

活性のない死菌などでも強毒生菌と同等の防御免疫が誘導できる結果が得られた。従って、毒素活性を欠失させサイトカイン誘導活性を維持したリコンビナント標品によって、より安全に宿主免疫応答を賦活したり、精製抗原との併用によるTH1免疫の誘導が可能になると考えられた。

一方まだ成果には至っていないが、結核菌由来のいくつかの因子による宿主サイトカイン誘導活性の検索も開始しており、これとは別にマクロファージ内エスケープを可能にする結核菌のエスケープ因子を探索する実験系も確立しつつある。従って、リステリアの実験系の発展と同時に、結核菌に関する同様の研究も今後展開が期待される。

E. 結論

リステリアのエスケープ因子であるLLOの毒性活性部位と免疫賦活活性部位は解離することが可能であり、その免疫賦活活性は感染防御免疫応答の誘導に応用が可能である。今後は結核菌および類似の抗酸菌について、同様のエスケープ因子の探索と宿主応答刺激活性を解析していきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohya, S., Xiong, H., Tanabe, Y., Arakawa, M. & Mitsuyama, M. : Killing mechanism of *Listeria monocytogenes* in activated macrophages as determined by an improved assay system. *J. Med. Microbiol.* 47(2):211-215, 1998.
- 2) Yoshimoto, T., Wang, C., Yoneto, T., Waki, S., Sunaga, S., Komagata, Y., Mitsuyama, M., Miyazaki, J. & Nariuchi, H. : Reduced Th1 responses in interleukin-12 p40 transgenic mice. *J. Immunol.*, 160:588-594, 1998.
- 3) Kobayashi, T., Ohmori, T., Yanai, M., Takeshita, Y. & Mitsuyama, M. : Protective effect of administration of skim milk on exogenous and endogenous infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 42(3):203-209, 1998.
- 4) Tachibana, T., Matsuyama, T. & Mitsuyama, M. : Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity. *Medical Mycology* 36(1):21-27, 1998.
- 5) Xiong, H., Ohya, S., Tanabe, Y. & Mitsuyama, M. : Administration of killed bacteria together with listeriolysin O induces protective immunity against *Listeria monocytogenes* in mice. *Immunology* : 94(1):14-21, 1998.
- 6) Ohya, S., Tanabe, Y., Makino, M., Nomura, T., Xiong, H., Arakawa, M. & Mitsuyama, M. : The contribution of reactive oxygen intermediates and reactive nitrogen intermediates to bactericidal mechanisms differ in macrophages activated pre- and postinfection. *Infect Immun* 66(9):4043-4049, 1998.
- 7) Tanabe, Y., Xiong, H., Nomura, T., Arakawa, M. & Mitsuyama, M. : Induction

of protective T cells against *Listeria monocytogenes* in mice by immunization with a non-immunogenic strain of bacteria and liposome-encapsulated listeriolysin O. *Infect Immun* 67(2) 568-575, 1999.

8) Ebe Y, Hasegawa G, Takatsuka H, Umezu H, Watanabe H, Mitsuyama M, Arakawa M, Mukaida N, Matsushima K, & Naito M. : The role of Kupffer cells and regulation of neutrophil migration into the liver by a C-X-C chemokines in primary listeriosis. *Pathology International*, in press, 1999.

9) 光山正雄、野村卓正：ツベルクン反応とBCG、臨床と研究 75(4):751-757, 1998.

10) 光山正雄：生体防御と感染、現代医療 30(5):1157-1162, 1998.

11) 河村伊久雄、光山正雄：特異的・非特異的感染防御因子、

INFECTION CONTROL 7(9):902-908, 1998.

12) 光山正雄：抗酸菌に対する免疫病理学的反応とサイトカインネットワーク、分子呼吸器病 2(5):14-20, 1998.

13) 光山正雄：生体は感染をどう防御しているか？ *Convention Insights on Chemotherapy* 13(2):10-11, 1998.

14) 光山正雄：結核防御免疫の誘導と発現、結核 73(11):639-644, 1998.

15) 光山正雄：細胞内寄生菌研究の動向、学術月報 52(2) : 142-146, 1999.

2. 学会発表

1) 河村伊久雄、光山正雄：食細胞による殺菌機構と菌のエスケープ。第71回日本細菌学会総会、1998.

2) 望月博史、野村卓正、大矢聡、河村伊久雄、光山正雄：サルコドーシスと *Propionibacterium acnes* : 菌株差によるサイトカイン誘発能の差異とその解析。第71回日本細菌学会総会、1998.

3) 藤田雅、光山正雄、仲川洋治：多剤耐性のセラチアの遺伝子発現について。第71回日本細菌学会総会、1998.

4) 野村卓正、田邊嘉也、光山正雄。：リステリア感染で誘導されるCTLの標的細胞における食胞内pHの意義。第71回日本細菌学会総会、1998.

5) 牧野真人、藤田雅、光山正雄：活性化Mφ内での *Listeria monocytogenes* 病原因子遺伝子発現の解析。第71回日本細菌学会総会、1998、松本。

6) 河村伊久雄、光山正雄：結核菌の細胞侵入因子によるマクロファージ活性酸素産生の抑制。第71回日本細菌学会総会、1998.

7) 橘敏明、松山東平、光山正雄：菌の温度感受性と宿主細胞性免疫は *Sporothrix schenckii* 感染の予後に関与する。第71回日本細菌学会総会、1998.

8) 筒井奈々子、野村卓正、河村伊久雄、光山正雄：劇症型溶連菌感染症由来菌の病原性：マウス足蹠感染モデルによる解析。第71回日本細菌学会総会、1998.

9) 江部佑輔、内藤真、長谷川剛、光山正雄：マクロファージ除去マウスにおける *Listeria* 感染機序。第38回日本リンパ網内系学会総会、1998.

10) 河村伊久雄、野村卓正、光山正雄：抗結核防御免疫へのリステリアヘモリシンの応用、第9回日本生体防御学会学術総会、1998.

11) 望月博史、野村卓正、河村伊久雄、光山

正雄：*Propionibacterium acnes* とサルコイドーシス：菌株によるサイトカイン誘発能の差異、第28回日本免疫学会総会、1998.

12) 河村伊久雄、幸田力、野村卓正、光山正雄：サイトカイン産生誘導能を有する *listeriolysin O* の抗結核防御免疫発現への応用、第28回日本免疫学会総会、1998.

13) 筒井奈々子、野村卓正、河村伊久雄、光山正雄：劇症型溶連菌感染症由来菌に対するマウスでのサイトカイン応答、第28回日本免疫学会総会、1998.

14) 光山正雄：リステリア感染防御の発現と誘導におけるNK細胞由来IFN-gの中心的役割、第22回阿蘇シンポジウム、1998.

15) M.Mitsuyama: Cytokine response of the host against virulence factor of *Listeria monocytogenes* and its implication in protective immunity. The 10th Takeda Science Foundation Symposium on Molecular Basis of Microbial Pathogenesis. 1999.

16) 筒井奈々子、野村卓正、河村伊久雄、光山正雄：劇症型溶連菌感染症由来菌の食食細胞への影響：J774細胞における解析、第72回日本細菌学会総会、1999.

17) 望月博史、野村卓正、河村伊久雄、光山正雄：*Propionibacterium acnes* とサルコイドーシス：菌株によるサイトカイン誘発能の

差異、第72回日本細菌学会総会、1999.

18) 牧野真人、藤田雅、光山正雄：マクロファージ内での *Listeria monocytogenes* 病原因子の遺伝子発現についての解析、第72回日本細菌学会総会、1999.

19) 河村伊久雄、幸田力、野村卓正、光山正雄：結核防御免疫誘導へのアジュバントとしてのリステリオリシンOの応用、第72回日本細菌学会総会、1999.

20) 野村卓正、幸田力、河村伊久雄、光山正雄：リステリオリシンO刺激によるIFN-g産生に関するサイトカインネットワークの解析、第72回日本細菌学会総会、1999.

21) 幸田力、野村卓正、河村伊久雄、光山正雄：リステリオリシンOのサイトカイン誘導能と細胞傷害活性の解離とサイトカイン産生誘導活性最小単位の特定、第72回日本細菌学会総会、1999.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

分担研究報告書

抗酸菌に対する生体防御機構の解析

分担研究者 小林和夫 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 生体防御部長

研究要旨

宿主感染防御機構において遺伝子、細胞や生理活性物質（サイトカインなど）が役割を演じているが、本分担研究ではサイトカインを中心に解析した。その結果、細胞性免疫の起動性サイトカイン、interleukin 12 (IL-12) が抗酸菌感染防御に貢献していることが判明した。しかし、IL-12は肉芽腫炎症病変も増強した。すなわち、感染防御と病変形成が表裏一体であることが判明した。

A. 研究目的

抗酸菌感染における宿主防御や肉芽腫炎症は、菌および宿主側両因子が関与する宿主-寄生体関係を介して成立し、抗酸菌と宿主の壮絶な生存戦争を反映している。幸運なことに宿主-抗酸菌寄生体関係において発病は10%以下であり、すなわち、宿主に抗酸菌感染防御機構が存在しているが、詳細は不明である。この機構の解明は抗酸菌感染症の予防・治療に貢献することが期待される。

B. 研究方法

純系マウスに抗酸菌（非結核性抗酸菌やらい菌）を接種し、病変局所における宿主免疫応答を解析した。また、得られた成績を基に、免疫強化療法の可能性について探索した。

C. 研究結果

In vivo *Mycobacterium avium*や*M. leprae*感染により、抵抗性および感受性純系マウスではIL-4発現（遺伝子および蛋白）を除いて明瞭な差異が認められた。すなわち、感受性マウスはinterferon (IFN)- γ に代表される1型ヘルパーT (Th1) 細胞反応不全を呈しており、この

不全はTh2反応 (IL-4) に非依存性であり、IL-12やIFN- γ -inducing factor (IGIF/IL-18) などのIFN- γ /Th1誘導性サイトカイン発現不全に起因していた。IL-12やIGIF/IL-18の主要な産生細胞がマクロファージであることを考え併せると、感受性マウス由来マクロファージに内因性欠陥が示唆される。

Th2非依存性IFN- γ /Th1誘導性サイトカイン発現不全はIL-12投与 (Genetics Inst., Cambridge, MA) により是正され、in vivo感染菌数を用量依存的に減少させた。IL-12投与は感染成立後でも有効であり、この効果は投与終了後も継続したことから、おそらく、IL-12が感染宿主内で殺菌作用を発揮したと考えられる。

他方、サイトカイン療法における負の側面として、宿主における局所的（病変部）および全身的（臓器障害）副反応を検索した。IL-12投与により、局所反応として、肉芽腫炎症は増強し、また、全身性反応として、血液（汎血球減少症）、肝や筋毒性を認めた。IL-12療法は確かに感染防御（正の側面）に貢献したが、毒性（負の側面）も惹起した。

D. 考察

抗酸菌感染感受性マウスには内因性マクロファージ欠陥があり、そのため、感染防御性マクロファージ由来サイトカイン（IL-12やIGIF/IL-18）発現不全を招来し、防御不全を呈していることが判明した。この欠陥はIL-12補充療法により是正され、感受性マウスにおける防御は増強した。補充療法は多剤耐性抗酸菌（*M. avium*）感染症にも有効であった。これらの成績から、サイトカイン補充療法の臨床応用を考慮した場合、1) 免疫不全宿主や2) 薬剤耐性抗酸菌感染が適応となる可能性を示唆している。

IL-12補充療法は感染防御（正の側面）に貢献したのみならず、宿主における局所的（肉芽腫炎症増強）および全身的（臓器障害）不利益な反応も惹起したことから、今後、サイトカイン補充療法において、投与方法（間欠、持続、抗菌化学療法薬との併用）、薬物分配系（局所集中、全身投与）、投与量、投与時期などを含め、宿主に不利益な反応を少なくすることが課題である。この課題の解決は防御性サイトカイン（IL-12など）発現を誘導する新規ワクチン開発にも必須である。

Th2非依存性Th1反応不全はIL-12などのIFN- γ /Th1誘導性サイトカイン補充投与より是正され、マウスの抗菌活性は増強した。免疫強化療法への戦略転換は抗酸菌のみならず、種々の微生物感染症にも貢献するであろうし、また、免疫強化療法と抗菌化学療法の併用療法も感染症制圧における新たな武器となるであろう。

E. 結論

宿主感染防御機構において遺伝子、細胞や生理活性物質（サイトカインなど）が役割を演じているが、本分担研究ではサイトカインを中心に解析した。その結果、細胞性免疫の起動性サイトカイン、IL-12が抗

酸菌感染防御に貢献していることが判明した。しかし、IL-12は肉芽腫炎症病変も増強した。すなわち、感染防御と病変形成が表裏一体であることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Saito, H., Y. Kashiwabara, and K. Kobayashi. 1998. Present and future in leprosy research. In *Clinical Mycobacteriology*. M. Casal, editor. Barcelona: Prous Science/Spain. 51-62.

Kobayashi, K., K. Hashimoto, M. Gidoh, M. Kai, and H. Saito. 1998. Possible involvement of type 1 helper T cell/interferon- γ inducing cytokines in protection against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice. In *Clinical Mycobacteriology*. M. Casal, editor. Barcelona: Prous Science/Spain. 109-114.

Kai, M., H. Saito, K. Kobayashi, and Y. Kashiwabara. 1998. *Mycobacterium avium* complex with different reactivity to DNA probes. In *Clinical Mycobacteriology*. M. Casal, editor. Barcelona: Prous Science/Spain. 159-164.

Saito, H., M. Gidoh, M. Kai, and K. Kobayashi. 1998. Chemoprophylaxis against *Mycobacterium avium* complex induced in mice. In *Clinical Mycobacteriology*. M. Casal, editor. Barcelona: Prous Science/Spain. 403-413.

Kawasaki, S., H. Takizawa, T. Ohtoshi, N. Takeuchi, T. Kohyama, H. Nakamura, T. Kasama, K.

Kobayashi, K. Nakahara, Y. Morita, and K. Yamamoto. 1998. Roxithromycin inhibits cytokine production by and neutrophil attachment to human bronchial epithelial cells in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1499-1502.

Kasahara, K., I. Sato, K. Ogura, H. Takeuchi, K. Kobayashi, and M. Adachi. 1998. Expression of chemokines and induction of rapid cell death in human blood neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 178: 127-137.

Kobayashi, K., M. Kai, M.-i. Gidoh, N. Nakata, M. Endoh, R.P. Singh, T. Kasama, and H. Saito. 1998. The possible role of interleukin (IL)-12 and interferon- γ -inducing factor/IL-18 in protection against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 88: 226-231.

小林和夫. 1998. 抗酸菌感染症制圧における生体防御増強戦略. BioDefence シリーズ 3. 異物反応と生体反応 -新しい視点を求めて- (日本生体防御学会、岡田秀親編). 東京: 菜根出版. 227-241.

進士ひとみ、小林和夫. 1998. マクロファージ活性化と病態形成. 細菌感染症. 臨床免疫 30: 207-213.

斎藤 肇、D. Dawson、甲斐雅規、小林和夫. 1998. *Mycobacterium avium* complexの自然環境における地理的分布並びにAIDS・非AIDS患者株の血清型. 結核 73: 379-383.

樋口一恵、原田登之、内山隆司、藤原寛、上田千里、露口泉夫、中村玲子、小

林和夫、青木正和. 1998. マクロファージのIL-12産生を高値に誘導する結核菌体成分の解析. 結核 73: 531-543.

2. 学会発表

小林和夫、吉田 彪 1998. 肉芽腫炎症制御におけるサイトカインネットワーク (要望課題). 結核、73: 236、1998. 第73回日本結核病学会総会 (新潟、4月)

樋口一恵、原田登之、内山隆司、藤原寛、上田千里、中村玲子、小林和夫 1998. マクロファージにおいてIL-12産生を高値に誘導する結核菌体成分の解析. 結核、73: 244、1998. 第73回日本結核病学会総会 (新潟、4月)

佐藤直樹、山崎利雄、芳賀伸治、小林和夫、柏原嘉子、林 公子、田村俊秀、山下研也、豊田耕一、岡沢 豊、丹野和信 1998. 生物発光を用いた結核菌の薬剤感受性試験法 (その2). アデノシン三リン酸 (ATP) 測定法の結核菌標準株による基礎的検討. 結核、73: 250、1998. 第73回日本結核病学会総会 (新潟、4月)

山崎利雄、佐藤直樹、芳賀伸治、小林和夫、柏原嘉子、林 公子、田村俊秀、山下研也、豊田耕一、岡沢 豊、丹野和信 1998. 生物発光を用いた結核菌の薬剤感受性試験法 (その2). ATP測定法の薬剤感受性試験への応用. 結核、73: 251、1998. 第73回日本結核病学会総会 (新潟、4月)

小林和夫、儀同政一、甲斐雅規、斎藤肇. 1998. *Mycobacterium leprae*感染マウスにおける免疫療法の理論と応用. 日本ハンセン病誌、67: 44、1998. 第71回日本ハンセン病学会総会 (平良、6月)

福富康夫、木村博昭、虎谷 聡、松木玄

二、小林和夫、松岡正典. 1998. らい菌貪食マクロファージにおいて誘導されるTNF、IL-10産生に対するIFN- γ の相反する影響. 日本免疫学会・学術集会記録、28 : 325、1998. 第28回日本免疫学会総会・学術総会（神戸、12月）

樋口一恵、原田登之、中村玲子、小林和夫. 1998. マクロファージのIL-12産生を高値に誘導する結核菌体成分の解析. 日本免疫学会・学術集会記録、28 : 331、1998. 第28回日本免疫学会総会・学術総会（神戸、12月）

厚生省新興再興感染症研究事業
分担研究報告書

分担研究者 後藤 義孝 宮崎大学農学部助教授

豚肺胞マクロファージを用いた抗酸菌感染モデルと *NRAMP1* 遺伝子

研究要旨

マウスの抗酸菌に対する自然抵抗性を支配する *NRAMP1* (natural resistance associated macrophage protein 1) 遺伝子は、近年その homologue が人、鶏、牛、羊、豚などの動物においても見い出されている。しかし、マウスを除きその自然抵抗性に対する関与の有無は明らかではない。ところで、豚は *M. avium* 感染症好発動物として知られ、公衆衛生面から問題視されている。今回、我々は豚の肺胞マクロファージを用いて豚のもつ *NRAMP1* 遺伝子と *M. avium* 感受性との関係について調べた。健康豚から肺胞マクロファージを採取し、人を含む動物から分離された *M. avium* を感染させ、10日目までの菌数を個体間で比較した。また、RT-PCRにより *NRAMP1* mRNA の肺胞マクロファージにおける発現量を健康豚と感染豚の間で比較した。また、同遺伝子の一部のシーケンス解析を行った。マクロファージ内における *M. avium* の増殖パターンは、株により著しく異なり、豚由来株は良く増殖し、牛由来株はほぼ横ばい、エイズ患者由来株は全ての個体において減少の一途をたどった。豚マクロファージにおける *NRAMP1* mRNA の発現量を健康豚と感染豚で比較したが、いずれも有意差はみられなかった。今回調査した感染豚のほとんどの例において、全身性に至る病変が見られなかったこと、またすべての非感染豚における菌の増殖パターンが酷似していたことから、調査対象とした個体間における遺伝形質（感受性／抵抗性）は同じであると考えられた。

A. 研究目的

マウスを用いた結核菌ならびに非定型抗酸菌感染症モデルは、同感染症に対する免疫研究や感染防御実験などに利用され、これまでに数多くの知見が得られてきた。ヒトを含め哺乳動物における抗酸菌感染に対する宿主抵抗性は、マクロファージなどの食細胞が関わる自然抵抗性とT細胞が関わる獲得抵抗性とに大別される。そのうち前者はマウ

スにおいては第一染色体上にある *NRAMP1* (Natural resistance associated macrophage protein) 遺伝子によってコントロールされていることが分かっている (Vidal ら *Cell*. 73: 469, 1993)。同遺伝子産物はマクロファージ上に発現していると考えられている (Vidal ら *J. Immunol.* 157: 3559, 1996) が、どのような機序で抵抗性発現に関わっているのかは全く分かつ

ていない。同遺伝子は最初、弱毒の *M. bovis* BCG Montreal 株に抵抗する遺伝子として発見され、その後、トリ型結核菌をはじめとする非結核性抗酸菌に対する抵抗性に関与することが証明されたものの、病原性の強いヒト型ならびにウシ型結核菌に対するマウスの抵抗性がさほど強くないことから、結核菌感染に対する同遺伝子の関与は疑問視されてきた。しかしヒト (Kishi *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204:1074, 1994) をはじめマウス以外の動物 (Feng ら *Genome. Res.* 6:956, 1996、Hu ら *Mammalian Genome.* 6:809, 1995) においても *NRAMP1* 遺伝子のホモログが相次いで発見され、ヒトの結核をはじめとする感染症やある種の疾患と同遺伝子との関連性について興味を持たれるようになった (Bellamy ら *N. Engl. J. Med.* 338:640, 1998、John ら *J. Rheumatol.* 24:452, 1997、Newport ら *J. Med. Genet.* 32:904, 1995.)。

われわれはマウスの抗酸菌感染症モデルを用いて *NRAMP1* 遺伝子の役割についてこれまで研究を続けてきた。その結果、同遺伝子は感染初期のみならず、感染後期の感受性/抵抗性にも関与していること、感染刺激を受けたマクロファージから産生されるサイトカインプロファイルや同細胞のもつ抗原提示能力にも影響を及ぼすことをあきらかにした。結核ならびに非定型抗酸菌症が慢性の感染症であることを考えると *NRAMP1* 遺伝子はヒトや家畜においても感染の予後を左右する極めて重要な働きをしているように思われる。ただマウスは遺伝的特性はじめ生理

学的特性や病理組織形態などがヒトとかなり異なっているため、同遺伝子の感染症における役割をより一層明確なものにするためには、マウス以外の動物を用いた感染モデルが必要ではないかと思われる。そこで今回我々は豚を用いた抗酸菌症モデルの作出を試みた。対象動物に豚を選んだ理由は、材料の入手が容易であることに加え、自然界において抗酸菌感染症が数多くみられる (Karlson ら *Am. J. Vet. Res.* 32:1257, 1971) こと、その病理組織像がマウスのそれに比べてヒトのそれに近いこと、最近種々の細胞表面マーカーやサイトカインの研究が進み、免疫学的な研究も可能になってきたからである。また最近豚の *NRAMP1* 遺伝子がクローニングされ、マウスやヒトの遺伝子との比較研究が可能になったことも理由のひとつとしてあげられる。豚の *NRAMP1* 遺伝子は第 15 染色体上に位置し、cDNA の全長は 1995bp で、人、牛、マウスの *NRAMP1* 遺伝子とそれぞれ 87%、88%、85% のホモロジーを有する (Tuggle ら *J. Anim. sci.* 75:227, 1997)。今年度、我々はまず豚のマクロファージを用いた *in vitro* 感染モデルを作出したうえで、同細胞が発現しているであろう *NRAMP1* 遺伝子と感染抵抗性との関連を解析しようと試みた。

B. 研究方法

M. avium : 東京大学医科学研究所の中田光博士より分与されたエイズ患者由来株 2 株 (No. 10 と No. 48-3) 牛の全身性抗酸菌症から分離した 1 株 (cattle)、豚の全身性抗酸

菌症と限局性抗酸菌症から分離されたもの各1株 (Mj21 と Mj6-2) の計5株を感染実験に供した。1%小川培地(日水製薬、東京)で培養されたこれらの株を 10% OADC enrichment を添加した Middle brook 7H9 Broth(Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) 培地に移し、37°Cで7日間培養した。菌液は-80°Cに保存した。

豚:南九州で繁殖飼育されたランドレース種(L)と大ヨークシャー種(W)の F1(LW・WL)にデュロック種(D)を交雑した6ヶ月齢のLWD・WLD、体重110kg前後の雌または去勢雄を用いた。宮崎市食肉衛生検査所にて肉眼的に病変が無いと診断された個体から無作為に肺を摘出し、直ちに氷冷し研究室まで搬送後、肺胞マクロファージの採取をおこなった。

肺胞マクロファージの採取:アンピシリン、カナマイシン添加氷冷PBS(-)を、バルーン付きカテーテルを装着した50mlのガラスシリンジに充填し、1cm程度切開した各気管支(副葉気管支、中葉気管支、左右の気管支と後葉気管支から分岐する背および腹枝、左肺の前葉気管支)からチューブを挿入して、気管支肺胞洗浄を行った。洗浄液を50mlの遠沈管に集め、1,500rpm、10分間遠心して細胞を集めた。集めた細胞を3回以上洗浄し、アンピシリン加RPMI1690培養液に再浮遊させた。5%CO₂フ卵器で2~3時間培養して細胞をプレートに付着させた後、温めたPBS(-)でプレートを3回洗浄して非付着細胞を除いた。付着細胞に羊赤血球を貪食させ95%以上の細胞が赤血球を貪食した検体についてのみ、それらを肺胞マクロファージと看做して

実験に供した。

肺胞マクロファージへの感染と菌数測定:細胞数を 2×10^6 /mlに調整し、24ウェルマイクロプレート(ナルジェンヌンク インターナショナル株式会社、東京)に1mlずつプレティングし、5%CO₂フ卵器で24時間培養した。 2×10^7 /mlに調整した菌液を各ウェルに1mlずつ接種し菌を貪食させた後、温めたPBS(-)で3回洗浄し、アンピシリン加RPMI1690培養液にて一定期間培養をおこなった。細胞内生菌数を測定するため、0.05% triton-Xで細胞を溶解、滅菌蒸留水で10倍段階希釈した後、10%OADC添加Middle brook 7H10寒天平板培地に接種、形成された集落を数えた。

細胞からの Total RNA 抽出:豚の肺マクロファージからRNA抽出液(ISOGEN ニッポンジーン、東京)を用いて、常法に従いtotal RNAを抽出した。得られたRNAの濃度を吸光度法にて測定した後-80°Cに保存した。同サンプルの一部は、変性アガロースゲル法によりリボゾームRNAのバンドの確認に、残りは*NRAMP1*の定量に用いた。

RT-PCR:遺伝子増幅にはGene Amp Thermostable *rTth* Reverse Transcriptase RNA PCR Kit(Perkin-Elmer Cetus Co., U.S.A.)を用いた。Gene Amp PCR System 2400(Perkin-Elmer Cetus Co., U.S.A.)を用いて60°C、30分間の条件でcDNA合成を行い、その後PCRを行った。増幅されたPCR産物を1%のアガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色、UV照射下で写真撮影を行った。発現量を比較するために写真

撮影後のバンドをコンピューターに取り込み画像処理を行った。豚ならびにマウスの *NRAMP1* プライマーは文献 (Tuggle *et al.*, 1997) をもとに設計した。対照遺伝子の HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyl transferase) と GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase) のプライマーは、文献 (Dennis *ら Anim. Bio.* 9:67, 1998) および GeneBank のデータベースより検索した配列をもとに設計した。

PCR 産物の精製と塩基配列の決定: RT-PCR 産物は 1%アガロースにより電気泳動を行った後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH., Germany) を用いるか、PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH., Germany) を用いて直接精製した。シーケンシング反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (パーキンエルマー・ジャパン、浦安) を用いて行い、塩基配列解析には ABI PRIZMTM310 Genetic Analyzer (パーキンエルマー・ジャパン、浦安) を用いた。

C. 研究結果

肺胞マクロファージによる菌の貪食

マクロファージによる菌の取り込み能力を菌株ごとに比較した。この実験には3頭の豚を用い、感染後1時間目の細胞内生菌数を貪食された菌数とみなした。エイズ患者由来株 No. 48-3 は他の4株に比べて取り込まれた菌数が多く、次いで Mj 21、牛由来株、Mj 6-2 の順となった。しかし、いずれのマクロファージも各株の貪食率に有意差は認めなかつ

た。

肺胞マクロファージ内における *M. avium* の推移

個々の豚の肺胞マクロファージに由来の異なる株を感染させ、経日的に細胞内の生菌数を調べた。結果を Fig. 1 に示す。いずれの個体のマクロファージも、感染1日目に最も多くの生菌が回収されたのは Mj 21 (豚由来株) で、牛由来株、エイズ患者由来2株の順に多かった。Mj 21 はただ一例を除き最初減少傾向を、5日目以降からは増加傾向を示した。牛由来株は感染期間を通じてほぼ横ばいを示し、エイズ患者由来2株はいずれの豚由来マクロファージにおいても増殖は認められなかった。Mj 6-2 株は豚の全身性抗酸菌症から分離した株であるが、局所性リンパ節炎から分離した Mj 21 株と同様のパターンを示した。

健康豚5検体の *NRAMP1* 遺伝子発現量の比較

全検体において、*NRAMP1*、GAPDH 発現が確認され、その発現量は肉眼的には差は認められなかった。画像処理をした、GAPDH 発現量に対する *NRAMP1* 発現量の割合はいずれの個体もほぼ同じであった。

局所または全身感染例における *NRAMP1* 遺伝子の発現

健康豚と感染例において *NRAMP1* 発現量の GAPDH 発現量に対する割合をそれぞれ算定し、個体ごとに比較をしたところ、局所性の病変をもつほとんどの個体は健康な個体とほぼ同レベルの発現を示し、*NRAMP1* と GAPDH の比率もほぼ同じであった。しかし、全身例と局

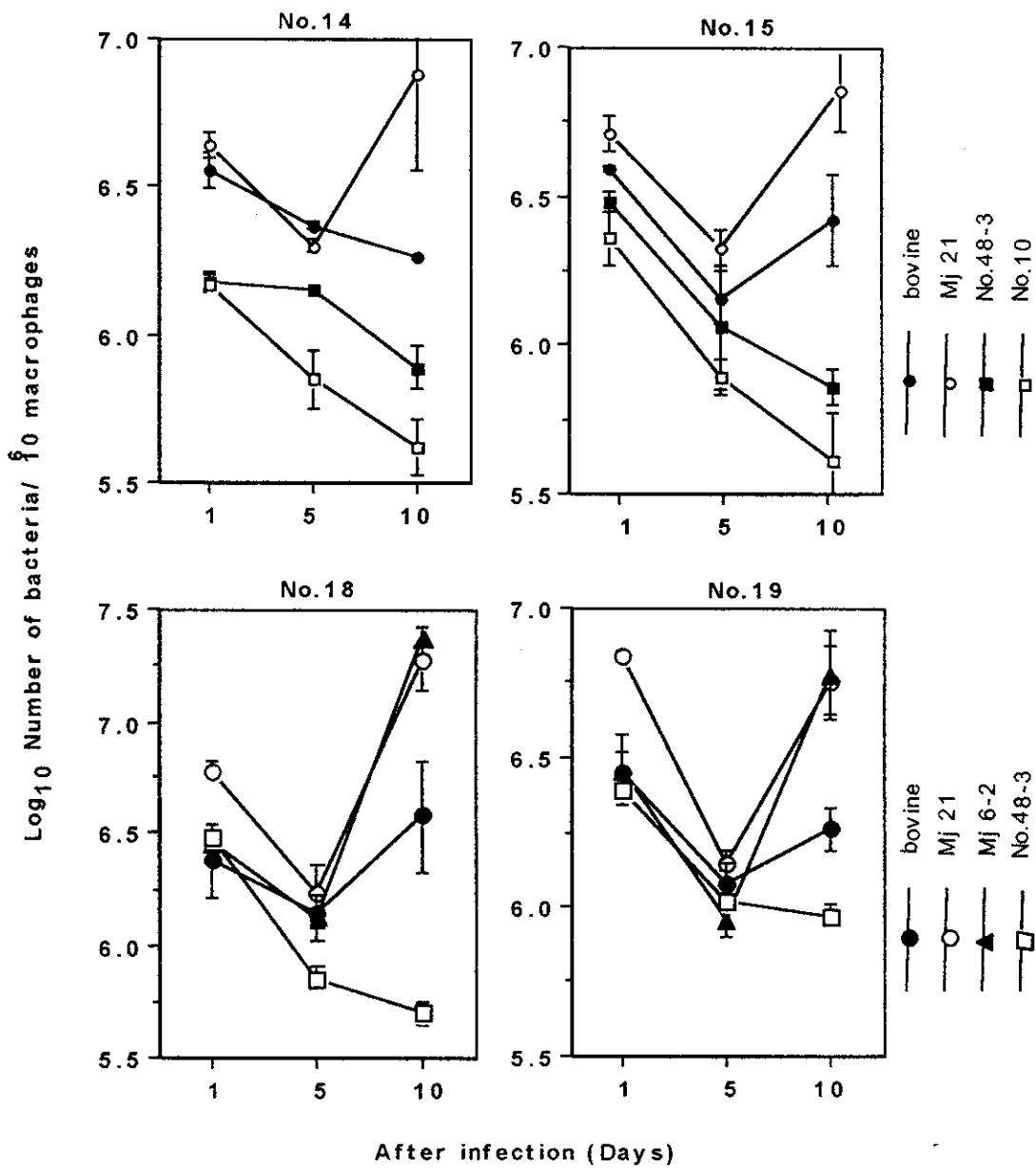


図 1. 豚肺マクロファージにおける *M. avium* の増殖パターン

豚の肺から採取したマクロファージに牛由来 (bovine)、豚由来 (Mj 21 と Mj 6-2) それにヒト由来 (No. 10 と No. 48-3) の *M. avium* を感染させ、細胞内生菌数の推移をしらべた。検査頭数は20だが、すべて類似のパターンを示したのでここでは典型例4頭の成績を示す。

所例のうちの1例は有意に高い値を示した。

豚 *NRAMP1* 遺伝子の DNA 解析

Tuggle らの報告した豚 *NRAMP1* 遺伝子塩基配列 (Tuggle ら *J. Anim. sci.* 75:227, 1997) と、今回得られた抗酸菌感染症例を含む計 9 検体の *NRAMP1* 遺伝子のシーケンスの比較を行った。554 番目と 617 番目の塩基が既報ではアデニンであるのに対し、今回は全例グアニンで、アミノ酸レベルでは前者がアルギニンからグリシンに、後者ではアスパラギンからアスパラギン酸へと変化していると推定された。また、691 番目はシトシンでこれも Tuggle らの報告にあるチミンとは異なっていたが、アミノ酸レベルでは同じであった。さらに、検体 No. 3 だけが 587 番目のグアニンがアデニンとなり、アミノ酸レベルではバリンからイソロイシンへの変異が推定された。なおシーケンス解析は複数回同じ結果が得られることを確認している。マウスにおける変異部分、すなわち *Bcg^f* マウスにおける 506 番目の塩基置換 (G→A; アミノ酸レベルではグリシン→アスパラギン酸) は、豚では同遺伝子の 5' 末端から数えて 570 番目のグアニンに相当し、*Bcg^f* マウスと同様、アミノ酸はグリシンでこちらはすべての検体で同じであった。

D. 考察

感染直後 (1 時間後) と 24 時間後の細胞内生菌数を比較したところ、前者では菌株間で大きな違いがみられなかったが、後者では株間で有意の差が認められた。1 時間目における菌貪食率に有意差がみられないことをあわ

せて考えるならば、株間に見られた差はマクロファージのもつ菌の処理能力の差というよりもむしろ菌側のマクロファージに対する抵抗力の差を反映しているものと思われる。菌のマクロファージへの侵入性や細胞内での増殖性を比較した研究では、細胞内で培養した株と、培養液のみで培養を続けた株では前者の方が後者よりも 6 倍から 8 倍も高い効率で侵入性を示し、その後の細胞内における増殖率も異なっていた。さらに両株に対する侵入に関わるマクロファージ側のレセプター ($\beta 1$ インテグリンやトランスフェリンなど) が異なっており、細胞内への侵入経路が異なると病原性にも違いが生じると述べている。こうした一連の実験結果は、それぞれの株はその由来となった動物のマクロファージ内での増殖を介して、異なる性状や病原性を獲得できる可能性を示唆している。このように *M. avium* 感染症における菌側の要因を全く無視することは出来ないが、やはり、抗酸菌症が発症するか否かは、宿主側の防御能に依存しているといえるだろう。

豚の肺マクロファージにおける *NRAMP1* の発現量を比較した。RT-PCR 法ではその性質上、mRNA 発現量を正確に定量することは容易ではなく半定量的なものにならざるを得ない。RT-PCR ではバンドが検出されるので、おそらくは産生される mRNA の量的問題であろう。RT-PCR により増幅した健康豚と感染豚の *NRAMP1* 遺伝子の塩基配列を比較した結果、健康豚 1 検体を除いては塩基配列が全く同じだった。Sun らによる豚 *NRAMP1* に関する報告 (Sun ら *Anim. Genet.* 29:138, 1998) による

と、豚 *NRAMP1* にはバリエーションがあるらしく 11 系統の豚を含む集団から 3 つの対立遺伝子が見い出されたという。そのうち A 対立遺伝子は dam(white) 系統のみで、C 対立遺伝子は sire(colored) 系統のみで認められたという。今回用いた検体はいずれも white 間の交雑で、遺伝的に均一な集団ではないので、シーケンスをおこなう際に対立遺伝子についても十分考慮する必要がある。抗酸菌症は white、colored いずれにも認められるが、両系の感染に対する感受性差などはほとんど調べられていない。今後、各系統の病豚と健常豚における *NRAMP1* 遺伝子の全塩基配列を分子遺伝学的に比較するとともに、同タンパクに対する抗体を作成し、免疫学的解析をおこなうことにより、豚 *NRAMP1* の抗酸菌感染症における役割を明らかにできるかもしれない。

E. 結論

今回の研究により、少なくとも 2 つのことが示唆された。まず、*M. avium* は感染する宿主により性質（動物種に対する親和性や臓器親和性）が変化する可能性がある。今回、由来の異なる *M. avium* 株をマクロファージに感染させたところ、実際に細胞内における菌数変化のパターンは株により異なっており、豚の細胞で最もよく増殖したのは、豚由来の株であった。また、豚ではマウスと異なり、系統によって *NRAMP1* 遺伝子に多様性が存在する可能性が考えられる。マウスにおいては同遺伝子の 1 塩基すなわち 1 アミノ酸の変化が抵抗性を感受性に変える。今回の豚 *NRAMP1* の

塩基配列は Tuggle らの報告と一部異なっていた。このことは、豚の *NRAMP1* 遺伝子には数種のパターンの塩基配列が存在することを意味しているのかもしれない。

豚に果たして抗酸菌に対する感受性／抵抗性の明確な形質の違いが存在するのかどうか、また、*NRAMP1* 遺伝子が関与しているのかどうかは今回の実験では明らかにできなかった。今後さらに検体を増やし、豚 *NRAMP1* の多様性をあきらかにするとともに、感受性／抵抗性形質発現をマクロファージを用いた *in vitro* 実験系で確立してゆくことが必要となるであろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

Xu, D. L., Goto, Y., Endo, F., Amoako, K. K. and Shinjo, T. The effect of *Bcg* gene on antigen presentation of spleen adherent cells and peritoneal macrophages from *M. bovis* BCG-infected *Bcg^s* and *Bcg^r* mice. *Veterinary Microbiology* 59:67-78 (1997)

Amoako, K. K., Goto, Y., Misawa, N., Xu, D. L. and Shinjo, T. The erythrocyte receptor for *Fusobacterium necrophorum* hemolysin: phosphatidylcholine as a possible candidate. *FEMS Microbiology Letters* 168:65-70 (1998)

Nakanaga, K., Maeda, S., Myojin, Y., Xu, D. L. and Goto, Y. Sequence analysis and Expression of *Nramp-1* Gene in *Bcg^r* and *Bcg^s*

Mice. The Journal of Veterinary Medical Science 61:(6) in press (1999)

2. 学会発表

Xu, De Long, Goto, Y, Amoako, K.K. Shinjo, T. The effect of Bcg gene on antigen presentation of spleen adherent cells and peritoneal macrophages from *M. bovis* BCG-infected Bcg^s and Bcg^r mice. The 4th Japan-Korea International Symposium on Microbiology. 1998. p62 (Tokushima, Japan)

Goto, Y, Xu, De Long, Nakanaga, K. Effect of corticosteroid on the expression of *Nramp-1* in *M. avium* infected Bcg^s and Bcg^r mice. Thirty-Third U. S.-JAPAN Tuberculosis and Leprosy Research Conference 1998. (Osaka, Japan) pg88-92

許徳龍、後藤義孝、江島美穂、高橋由紀子、新城敏晴 *Nramp-1*(Bcg) 遺伝子が人型結核により誘導される調節性サイトカインに及ぼす影響。126回日本獣医学会 1998年8月、江別。

中永和枝、江島美穂、後藤義孝 Bcg^sマウス由来細胞株における *Nramp1* 遺伝子発現の試み。126回日本獣医学会、1998年8月、江別。

許徳龍、後藤義孝、新城敏晴 NRAMP-1 遺伝子が *M. avium* 感染により産生されるサイトカインに及ぼす影響。日本細菌学会、1999年3月 東京、細菌学雑誌 54 (1)

岩切章、長友亜樹子、前淵恭子、許徳龍、後藤義孝、新城敏晴 豚抗酸菌(野外例)における免疫応答。第127回日本獣医学会、1999年4月、東京。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

結核菌の殺菌機構に関する研究

分担研究者 赤川清子 国立感染症研究所
細胞免疫部免疫工学室長

研究要旨

*M. avium*をヒト単球に感染させると、GM-CSFによるマクロファージへの分化は抑制され、細胞死が誘導されたが、M-CSFによるマクロファージへの分化は抑制されなかった。同様の現象は、IL-10の添加によっても誘導されること、また*M. avium*は単球からIL-10の産生を促すことが知られていることより、2種類のCSFによる単球のマクロファージへの分化にたいする*M. avium*感染の異なる影響はIL-10の産生を一部介することが示唆された。

A. 研究目的

ヒト単球、及び単球由来マクロファージは、結核菌の増殖や殺菌に重要な役割を果たすと共に、結核菌抗原をT細胞に提示し、結核免疫の成立に重要な役割を果たしている。本研究においては、ヒト単球、マクロファージの結核菌にたいする増殖及び殺菌機構を解明するとともに、結核菌等の感染が、マクロファージ機能に及ぼす影響を解析する。

B. 研究方法

リコンビナントヒトIL-10及びIFN- γ はゲンザイム社より購入した。リコンビナントM-CSFは森永乳業より、またGM-CSFは、Shaeing Plau社より供与された。ヒト単球の調整は、末梢血よりリンホブレップにて分離した単核球より、MACSによりCD14陽性の細胞を回収し、その後プレートにて附着させ純度の高い(>96%)CD14陽性単球画分を得た。

これら単球をGM-CSF (500 U/ml)またはM-CSF (10⁴ U/ml)存在下に7日間培養することによりマクロファージへの分化を誘導した。形成されたマクロファージの数は、セタブロン法により測定した。非定型抗酸菌としては、*M. avium* にNIHJ-1605株を用い、moi 5-10で培養開始時に感染させた。

C. 結果

ヒト単球をGM-CSF及びM-CSF存在下に培養すると細胞死はおきず、それぞれの特徴を有するマクロファージへの分化が認められた。しかし培地のみで培養するとほとんどの細胞は死んでしまう。単球に*M. avium*を感染し、培地のみで培養すると、感染しなかった場合に比べ生存する単球の数が増加し、またマクロファージへの分化が認められた。M-CSFによる単球のマクロファージへの分化は、感染により著名な影響を与えられなかったが、GM-CSF存在下に培養した群では、GM-

CSFが存在するにも関わらず、単球の細胞死が誘導され、培地のみで感染させた場合と同様の数のマクロファージしか分化誘導されなかった。

既にIL-10がM-CSFによる単球のマクロファージへの分化を増強することを報告したが、GM-CSFによるマクロファージへの分化にどのように影響するか単球をGM-CSFとIL-10共存下に培養すると*M. avium*感染の場合同様単球の細胞死及びマクロファージへの分化が抑制された。

D. 考察

ヒト単球は、CSF非存在下に培養した場合、アポトーシスを起こすことが知られているが、CSF存在下では生存及びマクロファージへの分化が誘導される。今回、単球に*M. avium*を感染させると単球のアポトーシスが一部抑制され、単球の生存とマクロファージへの分化が誘導されることが知られた。このような感染により単球のアポトーシスの抑制が起きることは既に他の研究者によって*M. avium*だけでなく、結核菌などでも報告されているが、その機構の詳細に関しては不明な点が多く今後明らかにしていく必要がある。また、CSFを共存した場合、M-CSFによるマクロファージへの分化は*M. avium*感染により著明な影響を受けなかったが、GM-CSFによるマクロファージへの分化は影響を受けることが知られた。この場合、回収されるマクロファージの数は、CSF非存在下の場合と変わらないことより、GM-CSFの作用が全く認められなくなる事が明らかになった。先に、我々は、既にIL-10がヒト単球のM-CSFによるM ϕ への分化を増強することを報告したが、今回IL-10は、GM-CSFによる分化を抑制し、単球の細胞死を誘導することを認めた。*M. avium*はヒト単球からのIL-10の産生を強く誘導することが知られていることより、M-CSFとGM-CSFに

よる単球のマクロファージへの分化に対する*M. avium*感染の異なる影響は、IL-10の産生を介することが示唆された。現在、これらの系におけるIL-10の関与について検討中である。今回の結果から、*M. avium*の感染は、抗原呈示機能の強いGM型マクロファージの単球からの分化を積極的に抑制して結核の感染防御免疫応答を抑制すると考えられる。しかし、一方で、Fcレセプター依存性の貪食能や、殺菌に必要な活性酸素産生能、IL-10産生能の強いM型のマクロファージの分化を促すことにより、エフェクター機能を増強している可能性が示唆された。現在、これらの系における菌の増殖や殺菌がどのようになっているか検討を加えている。

E. 研究発表

1. 論文発表

Hashimoto, S., Yamada, M. and Akagawa K.: IL-10 Modulates CSF-Induced Human Monocytes Differentiation into Macrophages. Proceedings of Thirty-third U.S. Japan Tuberculosis and Leprosy Research Conference, p. 167-171. 1998.

E. 学会発表

1) Hashimoto, S., Yamada, M. and Akagawa K.: IL-10 Modulates CSF-Induced Human Monocytes Differentiation into Macrophages. Thirty-third U.S. Japan Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 1998 July, Osaka.

2) 赤川清子、山崎利雄:ヒト単球よりのマクロファージ形成への*Mycobacterium avium*感染の影響、第135回日本結核病学会関東支部会、1999年5月、東京

結核免疫誘導に関する研究

分担研究者 持田恵子 国立感染症研究所

研究要旨 ヒト末梢血単球由来マクロファージ(GM-M ϕ , M-M ϕ)のツベルクリン蛋白 (PPD) 応答 T リンパ球機能抑制活性を検討した。GM-M ϕ は interleukin-10 (IL-10)産生能を欠き T リンパ球の増殖を抑制するものの interferon- γ (IFN- γ)産生は抑制しなかった。一方、M-M ϕ は IL-10 産生能を有し、T リンパ球のいずれの機能も抑制した。IFN- γ 産生が IL-10 により抑制されることを、recombinant IL-10 と中和抗体を用いた実験により示した。T リンパ球の増殖と IFN- γ 産生が M ϕ の異なる機序で制御される可能性が示唆された。

A. 研究目的

結核発症の主たる臓器である肺においては T リンパ球に対するマクロファージ (M ϕ)の比率が他の臓器に比べ高く、このような環境下ではリンパ球の機能は抑制されることが知られている。しかしながら、抑制活性を示す M ϕ の性状および機序は不明である。末梢血単球より二つの異なるコロニー刺激因子で分化誘導したマクロファージを肺胞 M ϕ および腹腔 M ϕ モデルとして T リンパ球の機能抑制機序を解明する。

B. 研究方法

ツベルクリン (PPD) 皮膚反応陽性者の末梢血単核球 (PBMC) より分離した単球を、granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)あるいは macrophage (M)-CSF 存在下に 1 週間培養し、GM-M ϕ および M-M ϕ を誘導した。これを同じドナー由来 PBMC に加え、PPD 刺激による DNA 合成と interferon- γ (IFN- γ)産生を測定した。

C. 研究結果

GM-M ϕ と M-M ϕ は PBMC による DNA 合成を同程度に抑制したが、M-M ϕ のみが IFN- γ 産生を抑制した。M-M ϕ は分化誘導の過程で、また、誘導後に PPD 刺激で interleukin-10(IL-10)を産生したが、GM-M ϕ は産生しなかった。M-M ϕ が産生するレベルの recombinant IL-10 は IFN- γ 産生を抑制したが、DNA 合成抑制にはより高濃度の IL-10 を要した。IL-10 に対する中和抗体は M-M ϕ による IFN- γ 産生抑制を回復させたが、DNA 合成抑制は回復させなかった。

D. 考察

健常者肺胞 M ϕ の性状は GM-M ϕ にほぼ等しいことが表面マーカーや液性因子産生様式などから推測されている。一方、M-M ϕ の性状は腹腔常在 M ϕ や慢性炎症反応後期に出現する M ϕ に近く、慢性喫煙者の肺胞 M ϕ もこれに類することが報告されている。T リンパ球による IFN- γ 産生は結核免疫誘導に重要な Th1 タイプ応答の指標とされ、IFN- γ 産生の有無が免疫応答を決定するとも言える。

結核菌感染時に GM-M ϕ タイプの M ϕ が肺を占めることの利点は、T リンパ球の増殖は抑制しても M ϕ の抗菌活性を高める IFN- γ 産生は抑制しないことであり、自然抵抗性の一環を担うものと考えられる。しかし、M-M ϕ が優勢となる環境下では、IFN- γ 産生の抑制から抗菌活性も低下し、宿主の感染抵抗性も低下すると予測される。肺胞 M ϕ の形質変化が感染免疫の決定に重要ではないかと思われる。

E. 結論

GM-M ϕ は、IL-10 産生能を持たず IFN- γ 産生を抑制しないが、M-M ϕ は IL-10 産生を介して DNA 合成と IFN- γ 産生を抑制する。

F. 研究発表

2. 学会発表

KN. Mochida, KS. Akagawa, EA. Rich. Interleukin-10 mediated suppression of interferon-g induced by monocyte cultured with macrophage colony-stimulating factor but not granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. The VIIth International Symposium on the Molecular Cell Biology of Macrophages '98. June 18, 19, Yamagata-city, Japan.

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

結核菌分泌タンパク質による遅延型皮膚反応惹起能の種差

主任研究者 山本 三郎 （国立感染症研究所）

研究要旨

結核菌分泌タンパク質 PPD および MPB64 抗原の遅延型皮膚反応惹起能がモルモットとマウスで異なることを明らかにした。

A. 研究目的

MPB64 (MPT64) はヒト型結核菌や *Mycobacterium bovis* BCG の一部（日本株、ロシア株、モロー株など）の菌種が分泌する分子量 26Kda のタンパク質である。このタンパク質による遅延型皮膚反応は、BCG 生菌免疫モルモットでは陽性、死菌免疫モルモットでは陰性である。しかし生菌免疫モルモットであっても、体内の菌が排除され、少なくなるにつれ、皮膚反応は急速に減弱することが知られている。一方、ヒト型結核菌生菌をモルモットに注射した場合、生体内での菌の増殖がそれほど大きくない時期においても、皮膚反応は陽性を呈することから、ヒトの活動性結核を早期に診断する方法として期待されてきた。しかし、MPB64 抗原に対する生菌免疫モルモットに比べ、結核患者での遅延型皮内反応は、活動性結核患者においてさえ、著しく弱い。このため皮内反応診断薬としては実現が困難と思われる。そこで、この原因を探るため、BCG 生菌免疫マウ

スにおける MPB64 抗原の細胞性免疫応答能を、遅延型皮膚反応、*in vitro* のリンパ球増殖反応及びインターフェロン γ 産生能で検討した。

B. 研究方法

MPB64 は、松尾・田坂らによって開発されたリコンビナント MPB64 (rMPB64) を用いた。このタンパクは MPB64 遺伝子を迅速発育抗酸菌である *Mycobacterium smegmatis* で発現させたもので、大腸菌に発現させたものと異なり、分泌型であり、したがって、大腸菌 rMPB64 のように、菌を破碎して菌体内部からこのタンパクを取り出す操作は不用である。動物 は、8-12 週令の雌 BALB/c および C57BL/6 マウス (SPF) を日本クレアから、体重 300-350g の雌ハートレーモルモット (クリーン) を SLC から購入して用いた。BCG は日本株を用いた。BCG の生菌免疫は、 7.2×10^7 CFU (1mg) をモルモットまたはマウスの皮下に注射しておこなった。モルモットの遅延型皮