

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）

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

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

非結核性抗酸菌感染症は結核など抗酸菌感染症の約20%を占めているが、特に、*Mycobacterium avium complex* (MAC) 感染症は非結核性抗酸菌感染症の70-80%を占め、最頻である。MACは環境菌であり、普遍的に存在するため、臨床および病原体診断を確定には臨床経過を考慮し、長期間を要する。MACは特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) を有している。化学的にGPLは全てのMACに共通なGPL核と可変的な糖鎖部分から構成されている。本研究では、GPL核抗原を用いた迅速・簡便血清診断法の開発を目的とした。その結果、肺MAC感染症に対する感度はIgG抗体：72.6%、IgA抗体：92.5%、IgM抗体：78.3%、特異度はIgG抗体：92.2%、IgA抗体：95.1%、IgM抗体：91.0%であり、IgA抗体は感度および特異度ともに良好な成績を示した。また、IgA抗体の陽性予測力（陽性適中力：陽性結果が出た場合、当該疾患の存在する確率）は89.1%、陰性予測力（陰性適中力：陰性結果が出た場合、当該疾患の存在しない確率）は96.7%であった。また、血清抗GPL核抗原-抗体価はMAC感染症の疾患活動性を反映した。従って、血清抗GPL核-IgA抗体による血清診断はMAC感染症の診断や疾患活動性の評価に有用である。

A. 研究目的

非結核性抗酸菌感染症は結核など抗酸菌感染症の約20%を占めているが、特に、*Mycobacterium avium complex* (MAC) 感染症は非結核性抗酸菌感染症の70-80%を占め、最頻である。MACは環境菌であり、臨床および病原体診断の確定には臨床経過を考慮するため、長期間を要する。また、MACは抗微生物薬に対し多剤耐性を示すため、治療に難渋し、根治は困難である。行政的に、ヒト-ヒト感染がないため、「結核予防法」による隔離を要しないが、多くの肺MAC症患者は抗酸菌喀痰塗抹陽性の時点で保健所長に届けられ、隔離を余儀なくされているのが実情である。MACは特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) を有している。化学的にGPLは全てのMACに共通なGPL核と可変的な糖鎖部分から構成されている。本研究では、GPL核抗原を用いた迅速・簡便血清診断法の開発を目的とした。

B. 研究方法

米国胸部疾患学会および国立療養所非定型抗酸菌研究班の診断基準に合致した肺MAC感染症(106例)、無症候性MAC感染(11例)、肺*M. kansasii*感染症(30例)、喀痰培養陽性結核(77例)および健常者(126例)由来治療前血清を用い、MAC特異的GPL核抗原に対するIgG抗体を酵素抗体法により測定した。標準菌株のMACからGPL核抗原を分離・精製し、薄層クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーにて、化学構造を決定した。

なお、患者血清採取に際し、インフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

化学的にGPLは全てのMACに共通なGPL核と可変的な糖鎖部分から構成されている。従って、抗原決定基をGPL核と可変的な糖

鎖部分を用いて同定した。血清抗体は GPL 核抗原で吸収されたが、糖鎖部分では吸収されなかった。すなわち、GPL 抗原の抗原決定部位は GPL 核であることが判明した。従って、GPL 核抗原を用いた血清診断法の開発に着手した。

肺 MAC 感染症に対する感度は IgG 抗体：72.6%、IgA 抗体：92.5%、IgM 抗体：78.3%、特異度は IgG 抗体：92.2%、IgA 抗体：95.1%、IgM 抗体：91.0%であり、IgA 抗体は感度および特異度ともに良好な成績を示した。なお、無症候性 MAC 感染、肺 *M. kansasii* 感染症、喀痰培養陽性結核および健常者における陽性率は 10%以下であった。

また、感度および特異度に最も優れた IgA 抗体の陽性予測力（陽性適中力：陽性結果が出た場合、当該疾患の存在する確率）は 89.1%、陰性予測力（陰性適中力：陰性結果が出た場合、当該疾患の存在しない確率）は 96.7%であった。

多くの健常者が BCG 既接種であることから、抗 GPL 核抗体の測定は BCG 接種の影響を受けないことも判明した。すなわち、血清抗 GPL 抗体の測定は主要な肺抗酸菌感染症（MAC 感染症、*M. kansasii* や結核）を安全、迅速、かつ、効率的に診断することに寄与していた。

次に、抗 GPL 核抗体価と疾患活動性に関し、解析した。すなわち、抗微生物化学療法により、喀痰 MAC 陰性が 6 ヶ月以上持続した患者の治療前（活動期）および後（非活動期）の血清を用い、抗 GPL 核抗体価（IgG、IgA、IgM）を測定した。治療前抗体高値症例は治療後に抗体価の減少が顕著であった。個々の症例で変動はあるが、全体として、治療後に抗体価の有意な減少を示した。すなわち、血清抗 GPL 核抗体価の測定は MAC 感染症の診断のみならず、MAC 感染症の疾患活動性を反映することが示唆された。

D. 考察

GPL 核抗原は全ての MAC に共通に存在する MAC 特異的抗原であり、GPL 核抗原に宿主が抗体産生など液性免疫応答することが判明した。従って、産生された血清抗体を

酵素抗体法で検出することにより、MAC 感染症の診断が可能となった。特に、IgA 抗体は感度および特異度共に最も有用性が高く、MAC 感染症の血清診断に適切な抗原と考えられる。抗酸菌感染に対する宿主防御は細胞性免疫が担当しているが、液性免疫、特に、粘膜免疫に貢献している IgA 抗体が抗酸菌感染防御に関与している可能性を示唆している。

さらに、抗 GPL 核抗体価の変動／減少は疾患活動性を反映することから、抗 GPL 核抗体価の測定は MAC 感染症の治療評価にも有用である。

血清抗体の測定は体外診断であり、安全、迅速（所要時間：約 3 時間）、簡便、かつ、多検体処理が可能であり、MAC 特異的抗原を用いた血清診断は MAC 感染症の診療に寄与するであろう。

今後、より簡便な GPL 核抗原を用いた血清診断キットの開発、大規模臨床試験による評価、抗 GPL 核抗体の出現時期や抗 GPL 抗体の宿主防御における生物学的意義を解明したい。

E. 結論

MAC 特異的抗原を用いた迅速・簡便血清診断法を開発した。血清抗 GPL 核抗体の測定は MAC 感染症の診断や疾患活動性の評価に有用である。血清抗体の測定は体外診断であり、安全、迅速（所要時間：約 3 時間）、簡便、かつ、多検体処理が可能であり、MAC 特異的抗原を用いた血清診断は MAC 感染症の診療に有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Minamino, M., I. Sakaguchi, T. Naka, N. Ikeda, K. Kato, I. Tomiyasu, I. Yano, and K. Kobayashi. 2003. Bacterial ceramides and sphingophospholipids induce apoptosis of human leukaemic cells.

Microbiology 149: 2071-2081.

- 2) 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. 2003. Structural analysis of sphingophospholipids derived from *Sphingobacterium spiritivorum*, the type species of genus *Sphingobacterium*. Biochim. Biophys. Acta 1635: 83-92.
- 3) Li, Y., Y. Kawamura, N. Fujiwara, T. Naka, H. Liu, X. Huang, K. Kobayashi, and T. Ezaki. 2003. *Chryseobacterium miricola* sp. nov., a novel species isolated from condensation water of space station Mir. Syst. Appl. Microbiol. 26: 523-528.
- 4) 前田伸司、小林和夫. 2003. 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.
- 5) 小林和夫. 2003. 見逃してはならない感染症. 最近の結核の動向. MB Derma 78: 31-36.
- 6) 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、斎藤 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). 2003. 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.
- 7) 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、斎藤 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). 2003. 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.

2. 学会発表

- 1) 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).

- 2) 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).

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）

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

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・病原微生物部部长）
研究協力者	前田 百美	（病原微生物部・研究員）
	中田 登	（病原微生物部・研究員）
	向井 徹	（病原微生物部・第一室長）
	鈴木 幸一	（病原微生物部・第四室長）
	稲垣 勝也	（病原微生物部）

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を以下の通り展開した。1) 非結核性抗酸菌感染症の迅速鑑別法の開発研究。非結核性抗酸菌の迅速かつ簡便な遺伝子診断法の開発を、等温核酸増幅法および Loop-mediated isothermal amplification 法 (LAMP 法) を用いて行った。非病原性 *M. gastri* と病原性 *M. kansasii* を 30 分の短時間で鑑別し得た。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たらい菌ゲノム DNA ライブラリを、プラスミド型ベクターを用いたライブラリと抗酸菌染色体組込型ベクターを用いたライブラリの両者を作製した。前者では、127 個の異なるクローンでらい菌ゲノムの約 79% がカバーされ、後者では 307 個のクローンで約 99% がカバーされた。両者を用いるとらい菌ゲノムの全域をカバーした。そのクローンセットを *Mycobacterium smegmatis* に導入し、サルシュワン細胞株との相互作用を調べた。しかし、菌の細胞との接着や細胞内での菌の生存には影響は見られなかった。また、らい菌株間での遺伝子上の相違点を見出し分子疫学調査に利用するため、らい菌 Thai53 株のゲノム中の各種のタンデムリピートと既報の TN 株のものと比較した結果、19 箇所両者に差異を認めた。3) 抗酸菌感染による宿主遺伝子の変化。宿主の生体防御に関わる因子 (TLR2) と菌の細胞内潜伏に寄与する因子 (TACO) が、ともに抗酸菌感染細胞内のファゴゾームに局在し、シグナル伝達や発現量調節を介して拮抗的に作用し、感染後の予後を決定する因子の一つであることが示唆された。4) 病原性因子およびワクチン開発に関する研究。抗酸菌のリポ蛋白 LpK の N 末端の脂質付加領域が、細胞性免疫応答の誘導に重要な IL-12 の産生を規定することを明らかにした。LpK の N 末端 12 アミノ酸を含むリポペプチドを合成し、その免疫学的特性を検討した。抗酸菌は、樹状細胞と親和性を有するものの、IL-12 p70 産生・T 細胞の活性化の誘導能は低く抑制されている。しかし、合成した LpK リポペプチドを抗酸菌とともに用いると、樹状細胞から IL-12 p70 を強く誘導し、自己の T 細胞を強く活性化した。リポペプチドは抗酸菌に対する生体防御反応を司る上で重要な役割を担うことが可能であると考えられた。抗酸菌に対する生体防御反応として、CD4 陽性 T 細胞を中心とした細胞性免疫反応が最も重要であるが、本反応を誘導する抗原は未だ不明である。抗酸菌画分の中で最も抗原性に富んだ細胞膜をゲル濾過法で分画し、高細胞性免疫反応を

示す患者血清を用いスクリーニングした結果、細胞性免疫誘導性抗原として Major Membrane Protein-II (MMP-II) が同定された。精製 MMP-II は正常健常者末梢単球由来樹状細胞を成熟化させ、IL-12 p70 を産生し、さらに自己 CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞を活性化した。従って、抗酸菌菌膜中に存在する MMP-II は、抗抗酸菌生体防御反応を誘導する抗原の一つと考えられた。

A. 研究目的

高感度な遺伝子検査法として、PCR 法が最も普及している。しかし、特別な温度制御装置を必要とし、数時間の反応時間を要する。PCR 法を用いず、より短時間で非結核性抗酸菌を鑑別する分子生物学的技法を開発する目的で、一定温度の恒温槽のみにより目的遺伝子の増幅を行う Loop-mediated isothermal amplification 法 (LAMP 法) の応用を目的とした。病原性非結核性抗酸菌症として重要な *M. kansasii* と鑑別が困難である非病原性 *M. gastri* を鑑別する LAMP 法の開発を目指した。(担当：向井 徹)

これまでに、モデル抗酸菌として用いたらい菌ゲノム全域の約 98% をカバーするシャトルコスミドライブラリを得たが、らい菌遺伝子の機能解析を行う上では重複する DNA 領域を有する隣接したクローンを得る必要がある。そのためコスミドクローンの解析をさらに進めた。また、らい菌の神経親和性を規定する遺伝子を同定するため、得られたコスミドクローンセットを *M. smegmatis* に導入し、シュワン細胞株との相互作用について検討した。一方、らい菌は、菌株により増殖速度が異なることが報告されているが、これまでに、らい菌間にゲノム DNA の RFLP 分析パターン等に違いが見られていない。そこでらい菌菌株毎の特性を規定する遺伝子を探索するため、らい菌ゲノム中に存在する各種のタンデムリピートを検索し、得られたコスミドクローンを用いて Thai53 株の各リピートのコピー数を決定し、他菌株である TN 株と比較した。(担当：中田 登)

抗酸菌感染マクロファージにおいて、生体防御に関わる重要な因子として Toll-like receptor 2 (TLR2) がある。一方、細胞内潜

伏に関与する因子として tryptophan aspartate- containing coat protein (TACO) が同定されている。TLR は NF- κ B の活性化などの細胞内シグナルを伝達し、TACO はアクチンと結合するとともに、NADPH oxidase の p40phox subunit や Rac1 と複合体を形成する。従って、両者の間にシグナル伝達分子を介した相互作用が存在する可能性が考えられる。今年度は、抗酸菌感染症の新たな予防・診断および治療の標的とすべき宿主細胞因子の探索を行う目的で、TLR2 と TACO の相互作用について検討した。(担当：鈴木幸一)

近年、脂質附加を受ける抗酸菌由来蛋白 LpK は樹状細胞を成熟・活性化することが明らかとなった。LpK は免疫応答の方向性を運命付けるサイトカイン IL-12 p70 を強く誘導し、Th1 タイプ CD4 陽性 T 細胞及び Tc1 タイプ CD8 陽性 T 細胞を活性化する。今回は LpK リポペプチドを合成し、新たな予防法を構築するため免疫学的検討を行った。(担当：前田百美)

病原性抗酸菌に対するワクチンとして *M. bovis* BCG が用いられてきたが、近年その有効性に強い疑問がもたれ、新たなワクチンの開発が望まれている。これまで数多くのワクチン候補分子が種々の観点より評価されてきたが、信頼に足るワクチンの開発にまでは至っていない。本研究は、抗抗酸菌ワクチンの開発を目指す。その際、抗酸菌に対する細胞性免疫反応が作動し、病変の限局化をもたらす得る抗酸菌由来抗原を同定することが、ワクチン候補分子探索に直接的に結びつく重要な一方法と考えられる。従って、本研究では強い細胞性免疫反応を示す患者血清を用い、抗酸菌より目的とした抗原を同定することを最終目的とした。(担当：牧野正彦、稲垣勝也)

B. 研究方法

1) 非結核性抗酸菌感染症の迅速鑑別法の開発研究。非結核性抗酸菌の鑑別を行う際に、*dnaA* 遺伝子が有用であることをこれまでに報告した。そこで、*M. gastri* と *M. kansasii* の鑑別に主眼を置き、*M. gastri* の部分 *dnaA* 配列 AB087690、561bp を LAMP 法標的遺伝子領域とした。LAMP 法に必要とされる 6 領域から構成される 4 プライマーの選択は、LAMP 法プライマー設計プログラムを用いた。特に、*M. kansasii* との鑑別性を考慮しプライマーの設計を行った。各プライマーの特異性は、1.0 ng の *M. kansasii* もしくは *M. gastri* のゲノム DNA を用い評価した。緩衝液、*Bst* DNA ポリメラーゼを混合し、恒温槽にて 63°C、30 分インキュベート後、5%ポリアクリルアミドゲルに泳動を行った。対照として、同様の DNA 量を用い *M. kansasii* および *M. gastri* の鑑別 PCR 法を行った。検出感度は、DNA 1.0 ng より 10 倍希釈系列を作製、検出限界 DNA 量を決定した。また、PCR 法についても同様の検討を行い LAMP 法と比較した。

2) 抗酸菌病原性因子の検討。分離したらい菌 (Thai53 株) シャトルコスミドクローンの DNA 断片の両末端部の DNA 配列を決定し、既報のらい菌 TN 株ゲノム DNA 配列を参照して、Thai53 株ゲノム地図を作成した。染色体組込型ベクターである pYUB412 を用いたライブラリの中から約 150 の異なるコスミドクローンを混合しクローンセットを作製した後、*M. smegmatis* にエレクトロポレーション法で導入した。これにより、らい菌ゲノム DNA の部分断片を持つ *M. smegmatis* のライブラリを作製した。さらに、サルシュワン細胞株に感染させ、その影響をベクタープラスミド pYUB412 のみを導入した *M. smegmatis* と比較した。また、既報の TN 株のゲノム DNA 配列よりタンデムリピートを同定し、そのうち 37 箇所について、Thai53 株のタンデムリピートの塩基配列を決定し比較した。

3) 抗酸菌感染による宿主遺伝子の変化。抗酸菌症患者皮膚生検組織や培養マクロフ

ージにおける TLR2 や TACO の局在を免疫組織化学的に染色し、光学顕微鏡や共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。また、菌を感染させた後の TACO 遺伝子や蛋白発現変化について、Western blotting、Northern blotting およびレポーター遺伝子を用いた転写活性の検討を行った。さらに、発現ベクターをトランスフェクションすることにより TLR を発現させた HEK293 細胞をリガンドで刺激し、TLR からのシグナルを NF- κ B レポーター遺伝子活性として測定する系を確立し、その系に、さらに TACO を強制発現させることによる TLR シグナルの変化について検討した。抗 TACO ポリクローナル抗体は Pieters から供与を受け、TACO cDNA プロブは RT-PCR にて作製、ヒト TACO プロモーター領域は、ヒトゲノム DNA からクローニングし、ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を持つプラスミドに挿入した。

4) 病原性因子およびワクチン開発に関する研究。樹状細胞 (DC) は正常健常者末梢血単球より rGM-CSF および rIL-4 を用いて分化誘導した DC に、抗原または抗酸菌でパルスし、その細胞表面抗原を、FACScalibur を用いて解析した。LpK の N 末端の 12 アミノ酸を含むリポペプチドは生化学的に合成した。リポペプチド LpK の構造は Palmitoyl-Cys (2,3-di (palmitoyloxy)-propyl)-Leu-Pro-Asp-Trp-Leu-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr-Gly-Gly-OH である。IFN- γ 、IL-10 及び IL-12-p70 の測定は BD Pharmingen の OptEIA キットを用いて半定量的に行った。抗 TLR2 モノクローナル抗体は Genentech 社から分与をうけた。DC を MMP-II を用いて刺激した際、DC より産生される IL-12 p70 は ELISA 法にて測定した。MMP-II パルス DC の抗原提示能は、自己 CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞をレスポナー細胞として用い T 細胞から産生される IFN- γ を指標に評価した。抗酸菌が保有し、T 細胞を中心とした細胞性免疫反応を誘導し得る抗原の探索は以下の通り行った。抗酸菌を分画し、抗酸菌菌膜を得た後、可溶化し、さらに、ゲル濾過法にて分画した。各分画を DC にパルスし、それぞれの菌膜分

画の抗原性を抗原パルス DC の抗原提示能により測定した。また、抗酸菌に対する細胞性免疫反応を示す患者より得た血清を用い、菌膜をウェスタンブロット法で検索し、抗原性の強い菌膜分画に共通して存在するバンドを得た。このバンドを抽出し、得られたタンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定し、目的としたタンパク質を同定した。得られたタンパク質をコードする遺伝子を PCR 法にて増幅した後、大腸菌に挿入し精製タンパクを得た。

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、さらに拒否し得ることを説明した上で理解(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法の開発研究(担当: 向井 徹)。 *M. gastri* の選択的増幅のため数種のプライマーセットを検討した。その結果、反応の安定性と特異性の観点より F3-2、F2-2、F1-2、B1-2、B2-2、B3-2 を選択し forward internal primer (FIP-2) および backward inner primer (BIP-2) とし、Dna Gas-2 プライマーセットを構築した(図 1)。本プライマーセットでは、*M. kansasii* DNA の増幅は認められず、PCR 法と同等の特異性を有していた(図 2)。次いで、10 倍希釈系列を用い感度を決定したところ、10ng ゲノム DNA まで良好な LAMP 法の遺伝子増幅パターンであるラダーが観察され、PCR 法と同程度の感度が得られた(図 3)。

2) 抗酸菌病原性因子の検討(担当: 中田 登)。らい菌ゲノム DNA ライブラリについて、昨年度までに解析した 400 のクローンに加え、新たに約 600 クローン

の分析を行った。プラスミド型シャトルコスミドベクターを用いて得た 127 クローンをを用いると、ゲノム全体の約 79% がカバーされた。一方、染色体組込型ベクターで得た 307 クローンをを用いるとゲノム全体の約 99% がカバーされた。両者を組み合わせ用いると、らい菌ゲノム全域(100%) をカバーするクローンセットが得られた。

らい菌の神経親和性因子の同定のため、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を構築し、*M. smegmatis* に導入し、シュワン細胞株に感染させた。しかし、シュワン細胞の表現型に有意な機質的变化は誘導しなかった。しかし、らい菌 TN 株のゲノム中に存在する各種のタンデムリピートの検索を行い、37 領域について新たに構築した Thai53 株コスミドクローンから得たリピートのコピー数と比較すると、19 の領域で両者に相違が見られた(表 1)。

3) 抗酸菌感染による宿主遺伝子の変化(担当: 鈴木幸一)。TLR2 と TACO は、抗酸菌症患者皮膚組織中の抗酸菌を貪食したマクロファージにおいて、ともに免疫組織化学的にファゴゾーム膜に局在していた。また、培養マクロファージに抗酸菌を感染させると、同様に菌周囲に TLR2 と TACO が局在することを共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて明らかにした。

HEK293 細胞に TLR2 発現ベクターを NF- κ B 依存性ルシフェラーゼレポーター遺伝子を含むプラスミドとともにトランスフェクションした後に抗酸菌を感染させると、NF- κ B の活性化が観察された。そこに、TACO 発現ベクターによって TACO を強制発現させると、TLR からのシグナルが抑制されることが判明した。また、培養マクロファージに抗酸菌を感染させると TACO 遺伝子のプロモーター活性が低下し、時間とともに TACO mRNA および蛋白量は低下した。

4) 病原性因子およびワクチン開発に関する研究(担当: 前田百美、稲垣勝也、牧野正彦)。正常健常ヒト末梢血単球から樹状細胞を得て、LpK リポペプチドでパルスす

ると、DC の膜表面抗原である、HLA-ABC、HLA-DR、CD83、CD86 の発現がリポペプチド 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を上限に濃度依存性に上昇した。抗酸菌存在下で樹状細胞をリポペプチドで刺激すると、さらにこれらの表面抗原の発現量が上昇した (図 4)。リポペプチドによる樹状細胞の IL-12 p70 誘導能を検索すると、リポペプチド濃度依存的 (0-0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に産生した (図 5)。抗酸菌存在下ではリポペプチド単独に比し、2 倍弱の IL-12 p70 が産生された。リポペプチドの特異性を検索するため、CD40L をリポペプチドの代わりに用いたが、IL-12 p70 産生増強は観察されなかった。Toll-like receptor2 (TLR2) は細菌由来リポ蛋白並びにリポペプチドの認識に重要な役割を果たす可能性が示唆されている。そこで、リポペプチド LpK と TLR2 の機能的相互関係を検索した。中和活性を有する抗 TLR2 抗体であらかじめ樹状細胞を処理した後リポペプチドをパルスし、抗原提示細胞として自己の CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞の活性化を IFN- γ 産性能を指標に調べた。図 6 で示すように、リポペプチド LpK (0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) でパルスした樹状細胞は有意に CD4 陽性 T 細胞を活性化したが、抗 TLR2 抗体の前処理により抗原提示能は抑制された。次に、抗酸菌存在下で樹状細胞をリポペプチドで刺激すると、T 細胞の活性化は有意に上昇し、TLR2 抗体処理によりリポペプチドによる T 細胞活性化上昇効果は抑制された (図 7)。細胞性免疫反応を伴う患者によって認識されている抗原は、樹状細胞表面に発現している可能性が高い。そこで、抗酸菌感染樹状細胞を検索したところ、感染 DC は患者血清および抗酸菌細胞膜に対するポリクローナル抗体で検出される抗原を細胞表面に発現していた。しかし、抗酸菌菌壁あるいは細胞質に対する抗体とは DC は反応しなかった。そこで、抗酸菌菌膜を可溶化し、さらに、ゲル濾過法により菌膜を分画した。ゲル濾過各分画には種々のタンパクが含まれていることを銀染色で確認した後、それぞれの菌膜画分を DC にパルスし、その抗原性を検索した。DC により刺激された T 細胞

から産生される IFN- γ を指標にすると、2 つのフラクションに CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を刺激し活性化する抗原が含まれていると考えられた。そこで、患者血清を抗酸菌の細胞壁と細胞質で吸収した後、ウェスタンブロット法で上記フラクションを検索し、両者に共通して存在するバンドを抽出し、その N 末端アミノ酸配列を解析した。その結果、細胞膜の主要タンパク成分である Major Membrane Protein-II (MMP-II) が同定された。そこで、T7 expression system を用い、大腸菌で MMP-II を産生し精製し、以下の実験に用いた。まず、MMP-II の抗原性について検索した。MMP-II を DC にパルスしたところ、DC 表面の HLA-ABC、HLA-DR、CD86 および CD83 抗原の発現量が MMP-II の濃度依存性に増強した。また、DC を MMP-II で刺激すると IL-12 p70 が産生され、マクロファージを刺激すると IL-10 が産生された。いずれも MMP-II の量に依存性であった。そこで、MMP-II がこれら抗原提示細胞を活性化する機序を解明する目的で、TLR2 との関連について検索した。TLR2 は、抗酸菌に対する自然免疫を活性化する抗原提示細胞のレセプターとして知られている。TLR2 遺伝子を導入した HEK293 細胞を MMP-II で刺激したところ、MMP-II の濃度依存性に HEK293 細胞内のレポーター遺伝子が活性化され、MMP-II が抗原提示細胞を刺激する際に、TLR2 が重要な役割を果たしていることが判明した。さらに、MMP-II パルス DC を用いて、自己の CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞を刺激したところ、MMP-II の濃度依存性に T 細胞が活性化され IFN- γ が産生された。しかし、TH2 サイトカインである IL-4 は産生誘導されなかった。また、T 細胞の活性化は CD4 陽性 T 細胞優位であり、抗原パルス DC を外来性 CD40L で処理すると、DC の T 細胞活性化能はさらに増強した。また、MMP-II パルス DC は、ナイーブタイプの T 細胞をも活性化し IL-2 を産生させた。

D. 考察

今回構築した、*M. gastri* と *M. kansasii*

を鑑別する LAMP 法は、定温の恒温槽で反応を展開する利点に加え、PCR 法と同等の遺伝子増幅能を有していた。また、PCR は約 2 時間の反応時間を要すが、LAMP 法は 30 分で同程度の解析が可能であり、遺伝子検出法として迅速かつ簡便であった。しかし、プライマーの設定には、非特異反応の出現を防止し、再現性に富んだ適切なプライマーの設計に充分配慮する必要性があり、臨床応用には十分な検討が必要と考えられる。

約 1000 のコスミドクローンを解析し、434 の異なるクローンを用い、らい菌ゲノム全域をカバーするクローンセットが完成された。本セットは、らい菌の神経親和性や薬剤耐性などの責任遺伝子の同定等の解析に有用と考えられる。

この中で、今回は末梢神経障害の直接的原因となるシュワン細胞のアポトーシスを誘導する遺伝子の同定を試みたが、成功せず、今後はクローンセットではなく個々のクローンを用いた解析が必要と想定された。

これまでらい菌ゲノム DNA は株間の多様性に乏しいと考えられてきたが、ゲノム中の多くのタンデムリピートが株により種々のコピー数を有することが明らかとなった。調べた 37 リピートのうち、19 リピートで TN 株と Thai53 株間にコピー数に差異が見られた。このうち、ゲノム上で 2658192、347280、442993、1116443、1531185、2597735、984591、1816855、1381661 の位置にある 9 リピートは Open Reading Frame 内に存在することから、遺伝子発現に基づきタンパク質の構造に影響を及ぼすと考えられる。増殖速度など機能上の変化も誘導される可能性が考えられる。また、こうした株間の違いは、らい菌の感染経路の特定にも繋がる可能性がある。

抗酸菌感染細胞において TACO がファゴゾーム膜に局在変化することは、菌の細胞内持続感染を可能にする要因の一つであると考えられた。また、TACO の発現が TLR からのシグナルに対して抑制的に作用することは、両者が菌の生存と排除という拮抗する働きを持っていることと矛盾しない所見であると考えられた。一方、感染により、

細胞全体として TACO の発現量が減少し、細胞膜における局在が消失した。このことも、菌にとって同様に有利に働くか否か、また、これが TLR を介したシグナルによるものかどうかについては不明である。これらの蛋白分子の相互作用は、ファゴゾーム膜の微小ドメイン構造において行われると想定されるが、これらの点は今後明らかにすべき重要な課題である。

これまでの実験で、N 末端の脂質付加領域を含む LpK の 82 アミノ酸が樹状細胞活性化に関わっていると考えられた。そこで N 末端の 12 アミノ酸を含むリポペプチドを合成し、樹状細胞にパルスした結果、リポペプチド単独の IL-12 p70 産生誘導能はリポ蛋白 LpK より低かったが、抗酸菌存在下では有意に増強された。リポペプチドを用い刺激した樹状細胞は成熟化および活性化し、CD4 陽性 T 細胞を活性化した。さらに、リポペプチド LpK は TLR2 をそのリガンドとして用い、自然免疫および獲得免疫の両者を賦活するものとして、今後の抗酸菌感染症に対する免疫療法剤として成長することが期待される。細胞性免疫反応は、抗酸菌感染症に対する生体防御反応の中心的役割を果たす。しかし、これまで抗酸菌を構成する成分の中で、宿主細胞免疫応答を有効かつ効率的に活性化する分子については同定されていない。細胞性免疫賦活能を有する抗原の同定は、抗酸菌感染症に対するワクチンの開発に直接的に結びつくため、極めて重要な研究課題である。本研究においては、抗酸菌に対して強い細胞性免疫反応を示す患者血清と、抗原性に富む抗酸菌菌膜を用いて上記抗原の同定を試みた。その結果として MMP-II が同定された。MMP-II は、1990 年に major native protein として同定され、1994 年に Bacterioferrin と同一分子であることが明らかにされたが、その抗原性、特に細胞性免疫賦活能については未検索のまま放置されてきた。本研究を通じ、MMP-II は DC を活性化・成熟化し、IL-12 を産生し、またマクロファージを刺激し IL-10 を産生することが判明した。さらに、DC に MMP-II をパルスすると、自己

の T 細胞を活性化・タイプ 1 CD4 陽性およびタイプ 1 CD8 陽性 T 細胞を活性化した。これらのことは、MMP-II は自然免疫 (innate immunity) および獲得免疫 (adaptive immunity) の両者を活性化することを示すものである。また、自然免疫の活性化には抗原提示細胞上の TLR2 が MMP-II ligand として作用している可能性が強く示唆された。

今後、MMP-II が実際に抗酸菌感染症患者の細胞性免疫活性化にどのように関与するか更なる検索が望まれる。

E. 結論

M. gastri と *M. kansasii* を鑑別する LAMP 法の構築に成功した。他の非結核性抗酸菌へ応用が期待される。らい菌ゲノムの全域をカバーする大腸菌-抗酸菌シャトルコスミドクローンのセットを得た。これにより、らい菌菌株間に多様性が存在することが明らかになった。抗酸菌感染細胞において、宿主の生体防御に関わる TLR2 と菌の細胞内潜伏に寄与する TACO が、拮抗的に作用している可能性が示され、両者のバランスが感染後の予後決定因子の一つと考えられた。

リポペプチド LpK はアジュバント作用を有し、TLR2 を介し樹状細胞を刺激し、タイプ 1 細胞性免疫を賦活することが明らかとなった。免疫療法剤の一候補と考えられる。抗酸菌感染症に対する免疫反応を誘導する菌体成分として MMP-II が同定され、精製 MMP-II は自然免疫および獲得免疫の両者を賦活することが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 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, 2004.
- 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, 2004.

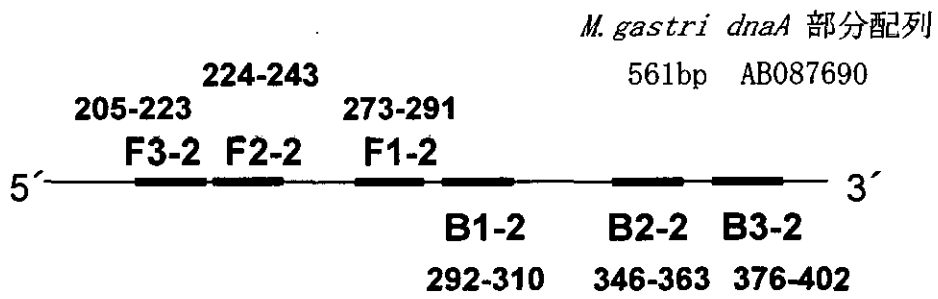
2. 学会発表

- 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) 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. 38th 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

ゲノム上の位置	リピート配列	TN株でのコピー数	Thai53株でのコピー数	コスミドクローン
1414666	A	9	9	B321, B759
976857	G	9	9	B403, B147
2658192	C	9	10	B703, A217
347280	G	10	14	A12
442993	G	10	11	B314, B876
1309544	G	11	11	B872, B668
1116443	G	12	9	B139, B633
1987156	C	16	15	B59, B837
312039	C	20	9	B751, B787, B417
2947291	CG	6	6	B859, A57
1531185	CA	8	11	B136, B125
2211035	AC	8	7	B853
1452573	AC	9	7	B327, B413
2507097	CA	6	6	B706, B488
3221617	TA	8	8	B750, B792
2844971	TA	9	9	B401, B421
1744091	TA	10	11	A8, B611
308815	TA	13	22	B751, B463
2951821	AT	10	9	B859, A57
2597735	AT	17	13	A210, A90, B120
984591	TA	18	20	B147, B661
1980041	CCA	5	5	B837, B332
2567251	GTG	6	6	B705, B376
1237528	AGT	5	5	B883, B744
1293503	AGT	5	5	B794, 872
2656108	ACT	5	5	B793, B703
2583814	GTA	9	11	B705
2785435	GAA	21	14	B2
2562391	CACCG	3	3	B705
1190343	GATGTC	3	3	B846
2302531	GATCAC	3	3	B61, B393
1816855	CCTGCA	7	6	A45, B173, B28
285076	GCGTGCC	3	3	B865, B216
1381661	CCTCAACAACCT	5	4	B867, B151
14227	AT	7	8	B416
337466	T8A6	8, 6	8, 6	A12, B226
514181	T6N7T8	6, 8	6, 8	B10, B606

表 1. らい菌ゲノムに見られるタンデムリピートの比較。らい菌 TN 株と Thai53 株でコピー数に違いが見られたものは太字で示した。



Dna Gas-2 primers set

- FIP: F1c-2=F2-2
- BIP: B1c-2=B2-2
- F3-2
- B3-2

図1. LAMP法プライマー設定位置

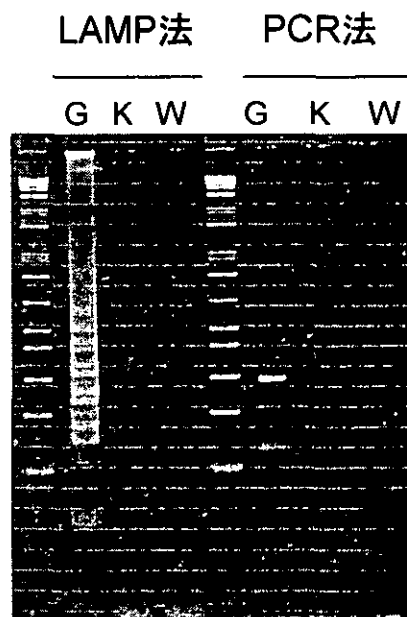


図2. LAMP法とPCR法の特異性比較

DNA種 G; *M. gastris*, K; *M. kansasii*, W; water

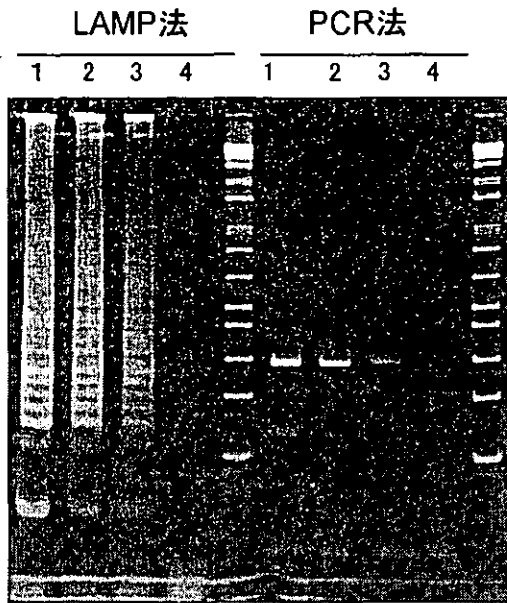


図3. LAMP 法と PCR 法の検出感度比較

DNA 量 1: 1ng, 2: 100pg, 3: 10pg, 4: 1pg

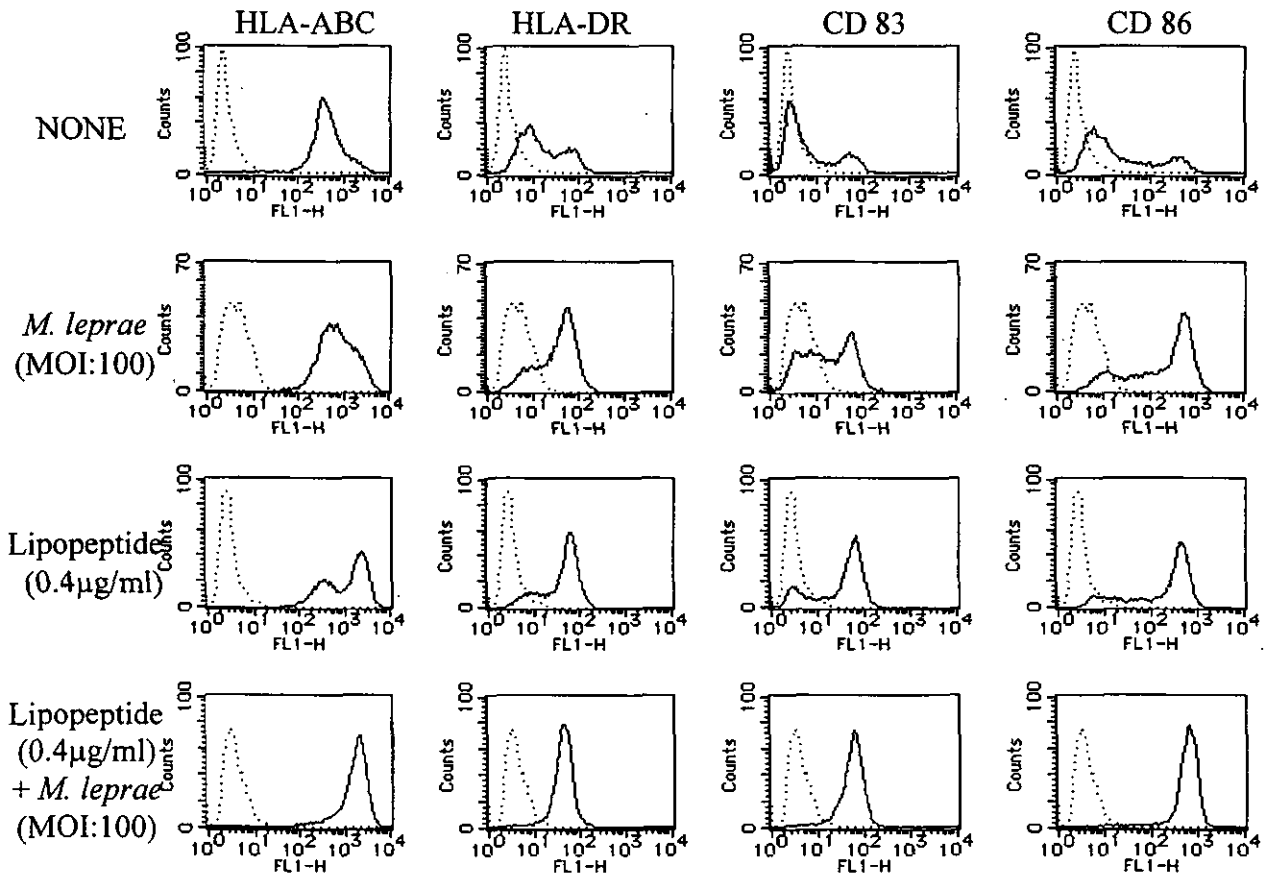
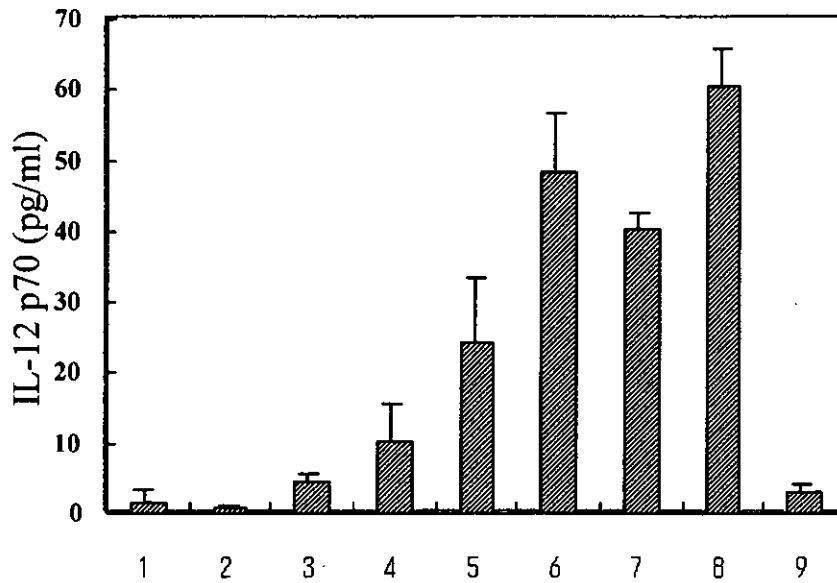
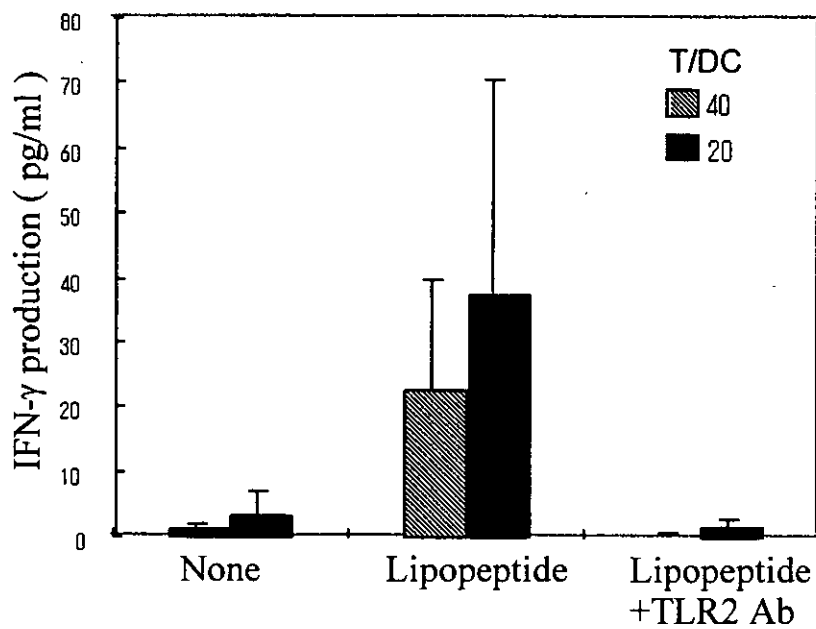


図 4. Effect of lipopeptide on the expression of surface molecules on DCs .

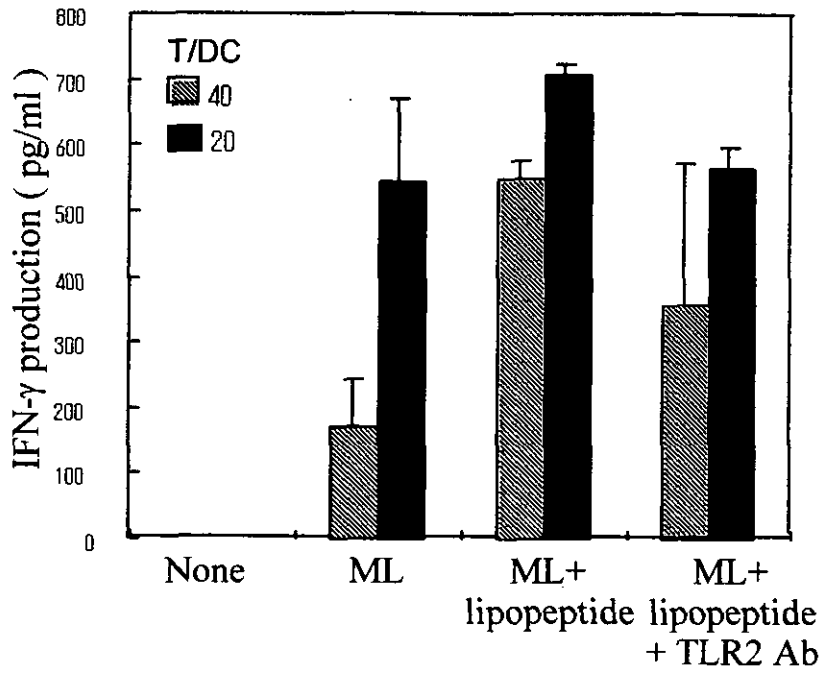
(..... control IgG, — indicated mAb)



⊠ 5. IL-12 p70 production from DCs. 1. None, 2. ML (MOI:100), 3. lipo (0.1), 4. lipo (0.1)+ML(MOI:100), 5. lipo (0.2), 6. lipo (0.2)+ML(MOI:100), 7. lipo (0.4), 8. lipo (0.4)+ML(MOI:100), 9. CD40L+ML(MOI:100)



⊠ 6. Lipopeptide LpK activates T cells through TLR2 receptor



⊗ 7. *M. leprae* enhances the T cell activating ability of lipopeptide. TLR2 was involved in T cell activation.

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshizawa, I., T. Mizuochi, A. Ogata, M. Murakami, H. Yagita, Y. Takahashi, T. Mizuochi, <u>T. Takemori</u> , 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
Naka, T., N. Fujiwara, I. Yano, S. Maeda, M. Doe, M. Minamino, N. Ikeda, Y. Kato, K. Watabe, Y. Kumazawa, I. Tomiyasu, <u>K. Kobayashi</u> .	Structural analysis of sphingophospholipids derived from <i>Sphingobacterium spiritivorum</i> , the type species of genus <i>Sphingobacterium</i> .	Biochim. Biophys. Acta	1635	83-92	2003
Li, Y., Y. Kawamura, N. Fujiwara, T. Naka, H. Liu, X. Huang, <u>K. Kobayashi</u> , T. Ezaki	<i>Chryseobacterium miricola</i> sp. nov., a novel species isolated from condensation water of space station Mir.	Syst. Appl. Microbiol.	26	523-528	2003
Minamino, M., I. Sakaguchi, T. Naka, N. Ikeda, K. Kato, I. Tomiyasu, I. Yano, and <u>K. Kobayashi</u>	Bacterial ceramides and sphingophospholipids induce apoptosis of human leukaemic cells.	Microbiology	149	2071-2081	2003
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
<u>小林和夫</u>	見逃してはならない感染症. 最近の結核の動向.	MB Derma	78	31-36	2003