

第75回総会ランチタイムセミナー

AIDS に 合 併 す る 結 核

¹中田 光 ²本田 芳広 ³田中 直彦 ³Michael Weiden
¹慶長 直人

¹国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部, ²仙台厚生病院内科,
³New York University Medical Center, Division of
Pulmonary & Critical Care Medicine

The 75th Annual Meeting Lunch-Time Seminar

TUBERCULOSIS IN PATIENTS WITH ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROME

¹Koh NAKATA, ²Yoshihiro HONDA, ³Naohiko TANAKA, ³Michael WEIDEN,
and ¹Naoto KEICHO

¹Department of Respiratory Diseases, Research Institute, The International Medical Center of Japan,
²Department of Medicine, Sendai, Kosei Hospital, ³Division of Pulmonary & Critical Care Medicine
and Bellevue Chest Service, NYU Medical Center

HIV-1 infection is a major cause of worldwide epidemic of tuberculosis. In Japan, the cumulative number of the patients reported is 131 by the end of 1999 with 10 to 20 annual new cases. Most of Japanese cases are advanced AIDS patients with low CD4 number less than $100/\mu\text{l}$. The peak age of Japanese patient is 40 to 60 years old, whereas that of foreigners is 20-30 years old, suggesting that most Japanese cases are recurrent tuberculosis. There is increasing clinical evidence that coinfection with *M. tuberculosis* accelerates progression of AIDS. We found that, *in vivo*, HIV-1 load and mutation increase in involved lung segments in patients with pulmonary tuberculosis. We also reported that *Mycobacterium tuberculosis* stimulates HIV-1 replication by enhancing transcription on the 5' LTR in a macrophage cell line, THP-1, *in vitro*. In contrast, HIV-1 replication is suppressed by *M. tuberculosis* infection of monocytes derived macrophages (MDM) or differentiated monocytic THP-1 cells. We observed that HIV-1 5' LTR function was repressed in PMA differentiated THP-1 cells after co-infection with *M. tuberculosis*. Point mutations in C/EBP- β binding domains of the HIV-1 LTR negative regulatory element (NRE) abolished promoter repression. Monocyte-derived macrophages and differentiated THP-1 cells increased expression of the 16 kDa inhibitory form of C/EBP- β after *M. tuberculosis* coinfection. Bronchoalveolar lavage cells obtained from normal controls and alveolar macrophages from uninflamed lung of tuberculosis patients also expressed the 16

*〒162-8655 東京都新宿区戸山1-21-1

* 1-21-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655 Japan.
(Received 21 Jun. 2000)

kDa inhibitory form of C/EBP- β . However, alveolar macrophages from lung segments involved with pulmonary tuberculosis had markedly reduced C/EBP- β expression. These data suggest that 16 kDa isoform of C/EBP- β plays an important role for the control of HIV-1 replication in macrophages. We propose derepression of HIV-1 LTR mediated transcription as one mechanism for enhanced HIV-1 replication observed in pulmonary tuberculosis.

Key words: HIV, AIDS, Tuberculosis, C/EBP- β , HIV-LTR

キーワード: HIV, エイズ, 結核, 転写因子, LTR

はじめに

WHOの推計によれば、結核とエイズの合併は1990年の時点で全患者数の4.2% (31万5000人)であったが、95年には8.4% (73万8000人)まで増加し、2000年には13.8% (141万人)に達すると推定されている (Fig. 1)。地域別ではアジア、アフリカが2000年の推計でそれぞれ、57万7000人、60万4000人であり、この2地域で全体の83%を占める。これらの地域では結核がAIDS患者にとって主要な合併症である¹⁾。

先進国においても大都市を中心に小流行がみられた。91年にニューヨークで新たに報告された3673人の結核患者のうち、約40%がHIVに感染しており、多剤耐性結核菌による結核症では85%がHIV陽性であった。91年に入院した結核患者のうち、麻薬常習者が約60%、HIV感染率は55%で、約70%がホームレスであり、貧困と麻薬とHIV感染が大都市における結核流行の重要な要因であった²⁾。その後、ニューヨーク市では、DOT (Directly Observed Therapy) と呼ばれる治療法 (投薬日ごとに看護婦などが患者に直接会い、薬を投与する方法) が行われ、患者数は、99年までに半減したが、HIV感染との合併率は依然として30%ある。

「厚生省エイズ時代の結核管理に関する研究班」 (代表: 森 亨, 結核研究所所長) 集計によると99年までにわが国において報告されたHIV感染と結核の合併は累計131例である。もちろん、この数は報告に上ったものだけであるから、実際にはこの数倍には達しているだろう。報告例は、93年12例、94年15例、95年19例、96年20例、97年25例と漸増傾向を示したが、98年、99年は、一転して16例、10例と少なかった³⁾。この突然の減少は、HIV感染に合併する非定型抗酸菌症でも一致していることから、HIVの治療として普及したHAARTにより、重症の日和見感染症を合併する患者が減少したことに原因があるのかもしれない。永井らによれば、HAART施行以前と以後では、エイズ合併結核の予後が大きく変

わってきており、結核治療後にHAARTによる抗ウイルス療法を受けた患者の予後は改善してきている⁴⁾。地域的には関東地区が全体の86%を占め、国籍は外国人が約30%を占めている。注目すべきことは、全体の53%が結核が診断された後にHIV感染が発見されていることである。血中CD4数では、100/ μ l以上の者は全体の18%しかない。HIV感染のリスクファクターとしては、異性交渉が48%、同性間が17.6%、麻薬によるものは3%であり、麻薬による感染が多い米国と異なる傾向である。また、日本人のエイズ合併結核の年齢分布は、40~50代にピークがあり、外国人のそれは20代にピークがあるのと対照的である。これは、日本人の結核が高齢者の既感染の再燃によるものが多いこととも合致している。

当然のこととはいえ、HIV感染の比較的初期から結核菌に対する防御免疫は著しく減弱することが知られている。ツベルクリン反応が陽性に転化したHIV感染者のうち、1年に約10%が活動性の結核を発病する。また、アフリカや合衆国における疫学調査から、結核菌に暴露された場合、HIV感染者は非感染者に比べて25~170倍も活動性結核になりやすい。こうした疫学調査の中で注目されるのは、95年に発表された予後のprospective studyである。合併したことのあるHIV抗体陽性者101人とそれ以外の陽性者105人を対象とした予後の追跡調査では、両群の調査開始時の血中CD4数に差がみられないにもかかわらず、また、有効な抗結核療法が行われたにもかかわらず、結核を合併したことのある患者はコントロール群に比べて有意に予後が悪くなっている⁵⁾。この理由の1つとして、前者では結核治療後に結核以外の日和見感染の頻度がコントロール群に比べて1.4倍も増加することが指摘されている。

結核炎症局所におけるHIV産生の亢進

結核菌が感染したマクロファージからはTNF- α 、インターロイキン (IL-1, IL-6) など炎症性のサイト

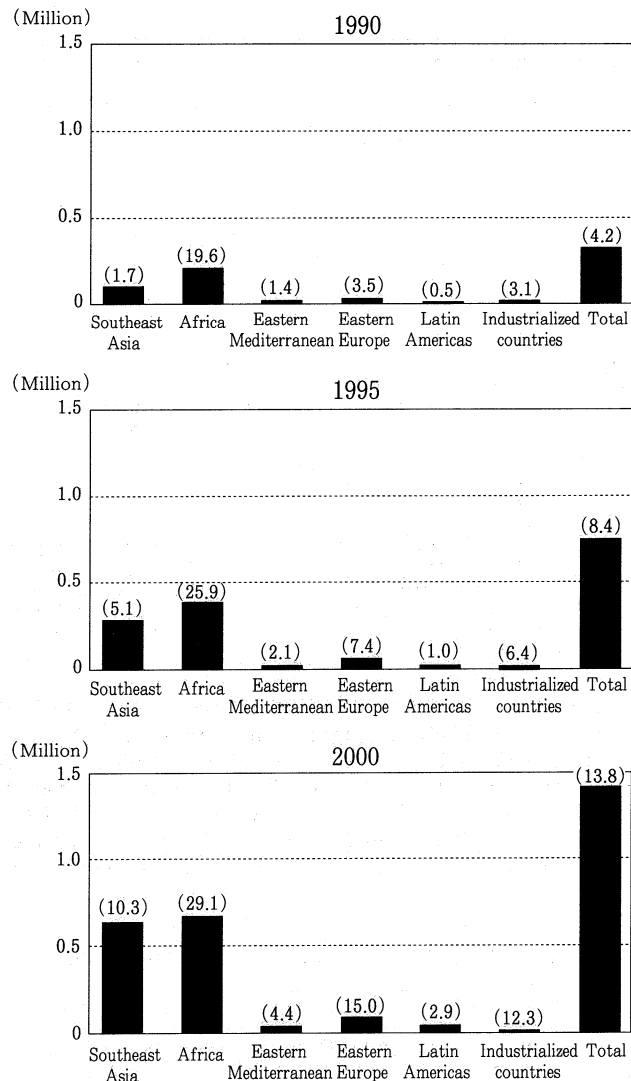


Fig. 1 Estimated tuberculosis incidence and HIV attributable tuberculosis cases in 1990, 1995, and 2000, by region (Rom WN, Garay SM, Bloom BR: Clinical Aspects. In: *Tuberculosis*. Little, Brown Co., New York, 1995, pp444.)

カインが放出されるが、これらはマクロファージやT細胞に作用し、様々な核内因子を誘導する。特にTNF- α はNF- κ BとI- κ Bの解離を促進し、NF- κ Bの核内移行を促進する。細胞にHIV-1が感染しているとウイルスゲノムのLTR (long terminal repeat) NF- κ Bが結合し、HIVの転写を促進する⁶⁾。すなわち、細胞内でのHIVの産生が亢進する。

*in vivo*においても結核を合併したAIDS患者の血中のウイルス量は合併症のない患者に比べて、有意に高く

なることが報告されている⁷⁾。筆者らは結核炎症局所においてウイルス産生が亢進することを見出し報告した⁸⁾。結核を合併したHIV-1抗体陽性者11人と肺に合併症のない陽性者10人(血中CD4数を合わせたコントロール群)に気管支肺洗浄(BAL)を行い、回収された洗浄液中のウイルス量と変異を解析し、比較検討した結果、HIV-1量は結核炎症部からのBALで合併者の非炎症肺、コントロール群からのBALに比べて著しく増加していた(Fig. 2)。同時に血中のHIV量を測

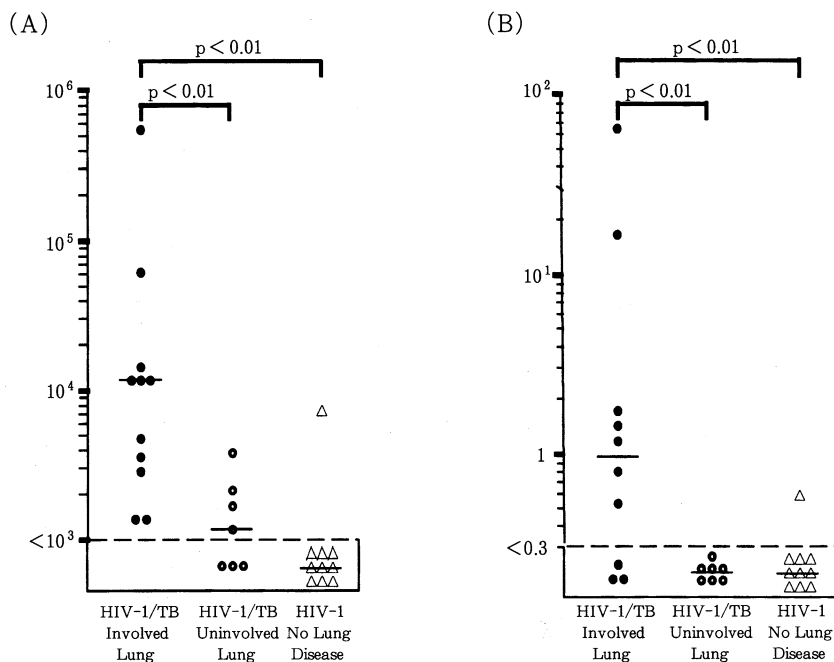


Fig. 2 HIV-1 in BAL fluid from pulmonary tuberculosis. (A) HIV-1 RNA particles/ml BAL fluid. There is a significant increase in HIV-1 RNA particles in BAL fluid from radiographically involved segments compared with uninvolved segments ($p < 0.01$) or in a HIV-1-infected comparison group with no lung disease ($p < 0.01$). (B) HIV-1 p24 pg/ml BAL fluid. Closed circles, HIV-1 involved lungs; open circles, HIV-1 uninvolved lung; open triangles, HIV-1 patients with no lung disease. (from reference 8).

Table HIV-1 Concentration in BAL and Plasma

Pt	CD4 ⁺ /μl	Plasma HIV-1/ml	BAL HIV-1/ml
K	100	<10,000	577,000
L	84	25,500	68,300
M	100	<10,000	12,000
N	20	<10,000	10,200
X	330	<10,000	10,200

定した合併者5例全例において炎症部のBAL中HIV量は血中のそれをはるかに凌駕する (Table) ことから、炎症部のウイルスの増加は単に血漿中からウイルスが沁みだしてきたものではなく、ウイルスの局所産生の増大の結果であることが示唆された。また、3例の合併者を結核治療開始後に定期的にBALを行ってそのウイルス量を調べたところ、治療が進むにつれ減少していくことが確認された (Fig. 3)。結核炎症部のBAL中のTNF- α 、IL-6量がコントロール群に比べて増加しており、

BAL中HIV量とTNF量との間には非常に強い相関がみられる (Fig. 4, $r=0.996$, $p<0.001$)。これに対してIL-6との間の相関は著明ではない。

結核菌感染とウイルス変異

結核による炎症はウイルスの変異も促進する⁸⁾。上記の研究でBAL中のウイルス変異を変異の起こりやすい膜蛋白のV3領域のアミノ酸配列について調べると、コントロール群、および結核合併者の非炎症部からの

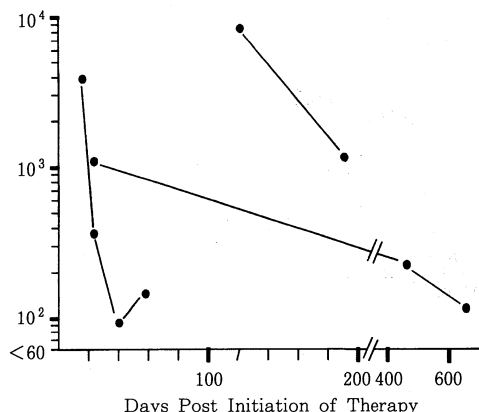


Fig. 3 HIV-1 RNA particles/ml BAL fluid decline with treatment for pulmonary tuberculosis. BAL fluid from three patients coinfecting with HIV-1 and tuberculosis demonstrates a decline in HIV-1 RNA particles/ml after antituberculosis therapy (from reference 8).

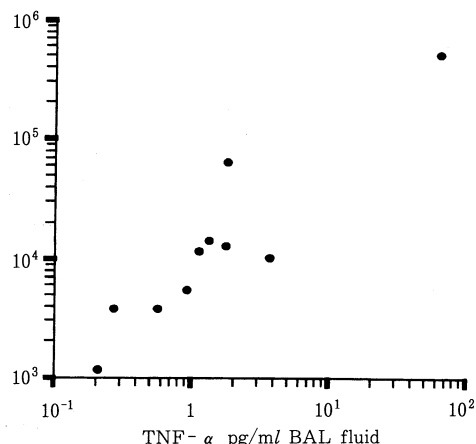
BAL中のアミノ酸配列は血漿中のそれに比べてより均一である (Fig. 5, つまり変異が少ない)。これに比べて結核炎症部のBALにおけるアミノ酸配列は不均一であった。(envelope V3領域アミノ酸配列の similarityのmedianは血漿中79%, 結核炎症部86%, 結核非炎症部92%, コントロール群BAL 94%: これらの数値が高いほどウイルスの変異が少なく均一である。) つまり, 炎症部ではウイルスの変異が促進されていると考えられる。また, この変異により強毒なウイルス株の割合が高くなることも示唆されている。また, こうした遺伝子解析から基本的にBAL中のHIVは血漿中のそれとは異なるウイルスであることが確認された。つまり, ウイルス産生と変異は局所で行われていると思われる。

抗酸菌の重感染によるマクロファージからの HIV-1 産生の変化

これまでの研究から抗酸菌感染の炎症部において HIV-1 を産生している細胞は主としてマクロファージであることが確認されている⁹⁾。そこで, われわれは, マクロファージの *in vitro* における HIV-1 と結核の重感染がウイルス産生に及ぼす影響を培養マクロファージを用いて検討した。

マクロファージ腫瘍細胞株である THP-1 に HIV-1 と *M. tuberculosis* H37Ra を重感染させると, 菌量依存的にウイルスの産生亢進がおこる。このことは, HIV-1 のプロモーター遺伝子 LTR の下流に chloram-

(A) Tumor Necrosis Factor- α



(B) Interleukin-6

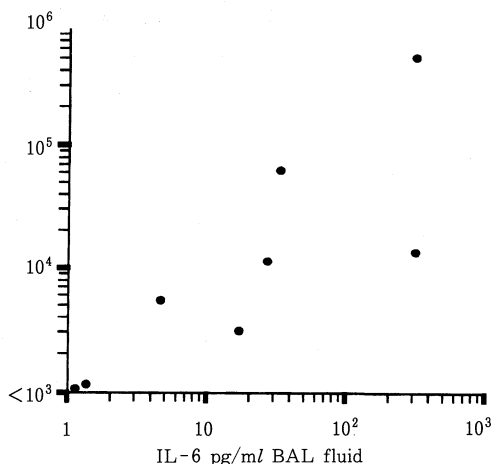


Fig. 4 Correlation of HIV-1 RNA particles/ml BAL fluid to cytokines. (A) TNF- α . There is a significant correlation ($r^2=0.99$, $p<0.01$) between HIV-1 RNA particles/ml BAL fluid and TNF- α concentrations. (B) IL-6. There is significant correlation ($r^2=0.43$, $p=0.05$) between HIV-1 RNA particles/ml BAL fluid and IL-6 levels (from reference 8).

phenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene 結合させたプラスミドを transfect した THP-1 細胞においても確認された。

一方, THP-1 にマクロファージの分化を誘導する作用が知られている化合物 phorbol myristate acetate

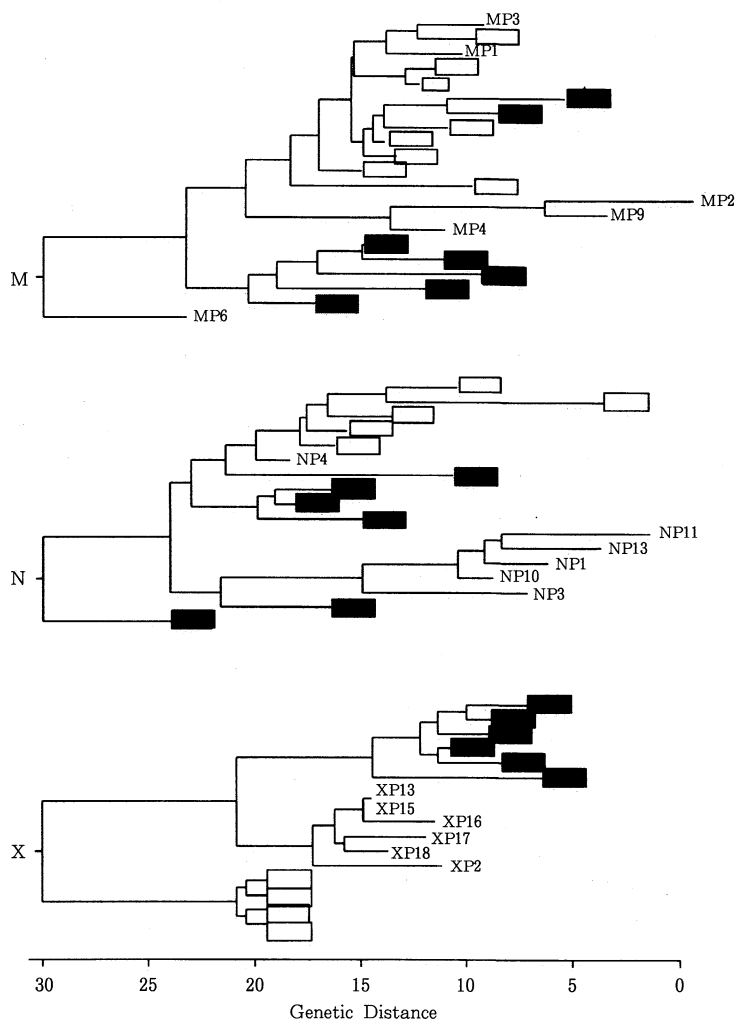


Fig. 5 Phylogenetic tree of BAL HIV-1 cDNA from HIV-1/TB coinfected patients. Patients M, N, and X have viral cDNA clones from plasma (P, no box), involved lung segments (■), uninvolved lung segments (□). The genetic distance scale is the percent amino acid substitution between different isolates (from reference 8).

(PMA)を添加し、付着性のマクロファージに分化させた後に重感染させると逆に菌量依存的に HIV-1 産生を抑制することがわかった。次に単球由来マクロファージに重感染させると、PMA 刺激 THP-1 と同様に菌量依存的にウイルス産生を抑制した¹⁰⁾ (Fig. 6)。この傾向は感染後、4～10日の間で変わりなく、また結核菌 H37Rv 株、BCG、*M. smegmatis* においても同程度に抑制されたが、H37Ra の死菌では効果が弱く、結核菌の膜成分である Lipoarabinomannan では全く効果が

なかった。前述の HIV-1 LTR CAT THP-1 を PMA で刺激して分化させた場合でも、MOI 1.0 で 33% の MOI 10 では 66% の CAT 活性の抑制が見られた。

C/EBP 結合部位と転写抑制の関係

HIV-1 LTR の negative regulatory element (NRE) が転写抑制に関与していることが知られている。HIV-1 LTR には C/EBP β 結合部位が 3 カ所あるが、それぞれに変異を加えた HIV-1 LTR luciferase

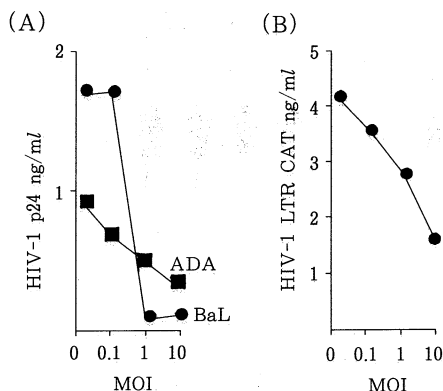


Fig. 6 HIV-1 Replication and HIV-1 LTR Function in Differentiated Macrophages. (A) Monocytes were differentiated with M-CSF and infected with macrophage-tropic HIV-1 strain BaL (n) or ADA (l). Cells were infected with *M. bovis* BCG with a multiplicity of infection (MOI) of 0.1, 1 and 10. HIV-1 p24 was measured six days post co-infection. (B) BF-24 cells are THP-1 cells with an integrated copy of HIV-1 LTR. CAT. BF-24 cells were differentiated with PMA and infected with *M. tuberculosis* H37Ra with an MOI of 0.1, 1 and 10. CAT expression was measured 48 hours after infection (from reference 10).

constructと wild type の construct を transfect した THP-1 細胞を用いて PMA と結核菌による刺激実験を行った。wild type の THP-1 では reporter の発現が24時間後に刺激前の14倍になり、その後抑制されて48時間後にピークの50%となった。一方、C/EBP変異の THP-1 では刺激後の活性が弱い48時間後の抑制が見られなかった (Fig. 7)。つまり、PMA で分化したマクロファージの重感染による HIV 産生抑制には C/EBP β が関与していることが示唆された。

単球由来マクロファージ、分化した THP-1 細胞、肺胞マクロファージに発現している 16 kDa の C/EBP β isoform

C/EBP β は C/EBP family に属する転写因子であり、多くのサイトカインのプロモーターに結合し炎症反応の発現に重要な役割を果たしている。inhibitory および stimulatory form の C/EBP β は単一の mRNA より作られており、stimulatory form は 37Kd と 33Kd からなっている。ribosome translation を最初あるいは 2 番目の AUG から開始することによって

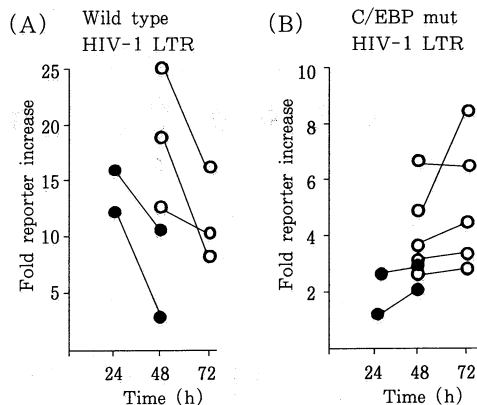


Fig. 7 Time course of HIV-1 LTR promoter activity in stably transfected THP-1 cells. (A) Wild-type HIV-1 LTR. *M. tuberculosis* (●) or LPS (○) produces a striking decline in reporter activity in THP-1 macrophages between 24 and 72 h. (B) HIV-1 LTR with mutated (mut) C/EBP β sites. *M. tuberculosis* (●) or LPS (○) produces a moderate increase in reporter activity in THP-1 macrophages.

stimulatory forms が作られ、これらは DNA binding domain, dimerization domain および transcriptional activating domain をもつ。16Kd の inhibitory form は ribosome が 3 番目の AUG より translation を開始することによってもたらされ、DNA binding domain と dimerization domain のみを持ち、dominant negative transcription factor として作用する¹¹⁾。

C/EBP β はマクロファージに発現しており、HIV-1 LTR の亢進と抑制の両方の作用があることが知られているが、この転写因子が結核菌の刺激下でどのような働きをもつかを明らかにするために、抗 C/EBP β 抗体を用いた細胞抽出液の immunoblot を行った。単球を M-CSF の存在下で培養すると、16kDa の C/EBP β isoform が発現するが、結核菌で刺激するとこの発現はさらに増強される (Fig. 8)。また、THP-1 細胞を PMA で刺激すると 16kDa の C/EBP β isoform が細胞核に発現してくるのに12日間もかかるが、この系に結核菌の刺激をさらに加えると、早くも48時間後に 16kDa の isoform が発現してくる。これに対して結核菌だけの刺激では 16kDa の isoform は発現してこない。健常者の肺胞マクロファージに発現しているのは結核菌と PMA で刺激した THP-1 の C/EBP β isoform

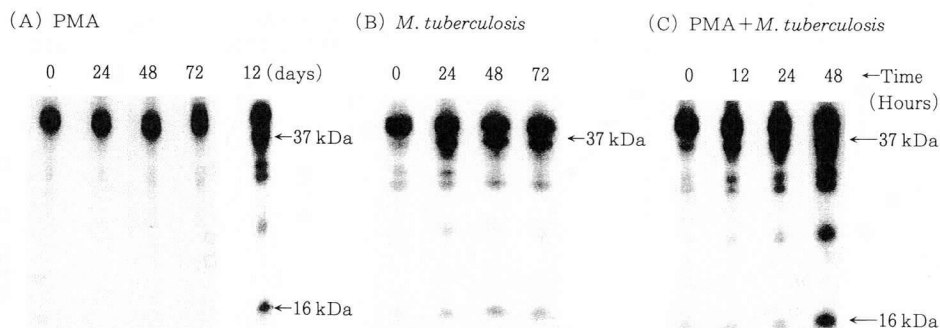


Fig. 8 C/EBP β Expression in THP-1 cells. (A) PMA. C/EBP β expression was unchanged over 72 hr but at 12 days both 37 kDa and 16 kDa isoforms were induced on immunoblots with polyclonal anti-C/EBP β antibody. (B) *M. tuberculosis* H37Ra. *M. tuberculosis* induced only a 37 kDa C/EBP isoform over 72 hr. (C) PMA and *M. tuberculosis* H37Ra. The combination of PMA and H37Ra induced both 37 kDa and 16 kDa C/EBP β isoforms over 48 hr.

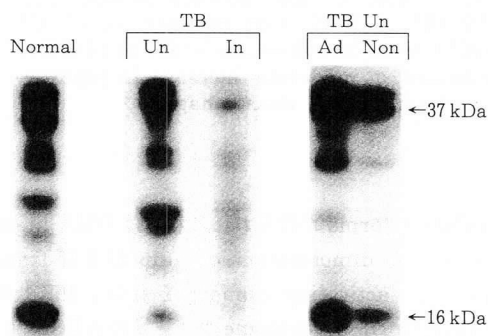


Fig. 9 C/EBP β Expression in Bronchoalveolar Lavage (BAL) Cells. BAL cells from a normal control revealed marked spontaneous expression of 37 and 16 kDa C/EBP β isoforms in a Western blot with anti-C/EBP β polyclonal antibody. BAL cells from a HIV-1 negative patient with pulmonary tuberculosis revealed both C/EBP β isoforms in the radiographically uninvolved lobe (Un) but only slight expression of the 37 kDa isoform and no expression of the 16 kDa isoform in the radiographically involved lobe (In). BAL cells from an uninvolved lobe of a HIV-1 positive patient with pulmonary tuberculosis demonstrated marked enrichment of 37 kDa and 16 kDa isoforms in adherent cells (Ad) compared to non-adherent cells (Non).

全く同様なパターンである。ところが、結核感染肺からの細胞ではすべての C/EBP β isoform の発現が非常に弱くなっている (Fig. 9)。このことは、HIV 合併結核でも非合併結核でも傾向は変わらなかった。また、気管支肺胞洗浄液細胞を付着性と非付着性細胞に分けて発現を観ると、付着性細胞にほとんどの発現があったことから、C/EBP β は肺胞マクロファージ由来と考えられた。

以上のことから、結核非病巣部の BAL 細胞に発現している C/EBP β short form (16kDa) が HIV-LTR の negative regulatory element (NRE) に結合し、HIV-1 の転写を抑制するという機序が想定されるが、このことを証明するために、結核病巣部と非病巣部の細胞から蛋白を抽出し、NRE 特異的な oligonucleotide プローブを用いて Electromobility shift assay (EMSA) を行った。結核病巣部の細胞では、NRE と蛋白の明らかな複合体の形成は認められなかったが、結核非病巣部の細胞では、明らかな複合体の形成を示すバンドを認め、このバンドは C/EBP β 特異的な抗体の添加で super shift をしたこと、NRE と複合体を形成している蛋白は確かに C/EBP β であることが証明された (Fig. 10)。以上のことから、結核病巣部では、C/EBP β による抑制が何らかの機序により解除されており、そのために HIV 産生が亢進していることが予測された。

AIDS に合併する結核の臨床像

肺病変は全 HIV-結核合併例の 75% にみられるが、肺外病変の頻度も高い。わが国の症例では、全体の 57

pattern に非常によく似ており、16kDa の C/EBP β isoform が発現している。胸部 X 線上結核非感染肺からの気管支肺胞洗浄液細胞に発現している isoform も

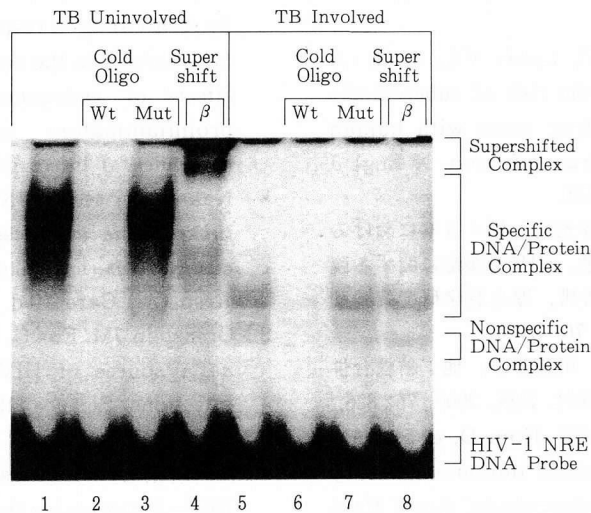


Fig. 10 C/EBP β in BAL cells from Pulmonary Tuberculosis. Binding to the HIV-1 LTR Negative Regulatory Element (NRE). Electromobility shift assays were performed with 25 bp of the HIV-1 LTR containing the NRE. Lane 1 demonstrates a specific C/EBP NRE/protein complex in an uninvolved lobe (TB Uninvolved) that is competed effectively with 100-fold excess unlabeled NRE probe (lane 2) but not 100-fold excess unlabeled mutant probe (lane 3). Anti-C/EBP β antibody supershifts the complex (lane 4). TB involved lobes demonstrate a faster migrating specific NRE/protein complex (lane 5) that is competed effectively with 100-fold excess unlabeled NRE probe (lane 6) but not 100-fold excess unlabeled mutant probe (lane 7). Anti-C/EBP β antibody does not supershift the complex (lane 8).

％にみられ、一般の肺結核症例の頻度14％に比べて著しく高い。全身播種も22％に報告されている。胸部X線像では、最も多いのは肺門、縦隔リンパ節腫大で、70％以上にみられる。これに対し、空洞は18％にすぎない。浸潤影は肺尖部や上葉に25％、下葉に10％あり、びまん性および粟粒影はそれぞれ7％にみられる。

しかしながら、こうした病像は患者の免疫低下の程度に大きく左右される。CD4数が300/ μ l以上の比較的免疫能が保たれた結核の病像はX線上肺野に浸潤と空洞を呈するような典型例が多い。これに対して、CD4数が300/ μ l以下のAIDSに合併する結核の病像は多彩である。このような症例では、肺門および縦隔リンパ節の腫脹が頻繁にみられる (Fig. 11)。こうしたリンパ節の病理組織像では、多数のマクロファージの浸潤が観察されるが、結核病巣に特徴的な乾酪壊死や類上皮細胞や巨細胞形成がみられない。しかしながら、チールニールセン染色では夥しい数の結核菌が検出される。このように、AIDSに合併する結核では、通常みられる結核性肉芽腫のラメラ構造の構築がなく、それがゆえに菌を局所に封じ込めることができなくて、血行性、リンパ行性

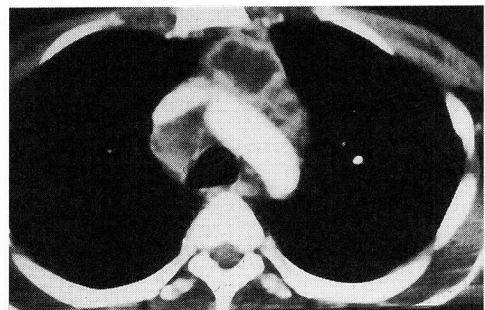


Fig. 11 A typical extrapulmonary tuberculosis in a patient coinfected with HIV and tuberculosis. The chest CT scan reveals rim enhancement of the mediastinal lymph nodes with central necrosis.

に菌が播種し、重症化しやすいのではないかとと思われる。

文 献

- 1) Garay S: Tuberculosis and the human im-

- munodeficiency virus infection. In: Tuberculosis, Little, Boston, and Co., Boston, 1996. 443-466.
- 2) Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, et al.: A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1989; 320: 545-550.
 - 3) 森 亨, 川辺芳子, 坂谷光則, 他: 日本における HIV 感染抗酸菌症の実態, HIV 感染症に関する臨床研究. 平成11年度報告書, 厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業. 76-84.
 - 4) 永井英明, 赤川志のぶ, 川辺芳子, 他: 結核合併 HIV 感染症例の予後の検討. *結核*. 2000; 75: 326.
 - 5) Whalen C, Horsburg CR, Hom D, et al.: Accelerated course of human immunodeficiency virus infection after tuberculosis. *Am J Resp Crit Care Med*. 1995; 151: 129-135.
 - 6) Zhang Y, Nakata K, Weiden M, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* enhances HIV-1 replication by transcriptional activation at the long terminal repeat. *J Clin Invest*. 1995; 95: 2324-2331.
 - 7) Goletti DD, Weissman D, Jackson R, et al.: The *in vitro* induction of human immunodeficiency virus (HIV) replication in purified protein derivative-positive HIV-infected persons by recall antigen response to *Mycobacterium tuberculosis* is the result of a balance of the effects of endogenous interleukin-2 and proinflammatory and antiinflammatory cytokines. *J Infect Dis*. 1998; 177: 1332.
 - 8) Nakata K, Rom WN, Honda Y, et al.: *M. tuberculosis* enhances human immunodeficiency virus-1 replication in the lung. *Am J Resp Crit Care Med*. 1997; 155: 996.
 - 9) Orenstein JM, Fox C, Whal SM: Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science*. 1997; 276: 1857.
 - 10) Honda Y, Rogers L, Nakata K, et al.: Type I interferon induces inhibitory 16 kDa C/EBP- β repressing the HIV-1 LTR in macrophages: pulmonary tuberculosis alters C/EBP expression enhancing HIV-1 replication. *J Exp Med*. 1998; 188: 1255.
 - 11) Ossipow V, Descombes P, Schibler U: CCAAT/enhance-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 8219-8223.

第75回総会シンポジウム

Ⅲ. 細胞内寄生菌の感染機序と免疫防御

座長 光山 正雄 (京都大学大学院医学研究科微生物感染症学)
鈴木 克洋 (近畿中央病院内科)

The 75th Annual Meeting Symposium

Ⅲ. MECHANISMS OF PATHOGENICITY AND HOST DEFENSE IN INFECTIONS
BY INTRACELLULAR PARASITIC MICROBES

Chairpersons: ¹*Masao MITSUYAMA
²Katsuhiro SUZUKI

¹*Department of Microbiology, Kyoto University Graduate School of Medicine,
²Kinki Chuo Hospital

Mycobacterium tuberculosis is one of the intracellular parasitic bacteria escaping the intracellular killing inside macrophages. The aim of this symposium was to get some insight into the mechanism of pathogenicity and host defense in *M. tuberculosis* infection, which has not yet been elucidated well, by the presentation of up-to-date knowledge on these aspect in infection with different intracellular parasitic microbes.

Dr. Yoshikai (Nagoya Univ.) indicated that TLR is involved in the initial response of host against *S. choleraesuis*. Among the cytokines contributing to the induction of specific immunity, the importance of IL-15 was emphasized, based on their own experimental data using IL-15 transgenic mice and the application of anti-IL-15 antibody *in vivo*.

Dr. Yoshida (Kyushu Univ.) reviewed the mechanisms of intracellular growth of *Legionellae*. Several genes so far identified as essential genes in intra-macrophage growth appeared to be similar to those encoding type 3 secretion system observed in *Shigellae*. There is a significant strain difference in the growth of *L. pneumophila* inside macrophages and such difference seemed to be under the control of a gene at chromosome 13, *Lgn1*. The investigation of difference in the mode of escape among various *Legionella* spp. may provide a novel mechanism in bacterial invasion and escape.

Dr. Kawamura (Kyoto Univ.) summarized some new reports on the molecular mechanism of the inhibition of P-L fusion by *M. tuberculosis*. He emphasized the importance of the alteration in phagosomal maturation as indicated by the accumulation of TACO protein. The possible involvement of TLR in the recognition of *Mycobacterial* cells and its LAM was discussed.

*〒606-8501 京都府京都市左京区吉田近衛町

* Yoshida Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto
606-8501 Japan.
(Received 21 Jun. 2000)

Dr. Kawakami (Ryukyu Univ.) first discussed the possibility that *Cryptococcus neoformans*, a fungal pathogen, could be regarded as one of the intracellular parasitic microbes. His presentation mainly focused on the TH1-TH2 balance in the expression of host defense against *C. neoformans* in mice. From their experimental infection using attenuated strain TC-13 in various cytokine-knock out mice, the pivotal role of both IL-12 and IL-18 was clearly indicated.

Key words : Intracellular parasitic bacteria, *Salmonella*, *Legionella*, *Mycobacteria*, *Cryptococcus*

キーワード：細胞内寄生菌，サルモネラ，レジオネラ，抗酸菌，クリプトコッカス

結核菌は代表的な細胞内寄生菌であり、マクロファージ内では phagosome-lysosome fusion を阻害して殺菌を免れ生存増殖することができる。結核菌の病原性は、主として細胞内殺菌からのエスケープ能と抗酸菌細胞壁特有の各種糖脂質のサイトカイン誘導能に依存するが、抗酸菌が宿主マクロファージ内で殺菌をエスケープする因子の分子遺伝学的解明は進んでいない。一方、結核菌以外の各種細胞内寄生菌のうち、リステリアについてはそのエスケープ機構が分子・遺伝子レベルで詳細に解明され、その他の菌についても徐々に解析が進んでいる。各種細胞内寄生菌は、分類細菌学的には極めて異なった位置にあるが、エスケープの戦略は類似しているため、他菌種の細胞内寄生の機構や免疫応答についての研究の現状を知ることにより、今後の抗酸菌感染機構の解明に何らかの示唆が得られるものと考えられる。そこで本シンポジウムではテーマを抗酸菌に限らずその他の細胞内寄生菌も含めて講演をお願いし、理解を深めることを目的とした。

1. サルモネラに対する早期感染防御機構

吉開泰信 (名大・医・病態研)

1) マクロファージの細菌認識レセプターの1つとしてTLRファミリーがあげられる。TLR-4はLPSシグナル伝達に重要であり、TLR-2はLPS以外にもグラム陽性細菌のタイロコ酸や結核菌のペプチドグリカンに結合する。われわれはマウスのTLR-2がマクロファージのみならず、 $\gamma\delta$ 型T細胞、腸管上皮間T細胞、NKT細胞にも発現していることを見出した。これらの細胞はTCR非依存性にlipid Aに反応してINF- γ を産生した。サルモネラ感染防御においてこれら早期誘導免疫を担う細胞群はTCRのみならず、TLR-2を介するシグナルで活性化されると考えられる。

2) 早期誘導免疫に関与するサイトカインとして、

IL-15があげられる。IL-15はIL-2とIL-2R $\beta/\gamma c$ をレセプターとして共有するサイトカインでマクロファージから産生され、NK、 $\gamma\delta$ T細胞、NKT細胞、上皮系Tリンパ球の分化増殖因子として働く。サルモネラ弱毒株(*S. choleraesuis* 31N-1)感染では、感染早期に感染局所でマクロファージからのIL-15の産生とNK、NKT細胞さらに $\gamma\delta$ 型T細胞の増加が認められた。抗IL-15抗体前投与による内因性IL-15の中和により、サルモネラ感染後のNK、NKT細胞と $\gamma\delta$ 型T細胞の増加が抑制された。さらに、血中のINF- γ レベルの低下とともに菌の排除が阻害された。一方、われわれが作成したIL-15トランスジェニック(Tg)マウスでは、サルモネラ弱毒株に対して強い抵抗性を示した。このマウスでNK細胞とメモリーCD8T細胞の増加が著しく、さらにサルモネラ特異的CD4Th1細胞の産生増加が認められた。抗CD8抗体投与によるCD8T細胞の消去はIL-15 Tgマウスの感染抵抗性を減弱させることから、CD8T細胞が早期感染免疫を担っていることが明らかとなった。感染後増加してくるCD8T細胞ポリクローナルであり、サルモネラ抗原特異性は認められず、*in vitro*のIL-15またはIL-2の刺激でINF- γ を産生した。メモリーCD8T細胞は内因性のIL-15やIL-2によってby standerに活性化されると考えられる。

3) サルモネラの早期感染防御を担う細胞群としてNK、NKT、 $\gamma\delta$ T細胞に加えてメモリータイプCD8T細胞が考えられる。これらの細胞群はサルモネラ感染防御機構において、自然免疫と適応免疫のギャップを埋めるのみならず、INF- γ などを介してサルモネラ特異的CD4Th1細胞の誘導に重要な役割を担っていると考えられる。またNKレセプターやTCRに加えてTLRファミリーもこれら細胞群のサルモネラ認識に関与していると推定される。

2. レジオネラのマクロファージ内増殖機構と宿主防御

吉田真一 (九大・医・細菌学)

1) *L. pneumophila* (Lp) はヒトの単球、マクロファージ (Mφ) 系細胞、自由生活アメーバ、絨毛虫に貪食され、あるいは上皮系細胞に侵入して増殖することができる。Lp は補体やオプソニン抗体を介して Mφ に貪食されるか coiling phagocytosis と称される様式で取り込まれることがある。取り込まれた細菌は食胞内の pH 低下を抑制しリソソームとの融合を阻害する。一方小胞の融合は、ミトコンドリアの接近、食胞膜へのリボソームの付着がおこる。本菌は食胞内にとどまって増殖し Mφ を殺して細胞外へ出るがそのときは鞭毛が形成され細胞への感染力も強くなっている。Mφ 内増殖能が脱落したトランスポゾン挿入変異株の遺伝子解析から *icm* (intracellular multiplication) や *dot* (defect in organelle trafficking) などの遺伝子群が同定されている。それらの遺伝子の大部分は、*S. sonnei* が接合の際にプラスミド DNA を伝達するのに使う secretion system のタンパクをコードする遺伝子群や *C. burunetii* の遺伝子と相同性がある。また、Lp が Mφ 内で増殖するのに必要な遺伝子群の大半がアメーバ内増殖に必要な遺伝子群であり、Mφ 内増殖能は哺乳類出現のはるか以前アメーバと出会ったときに獲得したものと考えられる。アメーバ内で増殖した Lp は Mφ 感染性・増殖能が高まるとの報告がある。

2) Lp に対する生体防御は細胞性免疫であり IFN-γ により活性化された Mφ に依存する。活性化 Mφ では菌を取り込んだ食胞とリソソームとの融合能が出現して殺菌力が亢進し、また transferrin receptor の down regulation により Mφ 内の鉄イオンを減少させることにより菌の増殖が抑制される。老化マウスは IFN-γ の産生が低下し個体レベルの抵抗性が減弱する。抗体は活性化 Mφ 出現後にはオプソニン抗体として生体防御に機能する。実験動物の Mφ が Lp の細胞内増殖を許すか否かに関しては Mφ 側に種差系統差があり、モルモット、ハムスター、ラットの Mφ は増殖を許すがマウスでは A/J 系以外の多くの系統の Mφ は増殖を許さない、われわれはこのマウスの系統差が 13 番目の染色体上にある一遺伝子に支配されていることを見出しその遺伝子を *Lgn1* と名づけた。この遺伝子産物が間もなく明らかにされようとしている。

3) ヒトから分離されたレジオネラ属 20 菌種の比較研究ではその細胞内増殖様式は多様であり Lp はむしろ例外的である場合もある。系統を問わずマウスの Mφ 内で増殖できるレジオネラ属菌は *L. bozemanii*, *L. micdadei* など 20 菌種中 11 菌種もあり、しかも Mφ 側の

菌の増殖を制御する遺伝子 *Lgn1* に支配されるのは 20 菌種中 Lp と *L. jordanis* のみであった。Lp の食胞にはリボソームが配列するが、多くの菌種は食胞に粗面小胞体が接近するタイプである。Lp は Mφ の食胞内にとどまって増殖するが、*L. dumoffii* や *L. feelii* など細胞質にエスケープする菌もある。*L. pneumophila* の上皮系細胞への侵入性は弱いながら *L. dumoffii* の侵入性は強くしかも receptor-mediated endocytosis で侵入する。これらレジオネラ属菌が示す多様な現象の研究は細胞内寄生菌の新しい細胞内侵入・増殖機序を見出す可能性がある。

3. 抗酸菌のエスケープ機構と宿主免疫応答

河村伊久雄 (京大・医・微生物感染症学)

結核菌や日和見感染を起こす非定型抗酸菌は生体内では細胞内寄生性を示し、マクロファージによる殺菌に強く抵抗する。この抵抗性のメカニズムとして活性酸素の産生抑制と消去、ファゴソーム内 pH 低下の抑制、inflammatory cytokine の産生抑制、あるいは P-L fusion の抑制などがある。菌のこのようなエスケープ機構に関与するいくつかの因子がすでに報告されているが、最も重要な因子は細胞壁の主要成分であるリポアラビノマンナン (LAM) である。LAM は活性酸素の産生抑制やそのスカベンジャーとして、または inflammatory cytokine 産生の modulation など様々な機序を介して菌の殺菌抵抗性に関与することが知られている。最近 BCG を取り込んだファゴソームの周りに宿主由来の tryptophane aspartate-containing coat protein (TACO) が集積し、P-L fusion を阻害することが報告されている。TACO を動員するための菌側の因子は今のところ不明であるが、その因子が殺菌抵抗性の発現において非常に重要な役割を果たしていることは間違いないであろう。一方、抗酸菌に対する宿主防御免疫の主体は細胞性免疫であり、その発現は感作 T 細胞が産生するサイトカインによるマクロファージの感染局所への動員と活性化による。防御免疫の中心は CD4⁺ T 細胞であるが、サイトカイン産生能を有する細胞障害性 CD8⁺ T 細胞や、感染早期には γδ T 細胞が防御免疫の発現に関与することが示されている。また、菌体抗原が CD1 分子を介して αβ 型 CD4⁺ CD8⁻ T に提示されることが報告されており、この細胞も宿主免疫応答に関与していると考えられる。これらの細胞がそれぞれの機能を発揮し、お互いに協調することが、抗酸菌に対する感染防御には必要である。一方、これらの細胞が組織障害にどの程度関与するかを明らかにすることも結核の病態を考える上で重要なポイントである。また最近、

LPS レセプターとして同定された Toll-like receptor (TLR) のうち、TLR2 がファゴゾームの周囲に早期に動員されることや、TLR2 が抗酸菌刺激に対してシグナル伝達できることが報告されている。これは抗酸菌に対する初期防御反応、あるいは感染防御免疫の誘導にこのレセプターが関与する可能性を示すものである。また、マウスを用いた実験感染モデルでは、結核に対する新たな予防手段としての DNA ワクチンの有効性が示されており、ECG に代わりうるワクチンとしての効果が期待されている。

4. クリプトコッカス感染防御における

Th1-Th2 バランスとその制御

川上和義 (琉球大・医・一内)

クリプトコッカス *Cryptococcus neoformans* (Cn) は酵母様真菌であり、多くはエイズなどの細胞性免疫低下患者に致死性の髄膜炎を発症することで問題になる。Cn は元来細胞外増殖菌と考えられているが、近年、本真菌が細胞内でも増殖しうることや、Cn が食細胞内での P-L fusion は抑制しないものの phagosome 内の酸性環境に抵抗性を示すことが明らかにされている。Cn に対する生体防御は主として細胞性免疫によって担われることが知られており、一部の報告を除き液性免疫や好中球による防御機構はほとんど無効と考えられている。われわれは、Cn を経気管的にマウスに接種することにより肺クリプトコッカス症モデルを作製しその感染防御機構について解析を行ってきた。弱毒株 (YC-1) を CD4 遺伝子欠損 (KO) マウスに接種すると、CD4 抗体を用いた従来の報告と異なり、肺内生菌数は野生型マウスとの間に差を認めなかった。これは、CD8⁺ T 細胞、DNT 細胞などが CD4⁺ T 細胞の機能を代償している可能性が考えられる。一方、Th1 サイトカインの役割を解析するために、YC-13 を IFN- γ KO (GKO) マウスに接種したところ感染の明らかな悪化が観察され、IFN- γ の重要性が再認識された。Th1 細胞

の分化誘導には IL-12 が重要であり、さらに IL-18 によって IL-12 の作用が著明に増強されることが報告されている。われわれは IL-12p40KO, IL-18KO そして IL-12p40/DKO, IL-18KO (DKO) マウスに YC-13 を感染させたところ、DKO, IL-12p40KO, IL-18KO マウスの順に感染の悪化が認められた。また、DKO マウスでは GKO マウスと同程度であった。従って、IL-12 と IL-18 はともに Cn 感染防御に重要であることが明らかになった。次に、IL-18 の作用機序として、Cn 特異的 Th1 細胞の分化誘導における役割について検討した。YC-13 で感作された IL-12p40KO マウスの細胞を抗原で再刺激して産生される IFN- γ を測定したところ、全く産生がみられず、また感作の時点で IL-18 を追加投与しても同様であった。しかし、IL-12 投与では明らかな Th1 細胞の誘導が観察された。一方、IL-18KO マウスについても同様の解析を行ったところ、脾細胞の再刺激により少量の IFN- γ 産生がみられ、IL-12 の追加投与でもわずかに産生が増強されるのみであった。IL-18 投与では、野生型マウス由来脾細胞と同程度の IFN- γ 産生がみられた。以上の結果から、Cn 感染においても Th1 細胞の分化誘導には IL-12 が必須であり、IL-18 単独では Th1 細胞を誘導できず、むしろ IL-12 の作用を増強するように働くことが明らかになった。

一方、致死性の感染を起こす強毒株 (YC-11) を用いた研究では、感染局所において Th1-Th2 バランスが Th2 側にシフトしており、IL-12 を投与することでバランスが Th1 側に是正されマウスは致死性の感染から免れることができた。また IL-4 は IL-12/IL-18 投与によって Th1-Th2 バランスが Th1 側へ是正されるのを解除し感染を再び悪化させる方向に働いた。さらに興味深いことには、Cn 自身がマクロファージからの IL-12 産生を抑制することで Th1-Th2 バランスを自己の生存に有利な方向に修飾している可能性を示す実験結果も得ている。

ピラジナミド感受性試験法の提案

平成12年 8月

日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会

ピラジナミド (PZA) は主要な抗結核薬の1つであり、半休止期の結核菌に殺菌的に働く薬剤である¹⁾。わが国では世界各国から数年遅れた1996年にPZAを含む6カ月の短期化学療法が標準治療法に加えられた²⁾。近年PZA耐性菌の出現が報告されているが、かかる場合は治療期間をさらに3~6カ月延長する必要がある。従って、PZAに感受性であるか否かを知ることは適切な治療のために重要である。PZAの最小発育阻止濃度 (MIC) は測定に用いる培地のpHにより大きく左右されることもあって、これまで標準となる感受性試験法は確立されていなかった。

治療により出現したPZA耐性結核菌はピラジナミダーゼ (PZase) 活性を欠くこと、また通常PZase活性の消失とPZA耐性発現の間に相関が見られることが明らかになった^{3)~6)}。PZaseの役割は、細菌細胞内でPZAを殺菌活性を持つピラジノ酸 (pyrazinoic acid) に変えることにあり、PZA耐性結核菌や *Mycobacterium bovis* (subtype *bovis*) はPZase活性を欠くためPZAに耐性を示すと考えられている。日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会では、PZA感受性の判定法としてピラジナミダーゼ試験の導入を考え、Wayneの方法を用いて検討を重ねてきた⁷⁾⁸⁾。その結果本法は再現性に優れていることが分かり、委員会ではPZA感受性試験法としてWayneにより開発されたピラジナミダーゼ試験を提案することにした。ただし、この試験の感度はあまり高くなく、結核菌集団の中に占める耐性菌の割合を知ることができないことなどの不十分な点もあることから、今後より優れた試験法が開発された場合にはなお検討の余地がある。

1. 試験培地

ミドルブルック 7H11 寒天培地粉末 1.9 g (BBL) または 2.1 g (Difco) にグリセリン 0.5 ml 加蒸留水 100 ml を加え、加熱溶解する。これにピラジナミド 10 mg とビルビン酸ナトリウム 200 mg を加え混和・溶解後、スクリュウキャップ付小試験管 (16×125 mm) に 5 ml ずつ分注、キャップを緩め 121℃ で 15 分間高压蒸気滅菌する。滅菌後キャップを締め、試験管立てに立て、固まらせる (斜面にしない)。4℃ に保存したとき 6 カ月間使用可能である。

2. 試験法

固形培地培養のできるだけ若い培養菌 (2~3 週) を接種菌として用いる。大量の菌 (山盛り 1~2 白金耳量) を試験培地の表面に広げて接種し、37℃ で培養する。培養 4 日目に使用直前に調製した 1% 硫酸鉄 (II) アンモニウム溶液を 1 ml 加え、室温に 30 分間放置、寒天表面に現れるピンクないし茶褐色のバンドを観察する。バンドが見られない陰性試験管は 4℃ に 4 時間放置後に再度判定する。色調は室内灯落下光線のもとで後ろに白色の紙などを置いて観察すると検出が容易である。

3. 結果の判定

寒天培地表層にピンクないし褐色のバンドが見られた場合を陽性、見られない場合を陰性と判定する。また陽性が陰性かの判定が困難な例は±と判定し、その場合は再試験する。

4. PZA 感受性の判定と記録

ピラジナミダーゼ試験陽性例は PZA 感受性、陰性例は PZA 耐性とする。

留意点

- ①試験培地への OADC 添加の有無は結果に影響しない。
- ②菌接種前に寒天培地の表面に滅菌蒸留水を 1 滴 (50~100 μ l) 滴下することにより菌接種が容易に行える。
- ③判定し難い場合は 4℃ に保存し翌日判定する。陽性試験管では前日表面に検出された着色が培地の中に拡散して見える。
- ④鑑別・同定の目的で使用する場合、培養 4 日目の成績が陰性の場合は培養 7 日目に判定することになっているが、この試験の目的は感受性を知ることであり培養 4 日目に判定する。

〔文 献〕

- 1) Heifets L, Lindholm-Levy P: Pyrazinamide sterilizing activity in vitro against semi-dormant *Mycobacterium tuberculosis* bacterial populations. Am Rev Respir Dis. 1992; 145: 1223-1225.
- 2) 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課: 結核医療の基準とその解説. 結核予防会, 東京, 1996.
- 3) Konno K, Feldmann FM, McDermott W: Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. Am Rev Respir Dis. 1967; 95: 461-469.
- 4) McClatchy JK, Tsang AY, Cernich MS: Use of pyrazinamidase activity in *Mycobacterium tuberculosis* as a rapid method for determination of pyrazinamide susceptibility. Antimicrob Agents Chemother. 1981; 20: 556-557.
- 5) Trivedi SS, Desai SG: Pyrazinamidase activity of *Mycobacterium tuberculosis*—a test of sensitivity to pyrazinamide. Tubercle. 1987; 68: 221-224.
- 6) Butler WR, Kilburn JO: Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide and its relationship to pyrazinamide activity. Antimicrob Agents Chemother. 1983; 24: 600-601.
- 7) Wayne LG: Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. Am Rev Respir Dis. 1974; 109: 147-151.
- 8) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会: 新結核菌検査指針. 結核予防会, 東京, 2000.

日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会

委員長	阿部千代治					
副委員長	河原 伸					
委員	飯沼	由嗣	一山	智	大泉耕太郎	
	尾形	英雄	鎌田	有珠	古賀 宏延	
	斎藤	肇	鈴木	克洋	本田 芳宏	
	森	亨	矢守	貞昭	和田 光一	