薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
116 (4) 323—328 (1996)

腸球菌製剤 FK-23 標品経口投与マウスにおける脾細胞の
インターフェロン産生能及び herpes simplex virus-1
感染抵抗性の増強

能味堂郎, ^{*,a} 安部 茂, ^b 加藤正弘, ^b 山本哲郎, ^a 山口英世
ニチニチ製薬 (株) 中央研究所, ^a 帝京大学医学部^b

Augmented Ability of Spleen Cells to Produce Interferons and
Prevention from Lethal Infection of herpes simplex virus
in Mice Orally Treated with *Enterococcus faecalis*
Preparation, FK-23

Takao NOHMI, ^{*,a} Shigeru ABE, ^b Masahiro KATO, ^b
Tetsuro YAMAMOTO, ^a and Hideyo YAMAGUCHI^b

Central Research Laboratories, Nichinichi Pharmaceutical Co., Ltd.,^a
239-1 Tominaga, Ohyamada-mura, Mie 518-14, Japan and
Department of Microbiology and Immunology, Teikyo
University School of Medicine, ^b 2-1-11 Kaga,
Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan

(Received November 15, 1995)

Effects of the oral or intraperitoneal administration of an *Enterococcus* preparation, FK-23, to mice on the interferon (IFN) production by their spleen cells and on the host defense against the infection with herpes simplex virus (HSV)-1 were examined. Spleen cells were obtained from the mice intraperitoneally treated with cyclophosphamide (CY) and subsequently orally administered FK-23 preparation, and then cultured with phytohemagglutinin-P or bacterial lipopolysaccharide *in vitro*. They produced higher titers IFN than those obtained from control mice which were not treated with the FK-23 preparation. The IFN activity was neutralized mainly by antiIFN- β antibody. Correspondingly, oral (5 mg/mouse) or intraperitoneal (1 mg/mouse) administration of the FK-23 preparation protected some of the CY-pretreated mice from death by HSV-1 infection.

Key words—*Enterococcus faecalis*; interferon; interferon inducer; herpes simplex virus; cyclophosphamide; spleen cell

我々は、健常者の糞便から分離された腸球菌 *Enterococcus faecalis* FK-23 株の加熱死菌体標品 (FK-23 標品) の免疫賦活作用を検討してきた。これまでに、FK-23 標品が、*in vitro* において好中球及びマクロファージを活性化させること、¹⁾ また *in vivo* においてマウスに対する腫瘍壊死因子 (TNF) 誘導効果及び抗腫瘍効果²⁾ を有することを報告した。さらに、cyclophosphamide (CY) で白血球減少状態にしたマウスに FK-23 標品を経口投与することで、白血球増多作用³⁾ 及び *Candida albicans* 感染予防効果⁴⁾ がみられることを明らかにした。

本菌と近縁の *Streptococcus pyogenes* の菌体からなる制がん剤 OK-432 は、非経口投与によりインターフェロン (IFN) の産生を促してウイルス感染に対する抵抗性を増強することが知られている。⁵⁾ 本研究では、FK-23 標品の IFN 誘導効果と併せて、IFN が感染防御効果を示すと報告されている herpes simplex virus (HSV)-1 (口唇ヘルペス)^{6,7)} の致死感染マウスモデルにおいて本標品が同様の効果を特に経口投与によって発揮するか否かを検討した。

材 料 と 方 法

マウス 日本 SLC 株より購入した SPF の C3H/He N, 雌性, 6—7 週齢のマウス (19—24 g) を 1 週間の予備飼育後に実験に用いた。CY (塩野義製薬株) 処置は、200 mg/kg の腹腔内投与により行った。

FK-23 標品の調製と投与 FK-23 標品は、大橋らの方法¹⁾ に準じて、*E. faecalis* FK-23 株の加熱死菌体を凍結乾燥して調製した。投与時に本標品を生理食塩水に懸濁し、3 日間連続して経口又は腹腔内投与した。

脾細胞の培養 マウスより脾細胞を採取し、終濃度で $0.1-1 \times 10^7$ cells/ml になるように、ウシ胎児血清を 5% (v/v) 添加した RPMI 1640 培地 (日本製薬株) に浮遊させた。この細胞浮遊液 100 μ l を 96 穴平底プレートに分注し、IFN- γ インデューサー⁸⁾ として Phytohemagglutinin-P (PHA) (和光純薬工業株) を、IFN- α/β インデューサー⁹⁾ として Lipopolysaccharide *E. coli* 0127: B8 (LPS) (Difco Laboratories) をそれぞれ 100 μ l 添加した後、5% CO₂ インキュベーター内で 37°C, 20 時間培養した。その培養上清を採取し、IFN 力価の測定時まで -80°C で保存した。

IFN 力価の測定及び抗体による中和 上記培養上清の IFN 力価の測定は、小長谷らの方法¹⁰⁾ に準じて、マウス繊維芽細胞由来 L-929 細胞と vesicular stomatitis virus を組み合わせた測定系を用い、細胞変性抑制効果を指標として行った。この測定系での IFN の検出限界値は 3 IU/ml であった。

一部の試験では、この測定系に抗 IFN- α 抗体 (17.3 μ g/ml), 抗 IFN- β 抗体 (0.2 μ g/ml) (共にヤマサ醤油株) 及び抗 IFN- γ 抗体 (0.5 μ g/ml) (Genzyme Co. Ltd.) を添加して IFN 力価の阻害率を求めた。この条件で、これらの抗体はそれぞれの IFN の活性約 300 IU/ml を完全中和した。

HSV-1 感染防御効果 Irie ら⁶⁾ の、マウスへの HSV-1 腹腔内接種による致死感染モデルを用いた。HSV-1 は、チミジンキナーゼ発現型 (GC⁺) の Miyama 株⁷⁾ を用いた。本ウイルスの CY 処置マウスにおける腹腔内接種の LD₅₀ は 1.5×10^4 PFU/マウスであった。FK-23 標品は、CY 処置の翌日より 3 日間連続して投与し、CY 処置 5 日目に 10 LD₅₀ の HSV-1 を腹腔内接種し、20 日間にわたり生死を観察した。

統計処理 各実験成績の有意差検定は、Wilcoxon rank-test 又は SAS Life test procedure (Wilcoxon test)¹¹⁾ で行い、危険率が 5% より小さい場合を有意差があるものと認めた。

結 果

マウス脾細胞による *in Vitro* での IFN 産生条件

In vitro でマウス脾細胞による IFN 産生に適した培養条件を検討した。20 時間培養後の培地中の IFN 力価を指標としたところ、無刺激ではいかなる脾細胞濃度においても IFN 産生はみられないが、10 μ g/ml の PHA で刺激した場合は、脾細胞数に依存して IFN 産生量が上昇し、脾細胞濃度 1×10^6 , 5×10^6 及び 1×10^7 cells/ml で、それぞれ約 <3, 4 及び 80 IU/ml の IFN の産

生が認められた。この結果より、以下の実験の脾細胞濃度は、IFN 産生増加が容易に観察できる濃度として suboptimal レベルの IFN 産生する 5×10^6 cells/ml に設定した。

正常マウスにおける FK-23 標品の IFN 産生誘導効果

FK-23 標品が、IFN 産生能にいかなる影響を与えるか、脾細胞の *ex vivo* 実験系を用いて検討した。FK-23 標品の投与は、*C. albicans* 感染マウスにおいて予防作用を発揮する条件⁴⁾を用いた。マウスに FK-23 標品を連続 3 日間 60 mg/マウス経口投与又は 1 mg/マウス腹腔内投与し、投与終了後 2 日目にマウスから脾臓を摘出し、脾細胞の IFN 産生能を調べた。

Fig. 1A に示すように、10 μ g/ml 以上の PHA で刺激した場合は、FK-23 標品経口投与群、FK-23 標品腹腔内投与群及び対照群のいずれの群においてもマウス脾細胞から IFN の産生が認められた。この条件下において、FK-23 標品腹腔内投与群の脾細胞は、対照群に比して約 4—5 倍と有意に ($p < 0.05$) 高い IFN 産生能を示した。一方、FK-23 標品経口投与群の脾細胞では IFN 産生能の亢進はみられなかった。

Fig. 1B は脾細胞を LPS で刺激した成績を示す。0.1 μ g/ml 以上の LPS で刺激すると全群において IFN の産生がみられたが、いずれの FK-23 標品投与群も対照群に比して、IFN 産生量に変化がみられなかった。

CY 処理マウスにおける FK-23 標品の IFN 産生誘導効果

次に、*C. albicans* 感染に対する FK-23 標品の防御効果が認められた CY 処置マウスにおいて、⁴⁾本標品が IFN 産生にどのような影響を与えるかを検討した。CY 処置の翌日から連続 3 日間 FK-23 標品を投与し、最終投与後 2 日目にマウスから脾臓を摘出し、脾細胞の IFN 産生能を測定した。CY 処置マウスの脾臓から回収される有核細胞数は、脾臓あたり約 2.0×10^7 cells で、正常マウスの約 4.8×10^7 cells に比べ半減していた。一方、CY 処置マウスにおいて、FK-23 標品を経口投与したマウス脾臓の有核細胞数は対照群よりも幾分多い傾向がみられたが、統計的には差を認めなかった。

CY 処置マウスの脾細胞を、PHA 又は LPS で刺激した場合、対照群においてもそれぞれ 100 又は 400 IU/ml に達する IFN の産生が認められ、同マウスに FK-23 標品を経口投与することにより、それらの IFN の産生はより増強された (Fig. 2A, B)。

Fig. 1. Interferon Production by Spleen Cells of the Mice Treated with FK-23 Preparation

Mice were orally given with saline (●) or FK-23 preparation (60 mg/mouse, ■) or intraperitoneally with FK-23 preparation (1 mg/mouse, ▲) from day -3 to day -1. Spleen cells were taken from them at day 0 and they (5×10^6 cells/ml) were cultured with PHA (A) or LPS (B) for 20 h. Interferon titers of their culture media were determined. Average is calculated from 3—8 independent values and bar represents standard error. Statistically significant difference from the Saline-treated group. * $p < 0.05$.

Fig. 2A に示されるように、対照群の脾細胞から明らかな IFN の産生誘導を促す PHA の最小濃度は $10 \mu\text{g/ml}$ であったのに対して、FK-23 標品経口投与群のそれは $1 \mu\text{g/ml}$ であった。また、FK-23 標品経口投与群での IFN 産生増強は 10 及び $30 \mu\text{g/ml}$ の PHA を添加した場合に有意な ($p < 0.05$) レベルに達した。

LPS で刺激した場合、対照群の脾細胞から測定可能レベルの IFN を誘導する LPS の最小濃度は $0.1 \mu\text{g/ml}$ であったのに対して、FK-23 標品経口投与群のそれは $0.01 \mu\text{g/ml}$ であった。1 及び $10 \mu\text{g/ml}$ の LPS で刺激した場合に、FK-23 標品経口投与群は対照群に比して有意に ($p < 0.05$) 高い IFN を産生した (Fig. 2B)。

FK-23 標品によって産生増強される IFN のクラス

PHA 及び LPS の存在下で、FK-23 標品投与によって産生増強された IFN のクラスを特定するために、IFN 力価の測定系に、抗 IFN- α 抗体、抗 IFN- β 抗体又は抗 IFN- γ 抗体を添加し、IFN 力価の阻止率から IFN のクラスを判定した。

FK-23 標品を経口投与した CY 処置マウスの脾細胞を LPS で刺激した時に産生された IFN 約 300 IU/ml は、抗 IFN- β 抗体添加により検出レベル以下に低下した。同脾細胞を PHA で刺激した場合に産生された IFN 約 100 IU/ml は抗 IFN- β 抗体添加後では約 40 IU/ml に、抗 IFN- γ 抗体添加後では約 60 IU/ml に低下した。一方、抗 IFN- α 抗体は、PHA 又は LPS の刺激で産生された IFN の力価に影響を与えなかった。

これらの成績より、FK-23 標品を投与したマウスの脾細胞においては IFN- β 及び IFN- γ 産生能が亢進していることが示された。

マウスにおける FK-23 標品の HSV-1 感染予防効果

HSV-1 感染マウスモデル⁹⁾を用いて FK-23 標品の感染予防効果を検討した。FK-23 標品の経口投与量は 5 , 20 及び 60 mg/マウス 、腹腔内投与量は 1 mg/マウス とした。Fig. 3 に示されるように、FK-23 標品経口投与の低用量 (5 mg/マウス) 投与群及び腹腔内投与群は対照群に比して生存日数が有意に ($p < 0.05$) 延長しており、FK-23 標品による致死感染予防効果が認められた。しかしながら、高用量の FK-23 標品の経口投与群 (20 及び 60 mg/マウス) では有意な

Fig. 2. Interferon Production by Spleen Cells of the Mice Treated with Cyclophosphamide and FK-23 Preparation

Mice were pretreated intraperitoneally with cyclophosphamide on day -4 and orally given saline (●) or FK-23 preparation 60 mg/mouse (■) from day -3 to day -1. Spleen cells were taken from them at day 0 and they ($5 \times 10^6 \text{ cells/ml}$) were cultured with PHA (A) or LPS (B) for 20 h. Interferon titers of their culture media were determined. Average is calculated from 6—7 independent data and bar represents standard error. Statistically significant difference from the control group. * $p < 0.05$.

延命効果は見られなかった。

考 察

本論文において CY 処置マウスに FK-23 標品を経口投与することにより、脾細胞の IFN 産生能を増強することを明らかにした。FK-23 標品を経口投与した CY 処置マウスの脾細胞は、無刺激では IFN を産生しないが、IFN 誘導剤で刺激すると IFN 産生量が明らかに増加していた。このとき、FK-23 標品を経口投与したマウスの脾細胞は対照に比して 1/10 の量の IFN 誘導剤で検出可能レベルの IFN を産生していた (Fig. 2A, B)。したがって、FK-23 標品の経口投与は、脾細胞に対して直接 IFN の産生を誘導するのではなく、PHA 又は LPS のような IFN 誘導剤に対する脾細胞の応答性を亢進させると考えられる。この条件下で脾細胞から産生された IFN のクラスは、PHA で刺激した場合は IFN- β と IFN- γ であり、LPS で刺激した場合は IFN- β であった。

この FK-23 標品の活性の特徴として、CY 処置マウスにおいては経口投与で IFN 産生増強効果がみられるのに対して、正常マウスではその効果がみられないことが挙げられる。同様に CY 処置マウスに致死量の *C. albicans* を接種した場合には FK-23 標品の感染予防効果がみられるが、正常マウスにおいては本標品は感染予防効果を示さないことが見いだされている。⁴⁾ マウスを CY 処置することによって FK-23 標品の効果がより明確に発揮される機序は不明であるが、CY の免疫機能に及ぼす抑制的作用と関係している可能性が考えられる。事実、CY は白血球の減少をもたらすことが知られており、³⁾ 本研究においても CY 処置マウスでの脾細胞数の減少及び、単位細胞数あたりの IFN 産生能の亢進が認められた。これらの成績を総合して考えると、FK-23 標品の効果は動物が免疫抑制状態にある場合に明確に現れるのかも知れない。

さらに CY 処置マウスにおいて、FK-23 標品は HSV-1 感染に対する抵抗性を増強した。HSV-1 の感染防御の機構として、主にマクロファージと NK 細胞が関与していることが知られている。⁵⁾ また、HSV-1 自体により、一定レベルの IFN が産生されることが報告されていることにより、¹²⁾ FK-23 標品を経口投与された HSV-1 感染マウスにおいては IFN を含めたサイトカインの強い産生誘導が起こり、それに伴いマクロファージ及び (又は) NK 細胞などが活性化され、この感染防御に働いていると想像される。しかしながら、HSV-1 感染マウスにおいては、IFN 産生を顕著に高める 60 mg/マウスの FK-23 標品投与では防御効果は得られず、5 mg/マウスという低用量で明らかな防御効果がみられた。この 2 つの実験間での有効投与量の不一致の原因は今後明らかにしていかなければならないが、HSV-1 感染自体が IFN を誘導することあるいは HSV-1 感染により免疫抑制状態になること¹²⁾ が関係している可能性がある。

Fig. 3 Protective Activity of Intraperitoneal or Oral Administration of FK-23 Preparation against Herpes Simplex Virus (HSV)-1 Infection of Cyclophosphamide-Treated Mice

Cyclophosphamide-treated mice were orally given saline (● $n=9$) or FK-23 preparation at 5 (○ $n=9$), 20 (△ $n=9$) or 60 (□ $n=9$) mg/mouse or intraperitoneally FK-23 preparation (1 mg/mouse, ▲ $n=6$) from day -3 to day -1. They were intraperitoneally challenged with HSV-1 at day 0. Statistical significance from saline group. * $p<0.05$.

う。また、FK-23 標品には TNF 及び GM-CSF などのサイトカインの産生を増強する作用^{1,13)}もあることより、それらが関与していることも推測される。

現在、抗ウイルス剤として用いられている IFN は、経口投与が不可能なこと、さらに副作用及び経済性の問題から、新規の治療薬が望まれている。IFN に比べ、FK-23 標品は、経口投与が可能で内因性の IFN の産生を高める点に特徴があり、しかも安全性が高いこと、経口投与で有効なこと、長期投与ができることなど幾つもの利点をもつ。現在、HSV-1 以外のウイルス感染に対する FK-23 標品の有効性を検討しつつある。

謝辞 IFN の測定法の指導を頂いた国立予防衛生研究所・小長谷昌功博士に、HSV-1 の譲渡並びに実験方法の指導を頂いた前東北大学歯学部・熊谷勝男博士並びに帝京大学医学部・入江 宏博士に深謝致します。また実験に協力して頂いた帝京大学中央動物施設・田村 弘博士及び帝京大学医学部・丹生 茂、奥富隆文両博士に深謝致します。

引用文献

- 1) 大橋一智, 上田浩史, 山崎正利, 木村貞夫, 安部 茂, 山口英世, 薬誌, **112**, 919 (1992).
- 2) 大橋一智, 里中勝人, 山本哲郎, 山崎正利, 木村貞夫, 安部 茂, 山口英世, 薬誌, **113**, 396 (1993).
- 3) 長谷川貴文, 金杉洋美, 日高真和, 小倉ゆかり, 猪俣生輝, 山本哲郎, 安部 茂, 山口英世, 動物臨床医学, **13**, 11 (1994).
- 4) Satonaka K., Ohashi K., Nohmi T., Yamamoto T., Abe S., Uchida K., Yamaguchi H., *Microbiol. Immunol.*, **40**, 217 (1996).
- 5) Harada Y., Kurokawa E., Endo H., Kimura T., Saito M., Sugawara Y., Irie H., Ito K., Fujii M., Shimizu Y., Kumagai K., *Microbiol. Immunol.*, **33**, 467 (1989).
- 6) Irie H., Harada Y., Yoshihashi H., Kimura T., Kojima M., Kataoka M., Saito M., Sugawara Y., Mori W., *Arch. Virol.*, **105**, 247 (1989).
- 7) Shimizu F., Satoh J., Tada M., Kumagai K., *Infect. Immun.*, **22**, 752 (1978).
- 8) Havell E. A., Spitalny G. L., Patel P. J., *J. Exp. Med.*, **156**, 112 (1982).
- 9) Belardelli F., Gessani S., Proitti E., Locardi C., Borghi P., Watanabe Y., Kawabe Y., Gresser I., *J. Gen. Virol.*, **68**, 2203 (1987).
- 10) 小長谷昌功, 荻野利夫, 治療学, **27**, 1164 (1993).
- 11) SAS Institute Inc., P-179, Additional SAS/STAT Procedures Release 6.03, SAS Institute Inc., Cary, N. C., 1988.
- 12) Gobl A. E., Funa K., Alm G. V., *J. Immunol.*, **10**, 3605 (1988).
- 13) 里中勝人, 大橋一智, 安部 茂, 山口英世, *Biotherapy*, **7**, 345 (1993).