

細胞を Peptide-25 と I-A^b-CHO 細胞で刺激後、T-bet, GATA-3, IL-12Rβ2の発現を定量的 RT-PCR 法により調べた。T-bet の発現は Peptide-25 刺激後 3 時間目と 15 時間目 (刺激 3 時間目がピーク) に見られた。GATA-3 の発現は刺激時間とともに減弱した。

(3) T-bet^{-/-} P25 TCR-Tg マウスのナイーブ CD4⁺ T 細胞を Peptide-25 と I-A^b-CHO 細胞で刺激しても、P25 TCR-Tg の T 細胞を用いた場合に比べ、低いけれども、有為な IFN-γ 産生細胞が出現した。また、T-bet^{-/-} P25 TCR-Tg マウスの T 細胞を、Peptide-25 と I-A^b-CHO 細胞により刺激しても、GATA-3 の発現減弱が観察された。

(4) OVA を Peptide-25 と共免疫すると、OVA 単独免疫に比べ、著明に高い CTL 応答を誘導できた。

D. 考察

(1) P25 TCR-Tg マウスのナイーブ CD4⁺ T 細胞は、サイトカイン (IL-12, IL-18, IFN-γ) や副刺激のない自然条件下で Peptide-25 刺激により、T-bet 非依存性に Th1 に分化する。この結果はこれまでの Th1 分化のセントラルドグマとは異なる。T-bet 以外の転写因子が、Th1 分化に関与するか解析することにより、ナイーブ CD4⁺ T 細胞の Th1 への分化の決定に関与する、新規制御系を明らかにできると期待している。

(2) P25 TCR-Tg マウスの T 細胞をヒト型結核菌感染マウスに移入する実験により、抗結核免疫に関与する細胞群、Peptide-25 のワクチンとしての有用性を明らかに出来るかもしれない。

(3) Peptide-25 のアジュバント活性発現機構を明らかにできれば、抗腫瘍免疫増強の方法を確立できるかもしれない。

E. 結論

(1) P25 TCR-Tg マウスのナイーブ CD4⁺ T 細胞は、自然条件下で Peptide-25 刺激により選択的に Th1 に分化する。その場合、サイトカイン (IL-12, IL-18, IFN-γ)、抗原提示細胞由来の副刺激、T-bet の選択的な発現は必須でない。TCR シグナルが T 細胞の

Th1 分化の決定に重要であり、サイトカインなどの 2 次シグナルは、Th1 への分化の安定化に関与しているのかもしれない。

(2) Ag85B 由来の Peptide-25 は、交叉性のない他の抗原と共免疫すると、その抗原に対する Th1 応答や CTL の生成を促進する。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagai, Y., T. Kobayashi, Y. Motoi, K. Ishiguro, S. Akashi, S. Saitoh, Y. Kusumoto, T. Kaisho, S. Akira, M. Matsumoto, K. Takatsu, and K. Miyake. Radioprotective 105/MD-1 links TLR2 and TLR4-MD2 in antibody response to microbial membranes. *J. Immunol.* 174:7043-7049, 2005.
- 2) Kikuchi, T., S. Uehara, H. Ariga, T. Tokunaga, A. Kariyone, T. Tamura, and K. Takatsu. Augmented induction of CD8⁺ cytotoxic T cell response and antitumour resistance by T helper type1-inducing peptide. *Immunology*, 117:47-58, 2006.

2. 学会発表

- 1) Instruction of CD4⁺ T cell fate to Th1 development by Th1 inducing peptide: Roles of T cell receptor-mediated signals. Takatsu, K. "3rd FIMSA Congress", Hangzhou, April, 2005.
- 2) Role of TCR signal in the Th1/Th2 regulation: A P25 TCR transgenic model, Takatsu, K. "22nd US-Japan Cooperative Medical Science Program", Seattle, July, 2005.
- 3) Th1 誘導ペプチドによる抗腫瘍免疫増強機構の解析. 菊池剛史, 田村敏生, 刈米アイ, 高津聖志. 第 64 回日本癌学会学術総会 2005 年 9 月 札幌
- 4) CpG ODN-Mediated Prevention from Ovalbumin-induced Anaphylaxis in Mouse through B Cell Pathway. XU, W.,

T. Tamura, and K. Takatsu. 第 35 回
日本免疫学会総会・学術集会 2005
年 12 月 横浜

- 5) 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. 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. 第 35 回日本免疫学会総会・学術
集会 2005 年 12 月 横浜
- 6) TCR: 抗原ペプチド MHC 複合体の相
互作用による IL-12p35 の制御. 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. 第 35 回日本免疫学会総
会・学術集会 2005 年 12 月 横浜

- 7) 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. 刈
米アイ, 菊池剛史, 田村敏生, 高津聖
志. 第 35 回日本免疫学会総会・学術
集会 2005 年 12 月 横浜

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

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

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
牧野正彦	結核・ハンセン病	倉田毅編	ネオエスカ 感染症・アレルギーと生体防御	同文書院出版		2005	105-110
牧野正彦	生体防御機構	牧野正直・長尾栄治・畑野研太郎編	総説現代ハンセン病医学	東海大学出版会	in press	2006	
小林和夫	マイコバクテリウム(抗酸菌)と感染症	山西弘一 監修、平松啓一、中込 治編	標準微生物学 第9版	医学書院	東京	2005	279-292
小林和夫	結核菌	光山正雄編	微生物感染学-新しい感染の科学	南山堂	東京	2005	178-187

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
牧野正彦、 鈴木幸一、 福富康夫、 山下康子、 前田百美、 宮本友司、 向井 徹、 中田 登、 甲斐雅規、 山崎利雄、 儀同政一、 松岡正典。	ハンセン病基礎医学研究のトピックス。	Jpn. J. Leprosy	74	3-22	2005
Y. Maeda, T. Mukai, J. Spencer, M. Makino.	Identification of Immunomodulating Agent from <i>Mycobacterium leprae</i> .	Infect. Immunity	73	2744-2750	2005
M. Makino, Y. Maeda, N. Ishii.	Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from <i>Mycobacterium leprae</i> .	Cell. Immunol.	233	53-60	2005
Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, M. Makino.	Identification and characterization of the genes involved in glycosylation pathways of mycobacterial glycopeptidolipids biosynthesis.	J. Bacteriol.	188 (1)	86-95	2006
T. Mukai, Y. Miyamoto, T. Yamazaki, M. Makino.	Identification of <i>Mycobacterium</i> species by comparative analysis of the <i>dnaA</i> gene.	FEMS Microbiol. Lettr.	254	232-239	2006

別紙5

S. Matsumoto, M. Matsumoto, K. Umemori, Y. Ozeki, M. Furugen, T. Tatsuo, Y. Hirayama, S. Yamamoto, T. Yamada, K. Kobayashi.	DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection in mice.	J. Immunol.	175	441-449	2005
R. Oiso, N. Fujiwara, H. Yamagami, S. Maeda, S. Matsumoto, S. Nakamura, N. Oshitani, T. Matsumoto, T. Arakawa, K. Kobayashi.	Mycobacterial trehalose 6,6'-dimycolate preferentially induces type 1 helper T cell responses through signal transducer and activator of transcription 4 protein.	Microb. Pathog.	39	35-43	2005
S. Kitada, R. Maekura, N. Toyoshima, T. Naka, N. Fujiwara, M. Kobayashi, I. Yano, M. Ito, K. Kobayashi.	Use of glycopeptidolipid core antigen for serodiagnosis of <i>Mycobacterium avium</i> complex pulmonary disease in immunocompetent patients.	Clin. Diagn. Lab. Immunol.	12	44-51	2005
R. Maekura, Y. Okuda, A. Hirotani, S. Kitada, T. Hiraga, K. Yoshimura, I. Yano, K. Kobayashi, M. Ito.	Clinical and prognostic importance of serotyping <i>Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare</i> complex isolates in human immunodeficiency virus-negative patients	J. Clin. Microbiol.	43	3150-3158	2005
N. Fujiwara, K. Kobayashi.	Macrophages in inflammation.	Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy	4	281-286	2005
小林和夫.	結核における肉芽腫炎症と宿主防御の統御.	日本医事新報	4235	20-26	2005

別紙 5

Nagai Y, Kobayashi T, Motoi Y, Ishiguro K, Akashi S, Saitoh S, Kusumoto Y, Kaisho T, Akira S, Matsumoto M, <u>Takatsu K,</u> Miyake K.	Radioprotective 105/MD-1 links TLR2 and TLR4-MD2 in antibody response to microbial membranes.	J. Immunol.	174	7043-7049	2005
Kikuchi T, Uehara S, Ariga H, Tokunaga T, Kariyone A, Tamura T, <u>Takatsu K.</u>	Augmented induction of CD8 ⁺ cytotoxic T cell response and antitumour resistance by T helper type1-inducing peptide.	Immunology	117	47-58	2006

4. 結核・ハンセン病

結核は、20世紀最大の脅威であった細菌感染症であり、ハンセン病は末梢神経障害に伴う著しい変形のため、長い間差別と偏見の対象となってきた疾患である。結核は、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の感染により、ハンセン病はらい菌 (*Mycobacterium leprae*) の感染により発症する。結核菌もらい菌も共に抗酸菌に分類される。抗酸菌は、現在では100種類以上が知られ、これらのなかにはヒトに病気を発症させる病原性抗酸菌と、ヒトに対しては病気を誘導しない非病原性抗酸菌が存在する。

結核菌も、らい菌も代表的な病原性菌である。両者は一旦感染するとヒトの体内に長く宿り、たとえ病気を発症させなくても潜伏感染する特徴をもっている。多くの場合、マクロファージなどの細胞内に寄生虫のように潜んでいるため、細胞内寄生菌ともよばれている。このことが、結核およびハンセン病を理解するうえで重要である。

1) 結核

(1) 概要

全世界のおよそ3分の1の人が結核菌に感染している。結核の発病率は、結核菌感染者の約10%であり、初回感染者は感染後2年以内であることが多い。感染しても発病しない、いわゆる潜伏感染時には、結核菌はマクロファージなど抗原提示細胞内に留まっている。

結核菌に対する生体防御反応は、インターフェロンガンマー (IFN- γ) を産生するCD4陽性T細胞およびキラー活性を獲得したCD8陽性T細胞などの細胞性免疫が中心となって営まれている。結核菌はヒトからヒトへ感染し、主に咳やくしゃみによる飛沫感染による。結核菌は、大きさ数ミクロンの桿状の菌であり、酸・アルカリ・乾燥に対し抵抗性である。

結核の確定診断は、患者体内から結核菌を同定することであり、喀痰の塗抹検査あるいは培養検査を行うか、菌の核酸 (DNA) を抽出し、核酸増幅法 (PCR)

で検索して菌を証明する。結核菌が酸に対して抵抗性であることを利用して、抗酸菌染色（Ziehl-Neelsen 染色）を行う。結核は全身病であるが、肺を主病巣とする肺結核がもっとも多く、2週間以上続く咳・痰・発熱あるいは胸痛・血痰が観察される場合は、結核を疑う必要性が高い。

結核に対する治療は、発病初期に4剤（イソニコチン酸ヒドラジド[INH]、リファンピシン[RFP]、ピラジナミド[PZA]とストレプトマイシン[SM]またはエタンブトール[EB]）を用いて徹底的に行うことが大切である。現在では、薬剤に対して抵抗性を示す薬剤耐性菌が出現していて、臨床上大きな問題となっている。結核に対するワクチンは、BCGが長い間用いられてきたが、高齢者に対しては無効であることが多く、新しい抗結核ワクチンの開発が強く求められている。

（2）結核菌と感染経路

結核菌は、長さ1～4ミクロン、幅0.3～0.6ミクロンの桿菌である。その表面は脂質に富んで、他の菌種にはみられない厚い外壁により覆われている。そのため粘着性が高く、いくつもの菌が房状に寄り集まることが多い。酸・アルカリ・乾燥に強い反面、紫外線・熱に弱い性質がある。

結核菌の感染は、ほぼ100%気道を介した吸入感染である。排菌者の咳・くしゃみ・痰に結核菌が含まれていると周囲の人に容易に感染する。空気中に放出された結核菌はその周囲の粘液性水分を急速に失い、非常に軽くなって長時間空気中に漂っているためである。

換気が悪い場所、あるいはオフィスなど気密度が高い所では、多数の人間に感染させ、集団感染をもたらす原因となる。結核は全身症であって、腎臓・関節・骨・腹膜などにも病変をもたらすが、これらの患者は空気中に結核菌を放出する可能性は低く、結核菌の感染源の大部分は肺結核患者である。

（3）疫学

全世界人口の約3分の1が結核菌に感染していて、毎年800万人が発病、200万人が死亡している。とくに、発展途上国は濃厚流行国でもある。結核死亡の99%は、アフリカ・中南米・東南アジアの人々である。

発病は、感染後2年以内が多く、結核菌に感染しても健常者の多くは発病しないで生涯を経過する（不顕性感染）。感染後に明らかな結核を発病するのは生涯を通じて約10%で、これに初感染結核など軽症の自然治癒する病気を加えても、発症するリスクは最大30%である。

不顕性感染した人では、免疫が作動して結核菌の体内拡散を防いでいる。この免疫反応は生体防御反応とよばれ、細胞性免疫すなわちIFN- γ を産生するCD4陽性T細胞、あるいはIFN- γ を産生すると同時に病原体に感染した細胞を殺戮することができるCD8陽性T細胞、または活性化したマクロファージが重要な働きをしている。

結核菌は一旦感染すると、多くはマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞

などのなかに寄生虫のように長時間留まる。そのため、抗菌的に働いている細胞性免疫が何らかの要因で低下すると、結核菌の活動性は急速に高まり結核が発症する。

乳幼児期では、免疫力が十分備わっていないため、その発病率は成人に比べ著しく高い。また、免疫力の低下を伴う疾患、たとえばHIV-1感染・糖尿病・悪性腫瘍・慢性腎不全を患う患者、免疫力が低下した高齢者・低栄養状態者では発病率が増加する。抗がん剤・免疫抑制剤・副腎皮質ホルモンによる治療を受けている患者でも同様に発病率が高い。とくに、HIV-1と結核菌が重複感染した場合は重篤な病変が観察され、現在50万人以上が死亡している。

(4) 結核の診断

結核に特異的な症状はなく、とくに肺結核の初期は無症状であるともいわれる。しかし、肺結核の80%は自覚症状の出現により発見される。咳・痰・発熱または寝汗・血痰・胸痛・体重減少の6症状のいずれかが2週間以上続く場合は肺結核を疑わなければならない。咳はもっとも多い症状であるが、咳によって結核菌の感染が広がるので、2次感染を防ぐためにも、咳が2週間以上続く場合は早期受診を勧めたい。

結核の確定診断は、結核菌が生体内に存在することを証明することである。その方法として、①喀痰塗抹検査、②喀痰培養法、③DNA検査などがある。

喀痰塗抹検査では、患者から採取された喀痰から塗抹標本を作製してZiehl-Neelsen染色または蛍光染色をした後、顕微鏡で観察する。通常30視野を観察して、明らかな桿菌のみを陽性として判定する。陽性と判定された菌が一定の視野中に何個あるかによってガフキーの号数*を決める。採取された喀痰の検査で、結核菌が1個でも認められる場合には、喀痰1 ml中に結核菌が7,000個以上存在することを示している。こうした状態では、すでに肺のなかには空洞が形成され感染源となり得るため、2次感染を防ぐ意味でも直ちに入院治療を行うことが重要である。喀痰中の結核菌が数千個以下の場合には、喀痰培養を行わないと結核菌の同定はできない。

小川培地を用いた培養が通常行われるが、結核菌は増殖が遅いため、診断を確定するためには4～8週間が必要となる。感度を高いまま維持し、結核菌検出までの時間を短縮する目的で開発されたのがMGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) 法である。約2.5週間で菌の検出が可能となった。また、結核菌の核酸(DNAなど)を抽出し人工的に増幅して、結核菌固有の塩基配列が存在すること(結核菌陽性)を証明するPCR法も開発されている。DNAを用いた方法は、薬剤耐性菌の検出、結核菌の感染経路を分子疫学的に追跡する際に有効なRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 分析にも応用できる。

結核の補助診断として有効な検査法が、胸部X線写真・胸部CT検査などの画像診断法とツベルクリン反応検査である。肺結核では肺尖部や上肺野が好発部位であるが、特定の陰影はなく種々の陰影を呈するため、異常影を認めた時は菌検査あるいは肺生検など病理学的検査を勧めたい。

ガフキーの号数 Gaffky table
ガフキーの号数とは、Gaffkyによって提唱された、喀痰の塗抹染色標本中の結核菌の量を示した数字である。菌数の少ない方から多い方へ1号～10号に分けられている。標本中の菌数は、材料の採取部位や塗抹の厚薄により変動するので、最近では段階の簡便な記載法に変わって居る。

ツベルクリン反応は、生体内に結核菌に反応するメモリーT細胞が存在するかを検索する方法である。ツベルクリンは、液体培地で数週間培養した結核菌を加熱・濾過^{ろか}処理したものである。ツベルクリン反応陽性とは、結核と同じ病原性をもつものが過去に生体内に入り、T細胞によって認識された経歴があることを示している。従って、「陽性」イコール「結核菌の感染あり」ということはできない。弱毒化牛型結核菌であるBCG接種者も陽性を示すことが多い。

(5) 結核の治療と予防

「不治の病」といわれた結核も、早期発見・早期治療の原則が守られれば6カ月で治る病気となっている。厚生労働省で認可されている薬剤は10種類以上を数えている。

基本的な治療法は、初期2カ月の強化療法とこれに続く4カ月の継続期治療の6カ月間治療である。強化療法とは、4剤（106頁参照）の併用療法であり、菌量を減少させることを目的としている。4カ月間の継続療法は、2～3剤（INH、RFPとEB）の併用療法である。日本では、1996（平成8）年厚生省の「結核治療基準」によって適用された。菌量の早期減少を図るとともに、耐性菌の出現を防ぐことを念頭において確定された治療法であるが、近年では耐性菌の数が次第に増加しており大きな問題となっている。複数の薬剤を長期服用するため、副作用の出現にも十分留意する必要がある。

予防法は、未だに確立されていない。ワクチンとしてBCGが使われてきたが、小児または青年成人の発症を防ぐうえでは有効であるが、高齢者など免疫機能が低下した人々に対しては無効である。BCGに代わる新しいワクチンの開発が切望されている。

排菌者と接触し、ツベルクリン反応検査から感染が強く疑われる場合には、「化学予防法」としてINH単剤を朝1回6カ月間の服用が有効である。

2) ハンセン病

(1) 概要

ハンセン病は、皮膚および末梢神経が主に侵される慢性感染症である。らい菌感染により発症するが、らい菌は末梢神経障害をもたらす唯一の抗酸菌である。病変部位に存在するらい菌の数により少菌型と多菌型に分類される。らい菌に対する生体防御反応（細胞性免疫が中心）の強弱によりその病型が決定され、細胞性免疫が働かない多菌型では、全身・左右対称性に病変が出現する。多菌型では、らい菌に特異的である抗PGL-I（Phenolicglycolipid-I）抗体の検出が補助診断法として有効である。

WHOによる多剤併用療法が有効であり、近年では新規発症患者数も徐々に低下してきて、日本国内での発症例は毎年20以下である。ハンセン病に対する有効なワクチンは存在せず、多剤耐性を示すらい菌も徐々に増加している。今後の課題が多い疾患である。

(2) らい菌と感染経路

らい菌は、長さ2ミクロン、幅0.3ミクロンの桿菌^{かん}であり、結核菌と同じ抗酸菌に分類される。抗酸菌を増殖のスピードから分類すると発育の早い菌と遅い遅発菌に分類されるが、らい菌はすべての細菌のなかでもっとも増殖が遅く、1回の分裂に約12日を要する（ちなみに大腸菌は20分）。らい菌を試験管のなかで人工的に増やすことはできず、アルマジロやヌードマウスを用いなければならない。らい菌の細胞壁は、結核菌と同様きわめて厚く脂質に富んだ構造をしている。このなからい菌に特異的な抗原であるPGL-Iが存在し、抗PGL-I抗体はハンセン病の血清診断に利用される。しかし、少菌型患者では、抗PGL-I抗体陰性の例が多い。

感染は鼻粘膜を介した飛沫感染である。従来損傷部位を介した経皮感染も考えられたが、感染には多数の菌が必要なため現在では否定的である。ヒトからヒトへの感染は、濃厚流行国の排菌患者周辺のみで起こる。

(3) 疫学

ハンセン病の濃厚流行国は、東南アジア・南米・アフリカである。1982-50（昭和57）年、WHOはハンセン病の制圧を目指し、3薬剤を同時に服用する多剤併用療法を開始した。本療法はきわめて有効であり、現在では登録患者数は44万人に、新規患者数は年間50万人にまで激減した。WHOはハンセン病の制圧を人口10万人対1以下と定義したが、現在このレベルに到達していないのは、ブラジル・インドなど数カ国のみである。しかし、濃厚流行国では、国全体としては制圧はされているものの、スポットとよばれる地域で未だに新規患者が多数発生している。

らい菌に対する生体防御反応は、結核と同じ細胞性免疫が主体であるが、結核とは異なりHIV-1感染者・高齢者など免疫状態が低下した患者に感染しても急性増悪することはない。HIV-1とらい菌の重複感染も臨床上問題とはならない。

(4) 臨床

らい菌は、マクロファージ・末梢神経のシュワン細胞および血管内皮細胞に主に感染する。そのためハンセン病は皮膚および末梢神経が主な病変部位となる。少菌型では、1個ないし少数の皮疹が左右非対称性に出現する。一方、多菌型では自覚症状は少なく、神経症状も徐々に出現する。多彩な皮疹が多数左右対称性に出現する。

ハンセン病の診断は、皮疹・らい菌の検出・末梢神経の肥厚・末梢神経の機能障害・病理組織学的検査・抗PGL-I抗体を用いた血清診断法が有効である。皮膚の病変部位をメスの刃で小さく切開し、組織液を取り、塗抹標本を作製する。Ziehl-Neelsen染色法で菌を同定する。菌が少数のみ存在し病理学的に同定しにくい場合は、病変部位を生検して組織を採取し、その組織よりDNAを抽出し、PCR法で診断する。この方法は感度のうえで優れている。病理学的検査では、少菌型は類上皮細胞性肉芽腫が観察されるが、多菌型では肉芽腫は形成されにくく、

泡沫状のマクロファージとらい菌が観察される。

末梢神経症状としては、皮疹に一致した知覚障害，とくに表在性感覚の低下が認められる。また，発汗障害・血管運動障害など自律神経系の異常を伴いやすい。これら末梢神経障害および皮疹の出現をみた場合，ハンセン病を疑って菌の検索を勧めたい。

治療は，抗菌活性の強い3剤（ダブソン[DDS]，クロファジミン[CLF：B663]，リファンピシン[RFP]）を同時に使用する多剤併用療法が基本である。ハンセン病に対する有効なワクチンは存在しない。

ハンセン病の治療中に突然“らい反応”とよばれる急性増悪がしばしば観察される。タイプ1とタイプ2の2型に分類され，タイプ1反応はらい菌抗原に対する強いアレルギー反応であり，タイプ2反応は免疫複合体が関与する。いずれも免疫抑制剤が有効である。

3) 結核・ハンセン病の撲滅

結核およびハンセン病は古くから知られる慢性感染症である。ともに細胞内に寄生性に感染する病原体により発症するため，その撲滅はきわめて難しい。耐性菌が出現し，その数が増加する傾向にある現在，有効なワクチンの開発が，両疾患に共通する最大の課題である。

表 4-49 世界における感染症による死亡数 (2003)

感染症	死亡数 (万人)
全感染症	1,490
急性呼吸器感染症	396
AIDS (結核の合併を含む)	277
下痢性疾患	180
結核	156
マラリア	127
麻疹	61
年間総死亡 (参考)	約 5,700

World Health Report 2004, WHO

どがあり、現在でも、多くの抗酸菌感染症患者が存在し、人類に甚大な健康被害を与えている。

1. 抗酸菌の特徴

抗酸菌 *Mycobacterium* 属は *Mycobacteriaceae* 科に属し、DNA 塩基構成の特徴として guanine + cytosine (GC) 含有量 (62~70%) が高い。抗酸菌は桿菌で (0.2~0.6×1~10 μm) 細胞壁は脂質に富み、そのため、アニリン色素に難染色性、グラム染色陽性である。いったん染色されると、酸アルコールに脱色され難い (抗酸性: acid-fastness, 図 4-55)。なお、“抗酸性”を示す細菌として、抗酸菌 *Mycobacterium* 属, *Nocardia* 属, *Corynebacterium* 属, *Actinomyces* 属や *Rhodococcus* 属があり、抗酸性染色で“赤染桿菌”として観察されるので、注意を要する。また、偏性好気性、芽胞非形成、非運動性である。増殖倍加時間は菌種により異なるが、2~20 時間以上であり、集落形成に 2 日~8 週間を要し、至適発育温度は 30~45°C である。なお、らい菌 *M. leprae* は人工培地における培養は成功していない。

紫外線照射を回避した場合、抗酸菌は環境中で数週間~数か月、生存可能である。加熱処理 (65°C 以上, 30 分以上) や紫外線照射 (日光曝露を含む) で不活化されるが、凍結や乾燥には抵抗性を示す。

結核菌やらい菌はヒトを含む温熱動物体内でのみ、発育・増殖可能である。他方、NTM は自由世代 (free-living) 抗酸菌なため、環境に普遍的

C. マイコバクテリウム (抗酸菌) と感染症

世界の年間総死亡数は約 5,700 万人、その内訳として、循環器疾患: 約 1,670 万人、感染症: 約 1,490 万人、悪性新生物: 約 710 万人であり、感染症は現在でも全世界の総死亡の 1/4 以上を占め、人類に大きな健康被害を招来している。感染症による死亡 (約 1,490 万人/年) の主要な原因として、急性呼吸器感染症 (肺炎など): 396 万人、後天性免疫不全症候群 (AIDS: 結核の合併を含む): 277 万人、下痢性疾患: 180 万人、結核: 156 万人、マラリア: 127 万人や麻疹 (はしか): 61 万人などがある (表 4-49)。

抗酸菌感染症には結核 tuberculosis, 非結核性抗酸菌 nontuberculous mycobacteria (NTM) 感染症やハンセン病 leprosy (Hansen's disease) な



図 4-55 結核菌の細胞内発育・増殖 (左) と走査電子顕微鏡による微細構造 (右)

結核菌 (赤染桿菌：左) がマクロファージ細胞内で発育・増殖している。

に存在し、水 (自然水や水道水)、土壌、原虫やヒトを含む動物に生息している。また、NTM はヒトや動物における正常細菌叢の構成微生物でないが、無症候性健常者の皮膚、気道、消化管や生殖器系からたびたび分離されることもある。

2. 抗酸菌の分類

抗酸菌は分類学的に、真菌 (myco-) と細菌 (bacterium) の中間に位置する微生物群を意味する。抗酸菌属の分類や同定には、① 発育・増殖速度、集落の性状 (形状、色調や光反応性)、② 生化学的性状 (代謝・酵素活性、鉄取り込み、食塩耐性、脂質)、さらに、③ 遺伝子解析などが有用である。なお、基準菌種は結核菌である。

1) 発育・増殖速度および集落の性状

至適発育温度が 30~37°C 領域の抗酸菌が多く、培養には 30°C と 37°C を施行する必要がある。増殖倍加時間は菌種により異なるが、2~20 時間以上であり、固形培地 (卵培地：Löwenstein-Jensen や小川および寒天培地：Middlebrook 培地) を用いる。集落形成に 8 日以上を要する遅発育抗酸菌 (slow growers) と 7 日以内である迅速発育

抗酸菌 (rapid growers) に大別される。集落の形状は平滑 (smooth 型)-不正、粗 (rough 型) など、多様である。なお、人工培地で培養不能な菌 *M. leprae* は培養不能抗酸菌に分類される。さらに、集落の性状として、色素産生と光反応性により、光発色菌群 photochromogens (I 群)、暗発色菌群 scotochromogens (II 群)、非光発色菌群 nonchromogens (III 群)、また、迅速発育菌群は色素産生や光反応性にかかわらず、一括して、IV 群に分類される。発育・増殖速度および集落性状を加味した抗酸菌の Runyon 分類 (表 4-50) がある。

2) 生化学的性状

抗酸菌の代謝・酵素活性に基づく生化学的性状 (表 4-51) として、

① ナイアシン産生は結核菌に比較的特異的であり、他の抗酸菌ではほとんど陰性である。

② ウレアーゼ産生は結核菌群や暗発色菌群で陽性であり、*M. avium* や *M. intracellulare* で陰性である。

③ 5% 食塩水存在下で耐性 (発育・増殖) を示す遅発育菌は *M. trivale* のみ、さらに、ほとんどの迅速発育菌は耐性である。

その他の生化学的性状として、3 日培養後のア

表 4-50 抗酸菌の Runyon 分類

分類		菌種名
培養可能菌	遅発育菌	●結核菌群 <i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. microti</i> <i>M. africanum</i>
		●非結核性抗酸菌群 I 群菌 光発色菌 <i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i> <i>M. asiaticum</i>
		II 群菌 暗発色菌 <i>M. flavescens</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i>
	III 群菌 非光発色菌 <i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. celatum</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. gastri</i> <i>M. genavense</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. shimoidei</i> <i>M. terrae</i> <i>M. trivale</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. xenopi</i>	
	迅速発育菌	IV 群菌 <i>M. abscessus</i> <i>M. fortuitum</i> group <i>M. chelonae</i> group <i>M. phlei</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i>
培養不能菌		<i>M. leprae</i>

リルサルファターゼ活性(陽性：*M. fortuitum* 群, *M. marinum*, *M. asiaticum*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. trivale* および *M. flavescens*/陰性：結核菌群, MAC や *M. kansasii*)、カタラーゼ活性(高活性：*M. kansasii*, *M. trivale*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum* group や *M. chelonae* group/低活性：結核菌群, MAC や *M. ulcerans*)、ピラジナミド分解酵素活性(陽性：ピラジナミド感受性結核菌, MAC, *M. fortuitum* group や *M. chelonae* group/陰性：ピラジナミド耐性結核菌, *M. bovis* や *M. kansasii*) などがある。

ミコール酸などの細胞壁脂肪酸分析(高速液体クロマトグラフィーなど)で、ミコール酸炭素鎖長は菌属に依存し、*Corynebacterium* 属：22-38, *Rhodococcus* 属：34-52, *Nocardia* 属：44-60, *Gordona* 属：48-66, *Mycobacterium* 属：60-90 であり、*Mycobacterium* 属のミコール酸炭素鎖は最長である。

従来、抗酸菌属は発育・増殖速度および集落の性状や生化学的性状により分類されてきた。長所として、①技術的に確立されていること、②標準化されていること、③比較的安価であること

表 4-51 主要な培養可能抗酸菌の表現型

分類	菌種	至適発育温度(°C)	集落形状	色素産生/ 光反応性	ナイアシン 産生	ウレアーゼ	5% 食塩水 耐性	核酸 プローブ
● 遅発育菌								
結核菌群	<i>M. tuberculosis</i>	37	粗(R)	非光発色	陽性	通常, 陽性	なし	あり
	<i>M. bovis</i>	37	粗(R)	非光発色	陰性	通常, 陽性	なし	あり
光発色菌群 (I)	<i>M. kansasii</i>	35	平滑(S)/粗(R)	光発色	陰性	通常, 陰性	なし	あり
	<i>M. marinum</i>	30	平滑(S)/粗(R)	光発色	通常, 陰性	陽性	なし	なし
	<i>M. goodii</i>	37	平滑(S)	光発色	陰性	一定しない	なし	あり
暗発色菌群 (II)	<i>M. scrofulaceum</i>	37	平滑(S)	暗発色	陰性	陽性	なし	なし
	<i>M. szulgai</i>	37	平滑(S)/粗(R)	暗発色	陰性	陽性	なし	なし
非光発色菌群 (III)	<i>M. avium</i>	35~37	平滑(S)/粗(R)	非光発色	陰性	陰性	なし	あり
	<i>M. intracellulare</i>	35~37	平滑(S)/粗(R)	非光発色	陰性	陰性	なし	あり
	<i>M. ulcerans</i>	30	粗(R)	非光発色	陰性	一定しない	なし	なし
● 迅速発育菌 (IV)								
	<i>M. fortuitum</i>	28~30	平滑(S)/粗(R)	非光発色	陰性	陽性	あり	なし
	<i>M. chelonae</i>	28~30	平滑(S)/粗(R)	非光発色	通常, 陰性	陽性	一定しない	なし
	<i>M. abscessus</i>	28~30	平滑(S)/粗(R)	非光発色	陰性	陽性	通常, あり	なし
	<i>M. smegmatis</i>	28~35	平滑(S)/粗(R)	暗発色	陰性	未報告	あり	なし
	<i>M. vaccae</i>	30	平滑(S)	暗発色	陰性	未報告	一定しない	なし

があげられるが、短所として、① 医療情報提供に際し、迅速性に欠くこと、② 大量の菌量を要することなどがある。これらの短所に対し、脂質や遺伝子解析は補完的である。

3) 遺伝子解析

結核菌、*M. bovis* やらい菌の全ゲノム塩基配列が解明され、病原性の理解、新規診断方法、抗菌薬やワクチンの開発、さらに、分子疫学領域など、今後の抗酸菌学や抗酸菌感染症の制圧対策に寄与することが考えられる。抗酸菌遺伝子解析法として、原理的に核酸探索子(プローブ)、核酸塩基配列および核酸増幅法が開発されている。核酸探索子法は抗酸菌の同定する目的で菌種特異的リボソーム RNA (rRNA) に相補的 DNA 探索子を用いる。rRNA は固形および液体培地に培養した抗酸菌から抽出する。所要時間は約 2 時間である。現在、入手可能な DNA 探索子は、結核菌群、*M. avium* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. goodii*, *M. kansasii* などがある。核酸塩基配列法は正確、迅速であるが、欠点として、高価および熟練を要するため、限られた施設でのみ用いられている。抗酸菌の 16 S rRNA が超可変部であり、菌種により異なることから、菌種特異的核酸配列を同定に用いる。核酸増幅法は

抗酸菌 DNA や RNA をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で増幅し、増幅された DNA や RNA を菌種特異的探索子で同定する。さらに、制限酵素を用いた DNA 指紋法 (DNA fingerprinting, restriction fragment length polymorphism (RFLP)) を組み合わせることにより、感染源の特定など分子疫学領域、さらに、薬剤耐性抗酸菌の迅速検出にも応用されている。欠点として、核酸増幅は菌の生死に依存しないこと、さらに、菌数を表現することが困難、すなわち疾患活動性を反映しないこと、精度管理 (微量核酸の混入、偽陽性や偽陰性) が困難なことなどがある。

3. 抗酸菌の病原性

抗酸菌は基本的に外毒素や内毒素非産生性であるが、例外的に *M. ulcerans* (西アフリカ諸国で猛威を奮っている Buruli 潰瘍の原因菌) が外毒素 (マイコラクトン mycolactone, 別名: マクロライド毒素。宿主組織に壊死を惹起する) を産生する。炎症病変や組織傷害は抗酸菌に対する免疫応答過程で宿主から産生されるサイトカインをはじめとする生理活性物質に依存している。また

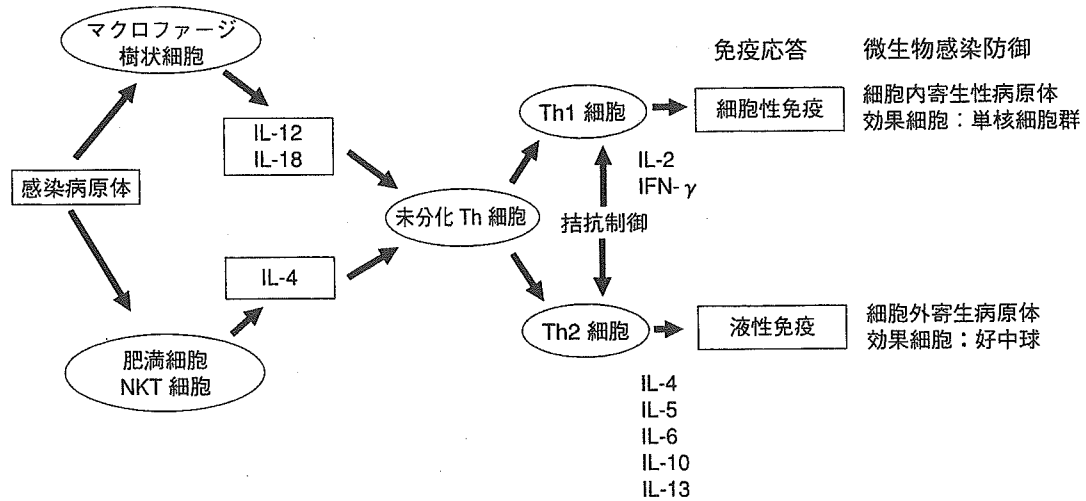


図 4-56 微生物感染における細胞性および液性免疫応答

酸菌，特に，結核菌の病原性は，① 結核菌を貪食したマクロファージの宿主感染防御機構から逸脱して細胞内生存および増殖すること（細胞内寄生病原体：図 4-55）や，② 遅延型過敏反応を誘導することにより表現される。この病原性の発現には細胞壁成分（ミコール酸糖脂質，リポアラビノマンナン，細胞壁成分による補体の活性化や熱ショックタンパク質）が関与している。細胞壁表面に存在するミコール酸糖脂質（別名：コード因子）は肉芽腫を誘導する。リポアラビノマンナンはマクロファージ活性化を阻害する一方，マクロファージから腫瘍壊死因子（TNF）- α 産生を促進し，発熱，体重減少や組織傷害を惹起する。さらに，インターロイキン interleukin (IL) 10 産生を誘導することにより，Tリンパ球活性化を抑制する。細胞壁成分による補体の活性化がオプソニン化を誘導する結果，結核菌が補体受容体を介してマクロファージに侵入することを促進する。結核菌由来熱ショックタンパク質はヒト由来熱ショックタンパク質と化学的に類似しているため，宿主成分と交叉免疫応答，すなわち，自己免疫反応を誘発する。

マクロファージに貪食された結核菌は，食胞体（ファゴソーム）と水解小体（リソソーム）の融合を阻害することにより，酸性化されず，食胞体内で生存し続ける（細胞内寄生病原体）。酸性化の抑制には結核菌のウレアーゼやマクロファージの

補体やマンノース受容体を介した取り込みが関与している。

4. 抗酸菌感染に対する宿主防御

抗酸菌は細胞内寄生病原体であり，宿主防御にマクロファージ-サイトカイン-CD4 陽性 1 型ヘルパー T (Th1) 細胞応答系，すなわち，細胞性免疫が貢献している（図 4-56）。細胞性免疫の起動サイトカインとして，IL-12，IL-18 や interferon (IFN)- γ が Th1 細胞分化や活性化など，重要な役割を演じている。しかし，結核菌感染に対する遅延型過敏反応を含む細胞性免疫の発現は抗結核菌防御と組織傷害に貢献，すなわち功罪の二面性（諸刃の剣）を表現する。また，遺伝的因子として，ヒト第 2 染色体に存在する遺伝子（*NRAMP1* : natural resistance associated macrophage protein 1, 別名=*SLC11A1*）が感染防御に関与し，この機能はマクロファージに表現されている。初回の結核菌曝露の場合，宿主の炎症応答は非特異的であり，普遍的な細菌感染に対する炎症応答に類似している。感染約 4~6 週後に乾酪壊死を伴う肉芽腫炎症が生じ，また，結核菌ツベルクリンタンパク質抗原に遅延型過敏反応，ツベルクリン皮内反応が成立する（図 4-57）。この機序として，病変部において炎症惹起性サイ

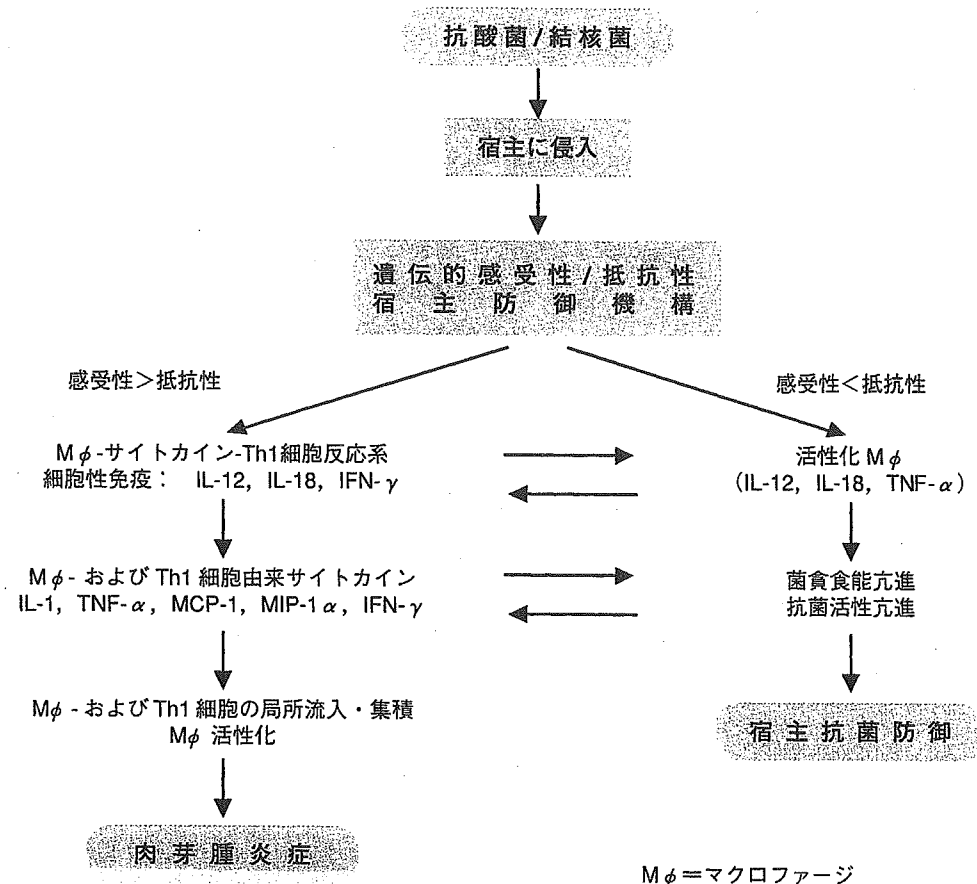


図 4-57 抗酸菌/結核菌感染における宿主細胞および機能分子応答機構

トカイン (IL-1 や TNF- α), Th1 細胞関連サイトカイン (IL-12, IL-18, IFN- γ) や単球走化性ケモカイン (monocyte chemoattractant protein 1: MCP-1 や macrophage inflammatory protein 1 α : MIP-1 α など) が産生され、マクロファージの局所的集積 (肉芽腫), 加えて、細胞性免疫 (遅延型過敏反応を含む) が誘導される。結核菌感染に対する宿主応答は一次感染と二次結核に大別される。

1) 一次感染

未曝露宿主が最初に結核菌を吸入した場合に生じるが、細胞性免疫の発現により感染防御が成立し、90% の感染宿主は発病を回避できる。空気感染した結核菌は肺胞マクロファージに貪食され、マクロファージとともに肺門リンパ節に移行する。未活性化マクロファージは抗菌活性を発揮

できず、結核菌はマクロファージ内で発育・殖、マクロファージを破壊、そして、周囲のラ染マクロファージに感染する。この過程で、肺から血行を介して全身播種性感染に至ることもある。

感染約 4~6 週後、すなわちツベルクリン反応が成立する時期、結核菌により活性化された T 細胞とマクロファージの相互作用により細胞性免疫が発現する。この機序に 3 経路が存在する。第 1 の経路は、Th1 細胞が IFN- γ を分泌し、IFN- γ はマクロファージを活性化し、活性化マクロファージは抗酸菌に対し殺傷能力を有する反応性窒素化合物 (NO, NO $_2$ や HNO $_3$) を産生し、抗結核菌防御を誘導する。この現象は皮膚肉芽腫の形成にも関連している。第 2 の経路は、CD8 陽性 T 細胞、すなわち細胞傷害性 T 細胞が感染したマクロファージを破壊すること

り、結核菌を殺傷する。第3の経路はCD4およびCD8陰性T細胞がマクロファージを破壊し、その結果、破壊されたマクロファージは乾酪壊死を伴う肉芽腫を形成する。乾酪壊死病巣に存在する抗酸菌は酸性環境や低酸素のため、発育・増殖が抑制される。最終的に、一次感染病巣は肺実質と肺門リンパ節の石灰化癥痕を形成する(初期変化群: Ghon complex)。

2) 二次結核と播種性結核

宿主が結核菌に既感染し、免疫学的感作が成立している場合、すなわち外来性再感染、内因性再燃、一次感染病巣から直接、全身播種性結核に進展した場合などがある。これらの誘因には結核菌の高病原性や宿主の易感染性が関与している。二次結核における肉芽腫形成部位は肺尖部に最も多くみられるが、他部位の肺、腎臓、髄膜や骨髄などにも播種する。これらの肉芽腫病変は結核における組織傷害の主因であり、その機序には遅延型過敏反応が寄与している。二次結核に特徴的所見は乾酪壊死と空洞形成であり、これらの病変から結核菌が血行を介して全身に散布、また、気道を介して排泄され、感染源(飛沫核感染)となる。

5. 結核 tuberculosis

結核は再興感染症の代表であり、1993年に世界保健機関(WHO)、1999年に厚生省(現厚生労働省)が「結核緊急事態宣言」を発表、結核問題を再認識し、結核制圧対策の強化に取り組んでいくことを提言している。また、2000年沖縄で開催されたG8サミットは結核、AIDSとマラリアによる年間発生患者数が3億人、死亡数が500万人以上であることから、これら3感染症を人類の健康被害における重点疾患と認識し、協調して介入していくことを決議している。結核対策は、①感染源対策(感染性の高い患者の早期発見・診断、隔離や確実な治療)、②感染経路対策(個室収容、独立空調、マスク)、③感受性宿主対策(ワクチン接種や抗結核薬による化学予防)および、④一般国民や医療従事者に啓発・教育から

構成される。

結核対策の目標としてWHOは、①2005年までに70%以上の感染性(喀痰塗抹陽性)結核患者の発見と85%以上の治癒、②2010年までに結核死亡や有病率を2001年の統計に比べて50%以下にすること、③2050年までに結核を世界的な公衆衛生問題からなくすことを目標設定している。

①発生動向: 全世界では約20億人(全人口の1/3)が結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* に既感染しており、毎年880万人が結核を発病、182万人(HIV/AIDS合併を含む)が死亡し、有病者は2,200万人であるといわれている。今後10年間、少なくとも、8,000万人が発病、2,000万人が死亡することが推定されている。わが国では、年間32,000人(罹患率人口10万対:24.8)が結核を発病し、2,300人(死亡率:1.9)が死亡しており、有病者は29,000人(有病率:23.3)と報告されている(2003年)。

結核は単一病原体による感染症として、世界最大である。疫学的に懸念される事項として、①急速な人口の高齢化に伴う高齢者結核の増加(70歳以上の占める割合:約40%)、②国内地域格差の拡大、③多剤耐性結核菌の出現(初回耐性:1%、獲得耐性:20%)、④ヒト免疫不全ウイルス感染症(AIDSを含む)の重複感染などがある。

②病原体: 結核菌の生物学的特徴(表4-52)として、①細胞内寄生性、②脂質成分に富む細胞壁、③好気性、④遅発育性、⑤飛沫核(空気)感染、⑥慢性炎症、⑦遺伝子の解読などがある。結核菌は好気性グラム陽性桿菌、細胞内寄生病原体であるが、細胞壁が長炭素鎖脂肪酸(ミコール酸)に富み、グラム染色では難染色性を示す。そのため、抗酸性(Ziehl-Neelsen, Kinyoun)染色や蛍光染色が用いられる。抗酸性染色は石炭酸フクシンで加温染色後、塩酸アルコールで脱色、メチレンブルーで後染色する。抗酸菌は“赤い桿菌”として観察される。抗酸菌以外の通常細菌やヒト組織・細胞は後染色のメチレンブルーにより“青く”対比染色される。抗酸菌をオーラミンやローダミンなどの蛍光色素を用いて染色し、塩酸アルコールで脱色後、蛍光顕微鏡で観察する蛍光染色法も広く用いられている。蛍光顕微鏡で観察