

平成 11 年度
厚生科学研究費補助金
研究報告書
(総括研究報告書・分担研究報告書)
(新興・再興感染症研究事業)

結核症及び非結核性抗酸菌症における生体防御機構
の解明とその予防・診断・治療への応用
(H10-新興-3)

主任研究者
国立感染症研究所
山本 三郎

総括研究報告書

総括研究報告書

結核症及び非結核性抗酸菌症における生体防御機構の解明とその予防・診断・治療への応用

主任研究者 山本三郎

国立感染症研究所細菌血液製剤部細菌製剤第一室長

研究要旨

結核及び非結核性抗酸菌症の生体防御機構、予防・診断・治療について、肺結核に対し効果のある新ワクチン評価の動物実験モデルの確立、それによる複数候補ワクチンの評価、BCGと結核菌を判別し得る新規同定法の開発、自然抵抗性遺伝子である Nrampl-1 に関連した宿主側の防御機構についての解析、新しい免疫療法の確立と感染阻害因子の解明、結核と HIV の重感染マクロファージにおける転写因子とウイルス産生の検証等を行った。

分担研究者

小林和夫	大阪市立大学	教授
光山正雄	京都大学	教授
本多三男	国立感染研	グループ長
赤川清子	国立感染研	室長
芳賀伸治	国立感染研	室長
菅原勇	結核研究所	科長
後藤義孝	宮崎大学	助教授
山崎利雄	国立感染研	主任研
持田恵子	国立感染研	主任研
中田光	東大医科研	助手

変形成は、菌側および宿主側の両因子が複雑に関与する宿主・寄生体関係を介して成立する。本研究では、結核・非結核性抗酸菌症について、宿主の感染抵抗性、感受性の発現機構を宿主遺伝子、細胞や生理活性物質動態などの宿主側因子とともに菌側因子を解析することにより明らかにするとともに、結核の予防・診断・治療戦略として、BCG に替わり得るワクチンの開発、結核と BCG 感染を区別し得る新たな手法の開発、サイトカインなどの免疫強化療法による結核の制圧を試みる。宿主側因子として Nrampl-1 遺伝子の解析を行う。この遺伝子はヒト、マウスに存在すること、細胞内寄生性病原体に対する宿主側の自然抵抗性と深く関わっているとされる。次に、結核菌・非結核性抗酸菌が生体内で増殖あるいは殺菌の場となる単球・マクロファージにおける制御機構を解明することにより、殺菌作用増強をはかる。結核免疫誘導における抗原（菌及び菌体成分）と抗原提示細胞の性状と誘導される反応を明確に

A. 研究目的

結核撲滅の世界戦略として、世界保健機構は EPI の最も基本的なワクチンとして BCG を取り上げ、また短期療法として DOTS の推進を図っているが、今日においても世界的に多数の新規患者が発生していることなどから、結核制圧は、多くの困難に直面している。一方、結核菌・非結核性抗酸菌感染に対する生体防御や病

することにより免疫活性強化を目指す。また HIV と結核菌の重複感染系におけるマクファージ内の HIV 産生の制御をみるため、ウイルス産生制御転写因子の動態を解明する。さらに各遺伝子を組み込んだリコンビナント BCG を作成し、抗結核効果の増幅を調べる。BCG の分泌タンパク質の細胞性免疫誘導能につき、プラスミド及びリコンビナントタンパク質を用いた免疫応答を解析する。また、遺伝子レベルでの結核菌と BCG の鑑別は今日のわが国の状況から必要であり、さらにその迅速化が望まれることからその開発をはかる。従来、結核感染モデル動物には静脈投与方法が用いられてきた。しかしもっとも多い肺結核は気道感染疾患であり、新しい治療法、新しいワクチンを開発するには再現性のある気道感染系の確立が急がれる。現在利用可能な動物噴霧感染システムを用いた基礎的データの集積をはかるとともに、結核易感染性で、ヒトに近いモデル動物であるモルモットを用いた効果を BCG ワクチンについて検討する。また免疫増強性オリゴ DNA を導入したプラスミドあるいはそのアジュバント効果について細胞性免疫能を指標に検討する。

B. 研究方法

肺結核モデル：モルモット当り 10^8 CFU の BCG を皮内接種し、8 週後に噴霧装置内でモルモットに平均 10^6 CFU の人型結核菌 H37Rv 株を気道感染させた。

リコンビナント BCG 結核ワクチンの作成：標的遺伝子として結核菌の有する分泌型の α 抗原蛋白及び類似の蛋白に着目し、その遺伝子を BCG 東京株に発現させる。さらに培養液中に遊離する蛋白を Western Blot 法で確認し、リコンビナント BCG を作成した。結核防御免疫誘導を目的とした抗酸菌由来分泌型遺伝子の

選択：これまで α 抗原蛋白遺伝子を標的としたリコンビナント BCG ワクチンを作製した。今回さらに MPB74 蛋白遺伝子及び ESAT6 蛋白遺伝子を増幅し、シャトルベクターに挿入した後、BCG 東京株にトランスフェクションした。さらに培養液中に遊離する蛋白を特異抗体によって Western Blot 法で検出した。

HIV-V3 領域と α 抗原の融合たんぱく質をコードしたプラスミドを導入した rBCG を使用し、その凍結乾燥品をモルモットに接種後、in vivo における安定性と細胞性免疫の指標として DTH 反応の誘導能を測定した。

結核菌群に特異的遺伝子の検索、プライマーの設計、遺伝子増幅、増幅産物の証明、プライマーの特異性を検討し、結核菌群の臨床分離株の鑑別同定可能かを調べた。また、BCG の senX3-regX3 の intergenic region (IR) のシーケンスを行い、77bp の mycobacterial interspersed repetitive unit (MIRU) の数を調べた。

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応答を解析し、抗菌化学療法、サイトカイン免疫強化療法および間欠併用療法の有効性について探索した。

IL-4 欠損マウスを H37Rv 結核菌株で経気道的に感染させた。感染暴露装置は Glas-Col 社を用いた。感染後 7 週して、マウスを解剖し、肺、脾、肝、腎組織標本を作製し、病変の程度を評価した。肺病変におけるサイトカイン mRNA の変化を追跡するために肺組織を凍結保存した。脾細胞をために肺組織を凍結保存した。脾細胞を ELISA で測定した。また H37Rv 刺激肺胞マクロファージからの NO 産生能を調べた。

日本クレア株式会社から購入した近交系マウス C57BL/6N(B6) と自家繁殖させた同系統の B6 コンジェニックマウス(B6)を実験に

用いた。*M. avium* Mino 株と *M. tuberculosis* 強毒株 (H37Rv) を用いた。感染実験には非定型抗酸菌症患者から分離された *M. avium* No. 36、38 株も使用した。各菌は、1% 小川培地 (日本製薬、東京) で純培養し、さらに Middlebrook 7H9 Broth (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) に 10% に OADC enrichment を添加した培地で増殖し実験に用いた。マクロファージならびに感染臓器におけるサイトカイン誘導: マクロファージを 24 ウェルマイクロプレート (Nunc, USA) 底に付着させた後、*M. avium* または *M. tuberculosis* の生菌刺激をおこなった。細胞と菌との混合比は 1:1 とした。継時的に細胞培養上清を回収し、中に含まれるサイトカイン量を調べた。マクロファージによる菌の貪食ならびに殺菌能に及ぼす recombinant IFN- γ の影響: マクロファージ 5×10^5 /ml を付着させ、 1×10^7 CFU/ml に調整した菌液を 500 μ l 接種した。貪食時間を 3~4 時間とし、その後貪食されなかった菌を洗浄によって取り除いた。rmIFN- γ は 500 U/well となるように加え、そのまま所定時間培養を続けた。細胞内の生菌数を測定するため、0.05% Triton-X で細胞を溶解したあと滅菌蒸留水で 10 倍段階希釈し、各希釈液を 0.05ml ずつ 10% OADC 添加 Middlebrook 7H10 寒天平板培地に接種した。37°C で一週間培養後、形成された集落から菌数を算定した。リコンビナントヒト (rh) GM-CSF は、Shaeing Plau 社より、rhM-CSF は、森永乳業よりそれぞれ供与された。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、CD14 ビーズ抗体と MACS により CD14 陽性の単球画分を分離精製した。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。M-CSF 及び GM-CSF で誘導したマクロファージは、そ

れぞれ M-M ϕ 及び GM-M ϕ と以後称する。BCG は日本株を、*M. avium* は、NIHJ-1605 株及び患者由来の 3 株 (No. 3, No. 6, No. 14) を用いた。これらの菌をマクロファージに moi1-10 で感染させ、5 日間培養後、マクロファージ内外の生菌数を測定した。一部の実験においては、感染 2 時間で細胞外の菌を洗浄除去後、さらに 5 日間培養し生菌数を OADC 添加 Middlebrook 7H10 寒天平板培地に接種、CFU 数を数えた。ヒト単球由来マクロファージにおける Nramp 1 遺伝子の発現は、ノーザンブロット (Nramp 1 cDNA は山口大学岸博士より供与) で検討した。

ラット肺胞 M ϕ 細胞株 (NR8383) を ATCC より購入した。この細胞は正常ラット肺胞 M ϕ を肺組織由来増殖因子で長期間培養することにより増殖因子非依存性増殖能を獲得した細胞であり、血清濃度にも依存して試験管内で増殖する。この細胞に BCG あるいは H37Rv を感染させ (MOI=1~5) 経時的に細胞を回収し、抗酸染色および還元培養により菌の感染と増殖を、アガロースゲル電気泳動およびウエスタンブロッティングにより宿主細胞のアポトーシス (DNA 断片化) と細胞内分子の発現を調べた。

THP-1, 肺胞マクロファージ、単球由来マクロファージ: ATCC より供与された THP-1 単球は RPMI1640 培地/10% FCS 中に sususpend し、継代した。THP-1 マクロファージはこれに 20ng/ml の PMA を添加し、1 昼夜培養することにより、付着性のマクロファージへと分化させた。ヒト肺胞マクロファージは気管支肺胞洗浄法により得た洗浄液からプラスチックシャーレ付着法により精製した。健常者ヒト単球はヘパリン血 50 ml より Ficoll Hypaque 比重遠心法により単核球を分離し、プラスチックプレート付着法により分離後、 1×10^5 /ml の密度で 24 穴プレート

または96穴プレートに撒いた。

IFN- γ 産生：マウス脾臓を無菌的に採取し、 6.25×10^6 /ml の濃度になるように完全培地に懸濁した。48穴組織培養用プレートにこの懸濁液0.4 mlを入れ、100 μ lのMY-1で24時間刺激し、培養上清を回収した。上清中のサイトカインはEIA法で測定した。また、マウス脾細胞を磁気ビーズで標識した抗NK細胞抗体(DX5)で処理し、Magnetic cell sorter (MACS, Miltenyi, Germany)を通過させてNK細胞を除去した。あるいは、Sephadex G-10カラムを通過させて、付着性細胞を除去した細胞をMY-1で刺激し、そのIFN- γ 産生を調べた。各種抗サイトカイン抗体を用いたIFN- γ 産生の抑制実験：C3H/HeN脾細胞をMY-1で刺激する系に抗IL-1 α 抗体(5 μ g/ml)、抗IL-12抗体(5 μ g/ml)、抗TNF- α 抗体(1 μ g/ml)(以上、Endogen, U.S.A.)あるいは抗IL-18抗体(2 μ g/ml)(MBL, 名古屋)を加え、それらサイトカインのIFN- γ 産生における関与を調べた

倫理面での配慮

感染研P3施設は「国立感染症研究所病原体等安全管理規程」にもとづき運営されており、動物実験は合わせて「国立感染症研究所実験動物管理運営規程」に基づき倫理面の審査を経てから実験を行った。末梢血、肺胞マクロファージは書面で患者に研究目的を伝え、インフォームドコンセントを取り採取した。

C. 研究結果

ツベルクリン反応：BCG Copenhagen 1331株、BCG Tokyo 172株(凍結乾燥標品および冷凍標品)で免疫したモルモットは、ツベルクリンPPDによりほぼ同程度に陽性の遅延型アレルギー反応(DTH)を示した。対照群はDTH陰性であった。

M. tuberculosis H37Rv感染後の体重変化：各BCG免疫群ならびに対照群のモルモットのM. tuberculosis感染後の体重の変化は、いずれの群でも体重増加がみられ、ワクチン群間にも、またワクチン群と対照群の間にも有意な差は認められなかった。

M. tuberculosis H37Rv臓器内生菌数測定：右肺下葉ならびに脾臓から回収された菌数と統計学的評価の結果、肺内生菌数はいずれのワクチン群でも非免疫対照群に比べ有意な減少が見られた。また脾臓の生菌数についてはワクチンの効果は著明で、対照群に比べて概ね 10^4 の減少が見られた。統計学的な評価の結果、肺、脾臓いずれも免疫群と対照群の間には有意な違いが認められたが、用いたワクチン間に有意な効果の違いは認められなかった。

病理学的検索結果：固定後の肺、肝、脾の肉眼所見および病理組織学的検索の結果、肉眼的に肺の白色結節病変が観察された。一方、対照群の全例において脾に明瞭な結節病変が観察されたのに対し、BCG免疫群では、脾に肉眼的異常がみられるものは極めて希であった。病理組織学的結果は、それぞれの病変をスコア化して評価した。すなわち、組織球系細胞(肺胞マクロファージ、脾洞の組織球系細胞、肝のクッパー星細胞等)の増数はあるが肉芽腫形成のみられないもの(-)、小型の肉芽腫を少数認めるもの(+)、大小の肉芽腫を多数認めるもの(++)、および大小の肉芽腫を多数みとめ肉芽腫中心部に凝固壊死(乾酪壊死)を伴うもの(+++)に分類して記載した。対照群とBCG免疫群の相違は脾で極めて顕著であった。対照群のモルモット全例で、脾に中心性の凝固壊死部を有する大型肉芽腫結節が多数形成されていたのに対し、BCG免疫群では、脾に肉芽腫結節が形成されている例は極めて希であった。肺については、全群・全症例で種々の程度で肉芽腫結節の形成が確認されたが、対照群において、

特に大型で凝固壊死を伴った肉芽腫結節が形成される傾向が明らかであった。なお、BCG Tokyo 172 株の凍結乾燥標品および冷凍標品、BCG Copenhagen 1331 株で免疫されたモルモットでは、各群の肺、肝、脾の病変はほぼ同程度であり、病理組織学的相違を明確にすることは困難であった。

分泌型抗原遺伝子発現リコンビナント結核ワクチンの作製

α 抗原及び MPB74 分泌蛋白遺伝子の発現はリコンビナント BCG 培養濾液を用い、その中に分泌された蛋白抗原を各々の特異抗体で結合性を見ることにより、Western Blot 法で確認することができた。

ESAT6 遺伝子をベクターに組み込み分泌蛋白として BCG 菌から遊離できるかどうかを現在確認中である。この ESAT6 の BCG はさらに α 抗原遺伝子が発現できるようになっており、両方の蛋白遺伝子の発現を検討中である。

α 抗原及び MPB74 遺伝子発現リコンビナント BCG をモルモットに接種し経時的に蛋白特異的な DTH の発現を見ると抗原特異的に強い遅延型皮膚反応が誘導された。

HIV-V3 領域に特異的な DTH 反応は 3 週から 6 週にかけて観察されたが、いずれも直径 10mm 以下と弱く 8 週目以降は観察されなかった。一方、コントロール抗原では 3 週目以降、直径 15mm 以上の強い DTH 反応が持続して見られた。Km 含有培地の非含有培地に対するコロニー数の比は 1, 2 週目に約 1/2、3 週目に約 1/4 で、4 週目には Km 含有培地では非含有培地に比べるとわずかなコロニーしか検出されなかった。4 週目における Km 非含有培地のコロニーを PCR 法により解析した結果、プラスミドを保持したコロニーは約 16% しか検出されなかった。しかし、培地上で継代した rBCG は 95% 以上のプラスミド保持率を維持していた。

結核菌を噴霧感染したモルモットの体重は感染後 1 週目まで増加したが、その後、増加は認められず 4 週目でも 400g 程度であった。H37Rv の肺あたり還元培養菌数の平均は感染 1 日目で 1×10^4 CFU、1 週目 (4.0×10^5 CFU)、2 週目 (3.4×10^7 CFU)、3 週目 (2.7×10^7 CFU)、4 週目 (1.0×10^7 CFU) と増加した。一方、脾臓での菌数の平均は 1 週目 (3 匹のうち 1 匹からコロニー 1 個/10mg 検出)、2 週目 (5.8×10^5 CFU)、3 週目 (5.0×10^5 CFU)、4 週目 (7.9×10^5 CFU) であった。感染後の肺重量の平均は 2.7 g (1 日目)、2.3 g (1 週目)、5.5 g (2 週目)、9.9 g (3 週目)、8.5 g (4 週目) と 3 週目をピークに増加した。脾臓重量の平均も 0.35 g (1 日目)、0.56 g (1 週目)、1.1 g (2 週目)、1.4 g (3 週目)、2.0 g (4 週目) と増加した。肺の病理組織像は 2 週目以降に多数の結節が観察され検鏡するとマクロファージ系細胞の浸潤が認められた。一方、PPD、MPB64、MPB70、MPT59 (各 $0.05 \mu\text{g}$) に対する DTH の平均値は、1 週目では発現せず、2 週目には PPD で 3 mm 程度、MPB64 は 14 mm 程度、3 週目には PPD 5mm 程度、MPB64 は 18 mm 程度、4 週目には PPD は 14 mm 程度、MPB64 は 23 mm 程度であり、MPB70 と MPT59 は 4 週目に若干認められた。

BCG-Tokyo 株を用いて同様の噴霧免疫実験 (単個菌 3×10^8 CFU/2.5ml 噴霧) を行ったところ、肺の還元培養菌数の平均は感染後から以下に示すように単調減少し、H37Rv の場合と顕著な差が認められた。すなわち、感染 1 日目 (2.7×10^4 CFU/肺)、2 週目 (9.2×10^3 CFU/肺)、4 週目 (1.8×10^3 CFU/肺)、6 週目 (2×10^2 CFU/肺)、8 週目 (検出限界以下) であった。体重は 8 週目まで増加し、4 週目で約 600g、8 週目で 700g に達した。肺重量と脾臓重量は顕著な増加は認められず、肺の組織像も感染による顕著な変化は見られなかった。各抗原 ($0.2 \mu\text{g}$) による DTH の誘導は 2 週目にはほとんど見

られなかったが、PPD 反応の平均値は 4 週目以降 8 週目まで 14mm 程度の発赤が持続して認められ、MPB64,MPB70 による発赤は 4 週目の 15mm 程度をピークに 8 週目まで減弱しながら観察された。

Strain 2 又は Strain 13 感作モルモットの皮内反応の直径と SD は、抗原量 0.05 μ g でテストすると、BCG 免疫動物では、PPD、MPB64、MPB70 の順に Strain 2 では 8.0 \pm 1.6、0、14.5 \pm 2.5mm (n=4) であり、Strain 13 では 10.9 \pm 1.5、12.5 \pm 2.4、12.6 \pm 1.5mm (n=4) であった。再度実験を繰り返しても同様の成績であった。結核菌感染動物では、PPD、MPB64、MPB70 の順に Strain 2 では 5.8 \pm 3.6、0、0 (n=5) であり、Strain 13 では 8.9 \pm 1.6、15.7 \pm 1.7、12.5 \pm 2.2mm (n=5) であった。これらの動物を抗原量 0.2 μ g でテストすると、Strain 2 では 12.7 \pm 2.3、5.0 \pm 6.9、14.5 \pm 2.0 (n=5) であり、Strain 13 では 11.4 \pm 0.9、16.0 \pm 1.9、14.9 \pm 0.9mm (n=5) であった。

プライマー MT-1,MT-2 は、結核菌 *pab* 遺伝子をコードしているが、結核菌群全て 419bp の DNA が増幅されたので、サンプル中の DNA の存在確認用に用いた。結核菌の *mtp* 40 遺伝子をコードするプライマー PT-1, PT-2 を用いた PCR では、*M. tuberculosis* は、319bp の DNA が増幅された。MPB64 遺伝子をコードするプライマー T-2, T-6 を用いた PCR では、*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* の 4 菌種全て 241bp の DNA が増幅された。しかし、BCG のうち Copenhagen, Glaxo, Pasteur, Tice の 4 株の DNA は増幅されなかった。これらの株は、サザンブロット法により MPB64 遺伝子が欠損していることを確認した。

pncA 遺伝子をコードするプライマー *pncA*-7, *pncA*-8 を用いた PCR 増幅産物のダイレクトシーケンスを行い、*pncA* 遺伝子内の 169 番

目が、*M. tuberculosis* は Cytosine、*M. bovis* は Guanine になっていることを利用し、プライマー *pncA*-10 と *pncA*-11 を設計した。*pncA*-7, *pncA*-10 は、*M. tuberculosis* 検出用に用いた。*pncA*-7, *pncA*-11 は、*M. bovis* 検出用としたが、*M. tuberculosis* にも弱いバンドが検出されたので *pncA*-11 の 3' 末端から 2 番目の T を C に置換したプライマー *pncA*-11C を合成し、*pncA*-7 と組み合わせたところ、*M. tuberculosis* の増幅はなくなったので、*pncA*-7, *pncA*-11C を *M. bovis* 検出用として用いた。前述プライマーを用いて *M. tuberculosis* (38 株), *M. africanum* (5 株), *M. bovis* (31 株) について PCR 後のバンド検出の有無によるパターンにより、結核菌群の鑑別同定が可能であった。しかし、*M. bovis* から BCG を鑑別することはできなかった。結核菌群の *senX3-regX3* の IR 中の MIRUs の数は、株によって異なり 8 群に大別されたという報告がある。そこで、BCG の各株について調べたところ、BCG の *senX3-regX3* の IR 中の MIRUs の数は、Glaxo, Russia, Tice, Tokyo, Sweden 株は 3 個、Pasteur, Moreau, Copenhagen 株は 2 個存在していた。また、53-bp の MIRU は、いずれの BCG 株にも存在しないことがわかった。

Mycobacterium avium や *M. leprae* 感染感受性マウスは細胞性免疫発現の指標である Th1 細胞/IFN- γ 誘導性サイトカイン：IL-12 や IL-18 発現不全を呈していた。その結果、細胞性免疫応答不全を招来し、宿主の抗酸菌感染防御が誘導されないことが判明した。

IL-12 補充免疫療法は感染菌数を用量依存的に減少させ、抗菌防御を達成することができた。IL-12 投与は感染成立後も有効であり、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。

しかし、IL-12 補充免疫療法は局所反応として、肉芽腫炎症を増強し、また、全身性反応として、血液（汎血球減少症）、肝や筋毒性を惹起した。すなわち、IL-12 補充免疫療法は抗菌防御（正の側面）に貢献したが、毒性（負の側面）も惹起した。IL-12 補充免疫療法の毒性を克服するため、抗菌化学療法+免疫療法（併用療法）の可能性について試みた。併用療法は最小限の病変形成で効率的な抗菌防御を誘導した。しかも、この効果は感染無胸腺ヌ・ドマウス、すなわち、免疫不全マウスにも有効であった。

IL-4 欠損マウスの肺に大きな肉芽腫が認められた。野生マウスの病変より有意に大きかった。壊死性病変は認められなかった。その肺組織内の結核菌数も増加していた。ELISA では、脾内 IL-10 レベルは低下していたが、IFN- γ 、IL-12 は高かった。IL-18 は野生マウスと比較して、正常範囲内だった。NO 産生能も両群で、有意差がなかった。6.5ヶ月後の IL-4 欠損マウスの肺病変は野生マウスのそれより拡大し、悪化していた。組み換えマウス IL-4 投与により肺肉芽腫病変は縮小したが、完全に治癒しなかった。

M.avium または *M.tuberculosis* で刺激したマクロファージから産生される IL-10 と IL-12 : まず骨髄由来マクロファージに *M.avium* または *M.tuberculosis* を刺激した際に放出される IL-10 と IL-12 についてしらべた。*M.avium* で刺激した場合に産生されてくる IL-10 の量は Bcg^s と Bcg^r マクロファージとではかなり異なっていた。一方 IL-12 は両マクロファージとも比較的良好に産生されたが、 Bcg^r のほうが Bcg^s に比べて有意に高いレベルを示した。つぎに virulent type の *M.tuberculosis* で刺激した場合をみると IL-10、IL-12 ともによく産生が認められ、 Bcg^s と Bcg^r マクロファージとの間の産生量にはほとんど違いが認められなかった。骨髄由来マクロファージの代わり

に腹腔滲出マクロファージを用いた場合にも同様の結果が得られた。

マクロファージ殺菌能に及ぼす IFN- γ の影響 (*M.avium* の場合) 骨髄由来マクロファージ貪食能に及ぼす IFN- γ の影響について調べるため、感染前4時間または感染と同時にマクロファージを 500U/well の IFN- γ で処理し、感染後4時間目の細胞内生菌数をかぞえた。*Mino* 株を感染させた場合、IFN- γ 処理された両マクロファージともにほぼ同数の生菌 (Bcg^s 6.26 ± 0.06 、 Bcg^r 6.27 ± 0.03) を取り込んでおり、無処理対照群 (Bcg^s 6.35 ± 0.06 Bcg^r 6.33 ± 0.09) に比べて貪食された菌数はややすくないもののこちらもまた有意差は認められなかった。感染後5日目まで IFN- γ 存在下で培養をおこない細胞内菌数を測定した。IFN- γ 処理しない対照群は Bcg^s 6.51 ± 0.12 、 Bcg^r 6.21 ± 0.06 であり、両者間に有意差が認められた。また IFN- γ 処理群は Bcg^s 6.22 ± 0.07 、 Bcg^r 5.78 ± 0.04 で、IFN- γ は有意 ($p < 0.01$) にマクロファージ内の菌数を減少させた。つぎに AIDS 患者由来の *M.avium* 2 株について同様の試験を行った。菌を感染させただけの対照群において No.36 株では感染後5日目の菌数は Bcg^s 5.98 ± 0.02 、 Bcg^r 5.90 ± 0.02 であった。また No.38 株を感染させた場合、 Bcg^s 5.88 ± 0.11 、 Bcg^r 5.98 ± 0.01 であった。いずれの菌株を感染させた場合も、1日目に比べて5日目の菌数が有意 ($p < 0.01$) に減少した。また、IFN- γ 処置群の菌数も対照群とほぼ同程度で、IFN- γ は両マクロファージの殺菌能力に影響を与えなかった。

マクロファージ殺菌能に及ぼす IFN- γ の影響 (*M.tuberculosis* の場合)

感染後、1日目および5日目のマクロファージ内の菌数を測定したところ、1日目の菌数は、 Bcg^s 5.75 ± 0.13 、 Bcg^r 5.76 ± 0.06 であり、両者に違いはみられなかった。5日目には Bcg^s 6.25

± 0.11 、 $Bcg^s 6.28 \pm 0.12$ であり、1 日目に比べ有意に増加した。しかし Bcg^s の菌数と Bcg^r のそれとの間に有意差は認められなかった。*M. avium* の実験と同様に感染マクロファージを 500U の IFN- γ 処理したグループの菌数は $Bcg^s 5.95 \pm 0.14$ 、 $Bcg^r 5.86 \pm 0.09$ と無処置対照グループに比べ有意 ($p < 0.01$) に減少した。その抑制率は Bcg^s 、 Bcg^r ともに同程度であり *Nramp-1* 遺伝子型の違いによる影響は認められなかった。

脾細胞からの IFN- γ 産生

正常マウスから脾臓を取り出し $5 \times 10^6/ml$ の細胞浮遊液とした。これらに *M. avium* を最終濃度が $5 \times 10^6 cfu/ml$ となるように加え、経時的に上清中に産生されてくる IFN- γ の量を測定した。

24 時間から 48 時間目にかけて Bcg^r 脾細胞は多くの IFN- γ を産生し Bcg^s のそれを上回った。時間後においても Bcg^r では Bcg^s よりも多くの IFN- γ 産生が認められた。

IL-4 ならびに IL-6 産生

M. avium Mino 株を感染させたマウスの脾臓乳剤上清中に含まれる IL-4 ならびに IL-6 について調べてみた。感染 10 日目における IL-4 産生量は両マウスともほぼ同レベル (300~350 pg/ml) であったが、感染後 3 週目の Bcg^r では増加傾向 (550~600 pg/ml) がみられた。IL-6 についてみると Bcg^s では感染期間を通じてほぼ一定量 (300~400 pg/ml) 産生されており、一方 Bcg^r では感染初期から Bcg^s のそれを上回り (10 日目で 600 pg/ml)、4 週目には約 1000 pg/ml へと増加した。

DNA ラダー (DNA fragmentation) の検出

菌感染後 24 時間において、マクロファージから DNA を抽出、電気泳動を行った結果 Bcg^r マクロファージで *M. bovis* BCG を感染させた場合に明らかな DNA fragmentation が確認された。

Terminal deoxynucleotide transferase (TdT) dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL) 法によるアポトーシスの検出

菌感染後、TUNEL 法により細胞を蛍光染色し、アポトーシスをおこしている細胞の割合を求めた。*M. bovis* BCG 感染の 15 時間後、アポトーシスをおこしている細胞の割合は Bcg^s マクロファージでは 3.95%、 Bcg^r マクロファージでは 7.16% であり、 Bcg^s マクロファージに比べ約 1.8 倍多かった。感染後 18 時間においては、 Bcg^s マクロファージでは 11.20%、 Bcg^r マクロファージでは 79.87% であり、 Bcg^s マクロファージに比べ約 7.3 倍多かった。*M. avium* Mino 株を感染させた場合は、感染 15 時間、18 時間とも *M. bovis* BCG を感染させた場合に比べアポトーシスをおこしている細胞はほとんどみられなかった。

骨髄由来マクロファージによる TNF- α 産生量の測定

M. bovis BCG 感染後 24 時間のマクロファージ培養上清を、L 929 Cell cytotoxic assay により TNF assay を行った。 Bcg^s マクロファージでの産生量は、 10^5 cells あたり 3.260 ± 0.043 U (\log_{10}) であり、 Bcg^r マクロファージの 2.939 ± 0.058 U に比べ、有意に多くの TNF- α が産生されていた ($p < 0.05$)。非感染のコントロールでは、TNF- α は産生されなかった。

骨髄由来マクロファージによる NO₂-産生

M. bovis BCG 感染後 24 時間目の NO₂-産生量を測定した。非感染のコントロールでは、 Bcg^s マクロファージが $1.747 \mu M$ 、 Bcg^r マクロファージが $1.925 \mu M$ と、わずかな量しか産生されていなかった。一方、*M. bovis* BCG を感染させたグループでは、 Bcg^s マクロファージが $3.954 \mu M$ でコントロールの 2.26 倍、 Bcg^r マクロファージが $3.670 \mu M$ でコントロールの 1.91 倍と明らかに多くの NO₂-が産生され、またその量は Bcg^s マクロファージの方が多かつ

た($p < 0.01$)。

ヒト単球由来 GM-M ϕ 及び M-M ϕ に BCG を感染させ、5 日後の細胞外及び細胞内菌数を CFU にて測定した結果、M-M ϕ 、GM-M ϕ とも、細胞外及び細胞内から回収される菌数は、感染時菌数に比べ著名に減少していた。しかし GM-M ϕ の減少の程度は、M-M ϕ に比べ小さかった。一方、感染 2 時間で細胞外にいる BCG 菌を洗浄除去した場合の 5 日後の菌数を調べたところ、M-M ϕ では、この場合も著名に減少していたが、GM-M ϕ では減少が認められなかった。M-M ϕ における菌の増殖抑制及び GM-M ϕ における菌の生存の傾向は、*M. avium* 感染においても認められ、特に患者分離株 (No. 6 と No. 14) では、GM-M ϕ の細胞内外で増殖が強く認められ感染時菌数を大幅に上回る菌数が回収された。しかし、患者分離株 No. 3 は、両マクロファージで菌の増殖パターンはほとんど変わらず、しかも BCG 同様細胞外での増殖はほとんど認められなかった。これらの結果は、M-M ϕ は、GM-M ϕ に比べ BCG や *M. avium* に対する増殖抑制活性が強いこと、GM-M ϕ は、むしろこれらの菌の生存あるいは増殖の場として作用することが知られた。感染させる菌量と感染率の検討をした。最初に加える菌の細胞に対する比率を 2~4 とした時、2~4 時間の感染で約 30% の細胞が菌を取り込むことがわかった。同程度の感染率を達成するためには H37Rv に比べ BCG はより多い菌数を必要とした。感染率が 60% を超える条件下で感染を持続させると、感染後 8 時間以降に DNA の断片化を特徴とする細胞死が誘導され、細胞内分子の変化を調べることはできなかった。以後の実験では、感染 2 時間で約 30% 感染する条件を設定した。SDS で可溶化した感染細胞溶解液を還元培養し、宿主細胞内での菌の増殖・生存を調べた。BCG は感染後 8 時間をピークにその後菌の生存数は減少した。一

方、H37Rv は最初に取り込んだ菌数を感染後 5 日目まで維持した。このことより、今回用いた NR8383 細胞はヒトが本来示す結核菌感受性と同じであることが示された。

早期エンドソームマーカーのひとつである低分子量 GTP 結合蛋白質 Rab5 の発現が結核菌感染で変化するか否かを検討した。BCG 感染に比べ、H37Rv 感染では Rab5 の減少が早期に起こった。M ϕ の抗菌活性を増強する IFN- γ を NR8383 細胞に作用させ、Rab5 の変化を調べた。IFN- γ は濃度依存性に Rab5 の発現を抑制した。後期エンドソームマーカーである Lamp-1 も同様に IFN- γ により抑制された。IFN- γ の M ϕ 細胞内での菌の増殖に対する効果については今後検討する予定である。

すでに、我々はマクロファージにおける HIV の産生抑制がそのプロモーターである LTR の negative regulatory element (NRE) と細胞側の転写因子 C/EBP β short form との結合により起こることを示唆してきたが、結核菌感染とマクロファージの分化の双方が C/EBP β short form の発現に影響することを見出した。THP-1 単球が結核菌感染も PMA 刺激も受けない場合は 37 kD と 16 kD の C/EBP β の発現がほとんどみられない。THP-1 単球は、結核菌感染後に 37 kD の C/EBP β を強く発現するが、C/EBP β 16 kD short form の発現は非常に弱い。これに対し、THP-1 マクロファージは結核菌感染 48 時間後に 37 kD と 16 kD の C/EBP β の両方を発現する。しかしながら、THP-1 マクロファージは結核菌感染がなければ、C/EBP β short form を発現しない。それゆえ、抑制性の転写因子 C/EBP β short form の発現は結核菌感染により惹起されていると考えられる。

一方、末梢血由来単球と単球由来マクロファージを用いて同様の検討を行った。THP-1 単球と同様に末梢血単球はほとんど C/EBP β 1

6 k D short form を発現していないが、単球由来マクロファージは弱く発現しており、結核菌を感染させるとさらに発現が増強した。我々は、すでにインターフェロン β によっても C/EBP β short form が誘導されること、結核菌感染によりインターフェロン β が放出されることを報告したが、THP-1 単球はインターフェロン β の刺激によって C/EBP β short form が誘導されず、THP-1 マクロファージにおいて刺激後強く誘導されてくる。結核菌感染の場合と異なるのは、結核菌の場合は、イムノブロット上、誘導されるのに48時間かかるが、インターフェロンでは3時間後に現れ、48時間後にピークとなることである。以上の結果から、単球からマクロファージへの分化がインターフェロン β への反応性を変化させるのではないかと考え、細胞内のシグナル伝達を調べた。インターフェロン β の受容体からの刺激により STAT1 と STAT2 の活性化による転写因子の複合体が形成される。すなわち、STAT1 または STAT2 と IRF-9 の heterodimer 複合体である ISGF-3 が形成され、核内に移動し、ISRE 部位に結合することが知られているが、結核菌感染は、この反応を促進する。結核菌感染4時間後に、ISGF-3 は THP-1 マクロファージの核内に現れるが、THP-1 単球の核内には見られなかった。この現象は14-24時間まで増強し続けた。また、THP-1 マクロファージでは、インターフェロンによる刺激後にも ISGF-3 の核内移動を認めたが、THP-1 単球では見られなかった。一般的に単球は、感染刺激によりインターフェロンを産生することが、知られているが、マクロファージとの違いは結核菌感染後に ISGF-3 を形成できないことかもしれない。このことを確認するために、THP-1 マクロファージをインターフェロンで刺激するか、または結核菌感染させると ISGF-3 を活性化した。

THP-1 が単球とマクロファージのモデルとして適当かどうかを調べるために、単球と肺胞マクロファージからの核抽出物に対し、EMSA を行った。結核菌感染後に単球は ISGF-3 が誘導されず、肺胞マクロファージでは感染前に比べて4倍の ISGF-3 が誘導された。肺胞マクロファージは resting の状態でも低レベルの ISGF-3 を発現していた。肺胞マクロファージの核内抽出物の EMSA は過剰量の ISRE oligonucleotide により band が消失し、抗 STAT1, STAT2, IRF-9 の抗体により supershift した。

インターフェロンの刺激により、ISGF-3 の形成 \rightarrow ISRE sequence への結合というシグナル経路以外に STAT1 homodimer の形成 \rightarrow GAS sequence への結合という経路があるが、STAT1 homodimer の形成は THP-1 単球、THP-1 マクロファージともに結核菌感染により誘導されなかった。これらの結果からマクロファージにおける結核菌の感染に際してインターフェロンのシグナル伝達経路は、主として ISGF-3 \rightarrow ISRE sequence への結合であると考えられた。

単球において結核菌感染後に ISGF-3 後に ISGF-3 の形成がないのは、複合体を形成する IRF-9 のレベルが低いためかもしれない。なぜなら、単球においても結核菌感染やインターフェロン刺激により STAT1 および STAT2 は誘導されてくるからである。そこで、結核菌感染後 THP-1 単球からの抽出物に recombinant IRF-9 を添加し、EMSA を行くと、THP-1 単球ではコントロールよりも多くの ISGF-3 の形成がみられた。末梢血単球からの抽出物も ISGF-3 の形成がみられないが、IRF-9 を添加すると形成された。これに対し、肺胞マクロファージからの抽出物は無刺激でも ISGF-3 を形成していた。

以上のように IRF-9 の発現が ISGF-3 の形成

に不可欠であると考えられたので、単球とマクロファージの IRF-9 の蛋白量を immunoblot を用いてインターフェロン刺激前後で調べた。THP-1 単球と末梢血単球の IRF-9 はほとんど検出できないが、THP-1 マクロファージと肺胞マクロファージでは検出された。また、末梢血単球に結核菌を感染させても検出できないが、肺胞マクロファージに結核菌を感染させたものではさらに増加した。

MY-1 の IFN- γ 産生誘導能

正常 C3H/HeN マウス脾細胞を 10 あるいは 100 $\mu\text{g/ml}$ の MY-1 で刺激したところ、強い IFN- γ 産生が認められた。この IFN- γ の産生誘導は 1 $\mu\text{g/ml}$ の MY-1 刺激でも認められたが、それ以下の濃度では誘導されなかった。調製した MY-1 には微量の LPS の混入が認められた。グラム陰性菌の細胞壁成分である LPS は強力に IFN- γ 産生を誘導することができる。計算上細胞培養系に混入しうる LPS 濃度は、100 $\mu\text{g/ml}$ の MY-1 で刺激した場合でも 0.05 EU/ml と非常に低く、この濃度では単独で IFN- γ 産生を誘導することはできない。しかし、MY-1 刺激で見られる IFN- γ 産生が MY-1 と LPS との相乗作用である可能性は否定できない。そこで、LPS-low responder strain である C3H/HeJ マウス脾細胞を MY-1 で刺激し、その IFN- γ 産生を調べた。その結果、C3H/HeN マウスの場合と同様に 10 および 100 $\mu\text{g/ml}$ で刺激した場合に強い IFN- γ 産生が認められ、1 $\mu\text{g/ml}$ の刺激でも有意な IFN- γ 産生が誘導された。この結果、MY-1 による IFN- γ 産生誘導には LPS は関与しないことが明らかとなった。

MY-1 による IFN- γ 産生誘導における細胞間ネットワーク

MY-1 刺激で誘導される IFN- γ の主な産生細胞は NK 細胞であることが示されている。そこで我々の実験系でも IFN- γ の主要な産生

細胞が NK 細胞であることを確認するため、C3H/HeN マウス脾細胞から NK 細胞を negative selection により完全に除去し、MY-1 で刺激して IFN- γ 産生を調べた。脾細胞より DX5 陽性の NK 細胞を除去すると IFN- γ 産生は著しく抑制された。また、DX5 陽性細胞のみを MY-1 で刺激しても IFN- γ 産生は認められなかった。一方、この DX5 陰性細胞と DX5 陽性細胞を正常脾細胞に含まれる割合で混合した後 MY-1 で刺激したところ、IFN- γ 産生のレベルの回復が認められたこのことから、この NK 細胞が主要な IFN- γ 産生細胞であることが確認された。さらに、この IFN- γ 産生は Sephadex-G-10 カラムを通過した細胞ではほとんど認められなかったことから、MY-1 で誘導される IFN- γ 産生にはマクロファージの関与が必要となることが示された。

MY-1 による IFN- γ 産生誘導に關与するサイトカイン

NK 細胞や T 細胞の IFN- γ 産生誘導には種々のサイトカインが関与することが知られている。MY-1 による IFN- γ 産生にはマクロファージが必要であることから、このマクロファージが産生するサイトカインが MY-1 刺激で誘導される IFN- γ 産生に必須であると考えられる。そこで、C3H/HeN マウス脾細胞を MY-1 で刺激する系に各種サイトカインに対するモノクローナル抗体を加え、その IFN- γ 産生を調べた。その結果、抗 IL-12 抗体を加えた場合の IFN- γ 産生は抗体を加えていない場合に比べて 60 %程度に抑制された。また、抗 IL-18 抗体を添加した系ではその産生はコントロールの 15 %程度に抑えられ、これら 2 種類の抗体を同時に添加するとその産生はさらに弱まることを示された。IL-1 α および TNF α の関与を調べるため同様の実験を行ったところ、IL-12 や IL-18 に比較して抗 IL-1 α 抗体および抗 TNF α 抗体では IFN- γ 産生は抑制

されないことがわかった。また、IL-12 および IL-18 の MY-1 による IFN- γ 産生への関与を明確にするため、それぞれのノックアウトマウスの脾細胞を MY-1 で刺激し、その IFN- γ 産生を調べた。その結果、コントロールマウスの IFN- γ 産生に比較してノックアウトマウスの IFN- γ の産生はいずれの場合も非常に弱いことがわかった。次に C3H/HeN マウス脾細胞を MY-1 で 24 時間刺激し、それらの産生量を調べた。その結果、強い IFN- γ 産生が誘導される 10 あるいは 100 μ g/ml の MY-1 刺激では IL-12(p70)の産生が認められた。しかし、同じ培養上清中に IL-18 産生は検出することはできなかった。

D. 考察

ヒト肺結核の実験モデル動物としては現在モルモット、マウス、ウサギ等が用いられている。モルモットは *M. tuberculosis* に感受性で特に炎症性刺激に対する肺の反応はヒトに非常に類似しており、加えて急性ならびに慢性の炎症メディエーターに対する皮膚反応もヒトに非常に類似している。Calmette と Guérin による BCG の前臨床試験はモルモットを用いて行われ、また Koch の結核菌感染モルモットに結核菌を皮内注射することにより惹起される DTH (Koch 現象) の観察はツベルクリンの力価試験にモルモットが使用される基礎となった。マウスは本来低菌量結核菌感染に対して低感受性で *M. tuberculosis* に対する抵抗性がヒトと異なり、ヒト肺結核の動物モデルとして適当ではない。しかし安価に入手できバイオハザードの点も含めて取扱いが容易である。更に現在では多種類の近交系マウスならびに特定遺伝子が欠落した近交系マウスが存在し、多種類のサイトカインならびにそれらに対する抗体、細胞表面抗原マーカーに対する抗体が市販され容易に入手できる。そのため、近年マウスを

用いて結核の感染防御機構が精力的に研究されている。それに対し、モルモットのサイトカインならびにそれに対する抗体、細胞表面抗原マーカーに対する抗体等が非常に少く入手困難であることが、モルモットを用いる感染防御機構の研究を困難にしている。更に近交系モルモットが非常に少数で、入手が容易でないことが、結核に対する免疫学的・遺伝学的な研究に支障をきたしている。ウサギは *M. bovis* には感受性が非常に高いが *M. tuberculosis* に対する感受性は低い。しかしながら、*M. tuberculosis* の感染病巣に空洞を形成するので病理組織学的研究には有用である。研究の目的により使用する動物種を選択することが必要である。*M. tuberculosis* の実験的感染経路として静脈内、腹腔内、気道等がある。気道感染は定量的感染技術とバイオハザード阻止の点で困難さがあるが、1950 年代に入りヒトの結核菌感染経路に近似の噴霧感染系を作成する試みがなされた¹⁶⁾。Smith の研究グループは長年にわたる基礎的な研究により低菌量 (5~10CFU) の結核菌をモルモットに噴霧感染し肺結核を惹起する実験系を確立し、その実験系を用いて、結核菌感染初期の病像の研究、BCG 等のワクチン効果の研究等を推進した。抗結核ワクチン効果を正確に評価するためには、動物実験に際しヒトに使用される予防接種の条件およびヒトの結核感染条件に近似の条件を用いることが必要である。Wiegenshaus と Smith はワクチン効果評価のための動物実験では 1. ワクチン量は防御効果を期待できる最低量であること、2. 非特異的な抵抗性を排除するためにワクチン投与後 6 週以降に有毒結核菌でチャレンジすること、3. チャレンジは気道感染によること、4. チャレンジ量は動物に感染惹起可能な最低菌量 (マウスおよびモルモット 1 匹あたり 5~10 CFU が妥当である) で行うこと、5. 予備試験によりチャレンジ後ワクチン

効果が最大に示される期間を求めておき、その期間内の早期に動物を安楽死させてワクチン効果を評価する等が必須であると報告した。その条件下で Smith らは 10 種類の BCG 亜株をヒトに投与する 1/600 量でモルモットを免疫しその抗結核効果を評価した。その結果、試作段階の 1 株以外の 9 株は効果に若干の差異はあるが、有効な抗結核効果を示した。使用 BCG 亜株はすべて匿名で記載されているが、論文の内容から有効な 9 株の中には Tokyo 172 株と Copenhagen 1331 株が入っていると推定される。今回我々は彼等とほぼ同様な方法¹⁴⁾で Tokyo 172 株の抗結核効果を検討し、Tokyo 172 株は凍結乾燥標品も冷凍標品も Copenhagen 1331 株と同等の防御効果を示す結果を得た。

Lagranderie らは BALB/c マウスを用いて BCG Pasteur 1173P2 株、Glaxo 1077 株、Russian 株、Prague 株および Tokyo 172 株の免疫原性を 1.BCG 各株(10^6 CFU)を静脈注射し脾臓内での増殖、2.BCG 各株(10^6 CFU)を静脈投与で免疫後、rBCG(10^6 CFU)を静脈注射でチャレンジし、rBCG に対する防御能、3.BCG 各株(10^9 CFU)を皮下投与で免疫後リンパ節細胞を採取し PPD で刺激してその細胞の BCG 感染肺胞マクロファージに対する CTL 活性、4.BCG 各株を静脈投与 (2×10^7 CFU, 2回)あるいは経口投与(5×10^9 CFU)で免疫した後の抗 PPD 抗体産生能、5.BCG 各株(10^9 CFU)を皮下投与で免疫後リンパ節細胞の PPD 刺激による増殖能、6.BCG 各株(10^9 CFU)を皮下投与で免疫後、リンパ節細胞の PPD あるいは ConA 刺激による IFN- γ と IL-2 産生能、7.BCG 各株を静脈投与(10^7 CFU)、皮下投与(10^9 CFU)および経口投与 (5×10^9 CFU)で免疫した後、PPD 特異的 DTH 等を比較検討した。その結果 BCG5 株の間で免疫原性に差があることを報告した。その中でも Tokyo 172 株はいくつ

かの点(上記 1,2,3,4&7)で低い成績を示した。Pasteur 1173P2 株は静脈注射により投与された後脾臓で増殖し、その後も脾臓中によく残存しているが、Tokyo 172 株は増殖することなく漸次減少している。12 週後の残存菌数は、Pasteur 1173P2 株 10^6 CFU に対し Tokyo 172 株は 10^3 CFU であった。BCG は生菌ワクチンであり、投与後も残存することがワクチン効果に必須であるが効果を発揮するためにはどの位の菌数が必要であるかについては、明確でない。Lagranderie ら²²⁾が 10^2 CFU と 10^5 CFU の Pasteur 1173P2 株をモルモットに皮内投与で免疫し 5~7CFU の *M. tuberculosis* H37Rv でチャレンジした結果では 10^2 CFU 投与も 10^5 CFU 投与もほぼ同等のワクチン効果を示している。

Teulieres らはヒト 1 才未満児に Pasteur 1173P2 株を皮内投与した際に、0.05mg (2.5×10^5 CFU 相当)群では 5.5%に、その半量の 0.025mg (1.2×10^5 CFU 相当)では 0.7%に化膿性リンパ節炎を認め、またツベルクリン反応で評価する限り両者のワクチン効果に差はなかったと報告している。これらの報告は、BCG 菌量が多ければワクチン効果が大きくなる訳ではなく、かえって副作用を惹起することを明示している。Lagranderie らにより示された Pasteur 1173P2 株等が投与後 8~80 倍増殖することがワクチン効果と副作用の両面にいかに作用するのか興味深い。マウスに 10^6 CFU 以上の BCG を投与する実験系で得られた結果が、ヒトに対するワクチン効果評価の基礎データになり得るかは疑問の残るところである。近年 BCG に勝る抗結核ワクチン開発をめざして、多くの rBCG、栄養要求変異結核菌株ワクチン、弱毒人型結核菌株ワクチン、死菌ワクチン、コンポーネントワクチン、DNA ワクチン等が作製され動物実験での評価が報告されている。ワクチン投与法は皮内注射、皮下注射の

他に筋肉注射、粘膜免疫等が工夫され、ワクチン効果を *in vitro* 系で予備的に評価する試みもなされている。

今回著者らが採用したモルモットにワクチン投与後低菌量の強毒結核菌を噴霧感染させ、惹起された肺結核症の程度で評価する実験系¹⁴⁾は現時点で実施可能なヒト肺結核に対するワクチン評価系として最も信頼されている。本研究でも病理組織所見は臓器内菌数をよく反映し、またこれらの結果はヒトの結核に対するBCGの「肺結核は50%発病率が低くなり血行性の結核性髄膜炎や粟粒結核などの重症結核には高い有効性を認める」という評価とよく一致し実験系の信頼性が確認された。しかしながら実験者自身が安全に強毒結核菌を動物に噴霧感染させ、感染した動物を飼育するためにはかなり大規模なBSL3の動物実験室ならびに動物飼育室が必須である。わが国でもすでに国立感染症研究所・結核予防会結核研究所はその施設を有し、徐々に整備されてきているので、将来的には国内で実施可能である。ヒト結核感染経路に近似の噴霧感染系を用いて多くの新たな抗結核ワクチン候補の評価が国内で実施され、現在のBCGよりも有効なワクチンが開発されることを願う次第である。

結核ワクチンの重要性は本年度になって結核症が再興感染症の一つとして我が国で宣言されたことから明らかであり、結核菌に対する有効なコントロール方法の研究開発が社会的にも求められている。このことはこれまでの結核ワクチンとしてのBCGが一定の評価を得ているにもかかわらず、改良すべき余地が残されていることを示唆している。その原因の一つとして耐性結核菌感染者の増加があげられ、その診断と菌にたいする対策が具体的に重要であると考えられる。さらに、結核症はHIV感染者の増加にともなって世界的にも急増しており、結核を効果的にコントロールするにはより

有効なワクチンの改良、開発が望まれていることは明らかである。これまでBCGワクチンの他に結核蛋白に対するコンポーネントワクチンあるいはDNAワクチンが試作されているが、これまでの結果から推測すると抗結核作用は充分ではなく、BCGの抗結核作用を超えられるようなワクチン効果を誘導できるものはまだ示されていないといっても過言ではないと思われる。したがって、現時点でより有効な抗結核作用を誘導する方法としてこれまで開発されているBCG菌を用いて免疫力を効果的に付加するリコンビナントBCG結核ワクチンの方向性が最も効果的ではないかと推測される。我々のグループはDTHを誘導できる能力を持つ抗酸菌の分泌できる遺伝子をクローニングし、その性質を明らかにしてきた。本研究ではさらにIFN- γ の誘導能に優れたESAT6ペプチドに着目し、それらの3つの遺伝子を個々にあるいはさらにコンビネーションに発現させBCGの抗結核免疫誘導能を強化することを目的とした。その方法が本プロジェクトの終了までに目処がつけられるようにプロジェクトとして検討する予定としている。

臨床分離菌株の *M. bovis* 31株中1株が、*M. tuberculosis* 検出用プライマーPT-1, PT-2と *pncA*-7, *pncA*-10により増幅され、*pncA*-7, *pncA*-11Cにて増幅されなかった。この株は、かつてアフリカより *M. bovis* として送られてきた株であるが、発育不良のため生化学的検査法による同定試験では *M. tuberculosis* として同定されなかった例である。このように、遺伝子を調べることにより、より正確な鑑別ができるようになった。

mtp 40 遺伝子をコードするプライマーPT-1, PT-2を用いた場合、396bpのPCR増幅バンドが検出されると *M. tuberculosis* と言える。*M. africanum* はかつてアフリカの結核患者から分離された菌種で、生化学的方法では *M.*

tuberculosis と *M. bovis* の中間であったために *M. africanum* という菌種名がつけられた。われわれの検討では *M. africanum* 5 株は全て PT-1, PT-2 と *pncA7*, *pncA10* の 2 組のプライマーにより増幅されたことから、*M. africanum* は人型の結核菌であると言える。臨床材料中より結核菌を迅速に検出し鑑別同定する方法は、既に遺伝子増幅法として臨床検査で用いられている。また、分離菌が得られれば、ごく微量の菌量で結核菌群として同定できる遺伝子診断法も普及している。しかし、結核菌群より *M. bovis* を鑑別したという報告はあるが、*M. bovis* BCG を明確に鑑別する方法は無い。そこで、BCG の鑑別同定を最終目標に研究を開始した。BCG の *senX3-regX3* の IR 中の 77bp-MIRU の数により *M. bovis* から BCG が鑑別できることを期待したが、*M. tuberculosis* と *M. bovis* の鑑別までしかなかった。酪農家や、酪農国では *M. tuberculosis* と *M. bovis*、さらに *M. bovis* から BCG を明確に鑑別することが必要であるが、わが国では、BCG-Tokyo 株を結核予防ワクチンとして接種しているので、牛に接する機会が無い人から分離された抗酸菌が、*M. bovis* のパターンをとれば、BCG として差し支えないと思われる。しかし、未だ BCG まで同定できてはいないので、文献的に報告されている遺伝子の再検討をおこない、Cole らにより報告された結核菌 H37Rv 株の全塩基配列を参照し、*M. bovis* BCG 特異的な塩基配列を検索する必要がある。

senX3-regX3 の IR 中の 77bp-MIRU の数と 53bp-MIRU の有無により、結核菌群は 8 群に大別されると Magdalena らは報告している。*senX3-regX3* の IR は、BCG は 2 群に大別された。しかし、臨床分離菌株の *M. tuberculosis* や *M. bovis* の被検菌株数を増やすことにより、感染源を突き止める疫学マーカーとしての利

用も期待されるので、次年度では、*senX3-regX3* の IR の検討も合わせて行う予定である。抗酸菌感染感受性マウスは感染防御性マクロファージ由来サイトカイン (IL-12 や IL-18) 発現に欠陥があることが判明し、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抗菌防御を回復できた。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 補充療法の毒性は抗菌化学療法+免疫療法 (併用療法) により、不利益な肉芽腫反応を回避し、最大の抗菌防御と最小の病変誘導を達成できた。併用療法の奏功機序として、1) 病原体—宿主の両者を標的、さらに、2) リファンピシンが糖質コルチコイド受容体に結合し、抗炎症作用を惹起した可能性などが考えられる。Immune-based intervention 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。病原体—宿主—抗菌薬連関を理解することはより良い治療や予防方法の開発に寄与することが期待される。

これまでに開発されたマウスの結核症モデルにおいて用いられてきたヒト型結核菌は *Nramp-1* 遺伝子型にかかわらずマウス臓器内で増殖を続け、*M. avium* を代表とする他の抗酸菌モデルの結果とはかなり異なっている。*M. tuberculosis* が *Nramp-1* 遺伝子の支配を受け付けられない理由は現在のところよく分かっていない。今回マクロファージを用いた *in vitro* 感染実験において我々は興味深い現象を見出した。*M. tuberculosis* でマクロファージを刺激した場合産生されるサイトカインプロファ

イルは Bcg^s と Bcg^r の間でそれほど大きな差が見られないのに対し、*M. avium* で刺激すると両マクロファージ間で産生されるサイトカイン、特に IL-10 と IL-12 の量がかなり異なっていた。これら 2 つのサイトカインとりわけ IL-12 は抗酸菌感染症における特異的免疫を誘導する際に深く関わっているといわれるが、感染初期に誘導されるこうしたサイトカインプロファイルの違いが *M. avium* 感染モデルと *M. tuberculosis* 感染モデルの違いを説明する糸口となるかもしれない。もうひとつの興味ある現象は、正常脾臓細胞を *M. avium* で刺激した場合に産生されてくる IFN- γ の量が Bcg^s と Bcg^r とでかなり異なっていたことである。われわれはまだどういった細胞集団がこの時期の IFN- γ 産生に関与しているのか精査していないが、この差が Nramp-1 遺伝子の支配を受けているとすれば同遺伝子の新たな役割として注目されるであろう。また感染マウスにおいて産生されてくる同サイトカイン量についてどの程度の差がみられるのかも興味あるところである。現在のところ *M. avium* に感染したマウス脾細胞における IFN- γ mRNA の発現量は、Bcg^s マウスに比べ Bcg^r マウスのほうが多く、ELISA 法でも産生量に差を認めている。IFN- γ はマクロファージを活性化する作用をもつサイトカインとして知られているが、菌貪食能試験では、IFN- γ によりマクロファージを前処置したグループとコントロールのグループとの間に違いはみられず、また、Nramp-1 遺伝子型が異なるマウス間にも違いが認められなかった。また *M. avium* Mino 株、No.36 株 と No.38 株、*M. tuberculosis* のうち IFN- γ によって活性化されたマクロファージにより菌増殖抑制がみられたのは、*M. avium* Mino 株と *M. tuberculosis* の 2 株であった。エイズ患者由来の 2 株は、*in vivo* における感染実験においても臓器内菌数は減少

傾向を示し、豚の肺胞マクロファージ中でも菌数が増殖することはない。これらの実験結果は、エイズ患者由来株は、他の動物由来または非定型抗酸菌症患者由来株に比べて病原性がそれほど強くないことを示している。今回データとして示さなかったが、非定型抗酸菌症患者より分離された *M. intracellulare* のなかに Bcg^s、Bcg^r 両マウスマクロファージ内で同じように増殖し、IFN- γ の殺菌能増強作用を全く受けない株があったことを付記しておく。菌種または菌株によって活性化マクロファージによる増殖抑制効果に違いが認められたが、抑制率に限って言えば、Bcg^s と Bcg^r の間にそれほど大きな差は認められず、マクロファージが IFN- γ によって活性化されてしまった後に表現される抵抗性は Nramp-1 遺伝子が支配するそれを凌駕してしまうように思われる。マクロファージが産生する抗微生物分子とされる窒素酸化物(NO²)は、IFN- γ 処理に加えて *M. avium* 刺激を同時に行った場合に、有意に多く産生される。*In vitro* でこうした実験をおこなった場合、産生量も Bcg^s マウスと Bcg^r マウスとの間に大きな違いは見られないので、充分量の IFN- γ 刺激があれば Nramp-1 遺伝子型にかかわらず、マウスマクロファージは相当量の NO² 産生を誘導できると我々は考えている。腹腔浸出性マクロファージを用いた *in vitro* の感染モデル実験においても、Nramp-1 遺伝子型(感受性または抵抗性)に関らず IFN- γ はマクロファージを活性化し *M. avium* Mino 株の増殖はある程度抑制された。今回の結果からは IFN- γ によって活性化されたマクロファージの抗菌作用が Nramp-1 遺伝子の支配を受けるというよりも、むしろ IFN- γ も含め、生菌刺激により誘導されてくるサイトカインが Nramp-1 遺伝子により量的または質的に修飾されそれが感受性/抵抗性の違いを生み出す原因となっていると考えたほうがよさそうで

ある。菌の刺激と同時にマクロファージから放出されるサイトカインの質的、量的差は当然その後誘導されてくる免疫応答に影響を及ぼすと思われ、結果的に感染全期間を通じた感受性の差となって表現されるのではないかと我々は考えている。

今回得られたもうひとつの知見は、細胞の形態学的変化の観察、DNA ラダーの検出、TUNEL 法の 3 つの手法を用いて *M.bovis* BCG の感染によりマウスの骨髄由来マクロファージにおいて、アポトーシスが生じることが分かったことである。今回行った *in vitro* の感染実験において、*Bcg^s* にくらべ、*Bcg^r* マクロファージにおいて明らかに多くのアポトーシス細胞が検出されたこと、また *M.avium* を感染させた場合にはマクロファージのアポトーシスはほとんどみられなかった。*Bcg^s* および *Bcg^r* 両マウスに、*M.avium* を感染させた場合の脾細胞幼若化反応や遅延型アレルギー反応の誘導は、*M.bovis* BCG を感染した場合に比べ非常に弱いことから、抗酸菌に対する免疫反応性がアポトーシスの誘導と深く関わっている可能性が示唆される。近年、ヒトの末梢血単球や肺胞マクロファージに、*M.bovis* BCG、*M.avium*、*M.tuberculosis* などの抗酸菌が感染するとアポトーシスが誘導されることが明らかになった。*M.bovis* BCG の感染によるアポトーシスについては、1994 年の Molly らの報告⁹⁾があるが、それによれば H_2O_2 により誘導されるヒトの抹消血単球のアポトーシスが細胞内の *M.avium*-*M.intracellulare* の殺菌に関わっている可能性について述べ、同時にその系において Fas レセプターを介するアポトーシスの関与を否定している。一方、Kremer らは *M.bovis* BCG 感染は、ヒトの抹消血単球のアポトーシスを抑制し、それが抗酸菌が宿主体内で生き残るための機構のひとつではないかと考えている。一方 Rojas らは、マウスの骨髄由

来マクロファージにおいて、強毒株の *M.tuberculosis* H37Rv によりアポトーシスが誘導されるが、死菌や弱毒株の *M.tuberculosis* H37Ra や、*M.kansasii* などはアポトーシスを誘導しないと報告している。さらに Rojas らは、*M.tuberculosis* H37Rv によるマクロファージのアポトーシスは、*Bcg^s* マクロファージに比べ *Bcg^r* マクロファージにおいて生じやすい傾向にあり、それは TNF- α により誘導される NO_2^- の毒性作用の結果であると報告している¹⁴⁾。今回の我々の実験においても、*Bcg^s* マクロファージに比べ *Bcg^r* マクロファージにおいてアポトーシスが生じやすい傾向にあるという点では、彼等と同じ結果が得られた。さらに、*M.bovis* BCG を感染させたマクロファージにおける TNF- α と NO_2^- の産生量を調べたところ、*Bcg^s* マクロファージのほうが *Bcg^r* マクロファージに比べ両方の産生量が有意に多く、この点において Rojas らの成績とは異なり *M.bovis* BCG により誘導されるマクロファージのアポトーシスの誘導と、TNF- α および NO_2^- の作用との直接的な関連性は確認できなかった。また、抗酸菌感染により誘導されるアポトーシスが、マウスおよび人のマクロファージにおいて生じることは先に述べたが、人のマクロファージでは抗酸菌感染によって NO_2^- は、ほとんど産生されることはない。このことは、アポトーシスの誘導因子としての NO_2^- の作用を考えると、考慮すべき点であるように思われる。Klingler らによれば、ヒトの末梢血単球では *M.tuberculosis* H37Ra の加熱死菌でもアポトーシスが生じるという。これらの報告は、同じ抗酸菌でもその菌種と感染細胞の組み合わせがアポトーシスに密接に関係することを推測させる。抗酸菌の誘導するマクロファージのアポトーシスについては、このように様々な報告があり、未だそのメカニズムはよく分らない。Fratazzi らは、*in vitro* の実験において

M. avium によるヒトのマクロファージは抗酸菌の拡散を防ぎ、非感染のマクロファージを新たに加えることでその増殖が抑制されるのではないかと考察している。また、Rojas らは、アポトーシスと Nramp 遺伝子を関連させた実験をさらに進めて、Nramp-1 遺伝子により支配されている TNF- α と IL-10 の産生の割合が、マクロファージのアポトーシスと生存のバランスを決定しているのではないかと述べている。我々の実験結果はマクロファージに感染する抗酸菌の種類により、誘導されてくるサイトカインのプロファイルがかなり異なり、それが感染予後のみならずアポトーシス誘導の有無にも強い影響力を及ぼす可能性を示唆するものである。菌のこういった成分がサイトカインのプロファイルを決定し、さらにはアポトーシス誘導をコントロールするのか、それらに Nramp-1 遺伝子がどのように関わるのかを詳細に検討してゆく必要がある。

GM-M ϕ はヒトの肺胞マクロファージに似た形質であることを我々は既に述べたが、このマクロファージで、患者由来 *M. avium* の増殖が強いことは、非定型抗酸菌や結核菌がヒトの肺で良く増殖することと考えあわせ興味深い結果である。BCG は、GM-M ϕ でもあまり増殖が認められなかったが、これは日本株 BCG はその毒力が弱いことと一致している。*M. avium* のマクロファージへの感染力の強さはストレインにより大きく異なり、患者分離株は、特に GM-M ϕ での増殖が強いものがあるが、これら *in vitro* における M ϕ への感染力の違いが、*M. avium* のヒト生体における毒力と相関するか否か興味ある点である。

AIDS 患者に結核菌や非定型抗酸菌が感染すると HIV の増殖が増強し病気が進行することが知られていることより、抗酸菌感染と AIDS の関係は注目を浴びている。先に我々は、HIV の増殖は M-M ϕ で強く GM-M ϕ では増殖抑制

が起きることを報告したが、今回の結果より、抗酸菌と HIV のマクロファージでの増殖パターンが逆であることは、両者に対する殺菌、殺ウイルス機構が異なることを示しており興味深く、現在それぞれの機構について検討中である。

結核菌感染後に単球は 37 kD の stimulatory C/EBP β を誘導するが、マクロファージは dominant negative 16kD C/EBP β を誘導し、HIV の転写を抑制してしまう。*ex vivo* の解析では、炎症部の肺胞マクロファージは何らかの機序により C/EBP β の発現全体が低下しており、NF- κ B による LTR の転写促進の機序が優先されるために HIV の産生が亢進しているものと思われる。これに対し、非炎症部の肺胞マクロファージでは constitutive に C/EBP β 16 kD が発現していて、HIV の転写が亢進しないように蓋がされている状態である。今回、我々は C/EBP β 16 kD の発現をインターフェロン β が誘導することに注目し、インターフェロンのシグナル伝達蛋白を単球とマクロファージを用いて調べた。結核菌感染により、STAT1 あるいは STAT2 と IRF-9 の heterodimer である ISGF-3 がマクロファージ内で形成され、核へ移行し、ISRF 部位に結合し、それが引き金となって C/EBP β 16kD の転写が促進されるのではないかと考えられた。一方、単球においては、結核菌感染後も ISGF-3 が形成されない。これは、細胞内の IRF-9 のレベルが低いためであると考えられた。単球は、結核菌刺激により、NF- κ B を強く発現することから、病巣部に遊走してくる単球に HIV が感染していると C/EBP β 16kD による抑制がかかっていないために HIV の産生が亢進してしまう可能性も考えられる。

M. bovis BCG の DNA-rich フラクションである MY-1 は NK 細胞を活性化し、IFN- γ 産生を誘導することが示された。Sephadex G-10