

示す細菌 DNA の塩基配列。第 28 回日本免疫学会・学術集会 1998 年 12 月、神戸市。

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。第 72 回日本細菌学会総会 1999 年 3 月、東京都。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

ハンセン病や実験的らい菌感染マウスモデルにおける病理形態学的解析

分担研究者 矢島幹久

国立療養所 多磨全生園 研究検査科長

研究要旨

ハンセン病と実験的らい菌感染マウスモデルを病理形態学的に比較解析し、ヒトにおけるらい菌感染の多様な表現型であるハンセン病が遺伝的感染抵抗性や感受性マウスを用いた実験的らい菌モデルに表現でき、実験的らい菌モデルがハンセン病の病変形成機序の理解に有用であることを示した。

A. 研究目的

抗酸菌感染における宿主防御や肉芽腫炎症は、菌および宿主側両因子が関与する宿主-寄生体関係を介して成立し、抗酸菌と宿主の壮絶な生存戦争を反映している。ハンセン病における宿主防御の組織病変表現型としてマクロファージやマクロファージ由来細胞（類上皮細胞、泡沫細胞、多核巨細胞）が局所的に集積した肉芽腫炎症が特徴的である。しかし、実験的らい菌感染モデルにおける組織病変の詳細な解析はほとんど報告されていない。ヒトにおけるらい菌感染の多様な表現型であるハンセン病と実験的らい菌感染マウスモデルを比較解析することにより、ハンセン病の実験モデルとしての妥当性を検索した。

B. 研究方法

患者（生検や剖検）から得た組織および実験的抗酸菌感染純系マウスモデルから得た組織を用いた。病理組織切片をhematoxylin-eosin染色、抗酸菌染色（Ziehl-Neelsen染色やFite染色）、さらに、らい菌特異的フェノール糖脂質抗原染色から解析した。

C. 研究結果

らい腫型ハンセン病は病変部で多菌性を示し、泡沫マクロファージ細胞の広範な浸

潤を特徴とした肉芽腫炎症病変を認めた。この病変やらい菌増殖は遺伝的らい菌感染感受性マウスを用いた実験モデルで観察することができた。類結核型ハンセン病は病変部で少菌性を示し、類上皮マクロファージ細胞の局所的な浸潤を特徴とした肉芽腫炎症病変を認めた。他方、らい菌感染抵抗性マウス用いた実験モデルでは少菌性であったが、炎症細胞浸潤や肉芽腫炎症病変をほとんど認めなかった。

D. 考察

らい菌などの細胞内寄生性病原体感染に対抗する宿主防御の第一線の動員細胞はマクロファージであることが判明した。感染感受性宿主（ハンセン病や感受性マウス）では泡沫マクロファージ細胞の広範な浸潤を特徴とした肉芽腫炎症病変を認めたが、この組織反応は感染したらい菌を処理・排除するために多数のマクロファージを感染局所に動員する必要性を示唆している。

類結核型ハンセン病の組織病変はらい菌感染抵抗性マウスを用いた実験モデルと対照的であった。この事実はらい菌感染における発病は感染者の0.5%以下であることに起因している可能性がある。抗酸菌感染において、無発症/無症候性に経過する例から激症/播種性に経過する例まで種々あり、抗酸菌感染という単一現象における宿

主の表現型は多様である。すなわち、感染抵抗性マウスは細胞を動員することなく、らい菌感染を局所に常在するマクロファージによって、処理・排除が充分可能であり、したがって、生体防御反応として肉芽腫炎症などの局所病変を形成する必要性がないと考えられる。類結核型ハンセン病はらい菌感染により、少菌型ではあるが、発症し、真の抵抗性ではないことが示唆される。すなわち、真の抵抗性ヒト宿主は無発症/無症候性に経過する例であり、実験モデルにおける遺伝的抵抗性マウスである。

E. 結論

ハンセン病と実験的らい菌感染マウスモデルを病理形態学的に比較解析し、ヒトにおけるらい菌感染の多様な表現型であるハンセン病が遺伝的感染抵抗性や感受性マウスを用いた実験的らい菌モデルに表現でき、実験的らい菌モデルがハンセン病の病変形成機序の理解に有用であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

矢島幹久、成田 稔、山田宣孝、浅野伍朗。1998. 剖検にて高頻度にらい菌 (*Mycobacterium leprae*) を確認し得たハンセン病 (極性らい腫型) に1例. 日本医科大学雑誌 65: 47-50.

2. 学会発表

矢島幹久、成田 稔、川津邦雄、山田宣孝、浅野伍朗。1998. ハンセン病 (LL) 長期療養中に腎透析となり、剖検にて全身性アミロイドーシスを認めた一例. 日本ハンセン病誌、67: 51、1998. 第71回日本ハンセン病学会総会 (平良、6月)。

山田宣孝、相田成隆、石渡俊行、矢島幹久、浅野伍朗。1998. 日本医大第一病院病理部総括: 8年間のデータ集計. 第66回日本医科大学学会 (東京、9月)。

高橋順子、出倉善四郎、古田 学、鈴木

慶治、堀口日出子、矢島幹久。ハンセン病などによる末梢神経障害を検索するための特殊染色方法の考案 (特別優秀賞受賞)。第26回厚臨協関信支部学会 (東京、9月)。

高橋順子、出倉善四郎、古田 学、鈴木慶治、堀口日出子、矢島幹久。メセナミン銀およびアニリン・フクシンを用いた髄鞘・軸索重染色の新しい試み (特に末梢神経を中心として)。第53回国立病院療養所総合医学会 (金沢、10月)。

分担研究報告書

抗酸菌感染防御における好中球の役割

分担研究者 笠原慶太
昭和大学医学部第1内科学講師

研究要旨

抗酸菌感染では初期に好中球浸潤、その後、単核細胞浸潤、肉芽腫形成に進展し、活性化マクロファージは抗菌活性を獲得する。抗酸菌感染における好中球応答、特にケモカイン（走化性サイトカイン）発現パターンやアポトーシス、を解析した。ツベルクリン蛋白や結核菌で刺激した好中球はケモカイン（IL-8やMIP-1 α ）を発現した。結核菌と腫瘍壊死因子（TNF）- α の共存刺激は好中球アポトーシスを惹起した。初期に集積した好中球はケモカインを産生し、好中球や単核細胞を走化/集積させるが、感染局所の結核菌とTNF- α は好中球アポトーシスを誘導し、その結果、好中球は消失し、単核細胞浸潤優位な肉芽腫炎症が成立すると想定される。

A. 研究目的

炎症細胞浸潤に炎症制御分子であるケモカインが白血球の走化/遊走に関与している。CXCケモカイン（interleukin 8 : IL-8など）は主として好中球、CCケモカイン（macrophage inflammatory protein 1 α ; MIP-1 α 、monocyte chemoattractant protein 1; MCP-1など）は主として単核細胞の走化/遊走に関与している。好中球は通常、炎症部位において最も早期に浸潤する細胞である。その後、急性炎症（一般細菌感染症）では持続的に好中球優位な細胞浸潤が、慢性炎症（抗酸菌感染症）では単核細胞優位な細胞浸潤が構築される。抗酸菌感染においても初期（感染後72時間以内）には好中球優位な細胞浸潤を認めるが、その後、マクロファージを中心とする単核細胞浸潤、肉芽腫形成に進展し、肉芽腫炎症部位の活性化マクロファージは抗菌活性を獲得し、抗酸菌感染を制圧する。この過程で好中球の役割はほとんど知られていない。分担研究者は抗酸菌感染の初期防御や炎症細胞浸潤機構の解明を目的として、抗酸菌感染における好中球応答を解析した。

B. 研究方法

ツベルクリン（purified protein derivative: PPD）皮内反応陽性健康ヒト末梢血好中球（ 5×10^6 /ml）を大腸菌由来lipopolysaccharide（LPS）、PPDや加熱死菌結核菌H37Rvなどで刺激し、ケモカイン発現（IL-8、MIP-1 α 、MCP-1）の遺伝子発現：Northern blot analysisおよび蛋白産生：Enzyme immunoassayを解析した。また、形態学的に好中球の生存（trypan blue dye exclusion）やアポトーシス（核のクロマチン濃縮や分断化）を観察した。

C. 研究結果

LPS、PPD、或いは、結核菌で刺激した末梢血好中球は用量依存的（0.001-100 μ m/ml）にIL-8やMIP-1 α 遺伝子および蛋白を発現したが、MCP-1発現は誘導しなかった。ケモカイン蛋白や遺伝子発現はLPS>結核菌 \geq PPDであった。なお、無刺激好中球はケモカイン発現をほとんど示さなかった。末梢血好中球由来ケモカイン発現の刺激時間経過はIL-8では4時間後から、MIP-1 α では8時間後から観察され、

24時間後まで持続した。すなわち、結核感染部位における好中球由来ケモカインは好中球や単核細胞浸潤に役割を演じていることが想定されるが、感染初期の好中球浸潤から、その後生じる単核細胞浸潤への移行をケモカイン発現パターンから説明することはできなかった。

結核菌や炎症性サイトカインは好中球など炎症性細胞のアポト-シスを惹起することが知られている。代表的な炎症性サイトカインであるtumor necrosis factor α (TNF- α)は結核病巣に多量に認められ、かつ、肉芽腫炎症惹起物質である。好中球を結核菌とTNF- α で共存刺激したところ、生存好中球は2-4時間後に激減し、さらに、形態学的に核のクロマチン濃縮や分断化が認められ、アポト-シスが示唆された。これらの成績は結核感染病巣における好中球の役割や単核細胞浸潤を中心とした肉芽腫炎症成立機序の理解と制御に寄与する。

D. 考察

抗酸菌感染初期に集積した好中球はケモカインを産生し、炎症性(好中球や単球/マクロファージ)や免疫担当細胞(T細胞など)を走化させ、さらに、活性化するが、この過程で結核菌とTNF- α が存在するため、好中球の急速な細胞死(アポト-シス)を誘導し、好中球は病変部から消失し、単核細胞浸潤を主とした肉芽腫炎症が成立することが考えられる。他方、急性炎症惹起物質であるLPSは好中球アポト-シスを抑制し、好中球優位な炎症応答を持続させることが考えられる。

結核菌感染初期における好中球の役割は1) 貪食、隔絶することにより、結核菌の播種を防止、2) 貪食した結核菌を処理し易いように改変、3) 単球/マクロファ-

ジがアポト-シスした好中球を貪食し、活性化し、抗菌活性が亢進するなど考えられる。従来、抗酸菌感染における宿主防御機序はマクロファージ-サイトカイン-Th1細胞連関、すなわち、細胞性免疫を中心に解析されてきた。しかし、多くの抗酸菌の侵入門戸である気道および気道上皮、好中球や肺胞マクロファージと抗酸菌の相互関係を非特異的防御の視点から解析し、最も早期に生ずる事象を理解することは、引き続き生ずる細胞性免疫など特異的防御の理解や応用に重大なヒントを提供するであろう。

E. 結論

抗酸菌感染症の初期における病変形成や宿主防御に好中球や好中球由来ケモカインが重大な役割を演じている。感染初期の細胞やサイトカイン動態はその後生ずる肉芽腫病変形成や防御に関与していることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

鹿間裕介、奥田健太郎、広沢陽一郎、小沢哲二、広瀬 敬、大西 司、堀地直也、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

炎症制御とサイトカイン免疫強化療法の安全性・毒性評価

分担研究者 笠間 毅
昭和大学医学部第1内科学講師

研究要旨

抗酸菌感染では初期に好中球浸潤、その後、単核細胞浸潤、肉芽腫形成に進展し、活性化マクロファージは抗菌活性を獲得する。抗酸菌感染防御に必須の役割を演じているinterleukin (IL) 12が治療用量において関節炎惹起能を有していた。サイトカイン免疫強化療法を開発する上で、血液、肝、筋障害とともに、安全性や毒性の観点から十分な配慮が望まれる。今後、サイトカインの投与量、時期や経路を工夫し、抗酸菌感染症に対する安全な免疫療法を確立したい。

A. 研究目的

抗酸菌感染では初期に好中球浸潤、その後、単核細胞浸潤、肉芽腫形成に進展し、活性化マクロファージは抗菌活性を獲得する。抗酸菌感染症において後遺症の少ない治癒を指向する上で、炎症病変過程は修復、組織破壊/傷害の理解に極めて重要である。しかし、感染防御と炎症病変形成は表裏一体の関係にある。実験的抗酸菌感染症におけるサイトカイン(interleukin 12: IL-12)療法は細胞性免疫を活性化し、その結果、防御を増強させたが、他方、肉芽腫炎症も増強させることが判明した。そこで、分担研究者は炎症制御機序とサイトカイン免疫強化療法の安全性・毒性評価を解析した。

B. 研究方法

ニワトリ由来II型コラーゲン/完全 Freundアジュバントで雄DBA/1Jマウスを免疫することにより、関節炎を誘導した。このモデルに細胞性免疫強化性サイトカイン(IL-12)を投与し、関節炎発症の制御および修飾を経時的に形態学、サイトカイン発現から解析した。

C. 研究結果

IL-12の大量投与(20 µg/kg/日、10日

間)により、関節炎の発症(罹患率および重症度)は抑制されたが、少量投与(0.2 µg/kg/日、10日間)により促進された。したがって、IL-12投与は実験的関節炎の発症を二相性に制御した。この機序を明らかにするため、抗II型コラーゲン抗体、リンパ球増殖反応、interferon (IFN)-γ、血清コルチコステロン、tumor necrosis factor (TNF)-α、IL-10などを測定した。IL-12の大量投与により、血清抗II型コラーゲン抗体価およびリンパ球増殖反応は減少したが、interferon (IFN)-γや血清コルチコステロンは増加した。コラーゲン誘導関節炎の調節因子であるTNF-αやIL-10は少量投与では炎症惹起性TNF-αが増加し、大量投与では炎症抑制性IL-10が増加していた。さらに、マウスを抗TNF-α抗体で処理することにより、関節炎の発症を抑制でき、病理形態学的にも、炎症や組織破壊/傷害は軽微であった。逆に、抗IL-10抗体で処理することにより、関節炎の発症を増強させ、広範な炎症と組織破壊/傷害を惹起した。

D. 考察

抗酸菌性肉芽腫炎症と関節炎は慢性経

過、単核細胞浸潤、細胞性免疫応答や組織破壊/傷害などの類似点が多い。また、ヒト慢性関節リウマチの病変局所から分離したT細胞が結核菌由来ツベルクリン蛋白や熱ショック蛋白に反応し、両疾患が病因および病態学的に類似していることが想定される。

本報告において、抗酸菌感染防御に必須の役割を演じているIL-12が治療用量(0.2-10 µg/kg/日)において関節炎惹起能を有し、サイトカイン免疫強化療法を開発する上で、血液、肝、筋障害とともに、安全性や毒性の観点から十分な配慮が望まれる。相互連関を形成している内因性生理活性物質群(サイトカイン、免疫グロブリン、副腎皮質ステロイド)は生体における炎症の発症・制御・修復の過程で関与している。抗酸菌感染防御と炎症病変成立を考慮した場合、最大限の防御と最小限の炎症が最も効率的である。防御と炎症の制御機構を理解することは免疫強化療法の開発に鍵となるであろう。

E. 結論

薬剤耐性抗酸菌感染症にサイトカイン免疫強化療法は有望であるが、治療用量において、関節炎の発症を促進した。サイトカイン免疫強化療法を開発する上で、安全性や毒性についても配慮する必要がある。今後、サイトカインの投与量、時期や経路を工夫し、抗酸菌感染症に対する安全な免疫療法を確立したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

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- γ -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 α . 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 α . Arthritis Rheum. 42: 100-109.

Iwabuchi, H., T. Kasama, R. Hanaoka, Y. Miwa, Y. Hatano, K. Kobayashi, Y. Mori, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 1999. Downregulation of intercellular adhesion molecule-1 expression on human synovial fibroblasts by endothelin-1. J. Rheumatol. 26: 522-531.

2. 学会発表

岩渕英章、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-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).