

Hamster Ovary(I-A^b-CHO)細胞（九州大学生体医学防御研究所 福井 宣規博士より供与された）を抗原提示細胞として用いた。

2. 培養

P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T 細胞を I-A^b-CHO 細胞存在下に Peptide-25 (FQDAYNAAGGHNAVF) または APL(FQDAYNAA AGHNAVF)で刺激した。刺激 6 日後に生細胞を回収し、固相化抗 CD3 で刺激した。

3. サイトカイン検出法

再刺激 1 日後に産生されるサイトカインを細胞内サイトカイン染色法にて検討した。また、培養上清に含まれるサイトカインは ELISA を用いて測定した。

4. mRNA の定量

ナイーブ CD4⁺ T 細胞を I-A^b-CHO 細胞存在下に Peptide-25 で刺激を行い、刺激 3、6、9、12、15、18 時間後の細胞より mRNA を調製し、Real-Time PCR 法にて mRNA 量を定量した。

5. アジュバント効果の検討

CFSE 標識した OT-1 CD8⁺ T 細胞を C57BL/6 脾臓由来抗原提示細胞存在下に OVA で刺激する際に P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T 細胞及び Peptide-25 または APL を添加し、OT-1 CD8⁺ T 細胞の細胞分裂回数及び IFN- γ 産生を指標に Peptide-25 のアジュバント活性を検討した。

(倫理面への配慮)

実験に供したマウスは東京大学医科学研究所の動物実験指針に基づき行った。

C. 結果

脾臓細胞由来抗原提示細胞存在下に P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T 細胞を Peptide-25 で刺激すると、自然条件でさえ Th1 細胞へと分化すること、この分化がサイトカイン(IFN- γ 、IL-12、IL-18)や副刺激分子(CD28、CTLA-4、LFA-1、ICOS)に依存しないことを明らかにし、TCR とペプチド/MHC クラス 2 分子の相互作用のみで Th1 細胞への分化規定しうることをこれまでの本研究で示してきた。本年度は、TCR からの活性化シグナルにより、Th 分化を誘導する因子が誘導されうるか検討した。P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T 細胞を I-A^b-CHO 細胞存在下に Peptide-25 刺激を行うと、Th1 細胞へと分化し、一方 APL 刺激を行うと Th2 細胞へと分化する。そこで、Peptide-25 または APL 刺激後の Th 分化規定因子 T-bet、GATA-3 の mRNA 発現を検討したところ、Peptide-25 刺激では 3 時間及び 15 時間をピークとする Th1 規定因子 T-bet の発現誘導、Th2 規定因子 GATA-3 の発現抑制が見られた。一方、APL 刺激では T-bet の発現上昇は見られず、GATA-3 は高濃度で発現が維持された。

TCR 活性化シグナルで誘導される Th1 分化における T-bet の役割に関して T-bet 欠損 P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T

細胞を用い検討した。T-bet 欠損 P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T 細胞を I-A^b-CHO 細胞存在下に Peptide-25 で刺激を行うと、野生型では全く見られなかった IL-4 を産生する Th2 細胞への分化誘導される一方、IFN- γ を産生する Th1 細胞への分化も依然として見られた。また、Peptide-25 刺激後の GATA-3 の発現を検討した結果、T-bet 欠損 P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T 細胞においても GATA-3 の発現低下が見られた。

次に、脾臓細胞由来抗原提示細胞を P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T 細胞を存在下に Peptide-25 で刺激を行うと、IL-12、IL-23、IL-27 産生が誘導され、CD40、CD80、CD86 の発現が上昇すること、この活性に伴い MHC クラス 1 抗原提示能が上昇し、OVA 特異的 CD8⁺ T 細胞の増殖を增强できることをこれまでの本研究にて明らかにしてきた。抗原提示細胞の MHC クラス 1 発現及び CD8⁺ T 細胞の活性化に IFN- γ が重要な役割を果たしていることはよく知られている。本年度は、このアジュバント効果における IFN- γ の役割に関して検討した。野生型または IFN- γ 欠損 P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T 細胞と野生型または IFN- γ 欠損脾臓細胞由来抗原提示細胞を用い、OT-1 CD8⁺ T 細胞の増殖及び IFN- γ 産生を指標にアジュバント効果を検討した結果、T 細胞及び抗原提示細胞の IFN- γ の欠損は OT-1 CD8⁺ T 細胞の分裂増殖にはほとんど影響を与え

ず、OT-1 CD8⁺ T 細胞の IFN- γ 産生のみを減弱させることが明らかになった。

Peptide-25 の代わりに APL で刺激を行うと、抗原提示細胞の副刺激分子の発現は Peptide-25 とほぼ同程度に誘導されるが、OT-1 CD8⁺ T 細胞の増殖分裂に対する増強効果は減弱した。

D. 考察

既知のサイトカインの産生や副刺激分子の発現が認められない CHO 細胞を抗原提示細胞として用い TCR からのみ活性化シグナルを惹起した場合にも Peptide-25 や APL 刺激によって T-bet、GATA-3 の発現を調節し、それぞれ Th1、Th2 細胞へと分化できることから、ナイーブ CD4⁺ T 細胞にとって最初の活性化シグナルを伝達する TCR からのシグナルが Th 細胞の分化の第 1 シグナルであることが明らかになった。また、Th1、Th2 分化誘導に必要なそれぞれに特異的なシグナルが TCR 結合部位の 1 アミノ酸の違いによって誘導される可能性が示唆された。

T-bet 欠損 P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T 細胞を Peptide-25 と I-A^b-CHO で刺激すると野生型では見られない Th2 細胞への分化が見られたことから、T-bet が Th1 細胞への分化を規定する重要な因子であること、しかしながら依然として Th1 細胞への分化が見られることから T-bet とは異なる Th1 分化誘導機構が存在

することが明らかになった。

また、Peptide-25 存在下に P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T 細胞との相互作用によって活性化した抗原提示細胞は OT-1 CD8⁺ T 細胞の増殖分裂を増強するが、APL ではその作用が減弱することから、Peptide-25 のアジュバント効果には P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T 細胞が Th1 細胞へと分化することが必須であることが示された。この Th1 分化に伴って誘導される IFN- γ は OT-1 CD8⁺ T 細胞の IFN- γ 産生に対しては増強効果を示すものの、分裂増殖には影響を与えないことから、抗原提示細胞の MHC クラス 1 抗原提示能の亢進には IFN- γ は必須ではないことが明らかになった。

E. 結論

結核菌分泌タンパク Ag85B 由来 Peptide-25 は TCR との相互作用により、副刺激分子やサイトカイン非依存的に Th1 分化を誘導できること、この TCR からの分化誘導シグナルは Th1 分化調節因子 T-bet の発現のみならず、T-bet と同等の機能を有する未知の因子の発現を誘導することが明らかになった。

また、Peptide-25 によって誘導された Th1 細胞が IFN- γ 非依存的に抗原提示細胞のクロスプレゼンテーションを増強できることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

I. Kikuchi, T., Uehara, S., Ariga, H., Tokunaga, T., Kariyone, A., Tamura, T., Takatsu, K. 2005. Augmented induction of CD8⁺ cytotoxic T-cell response and antitumour resistance by T helper type 1-inducing peptide. *Immunology*. 117:47-58.

2. 学会発表

- ① 菊池 剛史、田村 敏生、刈米 アイ、高津 聖志：Th1 誘導ペプチドによる抗腫瘍免疫増強機構の解析、第 64 回日本癌学会学術総会記録、第 64 巻、p492、2005。
- ② Xu, W., Tamura, T., Takatsu, K.: CpG ODN-mediated prevention from ovalbumin-induced anaphylaxis in mouse through B cell pathway、第 35 回日本免疫学会総会・学術集会記録、第 35 巻、p175、2005。
- ③ 下袴田 陽子、徳永 岳史、仲田 真己代、有賀 晴之、刈米 アイ、田村 敏生、高津 聖志：TCR シグナルを介する Th1 分化における転写因子 T-bet の役割；T-bet ノックアウトマウスを用いた解析、第 35 回日本免疫学会総会・学術集会記録、第 35 巻、p228、2005。
- ④ 刈米 アイ、菊池 剛史、田村 敏

生、高津 聖志：結核菌蛋白 Ag85B
由来 Peptide-25 によるクロスプライ
ミングの増強、第 35 回日本免疫学会
総会・学術集会記録、第 35 巻、p266、
2005。

- ⑤ 徳永 岳史、下袴田 陽子、菊池 剛
史、仲田 真己代、有賀 晴之、刈
米 アイ、田村 敏生、高津 聖志：
TCR:抗原ペプチド MHC 複合体の相
互作用による IL-12p35 の制御、第 35
回日本免疫学会総会・学術集会記録、
第 35 巻、p266、2005。

H. 知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし。

「抗酸菌感染の国際的対応への貢献を目指した基盤に関する研究」

分担研究課題：マクロファージの結核菌殺菌能の分化制御

分担研究者 赤川清子 国立感染症研究所 免疫部 室長

研究要旨 結核菌に対する増殖制御活性の異なるヒト単球由来M型マクロファージ（M ϕ ）及びGM型M ϕ における結核菌の増殖に關与することが知られているカタラーゼの発現の違いについて解析した。その結果、カタラーゼは、結核菌の増殖を促すGM型M ϕ では産生が高くかつCSF非依存性に、結核菌を殺菌するM型M ϕ では産生が低くかつCSF非依存性に産生されること、またカタラーゼは、*BCL-2*ファミリー遺伝子の発現を介してヒトM ϕ の生存に關与していることが明らかになった。

A. 研究目的

結核菌の主な増殖場所はマクロファージ（M ϕ ）内であるため、感染初期での生体内の結核菌の増減はM ϕ が要となる。M ϕ の結核菌に対するエフェクター機構として、ROI及びRNIが知られている。一般的に結核菌は、ROIにたいし抵抗性を示す。それは、結核菌の *villence gene* として知られているカタラーゼ遺伝子（*KatG*）の作用による。*KatG*はM ϕ の産生するROIをスカベンジする事で、M ϕ 内での結核菌の生存及び増殖を可能にしている。

先に、ヒト単球よりM-CSFにより誘導したM型M ϕ は結核菌を殺菌するが、GM-CSFにより誘導したGM型M ϕ は結核菌の増殖を促すことを明らかにした。この結果は、M ϕ の種類が異なると同一の菌が感染してもその後の菌の増殖応答が異なることを示している。*KatG*が *villence gene* として重要なことから、

M ϕ の結核菌感染感受性の違いの理由として、M ϕ 側のカタラーゼ産生能の違いも考えられる。そこで、本研究では、M型M ϕ 及びGM型M ϕ の結核菌に対する応答能とカタラーゼ産生能が關連するか否か検討し、また結核菌感染にとり重要な役割を果たす肺胞M ϕ との比較検討を行った。

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、正常ボランティアの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M-CSF（100ng/ml）およびGM-CSF（50 ng/ml）存在下に10%FCSを含むRPMI1640培地で1週間培養し、M型M ϕ 及びGM型M ϕ を

作製した。

健常者由来の肺胞 MΦは、肺胞洗浄法にて回収した。これら細胞におけるカタラーゼの酵素活性は、スコポルチン法で測定した。カタラーゼ及び *BCL-2* ファミリー遺伝子の発現は、ノーザンブロットまたは RT-PCR で、蛋白発現は、それぞれの分子に対する抗体を用いてウエスタンブロットにより検討した。細胞のアポトーシスは、DNA 断片化及び TUNEL 法により測定した。

(倫理面への配慮)

正常ボランティアよりの血液及び肺胞 MΦの採取に関しては、インフォームドコンセントを得た。

C. 結果

1. 単球由来 MΦ のカタラーゼ産生能と MΦ の生存

結核菌感染感受性の異なる M 型 MΦ と GM 型 MΦ はカタラーゼ産生能が異なり、M 型 MΦ ではコロニー刺激因子 (CSF) 依存性であるが、GM 型 MΦ では CSF 非依存性であり、その産生量も多いことが知られた (Fig. 1)。また、CSF を除いた M 型 MΦ は、アポトーシスを誘導したが、GM 型 MΦ は、CSF を除去しても生存し続けた。CSF を除去した M 型 MΦ に CSF 非存在下に培養した GM 型 MΦ の培養上清を添加した結果、M 型 MΦ の生存は維持された (Fig. 2)。しかし、抗カタラーゼ抗体で処理した培養上清には生存維持活性は認められなかった (Fig. 3)。一方、ヒトの赤血球由来カタラーゼ添加も CSF 除去 M 型 MΦ の生存を維持した (Fig. 2)。CSF 依存 M 型 MΦ 及び CSF 依存及び非依存 GM 型 MΦ の生存は、培養系に抗カタラーゼ抗体を添加する事で阻害された。そこにヒトの赤血球

由来カタラーゼを添加すると回復が認められた。

これらの結果は、カタラーゼが MΦ の生存に重要な役割をはたしていることを示すと同時に、カタラーゼの産生制御機構は、M 型 MΦ と GM 型 MΦ で異なることを示している。

2. *BCL-2* ファミリー遺伝子の発現に対するカタラーゼの影響

細胞の生存には、*BCL-2* ファミリー遺伝子が重要な役割を果たしている。上記結果は、カタラーゼがそれらの遺伝子の発現を制御する事で MΦ の生存に関与していることを示唆している。そこで、M 型 MΦ 及び GM 型 MΦ の *BCL-2* 遺伝子及びその蛋白質の発現とカタラーゼの関連を検討した。その結果、カタラーゼは M 型 MΦ では *BCL-2* の発現を、GM 型 MΦ と肺胞 MΦ では *BCL-X_L* の発現を誘導することが示された (Fig. 4 and 5)。また、*BCL-2* や *BCL-X_L* のアンチセンスオリゴヌクレオチドや RNAi を用いた実験から、*BCL-2* は、M 型 MΦ の生存に、また *BCL-X_L* は GM 型 MΦ の生存に重要なことが明らかになった。

3. ヒト肺胞 MΦ のカタラーゼ及び *BCL-2* ファミリー遺伝子の発現

ヒトの肺胞 MΦ は、結核菌の増殖にとり重要な場となる細胞である。そこで、この細胞のカタラーゼ遺伝子及びカタラーゼによる *BCL-2* ファミリー遺伝子及びその蛋白質の発現を検討した。その結果、肺胞 MΦ のそれらの発現は、GM 型 MΦ と同じであった (Fig. 5)。

D. 考察

今回の結果より、結核菌殺菌活性を有する M 型 MΦ と結核菌の増殖を促す GM 型 MΦ では、カタラーゼ産生能が異なる

ことが明らかになった。カタラーゼは、結核菌の増殖にポジティブに働くことより、このカタラーゼ産生能の違いも M 型Mφと GM 型Mφの結核菌感染感受性の違いの理由の一つと考えられる。

GM型Mφは、形態、細胞表面マーカーの発現様式、HIV-1 感染感受性においてヒトの肺胞Mφと同じであることを既に報告した。今回、GM型Mφとヒト肺胞Mφは、カタラーゼ遺伝子、*BCL-2* ファミリー遺伝子及びそれらのの蛋白の発現様式においても同じであることを明らかにした。これらの結果は、GM型Mφをヒトの肺胞Mφのモデルとして結核菌感染実験に用いることが可能であることを示唆している。

E. 結論

1. 結核菌感染感受性の異なるM型Mφと GM型Mφはカタラーゼ産生能が異なり、M型Mφでは CSF 依存性であるが、GM型Mφでは CSF 非依存性である。

2. カタラーゼはM型Mφでは *BCL-2* の発現を、GM型Mφと肺胞Mφでは *BCL-X_L* の発現を誘導してMφの生存に関与している。

3. ヒト肺胞Mφは、カタラーゼ産生能、*BCL-2* ファミリー遺伝子及びその蛋白の発現様式において GM型Mφと同じであった。

4. 結核菌の KatG にみられるように、カタラーゼはMφの ROI に対し抵抗性を与え、結核菌の増殖にポジティブに働くことより、M型Mφと GM型Mφのカタラーゼ産生能の違いも両Mφの結核菌感染感受性の違いの理由の一つと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Komuro, I., Yasuda, T., Iwamoto, A. and Akagawa, K.S. : Catalase plays a critical role in the CSF-independent survival of human macrophages via regulation of the expression of Bcl-2 family genes. **J. Biol. Chem.** 280:41137-41145, 2005.

2. Akagawa, K.S., Komuro, I., Kanazawa H., Yamazaki, T., Mochida, K. and Kishi, F.: Functional Heterogeneity of Colony-Stimulating Factor-Induced Human Monocyte-Derived Macrophages. **Respirology** 11:S32-S36, 2006

1. 学会発表

赤川清子、金沢裕子、岸 文雄：結核菌感染ヒト単球由来マクロファージにおける Hck 及び C/EBPβの発現、第35回日本免疫学会総会・学術集会、平成17年12月14日、横浜市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

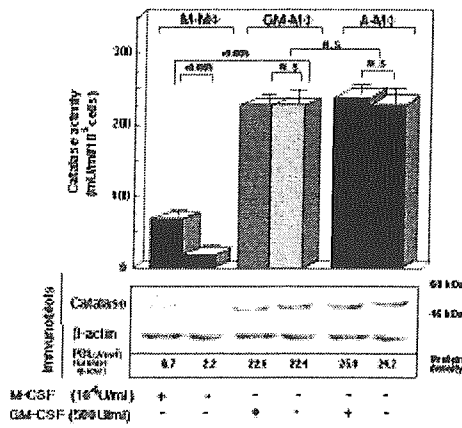


Fig. 1 Enzyme activity and protein levels of catalase in monocyte-derived MΦs and A-MΦ.

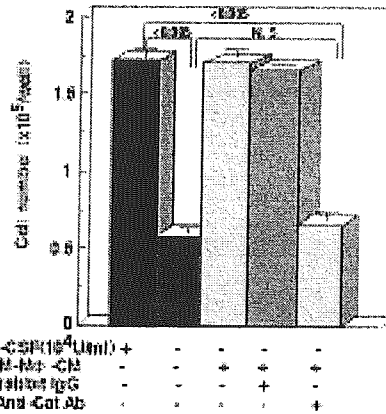


Fig. 3 Anti-catalase antibody abolishes the effect of GM-MΦ-CM on the survival of CSF-withdrawn M-MΦ

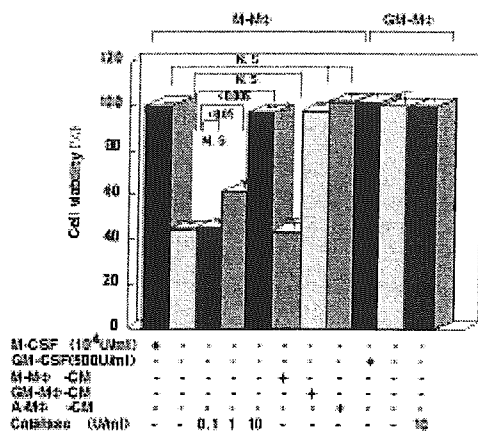


Fig. 2 Effect of conditioned medium (CM) and catalase on the survival of CSF-withdrawn M-MΦ

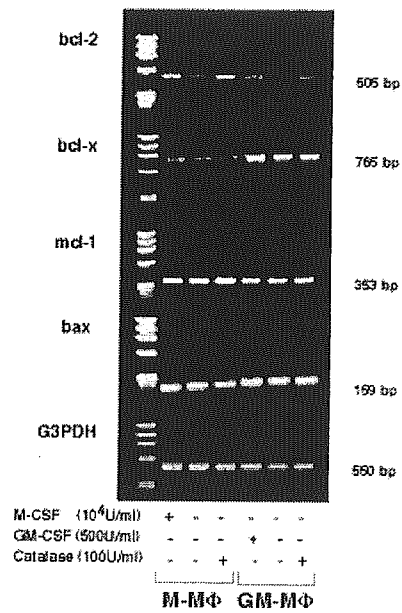


Fig. 4 Effects of CSF and catalase on the levels of mRNA expression of BCL-2 family genes in monocyte-derived M-MΦ and GM-MΦ.

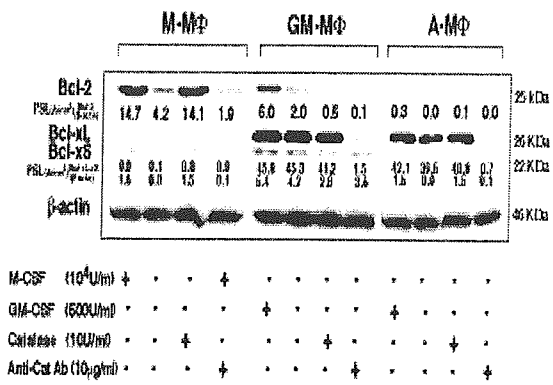


Fig. 5. Effects of CSF and catalase on the expression of BCL-2 family proteins in monocyte-derived MΦs and Alveolar-MΦ.

非結核性抗酸菌症と CFTR 遺伝子

分担研究者 慶長直人、MH Nam, 土方美奈子、小林信之、豊田恵美子、田中剛、工藤宏一郎、永井英明、倉島篤行、庄嶋淳子、松下育美、櫻田紳策（国立国際医療センター、国立病院機構東京病院）

研究要旨

非結核性抗酸菌症特に *M. Avium*, *M. Intracellulare* の2種の菌種よりなる MAC 症は、近年、我が国での増加が報告されており、進行は緩徐ながら、慢性、難治性で、各種抗結核剤への反応も不十分なため、大きな問題となっている。特に中高年の女性に発症する肺 MAC 症は、全身的な免疫抑制状態や既往症などを伴わず発症する。経過途中で、*M. Avium* と *M. Intracellulare* が交代することなどもあり、基礎に何らかの宿主側の肺局所の粘膜防御因子の傷害があることが予測される。我々は、CFTR 遺伝子の遺伝子変異のうち、アジア人に高頻度に見られ、機能的意義が確立しているイントロン8の poly-T および TG リピートに注目し、解析を行ったところ、異常なスプライシングを生じやすいことの知られる 5T アリルと long TG リピート (TG12, TG13) が、低頻度ながら、対照群に比べ、MAC 群に有意に高頻度で見られた。宿主側の遺伝子多型が MAC 症の発症に関連している可能性を示唆した。

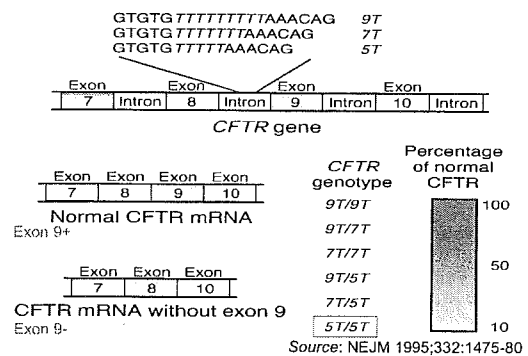
A. 研究目的

非結核性抗酸菌症特に *Mycobacterium avium* complex (MAC)症感染症は近年増加傾向にある。HIV 感染に伴う全身性 MAC 症、全身の免疫不全状態を伴わない肺 MAC 症がみられるが、われわれは、中高年女性に多く発症し、発症機構の不明な肺 MAC 症に焦点をあて、宿主側の発症要因を探究している。

CFTR 遺伝子は嚢胞性線維症(CF)の責任遺伝子であり、3塩基の欠失が CFTR の機能欠損を来し、欧米人の CF の主要な原因となっている。CF においては、慢性気道感染症を主要な特徴の一つとしており、MAC 易感染性もよく知られている。CFTR 遺伝子には多くの遺伝子多型が知られ、その中には、アジア人にも稀ならずみられ、しかも CFTR 遺伝子の機能に影響を与える高頻度の多型もあり、その代表として、イントロン8にあるポリT多型は、エクソン9のスキッピングの頻度に関連し(図1)、正常 CFTR の生成量と関連し、気管支拡張症など慢性気道疾患との関連が報告されてきた。そこで、本年度、この遺伝子多型と MAC 症発症

との関連を検討することとした。

図1 CFTR 遺伝子のイントロン8に見られる Poly-T 多型とスプライシング異常



B. 方法

国立病院機構東京病院と国立国際医療センターの共同研究により得られた 121 症例を対象とした。MAC 症の診断は臨床徴候、画像所見、菌の検出頻度に基づく、アメリカ胸部疾患学会の基準に従い、菌の同定は検査室レベルで PCR キットを使用した。

明らかな免疫不全状態や免疫抑制療法を行っている症例は除外された。

Poly-T 多型は、これまでも報告されてきた双方向性塩基配列決定により、タイピングした。プライマーペアは、イントロン8とエクソン9の接合部に、センス側 5'-GAT CAT GTC CTC TAG AAA CCG-3', アンチセンス側 5'-CAA ATT AAG TTC TTA ATA GTG-3' を設定し、Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems). とオートシーケンサー (ABI Prism3100) を用いて塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子解析に関しては、三省合同の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠した当施設の遺伝子解析に係わる倫理委員会の承認を受けている。

C. 結果

MAC 症 121 例の平均発症年齢は、60.5 歳、男性 28 例、女性 93 例、起炎菌は、M. Avium 99 例、M. Intracellulare 12 例、MAC 症 (菌種記載無し) 10 例であった。

イントロン8の poly-T 多型には、T5, T6, T7, T9 が見られ、健常人 (2n =200) では、それぞれ、0.5%、0.0%、99.0%、0.5% であり、T7 が主要なアリルであった。一方、MAC 症 (2n=242) では、同様に、3.7%、0.4%、94.7%、1.2% と特に、T5 アリルの頻度が MAC 症例で有意に高かった (p=0.026)

T5 アリルを有する 8 症例 (うち 1 例は T5 アリルのホモ接合) の発症年齢、男女比、菌種などについては、T5 アリルを持たない症例と区別できるような臨床的特徴は認められなかった。

D. 考察

CF は欧米人の疾患として知られているが、その責任遺伝子である CFTR には多くの遺伝子多型が存在し、その遺伝子発現に影響を与える多型も存在する。その中で、特にアジアで頻度が高く、エクソン9のスキッピングの原因となることが知られる、イントロン8のポリT多型に注目して、検討を行った。その結果、最もエクソン9のスキッピングが見られやすい 5T アリルの頻度が、MAC

症例で有意に高かった。5T アリルのホモ接合体では、エクソン9のスキッピングが全 mRNA の 90% におよび、正常 CFTR 量が 1 / 10 程度まで減少することが実験的に知られている。この多型は、これまでもびまん性気管支拡張症や気管支喘息など慢性気道疾患との関連が報告されてきた。特に T5 多型は、その配列に続く TG リピートの数が多い (TG12, TG13) と合わさると、さらにエクソンスキッピングを起こしやすくなることが知られ、アジア人の T5 アリルは、欧米人に比べ、この long リピートを多く有することも、われわれの検討から明らかにされた。したがって、アジア人の原因不明の慢性気道感染症の発症に、この多型が一部関与している可能性が考えられた。T5 アリルを片側だけ有するヘテロ接合の場合の病的意義については不明な点が多いため、今後の検討を必要とする。

E. 結論

CFTR 遺伝子の遺伝子変異のうち、異常なスプライシングを生じやすいことの知られるイントロン8の 5T アリルと long TG リピート (TG12, TG13) が、低頻度ながら、対照群に比べ、MAC 群に有意に高頻度で見られた。宿主側の遺伝子多型が MAC 症の発症に関連している可能性を示唆するものと思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Nam MH, Hijikata M, Tuan LA, Lien LT, Shojima J, Horie T, Nakata K, Matsushita I, Ohashi J, Tokunaga K, Keicho N. Variations of the CFTR gene in the Hanoi-Vietnamese. *Am J Med Genet A*. 136 (3): 249-53, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

抗酸菌感染の国際的対応への貢献を目指した基盤に関する研究

IL-12 系と抗酸菌症感受性に関する研究

分担研究者：白川太郎 京都大学教授

研究要旨：著しい T_H1 活性の低下が抗酸菌症をはじめとした細胞内寄生性病原体への選択的易感染性をきたすことが明らかとなり、“Mendelian susceptibility to mycobacterial disease” という新たな疾患概念が確立されるに至った。そこで白川太郎らは MAC 症 178 例、多剤耐性結核症 48 例について IL-12 系遺伝子をシーケンスした結果、IL-12Rb1 遺伝子 (*IL12RB1*) に注目し、エクソン領域における多型解析を行った。その結果、MAC 症では *IL12RB1* 内に新たな変異を 6 ケ所に認め、全 178 例中 28 例 (13.5%) においてミスセンスあるいはフレームシフト変異を持つことが明らかとなった。これらの変異の機能的な意義については現時点では不明であるが、NTM(non-tuberculosis mycobacteriosis)患者の一部は IL-12/IL-23-IFN-gシステム内に遺伝子変異・欠損を持つ可能性が示唆された。

A. 研究目的

結核などの抗酸菌感染症の発症には宿主側の環境衛生・生活栄養状態といった要因に加え、免疫反応に影響をもたらす遺伝要因が深く関わることがこれまでに強く示されてきた。近年、BCG や非結核性抗酸菌 (NTM) あるいはサルモネラによる致死性の重症感染をきたした家系や小児患者群から、インターロイキン-12 (IL-12) およびインターフェロン-g (IFN-g) といった T_H1 免疫反応の中心を担うサイトカイン関連遺伝子の欠損・変異が相次いで見出された。これら一連の報告により、著しい T_H1 活性の低下が抗酸菌症をはじめとした細胞内寄生性病原体への選択的易感染性をきたすことが明らかとなり、“Mendelian susceptibility to mycobacterial disease” (MSMD; MIM 209950) という新たな疾患概念が確立されるに至った。

IFN-g 産生を誘導するサイトカインである IL-12 と IL-23 は IL-12p40 リガンドおよび IL-12Rb1 受容体を共有することが知られており、これらの遺伝子異常は両サイトカインの機能異常をもたらすと考えられている。MSMD 患者でこれらの遺伝子欠損が見出されていたが、

一般集団レベルでの抗酸菌感染の感受性には、より影響が軽微な遺伝子多型が存在する可能性が考えられていた。我々は IL-12Rb1 遺伝子 (*IL12RB1*) に注目し、エクソン領域における多型解析を行った。その結果、*IL12RB1* 内に 3 か所のミスセンス多型があることを見出し、そのリスクアレルが IL-12 (および IL-23) の受容体に対する反応性を低下させ、最終的に IFN-g を介した T_H1 免疫反応が減弱することで結核感染への感受性に寄与していることを報告した (Akahoshi et al. Hum Genet, 2003)。さらに発現ベクターを用いて *IL12RB1* バリエントの機能解析を行った最近の報告でも、結核のリスクアレルは IL-12 への反応性が低いという我々と同様の結果が得られている (van de Vosse E et al. Hum Mol Genet, 2005)。また、その後の我々の行った関連解析では、 T_H1 反応に関連した他の候補遺伝子については結核感染との相関は認められていない (Akahoshi et al. Hum Genet, 2004)。

B. 研究方法

多剤耐性結核患者 48 名、非定型抗酸菌症患者

者 178 名の患者サンプルを收拾し、IL-12 系遺伝子群 (IL12, IL12RB1, IL12RB2) に関してまず、これまでに知られている SNP(single nucleotide polymorphism) を基に case-control study を行った。その上で、関連を認めた遺伝子群については全患者におけるシーケンスを実施した。

(倫理面への配慮)

解析に用いるヒトサンプルは、すべて、理化学研究所、九州大学及び検体採取施設の倫理委員会に承認され、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省 厚生労働省 経済産業省)」に準拠して行われている。本研究の実施に当たっても、この指針に基づいた各施設内での倫理委員会に申請し、承認後に行った。すでに各施設において使用しているサンプルは同倫理委員会により承認を受け、使用されており、本研究ではこのサンプルを倫理委員会の承認後に使用した。

C. 研究結果

我々の報告を受けて *IL12B1* 遺伝子と結核の関連についての追試が行われ、モロッコ人集団での結核との関連がフランスのグループより報告された (Remus N et al. *J Infect Dis*, 2004)。我々も改めて日本人における *IL12B1* の広範囲な多型検索を行った結果 48 のバリエーションを同定し、機能的なプロモーター多型とアトピー性皮膚炎を含めたアトピー表現型との関連を最近報告した (Takahashi et al. *Hum Mol Genet*, 2005)。これらの結果をもとに、NTM および多剤耐性結核 (MDR-TB) 患者サンプルについても関連解析を行ったところ MDR-TB 患者についてのみ *IL12B1* 多型との弱い相関が認められた。さらに 178 例の NTM 患者サンプルを用いて *IL12B1* の全 17 エクソンについてシーケ

ンスを行ったところ、新たな変異を 6 ヶ所に認め、全 178 例中 28 例 (13.5%) においてミスセンスあるいはフレームシフト変異を持つことが明らかとなった。

D. 考察

これらの変異の機能的な意義については現時点では不明であるが、NTM 患者の一部は IL-12/IL-23-IFN-g システム内に遺伝子変異・欠損を持つ可能性が示唆された。

E. 結論

抗酸菌症の感受性には TH1 遺伝子系、特に IL12 系が重要な役割を果たしていることが明らかとなった

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1)Kutok JL, Yang X, Folkerth RD, Imitola J, Raddassi K, Yano Y, Salahuddin S, Lawitts J, Imboden H, Chinami M, Shirakawa T, Turner H, Khoury S, Sayegh MH, Scadden D, Adra C:

The cell cycle association protein, HTm4, is expressed in differentiating cells of the hematopoietic central nervous system in mice.

J Mol Histol. 2005; 36(1-2):77-87.

(2) Akahashi M, Obara K, Hirota T, Matsuda A, Hasegawa K, Takahashi N, Shimizu M, Nakashima K, Cheng L, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Higashi N, Taniguchi M, Enomoto T, Mao XQ, Nakashima H, Adra CN, Nakamura Y, Tamari M, Shirakawa T: Functional promoter polymorphism in the TBX21 gene associated with aspirin-induced asthma. *Hum Genet*. 2005; 117(1):16-26.

(3) Akahoshi M, Nakashima H, Shirakawa T; Th1 immunity and autoimmune disorders. *Semino Immunol.* 2006 (in press).

H. 知的財産権の出願・登録状況
とくになし。

抗酸菌感染に関わる動物感受性と病原因子に関する研究

分担研究者

後藤 義孝

宮崎大学教授

研究要旨

抗酸菌の感染に対する防御機構には *NRAMP-1* により支配をうける自然抵抗性と細胞性免疫を主体とする獲得抵抗性とが知られている。*NRAMP-1* の遺伝型（表現型）が同じ C57BL/6 (B6) と BALB/c に結核菌を感染させた場合にみられるマウスの感受性差が、感染に対して誘導される免疫の差に起因しているかどうかを調べた。①B6 と BALB に弱毒結核菌 H37Ra 株を 2×10^5 cfu/head で i.v. 感染し、感染後、所定の時期の脾と肺の生菌数をしらべた。②抗原刺激により脾細胞ならびに骨髄マクロファージから産生されるサイトカインの種類と量をしらべた。感染後 2 週目までは両マウスとも臓器内菌数は同じように増加したが、以後、肺、脾の菌数は減少し、その減少率は B6 の方が多かった。感染、非感染に関わらず、B6 の IL-12、IFN- γ の産生能は BALB に比べて高かったことから、前者は後者に比べて生得的に Th1 細胞誘導能が高いと思われた。BALB における感染初期のサイトカインプロファイルは B6 のそれとは異なるが、結果的に IFN- γ 値の上昇、臓器内菌数の減少がみられることから、Th1 を主体とした M₁ 活性化経路とは異なる別経路が賦活されている可能性が考えられた。また両系統マウスが本来保持する M₁ の貪食および殺菌能力には差がほとんど無く、結核に対する防御能の系統差を決定付けているのは、感染により産生される Th1 細胞誘導因子、および M₁ 活性化因子の量的差であると考えられる。このことが両系統における感染防御能や肉芽腫形成能の違いに影響を与えていると思われる。

A. 研究目的

Mycobacterium tuberculosis 以下 M.tb と略す) は生体内においてマクロファージ (以下 M Φ と略す) に捕食され、同細胞内で増殖する細胞内寄生病原体である。M Φ に寄生して増殖する病原体のいくつかは *NRAMP1* 遺伝子の影響をうける。マウスを用いた実験では、*NRAMP1* 遺伝子の突然変異がウシ型結核菌 *M.bovis* やトリ型結核菌 *M.avium* に対する感受性を高めることが分かっている。同遺伝子は自然抵抗性を支配すると考えられており、感染初期において重要な働きをしていると考えられている。しかし M.tb 感染においては *NRAMP1* 遺伝子型と感受性との

間に相関性はみられない。例えば結核菌 (M.tb) Erdman 株の実験感染では *NRAMP1* 遺伝子型が同じ感受性型である C57BL (B6) と BALB にも生存期間の差がみられ、C57BL の方が強い抵抗性を示す。

M.tb 感染においては T 細胞を主体とする獲得免疫が抵抗性に重要な働きをしていると思われる。獲得免疫は抗原提示細胞により T 細胞に抗原が提示されることから始まる。ナイーブ T 細胞は TCR を介して抗原提示細胞から刺激を受け活性化され、最終的に 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) もしくは 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) へと分化する。ヘルパー T 細胞は産生するサイ

トカインの違いによって区別され、異なる免疫反応を制御しており、一般に Th1 は IL-12、IFN- γ を産生し、細胞性免疫反応による細胞内寄生微生物に対する感染防御において重要な働きをするのに対し、Th2 は IL-4、IL-10などを産生し、体液性免疫反応による細胞外寄生微生物に対する感染防御に関与している。細胞内寄生微生物であるリーシュマニアを用いた実験モデルでは、効率よく Th1 型の免疫が誘導される B6 マウスはリーシュマニアに対して強い抵抗性を示すが、Th2 型の免疫が誘導される BALB では死に至る。また、感染初期の BALB に IL-12 を投与することで Th1 細胞の活性化を促し、リーシュマニア感染に対する抵抗性が増強される。これらの実験から、リーシュマニアに対しマウスが示す抵抗性の違いは感染時に誘導される T 細胞の質的差に起因しており、B6 と BALB の両系統にはそうした遺伝的素因が備わっていると思われる。本実験ではこれらの2系統のマウスを用いて、両系統間にみられるサイトカイン産生の質的あるいは量的差異を中心に弱毒化ヒト型結核菌 H37Ra 株に対する感受性および免疫応答性の差を調べることにより、M.tb に対する感染防御システムの一端的な解明を試みた。

B. 研究方法

マウス:日本チャールズリバー株式会社より購入した7~8週齢の雌の C57BL/6 および BALB/c マウスを実験に使用した。

感染および臓器内菌数の測定: *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra 株を感染実験、または抗原刺激に用いた。滅菌蒸留水にて 1×10^6 CFU/ml に希釈した菌液をマウス尾静脈内に1匹あたり 0.2ml 接種した (2×10^5 CFU/匹)。所定の時期に肝臓、脾臓、肺を採取し、10%OADC enrichment 加 Middlebrook 7H10 寒天培地 (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) に接種、37°C で3週間培養した。培養後、形成された集落数をかぞ

え臓器あたりの生菌数を算定した。

細胞から産生されるサイトカインの定量: 感染および非感染マウスより脾臓を採取し、10% FBS を含む RPMI にて 1×10^7 /ml の細胞浮遊液とした。24 穴マイクロプレートに 1 ml/well の割合で細胞を接種し、半数のウェルについては生菌による抗原刺激をおこなうため細胞: 菌の比率が 1 : 1 となるように 50 μ l の菌液を加えた。抗原刺激または非刺激の脾細胞は 5%CO₂ 37°C で 24 時間培養後培養上清を回収した。骨髓由来 M Φ は正常マウスの骨髓細胞を M-CSF 存在下で培養することにより得、24 穴マイクロプレートに 5×10^5 /1 ml/well の割合で細胞を接種した。細胞: 菌の比率が 1 : 1 となるように 50 μ l の菌液を加えた後、5%CO₂ 37°C で 24 時間培養、上清を回収した。上清中のサイトカイン量は BIO-PLEX (Bio-Rad Laboratories, USA) を用いて測定した。

血清中の抗体価の測定: 変法ソートン液体培地にて 37°C 1 ヶ月静置培養した H37Ra 株を高圧滅菌 (121°C 5 分) し、菌塊を超音波で破碎した後、冷却遠心 (5, 700 g) し上清を回収した。透析により約 10 倍に濃縮して析出物を除くために再度冷却遠心 (7, 800 g)、上清を回収し -20°C に保存し抗体価測定用抗原として使用した。ELISA 用マイクロプレート (Nalge Nunc, DENMARK) に抗原 (PBS で 500 μ g/ml に調整したもの) を 50 μ l/well 加え、4°C で一晩コーティングした。0.05% Tween20 加 PBS (T-PBS) で4回洗浄後、2%FBS 加 RPMI を 100 μ l/well 加え 37°C で1時間ブロッキングし再度 T-PBS で4回洗浄した。被検血清を2倍段階希釈し、100 μ l/well 分注し室温で2時間反応させた。洗浄後、HRP 標識抗マウス IgG/IgG1/IgG2a ヤギ抗体 (BETHYL, USA) を 0.5%BSA 加 T-PBS で 10,000 倍希釈したものを 100 μ l/well で加え室温で2時間反応させた。O-phenylenediamine dihydrochloride (SIGMA-

ALDRICH、USA) による反応を plate reader にて測定した。カットオフ値は非感染血清の OD 値 + 3 SD とし、カットオフ値を超える最高の希釈倍率を抗体価とした。

C. 研究結果

臓器内菌数の推移

B6、BALB 両マウスともに、肺および脾臓では感染後 15~20 日目に菌数のピークが見られ、その後漸次減少した。ピーク時の肺内菌数は両マウス間で差が無かったが、脾臓内菌数は B6 より BALB のほうが有意に多かった。感染後 20 日から 50 日にかけての肺および脾における菌数減少の割合は、BALB よりも B6 のほうが大きかった。肝臓では両マウスともに感染後 15 日目にピークがみられたが、そのときの両系統マウスにおける菌数はほぼ同じであった。しかし 15 日目以降はどちらも大きく減少し、両マウスにおける菌数にも差はみられなかった。

生菌刺激によるマウス脾細胞からのサイトカイン産生

IL-12p40 は M. t b 生菌の二次刺激なしでも相当量が感染直後に産生され、B6 では感染直後から漸次増加し 25 日目にピークを示した後、35 から 90 日目にかけて感染直後のレベルにまで低下した。一方、BALB では感染期間を通じて産生量は B6 より少なく 150 pg/ml 前後で推移した。生菌による二次刺激は B6 および BALB 両マウスにおいて IL-12p40 の産生量の増加を促したが、その産生総量は常に B6 が BALB を上回り、特に B6 では感染後 15 日目にみられた産生量のピーク (650 pg/ml) が BALB では認められず、感染後 35 日目になってようやくピーク (450 pg/ml) を示した。IL-12p70 は M. t b 生菌の二次刺激なしでは産生されず、二次刺激によってはじめて産生され、感染後 35 日目にピーク (80~100 pg/ml) を示した。興味あることに感染後 15 日目を除き B6 と BALB の産生

量の間には大きな差はみられなかった。IL-17 は M. t b 生菌の二次刺激なしの場合、B6 は 90 日目までほとんど産生がみられなかったのに対し、BALB は 25 日目と 90 日目に産生がみられた。M. t b 生菌による二次刺激を行った場合、B6 では 15 日目にピークを示すのに対し、BALB では B6 より遅れて 25 日目にピークを示した。感染後 15 日目の IFN- γ 産生量は両系統間で有意差が見られ、M. t b 生菌の二次刺激なしの場合でも B6 の方がより多くの産生がみられた。生菌による二次刺激は両マウスの IFN- γ 産生量を飛躍的に高め、どちらも検出限界 (32,000 pg/ml) を超えた。

IL-4 は二次刺激なしでは両系統とも 1 pg/ml 以下の産生量で、産生パターンに両系統間に大きな差はなかった。二次刺激を行うと産生量は増加したが両系統の産生パターンは変わらず、B6、BALB いずれも 25 日目にピーク (B6 : 28pg/ml、BALB : 27pg/ml) を示した。IL-5 と IL-10 は二次刺激によってはじめて検出され、どちらのサイトカインも感染直後には B6 より BALB で高い値を示し、15 日以降では逆転して B6 が BALB の値を上回った。

RANTES は、感染に対して BALB より B6 で有意に産生量が増加した。RANTES は二次刺激を加えないと、感染 35 日目まで B6 では 800pg/ml 前後、BALB では 400pg/ml 前後でほぼ横ばいの値であった。ただし、90 日目には BALB において 5600pg/ml まで上昇した。二次刺激を加えると、B6 では MIP-1 α と同じように 25 日目にピークを示し、その値は 25000pg/ml であった。BALB では感染に伴い産生量の増加が見られたが、上昇の割合は B6 よりゆるやかで最高値を示した 90 日目でも値は 5700pg/ml であった。

TNF- α はいずれの系統のマウスにおいても二次刺激を加えた場合にのみ産生された。どちらのマウスでも感染直後から 15 日目にかけて TNF- α の産生量は増加し、15 日目から 35 日目

までは BALB より B6 の方が高い産生値を示した。しかし感染後 90 日目には両系統とも 50pg/ml 程度まで低下した。

正常 MΦ を生菌刺激した場合に産生されるサイトカイン

正常な B6 および BALB マウスの骨髄からそれぞれ細胞を取り出し、分化増殖因子 (M-CSF) 存在下で培養して得られた BM-MΦ を生菌刺激した際に産生される 3 種類のサイトカイン (IL-12p40、IL-10) について調べた。結果を Fig.2 に示す。いずれのサイトカインも刺激後 24 時間内に産生され、それらの量はいずれも BALB より B6 で有意に多かった。各マウス BM-MΦ の産生する IL-12p40 の量は刺激後 1～4 日目にかけて大きく変動することはなかったが、IL-10 は刺激後 1 日目に最も多く産生され、その後漸次減少した。理由はよく分からないが、抗原刺激をしないにもかかわらず BM-MΦ は培養開始 4 日目に IL-12p40 と IL-10 を産生した。

脾細胞培養上清 (CS) による BM-MΦ の活性化と菌増殖抑制

BALB 由来の BM-MΦ に *M. t b* を感染した場合には、CS 非添加群と CS 添加群との間に食能の差は見られなかったが、B6 由来の BM-MΦ では CS 添加群で有意に MΦ に貪食される菌数が増加した。また、どちらの系統の CS を添加された BM-MΦ も CS 非添加のそれに比べて有意に菌の増殖を抑制し、感染から 6 日目には B6、BALB どちらにおいても CS 添加群は非添加の対照群に比べて 70% 前後菌の増殖を抑えた。

BM-MΦ の系統差と CS に対する影響

正常 BM-MΦ 中 (CS 非添加群) における菌の増殖傾向は B6 と BALB の間で違いはみられず、どちらも感染 6 日目には感染時の約 10 倍の菌数に達した。6 日目の両マウスの CS 添加群における菌数をそれぞれの対照非添加群のそれと比べると、B6 BM-MΦ に B6 由来または

BALB 由来の CS を加えた場合それぞれ約 70% と約 50% の菌数の減少がみられた。一方、BALB BM-MΦ に B6 由来または BALB 由来の CS を加えた場合にはそれぞれ約 40% と約 60% の菌数の減少がみられた。いずれの BM-MΦ と CS との組み合わせにおいても食能に差はみられなかった。

抗原特異的抗体価の測定

感染マウスの血液中に含まれる *M. t b* 菌体抗原に対する IgG およびそのサブクラス IgG₁ と IgG_{2a} の量を ELISA 法で調べた (Fig.3)。IgG は B6 では感染後 15 日目から、BALB では 35 日目から検出され、その後感染経過に伴い 2¹⁵ まで上昇した。IgG₁ は BALB では感染後 35 日および 90 日目に検出され、抗体価の上昇がみられたのに対し、B6 では 90 日目のみにわずかに産生されたのみであった。IgG_{2a} はどちらの系統でも抗体価の上昇はほとんどみられず、BALB において感染 90 日後にわずかな産生がみられたのみであった。

D. 考察

H37Ra 株はモルモットに対する病原性を欠く弱毒株であり、マウスに対しても強い病原性を示さない。B6 と BALB の両系統マウスにこの株を静脈内接種すると、両マウスともに 24 時間以内に約 90% が肝臓に、10% が脾臓に捕捉され、肺にはわずか 2～3% しか捕捉されなかった。これら各臓器への菌の分布比率は、強毒結核菌や他の抗酸菌種 (例えば *M. bovis* や *M. avium* など) をこれらマウスの静脈内に接種した場合とほぼ同じであり (データ未発表)、このことから各臓器に分布する MΦ の菌捕捉能力についてはマウスの系統間で大きな違いはないと思われる。感染直後から感染 15 日目にかけて H37Ra 株の増殖率が 3 つの臓器 (肝、脾、肺) で異なるのは、各臓器に定着・分化した MΦ の能力が異なっているためかもしれない [56]。肺と脾臓

内における H37Ra 株の増殖パターンは肝臓におけるそれと同じではなかった。特に感染後 15 日以降に B6 の脾臓ならびに肺では BALB のそれら臓器に比べて有意に菌数が減少したことから、それぞれの臓器において誘導される防御能に差があること、その能力は B6 のほうが優れていることが分かった。

B6 と BALB の間にみられた M.tb に対する防御能力の差は免疫細胞をとりまく環境中のサイトカインの違いによって生じた可能性がある。マウス系統によるサイトカイン産生能の差があるかどうかを調べるため、まず MΦ から産生されるサイトカインについて比較した。BM-MΦ に M.tb を感染させた場合、B6、BALB どちらも菌をほぼ同じように捕食し、その後どちらもほぼ同じように菌の増殖を許した。しかし産生されるサイトカイン量には違いがみられ、B6 の BM-MΦ からは 24 時間以内に大量の IL-12 が産生され、BALB の BM-MΦ からのそれを大きく上回った。MΦ 内に取り込まれた抗原の量は B6 と BALB でほぼ同じであり、サイトカイン産生能の差は抗原の量によるものではないと思われる。

非感染マウスから得た脾細胞に *in vitro* で生菌刺激を行った場合、正常脾細胞は抗原(生菌)の刺激がなくても培養液中に IL-12 p40 はじめ 7 種類のサイトカインやケモカインを産生していることが分かった。また、非感染マウスから得た脾細胞に *in vitro* で生菌刺激を行うことで、*in vivo* において脾細胞が初めて H37Ra に会う時、すなわち感染直後の脾臓におけるサイトカイン産生の状態を推定した。この時、両系統マウスともサイトカイン産生の亢進がみられ、B6 では BALB に比べると、IL-12 p40、IFN- γ といったサイトカインが多く産生されており、M.tb の感染に対してすばやく Th1 誘導型のサイトカイン産生がおこっていることが示唆された。感染 15 日目を以降においても B6 では二次的な抗原

刺激なしでも IL-12 p40 の上昇がみられたが BALB ではほぼ横ばいであり、感染個体においても BALB では感染に伴う IL-12 p40 の産生量増加はみられないと考えられる。また、臓器内菌数の減少が BALB より B6 で早い時期からみられたのに一致して IFN- γ も B6 のほうが早くピークを示した。さらに、抗原刺激ありの結果から IL-12 p40 や p70、IL-17 も BALB より B6 のほうが早く反応していることが分かり、B6 のほうがより Th1 型の免疫反応が誘導されていると考えられる。加えて、これは臓器内菌数が減少し始める時期と一致した。ケモカイン産生調節において重要な役割を果たすのが TNF- α であり、感染防御における TNF- α の働きは、MΦ の活性化と感染部位への集積である。TNF- α 遺伝子改変マウスでは M.tb 感染に対して野生型マウスに匹敵するほどの CD4⁺T 細胞の活性化、IFN- γ 産生、遅延型アレルギー反応がみられるものの、肉芽腫中への T 細胞および MΦ の集積は少なく、大量の菌増殖を伴い 4~5 週で死亡する。今回の実験では、抗原刺激をしない場合では培養上清中に TNF- α は認められなかった。これは、TNF- α は抗酸菌防御に必要なサイトカインであると同時に細胞傷害作用も持つため、広範な細胞に働きかけるというより局所で働くメディエーターであるためかもしれない。実際に、二次的な抗原刺激を加えると TNF- α の産生が認められるようになり、BALB より B6 でより多くの量が産生されることがわかった。また、B6 での TNF- α の高値は MIP-1 α や RANTES が BALB より B6 で高い値を示したことと一致し、肉芽腫形成能や Th1 型の免疫反応の差に影響を与えていると考えられる。

Th2 型サイトカインのレベルは M.tb を感染させても顕著な上昇を示さなかったが、B6、BALB 両マウスともに抗原特異的 IgG 抗体の産生がみられた。特異的 IgG の総量のレベルをみると、B6 のほうが BALB よりも早い時期から上

昇がみられた。感染 B6 マウスでは IgG₁、IgG_{2a} の抗体価上昇はほとんどみられず、BALB では産生された IgG の大部分を IgG₁ が占めた。産生された IgG サブクラスのパターンの違いとサイトカインとの因果関係については今後解析をしていく必要がある。

Th1/Th2 型の免疫反応において重要な役割を果たしている IL-4 と IFN- γ は検出限界値を大きく逸脱していたため Bio-Plex 法では正確な値を得ることができなかった。そこで、ELISPOT 法を用いて脾臓あたりの IFN- γ および IL-4 産生細胞数を調べたところ、非感染マウスの脾細胞を抗原で一次刺激した場合、24 時間以内に IFN- γ を産生した細胞数は B6 と BALB で異なり、B6 における陽性細胞数は BALB のそれを有意に上回った。このことは、抗原（ここでは M.tb）に対して素早く反応する細胞集団（おそらくその多くは NK 細胞や γ δ T 細胞）の占める割合がマウスの系統によって異なるからだろうと思われる。感染 25 日目になると、その差はさらに広がり、B6 の脾臓中では BALB よりも飛躍的に IFN- γ 産生細胞数が増加しており、Th1 細胞を誘導する能力もまた B6 の方が高いと考えられる。一方、正常脾細胞中の IL-4 産生細胞の数は、生菌による二次刺激の有無に関わらず大きな変動はなかった。BALB の IL-4 産生細胞は新しい抗原の刺激に対して素早く応答しないばかりか、感染 25 日目でも抗原刺激の有無に関係なく産生細胞数に違いはみられず、感染に伴う陽性細胞の増加もほとんどみられなかった。一方、B6 では抗原刺激により IL-4 産生細胞が増加しており、感染 25 日目では BALB より B6 の方が有意に多かった。

M.tb 感染に伴って産生されるサイトカインおよび免疫細胞の動態とそれらの感染防御機構への関与についていろいろ考察を加えてきた。それらをもとに、B6 と BALB における免疫活性過程の違いについて考えてみたい。B6 は

ELISPOT の結果（データ未掲載）は、もともと脾細胞中に含まれる IFN- γ 産生細胞の数が BALB より多く、M.tb の侵入に対して素早く IFN- γ を産生し、M Φ を活性化することを示している。同時に IL-12 産生も亢進され、Th1 細胞の誘導、Th1 細胞からのサイトカイン産生による M Φ 活性化、および肉芽腫形成など Th1 型免疫反応を促進し、さらに活性化された M Φ からのサイトカインが Th1 細胞の増殖と活性化や IFN- γ 産生を促す。一方で、元々 B6 に比較すると IFN- γ 産生細胞数が少なく、感染に伴う IL-12p40 産生の増加がほとんどみられない BALB では、Th1 細胞を介した M Φ の活性化をすることができず、主に IL-1 や増殖因子の働きにより M.tb を殺そうとする。ただし、これらのサイトカインも B6 では Th1 型免疫反応のフィードバックにより産生が亢進してくるので、15 日目以降では B6 での産生量が BALB のそれを上回り、結局のところ BALB では B6 ほどの防御能力を発揮することができないと思われる。

E. 結論

M.tb に対する感受性はマウス系統により違いがあることが確認された。また、脾細胞からのサイトカイン産生を測定することで、B6 では BALB よりも Th1 誘導に働くサイトカインが、感染後 15 から 25 日という早い時期に多く産生されることがわかった。両マウス M Φ を用いた *in vitro* 実験で貪食、殺菌能およびサイトカインに対する反応性にはほとんど差がみられないことから、両系統間にみられた感受性差は、感染により免疫細胞をとりまく環境中に放出される Th1 誘導因子、M Φ 活性化因子の量的差に起因するのではないかと考えられた。感染早期に起こる M Φ や NK からのサイトカイン産生や増殖因子による M Φ の殺菌能の増強もまた M.tb 感染防御において有利に働くと思われるが、結果的に BALB と B6 の間でみられた M.tb に対する