

原

著

## TACO 過剰発現マウスにおける BCG 誘発肝肉芽腫形成

廣 瀬 貴 之

新潟大学大学院医歯学総合研究科  
内部環境医学講座呼吸器内科学分野  
(主任：下條文武教授)

### BCG Induced Hepatic Granuloma Formation in TACO Transgenic Mice

Takayuki HIROSE

*Department of Homeostatic Regulation and Development,  
Division of Respiratory Medicine,  
Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University  
(Director : Prof. Fumitake GEJO)*

#### 要 旨

TACO (Tryptophane aspartate – containing coat protein) は BCG 生菌を貪食したマクロファージの貪食空胞 (phagosome) から単離された蛋白で、その膜周囲にとどまり続けて BCG のライソゾーム (lysosome) への移行を妨げ、結核菌の細胞内寄生成立に加担する分子と考えられている。本研究では TACO 過剰発現マウス (TG) を作製し、その BCG 感染時の肝臓における肉芽腫形成および BCG 菌数の推移を野生型マウス (WT) と比較し、TACO の結核菌貪食および殺菌における役割を検討した。TG においては感染早期 (2 週目まで) の肝肉芽腫数が WT に比較して有意に少なく、反対に 4 週目以後ではより増加した。肉芽腫内の類上皮細胞数は TG で多く、反対に T リンパ球数は少なかった。BCG 静注 1 時間後の肝内の BCG 貪食 Kupffer 細胞数は TG において有意に少なく、BCG 菌数も同様に少なかった。TG の腹腔滲出マクロファージは WT に比し有意に BCG 貪食能が低く、その後の細胞内殺菌能も低い傾向がみられた。以上の成績から TACO は結核菌の殺菌のみならず、貪食機構にも関与する分子と考えられた。

キーワード：TACO, トランスジェニックマウス, BCG, Kupffer 細胞, 肉芽腫

Reprint requests to: Takayuki HIROSE  
Department of Homeostatic Regulation and  
Development  
Division of Respiratory Medicine  
Graduate School of Medical and Dental Sciences  
Niigata University  
1-757 Asahimachi - dori.  
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通 1-757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講座  
呼吸器内科学分野 廣瀬 貴之

## はじめに

微生物が生体内に侵入する際には、通常マクロファージなどの食食能をもった細胞が最初の障壁となる<sup>1)2)</sup>。結核菌はマクロファージをおもなターゲットとする細胞内寄生細菌で、細菌の phagosome から lysosome への移行を阻止することで殺菌機構から逃れていると考えられている。しかし死菌の場合にはこのような現象はみられず、容易に lysosome による消化が行われる<sup>3)–5)</sup>。一方 Coronin は酵母からヒトまで広く有核細胞に発現する F-actin に結合する protein family の一員であり<sup>6)7)</sup>、細胞の運動、食食および分裂等に関与している<sup>8)–11)</sup>。TACO (Tryptophane aspartate-containing coat protein) は哺乳類の 5 つの Coronin-like protein のうち Coronin 1<sup>12)13)</sup> と相同性をもつ蛋白であり、BCG 生菌を食食したマウスマクロファージ様細胞株である J774.1 から単離されクローニングされた<sup>14)</sup>。TACO は食食された BCG 生菌を含む phagosome の膜周囲にとどまり続けて BCG の lysosome への移行を妨げるとされ、また同蛋白を強制発現させた細胞では結核菌が多く生存し増殖したことから、結核菌の細胞内寄生にとって大きな役割を担う物質と考えられている<sup>14)</sup>。しかしその *in vivo* における機能に関してはまだ詳細な解明がなされていない。

BCG 感染マウスは全身性の肉芽腫性炎症の解析に有用な実験モデルとして活用されてきた<sup>15)–20)</sup>。われわれは TACO の生体内における機能解析を行う目的で TACO 過剰発現マウス (TG) を作製し、その BCG 感染に関して野生型マウス (WT) と比較検討を行い、TACO の細菌食食および殺菌機能に関する新しい知見を得たので報告する。

## 材料と方法

### 1. 動物および臓器における TACO mRNA 発現

TACO 過剰発現マウスの作製は以下の様に行った。TACO cDNA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=4867978>) を pUC-CAGGS ベクターに導入し、クローニン

グ後に制限酵素 SalI と BamHI で消化し、CMV-enhancer, Chicken  $\beta$ -actin promoter と導入された TACO cDNA を含む約 4kb の遺伝子フラグメントを 0.8 % アガロースゲルで泳動し抽出精製した。このフラグメントを C57BL/6 系マウスの受精卵前核に注入し、出産したマウスの尾から genomic DNA を抽出した。TACO 遺伝子導入の有無は以下のプライマーを用いて PCR により確認した (forward: 5'-CCACGTGTTTGGACAGCCAGCCAA-3', reverse: 5'-GCGGGATCCGTGTG GACACTAGGCGATGTC-3', PCR 条件: denature 94 °C 40 秒, annealing 60 °C 90 秒, extension 72 °C 60 秒で 30 サイクル, PCR 産物: 240bp)<sup>14)21)</sup>。

このマウスは Basel 大学 Jean Pieters 教授より恵与頂き、SPF 環境下で野生型 C57BL/6 系マウスと交配させ継代し、上記の方法で TACO 遺伝子導入の有無を確認した。

全ての実験で使用したマウスは 16 ~ 24 週齢の TG および WT マウスで、両群で週齢をマッチさせた。全身諸臓器 (脳、骨格筋、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺) における TACO および  $\beta$ -actin の mRNA 発現は、各臓器から AGPC 法にて total RNA を採取し cDNA を合成した後、以下のプライマーを用いて PCR を行い、PCR 産物を半定量的に解析した (TACO forward: 5'-ATTGCCA TGACAGTGCCTAG-3', TACO reverse: 5'-GCAC TATGGCGTTTCAGATTC-3', PCR 条件: denature 94 °C 60 秒, annealing 56 °C 60 秒, extension 72 °C 60 秒で 30 サイクル, PCR 産物: 291bp) ( $\beta$ -actin forward: 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3',  $\beta$ -actin reverse: 5'-TAAAACGCAGCTCA GTAACAGTCCG-3', PCR 条件: denature 94 °C 60 秒, annealing 55 °C 60 秒, extension 72 °C 60 秒で 30 サイクル, PCR 産物: 348bp)。

### 2. 使用した細菌およびマウスへの感染

Mycobacterium bovis BCG (Bacillus Calmette-Guerin) は乾燥 BCG ワクチン (日本ビーシージー製造株式会社, 東京, 日本) を使用した。マウスには 0.05 % Tween 80 (和光純薬工業株式会社, 東京, 日本) 添加滅菌生理食塩水にて溶解した菌液を  $1 \times 10^7$  colony-forming units (CFU)/0.1ml

尾静脈より静注投与した。

### 3. 肉芽腫, 肉芽腫構成細胞および BCG の観察

BCG 静注後マウスは経時的に屠殺し, 肝臓は 10 %緩衝ホルマリンにて固定しパラフィン包埋ブロックを作製して  $3\mu\text{m}$  厚に薄切した。脱パラフィン後に親水化し, その後 Hematoxylin-eosin (HE) 染色を施行し, 光顕下で肉芽腫の直径, 単位面積あたり ( $/\text{mm}^2$ ) の肉芽腫数および肉芽腫内の類上皮細胞数を計測した。BCG および BCG を貪食した細胞の観察は Ziehl-Neelsen (ZN) 染色標本で行った。

### 4. 免疫組織学的染色

肝臓は periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 液にて 2 時間固定し, 10 %, 15 % および 20 % しょ糖添加 PBS にて各々 6 時間洗浄後に OCT コンパウンド (Miles, Elkhart, USA) で凍結包埋した。クリオスタット (Bright, Huntington, UK) を用い  $6\mu\text{m}$  厚に薄切し, Isobe らの方法で内因性ペルオキシダーゼを阻害した<sup>22)</sup>。一次抗体として抗 T リンパ球抗体 Thy1.2 (Becton Dickinson, Bedford, USA) およびウサギ抗マウス TACO ポリクローナル抗体 (Basel 大学 Jean Pieters 教授より恵与) を使用し, 二次抗体として各々 goat anti-rat IgM + IgG (H + L chain specific) (Southern Biotechnology Associates, Atlanta, USA), anti-rabbit IgG, peroxidase-linked species-specific F(ab')<sub>2</sub> fragment (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) を使用した。3,3'-diaminobenzidine (同人化学研究所, 熊本, 日本) を用いて可視化した後メチルグリーンにて核染色を行い, 光顕下で肉芽腫単位面積あたり ( $/\text{mm}^2$ ) の Thy1.2 陽性細胞数を計測した。TACO 陽性細胞に関しては肝臓内での分布を観察した。

### 5. 臓器中の BCG 生菌数の算定

肝臓および脾臓を無菌的に採取し, 0.05 % Tween80 添加滅菌 PBS 10ml を添加してホモジェナイズした後, 10 倍希釈系列を作製した。至適希釈濃度にて 2 % 小川培地 (極東製薬工業株式会社, 東京, 日本) に接種し, 恒温装置内で  $37^\circ\text{C}$  にて分離培養を行ない, 21 日後に集落数から生菌数

(CFU) を算定した。

### 6. マウス腹腔滲出マクロファージを用いた BCG 取り込みおよび殺菌能の検討

4.05 % Brewer チオグリコレート培地 (Difco, Detroit, USA) 2ml をマウス腹腔内に投与し, 3 日後に冷滅菌 PBS 5ml を腹腔内投与して腹腔滲出マクロファージを回収した。遠心 ( $1000\text{rpm}$ , 10 分間) 後に 10 % 非働化ウシ胎児血清および ampicillin ( $100\mu\text{g/ml}$ ) 添加 RPMI 1640 培地 (Sigma, St.Louis, USA) に希釈し細胞数を算定した。  $1 \times 10^6$  個の細胞を 5 %  $\text{CO}_2$  下  $37^\circ\text{C}$  にて細胞培養フラスコ (旭テクノグラス株式会社, 東京, 日本) 内で 3 時間付着させ, BCG 菌液 ( $1 \times 10^7$  CFU) を添加して 2 時間食菌させた。その後上清を除去し, 貪食されなかった BCG を除去する目的で streptomycin 添加冷滅菌 PBS にて 4 回洗浄した。細胞を回収して 10ml の滅菌蒸留水で希釈し, 1 分間激しく攪拌して細胞を破壊した後, 10 倍希釈系列を作製し上述のごとく細胞内生存菌数 (CFU) を算定した。実験は 3 回行い, その平均を用いて検討した。

### 7. 統計学的検討

統計学的検討には Student's *t*-test を用いた。

## 結 果

### TACO 過剰発現マウスおよび野生型マウスにおける TACO mRNA 発現

定常状態のマウス各臓器における TACO mRNA の発現を RT-PCR 法で検討すると, 肝臓および骨格筋においては WT では発現がみられず, TG において発現を示すバンドがみられた。また TG の心臓において発現の増強がみられた (図 1)。

### BCG 投与後の Kupffer 細胞への取り込みと肝肉芽腫形成

BCG を静注すると菌は Kupffer 細胞に取り込まれ, 静注 1 時間後の肝臓内において BCG を貪食している Kupffer 細胞数を比較すると TG 群では有意に少なかった (図 2)。3 日目から小型の肉芽腫の形成がみられ, 以後増大し, 肉芽腫直径は

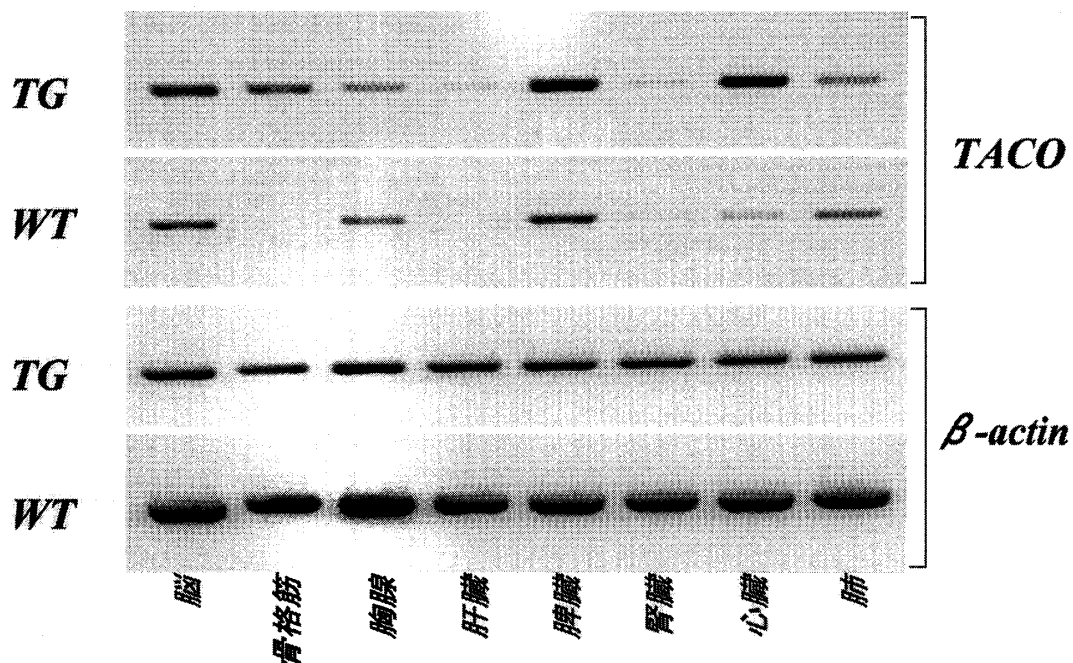


図1 諸臓器における TACO mRNA の発現

肝臓および骨格筋においては WT では発現がみられず TG において発現がみられた。また TG の心臓では発現の増強がみられた。

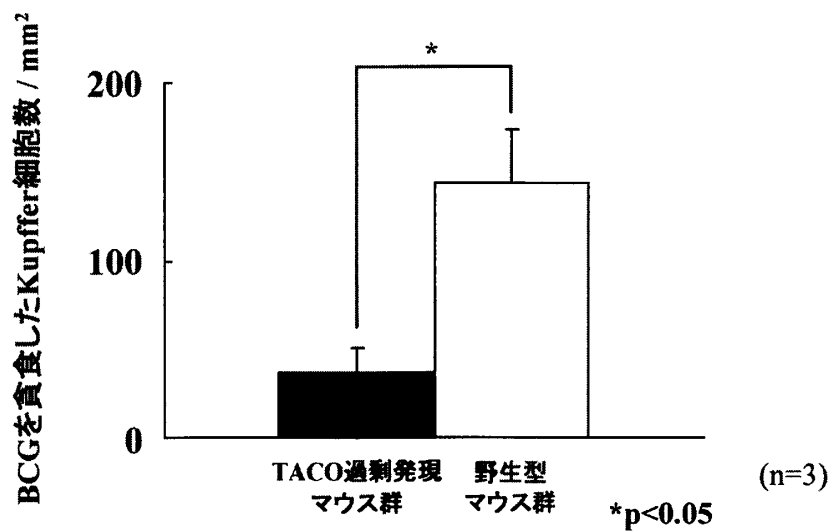


図2 静注1時間後のBCGを貪食したKupffer細胞数(肝1mm²あたり)

BCG静注1時間後には、菌を貪食したKupffer細胞数はTG群において有意に少なかった。

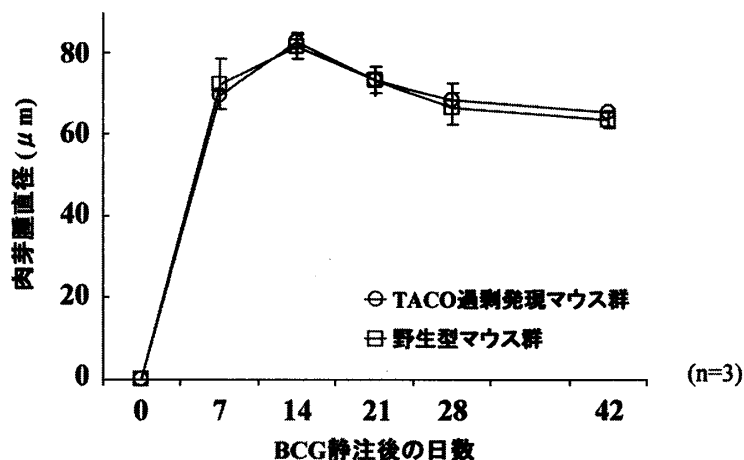


図3 BCG 生菌静注後のマウス肝臓における肉芽腫直径  
肉芽腫直径は14日目に両群で最大となった。両群間に差はみられなかった。

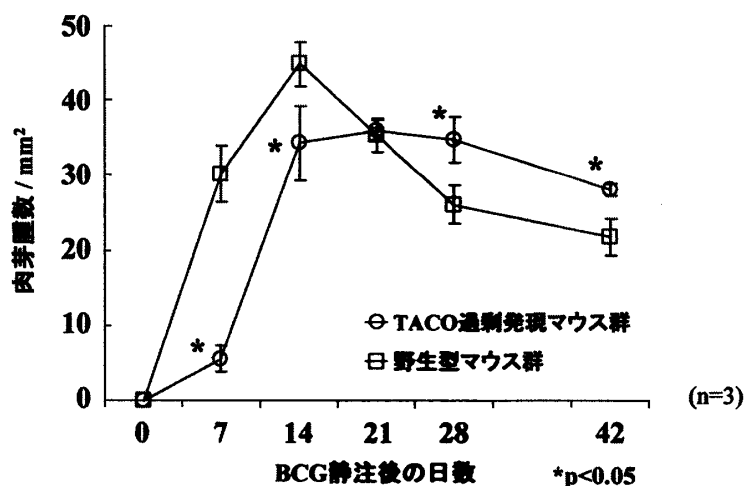


図4 BCG 生菌静注後のマウス肝臓における肉芽腫数  
(肝1mm²あたり)

肉芽腫数はWT群で14日目、TG群で21日目に最多となり、7日から14日目ではTG群で有意に少なく、28日から42日目ではTG群で有意に多かった。

14日目に両群で最大となったが有意差はなかった(図3)。単位面積あたりの肉芽腫数はWT群で14日目、TG群で21日目に最多となった。7日目、14日目ではTG群では有意に肉芽腫数が少なく、28日目、42日目ではTG群の肉芽腫数が多かった(図4, 5)。BCGはいずれも肉芽腫内に局在していた(図5)。

肉芽腫内の類上皮細胞数は肉芽腫形成初期から明らかな変動を示さず推移したが、14日目以後TG群で有意に多く観察された。免疫組織学的にTリンパ球数を算定すると、肉芽腫形成に並行して増加し、両群とも21日目に最大となり、7日目以後TG群で有意に少なかった(図6)。抗TACO抗体を一次抗体とした免疫組織学的染色では、

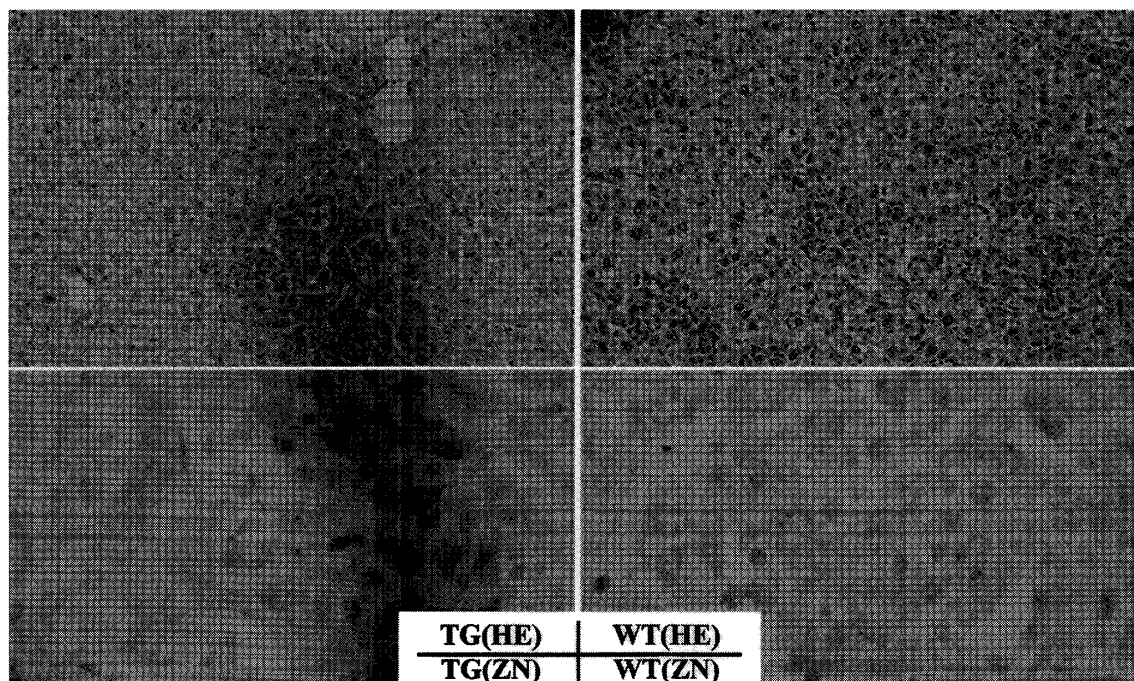


図5 BCG生菌静注後7日目のマウス肝臓HE染色標本およびZN染色標本(左上下段: TG, 右上下段: WT)

7日目ではTG群で有意に肉芽腫数が少なかった(上段). BCGはいずれの群でも肉芽腫内で認められ, その分布には明らかな差を認めなかった(下段). (倍率: HE染色標本×200, ZN染色標本×1000)

TACO陽性細胞は肉芽腫に一致して観察され, HE染色と同様に感染早期ではTG群で少なかった(図7).

#### 肝臓および脾臓におけるBCG生菌数の推移

BCG静注後の肝臓内における生菌数を分離培養法により比較すると, 両群とも3日目に最大の菌数となり, その後減少した. 静注後1時間では, TG群の菌数が有意に少なかった(図8). 脾臓においても菌数は3日目にピークとなり肝臓と同様の傾向がみられ, 静注後1時間でもTG群の菌数が少ない傾向がみられたが, 有意差は得られなかった(図9).

#### 腹腔滲出マクロファージのBCG取り込みと殺菌能

腹腔滲出マクロファージに2時間の間に取り込まれたBCG菌数はTG群で有意に少なかった. その後3時間および15時間細胞内殺菌させると,

WT群では経過とともに菌数が減少する傾向がみられたのに対し, TG群では明らかな増加あるいは減少がみられなかった(図10).

#### 考 察

微生物が生体内に侵入を試みる際には, 多くの場合マクロファージなどの貪食能をもった細胞が最初の障壁となる<sup>1)2)</sup>. 貪食したマクロファージは酸化性的あるいはlysosome内の消化酵素などによる非酸化性的機構による殺菌を行う<sup>23)24)</sup>. しかし一部の微生物は貪食された後に宿主の細胞内にとどまり続ける機構を獲得しており, 宿主の細胞骨格やシグナル伝達機構などを巧妙に利用している<sup>1)2)25)</sup>. 結核菌もいわゆる細胞内寄生細菌のひとつで, 細菌のphagosomeからlysosomeへの移行を阻止することで殺菌機構から逃れていると考

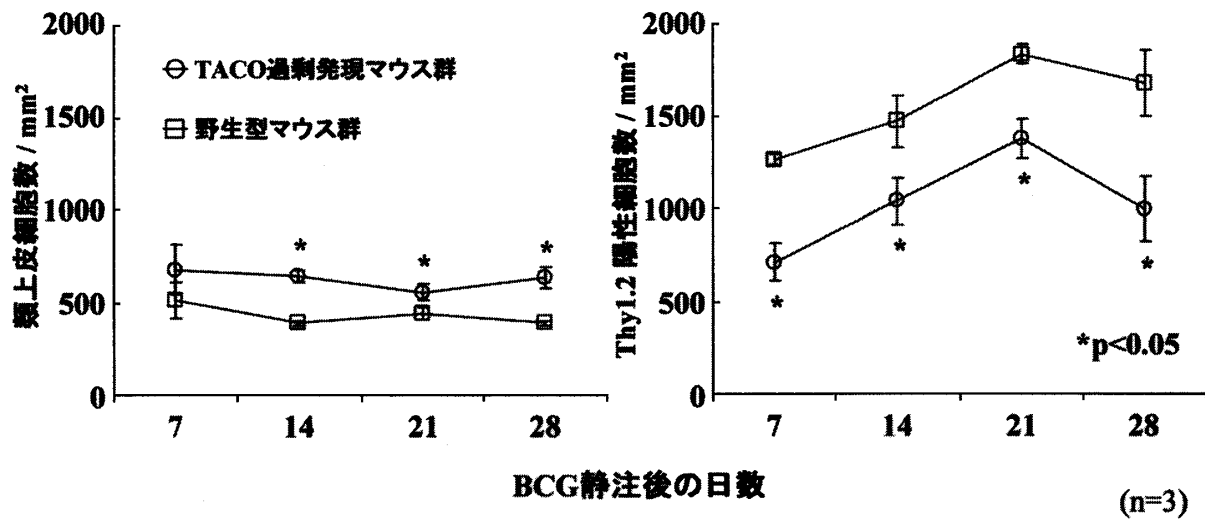


図6 BCG 生菌静注後のマウス肝臓における類上皮細胞数と Thy1.2 陽性細胞数 (肉芽腫 1 mm<sup>2</sup> あたり)

肉芽腫内の類上皮細胞数は 14 日目以後 TG 群で有意に多く観察された。肉芽腫内の T リンパ球数は肉芽腫形成に並行して増加し、7 日目以後 TG 群で有意に少なかった。

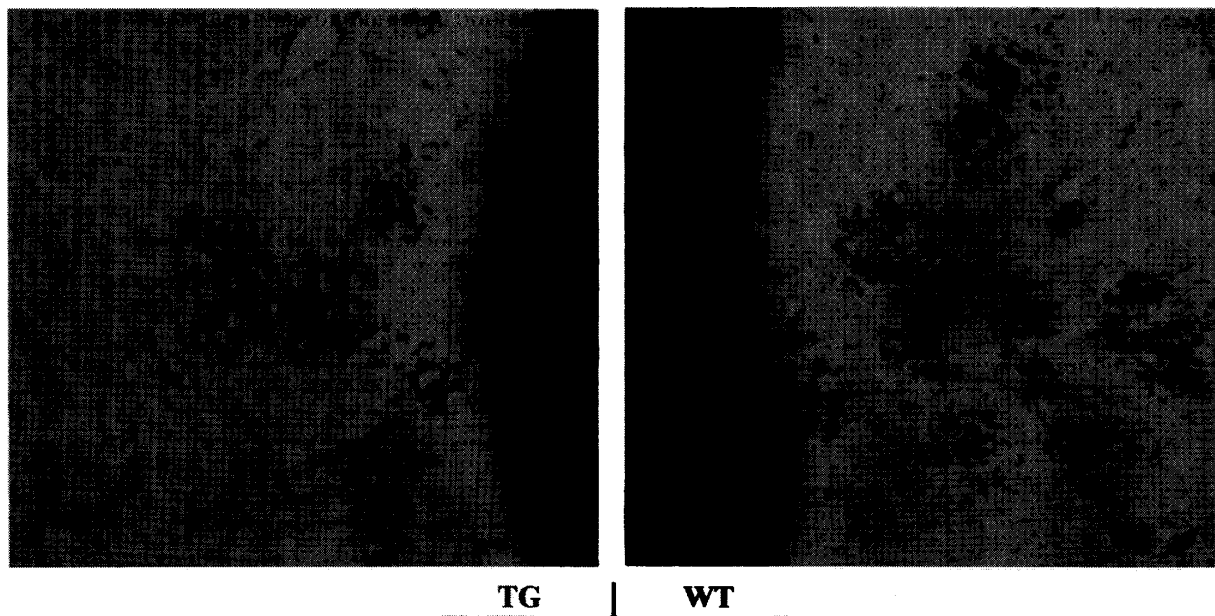


図7 BCG 生菌静注後 7 日目のマウス肝臓における TACO の発現 (左: TG, 右: WT)

抗 TACO 抗体を一次抗体とした免疫組織学的染色では、TACO 陽性細胞は肉芽腫に一致して観察され、HE 染色における肉芽腫と同様 TG において少なかった。(倍率: × 200)

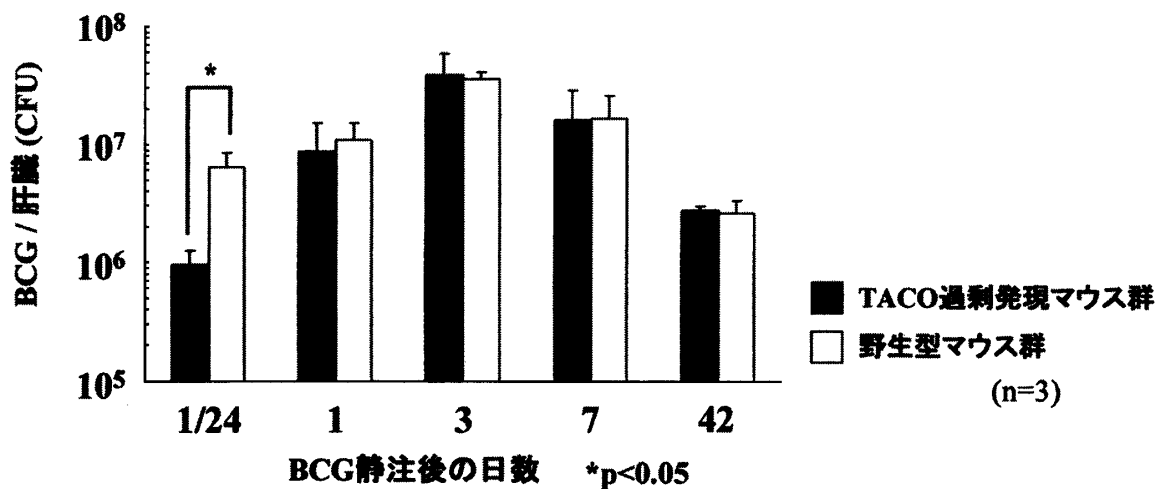


図8 BCG 静注後のマウス肝臓における生菌数

両群とも3日目に最大の菌数となり、その後減少した。静注後1時間の時点において、TG 群の菌数が有意に少なかった。

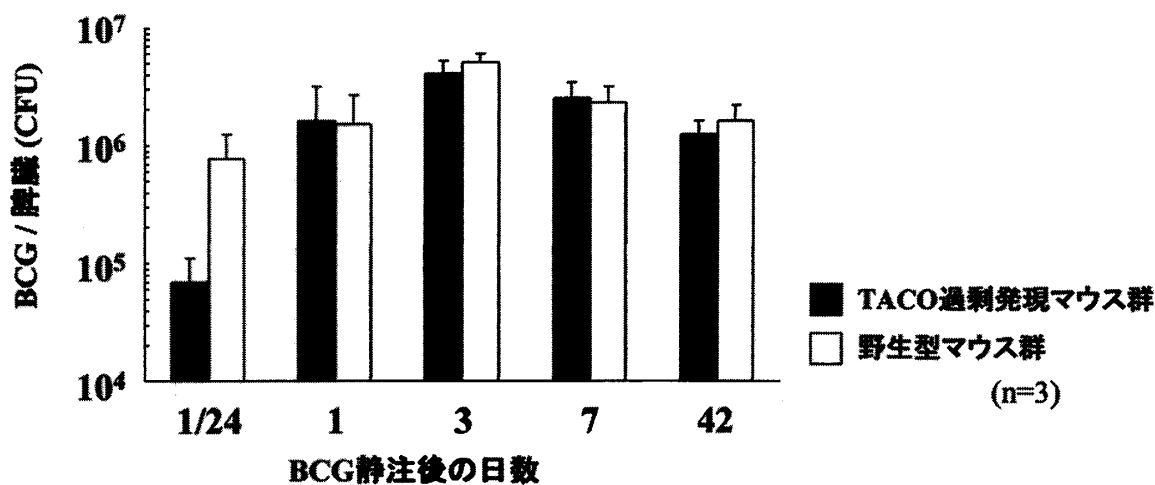


図9 BCG 静注後のマウス脾臓における生菌数

菌数は3日目にピークとなり肝臓と同様の傾向がみられ、静注後1時間の時点においてTG 群の菌数が少ない傾向がみられた。

えられている<sup>3)-5)</sup>。

Coronin は酵母からヒトまで広く有核細胞に発現する F-actin に結合する protein family の一員であり<sup>6)7)</sup>、そのアミノ酸配列は特徴的な WD repeat<sup>26)27)</sup> を有している。その機能として細胞の遊走、運動、貪食および分裂等への関与が報告

されている<sup>8)-11)</sup>。TACO は哺乳類の 5 つの Coronin-like protein のうち Coronin 1<sup>12)13)</sup> と相同性をもつ蛋白であり、BCG 生菌を貪食した細胞株から単離されクローニングされた<sup>14)</sup>。その生菌と死菌貪食時の細胞内動態の違いおよび同蛋白を強制発現させた細胞内で結核菌が多く生存し



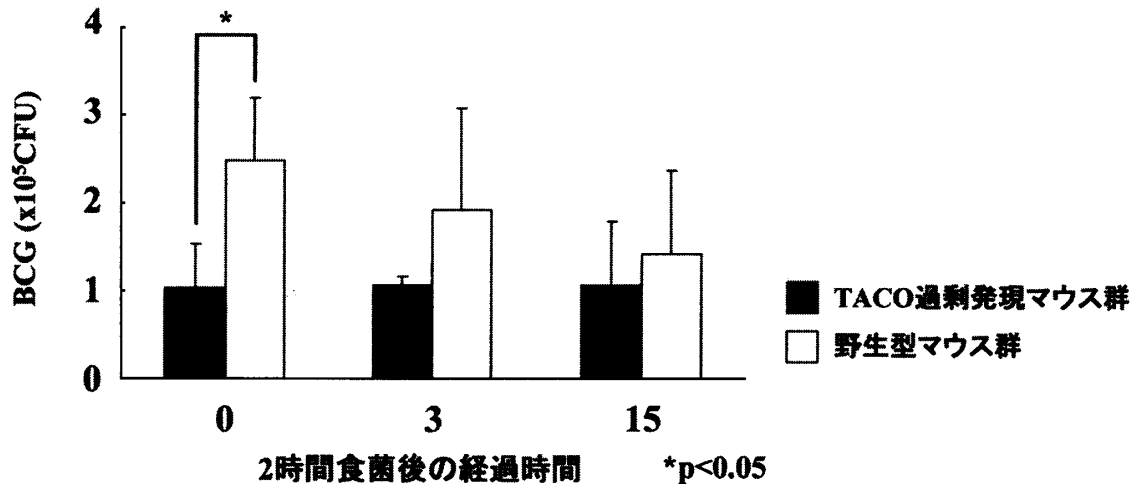


図 10 腹腔滲出マクロファージによる BCG の取り込みおよび殺菌能の比較

2 時間で取り込まれた BCG 生菌数は TG 群において有意に少なかった。その後 WT 群では経過とともに菌数が減少する傾向がみられたが、TG 群ではそのような傾向はみられなかった。

増殖したことから、結核菌の細胞内寄生を助長する機能が想定されていた<sup>14)</sup>。

本研究においてはまず定常状態の TACO 過剰発現マウス (TG) と野生型マウス (WT) において各臓器における同蛋白の mRNA レベルでの発現を分析し、TG の肝臓において WT ではみられない TACO mRNA 発現を確認した。

肝臓は BCG 静注による感染時に肉芽腫形成の主体となる臓器であり<sup>15)–20)</sup>、肝臓の組織マクロファージである Kupffer 細胞がそのクリアランスの大部分を担っている<sup>28)29)</sup>。本実験では静注後短時間の肝臓において BCG を貪食した Kupffer 細胞数が TG 群で有意に少なく、肝臓内の BCG 菌数も同様に少数であった。その後の肉芽腫形成についても、肉芽腫数は TG 群において 2 週目まで有意な減少がみられた。これらは TACO 過剰発現が影響し Kupffer 細胞の貪食機構が障害を受け、その結果として肉芽腫形成が低下したものと考えられる。Schuller らは BCG を貪食したヒトの単球由来マクロファージにおいて、Coronin は F-actin とともに BCG の貪食に深く関わることを示している<sup>30)</sup> が、われわれの結果はこれを支持するものといえる。

肉芽腫は病原体を捕捉して閉じ込め、感染の全身への拡散を防止することにより生体防衛に重要な役割を果たしている<sup>31)32)</sup>。また肉芽腫を構成する細胞の大半はマクロファージ (類上皮細胞も含む) とリンパ球であり、これらが協同して感染防御にあたるが、その動員において TG 群の肉芽腫では類上皮細胞が多く T リンパ球が少ないという結果が得られた。TACO 過剰発現と動員細胞の関係を明確に説明はできないが、肉芽腫への T リンパ球の動員は結核菌の感染防御において不可欠であり<sup>28)33)</sup>、その障害が生体にとって不利益になることは明らかである。つまり感染初期の肉芽腫数が少ないことや T リンパ球動員の低下は後の感染の助長につながり、BCG 静注 4 週目以後の TG 群肝臓における肉芽腫数の増加および炎症の遷延はこれを反映していると考えられる。

腹腔滲出マクロファージを用いた実験では、初期の BCG の取り込みに関しては Kupffer 細胞と同様に TG 群の菌数が有意に少なかった。細胞内殺菌を比較すると、WT 群では 15 時間で菌数が約半数となるのに比し、TG 群では最初に取り込まれた菌数は少なかったものの 15 時間後も菌数に変化はみられなかった。これは TACO 過剰発現

によるマクロファージ殺菌能の低下を意味しており、TACOを強制発現させた細胞株における殺菌能低下<sup>14)</sup>と同様のメカニズムによるものと考えられる。

以上TACOがマクロファージの貪食および殺菌に関与することが明らかにされた。今後TACOの細胞内動態決定因子や、結核菌生菌の認識機構などについての解明が期待される。

## 結 論

TACO過剰発現マウスにおいては、Kupffer細胞および腹腔滲出マクロファージのBCG貪食および殺菌能の低下がみられ、TACOが結核菌貪食および殺菌機構の一部として、重要な役割を演ずるものと考えられる。

## 謝 辞

最後に実験の計画および実技の指導、論文校閲を頂いた新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞病理学分野 内藤 眞教授、マウスおよび抗体を恵与頂き多数の助言も頂いたBasel大学 Jean Pieters教授に深く感謝いたします。また本研究に関して助言・協力頂いた長谷川 剛講師、山本 尚助手、川崎 隆助手、江部佑輔先生、百崎 進技官、大谷内健二技官、青山 崇技官をはじめ教室の皆様にご礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Small PL, Ramakrishnan L and Falkow S: Remodeling schemes of intracellular pathogens. *Science* 263: 637-639, 1994.
- 2) Russell DG: Mycobacterium and Leishmania: stowaways in the endosomal network. *Trends Cell Biol* 5: 125-128, 1995.
- 3) Armstrong JA and Hart PD: Response of cultured macrophages to mycobacterium tuberculosis, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med* 134: 713-740, 1971.
- 4) Barker LP, George KM, Falkow S and Small PL: Differential trafficking of live and dead *Mycobacterium marinum* organisms in macrophages. *Infect Immun* 65: 1497-1504, 1997.
- 5) Hasan Z, Schlax C, Kuhn L, Lefkovits I, Young D, Thole J and Pieters J: Isolation and characterization of the mycobacterial phagosome: segregation from the endosomal/lysosomal pathway. *Mol Microbiol* 24: 545-553, 1997.
- 6) de Hostos EL, Bradtke B, Lottspeich F, Guggenheim R and Gerisch G: Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits. *EMBO J* 10: 4097-4104, 1991.
- 7) de Hostos EL: The coronin family of actin-associated proteins. *Trends Cell Biol* 9: 345-350, 1999.
- 8) de Hostos EL, Rehfuess C, Bradtke B, Waddell DR, Albrecht R, Murphy J and Gerisch G: *Dictyostelium* mutants lacking the cytoskeletal protein coronin are defective in cytokinesis and cell motility. *J Cell Biol* 120: 163-173, 1993.
- 9) Maniak M, Rauchenberger R, Albrecht R, Murphy J and Gerisch G: Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocation visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell* 83: 915-924, 1995.
- 10) Fukui Y, Engler S, Inoue S and de Hostos EL: Architectural dynamics and gene replacement of coronin suggest its role in cytokinesis. *Cell Motil Cytoskeleton* 42: 204-217, 1999.
- 11) Mishima M and Nishida E: Coronin localizes to leading edges and is involved in cell spreading and lamellipodium extension in vertebrate cells. *J Cell Sci* 112: 2833-2842, 1999.
- 12) Suzuki K, Nishihata J, Arai Y, Honma N, Yamamoto K, Imamura T and Toyoshima S: Molecular cloning of a novel actin-binding protein, p57, with a WD repeat and a leucine zipper motif. *FEBS Lett* 364: 283-288, 1995.
- 13) Grogan A, Reeves E, Keep N, Wientjes F, Totty NF, Burlingame AL, Hsuan JJ and Segal AW: Cytosolic p57 proteins interact with and regulate the assembly of coronin in neutrophils. *J Cell Sci* 110: 3071-3081, 1997.
- 14) Ferrari G, Langen H, Naito M and Pieters J: A

- coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97: 435 - 447, 1999.
- 15) Mackaness GB: Cellular resistance to infection. *J Exp Med* 116: 381 - 406, 1962.
- 16) Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF and Vassalli P: The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 56: 731 - 740, 1989.
- 17) Nibbering PH, van der Heide GA and van Furth R: Immunocytochemical analysis of cellular responses to BCG. *Clin Exp Immunol* 75: 147 - 154, 1989.
- 18) Gordon S, Keshav S and Stein M: BCG - induced granuloma formation in murine tissues. *Immunobiology* 191: 369 - 377, 1994.
- 19) Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H and Britton WJ: TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 168: 4620 - 4627, 2002.
- 20) 櫻田潤子: BCG 生菌および死菌による肉芽腫形成と Macrophage Scavenger Receptor の役割 新潟医学会雑誌 117: 401 - 411, 2003.
- 21) Niwa H, Yamamura K and Miyazaki J: Efficient selection for high - expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108: 193 - 199, 1991.
- 22) Isobe Y, Chen ST, Nakane PK and Brown WR: Studies on translocation of immunoglobulins across intestinal epithelium. I. Improvements in the peroxidase - labeled antibody method for application to study of human intestinal mucosa. *Acta Histochem Cytochem* 10: 161 - 171, 1977.
- 23) Shepherd VL: The role of the respiratory burst of phagocytes in host defense. *Semin Respir Infect* 1: 99 - 106, 1986.
- 24) Rook GAW: Intracellular killing of microorganisms. In: *Human Monocytes* (Zembala M, Asherson GL, eds) Academic Press, London, pp 291 - 302, 1989.
- 25) Finlay BB and Cossart P: Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276: 718 - 725, 1997.
- 26) Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R and Smith TF: The ancient regulatory - protein family of WD - repeat proteins. *Nature* 371: 297 - 300, 1994.
- 27) Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K and Neer EJ: The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* 24: 181 - 185, 1999.
- 28) North RJ: T cell dependence of macrophage activation and mobilization during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 10: 66 - 71, 1974.
- 29) Wardle EN: Kupffer cells and their function. *Liver* 7: 63 - 75, 1987.
- 30) Schuller S, Neefjes J, Ottenhoff T, Thole J and Young D: Coronin is involved in uptake of *Mycobacterium bovis* BCG in human macrophages but not in phagosome maintenance. *Cell Microbiol* 3: 785 - 793, 2001.
- 31) Saunders BM and Cooper AM: Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol* 78: 334 - 341, 2000.
- 32) Peters W and Ernst JD: Mechanisms of cell recruitment in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect* 5: 151 - 158, 2003.
- 33) Pancholi P, Mirza A, Bhardwaj N and Steinman RM: Sequestration from immune CD4<sup>+</sup> T cells of mycobacteria growing in human macrophages. *Science* 260: 984 - 986, 1993.

(平成 16 年 1 月 21 日受付)