

厚生省
新薬開発研究費

自己免疫疾患治療薬の開発研究

—微生物二次代謝産物を中心として—

青柳班

平成元年度研究報告書

平成2年3月

研究報告書の作成にあたって

厚生省薬務局より昭和 60 年度に新薬開発研究として「自己免疫疾患治療薬の開発研究—微生物二次代謝産物を中心として」がとりあげられ、青柳を班長として本研究班が発足して最終年度を迎えた。

本研究班は根本的治療法のない難病である膠原病、神経疾患など自己免疫疾患の患者ならびに病態モデル動物の病態解析を生化学、薬理学、生理学、病理学などの領域から究明し、さらに前臨床試験など広範囲の研究を施行し、治療薬を開発することを目的とした。本邦斯界の優れた研究者から構成された本班は各班員の努力により自己免疫疾患に対する治療薬の開発に大きく前進したと言えよう。即ち、膠原病、神経疾患を含む自己免疫疾患のモデル動物に対し、数種の酵素阻害物質、15-Deoxyspergualin, Bactobolin, Bactobolamine などに顕著な予防効果あるいは治療効果のあることが見出され、自己免疫疾患に対する新しい治療薬開発の可能性を強く示唆した。

難病治療薬開発という使命を担った本班は班員各位の絶大の努力により、その任務を全うし得たことを幸せに思う。厚生省から与えられた研究期間は一応終了したが、この研究を通して培われた研究網を基として、さらに本研究班の目的達成に努力する。

本研究を重要課題としてとりあげた厚生省薬務局ならびに班員各位に衷心より感謝する次第である。

平成 2 年 3 月

班長 青柳高明

目 次

研究報告書の作成にあたって	青柳高明	i
---------------	------	---

総括研究報告

自己免疫疾患治療薬の開発研究		
—微生物二次代謝産物を中心として—		3
	青柳高明	

分担研究報告

自己免疫疾患治療薬の開発研究		
A. 生理活性物質の概要		17
	青柳高明	
自己免疫疾患治療薬の開発研究		
B. 光学異性体 Deoxyspergualin の脾内酵素網におよぼす影響		25
	青柳高明	
膠原病の基礎的解明とその治療への応用(V)		
—エリテマトーデスモデルマウス(BXSB雄マウス, MRL/lprマウス)のペプチダーゼに及ぼす 15-デオキシスパーガリンの効果と膠原病患者体液のプテリジン類の変化—		31
	永津俊治	
イノシトールリン脂質代謝回転抑制物質のスクリーニングと免疫抑制作用		39
	梅澤一夫	
免疫修飾に作用する微生物代謝産物の研究		
A) 15-Deoxyspergualin の免疫修飾作用		47
	石塚雅章	
免疫修飾に作用する微生物代謝産物の研究		
B) 免疫調節物質の探索		53
	石塚雅章	
自己免疫性脳脊髄炎, 神経炎の治療薬開発		55
	田平武	
Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis(EAMG)ラットの治療実験		61
	佐藤猛	

15-Deoxyspergualin の免疫抑制活性発現の機序に関する研究	67
	徳 永 徹
I 型糖尿病モデルマウスに対する IFN- γ の効果	75
	谷 口 克
ポリ ADP-リボース合成酵素阻害剤(ベナドロスチン)の <i>in vivo</i> 抗体産生に及ぼす効果： ループス(SLE)モデルマウスを用いた解析	83
	金 井 芳 之
エリテマトーデスモデルマウスを用いた微生物代謝二次産物の治療効果に関する研究	89
	藤 原 道 夫
各種微生物二次代謝産物による病変の修飾に関する神経病理学的研究	95
	生 田 房 弘
実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)に関する二次代謝産物治療剤の検索	99
	永 井 克 孝
インパルス応答から見た各種免疫調節剤の作用解析と比較	103
	和 田 孝 雄
微生物二次代謝産物の免疫抑制効果，とくに腎炎発症・進展の抑制について	113
	大 久 保 充 人
Bactobolin, Actinobolin, Foroxymithine の実験的アレルギー性神経炎に対する治療効果の検討	121
	井 形 昭 弘
15-DSG, methyl-DSG, Diplotin A, Foroxymithine, Bestatine の HAM 患者 末梢血リンパ球自己増殖反応(APR)への影響	127
	井 形 昭 弘
ヒト末梢血単核球による抗核抗体産生におよぼす 15-deoxyspergualin の影響に関する研究 —抗体産生抑制機序について—	131
	本 間 光 夫

本研究班を終了するに当たって

本研究班を終了するに当たって	137
	青 柳 高 明
自己免疫疾患治療薬の開発研究—微生物二次代謝産物を中心として— 開発研究班分担研究者一覧	149

総括研究報告

自己免疫疾患治療薬の開発研究

—微生物二次代謝産物を中心として—

主任研究者 青 柳 高 明

本研究班は自己免疫疾患の治療薬を開発することを目的として、昭和 60 年度に厚生省薬務局より新薬研究班として発足し、最終年度を迎えた。本班は根本的治療法のない難病である全身性エリテマトーデス、進行性全身性硬化症、慢性関節リウマチなどを含む膠原病また脱髄性神経疾患などを対象とし、これらの疾病に対する治療薬を発見することを目的とした。この研究は医学界、薬学界にとって最大研究課題の一つと言えよう。

微生物代謝産物として発見された多くの酵素阻害物質、抗菌物質、制癌物質などの低分子二次代謝産物は新規な構造を有するとともに、免疫調節作用を有することで世界の注目を集めている。

自己免疫疾患治療薬の開発研究を行うことを目的とした本研究班は病態解析に基づく探索法を確立し、治療効果を有する化合物の分離・精製、構造決定ならびに治療効果を検討した。各年度別に施行した研究の大別は下記の Scheme にしめす。

年度	昭和 60	昭和 61	昭和 62	昭和 63	平成 1	平成 2
新規治療薬の探索	—————→					
分離・精製・構造決定	—————→					
自己免疫疾患の病態解析	—————→					
治療効果判定基準の設定	—————→					
誘導体の合成	—————→					
前臨床試験	—————→					

本研究班の対象疾患としては、全身性エリテマトーデス、進行性全身性硬化症、結節性多発性動脈炎、皮膚筋炎、リウマチ熱、慢性関節リウマチ

を含む膠原病ならびに脱髄性神経疾患、重症筋無力症、ネフローゼ症候群などである。

本年度の研究において、自己免疫疾患の病態解析に著しい成果が認められ、この結果に基づく探索法の開発研究が一段と進歩した。さらに、benadrostin, dioctatin A, poststatin などの酵素阻害物質および 15-deoxyspergualin, bactobolin, bactobolamine などが自己免疫疾患モデル動物に対し、顕著な予防あるいは治療効果のあることが報告された。自己免疫疾患症に対し治療効果を期待できる可能性が示唆され、上記疾患の治療に大きな光を与えたということができた。さらに病因の解明に務め、臨床研究に貢献するよう努力する。

各分担研究者により施行された研究は次の通りである。

1) 青柳高明 (微生物化学研究所) : 自己免疫疾患治療薬の開発研究

A) 生理活性物質の概要

B) 光学異性体 DSG の脾内酵素網におよぼす影響

2) 永津俊治 (名古屋大学医学部) : 膠原病の基礎的解明とその治療への応用(V), エリテマトーデスモデルマウス (BXS_B 雄マウス, MRL/*lpr* マウス) のペプチダーゼに及ぼす 15-デオキシスパーガリンの効果と膠原病患者体液のプテリジン類の変化

3) 梅澤一夫 (慶応義塾大学理工学部) : イノシトールリン脂質代謝回轉抑制物質のスクリーニン

グと免疫抑制作用

4) 石塚雅章 (化学療法研究所) : 免疫修飾に作用する微生物代謝産物の研究

A) 15-Deoxyspergualin の免疫修飾作用(III)

B) 免疫修飾物質の探索

5) 田平 武 (国立精神・神経センター) : 自己免疫性脳脊髄炎, 神経炎治療薬の開発

6) 佐藤 猛 (順天堂大学医学部) : Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis ラットの治療実験

7) 徳永 徹 (国立予防衛生研究所) : 15-Deoxyspergualin の免疫抑制活性発現の機序に関する研究

8) 谷口 克 (千葉大学医学部) : I 型糖尿病モデルマウスに対する IFN- γ の効果

9) 金井芳之 (東京大学医科学研究所) : ポリ ADP-リボース合成酵素阻害剤(ベナドロスチン)の *in vivo* 抗体産生に及ぼす効果, ループモデルマウスを用いた解析

10) 藤原道夫 (新潟大学医学部) : エリテマトーデスモデルマウスを用いた微生物代謝二次産物の治療効果に関する研究

11) 生田房弘 (新潟大学脳研究所) : 各種微生物二次代謝産物による病変の修飾に関する神経病理学的研究

12) 永井克孝 (東京大学医学部) : 実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) に関する二次代謝産物治療剤の探索

13) 和田孝雄 (慶応義塾大学医学部) : インパルス応答から見た各種免疫調節剤の作用解析と比較

14) 大久保充人 (北里大学医学部) : 微生物二次代謝産物の免疫抑制効果, 特に腎炎発症・進展の抑制について

15) 井形昭弘 (鹿児島大学) :

A) Bactobolin, Actinobolin, Foroxymithine の実験的アレルギー性神経炎に対する治療効果の検討

B) 15-Deoxyspergualin, methyl-DSG, Diplothin-A, foroxymithine, Bestatine の HAM 患者末梢血リンパ球自己増殖反応 (APR) への影響

16) 本間光夫 (慶応義塾大学医学部) : ヒト末梢血単核球による抗核抗体産生におよぼす 15-deoxyspergualin の影響に関する研究—抗体産生抑制機序について

次に上記各班員の研究報告について要約する。

1. 自己免疫疾患治療薬の開発研究

青柳班員は自己免疫疾患治療薬の開発研究にあたり, 各班員の要望に答えるために二次代謝産物の構造および化学的性状などの概要を説明するとともに, 二次代謝産物の配布を行った。さらに, 自己免疫疾患の発病機序を究明することを目的として, 強い免疫抑制能を有する 15-Deoxyspergualin (DSG) の 2 種の光学異性体の脾内酵素網に及ぼす影響について研究を行った。

A) 生理活性物質の概要 : 自己免疫疾患治療薬の開発研究を目的とした本研究班の各班員に二次代謝産物として得られた生理活性物質, 即ちプロテアーゼ阻害物質を含むエクトエンザイム阻害物質, 抗菌物質, 制癌物質およびその他の生理活性物質につき, その構造, 阻害活性, 阻害機構, 毒性および溶解性などの周知を図り, また各班員の要望する生理活性物質の配布を行った。

B) 光学異性体 DSG の脾内酵素網におよぼす影響 :

免疫抑制作用を有する DSG の (-), (+)-enantiomers の作用機序解明を目的とし, 両-enantiomers を連続投与したマウス脾内の酵素活性の動態を経時的に調べた。(-)-DSG 群は DPP-IV と GlcNAc-ase 活性が有意に抑制された。両酵素とも T 細胞と密接な関係を有し, (-)-DSG は T 細胞の異なった subsets に影響を与えるものと思われる。一方, (+)DSG は AP-B と Leu-

AP 活性の有意な増加および GlcNAc-ase のみが有意に抑制された。上記両-enantiomers の作用機序についてさらに検討する。

2. 膠原病の基礎的解明とその治療への応用(V)

—エリテマトーデスモデルマウス(BXSB 雄マウス, MRL/*lpr* マウス)のペプチダーゼに及ぼす 15-デオキシスパーガリンの効果と膠原病患者体液のプテリジン類の変化—

永津班員はエリテマトーデスモデルマウスのペプチダーゼに及ぼす 15-デオキシスパーガリンの効果と膠原病患者体液のプテリジン類の変化について研究した。

エリテマトーデスモデル動物の BXSB 雄マウス(対照は BXSB 雌マウス)と MRL/*lpr* マウス(対照は MRL/++マウス)に 13 週齢から免疫抑制薬 15-デオキシスパーガリン(DSP)を投与して、発症を抑制して、薬剤を投与しない発症したマウスと比較して、ペプチダーゼ類の変化を検索した。20 週齢の発症したマウスは脾臓のジペプチジルアミノペプチダーゼ(DAP)-II が増加, DAP-IV が減少し、従って DAP-II/DAP-IV 比が増加, ポストプロリンクリーピングエンザイム(PPCE)の増加が認められた。DSP 投与で発症を抑制したマウスではこれらのペプチダーゼの変化はなく, 対照マウスとの間に有意差はなかった。この成績は, エリテマトーデスモデルマウスの DAP-II, DAP-IV, PPCE の変化は自己免疫疾患の原因と密接に関係しており, 酵素阻害のある微生物二次代謝産物に自己免疫疾患治療薬を発見する可能性を示唆している。

従来の研究でエリテマトーデスモデル動物の NZB マウス(対照は BALB/c マウス)で脾臓などの組織に微量に存在するネオプテリンが有意に増加し, ネオプテリン/ピオプテリン比が有意に増加することを報告したが, 本年度の研究で, 血清のネオプテリンとネオプテリン/ピオプテリン比

が膠原病の全身性エリテマトーデス(SLE)で対照正常者と比べて有意に増加すること, 関節液のネオプテリンとネオプテリン/ピオプテリン比が膠原病の慢性関節リウマチ(RA)で対照の非自己免疫疾患である骨関節症と比べて, 有意に増加することを見出した。関節液のネオプテリンとピオプテリンは血清より有意に増加していた。この成績は関節液のネオプテリンは関節内でマクロファージから生成され, ネオプテリン/ピオプテリン比は自己免疫疾患の生化学的指標であることを示唆する。

3. イノシトールリン脂質代謝回転抑制物質のスクリーニングと免疫抑制作用

梅澤班員は自己免疫疾患治療薬を検索するため, イノシトールリン脂質代謝回転抑制物質について研究した。

リンパ球活性の機構にイノシトールリン脂質代謝回転が含まれることから, 前年度につづき微生物二次代謝産物からイノシトールリン脂質代謝回転阻害物質をスクリーニングし, 得られた化合物の免疫系における作用を検討した。その結果, 放線菌から新規ポリエーテル構造を有する阻害物質を単離し, inostamycin と命名した。inostamycin は既知ポリエーテル化合物の lysocellin と構造が類似するが, 阻害活性はより強く, IC_{50} , $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ で EGF に誘導される A 431 細胞のイノシトールリン脂質代謝回転を阻害した。イノシトールリン酸の生成も阻害したが, 添加時期により阻害効果が異なる実験結果から, inostamycin はおそらくイノシトールリン脂質代謝回転経路の中で CDP-DG イノシトールトランスフェラーゼを阻害することが示唆された。inostamycin はマウスのエーリツヒがんに対し, *in vivo* で抗がん活性を示した。inostamycin は線維芽細胞の PDGF による S 期誘導を阻害したが, マウス脾細胞の conA, IL-2, または MLC により活性化される DNA 合

成は毒性の表れない濃度で阻害しなかった。また *in vivo* でマウスの抗体産生、遅延型過敏反応を抑制しなかった。

前年度報告した PI キナーゼ阻害物質、orobol と 2,3-dihydroxy benzaldehyde は *in situ* でもイノシトールリン脂質代謝回転とイノシトールリン酸の生成を阻害した。

4. 15-Deoxyspergualin の免疫修飾作用および免疫修飾物質の探索

石塚班員は 15-deoxyspergualin (15-DSG) の免疫修飾作用について研究した。また、免疫修飾物質の探索も行った。

A) 15-DSG の免疫修飾作用(III)

前年度までの本研究によって 15-DSG は T 細胞に作用して IL-2 産生を増強し、ConA による T 細胞の IL-2 受容体形成を抑制または増強することを明らかにした。マウスへの投与は各種の T 細胞サブセット比に影響を与えず、腹腔浸出マクロファージの活性化に作用することも認めた。本年度は T 細胞の産生する IL-3 あるいはマクロファージ活性化因子に対する 15-DSG の作用について検討した。その結果、T 細胞を 15-DSG で *in vitro* で処理することによって IL-3 産生誘導およびその増強が見られた。15-DSG で直接処理しても腹腔マクロファージの活性化は見られないことから、その作用はリンフォカインによって仲介されていると考えられたので、15-DSG 投与マウスから採取した T 細胞と正常マウスから得たマクロファージを接触させずに培養し、その効果を調べたところ、マクロファージは活性化され T 細胞によって仲介されていることを認めた。活性化因子を大量に採取することを目的に EL 4 細胞を 15-DSG で処理した後、その培養上清のマクロファージに対する作用を調べたところ活性化因子の産生が見られた。

B) 免疫修飾物質の探索

微生物代謝産物中に自己免疫疾患に有用な物質として免疫担当細胞の修飾に作用する物質を探索し、抗生物質 Nocardamin および Deferoxamine にその作用を見出した。これらの物質は混合リンパ球培養反応および IL-2 誘導 T 細胞増殖を特異的に阻害した。これらの鉄キレート物質の免疫疾患への応用が期待される。

5. 自己免疫性脳脊髄炎、神経炎の治療薬開発

田平班員は自己免疫性脳脊髄炎、神経炎の治療薬開発について研究した。

(1) Bactobolin 誘導体の検討

これまでに Bactobolin がミエリン塩基性蛋白 (BP) 感作により誘発されるラットの自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を抑制することを示し、しかし毒性が強く効果域が狭いことから、その誘導体の合成の必要性を指摘してきた。本年度は、明治製菓、微化研で開発された Bactobolin の誘導体である Actinobolin, Bactobolamine, N-Acetyl-Bactobolamine について検討した。

方法：Lewis ラットをモルモット BP とフロインド完全アジュバンドで感作し、各濃度の上記薬剤を連日腹腔内注射し、EAE の臨床的重症度を従来の方法で評価した。

結果：Actinobolin は 120 mg/kg, day 1-17 の投与で、EAE の発症を有意に遅延させた。

Batobolamine は 40-50 mg/kg でごく軽度の発症遅延を示したが、有意ではなかった。更に高濃度の検討が必要である。Bactobolamine の毒性に lot 差が見られ、ある lot では 40 mg/kg 以上でラットが死亡した。N-Ac-Bactobolamine は 40 mg/kg で毒性を示さず、EAE 抑制効果も示さなかった。

考案：今回テストした 3 つの誘導体はいずれも著しい毒性の低下が見られたが、効果も低下した。更に新しい誘導体の合成が必要である。

(2) Bactobolin のサプレッサー誘導能の検討

Bactobolin がサプレッサーを誘導し EAE を抑えるのか否かについて検討した。

方法：Lewis ラットを BP/CFA で感作し、Bactobolin を連日注射，day 11-12 の脾細胞を naive recipient に移入し，BP/CFA で感作した。結果：初期の 2~3 回の実験で Bactobolin による EAE の抑制が脾細胞で移入できるかの印象を得たが，その後の実験で Whole SPC, adherent vs. nonadherent, T vs. non-T に分けて検討したが，サプレッサーの証明に到らなかった。

6. Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis ラットによる新免疫抑制剤の探索研究

佐藤班員は Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis (EAMG) ラットを用いて，新しい免疫抑制剤を探索した。

昨年度までは，抗腫瘍抗生物質である 15-Deoxyspergualin (15-DSG)，Bactobolin, Actinobolin ならびにプロテアーゼ阻害剤である Arphamenine A の重症筋無力症に対する治療効果を検討したが，今年度はこれらに Bactobolamine を加え，今まで行った治療実験について総括的に考察してみた。

15-DSG および Actinobolin は EAMG の発症を有効に阻止したが，Bactobolin, Arphamenine A は免疫直後から投与を開始しても抗体産生を十分に抑制できず，EAMG の発症を阻止できるとは言えなかった。

急性期から慢性期に移行すると思われる免疫後 10 日目から治療を開始した場合，15-DSG および Actinobolin の免疫抑制効果は十分に発揮されなかった。残念ながら，一旦免疫を獲得し抗体産生能を持った EAMG ラットに対して，それを有効に治療し得る薬剤は現在のところ開発されていないようである。

Bactobolamine は Actinobolin の誘導体で，

Actinobolin と同様に毒性が非常に低いことで注目されている。25 mg/kg/day の Bactobolamine は免疫直後から投与しても，十分に抗体価の上昇を抑制することができず，免疫後 10 日目から 5, 25, 50 mg/kg/day いずれの投与量の Bactobolamine も有効に抗体産生の抑制をすることができなかった。

今後さらに安全かつ強力な免疫抑制剤が開発されることを期待したい。

7. 15-Deoxyspergualin の免疫抑制活性発現の機序に関する研究

徳永班員は 15-Deoxyspergualin の免疫抑制活性発現の機序について研究した。

昨年までの研究で，15-deoxyspergualin (DSG) および 15-deoxymethylspergualin (MeDSG) が，マウスの二次 CTL の誘導および骨髄細胞の分化・増殖を抑制することを明らかにした。特に，CTL 誘導の系において，MeDSG による抑制がインターフェロン γ を添加することで回復するが，MeDSG は MLR におけるインターフェロン γ を初めとするサイトカイン産生は抑制しないこと，CTL 前駆細胞の熟成 CTL への分化の過程が DSG および MeDSG に最も感受性が高いことを見出した。DSG (MeDSG) の免疫抑制効果が分化誘導抑制によるものか否か，また，CTL 以外の細胞の分化も DSG (MeDSG) によって抑制されるか否かを明らかにするため，今回は骨髄性白血病細胞 (HL-60, M1) のマクロファージへの分化 (PC12)，マクロファージ活性化 (分化の一側面と考える) に伴う表層蛋白質 (Ia 抗原) の変化に対する MeDSG の効果を検討した。分化誘導の前後あるいは同時に MeDSG を添加し，HL-60 および M1 細胞の Fc レセプター発現，PC12 細胞の神経突起伸展，マクロファージ (P388D, および腹腔マクロファージ) の Ia 抗原発現を調べたが，全く抑制効果は認められなかった。ところが，M1 細胞の

DNA, RNA, 蛋白合成は MeDSG により著明に低下し, 特に, 5 日間共存培養した際の蛋白合成は 1 ng/ml 以上の濃度で 50% 以上抑制された。

8. I 型糖尿病モデルマウスに対する IFN- γ の効果

谷口班員は I 型糖尿病モデルマウスに対する IFN- γ の効果について研究した。

NOD マウスは, 代表的な臓器特異的自己免疫疾患である I 型糖尿病を解析する上での格好のモデル動物である。生後 4~6 週齢までに, 藤ラ氏島への限局性の細胞浸潤を認め, 12 週齢頃より β 細胞の崩壊による顕性糖尿をきたす。発症動物は, 多飲, 多尿, 高血糖, 尿糖を呈し, 体重が減少し, ketoacidosis をきたし死亡する。本症の発症は T 細胞依存性であり, β 細胞崩壊は MHC クラス II 限局性に CD4 (L3T4) 陽性 T 細胞により完遂される。

γ -インターフェロン (IFN- γ) は, MHC クラス I やクラス II の発現, T 及び B 細胞機能の調節, NK 細胞やマクロファージの活性化, IL-2 の発現促進等, 多彩な免疫調節機能を有するペプチドである。しかし, IFN- γ の各種自己免疫疾患に対する全身投与の効果は必ずしも一定ではない。すなわち, SLE モデルマウスに対しては, ループス腎炎をはじめとする各種病態を悪化させる。また, 臨床的にも多発性硬化症が, IFN- γ の投与により悪化すると報告もある。逆に, 実験的アレルギー性脳脊髄炎は, IFN- γ の投与により, 病状の進行が阻止されるという。

今回は I 型糖尿病のモデル動物である NOD マウスに IFN- γ を全身投与し, 自己免疫病発症に対する同剤の効果を検討した。その結果, IFN- γ は糖尿病発症前のいずれの時機から投与しても, NOD マウスの顕性糖尿の発症を抑制した。しかし, 組織学的には, IFN- γ は insulinitis を早期に誘導する作用を有していた。すなわち, IFN- γ は

NOD マウスの自己免疫現象に対して, insulinitis の促進と糖尿病発症の抑制 (β 細胞破壊の抑制) という 2 つの異なった作用を有することが明らかとなった。IFN- γ がどのような機序により insulinitis を促進し, 逆に β 細胞の破壊を抑制するのかわからないが, 我々のこれまでのモノクローナル抗体投与実験ならびに, これまで集積されてきた NOD マウスの遺伝学的解析から, “insulinitis の存在” と “ β 細胞の破壊” とは, それぞれ独立した事象であり, IFN- γ は少なくともこの 2 つの自己免疫現象に対して, 相異なった作用を示すと考えられた。

9. ループスモデルマウスを用いたベナドロスチンの *in vivo* 抗核抗体産生に及ぼす効果の解析

金井班員はループスモデルマウスを用いてポリ ADP-リボース合成酵素阻害剤 (ベナドロスチン) の *in vivo* 抗体産生に及ぼす効果について研究した。

全身性エリテマトーデス (SLE) 合併妊娠で子宮内胎児死亡 (IUFD), 早・流産の頻度の高いことが知られている。我々はこの病態の研究および治療のための動物モデルを MRL/l マウスの妊娠の系に見いだすことに成功した。すなわち当核妊娠系で正常分娩と思われる高仔産例と IUFD によると思われる低仔産例があって, 後者が妊娠 1 週にて血清抗ポリ ADP-リボース抗体に選択的上昇がみられ, IUFD の予知が出来るというものである。これに関して治療という側面から MRL/l マウスを用いてのポリ ADP-リボース合成酵素阻害剤投与による抗ポリ ADP-リボース抗体の選択的抑制を検討してきた。雌 MRL/l マウス 10 週齢 (通常我々は 10 週で mating を行っている) には抗ポリ ADP-リボース抗体価が相対的に抗 ssDNA 抗体価より高値を示すものが約 50% (そのうち特に高いものは 17%) 存在することがわかり, そのようなマウス群でベナドロスチンの選択

の抗体抑制効果がみられることがわかった。また一見ベナドロスチンによる抑制効果がないようなマウスでも測定系に一本鎖 DNA 抗原を共存させると抑制効果がみられるようになるという知見も得た。さらに前回は週3回投与法を用いたが、今回週1回投与でも効果的であるという予備的知見も得た。今回10週齢 MRL/l マウスのベナドロスチン投与による抗ポリ ADP-リボース抗体の選択的抑制の確認と、用いた MRL/l マウスの全例においてポリ ADP-リボース感作による特異的抗体 (IgG) が産生されたことから、MRL/l マウスにおける抗ポリ ADP-リボース抗体の産生にポリ ADP-リボース抗原の関与が強く示唆された。以上の結果、MRL/l マウスの妊娠前後でのベナドロスチン投与と低仔産例の防止の実験的基盤が確立したと考える。

10. エリテマトーデスモデルマウスを用いた微生物代謝二次産物の治療効果に関する研究

藤原班員はエリテマトーデスモデルマウスを用いて微生物代謝二次産物の治療効果について研究した。

1) Poststatin および Diocstatin の効果

これら産物を 5 mg/kg MRL/lpr マウスに5週齢から週3回7週間投与し、B細胞活性化現象とルーブス腎炎発症に対する影響を調べた。両者とも抑制効果は認められなかった。

2) 15-デオキシスパーガリン (DSP) の作用機序

これまでの実験から、DSP は強い免疫抑制活性を持ち、エリテマトーデスモデルマウス MRL/lpr および BXS^B(♂) マウスに対して治療効果を示すことが示されている。MRL/lpr マウスで DSP の作用様式を調べ、次のような結果を得ている。①このマウスに特徴的なリンパ節の腫脹を抑える。②それは Thy-1.2⁺ (T細胞マーカー)、CD4⁻ および CD8⁻、B²²O⁺ (これは通常 B細胞に発現される) の T細胞の増殖を強く抑制する。③

正常の T および B細胞は障害されないで、免疫応答性は温存される。このように DSP は治療薬として期待できる。

3) 移植細胞対宿主反応 (GVHR) の抑制

C57BL/6 (B6) マウスの CD4⁺T細胞を (B6 × bml²*) F1 マウスに移入すると GVHR が起り、ルーブス腎炎や臓器特異的自己免疫疾患が発症することが知られている。(*bml²マウス: B6 と MHC クラス II (Ia) 抗原のみ異なる) この系を用いて DSP の効果を検討したところ、強い抑制効果が示された。DSP の投与スケジュールとして、GVHR が進んでから投与しても抑制効果をもたらされるが、初期 (細胞移入直後) のみ投与すると、GVHR は却って増強することが示されている。治療には持続的投与が必要なが示唆された。

11. 各種微生物二次代謝産物による病変の修飾に関する神経病理学的研究

生田班員は Bactobolin の EAE 抑制効果について研究した。

Bactobolin のラット EAE を抑制する最少有効量を知るために以下の実験を行った。

6週齢雄 Lewis ラット、各群5例づつにモルモット脊髄を抗原として EAE を惹起した。EAE 発症後 Bactobolin 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.01 mg/kg の各量を、麻痺の認められる期間連日腹腔内投与した。動物は全て感作 29 日目に、灌流固定し、全中枢神経系を組織学的に検討した。

結果: Bactobolin 0.1 mg/kg 投与群では、1例は cannibalism により死亡した。比較的軽症に経過した1例のラットでは、対照5例の何れよりも強い EAE 病巣をみとめた。これ以外の3例では、対照 EAE ラットに比べ病巣は明らかに少なく、微小かつ比較的古いものが多かった。

Bactobolin 0.05 mg/kg, 0.01 mg/kg 夫々を投与した群では、両群とも同様の組織像を示した。すなわち、いずれも癒合性の広範な脱髄巣を示す

ラットが多く、大型から中等大の脱髄病巣も多数認められた。いずれも対照群に比較し、強い病変を示していた。

まとめ：脊髄 homogenate を抗原とするラット EAE 系では、Bactobolin の最少有効量は 0.1 mg/kg と推定された。より少量の 0.05 mg/kg、および 0.01 mg/kg では、逆に EAE 病変を増強しているように思われた。

12. 実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)に関する二次代謝産物治療剤の検索

永井班員は実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)に関する二次代謝産物治療剤の探索研究を行った。

Bactobolin のラット EAE への治療効果は 1 mg/kg 以下の濃度で認められた。昨年度は 0.3 mg/kg で有効性が確認されたが、今年度は 0.1 mg/kg で治療効果を検討した。本薬剤の毒性が強いために、使用には限界がある。なるべく毒性の少ない薬剤の検索が今後必要と考えられる。今回は新しく bactobolamine, poststatin と dioctatin-A について比較検討した。

ラット EAE はルイスラットにモルモット脊髄抗原を接種して作製した。これらの薬剤の投与は、0.1 mg, 1.0 mg, 10 mg/kg の濃度で発症直後から開始し麻痺のみられる期間中に行った。

評価判定基準として EAE ラットの臨床経過と病変数を調べた。Bactobolin 0.1 mg/kg 投与群で症状の軽減がみられた。病変数は control 群との間に有意差は認められなかったが減少傾向を示した。また、病巣の大きさと新旧病変の比較から bactobolin は、いったん形成された EAE 病変の進行を抑制しているものと推測された。

Poststatin 1 mg/kg 投与群では bactobolin 0.1 mg/kg 投与群よりも抑制効果は低かった。それに対して poststatin 0.1 mg/kg 投与群では病変数は少なく、抑制効果を認めるようであり、検

討中である。

さらに、MBP 抗原感作ラット EAE に対する効果についても比較検討中である。

13. インパルス反応から見た各種免疫調節剤の作用解析と比較

和田班員はインパルス反応から見た各種免疫調節剤の作用解析と比較研究を行った。

本班の過去 4 年間にわたる研究によって、自己回帰モデルによるフィードバック解析法を免疫ネットワーク解析に利用し、さらに免疫調節作用をシステム論の立場から解明することを試みてきた。今回の研究では各種免疫調節剤の作用を、インパルス応答という手法を通して比較することを試みた。

正常コントロール 2 名、全身性エリテマトーデス 1 名、慢性関節リウマチ 6 名、慢性血液透析患者 3 名について、30 週ないし 60 週にわたり、毎週 1 回、末梢静脈から採血し、IgG, CD4, CD8 を検査した。各種の免疫調節剤を投与し、サラゾピリンについては血中濃度を測定し、投与量または血中濃度の変動が免疫ネットワークに及ぼす影響についても研究した。

ベスタチンを透析患者に投与した時の時系列変化を解析すると、この薬剤は IgG の産生異常を正常化させるが、その作用は恐らく B 細胞を賦活化させることによって生じるものと考えられた。一方、カルフェニール、サラゾピリンなどでは、たしかに免疫ネットワークに影響するが、患者によってかなり差があり、ベスタチンのように明確な機能を見出すに至らなかった。これら 2 薬剤はリウマチ患者において、臨床的に効果が認められているが、その効果がリンパ球ネットワークに直接関係しているかどうか不明である。むしろ各種の炎症因子などに作用し、その結果として間接的に免疫ネットワークに影響する可能性が強いと思われる。

ベスタチンには副作用がほとんど無いに等しいことから考えると、ベスタチンをリウマチ患者に投与して、免疫機能異常にどう影響するかを検討することは非常に有意義と考えられる。今後、専門家の意見をいれてその是非について検討したい。

14. 微生物二次代謝産物の免疫抑制効果、特に腎炎発症・進展の抑制について

大久保班員はニュージーランド B/W F1 マウスの進行した糸球体腎炎に対する 15-deoxyspergualin および bactobolamine の効果について研究した。

(1) ニュージーランド B/W F1 マウスの進行した糸球体腎炎に対する 15-deoxyspergualin の効果—同一マウスにおける検討—

15-deoxyspergualin (15-dsp) の B/W マウスの進行した糸球体腎炎に対する効果を昨年度に報告したが、今回は同一マウスにおける変化を経時的に追求することにより、その効果を確認するとともに、さらに詳細な検討を行った。32 週齢の B/W マウスに片側腎摘を施行した後、PBS, methylprednisolone 20 mg/kg または 15-dsp 6.7 mg/kg の週 4 回皮下投与を開始した。40 週齢で採尿、採血後にマウスを屠殺、腎を摘出して(免疫)組織学的に腎糸球体病変を評価した。マウス生存率は 38 週齢以降 15-sep 群で対照群に比較して有意に高値であった。また、群間の比較で、蛋白尿の推移はコントロール群と有意に異なっていた。同様に、腎糸球体光顕所見の推移、IgG の腎糸球体への沈着も対照群に比し有意に改善された。15-dsp 群の血清抗 DNA 活性の変化も対照群と有意に異なっていた。以上の結果から、15-dsp は B/W マウスの腎症発症を抑制するだけでなく、すでに進行した糸球体腎炎に対しても治療効果を有することが確認された。

(2) ニュージーランド B/W マウスの進行した糸

球体腎炎に対する bactobolamine の効果

Bactobolamine (BBM) の免疫抑制効果を検討するため、すでに腎症を発症した 28 週齢のニュージーランド B/W F1 マウス (B/W マウス) に BBM 3.5-30 mg/kg × 4/wk を投与した。40 週齢で採尿、採血後に屠殺して、腎臓を摘出、腎糸球体の組織学的並びに免疫組織学的検討を行った。蛋白尿は BBM 15-30 mg/kg 群で対照群に比較して有意に減少した。腎糸球体組織学的検査でも BBM 30 mg/kg 群で対照群に比して有意低値であった。同様に腎糸球体における C3 および IgG の沈着も 15 および 30 mg/kg 群で有意に減少した。BBM の免疫抑制機序にかんして現在 BALB/c マウスを用いて検討中である。

15. Bactobolin, Actinobolin, Foroxymithine の実験的アレルギー性神経炎に対する治療効果の検討および 15-Deoxyspergualin, methyl-DSG, Diplotin A, Foroxymithine, Bestatine の HAM 患者末梢血リンパ球自己増殖反応 (APR) への影響

井形班員は Bactobolin, Actinobolin, Foroxymithine の実験的アレルギー性神経炎に対する治療効果および 15-Deoxyspergualin, methyl-DSG, Diplotin A, Foroxymithine, Bestatine の HAM 患者末梢血リンパ球自己増殖反応 (APR) への影響について研究した。

(A) Bactobolin, Actinobolin, Foroxymithine の実験的アレルギー性神経炎に対する治療効果の検討

末梢神経髄鞘に対する自己免疫疾患と考えられている Guillain-Barré 症候群の実験モデルである EAN を用いて Bactobolin, Actinobolin, Foroxymithine の EAN 発症後投与による治療効果につき臨床的、組織学的に検討した。EAN は Lewis ラットに牛末梢ミエリン 300 μg 蛋白を完全アジュバンドと共に接種し作成。Bactobolin 1

mg/kg・匹, Actinobolin 200 mg/kg・匹, Foroxymithine 1 mg/匹, 20 mg/匹を EAN 発症後より連日 5 日間腹腔内投与し, 臨床症状, 組織所見の程度をスコアし, コントロールと比較した。

Bactobolin 1 mg/kg では有意の治療効果はみられなかった。Actinobolin 200 mg/kg の大量投与で臨床的にも組織学的にも明らかに EAN 所見の軽減が認められ, 治療効果ありと判断した。Foroxymithine は両投与量でも明らかな治療効果は認められなかった。

(B) 15-Deoxyspergualin, methyl-DSG, Diploin A, Foroxymithine, Bestatine の患者末梢血リンパ球自己増殖反応 (APR) への影響

HTLB-I が関与し, 免疫学的機序により発症すると考えられる HAM の治療薬の開発を目的に HAM 患者に特有に認められる APR を抑制することを指標として各種免疫修飾剤のスクリーニングを行った。15-DSG と methyl-DSG は APR を抑制し, 安定な methyl-DSG がより低濃度で抑制した。また高濃度では逆に抑制が低下した。Diploin A は APR を抑制せず, むしろ高める方向に作用した。Foroxymithine は用量依存性に APR を抑制した。Bestatine は 10 μ g/ml までは用量依存性に APR を抑制したが, より高濃度にしてもそれ以上の抑制は認められなかった。以上より, APR のこれらの薬剤に対する動態は EAE ~EAN など自己免疫疾患動物モデルに対する抑制効果と類似しており, HAM の病態の解析と治療薬の開発に本方法が有用と考えられる。

16. ヒト末梢血単核球による抗核抗体産生におよぼす 15-deoxyspergualin の影響に関する研究—抗体産生抑制機序について—

本間班員はヒト末梢血単核球による抗核抗体産生におよぼす 15-deoxyspergualin (DSG) の影響について研究した。

目的: 本年度は, T 細胞活性化経路における

DSG の作用部位を調べるため, マイトーゲンによる細胞内カルシウム濃度の変化を調べた。

方法: 健常人と SLE 患者の末梢血より単核球を得, サイクロスポリン A または DSG を添加し 24 時間培養した。対照には, 薬剤非添加で培養したものをを用いた。培養終了後, カルシウム感受性蛍光色素である Fura-2AM を加え, 反応させた後, カルシウム緩衝液に浮遊し検体とした。細胞内カルシウム濃度は Fluorescence Spectrophotometer を用い測定した。検体にマイトーゲンとして PHA を加え, 細胞内カルシウム濃度の上昇反応を調べた。またカルシウム・イオノフォアを加えて上昇反応の指標とした。

結果: 健常人単核球では, PHA 添加直後より細胞内カルシウム濃度の上昇 (初期上昇反応) があり, 5 分後よりさらに軽度の上昇 (後期上昇反応) が認められた。約 10 分後にイオノフォアを加えたところ, 著明な細胞内カルシウム濃度の上昇がみられた (最大蛍光強度)。

基礎値から最大蛍光強度までの上昇を 100% とし, 個々の成績を評価した。健常人対照では, 初期上昇反応は約 40% であった。サイクロスポリン A 処理では, 25% であった。DSG 処理単核球でも同様 (約 25%) の抑制が認められた。いずれも後期上昇反応には影響しなかった。一方 SLE では, 初期上昇反応は約 40% と健常人と差がなかったが, 後期上昇反応は逆に低下した。サイクロスポリン A 処理で, 初期上昇反応は約 50% となったが, 後期上昇反応は認められなかった。DSG 処理では, 初期上昇反応は約 30% で, 後期上昇反応は僅かに認められた。

結語: 1) 健常人において, DSG はサイクロスポリン A と同様 PHA 刺激による細胞内カルシウム濃度の初期上昇反応を抑制した。2) SLE 患者では, PHA 刺激後細胞内カルシウム濃度の初期上昇反応は健常人同様に認められたが, 後期上昇反応はむしろ低下した。3) SLE における細胞

内カルシウム濃度の後期上昇反応の欠如は、DSG 処理で改善された。

以上より、DSG はサイクロスポリン A 同様、健康人単核球の細胞内小胞体からのカルシウムの動

員を抑制すると考えられた。細胞外からのカルシウム動員は、SLE 患者単核球で低下していたが、DSG 処理により一部改善した。

分 担 研 究 報 告

自己免疫疾患治療薬の開発研究

A. 生理活性物質の概要

青 柳 高 明*

研究協力者 小川慶治*, 小島露子*, 永井真知子*, 原田滋子*

自己免疫疾患治療薬の開発研究を行うことを目的とした本研究班は、微生物代謝産物として発見された多くの酵素阻害物質、抗菌物質、制癌物質ならびに新しい探索研究の結果、見出されたさまざまな生理活性物質を用い治療薬の開発研究を行っている。

これらの生理活性物質は新規な構造を有する低分子物質であるとともに、免疫調節作用を有することで世界の注目を集めている。

初めに、本研究班の班員の要望に答えるため、エンドペプチダーゼ阻害物質、エクトエンザイム阻害物質、その他の酵素阻害物質ならびに免疫修飾物質を含む抗菌物質、抗癌物質などの化学構造、阻害活性、毒性および溶解性などの概要を述べる。

Endopeptidases に属する serine proteinases, cystein proteinases, aspartic proteinases, metal proteinases を阻害する物質として見出した leupeptin, antipain, pepstain, hydroxyepstatin, pepstanone, phosphoramidon などの構造は図1に示す。

Ectoenzyme のうち、exopeptidases に属する aminopeptidases, dipeptidylaminopeptidases, carboxypeptidases, dipeptidylcarboxypeptidases ならびに alkaline phosphatase, esterase および phospholipases などを阻害する多くの低分子阻害物質を発見した。

Aminopeptidases に対する阻害物質として amastatin, bestatin, arphamenines A と B, actinonin, ebelactones A と B, formestin A と B, probestin, prostatin, leuhistin など、また dipeptidylaminopeptidases を阻害する物質として dioctatins A と B, diprotins A と B などを見出した。一方、carboxypeptidases 阻害物質として, (s)- α -benzylmalic acid および histargin など、また dipeptidylcarboxypeptidases 阻害物質として angiotensin converting enzyme を阻害する (s,s)-N,N'-ethylenediaminedisuccinic acid (EDDS), Foroxymithine および histargin などを見出した。上記 exopeptidases 阻害物質の構造は図2-(1, 2)に示す。

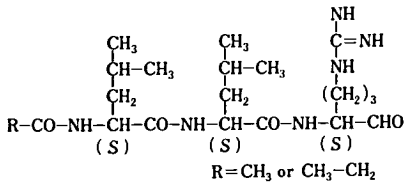
さらに ectoenzyme である alkaline phosphatase の阻害物質として forphenicine を、また esterase の阻害物質として esterastin および ebelactones A と B を、さらに phospholipase の阻害物質として plipastatins A1, A2, B1, B2 など、さらに EDDS などを見出した。これらの阻害物質の構造は図2-(3)に示す。

免疫修飾物質を含む抗腫瘍性物質の探索研究において (\pm)-15-deoxyspergualin, bactobolin, bactobolamine, Ac-bactobolamine, Thr-bactobolamine, Suc-bactobolamine, Coformycin, Azomycin などを、また poly(ADP-ribose)-synthetase 阻害物質として benadrostin, さらに sialid-

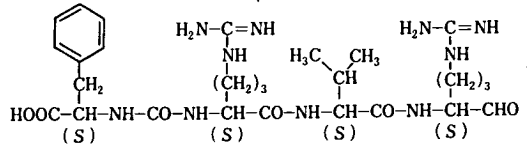
*微生物化学研究所

Inhibitors of serine and cysteine proteinases.

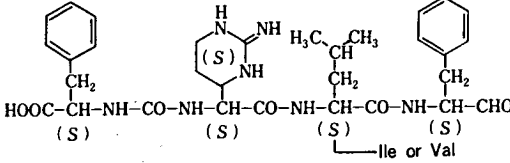
Leupeptin



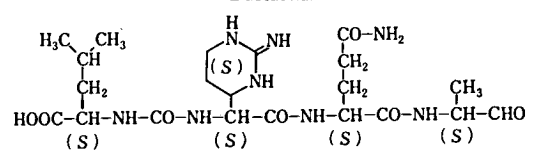
Antipain



Chymostatin

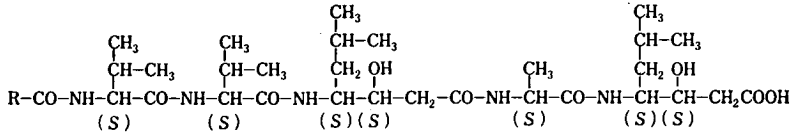


Elastatinal



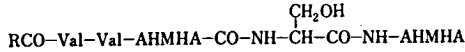
Inhibitors of carboxyl proteinases.

Pepstatin

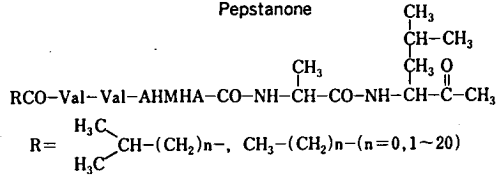


Isovaleryl-L-valyl-L-valyl-AHMHA-L-alanyl-AHMHA

Hydroxypepstatin



Pepstanone



AHMHA : (3S, 4S)-4-Amino-6-methylheptanoic acid

Inhibitors of metal proteinases.

Phosphoramidon

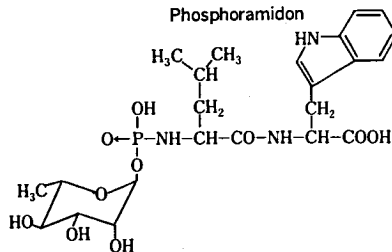


図1 エンドペプチダーゼ阻害物質

自己免疫疾患治療薬の開発研究

Inhibitors of aminopeptidases.

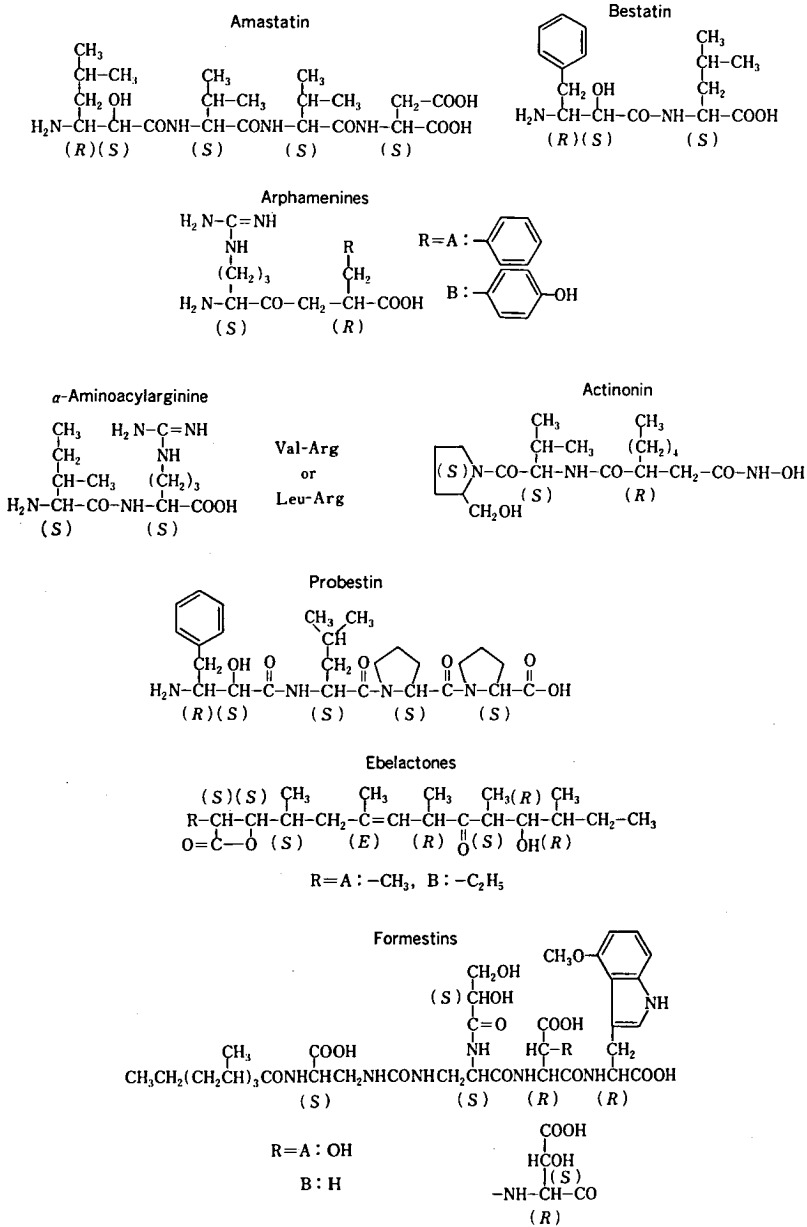


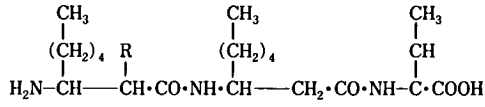
図 2-(1) 細胞膜酵素阻害物質

ase 阻害活性を示すとともに免疫修飾作用を呈する α -sialosylcholesterol を合成により得た。これらの物質の構造は図 3 に示す。上述した酵素阻害

物質の毒性、溶解性、阻害を受ける酵素などは表 1 に、また免疫修飾物質を含む抗腫瘍物質の毒性および溶解性は表 2 に示す。

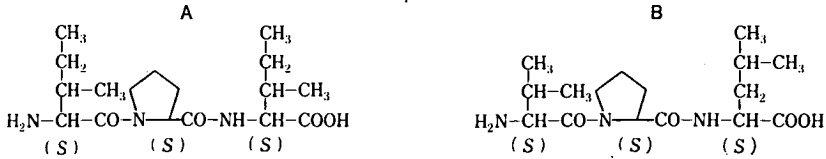
Inhibitors of dipeptidyl aminopeptidases.

Diocetats



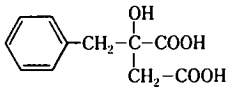
Diocetats A : R = CH₃, B : R = H

Diprotins

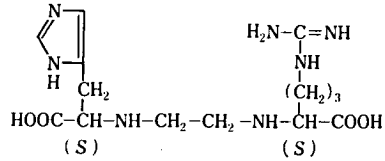


Inhibitors of carboxypeptidases.

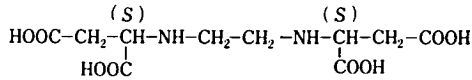
(S)- α -Benzylmalic acid



Histargin



(S,S)-N,N'-Ethylenediaminedisuccinic acid (EDDS)



Inhibitors of dipeptidylcarboxypeptidases.

Foroxymithine

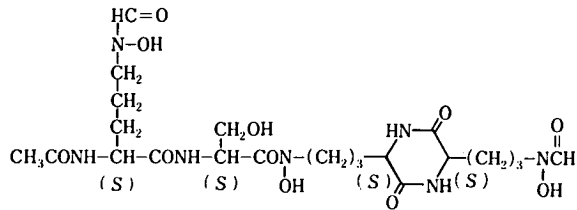
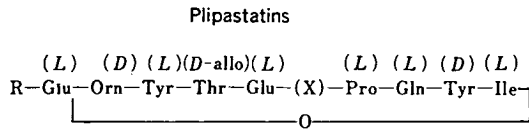
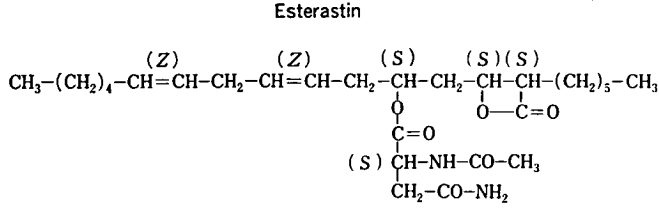
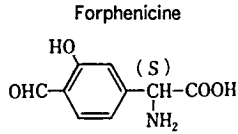


图 2-(2) 細胞膜酵素阻害物質

自己免疫疾患治療薬の開発研究



Plipastatin	R	(X)	
A1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\overset{\text{OH}}{\text{CH}}\text{CH}_2\text{CO}-$	3-(R)-hydroxy hexadecanoic acid	D-Ala
A2	$\text{CH}_3\text{CH}_2\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}(\text{CH}_2)_{10}\overset{\text{OH}}{\text{CH}}\text{CH}_2\text{CO}-$	14-(S)-methyl-3-(R)-hydroxy hexadecanoic acid	D-Ala
B1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\overset{\text{OH}}{\text{CH}}\text{CH}_2\text{CO}-$	3-(R)-hydroxy hexadecanoic acid	D-Val
B2	$\text{CH}_3\text{CH}_2\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}(\text{CH}_2)_{10}\overset{\text{OH}}{\text{CH}}\text{CH}_2\text{CO}-$	14-(S)-methyl-3-(R)-hydroxy hexadecanoic acid	D-Val

図 2-(3) 細胞膜酵素阻害物質

(±)-15-Deoxyspergualin

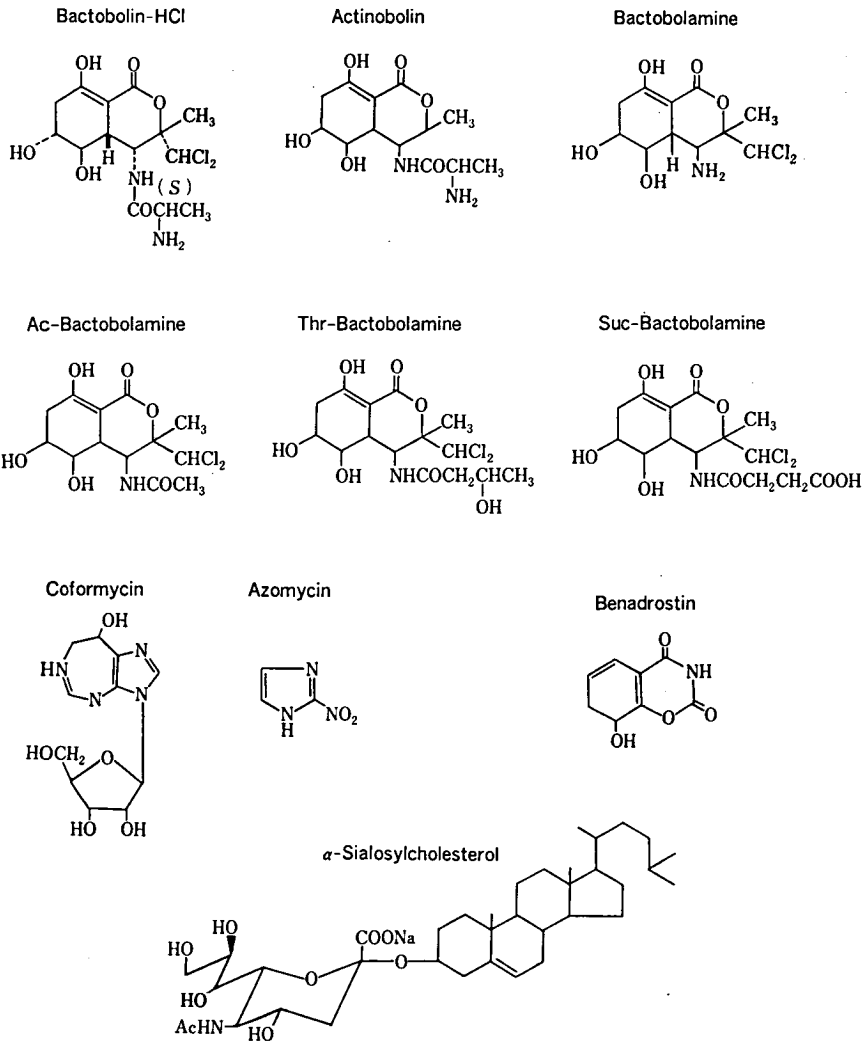
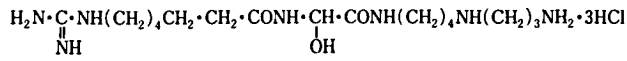


図 3 免疫修飾物質を含む抗菌および抗腫瘍物質

表 1 酵素阻害物質の毒性および溶解性

酵素阻害物質	LD ₅₀ (mg/kg)	溶 解 性	阻害を受ける酵素
Leupeptin・H ₂ SO ₄	80 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (>10 mg/ml)	trypsin, plasmin, papain, cathepsin B など
Phosphoramidon	>500 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (>10 mg/ml)	金属プロテイナーゼ
Bestatin	>500 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (2.5 mg/ml, 加温)	AP-B, Leu-AP
Arphamenine A・H ₂ SO ₄	200 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (>10 mg/ml)	AP-B
Arphamenine B・H ₂ SO ₄	>500 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (>10 mg/ml)	AP-B
Diocstatin A・H ₂ SO ₄	>250 (ip, マウス)	水難溶, 10% DMSD で白濁液 (1 mg/ml)	DPP-II
Diprotin A	>250 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (>5 mg/ml)	DPP-IV
Z-Diprotin A	>500 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (2 mg/ml, 白濁)	Post-Pro-Enz
Poststatin	>125 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (>5 mg/ml)	Post-Pro-Enz
Formestin A	>125 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (5 mg/ml)	fMet-AP
Actinonin	>125 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (5 mg/ml)	AP-M
Probestin	>250 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (2 mg/ml)	AP-M
Benzylmalic acid	>500 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (5 mg/ml)	CP-A
Histargin	>500 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (5 mg/ml)	CP-B, ACE
Foroxymithine	>500 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (5 mg/ml)	ACE
Forphenicine	>500 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (>1 mg/ml)	Alkaline phosphatase
Esterastin	>250 (iv, マウス)	水難溶, 10% DMSO で白濁液 (1 mg/ml)	Arylesterase

AP : aminopeptidase, CP : carboxypeptidase, ACE : angiotensin converting enzyme

表 2 免疫修飾物質を含む抗菌と抗腫瘍物質の毒性および溶解性

抗生物質	LD ₅₀ (mg/kg)	溶 解 性	備 考
15-Deoxyspergualin	38.4 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (>10 mg/ml)	
Bactobolin・HCl	6.0 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (5 mg/ml)	
Actinobolin	800.0 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (>5 mg/ml)	
Bactobolamine	>100.0 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (>5 mg/ml)	
Coformycin	25.0 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (1 mg/ml)	
Azomycin	80.0 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (1 mg/ml)	
Benadrostin	>250.0 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (1 mg/ml)	Poly (ADP-ribose) 合成酵素を阻害
α -sialosylcholesterol	93.0 (iv, マウス)	水, Saline, PBS 可溶 (5 mg/ml)	Sialidase を阻害

自己免疫疾患治療薬の開発研究

B. 光学異性体 Deoxyspergualin の脾内酵素網におよぼす影響

青 柳 高 明*

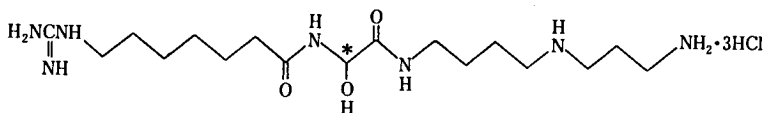
研究協力者 小川慶治*, 小島路子*, 永井真知子*, 原田滋子*

抗腫瘍性抗生物質として見出された Spergualin^{1,2)}は、その誘導体である Deoxyspergualin (DSG)^{3,4)}が強い免疫抑制能を有することで注目されている。DSG の薬理作用は「自己免疫疾患治療薬の開発研究」の報告書(厚生省新薬開発研究青柳班, 昭和 60 年度~63 年度)⁵⁻⁸⁾に報告されているように、ラット急性実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE), エリテマトーデスモデルマウス(NZB/WF1, MRL/MP-lpr/lpr, BXS/B/雄), 重症筋無力症ラットなどの治療に有効である。さらに、皮膚, 甲状腺移植などの実験同種臓器移植に優れた効果が認められ, 移植免疫抑制物質として期待されている。

大林班員らは DSG の 11 位の立体配置と生物活性との相関を調べ, (-)-enantiomer に活性が認められ, DSG 活性発現に 11 位の立体配置が重要な役割を果たすことを報告した^{6,9)}。本報告は DSG の(-), (+)-enantiomers を長期間投与し, 経時的に脾内の酵素網の動態を調べたのでその結果を述べる。

実験方法

動物および光学異性体 DSG: ICR マウス(7 週齢, 雄)は静岡県実験動物農業協同組合から購入した。DSG(-), (+)-enantiomers の構造は以下に示す。



上記光学異性体(20 μg/マウス)は連続 33 日間, 腹腔内に投与した。対照マウスは生食水を同期間腹腔に投与した。マウスは毎日あるいは 2 日間隔で屠殺し, 脾を摘出した後直ちに -70°C で保存した。脾は 10 倍量の phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)中で, 組織ホモジナイザー (ultra-turrax)を用い, 1 分間ホモジナイズした。酵素活性の測定には, ホモジネートの 3,000×g, 20 分間の遠心上清を用いた。

基質: 酵素活性測定用の基質ならびに略語は下記に示す。

L-arginine β-naphthylamide·HCl (Arg·NA), L-glutamic acid β-naphthylamide·HCl (Glu·NA), L-leucine β-naphthylamide·HCl (Leu·NA), and L-methionine β-naphthylamide (Met·NA) from Mann Research, N.Y., U.S.A.; glycyl-L-proline β-naphthylamide (Gly-Pro·NA), L-lysyl-L-alanine β-naphthylamide (Lys-Ala·NA) and acetyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine methyl ester (Ac(Ala)₃·ME) from Bachem Feinchemi-

*微生物化学研究所

kalien Ag., Budendorf, Switzerland; N-Benzoyl-L-arginine ethyl ester, N-acetyltirosine ethyl ester, and p-nitrophenyl acetate (NPA) from Tokyo Kasei Kogyo Co., Tokyo, Japan; p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (NP-Glc), p-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside (NP-Man), and p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (NP-GlcNAc) from BDH chemicals Ltd., Poole, England. Formyl L-methionine β -naphthylamide (fMet \cdot NA) and carbobenzoxycglycyl-L-proline β -naphthylamide (Z-Gly-Pro \cdot NA) were synthesized from Met \cdot NA and Gly-Pro \cdot NA, respectively, in our laboratory.

緩衝液：酵素活性測定用の緩衝液は 0.02 M PBS (pH 7.2) を用いた。ただし、post-proline-cleaving enzyme (Post-Pro-Enz) の測定には 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 7.8) を用いた。

酵素活性の測定：臓器ホモジネートの遠心上清分画は、それぞれの基質溶液および緩衝液を含む反応試験管 (1.5 \times 10 cm) に分注し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間の反応を行った。Post-Pro-Enz については、前述の緩衝液を用いて測定した。すべての酵素活性の測定には 3 本宛の試験管を用い、その平均値を記載した。6 種類の aminopeptidase, 4 種類の endopeptidase, 3 種類の glycosidase および arylesterase について活性を測定した。各酵素活性の測定法および基質は表 1 に示す。

蛋白の測定：標準蛋白としてウシ血清アルブミンを用い、Lowry 法¹⁴⁾で測定した。

結果および考察

DSG の 11 位立体配置と生物活性との相関を理解することを目的として、DSG の (-), (+)-enantiomers を連続投与し、経時的に脾内酵素網の動態を調べた。

両 enantiomers を連続投与したマウス脾内の酵素活性の変動を図 1, 2 および表 2 に示す。(-) DSG 群では、DPP-IV と GlcNAc-ase 活性が有意に抑制された。DPP-IV は T 細胞表面に存在することが知られ¹⁵⁻¹⁷⁾、また DPP-IV とともに GlcNAc-ase も T 細胞に関係する酵素であることを報告した¹⁸⁾。(-)DSG は T 細胞の異なった subsets に影響を与えるものと思われる。一方、(+) DSG 群は AP-B と Leu-AP 活性の有意な増加および GlcNAc-ase のみが有意に抑制されることが認められた。AP-B と Leu-AP の変動は脾内の T, B 両細胞の比率の変化によりもたらされたものとする。上記薬剤の作用機序についてはさらに検討する予定である。

ま と め

免疫抑制作用を有する DSG の (-), (+)-enantiomers の作用機序を解明することを目的として、連続投与したマウス脾内の酵素活性の動態を経時的に調べた。(-)DSG 群は DPP-IV と GlcNAc-ase 活性が有意に抑制された。一方、(+) DSG 群では GlcNAc-ase 活性のみが有意に抑制された。既に報告した結果を併せ考えると、上記 2 酵素は T リンパ球の機能と密接な関係を有することを示唆した。

表 1 List of the Enzymes Measured and their Substrates

Enzyme	Abbreviation	Substrate	Reference for assay method
Aspartate aminopeptidase (EC 3.4.11.7)	AP-A	Glu-NA	10
Arginine aminopeptidase (EC 3.4.11.6)	AP-B	Arg-NA	10
Proline iminopeptidase (EC 3.4.11.5)	Pro-IP	Pro-NA	10
Leucine aminopeptidase (EC 3.4.11.1)	Leu-AP	Leu-NA	10
Formylmethionine aminopeptidase	fMet-AP	fMet-NA	10
Dipeptidylpeptidase II (EC 3.4.14.2)	DPP-II	Lys-Ala-NA	11
Prolyl endopeptidase (EC 3.4.21.26)	Post-Pro-Enz	Z-Gly-Pro-NA	12
Serine proteinase (EC 3.4.21)	Trypsin-like	BAEE	11
Serine proteinase (EC 3.4.21)	Chymotrypsin-like	ATEE	11
Serine Proteinase (EC 3.4.21)	Elastase-like	Ac(Ala) ₃ ·ME	11
α -D-Glucosidase (EC 3.2.1.20)	Glucosidase	NP-Glc	11, 13
α -D-Mannosidase (EC 3.2.1.24)	Mannosidase	NP-Man	11, 13
β -N-Acetyl-D-glucosaminidase (EC 3.2.1.30)	GlcNAc-ase	NP-GlcNAc	11, 13
Arylesterase (EC 3.1.1.2)	Esterase	NPA	11

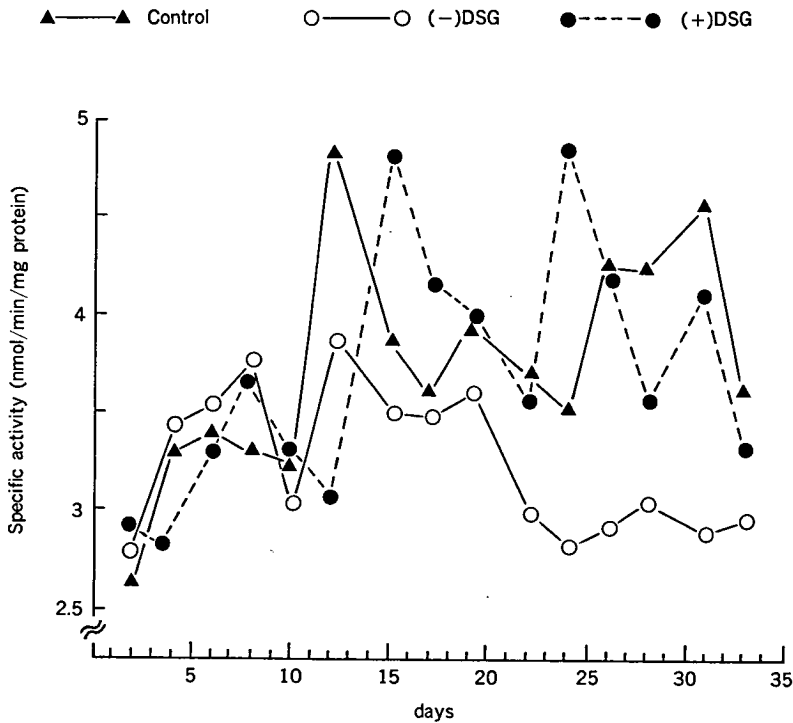


図 1 Effect of two enantiomers of DSG on the time course of DPP-IV activity in spleen

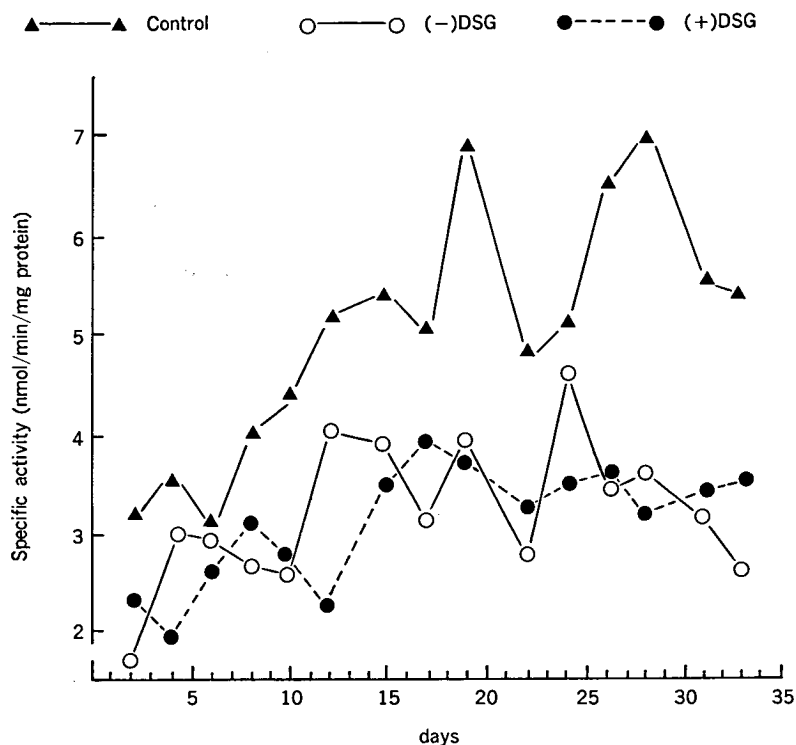


图 2 Effect of two enantiomers of DSG on the time course of GlcNAc-ase activity in spleen

表 2 Changes in splenic enzyme activities induced by the administration of two enantiomers of DSG

Enzyme	Specific activity (Mean±SD, n=15) (nmol/min/mg protein)		
	Control	(-)DSG	(+)DSG
AP-A	0.48± 0.09	0.50± 0.08	0.45± 0.90
AP-B	7.56± 1.18	8.43± 1.24	8.85± 1.42*
Pro-IP	0.80± 0.38	0.66± 0.22	0.81± 0.32
Leu-AP	7.11± 0.73	7.52± 0.67	7.89± 1.10*
fMet-AP	11.68± 1.32	11.47± 1.49	11.60± 1.10
DPP-IV	3.75± 0.56	3.24± 0.38**	3.72± 0.64
Post-Pro-Enz	2.78± 1.34	2.52± 1.24	2.38± 1.13
Trypsin-like	39.15± 4.69	37.56± 6.39	38.60± 6.00
Chy-try-like	52.88±45.77	48.76±52.77	60.58±91.19
Elastase-like	39.28± 8.98	35.15±13.73	36.67±12.10
Glucosidase	1.25± 0.28	1.20± 0.24	1.27± 0.29
Mannosidase	0.45± 0.11	0.41± 0.13	0.39± 0.12
GlcNAc-ase	5.00± 1.27	3.22± 0.76***	3.10± 0.59***
Esterase	39.47± 5.82	42.03± 3.46	40.39± 3.80

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$

文 献

- 1) Takeuchi, T., Iinuma, H., Kunimoto, S., Masuda, T., Ishizuka, M., Takeuchi, M., Hamada, M., Naganawa, H., Kondo, S. and Umezawa, H. : *J. Antibiotics* **34**, 1619-1621 (1981).
- 2) Umezawa, H., Kondo, S., Iimura, H., Kunimoto, S., Ikeda, Y., Iwasawa, H., Ikeda, D. and Takeuchi, T. : *J. Antibiotics* **34**, 1622-1624 (1981).
- 3) Iwasawa, H., Kondo, S., Ikeda, D., Takeuchi, T. and Umezawa, H. : *J. Antibiotics* **35**, 1665-1669 (1982).
- 4) Umeda, Y., Moriguchi, M., Kuroda, H., Nakamura, T., Iinuma, H., Takeuchi, T. and Umezawa, H. : *J. Antibiotics* **38**, 886-898 (1985).
- 5) 厚生省新薬開発研究費「青柳班」：自己免疫疾患治療薬の開発研究。—微生物二次代謝産物を中心として—昭和60年度研究報告書(1986)。
- 6) 厚生省新薬開発研究費「青柳班」：自己免疫疾患治療薬の開発研究。—微生物二次代謝産物を中心として—昭和61年度研究報告書(1987)。
- 7) 厚生省新薬開発研究費「青柳班」：自己免疫疾患治療薬の開発研究。—微生物二次代謝産物を中心として—昭和62年度研究報告書(1988)。
- 8) 厚生省新薬開発研究費「青柳班」：自己免疫疾患治療薬の開発研究。—微生物二次代謝産物を中心として—昭和63年度研究報告書(1989)。
- 9) Umeda, Y., Moriguchi, M., Ikai, K., Kuroda, K., Nakamura, T., Fujii, A., Takeuchi, T. and Umezawa, H. : *J. Antibiotics* **40**, 1361-1324 (1987).
- 10) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, H. : *J. Clin. Invest.*, **67**, 51-59 (1981).
- 11) McDonald, J.K., Leibach, F.H., Grindeland, R. E. and Ellis, S. : *J. Biol. Chem.*, **243**, 4143-4150 (1968).
- 12) Yoshimoto, T., Fischl, M., Orłowski, R.C. and Walter, R. : *J. Biol. Chem.*, **253**, 3708-3716 (1978).
- 13) Aoyagi, T., Nagai, M., Iwabuchi, M., Liaw, W. S., Andoh, T. and Umezawa, H. : *Cancer Res.*, **38**, 3505-3508 (1978).
- 14) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 15) Schoen, E., Demuth, H.U., Barth, A. and Ansorge, S. : *Biochem. J.*, **223**, 255-258 (1984).
- 16) Ansorge, S. and Schoen, E. : *Advances in the biosciences* Vol. 65, pp. 3-10 (1987), Pergamon Press.
- 17) Flad, H.D., Gruber, M., Scholz, W., Feller, A.C., Ulmer, A.J. and Heymann, E. : *Advances in the biosciences* Vol. 65, pp. 19-25 (1987), Pergamon Press.
- 18) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Yoshida, S., Sasagawa, S., Tamura, M. and Umezawa, H. : *Biochem. Int.*, **18**, 383-389 (1989).

膠原病の基礎的解明とその治療への応用(V)

—エリテマトーデスマデルマウス(BXSB雄マウス, MRL/*lpr* マウス)
のペプチダーゼに及ぼす 15-デオキシスパーガリンの効果と
膠原病患者体液のプテリジン類の変化—

永津俊治*

研究協力者 萩原昌子*, 藤原道夫**

膠原病は、全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus, SLE), 進行性全身性硬化症(progressive systemic sclerosis, PSS), 結節性多発性動脈炎(polyarteritis nodosa, PN), 皮膚筋炎(dermatomyositis), リウマチ熱(rheumatic fever, RF), 慢性関節リウマチ(rheumatic arthritis, RA)などの96疾患の総称名で、全身性、非感染性、非悪性腫瘍性、自己永続性の炎症疾患であり、多臓器障害性で間欠的に再発と緩解を示す、などの共通した特徴をもっている。汎発性結合組織疾患ともよばれて、全身系統的に結合組織のフィブリノイド変化がみられる。膠原病は自己成分に対する抗体が高率に証明されるので自己免疫疾患と考えられており、免疫複合体やある種の抗体が疾患の進行に関連している。膠原病ではT細胞の機能に欠陥がおこり、自己抗体を産生するB細胞の分裂・成熟のコントロールが破綻して自己抗体が不必要に産生されて発症すると推定されている。

著者らは昭和60~62年度の3年間の研究で、血液(血清, 血漿), 組織の自己免疫疾患に特有な生化学的マーカーを、膠原病のSLEとRAの患者の血清, 膠原病モデル動物のエリテマトーデスマウス(NZBマウス)の血液と組織について検索し

た。生化学的マーカーとしてペプチダーゼ類とプテリジン類を検索した結果、膠原病モデル動物とSLEおよびRA患者で特異的な変化のあることを発見した。

ペプチダーゼ類では次の知見を得た。(1)コラーゲン由来のペプチドの水解に働くと推定される、いわゆるコラゲナーゼ様ペプチダーゼ(collagenase-like peptidase, CL-ペプチダーゼ)と、CL-ペプチダーゼの次の段階に働く、ペプチドのアミノ末端のX-Proのジペプチドを水解遊離するジペプチジル(アミノ)ペプチダーゼIV [dipeptidyl (amino) peptidase, DAP-IV] が膠原病のSLEとRAの患者の血清で著明に低下していた¹⁻³⁾。(2)自己免疫疾患モデル動物のエリテマトーデスマウスのNZBマウスでも血漿中のCL-ペプチダーゼとDAP-IVが低下していた。(3)NZBマウスで、DAP-IVと類似のペプチダーゼで、アミノ末端のLys-Alaに比較的特異的なDAP-IIと、Proの後でペプチドを水解するプロリルエンドペプチダーゼのいわゆる post-proline cleaving enzyme(PPCE)の活性とが、NZBマウスの脾臓で成長発病と共に増加していた。DAP-IVが減少しているため、その結果DAP-II/DAP-IVの比が増加していた。(4)ヒトのSLEやRAでも血清のDAP-IIが増加しており、DAP-IVが減少しているため、DAP-II/DAP-IVの比はSLEやRAで著明に増加してい

*名古屋大学医学部生化学第一講座

**新潟大学医学部医動物免疫講座

た⁴⁾。(5) NZB マウスの DAP-II, DAP-IV, PPCE, CL-ペプチダーゼの4種のペプチダーゼの成長発病に伴う変化を、血漿、脾臓の他に腎臓、肝臓、脳で検索すると、DAP-IIの増加とPPCEの増加が認められた。PPCEの増加は、1986年 青柳ら⁵⁾が最初に報告したが、これを支持した。

プテリジン類は自己免疫疾患のマーカーとして最近急速に関心が高まっているが、本研究では、NZB マウスでネオプテリンとピオプテリンの変化を初めて検索報告した。高等生物のプテリジンは2-アミノ-4ヒドロキシプテリジンの構造を一般にとっておりプテリンとよばれる。生化学的に機能の明らかなプテリンはテトラヒドロピオプテリン [(6R)-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin]であり、プテリン要求モノオキシゲナーゼであるフェニルアラニン水酸化酵素、チロシン水酸化酵素、トリプトファン水酸化酵素の補酵素として、神経伝達物質のカテコールアミン(ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン)とインドールアミン(セロトニン)の生合成に働いている⁶⁾。免疫系とのかかわりで注目されているプテリンはテトラヒドロピオプテリン生合成の中間体であるネオプテリンである。テトラヒドロピオプテリンは次の推定経路で生合成される。GTP^①D-erythro-7,8-ジヒドロネオプテリン三リン酸^②6-ピルボイルテトラヒドロプテリン^③6-ラクティルテトラヒドロプテリン^④テトラヒドロピオプテリン。この生合成中間体のD-erythro-7,8-ジヒドロネオプテリン三リン酸より脱リン酸、酸化されてネオプテリンが生成される。ヒトとサルでは、テトラヒドロピオプテリンの酸化物のL-erythro-ピオプテリンと共に、かなりの量のD-erythro-ネオプテリンが組織、血液、尿に存在する。しかしラットなどの小動物ではネオプテリンの量はピオプテリンと比べて極めて小さい⁷⁾。T細胞はGTPからテトラヒドロピオプテリンを合成できるが、マクロファージは③、④の酵素がないのでジヒドロネ

オプテリン三リン酸よりネオプテリンを生成すると推定されている。マクロファージがT細胞に抗原を提示してT細胞が活性化されるとインターフェロン- γ を介してマクロファージを活性化する。マクロファージのGTPシクロヒドロラーゼ(①の酵素)が活性化されてGTPよりジヒドロネオプテリン三リン酸が大量に生成し、脱リン酸ついで酸化されてネオプテリンとなりマクロファージから分泌されると推定される。著者らは昭和62年度の研究で、自己免疫疾患モデル動物のエリテマトーデスマウスのNZBマウスを対照のBALB/cマウスと比べたところ、組織のピオプテリンと比べてネオプテリンは極めて少いが、ネオプテリンとネオプテリン/ピオプテリン比が発症と共に増加することを報告した。

本年平成元年度の研究でさらに次の課題を検討した。(1)著者らはエリテマトーデスマウス(BXSB雄マウス, MRL/*lpr* 雄マウス)のDAP-II/DAP-IV比が発症と共に上昇することを発見したが、他方、藤原道夫ら⁸⁾は微生物二次代謝産物の免疫抑制物質15-デオキシスパーガリン(DSP)がエリテマトーデスマウスの発症を抑制することを発見したので、藤原と共同して、エリテマトーデスマウスの発症をデオキシスパーガリンで抑制してペプチダーゼ類の変化を検索した。(2)NZBエリテマトーデスマウスで発見したネオプテリン/ピオプテリン比の増加が、SLEやRAの患者の血清や関節液でも認められるかを検索した。

研究 方法

エリテマトーデスマウスのMRL/*lpr*マウスとBXSB雄マウスはすべてJackson Laboratory(Bar Harbor, ME)に由来するもので、新潟大学医学部動物実験施設、藤原研究室で繁殖維持された動物である。ループス腎炎を13週齢で発症し始め、20週齢で症状が進行した⁹⁾。DSPを生

理的食塩水に溶かし 5 mg/kg をマウスの腹腔内に、13 週～14 週(2 週間)注射, 2 週間休み, 17～18 週(2 週間)注射, 1 週間休み, 20 週齢で屠殺した。脾臓、腎臓、肝臓を採取し凍結して -80°C に測定まで保存した。組織を 0.25 M ショ糖溶液でホモジネートとし、 $3,000\times g$ 20 分間遠沈して上清を酵素材料とした。

酵素活性測定のためのペプチド基質はペプチド研究所より購入した。DAP-II には Lys-Ala-4-メチルクマリンアミド⁹⁾, DAP-IV には 7-Gly-Pro-4-メチルクマリンアミド¹⁰⁾, PPCE にはスクシニル(SU)-Gly-Pro-4-メチルクマリンアミド¹¹⁾, CL-ペプチダーゼには SU-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-4-メチルクマリンアミド¹²⁾を基質に用いた。酵素活性測定のための緩衝液は、DAP-II には 0.2 M ホウ酸ナトリウム+0.05 M クエン酸を 0.1 M リン酸ナトリウムで pH 5.3 に調製した広域緩衝液, DAP-IV は 0.15 M グリシン-NaOH 緩衝液(pH 8.7), PPCE には 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.8) (1 mM EDTA を含む), CL-ペプチダーゼは 0.2 M トリスマレイン酸緩衝液(pH 8.0) (20 mM CaCl_2 を含む)をそれぞれ用いた。

酵素活性の測定はすべて基質よりペプチダーゼ反応により遊離する 7-アミノ-4-メチルクマリンの蛍光を、励起波長 380 nm, 蛍光波長 460 nm で測定した。

DAP-II の活性は 7-Lys-Ala-4-メチルクマリンアミドを基質として、アミノペプチダーゼの阻害剤 1 mM オルトフェナントロリンの存在下, Lys-Ala と共に生成する 7-アミノ-4-メチルクマリンを高速液体クロマトグラフィーで分離して蛍光検出をした⁹⁾。DAP-IV の活性は 7-Gly-Pro-4-メチルクマリンアミドを基質として、Gly-Pro と共に生成する 7-アミノ-4-メチルクマリンの蛍光を測定した¹⁰⁾。PPCE の活性は SU-Gly-Pro-4-メチルクマリン-7-アミドを基質として生成する 7-アミノ-4-メチルクマリンを蛍光測定した¹¹⁾。CL-ペプチ

ダーゼの活性は、SU-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-4-メチルクマリン-7-アミドを基質として、CL-ペプチダーゼによりまず SU-Gly-Pro-Leu と Gly-Pro-4-メチルクマリン-7-アミドを生成させ、ついで反応系に添加してあるヒト顎下腺より精製した DAP-IV の作用により、Gly-Pro と 7-アミノ-4-メチルクマリンに分解して後者の蛍光を測定した¹²⁾。

血清、関節液のペテリジン類(ビオプテリン、ネオプテリン)の濃度は高速液体クロマトグラフィー/蛍光法¹³⁾により測定した。血清は健康対照者 21 例と RA 患者 21 例と SLE 患者 23 例より、関節液は骨関節症(osteoarthritis, OA)患者 21 例, RA 患者 21 例より、それぞれ得られた。症例の年齢は、健康対照者(血清)55.8 歳(36-78 歳), OA(関節液)65.5 歳(43-84 歳), RA 56.1 歳(血清と関節液)(28-75 歳), SLE(血清)48.5 歳(38-65 歳)であった。血清、関節液はトリクロル酢酸存在下に酸性条件下でヨウ素酸化して酸化型で強い蛍光を発するビオプテリンとネオプテリンにしてから、Dowex-50- H^+ カラムで部分精製し、 NH_4OH で溶出して凍結乾燥後、高速液体クロマトグラフィーで分離し、蛍光検出器で励起波長 350 nm, 蛍光波長 450 nm でビオプテリンとネオプテリンのピークを検出定量した。

研究結果

(1) エリテマトーデスマデルマウス(BXSB 雄マウス, MRL/*lpr* マウス)のペプチダーゼに及ぼす 15-デオキシスパーガリン(DSP)の効果

藤原ら^{8,14)}は、エリテマトーデスマデルマウスとして BXSB 雄マウスと MRL/*lpr* マウスを用いて、DSP がこれらマウスにみられる免疫異常とループス腎炎の発症を、発症前に投与することにより予防できるのみならず、発症してからも抑制する治療効果があることを発見している。今年度の研究では、藤原らと共同して、エリテマトーデスを発症した 20 週齢の BXSB 雄マウスと

表 1 Effect of 15-Deoxyspargualin (DSP) on Peptidase Activities from BXSB Mice with Lupus Erythematosus-like Syndrome

Species	DSP (5 mg/kg)	DAP II (nmol/min/mg protein)	DAP IV (nmol/min/mg protein)	DAP II/ DAP IV	PPCE (nmol/min/mg protein)	CL-P (nmol/min/mg protein)
Spleen						
Female BXSB (control)	untreated	2.02±0.16	4.84±0.21	0.41±0.02	2.01±0.24	2.84±0.25
Male BXSB (control)	untreated	2.57±0.17	2.79±0.09	0.92±0.10	1.72±0.11	2.08±0.12
(experiment)	treated	1.62±0.08**	2.60±0.12*	0.61±0.04**	2.26±0.09**	2.80±0.24**
Female BALB/c (control)	untreated	1.39±0.12	2.72±0.15	0.15±0.02	2.76±0.15	0.92±0.03
Kidney						
Female BXSB (control)	untreated	2.03±0.14	4.49±0.26	0.46±0.04	1.54±0.11	1.04±0.13
Male BXSB (control)	untreated	2.41±0.14	3.90±0.52	0.62±0.06	1.60±0.09	0.98±0.08
(experiment)	treated	2.27±0.08	3.78±0.45	0.60±0.06	1.71±0.15	0.97±0.07
Female BALB/c (control)	untreated	2.64±0.26	2.37±0.18	1.11±0.08	2.00±0.19	1.07±0.03
Liver						
Female BXSB (control)	untreated	1.93±0.15	2.57±0.30	0.82±0.06	3.22±0.35	1.30±0.13
Male BXSB (control)	untreated	3.38±0.35	3.00±0.53	1.16±0.11	2.51±0.57	1.55±0.29
(experiment)	treated	2.91±0.58	3.11±0.76	0.95±0.16	2.76±0.52	1.66±0.46
Female BALB/c (control)	untreated	2.78±0.30	2.94±0.10	0.94±0.07	3.11±0.12	1.40±0.10

mean±SD (n=5). Significantly different from controls (Male BXSB). **p*<0.05, ***p*<0.001.

表 2 Effect of 15-Deoxyspargualin (DSP) on Peptidase Activities from MRL/*lpr* Mice with Lupus Erythematosus-like Syndrome

Species	DSP (5 mg/kg)	DAP II (nmol/min/mg protein)	DAP IV (nmol/min/mg protein)	DAP II/ DAP IV	PPCE (nmol/min/mg protein)	CL-P (nmol/min/mg protein)
Spleen						
Male MRL/++ (control)	untreated	2.08±0.19	4.40±0.19	0.47±0.03	1.50±0.08	2.69±0.25
Male MRL/ <i>lpr</i> (control)	untreated	2.58±0.14	3.97±0.16	0.64±0.05	2.21±0.12	3.21±0.27
(experiment)	treated	1.31±0.14***	4.86±0.11***	0.42±0.03***	1.27±0.21***	2.27±0.23***
Female BALB/c (control)	untreated	1.39±0.12	2.72±0.15	0.51±0.02	2.76±0.15	0.92±0.03
Kidney						
Female MRL/++	untreated	3.99±0.44	6.41±0.39	0.61±0.04	1.40±0.15	2.94±0.37
Male MRL/ <i>lpr</i> (control)	untreated	4.56±0.22	5.44±0.70	0.84±0.05	1.40±0.02	3.30±0.18
(experiment)	treated	4.00±0.30*	4.65±0.51*	0.86±0.03	1.42±0.02	3.47±0.16
Female BALB/c (control)	untreated	2.64±0.26	2.37±0.18	1.11±0.08	2.00±0.19	1.07±0.03
Liver						
Male MRL/++ (control)	untreated	2.26±0.27	4.21±0.29	0.53±0.06	1.99±0.32	3.21±0.31
Male MRL/ <i>lpr</i> (control)	untreated	2.75±0.53	4.03±0.21	0.68±0.12	2.60±0.16	3.54±0.54
(experiment)	treated	1.58±0.41**	4.08±0.99	0.39±0.12**	2.68±0.77	3.71±1.07
Female BALB/c (control)	untreated	2.78±0.30	2.94±0.10	0.94±0.07	3.11±0.12	1.40±0.10

mean±SD (n=5). Significantly different from controls (Male MRL/*lpr*). **p*<0.02, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

MRL/*lpr* マウスを対照(control)として, DSP の 13 週齢よりの投与により発症の著明な抑制が免疫学, 病理組織化学で証明された 20 週齢のマウス

を実験群(experiment)として, 脾臓, 腎臓, 肝臓のペプチダーゼ類の変化を検索した. エリテマトーデスマウスの対照として, BXSB 雄マウスに

表 3 Neopterin and Biopterin Concentrations and their Ratios in Controls, and RA, OA, and SLE Patients

	n	Mean and SD concn, nmol/L		Neopterin/biopterin ratio
		Neopterin	Biopterin	
<i>Serum samples</i>				
Control	21	26.13 (9.72)	11.32 (3.00)	2.23 (0.54)
RA	21	21.63 (3.32)	10.02 (1.68)	2.32 (0.40)
SLE	23	43.08 (13.3) ^a	9.71 (3.47)	4.88 (2.68) ^a
<i>Synovial fluid specimens</i>				
OA	21	25.64 (9.99)	16.61 (7.47)	1.63 (0.81)
RA	21	74.96 (35.88) ^b	22.11 (7.57) ^c	3.62 (1.68) ^c

^a Significantly different from controls: $p < 0.001$. ^{b,c} Significantly different from OA: ^b $p < 0.001$ and ^c $p < 0.02$.

は BXSB 雌 マウス, MRL/*lpr* マウス には MRL/++マウスを用いた。また正常対照マウスとして BALB/c 雌マウスを用いた。

表 1 に BXSB 雄マウスのエリテマトーデス発症に伴うペプチダーゼの変化に及ぼす DSP による発症抑制の影響を示す。

BXSB 雄マウスのペプチダーゼ類のエリテマトーデス発症に伴う変化で著明なものは, DAP-II/DAP-IV比の増加と DAP-IIの増加であった。この変化は脾臓で最も著明であった。この結果は, 前報の NZB マウス⁴⁾, BXSB 雄マウス^{15,16)}の成績と一致した。DSP で発症を抑制した BXSB 雄マウスの脾臓の DAP-II/DAP-IV比の増加と DAP-IIの増加は認められず, 発症しない対照の BXSB 雌マウスと等しい値となった。

表 2 に MRL/*lpr* マウスのエリテマトーデス発症に伴うペプチダーゼの変化に及ぼす DSP による発症抑制の影響を示す。

MRL/*lpr* マウスのペプチダーゼ類のエリテマトーデス発症に伴う変化で著明なものは, BXSB 雄マウスと等しく, DAP-II/DAP-IV比の増加と DAP-IIの増加であった。PPCE 活性は脾臓で有意に増加して, 青柳ら⁵⁾の前報を支持した。これらの MRL/*lpr* マウスでのペプチダーゼ類の変化は, 前報の NZB マウス⁴⁾, MRL/*lpr* マウス^{15,16)}の成績と一致した。DSP で発症を抑制した MRL/*lpr* マウスの脾臓での DAP-II/DAP-IV比の増

加, DAP-IIの増加, PPCE の増加はいずれも認められず, 発症しない対照の MRL/++マウスと等しい値となった。

(2) 膠原病患者体液(血清, 関節液)のプテリジン類(ネオプテリン, ビオプテリン)の変化¹⁷⁾

表 3 に, 対照正常者, RA 患者, SLE 患者の血清のネオプテリン, ビオプテリン, ネオプテリン/ビオプテリン比, および OA 患者と RA 患者の関節液のネオプテリン, ビオプテリン, ネオプテリン/ビオプテリン比を示す。血清では RA 患者では正常対照者と比べて有意な変化はないが, SLE 患者ではネオプテリンが著明に増加しており, ネオプテリン/ビオプテリン比も有意に増加した。関節液で炎症性の自己免疫疾患である RA 患者を, 非炎症性の非自己免疫疾患である OA 患者と比較すると, ネオプテリンが約 3 倍に高度に増加しており, ビオプテリンも軽度であるが有意に増加し, 従ってネオプテリン/ビオプテリン比も著明に増加した。

考 察

(1) 自己免疫疾患モデル動物と患者におけるペプチダーゼ類の変化と, 自己免疫疾患治療薬 15-デオキシスパーガリンのペプチダーゼに及ぼす影響

昭和 60 年度より本年平成元年度の研究で, 自己免疫疾患モデル動物の NZB マウス, BXSB 雄マ

ウス, MRL/*lpr* マウスの血漿, 脾臓, 腎臓, 肝臓のペプチダーゼ類の発病前(6週齢), 発症初期(13週), 症状進行期(20週齢)における変化を検索してきた。その結果, 自己免疫疾患モデル動物のペプチダーゼ類の発症に伴う特異的な変化は, ①血漿と脾臓における DAP-II の増加と DAP-IV の減少, 従って DAP-II/DAP-IV 比の増加, ②脾臓の PPCE の増加であった。②の PPCE の増加は青柳ら⁹⁾の前報と一致した。①の DAP-II の増加, DAP-IV の減少, DAP-II/DAP-IV 比の増加は, RA と SLE の患者の血清, ことに SLE 患者の血清で明瞭に認められた。本年度の研究で, 藤原らと共同して, BXS B 雄マウスと MRL/*lpr* マウスに DSP を発病症期(13週)より投与して発病を抑制すると, DAP-II, DAP-II/DAP-IV 比の発症に伴う変化は抑制されて, 対照無症状の BXS B 雌マウスと MRL/++マウスと等しい値となった。MRL/*lpr* マウスの脾臓の PPCE の活性の増加も抑制されて対照 MRL/++マウスと等しい値となった。

これらの成績は, 自己免疫モデル動物に共通に認められる特徴的なペプチダーゼ類の変化は脾臓と血液(血漿, 血清)の DAP-II の増加, DAP-IV の減少, DAP-II/DAP-IV 比の増加, 脾臓の PPCE の増加であり, これらの変化は DSP で発症を抑制すると正常化することを示している。DAP-II の増加と DAP-II/DAP-IV 比の増加は RA と SLE の患者血清でも認められるので, DSP のような自己免疫疾患治療薬で治療すればこの血清ペプチダーゼの変化も正常化することが期待される。DAP-IV は中性セリンペプチダーゼでリンパ球の T 細胞に局在することがわかっている。DAP-II はリソソーム酵素であり組織の免疫系における役割は未だ明らかでない。DAP-II も DAP-IV も血液(血漿・血清)に存在し, 脾臓の酵素と平行して変化するが, 由来組織は未定である。本年度の研究で, 自己免疫疾患治療薬 DSP が DSP-II の増加と DSP-II/DSP-IV 比の増加が正常化される知見は,

この変化が自己免疫疾患の原因と密接に関係した変化であり, 自己免疫疾患の重要な生化学的指標であることを示している。DAP-II の増加と DAP-II/DAP-IV 比の増加が自己免疫疾患の原因か結果かが問題となるが, DAP-II の酵素阻害剤を微生物の二次代謝産物中に探索して, 自己免疫疾患モデル動物で新しい免疫疾患治療薬を開発する研究を進めている。

(2) 自己免疫疾患患者の体液(血清と関節液)におけるプテリジン類の変化

昭和 62 年度の研究で, 自己免疫疾患モデル NZB マウスの組織のプテリジン類の発症に伴う変化を検索した。哺乳動物組織のプテリジン類は大部分テトラヒドロ型のピオプテリンであり, その生合成中間体由来のネオプテリンはヒトとサル以外の小動物ではほとんど検出されない。NZB マウスの対照の BALB/c マウスでも組織のプテリジンはほとんどピオプテリンであったが極めて少量のネオプテリンも検出され, NZB マウスのすべての組織でネオプテリンとネオプテリン/ピオプテリン比が高値を示すことを報告した。本年平成元年度の研究で, RA と SLA 患者の血清と関節液のプテリジンを検索した。ヒトではネオプテリンがピオプテリンと等しく主要な組織プテリジンである。血清では SLE 患者で著明にネオプテリンとネオプテリン/ピオプテリン比が増加していた。関節液は RA 患者のみで認められるが, 非自己免疫疾患の OA 患者と比べるとネオプテリン, ネオプテリン/ピオプテリン比が著明に増加していた。この成績はネオプテリン/ピオプテリン比が自己免疫疾患の生化学的マーカーであることを示す。ネオプテリンは, マクロファージが T 細胞に抗原を提示すると T 細胞が活性化されて, インターフェロン- γ が放出され, インターフェロン- γ 受容体を介してマクロファージで GTP よりシクロヒドロラーゼが活性化されて生合成される 7,8-ジヒドロネオプテリン三リン酸に由来する。本研

究で、RA患者で血清のネオプテリンは変化しないのに関節液のネオプテリンは著明に増加していることは、関節液のネオプテリンが血清よりはるかに高くなることと考えて、関節内でマクロファージより生成されることを示唆している。つまり局所でのT細胞の活性化を示している。従ってネオプテリン/ピオプテリン比は、DAP-II/DAP-IV比と共に、微生物の生産する二次代謝産物中に自己免疫疾患の治療薬を開発するスクリーニングに有用と考えられる。

文 献

- 1) Iwase-Okada, K., Kojima, K., Kato, T., Kaku, H., Okazaki, T., Wago, K., Sakakibara, S. and Nagatsu, T. : Collagenase-like peptidase activity in serum from patients with rheumatoid arthritis. *Experientia*, **41**, 487-488 (1985).
- 2) Iwase-Okada, K., Nagatsu, T., Fujita, K., Torikai, K., Hashimoto, T., Shibata, T., Maeno, Y. and Sakakibara, S. : Serum collagenase-like peptidase activity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clinica Chimica Acta*, **146**, 75-79 (1985).
- 3) Fujita, K., Hirano, M., Ochiai, J., Funabashi, M., Nagatsu, I., Nagatsu, T. and Sakakibara, S. : Serum glycyloproline *p*-nitroanilidase activity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clinica Chimica Acta*, **88**, 15-20 (1978).
- 4) Hagihara, M., Ohhashi, M. and Nagatsu, T. : Activities of dipeptidyl peptidase II and dipeptidyl peptidase IV in mice with lupus erythematosus-like syndrome and in patients with lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Clinical Chemistry*, **33**, 1463-1465 (1987).
- 5) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Okubo, M., Masaki, Y. and Umezawa, H. : Abnormality of the post-proline-cleaving enzyme activity in mice with systemic lupus erythematosus-like syndrome. *Journal of Applied Biochemistry*, **7**, 273-281 (1985).
- 6) Nagatsu, T. : Biopterin cofactor and monoamine-synthesizing monooxygenases. *Neurochemistry International*, **5**, 1-27 (1982).
- 7) Hasler, Th. and Niederwieser, A. : Tetrahydrobiopterin-producing enzyme activities in liver of animals and man. In : Cooper, B.A., Whitehead, V.M. (Eds.) : Chemistry and Biology of Pteridines 1986, Walter de Gruyter, Berlin, 1986, pp. 319-322.
- 8) Makino, M., Fujiwara, M., Aoyagi, T. and Umezawa, H. : Immunosuppressive activities of deoxyspergualin. I. Effect of the long term administration of the drug on the development of murine lupus. *immunopharmacology*, **14**, 107 (1987).
- 9) Nagatsu, T., Sakai, T., Kojima, K., Arai, E., Sakakibara, S., Fukasawa, K. and Harada, M. : A sensitive and specific assay for dipeptidyl-aminopeptidase II in serum and tissues by liquid chromatography-fluorometry. *Analytical Biochemistry*, **147**, 80-85 (1985).
- 10) Kato, T., Nagatsu, T., Kimura, T. and Sakakibara, S. : Fluorescence assay of X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase activities with a new fluorogenic substrate. *Biochemical Medicine*, **19**, 351-359 (1978).
- 11) Kato, T., Okada, M. and Nagatsu, T. : Distribution of post-proline clearing enzyme in human brain and peripheral tissues *Molecular and Cellular Biochemistry*, **32**, 117-121 (1980).
- 12) Kojima, K., Kinoshita, H., Kato, T., Nagatsu, T., Takada, K. and Sakakibara, S. : A new and highly sensitive fluorescence assay for collagenase-like peptidase activity. *Analytical Biochemistry*, **100**, 43-50 (1979).
- 13) Fukushima, T. and Nixon, J.C. : Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids. *Analytical Biochemistry*, **102**, 176-188 (1980).
- 14) 藤原道夫, 伊藤 聡, 渡辺久美 : エリテマトーデスモデルマウスを用いた微生物代謝二次産物の治療効果に関する研究. 青柳班, 昭和63年度報告書, p. 89-96 (1989).
- 15) 永津俊治, 萩原昌子, 藤原道夫 : 膠原病の基礎的解明とその治療への応用(IV) — エリテマトーデスモデルマウス(BXSB雄マウス, MRL/lprマウス)のペプチダーゼの変化 —
- 16) Hagihara, M., Fujiwara, M. and Nagatsu, T. : Activities of dipeptidyl peptidases in BXSB mice and MRL/lpr mice with lupus erythematosus-like syndrome. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, **42**, 224-231 (1989).
- 17) Hagihara, M., Nagatsu, T., Ohhashi, M. and Miura, T. : Concentrations of neopterin and biopterin in serum from patients with rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus and in synovial fluid from patients with rheumatoid and osteoarthritis. *Clinical Chemistry*, in press (1990).

イノシトールリン脂質代謝回転抑制物質の スクリーニングと免疫抑制作用

梅 澤 一 夫*

共同研究者 井本正哉*, 西岡 浩**, 水田実津子**, 沢 力**,

竹内富雄**, 石塚雅章***

がん遺伝子 ras, src, erb B, fms, fes など形質転換した細胞はそのイノシトールリン脂質代謝回転(PI turnover)が上昇している。PI turnover の活性化によりイノシトール3リン酸とジアシルグリセロールが生産され、それぞれは細胞内カルシウムイオンの移動とプロテインキナーゼCの活性化を引き起こし、細胞増殖が活性化される。一方、PI turnover は免疫系細胞の活性化機構に関与することが示唆されている^{1,2)}。そこでPI turnover 阻害物質には免疫抑制物質、自己免疫疾患治療物質としての可能性が期待される。私達は微生物二次代謝産物中から低分子PI turnover 阻害物質のスクリーニングを試み、昨年度までにイソフラボン構造の psi-tectorigenin³⁾, pendolmycin⁴⁾および2,3-dihydroxybenzoic acid⁵⁾を単離した。さらに psi-tectorigenin は *in situ* でリンパ球の conA, IL-2, MLR 等による活性化を抑制した。今年度はPI turnover 阻害物質のスクリーニングを続け、新規物質の inostamycin を単離した⁶⁾。そして, inostamycin, psi-tectorigenin, 2,3-dihydroxybenzoic acid のアルデヒド体の生物活性を調べ、特に inostamycin の免疫抑制に関して考察を行った。

方 法

イノスタマイシン・Na 塩の単離精製: *Streptomyces* sp. MH816-AF15 株を、2.0%ガラクトース、2.0%デキストリン、1.0%ソイペプトン、0.5%コーン・ステープ・リカー、0.2%硫酸及び0.2%炭酸カルシウムを含む培地(pH 7.4)中で30°C、5日間種母培養後、その培養液を2.0%グリセロール、2.0%デキストリン、1.0%ソイペプトン、0.3%酵母エキス、0.2%硫酸及び0.02%炭酸カルシウムを含む生産培地(pH 7.4)に3%植菌し、27°Cで6日間培養を行った。その培養液(5 l)は遠心分離後、菌体のアセトン抽出液を培養上清と混ぜ、3.5 lの酢酸エチルで抽出を行った。酢酸エチル抽出物(1.03 g)はシリカゲルカラムクロマトグラフィー(50 gシリカゲル)にかけ、inostamycin を含む画分をCHCl₃:MeOH=100:1で溶出した。得られた溶出液より acetonitrile 沈澱法及び遠心向流分配クロマトグラフィーにて精製後、hexane-dichloromethane による結晶化、更に1 N NaOH 処理、hexane-dichloromethane による再結晶を経て、最終的に inostamycin Na 塩の板状結晶(112.4 mg)を得た。

ホスファチジルイノシトール(PI)turnover : 3×10⁵ の A431 細胞を5%の calf serum を含むダルベッコ培養液で16時間培養し、その後、medium を除き、1 ml の Hepes buffered saline

*慶応義塾大学理工学部

**微生物化学研究所

***化学療法研究所

(20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.1% glycerol を含む) に ³H-inositol (1 μCi/ml, 14 Ci/mmol) を加え 37°C, 30 分培養した。次に, test chemical と 400 ng/ml の EGF を加え, さらに 37°C, 60 分培養をつづけた。次に, 0.01 M sodium pyrophosphate を含む 0.5 ml の 10% trichloroacetic acid (TCA) を加え, TCA 不溶画分を 1 ml の水と共にかきとった。lipid 画分はクロロホルム/メタノール (1:1) で抽出して, その放射能をカウントした。

イノシトールリン酸産生: ³H-inositol (1 μCi/ml) でプレラベルした A431 細胞を 30 mM LiCl を含む inositol-free DMEM 中で培養し, 所定の時間に chemical 及び EGF (400 ng/ml) を添加した。反応は 100 μl の 10% HClO₄ で停止後, HClO₄ 抽出液を 75 mM HEPES を含む 1.53 M KOH にて中和し, 遠心分離して, 上清を Amprep™ SAX カラム (Amersham) にチャージした。水洗により遊離の ³H-inositol を除去した後, 5 ml の 0.17 M KHCO₃ でイノシトールリン酸 (IP₁+IP₂+IP₃) を溶出させ, その溶出液の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

Concanavalin A blast 細胞の増殖: ナイロンウールカラム処理したラット脾細胞 (1×10⁶細胞/ml) を 0.2 ml ずつ 96 穴プレートに分注し 1% 牛胎児血清を含む RPMI 1640 中 concanavalin A 0.5 μg/ml で 4 時間処理した。次に concanavalin A を除き, medium を加えサンプルを添加し, 37°C, 72 時間培養後 ³H-チミジン取り込みを測定した。³H-チミジンは培養終了 18 時間前に添加した。

IL-2 添加 concanavalin A blast 細胞の増殖: 上記のナイロンウールカラム通過ラット脾細胞を 96 穴プレート中 concanavalin A (5 μg/ml) 処理し, 4 時間後 concanavalin A を除いた。5% 牛胎児血清を含む RPMI1640 培地中にサンプルと IL-2 を加え, 37°C で 3 日間培養した。培養終了 18

時間前に ³H-チミジンを添加し, 取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。

Mixed lymphocyte culture (MLC): WKY ラット脾細胞を 50 μg/ml の mitomycin C と共に 20 分間 37°C で incubate し, 不活性化して stimulator として用いた。それらの細胞 (2×10⁵/ml) とナイロンウールカラム処理した F344 ラットの脾細胞 (responder) 1:1 に混合し, 0.2 ml の medium 中で 5 日間培養して ³H-チミジンの 18 時間取り込みを測定した。

抗体産生反応: 一群 5 匹の 8 週齢雌 CDF₁ マウスに 10⁸ のヒツジ赤血球を Day 0 に静脈注射した。4 日後 (Day 4) に脾臓を取り出し, 脾細胞のサスペンションを調整し, ヒツジ赤血球, モルモットの補体存在下で, Jerne のブランクフォーミングアッセイを行った。inostamycin は Day 1 から Day 3 まで連日腹腔内投与した。

遅延型過敏反応: 遅延型過敏反応は Lagrange らに報告された方法で行った。一群 5 匹の 8 週齢雌, CDF₁ マウスを用い, Day 0 に尾静脈から 10⁸ のヒツジ赤血球を注射した。Day 4 に右 hind footpad に 10⁸ のヒツジ赤血球を皮下に注射し, 24 時間後右 footpad の厚さを測定した。inostamycin は Day 1 から Day 3 まで連日腹腔内投与した。

結 果

1. inostamycin の単離と生物活性

放線菌 *Streptomyces* sp. MH816-AF15 株の培養上清に強いイノシトールリン脂質代謝回転阻害活性がみられ, 活性本体の単離, 精製を行った。¹H および ¹³C-nmr スペクトルにより平面構造を決定し, さらにナトリウム塩の結晶解析を行って相対構造を決定した。検索の結果, 新規構造物質であり inostamycin と命名した。Fig. 1 に示すように inostamycin の構造は既知のポリエーテル化合物 lysocellin の構造と類似する。ただし,

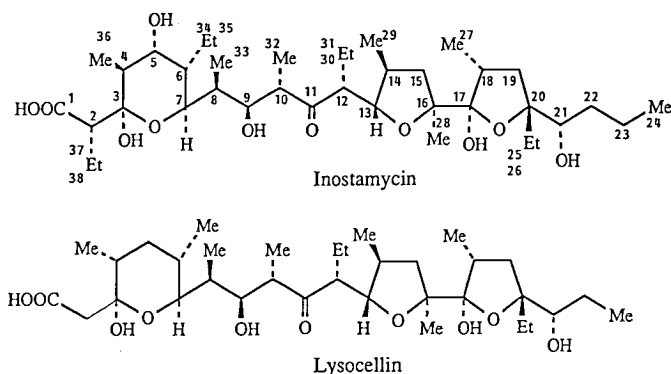


Fig. 1 Relative structure of inostamycin

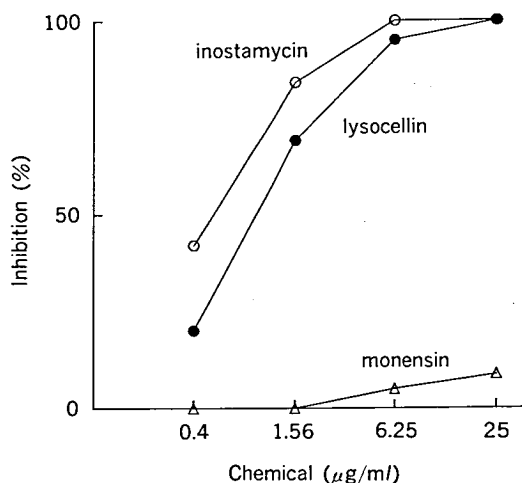


Fig. 2 Inhibition of PI turnover by inostamycin

lysocellin とは炭素番号 36 のメチル基の立体配置が逆になっているなどの点で異なっている。inostamycin は Fig. 2 に示すように IC₅₀ 0.5 μg/ml で EGF に誘導される A431 細胞のイノシトールリン脂質代謝回転を阻害し, lysocellin より活性が強かった。より構造の異なるポリエーテルの monensin には阻害活性はみられなかった。A431 細胞をラベルした正リン酸と共にプレインキュベートした後, 400 ng/ml の EGF を 1 時間添加して PI およびホスファチジル酸 (PA) をクロロホルムで抽出し, 薄層クロマトグラフィーで分析したところ, inostamycin は 1.6 および 6.4 μg/ml で PI および PA の生成を阻害した。(data

not shown) 又, Table 1 に示すように 5 μg/ml の inostamycin は A431 細胞のイノシトールリン酸の生成を阻害した。この時, Exp. 1 のように inostamycin を EGF と同時に添加すると阻害効果を示さなかったが, Exp. 2 のように ³H-inositol と同時に添加すると阻害効果を示した。

Table 2 に示すように inostamycin はエールリッヒがんに対して腫瘍の増殖を有意に抑制した。一方, マウス L1210 白血病に対しては 6-200 μg/mouse, day 1-9 連日腹腔内投与で全く阻害効果を示さなかった (data not shown)。

Table 3-7 に inostamycin の *in situ, in vivo* 免疫系における効果を示す。Table 3 に示すように inostamycin は 0.1~100 μg/ml で concanavalin A blast 細胞のチミジン取り込みを強く阻害した。0.39 μg/ml 以上の濃度では, 検鏡下で細胞の死滅を認めたが, 0.1 μg/ml では認められなかった。Table 4 に示すように inostamycin は 0.39~6.25 μg/ml の濃度範囲で IL-2 存在下の concanavalin A blast 細胞のチミジン取り込みを強く抑制したが, 検鏡の結果, 0.39 μg/ml 以上では細胞の死滅を認めた。Table 5 に示すように同様に MLC によるチミジン取り込みも 0.39 μg/ml 以上で強く阻害したが, 同じ濃度で毒性も認められた。*in vivo* においては Table 6 に示すように inostamycin は抗体産生に対する抑制作用を示さ

Table 1 Effect of inostamycin on inositol phosphates formation

Treatment	³ H-inositol phosphates [dpm]	
	Exp. 1	Exp. 2
None	234.79±91.87	126.89±15.4
+EGF	478.04±198.96	252.75±33.7
+EGF+Inostamycin (5 μg/ml)	484.44±86.74	168.15±41.2*

**p*<0.05

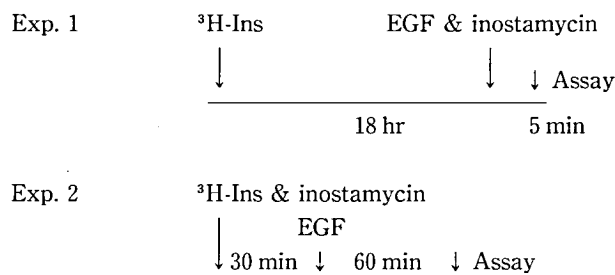


Table 2 Antitumour activity of inostamycin on Ehrlich solid tumour

	Dose (μg/mouse)	Solid weight (mg±SD)	Inhibition (%)	<i>p</i>
Control	—	1,164±295	—	—
Inostamycin	0.98	587±296	49	<0.05
	3.9	537±289	53	<0.01
	15.6	372±169	68	<0.01
	62.5	401±137	65	<0.001

sc (2×10⁶)-ip, qld×9 Tumours were weighed after 15 days of implantation.

Table 3 Inhibition of concanavalin A-induced DNA synthesis in rat spleen cells by inostamycin

Inostamycin (μg/ml)	cpm±SD	T/C (%)	<i>p</i>
0	317±63	100	—
0.1	77±36	24	<0.01
0.39	37±20	12	<0.01
1.56	49±29	15	<0.01
6.25	41±18	13	<0.01
25	31±10	10	<0.05
100	34±20	11	<0.01

なかった。同様に遅延型過敏反応に対しても効果がなかった (Table 7)。

2. PI キナーゼ阻害物質による PI turnover の障害

orobol は A431 の PI キナーゼを IC₅₀ 0.25 μg/

Table 4 Inhibition of IL-2-induced DNA synthesis in rat spleen cells by inostamycin

Inostamycin ($\mu\text{g/ml}$)	cpm \pm SD	T/C (%)	<i>p</i>
None	1,156 \pm 140	—	—
IL-2	10,457 \pm 388	100	—
0.0063	9,913 \pm 431	95	NS
0.025	8,855 \pm 555	85	<0.05
0.1	8,541 \pm 1,950	82	NS
0.39	255 \pm 41	2	<0.001
1.56	222 \pm 56	2	<0.001
6.25	98 \pm 23	1	<0.001

Table 5 Inhibition of mixed lymphocyte culture reaction by inostamycin

Inostamycin ($\mu\text{g/ml}$)	cpm \pm SD	T/C (%)	<i>p</i>
0	9,742 \pm 1,909	100	—
0.1	8,428 \pm 1,740	87	NS
0.39	62 \pm 20	0	<0.001
1.56	97 \pm 54	0	<0.001
6.25	73 \pm 50	0	<0.001
25	41 \pm 14	0	<0.001
100	56 \pm 3	0	<0.001

Table 6 Effect of inostamycin on antibody production in mice

Inostamycin ($\mu\text{g/mouse}$)	PFC/spleen ($\times 10^{-3}$)	T/C (%)	<i>p</i>
0	274 \pm 42	100	—
1.95	205 \pm 20	75	NS
7.8	249 \pm 23	91	NS
31.25	262 \pm 67	96	NS
125	312 \pm 42	118	NS
500	Toxic		

ml で阻害する⁵⁾。orobol は *in situ* で A431 細胞に EGF と同時に添加したところ PI turnover を IC₅₀, 15 $\mu\text{g/ml}$ で阻害した。一方 2,3-dihydroxybenzaldehyde は IC₅₀, 0.45 $\mu\text{g/ml}$ で PI キナーゼを阻害する⁵⁾。2,3-dihydroxybenzaldehyde は *in situ* PI turnover を IC₅₀, 7 $\mu\text{g/ml}$ で阻害した。

A431 細胞におけるイノシトールリン酸の生成を調べたところ Table 8 に示すように orobol と

2,3-dihydroxybenzaldehyde は両者とも 10 $\mu\text{g/ml}$ で有意に約 60% 阻害した。

考 察

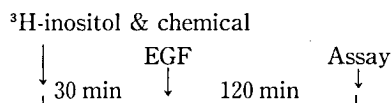
放線菌からの PI turnover 阻害物質スクリーニングを続けた結果、今までに単離した阻害物質と全く異なる構造の inostamycin を見出した。分光分析、ナトリウム塩の結晶解析で決定した構造

Table 7 Effect of inostamycin on delayed-type hypersensitivity reaction in mice

Inostamycin ($\mu\text{g/ml}$)	Footpad thickness ($\times 0.1 \text{ mm}$)	T/C (%)	<i>p</i>
0	15.6 \pm 1.0	100	—
1.95	16.7 \pm 1.7	107	NS
7.8	14.0 \pm 0.4	90	NS
31.25	16.8 \pm 0.6	108	NS
125	9.6 \pm 0.6	62	<0.01
500	Toxic		

Table 8 Effect of PI kinase inhibitors on inositol phosphates formation

Chemical (10 $\mu\text{g/ml}$)	^3H -inositol phosphates	
	(dpm)	
None	77.21 \pm 8.98	
+EGF	1415.37 \pm 102.80	
+EGF+Orobol	632.46 \pm 88.80*	
+EGF+2,3-Dihydroxybenzaldehyde	580.96 \pm 53.08*	

**p* < 0.05

は相対構造であるが、今後、絶対構造を決めるためルビジウム等、大きなイオンとの塩を結晶化させたいと考えている。

私達の PI turnover のアッセイではラベルしたイノシトールを細胞に取り込ませ、その後、EGF で PI turnover を刺激し、脂溶性画分に入る放射活性を測定する。EGF は主に phospholipase C を活性化して、PIP₂ の分解を促進すると考えられている。Table 1 のイノシトールリン酸生成阻害の結果から inostamycin はイノシトールから PI の生成、つまり CDP-DG イノシトールトランスフェラーゼを阻害すると考えられる。イノシトールと共に添加すれば PI, PIP, PIP₂ のプールを減少させることになり、EGF で刺激した後のイノシトールリン酸の生成を低下させる。一方、EGF と共に添加したのでは既に PIP₂ のプールがあるために阻害効果はみられない。現在、この阻害機構を確

認するため、*in vitro* での CDP-DG イノシトールトランスフェラーゼの阻害効果を調べている。

Inostamycin は静止期にある NIH-3T3 細胞の PDGF による S 期誘導を細胞毒性を示さない濃度で阻害し、その S 期誘導に PI turnover が関与することを確認した (data not shown)。又、エーリッヒがんに対して抗がん効果を示したが、inostamycin ががん細胞の PI turnover を阻害して抗がん活性を示すのか検討したいと考えている。

一方、リンパ球の S 期誘導に相当する 3 つの *in vitro* の実験 (Table 3, 4, 5) で、inostamycin は毒性を示さない濃度で、殆んど阻害効果を示さなかった。又、*in vivo* の抗体産性、遅延型過敏反応にも全く効果がなかった。より特異的な免疫系で阻害効果を示すか、さらに調べたいと考えている。昨年度、orobol と 2,3-dihydroxybenzaldehyde の PI キナーゼ阻害活性を見出したが、*in situ*

で PI turnover およびイノシトールリン酸生成に対する効果を調べたところ、いずれも阻害効果を示した。特に、2,3-dihydroxybenzaldehyde は阻害効果が強く、毒性も低いと考えられるので *in vivo* の抗がん、免疫抑制作用を調べたいと考えている。

References

- 1) Fisher, D.B. and Mueller, G.C. : Studies on the mechanism by which phytohemagglutinin rapidly stimulates phospholipid metabolism of human lymphocytes. *Biochem. Biophys. Acta*, **248**, 434-448 (1971).
- 2) Maino, V.C., Hayman, M.J., and Crumpton, M. J. : Relationship between enhanced turnover of phosphatidylinositol and lymphocyte activation by mitogens. *Biochem. J.*, **146**, 247-252 (1975).
- 3) Imoto, M., Yamashita, T., Sawa, T., Kurasawa, S., Naganawa, H., Takeuchi, T., Bao-quan, Z., and Umezawa, K. : Inhibition of cellular phosphatidylinositol turnover by psi-tectorigenin. *FEBS Letters*, **230**, 43-46 (1988).
- 4) Yamashita, T., Imoto, M., Ishhiki, K., Sawa, T., Naganawa, H., Kurasawa, S., Bao-quan, Z., and Umezawa, K. : Isolation of a new indole alkaloid, pendolmycin, from *Nocardioopsis*. *J. Nat. Prod.*, **51**, 1184-1187 (1988).
- 5) Nishioka, H., Imoto, M., Sawa, T., Hamada, M., Naganawa, H., Takeuchi, T., and Umezawa, K. : Screening of phosphatidylinositol kinase inhibitors from *Streptomyces*. *J. Antibiotics*, **42**, 823-825 (1989).
- 6) Imoto, M., Umezawa, K., Takahashi, Y., Naganawa, H., Iitake, Y., Nakamura, H., Koizumi, Y., Sasaki, Y., Hamada, M., Sawa, T., and Takeuchi, T. : Isolation and structure determination of inostamycin, a novel inhibitor of phosphatidylinositol turnover. *J. Nat. Prod.*, in press.

免疫修飾に作用する微生物代謝産物の研究

A) 15-Deoxyspergualin の免疫修飾作用

石塚 雅章*

共同研究者 増田 徹*, 大藪三千代*, 飯島正富*

はじめに

昨年度まで 15-Deoxyspergualin (15-DSG) の免疫抑制作用ならびに抗 L-1210 作用について報告してきた。免疫抑制作用は投与量に依存してみられるが、細胞毒性の作用機構についてはまだ明らかにされていない。15-DSG を 3 日間連続投与後 24 時間で免疫応答を調べると著明な免疫抑制作用を示すが^{1,2)}、投与後 24 時間目に各種のリンパ器官における T 細胞 subset に対する影響を検討した結果、T 細胞数ならびにリンフォカイン産生機能に対する著明な変化は見られなかった³⁾。このことは 15-DSG の免疫抑制作用は免疫担当細胞に対する直接の細胞毒性によるものではないことを示唆している。一方、15-DSG は L1210 に著明な抗腫瘍効果を示すとともに、抗腫瘍免疫を誘導することが明らかにされている⁴⁾。15-DSG は T 細胞に特異的に作用してそのリンフォカイン産生を調節することにより免疫調節作用を示すことが明らかにされつつある。15-DSG は IL 2 誘導物質であることを明らかにし^{1,2,4)}、その IL 2 受容体形成に対する作用も検討してきたが³⁾、T 細胞の産生する他のリンフォカインについての詳細な検討はなされていない。今年度の本研究ではこれらの点を明らかにすることを目的に実験を行った。

実験方法

IL2 および IL3 活性の測定： Intercell (倉紡) を用いてマイクロプレートに腹腔浸出細胞 (PEC), Intercell 中に正常マウスより採取したナイロンウール通過脾細胞を 15-DSG と共に 5 日間培養し、その培養上清中の IL 2 および IL 3 活性を CTLL 2 細胞および IC 2 細胞を用いて測定した。

15-DSG 投与マウス PEC の cytostatic 活性の測定： CDF₁ マウス (10 週齢, 雌性) に 15-DSG を 1 日間隔で 2 回腹腔注射して 24 時間後、PEC を採取し洗滌, EL 4 細胞を各割合に加え 24 時間培養した後、³H-thymidine で 4 時間パルスし、その培養細胞への取り込みを指標として活性を測定した。

培養 T 細胞あるいは EL4 細胞培養上清による PEC の活性化： 15-DSG 投与マウスから採取した脾細胞をナイロンウール処理後、 3×10^6 個を Intercell 中に正常マウスから採取した PEC をマイクロプレート中に 5 日間, co-culture 後、T 細胞を除き PEC に EL 4 細胞を添加して 24 時間培養し EL 4 細胞への ³H-thymidine の取り込みを測定して PEC の cytostatic 活性を調べた。また、EL 4 細胞を 15-DSG で 4 時間加温後、 1×10^6 細胞/ml を 3 日間培養し透析、その 20% を PEC に添加して 3 日間培養し、洗滌後、標的細胞として EL 4 細胞を加え 24 時間後前述のように cyto-

*微生物化学研究会化学療法研究所

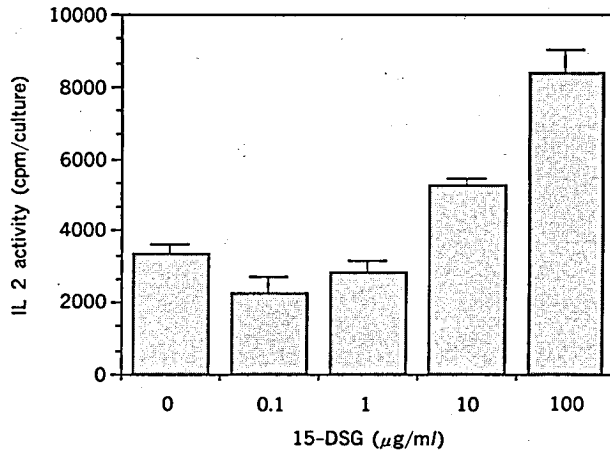


図 1 Enhancement of IL 2 Production by 15-DSG

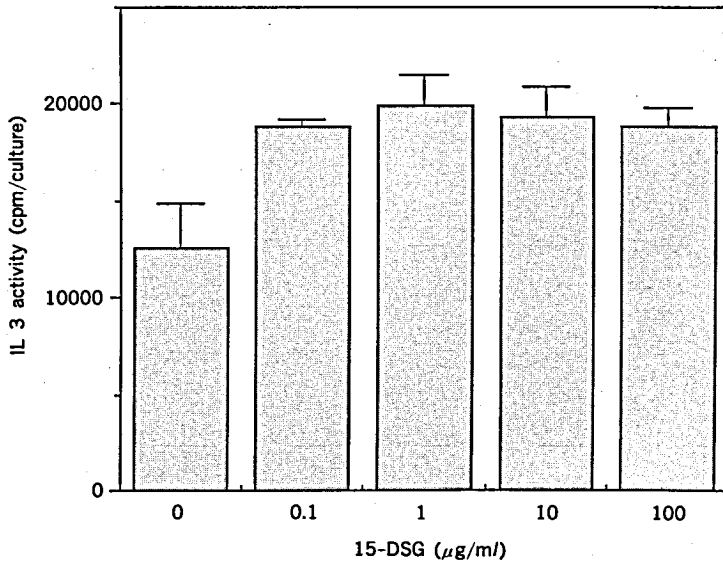


図 2 Enhancement of IL 3 activity by 15-DSG

static 活性を調べた。

実験結果

培養 T 細胞による IL2 および IL3 産生：15-DSG 投与正常あるいは L1210 担癌マウス細胞による IL 2 産生については既に報告した²⁾。今回はマクロファージ共存下における正常 T 細胞に対する 15-DSG による IL 2 および IL 3 産生について検討した。

正常マウスより PEC および脾細胞を採取した

後、脾細胞からナイロンウール通過 T 細胞を得て 15-DSG で 4 時間加温した後、Intercell を用いて各々を接触しないように培養し、その培養上清中のリンフォカイン活性を調べた。その結果は図 1, 2 に示すように 15-DSG は 10-100 μg/ml の濃度で IL 2 を、0.1-100 μg/ml で IL 3 産生を増強した。この時 PEC を除いた T 細胞のみの培養では増強活性は弱かった。

15-DSG 投与マウスより得た T 細胞による PEC の活性化：前年度の本研究によって 15-

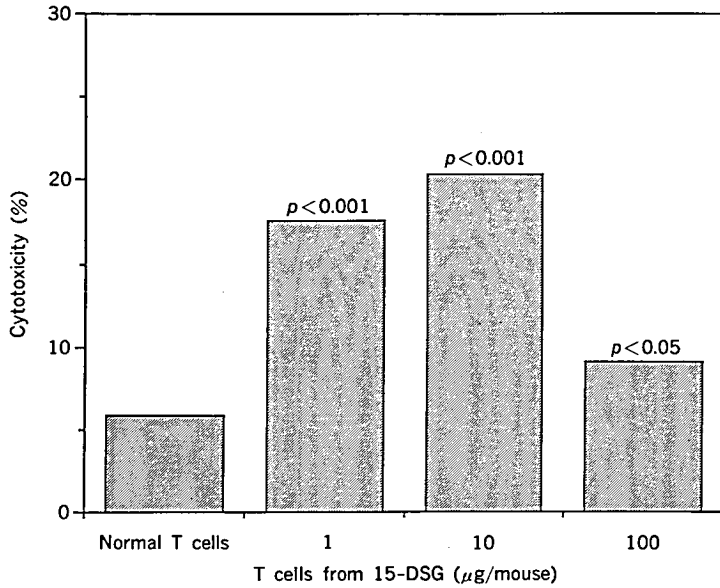


図3 Stimulation of Cytostatic Activity in Normal PEC Cultured with T Cells from Mice Given 15-DSG

DSG 投与マウスより得た PEC が EL 4 細胞に対して cytostatic 活性を示すことを報告したが³⁾, 15-DSG は *in vitro* で直接 PEC を活性化しないことから, 15-DSG のこの活性は T 細胞によって仲介されていると考え, 15-DSG 投与マウスより採取した T 細胞と Intercell を用いて co-culture した PEC についてその cytostatic 活性を検討した。

正常マウスより採取した PEC を Intercell 中の 15-DSG 投与マウスの T 細胞と共に培養した後, T 細胞を除き PEC の cytostatic 活性を調べた。その結果は図 3 に示すように 1-10 µg/マウスを投与したマウスより得た T 細胞によって PEC の活性化が見られた。そこで *in vitro* で 15-DSG によって処理した T 細胞を用いて PEC の活性化を試みた。

正常マウスより得た T 細胞を 15-DSG で 4 時間加温, この T 細胞を Intercell 中に, また正常マウスより得た PEC をマイクロプレート中で co-culture した後, 前述のように PEC の cytostatic 活性を調べた。その結果, 0.1-1 µg/ml で処理し

た T 細胞と co-culture した PEC に著明な cytostatic 活性が見られ, *in vitro* で 15-DSG で処理した T 細胞でも PEC を活性化することが明らかにされた(図 4)。

これらの結果から, 15-DSG は T 細胞のマクロファージ活性化因子の産生を促進すると考えられたので, T 細胞として EL 4 細胞を用いて液性因子の産生について検討した。EL 4 細胞を 15-DSG で 4 時間加温して洗滌後, 3 日間培養し, その培養上清を採取した。正常マウスより採取した PEC をこの上清と共に 3 日間培養して培養液を除き, 標的細胞としての EL 4 細胞を加えて 24 時間後, cytostatic 活性を検討した。その結果, 図 5 に示す様に 15-DSG は 0.1-10 µg/ml で EL 4 細胞の PEC 活性化因子の産生増強に作用した。

考 察

T 細胞のリンフォカイン産生に対する 15-DSG の作用について検討した。その作用については既に混合リンパ球培養や正常あるいは担癌マウスでも明らかにされているが, 今回は Intercell を用い

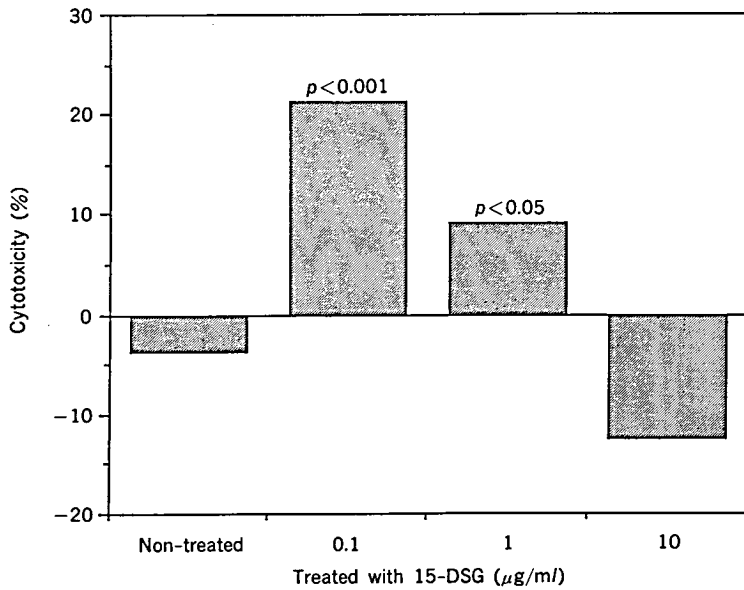


図 4 Induction of Cytostatic Activity in PEC Cultured with T Cells Treated with 15-DSG in Intercell

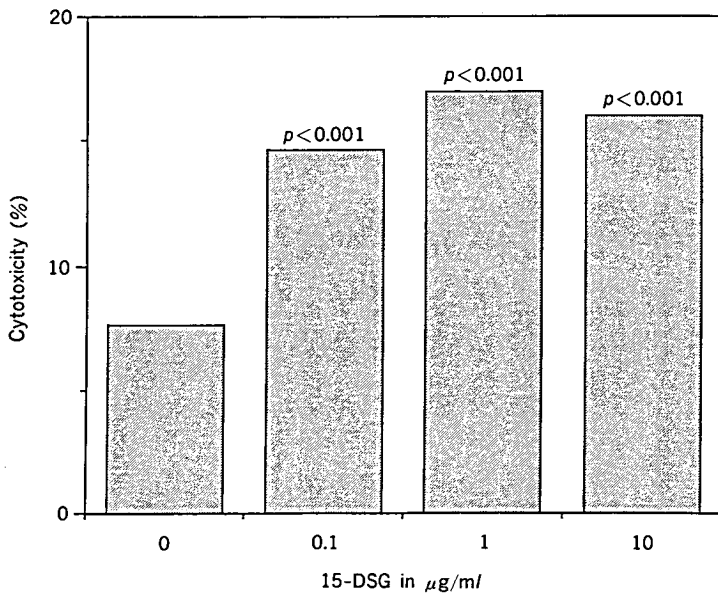


図 5 Induction of MAF Like Activity in Cultured Fluid of EL 4 Cells with 15-DSG

た実験によりマクロファージ存在下に T 細胞による IL 2 および IL 3 産生に対する 15-DSG の作用を調べた。15-DSG は T 細胞に作用してリンフォカイン産生を刺激するが、T 細胞は感作されていることが必要であることからマクロファージ

存在下で実験を行った。各々の細胞の接触を避けるために Intercell を用いて培養し 15-DSG の効果を調べた。IL 2 産生 0.1-10 $\mu\text{g/ml}$ では効果を示さなかったが、10-100 $\mu\text{g/ml}$ では dose-dependent にその産生を増強した。一方、IL 3 産生に対

しては0.1-100 $\mu\text{g/ml}$ の処理で dose-independent にその産生を亢進させた。このことは 15-DSG が細胞のリンフォカイン産生の誘導ならびに増強に働いていることを示している。

我々は前年度の本研究において 15-DSG の腹腔投与が PEC の活性化を増強することを報告した。しかし 15-DSG は *in vitro* において直接 PEC を活性化しなかったため、その作用はリンフォカインを介していると考え、15-DSG 投与マウスより得た T 細胞と正常マウスより得た PEC を接触させずに培養し、PEC の活性化が得られるか否かを検討した。その結果、正常マウスの PEC は 15-DSG 投与マウスより得た T 細胞によって活性化され、さらに正常マウスより得た T 細胞を 15-DSG で処理しても同様の作用を示し、その作用はリンフォカインによって仲介されていると考えられた。そこで培養に十分なリンフォカインを採取するため EL 4 細胞を 15-DSG で処理した後、EL 4 細胞培養上清中の PEC 活性化作用を調べた結果、著明な効果を認めた。このことから 15-DSG は T 細胞の PEC 活性化に作用するリンフォカイン産生を誘導し、間接的にその作用を示すことが明らかにされた。

これらの結果は 15-DSG の L-1210 に対する腫瘍免疫形成などの作用がリンフォカインの産生を調節した結果であることが示唆された。一方、15-DSG の免疫抑制作用は T 細胞の IL 2 受容体形成への阻害³⁾および B 細胞に対する抑制²⁾によるものと思われ、さらに抗腫瘍作用を示す量の投与では細胞性免疫増強作用による免疫担当細胞への抑制効果も考えられるが、これは今後の課題である。

文 献

- 1) Masuda, T. : S. Mizutani, M. Iijima, H. Odai, H. Suda, M. Ishizuka, T. Takeuchi & H. Umezawa : Immunosuppressive activity of 15-deoxyspergualin and its effect on skin allografts in rat. *J. Antibiotics* **40** : 342-359, 1987.
- 2) 石塚雅雄, 大藪三千代, 水谷滋利 : 15-デオキシスバガリンの免疫修飾作用。厚生省新薬開発研究。青柳班。昭和 62 年度報告書。51-55, 1988.
- 3) 石塚雅雄, 大藪三千代, 水谷滋利 : 15-デオキシスバガリンの免疫修飾作用(II)厚生省新薬開発研究。青柳班。昭和 63 年度報告書。43-48, 1989.
- 4) Ishizuka, M. : T. Masuda, S. Mizutani, M. Osono, H. Kumagai, T. Takeuchi & H. Umezawa : Induction of antitumor resistance to mouse leukemia L-1210 by spergualins. *J. Antibiotics* **39** : 1736-1743, 1986.

免疫修飾に作用する微生物代謝産物の研究

B) 免疫調節物質の探索

石塚 雅章*

共同研究者 飯島正富*, 山崎勝久*, 増田 徹*

微生物代謝産物中に自己免疫疾患に有用な免疫担当細胞に特異的に作用する免疫調節物質を探索することを目的に、混合リンパ球培養ならびにリンパ芽球の培養に対してスクリーニングを行ない、抗生物質 Nocardamin¹⁾ および Deferoxamine²⁾ にその作用を見出した。

実験方法

ナイロンウール通過 F344 ラット脾細胞を反応細胞、マイトマイシン C 処理 WKY ラット脾細胞を刺激細胞として混合リンパ球培養 (MLCR) を行ない、その反応に対する影響を検討した。またナイロンウール通過 F344 ラット脾細胞を ConA で 4 時間加温、洗滌後、T リンパ芽球として IL2 を添加あるいは無添加で培養、その反応に対する効果を検討した。対照として、L1210 細胞培養に対する効果も調べた。

CDF₁ マウスの羊赤血球に対する遅延型過敏症 (DTH)、ならびにラット皮膚移植に対する効果についても検討した³⁾。

Nocardamin および Deferoxamine は放線菌培養濾液より常法に従って化学療法研究所において調製した。

実験結果

Nocardamin および Deferoxamine は MLCR に添加したとき、その反応を著明に抑制した。IC₅₀ は Nocardamin で 0.1-0.4 $\mu\text{g/ml}$ 、Deferoxamine では <0.1 $\mu\text{g/ml}$ であった。IL2 による T リンパ芽球の増殖に対する IC₅₀ は、Nocardamin が 20-50 $\mu\text{g/ml}$ 、Deferoxamine が 1.56-6.25 $\mu\text{g/ml}$ であった (表 1)。

一方、L1210 に対する細胞毒性は Nocardamin が >50 $\mu\text{g/ml}$ 、Deferoxamine では >200 $\mu\text{g/ml}$ で細胞毒性を示さなかった。

以上の結果から、これらの物質は免疫担当細胞に特異的な抑制を示すと思われたのでマウスの DTH 反応に対する効果を検討した。50 mg/kg を羊赤血球で免疫後より 4 日間投与したが、有為な抑制または増強を示さなかった。また、ラットを用いた皮膚移植に対しても 50 mg/kg では効果は見られなかった。

考察

免疫応答を特異的に抑制する物質を微生物代謝産物中に探索し、鉄キレート物質、Nocardamin および Deferoxamine を見出した。これらの物質は MLCR および T リンパ芽球の IL2 による増殖を低濃度で抑制したが、L1210 の培養細胞に対しては 50 $\mu\text{g/ml}$ でも抑制を示さず、免疫応答系あるいは免疫担当細胞に特異的な抑制を示すと

*微生物化学研究会化学療法研究所

表 1 Inhibition of Immune Response *in vitro* by Nocardamin and Deferoxamine

Test system	Nocardamin	Deferoxamine
	IC ₅₀ (μg/ml)	
MLCR	0.4	0.1
IL2/Tblasts	25.0	2.5
LI210	>50.0	>200

思われた。そこでマウスあるいはラットを用いて DTH または皮膚移植に応用したが、50 mg/kg の投与では効果は見られなかった。しかし、今回用いた投与量は比較的少量なので、この実験でこれらの物質の *in vivo* における効果を評価することはできない。今後さらに大量を用いて、さらに効果を追求する価値があると思われる。

文 献

- 1) Stoll, A. *et al.* : *Z. Pathol. u. Bacteriol.*, 14 : 225, 1951.
- 2) Bickel, H. : R. Bosshart, E. Gäumann, P. Reusser, E. Vischer, W. Voser, A. Wettstein und H. Zähler : Über die Isolierung und Charakterisierung der ferrioxamine A-F, neuer wuchsstoffe der sideramin-gruppe. *Helv. Chim. Acta*, 43 : 2118, 1960.
- 3) 石塚雅章 : スパガリンの免疫修飾作用。厚生省新薬開発研究。青柳班。昭和 61 年度報告書。37-42. 1987.

自己免疫性脳脊髄炎，神経炎の治療薬開発

田 平 武*

研究協力者 田平順子*，姚 大林*，西澤正豊*

目 的

これまで実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)を用いて，自己免疫性脳脊髄炎，神経炎の治療薬開発のスクリーニングを行ってきた。その中で，バクトボリンがEAEの発症を抑制することを見出し報告した。しかし，バクトボリンは毒性が強く，効果域が狭いので，誘導体の開発が必要であることを指摘した。本年度は明治製菓，微化研で開発されたいくつかの誘導体について検討することを目的とする。また，バクトボリンがサプレッサーT細胞を誘導するか否かについて検討する。

1. 実験的アレルギー性脳脊髄炎を用いたバクトボリン誘導体のスクリーニング

Bactobolin, Actinobolin, Bactobolamine, N-Ac-Bactobolamine

Lewis ラット(チャールズリバー，8~11週，雌)をモルモットミエリン塩基性蛋白(GPBP)50 μ g とフロインド完全アジュバント(結核死菌 H37Ra 200 μ g)で感作し(両後肢足蹠)微化研から提供を受けた以下の新薬についてその効果を検討した。EAEの評価は0-5の6段階によった(0, 正常；1, 尾の低緊張；2, 後肢脱力；3, 完全対麻痺；4, 四肢麻痺；5, 死亡)。

1) 実験1(Actinobolin-[1])

感作後 day 1-17 に Actinobolin 120 mg/kg を

腹腔内に毎日注射し，PBS コントロールと比較した。

2) 実験2(Actinobolin-[2], Bactobolin)

感作後 Actinobolin 120 mg/kg(n=4) を day 1-17 に腹腔内注射して，Bactobolin 1 mg/kg(n=4)，PBS コントロール(n=4)と比較した。

3) 実験3(Bactobolamine-[1])

感作後 day 1-14 に Bactobolamine 40 mg/kg(n=4)を PBS に溶解し腹腔内に連日注射し，PBS コントロール(n=4)と比較した。

4) 実験4(Bactobolamine-[2])

感作後 day 1-17 に Bactobolamine 60 mg/kg を連日腹腔内に注射した。

5) 実験5(Bactobolamine-[4])

実験3において Bactobolamine-[2] のグループは day 2 に3匹，day 5 に1匹死亡した。よって本実験ではGPBP感作したLewisラットにLotは異なるが Bactobolamine-[4]を用いて毒性を調べた。即ち Bactobolamine-[4]30 mg/kg(n=4)，40 mg/kg(n=4)，50 mg/kg(n=4)，60 mg/kg(n=1)を day 1-8 に腹腔内投与した。コントロールには PBS(n=4)を用いた。

6) 実験6(Bactobolamine-[2], [3], [4])

感作後のLewisラットに各々Lotの異なる Bactobolamineを用いてその毒性を比較した。Bactobolamine-[2] 50 mg/kg(n=4)，Bactobolamine-[3] 40 mg/kg(n=4)，Bactobolamine-[4] 40 mg/kg(n=4)を day 1-8 に腹腔内投与した。対

*国立精神・神経センター神経研究所

照には PBS コントロール(n=4)を用いた。

7) 実験7(Bactobolamine-[2])

感作しない Lewis ラットに Bactobolamine-[2] 40 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg (各 n=4) を腹腔内投与し, PBS コントロール(n=4)と比較してその毒性を調べた。

8) 実験8(N-Ac-Bactobolamine)

Lewis ラットを感作し, N-Ac-Bactobolamine 40 mg/kg(n=4)を tween 20 2-3 滴に混和し, 5% アラビアゴムに懸濁し, 感作後 1 日目より 14 日間腹腔内投与し PBS コントロール(n=4)と比較した。

2. バクトボリンの作用機序の検討: サプレッサー誘導能の検討

雌 Lewis ラット(8-12 週)を同様に GPBP と CFA で後肢足蹠に感作し(day 0), PBS に溶解した Bactobolin 0.5-1.0 mg/kg/day を腹腔内に毎日注射し(7-11 日間), 11 または 12 日目に脾臓を

摘出し, $3-5 \times 10^8$ 個の全脾細胞(SPC)を naive recipient rat に移入した。その翌日 recipient を同様に GPBP/CFA で感作し, 経過を観察した。対照は PBS のみ注射したラットの脾細胞を用いた。また脾細胞を adherent cell と non-adherent cell, T cell と non-T cell に分けて同様の実験を行なった。

結 果

1. Bactobolin 誘導体の評価

実験1. Actinobolin 120 mg/kg(n=4) の day 1-17 の連日腹腔内投与で, PBS コントロール(n=4)に比し明らかな発症遅延を認めた。この結果は昨年度報告したが, もう一度図1に示す。

実験2. Actinobolin 120 mg/kg(n=4) の day 1-17 連日腹腔内投与で, 再び PBS 対照(n=4)に比し明らかな発症遅延を認めた(図2)。今回バクトボリン 1 mg/kg(n=4)は更に発症が遅延した

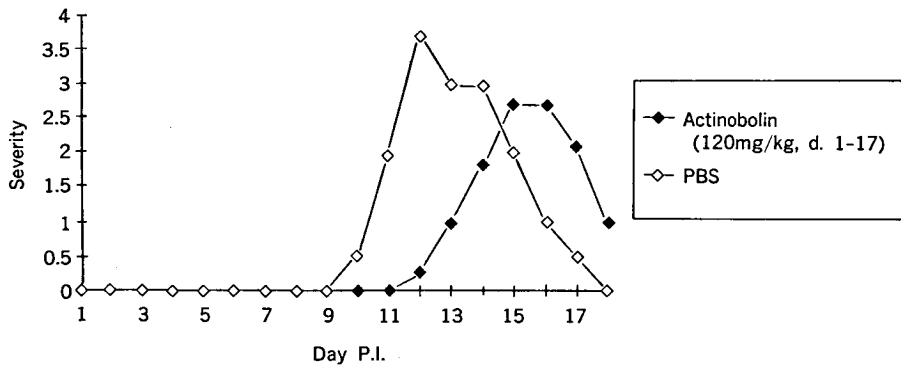


図1 ラット EAE に対する Actinobolin の効果 (day 1-17 注射)

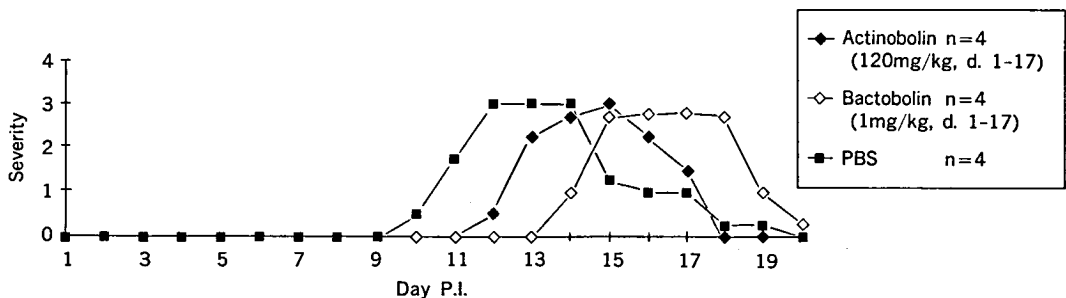


図2 ラット EAE に対する Actinobolin, Bactobolin の効果 (day 1-17 注射)

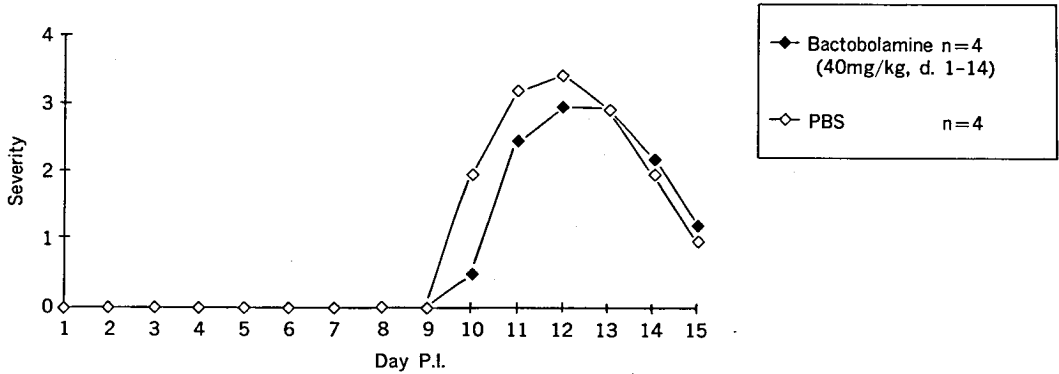


図3 ラット EAE に対する Bactobolamine-[1] の効果 (day 1-14 注射)

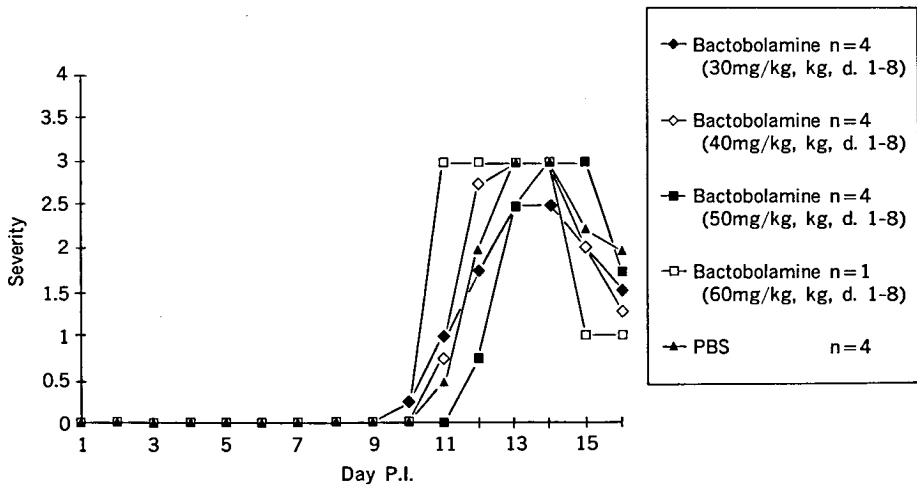


図4 ラット EAE に対する Bactobolamine-[4] の効果 (day 1-8 注射)

が，全例対照と同じ程度の EAE を発症した。

実験 3. Bactobolamine-[1] (数字は lot 番号を示す) 40 mg/kg (n=4) day 1-14 連日腹腔内投与は，ごく軽度の EAE 抑制傾向を示したが，PBS 対照 (n=4) に比し有意といえる程ではなかった (図 3)。

実験 4. Bactobolamine-[2] を 60 mg/kg (n=4) に増量し連日腹腔内投与した所，day 2 に 3 匹，day 5 に 1 匹，計 4 匹全例が死亡した。この時 PBS コントロールおよび他の薬剤投与ラットには死亡は見られなかった。

実験 5. Bactobolamine-[4] を 30 mg/kg (n=

4)，40 mg/kg (n=4)，50 mg/kg (n=4)，60 mg/kg (n=1) を day 1-8 に連日腹腔内投与し，PBS (n=4) と比較した。50 mg/kg でごく軽度の抑制傾向を認めたが，dose response を認めず，有意な差とは言えない (図 4)。Bactobolamine-[4] は 50 mg/kg，60 mg/kg でも死亡しなかった。

実験 6. Bactobolamine-[2] 50 mg/kg を毎日腹腔内に注射した所，day 2 に 1 匹，day 3 に 1 匹，day 5 に 1 匹，day 7 に 1 匹の計 4 匹全例が死亡した。Bactobolamine-[3] 40 mg/kg (n=2)，Bactobolamine-[4] 40 mg/kg (n=2) の day 8-14 の腹腔内注射は全く EAE を抑制しなかった (図 5)。

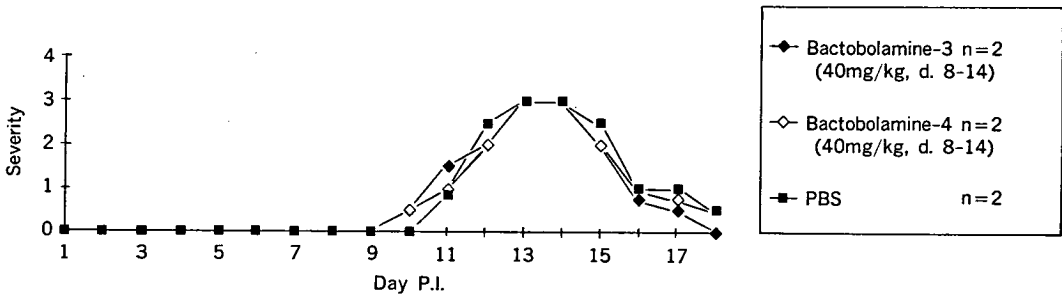


図5 ラット EAE に対する Bactobolamine-[3], -[4] の効果 (day 8-14 注射)

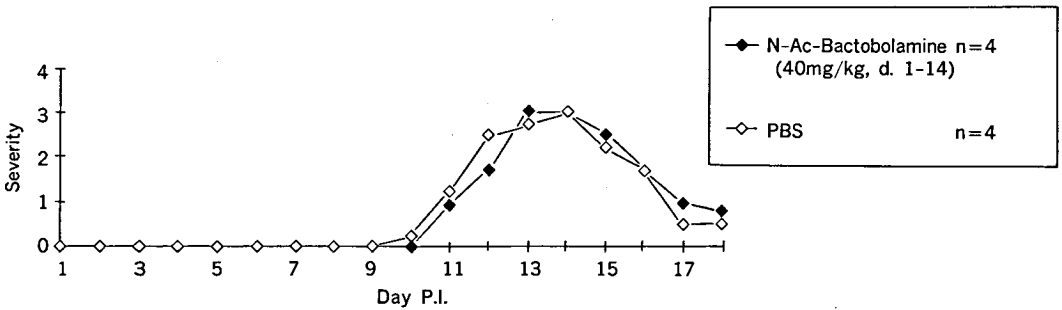


図6 ラット EAE に対する N-Ac-Bactobolamine の効果 (day 1-14 注射)

実験7. 実験4と6で Bactobolamine-[2] に毒性が見られたので、感作しないラットを用いて、40 mg/kg (n=1), 50 mg/kg (n=1), 60 mg/kg (n=1) を注射した所、それぞれ day 7, day 9, day 8 に死亡した。このことから明らかな lot 差があることが明らかになった。

実験8. N-Acetyl Bactobolamine 40 mg/kg (n=4) を day 1-14 に連日腹腔内注射したが、PBS コントロールとの間に全く差を認めなかった(図6)。

2. Bactobolin の作用機序の検討

表1に示す如く、Bactobolin 投与ラット脾細胞の移入を受けた recipient は、GPBP/CFA 感作による EAE が初期の実験では遅延する傾向が見られた。しかし、後期の実験では抑制傾向が見られず、adherent cell と non-adherent cell, あるいは T cell と non-T cell に分けて検討したが対照との間に差を認められなかったので、明らかなサブレッサー細胞誘導は認められないと結論した。

考 察

Bactobolin の誘導體として Actinobolin, Bactobolamine, N-Ac-Bactobolamine を検討した結果、120 mg/kg 投与で Actinobolin に軽度の EAE 抑制効果を認めた。Bactobolamine は毒性に lot 差があり、40 mg/kg 以上で死亡が見られるものであった。毒性を示さないものは 40 mg/kg で無効であった。N-Ac-Bactobolamine も 40 mg/kg で無効であった。後2者については high dose とした時の効果については不明であり、更に検討が必要である。Bactobolin の毒性は、これらの誘導體によって著しく改善されたが、効果も低下した。Bactobolin は以前の実験で、day 15 までの観察で完全に EAE を抑えたが、今回やや早く発症した為観察を続けた所、重症度は変わらない EAE が遅れて発症することが分かった。初期の Bactobolin は 1 mg/kg で死亡する例が見られたが、最近では 1 mg/kg で死亡することはなく、効果もや

表 1 Bactobolin のサブレッサー誘導能の検討

Experiment	No. Cells Transferred	Animal No.	Day after immunization														Bactobolin Treatment in Donor Rats		
			7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			
1	5×10 ⁸ SPC	Bact-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5 mg/kg d. 1-8
		Bact-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	〃
		PBS-1	0	0	0	0	0	2	3	3	3	3	3	1	0	0			—
		PBS-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	2	1		—
2	5×10 ⁸ SPC	Bact-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					0.5 mg/kg d. 1-8	
		PBS-3	0	1	1	2	3	3	4	3	1	0	0						—
3	4×10 ⁸ SPC	Bact-4	0	0	0	0	0	0	0	2	3	1	0					0.5 mg/kg d. 1-8	
		Bact-5	0	0	0	0	0	0	0	2	3	2	0						〃
		PBS-4	0	0	0	1	2	3	3	3	3	3	0						—
		PBS-5	0	0	0	0	0	1	1	4	3	1	0						—
4	4-5×10 ⁸ SPC	Bact-6	0	0	0	0	0	1	3	4	2	1	1	0				0.5 mg/kg d. 1-8	
		Bact-7	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	1	0					〃
		PBS-6	0	0	0	0	0	1	4	3	1	1	1	0					—
5	4×10 ⁸ SPC	Bact-8	0	0	0	0	3	4	4	3	1	0	0					1.0 mg/kg d. 1-8	
		Bact-9	0	0	0	0	1	3	3	4	3	0	0						〃
		PBS-7	0	0	1	3	4	4	2	0	0	0	0						—
		PBS-8	0	0	0	1	3	3	4	4	3	0	0						—
6	2.5-4×10 ⁸ SPC	Bact-10	0	0	0	1	3	3	4	4	4	2	0	0				1.0 mg/kg d. 1-8	
		Bact-11	0	0	0	0	0	1	2	3	3	2	1	0					〃
		PBS-9	0	0	0	1	2	3	3	3	2	0	0	0					—
7	3-4×10 ⁸ SPC	Bact-12	0	0	0	0	1	3	4	4	2	2	1	0				0.5 mg/kg d. 1-7	
		Bact-13	0	0	0	0	1	3	4	3	2	2	1	0					〃
		PBS-10	0	0	0	0	0	2	3	3	2	2	1	0					—
		PBS-11	0	0	0	0	0	2	3	3	3	2	1	0					—
8	5×10 ⁸ SPC	Bact-14	0	0	0	2	3	4	3	2	1	1	1	1	0			0.75 mg/kg d. 1-8	
		Bact-15	0	0	0	2	3	4	4	3	2	2	2	1	0				〃
9	3-4×10 ⁷ Adherent	Bact-16	0	0	0	0	1	2	3	3	1	1	0					0.63 mg/kg d. 1-10	
		Bact-17	0	0	0	0	1	1	3	3	1	1	0						〃
		Bact-18	0	0	0	1	3	3	3	2	1	1	0						0.75 mg/kg d. 1-11
		Bact-19	0	0	0	1	1	3	3	3	1	1	1						〃
		PBS-12	0	0	0	0	1	2	2	2	2	1	0						—
		PBS-13	0	0	0	0	1	3	3	3	2	1	0						—
10	3×10 ⁸ Non-adherent	Bact-20	0	0	3	3	3	3	3	1	1	1	0					0.63 mg/kg d. 1-10	
		Bact-21	0	0	2	2	2	2	1	1	1	0	0						〃
		Bact-22	0	0	0	1	3	3	3	1	1	1	1	0					0.75 mg/kg d. 1-11
		Bact-23	0	0	0	0	1	3	3	3	1	1	1	1					〃
11	2×10 ⁸ T	Bact-24	0	0	0	1	1	2	4	3	1	1	1	0				0.75 mg/kg d. 1-11	
		PBS-14	0	0	0	0	1	4	4	3	1	1	1	1					—
12	2×10 ⁸ Non-T	Bact-25	0	0	0	1	2	3	2	2	1	1	1	1				0.75 mg/kg d. 1-11	
		PBS-15	0	0	0	1	3	3	3	1	0	0	0	0					—

GPBP/CFA で感作した donor ラットに Bactobolin または PBS を上記投与量，投与期間注射し，day 11 または 12 に脾細胞 (SPC) を recipient に移入し，翌日 recipient を GPBP/BFA で感作し，clinical score の経過を見た。一部は SPC を adherent と non-adherent，T と non-T に分けて移入した。

や低下しているように見受けられ、lot 差があると思われる。

今回 Bactobolin の Cl 基を残してアミノ基をつけた Bactobolamine で毒性の低下が見られた事により、Cl 基が毒性の本態でないことが分かった。また Cl 基をはずした Actinobolin に軽度の効果が見られたので、Cl 基が作用の本態でないことも分かった。これらのことをヒントに今後更に誘導体の検討が行われることが期待される。

Bactobolin の作用機序について今回サブレッサー誘導能をみたが、Bactobolin 投与ラット脾細胞の移入により、初期の実験で EAE の抑制傾向を認めたと、サブレッサーを証明するに到らな

かった。昨年、一昨年の本報告で、感作動物のリンパ節細胞の BP に対する増殖反応が低いこと、起炎性 T 細胞クローンの BP に対する反応および脾細胞のクレチンに対する反応を濃度依存的に低下させること、*in vitro* における IL-2 に対する反応を抑えること、しかし IL-2 産生は抑えないこと、脾細胞の T 細胞分画に大きな変化をきたさないことを示した。また *in vitro* で cytotoxic に作用し、活性化されたリンパ球がより強く障害されることを示した。従って Bactobolin は抗原非特異的な細胞障害性機序によりエフェクター T 細胞の誘導を抑え、その結果 EAE を抑えている可能性が最も高い。

Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis (EAMG) ラットの治療実験

佐藤 猛*

共同研究者 石垣泰則*, 宋 東林*, 服部信孝*, 林 恭三**

はじめに

実験的自己免疫性重症筋無力症(EAMG)ラットを用いて、新しい免疫抑制剤のスクリーニングを行った。昨年度までは、抗腫瘍抗生物質である 15-Deoxyspergualin, Bactobolin, Actinobolin ならびにプロテアーゼ阻害剤である Arphamenine A の重症筋無力症に対する治療効果を検討したが、今年度はこれらに Bactobolamine を加え、今まで行った治療実験について総括的に考察してみた。

方 法

1) EAMG の作成

従来通り、7-9 週齢の雌 Lewis ラットを用い、カリフォルニア・シビレエイの電気器官から精製された 250 pmol・toxin binding site のアセチルコリン受容体(AChR)蛋白を免疫した。必要に応じて、初回免疫 4 週後に追加免疫を行った。

2) 薬剤の投与

薬剤は PBS に溶解し、ラット腹腔内に注射した。投与スケジュールは図 1 の様に行った。

3) EAMG の評価

連日臨床症状の観察と体重測定を行い、2 週に 1 回尾静脈より採血した。

4) 抗 AChR 抗体価測定

抗 AChR 抗体価の測定は、従来通りラット筋 AChR を用いた二抗体法で行った。

結 果

1) 15-Deoxyspergualin (15-DSP)

15-DSP を初回免疫直後から投与すると、投与量と相関して抗体産生を抑制することが可能であった。すなわち、EAMG ラットの場合、2.5 mg/kg/day 以上の 15-DSP を投与することにより完全に抗体産生を抑制することができた(図 2)。しかし、5.0 mg/kg/day の投与量では投与開始 24 日以内に全ての実験動物が死亡した。

15-DSP の毒性が最も少なく、かつ免疫抑制作用が最も有効に発揮できる薬剤の投与方法を見いだすために、15-DSP の間欠的投与方法を試みた。連日投与では抗体産生は完全に抑制することができたが毒性も強く現われた 5.0 mg/kg/day の 15-DSP を、週 1 回ないし 2 回投与した。この投与方法では初回免疫後 4 週まで抗体価は低値を示したが、追加免疫を行うと著しい抗体価の上昇を認め、効果は不十分であった(図 3)。

初回免疫後 10 日目から 2.5 mg/kg/day の 15-DSP で治療を始めた群では、免疫後 4 週目から抗体価が上昇し始めた。そして、追加免疫により著しいブースター効果を認め(図 4)、追加免疫を行った EAMG ラット 5 匹中 3 匹が死亡した。すなわち、一度免疫を獲得してしまうと、それを抑

*順天堂大学脳神経内科

**岐阜薬科大学薬剤学

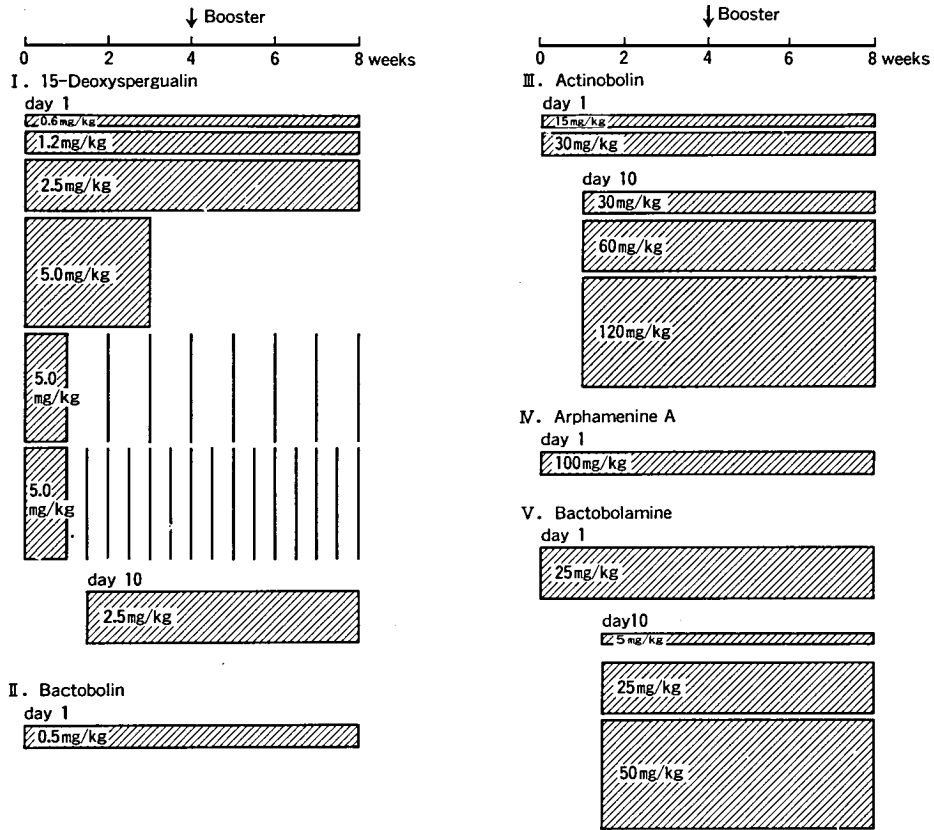


図 1 薬剤の投与スケジュール

制することはかなり困難であった。

2) Bactobolin

0.5 mg/kg/day の Bactobolin を免疫直後から投与したところ、抗体価は初回免疫後 4 週後より上昇し始め、追加免疫後著明に上昇した。5 匹中 3 匹のラットが 8 週の実験期間中生存し得た。

3) Actinobolin

15 ならびに 30 mg/kg/day の Actinobolin を初回免疫直後から投与した群では、薬剤の投与量に相関して抗 AChR 抗体価の上昇は抑制された (図 5)。いずれの群のラットも 8 週の実験期間中順調に生育した。

一方、免疫後 10 日後より治療を開始したラットには、30, 60, 120 mg/kg/day の薬剤を投与した 3 群を設定した。抗 AChR 抗体価は各群とも各個体毎にばらつきがあり、抗体産生の抑制程度と薬剤

の投与量との間に相関関係は見いだせなかった (図 6)。15-DSP と同様に、一度免疫を得た場合の治療は困難であった。

4) Arphamenine A

100 mg/kg/day の Arphamenine A を免疫直後から投与したが、免疫 2 週後から抗 AChR 抗体価が上昇するラットがみられ、追加免疫後著明な抗体産生を示したものもいた。筋無力症状のため、発育も不良であった。

5) Bactobolamine

25 mg/kg/day の Bactobolamine を免疫直後から投与を開始したラットにおいて、抗体価の上昇が観察されたものがいた。特に 2 匹のラットの抗体価の上昇は著しかった (図 7)。

一方、免疫後 10 日目より治療を開始したラットにおいて、5, 25, 50 mg/kg/day の治療群を設定

した。いずれの投与量でも、個体差はあるものの十分な抗体産生抑制は得られず、また抗体価と薬剤投与量との間に相関関係は認められなかった(図8)。

考 察

これまでに、抗腫瘍抗生物質である 15-DSP, Bactobolin, Actinobolin, Bactobolamine ならびにプロテアーゼ阻害剤である Arphamenine A の

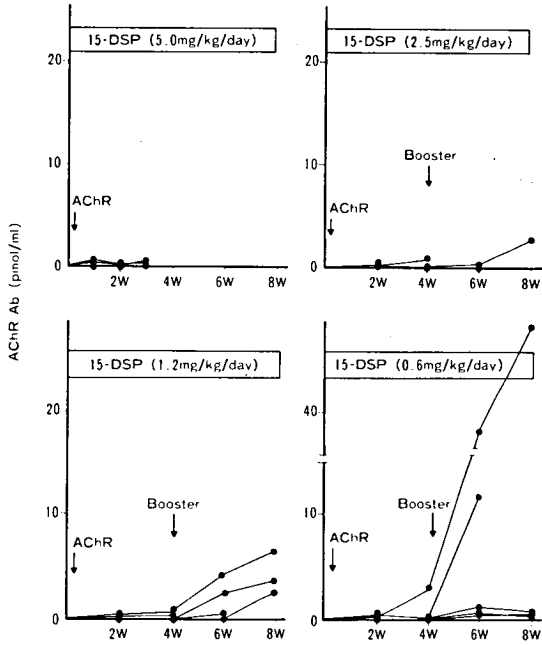


図 2 15-DSP は免疫直後から投与すると、投与量と相関して抗体産生を抑制する (文献2より引用)

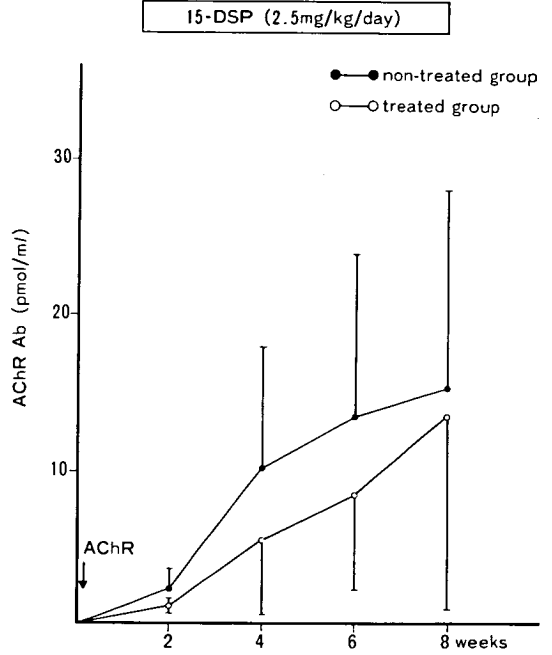


図 4 2.5 mg/kg/day の 15-DSP を、免疫後 10 日目から投与すると、追加免疫後著しく抗体価が増加した

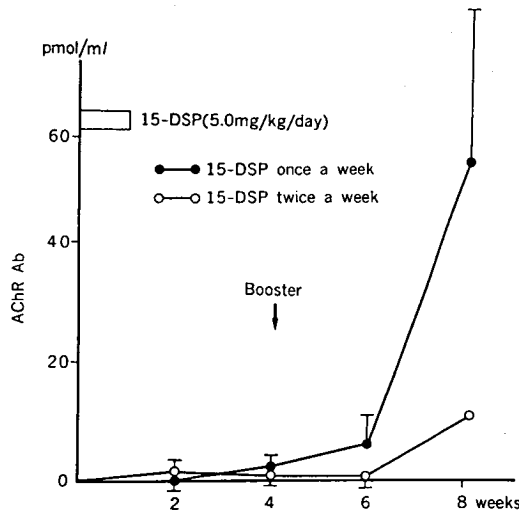


図 3 5.0 mg/kg/day の 15-DSP を週 1 回ないし 2 回間欠的に投与すると追加免疫後抗体価の上昇が観察された

EAMG に対する治療実験を行った。

15-DSP の EAMG の発症抑制効果は、実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) と同様に効果的で、薬剤の投与量に依存した¹⁾。2.5 mg/kg/day 以上の 15-DSP を投与すると、ほぼ完全に抗体産生を

抑制することが可能であり、またそれ以下の 1.2, 0.6 mg/kg/day の投与量でも、その投与量に応じて抗体産生抑制効果を示した²⁾。一方、急性期から慢性期に移行すると思われる免疫後 10 日目頃から治療を開始した場合、15-DSP の免疫抑制効果は十分に発揮されなかった。免疫後、治療群ラットの抗体価は非治療群に比してわずかに産生が抑制されているかに見えるが、過半数のラットは発症し、抗体価が上昇、死亡したのもみられた。すなわち、15-DSP は免疫担当細胞が抗原を認識し抗体を産生しようというところに作用するので、免疫の獲得が起こる時点で投与を開始できれば強力に EAMG ラットの抗体価が上昇するのを抑制するが、一旦免疫を獲得してしまったあとに投与を開始しても十分な抗体産生抑制作用は得られなかった。5.0 mg/kg/day の 15-DSP を免疫直後から投与すると抗体産生は完全に抑制できたが、この投与量では EAMG ラットは 3 週ほどで死亡してしまった。そこで、その免疫抑制効果は保持したままでかつ安全に 15-DSP を投与することを期待して、間欠投与法を試みた。しかし期待に反し、十分な免疫抑制効果は得られず、MG が発症して死亡したラットも存在した。

Bactobolin は EAE に対しては 15-DSP よりも強力にその発症を抑制すると言われている³⁾。

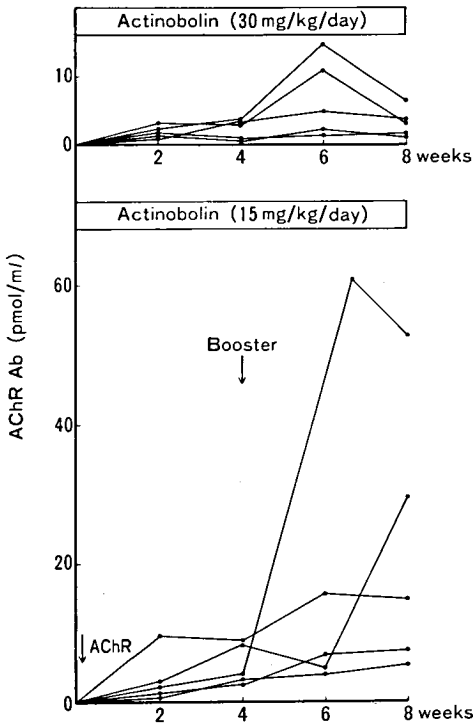


図 5 Actinobolin を免疫直後より投与すると、薬剤の投与量と相関して抗体価の上昇を抑制する

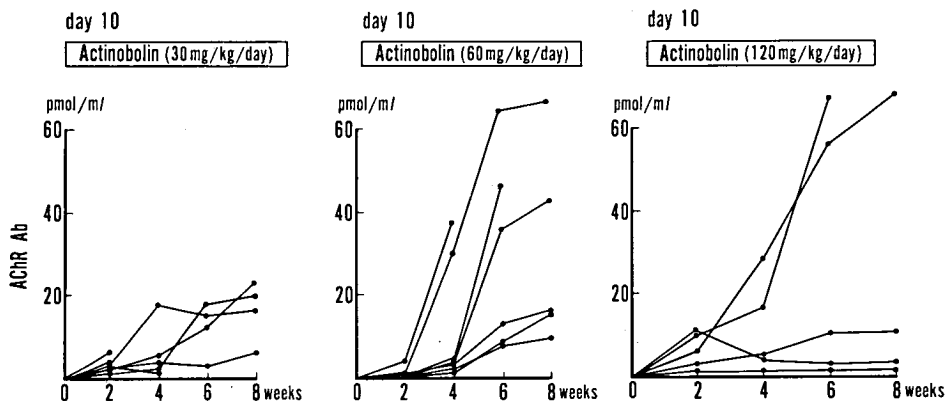


図 6 Actinobolin を免疫後 10 日目から投与すると、抗体価は個体毎にばらつきがあり、薬剤の効果は十分といえなかった

そこで、EAE の発症を抑制する 0.5 mg/kg/day の Bactobolin を EAMG に投与してみた。しかし、この投与量では追加免疫後の抗体価の上昇は抑えきれない上に、筋無力症状に全身状態の悪化をともない死亡する動物がみられた。Bactobolin の EAMG 発症抑制効果は、15-DSP のそれと比

較して弱いように思われた。

Actinobolin は Bactobolin の類縁体で毒性を著しく抑えた物質であるが、EAE の実験では Bactobolin ほどの効果を得ることが出来なかった^{4,5)}。しかし EAMG に対しては、薬剤を免疫直後から投与すれば有効に抗体産生を抑制することができ、抗体産生抑制能は薬剤の投与量に相関していた。そこで、免疫獲得後の治療効果を検定するために、免疫後 10 日目からの投与群を設定したところ、動物個体により抗体価の上昇程度にばらつきはあるが、十分な抗体産生抑制効果があるとはいえず、薬剤の投与量と抗体上昇の抑制程度との間には相関関係は見いだせなかった。

免疫異常の発病機序にプロテアーゼなどの酵素が関与することが注目されている⁶⁾。Arphamine A はアミノペプチダーゼ B の阻害物質で、これを EAMG ラットに投与し、その薬剤の EAMG 発症に対する影響を調べた。しかし、100 mg/kg/day の Arphamenine A では全く抗体産生阻止効果はなかった。EAMG ラットのような *in vivo* の実験系では Arphamenine A の微妙な免疫系への関与は評価することが難しいと思われた。

Bactobolamine は Actinobolin の誘導体で、

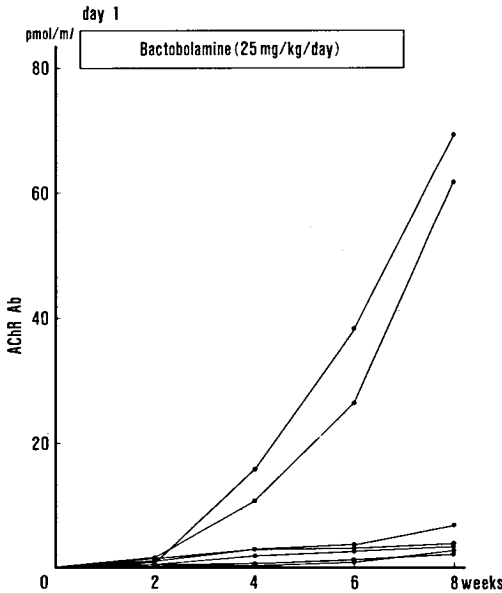


図 7 25 mg/kg/day の Bactobolamine を免疫直後から投与したが、著しい抗体価の上昇を認めたラットが存在した

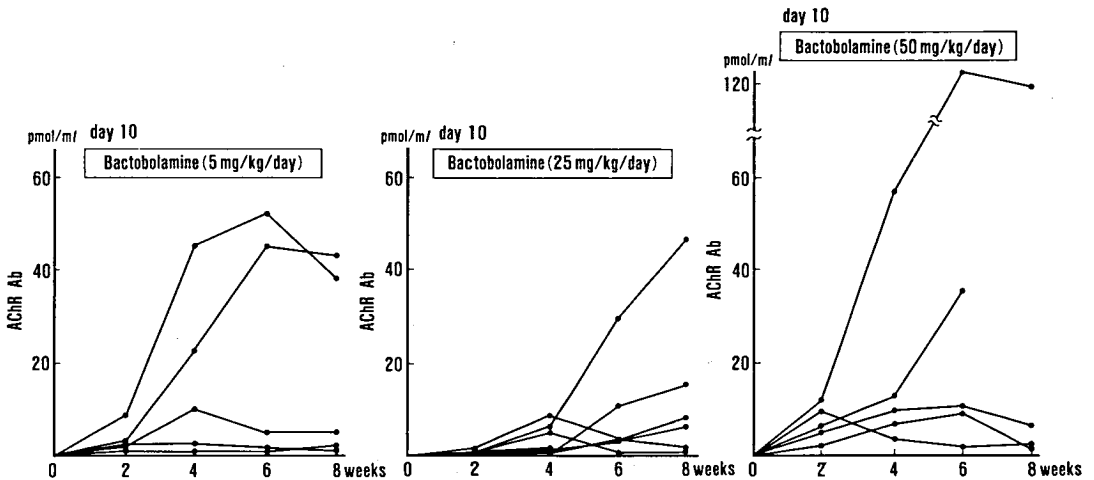


図 8 Bactobolamine を免疫後 10 日目から投与すると、効果は個体毎にばらつきがあり、薬剤の効果は十分といえなかった

Actinobolinと同様に毒性が非常に低いことで注目されている。EAEの治療実験では、まだ一定の評価を得ていないが、発症をみなかった個体が存在した⁷⁾。25 mg/kg/dayのBactobolamineは免疫直後から投与しても、十分に抗体価の上昇を抑制することができず、免疫後10日目から5、25、50 mg/kg/dayいずれの投与量のBactobolamineも有効に抗体産生の抑制をすることができなかつた。

15-DSPおよびActinobolinはEAMGの発症を有効に阻止しようと思われた。しかし残念ながら、一旦免疫を獲得し抗体産生能を持ったEAMGラットに対して、それを有効に治療し得る薬剤は現在のところ開発されていない。今後の研究で、さらに安全かつ強力な免疫抑制剤が開発されることを期待したい。

文 献

- 1) Ishigaki, Y., Sato, T., Song, T.-L., Hayashi, K.: Treatment of experimental allergic myasthenia gravis with a new immunosuppressant: 15-Deoxyspergualin. *Adv. Neurol* 540: 551-553, 1988.
- 2) Ishigaki, Y., Sato, T., Song, T.-L., Hayashi, K.: New immunosuppressive therapy with 15-deoxyspergualin of experimental autoimmune myasthenia gravis in rats. *Neuro-immunological diseases, Recent advances in pathogenesis and treatment.* ed. by Igata, A., University of Tokyo press, 403-406, 1988.
- 3) 田平 武: 自己免疫性能脊髄炎の治療薬開発研究, (2)ラット急性EAEモデルを用いた免疫抑制物質の評価: bactobolinとarphamenine AのEAE抑制効果について. 厚生省新薬開発研究費, 青柳班, 昭和61年度報告書51-53.
- 4) 田平 武: 自己免疫性能脊髄炎, 神経炎の治療薬開発, 厚生省新薬開発研究費, 青柳班, 昭和63年度報告書, 49-55.
- 5) 生田房弘: 各種微生物二次代謝産物による病変の修飾に関する神経病理学的研究, ActinobolinとDiprotin Aの急性EAEに対する影響. 厚生省新薬開発研究費, 青柳班, 昭和63年度報告書, 97-101.
- 6) 永津俊治: 膠原病の基礎的解明とその治療への応用(IV)—エリテマトーデスモデルマウス(BXSB雄マウス, MKL/lprマウス)のペプチダーゼの変化—. 厚生省新薬開発研究費, 青柳班, 昭和63年度報告書, 29-35.
- 7) 永井克孝: 実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)に関する二次代謝産物治療剤の検索. 厚生省新薬開発研究費, 青柳班, 昭和63年度報告書, 103-106.

15-Deoxyspergualin の免疫抑制活性発現の機序に関する研究

徳 永 徹*

協力研究者 西村恵子*

はじめに

昨年度までの研究で我々は、15-Deoxyspergualin (DSG) およびその誘導体 15-Deoxymethylspergualin (Me DSG) がマウスの細胞障害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocyte : CTL) の誘導および未熟骨髄細胞の分化・増殖を抑制すること、*in vitro* での MeDSG による CTL 誘導抑制はインターフェロン γ (IFN- γ) を加えることで回復することを明らかにした^{1,2,3}。ところが、MeDSG は CTL 誘導が抑制される培養系においても、IFN- γ を初めインターロイキン 2 およびインターロイキン 6 等の産生そのものは抑制しないなど矛盾する点が多く、その作用機序は未だ謎に包まれている。さらに、DSG および MeDSG の免疫抑制活性は、作用時間および作用容量に強く依存しており、生体内あるいは培養系からこれら薬剤を除くとその抑制効果が失われることから、Reversible な作用であると考えられる。我々は、CTL 誘導の系で、CTL 前駆細胞から成熟 CTL への分化の過程が DSG および MeDSG に最も感受性が高いことを *in vivo* および *in vitro* の実験で明らかにし^{1,2}、本薬剤のターゲットが分化過程にある細胞である可能性を示唆してきた。

そこで、本年度は DSG および MeDSG の免疫抑制活性が分化誘導抑制によるものか否かを明ら

かにすることを目的とした。そのため分化誘導の機序が明らかにされている白血病細胞のマクロファージへの分化^{4,5}、神経細胞の分化⁶) をモデル実験系として用いた。また成熟マクロファージ活性化(分化の一側面と考える)に伴う表層抗原の変化についても検討した。

材料と方法

実験動物

日本エスエルシー株式会社より購入した 7~9 週齢の DBA/2 雌マウスを用いた。

株化細胞

ヒトおよびマウス骨髄性白血病細胞 (HL-60 および M1)、マウスマクロファージ様株化細胞 (P388 D₁) は、国立予防衛生研究所の赤川博士より供与された。ラットフェオクロモサイトーマ (PC12) は三菱化成生命研の水落博士より供与された。

マウス腹腔マクロファージ

DBA/2 マウス腹腔内に 10% プロテオースペプトン 1.5 ml を投与し、4 日後に腹腔洗浄によりマクロファージを回収した。CO₂ インキュベーター中に 2 時間静置し、非付着細胞を除いた後、マクロファージ単層培養として以後の実験に供した。

免疫抑制剤

MeDSG は生理食塩水に 10mg/ml の濃度に溶解後、-80°C で保存し、使用直前に解凍、RPMI1640 培地 (日水製薬) にて希釈し用いた。

*国立予防衛生研究所

リンフォカインおよび試薬

リコンビナントマウスインターフェロン γ (IFN- γ ; 東レより供与), LPS (*E. coli* 由来, serotype 055 : B5 ; Sigma), PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate ; Sigma), 7S-NGF (nerve growth factor ; Collaborative Research, Inc.) を用いた。

白血球細胞のマクロファージへの分化誘導

HL-60 細胞 ($5 \times 10^4/ml$) および M1 細胞 ($2.5 \times 10^4/ml$) に PMA (10 ng/ml) および LPS (100 ng/ml) と IFN- γ (5 U/ml) を添加し 3 日間培養した。遠心により細胞を回収し、抗血清で感作した羊赤血球 (EA) とのロゼット形成能より Fc レセプター (FcR) 陽性細胞をカウントした。200 個以上の細胞をカウントし、FcR 陽性細胞の割合を百分率で表示した。

PC12 細胞の NGF による突起伸展の検出

PC 12 細胞 ($2 \times 10^4/ml$) に NGF (100 ng/ml) を添加し、3 日間培養後、位相差顕微鏡下で神経突起伸展細胞の数をカウントした。細胞体の 2 倍以上の長さの突起を有する細胞を陽性細胞とした。

マクロファージ活性化に伴う Ia 抗原発現の検出

P 388 D₁ 細胞 ($2 \times 10^5/ml$) は 10 U/ml の IFN- γ で、ペプトン誘導腹腔マクロファージ ($4 \times 10^5/ml$) は LPS (100 ng/ml) と 50 U/ml の IFN- γ で刺激後 2 日間培養した。培養終了後、0.4% EDTA を含むリン酸緩衝生理食塩水で細胞をはがし、遠心、洗浄して免疫蛍光染色に供した。ラット IgG であらかじめ FcR をブロックした後、マウス抗 Ia^dモノクローナル抗体 (MK-D 6) を反応させ、次いで FITC 標識抗マウス IgG で染色した。常法に

Table 1 Effect of MeDSG on the differentiation of HL-60 cells induced by PMA *in vitro*

Inducer ^a	Treatment with MeDSG (period) ^b	FcR expression ^c
-	-	5.8±2.0
+	-	46.9±9.7
+	+ (day -1~3)	42.3±6.2
+	+ (day 0~3)	46.5±0.7
+	+ (day 1~3)	45.3±6.2
+	+ (day 2~3)	36.0±3.0

^a PMA (10 ng/ml) was added to each culture on day 0. ^b HL-60 cells ($5 \times 10^4/ml$) were treated with MeDSG ($10 \mu\text{g/ml}$) for a period as indicated. ^c Expression of Fc receptor (FcR) was determined on day 3. Results are expressed as mean±standard deviation (S.D.) of triplicate cultures in each group.

Table 2 Effect of MeDSG on the differentiation of M1 cells induced by LPS and IFN- γ *in vitro*

Inducer ^a	Treatment with MeDSG (period) ^b	FcR expression ^c
-	-	1.4±0.5
+	-	40.3±5.5
+	+ (day -1~3)	51.9±3.9
+	+ (day 0~3)	55.8±3.5
+	+ (day 1~3)	43.4±1.6
+	+ (day 2~3)	37.8±3.9

^a LPS (100 ng/ml) and IFN- γ (5 U/ml) were added to each culture on day 0. ^b M1 cells ($2.5 \times 10^4/ml$) were treated with MeDSG ($10 \mu\text{g/ml}$) for a period as indicated. ^c Expression of FcR was determined on day 3. Results are expressed as mean±S.D. of triplicate cultures in each group.

Table 3 Effect of MeDSG on the differentiation of PC 12 cells induced by NGF *in vitro*

Inducer ^a	Treatment with MeDSG (period) ^b	Neurite expression ^c
—	—	1.6±0.6
+	—	66.2±3.3
+	+ (day -1~3)	51.7±12.9
+	+ (day 0~3)	57.6±7.5
+	+ (day 1~3)	54.1±10.4
+	+ (day 2~3)	56.3±6.8

^a 7S-NGF (100 ng/ml) was added to each culture on day 0. ^b PC 12 cells (2×10^4 /ml) were treated with MeDSG (10 μ g/ml) for a period as indicated. ^c Expression of neurite was determined on day 3. Results are expressed as mean±S.D. of triplicate cultures in each group.

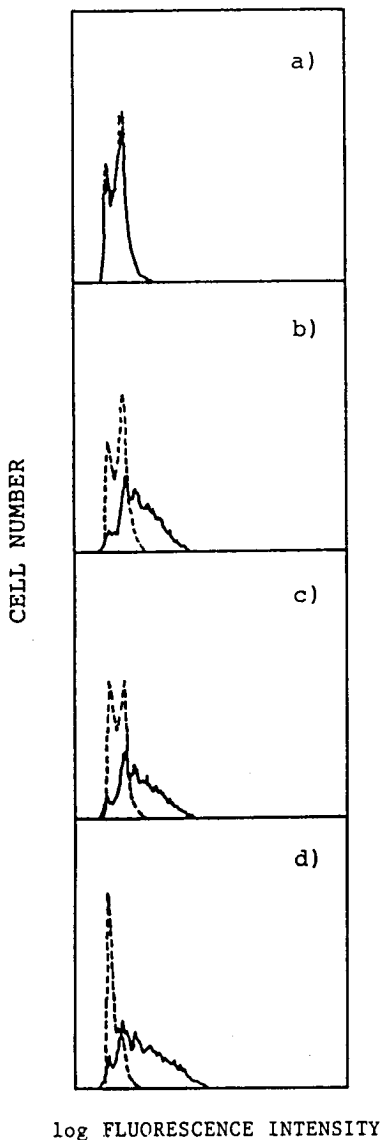


Figure 1 Effect of MeDSG on the induction of Ia antigen on P388D₁ cells stimulated with IFN- γ . P388D₁ cells (2×10^5 /ml) were cultured with a) medium alone, b) IFN- γ (10 U/ml), c) IFN- γ (10 U/ml) plus MeDSG (1 μ g/ml) or d) IFN- γ (10 U/ml) plus MeDSG (100 μ g/ml) for 2 days. The solid lines represent cells stained with anti-Ia^d monoclonal anti-body (MK-D6) and FITC-goat anti-mouse immunoglobulin (GAMIG). Dotted lines represent cells stained with FITC-GAMIG alone.

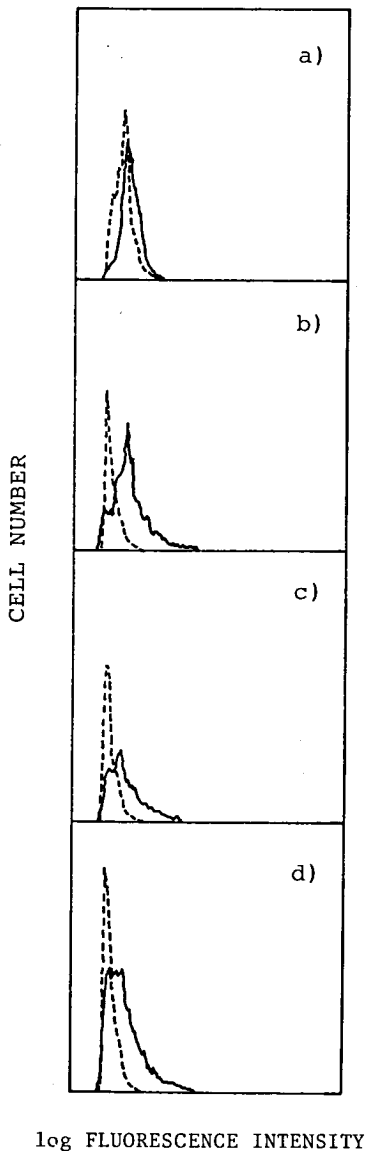


Figure 2 Effect of MeDSG on the induction of Ia antigen on pepton-induced peritoneal macrophages (pM ϕ) stimulated with LPS and IFN- γ .

PM ϕ ($4 \times 10^5/ml$) were cultured with a) medium containing 100 ng/ml of LPS, b) LPS and IFN- γ (50 U/ml), c) LPS and IFN- γ plus MeDSG (1 $\mu g/ml$) or d) LPS and IFN- γ plus MeDSG (100 $\mu g/ml$) for 2 days. The solid lines represent cells stained with anti-Ia^d monoclonal antibody and FITC-GAMIG. Dotted lined represent cells stained with FITC-GAMIG alone.

従い、Flow cytometry (日本分光, Cyto Ace-150)にて解析した。

M1細胞による DNA, RNA, 蛋白合成の検出
M1細胞 ($1 \times 10^4/0.1 ml$) を 96 穴平底マイクロタイタープレートで 1, 3 および 5 日間培養し、培養終了 4 時間前に 3H -thymidine, 3H -uridine および 3H -leucine (0.5 $\mu Ci/well$) をパルスし、それぞれの取り込みを液体シンチレーションカウンターにて測定した

結 果

白血病細胞のマクロファージへの分化に対する MeDSG の効果

骨髄性白血病細胞 HL-60 および M1 が種々の化学物質あるいはサイトカイン刺激によりマクロファージへと分化することが知られている^{4,5)}。今回、我々は PMA による HL-60 細胞の分化および LPS と IFN- γ による M1 細胞の分化を FcR 発現を指標に検討した。分化誘導 2 日前から

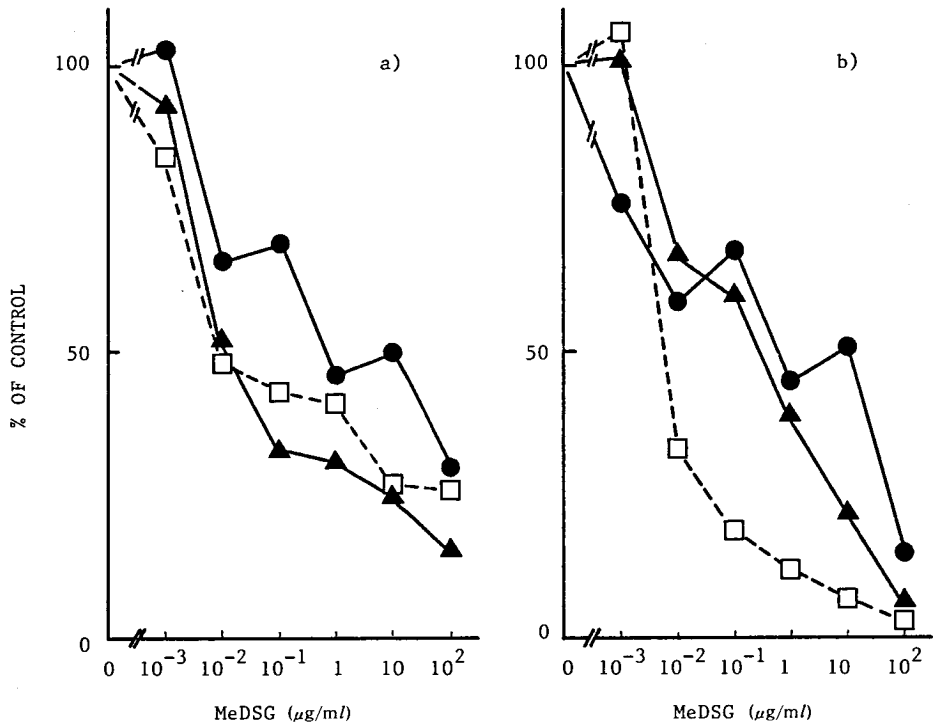


Figure 3 Effect of MeDSG on the synthesis of DNA, RNA and protein in M1 cells. M1 cells ($1 \times 10^4/0.1 \text{ ml}$) were cultured with or without MeDSG for 3 (a) or 5 (b) days in microtiter plates. Cells were pulsed with $0.5 \mu\text{Ci}$ of ^3H -thymidine (\bullet), ^3H -uridine (\blacktriangle) or ^3H -leucine (\square) for the last 4 hours of incubation. Results are expressed as mean % of control (medium alone) of triplicate wells in each group.

MeDSG を加えると(合計5日間作用), FcR 測定時に生細胞がほとんど残っておらず(**Figure 3-b**を参照), 検出が不可能であったため, 1日前から2日後の各日に MeDSG を加え, FcR 発現に対する効果を調べた. **Table 1** および **Table 2** に示すように, MeDSG は FcR 発現を抑制しなかった. 分化誘導1日前より MeDSG を加えた群の生細胞回収率は著しく減少したが, 残存細胞内での FcR 陽性率にはほとんど影響しなかった. また, 分化誘導物質非存在下で MeDSG は FcR 発現に何ら効果を示さなかった.

神経細胞分化に対する MeDSG の効果

ラットのフェオクロモサイトーマ(PC12)は NGF に応答し神経細胞に特徴的な種々の形質を発現することから, 神経細胞分化誘導因子あるいは神経栄養因子のインディケータ細胞として広

く用いられている⁹⁾. NGF 添加後に PC12 細胞は DNA 合成を停止し, 神経突起および軸索形成に必要な新たな蛋白質を合成する. MeDSG を NGF 添加1日前より2日後まで各日加えその効果を調べたが, 神経突起伸展に全く影響しなかった(**Table 3**). NGF を添加しない通常の培養時においては, PC12 細胞に対して MeDSG は $100 \mu\text{g/ml}$ という高濃度で3日以上共存培養した際のみ, DNA 合成を50%以上抑制した(3日および5日間培養での抑制率はそれぞれ63%および73%であった).

マクロファージ活性化に伴う Ia 抗原発現に対する MeDSG の効果

マウスのマクロファージ様株化細胞 P388D₁ を IFN- γ (10 U/ml) で2日間処理すると Ia 抗原が出現してくる(**Figure 1-b**; 陽性率 39.1%).

この系に IFN- γ 添加と同時に MeDSG を 1 μ g/ml あるいは 100 μ g/ml の濃度で加えたが、いずれの濃度においても Ia 発現は抑制されなかった (Figure 1-c, d; 陽性率は c: 39.9%, d: 45.6%)。ペプトン誘導腹腔マクロファージを用いた実験でも同様に、MeDSG は LPS および IFN- γ 刺激によるマクロファージ活性化に伴う Ia 抗原発現を全く抑制しなかった (Figure 2)。

考 察

ヒトおよびマウスの株化細胞、ペプトン誘導マウス腹腔マクロファージを用いて、分化および活性化(活性化も分化の一側面と考えられる)に伴う新たな形質発現 (FcR, 神経突起伸長および Ia 抗原の発現) に対する MeDSG の効果を検討した。MeDSG は、今回用いた実験系および細胞種に対しては全く抑制効果を示さないことが明らかにされた。実際に本実験系で MeDSG が作用していることは、M1 細胞の DNA, RNA および蛋白合成が 3 日ないし 5 日間培養した際に、dose-dependent に抑制される (Figure 3) ことより明らかである。特に、5 日間培養後の蛋白合成は、1 ng/ml 以上の濃度で 50% 以上抑制され、RNA や DNA 合成に比し MeDSG により感受性であることが見出された。当初、DSG および MeDSG の親化合物である Spergualin は白血病に対する抗腫瘍活性が目ざされ、その作用機序は蛋白合成阻害であることが示唆されている。しかしながら、本研究で示されたように、MeDSG による蛋白合成阻害は分化に伴い新たに合成される特定の蛋白質というよりは、細胞の生存維持に必要な蛋白質全般に向かうものと考えられる。データには示さないが、M1 細胞を LSP と IFN- γ で分化誘導した際に MeDSG を加えても、DNA, RNA 蛋白合成に大きな変化は認められなかった。

現在、混合リンパ球反応 (MLR) における抗原提示細胞の Ia 抗原発現に対する MeDSG の効果を

検討中であるが、昨年の我々の研究³⁾から、MeDSG は MLR による IFN- γ 産生を抑制しないことが明らかにされており、今回の実験結果と考え合わせると直接マクロファージへ抑制効果を示す可能性は低いと予想される。また、MLR 成立が Ia 抗原発現だけでは説明されないことが最近明らかにされつつあり、別の局面からのアプローチも必要と思われる。

今後解決すべき問題として、DSG および MeDSG による CTL 誘導抑制が、“分化”抑制によるものか、あるいは全く異なる機序によるものなのか、これら薬剤の抑制効果の Reversibility の原因は何か、が挙げられる。

これまで、我々が研究した限りでは、DSG および MeDSG の抑制効果は IFN- γ や IL-2 等の活性因子産生抑制や Ia 抗原の発現抑制ではないことが明らかである。これまでの免疫抑制剤の常識からは、DSG (MeDSG) の作用機序を説明することは困難と思われるが、全く新しいタイプの免疫抑制剤として今後更なる検討が期待される。

文 献

- 1) Nishimura, K. and Tokunaga, T.: Mechanism of action of 15-deoxyspergualin. I. Suppressive effect on the induction of alloreactive cytotoxic T lymphocytes *in vivo* and *in vitro*. *Immunology*, 68, 66-71, 1989.
- 2) 徳永 徹, 西村恵子, : 15-Deoxyspergualin の免疫抑制活性発現の機序に関する研究. 厚生省新薬開発研究費, 青柳班, 昭和 62 年度報告書, p. 75-82, 1988.
- 3) 徳永 徹, 西村恵子, : 15-Deoxyspergualin の免疫抑制活性発現の機序に関する研究. 厚生省新薬開発研究費, 青柳班, 昭和 63 年度報告書, p. 67-72, 1989.
- 4) Lotem, J. and Sachs, L.: Regulation of normal differentiation in mouse and human myeloid leukemic cells by phorbol esters and the mechanism of tumor promotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5158-5162, 1979.
- 5) Weiss, B. and Sachs, L.: Indirect induction of differentiation in myeloid leukemic cells by lipid A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1374-

15-Deoxyspergualin の免疫抑制活性発現の機序に関する研究

- 1378, 1978.
- 6) Greene, L.A. and Tischler, A.S. : Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2424-2428, 1976.

I型糖尿病モデルマウスに対する IFN- γ の効果

谷 口 克*

研究協力者 小池隆夫**, 倉沢和宏**

はじめに

γ -インターフェロン(IFN- γ)は主要組織適合抗原(MHC)クラス I 及びクラス II の発現誘導, マクロファージや NK 細胞の活性化など, 多くの免疫調整作用を持つペプチドである¹⁾。一般に IFN- γ の全身投与によって免疫反応は促進される事が知られている。実際, IFN- γ の投与により SLE モデルマウス(B/WF₁)の腎炎をはじめ多くの自己免疫疾患は悪化することが知られている。逆に, 抗 IFN- γ 抗体の投与によって, B/WF₁マウスのループス腎炎の進展は抑制されると報告されている²⁾。

NOD マウスは, I 型糖尿病のモデルマウスで, 雄, 雌とも, 生後 4-6 週齢までに単核細胞のラ氏島への浸潤(ラ氏島炎, insulinitis)がおこり, ついで 12 週齢頃より雌 NOD マウスに, 顕性糖尿病が発症してくる³⁾。

新生時期胸腺摘出, 抗 Thy-1 抗体の投与, nude 遺伝子の NOD マウスへの導入等によりラ氏島炎ならびに糖尿病の発症は抑制されることより, NOD マウスにおけるラ氏島炎ならびに糖尿病の発症機序は, T 細胞依存性の自己免疫現象であると考えられている^{4,5,6)}。

今回, 我々は, NOD マウスのラ氏島炎ならびに

糖尿病発症におよぼす IFN- γ の効果を, 全身投与により検討した。

方 法

マウス: シオノギ研究所より入手し, 千葉大学動物実験施設で繁殖した雌 NOD マウスを使用した。

IFN- γ : IFN- γ は Genentech, Inc., より供与された recombinant mouse IFN- γ を 2.5×10^5 U/ml に調整し使用した。

投与方法: ①ラ氏島炎未発症の生後 2 週齢より 10 匹の雌 NOD マウスに週 3 回, 5×10^4 U の IFN- γ を腹腔内投与し, 生後 6 週齢で組織学的検索をおこなった。対照群には同量の PBS を投与した。

②生後 2 週齢より各群 11 匹の雌 NOD マウスに同様に, 5×10^4 U の IFN- γ または PBS を週 3 回投与し, 血糖, 尿糖を週 1 回測定し, その推移を生後 20 週齢まで観察した。

③ラ氏島炎は発症しているが, 糖尿病未発症である 8 週齢より, 各群 10 匹の雌 NOD マウスに週 3 回, IFN- γ または PBS を投与し, 血糖, 尿糖を週 1 回測定し, その推移を生後 24 週齢まで観察した。

糖尿病発症の定義: 血糖値 200 mg/dl 以上かつ尿糖陽性を示した個体を糖尿病発症マウスと定義した。

組織学的検索: 実験終了時にマウス臍臓を取出

*千葉大学医学部附属高次機能制御研究センター
免疫機能分野

**千葉大学医学部第 2 内科

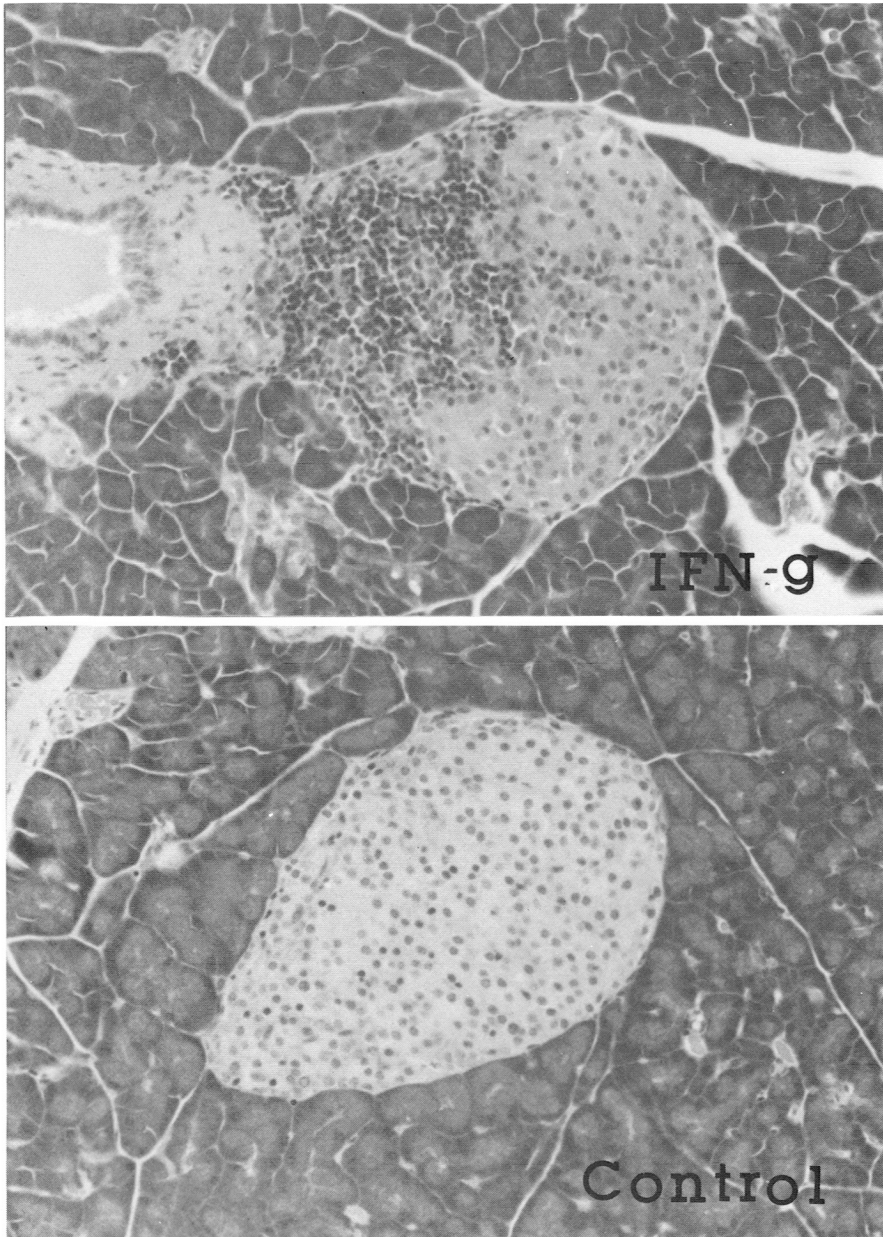


図 1 IFN- γ を 2 週齢から投与された NOD マウス (♀) の膵組織像 (6 週齢)

し、10%ホルマリンで固定し、ヘマトキシリン-エオジンで染色し、検鏡した。ラ氏島炎の程度は、以下のようにスコアリングした。

Score 0：単核球浸潤が認められないもの。

Score 1：ラ氏島周囲の弱い単核球の浸潤を認めるもの。

Score 2：ラ氏島内に単核球の浸潤を認めるが、

ラ氏島の構造は保たれているもの。

Score 3：ラ氏島の変性をともなった単核球のラ氏島への浸潤を認めるもの。

Score 4：単核球にラ氏島が置き変わっているもの。変性し内分泌細胞の消失したラ氏島。

ラ氏島炎の程度 = Score の合計 / ラ氏島の数

また、膵臓組織の一部は凍結切片とし、抗 Thy-1, 抗 Lyt-2, 抗 L3T4, 抗 Ia 抗体(10-2-16)を用い免疫組織学的検索をおこなった。

膵臓リンパ球表面マーカーの検索：実験終了時に膵臓リンパ球表面マーカーを抗 Thy-1, 抗 Lyt-2, 抗 L3T4, 抗 Ia 抗体および抗マウス Igs 抗体を用い、FACS にて解析した。

結 果

生後2週齢よりの IFN- γ の投与：NOD マウスラ氏島に単核細胞の浸潤のおこり始める生後6週齢に組織学的検索をおこなった。対照群では一部ラ氏島に軽度から中等度の細胞浸潤がみられるのにすぎないが、IFN- γ 投与群では大多数のラ氏島に中等度以上の単核球浸潤が認められ〔スコアリング：対照群：IFN- γ 投与群=0.32 \pm 0.25：1.78 \pm 0.37(m \pm se), (p <0.01)](図1), IFN- γ の投与によりラ氏島炎の発症が促進されることが示された。

NOD マウスの MHC クラス II 抗原は特殊で (Ia^{NOD}), 10-2-16 抗体のみが NOD マウスの MHC クラス II 抗原を認識する。図2は、同抗体を用い、NOD マウス膵臓リンパ球における染色パターンを FACS により解析した結果を示している。

IFN- γ 投与マウスに認められたラ氏島炎発症の促進が、IFN- γ によるラ氏島上の MHC の異所性発現によるものか否かを調べるために、上述の抗 Ia 抗体で酵素抗体法により染色した(図3)。しかし、IFN- γ 投与群、対照群ともにラ氏島細胞上には Ia 抗原の異所性発現をみとめなかった。

つぎに糖尿病の発症におよぼす IFN- γ の効果について検討した。対照群では生後12週齢より糖尿病を発症してくる個体が出現しはじめ、実験終了時の20週までには82%の個体が糖尿病を発症したのに対し、IFN- γ 投与群では18%の個体に高血糖を認めたのみであり (p <0.01)(図4), ラ氏島炎発症以前より IFN- γ を投与することによって

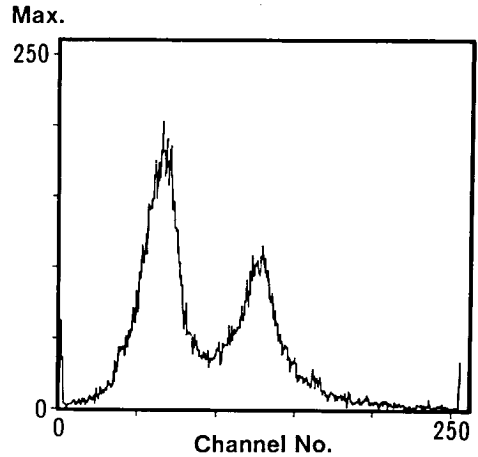


図2 抗 Ia 抗体 (10-2-16) による脾細胞の染色パターン

糖尿病の発症が抑制されることが示された。

20 週齢での対照群の膵ラ氏島組織像は大多数のラ氏島への中等度以上の単核球浸潤を認めたが、IFN- γ 投与群においても同程度のラ氏島炎を認め〔スコアリング：対照群：IFN- γ 投与群=2.4 \pm 0.78：2.2 \pm 0.47(p <0.1)](図5), 両群間には有意差を認めなかった。

20 週齢時におこなった免疫組織学的検索では、両群ともラ氏島炎は Thy-1 陽性細胞より成り、その多くは L3T4 陽性細胞であり、一部 Lyt-2 陽性細胞も存在しており、これらにも有意の差を認めなかった。

膵臓リンパ球表面マーカーの解析を20週齢時におこなった。IFN- γ 投与群では、対照群に比して Thy-1 陽性細胞が有意に減少していた。しかし、T 細胞内の各サブセットの割合には両群間で有意な偏りは認められなかった。

生後8週齢よりの IFN- γ の投与：ラ氏島炎はすでに発症しているが、糖尿病未発症である8週齢の雌 NOD マウスに24週齢まで IFN- γ を投与し、糖尿病発症へ及ぼす効果を検討した。対照群では生後13週齢頃より糖尿病を発症する個体が出現しはじめ、実験終了時の24週齢までに80%の個体に顕性糖尿病を認めた。しかし、IFN- γ 投

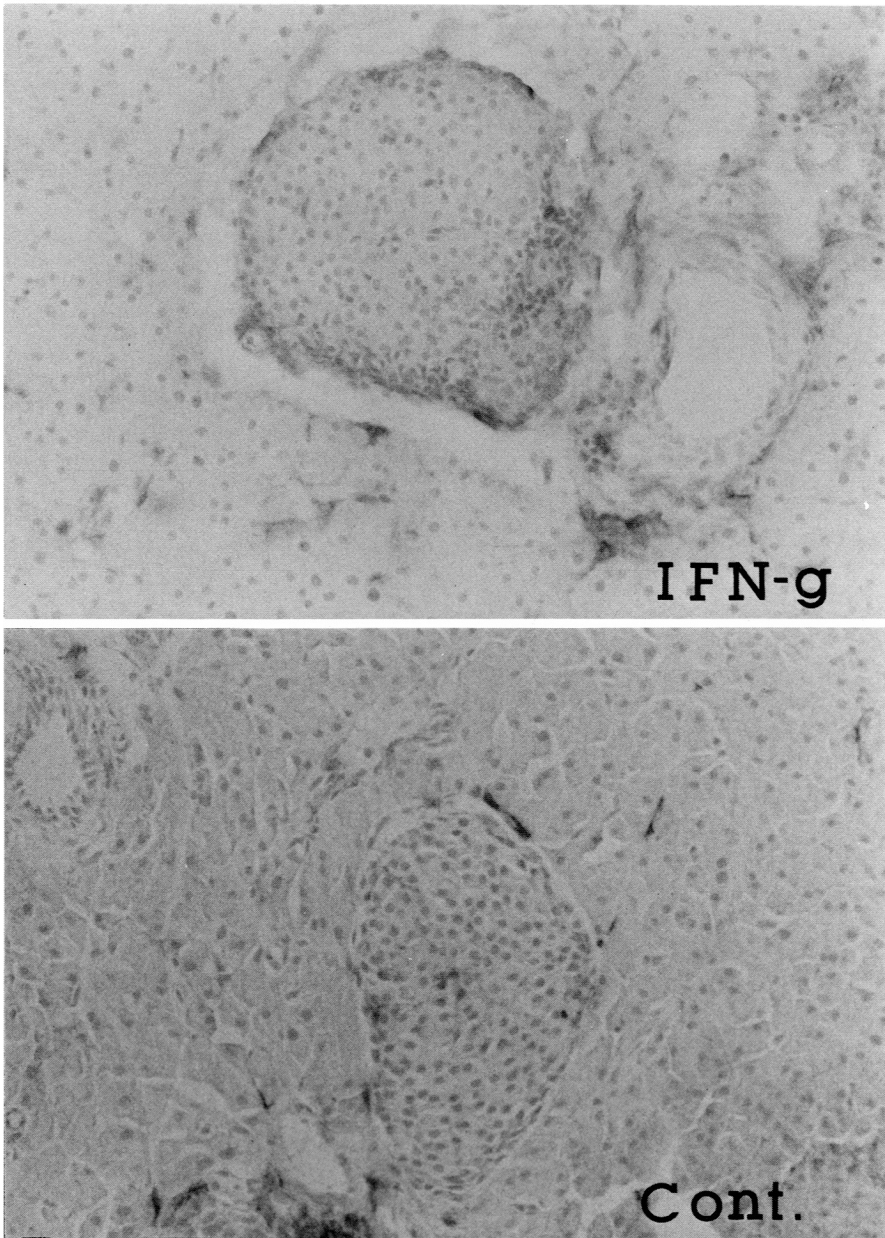


図 3 IFN- γ を 2 週齢から投与された NOD マウスの膵組織の抗 Ia 抗体 (10-2-16) による染色

与群では 24 週齢までに糖尿病を発症する個体を認めず ($p < 0.01$) (図 6), IFN- γ はラ氏島炎がすでにおこっているマウスに投与しても糖尿病の発症を抑制することが示された。

実験終了時の 24 週齢におこなった膵臓の組織学的検索では、対照群、IFN- γ 投与群とも中等度以上のラ氏島炎が観察され、両群のあいだには、

有意な差は認められなかった [スコアリング：対照群：IFN- γ 投与群 = 2.70 ± 0.31 : 2.52 ± 0.51 ($p < 0.1$)] (図 7)。

ラ氏島炎構成細胞について免疫組織学的に検索したところ両群ともに Thy-1, L3T4 陽性細胞が主で、一部 Lyt-2 陽性細胞より成立しており、これらにも有意な差は認めなかった。

I型糖尿病モデルマウスに対する IFN- γ の効果

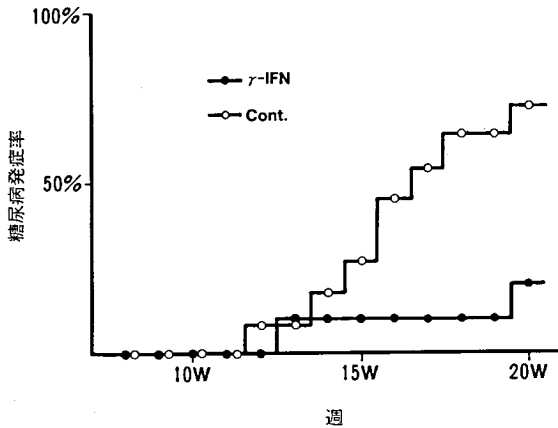


図 4 IFN- γ を 2 週齢から投与された NOD マウスの累積糖尿病発症率

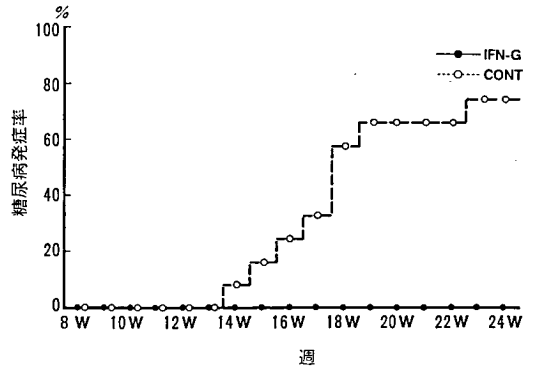


図 6 IFN- γ を 8 週齢から投与された NOD マウス (♀) 累積糖尿病発症率

実験終了時におこなった脾臓リンパ球サブセットの解析では、生後 2 週齢よりの IFN- γ 投与実験時と同様に Thy-1 陽性細胞が減少していた(対照群: IFN- γ 投与群 = $46.2 \pm 7.0\%$: $30.2 \pm 4.8\%$ ($p < 0.01$)).

考 察

IFN- γ は T 細胞より産生される cytokine で T 細胞, B 細胞機能の調節, NK 細胞, マクロファージの活性化, MHC クラス II 抗原の発現の誘導など多くの免疫調節作用を持つ。また, tumor necrosis factor (TNF), IL-1 などとともに, サイトカインネットワークを形成している¹⁾。

I 型糖尿病に代表される臓器特異性自己免疫疾患の発症メカニズムを推察するのに, IFN- γ による MHC クラス II 抗原の発現の誘導作用が注目されている。すなわち, IFN- γ は, 単独で, または TNF の共存下に, 正常では発現されていない甲状腺濾胞細胞や膵 β 細胞上に MHC クラス II 抗原を誘導することができる^{7,8)}。標的臓器の MHC クラス II 抗原の発現により, 当該臓器が抗原提示細胞としての機能を有し, MHC プラス自己抗原を T 細胞に提示することによって, 自己免疫反応がおこるといふ考えである⁹⁾。

しかしながら我々の NOD マウスを用いた IFN- γ の投与実験からは, 組織レベルでは膵ラ氏島上での異所性 MHC クラス II 抗原の発現を認めることはできなかった。

IFN- γ の自己免疫疾患モデルマウスへの投与は, SLE モデルマウスの腎炎, マウスコラーゲン誘発関節炎, streptozotosin 誘発マウス糖尿病をそれぞれ悪化させることが知られている^{2,10,11)}。逆に抗 IFN- γ 抗体の投与によって, B/WF₁ マウスのループス腎炎の進展は抑制されることが報告されている²⁾。臨床的にも, 多発硬化症が IFN- γ の投与により悪化したり¹²⁾, IFN- γ で治療中の悪性腫瘍患者に自己免疫現症が出現するという事実がある¹³⁾。

しかし, これらの報告とは反対に実験的アレルギー性脳脊髄炎は IFN- γ の投与により, 病状の進行が阻止され, 抗 IFN- γ 抗体の投与によって促進される¹⁴⁾。臨床的にも IFN- γ の投与によって慢性関節リウマチが改善するという報告もある¹⁵⁾。

これらの相反する現象は, IFN- γ の作用の多様さと自己免疫疾患の原因の多様性を反映しているのかもしれない。

今回の実験から, IFN- γ は NOD マウスの自己免疫現象に対して, 2 つの異なる作用を持つことが明らかとなった。すなわちラ氏島炎の発症の

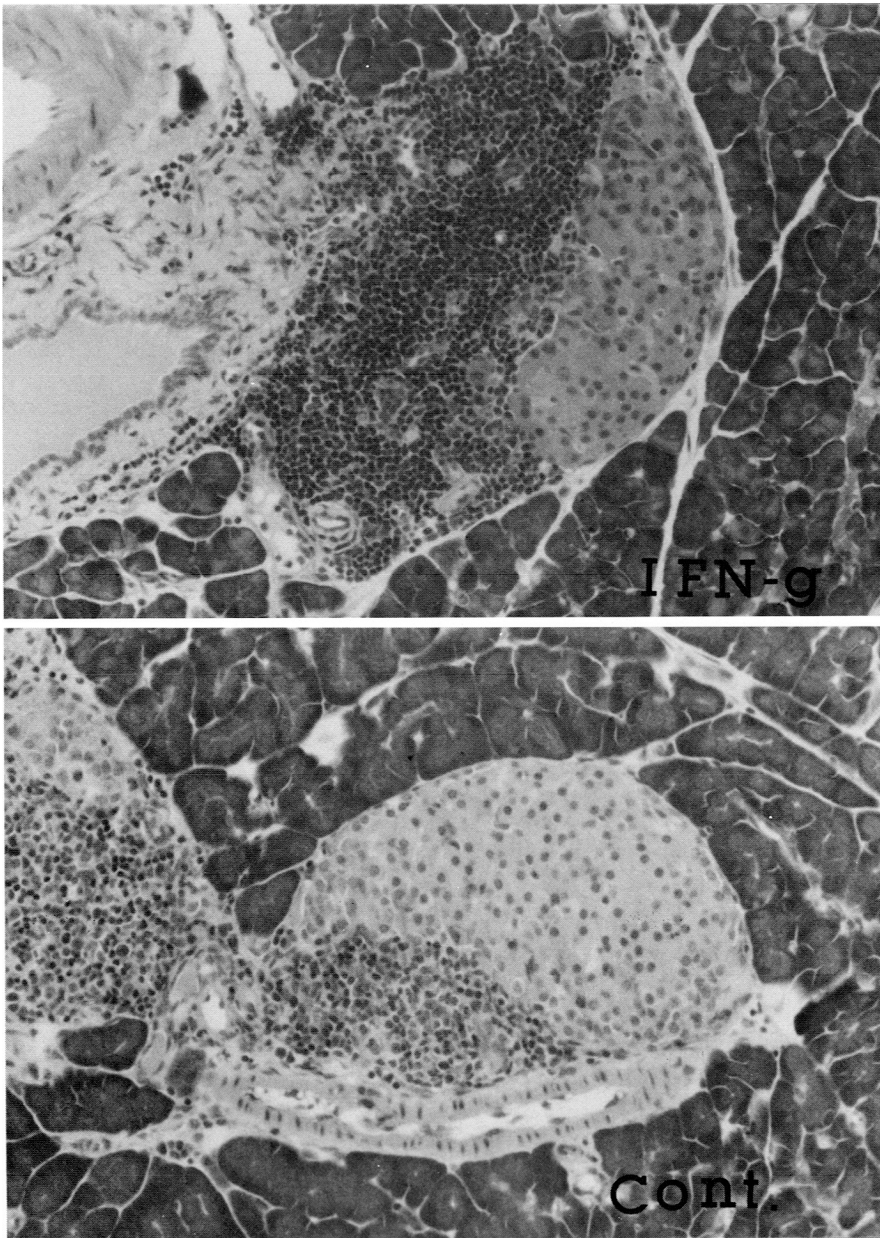


図 5 IFN- γ を 2 週齢から投与された NOD マウス (♀) の膵組織像 (20 週齢)

促進と糖尿病発症の抑制(= β 細胞破壊の抑制)とである。

我々はラ氏島炎発症以前の 2 週齢より雌 NOD マウスに、抗 L3T4 または、抗 Lyt-2 抗体を投与し標的細胞を除去することにより、ラ氏島炎および糖尿病の発症を抑制できることを、また、ラ氏島炎は発症しているが糖尿病未発症の 12 週齢の

NOD マウスに同様の抗体を投与し、抗 L3T4 抗体投与によっては、糖尿病の発症は抑制できるが、抗 Lyt-2 抗体投与によっては糖尿病の発症は抑制できない事実を報告してきた^{16,17,18)}。これらの結果は、ラ氏島炎の発症には L3T4 陽性、および Lyt-2 陽性の両 T 細胞の存在が必要だが、糖尿病の発症(β 細胞破壊)は L3T4 陽性細胞のみにより

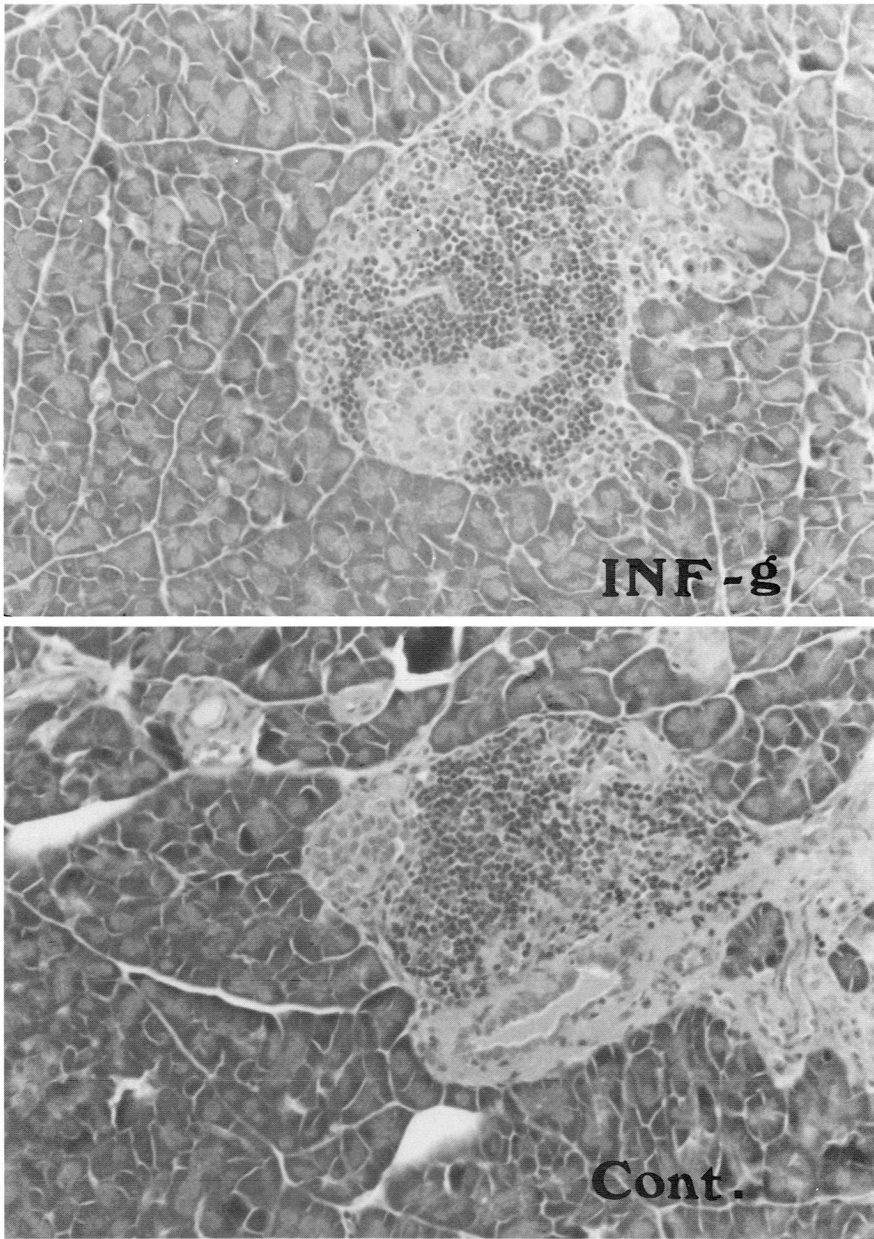


図 7 IFN- γ を 8 週齢から投与された NOD マウス (♀) の膵組織像 (24 週齢)

遂行されることを意味している。

IFN- γ がどのような機序により、ラ氏島炎を促進し、逆に β 細胞の破壊を抑制するかは不明であるが、我々のモノクローナル抗体投与実験ならびに、これまで集積されてきた NOD マウスの遺伝学的解析から、「ラ氏島炎の発症」と「 β 細胞の崩壊」とは、異なった事象であり、IFN- γ は、少な

くともこの 2 つの自己免疫現象に対して、相異なった作用を持っていると考えられた。

しかし、IFN- γ の投与による β 細胞の破壊の抑制は、ラ氏島炎の有無に関わらず認められ、ある種の I 型糖尿病の治療に応用される可能性が示された。

文 献

- 1) Trinchieri, G. Perussia, B. : IFN- γ , a pleiotropic lymphokine. *Immunol. Today* **6** : 131-136, 1985.
- 2) Jacob, C.O., von der Meide, P.H., McDevitt, H.D. : *In vivo* treatment of (NZB \times NZW) F₁ lupus-like nephritis with monoclonal antibody to γ -interferon. *J. Exp. Med.* **166** : 798-803, 1987.
- 3) Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K., Tochino, Y. : Breeding of non-obese diaetic strain of mice. *Exp. Anim.* **29** : 1-13, 1980.
- 4) Ogawa, M., Maruyama, T., Hasegawa, T., Kanaya, T., Kobayashi, F., Tochino, Y., Uda, H. : The inhibitory effect of neonatal thymectomy on the incidence of insulinitis in non-obese diabetes (NOD) mice. *Biomed. Res.* **6** : 103-105, 1985.
- 5) Harada, M., Makino, S. : Suppression of overt diabetes in NOD mice by anti thymocyte serum or anti-Thy-1 antibody *Exp. Anim.* **35** : 495-498, 1986.
- 6) Makino, S., Harada, M., Kishimoto, Y., Hayashi, Y. : Absence of insulinitis and overt diabetes in athymic nude mice with NOD genetic background. *Exp. Anim.* **35** : 495-498, 1986.
- 7) Todd, I., Pujol-Borrell, R., Hammond, L.J., Bottazzo, G.F., Feldmann, M. : Interferon- γ induces HLA-DR expression by thyroid epithelium *Clin. Exp. Immunol.* **61** : 265-273, 1985.
- 8) Pujol-Borrell, R., Todd, I., Doshi, M., Bottazo, G.F., Sutton, R., Gray, D., Adolf, R., Feldmann, M. : HLA class II induction in human islet cells by interferon- γ plus tumor necrosis factor or lymphotoxin. *Nature* **326** : 304-306, 1987.
- 9) Bottazo, G.F., Pujero-Borrell, R., Hanafusa, R., Feldmann, M. : Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* **2** : 1115-1119, 1983.
- 10) Cooper, S.M., Sriram, S., Ranges, G.E. : Suppression of murine collagen-induced arthritis with monoclonal anti-Ia antibodies and augmentation with IFN- γ *J. Immunol.* **141** : 1958-1962, 1988.
- 11) Campbell, I.L., Oxbrow, L., Koulmanda, M., Harrison, L.C. : IFN- γ induces islet cell MHC antigens and enhances autoimmune streptozotocin-induced diabetes in the mouse. *J. Immunol.* **140** : 1111-1116, 1988.
- 12) Panitch, H.S., Haley, A.S., Hirsch, R.L., Johnson, K.P. : Exacerbation of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* **1** : 893-894, 1987.
- 13) Schattner, A. : Review : interferon and autoimmunity. *Am. J. Med. Sci.* **295** : 532-544, 1988.
- 14) Billiau, A., Heremans, H., Vandskerckhove, F., Dijkmans, R., Sobis, H., Meulepas, E., Carton, H. : Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN- γ . *J. Immunol.* **140** : 1506-1510, 1988.
- 15) Veys, E.M., Mielants, H., Verbruggen, G., Grosclaude, J-P., Meyer, W., Galazka, A., Schindler, J. : Interferon gamma in rheumatoid arthritis. A double blind study comparing human recombinant interferon gamma with placebo. *J. Rheumatol.* **15** : 570-574, 1988.
- 16) Koike, T., Itoh, Y., Ishii, I., Ito, I., Takabayashi, K., Maruyama, N., Tomioka, H., Yoshida, S. : Preventive effect of monoclonal anti-L3T4 antibody on development of diabetes in NOD mice. *Diabetes* **36** : 539-541, 1987.
- 17) 伊藤洋次郎, 小池隆夫, 倉沢和宏, 石井達子, 伊藤勇夫, 富岡玖夫, 吉田 尚 : 抗 L3T4 抗体および抗 Ly-2 抗体投与による NOD マウス INSULITIS 局所の T 細胞サブセットの変化と糖尿病の発症. *糖尿病* **31** : 257-260, 1988.
- 18) 倉沢和宏, 小池隆夫, 伊藤洋次郎, 松村龍太郎, 宇津木達子, 伊藤勇夫, 富岡玖夫, 吉田 尚, NOD マウスの糖尿病発症に關与する L3T4 陽性細胞と Ly-2 陽性細胞の役割. *糖尿病* **31** : 937-939, 1988.

ポリ ADP-リボース合成酵素阻害剤(ベナドロスチン)の *in vivo* 抗体産生に及ぼす効果：ループス(SLE) モデルマウスを用いた解析

金井 芳之*

協同研究者 山内茂人*, 今岡浩一**

はじめに

全身性エリテマトーデス(SLE)患者が妊娠した場合、健常人に比べて子宮内胎児死亡(IUFD)、流産・早産の頻度が高いことが指摘されている¹⁾。我々はSLEの流産モデルをSLEモデルマウス(MRL/l)で作出することに成功した。すなわちMRL/lマウスの妊娠例で低仔産(リッターサイズが4以下)の場合は高い確率でIUFDを伴っていることがわかり、その場合妊娠7日で抗ポリADP-リボース抗体(IgG 2a)の選択的上昇が見られ、本抗体はIUFDを予知するのに都合の良いマーカー抗体になることをつきとめた²⁾。この現象はヒトSLE妊娠6例中4例にも認められ、抗ポリADP-リボース抗体がSLEモデル動物のみならず、ヒトSLEでもIUFDや流産予知の為に良いマーカー抗体になることが示された³⁾。以上のことからポリADP-リボース異常代謝、特に、その過剰産生と抗ポリADP-リボース抗体の選択的上昇の関連性を予想し、昨年度非妊娠MRL/lマウスに対するポリADP-リボース合成阻害剤ベナドロスチン(Bd)投与効果を調べ、Bdには抗ポリADP-リボースIgG抗体産生の選択的抑制作用がみられる知見を得た⁴⁾。今回はその基礎実験をさらに追加し、あわせてMRL/lマウスにおける抗

ポリADP-リボース抗体の上昇とポリADP-リボース抗原感作との関連性も調べた。

材料と方法

薬剤：ベナドロスチン(Bd)は微生物化学研究所青柳高明博士より恵与された。Bdは0.5%のアラビアゴムを含有する生理食塩水にて2mg/mlに溶解し、-20°Cで保存した。

マウスおよびBdの投与方法：マウスは米国Jackson Laboratoriesより入取し、東京大学医科学研究所で繁殖・維持しているMRL/lを用いた。実験には10週齢雌MRL/l(原則として)を用い、前回の実験では10mg/kgを週3回腹腔内投与したが、今回は妊娠中の薬剤投与のストレスを考慮し、週1回投与方法も検討した。尚実験期間は4週間とした。

ポリADP-リボースによるMRL/lマウスの感作：抗原の調製及び感作法は既法^{5,6)}に従った。対照実験としてポリADP-リボースを含まない溶媒と Freund's アジュバントの混合液による感作法を用いた。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)：ポリL-リジンで前処理したマイクロタイターウェル(Falcon No 3912)にポリADP-リボース、二本鎖(ds)DNA、あるいは一本鎖(ss)DNAを各ウェルに50ng加え、蒸発乾固したマイクロタイタープレートを固相抗原として用い、

*東京大学医科学研究所癌生物学研究部

**東京大学医科学研究所実験動物研究施設

既法に従って抗ポリ ADP-リボース抗体, 抗 dsDNA, 抗 ssDNA 抗体を測定した⁷⁾. また抗体の特異性は competitive ELISA にて調べた⁷⁾.

結 果

10 週齢 MRL/l マウスにおける抗ポリ ADP-リボース抗体価：雌雄の MRL/l マウス(雌 20 匹, 雄 20 匹)における抗ポリ ADP-リボース IgG 抗体の上昇度を抗 ssDNA IgG 抗体と比較して調べた. 抗ポリ ADP-リボース抗体, A₄₀₅ユニットが 0.5 以上で且つ抗 ssDNA 抗体に対する見かけの比が 1.5 以上のもの(図 1, 上部破線より上)が 7 匹(17.5%)であったことから, 遺伝的背景が均一であるにもかかわらず 10 週齢の各々のマウスでポリ ADP-リボースに対する感作状態に差のあることがわかった.

Bd 1 回投与で見られる抗ポリ ADP-リボース抗体価の変動と特異性：図 2, 3 に Bd 投与による抗ポリ ADP-リボース抗体産生の抑制例と Bd 投与に対して無反応の例を示した. 左のカラムは抗体の変化を右のカラムには抗体の特異性が示されている. Bd 投与時(10 週齢)に既に高力価の場合には, その抗体はポリ ADP-リボースに特異的であるのに対して, 低力価で無反応の場合は特異性に乏しいことがわかる.

Bd 投与効果の判定法：抗ポリ ADP-リボース抗体には ssDNA と交叉反応性のものが多く存在

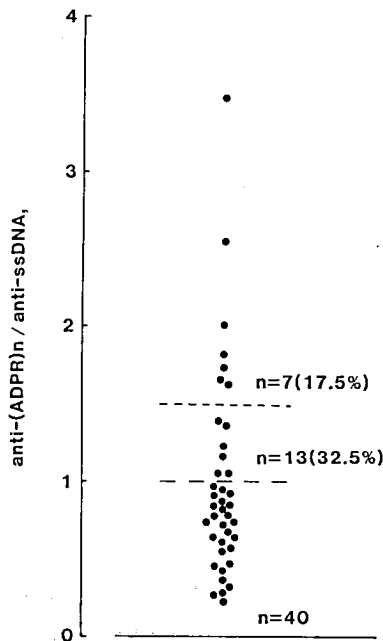


図 1 10 週齢 MRL/l マウス (雌雄) における抗ポリ ADP-リボースと抗 ssDNA 抗体との相対的關係

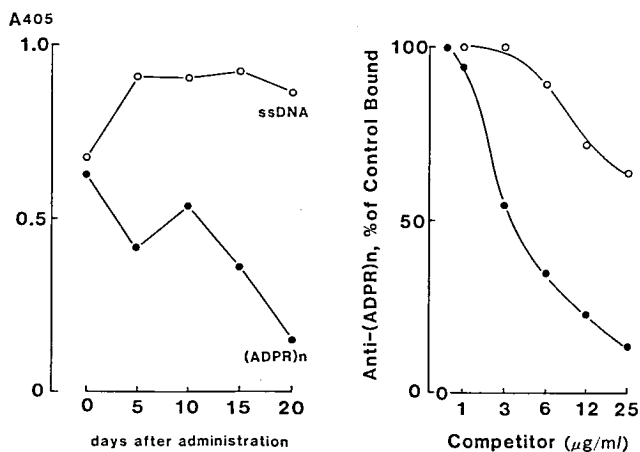


図 2 ベナドロスチンの 1 回投与後の抗ポリ ADP-リボース抗体価の変化 (左) と投与時点における抗ポリ ADP-リボース抗体の特異性 (右) : 効果例

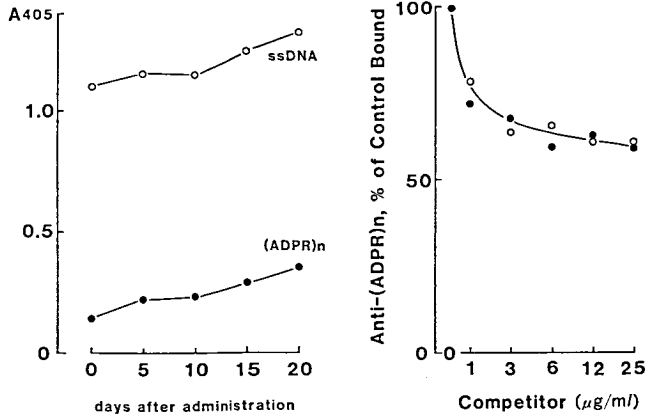


図3 ベナドロスチンの1回投与後の抗ポリ ADP-リボース抗体価の変化(左)と投与時点における抗ポリ ADP-リボース抗体の特異性(右):無効果例

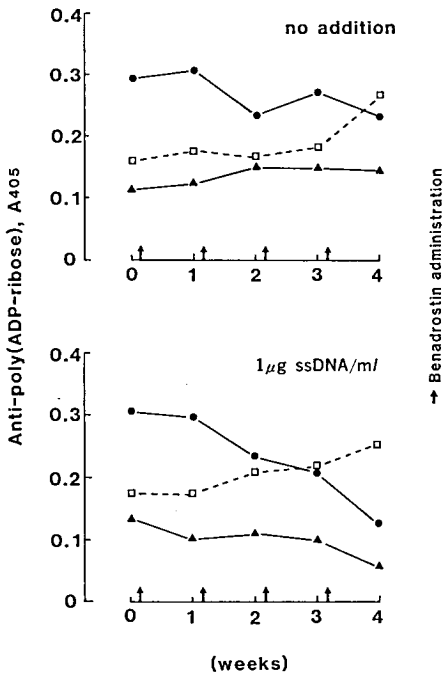


図4 ベナドロスチン連続投与と抗ポリ ADP-リボース抗体の変動

することから¹²⁵I-Bd 投与効果の判定が必ずしも容易でない。この判定を容易ならしめるために、抗ポリ ADP-リボース抗体測定の際の希釈液中に抗 ssDNA 抗体を吸収する目的で 1 μg/ml の濃度で ssDNA を加えてみた。異なる 3 匹の MRL/l について希釈液中に DNA を含まない系と含む系で

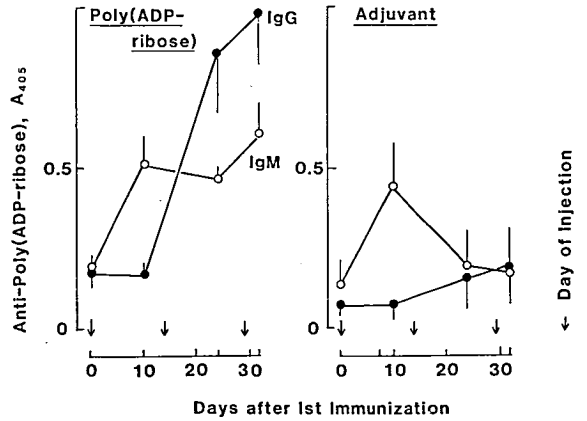


図5 10週齢雌 MRL/l マウス (4 匹) におけるポリ-リボース感作とそれに対する免疫応答

Bd 投与中における抗ポリ ADP-リボース抗体の変化を比較した。この方法によると抑制のみられないもの(▲)(図4上段)でも抑制が見られるようになり(図4下段)また軽度の抑制効果のあるもの(●)(図4上段)では一層抑制効果が明瞭になることがわかる(図4下段)。なお(□)は Bd を投与していない対照マウスである。

MRL/l マウスにおけるポリ ADP-リボース抗原感作と抗ポリ ADP-リボース免疫応答: 図5に 10 週齢雌 MRL/l マウスに観察されたポリ ADP-リボース感作と抗ポリ ADP-リボース免疫

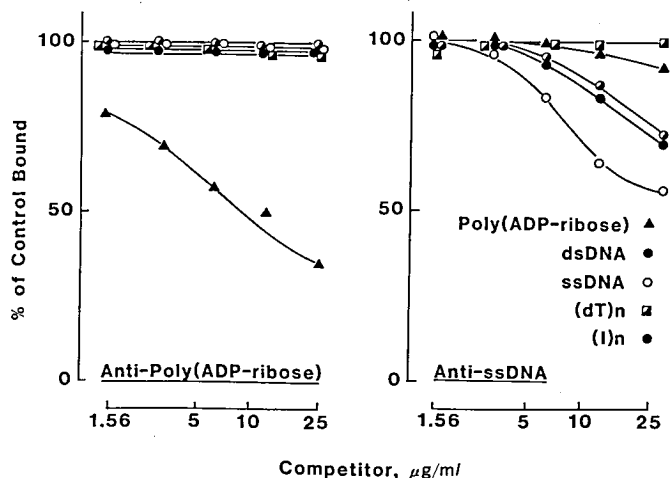


図6 図5にみられた免疫応答の特異性

応答の経過を示した。図左にみられる如く、2回目の感作でIgMからIgGへの明瞭なクラス転換が認められ、ポリADP-リボース抗原に対して強い応答が示された。一方図右にみられるようにアジュバントを用いた対照実験ではクラス転換は認められなかった。

抗原感作によって増強された抗ポリADP-リボース抗体の特異性：図6左に示されている如く、増強抗体は当該抗原によってのみ固相抗原ポリADP-リボースとの結合が抑制され、特異性の強いことがわかった。なお同様にssDNAの感作でも認められる抗ssDNA抗体は図6右に示されている如く、ssDNAに特異性の乏しいことがわかった。

考 察

抗ポリADP-リボース抗体は最初当該抗原に特異性の高い抗体としてヒトSLE血清中に見出されたものであるが⁸⁾、後にMRL/lマウスでの検索の結果、抗ポリADP-リボース抗体と抗ssDNA抗体は相互に交叉する場合の多いことが明らかにされた⁷⁾。しかし今回40匹の10週齢MRL/lマウスの検索では抗ssDNA抗体よりも高値を示すものが17%程度存在することがわかった。さらに軽

度ではあるが、抗ssDNA抗体と凌駕するものを含めると、33%にも及んだ(図1)。10週齢で低値の抗ポリADP-リボース抗体価を示すものはBd投与効果が認められないが、逆に高値を示すものではBdによる抗体抑制を受けやすいということは(図2、図3)MRL/lマウス妊娠例での高仔産群と低仔産群(流産又はIUFD)の存在の説明に都合が良く、Bdの投与による流産・IUFD等の防止の理論的可能性を示唆するものである。Bd投与法の基礎実験として前回は週3回の投与を行い、抗ポリADP-リボース抗体の選択的抑制効果を得たが、今回の検索の結果、週1回投与でもその効果が期待できそうな知見を得た。

一方SLEのような全身性自己免疫疾患では抗原、例えばDNAが抗体産生のトリガーになっているかどうか未解決のままである。ポリADP-リボースは抗原性が強く⁹⁾、SLE合併妊娠で、その経過中ポリADP-リボースに対する選択的免疫応答の増強がみられる³⁾などSLEまたはSLEモデルマウスにおいてポリADP-リボース抗原感作が充分考えられる。これを確かめる実験のひとつとして、10週齢MRL/lマウスをポリADP-リボースで感作してみたところ数回の抗原感作でIgMからIgGへのクラス転換がみられ、明らかに外来の

ポリ ADP-リボース抗原に対応する B 細胞群の存在することが示唆された。

ま と め

1) 10 週齢 MRL/l マウス 40 匹の検索でその 17% に抗 ssDNA 抗体に比して明らかに高値を示す抗ポリ ADP-リボース抗体の存在が認められた。

2) 10 週齢で高力価抗ポリ ADP-リボース抗体を有する MRL/l マウスでは Bd の抗体抑制効果がみられた。

3) Bd 効果は週 1 回投与でもみられる。

4) MRL/l マウスにおける選択的な抗ポリ ADP-リボース抗体の産生にはポリ ADP-リボース抗原の関与が強く示唆された。

文 献

- 1) 横張龍一：共通テーマ，全身性エリテマトーデス (SLE) と妊娠。厚生省特定疾患自己免疫疾患調査研究班昭和 62 年度研究業績，p. 26, 1988.
- 2) Isonishi, S. and Kanai, Y. : Antibody to poly (ADP-ribose) as a predictor of obstetric com-

plication in autoimmune MRL/Mp-*lpr/lpr* mice : Basis for its application to pregnant patients with systemic lupus erythematosus. *Immunol. Lett.*, **18**, 61 (1988)

- 3) Kanai, Y., Isonishi, S. and Terashima, Y. : Antibody to poly(ADP-ribose) is an indicator of obstetric complication in pregnant patients with Systemic lupus erythematosus. *Immunol. Lett.*, **21**, 217 (1989)
- 4) 金井芳之, 山内茂人：ポリ ADP-リボース合成酵素阻害剤(ベナドロスチン)の *in vivo* 抗体産生に及ぼす効果：ループス (SLE) モデルマウスを用いた解析，厚生省新薬開発青柳班昭和 63 年度研究報告書，p. 83, 1989.
- 5) Kanai, Y., Kawamitsu, H., Tanaka, M., Matsushima, T. and Miwa, M. : A novel method for purification of poly(ADP-ribose). *J. Biochem.*, **88**, 917 (1980)
- 6) Kanai, Y., Miwa, M., Matsushima, T. and Sugimura, T. : Comparative studies on antibody and antibody production to poly(ADP-ribose) in mice. *Immunology*. **34**, 501, (1978)
- 7) Kanai, Y. and Fujiwara, M. : Naturally occurring antibodies to poly(ADP-ribose) in autoimmune MRL/Mp-*lpr/lpr* mice. *Clin. Exp. Immunol.*, **59**, 132. (1985)
- 8) Kanai, Y., Kawaminami, Y., Miwa, M., Matsushima, T., Sugimura, T., Moroi, T. and Yokohari, R. : Naturally-occurring antibodies to poly(ADP-ribose) in patients with Systemic lupus erythematosus. *Nature* (London). **265**, 175 (1977)

エリテマトーデスモデルマウスを用いた微生物代謝 二次産物の治療効果に関する研究

藤原道夫*

研究協力者 伊藤 聡*, 斉藤忠雄*, 渡部久実*

I. Prostatin および Dioctatin の効果

エリテマトーデスを自然発症する MRL/*lpr* マウスの多クローン性 B 細胞活性化とループス腎炎の発症に対する上記代謝産物の効果を調べた。両者とも不溶性なので、一定量の粉末を乳鉢にとり、Tween 20 を 2, 3 滴々下して乳棒でよく粉砕し、5%アラビアゴムを加え、1 mg ないし 0.1 mg/ml の懸濁液とした。これらを 10 ないし 1 mg/kg になるようにマウス腹腔内に投与した。マウス 5 週齢から投与を開始し、週 3 回、7 週間に渉って投与を行い、13 週齢目に屠殺して免疫学的検索を行った。既に有効性の示されているデオキシスパーガリン(DSP)5 mg/kg も同様に投与した。

1) 腹腔リンパ節重量に対する影響

MRL/*lpr* マウスは加齢に伴って全身のリンパ節腫脹をきたし、それが抑えられるかどうかはこのマウスを用いて治療効果を検定する場合のよい指標となる^{1,2)}。上記のプロトコールに従って投与して 13 週齢で処分したときの各群の腹腔リンパ節の重量を表 1 に示す。DSP 投与群ではリンパ節腫脹が殆んどみられなかったのに対して、Prostatin ならびに Dioctatin 投与群では腫脹は全く抑えられていなかった。

2) 脾中 IgG 産生細胞数に対する影響

MRL/*lpr* マウスではリンパ腫脹に伴って多クローン性に B リンパ球の活性化がおこり、これは

脾中の免疫グロブリン、特に IgG 産生細胞数を算定することによって推し測ることができる^{1,2)}。実験各群の脾中 IgG 産生細胞数を表 2 に示す。DSP 投与群では著しく低下していたが、他群は未処置マウスに比して有意差はなかった。

3) 腎糸球体への免疫複合体の沈着に対する影響

腎凍結切片を常法通り FITC-標識抗マウス C 3 で染色し、腎糸球体への免疫複合体の沈着の程度を調べた。蛍光初見は 0 から +4 までの 5 段階に分けた。DSP 投与群では蛍光初見が弱くなっていた(平均 1.4)が、他の群は 2.8-3.3 で有意差はみられなかった。

以上の結果から Prostatin および Dioctatin ともにループス腎炎の発症に対する予防効果はみられないと判定された。

II. MRL/*lpr* マウスのリンパ節腫脹に対するデオキシスパーガリン(DSP)の効果

DSP が MRL/*lpr* マウスにみられるリンパ節の腫脹を抑制することは既に述べた。リンパ節の腫脹は Thy-1, 2⁺, L3T4⁻, Lyt-2⁻, B220⁺細胞の著しい増殖によっていることが分っている。DSP がこの細胞群に対してどのような影響を及ぼすかについて検討した。Thy-1, 2 は biotin 標識抗 Thy-1, 2 → PE 標識 avidin で染色し、B 220 は FITC-標識抗 B 220(Dr. Morse, NIH より供与された)で染色した。Flow cytometer によって末梢

*新潟大学医学部医動物学

表 1 Prostatin, Dioclatin 投与の MRL/*lpr* マウスリンパ節腫脹に対する影響。

マウス数		腹腔リンパ節重量 (g) ±S.E.
Prostatin		
10 mg/kg	4	0.84±0.21
1 mg/kg	4	0.82±0.12
Dioclatin		
10 mg/kg	4	1.24±0.39
1 mg/kg	4	1.21±0.24
DSP		
5 mg/kg	4	0.31±0.04
Untreated	4	1.01±0.20

血より分離したリンパ球について調べた二重染色パターンを図 1 に示す。未処理 MRL/*lpr* マウスで double positive cells は 37.9% だったのに対して、DSP 5 mg/kg 投与群 (c: 13-15 週および 17-19 週, d: 17-19 週) で各 15.0%, 20.1% と減少していた。最も著しい変化は Thy-1, 2⁺, B 220⁺ 細胞の減少だったが、図 2 に示すようにこれは sIgM⁺ の B 細胞の減少によるものではない。全体として B 220⁺ の Thy-1, 2-positive 又は Thy-1, 2 weakly positive T 細胞を減少させており、これがエリテマトーデスの発症を阻止する原因となっていると考えられる。

III. DSP の移植細胞対宿主反応 (GVHR) に対する影響

GVHR はさまざまな条件によって起こり、多彩な免疫学的異常をもたらす。その中にはエリテマトーデスを含む自己免疫疾患を発症する例も知られている。我々は C 57 BL/6 (B 6) マウス脾細胞ないしそれより得た L3T4⁺ T 細胞 (1~5×10⁷ ケ) を (B 6×bm 12*) F₁ ないし bm 12 マウスも移入する実験系を用いた。この系では自然発症マウスよりは軽度ではあるがグループ腎炎を発症してくる^{3,4)}。また肝^{5,6)}・脾⁷⁾にも自己免疫疾患様病変が起ってくることが分ってきた。

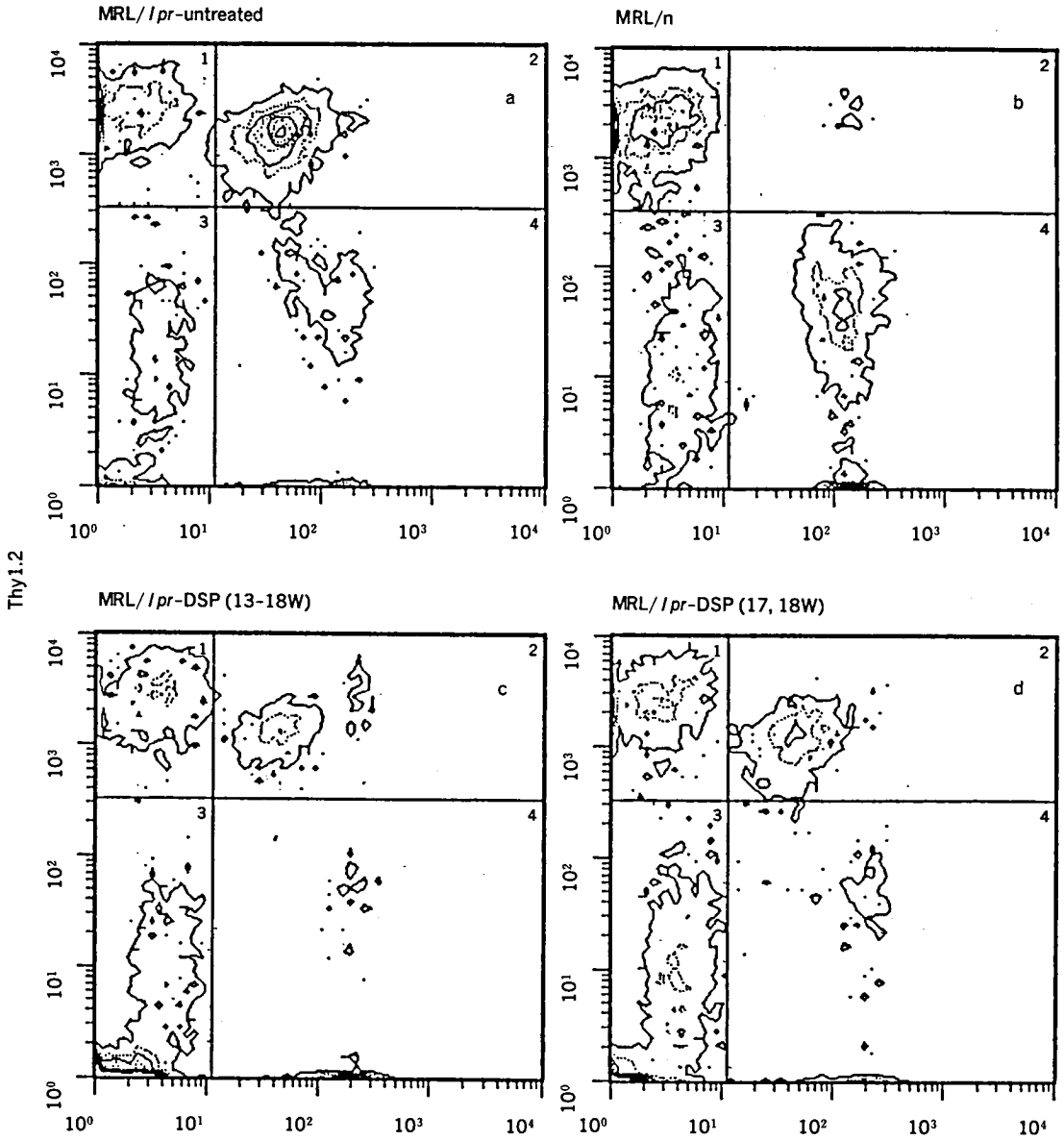
表 2 Prostatin, Dioclatin 投与の MRL/*lpr* マウスにみられる多クローン性 B リンパ球活性化に対する影響。

マウス数		IgGPC (×10 ⁴)/脾 ±S.E.
Prostatin		
10 mg/kg	4	308±46
1 mg/kg	4	367±76
Dioclatin		
10 mg/kg	4	425±101
1 mg/kg	4	383±72
DSP		
5 mg/kg	4	97±7
Untreated	4	341±67

この実験系を用いて DSP 10 mg/kg i.p. の効果を調べた。このとき比較のためシクロスポリン A (CyA, 100 mg/kg per os), シクロフォスファミド (CP, 100 mg/kg i.p.) ロイケラン (Leu 200 μg/kg per os) も用いた。以下に代表的な実験例を示す。

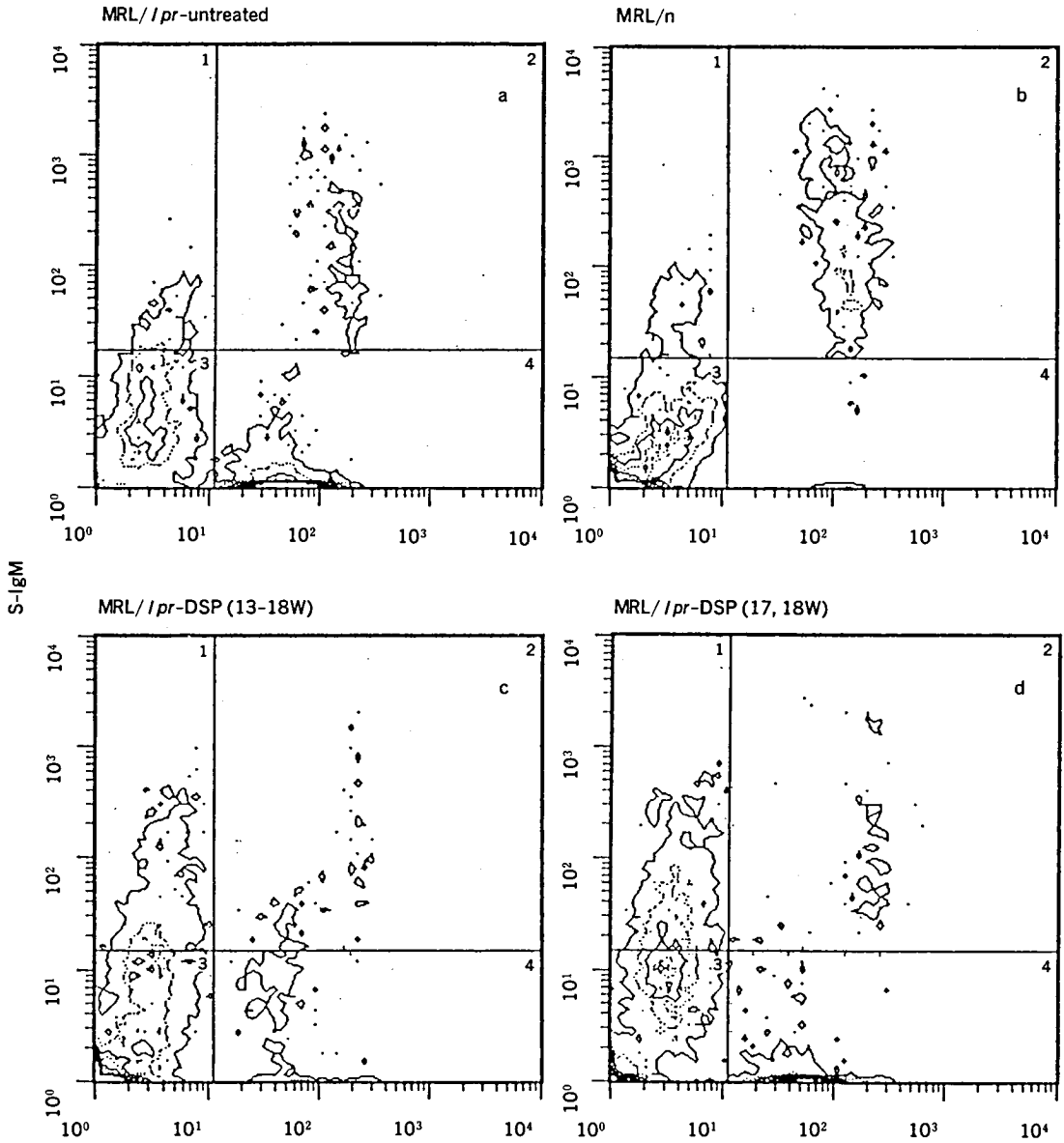
bm 12 マウスに B 6 脾細胞 5×10⁷ を 0 日と 7 日目に移入した。上に述べたサンプルを 0 日から連日 13 日目まで投与し、14 日目に屠殺して検索を行った。GVHR が起こっている一つの指標として多クローン性 B リンパ球活性化が挙げられる。ここでは脾中の IgM および IgG 産生細胞数によって測定した。図 3 に示すように、未処置 (VT, GVHR を起こし、サンプルは投与しない) マウスに比して DSP および CP 投与群では有意に IgMPC, IgGPC とも抑制されていた。CyA の場合は逆に IgPC の著しい増加が観察された。腎糸球体への免疫複合体の沈着程度を免疫蛍光法で調べた。結果は図 4 に示す。CP で最も弱くなっていたが DSP でも C 3 の沈着は完全に抑えられていた。IgG の沈着は弱いながら観察されたが有意に

*bm12 マウス: B6 マウスの IA (Aβ) 変異マウスで、ここのみ異なる。従って移入 B6 L3T4⁺ T 細胞は Ia 抗原の差を認識し、GVHR を起こす。



B220

図 1 DSP 投与の末梢血リンパ球ポピュレーションに対する影響 (1)
 a. 未処置 MRL/lpr マウス末梢リンパ球ポピュレーション
 b. 対照としての MRL/n マウス
 c. DSP 投与 (13-14, 17-18 週齢) MRL/lpr マウス
 d. DSP 投与 (17-18 週齢) MRL/lpr マウス



B220

図 2 DSP 投与の末梢血リンパ球ポピュレーションに対する影響 (2)
 a. 未処置 MRL/lpr マウス末梢リンパ球ポピュレーション
 b. 対照としての MRL/n マウス
 c. DSP 投与 (13-14, 17-18 週齢) MRL/lpr マウス
 d. DSP 投与 (17-18 週齢) MRL/lpr マウス

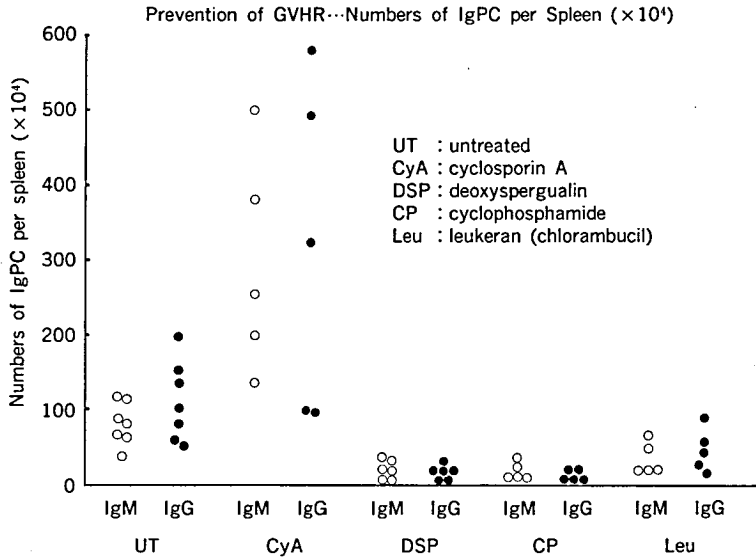


図3 DSPのGVHR抑制効果(1)脾IgPC数に対する効果

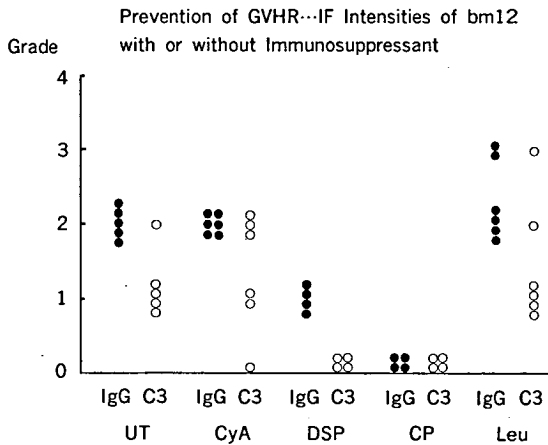


図4 DSPのGVHR抑制効果(2)腎蛍光所見

○: 蛍光陰性, 1: 弱陽性, 2: 中程度陽性,
3: 強陽性, 4: 最強陽性

低下していた。CyAおよびLeuでは抑制は認められなかった。

以上のように、DSPはGVHRによる自己免疫の発現にも抑制的に働くことが示された。その働きはCPに比適していた。現在免疫抑制剤として知られているCyAにはこの系では抑制効果は全くなく、逆に症状を悪化させる面があった。

文 献

- 1) Shiraki, M., Fujiwara, M. and Tomura, S.: Long term administration of cyclophosphamide in MRL/l mice. I. The effects on the development of immunological abnormalities and lupus nephritis. *Clin. Exp. Immunol.* **55**, 333 (1984).
- 2) Makino, M., Fujiwara, M., Aoyagi, T. and Umezawa, H.: Immunosuppressive activities of deoxyspergualin. I. Effect of the long-term administration of the drug on the development of murine lupus. *Immunopharmacology* **14**, 107 (1987).
- 3) Gleichmann, E., van Elven, E.H. and Gleichmann, H.: Immunoblastic lymphadenopathy, systemic lupus erythematosus, and related disorders. *Am. J. Clin. Pathol.* **72**, 708 (1979).
- 4) 伊藤 聡, 齊藤忠雄, 渡部久実, 藤原道夫, 荒川正昭: MHCクラスI移植細胞対宿主反応によるlupus nephritisの抑制. 第19回日本免疫学会総会記録. p. 457, 1989年11月札幌.
- 5) Saitoh, T., Fujiwara, M., Nomoto, M., Makino, M., Watanabe, H., Ishihara, K., Kamimura, T. and Ichida, F.: Hepatic lesions induced by graft-versus-host reaction across MHC class II antigens: An implication for animal model of primary biliary cirrhosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **49**, 166 (1988).
- 6) Saitoh, T., Fujiwara, M., Nomoto, M., Kamimura, T., Ishihara, K. and Asakura, H.: Histologic studies on the hepatic lesions induced

by graft-versus-host reaction in MHC class II disparate hosts compared with primary biliary cirrhosis. *Amer. J. Pathol.* **135**, 301 (1989).

7) 齊藤忠雄, 五十嵐美德, 藤原道夫: L3T4⁺細胞移

入による MHC クラス II 移植細胞対宿主反応 (GVHR) — NOD マウス類似の膵島炎および外分泌腺導管の変化. 第 19 回日本免疫学会総会記録, p. 82. 1989 年 11 月札幌.

各種微生物二次代謝産物による病変の修飾に 関する神経病理学的研究

生 田 房 弘*

研究協力者 武田茂樹*, 永井克孝**

Bactobolin は、ミエリン分画を抗原とするラット EAE に対する抑制効果⁹⁾ばかりでなく、脊髄 homogenate を抗原とするラット EAE に対し治療効果を有する⁶⁾。しかしながら、Bactobolin は急性毒性が強いことが難点であり^{1,2)}、より微量で有効な治療効果を上げる薬剤が望まれる。そこで我々は、まず Bactobolin と他剤を併用することによる EAE の抑制増強効果の有無について検討を加えた。ついで、Bactobolin 単独投与の際の最少有効量について検討した。

I. Bactobolin と他剤併用による EAE 抑制効果

1. 実験材料と方法

Bactobolin は、一昨年⁹⁾の我々の実験⁹⁾で、治療効果が明らかに認められた 0.1 mg/kg 量を用いた。併用した薬剤は、Benadrostin 10 mg/kg^{4,5)}と 15-Deoxyspergualin 5 mg/kg³⁾である。

EAE は 6 週齢雄 Lewis rat 各々 3 匹にモルモット脊髄 homogenate を抗原として作製した。感作日を day 0 とし、薬剤は PBS に溶解し、いずれも発症後から臨床症状の認められる期間腹腔内投与した。動物は全て day 29 で灌流固定した。表 1 に対照 EAE ラットと薬剤投与群の臨床経過を示した。

EAE 病変の検討は、一昨年と同様^{5,6)}嗅球から脊髄円錐に至る全中枢神経系を標本化し、HE, KB

染色を施し組織学的に検討した。

2. 結果とまとめ

臨床的にいずれの薬剤投与群のラットも、対照 EAE ラットに比較し、麻痺の持続時間が短かった。しかし、Bactobolin 単独投与と、併用投与群の間に、差は認められなかった (表 1)。

各群における EAE 病変の数を表 2 に示した。Bactobolin 単独投与、Benadrostin との併用投与いずれも、形成される EAE 病巣は比較的多いが、個々の EAE 病変は小さく、また、対照群に比べて、より慢性化したものが目立つ。一方、15-Deoxyspergualin との併用投与群では、3 例とも、小脳や間脳に癒合性の広範な EAE 病変が認められ、対照群よりも、むしろ強い EAE 病変を示した。

すなわち、Bactobolin は単独では 0.1 mg/kg 量でも、EAE 発症後投与により、Rat EAE を臨床的にも、病理組織学的にも抑制した。また、Benadrostin や 15-Deoxyspergualin と併用しても、その効果は増強されず、特に 15-Deoxyspergualin との併用は、EAE を悪化させる。むしろ、単独投与の方が有効であると思われた。

II. Bactobolin の最少有効量の検討

1. 実験材料と方法

Bactobolin 0.1 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.01 mg/kg の 3 段階の量を腹腔内投与し、対照 EAE と比較検討した。Bactobolin は EAE 発症日より臨

*新潟大学脳研究所実験神経病理学部門

**新潟大学脳研究所神経生物学 (客員) 部門

表 1

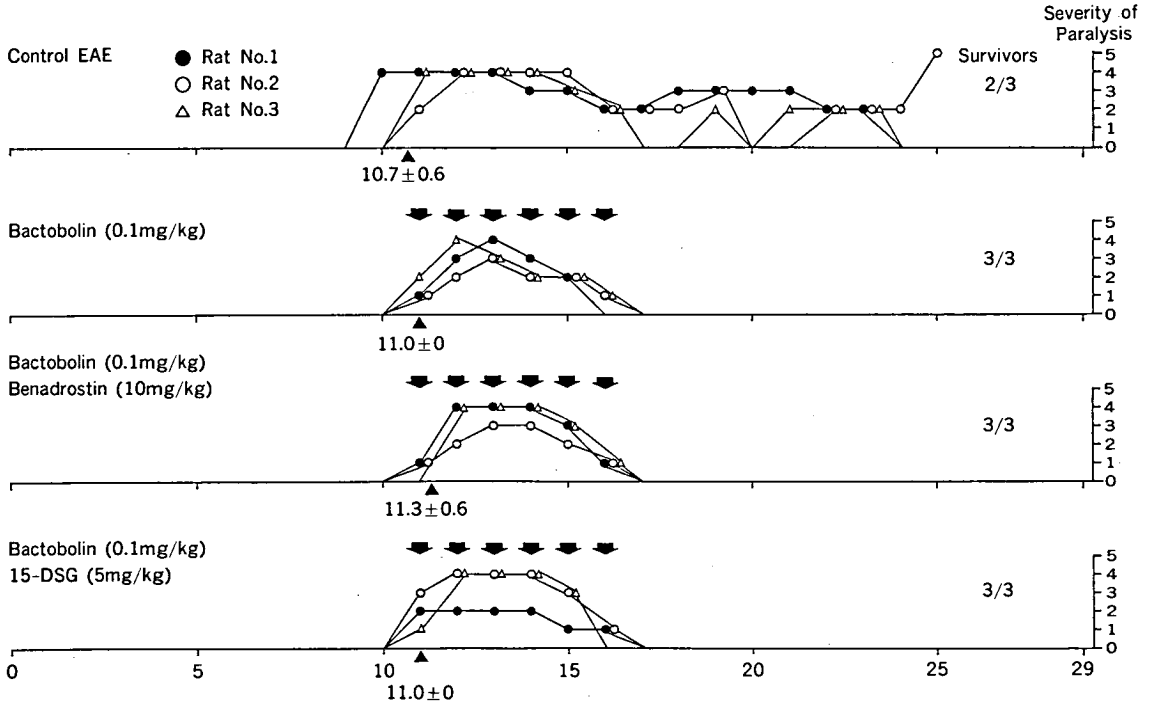


表 2 Suppression of Rat EAE by Bactobolin with or without Other Drugs after Onset

	Dose (mg/kg/day)	Onset (day)	Survivors	Mean No. of lesions
				$\left[\frac{\text{No. of lesions found}}{\text{No. of specimens examined}} \right]$
Control		10.7±0.6	2/3	>13.0±5.6
Bactobolin	0.1	11.0±0	3/3	8.6±1.9
Bactobolin Benadrostin	0.1 10.0	11.3±0.6	3/3	8.8±3.7
Bactobolin 15-DSG	0.1 5.0	11.0±0	3/3	>12.4±3.6

床症状発現期間中、各々上記量を連日投与した。表 3 に対照 EAE ラットと薬剤投与群の臨床経過を示した。

EAE 感作はこれまでと同様に行い、EAE 病変の組織学的検討も全中枢神経系について行った。

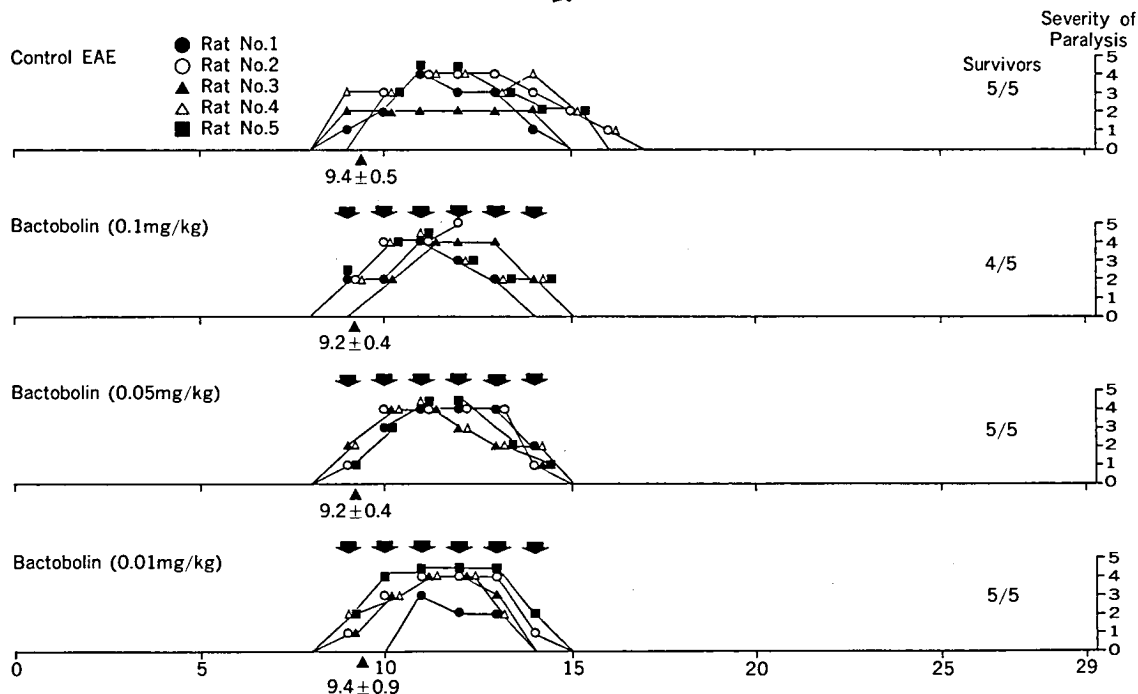
2. 結果

Bactobolin を投与した 3 群は、いずれも、ほぼ同様かつ同程度の EAE 症状を呈した。0.1 mg/kg

投与群の No. 2 ラットが cannibalism により day 12 で死亡した以外、全例回復した。組織学的検索は、0.1 mg/kg 投与群の No. 2 ラットを除いて行った。

対照群ではいずれも癒合性の大病巣は少なかった。血管周囲性の gliosis を伴う比較的古い脱髄病巣も多いが、単核細胞の浸潤像を示す新しい病巣も目立った (図 1)。

表 3



Bactobolin 0.1 mg/kg 投与群では、臨床的に比較的軽症に経過した No. 1 ラットに、対照 5 例いずれのラットよりも強い EAE 病巣を認めた。検索した全ての切片で、病変は癒合的で大型ないし中等大であり、比較的古い病変が目立つが、新しい病巣も混在していた。これ以外の 3 例では、病巣は微小かつ比較的古いものが多かった(図 2)。

Bactobolin 0.05 mg/kg, 0.01 mg/kg 各々を投与した群は、同様の組織像を示した。両群ともに、癒合性の広範な脱髄病巣(図 3)を示すラットが多く、それ以外でも、大型から中等大の脱髄病巣を多数認めた。いずれも対照群に比較し、強い病巣を示した。

3. 考案

Bactobolin が牛脳塩基性蛋白(MBP)を抗原とするラット EAE に対し、感作日より連日、および発症後連日投与いずれでも、抑制効果を有することは田平らにより示された⁹⁾。

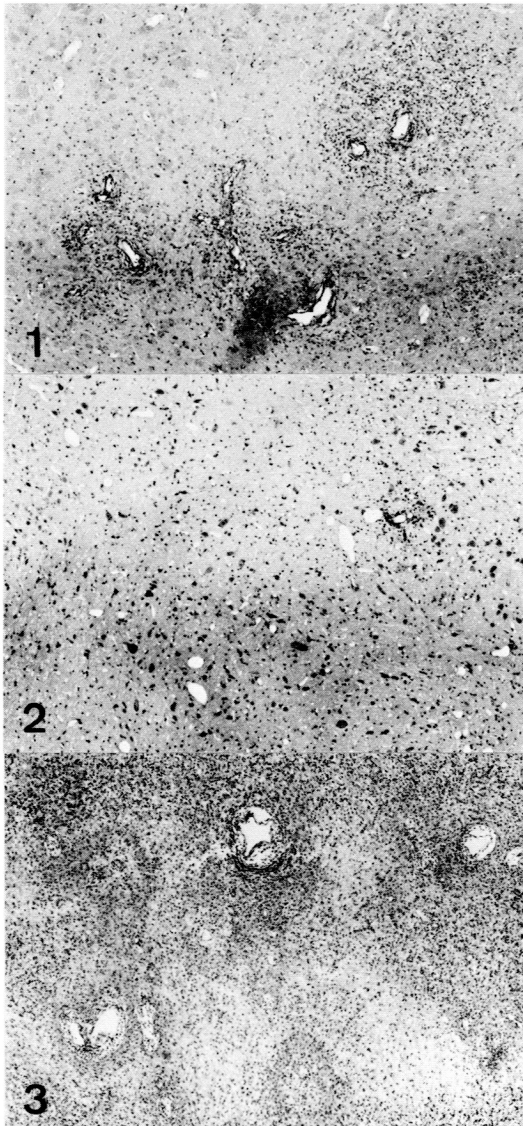
他方我々は、モルモット脊髄 homogenate を抗

原としたラット EAE 系では、感作当日からの投与では本剤の抑制効果は期待できず、むしろ EAE 発症後の連日投与で初めて抑制効果が得られることを示した⁶⁾。

また、EAE 系に対し、現在まで検討された Bactobolin の投与量は、体重 1 kg あたり 3 mg, 1 mg, 0.6 mg, 0.5 mg, 0.3 mg, 0.1 mg の各量である^{6,8,9)}。本剤の誘導体である Actinobolin は安全域が広いものの、EAE に対する有効な治療効果は見出されておらず^{7,10)}、急性毒性の強い本剤の最少有効量を知ることは重要である。

今回の実験で、0.1 mg/kg 投与群 4 例中の 3 例では、殆どは微小な EAE 病変を認めるのみであり、有効な治療効果を示していた。しかしながら 1 例に強い EAE 病変を認めたことは、注意しておく必要があると思われた。

また、0.05 mg/kg および 0.01 mg/kg 群で、対照例でも認められない癒合性の広範な脱髄巣を多くのラットで認めたことは重要と思われた。なぜなら、Bactobolin はこのような少量では、逆に



- 図 1 対照 EAE ラット. 中等大の病変が多い. 大脳. HE 染色. $\times 45$.
- 図 2 Bactobolin 0.1 mg/kg 投与ラット. 微小な EAE 病変を少数認めるにすぎない. 大脳. HE 染色. $\times 45$.
- 図 3 Bactobolin 0.05 mg/kg 投与ラット. 癒合性の広範な脱髄病巣を認める. 小脳. HE 染色. $\times 45$.

EAE 病変を増強することをこの結果は示しているように思われるからである. 0.6 mg/kg 投与例⁸⁾でも, 同様な癒合性の広範な EAE 病変を多くのラットで認めており, Bactobolin の薬効を追求し

ていく上で, 考慮しておかなければならない所見と思われた.

4. ま と め

脊髄 homogenate を抗原とするラット EAE 系では, Bactobolin の最少有効量は 0.1 mg/kg と推定された. より少量である 0.05 mg/kg, および 0.01 mg/kg では逆に EAE 病変を増強させる効果のあることを認めた.

文 献

- 1) 青柳高明, 小川慶治, 小島路子, 永井真知子, 原田滋子: 生理活性物質の概要. 厚生省新薬開発研究費, 青柳班, 昭和 62 年度研究報告書, 17-23 (1988).
- 2) 深津俊三, 魚沼和道, 武部英日, 今井 敏: 微生物二次代謝産物の開発研究. 厚生省新薬開発研究費, 青柳班, 昭和 62 年度研究報告書, 151-157 (1988).
- 3) 生田房弘, 武田茂樹, 永田伴子, 永井克孝: Spergualin (SPG) による急性 EAE の抑制. 厚生省新薬開発研究費, 青柳班, 昭和 60 年度研究報告書, 59-64 (1986).
- 4) 生田房弘, 武田茂樹, 永田伴子, 永井克孝: 15-Deoxyspergualin の急性 EAE に対する抑制—長期観察と Benadrostin との併用—. 厚生省新薬開発研究費, 青柳班, 昭和 61 年度研究報告書, 69-76 (1987).
- 5) 生田房弘, 武田茂樹, 永井克孝: 15-Deoxyspergualin と Benadrostin の併用投与による急性 EAE の抑制. 厚生省新薬開発研究費, 青柳班, 昭和 62 年度研究報告書, 89-91 (1988).
- 6) 生田房弘, 武田茂樹, 永井克孝: Bactobolin による急性 EAE の抑制. 厚生省新薬開発研究費, 青柳班, 昭和 62 年度研究報告書, 93-95 (1988).
- 7) 生田房弘, 武田茂樹, 永井克孝: Actinobolin と Diprotin A の急性 EAE に対する影響. 厚生省新薬開発研究費, 青柳班, 昭和 63 年度研究報告書, 97-101 (1989).
- 8) 永井克孝, 小山内たか, 村上隆稔, 武田茂樹, 生田房弘: 実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) に関する二次代謝産物治療剤の検索. 厚生省新薬開発研究費, 青柳班, 昭和 63 年度研究報告書, 103-106 (1989).
- 9) 田平 武, 姚 大林, 山村 隆: Bactobolin と arphamenine A の EAE 抑制効果について. 厚生省新薬開発研究費, 青柳班, 昭和 61 年度研究報告書, 51-53 (1987).
- 10) 田平 武, 本山和徳, 田平順子, 西澤正豊, 宇宿功市郎: 自己免疫性脳脊髄炎, 神経炎の治療薬開発. 厚生省新薬開発研究費, 青柳班, 昭和 63 年度研究報告書, 49-55 (1989).

実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) に関する 二次代謝産物治療剤の検索

永井克孝***

研究協力者 小山内たか*, 村上隆稔*, 武田茂樹***, 生田房弘***

bactobolin はラット EAE に対して 0.3 mg/kg 以下の投与でも治療効果を有していることが認められた¹⁾。なるべく低濃度での投与が望まれ、その結果 0.1 mg/kg の濃度でも治療効果を認めた²⁾。でその効果の再現性について検討した。しかしながら、この薬剤は毒性が強いため、その使用には限界が予想される。その為に、bactobolin で認められた治療効果と同等あるいはそれ以上の効果を示す薬剤の検索が急務である。今回は新しく bactobolamine, poststatin, dioctatin A をとりあげ、ラット EAE への治療効果を比較検討した。

実験材料と方法

7週齢ルイスラット雌にモルモット脊髄抗原を感作した。使用した薬剤の種類と投与量を表 1 に示した。薬剤は PBS 溶液あるいは tween 80 と 0.5%アラビアゴム・PBS 溶液として調整し腹腔内投与を行った。投与は発症直後から開始し、麻痺のみられる期間中に行った。EAE 症状の評価は動作緩慢、立毛等の一般状態の悪化を 1、歩行障害を 2、下肢麻痺を 3、四肢麻痺を 4 とし、これらに失禁、下痢等が加わった場合に 1 を加えた 5 段階評価とした。

EAE 病変程度の評価は次のように行った。すなわち、感作後 38 日目に表 2 で示された control,

bactobolin (0.1 mg/kg) と poststatin (1.0 mg/kg) 投与群ではすべて 4% paraformaldehyde による灌流固定を、poststatin (0.1 mg/kg) 投与群は 10% formalin による浸潤固定を行った。嗅球から馬尾にいたる全中枢神経系に約 2 mm 厚の、43~54 の割を加え、paraffin 包埋後、得られた切片に HE, KB 染色を施行した。組織検索は前例について、血管周囲性の EAE 病変をかぞえるとともに、病変の新旧と、その大きさにも着目し、比較検討した。

結果と考察

EAE ラットの臨床経過と病変数を調べた結果を表 1 と表 2 に示した。ラットは全例 11 日目に発症し、薬剤の投与は同日から開始した。11~30 日目までの各群 (5 匹分) について total clinical scores で比較した時、control 群に対して有意な治療効果を示したのは bactobolin 0.1 mg/kg 投与群であった。しかし、1.0 mg/kg 投与群では 5 匹中 2 匹がこの期間中に死亡した。これは本剤の強い毒性によるものと思われた。

bactobolamine, poststatin, dioctatin A の投与では、total clinical scores からは有意な治療効果は認められなかった。今回は、比較的 total clinical scores の少なかった bactobolin 0.1 mg/kg と poststatin (0.1 mg/kg, 1.0 mg/kg) 投与群について病理組織学的に検討した。

Control 群について：5 例の 1 切片あたりの EAE 病変数は 30.6 ± 10.6 であった。No. 1, 2 は病

*東京大学医学部生化学

**新潟大学脳研究所神経生物学 (客員) 部門

***新潟大学脳研究所実験神経病理学部門

表 1 Effects of protease inhibitors on EAE in rats

Inhibitors	No. of animals	Clinical scores/5 rats/day (11-30 days after immunization)																													Total clinical scores
		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31									
Control (none treatment)	5	(15	15	19	9	5	5	4	4	2	1	3	4	4	3	2	1	2	5	3	3)	109									
Bactobolin																															
0.1 mg/kg	5	(7 ^b)	11	14	10	5	5	0	0	0	1	0	1	0	1	0	2	3	1	2	2)	65 ^{b)}									
0.1 mg/kg	5	(9	14	14	10	4	2	1	0	0	1	1	1	2	1	1	2	1	0	3	0)	67									
1.0 mg/kg	5	(11	12	8+D ^{***3}	3	3	1	2	0+D ^{***4}	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0)	—									
Bactobolamine																															
1.0 mg/kg	5	(12	14	15 ^{b)}	9	5	5	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4)	104								
1.0 mg/kg	5	(15	13	15	9	5	4	3	0	0	1	0	0	0	2	4	3	2	0	0	0)	76									
10.0 mg/kg	5	(12	13	16	5	4	4	0	0	0	0	0	0	0	1	3	2	2	0	0	0)	73									
Poststatin*																															
0.1 mg/kg	5	(9 ^{b)})	13	17	13	5	5	1	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1	0	2	1)	70									
1.0 mg/kg	5	(9 ^{b)})	12	14	12	5	3	0	0	0	0	0	1	1	1	2	1	0	1	2)	66										
Dioclatin A**																															
0.1 mg/kg	5	(15	15	18	14	8	7	6	5	3	7	6	6	4	3	2	1	1	0	0	0)	121									
1.0 mg/kg	5	(7 ^{b)})	11 ^{a)}	15	14 ^{b)}	7	5	3	2	1	0	0	3	4	2	2	0	1	0	1	1)	79									

Ag: guinea pig spinal cord homogenate, FCA: Aoyama B. Poststatin*. Prolylendopeptidase inhibitor. Dioclatin A**: Dipeptidylaminopeptidase inhibitor. D***: One of rats died. a): $p < 0.01$, b): $p < 0.05$. The differences in clinical scores between control and inhibitor-treated groups were assessed using Cochran-Cox test.

表 2 Effects of protease inhibitors on EAE in rats

Inhibitors	No. of animals	Total clinical scores	Lesion/Section	Mean±SD
Control (none treatment)	1	20	961/43=22.3	30.6±10.6
	2	14	852/49=17.4	
	3	19	2097/48=43.7	
	4	22	1747/49=35.7	
	5	34	1556/46=33.8	
Bactobolin (0.1 mg/kg)	1	10	550/46=12.0	17.6±6.9
	2	25	1059/51=20.8	
	3	10	823/51=16.1	
	4	8	1370/49=28.0	
	5	12	753/51=11.2	
Poststatin (1.0 mg/kg)	1	6	786/45=17.5	21.4±13.4 {No. 1, 2, 3 では 13.3±7.5}
	2	23	799/45=17.8	
	3	12	211/46=4.6	
	4	13	1177/45=26.2	
	5	12	2045/50=40.9	
Poststatin (0.1 mg/kg)	1	13	697/54=12.9	/ {No. 1, 3, 4, 5 では 12.0±2.8}
	2	11	>1133/51=22.2	
	3	17	418/46=9.1	
	4	14	561/53=10.6	
	5	15	714/46=15.5	

変数が少なく、癒合性の病変も少ない。gliosis を伴う慢性期にあると思われる病変が多いが、単核球の浸潤を伴う新しい病変も認められた。他の3例では、癒合性で比較的大きな病変が多く、単核球の浸潤を伴うものが目立っていた。小さな病変でも新しいものが混在していた(図1)。

Bactobolin 0.1 mg/kg 投与群について：5例の1切片あたりのEAE病変数は、control群との間に有意差は認めなかった。しかしながら、癒合性の病変は明らかに少なく、control群より単核細胞の浸潤を伴わない古いものが目立っていた(図2)。病巣の大きさと新旧病変の比較からbactobolinは、いったん形成されたEAE病変の進行を抑制している可能性が推測された。

Poststatin 1.0 mg/kg 投与群について：1切片あたりの病変数はばらつきを示し、平均値は

21.4±13.4であった。No.3のように極めて少数のEAE病変を示す例やNo.5のようにcontrolと同程度の病変を認める例があった。control群のNo.3,4,5に認めた癒合性の大病変を示す例はないが、No.3以外では中等大の病変が目についた(図3)。単核球の浸潤を伴う病変がbactobolin投与例よりも目立っていた。

Poststatin 0.1 mg/kg 投与群について：この群は10%formalinによる浸潤固定の為に他の3群よりも標本がよみにくい。No.2以外の1切片あたりの病変数は12.0±2.8でcontrol群にくらべ明らかにEAE病変数は少なかった。1 mg/kg投与群よりも小さな病巣が目立っていた。新旧の病巣の混在は、ここでも認められた(図4)。

1 mg/kg 投与群では、No.3のように、極端にEAE病変が軽い例もあるが、他の4例の結果から

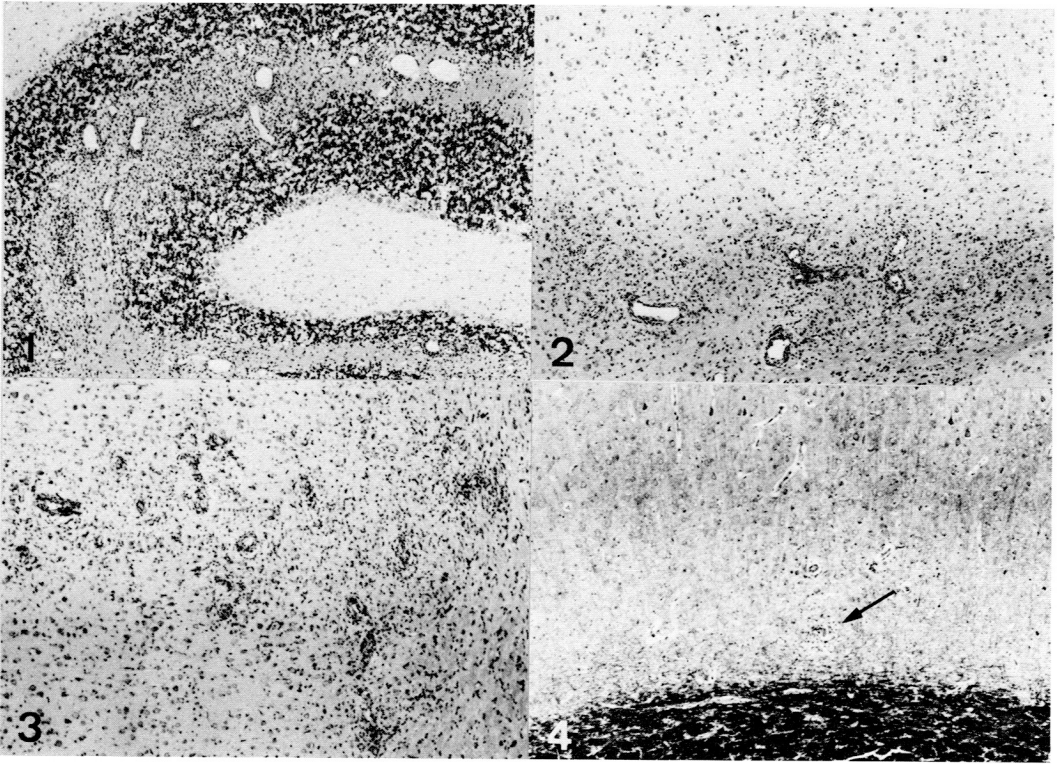


図 1 対照 EAE ラット．癒合性で比較的大きな病変を認める．小脳，KB 染色．×45.
 図 2 Bactobolin 0.1 mg/kg 投与ラット．癒合性の病変はなく，小型ないし中等大の病変が多い．大脳，KB 染色．×45.
 図 3 Poststatin 1.0 mg/kg 投与ラット．癒合性の大病変はない．多くの病変は中等大で，数も多い．大脳，KB 染色．×45.
 図 4 Poststatin 0.1 mg/kg 投与ラット．微小病変（矢印）を少数認めるにすぎない．大脳，KB 染色．×45.

はこの量では抑制効果があるとはいえない．一方，0.1 mg/kg 投与群では，No. 2 以外は EAE 病変は明らかに少なく，抑制効果が得られた可能性がある．しかしながら，組織固定の問題もあり，追試で確認することが望まれた．

以上の結果より，ラット EAE に対して bacto-
 bolin 0.1 mg/kg で再現性ある治療効果が認められた．病理組織学的所見から，poststatin について EAE 抑制効果が予想される結果が得られたので，さらに検討を加える．

文 献

- 1) 永井克孝，小山内たか，村上隆稔，武田茂樹，生田房弘：実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)に関する二次代謝産物治療剤の検索，厚生省新薬開発青柳班，昭和 63 年度研究報告書．p. 103-106, 1989.
- 2) 生田房弘，武田茂樹，永井克孝：各種微生物代謝産物による病変の修飾に関する神経病理学的研究．B. Bactobolin による急性 EAE の抑制．厚生省新薬開発青柳班，昭和 62 年度研究報告書．p. 93- 95, 1988.

インパルス応答から見た各種免疫調節剤の 作用解析と比較

和田孝雄*

研究協力者 小森正樹*, 黒田重臣**

緒 論

免疫学の領域においては、Jerne に代表されるようなネットワーク理論に基づくシステム論的な考えかたが根づいている。またそれを反映して、システム工学的な立場から免疫系にアプローチしようとする試みも決して少なくはない^{1,2)}。しかし、この10年間における生化学の急速な進歩とあいまって、免疫制御に関与する因子が次々と知られるようになり、従来の微分方程式を中心としたモデリング手法では、免疫ネットワークの取扱いがきわめて困難な状況が出来上ってきている。

和田らは7年間にわたって、文部省統計数理研究所所長、赤池弘次博士が開発した自己回帰モデルによるフィードバック解析法³⁻⁵⁾をライフサイエンスに取入れる試みを行なってきた。それによって、この方法は内分泌学、代謝学、免疫学などのデータ解析に適用可能であるという証明が得られてきている⁶⁻¹²⁾。

この方法を用いて、われわれは昨年までの青柳班の研究で免疫調節剤の作用幾序について研究を推し進めてきた。今回の研究では、ベスタチン、カルフェニール、サラゾピリンなどの各種免疫調節剤の免疫ネットワークに及ぼす影響について探求した。

方 法

1. 対象患者と検査項目

正常コントロール2名、全身性エリテマトーデス1名、慢性関節リウマチ6名、慢性血液透析患者3名について、30週ないし60週にわたり、毎週1回、末梢静脈から採血し、血漿IgG、CD4、CD8を検査した。各種の免疫調節剤を投与し、サラゾピリンについては血中濃度を測定し、投与量または血中濃度の変動が免疫ネットワークに及ぼす影響についても研究した。

2. 多変量自己回帰モデルのあてはめ

多変量自己回帰モデルは以下の式によって表わされる。

$$X_i(s) = \sum_{m=1}^M \sum_{j=1}^K a_{ij}(m) x_{ij}(s-m) + n_i(s)$$

この式の意味するところは、ある変数 x_i の現在の値を他のいくつか (K 個) の変数 x_j (自己をもふくむ) の過去の m 時点における値の重み付け総和、つまり線形和として表現することにある。この時の重み付け係数を自己回帰係数と呼ぶ。 $n_i(s)$ は上記の線形和ではうまくあてはまらない誤差部分であり、これをホワイトノイズと呼ぶ。

まず実測値からなる時系列データに対して式1のあてはめを行なう。その原理は一般的な統計手法において、たとえば X と Y の観測値から $Y = aX + b$ という形の理論的回帰曲線を求めるのと

*慶応大学腎臓センター

**国立大蔵病院内科

同じである。つまり最小自乗法を用いて実測値と理論値との誤差つまりホワイトノイズ $n_i(s)$ が小さくなるように自己回帰係数を選べばよいのである。ただし、式 1 において、過去のいくつかの時点 (m) までさかのぼればよいかを決めること、つまり最適次数 M を決定するのが難しく、この点については赤池が考案した AIC (赤池情報基準量) を用いた高度な計算法が用いられる。

こうして自己回帰係数が決定すれば、その時系列データに最適の自己回帰モデルが決定したことになる。これを用いて赤池のパワー寄与率を算出し、また以下の方法でインパルス応答を求めたが、今回はパワー寄与率についての検討は省略する。

3. インパルス応答

自己回帰係数 $a_{ij}(m)$ は x_i の過去の動きが x_j の現在の動きに対して影響を与える程度を規定する係数である。したがって自己回帰係数行列を利用して系のダイナミクスを表現する状態方程式を作ることが出来る。

以下の式は赤池の状態空間表示として知られるものである。

$$Z(s) = \Psi Z(s-1) + V$$

ここで Z, V, Ψ は全て行列である。ことに Ψ は以下のごとく自己回帰係数からなる行列である。

$$\Psi = \begin{bmatrix} A(1) & A(2) & \dots & A(M-1) & A(M) \\ I & O & \dots & O & O \\ O & I & \dots & O & O \\ O & O & \dots & O & O \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot & \cdot \\ O & O & & O & O \end{bmatrix}$$

ここで行列の要素 A(1), A(2) ... などは、それ自身も行列である。また I および O は上記の式と同じく、単位行列ならびにゼロ行列である。また上記の式において Z(s) は状態変数と呼ばれ、観測値

行列 X(s) から次の式で求められる。

$$X(s) = HZ(s)$$

$$H = [I \quad O \quad O \dots O]$$

また V はホワイトノイズに相当する部分の行列である。

$$V(s) = \begin{bmatrix} N(s) \\ O \\ O \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ O \end{bmatrix}$$

ここで I および O は上記の式と同じく、単位行列ならびにゼロ行列である。上記の状態方程式において、まず Z と V の要素をすべてゼロの状態にして置き、ある時点 s でホワイトノイズ行列の中のある特定の変数に該当する要素にインパルスとして 1.0 というような値を入力する。こうして Z(s), Z(s+1), Z(s+2) を、1 段階前の状態変数から次々に求めて行き、その行列の各要素をプロットして行けば、各変数の変化を図示することが出来る。これがインパルス応答と呼ばれるものである。

結 果

1) リウマチ性疾患患者と透析患者における免疫調節異常の相違点

図 1 の上半分にはリウマチ性疾患患者における IgG 対 CD4 の応答を示す。IgG にホワイトノイズの 2SD に相当する大きさのインパルス入力を行った時の CD4 の応答を見ると、コントロールでは CD4 が陰性の応答を示すのに対して、RA 患者では陽性の応答を示している。また SLE では CD4 が低下と上昇をくりかえし、系の不安定性を示している。図の下半分には透析患者における応答を比較のために示してある。

透析患者においては CD4 の応答が非常に遅延し

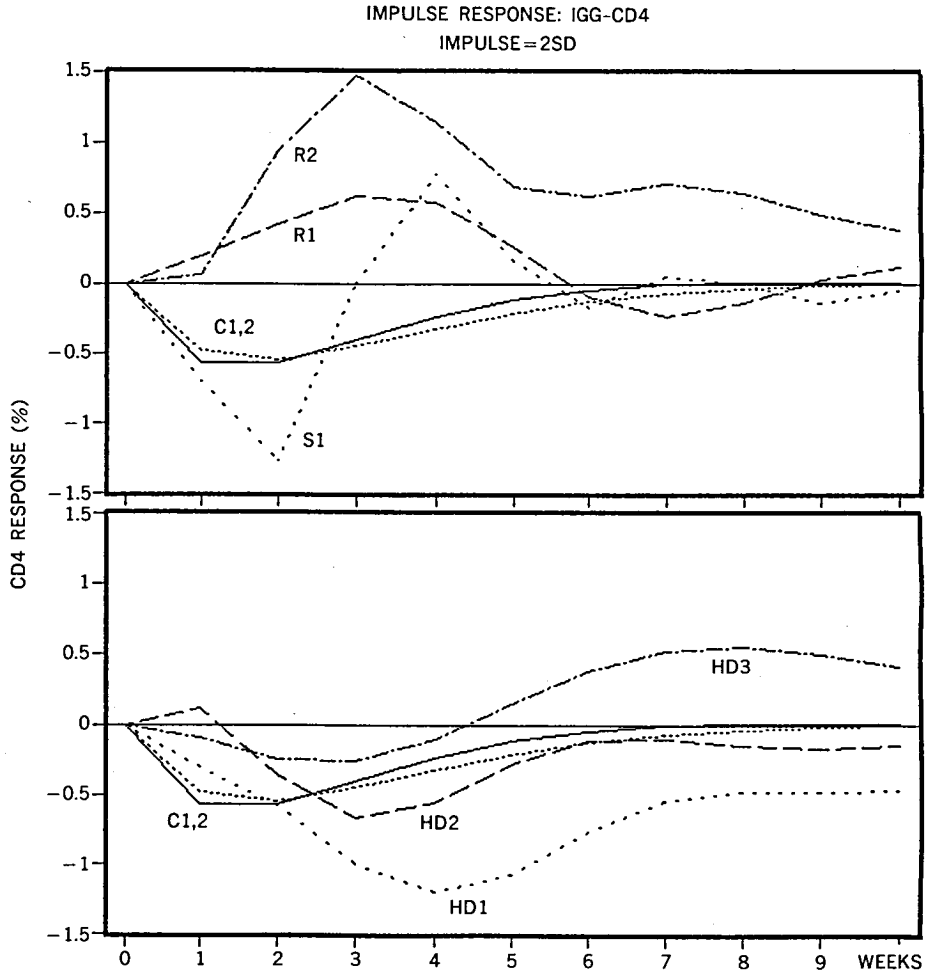


図 1 IgG にインパルスを与えた時の CD4 の応答。凡例は以下の通り。

- C1 : コントロール 1
- C2 : コントロール 2
- S1 : SLE 患者
- R1 : RA患者 1
- R2 : RA患者 2
- HD : 透析患者

ていることが一見して認められる。

図 2 は CD4 にインパルスを与えた時の IgG の応答を示す。2 例のコントロールにおいては陽性応答を示したのに対し、RA2 では応答が弱く、SLE および RA1 では陰性応答が見られた。このことはこれらの疾患において CD4 細胞にヘルパー細胞の機能が失われている可能性を示しているが、CD4/8 比の点から見た SLE と RA1 症例の

類似性に一致する所見である。透析患者では 2 例において陰性応答が見られるが、残りの 1 例では逆応答になっている。しかし、いずれにせよ応答様式は 3 例ともに非常に緩徐であり、これが透析患者における大きな特徴となっているように思われる。

以上のごとき各病態に特有な免疫ネットワーク異常様式は、当然ながら免疫調節剤の効果発現に

IMPULSE RESPONSE: CD4-IGG
IMPULSE=2SD

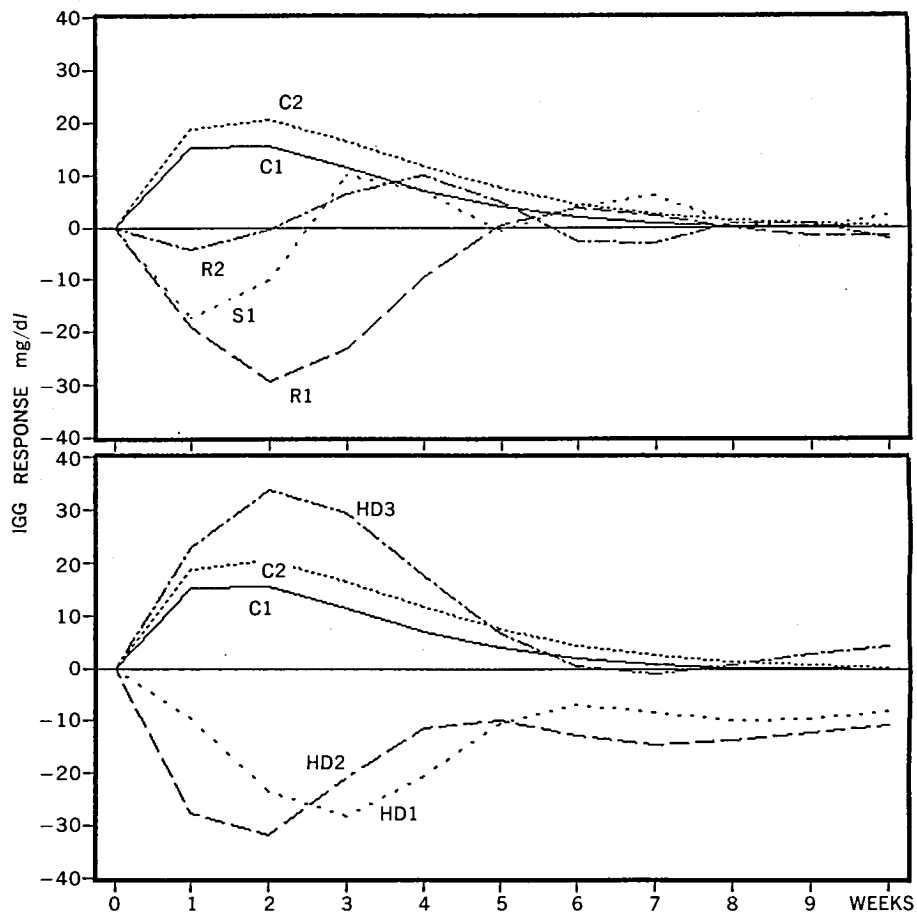


図2 CD4にインパルスを与えた時のIgGの応答。凡例は図1と同じ。

も影響を与えると思われる。このような背景をふまえて以下の解析を進める。

2) 各免疫調節剤の作用解析

図3-5にカルフェニールによるIgG, CD4, CD8のインパルス応答を示す。図3はIgGの応答であるが、2例のリウマチ患者ではコントロールに比べてかなり強い陽性応答が見られる。

図4はCD4の応答であるが、コントロールでは陰性応答であるのに対して、リウマチ患者では2例ともに陽性応答を示している。

図5はCD8の応答である。コントロールおよび1例のリウマチ患者(RA2)では強い陽性応答が見られるのに対して、もう1例のリウマチ患者

(RA1)ではむしろ陰性の応答が見られる。これは先にのべたIgGの応答と結びつけて考えるとよく説明される。すなわちRA2ではIgGの応答が強いためにCD8がそれを抑制しようとして、強く陽性に応答したように思われる。

図6-8にコントロールおよび透析患者におけるベスタチンによるインパルス応答を示す。図6はベスタチンに対するIgGの応答である。透析患者では3例ともに強い陽性応答を示すのに対して、コントロールではごく弱い陰性応答を示している。

図7はベスタチンに対するCD4の応答を示す。この応答はIgGの応答に対してほぼ逆方向の応

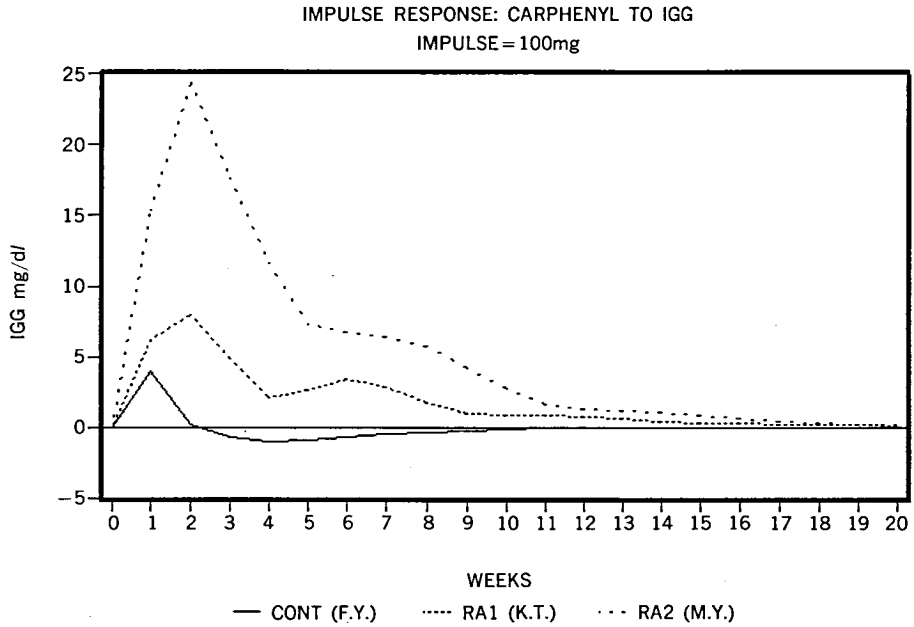


図 3 カルフェニールに対する IgG のインパルス応答。

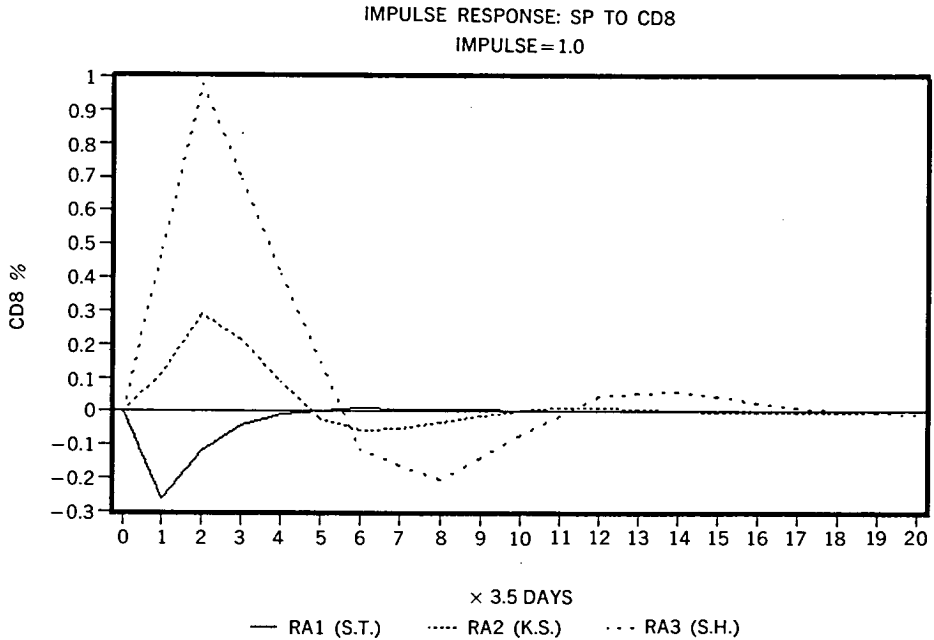


図 4 カルフェニールに対する CD4 のインパルス応答。

答を示しており、しかもそのタイミングから見て IgG によって動かされている部分が多い。

図 8 はベスタチンに対する CD8 の応答を示す。CD4 の場合とは異なり IgG の応答によって動かされている部分は少ない。もし IgG の応答によ

て動かされているとすれば、むしろ陽性の応答となるべきところであるが、そうはなっていない。

これらの状況を矛盾なく説明するには、ベスタチンはむしろ B 細胞に作用すると考えるのが妥当であろう。

IMPULSE RESPONSE: CARPHENYL TO CD8
IMPULSE = 100mg

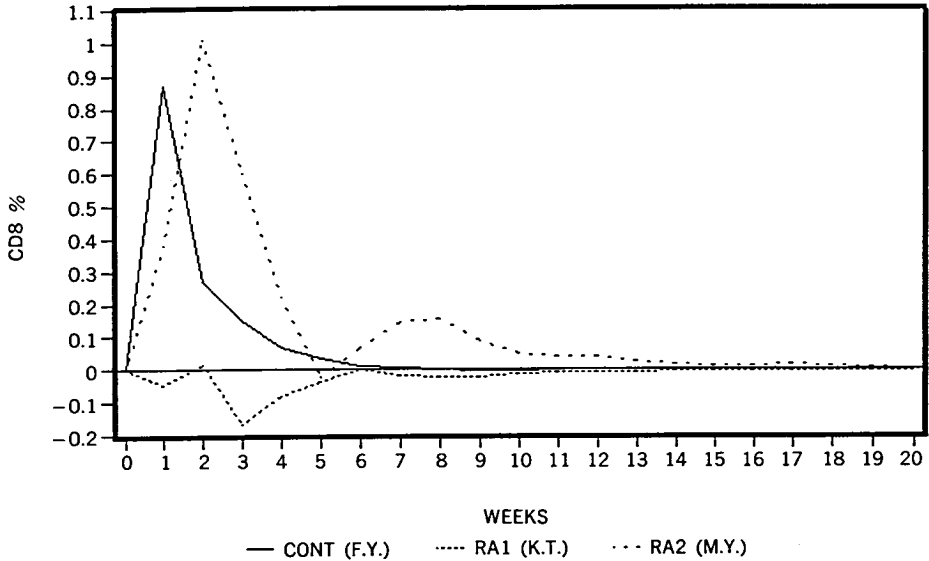


図 5 カルフェニールに対する CD8 のインパルス応答。

IMPULSE RESPONSE: BESTATIN TO IGG
IMPULSE = 20mg

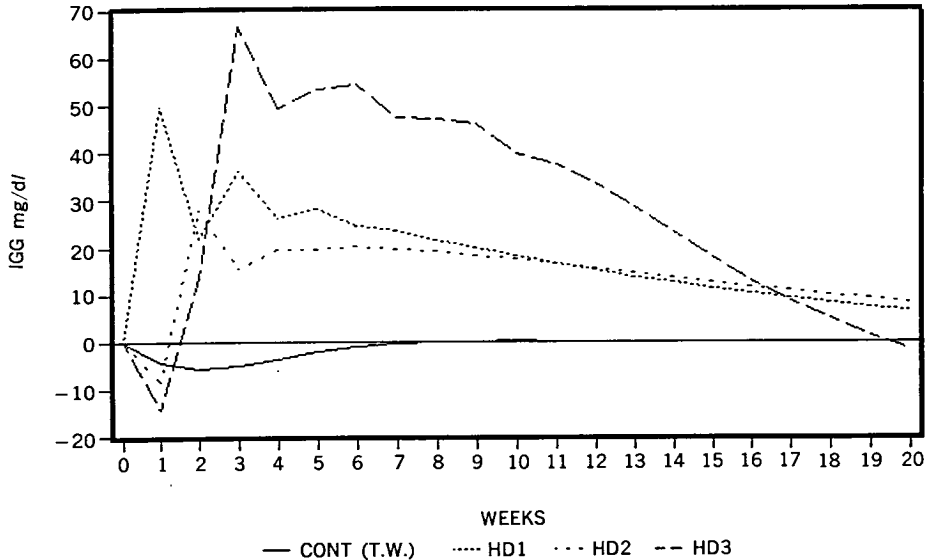


図 6 ベスタチンに対する IgG のインパルス応答。

図 9-11 はサラゾピリンの血中濃度が IgG, CD4, CD8 に対して影響する様式を示す。いずれの場合も 3 例の間に多少の解離が見られ、この免疫調節剤が直接にこれらの免疫因子に作用していると考えするには根拠が薄弱である。この結果から

考えると、他の炎症因子などに影響している可能性のほうが高い。

考 案

リウマチ性疾患患者においては T リンパ球の

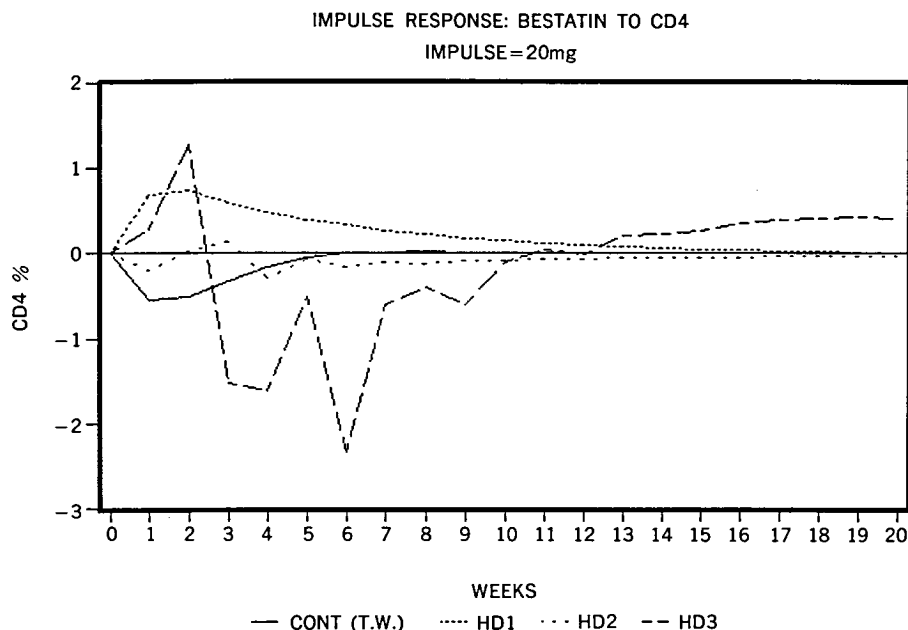


図 7 ベスタチンに対する CD4 のインパルス応答。

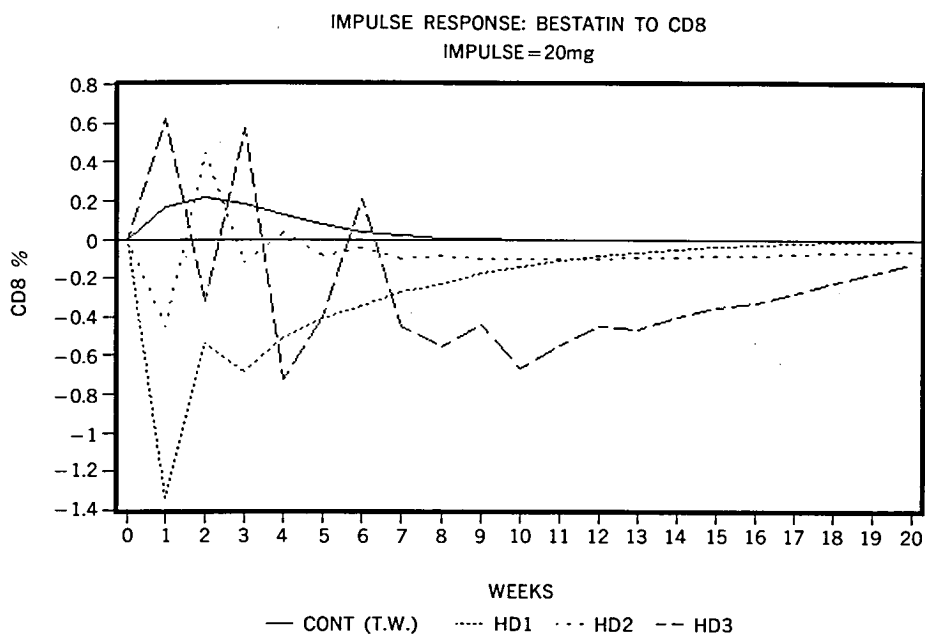


図 8 ベスタチンに対する CD8 のインパルス応答。

機能異常があることが多くの研究者によって指摘されてきた。臨床の場ではこの機能異常を示唆する最も単純な指標として、末梢血液中の CD4 細胞と CD8 細胞の比(CD4/8 比)がよく用いられている。

ただし、この CD4/8 比の意味するところはかならずしも明確ではない。この比のみならず、CD4 細胞ならびに CD8 細胞そのものも、従来いわれてきたヘルパー細胞、サブプレッサー細胞という単純な分類では説明出来ない点があり、一般臨床家の

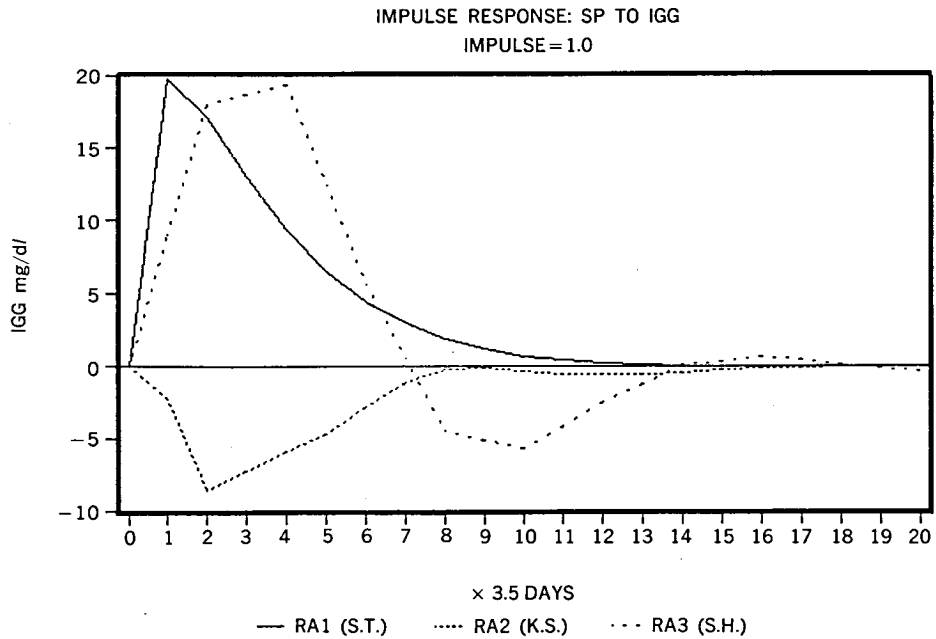


図9 サラゾピリンに対するIgGのインパルス応答。

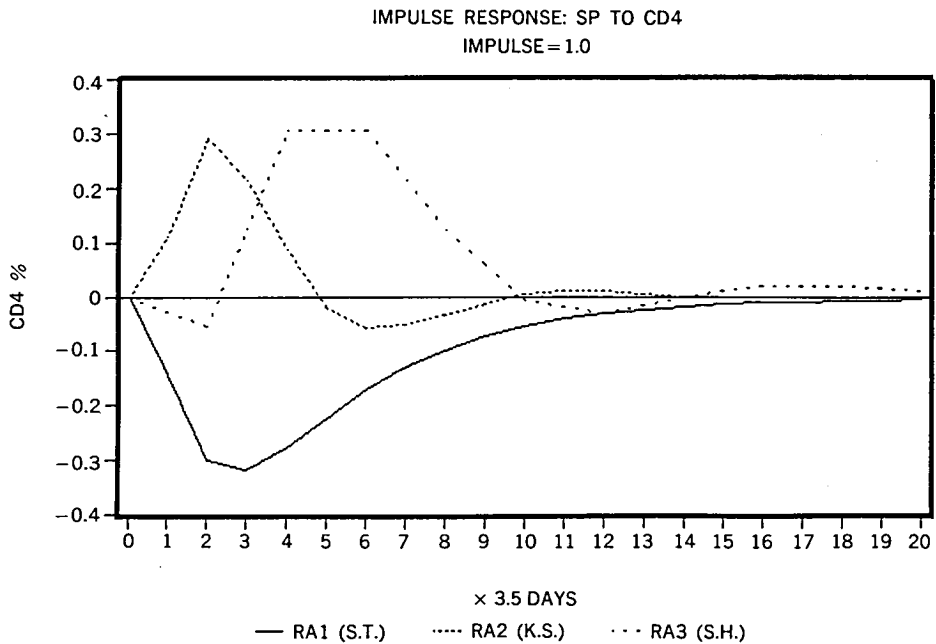


図10 サラゾピリンに対するCD4のインパルス応答。

間に混乱を生じている。

そもそもヘルパー、サブレッサーという制御論的な立場から生まれた動的な概念を、両者の比という静的な概念におきかえることには無理があつ

た。しかし臨床検査においては情報取得に限界があり、わずか1回の採血でCD4とCD8の間にある関係のある程度推察しようとするためにやむを得ず生まれた臨床的な知恵であったとはいえよ

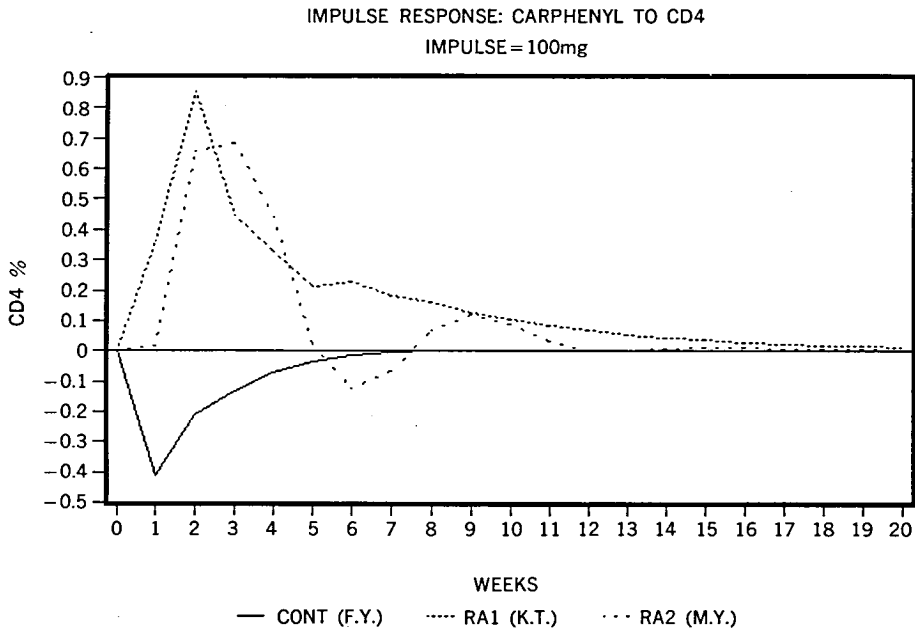


図11 サラゾピリンに対するCD8のインパルス応答。

う。

この方法を用いてまず、正常人、リウマチ性疾患患者、透析患者についてのネットワークの相違点を明らかにした。このような病態による基礎状態の差が厳然として存在するかぎり、その時に投与される免疫調節剤の効果もまた異なるのが当然であろう。ことにベスタチンが透析患者においてのみIgGの代謝に明らかな影響をおよぼすのも、この状態においてIgGの代謝異常が存在すればこそであるといえる。またこの薬剤の効果がTリンパ球機能を介するものとするよりは、むしろBリンパ球を介するものとするほうが妥当であろう。

カルフェニール、サラゾピリンについても、インパルス応答の様式から見てかなり一定の免疫作用が考えられたが、ベスタチンほどの明らかな作用は見られなかった。この2薬剤共に、抗リウマチ作用はよく臨床的に確認されているので、その作用をTリンパ球と結びつけて考えるよりはむしろ抗炎症作用などに関係づけた方が説明しやす

いようである。しかし、たとえセカンダリーなものとはいえ、免疫ネットワークにも作用していることはほぼ間違えなさそうである。

今後、これらの成績をふまえて、免疫調節剤の開発のありかたをより深く探求してみたい。ことにベスタチンをリウマチ疾患患者に投与してみることは非常に興味深いものがあるが、そのためにはトライアルをするための理論的根拠が現時点においていささか薄弱であることが障害となっている。少なくとも副作用はほとんど無に近いものであるので、専門家ともう少し討議して、治験の方針を決定したいと考えている。

結 論

ベスタチン、カルフェニール、サラゾピリンなどの免疫調節剤の作用機序を自己回帰モデルにより解析し、インパルス応答という形で視覚化して比較した。これによって抽象的な表現として用いられてきた免疫調節作用を具体的な概念として表現することが可能となった。この3薬剤ともに、

免疫調節と呼ばれるべき作用があることは肯定的に確認された。またベスタチンについてはIgGの産生異常を正常化するという証拠が得られた。他の2薬剤についてはB細胞の機能を介してT細胞に影響する可能性が考えられたが、この免疫調節作用とこれまで知られている臨床的な効果とを直接結びつけるべきか否かについて疑問が残る。各種炎症因子などに直接作用し、間接的に免疫調節に影響している可能性を否定し得ない。

文 献

- 1) Jilek, M., Prikrylova, D. : Some notes on mathematical modelling. *In Immunology and Epidemiology, Lecture Notes in Biomathematics*, Vol. 65 (Eds. G.W. Hoffman and T. Hraba), pp. 8-14. Springer, Berlin (1985).
- 2) Bell, G.I., Perelson, A.S. and Pimbley, G.H. (Eds.) *Theoretical Immunology*. Dekker, New York (1978).
- 3) Akaike, H. : Some problems in the application of the cross spectral method. *In Spectral analysis of time series* (Edit. B. Harris), Wiley, New York, 1967, p. 81-107.
- 4) Akaike, H. : On the use of a linear model for the identification of feedback systems. *Ann. Inst. Statist. math.* **20** : 425-439, 1969.
- 5) 赤池弘次, 中川東一郎, *ダイナミックシステムの統計的解析と制御*, サイエンス社, 1972.
- 6) Wada, T. *et al.* Autoregressive models provide stochastic description of homeostatic processes in the body. *Jap. J. Nephrol.* **28** : 263-268, 1985.
- 7) Wada, T. *et al.* Frequency dependency of causal factors for hypertension in hemodialysis patients. *Jap. J. Nephrol.* **28** : 1231-1248, 1985.
- 8) Matuo, N. and Wada, T. : Spectral analysis in analyzing the data of SIADH. *In Recent Advances in Pediatric Nephrology* (Murakami, K. *et al.* eds.). *Excerpta Medica*, New York, 1987. pp. 595-598.
- 9) Wada, T., Aoyagi, T., Kojima, F., Umezawa, H. : Dynamic relationship between hydrolytic enzymes and the immune system in rheumatic diseases. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2** : 71-81, 1987.
- 10) Wada, T., Yamada, H., Iso, T., Udagawa, E. : Application of multivariate autoregressive modelling for analysis of immunologic networks. *Comput. Math. Applic.* **9** : 713-722, 1988.
- 11) Wada, T., Jinnouchi, M., and Matumura, Y. : Application of autoregressive modelling for the analysis of clinical and other biological data. *Ann. Inst. Math. Inst.* **20** : 425-439, 1968.
- 12) Wada, T., Aoyagi, T., Kojima, F., and Umezawa, H. : Feedback analysis of renin-angiotensin system under the effects of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Biotech. Appl. Biochem.* **10** : 435-446, 1988.

微生物二次代謝産物の免疫抑制効果，とくに 腎炎発症・進展の抑制について

大久保充人*

共同研究者 鎌田貢寿*，真崎義彦*

1. ニュージーランド B/W F₁ マウスの進行した糸球体腎炎に体する 15-deoxyspergualin の効果。一同一マウスにおける検討—

目 的

これまでに，ニュージーランド B/W F₁ マウス (B/W マウス) に発症するループス腎炎に対して，腎炎が発症する 14 週齢より 15-deoxyspergualin (15-dsp) を投与すると，ループス腎炎の発症・進展が抑制され，生命予後はコントロール群の平均 40 週に比べて，99 週まで延命することを報告した¹⁾。本研究では，すでに発症した B/マウスのループス腎炎の治療の可能性について検討を行った。

対象および方法

日本チャールズリバー(株)より購入した 32 週齢の B/W マウスを用い，32 週齢で片側腎摘し，治療前の組織学的検討に用いた。片側腎摘後一週間以内に死亡したマウスは，腎摘による侵襲の影響が強いと判断し本実験より除外した。腎摘後一週間以上生存した 32 匹のマウスについて 32 週齢より 40 週齢まで実験を行った。マウスは 3 群に分け，コントロール群 14 匹には，50 μ l の PBS を週 4 回，皮下投与した。PSL 群 9 匹には 50 μ l の PBS に溶解したメチルプレドニソロン 20 mg/kg

を週 4 回，皮下投与した。15-dsp 群 9 匹には，50 μ l の PBS に溶解した 15-dsp 6.7 mg/kg を週 4 回，皮下投与した。40 週齢で治療後の検討を行った。

観察項目は表 1 に示すごとくである。蛋白尿の評価はヘマコンビスティックス III を用い，随意尿を 0-4+ の四段階に分けた，血清中抗 DNA 抗体価は，double stranded DNA を抗原とした ELISA 法にて行った。腎組織所見の評価では，すでに報告²⁾したごとく，管内細胞増生所見は，その程度に応じて，0-3 点の評価を与えた。糸蹄壊死および管外細胞増生所見は，糸球体にその所見の無いものを 0 点，0-30% の糸球体に所見の有るものを 1 点，30-60% の糸球体に所見のあるものを 2 点，60% 以上の糸球体に所見のあるものを 3 点として，それぞれ得点を与えた。蛍光抗体法所見では，メサンギウム領域への沈着と，末梢血管係蹄壁への沈着に分け，それぞれ陰性を 0 点，陽性を 1 点，強陽性を 2 点として評価した。統計学的処

表 1 観察項目

- | |
|-----------------|
| 1) マウス生存率 |
| 2) 蛋白尿 |
| 3) 腎糸球体の光顕所見 |
| a) 管内細胞増生 |
| b) 糸蹄壊死 |
| c) 管外細胞増生 |
| 4) 腎糸球体の蛍光抗体法所見 |
| a) IgG 沈着 |
| b) C3 沈着 |

*北里大学内科

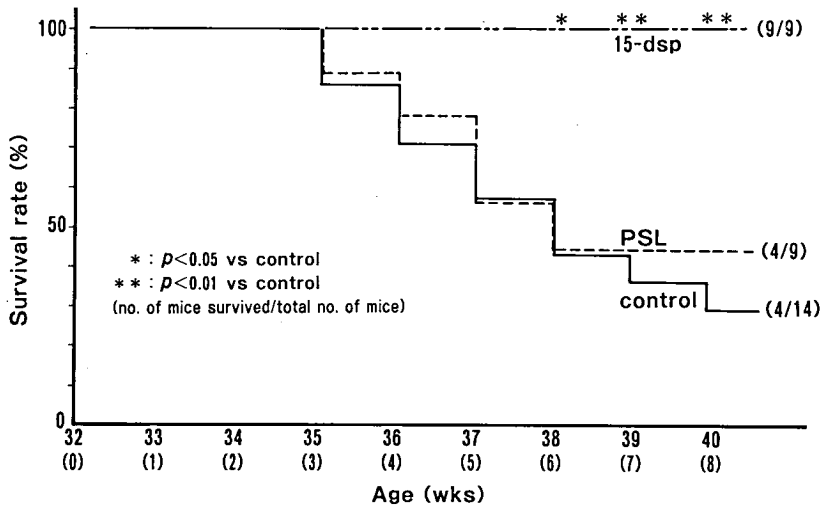


図1 マウス生存率に対する15-dspおよびPSLによる治療の影響

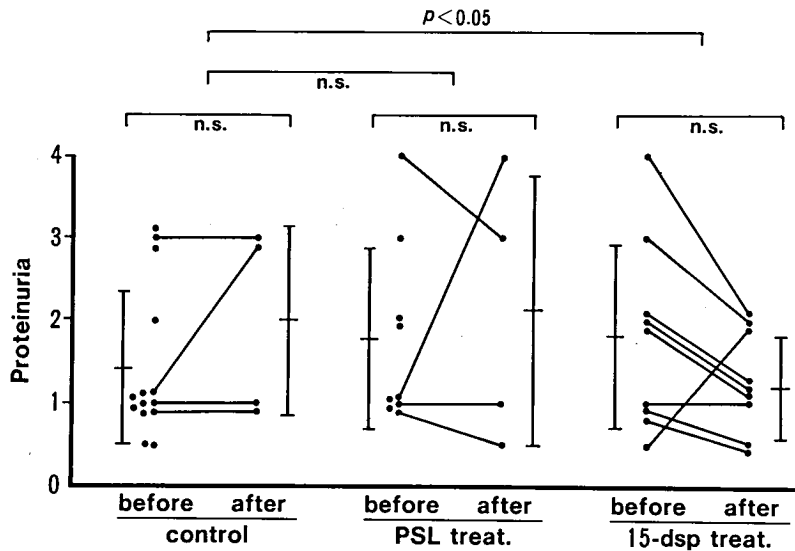


図2 蛋白尿に対するPSLおよび15-dspによる治療の効果

理は、マウス生存率はchi square test, その他は Wilcoxon signed rank test で比較検討した。

結 果

1. マウス生存率：結果を図1に示す。コントロール群マウスは、35週齢より死亡するものが現れ、40週齢では14匹中4匹のみが生存し、生存率は28.5%であった。PSL群もほぼ同様の生存曲線

を示し、コントロール群と差異を認めない。15-dsp群のマウスは、40週齢まで一匹も死亡せず、38週齢以降、コントロール群に比し、有意な変化を示した。

2. 蛋白尿の推移：治療前後の蛋白尿の経過を図2に示す。各群のマウスの治療前後の比較では、いずれの群でも有意差を認めないが、群間の比較では、コントロール群と15-dsp群に差異($p <$

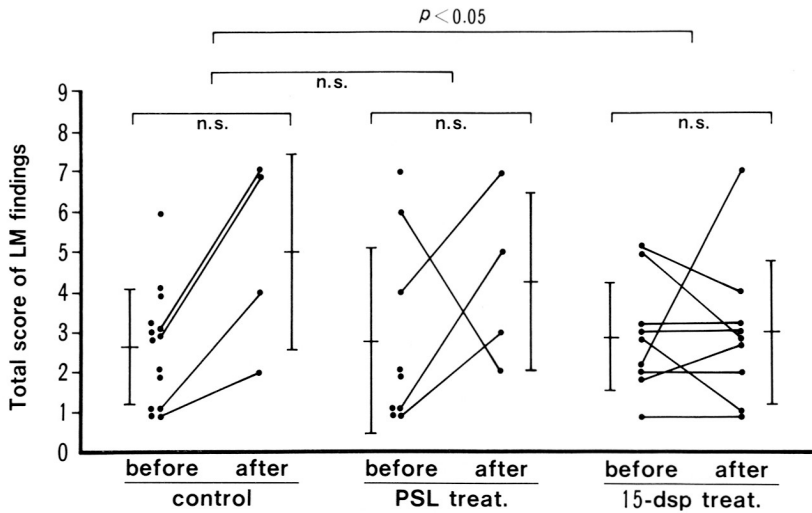


図 3 腎糸球体病変 (光顕スコア) に対する PSL および 15-dsp による治療の効果

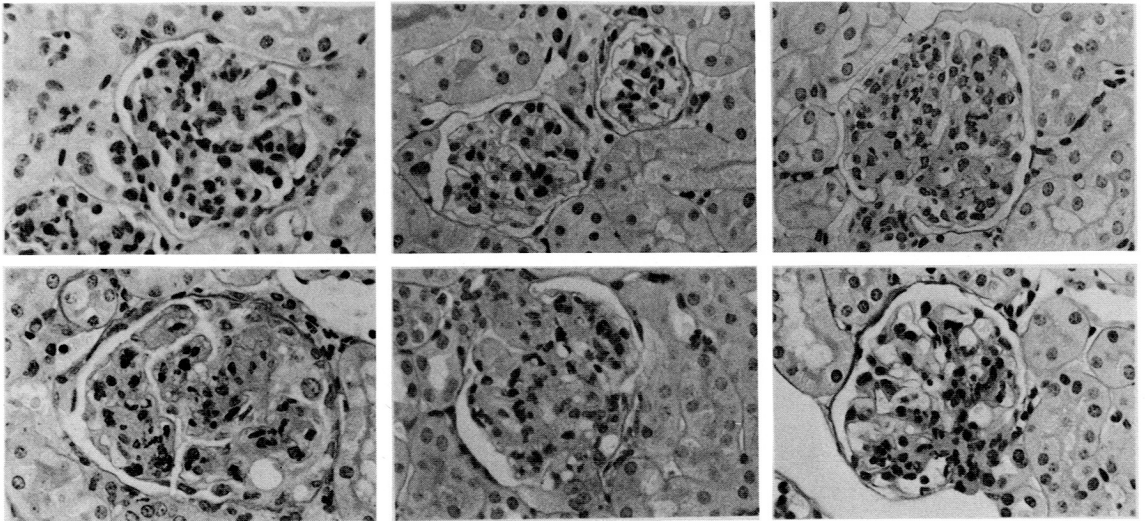


Photo 1. Light micrograph of the glomeruli taken from the individual mice before (upper column) and after (lower column) the treatment.

The left: control mouse; the center: PSL-treated mouse; the right: DSP-treated mouse.

0.05)を認めた。すなわち, コントロール群では, 蛋白尿が増加ないし不変の傾向であるのに比べ, 15-dsp 群では減少傾向であった。

3. 腎糸球体の光顕所見の比較: 管内細胞増生所見, 糸球体壊死所見, 管外細胞増生所見を, それぞれ独立に評価した結果では, 各群の治療前後の比較, 群間の比較で, いずれも有意な差異を認め

なかった。上記三つの所見に与えられた得点の総和を比較検討した結果を図3に示す。各群の治療前後の比較では有意な差異は認められなかったが, 群間の比較では, 15-dsp 群がコントロール群に比し有意($p < 0.05$)な変化を示した。コントロール群では全例で組織得点が増加したが 15-dsp 群ではほぼ変化が見られなかった。Photo 1に各群

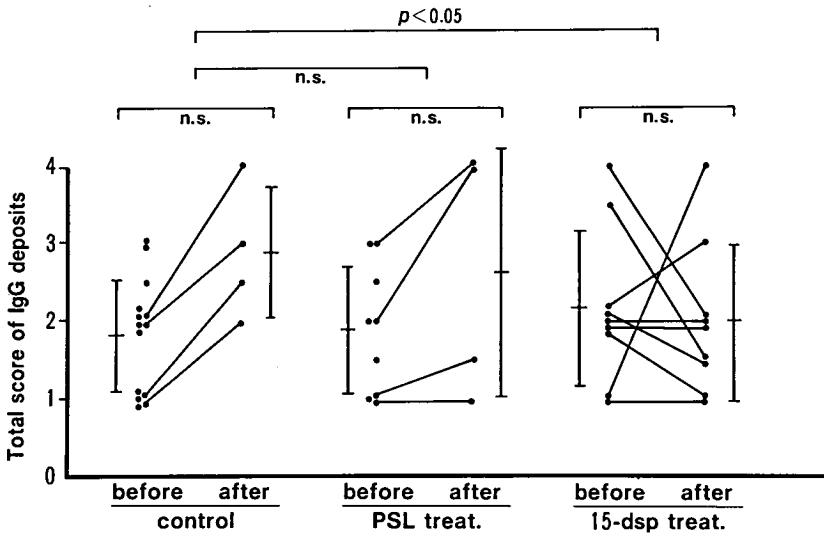


図 4 腎糸球体沈着 IgG (IF スコア) に対する PSL および 15-dsp による治療の効果

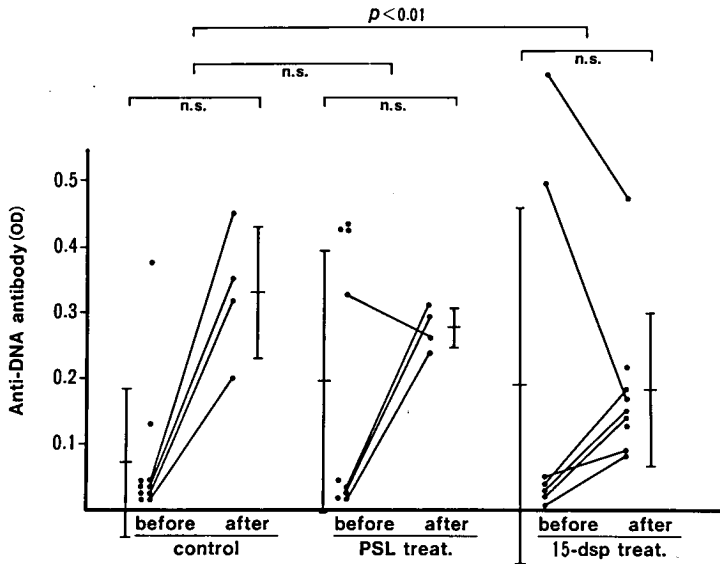


図 5 血清抗 DNA 抗体活性に対する PSL および 15-dsp による治療の効果

の治療前後の顕微鏡写真を示した。

4. 蛍光抗体法所見の比較：IgG の糸球体への沈着は、メサンギウム領域および末梢血管係蹄壁への沈着を、それぞれ独立に検討すると、各群の治療前後の比較、群間の比較でいずれも有意差は見られなかった。メサンギウム領域、末梢血管係蹄壁への沈着の総和を比較検討した結果を図 4 に示す。各群の治療前後の比較では、有意な差異は

認められなかったが、群間の比較では、15-dsp 群はコントロール群に比し有意 ($p < 0.05$) な変化を示した。すなわち、コントロール群では、全例で得点増加がみとめられたのに比し、15-dsp 群では、大きな変化を示さなかった。補体成分 C3 の糸球体への沈着は、メサンギウム領域、末梢血管係蹄壁、あるいはその両方の総和について検討したが、いずれも有意差がみられなかった。

5. 血清中抗 DNA 抗体価の比較：結果を図 5 に示す。各群のマウスの治療前、治療後の抗 DNA 抗体価の比較では有意差は認められないが、群間の比較では、15-dsp 群で、コントロール群に比し有意な差異が見られた。コントロール群では、全例の抗 DNA 抗体価が上昇するが、15-dsp 群では、上昇傾向は見られなかった。

考 察

15-dsp は、B/W マウスのループス腎炎の発症・進展を抑制するだけでなく、すでに発症したループス腎炎の治療にも有効で、有意な延命効果をもたらした。この延命効果は、コントロール群に見られる腎糸球体への免疫グロブリンの沈着増加と糸球体障害の進展が、15-dsp により抑制された結果と考えられる。さらに、15-dsp が血清中抗 DNA 抗体価の上昇を抑制したことは、15-dsp が、腎炎関連抗体の増加を抑制し、腎糸球体への抗体沈着を抑制したことで、糸球体障害抑制効果が得られたと推察される。15-dsp は、抗体産生細胞の分化増殖を直接的に抑制する¹⁾だけでなく、T 細胞亜分画の IL-2 産生に関わらない細胞 (TH-2 細胞) の分化増殖を抑制することから³⁾、抗体産生細胞抑制効果だけでなく、T 細胞に直接影響を与えることにより、腎炎治療効果を発揮することが考えられる。

結 論

15-dsp は、B/W マウスに発症したループス腎

炎の進展を抑制し、延命治療効果をもたらした。

文 献

- 1) Okubo, M., Masaki, Y., Kamata, K., Sato, N., Inoue, K., Umetani, N.: Immunosuppressive mode of action of deoxyspergualin in mice, as compared with cyclosporine A and mizoribine. *Transpl. Proc.* **21** : 1085-1087, 1989.
- 2) Kamata, K., Okubo, M., Uchiyama, T., Masaki, Y., Kobayashi, Y., Tanaka, T.: Effect of mizoribine on lupus nephropathy of New Zealand Black/White F₁ hybrid mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **33** : 31-38, 1984.
- 3) Okubo, M., Inoue, K., Umetani, N., Sato, N., Kamata, K., Masaki, Y., Uchiyama, T., Yan, X-J., Aoyagi, T., Shirai, T.: Lupus nephropathy in New Zealand F₁ hybrid mice treated by (-)-15-deoxyspergualin. *Kidney Int.* **34** : 467-473, 1988.

2. ニューゼーランド B/W F₁ マウスの進行した糸球体腎炎に対する bactobolamine の効果

目 的

Bactobolamine (BBM) は当研究班で開発された微生物二次代謝産物の一つで、bactobolin や actinobolin などと類似の構造を有する (図 1)。永井らは EAE のモデルで BBM が免疫抑制効果を有することを報告している¹⁾。われわれは進行したニューゼーランド B/W F₁ マウス (B/W マウス) に BBM を投与し、その治療効果を検討した。

材料ならびに方法

28 週齢メス B/W マウス (日本チャールズリ

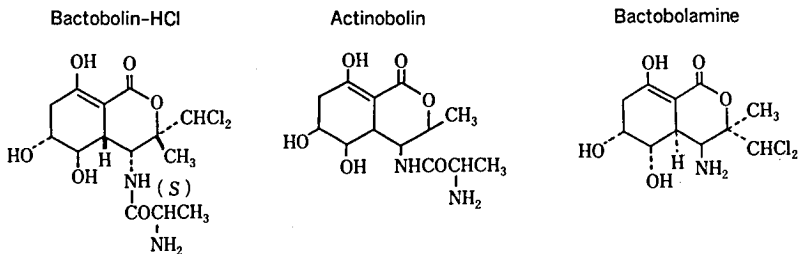


図 1 Bactobolin, Actinobolin および Bactobolamine の構造式

バー)を4群に分け, PBS 50 μ l(コントロール群)あるいは, BBM 3.5, 7.5, 15 または 30 mg/kg 体重相当量を PBS 50 μ l に溶解したものを週4日腹部皮下に投与した。毎2週体重測定を行い, 40週齢で屠殺し, 採尿, 採血後, 腎臓を摘出し, 以下の検査を行った。尿蛋白は Haemacombistix III (三共・マイルス)で半定量し, 血清 IgG 抗 DNA 抗体活性は ELISA 法で測定した。摘出した腎は一部をドライアイス・アセトンで迅速凍結し, 残りをバッファー・ホルマリンで固定した。ホルマリン固定試料より 2 μ 切片を作成, ヘマトキシリン・エオシンおよび PAS 染色し, 光学顕微鏡を用いて腎糸球体の病変を観察した。評価はすでに報告した方法²⁾に準じて行い, intracapillary proliferation, extracapillary proliferation および tuft necrosis にかんして病変の程度または広がり

の程度に従って, 各 0-3 点を与えた。また, 凍結試料よりクリオスタットで 4 μ の切片を作り, FITC 標識抗マウス IgG, IgM または C3(Cappel)と反応させ, 蛍光抗体法により糸球体沈着 Ig および補体を検索した。沈着の程度は, メサンギウムおよび末梢係蹄にかんして 0-2 点に評価した。データは M \pm s.e.m. で表示し, 差の検定は Student's t test で行った。

結 果

40 週齢屠殺時において各群の蛋白尿の程度を比較した(**Table 1**)。BBM 15 および 30 mg/kg 群における蛋白尿は各 0.6 \pm 0.22 および 0.8 \pm 0.27 であり, 対照群の 2.7 \pm 1.11 に比して有意に低値であった。一方, 抗 DNA 抗体価にかんして, 30 mg/kg 群の 0.20 \pm 0.079 は対照群の 0.46 \pm 0.365 に比

Table 1 The levels of proteinuria and serum IgG anti-ds DNA antibodies in B/W mice treated with bactobolamine.

	Control mice	Mice given, s.c., 4 times/week, bactobolamine at:			
		3.5 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
No. of mice	7	5	5	5	5
Proteinuria #	2.7 \pm 1.11	2.1 \pm 1.43	1.6 \pm 1.29	0.6 \pm 0.22*	0.8 \pm 0.27*
Anti-DNA, OD ##	0.46 \pm 0.365	0.78 \pm 0.390	0.65 \pm 0.259	0.37 \pm 0.267	0.20 \pm 0.079**

#: Proteinuria was semi-quantitated as 0 to 4+. Data were shown as M \pm s.e.m.; ##: anti-DNA activities were measured with ELISA (see text), and expressed as OD. *: $p < 0.05$ v control mice; **: $p < 0.05$ v 3.5mg- and 7.5 mg-groups of mice.

Table 2 The histological and immunohistological findings in B/W mice treated with bactobolamine.

	Control mice	Mice given, s.c., 4 times/week, bactobolamine at:			
		3.5 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
No. of mice	7	5	5	5	5
LM score #	6.5 \pm 2.07	7.0 \pm 1.15	6.6 \pm 1.34	6.0 \pm 0.00	3.0 \pm 1.00*
IF score ##					
C3	2.4 \pm 0.79	2.6 \pm 0.55	1.8 \pm 1.50	0.9 \pm 0.74*	0.3 \pm 0.45*
IgG	3.2 \pm 0.57	2.8 \pm 0.96	1.9 \pm 1.34	1.0 \pm 0.71*	0.6 \pm 0.42*

#: LM score was the sum of intracapillary and extracapillary proliferation and tuft necrosis, totaling 0 to 9 (see text); ##: IF score was the sum of deposition in the mesangium and along the peripheral capillary loops, totaling 0 to 4 (see text). *: $p < 0.05$ v control mice.

較して差を認めなかった。腎の組織学的所見にかんして, BBM 30 mg/kg 投与群における腎糸球体の光学顕微鏡的スコア 3.0 ± 1.00 は, 対照群の 6.5 ± 2.07 に比べて有意に低値であった (Table 2)。また, 免疫組織学的所見にかんしても, 腎糸球体における C3 および IgG の沈着は BBM 15 mg/kg 群および 30 mg/kg 群において, 対照群と比較して有意に減少していた。

考 察

BBM はすでに進行した B/W マウス糸球体腎炎に対して 15-30 mg/kg 週 4 回投与することにより, 蛋白尿の抑制, 腎組織および免疫組織学的所見の改善を認めたことより, 腎炎の進行阻止ないし改善効果を有すると考えられる。有効投与量 15-30 mg/kg は同マウス糸球体腎炎に対する 15-deoxyspergualin の有効量 1.5-6.0 mg/kg, 週 4 回投与³⁾に比べて約 5-10 倍である。一方, マウスにおける BBM の $LD_{50} > 100.0$ mg/kg も 15-deoxyspergualin の 38.4 mg/kg に比較して約 3 倍であり⁴⁾, BBM は比較的毒性の少ない薬剤であると考えられる。BBM 免疫抑制機序にかんする報告

はなく, 不明である。われわれが BALB/c マウス脾細胞を用いて行った予備実験の結果, BBM 20 μ g/ml を培養開始時に *in vitro* で添加することにより, IL-2 産生の抑制や Con A, Enterotoxin A, PHA P などに対する lectin 反応性の抑制が対照に選んだ cyclosporin A 200 ng/ml と同程度に認められた。この結果から, BBM はヘルパー T 細胞機能を抑制すると思われるので, 現在 BALB/c マウスでの検討を続けている。

文 献

- 1) 永井克孝ほか: 実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) に関する二次代謝産物治療剤の検索。厚生省新薬開発青柳班, 昭和 63 年度研究報告書 p. 103-106, 1989.
- 2) Kamata, K., Okubo, M., Uchiyama, T. *et al.*: Effect of mizoribine on lupus nephropathy of New Zealand Black/White F₁ hybrid mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **33**: 31-38, 1984.
- 3) Okubo, M., Masaki, Y., Kamata, K. *et al.*: Immunosuppressive mode of action of deoxyspergualin in mice, as compared with cyclosporine A and mizoribine. *Transpl. Proc.* **21**: 1085-1087, 1989.
- 4) 青柳高明ら: 自己免疫疾患治療薬の開発研究. A. 生理活性物質の概要。厚生省新薬開発青柳班, 昭和 63 年度研究報告書 p. 15-22, 1989.

Bactobolin, Actinobolin, Foroxymithine の実験的 アレルギー性神経炎に対する治療効果の検討

井形 昭 弘*

共同研究者 出雲周二**, 田代アリシア**, 高橋浩一**, 伊地智俊晴**

三村芳弘**, 納 光弘**, 植村慶一***

末梢神経に対する自己免疫がその病態として考えられている Guillain-Barré 症候群の病態解明と治療薬の開発を目的として、その疾患動物モデルである実験的アレルギー性神経炎(EAN)^{1,2)}を用いて本研究班で開発された微生物二次代謝産物が EAN に対してどのような効果を及ぼすかを検討してきた^{3,4,5)}。その結果、(1) 15-Deoxyspergualin が EAN の induction phase に対する投与にて臨床的、組織学的に EAN の発症を遅らせ、病変の程度も軽度で明らかな抑制効果が認められた。(2) Bactobolin は induction phase に対する投与で著明な EAN 抑制効果が認められ、発症後の治療的投与では 0.5 mg/kg・day の投与量で有意の効果をみいだせなかった。(3) Foroxymithine は EAN の進行を遅らせ、軸索変性を減じる効果がみられた。(4) Forphenicine に EAN 抑制効果はみられず、また、(5) T 細胞分画に rich で、自己免疫疾患の発症、進行とともにその活性の低下がみられる DAP-IV の阻害剤である Diprotin A の投与では、EAN の発症をむしろ早め、病変も高度で、自己免疫現象を増強することが示唆された。

Guillain-Barré 症候群は感冒様症状を前駆とする例はあるものの、その発症の予測は難しく、通常急性発症し、再発はみられない疾患であり、発

症して初めて治療の対象となる。治療薬の開発においても発症後投与にて治療効果の判定をする必要があると考えられる。治療的投与に関する報告は実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)に対して Bactobolin が治療効果を示したことが報告されたが⁶⁾、昭和 62 年度、我々は EAN に対して Bactobolin 0.5 mg/kg・day, Foroxymithine 400 μg/匹・day の投与量で治療実験を行ない、その量では有意の治療効果は見い出せなかったことを報告した⁴⁾。今回我々は、さらに投与量を増やして検討するとともに、Bactobolin の誘導體でより毒性の少ない actinobolin についてもその大量投与での EAN 治療効果について検討した。

材 料 ・ 方 法

(実験 1)

EAN の惹起：雄成熟 Lewis ラット 14 匹を使用した。抗原は植村らにより牛馬尾神経より精製された末梢神経ミエリンを用い、その 300 μg 蛋白/0.1 ml PBS に溶解、同量の Freund's complete adjuvant と混合し、1 匹当たり 0.2 ml をラット後肢足背に接種した。

投与薬剤及び投与量は以下の通りで、

A 群：Bactobolin 1 mg/kg・匹 (n=4)

B 群：Foroxymithine 1 mg/匹 (n=5)

C 群：生理食塩水 1 ml/匹 (n=5)

EAN 発症後 1—5 日目まで連日腹腔内投与を行

*鹿児島大学

**鹿児島大学医学部第三内科

***慶応大学医学部生理学教室

なった。さらに2日目後の感作後第20日に全動物を灌流固定し、組織学的に検索した。

〔実験2〕

雌成熟Lewisラット15匹を実験1と同様にEAN感作し、以下の3群に分け治療実験を行った。

A群：Actinobolin 200 mg/kg・匹 (n=5)

B群：Foroxymithine 20 mg/匹 (n=5)

C群：生理食塩水 1 ml/匹 (n=5)

発症後1~5日(感作後第12~16日目)に連日腹腔内投与し、感作後第17日目に全動物を組織学的に検索した。

臨床症状の評価：実験1,2共に以下の基準によりスコアリングを行なった。

- 1：軽度の尾の脱力
- 2：中等度の尾の脱力
- 3：軽度の後肢脱力が加わる
- 4：中等度の後肢脱力
- 5：後肢を引きずって歩く
- 6：前肢の脱力が加わる

7：死亡

組織学的検索：実験1では感作後20日目、実験2では17日目に全例を0.1 M phosphate bufferに溶解した3% glutaraldehyde, 1% paraformaldehyde液にて灌流ないし浸潤固定し、胸髄中央部、腰髄膨大部、腰髄神経根、後根神経節、坐骨神経近位部、同遠位部を切り出し、1%オスミウム固定後アルコールにて脱水、Epon包埋し、1 μm厚切片を作製、トルイジンブルー・サフラニン染色を施し、光顕にて観察した。EAN病変の程度を比較するため、胸髄中部の後索、坐骨神経遠位部に生じている軸索変性所見の程度を0~4点で評価した。

結 果

〔実験1〕第14日目に発症し薬剤の投与を開始した。15日目には全例がEAN症状を呈し16日目にコントロールの1例が死亡した。各群の臨床スコアの変動を図1に示す。コントロールに比しBactobolin, Foroxymithine投与ではピーク時の

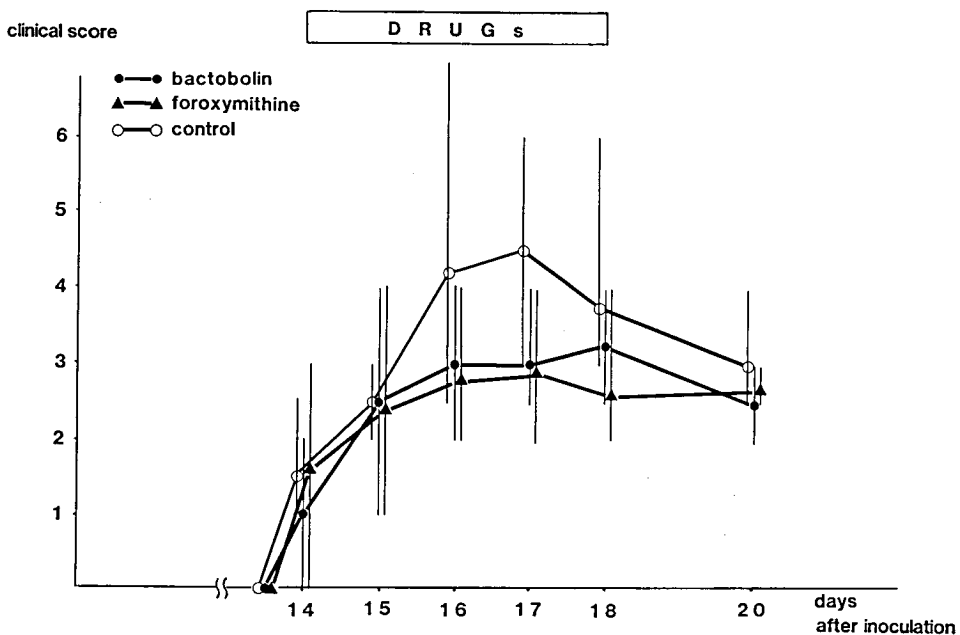


図1 実験1の臨床スコアの経時的変化

表 1 実験 1 の病理組織変化 (Pathological Score)

	胸髄後索	坐骨神経遠位	TOTAL
Bactobolin	1.75 (1-2)	1.75 (0.5-4)	3.5 (2.5-5)
Foroxymithine	1.90 (1-2.5)	1.60 (0-3)	3.5 (1-5.5)
control	2.00 (1-3)	2.00 (0-4)	4.0 (2-7)

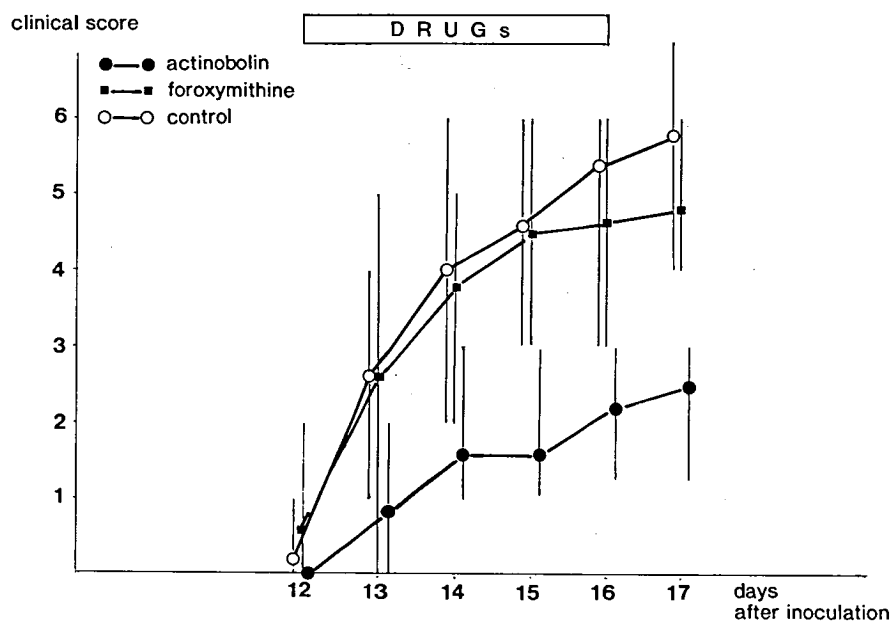


図 2 実験 2 の臨床スコアの経時的変化

表 2 実験 2 の病理組織変化 (Pathological Score)

	胸髄後索	坐骨神経遠位	TOTAL
Actinobolin	0.8 (0-2)	0.2 (0-1)	1.0 (0-2)
Foroxymithine	2.4 (2-3)	2.8 (0-4)	5.2 (2-7)
control	2.0 (1-3)	2.4 (0-4)	4.4 (1-7)

症状が軽い傾向が認められるが、後半では有意の差はみられなかった。

組織学的には全例にて EAN 病変が観察され、病勢の程度を反映すると考えられる胸髄、坐骨神経遠位部の軸索変性程度は表 1 に示すごとくコントロールに比し両薬剤投与群でやや軽度であったが、有意の差とは考えられなかった。

〔実験 2〕 第 12 日目に発症し、薬剤の投与を開始した。全例で EAN 症状を示したが、Actinobolin

投与群は臨床スコア 1~3 の軽度の EAN 症状にとどまった。Foroxymithine 投与群とコントロール群に有意の差はみられなかった(図 2)。

組織学的にも Actinobolin 投与群は軽微の軸索変性にとどまり、Foroxymithine 投与群はコントロールに比し同等、ないし、より高度の軸索変性所見を示した(表 2)。

考 察

Guillain-Barré 症候群の治療法の検討においては、前述のごとく疾患の性格上、発症後の治療効果の有無が重要と思われる。今回我々は EAE⁶⁾、EAN⁴⁾、あるいは EAMG⁷⁾においてその発症抑制効果が認められている Bactobolin, Foroxymithine, Actinobolin についてそれらの治療効果を検討した。

Bactobolin は EAE においてその治療投与による効果が報告されているが⁶⁾、我々は一昨年度 EAE で効果が認められた 0.5 mg/kg・匹の投与量では EAN に対して有意の治療効果を示さないことを報告した⁴⁾。今回は倍の投与量の 1 mg/kg・匹に増量して検討したが、臨床的にも組織学的にも有意の治療は認められなかった。永井ら⁸⁾は昨年度むしろ低濃度 (0.3 mg/kg) の投与量により明らかな EAE 抑制効果を見ており、Bactobolin の治療効果についてはその投与量、方法の検討が必要と思われる。

Actinobolin は Bactobolin の誘導体で、その毒性が著しく減少していると共に、EAE に対してその大量 120 mg/kg の感作後連日投与で多少の抑制効果が認められている。また EAMG に対する効果も報告されている⁷⁾。今回、EAN を用いた治療実験で 200 mg/kg という大量の Actinobolin 投与により臨床的にも組織学的にも明らかな治療効果が認められ、大量投与にても外見上明らかな副作用はみられなかった。Actinobolin の作用機序は Bactobolin のそれと同様であると考えられるが、Bactobolin では 1 mg/kg の投与量にて EAN 治療効果は認められていない。Actinobolin と Bactobolin の EAN と EAE に対する効果の差は両疾患の発症機序や作用機序の差によるものではなく、毒性の差による投与量の違いが大きな意味を持っているものと思われ、より低濃度で作用し、毒性の少ない誘導体の開発が望まれる。

Foroxymithine は永井らにより EAE の抑制効果が報告され、我々は EAN において多少の抑制効果と軸索変性所見の軽減を示唆する所見が得られたことを報告したが⁴⁾、今回その投与量を増量し、1 mg/匹、20 mg/匹にて治療効果を検討した。しかしながら有意の効果は認められなかった。このような酵素阻害剤は自己免疫疾患における病変の二次的進展を阻止する可能性があり、病変の進展にかかわる酵素群の解明と、その阻害物質の開発が必要と思われる。

ま と め

1. EAN に対する Bactobolin, Actinobolin, Foroxymithine の発症後投与による治療効果について検討した。
2. Actinobolin 200 mg/kg の大量連日投与により EAN の臨床的・組織学的軽減が認められた。
3. Bactobolin 1 mg/kg, Foroxymithine 1 mg/kg, 20 mg/kg の投与では有意の治療効果はみられなかった。

文 献

- 1) Shuji Izumo, Christopher Linington, Hartmut Wekerle, Richard Meyerman. : A morphologic study on experimental allergic neuritis mediated by T-cell line specific for bovine P₂ protein in Lewis rats. *Laboratory Investigation*, 53(2), 209-218, 1985.
- 2) Christopher Linington, Shuji Izumo, Masaru Suzuki, Keiichi Uyemura, Richard Meyermann, Hartmut Wekerle. : A permanent rat T-cell line that mediates experimental allergic neuritis in the Lewis rat in vivo. *J. Immunol.*, 133, 1946-1951, 1984.
- 3) 井形昭弘, 出雲周二, 梅原藤雄, 他: 実験的アレルギー性神経炎に対する deoxyspergalin の抑制効果。自己免疫疾患治療薬の開発研究青柳班, 昭和 61 年度報告書, p. 111-116, 1987.
- 4) 井形昭弘, 出雲周二, 松室健士, 他: 実験的アレルギー性神経炎に対する Bactobolin, Forphenicine, Foroxymithine の抑制効果についての検討。自己免疫疾患治療薬の開発研究青柳班, 昭和 62 年度報告書, p. 125-131, 1988.
- 5) 井形昭弘, 出雲周二, 樋口逸郎, 田代アリシア,

- 納 光弘, 植村慶一: Dipeptidyl peptidase IV 阻害剤 Diprotin A の実験的アレルギー性神経炎に及ぼす影響. 厚生省新薬開発青柳班, 昭和 63 年度報告書, pp. 125-129, 1989.
- 6) 田平 武, 姚 大林, 山村 隆: 自己免疫性脳脊髄炎治療薬開発研究. (2)ラット急性 EAE モデルを用いた免疫抑制物質の評価: bactobolin と arphamenine A の EAE 抑制効果について. 自己免疫疾患治療薬の開発研究青柳班, 昭和 61 年度報告書, p. 51-53, 1987 年.
- 7) 佐藤 猛, 石垣泰則, 宋 東林, 池辺紳一郎, 林 泰三: Experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) ラットの治療実験. 厚生省新薬開発青柳班, 昭和 63 年度報告書, pp. 57-66, 1989.
- 8) 永井克孝, 小山内たか, 村上隆稔, 武田茂樹, 生田房弘: 実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) に関する二次代謝産物治療剤の検索. 厚生省新薬開発青柳班, 昭和 63 年度研究報告書, pp. 103-106, 1989.
- 9) 田平 武, 本山和徳, 田平順子, 西沢正豊, 宇宿功市郎: 自己免疫性脳脊髄炎, 神経炎の治療薬開発, 厚生省新薬開発青柳班, 昭和 63 年度研究報告書, pp. 49-55, 1989.

15-DSG, methyl-DSG, Diplotin A, Foroxymithine, Bestatine の HAM 患者末梢血リンパ球自己増殖反応 (APR) への影響

井形 昭弘*

共同研究者 町頭幸一**, 柴楽信隆**, 出雲周二**, 園田俊郎***, 納 光弘**

目 的

HAM は, HTLV-I が関与し, 免疫学的機序により発症すると考えられている, 痙性対麻痺を主徴とする神経疾患である。

Usuku らは, HAM 患者の末梢血リンパ球を *in vitro* 培養すると, 何等の外来抗原刺激なしで T 細胞が増殖することを見だし, この現象を autologous proliferative response (APR) と呼び, HAM および HTLV-I 無症候性キャリアーでの自己免疫に関連する指標として, その有用性を提唱した¹⁾。

昨年我々は, Prednisolone (PSL), Interferon alpha (IFN- α) が *in vitro* の系及び, 治療前後のリンパ球を用いた系 (*in vivo*) で, 共に APR を抑制し, その治療効果と相関することを報告した²⁾。

今回我々は, 15-Deoxyspergualin (DSG), methyl-DSG, Diplotin A, Foroxymithine, Bestatine について (表 1), これらの薬剤が HAM 患者末梢血リンパ球の APR に及ぼす影響を評価し, HAM の治療薬としての可能性について検討した。

対 象 と 方 法

未治療の HAM 患者よりヘパリン加末梢血を採取し, Ficoll-Hypaque 法で単核細胞 (リンパ球

を含む) を分離凍結保存した。これを用時解凍して, 非働化したヒトプール血清を加えた RPMI-1640 培地中で 6 日間培養し, その自己増殖機能 (APR) をトリチウムサイミジンの取り込みにより測定した。この培養系は, 5×10^4 cells/well/200 μ l で行い, 被検薬剤の濃度は, 15-Deoxyspergualin (DSG) と methyl-DSG は, 0.1, 1, 10, 100 μ g/ml で反応させ, また Diplotin A と Foroxymithine, Bestatine は, 1, 10, 100, 1,000 μ g/ml の各濃度で反応させて APR に対する抑制効果を評価した。薬剤は, 培養初日に添加し, 6 日間培養後に効果を判定した。

結果 (図 1, 図 2, 表 2)

1. 15-DSG, methyl-DSG

15-DSG は, 10 μ g/ml の濃度で有意 (5% 以下) に APR を抑制したが, それより低い濃度や高い濃度では, 抑制しなかった。

methyl-DSG は, 1, 10, 100 μ g/ml の濃度で有意に APR を抑制した。抑制の強さは, 10 μ g/ml の濃度でピークを呈した。

2. Diplotin A

Diplotin A は, APR を抑制せず, むしろ亢進させる傾向にあったが, 有意差はなかった。

3. Foroxymithine

Foroxymithine は, 100 μ g/ml 以上の濃度で APR を抑制し特に 1,000 μ g/ml では, 著明に抑制した (有意差 1% 以下)。

*鹿児島大学

**鹿児島大学医学部第三内科

***鹿児島大学医学部ウイルス学

表 1 本実験で用いた免疫修飾物質と酵素阻害物質の一覧

薬 剤 名	阻害を受ける酵素名, その他
15-Deoxyspergualin (DSG)	B リンパ球活性化を抑制
methyl-Deoxyspergualin (methyl-DSG)	水溶性, DSG より <i>in vitro</i> で安定
Diplotin A	Dipeptidylaminopeptidase IV を阻害
Foroxymithine	angiotensine converting enzyme を阻害
Bestatine	aminopeptidase を阻害

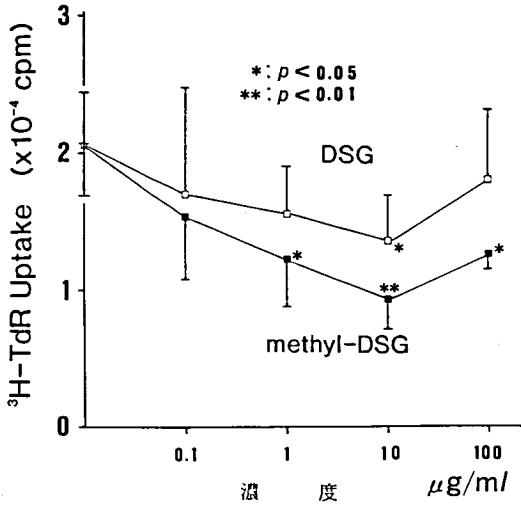


図 1

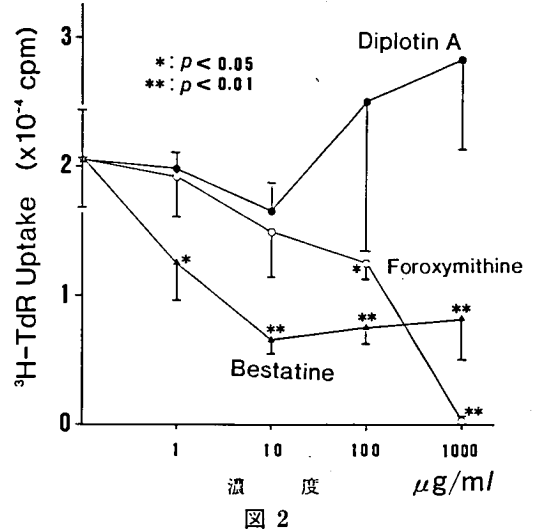


図 2

表 2 薬剤投与前に対する各種薬剤投与後の ³H-TdR 取り込みの有意差検定結果

(student t test)

	0.1 μg/ml	1 μg/ml	10 μg/ml	100 μg/ml	1000 μg/ml
DSG	N.S.	N.S.	<0.05	N.S.	—
methyl-DSG	N.S.	<0.05	<0.01	<0.05	—
Diplotin A	—	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Foroxymithine	—	N.S.	N.S.	<0.05	<0.01
Bestatine	—	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01

N.S.: not significant

4. Bestatine

Bestatine は, 1 μg/ml 以上の濃度で有意に APR を抑制したが, 10 μg/ml 以上の濃度では, 抑制の程度は plateau となり, 用量依存性の関係はなかった。

考 察

APR は, HTLV-I 感染の免疫学的指標として

有用である。特に HAM では APR の高値と APR での CD8 陽性 T 細胞サブセット比率の上昇がみられ³⁾, APR が HAM の病態と関連することが示唆されている。

PSL や IFN-α は, HAM においてよく用いられる治療薬であるが, いずれも *in vitro* 及び *in vivo* で, APR を抑制し²⁾, 治療効果と相関していた。

今回我々は、15-DSG, methyl-DSG, Diplotin A, Foroxymithine, Bestatine が各濃度で、APR に及ぼす影響を評価することで、HAM に対する新しい治療薬剤としての有効性を判定した。

15-DSG と methyl-DSG は、実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE)⁴⁾ や実験的アレルギー性神経炎 (EAN)⁵⁾ の発症を抑制する効果を認める。いずれも APR に対しては同様の傾向を示した (図 1) が、methyl-DSG の方が、より低濃度で有意な抑制を示した。これは、methyl 化することで DSG がより安定化するためと考えられる。また、用量依存性に抑制するのではなく、高濃度で逆に抑制が低下することは、作用機序を考える上で興味ある所見であった。

Diplotin A は、T 細胞特有の酵素である dipeptidylaminopeptidase IV を阻害する薬剤であるが、EAE や EAN の抑制効果を認めない⁶⁾。本実験でも APR の抑制を認めずむしろ高値を呈し (図 2)、EAE や EAN での病変の遷延化との関連が疑われる。

Foroxymithine は、angiotensin converting enzyme を阻害する薬剤であり、EAE⁸⁾、EAN⁹⁾ に対して、多少の抑制効果が認められているが、ほぼ用量依存性に APR を抑制した (図 2)。

Bestatine は、aminopeptidase 阻害作用があり、免疫調節剤として、使用されている。これは、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までは、用量依存性に APR を抑制したが、より高濃度にしても、それ以上の抑制は認められなかった (図 2)。

結 論

種々の自己免疫疾患治療薬 (候補) の HAM に対する有効性を APR にたいする抑制効果を指標として *in vitro* で評価した。

HAM に対する有効性の評価が妥当なものであ

るかは、今後の検討が必要であるが、EAE や EAN などの動物実験に対する有効性の評価とは、かなりな程度相関していると考えられた。

文 献

- 1) Usuku, K., Sonoda, S., Osame, M., *et al.* : HLA haplotype-linked high immune responsiveness against HTLV-I in HTLV-I-associated myelopathy : Comparison with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Ann. Neurol.*, 1988 ; 23 (suppl.) : 143-150.
- 2) 井形昭弘, 榮楽信隆, 伊地知信二, 他 : Prednisolone, Interferon alpha, 15-Deoxyspergualin による HAM 患者末梢血リンパ球自己増殖反応 (APR) への影響。自己免疫疾患治療薬の開発研究青柳班, 昭和 63 年度研究報告書, p. 131-133, 1988 年。
- 3) 井形昭弘, 榮楽信隆, 園田俊郎, 他 : HAM 患者末梢血リンパ球の自己増殖反応における T 細胞サブセットの検討。厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班, 昭和 62 年度研究報告書, p. 319-322, 1987 年。
- 4) 田平 武, 山村 隆, 並河 正, 他 : Deoxyspergualin の実験的アレルギー性脳脊髄炎に対する治療効果。自己免疫疾患治療薬の開発研究青柳班, 昭和 60 年度研究報告書, p. 47-51, 1985 年。
- 5) 井形昭弘, 出雲周二, 梅原藤雄, 他 : 実験的アレルギー性神経炎に対する deoxyspergualin の抑制効果。自己免疫疾患治療薬の開発研究青柳班, 昭和 61 年度研究報告書, p. 111-116, 1986 年。
- 6) 生田房弘, 武田茂樹, 永井克孝 : 各種微生物に次代謝産物による病変の修飾に関する神経病理学的研究。Actinobolin と Diplotin A の急性 EAE に対する影響。自己免疫疾患治療薬の開発研究青柳班, 昭和 63 年度研究報告書, p. 97-101, 1988 年。
- 7) 井形昭弘, 出雲周二, 樋口逸郎, 他 : Dipeptidyl peptidase IV 阻害剤 Diplotin A の実験的アレルギー性神経炎に及ぼす影響。自己免疫疾患治療薬の開発研究青柳班, 昭和 63 年度研究報告書, p. 125-129, 1988 年。
- 8) 永井克孝, 小山内たか, 村上隆稔 : EAE に対するプロテアーゼインヒビターの治療効果の検討とその意義。自己免疫疾患治療薬の開発研究青柳班, 昭和 61 年度研究報告書, p. 77-84, 1987 年。
- 9) 井形昭弘, 出雲周二, 松室健士, 他 : 実験的アレルギー性神経炎に対する Bactobolin, Forphenicine, Foroxymithine の抑制効果についての検討。自己免疫疾患治療薬の開発研究青柳班, 昭和 62 年度研究報告書, p. 125-131, 1988 年。

ヒト末梢血単核球による抗核抗体産生におよぼす 15-deoxyspergualin の影響に関する研究

—抗体産生抑制機序について—

本 間 光 夫*

共同研究者 秋月正史*, 天野宏一*

目 的

膠原病は抗核抗体など種々の自己抗体産生を特徴とする自己免疫疾患である¹⁾。その組織障害には、これらの自己抗体が関与することが示唆されている²⁾。したがって、自己抗体産生機序の追究は、膠原病の病態解明に大切な課題である。さらに自己抗体産生の制御は膠原病の治療への応用が考えられる。

15-deoxyspergualin(以下 DSG)は種々の免疫抑制作用を有することが知られている。すなわち、ループスマウスの腎病変の進行や抗 DNA 抗体産生を抑制し生命予後を改善すること³⁾、ラットの実験的アレルギー性脳脊髄膜炎の臨床症状および病理学的所見を改善すること⁴⁾などが報告されている。そして、かかる免疫抑制作用は、免疫担当細胞を介するものであることが知られている^{5,6,7)}。

昨年までに教室では、SLE 患者末梢血単核球を用い、DSG の免疫抑制作用を *in vitro* で証明した。さらに DSG がどの免疫担当細胞を介して作用するかを明らかにするため種々の実験を試み、主に T 細胞を介したものであると報告してきた⁸⁾。本年度は、T 細胞活性化経路における DSG

の作用部位を、T 細胞マイトーゲンによる細胞内カルシウム濃度の変化を指標とし調べた。また、SLE 患者末梢血を用い、SLE で見られる免疫異常を DSG が改善しうるかどうかを調べ、SLE の治療薬としての可能性を調べることを目的とした。

方 法

1) 細胞の分離および培養：ヘパリン加末梢血より、Ficoll Conray 比重遠心法にて単核球を得た。末梢血単核球を RPMI 1640 培地に 1×10^6 /ml に浮遊し、37°C、5%CO₂下で 24 時間培養した。サイクロスポリン A および DSG は、ともに終濃度 10 µg/ml で添加した。対照には、薬剤非添加で同様の条件で培養したものをを用いた。

2) 細胞内カルシウム濃度の測定⁹⁾：培養が終了した細胞 (1×10^7) を RPMI 培地 2 ml に浮遊し、カルシウム感受性蛍光色素である Fura-2 AM (50 µM を 2 µl 加え、37°C で 30 分反応させた。RPMI で洗浄後、 3×10^6 個の細胞をとり、0.6 ml のカルシウム緩衝液 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.0 mM MgCl₂, 1.0 mM CaCl₂, 20 mM HEPES, 25 mM glucose, pH 7.4) に浮遊し検体とした。細胞内カルシウム濃度は、HITACHI F-4010 Fluorescence Spectrophotometer を用いて、励起波長 335 nm、測定波長 500 nm の条件で測定した。測定

*慶応義塾大学内科

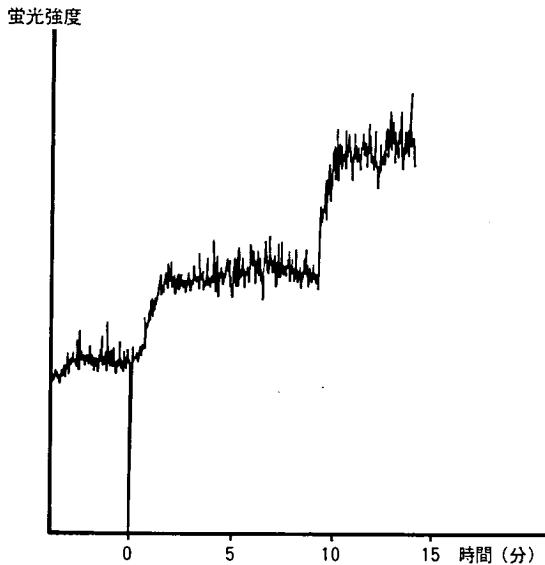


図1 健康人末梢血単核球をRPMI培地に浮遊し、5%CO₂, 37°Cの条件で24時間培養する。Fura-2 AMを加え30分反応させ、培地で洗浄後、3×10⁶個をとり、0.6 mlのカルシウム緩衝液に浮遊した。HITACHI F-4010を用い、蛍光強度の基礎値を確認した後、PHA(1 mg/ml)を4 μl加えた(終濃度6.7 μg/ml)。この時を0分とし、蛍光強度の変化を時間をおって観察した。PHA添加直後より、速やかな蛍光強度の上昇(初期上昇反応)が認められた。引き続き約5分後より、僅かながら第二の上昇反応(後期上昇反応)がみられた。10分後にカルシウム・イオノフォア(100 μg/ml)を4 μl加え(終濃度670 ng/ml)、最大蛍光強度を得た。

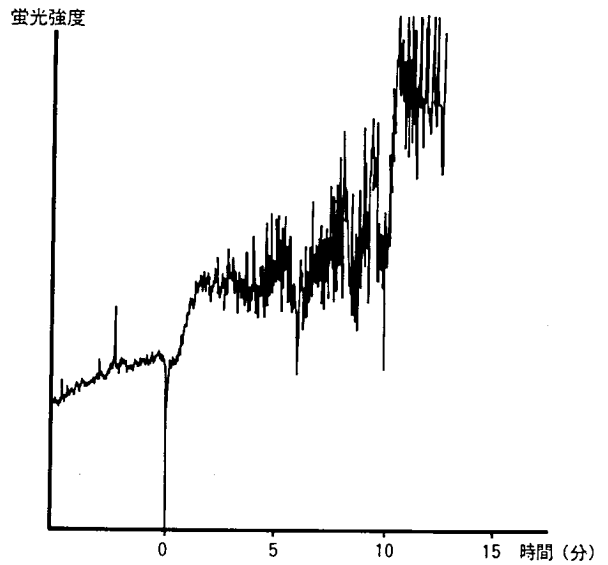


図2 健康人末梢血単核球を、24時間サイクロスポリンA(10 μg/ml)とともに培養し、同様にFura-2 AMと反応させた後、RPMI培地で洗浄、0.6 mlのカルシウム緩衝液に浮遊した。図1と同様にPHAを添加し、蛍光強度の変化を観察した。

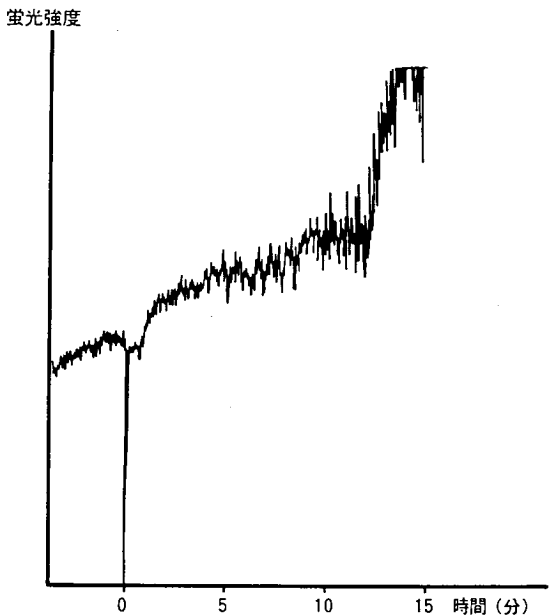


図3 健康人末梢血単核球を、24時間15-deoxyspergualin(DSG, 10 μg/ml)とともに培養し、同様にFura-2 AMと反応させた後、RPMI培地で洗浄、0.6 mlのカルシウム緩衝液に浮遊した。図1と同様にPHAを添加し、蛍光強度の変化を観察した。

開始後2~3分間で蛍光強度の基礎値を確認した後、検体にPHA(Phytohemagglutinin, 1 mg/ml)を4 μl(終濃度6.7 μg/ml)を加えた時の細胞内カルシウム濃度の上昇反応を調べた。またカルシウム・イオノフォア(4-Bromo-Calcium Ionophore, 100 μg/ml)を4 μl(終濃度670 ng/ml)を用いて最大蛍光強度を得、上昇反応の指標とした¹⁰⁾。

結 果

健康人単核球では、図1のようにPHA添加直後より細胞内カルシウム濃度の上昇がみられ(初

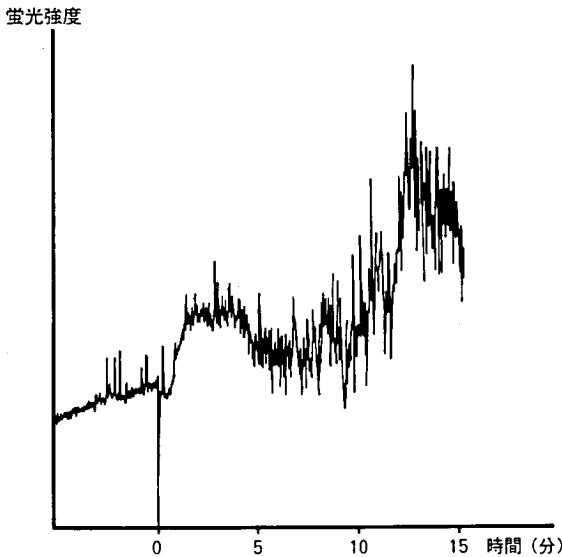


図 4 SLE 患者末梢血単核球を RPMI 培地に浮遊し、5%CO₂、37°C の条件で 24 時間培養する。Fura-2 AM を加え 30 分反応させ、培地で洗浄後、 3×10^6 個をとり、0.6 ml のカルシウム緩衝液に浮遊した。図 1 と同様に PHA を添加し、蛍光強度の変化を観察した。

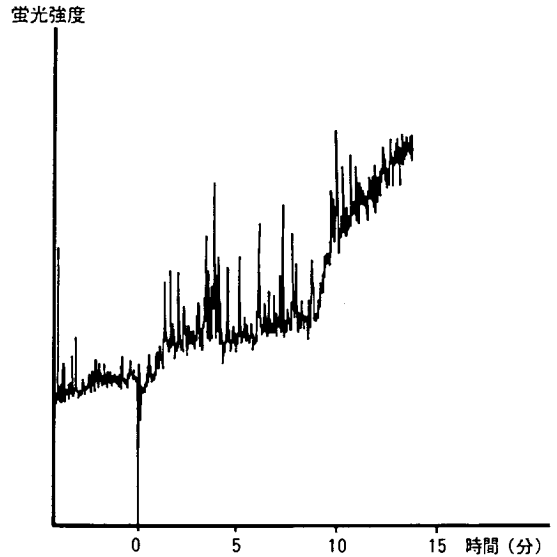


図 6 SLE 患者末梢血単核球を、24 時間 15-deoxyspergualin(DSG, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とともに培養し、同様に Fura-2 AM と反応させた後、RPMI 培地で洗浄、0.6 ml のカルシウム緩衝液に浮遊した。図 1 と同様に PHA を添加し、蛍光強度の変化を観察した。

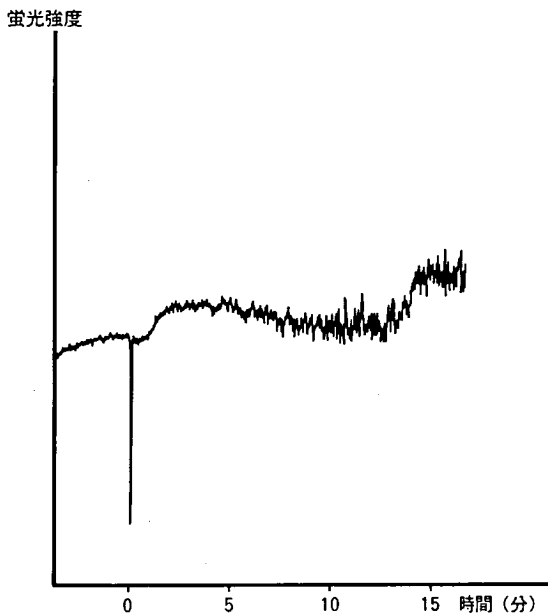


図 5 SLE 患者末梢血単核球を、24 時間サイクロスポリン A(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とともに培養し、同様に Fura-2 AM と反応させた後、RPMI 培地で洗浄、0.6 ml のカルシウム緩衝液に浮遊した。図 1 と同様に PHA を添加し、蛍光強度の変化を観察した。

期上昇反応)、約 5 分後よりさらに軽度の上昇(後期上昇反応)が認められた。これはまず細胞内カルシウム・プールからの動員後、細胞外からの流入が引き続いて起こることによるとされている⁹⁾。約 10 分後にイオノフォアを加えたところ、著明な細胞内カルシウム濃度の上昇がみられ最大蛍光強度を得た。

基礎値から最大蛍光強度までの上昇反応を 100%とした時、PHA 添加後の上昇は約 40%であった。サイクロスポリン A 処理単核球では、図 2 のように、PHA 刺激後の細胞内カルシウム濃度の初期上昇反応は約 25%と抑制された。DSG 処理単核球でも同様(約 25%)の抑制が認められた(図 3)。しかし、後期上昇反応にはほとんど影響を及ぼさなかった。

一方 SLE では、初期上昇反応は約 40%とほぼ健常人と差がなかったが、後期上昇反応は全く認められず、むしろカルシウム濃度は低下した(図

4). 辻らは⁹⁾, SLE 患者リンパ球では PHA 刺激後の細胞内カルシウム濃度の上昇反応は初期, 後期とも抑制されるが, 後期上昇反応のみ抑制される場合もあることを示した. サイクロスポリン A 処理した場合, 最大蛍光強度が低かったため, 初期上昇反応は約 50% となったが, 後期上昇反応は全く認められなかった(図 5). DSG 処理では, 図 6 のように, 初期上昇反応は最大蛍光強度の約 30% であったが, 後期上昇反応は僅かに認められた.

結 語

1) 健康人単核球において, DSG はサイクロスポリン A と同様に, PHA 刺激による細胞内カルシウム濃度の初期上昇反応を抑制した.

2) SLE 患者単核球では, PHA 刺激後, 細胞内カルシウム濃度の初期上昇反応は健康人同様に認められたが, 後期上昇反応はみられず, むしろ低下した.

3) サイクロスポリン A 処理は, SLE における細胞内カルシウム濃度の後期上昇反応の欠如を是正しなかったが, DSG 処理ではこれを改善した.

以上より, DSG はサイクロスポリン A 同様, 初期の細胞内カルシウム濃度の上昇反応, すなわち細胞内小胞体からカルシウムの動員を抑制する可能性が考えられた. また後期上昇反応, すなわち細胞外からのカルシウムの動員については, DSG

は健康人単核球に影響しなかったが, SLE で低下した反応を回復させることが示唆された.

文 献

- 1) 本間光夫: 膠原病の臨床. 日内会誌, 70: 1-15, 1981.
- 2) Koffler, D., *et al.*: Systemic lupus erythematosus: prototype of immune complex nephritis in man. *J. Exp. Med.*, 134: 1695-1705, 1971.
- 3) Okubo M., Inoue K., Umetani N., *et al.*: Lupus nephropathy in New Zealand F₁ hybrid mice treated by (-)15-deoxyspergualin. *Kidney Int.*, 34: 467-473, 1988.
- 4) 井形昭弘, 他: 厚生省新薬開発研究費. 自己免疫疾患治療薬の開発研究, 青柳班, 昭和 61 年度研究報告書. pp. 111-116, 1987.
- 5) 藤原道夫, 他: 厚生省新薬開発研究費. 自己免疫疾患治療薬の開発研究, 青柳班, 昭和 61 年度研究報告書. pp. 61-67, 1987.
- 6) 徳永 徹, 他: 厚生省新薬開発研究費. 自己免疫疾患治療薬の開発研究, 青柳班, 昭和 63 年度研究報告書. pp. 67-72, 1989.
- 7) Fujii H, Takada T., Nemoto K., *et al.*: *In vitro* immunosuppressive properties of spargualins to murine T cell response. *J. Antibiotics*, 42 (5): 788-749, 1989.
- 8) 本間光夫, 他: 厚生省新薬開発研究費. 自己免疫疾患治療薬の開発研究, 青柳班, 昭和 63 年度研究報告書. pp. 135-139, 1989.
- 9) 辻 秀一, 鈴木康夫, 山田秀裕, 松岡康夫, 入交昭一郎, 市川陽一, 本間光夫: 全身性エリテマトーデス(SLE)患者のリンパ球活性化における初期情報伝達系異常に関する研究. 一細胞内 Ca²⁺ 上昇反応の低下. 第 33 回日本リウマチ学会総会抄録集. p. 137, 1989.
- 10) Personal consultation to Dr. Tsuji.

本研究班を終了するに当たって

本研究班を終了するに当たって

班 長 青 柳 高 明

短かったこの5年間を簡単に取りまとめてみる。

本研究班の発足の経緯については先に述べたので省略する。

班の構成メンバーには幾つかの変更があった。

班員では2年目から順天堂大学の佐藤猛博士に、3年目から国立予防衛生研究所の徳永徹博士に、そして最後の2年間には更に千葉大学の谷口克博士と東京大学医科学研究所の金井芳之博士にもご協力いただいた。その反面、班員の人数の都合で、本研究班の発足以来微生物二次代謝産物とその誘導体の作製と試料の提供にご協力願っていた明治製菓株式会社の深津俊三博士、日本化薬株式会社の滝田智久博士、宝酒造株式会社の大林晃博士には4年目以後は班友会社としてご協力いただくことになってしまった。誠に申し訳なく思っている。改めてお礼申し上げる次第である。

一方、班友では悲しい2つの思い出がある。それは、本研究班の生みの親でもある微生物化学研究所長の梅澤浜夫先生が昭和61年12月25日に、また日本化薬株式会社の松田明先生が昭和62年3月4日に逝去されたことである。班員、班友一同とともに慎んでご冥福をお祈り申し上げます。

さて最後に、班員各位の研究期間における成果を要約して本報告書を終わることにする。

班員が施行された研究は次のとおりである。

1) 青柳高明 (微生物化学研究所・研究期間5年) : 自己免疫異常における酵素網の解明と二次

代謝産物の探索

2) 永津俊治 (名古屋大学医学部・5年) : 膠原病の基礎的解明とその治療への応用

3) 梅澤一夫 (慶応義塾大学理工学部・5年) : がん遺伝子作用阻害物質による免疫抑制の試み

4) 石塚雅章 (化学療法研究所・5年) : 免疫修飾に作用する微生物代謝産物の研究

5) 田平 武 (国立精神・神経センター・5年) : 自己免疫性脳炎・神経炎の治療薬開発

6) 佐藤 猛 (順天堂大学医学部・4年) : 新しい免疫抑制剤による実験的自己免疫性筋無力症ラットの治療実験

7) 徳永 徹 (国立予防衛生研究所・3年) : 15-Deoxyspergualin の免疫抑制活性発現の機序に関する研究

8) 谷口 克 (千葉大学医学部・2年) : 自己免疫疾患モデルマウスに対するFK-506ならびにIFN- γ の効果

9) 金井芳之 (東京大学医科学研究所・2年) : ポリADP-リボース合成酵素阻害剤(ベナドロスチン)と抗ポリADP-リボース抗体

10) 藤原道夫 (新潟大学医学部・5年) : エリテマトーデスモデルマウスを用いた微生物代謝二次産物の治療効果に関する研究

11) 生田房弘 (新潟大学脳研究所・5年) : 各種微生物二次代謝産物によるEAE病変の修飾に関する神経病理学的研究

12) 永井克孝 (東京大学医学部・5年) : 実験的ア

レルギー性脳脊髄炎(EAE)に関する二次代謝産物の治療剤の検索

13) 和田孝雄(慶応義塾大学医学部・5年):自己回帰モデル解析による免疫ネットワーク解析と免疫調節剤の作用評価

14) 大久保充人(北里大学医学部・5年):微生物二次代謝産物の免疫抑制効果,特に腎炎発症・進展の抑制について

15) 井形昭弘(鹿児島大学・5年):自己免疫性神経疾患治療薬の開発研究

16) 本間光夫(慶応義塾大学医学部・5年):ヒト末梢血単核球による抗核抗体産生におよぼす15-deoxyspergualinの影響に関する研究

次に,上記各分担研究者の研究成果について要約する。

1. 自己免疫異常における酵素網の解明と二次代謝産物の探索(青柳高明)

本班は全身性エリテマトーデス,進行性全身性硬化症,慢性関節リウマチなどを含む膠原病,また脱髄性神経疾患などの自己免疫疾患治療薬を開発することを目的として,昭和60年度に厚生省薬務局より新薬開発研究班として発足し現在に至っている。

難病治療薬開発という使命を担った本班の主旨に沿い,微生物二次代謝産物から有効と思われる多くの低分子化合物を検索した。即ち,酵素阻害物質としては,エンドペプチダーゼ阻害物質,エクソペプチダーゼ阻害物質,エクトエンザイム阻害物質ならびに免疫修飾物質を含む抗菌物質,抗癌物質などを微生物培養液中に発見し,班員の要望に答え配布した(昭和60年度~平成元年度)。

一方,自己免疫疾患の病態を解明し,その治療薬の開発を志し,病態モデル動物の血清を含む各臓器ならびに患者血清中の酵素網の動態を調べ,病因に密接に関係すると考えられる新しい探索法を考案し,この方法により発見された活性物質の

構造並びに薬理活性を研究した。

SLE腎症を呈するNZB/W F1マウス脾内のprolyl endopeptidase(PPCE)は病状の進行とともに増加することが注目された。PPCEに対する阻害物質を探索し,poststatinを発見した。免疫不全におけるPPCEおよびpoststatinの役割を研究している(昭和60年度)。さらに,MRL/*lpr*マウス脾内のセリン・プロテアーゼとプロリン関連酵素の病因的意義を調べた。脾内の酵素活性のうち,第一主成分に高い相関を有するセリン・プロテアーゼが年齢に伴い減少する。この関係はNZB/W F1および老化マウスにも認められ,病因との関係を研究中である(昭和61年度)。一方ヒトリンパ球のサブポピュレーションとプロテアーゼを含む酵素網との関連性を調べ,T細胞特有の酵素としてGlcNAc-ase(N-acetyl- β -D-glucosaminidase),PPCE,DPP-IV(dipeptidyl peptidase IV)が,またB細胞特有の酵素としてPoly(ADP-ribose)synthetase,Leu-AP,AP-B,cathepsin Bなどが作用していることを明らかにした。DPP-IV阻害物質としてDiprotins AとB,またPoly(ADP-ribose)synthetase阻害物質としてBenadrostinなどを発見した。これら阻害物質の薬理作用は研究中であるが,EAEに有効であることが報告されている(昭和62年度)。SLEモデル動物(NZB/W F1,MRL/*lpr*,BXSb/雄)の脾内セリン・プロテアーゼの動態を発病前,発病時,発病後の各時期について比較検討した。脾内セリン・プロテアーゼ活性は発病前後から低下する傾向が認められ,この低下が中心的役割を果たしていることを明らかにした(昭和63年度)。強い免疫抑制能を有するDeoxyspergualin(DSG)の(-),(+)-enantiomersを連続33日間マウス腹腔に投与し,脾内の酵素網の動態を調べた。(-)-DSG群はDPP-IVとGlcNAc-ase活性を有意に抑制した。(+)-DSG群はGlcNAc-ase活性のみが有意に抑制された。(-)-DSGの活性発現と

DPP-IV 活性が密接な関係にあることを明らかにした。DPP-IV 阻害物質 Diprotins A と B, また永津班員らが報告した DPP-II の役割を明らかにするため, DPP-II 阻害物質 Diocstatin を発見した。これら阻害物質の薬理作用を研究中である(平成元年度)。

2. 膠原病の基礎的解明とその治療への応用(永津俊治)

膠原病の原因の基礎的解明と、微生物が生産する二次代謝産物に自己免疫疾患である膠原病の治療薬を開発するスクリーニング法を確立する目的で、膠原病に特異的な生化学的指標を研究した。自己免疫疾患モデル動物として NZB マウス, BXSB 雄マウス, MRL/lpr マウスを用いて、発症前, 発症直後, 発症進行中の期間における脾臓などの組織と血漿を検索した。患者では膠原病の代表疾患の慢性関節リウマチ(RA)と全身性エリテマトーデス(SLE)の血清と関節液を検索した。生化学的指標として、永津ら、青柳らが膠原病に特異的な変化を見出しているペプチダーゼ類と、マクロファージが T 細胞の活性化により生成すると推定されているネオプテリンなどのプテリジン類を検索した。本研究の結論として、モデル動物と患者とで一致した膠原病に特異的な生化学的変化は、ペプチダーゼ類では、ジペプチジル(アミノ)ペプチダーゼ(DAP)-II の増加, DAP-IV の減少, ポストプロリンクリーピングエンザイム(PPCE)の増加, DAP-II/DAP-IV 比の増加であり、プテリジン類では、ネオプテリンの増加, ネオプテリン/ピオプテリン比の増加であった。モデル動物のペプチダーゼの変化は 15-デオキシスパーガリンで発症を抑制すると正常化された。以上の成績は、ペプチダーゼ類とプテリジン類の生化学的変化は自己免疫疾患の原因と密接に関連しており、自己免疫疾患モデル動物で DAP-II/DAP-IV 比とネオプテリン/ピオプテリン比を正常化する微生物

の二次代謝産物は自己免疫疾患の治療薬となることを示す。*in vivo* の系では、DAP-II と PPCE の酵素阻害薬のスクリーニングで自己免疫疾患の治療薬を開発できることを示唆する。

本研究で、初期の目的をほぼ達成できたが、DAP-II と PPCE の酵素阻害物質を微生物の二次代謝産物に発見して、自己免疫疾患モデル動物で治療の有効性をみてさらにヒトの自己免疫疾患への応用を研究していく予定である。ネオプテリンの増加はマクロファージの活性化の結果と考えられるが自己免疫疾患治療薬をモデル動物でスクリーニングするために有用な生化学的指標と考えられる。

3. がん遺伝子作用阻害物質による免疫抑制の試み(梅澤一夫)

発がんプロモーターやがん遺伝子の作用機構とリンパ球やマクロファージ活性化の機構に多くの共通点があることから、放線菌など微生物より新しいがん遺伝子作用阻害物質を単離し、免疫抑制物質、さらに自己免疫疾患治療薬に発展させることを目的とした。その結果、イノシトールリン脂質代謝回転阻害物質として新規物質のイノスタマイシンとペンドールマイシン、既知物質のプシテクトリゲニン、オロボール、2,3-ジヒドロキシベンゾイックアシッドをスクリーニングすることができた。この中でプシテクトリゲニンは *in vitro* 実験系で免疫抑制作用を示した。一方で既に発がんプロモーション抑制や EAE を抑制することが知られている SD170 を抗発がんプロモーション活性を指標により効果的に修飾することを試み、SD714 を見出した。SD714 は *in vitro* および *in vivo* マウス免疫系で抑制作用がみられた。

分担研究期間の成果として免疫抑制の機構に基づいて新物質を含むいくつかの生理活性物質が微生物から得られたことがあげられる。残したことは動物を用いた免疫抑制の実験を充分に行っては

いないこと、得られた生理活性物質を自己免疫疾患治療薬に発展させるに至らなかったことである。しかし自己免疫疾患治療薬の開発における本研究の意味は、イノシトールリン脂質代謝阻害物質には免疫抑制を示すものも得られたことから、現代の免疫学の知識に基づく新しい自己免疫疾患治療薬の開発の可能性を示したことと考えている。

4. 免疫修飾に作用する微生物代謝産物の研究 (石塚雅章)

A) 15-Deoxyspergualin の免疫修飾作用

研究目的：15-DSG は L1210 に著明な抗腫瘍効果を示すとともに腫瘍免疫を誘導する。また強い免疫抑制作用を示し皮膚移植あるいは各種の免疫疾患のモデルに効果を示すことが明らかにされている。本研究は相反すると思われる 15-DSG の作用機構を明らかにすることを目的とする。

研究成果：

(1) 15-DSG はマウスの羊赤血球に対する遅延型過敏症(DTH)および抗体産生などの免疫応答を 1.6-25 mg/kg, 3 日間の投与で著明に抑制し、脾細胞培養による抗体産生系では生細胞数に影響を与えずこれを強く抑制した。(昭和 61 年度)

(2) 15-DSG は混合リンパ球培養反応を濃度に依存してこれを抑制したが、培養上清の IL-2 産生を抑制せず増強した。15-DSG 投与マウスの脾細胞は、正常あるいは坦癌マウスのいずれにおいても IL-2 産生能の増強を示した。Cyclosporin A はこれを強く抑制した。(昭和 61・62 年度)

(3) 15-DSG 投与マウスの脾細胞およびリンパ節中 T 細胞の Ly2, L3T4, Thy1. 2 比には著明な変化は見られなかった。Cyclosporin A では T 細胞 subset に著明な減少が見られる。(昭和 62・63 年度)

(4) 15-DSG は Con A で T 細胞に誘導される IL-2 受容体形成を濃度に依存して抑制した。(昭

和 63 年度)

(5) L1210 移植マウスへ 0.4-12.5 mg/kg の腹腔内投与で治癒ならびに腫瘍免疫を誘導した。抗腫瘍効果は免疫抑制効果より比較的少量でも得られる。

(6) 腹腔内投与で Ia 陽性腹腔内浸出細胞比の上昇が見られた。(昭和 62・63 年度)

(7) 15-DSG 腹腔内投与マウスから採取した腹腔マクロファージは Cytostatic 活性を示した。(昭和 63 年度)

(8) 15-DSG は *in vitro* でマクロファージ存在下、T 細胞の IL-3 および MAF (macrophage activating factor) 産生を増強した。(平成元年度) まとめ：

現在までに得られた結果から 15-DSG の作用機構は以下のように考えられる。

免疫抑制作用は、15-DSG の比較的大量投与によって見られ、細胞数および subset 比に著明な影響を示さないが、特に T 細胞の IL-2 受容体形成の阻害に働くことによって得られる。また、B 細胞の抗体産生抑制にも働くと思われるが直接の証明は得られていない。

一方、腹腔内移植 L1210 に対し、腹腔内投与された 15-DSG は T 細胞に働き、その MAF 産生を刺激し、MAF は腹腔内マクロファージの Ia 陽性細胞数を増加させ抗原提示細胞としての機能を増強するとともに、T 細胞の IL-2 および IL-3 などのリンフォカイン産生を増強した結果、抗腫瘍エフェクターの生成に働き腫瘍免疫の成立に作用すると思われる。

B) 免疫調節物質の検索(平成元年度)

微生物代謝産物中に自己免疫疾患に有効な免疫調節物質を探索することを目的に混合リンパ球培養(MLCR)ならびに IL-2 の T リンパ芽球増殖刺激反応に対してスクリーニングを行い抗生物質 Nocardamin および Deferoxamine にその作用を見出した。

これらの物質はMLCRおよびIL-2反応を低濃度で抑制したが、L1210培養細胞に対しては抑制が極めて弱く免疫反応に特異的な抑制作用と思われた。これらの物質はいずれも鉄キレート剤であり、免疫応答系に対する鉄イオンの存在が重要と思われ、今後検討する価値があると思われる。

5. 自己免疫性脳炎・神経炎の治療薬開発(田平武)

多発性硬化症(MS)は我が国では特定疾患に指定されており、我が国で人口10万対5人、欧米で人口10万対50~80人の患者がいる。しかし、その発病機序は未だ不明で、的確な治療法もない。実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)は自己免疫が本態の脱髄性脳炎であり、MSの動物モデルとして治療開発のために用いられている。本研究者はEAEを用いて、それを抑制する薬物を特に微生物二次代謝産物の中からスクリーニングすることを目的に研究に取り組んできた。その結果、15-Deoxyspergualin, Bactobolin, FK-506に有意なEAE抑制効果があることを見出した。特にBactobolinは本研究者らのoriginalな発見であり、BactobolinについてはEAEの予防効果ばかりでなく、発症後の投与でも有効であることを見出した。このことは、患者は発症後病院を訪れるので、このような薬剤の発見は最も期待される場所である。しかしBactobolinは残念ながら毒性が強く、かつ効果域が狭いという欠点があった。そのため毒性の低い効果域の広い誘導体の合成の必要性を指摘した。これまでにActinobolin, Bactobolamine, N-Acetylbactobolamineのテストが可能となり、テストした結果、いずれも著しい毒性の低下を認めたと、効果も減弱し、わずかにActinobolinが120 mg/kgという高濃度でEAEの軽度抑制を示すことが分かった。今後更に新しい誘導体を合成し、テストを重ねていく必要がある。またBactobolinの作用機序については、

抗原非特異的に特に活性化リンパ球に対しCytotoxicに作用している可能性が最も高いことを指摘したが、作用機序の検討も引き続き必要である。また、薬剤の安定性、投与方法の改善に関する検討も必要と思われる。

最近自己免疫疾患の発症機序は分子レベルで明らかにされてきており、その理論にもとづく新しい免疫療法の開発研究が盛んに行われている。例えば、T細胞受容体抗体、ワクチネーション、抗イディオタイプ抗体、抗原ペプチドに類似のペプチドによる競合的抑制などである。今後は二次代謝産物からのスクリーニングのみでなく、新しい免疫理論にもとづく治療法開発研究が必要であろう。

6. 新しい免疫抑制剤による実験的自己免疫性筋無力症ラットの治療実験(佐藤 猛)

重症筋無力症の治療には胸腺摘出術、ステロイド大量療法、その他の免疫抑制剤の投与などが行われているが、より安全で有効性の高い免疫抑制剤の開発を目的として、動物モデルを用い、4種の新しい免疫抑制剤の投与実験を行った。

15-Deoxyspergualin, Bactobolin, Actinobolin, Bactobolamineは近年開発された抗腫瘍性抗生物質で、ともに免疫抑制作用を持つことが知られている。そこで、これらの薬剤を実験的自己免疫性筋無力症(EAMG)ラットに投与し、その有用性を検討した。

15-Deoxyspergualinは0.6~5.0 mg/kg/day投与量を設定し、免疫後1日並びに10日目から投与開始した。Bactobolinは0.5 mg/kg/dayおよび5.0 mg/kg/dayの投与群を設定し、免疫後1日目から投与開始した。Actinobolinは15~120 mg/kg/dayの投与量を設定し、免疫後1日並びに10日目から投与開始した。Bactobolamineは5~50 mg/kg/dayの投与量を設定し、免疫後1日目および10日目から投与した。2週毎に採血を行

い抗 AChR 抗体価を測定した。また、8 週の臨床観察を終えた後、後肢伸筋を採取し電顕による観察を一部について行った。

15-Deoxyspergualin 並びに Actinobolin を免疫後 1 日目から投与した群では、薬剤の投与量に対して抗 AChR 抗体価の上昇が抑制された。一方、免疫後 10 日目から投与開始した群では抗体価の上昇を抑制することは可能であったが、十分な治療効果を得られなかった。

4 種類の新しい免疫抑制剤の重症筋無力症への応用を目的として EAMG ラットの治療実験を行ったが、初日より免疫抑制剤を投与した群では 15-Deoxyspergualin と Actinobolin で効果が認められた。

実際の患者では発症し、抗 AChR 抗体が上昇している時期に治療を始める。EAMG ラットでは慢性期に相当すると考えられている。EAMG ラットでは、7~10 日後に抗体が検出され、神経筋接合部ではマクロファージの浸潤が認められ、急性期に相当する。そこで 2 種の免疫抑制剤を免疫 10 日目から投与したが、15-Deoxyspergualin 0.6 mg/kg/day にて抗体抑制効果が認められ、臨床的有用性が期待された。しかし 15-Deoxyspergualin は 5 mg/kg/day ではラットに著しい毒性が認められ、臨床応用面ではなお問題があるので、より安全性の高い誘導体の開発が期待される。

7. 15-Deoxyspergualin の免疫抑制活性発現の機序に関する研究 (徳永 徹)

15-Deoxyspergualin (DSG) による免疫抑制の機序を明らかにするため、マウスの CTL 誘導、骨髄細胞の分化・増殖、各種株化細胞の分化の糸を用いて検討した。in vivo の実験では、溶液中で安定な DSG の誘導体 15-deoxymethylspergualin (MeDSG) を用いた。

二次 CTL 誘導の糸を用い、DSG および MeDSG の投与(処理)時期を検討したところ、

CTL 前駆細胞から成熟 CTL への分化のステップが本薬剤に最も感受性が高く、成熟 CTL の effector phase での機能は抑制しないことが明らかにされた。in vivo での MeDSG による CTL 誘導抑制は IL-2 では完全には回復せず、IFN- γ (50 u/ml) で完全に回復した。しかしながら、MeDSG は二次 MLR による IL-6 および IFN- γ の産生そのものは抑制しなかった。

DSG 投与マウス骨髄細胞の CSF 応答性、正常骨髄細胞の CSF による増殖に対する MeDSG の効果を検討した結果、本薬剤は骨髄幹細胞の分化・増殖を損なうことなく一時的に細胞を凍結する作用のあることを見出した。

MeDSG は、骨髄性白血病細胞のマクロファージへの分化、神経細胞の分化、マクロファージの Ia 抗原発現を抑制しなかった。

以上の研究成果から DSG の作用機序が十分に解明されたとは言えないが、従来の免疫抑制剤 (Cyclosporin A, FK-506) とは明らかに作用機序を異にすることは明らかにされたと思われる。

DSG の利点は、MLR および CTL 誘導を抑制するものの、IL-2 を初めとするサイトカイン産生は抑制しないこと、胸腺髄質細胞を障害しないこと、抑制効果が Reversible であること等が挙げられる。他の免疫抑制剤との併用など効果的な使い方をするこで、相乗効果が期待される。

8. 自己免疫疾患モデルマウスに対する FK-506 ならびに IFN- γ の効果 (谷口 克)

(昭和 63 年度)

代表的な全身性自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) のモデル動物の NZB \times NZW F1 (B/W F1) マウスと MRL/lpr マウスならびに臓器特異的自己免疫疾患である I 型糖尿病のモデル動物の NOD マウスに、新たに開発された免疫抑制剤、FK-506 を全身投与し、同剤の自己免疫疾患に対する効果を検討した。その結果、

SLE モデル動物に対しては、生存率の有意な延長、蛋白尿出現の抑制、ループス腎炎発症の抑制等が認められた。特に MRL/*lpr* マウスにおいては、このマウスに特徴的に認められるリンパ節腫脹の抑制効果を発揮した。しかし、抗 DNA 抗体等、自己抗体価には変化は見られず、免疫グロブリンのレベルも、投与群とコントロール群間には有意な差は認めなかった。以上の結果から、FK-506 は直接 B 細胞もしくは抗体産生を制御する T 細胞には関与せずに免疫抑制効果を示すと考えられた。

I 型糖尿病に対する効果も顕著で、NOD マウスの顕性糖尿の出現を完全に抑制し、通常生後 3 ヶ月齢までには認められる insulinitis も完全に消失していた。

以上のように FK-506 は SLE ならびに I 型糖尿病のモデルマウスの自己免疫病の発症を抑制した。組織学的レベルでは、明らかな副作用は認めなかったが、唯一 NOD マウスにおいて食事摂取の低下に起因する体重減少が認められた。
(平成元年度)

I 型糖尿病のモデル動物である NOD マウスに IFN- γ を全身投与し、自己免疫発症に対する効果を検討した。その結果、IFN- γ は糖尿病発症前のいずれの時機から投与しても、NOD マウスの顕性糖尿病の発症を抑制する効果を有していた。しかし、組織学的には、IFN- γ は insulinitis を早期に誘導する作用を有していた。すなわち、IFN- γ は、NOD マウスの自己免疫現象に対して、insulinitis の促進と糖尿病発症の抑制(β 細胞破壊の抑制)という、2 つの異なった作用を有することが明らかとなった。

9. ポリ ADP-リボース合成酵素阻害剤(ベナドロスチン)と抗ポリ ADP-リボース抗体 (金井芳之)

SLE モデルマウスの妊娠系に対するベナドロ

スチンの選択的免疫抑制作用を検討し、SLE 妊娠合併時の早・流産治療薬開発のための基盤確立の目的で以下の実験を行った。

先ず MRL/*l* マウスにおけるベナドロスチン投与法の検討を行い 10 mg/kg で週 1~3 回の ip 投与で病理組織学的変化のないことを確認した。これに基づいて 10 週齢の MRL/*l* マウスの抗核抗体産生に対するベナドロスチンの効果を調べ、抗ポリ ADP-リボース抗体に対する選択的抑制作用のあることをつきとめた。この抑制作用は 10 週齢の時点で抗 ssDNA 抗体よりも抗ポリ ADP-リボース抗体が高値であるマウスで著明であった。ちなみに 10 週齢で抗ポリ ADP-リボース IgG 抗体が抗 ssDNA IgG 抗体よりも高いマウスの頻度を調べたところ約 50%であった。このように 10 週齢で既に高力価の抗ポリ ADP-リボース抗体を有するマウスは当該抗原に対して特異的であり、ベナドロスチンによる抗体産生抑制効果がよく現われるところから、MRL/*l* マウスの低仔産例での選択的抗ポリ ADP-リボース抗体の異常上昇にはポリ ADP-リボース合成酵素の関与が強く示唆される。また 10 週齢 MRL/*l* マウスのポリ ADP-リボース感作で全例に強い IgG 抗体応答がみられたことから以上のことが支持されよう。

以上の結果から、ベナドロスチン投与実験は抗原つまりポリ ADP-リボースの B 細胞への提供を物質の産生レベルで低下させ、免疫調節できることを示したものである。また本研究は全身性自己免疫疾患において自己抗原が重要な作用をになっている場合のあることを明瞭に示すことが出来た初めてのケースであろう。今回は基礎実験に重点を置いたが、次に来る実験計画では MRL/*l* マウスを用いた妊娠系での臨床実験が可能となろう。

10. エリテマトーデスモデルマウスを用いた微生物代謝二次産物の治療効果に関する研究 (藤原道夫)

上記タイトルを遂行する目的で以下のようなステップで試験を実施した。

(1) 免疫応答に対する産物の効果

これまでに知られている治療薬(ステロイド類, サイクロフォスファミド)は強い免疫抑制効果を持つことから, 簡便で定量性のあるヒツジ赤血球に対するマウスのブラック形成能に対する影響を指標にして産物のスクリーニングを行った。調べた産物の中で15-デオキシスパーガリン(DSP)のみが強い抑制活性を示すことが確かめられた。

(2) 次のステップとしてエリテマトーデスモデルマウスを用いて発症抑制効果を調べた。

ヒトへの応用を考える場合, 疾患モデル動物の妥当性が問題となる。エリテマトーデスには優れたマウスモデルがあるので, それを用いて産物の効果を検索した。MRL/*lpr* および BXSB(♂)マウスは8週齢までは異常は認められないが, 13週齢位でB細胞の自発的活性化が顕著になり, 自己抗体(抗核抗体など)が検出されるようになり, ループス腎炎が発症してくる。20週には諸症状が顕著になり, マウスは死亡し始める。

これらマウスに5週齢から7週間 DSP(2.5~5 mg/kg)投与すると免疫異常とループス腎炎の発現が完全に防止できた。

(3) 次に発症後に DSP を投与してエリテマトーデスの進展に対する効果を調べた。13週齢から DSP 5 mg/kg 2週間投与し, 2週間休み, 再び次の2週間投与するというプロトコルで, エリテマトーデスの進展は著しく抑制されていた。さらに17週齢から同量を2週間投与した場合にも抑制効果が示された。他の産物でこのような効果は示されていない。

(4) DSP の作用機序の検討

DSP は T および B 細胞の両者に作用すると考

えられる。T 依存性および非依存性(B細胞依存性)の免疫応答を共に著しく抑制するからである。MRL/*lpr* マウスでは, 異常に増殖する T 細胞ポピュレーションを選択的に障害し, 正常の T 細胞は保持される。

以上のように DSP はエリテマトーデスに対して治療効果があることがモデルマウスで示された。しかも異常な細胞増殖を選択的に障害するという好ましい側面も示された。

(5) 今後の問題点

これは更に詳しい作用機序と副作用の追求という点にしぼられてくる。投与プロトコルと他剤との併用効果も検討する余地が残されている。

またエリテマトーデスの他のモデルを用いた効果, 臓器特異的自己免疫疾患に対する効果も検討を進める必要がある。

11. 各種微生物二次代謝産物による EAE 病変の修飾に関する神経病理学的研究 (生田房弘)

本班で有する各種薬剤に関し, 脊髄 homogenate を抗原とするラット EAE に対するそれらの抑制効果を組織学的に検討した。

(1) 15-Deoxyspergualin (DSP)

感作当日から 5 mg/kg 連日投与することで発症は遅延し, 症状の回復率も高まり, 形成病変も軽かった。感作後 5 日目以後, ないし発症後投与では, 抑制効果はない。感作当日から連日投与し, 感作後 59 日目での結果は, DSP 投与により EAE 病変はかなりの程度に治癒し得る可能性を示していた。

(2) Benadrostin

感作当日より 10 mg/kg あるいは 20 mg/kg を連日投与しても, 発症遅延効果は認めない。脱髄巣も多数認められたが, その程度は無処置対照 EAE ラットより軽く, 組織学的に, ある程度の抑制効果が得られた。

(3) DSP-Benadrostin 併用

感作当日以後 10 日間併用投与を試みた。組織学的には抑制効果が認められた。一方、発症直後からの投与では、組織学的に抑制効果は軽度であった。

(4) Bactobolin

1 mg, 0.1 mg/kg 量では感作当日、あるいは、感作後 5 日目からの連続投与でも病変形成の抑制効果は認められなかった。一方、発症後の同量連日投与では、EAE 病変形成は強く抑制された。治療薬としての本剤の最少有効量を知るために更に 0.05 mg/kg, 0.01 mg/kg の各量を発症後投与し、検定したが、いずれの量でも、対照とした EAE ラットの病変よりも強い病変が形成された。以上 4 dose での検定では、0.1 mg/kg が最少有効量と考えられた。

(5) Bactobolin と他剤併用

Bactobolin 0.1 mg/kg に Benadrostin 10 mg/kg または、DSP 5 mg/kg を発症後連日投与し検討したが、Bactobolin の抑制効果は増強されず、むしろ単独投与が有効であった。

(6) Actinobolin

5 mg/kg, 20 mg/kg 量を感作日および発症後に連日投与した。抑制効果を認めなかった。

(7) Diprotin A

1 mg/kg, 20 mg/kg 量を感作日および発症後より連日投与した。抑制効果を認めない。

以上から、EAE に対する DSP の予防効果と Bactobolin の治療効果が示された。Bactobolin の最少有効量は 0.1 mg/kg と考えられた。より少量投与では逆に EAE を増強する、このことは重要である。

12. 実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)に関する二次代謝産物の治療剤の検索(永井克孝)

多発性硬化症など免疫性要因が関与する難治性脱髄性脳・神経疾患を治療対象疾患とした微生物

二次代謝産物を、疾患モデル動物(実験的アレルギー性脳脊髄炎; EAE)でスクリーニングし、発症抑制、疾患の治療を可能にする物質を見出し、新薬として臨床での実現を図ることを目的としている。

これまでに数十種類の薬剤をスクリーニングしてきた。デオキシスパーガリンとバクトボリンが有望な薬剤として登場した。デオキシスパーガリンはどちらかという、発症の抑制により効果的であった。これに対してバクトボリンは発症後も効果がある点で治療剤として期待できた。しかし動物種によっては極めて強い毒性がみられ問題があった。

他方、毒性のない誘導体では治療効果も減少した。脳・神経疾患には脳・血管関門の障壁の克服という問題があり、その疾患治療にはドラッグ・デリバリーシステムの開発が要求されているが満足すべき解答がえられていない。それに対する方策としてリポソーム投与法を取り上げた。ロイペプチンや、抑制性 T-細胞誘導能をもつペプチドである血清胸腺因子(FTS)を、スルファチド・リポソームに抱合して EAE 動物に投与した時、顕著な治療効果を見とめた。このリポソーム法の利点は薬剤の毒性の軽減、投与薬剤の生体内半減期の制御、脳・血液関門通過の増強などにあるものと考えられる。

EAE を検定系として用いた場合に、動物種、抗原などの相異から統一した見解が得られるのに困難が生じた。班員の研究結果を整理し、有効性の判定、投与法、使用動物種、抗原等について一定の方式を決めていく必要がある。

課題としては有効薬剤の検索とリポソーム法など投与法の開発を図ることが引き続き必要である。本プロジェクトで開発される新薬が、多くの自己免疫疾患の病理の理解を助けるとともに臨床への実験的応用へと進展してゆくことを期待している。

13. 自己回帰モデル解析による免疫ネットワーク解析と免疫調節剤の作用評価 (和田孝雄)

従来、自己免疫疾患の治療薬において、中心的役割を演じてきたのは、主としてステロイドと免疫抑制剤であった。しかし、これらは免疫系全体に抑制的なために、必然的に生体の抵抗力を弱めるという副作用をもっている。そこで特定の免疫担当細胞の機能障害を正常化させる期待をもって免疫調節剤といわれる薬剤の開発がなされるようになってきた。しかし、免疫系は全体としてネットワークを形成しているために、いわゆる免疫調節とよばれる作用は具体的にどのようなものをさすのかということになると、不明な点が多い。そこで、この分野に自己回帰モデルを用いたネットワーク解析法を導入し、免疫調節作用の実態をあきらかにし、ついで免疫調節剤の作用を客観的に評価する方法の開発からとりかかった。最初の2年間で赤池のパワー寄与率およびインパルス応答がCD4, CD8細胞を中心とするフィードバック制御を具体的に表示し得ることを証明した。3年目は健康人においてベスタチンの免疫調節作用について調査を行い、この薬剤が従来生体外で確認された作用と、生体内作用との関係を明らかにし、また同時にこの薬剤の安全性の確認を行った。4年目は免疫異常のある透析患者において、ベスタチンを投与し、この薬剤がIgGの異常を正常化させる作用を持つことを明らかにした。5年目がベスタチンと他の免疫調節剤、すなわちロベンザリッド、サラゾピリンなどの調節作用との比較研究をおこなった。その結果、免疫調節という面からみると、ベスタチンはかなり直接的に免疫担当細胞の機能回復を実現するが、他の2薬剤の作用は、炎症因子などに対する作用を介して免疫ネットワークに間接的に影響すると思われた。従って、この2薬剤の投与下では個体によってさまざまな動的变化が見られ、あまり一定な作用がみられないことが分った。今後、免疫調節剤というカテゴ

リーを明確にさせるためにも、このようなフィードバック解析法を用いる必要があると考えられる。

14. 微生物二次代謝産物の免疫抑制効果、特に腎炎発症・進展の抑制について (大久保充人)

微生物二次代謝産物のうち、免疫抑制作用を有するものをスクリーニングして、腎疾患に対する効果を検討し、ヒトへの応用を最終の目的とした。

まず、糸球体腎炎を自然発症するマウスであるニュージーランドB/W F1マウス(B/Wマウス)を対象に選び、マウスに対する延命効果を指標にして、当研究班で開発された20数種類の微生物二次代謝産物に関してスクリーニングを行った。これらの薬剤のうち、延命効果を認めたものについて、腎炎への影響および免疫抑制機序を中心に詳細な検討を試みた。また、BALB/cマウスを用いて、該当薬剤の毒性試験、作用機序の検討や同種免疫反応への抑制効果の有無の検索などを行った。最後にヒト腎移植患者への臨床応用も試みつつある。

スクリーニングを行った薬剤のうち、15-deoxyspergualin(DSP)で明らかな延命効果が認められた。また、bactobolinで軽度の延命効果を、bactobolamineで腎症への治療効果を認めた。DSPに関して、さらに検討した結果、B/Wマウスの糸球体腎炎に対して発症だけでなく、すでに進行した腎炎に対する治療効果も認められた。また、DSPはマウスの同種甲状腺移植片の生着延長も来した。一方で、DSPは白血球減少や貧血など骨髄抑制作用を呈することが判明した。これは、ヒト腎移植患者で急性拒絶反応のrescue therapyにSDPを応用する際にも、今後の問題として残されている。

B/Wマウスでの成績は今後DSPをSLEや腎炎を初めとする各種の自己免疫疾患の治療に応用する根拠を提供する。また、DSPはIL-2産生に影

響を与えずに、ヘルパーT細胞を抑制、すなわちTH-2クローンを抑制するものと推定させる結果が得られたので、この点をさらに追求することにより、B/Wマウス腎炎発症メカニズム解明の有力な手段となり得よう。

15. 自己免疫性神経疾患治療薬の開発研究（井形昭弘）

免疫学的機序がその病態として考えられている各種神経疾患の治療薬の開発を目的とした。

方法：(1)末梢神経ミエリンに対する自己免疫が病態として考えられている Guillain-Barré 症候群の動物実験モデルである実験的アレルギー性神経炎(EAN)をもちいて本研究班で開発された各種薬剤を投与し、EAN抑制効果及び、発症後の治療効果を臨床的、組織学的に検討した。(2)HTLV-Iが関与する慢性進行性のミエロパチー・HAMの病態に免疫学的機序が想定されており、その臨床像、各種免疫学的パラメータを検討した。さらに本症に特徴的にみられる末梢リンパ球の自己増殖反応(APR)の分析を行い、それを指標としてHAMの治療薬のスクリーニングを試みた。

結果：(1)EANは15-Deoxyspergualin(15-DSG)、Bactobolinによりその発症が抑制された。Foroxymithineでは病変は軽度である傾向が示された。Forphenicine、Diplotin-Aに抑制効果はみられず、Diplotin-Aはむしろ病変を増殖した。発症後の治療的投与では15-DSG、Bactobolinの0.5mg、1mg/kg・匹、Foroxymithineの400 μ g、1mg、20mg/匹の投与にて有意の治療効果は見出せなかった。Actinobolin 200mg/kgではEAN病変の軽減が認められた。(2)HAM患者ではIgG・IgAの増加、活性化T細胞の増加、APRにおけるCD8陽性細胞の優位などの免疫学的特徴が明らかとなり、プレドニゾロン、IFN- γ が治療効果を示した。更にAPRはこの2剤により明ら

かに抑制されることより、本研究班で開発された各種薬剤がHAMの治療薬となり得るかをAPRの抑制を指標に検討した。その結果、15-DSG、methyl-DSG、Foroxymithine、BestatinにAPR抑制効果が認められ、Diplotin-AはAPRを増強した。

考察：Guillain-Barré症候群の治療薬として15-DSG、Bactobolin、Actinobolinにその可能性が示唆されたが、発症後の治療効果は不十分で、投与量、投与方法の検討、さらに新しい薬剤の開発がまたれる。また、自己免疫疾患の病態が明らかになりつつあり、その免疫学的過程に対応した薬効を持つ薬剤の開発により、その病態に則した治療が可能となるものと期待される。

HAMの病態における免疫学的機序の役割がかなり明らかとなり、さらにAPRの抑制を指標とする治療薬スクリーニングはHAMの治療薬開発の突破口として期待される。今後より多数の薬剤につき検討を進めたい。

16. ヒト末梢血単核球による抗核抗体産生におよぼす15-deoxyspergualinの影響に関する研究—抗体産生抑制機序について—（本間光夫）

種々の動物実験で15-deoxyspergualin(以下DSG)は免疫抑制作用を有することが示された。本研究は、DSGがヒトの膠原病の治療に使用されることを念頭に、その作用機序を明らかにするため*in vitro*での実験を行った。

まず、膠原病患者末梢血単核球による無刺激IgG産生ならびに自己抗体産生を、DSGが抑制するかどうかを調べた。その結果、DSGはこれらを抑制することが判明した。同時にマイトゲン刺激による健常人末梢血単核球の増殖およびIgG産生も抑制することが判明した。

次に、この抑制作用が免疫担当細胞のどの細胞を介したものであるかを明らかにするため、健常人末梢血単核球を用い、細胞の組合せ培養実験を

行った。その結果、T細胞、B細胞いずれも DSG 処理により、増殖反応ならびに IgG 産生が低下したが、主として T細胞に作用することがわかった。

さらに、T細胞を T4 および T8 の亜分画に分け、それぞれのマイトゲンに対する増殖反応を調べたところ、主に T4 細胞の増殖が抑制された。

一方、SLE 患者(抗 SSB/La 抗体陽性)末梢血単核球を用いた特異抗体産生(抗 SSB/La 抗体陽性)は、むしろ B細胞を DSG 処理した方が強く抑制された。

最後に、最近 T細胞増殖反応の初期段階として注目されている T細胞活性化機構において、健康人末梢血単核球を用い、細胞内カルシウム濃度を指標としてその影響を調べた。

その結果、PHA (Phytohemagglutinin) で刺激した時のカルシウム濃度の上昇は、サイクロスポ

リン A および DSG で一部抑制された。

〔結果の評価〕

DSG は、健康人では主として T細胞に、SLE では主に B細胞に作用し、これら免疫担当細胞の増殖反応を抑制することにより抗体産生を抑制したと考えられた。また、この細胞増殖反応抑制には、初期の細胞内カルシウム濃度の変化が関与している可能性が示唆された。

〔今後の展開〕

細胞内カルシウム動態をさらに詳しく調べることにより、既にサイクロスポリン A で明らかにされつつある細胞内での作用機序が、DSG についても明らかにされることが期待される。また、将来膠原病など自己免疫疾患患者で、DSG のかかる抗体産生抑制作用が自己抗体産生を抑え治療につながる可能性がある。

自己免疫疾患治療薬の開発研究
—微生物二次代謝産物を中心として—
開発研究班分担研究者一覧

氏名	所属	〒	住所	TEL
班長 青柳 高明	微生物化学研究所	141	東京都品川区上大崎 3-14-23	03-441-4173 内 233
幹事 永井 克孝	東京大学医学部 生化学	113	東京都文京区本郷 7-3-1	03-812-2111 内 3448
〃 和田 孝雄	慶応義塾大学医学部 腎臓センター	160	東京都新宿区信濃町 35	03-353-1211 内 2257
監事 本間 光夫	慶応義塾大学医学部 内科	160	東京都新宿区信濃町 35	03-353-1211
班員 井形 昭弘	鹿児島大学	890	鹿児島市郡元 1-21-24	0992-54-7141
〃 生田 房弘	新潟大学脳研究所	951	新潟市旭町通 1-757	0252-23-6161 内 5151
〃 石塚 雅章	化学療法研究所	410-03	沼津市宮本字元野 18-24	0559-24-0601
〃 梅澤 一夫	慶応義塾大学理工学部 応用化学科	223	横浜市港北区日吉 3-14-1	044-63-1141 内 3481
〃 大久保充人	北里大学医学部 内科	228	相模原市北里 1-15-1	0427-78-8111
〃 金井 芳之	東京大学医科学研究所 癌生物学研究部	108	東京都港区白金台 4-6-1	03-443-8111
〃 佐藤 猛	順天堂大学医学部 脳神経内科	113	東京都文京区本郷 2-1-1	03-813-3111 内 3322
〃 田平 武	国立精神・神経センタ ー神経研究所	187	小平市小川東町 4-1-1	0423-41-2711 内 5161
〃 谷口 克	千葉大学医学部 高次機能制御研究 センター	280	千葉市亥鼻 1-8-1	0472-22-7171
〃 徳永 徹	国立予防衛生研究所	141	東京都品川区上大崎 2-10-35	03-441-2181
〃 永津 俊治	名古屋大学医学部	466	名古屋市昭和区鶴舞町 65	052-741-2111
〃 藤原 道夫	新潟大学医学部 医動物学	951	新潟市旭町通 1-757	0252-23-6161
班友 石井 靖男	日本化薬株式会社	102	東京都千代田区富士見 1-11-2	03-237-5153
〃 大宮 久	宝酒造株式会社	600	京都市下京区四条通 東洞院東入立売西町 60	075-211-7131
〃 北里 一郎	明治製菓株式会社	104	東京都中央区京橋 2-4-16	03-273-3414
〃 志鳥 善保	メクト株式会社	163	東京都新宿区西新宿 2-1-1 三井ビル 5F	03-344-5411
〃 竹内 富雄	微生物化学研究所	141	東京都品川区上大崎 3-14-23	03-441-4173

(五十音順)