

抗酸菌免疫研究の動向1997-2005

編集 岩井 和郎 菅原 勇
 執筆 前田 伸司 御手洗 聡 菅原 勇
 山田 博之 原田 登之 樋口 一恵
 岩井 和郎 和田 雅子

編集者からの言葉：最近の医学では分子生物学的研究の発展が目覚ましく、結核研究の基礎研究領域でも生物学的観察から、より深い知識が加えられての理解をなしうようになってきた。ことに結核菌の全ゲノム配列が明らかにされた1998年を境にして、結核研究は現象論や断片的遺伝子研究から、全遺伝子地図を基礎に置いての遺伝子機能の研究が進められるようになり、質的に大きな転換を始めたといえる。

私たちは抗酸菌症の免疫に関する外国文献の網羅的検索と、その中で関心を引かれた文献の抄読会での紹介、年単位でのその抄読会記録のまとめ（結核予防会発行「資料と展望」掲載）を10年来続けてきたが、今回その全体のまとめを、各領域別に研究者が分担することで行うこととした。もちろん、すべての文献を網羅したものではないとしても、抗酸菌免疫研究の流れを俯瞰することは可能ではないかと考えて、領域別にまとめてみたのが本稿である。その際、純粋な基礎的立場ではなく臨床的関心からみた基礎文献の整理を行い、その課題に従って展望することを心掛けた。これから始めようという研究者のために、免疫学の教科書にはまだあまり収録されていないと思われる知見を紹介することが目的の一つである。また、文献はすべて英文誌に掲載されたもので、必要な場合にはその原著を参照できるよう、紹介されたすべての文献を各章末に掲載した。

目 次

A. 菌側からみた研究

A-1：抗酸菌全ゲノム配列・分類・系統樹

(1) 結核菌 (2) ウシ型結核菌 (3) その他の抗酸菌

A-2：結核菌群の分類・新亜種

(1) 結核菌群の分類・タイピング (2) 結核菌群の新種 (3) 結核菌群の系統発生 (4) 非結核性抗酸菌群の分類 (附) 抗酸菌ファージを用いた新診断法

A-3：抗酸菌特異抗原とそのT細胞エピトープ

(1) 抗原85 (2) ESAT-6およびCFP-10 (3) リポタンパク質とToll-like receptor (TLR) (4) PE/PE₃ PGRSファミリータンパク (5) 結核菌糖脂質抗原とCD1レセプター (6) その他のT細胞エピトープ

A-4：結核菌の毒力関連遺伝子

(1) RD1 (2) 代謝調節関連遺伝子 (3) 酸化的殺菌への拮抗因子 (4) 細胞壁脂質関連物質 (5) 宿主主要因関連

A-5：休眠結核菌関連遺伝子

A-6：結核ワクチンの開発・改良

(1) 結核ワクチンの種類 (2) 結核ワクチンに対する免疫応答 (3) 結核ワクチン予防効果の改良 (4) 結核ワクチンの治療効果 (5) その他の結核菌抗原によるワクチン探索

A-7：薬剤耐性遺伝子など

(1) 薬剤耐性を調べる新しい技法 (2) RFPの抗菌性以外の作用 (3) 多剤耐性遺伝子の研究 (4) 薬剤耐性と毒力

B. 生体側からの研究

B-1: 菌と貪食細胞の付着, TLRs

- (1) マンノース受容体 (2) 表面活性タンパク質
(3) その他の分子 (4) Toll-like receptors

B-2: 貪食細胞内での菌と宿主細胞の相互作用

- (1) ファゴソーム-ライソソーム融合 (P-L fusion) の阻害 (2) ファゴソーム膜の透過性 (3) P-L fusion 後の殺菌機構 (4) Autophagyによる殺菌機構

B-3: 細胞・核内シグナル伝達系の解明

- (1) 結核感染とTLRを介するシグナル伝達系 (2) 結核菌体成分とサイトカインによる細胞内シグナル伝達系活性化 (3) シグナル伝達分子

B-4: 抗酸菌感染における細胞内殺菌活性とアポトーシス

- (1) 殺菌因子 (2) 抗殺菌因子 (3) アポトーシス

B-5: 各種サイトカイン, ケモカインと結核症での役割

- (1) 細胞性免疫抑制性サイトカイン (2) 細胞性免疫誘導性サイトカイン (3) IFN- γ , TNF- α (4) ケモカイン, その他のサイトカイン, 免疫調節因子

B-6: 抗酸菌免疫における各種免疫担当細胞の役割

- (1) 結核性病変の病理発生 (2) CD4⁺T細胞 (3) CD8⁺T細胞: 脂質抗原認識と特有の殺菌機構 (4) $\gamma\delta$ T細胞 (5) NK細胞 (6) NKT細胞 (7) 調節性T細胞 (Treg) (8) Th1/Th2バランス: 気道感染症かアレルギー性過敏反応か (9) 樹状細胞 (10) 好中球, 好酸球, 好塩基球

B-7: ヒトの発病素因

- (1) 結核感受性遺伝子 (2) HIVと結核感染 (3) 非結核性抗酸菌症での免疫

A. 菌側からみた研究

A-1 抗酸菌全ゲノム配列・分類・系統樹

要約: 結核菌の全遺伝子配列が解明され, 各遺伝子が番号で示されたのは1998年であり, 続いてレブラ菌が2001年に, ウシ型結核菌が2003年に明らかにされた。非結核性抗酸菌では一部が解明されているが, 多くはなお進行中である。

A-1 (1) 結核菌

1998年 S.T. Coleらによって報告された結核菌 H37Rv株の全ゲノム塩基配列は, 抗酸菌属では最初の報告である¹⁾。このH37Rv株は, 薬剤感受性株であり, 遺伝子操作等も可能で, 動物モデルで毒力を保持していることなどから, 結核菌の標準株の一つとして生物学的な研究のため世界的に広く使われている。この報告では, 結核菌 H37Rv株ゲノムは, 4,411,529塩基対 (約4.4 Mbp) からなり, 約4000個の遺伝子を含み, Guanine+Cytosine含量 (65.6%) が非常に高いとされている。このデータは, 現在も更新され <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/> 上で公開されており, 広く利用することができる。結核菌は他の細菌と異なり, 脂質生成や脂質分解に関わる酵素をコードする遺伝子を多くもっているのが特徴である。また, 抗原性の多様性と関連する PE/PPEファミリーの遺伝子群は, ゲノム全体の約9%を占めていた。

続いて, 結核菌 CDC 1551株のゲノム解析結果が報告され, 結核菌内での多様性も明らかにされている²⁾。H37Rvは動物モデルで病原性があるのに対して, 結核菌 CDC 1551株はヒトに対して高い病原性をもった株とし

て分離されたもので, それぞれ異なった目的のために研究に利用されている。

A-1 (2) ウシ型結核菌

ヒト型結核菌のゲノム解読に続いて *Mycobacterium bovis* AF2122/97株の全ゲノム塩基配列が2003年に解読された³⁾。このゲノムは, 4,345,492塩基対からなり結核菌よりも少し短い, 相同性は99.95%以上である。細胞壁の構成物質や分泌タンパク質, 抗原および代謝経路等に相違はあるが, *M. bovis*に特異的な遺伝子は存在していない。このゲノム解析結果は, ウシ結核の分子病理メカニズムの解明に貢献するものと考えられる。また, *M. bovis* BCGとのゲノム構造の比較から, 病原性因子の解析あるいは免疫原性の高い改良型ワクチンの開発等に寄与する可能性がある。

A-1 (3) その他の抗酸菌

ハンセン病の原因菌であり, 未だに人工培地での培養ができない *M. leprae* TN株は2001年に, およびウシなどの反芻動物にヨーネ病を起こし, ヒトのクローン氏病との関連が問題とされている *M. avium* subsp. *para-*

tuberculosis K-10株の全ゲノム塩基配列が2005年に報告されている⁴⁾⁵⁾。*M. leprae*では、約3.3 Mbpのゲノムサイズをもち、GC含量も57.8%と抗酸菌の中では低い。また、全遺伝子の41.2%に相当する1133個の偽遺伝子が存在した。非病原性迅速増殖菌である *M. smegmatis* mc² 155株の全ゲノム塩基配列も報告されている⁶⁾が、この

株は、迅速発育菌であることから、特にプラスミドの導入実験や遺伝子破壊など抗酸菌を宿主とした組み換えDNA実験などに使われている。また、遅発育性非結核性抗酸菌の代表的菌種である *M. avium* 104株についても、最近その全ゲノム配列が明らかにされた⁷⁾。

(担当：前田伸司)

A-2 結核菌群の分類・新亜種

要約：解明された各種抗酸菌の遺伝子地図を基に、その遺伝子配列の差による抗酸菌分類の再検討や、抗酸菌の系統樹の探求などがなされて、研究は大きく様変わりしつつある。

A-2 (1) 結核菌群の分類・タイピング

一般に臨床検体にはPCR反応を阻害する物質が含まれていることが多く、PCR検査が陰性になることが多い。そこで、検体中の標的配列を含むDNAをcaptureし精製した後にDNAを増幅させるsequence capture-PCR法が開発された⁸⁾。この方法を用いると菌含量が少ない臨床材料中の結核菌DNAの検出感度を改善することができるとされている。一方、PCR法は、結核菌DNAの検出だけでなく、結核菌群の亜種分類に応用可能とする報告がある。一つは、ゲノム欠損を基盤とした結核菌群の分類法で16S rRNA, Rv0577, Rv1510, Rv1970, Rv3877/8, Rv3120遺伝子および挿入配列 (IS) 1561内にプライマーを設計し、合計7カ所について別々に並行してPCRをかけてPCR産物を観察し、検体ゲノム上にこれら遺伝子の有無を調べることによって、結核菌群の鑑別が可能であると報告された⁹⁾。この成果は、臨床分離株が非結核性抗酸菌か結核菌群かを迅速に鑑別するのに有用である。その他に *hupB* 遺伝子を用いた結核菌と *M. bovis* の鑑別法¹⁰⁾、結核菌のRD1 (Region of Difference 1) 領域を標的とした結核菌と *M. bovis* BCGとの鑑別法が報告され¹¹⁾、後者ではヒト型およびウシ型結核菌からRD1領域の欠損したものがBCG菌であると理解されるに至っている。

結核菌のタイピングのマーカーとしてIS6110およびdirect repeat (DR) などが利用されている。IS6110-制限酵素断片長多型 (RFLP) は密接に関連した分離株のグループ化に有効であるが、結核菌の発生学的な相関をみるために用いると誤った推論を導く可能性がある。また、DR部位のDNA塩基配列分析は、IS6110-RFLP法によるタイピング情報を補足し、進化の段階に関連深い分離株間の関係を再構成することが可能であると報告された¹²⁾。

持続排菌者の喀痰中結核菌のRFLP分析パターン変化を調べたところ、調べた株の4%で変化が起こり、IS6110変化のhalf-timeは平均8.74年で、発症早期では0.57年、晩期では10.69年であった。これらの違いは主として化学療法の前後での菌増殖状態を反映しているものと考えられた¹³⁾。

IS6110-RFLP分析が現在も結核菌タイピング法の標準法であるが、近年PCRを利用した反復配列多型 (VNTR: variable numbers of tandem repeats) 分析やスポリゴタイピング法などの新しい迅速タイピング法が開発されている。VNTR分析は、結核菌ゲノム上に多数存在するミニサテライトDNAを利用し、結核菌を分類する方法である¹⁴⁾。つまり、多型部位の外側の定常領域にプライマーを設計し、PCR法でDNAの増幅を行う¹⁵⁾¹⁶⁾。そのPCR産物の分子量から反復配列のコピー数の違いを算出し、多型検出を行う方法である。また、結核菌ゲノム上には、10から50個程度存在するDR (36 bpからなる)をつなぐ短い多様性に富んだスパーサー部位 (37-41 bp)がある。このスパーサー部位中の43カ所について、その有無を調べることによって、結核菌株を区分する方法が、スポリゴタイピング法である¹⁷⁾。Beijing型結核菌は、このスポリゴタイピング法で35から43までの9カ所のスパーサー部位のみが陽性で、1から34のスパーサー部位は陰性となる株として定義されている。

Beijing型とnon-Beijing型結核菌、さらに多剤耐性結核菌 (MDR-TB) とnon-MDR-TBについて、IS6110-RFLP, VNTRおよびスポリゴタイピング分析を行いタイピング能の違いが解された。Beijing型結核菌では、IS6110-RFLP分析と比べてMycobacterial Interspersed Repetitive Unit (MIRU)-VNTR分析 (12 locus) のほうがタイピング能は低かった。しかし、non-Beijing型結核菌、MDR-TBおよびnon-MDR-TBを対象とした分析では、2つの分析法間で分解能の違いはみられなかった¹⁸⁾。

DNAマイクロアレイを用いて、*M. microti*の遺伝子を結核菌 H37Rvのものと比較した。*M. microti*では*M. bovis* BCGと同様にH37Rv上のRD1からRD10までの欠損がみられた。さらに、*M. microti*に特異的な4カ所の欠損が観察された。しかし、*M. microti*に特異的な遺伝子欠損と宿主に対する毒力とを関連付けることは難しいことが示された¹⁹⁾。*M. africanum*についてIS6110-RFLPとスポリゴタイピング法で分析したところ、ウガンダのKampalaでは*M. africanum* subtype IIが2種類の遺伝子型に分類され、結核菌群の中で特有の系統発生を示し、この地方の結核症の主要原因菌であった²⁰⁾。

A-2 (2) 結核菌群の新種

M. canettii 43株をVNTR、DR locus分析および*hsp65*遺伝子多型分析を行い解析したところ、*M. canettii*は、系統樹上結核菌群の他の枝葉というよりは結核菌の起源種である可能性が高いことが明らかにされた²¹⁾。また、*M. tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. *nov.* はヤギから単離され、結核菌群に分類された抗酸菌であり、IS6110あるいは多型性GCリッチ配列(PGRS)をプローブとしたRFLP分析およびスポリゴタイピング法で、他の結核菌群菌と区別できた²²⁾。

A-2 (3) 結核菌群の系統発生

結核菌群のゲノム多型性を調べるとゲノム上の一部領域の欠落が生じ*M. tuberculosis*および*M. africanum*から*M. microti*/seal bacillus, *M. caprae*, *M. bovis*の順に欠損部位の蓄積がみられた。結核菌群の進化に伴いゲノム領域の欠損が生じたとすれば、ヒト型結核菌は、*M. bovis*由来ではないこと、また遺伝子欠損を調べることは結核菌

群の進化を研究するうえで有用であることが報告されている²³⁾(図1)。

最近、single nucleotide polymorphism (SNP) とスポリゴタイピングおよびVNTR法を用いて、世界各国から集めたヒト型およびウシ型結核菌を調べて、その系統発生樹の作成を行い、各方法による結果の比較を行った報告が出た。その結果、SNPとスポリゴタイピング法ではほぼ同じclades(系統群)に分類されたが、VNTR法は一致性が少なく、むしろ個別に菌株の違いを見るのには優れているという成績であった。また最も古い結核菌は東アフリカ・インド亜大陸からのもので、そこから東アジアに広がったものであることが、分離株の出所と系統樹との対比から推察され、またウシ型結核菌はヒト型結核菌と共通の祖先をもつが後に変異し分枝したものであると考えられた²⁴⁾(図2)。

A-2 (4) 非結核性抗酸菌群の分類

抗酸菌の16S rRNA遺伝子の塩基配列を調べて菌の分類を試みても、臨床分離株の場合、多くの多型が存在し明確に分類することは難しい。そのため、各施設での成績をデータベース化して共同利用することが望まれる²⁵⁾。また、非結核性抗酸菌の疫学研究には、オリゴヌクレオチド(GTG)₅をプローブとしたRFLP分析法が有効であり、*M. avium*では、IS1245-RFLP分析がタイピングに有効であることが示された²⁶⁾。

鼠径ヘルニア手術後に抗酸菌が検出され16S rRNA遺伝子塩基配列分析によって*M. goodii*と同定された²⁷⁾。敗血症患者から抗酸菌が検出され、16S rRNA遺伝子塩基配列から*M. diernhoferi*に酷似していた。しかし、ミコール酸のHPLCでの溶出パターンからは*M. smegmatis*に類

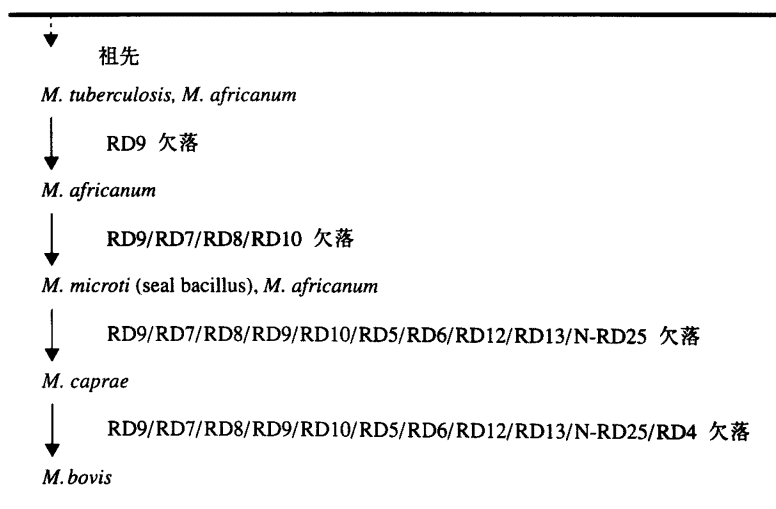


図1 結核菌群の推定系統発生 (Mostowy²³⁾ の図を簡略化)

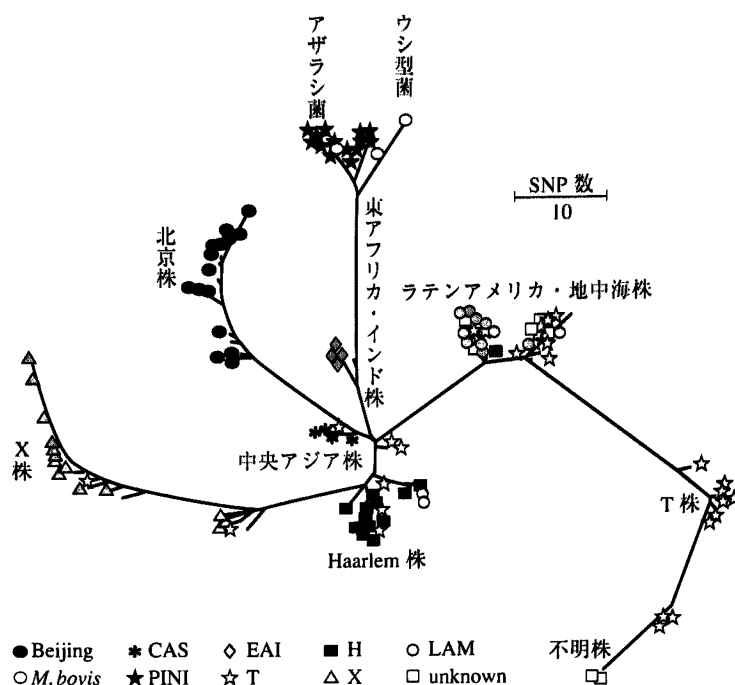


図2 SNPによる結核菌系統発生推定図 (Filliol²⁴⁾の図より)

似していた。これらの結果から分離菌は、新種の抗酸菌として分類され、*M. hackensackense* と命名された²⁸⁾。

ブタリンパ節から分離された *M. porcinum* は、ヒトから分離された *M. fortuitum* 3rd biovariant と 16S rRNA 塩基配列が 100% 一致し、*hsp65* 遺伝子の塩基配列は 2～3 塩基が異なるだけであった。以上から *M. porcinum* と *M. fortuitum* 3rd biovariant を同定するには *hsp65* 遺伝子の PCR 産物制限酵素切断分析 (PRA)、16S rRNA および *hsp65* 遺伝子の塩基配列分析の組み合わせが必要であるとされた²⁹⁾。

M. ulcerans により発症するブルリ潰瘍は、ことにアフリカでは結核やハンセン病に次いで多い抗酸菌症であるが、その感染伝播様式は明らかでない。ゲノムの解析により、*M. ulcerans* はこの菌種特有な IS2404 をもつことが知られていて、この塩基配列を標的にしたリアルタイム PCR の系を設定して *M. ulcerans* DNA が定量された。このシステムは、*M. ulcerans* 感染症の病理や伝播様式を研究するうえで有用な方法となる³⁰⁾。

A-2 (附) 抗酸菌ファージを用いた新診断法

抗酸菌ファージを用いて結核菌の同定を試みたところ、陽性率、判定に要した日数などの点で MGIT、L-J 培地に劣らない成績が得られ、さらに耐性検査結果も一致した³¹⁾。また、結核診断にファージを利用し、培養染色法と比較したところ、ファージ法の塗抹培養法に対する感度、特異性、陽性および陰性期待値は、それぞれ

58.3, 99.1, 83.2, 96.9% であった³²⁾。ファージを用いた結核診断法は、48時間の短時間で特異的に安全で容易に行える方法で、疑陽性はみられず、生菌単位 10 以下でも検出可能であり、特に開発途上国で有用であることが述べられた³³⁾。(担当：前田伸司)

文 献

A-1 抗酸菌全ゲノム配列・分類・系統樹

- 1) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998; 393: 537-44. Erratum in: *Nature*. 1998; 396: 190.
- 2) Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, et al.: Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol*. 2002; 184: 5479-90.
- 3) Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, et al.: The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 7877-82.
- 4) Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, et al.: Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001; 409: 1007-11.
- 5) Li L, Bannantine JP, Zhang Q, et al.: The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 12344-9.
- 6) <http://gib.genes.nig.ac.jp/single/index.php?spid=Msme> MC2 155
- 7) <http://gib.genes.nig.ac.jp/single/index.php?spid=Mavi> 104
- A-2 (1) 結核菌群の分類・タイピング
- 8) Mangiapan G, Vokurka M, Schouls L, et al.: Sequence

- capture-PCR improves detection of mycobacterial DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1996 ; 34 : 1209-15.
- 9) Huard RC, deOliveira LC, Butler WR, et al.: PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol.* 2003 ; 41 : 1637-50.
 - 10) Prabhakar S, Mishra A, Singhal A, et al.: Use of the *hupB* gene encoding a histone-like protein of *Mycobacterium tuberculosis* as a target for detection and differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis*. *J Clin Microbiol.* 2004 ; 42 : 2724-32.
 - 11) Talbot EA, Williams DL, Frothingham R: PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol.* 1997 ; 35 : 566-9.
 - 12) Fang Z, Morrison N, Watt B, et al.: IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Bacteriol.* 1998 ; 180 : 2102-9.
 - 13) Warren RM, van der Spuy GD, Richardson M, et al.: Calculation of the stability of the IS6110 banding pattern in patients with persistent *Mycobacterium tuberculosis* disease. *J Clin Microbiol.* 2002 ; 40 : 1705-8.
 - 14) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al.: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.* 2000 ; 36 : 762-71.
 - 15) Frothingham R, Meeker-O'Connell WA: Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology.* 1998 ; 144 : 1189-96.
 - 16) Supply P, Lesjean S, Savine E, et al.: Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol.* 2001 ; 39 : 3563-71.
 - 17) Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al.: Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997 ; 35 : 907-14.
 - 18) Kam KM, Yip CW, Tse LW, et al.: Utility of mycobacterial interspersed repetitive unit typing for differentiating multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates of the Beijing family. *J Clin Microbiol.* 2005 ; 43 : 306-13.
 - 19) Frota CC, Hunt DM, Buxton RS, et al.: Genome structure in the vole bacillus, *Mycobacterium microti*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex with a low virulence for humans. *Microbiology.* 2004 ; 150 : 1519-27.
 - 20) Niemann S, Rusch-Gerdes S, Joloba ML, et al.: *Mycobacterium africanum* subtype II is associated with two distinct genotypes and is a major cause of human tuberculosis in Kampala, Uganda. *J Clin Microbiol.* 2002 ; 40 : 3398-405.
- A-2 (2) 結核菌群の新種
- 21) Fabre M, Koeck JL, Le Fleche P, et al.: High genetic diversity revealed by variable-number tandem repeat genotyping and analysis of *hsp65* gene polymorphism in a large collection of "*Mycobacterium canettii*" strains indicates that the *M. tuberculosis* complex is a recently emerged clone of "*M. canettii*". *J Clin Microbiol.* 2004 ; 42 : 3248-55.
- 22) Aranaz A, Liebana E, Gomez-Mampaso E, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol.* 1999 ; 49 : 1263-73.
- A-2 (3) 結核菌群の系統発生
- 23) Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, et al.: Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infect Dis.* 2002 ; 186 : 74-80.
 - 24) Filliol I, Motiwala AS, Qui W, et al.: Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: Insight into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting system and recommendations for a minimal standard SNP set. *J Bact.* 2006 ; 188 : 759-72.
- A-2 (4) 非結核性抗酸菌群の分類
- 25) Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, et al.: Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol.* 2001 ; 39 : 3637-48. Erratum in: *J Clin Microbiol.* 2002 ; 40 : 2316.
 - 26) Cilliers FJ, Warren RM, Hauman JH, et al.: Oligonucleotide (GTG)_n as an epidemiological tool in the study of nontuberculous mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1997 ; 35 : 1545-9.
 - 27) Sohail MR, Smilack JD: Hernia repair mesh-associated *Mycobacterium goodii* infection. *J Clin Microbiol.* 2004 ; 42 : 2858-60.
 - 28) Hong T, Butler WR, Hollis F, et al.: Characterization of a novel rapidly growing *Mycobacterium* species associated with sepsis. *J Clin Microbiol.* 2003 ; 41 : 5650-3.
 - 29) Wallace RJ Jr, Brown-Elliott BA, Wilson RW, et al.: Clinical and laboratory features of *Mycobacterium porcinum*. *J Clin Microbiol.* 2004 ; 42 : 5689-97.
 - 30) Rondini S, Mensah-Quainoo E, Troll H, et al.: Development and application of real-time PCR assay for quantification of *Mycobacterium ulcerans* DNA. *J Clin Microbiol.* 2003 ; 41 : 4231-7.
- A-2 (附) 抗酸菌ファージを用いた新診断法
- 31) Banaiee N, Bobadilla-Del-Valle M, Bardarov S Jr, et al.: Luciferase reporter mycobacteriophages for detection, identification, and antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico. *J Clin Microbiol.* 2001 ; 39 : 3883-8.
 - 32) Alcaide F, Gali N, Dominguez J, et al.: Usefulness of a new mycobacteriophage-based technique for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2003 ; 41 : 2867-71.
 - 33) McNerney R, Kambashi BS, Kinkese J, et al.: Development of a bacteriophage phage replication assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2004 ; 42 : 2115-20.

A-3 抗酸菌特異抗原とそのT細胞エピトープ (表1)

要約: 結核菌に特異的抗原物質の探索は、結核菌の遺伝子的同定と診断、特異的免疫反応の機序、特異抗原刺激による免疫学的診断、さらには抗菌製剤開発 (創薬) へと結びつきうる。特異抗原物質として明らかにされてきたものの数は多く、Tリンパ球に認識されるエピトープ分子も明らかにされつつある。生体の免疫反応は、それら特異的抗原物質の複合作用の上に成り立っていると考えられる。

A-3 (1) 抗原 85

活発に分裂している抗酸菌のみが、結核菌に対する細胞免疫を効果的に誘導する。そのため、菌の分泌性タンパク質が注目されてきた。抗原85複合体 (Ag85A, Ag85B, Ag85Cから構成される) は、結核菌の主要な分泌タンパク質で、マウスおよびモルモットでは遅延型過敏症、防護免疫、特異抗体を誘導し、またツ反陽性健康者由来の培養末梢血単球に、細胞性免疫を誘導する。このような免疫反応は、活動性結核患者においてAg85が尿中に排泄されず主として血清中のフィブロネクチンおよびIgGと結合して循環することで生じている¹⁾。また、 α 抗原 (Ag85B) のアミノ酸配列の一部である peptide 25が、 α 抗原自体と同程度に感作リンパ節細胞 (V β 11⁺T) を刺激増殖させることがマウスで報告されている。この peptide 25が抗菌免疫原性をもつのか、さらにI-A^b

とTCRとを認識してT細胞を刺激する peptide 25上の特定部分が報告されている²⁾。Ag85Cペプチド (AA 204-212) も、CD8⁺T細胞を刺激して結核菌やBCG貪食マクロファージを殺し、IFN- γ やTNF- α を産生することが確認された³⁾。他方、Ag85A, Ag85BおよびAg85CについてマウスのTh1細胞エピトープの解析を行い、マウスの系統によってAg85抗原刺激によるT細胞反応性が異なることも報告されている⁴⁾。

Ag85AおよびAg85B遺伝子を破壊したH37Rv変異株を作製してマウスに対する病原性を調べると、Ag85A遺伝子破壊株はマウスに対する病原性を低下させたが、Ag85B遺伝子破壊株では野生株と変わらなかった。Ag85A遺伝子破壊株ではマウスでの病原性が低下し、マクロファージ内でのTNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ およびNO合成酵素のmRNAレベル上昇、菌自体のNO感受性増加、マウス内での菌増殖低下がみられた⁵⁾。

表1 結核菌特異抗原とその遺伝子登録番号

抗原	遺伝子名	別名	登録番号	Product	Function
Ag85 A	<i>fbpA</i>	85A, <i>mpt44</i>	Rv3804c	}	トレハロース 6,6'- ダイマイコレート (TDM) 合成
Ag85 B	<i>fbpB</i>	85B, <i>mpt59</i>	Rv1886c		
Ag85 C	<i>fbpC</i>	85C, <i>mpt45</i> , <i>fbpC2</i>	Rv0129c		
ESAT-6	<i>esxA</i>	<i>esat-6</i>	Rv3875		
CFP-10	<i>esxB</i>	<i>lhp</i> , <i>cfp10</i>	Rv3874		
PE_PGERS33			Rv1818c		
CFP-32	<i>TB27.3</i>		Rv0557		
HBHA	<i>hbhA</i>		Rv0475		
16kDa	<i>mpt63</i>	<i>mpb63</i>	Rv1926c		
30kDa		Ag85 B	Rv1886c		
32kDa		Ag85 A	Rv3804c		
MPB70	<i>mpt70</i>	<i>mpb70</i>	Rv2875	Major secreted immunogenic protein	Not really known
MPT51	<i>fbpD</i>	<i>mpt51</i> , <i>mpb51</i> , <i>fbpC1</i>	Rv3803c	分泌タンパク質 Ag85 抗原と相同性	TDM 合成
MPB83	<i>mpt83</i>	<i>mpb83</i>	Rv2873	Cell surface lipoprotein MPT83 (lipoprotein P23)	Not really known
19kDa	<i>lpqH</i>		Rv3763		
24kDa	<i>lprG</i>	P27	Rv1411c		
27kDa	<i>lprG</i>	P27	Rv1411c		
38kDa	<i>pstS1</i>	<i>phoS1</i>	Rv0934		

A-3 (2) ESAT-6およびCFP-10

結核菌はESAT-6 (6kDa early secreted antigenic target) 抗原をもつが、BCGはもたないことが知られており、ESAT-6抗原は結核を過去のBCG接種の影響を除外して診断するのに有用な抗原である。ESAT-6構成ペプチドを14merずつに区分し、これを用いて末梢血単核細胞を刺激して反応性を調べると、強反応部位の分布パターンは人種によって異なることが報告された⁶⁾。この結果は、ESAT-6抗原をBCG接種や抗酸菌症と結核の鑑別診断に用いることはできても、人種によってその反応性に差がありうることを示唆している。

M. kansasii と *M. marinum* も ESAT-6 と CFP-10 (10kDa culture filtrate protein) の遺伝子をもつことが知られているが、*M. kansasii* あるいは *M. marinum* に感染発病した患者もほとんど ESAT-6 と CFP-10 反応性 T 細胞をもっており、環境中の同抗酸菌に曝露された者でも同様であった⁷⁾。また、臨床および環境からの *M. kansasii* 分離株を用いて ESAT-6 および CFP-10 と病原性との関連を検討した報告もある⁸⁾。

ESAT-6 ペプチドに対する T 細胞の強い応答は、結核の活動性の時期にのみ見られることから、ESAT-6 による反応性から活動性結核を潜在性結核から区別できる⁹⁾。また、enzyme-linked immunospot (ELISPOT) 法をリンパ球増殖 (LPA) 法と比較し、ELISPOT 法のほうが特異性、感度とも優れており有用であると報告された¹⁰⁾。

ESAT-6 ファミリー内で共通する MHC-I 拘束性エペトープを同定し、このアミノ酸配列が結核感染マウスで CD8⁺ T 細胞と反応を起こすことが確認されている¹¹⁾。この CFP-10 がワクチンに利用できるか検討が行われ、CFP-10 の構成アミノ酸配列の一部であるペプチド (CFP-10₇₁₋₈₅) は、MHC-II と MHC-I 分子を発現するヒト CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞により、IFN- γ 産生能と細胞傷害活性をもつことが示され、15 個のアミノ酸からなる CFP-10₇₁₋₈₅ は、幅のある MHC に対して有効なワクチンとなりうると報告されている¹²⁾。

A-3 (3) リポタンパク質と Toll-like receptor (TLR)

リポタンパク質に関する報告には、38kDa、19kDa、24kDa および 27kDa に関するものが結核菌のもつリガンドとして挙げられており、TLR との関連で数多く報告されている。38kDa リポタンパク質上に存在する細胞傷害性 T 細胞エペトープの研究¹³⁾や、19kDa リポタンパク質の作用にはタンパク質部分 (ポリペプチド) のみが必要で、アシル化シグナル (脂質) 部分は必要なく、TLR2 を介してマクロファージのアポトーシスを誘導するという報告¹⁴⁾、また、感染早期においてマクロファージのア

ポトーシスと IL-1 β 放出を誘導する¹⁵⁾とする報告がある。さらに、マイクロアレイを使った研究では、結核菌と 19kDa リポタンパク質による TLR シグナルは、マクロファージの特定遺伝子の IFN- γ による調節を抑制した¹⁶⁾、19kDa リポタンパク質はファゴソーム成熟とその中の抗原分解を MyD88 依存性に阻害し、抗原と MHC-II/MHC-I の結合を阻害することで、CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞による免疫監視機構から逃れて結核菌を生存させ続ける¹⁷⁾、などの報告がある。

Rv1411c がコードする 24kDa リポタンパク質 LprG (ここではこのように表記されているが 27kDa リポタンパク質と同タンパク質) は、ヒトマクロファージの MHC-II 伸介 CD4⁺ T 細胞への抗原提示能を抑制する、TLR2 リガンドであることが示された¹⁸⁾。他方、27kDa リポタンパク質は、Th1 免疫応答を誘導するが、BCG あるいは他の抗酸菌で付与される感染防御能は、27kDa 抗原をこれらのワクチンに加えると消失したことから、防御効果に悪影響を与えると報告されている¹⁹⁾。

TLR2 および TLR4 リガンドとして働く *M. bovis* BCG の細胞壁骨格は、マクロファージや樹状細胞の抗原提示反応に LPS とは別のメカニズムで関わっている²⁰⁾。

A-3 (4) PE/PE_PGRS ファミリータンパク

PE ファミリータンパク質は、アミノ末端付近にプロリン-グルタミン酸 (PE) モチーフを含む 110 アミノ酸程度の非常に保存性の高いドメインをもちグリシンに富んだタンパク質である。このような PE ファミリータンパク質のうち、C 末端に polymorphic GC-rich sequence (PGRS) をもつタンパク質は PE_PGRS サブファミリーとして分類されている。これらのタンパク質の機能は、よくわかっていないが、Epstein-Barr virus の核抗原 (EBNAs) と相同性が高いことから、T 細胞の抗原提示を阻害するという Epstein-Barr virus と同様なメカニズムで病原性発現に関与している可能性もある。BCG においてその遺伝子産物は菌体表面に存在し、この遺伝子に変異が起こると菌発育形状が変化し、マクロファージへの付着性と感染能が低下した²¹⁾。Rv1818c は PE_PGRS タンパク質ではあるが、遺伝子操作で C 末端の部分に欠落させて Rv1818c PE タンパク質を作製して、PE タンパク質と PE_PGRS タンパク質の機能の違いを検討した。Rv1818c PE タンパク質でマウスを免疫すると IFN- γ 産生と感染防御効果がみられ細胞性免疫が誘導されたが、Rv1818 PE_PGRS タンパク質では、抗体産生は観察されたが細胞性免疫は誘導されなかった。さらに、結核菌免疫でも抗 PE_PGRS 抗体が産生されたが、抗 PE 抗体は産生されなかった²²⁾。PE_PGRS ファミリータンパク質は抗原性をもつが、Gly-Ala に富んだ PGRS ドメインが

抗原性に関わっていることが示唆された。また、PE_PGRSファミリー内のタンパク質に対する抗体は、交差反応を示すが、PE_PGRSタンパク質が繰り返し構造をもちアミノ酸レベルで相同性が高く共通エピトープをもつことが原因と推定された。これらタンパク質は細胞壁や細胞膜に局在し、可溶性表面抗原であることが示唆されている²³⁾。

A-3 (5) 結核菌糖脂質抗原と CD1 レセプター

モルモットの CD1 タンパク質の CD1b および CD1c 分子は、ヒトのものと同様性があり、モルモットがヒトの抗酸菌免疫研究に有用であることを示している。モルモットを実験モデルとして用いて、結核菌糖脂質が CD1 を介して T 細胞に抗原を提示し、結核免疫を引き起こすこと²⁴⁾が示された。構造的に mycobactin siderophores と関連する didehydroxymycobactins と命名された結核菌由来の未知リポタンパク質と CD1a が結合して、T 細胞に抗原提示を行うこと²⁵⁾、抗酸菌の脂質の中で phosphatidylinositol mannoside (PIM) だけが CD1d と結合し NKT 細胞を刺激することが示された²⁶⁾。結核菌から新たに同定された抗原であるジアシル化スルフォグリコリピドも、CD1 拘束性に T 細胞を刺激し IFN- γ を産生させる。この抗原は、有力なワクチン候補の一つと考えられた²⁷⁾。

A-3 (6) その他の T 細胞エピトープ

モルモットの脾細胞のリンパ球増殖反応を利用して結核菌分泌タンパク質 16kDa, 30kDa および 32kDa の T 細胞エピトープを同定した報告²⁸⁾、MPB70 上のヒト Th1 細胞エピトープ解析に関するもの²⁹⁾、防御抗原 MPT51 のマウス H2-D^d, H2-A^b 拘束性 T 細胞エピトープを同定した報告がある³⁰⁾。

結核菌群特異的な遺伝子である Rv0557 によりコードされる CFP32 は、結核患者の 32% の血清中に抗体が検出され、喀痰では 56% で CFP32 タンパク質が検出された。喀痰中では CFP32 量は、IL-10 量と比例していたが、IFN- γ 量とは関連しなかった³¹⁾。

マウスを使った実験からフォルミル化メチオニン (f-Met) ペプチドのような非多型性クラス I 分子に結合するペプチドは、結核に対する免疫応答を惹起することが報告されている³²⁾。また、ヘパリン結合性ヘマグルチニンのメチル化の有無を利用した実験から、タンパク質翻訳後の修飾は、防御的 T 細胞免疫誘導に重要であることが明らかにされている³³⁾。

結核菌, *M. avium* complex の細胞壁画分に存在するヒト補体 C3 結合タンパク質を検索するとヘパリン結合性ヘマグルチニン (HBHA) であった。抗酸菌の HBHA は

C3 と結合し、C3 レセプターに作用して単核食細胞に接着・貪食されると考えられる³⁴⁾。また、グルカンは結核菌表面成分であり、*in vitro* と *in vivo* 双方で発現している。菌培養によるグルカンの産生に伴って生菌接種マウスでは、強い抗グルカン抗体の産生がみられた³⁵⁾。

BCG ワクチンは株によって、抗原である MPB70 および MPB83 タンパク質の発現量が大きく異なっているが、それは結核菌のシグマファクターの一つである *sigK* 遺伝子の変異によって、MPB70 および MPB83 タンパク質の発現量が低下したものとされた³⁶⁾。

(担当：前田伸司)

文 献

A-3 (1) 抗原 85

- 1) Bentley-Hibbert SI, Quan X, Newman T, et al.: Pathophysiology of antigen 85 in patients with active tuberculosis: antigen 85 circulates as complexes with fibronectin and immunoglobulin G. *Infect Immun.* 1999; 67: 581-8.
- 2) Kariyone A, Higuchi K, Yamamoto S, et al.: Identification of amino acid residues of the T-cell epitope of *Mycobacterium tuberculosis* alpha antigen critical for V β 11⁺ Th1 cells. *Infect Immun.* 1999; 67: 4312-9.
- 3) Klein MR, Smith SM, Hammond AS, et al.: HLA-B*35-restricted CD8 T cell epitopes in the antigen 85 complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 2001; 183: 928-34.
- 4) D'Souza S, Rosseels V, Romano M, et al.: Mapping of murine Th1 helper T-Cell epitopes of mycolyl transferases Ag85A, Ag85B, and Ag85C from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2003; 71: 483-93.
- 5) Copenhagen RH, Sepulveda E, Armitage LY, et al.: A mutant of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv that lacks expression of antigen 85A is attenuated in mice but retains vaccino-genic potential. *Infect Immun.* 2004; 72: 7084-95.

A-3 (2) ESAT-6 および CFP-10

- 6) Ravn P, Demissie A, Eguale T, et al.: Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 1999; 179: 637-45.
- 7) Arend SM, van Meijgaarden KE, de Boer K, et al.: Tuberculin skin testing and *in vitro* T cell responses to ESAT-6 and culture filtrate protein 10 after infection with *Mycobacterium marinum* or *M. kansasii*. *J Infect Dis.* 2002; 186: 1797-807.
- 8) Arend SM, de Haas P, Leyten E, et al.: ESAT-6 and CFP-10 in clinical versus environmental isolates of *Mycobacterium kansasii*. *J Infect Dis.* 2005; 191: 1301-10.
- 9) Vincenti D, Carrara S, De Mori P, et al.: Identification of early secretory antigen target-6 epitopes for the immunodiagnosis of active tuberculosis. *Mol Med.* 2003; 9: 105-11.
- 10) Scarpellini P, Tasca S, Galli L, et al.: Selected pool of peptides from ESAT-6 and CFP-10 proteins for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 3469-74.

- 11) Majlessi L, Rojas MJ, Brodin P, et al.: CD8⁺T-cell responses of *Mycobacterium*-infected mice to a newly identified major histocompatibility complex class I-restricted epitope shared by proteins of the ESAT-6 family. *Infect Immun.* 2003 ; 71 : 7173-7.
- 12) Shams H, Klucar P, Weis SE, et al.: Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide that is recognized by human CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the context of multiple HLA alleles. *J Immunol.* 2004 ; 173 : 1966-77.
- A-3 (3) リポタンパク質と Toll-like receptor (TLR)
- 13) da Fonseca DP, Joosten D, van der Zee R, et al.: Identification of new cytotoxic T-cell epitopes on the 38-kilodalton lipoglycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* by using lipopeptides. *Infect Immun.* 1998 ; 66 : 3190-7.
- 14) Lopez M, Sly LM, Luu Y, et al.: The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *J Immunol.* 2003 ; 170 : 2409-16.
- 15) Ciaramella A, Cavone A, Santucci MB, et al.: Induction of apoptosis and release of interleukin-1 beta by cell wall-associated 19-kDa lipoprotein during the course of mycobacterial infection. *J Infect Dis.* 2004 ; 190 : 1167-76.
- 16) Pai RK, Pennini ME, Tobian AA, et al.: Prolonged toll-like receptor signaling by *Mycobacterium tuberculosis* and its 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-induced regulation of selected genes in macrophages. *Infect Immun.* 2004 ; 72 : 6603-14.
- 17) Tobian AA, Potter NS, Ramachandra L, et al.: Alternate class I MHC antigen processing is inhibited by Toll-like receptor signaling pathogen-associated molecular patterns: *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa lipoprotein, CpG DNA, and lipopolysaccharide. *J Immunol.* 2003 ; 171 : 1413-22.
- 18) Gehring AJ, Dobos KM, Belisle JT, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* LprG (*Rv1411c*): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol.* 2004 ; 173 : 2660-8.
- 19) Hovav AH, Mullerad J, Davidovitch L, et al.: The *Mycobacterium tuberculosis* recombinant 27-kilodalton lipoprotein induces a strong Th1-type immune response deleterious to protection. *Infect Immun.* 2003 ; 71 : 3146-54.
- 20) Begum NA, Ishii K, Kurita-Taniguchi M, et al.: *Mycobacterium bovis* BCG cell wall-specific differentially expressed genes identified by differential display and cDNA subtraction in human macrophages. *Infect Immun.* 2004 ; 72 : 937-48.
- A-3 (4) PE/PE_PGRS ファミリータンパク
- 21) Brennan MJ, Delogu G, Chen Y, et al.: Evidence that mycobacterial PE_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. *Infect Immun.* 2001 ; 69 : 7326-33.
- 22) Delogu G, Brennan MJ: Comparative immune response to PE and PE_PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2001 ; 69 : 5606-11.
- 23) Banu S, Honore N, Saint-Joanis B, et al.: Are the PE_PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? *Mol Microbiol.* 2002 ; 44 : 9-19.
- A-3 (5) 結核菌糖脂質抗原と CD1 レセプター
- 24) Hiromatsu K, Dascher CC, LeClair KP, et al.: Induction of CD1-restricted immune responses in guinea pigs by immunization with mycobacterial lipid antigens. *J Immunol.* 2002 ; 169 : 330-9.
- 25) Moody DB, Young DC, Cheng TY, et al.: T cell activation by lipopeptide antigens. *Science.* 2004 ; 303 : 527-31. Erratum in: *Science.* 2004 ; 304 : 211.
- 26) Fischer K, Scotet E, Niemeyer M, et al.: Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 ; 101 : 10685-90.
- 27) Gilleron M, Stenger S, Mazon Z, et al.: Diacylated sulfoglycolipids are novel mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med.* 2004 ; 199 : 649-59.
- A-3 (6) その他の T細胞エпитープ
- 28) Lee BY, Horwitz MA: T-cell epitope mapping of the three most abundant extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in outbred guinea pigs. *Infect Immun.* 1999 ; 67 : 2665-70.
- 29) Al-Attiyah R, Shaban FA, Wiker HG, et al.: Synthetic peptides identify promiscuous human Th1 cell epitopes of the secreted mycobacterial antigen MPB70. *Infect Immun.* 2003 ; 71 : 1953-60.
- 30) Suzuki M, Aoshi T, Nagata T, et al.: Identification of murine H2-D^d- and H2-A^b-restricted T-cell epitopes on a novel protective antigen, MPT51, of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2004 ; 72 : 3829-37.
- 31) Huard RC, Chitale S, Leung M, et al.: The *Mycobacterium tuberculosis* complex-restricted gene *cfp32* encodes an expressed protein that is detectable in tuberculosis patients and is positively correlated with pulmonary interleukin-10. *Infect Immun.* 2003 ; 71 : 6871-83.
- 32) Dow SW, Roberts A, Vyas J, et al.: Immunization with f-Met peptides induces immune reactivity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc Lung Dis.* 2000 ; 80 : 5-13.
- 33) Temmerman S, Pethe K, Parra M, et al.: Methylation-dependent T cell immunity to *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding hemagglutinin. *Nat Med.* 2004 ; 10 : 935-41.
- 34) Mueller-Ortiz SL, Wanger AR, Norris SJ: Mycobacterial protein HbhA binds human complement component C3. *Infect Immun.* 2001 ; 69 : 7501-11.
- 35) Schwebach JR, Glatman-Freedman A, Gunther-Cummins L, et al.: Glucan is a component of the *Mycobacterium tuberculosis* surface that is expressed in vitro and in vivo. *Infect Immun.* 2002 ; 70 : 2566-75.
- 36) Charlet D, Mostowy S, Alexander D, et al.: Reduced expression of antigenic proteins MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis* BCG strains due to a start codon mutation in *sigK*. *Mol Microbiol.* 2005 ; 56 : 1302-13.

A-4/A-5 結核菌の毒力関連遺伝子と休眠結核菌関連遺伝子

要約: 結核菌には毒力に幅があることが古くから知られている。毒力を支配する遺伝子として Region of Difference 1 (RD1) の存在が注目されたが, その他にも菌の代謝に関連する遺伝子の一群, 抗酸化遺伝子, 細胞壁合成・代謝に関連する遺伝子なども, その変異により生体内菌増殖の抑制が起こるのが観察されている。また結核菌の特徴として, 環境の悪化に伴って菌の形態の変化と代謝の抑制が起こり, いわゆる persister (休眠菌) が出現して病巣内で長期に潜伏し, 条件好転に伴って再増殖を始めることが考えられている。その休眠状態で発現する, およびその再活性化時に発現してくる結核菌遺伝子の解明が進んでいる (表 2, 3)。

A-4 結核菌の毒力関連遺伝子

結核菌の毒力について, 一つの因子のみで規定することは不可能である。感染および発病の過程に関連する因子は基本的にはすべて病原性 (毒力) に関連しており, これらには, ①宿主標的細胞への菌接着・侵入, ②細胞内での菌増殖 (免疫機構の回避を含む), ③他 (細胞・宿主) への播種能に関連すると考えられる。また, 結核菌の場合は, ④生体内での長期生存 (persister) や, ⑤薬剤耐性獲得も毒力の一部と考えることができる。

近年これらに関する結核菌遺伝子の解析が進んでおり, ここでは毒力因子について最近の知見を紹介する。

その多くは遺伝子の変異体を作製し, 最終的に菌の増殖等を評価するという実験が多い。毒性評価において, 菌および感染動物の mRNA の発現を調べる手法もよく用いられるが, *in vitro* と *in vivo*, あるいはマウスとヒトでは発現様式が異なることが示されており, その成績の評価には注意が必要である。

A-4 (1) RD1

結核菌, BCG などの全遺伝子配列を比較することにより, 病原性関連因子の所在が明らかになりつつある。結核菌にあり BCG 菌に欠けている, Region of Difference と呼ばれる領域中の RD1 に関する知見が蓄積しつつあ

表2 結核菌毒力関連遺伝子

RD1	Rv3871-3879c	ESAT-6, CFP-10を含む Region, その欠落では感染性や細胞内増殖低下
代謝調節関連遺伝子		
<i>katG</i>	Rv1908c	catalase-peroxidase 活性タンパクコード遺伝子, 変異株は弱毒, 上流の <i>furA</i> が調節
<i>ideR</i>	Rv2711	鉄存在下で promoter 領域に結合して転写調節, 必須の遺伝子で欠損株は死滅する
<i>narGHJI</i>	Rv1161-1164	嫌気状態での硝酸塩呼吸を可能にし, 毒力と persistency とに関連
<i>mptpB</i>	Rv0153c	tyrosine phosphatase の 1 つをコード
<i>mce1 operon</i>	Rv0166-0178	欠損株では persister になりえない
<i>panCD</i>	Rv3601c, 3602c	その変異によりパントテン酸依存株となる
<i>glnA1</i>	Rv2220	その変異はグルタミン酸依存株となる
酸化的殺菌阻害因子		
<i>sodA</i>	Rv3846	過酸化水素解毒関連
<i>hspX</i>	Rv2031c	α -crystallin, NO 曝露で増加
<i>mshB</i>	Rv1170	グルタチオン様抗酸化作用
細胞壁脂質関連		
<i>phoP</i>	Rv0757	リン酸代謝に関連, two component system により脂質合成, コード形成に関連
<i>mmpL8</i>	Rv3823c	sulfolipid transporter の欠損は毒力低下あり
<i>ppsA, fadD28, mmpL7</i>	Rv2931, 2941, 2942	phitocerosol dimycocerosate (PDIM) 合成, 細胞壁輸送に関連, 変異株は毒力低下
<i>hma (cmaA, mma4)</i>	Rv2689c	細胞壁ミコール酸合成関連, 変異株は毒力低下
<i>lspA</i>	Rv1539	リポタンパク合成, 欠損株は毒力低下
<i>icl</i>	Rv0467	脂肪酸代謝関連 isocitrate lyase の遺伝子破壊により persistency 低下
附・宿主要因関連		
<i>Mramp</i>		ヒト結核感受性関連遺伝子 Nramp に相当するマウス遺伝子

り、それにコードされ IFN- γ 誘導能をもつ ESAT-6 および CFP-10 蛋白の研究が多くなされている。RD1 を欠失している変異結核菌株ではマクロファージへの感染性や細胞毒性が低下している²⁾、BCG に RD1 をノックインすることにより肉芽腫形成等の病原性が回復することが認められている³⁾。また RD1 領域に含まれる遺伝子は ESAT-6 の細胞外分泌にも関与しており⁴⁾、また RD1 は肺間質への菌侵入に関与する細胞溶解性の低下を介して BCG の病原性低下をきたしていると考えられている⁵⁾。

A-4 (2) 代謝調節関連遺伝子

遺伝子 *katG* は Catalase-Peroxydase 活性を有する KatG タンパクをコードしている遺伝子であり、この変異は Isoniazid (INH) の耐性や結核菌毒力の変化に関連している。*katG* は独自のプロモーターをもたず、上流に位置する *furA* (鉄摂取に関連する遺伝子) によって調節されている⁶⁾。INH 高度耐性株では毒力が低下していると言われているが、INH 耐性菌の *katG* に最も多く認められる、コドン 315 のセリンからスレオニンへの変異株では、Catalase-Peroxydase 活性を保持し毒力低下は認められず、他部位の検索が必要であることが示された⁷⁾。

鉄の代謝系はあらゆる細菌にほぼ普遍的に存在するが、*ideR* がコードしているタンパクは鉄存在下でプロモーター領域の特異配列に結合して、その転写を調製する trans regulator である。IdeR は必須であり、その欠損株は死滅する。これにより調節される遺伝子としては、鉄合成と貯蔵に関するタンパク、転写制御因子、脂質代謝関連酵素等が含まれ、毒力と関連する⁸⁾。また *ideR* はコリネバクテリアのジフテリア毒素抑制遺伝子 *dtxR* と 80% の相同性を示すが、この *dtxR* を発現させた結核菌株ではマウスでの増殖が抑制され、病原性が低下することも示されている⁹⁾。

遺伝子 *narGHJI* は、嫌気的狀態での硝酸塩呼吸を可能にする硝酸塩還元酵素をコードしている。この遺伝子の働きにより膿瘍や肉芽腫内等の嫌気的狀態下でも生存可能となり、*narGHJI* は毒力と persistency の両方に関連していると考えられる¹⁰⁾。

チロシンフォスファターゼはリン酸化機構を変化させることにより毒力因子として働いている。この酵素の一つをコードしている遺伝子 *mptpB* の変異株では、活性化マクロファージ内での生存能が低下している¹¹⁾。さらに *mce1* オペロンを不活化した結核菌では persistent な状態に移行せず増殖し続ける hypervirulent な菌になることが示された¹²⁾。

栄養要求性に関連する遺伝子として *panCD* があるが、その欠損変異株でパントテン酸要求性の高度低下をみる結核菌では毒力が高度に低下し、マウス感染実験では生

存日数が BCG に比較しても有意に長いことが観察されている¹³⁾。また、Glutamine synthetase (*glnA1*) は窒素代謝に重要であるが、これが欠損した変異株は L グルタミン酸要求性となり、マクロファージ内での菌発育抑制など病原性の低下が示されている¹⁴⁾。

A-4 (3) 酸化的殺菌への拮抗因子

Superoxide dismutase (SOD) 遺伝子に対するアンチセンスを組み込んだ結核菌では H₂O₂ に対する感受性が明らかに高く、マウス感染での増殖も明らかに少ないことが示されており、SOD 産生は宿主の酸化的防御に対して重要な対抗手段と考えられる¹⁵⁾。結核菌は 2 つの SOD 遺伝子 (*sodA*, *sodC*) をもっており、Cu, Zn SOD をコードする *sodC* は SOD 活性の一部を担っているにすぎないが、リポタンパク結合活性により菌表面での抗酸化活性を示すと考えられている¹⁶⁾。また IFN- γ および iNOS を用いた研究で、iNOS 以外の IFN- γ 依存性免疫機構に対抗する、結核菌側の因子に関連する遺伝子が結核菌で同定されている¹⁷⁾。さらにマクロファージ感染過程や低酸素状態で発現が増加する Acr タンパクは¹⁸⁾、NO 曝露下で増加することから、酸化殺菌機構に対応する菌タンパクであると考えられた¹⁹⁾。

Mycothiol (MSH) は結核菌やコリネバクテリウムにより産生されるグルタチオン様の機能をもつ thiol であり、オキシダントや抗生物質からの防御や発育に必須である。Mycothiol の合成遺伝子の欠損では、hydroperoxide や Rifampicin (RFP) に対する感受性が増加し、INH に対する抵抗性が増加するのがみられた²⁰⁾。

A-4 (4) 細胞壁脂質関連物質

抗酸菌群の特徴の一つである厚い脂質層の代謝も毒力に関連しうる。リン酸代謝に関連する遺伝子の一つである *phoP* を不活化すると、結核菌はコード形成しなくなり、マクロファージ内での増殖も低下するが²¹⁾、その後 two component system の存在が毒力に関連することが示され²²⁾、最近になって PhoPR の two component system が明らかに脂質合成に関連し、それが関連した毒力低下があることが示されるに至っている²³⁾。

また、スルホリピド 1 (SL-1) も細胞壁脂質の重要な構成成分である。このリピドトランスポーターファミリーの一員である *mmpL8* を欠損した結核菌株はマウス体内での増殖低下を示す。SL-1 合成の初期段階に関与する *pks2* の変異体では増殖抑制がないことから、*mmpL8* は脂質合成の中間段階に必要であり、前駆物質の貯留が他の結核菌代謝を阻害する可能性が考えられる²⁴⁾。同様に Phitocerosol dimycocerosate (PDIM) の合成あるいは細胞壁への輸送に関与する遺伝子 (*ppsA*, *fadD28*, *mmpL7*) を

不活化した変異株では、肺内での増殖が抑制されていることも、細胞壁脂質が毒力に関連していることを示している²⁵⁾。

結核菌のミコール酸には酸化されていない α 型と、酸化されている keto および methoxy ミコール酸が存在するが、酸化ミコール酸の合成に関与する *hma* 遺伝子 (*cmaA*, *mma4*) の変異株では酸化ミコール酸が産生されず、かつ細胞壁透過性の亢進とマウスでの菌増殖の低下とが認められている²⁶⁾。同様に *mma3* 遺伝子 (keto を methoxy に変換する) を過剰産生させてすべてを methoxy mycolate にすると、細胞内増殖が阻害され、ampicilline や RFP の感受性が増加することが示されている。これはミコール酸の構成が細胞壁機能に関連することを示している²⁷⁾。

リポタンパクは分泌タンパクの一つで、N末端の脂質化が特徴である。リポタンパクは prolipoprotein diacylglycerol transferase (Lgt) と lipoprotein signal peptide (*lspA*) により合成される。リポタンパク修飾の阻害された *lspA* 欠損結核菌のマウス感染モデルでは、生菌数の減少が認められたが、その機序の詳細は不明であるとの報告がある²⁸⁾。また、脂肪酸代謝に関連する isocitrate lyase のコード遺伝子 (*icl*) を破壊すると、菌の増殖性には影響はないがその生体内での存続性が低下し、それは IFN- γ 欠失マウスでは認められなかったことが示された²⁹⁾。

A-4 (5) 宿主要因関連

Natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp 1) は IFN- γ により誘導されるマクロファージ活性化関連遺伝子の mRNA の安定性に関与していることが示されている³⁰⁾。しかし真核生物の Nramp1 に相当する結核菌の Mramp の遺伝子を欠失した変異株によるマウス感染モデルでは、感染後の菌の発育・増殖には差が認められていない (しかし鉄の抑制状態では増殖障害が認められている³¹⁾)。これは Nramp1^{-/-}マウスでも同様であり、Mramp および Nramp1 は少なくともマウス感染モデルで

は毒力に関係していないと考えられる³²⁾。

非メチル化 CpG モチーフを有するオリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODNs) は免疫担当細胞を刺激してサイトカイン類の産生を促し、Th-1 応答を誘導することにより、結核菌感染への抵抗力を増強する。これは IFN- γ ノックアウトマウスでは観察されないことから、CpG ODNs は IFN- γ 産生を介して宿主の抵抗力を改善させると考えられる³³⁾。

その他、36kDa の分泌タンパクである Erp をコードしている *erp* 遺伝子を破壊した結核菌では、マクロファージ内での増殖能が低下しているという報告があるが³⁴⁾、同時に Erp の疎水性領域 (C 末端) は毒性に関与していないという報告もある³⁵⁾。

A-5 休眠結核菌関連遺伝子

結核症が臨床的に治癒した後も、結核菌は長く生体内で生存し続け、再燃する potency を長期に維持していると言われている。この休眠状態にある結核菌の代謝状態やそれに関する遺伝子群の機能解析が、特に結核菌全遺伝子解明後に進んでおり³⁶⁾、そのマイクロアレイによる解析では低酸素状態に反応する遺伝子が 100 以上もあるとされているが³⁷⁾、活性化する遺伝子群のほとんどは機能がなお不明である。

結核菌が休眠状態へ移行する際、Wayne のモデルでも示されているように低酸素状態が重要な誘導因子となるが、Nitric oxide (NO) も結核菌休眠状態を誘導する因子として重要であることが示されている³⁸⁾。また宿主の Th1 免疫反応の結果に由来する反応もあると考えられる³⁹⁾。それに続く結核菌の代謝過程の調整では、RelA は ATP: GTP/GDP/ITP 3'-pyrophosphoryl-transferase と (p) ppGpp 3'-pyrophospho-hydrolase の両方の機能を有する酵素であり、この酵素が広範な酵素活動を調和的に制限・停止することにより、結核菌の休眠状態への誘導が行われるということが報告された⁴⁰⁾。また、結核菌が低酸素状態におかれると α -crystallin 遺伝子 (*arc* または *hspX*) が発現

表3 結核菌の休眠・覚醒関連遺伝子

休眠導入・維持		
<i>hspX</i>	Rv2031c	低酸素状態で発現するタンパク α -crystallin コード遺伝子
<i>sigF</i>	Rv3286c	低酸素状態で発現する, <i>sigB/E/H</i> が問題とも
<i>relA</i>	Rv2583c	ATP: GTP/GDP/ITP のピロリン酸転位・水解酵素の調和的制限・停止機能により菌を休眠状態に導く遺伝子
<i>dosR/devR</i>	Rv3133c	α -crystallin を含む 3 つのタンパク発現を制御, その破壊で低酸素適応消失
<i>mprA</i>	Rv0981	Mycobacterium persistence regulator 遺伝子で, その変異は動物体内での長期生存不可能
休眠からの覚醒		
<i>rpfB</i>	Rv1009	Resuscitation promoting factor, 休眠状態の菌の再活性化に必要な遺伝子

することは以前から報告されている⁴¹⁾⁴²⁾が, dormancy survival regulator (*dosR* or *devR*: Rv3133c) と名付けられた遺伝子は, α -crystallinを含む3つのタンパクの発現を制御しており, これを破壊することにより低酸素状態への適応性が失われることが報告された⁴³⁾⁴⁴⁾。

結核菌に存在する13のシグマ因子群に関連し, *sigF*をBCGに導入すると低酸素下でその発現が増幅すると報告されている⁴⁵⁾。一方では, 結核菌では種々のストレス下でも*sigF*は増加せず, *sigB*と*sigE*が増加していたという報告もある⁴⁶⁾。*sigH*の欠損株は臓器内での炎症反応が弱く遅延していることも示されており, また, *sigH*はマイクロアレイ解析では少なくとも31の遺伝子の転写に関わることが示されている⁴⁷⁾。mycobacterium persistence regulator (*mprA*) と名付けられた遺伝子の変異株では, 感染マウスで長期間生存することができず, ステロイド投与で宿主免疫を低下させると野生株結核菌では再増殖するのに対して, 変異株では増殖しないことが報告されている⁴⁸⁾。

この休眠状態の結核菌の再活性化に関して, resuscitation promoting factor (RPF) (Rv1009コードタンパク)は, 結核菌を含む休眠状態のGCリッチグラム陽性細菌を再活性化する⁴⁹⁾。グリコシドヒドロラーゼであるリゾチームとの構造的類似から, *rpfB*コードタンパクはオリゴサッカライドを開裂することが示唆されており, 活性部位のグルタミン酸が再活性化に重要であること, オリゴサッカライドの開裂が休眠状態からの結核菌再活性化のシグナルとなることが報告されている⁵⁰⁾。

(担当: 御手洗聡)

文 献

- A-4 結核菌の毒力関連遺伝子
- 1) Timm J, Post FA, Bekker LG, et al.: Differential expression of iron-, carbon-, and oxygen-responsive mycobacterial genes in the lungs of chronically infected mice and tuberculosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 14321-6.
- A-4 (1) RD1
- 2) Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, et al.: Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 2004; 51: 359-70.
 - 3) Pym AS, Brodin P, Brosch R, et al.: Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol*. 2002; 46: 709-17.
 - 4) Gao LY, Guo S, McLaughlin B, et al.: A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Mol Microbiol*. 2004; 53: 1677-93.
 - 5) Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, et al.: The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 12420-5.
- A-4 (2) 代謝調節関連遺伝子
- 6) Pym AS, Domenech P, Honore N, et al.: Regulation of catalase-peroxidase (KatG) expression, isoniazid sensitivity and virulence by *furA* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 2001; 40: 879-89.
 - 7) Pym AS, Saint-Joanis B, Cole ST: Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infect Immun*. 2002; 70: 4955-60.
 - 8) Rodriguez GM, Voskuil MI, Gold B, et al.: *ideR*, An essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of *IdeR* in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. *Infect Immun*. 2002; 70: 3371-81.
 - 9) Manabe YC, Saviola BJ, Sun L, et al.: Attenuation of virulence in *Mycobacterium tuberculosis* expressing a constitutively active iron repressor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 12844-8.
 - 10) Weber I, Fritz C, Rutkowski S, et al.: Anaerobic nitrate reductase (*narGHJI*) activity of *Mycobacterium bovis* BCG in vitro and its contribution to virulence in immunodeficient mice. *Mol Microbiol*. 2000; 35: 1017-25.
 - 11) Singh R, Rao V, Shakila H, et al.: Disruption of *mptpB* impairs the ability of *Mycobacterium tuberculosis* to survive in guinea pigs. *Mol Microbiol*. 2003; 50: 751-62.
 - 12) Shimono N, Morici L, Casali N, et al.: Hypervirulent mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resulting from disruption of the *mce1* operon. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 15918-23.
 - 13) Sambandamurthy VK, Wang X, Chen B, et al.: A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. *Nat Med*. 2002; 8: 1171-4.
 - 14) Tullius MV, Harth G, Horwitz MA: Glutamine synthetase GlnA1 is essential for growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human THP-1 macrophages and guinea pigs. *Infect Immun*. 2003; 71: 3927-36.
- A-4 (3) 酸化的殺菌への拮抗因子
- 15) Edwards KM, Cynamon MH, Voladri RK, et al.: Iron-cofactored superoxide dismutase inhibits host responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164: 2213-9.
 - 16) Piddington DL, Fang FC, Laessig T, et al.: Cu, Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst. *Infect Immun*. 2001; 69: 4980-7.
 - 17) Hisert KB, Kirksey MA, Gomez JE, et al.: Identification of *Mycobacterium tuberculosis* counterimmune (cim) mutants in immunodeficient mice by differential screening. *Infect Immun*. 2004; 72: 5315-21.
 - 18) Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, et al.: The 16-kDa alpha-

crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. Proc Natl Acad Sci USA. 1998 ; 95 : 9578–83.

- 19) Garbe TR, Hibler NS, Deretic V : Response to reactive nitrogen intermediates in *Mycobacterium tuberculosis* : induction of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog by exposure to nitric oxide donors. Infect Immun. 1999 ; 67 : 460–5.
- 20) Buchmeier NA, Newton GL, Koledin T, et al. : Association of mycothiol with protection of *Mycobacterium tuberculosis* from toxic oxidants and antibiotics. Mol Microbiol. 2003 ; 47 : 1723–32.

A-4 (4) 細胞壁脂質関連物質

- 21) Perez E, Samper S, Bordas Y, et al. : An essential role for *phoP* in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. Mol Microbiol. 2001 ; 41 : 179–87.
- 22) Parish T, Smith DA, Kendall S, et al. : Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun. 2003 ; 71 : 1134–40.
- 23) Walters SB, Dubnau E, Kolesnikova I, et al. : *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. Mol Microbiol. 2006 ; 60 : 312–30.
- 24) Converse SE, Mougous JD, Leavell MD, et al. : MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 ; 100 : 6121–6.
- 25) Cox JS, Chen B, McNeil M, et al. : Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Nature. 1999 ; 402 : 79–83.
- 26) Dubnau E, Chan J, Raynaud C, et al. : Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Mol Microbiol. 2000 ; 36 : 630–7.
- 27) Yuan Y, Zhu Y, Crane DD, et al. : The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol. 1998 ; 29 : 1449–58.
- 28) Sander P, Rezwan M, Walker B, et al. : Lipoprotein processing is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol. 2004 ; 52 : 1543–52.
- 29) McKinney JD, Honer zu Bentrup K, Munoz-Elias EJ, et al. : Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. Nature. 2000 ; 406 : 735–8.

A-4 (5) 宿主要因関連

- 30) Brown DH, Lafuse WP, Zwilling BS : Stabilized expression of mRNA is associated with mycobacterial resistance controlled by Nrp1. Infect Immun. 1997 ; 65 : 597–603.
- 31) Boechat N, Lagier-Roger B, Petit S, et al. : Disruption of the gene homologous to mammalian Nrp1 in *Mycobacterium tuberculosis* does not affect virulence in mice. Infect Immun. 2002 ; 70 : 4124–31.
- 32) North RJ, LaCourse R, Ryan L, et al. : Consequence of

Nrp1 deletion to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. Infect Immun. 1999 ; 67 : 5811–4.

- 33) Juffermans NP, Leemans JC, Florquin S, et al. : CpG oligodeoxynucleotides enhance host defense during murine tuberculosis. Infect Immun. 2002 ; 70 : 147–52.
- 34) Berthet FX, Lagranderie M, Gounon P, et al. : Attenuation of virulence by disruption of the *Mycobacterium tuberculosis* *erp* gene. Science. 1998 ; 282 : 759–62.
- 35) Kocincova D, Sonden B, Bordat Y, et al. : The hydrophobic domain of the Mycobacterial Erp protein is not essential for the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun. 2004 ; 72 : 2379–82.

A-5 休眠結核菌関連遺伝子

- 36) Sassetti CM, Rubin EJ : Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 ; 100 : 12989–94.
- 37) Betts JC, Lukey PT, Robb LC, et al. : Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. Mol Microbiol. 2002 ; 43 : 717–31.
- 38) Voskuil MI, Schnappinger D, Visconti KC, et al. : Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. J Exp Med. 2003 ; 198 : 705–13.
- 39) Shi L, Jung YJ, Tyagi S, et al. : Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a *Mycobacterium tuberculosis* transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 ; 100 : 241–6.
- 40) Dahl JL, Kraus CN, Boshoff HI, et al. : The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 ; 100 : 10026–31.
- 41) Sherman DR, Voskuil M, Schnappinger D, et al. : Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha-crystallin. Proc Natl Acad Sci USA. 2001 ; 98 : 7534–9.
- 42) Monahan IM, Betts J, Banerjee DK, et al. : Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. Microbiology. 2001 ; 147 : 459–71.
- 43) Park HD, Guinn KM, Harrell MI, et al. : Rv3133c/*dosR* is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol. 2003 ; 48 : 833–43.
- 44) Boon C, Dick T : *Mycobacterium bovis* BCG response regulator essential for hypoxic dormancy. J Bacteriol. 2002 ; 184 : 6760–7.
- 45) Michele TM, Ko C, Bishai WR : Exposure to antibiotics induces expression of the *Mycobacterium tuberculosis sigF* gene : implications for chemotherapy against mycobacterial persistors. Antimicrob Agents Chemother. 1999 ; 43 : 218–25.
- 46) Manganelli R, Dubnau E, Tyagi S, et al. : Expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol. 1999 ; 31 : 715–24.

- 47) Kaushal D, Schroeder BG, Tyagi S, et al.: Reduced immunopathology and mortality despite tissue persistence in a *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking alternative sigma factor, SigH. Proc Natl Acad Sci USA. 2002 ; 99 : 8330-5.
- 48) Zahrt TC, Deretic V: *Mycobacterium tuberculosis* signal transduction system required for persistent infections. Proc Natl Acad Sci USA. 2001 ; 98 : 12706-11.
- 49) Shleeva MO, Bagramyan K, Telkov MV, et al.: Formation and resuscitation of "non-culturable" cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase. Microbiology. 2002 ; 148 : 1581-91.
- 50) Cohen-Gonsaud M, Barthe P, Bagnier C, et al.: The structure of a resuscitation-promoting factor domain from *Mycobacterium tuberculosis* shows homology to lysozymes. Nat Struct Mol Biol. 2005 ; 12 : 270-3.

A-6 結核ワクチンの開発・改良

要約: BCGは小児結核の予防に効果があるが、成人結核には予防効果がないという報告以来、BCGより優れた結核ワクチンを作ることが結核対策上での悲願となっている。1997年から2005年までの9年間で、主要な雑誌に掲載された結核ワクチンに関する英語論文の特徴としては、単に新しい結核ワクチンを作ったというだけの報告ではなく、これらワクチンの *in vivo* における生体内反応を詳しく深く調べている点があげられる。これらの論文をその内容から分類すると、次のように大まかに分けられる。①結核ワクチンの種類、②結核ワクチンに対する免疫応答、③結核ワクチン予防効果の改良、④結核ワクチンの治療効果、⑤その他の結核菌抗原によるワクチン探索。

A-6 (1) 結核ワクチンの種類

結核ワクチンとして、結核 DNA ワクチン¹⁾²⁾、組み換え BCG^{3)~5)}、遺伝子の一部を変異させた結核菌^{6)~8)}、成分ワクチン^{9)~11)}があげられる。(a) DNA ワクチンとしては、MPT64, Ag85B, ESAT-6 遺伝子を組み込んだプラスミド, Ag85A を発現させたワクシニアウイルス, MPB83 を発現させた DNA ワクチンが発表されている。ごく最近、岡田らが結核菌由来 *hsp65* ワクチンをカニクイザルに使用して、予防効果があったと報告している¹²⁾。(b) 組み換えワクチンとして ESAT-6 を発現させた BCG, 結核菌分泌タンパク 30kDa をコードする BCG, latency associated peptide (LAP) を組み込んだ BCG⁵⁾, listeriolysin を組み込んだ BCG¹³⁾が例としてあげられる。(c) 遺伝子の一部が変異された結核菌として、ESAT-6 ノックアウト *M. bovis*, 栄養要求性変異 BCG, lysine 要求性結核菌, *M. microti* 弱毒株があげられる。(d) 成分ワクチンとして、結核菌由来タンパクを含む成分ワクチン、休眠状態の菌が増殖を再開するときに必要なとされる resuscitation promoting factor (RPF) タンパクの論文が、例としてあげられる。今回の論文には出ていないが、S.Reedらが積極的に進めている 72f タンパクも有望で、興味ある結果が報告されている¹⁴⁾。

これらの研究を、今後ヒトに応用するにしても、既存の BCG との併用が中心になると思える。また、Ag85A を発現させたワクシニアウイルスをヒトに投与して免疫賦活作用があったとの報告²⁾は、今後5年間で、臨床応

用に向けたよりよい結核ワクチンが出現することを考えさせる。

A-6 (2) 結核ワクチンに対する免疫応答

結核菌に特異的に反応する CD4⁺T細胞を用いて、大腸菌に発現させた結核菌ゲノムライブラリーを高感度でしかも迅速に調べる技法に関する論文¹⁵⁾は興味深い。Ag85A を組み込んだアルファウイルス・プラスミドによる免疫は、通常のベクターを用いたときと比べて、効果が大きい高められる¹⁶⁾。皮内接種される BCG に比べて経鼻接種 BCG のほうが予防効果が高いという報告¹⁷⁾があり、抗原特異的に IFN- γ がより多く誘導され、また抗原特異的 Tリンパ球も増加している。経口 BCG 免疫の論文¹⁸⁾も存在するが、総じて、よりよい防御効果を誘導するには、投与量、投与時期、投与回数の見極めが大切である。

Trehalose dimycolate (TDM) で被覆した炭素粒子を注入したところ、IL-6, TNF- α , IL-12, IL-10, IFN- γ , IL-4 の産生が肺で見られた¹⁹⁾。このことは、TDM は、DNA ワクチンのアジュバントとなる可能性を示唆する。しかし、TDM は結核菌の重要構成成分で、肉芽腫形成因子でもあり²⁰⁾、使用にあたっては、このバランスに注意しなければならない。

ESAT-6, MPT-64, KatG, HBHA の抗酸菌タンパクをコードした遺伝子と、同一組み換えタンパクを組織プラスミノゲン・アクチベータ (TPA) シグナル配列に組み込まれたワクチンとで免疫能を調べた報告²¹⁾があり、

TPA融合プラスミドDNAがより高い免疫応答を惹起するのが示された。

A-6 (3) 結核ワクチン予防効果の改良

アデノ・ウイルスに抗原遺伝子を組み込んだワクチンを作製し、これを気管支粘膜、腸粘膜に取り込ませてT細胞の動向を調べたところ、当該粘膜にCD4、CD8 T細胞が出現し長期間存在した²²⁾。またBCGを経典的に投与すると、免疫増強がみられたとの報告がある。もう一度原点に戻って、ワクチン投与は、全身がいいのか、局所がいいのか再検討する価値がある。

DNAワクチンの効果を完全なものとするには、アジュバントの開発も重要である。ベルギーパスツール研究所から筋肉注射用アジュバント vaxfectin の論文²³⁾が出た。マウスの実験であるが毒性がないので、ヒトでも使用可能である。マウス実験で、脂質で包んだBCGはBCGより高い防御効果がみられた。BCGが分解されないで長く刺激効果を発揮できたためであろう。特定の遺伝子配列をもつ細菌DNAも、有効なアジュバントになる可能性がある。

最後に、注目される2つの論文を紹介しよう。抗アポトーシスタンパクをコードするDNAを同時投与すると樹状細胞の寿命が延長して防御効果が高められた²⁴⁾。また、IL-12ヘテロ二量体とともに発現させたセルフブライシングベクターは、BCGの防御効果を増強する²⁵⁾という報告は、今までの報告からして理にかなった結果だと思う。

A-6 (4) 結核ワクチンの治療効果

結核ワクチンは主としてその予防効果を狙いとしているが、治療効果をみた時にも効果を認めたという論文は少数ある。INH、PZAで治療を開始し、その後Tb hsp 65 DNAワクチンを3回筋注したところ、3回投与で完全に結核菌が肺内から消失し、BCG投与では完全に結核菌は消失しなかった²⁶⁾。このLowrieらの報告は、DNAワクチンを治療のために使用した初めてのものと思われる。私の研究室でも*M. vaccae*死菌を使って治療実験を行ったが、有意な治療効果はみられなかった。

A-6 (5) その他の結核菌抗原によるワクチン探索

ESAT-6とAg85の融合タンパクをコードするDNAワクチンはBCGと同程度の効果がみられた²⁷⁾。細菌DNAは、マクロファージを刺激して抗菌活性を増加させた²⁸⁾。MPT 83をコードする遺伝子導入DNAワクチンは、肺病変を軽減するが、結核菌の血行性播種を抑制できなかった²⁹⁾。

以上、結核菌由来抗原を用いて高い有効性をもつワクチン

物質の探索が行われてきたが、研究はまだ不十分であると思われる。結核菌全ゲノムが解読されているが、4.4 Mbpの長さの中の既知のタンパク以外に、多くの機能不明なhypothetical proteinが存在している。この中に有望な結核ワクチンの素材が隠されている可能性がある。結核菌遺伝子の一つを相同組み換えによりノックアウトしてミュータントを作り、その遺伝子の機能を調べるのも有力なアプローチである³⁰⁾³¹⁾。この種の論文が、かなり出てきている。

結核ワクチンの基礎・臨床研究はどのように進むのであろうか。地球規模では、まだまだ結核の発生が多い今日、筆者としては、一刻も早く臨床試験に堪えられる結核ワクチンが出現することを望むものである。

(担当：菅原 勇)

文 献

A-6 (1) 結核ワクチンの種類

- 1) Kamath AT, Feng CG, MacDonald W, et al.: Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1999; 67: 1702-7.
- 2) McShane H, Pathan AA, Sander CR, et al.: Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A *bovis* BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nature Med.* 2004; 10: 1240-4.
- 3) Bao L, Chen W, Zhang H, et al.: Virulence, immunogenicity, and protective efficacy of two recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin strains expressing the antigen ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2003; 71: 1656-61.
- 4) Horwitz MA, Harth G: A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect Immun.* 2003; 71: 1672-9.
- 5) Marshall BG, Wangoo A, O'gaora P, et al.: Enhanced antimycobacterial response to recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing latency-associated peptide. *Infect Immun.* 2001; 69: 6676-82.
- 6) Wards BJ, de Lisle GW, Collins DM: An *esat6* knockout mutant of *Mycobacterium bovis* produced by homologous recombination will contribute to the development of a live tuberculosis vaccine. *Tuber Lung Dis.* 2000; 80: 185-9.
- 7) Chambers MA, Williams A, Gavier-Widen D, et al.: Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG auxotrophic mutant that protects guinea pigs against *M. bovis* and hematogenous spread of *Mycobacterium tuberculosis* without sensitization to tuberculin. *Infect Immun.* 2000; 68: 7094-9.
- 8) Pavelka MS Jr, Chen B, Kelly CL, et al.: Vaccine efficacy of a lysine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2003; 71: 4170-82.

- 9) Doherty TM, Olsen AW, Van Pinxteren L, et al.: Oral vaccination with subunit vaccines protects animals against aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2002 ; 70 : 3111-21.
- 10) Yeremeev VV, Kondratieva TK, Rubakova EI, et al.: Proteins of the Rpf family: immune cell reactivity and vaccination efficacy against tuberculosis in mice. *Infect Immun.* 2003 ; 71 : 4789-94.
- 11) Olsen AW, van Pinxteren LAH, Oillels LM, et al.: Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85A and ESAT-6. *Infect Immun.* 2001 ; 69 : 2773-8.
- 12) Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, et al.: Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine.* 2005 ; 23 : 2132-5.
- 13) Grode L, Seiler P, Baumann S, et al.: Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest.* 2005 ; 115 : 2472-9.
- 14) Skeiky YAW, Alderson MR, Owendale PJ, et al.: Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *J Immunol.* 2004 ; 172 : 7618-28.
- A-6 (2) 結核ワクチンに対する免疫応答
- 15) Alderson WR, Bement T, Craig H, et al.: Expression cloning of an immunodominant family of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using human CD4⁺T cells. *J Exp Med.* 2000 ; 191 : 551-9.
- 16) Kirman JR, Turon T, Su H, et al.: Enhanced immunogenicity to *Mycobacterium tuberculosis* by vaccination with an alphavirus plasmid replicon expressing antigen 85A. *Infect Immun.* 2003 ; 71 : 575-9.
- 17) Chen L, Wang J, Zganiacz A, et al.: Single intranasal mucosal *Mycobacterium bovis* BCG vaccination confers improved protection compared to subcutaneous vaccination against pulmonary tuberculosis. *Infect Immun.* 2004 ; 72 : 238-46.
- 18) Manabe YC, Scott CP, Bishai WR: Naturally attenuated orally administered *Mycobacterium microti* as a tuberculosis vaccine is better than subcutaneous *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 2002 ; 70 : 1566-70.
- 19) Lima VM, Bonato VL, Lima KM, et al.: Role of trehalose dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and NO in tuberculosis. *Infect Immun.* 2001 ; 69 : 5305-12.
- 20) Sugawara I, Udagawa T, Hua SC, et al.: Pulmonary granulomas of guinea pigs induced by inhalation exposure of heat-treated BCG Pasteur, purified trehalose dimycolate and methyl ketomycolate. *J Med Microbiol.* 2002 ; 51 : 131-7.
- 21) Zhongming L, Angela H, Cynthia K, et al.: Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue plasminogen activator signal sequences. *Infect Immun.* 1999 ; 67 : 4780-6.
- A-6 (3) 結核ワクチン予防効果の改良
- 22) Santosuosso M, Zhang X, McCormick S, et al.: Mechanisms of mucosal and parenteral tuberculosis vaccinations; Adenoviral-based mucosal immunization preferentially elicits sustained accumulation of immune protective CD4 and CD8 T cells within the airway lumen. *J Immunol.* 2005 ; 174 : 7986-94.
- 23) D'Souza S, Rosseels V, Denis O, et al.: Improved tuberculosis DNA vaccines by formulation in cationic lipids. *Infect Immun.* 2002 ; 70 : 3681-8.
- 24) Kim TW, Hung CF, Ling M, et al.: Enhancing DNA vaccine potency by administration of DNA encoding antiapoptotic proteins. *J Clin Invest.* 2003 ; 112 : 109-17.
- 25) Palendira U, Kamath AH, Feng CG, et al.: Coexpression of interleukin-12 chains by a self-splicing vector increases the protective cellular immune response of DNA and *Mycobacterium bovis* BCG vaccines against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2002 ; 70 : 1949-56.
- A-6 (4) 結核ワクチンの治療効果
- 26) Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VD, et al.: Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature.* 1999 ; 400 : 269-71.
- A-6 (5) その他の結核菌抗原によるワクチン探索
- 27) Delogu G, Li A, Repique C, et al.: DNA vaccine combinations expressing either tissue plasminogen activator signal sequence fusion proteins or ubiquitin-conjugated antigens induce substantial protective immunity in mouse model of pulmonary tuberculosis. *Infect Immun.* 2002 ; 70 : 292-302.
- 28) Hayashi T, Rao SP, Takabayashi K, et al.: Enhancement of innate immunity against *Mycobacterium avium* infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Infect Immun.* 2001 ; 69 : 6156-64.
- 29) Xue T, Stavropoulos E, Yang M, et al.: RNA encoding the MPT83 antigen induces protective immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun.* 2004 ; 72 : 6324-9.
- 30) Pym AS, Brodin P, Majlessi L, et al.: Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nature Med.* 2003 ; 9 : 533-9.
- 31) Lewis KN, Liao R, Guinn KM, et al.: Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics Bacille Calmette-Guérin attenuation. *J Infect Dis.* 2003 ; 187 : 117-23.

A-7 薬剤耐性遺伝子など

要約：この9年間で主要な英文雑誌で発表された14論文は、その内容から、①薬剤耐性を見つける新しい技法、②抗結核剤の新しい機能、③多剤耐性遺伝子そのものの研究、④薬剤耐性と毒力、に分けられる。

A-7 (1) 薬剤耐性を調べる新しい技法

mycobacteriophage D27を用いた新しい迅速薬剤感受性試験法が発表された¹⁾。従来法と比較すると、統計的にRFP感受性94.6%、INH感受性は81%、多剤耐性菌MDRは100%の感度を示した。全行程を終わるのに3~4日であり、BACTECを用いた試験法が21日かかるのに比べると、はるかに短い。薬剤耐性菌では、菌体に侵入したファージが増殖し、菌体外に放出され*M. smegmatis*に入り再増殖するので、プラークの形成が認められるが、感受性菌は、薬剤で殺されるためにファージが菌体に入らず、増殖がみられない。ファージを用いているため、一般の実験室で普及するかは疑問である。

フローサイトメトリーを用いて24時間で結果が出る結核菌の薬剤感受性試験法も発表された²⁾。結核菌に薬剤を加えて24時間、37度で培養後、fluorescein diacetateを30分間作用させる。この後FACSで蛍光強度測定し、感受性株と比較する。fluorescein diacetateが菌由来エステラーゼで分解されfluoresceinを放出することに基づいている。この方法だと、感受性菌と、明らかな耐性菌の判定は容易だが、中等度の耐性菌は、判定が困難になる危険性がある。

結核菌群の検出およびRFP耐性を同時に検出するための逆ハイブリダイゼーション・アッセイの論文は興味をひく³⁾。結核菌群の菌株を検出するための1種類のオリゴヌクレオチド・プローブと*rpoB*部位に関連するヌクレオチド配列の変化を検出するために9種類のプローブを用いている。この逆ハイブリダイゼーション・アッセイは簡易性と迅速性を備えていることから、日常の診断用途に幅広く適用できる有用な試験法と考えられる。

A-7 (2) RFPの抗菌性以外の作用

RFPは広く使われている抗結核剤であり、RNA polymerase β -subunitが標的である。この薬剤が非ステロイド系リガンドであり、ヒト・グルココルチコイド受容体の活性化物質であるとの論文が出た⁴⁾。もし正しいなら、ヒト・グルココルチコイド受容体に結合することにより免疫抑制剤の性質をもつことになる。その後、この結果を否定するデータが出た⁵⁾。この相違は、実験に

使用した細胞種、プロモーターの違いに起因すると述べられているが、再検討が望まれる。

A-7 (3) 多剤耐性遺伝子の研究

結核菌群の*pncA*遺伝子におけるPZA耐性に関与した突然変異に関する論文が出た⁶⁾。*pncA*でこれまで報告されていない17に及ぶ別の変異部位が見出された。そして、染色体上にコードされた遺伝子上での単一の変異によって耐性となることが示唆された。われわれも、同様の経験をしている。中国から提供されたPZA耐性結核菌を解析したところ、様々の突然変異が見つかり、すでに報告されている突然変異とは異なっていた。

エタンプトール(EB)もよく使われる薬剤である。標的は、arabinosyl transferase 遺伝子であり、とくに*embB*が重要である。エタンプトール耐性結核菌は、gene clusterである*embB*オペロンをもっている⁷⁾。この遺伝子のコドン306番目の突然変異が重要で、われわれの研究でも、40%以上に遺伝子変異がみられた。ここがhot spotであろう。

抗酸菌のPZA耐性機序を調べるため、ピラジナミダーゼ活性とPZA取り込みを調べた報告⁸⁾がある。調べたかぎり、*M. tuberculosis*はピラジナミダーゼ活性をもち、PZAの菌体内に取り込みができた唯一の細菌であった。ピラジナミダーゼ活性と取り込みが、PZA耐性結核菌では欠如していた。PZA耐性を推測するのに、この酵素活性を測定することがよく行われている。

抗癌剤耐性癌細胞のあるものは、P糖タンパクを発現している。このタンパクが抗癌剤の排出に、深く関与している。*Lactococcus lactis*由来LmrAは、P糖タンパクと類似した機能をもち興味深い。LmrAが哺乳類細胞で発現し、機能するというのは特に興味深い⁹⁾。残念ながら、結核菌ではこの種の遺伝子の存在は不明である。

*M. avium*のクラリスロマイシン耐性機序を分子生物学的に研究したところ、23Sr RNA 遺伝子ドメインVの変異に由来していた¹⁰⁾。しかし、すべてがこの変異で説明できないので、未知の耐性機構の存在も示唆される。

少し変わった論文も出てきている。*M. smegmatis*, *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis*のINH耐性に関与するのは、*inhA* 遺伝子の過剰発現である¹¹⁾。*kasA*が深く関与すると

いう論文もあり、さらなる検討が必要である。結核菌群は、マクロライドに自然耐性があるが、どのように説明されるのか。細胞壁の薬剤浸透度が低いと説明されているが、NTMでは感受性なので、この説明では不十分である。最近、結核菌群のマクロライド自然耐性には、Erm methyltransferase (ErmMT) 遺伝子の変異が関係するとの報告¹²⁾があり、一考の余地がある。

A-7 (4) 薬剤耐性と毒力

薬剤耐性菌は感受性菌より毒力が強いのかどうかは興味あるテーマだが、研究しにくい側面を有する。ドイツで、451の多剤耐性株を調べたら、58.3%が北京株で、患者の70%が外国生まれであった。従って、多剤耐性株による再感染が治療失敗の原因である。これからすると、薬剤耐性菌がずっと生体内に生存し、細胞性免疫の低下とともに悪化すると、この菌は毒力が強いと考えてもいいのではないか¹³⁾。

IS6110は多剤耐性臨床分離株の *phoP* 毒力因子の転写を仲介するという興味ある報告が出た。*phoP* プロモーター領域に IS6110 をもたない結核菌を陰性対照にして、*phoP* とそのプロモーター領域をプラスミドに組み込んで *M. smegmatis* に移入すると、IS6110 の存在が、*phoP* 発現を強く亢進させた。IS6110 の別の機能が推定され興味深い。IS6110 が、なにも、RFLP のプローブにしか使用されないということではないのである¹⁴⁾。

以上より、抗結核剤とその耐性遺伝子について、標的遺伝子の変異だけで100%耐性を説明できないことがあり、さらに機能を調べる多くの研究が必要であろう。薬剤の取り込み低下とか、他の未知の機構が存在すると思われる。この詳細な研究成果が、別の薬剤開発につながる可能性がある。(担当：菅原 勇)

文 献

A-7 (1) 薬剤耐性を調べる新しい技法

- 1) Wilson SM, Al-Suwadi Z, McNerney R: Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Med.* 1997; 3: 465-8.
- 2) Kirk SM, Mazurek GH, Callister SM, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility results in 24 hours by using flow cytometry. *Clin Microbiol Newsletter.* 1998; 20: 83-90.
- 3) Rossau R, Traore H, Beenhouwer HD, et al.: Evaluation of

the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampicin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 2093-8.

A-7 (2) RFP の抗菌性以外の作用

- 4) Calleja C, Pascussi JM, Mani JC, et al.: The antibiotic rifampicin is a nonsteroidal ligand and activator of the human glucocorticoid receptor. *Nature Med.* 1998; 4: 92-6.
- 5) Ray DW, Lovering AM, Davis JR, et al.: Rifampicin: a glucocorticoid receptor ligand? *Nature Med.* 1998; 4: 1090.

A-7 (3) 多剤耐性遺伝子の研究

- 6) Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, et al.: Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 636-40.
- 7) Telenti A, Phillip WJ, Sreevatsan S, et al.: The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involve in resistance to ethambutol. *Nature Med.* 1997; 3: 567-70.
- 8) Raynaud C, Laneelle M-A, Senaratne RH, et al.: Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamide activity. *Mycobacteriology.* 1999; 145: 1359-67.
- 9) van Veen HW, Callaghan R, Soceneantu L, et al.: A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug resistance P-glycoprotein gene. *Nature.* 1998; 391: 291-5.
- 10) Jamal MA, Maeda S, Kai M, et al.: Molecular basis of clarithromycin-resistance in *Mycobacterium avium intracellulare* complex. *Tubercle Lung Dis.* 2000; 80: 1-4.
- 11) Larsen MH, Vilcheze C, Kremer L, et al.: Overexpression of *inhA*, but not *kasA*, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 2002; 46: 453-66.
- 12) Buriankova K, Doucet-Populaire F, Dorson O, et al.: Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 143-50.

A-7 (4) 薬剤耐性と毒力

- 13) Kubica T, Rusch-Gerdes S, Niemann S: The Beijing genotype is emerging among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Germany. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004; 8: 1107-13.
- 14) Soto CY, Menendez MC, Perez E, et al.: IS6110 mediates increased transcription of the *phoP* virulence gene in a multidrug-resistant clinical isolate responsible for tuberculosis outbreaks. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 212-19.

B. 生体側からの研究

B-1 菌と貪食細胞の付着, TLRs (図3)

要約: 抗酸菌, 特に結核菌の主たる感染臓器は肺であり, そこに常在する肺胞マクロファージが菌にとって安定した宿主であると考えられる。菌がその食細胞に取り込まれる過程では, 抗酸菌菌体成分とマクロファージ細胞表面のいくつかの受容体との反応に加えて, 肺胞腔に恒常的に存在する分子の関与も明らかにされてきている。

B-1 (1) マンノース受容体

結核菌細胞壁表面に存在する糖脂質 lipoarabinomannan (LAM) は強毒菌ではその末端がマンノースでキャップされており (ManLAM), これが菌体最外面に突出している。ManLAMで被覆したビーズをヒト末梢血由来マ

クロファージに貪食させた実験では, マンノース存在下で前培養して, マクロファージのマンノース受容体 (MR) を飽和させることにより特異的に貪食が阻害され, 結核菌の取り込みに LAMと MRの結合が重要であることが報告されている。また, このプロセスはエネルギーおよび細胞骨格の actin 合成に依存し, MRは新たに

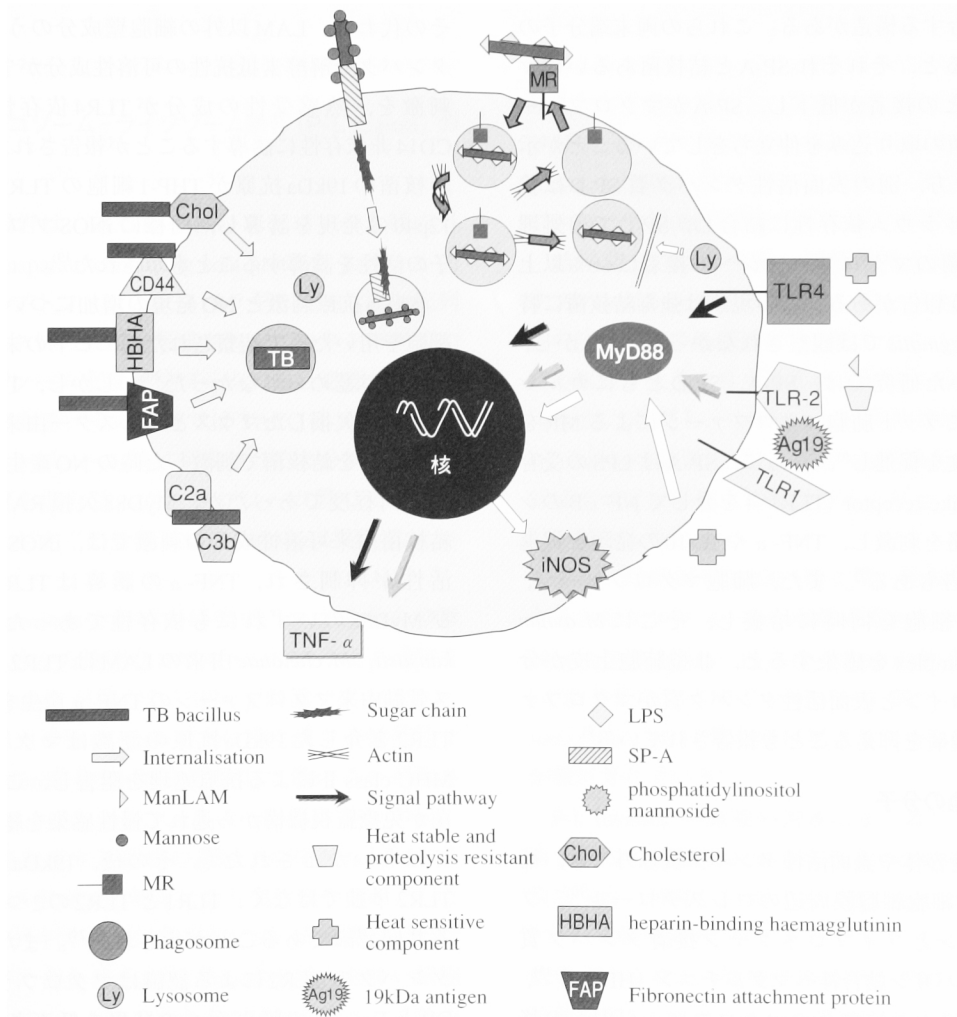


図3 菌のマクロファージ付着

合成されて細胞表面に発現されるよりも、主としてリサイクルされていることも示された¹⁾。また、ManLAMはヒト末梢血単球由来樹状細胞のLPS刺激誘導IL-12産生を濃度依存的に阻害し、強毒菌感染時のTh1応答の誘導を妨害することで、菌の生存に有利に働いている可能性も示唆されている²⁾。

また、マクロファージがManLAMとMRの結合を経て結核菌を取り込む際にはファゴソーム-ライソソーム融合の阻害が起こるが、MRを発現しない細胞やFc γ 受容体を介した貪食で生じたファゴソームでは容易にライソソームと融合することが示されている³⁾。

B-1 (2) 表面活性タンパク質

肺胞腔表面を覆っている表面活性タンパク質がマクロファージによる抗酸菌の取り込みに関与しているという報告がある。表面活性タンパク質の1種SP (Surfactant protein) -Aは構造的に補体成分のC1qと類似してC末端に糖鎖(マンノース)と結合するレクチン様構造があり、N末端にはコラーゲン様領域がありマクロファージ細胞表面糖質と結合する構造がある。これらの両末端分子の働きを阻害すると、それぞれSP-Aと結核菌あるいはマクロファージとの接着が低下し、SP-Aがマクロファージによる結核菌の取り込みを仲立ちをしていることが示唆された⁴⁾。一方、別の表面活性タンパク質SP-Dは強毒結核菌とカルシウム依存性に結合し、SP-Dで前処理した強毒結核菌のマクロファージへの接着は60%以上低下するという報告がある。この現象は強毒結核菌に特異的で、*M. smegmatis*では観察されなかった⁵⁾。しかし、*M. avium*を用いた研究では、SP-A、SP-Dともにカルシウム非依存性にラット肺胞マクロファージによるMRを介した菌の貪食を促進し⁶⁾、さらに、SP-AはLPSの受容体であるToll-like receptor (TLR) 4を介してNF- κ Bのシグナル伝達経路を刺激し、TNF- α やIL-10の発現を促進するという報告もある⁷⁾。また、肺胞マクロファージ、II型肺胞上皮細胞を同時に培養し、そこに*M. avium intracellulare* complexを感染すると、II型肺胞上皮が分泌するサイトカインと表面活性タンパク質がマクロファージ内の菌の増殖を抑えることも報告されている⁸⁾。

B-1 (3) その他の分子

マンノース受容体や表面活性タンパク質以外では、補体成分⁹⁾、貪食細胞細胞膜周囲のコレステロール¹⁰⁾、フィブロネクチンとフィブロネクチン接着タンパク質(FAP)¹¹⁾¹²⁾、ヘパリン結合性ヘマグルチニン(HBHA)¹³⁾、CD44¹⁴⁾などが様々な抗酸菌のマクロファージ内への移行に関与していることが示されている。

M. avium subsp. *paratuberculosis*の腸管上皮細胞への侵

入には35kDa major membrane protein (MMP)が重要な役割を果たしており¹⁵⁾、また、*M. marinum*のマクロファージ感染には*mel1*と*mel2*という遺伝子領域にある11の遺伝子の産物が重要であるという報告がある¹⁶⁾。

B-1 (4) Toll-like receptors

昆虫のショウジョウバエ(*Drosophila*)の免疫担当細胞で病原菌と直接接触する受容体として同定されたTollの類縁構造が、植物や脊椎動物でも発見され、Toll-like receptor (TLR)として総称されている。抗酸菌とマクロファージの相互作用においても、複数のTLRと菌体成分の関わりが報告されている。

初期の報告では、結核菌のLAMを含む菌体成分がTLR2に認識され、細胞内のMyD88を介するシグナル伝達を介してTNF- α の産生を促すことが示された¹⁷⁾。しかし、同時期に、別の研究室で、迅速発育菌由来のLAMはTLR2を介して受容体を発現する細胞の活性化を誘導したが、結核菌やBCG菌由来のLAMはTLR2、TLR4のいずれの受容体経由の細胞活性化も誘導せず、その代わり、LAM以外の細胞壁成分のうち熱安定性でタンパク分解酵素抵抗性の可溶性成分がTLR2依存性の刺激を、熱感受性の成分がTLR4依存性の活性化をCD14非依存性に誘導することが報告された¹⁸⁾。さらに、結核菌の19kDa抗原がTHP-1細胞のTLR2を介してIL-12p40の発現を誘導し、同様にiNOSプロモーター遺伝子の活性を誘導することも示された¹⁹⁾。

19kDa抗原刺激とNO発現の増加についてはマウスの細胞を用いた系で観察されたが、ヒトの末梢血由来単球の系では認められなかった²⁰⁾。しかし、TLR2、TLR4をそれぞれ欠損したマウスとハムスター由来の腹腔マクロファージを結核菌で刺激した時のNO産生量はwildの個体と同程度であったが、MyD88欠損RAW264.7細胞の結核菌由来可溶性成分の刺激では、iNOSプロモーター活性が抑制され、TNF- α の誘導はTLR2、TLR4およびMyD88のいずれにも依存性であった²¹⁾。また、*M. kansasii*、*M. chelonae*由来のLAMはTLR2を介してマウス骨髄由来マクロファージのTNF- α 産生を誘導した²²⁾。TLR2を介した19kDa抗原の認識はマクロファージのMHC class IIによる抗原処理を阻害し、これにより結核菌が免疫監視機構から逃れて慢性感染を維持しているのではないかとされた²³⁾。その後、19kDa抗原の認識はTLR2単独ではなく、TLR1とTLR2の2つの受容体による共同認識であることが示された²⁴⁾。また、19kDaリポタンパクのTLR2による認識はマクロファージのHLA-DRとFc γ R1の膜表面への発現を低下させ、抗原提示能を阻害して菌の生存に貢献しているという報告もある²⁵⁾。

TLR2欠損マウスを用いた吸入感染実験では、感染後5カ月以内にすべてのマウスが死亡したが、それらのマウスでは野生型対照マウスと比較してIFN- γ 、TNF- α 、IL-12p40の発現が増加し、肺組織内のCD4⁺、CD8⁺細胞も増加していた。マウス死亡の原因として、炎症反応の調節がTLR2の欠損により支障をきたしているためであろうとされた²⁶⁾。正常なTLR4の機能が欠損しているC3H/HeJマウスを用いた吸入感染実験で、正常なTLR4

を発現するC3H/HeNと比較して感染1カ月以降、肺、脾、肝臓での臓器内生菌数の増加が見られた。NF- κ Bを刺激してTh1サイトカイン等の発現を促す抗酸菌リン脂質抗原 phosphatidylinositol mannosideは本来TLR4により認識されるが、C3H/HeJマウスではこの経路が正常に機能していないことが原因である可能性が示された²⁷⁾。

(担当：山田博之)

B-2 貪食細胞内での菌と宿主細胞の相互作用 (図4)

要約：結核菌は細胞内寄生菌であり、貪食したマクロファージ内で生存、増殖できるか否かが菌と宿主の両方にとって大きな問題である。一般的に、マクロファージに貪食された病原菌は、病原菌を包含するファゴソームと種々の分解酵素で満たされたライソゾームが融合することにより、それらの酵素が作用して殺菌されると考えられている。しかし、結核菌を含む抗酸菌は、進化の過程でファゴソームとライソゾームの融合(P-L fusion)を阻害し、ファゴソームの中で長期にわたり生存、増殖する能力を獲得して生き続けている。菌の殺菌に必要なP-L fusionを、結核菌がどのようにして阻害しているかについて報告されている。

B-2 (1) ファゴソーム-ライソゾーム融合(P-L fusion)の阻害

興味深い報告は、BCG菌を含むファゴソーム膜の外側 tryptophan aspartate-containing coat protein, TACOと名付けられトリプトファンとアスパラギンの繰り返し配列をもつタンパク質の被覆が形成され、このタンパク質の存在がファゴソームとライソゾームの融合を妨げているとするものである。その報告ではTACOはBCG生菌を取り込んだファゴソーム膜に形成されると分解されずに残るが、死菌を取り込んだファゴソーム膜ではいったん形成されるがすぐに遊離してP-L fusionが起きたという²⁸⁾。

また、*M. fortuitum*を用いた研究で、マウスから分離された単一菌株から透明なコロニー(SmTr)と不透明なコロニー(SmOp)が得られ、IFN- γ 刺激マクロファージ感染後に毒力の強いSmTrはNO産生減少と抵抗性を示し、P-L fusion率もSmOpと比較して低いことが示された²⁹⁾。

P-L fusionを阻害する菌側の遺伝子の検討も行われている。トランスポゾン導入により突然変異を起こした結核菌を、鉄デキストランでライソゾームを標識したマクロファージに貪食させ、P-L fusionが起きた後、細胞を破碎し、鉄デキストランを含んだ分画に存在する菌を分離してその菌で欠失した遺伝子を解析した。その結果、未知の機能の遺伝子、トランスポーター、脂質合成

酵素など多数の遺伝子の関与が示された³⁰⁾。その後、ファゴソーム内で菌が分泌するセリン/スレオニン protein kinase G (PKG)がP-L fusionの阻害に関与している可能性が、PKG欠損BCG菌を用いた研究で明らかにされた³¹⁾。

結核菌H37Raの生菌、加熱死菌、放射線処理死菌、リファンピシン処理死菌について、マクロファージ貪食後の抗原85Bの処理過程を比較したところ、加熱死菌が他の死菌、生菌よりも多くのT細胞への抗原提示性がみられた。ただし、lysotrackerと共焦点顕微鏡を用いたP-L fusionの確認では、生菌のみが融合を阻害し、死菌ではすべて80%以上の融合がみられた。生菌では、40%以下であった³²⁾。

また、結核菌CDC1551株を用いた検討では、菌を取り込んだファゴソームの成熟が遅れるのは phosphatidylinositol-3-phosphate (PI-3-P) kinaseの働きが低下し、PI-3-P依存性に起こるファゴソーム膜への early endosome autoantigen EEA1発現が抑制されているためであることが報告されている³³⁾。

P-L fusionとの直接の関連は示されていないが、結核菌と同じく細胞内寄生菌である *Salmonella enterica* の細胞内生存、増殖に必須である遺伝子 *mgtC* の類縁遺伝子(アミノ酸相同性38%)を不活化した結核菌強毒株は、低マグネシウム・弱酸性環境での増殖が低下しており、結核菌においても *mgtC* 遺伝子によるファゴソーム内のマグネシウムイオン獲得が菌増殖、さらには病原性に必須であることが示唆された³⁴⁾。

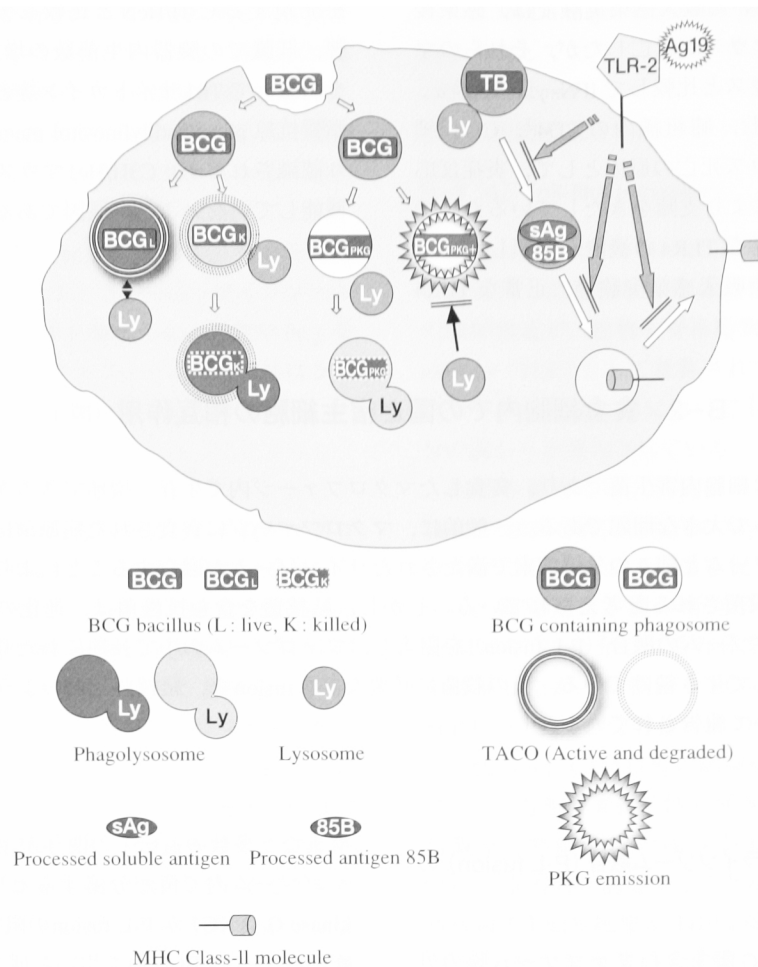


図4 マクロファージ内での菌と宿主の相互作用

B-2 (2) ファゴソーム膜の透過性

BCG (Connaught) を取り込んだファゴソームでは膜の透過性が向上して生存・増殖に必要な栄養分の補給が容易になると同時に、菌体の抗原成分がMHC分子により提示されやすくなることが示唆された³⁵⁾。また、BCG (Pasteur) を用いた研究で、ファゴソーム内の菌からFAPや抗原85複合体が細胞質へ流出しているのをwestern blotting法と免疫電顕法で確認した報告もある³⁶⁾。さらに、H37Raを取り込んだIFN- γ 刺激マクロファージではAntigen 85BとMHC class II分子が食後20分以降細胞膜上に検出されるが、この現象は生菌よりも死菌のほうが早く進行し、生菌がファゴソームの成熟や抗原とMHCの結合を低下させることも報告されている³⁷⁾。タンパク質以外の菌体成分としては、BCG (Pasteur) を取り込んだマウス骨髄由来マクロファージを破砕し、密度勾配遠心で菌を含まない分画に含まれる菌体成分を薄層クロマトグラフィーで調べたところ、phosphatidylinositol dimannosides (PIM2) などいくつかの脂質が確認された。

これらの脂質で被覆したビーズをIFN- γ 刺激マクロファージに食食させるとTNF- α 、MCP-1などの産生がみられ、抗酸菌の脂質がマクロファージによる炎症性サイトカイン産生と肉芽腫形成に寄与することが示された³⁸⁾。

B-2 (3) P-L fusionの殺菌機構

強毒結核菌Erdman株とIFN- γ KO、IFN- γ RKO、STAT-1KO、NOS2KOマウスを用いた実験でIFN- γ 誘導性NO以外の殺菌機序としてGTPファミリーのLRG47の関与が示唆された³⁹⁾。LRG47欠損マウスに*M. avium*を感染させると肺、肝臓における菌数は野生型マウスと比較して有意に増加していたが、肝臓における肉芽腫形成は野生型より貧弱で、脾臓内、末梢血内のリンパ球数が減少しており、LRG47がリンパ球動員の調節因子である可能性が示唆された⁴⁰⁾。

B-2 (4) Autophagyによる殺菌機構

一般に細胞外の異物を食食し、分解処理する過程はへ

テロファジーと称されるが、細胞内の老廃物やオルガネラをその細胞内で処理する過程はオートファジーと称され、これまであまり注目されていなかった。しかし近年、様々な病原菌の殺菌にオートファジーの機序が関与している可能性が報告されている。薬物やアミノ酸飢餓状態においたマクロファージに菌を感染させるとオートファジー膜の成熟が起こり、ライソゾームと融合しなかったファゴソームをまるごと取り込みそこにライソゾームが融合して殺菌する。このオートファジーの誘導にはIFN- γ で誘導されるLRG47が関与している可能性も示唆されている⁴¹⁾⁴²⁾。(担当：山田博之)

文 献

B-1 (1) マンノース受容体

- 1) Kang BK, Schlesinger LS: Characterization of mannose receptor-dependent phagocytosis mediated by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. *Infect Immun.* 1998 ; 66 : 2769-77.
- 2) Nigou J, Zelle-Rieser C, Gilleron M, et al.: Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: Evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol.* 2001 ; 166 : 7477-85.
- 3) Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, et al.: The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med.* 2005 ; 202 : 987-99.

B-1 (2) 表面活性タンパク質

- 4) Pasula R, Downing JF, Wright JR, et al.: Surfactant protein A (SP-A) mediates attachment of *Mycobacterium tuberculosis* to murine alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997 ; 17 : 209-17.
- 5) Ferguson JS, Voelker DR, McCormack FX, et al.: Surfactant protein D binds to *Mycobacterium tuberculosis* bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. *J Immunol.* 1999 ; 163 : 312-21.
- 6) Kudo K, Sano H, Takahashi H, et al.: Pulmonary collectins enhance phagocytosis of *Mycobacterium avium* through increased activity of mannose receptor. *J Immunol.* 2004 ; 172 : 7592-602.
- 7) Guillot L, Balloy V, McCormack FX, et al.: The immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol.* 2002 ; 168 : 5989-92.
- 8) Sato K, Tomioka H, Shimizu T, et al.: Type II alveolar cells play roles in macrophage-mediated host innate resistance to pulmonary mycobacterial infections by producing proinflammatory cytokines. *J Infect Dis.* 2002 ; 185 : 1139-47.

B-1 (3) その他の分子

- 9) Schorey JS, Carroll MC, Brown EJ, et al.: A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science.* 1997 ; 277 : 1091-3.

- 10) Gatfield J, Pieters J: Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science.* 2000 ; 288 : 1647-50.
- 11) Middleton AM, Chadwick MV, Nicholson AG, et al.: The role of *Mycobacterium avium* complex fibronectin attachment protein in adherence to the human respiratory mucosa. *Mol Microbiol.* 2000 ; 38 : 381-91.
- 12) Secott TE, Lin TL, Wu CC: Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect Immun.* 2001 ; 69 : 2075-82.
- 13) Pethe K, Alonso S, Biet F, et al.: The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. *Nature.* 2001 ; 412 : 190-4.
- 14) Leemans JC, Florquin S, Heikens M, et al.: CD44 is a macrophage binding site for *Mycobacterium tuberculosis* that mediates macrophage recruitment and protective immunity against tuberculosis. *J Clin Invest.* 2003 ; 111 : 681-9.
- 15) Bannantine JP, Huntley JF, Miltner E, et al.: The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells. *Microbiology.* 2003 ; 149 : 2061-9.
- 16) El-Etr SH, Subbian S, Cirillo SL, et al.: Identification of two *Mycobacterium marinum* loci that affect interactions with macrophages. *Infect Immun.* 2004 ; 72 : 6902-13.

B-1 (4) Toll-like receptors

- 17) Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, et al.: Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 ; 96 : 14459-63.
- 18) Means TK, Wang S, Lien E, et al.: Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1999 ; 163 : 3920-7.
- 19) Brightbill HD, Libraty D, Krutzik SR, et al.: Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science.* 1999 ; 285 : 732-6.
- 20) Thoma-Uszynsky S, Stenger S, Takeuchi O, et al.: Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science.* 2001 ; 291 : 1544-7.
- 21) Means TK, Jones BW, Schromm AB, et al.: Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage responses. *J Immunol.* 2001 ; 166 : 4074-82.
- 22) Quesniaux VJ, Nicolle DM, Torres D, et al.: Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J Immunol.* 2004 ; 172 : 4425-34.
- 23) Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, et al.: Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2001 ; 167 : 910-8.
- 24) Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, et al.: Role of Toll-like

- receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol.* 2002 ; 169 : 10-4.
- 25) Gehring AJ, Rojas RE, Canaday DH, et al.: The *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-regulated HLA-DR and Fc gamma R1 on human macrophages through Toll-like receptor 2. *Infect Immun.* 2003 ; 71 : 4487-97.
- 26) Drennan MB, Nicolle D, Quesniaux VJ, et al.: Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Am J Pathol.* 2004 ; 164 : 49-57.
- 27) Abel B, Thiebmont N, Quesniaux VJ, et al.: Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol.* 2002 ; 169 : 3155-62.
- B-2 (1) ファゴソーム-ライソソーム融合 (P-L fusion) の阻害
- 28) Ferrari G, Langen H, Naito M, et al.: A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell.* 1999 ; 97 : 435-47.
- 29) Da Silva TR, De Freitas JR, Silva QC, et al.: Virulent *Mycobacterium fortuitum* restricts NO production by a gamma interferon-activated J774 cell line and phagosomelysosome fusion. *Infect Immun.* 2002 ; 70 : 5628-34.
- 30) Pethe K, Swenson DL, Alonso S, et al.: Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective in the arrest of phagosome maturation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 ; 101 : 13642-7.
- 31) Walburger A, Koul A, Ferrari G, et al.: Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science.* 2004 ; 304 : 1800-4.
- 32) Ramachandra L, Smialek JL, Shank SS, et al.: Phagosomal processing of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85B is modulated independently of mycobacterial viability and phagosome maturation. *Infect Immun.* 2005 ; 73 : 1097-105.
- 33) Purdy GE, Owens RM, Bennett L, et al.: Kinetics of phosphatidylinositol-3-phosphate acquisition differ between IgG bead-containing phagosomes and *Mycobacterium tuberculosis*-containing phagosomes. *Cell Microbiol.* 2005 ; 7 : 1627-34.
- 34) Buchmeier N, Blanc-Potard A, Ehrt S, et al.: A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* 2000 ; 35 : 1375-82.
- B-2 (2) ファゴソーム膜の透過性
- 35) Teitelbaum R, Cammer M, Maitland ML, et al.: *Mycobacterial infection* of macrophages results in membrane-permeable phagosomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 ; 96 : 15190-5.
- 36) Beatty WL, Russell DG.: Identification of mycobacterial surface proteins released into subcellular compartments of infected macrophages. *Infect Immun.* 2000 ; 68 : 6997-7002.
- 37) Ramachandra L, Noss E, Boom WH, et al.: Processing of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85B involves intraphagosomal formation of peptide-major histocompatibility complex II complexes and is inhibited by live bacilli that decrease phagosome maturation. *J Exp Med.* 2001 ; 194 : 1421-32.
- 38) Rhoades E, Hsu F, Torrelles JB, et al.: Identification and macrophage-activating activity of glycolipids released from intracellular *Mycobacterium bovis* BCG. *Mol Microbiol.* 2003 ; 48 : 875-88.
- B-2 (3) P-L fusion後の殺菌機構
- 39) MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD : Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science.* 2003 ; 302 : 654-9.
- 40) Feng CG, Collazo-Custodio CM, Eckhaus M, et al.: Mice deficient in LRG-47 display increased susceptibility to mycobacterial infection associated with the induction of lymphopenia. *J Immunol.* 2004 ; 172 : 1163-8.
- B-2 (4) Autophagyによる殺菌機構
- 41) Vergne I, Chua J, Singh SB, et al.: Cell biology of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004 ; 20 : 367-94.
- 42) Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, et al.: Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell.* 2004 ; 119 : 753-66.

B-3 細胞・核内シグナル伝達系の解明

要約：結核菌など抗原に接した細胞は、細胞膜外受容体の刺激が細胞膜下のアダプター分子に伝達されて細胞質内の種々のシグナル伝達系をリン酸化により活性化し、NF κ Bが核内移行しDNA鎖プロモーターとの結合により、下流遺伝子の活性化と種々の炎症性タンパクの産生をきたす。結核菌に対する先天免疫では、細胞膜受容体のTLR2からMyD88を介してIFN- γ 産生に至る経路が重要であり、菌体成分の一部はそれを阻害する働きももつが、結核菌と *Mycobacterium avium* では阻害のしかたに差がある。シグナル伝達分子としては、MAPK, CREB, LRG, NEMOなどの分子の動きが紹介された。一次および二次免疫における細胞内シグナル伝達系全体の中での意味を考えるのに必要と思われる図を以下に示した(図5)。

B-3 (1) 結核感染とTLRを介するシグナル伝達系

結核に対する生体防御機構に関して、MyD88を介するToll-like receptors (TLRs)の役割が重要であることが報告された¹⁾。MyD88はTLRs/IL-1Rのシグナルを伝達するのに必須のアダプター分子であり、これをノックアウトしたマウスに結核菌を感染させると、野生型マウスと比較し非常に早期に死亡することが示された。しかし、MyD88ノックアウトマウスにおいてTLRを介する自然免疫は、結核感染の初期防御においては重要であるが、獲得免疫はMyD88非依存性であることが示された²⁾。すなわち、結核に対する生体防御機構は、感染初

期のMyD88依存的な自然免疫系によるものと、その後のMyD88非依存的な獲得免疫による2者があることが明らかになった。また、結核菌とTLRを介するシグナル伝達系の関わりについては、結核菌成分(19kDaリポタンパク)がTLR2を介し、マクロファージの抗原提示能を亢進させるIFN- γ の作用を阻害することが報告されている³⁾。その後、マクロファージに対するIFN- γ 以外の作用も結核菌成分により抑制されることが報告されたが、その中で19kDaリポタンパクに加え、結核菌の細胞壁に含まれる他の特有の成分であるmycolylarabinogalactan peptidoglycanもMyD88非依存的にIFN- γ のマクロファージ活性化作用を阻害することが報告された⁴⁾。

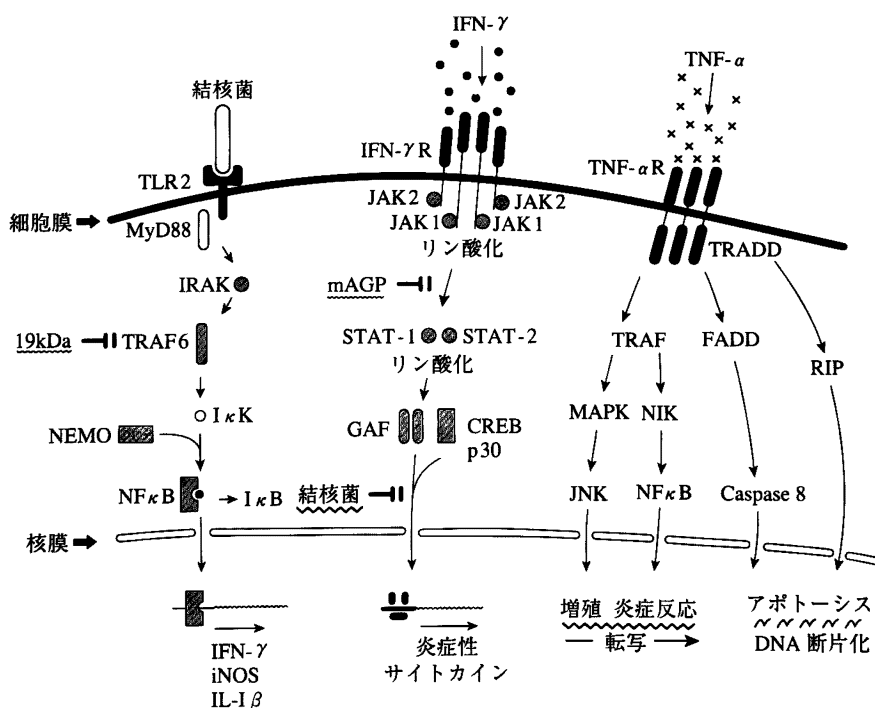


図5 各種細胞内シグナル伝達系

このように、結核菌体成分にはTLRs依存性のものと非依存性のものが含まれていることが明らかになり、さらに結核菌増殖抑制性サイトカインであるIFN- γ の作用を阻害することにより、結核菌が生体防御機構から逃れる性質を進化させてきたことが窺われる。しかし、MyD88依存的な自然免疫系が結核感染初期の防御にとって重要であるという事実から、結核菌は少なくとも一部の生体防御機構を活性化すると考えられる。今後、結核菌体成分による生体防御機構に対するポジティブおよびネガティブな作用の詳細な検討が望まれる。

B-3 (2) 結核菌体成分とサイトカインによる細胞内シグナル伝達系活性化

前述の、結核菌19kDaリポタンパクのIFN- γ 阻害作用の機構として、STAT-1のリン酸化、核内への移行およびIFN- γ 感受性プロモーターへの結合が検討され、19kDaリポタンパクはIFN- γ の細胞内シグナル伝達系には影響しないことが示されているが、結核菌がIFN- γ の細胞内シグナル伝達系を阻害する機構として、STAT-1と転写共活性化因子であるCREB結合タンパク、およびp300との結合を阻害することが示された⁵⁾。一方、*M. avium*感染したマクロファージにおいては、IFN- γ 受容体発現低下に起因するJAK1, JAK2, およびSTAT-1のリン酸化が抑制される結果として、IFN- γ の作用が阻害されることが報告された⁶⁾。すなわち、菌種による阻害機構の相違の可能性が示唆された。

細胞性免疫を誘導するのに重要な役割を果たしているIL-12に関して、*M. avium*感染を繰り返す患者において、IL-12で活性化されるSTAT-4の核内移行が阻害されることにより、IL-12のシグナル伝達が抑制されることが示された⁷⁾。このような機構による抗酸菌感染への高感受性の報告は初めてであり、今後の詳細な抑制機構の解明が待たれる。

B-3 (3) シグナル伝達分子

抗酸菌感染とその他のシグナル伝達分子の関わりについては、多数のサイトカインの細胞内シグナル伝達に関与しているMitogen activated protein kinase (MAPK)の活性が、病原性抗酸菌の感染したマクロファージにおいて、非病原性抗酸菌感染と比較し低下していることが示された⁸⁾。同時に、病原性抗酸菌感染マクロファージではTNF- α , IL-1 β , iNOS2産生の低下もみられている。この論文は、病原性抗酸菌感染によりMAPK活性の低

下が起こる結果、免疫防御機能に必要な分子の産生が低下し、効果的な免疫防御機能を発揮できないという、重要で新たな知見を示した。最近彼らは、さらにこの知見をより詳細に検討し、非病原性抗酸菌感染において転写因子の一つであるcyclic AMP response element binding protein (CREB)が、病原性抗酸菌感染よりも活性化しており、CREBがp38 MAPKのシグナル伝達の下流に位置することから、TNF- α 産生に重要な役割を果たしていると報告している⁹⁾。彼らは同時に、病原性抗酸菌感染によりserine/threonine phosphataseであるPP2Aの活性が亢進することによりMAPK活性の低下をきたすことを示唆している。このように、抗酸菌感染の際のシグナル伝達機構が徐々に解明されつつあり、薬剤の標的が近い将来発見されると期待される。また、直接的なシグナル伝達分子ではないが、IFN- γ により誘導される47kDaのGTP結合性タンパクであるLRG-47を欠損したマウスにおいて、*M. avium*感染によりリンパ球数の減少が起こることが報告されている¹⁰⁾。この結果は、LRG-47が抗酸菌感染の際、リンパ球の生存にとって重要であることを示唆しており、この点においても抗酸菌感染抑制におけるIFN- γ の重要性がみられる。

抗酸菌感染とは直接的に関連しないが、多数のサイトカインやTLRのシグナル伝達系に関与している、核内転写因子NF κ Bの活性化機構に関して興味ある知見が報告された¹¹⁾。NF κ Bの活性化には、調節タンパクであるNEMO (NF κ B essential modifier)が必要であり、またNF κ B抑制タンパク(I κ B)リン酸化酵素IKK (これはIKK α とIKK β の2つのリン酸化酵素の複合体である)の活性も必要とされる。このNEMOのN末端にある α ヘリックス領域と、IKK α およびIKK β のC末端部分にあるNEMO結合領域(NBD)が結合することが示され、さらにNBDペプチドを添加するとサイトカインにより誘導されるNF κ Bの活性化と、それに依存性の遺伝子発現が抑制されること、およびマウスを用いた急性炎症実験においてNBDペプチドが炎症反応を改善することが報告された。この知見は、消炎性薬剤の開発につながるものであり、今後の進展が注目される。

新たな細胞・核内シグナル伝達系の研究方法としては、21個のヌクレオチドRNAを細胞培養系に添加することにより、これをコードする遺伝子の発現が特異的に阻害されることが報告された¹²⁾。この方法RNAiを用いることにより、従来より簡便に遺伝子機能の解析が行われるようになることが期待される。(担当：原田登之)

B-4 抗酸菌感染における細胞内殺菌活性とアポトーシス

要約：感染防御の最終的段階である殺菌作用にはいくつかの機序が考えられており、また殺菌活性を抑制する因子の存在も、結核菌が免疫機構から逃れて細胞内で生存を続けうる機序として指摘されている。IFN- γ や TNF- α 刺激による RNI および ROI の産生は細胞内殺菌に関与しているが、主として CD8⁺T リンパ球顆粒から放出される perforin と granzyme とは、細胞の融解、菌放出と殺菌作用とで、マクロファージ内菌を殺しうると報告された。一方、殺菌抑制的に働く因子として SP-A があり、また結核菌の産生物質で殺菌に拮抗作用を示すものも見出されている。アポトーシスに陥った細胞内では、細胞内菌増殖が抑制されると考えられているが、結核菌がアポトーシス阻害タンパクの Mcl-1 を誘導し、アポトーシスを回避するという報告がある。アポトーシスに陥った細胞からは、抗原物質の細胞外放出があり、それを別の細胞が貪食することが推定され、ことに樹状細胞への抗原物質移行は重要な意味をもつと思われる。これらを図6に示した。

B-4 (1) 殺菌因子 (図6)

生体は細胞内に感染した抗酸菌を除去し、感染菌による発病を防ぐために効率的にマクロファージや NKT 細胞を活性化させるカスケード機構を有している。

T細胞由来の IFN- γ は単独でも濃度依存的に細胞内感染菌の増殖を抑制し、マクロファージに対して反応性窒素中間体 (reactive nitrogen intermediate: RNI) の一つである NO 産生を促進させるが、TNF または TNF₇₀₋₈₀ が加わると活性化はさらに増強する。TNF および合成

TNF₇₀₋₈₀ によるマクロファージの活性化は TNF または IFN- γ に対する中和抗体で阻害され、NO 産生と抗酸菌増殖阻害は L-arginine 競合阻害剤で iNOS をブロックすることにより消失した。また、TNF または合成 TNF₇₀₋₈₀ によるマクロファージの活性化は、可溶性 I 型 TNF レセプターにより阻害されることから、TNF₇₀₋₈₀ 11 mer のアミノ酸配列はシグナル伝達に I 型 TNF レセプターを使用していることが示された¹³⁾。これらの成績から、TNF₇₀₋₈₀ を用いた治療法開発への可能性が示された。

また、RNI 生成酵素である iNOS や、マクロファージ

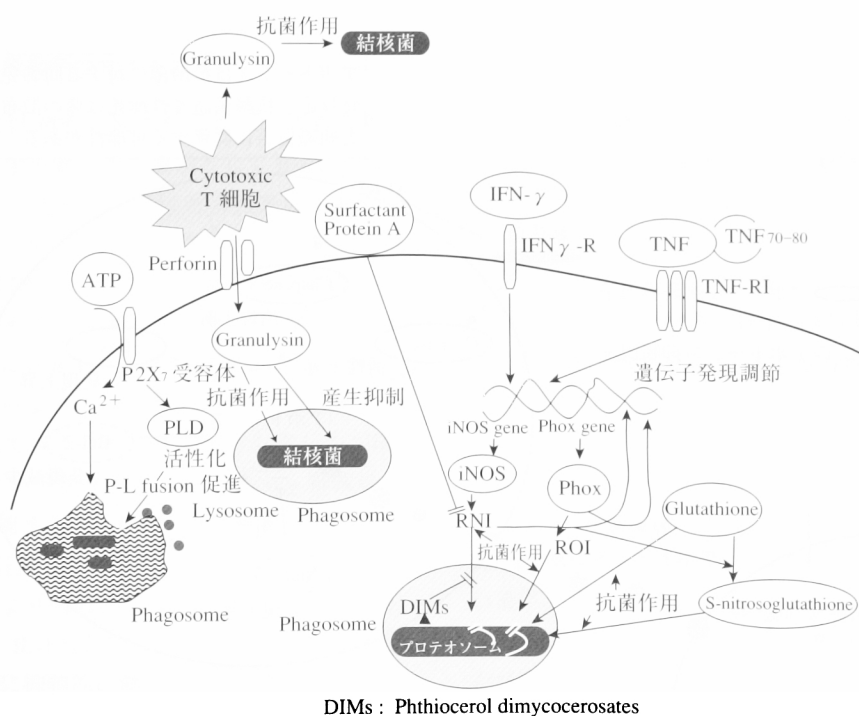


図6 マクロファージ内殺菌および殺菌抑制因子

で主に反応性酸素中間体を生成する phagocyte oxidase 自体の発現が、マクロファージの殺菌活性を支える強力な転写遺伝子群を誘導し、再編していることが示された¹⁴⁾。抗酸菌に感染したマクロファージを ATP 処理すると、細胞内抗酸菌の迅速な殺菌と細胞のアポトーシスを誘導するが、細胞内抗酸菌の殺菌は ATP 受容体である P2X₇ を介してファゴソーム-ライソソーム融合を引き起こすことに起因することが示された¹⁵⁾。一方、細胞のアポトーシスはこの経路とは別であることも示された。これら酸素あるいは窒素の反応性中間体が産生される際に、細胞によって高濃度に合成されるグルタチオンが、細胞内抗酸菌の抑制に重要な役割を果たしているという興味ある研究も発表された¹⁶⁾。

CD8⁺CTL が産生する granulysin と perforin¹⁷⁾ は相互的に作用して、細胞内感染菌を直接殺菌することが示された。また、ハンセン病の病変部位での granulysin の発現解析の結果、CD4⁺T 細胞由来の granulysin が感染における宿主防御機構の一因であることが示された¹⁸⁾。さらに、V γ 9/V δ 2 T 細胞由来の granulysin と perforin¹⁹⁾、NKT 細胞由来の granulysin が宿主防御機構に関与していることが示唆されている²⁰⁾。

B-4 (2) 抗殺菌因子

生体が産生する生化学的物質や抗酸菌自体が産生する物質が殺菌抵抗性の因子として殺菌作用を抑制する機構が存在する。結核菌と肺胞マクロファージの付着に介在

する Surfactant protein A (SP-A) は、マクロファージの RNI 産生レベルを抑制し、細胞内の結核菌増殖を促進するが、RNI レベルが有意に低下することで細胞傷害性は軽減されることが考えられる。この機構に特異的に作用する物質は、結核菌を deglycosylated SP-A とマクロファージと共に培養した時に RNI 産生抑制が消失することから、結核菌に付着する SP-A の oligosaccharide が RNI 産生抑制に必須であることが示唆された²¹⁾。マウスの肺、肝臓、腎臓において BCG 菌が生存維持するためには、嫌気性硝酸塩還元酵素が必要であることを実証した研究があり、この酵素は広義の意味で殺菌抑制因子と考えられる²²⁾。また、結核菌のもつプロテオソームが、マクロファージによる酸化や窒化ストレスに対する防御機構としての役割を果たしていることが示唆された²³⁾。さらに結核菌の産生する phthiocerol dimycocerosates (DIMs) が、反応性窒素中間体の殺菌作用から菌を守ることも報告されている²⁴⁾。

B-4 (3) アポトーシス (図7)

結核菌が単球やマクロファージに感染すると細胞はアポトーシスを起こすが、その機構についていくつかの研究報告がある。

結核菌が感染した単核球のアポトーシスは、アポトーシスの阻害分子である Bcl-2 の減少により調節されていることを示し、さらにアポトーシスにより結核菌の増殖が阻害されている可能性を論じている²⁵⁾。また結核菌感

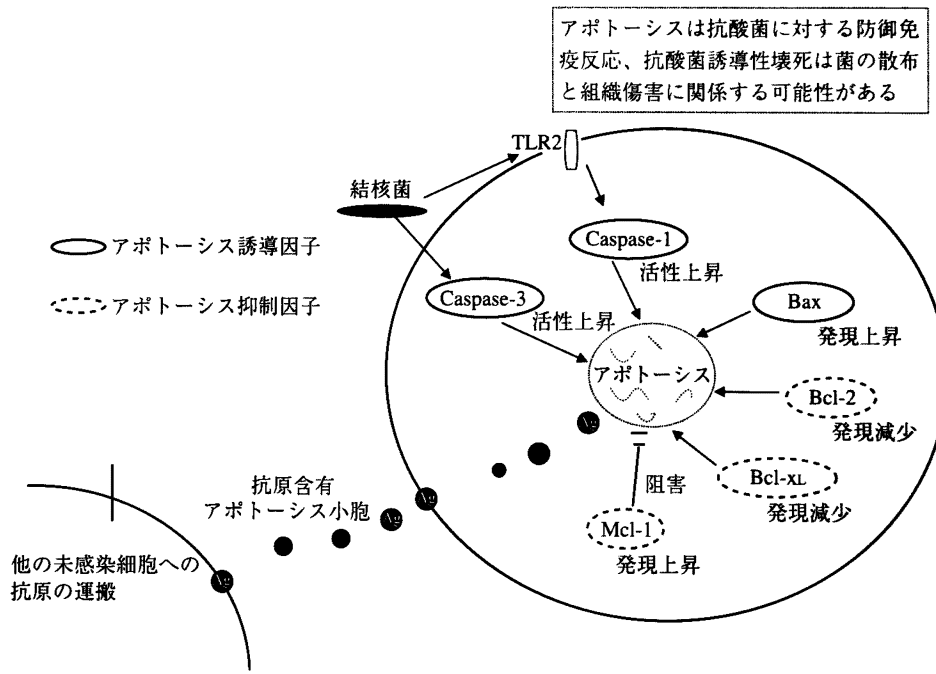


図7 抗酸菌によるアポトーシス誘導メカニズム

染により誘導されるアポトーシスは、caspase-1を介して、これは前炎症性サイトカインの産生と関連していることが示された²⁶⁾。好中球も結核菌感染によりアポトーシスを引き起こすが、この機構は感染好中球において活性化酸素類依存性のBax/Bcl-x_L発現の変化とcaspase-3の活性化を誘導するためであることが示された²⁷⁾。本論文も、好中球のアポトーシスは感染細胞の選択的な除去と、局所マクロファージの活性化という重要な宿主防御機構の一つであることを示唆した。

しかし、結核菌が感染マクロファージにおいて、抗アポトーシス・タンパクであるMcl-1の発現を誘導しアポトーシスを阻害している可能性も示されている²⁸⁾。さらに、感染細胞にアポトーシスを誘導することにより、アポトーシス小胞を放出させ、この小胞が結核菌抗原を非

感染細胞へ運搬するという新たな抗原提示経路が提唱された²⁹⁾。

感染によりアポトーシスのみでなく壊死も誘導されることは知られているが、アポトーシスはPPD皮内反応陽性健常者にみられる防御免疫反応を示し、壊死は活動性結核患者にみられる細菌散布と組織傷害とに関与している可能性が示された³⁰⁾。これらの研究から、結核感染細胞のアポトーシスは、宿主にとって有利に作用していると考察された。

しかし一方で、CD8⁺CTLによって引き起こされる感染細胞のアポトーシスは、細胞内結核菌の殺菌に関与しないという報告もある³¹⁾。このような相違は、使用した実験系の相違による可能性も高いので、今後さらなる解析が待たれる。
(担当：樋口一恵)

B-5 各種サイトカイン、ケモカインと結核症での役割

— IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α , CCR2, Neuropin, Leptin, Osteopontin など —

要約：免疫反応による炎症性変化を調節しているのは、炎症細胞の産生する各種インターロイキンやサイトカインであるが、IFN- γ 、TNF- α 、IL-12など促進的に働く因子と、IL-10やTGF- β など抑制的に働く因子とがある。それらサイトカインと共に、炎症細胞を反応局所に呼び寄せるケモカインとその受容体の働きも重要で、それらが相まって炎症の増悪、消褪が調節されていると思われる。サイトカインについては、最近いくつかの特異的な性質をもつサイトカインが報告されており、それらをまとめたのが、表4である。

B-5 (1) 細胞性免疫抑制性サイトカイン

結核患者の中にはPPDに反応を示さないアネルギー状態の患者が存在するが、その原因としてIL-10との関係が報告された³²⁾。通常は、結核患者由来のT細胞をPPDで刺激すると、IL-10とIFN- γ の産生および細胞増殖が誘導されるのに対し、アネルギー結核患者ではIL-10産生だけが誘導された。アネルギー患者では、IL-10産生T細胞が恒常的に存在し、またT細胞受容体以降のシグナル伝達が起こらないという結核菌の宿主免疫監視からの逃避機構として新たな知見が提供された。IL-10はヒト肺マクロファージからのLPSとIFN- γ 刺激によるIL-12産生を抑制するが、CD40とIFN- γ 刺激によるIL-12産生誘導は阻害しないことが示された³³⁾。この結果は、菌体成分により刺激された肺マクロファージからのIL-12産生は、IL-10によりオートクライン的に調整され、細胞性免疫に抑制的に働くことを示唆している。さらに、IL-10はIFN- γ によるマクロファージの抗酸菌抑制活性を阻害して、抗酸菌感染を持続させる可能性も示された³⁴⁾。

TGF- β もIL-10と共に炎症性サイトカインと拮抗するものであるが、両者のCD4⁺ α/β T細胞と γ/δ T細胞に対する作用が調べられた³⁵⁾。その結果、IL-10とTGF- β は共にCD4⁺ α/β T細胞と γ/δ T細胞に対し抑制的に作用するが、IL-10による抑制がより強く、また作用機序も異なることが示された。さらに、TGF- β のサイトカイン産生に及ぼす影響を、モルモットの結核性胸膜炎モデルを用い調べた結果、TGF- β 1は胸腔内抗酸菌抗原による特異的炎症反応を軽減する方向に働くのが示された³⁶⁾。

このように、IL-10およびTGF- β は細胞性免疫を抑制することにより、結核菌にとって有利な方向に働くが、一方でIL-10は樹状細胞をマクロファージ様細胞に分化誘導し細胞内の結核菌増殖を抑制することも報告されている³⁷⁾。この矛盾する結果は、研究に用いた系による相違を反映している可能性もあり、今後さらなる解析が待たれる。

B-5 (2) 細胞性免疫誘導性サイトカイン

細胞性免疫誘導性サイトカインとしては、IL-12およ

表4 サイトカイン, ケモカイン類についての最近の研究

抑制性サイトカイン	
IL-10	アネルギー結核で増加, M ϕ 抗菌活性を抑制
TGF- β	IL-10より弱い ³⁵ , CD4 ⁺ Tリンパ球機能を抑制
誘導性サイトカイン	
IL-12p40 (IL-23 subunit)	NKと共存下で, 菌貪食M ϕ より産生, ホモダイマー形成, Th1型防御反応誘導
IL-18, IL-6	IL-12と協調してTh1型防御反応誘導, apoptosisとも関連
IL-1R1	結核感染防御機構に必須
IFN- γ	結核感染初期での細胞動員とリンパ球応答を抑制
TNF- α	作用濃度により相反する結果となり, その機序は複雑である
その他のサイトカイン	
PGE ₂ , EP ₂	Gタンパク結合受容体を介してM ϕ 貪食能に関連
Osteopontin	肺肉芽腫形成に関連
Neuropilin	樹状細胞とT細胞接着に重要で初期免疫に関連. 神経系と免疫系との関連を示唆
Leptin	脂肪細胞から分泌, Th1サイトカイン誘導, Th2に抑制的に働く
SLAM/SAP	T細胞からのIFN- γ 産生をup/down regulate
DAP12	単球/M ϕ /樹状細胞/NK細胞からのIFN- γ /TNF- α 産生と関連
ケモカイン	
MIF	TLR4を介して自然免疫調節
MIC-1	TGF- β スーパーファミリー, M ϕ の働き阻害
CCR2	これによる細胞応答が感染初期の菌増殖を制御
CXCR3	肉芽腫形成に関連
Lymphotoxin β (TNF- β)	細胞内寄生菌の封じ込めに関連
ICAM-1	結核性胸膜炎の中皮に発現, 胸水への単球遊走に関連

びIL-18がよく知られているが, 最近IL-12p40のサブユニットを共有するサイトカインでありTh1型防御反応を誘導するIL-23が同定された。これにより, IL-12p40欠損マウスがIL-12p35欠損マウスに比較して防御免疫能が顕著に低下している原因が理解可能になった。すなわち, IL-12p40がIL-23のサブユニットであるため, IL-12p35欠損マウスではIL-23によりIL-12の欠損が代償されることが理由と考えられる³⁸⁾。IL-12の産生機構に関して, マクロファージからのIL-12産生はIFN- γ により顕著に増強されるが, BCGで刺激されたヒト単球由来マクロファージのIL-12産生には, IFN- γ よりもNK細胞が共存することが重要であるのが示された³⁹⁾。また, マクロファージのIL-12産生は, 貪食という機械的刺激によっても誘導されることが報告された⁴⁰⁾。興味ある知見として, IL-12p40ホモダイマーがアゴニスト様の活性をもち, 抗酸菌感染において防御的作用をもつこと⁴¹⁾, またIL-12をマウス結核に対する免疫療法に用いる試みもなされた⁴²⁾。このIL-12の細胞内シグナル伝達に関して, IL-12受容体が2本鎖 (IL-12R β 1とIL-12R β 2) から構成されており, IL-12R β 1は機能的IL-12受容体に必須の成分であることが報告されている⁴³⁾。

IL-12と協調してIL-6⁴⁴⁾とIL-18⁴⁵⁾が, 結核サブユニッ

トワクチン接種時のTh1型防御反応誘導に重要であることも報告された。IL-18のプロモーターを解析した研究からは, IL-18発現が宿主防御機構の一つであると考えられているアポトーシスと関連している可能性が示された⁴⁶⁾。

IL-15は結核感染に対する防御免疫応答を亢進させることが以前に報告されたが, そのIL-15の欠損下でもエフェクターCD4⁺およびCD8⁺T細胞は出現し, recall T細胞反応は障害されていたのが示され⁴⁷⁾, その評価は難しい。

その他重要なサイトカインとしては, IL-1 type 1受容体欠損マウスに結核菌を感染させた実験の結果, IL-1 type1受容体は肺における結核防御機構にとって必須であることが示され, IL-1も結核防御機構で重要な役割を果たしていることが考えられた⁴⁸⁾。しかし, IL-1 type1受容体に結合するIL-1 α/β が, ヒトマクロファージ系において直接マクロファージの制菌機能を抑制することも報告されており⁴⁹⁾, 今後の詳細な解析が望まれる。

B-5 (3) IFN- γ , TNF- α

IFN- γ とTNF- α は, 共に強力なマクロファージ活性化サイトカインであり, 結核に対する防御機構において

非常に重要な役割を担っている。IFN- γ の作用については過去に多数の文献が出されているので、本項ではこれまでと若干異なった視点でIFN- γ の新たな知見を紹介する。遺伝子工学によりIFN- γ 産生性マクロファージを作製し、これをscidマウス肺胞内に移入すると、マウスの免疫機能が回復した⁵⁰。この方法は、結核の免疫療法への応用の可能性を示していると考えられる。モルモットを用いた結核感染実験でのreal-time PCRによる各種サイトカイン発現の解析からは、DTH反応とIFN- γ 発現の時期は一致せず、両者は複雑な関係にあることが示された⁵¹。このような方法論は新たな結核ワクチン開発に応用できると思われる。

ウシの結核はBCG接種により軽減され、BCGには存在しない結核菌抗原ESAT-6に対するIFN- γ 応答は、結核感染とBCG接種とを区別できることを示した⁵²。IFN- γ ノックアウトマウスを用いて、IFN- γ は結核菌感染初期の細胞動員と獲得性リンパ球応答の両者を制限していることが示された⁵³。

中枢神経系への抗酸菌感染では、TNF- α のレベルが病状の進行を決定する一つの要因であることが示された⁵⁴。TNF- α ノックアウトマウスでの実験で、TNF- α の作用はT細胞やマクロファージの活性化でなく、結核菌気道感染における肉芽腫形成であることが示された⁵⁵。TNF- α ノックアウトマウスにTNF- α 産生BCGを感染させる実験により、TNF- α はその量により防御的にも破壊的にも作用することが示された⁵⁶。TNF- α の局在的活性を抑制したsurfactant apoprotein C promotor/soluble TNF receptor type II-Fc fusion protein [SPCTNFR II-Fc]マウスを用いた研究より、結核菌に対する宿主防御機構にはTNF- α の局所的な調節が重要であり、その作用は前炎症性メディエーター発現の抑制にあることが示された⁵⁷。ヒト肺胞マクロファージを用いた*in vitro*感染実験により、TNF- α は細胞内結核菌の増殖を亢進させる⁵⁸が、好中球の結核菌殺菌活性を亢進させることも報告されている⁵⁹。TNF- α の選択的抑制剤であるサリドマイドを用いた研究により、肺胞マクロファージによる抗酸菌の殺菌にはTNF- α 以外の要因が関与していることが示された⁶⁰。リコンビナントモルモットTNF- α を調整し、モルモットの肺胞および腹腔マクロファージに対する影響を検討した⁶¹。その結果、防御的サイトカインの最適な発現にはTNF- α の濃度が決定的であり、またTNF- α が結核菌に対する宿主抵抗性を亢進するため菌の増殖を制御することが示された。このように、TNF- α に関する報告は、使用する材料、濃度等により相反する結果が得られており、今後詳細な比較検討が望まれる。

B-5 (4) ケモカイン, その他のサイトカイン, 免疫調節因子

これまで研究されてきた上記の主要な炎症性サイトカインのほかに、炎症細胞を局所に引き寄せるケモカインの役割についてその後多くの研究がなされるようになり、また、これまで知られなかった新しいサイトカインのいくつかの、結核炎での意義が調べられている。

防御免疫に関与するケモカインとして、MIFはTLR4を介して自然免疫系を調節しているのが観察され⁶²、またMIC-1がクローニングされ、TGF- β のスーパーファミリーとしてオートクライン的にマクロファージを後期で制限することが示唆された⁶³。ケモカインレセプター2 (CCR2)を介した細胞応答が結核菌感染の初期における菌の制御に必須の役割をしていることが、ノックアウトマウスを用いた研究により示され⁶⁴、Lymphotoxin β 受容体を介したシグナル伝達が、結核菌やリステリアなど細胞内病原菌の封じ込めに重要であることがLymphotoxin β 受容体ノックアウトマウスを用いた研究により示された⁶⁵。

カニクイザルを結核菌で気管内感染させた実験では、肺肉芽腫形成とその維持にCXCR3陽性細胞の発現とCXCR3リガンドをもつ細胞の動員が関与していることが示された⁶⁶。結核性胸膜炎では、結核菌感染により胸膜中皮上に誘導・発現されたICAM-1が、胸腔内への単球遊走に関与していることが示された⁶⁷。

最近、神経軸索誘導に関与する受容体であるNeuropilin-1 (NP-1)が、初期免疫に必須である樹状細胞とT細胞との接着に重要な役割を果たして、神経系と免疫系の相互作用が示唆される、物質レベルでの初めての研究として注目された⁶⁸。また、肥満遺伝子*obese*がコードするタンパクのレプチン (leptin) は、Th1サイトカイン産生を誘導しTh2サイトカイン産生を抑制し、飢餓による免疫低下を回復させることが示された⁶⁹。破骨細胞関連のオステオポンチンが肺肉芽腫形成時のマクロファージ動員を調節し、抗酸菌感染での防御免疫発現に関与していること⁷⁰、活動性結核でIL-12を介するTh1細胞反応を引き起こして、病変形成に関与していることが示された⁷¹。

さらに免疫反応を調節し左右する因子の研究も、最近進められている。細胞膜リン脂質由来のProstaglandin E2 (PGE₂)は、Gタンパク結合受容体であるEP₂を介し肺胞マクロファージの貪食能を阻害することが示唆された⁷²。

ステロイドはT細胞のIL-7受容体 α 鎖の発現を誘導し、TCRからのシグナルは抑制方向に働く。ステロイドはこの機構を介し、T細胞の生存や機能にとって正の

制御を行っている⁷³⁾。

活動性結核患者においては結核菌に対するT細胞応答は高応答群と低応答群があるが、Th1サイトカインを制御していることが知られている分子SLAM (signaling lymphocytic activation molecule) とSAP (SLAM-associated protein) の発現を両応答群で解析した⁷⁴⁾。その結果、SLAMの発現はTh1応答に寄与し、SAPの発現はTh1応答を阻害することが示され、SAPとSLAMが結核治療のためにT細胞サイトカインを調節する時の標的となることが示唆された。

最近同定された免疫調節分子であるDAP12と、これに結合する分子であるMDL-1、TREM-1およびTREM-2の発現に対する、結核感染とTh1サイトカインの影響が解析された⁷⁵⁾。その結果、DAP12と結合分子は結核感染とTh1サイトカインにより異なった調節を受け、またMDL-1とTREM-1を介するDAP12のシグナル伝達が、抗菌性のTh1免疫応答に重要な役割を果たしていることが示唆された。(担当：原田登之)

文 献

- B-3 (1) 結核感染とTRLを介するシグナル伝達系
- 1) Scanga CA, Bafica A, Feng CG, et al.: MyD88-deficient mice display a profound loss in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* associated with partially impaired Th1 cytokine and nitric oxide synthase 2 expression. *Infect Immun.* 2004 ; 72 : 2400-4.
 - 2) Fremont CM, Yeremeev V, Nicolle DM, et al.: Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *J Clin Invest.* 2004 ; 114 : 1790-9.
 - 3) Pai RK, Convery M, Hamilton TA, et al.: Inhibition of IFN-gamma-induced class II transactivator expression by a 19-kDa lipoprotein from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for immune evasion. *J Immunol.* 2003 ; 171 : 175-84.
 - 4) Fortune SM, Solache A, Jaeger A, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage responses to IFN-gamma through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol.* 2004 ; 172 : 6272-80.
- B-3 (2) 結核菌体成分とサイトカインによる細胞内シグナル伝達系活性化
- 5) Ting LM, Kim AC, Cattamanchi A, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J Immunol.* 1999 ; 163 : 3898-906.
 - 6) Hussain S, Zwilling BS, Lafuse WP: *Mycobacterium avium* infection of mouse macrophages inhibits IFN-gamma Janus kinase-STAT signaling and gene induction by down-regulation of the IFN-gamma receptor. *J Immunol.* 1999 ; 163 : 2041-8.
 - 7) Toyoda H, Ido M, Hayashi T, et al.: Impairment of IL-12-dependent STAT4 nuclear translocation in a patient with recurrent *Mycobacterium avium* infection. *J Immunol.* 2004 ; 172 : 3905-12.
- B-3 (3) シグナル伝達分子
- 8) Roach SK, Schorey JS: Differential regulation of the mitogen-activated protein kinases by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. *Infect Immun.* 2002 ; 70 : 3040-52.
 - 9) Roach SK, Lee SB, Schorey JS: Differential activation of the transcription factor cyclic AMP response element binding protein (CREB) in macrophages following infection with pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and role for CREB in tumor necrosis factor alpha production. *Infect Immun.* 2005 ; 73 : 514-22.
 - 10) Feng CG, Collazo-Custodio CM, Eckhaus M, et al.: Mice deficient in LRG-47 display increased susceptibility to mycobacterial infection associated with the induction of lymphopenia. *J Immunol.* 2004 ; 172 : 1163-8.
 - 11) May MJ, D'Acquisto F, Madge LA, et al.: Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I-kappaB kinase complex. *Science.* 2000 ; 289 : 1550-4.
 - 12) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al.: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001 ; 411 : 494-8.
- B-4 (1) 殺菌因子
- 13) Britton WJ, Meadows N, Rathjen DA, et al.: A tumor necrosis factor mimetic peptide activates a murine macrophage cell line to inhibit mycobacterial growth in a nitric oxide-dependent fashion. *Infect Immun.* 1998 ; 66 : 2122-7.
 - 14) Ehrt S, Schnappinger D, Bekiranov S, et al.: Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium tuberculosis*: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J Exp Med.* 2001 ; 194 : 1123-40.
 - 15) Fairbairn IP, Stober CB, Kumararatne DS, et al.: ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X(7)-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion. *J Immunol.* 2001 ; 167 : 3300-7.
 - 16) Venketaraman V, Dayaram YK, Amin AG, et al.: Role of glutathione in macrophage control of mycobacteria. *Infect Immun.* 2003 ; 71 : 1864-71.
 - 17) Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al.: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science.* 1998 ; 282 : 121-5.
 - 18) Ochoa MT, Stenger S, Sieling PA, et al.: T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. *Nature Med.* 2001 ; 7 : 174-9.
 - 19) Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, et al.: Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by Vγ9/Vδ2 T lymphocytes. *J Infect Dis.* 2001 ; 184 : 1082-5.
 - 20) Gansert JL, Kiessler V, Engele M, et al.: Human NKT cells

- express granulysin and exhibit antimycobacterial activity. *J Immunol.* 2003 ; 170 : 3154–61.
- B-4 (2) 抗殺菌因子**
- 21) Pasula R, Wright JR, Kachel DL, et al. : Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest.* 1999 ; 103 : 483–90.
 - 22) Fritz C, Maass S, Kreft A, et al. : Dependence of *Mycobacterium bovis* BCG on anaerobic nitrate reductase for persistence is tissue specific. *Infect Immun.* 2002 ; 70 : 286–91.
 - 23) Darwin KH, Ehrt S, Gutierrez-Ramos JC, et al. : The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide. *Science.* 2003 ; 302 : 1963–6.
 - 24) Rousseau C, Winter N, Pivert E, et al. : Production of phthiocerol dimycocerosates protects *Mycobacterium tuberculosis* from the cidal activity of reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection. *Cell Microbiol.* 2004 ; 6 : 277–87.
- B-4 (3) アポトーシス**
- 25) Klingler K, Tchou-Wong KM, Brandli O, et al. : Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes. *Infect Immun.* 1997 ; 65 : 5272–8.
 - 26) Ciarabella A, Cavone A, Santucci MB, et al. : Proinflammatory cytokines in the course of *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptosis in monocytes/macrophages. *J Infect Dis.* 2002 ; 186 : 1277–82.
 - 27) Perskvist N, Long M, Stendahl O, et al. : *Mycobacterium tuberculosis* promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway. *J Immunol.* 2002 ; 168 : 6358–65.
 - 28) Sly LM, Hingley-Wilson SM, Reiner NE, et al. : Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J Immunol.* 2003 ; 170 : 430–7.
 - 29) Schaible UE, Winau F, Sieling PA, et al. : Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med.* 2003 ; 9 : 1039–46.
 - 30) Gil DP, Leon LG, Correa LI, et al. : Differential induction of apoptosis and necrosis in monocytes from patients with tuberculosis and healthy control subjects. *J Infect Dis.* 2004 ; 189 : 2120–8.
 - 31) Thoma-Uszynski S, Stenger S, Modlin RL : CTL-mediated killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* is independent of target cell nuclear apoptosis. *J Immunol.* 2000 ; 165 : 5773–9.
- B-5 (1) 細胞性免疫抑制性サイトカイン**
- 32) Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ, et al. : IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest.* 2000 ; 105 : 1317–25.
 - 33) Isler P, de Rochemonteix BG, Songeon F, et al. : Interleukin-12 production by human alveolar macrophages is controlled by the autocrine production of interleukin-10. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 ; 20 : 270–8.
- 34) Murray PJ, Wang L, Onufryk C, et al. : T cell-derived IL-10 antagonizes macrophage function in mycobacterial infection. *J Immunol.* 1997 ; 158 : 315–21.
 - 35) Rojas RE, Balaji KN, Subramanian A, et al. : Regulation of human CD4⁺ $\alpha\beta$ T-cell-receptor-positive (TCR⁺) and $\gamma\delta$ TCR⁺ T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 and transforming growth factor β . *Infect Immun.* 1999 ; 67 : 6461–72.
 - 36) Allen SS, Cassone L, Lasco TM, et al. : Effect of neutralizing transforming growth factor β 1 on the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pigs. *Infect Immun.* 2004 ; 72 : 1358–63.
 - 37) Fortsch D, Rollinghoff M, Stenger S : IL-10 converts human dendritic cells into macrophage-like cells with increased antibacterial activity against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2000 ; 165 : 978–87.
- B-5 (2) 細胞性免疫誘導性サイトカイン**
- 38) Cooper AM, Kipnis A, Tumer J, et al. : Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. *J Immunol.* 2002 ; 168 : 1322–7.
 - 39) Matsumoto H, Suzuki K, Tsuyuguchi K, et al. : Interleukin-12 gene expression in human monocyte-derived macrophages stimulated with *Mycobacterium bovis* BCG: cytokine regulation and effect of NK cells. *Infect Immun.* 1997 ; 65 : 4405–10.
 - 40) Ladel CH, Szalay G, Riedel D, et al. : Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *Infect Immun.* 1997 ; 65 : 1936–8.
 - 41) Holscher C, Atkinson RA, Arendse B, et al. : A protective and agonistic function of IL-12p40 in mycobacterial infection. *J Immunol.* 2001 ; 167 : 6957–66.
 - 42) Nolt D, Flynn JL : Interleukin-12 therapy reduces the number of immune cells and pathology in lungs of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2004 ; 72 : 2976–88.
 - 43) Wu C, Ferrante J, Gately MK, et al. : Characterization of IL-12 receptor β 1 chain (IL-12R β 1)-deficient mice: IL-12R β 1 is an essential component of the functional mouse IL-12 receptor. *J Immunol.* 1997 ; 159 : 1658–65.
 - 44) Leal IS, Smedegard B, Andersen P, et al. : Interleukin-6 and interleukin-12 participate in induction of a type 1 protective T-cell response during vaccination with a tuberculosis subunit vaccine. *Infect Immun.* 1999 ; 67 : 5747–54.
 - 45) Sugawara I, Yamada H, Kaneko H, et al. : Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. *Infect Immun.* 1999 ; 67 : 2585–9.
 - 46) Tone M, Thompson SA, Tone Y, et al. : Regulation of IL-18 (IFN- γ -inducing factor) gene expression. *J Immunol.* 1997 ; 159 : 6156–63.
 - 47) Lazarevic V, Yankura DJ, DiVito SJ, et al. : Induction of *Mycobacterium tuberculosis*-specific primary and secondary T-cell responses in interleukin-15-deficient mice. *Infect*

- Immun. 2005 ; 73 : 2910-22.
- 48) Juffermans NP, Florquin S, Camoglio L, et al. : Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis.* 2000 ; 182 : 902-8.
- 49) Bouchonnet F, Boechat N, Bonay M, et al. : Alpha/Beta interferon impairs the ability of human macrophages to control growth of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 2002 ; 70 : 3020-5.
- B-5 (3) IFN- γ , TNF- α
- 50) Wu M, Hussain S, He YH, et al. : Genetically engineered macrophages expressing IFN- γ restore alveolar immune function in scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 ; 98 : 14589-94.
- 51) Kawahara M, Nakasone T, Honda M : Dynamics of gamma interferon, interleukin-12 (IL-12), IL-10, and transforming growth factor β mRNA expression in primary *Mycobacterium bovis* BCG infection in guinea pigs measured by a real-time fluorogenic reverse transcription-PCR assay. *Infect Immun.* 2002 ; 70 : 6614-20.
- 52) Vordermeier HM, Chambers MA, Cockle PJ, et al. : Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 2002 ; 70 : 3026-32.
- 53) Pearl JE, Saunders B, Ehlers S, et al. : Inflammation and lymphocyte activation during mycobacterial infection in the interferon- γ -deficient mouse. *Cell Immunol.* 2001 ; 211 : 43-50.
- 54) Tsenova L, Bergtold A, Freedman VH, et al. : Tumor necrosis factor α is a determinant of pathogenesis and disease progression in mycobacterial infection in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 ; 96 : 5657-62.
- 55) Bean AG, Roach DR, Briscoe H, et al. : Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol.* 1999 ; 162 : 3504-11.
- 56) Bekker LG, Moreira AL, Bergtold A, et al. : Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. *Infect Immun.* 2000 ; 68 : 6954-61.
- 57) Smith S, Liggitt D, Jeromsky E, et al. : Local role for tumor necrosis factor alpha in the pulmonary inflammatory response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun.* 2002 ; 70 : 2082-9.
- 58) Engele M, Stossel E, Castiglione K, et al. : Induction of TNF in human alveolar macrophages as a potential evasion mechanism of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2002 ; 168 : 1328-37.
- 59) Kisich KO, Higgins M, Diamond G, et al. : Tumor necrosis factor alpha stimulates killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human neutrophils. *Infect Immun.* 2002 ; 70 : 4591-9.
- 60) Arruda MS, Richini VB, Oliveira SM, et al. : Experimental murine mycobacteriosis: evaluation of the functional activity of alveolar macrophages in thalidomide-treated mice. *Braz J Med Biol Res.* 2004 ; 37 : 485-92.
- 61) Cho H, Lasco TM, Allen SS, et al. : Recombinant guinea pig tumor necrosis factor alpha stimulates the expression of interleukin-12 and the inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* growth in macrophages. *Infect Immun.* 2005 ; 73 : 1367-76.
- B-5 (4) ケモカイン, その他のサイトカイン, 免疫調節因子
- 62) Roger T, David J, Glauser MP, et al. : MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature.* 2001 ; 414 : 920-4.
- 63) Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, et al. : MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF- β superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 ; 94 : 11514-9.
- 64) Peters W, Scott HM, Chambers HF, et al. : Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 ; 98 : 7958-63.
- 65) Ehlers S, Holscher C, Scheu S, et al. : The lymphotoxin β receptor is critically involved in controlling infections with the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Listeria monocytogenes*. *J Immunol.* 2003 ; 170 : 5210-8.
- 66) Fuller CL, Flynn JL, Reinhart TA : In situ study of abundant expression of proinflammatory chemokines and cytokines in pulmonary granulomas that develop in cynomolgus macaques experimentally infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2003 ; 71 : 7023-34.
- 67) Nasreen N, Mohammed KA, Ward MJ, et al. : *Mycobacterium*-induced transmesothelial migration of monocytes into pleural space: role of intercellular adhesion molecule-1 in tuberculous pleurisy. *J Infect Dis.* 1999 ; 180 : 1616-23.
- 68) Tordjman R, Lepelletier Y, Lemarchandel V, et al. : A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol.* 2002 ; 3 : 477-82.
- 69) Lord GM, Matarese G, Howard JK, et al. : Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature.* 1998 ; 394 : 897-901.
- 70) O'Regan AW, Hayden JM, Body S, et al. : Abnormal pulmonary granuloma formation in osteopontin-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 ; 164 : 2243-7.
- 71) Koguchi Y, Kawakami K, Uezu K, et al. : High plasma osteopontin level and its relationship with interleukin-12-mediated type 1 T helper cell response in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 ; 167 : 1355-9.
- 72) Aronoff DM, Canetti C, Peters-Golden M : Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J Immunol.* 2004 ; 173 : 559-65.
- 73) Franchimont D, Galon J, Vacchio MS, et al. : Positive effects of glucocorticoids on T cell function by up-regulation of IL-7 receptor α . *J Immunol.* 2002 ; 168 : 2212-8.

74) Pasquinelli V, Quiroga MF, Martinez GJ, et al.: Expression of signaling lymphocytic activation molecule-associated protein interrupts IFN- β production in human tuberculosis. *J Immunol.* 2004 ; 172 : 1177-85.

75) Aoki N, Zganiacz A, Margetts P, et al.: Differential regulation of DAP12 and molecules associated with DAP12 during host responses to mycobacterial infection. *Infect Immun.* 2004 ; 72 : 2477-83.

B-6 抗酸菌免疫における各種免疫担当細胞の役割

要約：抗酸菌症の細胞性免疫に関与する細胞として、 $CD4^+$ T細胞が IFN- γ などを介しての細胞内殺菌に重要であることが知られていたが、そのメモリー細胞の老化に伴う変化の分析が行われた。また、 $CD4^+$ に次いで多い $CD8^+$ T細胞の役割について、その顆粒が含む perforin と granulytin とで結核菌を細胞外に放出させて殺菌的に働く機序が報告された。 $CD8^+$ Tの抗原認識には、結核菌の脂タンパク抗原が HLA class I に似た CD1 に拘束性に働き、 $CD4^+$ Tのように class II 拘束性でないことが調べられた。その他のリンパ球として、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞あるいは最近認知された NKT細胞の役割や、それらの働きを抑制する調節性Tリンパ球の存在も明らかとなっているが、結核での役割はまだ不明の点が多い。抗原提示細胞として従来は $M\phi$ が考えられてきたが、抗原提示能が $M\phi$ より強力な樹状細胞の結核症での役割も注目されるようになった。肺胞で $M\phi$ に貪食された抗原は樹状細胞に伝達されて肺門リンパ節に到達し (図8)、そこでTリンパ球を感作するのは主として樹状細胞であるとされるに至っている。その他、好中球の抗結核菌作用が見直されるようになってきた。免疫担当細胞の一覧を表5に示した。

B-6 (1) 結核性病変の病理発生

結核菌感染時の病態に関しては古くから多数の動物実験が行われてきたが、吸入感染では早期にリンパ節・脾臓に菌が到達したマウスでより早く免疫反応が始まり、その結果感染抵抗性が大であること¹⁾。タンパク欠乏食モルモットでは $CD8^+$ T細胞のリンパ節への集積があること²⁾、強毒菌マウス感染では IFN- γ などサイトカイン

の著明な減少があること、一方 IFN- α/β 投与では IFN- γ と異なり感受性の増大があること³⁾などが報告された。結核抗原吸着ビーズでの肉芽腫形成実験⁴⁾以外に、標識した2種の結核菌での感染実験で、再感染菌が初感染時に形成された肉芽腫内に取り込まれうるという観察⁵⁾は、これまでの常識になかった病態の報告である。

感染で活性化されるリンパ球遺伝子：最近のマイクロアレイの手技により、ヒト $CD4^+$ と $CD8^+$ の T細胞を結

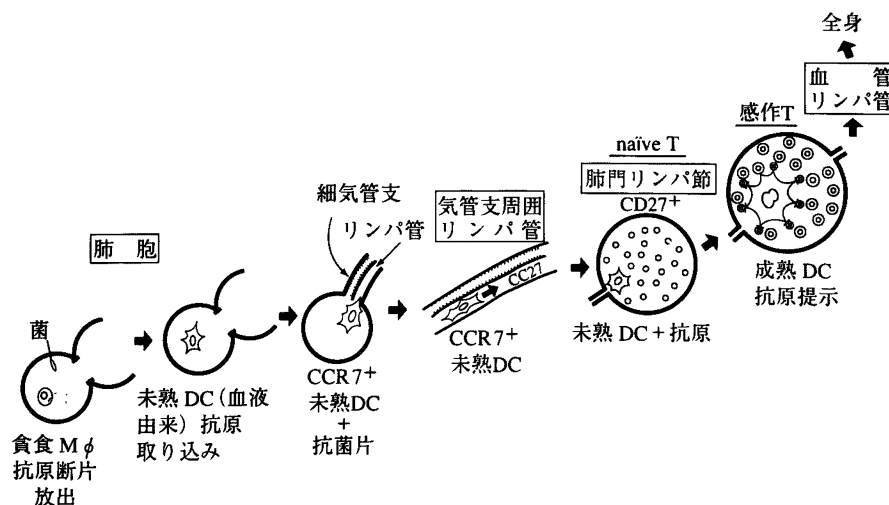


図8 肺に吸入された結核菌の肺門リンパ節への移行

表5 免疫担当細胞の種類と主な特性

細胞の種類	特徴と機能
CD4 ⁺ (CD8 ⁻) Tリンパ球	effector T, Th1 MHC class II 拘束性の抗原伝達され、IFN- γ 、IL-2、TNF- α などの産生を介するM ϕ 殺菌能の亢進
	Th2 IL-4、-5、-6、-10、-13などを産生、体液性免疫や気道過敏反応に関与
memory T	CD45RB ^{high} CD59 ⁺ CD25 ⁺ のマーカーをもつ、マウスでは160日以上記憶保持
CD4 ⁺ CD8 ⁺ Tリンパ球	cytotoxic Tの一部、Fas-FasL依存性にアポトーシス誘導
(CD4 ⁻) CD8 ⁺ Tリンパ球	cytotoxic T CD1b拘束性に脂質・糖脂質抗原を伝達され、perforin/granulysinによる細胞融解と殺菌作用
	memory T CD69 ^{low} CD25 ^{low} CD44 ^{high} のマーカーをもつ、加齢により増加
CD4 ⁻ CD8 ⁻ Tリンパ球	double negative T. Fas-FasL依存性にアポトーシス誘導
$\gamma\delta$ Tリンパ球	IFN- γ 産生+, granulysin陽性顆粒+, M ϕ 内結核菌殺菌作用あり
NK細胞, CD3 ⁻ CD16 ⁺	非特異的殺菌作用・抗腫瘍作用あり、IFN- γ 産生+, 肉芽腫内への浸潤+
NKTリンパ球	抗腫瘍効果を示すが、結核菌に対する作用は不明
調節性Tリンパ球, Treg	CD4 ⁺ CD25 ^{high} , IL-10分泌を介してTリンパ球機能刺激
Th17	IL-17分泌を介してTリンパ球機能抑制
マクロファージ	食食能とライソゾーム顆粒をもち、IFNなどの刺激による細胞内殺菌に関与
樹状細胞, myeloid 未熟	DC-SIGNによる食食後、炎症性サイトカイン刺激でリンパ臓器に移動し、成熟化する
myeloid 成熟	多数のMHC分子、共刺激因子によるTリンパ球への強い抗原提示能を示す
lymphoid	免疫寛容の誘導を行うと考えられている
好中球	好中球放出顆粒 (Myeloperoxidase) の取り込みによるM ϕ 殺菌効果増幅

核菌で刺激した時に活性化される遺伝子を網羅的に調べた研究では、それぞれのT細胞に特徴的な転写因子、シグナル因子、膜貫通因子、分泌因子の発現がみられ、機能不明の遺伝子の活性化もみられたと報告された⁶⁾。

B-6 (2) CD4⁺T細胞

結核感染免疫ではTリンパ球が中心的役割を果たし、感作CD4⁺T細胞の抗原刺激によるIFN- γ 、TNF- α など各種のサイトカイン産生と、マクロファージ活性化に続く反応性窒素中間代謝物の形成が重要な殺菌機構として考えられてきた。しかし、リンパ球と結核菌食食マクロファージの共培養実験では細胞内菌増殖の90%が抑制され、それにはIFN- γ やNOを介さない殺菌機構もあり、細胞内殺菌には未だ不明の部分があるとされた⁷⁾。

CD4⁺Tリンパ球のメモリー機能については、抗原刺激後にメモリー型が出現して長期にメモリーを維持することが知られてきたが、人の結核では不活動性病変の再燃により発病することも少なくないため、メモリーの維持機構は重要な課題となる。マウスの結核菌感染後に抗結核剤を投与し、病変を安定化させた状態をメモリー維持のモデルと考えての分析的研究が行われた。このようなマウスでは、CD4⁺T細胞の表面マーカーがCD45RB^{high}でCD59、CD25、L-selectin高度発現のT細胞のみが感染抵抗性に関与し⁸⁾、そのメモリーは免疫後少なくとも160日以上維持されるのがみられた⁹⁾。また放射線骨髄照射後に老若ナイブ・リンパ球を移入した

マウスでの、加齢の免疫に及ぼす影響を調べた研究では、結核菌感染後に抗原再刺激した時の反応は、老齢リンパ球移入で若齢リンパ球移入より明らかに低く、老齢マウスでのメモリー維持の低下が認められた¹⁰⁾。最近メモリーT細胞はnaïve memory, effector memory T (T_{EM}), central memory T (T_{CM}), terminally differentiated cell (T_{TD})に分けられ、T_{EM}は増殖能はないがサイトカイン産生が盛んであるのに対して、CCR7⁺のT_{CM}は増殖能は高いがeffector機能に乏しく免疫メモリーの維持を担っていると報告されている¹¹⁾。

*Mycobacterium avium*での免疫について、AIDSで特に問題となるこの菌をマウス消化管内に感染させた実験では、感染蔓延防御にCD4⁺T細胞が必要であるが、CD8⁺T細胞や $\gamma\delta$ T細胞は必要としないと報告された¹²⁾。

B-6 (3) CD8⁺T細胞：脂質抗原認識と特有の殺菌機構

CD4⁺T細胞以外にCD8⁺Tリンパ球も感染防御に重要な役割を演じていることが最近明らかにされ、抗原がMHC class IIと共にM ϕ 膜に表出されCD4⁺Tリンパ球に伝達される経路以外に、MHC class I様の細胞表面分子であるCD1が、抗酸菌の脂質など非ペプチド抗原と共にCD8⁺Tリンパ球に提示することが分かってきた。

CD8⁺T細胞の細胞膜CD1分子による脂質抗原認識に関して、抗酸菌の細胞壁成分であるイソプレノイド糖脂質がCD1c拘束性に認識されるのが、結核菌感染時に有意に上昇していた。その脂肪酸鎖の1カ所が不飽和から

飽和に変化しても抗原性が変化するのがみられた¹³⁾。組織レベルの研究でも、リンパ節内集積 CD8⁺T細胞を取り出して調べると、perforin 依存性に結核菌貪食マクロファージを融解するのが観察され¹⁴⁾、一方結核菌分泌タンパクである Ag85A もヒト CD8⁺T細胞の HLA-A 拘束性に傷害をきたす¹⁵⁾。この CD8⁺T細胞にも CD4⁺T細胞同様メモリー細胞があり、その膜には CD69^{low}, CD25^{low}, CD44^{high}が発現していた¹⁶⁾。

CD1 拘束性の T細胞には、細胞内顆粒依存性の CD4⁻CD8⁺T細胞と、Fas-FasL 依存性の CD4⁻CD8⁻ (Double negative) T細胞とがあり¹⁷⁾、免疫 CD8⁺T細胞と抗酸菌培養濾液との共培養では、IFN- γ 産生と perforin/granzyme 依存性の細胞傷害活性を示した¹⁸⁾。さらに肺組織に浸潤しているリンパ球を調べ、結核菌特異ペプチドの一つである CFP-10 特異的 CD8⁺T細胞に細胞傷害活性のあることが証明もなされている¹⁹⁾。なお、ウシでも結核感染免疫で CD8⁺Tが重要であるとされ²⁰⁾、ウシ型菌感染牛での ESAT-6/CFP-10 融合タンパクに対する免疫反応の分析もなされている²¹⁾。マウスでは 50% の CD4⁺T細胞が Fas-FasL を介して、64% の CD8⁺T細胞が perforin 依存性に細胞融解を示すが、菌数減少効果は CD8⁺T細胞のみにもみられた (細胞外殺菌作用を示唆) と報告された²²⁾。CD8⁺Tの細胞融解による菌増殖抑制は、アポトーシス関連 CD95/95L の欠損マウスでは低下していたとの報告²³⁾は、菌貪食細胞のアポトーシスが細胞内菌 (体成分) の細胞外放出と新しい抗原提示細胞による取り込みとを経て、免疫反応が進むという考えに矛盾しない。なお、老齢マウスの感染早期の抵抗性は若齢マウスよりも高く、これは CD4⁺T細胞の低下を補うように肺内 CD8⁺T細胞数と IFN- γ 産生能の高いことを反映しているのであろう²⁴⁾と考えられた。CD8⁺メモリー T細胞も CD4⁺T同様に T_{EM} と T_{CM} とが区別され、前者は炎症局所に後者は主としてリンパ臓器にあり、抗結核治療により減少するが再感染で急速に増加することが、マウスで観察されている²⁵⁾。

CD8⁺T細胞についてのヒトでの研究では、HLA-A*0021 拘束性に CD8⁺T細胞と結合するエピトープの探求と共に、反応する CD8⁺T細胞株の樹立もなされた²⁶⁾。ヒト CD8⁺T細胞では IFN- γ 産生は CD4⁺T細胞依存性²⁷⁾であるが、抗酸菌ワクチンは CD8⁺T細胞を活性化するも CD4⁺T細胞の存在を必要としないとされ²⁸⁾、CD4⁺Tと CD8⁺T細胞の相互の役割については、なお知見の積み重ねが必要と思われる。

CD8⁺Tと特異的に反応する結核菌エピトープについては、HLA-A*0201 拘束性に 16kDa p21-29/p120-128 タンパクが反応するとされ²⁹⁾、同じ HLA 型のリンパ球に反応する結核菌 Rv0341 の 43.9kDa タンパクの 3 つのペプ

チドもエピトープとして同定されたという報告がある³⁰⁾。BCG 脂質/糖脂質も CD1 拘束性に CD8⁺T細胞に伝達されるが、その CD1 分子が貪食空胞内に存在しているのが示された³¹⁾。ツ反陽性者の CD8⁺T細胞は CD40L トリマーで刺激されて IL-12/IL-18 依存性に IFN- γ 産生を高め、細胞分裂もするが、これにはリン酸化 CREB と cJun などの転写因子が必要で、これにより perforin/granzyme 依存性の細胞傷害活性を発現する³²⁾。

B-6 (4) $\gamma\delta$ T細胞

T細胞受容体が $\alpha\beta$ 型でなく $\gamma\delta$ 型である T細胞は、分化の早い段階で出現し、健康成人の末梢血に数パーセント程度存在することが認められ、細胞質内に granzyme 顆粒を有し、結核感染の早期に増加するとされているが、その機能は未だ明らかでない。この $\gamma\delta$ T細胞が *in vitro* でマクロファージ内結核菌増殖抑制作用を強く示すと報告された³³⁾。最近この $\gamma\delta$ T細胞が isopentenylpyrophosphate (IPP) などのリン酸化抗原で刺激すると増殖するのが知られ、その殺腫瘍細胞活性が注目されている。小児結核患者の V γ 9/ δ 2 T細胞は健康小児に比して分裂能は高いが IFN- γ 産生や細胞内 granzyme の発現が少なく、結核治療後は分裂能は低下するが IFN- γ 産生や granzyme は増加してくるのが認められ³⁴⁾、結核症でも何らかの役割を担っていることが示唆された。

B-6 (5) NK細胞

CD3⁻, CD16⁺ で細胞質内に perforin/granzyme 顆粒を有し、以前より感染症よりも腫瘍免疫の立場から注目されてきたが、結核感染での役割も調べられている。ヒトの CD3⁺/CD16⁻ の T細胞、CD3⁻/CD16⁺ の NK細胞、IL-2 活性化キラー (lymphokine activated killer, LAK) 細胞とを結核菌貪食マクロファージと共培養すると、それぞれ 77%, 84%, 97% の殺菌作用を示し³⁵⁾、Th1 肉芽腫内には NK細胞もみられ、CCR1 欠損マウスではそれが 60% の減少を示した³⁶⁾とする報告などがある。

B-6 (6) NKT細胞

NK細胞マーカーと T細胞マーカーの双方をもち、 β -GalCer による刺激で著明に分裂増殖することから、抗腫瘍免疫効果の臨床的効果が期待されているが、結核免疫に果たす役割はほとんど不明である。

B-6 (7) 調節性 T細胞 (Treg)

自己免疫性疾患、移植免疫および腫瘍免疫などの領域では、CD4⁺T細胞の一種として免疫反応に抑制的に働く Treg の存在と役割が研究され、CD4⁺CD25^{high} の表面マーカーをもち、IL-10 分泌などを介して免疫抑制的に

働くと考えられる。結核患者の血液およびBAL液中には健康対照者より高率にTregがみられ、血液よりもBAL液内で高く、結核免疫活性にも調節的役割を果たしているのではないかと、最近報告された³⁷⁾。

注：さらに最近、IL-17を分泌しTh17と呼ばれる新しいT細胞集団が報告され、IL-6などによる自己抗原への反応性を惹起せしめて自己免疫疾患発生に役割を果たし、前記Treg^{38),39)}、あるいはIFN- γ ⁴⁰⁾はそれに抑制的に働いて拮抗し、両者のバランスが問題であると提起されている。

B-6 (8) Th1/Th2バランス：気道感染症かアレルギー性過敏反応か

気管支に吸入された抗原が、慢性炎症の引き金となるか、アレルギー性過敏反応を招来するかの機序は未だ研究の途上にある問題である。すなわち、CD3⁺Tリンパ球がCD4⁺Th0からTh1とTh2へと分化していく過程が、いかなる機序で規定されており、そのバランスが調節されているかは、気管支喘息の診断・治療上なお残された重要な疑問で、それに関する多角的な最近の研究の成績を以下にまとめた。

LPS刺激で、C57, B10のTh1系マウスのM ϕ ではIFN- γ やNOを産生し、DBA, Balb/cなどTh2系マウスM ϕ ではornithine産生が起こるが、それにはTGF- β 1による調節機構が注目され⁴¹⁾、あるいはM ϕ 除去マウスではTh1反応の抑制とTh2(好酸球と気道過敏性)反応の促進が起こり、M ϕ 補完により回復し、樹状細胞やB細胞移入でTh2反応が促進され、M ϕ が調節因子であるとされる⁴²⁾。その反応は接種菌量でも左右され、BCG少量接種ではTh1型反応が、大量接種ではTh1/Th2混合性反応が出現したという報告⁴³⁾がみられる。その反応は経時的にも異なり、初期に産生されるTh1型のIFN- γ ・TNF- α が、後のIL4などTh2サイトカイン産生に影響するのではという報告⁴⁴⁾⁴⁵⁾もある。

これらの成績を敷衍するかのようにより、卵白アルブミンで感作したマウスにBCGを投与すると、Th2反応からTh1反応へシフトが起こり、それはVCAM-1の著明減少による好酸球浸潤抑制によるのではないかと⁴⁶⁾とされ、その作用は*Mycobacterium vaccae*投与実験でも認められている⁴⁷⁾⁴⁸⁾。また、卵白アルブミン感作マウスに*M. vaccae*を投与した時、気道アレルギー反応が調節性Tリンパ球により抑制されるのがみられたとする報告⁴⁹⁾もあり、調節性T細胞の検討も行われているが、その結核菌感染の意味については未だ明らかでない。気道アレルギー発現の研究からは、強力な抗原提示作用をもつ樹状細胞によるTh2反応誘発の意味が、最近とくに重要視されてきた。

B-6 (9) 樹状細胞

抗原提示細胞としては、これまでよく知られたマクロファージ以外に樹状細胞(Dendritic cells, DC)があり、これにはlymphoid, myeloid, interstitial, epithelialなどの亜型が存在し、その抗原提示能はマクロファージよりもDCのほうがはるかに高いことが、近年知られるに至っている。それに伴って肺の結核性炎でのDCの役割についての研究も行われるようになってきた。

実験的結核病巣でのDCの動態：実験的BCG肉芽腫にはDC特有の表面マーカーをもつ細胞が見られ、電顕的にも特徴的所見のあるDCが病変部へ浸潤しているのがみられた⁵⁰⁾。PPD被覆ピースによる肉芽腫でもCD11c, HLA class II陽性、IL-12 p40産生性のDCがみられ、そのマウスの縦隔リンパ節には高い分裂能をもつPPD特異的T細胞が見出された⁵¹⁾。BCG貪食DCをDC・T cell接着関連のCD40に対する抗体で刺激すると、IL-12 p40, IFN- γ 産生などの特異的免疫反応が促進されたが、このDCを移入したマウスでの肺内強毒菌増殖は抑制できなかった⁵²⁾。貪食能をもつ未熟DCでは抗原ペプチドとMHC-II分子との複合体が細胞質内に検出され、抗原が貪食されたことが知られ、BCG感染マウスの未熟DCでは菌が2週後までなお細胞質内にみられ、それと共に抗原提示能は低下していた⁵³⁾。Leishmania majorを抗原とした時にも同様に、Th1型の反応が出現し⁵⁴⁾、結核菌感染・DC欠損マウスではCD4⁺T細胞反応が野生マウスよりも遅延し、結核菌増殖が促進されていた⁵⁵⁾。なお結核菌感染した樹状細胞はナイーブT細胞をTh1細胞型に誘導するが、結核菌感染マクロファージはTh1細胞型に誘導しないとも報告されており⁵⁶⁾、抗原提示細胞の相違により誘導される免疫系の異なる可能性がある。

DCによる抗原処理：外来性抗原がDCに接着すると、細胞表面のC型レクチンであるDC-SIGN(DC-Specific ICAM Grabbing Non-integrin)が抗原と複合物を形成し、endosome/lysosome内に取り込まれて処理された後、CD4⁺Tリンパ球に抗原情報が伝達される⁵⁷⁾。結核菌抗原Mtb39の遺伝子を組み込んだウイルス・ベクターを移入したDCを投与されたマウスでは、抗原特異的CD8⁺T細胞が出現し、またヒトPPD反応陽性者でもMtb39抗原特異的リンパ球(CD4⁺/CD8⁺)が検出され、この系はワクチンの免疫原性の測定に使えるのではないかとされた⁵⁸⁾。すなわち、DCはCD4⁺T細胞にもCD8⁺T細胞にも抗原情報を伝達しようと思われる。

ヒトでの研究：未熟DCは結核菌の脂質抗原と反応するが、それはT反応陽性者で陰性者より強くみられ、結核患者では抗結核剤投与後に陽性化する⁵⁹⁾。一方未熟DCに取り込まれた結核菌はDCの未熟型から成熟型へ

の移行を阻害するのが観察され、結核菌が宿主免疫反応から逃れる機構の一つであろうとする報告もある⁶⁰⁾。

DCの化学走向性：DCの走向性に関係するケモカインの研究も行われ、DCはCCR7を豊富に発現しており、気管支周囲結合織やリンパ管からのCCL-21と反応して肺門リンパ節へと走行するが、実験的に結核死菌貪食の標識マクロファージと別の標識をしたDCとを混合して気管支内に注入すると、CCR7を発現しているDCのみが縦隔リンパ節に出現し、T細胞分裂とIFN- γ 産生を引き起こした⁶¹⁾との報告は、結核菌初感染時の生体内での反応形式を想起させる。結核菌貪食DCはIFN- α/β 依存性にCXCL-10を分泌し、*in vitro*でCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、NK細胞の遊走性を低下させて炎症を負に調節する⁶²⁾、結核感染肺へのマクロファージとCDの流入はCCR2依存性である⁶³⁾などの報告がある。

表皮型DC、別名ランゲルハンス細胞：他の部位のDCと異なりC-type lectinであるランゲリンをCD1aと共に発現し、単球由来DCより高いCD1a拘束性の抗原提示能をもつことが、ハンセン病患者皮膚で調べられた⁶⁴⁾。

B-6 (10) 好中球, 好酸球, 好塩基球

顆粒球はこれまで結核性炎症ではその役割があまり問題にされず、好中球でも炎症初期にマクロファージを呼び寄せることに意味があるとされてきた。しかし、最近ことに好中球も抗菌の働きをしていることが疑われている。

好中球：抗体で好中球を減少させたマウスでは、respiratory burstの低下と、サルモネラや鼠チフス菌などの迅速発育菌の増殖を亢進させ⁶⁵⁾、感染BCG菌の肺内増殖を高めるが⁶⁶⁾、他の炎症性サイトカインに抑制的に働く作用もある⁶⁷⁾。その作用はアポトーシスとなった好中球の顆粒をマクロファージが貪食することで、ファゴソームの殺菌能が増加することが関連すると報告された⁶⁸⁾。

好酸球：好酸球性ペルオキシダーゼ (EPO) は好中球のミエロペルオキシダーゼ (MPO) に匹敵する *in vitro* での結核菌発育抑制作用があるが、電顕的に溶菌活性を示し、それはMPOと異なりH₂O₂非依存性である⁶⁹⁾。

肥満細胞：結核菌と接触させると膜表面のCD48分子の凝集とヒスタミン放出が起こり、非感作宿主の結核菌に対する反応を調節する大きな役割があるのだらう⁷⁰⁾。

(担当：岩井和郎)

文 献

B-6 (1) 結核性病変の病理発生

1) Chackerian AA, Alt JM, Perera TV, et al.: Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* is influenced by host factors

and precedes the initiation of T-cell mediated immunity. *Infect Immun.* 2002; 70: 4501-9.

- 2) Mainail ES, McMurray DN: Protein deficiency induces alterations in the distribution of T-cell subsets in experimental pulmonary tuberculosis. *Infect Immun.* 1998; 66: 927-31.
- 3) Manca C, Tsenova L, Bergold A, et al.: Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by the failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha/beta. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2001; 98: 5752-7.
- 4) Pussegur MP, Botanch C, Duteyrat J-L, et al.: An *in vitro* dual model of mycobacterial granulomas to investigate the molecular interaction between mycobacterial and human host cell. *Cell Microbiol.* 2004; 6: 423-33.
- 5) Cosma CL, Humbert A, Ramacrisnan L: Superinfecting mycobacteria home to established tuberculous granuloma. *Nature Immunol.* 2004; 5: 825-35.
- 6) Cliff JM, Andrade IN, Mistry R, et al.: Differential gene expression identifies novel markers of CD4⁺ and CD8⁺ cell activation following stimulation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2004; 173: 485-93.

B-6 (2) CD4⁺T細胞

- 7) Siobhan C, Elkins KL: CD4⁺T cells mediate IFN- γ -independent control of *Mycobacterium tuberculosis* infection both in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2003; 171: 4689-99.
- 8) Anderson P, Swedegard B: CD4⁺T-cell subsets that mediate immunological memory to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Infect Immun.* 2000; 68: 621-9.
- 9) Winslow GM, Roberts AD, Blackman MA, et al.: Persistence and turnover of antigen-specific CD4⁺T cells during chronic tuberculosis infection in mouse. *J Immunol.* 2003; 170: 2046-52.
- 10) Heynes L, Eaton SM, Burns EM, et al.: CD4⁺T cell memory derived from young naïve cells functions well into old age, but memory generated from aged naïve cells functions poorly. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2003; 100: 15053-8.
- 11) Stubbe M, Vanderheyde N, Goldman M, et al.: Antigen-specific central memory CD4⁺T lymphocytes produce multiple cytokines and proliferate in vivo in humans. *J Immunol.* 2006; 177: 8185-90.
- 12) Petrofsky M, Bermdez LE: CD4⁺T cells but not CD8⁺ or $\gamma\delta$ ⁺ lymphocytes are required for host protection against *Mycobacterium avium* infection and dissemination through the intestinal route. *Infect Immun.* 2005; 73: 2621-7.

B-6 (3) CD8⁺T細胞：脂質抗原認識と特有の殺菌機構

- 13) Moody DB, Ulrichs T, Muhlecker W, et al.: CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nature.* 2000; 404: 884-8.
- 14) Serbina NV, Liu C-C, Scanga CA, et al.: CD8⁺ CTL form lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice express perforin *in vivo* and lyse infected macrophages. *J Immunol.* 2000; 165: 353-63.
- 15) Smith SM, Brookes R, Klein MR, et al.: Human CD8⁺ CTL specific for the mycobacterial major secreted antigen 85A. *J*

- Immunol. 2000 ; 165 : 7085-95.
- 16) Serbina NV, Flynn JL: CD8⁺ T cells participate in the memory immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 2001 ; 69 : 5320-8.
 - 17) Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uemura K, et al.: Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science*. 1997 ; 276 : 1684-7.
 - 18) Denis O, Huygen K: Characterization of the culture filtrate-specific cytotoxic T lymphocyte response induced by Bacillus Calmette-Guérin vaccination in H-2b mice. *Intl Immun*. 1999 ; 11 : 209-16.
 - 19) Kamath AB, Woodworth J, Xiong X, et al.: Cytolytic CD8⁺ T cells recognizing CFP-10 are recruited to the lung after *Mycobacterial tuberculosis* infection. *J Exp Med*. 2004 ; 200 : 1479-89.
 - 20) Maue A, Waters WR, Davis WC, et al.: Analysis of immune responses directed toward a recombinant early secretory antigenic target six-kilodalton protein-culture filtrate protein 10 fusion protein in *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Infect Immun*. 2005 ; 73 : 6659-67.
 - 21) Liebena E, Girvin R, Welsh M, et al.: Generation of CD8⁺ T-cell responses to *Mycobacterium bovis* and mycobacterial antigen in experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun*. 1999 ; 67 : 1034-44.
 - 22) Silva CL, Lowrie DB: Identification and characterization of murine cytotoxic T cells that kill *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 2000 ; 68 : 3268-74.
 - 23) Turner JD, Souza CD, Pearl JE, et al.: CD8⁻ and CD95/95L-dependent mechanisms of resistance in mice with chronic pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 ; 24 : 203-9.
 - 24) Turner J, Frank AA, Orme IM: Old mice express a transient early resistance to pulmonary tuberculosis that is mediated by CD8⁺ T cells. *Infect Immun*. 2002 ; 70 : 4628-37.
 - 25) Kamath A, Woodworth J, Behar SM: Antigen-specific CD8⁺ T cells and the development of central memory during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 2006 ; 177 : 6361-9.
 - 26) Cho S, Mehra V, Thoma-U S, et al.: Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8⁺ T cells in human tuberculosis. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2000 ; 97 : 12210-5.
 - 27) Shams H, Wize B, Weis SE, et al.: Contribution of CD8⁺ T cells to gamma interferon production in human tuberculosis. *Infect Immun*. 2001 ; 69 : 3497-501.
 - 28) Wang J, Santosuosso N, Nugai P, et al.: Activation of CD8⁺ T cells by mycobacterial vaccination protects against pulmonary tuberculosis in the absence of CD4⁺ T cells. *J Immunol*. 2004 ; 173 : 4590-7.
 - 29) Caccamo N, Milano S, Sano CD, et al.: Identification of epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa protein recognized by human leucocyte antigen-A*0201 CD8⁺ T lymphocytes. *J Infect Dis*. 2002 ; 186 : 991-8.
 - 30) Flyer DC, Ramakrishna V, Miller C, et al.: Identification by mass spectrometry of CD8⁺ T-cell *Mycobacterium tuberculosis* epitopes within the *Rv0341* gene product. *Infect Immun*. 2002 ; 70 : 2926-32.
 - 31) Kawashima T, Norose Y, Watanabe Y, et al.: Major CD8⁺ T cell response to live Bacillus Calmette-Guérin is mediated by CD1 molecules. *J Immunol*. 2003 ; 170 : 5345-8.
 - 32) Samten B, Wize B, Shams H, et al.: CD40 ligand trimer enhances the response of CD8⁺ T cells to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2003 ; 170 : 3180-6.
- B-6 (4) $\gamma\delta$ T細胞**
- 33) Worku S, Hoft DF: Differential effects of control and antigen-specific T cells on intracellular mycobacterial growth. *Infect Immun*. 2003 ; 71 : 1763-73.
 - 34) Dieli F, Sireci G, Caccamo N, et al.: Selective depression of interferon- γ and granulysin production with increase of proliferative response by V γ 9/V δ 2 T cells in children with tuberculosis. *J Infect Dis*. 2002 ; 186 : 1835-9.
- B-6 (5) NK細胞**
- 35) Yoneda K, Ellner JJ: CD4⁺ T cell and natural killer cell-dependent killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 ; 158 : 395-403.
 - 36) Shang X, Qiu B, Frait KA, et al.: Chemokine receptor 1 (CCR1) knockout abrogates natural killer cell recruitment and impairs type-I cytokines in lymphoid tissue during pulmonary granuloma formation. *Am J Pathol*. 2000 ; 157 : 2055-63.
- B-6 (7) 調節性 T細胞 (Treg)**
- 37) Guyot-Revol V, Innes JA, Hackforth S, et al.: Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am Rev Respir Crit Care Med*. 2006 ; 173 : 803-10.
 - 38) Bettelli E, Carrier Y, Gao W: Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 ; 441 : 235-8.
 - 39) Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al.: Transforming growth factor- β induces development of the T(H) 17 lineage. *Nature*. 2006 ; 441 : 231-4.
 - 40) Cruz A, Khader SA, Torrado E, et al.: IFN- γ regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during Mycobacterial infection. *J Immunol*. 2006 ; 177 : 1414-20.
- B-6 (8) Th1/Th2 バランス : 気道感染症かアレルギー性過敏反応か**
- 41) Mills CD, Kincaid K, Alt JM, et al.: M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000 ; 164 : 6166-73.
 - 42) Tang C, Inman MD, van Rooijen N, et al.: Th type-1-stimulating activity of lung macrophages inhibits Th2-mediated allergic airway inflammation by an IFN- γ -dependent mechanism. *J Immunol*. 2001 ; 166 : 1471-81.
 - 43) Power CA, Well G, Bretscher P: Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of the immune response independently of whether immunization is administered by the intravenous, or intradermal route. *Infect Immun*. 1998 ; 66 : 5743-50.
 - 44) Qiu B, Frait KA, Reich F, et al.: Chemokine expression

- dynamics in mycobacterial (type-1) and schistosomal (type-2) antigen-elicited pulmonary granuloma formation. *Am J Pathol.* 2001 ; 158 : 1503–15.
- 45) Jiao X, Lo-Man R, Winter IV, et al.: The shift of Th1 to Th2 immunodominance associated with chronicity of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin infection does not affect the memory response. *J Immunol.* 2003 ; 170 : 1392–8.
- 46) Yang X, Fan Y, Wang S, et al.: Mycobacterial infection inhibits established allergic inflammatory responses via alteration of cytokine production and vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Immunology.* 2002 ; 105 : 336–43.
- 47) Hopfenspirger MT, Agramal DK: Airway hypersensitiveness, late allergic response, and eosinophilia are reversed with mycobacterial antigens in ovalbumin-prensensitized mice. *J Immunol.* 2002 ; 168 : 2516–22.
- 48) Zuany-Amorim C, Manlins C, Trifilieff A, et al.: Long-term protective and antigen-specific effect of heat killed *Mycobacterium vaccae* in a murine model of allergic pulmonary inflammation. *J Immunol.* 2002 ; 169 : 1492–9.
- 49) Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C, et al.: Suppression of airway eosinophilia by killed *M. vaccae*-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nature Med.* 2002 ; 8 : 625–9.
- B–6 (9) 樹状細胞
- 50) Tsuchiya T, Chida K, Suda T, et al.: Dendritic cell involvement in pulmonary granuloma formation elicited by Bacillus Calmette-Guérin in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 ; 165 : 1640–6.
- 51) Iyonaga K, McCarthy KM, Schneeberg EE, et al.: Dendritic cells and the regulation of a granulomatous immune response in the lung. *Am J Respir Cell Molec Biol.* 2002 ; 26 : 671–9.
- 52) Emangel C, Palendria U, Feng CG, et al.: Stimulation of dendritic cells via CD40 enhances immune responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2001 ; 69 : 2456–91.
- 53) Jiao X, Lo-Man R, Gueumonprez P, et al.: Dendritic cells are host cells for mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity. *J Immunol.* 2002 ; 168 : 1294–301.
- 54) Berberich C, Ramirez-Pineda JR, Hambrecht C, et al.: Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens. *J Immunol.* 2003 ; 170 : 3171–9.
- 55) Tian T, Woodworth J, Kold M, et al.: In vivo depletion of CD 11c⁺ cells delays the CD4⁺T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* and exacerbates the outcome of infection. *J Immunol.* 2005 ; 175 : 3268–72.
- 56) Hickman SP, Chan J, Salgame P: *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naïve T cell polarization. *J Immunol.* 2002 ; 168 : 4636–42.
- 57) Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet S, et al.: The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol.* 2002 ; 168 : 2118–26.
- 58) Lewinsohn DA, Lines RA, Lewinson DM, et al.: Human dendritic cells presenting adovirally expressed antigen elicit *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8⁺ T cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 ; 166 : 843–8.
- 59) Ulrichs T, Moody DB, Grant E, et al.: T-cell responses to CD I-presented lipid antigens in humans with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2003 ; 71 : 3076–87.
- 60) Hanekom WA, Mendillo M, Manca C, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* inhibits maturation of human monocyte-derived dendritic cells *in vitro*. *J Infect Dis.* 2003 ; 188 : 257–66.
- 61) Baht K, Hickman SP, Salgame P, et al.: A new approach to modeling early lung immunity in murine tuberculosis. *J Immunol.* 2004. 172 : 2748–51.
- 62) Lande R, Giacommini E, Grassi T, et al.: IFN- α , β released by *Mycobacterium tuberculosis*-infected human dendritic cells induces the expression of CXCL-10: selective recruitment of NK and activated T cells. *J Immunol.* 2003 ; 170 : 1174–82.
- 63) Peters W, Cyster JF, Mack M, et al.: CCR-2 dependant trafficking of F 4/8^{dim} macrophages and CD11c^{dim/intermediate} dendritic cells is crucial for T cell recruitment to lungs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2004 ; 172 : 7647–53.
- 64) Hunger RE, Sieling PA, Ochoa MT, et al.: Langerhans cells utilize CD 1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest.* 2004 ; 113 : 701–8.
- B–6 (10) 好中球, 好酸球, 好塩基球
- 65) Seiler P, Aichele P, Raupach B, et al.: Rapid neutrophil response controls fast-replicating intracellular bacteria but not slow-replicating *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 2000 ; 181 : 671–80.
- 66) Fulton SA, Reba SM, Mortin TD, et al.: Neutrophil-mediated mycobacterial immunity in the lung during *Mycobacterium bovis* BCG infection in C57BL/6 mice. *Infect Immun.* 2002 ; 70 : 5322–7.
- 67) Xing L, Remick DG: Neutrophils as firemen, production of anti-inflammatory mediators by neutrophils in a mixed cell environment. *Cell Immunol.* 2005 ; 231 : 126–32.
- 68) Tan BH, Meinken C, Bastian M, et al.: Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J Immunol.* 2006 ; 177 : 1864–71.
- 69) Borelli V, Vila F, Shankar S, et al.: Human eosinophil peroxidase induced surface alteration, killing, and lysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2003 ; 71 : 605–13.
- 70) Munoz S, Hernandez-Pando R, Abraham SN, et al.: Mast cell activation by *Mycobacterium tuberculosis*: mediator release and role of CD48. *J Immunol.* 2003 ; 170 : 5590–5.

B-7 ヒトの発病要因

要約: 結核感受性遺伝子については、表6に見るごとく、マウス *Bcg* のヒト homologe の NRAMP1 を嚆矢として、IFN- γ R, IL-12R β 鎖の変異を示す症例の報告が相次ぎ、さらにケモカイン MCP-1 遺伝子プロモーター領域の変異が感受性遺伝子として報告された。最近、ビタミン D1 水酸化酵素遺伝子変異による Vit.D 合成低下が、アフリカ系アメリカ人での感染抵抗性低下の一因であるという報告がなされた。異なった角度からの観察として、抗 IFN- γ 自己抗体をもつ個体で高い抗酸菌感受性を示したとする報告がある。また、特定候補遺伝子の観察ではなく、染色体上の感受性関連遺伝子をスキャンする研究が、結核とハンセン病患者でなされ、iNOS, STAT, CCL などの遺伝子が多い第17染色体に関連遺伝子のある座が見つかった。発病要因の研究では、今後複数の、正と負の遺伝子の組み合わせでの影響を考慮する必要があると思われる。結核と HIV との関連では、先行する HIV 感染を続発の結核感染が増悪させるという臨床的観察を裏付ける研究がなされた。ヒト非結核抗酸菌症の免疫に関しては、T細胞系のサイトカイン産生低下と細胞内菌増殖抑制とが観察された。

B-7 (1) 結核感受性遺伝子

結核感受性マウスと抵抗性マウスの比較から *Bcg* 遺伝子に関連する natural resistance associated macrophage protein (NRAMP) 1 の存在が、以前から指摘されていた。そのヒトでの homologe が成人¹⁾²⁾、小児³⁾での結核発病に関連すると報告された。その機序についてマウスではファゴソームへの2価陽イオン流入と、膜成熟が関連することが、ヒトでは IL-10 産生と関連していることが疑われた²⁾。

結核患者末梢血リンパ球は抗原刺激時の IFN- γ 産生が低下し、IL12-R β 発現 Tリンパ球の割合も低下し、結核病巣では逆に亢進している⁴⁾が、結核感受性とサイトカイン遺伝子変異との関連についての研究報告が相次いだ。IFN- γ R1 の部分的欠損が BCG 血症をきたした小児と結核の兄弟にみられたという症例報告⁵⁾をはじめとして、IFN- γ 第一イントロンでの変異が113人の結核患者での調べで発病と関連しているのがみられたという報

告⁶⁾、TNF- α と IL-10 遺伝子のプロモーター領域での単一塩基多型 (SNP) がハンセン病発病と関連するという報告⁷⁾が見られる。

その後、IL-12 受容体遺伝子に異常のある4症例が全身性抗酸菌症 (2例は BCG, 2例は *M. avium*) をきたしたという報告がなされ、IFN- γ 産生能の抑制があるとされた⁸⁾⁹⁾。以後、同様の報告がヨーロッパ¹⁰⁾、モロッコ¹¹⁾、香港¹²⁾から相次いでなされ、受容体細胞外ドメインに未熟なストップコドンがある⁸⁾、またリスクハロタイプと防御的ハロタイプの両者があること¹²⁾などが示唆された。

これら proinflammatory cytokine の遺伝子多型性以外に、ケモカイン受容体の異常が結核感受性に関連するという報告が現れた、CCR2 (MCP-1) ノックアウトマウスでの結核菌感染実験では、肺への細胞流入、IFN- γ と iNOS2 の発現の遅れが観察されている¹³⁾が、ヒトでも MCP 遺伝子のプロモーター領域に SNP のある結核患者で、A-G および G-G 型では A-A 型より 2.3 倍と 5.4 倍に

表6 抗酸菌症易感染性に関連する主な遺伝子

変異遺伝子	特 徴
SLC11A1 (NRAMP1)	ファゴソーム成熟に関連? IL-10 産生と関連?
IFN- γ R1	抗酸菌症易感染性 (症例報告)
IL-12 R	抗酸菌症易感染性 (症例報告) 結核患者集団でプロモーター領域 SNP の検討
TNF- α /IL-10	ハンセン病患者集団で両遺伝子プロモーター領域の SNP 存在
CCR2 (MCP-1)	結核患者集団で SNP 多し
ビタミン D1 水酸化酵素遺伝子	細胞内殺菌物質 cathelicidin 産生低下と関連
染色体スキャンでの所見	17q11-q21 (NOS 2A, CCL18, CCL4, STAT 5B) 上の変異 10q, 11q, 20q 上の変異
抗 IFN- γ 自己抗体保有者	抗酸菌易感染者で抗体陽性 (症例報告)

罹患率の高いことが、メキシコと韓国とでの調査で示され、その G-G genotype では結核抗原による IL-12 p40 産生の抑制と活動性結核へ進展しやすいことが示唆された¹⁴⁾。

この他、結核菌の細胞付着に関連するマンノース結合レクチン遺伝子の多型性が、結核発病と関連するのではという報告もある¹⁵⁾。

このような特定の遺伝子の変異についての研究に続いて、多数の遺伝子のスキャンによる結核感受性関連遺伝子の探索が行われている。ブラジル人の結核患者とハンセン病患者とその家族について調べたイギリスの、49 個の SNP を用いた研究¹⁶⁾では、17q11-q21 染色体上にあり離れた位置にある、NOS2A, CCL18, CCL4, STAT5B の 4 遺伝子が、それぞれ独立して発病と関連すると述べている。1405 個のマーカーを活用して検索したブラジル人での別の研究¹⁷⁾では、結核に関連して 10q, 11q, 20q 染色体上に、高い LOD スコア値を示す場所が見つかったとしているが、この研究ではどのような機能をもつ遺伝子かは不明である。

その他、CD8⁺T 細胞への抗原受け渡しに関連する HLA class I の subtype の増加あるいは減少が、結核発病と重症度に関連するとの報告もある¹⁸⁾。また最近、マウス第 1 染色体 sst1 領域内にあり *Ipr* (intracellular pathogen resistance) と命名された遺伝子が、結核を含む細胞内寄生菌に対する自然抵抗性に関与しているとの報告がある¹⁹⁾が、ヒトでのそれは不明である。

感受性関連遺伝子とは全く異なった角度からの研究として、IFN- γ に対する自己抗体をもつことが抗酸菌症易感性に関連するという報告がある。*Mycobacterium chelonae*²⁰⁾ や *M. fortuitum*²¹⁾ への易感染性を示していた症例が、抗 IFN- γ 自己抗体 IgG をもつ個体であったことが報告されていたが、*M. avium* complex の 2 例と *M. fortuitum* の 1 例で、患者血清中に抗 IFN- γ 抗体が存在していて、血液細胞の抗原刺激でも IFN- γ を産生せず、免疫不全の状態になっているとする報告²²⁾がなされた。抗 IFN- γ 自己抗体の産生は、先天性というより何らかの要因(例えばウイルス感染)で獲得された素因であると考えられている。結核症での同様の報告は現在までなく、非結核性抗酸菌症での問題と思われる。

最近、結核やサルコイドーシスに感受性の高いアフリカ系アメリカ人では、Vitamin D-1 hydroxylase 遺伝子が関与する細胞内抗菌ペプチド cathelicidin 産生に異常があり、血清中の 25-hydroxyvitamin D 値が白人に比して低く、cathelicidin mRNA の誘導が悪く、全体として TLR 刺激による Vitamin D 依存性の抗菌活性の低下が起こっている。これは、豊富な皮膚のメラニン色素により Vit.D 生合成のレベルが低く保たれていることと関連し

ているのではないかという報告²³⁾があった。人種間の感染抵抗性の差を考えるうえで重要な報告であり、アフリカからの結核研究報告の評価にはこの点を念頭において、考える必要があると思われた。

B-7 (2) HIV と結核感染

先行する HIV 感染が結核感染により増悪することが臨床的に観察されていたが、サルを使った SIV の実験でその現象を検証した報告がある²⁴⁾。SIV および BCG 感染だけでは末梢血 CD4⁺T リンパ球数に変化はないが、SIV 感染後に BCG を感染させると CD4⁺T リンパ球数の減少が起こり、生存日数を大きく低下させ、それには TCR- β 領域の CDR3 鎖の変化が関連しているとされた。また、HIV 陽性で結核性胸膜炎患者の末梢血と胸水中の単核細胞の比較で、胸膜炎部位での CCR5 (HIV-1 co-receptor) の発現がより高く、炎症性サイトカインやケモカインの発現は低下していて、局所での HIV 転写増殖過程を促進する方向の変化がみられるとされた²⁵⁾。

B-7 (3) 非結核性抗酸菌症での免疫

非結核性抗酸菌症の中で日本で最も多い *Mycobacterium avium* complex 症の免疫学的プロフィールについて、IFN- γ と TNF- α の産生が低下し、IL-12, IL-18 の低下があり、IL-10 産生は亢進している²⁶⁾、あるいは患者リンパ球のマクロファージ内菌増殖抑制能が低下していて、IFN- γ などを加えるとその回復がある²⁷⁾とされるが、肺結核患者でも重症化した例では同様の傾向があり、結核症と抗酸菌症のプロフィールの間に質的差異を求めることは難しい。むしろ、共通した抗原性を多くもつ非結核性抗酸菌が、BCG 接種の効果に影響するというマウスでの研究²⁸⁾の臨床的意味が注目されている。

(担当：和田雅子，岩井和郎)

文 献

B-7 (1) 結核感受性遺伝子

- 1) Hoal EG, Lewis LA, Jamieson SE, et al.: SLC11A1 (NRAMP1) but not SLC11A2 (NRAMP2) polymorphisms are not associated with susceptibility to tuberculosis in a high-incidence community in South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004; 8: 1464-71.
- 2) Awomoyi AA, Marchant A, Howson JM, et al.: Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly *Nramp-1*) and susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis.* 2002; 186: 1804-14.
- 3) Malik S, Abel L, Tooder H, et al.: Alleles of the NRAMP1 gene are risk factors for pediatric tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; 102: 12183-8.
- 4) Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Altare F, et al.: Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with

- tuberculoid bacillus Calmette-Guérin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *J Clin Invest.* 1997 ; 100 : 2658-64.
- 5) Zhang M, Gong J, Presky DH, et al. : Expression of the IL-12 receptor $\beta 1$ and $\beta 2$ subunits in human tuberculosis. *J Immun.* 1999 ; 162 : 2441-7.
 - 6) Lopez-Makeruelo D, Arnalich F, Serantes R, et al. : Interferon- γ and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 ; 167 : 970-5.
 - 7) Santos AR, Suffyo PN, Vandarrhought PR, et al. : Role of tumor necrosis factor- α and IL-10 promoter gene polymorphism in leprosy. *J Infec Dis.* 2001 ; 186 : 1687-91.
 - 8) Altare F, Durandy A, Lammas D, et al. : Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science.* 1998 ; 280 : 1432-5.
 - 9) Altare F, Ensser A, Breiman A, et al. : Interleukin-12 receptor $\beta 1$ deficiency in a patient with abdominal tuberculosis. *J Infec Dis.* 2001 ; 184 : 231-6.
 - 10) Jong RD, Altare F, Haagen I-A, et al. : Severe Mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science.* 1998 ; 280 : 1435-8.
 - 11) Remus N, Baghadi JE, Fieschi S, et al. : Association of IL-12R $\beta 1$ polymorphism with pulmonary tuberculosis in adults in Morocco. *J Infec Dis.* 2004 ; 190 : 580-7.
 - 12) Tsu HW, Lau YL, Tam CM, et al. : Association between IL-12 β polymorphisms and tuberculosis in Hong Kong Chinese population. *J Infec Dis.* 2004 ; 190 : 913-27.
 - 13) Scott HM, Flynn JL : *Mycobacterium tuberculosis* in chemokine receptor-2 deficient mice : Influence of dose on disease progression. *Infec Immun.* 2002, 170 : 5946-54.
 - 14) Flores-Villanueva PO, Ruiz-Morales JA, Song C-H, et al. : A functional promoter polymorphism in *monocyte chemo-attractant protein-1* is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *J Exper Med.* 2005 ; 202 : 1649-58.
 - 15) Soborg C, Madsen HO, Andersen AB, et al. : Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis. *J Infec Dis.* 2003 ; 188 : 777-82.
 - 16) Jamieson SE, Miller EN, Black GF, et al. : Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11- q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. *Genes Immun.* 2004 ; 5 : 46-57.
 - 17) Miller EN, Jamieson SE, Joberty C, et al. : Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes Immun.* 2004 ; 5 : 63-7.
 - 18) Balamurungan A, Sharma SK, Mehra NK : Human leukocyte antigen class I subtypes influence susceptibility and severity of tuberculosis. *J Infect Dis.* 2004 ; 189 : 805-11.
 - 19) Pan H, Yan BS, Rojas M, et al. : *lpr 1* gene mediates innate immunity to tuberculosis. *Nature.* 2005 ; 434 : 767-72.
 - 20) Höflich C, Sabat R, Rosseau S, et al. : Naturally occurring anti-IFN- γ antibody and severe infections with *Mycobacterium chelonae* and *Burkholderia cocovenenans*. *Blood.* 2004 ; 103 : 673-5.
 - 21) Döffinger R, Helbert MR, Barcenas-Morales G, et al. : Autoantibodies to interferon- γ in a patient with selective susceptibility to Mycobacterial infection and organ-specific autoimmunity. *Clin Infect Dis.* 2004 ; 38 : 10-3.
 - 22) Kampmann B, Hemingway C, Stephens A, et al. : Acquired predisposition to mycobacterial disease due to autoantibodies to IFN- γ . *J Clin Invest.* 2005 ; 115 : 2480-9.
 - 23) Liu PT, Stenger S, Li H, et al. : Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006 ; 311 : 1770-3.
- B-7 (2) HIVと結核感染
- 24) Zhou D, Shen L, Chalifoux L, et al. : *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin enhances pathogenicity of simian immunodeficiency virus infection and accelerated progression to AIDS in Macaque : A role of persistent T cell activation in AIDS pathogenesis. *J Immun.* 1999 ; 162 : 2204-16.
 - 25) Toosii Z, Johnson JL, Kanost R, et al. : Increased replication of HIV-1 at sites of *Mycobacterium tuberculosis* infection : Potential mechanisms of viral activation. *JAIDS.* 2001 ; 28 : 1-8.
- B-7 (3) 非結核性抗酸菌症での免疫
- 26) Vankayapati R, Wizel B, Samten B, et al. : Cytokine profiles in immunocompetent persons infected with *Mycobacterium avium* complex. *Infec Dis.* 2001 ; 183 : 478-84d.
 - 27) Tsukaguchi K, Okumura H, Tamaki S, et al. : Defective T cell function for inhibition of growth of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) in patients with MAC disease. : Restoration by cytokines. *J Infec Dis.* 2000 ; 182 : 1664-71.
 - 28) Brandt L, Cunha F, Weinreich Olsein A, et al. : Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine : Some species of environmental Mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infec Immun.* 2002 ; 70 : 672-8.