

第 70 回総会シンポジウム

I. ヒト結核の感染・発病と免疫

座長 露口泉夫 (大阪府立羽曳野病院)
富岡治明 (島根医大微生物・免疫)

受付 平成 7 年 8 月 21 日

The 70th Annual Meeting Symposium

I. TUBERCULOSIS : IMMUNOLOGICAL AND EPIDEMIOLOGICAL
ASPECTS OF THE ESTABLISHMENT AND
DEVELOPMENT OF INFECTION

Chairpersons : Izuo TSUYUGUCHI *
Haruaki TOMIOKA **

Presenters

1. The role of some cellular components of bacterial parasites in determining the incidence of tuberculosis : Studies on mycobacterial antigens, with special reference to mycobacterial immunoreactive ribosomal and secreted proteins : Takeshi YAMADA (School of Dentistry, Nagasaki University), et al.
2. The mode of infection of tuberculosis : Analysis using molecular epidemiologic methods ; Chiyoji ABE (Research Institute of Tuberculosis).
3. The mechanism of induction and expression of protective immunity, with special reference to the role of cytokines : Masao MITSUYAMA (Department of Bacteriology, Niigata University School of Medicine)
4. Clinical comparison of pulmonary tuberculosis with pulmonary *M. avium* complex disease : Katsuhiro SUZUKI (Chest Disease Research Institute, Kyoto University)

(Received 21 August 1995)

Increases in the incidence of tuberculosis coincident with the AIDS epidemic have been reported in some countries in Africa and in certain regions of the United States. The recent emergence of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), defined as infection with *Mycobacterium tuberculosis* having *in vitro* resistance to both isoniazid and rifampicin, in HIV patients has resulted in extremely high mortality rates ranging from 72 to 89% with median intervals from diagnosis to death of 4 to 16 weeks in such patients. Thus, MDR-TB in immunocompromised hosts is almost entirely intractable to treatment.

These changes in the worldwide status of tuberculosis encouraged us to consider the immunological and epidemiological profiles of tuberculosis infections including the infec-

* From the Osaka Prefectural Habikino Hospital, Habikino-shi, Osaka 583 Japan.

** From the Shimane Medical University, Izumo, Shimane 693 Japan.

tious process and the mechanisms leading to the development of tuberculosis. This symposium included four speakers who study immunology, molecular epidemiology, and clinical diagnosis and treatment of mycobacterial infections. The speakers presented their original work and also reviewed recent worldwide progress in their particular fields of study.

In this symposium, there was detailed discussion concerning the following items, which are related either to the nature of bacterial pathogens or the profiles of host response to mycobacterial infection.

- 1) Dr. Yamada reviewed immunological profiles of mycobacterial infections, particularly as they related the participation of bacterial antigens including mycobacterial immunoreactive ribosomal and secreted proteins in the establishment and development of the infectious process and in the expression of host resistance to mycobacteria. He reported biochemical and immunological properties of mycobacterial ribosomal proteins with very potent immunogenicity.
- 2) Dr. Abe reported the usefulness of molecular epidemiologic studies based on restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using IS6110 as a probe DNA in elucidating the mode of infection of tuberculosis, especially that in the worldwide outbreak of tuberculosis infections among HIV patients. He also suggested that RFLP analysis may be useful in the establishment of a new method for subtyping various *M. tuberculosis* strains.
- 3) Dr. Mitsuyama reviewed the mechanisms of the induction and expression of protective immunity, in particular as they concern the role of immunoregulatory cytokines. He presented his original findings which clearly indicate that the induction of protective T cells is largely dependent on various cytokines produced by the host in the early stage of immunization, and discussed the relative contribution of several cytokines, including IFN- γ , IL-1, and IL-12, and in addition IL-4 and IL-10, to the induction and expression of cell-mediated immune protection.
- 4) Dr. Suzuki reported recent findings of his clinical studies of pulmonary tuberculosis and *M. avium* complex (MAC) disease and attempted to compare clinical aspects of the two types of infections, using in particular the radiographic profiles and clinical characteristics of patients with primary or secondary pulmonary tuberculosis, MAC disease without predisposing conditions, and pulmonary tuberculosis with HIV infection. He indicated some suggestive differences in the clinical features of tuberculosis and MAC infection, which may be quite useful in understanding peculiar characteristics of the two mycobacterial diseases.

There are numerous questions concerning the immunological and epidemiological aspects of tuberculosis and other mycobacterial infections. The four investigations reported by the members of this symposium also raised a number of questions which must be answered in the future. The extremely strong immunogenicity and strong resistance of mycobacterial organisms to microbicidal functions of host macrophages are the most important factors for the establishment of persistence in the host. This is closely related to certain clinical aspects characteristics of mycobacteriosis during the course of initiation of the infectious process and the development of signs and symptoms of the bacterial disease. A number of systematic studies are required to address these interesting problems, but such efforts may produce many findings useful for development of new protocols for clinical treatment of mycobacterial infections including tuberculosis.

Key words : Tuberculosis, Infection, Immune response

キーワード : 結核, 感染, 免疫応答

シンポジスト

1. 結核発病における菌側の因子：抗酸菌の抗原研究の意味
山田 毅（長崎大歯口腔細菌），他
2. 結核の感染様式—分子疫学的手法による解析—
阿部千代治（結核予防会結研）
3. サイトカインを中心とした防御免疫の誘導と発現機構
光山 正雄（新潟大医細菌）
4. 結核の発症・進展に関する一考察
—*M. avium* complex 感染症との対比から—
鈴木 克洋（京都大胸部疾患研）

近年、アフリカ諸国や米国の一部の地域では AIDS の蔓延に伴う結核の増加が報告されてきているが、これに加うるに INH・RFP 両剤に耐性の結核菌による感染症として定義される多剤耐性結核の出現は、HIV 感染者にその発症を見た場合、多くは診断後 4~16 週という短い期間のうちに 72~89% に及ぶ高い死亡率をみることから明らかなごとく、HIV 感染者などの易感染性宿主では極めて難治性であり、重要な問題としてクローズアップされてきている。

このような現状に鑑み、本シンポジウムでは、ヒト結核の感染・発病および免疫にまつわる諸問題について、特に「結核と宿主」という観点を踏まえての考察を試みた訳である。今回は特に、結核をはじめとする抗酸菌症の免疫学、分子生物学的手法による疫学的研究、抗酸菌感染症の臨床に詳しく、その分野の諸問題について一言を持っておられる先生方にそれぞれの立場から現在までにご専門の分野での研究がどこまで進められており、何が明らかになりつつあり、何が今後の問題として残されているのかを解説していただいた。

本シンポジウムにおいて、山田博士により抗酸菌の菌体抗原、特にリボゾーム蛋白のもつ免疫誘導能といった問題を中心にした抗酸菌症の免疫学的なプロフィールの一端が明確な形で呈示された。

阿部博士は、RFLP 分析をはじめとする分子疫学的手法を駆使しての解析が結核の感染様式と疫学的諸問題についての考察に極めて有用であることを報告した。

光山博士は、生菌免疫の諸問題を中心としての抗酸菌宿主での感染免疫成立・発現についてサイトカインとの関連からの考察を行い、IFN- γ や IL-12 などの促進性サイトカインの果たす役割を示唆した。

鈴木博士は、MAC 症の臨床的な所見と結核のそれとの比較を行うことによる結核の病像を浮き彫りにさせようとする一連の試みについて、特に画像所見からの臨床的検討を中心に紹介した。

本シンポジウムで取り上げた問題は、結核を中心にした抗酸菌症の感染免疫、疫学についての研究の現状のほんの一端に過ぎないが、それでも実に多くの課題や、今後の解明を要する問題が山積していることが明らかである。抗酸菌症を規定するものはなんと言っても、抗酸菌のマクロファージ内殺菌メカニズムに対する抵抗性と、免疫原性の強さであり、これが persistent infection の代表としての抗酸菌症の特異な病像を規定していると言ってもあながち過言ではない。このような観点からすると抗酸菌症はきわめて興味深い研究対象であり、今後の研究のますますの発展が囑望されるゆえんである。

第70回総会シンポジウム

I. ヒト結核の感染・発病と免疫

1. 結核発病における菌側の因子：抗酸菌の抗原の研究の意味

山田 毅・大原直也・松本 壮吉
松尾 長光・北浦英樹・高野 美貴子
雪竹 英治・和田 直子
西山 毅・内藤 真理子

長崎大学歯学部口腔細菌

木ノ本 雅 道

国立予防衛生研究所

木 村 誠

九州大学農学部

受付 平成7年8月21日

1. THE ROLE OF SOME CELLULAR COMPONENTS OF BACTERIAL
PARASITES IN DETERMINING THE INCIDENCE OF TUBERCULOSIS :
STUDIES ON MYCOBACTERIAL ANTIGENS, WITH SPECIAL
REFERENCE TO MYCOBACTERIAL IMMUNOREACTIVE
RIBOSOMAL AND SECRETED PROTEINS

Takeshi YAMADA*, Naoya OHARA, Sokichi MATSUMOTO,
Takemitsu MATSUO, Hideki KITAURA, Hideharu YUKITAKE,
Naoko WADA, Takeshi NISHIYAMA, Mariko NAITO,
Masamichi KINOMOTO
and Makoto KIMURA

(Received 21 August 1995)

Tuberculosis remains as major disease, affecting more than 20 million people. The elimination of the disease with vaccination, rapid diagnosis, and efficient therapy is an important objective of our study. To realize the objective, the characterization of antigens is essential.

We have chosen two kinds of antigens for our study, the ribosomal antigens and an antigenic proteins secreted by mycobacteria.

* From the Nagasaki University, School of Dentistry, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki-City, Nagasaki 852 Japan.

The biochemical and immunological characterization of ribosomal fraction was carried out. Ribosomal proteins were purified and assessed for DTH reaction. The N-terminal amino acids sequences were determined. Total structures of S19, S7 and S12 in 30S and L7/L12 in 50S subunits were elucidated. L7/L12 had 66% homology with analogue from *S. griseus* which showed GTPase activity in protein synthesis. This protein was secreted in culture medium and induced strong DTH.

Secreted antigenic proteins are of great interest for us. Secreted antigens may be recognized rapidly by immune system and therefore may induce rapid and high level immune response. It is also expected that it may contain protective antigens, since live BCG protect disease more efficiently than heat killed BCG. We have determined and published the total structure of four proteins (MPB64, MPB70, MPB57, and α antigen).

We attempted to utilize this antigen for the diagnosis and the design of vaccine. The structures of α antigens from *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii* and BCG were determined and its potential for application to diagnosis was presented. Using the operon of *M. kansasii*, α antigen and V3 region of HIV-1 were expressed by recombinant BCG which induced CTL in mice.

Key words : Antigen, Ribosomal protein, Secreted protein

キーワード : 抗原, リボソーム蛋白, 分泌蛋白

緒 言

結核研究が盛り上がってきた。本格的分子生物学者や免疫学者が、結核研究を本気でやりだした。WHO や NIH も、若い革新的な研究者を育てるために研究費を増やしている。その大きな要因は、HIV とリンクしていることである。ここではまず HIV との関係について簡単に述べ、ついで結核の病原性因子について述べ、最後にわれわれの研究結果について述べる。

HIV と結核菌

HTLV-1 を感染させたヒトの T リンパ球の cell line には、HIV 感染が効率よく起こる¹⁾ことが 1985 年 Science に発表された。その原因となる因子は lymphotoxin (TNF- β) であることが分かった²⁾。やがて TNF- α も同じような作用を発揮することが分かってきた。これらは HIV が感染した細胞を殺すが、一方では HIV の分裂を促進する^{3,4)}。HIV の分裂の促進は、TNF- α により NF-KB の誘導を介して起こることが分かり、以後サイトカインと HIV 感染の関係について盛んに研究が行われるようになった⁵⁾。

HIV が感染した単球系の cell line に結核菌を加えると、ウイルスのコア抗原が大量に分泌されてくる。これに抗 TNF- α を加えておくと産生量は抑制される。同じ実験を PPD で行くと同様にウイルスの抗原産生は

促進するが、抗 TNF- α で抑制されない。このことは PPD による HIV 増殖促進は、TNF- α と違う機構によってひき起こっていることを示している。

この cell line のもとの細胞に、組み換え HIV ウイルスを感染させた。このプラスミドは HIV の分裂に必要な部分に、クロマイ不活化酵素の遺伝子をつないだものである。遺伝子の分裂が起これば、この酵素活性が高くなる。PPD を加えると酵素活性が高くなった。リンパ球系の細胞でも同様の現象がみられた。LPS では同様の現象はみられない。細胞壁に含まれる LAM が、NF-KB を活性化することが知られているので、これが PPD の中に含まれている可能性もある。PPD 中のどの分子が HIV を活性化するのか、検討すべき重要な問題となってきた⁶⁾。

HIV-1 に感染した肺結核患者のマクロファージを PPD で刺激すると、強く反応し増殖が盛んになる。HIV-1 に感染していない肺結核患者に比べて、3~10 倍も強く反応する⁷⁾。これが HIV-1 の増殖を促し、エイズの発病を早くしている。肺結核患者と健康人から単球を分離し、各々に HIV-1 を感染させ、p24 蛋白の合成量をしらべると、肺結核患者のほうが高い。また HIV-1 の DNA の量を、PCR で増幅し比べてみると、肺結核患者のほうが多い。約 2 倍も多いことが報告された⁸⁾。

HIV が感染した細胞は、PPD や TNF- α によりま

ず HIV の増殖が盛んとなり、そのために IL-6 を大量に産生するようになる。この IL-6 は抗酸菌 (MAI) の増殖を促す⁹⁾。MAI が増えてくると感染した $m\phi$ は、CD11b や CD14 の発現が少なくなってくる。そのため T リンパ球との相互作用が減弱し、細胞性免疫が低下することになる¹⁰⁾。また、HIV の産生物 Tat 蛋白は *M. avium* と強く結合する。この結合体は、インテグリンレセプターを介して $m\phi$ に取り込まれる。TGF- β の産生を高め菌の増殖を促進する¹¹⁾。

HIV の gp120 を *M. avium* に加え $m\phi$ に感染させるとプロスタグランジン E2 を盛んに生産し、これが免疫抑制的に働き菌の増殖を促進する¹²⁾¹³⁾。gp120 や *M. avium* を単独に $m\phi$ に加えるよりも、プロスタグランジン E2 の産生を促進している。HIV 感染と抗酸菌感染は相乗的な関係にある。その機構解明の研究が盛んに行われている。

結核菌の病原因子

菌は肺胞上皮に侵入する病原因子を持っている。加えて菌は多くの蛋白を分泌している。その時に産生される N-fMet は、肺胞マクロファージ ($m\phi$) に結合しシグナルを送り、濃度の高い所へ動引する。C3 が菌体に結合すると、酵素活性を獲得し C5 を切断し C5a を産生する。これも $m\phi$ を菌体のほうへ動引する。動引された $m\phi$ も、leukotoxin, IL-8 を産生し $m\phi$ を動引する。 $m\phi$ には菌体を取り込むためのレセプターがある。マンノース受容体は、菌のリポアラビノマンナンが結合する。菌体抗原が抗体と結合し、Fc 受容体や補体受容体を介して、また抗酸菌特有の α 抗原群は、フィブロンクチンと結合し受容体を介して $m\phi$ に侵入する。

受容体の刺激は活性酸素 (ROI) の産生を高める。侵入した結核菌はファゴソーム (PL) の中でしぶとく生きているが、この間蛋白質を分泌している。鉄結合蛋白は宿主から鉄をうばい菌が利用するためにある。 $m\phi$ は抗原を分解し、MHC クラス II にこれを結合し細胞表面に提示する。これを CD4⁺ の細胞が認識し、INF- γ を産生し $m\phi$ を活性化する。また、IL-2 を産生し他のリンパ球の増殖を促す。やがて $m\phi$ もサイトカインを分泌し、自身を活性化し Reactive Nitrogen Intermediate (RNI) を産生する。

PL 内は酸性であり、RNI が毒性を発揮するのに都合よく出来ている。しかし菌は NH₄⁺ を産生し、この作用やさまざまな分解酵素作用をキャンセルする。NH₄⁺ とある種の因子は PL の融合を阻害し細胞質へ逃げるができる。そこで菌はさまざまな蛋白質を分泌している。 $m\phi$ はこれを分解し、MHC クラス I にトラップする。 $m\phi$ は異物の侵入を受けストレス蛋白質を

産生し、上記の結合を助ける。これを認識する CD8⁺ 細胞は、活性化され感染細胞を殺す。しかしすべての菌が細胞質にエスケープできるわけではなく、PL 内でこの菌は蛋白を分泌している。殺されるものもある。この過程で MHC クラス II と結合するが、細胞質に放り出されそこでクラス I と結合し表層に提出されるものもある。CD4⁺、CD8⁺ 細胞が活性化される。

分解された菌体成分はさまざまな免疫反応を惹起する。DNA 成分は INF- α を産生し、NK 細胞を活性化する。表層の蛋白やリボソーム蛋白には強い遅延型皮膚反応を惹起するものがある。リポ多糖体は一方では細胞性免疫を高める IL-12 の産生を促進するが、また、抑制性で抗体産生促進性、細胞性免疫抑制サイトカイン産生を促進する。このバランスがどこに片寄るかによって病態が異なる。菌の遅発育性と薬剤耐性を獲得しやすい性状も、細胞寄生性を演出している。

抗原の生化学と免疫学

われわれは病気を予防し迅速正確に診断し、効率よく治療するために研究を行っている。この目的を達成するためには病気が起こる機構を理解することが重要となる。これを理解するためには抗原の研究が基礎となる。多くの抗原が研究された。研究の目的によって、さまざまな抗原が研究の対象となった。診断の目的のためには種特異的抗原が重要となる。ワクチンの目的には防御抗原が重要である。

われわれはリボソーム蛋白質と分泌蛋白質に重点をおいて研究を進めてきた。Youmans & Youmans は結核菌のリボソームが結核を予防すると報告した。以後さまざまな病原性細菌について、同様な現象が見られることが分かってきた。リボソームワクチンと呼ばれている。われわれは Youmans & Youmans の実験を確認した。次いでリボソーム画分 (遠心画分によりリボソームを得る) の生化学的免疫学的研究を始めた。リボソームの免疫学はリボソームの機能¹⁴⁾、合成、進化論¹⁵⁾ と無関係ではない。これらを総合的な視野で研究する必要があると考える。

BCG 菌はリボソーム RNA (rRNA) 遺伝子 (16S - 23S - 5S) を 1 つ持っている¹⁶⁾¹⁷⁾。ちなみに増殖がやや早い *M. phlei*, *M. smegmatis* は 2 つ、遅い *M. lepraemurium* は 1 つの rRNA 遺伝子を持つ¹⁸⁾¹⁹⁾。大腸菌は 7 つ、枯草菌は 10 の rRNA 遺伝子を持つ。これを反映して抗酸菌のリボソームの数は非常に少ない。これは遅発育性の原因の 1 つとなっていると考えてよい。栄養素を取り込む能力も劣ることが他の研究者によって報告されている。これも遅発育性の原因となっている。この遅発育性は細胞寄生性の要因の 1 つとなっている。

rRNA 遺伝子が1つであるという事実は rRNA をターゲットにする抗生物質（ストマイ）に対する耐性を獲得しやすいということを意味しており重要である²⁰⁾²¹⁾。リボソーム RNA の合成を開始する点が少なくとも2つあり、その1つは大腸菌とよく似ているが、もう1つは BCG に特異的である²²⁾。

リボソームには熱ショック蛋白質が結合している。70 kDa, 65 kDa, 10 kDa の熱ショック蛋白質が結合している。65 kDa 蛋白質は、30S リボソームにある S1 蛋白質に強く結合している。S1 蛋白質は蛋白質合成の開始に重要な役割を持っているので、熱ショック蛋白質は蛋白質合成を制御している可能性がある。30S 亜粒子の構成蛋白質に α -クリスタリンファミリーに属する熱ショック蛋白質がある。このように熱ショック蛋白質がリボソーム画分に多数あるという事実は、リボソーム蛋白質の合成や、リボソームでの一般の蛋白質合成と折りたたみに関与していることを示唆している。さらに熱ショック蛋白質は γ/δ T リンパ球の誘導、ヘルパー T リンパ球の誘導や、自己免疫疾患における役割を演じていることが分かっている。リボソーム画分が病原性に大きくかわりを持っていることがうかがわれるのである。また防御免疫の原因の一端を担っている可能性もある。50S 亜粒子にある L7/L12 蛋白質は、強い遅延型皮膚反応を惹起する。これも感染防御機構の役割を演じているものと考えている²³⁾²⁴⁾。現在われわれは残ったリボソーム蛋白質の免疫活性と生化学的性状の研究を進めている²⁵⁾²⁶⁾。

分泌する蛋白質も重要である。これらは免疫系に最も早く遭遇し強い免疫反応を誘導すると思う。また死菌よりも生菌が感染防御を付与しうる事実を考えると、分泌蛋白質の中に防御抗原があると考えられることができる。われわれは5つの抗原の構造を決定することができた。MPB57, MPB70, MPB64, MPB59 (= α 抗原=85 complex B=antigen 6) MPB51 である²⁷⁾³⁶⁾。以上の抗原は永井定博士により各々特徴のある抗原として精製されていたものである。このN末端数10個のアミノ酸配列を参考にして、これをコードするオリゴヌクレオタイドを合成し遺伝子をクローニングし配列を決めた。MPB70 は *M. bovis* が大量に産生している。その mutant である BCG 菌の substrains のなかには大量に分泌するもの（東京株）とほとんど分泌しない（Pasteur 株）ものがある。

この遺伝子と転写を解析した結果、転写効率に差があることが分かった。コンピューター解析の結果 Osteoblast-specific factor 2 と類似の構造をもっていることが分かった。外国でも独立にこの事実を同時に報告している。東京株のワクチンでは10万人に数人の割合で骨炎を起こしているが、パスツール株ではこのような例が

ない。その原因は恐らく MPB70 であろう³⁷⁾³⁸⁾。

α 抗原と交叉する蛋白質が多数ある。これは TFN- γ を誘導し防御抗原となる。われわれはこの蛋白質をキャリアーとし、多価予防ワクチン作製の可能性を示した³⁹⁾⁴⁰⁾。

文 献

- 1) Harada S, Koyanagi Y, Yamamoto N : Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-1-carrying cells MT-2 and MT-4 and an application in a plaque assay. Science. 1985 ; 229 : 563-566.
- 2) Matsuyama T, Hamamoto Y, Yoshida T, et al. : Effect of culture supernatant of MT-2 cells on human immunodeficiency virus-producing cells, Molt-4/HIV HTLV-III. Jpn J Cancer Res. 1988 ; 79 : 156-159.
- 3) Matsuyama T, Hamamoto Y, Kobayashi S, et al. : Enhancement of human immunodeficiency virus production by natural lymphotoxin. Med. Microbiol Immunol. 1988 ; 177 : 181-187.
- 4) Matsuyama T, Hamamoto Y, Soma G, et al. : Cytocidal effect of tumor necrosis factor on cells chronically infected with human immunodeficiency virus (HIV) : enhancement of HIV replication. J Virol. 1989 ; 63 : 2504-2509.
- 5) Matsuyama T, Kobayashi N, Yamamoto N : Cytokines and HIV infection : is AIDS a tumor necrosis factor disease? AIDS. 1991 ; 5 : 1405-1417.
- 6) Lederman MM, Georges DL, Kusner DJ, et al. : *Mycobacterium tuberculosis* and its purified protein derivative activate expression of the human immunodeficiency virus. J Acquired Imm Def Synd. 1993 ; 7 : 727-733.
- 7) Wallis RS, Vjecha M, Amir-Tahmassehi M, et al. : Influence of tuberculosis on human immunodeficiency virus (HIV-1) : Enhanced cytokine expression and elevated β_2 -microglobulin in HIV-1-associated tuberculosis. The J Inf Dis. 1993 ; 167 : 43-48.
- 8) Toossi Z, Sierra-Madero JG, Blinkhorn RA, et al. : Enhanced susceptibility of blood monocytes from patients with pulmonary tuberculosis to productive infection with human immunodeficiency virus type 1. The J

- Experimental Medicine. 1993 ; 177 : 1511-1516.
- 9) Newman GW, Gan HX, McCarthy PL Jr, et al. : Survival of human macrophages infected with *Mycobacterium avium intracellulare* correlates with increased production of tumor necrosis factor- α and IL-6. J Imm. 1991 ; 147 : 3942-3948.
 - 10) Tsuyuguchi I, Kawasumi H, Takashima T, et al. : *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex-induced suppression of T-cell proliferation *in vitro* by regulation of monocyte accessory cell activity. Inf. Imm. 1990 ; 58 : 1369-1378.
 - 11) Denis M : Tat protein from HIV-1 binds to *Mycobacterium avium* via a bacterial integrin. Effects on extracellular and intracellular growth. J Imm. 1994 ; 153 : 2072-2081.
 - 12) Denis M : Envelope glycoprotein (gp 120) from HIV-1 enhances *Mycobacterium avium* growth in human bronchoalveolar macrophages ; an effect mediated by enhanced prostaglandin synthesis. Clin Exp Imm. 1994 ; 98 : 123-127.
 - 13) Denis M, Gregg EO : Recombinant tumor necrosis factor- α decreases whereas recombinant interleukin-6 increases growth of a virulent strain of *Mycobacterium avium* in human macrophages. Immunol. 1990 ; 71 : 139-141.
 - 14) Yamada T : Characterization of an S1-like protein in *Mycobacterium smegmatis* ribosomes. FEBS LETTERS. 1982 ; 142 : 267-270.
 - 15) Dams E, T Yamada, R De Baere, et al. : Structure of 5S rRNA in Actinomycetes and relatives and evolution of eu bacteria. J Molecular Evolution. 1987 ; 25 : 255-260.
 - 16) Suzuki Y, A Nagata, Y Ono, et al. : Complete nucleotide sequence of the 16S ribosomal RNA gene in *Mycobacterium bovis* BCG. J Bacteriol : 1988 ; 170 : 2886-2889.
 - 17) Suzuki Y, K Yoshinaga, Y Ono, et al. : Organization of rRNA genes in *Mycobacterium bovis* BCG. J Bacteriol. 1987 ; 169 : 839-843.
 - 18) Suzuki Y, T Yamada : Study on rRNA genes in *Mycobacterium smegmatis*. Microbiol Immunol. 1988 ; 32 : 1259-1262.
 - 19) Suzuki Y, Y Miyata, T Mori, et al. : Number of ribosomal RNA genes in *Mycobacterium lepraemurium*. FEMS Microbiology Letter. 1987 ; 44 : 73-76.
 - 20) Yamada T, A Nagata, Y Ono, et al. : Alteration of ribosomes and RNA polymerase in drug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 1985 ; 27 : 921-924.
 - 21) Yamada T, Y Mizuguchi, KH Nierhaus, et al. : Resistance to viomycin conferred by RNA of either ribosomal subunit. Nature. 1978 ; 275 : 460-461.
 - 22) Suzuki Y, A Nagata, T Yamada : Analysis of the promoter region in the rRNA operon from *Mycobacterium bovis* BCG. Antonie van Leeuwenhoek/J of Microbiol. 1991 ; 60 : 7-11.
 - 23) Tantimavanich S, S Nagai, H Nomaguchi, et al. : Immunological properties of ribosomal proteins from *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun. 1993 ; 61 : 4005-4007.
 - 24) Ohara N, M Kimura, N Wada, et al. : Cloning and sequencing of the gene encoding the ribosomal L7/L12-like protein of *Mycobacterium bovis* BCG. Nucleic Acids Research. 1993 ; 21 : 3.
 - 25) Ohara N, M Kimura, Y Higashi, et al. : Isolation and amino acid sequence of the ribosomal protein S19 from *Mycobacterium bovis* BCG. FEBS LETTERS. 1993 ; 331 : 9-14.
 - 26) Iwanaga S, N Ohara, T Kariu, et al. : Cloning and nucleotide sequence of the gene cluster encoding ribosomal proteins S12 and S7 from *Mycobacterium bovis* BCG. Biochem. Mol. Biol. International. 1995. (Biochem, International before 1994 ; 36 : 209-218.)
 - 27) Matsuo K, R Yamaguchi, A Yamazaki, et al. : Cloning and expression of *Mycobacterium bovis* BCG gene for alpha antigen. J Bacteriol. 1988 ; 170 : 3847-3854.
 - 28) Yamaguchi R, K Matsuo, A Yamazaki, et al. : Immunogenic protein MPB57 from *Mycobacterium bovis* BCG : molecular clon-

- ing, nucleotide sequence and expression. FEBS LETTERS. 1988 ; 240 : 115-117.
- 29) Matsuo K, R Yamaguchi, A Yamazaki, et al. : Cloning and expression of the gene for the cross-reactive alpha antigen of *Mycobacterium kansasii*. Infect. Immun. 1990 ; 58 : 550-556.
- 30) Yamaguchi R, K Matsuo, A Yamazaki, et al. : Cloning and characterization of the gene for the immunogenic protein MPB64 of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun. 1988 ; 57 : 283-288.
- 31) Yamaguchi R, K Matsuo, A Yamazaki, et al. : Fusion protein based epitope mapping of the MPB57 protein from *Mycobacterium bovis* BCG and its epitope insertion into the native protein. Canadian J Microbiol. 1991 ; 37 : 7-13.
- 32) Terasaka K, R Yamaguchi, K Matsuo, et al. : Complete nucleotide sequence of immunogenic protein MPB70 from *Mycobacterium bovis* BCG. FEMS Microbiology Letters. 1989 ; 58 : 273-276.
- 33) Ohara N, K Matsuo, R Yamaguchi, et al. : Cloning and sequencing of the gene for α -antigen from *Mycobacterium avium* and mapping of β -cell epitope. Infect Immun. 1993 ; 61 : 1173-1179.
- 34) Kitaura H, N Ohara, T Matsuo, et al. : Cloning and sequencing of the gene for alpha-antigen from *Mycobacterium intracellulare* and use of PCR for the rapid identification of *Mycobacterium intracellulare*. Biophys Biochem Res Comm. 1993 ; 196 : 1466-1473.
- 35) Takano M, N Ohara, A Mizuno et al. (1994) : Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the gene for α antigen from *Mycobacterium scrofulaceum*. Scand J Imm. 1994 ; 40 : 165-170.
- 36) Ohara N, H Kitaura, H Hotokezaka, et al. : Characterization of the gene encoding the MPB51, one of the major secreted protein antigens of *Mycobacterium bovis* BCG and identification of the secreted protein closely related to the fibronectin 85 complex. Scand J Imm. 1995 ; 41 : 433-442.
- 37) Matsumoto S, T Matsuo, N Ohara, et al. : Cloning and sequencing of a unique antigen MPT70 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and expression in BCG using *E. coli* mycobacteria shuttle vector. Scand J Imm. 1995 ; 41 : 281-287.
- 38) Matsuo T, S Matsumoto, N Ohara, et al. : The differential secretion of a unique antigen MPB70 in two major groups of Bacille Calmette-Guerin (BCG) substrains. Microbiol. 1995 ; 141 : 1601-1607.
- 39) Matsuo K, R Yamaguchi, A Yamazaki, et al. : Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. Infect. Immun. 1990 ; 58 : 4049-4054.
- 40) Kameoka M, Y Nishino, K Matsuo, et al. : Cytotoxic T lymphocyte response in mice by a recombinant BCG vaccination producing an extracellular α antigen fused with human immunodeficiency virus type 1 envelope immunodominant domain in V3-loop. Vaccine. 1994 ; 12 : 153.

第70回総会シンポジウム

I. ヒト結核の感染・発病と免疫

2. 結核の感染様式

— 分子疫学的手法による解析 —

阿部 千代治

結核予防会結核研究所

受付 平成7年8月21日

2. THE MODE OF INFECTION OF TUBERCULOSIS

— Analysis Using Molecular Epidemiologic Methods —

Chiyoji ABE*

(Received 21 August 1995)

In the 1950s, evidence showed that INH-resistant *Mycobacterium tuberculosis* organisms were attenuated in both virulence and pathogenicity in animals, and it was postulated that these bacilli might also be attenuated in their virulence to humans. Subsequent studies, however, indicated that all INH-resistant strains should not be considered as being attenuated in their virulence to humans. The general conclusion was that patients excreting INH-resistant organisms are somewhat less infectious to their contacts than patients excreting INH-susceptible organisms.

Insertion sequences are suitable tools for the diagnosis and epidemiology of tuberculosis because of the highly variable copy number and variability of insertion sites in the chromosome. This variability allows the subtyping of *M. tuberculosis* strains by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Patients with the same RFLP pattern constitute an epidemiologically linked cluster. Clustering indicates recent infection and rapid progression to clinical illness. Nearly one thirds of new cases of tuberculosis in San Francisco are the result of recent infection. In Thailand, tuberculosis has now emerged as the most common opportunistic disease associated with HIV infection. Cluster analysis showed the risk of progression to active tuberculosis among individuals infected with HIV.

There have been numerous outbreaks of multidrug-resistant tuberculosis in the United States. Most of such outbreaks have primarily involved persons infected with HIV, who are thought to have been exposed to the strains in medical or correctional facilities. Resistance to antituberculous drugs can develop not only in the strain that caused the initial disease, but also as a result of reinfection with a new strain of *M. tuberculosis* that is

* From the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association
Matsuyama 3-1-24, Kiyose-shi, Tokyo 204 Japan.

drug-resistant. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *M. tuberculosis* can occur either during therapy for the original infection or after the therapy has been completed.

Nosocomial outbreaks of tuberculosis have increased the occupational acquisition of tuberculosis by health care workers. The Centers for Disease Control and Prevention have issued recommendations and regulations in an effort to decrease health care workers' risk for exposure to patients with infectious tuberculosis.

Key words : Tuberculosis among HIV-infected persons, Transmission to health care workers, RFLP analysis, Multidrug-resistant tuberculosis

キーワード : HIV 感染者の結核, 医療従事者の感染, RFLP 分析, 多剤耐性結核

1. 薬剤耐性結核菌と感染

イソニアジド (INH) に耐性を獲得した菌では実験動物に対する病原性が低下していることが 1950 年代初めに Middlebrook ら¹⁾, Barnett ら²⁾ により報告された。当時はヒトについても同様であろうと考えられていた。しかしその後の研究で、すべての INH 耐性菌がヒトに対する病原性を失っているわけではないことが示された。1955 年に INH-SM 耐性結核患者の兄弟の一人から INH-SM 耐性菌が分離された³⁾ ことが報告された。この患者は以前に結核の治療を受けていないことから、この事実は INH 耐性菌によるヒトからヒトへの伝播を示唆している。Riley らの古典的研究⁴⁾ は、INH 耐性菌を排出している未治療患者の室内空気に曝されたモルモットは結核に感染することを示した。しかし INH 耐性菌を排出している患者は感受性菌を排出している患者より感染性は低かった。近年のいくつかの研究⁵⁻⁷⁾ では、INH 感受性菌排出患者と INH 耐性菌排出患者の接触者の間にツベルクリン反応の陽性/陽転率に差がみられないことも報告されている。しかし一般的な結論として、INH 耐性菌を排出している患者は感受性菌を排出

している患者より接触者への感染性はいくぶん低いし、感染後の発病率も低いと考えられている。

1989 年から 1992 年にかけて米国で主にエイズ患者の間で多剤耐性結核菌による集団感染が 10 数件報告された。フロリダとニューヨークで起こった 6 件の集団感染事件⁸⁻¹¹⁾ では 8 から 65 名の患者が発生し、集団感染合計で 200 名以上に発病がみられた (Table)。IS6110 をプローブとした RFLP 分析により、それぞれの集団感染事件内の菌は共通の感染源に由来することが明らかになった。多剤耐性菌の伝播は患者間、患者から医療従事者または更生および矯正施設職員へ、患者の家族へと起こった。そして発病者の約 10% は HIV 陰性者であった。前にも述べたように INH 耐性菌の多くは動物に対する病原性が低いことが知られている。しかし多剤耐性菌はヒトに対する病原性を十分に保持していることを、これらの集団感染事件は示している。

2. 結核菌の型別 (亜分類)

分離された結核菌株の型別は感染源を追跡する上で重要である。これまで感染源を特定する手段として用いられてきたのが、ファージ型別と薬剤感受性パターンの組

Table Outbreaks of Multidrug-Resistant Tuberculosis in the United States

Outbreak	Cases	HIV infection	Mortality (%)	Median interval TB Dx to death	Drug resistance	Reference
A	35	100	89	16 weeks	INH, SM, RFP, EMB	8
B	21	95	82	6 weeks	INH, SM, RFP, EMB	8
C	65	96	72	7 weeks	INH, RFP, EMB	8, 9
D	26	92	83	4 weeks	INH, SM, RFP, EMB	8
E	8	87	100	4 weeks	INH, SM, RFP, EMB PZA, KM, ETH	10
F	16	87	88	8 weeks	INH, SM, RFP	11

合せであった。しかしこれまでに明らかになっているファージ型は数種¹²⁾のみで、疫学的調査への利用にはおのずと制限があった。将来多くの新しいファージが発見されれば、結核菌の型別法として利用できよう。抗結核薬に対する感受性パターンの比較も集団感染の感染源の調査の補助手段の一つとして用いられてきたが、分離菌の多くは抗結核薬に感受性である¹³⁾ため、この方法も感染源を特定する上で決め手となりえなかった。

染色体 DNA の上には種々の情報をコードしている遺伝子があり、それぞれの遺伝子は1～2コピー存在する。しかし数コピー存在する因子もみつかった。結核菌でもいくつか報告^{14)~17)}されている。その代表的な因子が挿入配列 IS986¹⁴⁾と IS6110¹⁵⁾であり、それらの配列は異なるグループにより決定された。決定された因子の配列はほぼ同一であり、違いは数塩基であることから2つを統一し、呼び方を IS6110 とすることが提案¹⁸⁾された。IS は1個の細胞内に複数コピー存在し、転位部位にも変化がみられることから、IS6110 内の 245bp PCR 産物をプローブとして用いるゲノム DNA の制限酵素 *Pvu* II 断片のサザンブロット分析 (RFLP) により結核菌の亜分類^{19)~21)}が可能となった。RFLP パターンに類似性がみられることは2つの菌の祖先が近いことを、またパターンが異なることは祖先が離れていることを意味すると考えられる。Van Soolingen ら¹⁹⁾の研究で、結核が蔓延している中央アフリカで分離された結核菌の RFLP パターンには国を越えて類似性がみられたが、多くの例で結核の発病は過去に感染を受けた人の再燃と考えられているオランダで分離された菌株のパターンは多形性に富んでいることが明らかになった。

われわれは、1987 年度結核療法研究協議会共同研究で日本各地から集められた結核菌の RFLP 分析²¹⁾を行った。IS コピー数は分離菌株により1コピーを持つものから19コピー持つものまでみられたが、多くの株 (93%) は9と14コピーの間であった。地域間で比べてみたとき RFLP パターンに多形性がみられたが、その中には共通のバンドもたくさん認められた。関東の異なる病院で分離された5株は共通のバンドを持っており、違いは1本の付加バンドの有無の差であった (Fig. 1)。患者の年齢は20代が2名、30代、50代、80代がそれぞれ1名ずつで広範であった。このことは同一地域に類似のパターンを示す菌が存在することを示している。これら患者同士の接触の有無については調べることができなかったが、感染が世代間というよりむしろ世代を越えて起こっていることを上記の成績は示している。同時にこのことは、日本はオランダと比べ結核の罹患率が相対的に高いことを暗示しているものと考えられる。

結核菌分離株の間で IS6110 を含む断片に多形性がみられることは、これらの因子は不安定であることを示している。しかしインビトロで長い間継代された株¹⁹⁾も、持続排菌している患者の1年後の結核菌も、さらに治療終了2ないし3年後に再発した患者から分離された菌も²²⁾、それぞれ前の株のパターンと同一であった。また BCG ワクチン接種2カ月後にリンパ節腫脹を示した人から分離された菌も、膀胱がん患者で BCG 治療を受けた患者から分離された菌²¹⁾も接種に用いた BCG と RFLP パターンに変化がみられなかった。これらのことは IS6110 の転位頻度はあまり高くなく、集団感染の特定に利用できることを示している (Fig. 2)。

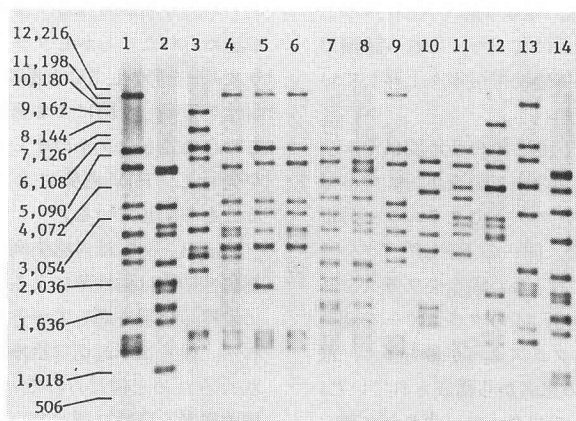


Fig. 1 DNA fingerprints of *M. tuberculosis* isolated in Kanto district. Lanes 1 to 3, *M. tuberculosis* isolated at A hospital ; lanes 4 to 6, at B hospital ; lanes 7 and 8, at C hospital ; lanes 9 to 13, at D hospital ; lane 14, at E hospital.

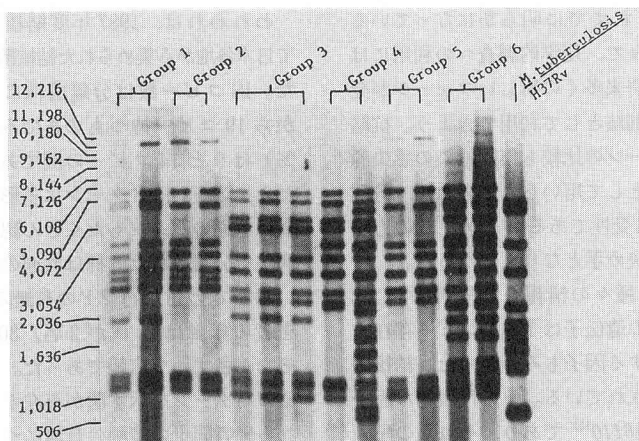


Fig. 2 RFLP analysis of epidemiologically related *M. tuberculosis* from tuberculosis patients.

Groups 1, 4 and 5, the small outbreaks in the office ; groups 2 and 3, the small outbreaks in the school ; group 6, familial infection.

3. エイズと結核

HIV 感染は CD4 細胞の進行性の消耗と機能不全であり、マクロファージと単球の機能の低下を伴う。そのためエイズまで進行した患者にニューモシスチス・カリニ肺炎、カンジダ症、サイトメガロウイルス感染症、抗酸菌症、カポジ肉腫などの日和見疾患の併発がみられる。HIV 非感染者においては結核菌の感染を受けても慢性的結核症になる人は一生のうちで約 10-20 % であるが、エイズ患者においては結核菌既感染者の 30 % 以上が発病^{23) 24)}している。最近の調査では、タイ、インド、ミャンマーなどの特定の地域では、結核発病率が 60 % 以上まで上がっていることが明らかになった。これら諸国では、結核患者の間の HIV 抗体陽性率が年々上昇していることも報告されている。

Small ら²⁵⁾は、1991 年と 1992 年の 2 年間にサンフランシスコで分離された結核菌の中で調査が可能であった 487 例について、RFLP パターンのクラスター分析を用いて疫学的研究を行った。同一の RFLP パターンが少なくとも 2 人以上の患者でみられた場合をクラスターとしたとき、487 例の中に合計 44 のクラスターを認めた。その中では 2 人からなるクラスターが最も多く、最も大きいクラスターは 30 名の患者から構成されていた。試験された株の 40 % は 44 クラスターのいずれかに属していた。調べたクラスター形成の因子の中で米国生まれ、黒人、ヒスパニックなどに加えエイズの高リスクが高いことが報告されている。この結果は、上記の高リスク集団ではごく近い過去に新感染が起こっていることを示

唆している。

われわれはタイのチェンライで分離された結核菌について耐性の頻度と RFLP パターンを調べた。102 例調べた中で患者の情報が得られたのは 68 例であった。それらの男女比は 4 : 1 であり、HIV 抗体陽性率は 44 % であった。INH に対する耐性は 102 例の 43 % にみられ、10 % の菌は SM, KM にも耐性を獲得していた。しかし米国などで言われている INH と RFP に耐性を獲得している多剤耐性結核の頻度は 7 % 以下であった。102 株について RFLP パターンのクラスター分析を行った。Small らの基準で調べてみると、2 名からなるクラスター 7 と 5 名からなるクラスター 1 の合計 8 クラスターが認められた。しかしクラスター形成率は低かった。クラスターを形成していた菌株の感受性試験の結果からは、耐性を獲得した菌による感染の証拠は得られなかった。これらのことはタイのチェンライにおいては結核の感染が先行し、HIV 感染により結核の発病が早められていることを示している。

Small ら²⁶⁾は再感染例についても報告している。多剤耐性結核は耐性菌による感染または感受性菌が治療中に耐性の発現を通してのどちらかにより起こると考えられる。後者は不適切な治療により薬剤耐性変異株が選択されるためと信じられている。Small らは 17 名の持続排菌患者を詳細に調べた。6 名からは数カ月後でも感受性菌が検出され、それらは前の株と同じ RFLP パターンを示した。11 名からは数カ月ないし 10 数カ月後に多剤耐性菌が分離された。薬剤耐性が発現されたにもかかわらず 6 名の菌の RFLP パターンはほぼ同一であった

が、4名では耐性菌が検出された時点で明らかに異なるパターンがみられた。このことは、治療中に耐性の発現が起こること、また耐性を獲得した別の菌による再感染も起こることを示している。なお再感染と考えられた4名はHIV感染者で、そのうちの3名は他にもリスク因子を持っていた。

4. 医療従事者の結核

Dooley ら²⁷⁾, Pearson ら²⁸⁾, Beck-Sague ら²⁹⁾ は、内科病棟に加え HIV 病棟に勤める看護婦の PPD 皮内反応の陽性/陽転率が、その他の病棟に勤める看護婦より2倍以上高いことを報告している。感受性菌による感染の場合、治療により排菌数は減少するが、多剤耐性結核患者では排菌し続けることから、多剤耐性結核患者のほうがこのリスクは高いとされている。そのため医療従事者に大きな不安を与えている。米国 CDC は結核患者の病室の構造や医療従事者へのマスクの着用などを含む医療従事者への結核の感染防止のためのガイドライン³⁰⁾を発表した。Maloney ら³¹⁾ は感染防止手段を遂行後に結核病棟に勤める看護婦の PPD 陽性/陽転率を他の病棟に勤める看護婦のレベルまで抑えることができたことを報告している。

結核療法研究協議会³²⁾ は、わが国の結核病院職員の5年間の結核罹患の実情を調査し報告した。調査年度の対照の結核罹患率と比べて、検査技師では約10倍、看護婦は3.5倍、医師は2.7倍高いことが明らかにされた。医療従事者の感染防止については結核病学会でも今後さらに慎重な議論が必要と思われる。

この研究は次の先生方との共同研究である。野内英樹(ジョンズホプキンス大, 米), Charoen Chchottaworn (中央胸部病院, タイ), 森 亨, 高橋光良, 平野和重, 鹿住祐子, 深澤 豊(結核予防会結核研究所)。

文 献

- 1) Middlebrook G, Cohn ML : Some observations on the pathogenicity of isoniazid-resistant variants of tubercle bacilli. *Science*. 1953 ; 118 : 297-299.
- 2) Barnett M, Bushby SRM, Mitchison DA : Tubercle bacilli resistant to isoniazid : virulence and response to treatment with isoniazid in guinea pigs and mice. *Br J Exp Pathol*. 1953 ; 34 : 568-581.
- 3) Murdoch JM, Grant IWF : Pulmonary tuberculosis due to bacilli resistant to streptomycin and isoniazid. *Lancet*. 1955 ; 2 : 587-588.
- 4) Riley RL, Mills CC, O'Grady F, et al. : Infectiousness of air from a tuberculous ward. *Am Rev Respir Dis*. 1962 ; 85 : 511-525.
- 5) Narain R, Chandrasekhar P, Satyanarayanachar RA, et al. : Resistant and sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* found in repeated surveys among a South Indian rural population. *Bull WHO*. 1968 ; 39 : 681-699.
- 6) Zaki MH, Lyons HA, Tizes R, et al. : The trend of infection with drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* among untreated patients. *Am J Public Health*. 1969 ; 59 : 2056-2066.
- 7) Siminel M, Bungetzianu G, Anastasatu C : The risk of infection and disease in contacts with patients excreting *Mycobacterium tuberculosis* sensitive and resistant to isoniazid. *Bull Int Union Tuberc*. 1979 ; 54 : 263.
- 8) CDC : Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons : Florida and New York, 1988-1991. *MMWR*. 1991 ; 40 : 585-591.
- 9) Fischl MA, Uttamchandani RB, Daikos GL, et al. : An outbreak of tuberculosis caused by multidrug-resistant tubercle bacilli among patients with HIV infection. *Ann Intern Med*. 1992 ; 117 : 177-183.
- 10) CDC : Transmission of multidrug-resistant tuberculosis among immunocompromised persons in a correctional system ; New York, 1991. *MMWR*. 1992 ; 41 : 507-509.
- 11) Coronado VG, Beck-Sague CM, Hutton MD, et al. : Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among persons with human immunodeficiency virus infection in an urban hospital ; epidemiologic and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Infect Dis*. 1993 ; 168 : 1052-1055.
- 12) Rado TA, Bates JH, Engel HWB, et al. : WHO studies on bacteriophage typing of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*. 1975 ; 111 : 459-468.

- 13) Hirano K, Kazumi Y, Abe C, et al. : Resistance to antituberculosis drugs in Japan. *Tuberc Lung Dis.* (in press).
- 14) McAdam RA, Hermans PWM, van Soolingen D, et al. : Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Mol Microbiol.* 1990 ; 4 : 1607-1613.
- 15) Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, et al. : IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res.* 1990 ; 18 : 188.
- 16) Collins DM, Stephens DM : Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. *FEMS Microbiol Lett.* 1991 ; 83 : 11-16.
- 17) Mariani F, Piccolella E, Colizzi V, et al. : Characterization of an IS like element from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Gen Microbiol.* 1993 ; 139 : 1767-1772.
- 18) Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al. : Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting : recommendations for a standard methodology. *J Clin Microbiol.* 1993 ; 31 : 406-409.
- 19) Hermans PWM, van Soolingen D, Dale JW, et al. : Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis* : a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1990 ; 28 : 2051-2058.
- 20) Van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, et al. : Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains : evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1991 ; 29 : 2578-2586.
- 21) Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y, et al. : Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Microbiol Immunol.* 1993 ; 37 : 289-294.
- 22) Otal I, Martin C, Vincent-Levy-Frebault V, et al. : Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1991 ; 29 : 1252-1254.
- 23) Raviglione MC, Narain JP, Kochi A : HIV-associated tuberculosis in developing countries : clinical features, diagnosis, and treatment. *Bull WHO.* 1992 ; 70 : 515-526.
- 24) Narain JP, Raviglione MC, Kochi A : HIV-associated tuberculosis in developing countries : epidemiology and strategies for prevention. *Tuberc Lung Dis.* 1992 ; 73 : 311-321.
- 25) Small PM, Philip MD, Hopewell PC, et al. : The epidemiology of tuberculosis in San Francisco : a population-based study using conventional molecular methods. *N Engl J Med.* 1994 ; 330 : 1703-1709.
- 26) Small PM, Shafer RD, Hopewell PC, et al. : Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med.* 1993 ; 328 : 1137-1144.
- 27) Dooley SW, Villarino ME, Lawrence M, et al. : Nosocomial transmission of tuberculosis in a hospital unit for HIV-infected patients. *JAMA.* 1992 ; 267 : 2632-2634.
- 28) Pearson ML, Jereb JA, Frieden TR, et al. : Nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* : a risk to patients and health care workers. *Ann Intern Med.* 1992 ; 117 : 191-196.
- 29) Beck-Sague C, Dooley SW, Hutton MD, et al. : Hospital outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections : factors in transmission to staff and HIV-infected patients. *JAMA.* 1992 ; 268 : 1280-1286.
- 30) CDC : Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care facilities. *MMWR.* 1994 ; 43 (RR-13) : 1-132.
- 31) Maloney SA, Pearson ML, Gordon MT, et al. : Efficacy of control measures in preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis to patients and health care workers. *Ann Intern Med.* 1995 ; 122 : 90-95.
- 32) 結核療法研究協議会 : 結核病院職員の結核罹患状況. 昭和62年度療研研究報告書. 1987 ; pp.3.

第70回総会シンポジウム

I. ヒト結核の感染・発病と免疫

3. サイトカインを中心とした防御免疫の
誘導と発現機構

光 山 正 雄

新潟大学医学部細菌学

受付 平成7年8月21日

3. THE MECHANISM OF INDUCTION AND EXPRESSION OF
PROTECTIVE IMMUNITY WITH SPECIAL REFERENCE
TO THE ROLE OF CYTOKINES

Masao MITSUYAMA *

(Received 21 August 1995)

The mechanism of induction of protective T cells mediating the anti-tuberculous immunity is not well elucidated. Using viable and killed cells of *Mycobacterium bovis* BCG and *Listeria monocytogenes*, which differ in the ability to induce specific protection in mice, we have found that the difference is mainly due to the different ability to induce several cytokines especially IFN- γ not due to the difference in antigenic property. It was shown that the induction of protective T cells is highly dependent upon various cytokines produced by the host at the early stage of immunization. Based on our own experimental result in mice, the relative contribution of several cytokines to the induction and expression of cell-mediated immune protection was discussed.

Key words : Cytokine, Protective T cells,
IFN- γ , BCG

キーワード: サイトカイン, 感染抵抗性T細胞, ガ
ンマインターフェロン, BCG

はじめに

結核の原因菌である結核菌および関連抗酸菌は代表的な細胞内寄生性細菌（マクロファージの細胞内殺菌をエスケープして生存増殖する細菌）であり、感染宿主には強い細胞性免疫を誘導する。

ところで、細胞性免疫が結核における生体防御に主要な役割を演じていることには異論がないと思われる。遅延型過敏反応（以下 DTH）、肉芽腫形成、感染防御のいずれにも Th1 タイプの T 細胞が関与し、抗原特異的に産生される各種サイトカインがメディエータとなってこれら免疫反応を発現させ、マクロファージを活性化し

* From the Department of Bacteriology, Niigata University School of Medicine, 1-757, Asahimachi-dori, Niigata 951 Japan.

て生体防御を担う。またマクロファージはそれ自身が種々の炎症性サイトカインを産生して、病態形成と防御の両者に深く関与している。

近年、各種サイトカインの構造と機能が分子レベルで明らかとなってきたが、結核に対する感染防御免疫の誘導と発現におけるサイトカインの働きは必ずしも明確ではなく、また動物モデルで得られた成績とヒト結核の間の discrepancy も指摘されている。ここでは、抗結核防御免疫を発現する抗原特異的 T 細胞の誘導、防御の発現の過程に各種サイトカインがどのように関与するかについて、主にマウスで得られたわれわれの成績をもとに述べることにする。

2. 防御免疫を担う T 細胞の性格

BCG による結核防御免疫誘導成立のパラメーターとして、DTH 反応が古くから用いられてきた。これは Th1 型 T 細胞の抗原特異的な各種サイトカイン産生に基づく炎症反応を生体内発現させるもので、惹起抗原としての PPD に特異的な T 細胞の存在を確認することができるが、防御免疫誘導の機構を T 細胞の分化誘導として解析するには、感染抵抗性発現を担う T 細胞を *in vitro* で追跡するに最も適した特徴を見出す必要がある。

以前にわれわれは、同じ細胞内寄生性細菌のひとつであるリステリア (*Listeria monocytogenes*) の生菌と死菌を用いてマウスを免疫し、致死量以下の生菌で免疫したマウスには再感染防御免疫 (攻撃感染に対する高い抵抗性) と DTH が誘導されるが、死菌をアジュバントに混じて免疫したマウスでは抗原特異的 DTH は生菌免疫マウスと同程度に成立するにも関わらず、再感染防御免疫は成立しないことを見出した¹⁾。生菌免疫マウスにみられる防御免疫と DTH はともに、CD4⁺ T 細胞の受け身移入で非免疫マウスに移入発現された²⁾。

表 1 死菌免疫と生菌免疫で誘導される T 細胞の違い

免疫	死菌/CFA	生菌
T cell subset	CD4 ⁺	CD4 ⁺
抗原刺激サイトカイン産生		
IL-2	+	+
IL-3	-	-
IL-4	-	-
IL-5	-	-
MCF	+	+
IFN- γ	-	+
T 細胞受身移入能		
遅延型過敏反応	+	+
再感染防御能	-	+

この両群のマウス由来の T 細胞を特異抗原で再刺激したときに、どのようなサイトカインが *in vitro* で産生されるかしらべたところ、表 1 に示すように多くのサイトカイン産生パターンに違いはないものの、唯一 γ -インターフェロン産生能に大きな違いがみられた³⁾。結核免疫誘導のモデル実験としてわれわれは *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur strain) を用いているが、BCG でも同様に、強い再感染防御免疫は生菌でのみ誘導され、死菌では DTH しか誘導されず、いずれも CD4⁺ T 細胞が担う (表 2)。そこで BCG 生菌または死菌で免疫したマウスの脾細胞をとり、PPD で刺激をすると、どちらも同等の IL-2 を産生したが、やはり免疫防御発現能の高い生菌免疫マウス由来の T 細胞のみが高い IFN- γ 産生能を示し (図 1)、この IFN- γ 産生能も完全に CD4⁺ T 細胞によるものであった (図 2)⁴⁾。

以上の結果から、いわゆる感染抵抗性 T 細胞はとくに高い抗原特異的 IFN- γ 産生能に特徴づけられ、さらに

表 2 BCG 生菌、死菌免疫マウスによる DTH と防御免疫の移入

免疫	脾細胞の前処理	DTH*	免疫防御レベル**
(-)	(-)	3.7	0
BCG 生菌	補体のみ	6.5	1.91
	抗 Thy 1 + 補体	3.7	n.d.
	抗 CD4 + 補体	3.9	0.04
	抗 CD8 + 補体	6.9	1.89
BCG 死菌	補体のみ	8.7	0.33
	抗 Thy 1 + 補体	2.2	n.d.
	抗 CD4 + 補体	4.4	n.d.
	抗 CD8 + 補体	7.5	n.d.

* PPD 惹起による遅延型足蹠反応 (0.1 mm 単位)

** 免疫後 4 週目に攻撃感染させた BCG 脾内菌数による排除能 (log)

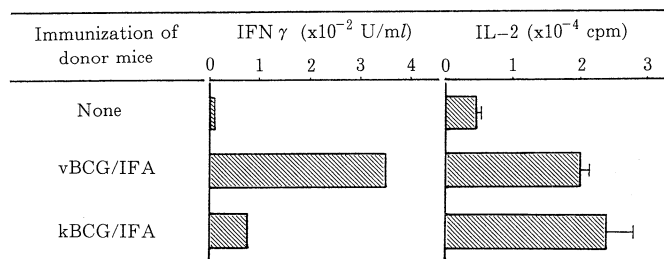


図1 BCG 生菌 (vBCG), 死菌 (kBCG) をアジュバントに混じて免疫したマウスにおける脾細胞の IFN- γ , IL-2 産生能。免疫後4週目に脾細胞を PPD 刺激し, 上清中の活性を IFN- γ は ELISA で, IL-2 は HT-2 細胞のチミジン取り込みで測定した。

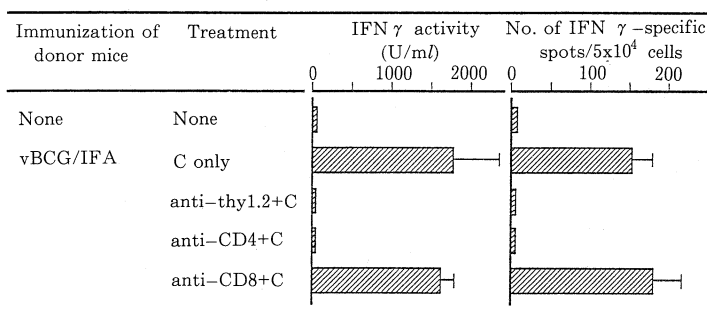


図2 BCG 生菌免疫マウス脾細胞を PPD 刺激したときの IFN- γ 産生細胞の同定。細胞を各種抗体で処理し, 上清の IFN- γ 量および ELISOT assay で算定される IFN- γ 産生細胞数を測定した。

DTH それ自身は抗原特異的 T 細胞 (とくに Th1 型) の存在を示すものではあるが, 必ずしも免疫防御の成立のパラメータとは成り得ないことが示唆された。

3. 感染抵抗性 T 細胞の識別抗原

DTH と感染防御免疫が解離する現象であれば, 感染抵抗性 T 細胞の誘導機構またはその分化機構を明らかにすることは極めて重要となる。前述のごとく, 死菌免疫でも, DTH を発現し各種サイトカインを産生する Th1 型 T 細胞は誘導されるので, 死菌と生菌の違い, または各々に対する宿主応答過程の違いを明らかにできれば, IFN- γ 産生能の高い感染抵抗性 T 細胞誘導の機構に近づくことができることになる。

一般にまず考えられるのは, 死菌と生菌では当然抗原の違いがあり, 免疫抵抗性発現に重要な IFN- γ 産生性 T 細胞の識別抗原 (または対応抗原) が死菌には存在しないことがあげられる。そこで, BCG 生菌で免疫したマウスの脾細胞をとり, 各種抗原刺激後の IFN- γ 産生

量を測定した。もし死菌に IFN- γ 産生性 T 細胞 (感染抵抗性 T 細胞) を誘導分化させる抗原が欠如していれば, 当然 *in vitro* での死菌による 2 次刺激では IFN- γ 産生は低いと予想されるからである。しかし, フレンチプレス破砕で調製した死菌抗原も, 生菌抗原と同様のレベルで生菌免疫マウス由来の脾細胞からの IFN- γ 産生を惹起させることができた (図3)。またこの菌体 lysate から得た分画から, この抗原性は主に膜画分に存在していることが明らかとなった。

この抗原は PPD にも存在するので, 蛋白を電気泳動しながら分子量別に分取することのできる装置 (ロトフォア) を用いて菌体 lysate および PPD を画分し, 各画分のどこにその抗原活性が存在するかをしらべたところ, 図4に示すように, 主として分子量 18,000 程度の低分子領域に存在することが明らかとなった⁵⁾。一方, 生菌に特有と考えられる抗原のうち, 精製標品として入手可能な熱ショック蛋白である, HSP65, HSP70 (いずれもリコンビナント標品) では生菌免疫マウス脾細胞を刺

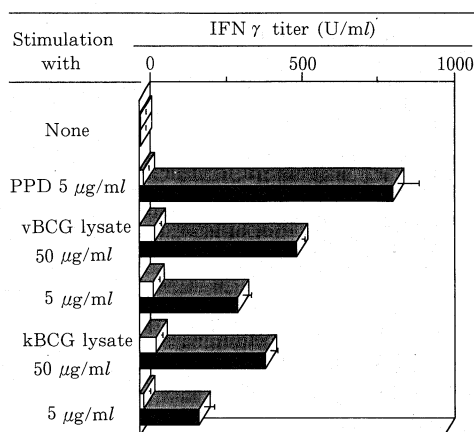


図3 BCG 生菌免疫マウス脾細胞を PPD, BCG 生菌 (vBCG) および死菌 (kBCG) の菌体 lysate で刺激して産生される IFN- γ 量の比較。

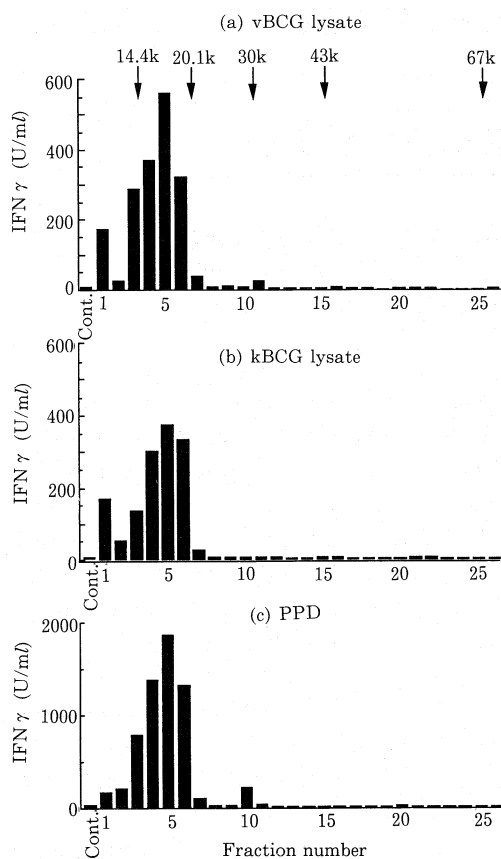


図4 生, 死菌体 lysate および PPD を分子量により分画し, BCG 生菌免疫マウス脾細胞を各画分で刺激したときの IFN- γ 産生パターン。

激しても有意の IFN- γ 産生はみられなかった。

以上の結果から, 防御免疫誘導における死菌の無効性は, いわゆる感染防御抗原が欠如していることによるものではなく, 別の要因があるものと考えられた。

4. 死菌と生菌に対する宿主サイトカイン 応答の違い

われわれはリステリア免疫モデルにおいて, やはり死菌が防御免疫を誘導できない機構として, 死菌と生菌の間の抗原的な違いよりも, 宿主に対するサイトカイン誘導能の違いが関与することを示唆する成績を得てきた。すなわち, 菌が宿主に接種された初期におけると考えられるマクロファージとのインタラクションにおいて, 代表的炎症性サイトカインである IL-1 の産生誘導能が生菌では高いのに対して, 死菌では極めて低いことをまず見出した⁶⁾。さらに死菌免疫に際し, リコンビナント IL-1 α をマウスに投与すると, T 細胞の機能分化が著明に促進されることが判明し, 抗原性とは異なる死菌, 生菌の違いがクローズアップされた⁷⁾。

さらにリステリアの場合, このようなマクロファージからの IL-1 産生を誘導する生菌特有の因子を検索した結果, リステリアの細胞内寄生を可能にする病原因子であるリステリオリシン O (LLO) が最も重要であることを, LLO 産生能の異なる菌株や精製 LLO を用いた実験で明らかにすることができた⁸⁾⁻¹⁰⁾。さらに免疫誘導能の異なる各種リステリア菌株を用いて, マウスに接種した免疫早期の脾内サイトカイン mRNA 発現を RT-PCR でしらべると, 菌の防御免疫誘導能とは関係なく TNF- α の発現はおこるが, IL-1 α および IFN- γ の発現は菌株が防御免疫誘導能の高い株に限ってみられることが判明した¹¹⁾。

そこで BCG の生菌, 死菌に対して同様の炎症性サイ

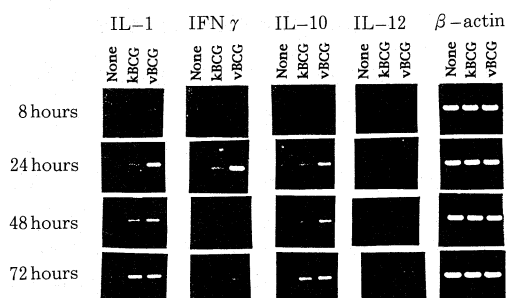


図5 正常マウス脾細胞を無刺激 (none), BCG 死菌 (kBCG), 生菌 (vBCG) で刺激し, 各時間後に抽出した RNA を用いて, RT-PCR により各種サイトカイン特異的 mRNA を検出した。

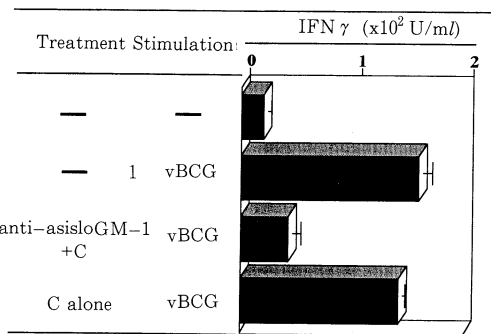


図6 マウス脾細胞を抗アシアロ GM-1 抗体+補体で処理したときの、BCG 生菌刺激に対する IFN- γ 産生の変化。

トカイン応答に違いがあるか否かを検討した。マウス脾細胞を BCG 生菌、死菌で刺激し、各種サイトカイン mRNA 発現を RT-PCR でしらべると、生菌刺激では IL-1, IFN- γ の発現が著明に高く、IL-12 の発現がやや高いという成績が得られた (図5)¹²⁾。

感染または免疫の初期には、炎症性サイトカインを中心に種々のサイトカイン産生がみられる。なかでも IFN- γ は Th1 と Th2 の分化の方向付けに重要であることが多くの研究から認識されている。すでに述べたリステリア死菌免疫に際して rIL-1 を投与する実験では、T 細胞の機能分化は促進させ得たが、免疫防御を担う Th1 型の感染抵抗性 T 細胞を生菌免疫と同様に誘導することはできなかった。

一方、まだ予備的実験ではあるが、免疫早期に抗 IFN- γ 抗体をマウスに投与して早期の内因性 IFN- γ を中和すると、リステリア生菌免疫で誘導されるべき感染抵抗性 T 細胞の出現が抑制される成績を得ている (Yang ら、未発表)。BCG を用いた同様の実験は未だ行っていないが、おそらく生菌接種マウスでおこる初期の IFN- γ 産生が、いわゆる感染抵抗性 T 細胞の分化誘導に最も重要な働きをしていると考えている。この免疫初期に産生される IFN- γ は、*in vitro* で脾細胞を生菌刺激する実験で、抗アシアロ GM-1 抗体と補体で NK 細胞を deplete すると低下する事実から (図6)、主に NK 細胞が産生していると考えている¹³⁾。

一方各種サイトカインのなかには、Th1 型 CD4⁺ 細胞の分化や機能発現を抑制するものがあり、IL-6 や IL-10 がその代表である。リステリアに対する T 細胞機能分化誘導実験で、抗体を用いて IL-10 を中和すると、死菌による脾細胞刺激でも抗原特異的に IFN- γ を産生する T 細胞の誘導がみられる結果が得られたことなどから、死菌で感染抵抗性 T 細胞が誘導されにくい理由

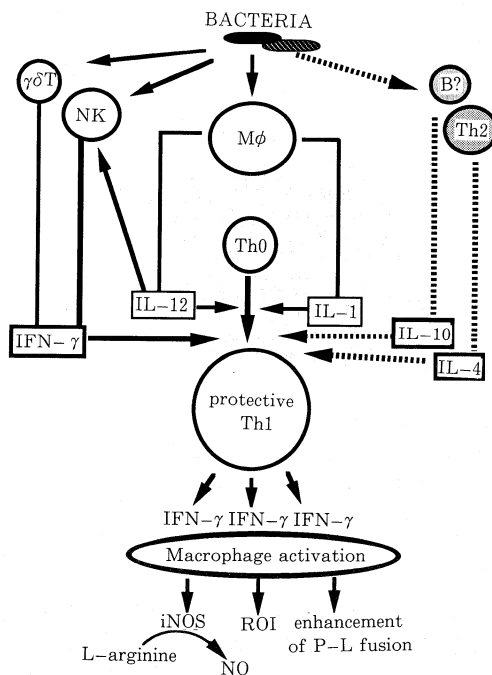


図7 感染抵抗性 T 細胞 (protective T cell) の分化誘導に関わるサイトカイン。促進的なものは実線で、抑制的なものは破線で示した。

として、IL-10 による分化抑制が強いことも関与していると考えられる¹⁴⁾。

以上の結果から生菌による感染防御免疫の誘導 (感染抵抗性 T 細胞の機能分化と増殖) に関与すると思われるサイトカインをシェマ的に示したのが図7である。IFN- γ を中心に幾つかの促進性、抑制性サイトカインがどのような比重で働くかが鍵となっている。

5. 防御免疫の発現とサイトカイン

結核菌が病原性を発揮し、慢性持続性炎症を呈するのはこの菌がマクロファージ内での殺菌に抵抗して増殖するからと考えられる。細胞内殺菌をエスケープする機構として、活性酸素の消去、食泡とリソソーム融合 (P-L fusion) 阻害などが知られているが¹⁵⁾¹⁶⁾、特に P-L fusion を抑制する菌側の分子機構は未だ不明である。

結核菌に代表される抗酸菌の多くは正常な細胞内殺菌機構に耐えるが、特異免疫が成立して感染抵抗性 T 細胞が誘導された個体では、マクロファージが活性化されて細胞内殺菌が進行すると考えられている。マクロファージを活性化する上で最も役立つのが、Th1 型 T 細胞が抗原特異的に産生する IFN- γ である。IFN- γ を作用させた活性化マクロファージでは、少なくともマウスで

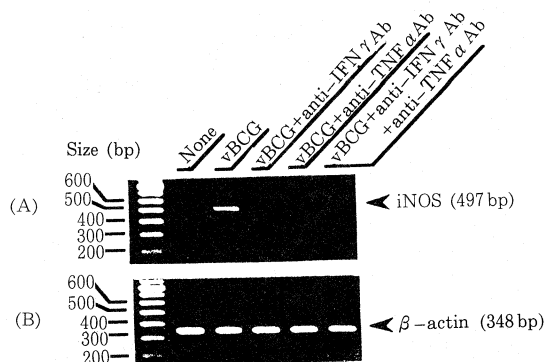


図8 マウス脾細胞をBCG生菌で刺激したときに発現されるiNOSのmRNAと抗体処理による変化。刺激後6時間で細胞からRNAを抽出し、RT-PCRにより検出した。

の実験に関する限り、細胞内での結核菌の増殖抑制または殺菌の亢進がみられている。

活性化マクロファージではなぜ正常マクロファージとは異なり強い細胞内殺菌（または静菌）作用がみられるか、について近年特に注目されているのが一酸化窒素ラジカル（ $\cdot\text{NO}$ ）である。マクロファージにIFN- γ を作用させると、正常マクロファージには発現されていない一酸化窒素合成酵素（iNOS: inducible NO synthase）が発現され、L-アルギニンを基質としてそのグアニヂノN基を酸化して $\cdot\text{NO}$ がつくられる。このガス状分子はラジカルであり、DNAを傷害し、また呼吸（酸化的リン酸化）に関連した金属配位酵素を障害して殺菌作用を発揮すると考えられている。

iNOSの誘導はIFN- γ に限らず、実験的にはIL-1, TNF, LPSなど（またはそれらの組み合わせ）でもみられ、われわれも、マウス脾細胞をBCG生菌刺激すると種々の炎症性サイトカインが産生され、その作用で脾細胞中のマクロファージがiNOSを発現するが、抗IFN- γ 抗体のみならず抗TNF- α 抗体でもブロックされることをRT-PCRで観察している（図8）¹³⁾。しかし問題はヒトの単球マクロファージではこれらのサイトカインを作用させてもiNOSの発現、NO産生がみられにくいことで、マウスで得られた知見が本当にヒトのメカニズムとして普遍化できるか否かは、今後の課題である。

6. おわりに

本稿は結核病学会シンポジウムでの発表内容に沿って書いたものであり、多くの総説や優れた原著論文を敢て引用せず、われわれの研究成果に基づいて話を進めた。

多分に独断的な内容となったきらいは否めないが、出発点は「なぜ死菌では細胞性免疫防御が誘導されないのか」という大昔からの疑問であり、あくまでこの線でのひとつの研究の進め方で得られた成果として御容赦願いたい。

HSPを含む多くの結核菌抗原蛋白の遺伝子がクローニングされリコンビナント標品が調製され、それらがDTHを誘導し発現させる抗原であることが確認されても、なおそれらのみで防御免疫を誘導できない現状をみると、感染抵抗性T細胞の分化誘導の機構を動物モデルからヒトへと普遍化できるレベルで今後解析していくことは、極めて重要なことと考えている。

文 献

- 1) Koga T, Mitsuyama M, Handa T, et al. : Induction by killed *Listeria monocytogenes* of effector T cells mediating delayed-type hypersensitivity but not protection in mice. *Immunology*. 1987 ; 62 : 241-248.
- 2) Mitsuyama M, Watanabe Y, Sano M, et al. : Generation of *Listeria monocytogenes*-specific T cells mediating delayed footpad reaction and protection in neonatally thymectomized mice but not in nude mice. *Med Microbiol Immunol*. 1988 ; 177 : 207-217.
- 3) Tsukada H, Kawamura I, Arakawa M, et al. : Dissociated development of T cells mediating delayed-type hypersensitivity and protective T cells against *Listeria monocytogenes* and their functional difference in lymphokine production. *Infect Immun*. 1991 ; 59 : 3589-3595.
- 4) Kawamura I, Tsukada H, Yoshikawa H, et al. : IFN- γ -producing ability as a possible marker for the protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice. *J Immunol*. 1992 ; 148 : 2887-2893.
- 5) Kawamura I, Yan J, Takaesu Y, et al. : Determination of the mycobacterial antigen provoking IFN- γ as a possible protective antigen in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun*. 1994 ; 62 : 4396-4403.
- 6) Mitsuyama M, Igarashi K, Kawamura I, et al. : Difference in the induction of macrophage interleukin-1 production between viable and killed cells of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. 1990 ; 58 : 1254-1260.
- 7) Igarashi K, Mitsuyama M, Muramori K, et

- al. : Interleukin-1-induced promotion of T cell differentiation in mice immunized with killed *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 1990 ; 58 : 3973-3979.
- 8) Tsukada H, Kawamura I, Arakawa M, et al. : Induction of macrophage interleukin-1 production by *Listeria monocytogenes* hemolysin. *Cell Immunol.* 1992 ; 140 : 21-30.
- 9) Yoshikawa H, Kawamura I, Fujita M, et al. : Membrane damage and interleukin-1 production in murine macrophages exposed to listeriolysin O. *Infect Immun.* 1993 ; 61 : 1334-1339.
- 10) Nishibori T, Cooray K, Xiong H, et al. : Correlation between the presence of virulence-associated genes as determined by PCR and actual virulence to mice in various strains of *Listeria* spp. *Microbiol Immunol.* 1995 ; 39 : 343-349.
- 11) Xiong H, Kawamura I, Nishibori T, et al. : Cytokine gene expression in mice at an early stage of infection with various strains of *Listeria* spp. differing in the virulence. *Infect Immun.* 1994 ; 62 : 3649-3654.
- 12) Yang J, Kawamura I, Mitsuyama M : Difference in the ability to induce the expression of inflammatory cytokines in spleen cells between viable and killed *Mycobacterium bovis* BCG. 1995 ; manuscript in preparation.
- 13) Yang J, Kawamura I, Mitsuyama M : involvement of NK cells in nitric oxide production by spleen cells after stimulation with *Mycobacterium bovis* BCG : Study for mechanism of the different ability between viable and killed BCG. *J Immunol.* 1995 ; 155 (12) : in press.
- 14) Song F, Matsuzaki G, Mitsuyama M, et al. : The role of B cells in the *in vitro* induction of IFN- γ -producing CD4⁺ T cells specific for *Listeria monocytogenes* : Positive and IL-10-mediated negative regulation. *Cell Immunol.* 1994 ; 157 : 403-414.
- 15) 光山正雄 : マクロファージと生体防御—貪食, 殺菌, エスケープ. *Medical Immunology.* 1993 ; 26 : 35-45.
- 16) 光山正雄, 藤田 雅 : 細菌の防御機構からのエスケープ. *化学療法の領域.* 1993 ; 9 : 46-54.

第70回総会シンポジウム

I. ヒト結核の感染・発病と免疫

4. 結核の発症・進展に関する一考察

— *M. avium* complex 感染症との対比から —

鈴木 克 洋

京大胸部疾患研究所感染・炎症学, 呼吸器感染症科

受付 平成7年8月21日

4. CLINICAL COMPARISON OF PULMONARY TUBERCULOSIS WITH
PULMONARY *M. AVIUM* COMPLEX DISEASE

Katsuhiro SUZUKI*

(Received 21 August 1995)

At first, we reviewed radiographic findings of primary pulmonary tuberculosis, secondary pulmonary tuberculosis, pulmonary *M. avium* complex (MAC) disease without predisposing conditions, and pulmonary tuberculosis in AIDS patient. Infiltrates in lower field, mediastinal lymphadenopathy, and pleural effusion were the characteristics for primary pulmonary tuberculosis, while multiple nodular shadow with/without cavitation in S^{1,2,6} were the characteristics for secondary pulmonary tuberculosis. In pulmonary MAC disease without predisposing conditions, lesions progressed slowly from a cluster of small nodules to cystic bronchiectasis with collapse of the segment or the lobe, and it took usually more than 10-years for the whole process interval. The characteristics of pulmonary tuberculosis in AIDS patient were nearly the same as those of primary pulmonary tuberculosis.

Secondly, we compared clinical characteristics between pulmonary tuberculosis and pulmonary MAC disease. We reviewed the medical records of hospitalized patients who were diagnosed as pulmonary tuberculosis or pulmonary MAC disease. Systemic compromised host defense, such as diabetes mellitus or malignancy, played a more important role in the development and progression of tuberculosis, while defect in local pulmonary defense, such as bronchiectasis or pneumoconiosis, was more important predisposing factors in the development of pulmonary MAC disease. The average age of patients with MAC disease was found to be older than those with tuberculosis. By gender women were predominant in MAC disease, while men were predominant in tuberculosis.

* From the Chest Disease Research Institute, Kyoto University : Sakyo-ku, Kyoto, 606 Japan.

Key words : Pulmonary tuberculosis, Pulmonary MAC disease, Predisposing factors, Radiographic findings

キーワード : 肺結核, 肺 MAC 症, 発症因子, 画像所見

はじめに

戦後順調に減少したわが国の結核罹患率と死亡率は、近年も減少は続けているものの、減少率の鈍化傾向が顕著であり、また塗抹陽性例の僅かながらの増加の報告もみられる¹⁾。さらに、*M. avium* complex (MAC) を中心とする非定型抗酸菌症の相対的、絶対的増加が明らかになっており²⁾、わが国の抗酸菌症の疾病構造は現在転換点を迎えていると思われる。このような変化の原因ははっきりしないが、医療関係者の抗酸菌症に対する無関心、無知もその一因と考えられる。一方欧米においては、周知のとおり HIV 感染に合併した結核、MAC 症が多発しており、医療関係者の結核症—特に耐性菌結核—に対する興味は復活しつつある。

本シンポジウムの、唯一の臨床サイドのシンポジストとしての私の役割は、結核の発症・進展に関する臨床的考察であろう。しかし結核が死亡原因の第一位であった時代を経験された諸先輩と比べると、私の臨床経験はなきに等しいと言っても過言ではない。結核の発症・進展に関して臨床的にいったい何を付け加えることができるのであろうか？

近年われわれは、肺に基礎疾患のないいわゆる一次型肺 *M. avium* complex (MAC) 感染症の発症・進展に関して、画像を中心とした臨床的検討を行い報告してきた³⁾。今回、肺結核症例の臨床的特徴を探索し、以前調べた MAC 症の特徴と比較することで、肺結核の発症・進展に関する相対的特徴を浮き彫りにし、シンポジストとしての役割の一端を果たそうと思う。

ヒト抗酸菌感染症の画像所見

従来より肺結核症の発症・進展に関しては、いわゆる一次結核症と二次結核症との区別がなされてきた。一次結核症は免疫が未完全な乳幼児期によく見られる初感染病巣から連続的に発症・進展したと考えられる病型で、中下野に病変が多く、しばしば肺門・縦隔リンパ節腫大や胸膜炎の合併を伴い、早期に髄膜炎等の肺外結核に進展しやすい特徴を持つ。図1は17歳男性症例で右下肺野の浸潤影、右胸水、縦隔リンパ節腫脹という一次結核症の画像上の特徴を備えている。

それに対して従来より成人型とも言われる二次結核症は、初感染病巣の成立後いったんは免疫反応により鎮静

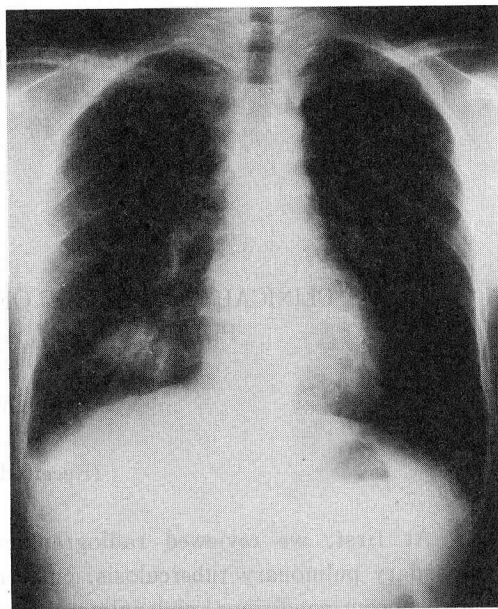


図1 一次肺結核症 (17歳, 男性)

化した病変が、年余をへて個体の何らかの免疫低下状態に乗じて再活性化し発病したものと考えられている。通常われわれが遭遇する成人発症の肺結核症は二次結核症が大部分を占め、病変が $S_{1,2,6}$ に好発し、しばしば空洞を伴う結節影が多発するという画像上の特徴を持つ。図2は54歳男性症例で、右 S^2 に多発性の結節影を呈しており二次結核症の典型的画像所見である。

一方当教室の田中らによると、肺に基礎疾患のないいわゆる一次型肺 MAC 症の画像上の特徴は、以下のとおりにとまとめられる³⁾；1) 灌流気管支の肥厚像または拡張像を伴う肺野末梢の多発性の小結節影（多くは空洞性病変がある）、2) 肺葉あるいは肺区域の虚脱を伴う囊状気管支拡張、3) 実質性肺炎。初期例は結節影のみを呈し、進行するに従い灌流気管支の肥厚像、拡張像を伴い、末期像として肺野の虚脱を伴う囊状気管支拡張へと進行する。稀に肺炎型の経過をとる症例もある。病変の好発部位は特になく、中葉舌区を中心に全肺野に比較的均等に分布し、病状の進行とともに多肺葉に存在するようになる。症状出現から、末期の肺野の虚脱を伴う囊状気管支拡張の出現まで大方の症例で10年以上の経過

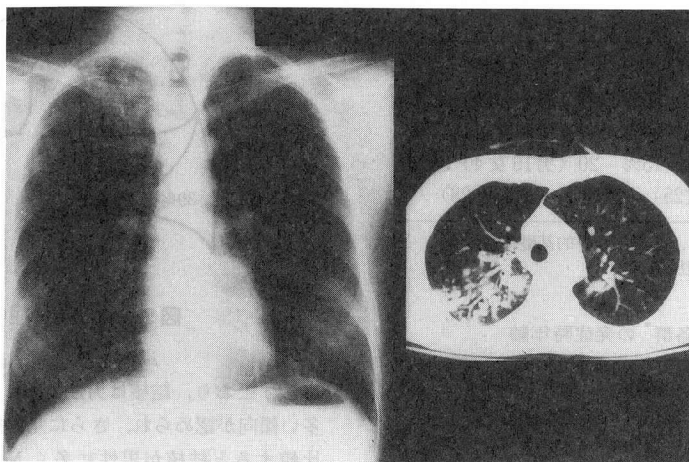


図2 二次肺結核症 (54 歳, 男性)



図3 肺 MAC 症 (60 歳, 女性)

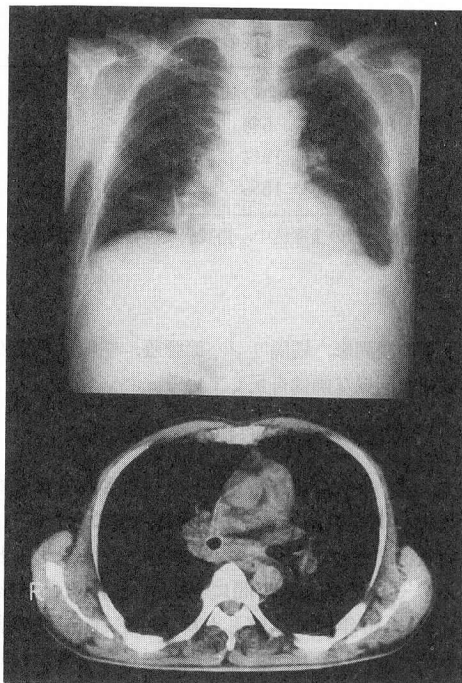


図4 AIDS 合併肺結核症 (50 歳, 男性)

をとるが、最期まで病変は肺内に限られていることが多い。図3は60歳女性の症例で発症後6年目のCT像である。右S⁶肺野末梢の多発性小結節影と、中葉の囊状気管支拡張を伴う虚脱を認め、一次型肺MAC症の特徴的画像所見を示していると考えられる。

近年欧米を中心に HIV 感染に結核症、MAC 症が高率に合併すると報告されている。結核症に関しては、HIV 感染の比較的初期の段階 (CD4 500/ μ l 位) では

通常の肺結核症 (二次結核症) に近い病態を示し、中程度に免疫が抑制される (CD4 100/ μ l 位) と、肺門・縦隔リンパ節腫大、下肺野陰影、肺炎像、肺外結核の合併等一次結核症に近い病態を示すようになると言われている⁴⁾。一方 MAC 症は HIV 感染末期 (CD4 50/ μ l 以下) にのみ出現し、呼吸器系・消化器系臓器を中心に全身感染の病感を示す。図4は50歳男性の AIDS 患者で、結核発症時の末梢血 CD4 リンパ球数は 41/ μ l であった。

表 1 基礎疾患による分類*

	結核	MAC
1 群	49 (男32女17) 55%	24 (男4女20) 48%
2 群	27 (男22女5) 30%	7 (男3女4) 14%
3 群	13 (男10女3) 15%	20 (男16女4) 38%
計	89名 (男64女25)	51名 (男23女28)

* 1 群：基礎疾患なし，2 群：全身の基礎疾患，
3 群：肺局所の基礎疾患

表 2 各群*の発症時年齢

	結核	MAC
1 群	45.2	53.9
2 群	56.7	52.8
3 群	63.8	58.1

* 群分けは表 1 と同じ。

表 3 結核の病変分布*

	S ^{1,2,6}	その他の肺野	胸膜炎	肺外結核
1 群	80%	6%	18%	14%
2 群	70%	19%	4%	7%
3 群	54%	15%	15%	0%

* 数値は各群の全症例中，当該病変の存在した症例の百分率。

右中下野の浸潤影，縦隔リンパ節腫脹，左胸水を認め一次結核症と同様な画像を呈している。

肺結核と肺 MAC 症の臨床像の比較

以上，種々症例の画像所見からも示唆されるように，ヒトにおける抗酸菌の発症・進展は，菌の毒力と Host 側の免疫状態との組合せで多彩なパターンを呈すると思われる。そこで過去 8 年間に当科に入院した肺結核 89 例と，過去 10 年間に入院した肺 MAC 症 51 例の臨床的比較を行い，両疾患の発症・進展の特徴を考察してみたいと思う。89 例の肺結核中一次結核症と考えられるのは 3 例のみで，他の 86 例は二次結核症であった。両症例共に以下のように基礎疾患の有無により 3 群に分類し検討した。つまり，基礎疾患のない 1 群，全身の基礎疾患（糖尿病，悪性腫瘍，副腎ホルモン服用等）のある 2 群，肺局所に基礎疾患（塵肺，慢性閉塞性肺疾患，陳旧性肺結核等）のある 3 群である。

表 1 のように 2 群は結核に多く，3 群は MAC に多い傾向があり，肺結核発症には全身的な感染防御能の低下が，一方肺 MAC の発症には肺局所の防御能の低下が比較的重要であることが示唆された。男女比では表 1

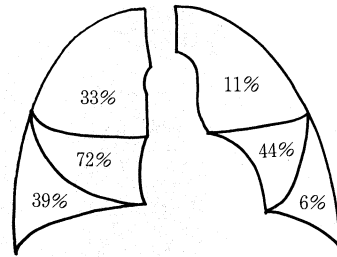


図 5 肺 MAC 症の病変分布

に示すとおり，結核は男性に多く，MAC はやや女性に多い傾向が認められ，さらに基礎疾患のない 1 群でのみ比較すると結核が男性に多く MAC は女性に多いという傾向がより顕著となった。

各群の発症時の年齢を比較すると，表 2 に示すとおり，結核では 1 群，2 群，3 群の順に高齢になる傾向があったが，MAC では各群共にほぼ同じ程度の年齢であった。基礎疾患のない 1 群で比較すると MAC は結核と比べてより高齢の傾向であった（表 2）。

結核の病変分布を検討したところ 1 群では S^{1,2,6} に病変が集中しているのに対して，2 群，3 群では他の肺野への病変の出現頻度もやや高まっている（表 3）。全体としてみれば結核では S^{1,2,6} に病変が出現しやすいのに対して，MAC では中葉舌区中心に比較的全肺野に均等に分布していることがわかる（図 5）。

以上の結果から，結核の発症がいわゆる二次結核症のストーリーで非連続的に生じていること，また結核菌の毒力が比較的高く生体防御機構と微妙なバランスを保っているため，HIV 陽性例でも示されているとおり，比較的軽度な全身の免疫抵抗減弱で発症しうることが推測される。一方，MAC 症に関しては，発症に肺局所の防御能の低下が比較的重要であり，さらに発症・進展の経過が慢性・連続的に生じているものと推測される。基礎疾患のない肺 MAC 症に関しては，中年以降の女性であることが重要な危険因子と考えられるが，その発症の機構はいまだ不明であり，今後の詳細な検討が待たれる。

おわりに

今回の発表に関して結核の勉強をし，自己の無知を自覚することができた。例えば結核が近代に至り猖獗を極めたのは，産業革命のため都市の劣悪な環境に人口が密集したためであり，最も産業革命の早かった英国では，19 世紀後半結核菌が発見されるかなり以前より既に罹患率が低下していたという事実は，諸先輩には周知のことだろうが，私自身には新鮮な発見であった。このような昔の常識をわれわれは知らないのである。結核が直せ

る事と理解する事は別であった訳である。確かに結核は臨床上昔日の栄光を失いはしたが、未だ重要な呼吸器疾患の一つであり続けている。それよりも重要なことは、一つの極めて大きな慢性感染症を克服してきたという歴史である。多剤耐性菌結核や肺 MAC 症等未だ克服することのできない抗酸菌感染症に立ち向かう場合、結核に対する先人の研究から学ぶものは多いはずである。

(シンポジウム講演では、抗酸菌貪食時ヒト肺胞マクロファージの各種サイトカイン発現に関する発表も行ったが、本稿では紙面の都合で省略した。後日原著として発表する予定である。)

謝 辞

症例を提供していただいた国立療養所南京都病院内科、佐藤敦夫先生と大阪赤十字病院呼吸器内科、西坂泰夫先

生に感謝致します。

文 献

- 1) 結核の統計 1994: 厚生省保険医療局エイズ結核感染症課監修, 財団法人結核予防会, 東京.
- 2) 坂谷光則: *Mycobacterium avium* Complex 症の現況と将来. *M. avium* Complex 症の疫学. 結核. 1993; 68: 43-46.
- 3) 田中栄作, 網谷良一, 久世文幸: *M. avium* Complex 症の臨床, “二次感染型”を中心として. 結核. 1993; 68: 57-61.
- 4) Hopewell PC: Clinical Features, Diagnosis, and Management of Tuberculosis in Immunocompromised Hosts. *Kekkaku*. 1991; 66: 433-447.