

## 第70回総会教育講演

## 日米の結核基礎研究の動向

東 市 郎

北海道大学免疫科学研究所

受付 平成7年12月7日

The 70th Annual Meeting Educational Lecture

BASIC STUDIES ON TUBERCULOSIS AND TUBERCLE BACILLI IN  
U.S.-JAPAN MEDICAL COOPERATIVE PROGRAM  
TUBERCULOSIS PANEL

Ichiro AZUMA \*

(Received 7 December 1995)

The U.S.-Japan Medical Cooperative Program has been started in 1965 and Tuberculosis Panel is one of the most important field of the programs. In this lecture, the recent advances in the basic studies on tuberculosis researches which were reported in Tuberculosis panel of the program were summarized.

The host defence mechanisms against *M. tuberculosis* infection were the most important subject. The role of Th1-mediated cytokins such as IL-2, IFN $\gamma$  and TNF $\beta$  in the host-defence mechanism against mycobacterial infection was extensively discussed. *Bcg* gene of the mice is the example case for the genetic background of host against mycobacterial infection. The virulence factor, however of *M. tuberculosis* is still unknown. The technique of molecular biology was applied to the diagnosis of tuberculosis. The PCR and RFLP methods are the useful strategies for the rapid diagnosis and analysis of the mode of infection with *M. tuberculosis*. The development of detection techniques of drug-resistant tubercle bacilli is also urgently required. Another approach by molecular biology to tuberculosis research is the cloning of gene of tuberculin protein and the production recombinant protein of *M. tuberculosis*. The amino acid sequences of several proteins have been determined and their immunological properties of recombinant proteins were investigated.

The immunological functions of lipid fractions of tubercle bacilli such as cord factor (TDM) and lipoarabinomannan (LAM) have been described. Especially the immunomodulating activities and the role of TDM as diagnostic antigen in the tuberculosis patients were described. The adjuvant activity of mycobacterial cell wall was well established and the minimum structural requirement was reported to be *N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP). The several MDP derivatives were selected as the cytokine inducers.

---

\* From the Section of Chemistry, Institute of Immunological Science, Hokkaido University, Kita-ku Sapporo 060 Japan.

Especially MDP-Lys (L18) was widely used as drug for the increasing the number of white blood cells and platelets in cancer patients. The effectiveness of MDP derivatives on the stimulating of mucosal immunity was also recently reported. The preventing activities of virus infection and cancer metastasis of MDP derivatives were shown in mice models.

**Key words** : Tubercle infection, Host defence mechanism, Tuberculoproteins, Lycoplipids, Muramyl dipeptides (MDP)

**キーワード** : 結核感染, 生体防御機構, 結核菌タンパク, 糖脂質, ムラミルジペプチド (MDP)

## はじめに

先進国においては、結核患者は抗結核化学療法剤の開発に伴って急激な減少傾向を示したが、わが国においては未だに毎年5万人以上の新規患者の発生があり、近年増加の傾向すら認められる。さらに、最近 AIDS の急激な蔓延により、多剤耐性結核菌による結核症の発症が報告され、結核症は、再び世界的な注目をあびるようになった。

1965年に発足した日本医学協力計画は、現在、結核、らい、コレラ関連下痢症、環境突然変異癌原、栄養障害、寄生虫疾患、肝炎、ウイルス性疾患、エイズ、免疫の10部会よりなり、すでに発足以来30年を経過した。結核部会は、発足以来、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、結核患者の減少傾向に伴い、一般医学研究者の結核研究への関心の低下、結核研究分野への科学研究費の削減などの中であって、本プログラムの30年にわたる継続は、わが国における結核の基礎研究に果たした役割はきわめて大きいと考えられる。

私は、本プログラム結核部会に発足以来参加し、昭和63年から平成6年まで部会長をつとめさせて戴いた。ここでは本プログラムにおける30年間の研究成果を総括しながら、特に最近の研究の流れを展望する。

### 1. 結核感染と宿主

抗酸菌感染に対する感受性が、人種間、個体間において異なり、それは遺伝的要因によるものと考えられている。抗酸菌に対する抵抗力が遺伝支配を受けていることを最初に報告したのは、1982年カナダの Skamene らによるマウスにおける *Bcg* 遺伝子の実験であった。

*Bcg* 遺伝子はマウスの第一染色体上にあり、感染の初期抵抗力を支配し、結核菌のみならずその他の細胞内宿主細菌の感染に対する初期の感染抵抗力に重要な役割を果たすものと考えられた。後藤(宮崎大農)らは *Bcg* コンジュニクマウスを作製して検討した結果、*Bcg* マウスは抗酸菌感染初期のみならず、免疫が誘導される

後期においても抵抗性を示すこと、*Bcg* 遺伝子による菌増殖抑制能は骨髓由来マクロファージにも発現していること、*Bcg*<sup>r</sup>, *Bcg*<sup>s</sup> マウスマクロファージには分化増殖能、貪食能、走化性などに差が認められないが、感染の際、出されるサイトカインの量に差が認められること、マクロファージによる抗原提示能は *Bcg*<sup>r</sup> マウス由来の方が *Bcg*<sup>s</sup> のそれよりもすぐれ、免疫応答にも差をおよぼしているなどを見出した。*Bcg* 遺伝子の本体についてもまだ不明なことが多く、今後の解明がまたれる。

結核感染に対する宿主の免疫応答は重要な課題であり、昭和20年代における故山村雄一(当時刀根山病院)らによる実験的結核性空洞形成実験にはじまり、わが国において多くのすぐれた研究成果が蓄積されつつある。特に結核菌感染症が結核菌感染性細胞内に長期的持続的に寄生し発病すること、その病態として遅延型アレルギーがきわめて重要な役割を果たしており、その際、マクロファージ、T細胞(主としてTヘルパー1細胞Th1)、NK細胞、 $\gamma/\delta$  T細胞などを主体とする細胞性免疫反応によるものであること、さらにマクロファージより産生される主としてTh1指向性のIL-12, IL-2, IFN- $\gamma$ , TNFなどのサイトカインが種々免疫反応の引き金を引くものと考えられる。露口(羽曳野病院)らは脂質を多量に含む結核菌菌体成分、例えば mycolic acid や、cord factor (trehalose dimycolate TDM), mycolic acid 含有脂質などの役割を重視している。光山(新潟大医)らもマウスにおける *L. monocytogenes* や BCG の感染モデルを用いて、生菌および死菌感染におけるサイトカイン産生について検討し、生菌免疫でIL-1, IFN $\gamma$  遺伝子の発現が明らかに強く誘導されることを見出した。

結核菌の病原性因子については1950年代のH. Blochらの cord factor (TDM) をはじめとして数多くの研究があるが、厳密な意味での決定的な病原性因子の報告はほとんどみられない。遺伝子の移入実験などによって検討されている病原性に関与する遺伝子の研究も、現在のところ成果が認められない。

## II. 結核症の遺伝子診断

### 結核菌遺伝子を用いる診断技術の確立

近年発達した分子生物学の導入によって結核の迅速診断技術の確立と発病様式の解析が可能となった。その代表的なものとしてPCR法は数コピーのDNAまたはRNAを増幅することによって結核菌、*M. avium*, *M. intracellulare*などを検出しようとするものであり、すでにキットも市販されている。現在これら核酸増幅法の導入における技術上の問題点、従来からの検査法である塗抹検査や培養試験による菌株の同定と感受性試験などの重要性についても改めて認識されており、新しい遺伝子診断法との関連についても検討されつつある。特に増幅酵素阻害物質の除去に関する検討が重要視されている。しかし結核菌の迅速検出法の開発はAIDSの蔓延なども考慮すると、極めて重要かつ緊急の課題であることは疑いがない。

結核の遺伝子診断のもう一つの展開にRFLP分析による結核症の感染様式の分析がある。高橋（結核予防会結研）らは1980年代に開発されたIS6110をプローブとしたRFLP分析によって全国38施設から集められた抗酸菌のなかから結核菌941株を用いて詳細な検討を行っているが、これらの成果は感染源のみならず感染様式の解析の上できわめて重要な指標となるであろう。今後のデータの集積がのぞまれる。近年AIDS患者での日和見感染として多剤耐性結核菌の出現が報じられているが薬剤耐性菌の検出法の確立も重要な課題である。

## III. 結核菌の菌体成分の構造と生物活性

### (1) 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。この技術を応用し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研究菌タンパクのうち、70/71 Kd, 64 Kd, 65 Kd, 38 Kd, 28 Kd, 30 Kd, 18 Kd 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70/71 Kd 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(大阪市大結

核研)、田村(兵庫医大)ら、山田(長崎大歯)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蛋白の精製と構造決定を精力的に行い、MBP-59, -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65 Kd タンパクである。65 Kd 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。

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<sup>+</sup>)が65 Kd タンパクに反応し分裂すること、IL-2やGM-CSF, IFN- $\gamma$ 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70 Kd 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70 Kd 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 $\gamma/\delta$ -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65 Kd, 70 Kd 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、 $\gamma/\delta$ -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らは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65 Kd タンパク反応性のT細胞クローン(A<sub>2</sub>b)により関節炎が誘発され、他のT細胞クローン(A<sub>2</sub>c)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。

最近、高津(東大医科研)らは結核菌タンパクMPT-59の詳細な抗原エピトープ分析を行った。結核菌感染マウスのリンパ節細胞に対する、MPT-47, -57, -59, -64の反応性を検討した結果、MPT-59がPPDに匹敵する反応性を示した。MPT-59のアミノ酸配列について、それぞれ部分的に配列する重複する15アミノ酸ペプチドを30種類合成し、それぞれの反応性を検討した結果、ペプチド25(QDAYNAAGGHNAVFN)が最も強い抗原性を示した。またMPT-59反応性の結核菌感染リンパ球はCD4<sup>+</sup>T細胞でありV $\beta$ 11を発現していることなどを明らかにした。

### (2) Cord factor (TDM) など

mycolic acid とともに最もよく研究された菌体脂質

に H. Bloch らによって報告された cord factor (trehalose-dimycolate, TDM) がある。TDM は当初病原結核菌の毒性因子の一つとして注目されたが、その後病原ミコバクテリアのみならずノカルジア、コリネバクテリアなどの非病原菌体にも含まれること、マウスに対する致死毒性のみならず、肉芽腫形成、免疫強化活性、サイトカイン誘導、抗腫瘍活性など、種々の生物活性が東、矢野（大阪市大・医）ら M. Goren (National Jewish Hosp) らによって報告された。その後矢野らは結核患者の血清中に抗 TDM 抗体を見出し、TDM の診断用抗原として有用性についても検討している。私どもは種々の化学合成した TDM 誘導体を用いてミコル酸の炭素分子鎖長、糖構造と上記生物活性との関連について明らかにした。最近、藤木ら（埼玉がんセンター）は TDM の発がんプロモーターとしての可能性を示唆している。

その他の結核菌菌体由来の脂質としてすでに Goren らによって報告されている sulfolipid (2, 3, 6, 6'-tetraacyl trehalose-3' sulfate) も TDM と共同して菌の virulence を高めること、P-L fusion の抑制など菌の毒力との関連が注目されている。B. Brennan ら（コロラド大）は *M. avium* complex (MAC) の表層抗原として glycopeptidolipid (GPL) を、*M. leprae* や *M. kansasii* に存在する phenol glycolipid (PGL) についてもその構造を明らかにしており、その診断用抗原としての役割のほかに他の生物活性についても検討されつつある。細胞表層分子として lipoarabinomannan (LAM) があり、すでに1950年代に積田（当時予研）らは LAM が血液凝集反応抗原としての有用性を明らかにしていたが、最近 LAM の新しい生物活性として免疫抑制活性や TNF 産生能も見出され、病原因子の一つとしてその可能性が示唆されている。

#### IV. 結核菌菌体成分の生物活性と臨床応用

##### (1) 免疫強化（アジュバント）活性

1970年、われわれは、細菌細胞壁骨格が結核菌をはじめとする細菌菌体のアジュバント活性因子であることを報告し、特に BCG 細胞壁骨格 (BCG-CWS) や *N. rubra*-CWS を用いるがん免疫療法の可能性を明らかにした。さらに細胞壁骨格の構成成分のうち、ペプチドグリカンが重要であることを報告した。

1974年に至り E. Lederer（パリ大学）のグループは、細菌細胞壁骨格のペプチドグリカンの構造のうちでも *N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamic acid (MDP) がアジュバント活性発現に必要な最小構造単位であることを報告した。MDP を抗原とともに鉱油油を用いる油中水型エマルジョンとして投与すると、

「Freund の完全アジュバント」に比すべき免疫アジュバント活性を示す。MDP は muramic acid (アミノ糖酸) と2個のアミノ酸からなる分子量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、その関連化合物の化学合成が広く行われ、その生物活性検討され、免疫アジュバント活性以外にも睡眠作用などきわめて多彩な生物活性を示すことが明らかにされた。

1976年 Chedid（パスツール研）らは MDP およびその誘導体の水溶液をマウスに皮下投与すると *KL. pneumoniae* に対する宿主の感染抵抗性が増強されることを見出した。興味あることに、MDP を皮下のみならず他の投与経路、例えば経口投与によっても感染防御活性が認められた。この研究に刺激されて、MDP の誘導体を医薬として開発しようとする試みが世界的に展開された。特に、先に述べた Lederer および Chedid のグループの他に、シンテック社やチバ・ガイギー社などのグループとともに、わが国においては山村教授を中心とする私どもの研究グループが積極的に検討した。

##### (2) MDP 誘導体の開発と臨床応用

松本（第一製薬中研）らは、マウスに対して大腸菌を皮下感染させ敗血症型のモデルを作製し、化学合成させた MDP のアシル化誘導体60種以上を皮下投与してマウスにおける感染抵抗性を指標にスクリーニングし、候補化合物として2種の MDP のステアロイル誘導体、L18-MDP, MDP-Lys(L18) が選抜された。

L18-MDP や MDP-Lys(L18) は MDP に炭素数18個の高級脂肪酸であるステアリン酸が結合した誘導体であるが、細菌、真菌などに対するマウスでの非特異的感染防御実験において MDP に比較してその活性が強く、そのスペクトラムも広い。またマウスにシクロホスファミド、マイトマイシン、コブラ蛇毒などを投与して免疫機能を低下させた宿主に、これらステアロイル MDP 誘導体を投与することにより正常動物レベルにその感染防御能を回復させることが可能である。一般に加齢によって免疫機構が低下することが知られており、細菌や真菌、ウイルスなどの感染症に対しても抵抗性が弱い。老齢化マウスにおける感染実験においても、MDP-Lys(L18) が有効であることが見出された。

さらに MDP-Lys(L18) は抗菌化学療法剤と併用することで、化学療法剤の有効性を相乗的に増強することも示された。その後、この2種の MDP のステアロイル誘導体のうち、MDP-Lys(L18) のヒトへの応用が積極的に進められた。

私どもはウイルスに対する宿主の感染抵抗性の増強について検討するため、センダイウイルス感染モデルを作

製した。マウスに MDP-Lys(L18) を経鼻的に投与後センダイウイルスを経鼻感染すると、対照群は1週間以内にほとんど死亡するのに対し、MDP-Lys(L18) を10~100  $\mu\text{g}$  投与した群はほとんどのマウスが生存する。一般にはウイルスはインターフェロンの誘発作用を有するが、その際 MDP-Lys(L18) 投与群に、より高値のインターフェロンが誘導されることも認められた。

さらに私どもは、サイクロホスファミド投与によって免疫抑制状態としたマウスに I 型ヘルペスウイルスを感染させることによって、日和見ウイルス感染モデルを作製し、MDP-Lys(L18) の効果を検討した結果、センダイウイルス感染モデルと同様、MDP-Lys(L18) はこれら感染モデルにも宿主抵抗性を賦与することが明らかにされた。MDP-Lys(L18) 投与により白血球、特に好中球、マクロファージおよび単球数の著しい増加も認められることを見出した。興味あることに、血小板数の増加も認められた。また X 線照射やサイクロホスファミド投与したマウスにおいても、低下した白血球数が回復することが明らかにされている。これらの造血機能に対する MDP-Lys(L18) の作用は、MDP-Lys(L18) がマクロファージに作用し誘導されるコロニー刺激因子 (CSF) や、IL-1, IL-6 などのサイトカインの作用によるものであらうと考えられる。その後私どもは、MDP-Lys(L18) を粘膜投与 (経鼻, 経口, 経腸) することにより、センダイウイルス、ロタウイルスなどの感染防御活性をマウス実験モデルを用いて明らかにした。これらの研究成果は、これら MDP 誘導体が粘膜免疫強化によって生体防御機構の強化の可能性を示唆している。

現在、MDP-Lys(L18) は化学療法や放射線治療により低下したがん患者の白血球や血小板数の回復に有効であることが明らかにされ、広く臨床応用が行われている。

現在私どもは、MDP-Lys(L18) や B30-MDP によるリコンビナントワクチン (例えば B 型肝炎ワクチンなど) に対する免疫力増強の試みも検討している。また

MDP-Lys(L18) の実験的がん転移防止活性も明らかにされている。

#### おわりに —残された多くの課題—

結核に対する基礎研究が分子生物学などの周辺科学の進歩によって一部ではめざましい進歩をとげたが、いくつかのきわめて重要な問題点は未解決のまま残されている。例えばさきに述べたように結核菌の病原因子や、薬剤耐性の機構も十分明らかにされていない。近年 AIDS 患者に多剤耐性結核菌感染が報告され、その死亡率の高さが注目されているが、リファンピシンの発見以後、新規抗結核薬の開発は行われておらず、漸く最近に至りリファマイシン関連化合物のうちでも KRM-1648 のすぐれた薬効が *in vitro* および動物実験によって確認されつつある。また、ニューキノロン系化合物の抗結核薬としての有効性も報告されており、今後の発展が期待されている。

BCG ほど長い歴史と広く用いられているにもかかわらず、その評価が必ずしも一定していないワクチンも少ないであろう。その原因は明らかでないが、実験的には BCG 生菌をこえる防御活性を示すワクチンは見出されていない。近年 BCG 生菌のワクチンとしての有効性の再検討とともに BCG 生菌に特定の DNA 断片を組み込むことによってより有効な抗結核ワクチンを開発しようとする試みや、BCG に他のワクチン活性を持つ DNA を組み込んだ複合ワクチンを作製し、BCG のもつアジュバント活性とともに有効なワクチン効果を期待しようとする試みもある。

近年に至り、結核菌研究の重要性が認識されつつあり、特に米国においては研究費の増加とともに、その研究者数の急激な増加がそれを示している。わが国における若い研究者の参入と今後の研究の発展を切に期待するものである。