* 変異株は EspA を含む Esp タンパク質群の分泌が抑制されることによって上皮細胞への接着能が著しく減少することが知られている¹⁸⁾。本成績は、GPU96MM が TTSS に関連する接着機構を介して ICR マウス腸管に定着することを強く示唆する。

GPU96MM の腸管上皮細胞への接着：腸管上皮細胞への接着およびコロニー形成について検討した。すなわち、 10^{11} CFU/kg の GPU96MM をマウスに接種し、接種 1、3、5、8、12、18、24 時間および 3 日後に腸管を摘出して免疫染色し、GPU96MM の腸管上皮細胞への接着像を CLSM で観察した (Fig. 4)。

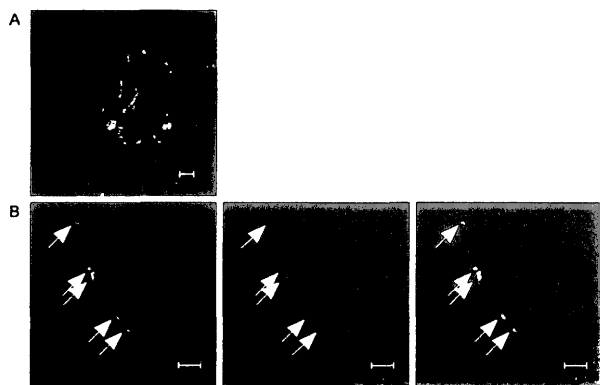


Fig. 4 Confocal laser scanning micrographs of the ceca excised from ICR mice inoculated with 10^{11} CFU/kg of GPU96MM (wild type). The ceca were taken 3 days (A) and 24 hr (B) after inoculation and double-stained with FITC-anti *E. coli* O157 antibody (green) and TRITC-phalloidin (red). Panel A is a three-dimensional image of the mucosal surface of the cecum (depth: 33 μ m, stack of 12 slice images). Panel B is a slice image of a cecal paraffin section (6 μ m) with versions in green (GPU96MM, left), red (F-actin, middle) and both colors (right) of the same image. Arrowheads show the adhesion of GPU96MM to cecal epithelia and the accumulation of F-actin beneath the attached bacteria. See the original²⁶⁾ (<http://www.sanbi.co.jp/capj/47/pdf/F470202.pdf>) for the color printing.

GPU96MM は接種 1 時間後にはすでに盲腸および結腸粘液層に観察された。しかし、接種後 12 時間以内では GPU96MM は粘液層には存在するものの、いずれの腸管部位にも上皮細胞への接着像は観察されなかった。接種 18 時間から 3 日後では、盲腸上皮細胞上に GPU96MM のマイクロコロニーが観察され (Fig. 4A)、菌が接着した上皮細胞では F-アクチンの凝集がみられた (Fig. 4B)。このような菌の接着およびコロニー形成は盲腸のリンパ様組織

上およびその周辺には観察されなかった。小腸および結腸では、菌は粘液層では観察されたが、上皮細胞への接着はいずれの時期も観察されなかった。

Tatsuno *et al.*¹⁹⁾は、Caco-2 細胞を用いた検討で、EHEC O157:H7 の散在性の初期接着は EspA 等により構成されるニードル様構造体によって形成されるが、その後のマイクロコロニー形成には intimin と Tir の相互作用が必要であるとしている。この intimin と Tir の相互作用は F-アクチンの凝集および A/E 病変の形成にも必須である²⁷⁾。盲腸上皮細胞において GPU96MM のコロニー形成および F-アクチンの凝集が観察されることから、本菌の接着は intimin と Tir の相互作用を伴うものであると考えられる。

成績には示さないが、GPU96MM は接種 4 週間まで盲腸、結腸および糞便中に検出された。しかし、コロニー形成は盲腸粘膜表面にのみ観察され、結腸では観察されなかった。結腸および糞便中に接種 4 週間まで持続的に検出される GPU96MM はおそらく盲腸上皮細胞に接着し増殖した菌に由来するものと思われる。GPU96MM が盲腸上皮細胞にのみ接着して他の腸管部位の上皮細胞に接着しない理由は不明であるが、マウスの盲腸には本菌の TTSS の発現および接着を促進するような環境因子が存在する可能性が考えられる。すなわち、EHEC O157:H7 を DMEM 培地で培養した場合、LB 培地などの細菌培養用の栄養培地で培養した場合に比して EspA や Tir のような TTSS に関わるタンパク質群がより多量に産生されることが知られている^{28,29)}。また、低栄養食餌を与えたマウスは EHEC O157:H7 の定着または増殖が促進するとの報告がある²²⁾。さらに、Sperandio *et al.*²⁹⁾は、EHEC O157:H7 は quorum sensing と呼ばれる機構によって腸内フローラを形成している非病原性大腸菌からの情報を受けて腸管内定着が促進するとしている。これらの知見は腸管内の環境あるいは腸管部位による常在細菌の相違が EHEC の腸管上皮細胞への接着に何らかの影響を及ぼす可能性を示唆する。GPU96MM が盲腸粘膜表面にのみ接着する理由として宿主細胞表面に発現しているレセプターの分布の違いも考えられる。すなわち、intimin には少なくとも 5 つのサブタイプが知られており^{30,31)}、EHEC の腸管定着部位は intimin のサブタイプに依存するとの報告がある^{32,33)}。本研究における成績では、GPU96MM のマウス腸管上皮細胞への接着は TTSS に依存することが強く示唆されたが、宿主細胞が持つ Tir 以外の intimin レセプター³⁴⁾あるいは線毛³⁵⁾、94 および 8 kDa の外膜タンパク質^{36,37)}、および *iha* のコードする表面タンパク質³⁸⁾のような接着因子が EHEC の腸管内局在性を規定している可能性もある。

GPU96MM の盲腸上皮細胞への接着像が接種から 12 時間までは観察されなかったことの詳細は不明であるが、前述のように TTSS の発現には外部環境による調節機構が存在し、腸管内の環境に適応して接着可能な状態になるの

に一定の時間が必要であるのかもしれない。

Phillips *et al.*³⁹⁾は、ヒト腸管の器官培養による検討で、EHEC O157:H7 の接着と A/E 病変の形成はパイエル板に限局すると報告している。しかし、本研究における検討では GPU96MM のコロニー形成はリンパ様組織上には観察されなかった。

以上のように、本節では EHEC O157:H7 はマウス盲腸上皮細胞に接着し、F-アクチンの凝集を引き起こすことを明らかにした。

3. 腸管粘膜免疫応答の誘導に対する腸管出血性大腸菌の接着因子の関与についての検討

EHEC に対する免疫応答に関し、ヒト⁴⁰⁻⁴²⁾および動物²⁴⁾について接着因子に対する抗体や O157-LPS に対する抗体などの研究が行われているが、生体防御の観点から腸管内に分泌される IgA 抗体のうち EHEC のどの抗原に対する抗体がどのように生体防御に役割を演じるかについてはほとんど明らかにされていない。しかし、EHEC とほぼ同一の LEE 領域を持ち、EHEC と同様の機序で腸管上皮細胞に接着する腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *E. coli*, EPEC) について、intimin に対する初乳中 IgA 抗体が EPEC の HeLa 細胞への接着を抑制することが報告⁴³⁾されている。EHEC 感染に対しても抗原特異的 S-IgA 抗体が粘膜免疫による生体防御において重要な役割を演じる可能性が考えられる。一方、粘膜免疫の誘導機構についても不明な点が多く³⁾、非病原性常在細菌に対しては生体から排除するような粘膜免疫は通常誘導されず、病原菌に対しては排除性の粘膜免疫が誘導される⁴⁴⁻⁴⁷⁾。この相違についてもいくつかの仮説は提唱⁴⁴⁻⁴⁷⁾されているものの明確な説明はなされていない⁴⁸⁾。常在細菌を排除しない理由として常在細菌に対しては免疫寛容が成立していることも考えられるが、一方では病原菌の病原性発現機構が生体に対して免疫誘導のトリガーとなり、効率的に粘膜免疫が誘導される可能性も考えられる。

そこで本節では、はじめに EHEC 経口感染マウスの腸管内に IgA 抗体産生が誘導されるか否かを検討し、次いで、*espA*、*sepL*、*tir* あるいは *eae* 遺伝子を欠失させることにより腸管上皮細胞への接着性を变化させた変異株を用い、免疫応答の誘導における接着の役割について検討した。

マウス：前述と同様の方法で飼育した。

菌株および増殖条件：用いた菌株を Table 1 に示す。これらの菌株は実験に供するまで -80°C に保存した。Sakai に Km 耐性遺伝子を導入した A2-F6、A6-E7、G1-E11 および Δeae は Km 耐性を増強するため 3 mg/ml Km を含む培地で増殖し、実験に供した。予備的検討において A2-F6 (対照株) は野生株である GPU96MM および Sakai と同様に

HeLa 細胞への接着活性、コロニー形成および F-アクチンの凝集活性を示すことを確認した。

供試菌の経胃接種：GPU96MM、GPU991、GPU992 および IID5208 は普通培地で、A2-F6、A6-E7、G1-E11 および Δeae は 1 mg/ml Km 加普通培地で培養した。以下、前節と同様の方法で調製しマウスに接種した。GPU96MM 加熱死菌は、所要濃度に希釈した GPU96MM をガラス瓶に密閉し、オートクレーブ殺菌した。

Table 1 *E. coli* strains used in this study

Strain	Characteristics	Reference
GPU96MM	Clinical isolate in Gifu (1996), Stx-1 and Stx-2-producing EHEC O157:H7	25,26)
GPU991	<i>espA</i> -deletion mutant of GPU96MM	of 26)
GPU992	<i>sepL</i> -deletion mutant of GPU96MM	of 26)
Sakai	Clinical isolate in Sakai (1996), Stx-1 and Stx-2-producing EHEC O157:H7	19,49)
A2-F6	Control mutant of Sakai by insertion of mini-Tn5Km2 into the 4769 bp site in Sakai-VT2 prophage, which is a pathogenicity-unrelated gene	19)
A6-E7	Mutant of Sakai by insertion of mini-Tn5Km2 into the <i>sepL</i> gene	19)
G1-E11	Mutant of Sakai by insertion of mini-Tn5Km2 into the <i>tir</i> gene	19)
Δeae	Nonpolar <i>eae</i> -deletion mutant of Sakai by replacing the portion containing the <i>eae</i> gene with an <i>aphA-3</i> cassette	19)
IID5208	Nonpathogenic <i>E. coli</i>	
C600	K12, laboratory strain	

糞便中排出菌数の測定：GPU96MM、GPU991 および GPU992 の菌数測定は前述と同様に行った。A2-F6、A6-E7、G1-E11 および Δeae の検出には Km 加 SMAC を用いた。

糞便からの抗体の抽出：新鮮便を 10 倍量の酸性緩衝液 (0.1% NaN₃ 加 0.5 M グリシン塩酸緩衝液、pH 1.8) に懸濁し、上清を遠心分離により回収した。この上清に等量の 1.0 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を混合して中和し、抗体価測定に供した。

Filtration ELISA による菌体に対する抗体価測定：検体中の自然抗体の吸収および Filtration ELISA は岐阜薬科大学微生物学教室で開発された方法²⁵⁾に準じて行った。すなわち、自然抗体を吸収するため、 2×10^7 CFU の C600 菌懸濁液を 96 穴フィルタープレート (MultiScreen[®]-GV、孔径 0.22 μ m、Millipore Corporation) に添加しブロッキング反

応後、5倍希釈した糞便検体または20倍希釈した血清検体とインキュベートした。検体を回収し、2倍希釈して Filtration ELISA に供した。

Filtration ELISA は以下のように行った。抗原となる細菌の内在性ペルオキシダーゼを失活後、自然抗体を吸収した検体とインキュベートした。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgM、IgG あるいは IgA 抗体を反応させた。基質溶液 (0.04% *o*-phenyldiamine および 0.012% H₂O₂ を含む 0.05 M クエン酸および 0.1 M Na₂HPO₄, pH 5.0) を添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。2 M H₂SO₄ で反応停止後、492nm (対照 660nm) の OD を測定した。OD 値が 3.0 を越えた検体は、OD 値を 3 とした。

統計処理：Bartlett 検定により分散の均一性を検定 ($P < 0.05$) し、適合したものについては分散分析を行い、群間に有意差の認められたものについて Duncan の多重比較検定によって群間の比較を行った。また、分散の均一性が不適合の場合はノンパラメトリック法で検定した。すなわち、Kruskal-Wallis 検定を行い、群間に有意差が認められた場合は順位付けしたデータについて Duncan の検定によって群間の比較を行った。すべての統計解析において、 $P < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。

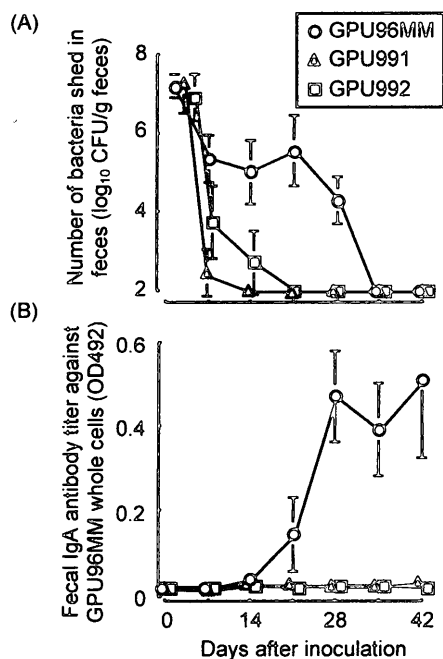


Fig. 5 Fecal shedding of bacteria (A) and fecal IgA antibody production in mice inoculated with GPU96MM (wild type), GPU991 (*espA*-deletion mutant) and GPU992 (*sepL*-deletion mutant) (B). Mice were inoculated intragastrically with 10¹¹ CFU/kg of the respective bacteria. GPU96MM was used as an antigen for the filtration ELISA to detect antibodies in the fecal and serum samples of mice. Data show the mean \pm SEM of 5 to 6 mice.

野生株 (GPU96MM)、*espA* 欠失変異株 (GPU991) および *sepL* 欠失変異株 (GPU992) 接種における糞便中排出菌数と IgA 抗体価の経時変動: 10¹¹ CFU/kg の GPU96MM、GPU991 および GPU992 をマウスに接種した。糞便中排出菌数と IgA 抗体価の経時変動についての成績を Fig. 5 に示す。

糞便中排出菌数は前述 (Fig. 3) と同様に、GPU96MM は長期の排菌がみられたのに対し、GPU991 および GPU992 は速やかに消失した (Fig. 5A)。糞便中 IgA 抗体価は、GPU96MM を接種した場合、接種 21 日後から上昇し 28 日以降に最高値を示したのに対し、GPU991 および GPU992 の接種では抗体価の上昇はみられなかった (Fig. 5B)。

GPU991 および GPU992 は腸管内から速やかに消失することから、次に抗原暴露量の増加を目的として菌の繰り返し接種の検討を行った。

espA 欠失変異株 (GPU991)、野生株 (GPU96MM) 加熱死菌および非病原性大腸菌 IID5208 の繰り返し接種による検討: 10¹¹ CFU/kg の GPU96MM を 1 回あるいは 1 週間おきに 4 回接種した。また、GPU991、GPU96MM 加熱死菌および IID5208 を同様に 4 回接種し、初回接種の 28 日後の糞便および血中抗体価を測定した。

GPU96MM を 4 回接種した場合、接種 11、15、20、23 および 26 日後にそれぞれ 1 匹ずつ死亡し、28 日後の生存数は 2 匹のみであった。したがって、このグループは以降の解析から削除した。GPU96MM を 1 回接種した場合 (GPU96MM \times 1) および GPU991 を 4 回接種した場合 (GPU991 \times 4) の糞便中排出菌数は前述 (Fig. 3) と同様に、GPU96MM \times 1 では 28 日後まで比較的高濃度の排菌がみられたのに対し、GPU991 \times 4 では 4 回接種のそれぞれ 3 日後には比較的高濃度の排菌がみられたが、それぞれの接種 6 日後には著しく減少した (Fig. 6A)。

糞便中 IgA 抗体価についての成績を Fig. 6B に示す。GPU96MM \times 1 の接種 28 日後の GPU96MM に対する糞便中 IgA 抗体価は非接種 (Normal) に比して顕著に高い値を示した。GPU991 \times 4 および GPU96MM 加熱死菌を 4 回接種した場合 (killed GPU96MM \times 4) の糞便中 IgA 抗体価は GPU96MM \times 1 に比して有意に低値であった。また、IID5208 を 4 回接種した場合 (IID5208 \times 4) の IID5208 を抗原として測定した抗体価は GPU991 \times 4 および killed GPU96MM \times 4 と同様に軽度の上昇がみられるに過ぎなかった。

血中 IgM、IgG および IgA 抗体価の成績を Fig. 6C に示す。血中 IgM および IgG 抗体価はすべての接種群で同程度の上昇がみられた。血中 IgA 抗体価については GPU96MM \times 1 に比して GPU991 \times 4 および killed GPU96MM \times 4 で低い傾向を示したが、明らかに上昇した。IID5208 \times 4 も血中 IgA 抗体価の明らかな上昇がみられた。

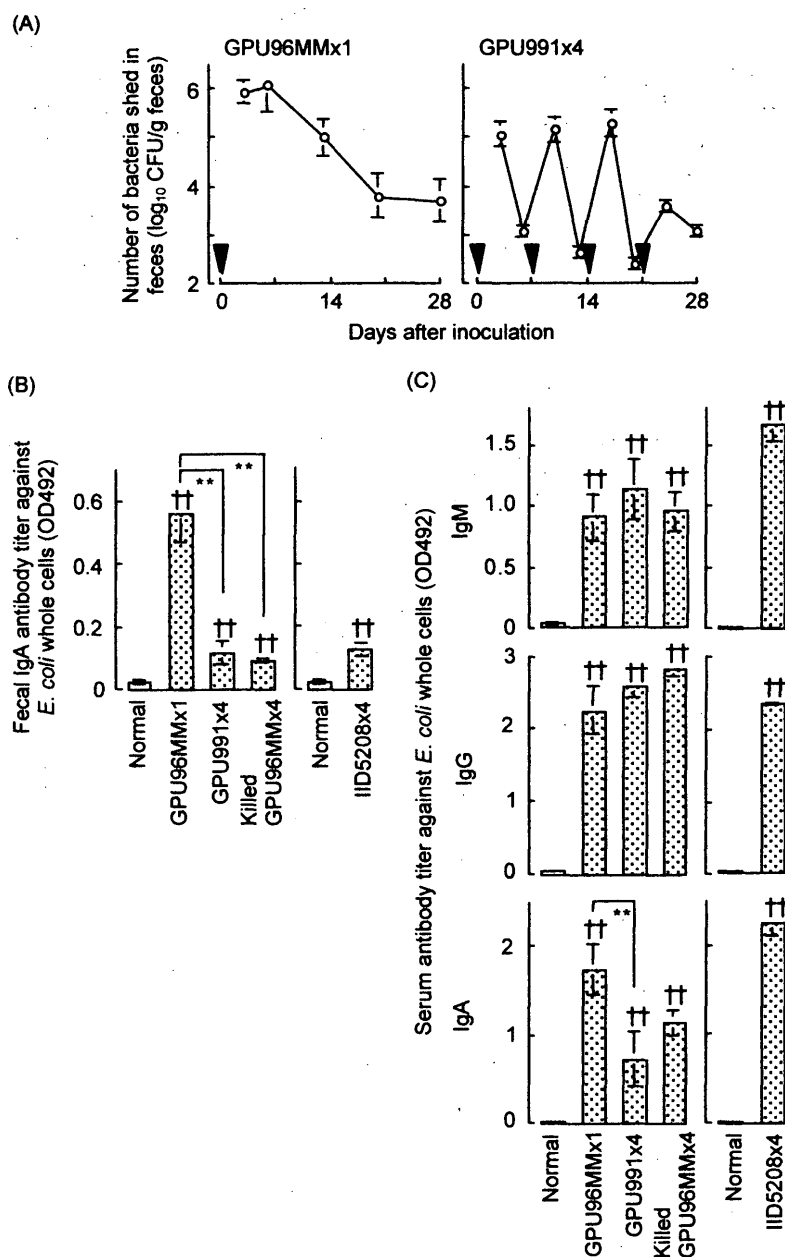


Fig. 6 Fecal shedding of bacteria (A), and fecal IgA (B) and serum IgM, IgG and IgA (C) antibody productions in mice inoculated with GPU96MM (wild type), GPU991 (*espA*-deletion mutant), heat-killed GPU96MM and nonpathogenic IID5208. Mice were inoculated intragastrically once with 10¹¹ CFU/kg of GPU96MM (x 1), and/or repeatedly 4 times at weekly intervals with 10¹¹ CFU/kg of the other bacteria (x 4). Arrows in (A) indicate the inoculation of bacteria. GPU96MM was used as an antigen for the filtration ELISA to detect antibodies in the fecal and serum samples obtained 28 days after the first inoculation, except that IID5208 was used as an antigen for those in the samples of mice inoculated with IID5208. Data show the mean ± SEM of 6 to 7 mice. Statistically significant differences were found from normal mice (††) and from GPU96MM x 1 (***) at *P* < 0.01.

以上のように、GPU991、GPU96MM 加熱死菌および非病原性大腸菌 IID5208 を繰り返し接種した場合も糞便中 IgA 抗体価の上昇はほとんどみられなかった。一方、血中 IgM、IgG および IgA 抗体については、GPU96MM のみならず、GPU991 および GPU96MM 加熱死菌さらには非病原性大腸菌である IID5208 のいずれの接種によっても誘導された。EHEC の腸管上皮細胞への接着と免疫応答の誘導

の関係をさらに検討するため、続いて抗生物質処置マウスを用いた検討を行った。

Km 処置マウスに *sepL* 変異株 (A6-E7)、*tir* 変異株 (G1-E11) および *eae* 変異株 (Δeae) を接種した場合の検討: マウスを抗生物質処置して腸内細菌叢を減少させた場合、EHEC の腸管内定着性が促進することが知られている^{20,23}。そこで、接着因子の欠失変異株を腸管内に持続感

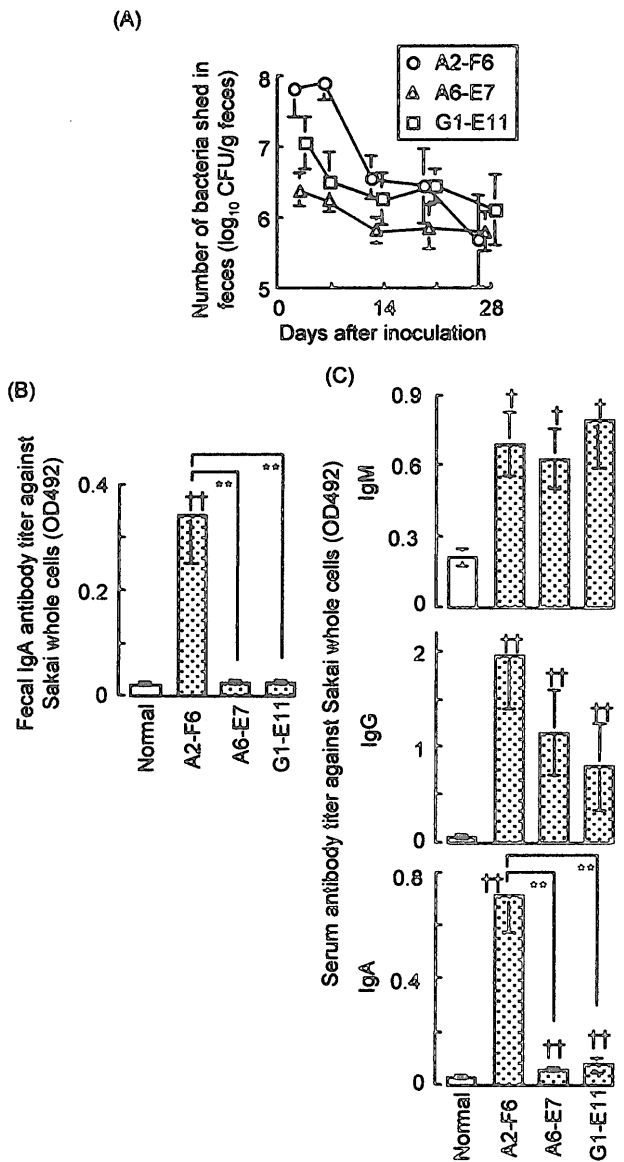


Fig. 7 Fecal shedding of bacteria (A), and fecal IgA (B) and serum IgM, IgG and IgA (C) antibody productions in mice inoculated with A2-F6 (control), A6-E7 (*sepL*-insertion mutant) and G1-E11 (*tir*-insertion mutant). Kanamycin-treated mice were inoculated intragastrically with 10^{10} CFU/kg of the respective bacteria. Sakai was used as an antigen for the filtration ELISA to detect antibodies in the fecal and serum samples obtained 28 days after the inoculation. Data show the mean \pm SEM of 7 mice. Statistically significant differences were found from normal mice at $P < 0.05$ (\dagger) and $P < 0.01$ ($\dagger\dagger$), and from mice inoculated with A2-F6 at $P < 0.01$ (**).

染させることを目的として Km 処置マウスを用いた検討を行った。すなわち、マウスに 0.5 mg/ml の Km 水溶液を実験期間中連続して自由飲水投与し、Km 投与開始 5 日後に 10^{10} CFU/kg の A2-F6 (対照菌株)、A6-E7、G1-E11 および Δeae を経胃接種した。糞便中排出菌数についての成績を Fig. 7A および 8A に示す。この場合、抗生物質非処置マウスの場合 (Fig. 3、5 および 6) と異なり、接着因子

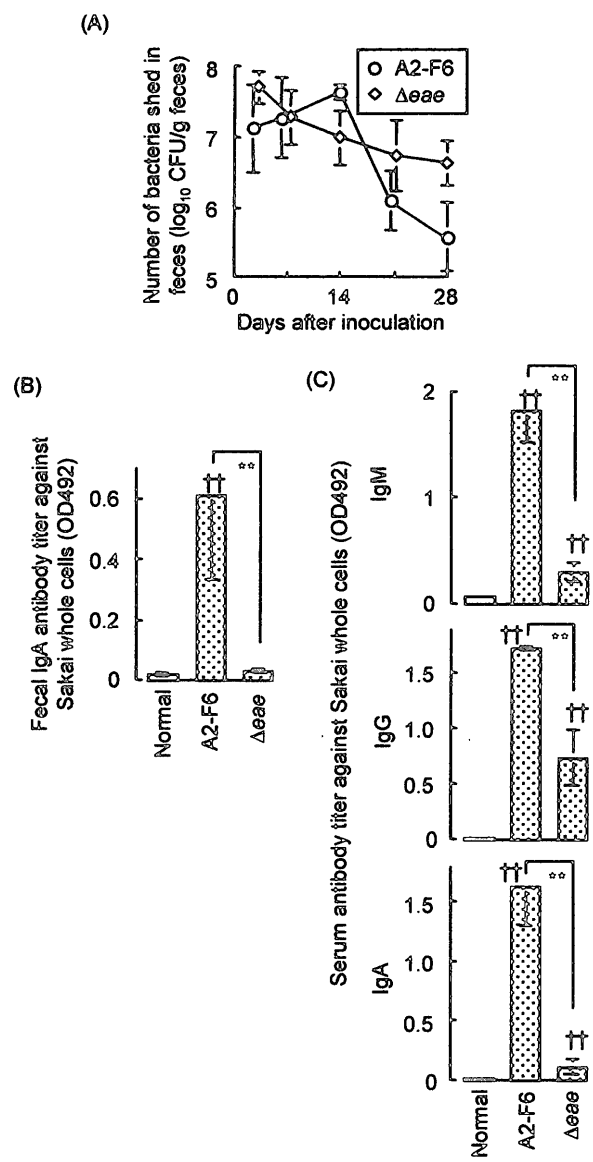


Fig. 8 Fecal shedding of bacteria (A), and fecal IgA (B) and serum IgM, IgG and IgA (C) antibody productions in mice inoculated with A2-F6 (control) and Δeae (*eae*-deletion mutant). Kanamycin-treated mice were inoculated intragastrically with 10^{10} CFU/kg of the respective bacteria. Sakai was used as an antigen for the filtration ELISA to detect antibodies in the fecal and serum samples obtained 28 days after the inoculation. Data show the mean \pm SEM of 7 mice. Statistically significant differences were found from normal mice ($\dagger\dagger$) and from mice inoculated with A2-F6 (**) at $P < 0.01$.

変異株 (A6-E7、G1-E11 および Δeae) は実験期間を通して対照菌株 (A2-F6) とほぼ同程度の排菌を示した。

糞便中および血中抗体価の成績を Fig. 7B、7C、8B および 8C に示す。糞便中 IgA 抗体価は A2-F6 を接種したマウスでは検出されたが、A6-E7、G1-E11 および Δeae を接種したマウスでは検出されなかった。血中 IgM および IgG 抗体価は A2-F6、A6-E7 および G1-E11 のいずれの菌株を

接種した場合も上昇した。 Δeae を接種した場合、血中 IgM 抗体価の上昇は軽度であったが、血中 IgG 抗体価は著明に上昇した。血中 IgA 抗体価は A2-F6 の接種では著明な上昇がみられたが、A6-E7、G1-E11 および Δeae の接種ではわずかな上昇しかみられなかった。

以上の成績より、Km 処置マウスでは対照株 A2-F6 のみならず、*sepL* 変異株 A6-E7、*tir* 変異株 G1-E11 および *eae* 変異株 Δeae のいずれの接着因子変異株も長期にわたり糞便中への排菌が持続することが明らかとなった。抗生物質非処置の SPF マウスでは接着因子を有する菌株は排菌が持続し、糞便中抗体価の上昇する時期に消失するのに対して接着因子変異菌株は速やかに腸管内から消失する。一方、Km 処置マウスでは接着因子変異株でも持続感染し、さらに、接着因子を有する菌株では抗体価が上昇しても腸管内から消失しない。詳細は不明であるが、生体防御の観点から考えると腸管内の EHEC の排除には抗体の産生のみでは不十分で、排除には腸管内の常在細菌の役割も大きいことを示唆する。一方、腸管内での S-IgA 抗体産生の誘導に関しては、Km 処置によって持続的に腸管内に存在しても接着因子変異株では IgA 抗体価の上昇はみられず、これらの成績は、EHEC の TTSS を介した接着がマウス腸管内での抗原特異的 S-IgA 抗体の誘導に必須であることを強く示唆する。

EHEC は HeLa 細胞や Caco-2 細胞などの培養上皮細胞に接着し、コロニーを形成する。*SepL* 変異株 (本研究における GPU992 および A6-E7) は TTSS によるタンパク質の分泌に障害をきたし¹⁸⁾、上皮細胞への接着能が消失する^{18,19)}。*EspA* 変異株 (本研究における GPU991) ではタンパク質を宿主細胞に移入するためのニードル様構造体が形成されず、接着能が消失する¹⁷⁾。一方、*tir* 変異株 (本研究における G1-E11) および *eae* 変異株 (本研究における Δeae) は Caco-2 細胞に対してニードル様構造体による散在性の接着は示すが、*Tir* と *intimin* (*Eae*) の結合ができないためコロニーの形成および F-アクチンの凝集はみられなくなる¹⁹⁾。この場合、*eae* 変異株は TTSS を介して *Tir* を宿主細胞内に移入できることが知られている⁵⁰⁾。したがって、これらの成績は TTSS を介した EHEC の腸管上皮細胞への散在性の接着および *Tir* などの宿主細胞への移入のみでは腸管内に抗原特異的 S-IgA 抗体の産生を誘導できず、その誘導には *intimin* と *Tir* の結合が必要であることを示す。その結合に至る過程での接着上皮細胞におけるシグナル伝達、あるいはそれに伴う接着上皮細胞のサイトカイン産生が免疫応答の誘導に関与する可能性が考えられる。EHEC が宿主細胞へ接着した場合、宿主細胞内のプロテインキナーゼ C や NF- κ B の活性化^{51,52)} および細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇⁵¹⁾ などの細胞内シグナル伝達系が活性化されることやインターロイキン-8 の産生が増加することが報告⁵¹⁾ されている。また、*Ismmaili et al.*⁵¹⁾ は、EHEC の宿主細胞への接

着はこれらのシグナル伝達カスケードの活性化に必須であるとしている。EHEC 接着後のどのようなシグナル伝達あるいはサイトカイン産生が抗原特異的 S-IgA 抗体の産生あるいは IgA 産生 B 細胞へのアイソタイプスイッチに関与しているかについては今後の検討が必要である。また、菌の腸管上皮細胞への接着と抗原特異的 IgA 抗体産生 B 細胞の腸管粘膜固有層へのホーミングの関係についても今後の検討が必要である。

全身性免疫応答としての血中 IgM および IgG 抗体は、GPU991、GPU96MM 加熱死菌および IID5208 を繰り返し接種した場合および接着因子変異株 (A6-E7、G1-E11 および Δeae) を Km 処置マウスに接種した場合のいずれの場合も誘導され (Figs. 6C、7C および 8C)、その誘導は菌の腸管上皮細胞への接着には依存しなかった。パイエル板などの腸管のリンパ様組織は濾胞関連上皮細胞によって覆われ、ここには抗原を活発に取り込む M 細胞が存在する⁵³⁾。EHEC の宿主細胞への侵入性は、ほとんど無い⁵⁴⁻⁵⁷⁾ か、あるいは低い^{58,59)} とされており、EHEC が直接生体内に侵入して全身性免疫応答を誘導する可能性は低いと思われる。また、GPU96MM 加熱死菌や非病原性大腸菌 IID5208 によっても血中特異抗体が誘導されたことから、菌体由来の抗原が M 細胞によって生体内に取り込まれ、全身性免疫応答を誘導する可能性が考えられる。

血中 IgA 抗体については、GPU991、GPU96MM 加熱死菌および IID5208 を繰り返し接種した場合は血中 IgA 抗体が誘導されたが (Fig. 6C)、Km 処置マウスに接着因子変異株 (A6-E7、G1-E11 および Δeae) を接種した場合は誘導されなかった (Figs. 7C および 8C)。この相違の理由は不明であるが、腸管内における菌の存在場所および抗原暴露様式の相違による可能性が考えられる。成績には示さないが、Km 処置マウスにおいても、非処置の場合と同様に、菌は主に盲腸に定着することを確認している。一方、繰り返し接種の場合は、その都度経胃的に小腸に達し、胃酸などで損傷を受けて菌体から放出される抗原が血中 IgA 抗体の産生を刺激するのかもしれない。

4. 結 論

EHEC はマウス盲腸上皮細胞に TTSS を介して接着した。EHEC 感染による腸管内免疫応答の誘導には TTSS を介した初期接着および *Tir* の上皮細胞への移入のみでは不十分で、*intimin* と *Tir* の結合を介した腸管上皮細胞への強固な接着が必要であった。また、全身性免疫応答の誘導には本菌の腸管上皮細胞への接着は必ずしも必要ではないことが明らかとなった。

5. 謝 辞

本総説に記述した研究は岐阜薬科大学微生物学教室で行われたものであり、研究の遂行に当たり終始ご協力を頂きました同教室の諸氏に厚くお礼申し上げます。また、貴重な菌株を分与して頂いた東京大学医科学研究所 笹川千尋 先生ならびに立野 一郎 先生に深謝いたします。

6. 参考文献

- Ogra, P. L., "Mucosal immunology," eds. by Ogra, P. L., Mestecky, J., Lamm, M. E., Strober, W., Bienenstock, J., Mcghee, J. R., Academic Press, New York, 1999, pp. 657-738.
- Russel, M. W., Kilian, M., Lamm, M. E., "Mucosal immunology," eds. by Ogra, P. L., Mestecky, J., Lamm, M. E., Strober, W., Bienenstock, J., Mcghee, J. R., Academic Press, New York, 1999, pp. 225-240.
- Mcghee, J. R., Czerkinsky, C., Mestecky, J., "Mucosal immunology," eds. by Ogra, P. L., Mestecky, J., Lamm, M. E., Strober, W., Bienenstock, J., Mcghee, J. R., Academic Press, New York, 1999, pp. 741-757.
- Mastroeni, P., Bowe, F., Cahill, R., Simmons, C., Dougan, G., *Gut*, **45**, 633-635 (1999).
- Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P. C., Steele, B. T., *Lancet*, **2**, 1299-1300 (1983).
- Donnenberg, M. S., Tzipori, S., McKee, M. L., O'Brien, A. D., Alroy, J., Kaper, J. B., *J. Clin. Invest.*, **92**, 1418-1424 (1993).
- Francis, D. H., Collins, J. E., Duimstra, J. R., *Infect. Immun.*, **51**, 953-956 (1986).
- Tzipori, S., Wachsmuth, I. K., Chapman, C., Birden, R., Brittingham, J., Jackson, C., Hogg, J., *J. Infect. Dis.*, **154**, 712-716 (1986).
- O'Brien, A. D., Tesh, V. L., Donohue-Rolfe, A., Jackson, M. P., Olsnes, S., Sandvig, K., Lindberg, A. A., Keusch, G. T., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **180**, 65-94 (1992).
- Paton, J. C., Paton, A. W., *Clin. Microbiol. Rev.*, **11**, 450-479 (1998).
- Sandvig, K., van Deurs, B., *EMBO J.*, **19**, 5943-5950 (2000).
- Paton, A. W., Voss, E., Manning, P. A., Paton, J. C., *Microb. Pathog.*, **24**, 57-63 (1998).
- Gansheroff, L. J., Wachtel, M. R., O'Brien, A. D., *Infect. Immun.*, **67**, 6409-6417 (1999).
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D. J., Frey, E. A., Finlay, B. B., *Cell*, **91**, 511-520 (1997).
- Deibel, C., Kramer, S., Chakraborty, T., Ebel, F., *Mol. Microbiol.*, **28**, 463-474 (1998).
- Karlinsey, J. E., Lonner, J., Brown, K. L., Hughes, K. T., *Cell*, **102**, 487-497 (2000).
- Ebel, F., Podzadel, T., Rohde, M., Kresse, A. U., Kramer, S., Deibel, C., Guzman, C. A., Chakraborty, T., *Mol. Microbiol.*, **30**, 147-161 (1998).
- Kresse, A. U., Beltrametti, F., Muller, A., Ebel, F., Guzman, C. A., *J. Bacteriol.*, **182**, 6490-6498 (2000).
- Tatsuno, I., Kimura, H., Okutani, A., Kanamaru, K., Abe, H., Nagai, S., Makino, K., Shinagawa, H., Yoshida, M., Sato, K., Nakamoto, J., Tobe, T., Sasakawa, C., *Infect. Immun.*, **68**, 5943-5952 (2000).
- Lindgren, S. W., Melton, A. R., O'Brien, A. D., *Infect. Immun.*, **61**, 3832-3842 (1993).
- Isogai, E., Isogai, H., Kimura, K., Hayashi, S., Kubota, T., Fujii, N., Takeshi, K., *Infect. Immun.*, **66**, 197-202 (1998).
- Kurioka, T., Yunou, Y., Kita, E., *Infect. Immun.*, **66**, 1726-1734 (1998).
- Wadolowski, E. A., Burris, J. A., O'Brien, A. D., *Infect. Immun.*, **58**, 2438-2445 (1990).
- Conlan, J. W., Perry, M. B., *Can. J. Microbiol.*, **44**, 800-805 (1998).
- Itoh, S., Kariya, M., Nagano, K., Yokoyama, S., Fukao, T., Yamazaki, Y., Mori, H., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 986-990 (2002).
- Nagano, K., Taguchi, K., Hara, T., Yokoyama, S., Kawada, K., Mori, H., *Microbiol. Immunol.*, **47**, 125-132 (2003).
- Liu, H., Magoun, L., Luperchio, S., Schauer, D. B., Leong, J. M., *Mol. Microbiol.*, **34**, 67-81 (1999).
- Ebel, F., Deibel, C., Kresse, A. U., Guzman, C. A., Chakraborty, T., *Infect. Immun.*, **64**, 4472-4479 (1996).
- Sperandio, V., Mellies, J. L., Nguyen, W., Shin, S., Kaper, J. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 15196-15201 (1999).
- Adu-Bobie, J., Frankel, G., Bain, C., Goncalves, A. G., Trabulsi, L. R., Douce, G., Knutton, S., Dougan, G., *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 662-668 (1998).
- Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marches, O., Caprioli, A., *Infect. Immun.*, **68**, 64-71 (2000).
- Phillips, A. D., Frankel, G., *J. Infect. Dis.*, **181**, 1496-1500 (2000).
- Tzipori, S., Gunzer, F., Donnenberg, M. S., de Montigny, L., Kaper, J. B., Donohue-Rolfe, A., *Infect. Immun.*, **63**, 3621-3627 (1995).
- Frankel, G., Phillips, A. D., Trabulsi, L. R., Knutton, S., Dougan, G., Matthews, S., *Trends Microbiol.*, **9**, 214-218 (2001).
- Karch, H., Heesemann, J., Laufs, R., O'Brien, A. D., Tacket, C. O., Levine, M. M., *Infect. Immun.*, **55**, 455-461 (1987).
- Sherman, P., Cockerill, F., 3rd, Soni, R., Brunton, J., *Infect. Immun.*, **59**, 890-899 (1991).
- Zhao, S., Meng, J., Doyle, M. P., Meinersman, R., Wang, G., Zhao, P., *J. Med. Microbiol.*, **45**, 90-96 (1996).
- Tarr, P. I., Bilge, S. S., Vary, J. C., Jr., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Ward, T. R., Baylor, M. R., Besser, T. E., *Infect.*

- Immun.*, **68**, 1400-1407 (2000).
39. Phillips, A. D., Navabpour, S., Hicks, S., Dougan, G., Wallis, T., Frankel, G., *Gut*, **47**, 377-381 (2000).
40. Jenkins, C., Chart, H., Smith, H. R., Hartland, E. L., Batchelor, M., Delahay, R. M., Dougan, G., Frankel, G., *J. Med. Microbiol.*, **49**, 97-101 (2000).
41. Srimanote, P., Paton, A. W., Paton, J. C., *Infect. Immun.*, **70**, 3094-3100 (2002).
42. Li, Y., Frey, E., Mackenzie, A. M., Finlay, B. B., *Infect. Immun.*, **68**, 5090-5095 (2000).
43. Camara, L. M., Carbonare, S. B., Silva, M. L., Carneiro-Sampaio, M. M., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **103**, 307-310 (1994).
44. Philpott, D. J., Girardin, S. E., Sansonetti, P. J., *Curr. Opin. Immunol.*, **13**, 410-416 (2001).
45. Sierro, F., Dubois, B., Coste, A., Kaiserlian, D., Kraehenbuhl, J. P., Sirard, J. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 13722-13727 (2001).
46. Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., Ricciardi-Castagnoli, P., *Nat. Immunol.*, **2**, 361-367 (2001).
47. Kagnoff, M. F., Eckmann, L., *J. Clin. Invest.*, **100**, 6-10 (1997).
48. Holmgren, J., Rudin, A., "Mucosal immunology," eds. by Ogra, P. L., Mestecky, J., Lamm, M. E., Strober, W., Bienenstock, J., Mcghee, J. R., Academic Press, New York, 1999, pp. 685-693.
49. Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C. G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M., Shinagawa, H., *DNA Res.*, **8**, 11-22 (2001).
50. DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D., Abe, A., Ruschkowski, S., Finlay, B. B., *Infect. Immun.*, **67**, 2389-2398 (1999).
51. Ismaili, A., Philpott, D. J., McKay, D. M., Perdue, M. H., Sherman, P. M., "Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin producing *E. coli* strains," eds. by Kaper, J. B., O'Brien, A. D., American Society for Microbiology, Washington, DC, 1998, pp. 213-225.
52. Berin, M. C., Darfeuille-Michaud, A., Egan, L. J., Miyamoto, Y., Kagnoff, M. F., *Cell Microbiol.*, **4**, 635-648 (2002).
53. Kelsall, B., Strober, W., "Mucosal immunology," eds. by Ogra, P. L., Mestecky, J., Lamm, M. E., Strober, W., Bienenstock, J., Mcghee, J. R., Academic Press, New York, 1999, pp. 293-317.
54. Sherman, P., Soni, R., Petric, M., Karmali, M., *Infect. Immun.*, **55**, 1824-1829 (1987).
55. McKee, M. L., O'Brien, A. D., *Infect. Immun.*, **63**, 2070-2074 (1995).
56. Donnenberg, M. S., Donohue-Rolfé, A., Keusch, G. T., *J. Infect. Dis.*, **160**, 452-459 (1989).
57. Dibb-Fuller, M. P., Best, A., Stagg, D. A., Cooley, W. A., Woodward, M. J., *J. Med. Microbiol.*, **50**, 759-769 (2001).
58. Oelschlaeger, T. A., Barrett, T. J., Kopecko, D. J., *Infect. Immun.*, **62**, 5142-5150 (1994).
59. Uhlich, G. A., Keen, J. E., Elder, R. O., *Infect. Immun.*, **70**, 395-399 (2002).

* 本総説は岐阜薬科大学博士論文（甲第 90 号）の内容を中心にまとめたものである。