

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

γ線照射処理抗酸菌による感染防御免疫の誘導

分担研究者 荒川 宜親 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部部長

研究要旨. BCGに代わる抗結核ワクチン開発を目的に、γ線照射抗酸菌の感染防御免疫誘導能を調べた。抗酸菌の増殖を停止させるに十分なγ線照射によってもエステラーゼ活性、RNA合成能およびmRNA発現は生菌と同程度に保持され、生菌の性状を大部分残す不活化であることがわかった。γ線照射BCGとBCG生菌をモルモットに免疫し、PPDに対する遅延型過敏症誘導能を比較した。γ線照射BCGは生菌の100倍量で同レベルの効果を示した。

A. 研究目的

BCGに代わる抗結核ワクチン開発を目的に、感染原因菌である結核菌を十分不活化し且つ免疫原性を有したワクチン候補としてγ線照射結核菌の有用性を明らかにする。本年度はP3施設での実験に制限があるため、P1レベルで扱えるBCGを用いてモルモットにおける免疫応答誘導能を検討した。

B. 研究方法

BCGおよび結核菌の増殖を阻害するγ線照射量を決定するため、種々のdoseの照射量処理をしたBCGおよび結核菌を小川培地および7H10寒天培地に接種し、コロニー形成能を調べた。γ線照射による菌のエステラーゼ酵素活性への効果は、FDA (fluorescein diacetate) を基質とした蛍光ELISA法にて測定した。照射後のRNA合成、mRNAの安定性を³H-uridineの取り込み、および主要な分泌蛋白質を標的としたRT-PCR法で調べた。

モルモットにBCG生菌およびγ線照射BCGを種々のdose皮下接種し、6週間および8週間後にPPD (0.05 μg)を皮内投与し、24時間後の皮膚の硬結サイズを計測した。

C. 研究結果

BCGおよび結核菌の増殖を阻害する最低γ線照射量は、40万ラドだった。この照

射量で少なくとも固形培地上でコロニーを形成し得る菌数は10⁸分の1以下になることが確かめられた。

エステラーゼ活性はγ線照射によっても全く減弱しなかった。一方、80度で3時間処理した菌のエステラーゼ活性は検出限界以下にまで低下した。

γ線照射BCGのRNA合成は、照射直後は生菌と同程度であったが、その後*in vitro*培養により徐々に低下し1週間後には生菌の1%以下のレベルにまで低下した。加熱処理菌は処理直後よりRNA合成活性を示さなかった。

BCG生菌およびγ線照射BCGの0.04 ~ 4000 μg (4 x 10³ ~ 4 x 10⁸ cfu相当)をモルモット左側腹部皮下に免疫し、毎週体重を測定したが、各処置群間で有意な差は認められなかった。免疫から6週間および8週間後に左右両側腹部皮内にPPD (0.05 μg)を投与し、24時間後の硬結直径を測定した。BCG生菌は0.04 μg以上の投与で有意な遅延型過敏症を誘導し、6週目では400 μg、8週目では4 μg投与群が最も強い反応を示した。一方、γ線照射BCGは0.04 μg投与群では全く効果がみられず、400 μg以上の投与でBCG生菌に匹敵する効果を示した。

D. 考察

γ線照射はBCGおよび結核菌の増殖能を選択的に阻害するが、酵素活性およびRNA合成は直ちには阻害しないことが判

明した。しかしながら、これら後者の活性も経時的に低下し、ほぼ1週間で消失する。現行の測定法では増殖活性を検出することはできないが、実際動物に接種した際にどれほどの期間菌が存在し続けるのかは不明であり、安全性確保の観点からも今後十分な検討が必要と思われる。また、免疫誘導効果において、 γ -線照射菌は生菌の100倍量が必要であった点は、弱毒と言われるBCGであっても生体内で一旦増殖した後、菌数が低下することが知られており、生体内で増殖しない γ -線照射BCGの抗原量が増殖する生菌に比べ多く必要になるためと考えられる。現在、抗菌活性誘導の有無を検討中であるが、 γ -線照射菌に感染防御効果が認められれば、HIV感染者や免疫抑制剤投与者などの免疫不全宿主への、より安全なワクチンとしての有用性が期待される。

E. 結論

γ -線照射BCGはBCG生菌に比べ約100倍量を要するが、有意な免疫誘導能を有することが明らかにされた。HIV感染者や免疫不全宿主において、より安全なワクチンとして使用できる可能性が示唆された。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
(準備中)

2. 学会発表

ガンマー線照射結核菌の増殖能と mRNA 発現に関する研究 (持田恵子・荒川宜親)、第76回日本結核病学会総会、平成13年4月20~21日、沖縄県宜野湾市

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

平成13年度 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

結核菌病原因子と宿主応答

分担研究報告書

分担研究者

小林 和夫（大阪市立大学大学院医学研究科・教授）

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

結核菌病原因子と宿主応答

分担研究者 小林 和夫 大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学 教授

研究要旨

結核菌などの抗酸菌感染に際し、宿主は1) 抗菌防御、あるいは、2) 肉芽腫炎症応答を表現するが、結核菌病原因子- 宿主応答の成立機序は不明である。本研究では、特に、結核菌に特徴的な細胞壁由来糖脂質に注目し、炎症および免疫惹起性を解析した。結核菌細胞壁由来ミコール酸糖脂質、trehalose dimycolate (TDM) が血管新生や肉芽腫炎症（異物性および過敏性）を惹起した。その分子機序として、TDM が宿主に炎症誘導性サイトカインや単球走化性ケモカイン、さらに、細胞性免疫起動性サイトカインを誘導することが判明した。また、TDM の構造- 活性関連では、TDM の炭素鎖長が病原性や毒性に関与していた。結核菌感染において、血管新生、肉芽腫炎症および細胞性免疫の発現は宿主防御や病変形成に必須であり、結核菌由来糖脂質は病原因子、かつ、防御抗原であることを示唆している。従って、結核菌由来糖脂質は結核の病態解明に重要であり、さらに、免疫介入療法（ワクチンを含む）の開発に有望な候補になる可能を示している。

A. 研究目的

結核菌細胞壁は脂質を豊富に含有し、特に、trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) は結核菌表層に特徴的な糖脂質成分である。結核菌感染による病変形成として、肉芽腫炎症が特徴的であるが、病原因子- 宿主関係による病変形成機序では未解明の部分が多い。本研究では、結核菌細胞壁由来 TDM に対する宿主免疫および炎症応答における分子機序を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

BALB/c や BALB/c 由来無胸腺ヌードマウスを用い、結核菌死菌を含む完全 Freund アジュバントで免疫後、細胞性免疫発現の指標として、遅延型足蹠腫脹反応を評価した。TDM を静脈および角膜内投与し、肉芽腫炎症や血管新生を病理形態学的に、また、病変部におけるサイトカインの蛋白発現を酵素抗体法により、評価した。さらに、TDM の構造- 活性関連を解析するため、抗酸菌類縁 *Rhodococcus* から TDM を分離・精製し、

病原性や毒性を検索した。

C. 研究結果

結核菌由来 TDM は遅延型足蹠腫脹反応を惹起し、かつ、免疫群において非免疫群に比し、有意に増強していた。ヌードマウスにおける足蹠腫脹反応は免疫群と非免疫群間で有意差を認めなかった。BALB/c マウスにおいて TDM 静脈内投与は肉芽腫炎症を誘導したが、免疫群は非免疫群に比し、顕著であった。他方、ヌードマウスでは免疫による肉芽腫炎症の増強は認めなかった。病変構成細胞として、免疫群で CD4 陽性細胞が有意に増加していた。病変部サイトカイン解析では早期に単球走化性ケモカイン（マクロファージ炎症性蛋白-1 α や単球走化性蛋白-1）および炎症惹起性サイトカイン（インターロイキン 1：IL-1 や腫瘍壊死因子- α ：TNF- α ）、その後、細胞性免疫誘導性サイトカイン（IL-12 やインターフェロン- γ ：IFN- γ ）の蛋白発現を認めたが、何れのサイトカインも免疫群は非免疫群に比し、高値

を示した。

健常角膜は無血管組織であるが、TDM の角膜内投与は血管新生を惹起し、その後、局所的な単核細胞浸潤から構成される肉芽腫形成を惹起した。血管新生は肉芽腫病変周囲に著明であった。角膜病変部は TDM 投与後早期に炎症惹起性サイトカイン (IL-1 や TNF- α) と血管新生性サイトカイン (IL-8 や血管内皮細胞増殖因子) を発現していた。抗 IL-8 や VEGF 抗体投与は TDM 誘導炎症細胞浸潤/肉芽腫炎症や血管新生を抑制したが、抗 IL-1 β や TNF- α 抗体は血管新生をほとんど抑制しなかった。

炭素鎖長の異なる TDM (*R. sp4306*: C34-38、*R. ruber*: C44-46、*R. terrae*: 58-62、結核菌: C78-88) の病原性 (肉芽腫炎症) や毒性 (体重減少) は *R. sp4306* < *R. ruber* < *R. terrae* < 結核菌であり、TDM の炭素鎖長が病原因子として重要な役割を演じていることが判明した。

D. 考察

結核菌由来 TDM は非特異的異物性炎症応答のみならず、特異性および記憶を特徴とする細胞性免疫応答も惹起すること、さらに、T 細胞依存性抗原であることが判明した。すなわち、結核性肉芽腫炎症は異物性および過敏性機序の関与した混合性病変である。TDM は、肉芽腫炎症に加えて、血管新生やアポトーシスも誘導し、結核の病原体-宿主関係における多機能分子である。

TDM が抗結核免疫の効果機能分子である IL-12 や IFN- γ を誘導したことは、TDM が結核菌感染における防御抗原であり、従って、ワクチンなど免疫介入療法の開発に寄与するであろう。また、TDM の構造-活性連関では、TDM の炭素鎖長が病原性や毒性に起因していることが判明し、今後、構造-活性連関はワクチン開発に安全な TDM 誘導体の探索に重要である。

E. 結論

結核菌細胞壁由来ミコール酸糖脂質が血管新生や肉芽腫炎症 (異物性および過敏性) を惹起した。その分子機序として、TDM

が宿主に炎症誘導性サイトカインや単球走化性ケモカイン、さらに、細胞性免疫起動性サイトカインを誘導することが判明した。結核菌由来糖脂質は病原因子、かつ、防御抗原である。また、TDM の構造-活性連関では、TDM の炭素鎖長が病原性や毒性に起因していることが判明した。従って、結核菌由来糖脂質は結核など抗酸菌感染症に対する免疫介入療法の開発に有望な戦略になる可能を示している。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kobayashi, K., K. Kaneda, and T. Kasama. 2001. The immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc. Res. Tech.* 53: 241-245.
- 2) Yamagami, H., T. Matsumoto, N. Fujiwara, T. Arakawa, K. Kaneda, I. Yano, and K. Kobayashi. 2001. Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body- and hypersensitivity-type granulomas in mice. *Infect. Immun.* 69: 810-815.
- 3) Ueda, S., N. Fujiwara, T. Naka, I. Sakaguchi, Y. Ozeki, I. Yano, T. Kasama, and K. Kobayashi. 2001. Structure-activity relationship of mycoloyl glycolipids derived from *Rhodococcus* sp. 4306. *Microb. Pathog.* 30: 91-99.
- 4) Maeda, S., M. Matsuoka, N. Nakata, M. Kai, Y. Maeda, K. Hashimoto, H. Kimura, K. Kobayashi, and Y. Kashiwabara. 2001. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3635-3639.
- 5) 藤原永年、山上博一、上田定男、矢野

郁也、小林和夫. 2001. 結核菌糖脂質と宿主応答機構. 炎症・再生 21: 133-138.

2. 学会発表

- 1) 北田清悟、豊島直美、前倉亮治、藤原永年、小林和夫、矢野郁也、小倉 剛. 2001. 肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症患者における血清抗 glycopeptidolipid (GPL) 抗体の特性. 結核、76 : 320、2001. 第 76 回日本結

核病学会総会 (宜野湾、4 月) .

- 2) 樋口一恵、小林和夫、原田登之、関谷幸江、森下加奈、後藤正道. 2001. UV 処理結核死菌と BCG 生菌における免疫力の比較. 結核、76 : 340、2001. 第 76 回日本結核病学会総会 (宜野湾、4 月) .

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

平成13年度 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

新しい診断法及び予防法の開発のための病原性及び
抗原性因子の研究

分担研究報告書

分担研究者

牧野 正彦（国立感染症研究所・病原微生物部部長）

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

新しい診断法及び予防法の開発のための病原性及び抗原性因子の研究

分担研究者 牧野 正彦（国立感染症研究所・病原微生物部部長）
研究協力者 前田 百美（感染研病原微生物部・研究員）
中田 登（感染研病原微生物部・研究員）
向井 徹（感染研病原微生物部・第1室長）
鈴木 幸一（感染研病原微生物部・第4室長）

研究要旨. 抗酸菌感染症に対する新しい診断法および予防法開発のため、病原性因子ならびに抗原性因子の探索研究を以下の通り行った。1) 非結核性抗酸菌感染症の迅速鑑別診断法の開発研究。遺伝子増幅法に基づいた非結核性抗酸菌症の迅速鑑別診断法の開発を目的とし、増幅候補遺伝子の検索を行った。その結果 *dna A* 遺伝子領域内の 600bp を候補領域とした。ついで各種抗酸菌ゲノム DNA より同領域増幅可能な特異プライマーの設計増幅条件の検討を行い、遺伝子産物の塩基配列の決定・解析を行った。同領域は、迅速診断法の開発を進めるうえで有用な領域であると考えられた。2) 抗酸菌病原性因子の検討。大腸菌—抗酸菌シャトルコスミドベクターを用いてらい菌ゲノム DNA ライブラリーを作製し、約 800 の大腸菌クローンを得た。それぞれのクローンから得られたコスミドの約 8 割が平均長約 35kb のらい菌 DNA を挿入断片として有していた。これらのうち約 100 クローンについてらい菌ゲノム地図上へのマッピングを行った。その中に迅速発育性抗酸菌である *Mycobacterium smegmatis* の増殖を著しく遅延させるクローンが見出された。3) 抗酸菌感染による宿主遺伝子の変化。抗酸菌感染後の宿主マクロファージの遺伝子発現変化を総合的に捉える目的で、DNA マイクロアレイによる解析を試みた。サイトカインや成長因子とそれらの受容体、細胞内シグナル伝達物質などに顕著な遺伝子発現変化を認めた。また、細胞接着因子、DNA 合成に関わる遺伝子や各種転写因子などの発現変化も確認された。4) 抗原性因子の探索。抗酸菌感染症に対するワクチンおよび免疫療法開発に必須な抗原性因子の探索のために菌膜の抗原性について検索した。菌膜を樹状細胞にパルスすると、樹状細胞は菌膜を取り込みプロセスし、自己 CD4 陽性 T 細胞を活性化し、IFN- γ 産生性 Th1 タイプ CD4 陽性 T 細胞および IFN- γ および Perforin 産生性 Tc1 タイプ CD8 陽性 T 細胞の分化および活性化を誘導した。さらに、ワクチンとして自然免疫および獲得免疫の両活性化経路を賦活する抗原の有効性が考察されているため、らい菌由来リポタンパクを大腸菌を用いて発現させ精製した後、その生物活性を検討した。リポタンパク LpK は正常健常者由来末梢単球を刺激し IL-12 p40 を産生した。

A. 研究目的

現在、抗酸菌感染症の確定診断に 2～4 週を要する。その間、患者は、結核として

治療が施され、行動の制限が課せられている。しかし、患者の 2 割は非結核性抗酸菌症であることが知られている。非結核性抗

酸菌症は、結核と異なる治療を要し、入院が不要なため患者の社会活動の著しい妨げとなり、医療問題の可能性も含む。また、非結核性抗酸菌は、一般にヒトに対し、病原性は弱いとされてきたが、近年高齢化に伴う肺機能低下患者の増加、医療の進歩に伴う治療的免疫不全状態、AIDSにおける日和見感染症として、その問題が増加している。しかし、抗酸菌の特徴である生育速度が非常に遅いことから、その確定診断に時間を要している。本研究は、迅速かつ簡便な非結核性抗酸菌症の鑑別診断法の開発を目的とし、患者の社会的資源の有効利用と向上への寄与を期待する。

結核菌やらい菌の病原性の本質を規定している因子については不明な点が多いが、これを明らかにすることは新たな化学療法剤や有効なワクチン開発につながる。らい菌は病原性抗酸菌に必要な最小限の遺伝子セットのみを有すると考えられている。そこで、らい菌遺伝子の機能についてゲノムの全領域を網羅した解析を行うため、ターゲット遺伝子を大腸菌—抗酸菌シャトルコスミドベクターを用いて非病原性抗酸菌に導入して解析することを目的として、らい菌ゲノム DNA ライブラリーの作製を試みた。

抗酸菌感染に伴う特異的細胞反応や免疫反応は徐々に解明されつつあるが、宿主細胞反応全般を説明するには至っていない。そこで、抗酸菌感染に伴う宿主マクロファージの遺伝子発現変化を総合的に調べ、抗酸菌感染症特有の細胞反応の全体像を理解するため、DNA マイクロアレイ法を用いた宿主細胞遺伝子発現プロファイリングを行う。本研究により、新たな診断・治療および予防の標的宿主細胞因子が同定されると期待される。

抗酸菌感染症に対するワクチンおよび免疫療法に用いる抗原の探索を目的とした。らい菌をモデル抗酸菌、樹状細胞(DC)を抗原提示細胞として用いると、生らい菌全体を用いるよりは、菌を構成する分画を用いた方がより有効な T 細胞免疫応答が誘導し得ることが想定されたため、特にらい菌膜に着目して、その抗原性について CD4 およ

び CD8 陽性 T 細胞をターゲットとして検討した。

結核菌由来の分子量 19kD のリポタンパクは、抗酸菌生体防御反応に重要な役割を果たす IL-12 を誘導することが報告されている。そこで、らい菌ゲノムデータベースより脂質附加を受けることが予想される蛋白をコードする遺伝子に着目し、*in vitro* で大腸菌を用い脂質附加させた後、抗酸菌由来リポタンパクを精製し、その生物活性を検討した。

B. 研究方法

1) 結核性抗酸菌感染症の迅速鑑別診断法の開発研究。遺伝子増幅法に基づいた開発を行うため、既に報告されている数種の抗酸菌遺伝子情報より、抗酸菌属における保存性を考慮し、種特異性を保有する増幅候補遺伝子領域の検索を行った。その結果、*dna A* 遺伝子領域内に存在する約 600bp を候補とした。候補領域を含む両端に存在し抗酸菌属に強く保存されている領域に、3種のプライマーペアを設計し増幅条件を検討した。各種抗酸菌のゲノム DNA の調整を行い、供試した全抗酸菌ゲノム DNA の同領域の増幅を可能とするプライマーペアを選択した。得られた増幅産物を、アガロースゲル電気泳動後に抽出精製し、塩基配列の決定を行なった。一部菌については発表されている配列により解析を行った。

2) 抗酸菌病原性因子の検討。精製したらい菌をポリトロンホモジナイザーを用いて液体窒素中で破砕し DNA を回収した。大腸菌—抗酸菌シャトルコスミドベクターは pYUB412、および pYUB415 を用い、T4 DNA polymerase で平滑末端化したらい菌 DNA を連結後、packaging を行って大腸菌に感染させライブラリーを作製した。それぞれの大腸菌クローンから抽出・精製したコスミドは、ベクター部の配列を利用して挿入 DNA 断片の両末端部の DNA 配列を決定し、DNASIS コンピュータソフトウェア(日立ソフトウェアエンジニアリング)を使用して既に報告されているらい菌ゲノム DNA 配列と比較解析し、らい菌ゲノム地図上にマッ

ピングした。

3) 抗酸菌感染による宿主遺伝子の変化。健康人末梢血単核細胞分画から付着性単球を得て、*M. leprae*, *M. avium*, *M. bovis* BCGなどを感染させた。感染前後の細胞から polyA⁺ RNA を調整し放射性標識 cDNA プロブを作製し、市販のナイロン膜アレイとハイブリダイズさせた。

4) 抗原性因子の探索。正常健康者末梢単球を得て、リコンビナント GM-CSF および IL-4 を用いて樹状細胞 (DC) を分化誘導した。らい菌 (Thai 53 株) はアルマジロを用いて増殖させビーズビーターと超遠心機を用いて、細胞壁・細胞膜・細胞質分画に分類精製した。菌分画成分をパルスした DC の抗原提示能は、自己 T 細胞の活性化誘導能で解析した。細胞表面抗原の解析には FACScalibur を用い、DC により刺激された CD8 陽性 T 細胞の perforin 産生能は T 細胞膜を permeabilize させた後、細胞質内 perforin を FACScalibur を用いて検索した。DC から産生された IL-12 p70、T 細胞から産生される IFN- γ は ELISA 法を用いてアッセイキットを用いて定量化した。また、リポタンパク LpK の作成にあたり、らい菌 Thai-53 株由来の遺伝子を用い、大腸菌発現ベクターを構築した。発現したリポタンパクは His-Bind カラムを用いて精製した。また、らい菌を上記方法で細胞分画し、ウェスタンブロッティング法によりリポタンパクを検出した。ヒト末梢血単球をリポタンパクで刺激して得た細胞培養上清中の IL-12 p70 は ELISA 法を用い半定量化した。

倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し理解 (インフォームドコンセント) を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。

C. 研究結果

1) 非結核性抗酸菌感染症の迅速鑑別診断法の開発研究 (担当: 向井徹)。各種抗酸菌ゲノム DNA をテンプレートに用い PCR を行った。得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により比較検討した。その結果、抗酸菌の種ごとに長さの異なる領域を含む PCR 産物であった (図 1)。次いで同領域の塩基配列を解読し解析した。その結果、5'側の 140bp と 3'側 207bp の 2ヶ所に抗酸菌でよく保存された領域が存在したが、この両端に挟まれた内部には変異に富む領域が存在した。5'側の 140bp 領域は、菌種間の相似性は最低でも 59.2%、また 3'側 207bp 領域では 62.1% 以上の相似性があった。また、これらの領域は菌種間での塩基の欠失や付加は見られず比較的保存された領域であると考えられた。両保存領域に挟まれた領域は、菌種間での相似性が低く、菌種間の最も低い相似性は僅かに 28.2% しかなかった。また、その長さも 181bp から 207bp と変化に富むものであった (図 2)。この変異領域の違いが、PCR 産物の泳動移動度の違いとして現れたと考えられる。この非常に変化に富んだ領域を用いて系統樹解析を行った (図 3)。結核菌群内では BCG に 1 塩基の置換が認められただけであり、本領域においても非常に保存されていた。しかし、*M. gastri* と *M. kansasii* 間の相似性は 83.6% であり *M. avium* と *M. intracellulare* 間の相似性は 78.3% であり他の領域に比べ低い相似性を示した。

2) 抗酸菌病原性因子の検討 (担当: 中田登)。らい菌ゲノム DNA ライブラリーとして約 800 の大腸菌クローンを分離した。それぞれの大腸菌クローンから得られたコスミドの約 8 割が平均長 35kb のらい菌 DNA を挿入断片として有していた。現在までにこのうち約 100 クローンについてらい菌ゲノム地図上へのマッピングを行った (図 4)。また、コスミド B90 の導入により迅速発育性抗酸菌 *M. smegmatis* の増殖に著しい遅延が観察された。寒天平板上に接種後 5 日目のコロニーサイズの比較ではコスミド B90 導入株では対照に比べ約 1/10 の直径を示し

た。一方、コスミド B90 と約 17kb の部分的重なりを持つ B159 ではこの現象は観察されず、また、B159 とは逆側に B90 と約 18kb の部分的重なりを持つ B80 では増殖の遅延が観察されたが、B90 と比較するとその程度は低かった。そこで、コスミド B90 上のどのらい菌遺伝子がこの形質に関与しているかを調べるため、遺伝子の不活化実験を行った。コスミド B90 に対し、*in vitro* でトランスポゾンのランダム挿入を行って、様々な部分にトランスポゾンの装入を持つコスミドを多数作製した。これらのコスミドを *M. smegmatis* に導入して増殖遅延の有無を調べた結果、ML2710、ML2709、または ML2707 遺伝子がトランスポゾン挿入により不活化された場合には増殖の遅延が緩和されたが、ML2711、*dnaA*、および *gyrB* 遺伝子の不活化では影響が見られなかった。これらの結果から、少なくともらい菌の ML2710、ML2709、および ML2707 遺伝子がこの形質に関与していることが示された。

3) 抗酸菌感染による宿主遺伝子の変化(担当：鈴木幸一)。感染によって宿主細胞に発現が誘導あるいは増強される遺伝子として、IL-2、IL-4、IL-10、IL-12、IFN、TNF α などの各種サイトカインや、MAPK などの細胞内シグナル伝達系については既に知られている。今回の検討で新たに IL-8、IL-15、IL-17 やインスリン様成長因子受容体などの細胞遊走や増殖などに関わる分子群や、LECAM2、CD51 などの細胞接着因子などの発現増強が認められた。また、DNA ポリメラーゼやトポイソメラーゼなど DNA 合成に関わる種々の遺伝子群や転写因子の発現増強も認められ上記と一致する所見が得られた。一方で、コロニー刺激因子受容体や甲状腺ホルモン受容体など増殖に関わる遺伝子でも発現が低下するものもあった。

4) 抗原性因子の探索(担当：牧野正彦・前田百美)。生らい菌・菌膜・細胞質を同量 DC にパルスすると、菌膜を抗原として用いた場合より強い CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞の増殖応答が観察された。そこで、菌膜の抗原性を細胞質分画をコントロールとして検索した。菌膜を DC にパルスし DC の

細胞表面を解析すると、細胞壁由来の抗原 (PGL-1) は存在せず、菌膜由来抗原 (LAM) が存在しかつハンセン病患者血清と反応した。菌膜を細胞内プロセッシング阻害剤であるクロロキニン存在下で DC にパルスすると細胞表面に発現し患者血清と反応する抗原量は低下した。従って、菌膜成分は DC 内でプロセッシングを受け、細胞表面に発現すると考えられた。さらに、菌膜成分に FITC をラベルした後 DC にパルスすると、トリパンブルーを用いて細胞表面に残存する FITC をマスクしても DC は FITC を発色し、かつその程度は減少しなかった。従って、菌膜は DC によって細胞内に取り込まれていると判明した。次いで、抗原提示に関する分子の菌膜パルス DC 表面への発現を検索すると、MHC class II、CD86 および CD83 抗原の発現が菌膜投与により増強された。菌膜パルス DC の抗原提示能を T 細胞活性化能で解析すると、CD40L 処理 DC により刺激された CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞は IFN- γ を産生した。IFN- γ 産生誘導能は菌膜が細胞質よりも強かった。IL-10 は産生されなかった。従って、らい菌膜は Th1 タイプ CD4 陽性 T 細胞および Tc1 タイプ CD8 陽性 T 細胞を活性化する上で重要な抗原を保有していると想定された。菌膜パルス DC を用い 10 日間自己の CD8 陽性 T 細胞を刺激すると、検索したドナーの 50% において CD8 陽性 T 細胞の細胞質内に perforin が産生された。しかし、*M. bovis* BCG 菌由来菌膜、あるいは非病原性抗酸菌 *M. smegmatis* 由来菌膜を抗原として用いた場合は全てのドナー CD8 陽性 T 細胞から perforin が産生され、かつその程度もらい菌膜に比し強かった。そこで、菌膜抗原の DC からの IL-12 p70 産生誘導能を検索した。らい菌膜は CD40L 抗原存在下で IL-12 p70 の産生を誘導した。その程度はらい菌膜細胞質を用いた場合よりも強かった。しかし、LPS 存在下では IL-12 p70 の産生は誘導できず、CD40L の存在が必要であった。*M. smegmatis* 菌膜は、LPS の存在下でも IL-12 p70 の産生を誘導した。また、らい菌膜を hydrophobic 分画と hydrophilic 分画に分けて IL-12 p70 の産

生能を検索したが、両分画ともに IL-12 を産生した。

抗酸菌では、抗原性を有するリポタンパクが形成されることが知られている。このリポタンパクは菌内でタンパクが脂質附加を受けて形成されるものであるが、この時脂質は一定の遺伝子配列すなわち consensus sequence を認識して結合する。らい菌のゲノムデータベースから、この consensus sequence を検索し、存在するプロリポタンパク(脂質附加を受ける前のタンパク)を全て Accession No. で表 1 に示した。その結果、結核菌では約 100 個のプロリポタンパクが存在するのに対し、らい菌では僅かに 10 個であった。その内の一つ、Accession No. Z99125/L536 (以下 lpk と名付ける) は結核菌ホモログに約 83.5% の相同性を示すが、結核菌ホモログには脂質附加を受ける consensus 配列が欠損していた。らい菌の特異性を加味して、今回はこの lpk に着目した。らい菌由来の蛋白質を得るためには、本来同一種であるらい菌を用いてリポタンパクを発現させ精製すべきであるが、残念ながららい菌は人工培養で生育できないため、大腸菌を用いて発現させた。プロモーター活性の弱い lac プロモーターを用いて C-末端にヒスチジン残基を導入することで遺伝子を発現させた(図 5A)。lpk 遺伝子導入大腸菌株を 12% SDS-ポリアクリアミドゲル電気泳動し、Coomassie 染色したところ、分子量約 33kD のリポタンパク LpK が発現した。さらに、tag として用いたヒスチジンに対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行うと 33kD のバンドが検出され、目的とした LpK リポタンパクの発現が確認された(図 5B)。つぎに、His-Bind Kit を用いてタンパクを精製した。図 6 の銀染色で示すように LpK は 60mM のイミダゾールで単一バンドとして溶出された。脂質の骨格の合成にはグリセロールの存在が必要である。この点を応用し、LpK が脂質附加を受けているか確認するため、¹⁴C-グリセロールの取り込みを測定した。¹⁴C-グリセロール附加 1、3、5 時間培養後、抗 His 抗体を用いて免疫沈行を行い SDS-PAGE で蛋白

を泳動し、さらに、BAS で分析した結果、mature form な lpk が 5 時間培養大腸菌に検出された(図 7A)。3 時間培養後は形成中の蛋白のバンドが検出される。また、シグナルペプチダーゼの阻害剤 Globomycin の存在化でリポタンパクの形成を行うと、LpK の合成が阻害された(図 7B)。得られた LpK は脂質附加を受けていることが証明された。さらに、作製した LpK は正常健常者末梢血単球を刺激し、IL-12p40 を産生した(図 8)。しかし、大腸菌を用いると inclusion body を形成するリポタンパク LpC では IL-12p40 の産生は確認できなかった。さらに、今回 LpK の精製に大腸菌を用いたため、IL-12p40 の産生が大腸菌由来の endotoxin の影響を受けている可能性が考えられた。そこで、単球を LPS の阻害剤である polymyxin B 存在下で刺激すると、LPS による IL-12p40 の産生は 90% 阻害されたのに対し、LpK 刺激による IL-12 の産生は阻害されなかった。このことから、LpK はヒト末梢血単球を刺激し、IL-12p40 を産生する能力を有していることが明らかになった。

D. 考察

現在、国内で 4 種の抗酸菌診断キットが入手可能である。3 種は結核菌群もしくは *M. avium* complex の迅速鑑別が可能である。残り 1 種は、18 菌種の鑑別が可能であるが、コロニー形成を必用とし、迅速性に欠ける。多種類の抗酸菌を迅速に鑑別診断し得るキットは存在しない。国外においては、本研究と同様の視点で様々な遺伝子領域の検索が行われ、*rpo B* や *rec A* 領域を解析した報告がなされている。今回、塩基配列解析した領域は、いずれの報告よりも相似性は低く、より鑑別性の優れた領域と考えられる。また 16 S-23 S ribosomal RNA spacer region 領域を標的遺伝子領域にした研究も進められているが、菌種内における変異が発生し易い。従って、変異株に対する対応が問題となってくる。さらに、検査施行時に疑陰性診断する恐れが生ずる。しかし、*dnaA* 領域のコードする DnaA は、細菌ゲノ

ムの複製に必須の蛋白と考えられ、その変異導入率は非常に低いものと考えられ、安定した検査結果が期待される。

分離したコスミドクローンにおけるらい菌 DNA 断片の総延長は、らい菌ゲノムの約 7 周分に相当し、らい菌ゲノム DNA のほぼ全ての領域を含むと考えられる。コスミド B90 による *M. smegmatis* の増殖遅延は、この断片上に染色体複製や菌の分裂など、らい菌の増殖にかかわる遺伝子が含まれているためと考えられ、また菌の増殖速度を規定している遺伝子が含まれる可能性も考えられる。遅発育性は病原性抗酸菌の特徴であり、宿主の免疫システムから逃れる上で重要であると考えられているため、現在詳細な遺伝子解析を行っている。

細胞増殖に対して促進的にも抑制的にも働くという結果が得られたが、このことは、このような複雑な細胞増殖調節機構が抗酸菌感染特異的な肉芽腫形成などの細胞反応に関与している可能性を示唆するものとも考えられ興味深い。抗酸菌感染に伴う宿主遺伝子発現変化は、菌との接着や貪食という細胞反応と、それらに伴う細胞内シグナルの活性化やオートクライン的に働くサイトカインの影響などの非特異的な反応も強く起こっていると考えられる。これらの中から、特定の抗酸菌感染による固有の変化を見出すためには、生菌と死菌との比較や感染後の時間経過による遺伝子発現変化など、より詳細な検討が必要であり、今後の課題として残された。

ハンセン病の発症を阻止するワクチンはこれまでに確立されておらず、早急な対応が望まれている。これまでに、らい菌は生らい菌を用いるよりは、菌を構成する分画を用いた方が T 細胞の増殖応答を誘導し易いユニークな抗酸菌であることを報告してきた。そこで、ワクチンの候補分子を探る目的で、らい菌を細胞膜・壁・細胞質の 3 つに分画しその抗原性を検索した。その結果、細胞膜に Th1 タイプ CD4 陽性 T 細胞・Tc1 タイプ CD8 陽性 T 細胞の活性化を誘導する分子が存在することが判明した。これらの T 細胞サブセットの活性化は、らい菌

膜が DC を刺激し IL-12 p70 を産生することに関連しているものと考えられた。CD8 陽性 T 細胞は perforin と granulysin を産生し、抗抗酸菌キラー活性を獲得し有効なワクチンおよび免疫療法のメディエーターとなり得ることが想定されている。その意味において、CD40L 存在下で菌膜は DC を介し perforin 産生に至るまで CD8 陽性 T 細胞を活性化したことは意義深い。一般に、CD8 陽性 T 細胞が Cytotoxic T lymphocytes に分化するためには、in vivo あるいは in vitro で複数回刺激される必要がある。本研究では、約 50% のドナーにおいて、CD8 陽性 T 細胞は in vitro で菌膜パルス DC による刺激を受けて CTL に分化したが、これはドナーの BCG に対する感受性あるいは BCG 菌による感作程度を反映している可能性が考えられ、抗酸菌に対するワクチンを考える際に有用な知見と思われる。

らい菌膜を油性分画と水性分画の二つにさらに分画し IL-12 p70 産生能を検索すると、両者において同程度にサイトカイン産生が誘導された。従って、菌膜にはワクチンとなり得る分子が複数存在するものと考えられた。

抗酸菌感染症に対する生体防御機構は、これまで十分に明らかにされておらず、それが故に BCG のワクチンとしての有効性が疑問視されているにもかかわらず、その改良法が未だ見いだされない原因となっている。近年、従来のものである免疫機構に加え、自然免疫の概念が確立され、その免疫応答システムは主要組織適合抗原とは独立し、多型性を示さない CD1 抗原を介するためにポリモルフィズムを示さず、各個人が抗原に対してほぼ同一の免疫応答を示すことに特徴を有している。この免疫応答システムの中心的役割を果たす抗原が脂質抗原であって、実際、結核感染症においては Th1 タイプの免疫応答を惹起し、生体防御に重要な役割を果たすことが証明されている。さらに、19kD のリポタンパクは Th1 タイプ CD4 陽性 T 細胞を活性化する際に重要である IL-12 を産生することが報告されている。今回得られたらい菌由来のリポタンパク

LpK は、らい菌をコードするリポタンパクとして世界で初めて精製されたものであるが、正常健常者末梢単球を刺激し IL-12 を産生したことは、上記観点において極めて有効であって、ハンセン病に対するワクチンを開発する上で有用な情報を提供するものと期待される。

E. 結論

抗酸菌を遺伝子増幅法に基づき鑑別可能な領域を *dna A* 遺伝子領域内に同定した。この領域は、迅速な非結核性抗酸菌症鑑別診断法の開発に有用と考えられた。らい菌ゲノムの約7周分に相当する大腸菌-抗酸菌シャトルコスミドクローンを約 800 クローン分離し、そのうち約 100 クローンの挿入断片についてらい菌ゲノム地図上の位置を決めた。これらの中でコスミド B90 の持つ約 36kb のらい菌 DNA 断片が迅速発育性抗酸菌 *M. smegmatis* の増殖速度を著しく低下させることがわかった。数多くの宿主遺伝子についてその発現変化の全体像が明らかとなり、今後の研究の新しい展開に有用なデータが得られた。抗酸菌菌膜には、樹状細胞より IL-12 p70 を産生し Th1 タイプ CD4 陽性 T 細胞および Tc1 タイプ CD8 陽性 T 細胞を活性化する抗原性分子が複数含まれていた。らい菌由来のリポタンパク LpK を大腸菌で発現し精製した。リポタンパクは IL-12 を強く誘導することより、らい菌感染に際し宿主生体防御応答に関わっている可能性が示唆された。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nomaguchi, H., N. Jahan, B. C. Mandal, Y. Yogi, K. Kawatsu, Y. Yoshizawa, H. Okamura, and M. Makino. IL-12 and IL-18 synergistically induce the bactericidal activity of murine peritoneal cells against *M. leprae*. *Jpn. J. Leprosy*, 70:113-119, 2001.

2) Umemura, M., K. Hirose, W. Wajjwaiku, H. Nishimura, T. Matsuguchi, Y. Gotoh, M. Takahashi, M. Makino, and Y. Yoshikai. Impaired IL-15 production associated with susceptibility of murine AIDS to mycobacterial infection. *J. Leukoc. Biol.* 69(1):138-148, 2001.

3) Makino, M., A. Utsunomiya, Y. Maeda, S. Shimokubo, S. Izumo, and M. Baba. Association of CD40 ligand expression on HTLV-I-infected T cells and maturation of dendritic cells. *Scand. J. Immunol.*, 54:574-581, 2001.

4) Kawamura, M., T. Naito, M. Ueno, T. Akagi, K. Hiraishi, I. Takai, M. Makino, T. Serizawa, K. Sugimura, M. Akashi, and M. Baba. Induction of mucosal immunity following intravaginal administration of inactivated HIV-1-capturing nanospheres in mice. *J. Med. Microbiology*, in press, 2002.

2. 学会発表

- 1) 野間口博子, 與儀ヤス子, 川津邦雄, 牧野正彦, 吉澤雄介, 岡村春樹. マウス腹腔内マクロファージのらい菌殺菌機構の解析. 第 74 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2001 年 5 月 米子.
- 2) 鈴木幸一, 石井 健, 木村博昭, 中田 登, 前田百美, 武下文彦, 牧野正彦. 宿主細胞内日本鎖核酸とらい菌感染とによる抗原提示能の活性化. 第 74 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2001 年 5 月 米子.
- 3) 前田百美, ブイ・バン・ホアン, 橋本 研, 中田 登, 前田伸司, 柏原嘉子, 牧野正彦. ハンセン病患者血清に反応する未知なる抗原の分子免疫学的解析. 第 74 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2001 年 5 月 米子.
- 4) 牧野正彦, 橋本 研, 前田百美, 松岡正典. らい菌の正常健常者末梢単球由来樹状細胞の抗原提示能に及ぼす影響第

31 回日本免疫学会総会 2001 年 12 月
大阪.

- 5) 梅村正幸, 西村仁志, 松口徹也, 牧野正彦, 須田貴司, 吉開泰信. IL-15 はマウス後天性免疫不全症候群の病態の進展を抑制する. 第 31 回日本免疫学会総会 2001 年 12 月 大阪.
- 6) Maeda Y., B. V. Hoang, S. Shrisungngam, S. Maeda, P. J. Brennan, Y. Kashiwabara, and M. Makino. Molecular

and immunological analysis of a protein against leprosy. International Symposium on Mycobacterial Diseases: Pathogenesis, Protection and Control, Jan., 2001, Bose Institute, Calcutta, India.

- H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

表 1. 脂質付加をうけると予想される *M. leprae* 遺伝子と脂質付加をうけるアミノ酸
コンセンサス配列

| Accession No. | Protein size (アミノ酸数) | Consensus sequence at prolipoprotein processing site |
|----------------------------|-------------------------|---|
| Z94723/B33 | 214 | MLLSCAV |
| AL022602/B268 | 239 | LATGCLR |
| Z99263/B637 (<i>Ipc</i>) | 302 | ILSSCAR |
| L78828/B983 | 397 | LLSSCGW |
| AL023591/B1259 | 555 | ALTACSG |
| Z95117/B1351 | 525 | LLVGCVP |
| Z98604/B2052 | 445 | GAVGCSS |
| AL035159/B1450.02 | 183 | VLGGCGA |
| AL035159/B1450.20 | 325 | MLAACGH |
| Z99125/L536 (<i>Ipk</i>) | 372 | VAVACL ^P |

Accession 番号およびプロリポ蛋白のアミノ酸残期数を示す。アミノ酸コンセンサス配列中、ボールドで示したCは脂質付加をうけるシステイン残期。表中、今回用いた *Ipk* および *Ipc* を示す。

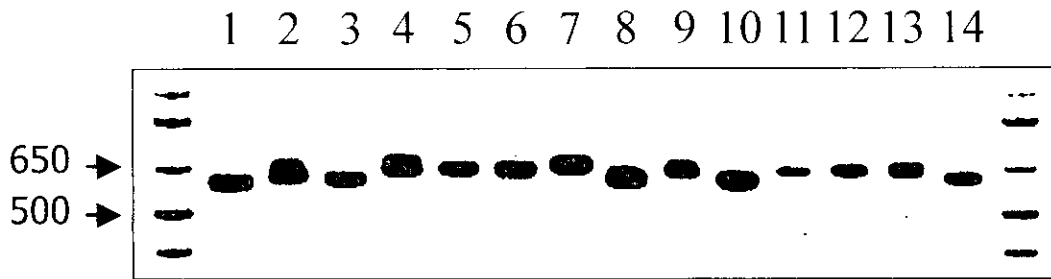


図1. 代表的 PCR 産物泳動の異動. 1;*M. nonchromogenicum*, 2;*M. phlei*, 3;*M. parafortuitum*, 4;*M. scrofulaceum*, 5;*M. simiac*, 6;*M. smegmatis*, 7;*M. szulgai*, 8;*M. terrae*, 9;*M. triviale*, 10;*M. ulcerans*, 11;*M. tuberculosis* H37Rv, 12;*M. tuberculosis* H37Ra 13;*M. vaccae*, 14;*M. xenopi*

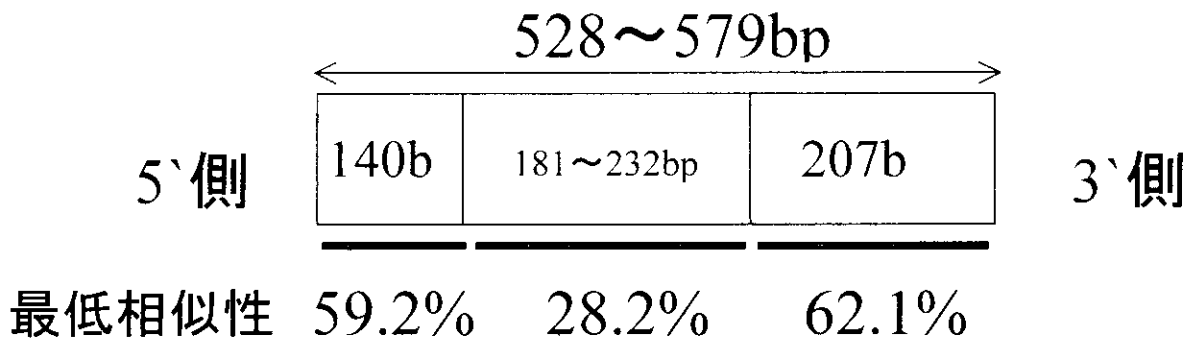


図2. 25 菌種よりの PCR 産物の塩基配列相似性相関図

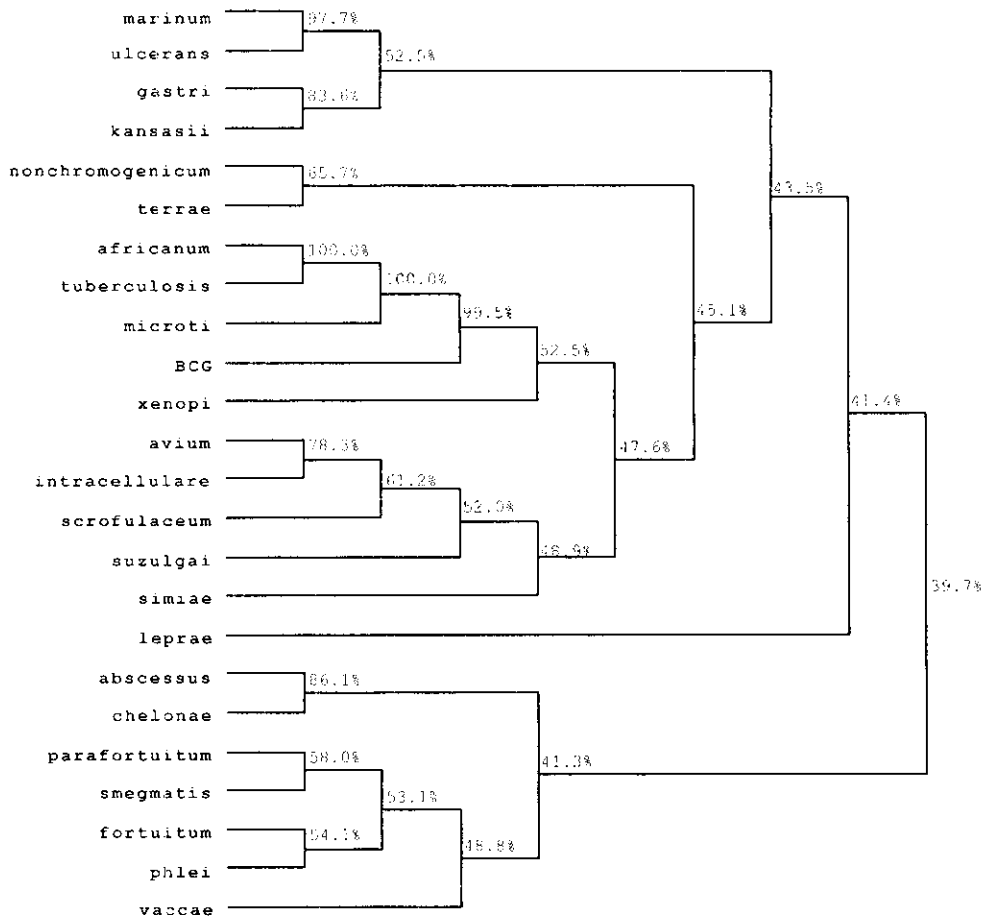


図3. 高度変異領域塩基配列に基づいた系統樹

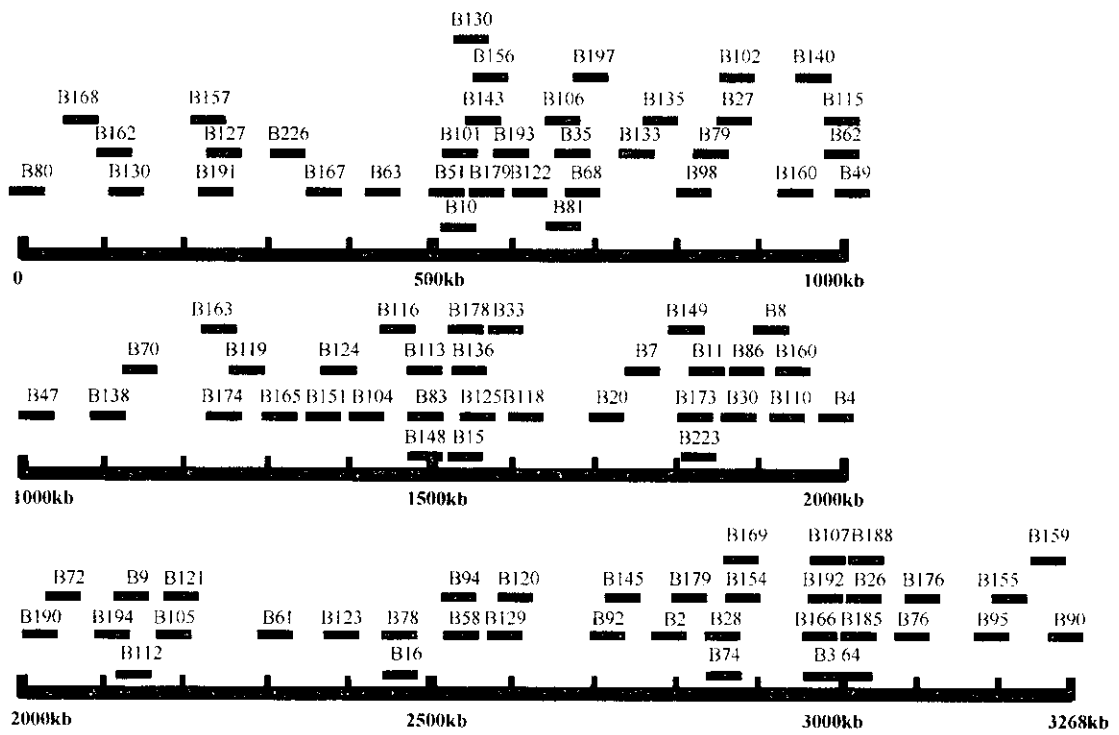


図4. らい菌コスミドクローンのマッピング

図5. リポ蛋白 LpK の発現

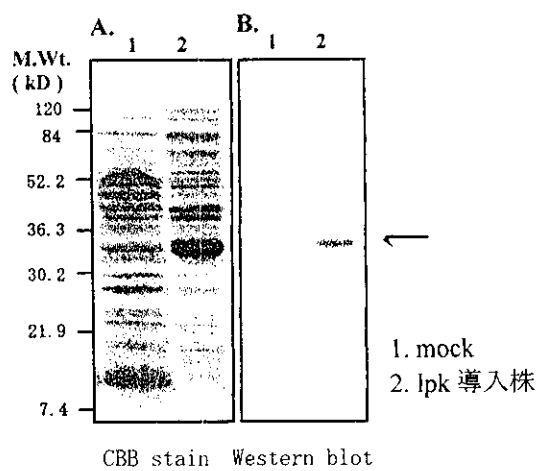


図6. LpK の精製

