

伸治、山本三郎、山崎修道 「リコンビナント BCG のワクチン開発の試み」 第 69 回実験結核研究会 99.04.14 宇都宮市 栃木県総合文化センター

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

結核の新ワクチン評価の為の肺結核症動物モデル開発及び、感染、発病、防御の  
代理マーカーの検討

分担研究者 芳賀伸治 国立感染症研究所 細菌部 室長

研究要旨

モルモットを用いた結核感染実験は、ツベルクリン反応や、より特異的なMPT64蛋白による皮膚反応と感染局所との関係を詳しく観察出来る。そこで、経気道感染実験のモデルにモルモットを用いることを企て、感染研 P3 動物実験室内に米国 Glas-Col 社のエアロゾル噴霧感染装置を導入した。昨年度この装置を用いた実験のバイオハザードの面からの安全性を確認したので、本年度はこの装置を用いてリコンビナント BCG の力価を評価する方法の検討を開始した。また近郊系モルモット Strain 13 及び Strain 2 がこの目的のために有用か否かの検討も行った。

A. 研究目的

結核のニューワクチンの開発、特に成人の肺結核症発病の防御を目的とした方策が強く望まれている。現在実験動物としてマウスを用いた結核症に対するDNAワクチン等の開発の報告が多くなされている。われわれは、マウスよりも人に近い反応を示すモルモットを実験動物に用いてリコンビナントワクチンの効果評価法の開発を進めている。モルモットを用いる事で皮膚 DTH 反応、とりわけツベルクリン反応やより特異的なMPT64による皮膚反応と感染局所との関係を詳しく観察出来る。又動物が比較的大きいので、感染動物の剖検所見のデータが多くとれる等の利点がある。

現在、本研究班分担研究者本多らにより結核に対抗するリコンビナント BCG (rBCG) ワクチンの作製が進められている。このワクチンの力価評価を行う準備をすすめているところであるが、作製される前に既に本多らにより開発がされているエイズに対抗するための凍結乾燥 rBCG ワクチン Lot K3 を用いて rBCG の特性を観察した。結核に対抗する rBCG ワクチンは Lot K3 を母胎としてその欠点を改良したものとして開発が進められている。

B. 研究方法

HIV-V3 領域と $\alpha$ 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。 $5 \times 10^5$  CFU/ml の菌液 0.5ml

をハートレイに静注し、1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 週後に DTH の測定と脾臓の摘出を行った。rBCG の分離培養は Km 含有、非含有 1%小川培地で培養後コロニー数を測定し、生じたコロニーを 7H10 培地で増菌後 boil 法により DNA を抽出した。M. kansasii  $\alpha$  抗原遺伝子上のプライマーを用いて PCR を行い、HIV-V3 領域の有無を調べた。

Glas-Col 社製エアロゾル噴霧感染装置を用いてモルモットへ結核菌 H37Rv を感染し、体重、組織重量、還元培養による肺や脾臓の生菌数、DTH の誘導能、肺や脾臓又はリンパ節等の病理組織像を、感染 4 週間まで経時的に観察した。体重約 350g のモルモット (ハートレイ:1 群 3 匹) に H37Rv の単個菌を  $3 \times 10^7$  CFU/2.5ml 噴霧感染させた。

Strain 2 又は Strain 13 に BCG-Tokyo 株 0.5mg 又は H37Rv の  $5 \times 10^6$  CFU を注射し、6 週又は 5 週間飼育後、皮膚テストに用いた。皮内テスト用抗原として市販 PPD 及び、MPB64、MPB70、のそれぞれ 0.05 $\mu$ g 又は 0.2 $\mu$ g を皮内注射し 24 時間後に観察した。

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。

C. 研究結果

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。(以上 HIV 関連の別の研究費報告と重複する部分が含まれるが結核に対抗するリコンビナント BCG (rBCG) ワクチンの作製及びその実用化のための重要な成績であるので報告する)。

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、その後は増加は認められず 4 週目でも 400g 程度であった。H37Rv の肺あたりの還元培養菌数の平均は感染 1 日目で  $1 \times 10^4$  CFU、1 週目 ( $4.0 \times 10^5$  CFU)、2 週目 ( $3.4 \times 10^7$  CFU)、3 週目 ( $2.7 \times 10^7$  CFU)、4 週目 ( $1.0 \times 10^7$  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 ( $5.8 \times 10^5$  CFU)、3 週目 ( $5.0 \times 10^5$  CFU)、4 週目 ( $7.9 \times 10^5$  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 $\mu$ 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  $3 \times 10^8$  CFU/2.5ml 噴霧) を行ったところ、肺の還元培養生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 ( $2.7 \times 10^4$  CFU/肺)、2 週目 ( $9.2 \times 10^3$  CFU/肺)、4 週目 ( $1.8 \times 10^3$  CFU/肺)、6 週目 ( $2 \times 10^3$  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 $\mu$ 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 $\mu$ 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  $8.0 \pm 1.6$ 、 $0$ 、 $14.5 \pm 2.5$  mm (n=4) であり、Strain 13 では  $10.9 \pm 1.5$ 、 $12.5 \pm 2.4$ 、 $12.6 \pm 1.5$  mm (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  $8.9 \pm 1.6$ 、 $15.7 \pm 1.7$ 、 $12.5 \pm 2.2$  mm (n=5) であった。これらの動物を抗原量 0.2 $\mu$ 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  $11.4 \pm 0.9$ 、 $16.0 \pm 1.9$ 、 $14.9 \pm 0.9$  mm (n=5) であった。

#### D. 考察

凍結乾燥処理した rBCG ワクチン Lot K3 は in vivo ではプラスミドが脱落しやすく、導入遺伝子特異的な細胞性免疫の誘導も弱いことが判った。今後、リコンビナント BCG のヒトへの応用には、プラスミド導入法の改善や凍結乾燥法以外の生菌保存運搬方法の開発または BCG の染色体への外来遺伝子の導入と発現などの改良を進めなければならない。現在その作業が進行中である。

結核菌エアロゾル噴霧感染及び BCG ワクチン噴霧免疫モルモットの基礎的な観察成績が得られた。なお結核菌エアロゾル噴霧感染での攻撃菌数は前出の条件の 1/1000 程度とするのが良いことも分かった。

Strain 2 では BCG 免疫及び結核菌感染動物ともに、0.05 $\mu$ g では MPB64 による反応は陰性であった。結核菌感染動物では 0.2 $\mu$ g に抗原量を増やすと 5

匹のうち2匹が陽性反応を示した。Strain 13 ではないずれの抗原でも良い反応性を示したが、これまでの Hartley の成績と比較すると反応性は劣っていた。これら抗原の反応特性を人の反応成績と比較した場合、Strain 2 では BCG 免疫群で MPB70 が陽性反応を示している点が異なる。BCG 陽転した人でも MPB70 に良く応答しない。

リコンビナント BCG の抗結核免疫力を評価する場合通常の BCG の力価と比較しなければならず、現在その方法を更に追索中である。rBCG ワクチン Lot K3 の安定性の成績に示すように、rBCG はモルモット体内では 100 パーセント生存せず通常の BCG と共存するか BCG の免疫力により淘汰されるようにも観察される。rBCG が長期間体内に生存できるように改良することがその実用化には必須である。2 種類以上の菌が肺内で相互に影響しながらどのように増殖淘汰されていくのかを知ることは非常に興味がある。この点について一部実験を始めている。

#### E. 結論

上記の実験観察からモルモット肺内や脾臓内での菌の増殖淘汰の基礎的な成績が多数得られた。

これらの成績をもとに、エアロゾル噴霧感染法により結核に対抗するリコンビナント BCG ワクチンの評価ができるようになった。しかし、一部基礎データが不足しているので感染条件や BCG ワクチンの免疫ルート等をさらに検討している。

Strain 2 又は Strain 13 モルモットはリコンビナント BCG の抗結核免疫の評価のために有用かもしれない。

#### F. 研究発表

##### 1. 学会

###### 1. 芳賀伸治・山崎剛・山崎利雄

結核感作近交系モルモット Strain 2 又は Strain 13 における分泌蛋白 MPB64、MPB70 の皮膚 DTH 反応  
第 75 回日本結核病学会総会、2000 年 4 月、大阪。

###### 2. 山崎剛・山崎利雄・芳賀伸治

凍結乾燥リコンビナント BCG の *in vivo* における安定性と細胞性免疫の誘導能

第 75 回日本結核病学会総会、2000 年 4 月、大阪。

###### 3. 芳賀伸治、山崎剛、山崎利雄

結核菌エアロゾル噴霧感モルモットの基礎的観察  
第 70 回実験結核研究会総会、2000 年 4 月、大阪。

###### 4. 山崎剛、芳賀伸治、山崎利雄、橋本 朗、戸井田一郎、松尾和弘、本多三男

凍結乾燥リコンビナント BCG の *in vivo* における安定性と細胞性免疫の誘導能  
第 70 回実験結核研究会総会、2000 年 4 月、大阪。

###### 5. 山崎剛、倉 文明、山崎利雄、赤川清子、芳賀伸治

実験動物をモデルとしたエアロゾル経気道噴霧感染の基礎的検討  
第 73 回日本細菌学会総会、2000 年 5 月、札幌。

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

結核菌群からの*Mycobacterium bovis* BCGの鑑別同定法の確立に関する研究

分担研究者 山崎利雄 国立感染症研究所 ハンセン病研究センター  
病原微生物部 主任研究官

研究要旨

文献的に結核菌群に特異的遺伝子を検索、プライマーを設計、PCRを行いプライマーの特異性について検討した。各プライマーを用いたPCR増幅バンドの検出パターンにより、迅速な結核菌群の*M. tuberculosis*と*M. bovis*の鑑別同定が可能な方法を確立した。

A. 研究目的

生化学的方法による抗酸菌鑑別同定キットでは、結核菌群(*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*)の菌種を鑑別することは難しい。そのため、国立感染症研究所にBCG接種後に分離された抗酸菌の同定依頼が来る。ところが、結核菌群よりBCGを明確に鑑別同定する方法は無い。また、現行法では、*M. bovis*と同定するにもおよそ2か月間を要する。迅速なBCGの鑑別同定により、患者の治療方針や、行政の予防対策方針を早期に決定することができる。さらに、*M. tuberculosis*とBCGの2種類の菌を用いた動物の感染実験をした時、還元培養菌が、*M. tuberculosis*かBCGであるかを明確に鑑別同定することは不可欠である。そのため、分子遺伝学的手法を用いて正確で、迅速な*M. bovis* BCGの鑑別同定法を確立する。

B. 研究方法

結核菌群に特異的遺伝子であると報告された、*pab*、*mtp40*、*MPB64*、*pncA*といった遺伝子を選択し、著者報告プ

ライマーの信頼性を、結核菌群参照株DNAを用いてPCRを行い追試をした。ダイレクトシーケンス法によりPCR増幅DNAの塩基配列を調べ、より適切なプライマーを設計し合成した。これらのプライマーを用いて、結核菌群の臨床分離株について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。

C. 研究結果

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。

#### D. 考察

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* の鑑別までしかできなかった。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。

## E. 結論

結核菌群に特異的なプライマーMT-1, MT-2、PT-1, PT-2、MPB64-T2, MPB64-T6、*pncA*-7, *pncA*-10、*pncA*-7, *pncA*-11Cの5組のプライマーを用いてPCRを行い、増幅バンドの出現パターンにより*M. tuberculosis*と*M. bovis*の鑑別が可能になった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

投稿準備中

### 2. 学会発表

1) 山崎利雄、芳賀伸治、赤川清子、山本三郎、PCR法による結核菌群からBCGの鑑別同定法の検討、第135回日本結核

分担研究報告書

実験的抗酸菌感染症における抗菌化学および免疫間欠併用療法の開発

分担研究者 小林 和夫 大阪市立大学医学部細菌学講座 教授

研究要旨

抗酸菌感染に対する細胞性免疫応答が宿主防御に貢献しているが、細胞性免疫は病変形成にも関与、すなわち、組織障害を招来し、諸刃の剣である。抗菌化学療法薬である rifampicin は抗菌活性のみならず、宿主のステロイド受容体に結合し、抗炎症作用を発揮する。従って、抗菌化学療法と免疫増強療法による間欠併用療法は「最大の防御と最小の病変形成」を誘導することができ、難治性抗酸菌感染症の制圧に有望な戦略である。

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、宿主防御には細胞性免疫応答が寄与している。抗酸菌感染症における治療標的として、抗酸菌および宿主を設定することにより、効率的な制圧戦略を開発することを目的とする。

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、抗菌化学療法+免疫療法（併用療法）の可能性について探索した。

C. 研究結果

*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1型ヘルパーT細胞/interferon- $\gamma$  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ることが判明した。

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。

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ードマウス、すなわち、免疫不全マウスにも有効であった。



#### D. 考察

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。

#### E. 結論

抗酸菌感染に対する細胞性免疫応答が宿主防御に貢献しているが、細胞性免疫は病変形成にも関与、すなわち、組織障害を招来し、諸刃の剣である。抗菌化学療法薬である rifampicin は抗菌活性のみならず、宿主のステロイド受容体に結合し、抗炎症作用を発揮する。従って、抗菌化学療法と免疫増強療法による間欠併用療法は「最大の防御と最小の病変形成」を誘導することが

でき、難治性抗酸菌感染症の制圧に有望な戦略である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kasama, T., J. Yamazaki, R. Hanaoka, Y. Miwa, Y. Hatano, K. Kobayashi, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 1999. Biphasic regulation of the development of murine type II collagen-induced arthritis by interleukin-12. Possible involvement of endogenous interleukin-10 and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Arthritis Rheum.* 42: 100-109.

Iwabuchi, H., T. Kasama, R. Hanaoka, Y. Miwa, Y. Hatano, K. Kobayashi, Y. Mori, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 1999. Downregulation of intercellular adhesion molecule-1 expression on human synovial fibroblasts by endothelin-1. *J. Rheumatol.* 26: 522-531.

Takizawa, H., T. Ohtoshi, S. Kawasaki, T. Kohyama, M. Desaki, T. Kasama, K. Kobayashi, K. Nakahara, K. Yamamoto, K. Matsushima, and S. Kudoh. 1999. Diesel exhaust particles induce NF- $\kappa$ B activation in human bronchial epithelial cells in vitro. Importance in cytokine transcription. *J. Immunol.* 162: 4705-4711.

Hatano, Y., T. Kasama, H. Iwabuchi, R. Hanaoka, H.T. Takeuchi, L. Jing, Y. Mori, K. Kobayashi, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 1999. Macrophage inflammation protein 1 alpha expression by synovial fluid neutrophils in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 58: 297-302.

Kai, M., M. Matsuoka, N. Nakata, S. Maeda, M.-i. Gidoh, Y. Maeda, K.

Hashimoto, K., Kobayashi, and Y. Kashiwabara. 1999. Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. FEMS Microbiol. Lett. 177: 231-235.

齋藤 肇、村上和保、小林和夫、儀同政一、日高隆義、權 赫們. 1999. 実験的 *Mycobacterium avium* complex 感染に対する化学的予防. 結核 74: 677-681.

Wang, L., S. Izumi, H. He, N. Fujiwara, N. Saita, I. Yano, K. Kobayashi, and N. Tatsumi. 1999. Serodiagnosis of Hansen's disease/leprosy by enzyme-linked immunosorbent assay using cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) as an antigen. Jpn. J. Lepr. 68: 165-174.

## 2. 学会発表

小林和夫、笠原慶太、吉田 彪. 1999. In vitro 肉芽腫炎症モデルの開発とその制御機序(要望課題) 結核、74:264、1999. 第 74 回日本結核病学会総会(宇都宮、4月).

笠原慶太、足立 満、小林和夫. 1999. 好中球の結核菌体成分刺激によるケモカイン産生(要望課題) 結核、74:264、1999. 第 74 回日本結核病学会総会(宇都宮、4月).

樋口一恵、原田登之、関谷幸江、中村玲子、小林和夫. 1999. 結核菌体蛋白のマウス肺胞マクロファージに対するサイトカイン産生誘導の解析. 結核、74:292、1999. 第 74 回日本結核病学会総会(宇都宮、4月).

原田登之、樋口一恵、関谷幸江、中村玲子、小林和夫. 1999. マウス肺胞マクロファージに対してサイトカイン産生誘導を行う結核菌体蛋白の解析. 結核、74:293、1999. 第 74 回日本結核病学会総会

(宇都宮、4月).

松岡正典、前田伸司、甲斐雅規、中田 登、小林和夫、柏原嘉子、和泉眞藏、Gue-Tae Chae、Thomas P. Gillis. 1999. らい菌 *rpoT* 遺伝子の多型性とその地理的分布. 日本ハンセン病誌、68:51、1999. 第 72 回日本ハンセン病学会総会(東京、4月).

笠間 毅、井出宏嗣、小林和夫. 1999. Interleukin-12 によるマウスコラーゲン誘導関節炎の制御:免疫応答およびサイトカイン動態の解析を中心として(ワークショップ). 日本炎症学会プログラム予稿集 89、1999. 第 20 回日本炎症学会総会(仙台、7月).

樋口一恵、原田登之、小林和夫. 1999. 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 II. 日本免疫学会・学術集会記録、29:243、1999. 第 29 回日本免疫学会総会・学術総会(京都、12月).

木村博昭、虎谷 聡、松岡正典、小林和夫、福富康夫. 1999. マクロファージにおける抗らい菌活性発現に関わる分子の解析. 日本免疫学会・学術集会記録、29:244、1999. 第 29 回日本免疫学会総会・学術総会(京都、12月).

結核菌誘導肉芽腫における IL-4 の役割に関する基礎的研究

主任研究者 山本三郎 国立感染症研究所

研究要旨 Th2 から分泌されるサイトカイン、IL-4 の役割を明らかにするために IL-4 欠損マウスを用いて結核菌感染実験を行った。結核菌を経気道的に IL-4 欠損マウスに感染させた。7 週後、肺病変を野生マウスと比較したところ、IL-4 欠損マウスの方が、肺病変の程度が強かった。6.5 ヶ月後に、肺病変を、再度比較したところ、病変は、野生マウスのより悪化していた。IL-4 欠損脾細胞は野生マウスより IFN-gamma, IL-12 を産生していた。IL-4 も、IFN-gamma, TNF-alpha と並んで、結核菌感染防御に何らかの働きをしていることが示唆された。

分担研究者 菅原 勇

(財) 結核研究所 分子病理学科  
科長

A. 研究目的

結核菌感染防御における IL-4 の役割を明らかにする。

B. 研究方法

Dr. Georges Kohler の研究室で作製された IL-4 欠損マウスを用いた。H37Rv 結核菌株でこれらのマウスを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 H37Rv で刺激し主要なサイトカインを 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。

C. 研究結果

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-gamma, 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。

D. 考察

従来、IL-4 は Th2 サイトカインであり Th2 は Th1 を抑制すると言われてきた。また、結核は Th1 と関係し、Th2 はライシユマニアーシスと関係するというパラダイムが存在する。もしこれが正しいな IL-4 欠損マウスでは、肺に肉芽腫ができにくいはずである。実際は、肉芽腫が、野生マウスのより大きかった。従って、IL-4 による Th1 の抑制が弱いのか、IL-4 に別の未知の働きがあるかもしれない。IFN-gamma, IL-12 が増加しても、これら欠損マウスに大きな肉芽腫が形成され

たことは興味深い。今後の研究課題である。

#### E. 結論

IL-4 は結核菌感染の進展に何らかの抑制作用をしていることが示唆された。しかしその抑制の程度は、IFN-gamma, TNF-alpha より、ずっと軽かった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

I. Sugawara, H. Yamada, H. Kaneko, S. Mizuno, K. Takeda and S. Skira: Role of IL-18 in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. *Infect. Immun.* 67, 2585-2589, 1999.

I. Sugawara: IL-18 and infectious diseases, with Special emphasis on diseases induced By intracellular pathogens. *Microbes and Infection*, 2000 (in press).

G. Yamada, S. Mizuno, R. Horai, Y. Iwakura, and I. Sugawara: Protective role of IL-1 in Mycobacterial infection in IL-1 alpha/Beta double-knockout mice. *Lab. Invest.*, 2000 (in press).

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

抗酸菌刺激によりマウスマクロファージから産生されるサイトカインの *NRAMP-1* 遺伝子による調節

分担研究者 後藤 義孝 官崎大学農学部助教授

### 研究要旨

自然抵抗性関連マクロファージタンパクをコードする *Nramp-1* 遺伝子と抗酸菌感染症におけるサイトカイン産生との関係についてマウスモデルを用いて解析した。抗酸菌感受性マウス (*Bcg<sup>s</sup>*) である C57BL/6 マウスとその *Nramp-1* コンジェニックマウス (*Bcg<sup>r</sup>*) を実験に用いた。両マウスマクロファージを *M. avium* または *M. tuberculosis* で刺激し、Th1 ならびに Th2 型ヘルパー T 細胞の誘導と分化に関するインターロイキン 10 (IL-10) と IL-12 の産生量をそれぞれしらべた。細胞を *M. avium* で刺激した場合、*Bcg<sup>s</sup>* で高いレベルの IL-10 産生がみられたが *Bcg<sup>r</sup>* ではほとんどみられなかった。IL-12 は両マウスマクロファージで産生されたが *Bcg<sup>s</sup>* のそれに比べて *Bcg<sup>r</sup>* のほうが有意に高かった。両マクロファージを *M. tuberculosis* で刺激した場合、IL-10 と IL-12 の両方が産生され、それぞれの産生量は両マウス間でほとんど同レベルであった。また正常脾細胞を *M. avium* 生菌で刺激した時の IFN- $\gamma$  産生量について調べたところ、*Bcg<sup>r</sup>* からの産生量は *Bcg<sup>s</sup>* からのそれを有意に上回っていた。*M. avium* 感染マウスと *M. tuberculosis* 感染マウスにおけるサイトカインプロファイルを比較してみると、感染初期においてかなり異なっていることが明らかとなった。これらの成績から、*Nramp-1* はマウス抗酸菌感染症のなかでもとりわけ *M. avium* 感染の際の選択的サイトカイン誘導に深く関わっており、とくに IFN- $\gamma$  と IL-12 が選択的に誘導されることが感染抵抗性の発現に重要ではないかと考えられた。今年度の研究ではさらに、マウスの骨髄由来マクロファージに *M. bovis* BCG を感染させるとアポトーシスが生じること、アポトーシスは、*Bcg<sup>s</sup>* マクロファージに比べ *Bcg<sup>r</sup>* マクロファージにおいて生じやすいことが明らかとなった。*M. avium* 感染系ではアポトーシスは生じなかった。

### A. 研究目的

マクロファージは免疫応答をはじめ、微生物の殺菌や腫瘍細胞の増殖抑制のエフェクターとして、また組織修復をはじめ生体のホメオスタシスにとって重要な役割を果たしている。マクロファージはまた細胞内寄生性病原体（抗酸菌、サルモネラ菌、リーシュマニアなど）による感染症における防御機構に重要な役割を果たしているが、その機能の一部は自然抵抗性関連マクロファージ蛋白 (NRAMP) と密接な関わりをもっている。NRAMP は *Nramp-1* (*Bcg*) 遺伝子がコードする糖タンパクであり、塩基配列からは多くの原核

生物や真核生物の細胞膜上にある輸送システムに関連した蛋白と類似構造をしていると推定され、マクロファージ特異的膜輸送機能を担っているのではないかと考えられている。マウス腹腔マクロファージや GM-CSF や M-CSF で増殖させた骨髄マクロファージに *in vitro* で抗酸菌を感染させた場合にみられる抗菌活性は *Nramp-1* 遺伝子の作用と考えられている<sup>2)</sup>。もっとも肺胞マクロファージを用いた感染実験では抗菌活性がほとんどみられないことから、抵抗性 (*Nramp-1<sup>r</sup>*) 由来のマクロファージであったとしても、その形質発現には細胞がある程度の成熟

段階に達するか、外界から何らかの刺激が必要であることを示している。抗酸菌が感染したマクロファージからは様々なサイトカインが産生されるがこれらは宿主抵抗性と深く係わっており、これらサイトカインの種類と量は感染の行方を左右する重要な要因となると考えられる。これまでに我々は感受性の遺伝形質 (*Bcg<sup>s</sup>*) をもつ C57BL/6 マウスに抵抗性マウス由来の *Nramp-1* 遺伝子を導入した *Nramp-1* コンジェニックマウス (*Bcg<sup>r</sup>*) を作成し、同遺伝子が *M.avium* をはじめとする非定型抗酸菌や弱毒結核菌 (*M.tuberculosis* H37Ra) などの実験感染に対し、初期の自然抵抗性発現のみならず獲得抵抗性にも関与していることをあきらかにしてきた<sup>13)</sup>。今回はこの研究では、*M.avium* 感染時にマクロファージから産生される IL-12 ならびに IL-10 量が両マウスでは異なっており、これらサイトカイン産生もまた *Nramp-1* 遺伝子の影響を受けることが分かった。さらにマウスマクロファージに人型結核菌強毒株 (H37Rv) が感染した場合に産生される IL-10 ならびに IL-12 を測定し、これらサイトカインと *Nramp-1* との関係をしらべた。また *Bcg<sup>s</sup>*、*Bcg<sup>r</sup>* 両マウスに *M.avium* を感染させ *in vivo* 及び *in vitro* におけるサイトカイン産生に及ぼす *Nramp-1* 遺伝子の影響を調べた。IFN- $\gamma$  は CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、NK 細胞などから産生され、マクロファージに対して細胞内寄生菌の増殖を抑制または殺菌する作用をはじめ多彩な活性作用を示す。IFN- $\gamma$  刺激による殺菌機能をはじめ LPS との共刺激により放出される窒素酸化物 (NO) などの殺菌物質産生能、MHC クラス II 分子の細胞表層における発現などいずれも *Bcg<sup>r</sup>* マクロファージのほうが *Bcg<sup>s</sup>* よりも強いという報告<sup>10)</sup>、ファゴソーム膜上に豊富にあるとされる NRAMP 自身もまた IFN- $\gamma$  や LPS 刺激によって発現が増強されるとする最近の報告<sup>11)</sup>などは生体における *Nramp-1* 遺伝子の機能に IFN- $\gamma$  をはじめとしたサイトカインの影響が無視できないことを示唆している。そこで今回我々は、骨髄由来および腹腔浸出性マクロファージを用いた *in vitro* の抗酸菌感染モデルにお

いて、マクロファージを *M.avium* または *M.tuberculosis* で活性化させた場合に産生されるサイトカインについて分析を試みた。

## B. 研究方法

**マウス:** 日本クレア株式会社から購入した近交系マウス C57BL/6N (*Bcg<sup>s</sup>*) と自家繁殖させた同系統の *Bcg* コンジェニックマウス (*Bcg<sup>r</sup>*) を実験に用いた<sup>13)</sup>。

**細菌:** サイトカイン誘導実験には *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 (日水製薬、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菌し実験に用いた。

**骨髄由来マクロファージの増殖:** 正常マウスの大腿骨骨髄を取り出し細胞浮遊液とした。その非付着性細胞を子牛血清 (CS) および M-CSF を各 10% に添加した RPMI1640 で 5 日間培養を行い、付着増殖した細胞を骨髄由来マクロファージとして実験に供した。

**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。これとは別に感染マウス臓器中に含まれるサイトカイン量の測定も試みた。この実験は *M.avium* 感染マウスについてのみ行った。感染後所定の時期に脾臓を採取し、冷 RPMI1640 培地を加えて 10 倍量の臓器乳剤を作成し、直ちに冷却遠心器にて遠心 (3,000 rpm, 10 min)、上清中に含まれるサイトカイン量を調べた。

**ELISA によるサイトカインの定量:** 回収した各

サンプル中の IL-12、IL-10、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-6 量をそれぞれの ELISA Kit (Biosource International, Camarillo, CA) を用いて定量した。所定のマニュアルに従ってアッセイをおこない、マイクロプレートリーダーにより波長 450nm の吸光度を測定した。

**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- $\gamma$ の影響**：24 ウェルマイクロプレート(Nunclon, USA)底にマクロファージ  $5 \times 10^5$ /ml を付着させ、そこに  $1 \times 10^7$ CFU/ml に調整した菌液を 500 $\mu$ 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。recombinant murine IFN- $\gamma$  (Pepro Teck Ec LTD, England, 以下 rmIFN- $\gamma$ ) は 500U/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。

**骨髄由来マクロファージによる菌の貪食**：24 ウェルマイクロプレート (Nunclon, USA) に骨髄由来マクロファージ  $1 \times 10^6$ /ml をプレーティングし、5%CO<sub>2</sub> フ卵器で数時間培養し、細胞を付着させた。菌液は溶解後直ちに遠心 (3,000rpm、20分) して上清を除き、 $1 \times 10^7$ CFU/ml に調整し、その 500 $\mu$ l を接種して感染させ、5%CO<sub>2</sub> フ卵器で 1 時間培養した。温めた PBS(-) で 3 回洗浄、0.05% Triton-X で細胞を溶解し、溶解液をエッペンデルフチューブにて、-80°C で保存した。サンプルは解凍後、10 倍段階希釈し、0.05ml ずつ 10%OADC 添加 Middlebrook 7H10 寒天平板培地に接種、37°C 1 週間以上培養後、形成されたコロニー数を数えた。

**M. bovis BCG 感染による形態的変化の観察**：Chamber slide (LAB-TEK) に  $1 \times 10^6$ /ml に調節した細胞を 1 ウェルあたり 200 $\mu$ l プレーティングした。その後、5%CO<sub>2</sub> フ卵器で一晩培養により、細胞を付着させ、 $1 \times 10^7$ CFU/ml に調節した菌を 200 $\mu$ l 接種した。6 時間、18 時間、24

時間の 3 条件で培養後、ディフ・クイック (国際試薬株式会社、神戸) にて染色、細胞形態を観察した。

**DNA ラダー(DNA fragmentation) の検出**： $5 \times 10^6$  の骨髄マクロファージに  $5 \times 10^7$ CFU の菌をシャーレ内で感染させ、5%CO<sub>2</sub> フ卵器で 24 時間培養した。その後、細胞を冷 PBS(-) で 3 回洗浄後、付着細胞をラバーポリスマンでかきとり、あらかじめ回収しておいた培養液とあわせ、1,500rpm で 10 分遠心後、細胞沈査を冷 PBS(-) で再び洗った。その沈査を 500 $\mu$ l の lysis buffer[0.5%Triton X、20mM EDTA、5mM Tris-HCl(pH8.0)] にとかし、氷中で 15 分間静置した。細胞溶液を 1.5ml のエッペンデルフチューブに移し、フェノール/クロロホルム処理を 3 回行い低分子量の DNA を抽出した。1,000 $\mu$ l のエタノールを加え、-20°C で over night 放置した。翌日、55 $\mu$ l の 5M LiCl を加え、14,000rpm、30 分間、4°C で遠心し、DNA を沈澱させ、上清を捨て、真空ポンプで 5 分間、DNA ペレットを乾燥させた。DNA ペレットに 15 $\mu$ l の RNaseA(0.05g/l. final concentration TE) を加え、37°C で 1~2 時間反応させた。溶液を 13,000rpm、5 分間遠心し、10 $\mu$ l の上清を 2.0% のアガロースゲル[エチジウムプロマイド (10 mg/ml) 添加：7 $\mu$ l / 100ml] で電気泳動後、UV 照射下で観察した。

**Terminal deoxynucleotide transferase (TdT) dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL) 法によるアポトーシスの検出**：スライドガラス付きディッシュ (Glass Bottom Microwell Dishes, 35mm dish, Mat Tek Corporation) に  $1 \times 10^6$ /ml に調節した細胞浮遊液 1ml を接種した。5% フ卵器で細胞を付着させた後菌を接種し、5%CO<sub>2</sub> フ卵器で 18 時間培養した。培養液を吸引除去し、10%ホルマリン PBS で細胞を固定後 70%EtOH に浸した。TUNEL assay には、Genzyme TACS in situ Apoptosis Detection Kit を使い、DNA 切断端は streptoavidin-fluorescein で蛍光標識 (緑色) した。共焦点レーザー顕微鏡下で、観察、アポトーシス細胞の割合を求めた。propidium

iodide(PI)で back ground を染色 (赤色) し、アポトーシス細胞は黄色で検出されるようにした。

## C. 研究結果

### *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<sup>s</sup> と Bcg<sup>r</sup> 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<sup>r</sup> のほうが Bcg<sup>s</sup> に比べて有意に高いレベルを示した (Fig.1A&B)。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<sup>s</sup> と Bcg<sup>r</sup> 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 (Fig.1C&D)。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- $\gamma$ 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- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\gamma$  処理された両マクロファージともにほぼ同数の生菌 (Bcg<sup>s</sup> 6.26 $\pm$ 0.06、Bcg<sup>r</sup> 6.27 $\pm$ 0.03) を取り込んでおり、無処理対照群 (Bcg<sup>s</sup> 6.35 $\pm$ 0.06 Bcg<sup>r</sup> 6.33 $\pm$ 0.09) に比べて貪食された菌数はやや少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- $\gamma$  存在下で培養をおこない細胞内菌数を測定した。IFN- $\gamma$  処理しない対照群は Bcg<sup>s</sup> 6.51 $\pm$ 0.12、Bcg<sup>r</sup> 6.21 $\pm$ 0.06 であり、両者間に有意差が認められた。また IFN- $\gamma$  処理群は Bcg<sup>s</sup> 6.22 $\pm$ 0.07、Bcg<sup>r</sup>

5.78 $\pm$ 0.04 で、IFN- $\gamma$  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<sup>s</sup> 5.98 $\pm$ 0.02、Bcg<sup>r</sup> 5.90 $\pm$ 0.02 であった。また No.38 株を感染させた場合、Bcg<sup>s</sup> 5.88 $\pm$ 0.11、Bcg<sup>r</sup> 5.98 $\pm$ 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- $\gamma$  処置群の菌数も対照群とほぼ同程度で、IFN- $\gamma$  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- $\gamma$ 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<sup>s</sup> 5.75 $\pm$ 0.13、Bcg<sup>r</sup> 5.76 $\pm$ 0.06 であり、両者に違いはみられなかった。5 日目には Bcg<sup>s</sup> 6.25 $\pm$ 0.11、Bcg<sup>r</sup> 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<sup>s</sup> の菌数と Bcg<sup>r</sup> 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- $\gamma$  処理したグループの菌数は Bcg<sup>s</sup> 5.95 $\pm$ 0.14、Bcg<sup>r</sup> 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<sup>s</sup>、Bcg<sup>r</sup> 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- $\gamma$ 産生

正常マウスから脾臓を取り出し 5 $\times$ 10<sup>6</sup>/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<sup>6</sup>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- $\gamma$  の量を測定した。24 時間から 48 時間目にかけて Bcg<sup>r</sup> 脾細胞は多くの IFN- $\gamma$  を産生し Bcg<sup>s</sup> のそれを上回った。72 時間後においても Bcg<sup>r</sup> では Bcg<sup>s</sup> よりも多くの IFN- $\gamma$  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



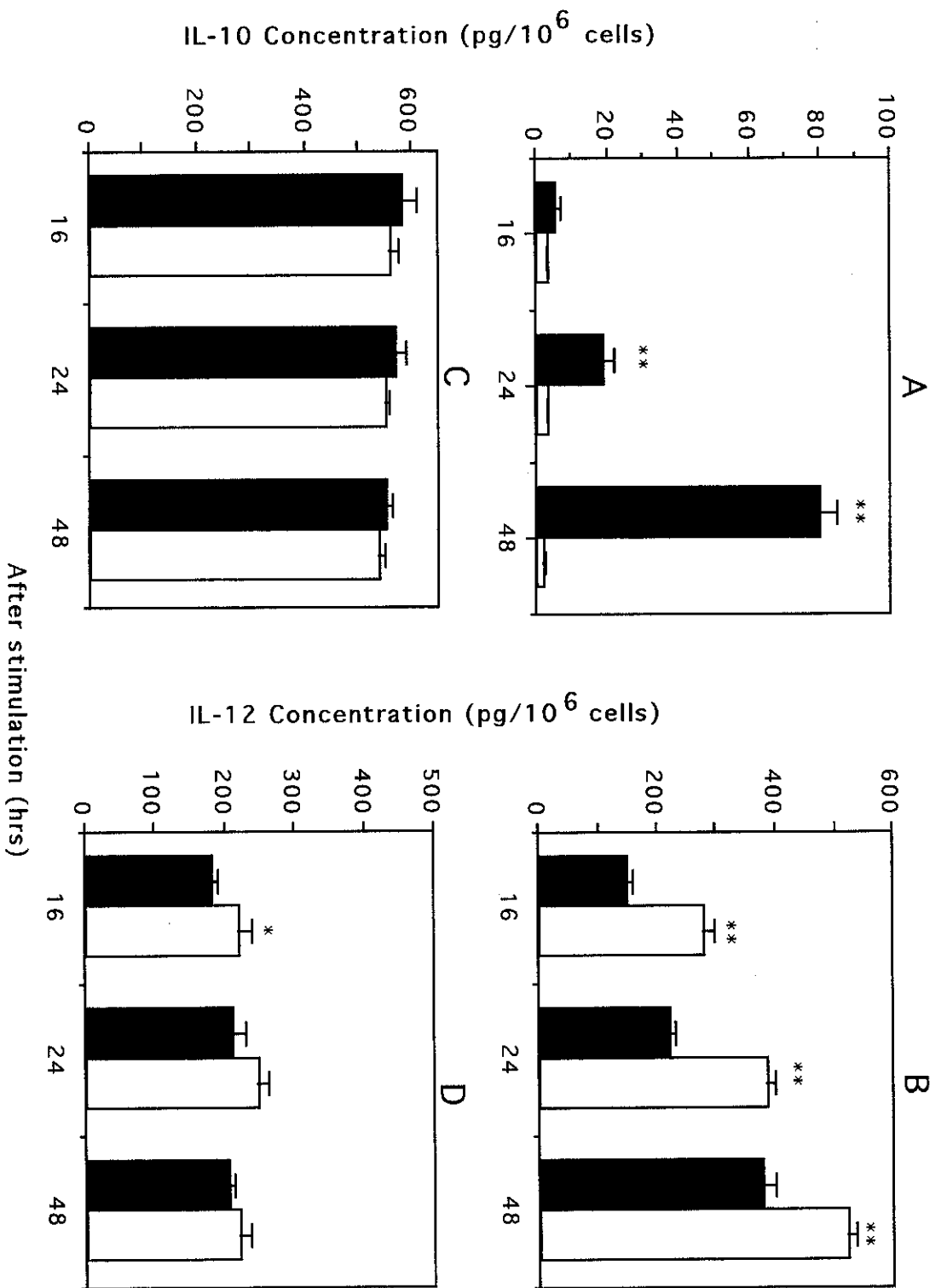


Fig. 1. IL-10 (panel A and C) and IL-12 (panel B and D) production in Bcg<sup>S</sup> (■) and Bcg<sup>T</sup> (□) BM macrophages. Cultured macrophages were stimulated with *M. avium* Mino (A and B) or *M. tuberculosis* H37Rv (C and D) respectively, and supernatants were collected at indicated times, then the amounts of cytokines were assayed by ELISA. Each bar represents mean ± standard deviation of three samples. \*\* p < 0.01, \* p < 0.05

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<sup>r</sup> 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<sup>s</sup> 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<sup>r</sup> では感染初期から Bcg<sup>s</sup> 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<sup>r</sup> 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 deoxynucleotidyl 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<sup>s</sup> マクロファージでは 3.95%、Bcg<sup>r</sup> マクロファージでは 7.16% であり、Bcg<sup>s</sup> 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<sup>s</sup> マクロファージでは 11.20%、Bcg<sup>r</sup> マクロファージでは 79.87% であり、Bcg<sup>s</sup> 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- $\alpha$ 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<sup>s</sup> マクロファージでの産生量は、10<sup>5</sup> cells あたり 3.260 $\pm$ 0.043 U (Log<sub>10</sub>) であり、Bcg<sup>r</sup> マクロファージの 2.939 $\pm$

0.058 U に比べ、有意に多くの TNF- $\alpha$  が産生されていた (p<0.05)。非感染のコントロールでは、TNF- $\alpha$  は産生されなかった。

#### 骨髄由来マクロファージによる NO<sub>2</sub>-産生

*M.bovis* BCG 感染後 24 時間目の NO<sub>2</sub>-産生量を測定した。非感染のコントロールでは、Bcg<sup>s</sup> マクロファージが 1.747  $\mu$ M、Bcg<sup>r</sup> 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<sup>s</sup> マクロファージが 3.954  $\mu$ M でコントロールの 2.26 倍、Bcg<sup>r</sup> 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 NO<sub>2</sub>-が産生され、またその量は Bcg<sup>s</sup> マクロファージの方が多かった (p<0.01)。

#### D. 考察

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ない<sup>8)</sup> 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<sup>s</sup> と Bcg<sup>r</sup> 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るといわれるが<sup>3,7)</sup>、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- $\gamma$ の量が Bcg<sup>s</sup>と Bcg<sup>r</sup>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- $\gamma$ 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<sup>1)</sup>。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- $\gamma$ mRNA の発現量は、Bcg<sup>s</sup> マウスに比べ Bcg<sup>r</sup> 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- $\gamma$  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、菌食能試験では、IFN- $\gamma$ 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- $\gamma$ 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<sup>s</sup>、Bcg<sup>r</sup> 両マウスマクロファージ内で同じように増殖し、IFN- $\gamma$ 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、抑制率に限っていえば、Bcg<sup>s</sup>と Bcg<sup>r</sup>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- $\gamma$ 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(NO<sup>2</sup>)は、IFN- $\gamma$ 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<sup>s</sup>マウスと Bcg<sup>r</sup>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- $\gamma$ 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 NO<sup>2</sup>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- $\gamma$ 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- $\gamma$ 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- $\gamma$ 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<sup>s</sup>に比べ、Bcg<sup>r</sup>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<sup>s</sup>および Bcg<sup>r</sup>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<sup>9)</sup>があるが、それによれば H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sup>6)</sup>。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<sup>11)</sup>。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<sup>s</sup> マクロファージに比べ Bcg<sup>r</sup> 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- $\alpha$  により誘導される NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の毒性作用の結果であると報告している<sup>11)</sup>。今回の我々の実験においても、Bcg<sup>s</sup> マクロファージに比べ Bcg<sup>r</sup> 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- $\alpha$  と NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の産生量を調べたところ、Bcg<sup>s</sup> マクロファージのほうが Bcg<sup>r</sup> 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- $\alpha$  および NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 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<sub>2</sub><sup>-</sup> 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<sub>2</sub><sup>-</sup> 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<sup>5)</sup>。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からない。Fratuzzi 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<sup>4)</sup>。また、Rojas らは、アポトーシスと *Nramp* 遺伝子に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- $\alpha$  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<sup>12)</sup>。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。

## E. 引用文献

1. Akinson, P.G.P, et al. 1997. *Nramp1* locus encodes a 65kDa interferon- $\gamma$  inducible protein in murine macrophages. *Biochem.J.* 325:779.
2. Denis M. 1991. Colony-stimulating factors increase resistance to atypical mycobacteria in resistant mice, whereas they decrease resistance in susceptible strains of mice. *J.Leukocyto Biol.* 50:296.
3. Flesch I.E, et al. 1995. Early interleukin 12 production by macrophages in response to