

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確立

平成16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17(2005)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確立 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：抗酸菌細胞壁表層糖脂質の診断応用 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：結核菌特異抗原に対する胸水中のリンパ球の反応を指標とした結核性および癌性胸膜炎の鑑別診断法の検討 荒川 宜親（国立感染症研究所）	19
分担研究報告書：新規抗酸菌ワクチンの開発・非結核性抗酸菌遺伝子診断法の確立 牧野 正彦（国立感染症研究所）	25
分担研究報告書：結核菌体ペプチドによる Th1 生成と結核ワクチン開発への応用研究 高津 聖志（東京大学医科学研究所）	33
研究成果の刊行に関する一覧表	37

平成16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確立

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確立

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）

研究要旨. 抗酸菌感染症は、単一病原体としては 20 世紀最大の恐怖を与えた細菌感染症である。近年では、診断法・予防法の確立に加え、薬剤耐性菌の増加が極めて大きな問題になっている。従って、全世界の人々の全てが抗酸菌の恐怖から逃れることはできないと想定されている。本研究班では、結核菌に対する新しい補助診断法の開発、非結核性抗酸菌の鑑別診断法の確立、病原性非結核性抗酸菌と非病原性非結核性抗酸菌の迅速鑑別法の確立、新しい抗酸菌ワクチン開発を目指すための BCG の改良法の検討、および薬剤耐性菌に対する新しい治療法の開発研究を行った。ツベルクリン反応に代わる結核菌感染補助診断法の開発では、抗酸菌共通抗原 Ag85a を組み込んだアデノウイルスベクターを用いた細胞性免疫反応を利用する方法がマウスを用いて確立し、ヒトへの応用を図った。非結核性抗酸菌感染症の 70~80% を占める *Mycobacterium avium complex* (MAC) の血清診断法キットを開発し、その有効性を多施設で臨床試験を進行させた。病原性非結核性抗酸菌 (*M. kansasii*) と非病原性菌 (*M. gastri*) を鑑別するキットは、これまで存在していなかったが、*dnaA* 遺伝子をターゲットとし、迅速かつ簡便に検査を遂行し得る等温遺伝子増幅法 (LAMP 法) を開発した。BCG に代わるワクチンの開発は、全世界で切望されている研究課題である。これまでに、高免疫原性を有する新しいタンパク抗原として、抗酸菌細胞膜に存在する Major Membrane Protein-II を同定した。本抗原を利用したリコンビナント BCG 菌を作製し、その有効性を判定することが最終目的であるが、本年度は抗酸菌に対する生体防御反応の根幹的役割を果たす樹状細胞の機能に対し、抗酸菌親和性末梢単球が産生するサイトカインがどのような役割を果たすか検討した。その結果、IL-1 β は樹状細胞の分化段階に働くと樹状細胞の著しい機能低下を誘導することが初めて明らかにされた。さらに、アジュバント活性を示す結核菌由来 Ag85B の主たる T 細胞エピトープである Peptide-25 を認識する T 細胞レセプター (TCR) を遺伝子導入したマウスを作製し、本マウス T 細胞は Peptide-25 刺激により選択的に Th1 に分化することを明らかにした。新しい抗結核薬の開発を目指し、ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子を利用した方法の開発を試みた。

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
	高津 聖志	東京大学医科学研究所	教授

- A. 研究目的
抗酸菌研究も新しい時代を迎え、世界の ニーズに合った研究が求められている。病原性抗酸菌全てについて共通の課題として、

①簡便かつ迅速に遂行し得る診断法の開発、②予防法の確立、③薬剤耐性機構の解明と新規薬剤の開発が主要かつ早急に解決されなければならない問題点である。世界の研究者が多く多くの時間と研究費を割いて真正面からこれらの問題に取り組む中、日本においても真摯な取り組みが強く求められている。本研究班では、これら全ての問題に対処すべく研究班を構築し、エキスパートによる研究を展開した。結核に対する新しい補助診断法は、結核に対する生体防御反応が細胞性免疫を中心に構築されていることを鑑み、樹状細胞と T 細胞の相互作用を利用した新しい高感度システムの開発を目的とした。非結核性抗酸菌症の 8 割を占める MAC 感染症を逸早く診断し、無用な医療費を削減し、患者の入院拘束を解除するため新しい血清診断キットを開発した。本キットの有用性を多施設において多くの患者血清を用いて評価する。さらに病原性抗酸菌と非病原性抗酸菌をより簡便に、かつより高感度に鑑別し、発展途上国でも用いられるべく LAMP 法を開発することを第 2 の目的とした。第 3 として、BCG に代わる新しいワクチンの開発を目指した。新しいワクチンとして、BCG を改良したワクチンの開発と BCG 非依存性に新しいワクチンの開発を目指す 2 つの方法が考えられる。本研究班では、両者について検討する。BCG を改良したリコンビナント BCG 菌の作製に先立ち、BCG の持つ欠点を明らかにすることを本年度の目標とした。また、BCG 非依存性ワクチンの作製に際しては、免疫原性およびアジュバント活性を併せ持つ抗原の開発が不可欠であるが、その目的に合致する分子として Ag85B 由来 Peptide-25 をすでに同定している。本ペプチドの作用機序、特に Th1 細胞の活性化にどのような免疫機構が働いているか明らかにすることを次の目的とした。新しい抗結核薬の開発にあたっては、従来の方法とは全く異なる方法を導入すること、すなわちヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子を利用する方法を考案し、その有効性を探った。

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に開発した血清診断キットの有効性の評価 (小林)
3. 病原性非結核性抗酸菌と非病原性菌を鑑別する *dnaA* 遺伝子を用いた LAMP 法の開発 (牧野・向井)
4. 末梢単球由来サイトカインの樹状細胞の機能に及ぼす影響の検討、とりわけ BCG の持つ欠点を明らかにする (牧野)
5. 結核菌体由来ペプチドの有するアジュバント作用の免疫学的解析 (高津)
6. 抗酸菌に対する抗ヘルペスウイルス薬の抗菌作用の検討 (荒川)

B. 研究方法

1. Ag85a 組み込みアデノウイルスを作製し、ヒト末梢単球に対し感染させ、LPS 存在下 3 日間培養した際 T 細胞から産生される IFN- γ を測定した (竹森)。
2. MAC 特異的糖脂質蛋白質 (GPL) およびその抗原決定基である GPL 核を抗原とした血清診断キットを作製した。本キットを用いて、米国胸部疾患学会の診断基準に合致した MAC 症例を用いて、抗 GPL 抗体価を ELISA 法で測定した (小林)。
3. *M. kansasii* (病原菌) と *M. gastri* (非病原菌) を鑑別する LAMP 法を開発するため、ターゲット遺伝子としての有用性を本研究班で確立した *dnaA* 遺伝子内にプライマーを設定した (牧野・向井)。
4. 末梢単球が産生するサイトカイン (IL-1 β 、IL-6、TNF α 、IL-10) を、樹状細胞の分化段階で作用させた場合の樹状細胞に与える影響を、IL-12p70 産生能および T 細胞活性化能で評価した (牧野)。
5. 結核菌の分泌する Ag85B の C 末端ペプチドである Peptide-25 を認識する T 細胞より T 細胞レセプター (TCR) の α 鎖および β 鎖 (P25 TCR) をコードする cDNA をそれぞれ単離し、P25 TCR 発現トランスジェニックマウスを作製した。その CD4 陽

性ナイーブ T 細胞の Peptide-25 による活性化を IFN- γ および IL-4 を指標に検討した(高津)。

6. 1 型ヘルペスウイルスおよび varicella zoster ウイルスのチミジンキナーゼをコードする遺伝子を PCR で増幅し、プラスミドベクターにクローニングした。プラスミドを *E. coli* および *M. smegmatis* に導入した後、抗ヘルペス薬感受性を検討した(荒川)。

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. Ag85a 組み込みアデノウイルスを用いて、BCG ワクチン接種正常健康者 T 細胞の IFN- γ 産性能を検討した。しかし、マウスの系と異なり Ag85a 特異的 T 細胞の活性化は観察されなかった(竹森)。
2. GPL 抗原の抗原決定基は GPL 核であることが判明した。GPL 核を用いた血清診断を肺 MAC 感染症を用いて行ったところ、IgA 抗体が最も優れ、高感度および高特異度を示した(小林)。
3. *M. kansasii* と *M. gastri* を鑑別する LAMP 法が樹立され、その検出感度は 500 ゲノムコピーであった(牧野・向井)。
4. 抗酸菌は末梢単球に強い親和性を示し、種々のサイトカインを産生する。これら

の中で IL-1 β が単球あるいは単球から樹状細胞に分化する段階で作用すると樹状細胞の機能を著しく障害し、IL-12p70 および T 細胞の活性化能を低下させた(牧野)。

5. 結核菌由来 Peptide-25 TCR トランスジェニックマウスを用い、T 細胞の分化の運命付けに関与する免疫機構を解析した。その結果、結核菌に対する生体防御反応として最も重要な Th1 への分化の決定には、TCR からのシグナルが一義的に重要であり、抗原提示細胞からのサイトカインや副刺激は必ずしも重要でないことが明らかになった(高津)。
6. ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子導入大腸菌では、抗ヘルペス薬に対する感受性が増進していたが、*M. smegmatis* では高感受性は確認されなかった(荒川)。

D. 考察

ツベルクリン反応に代わる新しい結核補助診断法の開発を試みた。BCG 接種マウスを用いたモデル動物実験系では、すでに本試験法は確立されており、Ag85a 組み込みアデノウイルスを脾細胞に添加し、LPS 存在下で 3 日間培養するのみで、T 細胞の Ag85a 特異的活性化が得られる。本年度は本試験法をヒト末梢血リンパ球に応用したが、診断法の確立までにはまだ若干の工夫が必要であった。その大きな原因は、リンパ球ドナーの多くがすでにアデノウイルスに感染または感作されていることに起因すると考えられる。今後アデノウイルスベクターを改良、あるいは試験法プロトコルの改良、さらにはベクターの変更が必要と考えられた。しかし、こうしたハードルは本質的な問題ではなく、今後マウスで観察されたような高特異度・高感度を示す試験管内検査法が確立されるものと期待される。

非結核性抗酸菌の鑑別診断法については、2 つの方策を遂行しているが、いずれも確立され、臨床の場へ還元し得る大きな研究成果と考えられる。第一の方策は、MAC の血清診断法の確立である。MAC は非結核性

抗酸菌感染症の 8 割を占める重要な抗酸菌であるが、MAC に特異的に存在する糖脂質蛋白質を抗原として用いた ELISA 法による血清診断用キットを作製した。現在、多施設において臨床サンプルを用いたデータを集積中である。広く臨床の場において用いられるためには、避けて通ることのできない時間のかかる地道な努力である。これまでにパイロットスタディとして 100 余のサンプルを用いた結果が得られているが、90% 以上の特異度および感度を示しており、本研究班が発祥の場となる新しい診断キットが誕生する日も間近と期待される。第二は、抗酸菌の遺伝子診断法である。これまでに、27 種の抗酸菌を鑑別するターゲット遺伝子として *danA* が有用であることを本研究班で見出してきた。本年度は、簡便かつ迅速に鑑別診断を行うため、LAMP 法を用いた診断法を確立した。LAMP 法は、PCR と異なり高価な機械を必要としないため、抗酸菌が蔓延する途上国においても容易に検査を行うことができるメリットを有している。本試験法も世界的規模で利用されることと期待している。抗酸菌症に対するワクチン開発に関しては、2 つの研究プロジェクトを遂行した。第一は、改良型リコンビナント BCG を用いた新しいワクチンの開発である。BCG は数十年にわたり用いられてきた安全性の確立されているワクチンである。しかし、種々の欠点を有するため、近年ではその有効性に限りがあると考えられている。リコンビナントワクチンの作製はすでに着手されているが、本年度は BCG の欠点を網羅すべく、基礎的免疫学的実験を遂行した。BCG および結核菌は一般に抗原提示細胞に感染し、生体内では末梢単球および樹状細胞の両者に強い親和性を示す。単球に感染すると寄生性感染を果たし、樹状細胞に感染すると T 細胞の活性化を誘導し生体防御反応が惹起される。しかし、抗酸菌が末梢単球に感染すると種々のサイトカインが産生されるが、そのサイトカインの樹状細胞に及ぼす影響、とりわけ樹状細胞に分化段階で作用した場合の樹状細胞の機能に及ぼす影響についてはこれまで明らか

かになっていなかった。本年度はこうした点を中心に解析したところ、単球に抗酸菌が感染すると IL-1 β が産生され、IL-1 β が単球あるいは未熟樹状細胞に作用すると成熟樹状細胞の著しい機能不全を誘導することを明らかにした。これまで報告されていなかった新しい BCG の欠点が明らかになった。第二のプロジェクトは、結核菌が分泌する抗原をコードするペプチドを用いたワクチン開発である。Ag85B の C 末端に存在するペプチド (Peptide-25) は T 細胞の活性化を強く誘導し、免疫原性を有すると同時にアジュバントとしても作用することをこれまでに見出しているが、本ペプチドが T 細胞を刺激する際、TCR との相互作用が第一義的に重要であることが明らかになった。従って、蛋白抗原が抗原提示細胞により認識され、MHC 抗原および T 細胞レセプターの相互作用によって誘導される古典的な T 細胞活性化経路の活性化が結核菌に対する生体防御反応を賦活する際極めて重要であることが、トランスジェニックマウスなど詳細な免疫学的解析により明らかにされた。結核菌に対するワクチン開発を考察する上で極めて重要な知見であると想定された。

E. 結論

ツベルクリン反応に代わる結核補助診断法の開発、非結核性抗酸菌の迅速・簡便診断法およびワクチン開発を中心に研究を展開し、極めて重要な成果および知見が得られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitada, S., R. Maekura, N. Toyoshima, T. Naka, N. Fujiwara, M. Kobayashi, I. Yano, M. Ito, and K. Kobayashi. 2005. Use of glycopeptidolipid core antigen for serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex

- pulmonary disease in immunocompetent patients. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12:44-51.
- 2) Wada, T., S. Maeda, A. Tamaru, S. Imai, A. Hase, and K. Kobayashi. 2004. Dual-probe assay for rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 42:5277-5285.
 - 3) Aoki, K., S. Matsumoto, Y. Hirayama, T. Wada, Y. Ozeki, M. Niki, P. Domenech, K. Umemori, S. Yamamoto, A. Mineda, M. Matsumoto, and K. Kobayashi. 2004. Extracellular mycobacterial DNA binding protein 1 participates in *Mycobacterium*-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. J. Biol. Chem. 279:39798-39806.
 - 4) Maeda, Y., P. J. Brennan, and M. Makino. Studies of lipoproteins of *Mycobacterium leprae*. Jpn. J. Leprosy, 73:15-21, 2004.
 - 5) 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., 72(1):50-53, 2004.
 - 6) Miyamoto, Y., T. Mukai, F. Takeshita, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, and M. Makino. Aggregation of mycobacteria caused by disruption of fibronectin-attachment protein-encoding gene. FEMS Microbiol. Letters, 236:227-234, 2004.
 - 7) Kimura, H., Y. Maeda, F. Takeshita, L. E. Takaoka, M. Matsuoka, and M. Makino. Upregulation of T-cell-stimulating activity of mycobacteria-infected macrophages. Scand. J. Immunol., 60:278-286, 2004.
 - 8) Yamashita, Y., Y. Maeda, F. Takeshita, P. J. Brennan, and M. Makino. Role of the polypeptide region of 33 kDa mycobacterial lipoprotein for efficient IL-12 production. Cell. Immunol., 229:13-20, 2004.
 - 9) Maeda, Y., T. Mukai, J. Spencer, and M. Makino. Identification of Immunomodulating Agent from *Mycobacterium leprae*. Infect. Immunity, 2005, in press.
 - 10) Tamura, T., H. Ariga, T. Kinashi, S. Uehara, T. Kikuchi, M. Nakada, T. Tokunaga, W. Xu, A. Kariyone, A. Saito, T. Kitamura, G. Maxwell, S. Takaki, and K. Takatsu. The role of antigenic peptide in CD4+ T helper phenotype development in a T cell receptor transgenic model. Int. Immunol. 16:1691-1699, 2004.

2. 学会発表

国内学会

- 1) 知っておきたい話題の感染症 (シンポジウム). 抗酸菌感染症. 小林和夫. 日本細菌学会雑誌, 59:63, 2004. 第77回日本細菌学会総会 2004年4月大阪.
- 2) 結核基礎研究の最前線 (シンポジウム). 結核, 光山 正雄, 小林和夫. 79:161, 2004. 第79回日本結核病学会総会 2004年4月名古屋.
- 3) マクロファージの機能と肉芽腫性炎 (ワークショップ). 抗酸菌病原因子と宿主応答の分子機序. 小林和夫. 日本ハンセン病誌, 73:125, 2004. 第77回日本ハンセン病学会総会 2004年5月さいたま.
- 4) らい菌由来抗原MMP-II分泌型BCG株の作製とその免疫学的性状解析. 稲垣勝也, 前田百美, 牧野正彦. 日本農芸化学会 2004年度 (平成16年度) 大会

- 2004年3月 広島.
- 5) らい菌由来抗原 MMP-II の分泌型および脂質付加型発現抗酸菌株の作製. 稲垣勝也, 前田百美, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004年4月 大阪.
 - 6) 抗酸菌糖脂質 Glycopeptidolipids (GPLs) 糖酵素遺伝子の破壊株作製とその機能解析. 宮本友司, 向井 徹, 武下文彦, 中田 登, 甲斐雅規, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004年4月 大阪.
 - 7) らい菌由来 Major Membrane Protein-II による自然免疫および獲得免疫の活性化. 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹, 武下文彦, 山下康子, 稲垣勝也, 石井則久. 第 77 回日本細菌学会総会 2004年4月 大阪.
 - 8) LAMP 法によるらい菌遺伝子の検出. 向井 徹, 宮本友司, 武下文彦, 牧野正彦. 第 77 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2004年5月 大宮.
 - 9) 抗酸菌感染マクロファージにおける菌の細菌内寄生と排除に関わる分子機構. 鈴木幸一, 武下文彦, 中田 登, 松岡正典, 牧野正彦. 第 45 回日本組織細胞化学学術集会 2004年10月 鹿児島.
 - 10) 自然免疫および獲得免疫の活性化能を有する新たな抗酸菌抗原の同定. 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹, 山下康子, 石井則久. 第 34 回日本免疫学会総会 2004年12月 札幌.
 - 11) ヒトマクロファージのらい菌貪食とサイトカイン産生. 福富康夫, 牧野正彦. 第 34 回日本免疫学会総会 2004年12月 札幌.
 - 12) TCR シグナルによる Th1 分化の制御: TRC トランスジェニックマウスを用いた解析. 仲田真己代, 有賀晴之, 田村敏生, 徳永岳志, 刈米アイ, 高津聖志. 第 34 回日本免疫学会総会 2004年12月 札幌.
 - 13) Th1 ペプチドである Peptide-25 による抗腫瘍免疫増強効果. 菊池剛史, 田村敏生, 上原秀一郎, 刈米アイ, 高津聖志. 第 34 回日本免疫学会総会 2004年12月 札幌.
 - 14) 結核菌蛋白 Ag85B 由来 Peptide-25 特異的 T 細胞クローンの TCR を認識する抗イディオタイプ抗体, KN7 を用いた Th1 応答の解析. 刈米アイ, 仲田真己代, 田村敏生, 高津聖志. 第 34 回日本免疫学会総会 2004年12月 札幌.

国際学会

- 1) Development of a new vaccine candidate against mycobacteria. Makino, M., M. Maeda, T. Mukai, and N. Ishii. 4th The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 30 August-2 September, 2004, Awaji Island, Hyogo, Japan.
- 2) Identification of anti-mycobacterial host defense-associated antigen and assessment of its immunological significance. Makino, M., Y. Maeda, and T. Mukai. Fortieth Anniversary US-Japan Cooperative Medical Science Program. 39th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, December 7-10, 2004.
- 3) Loop-mediated isothermal amplification of the *dnaA* sequence for rapid detection of *Mycobacterium leprae*. Mukai, T., Y. Miyamoto, M. Matsuoka, T. Yamazaki, and M. Makino. Fortieth Anniversary US-Japan Cooperative Medical Science Program. 39th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, December 7-10, 2004.
- 4) Immunogenicity of Peptide-25 of Ag85B in Th1 development: Analysis of TCRV α . 5 + V β 11 + T cells by anti-idiotypic antibody, KN7. Kariyone, A., M. Nakada, T. Tamura, and K. Takatsu. 12th Int. Cong. Immunol. July, 2004, Montréal.

- 5) Enhancement of anti-tumor immunity by Th1-inducible peptide from *Mycobacterium tuberculosis*. Kikuchi, T., T. Tamura, S. Uehara, H. Ariga, Xu Wen, A. Kariyone, and K. Takatsu. 12th Int. Cong. Immunol. July, 2004, Montréal.
- 6) Role of T cell receptor and Peptide/MHC interaction in Th1 development by Peptide-25. Ariga, H., T. Tamura, T. Kikuchi, X. Wen, M. Nakada, A. Kariyone, and K. Takatsu. 12th Int. Cong. Immunol. July, 2004, Montréal.

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16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・部長)
研究協力者	阿戸 学	(国立感染症研究所・免疫部・研究員)
研究協力者	藤猪 英樹	(国立感染症研究所・免疫部・研究員)
研究協力者	高須賀直美	(国立感染症研究所・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、真核高等動物細胞のコドン読み枠に変換した抗酸菌特異的遺伝子 Ag85a を組み込んだアデノウイルスベクターを作成し、感染させたヒト末梢血単核球で翻訳提示された遺伝子産物に対する T 細胞免疫反応の惹起を検討した。その結果、ヒトの末梢血単核球にアデノウイルスを感染させると、既存のアデノウイルスに対する免疫によって T 細胞の活性化が起こり、多量のインターフェロンガンマ(IFN γ)が産生された。また、この T 細胞反応は、血清中の抗アデノウイルス抗体価と相関していなかった。このため、このウイルスベクターを用いた系は、現在の形では結核診断法として用いることができないことが判明した。一方、ヒト末梢血単核球への Ag85a 組み込みアデノウイルス感染により、アデノウイルスに対する IFN γ 産生反応は、コントロールウイルスを感染させた群に比べて優位に低下し、Ag85a が他の抗原特異的 T 細胞応答を抑制する可能性を示唆した。

A. 研究目的

これまでに結核感染の免疫学的補助診断法としてツベルクリン反応が用いられているが、我が国の対象者は BCG ワクチン接種を受けていることから判定に困難を伴う場合が多い。このため我々は、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目的で、アデノウイルスベクターを利用した免疫反応の誘導とそれを計測するシステムの確立を目指し研究を行った。診断法の確立には最終的に真核高等動物細胞のコドン読み枠に変換した結核菌特異的遺伝子 ESAT6 組み込みアデノウイルスベクターが必要である。しかしこの方法の有用性を検討する第一ステップとして、操作のしやすいモデル実験で検討した。すなわち、抗酸菌特異的遺伝子 Ag85a 組み換えウイルスを試験管内で強力な抗原提示細胞である樹状細胞に感染さ

せることにより、抗酸菌に感作された T 細胞が特異的に反応し活性化される至適条件を検討した。これまでの研究で、Ag85a アデノウイルス感染樹状細胞は Ag85a を発現し、試験管内で BCG 感染マウス由来 T 細胞を強く刺激しインターフェロンガンマ(IFN γ)の産生を促すことを明らかにした。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 γ 産生を誘導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 γ 産生細胞は CD4 陽性記憶 T 細胞であることから、我々が開発した系は、簡便に感染後長期にわたり T 細胞免疫動態を測定することが可能であることが示唆された。これらの結果から結核菌特異的遺伝子組み込みアデノウイルスを用いた特異的診断法の開発の有用性が確認された。本研究は、次のステ

ップとしてヒト末梢血単核球に組み込みアデノウイルスを感染させ、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的とした。

B. 研究方法

(1) Ag85a 組み込みアデノウイルスの作製
Ag85a 組み込みアデノウイルス (pShuttle Ag85a 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。アデノウイルス作製過程で問題になる E1E3 遺伝子を持つ野生株の出現は、HeLa 細胞を用いてその混入がないことを確認した。

(2) Ag85a 組み込みアデノウイルスの樹状細胞への感染

健常人ボランティアの血液より末梢血単核球を精製し、単核球 1×10^6 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、LPS 存在下で3日間培養した。

(3) 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

末梢血単核球 1×10^6 にアデノウイルスまたは PPD を加えて、LPS 存在下で3日間培養した。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。また、単核球の増殖能をトリチウムサイミジンの取り込みによって測定した。

(4) 抗 5 型アデノウイルス IgG 抗体価の測定
末梢血採取時に同時に血清を保存し、ベクターに用いている 5 型アデノウイルス感染に対する中和抗体価を測定した。(SRL に委託)

C. 研究結果

23 歳から 50 歳までの、男女混合の健常人ボランティア (9 名) より末梢血単核球を精製し、LPS 共存下にて単核球に直接 Ag85a 組み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 γ の濃度を測定した。その結果、マウスの結果とは異なり、コントロールアデノウイルス感染によって高い IFN γ 産生を誘導することが明らかとなった。一方、Ag85a 組み込みアデノウイル

スの感染では、コントロールウイルスと比較して有意に IFN γ 産生が低下していることが明らかになった (図 1)。

T 細胞反応を別な系で評価する目的で、この反応系において単核球の増殖反応を測定した。その結果、IFN γ 産生と同様に、Ag85a 組み込みアデノウイルスの感染では、コントロールウイルスの感染と比較して有意に単核球の増殖能が低下していることが明らかになった (図 2)。

以上のことから、既存のアデノウイルスに対する免疫反応によって、コントロールアデノウイルス感染に対して強い T 細胞反応が誘導されることが示唆された。このアデノウイルスに対する T 細胞性免疫反応が、血中抗体価とどのような関係にあるかを調べる目的で、末梢血単核球を採取するときに同時に採取した血清を用いて、抗 5 型アデノウイルス IgG 抗体価を測定し、IFN γ 産生能との間で相関を評価した。その結果、抗体価と IFN γ 産生能の間には相関が認められなかった (図 3)。

D. 考察

本研究において抗酸菌特異的遺伝子 Ag85a を組み込んだアデノウイルスを作製した。前年度までの結果より、このウイルスを感染させたマウス樹状細胞は、LPS 刺激を加えることで抗原提示細胞として機能し、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。これらの結果は、Ag85a 組み込みアデノウイルスを用いて簡便に抗結核菌/BCG 免疫記憶に関わる T 細胞反応を同定する技術が、少なくともマウスを対象として確立されたことを支持した。

アデノウイルスは人に常時感染していることから、このシステムが有用であるか否か事前にヒト血清抗体価を測定した。この結果、抗アデノウイルス抗体価は低く、特異

性の評価に問題ないと判断して次のステップに進んだ。しかし、ヒト健常人末梢血 T 細胞は、コントロールアデノウイルスの *in vitro* 感染に対して強く反応し、大量の IFN γ を産生した。このマウスとヒトの反応の違いは、ヒトではこのシステムでベクターとして用いられている 5 型アデノウイルスに既に感染して細胞性免疫が成立して、かつ、免疫記憶が維持されており、末梢血にウイルスを感染させ T 細胞が活性化されるとこのシステムですべて陽性と判定されることを示唆する。

一方、Ag85a 組み込みアデノウイルスをヒト末梢血単核球に感染させた場合には、PPD に対する反応の差や抗アデノウイルス抗体価の差にかかわらず、コントロールウイルスに比べて IFN γ 産生がすべての検体で低下していた。以上のことから、5 型アデノウイルスを使った検査システムは、結核の補助診断として現在の形では用いることができないことが判明した。今後、感染の既往がなく、1979 年以降に生まれた人では免疫を持っておらず、かつ樹状細胞指向性が高いワクシニアウイルスに Ag85a を組み込んでヒト末梢血細胞に感染させ、T 細胞反応を測定する系の確立を検討する予定である。

また、Ag85a 組み込みアデノウイルスに対する T 細胞反応が、コントロールウイルスと比較して減弱しているという結果から、Ag85a が他の抗原特異的 T 細胞応答を抑制する可能性が示唆された。Ag85a はミコール転移酵素であり、抗酸菌の細胞壁合成に必要である。しかし、宿主に対する作用に関しては、Ag85a そのものに免疫原性が認められること、フィブロネクチンに結合することが報告されている以外、免疫応答に

対する役割はわかっていない。現在、Ag85a が T 細胞免疫応答を抑制するメカニズムを解析中である。このような抗酸菌由来遺伝子産物は多数存在すると考えられ、これらの宿主免疫応答に与える影響を考慮し、生菌による免疫応答を抑制・促進する抗酸菌由来遺伝子を同定し、T 細胞反応を測定することによってより有用な結核菌感染補助診断法を確立するとともに、ワクチン開発にもその成果を応用することを、今後の研究で目指す。

E. 結論

新規結核感染診断法の開発に必要な 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、感度をヒトで検討したところ、ヒト末梢血単核球にアデノウイルスを感染させると、既存のアデノウイルスに対する免疫によって T 細胞の活性化が起こるため、このウイルスベクターを用いた系は、現在の形では結核診断法として用いることができないことが判明した。また、末梢血への Ag85a 導入により、アデノウイルスに対する IFN γ 産生反応は、コントロールウイルスを感染させた群に比べて優位に低下し、Ag85a が他の抗原特異的 T 細胞応答を抑制する可能性を示唆した。今後は、システムの改良を行うとともに、宿主免疫応答を修飾する抗酸菌由来遺伝子の同定を目指す。

G. 研究発表

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

Ag85a-adenovirus infection results in decreased IFN γ production in response to type-Y adenovirus

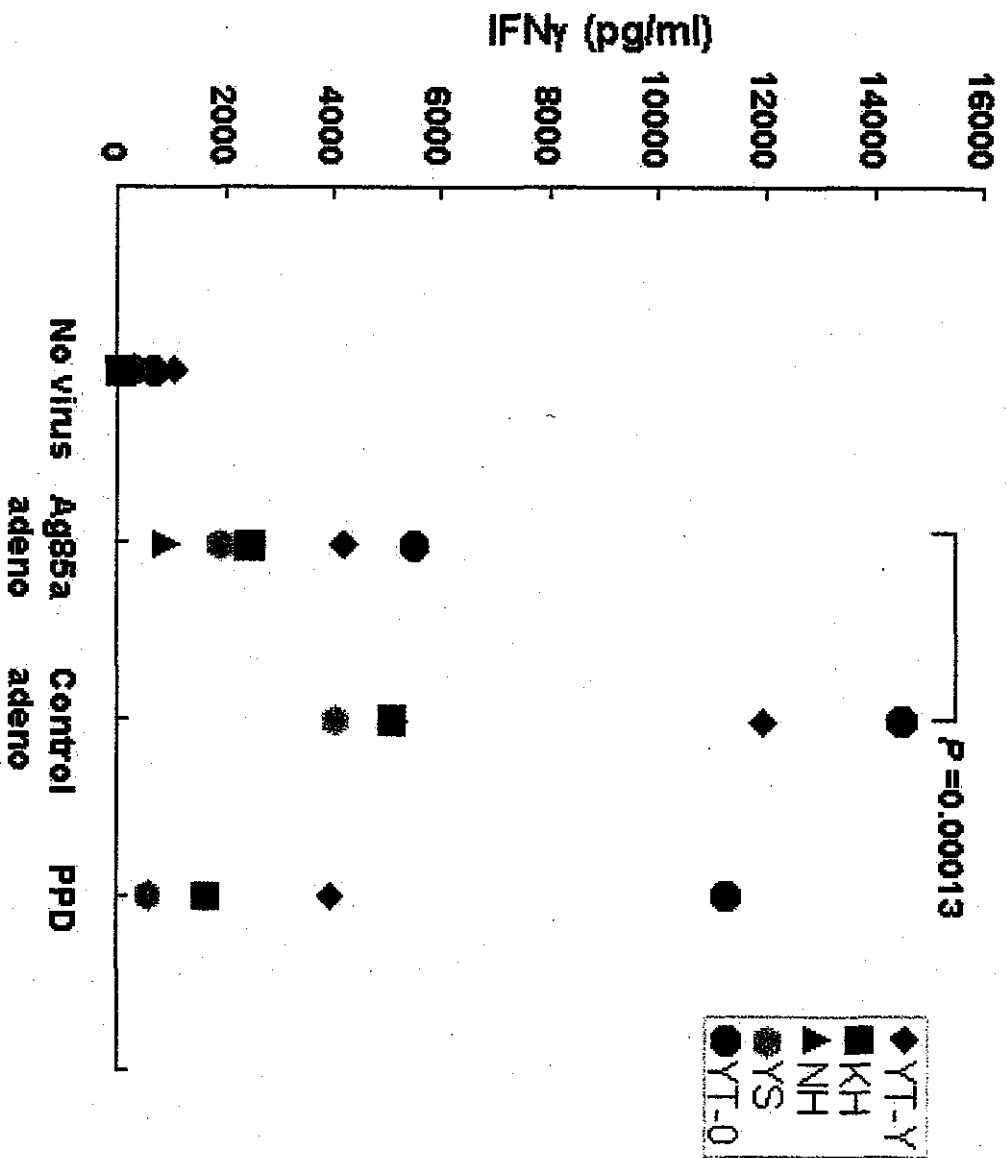


図1 ヒト末梢血単核球 1×10^6 に組み込みウイルスをMOI50で感染させたときのIFN γ 産生量

Ag85a-adenovirus infection results in decreased T cell proliferation to type-V adenovirus

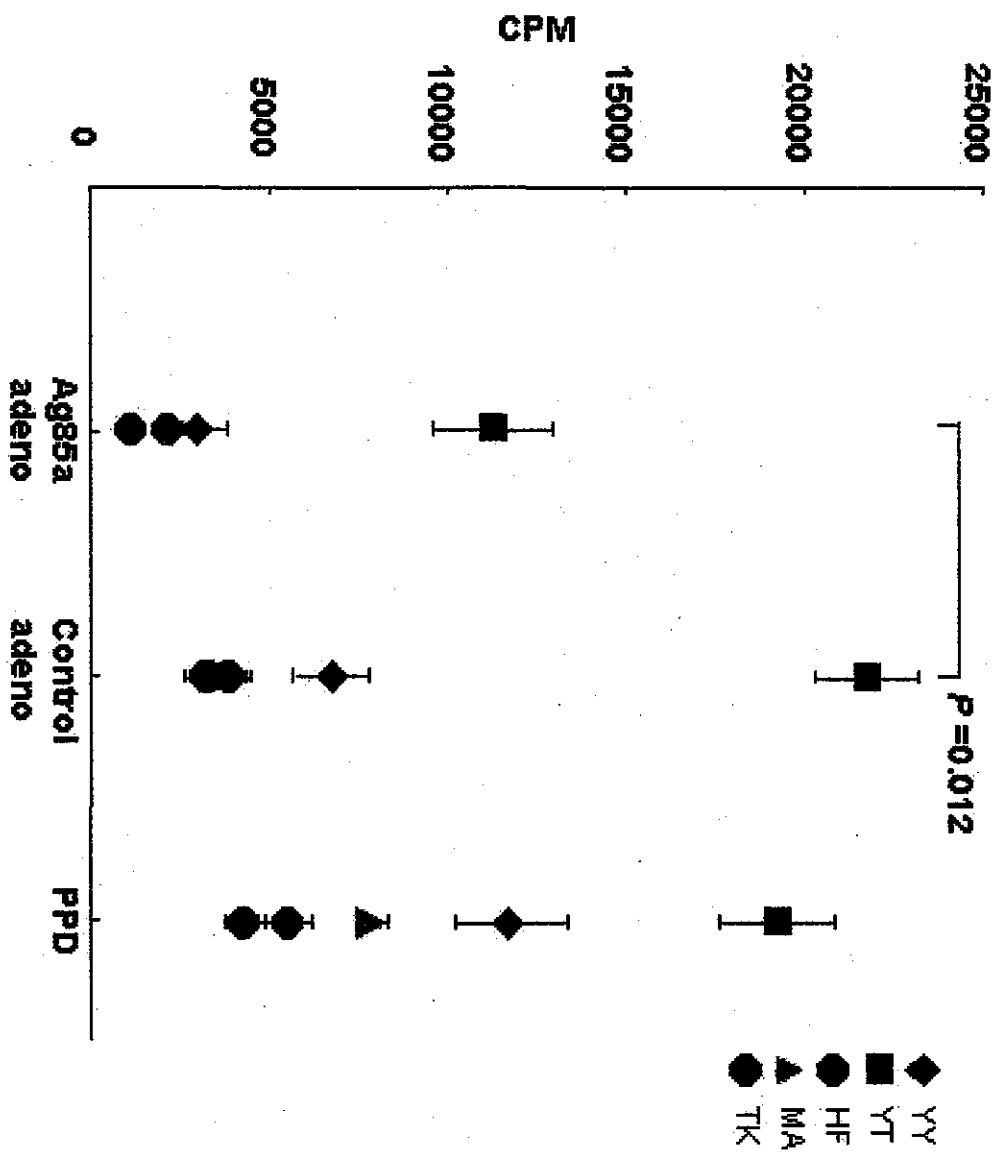


図2 ヒト末梢血単核球1×10⁶に組み込みウイルスをMOI50で感染させたときの単核球の増殖能

IFN γ production in response to adenovirus is not associated with anti-adenovirus type-V IgG titer

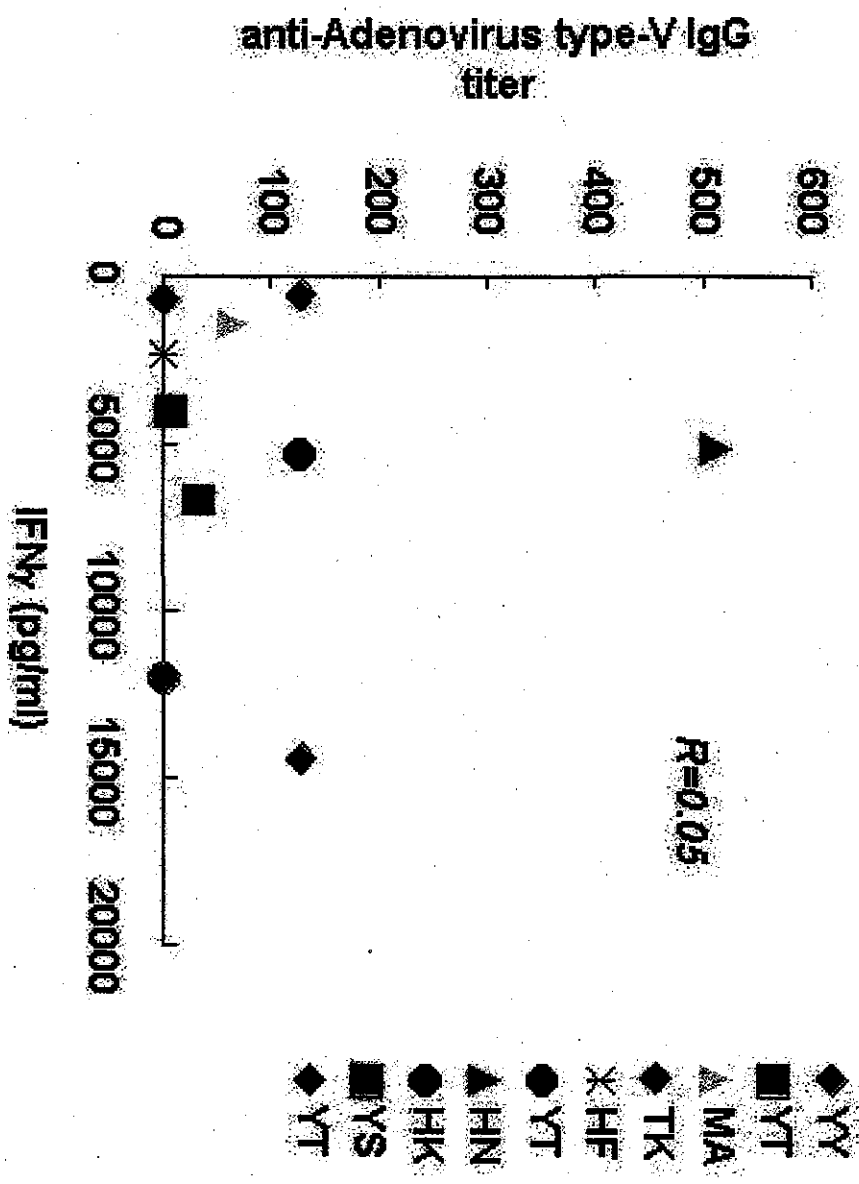


図3 アデノウイルスin vitro感染によるIFN γ 産生反応と血中抗5型アデノウイルス抗体価との相関

平成16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）

抗酸菌細胞壁表層糖脂質の診断応用

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・感染防御学教授）

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

抗酸菌細胞壁表層糖脂質の診断応用

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

抗酸菌の特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質や接着／侵入に関与する菌表層蛋白質の宿主に対する生物学的活性を免疫原性（抗原決定基、液性および細胞性免疫）、炎症惹起や抗菌防御の視点から分子医学的に解析し、新規診断・治療候補として抗酸菌細胞壁糖脂質や蛋白質の可能性を探索した。*Mycobacterium avium* complex (MAC) 特異的糖脂質蛋白質 (GPL やその抗原決定基である GPL 核) を抗原とした血清診断はヒト MAC 感染症に高い特異性 (92.5%) や感度 (95.1%) を示した。現在、関西地区を中心として多施設-臨床試験が進行している。抗酸菌の気道上皮細胞への接着・侵入は抗酸菌特異的 DNA 結合蛋白質 (MDP1) と宿主細胞表面に存在するグリコサアミノグリカン (GAG) に依存していた。予備的な *in vivo* 感染実験結果は抗 MDP1 抗体や GAG の感染前や感染後投与でも有効、すなわち、予防・治療に有効な手段であった。

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。

新規治療・予防方法の開発を目的に、従来の抗菌化学療法と全く異なった戦略、抗酸菌の宿主細胞接着・侵入物質（菌表層蛋白質）を標的とした新規戦略の開発に着

手した。

B. 研究方法

米国胸部疾患学会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)、喀痰培養陽性肺結核 (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。

結核菌や弱毒ウシ型結核菌 (BCG) などの抗酸菌から抗酸菌特異的 DNA 結合蛋白質 (MDP1、分子量 28 kDa) を精製、遺伝子の塩基配列を決定、生物学的意義（宿主細胞へ接着／侵入・侵入、MDP1 の治療効果：動物感染実験）を解析した。

C. 研究結果

化学的に GPL は全ての MAC に共通な GPL

核と可變的な糖鎖部分から構成されていることから、抗原決定基を GPL 核と可變的な糖鎖部分を用いて同定した。二次元薄層クロマトグラフィーを用い、GPL 核抗原を単一物質として精製し、質量分析結果から GPL 核抗原は分子量 1,208 であった。血清抗 GPL 抗体 (IgG、IgA、IgM) 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 (106 例) の感度は 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、特に、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 (11 例)、肺 *M. kansasii* 感染症 (30 例)、喀痰培養陽性肺結核 (77 例) および健常者 (126 例) における陽性率はいずれも 10% 以下であった。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、体外診断である血清抗 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。抗菌化学療法反応群 (治療による菌陰性化、14 例) と抗菌化学療法非反応群 (菌陽性持続、13 例) の抗体価の推移を解析した。反応群では治療後に抗体価が有意に減少したが、非反応群では変動はなかった。また、非反応症例で肺葉切除患者 (1 例) の抗体価は切除後に減少した。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。

MDP1 の発現強度は対数増殖期 < 定常期

= 衰退期であった。また、MDP1 は抗酸菌の細胞質や表層に局在していた。機能的に細胞質 MDP1 は抗酸菌 DNA と結合し、DNA や RNA 合成、さらに、蛋白合成を阻害し、その結果、抗酸菌の分裂増殖速度を遅延させた。他方、抗酸菌表層 MDP1 は非食食性気道上皮細胞表面に存在するグリコサミノグリカン (ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸など) に結合した。抗酸菌-気道上皮細胞の接着・侵入は抗 MDP1 抗体やグリコサミノグリカン (特に、ヒアルロン酸) で阻害されたことから、MDP1-グリコサミノグリカン相互作用を介して、結核菌が気道上皮細胞に接着・侵入している。なお、予備的な *in vivo* 感染実験結果から、抗 MDP1 抗体やグリコサミノグリカンの結核菌感染前、或いは、感染後投与でも有効であり、すなわち、予防・治療の両者に有効な介入手段であることが判明した。

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。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。GPL 核抗原を用いた血清診断キットを試作し、現在、関西地区を中心として多施設-臨床試験が進行している。

結核菌など抗酸菌は細胞内寄生病原体であるため、感染の成立には宿主細胞へ接着・侵入・食食が必須となる。しかし、宿主細胞の結核菌食食に補体受容体やマンノース受容体の関与が報告されていたが、接