

総 説

結核菌研究—最近25年間の進歩

— 日米医学協力計画25周年記念大会結核部会報告 —

1965年に発足した日米医学協力計画は、現在、結核、らい、コレラ関連下痢症、突然変異・がん原、栄養異常、寄生虫疾患、ウイルス性疾患、肝炎、エイズ、免疫の10部会から構成される。結核部会は最初から本プログラムの中心課題として重要な役割を果たしてきたが、さらにわが国の結核の基礎的研究に果たした役割もきわめて大きいと考えられる。

本プログラム発足25周年を記念して、去る1990年7月18日東京において第25周年記念大会が開催され、各部会における過去25年間の研究の進展が報告された。日米両国における結核の基礎的研究の発展については、日米両国の結核部会を代表して東市郎結核部会長より報告されたが、ここに掲載したのがその報告の全文である。

東 市 郎

北海道大学免疫科学研究所

受付 平成3年2月8日

25 YEARS ADVANCE IN TUBERCULE BACILLUS RESEARCH

— Report of Tuberculosis Panels in Silver Jubilee of the
Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program —

Ichiro AZUMA *

(Received for publication February 8, 1991)

はじめに

結核症は抗結核化学療法剤の発達にもかかわらず、世界中で患者数900万人、わが国においても毎年5万人を超える新規患者の発生をみており、10万人の患者が治療を受けている。このようにわが国において未だに最も重要な感染症の一つであり、アジア諸国においてはさらに大きな公衆衛生上の問題である。最近、欧米先進国においてもAIDSに伴う日和見感染症として結核症が非定型抗酸菌とともに再び注目されつつあることも周知のとおりである。

結核症における基礎的研究は周辺科学の進歩に支えら

れ、過去四半世紀に飛躍的な進歩を遂げた。特に基礎免疫学、分子生物学、生化学などが結核研究に大きく寄与した。

結核病学と免疫学の関連はきわめて深く、その例として1942年Chaseによって行われた遅延型アレルギーのtransferに血清成分でなく細胞の移入が必要であることを明らかにした研究や、山村らによって行われたウサギにおける実験的結核性空洞形成とその機序に関する研究が挙げられる。これらは細胞性免疫に関する先駆的研究であり、いずれも結核菌を材料として用い、その遅延型アレルギーの機序あるいは結核症の病態を解明しようとして行われた研究である。また、1966年David、

*Institute of Immunological Science Hokkaido University, Kita-15, Nishi-7, Kita-Ku, Sapporo 060 Japan.

Bloom らによって報告されたマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) の研究は近年免疫学のトピックスの一つとして注目を浴びているサイトカインに関連する研究の嚆矢をなすものであり, 1988年その cDNA のクローニングが David らのグループによって完成された。また, 高津らによって見出された IL-5 も PPD 反応性 T 細胞クローンに由来するものであり, 岸本, 平野によって発展された IL-6 も, 最初平野らによって結核性胸膜炎胸水中にその活性が見出された。

ここでは日米医学協力プログラム結核部会において発展させられた研究を中心に, 過去 25 年間の結核研究の歩みを要約したい。

I. 結核菌の菌体成分の構造と生物活性

1) 抗原多糖

従来より結核菌の皮内反応抗原については後述するように Seibert の精製ツベルクリン (PPD) をはじめとし, 主としてタンパクが検討されたが, 多糖抗原の役割については十分に明らかにされていなかった。

結核菌多糖に関する研究は 1948 年の Stacey らの研究にさかのぼるが, 結核菌菌体の主要な多糖の系統的な研究は三崎ら, 筆者らによって 1966 年頃より行われた。結核菌菌体中に含まれる主要な多糖として細胞壁骨格の構成成分である arabinogalactan および細胞質中に含まれると考えられる arabinomannan, mannan, glucan が精製され, それぞれの基本構造が示された。特に arabinogalactan および arabinomannan は結核菌感作モルモットに対しアナフィラキシー反応およびアルサス型皮内反応を示すとともに, 抗血清に対し反応性を示した。しかし mannan および glucan はほとんど抗原性を示さなかった。一方, 積田らは arabinomannan に脂肪酸が結合したリポ多糖が血球凝集反応の抗原となることを見出したが, その構造の詳細は Brennan らにより明らかにされた。

2) ツベルクリンタンパク

ミコバクテリア由来の抗原性タンパクの精製に関する研究の歴史は旧く, Seibert による精製ツベルクリン (PPD) の報告以来, すでに 50 年を経た現在でも皮内反応抗原として, これに代わり得るものは得られていない。PPD は約 300 種もの培養濾液タンパクの可熱変性したものであり, 近年単クローン抗体や遺伝子工学的的手法を用いて精製タンパクを生産する方法が試みられている。特にらい菌についてはらい菌が培養困難であるため遺伝子工学的手法が Young らを中心とするアメリカの研究者によって積極的に応用され, 多大な成果を上げた。この技術を用いて結核菌タンパクの構造解明が行われた。今日までに単離された結核菌タンパクのうち, 70/71Kd, 64Kd, 65Kd, 38Kd, 28Kd, 30Kd, 18Kd タ

ンパクなどはその遺伝子がクローニングされている。特に 70/71Kd タンパクはストレスタンパクまたは熱ショックタンパク (Hsp) として知られる Dnak と同一分子とみなされている。わが国においても永井, 田村ら, 山田らによって積極的に結核菌タンパクの精製と遺伝子のクローニングが進められている。特に永井は培養液中のツベルクリンタンパクの精製と構造決定を精力的に行い, MBP59, 64, 70, 57 についてその性状を明らかにした。

これらのタンパクのうち, 最もよく研究されているものは 65Kd タンパクである。65Kd タンパクに対する免疫応答のエピトープ地図に示されるように, 結核菌の場合, N 末端をメチオニンとする 576 個のアミノ酸が並んでいる。BCG と結核菌の配列は 100% 同一であり, らい菌とは 95% 以上のホモロジーがある。28 種の単クローン抗体がそれぞれ反応し得る分子内の部分を示し, 識別し得る抗原決定基が分子全体にわたって存在している。一方, 10 個の T 細胞クローンとポリクローナルな T 細胞が反応し得るエピトープがあり, アミノ末端側に偏在している傾向がみられる。この 65Kd タンパクと大腸菌の熱ショックタンパクである 60Kd タンパク (GroEL) との間には 60% のアミノ酸配列の一致がみられる。

熱ショックタンパクは他の菌体抗原とも抗原構造に相同性を有していることも明らかにされており, ヒトのクローン化 T 細胞 (CD4⁺) が 65Kd タンパクに反応し分裂すること, IL-2 や GM-CSF, IFN- γ などのサイトカインも産生することが見出されている。また別の熱ショックタンパクである 70Kd タンパクは種々のミコバクテリアタンパクと相同性を有するとともに, 哺乳動物の 70Kd 熱ショックタンパクとも類似性を有していることが明らかにされた。さらに γ , δ -T 細胞がミコバクテリアの熱ショックタンパクを認識することも明らかにされており, 今後これら 65Kd, 70Kd タンパクの防御ワクチンとしての感染免疫における役割が明らかにされるであろう。

近年, 結核菌の熱ショックタンパクを認識する γ , δ -T 細胞が関節リウマチの関節腔液中に出現することが報告されており, また 1964 年 Pearson らも結核菌を用いて実験的関節炎モデルをラットに作製しているが, Eden らは結核菌 65Kd タンパク反応性の T 細胞クローン (A₂b) により関節炎が誘発され, 他の T 細胞クローン (A₂c) がアジュバント関節炎成立に抑制的に作用することを見出している。今後自己免疫疾患と結核菌との関連についても注目すべきであろう。

3) 糖脂質

結核菌菌体成分糖脂質およびその関連脂質として cord factor, 硫酸化脂質およびリン脂質が挙げられる。

(1) Cord factor

Cord factor は H. Bloch によって 1950 年毒力結核菌のヒモ様発育に関与する物質として報告され、マウスに対する致死活性が示され、結核菌の毒性物質として注目された。Cord factor の化学構造は Bloch らにより trehalose-6, 6'-dimycolate (TDM) と確立された。鉱物油または植物油に溶解させ、または o/w エマルジョンとして TDM はマウスに対して致死活性毒性を示すが、その毒性は投与形態、投与経路、動物種により異なる。さらに TDM はマウスに対する毒性のみならず、マウス、モルモットに対して強い免疫アジュバント活性を示すことが見出され、新しい型の免疫アジュバントとして注目されている。TDM の関連化合物の化学合成と毒性、マウス腹腔マクロファージに対する免疫アジュバント活性の相関については筆者らによって詳細に検討された。NIH の Ribi らはミコバクテリア細胞壁骨格と TDM (Ribi らは P₃ と命名した)、グラム陰性菌の内毒素 lipid A, TDM と MDP などと併用することにより line 10 肝癌に対する抗腫瘍活性、マウスでの肺肉芽腫形成および毒力結核菌の吸入感染に対する感染防御活性などに対し相乗的に作用することを見出した。その後矢野らはミコール酸残基が 3 個以上トレハロースに結合した TDM 同族体を見出し、その生物活性について詳細に検討している。

(2) Sulfolipid

TDM 関連化合物として Goren らによって精力的に研究された Sulfolipid (SL-I および SL-III) が挙げられる。Sulfolipid の結核菌菌体成分としての役割について Middlebrook らによって主張された毒力結核菌関連脂質と考えられ、その含量と菌の毒力との相関についても検討されたが、Sulfolipid の菌の毒力との関連については結論は得られていない。

SL-I および SL-III はトレハロースの脂肪酸エステルの硫酸化物であるため、デタージェント活性を有するとともに、TDM 同様他の免疫アジュバントとの併用において相乗的にその免疫アジュバント活性を増強することも見出されている。

(3) Phosphatidylinositol pentamannoside

結核症の血清診断に高橋らはリン脂質画分を用いるいわゆる「カオリン凝集反応」を用いていたが、その活性因子についても明らかにされた。1959 年野島は結核菌菌体のリン脂質として phosphatidylinositol oligomannoside (PIMx) の存在を初めて報告したが、Suhrahmanyam らは数種のミコバクテリアのリン脂質より PIM₁, PIM₂, PIM₅ を精製し、このリン脂質が血清学的に活性因子であることを明らかにした。さらに Pangborn ら、佐々木らも詳細な化学分析を行った。Ballou らは PIM₅ の化学構造の詳細について検討した。このほかに Brennan らによって phenol 骨格を有する

抗原性糖脂質が同定され、菌分類上の有用性が明らかにされた。

II. 結核菌細胞壁の構造と機能

1) ミコール酸とアラビノースマイコレート

結核菌の菌体成分の生化学的特性の一つは多量の脂質を含むことである。特にミコール酸とよばれる総炭素数 80 前後の超高級分岐オキシ酸は、結核菌をはじめとするミコバクテリアを特徴付けるものとして古くから注目されていた。ミコール酸の生化学的研究はすでに 1930 年代にエール大学の Anderson らによって始められ、1950~60 年代にパリ大学の Lederer のグループによって詳細な構造研究が行われ、ミコール酸はその構造上から α , β , γ など数種のグループに分類されることが構造研究から明らかにされている。

このようにミコバクテリアに特徴的なミコール酸の存在様式については、i) cord factor, ii) glycerol monomycolate, iii) ロウ D などのエステル型糖脂質として存在することが明らかにされた。その後筆者らはヒト型結核菌青山 B 株の結合脂質よりミコール酸がアラビノースの 5 位の水酸基にエステル結合した糖脂質断片 (アラビノース-5-マイコレート) を分離した。さらに筆者らによってこの糖脂質断片は細菌細胞壁の部分構造をなすものであること、細菌細胞壁の融解産物と考えられるロウ D 画分においても同様の存在様式が認められることが見出された。ミコール酸の 90% 以上は先に述べた存在様式で細菌細胞壁に局在するものと考えられた。またミコール酸は細菌細胞壁の主要な構成成分として酸性染色に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。

2) 細菌細胞壁の構造

結核菌の細胞壁の構造については小谷ら、Lederer ら、三崎ら、筆者らによって詳細に検討され、これらの成績から基本構造が確定された。先に述べたようにミコール酸がミコバクテリアの抗原多糖の一種であるアラビノガラクトタン (AG) のペプチドグリカンとリン酸エステル結合およびグリコシド結合している可能性が示唆されている。ミコバクテリアのペプチドグリカンの特徴的なことは、ムラミン酸のアミノ基がグリコリル化されていることであり、同様の結果はミコバクテリアの近縁細菌であるノカルジアにおいても認められ、これら細菌細胞壁の構成成分は細菌分類の生化学的手法として広く用いられるように至った。一方、高山らは INH によるミコール酸の、エタンブールによるアラビノガラクトタンの生合成阻害を明らかにし、これら抗結核剤の作用機作の一端を示した。

3) 細菌細胞壁の免疫増強活性因子

1942 年、Freund によって結核死菌と鉱物油中に浮

遊させたいいわゆる「Freundの完全アジュバント、FCA」がきわめて強い免疫増強活性（アジュバント活性）を有することが報告されて以来、その活性因子について White, Raffel らによりロウD画分であるとされた。しかし1970年筆者らによりミコバクテリアの最も重要なアジュバント活性因子が細菌細胞壁であること、さらに細菌細胞壁のうちでも特にペプチドグリカン部分がアジュバント活性発現に最も重要な役割を果たすことが明らかにされた。結核菌細胞壁骨格は結核死菌と同様に血中抗体産生のみならず、細胞性免疫の誘導に対しても強い免疫増強活性を示した。

III. 結核菌の抗腫瘍活性

1) BCG 生菌を用いる癌免疫療法

BCGを中心とするミコバクテリアの免疫増強活性（アジュバント活性）を生体防御機構への強化に応用しようとする研究は、フランスの Mathé 博士、UCLA の Morton 博士を中心に急性白血病、悪性黒色腫に対し試みられた。その後、ほとんどすべての腫瘍に対し BCG 生菌単独、または従来の癌治療法との併用療法としてその有効性が検討され、一部の腫瘍において有効性が認められた。これら BCG と癌免疫療法に関する研究を通して、Biological Response Modifier (BRM) の概念が確立され、BRM の癌治療薬としての臨床評価は randomized controlled trial による患者の生存率の延長を指標とするべきであるとの合意が得られた。

2) 結核菌菌体成分による癌免疫療法

BCG が強い免疫増強活性を有することは周知のことであるが、その副作用および免疫力の低下した癌患者に対して生菌を使用することの危険性を考慮し、癌免疫療法に有効な菌体成分の開発が進められた。その結果、BCG-細胞壁骨格 (CWS)、そのペプチドグリカン、水溶性アジュバント (WSA)、DNA 画分、ムラミルジペプチド (MDP) 誘導體、コードファクター (TDM) 誘導體、特に BCG-CWS および関連物質である *Nocardia rubra*-CWS については山村らにより、BCG-CWS に TDM を加えた混合アジュバント、TDM およびグラム陰性菌の内毒素の活性因子である lipid A との混合アジュバントについては NIH Rocky 山研究所の Ribi らによって、BCG 菌体中の DNA 画分および合成 DNA について徳永らのグループによりその抗腫瘍活性が詳細に検討された。BCG-CWS、*N. rubra*-CWS を少量の鉱油やスクワレンで処理し、生食水に水中油エマルジョンとした製剤がマクロファージを中心とする免疫担当細胞に作用し、生体防御系の活性化を通して担癌患者に作用するものと考えられる。BCG-CWS、*N. rubra*-CWS は実験腫瘍系に対しても、①同系移植腫瘍系に対する腫瘍生着阻止活性と退縮

活性、②自家癌系における腫瘍片の自家移植阻止活性および腫瘍退縮活性、③転移阻止活性、④自然発癌、化学発癌の阻止活性などがマウス、ラット、モルモット、ウサギなどの実験系において明らかにされた。さらに *N. rubra*-CWS は肺癌、胃癌、癌性胸水貯留症例、急性骨髄性白血病などについて無作為割付法により検討され、その有効性が明らかにされた。

徳永らは BCG から抽出した DNA 画分 (MY-1) に抗腫瘍活性とともに強い NK 活性増強作用、IFN- α/β 、 $-\gamma$ の誘導作用があることを見出した。MY-1 は毒性がきわめて低く、ヒトの悪性リンパ腫、成人 T 細胞白血病の皮膚症状などに応用され有効例が認められている。

さらに徳永らは合成 DNA を用いて *in vitro* における NK 活性、MAF 活性、IFN 活性などのアジュバント活性を指標にスクリーニングし、合成 poly G : C 単一鎖に最も強い活性を認めた。徳永らは免疫アジュバント活性発現のために有効な合成オリゴヌクロチドの配列についても検討しつつある。

合成 MDP 誘導體の抗腫瘍活性についても広く試みられたが、特に Fidler および CIBA-GEIGY の研究グループによって行われた MTP-PE と IFN- γ をリポソームに封入した製剤に強い癌転移阻止活性が見出されている。

IV. 合成免疫アジュバントの開発

結核菌菌体成分の研究の中で、細胞壁骨格を中心とする菌体成分および関連合成化合物の免疫アジュバント活性の研究は最も輝かしい成果の一つであろうと考えられる。

1) MDP の発見

先に述べたように筆者らは結核菌細胞壁の免疫増強活性因子がペプチドグリカン部分であることを明らかにしたが、1974年 Ellouz らはペプチドグリカン構造のうち、*N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP) が細胞壁のアジュバント活性最小構造単位であることを天然の細菌細胞壁のペプチドグリカンから精製した MDP および化学的に合成した MDP 標品を用いて明らかにした。MDP は免疫アジュバント活性のみならず、発熱原性や睡眠作用などさまざまな生物活性を示すことが報告されている。

MDP は分子量 492 の水溶性の糖ペプチドであり化学合成が比較的容易であることから、数多くの関連化合物が化学合成され、その生物活性が検討された。種々の化学合成された MDP 関連化合物の構造と遅延型アレルギーを指標とした免疫アジュバント活性との相関関係が詳細に検討された。結核菌細胞壁骨格は MDP を中心とする繰り返し構造をもつペプチドグリカンに多糖 (ア

ラビノガラクトン) および超高級脂肪酸のミコール酸から構成された巨大分子をなしており、これら脂溶性基、水溶性基が MDP およびその重合体である細菌細胞壁のアジュバント活性発現に大きな影響を与えているものと考えられる。

2) MDP 関連化合物による生体防御機構の強化

免疫アジュバント、特に MDP は多方面の応用が考えられるが、ここでは二つの例について紹介したい。

i) アシル MDP 誘導体による非特異的生体防御機構の強化

筆者らは 60 種をこえる MDP のアシル誘導体について *E. coli* を用いる感染防御活性についてマウスで検討し、MDP ステアロイル誘導体である MDP-Lys (L18) を選抜した。この化合物は *E. coli* のみならず他の細菌、真菌、ウイルス感染に対しても非特異的感染防御活性を示すことが明らかにされた。その作用機作として多形核白血球の数および機能亢進、IL-1, CSF などのサイトカイン産生などが考えられている。MDP-Lys (L18) の臨床応用として、化学療法などで治療を受けたがん患者の低下した白血球数と血小板数の回復に用いられ、その有効性が認められている。MDP-Lys (L18) の他に非特異的感染防御活性を有する免疫アジュバントの開発が世界的に広く進められ、MDP 誘導体および関連するペプチドリビドが類似した活性を有することが報告されている。

ii) ワクチンの効果増強のためのアジュバントの開発

現在細菌やウイルス、原虫のワクチン開発は抗原タンパクの遺伝子クローニングを中心にリコンビナントワクチンおよび有効成分のみを精製したコンポーネントワクチンの開発に向けられつつある。これらリコンビナントワクチンやコンポーネントワクチンのヒトへの応用には、有効な免疫アジュバントの併用と効率的な投与形態の開発が必須と考えられる。その試みとして結核菌菌体成分のうちでも MDP 誘導体および TDM 誘導体が注目されている。特に MDP 誘導体である B30-MDP が脂溶性基と親水基を有し、容易にミセルを形成するという特異な物性から、ワクチンの免疫アジュバントとしての

広い応用が示唆されている。また TDM や MDP-Lys (L18) も原虫(マラリヤ)ワクチンのアジュバントとしての有効性が実験的に示唆されており、今後の発展が期待される。

V. 将来への展望

結核症は未だに世界的にみて最も重要な感染症の一つであり、WHO は年間 300 万人以上の人々が結核症によって死亡していると推定している。さらに AIDS 患者の日和見感染症として結核症は非定型抗酸菌症とともにその重要性を増しつつある。

長年にわたり用いられた BCG のワクチンとしての有効性についても疑問が投げ掛けられており、今後有効な抗結核ワクチンおよび抗結核化学療法剤の開発が緊急事と考えられる。現在、Bloom ら、水口らによって進められている BCG を用いた新しいベクター系の開発研究は、有効な抗結核ワクチンの開発のみならず、より有効な抗原タンパクを導入することによって広く生菌ワクチン開発への応用が可能であり、注目されている。今後結核菌に対する病原性、免疫原性、薬剤耐性などの問題についてさらに追究することが望まれる。

結核菌は宿主との特殊な関わり合いを有する細菌であり、宿主応答と病態についてのより正確な理解が今後結核症の征服のために重要な課題と考えられる。

おわりに

紙数の関係で省略したが、過去 25 年間、日米両国の結核部会で行われた結核症の基礎的研究には、ヒト結核症における免疫調節に関する研究などのほかに、結核菌タンパクに対する単クローン抗体の作製やミコプラズマ菌株の蒐集など地道な研究も含まれており、今後の結核症の研究に大きな寄与をなすものと考えられる。

文 献

厚生省、日米医学協力研究会編：25Years Progress, US-Japan Cooperative Medical Science Program, 280~286, 1990.