

原 著

## 口顎領域感染症モデルにおける T 細胞分化誘導の 治療学的基礎研究

伊 藤 良 明

### Therapeutic Studies on Induction of T-cell Differentiation in Infection Models of Murine Oral Region

Yoshiaki Itoh

(平成14年1月19日受付)

#### 緒 言

歯科口腔外科臨床において、炎症は日常的によく遭遇する病態である。この治療には、一般的に抗菌剤投与などの既知の治療法に加えて、消炎の補助的的外科療法などを行っているのが現状であるが、炎症症状が遷延化し、または難治化する例も多い。口顎炎症の治療上、これら病態の基礎的および臨床的解明が必要である。その基礎的研究の主眼は、これまで炎症細胞の解析とヒスタミンなどの各種 chemical mediator の遊離に伴う二次的病態の解析、さらに対症療法の有用性に関する研究に主力がおかれてきた。しかし、近年の免疫学の進歩により、ヘルパー T (Th) 細胞の分化程度が消炎過程にいかなる影響を及ぼし、またその消長が炎症にいかなる関与をしているかを示唆する報告がみられるようになった<sup>1,2)</sup>。生体防御機構に作動する Th 細胞は、種々の抗原刺激により賦活化されるが、このサイトカイン産生パターンにより、Th1 細胞 (Th1) と Th2 細胞 (Th2) に 2 大別されている。Th1 は、イ

ンターロイキン (IL)-2 やインターフェロン (IFN)- $\gamma$  を産生し、主としてキラー T 細胞や多形核白血球の増生や分化に働き、細胞性免疫に関係することが判明している。一方、Th2 は、IL-4, 5 など産生して B 細胞の分化や増生に働き、さらに抗体や chemical mediator の産生の点から、液性免疫に関係している。これらは cross regulation されており<sup>3)</sup>、いずれの亜集団が活性化されるかによって免疫応答は異なった様相を呈し、Th1/Th2 理論の概念となっている (図 1)。Mosmann ら<sup>3)</sup> (1989年) により Th2 細胞から産生され、第 10 番目のインターロイキン (interleukin: IL) として発見された IL-10 は、Th1 細胞から産生されるサイトカインを抑制する因子として同定された。当初は、cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF) と呼ばれていたが、Moore ら<sup>4)</sup> は、この CSIF の活性に着目して、expression cloning 法によりマウスおよびヒトの cDNA を単離した。その後、他のサイトカインと同様に遺伝子組換え体の標品が大量に入手可能となって、CSIF 活性以外にも多彩な生物活性を有することも判明したため、IL-10 と改名されると同時に、多機能性サイトカインとして知られるようになった。石田ら<sup>5-8)</sup> は、重症穿孔性腹膜炎のモデルマウスを作成し、IL-10 の治療効果を検討し、その臨床応用の可能性を示唆したが、著者も炎症に対する IL-10 の生物学的役割を明らかにするために、マウスで口顎領域の急性感染症モデルを作成して、臨床応用への可能性を検討した。

エリスロマイシン (EM) は、McGuire ら (1952年) により放線菌 (*Streptomyces erythreus*) から分離精製された抗生剤であるが、マクロライド系抗生物質に属するもので、マイコプラズマなどによる感染症では、今なお第一選択剤としての地位を保持している。しか

広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座 (主任: 石川武憲教授) 本論文の内容の一部は、第16回日本歯科薬物療法学会 (1997年2月, 千葉), 第17回日本歯科薬物療法学会 (1998年2月, 鶴見), 第52回日本口腔科学会総会 (1998年4月, 松山), 第18回日本歯科薬物療法学会 (1999年2月, 札幌), 第47回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会 (1999年11月, 神戸), 第33回広島大学歯学会総会 (2000年6月, 広島), 第45回日本口腔科学会総会 (2000年10月, 千葉) において口演発表した。

本研究は、一部文部科学省科学研究費 (平成12, 13年度 No. 12771221) による。

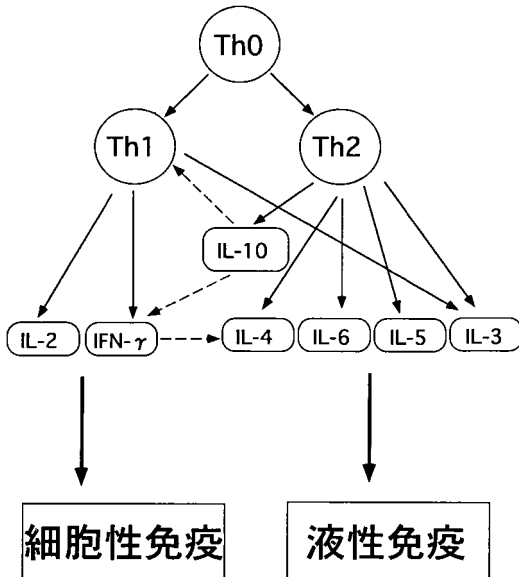


図1 Th細胞の分化と産生サイトカインの関係

Th1は細胞性免疫に、Th2は液性免疫に関与しており、いずれが活性化するかによって免疫応答は異なった様相を呈する。

し、近年、開発や臨床応用のめざましく進んだセフェム系抗生物質と比較すると、一見、退行するように思える。しかし、工藤ら<sup>9-12)</sup>のびまん性細気管支炎(diffuse panbronchiolitis: DPB)に対する著効例の報告以来、本来の殺菌効果以外の薬理的免疫賦活能が注目されている。特に、炎症病巣での好中球浸潤を抑制する効果は、前述したTh1/Th2理論に拡大できる可能性がある。このため、他の抗生剤と対比すべく検索を行うことにした。

## 実験法と材料

### I. カラゲニン発炎マウスの病態とIL-10単独の効果

#### 1. カラゲニン単独発炎マウスの作成

8週齢のBALB/cとC3H/HeN(以下、C3H)の各雌マウスを日本チャールズリバー社より購入し、λ-カラゲニン(和光純薬工業KK, 東京)の2, 4, 8%の各濃度に調整したゲルを作製し、これら各濃度のゲルを1群各30匹ずつのマウスに、各50μlずつのゲルを咬筋部皮下にマントウ針で注入し、発炎させた。

#### 2. 発炎マウスの腫脹径の計測

カラゲニン単独発炎マウスにおける腫脹部の長径と短径を経時的にノギスで計測した。

#### 3. 発炎マウスにおける白血球の検査

発炎マウスの血液を後大静脈より経時的に採取し、白血球数と分画比率の推移をライト・ギムザ染色法を

用いて検索した。

### 4. 発炎マウスの血中におけるTh細胞分化に関する検索

発炎マウスの後大静脈から経時的に採血し、比重遠心法で単核球層を分離し、Tris緩衝液(PH7.2)で洗浄後、37°Cで2時間のインキュベーションにより、単球の除去後、水中で30分間FITC-CD4モノクローナル抗体(PHARMINGEN社, USA)と反応させた。さらにフローサイトメーター(EPICS ELITE, COULTER, USA)を用いてCD4陽性細胞を選別した。その後、再び水中で30分間PE-IL-1Rモノクローナル抗体(PHARMINGEN社, USA)を反応させ、上記フローサイトメーターでIL-1Rの陽陰性を検索し、Th1とTh2の分化程度を検索した<sup>58, 59)</sup>。

### 5. IL-10単独投与による抗炎症効果の判定

遺伝子組換えマウスのIL-10をGenzyme社(USA)より購入し、0.05から0.5μgまでの各量を、発炎12時間後に腫脹部皮下にマントウ針により単回投与した。前述した発炎マウスと同様に、IL-10単独投与マウスでも経時的に腫脹径、白血球数、その生存率と血中でのTh細胞の分化様相を検索した。

生存率は、Kaplan-Meier法で判定し、腫脹径の平均値差は、Student's t検定法を用いた。

## II. 感染症モデルマウスの作成

### 1. 細菌の調達と培養

当科で対処した菌性感染症患者から膿汁を採取し、本学医学部附属病院細菌検査部で分離同定した*S. mitis*, *S. intermedius*および*S. sanguis*を、5%ウサギ血球を加えたbrain heart infusion broth(DIFCO, USA)に播種し、37°Cに設定した振蕩培養器で培養し、経時的に吸光度(A660nm)を吸光度計(日立製作所, 東京)で測定した。また、血液寒天培地で細菌数を算定し、各増殖曲線を作成した。

### 2. 感染症マウスの作成と腫脹径の測定

8週齢のBALB/cマウスの咬筋部皮下に、実験法1で述べた如く培養した*S. mitis*, *S. intermedius*および*S. sanguis*の各菌を $2.0 \times 10^9$  CFU/mlに調整し、その50μlと8%カラゲニン50μlを単独または混合して注入し、感染症マウスを作成した。この感染部の腫脹径と膿汁中の細菌数を血液寒天培地を用い経時的に計測および算定した。

## III. in vivo と in vitro における各種抗生剤のTh細胞への影響

### 1. 各種抗生剤がin vivoで示すTh細胞への影響

8週齢の正常BALB/cマウスにエリスロマイシン

(EM) 0.27 mg, セファクロル (CCL) 0.25 mg (EM, CCLともに塩野義製薬株式会社より供与), レボフロキサシン (LVFX) 0.1 mg (第一製薬株式会社より供与) をそれぞれ連日経口投与し, 投与開始から7日, 14日, 21日, 28日後に後大静脈から採血し, Th細胞の分化状態をフローサイトメーターにより分析した。

## 2. エリスロマイシンが *in vitro* で示す Th細胞への影響

1. の実験から, *in vitro* での Th細胞の IL-1Rの発現における EMの影響を宿主因子の関与時と比較検討した。EMの1.1 µg/mlを含有するように調整した Phosphate buffered saline (PBS) 単独とこの PBSに正常 BALB/cマウスの血清および発炎2日目の BALB/cマウスの血清をそれぞれ5%加えた3群において, Th細胞を37°Cで3時間または6時間培養したものを, フローサイトメーターで分析した。

## IV. カラゲニンと細菌の混合注入による感染症マウスに対する IL-10と各種抗生剤の作用効果

### 1. 腫脹径と白血球分画への影響

実験法Ⅱと同様の方法で, *S. mitis*, *S. intermedius* および *S. sanguis* の各菌を  $2.0 \times 10^9$  CFU/mlに調整し, その50 µlと8%カラゲニン50 µlを混合し, BALB/cマウスの咬筋部皮下に注入し発炎させ, 前述のごとく腫脹部の長径と短径を経時的に計測し, 白血球についても発炎マウスの血液を経時的に後大静脈より採取し, 白血球数と比率の推移を検索した。

### 2. 血中 Th細胞分化の様相と IL-1R陽性率

実験Ⅰと同様に, 血中 Th細胞の分化様相をフローサイトメーターで検索し, その IL-1Rの陽性率を測定した。

### 3. 炎症組織における Th1と Th2の産生サイトカインとリンパ球 mRNAの検索

#### 1) RT-PCR法

i) RNAの抽出; 経時的に採取して凍結保存(-90°C)した炎症巣組織を, RNeasy miniKIT (QIAGEN, GERMANY) を用いて総 RNAを抽出し, 20-100 µlの蒸留水に溶解した。

ii) cDNAの作製; 上述の RNA溶液1 µlと, プライマー (IFN- $\gamma$ =5'Primer: 5'-TGCATCTTGGCTT-GCAGCTCTTCCTCATGGC-3' 3'Primer:5'-TGGACCTGTGGTTGTTGACCTCAAACCTG-3', IL-4=5'Primer: 5'-CCAGCTAGTTGTCATCCTGCTCTTCTTCTCG-3' 3'Primer:5'-CAGTGATGTGGACTTGGACTCATTG-ATGGTGC-3' および  $\beta$ -actin=5'Primer:5'-GTGGCC-GCTCTAGGCACCAA-3' 3'Primer:5'-CTCTTTGATGTC-ACGCAGGATTTC-3', いずれも東洋紡社製) の計20 µlを準備し, First-Strand cDNA Synthesis Kit (Phar-

macia-LKB, Sweden) を用いて逆転写反応を行った。反応後, 30 µlの蒸留水を添加し, 得られた溶液を cDNA溶液とした。

iii) PCR法による mRNAの測定; 各サイトカインの mRNAの発現を知るため, 作製した cDNA溶液の5 µlをテンプレートして PCR反応を行った。反応後 PCR産物10 µlをサンプリングし, 1.5%アガロースゲル上で電気泳動を行った。PCRの反応条件は, 94°Cで0.5分, 60°Cで2分, 72°Cで3分を33 cycle行った。各 PCR産物は, internal markerである mouse  $\beta$ -actin (540 bp), mouse IFN- $\gamma$  (365 bp), mouse IL-4 (358 bp) で得られた発光バンドを, 各々の positive controlの対比から, 各サイトカインの mRNAの発現有無を検討した。

## 2) In situ hybridization法

炎症組織中のリンパ球の Th1と Th2産生サイトカインの発現を *in situ hybridization* 法で検索するため, 27bp アンチセンスオリゴヌクレオチド DNAプローブ (IL-4=5'-TCCGTGCATGGCGTCCCTTCTCCTGTG-3', IFN- $\gamma$ =5'-ATGATTTGGAAGTATTGTTAGATGTCT-3', IL-5=GCCTCGTCTCCGTCTCTC=CTCGCCAC, IL-3=CTCGAATGAAGAAGACCCTGGCAGCGCAG) を作製し, プローブの3'末端を6連鎖ビオチン化処理後, 400倍に希釈し, fast redを用いて赤色に発色させた。任意の10視野を抽出し, リンパ球100個中の mRNA陽性細胞数を算定し, その平均値を陽性率とした。

## 実験結果

### I. カラゲニン発炎マウスの病態と IL-10単独の効果

1. 両マウス群の腫脹は, ともに, カラゲニン注入12時間後より著明になり, 2日後には最大となった(図2)。発炎1-2日目には腫脹部には, 半透明でやや白色調の粘稠性液体が貯留し, 以後経時的に滞黄色で不透明な粘稠液体に変化した。両マウス群は, ともにカラゲニンの濃度依存性に腫脹は増大したが, どのカラゲニン濃度によっても C3Hマウスの腫脹反応の強いことが判明した。

2. カラゲニン誘発炎症後の血中の白血球数と白血球分画の経時的推移は, 両マウス群ともに発炎1日後には好中球増多が著明となり, 2日後にはピークに達した(図3)。

3. 血中 Th細胞の IL-1Rのヒストグラムは, カラゲニン投与の6-12時間後には, 対照群のマウスと同じく, ヒストグラムのピークは, IL-1R弱陽性から陰性域にあったが, 1日後から IL-1Rは陰性側へ移動し, 3-7日後には陰性側への移動は最大となった。逆に, 2

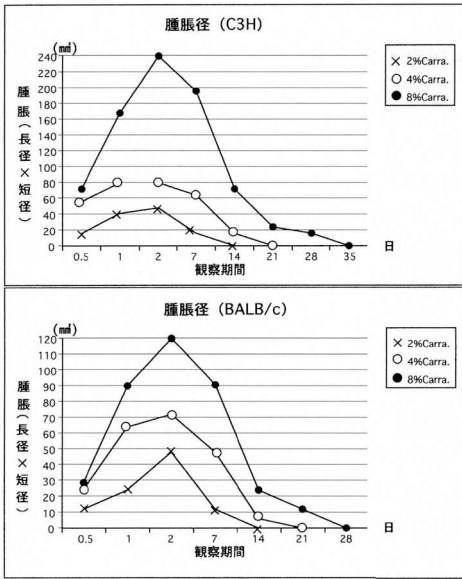
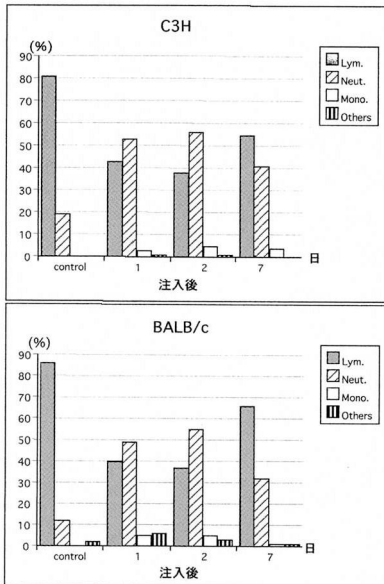


図2 カラゲニンによるマウス腫脹径の推移  
各濃度のカラゲニン 50  $\mu$ l をマウス咬筋部皮下に注入し発炎。両マウス群ともにカラゲニン濃度依存性に腫脹は増大し、カラゲニン注入2位置後に腫脹は最大となった。



マウス条件 計測	CONTROL		8%Carra. Inj.			
	C3H	BALB/c	2days		7days	
			C3H	BALB/c	C3H	BALB/c
WBC( $10^3 / \mu$ l)	2.2	3.1	5.7	5.5	5.2	4.7

図3 カラゲニン発炎のマウス白血球分画  
8%カラゲニン 50  $\mu$ l をマウス咬筋部皮下に注入し発炎。両マウス群ともに発炎1日後には好中球増多が著明になり、2日後に最大となった。

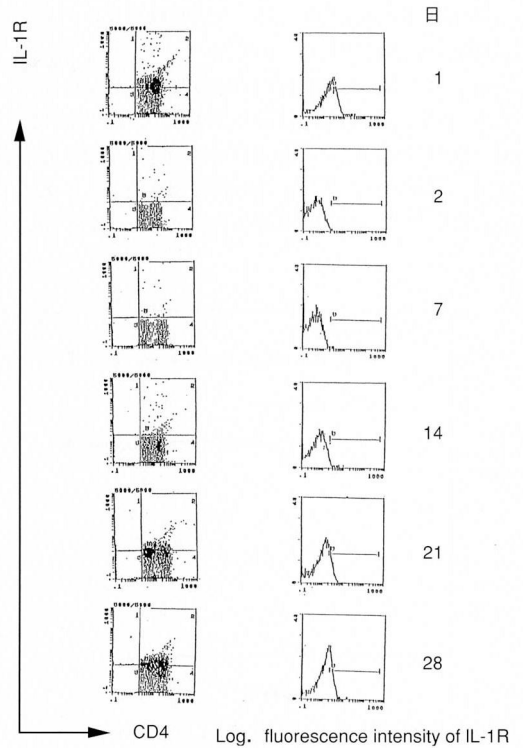


図4 Th細胞におけるIL-1Rの経時的推移  
8%カラゲニン単独発炎時におけるTh細胞のIL-1Rのフローサイトメトリーによる解析。IL-1Rのヒストグラムのピークは、発炎1日後からIL-1R陰性側へ移動し、3~7日後には陰性側への移動は最大となった。逆に、2週後からIL-1R陽性側に移動し、約4週後に元の状態に復した。

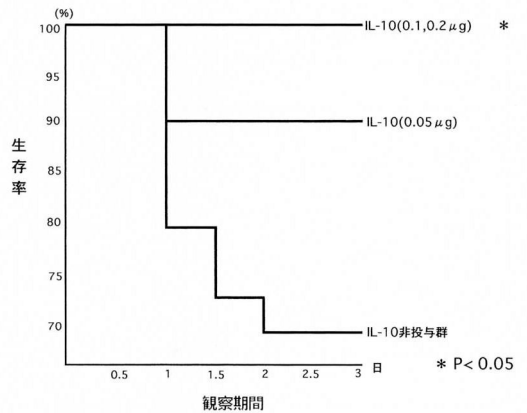


図5 発炎C3HのIL-10による生存率  
8%カラゲニン 50  $\mu$ l をマウス咬筋部皮下に注入し発炎。IL-10の0.1, 0.2  $\mu$ g投与群では有意に生存率が改善された。

週後から IL-1R 陽性側にピークは移動し、3-4 週後には元の状態に復した (図4)。

4. カラゲニン投与の12時間後に、IL-10の0.05, 0.1と0.2  $\mu\text{g}$  の各量を投与した結果、C3H マウス群では、IL-10 非投与群の発炎3日後の生存率は68%であったが、IL-10 の0.05  $\mu\text{g}$  投与群では90%, 0.1と0.2  $\mu\text{g}$  投与群では100% ( $P < 0.05$ ) の生存率を示した

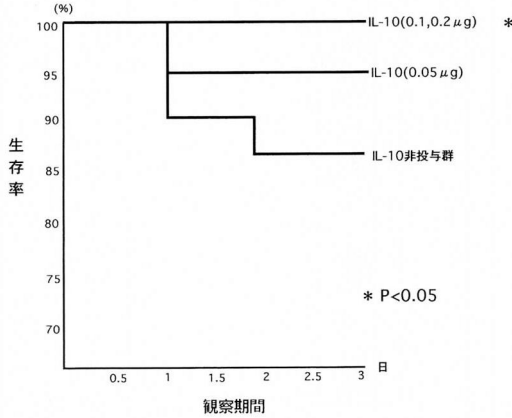


図6 発炎 BALB/c の IL-10による生存率  
8%カラゲニン 50  $\mu\text{l}$  をマウス咬筋部皮下に注入し発炎。IL-10 の0.1, 0.2  $\mu\text{g}$  投与群では有意に生存率が改善された。

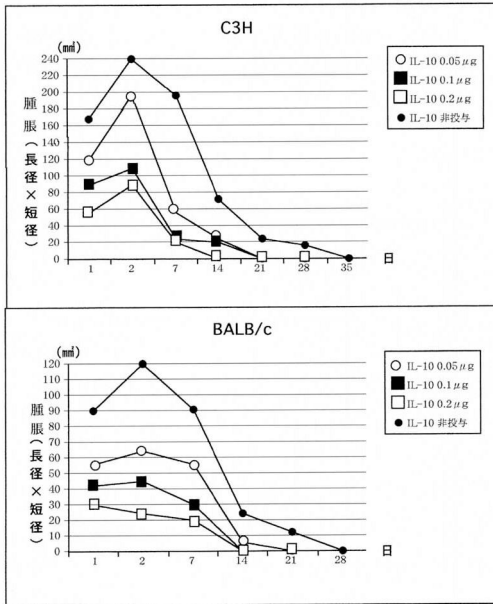


図7 IL-10 の抗腫脹効果  
8%カラゲニン注入12時間後に各量の IL-10 を投与。両マウス群ともに IL-10 は濃度依存性に抗腫脹効果を示した。

(図5)。一方、BALB/c マウス群では、IL-10 非投与群の発炎3日後の生存率は86%であったが、IL-10 の0.05  $\mu\text{g}$  投与群では96%, 0.1と0.2  $\mu\text{g}$  投与群では100% ( $P < 0.05$ ) の生存率であった (図6)。抗腫脹効果をみると、C3H と BALB/c の両マウス群ともに IL-10 は濃度依存性に抗腫脹効果を示した (図7)。両群ともに IL-10 の0.2  $\mu\text{g}$  投与では、発炎2週後には元の状態に復し、非投与群に比較して有意に ( $P < 0.05$ ) 抗腫脹効果を示した。

5. 8%カラゲニンで発炎させた C3H と BALB/c 群に、発炎12時間後に IL-10の0.2  $\mu\text{g}$  を投与し、血中 Th 細胞の IL-1R のヒストグラムを解析した。この結果、両群ともにカラゲニン投与の2日後から、IL-1R 強陽性域に Th 細胞集団が発現し、1 週後には、その細胞群は増加した。2 週後には、ほぼ元の状態に復し、また同時期に腫脹もほぼ消退した (図8)。

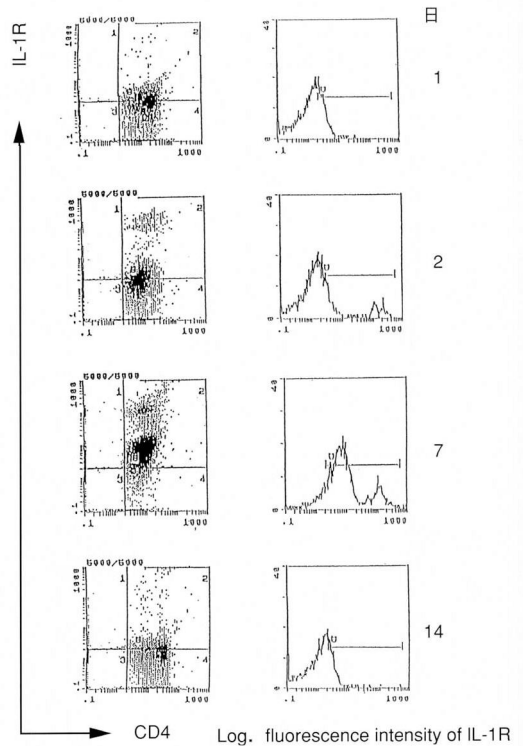


図8 Th 細胞に対する IL-10の影響  
8%カラゲニン注入12時間後に IL-10の0.2  $\mu\text{g}$  投与し、Th 細胞の IL-1R をフローサイトメトリーで検索。カラゲニン投与2日後から、IL-1R 強陽性側に Th 細胞集団が発生し、1 週後にはその細胞群は増加した。2 週後にはほぼ元の状態に復し、同時期に腫脹も消退した。

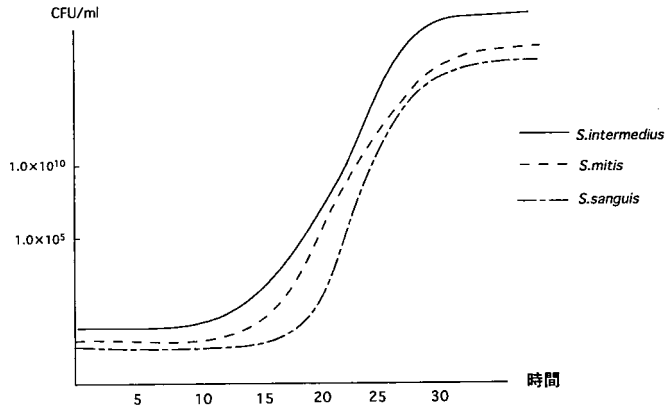


図9 各種細菌の成長曲線

*S. mitis*, *S. intermedium* と *S. sanguis* を5%ウサギ血球を加えた brain heart infusion broth で培養。*S. intermedium* は12時間で、*S. mitis* と *S. sanguis* はそれぞれ15時間と16時間で対数増殖期に入り、いずれも26~28時間後にはプラトーに達した。

## II. 感染症モデルマウスの作成

1. *S. mitis* は、培養後15時間で、また、*S. intermedium* と *S. sanguis* はそれぞれ12時間と16時間で対数増殖期に入り、いずれも26-28時間後にはプラトーに達した(図9)。

2. この3種の細菌はともに、24時間培養後に、単独または各細菌の混合したものを BALB/c マウス咬筋部皮下に注入して膿瘍形成の有無を検討した。この結果、*S. mitis* と *S. sanguis* の単独注入では、膿瘍形成はみられなかった。*S. intermedium* の単独注入では、15例中2例(13.3%)に膿瘍形成がみられ、*S. intermedium* と *S. mitis* および *S. sanguis* の各混合では、両者ともに15例中4例(27.7%)に、また、3者併用群では、15例中5例(33.3%)に膿瘍形成が見られた(表1)。しかし、このいずれも腫脹や膿汁貯留量は少なく、さらに、発炎5日後には腫脹はほぼ消退したことから、急性感染症のモデルとしては使い難い欠点があった。このため、前述のカラゲニン(8%)の50 $\mu$ l と50 $\mu$ l 中に $2.0 \times 10^9$ に調整した *S. mitis*, *S. intermedium* と *S. sanguis* の各液を混合して注入すると、膿瘍形成率は100%となり、また腫脹も長期間持続することが判明し、感染症モデルになりうると考えた。この条件下で、BALB/c マウスの咬筋部皮下にカラゲニンと *S. mitis*, *S. intermedium* と *S. sanguis* をそれぞれ混合したものを注入時の膿汁中の細菌数の推移は、いずれも注入時の $1.0 \times 10^8$  CFU に対して、注入1日後には、*S. mitis* は $2.0 \times 10^8$  CFU, *S. intermedium* は $1.4 \times 10^8$  CFU, *S. sanguis* は $1.1 \times 10^8$  CFU に増殖したが、7日後にはそれぞれ $3.1 \times 10^2$ ,  $2.0 \times 10^2$  および $3.6 \times 10^4$  と漸減し、さらに14日後には、細菌は検出できなくなった(表2)。

表1 菌種差による膿瘍形成と腫脹

細菌種	膿瘍形成	腫脹 (長径×短径)	膿瘍形成率 (%)
<i>S. mitis</i>	0/15	—	0
<i>S. sanguis</i>	0/15	—	0
<i>S. intermedium</i>	2/15	20	13.3
<i>S. mitis</i> +	4/15	24	27.7
<i>S. intermedium</i>			
<i>S. sanguis</i> +	4/15	28	27.7
<i>S. intermedium</i>			
<i>S. mitis</i> +	5/15	32	33.3
<i>S. sanguis</i> +			
<i>S. intermedium</i>			
8%Carra. +	15/15	240	100
<i>S. mitis</i> +			
<i>S. sanguis</i> +			
<i>S. intermedium</i>			

各種細菌と8%カラゲニンを BALB/c マウス咬筋部皮下に単独および混合注入し、膿瘍形成率を検討。*S. mitis*, *S. intermedium*, *S. sanguis* とカラゲニンの混合注入により膿瘍形成率は100%となり、また腫脹も長期持続し、感染症モデルになると考えられた。

## III. in vivo と in vitro における各種抗生剤の Th 細胞 への影響

1. 7日後までは、3剤ともに大きな変化を示さなかったが、14日後から、EM 投与群のヒストグラムの

表2 感染症マウスの膿汁中細菌の経時的推移

細菌	H	0	1	2	7	14
<i>S. mitis</i> (CFU)		$1.0 \times 10^8$	$2.0 \times 10^8$	$4.2 \times 10^6$	$3.1 \times 10^2$	0
<i>S. intermedius</i> (CFU)		$1.0 \times 10^8$	$1.4 \times 10^8$	$2.3 \times 10^6$	$2.0 \times 10^2$	0
<i>S. sanguis</i> (CFU)		$1.0 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$	$2.1 \times 10^6$	$3.6 \times 10^4$	0

8%カラゲニンと各種細菌をそれぞれ混合したものを、BALB/c マウス咬筋部皮下に注入時の膿汁中の細菌数。いずれの細菌も注入1日後には増殖したが、その後漸減し、14日後には検出できなくなった。

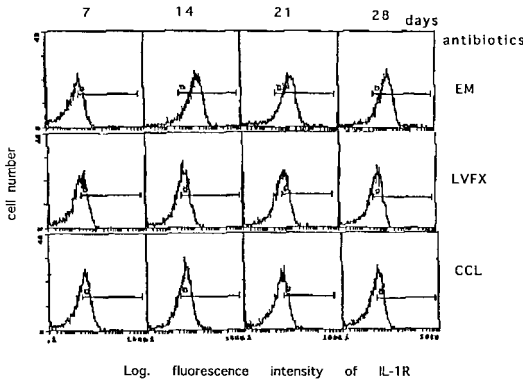


図10 Th 細胞の IL-1R に対する抗生剤への影響  
正常 BALB/c マウスに、各種抗生剤を経口投与し、Th 細胞の分化状態をフローサイトメトリーで検索。EM 投与群のヒストグラムのピークは、14日後から IL-1R 陽性側にシフトし、この傾向は21、28日後にもみられた。他の抗生剤投与群では変化は生じなかった。

ピークは IL-1R 陽性側にシフトした。

この傾向は、21日と28日後にも見られたが、他の抗生剤は、変化を生じなかった (図10)。

2. EM 単独培養群の培養3時間後には、ヒストグラムが IL-1R 陽性側にシフトし始め、6時間後には、明らかに IL-1R 陽性側にシフトしていた。しかし、他群でのヒストグラムの変化は全培養期間には見られなかった (図11)。

IV. カラゲニンと細菌の混合注入による感染症マウスに対する IL-10と各種抗生剤の作用効果

1. IL-10投与群では、いずれも抗腫脹効果が有意に著明 ( $P < 0.05$ ) であり、また、腫脹も平均14日で消失

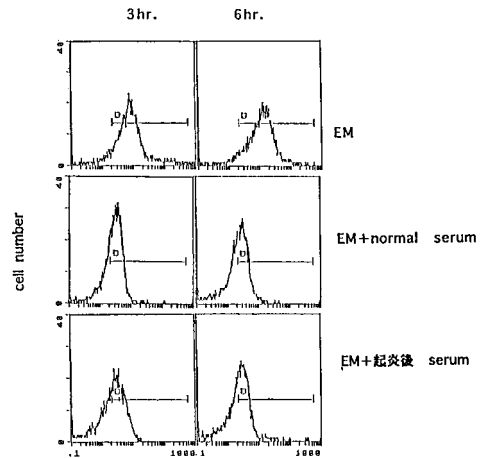


図11 Th 細胞 IL-1R に対する EM と宿主因子の影響 (in vitro)

in vitro での Th 細胞の IL-1R の発現における EM の影響をフローサイトメトリーで検索。EM 単独培養群では、培養3時間後にはヒストグラムが IL-1R 陽性側にシフトし始め、6時間後には明らかにシフトしていた。しかし、他群でのヒストグラムの変化は全培養期間において見られなかった。

した。この結果は、非投与群の平均28日に比較して、腫脹期間も半減していた。一方、抗生剤単独投与群では、非投与群に比べて、その腫脹は減じたものの、IL-10 投与群で得られた腫脹縮小性と腫脹期間の減少効果は得られなかった。また、IL-10 と抗生剤の併用投与群は、IL-10 単独投与群 (以下、IL-10 only) より強い抗腫脹性が得られた。IL-10 と抗生剤の併用投与群中では、EM と CCL の併用投与群 (以下 IL-10+EM+CCL) が最も良好な抗腫脹性が得られたが、IL-10 と

EM 併用投与群（以下 IL-10+EM）や IL-10 と CCL 併用投与群（以下 IL-10+CCL）のものに比べて、有意な抗腫脹性は認められなかった（図12）。炎症を反映する白血球数の推移については、非投与群では、発炎2日

目の白血球数は平均 8800/ $\mu$ l であったのに対して、EM 単独投与群（以下 EM only）では 6600/ $\mu$ l、IL-10 only では 4500/ $\mu$ l、IL-10+EM では 4100/ $\mu$ l、IL-10+EM+CCL では 3700/ $\mu$ l と明らかに減少した。しかし、

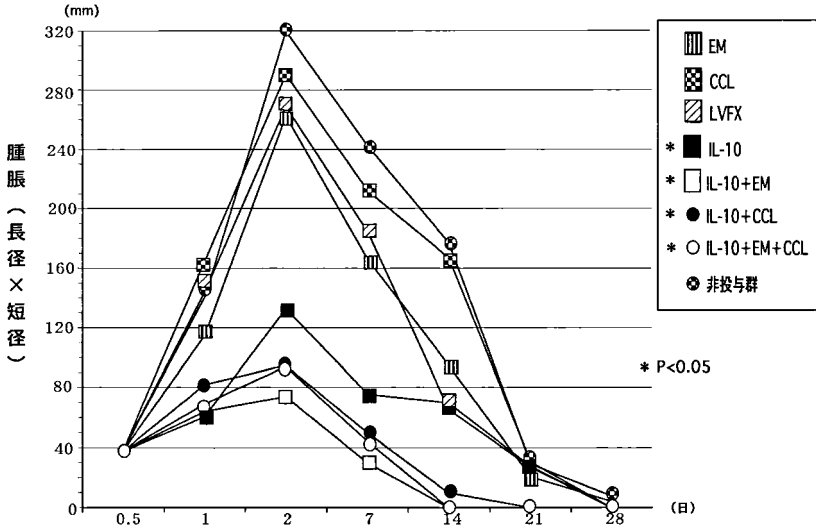


図12 感染症モデルマウスにおける IL-10 と抗生剤の抗腫脹効果

8%カラゲニンと *S. mitis*, *S. intermedius*, *S. sanguis* を BALB/c マウス咬筋部皮下に混合注入後、IL-10 と各種抗生剤を単独および併用投与時の腫脹。IL-10 投与群はいずれも抗腫脹効果有意に著明であり、腫脹も平均14日で消失した。抗生剤投与群は非投与群に比べ腫脹は減じたものの、IL-10 投与群で得られた腫脹縮小性と腫脹期間の減少効果は得られなかった。

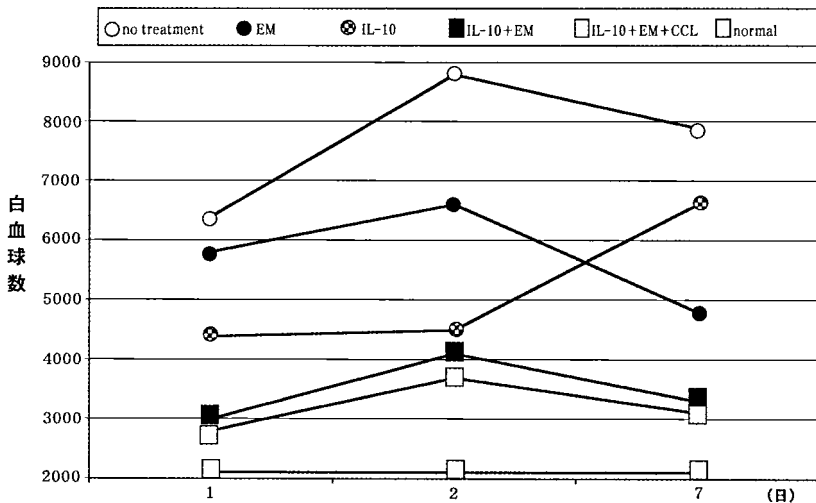


図13 感染症モデルマウスの各処置時の白血球数の推移

8%カラゲニンと *S. mitis*, *S. intermedius*, *S. sanguis* を BALB/c マウス咬筋部皮下に混合注入後、IL-10 と各種抗生剤を単独および併用投与時の白血球。IL-10 と抗生剤併用投与群および EM 単独投与群では、発炎2日後より白血球数は漸減したのに対して、IL-10 単独投与群では発炎2日目の 4500/ $\mu$ l に比べ7日目には 6700/ $\mu$ l に上昇していた。



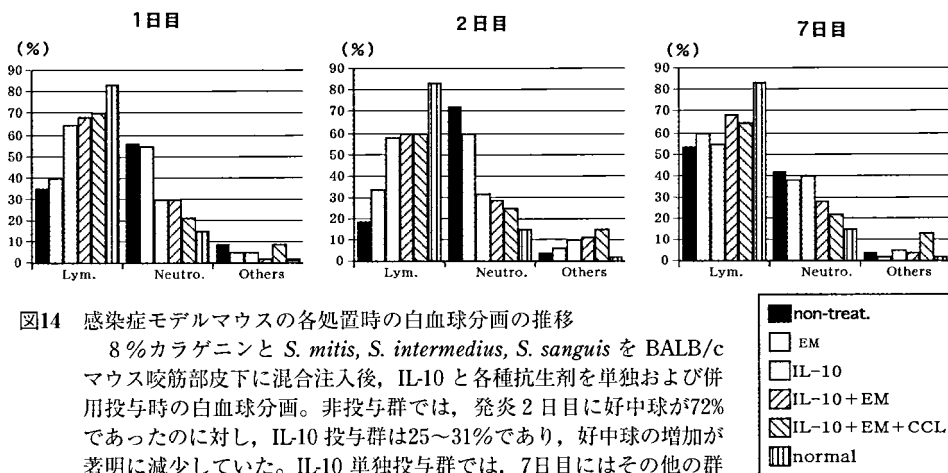


図14 感染症モデルマウスの各処置時の白血球分画の推移

8%カラゲニンと *S. mitis*, *S. intermedius*, *S. sanguis* を BALB/c マウス咬筋部皮下に混合注入後、IL-10 と各種抗生剤を単独および併用投与時の白血球分画。非投与群では、発炎2日目に好中球が72%であったのに対し、IL-10 投与群は25~31%であり、好中球の増加が著明に減少していた。IL-10 単独投与群では、7日目にはその他の群で好中球が漸減しているのに対して、発炎2日目の31%から40%に上昇していた。

IL-10 only では、他の群では白血球数が漸減したのに対して、発炎7日目には6700/ $\mu$ lと上昇した(図13)。白血球分画の推移をみると、非投与群では、発炎2日目に好中球が72%であったのに対し、IL-10 投与群は25-31%であり、好中球の増加が著明に減少していた。しかし、白血球数同様に、IL-10 単独投与群では、7日目にはその他の群では漸減しているのに対して、発炎2日目は31%から40%に上昇していた(図14)。また、膿汁中の細菌数は、非投与群では感染時の  $3.0 \times 10^8$  CFU から発炎1日後には  $4.8 \times 10^8$  CFU に増加した。IL-10 only でも発炎1日後には  $3.5 \times 10^8$  CFU に増加したが、EM only を除いて IL-10+EM および IL-10+

EM+CCL では細菌数は漸減し、発炎7日後には、膿汁中に細菌は認められなくなった(表3)。

2. 血中の Th 細胞の分化状態を経時的に解析すると、非投与群では、発炎1日後からヒストグラムのピークは、IL-1R 陰性側に強くシフトし、その後、元の分化状態に復すのに約6週を要した。一方、EM only と CCL only では、発炎1日後には、非投与群と同様のヒストグラムを示したが、発炎2日後には、非投与群に比べて IL-1R 陰性側に強くシフトする所見はなかった。また、EM only と CCL only の間には大きな差違はなかった(図15)。次に IL-10 投与群は、IL-10+EM および IL-10+EM+CCL ともに非投与群に比較して、IL-1R 陰性側に強くシフトする例はなく、発炎2日目や7日目には、IL-1R 陽性側に亜集団が発現し、発炎14日後にはほぼ元のヒストグラムの状態に復した。IL-10 only では、発炎7日後に IL-1R 陽性側に亜集団が見られたが、14日後の細胞分布は、IL-1R 陰性側にシフトし、同時期には腫脹も残存していた(図16)。

3. 発炎マウスの血中 Th 細胞における IL-10 と抗生剤の IL-1R 陽性率への影響を検討し、正常マウスの IL-1R 陽性率が27.2%に対して、IL-10 投与群は、発炎24時間後には、IL-10 only では38.4%、IL-10+EM では58.4%、IL-10+EM+CCL では64.8%と高い IL-1R 陽性率を示した。一方、未処置群では、発炎24時間後に5.2%、48時間後には1.5%と低値を示した(表4)。

4. 炎症組織中での Th1 と Th2 の細胞分化様相を検討するために、Th1 の分泌する代表的サイトカインの IFN- $\gamma$  の mRNA と、同じく Th2 の分泌する IL-4 の mRNA 発現を RT-PCR 法で検索した。未処置群では、発炎12時間後から IFN- $\gamma$  の mRNA は発現し、48時間

表3 感染症モデルマウスにおける各処置後の膿汁中細菌の推移

処置 \ 日	1	2	7
non-treatment	$4.8 \times 10^8$	$2.2 \times 10^7$	$1.0 \times 10^6$
IL-10	$3.5 \times 10^8$	$2.0 \times 10^7$	$4.0 \times 10^3$
EM	$1.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^5$	$3.1 \times 10^2$
IL-10+EM	$1.0 \times 10^6$	$5.0 \times 10^4$	—
IL-10+EM+CCL	$2.0 \times 10^5$	$2.0 \times 10^3$	—

感染モデル (BALB/c) に、IL-10 と各種抗生剤を単独および併用時の膿汁中の細菌数 (CFU)

非投与群では、感染時の  $3.0 \times 10^8$  CFU から発炎1日後には  $4.8 \times 10^8$  CFU に増加した。IL-10 単独投与群でも発炎1日後に増加したが、その他の群では漸減し、IL-10 と抗生剤併用群は、発炎7日目には膿汁中に細菌は認められなくなった。

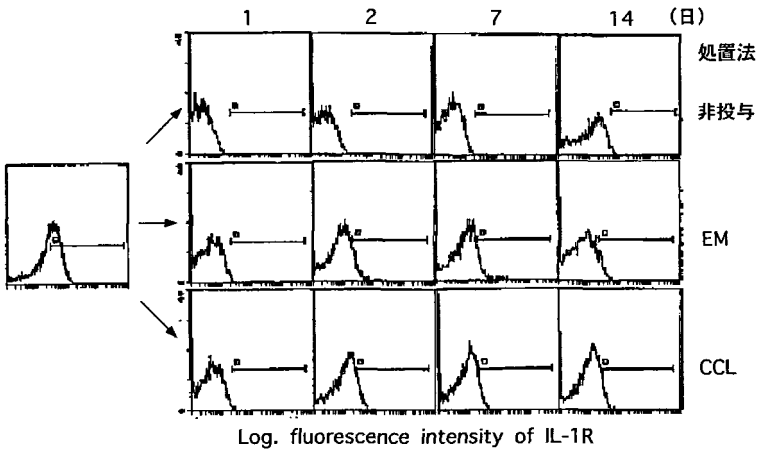


図15 発炎時 Th 細胞の IL-1R への抗生剤の影響

感染モデル (BALB/c) の Th 細胞の分化における EM と CCL の影響をフローサイトメトリーで検索。非投与群では、発炎1日後からヒストグラムのピークは IL-1R 陰性側に強くシフトし、元に復すのに約6週を要した。EM と CCL 投与群は発炎1日後には非投与群と同様のヒストグラムを示したが、発炎2日後には非投与群に比べて IL-1R 陰性側に強くシフトする所見はなかった。

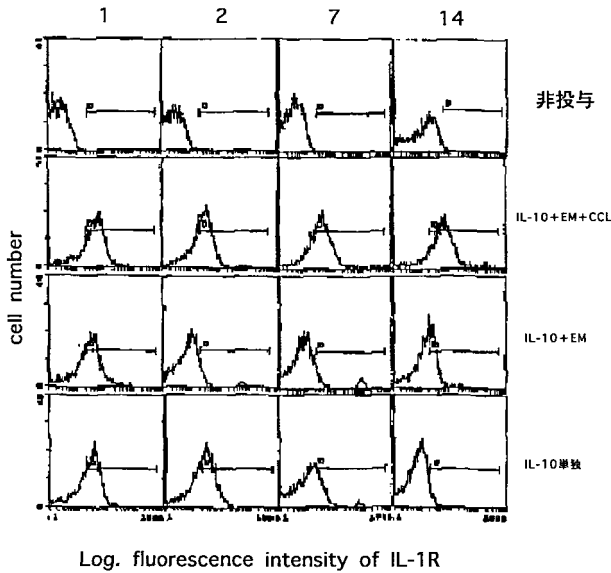


図16 発炎時 Th 細胞における IL-1R への IL-10 と抗生剤の影響

感染モデル (BALB/c) の Th 細胞の分化における IL-10 と各種抗生剤の影響をフローサイトメトリーで検索。IL-10 と抗生剤併用投与群は、非投与群と比較して IL-1R 陰性側に強くシフトする例はなく、発炎2, 7日目には IL-1R 陽性側に亜集団が発現し、14日後にはほぼ元のヒストグラムの状態に復した。IL-10 単独投与群では、発炎7日後に IL-1R 陽性側に亜集団が見られたが、14日後の細胞分布は IL-1R 陰性側にシフトし、同時期には腫脹も残存していた。

後にはピークとなり、72時間後まで持続した。しかし、7日目以後には発現しなかった。一方、IL-4の mRNA は、全検索期間中には検出できなかった。IL-10+EM +CCL では、投与24時間後には IFN- $\gamma$  の mRNA は発

現したが、他の時期にはこの mRNA の発現は認められなかった。また、同群での IL-4 の mRNA は、投与24時間後に発現した (図17)。

5. 炎症組織中のリンパ球の分化様相を検討するた

表4 Th細胞のIL-1Rに対するIL-10と抗生剤の影響(発炎時)

投与	日	1	2	7	14	28	42
非投与	(%)	5.2	1.5	7.8	9.6	14.5	24.7
EM	(%)	7.8	5.5	14.0	19.2	26.2	27.9
IL-10	(%)	38.4	40.4	19.8	22.0	26.3	26.1
IL-10+EM	(%)	58.7	51.2	38.9	35.0	30.1	29.4
IL-10+EM+CCL	(%)	64.3	65.7	52.0	49.8	35.5	30.2

CONTROL: 27.2

感染モデル(BALB/c)に、IL-10と各種抗生剤を単独および併用時のTh細胞におけるIL-1R陽性率。

IL-10投与群は、発炎1日後にはIL-10単独投与で38.4%、IL-10とEM併用投与群で58.7%、IL-10とEM、CCL併用投与群で64.8%と高いIL-1R陽性率を示した。未処置群では、発炎1日後に5.2%、2日後に1.5%と低値を示した。

めに、Th1とTh2の産生サイトカインのmRNAをin situ hybridization法で検討した。この結果、未処置群では、IFN- $\gamma$ のmRNAは、発炎6時間後から陽性所見を示し、14日後まで持続した。また、IL-4のmRNAは、同群の各炎症期を通じて、陽性所見はほとんど認められなかった(図18)。加えて、同群でのリンパ球のIFN- $\gamma$ とIL-4のmRNAの陽性率から、IFN- $\gamma$ のmRNAの陽性率は、発炎12時間後から1日後にはピークとなり、その陽性率は48%であった。その後漸減し、14日

表5 炎症組織のリンパ球におけるIFN- $\gamma$ とIL-4のmRNAの陽性率(%)

cytokine	day	0.25 (6 hr)	0.5 (12 hr)	1	2	7	14
IFN- $\gamma$		11	48	46	36	30	12
IL-4		0	0	1	2	0	0

感染モデル(BALB/c)の炎症組織において、任意の10視野を抽出し、リンパ球100個中のmRNA陽性細胞数を算定し、その平均値を陽性率とした。

IFN- $\gamma$ のmRNA陽性率は、発炎12時間後から1日後にピークとなり、48%を示した。その後漸減し、14日後には12%に低下した。一方、IL-4のmRNA陽性率は、いずれの炎症期にもほとんど発現しなかった。

後には12%に低下した。一方、IL-4のmRNAは、いずれの炎症期にもほとんど発現しなかった(表5)。次に、IL-10+EM+CCLについて検索した結果、IL-4のmRNAは、IL-10投与の12時間後から陽性を示し、7日後まで持続した。また、同群のIFN- $\gamma$ のmRNAは、14日後までのいずれの炎症期にも陽性を示した(図19)。同群において、Th2産生サイトカインのIL-5と、Th1とTh2に共通して産生するサイトカインのIL-3について同様の検索を行った結果、両サイトカインはともに、IL-4と同様に、IL-10投与12時間後より陽性を示し、7日後まで持続した(図20)。また、同群の各サイトカイン陽性率を検討すると、Th2産生サイトカインのIL-4とIL-5は、IL-10の投与1日後にそれぞれ最

非投与

IL-10+EM+CCL

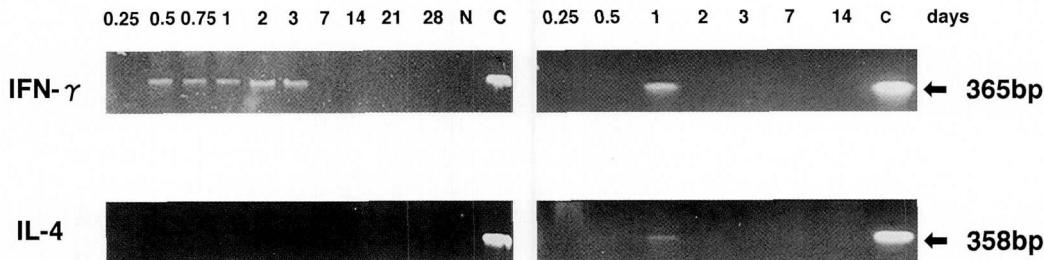


図17 炎症組織中のmRNAの発現

感染モデル(BALB/c)に、IL-10とEMおよびCCL併用投与時の、炎症局所におけるmRNAの検索。未処置群では、発炎12時間後からIFN- $\gamma$ のmRNAは発現し、72時間後まで持続した。同群でのIL-4のmRNAは全検索期間中で検出できなかった。IL-10とEM、CCL併用投与群では、投与24時間後にはIFN- $\gamma$ のmRNAは発現したが、他の時期には発現は認められなかった。また、同群でのIL-4のmRNAは、投与24時間後に発現した。

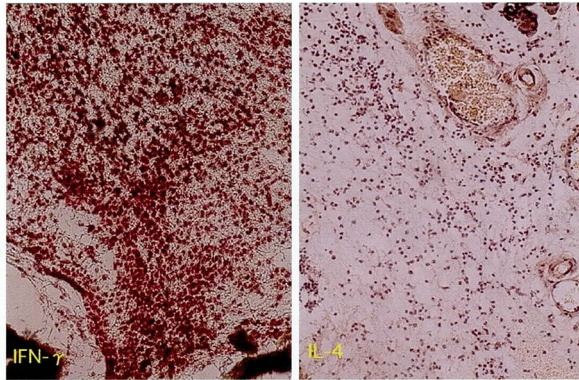


図18 未処置時の in situ hybridization 像

感染モデル (BALB/c) における, 未処置時の炎症組織の染色結果。IFN- $\gamma$  の m-RNA は, 発炎6時間後から陽性所見を示し, IL-4 の m-RNA は, 各炎症期を通じて陽性所見はほとんど認められなかった。(IFN- $\gamma$ , IL-4 ともに発炎24時間後の染色結果を示す。)

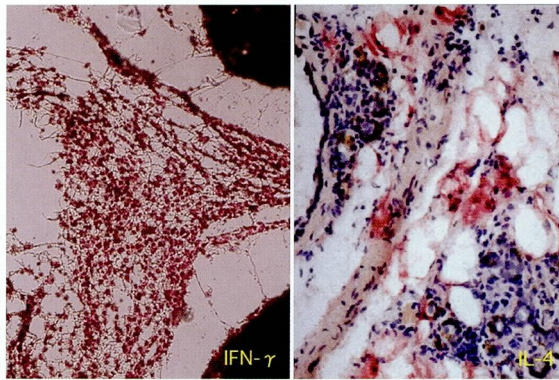


図19 [IL-10+EM+CCL] 投与群に in situ hybridization 像

感染モデル (BALB/c) に IL-10 と EM, CCL を併用投与した炎症組織における IFN- $\gamma$  と IL-4 の染色結果。IL-4 の m-RNA は, IL-10 投与12時間後から陽性所見を示し, 7日後まで持続した。また, 同群の IFN- $\gamma$  の m-RNA は, 14日後までのいずれの炎症期にも陽性を示した。写真は, IFN- $\gamma$ , IL-4 ともに IL-10 投与24時間後の染色結果を示す。

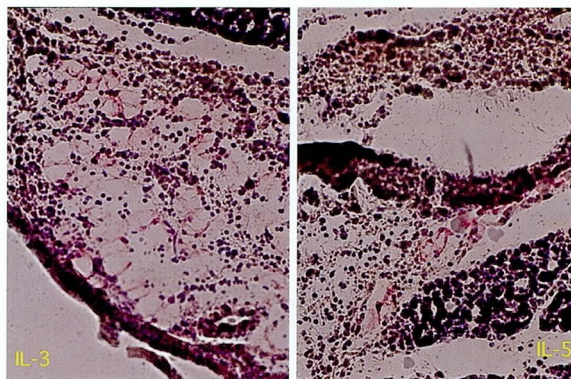


図20 [IL-10+EM+CCL] 投与群の in situ hybridization 像

感染モデル (BALB/c) に IL-10 と EM, CCL を併用投与した炎症組織における IL-3 と IL-5 の染色結果。IL-3, IL-5 ともに IL-10 投与12時間後より陽性所見を示し, 7日後まで持続した。写真は IL-3, IL-5 ともに IL-10 投与24時間後を示す。

表6 炎症組織中のリンパ球におけるサイトカインの mRNA の陽性率

cytokine	days	days				
		0.5	1	2	7	14
IL-4	(%)	9	28	21	5	0
IL-5	(%)	4	10	8	2	1
IL-3	(%)	16	5	6	5	0
IFN- $\gamma$	(%)	30	24	20	14	2

感染モデル (BALB/c) に IL-10 と EM, CCL を併用投与した炎症組織において、任意の10視野を抽出し、リンパ球100個中の mRNA 陽性細胞数を算定し、その平均値を陽性率とした。

Th2 産生サイトカインの IL-4 と IL-5 は、IL-10 投与 1 日後にそれぞれ最大値28%と10%を示した。Th1 と Th2 に共通する産生サイトカインの IL-3 は12時間後に最大値16%を示した。IL-4, 5 および IL-3 は 7 日後にはそれぞれ 5%, 2%, 5% となり、それ以後陽性所見は見られなかった。Th1 産生サイトカインの IFN- $\gamma$  は、IL-10 投与 1 日後には 24% を示したが、14 日後には 2% となり、IL-10 投与により各炎症期においても陽性率は明らかに減じた。

大値28%と10%を示した。Th1 と Th2 に共通する産生サイトカインの IL-3 は、12時間後には16%と最も高い陽性率を示した。IL-4, IL-5 および IL-3 は、いずれも 7 日後には、それぞれ 5%, 2% および 5% と低値を示し、それ以後には陽性所見はほとんど認められなかった。一方、Th1 産生サイトカインの IFN- $\gamma$  は、IL-10 投与12時間後から、14日後まで陽性を示したが、前述した未処置時には、発炎 1 日後の陽性率は、48%であったものが、IL-10 と EM および CCL の併用投与により、30%に減少し、各炎症期においても、陽性率は明らかに減じた (表6)。

## 考 察

### 1. カラゲニン発炎マウスの病態と IL-10 の治療的効果について

紅藻類から得られ、硫酸基を有するポリ D-ガラクトースであるカラゲニン<sup>13)</sup> は、マクロファージによく貪食され、細胞性免疫を惹起することが知られており、炎症モデルの起炎剤として頻用されている。本実験では、この各 2, 4, および 8%ゲルを作製し、発炎させたが、BALB/c と C3H マウスはともに、カラゲニンの濃度依存性に腫脹は増大した。どの炎症時期においても腫脹径は C3H 群のものが BALB/c 群のものより大きく、また、腫脹持続期間も長かった。発炎 3 日後

の生存率も C3H 群が低く、加えて発炎 1, 2, 7 日後の白血球数と好中球の比率は高かった。これらの現象から、C3H マウスは BALB/c マウスに比べて、細胞性免疫を惹起しやすく、かつより強い炎症反応の進行することが推定された。Reiner<sup>13)</sup>, Sadick<sup>14)</sup> や Heinzel<sup>15, 16)</sup> は、マウスの系統別免疫応答の違いについて検索しているが、C3H マウスの Th 細胞は Th1 優位の細胞性免疫反応を呈し、BALB/c マウスの Th 細胞は Th2 優位の液性免疫反応を示すと報告している。この結果は、筆者の結果と一致したものであった。ここで、生体防御機構の中心である Th 細胞は、そのサイトカイン産生パターンにより、IL-2, IFN- $\gamma$  を産生する Th1 細胞と、IL-4, 5, 6 などを産生する Th2 細胞に大別されることが一般に受容されている<sup>2, 5, 6)</sup>。筆者は、この概念が各種疾患の病態形成の違いや治療法に応用できるものと考え、特に IL-10 は抗炎症作用のキーサイトカインになり得ると考えて、本研究を遂行することにした。IL-10 は、Mosmann ら (1989年) により発見された Th2 細胞から産生されるサイトカインであり<sup>1)</sup>、Th1 細胞からのサイトカイン産生を抑制する因子として同定された<sup>3)</sup>。このため、当初はサイトカイン産生抑制因子 (cytokine synthesis inhibitory factor: CSIF) と呼ばれたが、Moore らは、この活性に着目して、expression cloning 法によってマウスやヒトの cDNA の単離に成功した<sup>4)</sup>。その後、CSIF 活性以外にも多様な生物活性を有することが判明し、1994年には多機能性サイトカインであるとして IL-10 と改称された。本研究では、カラゲニンによる誘発炎症に対して、IL-10 は、著明な抗腫脹効果を示し、特に、その 0.2  $\mu$ g 投与群では、感染症モデルの BALB/c と C3H マウスはともに30例中死亡例はなく、IL-10 投与の基準量になることが推測された。また、血中の Th 細胞の検索では、非投与では、炎症時の Th 細胞の分化は、Th0  $\rightarrow$  Th1  $\rightarrow$  Th0 の推移を示し、発炎から治癒への経移とよく相関し、Th1 への過剰分化をいかに制御するかが炎症状態を早期に治癒せしめ、重症化を回避することにつながると考えられた。IL-10 の投与により、Th 細胞の分化は、Th0  $\rightarrow$  Th1 + Th2  $\rightarrow$  Th0 の推移を示して、Th1 への過剰な分化を早期に抑制し、腫脹程度と腫脹期間を有意に縮小や減少させることができたと考えた。また、IL-10 投与時には、BALB/c マウスは C3H マウスにおけるよりも、多くの Th2 細胞を分化誘導することができ、前述した BALB/c マウスと C3H マウスの Th 細胞の免疫的性質に合致していると考えられた。

### 2. 感染症マウスの作成について

本研究に用いた細菌は、いずれもヒト口腔感染症の

起炎菌として一般的なものであるが、特に佐々木ら<sup>17,18)</sup>の報告では、*S. sanguis* は、歯性感染症の膿汁から分離同定した菌株487例中54株を占め、最も多く検出されているものである。また、*S. intermedius* は、*S. anginosus* や *S. constellatus* とともに *S. milleri group* と称せられ、単独でも歯性感染症を発症させることが知られている<sup>17)</sup>。この菌群は重症感染症にも頻繁に検出されており、口腔外科にとって、重要な細菌である。しかし、*S. intermedius*, *S. sanguis*, *S. mitis* の3者併用によって、15匹中5匹(33.3%)は膿瘍を形成したが、腫脹や膿汁は少なく、発炎5日後には腫脹はほぼ消退した。このため、急性感染症のモデルには不相当と考えられた。これら細菌とカラゲニンの併用によると、マウスの感染部には、細菌の増殖も確認でき、また、腫脹も長期に持続することから、急性感染症モデルになり得ると考えた。

### 3. in vivo と in vitro における Th 細胞への各種抗生剤の影響

EM は、リボゾーム上の 50S RNA に結合することから tRNA-ペプチド鎖の移動を阻害する。すなわち細胞の蛋白合成を阻害することから抗菌作用のあることが知られている。しかし、近年マクロライド系抗生剤の抗菌作用の他の優れた作用が注目されるようになってきた。特に、工藤ら<sup>9-12)</sup>が発見した EM のびまん性汎細気管支炎 (diffuse panbronchiolitis: DPB) に対する効果は、最初の報告 (1984年) 以来、次々と追試され、予後不良であった同疾患の治療と予後に革命的な治療効果をもたらした。現在、この研究はさらに進歩し、Paster<sup>19)</sup> や Rao<sup>20)</sup>、森川ら<sup>21-25)</sup> によって、マクロライド系抗生物質の免疫薬理作用、特に T 細胞賦活作用への影響が盛んに発表されるに到っている。著者は、EM による DPB 患者の好中球減少効果と最近の EM の T 細胞に対する知見から、この EM の免疫薬理作用が Th1/Th2 理論に拡大付言できないかを検討した。正常 BALB/c マウスに、EM, CCL, LVFX をそれぞれ連日経口摂取させ、投与約 2 週間よりフローサイトメトリーで、EM のみが血中 Th 細胞のヒストグラムを IL-1R 陽性側にシフトさせ、Th 細胞が、Th0 → Th2 に移行することが判明した。この in vivo での実験結果を基に、EM の T 細胞への直接効果を考え、EM を添加した培養液で Th 細胞を培養した結果、培養 3 時間後から Th 細胞のヒストグラムは、IL-1R 陽性側へシフトし、Th0 → Th2 へ推移した。マクロライド系抗生剤の 23員環 FK506 やシクロスポリン、31員環ラパマイシンは、それぞれ FK506 結合蛋白 FKBP-12、シクロフィリンやラパマイシン結合蛋白 FRAP などの細胞内蛋白の

いわゆるイムノフィリンと結合し、T 細胞の IL-2 の転写レベルでの発現と IL-2R の発現を阻害することが判明している<sup>26-33)</sup>。森川ら<sup>21)</sup>の実験から、EM の結合イムノフィリンは、これらと違うことが報告されているが、IL-2 は Th1 産生のサイトカインであり、EM の細胞内結合イムノフィリンを同定することは、今後、EM の Th 細胞への作用を知る大きな手掛かりになることは間違いないと思われる。

### 4. カラゲニンと細菌の併用による感染時の IL-10 と EM の影響

前述した 8%カラゲニン単独投与による発炎時に比べ、細菌を混合感染させた群では、感染 2 日後の最大腫脹径は約 2.8 倍増大した。IL-10 投与群と非投与群および抗生剤単独投与群の間には抗腫脹効果が有意に認められたが、IL-10 only と IL-10 と抗生剤併用投与群間では、後者が経時的な平均腫脹径は、どの時期においても小さく、有意差は認められなかった。しかし、IL-10 only では、他群の感染 2 日後の血中白血球数は上昇してピークを呈し、7 日後にはすべて減少していたが、感染 2 日後の血中白血球数は 4500/μl であり、7 日後には 6700/μl に上昇していた。膿汁中の細菌数も抗生剤投与群では、感染 7 日後には検出できなかったのに対して、IL-10 only では 4.0×10<sup>5</sup>/ml が残存しており、感染 14 日後のフローサイトメトリーの解析では、Th 細胞は、Th1 陽性側にシフトしていた。IL-10 の単独投与でも感染症を治癒方向へ向かわせることのできる結果が推定されたが、抗生剤の併用により、効果はより上昇することが判明した。IL-10 と抗生剤の併用投与群では、抗腫脹効果は、EM と CCL の併用投与、EM の併用投与、CCL の併用投与の順に強かったが、それぞれの間に有意差はなかった。前述のごとく、EM の投与により、Th0 → Th2 への分化誘導効果は、in vitro では、約 3 時間後より観察された。一方、in vivo では、約 2 週を要した。この結果は、Th 細胞に対する生体内での EM の効果は、比較的長期間を要するか、生体内で遅延する可能性が推測された。菊池や洲崎ら<sup>31-37)</sup>の報告によると、慢性副鼻腔炎に対する EM 療法の治療経過を見ると、EM 投与後 1-2 週で効果の発現する例もあるが、効果が発現し、安定化するまでには 2-3 ヶ月を要するとしている。本研究における感染症モデルマウスの未処置群では、血中 Th 細胞の IL-1R 陽性率の低下、すなわち血中の Th 細胞の Th1 への偏りが、炎症巣での Th1 への偏りに比べ、最後まで残存することが判明した。局所の腫脹がほぼ消失しても、血中にはその影響が残存持続していることは興味ある結果であった。このことは、同じ抗原刺激が持続的に加



わったとしても即座に対応できるような宿主の反応機序を有しているように思える。一方、IL-10とEM併用投与により、明らかに腫脹が減じ、炎症組織でのTh1サイトカインの陽性率を抑制し、また、Th2サイトカインの産生誘導を行っていることが推測された。しかし、腫脹の消退後も血中Th細胞のIL-1R陽性率は、感染14日後も50%のレベルを持続し、約27%であった元のレベルに復すのに、その後約3週を要した。この結果は、IL-10の投与により、Th細胞のTh1への分化を抑制するが、逆にTh2への分化が長期化する可能性を示唆している。吉野ら<sup>38-41)</sup>は、Th1/Th2の不均衡を人為的に調節する場合、Th1反応の過度の抑制やTh2反応の強い促進は、IgE型アレルギー反応の発現や腫瘍発生につながる可能性のあることに注意を要することを警告している。IL-10の作用機序は、最近の研究により、活性化T細胞やNK細胞からのIL-2やIFN- $\gamma$ の産生を抑制する間接的機序と、マクロファージなどの抗原提示細胞(Antigen Presenting Cell: APC)上にあるレセプターを介し、IL-12やIFN- $\gamma$ の産生を抑制する直接的機序が判明してきた<sup>42-48)</sup>。さらに、APCの貪食作用後の活性酸素やNOの産生を強く抑制することも判明している<sup>49-51)</sup>。Th1/Th2のバランス制御は、最終的にはサイトカインを介していると考えられているが、他の制御因子として、抗原の量、形態、投与方法、接着分子、シグナル伝達、ホルモン・神経系、遺伝的支配因子などが考えられている<sup>52-57)</sup>。これら多岐にわたる制御因子の解明と関連を検索することが、種々の病態形成の解明と新治療法の確立に重要な課題である。

## 結 論

カラゲニンと細菌を併用して作成した感染症モデルマウスの病態発生の機序を検索し、IL-10と各種抗生剤を併用し、本感染症に対する治療効果から以下の結論を得た。

1. IL-10は、本感染症マウスの腫脹を早期に改善し、致命的経過をたどるマウスの救命に働く可能性を示した。重症の化膿性炎症に対してIL-10は極めて有用な作用を示すことがマウスレベルで判明した。その主作用は、Th細胞のTh1への過剰な分化抑制とTh2への分化誘導であり、Th1への過剰な分化が原因で惹起される種々な疾患に対して、治療薬として導入される可能性のあることが示唆された。

2. IL-10のTh細胞への影響は、局所に比べ血中で比較的長く残存しており、安易な投与は、逆にTh2への過剰な分化を惹起し、新たな病態の発症への可能性が危惧される。

3. Th細胞に対するEMの効果を検討し、in vitroでは、短時間でTh細胞上に直接的なIL-1Rを発現、すなわちTh2に分化誘導することが判明した。しかし、in vivoにおけるTh細胞への影響は、約2週を要し、IL-10に比し、重症化膿性炎症に対して即効性はなく、比較的長期間の投与が必要であることが示唆された。本実験で、IL-10とEMに既存の抗生剤のCCLを加えた実験群が最も抗腫脹効果を示した。これより、Th細胞のTh1への過剰な分化を是正するために、IL-10は即効性を発揮し、EMは遅発的で、かつ持続的にその効果を発現し、さらに既存の細菌スペクトラムに合致した抗生剤の投与によって、より効果的で、かつ早期に重症化膿性炎症を駆逐できる可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導および御高閲を賜りました本学顎口腔頸部医科学講座(口腔外科学第二)石川武憲教授に心より感謝の意を表します。

また、本論文作成上、終始御懇切なる御助言ならびに御教示、御校閲を賜りました本学病態探究医科学講座(口腔生理学)柴 芳樹教授、ならびに本学探索医科学講座(口腔細菌学)菅井基行教授に深厚なる謝意を表します。

また、本研究を進めるに際し、終始、御支援、御協力を戴きました本学顎口腔頸部医科学講座(口腔外科学第二)杉山 勝助教授ならびに教員各位に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Mosmann, T.R.: Cytokine secretion patterns and cross-regulation of T cell subsets. *Immunol. Res.* **10**, 183-188, 1991.
- 2) 石田 博, 大田博之: 重症炎症性疾患モデルマウスに対するIL-10の治療効果の検討. 炎症 VOL 15 NO. 5 1995.
- 3) Fioretino, D., Bond, M., Mosmann, T.: Two types of mouse helper T cells. IV, Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* **170**, 2081-2095, 1989.
- 4) Moore, K.W., Vieira P., Fiorentino, D. et al.: Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* **248**, 1230-1234, 1990.
- 5) Ishida, H., Hastings, R., Kearney, J. et al.: Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cell but not conventional B cell. *J. Exp. Med.* **175**, 1213-1220, 1992.
- 6) Ishida, H., Hastings, R., Snipes, L. et al.: Modi-

- fied immunological status of anti-IL-10 treated mice. *Cell Immunol.* **148**, 371–384, 1993.
- 7) 石田 博：IL-10 の生物学。炎症と免疫 **4**, 367–375, 1993.
  - 8) 石田 博：IL-10 と疾患。臨床病理 **42**, 843–852, 1994.
  - 9) 工藤翔二, 木村 仁, 植竹健司：びまん性汎細気管支炎に対するマクロライド系抗生剤の少量長期投与の臨床効果。日胸疾会誌 **22**, 254, 1984.
  - 10) 工藤翔二：びまん性汎細気管支炎に対するエリスロマイシン少量長期投与の臨床効果—4年間の治療成績。日胸疾会誌 **25**, 632–642, 1987.
  - 11) 工藤翔二：びまん性汎細気管支炎の予後。厚生省特定疾患びまん性肺炎患者調査研究班平成7年度研究報告書, 1996.
  - 12) 工藤翔二：少量長期療法の発端と現状—DPB をめぐって。JOHNS **12**(2), 207, 1996.
  - 13) Reiner, S.L. et al.: The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 151–177, 1995.
  - 14) Sadick, M.D. et al.: Cure of leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. *J. Exp. Med.* **171**, 115–127, 1990.
  - 15) Heinzl, F.P. et al.: Recombinant Interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* **177**, 1505–1509, 1993.
  - 16) Heinzl, F.P. et al.: Endogenous IL-12 is required for control of Th2 cytokine responses capable of exacerbating leishmaniasis in normally resistant mice. *J. Immunol.* **155**, 730–739, 1995.
  - 17) 佐々木次郎：くすりの適剤適処。デンタルダイヤモンド社, 東京, 1995.
  - 18) 佐々木次郎：最近の抗生薬（抗生剤）の変遷。日本歯科医師会雑誌 **44**巻7号, 1991.
  - 19) Pastor, M. I. et al.: The regulation and function of p21ras during T-cell activation and growth. *Immunol. Today* **16**, 159–165, 1995.
  - 20) Rao, A.: NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today* **15**, 274–281, 1994.
  - 21) Morikawa, K. et al.: Immunomodulatory effects of three macrolides, midecamycin acetate, josamycin, and clarithromycin, on human T-lymphocyte function in vitro. *Antimicrob. Agent Chemother.* **38**, 2643–2647, 1994.
  - 22) Northrop, J.P. et al.: NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* **369**, 497–502, 1994.
  - 23) Miyazaki, T. et al.: Three distinct IL-2 signaling pathway mediated by bcl-2, c-myc, and lac cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell* **81**, 223–231, 1995.
  - 24) Nourse, J. et al.: Interleukin-2-mediated elimination of the p27<sup>kip1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* **372**, 570–573, 1994.
  - 25) Liu, J. et al.: Calcineurin is a common target for cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complex. *Cell* **66**, 807–815, 1991.
  - 26) Weiss A, Littman DR: Signal transduction by lymphocyte antigen receptor. *Cell* **76**, 263–274, 1994.
  - 27) Hoey T, Sun Y-L, Williamson K et al: Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity* **2**, 461–472, 1995.
  - 28) Masuda ES, Naito Y, Tokumitsu H et al: NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus. *Mol Cell Biol* **15**, 2697–2706, 1995.
  - 29) Shaw KTY, Ho AM, Raghavan A et al: Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 11205–11209, 1995.
  - 30) Brown EJ, Beal PA, Keith CT et al: Control of p70 S 6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* **377**, 441–446, 1995.
  - 31) Kissinger CR, Parge HE, Knighton DR et al: Crystal structure of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* **378**, 641–644, 1995.
  - 32) Cameron AM, Steiner JP, Roskams AJ et al: Calcineurin associated with the inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor-FKBP12 complex modulated Ca<sup>2+</sup> flux. *Cell* **83**, 463–472, 1995.
  - 33) Wang T, Donahoue PK, Zervos AS: Specific interaction of type I receptors of the TGF-β family with the immunophilin FKBP12. *Science* **265**, 674–676, 1994.
  - 34) 洲崎春海：エリスロマイシンはなぜびまん性汎細気管支炎に効くのか—びまん性汎細気管支炎に併発する慢性副鼻腔炎に対する効果—。 *Therapeutic Research* **11**, 29–31, 1990.
  - 35) 菊池 茂, 洲崎春海ほか：副鼻腔炎とエリスロマイシン少量長期投与。耳鼻科臨床 **84**(1), 41–47, 1991.
  - 36) 菊池 茂, 山唄達也, 洲崎春海ほか：副鼻腔炎とエリスロマイシン少量長期投与—第2報—。耳鼻科臨床 **85**(8), 1245–1252, 1992.
  - 37) 大山 勝：慢性副鼻腔炎に対するエリスロマイシンの少量長期投与療法。日本耳鼻咽喉科学会専門医通信第30号：14–15, 1992.
  - 38) Yoshino, S.: Effect of a monoclonal antibody against interleukin-4 on collagen-induced arthritis. *Br. J. Pharmacol.* **123**, 237, 1998.



- 39) Yoshino, S., Quattrocchi, & Weiner, H.L.: Suppression of antigen-induced arthritis in Lewis rats by oral administration of type II collagen. *Arthritis Rheum.* **38**, 1092, 1995.
- 40) 吉野 伸: 慢性関節リウマチにおける Th1/Th2 バランスとその人為的制御. *臨床免疫* **30**(4), 467-470, 1998.
- 41) Chernoff, A.E., Granowitz, E.V., Shapiro, L., et al.: A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. *J. Immunol.* **154**, 5492-5499, 1995.
- 42) Yoshimoto, T., Bendela, A., Watson, et al.: Role of NK1.1<sup>+</sup> T cells in a Th2 response and immunoglobulin E production. *Science* **270**, 1845, 1995.
- 43) Kuchroo, V.K., Das, M.P., Brown, J.A., et al.: B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 development pathways: Application to autoimmune disease therapy. *Cell* **80**, 707, 1995.
- 44) 西村孝司: Th1/Th2 バランスを制御する T 細胞サブセットとサイトカイン. *実験医学*, **15**, 111, 1997.
- 45) 青木一郎: アクセサリー細胞と Th1/Th2 細胞の分化. *臨床免疫* **29**, 1072, 1997.
- 46) Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., et al.: A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737, 1997.
- 47) Kullberg, M., Berzofsky, J.A., Jankovic, D.L., et al.: T cell-derived IL-3 induces the production of IL-4 by non-B, non-T cells to amplify the Th2-cytokine response to a non-parasite antigen in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J. Immunol.* **156**, 1482-1489, 1996.
- 48) Huang, F.-P., Feng, G.-J., Lindop, G., et al.: The role of interleukin 12 and nitric oxide in development of spontaneous autoimmune disease in MRL/MP-lpr mice. *J. Exp. Med.* **183**, 1447, 1996.
- 49) Niho, Y., Niino, H., Kuga, S., et al.: Interleukin-10 inhibits functions of activated human monocytes. In *Molecular Biology of Haematopoiesis*, Intercept, Andover, Vol. 3, 621, 1994.
- 50) Bogdan, C., Vodovotz, Y., Nathan, C.: Macrophage deactivation by interleukin-10. *J. Exp. Med.* **174**, 1549, 1991.
- 51) Cunha, F.Q., Moncada, S., Liew, F.Y.: Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon- $\gamma$  in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**, 1155, 1992.
- 52) Trinchieri, G.: Interleukin-12: A cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood*, **84**, 4008, 1994.
- 53) Hosken, N.A., Shibuya, K., Heath, W., et al.: The effect of antigen dose on CD4<sup>+</sup> T helper cells phenotype development in a T cell receptor- $\alpha\beta$ -transgenic model. *J. Exp. Med.*, **182**, 1579, 1995.
- 54) Stuber, E., Strober, W. & Neurath, M.: Blocking the CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion. *J. Exp. Med.*, **183**, 693, 1996.
- 55) Tamura, T., Nakano, H., Nagase, H., et al.: Early activation signal transduction pathways of Th1 and Th2 cell clones stimulated with anti-CD3. Roles of protein tyrosine kinases in the signal for IL-2 and IL-4 production. *J. Immunol.*, **155**, 4692, 1995.
- 56) Rook, G.A.W., Hernandez-Pando, R. & Lightman, S.L.: Hormones, peripherally activated prohormones and regulation of the Th1/Th2 balance. *Immunol. Today*, **15**, 301, 1994.
- 57) Shankar, A.H. & Titus, R.G.: T cell and non-T cell compartments can independently determine resistance to *Leishmania major*. *J. Exp. Med.*, **181**, 845, 1995.
- 58) 小野江和則: T 細胞の分化と成熟. 中外医学社, 東京, 1993.
- 59) Greenbaum LA, Horowitz JB, Woods A, et al: Autocrine growth of CD4<sup>+</sup> T cells. Differential effects of IL-1 on helper and inflammatory T cells. *J. Immunol.* **140**, 1555, 1988.