

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

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
大阪市立大学大学院医学研究科 感染防御学 教授

研究要旨

抗酸菌感染に対する宿主応答、すなわち、抗菌防御や病変形成は宿主細胞（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、細胞間情報伝達物質ネットワーク、細胞内殺菌、細胞性免疫：マクロファージサイトカイン-T細胞連関系に集約されていることが解明された。これらの知見を基盤とし、実験的難治性抗酸菌感染症に対する新規治療（免疫介入および抗菌化学併用療法）および予防戦略（DNA ワクチンや死菌ワクチン）の開発に成功した。これらの成果は1）抗酸菌感染症における宿主防御機構の理解、2）新規治療および予防戦略の構築や3）薬剤耐性抗酸菌感染症の制圧対策に有用な情報や基盤を提供することが期待される。

分担研究者

野間口博子	ハンセン病研究センター	室長
福富康夫	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
皆川文重	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
滝沢始	東京大学医学部	講師
樋口一恵	結核研究所	主任

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、宿主感染防御機構を解明することは、抗酸菌感染症の新規治療や予防戦略の開発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細胞、免疫・炎症応答や生理活性物質などの解析から明らかにする。抗酸菌の侵入経路は経気道感染であることから、抗酸菌感染における気道上皮細胞応答を検索する。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、抗酸菌感染症の新規治療戦略として、新規抗菌化学療法薬や感染防御性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、臨床応用への可能性を探索する。抗酸菌感染症の発症予防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、遺伝子（DNA）ワクチンの作用機序、さらに、死菌ワクチンの可能性を探索する。

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抗菌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：800万人/年、1998年、WHO）が発生している。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症はハンセン病：約0.2%、結核：約10%

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蛋白および遺伝子発現（酵素抗体法や遺伝子増幅法）、抗酸菌増殖抑制活性（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および制菌に関与する分子機構を解析した。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。抗酸菌感染における気道上皮細胞応答は炎症性サイトカイン発現の分子制御機序から解析した。

抗酸菌誘導炎症病変が慢性関節リウマチ病変（肉芽腫や血管新生）に酷似しており、共通の分子制御機序を炎症性サイトカインおよび血管新生因子動態から解析した。

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

ヒトにおけるハンセン病疾患活動性を評価するため、血清に存在するらい菌特異的抗原を酵素抗体法および血球凝集抑制法を用いた。

新規抗ハンセン病併用抗菌化学療法を開発するため、マクロライドおよびキノロン系薬の抗らい菌活性について探索した。また、実験的治療戦略として、免疫療法と抗菌化学療法の併用療法をらい菌感染モデルを用いて、その有用性や毒性を評価した。

新規発症予防戦略の開発は遺伝子（DNA）ワクチンおよび死菌ワクチン開発の可能性に着手した。

C. 研究結果

宿主の抗酸菌感染防御にマクロファージ-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機能分子が重要な役割を演じていることが判明した。特に、分子機構として細胞性免疫/interferon- γ (IFN- γ) 発現における起動性サイトカインであるマクロファージ由来 interleukin (IL) 12 や IL-18 発現が抗酸菌

防御において決定的な役割を演じていた。その抗菌機序として、殺菌効果分子：反応性窒素および感染細胞死の誘導に依存していることが判明した。抗酸菌貪食細胞はマクロファージであり、貪食受容体としてマンノース受容体が機能しており、貪食に際し、マクロファージ由来 tumor necrosis factor- α (TNF- α) が関与していた。すなわち、抗酸菌感染防御として、細胞性免疫、特に、マクロファージやマクロファージ由来効果機能分子が必須の役割を演じていることが明かとなった。他方、各種免疫不全マウスを用いたらい菌感染モデルではらい菌殺菌・排除にらい菌特異的免疫機構が重要な役割を演じていた。

抗酸菌感染による病変形成機序として、最初の侵入門戸である気道上皮細胞は感染により炎症性サイトカイン (IL-8) 発現に関与する転写因子群を制御していた。すなわち、初期防御機構として、気道上皮細胞は役割を果たしている。抗酸菌感染で最も早期に局所浸潤する好中球は急速細胞死（アポトーシス）に至るが、肉芽腫病変の主構成細胞：マクロファージはアポトーシスをほとんど示さなかった。さらに、生存マクロファージは単球走化性ケモカインを発現し、病変部におけるマクロファージ集積を促進した。病変形成は炎症惹起性サイトカイン (IL-1 や tumor necrosis factor α : TNF- α 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 α など）の関与が明かとなった。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。

肉芽腫炎症病変の生成過程において重要な役割を演じていると考えられている血管新生を正に制御する因子（vascular endothelial growth factor : VEGF）が慢性炎症の初期病変の形成において必須であった。

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、食食に際し、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、食食により、TNF- α 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。

らい菌と神経組織由来シュワン細胞株を混合培養した場合、24 時間後にシュワン細胞内にらい菌の存在し、72 時間後には殆ど全ての細胞内に多数のらい菌の存在が確認された。シュワン細胞株はらい菌感染により、neurotrophin 3、glial cell-derived neurotrophic factor、regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted など神経細胞指向性サイトカインおよび炎症性ケモカイン発現増強を認めた。さらに、らい菌感染シュワン細胞株培養上清の添加により、培養神経細胞の生存率は 126%に増加し ($p < 0.05$)、また突起伸長の効果も認めた。

らい菌感染による液性免疫応答：らい菌特異的抗体はらい菌由来フェノール性糖脂質抗原を認識していることを明らかにし、それに対する単クローン性抗体を作成することにより、らい菌特異的抗原検出系を開発し、検出系は簡便・迅速であった。

新規マクロライド系薬 (roxithromycin : RXM、azithromycin : AZM、clarithromycin : CAM)、ニューキノロン系薬 (levofloxacin : LVFX、sparfloxacin : SPFX、ofloxacin : OFLX)、さらに、clindamycin の抗らい菌活性を *in vivo* (ヌードマウス足蹠法) と *in vitro* (Buddemeyer 法) で探索した。マクロライド系薬は AZM < RXM < CAM の順で、ニューキノロン系薬は OFLX < LVFX < SPFX の順で抗らい菌活性を認めた。防御性サイトカイン免疫療法と抗菌化学療法の併用療法は抗菌防御に優れ、さらに、病変形成も軽微であった。この機序はまた、併用療法による全身毒性 (血液、肝、腎、筋障害など) はほとんど認めなかった。

DNA ワクチン候補として、BCG 由来核酸成分 (人工合成免疫増強性オリゴヌクレオチド : MY-1) が 1 型ヘルパ-T 細胞 (Th1) 応答を効率的に誘導することを既に報告しているが、今回、Th1 細胞と拮抗制御する Th2 細胞応答をヒト末梢血単核球 (PBMCs) による抗体 (IgE) 産生や IL-4 発現を指標として検索した。MY-1 は濃度依存的に IgE 産生を抑制した。MY-1 は PBMCs に毒性は示さなかった。Th1 細胞由来 interferon (IFN) - γ 産生は MY-1 を添加することにより増強した。IgE 産生抑制は抗 IFN- γ 抗体を添加することにより、一部解除された。さらに、抗 IL-12 抗体の添加は、抗 IFN- γ 抗体と同様、MY-1 誘導性 IgE 産生抑制を部分的に解除した。免疫増強性オリゴヌクレオチドにらい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。MY-1 単独投与はらい菌感染マウスにおける抗菌防御に貢献したが、らい菌由来 hsp65 を組み込んだ MY-1 は期待した抗菌活性を発揮しなかった。

他のワクチン候補として、結核死菌ワクチンの開発と有用性について検証した。マウス肺胞マクロファージを *in vitro* で結核菌で刺激し、細胞性免疫の発現に関与しているサイトカインを指標に探索した。結核生菌由来細胞質成分は単独刺激で最も強力に抗菌防御性サイトカインである IL-12 (p40+p70) 産生誘導を示したが、IFN- γ 存在下では紫外線 (UV) 処理結核死菌体が高い IL-12 誘導活性を示した。加熱処理死菌体と formalin 処理死菌体は防御性サイトカインをほとんど誘導しなかった。マウスを UV 処理死菌体や BCG で免疫し、結核菌吸入感染後に臓器内生菌数を測定した結果、4 週目までは UV 処理した死菌体と BCG は類似した制菌曲線を示した。しかし、8 週目から 12 週目では UV 処理死菌体の制菌活性は BCG を凌駕した。

D. 考察

抗酸菌感染防御に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が、その分子機構を明らかにし、治療および予防標的を設定することができた。

抗酸菌感染防御における分子機構として、防御性サイトカイン (IL-12、IL-18、IFN- γ や TNF- α など) 応答が重要であり、その結果、細胞性免疫を誘導することにより、抗菌防御に貢献している。防御性サイトカインで活性化されたマクロファージは殺菌性ガス状物質 (一酸化窒素) を産生し、抗菌性を発揮した。また、多くの抗酸菌感染における侵入門戸は気道であり、感染宿主において気道上皮細胞は最も初期に抗酸菌と接触し、宿主応答の「引き金」を演じていることが示唆された。

抗酸菌感染による病変形成機序として、最初の侵入門戸である気道上皮細胞は感染により炎症性サイトカイン発現に関与する転写因子群を制御し、初期防御機構として、気道上皮細胞は役割を果たしている。侵入した抗酸菌は宿主マクロファージに貪食されるが、その分子機構として、マクロファージ表面マンノース受容体が関与している。また、抗酸菌性肉芽腫炎症機序に関する新知見として、貪食/単球細胞走化因子、好中球アポトーシス、さらに、血管新生の関与が判明し、分子病態が解明されつつある。らい性末梢神経炎の機序として、らい菌親和性シュワン細胞がらい菌感染に際し、神経細胞成長調節因子や炎症惹起性サイトカインを発現し、病変形成に寄与していることが示唆された。これらの知見は抗酸菌感染における貪食-細胞内殺菌機構-細胞間情報伝達機構、すなわち、ハンセン病における宿主防御機構の理解に有用であり、治療や予防戦略の構築に重要なヒントを提供している。

次に、宿主防御機構の解明過程から得られた知見を総合し、新規治療および予防戦略の開発を試みた。免疫介入療法：サイトカイン免疫療法 (IL-12) は宿主防御を増強し、抗菌防御に優れていたが、副作用 (局所肉芽腫病変増強、血液、肝、筋障害、関

節炎誘導) を発現した。防御性サイトカイン免疫療法 (IL-12) と抗菌化学療法 (リファンピシン) の間欠短期併用療法は抗菌防御に極めて優れ、薬剤耐性抗酸菌感染症にも有効、さらに、病変形成も軽微であり、併用療法による全身毒性 (血液、肝、腎、筋障害など) はほとんど認めなかったことから、今後、難治性抗酸菌感染症に臨床応用が期待される。

発症予防戦略の開発として、DNA ワクチン候補である BCG 由来核酸成分 (人工合成免疫増強性オリゴヌクレオチド：MY-1) が選択的 1 型ヘルパ-T 細胞 (Th1) 誘導活性を有し、抗酸菌感染防御に有用であり、かつ、MY-1 がサイトカイン依存性に Th2 細胞応答を抑制することから、IgE 介在性アレルギー反応における有望な治療戦略となる可能性も示唆され、BCG 由来核酸成分は抗酸菌感染症のみならず、アレルギー/アトピー性疾患の制圧に寄与することが期待される。他のワクチン候補として、UV 死結核菌ワクチンは抗原性の保持、有効性 (抗菌防御) において、BCG を凌駕しており、また、死菌であるため、安全性に優れているなど、今後、臨床応用へ向けて、研究開発を進展させたい。

E. 結論

抗酸菌感染に対する宿主応答、すなわち、抗菌防御や病変形成は宿主細胞 (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、細胞間情報伝達物質ネットワーク、細胞内殺菌、細胞性免疫：マクロファージ-サイトカイン-T 細胞連関係に集約されていることが解明された。これらの知見を基盤とし、実験的難治性抗酸菌感染症に対する新規治療 (免疫介入および抗菌化学併用療法) および予防戦略 (DNA ワクチンや死菌ワクチン) の開発に成功した。これらの成果は 1) 抗酸菌感染症における宿主防御機構の理解、2) 新規治療および予防戦略の構築や 3) 薬剤耐性抗酸菌感染症の制圧対策に基盤を提供することが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

Takizawa, H., T. Ohtoshi, S. Kawasaki, T. Kohyama, M. Desaki, T. Kasama, K. Kobayashi, K. Nakahara, K. Yamamoto, K. Matsushima, and S. Kudoh. 1999. Diesel exhaust particles induce NF- κ B activation in human bronchial epithelial cells in vitro. Importance in cytokine transcription. *J. Immunol.* 162: 4705-4711.

Hatano, Y., T. Kasama, H. Iwabuchi, R. Hanaoka, H.T. Takeuchi, L. Jing, Y. Mori, K. Kobayashi, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 1999. Macrophage inflammation protein 1 alpha expression by synovial fluid neutrophils in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 58: 297-302.

Kai, M., M. Matsuoka, N. Nakata, S. Maeda, M.-i. Gidoh, Y. Maeda, K.

Hashimoto, K. Kobayashi, and Y. Kashiwabara. 1999.

Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 177: 231-235.

Wang, L., S. Izumi, H. He, N. Fujiwara, N. Saita, I. Yano, K. Kobayashi, and N. Tatsumi. 1999. Serodiagnosis of Hansen's disease/leprosy by enzyme-linked immunosorbent assay using cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) as an antigen. *Jpn. J. Lepr.* 68: 165-174.

Naka, T., N. Fujiwara, E. Yabuuchi, M. Doe, K. Kobayashi, K. Kato, and I. Yano. 2000. A novel sphingolipid containing galacturonic acid and 2-hydroxy fatty acid in cellular lipids of *Sphingomonas yanoikuyae*. *J. Bacteriol.* 印刷中.

Hamasaki, N., K. Isowa, K. Kamada, Y. Terano, T. Matsumoto, T. Arakawa, K. Kobayashi, and I. Yano. 2000. In vivo administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits. *Infect. Immun.* 印刷中.

Kasama, T., K. Kobayashi, N. Yajima, F. Shiozawa, Y. Yoda, H.T. Takeuchi, Y. Mori, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 2000. Expression of vascular endothelial growth factor by synovial fluid neutrophils in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 印刷中.

Lu, J., T. Kasama, K. Kobayashi, Y. Yoda, F. Shiozawa, M. Hanyuda, M.

Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 2000. Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* 印刷中.

Yogi, Y., T. Banba, M. Kobayashi, H. Katoh, N. Jahan, M. Endoh, and H. Nomaguchi. 1999. Leprosy in hypertensive nude rats (SHR/NCr-mu). *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 67: 435-445.

Yogi, Y., M. Endoh, T. Tanaka, and S. Akira, H. Okamura, H. Nomaguchi. 1999. Bacteria killing by macrophages via NF-IL6 gene dependent mechanism: the susceptibility to *Mycobacterium leprae* in NF-IL6 knockout mice. *Jpn. J. Lepr.* 68: 97-108.

Naito, M., M. Matsuoka, N. Ohara, H. Nomaguchi, and T. Yamada. 1999. The antigen 85 complex vaccine against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice. *Vaccine* 18: 795-798.

Ohara N, M. Matsuoka, H. Nomaguchi, M. Naito, and T. Yamada. 2000. Inhibition of multiplication of *Mycobacterium leprae* in mouse foot pads by recombinant bacillus Calmette-Guérin (BCG). *Vaccine* 18: 1294-1297.

Tokunaga, T., T. Yamamoto, and S. Yamamoto. 1999. How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn. J. Infect. Dis.* 52: 1-11.

Iho, S., T. Yamamoto, T. Takahashi, and S. Yamamoto. 1999. Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequence with internal 5'-

CG-3' directly act on human natural killer and activated T cells to induce IFN- γ production in vitro. *J. Immunol.* 163: 3642-3652.

Fujieda, S., S. Iho, Y. Kimura, H. Sunaga, H. Ikara, C. Sugimoto, S. Yamamoto, and H. Saito. 1999. DNA from *Mycobacterium bovis* BCG (MY-1) inhibits the synthesis of immunoglobulin E by interleukin-4-stimulated human lymphocytes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160: 2056-2061, 1999.

Yamamoto, S., T. Yamamoto, and T. Tokunaga. 1999. Oligodeoxyribonucleotides with 5'-ACGT-3' or 5'-TCGA-3' sequence induce production of interferons. *Current Topics Microbiol. Immunol. Immunobiology of Bacterial CpG-DNA* 247:23-39.

Yamamoto, S., T. Yamamoto, and T. Tokunaga. 2000. The discovery of immunostimulatory DNA sequence. *Springer Seminars in Immunopathology : Immunostimulatory DNA Sequences* 印刷中.

Yamamoto, S., T. Yamamoto, S. Iho, and T. Tokunaga. 2000. Activation of NK cell (human and mouse) by immunostimulatory DNA sequence. *Springer Seminars in Immunopathology : Immunostimulatory DNA Sequences* 印刷中.

齋藤 肇、村上和保、小林和夫、儀同政一、日高隆義、権 赫們. 1999. 実験的 *Mycobacterium avium* complex 感染に

対する化学的予防. 結核 74 : 677-681.

藤枝重治、齋藤 等、伊保澄子、山本三郎. 1999. 結核菌 DNA および合成短鎖 DNA による IgE 産生抑制の試み. 日鼻誌 38 : 84-90.

與儀ヤス子、遠藤真澄、田中貴志、審良静男、岡村春樹、野間口博子. 1999. 転写調節因子 NF-IL6 を介したマクロファージによる殺菌・排除機構 : NF-IL6 ノックアウトマウスへのらい菌感染. 日本ハンセン病誌 68 : 97-108.

皆川文重. 1999. らい菌、広範囲 血液・尿化学検査. 免疫学的検査 (3) その数値をどう読むか. 日本臨床 57 : 134-137.

儀同政一. 1999. 化学療法からみた末梢神経障害抑制. 日本ハンセン病学会雑誌 68 : 83-86.

矢島幹久、成田 稔、山田宣孝、浅野伍朗. 1999. ハンセン病末梢神経病変と血管. 日本ハンセン病誌、68 : 91-96.

鈴木慶治、高橋順子、出倉善四郎、矢島幹久. 1999. オ-ラミン・ロダミン (Combination) 蛍光染色. 検査と技術 27 : 462-465.

山本十糸子、Phalen, S., 内田和幸、梅森清子、野島康弘、堀内善信、後藤義孝、McMurray, D.N., 山本三郎. 2 000. BCG Tokyo 172 株の抗結核効果 : 結核菌噴霧感染によるモルモット肺結核実験モデルを用いた防御効果の検討. 結核 75 : 印刷中.

2. 学会発表

Kai, M., N. Nakata, M. Gido, and S. Maeda. 1999. Cloning a novel gene involved in resistance in mycobacteria. 39 th Interscience Conference on

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. (Sept., 1999. USA).

Toratani, S., and Y. Fukutomi. 1999. Tumor necrosis factor- α -dependent activation of inducible nitric oxide synthase is necessary for production of nitric oxide in murine peritoneal macrophages. 8th Meeting of the Society for Free Radical Reserch, Sydney, Australia, Dec., 1999.

Yamamoto, S. 1999. Immunostimulatory DNA from BCG augments host defense mechanisms via induction of interferons. First International Workshop on Immunobiology of Bacterial CpG-DNA, September 1999, Schloss Elmau, Germany.

Yamamoto, S. 1999. Safety issue of rBCG. International Workshop on Research and Development of Recombinant BCG-Based HIV Vaccine. November 1999, Tokyo, Japan.

小林和夫、笠原慶太、吉田 彪. 1999. In vitro 肉芽腫炎症モデルの開発とその制御機序 (要望課題). 結核、74 : 264、1999. 第 74 回日本結核病学会総会 (宇都宮、4 月) .

笠原慶太、足立 満、小林和夫. 1999. 好中球の結核菌体成分刺激によるケモカイン産生 (要望課題). 結核、74 : 264、1999. 第 74 回日本結核病学会総会 (宇都宮、4 月) .

樋口一恵、原田登之、関谷幸江、中村玲子、小林和夫. 1999. 結核菌体蛋白のマウス肺胞マクロファージに対するサイトカイン産生誘導の解析. 結核、74 : 292、1999. 第 74 回日本結核病学会総会 (宇都宮、4 月) .

原田登之、樋口一恵、関谷幸江、中村玲子、小林和夫. 1999. マウス肺胞マクロファージに対してサイトカイン産生誘導を行う結核菌体蛋白の解析. 結核, 74:293, 1999. 第74回日本結核病学会総会(宇都宮, 4月).

松岡正典、前田伸司、甲斐雅規、中田 登、小林和夫、柏原嘉子、和泉眞藏、Gue-Tae Chae、Thomas P. Gillis. 1999. らい菌 *rpoT* 遺伝子の多型性とその地理的分布. 日本ハンセン病誌, 68:51, 1999. 第72回日本ハンセン病学会総会(東京, 4月).

笠間 毅、井出宏嗣、小林和夫. 1999. Interleukin-12 によるマウスコラーゲン誘導関節炎の制御:免疫応答およびサイトカイン動態の解析を中心として(ワークショップ). 日本炎症学会プログラム予稿集 89, 1999. 第20回日本炎症学会総会(仙台, 7月).

樋口一恵、原田登之、小林和夫. 1999. 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 II. 日本免疫学会・学術集会記録, 29:243, 1999. 第29回日本免疫学会総会・学術総会(京都, 12月).

木村博昭、虎谷 聡、松岡正典、小林和夫、福富康夫. 1999. マクロファージにおける抗らい菌活性発現に関わる分子の解析. 日本免疫学会・学術集会記録, 29:244, 1999. 第29回日本免疫学会総会・学術総会(京都, 12月).

野間口博子、與儀ヤス子、松岡正典、岡村春樹. 1999. 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.

松尾長光、内藤真理子、大原直也、野間口博子、松岡正典、山田 毅. 1999. ハンセン病予防ワクチンの開発. 日本細菌学会雑誌 54:299.

野間口博子. 1999. HSP65 による免疫モデュレーション(ワークショップ). 第20回日本炎症学会総会(仙台, 7月).

與儀ヤス子、Naila A. Khokhar, 遠藤真澄、川津邦雄、坂場智子、小林政徳、野間口博子. 1999. らい菌感染により誘導されるアポトーシス. 第35回 SHR 学会(札幌, 8月).

山田 毅、内藤真理子、松岡正典、野間口博子、大原直也. 1999. 抗酸菌の主要抗原である Antigen85 をもちいたハンセン病予防ワクチンの開発. 日本ハンセン病誌, 68:53, 1999. 第72回日本ハンセン病学会総会(東京, 4月).

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. 1999. 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. 日本ハンセン病誌 68:53. 第72回日本ハンセン病学会総会(東京, 4月).

野間口博子、Jahan, N., 與儀ヤス子、川津邦雄、岡村春樹. 1999. らい菌感染細胞のNK 介在性細胞障害:IL-12 および IL-18 の作用. 日本ハンセン病誌 68:54. 第72回日本ハンセン病学会総会(東京, 4月).

皆川文重、Isagani R. Patricio, Bui Q. Tuan、福富康夫、藤原 剛. 1999. PGL-I 抗原に対する患者ポリクローナル抗体の解析. 日本ハンセン病学会雑誌 68:48. 第72回日本ハンセン病学会総会(東京, 4月).

藤原 剛、皆川文重. 1999. PGL-I の三糖鎖を認識する単クローン抗体 SF1 の抗原認識機構の解析. 日本ハンセン病学会雑誌 68:49. 第72回日本ハンセン病学会総会(東京, 4月).

儀同政一. 1999. 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. 第 72 回日本ハンセン病学会総会(4月、東京).

儀同政一. 1999. ハンセン病末梢神経障害克服への展望、化学療法からみたハンセン病末梢神経障害. 第 72 回日本ハンセン病学会総会(4月、東京).

Jamal, M.A., 前田伸司、中田 登、儀同政一、柏原嘉子. 1999. Molecular basis of clarithromycin resistance in mycobacteria. 第 72 回日本ハンセン病学会総会(4月、東京).

儀同政一. 2000. 新規マクロライド系及びニューキノロン系薬剤の抗らい菌活性. 第 73 回日本ハンセン病学会総会(3月、鹿児島).

Shi, L., M. Yajima, K. Kawatsu, M. Matsuoka, Y. Kashiwabara, and M. Endoh. 2000. Investigation of polymerase chain reaction and immunohistochemical staining with histopathology in the diagnosis of early leprosy in Sichuan province of China. 日本ハンセン病誌, 69: 40. 第 73 回日本ハンセン病学会総会(鹿屋、3月).

Mwanatambwe, M., Y. Fukunishi, M. Yajima, K. Suzuki, K. Asiedu, N. Yamada, and G. Asano. 2000. Clinical and histopathological findings of Buruli ulcer. 日本ハンセン病誌, 69: 49. 第 73 回日本ハンセン病学会総会(鹿屋、3月).

山本十糸子、梅森清子、野島康弘、佐藤由紀夫、松尾和浩、野間口博子、山本三郎. 1999. 免疫増強性オリゴ DNA 配列の結核菌噴霧感染モデル系でのワクチン効果. 第

29 回日本免疫学会総会・学術総会(京都、12月).

福富康夫、虎谷聡、木村博昭、松木玄二、松岡正典. 1999. マクロファージにおける抗らい菌活性発現に対する TGF β の抑制作用機序. 第 72 回日本ハンセン病学会総会(東京、4月).

虎谷聡、木村博昭、松岡正典、J.L.Krahenbuhl、福富康夫. 1999. マクロファージにおける IFN- γ 誘導 NO 産生と細胞表面 Ia 分子発現の関係. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会(京都、12月).

福富康夫、木村博昭、虎谷聡、松岡正典. 2000. らい菌刺激マクロファージのサイトカイン産生に対する PGE2 の影響. 第 73 回日本ハンセン病学会総会(鹿屋、3月).

遠藤真澄、野間口博子、小林和夫. 1999. シュワン細胞における抗酸菌感染による神経栄養因子・サイトカインの発現. 神経化学 38: 357. 第 42 回日本神経学会(広島、9月).

山本三郎、山本十糸子、梅森清子. 1999. 抗 HIV リコンビナント BCG ワクチンの安全性・安定性. 第 74 回日本結核病学会総会(3月、宇都宮市).

山崎利雄、芳賀伸治、赤川清子、山本三郎. 1999. PCR 法による結核菌群から BCG の鑑別同定法の検討. 第 135 回日本結核病学会関東支部総会(5月、東京).

山本三郎. 1999. 免疫増強性 DNA. 第 8 回臨床免疫学生物学研究会(7月、神戸市).

山本三郎、山本十糸子、David N. McMurray. 1999. モルモットに対する

結核菌噴霧感染に及ぼす BCG ワクチンの効果. 第 3 回日本ワクチン学会 (11 月、名古屋) .

山本十糸子、梅森清子、野島康弘、佐藤由紀夫、松尾和浩、野間口博子、山本三郎. 1999. 免疫増強性オリゴ DNA 配列の結核菌噴霧感染モデル系でのワクチン効果. 第 29 回日本免疫学会学術集会 (12 月、京都) .

伊保澄子、山本十糸子、山本三郎. 1999. ヒト NK 及び T 細胞に対し IFN- γ 産生誘導活性を示す細菌 DNA の塩基配列 (2) . 第 29 回日本免疫学会学術集会 (12 月、京都) .

分担研究報告書

IL-12 および IL-18 によるらい菌宿主および菌の障害

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 病原微生物部第1研究室長

研究要旨

IL-12 および IL-18 がらい菌およびその宿主にどのような影響を与えるかについて、マウス腹腔内培養細胞を用いて検討した。IL-12 および IL-18 を同時に加えて培養すると、らい菌の感染および非感染に関わらず、NK 細胞に依存して細胞の破壊がみられた。FDA/EB 染色により、control、IL-12 または IL-18 どちらか一方を加えたもので、半数の菌が死菌であると推測された。IL-12 および IL-18 両方加えたものでは約 80% が死菌であった。一方、抗 IL-12 または抗 IL-18 を加えた場合では約 10% のみが死菌であった。宿主と菌の障害度との間には完全な比例関係はみられなかった。

A. 研究目的

ハンセン病の原因菌である *Mycobacterium leprae* (らい菌) は宿主細胞内で生育できる細胞寄生菌である。したがって、菌が直接障害を受け殺菌される場合はもちろんのこと、菌感染宿主の障害も菌の生育に重大な影響を及ぼす。マウスにらい菌を接種する事によって IL-12 および IL-18 の誘導産生が見られる。IL-12 および IL-18 がらい菌およびその宿主にどのような影響を与えるかについて、マウス腹腔内培養細胞を用いて検討したので報告する。

B. 材料と方法

らい菌: *Mycobacterium leprae* Thai 53 (らい菌) は、BALB/cA-nu/nu にて継代されたものである (ハ病研: 松岡博士より分与された)。

細胞培養: BALB/cA マウス (♀; 6-7 週令) の腹腔内細胞 (PC) を採取して、24 穴プレートにカバースリップをいれた上で培養した (2×10^5 /well)。培養液は、15% 子ウシ血清添加 DMEM を用いた。

IL-12 および IL-18 (各 10 ng/ml)、anti-IFN- γ (50 μ g/ml)、L-NMMA (500 μ M) を必要に応じて添加した。

NK 細胞または T 細胞の除外には、anti-AsialoGM1 + complement (100 μ g/ 10^6 cells + 20 μ l/ 10^6 cells) または anti-CD4 or CD8 Mab + complement を用いた。

サイトカインおよび NO の測定: 培養 3 日目の培養液中の価について、ELISA キット (Endogen) を、NO は Griess Reagent を用いて測定した。

細胞数および菌数カウント: カバースリップ (2 サンプル) を PBS で洗浄した後メタノール固定 (10 分) し、抗酸菌染色をおこなった。顕微鏡下 (400 倍率) で細胞数 (ブルー色) をカウントし、ランダムに選んだ 10 視野の平均値 (1 視野) を細胞数とした。菌数は、カバースリップ (2 サンプル) を PBS で洗浄、超音波処理し、シェパードの方法により測定し平均値を菌数とした。菌の生死の判断は FDA/EB 染色によった。

C. 結果

IL-12 および IL-18 による宿主細胞の障害: 培養 11 日目の細胞数をカウントした。顕微鏡下での観察で、すべての細胞が菌を取り込んでいた。IL-12 および IL-18 を同時に加えて培養した場合、らい菌の感染お

よび非感染に関わらず細胞の破壊がみられ、細胞数は約 1/6 に減少していた。このような細胞破壊は、大きく NK 細胞に依存していた。宿主細胞の破壊がアポトーシスによるものであるかどうかの検討をおこなったが、今までのところアポトーシスであることの証明はできなかった。

らい菌の障害：IL-12 および IL-18 を同時に加えて培養した場合、約 2 週間には宿主細胞に障害をきたし、intact 細胞内菌数は control に比して約 1/8 に減少していたが、全菌数（障害細胞中の菌を含む）はほとんど変わらなかった。FDA/EB 染色によると、培養 15 日目では、control、IL-12 または IL-18 どちらか一方を加えたもので、半数の菌が死菌であると推測された。IL-12 および IL-18 両方加えたものでは約 80% が死菌であった。一方、抗 IL-12 または抗 IL-18 を加えた場合では約 10% のみが死菌であった。宿主と菌の障害度との間には比例関係はみられなかった。

D. 考察

腹腔内培養細胞は、physiological に IL-12 を産生していることに加えて、らい菌の感染によって IL-12 および IL-18 の産生がみられることを前に報告した。本実験における菌感染濃度では宿主の障害を引き起こさないまでも、内因性サイトカインの誘導や産生が殺菌効果を示すことが考えられた。

E. 結論

生存らい菌、宿主細胞および感染防御性サイトカイン (IL-12 および IL-18) がネットワークを形成し、宿主防御に貢献している。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yogi, Y., T. Banba, M. Kobayashi, H. Katoh, N. Jahan, M. Endoh, and H. Nomaguchi. 1999. Leprosy in hypertensive nude rats (SHR/NCr-mu). *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*

67: 435-445.

Yogi, Y., M. Endoh, T. Tanaka, and S. Akira, H. Okamura, H. Nomaguchi. 1999. Bacteria killing by macrophages via NF-IL6 gene dependent mechanism: the susceptibility to *Mycobacterium leprae* in NF-IL6 knockout mice. *Jpn. J. Lepr.* 68: 97-108.

Naito, M., M. Matsuoka, N. Ohara, H. Nomaguchi, and T. Yamada. 1999. The antigen 85 complex vaccine against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice. *Vaccine* 18: 795-798.

Ohara N, M. Matsuoka, H. Nomaguchi, M. Naito, and T. Yamada. 2000. Inhibition of multiplication of *Mycobacterium leprae* in mouse foot pads by recombinant bacillus Calmette-Guérin (BCG). *Vaccine* 18: 1294-1297.

2. 学会発表

野間口博子、与儀ヤス子、松岡正典、岡村春樹. 1999. 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.

松尾長光、内藤真理子、大原直也、野間口博子、松岡正典、山田 毅. 1999. ハンセン病予防ワクチンの開発. *日本細菌学会雑誌* 54 : 299.

野間口博子. 1999. HSP65 による免疫モデュレーション. 第 20 回 日本炎症学会 ワークショップ (HSP と炎症) p 108.

与儀ヤス子、Naila A. Khokhar, 遠藤真澄、川津邦雄、坂場智子、小林政徳、野間口博子. 1999. らい菌感染により誘導されるアポトーシス. 第 35 回 SHR 学会 (8 月、札幌).

山田 毅、内藤真理子、松岡正典、野間口博子、大原直也. 抗酸菌の主要抗原である Antigen85 をもちいたハンセン病予防ワクチンの開発. 第 72 回日本ハンセン病学会総会 p53 東京 1999 年 4 月.

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 7 2 回日本ハンセン病学会総会 p53 東京 1999 年 4 月.

野間口博子、Jahan, N.、與儀ヤス子、川津邦雄、岡村春樹. らい菌感染細胞の NK 介在性細胞障害 : IL-12 および IL-18 の作用. 第 7 2 回日本ハンセン病学会総会 p53 東京 1999 年 4 月

山本十糸子、梅森清子、野島康弘、佐藤由紀夫、松尾和浩、野間口博子、山本三郎. 1999. 免疫増強性オリゴ DNA 配列の結核菌噴霧感染モデル系でのワクチン効果. 日本免疫学会総会 京都.

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2研究室長

研究要旨

マクロファージは種々の機能を担っている免疫担当細胞であり、異物食食やサイトカイン産生等、重要な役割を果たしている。同細胞の細胞膜上には様々なレセプターが存在し、病原細菌を認識あるいは食食するのに関与するものがいくつか知られている。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食食する機構について解析した。その結果、マウスマクロファージがらい菌により刺激された時に、マンノースレセプターがサイトカインの一つである腫瘍壊死因子（TNF）の産生誘導に大きく関わっていることが判明した。

A. 研究目的

マクロファージの病原細菌を認識する細胞膜上の分子については、最近 TLR (Toll-like receptor) がよく知られており、特に LPS のシグナル伝達を介する TLR4 に関してはそのアダプター分子である MyD88 から NF- κ B の活性化までのメカニズムが解明されつつある。抗酸菌に関しては TLR2 の関与が示唆されているが、まだ詳しくは解明されていない。抗酸菌はマクロファージに食食される。その食食機構については補体や抗体のオプソニン作用が大きな役割を果たしているが、それ以外にも菌表層に多く存在するマンノースに対するマクロファージ上のマンノースレセプターも関与することが示唆されている。そこで我々は、マクロファージがらい菌の糖を認識し、TNF 等のサイトカインの発現誘導やらい菌の食食が起こる系が存在するか否かを検討した。

B. 研究方法：

らい菌の回収：ヌードマウス foot pad にらい菌 (Thai-53 株) を接種し、一年後に増殖してきた菌を回収し、7H12 培地に浮遊させ 4 °C で保存し、実験に供与した。

マクロファージの培養：ICR マウス腹腔常在細胞をカバーリップの入った 24 well プレートにまいて、10% FBS-RPMI 培地中で一晩前培養した。ハंकス液で洗浄後、得られた付着細胞をマクロファージとして用いた。

らい菌のマクロファージへの感染：Shepard 法で菌数計算した一定量のらい菌を細胞培養液に加え、4 時間 37 °C で培養した。

培養上清中のサイトカイン測定：培養上清を回収し、遠心して細胞等を除去した後、ELISA (R&D) 法で培養上清中の TNF 量を定量した。

RT-PCR：total RNA 抽出後、reverse transcriptase (Perkin-Elmer) で逆転写したものを鋳型として GeneAmp PCR kit (Perkin-Elmer) で増幅することにより、TNF 及びコントロールとして GAPDH mRNA の発現量を調べた。プライマーには以下に示したものをを用いた。

TNF sense primer：

(5'-TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGG-3')

TNF anti-sense primer：

(5'-TGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGG-3')

GAPDH sense primer :

(5'-TCGGTGTGAACGGATTGGC-3')

GAPDH anti-sense primer :

(5'-CTCTTGCTCAGTGTCCCTTGC-3').

(6) 抗酸菌染色 : BBL TB Quick Stain Reagents (Becton Dickinson) でカバースリップ上のらい菌感染細胞を染色し、光学顕微鏡で鏡検した。

C. 研究結果

マウスマクロファージをらい菌と混合培養すると、らい菌が迅速にマクロファージ内に取り込まれた。また、培養 2 時間後の RT-PCR にて TNF mRNA 発現誘導が確認された。培養 4 時間後の培養上清を採取し、EIA を行った結果、TNF 蛋白産生も確認された。この系にマンノース (2-5 mg/ml) を共存させたところ、TNF mRNA および蛋白発現が共に抑制され、食食もわずかに抑制されていた。マクロファージをらい菌と IFN- γ 共存下で 48 時間処理すると NO が産生されることを我々はすでに報告している。マンノース 10 mg/ml でも同様に TNF の発現が抑制されたが、IFN 共存下 48 時間後の NO 産生量がマンノース 0-5 mg/ml の時と比べて著明に低下していたので、マンノース濃度過剰による毒性が現れたと考えられた。次にマンノースダイマー (Manal \rightarrow 6Man) 10 mg/ml 共存下で培養 4 時間後の培養上清中 TNF 発現量を調べたところ、マンノースモノマーと同様に TNF 発現誘導が抑制された。さらにマンノースダイマー BSA (Manal \rightarrow 6Man)-BSA でも TNF 発現誘導が抑制され、BSA のみではそのような抑制は見られなかった。これらのことから、マンノースレセプターはらい菌によるマクロファージの活性化において重要な役割を果たしていること示唆された。LPS のレセプターとされている CD14 に対する抗体と共に LPS あるいはらい菌でマクロファージを処理すると、LPS による TNF の発現誘導は抑制されたが、らい菌による TNF 発現誘導は抑制されなかった。

D. 考察

大腸菌の細胞壁構成成分の LPS による刺激がマクロファージ内部へ伝達される場合に必要な分子として TLR4 がクローズアップされ、その解析が進んでいる。その TLR のファミリー分子の一つである TLR2 が抗酸菌の構成成分や抗酸菌自体によるマクロファージ系細胞への刺激に関係しているという報告が最近多くなった。ただし、抗酸菌の細胞表面上には様々な分子が多く存在し、TLR2 のみが抗酸菌を認識しているとは考えにくい。マンノースレセプターは抗酸菌の食食に関わる分子であるが、同時に菌による刺激の伝達にも関わっているのではないかと我々は考え、今回の報告のような実験を行った。その結果、マンノースレセプターも TLR ファミリーのように細菌構成成分の刺激を伝達していることが示唆された。これだけのデータでは不十分であり、マンノースレセプターのノックアウトマウス等を使用した実験を行う必要がある。また、他の抗酸菌や抗酸菌構成成分、抗酸菌分泌物質等でも同様に検討しなければならない。

E. 結論

マンノースレセプターはらい菌食食及びらい菌認識時のマクロファージの反応に重要な役割を果たしており、TNF の発現誘導に関わりを持っていることがわかった。

F. 研究発表

2. 学会発表

福富康夫、虎谷聡、木村博昭、松木玄二、松岡正典 : マクロファージにおける抗らい菌活性発現に対する TGF β の抑制作用機序. 第 7 2 回日本ハンセン病学会総会、東京、4 月、1999.

虎谷聡、木村博昭、松岡正典、J.L.Krahenbuhl、福富康夫 : マクロファージにおける IFN- γ 誘導 NO 産生と細胞表面 Ia 分子発現の関係. 第 2 9 回日本免疫学会総会・学術集会、京都、1 2 月、1999.

木村博昭、虎谷聡、松岡正典、小林和夫、
福富康夫：マクロファージにおける抗らい
菌活性発現に関わる分子の解析. 第29回
日本免疫学会総会・学術集会、京都、12
月、1999.

Toratani, S., and Y. Fukutomi. 1999.
Tumor necrosis factor- α -dependent
activation of inducible nitric oxide
synthase is necessary for production of
nitric oxide in murine peritoneal
macrophages. 8th Meeting of the
Society for Free Radical Reserch,
Sydney, Australia, Dec., 1999.

福富康夫、木村博昭、虎谷聡、松岡正典：
らい菌刺激マクロファージのサイトカイン
産生に対する PGE2 の影響. 第73回日本
ハンセン病学会総会、鹿屋（鹿児島）、3
月、2000.

分担研究報告書

転写調節因子 NF-IL6 発現とらい菌感受性

分担研究者 與儀 ヤス子

国立感染症研究所ハンセン病研究センター 生体防御部第2研究室長

研究要旨

腹腔マクロファージにおける転写調節因子 NF-IL6 遺伝子発現と宿主のらい菌感受性についてマクロファージ機能不全を呈する NF-IL6 ノックアウトマウス、T・B およびらい菌感染マクロファージ機能不全を呈する ALY マウスおよび T・B・NK 細胞機能不全によりマクロファージ活性が亢進した KSN-BNX マウスのらい菌感受性能と NF-IL6 遺伝子発現を中心とした実験結果から、らい菌特異的免疫機構が宿主からのらい菌排除に重要な役割を演ずることが明らかにされた。

A. 研究目的

NF-IL6 ノックアウトマウスへのらい菌感染実験から転写調節因子 NF-IL6 を介する免疫機構がらい菌の生体内からの殺菌・排除に関与していることを明らかにし日本ハンセン病学会誌に報告した。しかしながら、その作用はリステリアや結核菌でみられた機序とは異なり、らい菌特異的免疫機構との相互制御的効果によるものであった。さらに、NF- κ B inducing kinase の変異により T・B 機能不全を呈する ALY マウスを用いてらい菌感受性と NF-IL6 遺伝子発現について検討した結果、プロテオース・ペプトン刺激 *aly/aly* マウスの腹腔内マクロファージには認められた NF-IL6 遺伝子の発現がらい菌を感染させた *aly/aly* マウスのマクロファージでは消失し腹腔内に接種されたらい菌は感染10カ月目の腹腔網内系組織球内で増殖していた。本年度は、石垣らにより開発された KSN (ヌード) マウスに NK 活性を低下させる *b eige* 遺伝子と B 細胞機能不全を起こす *x id* 遺伝子を導入することにより作出した3細胞(T・B・NK)免疫機能低下マウスを供試してらい菌感受性と NF-IL6 遺伝子の発現について検討した。

B. 研究方法

KSN (T細胞機能不全)、KSN-*bg* (T・NK細胞機能不全)、KSN-*xid* (T・B機能細胞不全) および KSN-BNX (T・B・NK細胞機能不全) マウスの両後肢足と静脈から 2×10^7 個のらい菌を感染させて細菌学・病理組織学的観察を経時的に実施した。また、各供試マウスの常在性および 2×10^8 個のらい菌を採取4日前に感染させた腹腔内マクロファージを24時間培養して NF-IL6 遺伝子とサイトカイン遺伝子発現について RT-PCR 法で調べた。培養上清中の TNF α 、IL-1 α および IL-12 産生について ELISA 法で検討した。脾細胞を3日間培養し同様に検討した。

C. 研究結果

らい菌感染後10カ月目まで観察した結果、菌増殖による足腫脹が KSN-BNX > KSN = KSN-*xid* > KSN-*bg* の順に観察された。リンパ球の浸潤が KSN, KSN-*bg* および KSN-BN マウスのらい菌感染足で認められたが、KSN-*xid* マウスにはリンパ球浸潤が見られなかった。また、らい菌感受性が最も低かった KSN-*bg* マウスの感染足には特に強いリンパ球浸潤が血管周囲に観察された。供試した全ての KSN-*bg* マウ

スの肝臓と脾臓には腫大像が認められ、H・E 染色結果からは胆管増生像が肝臓の全域に認められた。同様の現象が KSN-BNX マウスの肝・脾臓でも軽度に認められたことから beige 遺伝子が関与していることが推察された。

常在性マクロファージを24時間培養後に発現するサイトカイン遺伝子を調べた結果、T・B・NK 細胞を欠損する KSN-BNX マウスの培養常在性マクロファージには強い NF-IL6 遺伝子の発現が認められ、IGIF/IL-18, IL-12, G-CSF および M-CSF 発現より重篤な免疫不全を呈する KSN-BNX マウスの培養マクロファージに強発現を認めた。この結果はらい菌4日間感染マウスの培養腹腔マクロファージでも同様だった。また、この系統マウスの培養上清中のサイトカイン産生を LPS 存在あるいは非存在下で検討した結果、LPS 非存在下では認められなかった TNF α 産生が、らい菌感染+LPS 存在下で培養すると KSN-xid および KSN-BNX の培養マクロファージが TNF α を産生した。より重篤な細胞性免疫不全を呈する宿主のマクロファージは高い IL-12 産生を誘導した。NK 細胞機能低下 KSN-bg マウスの腹腔マクロファージからの IL-1 α 産生はわずかであったが、他方、効率的な IL-6 産生が認められた。

D. 考察

T 細胞欠損依存性細胞性免疫不全を呈するヌードマウスでは、マクロファージやナチュラルキラー細胞の活性が亢進していることが知られている。KSN-BNX 免疫不全マウスは、3細胞:T・B・NK 機能不全マウスであるが、RT-PCR あるいは ELISA によりサイトカイン発現結果から、T、T・B および T・NK 免疫不全の他 KSN 系マウスよりも KSN-BNX 免疫不全マウス(T・B・NK 機能不全)由来マクロファージはさらに活性化していた。

しかし、KSN-BNX 免疫不全マウスのらい菌感染感受性は極めて高く、マクロファージ活性が亢進していても T・B・NK 細

胞機能不全を呈する宿主では、らい菌の殺菌・排除に欠陥を生じることが判明した。

E. 結論

マクロファージ機能亢進した宿主ではらい菌貪食能は亢進するが、T・B・NK 細胞機能不全により殺菌・排除機能が作動しない。したがって、らい菌殺菌・排除にらい菌特異的免疫機構が重要な役割を演じている。

F. 研究発表

1. 論文発表

與儀ヤス子、遠藤真澄、田中貴志、審良静男、岡村春樹、野間口博子、1999. 転写調節因子 NF-IL6 を介したマクロファージによる殺菌・排除機構: NF-IL6 ノックアウトマウスへのらい菌感染. 日本ハンセン病学会誌、68: 97-108.

2. 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: 54、1999.

與儀ヤス子、Khokhar, N. A., 遠藤真澄、川津邦雄、坂場智子、小林政徳、野間口博子、らい菌感染により誘導されるアポトーシス. 第35回 SHR 学会総会、第35回 SHR 学会総会抄録集、55、1999.

分担研究報告書

液性免疫応答

分担研究者 皆川 文重

国立感染症研究所ハンセン病研究センター 生体防御部第3研究室 室長

研究要旨

フェノール性糖脂質抗原(PGL-I)は、ハンセン病の起因であるらい菌種に特異的である。特異性を担う三糖鎖部分は化学合成され、本病の疫学調査や患者の臨床動態を把握する診断用抗原として活用されている。治療効果の判定を行うには、抗原量の変動追跡が優れている。そこで、劣性エピトープに対するモノクローナル抗体を利用した、血中の抗原量を測定する新たな方法を開発した。

A. 研究目的

抗原の定量法としては、既に Dot-ELISA 法が確立している。しかし、この方法は、血清サンプルをカラムで精製・濃縮して使用するため、煩雑で時間を要する。臨床現場で実用可能な、簡便・迅速で高感度な方法の開発を目指した。

B. 研究方法

最初に、特異性を担う三糖鎖について12種類の構成糖鎖抗原を準備した。これを用いて、PGLの三糖鎖部分に対するモノクローナル抗体をマウスで作成し、それぞれの抗体が認識するエピトープの化学構造の解析を行った。次いで、様々な臨床状態にある患者ポリクローナル血清中に出現する抗体の種類を、凝集抑制法を活用して分析した。劣性エピトープを割り出した後、これに対するモノクローナル抗体を指標あるいは捕捉抗体として、循環免疫複合体の定量をサンドイッチ ELISA 法と凝集抑制法で行った。

C. 研究結果

I. 糖鎖モノクローナル抗体の種類
大別して、3種類ある。最優位な抗体で非還元末端側単糖(3,6-OMe₂-glucose)または二糖を認識するもの、中間部糖鎖を認

識するもの、および三糖鎖を一括して認識する抗体である。

II. 患者ポリクローナル抗体の構成
マウスで多彩な抗体が得られたので、臨床状態により、色々な抗体種の組合せを予測したが、結果は意外に単純であった。主要抗体は、マウスと同様に非還元末端側糖鎖に対する抗体で、全ての患者で観察された。三糖鎖を一括して認識する抗体は、ヒトでは1例もみられていない。中間部の糖鎖をエピトープとする抗体として、第三位糖であるラムノースを認識する患者が5%存在した。複数の抗体が共存する個体は僅かであった。結果として、3-OMe-rhamnose に対するモノクローナル抗体、DZ2C11 を捕捉あるいは指標抗体として選択した。

III. 免疫複合体の定量
サンドイッチ ELISA と凝集抑制の二法を固定した。検出感度は、いずれも 10 ng/ml であった。複合体の捕捉用 mAb をプレートに塗布後、サンプルを添加し、第二抗体で定量する作業はかなり煩雑で時間を要する。それに比べ、指標抗体として利用する凝集抑制法による定量法は、簡便で療養所などの現場での活用が期待できる。また、検査費用も安く経済的である。

D. 考察

従来法と比較して、簡便さと感度共に優

れた PGL 抗原の定量法である。サンドイッチ ELISA 法は結果を得るのに数時間を要するが、凝集抑制法は僅か 2 時間で完了する。また、未治療のらい腫型ハンセン病患者での血中抗原量は 5000 ng/ml 程度を示し、検出感度限界の 10 ng/ml は治療に伴い減少する抗原量をモニターするのに、充分実用に耐える値であるといえる。

E. 結論

らい菌種特異的な PGL 抗原を、鎖反応性モノクローナル抗体を捕捉あるいは指標抗体として利用して、高感度に検出する方法を開発した。約 2 時間で 10 ng/ml の抗原を検出できる凝集抑制法は、臨床応用可能ならい菌特異的抗原検出方法である。

F. 研究発表

1. 論文発表

皆川文重. 1999. らい菌、広範囲 血液・尿化学検査. 免疫学的検査 (3) その数値をどう読むか. 日本臨床 57 : 134-137.

2. 学会発表

皆川文重、Isagani R. Patricio、Bui Q. Tuan、福富康夫、藤原 剛. 1999. PGL-I 抗原に対する患者ポリクローナル抗体の解析. 日本ハンセン病学会雑誌 68:48. 第 72 回日本ハンセン病学会総会 (東京、4 月)

藤原 剛、皆川文重. 1999. PGL-I の三糖鎖を認識する単クローン抗体 SF1 の抗原認識機構の解析. 日本ハンセン病学会雑誌 68:49. 第 72 回日本ハンセン病学会総会 (東京、4 月)