

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

免疫工学室長

研究要旨

ヒト単球より M-CSF 及び GM-CSF で誘導した、M-Mφ 及び GM-Mφ の結核菌 H37RV に対する殺菌能を検討した結果、ヒト肺胞 Mφ に形質が似ている GM-Mφ は、結核菌の増殖の場として作用すること、また M-Mφ は、結核菌の殺菌を促すことを見つけた。H₂O₂ や NO は、M-Mφ の殺菌能とは関連しなかった。しかし、マウスの BCG 感染に対する自然抵抗性を規定している Nramp1 遺伝子のヒトホモログである NRAMP1 遺伝子の mRNA は、M-Mφ で発現していたが、GM-Mφ では発現が認められなかったことより、NRAMP1 遺伝子の発現の違いが両 Mφ における殺菌活性の違いと関連する可能性が示唆された。

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。ヒト単球、マクロファージにおける結核菌の増殖と殺菌を制御する機構を解明し、殺菌作用を増強する方法を見つけることは、結核の治療への応用に有用である。我々は、ヒト単球を M-CSF 及び GM-CSF などのコロニー刺激因子 (CSF) で培養することにより形態、細胞表面マーカーの発現 (CD14 の発現の有無等) 及び機能 (HIV 感染感受性、活性酸素産生能、抗原呈示機能等) の異なる 2 種類のマクロファージへの分化が誘導されることを報告した。

昨年度、マクロファージの結核菌に対する増殖及び殺菌機構の解明をめざす一端として、

これらヒト単球由来マクロファージの BCG 及び患者由来 *M. avium* に対する感染感受性を検討した。その結果、ヒト単球由来 GM-Mφ は、患者由来 *M. avium* の増殖の場として作用すること、しかし M-Mφ は増殖抑制活性が強いことが知られた。一方、BCG はその毒力が弱いことと一致して M-Mφ では殺菌され、また GM-Mφ でもあまり増殖を認めなかった。

今年度は、これらヒト単球由来マクロファージの結核菌 H37Rv に対する感染感受性を検討すると共に、マクロファージの感染感受性の違いが何に由来するか、マウスの BCG 感染感受性を規定している自然抵抗性遺伝子

(Nramp1) のヒトホモログである NRAMP1 遺伝子の発現や、マウスマクロファージの結核菌に対するエフェクター分子として知られている NO や、ヒト単球内の結核菌の殺菌を誘導することが知られている H₂O₂ との関連な

どについて検討した。

B. 研究方法

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 (500U/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-Mφ 及び GM-Mφ と以後称する。

結核菌 H37Rv を、マクロファージに moi 1 で感染させ、5-7 日間培養後、マクロファージ内外の生菌数を OADC 添加 Middle brook 7H10 寒天平板培地に接種、CFU 数を数え測定した。一部の実験においては、感染 3 時間で細胞外の菌を洗浄除去後、さらに 6 日間培養した。

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。

NO 産生は、グリース試薬で測定した。

C. 結果

ヒト単球由来 GM-Mφ 及び M-Mφ に H37Rv を感染させ、5-7 日後の細胞外及び細胞内菌数を CFU にて測定した結果、M-Mφ では、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-Mφ では、細胞内外で結核菌の増殖が強く認められ感染時菌数を大幅に上回る菌数 (数倍から 10 数倍) が回収された。感染 3 時間後に細胞外の結核菌を洗いのぞき細胞内に取り込まれた結核菌数を測定したところ、その数は、両マクロファージでほぼ同じであったが、その後の培養により、GM-Mφ では

菌数の著明な増加を認めたが、M-Mφ では殺菌され減少した。

M-Mφ の結核菌殺菌能は、500-1000 U/ml のカタラーゼ添加でも変化しなかった。結核菌感染マクロファージの培養上清中の NO 量を測定した結果、いずれのマクロファージでもわずかしか産生されなかったが、菌の増殖が強く認められる GM-Mφ の方が時間と共に増加する事が知られた。また、結核菌単独培養上清中にも NO 産生が認められた。NRAMP1 mRNA の発現を検討した結果、M-Mφ では認められたが GM-Mφ では認められなかった。

D. 考察

今回ヒト単球由来マクロファージを用いて結核菌の増殖について検討した結果、M-Mφ は殺菌を GM-Mφ は増殖を誘導することを認めた。GM-Mφ は、ヒトの肺胞マクロファージに似た形質であることを既に述べたが、このマクロファージで、結核菌の増殖が強いことは、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。

M-Mφ の結核菌の殺菌作用は、NO とは関係ないことが知られた。マウスではマクロファージの結核菌殺菌機構として、iNOS の活性化と NO 産生が重要なことが、報告されているが、今回の結果は、必ずしもヒトとマウスのマクロファージの殺菌機構は同じでないことを示している。

一方、M-Mφ は GM-Mφ に比べ高い H₂O₂ 産生能を有すること、また H₂O₂ は結核菌の殺菌を促すことも知られているが、カタラーゼ添加でも M-Mφ の結核菌殺菌能はほとんど影響されなかったことより NO 同様 H₂O₂ も M-Mφ の殺菌活性とは関連しないことが知られた。

マウスでは Nramp1 遺伝子の発現は BCG の感染感受性とは関連するが、結核菌の感受性とは関連しないことが報告されている。しかし本実験において結核菌の感染感受性の異

なる M-Mφ と GM-Mφ で NRAMP1 の遺伝子発現が異なることが知られたことは、ヒトの結核感染感受性とヒトの NRAMP1 遺伝子の発現は関連する事が示唆された。NRAMP1 遺伝子のプロモータには多様性があることが知られているが、それらの多様性とヒトの結核感受性との関連する可能性を示唆する患者の解析結果が、世界的にもいくつか報告されており、また日本の結核患者を用いた解析からも報告された。今後、M-Mφ の殺菌機構の解明及び NRAMP1 遺伝子との関連、また、GM-Mφ における結核菌の増殖をどうしたら抑制できるかの検討が必要である。

E. 結論

ヒト単球由来 M-Mφ は結核菌の殺菌を誘導すること、しかし GM-Mφ は逆に結核菌の増殖を促すことが知られた。M-Mφ の結核菌殺菌活性は H₂O₂ や NO によらないこと、また M-Mφ と GM-Mφ では NRAMP1 の遺伝子発現が異なることから、M-Mφ の結核菌感染抵抗性はこの遺伝子発現と関連する可能性が示唆された。

F. 研究発表

誌上発表

1. Akagawa, K.S., Komuro, I., Yamazaki, T., and Haga, S.: M-CSF-but not GM-CSF induced human monocyte-derived macrophages inhibit growth of *M. tuberculosis*. Proceedings of Thirty-fourth U.S. -Japan Tuberculosis and Leprosy Research Conference, p. 115-118, 2000.

2. 赤川清子：結核の免疫、Pharma Medica Vol. 18 (10): 19-25, 2000

3. 赤川清子、小室 巖、持田恵子：単球由来マクロファージの多様性、炎症と免疫 Vol. 8 360-366, 2000

4. 持田恵子、赤川清子：結核菌特異的キラー T細胞誘導における抗原提示細胞 臨床免疫 33, 18-23, 2000

学会発表

1. 赤川清子、山崎利雄、芳賀伸治：ヒト単球由来マクロファージの BCG 及び *Mycobacterium avium* 感染感受性、第 75 回日本結核病学会、大阪市、2000 年 4 月。

2. Akagawa, K.S., Komuro, I., Yamazaki, T., and Haga, S.: M-CSF-but not GM-CSF-induced human monocyte-derived macrophages inhibit growth of *M. tuberculosis*. US-Japan cooperative medical science program 35th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. Yokoham, July 2000.

3. 赤川清子：リンパ網内系細胞の多様性と生体防御 - ヒト単球由来マクロファージの多様性を中心に、第 40 回日本リンパ網内系学会総会シンポジウム“リンパ網内系と生体防御”浜松市、2000 年 8 月

4. 赤川清子、小室巖、岸 文雄：ヒト単球由来マクロファージの結核菌の増殖及び増殖抑制機構の解明、第 30 回日本免疫学会総会、仙台市、2000 年 11 月

5. 川野英治、小室巖、赤川清子：ヒト単球由来マクロファージにおける NO 産生能について、第 30 回日本免疫学会総会、仙台市、2000 年 11 月

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

昨年に引き続きモルモット系統間における結核菌感染に対する応答の差異を検討したところ次に示す成績及び結論が得られた。すなわち、Hartley は炎症反応を強めることで菌の増殖伝搬を防ぎ、Strain 13 は炎症反応はあまり強くないが菌の増殖伝搬を防ぐことができ、Strain 2 は炎症反応があまり強くない、菌の増殖伝搬を防ぎきれないことが観察された。これらの成績と PPD ツベルクリン反応の成績がきわめてよく相関していた。なお、噴霧感染群でも同様の傾向であった。Hartley はもとより Strain 2、Strain 13 は結核研究においてきわめて有用な実験動物であることが実証された

A. 研究目的

昨年に引き続きモルモット系統間における結核菌感染に対する応答の差異を検討した。特に、菌の感染ルートが皮下や経気道と異なる場合に、感染局所での菌の増殖及びリンパ節や脾臓への菌の伝搬の程度、結節や膿瘍形成、PPD によるツベルクリン反応について観察した。

B. 研究方法

近交系モルモット Strain2(#2), Strain13(#13), 又は Hartley(Ha.) (日本 SLC から入手) に結核菌 H37Rv 5×10^6 CFU を左側下腹部皮下に注射、5週目に皮膚テストを行った後剖検した。感染部位の膿瘍形成は1週間毎に観察し、デジタルカメラで記録した。摘出した肺は PBS で洗浄後平底シャーレに入れ、表面をエブソンスキャナー ES2000 を用いて観察記録した。この方法で直径 0.1mm の大きさの結節も識別できる。記録した画像は P3 動物実験室内のパソコン及び所内ネットワークを経由してそのつど我々のオフィスへ転送した。経気道感染には Glas-Col 社製エアロゾル噴霧感染装置を用い、H37Rv 単個菌 7×10^4 CFU/ml を 2.5ml 噴霧した。肺当たりの感染菌数は計算値で 90CFU と推定した。感染 5週目に皮膚テストを行った後剖検した。解剖は安全キャビネット内で行い、キャビネット内に設置したデジタルカメラで記録した画像はオフィスへ転送した。なお、このカメラを通じてリアルタ

イムに所内各所へ解剖の様子を中継でき、共同研究者から解剖中にコメントや支援を受けられるようにした。各臓器からの回収した結核菌は小川培地で還元培養した。

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

皮下感染群(各群 5 匹)の各臓器から回収された平均菌数(log10CFU)は脾臓(#2:5.5, #13:2.9, Ha:3.6)、鼠蹊リンパ節(#2:5.4, #13:5.3, Ha:5.3)、肺(#2:4.0, #13:2.9, Ha:1.3)であった。臓器重量(g)は脾臓(#2:1.7, #13:0.8, Ha:2.1)、肺(#2:3.4, #13: 4.1, Ha:3.2)で、鼠蹊リンパ節左の大きさ (スコア;+3:大豆大,+4:空豆大)は#2:+3, #13:+3, Ha:+4 であった。感染 3 週目の膿瘍の大きさ(長径× 短径; mm×mm)は #2(6.7× 7.0), #13(11×5.9), Ha(19. ×7.7)であった。PPD 反応(直径 mm)は#2:5.8, #13:8.9, Ha:15 となった。噴霧感染群(各群 3 匹)の各臓器から回収された平均菌数(log10CFU)は肺(#2:5.0, #13:4.8, Ha:4.8)、肺門リンパ節(#2:5.3, #13:5.2, Ha:5.2)、脾臓(#2:4.8, #13:2.3, Ha:3.4) であった。臓器重量(g)は肺(#2:2.4, #13: 2.9, Ha:4.2)、肺門リンパ節(#2:1.2 #13:1.3, Ha:2.5)、脾臓(#2:1.3, #13:0.8, Ha:1.4)であった。肺表面の結節数(直径 3mm 以上の大きさ

のものは#2:23(8), #13:17(8), Ha.:34(8), PPD 反応 (mm)は#2:6.0, #13:12.5, Ha:18 となった。

D. 考察

皮下感染による局所の膿瘍形成はHa:強, #13:中, #2:弱と系統間の差が顕著で、同様に PPD 反応も Ha:強, #13:中, #2:弱となり、膿瘍と PPD 反応の強弱に強い相関が見られた。また、菌の各臓器からの回収は感染部位近くの鼠蹊リンパ節では系統間で差はないものの、遠隔部位の脾臓・肺では Ha:中, #13:小, #2:多となり、特に脾臓では#2 は#13 より 400 倍の菌が回収された。噴霧感染の場合も同様の傾向が認められ、PPD 応答が弱い#2 は脾臓から回収された菌数が#13 の 300 倍となった。これらのモルモットは BCG 接種により誘導される PPD 反応も Ha:強, #13:中, #2:弱となることが観察されている。Hartley はもとより Strain 2、Strain 13 は結核研究においてきわめて有用なモルモットであることが改めて実証された。一方、ヒトにおいても BCG 接種後に PPD への応答性の差が見られることから、今後これらモルモット間の遺伝的背景がゲノム解析などにより明らかになれば、ヒトでの結核菌への感受性の差異を示す因子の同定などに役立つと考えられる。

E. 結論

Hartley は炎症反応を強めることで菌の増殖伝搬を防ぎ、Strain 13 は炎症反応はあまり強くないが菌の増殖伝搬を防ぐことができ、Strain 2 は炎症反応があまり強くない、菌の増殖伝搬を防ぎきれないことが観察された。これらの成績と PPD ツベルクリン反応の成績がきわめてよく相関していた。なお、噴霧感染群でも同様の傾向であった。Hartley はもとより Strain 2、Strain 13 は結核研究においてきわめて有用な実験動物であることが実証された

F. 研究発表

1 論文

Tsuyoshi Yamazaki, Toshio Yamazaki, Kiyoko Akagawa, Toshihiko Asano, Mitsuo Honda, Shinji Haga (2001) Different immune responses induced in Strain 2 & 13 inbred guinea pigs, challenged with *Mycobacterium tuberculosis* via respiratory and intradermal route. J.Leukoc.Biol. submitted.

2 学会

1. 芳賀伸治・山崎剛・山崎利雄・赤川清子
結核感染近交系モルモット Strain 2、Strain 13 又は Hartley における脾臓、肺臓、リンパ節の還元培養菌数及び皮膚反応など遅延型過敏反応の差異について
第 76 回日本結核病学会総会、2001 年 4 月、沖縄。

2. 山崎剛・山崎利雄・赤川清子・浅野敏彦・本多三男・芳賀伸治
近交系モルモット Strain2, Strain13, Hartley における結核菌感染に対する応答性の差異
第 71 回実験結核研究会総会、2001 年 4 月、沖縄。

3. 芳賀伸治・山崎剛・山崎利雄・山本三郎・赤川清子・本多三男
BCG-Tokyo 株免疫モルモットの結核菌経気道噴霧感染法による結核防御効果の評価
第 71 回実験結核研究会総会、2001 年 4 月、沖縄。

4. 結核菌濃厚感染に対する BCG ワクチンの防御効果
山崎剛・山崎利雄・山本三郎・芳賀伸治
第 76 回日本結核病学会総会、2001 年 4 月、沖縄。

5. BCG の皮下及び経気道接種による結核菌噴霧感染への防御効果
山崎剛・山崎利雄・赤川清子・芳賀伸治
第 74 回日本細菌学会総会、2001 年 4 月、岡山。

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

結核菌感染における好中球、NK細胞、NKT細胞の役割

分担研究者 菅原 勇 （財）結核予防会結核研究所 分子病理学科科長

研究要旨

結核菌感染過程における好中球、NK細胞、NKT細胞が果たしている役割は、まだ十分に解明されているとは言い難い。本研究は、これら細胞の役割に焦点を当てた。好中球除去ラット、ベージュマウス、NKT欠損マウスを結核菌でエアロソール感染させた。肺病変の程度を野生ラット、マウスと比較検討した。好中球除去ラットとNKT欠損マウスでは結核菌誘導肉芽腫性病変が、より顕著だったが、ベージュマウスでは有意差が認められなかった。

A. 研究目的

B. 結核菌感染発病過程における好中球、NK細胞、NKT細胞の役割を明らかにする。明らかにすることにより、結核治療に対する効果的治療の基礎データを得る。

B. 研究方法

抗ラット好中球モノクローナル中和抗体を結核菌エアロソール感染直後3日間連続腹腔投与した。ベージュマウス、NKT欠損マウス（千葉大学医学部谷口研究室で作製）を同様に結核菌でエアロソール感染させた。

7週後、動物を麻酔薬で安楽死させた後、肺、脾、肝、腎、リンパ組織標本を作製して病変の程度を調べた。同時に、肺、脾組織をすりつぶして、組織内結核菌を4週間7H10上で培養することによりCFUの形で算定した。

C. 研究結果

好中球除去マウスでは好中球が6分の1以下に低下した。結核菌感染好中球除去マウスの肺肉芽腫病変の程度は、結核菌

も好中球除去マウスで有意に高かった。結核菌感染NKT欠損マウスの肺病変は対照マウスより、有意に大きかった。結核菌感染脾細胞は野生マウス由来脾細胞より少なくIFN- γ を産生した。肺内CFUもNKT欠損マウスの方が大であった。これに対してNK細胞の機能に欠陥のあるベージュマウスの肺病変は、野生マウスと有意差がなかった。脾細胞によるIFN- γ 産生も野生マウス由来脾細胞レベルと差が見られなかった。肺内CFUも野生マウスと有意差がなかった。

D. 考察

本研究で、好中球除去マウスとNKT欠損マウスで肺病変が、結核菌感染により悪化した。従って結核の進展に好中球とNKT細胞が何らかの役割を果たしていることが推察される。従来、結核における好中球の役割について賛否両論がある。好中球が結核初期に重要な役割を果たしていることが判明したので、好中球を賦活化させることにより結核の進展を

ある程度くい止められるかもしれない。

NK細胞に異常のあるベージュマウスでは、肺肉芽腫病変に有意な差は見られなかった。このマウスでは、TH1,NKTより十分なIFN- γ が産生されるために豹変に差がないのだろう。

E. 結論

結核の進展に好中球、NKTは一定の役割を担うが、NK細胞はそれほどの役割を果たさない。

F. 研究発表

1. 菅原 勇、山田博之、大友幸二、青木俊明、水野悟、宇田川忠：

自動吸入暴露感染装置を用いた実験的結核モデル確立のための最適条件とその応用例。Kekkaku, 75:463-469, 2000.

2. I. Sugawara, S. Mizuno, H. Yamada, M. Matsumoto and S. Akira:

Disruption of nuclear factor-IL6, a transcription factor, results in severe mycobacterial infection. Am. J. Pathol., 158:361-366, 2001.

3. H. 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., 80: 759-767, 2000.

4. I. Sugawara, H. Yamada, S. Mizuno, and Y. Iwakura: IL-4 is required for defense against mycobacterial infection. Microbiol. Immunol., 44:971-979, 2000.

5. K. Ohtomo, S. Wang, A. Masunaga, A. Iwamoto and I. Sugawara:

Secondary infections of AIDS autopsy cases in Japan with special emphasis on *Mycobacterium-avium-intracellulare* complex infection. Tohoku J. Exp. Med., 192:99-109, 2000.

6. I. Sugawara:

IL-18 and infectious diseases, with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens. Microbes Infect., 2:1257-1263, 2000.

平成 12 年度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

Mycobacterium intracellulare 感染マウスに誘導される
ナチュラルキラー細胞と *NRAMP-1* 遺伝子の役割

分担研究者 後藤 義孝 宮崎大学農学部助教授

Mycobacterium avium (*M. avium*) や *M. intracellulare* に感染したマウスは *NRAMP-1* 遺伝子型によりその運命が決定される。我々の感受性 (*Bcg^{s/s}*) と抵抗性 (*Bcg^{r/r}*) マウス実験モデルにおける感受性差は *NRAMP-1* 遺伝子上のわずか 1 塩基の違いに基づいている。同遺伝子の転写物 (mRNA) は感受性、抵抗性にかかわらず体内の諸臓器に分布するマクロファージにより発現し、LPS やサイトカイン刺激はその量的変化をもたらす。我々は両抗酸菌種を用いた *in vitro* 感染実験において、異なる *NRAMP-1* 遺伝形質をもつマクロファージ内での増殖パターンが異なることを見出した。すなわち *M. avium* は *Bcg^{s/s}* マウス由来マクロファージでのみ増殖がみられるのに対し、*M. intracellulare* では *Bcg^{r/r}* 由来のマクロファージでも感受性のそれと同様、菌増殖を許してしまうことが分かった。このことは *in vivo* でみられる感染初期抵抗性が単にマクロファージ内における菌増殖の差異によってのみ生じるものではないことを示している。*NRAMP-1* 遺伝子型の差はマウスの抗酸菌に対する免疫応答性のみならずマクロファージが産生するサイトカインにも種々の影響を及ぼす。*M. avium* 感染マウスにおけるサイトカインプロファイルと比較してみると、感染初期における 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 のマクロファージからの産生量が *Bcg^{s/s}* と *Bcg^{r/r}* とではかなり異なっていることが分かった。自然抵抗性に関連して、*NRAMP-1* 遺伝子型の異なる NK 細胞はネズミチフス菌の刺激に対して IFN- γ の産生能力が異なるという報告がなされている。そこで我々は *M. intracellulare* 感染における NK 細胞の働きと *NRAMP-1* 遺伝子との関係をしらべた。その結果、NK 細胞数は感染早期 (~48 時間) に有意に増加すること、*in vitro* における感染実験では感染後 12 ないし 48 時間で大量の IFN- γ 産生が誘導されることが分かった。ただしいずれも *NRAMP-1^{s/s}* マウスと *NRAMP-1^{r/r}* マウスとの間で有意差がみられなかった。*M. intracellulare* 感染症において NK 細胞は *NRAMP-1* 遺伝子型に関わらず IFN- γ を介した免疫応答に深くかかわっている可能性が強く示唆された。

非定型抗酸菌症は基礎肺疾患、糖尿病、白血病、あるいは高齢者の免疫低下に伴って発症する難治性かつ予後不良の日和見感染症であり、近年では AIDS 末期に発症する播種性非定型抗酸菌症が問題となっている。非定型抗酸菌症の原因菌は多種にわたり、ヒトでは *M. avium-intracellulare complex* が最も多く全体の 70% あまりを占め、次に *M. kansasii* が 20% あまり

を占めるとされている。MAC のなかでも *M. avium* は東日本で多く分離され、逆に *M. intracellulare* は西日本で多く分離される (非定型抗酸菌症対策委員会, 1998)。家畜においては経済上問題となるのはブタの非定型抗酸菌症であり、その原因菌のほとんどは *M. avium* である (岩切ら)。非定型抗酸菌症では肺、リンパ節、肝臓などに結核様病変が、ある

いは皮膚、リンパ節などに化膿巣、潰瘍などの病変が形成される。感染源は土壌、水（水道水）などであり、結核菌とは異なり、基本的にヒト-ヒト感染や家畜-ヒト、家畜-家畜感染は否定されている。しかし、最近いわゆる「24時間風呂」から *M. avium* が検出されたという報告もある（斎藤，2000）。以上のような社会的背景から非定型抗酸菌症は大きな問題となっている。

抗酸菌をはじめとする細胞内寄生性病原体に対する宿主の防御免疫において、特異的感作 Th1 細胞を中心とした細胞性免疫が重要な役割を果たしていることは良く知られている。まず菌を貪食したマクロファージは T 細胞への抗原提示や IL-10、IL-12、IL-18、IL-1 β 、TNF- α などのサイトカイン放出を通して T 細胞や NK 細胞などの免疫細胞を活性化し、その後特異的感作 Th1 細胞や NK 細胞からの IFN- γ 産生などを通じて最終的にマクロファージ殺菌能を亢進させ結核菌に対する抵抗性を増強する方向に働く。IFN- γ はマクロファージを活性化させる主要なサイトカインであり、CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、NK 細胞などから産生される IL-2 や IL-12 とともに細胞性免疫を制御するサイトカインである。また、それ以外の細胞に対しても MHC クラス I、II 分子の発現を高めたり、T 細胞や B 細胞に直接作用してその分化を促進し、好中球を活性化し NK 細胞の細胞障害活性を高めるなどの作用を示す。マウスを用いた抗酸菌感染症モデルにおいては T 細胞や NK 細胞から放出される IFN- γ が防御免疫において大きな役割を果たしていることが数多く報告されている。

抗酸菌感染にみられる細胞性免疫は、抗原となる菌に再び曝露されたときにより顕著に発現し、結核菌の再感染においては、感染早期における主要な IFN- γ 産生細胞群は T 細胞であり NK 細胞はむしろ T 細胞より産生量が低いと報告されている（Kemp ら，1997）。

抗酸菌に対する免疫応答としては細胞性免疫のほか自然免疫があり、そこでは NK 細胞

が大きな役割を果たしていることが近年の研究で次第に明らかにされてきた。NK 細胞は T 細胞における T 細胞受容体、B 細胞における免疫グロブリン受容体などの抗原受容体を発現せず、しかも特定の抗原刺激を受けない正常個体の中にあってもすでに機能的に成熟した細胞として常時存在するなどの特徴をもつ、リンパ球のなかでもユニークな存在で、このような特性はむしろ自然免疫に関わる細胞のそれであり、事実 NK 細胞はリンパ球でありながらマクロファージと並んで自然免疫を担う主役の細胞のひとつであると考えられている。これまで NK 細胞を規定するものとして asialo-GM1 や NK1.1、DX5 などの表面抗原が報告されている。しかし、T 細胞の中にもこれらの表面抗原を有するものが正常個体のなかにあっても一定の割合で存在すること、またウイルスに感染した個体では CD4⁺ T 細胞や CD8⁺ T 細胞も高率にこれら表面抗原を表出する（Slifka ら，2000）ことなどから、これら表面抗原を NK 細胞の特異的マーカーとするには問題なしとは言えないが、これら抗原はこれまで多くの NK 細胞の研究に用いられており、NK 細胞を論じるのに十分な汎用性をもつと言って差し支えないと考えられる。NK 細胞の機能としては、MHC に拘束されない細胞障害機構、すなわちウイルス感染細胞や腫瘍細胞を直接に傷害し破壊することと、ある種のサイトカインを産生することである。産生するサイトカインで特に重要なのが IFN- γ で、NK 細胞によって産生された IFN- γ は NK 細胞自体に対するポジティブフィードバック因子としても働くことが知られている。Yang らは、リステリアや *M. bovis* BCG の生菌感染において、感染早期に抗 IFN- γ 抗体をマウスに投与することで T 細胞の Th1 細胞への機能分化が阻害されることを見出し（Yang ら 1997）、1996 年に米田らはマウスにおいて NK 細胞が T 細胞よりも早期に単球を活性化する可能性を示した（米田ら，1996）。NK 細胞を欠き CD8⁺ T 細胞の機能が低下しているベージュマウスにおいて *M. intracellulare* の

増殖が著しいことが Saxena らや江森らによって報告されている (Saxena ら 1984、江森ら 1994)。またヒトにおいても末梢血リンパ球中のマクロファージは活性化NK細胞の存在下で抗酸菌増殖抑制能が増強されることが報告された (Eduardo, 1991)。これらの知見は細胞内寄生性病原体に対する免疫におけるNK細胞の重要性を示唆するものである。

1996年に当研究室において作出された *Bcg* congenic マウス (*Bcg*^rマウス) はある種の抗酸菌に対しその遺伝的バックグラウンドである C57BL/6 (*Bcg*^sマウス) に比べ自然抵抗性が高いことがわかっている (Xu ら, 1995)。マウスの第一染色体上に位置する *Nramp-1* 遺伝子の解析により、この抵抗性は同遺伝子の一塩基配列の違いによるものであることが示された。*Nramp-1* 遺伝子は広く生物に分布する膜輸送システム関連タンパクと構造が類似した糖タンパクをコードしており、マクロファージ細胞の、おそらくはファゴソーム内に発現していると考えられている。*Bcg*^sマウスではアスパラギンから *Bcg*^rマウスでグリシンに変化していることが明らかになるにつれ、これが決定的なNRAMP構造の違いを生み出し、抗酸菌に対する抵抗性を増強させていると推察されている (Vidal ら, 1993)。

Nramp-1 遺伝子に支配される抵抗性のメカニズムについてはこれまでも様々な研究が行われてきた。Roach らはマクロファージにより産生された窒素酸化物 (NO) による殺リーシュマニア能が *Bcg*^rマウスのほうが *Bcg*^sマウスより高いことを報告し、1999年に Zwilling らは *M. avium* に対する *Bcg*^rマウスの抵抗性はマクロファージ内において細胞質からファゴソーム内への Fe²⁺の輸送が制限されるためであると報告した。しかしこうした報告にも関わらずマクロファージ内でどのような機構が抵抗性を増強するのか、あるいはマクロファージ以外の防御免疫担当細胞における *Nramp-1* 遺伝子の関与、とくに一塩基配列の違いに基づく抵抗性の強弱とそれらとの関係については未

だ明らかにされていない。*Nramp-1* 遺伝子による抵抗性は菌種によって差があることがわかっている。我々がこれまでに行った実験によれば、*M. intracellulare* と *M. avium* は *in vivo* においてはその増殖は *Nramp-1* 遺伝子の影響を受ける。しかし、マウスから骨髄マクロファージを取り出しこれらの菌に *in vitro* 感染させると *M. avium* では *in vivo* ときわめてよく似た増殖パターンを示すのに対し、*M. intracellulare* では *Bcg*^s、*Bcg*^r いずれのマウスにおいても菌は増殖のパターンを示す。この結果は *in vivo* の成績と異なり、このことは抗酸菌に対する *Nramp-1* 抵抗性が、マクロファージのみに発現しているというこれまでの説の他に、それ以外の免疫担当細胞を介して生じる場合もあるという可能性を示唆している。

今回我々はこうした点に注目し、NK細胞がサイトカイン、特に IFN- γ を介して抗酸菌感染症の早期における宿主防御に関わっている可能性ならびに *in vivo* においてみられた *Bcg*^s マウスと *Bcg*^r マウスの抵抗性の差にNK細胞が関与している可能性について検討を試みた。

材料と方法

マウス: C57BL/6 (*Bcg*^sマウス) は九動株式会社(熊本)より購入し、*Bcg* congenic マウス (*Bcg*^rマウス) は自家繁殖したものを実験に供した。

菌株: 国立療養所宮崎病院 (宮崎県児湯郡川南町) より分与された非定型抗酸菌症患者由来の *M. intracellulare* (菌の同定は Wilton and Cousins の報告に準じて行われた) のうち No. 5 を実験に供した。同株は 1% 小川培地で培養後、10% に OADC enrichment を添加した Middlebrook 7H9 培地 (Difco Laboratories, Detroit, Mich, USA) で増菌し、それを -80°C に保存した。実験にはそれを室温で融解した後、ただちに使用した。

抗体ならびに補体: 抗 NK1.1 モノクローナル抗体産生細胞、PK136 は 10% FCS 加 Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma Chemical

Co.,USA) ; DMEM培地で、抗 CD3 抗体産生細胞 145-2C11 は 10%FCS 加イスコフ培地 (Sigma Chemical Co.,USA) でそれぞれ増殖させたあと、 $1.0 \times 10^7/\text{ml}$ に調整し、GIT培地 (日本製薬株式会社, 東京) にてさらに1週間培養し培養上清を得た。それらを濃縮したものを原液として細胞消去実験に用いた。両抗体について予備実験を行い、至適濃度として抗 NK1.1 抗体は $100 \mu\text{l}/\text{ml}$ 、抗 CD3 抗体は $30 \mu\text{l}/\text{ml}$ に希釈したものをを用いるのが良いと決定した。補体には市販のモルモット血清 (Cedarlane,Canada) を用いた。フローサイトメトリー (FACS) による解析 (後述) のための免疫染色には PE 標識抗マウス CD3 ϵ ハムスター抗体と FITC 標識抗マウス NK1.1 抗体 (Southern Biotechnology Associates Inc.,USA) を用いた。

in vitroにおける細胞消去試験と感染: マウスから脾臓を摘出し、RPMI1640 培地中で細断し、ステンレスメッシュ (#200) を通して細胞浮遊液を作成した。細胞は2回洗浄 ($1,500\text{rpm} \times 10\text{min}$ 、室温にて遠心) し、 $2.0 \times 10^7/\text{ml}$ に調整した。同細胞浮遊液をさらに Lympholyte-M (Cedarlane, Canada) に重層し、 $2,300\text{rpm} \times 20\text{min}$ 、室温にて遠心した。回収したリンパ球浮遊液を、 $1.0 \times 10^7/\text{ml}$ に調整し、細胞消去試験を行った。まず抗体処理を 4°C で1時間おこなった後、補体を所定量加え、 37°C 、30 分間インキュベートした。10%FCS 加 RPMI1640 培地で生細胞数を $2.0 \times 10^7/\text{ml}$ に調整し、同じく同培養液で $2.0 \times 10^7/\text{ml}$ に調整した *M.intracellulare* No.5 と等量混合した。感染後 12、24、36 および 48 時間目に細胞と上清を回収し、細胞は FACS 解析に、また上清は IFN- γ の測定に供した。

in vivo 感染とフローサイトメトリーによる細胞解析: *Bcg^s* ならびに *Bcg^r* マウス尾静脈に $1.6 \times 10^7/0.2\text{ml}$ ずつ接種した。マウスから脾臓を採取し、Lympholyte-M にてリンパ球を分離し、血球計算版にて総リンパ球数をカウントするとともに前述の標識抗体 (抗 NK1.1 抗体、抗

CD3 抗体) で二重染色し FACS 解析して抗体陽性細胞の割合を算出した。リンパ球浮遊液を氷冷した PBS(-) で2回洗浄した後、5%正常マウス血清加 PBS(-) にて $2 \times 10^7/\text{ml}$ に調整してその $50 \mu\text{l}$ を染色に使用した。染色後氷冷した PBS(-) で2回洗浄し、10%ホルマリン加 PBS(-) で細胞を固定、Flowcytometer (Coulter, USA) にて測定した。

培養脾細胞の上清中に含まれる IFN- γ の測定: 脾細胞培養上清中の IFN- γ 量を市販の ELISA Kit (BioSource International Inc., USA) にて測定した。方法は添付されたマニュアルに従って行った。

結 果

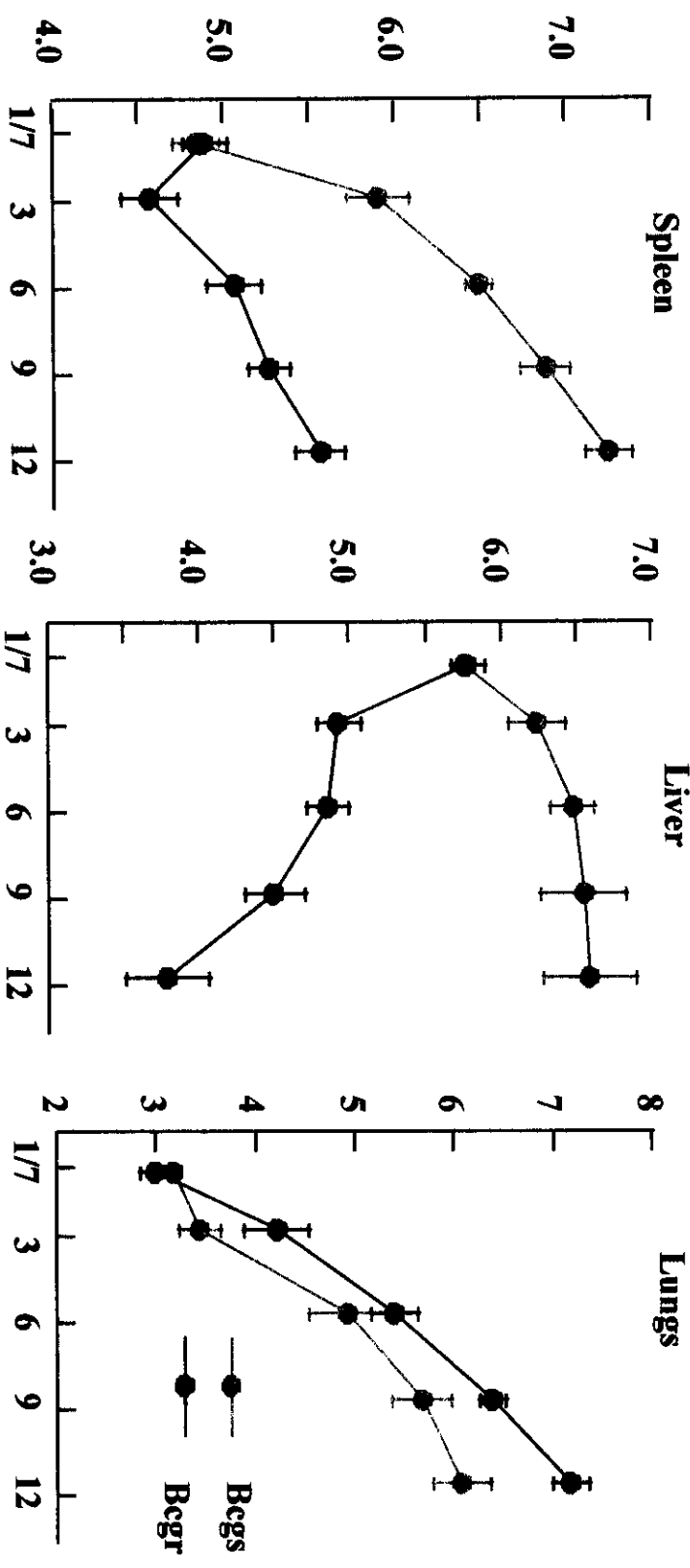
In vivoにおける *M.intracellulare* の増殖

Bcg^s ならびに *Bcg^r* マウスに 1×10^6 の *M.intracellulare* の増殖を感染させ、経日的に脾臓、肝臓ならびに肺内の生菌数を調べた (Fig.1)。感染直後の脾臓における菌数は *Bcg^s*、*Bcg^r* の間で有意な差はみられなかった。しかし感染後 12 週目には *Bcg^s* マウスで 100 倍以上、*Bcg^r* マウスで約 8 倍程度の増殖がみられた。肝臓における菌の推移をみると、*Bcg^s* マウスでは微増したものの、*Bcg^r* マウスでは 1/100 に減少した。一方、肺では実験期間を通じて *Bcg^s*、*Bcg^r* の間で同じような菌数の推移を示し、両マウスともに著しい増殖を示した。

In vitro 培養マクロファージ内における *M.intracellulare* の増殖

次に *Bcg^s* と *Bcg^r* の骨髓由来マクロファージを用いて両細胞内における *M.intracellulare* の増殖パターンを比較した。24 ウェル平底プレートを用い、 $1 \times 10^6/\text{ウェル}$ に調整した培養細胞に 1×10^7 の菌を感染させ、貪食されなかった菌を洗浄によって除いたあと、感染後 3 時間目と 5 日目における細胞内生菌数を比較した。感染 3 時間目の細胞内生菌数は *Bcg^s* 6.66 ± 0.00 、*Bcg^r* 6.66 ± 0.00 と両者の間に有意差はみられ

Log₁₀ Number of bacteria per organ



After infection (weeks)

Fig.1 Bcgs^sおよびBcgs^rマウスの脾臓、肝臓ならびに肺における*M. intracellulare* No.5株の増殖パターン。両系統マウスの尾静脈に1×10⁶の菌を接種し、所定の時期に各群3匹づつ臓器内の生菌数を調べた。それぞれのポイントはそれぞれの群の平均値をバーは標準偏差値を示す。

なかった。また感染後 5 日目の細胞内生菌数は Bcg^s 6.66 ± 0.00 、 Bcg^r 6.66 ± 0.00 とどちらも感染 3 時間目に比べて有意に増加していた。しかし Bcg^s と Bcg^r との間に有意差はみられなかった。

感染マウスにおける初期リンパ球の動態

感染後 48 時間のマウス脾臓内の総リンパ球は、 Bcg^s マウスにおいては非感染群と変わらなかったが、 Bcg^r マウスでは非感染群と比べ感染群で有意に増加した。FACS 解析では、両マウスとも非感染群と感染群との間における NK 細胞、T 細胞の割合に差はみられず、結果的に Bcg^r マウスにおける NK 細胞の総数ならびに T 細胞の総数が感染に伴って増加することが分かった。

つぎに *in vitro* 感染系における NK 細胞と T (CD3⁺) 細胞の動態をしらべた。正常脾細胞を *M.intracellulare* 生菌で刺激し、経時的に誘導される細胞群を FACS 解析した。生菌を刺激したグループでは Bcg^s 、 Bcg^r 両マウスともに非刺激のグループに比べて有意に NK1.1⁺細胞の全脾細胞に占める割合ならびに実数が増加した (Fig.2)。陽性細胞は菌刺激後 24 時間目から Bcg^s マウスと Bcg^r マウスともに感染群において有意に増え始め、感染後 72 時間目まで増加し続けた。FACS 解析によれば、陽性 (NK1.1⁺) 細胞は全体の細胞数のみならず個々の細胞の染色性も増強された (Fig.3)。ただし Bcg^s と Bcg^r マウスとの間にその差は見られなかった。一方 T (CD3⁺) 細胞は Bcg^s マウスと Bcg^r マウスにおいても、非感染群と感染群においてもその割合はほとんど変わらず、細胞数もほとんど変わらないかやや減少の傾向を示した。

in vitro 感染系における IFN- γ 産生

最後に *in vitro* 感染系における IFN- γ 産生について調べた。産生細胞を特定する目的で、一部はあらかじめ抗 CD3 抗体または抗 NK1.1 抗体と補体でリンパ球を処理した後、*M.intracellulare* を感染させた。抗体と補体で

処理しなかったグループでは Bcg^s 、 Bcg^r とともに感染後 1 2 時間目には高い値の IFN- γ 産生がみられ、感染後 4 8 時間目までその値は持続した。非感染対照群では IFN- γ 産生はほとんどみられなかった。抗 CD3 抗体処理グループと抗 NK1.1 抗体処理グループにおいても IFN- γ 産生が認められ、前者のグループは感染対照群と産生量において有意差はほとんどみられなかった。しかし後者抗 (NK1.1 抗体処理グループ) は感染対照群や抗 CD3 抗体処理グループに比べ産生量が有意に低下した。 Bcg^s 、 Bcg^r との間で産生量、もしくは抗体処理による抑制の割合に差はみられなかった (Fig.4)。

考 察

in vivo における感染実験において、脾臓内の NK 細胞の比率は Bcg^s 、 Bcg^r 両マウスともに変わらなかったものの、実際の細胞数は Bcg^r のほうが Bcg^s マウスより多かった。一方、*in vitro* 感染実験において NK1.1⁺細胞数は生菌刺激により両マウスともに短時間で増加し、CD3⁺細胞数はあまり変動しなかった。*In vivo*、*in vitro* 両実験において異なる結果が得られた理由として、前者では両系統マウスの間で脾臓以外のリンパ器官あるいは他組織への、またはそうした器官からの細胞流出入する速度の違いや細胞種の違いにその原因が求められるかもしれない。*M.intracellulare* の静脈感染は脾臓に 10~20%の菌を集積させるが、その菌の刺激を受けた結果、NK 細胞は脾臓で増殖しその数を増やすと同時に、全身へと循環してゆくに違いない。結果として総リンパ球中の NK や T の割合が感染前と変わらなかったということは、感染刺激に対して NK、T 両細胞がともに反応している可能性を示唆している。 Bcg^s マウスの脾臓内リンパ球数は感染によっても変化しないのに Bcg^r マウスでのみこのような変化がみられたことについては、*Nramp-1* 遺伝子に

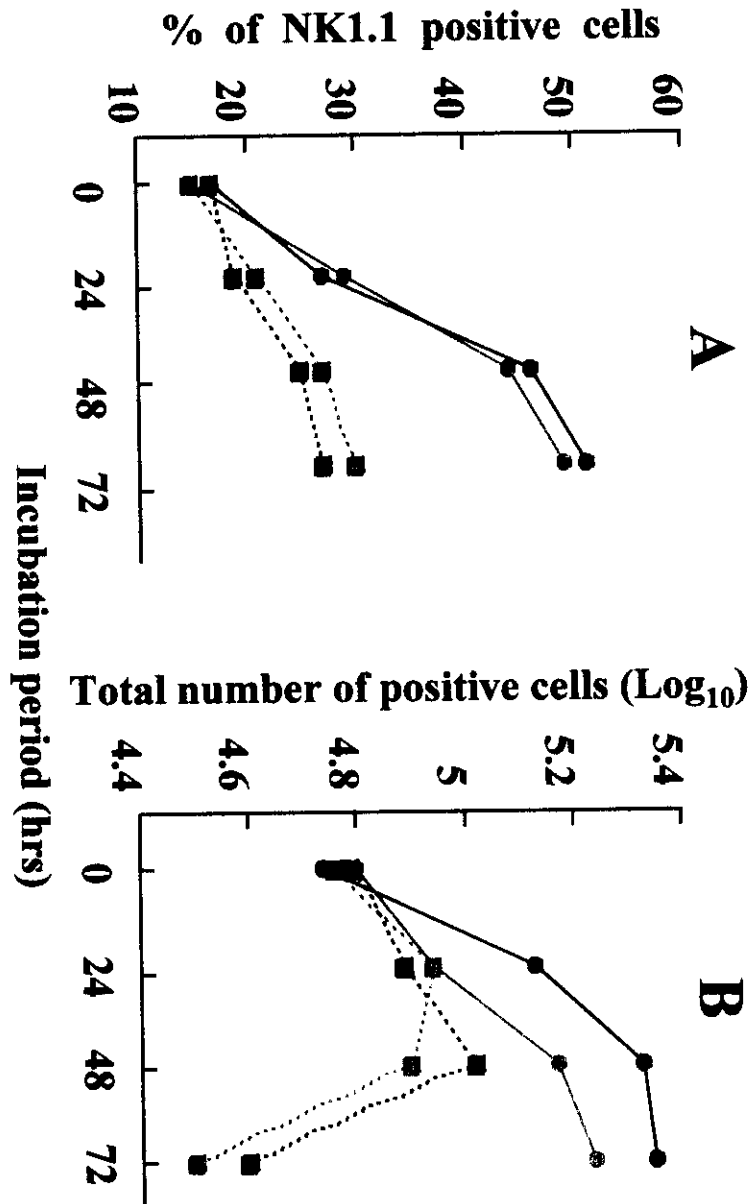


Fig. 2 In vitroにおけるNK1.1+細胞の動態。*M.intracellulare*生菌で刺激したBcg^s (●)、Bcg^f (■) 脾細胞と刺激しなかったもの(Bcg^s (○)、Bcg^f (□))をそれぞれFACS解析した。パネルAは培養脾細胞全体に占める陽性細胞数の割合を、またパネルBは実際の細胞数を示す。

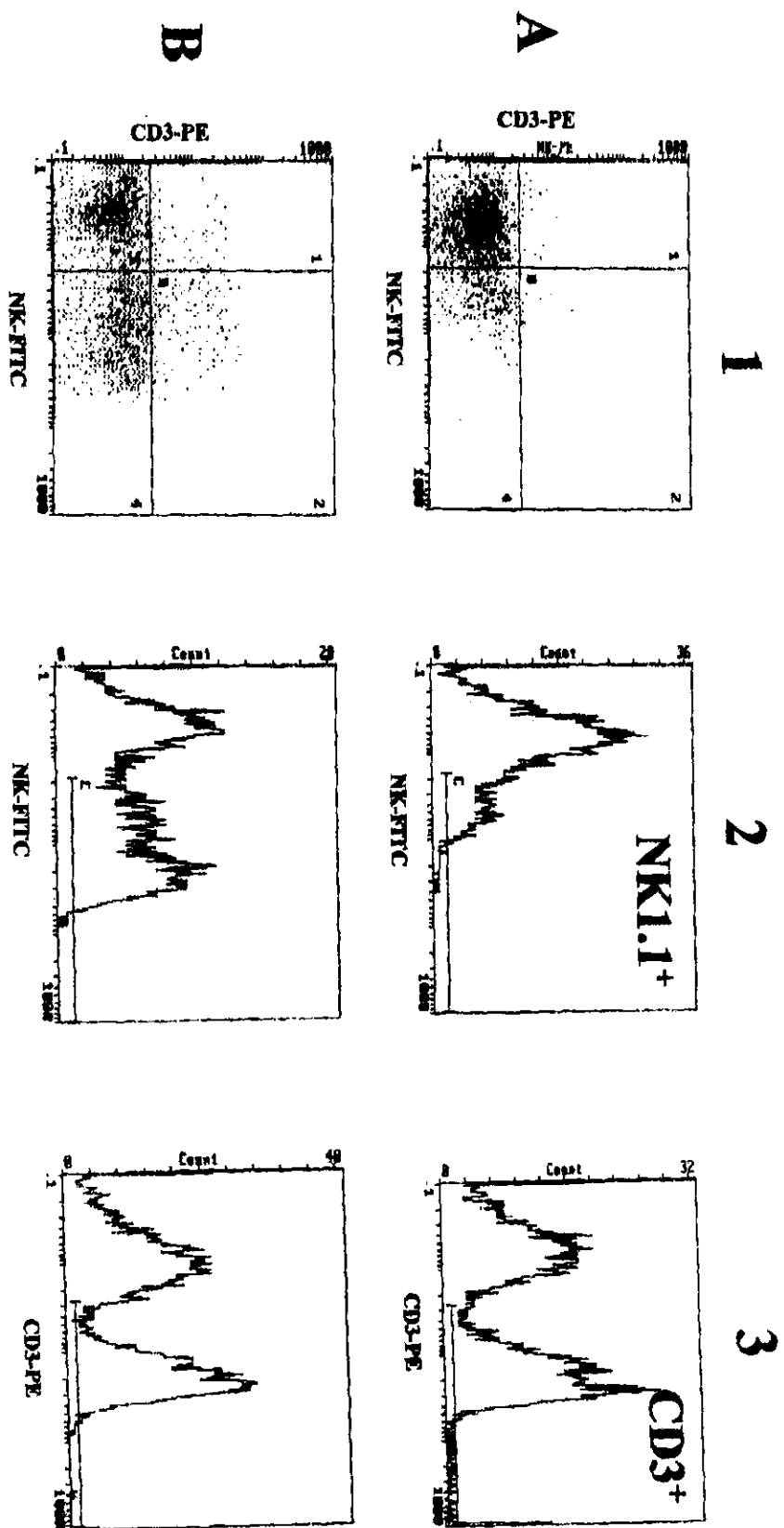


Fig. 3 *M.intracellularis*生菌刺激によるNK1.1+細胞の誘導。Bcgs⁺マウス脾細胞浮遊液 (1×10^7 /ml)に同数の*M.intracellularis*浮遊液を加え、48時間後にNK1.1陽性細胞とCD3陽性細胞の割合をFACS解析した(Bの1、2、3)。A(1-3)は生菌刺激をせずに同じ時間培養した対照脾細胞。CD3、NK1.1両陽性細胞数の微増とNK1.1強陽性細胞が多数誘導されていることが分かる(Bの1と2)。同様の現象はBcgs⁺マウスにおいても観察された。

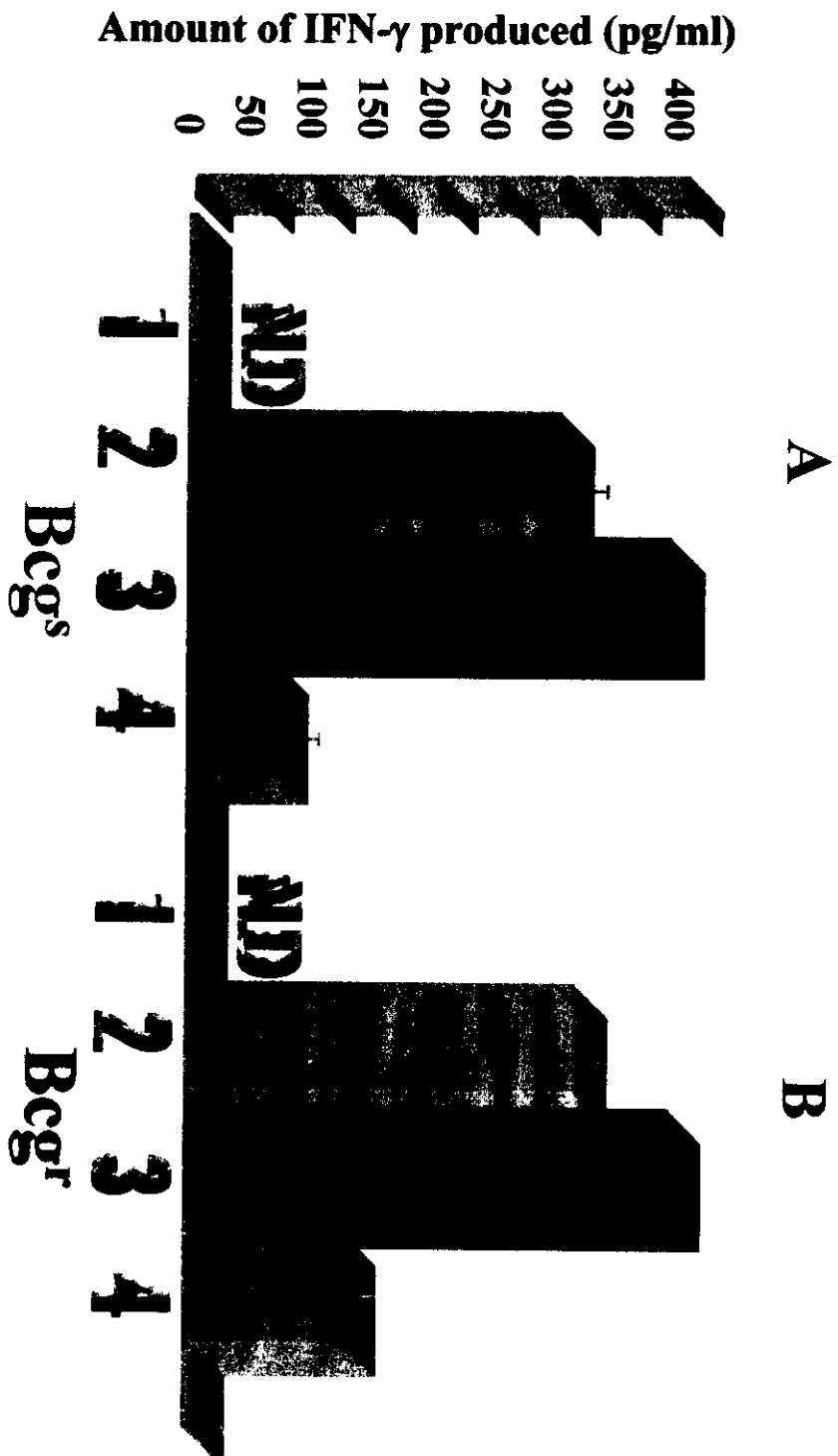


Fig. 4 Bcg^s (A)ならびにBcg^r (B)マウス脾細胞から産生されるIFN-γ。両マウスから採取した脾細胞 1×10^7 をそれぞれ*in vitro*で 1×10^7 の*M. intracellulare*生菌でもって刺激した(レーン2~4)。レーン1は刺激を行わなかった対照群。なお一部の脾細胞は抗CD3抗体と補体(レーン3)あるいは抗NK1.1抗体と補体(レーン4)とで処理をおこなった後で生細胞数を 1×10^7 に調整し、生菌刺激を行った。上清中のIFN-γ量は生菌刺激後12時間目に測定した。NDはIFN-γが検出限界以下であったことを示す。

よる影響を感じさせるが、これが本質的な変化かどうかはさらに詳しく調べる必要がある。

いずれにせよ、*M.intracellulare* 感染によってNK細胞は早い時間に増加し、その割合は *Bcg^s* マウスのほうが *Bcg^r* マウスより多いと考えられる。NK細胞はマクロファージを介する（そこから放出されるサイトカインを介する）ことなく菌の直接刺激によっても反応を示すことが分かっている (Roach, 1991) が、*in vitro* におけるNKの反応性 (IFN- γ 産生性) をみるかぎり、少なくとも感染早期のNK細胞と菌とが仮に直接反応したとしても、そこに *Nramp-1* 遺伝子が直接関与している可能性は低いと考えられる。

in vitro 感染系におけるIFN- γ 産生量は感染後12時間という早い時間で高い値を示した。NK細胞ならびにT細胞に特異的な抗体と補体とで細胞消去実験を試みたにもかかわらず、両細胞集団ともに細胞が残り、NK細胞、T細胞いずれもIFN- γ を産生した。ただしNK細胞の消去はCD3⁺細胞の消去に比べてよりIFN- γ 産生量を抑制したことからNK1.1⁺細胞が *M.intracellulare* 感染刺激によってIFN- γ を産生することはほぼ間違いないと思われる。ただ細胞消去試験においては、ほぼ完全に消し去ったはずのNK1.1⁺細胞もCD3⁺細胞が12~24時間後には消去前とほぼ同じ割合にまで回復してくるため、*in vitro* 感染系であっても新たにリクルートされる細胞によるIFN- γ 産生の可能性は否定できなかった。今回の *in vitro* 感染系において、NK細胞以外にIFN- γ を産生した可能性があるのはT細胞のうちTh1細胞であるが、同細胞がIFN- γ を効率よく産生するためには、予め抗原感作を受ける必要があること、またそうした感作Th1細胞が再度抗原刺激され産生がピークに達するまでにおおよそ24時間を要すること (Kemp, 1997) など時間的な面からみても、今回検出されたIFN- γ の大部分はNK細胞によって産生された可能性が高いと思われる。

今回の実験により、*M.intracellulare* 感染に

おいて、感染後の非常に早い時期(12時間以内)にIFN- γ が産生されてくることが分かった。IFN- γ はNK細胞やマクロファージなど免疫エフェクター細胞を活性化させ、細胞(マクロファージ)内の抗酸菌の増殖を抑制するなど免疫に関与していると思われる。一方 *Bcg^s*、*Bcg^r* 両マウスを用いた比較感染実験から、NKは *Nramp-1* 遺伝子型とは関係なく *M.intracellulare* 刺激に対して同じように反応し、そこには同遺伝子による直接的な影響は認められなかった。

参考文献

- Eduardo,E.,et al. 1991. Natural Killer cell-dependent mycobacteriostatic and mycobactericidal activity in human macrophages. *J. Immunol.* 146: 265-270.
- Florido,M.,et al. 1997. Evidence for a reduced chemokine response in the lungs of beige mice infected with *Mycobacterium avium*. *Immunol.*, 90: 600-606.
- Kemp,K.,et al. 1997. Interferon- γ production by Human T cells and Natural Killer Cells *in vitro* in response to antigens from the two intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Leishmania major*. *Scand J Immunol.*, 46: 495-499.
- Korsgren,M.,et al. 1999. Natural killer cells determine development of allergen-induced eosinophilic airway inflammation in mice. *J Exp Med.* 189 ;553-562.
- Slifka,M.K.,et al. 2000. NK markers are expressed on a high percentage of virus-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells. *J Immunol.*, 164: 2009-2015.
- Emoto,M.,et al. 1999. Induction of IFN- γ producing CD4⁺ natural killer T cells by *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin. *Eur J Immunol.* 29: 650-659.
- Roach,T.I., et al. 1991. Role of inorganic

nitrogen oxides and tumor necrosis alpha in killing *Leishmania donovani* amastigotes in gamma interferon-lipopolysaccharide activated macrophage from Lsh^s and Lsh^r congenic mouse strains. *Infect Immun.*, 59: 3935-3944.

Ota T., et al. 1990. Analysis of immunologic mechanisms of high Natural Killer Cell activity in tuberculous pleural effusions. *Am Rev Respir Dis*; 142: 29-33.

Vidal, S.M., et al. 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for *Bcg*. *Cell* 73: 469-485.

Xu, D.L., et al. 1995. Establishment of *Bcg*^r congenic mice and their susceptible/resistance to mycobacterial infection. *Vet Microbiol* 50: 73-79.

Zwilling, B.S., et al. 1999. Role of iron in *Nramp1*-mediated inhibition of mycobacterial growth. *Infect Immun.*, 67: 1386-1392.

江森方子ら 1994. *Mycobacterium intracellulare* 感染症モデルとしての免疫不全マウスおよび同ラット。結核； 69(4)；317-322.

斎藤肇ら 2000、「24時間風呂」からの *Mycobacterium avium* complex の検出。結核； 75 (1)；19-25.

米田尚弘 1996、肺結核症におけるNK細胞の基礎的・臨床的研究。結核 71(11)；625-631.

核効果：結核菌噴霧感染によるモルモット肺結核実験モデルを用いた防御効果の検討。結核、75 (5)：379-388.

Iwakiri, A., Toshimasu, M., D.L. Xu., Shinjo, T., and Goto Y. 2001. Lymphoproliferative Responses in Pigs Infected with *Mycobacterium avium*. *Jap. J. Med. Vet. Sci.* (accepted).

研究成果

Izu, K., Yoshida, S., Miyamoto, H., B. Chang., Ogawa., Yamamoto, H., Goto, Y., Taniguchi, H. 1999. Grouping of 20 reference strains of *Legionella* species by the growth ability within mouse and guinea pig macrophages. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 26:61-68.

山本十糸子、Susan Phalen、内田和幸、梅森清子、野島康弘、堀内善信、後藤義孝、D. McMurray、山本三郎。2000年。BCG Tokyo 172株の抗結

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

結核菌群の *SenX3-regX3* 遺伝子間領域のシーケンスを行い、この領域中に存在する 77bp-MIRU の数と 53bp の MIRU の有無を調べ、結核菌群から BCG を鑑別同定する方法を確立した。

A. 研究目的

現行の生化学的方法による抗酸菌鑑別同定法では、結核菌群(*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*)の菌種を鑑別同定することは難しい。また、結核菌群より BCG を明確に鑑別同定する方法は無く、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。迅速な鑑別同定をするために、分子遺伝学的手法を用いて昨年度は、*M. tuberculosis* と *M. bovis* の鑑別まで出来るようになった。今年度は、*M. bovis* Tokyo 株までの鑑別同定法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

M. tuberculosis 43 株、*M. africanum* 6 株、*M. bovis* 47 株 (BCG8 株を含む) の *senX3-regX3* の遺伝子間領域(intergenic region; IR)を増幅するプライマー C5、C3 を用いて PCR を行い、電気泳動により増幅バンドの大きさと、ダイレクトシーケンス法により PCR 増幅 DNA の塩基配列を調べた。また、この領域中に存在する 77bp の mycobacterial interspersed repetitive unit (MIRU)の数と 53bp の MIRU

の有無を調べた。さらに、保存の BCG-Tokyo の臨床分離菌 2 株について同様に検査し、BCG-Tokyo の標準菌株と同様な結果が得られるかを調べた。

M. tuberculosis H37Rv と BCG-Tokyo を重感染させたモルモットの肺の還元培養菌の単コロニーを拾い増菌後、DNA を抽出し、昨年度報告したプライマー MT-1,-2、PT-1,-2、*pncA*-7,-10、*pncA*-7,-11C を用いて、PCR 増幅バンドの検出パターンを調べた。

C. 研究結果

結核菌群の *senX3-regX3* の遺伝子間領域を増幅するプライマー C5、C3 を用いた PCR 増幅産物の大きさは、同一菌種であっても株によって異なっていた。*M. tuberculosis* (33 株/43 株)、*M. africanum* (5 株/6 株) は、大きさ 329bp で 77bp-MIRU が 2 個、53-bpMIRU が 1 個存在していた。*M. tuberculosis* 1 株は、637bp で 77bp-MIRU が 6 個、53-bpMIRU が 1 個存在していた。*M. tuberculosis* 1 株は、483bp で 77bp-MIRU が 4 個、53-bpMIRU が 1 個存在していた。*M. tuberculosis* 1 株は、252bp で 77bp-MIRU が 1 個、53-

bpMIRU が 1 個存在していた。ところが、*M. tuberculosis* 5 株は、大きさ 353bp で 77bp-MIRU の数は 3 個存在したが、53-bp の MIRU は存在しなかった。BCG 以外の *M. bovis* 39 株と *M. africanum* 1 株は、406bp で 77bp-MIRU が 3 個、53-bp-MIRU が 1 個存在していた。BCG の 8 株について調べたところ、Glaxso, Russia, Ticc, Tokyo, Sweden 株は、大きさ 353bp で 77bp-MIRU の数は 3 個、Pasteur, Moreau, Copenhagen 株は大きさ 276bp で 77bp-MIRU の数は 2 個存在していた。しかし、53-bp の MIRU は、いずれの BCG 株にも存在していなかった。*M. tuberculosis* H37Rv 株は、大きさ 353bp で 77bp-MIRU の数は 3 個、53-bp の MIRU は存在せず、BCG-Tokyo と同じであった。しかし、プライマー MT-1,-2、PT-1,-2、pncA-7,-10、pncA-7,-11C を用いた PCR 増幅バンド検出の有無によるパターンにより、両者の鑑別は可能であった。また、かつて生化学的方法により BCG と同定された臨床分離菌 2 株について同様に検査したところ、BCG-Tokyo の標準菌株と同様な結果が得られた。

M. tuberculosis H37Rv と BCG-Tokyo を重感染させたモルモットの肺の還元培養菌 51 コロニーを拾い増菌後、DNA を抽出し、前述プライマーにより、両者の鑑別をおこなった。

M. tuberculosis H37Rv は、41 コロニー (80.4%)、BCG-Tokyo は、10 コロニー (19.6%) であった。また、別の実験ではモルモットの個体 A より 21 コロニー、個体 B より 19 コロニーについて調べた。個体 A では、H37Rv は、7 コロニー (33.3%)、BCG-Tokyo は、14 コロニー (66.7%) であり、個体 B では、H37Rv は、7 コロニー (36.8%)、BCG-Tokyo

は、12 コロニー (63.2%) であった。このように、肺における両者の分布菌数がわかるようになった。

D. 考察

昨年度は、結核菌群に特異的な 5 組のプライマー MT-1,-2、PT-1,-2、MPB64-T2,-T6、pncA-7,-10、pncA-7,-11C を用いて PCR を行い、増幅バンドの検出パターンにより *M. tuberculosis* と *M. bovis* の鑑別が可能になったことを報告した。しかし、*M. bovis* から BCG を鑑別同定することはできなかった。そこで、Magdalena らが報告した、結核菌群の *senX3-regX3* の遺伝子間領域を増幅するプライマー C5, C3 を用いて PCR を行い、電気泳動による増幅バンドの大きさと、この領域の PCR 増幅 DNA 断片の塩基配列を、ダイレクトシーケンス法により調べた。BCG 以外の *M. bovis* は、大きさ 406bp で 77bp-MIRU が 3 個、53-bp-MIRU が 1 個存在していた。BCG の Glaxso, Russia, Ticc, Tokyo, Sweden の各株は、353bp で 77bp-MIRU の数は 3 個、Pasteur, Moreau, Copenhagen の各株は 276bp で 77bp-MIRU の数は 2 個存在していた。しかし、53-bp の MIRU は、いずれの BCG 株にも存在していなかった。Magdalena らは、53-bp の MIRU は毒力に関係していると報告しているが、*M. tuberculosis* 5 株には、53-bp の MIRU は存在しなかったことから、53-bp の MIRU が存在しないから BCG であると言い切ることはできなかった。*M. tuberculosis* H37Rv 株は、大きさ 353bp で 77bp-MIRU の数は 3 個、53-bp の MIRU は存在せず、BCG-Tokyo と同じであった。しかし、プライマー MT-1,-2、PT-1,-2、pncA-7,-10、pncA-7,-11C を用いた PCR 増幅バンド検出の有無に