

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

ツベルクリン検査、BCG 等に代わる結核等の抗酸菌症に係る新世代の診断技術及び予防技術の開発に関する研究

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 牧野 正彦

(国立感染症研究所・病原微生物部長)

平成 15(2003)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

ツベルクリン検査、BCG等に代わる結核等の抗酸菌症に係る新世代の診断技術及び予防技術の開発に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 牧野 正彦

(国立感染症研究所・病原微生物部部長)

平成15(2003)年3月

目 次

総括研究報告書：ツベルクリン検査、BCG等に代わる結核等の抗酸菌症に係る新世代の診断技術及び予防技術の開発に関する研究 牧野 正彦（国立感染症研究所）	1
分担研究報告書：アデノウィルスベクターを用いた新しい結核診断法及び抗結核免疫賦活能の解析 竹森 利忠（国立感染症研究所）	9
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 荒川 宜親（国立感染症研究所）	13
分担研究報告書：結核菌病原因子と宿主応答 小林 和夫（大阪市立大学大学院医学研究科）	15
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 牧野 正彦（国立感染症研究所）	19
研究成果の刊行に関する一覧表	39

平成 14 年度 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

ツベルクリン検査、BCG等に代わる結核等の抗酸菌症に係る
新世代の診断技術及び予防技術の開発に関する研究

総括研究報告書

主任研究者

牧野 正彦

(国立感染症研究所・病原微生物部部長)

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

ツベルクリン検査、BCG等に代わる結核等の抗酸菌症に係る新世代の
診断技術及び予防技術の開発に関する研究

主任研究者 牧野 正彦 国立感染症研究所 病原微生物部長

研究要旨. 抗酸菌感染症制圧を目指すため、新しい診断技術ならびに予防法の開発に関する基礎的研究を行った。ツベルクリン反応に代わる結核菌感染補助診断方法を確立するため、結核菌特異的抗原遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込み樹状細胞に発現させ、それに対するT細胞反応を測定する系を構築した。活性指標としてIFN- γ を測定したところ、BCG菌感染マウス由来T細胞を強く活性化させた。非結核性抗酸菌の診断法として、PCR法を用いた抗酸菌の迅速鑑別診断法の開発と、*M. avium-intracellular complex* (MAC)特異的抗原を用いた血清診断法を確立した。前者は、*dnaA*遺伝子領域内の約200bpを用いたが、臨床的に鑑別が強く求められるにもかかわらず、これまで鑑別が困難であった病原性菌と非病原性菌の迅速鑑別法を初めて可能とした。後者では、MAC特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質(GPL)抗原を用い患者血清を検索したところ、肺MAC感染症に対する感度は92.3%、特異度98.5%であった。さらに、これにより治療効果判定あるいは疾患活動性の評価も可能となった。次いで、抗酸菌病原性因子を検討するため、大腸菌—抗酸菌シャトルコスミドベクターを用い、らい菌ゲノムの98%以上をカバーするクローンセットを得た。これを用い、らい菌の発育を著しく阻害している遺伝子を特定し得る可能性を示した。また、抗酸菌に対する宿主遺伝子の変化をDNAマイクロアレイ解析に基づいて検索したところ、インスリン様成長因子受容体は何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。抗酸菌に対するワクチン開発の試みとして、ガンマ線照射BCG菌のモルモット生体内での役割を検討した。BCG菌に代わる新しいワクチンとして、コンポーネントワクチンの可能性を検索するため、抗酸菌特異的リポタンパクLpKの役割を検討した。LpKは、単独で樹状細胞を活性化したが、LpKのタンパク部分が特異性を与え、脂質が樹状細胞を強く活性化した。これまでにない新しいタイプのワクチン開発の可能性が示された。抗酸菌に対する生体防御反応を増強するため、抗酸菌感染マクロファージを樹状細胞様に形質転換したところ、キラーT細胞に対する感受性が増大し、より効率よく殺戮された。新しい予防法・治療法を考える上で有用な知見を提供した。

分担研究者	竹森 利忠	国立感染症研究所	部長
	荒川 宜親	国立感染症研究所	部長
	小林 和夫	大阪市立大学大学院	教授

A. 研究目的
抗酸菌感染症は 20 世紀最大の細菌感染症の一つであり、今尚全世界の恐怖となっている。抗酸菌感染症の制圧には、診断技

術・予防法さらに新しい治療法の開発全てが必要とされている。一方、非結核性抗酸菌感染症は結核症とは異なり、一般に化学療法剤に対し抵抗性を示しやすいものの人から人への伝播はなく、そのため結核症のような隔離を必要としない。従って、結核菌と非結核性抗酸菌を迅速かつ特異性高く鑑別する方法の樹立も厚生行政上極めて重要な課題となっている。抗酸菌感染症に対するワクチンとしては、生 BCG 菌を用いることが現在まだ唯一の方法である。幼児初期感染を予防する方法としては有効性が認められているが、高齢者層にはその効果は極めて乏しい。新たなワクチンの開発が叫ばれて世界的な研究テーマとして取り上げられているが、未だ充分成果は上がっていない。本研究班では、こうした難問に対する回答の糸口を見い出すため以下の研究を展開することを目的とした。

1. 結核菌感染症に対する、ツベルクリン反応に代わる新たな診断補助検査法の確立（竹森）
2. 非結核性抗酸菌感染症に対する PCR 法を用いた高感度迅速鑑別診断法の開発（牧野・向井）
3. MAC 感染症を迅速に診断するための血清診断法の開発（小林）
4. 抗酸菌全ゲノムをカバーするコスミドクローンの樹立と、それを用いた抗酸菌増殖を規定する遺伝子の同定（牧野・中田）
5. 抗酸菌感染初期に変化する宿主マクロファージの遺伝子の同定（牧野・鈴木）
6. 生 BCG 菌の代わる新しいワクチンとしての大量ガンマー線照射“半生” BCG 菌の生体内での役割解析（荒川）
7. 本研究事業により新たに発見した抗酸菌特異的リポタンパク LpK の抗原提示細胞への影響とワクチンとしての有用性の検討（牧野・前田）
8. 抗酸菌に対する生体防御反応を増強し、宿主細胞への寄生性感染を阻止するための方策開発（牧野）

B. 研究方法

1. Ag85 遺伝子組み込みアデノウイルスを作成し樹状細胞へ感染させた後、BCG 菌感染マウス T 細胞を刺激した。T 細胞の IFN- γ 産生を指標に抗酸菌感染の有無を定量化する（竹森）。
2. 抗酸菌 *dnaA* 遺伝子内に存在する種特異性が強い 200bp 領域を用いた PCR 法により 27 菌種の鑑別性を検索し、さらに離床分離株を用いその有効性を検討した（牧野・向井）。
3. 11 標準 MAC 株から MAC 特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) を分離・精製した後、抗原として血清診断法に用いた（小林）。
4. 大腸菌—抗酸菌シャトルコスミドベクターを用いて、コスミドクローンを得て、既報のらい菌 TN 株ゲノム DNA 配列と比較して、ゲノム地図上にマッピングした。コスミドクローンを非病原性抗酸菌 *M. smegmatis* へ導入し、増殖の速度と形態に及ぼす影響を検索した（牧野・中田）。
5. DNA マイクロアレイ解析によって変化が観察された 160 個の遺伝子についてクラスタリング解析を行った（牧野・鈴木）。
6. 40 万ラド照射 BCG 菌をモルモットに接種後、PPD に対する遅延型過敏反応、BCG 菌に対する殺菌作用、サイトカイン産生能を検索した（荒川）。
7. LpK および Truncated LpK を作成・精製した後、正常健常者末梢単球由来樹状細胞にパルスし、その成熟化・活性化に及ぼす影響を細胞表面抗原および IL-12p70 産生能をマーカーに検索した（牧野・前田）。
8. 抗酸菌感染マクロファージをサイトカインを用いて処理し、抗原提示能 (T 細胞活性化能) とキラー T 細胞に対する感受性を検討した（牧野）。

倫理面への配慮 人体材料を用いる場合は、当該施設の倫理委員会に対し申請し承認を得た後遂行する。特に、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う。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するとともに、いかなる不都合が存在する場合には、これを拒否できることを説明する。十分な理解と同意が得られた場合のみ遂行する（インフォームドコンセント）。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る。また、動物を用いた実験系を遂行する際は、当該施設の動物実験指針に従い施行する。特に、動物愛護の観点に立ち、痛みの軽減・安楽死などの処置を行う。

C. 研究結果

1. Ag85 組み込みアデノウイルス感染樹状細胞は、BCG 菌接種マウス由来メモリータイプ T 細胞を抗原特異的に刺激し IFN- γ を産生させた(竹森)。
2. *dnaA* 遺伝子領域にある 200bp (Domain 2) を用いると、これまで鑑別不可能であった病原性抗酸菌と非病原性抗酸菌の迅速鑑別診断が可能となった。臨床分離株を用いても安定した鑑別診断が可能であった(牧野・向井)。
3. MAC 特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質を抗原として用いると、MAC 感染症患者を高感度ならびに高特異度をもって血清診断することが可能であった。治療後の疾患活動性の評価にも応用し得る可能性が示唆された(小林)。
4. らい菌ゲノムの 98%以上をカバーするコスミドクローンセットが得られた。これらを用い、らい菌の遅発育性を規定する遺伝子の同定を試みたところ、*trxB/A* 遺伝子上流から *rpmH* 遺伝子上流までの約 9kb 領域が責任遺伝子候補であることが判明した(牧野・中田)。
5. 抗酸菌感染初期において、ヒトマクロファージのインスリン様成長因子受容体の発現が増加することが明らかになった(牧野・鈴木)。
6. 半生 BCG 菌を用いても、モルモット生体

内で抗菌活性を有する免疫担当細胞を活性化し得ることが明らかになった。しかし、その効果は持続せず、むしろ接種長期後においては加熱処理 BCG 菌の方が生らい菌よりも有効な生体防御反応を惹起する可能性が示唆された(荒川)。

7. LpK は単独で樹状細胞を成熟化・活性化し得た。LpK を構成する脂質付加を受けるとともに、タイプ 1 細胞性免疫賦活に関与し、脂質が樹状細胞の活性化を増強するアジュバント的作用を有していた。単一分子であるにもかかわらず 2 つの異なった作用を示した(牧野・前田)。
8. 抗酸菌感染マクロファージをサイトカインを用いて処理すると、樹状細胞様に形質転換し、自己 T 細胞を刺激・活性化するとともに、抗酸菌特異的キラー T 細胞に対する感受性を増大させ、容易に殺戮されるに至った(牧野)

D. 考察

抗酸菌に対する生体防御反応の基本は細胞性免疫反応である。細胞性免疫反応は、抗原提示細胞と T 細胞の両者の存在が必須で、抗原提示細胞の中でも生体内で最も有用な樹状細胞の果たす役割は極めて大きい。従って、結核菌感染補助診断方法も細胞性免疫反応を利用することが有効かつ信頼できる方法と想定できる。この点これまでに用いられてきたツベルクリン反応も、理論的には有用な方法と考えられる。しかし、特異性の点において多くの問題を抱え、とりわけ日本のように BCG 接種が義務付けられてきた国においては、重大な問題となっている。従って、本研究班で着手している結核菌特異的抗原と樹状細胞を用い、新たな補助診断法を開発しようとする試みは、理論上鋭敏かつ特異性に優れた診断技術の開発を可能とするものである。

非結核性抗酸菌は、病原性抗酸菌感染症の約 20% を占める。しかし、化学療法剤抵抗性を示すことが多いこと、ヒトからヒトへの伝播が極めて稀なことなどにより、結

核菌とは異なった治療体制を構築することが必要である。従って、結核菌と非結核性抗酸菌の鑑別診断および病原性抗酸菌と非病原性抗酸菌の鑑別をより迅速に、かつ、より安全に行う必要がある。本研究班では、2つのアプローチを試みた。第1はPCR法を用い、菌をダイレクトに鑑別する方法を確立することであり、第2は生体反応を利用し、すなわち抗体を検出することで、非結核性抗酸菌の中で最も多いMAC感染症を診断するものである。両方法とも極めてプロミッシングで共にキット化あるいは実用化の可能性が高い。また、前者はこれまで不可能であった非病原性抗酸菌を鑑別することを可能とし、後者の治療効果判定および疾患活動性を把握することも可能な点有用であって、共に医療費の軽減、不必要な入院拘束を不要とする意味において、重要な厚生行政貢献を果たすことに繋がる。

ワクチンとして生BCG菌を用いてきたことは周知の事実である。しかし、高齢者を中心にBCG菌の効果に疑問を示す声が高まっている。BCG菌も抗酸菌であるため、抗原提示細胞に感染後ファゴゾームを形成するが、結核菌と同様ライソゾームとの融合が阻止される。その結果、BCG菌由来の抗原が細胞表面に発現される効率が低く、そのため有効な細胞性免疫応答も効果的に誘導されにくい。こうした点を考えると、生きてきた抗酸菌を用いるのではなく、死菌あるいは抗酸菌を形成している成分を用いたコンポーネントワクチンの有効性をあらためて考え直す時期に至っていると考えられる。こうした観点より本研究班では、2つの試みを行っている。第1は、40万ラド照射によって作成する“半生”(mRNAは産生するが菌の増殖能力はない)BCG菌の利用、第2は抗酸菌特異的リポタンパクを用いる方法である。生体防御反応と同様にワクチンもまた、効率よく抗抗酸菌細胞性免疫を惹起しなければならない。従って、ワクチンと抗原提示細胞とりわけ樹状細胞との親和性、樹状細胞を成熟化・活性化し得るか否かなどが、ワクチンに求められる作用となる。

この点、今回検討したリポタンパクLpKは、樹状細胞を活性化する上で極めて有効であった。これまでにない新しいタイプのワクチンとして大きな期待が寄せられる。

E. 結論

新しい結核感染診断法開発のためにAg85a組み込みアデノウイルス粒子を作製し、これを用いてT細胞反応を惹起させることに成功した。よって結核菌遺伝子組み込みアデノウイルスベクターは抗原特異的な細胞性免疫反応診断の技術として有用である可能性が示唆された。構築した菌種特異的PCR法により、新たな迅速鑑別診断の開発が可能となった。MAC特異的GPL抗原を用い、MAC感染症の診断や疾患活動性の評価に有用な迅速・簡便血清診断法が開発された。抗酸菌特異的LpKは、タンパク部分でその特異性を与え、脂質部分が樹状細胞を活性化する全く新しいタイプのワクチンとなり得る可能性が示唆された。抗酸菌感染マクロファージを樹状細胞様に形質転換することで、抗酸菌に対する生体防御反応を高め、抗酸菌症に対する免疫療法の開発が可能となった。

F. 健康危険情報

豚由来*M. avium* 5分離株(異なった3地域より分離)の*dnaA*変異領域の塩基配列の検討を行ったところ、5株間ではその配列が100%一致し、ヒトより分離された標準株とは、99.1%の相似性があった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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*, 66:291-298, 2002.
- 2) Maeda, Y., M. Makino, D. C. Crick, S.

- Mahapatra, S. Srisunnam, T. Takii, Y. Kashiwabara, and P. J. Brennan. Novel 33-Kilodalton Lipoprotein from *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immunity*, 70(8):4106-4111, 2002.
- 3) Shimokubo, S., S. Wakamatsu, Y. Maeda, M. Baba, and M. Makino. Fusion of Mature Dendritic Cells and Human T-Lymphotropic Virus Type-I-Infected T cells: its Efficiency as an Antigen-Presenting Cell. *Virology*, 301:13-20, 2002.
 - 4) Hashimoto, K., Y. Maeda, H. Kimura, K. Suzuki, A. Masuda, M. Matsuoka, and M. Makino. *Mycobacterium leprae* Infection in Monocyte-Derived Dendritic Cells and Its Influence on Antigen-Presenting Function. *Infect. Immunity*, 70(9):5167-5176, 2002.
 - 5) Nomaguchi, H., T. Mukai, F. Takeshita, M. Matsuoka, Y. Maeda, T. M. Aye, N. Jahan, Y. Yogi, M. Endo, Y. Sato, and M. Makino. Effect of hsp65 DNA vaccination carrying immunostimulatory DNA sequences (CpG motifs) against *Mycobacterium leprae* multiplication in mice. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, 70(3):182-190, 2002.
 - 6) Umemura, M., H. Nishimura, T. Yajima, W. Wajjwalk, T. Matsuguchi, M. Takahashi, Y. Nishiyama, M. Makino, Y. Nagai, and Y. Yoshikai. Overexpression of interleukin-15 prevents the development of murine retrovirus-induced acquired immunodeficiency syndrome. *FASEB*, 16:1755-1763, 2002.
 - 7) 牧野正彦. ハンセン病—Hansen's Disease, Leprosy. 小早川隆敏編, 新版・感染症マニュアル, 176-179, 2002.
 - 8) 牧野正彦. らい菌と樹状細胞の相互作用. *臨床免疫* 38(5), in press, 2003.
 - 9) Toyama, H., S. Okada, M. Hatano, Y. Takahashi, N. Takeda, H. Ichii, T. Takemori, Y. Kuroda, and T. Tokuhisa. Generation of memory B cells independent of germinal center formation. *Immunity* 17:329-339, 2002
 - 10) Tsunetsugu-Yokota, Y., H. Tamura, M. Tachibana, K. Ogata, M. Honda, and T. Takemori. Selective expansion of perforin-positive CD8⁺ T cells by immature dendritic cells infected with live *Bacillus Calmette-Guérin* mycobacteria. *J. Leuk. Biol.* 72:115-124, 2002
 - 11) Toda, M., M. Kasai, H. Hosokawa, N. Nakano, Y. Taniguchi, S. Inouye, S. Kaminogawa, T. Takemori, and M. Sakaguchi. DNA vaccine using invariant chain gene for delivery of CD4⁺ T cell epitope peptide derived from Japanese cedar pollen allergen inhibits allergen-specific IgE response. *Eur. J. Immunol* 32:1631-1639, 2002
 - 12) Takasuka, N., K. Enami, K. Kuroda, Y. Itamura, and T. Takemori. Intranasal inoculation of a recombinant influenza virus containing the exogenous nucleotides in the NS segment results in immune response against the exogenous gene product within the respiratory immune system. *Vaccine* 20:1579-1585, 2002
 - 13) Kitada, S., R. Maekura, N. Toyoshima, N. Fujiwara, I. Yano, T. Ogura, M. Ito, and K. Kobayashi. Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex with an enzyme immunoassay that uses the mixture of glycopeptidolipid antigens. *Clin. Infect. Dis.* 35: 1328-1335, 2002.
 - 14) 前田伸司、小林和夫. 医学細菌の分類・命名の情報. 1 2. 病原性抗酸菌の新種. *感染症学雑誌* 76: 413-415, 2002.
 - 15) 小林和夫. 21世紀における感染症の脅威と制圧戦略. *日本臨床内科医会誌* 17: 233-238, 2002.
2. 学会発表
 - 1) 前田百美, 柏原嘉子, 牧野正彦. らい菌のリポ蛋白をコードする遺伝子の発現とその機能的役割. 第75回日本細菌学会総会 2002年4月 横浜
 - 2) 牧野正彦, 前田百美, 松岡正典. らい菌と正常健常者末梢単球由来樹状細胞の相互作用. 第75回日本細菌学会総会 2002年4月 横浜
 - 3) 前田百美, 鈴木幸一, 川津邦雄, 牧野正彦. らい菌のリポ蛋白の発現とその生理的役割. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島

- 4) 鈴木幸一, 武下文彦, 中田 登, 川津邦雄, 松岡正典, 石井則久, 牧野正彦. ファゴゾーム・ライソゾーム融合阻止に関わる因子 TACO の宿主細胞内らい菌潜伏における役割. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 5) 牧野正彦, 前田百美, 儀同政一. らい菌菌膜の細胞性免疫誘導能の検討. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 6) 武下文彦, 向井 徹, 牧野正彦. らい菌 Fibronectin Attachment Protein の免疫原生およびその宿主細胞侵入抑制効果. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 7) 向井 徹, 武下文彦, 牧野正彦. 経鼻腔粘膜ワクチンの開発. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 8) 鈴木幸一, 前田百美, 中田 登, 松岡正典, 牧野正彦. DNA マイクロアレイを用いたらい菌感染細胞の遺伝子発見プロファイリング. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 9) 中田 登, Khairul A. Hashim, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 柏原嘉子, 前田伸司, 牧野正彦. 大腸菌-抗酸菌シャトルコスミドを用いたらい菌ゲノム DNA バンクの作製と遺伝子解析. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 10) 甲斐雅規, 中田 登, Patrick J. Brennan, 牧野正彦. らい菌ゲノム上に存在する2成分制御系 (ML2439-ML2440) の発現と機能解析. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 11) Makino, M., and Y. Maeda. Dendritic cell-mediated production of IL-12 and IFN- α by *Mycobacterium leprae*-derived cell membrane. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 37th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, August 21-23, 2002.
- 12) Maeda, Y., Y. Kashiwabara, K. Suzuki, D. C. Crick, P. J. Brennan, and M. Makino. Characterization of *Mycobacterium leprae* 33 kD lipoprotein and its immunological significance. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 37th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, August 21-23, 2002.
- 13) Nakata, N., K. A. Hashim, M. Kai, K. Suzuki, M. Matsuoka, S. Maeda, Y. Kashiwabara, and M. Makino. Construction and analyses of a shuttle cosmid library of *Mycobacterium leprae* (Thai 53). US-Japan Cooperative Medical Science Program. 37th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, August 21-23, 2002.
- 14) Makino M. Monocyte-derived dendritic cell-mediated antigenicity of *M. leprae* subcellular fractions. Pre workshop, 16th International Leprosy Congress, 4-9 August, 2002, Salvador, Bahia, Brasil.
- 15) Maeda Y., M. Gidoh, N. Ishii, and M. Makino. Dendritic cell-mediated production of IL-12 and IFN- α by *Mycobacterium leprae*-derived cell membrane. 16th International Leprosy Congress, 4-9 August, 2002, Salvador, Bahia, Brasil.
- 16) Maeda Y., M. Makino, D. C. Crick, Y. Kashiwabara, and P. J. Brennan. A novel 33 KD Lipoprotein Antigen from *Mycobacterium leprae*. 16th International Leprosy Congress, 4-9 August, 2002, Salvador, Bahia, Brasil.
- 17) 高橋宜聖, 稲嶺絢子, 吉岡絵美, 薄井正義, Wang Yatao, 須田貴司, 安達貴弘, 鏑田武志, 竹森利忠. Regulatory molecules for the maintenance of memory B cells. 第32回日本免疫学会総会. 2002年 東京
- 18) 稲嶺絢子, 高橋宜聖, 手塚克成, 竹森利忠, 安部良. AILIM/COS による抗原特異的B細胞産生・分化の制御. 第32回日本免疫学会総会. 2002年 東京

- 19) 横田 (恒次) 恭子, 磯貝まや, 立川 (川名) 愛, 岩本愛吉, 竹森利忠, Brigitte Autran. HIV-1 感染者の CD8 陽性 T 細胞の機能に関する解析. 第 32 回日本免疫学会総会. 2002 年 東京
- 20) 橋本修一, 竹森利忠. 記憶 B 細胞に特異的に発現する細胞表面分子の探索. 第 32 回日本免疫学会総会. 2002 年 東京
- 21) 松本壮吉, 小林和夫. 抗酸菌感染に対する宿主防御と病変形成機序. 細胞内寄生菌に対する感染防御免疫 (シンポジウム). 日本細菌学会雑誌, 57:69, 2002. 第 75 回日本細菌学会総会 2002 年 4 月 横浜.
- 22) 前田伸司, 松岡正典, 中田 登, 甲斐雅規, 前田百美, 橋本 研, 小林和夫, 柏原嘉子. ハンセン病における薬剤耐性検査法の確立. 日本細菌学会雑誌, 57:123, 2002. 第 75 回日本細菌学会総会 2002 年 4 月 横浜.
- 23) 小林和夫. 結核菌菌体成分に対する炎症および免疫応答. 結核免疫の動向と課題 (シンポジウム). 結核, 77:92, 2002. 第 77 回日本結核病学会総会 2002 年 4 月 東京.
- 24) 小林和夫. 21 世紀における感染症の脅威と制圧戦略 (教育講演). 日本臨床内科医会誌, 17:246. 第 16 回日本臨床内科医学会 2002 年 9 月 和歌山.
- 25) 持田恵子, 荒川宜親. 結核菌および BCG の脂質代謝酵素遺伝子発現に関する研究. 第 77 回日本結核病学会総会 2002 年 4 月 東京

H. 知的財産権の出願・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 14 年度 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

アデノウィルスベクターを用いた新しい結核診断法
及び抗結核免疫賦活能の解析

分担研究報告書

分担研究者

竹森 利忠（国立感染症研究所・免疫部長）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

アデノウィルスベクターを用いた新しい結核診断法及び抗結核免疫賦活能の解析

分担研究者 竹森 利忠（国立感染症研究所・免疫部長）
研究協力者 藤猪 英樹（感染研免疫部・研究員）
森川 裕子（北里大生命科学研・教授）
榎並 正芳（金沢大学医学部生化学第一・助教授）

研究要旨. ツベルクリン反応に代わる結核菌感染補助診断方法を確立するため、結核菌特異的抗原遺伝子を抗原提示細胞に発現させ、それに対するT細胞の反応の有無を測定する系の確立を行った。樹状細胞をターゲットとする結核菌特異的発現ベクター構築の第一ステップとして、コドンを高等真核動物細胞での発現に適した使用に変換したBCG/結核菌共通抗原Ag85aをアデノウィルスベクターに組み込み、ウィルス粒子を得て、ウィルス感染細胞がAg85aを発現することを確認した。更に、コドン変換Ag85aをHIVgag末端に融合させシャトルベクターGAPプロモーター下流に挿入し、酵母細胞を形質転換し最終的にAg85aを発現するVLP(ウィルス様粒子)を得た。アデノウィルス、VLPをそれぞれ強力な抗原提示細胞である樹状細胞に感染させBCG接種マウスより得たT細胞と試験管内で反応させ、活性の指標として培養液中のインターフェロンガンマ(IFN γ)を測定した。この結果、Ag85a組み込みアデノウィルス感染樹状細胞をLPS刺激で成熟させると強いT細胞反応が惹起されることが明らかとなった。

A. 研究目的

迅速で敏感なBCGワクチン接種及び結核菌感染の判定を可能にする検査システムを確立する。このため、高等真核動物細胞のコドン読み枠に変換した、結核菌/BCG特異的遺伝子Ag85a及び結核菌特異的遺伝子ESAT6をアデノウィルスベクターに組み込む。第一ステップとして操作のしやすいモデル実験を組み、組み換えウィルスを試験管内で末梢血に感染させることにより、BCG及び結核菌に感作された小動物、あるいはBCG接種者由来Tリンパ球が特異的に反応し活性される至適条件を明らかにする。さらにこの条件を踏まえ、臨床検体を対象に、結核菌特異的遺伝子ESAT6組み込みアデノウィルスを用いた検査システムの特異性、感度を検討し、臨床診断薬としての有用性を検討する。同時に、この組み換えウィルスを呼吸器粘膜免疫をターゲットとした抗結核ワクチンとして利用し、その有効性を検討する。

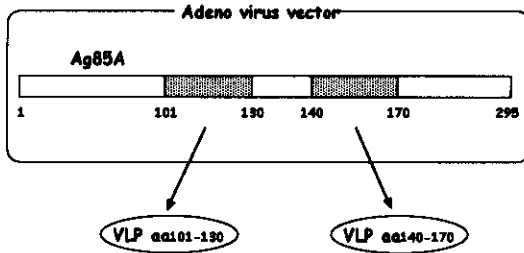
B. 研究方法

1. ツベルクリンに代わる新たな免疫学的診断法の開発

(1)Ag85a遺伝子組み込みアデノウィルス(pShuttle Ag85 GFP)はTong-Chenらの提供するA Symplified System for Rapid Generation of Recombinant Adenovirusesを用いて作製した(図1)。アデノウィルス作製過程では、E1E3遺伝子をもつ野生株の出現が問題になるが、E1E3非発現HeLa細胞を用いて野生株の混入がないことを確認した。

(2)Ag85a組み込みウィルス株粒子の作製 HIV gag 蛋白に相当するcDNA断片とAg85a抗原エピトープを融合し、シャトルベクターのGAPプロモーター下流に挿入した。このプラスミドを酵母細胞に導入し、酵母スフェロプラストの培養上清からVLPを精製した(図1)。

図1



(3) Ag85a組み込みアデノウィルスの樹状細胞への感染

正常BALB/cマウスの脾臓より樹状細胞を精製し、 2×10^5 の細胞をアデノウィルスをMOI50の条件下で感染させた。この際、GM-CSFを添加し、LPS存在下、非存在下で2日間培養した。

(4) Ag85a感染樹状細胞によるT細胞反応

1×10^7 cfuのBCGを皮下接種したBALB/cマウスの脾臓よりT細胞を精製した。T細胞 1×10^5 とウィルス感染樹状細胞を3日間培養し、培養上清中のインターフェロンガンマ (IFN γ) の濃度をELISAにて測定した。

(5) Ag85aエピトープ発現VLPを用いたT細胞反応

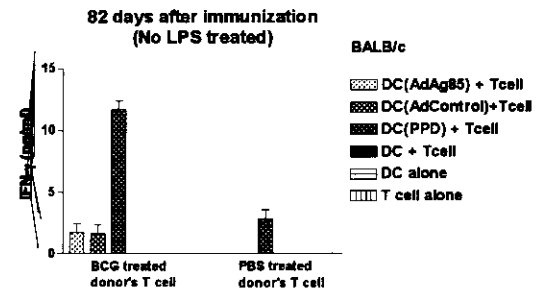
正常BALB/cマウスの脾臓より精製した樹状細胞培養中に $5 \mu\text{g/ml}$ の濃度でVLPを添加して、ここにBCG接種BALB/cマウスより得たT細胞 1×10^5 を加え3日後のIFN γ のレベルを測定した。

C. 研究結果

1. Ag85a組み込みアデノウィルス感染樹状細胞によるT細胞の反応

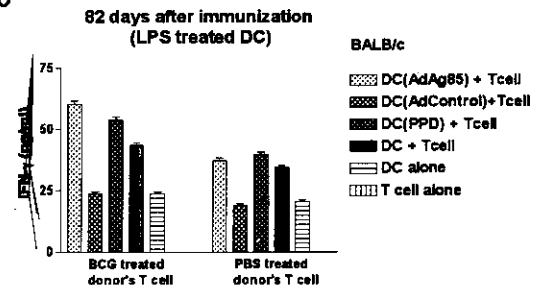
BCG接種後82日目にT細胞を精製し、組み込みアデノウィルスとの共培養の結果産生されるIFN γ の濃度を測定した。対照群としてT細胞にPPDを添加すると培養中に高いIFN γ の産生が認められたが、Ag85a組み込みアデノウィルス感染樹状細胞との共培養では認められなかった(図2)。

図2



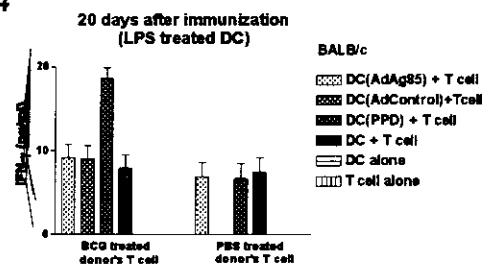
樹状細胞内で合成されるAg85aを効率良くMHC上に抗原提示させることを目的として、Ag85a組み込みアデノウィルス感染樹状細胞の成熟を促すために感染中にLPS存在下で刺激した後T細胞と共培養した。その結果、BCG接種マウスより得たT細胞はPPD刺激T細胞群と比較し高いレベルのIFN γ を産生することが明らかとなった(図3)。

図3



この反応は、コントロールアデノウィルス感染樹状細胞では惹起されず抗原特異的である可能性が推察された。しかし、この条件下において非感染樹状細胞とT細胞との共培養により中程度のIFN γ の産生が認められ、何らかの非特異的反応の混在も考えられた。一方、Ag85a組み込みアデノウィルス感染樹状細胞により誘導されるT細胞反応は、BCG接種後初期のT細胞に対しては認められず(図4)、

図4



この反応対象が記憶T細胞である可能性が推察された。またBCG感受性マウスであるC57BL/6マウスより精製したT細胞は同一条件下でAg85a組み込みアデノウイルス感染樹状細胞の刺激に反応しないことが示され、個体のBCG抵抗性との関係が示唆された。

D. 考察

本研究において、BCG菌・結核菌共通遺伝子を組み込んだアデノウイルスを作製し、このウイルスを樹状細胞に感染させて抗原提示細胞として用いた。抗原提示には樹状細胞の成熟が必要であり、アデノウイルスベクター感染樹状細胞をLPS刺激により成熟させた場合のみT細胞反応が誘導され、高いレベルのIFN γ の産生が認められた。しかし、非感染樹状細胞との共培養においてもT細胞からのIFN γ 産生が認められ、抗原特異的な反応の亢進のためには更に何らかの改善が必要であることが明らかとなった。現在抗原提示細胞とT細胞の比率に起因するT細胞反応抑制の可能性、及びLPS刺激のみならず、CD40刺激も考慮に入れた抗原提示細胞の成熟度のコントロールを検討中である。一方同様の目的で作製されたHIV gag-Ag85a発現VLPは、HIV gag VLPがTLRを介した刺激で樹状細胞を成熟させる著明なT細胞反応の誘導には至らなかった。

E. 結論

新規結核感染診断法の開発に必要なAg85a組み込みアデノウイルスベクターとgag-Ag85aVLPを作製し、その反応の特異性、感度を検討したところ、特にAg85a組み込みアデノウイルスベクターはその高い感度から、抗原非特異的な反応を抑制することで診断薬として有効に利用できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Toyama, H., S. Okada, M. Hatano, Y.

Takahashi, N. Takeda, H. Ichii, T. Takemori, Y. Kuroda, and T. Tokuhisa. Generation of memory B cells independent of germinal center formation. *Immunity* 17:329-339, 2002

(2) Tsunetsugu-Yokota, Y., H. Tamura, M. Tachibana, K. Ogata, M. Honda, and T. Takemori. Selective expansion of perforin-positive CD8⁺ T cells by immature dendritic cells infected with live *Bacillus Calmette-Guérin* mycobacteria. *J. Leuk. Biol.* 72:115-124, 2002

(3) Toda, M., M. Kasai, H. Hosokawa, N. Nakano, Y. Taniguchi, S. Inouye, S. Kaminogawa, T. Takemori, and M. Sakaguchi. DNA vaccine using invariant chain gene for delivery of CD4⁺ T cell epitope peptide derived from Japanese cedar pollen allergen inhibits allergen-specific IgE response. *Eur. J. Immunol* 32:1631-1639, 2002

(4) Takasuka, N., K. Enami, K. Kuroda, Y. Itamura, and T. Takemori. Intranasal inoculation of a recombinant influenza virus containing the exogenous nucleotides in the NS segment results in immune response against the exogenous gene product within the respiratory immune system. *Vaccine* 20:1579-1585, 2002

2. 学会発表

(1) 高橋宜聖, 稲嶺絢子, 吉岡絵美, 薄井正義, Wang Yatao, 須田貴司, 安達貴弘, 鏑田武志, 竹森利忠. Regulatory molecules for the maintenance of memory B cells. 第32回日本免疫学会総会. 2002年 東京

(2) 稲嶺絢子, 高橋宜聖, 手塚克成, 竹森利忠, 安部良. AILIM/ICOSによる抗原特異的B細胞産生・分化の制御. 第32回日本免疫学会総会. 2002年 東京

(3) 横田(恒次)恭子, 磯貝まや, 立川(川名)愛, 岩本愛吉, 竹森利忠, Brigitte Autran. HIV-1感染者のCD8陽性T細胞の機能に関する解析. 第32回日本免疫学会総会. 2002年 東京

(4) 橋本修一, 竹森利忠. 記憶B細胞に特異的に発現する細胞表面分子の探索. 第32回日本免疫学会総会. 2002年 東京

H. 知的財産権の出願・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 14 年度 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

γ -線照射処理抗酸菌による感染防御免疫の誘導

分担研究報告書

分担研究者

荒川 宜親（国立感染症研究所・細菌第二部部長）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

γ線照射処理好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・細菌第二部部長）
研究協力者 持田 恵子（感染研細菌第二部・研究員）

研究要旨 免疫抑制宿主においても安全に使用でき有効性のある抗結核ワクチン開発を目的に、γ線照射 BCG の感染防御免疫誘導能を調べた。BCG 生菌、γ線照射 BCG および加熱処理 BCG をモルモットに免疫し、遅延型過敏症誘導能、*in vitro* 殺菌活性およびサイトカイン産生誘導能を比較した。いずれのワクチンによっても遅延型過敏症は同程度に誘導され、免疫後 14 週目でも活性の低下は認められなかった。一方、γ線照射 BCG は生菌と同様、免疫後 10 週目に有意な殺菌活性およびサイトカイン産生誘導を示したが、14 週目にはこれらの活性は著減した。加熱死菌は 10 週目には殺菌活性誘導がなく 14 週目に初めて活性が発現し、生および半生ワクチンとは免疫誘導パターンが違うことが明らかにされた。

A. 研究目的

HIV 感染、自己免疫疾患、高齢化等の免疫低下宿主の増加を背景に、BCG に代わる安全な抗結核ワクチン開発が望まれている。本年度は BCG 生菌とガンマー線照射あるいは加熱処理により不活化した BCG ワクチンとを比較検討し、不活化条件の違いによるワクチン効果の差を明らかにした。

B. 研究方法

BCG の不活化は、⁶⁰Co を照射源にする γ線照射装置での 40 万ラド照射および 80°C で 3 時間加熱処理の両方法を用いた。ハートレイ系モルモットに BCG 生菌、ガンマー線照射 BCG、および加熱処理 BCG を皮内接種した。接種後 8 週および 12 週目に PPD に対する遅延型過敏症を、10 週および 14 週目に脾細胞による殺菌作用、TNF-α 産生および IFN-γ 遺伝子発現を調べた。なお、8 週目に遅延型過敏症を測定したモルモットは 2 週間の間隔を置いて、10 週目に *in vitro* 試験を行った。12 週および 14 週目の場合も同様に行った。In vitro 試験は、脾細胞培養に BCG または結核菌 H37Rv を感染させ、2 日後の菌の cfu を 7H10 培地でのコロニー形成を指標に殺菌

活性を測定した。同時に培養上清中の TNF-α 活性を L929 細胞に対する細胞傷害活性で、IFN-γ mRNA 発現を半量的定量的 RT-PCR で測定した。

C. 研究結果

各種 BCG 免疫後 8 週および 12 週目の遅延型過敏症はすべてのワクチンで有意に増強され、それぞれのワクチン間での有意差は認められなかった。この結果はすでに報告されているように、加熱死菌でも遅延型過敏症の誘導が可能であるということ了我々の系で追試したものである。

免疫後 10 週目では γ線照射 BCG 群でのみ有意な殺菌活性およびサイトカイン誘導活性増強が認められた。これに次いで生菌免疫群の活性増強が認められたが、γ線照射 BCG 群に比べ個体間でのばらつきが大きく非免疫群との間で統計的に有意な差とはならなかった。加熱処理 BCG 免疫群はサイトカイン産生誘導の増強は認められたが殺菌活性は認められなかった。

免疫後 14 週目の殺菌活性およびサイトカイン産生誘導は 10 週目とは全く異なっていた。BCG 生菌および γ線照射 BCG 群はすべての活性が顕著に低下し、非免疫群

との有意差はなかった。一方、加熱処理 BCG 免疫群のみがすべてに有意な活性を示し、10 週目には認められなかった殺菌活性も上昇していた。

D. 考察

γ -線照射 BCG のワクチンとしての性状は不活化ワクチンにも拘わらず BCG 生菌に近いものであった。このことは、10 週目に認められる防御活性が 14 週目には顕著に低下するという現象が BCG 生菌免疫群でも同様に見られることより明らかにされた。これほど短い期間に活性の低下が起こることは予想していないことだった。細胞性免疫を示す指標となる遅延型過敏症は、昨年報告したように免疫後 6 週目から今回の報告にあるように 14 週目までほとんど低下することなく維持されていた。しかしながら、防御活性の持続期間は短く、免疫後 10 週から 14 週目の間に低下した。これまで、防御活性が低下することを報告した例はないが、BCG 生菌または γ -線照射 BCG 免疫によっても感染防御免疫抑制が起こる可能性を示唆するものである。また、これまでの報告と同様、遅延型過敏症と防御免疫活性は相関しないことも確認された。

これまで加熱死菌では防御活性は誘導されないとされてきたが、我々の系では BCG 生菌あるいは γ -線照射 BCG 免疫群に遅れて加熱死菌免疫群の活性が出現することが明らかにされた。今回の結果が活性測定の時期の違いに基づくものか、あるいは加熱処理の条件や免疫量の違いに由来するものかは不明である。また、14 週目以降に活性の変動があるか否かについても今後検討すべき課題と思われる。

E. 結論

γ -線照射 BCG は不活化ワクチンであるにも拘わらず、BCG 生菌とほぼ同様の免疫誘導効果を示す。これらの生および半生ワクチンは早期に防御活性を誘導するものの活性の持続性に欠け、遅延型過敏症に代表される細胞性免疫が持続する時期でも顕著に活性低下を示す。加熱処理をした不活化

BCG は防御活性誘導が遅れて発現する。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 持田恵子, 荒川宜親. 結核菌および BCG の脂質代謝酵素遺伝子発現に関する研究. 第 77 回日本結核病学会総会 2002 年 4 月 東京

H. 知的財産権の出願・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 14 年度 厚生労働科学研究費補助金（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）