

よるパターンにより、両者の鑑別は可能であった。これらのことから、わが国では、分離された抗酸菌が、*M. bovis* のパターンをとり、*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 増幅産物の大きさが 353bp であり、77bp の MIRU が 3 個存在し、53bp の MIRU が存在しなければ、BCG-Tokyo と断定して差し支えないと思われる。

M. tuberculosis H37Rv と BCG-Tokyo をモルモットに重感染させた動物実験でも、前述プライマーを用いて、PCR 増幅バンドの検出パターンにより、両者の肺における分布菌数がわかるようになった。このことは、結核のワクチン開発や、BCG の免疫効果の解析に非常に役立つ所見となるであろう。

E. 結論

結核菌群に特異的なプライマー MT-1,-2、PT-1,-2、MPB64-T2,-T6、*pncA*-7,-10、*pncA*-7,-11C の 5 組のプライマーを用いた PCR 結果と、*SenX3-regX3* 遺伝子間のシーケンスにより BCG までの鑑別同定法を確立した。

わが国では、分離された抗酸菌が、*M. bovis* のパターンをとり、*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 増幅産物の大きさが 353bp であり、シーケンスの結果、77bp の MIRU が 3 個存在し、53bp の MIRU が存在しなければ、BCG-Tokyo と断定して差し支えないと思われる。

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、山崎 剛、芳賀伸治、赤川清子、山本三郎、結核菌と BCG の鑑別同定法の検討、第 83 回日本細菌学会関東支部総会、2000 年 11 月、東京

有毒結核菌病原性発現の解析

分担研究者 持田恵子 国立感染症研究所

研究要旨 有毒結核菌（H37Rv）およびワクチン株（BCG）は、ラット肺胞マクロファージ細胞株（NR8383）に感染し細胞死を誘導する。細胞死誘導に必要な細菌因子を同定するため、ガンマー線照射および加熱による不活化菌の NR 細胞増殖に対する効果を検討した。NR 細胞感染早期（2日目）の細胞数は加熱 BCG > ガンマー線照射 BCG = BCG 生菌の順であったが、感染後期（7日目）では加熱 BCG > ガンマー線照射 BCG > BCG 生菌の順になった。このことより、感染早期における病原性はガンマー線照射による影響を受けないが、感染期間の持続によりその影響は有意に発現することが明らかにされた。また、宿主細胞死誘導には感染細胞内での菌の増殖は必須ではなく、熱に感受性の菌体表層分子が重要である可能性が示唆された。

A. 研究目的

結核発症の主たる臓器である肺の中でも肺胞マクロファージ（Mφ）は結核菌感染の最初の標的細胞として、末梢の Mφ とは性状が異なる可能性が示唆されている。しかしながら、これまでの多くの研究は末梢 Mφ あるいは骨髓細胞由来 Mφ を用いて *in vitro* 実験がなされており、なぜ、肺胞 Mφ で結核菌が増殖あるいは持続的潜伏感染が容易であるかの解答は得られなかった。本研究では、正常肺胞 Mφ を用いて結核菌および BCG による宿主細胞死誘導に必要な菌由来因子の検討を行った。好酸菌感染による宿主細胞死により菌が全身へ拡散することは、特に免疫能の低下した宿主において重篤となり病原性の一因と考えられる。

B. 研究方法

ラット肺胞 Mφ 細胞株（NR8383）を ATCC より購入した。この細胞は正常ラット肺胞 Mφ 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。昨年報告したように、この細胞に BCG あるいは H37Rv を高率に感染させると DNA 断片化を特徴とした細胞死が誘導される。今回、細胞死誘導に対する効果をガンマー線照射（40 万ラド）および加熱（80 度、2 時間）処理により不活化した菌を生菌と比較した。96 穴プレートに NR 細胞を蒔き、MOI が 0.3～20 となるように各種 BCG を感染させ、2～7 日にミトコンドリア酵素活性を計測した（テトラカラー・ワン、生化学工業）。

（倫理面への配慮）

今回用いた実験系は、株化細胞と BCG 菌の組み合わせであり、倫理面への配慮は不要と考えられる。

C. 研究結果

ガンマー線照射線量と BCG 菌の生存率を検討した。0～60 万ラド照射した BCG を 7 H10 および小川培地に還元培養し菌の生存率を調

べたところ、40 万ラド以上の照射で完全にコロニー形成は抑制された。加熱処理では、80 度で 2 時間以上の処理でコロニー形成はほぼ抑制されたが、完全ではなかった。オートクレーブ処理では菌を完全に死滅させることは可能であったが、菌は凝集塊を形成し single cell suspension を作ることは困難であった。

生菌および不活化菌の NR 細胞増殖に対する効果を調べた。感染早期（1～2 日目）では高い感染率の生菌および照射菌は同程度の細胞増殖抑制効果を示し、培地のみの培養に比べ有意に細胞数は減少していたが、感染後期（7 日目）では照射菌の抑制効果は生菌より低かった。加熱死菌はいずれの時期もほとんど影響を与えなかった。

D. 考察

本研究から、BCG 感染による宿主マクロファージの細胞死に必ずしも BCG の複製が必要ではないことが解った。しかしながら、加熱による不活化菌では宿主細胞に病原性を示さなかったことより、加熱による表面蛋白質の変性や分子構造の変化などが病原性の減弱に寄与する可能性が示唆される。ガンマー線照射および加熱直後の BCG の RNA 量は非照射菌と同程度であったが、DNA は著しく減少した。このことより、菌の増殖能力は消失しても蛋白質合成能は保持されていることが示唆される。以上のことから、菌による蛋白質合成の潜在的な能力よりも既に菌表面に発現している分子の機能が宿主細胞への細胞死誘導シグナルとして作用している可能性が考えられる。

また、将来、ワクチンへの応用を考えた場合、ガンマー線照射による菌の不活化は生菌の有する性状をかなりの部分保持しているこ

とから、有望な不活化ワクチン候補と言える。

E. 結論

ガンマー線照射 BCG は生菌と同程度の宿主細胞死誘導活性を有していた。宿主マクロファージへの病原性の発現には菌の増殖は必須ではなく、菌体表面の熱感受性分子の関与が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
(再投稿中)
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

HIV/結核重感染の病理に関する研究

分担研究者

- 1) 中田 光、橋本みちえ、慶長直人
- 2) 本田芳広
- 3) Michael Weiden
- 4) 永井英明、倉島篤行、蛇澤晶
- 5) 藤田明
 - 1) 国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部
 - 2) 仙台厚生病院内科
 - 3) ニューヨーク大学医学部呼吸器内科
 - 4) 国療東京病院
 - 5) 都立府中病院

研究要旨

HIV感染者における日和見感染症の合併はエイズの発症を惹起し、その予後を著しく不良にすることが知られている。これは、炎症によりHIV感染細胞からのウイルス産生が亢進することが一因と考えられている。結核は、AIDSの合併症のなかではCD4数が $300/\text{mm}^3$ の付近から頻発し、急速に免疫不全を進行させる。その機序として、炎症に伴い誘導される転写促進因子NF- κ BがHIV-LTRに結合し、プロウイルスの転写が促進する機構が知られている。また、我々は転写抑制の機序としてC/EBP β の16Kd short formはHIV-LTRのnegative regulatory element(NRE)に特異的に結合し、転写が抑制されることを見出し、HIV感染者の肺洗浄液を用いた検討で健常肺中の細胞と組織ではC/EBP β 16kdが発現していてHIVの産生が抑制されているが、結核病巣では発現がみられず、かつHIV産生が亢進していることを報告してきた。今回我々は、HIV/結核重感染の病巣部を病理学的に検討し、細胞相と上記転写因子の発現の関係について調査した。

9. 研究目的

HIV/結核重感染の病巣部におけるウイルス産生調節機構を明らかにすることにより、結核合併した患者のAIDSの進行を制御する方法を勘案することが本研究の目的である。

研究方法

1. 対象：ニューヨーク大学ベルビュー病院においてHIV陽性でかつ肺結核と診断された11人の患者にBALを施行した。全ての患者は胸部レントゲン 真上、何れかの肺葉に浸潤影をもち、喀痰、BAL、あるいは肺組織から結核菌が検出された。BALはこの浸潤影のある部より採取した。また、7人については胸部レ線上非病巣部（浸潤影のない部）からもBALを採取し、塗末培養で結核菌が検出されないことを確認した。コントロールとして10人のレ線上肺陰影のないHIV感染者にBALを行い、培養上、病原体が検出されないことを確認した。
2. 気管支肺胞洗浄及び細胞採取：BALはオリンパス社製のflexible fiberoscopyを用い、300mlの生理食塩水にて洗浄した。BALは濾過後、低速遠心し、細胞成分と上清に分

け、それぞれ-80度で保存した。細胞分画はサイトスピン標本をDiff Quick 染色して得た。

3.HIV-1 RNA定 : HIVは超遠心 (40000 x g, 1h) にて10倍に濃縮し、branchedDNA hybridization (Chiron Corporation, Emeryville, CA) 法を用いて測定した。血漿中のHIVは濃縮せずに同様の方法で測定した。

3.BAL中TNF α 及びIL6定 : BAL中のTNF α とIL6は市販のELISA kit (Quantikine, high sensitivity kit, R&D system) を用いて測定した。

免疫組織化学染色 : 検体はHIV/結核剖検例2例の肺及びリンパ節、2例の生検リンパ節を用い、以下の一次抗体を用いた。CD68 (マクロファージマーカー) : Dako PG-M1, CD4:Novo 1F6, CD8: Novo 4B11, anti NF- κ B monoclonal antibody (Santa Cruz, F-6, 12H11), anti C/EBP β polyclonal antibody (Santa Cruz, Sc-150)。2次抗体としてシンプルステインPO Max (ニチレイ製) を用い、発色剤としてDABまたはAECをもちいた。また、一部は二重染色のため、アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgGを二次抗体とし、BCIP/TMB にて発色した。

研究結果

1, 気管支肺胞洗浄液中のウイルス量と血中CD4数との関係

HIV/結核重感染の患者の病巣部の気管支肺胞洗浄液中のウイルス量を表1に示した。病巣部のウイルス量は、肺感染のないそれが検出限界以下であるのに対し、最高で577000 copy/mlと増加しており、またプロウイルスでも病巣部のウイルスは10倍以上に増加している。しかし、興味深いことに血中CD4数が4~10/mm³と減少した進行したAIDS患者のウイルスは<1000~5645/mm³と逆に減少する傾向がみられた。

2, HIV/結核リンパ節及び肺の病巣部の細胞相

剖検肺及びリンパ節の結核病巣は、本邦で行われた7例中5例が粟粒結核型で、かつ全例に縦膈リンパ節結核があった。その内訳を表2に示した。このうちの2例と他に、HIV/結核のリンパ節生検2例を用い、非HIVの結核結節をコントロールとして染色した。結核病巣部の細胞相を調べた。コントロールの非HIVの壊死のあるリンパ節では、壊死の最外層に融合していない浸潤マクロファージがあり、周辺に密に融合したマクロファージからなる類上皮層があり、それを取り囲むようにCD4とCD8Tリンパ球の混合した層が形成される。これより早期と思われる壊死のない結核リンパ節では密に融合したマクロファージの類上皮の周辺にCD4とCD8リンパ球の混合した層が形成される。チールニールセン染色で染まる結核菌は類上皮層になく、壊死層にごくまれに認められる程度である。血中CD4が84/mlのHIV/結核重感染のリンパ節では、壊死層の周辺は融合していないマクロファージと線維芽細胞層からなり、その周囲を類上皮が囲むが融合が疎の間質に主としてCD8からなるリンパ球の浸潤があった。類上皮層と浸潤リンパ球層の境界が不鮮明で、入り乱れている。CD4リンパ球は極めて少なく、病巣の最外層に集簇が認められた。結核菌は壊死の辺縁部に見られたが、類上皮層には認められなかった。CD4が41/mlのリンパ節では類上皮はさらに疎な融合からなり、細胞間隙が目立った。

壊死の形成は不完全で壊死中にマクロファージとCD8リンパ球の浸潤が見られた。類上皮の間隙には多くのCD8リンパ球の浸潤があり、類上皮層と浸潤リンパ球層の境界は判不可能である。CD4が26と6のリンパ節では、壊死の周辺をマクロファージが取り囲むが、類上皮形成せず、その周囲をさらにCD8リンパ球が包囲していた。CD4リンパ球は皆無であった。

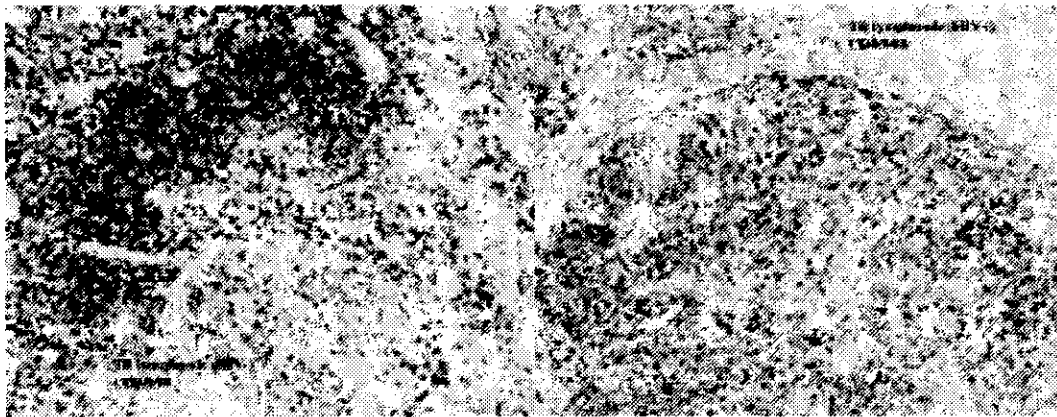


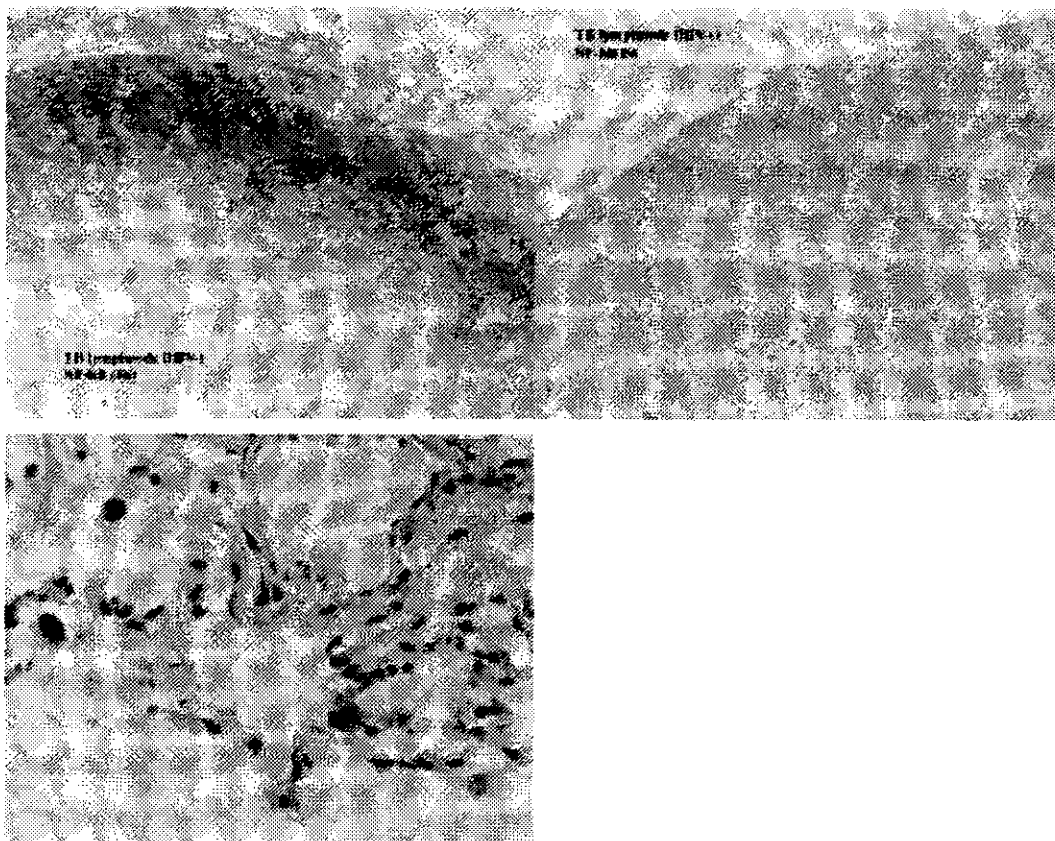
図1：結核肉芽腫の病理像、左非HIV感染、右HIV感染者の肉芽腫

非HIVではCD4+CD8細胞が類上皮細胞を包囲しているが、HIV陽性の結核肉芽腫では、CD8細胞と類上皮細胞が混在している。CD4はみられない。

HIV/結核重感染病巣部のHIV 産生細胞

これまでの研究から抗酸菌感染の炎症部においてHIV-1を産生している細胞は主としてマクロファージであることが確認されている。しかし、結核病巣部には浸潤してきたマクロファージの他、マクロファージが融合した類上皮細胞や巨細胞がある。そこで、我々は、HIV-1の病巣部における局在を免疫組織化学法を用いて検討した。CD4が41のリンパ節結核の病巣部では、肉芽腫の中の類上皮細胞にp24陽性細胞群が観察された。剖検及び生検組織中の肉芽腫の特徴と転写因子の発現

非HIV結核結節では乾酪壊死周囲の類上皮にNF- κ Bが強く発現し、その周囲をやはりNF- κ B陽性のTリンパ球が包囲していた。C/EBP β の発現は見られなかった。血中CD4が84/mlのHIV/結核患者のリンパ節ではNF- κ B陽性マクロファージは限局しており、非HIV結核に比べて減弱していた。やはり、C/EBP β は発現していなかった。血中CD4が41の生検リンパ節では、さらに類上皮細胞NF- κ Bの発現は弱かった。CD4が24及び6/mm³のリンパ節結核病巣では壊死ないしは類壊死の周辺に薄い融合していないマクロファージ層があり、NF- κ Bを弱く発現していた。HIV合併結核の非病巣部及び健常肺では上皮およびマクロファージにNF- κ Bが弱く発現し、C/EBP β は肺胞マクロファージの核に強く発現していた(図5)。また、粟粒結核の病巣部ではNF- κ BもC/EBP β も発現していなかった。



左上：非HIVの結核肉芽腫のNF-κBの発現、右上：HIV/結核のNF-κB発現
下：健常肺のC/EBPβの発現 肺胞マクロファージの核に局在している。

以上のことから、以下の結論を得た。

HIV結核の結核病巣部は類上皮細胞の形成不全がみられる。

非HIVの結核病巣部に比べ、HIVのそれは、NF-κB の発現が弱い。

病巣部のCD4 細胞はほとんど見られない。

C/EBPβは健常部の肺胞マクロファージの核に発現しているが、病巣部の肺胞マクロファージ及び肉芽腫内のマクロファージには発現していなかった。

12. 考察

HIV-1感染したマクロファージのウイルス産生を促進する因子としてこれまでの報告では、NF-κBが最も重要であると考えられている。今回我々が検討した気管支肺胞洗浄液中のウイルス と同じNF-κBを促進因子とするTNFは非常に緊密な相関関係にあったが、血中CD4数とは一定の関係がなく、CD4が極端に減少した症例では、結核による炎症があってもBAL中のHIV量もTNF量も減少しているという結果がえられた。CD4リンパ球がほとんど見られないHIV/結核重感染の病巣部では、類上皮細胞形成が未熟で、NF-κBの発現が非常に弱く、また、ウイルスの検出も微弱であった。以上の結 は、HIV/結核重感染の病巣部においてCD4リンパ球がNF-κBの産生およびHIV産生に重要な役割をに

なっていることが示唆される。今後、より多くのHIV/結核重感染の病理標本を検討し、検証すると同時にin vitro においてCD4リンパ球のHIV産生に果たす役割について調べていきたい。

13. 結論

HIV結核の病巣部におけるウイルス産生調節機構としてこれまでNF- κ Bが重要であると言われてきたが、それに加えてC/EBP bによるウイルス産生抑制の解除という機構が重要であると思われる。

文献

1) Mycobacterium tuberculosis enhances HIV-1 replication by transcriptional activation at the long terminal repeat. J. Clin. Invest. 95:2324-2331, 1995 Zhang Y, Nakata K, Weiden M, and Rom WN.

2) Limited variability and copy number of proviral DNA in alveolar macrophages from HIV-1 infected patients: J. Mol. Med., 1995, Molecular Medicine, 1, 744757, Koh Nakata, Michael Weiden, Timothy Harkin, David Ho, and William N. Rom.

3) The Effect of Thalidomide on the Pathogenesis of HIV-1 and M. tuberculosis Infection. AIDS Research and Human Retroviruses 1996, 11:247-257 Klausner JD, Makonkawkeyoon S, Nakata K, and Kaplan G.

4) M. tuberculosis enhances human immunodeficiency virus-1 replication in the lung. Am. J. Resp. Crit. Care Med. 155:996. 1997 Nakata K, Rom WN, Honda Y, Condos R, Kanegasaki S, Cao Y, and Weiden M.

5) Type I interferon induces inhibitory 16 kDa C/EBP-b repressing the HIV-1 LTR in Macrophages: pulmonary tuberculosis alters C/EBP expression enhancing HIV-1 replication. J. Exp. Med. 188:1255. 1998. Honda Y, Rogers L, Nakata K, Zhao BY, Pine R, Rom WN, and Weiden M.

6) Differentiation of monocytes to macrophages switches the Mycobacterium tuberculosis effect on HIV-1 replication from stimulation to inhibition: modulation of interferon response and CCAAT/enhancer binding protein b expression, Journal of Immunology, 2000, 165:2028-2039, Mi Weiden M, Tanaka N, Qiao Y, Honda Y, Nakata K, Rom WN, and Pine R

7) Comparison of antimycobacterial activity of grepafloxacin against Mycobacterium avium with that of levofloxacin: Accumulation of grepafloxacin in

human macrophages

J. Infection and Chemotherapy, in press, Hirota M, Totsu T, Adachi F, Kamikawa K, Watanabe J, Kanegasaki S, and Nakata K

厚生科学研究費補助金
分担研究報告書

改良型抗結核ワクチンの開発 : Ag85 complex の応用に関する研究

分担研究者 内藤 真理子 (長崎大学歯学部口腔細菌学講座)

A. 研究目的

現在用いられている抗結核ワクチンである BCG のその効果の評価は各調査ごとにばらついている。共通なのは BCG を上回る、より効果的な抗結核ワクチンの開発が必要とされることである。そこで、近年、結核防御抗原として注目を集める Ag85 complex に注目した。そこで本研究においてこの Ag85 complex 抗原をもちいた改良型抗結核ワクチンの開発を目指した。

また抗酸菌の病原性を解析する為、抗酸菌の増殖調節に関わる因子の検索を行う。

B. 研究方法

1 Ag85 complex 発現ベクターの作成

Ag 85 complex は3つのコンポーネント、Ag85A、Ag85B、Ag85C からなる。そこでこれらの遺伝子を BCG 染色体ゲノムよりクローニングし、我々のグループが開発した抗酸菌用の発現ベクターに組み込んだ。また、Ag 85 complex と相同性が高く、交差反応をしめす MPB51 の遺伝子も同様に調整し、発現ベクターに組み込んだ。

2 DNA ワクチン用遺伝子作成

DNA ワクチン用発現ベクターに組み込むため、1で得られた各遺伝子 DNA 断片調整し分担研究者に提供した。

3 リコンビナント BCG 作成

BCG Tokyo 株を1にて作成した各発現ベクターをエレクトロポレーション法にて導入する。形質転換されたリコンビナント BCG を培養し、Ag 85 complex と MPB51 の培養上精中への発現を調べた。各抗原の発現は培養上精を2次元電気泳動にて展開し、ウェスタンブロッティング法にて確認する。また発現量は2次元電気泳動したゲルを CBB 染色し、スポット解析にて測定した。

4 リコンビナント BCG のワクチン効果の検定

マウスに今回作成したリコンビナント BCG と BCG 菌をマウスの皮下に接種する。接種一ヶ月後に脾臓を取り出し、脾細胞を調整する。この脾細胞を精製 Ag 85 complex で再刺激し、誘導されるサイトカインを測定した。

5 抗酸菌の増殖調節に関わる因子の検索

菌の増殖に DNA 結合蛋白質が関わることが多く報告されていることから、BCG 菌の DNA 結合性蛋白質を検索した。BCG 菌の染色体 DNA を制限酵素で消化し、発現用ファージベクターに組み込み、ライブラリーを作成した。この発現ライブラリーより DNA に結合するクローンを得た。このクローンをもとに遺伝子の全体をクローニングし塩基配列を決定した。またこの遺伝子がコードする蛋白質を BCG 菌体から精製した。

C. 研究結果

Ag 85 complex の各コンポーネントと MPB51 の各遺伝子を導入したリコンビナント BCG が得られた。各々のリコンビナント BCG は導入された遺伝子により、親株の 7-8 倍の Ag 85 complex の各コンポーネントや MPB51 を大量に発現することが確かめられた。さらにマウスを用いた実験により、このリコンビナント BCG は従来の BCG よりもインターフェロン γ が多く誘導できることが確認された。インターフェロン γ は抗結核免疫の要となることから、結核防御ワクチンとして有望であると考えられた。

また抗酸菌の病原性を解析する為、抗酸菌の増殖調節に関わる DNA 結合蛋白質 (Mycobacterial DNA binding Protein 1 : MDP1) を精製、同定し、遺伝子をクローニングした。また精製蛋白質を用いた実験により DNA 結合性を確認した。

D. 健康危険情報

該当なし

E. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1 発表日 / 平成 12 年 5 月 30 日

学会・雑誌名

第 73 回日本細菌学会総会 (札幌)

発表内容 (演題等)

組み換え BCG ワクチンによる *Mycobacterium leprae* の増殖抑制

山田毅、大原直也、松岡正典、野間口博子、内藤真理子

2 発表日 / 平成 12 年 7 月 21 日

学会・雑誌名

US-Japan cooperative medical science program,

Thirty-Fifth Tuberculosis and Leprosy Research Conference

(横浜)

発表内容 (演題等)

Inhibition of multiplication of *Mycobacterium leprae* in mouse foot pads by recombinant BCG vaccination

N. Ohara, M. Matsuoka, H. Nomaguchi, M. Naito and T. Yamada

F. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得、2. 実用新案登録、3. その他 とも無し (予定を含む)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamoto, S., Yamamoto, T. and Tokunaga, T.	Oligodeoxyribonucleotides with 5'-ACGT-3' or 5'-TCGA-3' sequence induce production of interferons.	Current Topics Microbiol. Immunol. Immunobiology of Bacterial CpG-DNA	247	23-39	2000.
Yamamoto, S., Yamamoto, T. and Tokunaga, T.	The discovery of immunostimulatory DNA sequence.	Springer Seminors in Immunopathology.	22	11-19	2000.
Yamamoto, S., Yamamoto, T., Iho, S. and Tokunaga, T.	Activation of NK cell (human and mouse) by immunostimulatory DNA sequence.	Springer Seminors in Immunopathology.	22	35-43	2000.
山本十糸子, Phalen, S., 内田和幸, 梅森清子, 野島康弘, 堀内善信, 後藤義孝, McMurray, D.N., 山本三郎	BCG Tokyo 172 株の抗結核効果：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	2000.
山本三郎	結核 DNA ワクチン。	ワールド・フォーカス (バイオメディカルサイエンス研究会)	14	1-2	2000.
山本三郎	結核菌感染後の発症予防。	日本薬学会ホームページ	ホットニュース、 www.pharm.or.jp/hot-news/		
伊保澄子, 山本三郎	非メチル化 CpG-DNA による NK 細胞の活性化。	Annual Review 免疫	2001	137-146	2000.
Naka, T., N. Fujiwara, E. Yabuuchi, M. Doe, <u>K. Kobayashi</u> , K. Kato, and I. Yano.	A novel sphingolipid containing galacturonic acid and 2-hydroxy fatty acid in cellular lipids of <i>Sphingomonas yanoikuyae</i> .	J. Bacteriol.	182	2660-2663	2000.
Hamasaki, N., K. Isowa, K. Kamada, Y. Terano, T. Matsumoto, T. Arakawa, <u>K. Kobayashi</u> , and I. Yano.	In vivo administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits.	Infect. Immun.	68	3704-3709	2000.
Lu, J., T. Kasama, <u>K. Kobayashi</u> , Y. Yoda, F. Shiozawa, M. Hanyuda, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi.	Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis.	J. Immunol.	164	5922-5927	2000.
Saita, N., N. Fujiwara, I. Yano, K. Soejima, and <u>K. Kobayashi</u> .	Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> induces corneal angiogenesis in rats.	Infect. Immun.	68	5991-5997	2000.
Yamagami, H., T. Matsumoto, N. Fujiwara, T. Arakawa, K. Kaneda, I. Yano, and <u>K. Kobayashi</u> .	Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> induces foreign-body- and hypersensitivity-type granulomas in mice.	Infect. Immun.	69	810-815	2001.
小林 和夫	結核菌感染防御における interleukin 12 の役割。	臨床免疫	35	1-7	2001.

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kayama S, <u>Mitsuyama M</u> , Sato N & Hatakeyama K:	Overgrowth and translocation of Escherichia coli from intestineduring prolonged external feeding in rats.	Journla of Gastroenterology.	35(1):	15-19,	2000.
Ishiguro, T., Naito,M., Yamamoto,T., Hasegawa,G., Gejo,F. <u>Mitsuyama,M.</u> Suzuki, H. & Kodama, T.:	Role of macrophage scavenger receptors in response to Lsiteria monocytogenes infection in mice.	American Journal of Pathology.	158:	179-188,	2001.
Baba H, Kawamura I, Kohda C, Nomura T, Kimoto T, Ito M, Watanabe I & <u>Mitsuyama M</u> :	Essential role of domain 4 of pneumolysin from Streptococcus pneumoniae in cytolytic activity as determined by truncated proteins.	Biochemical and Biophysical Research Communications.	281:	37-44,	2001.
<u>Akagawa, K.S.</u> , Komuro, I., Yamazaki, T. and Haga, S.:	M-CSF but not GM-CSF induced human monocyte-derived macrophages inhibit growth of M. tuverulosis.	Proceedings of Thirty-fourth U.S. Japan Tuberculosis and Leprosy Research Conference,	p.	115-118,	2000.
<u>赤川清子</u> :	結核の免疫、	Pharma Medica	Vol. 18 (10):	19-25,	2000.
<u>赤川清子</u> 、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.
持田恵子、 <u>赤川清子</u> :	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.
Mari Takizawa, Jo Chiba, <u>Shinji Haga</u> , Toshihiko Asano, and Mitsuo Honda:	Expansion of Ia positive activated T cells in primary response to Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) in guinea pigs and its biological significance.	Cytometry Research,	10(2):	43-48,	2000.
<u>I. Sugawara</u> , S. Mizuno, H. Yamada, M. Matsumoto and S. Akira:	Disruption of nuclear factor-IL6, a transcription factor, results in severemycobacterial infection.	Am. J. Pathol.,	158:	361-366,	2001.
<u>菅原 勇</u> 、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.
H. Yamada, S. Mizuno, R. Horai, Y. Iwakura and <u>I. Sugawara</u> :	Protective role of IL-1 in mycobacterialinfection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice.	Lab. Invest.,	80:	759-767,	2000.
<u>I. Sugawara</u> , H. Yamada, S. Mizuno and Y. Iwakura:	IL-4 is required for defense against mycobacterial infection.	Microbiol. Immunol.,	44:	971-979,	2000.
K. Ohtomo, S. Wang, A. Masunaga, A. Iwamoto and <u>I. Sugawara</u> :	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.
<u>I. Sugawara</u> :	IL-18 and infectious diseases, with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens.	Microbes Infect.,	2:	1257-1263,	2000.
T. Koura, Y. Gon, S. Hashimoto, A. Azuma, S. Kudoh, Y. Fukuda, <u>I. Sugawara</u> , J. Yodoi and T. Horie:	Expression of thioredoxin in granulomas of sarcoidosis: possible role in development of T lymphocyte activation.	Thorax,	55:	755-761,	2000.

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
山本十糸子、S. 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	BCG Tokyo 172 株の抗結核効果：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	2000。
Nakata, K., Honda, Y. and Weiden, M.	Involvement of Interferon in Transcriptional Regulation of HIV production in macrophages co-infected with <i>M. tuberculosis</i> .	Thirty-fourth U.S.-Japan cooperative medical science program-Tuberculosis-leprosy research conference, San Fransisco	40-44	1999	
Nakata, K., Tanaka, N., Honda, Y., Pine, R. and Weiden, M.	The <i>Mycobacterium tuberculosis</i> effect on interferon signaling pathway and C/EBP β expression.	Thirty-fifth U.S.-Japan cooperative medical science program-Tuberculosis-leprosy research conference, Yokohama	143-148	1999	
Weiden, M., Tanaka, N., Qiao, Y., Honda, Y., Nakata, K., Rom, W.N. and Pine, R.	Differentiation of monocytes to macrophages switches the Mycobacterium tuberculosis effect on HIV-1 replication from stimulation to inhibition: modulation of interferon response and CCAAT/enhancer binding protein b expression.	Journal of Immunology	165	2028-2039	2000.
中田 光	結核-21世紀の展望、現代医療。		31(7)	116-120	1999。
中田 光、本田芳広、田中直彦、Michael Weiden、慶長直人	AIDS に合併する結核、日本結核病学会誌。		75(9)	547-556	2000。
中田 光	エイズと結核、日本ハンセン病学会誌。		69	87-92	2000。
中田 光	AIDS と結核、皮膚病診療。		22(9)	802-805	2000。
中田 光	エイズと結核、Pharma Media。		18(10)	61-65	2000。

IV. 研究成果の刊行物・別刷

結核菌と BCG の鑑別同定法

厚生科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業（H10-新興-3；
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）研究班 監修

はじめに

BCGは、CalmetteとGuérinにより、ウシ型結核菌（*Mycobacterium bovis*）をウシ胆汁加馬鈴薯グリセリン培地にて13年間、230代継代され、弱毒化された株で、1921年に*M. bovis* BCGと名付けられた。その後BCGは1924年にロシア、ブラジル、オランダに分与され、わが国には1925年に志賀潔により導入され、1926年にスウェーデンに、1931年にはデンマーク血清研究所に分与された。1931年ParisのAcademie de Medicineは、BCGが無害なことを確認した。各国でそれぞれ継代維持されてきた菌株間に性状の違いが生じてきているが、BCGは現在でも唯一の結核予防ワクチンとして世界中で使われている。BCGによる結核の予防は特に小児において有効で、世界保健機構（WHO）ではBCG接種を予防接種拡大計画（Expanded Programme on Immunization；EPI）の1つにとりあげ、結核予防のために、全世界の新生児にできるだけ早い時期にBCG接種を行うように勧告している。現在わが国では、乳幼児に生後3ヶ月から4歳に達するまでの間に1回BCG接種を行い、小学校1年と中学校1年でツベルクリン反応陰性の人にはBCGを接種している。そのためわが国では1955年以降、0から4歳の結核性髄膜炎による死亡が毎年14.8%の割合で減少し、感染危険率を上回ってきた。しかしBCG接種による副反応も生じている。主に局所リンパ節の腫脹、局所の潰瘍等で重篤な例は少ないが、副反応が強い場合は治療が必要となる¹⁾。そのため、主治医によっては局所リンパ節の摘出や、局所の潰瘍から分離培養が行われる。そこで抗酸菌が分離された場合、分離された抗酸菌が結核菌か、BCGかを明確にする必要があるので、本BCG同定マニュアルに従い、分離菌の同定を行う。

本マニュアルは、厚生科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業（H10-新興-3；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）の援助を受けて作成した。

1 同定検査受け入れ時の確認事項

BCG 同定検査依頼受け入れ時には、依頼者に対し以下のことを確認する。

- 1) 分離菌の由来検体名 (例：腋下リンパ節)
- 2) BCG 接種後、検体採取までの期間
- 3) 健常者からの検体かどうか
- 4) 分離菌が抗酸菌かどうか
- 5) 現行法の検査成績の確認 (ナイアシン試験、硝酸塩還元試験の成績は最低確認する)

2 同定検査

遺伝子増幅法を用いて迅速に検査結果を出し中間報告をする。当面生化学的検査法も平行して行い、遺伝子増幅法の結果を確認し最終報告とする。

1) 遺伝子増幅法

結核菌群に特異的遺伝子であると報告された、*pab*²⁾、*mtp40*³⁾、*MPB64*¹⁾、*pncA*⁵⁾ といった遺伝子を標的としたプライマーを用いて PCR を行い、増幅バンドの有無を確認し、表 2 に示したパターンにより判定する。また、結核菌群の *senX3-regX3* 遺伝子間領域 (intergenic region ; IR)⁶⁾ 増幅用プライマー C5、C3 を用いて PCR 後シーケンスを行う。(図 1)

a. 供試 DNA の準備

各自好みの方法により被検菌より DNA を抽出する。われわれは、1%小川培地 3 週間培養の菌塊 1 白金耳を 100 µl の TE-tritonX100* に懸濁し、100℃で 30 分間加熱、氷冷、12,000×g にて数秒遠心分離した上清を供試 DNA とし、反応液 50µl の系に 3µl を用いて PCR を行っている。

* : 10mM Tris-1mM EDTA(pH8.0) に TritonX100 を 1%になるように調製する。

b. プライマー

MT-1, MT-2 (*pab* 遺伝子) : 試料中の結核菌群 DNA の存在確認用。 *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* の 4 菌種全て 419bp の DNA が増幅される。

PT-1, PT-2 (*mtp40* 遺伝子) : *M. tuberculosis*, *M. africanum* は、319bp の DNA が増幅される。しかし、PT-1, PT-2 により増幅されない *M. tuberculosis* が 20% 存在するので、PCR 陰性の場合には後述のプライマーを用いて、確認する必要がある。

MPB64 T-2, MPB64 T-6 (MPB64 遺伝子) : 結核菌群全て 241bp の DNA が増幅される。しかし、BCG の 4 株 (Copenhagen, Glaxo, Pasteur, Tice) は、MPB64 遺伝子が欠損しているため、増幅されない。

pncA-7, pncA-10 (pncA 遺伝子) : *M. tuberculosis*, *M. africanum* は、185bp の DNA が増幅される。

pncA-7, pncA-11C (pncA 遺伝子) : *M. bovis* は、186bp の DNA が増幅される。

C5, C3 (senX3-regX3 遺伝子間領域) : 結核菌群の *senX3-regX3* 遺伝子間領域増幅用。同一菌種であっても株によって、いろいろなサイズの DNA 断片が増幅される。*M. tuberculosis* と *M. africanum* は、大きさ 329bp で 77bp-MIRU が 2 個、53-bpMIRU が 1 個存在する株が多い。しかし、*M. tuberculosis* でも、大きさ 353bp で 77bp-MIRU の数は 3 個存在するが、53-bp の MIRU は存在しない株もある。BCG 以外の *M. bovis* は、406bp で 77bp-MIRU が 3 個、53-bp-MIRU が 1 個存在している株が多い。BCG-Glaxo, Russia, Tice, Tokyo, Sweden 株は、353bp で 77bp-MIRU の数は 3 個、Pasteur, Moreau, Copenhagen 株は 276bp で 77bp-MIRU の数は 2 個存在するが、53-bp の MIRU は、いずれの BCG 株にも存在しない。

c. PCR

PCR 反応液の組成は、一般的に用いられている組成である。われわれは、耐熱性 DNA Polymerase (宝酒造) のキットを用いて、下記に示す反応液を調製し、用いるプライマーによって表 2 に示したアニーリング温度で、30 サイクルの PCR を行っている。

PCR の結果は、2% アガロースゲル電気泳動を行い、Ethidium bromide 染色後、写真を撮り、増幅されたバンドの確認をしている。(図 2、図 3)

PCR 反応液 (Total 50 μ l)	
H ₂ O	35.7 μ l
X10 buffer (in kit)	5.0
dNTPs (in kit)	4.0
Primer-1 (10 pmol/ml)	1.0
Primer-2 (10 pmol/ml)	1.0
Taq DNA polymerase (5 U/ml)	0.3
Template (TE-tritonX extract)	3.0

d. 判定

被検菌が、*M. bovis* のパターンをとり、*senX3-regX3* IR のシークエンスの結果、53bp の mycobacterial interspersed repetitive unit (MIRU) が存在しなければ BCG である。増幅バンドのサイズが 353bp であり、77bp の MIRU が 3 個存在し、被検菌が日本人由来であれば、BCG-Tokyo 株である。