

TABLE 3. Causes of non-MAC-related deaths ( $n = 13$ )

Case	Serotype	Age (yr) at death	Cause of death <sup>a</sup>	Outcome of MAC treatment	Change in radiographic findings	Extent of lesions
1	4	73	Lung cancer	Cured	None	Minimal
2	4	84	Liver cirrhosis	Relapsed	Worsened	Moderate
3	4	67	Liver cirrhosis	Cured	None	Minimal
4	6	81	IHD	Cured	Improved	Minimal
5	8	72	IPF	Nonresponsive	Worsened	Moderate
6	9	76	IPF	Nonresponsive	None	Minimal
7	14	76	IHD	Nonresponsive	Worsened	Far
8	16	73	Stomach cancer	Nonresponsive	Improved	Far
9	16	87	Cerebral infarct	Relapsed	Worsened	Minimal
10	16	91	Cerebral infarct	Relapsed	Worsened	Moderate
11	16	83	Parkinson's disease	Cured	Improved	Minimal
12	1	84	Sudden death at home	Relapsed	Worsened	Far
13	1	65	RA, pneumonia	Nonresponsive	None	Moderate

<sup>a</sup> IHD, ischemic heart disease; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; RA, rheumatoid arthritis.

probably not known that there were some pulmonary MAC patients with poor prognosis among immunocompetent patients. The evaluation of prognostic predictors and treatment outcomes for pulmonary MAC disease requires long-term follow-up of many patients. In this study, we have been able to follow 68 patients on a monthly basis for more than 5 years. Most of the patients had undergone multidrug antituberculosis chemotherapy, which was conventionally used before the American Thoracic Society recommendation of 1997 (1, 2). Half of the patients had also been treated with CAM in addition to being treated with multidrug antituberculosis chemotherapy. Consequently, the rate of sputum-negative conversion was similar to that in the previous reports (15, 22, 26, 30). At least 21 (30.9%) of 68 patients with pulmonary MAC disease experienced progression or aggravation of the disease and died, excluding non-MAC-related deaths, because the subjects were older. In considering the prognosis of MAC disease in the HIV-negative patient, the progression or aggravation of pulmonary MAC disease that was not due to an opportunistic infection was a direct cause of death.

The ratio of deaths unrelated to MAC was high in the group with serovars other than serovar 4. This was especially true for the serovar 16 patients, who were significantly older than the

patients with serovar 4. The 13 cases of deaths unrelated to MAC, including six patients with worsening findings on radiograms, were excluded from the survival prognosis analysis in order to achieve accurate evaluation. Although the number of cured patients was also small, the population in our study seemed to be appropriate to evaluate the prognostic predictors in patients with pulmonary MAC disease.

Regarding the correlation between treatment outcomes and survival prognosis, it is first very important that all cured patients, including one with serovar 8 who underwent surgical therapy, were alive at the end of this study. Second, it is important that the relapsed patients had a significantly better prognosis than the nonresponders to treatment. The extent of radiographic lesions was also significantly correlated with the prognosis of survival. These results reveal that the outcomes of chemotherapy are closely associated with the survival time for patients with pulmonary MAC disease. The severity of disease and the outcome of chemotherapy could also be prognostic factors for survival in pulmonary MAC patients.

We also studied the relationship between the serotypes of MAC isolates and the long-term survival of patients with pul-

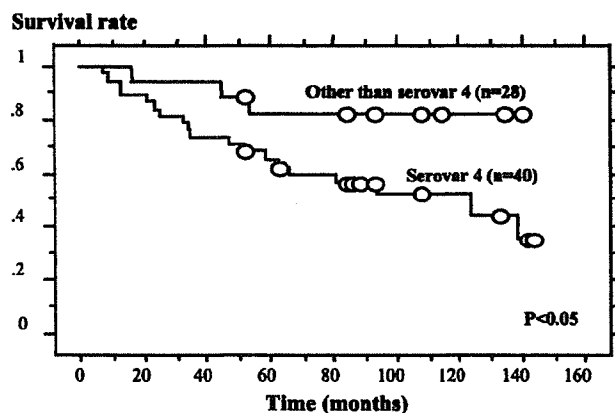


FIG. 5. Kaplan-Meier survival analysis of MAC patients with serovar 4 and those with other serovars. Log rank (Mantel-Cox) test,  $P < 0.05$ .

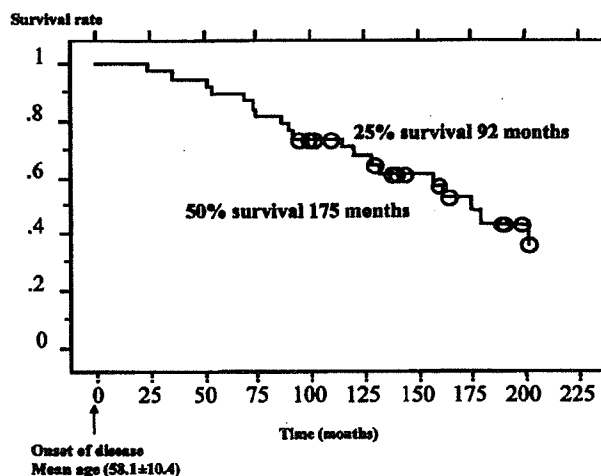


FIG. 6. Kaplan-Meier survival analysis of MAC patients with serovar 4 from the onset of disease.

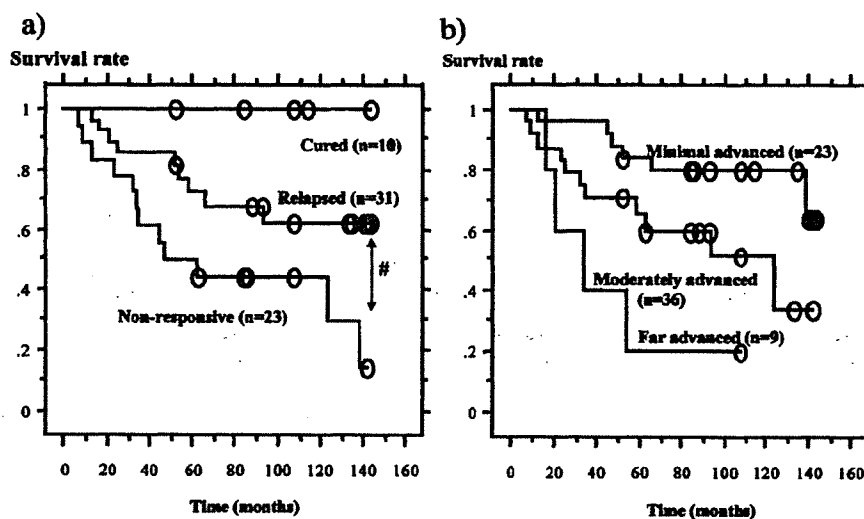


FIG. 7. Kaplan-Meier survival analysis of patients with pulmonary MAC disease divided by (a) bacteriological outcome and (b) the extent of radiographic lesions. (a) Log rank test,  $P < 0.05$  (#); (b) log rank (Mantel-Cox) test,  $P < 0.01$ .

monary MAC disease. It was more difficult to convert sputum to negative when the disease was caused by serovar 4 than for other serovars. The serovar 4 isolates were more resistant to RFP and CAM, and the patients with serovar 4 were more frequently nonresponders to the multidrug chemotherapy than patients with other serovars. However, the sputa of most patients with pulmonary MAC disease became positive on culture during the follow-up period, and the rates were nearly equal between the serovar 4 and the other-serovar groups. This might be due to the factors involved in long-term follow-up and the higher relapse rate in the population of patients being retreated with chemotherapy than in those receiving initial treatment. The patients also may acquire subsequent infections from the living environment, and we have begun a study to

investigate MAC organisms from the houses where the patients live.

The radiographic findings for the serovar 4 group had also become significantly worse in the follow-up periods compared with those in the other-serovar group. In cases of death, the radiographic findings for patients with upper-lobe cavitory disease or with nodular bronchiectasis at enrollment had progressed to bilateral cavitory lesions with sclerofibrotic and emphysematous changes (Fig. 2 to 4). Although radiographic findings alone, whether cavitory or bronchiectasis, cannot be a prognostic tool, the progress of the disease should be closely observed by means of radiographic changes.

In conclusion, the survival time of the serovar 4 group was significantly shorter than that of the other-serovar group. At an

TABLE 4. Susceptibilities of patient isolates to ethambutol, rifampin, clarithromycin, and sparofloxacin

Drug, species, and serovar	No. of isolates with MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) of:						
	$\leq 0.78$	1.56	3.13	6.25	12.5	25	$\geq 100$
<b>Ethambutol</b>							
<i>M. avium</i> serovar 4		1	1	8	11	7	2
<i>M. avium</i> serovars 1, 6, 8, 9			1	3	3	2	
<i>M. intracellulare</i> serovars 14, 16		1	2	4	1		
<b>Rifampin</b>							
<i>M. avium</i> serovar 4	3		4	6	9	4	4
<i>M. avium</i> serovars 1, 6, 8, 9	1	2	1	2	2	1	
<i>M. intracellulare</i> serovars 14, 16		1	5	2			
<b>Clarithromycin</b>							
<i>M. avium</i> serovar 4	6	5	4	10	1		4
<i>M. avium</i> serovars 1, 6, 8, 9	2	1	3	1	1		
<i>M. intracellulare</i> serovars 14, 16		3	5				
<b>Sparofloxacin</b>							
<i>M. avium</i> serovar 4	15	7	3	3	1	1	
<i>M. avium</i> serovars 1, 6, 8, 9	4	1	2	1			
<i>M. intracellulare</i> serovars 14, 16		5	3				

early stage of infection, it is difficult to judge the prognosis of patients with pulmonary MAC disease. Although further studies with large numbers of patients are required, the identification of serotype-specific GPLs may be helpful for prognosis. However, there were MAC-related deaths in patients with pulmonary MAC disease caused by serovar 8 or serovar 14. The importance of other serovars as prognostic predictors will be analyzed when the number of cases with each serovar increases to a level sufficient for statistical evaluation. There were also a number of nonserotypeable patients, including some of the cases with poor prognoses. Thus, it could be argued that the sensitivity of serotyping should be improved. Also, the laborious and time-consuming serotype identification of isolates used in this study needs to be replaced with simple and rapid diagnostic methods, and serotyping is not routinely performed. We have developed enzyme-linked immunosorbent assay serodiagnostic tests that use various serotypes of glycopeptidolipids as antigens and a new serotyping method which uses high-performance liquid chromatography/mass spectrometry analyses with a small-scale preparation of GPLs from MAC isolates for 2 days (21, 27).

The number of serovars identified was lower than in previous reports (4, 9, 13, 35). This might be due to either the effects of the preceding multidrug chemotherapy or to problems of identification, because only 14 serovar-specific polar GPLs from MAC have been structurally characterized at this time (5, 8, 24). Also, neither the GPL antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay nor the original type-specific rabbit antisera were available during our study. However, the serotype specificity could be accurately identified using TLC and FAB-MS analyses. *M. avium* and serotype 4 predominated in this study because of the high geographical distribution of *M. avium* in the Kinki area, in which our institute is located (32). The skewed distribution may also relate to the previous multidrug chemotherapy that most of the enrolled patients had undergone, because the disease caused by *M. avium* was more difficult to cure than *M. intracellulare*-related disease (37). Furthermore, in cases where the serotypes were analyzed twice, both isolates were identified as serovar 4.

The mechanisms underlying resistance to MAC organisms are likely to be highly informative in regard to both host defense against these infections and the basis of the more virulent MAC relatives. It was recognized early in the HIV pandemic that the decline of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte levels to below 100 cells/mm<sup>3</sup> was a profound risk for the development of disseminated MAC (7, 17). Since the CD4<sup>+</sup> T lymphocyte is a major producer of gamma interferon as well as other cytokines, it was speculated that gamma interferon might be important in the control of MAC disease. Despite the wealth of information regarding disseminated infections with MAC, the underlying immune defects have yet to be convincingly demonstrated for pulmonary MAC infections, except in the case of HIV infection. Specific serotypes such as 1, 4, and 8 can be frequently isolated from humans infected with HIV, and the prognosis after infection differs depending on the serotype. Serovar 4 shows an unfavorable prognosis, whereas serovar 16 is associated with rapid recovery (8, 13).

No information dealing on the virulence factor of MAC that is directly related to the intracellular bactericidal activity has been available to date. We have previously reported effects of

(i) various GPLs purified from MAC on the phagocytic processes of human polymorphonuclear leukocytes, (ii) GPL-coated heat-killed staphylococcal cells that were phagocytosed by polymorphonuclear leukocytes, and (iii) the phagosome-lysosome (P-L) fusion (34). Phagocytosis was strongly promoted and the P-L fusion was markedly inhibited by serovar 4, but not serovar 16, GPLs. Serotype 8 GPLs showed concomitant stimulation of both phagocytosis and P-L fusion. These effects may be due to an unknown interaction between specific carbohydrate chains and host phagocytic cell membranes.

The pulmonary MAC disease caused by serovar 4 had a poor long-term survival prognosis. For the treatment of pulmonary MAC disease, including surgery, diagnosis and treatment at an early stage are important. In cases of patients with pulmonary MAC disease caused by serovar 4, it was argued that multichemotherapy including CAM (one of the newer macrolides) and sparfloxacin (one of the newer fluoroquinolones) should be prescribed, because the results of MIC determinations showed that CAM and sparfloxacin were more effective against serovar 4 than EB or RFP. Furthermore, lung resections should be performed in patients with adequate pulmonary reserve for whom medical therapy has been unsuccessful. In addition to the defense mechanism in the patient's lung, the virulence of the organism, and resistance to chemotherapy, a problem regarding the worsening of pulmonary MAC disease that also needs to be addressed is patient compliance issues, which may include a lack of knowledge of the gravity of the disease on the part of both the patient and the physician.

#### REFERENCES

1. American Thoracic Society. 1990. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142:940-953.
2. American Thoracic Society. 1997. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156:S1-S25.
3. Ardalán, P. 1968. *Mycobacterium avium* as cause of human cavernous pulmonary tuberculosis. *Prax. Pneumol.* 22:549-554.
4. Askgaard, D. S., S. B. Giese, S. Thybo, A. Lerche, and J. Bennedsen. 1994. Serovars of *Mycobacterium avium* complex isolated from patients in Denmark. *J. Clin. Microbiol.* 32:2880-2882.
5. Brennan, P. J., and H. Nikaido. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64:29-63.
6. Brooks, R. W., B. C. Parker, H. Graft, and J. O. Falkinham III. 1984. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria. Numbers in eastern United States soils and correlation with soil characteristics. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130:630-633.
7. Chaisson, R. E., R. D. Moore, and D. D. Richmann. 1992. Incidence and natural history of *Mycobacterium avium* complex infections in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146:285-289.
8. Chatterjee, D., and K. H. Khoo. 2001. The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:2018-2042.
9. Denner, J. C., A. Y. Tsang, D. Chatterjee, and P. J. Brennan. 1992. Comprehensive approach to identification of serovars of *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.* 30:473-478.
10. Enomoto, K., K. Oka, N. Fujiwara, T. Okamoto, Y. Okuda, R. Mackura, T. Kuroki, and I. Yano. 1998. Rapid serodiagnosis of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex infection by ELISA with cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate), and serotyping using the Glycopeptidolipid Antigen. *Microbiol. Immunol.* 42:689-696.
11. Gimpl, F., A. Koman, J. Vandro, M. Kapitany, and T. Major. 1969. Lung infection caused by *Mycobacterium avium*. *Z. Erkr. Atmungsorgane. Folia Bronchol.* 131:101-105.
12. Heifets, L. 1996. Susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:1759-1767.
13. Hoffner, S. E., G. Kallenius, B. Petrini, P. J. Brennan, and A. Y. Tsang. 1990. Serovar of *Mycobacterium avium* complex isolated from patients in Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 28:1105-1107.
14. Holland, S. M. 2001. Nontuberculous mycobacteria. *Am. J. Med. Sci.* 321:49-55.

15. Horsburgh, C. R., Jr., U. G. Mason, and L. B. Heifets. 1987. Response to therapy of pulmonary *Mycobacterium avium-intracellulare* infection correlates with results of in vitro susceptibility testing. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135:418-421.
16. Horsburgh, C. R., Jr., and R. M. Selik. 1989. The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Am. Rev. Respir. Dis.* 139:4-7.
17. Horsburgh, C. R., Jr. 1996. Epidemiology of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Semin. Respir. Infect.* 11:244-251.
18. Kalayjian, R. C., Z. Toossi, J. F. Tomashefski, Jr., J. T. Carey, J. A. Ross, J. W. Tomford, and R. J. Blinkhorn. 1995. Pulmonary disease due to infection by *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 20:1186-1194.
19. Kaplan, E. L., and P. Meier. 1958. Nonparametric estimation from incomplete observation. *J. Am. Stat. Assoc.* 53:457-481.
20. Kirschner, R. A., Jr., B. C. Parker, and J. O. Falkinham III. 1992. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. X. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* in acid, brown-water swamps of southeastern United States and their association with environmental variables. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145:271-275.
21. Kitada, S., R. Maekura, N. Toyoshima, N. Fujiwara, I. Yano, T. Ogura, M. Ito, and K. Kobayashi. 2002. Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex with an enzyme immunoassay that uses a mixture of glycopeptidolipid antigens. *Clin. Infect. Dis.* 35:1328-1335.
22. Kobayashi, Y., N. Okimoto, T. Matsushima, and T. Abe. 2002. The effect of combined chemotherapy following the guidelines on treatment for *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. *Kekkaku* 6:435-441.
23. Maekura, R. 1997. The indication of surgical management in patients with pulmonary disease caused by *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. *Kekkaku* 72:53-56.
24. McNeil, M., D. Chatterjee, S. W. Hunter, and P. J. Brennan. 1989. Mycobacterial glycolipids: isolation, structures, antigenicity, and synthesis of neoantigens. *Methods Enzymol.* 179:215-242.
25. Modilevsky, T., F. R. Sattler, and P. F. Barnes. 1989. Mycobacterial disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *Arch. Intern. Med.* 149:2201-2205.
26. Nightingale, S. D., L. T. Byrd, P. M. Southern, J. D. Jockusch, S. X. Cal, and B. A. Wynne. 1992. Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Infect. Dis.* 165:1082-1085.
27. Nishiuchi, Y., S. Kitada, and R. Maekura. 2004. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of small scale glycopeptidolipid preparations to identify serovars of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. *J. Appl. Microbiol.* 97:738-748.
28. Prince, D. S., D. D. Peterson, R. M. Steiner, J. E. Gottlieb, R. Scott, H. L. Israel, W. G. Figueroa, and J. E. Fish. 1989. Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions. *N. Engl. J. Med.* 321:863-868.
29. Reich, J. M., and R. E. Johnson. 1991. Pulmonary disease incidence, presentation, and response to therapy in a community setting. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143:1381-1385.
30. Research Committee of the British Thoracic Society. 2001. First randomized trial of treatments for pulmonary disease caused by *M. avium intracellulare*, *M. malmoense*, and *M. xenopi* in HIV negative patients: rifampicin, ethambutol and isoniazid versus rifampicin and ethambutol. *Thorax* 56:167-172.
31. Ruf, B., D. Schurmann, W. Brehmer, H. Mauch, and H. D. Pohle. 1989. Mycobacteria in AIDS patients. *Klin. Wochenschr.* 67:717-722.
32. Sato, A. 2000. Geographic distribution of *Mycobacterium avium intracellulare* complex serovars isolated from patients in five cities of Japan. *Kansenshogaku Zasshi* 74:64-72.
33. Stappaerts, I., F. Portaels, and L. Van Schil. 1993. Long-term follow-up of pulmonary disease caused by *Mycobacterium avium* in a previously healthy patient. *Acta Clin. Belgica* 48:202-208.
34. Takagi Y. 2000. Effect of serotype specific glycopeptidolipid (GPL) isolated from *Mycobacterium avium* complex (MAC) on phagocytosis and phagosome-lysosome fusion of human peripheral blood monocytes. *Kekkaku* 75: 9-18.
35. Yakus, M. A., and R. C. Good. 1990. Geographic distribution, frequency, and specimen source of *Mycobacterium avium* complex serotypes isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 28:926-929.
36. Yamamoto, M. 1971. Present status of pulmonary atypical mycobacterial disease in Japan. XXist IUAT, Moscow, Russia.
37. Yamori, S., and M. Tsukamura. 1992. Comparison of prognosis of pulmonary diseases caused by *Mycobacterium avium* and by *Mycobacterium intracellulare*. *Chest* 102:89-90.

# Macrophages in Inflammation

Nagatoshi Fujiwara\* and Kazuo Kobayashi

Department of Host Defense, Osaka City University Graduate School of Medicine, 1-4-3 Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan

**Abstract:** The inflammatory process is usually tightly regulated, involving both signals that initiate and maintain inflammation and signals that shut the process down. An imbalance between the two signals leaves inflammation unchecked, resulting in cellular and tissue damage. Macrophages are a major component of the mononuclear phagocyte system that consists of closely related cells of bone marrow origin, including blood monocytes, and tissue macrophages. From the blood, monocytes migrate into various tissues and transform macrophages. In inflammation, macrophages have three major functions; antigen presentation, phagocytosis, and immunomodulation through production of various cytokines and growth factors. Macrophages play a critical role in the initiation, maintenance, and resolution of inflammation. They are activated and deactivated in the inflammatory process. Activation signals include cytokines (interferon  $\gamma$ , granulocyte-monocyte colony stimulating factor, and tumor necrosis factor  $\alpha$ ), bacterial lipopolysaccharide, extracellular matrix proteins, and other chemical mediators. Inhibition of inflammation by removal or deactivation of mediators and inflammatory effector cells permits the host to repair damaged tissues. Activated macrophages are deactivated by anti-inflammatory cytokines (interleukin 10 and transforming growth factor  $\beta$ ) and cytokine antagonists that are mainly produced by macrophages. Macrophages participate in the autoregulatory loop in the inflammatory process. Because macrophages produce a wide range of biologically active molecules participated in both beneficial and detrimental outcomes in inflammation, therapeutic interventions targeted macrophages and their products may open new avenues for controlling inflammatory diseases.

## INTRODUCTION

Inflammation is a complex, highly regulated sequence of events that can be provoked by a variety of stimuli including pathogens, noxious mechanical and chemical agents, and autoimmune responses. The subsequent cascade of events is characterized by the signs and symptoms of redness, swelling, heat, and pain. The inflammatory response occurs in the vascularized connective tissue, including plasma, circulating cells, blood vessels, and cellular and extracellular components. This corresponds with increased microvascular caliber, enhanced vascular permeability, leukocyte recruitment, and release of inflammatory mediators [1]. Inflammation is the primary process through which the body repairs tissue damage and defends itself against stimuli. In the physiologic condition, the regulated response protects against further injury and clears damaged tissue. In pathologic situation, inflammation can result in tissue destruction and lead to organ dysfunction.

The process of inflammation is divided into acute and chronic patterns. Acute inflammation is of relatively short duration, lasting for minutes, several hours, or a few days, and its main features are the exudation of fluid and plasma proteins (edema) and the emigration of leukocytes, predominantly neutrophils. Chronic inflammation is of longer duration and is associated histologically with the presence of lymphocytes and macrophages, the proliferation of blood vessels, fibrosis, and tissue necrosis. Many factors participate in the course and histologic features of both acute and chronic inflammation. In inflammation, macrophages have three major functions; antigen presentation, phagocytosis, and immunomodulation through production of various cytokines and growth factors [2, 3]. No human has been identified as having congenital absence of this cell line, probably because macrophages are required to remove primitive tissues during fetal development as new tissues develop to replace them. In this article, we will review the role of macrophages in inflammation.

## DEVELOPMENT OF MACROPHAGES

The mononuclear phagocyte system consists of cells that have a common lineage whose primary function is phagocytosis. Monocytes and tissue macrophages in their various forms make up the system [4]. These cells are a system because of their common origin, similar morphology, and common functions, particularly phagocytosis. The cells of the mononuclear phagocyte system originate in the bone marrow, circulate in

the blood, and mature and become activated in various tissues (Fig. 1). The first cell type that enters the peripheral blood after leaving the marrow is incompletely differentiated and is called monocytes. When the monocyte reaches the extravascular tissue, it undergoes transformation into a larger phagocytic cell, the macrophage. In addition to augmenting phagocytotic activity, macrophages have the potential of being activated, a process that results in increased cell size, increased production of lysosomal enzymes, more active metabolism, and greater ability to phagocytose and kill ingested microbes. Once they settle in the tissues, these cells mature and become macrophages. Macrophages may exhibit different morphology and functional properties after activation by external stimuli, including microorganisms. Some develop abundant cytoplasm and are called epithelioid cells because of the morphologic similarity to epithelial cells of the skin. Activated macrophages can fuse to form multinucleated giant cells. Epithelioid cells and multinucleated giant cells are the major cellular component of granulomas, a typical phenotype of chronic inflammation [5]. Macrophages are found in all organs and connective tissues and named to designate their location, such as microglial cells in the central nervous system, Kupffer cells in the liver, alveolar macrophages in the lung, and osteoclasts in the bone.

## FUNCTIONS OF MACROPHAGES

Macrophages have at least three major functions: antigen presentation, phagocytosis, and immunomodulation [2, 3]. The functional responses of macrophages in host defense consist of sequential steps; active recruitment of the cells to the site of infection, recognition of microbes, phagocytosis, and destruction of ingested microbes. In addition, macrophages produce biological active molecules that serve many important roles in innate and adaptive immune responses.

### Antigen Presentation

Antigen-presenting cells function to display antigens for recognition by lymphocytes and to promote the activation of lymphocytes. Antigen-presenting cells include dendritic cells and monocytes/macrophages. Macrophages containing ingested microbes present microbial antigens to differentiated effector T lymphocytes. The effector T cells then activate macrophages to kill microbes in association with cytokines. The macrophage-cytokine-T lymphocyte axis plays a critical role in development of cell-mediated immunity against intracellular pathogens, including *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhi*, and *Listeria monocytogenes*. Ingested macrophages play a role in activate/differentiate naïve T lymphocytes to induce primary responses to microbial antigens, although it is likely that dendritic cells act as more effective inducers of the response.

### Phagocytosis

Macrophages ingest materials to eliminate waste and debris (scavenging) and to kill invading pathogens. The microbicidal mechanisms of phagocytes are largely confined to intracellular vesicles (lysosomes and phagolysosomes) to protect the cells themselves from injury. Therefore,

\*Address correspondence to this author at the Department of Host Defense, Osaka City University Graduate School of Medicine, 1-4-3 Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan; Tel: +81-6-6645-3746; Fax: +81-6-6645-3747; E-mail: fujiwara@med.osaka-cu.ac.jp

Contract grant sponsors: Ministry of Health, Labour and Welfare (Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, Health Sciences Research Grants), The Japan Health Sciences Foundation, Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Osaka City University (Urban Research Project), and The United States-Japan Cooperative Medical Science Program against Tuberculosis and Leprosy.

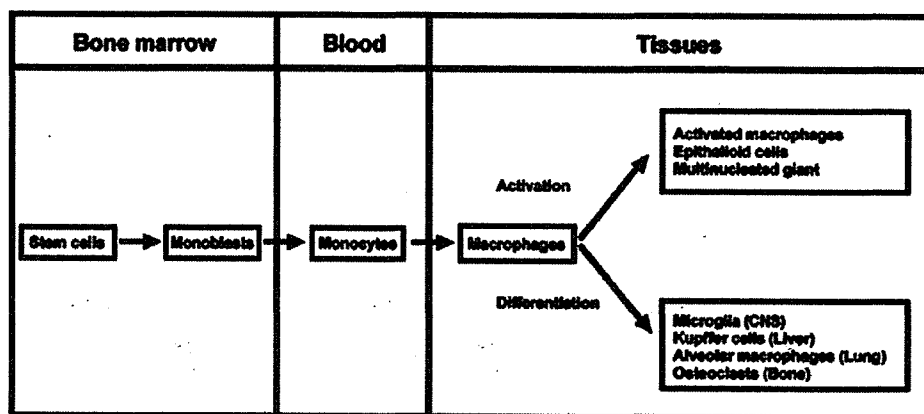


Fig. (1). Maturation of mononuclear phagocytes.

ingestion of microbes into these vesicles is a necessary prelude to microbial killing, and the first step in ingestion is recognition of the microbes by cell surface receptors [6]. Macrophages also express receptors that activate the cells to produce cytokines and microbicidal substances and receptors that stimulate the migration/chemotaxis of the cells to sites of infection. These include mannose receptors, scavenger receptors, receptors for opsonins, seven  $\alpha$ -helical transmembrane/G protein-coupled receptors, and Toll-like receptors (TLRs).

The mannose receptors and scavenger receptors function to bind and ingest microbes. The mannose receptor is a macrophage lectin that binds terminal mannose and fucose residues of glycoproteins and glycolipids on microbial cell walls. Because glycoproteins and glycolipids contain terminal sialic acid or N-acetylglucosamine, the macrophage mannose receptor recognizes microbes but not host cells. Macrophage scavenger receptors bind a variety of microbes as well as modified low-density lipoprotein particles that cannot interact the conventional LDL receptors.

Receptors for opsonins promote phagocytosis of microbes coated with various proteins, including antibodies, complement proteins, and lectins. Fc receptors and complement receptors of macrophages contribute to the opsonin-mediated process. Seven  $\alpha$ -helical transmembrane/G protein-coupled receptors are expressed on leukocytes, recognize microbes and certain mediators that are produced in response to infections, and function mainly migration/chemotaxis of leukocytes to sites of infection [7]. These receptors are found on polymorphonuclear neutrophils (PMNs), macrophages, and most other types of leukocytes. The receptors recognize short peptides containing N-formylmethionyl residues. Because all bacterial proteins and few mammalian proteins (only those synthesized within mitochondria) are initiated by N-formylmethionine, this receptor allows leukocytes to detect and respond to bacterial proteins. PMNs and macrophages also express seven  $\alpha$ -helical transmembrane receptors for chemokines, proteolytic products of complement proteins, lipid mediators such as platelet-activating factor, prostaglandin E, and leukotriene B<sub>4</sub>.

Biding of ligands to the receptors induces migration/chemotaxis of cells from the blood through endothelium and production microbicidal substances, including reactive oxygen/nitrogen intermediates (ROIs/RNIs).

TLRs are a family of membrane proteins that serve as pattern recognition receptors for a variety of microbe-derived molecules and stimulate inflammatory/innate immune responses to the microbes expressing pathogen associated molecular patterns (PAMPs) [8]. To date, 10 mammalian TLRs have been identified and are involved in responses to widely divergent types of molecules that are commonly expressed by microbes but not mammalian cells. The innate immune response to one species of microbe may reflect an integration of the responses of several TLRs to different molecules produced by the microbe. The microbial products that stimulate TLRs include lipopolysaccharide (LPS) of gram-negative bacteria (TLR4), peptidoglycan, lipoteichoic acid, and liparabinomannan of gram-positive bacteria (TLR2), flagellin (TLR5), and unmethylated CpG motifs (TLR9). Specificities of the TLRs are influenced by non-TLR adapter molecules. For example, LPS first binds to soluble LPS-binding protein (LBP) in the blood or extracellular fluid, and this complex serves to facilitate LPS binding to CD14, which exists as both a plasma protein and a glycosphosphatidylinositol-linked membrane protein on most cells except endothelial cells. Once LPS binds to CD14, LBP dissociates, and the LPS-CD14 complex physically associated with TLR4. The predominant signaling pathway used by TLRs results in the activation of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B. The genes that are expressed in response to TLR signaling encode proteins important in components of innate immune responses. These include proinflammatory cytokines [interleukin (IL)-1, IL-12, and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )], endothelial adhesion molecules, and proteins involved in microbicidal mechanisms (inducible nitric oxide synthase).

#### Immunomodulation

Activated macrophages release cytokines such as IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\alpha/\beta$ , IL-10, IL-12, and IL-18 that participate in the

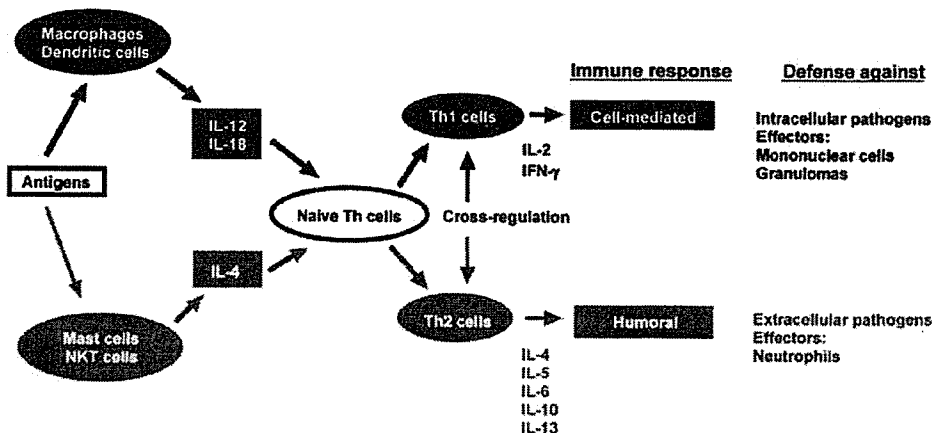


Fig. (2). The system of Th1 and Th2 lymphocytes.

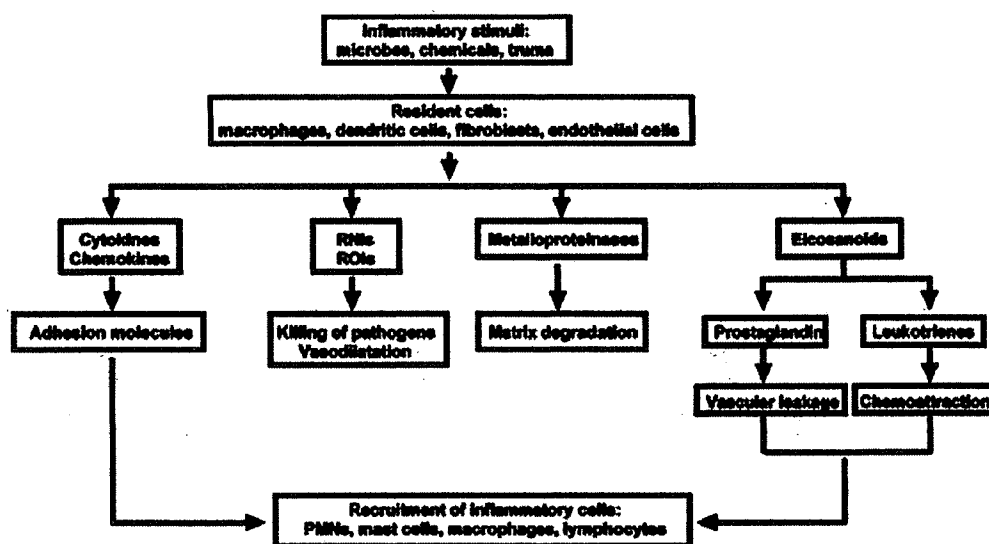


Fig. (3). Initiation of inflammation and recruitment of inflammatory cells.

regulation of immune/inflammatory responses. IL-12 is a heterodimeric cytokine produced primarily by antigen-presenting cells that has important activities in the regulation of various aspects of the immune response. IL-12 stimulates proliferation of activated T and natural killer (NK) cells, enhances NK and lytic activity of cytotoxic T lymphocytes, and induces IFN- $\gamma$  production by T and NK cells. IL-12 plays a central role in promoting type 1 helper T (Th1) immune responses and thus cell-mediated immunity (Fig. 2) [9]. IL-12 represents a functional bridge between the early nonspecific innate resistance and the subsequent antigen-specific adaptive immunity [10]. In addition, they produce chemokines that stimulate leukocyte movement and regulation of migration leukocytes from the blood to tissues [7].

### INITIATION OF INFLAMMATION

The inflammatory response is a tightly ordered sequence of events. After the initial stimulus, a massive influx of inflammatory cells to the site of injury begins. The process begins with release of chemokines and soluble mediators from locally residing cells, including vascular endothelial cells, dendritic cells, macrophages, and interstitial fibroblasts. Signals from these events alter the local adhesion molecule profile and create a chemotactic gradient that recruits cells from the circulation. PMNs are the first inflammatory cells to extravasate and arrive at the site of injury. Specialized mononuclear cells, such as monocytes/macrophages and lymphocytes, are then recruited by further downstream signals. Macrophages participate in the production, mobilization, activation, and regulation of inflammatory/immune effector cells.

When inflammation is triggered by a pathogen, resident macrophages are stimulated by pattern recognition receptors expressed on macrophages as the innate immune response. These receptors include the TLR family and can recognize molecular structures on microbial pathogens, but not on mammalian cells. TLR-mediated responses lead to the activation of NF- $\kappa$ B in association with a battery of proinflammatory cytokine genes, including IL-1 and TNF- $\alpha$ . Because activated macrophages are the main producers of such inflammatory cytokines, the cells play a key role in the initiation of inflammation (Fig. 3). In addition to the innate immune response mediated by TLRs, microbes are opsonized by specific antibodies and complement pathways.

### ACTIVATION OF MACROPHAGES

The important step in the functional maturation and inflammation of macrophages is the conversion from a resting to an activated macrophage. The term activated macrophage indicates that the cell has an augmented capacity to kill microbes or tumor cells. Activation signals include T lymphocyte-derived cytokines [IFN- $\gamma$ , granulocyte-monocyte colony stimulating factor (GM-CSF), and TNF- $\alpha$ ], microbial products (eg. LPS), immune complexes, chemical mediators, and extracellular matrix proteins such as fibronectin. Activated macrophages exhibit an enhanced capacity

to kill microbes and tumor cells. They are larger, with more pseudopods and pronounced ruffling of the plasma membrane, and they produce a wide variety of biologically active products that, if unchecked, result in the tissue damage and fibrosis in chronic inflammation (Table 1). In short-lived inflammation, if the eliciting agent is eliminated, macrophages eventually disappear. In chronic inflammation, macrophage accumulation persists.

Table 1. Upregulated Functions of Activated Macrophages

Microbicidal activity
Tumoricidal activity
Chemotaxis
Phagocytosis/pinocytosis
Glucose transport and metabolism
Generation of gaseous mediators
Reactive nitrogen intermediates
Reactive oxygen intermediates
Enzymes
Neutral proteases, elastase, lysozyme, acid hydrolases, collagenases, plasminogen activator, arginase, lipases, phosphatases
1 $\alpha$ -hydroxylase
Plasma proteins
Complement components (C1-C5, properdin)
Coagulation factors (factors V, VIII, tissue factor)
Fibronectin
Cytokines and chemokines
IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , TGF- $\beta$
GM-CSF, M-CSF, G-CSF
IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha/\beta$ regulated on activation normal T expressed and secreted
Growth factors
Platelet-derived growth factor, endothelial growth factor, fibroblast growth factor
Lipid mediators
Eicosanoids

Macrophage activation is accomplished during infection through the release of macrophage-activating cytokines from T lymphocytes specifically sensitized to antigens of the infecting microbe (Fig. 4). The macrophage-cytokine-T lymphocyte axis plays a critical role in the development of cell-mediated immunity. In the process, IFN- $\gamma$  produced by NK cells (innate immune response) and Th1 cells (adaptive immune response) is the most powerful macrophage-activating cytokine and is currently used for preventing/treating opportunistic infections in patients with immunodeficiency [11], for treating malignant melanoma [12], and for treating the decreased bone resorption of osteopetrosis, which is caused by impaired function of osteoclasts (bone macrophages) [13].

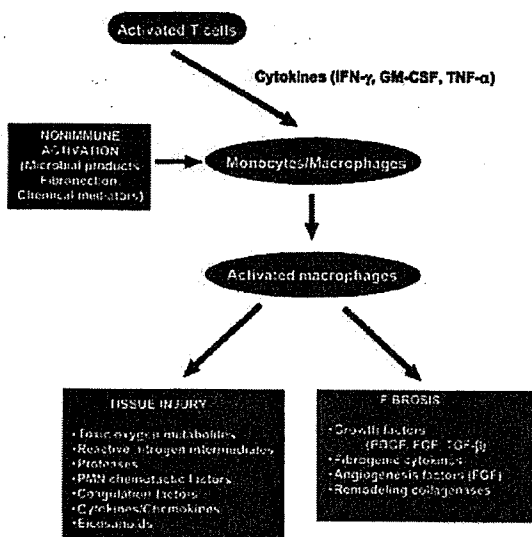


Fig. (4). Two stimuli for macrophage activation. The products by activated macrophages mediate tissue injury and fibrosis.

Macrophages exposed to bacterial LPS and/or other inflammatory stimuli release TNF- $\alpha$ , which itself can activate macrophages. As macrophages become activated, they express greater numbers of TNF- $\alpha$  receptors. Macrophages at sites of inflammation have the potential to activate themselves and express augmented function more rapidly than through the development of cell-mediated immunity, which requires recruitment of antigen-specific Th1 lymphocytes. Following surface and endocytic stimulation, macrophages can secrete a wide range of products. These include enzymes involved in antimicrobial resistance, proteinases, eicosanoids/arachidonate metabolites that contribute to inflammation and

tissue repair, cytokines such as IL-1 and TNF- $\alpha$  that modulate the activities of leukocytes and endothelial cells, and RNIs/ROIs in host defense. Ligation of specific receptors induces various signaling pathways and is able to alter gene expression in macrophages. Transcription factors, including NF- $\kappa$ B [14] and PU.1 [15] families contribute to macrophage-restricted or activation dependent changes of gene expression. Expression of products depends further on translational regulation, post-translational modification such as proteolytic processing, and expression of inhibitory cytokines, IL-10 and transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , which are produced by macrophages, fibroblasts, and T lymphocytes. Macrophage products are labile and act close to the cell surface, and overproduction results in tissue catabolism/damage and systemic effects associated with widespread infection or chronic inflammation, often as a result of an immunologically mediated disease process.

## RESOLUTION OF INFLAMMATION

Inflammation is the physiologic response to damaging influences, but when allowed to continue unopposed, the subsequent cascade of events can lead to serious host injury. Inhibition of inflammation by removal or deactivation of mediators and inflammatory effector cells permits the host to repair damaged tissues (Fig. 5). Although the precise mechanisms controlling the switch from proinflammatory pathways to anti-inflammatory are not fully clarified, components of resolution include a cellular response (apoptosis), formation of soluble mediators (such as anti-inflammatory cytokines and antioxidants), and production of direct effectors (such as protease inhibitors). Importantly, macrophages play a key role in the down-regulation process.

### Apoptosis

Apoptosis is a conserved "program" in eukaryotic cells that leads to cell death and marks their surfaces for rapid removal by phagocytes [16]. The process fails to induce an inflammatory response, although cell death by necrosis results in the release of intracellular contents into the microenvironment provokes inflammation. Apoptosis is the normal process by which inflammatory cells are removed from healing sites. Defective apoptosis or persistence of apoptotic cells that escape clearance may contribute to chronic inflammation and autoimmune disease. Commitment to apoptosis can be provoked by various factors, including ROIs in the microenvironment and signals from death receptor pathways, FasL/Fas. Removal of apoptotic bodies and/or the remnants of packaged apoptotic cells is rapid and can be achieved by macrophages, dendritic cells, fibroblasts, epithelia, endothelia, and myocytes. The surface receptors used in recognition and engulfment of apoptotic cells include integrins, lectins, scavenger receptors, ATP-binding cassette transporter, LPS receptor, CD14, and complement receptors CR3 and CR4, although some of these molecules can be used in both proinflammatory and apoptotic pathways, the diversity may be based on distinct ligands and accessory molecules. Apoptotic cells exhibit a series of apoptotic cell associated molecular patterns distinct from PAMPs.

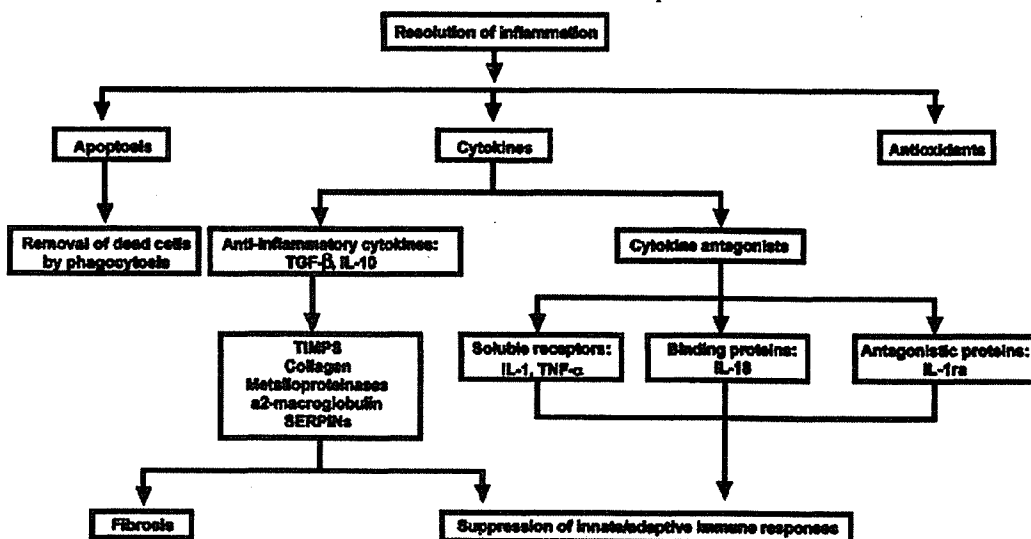


Fig. (5). Resolution of inflammation. Multiple endogenous pathways participate in the resolution.

## Soluble Mediators

### Antiinflammatory Cytokines

There are cytokines that initiate and induce the inflammatory response. By contrast, an array of cytokines, such as TGF- $\beta$ , IL-4, and IL-10, acts as down-regulators in the inflammatory response. The anti-inflammatory cytokines, TGF- $\beta$  and IL-10, are produced by macrophages, fibroblasts, and T lymphocytes, although IL-4 is produced by NKT and Th2 cells. TGF- $\beta$  is a potent stimulator of mesenchymal cell proliferation, which is essential for wound healing. TGF- $\beta$  suppresses collagenase production, increase collagen deposition, and decreases metalloproteinase (MMP) activity by inducing production of the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). Although it is obvious that wound healing is necessary, the resolution of inflammation is abnormal in diseases that fibrosis represents a major pathologic feature, including systemic sclerosis, which shows a marked diffuse fibrosis associated with high levels of TGF- $\beta$  and increased extracellular matrix production [17].

IL-4 inhibits the activation of Th1 lymphocytes, and this, in turn, decreases the production of IL-1 and TNF- $\alpha$  and exerts anti-inflammatory activity. IL-4 also inhibits the production of IL-6 and IL-8, but increases the expression of IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) [18].

IL-10 modulates expression of cytokines, chemokines, soluble mediators and cell surface molecules by cells. The effects of IL-10 on cytokine production and function of macrophages are generally similar to those on monocytes. IL-10 potentially inhibits production of IL-1, IL-6, IL-10 itself, IL-12, IL-18, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, TNF- $\alpha$ , leukemia inhibitory factor and platelet-activating factor (PAF) by activated monocytes/macrophages. The inhibitory effects of IL-10 on production of IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$  are crucial to its anti-inflammatory activities, because these cytokines have synergistic activities on inflammatory pathways and processes, and amplify these responses by induction of secondary mediators, including chemokines, prostaglandins, and PAF. IL-10 also inhibits production of both CC (monocyte chemoattractant protein; MCP1, MCP5, macrophage inflammatory protein; MIP-1 $\alpha/\beta$ , MIP-3 $\alpha/\beta$ , regulated on activation normal T expressed and secreted; RANTES) and CXC (IL-8, interferon-inducible protein; IP-10, MIP-2, GRO- $\alpha$ ) chemokines by activated macrophages. IL-10 not only inhibits production of these effectors, but also enhances expression of their natural antagonists, including IL-1 receptor antagonist and soluble p55 (type 1) and p75 (type 2) TNF receptors, and it inhibits expression of IL-1 receptors by activated macrophages, indicating that IL-10 not only deactivates macrophages but also induces production of anti-inflammatory molecules. IL-10 inhibited production of prostaglandin E2 (PGE2), through down-regulation of cyclooxygenase 2 (COX-2) expression. Certain T lymphocyte-derived cytokines, including IL-4, IL-10, and IL-13, suppress the expression of matrix MMPs by cells stimulated with proinflammatory cytokines, such as IL-1 and TNF- $\alpha$  [19].

To regulate/limit the action of proinflammatory cytokines, it is known decoy receptors that recognize inflammatory cytokines with high affinity and specificity [20]. These include IL-1 and TNF- $\alpha$  receptors, and are structurally incapable of signaling or presenting the agonist. In rheumatoid arthritis, insufficient production of the inhibitors and may contribute to disease, and administration of exogenous antagonist has therapeutic benefit. The activity of IL-1 is regulated by two different mechanisms involving an IL-1 decoy receptor and a natural receptor antagonist protein, IL-1ra that binds to functional IL-1 receptors and competes with IL-1. IL-1ra does not transduce a signal to the cell and can block the biologic function of IL-1. Soluble cytokine receptors (eg. TNF- $\alpha$  receptors) can be released from cells after proteolytic cleavage of the transmembrane domain to remove the cytokine from the environment. IL-18 binding proteins capture and neutralize IL-18 activity.

### Suppressors of Cytokine Signaling Proteins

The suppressor of cytokine signaling (SOCS) family of cytoplasmic proteins functions as a negative feedback loop to attenuate signal transduction from cytokines [21]. The phagocytes of the innate immune system are regulated by cytokines that are controlled by SOCS proteins, including IL-12 and interferons.

### Eicosanoids

COX-2 induced by inflammatory mediators contributes to the early/induction phase of inflammatory response, although COX-2 plays a role in the late/resolution [22]. In the process, cyclopentenone prostaglandins are formed and may be anti-inflammatory by inhibition of proinflammatory gene transcription. Cyclopentenone prostaglandins bind to peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), which is present in monocytes/macrophages and inhibits the activation of macrophages and

the production of proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$ ) by the suppression of AP-1 and STAT transcriptional pathways. Because cyclopentenone prostaglandins suppress inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase (IKK)-catalyzed phosphorylation that is an essential step in the signal-induced activation of NF- $\kappa$ B, and consequently they inhibit NF- $\kappa$ B activation.

## Inhibitors of Direct Inhibitors

### Antioxidants

In the process of inflammation, ROIs are produced and contribute to host defense. Excessive production of them can also lead to tissue damage by reacting indiscriminately. To protect host cells and avoid tissue damage, an array of antioxidants exists. These include antioxidant enzymes, chain-breaking antioxidants, and metal-binding proteins [23].

The antioxidant enzymes include catalase and superoxide dismutase. Catalase is a peroxisomal enzyme that catalyzes the conversion of hydrogen peroxide to water and oxygen. Superoxide dismutases exhibit the dismutation of superoxide radicals to form dioxygen and hydrogen peroxide. Because ROIs are the product of activated macrophages, antioxidant enzymes indirectly inhibit the macrophage function.

Interactions of ROIs with surrounding molecules generate secondary radical species in a self-propagating chain reaction. Chain-breaking antioxidants are small molecules that receive or donate an electron and thus form a stable by-product with a radical. These antioxidants can be divided into aqueous (vitamin C, albumin, and reduced glutathione) and lipid (vitamin E, carotenoids, and flavonoids) substances. Metal-binding proteins function as antioxidants by sequestering cationic iron and copper and consequently inhibiting hydroxyl radical propagation.

### Protease Inhibitors

Tissue destruction mediated by proteases is a feature of inflammation. Mechanisms to protect the host and prevent uncontrolled tissue damage using protease inhibitors have developed in the process of repair/resolution. Protease inhibitors regulate the function of endogenous proteases and reduce tissue damage. These are categorized into  $\alpha$ 2-macroglobulins and active site inhibitors.  $\alpha$ 2-macroglobulins act by covalently linking the protease to the  $\alpha$ 2-macroglobulin chain and inhibiting binding to substrates. As the active site inhibitors, inhibitors of serine proteases (SERPINs) are the most abundant and play a role in regulation of blood clot regulation and inflammation. In addition to inactivation by protease inhibitors, serine proteases are inactivated by oxidation.

Inhibition of MMP functions can be induced during the repairing/resolution phase of inflammation. A family of TIMPs suppresses most of MMPs [24]. The TIMPs bind to activated MMPs and irreversibly block their catalytic sites. Although IL-1 and TNF- $\alpha$  induce MMPs, TGF- $\beta$  and certain growth factors suppress MMPs and increase TIMPs and production of matrix proteins. When proinflammatory cytokines predominate, the balance favors matrix destruction. By contrast, production of matrix protein increases and MMPs are inhibited by TIMPs in the presence of inhibitors of proinflammatory cytokines and growth factors.

## THERAPEUTIC INTERVENTIONS

Development of an effective inflammatory response can play an important role in the host defense. But the response can sometimes be detrimental, for example allergies, autoimmune diseases, and microbial infections may be initiate chronic inflammatory response. It is available to therapeutic approach for reducing long-term inflammatory responses.

### Glucocorticosteroids

The initial subcellular events are triggered by glucocorticoid binding to cytoplasmic receptor, glucocorticoid receptor (GR). Glucocorticoids play a role in anti-inflammation/immunosuppression through their inhibition of NF- $\kappa$ B, which is a major factor involved in the regulation of cytokine expression [25]. NF- $\kappa$ B is normally located in the cytoplasm associated with the inhibitor protein I $\kappa$ B. There have been two mechanisms involving GR-mediated suppression of NF- $\kappa$ B. One is that glucocorticoids *via* GR induces the expression of I $\kappa$ B that then sequesters NF- $\kappa$ B in the cytoplasm and prevent it from translocating to the nucleus and inducing gene activation. The suppression mechanism of NF- $\kappa$ B by GR may be limited to certain cell types, particularly monocytes/macrophages and lymphocytes. On the other hand, there is a physical interaction or cross-talk between NF- $\kappa$ B and GR that prevents gene expression.

Glucocorticoids modulate cytokine expression, adhesion molecule expression and cell trafficking, expression of chemokines, and production of inflammatory mediators. Glucocorticoids suppress the expression of proinflammatory cytokines, including IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and GM-CSF, whereas upregulating anti-inflammatory cytokines, IL-4 and IL-10 by high doses of glucocorticoids. They reduce the trafficking of leukocytes to the site of inflammation. This is mediated by the down-regulation of protein molecules involved in the attraction and adhesion of leukocytes into the site. They inhibit the expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), E-selectin (ELAM-1), and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). Glucocorticoids down-regulate the expression of CXC (IL-8, GRO- $\alpha$ ) and CC (MCP1-3, RANTES, eotaxin). Glucocorticoids also suppress the production of inflammatory mediators such as nitric oxide by the inhibition of nitric oxide synthase and prostaglandins by the inhibition of phospholipase A2 and COX-2. Glucocorticoids interfere with the protective and defense mechanisms of activated macrophages and induce apoptosis in monocytes/macrophages. Consequently glucocorticoids reduce the number of circulating monocytes, and thus decrease synthesis of macrophage-derived inflammatory enzymes, including collagenases and elastases. They induce a shift from a Th1 to a Th2 pattern of adaptive immunity, because glucocorticoids down-regulate Th1 cytokines and thus result in the dominant expression of Th2 cytokines. IL-12, an initiation cytokine of Th1 response produced mainly by macrophages and dendritic cells, is down-regulated via inhibition of STAT4 phosphorylation in the signaling cascade downstream of IL-12.

#### TNF- $\alpha$ Antagonists

TNF- $\alpha$ , a proinflammatory cytokine that is released by activated monocytes/macrophages and T lymphocytes, promotes inflammatory responses. It binds two receptors, type 1 and type 2 TNF- $\alpha$  receptors. In addition, the biologic activity of TNF- $\alpha$  can be attenuated by soluble TNF- $\alpha$  receptors. TNF- $\alpha$ -based strategies are being explored for the treatment of inflammatory diseases. These include the neutralization of TNF- $\alpha$  by soluble receptors (etanercept) or monoclonal antibodies (adalimumab and infliximab). TNF- $\alpha$  antagonists are currently used for the treatment of rheumatoid arthritis, Crohn's disease, psoriasis, ankylosing spondylitis, juvenile arthritis, Still's disease, uveitis, and vasculitis [20]. It has been found the adverse effects of therapy with TNF- $\alpha$ , including infections, cancer, vasculitis, lupus-like-autoimmune disease, multiple sclerosis-like disorders, aplastic anemia and lymphoma., although the relationship between anti-TNF- $\alpha$  therapy and these adverse events are unknown.

#### IL-1ra

IL-1, produced by monocytes/macrophages, has proinflammatory activities. The action is down-regulated by IL-1ra, a natural inhibitor that competes for the binding to IL-1 receptors. Anakinra is a recombinant form of human IL-1ra that targets the type 1 IL-1 receptors and is used for treatment of rheumatoid arthritis [26]. Similar to the situation with TNF- $\alpha$  antagonists, the risk of infection appears to be increased.

#### IL-6 Antagonist

Humanized antibody against IL-6 receptor has shown that inhibition of IL-6 significantly improves the signs and symptoms of RA and normalized the acute-phase reactants [27].

## CONCLUSIONS

The inflammatory process is usually tightly regulated, involving both signals that initiate and maintain inflammation and signals that shut the process down. An imbalance between the two signals leaves inflammation unchecked, resulting in cellular and tissue damage. Because macrophages produce a wide range of biologically active molecules participated in both beneficial and detrimental outcomes in inflammation, therapeutic interventions targeted macrophages and their products may open new avenues for controlling inflammatory diseases.

## REFERENCES

- [1] Collins, T. In *Robbins Pathologic Basis of Disease*, Cotran, R.S.; Kumar, V.; Collins, T. Eds.; Saunders: Philadelphia, 1999, pp. 50-88.
- [2] Kasahara, T.; Matsushima, K. *Trends Immunol.*, 2001, 22, 593.
- [3] Firestein, G.S. In *Cecil Textbook of Medicine*, Goldman L.; Ausiello, D. Eds.; Saunders: Philadelphia, 2004, pp. 227-233.
- [4] Abbas, A.K.; Lichtman, A.H. In *Cellular and Molecular Immunology*. Saunders: Philadelphia, 2003, pp. 16-39.
- [5] Kobayashi, K.; Yoshida, T. *Methods*, 1996, 9, 204.
- [6] Underhill, D.M.; Ozinsky, A. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002, 20, 825.
- [7] Rot, A.; von Andrian, U.H. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, 22, 891.
- [8] Takeda, K.; Kaisho, T.; Akira, S. *Annu. Rev. Immunol.*, 2003, 21, 335.
- [9] Kobayashi, K.; Kaneda, K.; Kasama, T. *Microsc. Res. Tech.*, 2001, 53, 241.
- [10] Gately, M.K.; Renzetti, L.M.; Magram, J.; Stern, A.S.; Adorini, L.; Gubler, U.; Presky, D.H. *Annu. Rev. Immunol.*, 1998, 16, 495.
- [11] Lauw, F.; van Der Meer, J.; de Metz, J.; Danner, S.; van Der Poll, T. *Clin. Infect. Dis.*, 2001, 32, E81.
- [12] Khorana, A.A.; Rosenblatt, J.D.; Sahasrabudhe, D.M.; Evans, T.; Ladigan, M.; Marquis, D.; Rosell, K.; Whiteside, T.; Philippe, S.; Acres, B.; Sios, P.; Squiban, P.; Ross, M.; Kendra, K. *Cancer Gene Ther.*, 2003, 10, 251.
- [13] Key, L.L., Jr.; Rodriguez, R.M.; Willi, S.M.; Wright, N.M.; Hatcher, H.C.; Eyre, D.R.; Cure, J.K.; Griffin, P.P.; Ries, W.L. *N. Engl. J. Med.*, 1995, 332, 1594.
- [14] Caernano, J.; Hunter, C.A. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, 15, 414.
- [15] Busslinger, M. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, 22, 55.
- [16] Marsden, V.S.; Strasser, A. *Annu. Rev. Immunol.*, 2003, 21, 71.
- [17] Letterio, J.J.; Roberts, A.B. *Annu. Rev. Immunol.*, 1998, 16, 137.
- [18] Wynn, T.A. *Annu. Rev. Immunol.*, 2003, 21, 425.
- [19] Moore, K.W.; de Waal Malefyt, R.; Coffman, R.L.; O'Garra, A. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001, 19, 683.
- [20] Olsen, N.J.; Stein, C.M. *N. Engl. J. Med.*, 2004, 350, 2167.
- [21] Alexander, W.S.; Hilton, D.J. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, 22, 503.
- [22] FitzGerald, G.A.; Patrono, C. *N. Engl. J. Med.*, 2001, 345, 433.
- [23] Cuzzocrea, S.; Riley, D.P.; Caputi, A.P.; Salverini, D. *Pharmacol. Rev.*, 2001, 53, 135.
- [24] Vincenti, M.P.; Clark, I.M.; Brinckerhoff, C.E. *Arthritis Rheum.*, 1994, 37, 1115.
- [25] Webster, J.I.; Tonelli, L.; Sternberg, E.M. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002, 20, 125.
- [26] Fleischmann, R.M.; Schechtman, J.; Bennett, R.; Handel, M.L.; Burmester, G.R.; Tesser, J.; Modafferi, D.; Poulakos, J.; Sun, G. *Arthritis Rheum.*, 2003, 48, 927.
- [27] Choy, E.H.; Isenberg, D.A.; Garrood, T.; Farrow, S.; Ioannou, Y.; Bird, H.; Cheung, N.; Williams, B.; Hazleman, B.; Price, R.; Yoshizaki, K.; Nishimoto, N.; Kishimoto, T.; Panayi, G.S. *Arthritis Rheum.*, 2002, 46, 3143.

# ハンセン病基礎医学研究のトピックス

牧野 正彦<sup>1)</sup> \*、鈴木 幸一<sup>1)</sup>、福富 康夫<sup>1)</sup>、山下 康子<sup>1)</sup>、前田 百美<sup>1)</sup>、  
宮本 友司<sup>1)</sup>、向井 徹<sup>1)</sup>、中田 登<sup>1)</sup>、甲斐 雅規<sup>1)</sup>、山崎 利雄<sup>1)</sup>、  
儀同 政一<sup>2)</sup>、松岡 正典<sup>2)</sup>

1) 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

2) 国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部

〔受付・掲載決定：2004年11月12日〕

キーワード：ハンセン病・らい菌・トピックス

ハンセン病はWHOの多剤併用療法の導入により、現在では「治る病気」として認識されるに至った。化学療法の普及と日本国内の新規患者の発症率から、ともすれば安易に考えられがちであるが、ハンセン病をサイエンスの観点から見た時、その重要性は極めて高い状態にある。ハンセン病及びらい菌を取り巻く基礎医学は、今尚未開発のまま取り残されている重要課題が山積みされている。ここでは、基礎医学上の最近のトピックスを紹介したい。

## はじめに

ハンセン病は有史以来、差別と偏見の対象となってきた慢性感染症である。抗酸菌属に分類されるらい菌の感染により発症し、皮膚および末梢神経を主病巣とする。1982年WHOは、多剤併用療法を推奨・開始した。本治療法は、薬剤耐性らい菌を抑制することを目的として開始されたが、当初期待した以上に奏効し、ハンセン病の制圧も視野に入るまでに至った。世界のハンセン病登録者数は順調に減少しているものの、新規ハンセン病患者の抑制は期待された以上には減少していない。真の意味でのハンセン病の制圧には、信頼に足るワクチンの開発が強く望まれる。また、薬剤

耐性らい菌は日に日に増加しており、今後世界的レベルでの対処が必要となると想定される。一方、基礎医学分野では、Cole等によりらい菌の全遺伝子配列が決定され、生化学・免疫学等の分野の進展とともに、ハンセン病に関する基礎医学も急速に発展し、有史以来のらい菌の謎も少しずつ解き明かされていくものと期待される。

本稿では、ハンセン病およびらい菌に関する最新の知見を紹介することを目的とする。ハンセン病制圧への一助となれば幸いである。

## I. 自然免疫

表皮や粘膜上皮などの被覆上皮は病原体の侵入を防ぐ物理的および生物学的障壁として働くが、病原体がそれらを超えて生体内に侵入した際に最初に発動するのが自然免疫系による生体防御反応である。すなわち、マクロファージなどの食細胞は、感染初期の段階において異物を認識し、食

\*Corresponding author :

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  
〒189-0002 東京都東村山市青葉町4-2-1  
Tel : 042-391-8211 Fax : 042-391-8212  
E-mail : mmaki@nih.go.jp

食・殺菌するとともに炎症性サイトカインやインターフェロンなどを産生する。そのような異物の認識に関わる手段として、細胞表面のス캐ベンジャー受容体やマンノース受容体を初めとするいくつかの機構が知られていたが、近年、Toll様受容体 (TLR) がクローニングされ、その自然免疫系における重要性が認識されてきた<sup>1)</sup>。

TLRはI型の膜貫通型受容体であり、現在までに11種が知られている。その発現は、マクロファージなどの免疫担当細胞に限らず、上皮細胞を初めとする生体内の多くの細胞に見い出されることが報告され、病原体が持つ様々な分子パターン (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) を認識するパターン認識受容体 (pattern recognition receptors : PRRs) として機能することが明らかにされてきた。

TLRが認識するPAMPsは、大別するとリポ多糖 (LPS) やペプチドグリカン (PGN) などの細菌由来成分 (TLR1, 2, 5, 6, 11などが認識) と、二本鎖RNA (dsRNA) や非メチル化CpGモチーフを持つDNAなどの核酸成分 (TLR3, 7, 8, 9などが認識) とに分けることができる。しかしながら、TLRは機能やリガンドの情報からではなく、ホモロジー検索によって先に遺伝子群がクローニングされたものであり、それらが認識するリガンドの全容は未だ明らかではない。また、一つのTLRが認識できるリガンドは必ずしも一種類に限定するものではなく、様々な分子パターンと幅広い親和性を持つと考えた方がより合目的でもある。

刺激前の状態においては、一部のTLRは細胞膜に発現し、その他は細胞内に存在するが、最終的には異物を含んだエンドゾーム膜などに局在変化するものと考えられる。TLRの細胞内ドメインは、インターロイキン1受容体 (IL-1R) とホモロジーが高くToll-IL-1R (TIR) ドメインと呼ばれる。TLRが異物を認識すると、このTIRドメインに結合するアダプター分子群が活性化し、シグナルが伝達される。抗酸菌が持つリポアラビノマンナン (LAM) やペプチドグリカン (PGN) は、マクロファージ等が細胞膜に発現しているTLR2がTLR1およびTLR6などと共同することによって認識される。その結果として、TIRドメインに

結合するMyD88 (myeloid differentiation factor 88) を介したシグナル伝達経路を活性化しNF $\kappa$ Bの誘導を経てIL-1やTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカイン遺伝子の転写を誘導することが示されている<sup>2)</sup>。

## Ⅱ. マクロファージとサイトカイン

### 1. ハンセン病におけるマクロファージの関与

らい菌は細胞内寄生菌としてマクロファージやシュワン細胞内で増殖する。マクロファージは下等動物から高等動物に至るまで広く存在し、体内に侵入した細菌などを貪食して排除する機能を有する。また、サイトカインなどの免疫調節分子を産生する他、抗原提示能を有し、さらには抗腫瘍作用も持ち合わせるなど多機能細胞である。

ハンセン病はきわめて特異な臨床スペクトラムを呈する疾患である。サイトカイン産生の観点からみると、TT型ではTh1型サイトカインであるIL-2とIFN- $\gamma$ が主に発現しており、LL型ではTh2型サイトカインであるIL-4、IL-5、IL-10が強く発現している。マクロファージが主体となり産生するサイトカインはTT型ではIL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、GM-CSF、IL-6、LL型ではIL-10である。

### 2. マクロファージが産生するサイトカイン

マクロファージはグラム陰性菌のLPSなど細菌菌体成分等の刺激によりIL-1やTNF $\alpha$ など炎症性サイトカイン、さらに、IL-6、IL-8、IFN $\alpha/\beta$ 等も産生する。抗酸菌にはLAMのような糖脂質を含む細胞壁菌体成分が存在し、LPSと同様にマクロファージからのサイトカイン産生を誘導する。らい菌を貪食したマクロファージからはTNF $\alpha$ やIL-10が産生されるが、LAMで前処理するとマクロファージの活性化が抑制される。マクロファージはマンノースなどの糖に対する受容体やフィブロネクチン等を介してらい菌を認識し貪食する。オプソニン化されたらい菌を補体受容体やFc受容体を通じて貪食する機構もある。その過程でTNF $\alpha$ やIL-1を産生する。しかし、*M. bovis* BCGなど他の抗酸菌と比較するとTNF $\alpha$ の産生量は低く、その原因はPGL-Iなどの脂質成分によるサイトカイン産生抑制作用によると考えられる。

また、免疫反応抑制因子の一つであるIL-1レセプターアンタゴニストが、らい菌刺激により産生されるLL型における増菌の一因である。ハンセン病患者の皮内反応に用いられるダルメンドラ抗原は脱脂菌体であるためサイトカイン産生を強く誘導し、結果としてリンパ球を強く刺激する<sup>3)</sup>。

### 3. マクロファージの機能発現に関わるサイトカイン

#### 1) 抗らい菌活性の発現と抑制に関わるサイトカイン

放射性同位元素標識基質の代謝を指標としてらい菌の生存率を定量する方法が開発されている。本方法を用いてマウスマクロファージの抗らい菌活性を検索すると、細胞性免疫の主役を担うIFN- $\gamma$ はマクロファージを活性化し抗菌活性を発揮する。この時殺菌作用を有するNOが遊離される。マクロファージの活性化には、らい菌貪食時に産生されるTNF $\alpha$ が二次刺激として必須であることが判明している。一方、ヒトマクロファージにおいては、IFN- $\gamma$ 刺激による抗らい菌活性の発現及びNOの産生は実験的には証明されていない。しかし、TT型病巣でIFN- $\gamma$ の発現が高いことから、*in vivo*ではIFN- $\gamma$ がヒトマクロファージの活性化に関与している可能性は高い。NO以外のO<sub>2</sub><sup>-</sup>などが殺菌に重要な役割を果たしている可能性もある<sup>4)</sup>。

IL-10はT細胞などにおけるサイトカイン産生を抑制する作用をもっている他、マクロファージの殺菌能を抑制することが知られている。LL型病巣部ではIL-10の発現が顕著にみられる。PGE<sub>2</sub>はT細胞やマクロファージに対して免疫抑制的に作用するプロスタノイドとして知られており、ハンセン病においてもPGE<sub>2</sub>を誘導するシクロオキシゲナーゼ-2がLL型病巣で多く発現している。従って、これら抑制因子がLL型病変部における殺菌能低下に関与していると考えられる。また、*in vitro*でらい菌感染マクロファージをIL-10存在下で培養すると、らい菌の代謝活性が長期維持され菌体の伸長現象も観察される。

#### 2) マクロファージの抗原提示機能に関わるサイトカイン

マクロファージはMHC class II抗原を通じた抗原提示機能を有しており、IFN- $\gamma$ 刺激によりその

発現は強まり提示能が増強される。*in vivo*や*in vitro*において、らい菌感染したマクロファージ表面のMHC class II抗原の発現低下が観察されている。らい菌が大量に存在するらい腫内マクロファージでは、その抗原提示機能の低下が考えられている。

## Ⅲ. 細胞内プロセッシング (P-L fusionを中心として)

マクロファージを主たる宿主とする細胞内寄生菌である結核菌やらい菌が、どのようにして細胞内に侵入し、長期間潜伏・増殖を可能にするのかという点はきわめて重要な問題である。これらの菌を含むファゴゾームは、成熟が抑制され、菌は、ライソゾームからの消化酵素や酸性のpHから逃れることによって細胞内寄生が可能となる。これらの現象は古くから知られているが、その分子機構は未だ不明な点が多い。本稿では、主に結核菌において得られた知見を元に概説する。

マクロファージによる異物の貪食は、特定の細胞膜受容体を介した接着と認識によって引き起こされる。抗酸菌の認識に際しては、免疫グロブリンのFc受容体、マンノース受容体、スカベンジャー受容体、補体受容体などが関与することが示されている。特に、CR3補体受容体による認識は重要であるが、抗酸菌の取込みには補体によるオプソニン化は必要では無く、菌体表面のリガンドを直接認識すると考えられている。

菌の取り込みに際しては、細胞膜上のコレステロールに富む脂質領域であるラフト構造が重要な役割を果たす<sup>5)</sup>。注目すべき点は、用いられる受容体の種類によって細胞内で活性化するシグナル伝達機構が異なり、その後の菌の運命に影響を与えることである。すなわち、補体受容体やスカベンジャー受容体によって認識された場合は、ファゴゾームの成熟が抑制され菌は生存可能となるが、免疫グロブリンでオプソニン化されFc受容体を介して取り込まれた場合は、ファゴゾームとライソゾームの融合(P-L fusion)が起こり殺菌される。このことは、菌を含むファゴゾームは全て同じではなく、菌の認識に関わった受容体の種類や菌との親和性によってそれぞれ異なることを意味

する。これらファゴゾームの多様性は、ファゴゾーム膜に存在するEEA 1, Rab 5, Rab 7, LAMP, PI (3) P, calnexin, H<sup>+</sup>ATPaseなど数多くの機能蛋白群によって規定されている<sup>6)</sup>。

IFN- $\gamma$ や活性型ビタミンD<sub>3</sub>などはマクロファージ内の菌に対し殺菌的に作用するが、その重要な手段の一つにP-L fusionの阻害を解除することがある。P-L fusionに際しては従来ライソゾームが完全にファゴゾームと一体化すると考えられてきたが、一過性に融合しすぐに離れる“kiss-and-run”機構も有力視されてきている。また、一般に、抗酸菌はサルモネラなど異なり積極的に細胞内に侵入する手段を持っていないと考えられているが、結核菌やらい菌が持つ遺伝子のmce1A領域遺伝子産物が積極的に細胞内侵入に関与するという報告もある<sup>7)</sup>。

未成熟のままのファゴゾームは、その中に潜伏する菌にとって、増殖するための栄養が供給される場であり、また、細胞内の殺菌機構から防御されるだけでなく、免疫監視機構からも逃れるシェルターの役割を果たし、これが長期間の菌の潜伏と持続感染を可能としている。マウスのマクロファージと*M. bovis* BCGを用いた研究で、アクチン結合性を有する細胞膜の裏打ち蛋白として知られていたcoronin (別名tryptophane aspartate-containing coat protein: TACO) は、生きた菌を含むファゴゾーム膜に移行し、そのことがP-L fusionの阻害に重要であることが示された<sup>8)</sup>。しかしながら、マウス以外の食細胞を用いた実験ではcoroninにそのような働きが見られない例も報告されている。したがって、coroninがヒトのマクロファージや、結核菌やらい菌感染においても報告されたような働きを持ち、P-L fusion阻止に関わる唯一の蛋白であるか否かに関しては、さらなる検討が必要である。また、末梢血単球からサイトカインで誘導されたマクロファージと樹状細胞とでは、ファゴゾームの性質や菌の増殖能が全く異なることも報告されている。これらのことは、細胞内プロセッシング機構の解明には培養細胞に菌を感染させるという実験手法が不可欠であるが、用いる細胞や菌の種類によってその結果が異なり、解釈には注意が必要であることを示している。

## IV. らい菌のリポ蛋白

細菌には多くのリポ蛋白が存在するが、その生理的役割は十分に明らかにされていない。結核菌では、19kDと38kDのリポ蛋白が報告され、その免疫学的性状も明らかにされつつあるが<sup>9)</sup>、らい菌に関しては、リポ蛋白の存在も明らかにされていなかった。2001年らい菌のゲノムDNAの全配列が公開され、我々は脂質附加を受けることが予想されるアミノ酸配列をもとにリポ蛋白をコードするらい菌遺伝子を探し、免疫学的活性を有する新しいリポ蛋白LpK (Accession No.ML0603) を発見した<sup>10)</sup>。

### 1. らい菌のリポ蛋白質の構造

細菌のリポ蛋白はN末端側に特徴的なアミノ酸配列 (MISALMVAVAC) を有するプロ蛋白質として合成され、Diacylglyceryl transferase及びSignal peptidase II により翻訳後修飾の脂質附加を受け、N-acyl-diglyceride-cystein構造を有する成熟リポ蛋白質となる。らい菌のゲノムDNA の情報をもとに遺伝子組み換えによりリポ蛋白LpKを大腸菌で発現し、その構造を検討した。LpKはらい菌の膜に存在し、分子量33kDでN末端のシステインに脂質が附加したリポ蛋白であることが明らかとなった。

### 2. リポ蛋白質の生理的役割

細菌の感染免疫反応に重要な役割を果たすリポ蛋白としては結核菌の分子量19kDのリポ蛋白が、IL-12 を強く誘導し細胞性免疫反応に関与していることが報告されている<sup>9)</sup>。

遺伝子組み換えにより大腸菌で発現したLpKについてヒト単球からのIL-12誘導活性を検討した結果、強くIL-12誘導する活性を有していることが明らかとなった。したがってLpKは生体防御反応に密接に関与しているものと考えられる。さらにLpKの種々の組み換え蛋白を大腸菌で作製し (図1)、IL-12誘導の活性中心を検討した<sup>11)</sup> (図2)。脂質の附加したLpK, LpK-aでは非常に強い活性があり脂質を欠くLpK-t, LpK-bではその活性が弱く、C末端側LpK-eには活性がないことが明らかとなった (図2)。したがってLpKのIL-12誘

導活性には脂質とN末端領域の蛋白部分の両方が必要であることが示唆された。

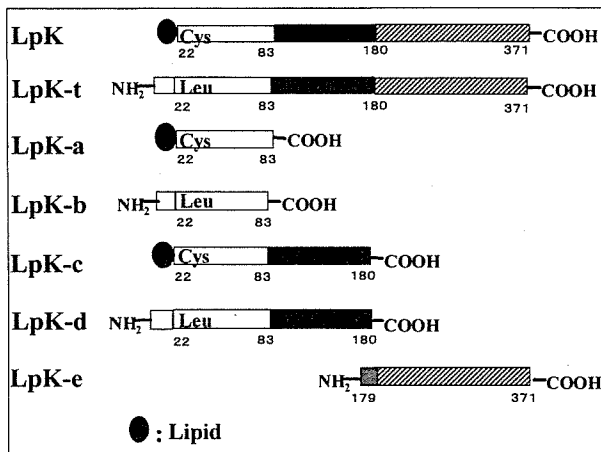


図1 リポ蛋白LpKおよびTruncated LpKの構造  
LpK およびTruncated LpKはらい菌のゲノムDNAをもとにアミノ酸配列を決定し、遺伝子組み換えにより大腸菌で発現させた。数字はpro LpKのN末端からのアミノ酸番号を示している。

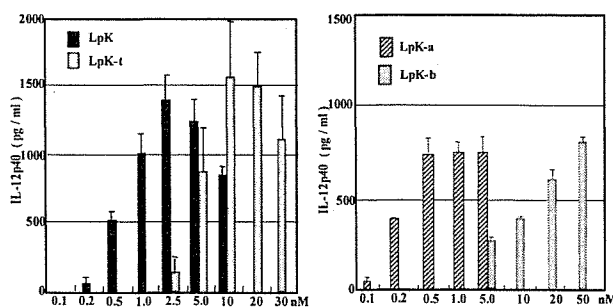


図2 リポ蛋白LpKおよびTruncated LpK刺激によるヒト単球からのIL-12誘導活性  
ヒト末梢血単球 ( $1 \times 10^5$  cells) をLpK及びTruncated LpKで37°C、24時間刺激し、産生したIL-12p40をELISA法で測定した。

### 3. リポ蛋白とTLR

近年、病原体の防御システムである自然免疫系においてTLRファミリーの関与が明らかとなってきた。種々の病原体の構成成分に対するTLRの活性化機構が報告されているが、リポペプチドによるサイトカインの誘導に関してもTLR2の関与の報告がある<sup>12)</sup>。らい菌のリポ蛋白LpKにおいてTLR2の関与を検討したところ、脂質を有するLpK, LpK-aでTLR2の関与が認められた(図3)。LpKはTLR2を介してIL-12を誘導しているものと考えられる。このことはLpKが自然免疫を賦活する物質のひとつであり、ワクチンの候補物質になりうる可能性を示唆している。

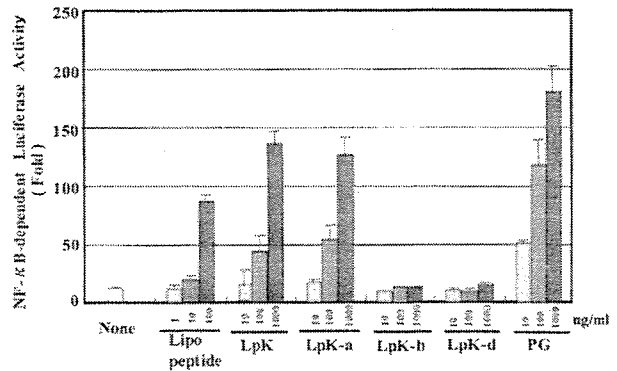


図3 リポ蛋白LpKおよびTruncated LpKのTLR2の関与  
TLR2導入HEK293細胞を用いて、LpK及びTruncated LpKの刺激により活性化されたNF-κB-luciferase活性を測定した。  
\*PG: peptidoglycan  
\*\*Lipopeptide: 合成lipopeptide

## V. 樹状細胞とワクチン

### 1. 樹状細胞

病原体が体外へ速やかに排除されるためには免疫系が十分に働かなければならない。その免疫系は、病原体感染初期に働く自然免疫系と、活性化には若干の時間を要する獲得免疫系に大別される。獲得免疫反応は、抗原特異的であり、多様な抗原に特異的に反応する多くのT細胞およびB細胞クローンから構築されている。獲得免疫が有効に活性化するためには、抗原提示細胞が抗原を取り込み活性化した後、抗原由来ペプチドを主要組織適合抗原とともに細胞表面に発現させ、T細胞を活性化する必要がある。抗原提示細胞には、マクロファージ・B細胞・樹状細胞が存在するが、この中でナイーブなT細胞を強く活性化できるのは樹状細胞だけである。樹状細胞は、抗酸菌に対する生体防御反応として最も重要なタイプ1細胞性免疫反応の活性化を推進するサイトカイン、IL-12を産生する。樹状細胞はあらゆる種類の抗原にも対応することが可能で、自然免疫反応と獲得免疫反応の橋渡し役をしている。従って、細胞性免疫反応の司令塔の役割を果たす細胞とも言える。樹状細胞は、樹状突起を持つ細胞として命名されたが、単一の細胞ではなく、細胞起源あるいは機能が異なる種々のサブセットからなる細胞集団である。本稿では、ヒト末梢単球からGM-CSFとIL-4を用いて分化誘導した樹状細胞を用いて得られ

た最近の知見を紹介する。

## 2. 樹状細胞とらい菌

少菌型ハンセン病患者皮膚病変を検索すると、類上皮性肉芽腫性病変を構成する細胞集団の中にCD1a陽性の樹状細胞が存在する。しかし、多菌型ハンセン病患者皮膚病変中には存在しない。このことは、抗らい菌細胞性免疫反応の活性化に樹状細胞が重要な役割を果たしていることを示している。*in vitro*でらい菌をパルスした樹状細胞を抗酸菌染色すると、細胞内に抗酸菌が染め出され、細胞内をFACSを用いて半定量的に解析すると、パルスしたらい菌の量依存性にPGL-I抗原の発現が増強する<sup>13)</sup>。その程度は、マクロファージと同程度であり、樹状細胞も*in vitro*ではらい菌に親和性を有するものと考えられる。一般に抗原提示細胞は、T細胞を活性化するにはその表面に病原体由来のペプチド抗原を発現しなければならない。マクロファージにらい菌が感染しても、ファゴゾームを形成しライソゾームとの融合を阻止して、らい菌由来抗原の細胞表面発現を抑制している。しかし、樹状細胞では、細胞表面にハンセン病患者血清と反応するらい菌抗原を発現させる。らい菌感染樹状細胞は、自己CD4陽性およびCD8陽性T細胞を刺激・活性化させて、IFN- $\gamma$ の産生を誘導する。以上より、樹状細胞は、らい菌に対する生体防御反応を惹起する上で、重要な役割を果たしていると考えられる。

## 3. 樹状細胞を用いたハンセン病免疫療法

ハンセン病に対する免疫療法の目的は、細胞内寄生性感染をしたらい菌を体外に排除することにある。らい菌は生体内ではマクロファージに対し最も強い親和性を示す。そこで、らい菌感染したマクロファージを上述のサイトカインを用い樹状細胞様に形質転換し、その免疫学的性状を解析した<sup>14)</sup>。形質転換した細胞は、自己のCD4陽性およびCD8陽性T細胞を活性化する能力を獲得し、同時にIL-12を産生する能力を得た。親マクロファージには存在しなかった抗原提示能を獲得したことが明らかになった。また、形質転換した細胞の表面を検索すると、らい菌由来細胞膜抗原が発現していた。そこで、本細胞膜に特異的に働く

CD8陽性キラーT細胞(CTL)を活性化したところ、らい菌感染した上記形質転換細胞は容易に殺戮されたが、親らい菌感染マクロファージは抵抗性を示した。このことから、新しい免疫療法の可能性が開けたと考えられる。

## 4. ハンセン病に対するワクチン開発

樹状細胞を用いると自己のT細胞を活性化することが可能である。らい菌に対するワクチンは、らい菌由来抗原を用いて、らい菌に対して迅速に反応するメモリーT細胞を産生することにある。そのためには、T細胞を強く活性化するらい菌抗原を同定しなければならない。我々は、らい菌を細胞壁・細胞膜・細胞質の3つに分画し、ワクチン候補分子となり得る抗原がどの分画に存在するか検索した<sup>15)</sup>。その結果、細胞膜は樹状細胞を強く成熟化および活性化させ、同時にCD4陽性およびCD8陽性T細胞を強く活性化しIFN- $\gamma$ を産生させた。今後、細胞膜中に存在するワクチン候補分子を同定する予定である。

## VI. 細胞壁の構造と成分

らい菌等の抗酸菌の主な特徴として、菌体を構成する細胞壁の構造が他の細菌に比べ非常に複雑であり、抗原性や病原性に深く関わっている点が挙げられる。細胞壁には抗酸菌に共通するアラビノガラクトタン層、ミコール酸などが存在し、さらに最外層にらい菌に特異的な糖脂質成分としてPhenolic glycolipid-I (PGL-I)を有する(図4, 5)。また細胞壁には糖脂質成分と並んでタンパク質成分も含まれており、これらが複合的あるいは単独で宿主に様々な影響を与えることにより、病原性因子として作用する。

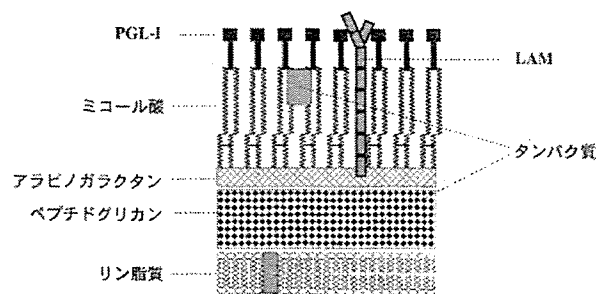


図4 らい菌細胞壁の構造

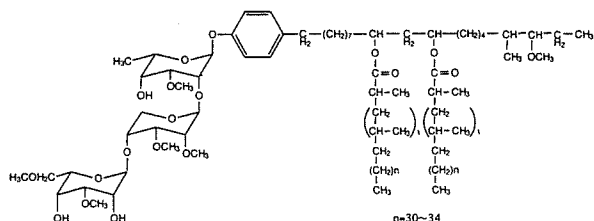


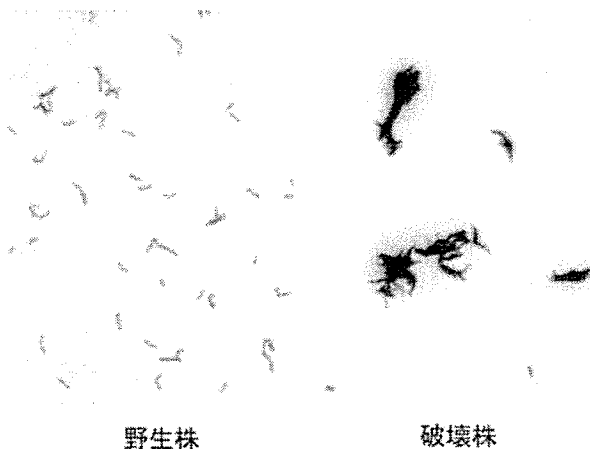
図5 PGL-Iの構造

### 1. 糖脂質

らい菌において主要な糖脂質成分の一つがPGL-Iである。PGL-Iは糖鎖部分が他のPGL類と異なりらい菌に特有な構造であることから、その抗原性を生かし血清診断法として利用されている。一方、病原性とPGL-Iとの関連性については従来不明な点が多かったが、近年いくつかの知見が発表され次第に明らかになりつつある。ハンセン病の主要な症状の一つに末梢神経障害がある。本症誘導に際し、らい菌のシュワン細胞への侵入にPGL-Iが深く関与しており、特に糖鎖部分が重要な役割を果たしていることが判明した<sup>16)</sup>。また、PGL-Iと糖鎖を除き構造がほぼ同一である結核菌のPGL類についても、これまで病原性との関わりは不明であったが、結核菌においてPGL類は高病原性株に偏在し、生体防御に重要である炎症性サイトカインを抑制する働きを持つことが明らかとなった<sup>17)</sup>。

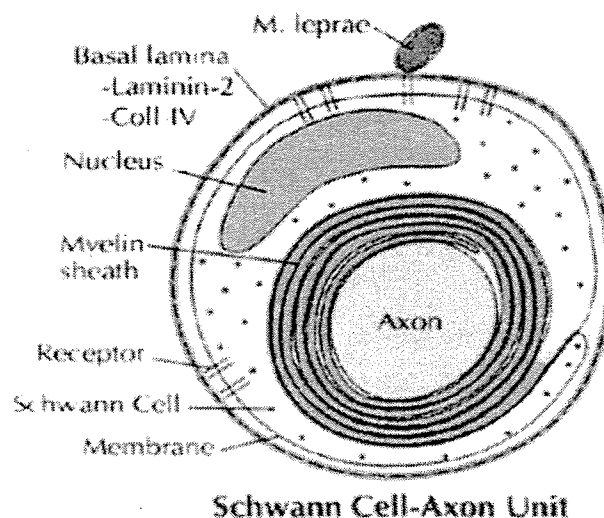
### 2. タンパク質

細胞壁には糖脂質成分と並んで、病原性に関与するタンパク質成分も数多く存在する。それらの一つとして、らい菌感染の第一段階である宿主細胞への接着へ関与するタンパク質FAP (Fibronectin-Attachment Protein) が知られている<sup>18)</sup>。FAPは、粘膜などに存在するfibronectinと結合する性質を持っており、この過程を経て宿主細胞へ侵入する。また、らい菌FAPのアミノ酸配列と高い相同性を示す分子が他の抗酸菌にも存在している。筆者らはらい菌FAPの詳細な機能を明らかにする目的で、同じ抗酸菌である*Mycobacterium smegmatis*において遺伝子破壊株を作製・解析し、FAPが菌体の凝集性や疎水性に大きな影響を与える因子であることを新たに明らかにした(図6)<sup>19)</sup>。らい菌においてもFAPは同様の機能を担っていることが予想される。

図6 *M. smegmatis* における FAP 遺伝子破壊株の形態

## VII. シュワン細胞とらい菌

ハンセン病はらい菌の感染により、末梢神経障害が誘導される疾患である。末梢神経障害に起因した運動機能障害が引き起こされる患者は少なくない。従って、らい菌による神経障害機構の解明はハンセン病の発病、病態を理解する上で不可欠である。神経細胞とらい菌の関係が少しずつ明らかになっている。シュワン細胞のbasal laminaに存在するラミニン2およびその受容体dystroglycanがらい菌との作用にかかわっていることが報告されている<sup>20)</sup>。近年、Rambukkanaらにより、らい菌の細胞壁に存在する糖脂質PGL-Iがラミニン2に結合することが明らかになった



A schematic drawing showing in vivo interaction of the leprosy bacterium *M. leprae* with the basal lamina of a myelinated Schwann cell-axon unit.

図7 らい菌とシュワン細胞の関係 (Vincent Ng et al. <sup>16)</sup>)  
らい菌はシュワン細胞のラミニン2に結合し感染する。

(図7)<sup>16)</sup>。PGL-Iはらい菌特異的な糖脂質であることから、らい菌の神経親和性にPGL-Iが関与している可能性が高い。ラミニン2に結合する菌因子として分子量21kDの蛋白(ML-LBP21)の報告もある<sup>21)</sup>。しかしながら、その多くの研究はハンセン病を発症しないラットのシュワン細胞が用いられて行われたことを重要視し<sup>16), 22)</sup>、我々はらい菌感染により末梢神経障害を示すことが報告されているサルに着目し、サル由来シュワン細胞を樹立した。

### 1. サル由来シュワン細胞の分離

カニクイザルの新生児および成体サルより、後根神経節および坐骨神経をコラゲナーゼとトリプシンで処理し、細胞を分散させ、初代培養を行った。その後DNA合成阻害剤であるAra-C (cytosine-b-D-arabinofuranoside)を作用させて、シュワン細胞の増殖を妨げる繊維芽細胞を除去した。さらに、増殖因子heregulin存在化で2～3週間培養し、シュワン細胞の分離を行った。

### 2. シュワン細胞表面マーカーの解析

サルの後根神経節、坐骨神経由来初代培養細胞、および株化細胞は、S-100およびラミニン抗原に対する抗体を用いたFACS解析、さらに、組織免疫染色によりシュワン細胞であること確認した

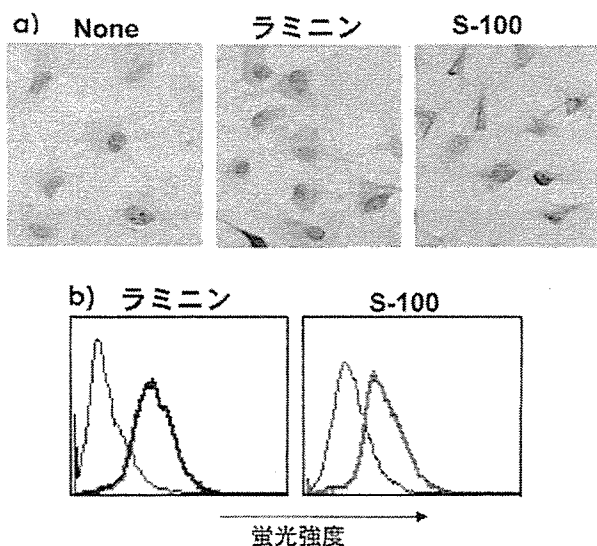


図8 a) サルのシュワン細胞をS-100、ラミニン抗原に対する抗体で組織免疫染色したところ、陽性であった。b) FACS解析：抗S-100及びラミニン抗体で染色し、さらに二次抗体、抗マウス-FITCで染めることによりシュワン細胞であること確認した。

(図8)。細胞表面マーカーを調べるとMHCクラスI抗原は発現していたが、クラスII抗原は陰性であった。

### 3. シュワン細胞のらい菌感受性

らい菌に対するシュワン細胞の感受性を検索した。FITC標識したらい菌をシュワン細胞と混合培養すると、2～3時間以内にらい菌はシュワン細胞により容易に取り込まれ高親和性を示した(図9)。さらに、らい菌の膜蛋白に対するポリクローナル抗体で、らい菌感染シュワン細胞表面を染色すると陽性であった。このことから、シュワン細胞は、らい菌感染をうけるとらい菌由来抗原をその表面に発現する可能性が示唆された。

サル由来のシュワン細胞はらい菌感受性があり、らい菌抗原をその表面に発現することから、ハンセン病における末梢神経障害機構の解析に有用であることが示唆された。

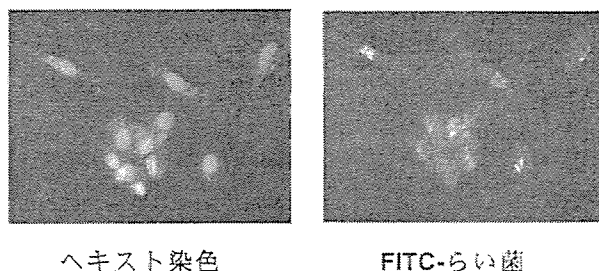


図9 FITCラベルしたらい菌をシュワン細胞と混合培養し、3時間後ヘキストで核を染色し、蛍光顕微鏡で観察すると、らい菌がシュワン細胞に取り込まれていることを確認した。

## VIII. らい菌の新しい遺伝子診断法

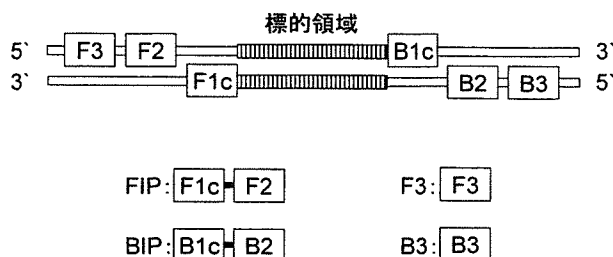
### 1. LAMP法とは

らい菌の遺伝子検査は、高感度で検出が容易なことからPCR法が広く利用されている。しかし、操作の煩雑性、器具が高価であることが問題となっている。最近、PCRと異なった原理に基づき、等温で標的遺伝子を増幅するシステム、loop-mediated isothermal amplification (LAMP法)が開発された<sup>23)</sup>。LAMP法は、温度制御装置を必要とせず、簡便かつ迅速に遺伝子を検出できるため、様々な分野において利用されつつある。

## 2. LAMP法の特徴

### 1) 反応組成

反応液は、緩衝液、鎖置換型DNAポリメラーゼ (*Bst* polymerase)、基質 (dNTP) およびプライマーから構成される。プライマーは、標的遺伝子配列の6領域を用いた4種類のプライマー (Forward Inner Primer [FIP], Backward Inner Primer [BIP], F3, B3) を用いる (図10)。

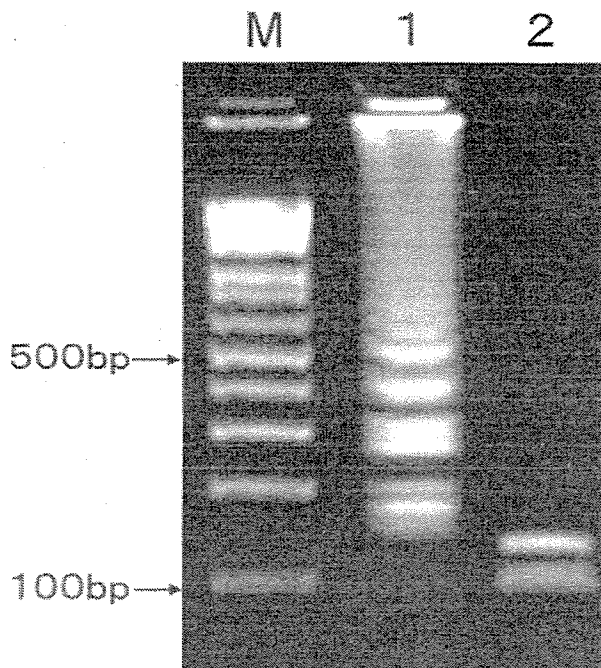


### 2) 一定温度による反応

反応液にサンプルを加え、60℃から65℃の間の一定温度に30分～1時間反応させることにより遺伝子を増幅する。つまり精密な温度制御装置を必要とせず、一定温度を保てる装置があれば反応が可能である。等温の遺伝子増幅過程においてDNAが、Loopを形成することより、loop-mediated isothermal amplificationと呼ばれる。詳細な増幅原理等は、参考文献に記載したホームページを参照されたい<sup>24)</sup>。

### 3) 高い特異性と増幅性

反応に6領域からなる4種のプライマーを用いるため、増幅の特異性は極めて高い。LAMP法の遺伝子増幅産物は、標的遺伝子の相補的な配列の繰り返し構造により様々なサイズで産生されるため、特徴的な電気泳動像になる。また、増幅領域内に単一で存在する制限酵素サイトの処理により産物は集約し、特異的増幅が確認できる (図11)。増幅効率も高く、ほとんどの標的遺伝子において10コピー以下の遺伝子から増幅が可能である。PCR法において阻害物質として知られるヘパリン添加血液も熱処理を施すことによりLAMP法に適用し得る。



### 4) 簡易検出法

PCR法の結果判定は、増幅産物のサイズや相同性を用いた特異性の確認が必要である。LAMP法では特異性が非常に高いことから、増幅産物の有無により検出判定が可能である。増幅産物産生量はPCR法に比べ非常に多量であるため、3%アガロース電気泳動法以外に、エチジウムブロマイドや、SYBR Green I 等の2本鎖DNAにインターカレートする試薬を添加し、産物の可視化による判定が可能である。また、増幅反応の副産物であるピロリン酸と反応液中のマグネシウムイオンの結合から生じるピロリン酸マグネシウムの白濁を指標にした肉眼による検出も可能である。現在、濁度測定を応用したリアルタイム検出器が市販されている。

## 3. LAMP法の応用

細菌、ウイルス、寄生虫など様々な病原体の検出に応用が試みられている。抗酸菌感染症では、結核菌、MAC<sup>25)</sup>、*M. paratuberculosis*<sup>26)</sup> への応用が報告され、らい菌検出のシステムも確立しつつある。LAMP法は、安価な設備・器具を用いるため、開発途上国における感染症診断をより容易にすると期待される。

## IX. らい菌の偽遺伝子

らい菌TN株のゲノムサイズは約3.3Mbで、結核菌H37Rv株の4.4Mbと比較して小さく、染色体上に多数の偽遺伝子が存在する<sup>27)</sup>。偽遺伝子とは、機能を持つ遺伝子の塩基配列と相溶性の高い塩基配列を持つが、塩基の置換、欠失などにより遺伝子としての機能を失ったDNA配列のことである。当初、らい菌TN株のゲノムには、1,604の遺伝子と1,116の偽遺伝子があるとされたが、2004年7月にコンピュータプログラムの変更により10の遺伝子と17の偽遺伝子が新たに追加された。

### 1. らい菌 *katG* 領域

筆者らは*katG*のDNA塩基配列をらい菌の偽遺伝子として初めて報告した<sup>28)</sup>。*katG*遺伝子はグラム陰性菌、陽性菌に広く分布する遺伝子で、カタ

ラーゼとパーオキシダーゼ両方の活性を持つ酵素タンパク質をコードしており、結核菌など細胞内寄生菌のビルレンス因子の一つと考えられている。らい菌の*katG*配列は結核菌などと同じく、その発現調節因子である*furA*配列の下流に存在し、周辺領域の遺伝子配置もほぼ同じであるが、5'末端側の領域に100塩基対程度の欠失が二ヶ所見られる。この配列が偽遺伝子であることを示す最大の特徴はその配列中に全てのフレームにおいて終止コドンが多数見られることである(図12)。一般に、生物の生存に重要な遺伝子領域に変異が生じて機能の喪失が起こると、その個体は淘汰されるため変異は蓄積されないが、生存に必須でない領域には時間とともに変異が蓄積する。らい菌の偽遺伝子にはこのように多重のナンセンス変異を持つものが多く、らい菌の遺伝子崩壊が起こり始めてから既に長い時間が経過していることを示唆している。

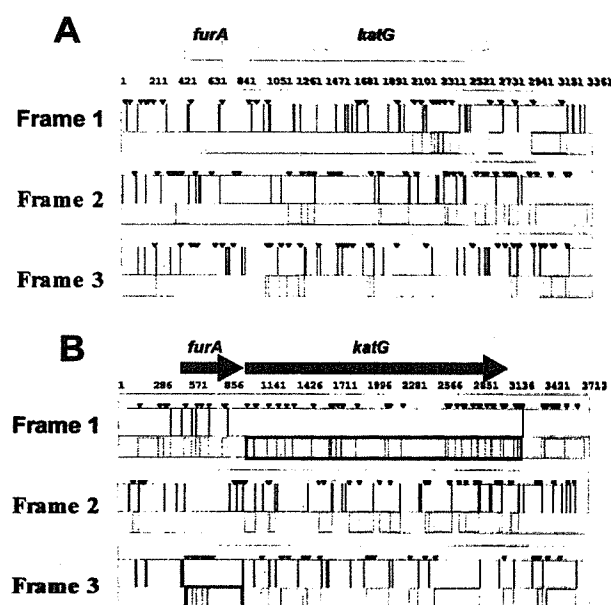


図12 らい菌と結核菌の*katG*領域のオープンリーディングフレーム分析

らい菌 (A)、結核菌 (B) の*katG*配列それぞれについて、3つのタンパク質翻訳フレームにおける開始コドン (V)、終止コドン (I) の位置とフィケット法によって導き出されたオープンリーディングフレーム (斜線部) を示した。結核菌ではフレーム1に2,223塩基対の*katG*遺伝子、フレーム3に453塩基対の*furA*遺伝子のオープンリーディングフレームが見られる (太線部分)。一方、らい菌の*katG*領域には*furA*、*katG*ともに高い相溶性を示す配列が存在するものの、それら遺伝子に相当するオープンリーディングフレームは見られない。らい菌*katG*配列内には、フレーム1、2、3にそれぞれ27、15、24個の終止コドンが存在する。

### 2. その他の偽遺伝子と偽遺伝子配列の機能

らい菌の特筆すべき特徴として遅増殖と人工培地での培養が困難であることがあげられるが、これらの性質と偽遺伝子の数の多さは決して無関係ではないと考えられる。結核菌とらい菌の遺伝子セットを比較すると、生合成や代謝に関わる様々な経路についてらい菌では多くの偽遺伝子が存在するが、機能別分類による偽遺伝子の偏りはあまり見られず<sup>27)</sup>、これらの原因となる決定的な遺伝子欠損は明らかになっていない。

細菌では一般にゲノムサイズを小さくしようとする力が働くため、機能を失ったDNA領域は染色体から脱落する傾向にあるが、らい菌染色体では30%近くの領域が偽遺伝子の配列で占められている。ゲノムに偽遺伝子を比較的多く持つ病原細菌と出芽酵母における遺伝子数、偽遺伝子数を表1に示したが<sup>29)</sup>、その中でもらい菌はとりわけ偽遺

表1 遺伝子数と偽遺伝子数

種	遺伝子数	偽遺伝子数
<i>Mycobacterium leprae</i> (らい菌)	1604	1116
<i>Rickettsia prowazekii</i> (発疹チフスリケッチア)	834	241
<i>Yersinia pestis</i> (ペスト菌)	4061	160
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (出芽酵母)	6340	241