

# 総括研究報告書

## ハンセン病における宿主防御機構の解明とその治療・予防応用

主任研究者 小林和夫 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 生体防御部長

### 研究要旨

抗酸菌感染応答は遺伝的制御、宿主細胞（炎症/防御に関与する細胞群：好中球やマクロファージ、神経組織：シュワン細胞）間クロストーク、防御（食食：マクロファージ糖受容体、殺菌：細胞内転写調節因子、細胞性免疫：マクロファージサイトカイン-T細胞連関係）や病変形成に関与する機能分子（サイトカイン、ケモカイン）から構成されていることが判明した。さらに、サイトカイン免疫療法は宿主防御を効率的に発現させ、治療や予防に新機軸を提供した。新規抗酸菌感染症ワクチン候補を探索したところ、細菌由来および人工合成免疫増強性オリゴヌクレオタイド（DNA）が細胞性免疫を効率的に誘導し、新規ワクチン開発に有望であることが判明した。宿主防御機構を解析することは抗酸菌感染症制圧戦略（新規治療方法やワクチン開発）を構築する上で、極めて重要である。

### 分担研究者

福富康夫	ハンセン病研究センター	室長
野間口博子	ハンセン病研究センター	室長
與儀ヤス子	ハンセン病研究センター	室長
遠藤真澄	ハンセン病研究センター	主任 研究官
儀同政一	ハンセン病研究センター	室長
山本三郎	国立感染研 村山分室	室長
矢島幹久	国療多磨全生園	科長
笠原慶太	昭和大学医学部	講師
笠間 毅	昭和大学医学部	講師

症はハンセン病：約0.2%、結核：約10%であり、宿主防御機構が発症防止に寄与している。したがって、発症制御機構を解明することは、抗酸菌感染症の治療や予防に貢献することが期待される。

本研究では抗酸菌感染症の発症予防および治療法について、宿主感染抵抗性/感受性の発現機構を宿主遺伝子、細胞や生理活性物質動態などの解析から明らかにする。また、ハンセン病における重大な機能障害の原因である末梢神経傷害の発症機序を解明する。さらに、抗酸菌感染症の新治療戦略として、新規抗菌化学療法薬やサイトカインによる免疫強化療法およびそれらの併用療法を開発し、安全性や毒性を評価し、臨床応用の可能性を模索する。抗酸菌感染症に効果的なワクチンはないが、安全で有効なワクチン開発の基礎として、成分（DNA）ワクチンの作用機序を検討する。

### A. 研究目的

ハンセン病を含めた抗酸菌感染症制圧の世界戦略（世界保健機関：WHO）は活動性患者の早期発見と多剤併用化学療法を中心に推進しているが、現在においても、多数の活動性新規患者（ハンセン病：69万人/年、結核：720万人/年、1998年）が発症している。抗酸菌（らい菌、結核菌、非結核性抗酸菌など）感染に対抗する宿主防御や病変形成は、宿主-寄生体関係を介して成立し、抗酸菌と宿主の壮絶な生存競争を反映している。抗酸菌感染における発

### B. 研究方法

実験的抗酸菌感染マウスモデルを用いて、抵抗性遺伝子、感染部位における細胞集積状況（病理形態学）、感染防御性サイ

トカイン発現（酵素抗体法や遺伝子増幅法）、マクロファージ殺菌能（Shepard法やBuddemeyer法）などを解析した。また、宿主マクロファージの抗酸菌貪食分子機構について解析をした。ヒト末梢血細胞（単球、樹状細胞や好中球）を用いて、感染防御や病変形成における役割を分子医学的に検索した。

ハンセン病における末梢神経傷害機構を解明するため、ラット神経組織由来シュワン細胞株を樹立し、らい菌感染による細胞応答を解析した。

新規抗ハンセン病併用化学療法を開発するため、ホスホマイシン、リファマイシン系薬およびキノロン薬の抗菌活性について探索した。さらに、感染防御性サイトカイン生体内投与（サイトカイン免疫療法）の臨床応用を考慮し、有用性、安全性や毒性について解析した。抗酸菌感染症の新規ワクチン候補として、遺伝子工学の手法を用いて、細胞性免疫を助長する安全かつ有効な成分（DNA）ワクチン開発の可能性に着手した。

### C. 研究結果

マウスの宿主遺伝子（常染色体性優性、第1染色体に位置する*Nramp1*遺伝子）が抗酸菌増殖や肉芽腫病変形成の制御に関与していること、さらに、宿主の抗酸菌感染部位にはマクロファージを中心とした細胞浸潤が病理形態学的に認められ、宿主防御機序としてマクロファージ-サイトカイン-T細胞連関（細胞性免疫）やマクロファージ由来効果分子が重要な役割を演じていることが判明した。特に、細胞性免疫/interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 発現における起動性サイトカインであるinterleukin (IL) 12やIL-18発現が抗酸菌（らい菌、非結核性抗酸菌）感受性マウスで低下していた。そのため、細胞性免疫不全を呈していることが明らかとなった。病変形成は炎症惹起性サイトカイン（IL-1やtumor necrosis factor  $\alpha$  : TNF- $\alpha$ など）に加え

て好中球由来走化性サイトカイン（ケモカイン：IL-8、単球走化性蛋白-1やマクロファージ炎症性蛋白-1 $\alpha$ など）の関与が明らかとなった。また、抗酸菌を貪食した好中球は、単球走化性ケモカインを分泌し、その後、急速な細胞死（アポトーシス）を招来した。らい菌感染におけるマクロファージの役割を貪食分子および細胞内情報伝達機構の観点から解析した。その結果、貪食にはマクロファージ細胞表面の糖（マンノース）受容体が必須であること、貪食により、TNF- $\alpha$ がマクロファージから分泌され、炎症や防御機構に関与していることが判明した。また、転写調節因子NF-IL6ノックアウトマウスでは著明ならい菌増殖が認められ、感染らい菌を排除することができなかった。らい菌を感染させた神経組織由来シュワン細胞株はサイトカイン（細胞性免疫：IL-12やIL-18、炎症惹起性：IL-1）およびケモカイン（RANTES）を発現した。

新規抗ハンセン病薬の開発に関して、ホスホマイシン、リファマイシン系薬（リファンピシンやKRM-1648）およびキノロン薬（スパルフロキサシン）の間欠投与が抗らい菌活性を示した。また、抗菌化学療法薬の奏功機序として、マクロライド系抗菌薬（erythromycinやroxithromycin）が炎症性サイトカイン（IL-8）発現抑制、すなわち、抗炎症作用を有することを証明した。宿主防御を増強する目的で、実験的マウスらい菌感染モデルを用いて、サイトカイン（IL-12）免疫療法の理論的妥当性を検証した。IL-12の間欠投与は病巣内らい菌数を減少させ、免疫療法の可能性を示唆した。しかし、IL-12免疫療法には毒性があり、高用量において血液、肝、筋障害が出現し、治療用量において関節炎を惹起した。

抗酸菌感染防御が細胞性免疫発現に依存していることから、細胞性免疫発現で鍵となるIFNやIL-12を示標として新規抗酸菌感染症ワクチン候補を探索しているが、細

菌由来および人工合成免疫増強性オリゴヌクレオチド (DNA) がIFN：細胞性免疫を誘導し、その標的細胞は末梢血単球や樹状細胞であった。免疫増強性オリゴヌクレオチドにらいる菌由来主要抗原である熱ショック蛋白 (hsp) 65を組み込んだDNAワクチンを構築した。免疫増強性オリゴヌクレオチド単独投与は感染マウスにおけるらいる菌増殖を抑制した。しかし、hsp65—免疫増強性オリゴヌクレオチドは期待した抗菌活性を惹起することはできなかった。

#### D. 考察

抗酸菌感染防御に遺伝的制御 (*Nramp1* 遺伝子)、マクロファージ—サイトカイン—T細胞連関係 (細胞性免疫) が重要な役割を演じていることが判明した。特に、マクロファージは貪食 (マンノース受容体)、殺菌・静菌 (転写調節因子NF-IL6)、サイトカイン分泌 (細胞性免疫惹起性：IL-12、IL-18やIFN- $\gamma$ 、病変惹起性：IL-1やTNF- $\alpha$ ) を担い、中心的役割を果たしている。したがって、免疫療法の標的としてマクロファージが第1候補であり、防御と病変形成におけるマクロファージの役割を解析することは新規治療方法やワクチンの開発に鍵となるであろう。また、多くの炎症病巣で最も早期に浸潤する好中球は抗酸菌感染において、単球走化性ケモカイン分泌および細胞死 (アポトーシス) を招来し、感染防御や肉芽腫炎症病変形成に関与している。ハンセン病の末梢神経障害機序ではらいる菌親和性シュワン細胞が感染により細胞応答 (サイトカインやケモカイン) を表現し、神経組織における病変形成や感染防御に貢献していることも判明した。

抗菌化学療法薬の併用においてホスホマイシン、リファマイシン系およびキノロン薬の間欠投与が抗らいる菌活性を示し、今後、ハンセン病への臨床応用が期待される。一方、抗菌化学療法は抗酸菌自身を標

的にしており、薬剤耐性抗酸菌の出現が不可避であるが、宿主防御/抵抗性を増強させる戦略 (免疫強化法) は抗酸菌感染症の治療や予防に新機軸を提供している。免疫強化療法への戦略転換は抗酸菌のみならず、種々の微生物感染症にも貢献するであろうし、また、免疫強化療法と抗菌化学療法の併用療法も感染症制圧における新たな武器となるであろう。しかし、IL-12免疫療法の開発に際し、安全性や毒性 (高用量：血液、肝、筋障害、治療用量：関節炎) に十分な配慮が必要である。

新規抗酸菌感染症ワクチン候補として、免疫増強性DNAは単球や樹状細胞に作用し、その結果、IFN発現/産生を促進し、最終的に、防御/細胞性免疫を誘導した。今後、感染病原体特異性や安全性に配慮しつつ、安全で有効な成分ワクチンの開発を推進したい。

#### E. 結論

抗酸菌感染応答は遺伝的制御、宿主細胞 (炎症/防御に関与する細胞群：好中球やマクロファージ、神経組織：シュワン細胞) 間クロストーク、防御 (貪食：マクロファージ糖受容体、殺菌：細胞内転写調節因子、細胞性免疫：マクロファージ—サイトカイン—T細胞連関係) や病変形成に関与する機能分子 (サイトカイン、ケモカイン) から構成されていることが判明した。さらに、サイトカイン免疫療法は宿主防御を効率的に発現させ、治療や予防に新機軸を提供した。新規抗酸菌感染症ワクチン候補を探索したところ、細菌由来および人工合成免疫増強性オリゴヌクレオチド (DNA) が細胞性免疫を効率的に誘導し、新規ワクチン開発に有望であることが判明した。宿主防御機構を解析することは抗酸菌感染症制圧戦略 (新規治療方法やワクチン開発) を構築する上で、極めて重要である。

#### F. 研究発表

## 1. 論文発表

Saito, H., Y. Kashiwabara, and K. Kobayashi. 1998. Present and future in leprosy research. In *Clinical Mycobacteriology*. M. Casal, editor. Barcelona: Prous Science/Spain. 51-62.

Kobayashi, K., K. Hashimoto, M. Gidoh, M. Kai, and H. Saito. 1998. Possible involvement of type 1 helper T cell/interferon- $\gamma$  inducing cytokines in protection against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice. In *Clinical Mycobacteriology*. M. Casal, editor. Barcelona: Prous Science/Spain. 109-114.

Kai, M., H. Saito, K. Kobayashi, and Y. Kashiwabara. 1998. *Mycobacterium avium* complex with different reactivity to DNA probes. In *Clinical Mycobacteriology*. M. Casal, editor. Barcelona: Prous Science/Spain. 159-164.

Saito, H., M. Gidoh, M. Kai, and K. Kobayashi. 1998. Chemoprophylaxis against *Mycobacterium avium* complex induced in mice. In *Clinical Mycobacteriology*. M. Casal, editor. Barcelona: Prous Science/Spain. 403-413.

Kawasaki, S., H. Takizawa, T. Ohtoshi, N. Takeuchi, T. Kohyama, H. Nakamura, T. Kasama, K. Kobayashi, K. Nakahara, Y. Morita, and K. Yamamoto. 1998. Roxithromycin inhibits cytokine production by and neutrophil attachment to human bronchial epithelial cells in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1499-1502.

Kasahara, K., I. Sato, K. Ogura, H. Takeuchi, K. Kobayashi, and M. Adachi. 1998. Expression of

chemokines and induction of rapid cell death in human blood neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 178: 127-137.

Kobayashi, K., M. Kai, M.-i. Gidoh, N. Nakata, M. Endoh, R.P. Singh, T. Kasama, and H. Saito. 1998. The possible role of interleukin (IL)-12 and interferon- $\gamma$ -inducing factor/IL-18 in protection against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 88: 226-231.

Ohta, T.M., T. Kasama, Y. Hanyuda, Y. Hatano, K. Kobayashi, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 1998. Interleukin-13 down-regulates the expression of neutrophil-derived macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ . *Inflamm. Res.* 47: 361-368.

Kasama, T., J. Yamazaki, R. Hanaoka, Y. Miwa, Y. Hatano, K. Kobayashi, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 1999. Biphasic regulation of the development of murine type II collagen-induced arthritis by interleukin-12. Possible involvement of endogenous interleukin-10 and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Arthritis Rheum.* 42: 100-109.

Soomro, F.R., V. Lailang, and M. Gidoh. 1998. Buddemeyer system radiorespirometric assay for screening antileprosy drug. *J. Pak. Assoc. Dermatol.* 8: 2-6.

Endoh, M., H. Hirose, D.-H. Chui, S. Nakatani, T. Kunishita, and T. Tabira. 1999. Production and characterization of monoclonal antibody specific to surface antigens in septal, hippocampal, and nigral neurons from neonatal mouse. *Neurochem. Res.* 24: 163.

Endoh, M., T. Kunishita, and T. Tabira. 1999. No effect of anti-leprosy drugs in the preservation of Alzheimer's disease and  $\beta$ -amyloid neurotoxicity. *J. Neurol. Sci.* 印刷中.

Tokunaga, T., T. Yamamoto, S. Yamamoto. 1999. How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn. J. Infect. Dis.* 印刷中.

小林和夫. 1998. 抗酸菌感染症制圧における生体防御増強戦略. *BioDefence シリーズ 3. 異物反応と生体反応 -新しい視点を求めて-* (日本生体防御学会、岡田秀親編) 東京: 菜根出版. 227-241.

斎藤 肇, D. Dawson, 甲斐雅規, 小林和夫. 1998. *Mycobacterium avium* complexの自然環境における地理的分布並びにAIDS・非AIDS患者株の血清型. *結核* 73: 379-383.

樋口一恵, 原田登之, 内山隆司, 藤原寛, 上田千里, 露口泉夫, 中村玲子, 小林和夫, 青木正和. 1998. マクロファージのIL-12産生を高値に誘導する結核菌体成分の解析. *結核* 73: 531-543.

橋本達一郎, 山本三郎. 1998. ワクチン開発の現状と問題点 BCGワクチン. *治療学* 32: 25-29.

## 2. 学会発表

Fukutomi, Y., G. McCormick, J.P. Pasqua, J.L. Krahenbuhl, S. Toratani, G. Matsuki, and M. Matsuoka. 1998. Elongation of *Mycobacterium leprae* in macrophages cultured in the presence of interleukin 10. 15th International Leprosy Congress. (Beijing, China, September, 1998).

Yamamoto S., E. Shigeto, S. Haga, and H. Tasaka. 1998. Cellular Immune responses to MPB64 antigen of tuberculosis patients and of mice immunized with BCG. Global Congress on Lung Health and the 29th World Conference of the International Union Against

Tuberculosis and Lung Disease November 1998, Bangkok, Thailand.

小林和夫, 吉田 彪 1998. 肉芽腫炎症制御におけるサイトカインネットワーク (要望課題) *結核*, 73: 236, 1998. 第73回日本結核病学会総会 (新潟, 4月).

樋口一恵, 原田登之, 内山隆司, 藤原寛, 上田千里, 中村玲子, 小林和夫 1998. マクロファージにおいてIL-12産生を高値に誘導する結核菌体成分の解析. *結核*, 73: 244, 1998. 第73回日本結核病学会総会 (新潟, 4月).

佐藤直樹, 山崎利雄, 芳賀伸治, 小林和夫, 柏原嘉子, 林 公子, 田村俊秀, 山下研也, 豊田耕一, 岡沢 豊, 丹野和信 1998. 生物発光を用いた結核菌の薬剤感受性試験法 (その2) アデノシン三リン酸 (ATP) 測定法の結核菌標準株による基礎的検討. *結核*, 73: 250, 1998. 第73回日本結核病学会総会 (新潟, 4月).

山崎利雄, 佐藤直樹, 芳賀伸治, 小林和夫, 柏原嘉子, 林 公子, 田村俊秀, 山下研也, 豊田耕一, 岡沢 豊, 丹野和信. 1998. 生物発光を用いた結核菌の薬剤感受性試験法 (その2) ATP測定法の薬剤感受性試験への応用. *結核*, 73: 251, 1998. 第73回日本結核病学会総会 (新潟, 4月).

岩淵英章, 笠間 毅, 三輪祐介, 羽生田芳生, 利 修治, 橋本幹生, 根岸雅夫, 井出宏嗣, 小林和夫, 森 義明. 1998. 慢性関節リウマチ関節内好中球からのchemokine発現とその調節. *リウマチ*, 38: 370, 1998. 第42回日本リウマチ学会総会 (東京, 5月).

笠間 毅, 波多野好美, 山崎純子, 大田朝子, 金光裕仁, 根岸雅夫, 井出宏嗣, 小林和夫. 1998. IL-12によるマウスコラーゲン誘導関節炎の抑制: 内因性IL-10の役割. *リウマチ*, 38: 397, 1998. 第42回日本リウマチ学会総会 (東京, 5月).

小林和夫, 儀同政一, 甲斐雅規, 斎藤

肇. 1998. *Mycobacterium leprae*感染マウスにおける免疫療法の理論と応用. 日本ハンセン病誌, 67:44, 1998. 第71回日本ハンセン病学会総会(平良, 6月).

樋口一恵、原田登之、中村玲子、小林和夫. 1998. マクロファージのIL-12産生を高値に誘導する結核菌体成分の解析. 日本免疫学会・学術集会記録, 28:331, 1998. 第28回日本免疫学会総会・学術総会(神戸, 12月).

野間口博子、與儀ヤス子、岡村春樹. 1998. 免疫増強DNA配列を有するベクターに挿入したらい菌hsp65遺伝子のワクチン効果. 日本細菌学雑誌, 53:235, 1998. 第71回日本細菌学会総会(松本, 4月).

野間口博子、與儀ヤス子、松岡正典、岡村春樹. らい菌熱ショック蛋白質のワクチン効果. 日本細菌学雑誌, 54:219, 1999. 第72回日本細菌学会総会(東京, 3月).

福富康夫、虎谷 聡、松木玄二、松岡正典. 1998. らい菌のマクロファージ内長期培養の試み(続報). 日本ハンセン病誌, 67:38, 1998. 第71回日本ハンセン病学会総会(平良, 6月).

松木玄二、虎谷 聡、松岡正典、福富康夫. 1998. マクロファージのらい菌貪食機構-糖レセプター-の関与-. 日本ハンセン病誌, 67:40, 1998. 第71回日本ハンセン病学会総会(平良, 6月).

福富康夫、木村博昭、虎谷 聡、松木玄二、小林和夫、松岡正典. 1998. らい菌貪食マクロファージにおいて誘導されるTNF、IL-10産生に対するIFN- $\gamma$ の相反する影響. 日本免疫学会・学術集会記録, 28:325, 1998. 第28回日本免疫学会総会・学術総会(神戸, 12月).

山本十糸子、種市麻衣子、蒲地一成、徳永徹、山本三郎. 1998. 細菌由来DNAおよび合成DNAに応答してインターフェロン $\alpha$ を産生する細胞に関する研究. 日

本細菌学雑誌, 53:111, 1998. 第71回日本細菌学会総会(松本, 4月).

山本三郎、山本十糸子、種市麻衣子、蒲地一成、徳永徹: 細菌DNAおよび合成DNAのNK細胞活性と抗腫瘍活性. 日本細菌学雑誌, 53:111, 1998. 第71回日本細菌学会総会(松本, 4月).

山本三郎、山本十糸子、種市麻衣子、芳賀伸治、重藤えり子、田坂博信: 結核患者におけるツベルクリン蛋白質抗原MPB64に対する細胞性免疫応答. 結核, 73:246, 1998. 第73回日本結核病学会総会(新潟, 4月).

山本三郎、山本十糸子. 1998. 免疫増強性オリゴDNAの免疫アジュバント活性. 日本免疫学会・学術集会記録, 28:66, 1998. 第28回日本免疫学会総会・学術総会(神戸, 12月).

山本十糸子、伊保澄子、徳永徹、山本三郎. 1998. 直接的かつ宿主介在性抗HIV作用を兼ね備えた非アンチセンスオリゴヌクレオチド抗エイズ薬の開発研究. 日本免疫学会・学術集会記録, 28:179, 1998. 第28回日本免疫学会総会・学術総会(神戸, 12月).

伊保澄子、山本十糸子、山本三郎. 1998. ヒトNK及びT細胞に対しIFN $\cdot\gamma$ 産生誘導活性を示す細菌DNAの塩基配列. 日本免疫学会・学術集会記録, 28:205, 1998. 第28回日本免疫学会総会・学術総会(神戸, 12月).

山本三郎、山本十糸子、梅森清子: ツベルクリンタンパク質抗原の細胞性免疫誘導に及ぼす細菌DNAおよび合成DNAのアジュバント効果. 日本細菌学雑誌, 54:245, 1999. 第72回日本細菌学会総会(東京, 3月).

鹿間裕介、笠原慶太、中島博昭、足立満. 1998. 肺線維芽細胞(IMR-90)の好酸球機能に及ぼす影響について. アレルギー, 47:968, 1998. 第48回日本アレルギー学会総会(神戸, 12月).

## 分担研究報告書

### らい菌と宿主細胞の相互作用

分担研究者 福富康夫

国立感染症研究所ハンセン病研究センター 病原微生物部第二研究室長

**研究要旨** マクロファージは種々の機能をもった免疫担当細胞であるが、異物貪食も重要な機能の一つである。同細胞の細胞膜上には様々なレセプターが存在するが、病原細菌貪食に関与するものも幾つか知られている。我々は、マウスマクロファージが細胞膜上のマンノースレセプターを介してらい菌を認識し貪食する機構が存在することを今回観察した。また、らい菌貪食刺激によってマクロファージが産生するサイトカインの一種である TNF の産生量は貪食量（菌体量）の影響を受けることが判明した。

#### A. 研究目的

マクロファージの抗酸菌貪食機構において、補体や抗体によるオプソニン作用が大きな役割を果たしている。ヒトマクロファージがらい菌を貪食する際にも補体オプソニンが貪食率を顕著に高めることが報告されている。さらに、結核菌の貪食に際しては、菌表層に存在するマンノースに対するマクロファージ上レセプターの関与も指摘されている。しかし、オプソニンが関与しないらい菌の認識や貪食機構については詳細には解析されていない。我々は、マウスマクロファージがらい菌に接触すると迅速に貪食を開始し、同時に TNF を産生することを観察している。そして、この貪食は非加熱血清を必要としないことから補体オプソニンは関与していないと想像される。そこで、貪食に際してマウスマクロファージがらい菌の糖を認識する機構が存在するか否かを検討した。

#### B. 研究方法

(1)らい菌の回収：ヌードマウス foot pad ならい菌(Thai-53 株)を接種し、一年後増殖してきた菌を回収し、7H12 培地に浮遊させ 4 度にて保存し実験に供与した。(2)マクロファージの培養：ICR マウス腹腔常在細胞をカバースリップの入った 24 穴プレート中にまき、非動化した牛胎児血清(FBS)を 10%含有する RPMI1640 培地にて 2 時間から一晩前培養した。そして、ハンクス液にて洗浄して得られるカバースリップ付着細胞をマクロファージとして用いた。(3)らい菌のマクロファージへの感

染：Shepard 法によって菌数計算したらい菌一定量をウエルに加え、4 時間培養した。(4)培養上清中の TNF 活性測定：培養上清を回収し、遠心して細胞を除去した後、L929 細胞を用いた細胞障害活性にて上清中の TNF 活性を定量した。(5)RT-PCR：GeneAmp RNA PCR kit (Perkin-Elmer)を用いて TNF $\alpha$  の mRNA 発現量を調べた。プライマーには、5'-末端側 TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGG、3'末端側 TGAGATAGCAAATCGGCTGACGGGTGTGGG を用いた。対照として GAPDH の発現量(5'-末端側 TCGGTGTGAACGGATTTGGC、3'末端側 CTCTTGCTCAGTGTCTTGC)を調べた。(6)抗酸菌染色：培養後のカバースリップをチールニールセン染色(室温でのカルボールフクシン染色)し、マクロファージ中のらい菌数を顕微鏡下で測定した。

#### C. 研究結果

56 度、30 分間処理して補体を不活化した非動化 FBS 含有培地存在下にてマウスマクロファージをらい菌とともに培養したところ、らい菌が迅速にマクロファージ内に取り込まれた。この貪食作用に伴い培養上清中には培養開始後 30 分後頃より TNF 活性が観察され、4 時間目迄産生は継続した。また、RT-PCR 法によって TNF mRNA 発現増強も観察された。そして、TNF 産生量は添加菌量に依存していた。抗酸菌染色によりマクロファージ中の菌数を確認したところ、添加菌量に応じた菌数が見られた。この培養系にマンノースやアラビノースを共存させたところ、アラビノース 10mg/ml では

食食、TNF 産生各々に対する影響は少なかったが、マンノース 10mg/ml 存在下では食食率は有為に低下し、同時に TNF 産生も抑制された。さらに、マウスマクロファージはザイモザンを食食し同時に TNF を産生したが、マンノース共存下により、食食、TNF 産生ともに抑制された。

#### D. 考察

結核菌の食食においては、オプソニン化された菌表面に存在する補体成分 C3 に対する補体レセプター(CR1、CR3)がマクロファージ上に存在しており、菌のマクロファージへの付着に関与していることが報告されている。また、Schlesinger らは、ヒトマクロファージによる結核菌の食食において、強毒結核菌である Erdman 株 (H37Rv) の食食はマンノースで抑制されるが、弱毒結核菌 (H37Ra) の食食はマンノースで抑制されないことを観察している。抗酸菌の代表的な菌体成分であるリポアラビノマンナン (LAM) との関与については以下のように考察されている。H37Ra に存在する LAM はマンノースの骨格にアラビノースのキャップがついているが H37Rv の LAM にはこのキャップがない。従って、H37RvLAM のマンノースをマクロファージがマンノースレセプターを通じて認識し同抗酸菌を食食する系が推測され、H37Ra に対しては LAM のマンノースがアラビノースによってマスクされているためマンノースレセプターが認識できないと考えられる。以上の結果は H37Ra の食食認識がマンノースレセプターを介していないことも示唆している。らい菌の LAM については構造の詳細は報告されていないが、H37RaLAM に似た LAM ともいわれており、今回観察されたマンノースによる食食抑制には LAM が関与していない可能性が強い。

マクロファージの TNF 産生刺激物質として有名なものにはグラム陰性菌細胞壁由来 LPS があるが、LPS はマクロファージ上の CD14 に結合して TNF 産生を刺激すると報告されている。この系には、アラビノースが関与している。一方、マンナンを大量に保有するザイモザン食食においてはマンノースレセプターが関与し、マンノース共存により食食、TNF 産生とも抑制され、さらにらい菌食食、TNF

産生ともマンノースによって抑制されることから、マンノースレセプターを介した刺激による TNF 産生が強く示唆された。食食する対象表面上のマンノースの構造、それに対するレセプターのキャッピングの程度などがマクロファージの細胞内刺激伝達系に与える効果に差を生じるのかもしれない。また、食食時の TNF 産生については、他の菌体成分、例えばムラミルペプチドやコードファクター等による刺激機構も考慮しなければならない。

#### E. 結論

マウスマクロファージ上にマンノースレセプターが存在し、らい菌上のマンノースを認識して食食する機構が存在する可能性が示唆され、TNF 産生量は食食量、つまり刺激となる菌体量に依存することが判明した。

#### 研究発表 (学会発表)

福富康夫、虎谷聡、松木玄二、松岡正典：らい菌のマクロファージ内長期培養の試み (続報)、第 71 回日本ハンセン病学会、1998 年 6 月 3, 4, 5 日、宮古 (沖縄)。

松木玄二、虎谷聡、松岡正典、福富康夫：マクロファージのらい菌食食機構 -糖レセプターの関与-、第 71 回日本ハンセン病学会、1998 年 6 月 3, 4, 5 日、宮古 (沖縄)。

Y. Fukutomi, G. McCormick, J. P. Pasqua, J. L. Krahenbuhl, S. Toratani, G. Matsuki, and M. Matsuoka: Elongation of *Mycobacterium leprae* in macrophages cultured in the presence of interleukin-10. 15<sup>th</sup> International leprosy congress, Beijing, Sept. 7-12, 1998.

福富康夫、木村博昭、虎谷聡、松木玄二、小林和夫、松岡正典：らい菌食食マクロファージにおいて誘導される TNF、IL-10 産生に対する IFN $\gamma$  の相反する影響、第 28 回日本免疫学会総会、神戸、12 月 2, 3, 4 日 98 年。



## ハンセン病に対する DNA ワクチンの開発

分担研究者 野間口博子 国立感染症研究所ハンセン病研究センター

Immunostimulatory DNA Sequences (ISS) を 2 個有するベクター pACB にらい菌主要抗原 hsp65 の遺伝子を組み込み、DNA ワクチンを構築した。マウスを用いてらい菌増殖抑制効果を検討した。

### A. 研究目的

世界的視野からみてハンセン病はいまだ制圧されているわけではなく、1997 年で約 69 万人の新患発症があったという WHO による報告があり、予防ワクチンの開発が期待されている。ここではらい菌蛋白成分を発現する DNA ワクチンの構築とその効果について報告する。

### B. 研究方法

DNA ワクチン構築のためのベクターには、哺乳動物での発現系であり、Th1 型サイトカインである IFN- $\gamma$  などの誘導因子である Immunostimulatory DNA Sequences (ISS) を 2 個有するベクター pACB を用いた。らい菌蛋白成分としては、その主要抗原であり、ハンセン病に関しては有力な感染防御抗原の一つであると考えられている hsp65 を用いた。この遺伝子を先の pACB に組み込みリコンビナント DNA (pACB/hsp) を作成、DNA ワクチンとした。その効果を BALB/cA マウスで検討した。

### C. 研究結果

1. pACB/hsp による hsp65 遺伝子の発現：哺乳動物細胞 (Cos-7) での発現が

Western Blot 法により証明された。また、pACB/hsp 免疫マウスにおいて、hsp65 に対する高い血清抗体価が認められ、in vivo での発現が裏付けられた。

2. 免疫マウスの培養脾細胞にみられるサイトカイン：pACB および pACB/hsp で免疫したマウスで、特に後者において高い IFN- $\gamma$  の産生がみられたが、免疫後期ではみられなくなっていた。IL-12 でも同様であったが、この場合 hsp65 の再刺激でその産生は抑制された。しかし、hsp65 に加えて、anti-IL-10 とともに培養すると IFN- $\gamma$  および IL-12 の産生は回復した。このことは、免疫後期に、特に hsp65 の再刺激で IL-10 の産生がみられるようになることを示唆している。IL-10 価を測定したところ、確かに免疫後期で検知され、hsp65 の再刺激で高くなった。

3. らい菌感染防御に対するワクチン効果：免疫マウスにおけるらい菌の増殖は、有意に抑制されていた。しかし、vector のみでも抑制がみられ、それはより強い結果を示した。これは、hsp65 の持続投与による IL-10 の出現の影響によるものと考えられる。

### D. 考察

ワクチン投与初期におけるサイトカイン産生の動態から見て pACB、特に

pACB/hspによるワクチン効果が期待された。この実験では、らい菌感染初期に殺菌効果がみられたであろうが、DNAワクチンという手段による hsp65 の持続投与により IL-10 の誘導を招き、十分殺菌され得なかった菌が、その結果再び増殖を始めたのではないかと考えられた。らい菌抗原を Th2 型のサイトカインを誘導しないものに置きかえる必要のあることがわかった。

しかし反面、このことは殺菌にとっては充分良いとはいえないが、たとえば神経障害などに関しては障害緩和の方向に働くことが予想される。続けて検討を重ねていきたい。

#### E. 結論

ISS を有するベクターがらい菌の増殖抑制効果を示すことが示された。Hsp65 は Th1 型のサイトカインの産生に寄与するばかりではなく、Th1 型サイトカインを大量に産生する環境に至るとその産生を抑制するような働き、すなわち Th2 型のサイトカイン産生に寄与し始めるという 2 面性のあることがここからも示唆された。

#### F. 研究発表

##### 2. 学会発表

野間口博子、與儀ヤス子、松岡正典、岡村春樹. らい菌熱ショック蛋白質のワクチン効果：DNA ワクチンによる免疫. 日本細菌学会雑誌 54：219 (1999).

## 分担研究報告書

### らい菌感染と転写調節因子 NF-IL6 遺伝子の動態

分担研究者 與儀ヤス子 国立感染症・ハ病研センター 生体防御部第二研究室長

研究要旨： 2系統の免疫不全マウスの腹腔内へらい菌感染を行った結果、腹腔網内系組織で増殖することが判明した。供試した2系統の腹腔マクロファージには NF-IL6 遺伝子の発現が認められず、その脾細胞からは Th1 型と Th2 型の両極のサイトカイン産生が認められたのに関わらず、腹腔内でのらい菌増殖が可能であったことから、宿主からのらい菌の殺菌・排除に NF-IL6 を介する機構が重要な働きをしているものと推察された。

#### A. 研究目的：

核転写調節因子 NF-IL6 を介した細胞内殺菌機構の存在が田中らにより見いだされた。その NF-IL6 ノックアウトマウスの腹腔内にらい菌感染を行うと、腹腔網内系組織にらい菌の増殖を認める。野生型マウスでは感受性を示さなかったが、らい菌感染後の腹腔内マクロファージにおける NF-IL6 遺伝子発現の消失、さらに IL-18/IGIF、iNOS および M-CSF 遺伝子の発現消失が認められた。そこで、らい菌に高感受性を示す ALY マウスを供試して腹腔網内系組織でらい菌が増殖するかについて、また、らい菌感染による NF-IL6 遺伝子発現の動態について検討した。

#### B. 研究方法：

ALY(*aly/aly*, *aly/+*)マウスの腹腔内へらい菌を感染させ、14カ月後に感染の広がりを病理組織学的に検討した。また、ALY マウスの常在性、プロテオース・ペプトンおよびらい菌4日間刺激した腹腔内マクロファージを4-30時間まで LPS マイナスあるいはプラス下で培養し、NF-IL6 とサイトカイン遺伝子の発現を RT-PCR 法で検討した。培養上清中のサイトカイン産生に

ついては ELISA 法で測定した。

#### C. 研究結果：

らい菌腹腔内感染 *aly/aly* マウスでは、NF-IL6 ノックアウトマウス同様に腹腔網内系組織でのらい菌の増殖が認められた。加えて、後肢足には軽い腫脹が観察され、Fite-Faraco 染色により多くのらい菌の増殖を認めた。らい菌の増殖は、前肢足、口唇部および耳等にも及び全身感染像が確認された。ALY マウスにおける NF-IL6 遺伝子発現は、*aly/+*では、プロテオース・ペプトン刺激よりらい菌刺激により増強され、LPS 加でさらに増強されたのに対して、*aly/aly*では、プロテオース・ペプトン刺激で NF-IL6 遺伝子発現がみられたが、らい菌刺激では発現が認められなかった。LPS 加においても *aly/aly* マウスは、プロテオース・ペプトン刺激下の腹腔マクロファージでは、LPS 刺激を行わない時より増強された NF-IL6 遺伝子発現がみられたが、らい菌刺激した腹腔マクロファージに LPS 刺激を加えても NF-IL6 遺伝子発現が認められなかった。IL-12、IL-18/IGIF、iNOS および M-CSF 遺伝子の発現も認められ

ず、ALY マウス腹腔内マクロファージにおける M-CSF 遺伝子発現の動きは、NF-IL6 遺伝子発現に連動した結果が得られた。

#### D. 考察:

腹腔マクロファージの NF-IL6 遺伝子発現の動態を検討した結果、プロテオース・ペプトン刺激 *aly/aly* マウスのマクロファージには発現が認められる NF-IL6 遺伝子が、らい菌を感染させた *aly/aly* マウスでは消失していた。*aly/+* マウスでは、逆に、プロテオース・ペプトンで刺激したマクロファージよりもらい菌で刺激した腹腔マクロファージに NF-IL6 遺伝子が強く発現していたことより、*aly/aly* マウスの単核食細胞内に貪食されたらい菌は、NF-IL6 を介する細胞内殺菌機構から逃れて増殖し、加えて *aly/aly* マウスのマクロファージからは IL-12、TNF $\alpha$  および NO $_2$  の産生、脾細胞からの IFN $\gamma$  産生も認められないことから全身性感染が成立したと考えられた。一方、NF-IL6 ノックアウトマウスの腹腔マクロファージの場合、対照野生マウスに比較して低下してはいるが、LPS 刺激で増強される NO $_2$  産生能を有していた。加えて、脾細胞からは、Th1 タイプのサイトカインが産生されたにも関わらず、腹腔内に接種されたらい菌は、腹腔網内系組織の単核食細胞内および雄性生殖器の一部で増殖が可能であった。この結果は、超遅延な細胞内寄生細菌であるらい菌の増殖にはマクロファージの機能が、より重要な意味を持ち、NF-IL6 を介する殺菌機構が宿主からのらい菌排除に重要な役割を演じることが推察された。

#### E. 結論

NF-IL6 遺伝子欠損マウスおよび ALY マウ

スの腹腔内にらい菌感染を行い、下記の成果が得られた。

- 1) 免疫不全マウスの腹腔内にらい菌感染を行うと網内系組織でらい菌が増菌する。
- 2) らい菌感染させた ALY マウスの腹腔マクロファージの NF-IL6 遺伝子の発現を検討した結果、高感受性のらい菌感染 *aly/aly* には NF-IL6 遺伝子の発現が見られず、低感受性の *aly/+* には発現を認めた。Th1 型サイトカイン産生が見られたにも関わらず NF-IL6 ノックアウトマウスの腹腔網内系組織にらい菌の増殖が認められた事実も鑑み、らい菌排除に NF-IL6 を介する殺菌機構が重要な役割を演じているものと推察された。

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

與儀ヤス子、遠藤真澄、坂場智子、田中貴志、審良静男、岡村春樹、野間口博子. らい菌感染 ALY マウスにおける転写調節因子 NF-IL6 遺伝子の動態. 第72回日本ハンセン病学会、日本ハンセン病学会誌、68 巻、54、1999.

## 末梢神経炎の制御機構

遠藤 真澄（国立感染症研究所ハンセン病研究センター主任研究官）

ハンセン病性末梢神経炎発症機構を解明する上で、らい菌とシュワン細胞の相互作用を解析することは極めて重要である。今回我々はシュワン細胞株を樹立し、シュワン細胞株由来生理活性物質遺伝子発現の解析を行った。さらに、らい菌感染に伴うシュワン細胞由来神経栄養因子、炎症惹起性サイトカイン等生理活性物質の動向を追跡した。本研究で神経再生・修復に重要な役割を果たしている生理活性物質の発現調節機構を解明することにより、それらの物質による後遺症を含めたハンセン病性末梢神経炎の新しい治療や予防戦略を構築することが期待できる。

### A、研究目的

ハンセン病による末梢神経炎発症機構は、現在でもほとんど不明であり、適切な治療方法や予防方法も確立されていない。実際、化学療法によりハンセン病の原因菌であるらい菌を完全に排除してもなお末梢神経炎は完治せず、後遺症として残存する。末梢神経炎の発症は、神経組織構成細胞であるシュワン細胞にらい菌が特異的に感染し、局所的な炎症性細胞浸潤を惹起することに起因している。シュワン細胞は神経栄養因子やサイトカインなどの生理活性物質を産生し、末梢神経や組織の恒常性維持に関与している。すなわち、末梢神経炎の際、これらの生理活性物質の発現レベルが変動することから、末梢神経炎あるいは炎症後の神経組織の再生・修復にシュワン細胞は重要な役割を果たしている。しかしながら、ハンセン病性末梢神経炎におけるシュワン細胞やシュワン細胞由来生理活性物質の役割はほとんど不明である。したがって、

ハンセン病性末梢神経炎発症機構を解明する上で、らい菌とシュワン細胞の相互作用を解析することは極めて重要である。本研究は、株化した培養シュワン細胞にらい菌を感染させ、シュワン細胞由来生理活性物質の発現調節機構の動態を解析すると共に、ハンセン病患者由来の末梢神経病変部におけるこれらの生理活性物質の発現、局在と病態との関係を解析する。これまでに我々は、ラット坐骨神経由来シュワン細胞の株化・クローニングを行い、それらが神経栄養因子を産生することを細胞培養系において検討してきた。そこで今年度は、シュワン細胞株由来神経栄養因子、サイトカイン等、生理活性物質遺伝子発現の解析を行った。

### B、研究方法

定法に従いシュワン細胞株より全 RNA を分離し、RT-PCR 法にて mRNA 発現を解析した。

### C、研究結果

シュワン細胞株T93.1a, T93.1b, T93.5a1, T93.5a10, T93.5a11について、細胞株由来各種生理活性物質、並びにそれらレセプターのmRNA発現を解析した結果、ラット坐骨神経由来シュワン細胞株が産生する主たる神経栄養因子は、NGF, BDNF, NT-3, GDNF, CNTF, IGF-1であることを確認した。その他にNGFの高レセプターであるTrk A、ニューロトロフィン親和性レセプターのp75の発現、並びにgp130、NCAMの強発現を認めた。増殖が遅い細胞株であるT93.5a11は、NT-3並びにTrk Aの発現を認めなかった。またサイトカインでは、IL-1, IL-12, IL-18、およびRANTESの発現を確認した。さらに、らい菌感染に伴うこれら生理活性物質の動向を解析した

### D、考察

シュワン細胞は自身が産生する因子により、autocrine growth controlを受けることが知られている。しかしいずれのシュワン細胞株もNT-3のレセプターであるTrk Cの発現は認めないことより、シュワン細胞株T93のautocrine growth controlに関与する因子はNGFであり、T93.5a11はTrk Aの欠如により自身が産生するNGFのフィードバックを受けられないために増殖速度が遅いことが示唆された。今後は、らい菌感染に伴うシュワン細胞由来神経栄養因子、炎症惹起性サイトカイン等生理活性物質の動向を詳細に解析する。また、ハンセン病患者由来の末梢神経病変部におけるこれらの生理活性物質の発現、局在と病態

の関係を解析する。本研究により、神経再生・修復に重要な役割を果たしている生理活性物質の発現調節機構を解明することにより、それらの物質による後遺症を含めたハンセン病性末梢神経炎の新しい治療や予防戦略を構築することが期待できる。

### E、結論

- 1、ラット坐骨神経由来シュワン細胞株は、NGF, BDNF, NT-3, GDNF, CNTF, IGF-1等の神経栄養因子、またIL-1, IL-12, IL-18およびRANTESの遺伝子発現を認めた。
- 2、らい菌感染に伴うシュワン細胞由来神経栄養因子、炎症惹起性サイトカイン等生理活性物質の動向を解析した。

### F、研究発表

#### 1、論文発表

Endoh M, Kunishita T, Tabira T :No effect of anti-leprosy drugs in the prevention of Alzheimer's disease and beta-amyloid neurotoxicity. J Neurol Sci 1999 in press.

Endoh M, Hirose H, Chui De-H, Nakatani S, Kunishita T, Tabira T :Production and characterization of monoclonal antibody specific to surface antigens in septal, hippocampal, and nigral neurons from neonatal mouse. Neurochem. Res. 24 : 163, 1999.

## (分担) 研究報告書

### 新規抗菌療法の開発研究

分担研究者 儀同 政一

国立感染症研究所ハセン病研究センター  
生体防御部第4研究室長

研究要旨：抗菌剤ホスホマイシン(FOM)とRFPまたはスパルフロキサシン(SPFX)併用による抗らい菌活性増強作用をヌードマウス足蹠法とBuddemeyer法を用いて検討したところ、両法ともFOM併用による増強作用をみとめた。

ヌードマウス足蹠法を用いて、菌接種後3～5カ月の3カ月間に月1回経口投与による新規リファマイシン誘導体KRM-1648(10mg/kg)またはRFP(20mg/kg)とSPFX(20mg/kg)+B663(20mg/kg)との間欠併用療法による足蹠内らい菌の増殖の完全阻止を認めた。このことは管理投薬による確実な多剤併用療法の実施が期できる。

#### A. 研究目的

ハンセン病の多剤併用療法は、今なお数カ月から数年に及ぶこと、またらい反応や肝腎障害などの副作用の問題がある。今回、これらの諸問題に対応するため抗菌活性増強作用・抗炎症作用・副作用軽減作用を持つホスホマイシン(FOM)の単剤及びRFPまたはSPFXとの併用による抗らい菌活性増強作用をヌードマウス足蹠法とBuddemeyer法で検討した。さらに不規則治療や治療中断による薬剤耐性を防止するためKRM-1648を含む3剤間欠併用療法を検討した。

#### B. 研究方法

##### 1. FOMを含む併用療法

###### (1) Buddemeyer法による抗らい菌活性

らい菌と薬剤を混合し、炭酸ガス培養器にて4日間培養後、<sup>14</sup>C-パルミチン酸を加え、更に培養器にて7日間培養を継続する。遊離した<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>量を液体シンチレーションカウンターで測定し、FOM単

独またはFOM+RFP併用による抗らい菌活性増強作用を検討した。

###### (2) ヌードマウス足蹠法による抗らい菌活性

1群10匹のBALB/c-nu/nu(ヌード)マウスの両後肢足蹠にらい菌10<sup>7</sup>を接種した。菌接種後3～5カ月に至る3カ月間①対照群を除き、②SPFX 3mg/kg, ③RFP 3mg/kg, ④FOM 40mg/kg, ⑤SPFX 3mg/kg+FOM 40mg/kg, ⑥RFP 3mg/kg+FOM 40mg/kgを、週6回毎日ステンレスカテーテルで経口投与した。菌接種後8～11カ月の4カ月間にわたり4足蹠/2匹の1足蹠当たりの平均菌数を求めた。

##### 2. KRM-1648を含む間欠併用療法

1群10匹のBALB/c-nu/nuマウスの両後肢足蹠にらい菌10<sup>7</sup>を接種した。菌接種後60・90・120日目に①対照群を除き②KRM-1648 10mg/kg, ③

RFP 20mg/kg, ④KRM-1648 5mg/kg+SPFX 20mg/kg, B663 20mg/kg, ⑤KRM-1648 10mg/kg+SPFX 20mg/kg+B663 20mg/kg, ⑥RFP 20mg/kg+SPFX 20mg/kg+B663 20mg/kg を月1回、ステンレスカテーテルで経口投与した。菌接種後8~11カ月の4カ月間にわたり4足蹠/2匹の1足蹠当たりの平均菌数を求めた。

## C. 研究結果

### 1. FOMを含む併用療法

#### (1) Buddemeyer法による抗らい菌活性

FOM単独では、80, 20, 8, 5 $\mu$ g/mlでの抑制率は、12. 6, 6. 7, 5. 4, 1. 6%, RFP(0. 125 $\mu$ g/ml)との併用で20, 8, 5 $\mu$ g/mlでの抑制率(RFP比)は、14. 4, 7. 3, 3. 4%で、抗らい菌活性増強作用を認めた。

#### (2) ヌードマウス足蹠法による抗らい菌活性

菌接種後11カ月目では①対照群 9. 3 $\times 10^9$ , ②SPFX 3mg/kg群 3. 0 $\times 10^9$ , ③RFP 3mg/kg群 9. 0 $\times 10^7$ , ④FOM 40mg/kg群 3. 5 $\times 10^9$ , ⑤SPFX 3mg/kg+FOM 40mg/kg群 3. 6 $\times 10^8$ , ⑥RFP 3mg/kg+FOM 40mg/kg群 4. 4 $\times 10^7$ で、FOMとSPFXまたはRFPとの併用による抗らい菌活性増強作用を認めた。

### 2. KRM-1648を含む間欠併用療法

菌接種後11カ月目では①対照群 5. 4 $\times 10^9$ , ②KRM-1648 10mg/kg群 2. 9 $\times 10^7$ , ③RFP 20mg/kg群 3. 3 $\times 10^7$ , ④KRM-1648 10mg/kg+SPFX 20mg/kg+B663 20mg/kg群 8. 4 $\times 10^6$ , ⑤KRM-1648 5mg/kg+SPFX 20mg/kg+B663 20mg/kg群 2. 2 $\times 10^7$ , ⑥RFP 20mg/kg+SPFX 20mg/kg+B663 20mg/kg群 8. 9 $\times 10^6$ であり、月1回併用投与での足蹠内らい菌の増殖を完全に抑制した。

## D. 考察

(1) 近年FOMは、抗菌活性以外の薬理作用が再評価された薬剤で、活性増強作用、免疫調節作用、抗炎症作用、臓器毒性など副作用軽減作用、マクロファージ内及び組織移行性増強作用などが

報告されている。今回、FOMとRFPまたはSPFXとの併用による抗らい菌活性増強作用が確認されたことは、治療期間短縮、らい反応や臓器毒性など副作用の発生防止の観点から有意な治療法と考える。臓器毒性軽減作用については検討中。(2) 多剤併用療法は、治療期間の短縮など優れた治療実績を上げたが、経済的、身体的負担が障害となり、不規則治療や治療中断による薬剤耐性化が懸念される。今回、現在最も強力な抗らい菌薬である新規リファマイシン誘導体KRM-1648とニューキノロンSPFXを含む3剤間欠併用療法でヌードマウス足蹠内らい菌増殖を完全に抑制したことは、ハンセン病多発国の患者に管理投薬による治療が可能となり確実に臨床的治癒に導くことでハンセン病克服に貢献すると考える。

## E. 結論

1. ホスホマイシンと抗らい菌薬RFPまたはSPFXとの併用で抗らい菌活性増強作用が確認された。
2. リファマイシン誘導体であるKRM-1648 10mg/kgまたはRFP 20mg/kgとSPFX 20mg/kg+B663 20mg/kgの3剤月1回、3回間欠併用投与でヌードマウス足蹠内らい菌の増殖を完全抑制した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 儀同政一：ハンセン病薬物療法，特に多剤併用療法の改善に関する基礎的研究，平成10年度日米医学協力計画報告書(1998)。
- 2) Kobayashi, K., Kai, M., Gidoh, M., Nakata, N., Endo, M., R. P. Singh, Kasama, T. and Saito, H.: The possible role of interleukin(IL)-12 and interferon- $\gamma$ -inducing factor/IL-18 in protection against experimental Mycobacterium leprae infection in mice. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 88. 226-231(1998).



3)F. R. Soomro, V. Lailang and Gidoh, M:  
Buddemeyer system radiorespirometric assay  
for screening antileprosy drug. Journal of  
Pakistan Association of Dermatologists. 8,  
2-6(1998).

分担研究報告書

免疫増強性 DNA の研究

山本 三郎 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部

研究要旨

塩基配列特異的な免疫増強性オリゴヌクレオチドは、BCG など細菌由来 DNA での存在比率が高く、かつモチーフ中のシトシンは非メチルであるが、免疫増強能の低い、動物 DNA では、存在比率が低く、シトシンはメチル化されている。DNA ワクチン中に、免疫増強性塩基配列を含むことにより、ワクチン効果を高めることが期待されることから、これら塩基配列を含むオリゴ DNA が誘導する IFN- $\alpha$  産生細胞について検討した。まず、ヒト末梢血単核球のサブセットを磁気ビーズカラム法により単離し、免疫増強性オリゴ DNA に反応して IFN- $\alpha$  を産生する細胞を確定するため、フローサイトメトリー法で細胞表面抗原を調べた。その結果、末梢血細胞を分離したところ、CD3<sup>-</sup>CD64<sup>-</sup>CD4<sup>dim/+</sup>細胞が IFN- $\alpha$  を産生すること、特に CD3<sup>-</sup>CD64<sup>-</sup>CD4<sup>dim</sup>細胞に著しいことが示された。この細胞の表面抗原は解析の結果 CD1a<sup>-</sup>、CD3<sup>-</sup>、CD8<sup>-</sup>、CD15<sup>-</sup>、CD19<sup>-</sup>、CD56<sup>-</sup>、CD64<sup>-</sup>、CD4<sup>dim</sup>、CD11b<sup>dim</sup>、CD13<sup>dim</sup>、CD14<sup>dim</sup>、CD33<sup>dim</sup>、CDw116<sup>dim</sup> で HLA<sup>-</sup>DR<sup>+</sup>であった。同様の方法で単離した血液樹状細胞は CD3<sup>-</sup>、CD11b<sup>-</sup>、CD16<sup>-</sup>、CD4<sup>+</sup>であり、オリゴ DNA 刺激により IFN- $\alpha$  を産生した。またこれらの表面抗原は CD3<sup>-</sup>、CD64<sup>-</sup>、CD4<sup>dim</sup>であった。これらの結果から、細菌 DNA または合成オリゴ DNA 刺激に応じて IFN- $\alpha$  産生するヒト末梢血細胞中の細胞は未熟な単球/樹状細胞であることが示唆された。

A. 研究目的

これまでに BCG 由来核酸画分 MY-1 がヒト末梢血細胞単核球の IFN- $\alpha$ 、MAF 産生をもたらすこと、その活性は特定のパリンドローム配列 (5'-ACGT-3'、5'-TCGA-3') を有するオリゴヌクレオチドにあること、Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  産生にかかわる標的細胞を明らかにした。そこで本年度は、MY-1 及び合成した免疫増強性オリゴ DNA に応答して、IFN- $\alpha$  を産生する細胞群を、ヒト末梢血細胞について検討し

た。

B. 研究方法

(1) 赤十字東京西血液センターより供与されたバフィーコートから末梢血細胞を比重遠心法により単離した。

(2) 磁気ビーズと結合した細胞表面抗原に対する各種抗体と (1) で単離した末梢血単核球を反応させ、磁場にセットしたカラムを用いて抗原陽性細胞と抗原陰性細胞

に分離した。中間的な細胞群は dim とした。

(3) 分画した細胞を MY-1 あるいは合成オリゴ DNA と共に培養し、培養上清中の IFN 力価をバイオアッセイ法で測定した。細胞の表面抗原をコールター社のエピックス-エリートを用いたフローサイトメトリーで分析した。

### C. 研究結果

(1) ヒト末梢血単核球細胞中の CD3(-)CD64(-)の細胞群に IFN 産生が認められた。また、その細胞群の中 0.2%程度存在する CD4dim の細胞群が高い IFN 産生能を示した。表現型は CD1a(-) CD3(-)CD8(-)CD15(-)CD16(-) CD19(-) CD56(-) CD64(-) CD4(dim) CD11b(dim) CD13(dim) CD14(dim) CD33(dim) CDw116(dim) HLA(-)DR(+)であることが知られた。

(2) 血液樹状細胞を同様の方法で分画したところ、MY-1 及び免疫増強性合成オリゴ DNA により高い力価の IFN を産生した。これらの細胞は 2 塩基置換体である 5'-CCGG-3'を含むオリゴ DNA には反応せず、IFN を産生しなかった。

(3) 上清を抗 IFN- $\alpha$  抗体、抗 IFN- $\beta$  抗体、抗 IFN- $\gamma$  抗体で処理することにより、IFN 型を調べたところ、産生された IFN は大部分が IFN- $\alpha$  であることが認められた。

(4) ヒト末梢血細胞中において、細菌由来 DNA および 5'-ACGT-3'オリゴ DNA などの免疫増強性オリゴ DNA に反応し IFN- $\alpha$  を産生する細胞は、分化段階の未熟な単球/樹状細胞であることが示唆された。

### D. 考察

(1) ヒト末梢血細胞中の表面抗原が CP3(-) CD64(-) CD4(dim/+)の細胞が細菌 DNA や 5'-ACGT-3'モチーフの 6 塩基パリンδροームを有する免疫増強性合成オリゴ DNA 刺激により IFN- $\alpha$  を産生することが示された。

(2) CD4 (dim) と CD4(+)の分離は完全ではない。単球関連の CD マーカーが「dim」であることから、IFN- $\alpha$  産生細胞は複雑な様相を示している。さらに、顆粒球の混入や顆粒球上の CD11b, CD13, CD33 抗原は抗体を用いた細胞分離を困難にしている。

(3) 磁気ビーズ法による細胞分離は操作そのものが、抗原陽性細胞の機能に影響を与える可能性を否定できない。

(4) ウィルスやウィルス感染細胞の刺激による IFN- $\alpha$  を産生する細胞はこれまでの研究から、単球、樹状細胞、NIPC(natural IFN- $\alpha$  producing cells)がある。一方、株化した細胞では、免疫増強性オリゴ DNA 刺激による IFN- $\alpha$  産生は認められなかった。ポリ I:C はこれら細胞株に IFN- $\alpha$  産生誘導をもたらすことが知られており、これらの事実はオリゴ DNA が末梢血細胞に作用して IFN- $\alpha$  産生をもたらすメカニズムはポリ I:C やウィルスが株化細胞に作用するとは異なるかも知れない。

### E. 結論

BCG 由来核酸画分である MY-1 に代表される細菌 DNA や 5'-ACGT-3'または 5'-CG-3'モチーフをもった免疫増強性オリゴ DNA が刺激して IFN- $\alpha$  を産生誘導するヒト末梢血細胞中は未熟な単球/樹状細胞であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tohru Tokunaga, Toshiko Yamamoto and Saburo Yamamoto: How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn. J. Infectious Diseases* (in press).

橋本達一郎、山本三郎: ワクチン開発の現状と問題点 BCG ワクチン。治療学 32(12)、25 - 29(1998)

2. 学会発表

Saburo Yamamoto, Toshiko Yamamoto, Ryo Takagi, Masayoshi Inoue, Yoshiharu Takahashi, Maiko Kamachi and Hiroto Hara: Immunostimulatory activity of oligodeoxyribonucleotides. The 33rd Research Conference on Tuberculosis and Leprosy. US-Japan Cooperative Medical Science Program July 1998, Osaka.

Saburo Yamamoto: DNA as Immunostimulatory Agents. Symposium on Immunology of Tuberculosis Pathogenesis and Vaccine Development. US-Japan Cooperative Medical Science Program July 1998, Osaka.

Saburo Yamamoto, Eriko Shigeto, Shinji Haga and Hironobu Tasaka: Cellular Immune Responses to MPB64 Antigen of Tuberculosis Patients and of Mice Immunized with BCG. Global Congress on Lung Health and the 29th World Conference of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease

November 1998, Bangkok, Thailand.

山本十糸子、種市麻衣子、蒲地一成、徳永徹、山本三郎: 細菌由来 DNA および合成 DNA に応答してインターフェロン $\alpha$ を産生する細胞に関する研究。第 71 回日本細菌学会総会 1998 年 4 月、松本市。

山本三郎、山本十糸子、種市麻衣子、蒲地一成、徳永徹: 細菌 DNA および合成 DNA の NK 細胞活性と抗腫瘍活性。第 71 回日本細菌学会総会 1998 年 4 月、松本市。

山本三郎、山本十糸子、種市麻衣子、芳賀伸治、重藤えり子、田坂博信: 結核患者におけるツベルクリン蛋白質抗原 MPB64 に対する細胞性免疫応答。第 73 回日本結核病学会総会 1998 年 4 月、新潟市。

山本十糸子、梅森清子、山本三郎: 細菌由来 DNA および 5'-ACGA-3'オリゴ DNA 刺激による免疫増強反応。第 80 回日本細菌学会関東支部総会 1998 年 11 月、東京都。

山本三郎、山本十糸子: 免疫増強性オリゴ DNA の免疫アジュバント活性。1998 年 12 月、神戸市。

山本十糸子、伊保澄子、徳永徹、山本三郎: 直接的かつ宿主介在性抗 HIV 作用を兼ね備えた非アンチセンスオリゴヌクレオチド抗エイズ薬の開発研究。第 28 回日本免疫学会・学術集会 1998 年 12 月、神戸市。

伊保澄子、山本十糸子、山本三郎: ヒト NK 及び T 細胞に対し IFN $\cdot$  $\gamma$  産生誘導活性を