

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15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16(2004)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)	7
分担研究報告書:ガンマー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)	14
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)	16
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	32

平成15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. 抗酸菌感染症が現在抱える最大の問題点を克服するため、結核菌および非結核性抗酸菌症の新しい診断法および予防法の開発を目指し、以下の基礎的研究を展開した。ツベルクリン反応に代わる結核菌感染補助診断法を確立するため、結核菌/BCG菌特異的遺伝子 Ag85a 組み込みアデノウイルスベクターを作製した後、BCG菌感作マウス脾細胞を刺激したところ、ナイーブマウス脾細胞に比し有意に高いT細胞応答が観察された。細胞性免疫を利用した新たな診断法の開発が可能となった。非結核性抗酸菌の診断として臨床上最も問題となる *M. avium* complex (MAC) の血清診断法の開発を行った。MAC特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) に対する IgG, IgA, IgM 抗体を MAC 症患者血清を用い測定したところ、IgA 抗体が感度および特異性において最も有用であり、かつ疾患活動性を反映していた。さらに、病原性抗酸菌として *M. kansasii* と非病原性菌 *M. gastri* を迅速かつ簡便に鑑別する遺伝子診断法を開発するため、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法の検討を行った。両者は30分の短時間で識別可能となった。病原性遺伝子を同定するため、多彩な病変を惹起するらい菌をモデルとして、大腸菌-抗酸菌シャトルコスミドベクターを用い、らい菌 (Thai53株) ゲノムの全域をカバーするクローンセットを得た。これを用い既報の TN 型との遺伝子配列を比較検討したところ、19箇所両者の差異を認めた。これまで多様性に乏しいと想定されたい菌の分子疫学調査を可能とした。抗酸菌に対する宿主遺伝子反応を検索し、生体防御に関与する TLR2 と抗酸菌の細胞内潜伏に寄与する TACO は共にファゴゾームに局在し、拮抗的に作用している可能性が示唆された。抗酸菌に対する予防法、とりわけ新しいワクチンの開発に関し、以下の三項目について検討した。ガンマー線照射 BCG を作製し、BCG 生菌あるいは加熱死菌と比較するため、長期予防効果の検討を計画した。抗酸菌リポタンパク LpK の免疫学的特性を検討した。LpK のリピッドを構築するリポペプチドを合成したところ、TLR2 を介し NF- $\kappa$ B を活性化するものの、自然免疫に重要な樹状細胞 IL-12 p70 の産生には至らず、LpK をコードするタンパク成分が必要であり、リピッドとタンパクの両者が重要な役割を果たしていた。抗酸菌に対する生体防御反応としては細胞性免疫が最も重要であるが、抗酸菌に対する高い細胞性免疫反応を示す患者血清を用い、細胞性免疫を誘導する抗原として抗酸菌菌膜成分である MMP-II が新たに同定された。新しいワクチン候補分子として有用であると想定される。

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

抗酸菌感染症は全世界的脅威を与える細菌感染症の一つである。高齢者あるいは HIV-1 感染者等宿主細胞性免疫機能が低下した感染者では高い致死率を示す。従って、抗酸菌の制御には、迅速かつ高い特異性を持って感染早期に診断しなければならない。本研究班では、ツベルクリン反応に代わるより特異性の高い結核感染症に対する補助診断法の開発を目指した。また、非結核性抗酸菌感染症の新たな診断法の開発を二つの方策を用いて行った。第一には、非結核性抗酸菌が環境菌であることから、長時間炎症を惹起している宿主、すなわち非結核性抗酸菌症を特異性高く同定するための新たな血清診断法を開発した。さらに、従来病原性抗酸菌と非病原性抗酸菌を鑑別する方策は確立されていなかったため、両者を迅速に鑑別する遺伝子診断法を開発を行った。また予防法に関し、BCG 菌の効果に限りがあることは明白であり、新たな方策の必要性の議論の余地はない。新しい予防法の開発、とりわけワクチン候補分子の開発を種々の観点から行うことを目的とした。以下に主な研究課題を挙げる。

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. 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)
3. 非結核性抗酸菌感染症に対する LAMP 法を用いた高感度迅速鑑別診断法の開発 (牧野・向井)
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伝播経路の検討 (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機能解析と生体防御との関連性 (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 菌の生体防御反応誘導能 (荒川)
7. 本研究事業により新たに発見した抗酸菌リポタンパク LpK のリピッドと

タンパク構成成分の生体防御反応誘導における役割検討 (牧野・前田)

8. 抗酸菌に対する細胞性免疫反応誘導責任タンパク抗原の同定 (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、あるいは直接的に BCG 菌感染マウス T 細胞を刺激した。T 細胞の IFN- $\gamma$  産生を指標に T 細胞の抗酸菌による感作の有無を定量化する (竹森)。
2. 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、MAC 感染症患者血清中に存在する抗 GPL 抗体を ELISA 法で測定した (小林)。
3. 鑑別診断に有用な dnaA 領域内に、病原性抗酸菌 *M. kansasii* と鑑別が困難である非病原性抗酸菌 *M. gastri* を特定する LAMP 法用プライマーセットを設定し、感度および特異性を検討した (牧野・向井)。
4. 大腸菌—抗酸菌シャトルコスミドベクターを用いて、らい菌の全ゲノムをコードするコスミドクローンセットを確立した後、菌株間の多様性を規定するゲノム DNA 配列を探索した (牧野・中田)。
5. マクロファージ内の TLR2 や TACO の局在、抗酸菌を感染後の TACO の遺伝子・蛋白発現上の変化を検討し、HEK293 細胞に TACO を強制発現させた際の TLR2 のシグナルの変化を検討した。(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、結核菌に対する感受性、サイトカイン産生能を検索した (荒川)。
7. LpK, truncated LpK およびリポペプチドを用い末梢単球由来樹状細胞を刺激し、樹状細胞の表面抗原の発現程度および IL-12 p70 の産生能を測定した (牧野・前田)。
8. 抗酸菌菌膜を可溶化した後ゲルろ過法で細分画し、強い細胞性免疫反応を示す患者血清を用い抗原性に富む分子を同

定した。本抗原の自然免疫および獲得免疫賦活能を樹状細胞を用いて検索した(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した。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した。十分な理解と同意が得られた場合のみ遂行した(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った。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した。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った。

#### C. 研究結果

1. 結核菌/BCG 特異的遺伝子 Ag85a を組込んだアデノウイルスを、BCG 接種マウス脾臓細胞に直接感染させた場合、非接種マウスと比較して有意に高い抗原特異的 CD4 陽性記憶 T 細胞反応が惹起した(竹森)。
2. GPL 核抗原を用いた血清診断法は肺 MAC 感染症に対しては、感度・特異度共に高かった。血清抗体価は MAC 感染症の疾患活動性をも反映した(小林)。
3. *M. kansasii* と鑑別可能な *M. gastri* LAMP 法用プライマーセットを確立した。検出限界は PCR 法と同等であり、鑑別診断に要する時間は、PCR 法の 2 時間に対し 30 分であった(牧野・向井)。
4. らい菌ゲノム全域をカバーするコスミドクローンセットが得られた。らい菌 Thai53 株中 19 箇所のリピート配列でらい菌 TN 株とコピー数の相違が見られた。(牧野・中田)。
5. HEK293 細胞に TLR2 を発現させリガンドで刺激する系に TACO を強制発現させる

と、TLR2 からのシグナルが抑制された。(牧野・鈴木)。

6. 免疫から 14 週間までの遅延型過敏症誘導能はすべての BCG 菌で差が認められなかった。(荒川)。
7. LpK の N 末端 12 アミノ酸を含むリポペプチドは TLR2 を介し樹状細胞を刺激し、自己 T 細胞を活性化した。抗酸菌存在下でその効果はさらに増強された。(牧野・前田)。
8. 抗酸菌菌膜を検索し、細胞性免疫反応を賦活する因子として、Major Membrane Protein-II (MMP-II) が同定された。MMP-II は、樹状細胞を成熟化・活性化した。MMP-II パルス樹状細胞は、自己ナイーブ T 細胞を活性化させた(牧野)

#### D. 考察

*M. bovis* BCG は牛結核菌の弱毒株であり、日本では結核菌のワクチンとして広く用いられてきたことは周知の事実である。しかし、BCG のワクチンとしての有用性、とりわけ高齢者など細胞性免疫機能が低下した宿主においては、その抗結核予防効果はほとんど期待できない。一方で、結核感染症の補助診断としてツベルクリン反応が用いられてきたが、BCG 菌接種を受けたほとんどが陽性であり、日本においてはツベルクリン反応は結核感染の補助診断とはなり得ない。本研究において、アデノベクターを用いて効率よく結核菌抗原を樹状細胞に導入した場合、より強く抗酸菌感作 T 細胞が刺激された。さらに、この組み込み型アデノベクターで直接的に抗酸菌感作全脾細胞を刺激した場合も同様の結果が得られたことは、新しい体外診断薬の開発の可能性が強く示唆された。今後もヒト末梢血リンパ球を用いて研究が展開されるべきだと考えられる。

非結核性抗酸菌感染症の診断方法の開発も昨年度に引き続き研究が展開され、より高感度に、より特異性高く、そして、より迅速に血清および遺伝子の両面で診断が可能となった。両方法ともキット化し、臨床の場へのフィードバックが一日も早く実現

されることを期待したい。

抗酸菌症の予防法の開発においては、二つの研究プロジェクトで進展が見られた。抗酸菌特異的リポタンパク LpK は、文字通り脂質部分とタンパク部分から成る複合体である。リポタンパクは自然免疫の観点から全世界的に幅広く研究が進められてきたが、その中心は脂質と TLR2 との結合による NF- $\kappa$ B の活性化にあった。しかし、本研究で明らかのように抗酸菌に対する予防法を確立するためには、自然免疫と獲得免疫の両者が賦活される必要があるが、LpK によるこれら免疫機構の活性化には脂質とタンパクの両者が必要であって、従来報告されてきた脂質と TLR2 との結合だけでは不十分であった。このことは、LpK に限らず種々のタンパクワクチンを考える上で重要な知見を与えていると考える。二つ目のプロジェクトとして、抗酸菌に対する細胞性免疫を誘導するタンパク抗原として、新たに MMP-II が同定されたことの意義は大きいと考える。MMP-II は、末梢単球由来樹状細胞を介して自然免疫および獲得免疫の両者を活性化することが可能であった。今後、ワクチンとしての有効性を評価されなければならないが、抗酸菌感染症に対するワクチン開発にまた新しい道が示されたと考える。

#### E. 結論

細胞性免疫反応を利用した結核感染症に対する補助診断法が開発される可能性が示唆された。MAC 特異的抗原を用いた MAC 感染症血清診断法が開発され、体外診断薬としてキット化される可能性が示唆された。これまで鑑別が困難であった病原性抗酸菌と非病原性菌を鑑別する抗酸菌遺伝子診断法が開発された。らい菌ゲノム全域をカバーするシャトルコスミドによる整列クローンライブラリが確立され、らい菌株間に多様性が存在することが明らかとなった。抗酸菌感染細胞において、宿主の生体防御誘導因子と菌の細胞内潜伏因子がファゴゾームに局在することが示された。リポペプチドは樹状細胞の抗原提示能を増強する新た

な抗酸菌症免疫療法剤である可能性が示唆された。抗酸菌生体防御反応を司る新たな細胞性免疫賦活化抗原として MMP-II が同定され、新しいワクチン候補分子と想定された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yoshizawa, I., T. Mizuochi, A. Ogata, M. Murakami, H. Yagita, Y. Takahashi, T. Mizuochi, T. Takemori, and Y. Tsunetsugu-Yokota. Studies on the generation and maintenance of mucosal Cytotoxic T Lymphocytes against human immunodeficiency virus type-1 Gag in mice. *Aids Res. Hum. Retro.*, 19:469-479, 2003
- 2) Maeda Y., M. Gidoh, N. Ishii, C. Mukai, and M. Makino. Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae*-derived antigens. *Cell. Immunol.*, 222:69-77, 2003.
- 3) Maeda, Y., P. J. Brennan, and M. Makino. Studies of lipoproteins of *Mycobacterium leprae*. *Jpn. J. Leprosy*, in press, 2003.
- 4) Kai, M., Y. Maeda, S. Maeda, Y. Fukutomi, K. Kobayashi, Y. Kashiwabara, M. Makino, M. A. Abbasi, M. Z. Khan, and P. A. Shah. Active surveillance of leprosy contacts in country with low prevalence rate. *Intl. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, in press, 2003.
- 5) 牧野正彦. らい菌と樹状細胞の相互作用. *臨床免疫* 39(2):109-115, 2003.
- 6) Minamino, M., I. Sakaguchi, T. Naka, N. Ikeda, K. Kato, I. Tomiyasu, I. Yano, and K. Kobayashi. Bacterial ceramides and sphingophospholipids induce apoptosis of human leukaemic

cells. Microbiology 149:2071-2081, 2003.

- 7) Naka, T., N. Fujiwara, I. Yano, S. Maeda, M. Doe, M. Minamino, N. Ikeda, Y. Kato, K. Watabe, Y. Kumazawa, I. Tomiyasu, and K. Kobayashi. Structural analysis of sphingophospholipids derived from *Sphingobacterium spiritivorum*, the type species of genus *Sphingobacterium*. Biochim. Biophys. Acta., 1635:83-92, 2003.
- 8) Li, Y., Y. Kawamura, N. Fujiwara, T. Naka, H. Liu, X. Huang, K. Kobayashi, and T. Ezaki. *Chryseobacterium miricola* sp. nov., a novel species isolated from condensation water of space station Mir. Syst. Appl. Microbiol., 26:523-528, 2003.
- 9) 前田伸司、小林和夫. 医学細菌の分類・命名の情報. 17. 結核菌群のゲノム構造の相違を利用した分類. 感染症学雑誌 77:651-653, 2003.
- 10) 小林和夫. 見逃してはならない感染症. 最近の結核の動向. MB Derma 7831-36. 2003.
- 11) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会 (富岡治明、阿部千代治、飯沼由嗣、小栗豊子、鎌田有珠、古賀宏延、小林和夫、齋藤 肇、竹山博泰、長沢光章、長谷川直樹、樋口武史、本田芳宏、山崎利雄、和田光一). 抗酸菌検査の精度管理 (1). 市販培地の発育試験成績について. 結核 78:61-64, 2003.
- 12) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会 (富岡治明、阿部千代治、飯沼由嗣、小栗豊子、鎌田有珠、古賀宏延、小林和夫、齋藤 肇、竹山博泰、長沢光章、長谷川直樹、樋口武史、本田芳宏、山崎利雄、和田光一). 抗酸菌検査の精度管理 (2). 市販薬剤感受性試験培地の精度について. 結核 78:563-568, 2003.

## 2. 学会発表

### 国内学会

- 1) 牧野正彦, 前田百美. タイプ1細胞性免疫を誘導するらい菌抗原の探索. 第76回日本細菌学会総会2003年4月 熊本.
- 2) 中田 登, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 前田伸司, 松岡正典, 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 Thai53 株整列クローンライブラリの作製と遺伝子解析. 第76回日本細菌学会総会2003年4月 熊本.
- 3) 甲斐雅規, 藤田由希子, 矢野郁也, 牧野正彦. らい菌由来糖脂質の解析. 第76回日本ハンセン病学会総会・学術大会2003年7月 神戸.
- 4) 宮本友司, 武下文彦, 中田 登, 前田百美, 甲斐雅規, 牧野正彦, 向井 徹. 抗酸菌 Fibronectin Attachment Protein の機能解析. 第76回日本ハンセン病学会総会・学術大会2003年7月 神戸.
- 5) 前田百美, 遠藤真澄, 寺尾恵治, 牧野正彦. シュワン細胞とらい菌の相互作用の解明. 第76回日本ハンセン病学会総会・学術大会2003年7月 神戸.
- 6) 武下文彦, 向井 徹, 宮本友司, 牧野正彦. らい菌 Fibronectin Attachment Protein (FAP) を標的にした DNA ワクチンの検討. 第76回日本ハンセン病学会総会・学術大会2003年7月 神戸.
- 7) 甲斐雅規, 中田 登, 牧野正彦. 速発育性抗酸菌 *M. smegmatis* のトランスポゾン変異株ライブラリーの作製と解析. 第86回日本細菌学会関東支部総会2003年10月 横浜.
- 8) 宮本友司, 武下文彦, 中田 登, 前田百美, 甲斐雅規, 牧野正彦, 向井 徹. *Mycobacterium smegmatis* 由来 Fibronectin Attachment Protein の解析. 第26回日本分子生物学会年会2003年12月 神戸.
- 9) 牧野正彦, 前田百美, 木村博昭, 武下文彦, 稲垣勝也. らい菌感染マクロファージの抗原提示能の増強. 第33回日本免疫学会総会2003年12月 福岡.
- 10) 福富康夫, 牧野正彦. マクロファージ内



におけるらい菌増殖機構. 第 33 回日本免疫学会総会 2003 年 12 月 福岡.

- 11) 和田崇之、前田伸司、長谷 篤、小林和夫. 2003. Real-time PCR を用いた薬剤耐性結核菌の迅速診断法の開発. 日本細菌学会雑誌、58 : 174、2003. 第 76 回日本細菌学会総会 (熊本、4 月) .
- 12) 小林和夫. 2003. 21 世紀における感染症の脅威と対策 (ICD 制度協議会第 15 回 ICD 講習会) . 第 16 回日本外科感染症学会学術集会-プログラム・抄録集-、57、2003. 第 16 回日本外科感染症学会学術集会 (横浜、11 月) .
- 13) 持田恵子・荒川宜親. ガンマー線照射 BCG による免疫誘導に関する研究. 第 78 回日本結核病学会総会、2003 年 4 月 24 -25 日、岡山県倉敷市

#### 国際学会

- 1) Makino M., Y. Maeda, H. Kimura, and F. Takeshita. Up-regulation of antigen presenting function of mycobacteria infected macrophage. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 38<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Newark, USA, July 21-23, 2003.

#### 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15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

アデノウイ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 （免疫部・研究員）  
高須賀直美 （免疫部・研究員）

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法を確立するため、その第一ステップとして真核高等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を組み込んだアデノウイルスベクターを作成し、BCG感染マウスを用いてT細胞反応惹起の特異性、感度を検討した。その結果、Ag85a組込みアデノウイルスベクターは樹状細胞に感染し、LPS刺激を加えることで抗原提示細胞として用いることが可能であり、BCG接種マウスのT細胞反応を試験管内で強く惹起することが確認された。さらにBCG接種マウスの全脾臓細胞に直接感染させることによっても正常マウスより得た全脾臓細胞と比較して有意に高いレベルのIFN $\gamma$ を産生することが明らかとなった。またこの反応系における主要なIFN $\gamma$ 産生細胞はCD4陽性細胞であることも明らかにした。

呼吸器粘膜免疫を賦活できるベクターとして、インフルエンザウイルスを用い、そのNS1 segmentにAg85Aのアミノ酸の一部を挿入・発現させた組換え型ウイルスのマウスにおける増殖と免疫反応を検討した。その結果、組換え型ウイルスは、高度に弱毒化しており、ウイルスベクターそのものに対しては、顕著なCD8の反応を誘導したが、挿入遺伝子産物に対しては、ごく弱い細胞性免疫反応を誘導したにとどまった。

A. 研究目的

迅速で敏感な結核菌感染の判定を可能にする免疫学的補助検査システムを確立する。このため、真核高等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組込みアデノウイルスベクターを作製し、抗原提示細胞に発現させ、抗原特異的なT細胞反応を測定する系の確立を試みることを目的とした。第一ステップとして操作のしやすいモデル実験システムを組み、Ag85a組換えウイルスを試験管内で末梢血に感染させることにより、BCGに感作されたモデルマウスのT細胞の特異的な反応が計測可能となるか否かを検討した。このモデル実験に成功すれば、BCG接種者由来ヒト末梢血における検討を試み、さらにこの条件を

踏まえ、臨床検体を対象に、結核菌特異的高原遺伝子ESAT6組込みアデノウイ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ことを目標としている。

一方新規予防ワクチン開発のため、結核菌主要感染部位である呼吸器粘膜免疫を賦活させる系を確立することを目標とした。これまでに、レポーター遺伝子(cat)を組み込んだ弱毒インフルエンザウイルスが、マウス呼吸器粘膜に感染し、挿入遺伝子に対する細胞性免疫を賦活することを明らかにした。そこでインフルエンザベクターに、Ag85Aを組み込んだ組換え型ウイルスを作製し、その免疫原性をマウスモデルシステムを用い解析した。また、これまでのウイ

ルスとは表面抗原を変えた組換え型ウイルスを用いて、ワクチンの2回接種(prime-boost)の効果を検討した。

## 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 組み込みアデノウイ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、様々な細胞数の樹状細胞に対してアデノウイルスを MOI50 の条件下で感染させた。この際、GM-CSF を添加し、LPS 存在下で2日間培養した。

#### (2) Ag85a 組み込みアデノウイルス感染樹状細胞による T 細胞反応

$1 \times 10^7$  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  $1 \times 10^5$  とウイ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 $\gamma$ )の濃度を ELISA にて測定した。

#### (3) Ag85a 組み込みアデノウイルスの全脾臓細胞への感染

$1 \times 10^7$  cfu の BCG を皮下接種した BALB/c マウスの脾臓より全脾臓細胞を調整

し、様々な数の全脾臓細胞数に対して、アデノウイルスを MOI50 の条件下で感染させた。その際 LPS 存在下で3日間培養し、培養上清中の IFN $\gamma$  の濃度を ELISA にて測定した。

#### (4) Ag85a 組み込みアデノウイルスの全脾臓細胞への感染における、IFN $\gamma$ 産生細胞の同定

$1 \times 10^7$  cfu の BCG を皮下接種した BALB/c マウスの脾臓より全脾臓細胞より CD8 陽性細胞及び CD4 陽性細胞を選択的に除去した後アデノウイルスを MOI50 の条件下で感染させた。その際 LPS 存在下で3日間培養し、培養上清中の IFN $\gamma$  の濃度を ELISA にて測定した。

### 2. 新たな結核ワクチン作製のためのデリバリーの検討

#### (1) 組換え型インフルエンザウイルス株 (金沢大学榎並博士より供与された)

NS2Acat 株: 親株 WSN(H1N1)より、NS1 蛋白の C 末側を欠失させ、そこに自己切断活性を持つ FMDV 由来 2A protease 配列を挟ん

で、chloramphenicol acetyltransferase (cat) 全配列が発現するように挿入した株。

NSAg85A(40)H1N1 株: NS2Acat 株と同様に、Ag85A のアミノ酸 140-179 番をコードする配列を挿入した株。

NSAg85(40)H3N2 株: NSAg85A(40)H1N1 株の表面抗原を Udorn 株(H3N2)に変えた株。

#### (2) マウスの免疫

麻酔下にて BALB/c マウスの両鼻腔より組換え型インフルエンザウイルス  $5 \times 10^4$  あるいは  $5 \times 10^6$  pfu/head 投与した。追加免疫を行う場合は、3週-5週後に表面抗原の異なるウイルスを同じ dose 投与した。

#### (3) マウス肺内でのウイルス増殖の検討

ウイルス感染後、経時的に肺胞洗浄液と鼻腔洗浄液を採取し、MDCK 細胞に感染させ形成されるプラーク数を数えた。

#### (4) IFN- $\gamma$ ELISPOT assay

追加免疫後 10-12 日目のマウスより、胸部および頸部リンパ節細胞を調製した。これらの細胞  $1 \times 10^6$  に、インフルエンザウイルス NP の CD8 エピトープを含むペプチド (fluNP)、あるいは Ag85A の CD8 エピトープを含むペプチド (p15, p17) を  $2 \mu\text{M}$  添加して1晩刺激し、IFN- $\gamma$  を産生した細胞数を数えた。

#### (5) T 細胞の再刺激による IFN- $\gamma$ 産生

追加免疫後 10-12 日目のマウスより、胸部および頸部リンパ節の T 細胞を精製した。T 細胞を正常マウス脾細胞由来の抗原提示細胞と共培養し、WSN ウイルス蛋白あるいは PPD で刺激した場合の、上清中の IFN- $\gamma$  濃度を測定した。

## C. 研究結果

### 1. ツベルクリンに代わる新たな免疫学的診断法の開発

BCG 接種後 40 日以上経過したマウスより T 細胞を調整し、Ag85a 組み込みアデノウイルス感染樹状細胞と共培養し、その結果産生される IFN $\gamma$  の濃度を測定した。昨年までの結果より、ウェル当たりの至適樹状細胞数を決めることが重要と考え、あわせて検討を行った。ウェル当たりの樹状細胞数が  $1 \times 10^5$  個以上では昨年報告と同様に非特異的反応が高く、 $1 \times 10^3$  個以下では反応自体が有効に惹起されなかった、 $1 \times 10^4$  個の場合に非特異的反応が最小に抑えられ、特異的

反応が最大となることが明らかとなった。BCG接種後40日以上経過したマウスよりT細胞を精製し、Ag85a 組込みアデノウイルス感染樹状細胞との共培養の結果産生されるIFN $\gamma$ の濃度を測定した。この結果、ウェル当たり樹状細胞数が $1 \times 10^4$ 、T細胞 $1 \times 10^5$ の際に非特異的反応が最小に抑えられ、特異反応が最大となった(図1)。

最終目的である末梢血での測定に代えて、LPS共存下にて全脾臓細胞に直接Ag85a 組込みアデノウイルスを感染させて3日間培養して産生されるIFN $\gamma$ の濃度を測定した。その結果、BCG接種マウスより得た全脾臓細胞が、ウェル当たり $1 \times 10^6$ の時、正常マウスより得た全脾臓細胞と比較して有意に高いレベルのIFN $\gamma$ を産生することが明らかとなった(図2)。

この反応は、コントロールアデノウイルス感染では惹起されず抗原特異的であることが確認された。さらにこの反応系でのIFN $\gamma$ 産生細胞亜群を明らかにする目的で、脾臓細胞よりCD8陽性細胞及びCD4陽性細胞を選択的に除去した後にアデノウイルスをMOI50の条件下で感染させた。その結果、CD4陽性細胞を選択的に除去した場合IFN $\gamma$ の産生が有意に減弱することが明らかとなった(図3)。

## 2. 新たな結核ワクチン作製のためのデリバリーの検討

Ag85A 遺伝子の一部(アミノ酸140-179番)を組み込んだインフルエンザウイルスNSAg85A(40)H1N1 株 および NSAg85(40)H3N2 株を、 $5 \times 10^4$  pfu/dose 鼻腔内投与した場合には、鼻腔内および肺内におけるウイルスの増殖はみられなかった。高濃度( $5 \times 10^6$  pfu/dose)鼻腔内投与してもマウスに病的変化は認められず、4日後の肺胞洗浄液に弱い(max. $10^3$  pfu/lung)ウイルスの増殖が認められるのみであった。高濃度の組換え型ウイルスで免疫したマウスの局所リンパ節細胞をCD8ペプチドで刺激したところ、NPflu peptide 刺激では明らかなIFN- $\gamma$ 産生細胞の増加がみられたが、p15あるいはp17 peptide 刺激では、無刺激の場合との大きな差はみられなかった。NPflu 刺激のIFN- $\gamma$ 産生細胞の増加は、特にNSAg85A(40)H1N1 株で初回免疫し、

NSAg85(40)H3N2 株で追加免疫した場合に顕著となる傾向があった(図4)。

高濃度の組換え型ウイルスを、初回免疫時に3日間続けて3回投与し、さらに5週間後に追加免疫したマウスより、局所リンパ節T細胞を精製して、IFN- $\gamma$ 産生を調べたところ、PPD 刺激あるいはウイルス WSN 蛋白刺激によって、上清中のIFN- $\gamma$ 濃度が増加する傾向があった(図5)。

## D. 考察

### 1. ツベルクリンに代わる新たな免疫学的診断法の開発

本研究において作成した、結核菌/BCG 特異的遺伝子 Ag85a 組込みアデノウイルスは、樹状細胞に感染し、感染細胞で産生されたAg85a 抗原は、感染細胞の成熟に伴いBCG接種マウスのT細胞を試験管内で強く刺激することが確認された。さらにAg85a アデノウイルスをBCG接種マウスの全脾臓細胞に直接感染させることによって正常マウスより得た全脾臓細胞と比較して有意に高いレベルのIFN $\gamma$ を産生することが明らかとなり、我々が目標とした第一ステップに到達した。またこの反応系における主要なIFN $\gamma$ 産生細胞はCD4陽性細胞であることも明らかにした。

現在、ヒト末梢血を対象とし、ヒト検体を用いてBCG接種者由来のT細胞が特異的に反応し活性化される至適条件の検討を計画しており、これがうまく行けば最終目的である結核菌特異抗原遺伝子 ESAT6 を組み込んだアデノウイルスを作成し、ヒト臨床検体を用いて検討する予定である。

この検査システムは結核菌に感作されたT細胞の有無を明らかにすることから、陽性と判定されたとしても感染治癒後の免疫反応と活動型の感染における免疫反応を区別することが可能であろうか?この問題の解決のためには多数の臨床検体における測定値と病態との相関、あるいはIFN $\gamma$ 以外のT細胞活性のマーカーを指標とした解析も検討する必要がある。

ともあれ、この系の大きなメリットは感染に対する特異的な細胞性免疫反応を測定することが可能となることであり、今後の発展は結核菌のみならず他の感染症の細胞性免疫測定を可能にする系の確立の礎となる

であろう。

## 2. 新たな結核ワクチン作製のためのデリバリーの検討

Ag85A 遺伝子組換え型インフルエンザウイルスは、cat 遺伝子組換え型ウイルスと比較しても 10 倍以上弱毒であり、予想以上に弱毒化した。これは、ベクター部分の構造のみならず、挿入遺伝子配列によってもウイルスの毒性が大きく左右されることが示唆された。

ウイルス表面抗原の異なる株(H1N1, H3N2)を用いて、prime-boost を行い、胸部及び頸部リンパ節細胞をウイルス NP の CD8 epitope peptide で刺激したところ、IFN- $\gamma$  産生細胞を ELISPOT で検出することができた。しかしながら、Ag85A の CD8 epitope として報告されている p15, p17 peptide 刺激では、有意な spot 数増加が殆ど認められなかった。また、リンパ節 T 細胞を試験管内にて PPD にて再刺激したところ、上清中に IFN- $\gamma$  産生が認められたが、その値は低かった。今回用いた組換え型ウイルスでは、強い免疫誘導がみられなかったが、これは組換え型ウイルスが弱毒になりすぎたか、あるいは組み込んだ Ag85A の配列部分 (40 アミノ残基) の免疫原性が弱いためではないかと考えられる。今後更にインフルエンザウイルスベクターの改良が必要とされる。

## E. 結論

新規結核感染診断法の開発に必要となる Ag85a を組み込んだアデノウイルスを作成し、その反応の特異性、感度を検討したところ、非常に高感度に BCG 感染マウスの T

細胞反応を惹起できたことから、ヒト末梢血を用いた結核菌感染判定診断薬としても有効に利用できる可能性が強く示唆された。Ag85A 遺伝子の一部を NS segment に組み込んだ組換え型インフルエンザウイルスは、マウスにおいて高度に弱毒化しており、ごく弱い免疫原性が認められた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoshizawa, I., Mizuochi, T., Ogata, A., Murakami, M., Yagita, H., Takahashi, Y., Mizuochi, T., Takemori, T. and Tsunetsugu-Yokota, Y. Studies on the generation and maintenance of mucosal Cytotoxic T Lymphocytes against human immunodeficiency virus type-1 Gag in mice. *Aids Res. Hum. Retro.* 19: 469-479, 2003

### 2. 学会発表

なし

## 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

## IFN- $\gamma$ production by T cells co-cultured with adenovirus infected DC

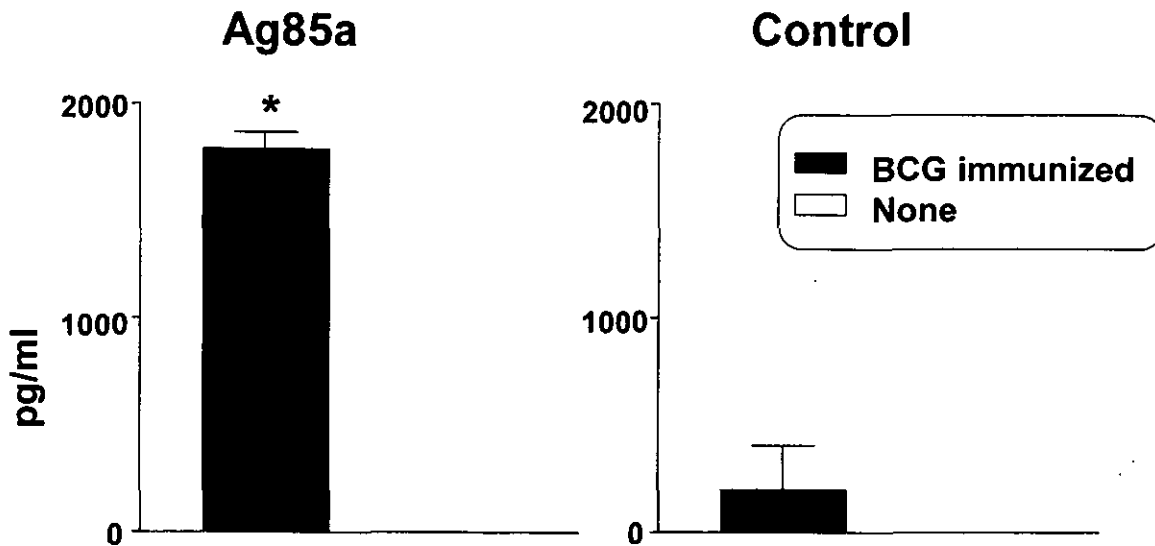


図1 ウェル当たり組込みアデノウイルスをMOI50で感染させた樹状細胞  $1 \times 10^4$ 個とT細胞  $1 \times 10^5$ でのIFN- $\gamma$  産生量

\*: P >0.001 vs control or none

## IFN- $\gamma$ production by whole spleen cells with adenovirus infection

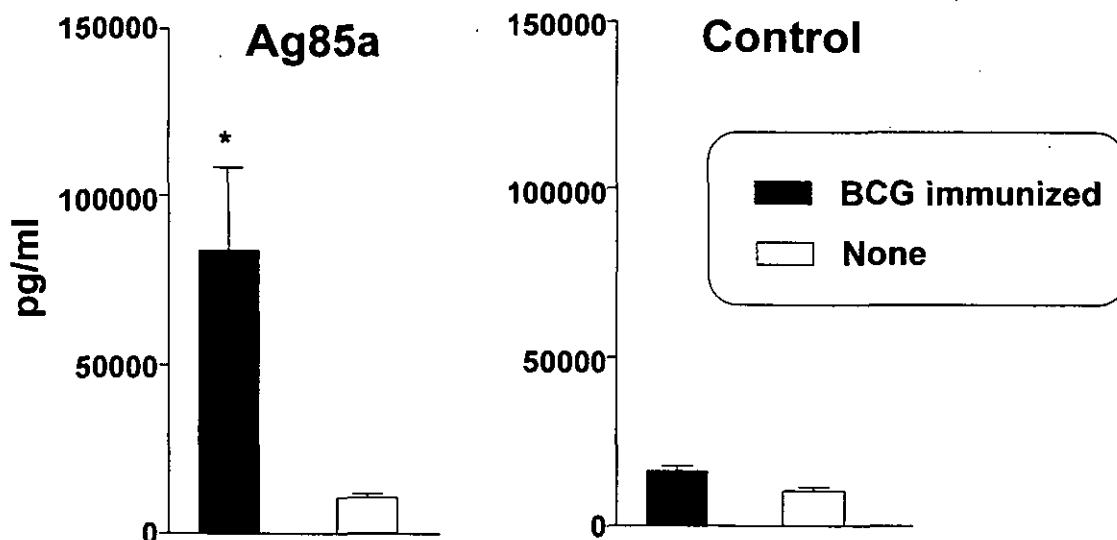


図2 全脾臓細胞をウェル当たり  $1 \times 10^6$ 個入れ、組込みアデノウイルスをMOI50で感染させた場合のIFN- $\gamma$  産生量

\*:P >0.001 vs control or none

## IFN- $\gamma$ production by whole spleen cells with adenovirus infection

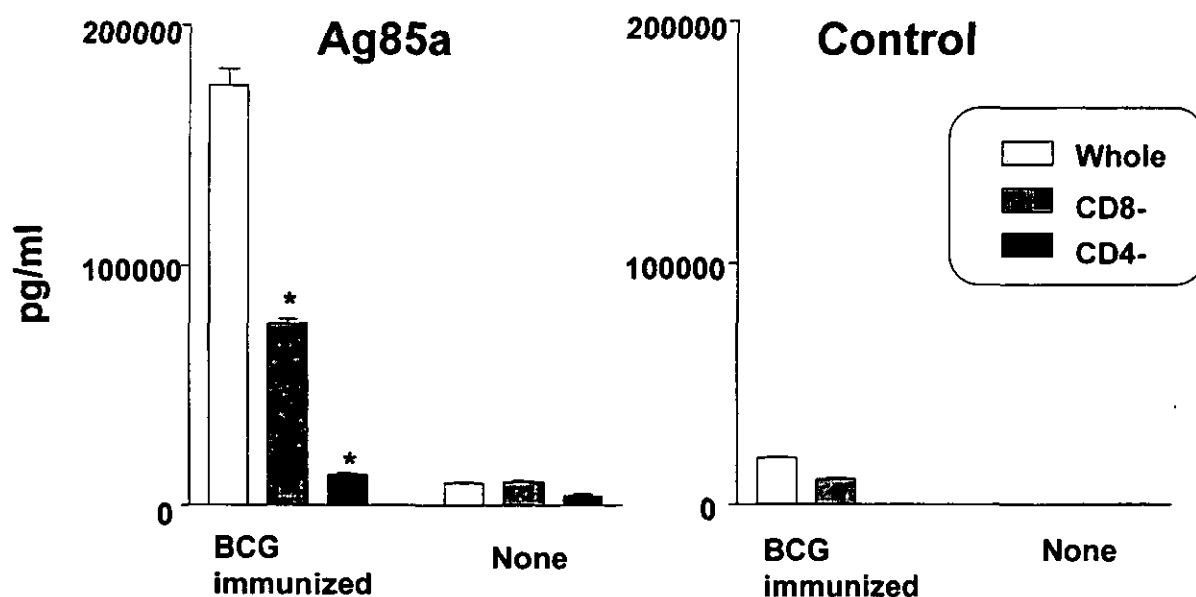


図3 全脾臓細胞、及びCD8陽性細胞、CD4陽性細胞を除去した脾臓細胞に組み込みアデノウイルスをMOI50で感染させた場合におけるIFN- $\gamma$ 産生量 \* : P > 0.001 vs whole

## IFN- $\gamma$ producing cell number in regional lymph nodes

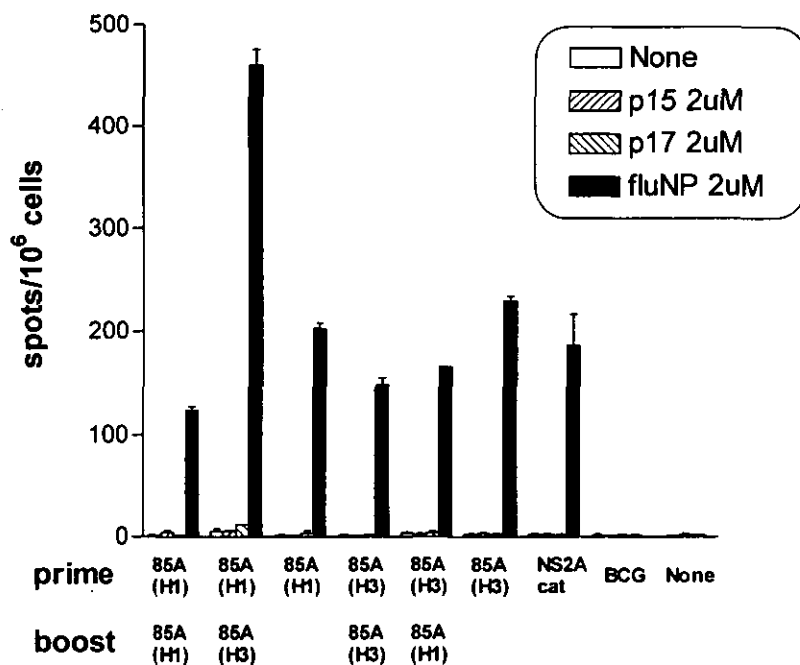


図4 免疫マウスの胸部/頸部リンパ節細胞を各種CD8エピートープペプチドで刺激した場合におけるIFN- $\gamma$ 産生細胞数



# IFN- $\gamma$ production from regional lymph node T cells stimulated with PPD or WSN proteins

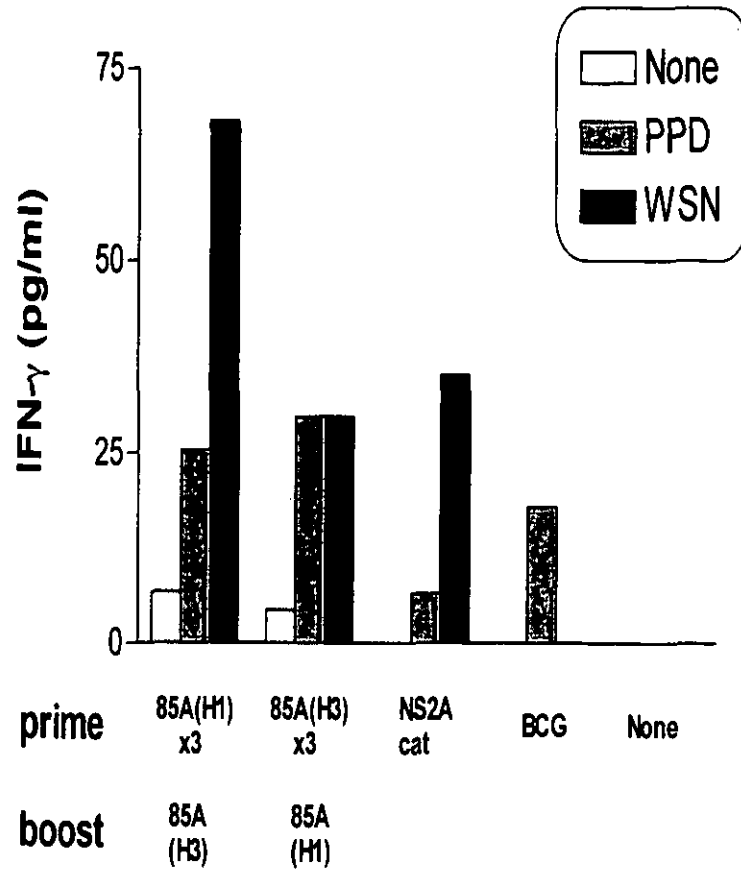


図5 免疫マウスの胸部/頸部リンパT細胞を、抗原提示細胞存在下において、結核菌PPDあるいはインフルエンザウイルスWSN蛋白で刺激した場合のIFN- $\gamma$ 産生量

平成15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）

$\gamma$ -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

ガンマー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・細菌第二部部長）  
研究協力者 持田恵子 （細菌第二部・研究員）

研究要旨. ガンマー線照射 BCG のワクチン効果を BCG 生菌および加熱死菌と比較した。本年度は、平成 14 年度に行った実験と同一のプロトコールで追試するとともに、前回用いたワクチン投与量（400 ug/モルモット）が生菌免疫としては high dose であったこと、加熱死菌免疫で抑制効果が認められないのは投与量が十分ではなかった、等の可能性を明らかにするため、low dose 生菌免疫群と high dose 死菌免疫群を追加して実験を行った。さらに、免疫効果の持続期間を明らかにするため、前年度の最長期間である 14 週間を上回る 55 週間後のワクチン効果についても実験を計画した（最終アッセイは平成 16 年 4 月以降）。結核菌噴霧感染実験を行うための予備実験を実施した。モルモット飼育条件を確立し、赤い色素を産生する腸内細菌であるセラチアを用いて噴霧感染装置の安全性および性能試験を行い、in vivo での感染実験によるワクチン効果試験系を確立した。

A. 研究目的

ガンマー線照射 BCG のワクチン効果を BCG 生菌および加熱死菌と比較する。特に、本年度は遅延型過敏症反応と抗菌活性持続期間を比較すること、BCG 死菌の過剰免疫による抑制活性の発現が可能か否かを明らかにすることを主たる目的とした。さらに、モルモットを用いた噴霧感染実験系を確立するための予備実験を行う。

B. 研究方法

ハートレイ雌モルモット（1 群 5 匹）に BCG 生菌（4 & 400 ug）、ガンマー線照射 BCG（400 ug）、加熱死菌（400 & 4000 ug）を皮下免疫し、8, 12, 53 週間後に PPD に対する遅延型過敏症を、10, 14, 55 週間後に in vitro でモルモット由来肺胞マクロファージおよび脾細胞へ結核菌感染実験を行った。感染 2 日後の上清中の TNF- $\alpha$  活性は L929 細胞を用いたバイオアッセイで測定し、感染細胞 RNA を用いた半定量的 RT-PCT によりサイトカイン遺伝子発現を、感染細胞の還元培養による菌量定量を行った。モルモット噴霧感染実験系確立の

ため、P3 動物実験施設の飼育チャンバーでラット用ケージでモルモットを飼育し体重増加を調べた。噴霧感染装置の安全性および性能を調べるため、セラチア（赤色のコロニーを形成する株）を用いて噴霧実験を行い、感染装置外部およびチャンバー内のスメアを培養した。

C. 研究結果

免疫から 14 週間までの遅延型過敏症誘導能はすべてのワクチンが有効であり、差が認められなかった。in vitro 感染実験は 1 年以上の期間を要するため、本年度中にすべての実験が終了せず、今後データの解析を行う予定である。

噴霧感染実験の安全性についての検討を行い、噴霧感染装置作動中の菌の漏れはなく、装置内チャンバーでのみ菌が回収され、菌の漏出が無い事を確認した。よって、有毒結核菌感染実験も安全に行えることが確かめられた。ラット用ケージでモルモットを飼育しても通常のモルモットケージで飼育した場合と同様に正常な体重増加を示すことがわかった。飼育チャンバーサイズの

都合上ラット用給水びんを用いることになり、1～2日おきに補給する必要があることが判明した。現状のままでは数週間から1年前後におよぶ実験の遂行が困難であるため、ケージ蓋および給水びんの形状改良が必要であった。

#### D. 考察

現行の唯一の結核ワクチンである BCG は小児において 80% の髄膜炎などへの重症化抑制効果が、50% の肺結核抑制効果が認められている。しかしながら、世界の結核患者の 8 割以上を占めるアジア・アフリカの結核蔓延地域は近年 HIV 感染者の急激な増加のため、弱毒菌である BCG によっても種々の副反応が生じ問題となっている。生菌に代わるより安全なワクチンが求められているが、成分ワクチンの有効性は BCG に程遠く、DNA ワクチンも単回投与では効果が低く複数回の投与を必要とするなどの煩雑さで実用性は低い。

ガンマー線照射 BCG は BCG 生菌と同等の免疫増強効果を示すことが明らかにされ、BCG 生菌に代わる有望な候補の一つに挙げられる。しかしながら、世界的レベルで見るとワクチン有効性は有毒結核菌の噴霧感染による感染死を防御できるか否かという実験により証明されることが不可欠であり、このデータなくしては最終的な結論は下せない。本年度、我々は結核菌噴霧感染実験の実現に向けて、P3 動物実験飼育条件、噴霧感染装置の安全性と性能の評価を行っ

た。その結果、モルモットを長期間飼育できる条件が整い、噴霧感染装置の使用が可能であることが確認された。今後、噴霧感染実験による有効性評価ができるものと期待される。

#### E. 結論

モルモットに結核菌を噴霧感染する実験系を確立した。ワクチン効果の長期間持続に関する研究は 1 年以上の期間を要するため、本年度中に実験が終了しなかった。

#### 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) ガンマー線照射 BCG による免疫誘導に関する研究 (持田恵子、荒川宜親)、第 78 回日本結核病学会総会、平成 15 年 4 月 24-25 日、岡山県倉敷市

#### 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