

9. 特発性造血障害におけるウイルス感染の関与

分担研究者 倉田 毅
国立感染症研究所感染病理部

共同研究者 岩崎琢也・佐多徹太郎・佐藤由子
片野晴隆・旭 康子・谷口貴代美
国立感染症研究所感染病理部

I. 研究目的

骨髄の造血機能の障害に由来する特発性造血障害ならびに特発性血小板減少症の発症に関与するウイルスの有無について解析することが本研究の目的である。骨髄造血幹細胞のうち、赤芽球系にはヒトパルボウイルス B19 (B19)が骨髄・巨核球系にはヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒトヘルペスウイルス 6(HHV6)が、リンパ系には HTLV/ATL、HIV、麻疹ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス (VZV)、EB ウイルス、HCMV、HHV6、ヒトヘルペスウイルス 7 (HHV7)、ヒトヘルペスウイルス 8 (HHV8)等が、さらには骨髄間質細胞に HCMV が感染することが、培養細胞系ならびに人体例での解析により明らかにされてきた。しかしながら、これらのウイルスを含め、骨髄疾患に先行あるいは関与するウイルスの同定は、骨髄という解析の困難な臓器、あるいは血液細胞の比較的長い寿命から、十分には解析されていない。

本研究では prospective に特発性造血障害の①再生不良性貧血、②溶血性貧血の aplastic crisis、③不応性貧血、④骨髄線維症ならびに血液凝固異常症の特発性血小板減少性紫斑病等の発症にウイルスが関与しているかどうかを、臨床検体の解析により明らかにする。具体的には、新規の症例の初発時ならびに経時的に採取された骨髄生検組織・穿刺液ならびに末梢血より核酸を抽出し、病変に特異に発現する転写産物あるいは存在する DNA を解析し、これらにウイルス感染に関与する産物があるかどうかを検索する。さらに、retrospective study を、採取されている上記の疾患患者について解析する。具体的には、すでに採取された骨髄組織について、抗ウイルス抗体を用いた免疫組織学的解析、ウイルスゲノムに対する in situ ハイブリダイゼーション、パラフィン包埋組織から抽出した核酸での PCR 解析を行い、臨床症状の推移との相関を含め総合的に解析する。

本研究は初年度の平成 8 年度には骨髄に感染することが明らかとなっている B19 ウイルスの病理診断のための抗体作製を行うとともに、作製した抗体を利用した免疫組織化学による診断法を確立した。次年度の平成 9 年度にはこの方法を用いて、2 例の骨髄生検組織に B19 感染を同定した。1 例は自己免疫性溶血性貧血の aplastic crisis 例であったが、残りの 1 例は基礎疾患を認めない症例で、再生不良性貧血の診断基準を満たした例であった。また、HHV6 の診断系の開発も行い、再生不良性貧血の 1 例の骨髄に HHV6 のウイルスゲノムを検出したが、ウイルス転写産物は検出されず、その臨床的意義については検討の余地を残した。最終年度である今年度は retrospective study を中心に検討し、さらに HHV8 の血清診断とゲノム検出を行った。

II. 研究成果

1. 研究方法

臨床検体の収集：特発性造血障害の厚生省研究班（班長：東京女子医科大学医学部血液内科溝口教授）の班員に文書をもって、当該疾患の骨髄ならびに血液標本を依頼し、送付をうけた、また臨床医・病理医よりも依頼をうけた検体を解析対象とした。その結果、再生不良性貧血（11 例）、pure red cell aplasia（5 例）、myelo-dysplastic syndrome (MDS)（45 例）、溶血性貧血（1 例）等の特発性骨髄障害ならびに特発性血小板減少性紫斑病（1 例）の症例の骨髄組織を入手することができた。

核酸の抽出：prospective study では初発時あるいは経時的に採取された骨髄組織あるいは末梢血からは有核あるいは単核細胞を分離し、DNA ならびに RNA を抽出した。具体的には DNA はドデシル硫酸ナトリウムと蛋白分解酵素 Proteinase K を含む溶液中で細胞を溶解し、フェノールを用いた脱蛋白により精製した。RNA は

Guanidium isothiocyanate とフェノールを含む溶液で細胞を溶解し、クロロフォルムにより有機溶媒層を取り除き、エタノール沈殿を経て精製した。

PCR あるいは RT-PCR による解析：ウイルスゲノムあるいはその転写産物を PCR ないし RT-PCR 法を用いて検索した。

免疫組織化学：解析に使用した抗体は 1 昨年度報告した B19 ウイルスの非構造ならびに構造蛋白に対する抗体、HCMV の前初期遺伝子蛋白 IE1・IE ならびにウイルス粒子蛋白を認識する抗体、HHV6 P101 蛋白を認識する抗体を用いた。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を脱パラフィン後、親水化し、内因性 peroxidase 活性を methanol/H₂O₂ で失活させた。その後、抗血清と反応させ、PBS 洗浄後 biotin 標識抗ウサギ血清、さらに洗浄後 peroxidase 標識ストレプトアビジンと反応させ、diaminobenzidine を基質とし発色した。

in situ ハイブリダイゼーション：プラスミドに分子クローンされた B19 のウイルスゲノムをベクター DNA よりクローニング部位で切断し、B19 ウイルスゲノムの塩基配列の断片を、1% アガロース電気泳動により、切り出し、アガロースゲルより抽出精製した。この操作をもう一度繰り返し、精製 DNA 断片をランダムプライム法によりピオチン標識した。パラフィン切片は脱パラフィン後、0.2N 塩酸・ProteinaseK 処理後、paraホルムアルデヒドで再固定後、グリシンでブロッキングした。ハイブリダイゼーションならびに洗浄は Tm-20 度の条件で行い、alkaline phosphatase 標識ストレプトアビジンを用いた検出を行い、NBT/BCIP を基質として発色した。

2. 研究結果

B19 ウイルス感染：現在までに B19 ウイルス感染 7 例を同定した (表 1)。これらの 7 例のうち 6 例には基礎疾患が認められた。

基礎疾患のみられなかった第 1 例は B19 ウイルス感染に特徴的な核内封入体を有した赤芽球も認められず、また、B19 ウイルス感染に特徴的に出現する giant proerythroblast も認められなかった。全例で、ウイルス粒子を構成する蛋白を認識する抗体ならびに低分子量の非構造蛋白を認識する抗体を用いた免疫組織化学とウイルスゲノムを検出する in situ ハイブリダイゼーションによりウイルス感染が確認された。

第 1 例においては血小板減少に由来する臨床症状も生じ、赤芽球系以外の造血系細胞の障害が生じ、かつ 3 ヶ月以上の pancytopenia が認められた。

表 1 B19 ウイルス感染による骨髄抑制

症例	年齢	基礎疾患	光顕 核内封入体	ウイルス 抗原・ ゲノム
1	14	不明	—	+
2	16	自己免疫性 溶血性貧血	+	+
3	42	心臓手術	+	+
4	48	腎移植	+	+
5	50	赤芽球癆	+	+
6		婦人科手術	+	+
7		自己免疫性 溶血性貧血	+	+

CMV 感染：末梢血もしくは骨髄の単核細胞分画が得られた症例において CMV のウイルスゲノムを nested PCR 法により検索したが、全例陰性であった。

HHV6 感染：末梢血もしくは骨髄の単核細胞分画が得られた症例において PCR を用いて HHV6 のウイルスゲノムを検索したところ、再生不良性貧血と診断された例の骨髄の単核細胞分画から抽出した 1 例が陽性であった。この例において、RNA を抽出し、HHV6 の転写産物の解析を試みたが、現在までに前初期遺伝子産物ならびに後期遺伝子産物をコードする RNA は検出できていない。

HHV8 感染：大腸菌に HHV8 の種々の ORF を GST 融合蛋白として発現させ、この発現蛋白を抗原として使用した ELISA による抗 HHV8 抗体の検出を行ってきた。血清もしくは血漿が入手できた再生不良性貧血 3 例、pure red cell aplasia 3 例、MDS 1 例は陰性であった。なお、比較においた Castleman 症候群の 8 例中 2 例は陽性となった。PCR を用いたウイルスゲノムの検索では PRCA の 1 例と MDS の 3 例に HHV8 のウイルスゲノムが検出されたが、これらの例においても抗体は検出されていない。

3. 考察

骨髄のウイルス感染に関する知見は乏しく、多くの場合見落とされるあるいは無視されることが多い。この中で、B19 ウイルスは基礎疾患に先天性球状赤血球症などの溶血性貧血を有している患者に感染した場合、重篤な貧血症状をもたらすことが知られている。これまでの 3 年間の間にこの研究の対象となった症例の基礎疾患は表 1 に示したように、既存に赤血球系

の造血障害がみられた3例と、腎移植が行われた免疫抑制宿主の1例、心臓手術ならびに婦人科手術のような多量の輸血あるいは血液製剤が使用された可能性がある2例、そして、基礎疾患は満たされずに再生不良性貧血の診断基準を満たし、かつ慢性の経過を示した1例であった。この1例は他の6例と異なり、典型的な核内封入体の形成あるいは **giant proerythroblast** の出現もみられず、補助的手段によってのみ病理診断することが可能であった。

この例の存在は骨髄に感染するウイルスが再生不良性貧血の臨床症状を表す可能性も示している。

HHV6B の1例は昨年度発見した症例であるが、その後の検索でも骨髄細胞にウイルスの何らかの転写産物を認めることはできず、その臨床症状とウイルスゲノムの存在の相関性は明らかにすることができなかつた。**HHV6** が *in vitro* での骨髄培養系の感染実験において、コロニー形成を抑制することが報告され、臨床的には **HHV6B** の初感染である突発性発疹においては一過性の血小板減少がみられることより、さらに検討する必要がある。

HHV8 の存在はこの数年次々に明らかにされ、骨髄組織の感染が問題とされている。血清中の抗体検出系が **Kaposi** 肉腫の症例においては非常に信頼できることがすでに確認されているが、他の疾患では **Castleman** 症候群においてのみ有意の結果が得られている。この点も引き続き検討する。

4. 結論

基礎疾患のない再生不良性貧血あるいは特発性血小板減少性紫斑病の原因として **B19** ウイルス感染を否定する必要がある。また、**HHV6** は *in vitro* において骨髄系細胞の増殖を抑制するが、**HHV6** のウイルスゲノムが再生不良性貧血の骨髄組織中に検出された例では単なる **passenger** である可能性も否定ない状態である。**CMV** 感染ならびに **HHV8** 感染の関与が確実な例は現在まで認められていない。

III. 研究発表

1. 論文発表

Yoshikawa T, Suzuki K, Ihira M, Furukawa H, Suga S, Iwasaki T, Kurata T, Asonuma K, Tanaka K, Asano Y: Human herpesvirus 6 latently infects mononuclear cells but not liver tissue. *J Clin Pathol* 52: 65-67, 1999

Narita M, Ando Y, Soushi S, Kurata T & Arai Y: The *Bgl*II-N fragment of herpes simplex virus type 2 contains a region responsible for resistance

to antiviral effects of interferon. *J Gen Virol* (in press)

Hashimoto Y, Katayama H, Kiyokawa E, Ota S, Kurata T, Gotoh N, Otsuka N, Shibata M and Matsuda M: Phosphorylation of CrkII adaptor protein at tyrosine 221 by epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 273: 17186-17191, 1998

Kiyokawa E, Hashimoto Y, Kurata T, Sugimura H, Matsuda M: Evidence that DOCK180 up-regulates signals from the CrkII-p130^{Cas} complex. *J Biol Chem* 273: 24479-24484, 1998.

Ogawa-Goto K, Arai Y, Ito Y, Ogawa T, Abe T, Kurata T, Irie S, Akanuma H: Binding of human cytomegalovirus to sulfated glucuronyl glycosphingolipids and their inhibitory effects on the infection. *J Gen Virol* 79: 2533-2541, 1998.

Kiyokawa E, Hashimoto Y, Kobayashi S, Sugimura H, Kurata T, Matsuda M: Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Develop* 12: 3331-3336, 1998

Takasaka N, Tajima M, Okinaga K, Satoh Y, Hoshikawa Y, Katsumoto T, Kurata T, Sairenji T: Productive infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-genome positive epithelial cell lines (GT38 and GT39) derived from gastric tissues. *Virology* 247: 152-159, 1998.

Yamauchi Y, Tachibana Y, Maeda A, Wakiguchi H, Usui M, Kurata T, Sairenji T: Evaluation of antibodies to the Epstein-Barr virus immediate early gene product ZEBRA by a new enzyme-linked immunosorbent assay. *Intervirology* (in press)

Satoh T, Hoshikawa Y, Satoh Y, Kurata T, Sairenji T: The interaction of mitogen-activated protein kinases to Epstein-Barr virus activation in Akata cells. *Virus Genes* 18:57-64, 1998.

Satoh Y, Takasaka N, Hoshikawa Y, Osaki M, Ohfuji S, Ito H, Kaibara N, Kurata T, Sairenji T: Pretreatment with restriction enzyme or bovine serum albumin for effective PCR amplification of Epstein-Barr virus DNA in DNA extracted from paraffin-embedded gastric carcinoma tissue. *J Clin Microbiol* (in press)

10. ウイルス感染による慢性肺気腫急性増悪の解明

分担研究者 山谷 睦雄 (東北大・老人科)

(はじめに)

気管支喘息や慢性気管支炎はウイルス感染が引き金になって急性増悪し、呼吸不全をきたすことが多い。ライノウイルス、インフルエンザウイルス、RSウイルスなどが同定され、二次性の細菌感染が更に症状を悪化させる¹⁾。ウイルス感染は気道上皮の剥離脱落や気道壁の浮腫を介して気道内腔を狭窄すると言われている。また、炎症性サイトカイン、ヒスタミンやキニンが気道炎症や気管支平滑筋収縮を生じて気流障害を促すと考えられている。慢性肺気腫も感冒を機会に急性増悪すると知られているが、起因ウイルスの同定や病態の把握はこれまでなされていない。ライノウイルスは感冒の主体をなすと報告されている。これまで major group ライノウイルスが ICAM-1 を受容体に介して気道上皮に感染すると知られてきたが、minor group ライノウイルスの気道上皮細胞への感染受容体は調べられていない。本年度は 1)慢性肺気腫の急性増悪をきたす起因ウイルスの同定と急性増悪の際の病態、および 2)minor group 2 型ライノウイルスの感染受容体の確認および感染気道上皮の炎症性サイトカイン、受容体発現につき研究を行った。また、3 年間のまとめを考察で総括した。

(方法)

①当科通院中の慢性肺気腫患者 20 人を対象に気道感染症状に随伴した急性増悪時に咽頭ぬぐい液を採取した。Numazaki らの方法によって、咽頭ぬぐい液を感受性のある細胞に摂取してウイルスを増殖し、免疫学的手法により同定した²⁾。患者の肺機能を検討するため、動脈血血液ガス分析とピークフロー値を測定した。ピークフロー値はピークフローメーター(Personal Best)で測定した。ウイルス感染による気道炎症を検討するため、呼気一酸化炭素濃度を測定した³⁾。

呼気一酸化炭素(CO)濃度は CO 測定器(portable Bedfont EC analyzer)で測定した。急性増悪時の血中因子の変化を検討するため、血中 IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、および可溶性 ICAM-1 を測定した。②剖検気管上皮細胞を滅菌試験管に培養し、2 型ライノウイルス 10^4 TCID₅₀/ml を 60 分間感染させた⁴⁾。1, 3 および 5 日後に培養液を回収し、新しい培養液と交換した。培養液の 2 型ライノウイルス量を線維芽細胞に対する細胞変性効果を用いて測定した。培養液の IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 濃度を ELISA 法で測定した。2 型ライノウイルスの感染受容体を確認するため、抗 LDL 受容体抗体(50 μ g/ml) を気管上皮細胞に前処置後 2 型ライノウイルスを感染させて、培養液ライノウイルス量、IL-1 β および IL-6 量を比較した。2 型ライノウイルス感染による気管上皮細胞の LDL 受容体発現量変化を検討するため、気管上皮細胞の RNA 抽出を時間経過で行った。

(結果)

①慢性肺気腫 20 例中 8 例において気道感染症状に随伴した急性増悪を生じた。8 例中 2 例で A 型インフルエンザウイルスを同定した。また、2 型アデノウイルスと単純ヘルペスウイルスをそれぞれ 1 例検出した(表 1)。8 例それぞれにおいて、急性増悪時に動脈血酸素分圧とピークフロー値が低下し、治療によって回復した(図 1)。気道炎症を表す呼気一酸化炭素濃度も、急性増悪時に上昇し、治療によって元の値に戻った(図 2)。血中 IL-6 と可溶性 ICAM-1 は急性増悪の慢性肺気腫患者において有意に高い値を示した(図 3)。血中 IL-1 β 、IL-4、IL-5 は急性増悪で変化しなかった。

②2 型ライノウイルスは培養気管上皮細胞に感染した。培養液中の 2 型ライノウイルス量は時間経過とともに増加し、1, 3, 5 日目にそれぞれ 3.1 ± 0.3 、 4.2 ± 0.2 、 3.7 ± 0.5 log TCID₅₀/ml(平均

±標準誤差、n=7)であった。抗 LDL 受容体抗体処理後、培養液ライノウイルス量は明らかに減少した(1.4±0.2log TCID₅₀/ml、1 日目)また、抗 LDL 抗体処理後に 2 型ライノウイルスを感染させた場合、培養液 IL-1β、IL-6 ともに減少した(図 4)。培養気管上皮の LDL 受容体 mRNA 発現量は 2 型ライノウイルス感染後、時間経過とともに増加した(図 5)。

(考 察)

本年度の研究で慢性肺気腫のウイルス感染時に低酸素血症とピークフロー値低下を生ずることが明らかになった(図 6)。これは気管支喘息や慢性気管支炎の急性増悪に共通している^{4,9)}。IL-6 と可溶性 ICAM-1 の増加はウイルス感染に伴う気道上皮細胞の IL-6、ICAM-1 合成増加に一致している。気道上皮のみならず、肺および一部分全身の炎症が関係している可能性がある。in vitro 研究で 2 型ライノウイルスが気管上皮細胞の低比重リポ蛋白(LDL)受容体を介して感染することを明らかにした。上皮細胞はライノウイルス感染後炎症性サイトカイン合成と LDL 受容体合成を増加した。2 型ライノウイルスは ICAM-1 合成も増加しており⁴⁾、ライノウイルスの血清型が 100 種以上あることより、受容体合成増加がライノウイルスの反復感染¹⁾に関係している可能性がある。major group も minor group も同種の炎症性サイトカインと双方の受容体発現を活性化した。14 型ライノウイルスも LDL 受容体発現を亢進(未発表)した。共通の機序を介して気道浮腫、気道炎症を生じ、慢性肺気腫の急性増悪をもたらすと推測される(図 6)。ウイルス感染予防はワクチンが最も有効であるが、ライノウイルスは 100 種以上の血清型があり、有効性が問題となる。ICAM-1 および LDL 受容体の発現抑制および炎症性因子抑制を介した治療法も可能性を有すると考えられる(図 6)。

(参考文献)

1) Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, et al: Community study of role of viral infections of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* 1995 ; 310 : 1225-1228.

2) Numazaki Y, Oshima T, Ohmi A, et al: A microplate method for isolation of viruses from infants and children with acute respiratory infections. *Microbiol Immunol* 1987; 31 : 1085-1095.

3) Yamaya M, Sekizawa K, Ishizuka S, et al: Increased carbon monoxide in exhaled air of subjects with upper respiratory tract infections. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 ; 158 : 311-314.

4) Terajima M, Yamaya M, Sekizawa K, et al : Rhinovirus infection of primary cultures of human tracheal epithelium : role of ICAM-1 and IL-1β. *Am J Physiol* 1997 ; 273: L749-L759.

5) Gump DW, Phillips CA, Forsyth BR, et al : Role of infection in chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1976 ; 133 : 465-474.

対 象

慢性肺気腫 症例数	感冒罹患数	症状増悪数	検出ウイルス
20	8	8	Flu A 2 HSV 1 Adeno 2 1

表 1. 対象患者および同定ウイルス。Flu,インフルエンザ; HSV,単純ヘルペスウイルス;Adeno, アデノウイルス。

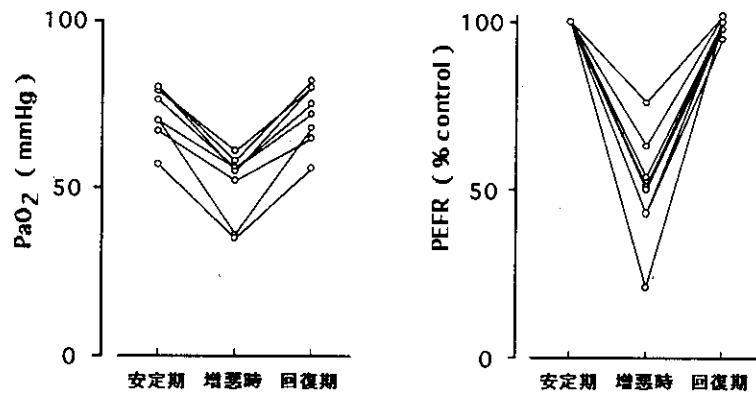


図 1.慢性肺気腫患者の気道感染前後における動脈血酸素分圧 (PaO₂) およびピークフロー値(PEFR)の変化

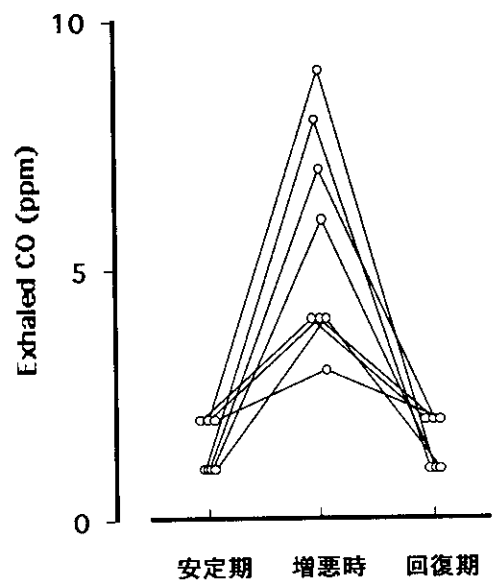


図 2.慢性肺気腫患者の気道感染前後における呼気一酸化炭素濃度の変化

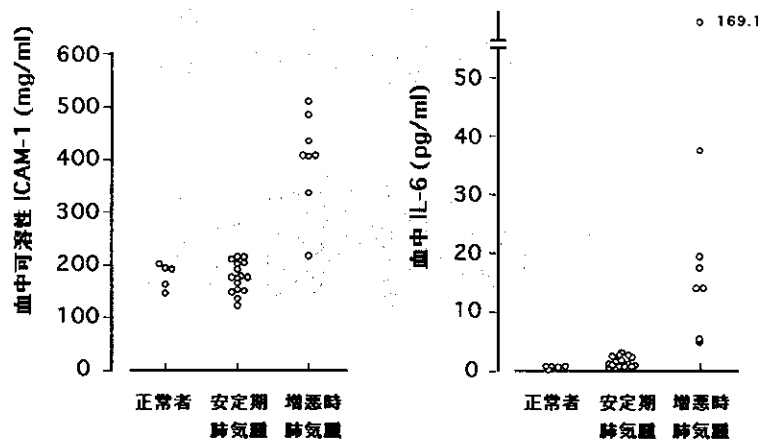


図 3. 正常者、安定期慢性肺気腫患者、急性増悪時慢性肺気腫患者の血中 ICAM-1 および IL-6 濃度。

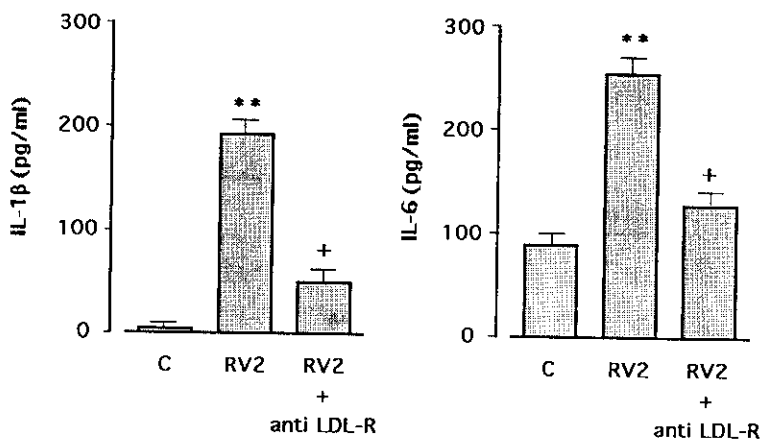


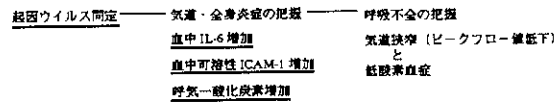
図 4. 2 型ライノウイルス感染(RV2)によるヒト気管上皮培養液 IL-1β および IL-6 (** $p < 0.01$)。抗低比重リポ蛋白受容体抗体(anti LDL-R)はサイトカイン合成を抑制した(+ $p < 0.05$)。C;コントロール。



図 5.2 型ライノウイルス感染によるヒト気管培養上皮細胞の低比重リポ蛋白受容体 (LDL-R)mRNA 合成増加。

3年間のまとめ

- ウイルス感染による慢性肺炎急性増悪の病態研究 (臨床研究)
[アンダーラインが新しい知見]



- ライノウイルス感染による慢性肺炎急性増悪の機序と制御方法 (気道上皮細胞を用いた *in vitro* 研究)
[アンダーラインが新しい知見]

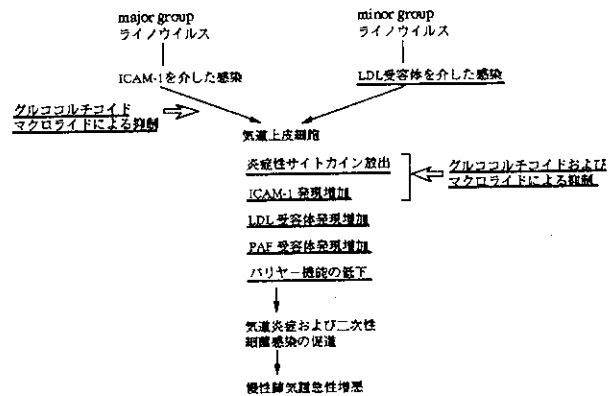


図 6.3 年間のまとめ

11. 微生物の感染とIgA腎症の関連についての研究

分担研究者	荒川 宜親	(国立感染研・細菌・血液製剤部)
共同研究者	堀田 修	(仙台社会保険病院 内科)
	松谷 幸子	(仙台日赤病院 耳鼻咽喉科)
	岩城 裕子	(国立感染研・安全性研究部)
	見理 剛	(同上)
	谷口 理恵	(同上)
	永田 典子	(同上)
	佐々木 次男	(同上)
	松尾 清一	(名古屋大医・第3内科腎臓研究室)
	湯沢 由紀夫	(同上)
	吉村 文信	(愛知学院大歯・微生物)
小佐野 悦男	(同上)	

(はじめに)

IgA腎症(IgA nephropathy, IgA glomerulonephritis)は若年者に好発する進行性腎障害の一つであり、腎糸球体の毛細血管の慢性的血管炎がその病態と考えられているが、その原因は不明である。発病者の約20%は慢性に経過し、長期的には腎不全に陥り、透析が必要となる予後不良の疾患である。IgA腎症の発症に先行して、発熱、下痢などの感染症を疑わせる症状がみられることが多いことから、常在性あるいは弱毒性の細菌の持続的感染とIgA腎症の発症、病状の進行との因果関係が疑われている。これまで、IgA腎症の患者で*Haemophilus parainfluenzae*に対する抗体価が高いとの報告や、CMV, EBV, HTLV-1などの関与が示唆されているが、はっきりした因果関係は証明されていない。本研究では、口腔細菌(マイコプラズマを含む)や腸内細菌などの弱毒性常在細菌の定着や持続感染とIgA腎症の発症、病状の進行との関連性について解析を行っている。

(対象と方法)

1. IgA腎症を発症して間際と思われる患者血清中に常在細菌由来の抗原と反応するIgMやIgA抗体の有無を検出し、特定の細菌との関連を検討する。
 2. IgA腎症を発症して間際と思われる患者の末梢血中のリンパ球の活性化状態を解析する。
 3. IgA腎症を発症して間際と思われる患者の咽頭スワブや末梢血中のリンパ球から、PCR法によりマイコプラズマ特異的なDNAを検出する。
 4. 治療目的の為、扁桃摘出を受けたIgA腎症患者の扁桃組織を譲り受け、組織中からのマイコプラズマ特異的な抗原を検出する。
- そのために次の方法により実験を実施中である。
1. 患者血清の収集

IgA腎症を発症して間際と思われる未治療の患者

の、リンパ球を分取した後、血清を分離する。T細胞及びB細胞については、CD69、IL-2R、CD40などの分子指標として細胞活性化の状態を解析した。

2. 患者血清は、細菌由来抗原とのウエスタンブロッティング解析などに用い、IgM抗体などの検出を行った。

3. IgA腎症患者の咽頭スワブや摘出扁桃、末梢血リンパ球からのマイコプラズマの検出

a. PCR法

咽頭スワブや摘出扁桃、末梢血リンパ球から定法に従い、template DNAを調整し、マイコプラズマ特異的IS配列やrRNAに特異的なPCRプライマーなどを用いたPCR法により、遺伝子を検出した。

b. 分離培用法

患者由来検体を、マイコプラズマの分離培地(PPLO培地)に接種し、菌の分離培養を試みた。

4. IgA腎症患者の摘出扁桃におけるマイコプラズマ抗原の検出

マイコプラズマの各菌種の抗原を認識する抗体を用いて、患者の摘出扁桃の免疫組織学的な解析を実施した。

(結果)

1. 検査した25人の半数でCD69, HLA-DRを発現する活性化T-およびB-細胞が増加していた(表1)。この所見は、これまで他の調査でも報告されており、IgA腎症の患者において一般的な所見であることが再確認された。

2. 検査した16名中11名の血清中に*M. fermentans*の菌体抗原に反応する、何らかのIgM抗体が認められた。

3. PCRにより、検査した8名の全ての咽頭スワブからマイコプラズマ属のDNAを検出した。特に、口腔常在性マイコプラズマである*M. orale*や*M. salivarium*

が検出されたが、*M. fermentans*に由来すると思われるPCR産物も3名の患者で観察された。(表2)

4. IgA患者の摘出扁桃からの*Mycoplasma*属の分離を試みたところ、生育速度の比較的早いアルギニン分解性マイコプラズマである*M. orale*や*M. salivarium*を検出する事ができたが、量的に少なく生育速度の遅い*M. fermentans*を分離することはできなかった。

5. IgA患者の摘出扁桃を各種のマイコプラズマの抗原に反応する抗体を用いて免疫組織学的に解析したところ、扁桃の上皮層に*M. fermentans*の抗原またはそれに類似した抗原性を示す物質の存在が示唆された。(表3)

(考 察)

IgA腎症は、腎臓の疾患ではなく、全身性の血管炎がその病態の本質であるPNやWegener肉芽腫症の類似疾患であり、特に腎糸球体の毛細血管の血管炎が強く起こるタイプの慢性血管炎と一部の専門家は指摘している。IgA腎症は、わが国において比較的頻繁に遭遇する疾患である為、診断基準の作成や治療法の研究は多くの臨床医により進められている。しかし、その原因については不明な点が多く、根本的な治療法は確立されておらず、対症療法としてステロイド剤や抗血小板薬などの投与が治療法の主流を占めている。また、一部の臨床家の間では、発症初期の軽症患者では扁桃の摘出とステロイドのパルス療法の併用が有効であるとされている。これは、扁桃など粘膜系のリンパ装置における慢性炎症を取り去り、免疫系への刺激を除去する事により、この疾患の進行を食い止めようとするものである。事実IgA患者では、B-細胞やT-細胞が全般的に活性化された状態であることは、今回の解析でも確認できているので、この悪循環を断ち切る治療法として、扁桃摘出とステロイドのパルス療法が効果を示している事も考えられる。

本研究では、扁桃組織などのリンパ組織への弱毒性・常在性の微生物の定着あるいは持続的な感染に伴い産生される生理活性物質により、免疫機構へ恒常的な刺激が加えられる結果、慢性的な血管炎が引き起こされ、それが、IgA腎症の症状の慢性的な進行を促すとの仮説に基づき、扁桃組織に常在する可能性の高い病原体の中から、弱毒性のマイコプラズマ属、特に*M. fermentans*の関与について解析を行っている。その理由の一つは、*M. fermentans*が産生するリポペプチドが、マクロファージやB細胞の強力な活性化能を有するという事実である。

これまでの解析から、患者の血清中には、*M. fermentans*由来の種々の菌体抗原に反応するIgM抗体が存在する傾向が見られており、この菌がIgA腎症の発症に何らかの関与をしていることが強く示唆される。PCR検査でも、数名の患者の咽頭スワブから*M. fermentans*に由来すると思われるPCR産物を検出しているが、しかし、この菌種を患者の咽頭や扁桃から実際に分離することには成功していない。その理由として、*M. fermentans*の菌数が相対的に少なく、しかも、増殖性の強い*M. orale*や*M. salivarium*の背後に隠れてしまい、一般的に用いられている分離・培用法では分離が難しい事が考えられるため、*M. fermentans*を特異的に分離できる方法について検討を行っている。

これまでのところ、患者の扁桃組織や検体からの*M. fermentans*の分離・培養には成功していないが、患者の扁桃の上皮層に*M. fermentans*に関連するとと思われる抗原の存在が、免疫組織学的な解析により8名中4名で観察されている。非特異的な反応の可能性も否定できないが、*M. orale*や*M. salivarium*に対する同様の検査では、ほぼ陰性の結果が得られているので、実際に*M. fermentans*に関連する抗原が扁桃の上皮層に存在している可能性は否定できない。今後陽性に染まった部位の電子顕微鏡による形態学的な解析を行う予定である。

*M. fermentans*は、他の口腔常在マイコプラズマと異なり、末梢血のリンパ球に付着して循環する事もあると報告されている。これまでのところ、通常の患者の扁桃組織や末梢白血球からのPCR法による*M. fermentans*遺伝子の検出には成功していない。菌数が少なく検出限界以下である可能性もあるので、より高感度の検出が可能なPCR法を確立する必要がある。

今後の研究計画としては、

IgA腎症の患者の咽頭や扁桃組織から*M. fermentans*を含む各種のマイコプラズマ属を分離する。

患者の扁桃組織における*M. fermentans*などの所在の有無を病理組織学的に解析する。

分離した*M. fermentans*が患者の末梢血細胞に及ぼす活性化能を解析する。

*M. fermentans*がIgA腎症の発症に関連する事が濃厚となった場合、ヒトに近縁のサルを用いて、*M. fermentans*の感染実験を行い、IgA腎症に類似の疾患が起こるか否かを解析する。

表1. 末梢リンパ球の細胞活性化マーカーの陽性数の比較

被験者	IgA 腎症患者					健常者				
	T cells			B cells		T cells			B cells	
細胞種類	CD69	HLA-DR	CD25	CD69	CD25	CD69	HLA-DR	CD25	CD69	CD25
陽性件数 試験数	8/26	13/25	1/23	11/26	2/22	1/7	0/7	0/4	1/3	ND

表2. PCR法によるマイコプラズマ属遺伝子の検出

検体	患者番号															
	1	2	3	4	11	13	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
末梢血単核球 (PBMC)	-	-	-	-	-	-	?	-	ND	-	-	-	-	-	-	ND
咽頭拭い液	ND	ND	ND	ND	ND	ND	S	S+F	O	S+O +F	S+F	ND	S	S	S	ND
扁桃組織	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	S	S	S	O

ND: 検査せず, O: *M. orale*, S: *M. salivarium*, F: *M. fermentans*

表3. IgA 腎症患者の扁桃組織の病理組織学的検討

◇IgA 腎症患者の扁桃組織の光顕所見

1. 扁桃陰窩の扁平上皮細胞の不全角化 ----- 8件 / 8検体
2. リンパ濾胞の委縮と壊死 ----- 8件 / 8検体
3. 血管周囲の結合織の増殖と血管の増生 ----- 8件 / 8検体
4. 上皮表層の細胞間への好中球の浸潤 ----- 2件 / 8検体
5. 扁桃陰窩上皮内への IgA 陽性細胞の浸潤 ----- 5件 / 8検体

◇IgA 腎症患者の扁桃上皮表層の免疫組織学的解析

1. 抗*M. orale*抗体による染色陽性件数 ----- 1件 / 8検体
2. 抗*M. salivarium*抗体による染色陽性件数 ----- 0件 / 8検体
3. 抗*M. fermentans*抗体による染色陽性件数 ----- 4件 / 8検体

12. 遷延する心筋炎と特発性心筋症に関する研究

分担研究者 和泉 徹 (北里大学医学部内科学)

共同研究者 河野 健, 横山浩之, 鈴木啓介, 青山直善 (北里大学医学部内科学)

(はじめに)

原因不明とされている拡張型心筋症の病因に感染因子(病原体)の自己免疫的メカニズムが示唆されている。感染を契機に、本来病原体に感染された心筋細胞を攻撃する免疫担当細胞が病原体と心筋構成タンパクとの間に存在するアミノ酸配列の類似性(molecular mimicry)を介して免疫的に賦活化され、自己の組織を障害するとの理解である。この自己免疫性メカニズムが惹起されると、心筋炎は遷延し最終的には拡張型心筋症に至ると考えられる。この仮説は、まず心筋ミオシン分画の感作によって発症する実験的自己免疫性心筋炎の動物モデルで実証された。モデル実験では、心筋ミオシンによって惹起された心筋炎が経過とともに終焉した後も、適度な間隔で心筋ミオシンを再感作する事により拡張型心筋症化することが証明された。そこでここでは、この動物モデルを使って、遷延化する心筋炎や特発性心筋症に関与する病原体をアミノ酸の一次構造側から明らかにしようと試みた。すなわち、同モデルにおいて心筋ミオシン上のエピトープ検索を行い、心筋ミオシンと病原体との分子学的共有性や類似性を証明しようと企画した。

(対象と方法)既に我々の研究により、ブタ心筋ミオシン重鎖1070-1165の96個のアミノ酸内にエピトープが局在していることが明らかにされている。そこで我々はラットの心臓よりmRNAを抽出し、上記96個アミノ酸をコードするDNAをRT-PCR法にて増幅した。増幅した心筋ミオシン重鎖 α 鎖や β 鎖とタンパク発現ベクターとのリコンビナントDNAを作成し、大腸菌にてタンパクを発現させ、目的タンバ

クを精製した。また、DNAレベルにおいて制限酵素を用いて細分化したタンパクも同様に形質発現させた。その後、生後6週の雄ルイスラットに精製タンパクを完全フロイドアジュバントと混合し感作した。この実験ラットを経時的に屠殺し検索した。各々のリコンビナントタンパクの心筋炎惹起能を検索し、そのアミノ酸一次構造から共有性や類似性のある病原体を検討した。

(結果並びに考案)重症で広範な心筋炎が大腸菌由来のリコンビナント型心筋ミオシン分画でも惹起された。この実験的自己免疫性心筋炎は、全例で発症し、その一部は心不全死した。細胞浸潤中には大型単核球が多数現れ、多核巨細胞もみられる、などブタ心筋ミオシン感作による自己免疫性心筋炎所見の特徴と同一であった。さらに、心筋ミオシン重鎖 α 鎖や β 鎖の各々についての心筋炎惹起能についても検索したが、上記と全く同じ臨床並びに組織所見を有し、両者に差異はなかった。さらに、細分化したペプチドによる心筋炎惹起能の検討により、エピトープは96アミノ酸内の後半40アミノ酸内に存在していることが明らかになった。

心筋ミオシン分子は2本の重鎖と4本の軽鎖、計6本のポリペプチド鎖から成り立つ、分子量510KDの巨大なタンパクである。T細胞免疫系ではこの様な巨大タンパクが直接抗原性を発揮することはない。心筋組織に何らかの侵襲が働くと、常態では筋形質膜内に隔絶されている心筋ミオシンが細胞膜外に流れ出し、それを間質に遊走してきたマクロファージが貪食し、次第に小さなフラグメントへと切断されていく。自己免疫性心筋炎の実験モデルではT細胞のトランスファー実

験にて心筋炎は移注され、その主体となるT細胞はCD4陽性細胞であった。このことより、MHCクラスII上に抗原提示が起こり、CD4陽性細胞が認識をしていると考えられる。したがって、惹起抗原であるエピトープは約20個位のアミノ酸からなるペプチドであろうと推測される。現在まで、我々は、心筋組織から粗の心筋ミオシンを取り出し、種々の制限酵素で切断して各種の分画を逐次回収した。これらのペプチドを用い、レイスラットに系統的に感作して心筋炎惹起能の有無を検討した。すると、ミオシン重鎖ロッド分画に属するRDCB9なるペプチドが、粗な心筋ミオシンより強い心筋炎惹起能を有することが分かった。このペプチドは96個のアミノ酸からなり、ロッド分画のS-2に含まれる。今回さらに同96個のアミノ酸についてDNAレベルにおいて心筋ミオシン重鎖 α 鎖や β 鎖を分けた感作実験の結果、両者とも心筋炎惹起能を呈していたことより、エピトープは両者が一次構造を共有している部位であると考えられた。さらに、タンパクの細分化による感作実験を繰り返し行い、後半部位のうち40アミノ酸にエピトープが存在する事を突き止めた。そこで、同部位と既知の病原微生物との分子学類似性や共有性を検索した(図-1)が、候補となり得る病原微生物の決定には至らなかった。この主要な要因として、完全にエピトープを絞り込めていないため、技術的にホモロジー検索が不完全になり易いためと思われる。また、拡張型心筋症の惹起能には免疫学的交叉性も密接に関与していると考えられ、この方法での病態解析にはエピトープの完全な同定が必須と考えられた。

(参考文献)

- 1) Izumi T., Maisch B. and Kochsiek K.: Experimental murine myocarditis after immunization with cardiac membranous proteins. Euro. Heart J. 8(Suppl): 419-424,1987.

- 2) Kodama M., Matsumoto Y., Izumi T. et al: A novel experimental model of giant cell myocarditis

- induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. Clin. Immunol. Immunopathol., 57: 250-262,1990.
- 3) Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M: In vivo lymphocyte-mediated myocardial injuries demonstrated by adoptive transfer of experimental autoimmune myocarditis. Circulation, 1992; 85: 1918-1926.
- 4) Kodama M, Hanawa H, Saeki M, et al.: Rat dilated cardio-myopathy after autoimmune giant cell myocarditis. Circulation Res, 994; 75: 278-284.
- 5) Inomata T, Hanawa H, Izumi T, et al.: Localization of porcine cardiac myosin epitopes that induce experimental autoimmune myocarditis. Circulation Res, 1995; 76: 726-733.
- 6) Beisel KW, Srinivasappa J, Prabhakar BS, et al: Identification of a putative shared epitope between Coxsackie virus B4 and alpha cardiac myosin heavy chain. Clin. Exp. Immuno, 1991; 86: 49-55.
- 7) Cunningham MW, Hall NK, Krisher KK, et al: A study of anti-group A streptococcal monoclonal antibodies cross-reactive with myosin. J Immunol, 1986; 136:293-298.
- 8) Cunningham MW, McCormack JM, Fenderson PG, et al: Human and murine antibodies cross-reactive with streptococcal M protein and myosin recognize the sequence gln-lys-ser-lys-gln in M protein. , J Immunol, 1989; 143:2677-2683

心筋炎惹起能を有する心筋アミノ酸一次配列と病原微生物とのホモロジー検索

N-IEELEELEAERTARAKVEKLRSDLTRELEEISERLEEAGG-C

IEELEELEAERTAR

EELEELEAERTARA

ELEELEAERTARAK

LEELEELEAERTARAKV

.....

LTRELEEISERLEEA

TRELEEISERLEEAG

RELEEISERLEEAGG

種々病原微生物のタンパク
アミノ酸一次配列

現時点では抗原が完全に絞り込めていないため、
病原微生物との明らかな相同性、共有制は確認できなかった。

13. 細菌アルギン酸リアーゼのバイオフィルム感染症治療への応用 -高次構造と抗原性部位の除去-

分担研究者 村田 幸作 (京大・食糧科研)

共同研究者 橋本 渉 (京大・食糧科研)

(はじめに)

本研究は、緑膿菌バイオフィルム感染症の治療に細菌酵素(アルギン酸リアーゼ)を適用することを目的としている。本酵素を安全に体内に導入するためポリエチレングリコール(PEG)修飾を行い、この修飾酵素の特性を検討することによって、高い活性を有し、かつ、低い抗原性を示す修飾酵素の調製法を決定した。分子量12,000のPEGを用いることにより、残存活性60%以上、残存抗原活性0.3%以下の良好な修飾酵素を調製した¹⁾。この修飾酵素を実験動物血中に導入し、その安定性と免疫反応性を評価した。その結果、ラット、ウサギ、モルモットにおいて、修飾酵素活性の消失半減期は著しく延長(未修飾体、20-30分;修飾体、20-140時間)し、この消失半減期の延長に伴い、全身クリアランスの著しい低下と、AUC(血中濃度-時間曲線下面積)の顕著な増大が認められた。また、修飾体は有意な免疫反応性も示さず、良好な血中動態結果が得られた。しかしながら、モルモット動物実験でアナフィラキシーショックを誘発した。そこで、X線結晶構造解析により、本酵素の高次構造を決定し、抗原性部位の除去を検討した。

(対象と方法)

土壌分離細菌 *Sphingomonas* sp. A1 株が生産するアルギン酸リアーゼ(A1-III)を枯草菌にクローニングし、菌体外生産された本酵素を蒸気拡散法で結晶化した。本酵素のX線結晶構造解析は、まず、結晶に各種重原子をソーキングして重原子同形置換体を作成し、重原子同形置換体及び非置換体からの回折差パターン関数を計算した。その結果に基づいて位相を決定し、立体構造を決定した。また、本酵素の一次構造に基づ

いたコンピューター予測と *in vitro* 抗原性試験により、抗原エピトープ部位を同定した。抗原エピトープ配列の除去は、タンパク質工学的手法により行った。

(結果)

1. X線結晶構造解析

X線結晶構造解析により、本酵素の高次構造を1.87Åの分解能で決定した(図-1)2,3,4)。結晶系はモノクリニック、空間群C2、単位格子は $a=48.9\text{Å}$, $b=92.4\text{Å}$, $c=81.6\text{Å}$ であり非対称単位当たり1分子の酵素を含んでいた。本酵素は、 β -シート構造をほとんど含まず、大小12個の α -ヘリックス構造からのみ形成されていた。また、高分子基質(アルギン酸)が貫通しながら酵素の触媒部位と相互作用するクレフトの存在が認められた。詳細は、論文4)参照。

2. 抗原エピトープの同定

アルギン酸リアーゼの一次構造及び *in vitro* 抗原性試験により、本酵素の抗原エピトープを、N末端側 Ser27-Cys44 に決定した(図-2)5)。特に、Ser27-Gly28-Gln29-Leu30-Asp31-Asp32-Arg33-Leu34-Lys35-Ala36-Ala37-Leu38-Pro39-Lys40-Glu41-Tyr42-Asp43-Cys44 の配列の各アミノ酸の酵素表面露出度は、それぞれ Ser(77)-Gly(81)-Gln(98)-Leu(23)-Asp(30)-Asp(75)-Arg(10)-Leu(0)-Lys(57)-Ala(66)-Ala(12)-Leu(41)-Pro(22)-Lys(81)-Glu(47)-Tyr(34)-Asp(57)-Cys(7)であり、タンパク質構造学的にもこの配列が強い抗原性を提示すると予想された。実際、この抗原性エピトープは、X線結晶構造から本酵素の表面に露出していることが確認され、活性中心からも十分に離れて存在していた。

3. 抗原エピトープの除去と変異酵素の生産

アルギン酸リアーゼの一次構造と高次構造に

基づいて、抗原エピトープを含むN末端 (His1-Cys44:アミノ酸 44 残基) を除去した変異酵素を作出し、この変異酵素を枯草菌菌体外分泌系で大量生産させた。現在、変異酵素のアルギン酸リアーゼ活性、抗原性、体内滞留性などを検討している。

(考 察)

PEG で化学修飾したアルギン酸リアーゼが、*in vitro*, *in vivo* 両系で極めて良好な性質を示していたため、モルモット試験でアナフィラキシーショックが誘発されたのは予想外であった。修飾酵素は、血中での活性と安定性ともに極めて優れていたため、血中で PEG が酵素から遊離した可能性は低い。最も考えられる可能性は、PEG の揺らぎのために抗原性部位が一時的な露出を繰り返すことである。この問題を解決するためには、抗原性エピトープの除去以外にはない。今回作成した抗原エピトープ除去酵素は (コンピューター解析では、これ以外に抗原エピトープと成り得る配列はないが、万一、抗原部位除去により、新たに酵素表面に抗原エピトープが提示されない限り)、実用的な酵素になると考えられる。

慢性肺疾患治療は、現在、抗生物質の長期・大量投与に依存しているが、耐性菌が出始めている現在、新たな治療法が求められることは間違いない。細菌アルギン酸リアーゼの実用化は、その意味で画期的であり、かつ、微生物酵素の新たな応用領域を開拓することにも繋がる。

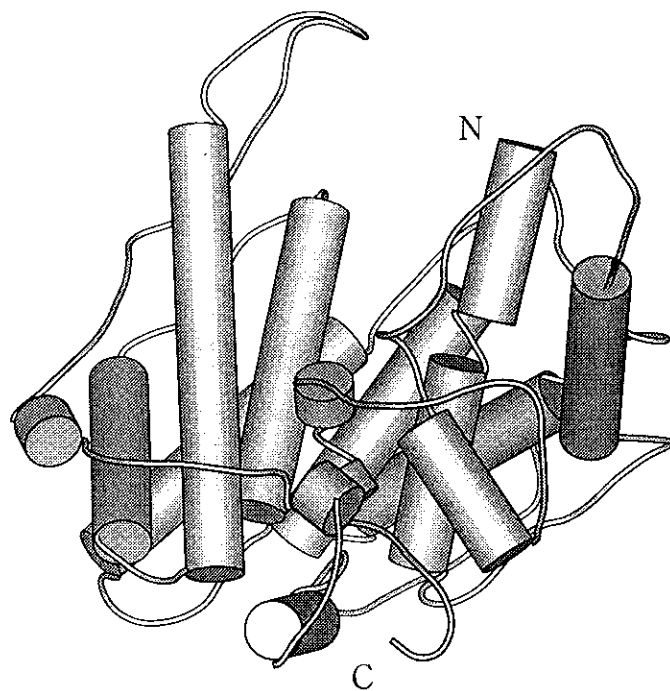
(参考文献)

- 1) 村田幸作、橋本 渉：細菌の多糖リアーゼ：酵素学的、遺伝学的側面と医薬への応用。日本応用酵素協会 1996;31:28-39.
- 2) Mikami B, Hisano T, Yamashita T, Inose T, Takagi M, Sakaguchi K, Kimura A, Imanaka T, Murata K:Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of bacterial alginate lyase. *J Ferment Bioeng* 1994;77:691-692.
- 3) 橋本 渉、門間敬子、村田幸作：ヘテロ多糖を食べる細菌。化学と生物 1998;36:709-715.
- 4) Yoon H-J, Mikami B, Hashimoto W, Murata

K:Crystal structure of alginate lyase A1-III from *Sphingomonas* species A1 at 1.78 Å resolution. *J Mol Biol* 1999;(in press).

- 5) Hashimoto W, Momma K, Miki H, Mishima Y, Kobayashi E, Miyake O, Kawai S, Nankai H, Mikami B, Murata K: Enzymatic and Genetic Bases on Assimilation, Depolymerization and Transport of Heteropolysaccharides in Bacteria. *J Biosci Bioeng* 1999;87:123-136.

(A)



(B)

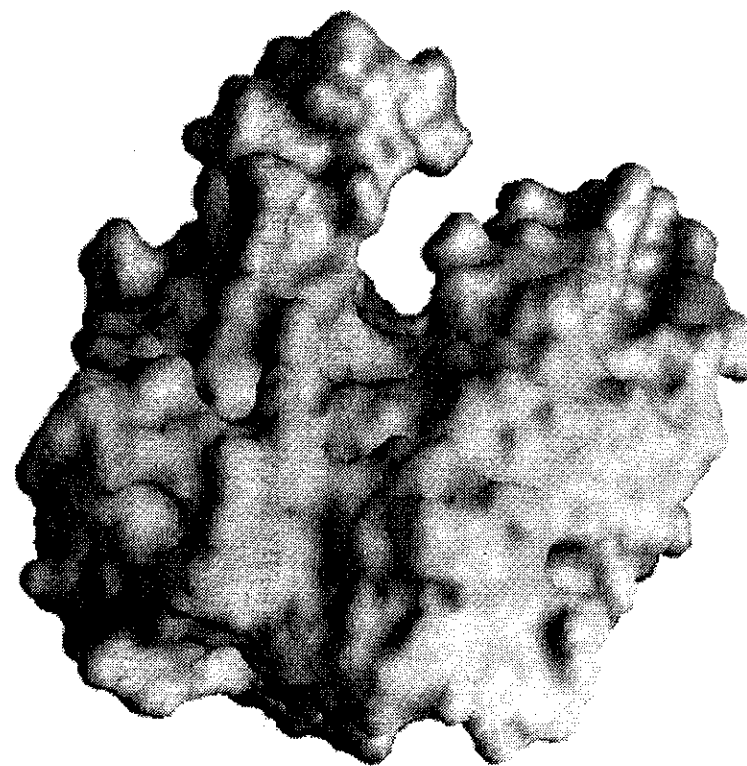


図1 アルギン酸リアーゼの高次構造
A、リボンモデル； B、酵素表面

HPFDQAVVKDPTASYVDVKARRTFLQSGQLDDRLKAALPKEYDCTTEATP 50
 NPQQGEMVIPRRYLSGNHGPVNPDYEPVVTLYRDFEKISATLGNLYVATG 100
 KPVYATCLLNMLDKWAKADALLNYDPKSQSWYQVEWSAATAAFALSTMMA 150
 EPNVDTAQRERVVKWLNRVARHQTSFPGGDTSCCNHSYWRGQEATIIGV 200
 ISKDELFRWGLGRYVQAMGLINEDGSFVHEMTRHEQSLHYQNYAMLPLT 250
 MIAETASRQGIDLYAYKENGRDIHSARKFVFAAVKNPDLIKKYASEPQDT 300
 RAFKPGRGDLNWI EYQRARFGFADELGFMTVP IFDPRTGGSGTLLAYKPQ 350
 GAAAQAPVS

図2 アルギン酸リアーゼの抗原エピトープ
 下線部：抗原エピトープ部位

14. 抗酸菌感染と自己免疫疾患（インシュリン依存型糖尿病）

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）

共同研究者 与儀 ヤス子, 川津 邦雄（国立感染研・ハンセン病研センター）、
岡村春樹（兵庫医大）、小澤 ゆか子（慶大・内）

【はじめに】

微生物の内、抗酸菌感染が自己免疫疾患の原因になっているのかどうかを、その主要コンポーネントでありまた微生物の共通抗原でもある65kD 熱ショック蛋白質—以下 hsp65 という—を指標に検討してきた。hsp65 は原核細胞から高等な哺乳類細胞にいたるまでアミノ酸配列が非常に類似していること、もう一つの特徴はこの蛋白の免疫原性が非常に強いことである。この一見相反する二つの特徴を合わせ持つことが、自己免疫疾患で注目される理由である。IDDMを自然発症する自己免疫疾患モデル動物であるNODマウスにおいては、そのIDDM発症にはTh1タイプのサイトカインである γ -IFN 1)およびIL-12)等が必要であると報告されている。前回、IDDM発症に関与すると報告されている γ -IFNおよびIL-12について報告した。PACB および pACB-hsp 投与マウスからの脾臓培養細胞からは、hsp の in vitro 刺激によって特に γ -IFN および IL-12 の誘導が見られたが、同時に高い IL-10 の誘導産生がみられた。この IL-10 により γ -IFN および IL-12 の産生が抑制されていた。この IL-10 産生の程度は pACB/hsp 免疫マウスでより大きかった。このことから、pACB および特に pACB/hsp の投与により糖尿病の発症抑制への可能性が考えられた。今回は、pACB および pACB/hsp 投与マウスにおける IDDM の発症状況について検討した。

【材料と方法】

マウス：5週令および10週令、雌 NOD/Shi Jic マウスを日本クレアから購入使用した。抗原など：hsp65 抗原としては、hsp65 の持続的な投与が期待できる方法として DNA ワクチネーシ

ョンの方法をとった。Hsp65を組み込んだDNA ワクチンの構築は、哺乳動物における発現系でありまた Immunostimulatory DNA Sequence (ISS) をもつプラスミド (pACB) 3) 4) に hsp65 の DNA 遺伝子を組み込む事に依った(pACB/hsp)。免疫：NOD マウスの尾付け根部分 (id) に、50 μ g/50 μ l PBS のプラスミド DNA を10日毎に3回投与した。

【結果】

NOD マウスの IDDM の発症には2段階、insulinitis の出現（6週令）と β 細胞破壊の進展による顕在性糖尿病（4-6ヶ月令）の段階がある。培養脾臓細胞からの γ -IFN の産生について検討したところ、insulinitis が進むにしたがって産生が増し、重篤な IDDM になる直前に最高となる事、また γ -IFN の産生が高くなっている状態では hsp65 の刺激で強い IL-10 の誘導がみられることなどを報告した。このように、hsp65 は γ -IFN の産生下では、IL-10 の産生を促して γ -IFN の産生を抑制する方向に働き始める。この結果は、hsp65 が γ -IFN 等 Th1 型のサイトカインの産生を抑制し、ひいては IDDM 発症抑制に働く可能性を示唆していた。PACB または pACB/hsp を皮内投与すると、やがて IL-10 の産生が優位になり、5週令マウスの場合には、pACB でも pACB/hspDNA の投与でも共に IDDM の発症を完全に抑制していた (Fig.1)。また、insulinitis が始まっている時期にあたる10週令マウスに投与した場合には、完全には抑制されなかったが対照マウスに比して遅れて IDDM の発症が見られた。すなわち、対照マウスでは24週令で50%のマウスが IDDM を発症したのに対して、pACB 投与では25%、pACB/hsp 投与では27週令で25%

の発症がみられた。抑制の程度は pACB/hsp でより大きく、すなわちより遅れて IDDM の発症がみられた (Fig.2)。

【考 察】

Th1 介在性自己免疫疾患とされる I 型糖尿病の発症が、hsp65 によって促進されるよりもむしろ抑制された。その原因として、hsp65 による Th2 型サイトカインである IL-10 の誘導があった。しかし、pACB の投与のみでも発症の抑制がみられ、この場合でも hsp65 の刺激で IL-10 の産生があった。PACB というベクターのみでは、哺乳動物細胞にては蛋白の発現はないことから、どのような機作によるのかについては不明であるが、DNA そのものの作用、特に ISS が働いているのではないかと考える。今後検討を要する問題である。また、我々の実験結果から推して、ストレス蛋白である hsp65 の長期間の誘導産生が、Th2 介在性疾患発症につながっていく可能性も否定できないと考える。この点も引き続き検討していきたい。

【参考論文】

- 1) Debray-Sachs, Carnaud MC, Boitard C, Cohen C, Gresser I, Bedossa P and Bach JF. 1991. Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN- γ . *J. Autoimmun.* 4:237-248.
- 2) Trembleau S, Penna G, Bosi E, Mortara A, Gately MK and Adorini L. 1995. Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. *J. Exp. Med.* 181:817-821.
- 3) Sato Y, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen M-D, Silverman GJ, Lotz M, Carson DA, Raz E. 1996. Immunostimulatory DNA Sequences Necessary for Effective Intradermal Gene Immunization. *Science* 273:352-354.
- 4) Yamamoto T, Yamamoto S, Kataoka T, Tokunaga. Lipofection of synthetic oligodeoxyribonucleotide having a palindromic sequence of AACGTT to murine splenocytes enhances interferon production and natural killer activity. *Microbiol Immunol* 1994;38(10):831-6