インフルエンザウイルス B/USSR 抽出ヘマグルチニンによる 遅延型過敏反応に対する免疫療法剤の効果

小林 豊一*

drug evaluation

炎症 VOL.12 NO.3
MAY 1992

Effect of immunotherapeutic agents on influenza virus B/USSR haemagglutinin induced delayed-type hypersensitivity in BALB/c mice

The effect of immunotherapeutic agents on influenza virus B/USSR haemagglutinin (B/HA) induced delayed-type hypersensitivity (DTH) in BALB/c mice was investigated. Until now we have studied in this experiment by using influenza virus A/Kumamoto haemagglutinin (A/HA). In this study, B/HA induced the DTH reaction same as A/HA did. In immune complex type hypersensitivity, mizoribine (MZR) inhibited the footpad swelling but cyclosporine A (CyA) and salicylazosulphapyridine (SASP) had no effect on the reaction. MZR and CyA inhibited DTH reaction but SASP had no effect on the HA induced footpad swelling which was augmented by cyclophosphamide pretreatment. These findings suggest that immunotherapeutic agents have various effects respectively.

Toyokazu Kobayashi*

key words : influenza virus B/USSR haemagglutinin, delayed-type hypersensitivity, mizoribine, cyclosporin A, salicylazosulphapyridine

近年、免疫抑制剤は、臓器移植時の拒絶反応の抑制だけでなく、慢性関節リウマチ (RA) などの自己免疫疾患の治療にも用いられている¹⁾。また、RA の薬物療法として免疫調節剤が広く用いられるようになってきている²⁾。

筆者らは、これら免疫療法剤の効果を、A 型のインフルエンザウイルスより抽出したヘマグルチニン (HA) を用いた遅延型過敏反応にて検討している^{3,4)}。インフルエンザウイルスは、RNA ウィルスでオルソミクスウイルス科に属し、内部蛋白の抗原性の違いにより、A、B および C 型に分類され、ウイルス学的類似性から A 型と B 型は同属に分類されている⁵⁾。

よって今回は、B 型のインフルエンザウイルスより抽出した HA を用いて、同属の A 型 HA と同様な反応の誘導を試みるとともに、免疫療法剤の効果を検討した。

材料と方法

(1) 実験動物

BALB/c 系雌性マウス (日本チャールスリバー)

は、6 週齢で購入して、1～2 週間予備飼育後実験に用いた。

(2) 薬物

免疫療法剤は、免疫抑制剤としてミゾリビン (MZR: 東洋醸造) とサイクロスポリン A (CyA: サンド社) を、免疫調節剤としてサリチルアゾスルファピリジン (SASP: ファルマシア AB) を用いた (図 1)。MZR および SASP は、蒸留水にそれぞれ溶解および懸濁して用い、CyA はオリーブ油に溶解して用いた。

(3) 抗原

インフルエンザウイルス B/USSR より抽出したヘマグルチニン (HA: 千葉血清研究所, 吉沢博士) を抗原として用いた。HA の力価は、36,000 HA units (HAU)/ml で実験には、生理食塩水に溶解して使用した。また、比較実験には、インフルエンザウイルス A/Kumamoto およびインフルエンザウイルス B/Ibaragi よりそれぞれ抽出した HA を用いた。

(4) 過敏症反応の惹起

過敏症は、Coombs と Gell によって 4 型に分類されている。そのⅢ型の Arthus 型過敏反応には、7 週齢の BALB/c 系雌性マウスを用いた。反応惹起日を 0 日としたとき、-19 日に HA 抗原

* Division of Rheumatology, Department of Medicine Juntendo University School of Medicine 順天堂大学医学部膠原病内科学教室

図 1 Chemical structure of mizoribine, salicylazosulphapyridine and cyclosporin A

図 2 Experimental scheme of influenza virus B/USSR haemagglutinin induced delayed-type hypersensitivity and time of administration of immunotherapeutic agents

800 HAU/body を皮下に初回免疫し、-5 日に同量を静脈内投与して、追加免疫を行った。0 日に HA 抗原 400 HAU/body を足蹠に投与して、1, 3, 6 および 24 時間後の腫脹を測定した。なお、薬物は、-5 日から -1 日まで 5 日間 1 日 1 回経口投与した(図 2 a)。

一方、IV 型の遅延型過敏反応は、8 週齢の BALB/c 系雌性マウスを用いた。0 日に、HA 抗原 800 HAU/body を皮下に免疫して、6 日に 400 HAU/body を足蹠に投与して 24 時間後の腫脹を

図 3 Comparative study of influenza virus A/Kumamoto (●), influenza virus B/USSR (○) and influenza virus B/Ibaragi haemagglutinin (▲) induced delayed-type hypersensitivity in BALB/c mice

Each point shows mean of 5 to 7 mice

測定した。なお、本実験では、サイクロフォスファミド (CPD: 塩野義製薬) を -1 日に 100 mg/kg 腹腔内投与することにより誘発される増強反応に対する免疫療法剤の効果を検討し、薬物投与は、0 日から反応惹起日の 6 日まで 7 日間 1 日 1 回経口投与した(図 2 b)。

(5) 実験データの統計処理

実験データの有意差検定には、Dunnett の多重比較を用いて危険率 5 % 未満を有意差ありと判定した。

図4 Comparative study of haemagglutinin induced cyclophosphamide (CPD) pretreated (▨) or non-treated type IV delayed-type hypersensitivity in BALB/c mice

Each point shows mean $\pm$ SD of 5 to 10 mice.

図5 Effect of mizoribine (MZR) on type III hypersensitivity to haemagglutinin in BALB/c mice

MZR was administered orally at the following doses: control (distilled water) (●); 2 mg/kg (○); 20 mg/kg (▲). Each point shows mean of 7 mice. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to the control group

結果

(1) ヘマグルチニンの比較

HA によるⅢ型の Arthus 型反応は、反応惹起3時間後にピークを示すが、インフルエンザウィルスのA型より抽出したHAと同等の応答を示すには、B型HAは、初回免疫、追加免疫および反

図6 Effect of cyclosporin A (CyA) on type III hypersensitivity to haemagglutinin in BALB/c mice

CyA was administered orally at the following doses: control (olive oil) (●); 10 mg/kg (○); 50 mg/kg (▲). Each point shows mean of 7 mice

図7 Effect of salicylazosulphapyridine (SASP) on type III hypersensitivity to haemagglutinin in BALB/c mice

SASP was administered orally at the following doses: control (distilled water) (●); 100 mg/kg (○); 200 mg/kg (▲); 500 mg/kg (△). Each point shows mean value.

* $P < 0.05$ compared to the control group

応惹起に要するHA量がA型の倍量必要で、しかも、反応の特異性に若干劣っていた(図3)。

一方、Ⅳ型の遅延反応は、CPDの前処理により増強された。Ⅲ型反応同様、Ⅳ型反応においてもA型HAを用いたときと同等の反応を得るためには、B型HAは、免疫量および反応惹起量ともにA型の倍量を必要とし、特異性も若干劣っていた(図4)。

(2) Ⅲ型反応に対する免疫療法剤の効果

B型HAによって惹起されるⅢ型の Arthus 型反応に対して、MZRは有意な抑制(図5)を、CyAは無影響(図6)で、SASPは抑制傾向(図7)をそれぞれ示した。

(3) Ⅳ型反応に対する免疫療法剤の効果

図 8 Effect of mizoribine (MZR), salicylazosulphapyridine (SASP) and cyclosporine A (CyA) on type IV hypersensitivity to haemagglutinin in BALB/c mice with cyclophosphamide (CPD) pretreatment

Each point shows mean $\pm$ SD of 7 mice. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to the control group

B 型 HA によって惹起される IV 型の遅延型過敏反応は、CPD の前処理により増強された。この反応に対して、MZR と CyA は有意な抑制を、SASP は抑制傾向を示した(図 8)。

考 察

筆者らは、インフルエンザウイルスより抽出したヘマグルチニン(A/HA)を用いて遅延型過敏反応(DTH)を誘導して実験を行ってきたが^{3,4)}、今回は、インフルエンザウイルス B ヘマグルチニン(B/HA)による試験を実施した。

これまでの検討結果より、HA によって誘導される III および IV 型反応は、それぞれ血清および細胞の移入によって受身伝達されることが確認されている³⁾。また、サイクロフォスファミド(CPD)前処理により増強されている IV 型反応は、CPD がサプレッサー T(T_s) 細胞を障害した結果生じるもので³⁾、種々薬物の評価上興味深いと考えられる。DTH を誘導する抗原としては、蛋白、化学修飾抗原、異種赤血球などが用いられるが⁶⁾、HA は抗原決定部位がそれらに比して少ないことが特徴である⁷⁾。

図 3 に III 型反応の比較実験結果を示したが、A/HA 同様 B/HA においても反応が誘導された。しかし、B/HA を用いて A/HA と同等の反応を誘導するには、倍量の HA が必要であり、また、A/HA の応答のほうが特異性が若干高かった。

図 4 には、IV 型反応を示したが、ここでも III 型反応と同様に CPD 前処理による増強効果において、A/HA を用いたときと同等の反応を示す B/HA 量は、倍量を必要として、特異性もやはり A/HA のほうが若干高かった。

以上の結果より、B/HA は、特異性でやや劣るものの、ウイルス学的に同属である A 型のインフルエンザウイルス抽出 HA とほぼ同等の反応が誘導されることが判明した。

インフルエンザウイルスの主要な表面抗原は HA とノイラミダーゼであり、HA は宿主細胞への吸着に関与している⁸⁾。すなわち、HA 蛋白は、ウイルスが細胞に接着するときに、細胞隔合を介して細胞に侵入する初期に機能し、特に A 型のインフルエンザウイルスの場合、宿主の住みわけや病原性の強弱へ深く関係している⁹⁾。このことは、A 型のインフルエンザウイルスは、B および C 型と異なり、自然宿主がヒト、ブタ、鳥類、ウマ、アザラシ、クジラ、ミンクと多く、人畜共通感染症としても重要で、さらに、臨床像も重篤とされていること^{5,10)}からも窺える。A 型および B 型のインフルエンザウイルス抽出 HA により誘発される DTH の差は、HA の宿主細胞への吸着能の違いではないかと考えられた。

MZR は、安全性の高い免疫抑制剤で、腎移植時の拒絶反応抑制¹¹⁾およびループス腎炎¹²⁾に臨床応用されているほかに、慢性関節リウマチに対する有用性も証明されており¹³⁾、自己免疫疾患治療薬として期待されている。MZR は、III 型反応を用量依存的に有意に抑制し、CPD によって増強された IV 型反応も 2 mg/kg という低用量で無処理コントロールレベルまで有意に抑制した。MZR は、プリン合成阻害により免疫抑制作用を発揮して¹⁴⁾、さらに FACStar 解析では、T リンパ球、B リンパ球およびマクロファージに対してすべて抑制作用を発揮することが判明している¹⁵⁾。よって、MZR の III 型および IV 型反応への作用は、抗原感作によって活性化された免疫担当細胞を抑制した結果であると考えられる。

一方、CyA は、移植全域において世界的に繁用されている免疫抑制剤で、ベーチェット病に対する有用性も証明されている¹⁶⁾。CyA は、III 型反応に無影響で IV 型反応には、用量依存的に有意な抑制を示した。CyA は、ヘルパー T 細胞(T_h)

を特異的に抑制し、T細胞活性化の過程におけるシグナルもブロックするが、すでに活性化されたT細胞の機能には影響しないので¹⁷⁾、追加免疫時より投与を行ったⅢ型反応には、無影響であったと考えられる。一方、Ⅳ型反応に対する抑制効果は、CyAのT_h細胞機能抑制に伴うリンフォカイン産生抑制によって発揮されたのではないかと考えられた。

SASPは、ふるくから潰瘍性大腸炎治療薬として使用されており、近年では、慢性関節リウマチに対しての有効性が報告されている^{18,19)}。SASPは、ⅢおよびⅣ型反応に対して抑制傾向を示すのみであった。おそらく、SASPのヒトでの臨床用量が他剤と比して大量であるため、明確な抑制効果が認められなかったと考えられる。本反応に対するSASPの抑制は、抗炎症作用とTリンパ球抑制の相互作用で発揮されたのではないかと推察された¹⁸⁾。

インフルエンザウイルスA型およびB型より抽出したHAは、ともに抗原決定部位が少なく、反応に特異性があること、簡便さ、再現性のよさなどより、免疫療法剤の*in vivo*でのスクリーニングや評価に最適で、今後、FACStar解析と組み合わせることで作用機序の検討にも有用であると考えられた。

稿を終わるにあたり、研究の機会をお与え下さり、御校閲を賜った順天堂大学医学部膠原病内科科学教室廣瀬俊一教授に心より感謝致します。

また、直接御指導と御校閲を賜った聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター安倍千之教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) 塩川優一：免疫抑制剤の発展と将来。最新医学 41(11): 2467-2469, 1986.
- 2) 柏崎禎夫：抗リウマチ薬・慢性関節リウマチの治療—全身治療からのリハビリテーションまで。(柏崎禎夫, 岡崎 健・共著), 南江堂, 1986, p 74-80.
- 3) Abe, C., Ono, N., Nishimura, T., Komatsu, Y., Taki, S., Hamuro, J.: Influenza virus A/Kumamoto Haemagglutinin induces type I, II,

- and IV hypersensitivity in mice. Int. J. Tiss. Reac. 7(4): 249-253, 1985.
- 4) Akita, S., Abe, C., Hirose, S.: Effect of a new antirheumatic drug (CGS 10787 B) on antibody formation and delayed-type hypersensitivity in BALB/c mice. Int. J. Tiss. Reac. 10(4): 199-205, 1988.
- 5) 石田名香雄, 田代真人：インフルエンザのすべて—インフルエンザウイルス。化学療法の領域 7(10): 15-21, 1991.
- 6) 石井 影：免疫・アレルギー疾患。動物モデル利用集成。(伊藤隆太, 高橋 良, 本田西男・編), R & C プランニング, 1985, p 383-392.
- 7) 松浦良樹：インフルエンザウイルス表面蛋白の構造免疫性との相関。蛋核酵 29(1): 60-61, 1984.
- 8) 石川博道：ウイルス, 細菌, かびなどに対する免疫。免疫学イラストレイテッド。(多田富雄・監訳), 南江堂, 1987, p 177-188.
- 9) 根路銘国昭：インフルエンザのすべて—ウイルス学的立場から1) A型。化学療法の領域 7(10): 32-42, 1991.
- 10) 上田健治：インフルエンザウイルスの分子生物学。蛋核酵 29(1): 60-61, 1984.
- 11) 稲生綱政：腎移植における Bredinin の免疫抑制効果—BREDININ 研究会集計。移植 17(suppl.): 547-561, 1982.
- 12) 本間光夫, 近藤啓文, 秋月正史, 横張龍一, 橋本博史, 柏崎禎夫, 入交昭一郎：ループス腎炎に対するミゾリビンの臨床評価(Ⅱ)—単盲検比較試験からの継続投与—。臨床医薬 5(4): 825-835, 1989.
- 13) 塩川優一, 廣瀬俊一, 藤 治言, 本間光夫, 宮本昭正, 延永 正, 水島 裕, 菅原幸子, 七川敏次, 近藤啓文：免疫抑制剤ミゾリビンの慢性関節リウマチに対する臨床的検討—第二相臨床試験—。炎症 8(3): 263-275, 1988.
- 14) Sakaguchi, K., Tsujino, M., Yoshizawa, M., Mizuno, K., Hayano, K.: Action of bredinin on mammalian cells. Cancer Res. 35:1643-1648, 1975.
- 15) 安倍千之, 小林豊一, 宮崎直美, 有西美奈子, 木根淵 猛, 奥村 康：免疫療法剤の薬効のFACStarによる解析, プレディニン, シクロスポリリン, ピンバニールのBALB/cマウスにおける効果。炎症 7(1): 93-94, 1987.
- 16) 安倍千之：(膠原病の治療)サイクロスポリリンA。内科 54(5): 850-852, 1987.
- 17) 岩崎洋治, 大塚雅昭：免疫抑制療法のメカニズム, シクロスポリリン。最新医学 41(11): 2502-2508, 1986.
- 18) 神宮政男, 延永 正：慢性関節リウマチの治療—新しい免疫調節薬。内科 63(2): 245-252, 1988.
- 19) 星 恵子：化学的免疫調節剤の開発動向と臨床応用。日本臨床 48(下巻): 911-915, 1990.