

分担研究報告書

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 生体防御部 主任研究官

研究要旨

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。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、らい菌並びにその他の抗酸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結果、感染に伴う特定因子の mRNA 発現増強を見いだした。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から起きている。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、それらが産生する神経栄養因子、サイトカイン等、生理活性物質遺伝子発現の解析を行ってきた。そこで今年度は、抗酸菌感染に伴う、これら生理活性物質遺伝子発現の変動を解析した。

B. 研究方法

シュワン細胞株にらい菌 (Thai53) を感染させた後、経時的に定法に従い細胞より全 RNA を分離し、RT-PCR 法にて神経栄養因子、それらのレセプター、サイトカイン、ケモカイン mRNA 発現を解析した。らい菌の感染は、カバースリップ上で培養した感染シュワン細胞株を、チール・ネールセン法による抗酸菌染色を施すことにより確認した。らい菌感染シュワン細胞株培養上清を初代培養神経細胞に添加し、突起伸長並びに生存維持に及ぼす影響についても検討した。

C. 研究結果

樹立したシュワン細胞株は、nerve growth factor (NGF)、brain-derived

neurotrophic factor (BDNF)、glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF)、neurotrophin 3 (NT-3)、Trk A (NGF receptor)、p75 (low affinity receptor for neurotrophins)、ciliary neurotrophic factor (CNTF)、leukemia inhibitory factor (LIF)、insulin-like growth factor 1 (IGF-1)、transforming growth factor β (TGF- β)、neural cell adhesion molecule (NCAM)、interleukin (IL) -1、IL-12、IL-18 (IGIF)、regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES) mRNA の構成的発現を認めた。らい菌は感染 24 時間後にはすでにシュワン細胞内に存在が認められ、72 時間後には殆ど全ての細胞中に多数のらい菌の存在が確認された。らい菌感染に伴い NT-3、GDNF、RANTES mRNA 発現の upregulate を認めた。一方、らい菌感染シュワン細胞株培養上清の添加により、初代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。

D. 考察

シュワン細胞へのらい菌の感染に伴い、シュワン細胞由来神経栄養因子発現の upregulate が認められた。これは *M. leprae* 感染に伴う神経炎の組織再生・修復にシュワン細胞由来因子が機能している可能性を示唆する。一方、ケモカインは特定の白血球の組織への浸潤を誘導することにより、感染症の病態に深く関与していると考えられており、特に HIV、*H. pylori*、マラリア感染におけるケモカインの関与は詳細な検討が成されている。そこで今後は、らい菌感染時におけるケモカイン RANTES 発現の意義を、*M. avium*、*M. intracellulare* 等他の抗酸菌感染に伴う結果と対比させながらの検討が必要である。

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、LIF、TGF- β 、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. 抗酸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・考察した。

F. 研究発表

1. 学会発表

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, 1999. 第 42 回日本神経化学会 (広島, 9月).

分担研究報告書

新規抗らい菌療法の開発研究

分担研究者 儀同 政一

国立感染症研究所ハンセン病研究センター 第4研究室長

研究要旨：

近年開発された炎症制御作用や免疫調節作用を持つ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）で検討した。ヌードマウス足蹠法では CAM と RXM は、40 mg/kg（週6日、90日間、経口投与）で抗らい菌活性を認めた。Buddemeyer 法では、薬剤濃度 2.0—0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、マクロライド系薬剤は、AZM<RXM<CAM の順で、ニューキノロン系薬剤は、OFLX<LVFX<SPFX の順で強い抗らい菌活性を認めた。

A. 研究目的

ハンセン病の多剤併用療法は、今なお数ヶ月から数年に及ぶこと、また治療の過程でらい反応や副作用の問題がある。これら諸問題を解決するため、ニューマクロライド系薬剤の炎症制御作用、免疫調節作用など抗菌活性以外の免疫薬理学的作用が注目されている。新規薬剤として roxithromycin（RXM）、azithromycin（AZM）は、clarithromycin（CAM）と、levofloxacin（LVFX）は、sparfloxacin（SPFX）及び ofloxacin（OFLX）と比較検討した。さらに clindamycin（CLDM）の再評価も行なった。各薬剤の抗らい菌活性は Buddemeyer 法とヌードマウス足蹠法を用いて行なった。

B. 研究方法

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、 ^{14}C -パルミチン酸を加え、さらに培養を7日間継続する。遊離した ^{14}C CO_2 量を液体シンチレーションカウンターで測定し、RXM、AZM、CAM、LVFX、SPFX、OFLX、CLDM、RFP（2.0—0.125

$\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の抗らい菌活性を検討した。

ヌードマウス足蹠法による抗らい菌活性 BALB/c-nu/nu ヌードマウスの両後肢足蹠にらい菌 10^7 を接種した。菌接種後3—5ヶ月に至る3ヶ月間、①対照群、②SPFX 10 mg/kg、③CAM 30 mg/kg、④CAM 40 mg/kg、⑤RXM 30 mg/kg、⑥RXM 40 mg/kg を、週6回マウス用カテーテルで経口投与した。菌接種後8—11ヶ月に、月1回、4ヶ月にわたり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

Buddemeyer 法による抗らい菌活性各薬剤の最終薬剤濃度 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での抑制率は、RFP（79.4%）、CAM（75.6）、SPFX（70.8）、RXM（65.4）、CLDM（44.3）、LVFX（33.8）、OFLX（21.6）、AZM（20.6）であった。ニューマクロライド系薬剤の抗らい菌活性は、CAM>RXM>AZM、ニューキノロン系では、SPFX>LVFX>OFLX であった。

ヌードマウス足蹠法による抗らい菌活性

菌接種後 11 ヶ月目では、①対照群： 6.0×10^9 、② SPFX 10 mg/kg： 6.5×10^6 、③ CAM 30 mg/kg： 3.6×10^7 、④ CAM 40 mg/kg： 1.9×10^7 、⑤ RXM 30 mg/kg： 4.0×10^8 、⑥ RXM 40 mg/kg： 2.2×10^8 であった。SPFX 10 mg/kg と CAM 40 mg/kg はヌードマウス足趾内らい菌の増殖を完全に抑制した。RXM はいづれの濃度でも抗らい菌活性を示すものの、不完全抑制であった。

D. 考察

作用機序の相違する各種薬剤の抗らい菌活性をヌードマウス足趾法と Buddemeyer 法で比較検討したところ、両法間の抗らい菌活性は、ほぼ一致したが、CAM など一部薬剤で相関が認められなかった。今回、*in vitro*法である Buddemeyer 法と *in vivo*法であるヌードマウス足趾法とも新規ニューマクロライド系 CAM と RXM に優れた抗らい菌活性が確認できた。特に RXM は、抗らい菌活性とともに強い炎症制御作用と免疫調節作用を有するなどクロファジミンと薬理作用が類似した薬剤で、クロファジミンのように色素沈着など副作用の少ない抗ハンセン病薬として期待される。また、Buddemeyer 法で、新規ニューキノロン系薬剤 LVFX に OFLX の 2 倍の抗らい菌活性を認めた。CLDM に優れた抗らい菌活性を認めた。

E. 結論

新規ニューマクロライド系薬剤であるクラリスロマイシン(CAM)とロキシスロマイシン(RXM)に強い抗らい菌活性を認めた。新規ニューキノロン系薬剤であるレボフロキサシン(LVFX)にオフロキサシン(OFLX)の 2 倍の抗らい菌活性を認めた。クリンダマイシン(CLDM)に優れた抗らい菌活性を認めた。

F. 研究発表

1. 論文

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.

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.

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.

2. 学会発表

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 7 2 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 7 2 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 7 2 回日本ハンセン病学会総会 (4 月、東京).

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).

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 7 3 回日本ハンセン病学会総会 (2000 年 3 月、鹿児島)

分担研究報告書

免疫増強性DNAワクチンの開発

分担研究者 山本 三郎

国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 細菌製剤第1室長

研究要旨 正常末梢血単核球(PBMC)をリコンビナントヒト IL-4と抗 CD40 抗体共存下に培養し上清に遊離する IgE を ELISA 法で検出する系を用いた。BCG 由来核酸画分で免疫増強活性のある MY-1 を添加し IgE 産生への影響を検討したところ、MY-1 の濃度に依存して IgE 産生は有意に抑制された。抑制率はばらつきが認められたが、50 μ g/ml の MY-1 の濃度で有意に産生抑制が認められた。MY-1 自身は PBMC に毒性は示さず、培養後の細胞生存率や細胞増殖率は無添加のものと同じであった。上清中の IFN- γ は、MY-1 の添加によって産生が亢進した。MY-1 による IFN- γ 産生亢進が IgE 産生抑制の機序であることを確かめるため、抗 IFN- γ 抗体を MY-1 が添加されている IgE 産生抑制系に加えたところ、IgE 産生抑制は一部解除された。また、抗 IL-12 抗体を添加し、IgE 産生への影響を検討したところ、抗 IL-12 抗体は、抗 IFN- γ 抗体と同様に、MY-1 の IgE 産生抑制を部分的に解除した。以上のことから、1) MY-1 は IgE 産生誘導を抑制する。2) その機序として、MY-1 によって産生亢進した IFN- γ が関与する。3) IL-12 も MY-1 による IgE 産生抑制機序の一端を担っていることが判明した。さらに 11 種類の合成オリゴヌクレオチドにより IgE 産生系への影響を検討したところ、CGTACG を含む 30 塩基のオリゴヌクレオチド A は IgE 産生抑制が認められた。IFN- γ 産生は、IgE 産生抑制とほぼ平行であり、オリゴヌクレオチド A は高い IFN- γ 産生を示した。

A. 研究目的

Mycobacterium bovis BCG の核酸画分、MY-1 は BCG の抗腫瘍効果を検討するなかで見出された。98%が核酸で、DNA が 70%、RNA が 28%であり、タンパク質 0.15%、糖 0.27%、脂肪 0.1%からなる。マウスの実験では、IFN- γ 等のインターフェロン、サイトカイン産生を誘導するとともに、NK 細胞活性を亢進させ、抗腫瘍効果も認められた。ヒト末梢血単核球(PBMC)においても IFN- γ の亢進が認めらる。一方、アレルギー性鼻炎は IgE に起因する即時型反応が主であり、IgE の産生は診断・治療のうえできわめて重要である。IgE の産生は T 細胞存在下、もしくは CD40 リガンド（抗 CD40 抗体）の存在下において IL-4 や IL-13 等のサイトカインによって誘導さ

れる。逆に、IgE 産生抑制は IgE 誘導初期に IFN- γ を作用させると起こるとされている。IFN- γ を産生したり、逆に、IFN- γ に誘導される IL-12 にも IgE の産生抑制作用がある。そこで、今回は、MY-1 を IgE を誘導する *in vitro* の系に添加して、IgE 産生を抑制できるかどうかを検討した。

B. 研究方法

正常人末梢血から Ficoll-Hypaque にて PBMC を分離した。得られた PBMC をリコンビナントヒト IL-4、抗 CD40 抗体にて 14 日間培養した。培養は IgE 誘導の至適条件である IL-4 (100U/ml)、抗 CD40 (0.1 μ g/ml)、培養 14 日間とした。MY-1 は培養の最初から添加した。培養 14 日目に培養上清を回収し、ELISA 法にて IgE を測定した。ELISA 法は 2 種類の抗体、CIA-E-

7.12 と CIA-E-4.15 を 96 穴プレートにコートし、サンプルを入れた後、アルカリフォスファターゼ結合 2 次抗体 (goat anti-human IgE) を加え、PNPP の発色を 405nm の吸光度にて測定した。合成 DNA は日清紡より購入した。

細胞上清中の IFN- γ 測定は、ELISA キットを用いた。

C. 研究結果

1. MY-1 の IgE 産生への影響

各種濃度の MY-1 を IgE 産生系に添加し、IgE 産生を抑制するかどうか検討したところ、MY-1 の濃度上昇に伴い、IgE 産生が有意に抑制された。MY-1 の濃度が 10 μ g/ml を越えると反応はほぼプラトーに達した。そこで、MY-1 の濃度を 50 μ g/ml に設定し、以下の実験を行った。

IgE の抑制率は個体によりばらつきが認められたが、80%の例において、50 μ g/ml の MY-1 濃度で有意に産生抑制が認められた。MY-1 自身は PBMC に毒性は示さず、培養後の細胞生存率や細胞増殖率は無添加のものと同じであった。

このように MY-1 の IgE 産生抑制の機序としては、IFN- γ の産生亢進がもっとも考えられる。そこで、14 日間培養した後の培養上清中の IFN- γ を測定した。その結果、MY-1 の添加によって PBMC 中の IFN- γ 産生が亢進することが認められた。MY-1 による IFN- γ 産生亢進が、IgE 産生抑制機序であることを確かめるため、抗 IFN- γ 抗体を MY-1 が添加されている IgE 産生誘導系に加えたところ、IgE 産生抑制は解除されたが、それでもなお 40%程度の抑制がなかったままであった。

IFN- γ 産生が MY-1 によって亢進し、MY-1 の IgE 産生抑制に関与することは、IFN- γ を *in vitro* で誘導する IL-12 の関与も推測される。そこで、IFN- γ と同様、抗 IL-12 抗体を添加し、IgE 産生への影響を検討したところ、抗 IL-12 抗体の添加は、抗 IFN- γ 抗体の添加と同様に、MY-1 の IgE 産生抑制を部分的に解除した。しかし、

30-50%程度の抑制率は残ったままであった。

以上のことから、1) MY-1 は IgE 産生誘導を抑制する。2) その機序として、MY-1 によって産生亢進した IFN- γ が関与する。3) IL-12 も MY-1 による IgE 産生抑制機序の一端を担っていることが判明した。

2. 合成 DNA の IgE 産生への影響

次に、より効率的に IgE 産生を抑制する目的で、MY-1 を細分化しもっとも IgE 産生を抑制する塩基配列を求めた。すでに、BCG のタンパク質 c DNA を 45 塩基ずつに分け、どこがもっともマウス脾細胞において IFN- γ 産生を介した NK 活性の増強が認められるかが同定されている。さらに 45 塩基よりも 6 塩基が対になった構造 (パリンドローム構造) を中心に持つ 30 塩基において IFN- γ 産生を介した NK 活性の増強が誘導できることが示された。その後、パリンドローム構造の前半 3 塩基のバリエーション、すなわち計 64 (4x4x4) 種類の 30 塩基オリゴヌクレオチドで NK 活性を調べたところ、10 種類に著しい NK 活性の増強が認められた。これはヒト末梢血を用いた実験でも同様であり、その際、IFN- γ 産生も平行して上昇していた。そこで、この 10 種類と増強しなかった 1 種類の計 11 種類で IgE 産生を検討した。IgE 産生抑制は個人差がかなり認められたが、その中で、CGTACG を含む 30 塩基のオリゴヌクレオチド A はほとんどの場合、抑制を認めた。同様に IFN- γ 産生を検討したが、やはり IgE 産生抑制とほぼ平行であり、CGTACG を含むオリゴヌクレオチド A は高い IFN- γ 産生を示した。

そこで、オリゴヌクレオチド A の IgE 産生抑制において、このパリンドローム構造が本当に重要であるか否か、4 番目の塩基 A を他の塩基に変えて IgE 産生を調べたところ、検討した 6 症例いずれも CGTTCG 配列がもっとも強く IgE 産生を抑制した。同様に IFN- γ 産生も高値を示した。抗 IFN- γ 抗体と抗 IL-12 抗体の添加によっては、MY-1 と同様に完全には IgE 産生抑

制を解除できなかつたが、約 60-70%の IgE 産生抑制を阻止し得た。すなわち、MY-1 とこの CGTTTCG の 30 塩基配列は同様の機序で IgE 産生を抑制しているものと考えられた。

D. 考察

本研究では、BCG 由来核酸 (MY-1) にて、IL-4 と抗 CD40 抗体にて誘導したヒト末梢リンパ球からの IgE 産生を抑制する可能性を示した。さらに、もっともその効果を示す部位は BCG タンパク質 c DNA の #813-842 の 30 塩基配列であった。さらに 30 塩基のなかでも GACGTC 配列はマウスの NK 活性では重要であったが、IgE 産生抑制においては CGTACG とともに、パリンドローム構造を崩した CGTTTCG 構造がもっとも IgE 産生を抑制した。IgE 産生抑制の機序としては、MY-1 や合成単鎖オリゴヌクレオチドによって誘導される IFN- γ と spontaneous に分泌される IL-12 が重要であり、それぞれの抗体にて MY-1 及びオリゴヌクレオチドによる IgE 産生抑制を阻止できた。しかし、これらの抗体による完全解除はできなかつたことから、他の機序も関与していることが推測された。

IFN- γ と IL-12 による IgE 産生抑制に関しては、多くの研究がなされている。しかし、臨床応用となると、IFN- γ も IL-12 も様々な問題点を抱えている。アレルギー性鼻炎患者に対して、リコンビナント IFN- γ の全身投与を行ったところ、特異的 IgE 及び抗原特異的な IgE 産生にはまったく影響を及ぼさず、アレルギー症状に対する効果も認められなかつた。さらに、全身の倦怠感や発熱といった副作用がかなりの頻度で認められた。IL-12 に関しては、IFN- γ 誘導による NK 活性の亢進をはじめとした抗腫瘍活性に多くの期待が寄せられたが、かなりの副作用が起こるとされている。唯一、この 2 つのサイトカインの臨床応用の可能性は、ネブライザーによる経鼻腔・経気道的投与によるアレルギー性鼻炎、気管支喘息などのアレルギー疾患治療がある。

実際、マウスのアレルギーモデルでは、IFN- γ や IL-12 のネブライザーによる経鼻腔・経気道的投与により、気道内でのアレルギー反応の低下や、好酸球の集積、IgE 産生亢進の阻止などが報告されている。MY-1 はがん患者に対する副作用は少なく安全であることから、MY-1 や合成 DNA のネブライザーによる鼻腔投与がもっとも臨床効果をあげやすいように思われる。しかし、MY-1 や合成 DNA のネブライザーによる投与による粘膜変化、とくに肉芽形成、や DNA 投与による人為的 DNA 組み替えによる不可逆的癌化などの検討はなされなければならない。

アレルギー疾患における結核菌や BCG による治療効果の可能性は以前から報告されている。結核菌で感作されたマウスは、抗原特異的な IgE 産生が抑制されることが報告されている。最近でも、*M.vaccae* 投与による抗原特異的 IgE の誘導抑制や BCG 感染による好酸球集積の抑制が報告され、IFN- γ ノックアウトマウスを用いた研究から、それらの機序が IFN- γ によることが証明されている。IFN- γ や IL-12 の産生は、結核菌や BCG で容易に誘導される。最近では、ツベルクリン反応性とアトピー性アレルギー疾患の頻度に有意な負の相関関係があることが統計学的に示された。このことは BCG ワクチンによる細胞性免疫の獲得とアレルギー治療の可能性が示されたが、臨床的には、早期の BCG ワクチン接種はアトピー性アレルギー疾患になんら影響を及ぼさなかつたとの報告もなされている。すなわち、たん白の投与によるワクチンでは、アレルギー治療の可能性は少なく、今回の研究で使用したような、DNA の必要性が示唆される。

最近では、遺伝子治療が新しい治療法として注目を集めている。アレルギー性疾患に対する遺伝子治療の可能性は、おおまかに 2 つに分けられる。1 つは、体内における免疫反応をアレルギー反応亢進に働く Th2 型、すなわち、IL-4 や IL-5 のサイトカイン産生パターンから、アレルギー反応抑制

に働く Th1 型、すなわち IL-12 や IFN- γ のサイトカイン産生パターンに変換することを目的に、ある種の DNA を投与するものである。その代表的なものとして、今回の MY-1 があげられる。さらには、CGTTCG などの合成オリゴ DNA が該当する。われわれの研究と平行して、Krieg らのグループは、細菌由来 5'-プリン-プリン-CG-ピリミジン-ピリミジン-3'を含む合成オリゴヌクレオチドが CpG モチーフとして免疫機能を調節できることを報告している。この CpG モチーフに関しては様々の検討がなされ、CpG モチーフが Th1 へのスイッチを促進することが判明した。Raz らのグループは、免疫増強性 DNA 配列をプラスミドに組込んで筋肉内投与すると、抗原特異的 IgE が減少し、IFN- γ で誘導される IgG2a の増加を報告している。同時に、IFN- γ や IL-12 が誘導され、IL-4 が減少することが認められた。

もう一つの遺伝子治療の可能性は、抗原をコードした c DNA を発現ベクターとともに投与するもので、現在、抗原を精製たん白として投与する減感作療法の遺伝子版といえる。抗原をコードした c DNA を発現ベクターとして投与されたマウスでは、抗原発現がなされ、IgE 産生を抑えて、ヒスタミンの遊離が抑制される。リコンビナント BCG をつくる発現ベクターに抗原を組込むと、抗原の発現と、さらに大量の IFN- γ 産生が起こるとの報告が行われている。この面においても、MY-1 の活用性がありえると思われる。

E. 結論

免疫増強性オリゴ DNA は IgE 産生誘導を抑制する。その機序として、産生亢進した IFN- γ 、IL-12 が IgE 産生抑制機序の一端を担っている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tokunaga, T., Yamamoto, T. and Yamamoto, S.: How BCG led to the

discovery of immunostimulatory DNA. Jpn. J. Infect. Dis. 52: 1-11, 1999.

Iho, S., Yamamoto, T., Takahashi, T. and Yamamoto, S.: 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, 1999.

Fujieda, S., Iho, S., Kimura, Y., Sunaga, H., Ikara, H., Sugimoto, C., Yamamoto, S. and Saito, H.: 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., Yamamoto, T. and Tokunaga, T.: 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, 1999.

藤枝重治、斎藤 等、伊保澄子、山本三郎: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, 1999.

Yamamoto, S., Yamamoto, T. and Tokunaga, T.: The discovery of immunostimulatory DNA sequence. Springer Seminars in Immunopathology: Immunostimulatory DNA Sequences (in press).

Yamamoto, S., Yamamoto, T., Iho, S.

and Tokunaga, T.: Activation of NK cell (human and mouse) by immunostimulatory DNA sequence. Springer Seminars in Immunopathology: Immunostimulatory DNA Sequences (in press).

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: 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: 2000 (in press)

2. 学会発表

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).

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.

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).

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

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

ヒトにおける双極型ハンセン病マウスモデルを確立し、形態学的に解析した。無胸腺ヌードマウスにらい菌を接種することにより、らい腫型病変を誘導でき、また、細胞性免疫誘導性サイトカイン投与により、類結核型病変を惹起できた。すなわち、実験的らい菌モデルがハンセン病における多彩な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。さらに、実験的らい菌感染モデルではヒトにおける双極ハンセン病：らい腫型および類結核型を表現できなかった。本研究では実験的らい菌感染マウスモデルを用い、免疫学的機作により双極ハンセン病を惹起し、形態学的に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

正常マウスや無胸腺ヌードマウスにらい菌を感染させた場合、感染部位にびまん性単核炎症細胞浸潤（マクロファージ、泡沫マクロファージなど）および多菌性を示し、ヒトにおけるらい腫型ハンセン病に類似していた。これらのモデルに細胞性免疫起動性サイトカインである interleukin 12 (IL-12) を投与することにより、局所的な単核細胞浸潤（マクロファージ由来類上皮性細胞集積：肉芽腫炎症）および少菌性を示し、ヒトにおける類結核型ハンセン病に類似していた。

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り、宿主防御は細胞性免疫発現に依存していることが判明した。細胞性免疫はマクロファージ由来 IL-12 により誘導され、宿主抗菌防御や病変形成に寄与している。

らい菌感染におけるヒト宿主応答は多彩であり、基本病型として1) 類結核型および2) らい腫型に大別される。その機序では抗菌防御と病変形成であり、分子機構として細胞性免疫発現が決定因子である。類

結核型：抗菌防御↑、肉芽腫炎症↑、細胞性免疫発現↑であり、らい腫型：抗菌防御↓、肉芽腫炎症↓（びまん性単核炎症細胞浸潤）、細胞性免疫発現↓である。しかし、詳細な解析や新規治療・予防戦略の開発には動物実験モデルの確立が急務である。

従来の実験的らい菌感染動物モデルはヒトにおけるハンセン病型を適切に表現することができず、解析が遅れていた。本研究の成果はヒトにおける双極型ハンセン病を表現する動物モデルを確立し、今後、分子医学的に解析することにより、新規治療・予防戦略の開発に寄与することが期待される。

E. 結論

ヒトにおける双極型ハンセン病マウスモデルを確立し、形態学的に解析した。無胸腺ヌードマウスにらい菌を接種することにより、らい腫型病変を誘導でき、また、細胞性免疫誘導性サイトカイン投与により、類結核型病変を惹起できた。すなわち、実験的らい菌モデルがハンセン病における多彩な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. 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. オーラミン・ロダミン (Combination) 蛍光染色. 検査と技術 27：462-465.

2. 学会発表

Shi, L., M. Yajima, K. Kawatsu, M. Matsuoka, Y. Kashiwabara, and M. Endoh. 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、2000. 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. Clinical and histopathological findings of Buruli ulcer. 日本ハンセン病誌、69：49、2000. 第73回日本ハンセン病学会総会（鹿屋、3月）.

分担研究報告書

抗酸菌感染防御における好中球やアポトーシスの役割

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

抗酸菌の感染病巣における局所炎症応答をヒト好中球と単核球ケモカイン発現や炎症細胞死（アポトーシス）から解析した。結核菌や結核菌由来ツベルクリン蛋白刺激は早期より好中球由来ケモカイン発現を誘導したが、結核菌と tumor necrosis factor α (TNF- α) の共存により、急速な好中球アポトーシスを惹起した。これらの刺激により、単核球は単核球走化性ケモカインを発現し、持続性発現を示した。好中球は単核球に比し、容易にアポトーシスを誘導した。マクロファージの局所的集積病変である結核性肉芽腫炎症はケモカイン動態とアポトーシス機序により、説明できる。

A. 研究目的

抗酸菌感染症では、他の細菌感染とは異なった生体反応を示す。例えば、単核細胞の集簇を示す肉芽腫である。抗酸菌は、菌体成分に脂質の含有が多く、また、細胞内寄生菌であり、増殖速度が遅いなどの特徴が、このような特殊な生体防御反応を引き起こしていると考えられる。生体は、抗酸菌に対し特別な反応で対抗（生体防御）しているにもかかわらず、必ずしもこの菌に対する防御反応は充分とはいえない。分担研究者は、抗酸菌による炎症病巣において菌に対して直接の防御にあたる炎症細胞である好中球と単核細胞の作用について、サイトカインの産生とアポトーシスを中心に検討し、炎症病巣の形成機序の解明を試みた。

B. 研究方法

ツベルクリン（purified protein derivative: PPD）皮内反応陽性健常者の末梢血より、好中球と単核球を分離した。好中球は 5×10^5 /ml に、単核球は 10×10^5 /ml に、RPMI 培地を使用した。これらの細胞を加熱死菌 H37Rv、PPD、lipopolysaccharide (LPS) にて刺激し、ケモカイン mRNA 発現（IL-8、MIP-1 α 、

MCP-1）を Northern blot analysis、蛋白産生を enzyme immunoassay (EIA) を用いて解析した。さらに、形態学的に炎症細胞のアポトーシス（核のクロマチン濃縮や断片化）に観察した。

C. 研究結果

H37Rv、PPD および LPS 刺激により好中球はケモカイン（IL-8 と MIP-1 α ）を比較的早期（mRNA では刺激後 30 分）より発現し、特に、LPS は最強のケモカイン誘導物質であった。しかし、MCP-1 発現はいずれの刺激でも認められなかった。一方、単核球はこれらの刺激により、IL-8、MIP-1 α および MCP-1 のいずれも発現した。単核球の IL-8 mRNA 発現は、刺激後 30 分より顕著に認められた。MIP-1 α mRNA は刺激後 30 分から発現し、2 時間後まで増加した。MCP-1 mRNA 発現は 2—4 時間後より明らかとなり、24 時間後まで増加していた。結核菌と PPD は LPS に比し、単核球 MCP-1 mRNA 発現を誘導した。

結核菌体成分と TNF- α の共存は好中球アポトーシスを惹起したが、LPS は好中球アポトーシスを抑制した。しかし、これらの条件下で単核球アポトーシスは誘導されなかった。

D. 考察

抗酸菌感染部位における最も早期に浸潤する炎症性細胞は好中球であり、その後、マクロファージ/単球が局所的に浸潤、集積し、肉芽腫炎症を形成する。肉芽腫炎症の分子機構は1) 炎症性および走化性サイトカイン制御、2) 炎症性細胞死(アポト-シス)に依存していることが判明した。

抗酸菌(菌体およびPPD)とは異なり、グラム陰性桿菌由来LPSで刺激された炎症細胞(好中球や単球/マクロファージ)は好中球走化性ケモカイン発現を選択的に誘導し、さらに、LPSは好中球アポトーシスを抑制することにより、感染部位における持続的な好中球流入および寿命延長を招来するため、好中球浸潤を特徴とする炎症病変を形成することが考えられる。

感染による炎症病変形成機序は1) 宿主因子と2) 病原体因子が相互に関与している。宿主因子ではケモカインやアポト-シス、病原体因子ではPPD(抗酸菌)やLPS(グラム陰性桿菌)などの物質が感染による炎症病変形成の分子機構である。

E. 結論

抗酸菌感染部位における最も早期に浸潤する炎症性細胞は好中球であり、その後、マクロファージ/単球が局所的に浸潤、集積し、肉芽腫炎症を形成する。肉芽腫炎症の分子機構は1) 炎症性および走化性サイトカイン制御、2) 炎症性細胞死(アポト-シス)に依存していることが判明した。

F. 研究発表

Kasahara, K., and K. Kobayashi. 1999. 34th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy. (San Francisco, July)

分担研究報告書

肉芽腫炎症における血管新生機序

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が認められ、その後に単核細胞浸潤が起こり最終的に肉芽腫が形成される。この病変部においては微小新生血管網の構築は必須の要件であると考えられる。このため慢性炎症における血管新生(neovascularization)の調節機構の解明は抗酸菌感染に対する生体の防御反応についての理解に、さらには血管新生をコントロールすることにより抗菌療法等の効果の増強を誘導できうる可能性について役立つと考えられる。

A. 研究目的

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、炎症病変形成についての調節機構の解明は修復、組織破壊/傷害の理解に極めて有用である。特にこのような慢性的に経過する病変部においては微小血管の新生およびそのネットワーク構築は重要であり、これを調節する血管新生因子の病変形成における役割の解明は對抗酸菌感染症における有効な手段となりうると思えられる。そこで、分担研究者は慢性炎症制御機序における血管新生因子の発現およびその経過における役割を解析した。

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。この関節炎発症の前後における炎症局所の新生血管および血管新生因子の発現を経時的に形態学、サイトカイン発現から解析した。

C. 研究結果

関節炎の発症に伴い炎症局所において血管形成の程度すなわち血管内皮細胞由来と考えられるフォンビルブランド因子の発現量と関節の腫脹は正の相関を示した。さらに血管新生因子である vascular

endothelial growth factor (VEGF) の発現量の関節の腫脹および血管新生と正の相関を示した。VEGF は特異的受容体である Flt-1 および Flk-1 を介して血管内皮細胞に作用すると考えられている。そこでこの 2 種類の VEGF 受容体の発現を RT-PCR 法および Southern blot 法で検出したところ、VEGF と同様に関節炎発症後より著明に局所において発現の増強を認めた。以上の結果より関節炎の発症に血管新生因子である VEGF およびその受容体を介する系が何らかの役割を担っていると考えられた。そこで実際に VEGF の活性を阻害した場合に、関節炎の発症あるいはその経過がどのように変化するかを検討した。関節炎の発症前（初回免疫後 28 日）に VEGF 中和抗体を投与することにより関節炎の発症およびその肉眼的・病理学的重症度は有意に抑制され、さらに関節組織の血管新生も抑制された。しかし関節炎完成後の VEGF 中和抗体投与では関節炎に対する抑制効果は認められなかった。

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、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(VEGF)が慢性炎症の初期病変の形成において必須の要因である事が証明された。このような血管新生を正あるいは負に制御する因子の発現および作用点(相)の解明は慢性炎症すなわち抗酸菌感染における生体防御機構の理解あるいは新規の治療法の開発にとり有用であると考えられる。

E. 結論

慢性炎症の発症あるいはその経過において血管新生は必須な過程であり、その活性を有する VEGF の抑制は関節炎のみならず抗酸菌感染症を制御する上でも重要であると考えられる。今後、血管新生を制御する事による新規の抗・抗酸菌療法などについての理解を確立したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kasama, T., Yamazaki, J., Hatano, Y., Kobayashi, K., Negishi, M., Ide, H., Adachi, M.: Biphase regulation by interleukin 12 of the development of murine type II collagen-induced arthritis: Possible involvement of endogenous interleukin 10 and tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 100-9.

Iwabuchi, H., Kasama, T., Hanaoka, R., Miwa, Y., Hatano, Y., Kobayashi, K., Mori, Y., Negishi, M., Ide, H., Adachi, M.: Down-regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression on human synovial fibroblasts by endothelin-1. *J Rheumatol.* 1999; 26: 522-31.

Kasama, T., Iwabuchi, H., Hanaoka, R., Takeuchi, T. T., Miwa, Y., Lu, J., Mori, Y., Kobayashi, K., Negishi, M., Ide, H., Adachi, M.: Synovial fluid neutrophil expression of interleukin 8 in

rheumatoid arthritis. *Jpn. J. Rheum.* 1999; 9: 175-187.

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

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

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.* In press.

2. 学会発表

羽入田芳生、笠間 毅、岩渕英章、大西玲子、小林和夫、根岸雅夫、井出宏嗣：マウスコラーゲン誘導関節炎の関節組織の血管新生；リウマチ、39：S421、第43回日本リウマチ学会、1999、6、札幌。

笠間 毅、井出宏嗣、足立 満、小林和夫：滑膜線維芽細胞における angiogenic factors の発現とその制御；日本免疫学会総会・学術集会記録、29、s192、第29回日本免疫学会総会・学術集会記録、1999、京都。

分担研究報告書

抗酸菌感染防御におけるヒト気管支上皮細胞の役割：サイトカイン遺伝子調節から

分担研究者 滝沢 始
東京大学医学部検査部講師

研究要旨

種々の抗酸菌の侵入における気道上皮細胞との相互関係は不明の点が多い。気道上皮は外界からの種々の刺激により活性化あるいは抑制され、そのサイトカイン発現能が変化する。抗酸菌感染の初期相で重要な働きをする好中球は局所で産生される IL-8 などにより動員・活性化される。気道上皮はその主な産生細胞であり、その遺伝子調節は複数の転写因子によって制御される。今回、そのうち IL-8 遺伝子制御に重要な NF κ B, および AP-1 の活性化が、BCG および MAC によりどう変化するかを検討した。BCG は濃度依存的な抑制作用を示したが、MAC にはこうした作用はみられなかった。ヒト気道上皮細胞のサイトカイン遺伝子発現調節は抗酸菌感染において初期的な宿主防御機構の一翼を担っている可能性がある。

A. 研究目的

外界から菌が侵入した際に、最も早く接触するのは気道上皮細胞であり、従来から感染防御の第一線としての役割が知られている。すなわち、気道上皮細胞は物理的なバリアー機能に加え、粘液-繊毛輸送系により外来性の細菌を排除する。また、ライソザイムなどは非特異的な、また分泌型 IgA は特異的な粘膜感染防御機構として古くからよく知られている。一方、グラム陰性桿菌ではこの気道上皮との接着が細菌侵入の第一段階として重要であることもよく認識されているが、グラム陽性菌や結核菌をはじめとする抗酸菌の侵入に関する知見は少ない。

最近、気道上皮細胞がさまざまな生物学的活性因子を産生・分泌することが明らかとなってきた。すなわち、気道上皮細胞は interleukin (IL)-6、IL-8、granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)、RANTES、eotaxin などのサイトカインやケモカインを産生し、気道局所への炎症細胞浸潤に積極的に関与することがわかった。また、抗菌物質としてのデフェンシンの産生もみら

れる。このうち、IL-8 は好中球に対する有力な遊走活性因子であり、抗酸菌の感染初期にみられる炎症応答において役割を演じているとされている。IL-8 の遺伝子発現調節機構はヒト気道上皮細胞において解明が進んでおり、そのプロモーター領域に NF κ B、NFIL-6、AP-1 などの結合部位が存在し、その遺伝子発現に重要な役割を果たしている。

細菌感染と気道上皮細胞のサイトカイン発現に関しては、グラム陰性桿菌の気道接着や細菌由来リポポリサッカライド (LPS) による IL-8 増強作用が報告されているが、抗酸菌についてはほとんど不明である。また、前述の転写因子への影響も未知の点が多い。

そこで、本研究では、ヒト気管支上皮細胞に各種抗酸菌を添加した際に、IL-8 発現や NF κ B、AP-1 などの転写調節因子がどう変化するかを検討した。

B. 研究方法

(1) ヒト気管支上皮細胞株の培養

米国 NCI Dr. Lechner らから供与されたヒト気管支上皮細胞株 BET-1A をおもに

用いた。成長因子添加無血清培養液 Ham's F12 液にてコンフルーエントまで培養した。

(2) BCG または *Mycobacterium avium* (MAC) を種々の濃度 (菌数:細胞数、0.01 - 10) で、細胞に添加した。

(3) 抗酸菌添加後経時的に、核タンパクを既報の方法にて抽出した。

(4) electrophoretic mobility shift assay (EMSA) により、³²P 標識した NF κ B, AP-1 の各々に特異的な DNA 塩基配列との結合を検討した。

C. 研究結果

(1) BCG 処置による転写因子 NF κ B 活性化への影響: 4時間処置の場合に BET-1A において、PMA 刺激で明らかな NF κ B の活性化が示されたが、BCG 添加 (菌数:細胞数、0.01 - 10) の4時間の投与によっては、添加した菌数に依存して抑制傾向が認められた。(2) BCG 処置による転写因子 AP-1 活性化への影響: 4時間処理の場合、BET-1A における AP-1 結合にも菌数に依存する活性化抑制傾向を認めた。

(3) MAC 処置による転写因子 NF κ B 活性化への影響:

4時間処置の場合に BET-1A において、PMA 刺激では明らかな NF κ B の活性化が示されたが、MAC 添加 (菌数:細胞数、0.01 - 10) の4時間の投与によっては、明かな影響は認められなかった。

(4) MAC 処置による転写因子 AP-1 活性化への影響:

4時間処置の場合、MAC 添加 (菌数:細胞数、0.01 - 10) の投与によっては、明かな影響は認められなかった。

(5) BCG, MAC 添加によるヒト気管支上皮細胞 BET-1A からの IL-8 遊離への影響: BCG または MAC の菌体を種々の濃度で細胞に添加したのち、24時間後に培養上清を回収して、IL-8 を ELISA 法により定量した。

今回の実験条件では、BCG, MAC とも有意な IL-8 産生増強ないし抑制作用は認められなかった。

(6) 以上の実験条件において、細胞の生存率、LDH 遊離などの影響は認められなかった。

D. 考察

抗酸菌の感染初期において、好中球の局所浸潤と活性化がおり、宿主の感染防御応答のひとつとして重要である。気道上皮は吸入された菌が最初に接触ないし接着しうる細胞であり、現にグラム陰性桿菌ではその重要な侵入経路となっている。抗酸菌感染における気道上皮の関与はこれまであまり知見がなく、その反応性の変化は宿主反応のひとつとして検討を要する。

ヒト気道上皮細胞株 BET-1A は無刺激下に少量の IL-8 を産生・遊離するが、PMA や IL-1, TNF α などの刺激により IL-8 遺伝子発現が誘導され、多量のサイトカインを遊離する。この系で重要な転写調節因子としては NF κ B, AP-1, NFIL-6 が知られており、今回はこのうち前2者について、さまざまな濃度で BCG と MAC 菌体を添加して、その活性化への影響を検討した。その結果、BCG では PMA で誘導される NF κ B の活性化を菌数依存的に抑制した。AP-1 はこの細胞においては構成的に活性化がある程度認められ、これに対しても BCG は抑制効果を示した。トリパンブルー法や LDH 定量によっても細胞毒性はみられず、この効果は細胞傷害によるものではないと思われる。一方、最近その頻度が上昇し、問題となっている非定型抗酸菌のうち最も多い菌である MAC によっては、以上のような影響は明らかでなく、抗酸菌の種類によって生物学的影響が異なることが示唆された。

BCG 添加によって、IL-8 転写調節に重要なふたつの転写因子 NF κ B と AP-1 が抑制された意義は、必ずしも明確ではない。抗酸菌と気道上皮細胞との相互関係についてはほとんど報告がないが、血管内皮細胞やマクロファージ細胞株において、そのサイトカイン発現増強作用が示される一方で、菌種や実験条件によっては転写因子活性を

抑制するとの報告もあり、一定しない。今後は、細胞の種類（正常、患者由来気道上皮細胞や肺胞マクロファージ）を変えたり、あらかじめ刺激した状態での検討も必要である。

E. 結論

BCG, MAC 菌体のヒト気管支上皮細胞の転写因子活性化に及ぼす影響について検討し、前者では抑制効果を認めたが、後者では明らかな効果を認めなかった。菌種によって異なるこのような作用は、抗酸菌感染症の第一の過程である生体への菌の侵入機構において、宿主の防御機構が菌種によって異なることを示唆しており、そのより詳細な検討が重要と思われた。気道炎症性疾患においてその治療効果が示されているマクロライド抗生物質との相互関係も興味をもたれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

Desaki, M., H. Takizawa, T. Ohtoshi, T. Kasama, K. Kobayashi, T. Sunazuka, S. Omura, K. Yamamoto, K. Ito. Erythromycin suppresses nuclear factor-kappa B and activator protein-1 activation in human bronchial epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267:124-128, 2000.

分担研究報告書

UV 処理ヒト結核菌死菌と BCG 菌における感染防御効果の比較

分担研究者 樋口 一恵
結核研究所基礎研究部免疫学科 主任

研究要旨

マウス肺胞マクロファージを *in vitro* で各々状態の異なる結核菌で刺激し、細胞性免疫に関与している代表的なサイトカインの誘導産生量を測定した。IL-12 (p40+p70) 産生は生きた結核菌から抽出した細胞質成分が単独刺激で最も高値の誘導を示したが、IFN- γ 存在下では UV 処理した死菌体刺激が有意に高い誘導を示した。TNF- α や IL-10 についても同様の傾向を示した。オートクレーブ処理死菌体と Formalin 処理死菌体刺激は全てのサイトカインにおいて低値であったが、特に Formalin 処理死菌体が低かった。In vivo でマウスに対して UV 処理した死菌体あるいは BCG で免疫し、吸入感染後に各週毎の臓器内菌量を測定した結果、4 週目までは UV 処理した死菌体と BCG は良く似た制菌カーブを示した。しかし、8 週目から 12 週目では UV 処理した死菌体の制菌力は BCG より高かった。ヒト結核菌が保有する遺伝子の幾つかのものが BCG 菌では欠落していることが報告された。このことは、BCG ワクチンの問題点として上げられる効果の長期維持や特異性に関連している可能性がある。

A. 研究目的

現在、抗結核ワクチンとしては唯一 BCG が使用されている。その効果に関しては、小児の結核性髄膜炎において最も有効とされているが、成人性結核に対しては永久免疫をもたらさないなど、依然として議論の余地が残されている。また、結核感染防御は Th1 タイプが担う細胞性免疫が主であることから、近年、この経路を活性化させる DNA ワクチンの開発も多く試みられているが、その特異性とワクチン効果の半永久化については検討改善が要求されている。従来、特異性の高いワクチン開発をする手始めとして熱処理死菌を使用して制菌力の比較が行なわれてきたが、BCG 以上の効果は得られていない。その原因としてはより強い抗原性を有する菌体蛋白高次構造部分の熱変性が、結果として抗原性の減弱化を導いたと考えられる。この点について、菌体蛋白の変性を起こさない方法で処理した結核菌と BCG との間で制菌効果を比較することを目的として、マウス吸入感染実験

を行った。

B. 研究方法

オートクレーブ処理 (121°C、15min)、Formalin 処理(菌液をマグネットスターラーで攪拌しながら 65°C でガス化させた Formaldehyde 30ml に暴露)、UV 処理 (4×10^8 CFU/ml の菌液を薄型バットに展開して UV 灯で 1 時間照射) を準備した。どの処理方法も生菌培養を行い完全に死菌であることを確認した。UV 処理に限り照射 10 分毎に生菌培養を行い照射時間 30 分以降は完全死菌であったことを確認した。

BAL 操作で収集したマウス肺胞マクロファージを使用して IL-12、TNF- α 、IL-10、IFN- γ の産生量を測定した。UV 死菌または BCG で免疫したマウスに結核菌 H37Rv (1.2×10^7 CFU/ml) 5ml を吸入感染させ、感染後 12 週目まで生菌培養を行った。また、肺での菌の動態と病理組織学的変化を観察するためにパラフィンブロックを作成した。平行してサイトカイン mRNA 検出の為に

肺の一部を凍結保存した。

C. 研究結果

In vitro の肺胞マクロファージにおけるサイトカイン産生は生菌の細胞質成分刺激が本実験で測定した全てのサイトカインを最も高く誘導したが、生菌体の IL-12 と TNF- α の誘導産生量は検出限界値以下であった。この結果は triplicate で 2 回行った実験で同様であった。これに対して UV 照射死菌体がやや高い IL-12 の産生を示し、IFN- γ 存在下では有意に高い誘導産生量を示した。オートクレーブ処理と Formalin 処理の死菌体及び細胞質刺激では全てのサイトカイン誘導が低値であったが、Formalin 処理では特に低かった。

In vivo 吸入感染実験における制菌効果は、3 週目まで生理食塩水の対照群と実験群間で差は無かったが、4 週目から実験群で有意に高い制菌性を示した。UV 群、BCG 群共に同様の制菌傾向を示したが、8 週目から 12 週目にかけては UV 照射群が BCG 群よりも高い制菌性を示した。吸入法で菌感染を行った本実験では脾臓及び肝臓の生菌数は感染 1 週間後から測定可能となり、各々の臓器における制菌性は肺と同様の傾向を示した。臓器重量の変化は、肺と肝臓においては UV 群、BCG 群、対照群間で同様の傾向を示し、肺では 4 週目から増加を示した。脾臓では感染 0 時間から対照群と実験群間で差があり、平均して実験群で 50 mg 増加していた。

D. 考察

In vitro の結果は、熱及び化学処理で生じた変性がマクロファージの TLR ファミリー (TLR-4、TLR-2) や CD-14 の様な膜レセプターとの親和性を極端に下げる事を示唆している。他方、UV 照射は抗原構造上の変化を伴わない殺菌であり、今後の死菌免疫として有効であることが示された。

実験的に BCG 以上のワクチン効果を有する物質は現在発見されていないが UV 照射結核死菌は完全なコードファクターが有

り、acyl radical が内在し、長期的な免疫力と特異的な細胞性免疫反応を誘導する可能性が考えられることから BCG 以上の可能性があると思われる。脾臓における臓器重量変化が BCG と同様の傾向を示した事もその可能性を示唆している。免疫後から感染までの期間の長短とそれに続く感染期間の長短がどのような傾向を示すか、実験的に検討することにより、この可能性については明解な結果が得られると思われる。

E. 結論

結核感染には『BCG 以上のワクチン効果を有する物質はない』という考え方が現在の正しい考え方であるが、本実験においては UV 照射死菌がそれを越える可能性を示唆した。

F. 研究発表

1. 学会発表

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) .

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) .