

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17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18(2006)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）	17
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）	23
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）	29
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）	35
研究成果の刊行に関する一覧表	39

平成17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.

結核を含む抗酸菌感染症の制御は、現代社会において要望の高い重要な研究課題の一つである。とりわけ、感染初期に有効な迅速診断法の開発と抗酸菌症の発症を有効に阻止し得る予防法の開発研究は重要であり早急な対応が望まれている。本研究班では昨年に引き続き、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 BCG 非依存性ワクチンの開発とその作用機構の解析を中心課題として取り組んだ。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モデルで確立されたため、ヒトへの応用を図った。ヒト末梢血を用いた試みでは、正常健康者は多くのウイルスにより感作されていることが判明し、これらウイルスの影響を受けないシステムの開発が必要であることが判明した。非結核性抗酸菌感染症において重要な位置を占める *Mycobacterium avium complex* (MAC) の血清診断用キットを確立し、その有効性を多施設において評価した。MAC 特異的糖脂質蛋白質 (GPL) の活性中心 (GPL core) に対する IgA 抗体は高い特異性と感度を有していた。病原性非結核性抗酸菌 (*M. kansasii*) と非病原性菌 (*M. gastri*) を迅速に鑑別する等温遺伝子増幅法 (LAMP 法) をさらに簡便化するため、FD 試薬を用いた診断法の開発に成功した。結核等の予防用ワクチンとして従来用いられてきた BCG の有効性は小児の粟粒結核など特殊な病変にのみ限られており、成人肺結核においてはほぼ無効とされている。そのため、BCG に改良を加えたリコンビナント BCG を作製した。本リコンビナント BCG は、従来の BCG に比し、より強くヒトのナイーブタイプの CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を活性化し、マウス生体内で効率良くメモリータイプ T 細胞を産生した。さらに、BCG 非依存性ワクチンの開発を目的として、結核菌 Ag85B の主たる T 細胞エピトープ Peptide-25 による T 細胞の活性化機構を解析した。Peptide-25 はアジュバント活性を有し、共免疫抗原に対し特異的細胞傷害性 T 細胞の生成を増強した。結核に対する新しい治療法を開発するため、結核菌が宿主細胞に結合する際、抗酸菌特異的 DNA 結合蛋白質 (MDP1) が重要な役割を果たしていることを見出した。MDP1 を標的とする新しい治療法が開発が可能であることを見出した。さらに、抗酸菌がマクロファージ内で寄生性感染を果たした際に、有効に作用する治療法を開発するため、感染マクロファージ内でのみ発現し、化学療法剤の標的となり得る分子の探索を試みた。

分担研究者

竹森 利忠
荒川 宜親
小林 和夫
高津 聖志

国立感染症研究所 部長
国立感染症研究所 部長
大阪市立大学大学院 教授
東京大学医科学研究所 教授

A. 研究目的

20世紀に引き続き、現在も猛威を振るい続ける病原性抗酸菌の制御は、現代でも最もニーズの高い研究課題の一つである。病原性抗酸菌に共通する課題として、①迅速かつ簡便な診断法および補助診断法の確立、②予防技術の確立、③薬剤耐性菌にも有効に作用する新しい治療法の開発が上げられる。本研究班では、これらの問題の解決に種々の観点からのアプローチを試みている。結核の補助診断法としてツベルクリン検査が長年用いられてきたが、これに代わる細胞性免疫反応を利用した方法の開発に取り組んでいる。非結核性抗酸菌症の多くを占める MAC 感染症を逸早く診断し、適切な治療を施すためには、迅速かつ高感度・高特異度を有する簡便な診断法の開発が不可欠である。そのため MAC 特異的抗原を用いた血清診断用キットを開発したが、その有用性を評価する目的で、多施設において臨床試験を展開した。また、病原性抗酸菌と非病原性抗酸菌を鑑別する遺伝子診断法、とくに発展途上国のような抗酸菌濃厚流行国でも利用可能な診断法を開発することを目的とした。次いで、BCG に代わる新しい予防用ワクチンの開発研究を行った。BCG は種々の欠点を有し、現在では小児の粟粒結核あるいは結核性髄膜炎など重篤小児疾患の発症を阻止する上では有効ではあるものの、現代社会で多くの問題を提起する成人あるいは高齢者肺結核の予防には全く功を奏していない。本研究班では、BCG に改良を加え BCG の持つ欠点を凌駕するとともに、より強く宿主免疫細胞を活性化し生体内においてメモリー T 細胞を効率良く産生する新しいリコンビナント BCG の開発を目的とした。さらに、BCG は頻回に投与を行ってもその効果は改善されない欠点を持つ。この点を打破するためには、BCG で感作されたリンパ球に対し、ブースター効果を発揮

し得る新しい BCG 非依存性ワクチンを開発することが重要である。そこで、昨年度までに同定した免疫原性およびアジュバント活性を併せ持つ Ag85B 由来 Peptide-25 の作用機構の解析を行った。とりわけ慢性潜伏感染を果たした結核菌を体外排除するために必要な細胞傷害性 T 細胞の活性化に焦点を当てた。薬剤耐性結核菌の出現・蔓延は、今後さらに拡大し極めて重要な研究課題に発展する可能性が考えられる。そこで、新しい治療法の開発にも着手した。結核菌が宿主細胞への接着を抑制する試みと、結核菌がマクロファージ内に寄生性感染した場合化学療法剤のターゲットとなり得る分子の探索である。

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 法の開発とその簡便化 (牧野・向井)
4. 新しいリコンビナント BCG の作製とその T 細胞活性化能の評価 (牧野)
5. 結核菌体タンパク Ag85B 由来ペプチドの細胞傷害性 T 細胞の生成 (高津)
6. 結核菌の宿主細胞への接着を誘導する菌体分子の同定とそれを標的とした結核菌細胞内進入阻止法の開発 (小林)
7. マクロファージ内感染を果たした結核菌が発現する遺伝子の解析 (荒川)

B. 研究方法

1. Ag85a をアデノウイルスに組み込み、正常健常人末梢単核球を MOI 50 で 3 日間

刺激した。培養上清中の IFN- γ を ELISA 法で測定した。細胞表面抗原はフローサイトメトリーで解析した。(竹森)。

2. 米国胸部疾患学会の診断基準に合致した MAC 症例の血清を用い、MAC 特異的糖脂質蛋白質 (GPL) 核抗原に対する抗体価を酵素抗体法で測定した (小林)。
3. LAMP 法による増幅産物の迅速検出法を検討した。検出試薬として Fluorescent Detection (FD) 試薬を用いた。陽性判定は、365nm の紫外線照射により発色させ行った (牧野・向井)。
4. 抗酸菌細胞膜に存在し強い抗原性を有する主要抗原 Major Membrane Protein (MMP)-II をコードする遺伝子上流に結核菌 Ag85A の secretion signal を付加し、HSP60 のプロモーターのもと遺伝子発現を制御するシステムを構築し BCG に組み込ませた (BCG-SM の作製)。BCG-SM とベクターコントロール BCG (BCG-pMV) の T 細胞活性化能をヒトリンパ球を用いた *in vitro* 実験とマウスを用いた *in vivo* 実験で評価した (牧野)。
5. 結核菌 Ag85B の C 末端ペプチド Peptide-25 のアジュバント活性を、マウスに OVA と Peptide-25 を共免疫し、OVA 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性化を指標に検討した (高津)。
6. 結核菌および BCG より DNA 結合蛋白質 (MDP1) を精製し、その遺伝子配列を決定した後、結核菌の宿主細胞への接着における役割を検討した (小林)。
7. 抗酸菌発現ベクター中の構成性発現プロモーター (hsp60) の下流に抗菌薬耐性遺伝子を組み込んだプラスミドを構築する。BCG 等の抗酸菌にプラスミドを導入し、得られた形質転換株の抗菌薬耐性をディスク法で検索する。さらに、hsp60 をマクロファージ内でのみ発現するプロモーター配列に置換し、同様に抗酸菌に導入する (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. A85a を組み込むベクターとしてセンダイウイルスを用いたが、アデノウイルスと同様、すでに感作されているリンパ球ドナーが多かった。しかし、この反応に末梢単球が関与していることが判明した (竹森)。
2. GPL 核抗原を用い、MAC 患者の抗体価を多施設において測定した。抗 GPL 核 IgA 抗体は感度・特異度に優れ、MAC 患者として *M. Kansasii* 感染患者および肺結核患者を容易に鑑別することが可能であり、かつ本 IgA 抗体は疾患活動性を反映した (小林)。
3. 非結核性抗酸菌の遺伝子診断法を LAMP 法を用いたシステムで確立し、さらに FD 試薬を用いることで、途上国でも簡便に使用できる測定系として樹立した。本方法は電気泳動法を用いないため、実験室周囲への抗酸菌の拡散を防ぐ上でも有用であった (牧野・向井)。
4. 抗酸菌の抗原性を規定する主要抗原を細胞内で分泌するリコンビナント BCG を作製した。本 BCG は従来の BCG に比し、T 細胞活性化能に優れ、タイプ 1 T 細胞を効率良く活性化し、マウス生体内で主要抗原特異的メモリー T 細胞を産生した (牧野)。
5. 結核菌 Ag85B 由来 Peptide-25 は強い T 細胞活性化能を有するとともにアジュ

バント作用をも併せ持っている、OVA と Peptide-25 を共免疫するとより強い抗 OVA 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を産生した(高津)。

6. 抗酸菌表層に存在する MDP1 抗原は、宿主細胞表面に存在するグリコサミノグリカンに結合した。結核菌は、MDP1 がグリコサミノグリカンに結合することで宿主細胞内に取り込まれ、抗 MDP1 抗体あるいはグリコサミノグリカンの生体内投与は、結核菌の宿主細胞への感染を著しく阻害した(小林)。
7. *S. aureus* 由来抗酸菌薬耐性遺伝子を発現させた BCG 株は用いた抗菌薬に対し耐性を示した。マクロファージ内でのみ抗菌薬耐性遺伝子を発現する BCG 株を樹立した(荒川)。

D. 考察

抗酸菌感染症は、結核を中心として未だに地球規模で猛威を振るっている細菌感染症である。MAC を中心とした非結核性抗酸菌は、高齢者あるいは HIV-1 感染者など免疫機能が低下した宿主においては重篤な結核様症状を誘導し、かつ通常用いられる抗結核薬に抵抗性を示す。一旦発症すると治療に苦慮する疾患である。従って、感染早期に適切に診断する方策の開発およびこれら抗酸菌症の感染あるいは発症を予防する有効な方策の開発・確立が強く望まれている。

結核に対する生体防御反応は、細胞性免疫応答が中心となって営まれている。従って、結核を感染早期のうちに診断する補助診断法も細胞性免疫反応を利用した方策が望ましい。しかし、多面化する現在社会においては、様々な病原体に曝露する機会が多く、一旦感染すると宿主は容易にこれら病原体に感作される。免疫担当細胞の中で、これら病原体に感染される細胞として、B リンパ球および T リンパ球が主として考えられてきたが、ヒト末梢単球もこれら病原体の影響を強く受け、結核菌特異的免疫反応を的確に把握する上で重要な負の影響を与える可能性が示唆された。普遍的かつ有

効な補助診断法を確立する上で重要な一步と考えられる。

非結核性抗酸菌は日和見感染を誘導する抗酸菌であり、同時に環境菌でもあるため、疾患起因菌を同定することは容易ではなく、種々の補助診断法を組み合わせる必要性が高い。本研究班では、非侵襲性血清診断法と抗酸菌遺伝子診断法を樹立した。ともに感度・特異度に優れ、両者を組み合わせることで、主たる非結核性抗酸菌症の診断を容易にすることが可能であると考えられる。両者はとくに発展途上国においても使用することが可能であり、今後全世界的に幅広く使用されることを願う。

BCG は抗酸菌症の発症を予防し得る唯一のワクチンとして長い間世界に君臨してきた。しかし、その有効性に近年では強く疑問が持たれ、現在では小児の粟粒結核など一部の結核にのみ有効とされ、その使用も限られてきている。BCG は生ワクチンであり、接種後 10~40 年と長期にわたり生体内で生存でき、この間有効に作用すると信じられてきたが、長期生存し宿主リンパ球を長期にわたり刺激し続けることは、むしろ逆効果ないしは欠点とも考えられる。より強く短期間の間宿主 T リンパ球を刺激し、質の良い抗原特異的なメモリー CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞を産生することがより重要である。そのためには、より強く T リンパ球を刺激し、自ら作製したエフェクター T 細胞に容易に体外に排除させるべきである。本研究班で作製したリコンビナント BCG はこうした条件を満たしている可能性が高い。実際、小動物の生体内に投与した結核など病原性抗酸菌による病変発症を抑制することが可能であれば、従来の BCG より有効なリコンビナント BCG として世界で 3 番目の報告となる。

成人あるいは高齢者の結核を有効に阻止するためには、抗原特異的なメモリー T 細胞を生体内で長期維持することが必要である。そのためには、定期的に T 細胞を刺激することが必要である。従来の研究で、BCG は頻回に投与してもその効果を増強させることは難しいことが明らかになっている。

従って、BCG 以外の抗原性に富んだブースターワクチンが必要である。本研究班で解析している Ag85B 由来 Peptide-25 は、ペプチドであるにもかかわらず T 細胞活性化能が非常に強く、宿主細胞を再刺激するためには有効な手段となるものと期待される。また、高齢者結核においては、潜伏感染している結核菌が再活性化して発症するケースが多く、こうした場合エフェクター細胞として CD8 陽性 T 細胞がより有効と考えられる。本年度の研究で、Peptide-25 は CD8 陽性 T 細胞にキラー活性を付与する上でも有効であり、ブースターワクチンとして大きな期待がかかる。

E. 結論

非結核性抗酸菌の補助診断法の開発および BCG に代わる新しいリコンビナント BCG 株の作製、BCG 非依存性ワクチン候補分子の開発に新たな知見が得られた。

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. Use of glycopeptidolipid core antigen for serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in immunocompetent patients. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 12:44-51, 2005.
- 2) Matsumoto, S., M. Matsumoto, K. Umemori, Y. Ozeki, M. Furugen, T. Tatsuo, Y. Hirayama, S. Yamamoto, T. Yamada, and K. Kobayashi. DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. J. Immunol., 175:441-449, 2005.
- 3) Oiso, R., N. Fujiwara, H. Yamagami, S. Maeda, S. Matsumoto, S. Nakamura, N. Oshitani, T. Matsumoto, T. Arakawa, and K. Kobayashi. Mycobacterial trehalose 6,6'-dimycolate preferentially induces type 1 helper T cell responses through signal transducer and activator of transcription 4 protein. Microb. Pathog., 39:35-43, 2005.
- 4) Maekura, R., Y. Okuda, A. Hirotsu, S. Kitada, T. Hiraga, K. Yoshimura, I. Yano, K. Kobayashi, and M. Ito. Clinical and prognostic importance of serotyping *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex isolates in human immunodeficiency virus-negative patients. J. Clin. Microbiol., 43:3150-3158, 2005.
- 5) Fujiwara, N., and K. Kobayashi. Macrophages in inflammation. Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy, 4:281-286, 2005.
- 6) Maeda, Y., T. Mukai, J. Spencer, and M. Makino. Identification of immunomodulating agent from *Mycobacterium leprae*. Infect. Immunity, 73:2744-2750, 2005.
- 7) Makino, M., Y. Maeda, and N. Ishii. Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from *Mycobacterium leprae*. Cell. Immunol., 233:53-60, 2005.
- 8) Miyamoto, Y., T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. Identification and characterization of the genes involved in glycosylation pathways of mycobacterial glycopeptidolipids biosynthesis. J. Bacteriol., 188:86-95, 2006.
- 9) Mukai, T., Y. Miyamoto, T. Yamazaki,

and M. Makino. Identification of *Mycobacterium* species by comparative analysis of the *dnaA* gene. FEMS Microbiol. Lettr., 254:232-239, 2006.

- 10) Nagai, Y., T. Kobayashi, Y. Motoi, K. Ishiguro, S. Akashi, S. Saitoh, Y. Kusumoto, T. Kaisho, S. Akira, M. Matsumoto, K. Takatsu, and K. Miyake. Radioprotective 105/MD-1 links TLR2 and TLR4-MD2 in antibody response to microbial membranes. J. Immunol. 174:7043-7049, 2005.
- 11) Kikuchi, T., S. Uehara, H. Ariga, T. Tokunaga, A. Kariyone, T. Tamura, and K. Takatsu. Augmented induction of CD8⁺ cytotoxic T cell response and antitumour resistance by T helper type1-inducing peptide. Immunology, 117:47-58, 2006.
- 12) 小林和夫. 結核における肉芽腫炎症と宿主防御の統御. 日本医事新報 4235:20-26, 2005.
- 13) 小林和夫. マイコバクテリウム (抗酸菌) と感染症. 標準微生物学 第9版 (山西弘一 監修、平松啓一、中込 治編) 東京: 医学書院. 279-292, 2005.
- 14) 小林和夫. 結核菌. 微生物感染学---新しい感染の科学--- (光山正雄編) 東京: 南山堂. 178-187, 2005.
- 15) 牧野正彦. 結核・ハンセン病. 倉田毅編, ネオエスカ 感染症・アレルギーと生体防御, 同文書院出版, 105-110, 2005.
- 16) 牧野正彦. 生体防御機構. 牧野正直・長尾栄治・畑野研太郎編, 総説現代ハンセン病医学, 東海大学出版会, in press, 2006.
- 17) 牧野正彦、鈴木幸一、福富康夫、山下康子、前田百美、宮本友司、向井 徹、中田 登、甲斐雅規、山崎利雄、儀同政一、松岡正典. ハンセン病基礎医学研究のトピックス. Jpn. J. Leprosy, 74:3-22, 2005.

2. 学会発表

国内学会

- 1) 結核菌の肺胞上皮細胞への接着/侵入におけるヒアルロン酸-MDP1 結合の役割 (ワークショップ). 平山幸雄、松本壮吉、和田崇之、尾関百合子、梅森清子、山本三郎、西内由紀子、松本真、小林和夫. 日本細菌学会雑誌, 60:104, 2005. 第77回日本細菌学会総会 2005年4月 東京
- 2) 結核菌感染における抑制性 T 細胞 (CD4⁺CD25⁺ regulatory T細胞) の役割 (ワークショップ). 尾関百合子、松本壮吉、小林和夫. 日本細菌学会雑誌, 60:156, 2005. 第77回日本細菌学会総会 2005年4月 東京
- 3) 結核菌の核酸結合性蛋白質と DNA の複合体に対する免疫応答解析. 松本壮吉、松本 真、梅森清子、尾関百合子、山本三郎、山田 毅、小林和夫. 日本細菌学会雑誌, 60:157, 2005. 第77回日本細菌学会総会 2005年4月 東京
- 4) 結核菌由来 cord factor は転写因子 STAT4 蛋白質を介して Th1 応答を誘導する. 大磯龍太、藤原永年、前田伸司、松本壮吉、小林和夫. 日本細菌学会雑誌, 60:163, 2005. 第77回日本細菌学会総会 2005年4月 東京.
- 5) 結核菌の分子疫学的手法としての MIRU-VNTR 法の有用性 (要望課題). 和田崇之、長谷 篤、前田伸司、小林和夫. 結核, 80:261, 2005. 第80回日本結核病学会総会 2005年5月 さいたま
- 6) 結核菌のミコール酸シクロプロパン環が宿主免疫応答に与える影響. 藤原永年、前田伸司、小林和夫. 結核, 80:265, 2005. 第80回日本結核病学会総会 2005年5月 さいたま
- 7) 結核菌のヒストン様蛋白質 mycobacterial DNA-binding protein 1 の抗原性における DNA 介在の意義.

- 松本壮吉、小林和夫、松本 真、尾関百合子、山本三郎、山田 毅. 結核、80 : 266、2005. 第 80 回日本結核病学会総会 2005 年 5 月 さいたま
- 8) 抑制性 T 細胞 (CD4⁺CD25⁺ regulatory T 細胞) の結核菌感染における役割. 尾関百合子、松本壮吉、小林和夫、菅原 勇、宇田川忠. 結核、80 : 267、2005. 第 80 回日本結核病学会総会 2005 年 5 月 さいたま
- 9) 抗酸菌の肺胞上皮細胞侵入における mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) とヒアルロン酸の役割. 平山幸雄、松本壮吉、小林和夫、和田崇之、尾関百合子、西内由紀子、山本三郎. 結核、80 : 268、2005. 第 80 回日本結核病学会総会 2005 年 5 月 さいたま
- 10) Extracellular occurring mycobacterial DNA-binding protein 1 is involved in *Mycobacterium*-lung epithelial cell interaction through binding to hyaluronic acid. Ozeki, Y., S. Matsumoto, K. Umemori, S. Yamamoto, and K. Kobayashi. 日本免疫学会・学術集会記録、35 : 69、2005. 第 35 回日本免疫学会総会・学術総会 2005 年 12 月 横浜
- 11) The role of mycobacterial DNA-binding protein-1-DNA complex in the host protection against *Mycobacterium tuberculosis*. Matsumoto, S., K. Umemori, Y. Ozeki, S. Yamamoto, T. Yamada, and K. Kobayashi. 日本免疫学会・学術集会記録、35 : 171、2005. 第 35 回日本免疫学会総会・学術総会 2005 年 12 月 横浜
- 12) 細胞内寄生に影響を与える抗酸菌糖脂質 Glycopeptidolipids の構造. 宮本友司、向井 徹、中田 登、甲斐雅規、前田百美、中 崇、矢野郁也、牧野正彦. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京
- 13) クロファジミンによるマクロファージの細胞死誘導. 福富康夫、前田百美、牧野正彦. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京
- 14) らい菌感染末梢血単球由来サイトカインの樹状細胞による生体防御反応に及ぼす影響 (ワークショップ). 牧野正彦、前田百美、向井 徹. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京
- 15) *Mycobacterium smegmatis* の持つ第 2 の *katG* 遺伝子の機能. 中田 登、甲斐雅規、宮本友司、鈴木幸一、牧野正彦. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京
- 16) MMP-II を用いたハンセン病血清診断法の開発. 前田百美、石井則久、向井徹、甲斐雅規、福富康夫、北田清悟、小林和夫、矢野郁也、牧野正彦. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京
- 17) リアルタイム PCR 法を利用した薬剤耐性変異検出の試み. 甲斐雅規、Nguyen Phuc Nhu Ha、松岡正典、牧野正彦. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2005 年 5 月 青森
- 18) クロファジミンによる細胞死誘導. 福富康夫、前田百美、牧野正彦. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2005 年 5 月 青森
- 19) らい菌偽遺伝子の一部は高レベルで発現しており感染後に発現量が変化する. 鈴木幸一、中田 登、Pham Dag Bang、牧野正彦. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2005 年 5 月 青森
- 20) らい菌膜免疫調整性蛋白の同定. 前田百美、向井 徹、山下康子、牧野正彦. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2005 年 5 月 青森
- 21) LAMP 法によるらい菌遺伝子診断法の確立. 向井 徹、宮本友司、松岡正典、牧野正彦. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2005 年 5 月 青森
- 22) Analysis of mechanisms of

multibacillary leprosy development: the role of IL-1 β (ワークショップ). 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹. 第 35 回日本免疫学会総会 2005 年 12 月 横浜

23) マクロファージの in vitro における抗らい菌活性発現. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第 35 回日本免疫学会総会 2005 年 12 月 横浜

Th1 誘導ペプチドによる抗腫瘍免疫増強機構の解析. 菊池剛史, 田村敏生, 刈米アイ, 高津聖志. 第 64 回日本癌学会学術総会 2005 年 9 月 札幌

24) CpG ODN-Mediated Prevention from Ovalbumin-induced Anaphylaxis in Mouse through B Cell Pathway. XU, W., T. Tamura, and K. Takatsu. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 2005 年 12 月 横浜

25) TCR シグナルを介する Th1 分化における転写因子 T-bet の役割: T-bet ノックアウトマウスを用いた解析. 下袴田陽子, 徳永岳史, 仲田真己代, 有賀晴之, 刈米アイ, 田村敏生, 高津聖志. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 2005 年 12 月 横浜

26) TCR: 抗原ペプチド MHC 複合体の相互作用による IL-12p35 の制御. 徳永岳史, 下袴田陽子, 菊池剛史, 仲田真己代, 有賀晴之, 刈米アイ, 田村敏生, 高津聖志. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 2005 年 12 月 横浜

27) 結核菌蛋白 Ag85B 由来 Peptide-25 によるクロスプライミングの増強. 刈米アイ, 菊池剛史, 田村敏生, 高津聖志. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 2005 年 12 月 横浜

国際学会

1) Functional counteraction between toll-like receptor 2 and COR01A that affects intracellular survival of mycobacteria. Suzuki, K., F. Takeshita, N. Nakata, N.

Ishii, and M. Makino. The 14th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage 2005, 3-4 June, 2005, Saitama, Japan.

2) IL-1 at the early stage of monocyte differentiation to dendritic cells impairs functional activities of dendritic cells. Makino, M., Y. Maeda, and T. Mukai. Fortieth Annual U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 40th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Seattle, USA, July 28-30, 2005.

3) Rapid detection of *Mycobacterium leprae* by a loop-mediated isothermal amplification method. Mukai, T., Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. Fortieth Annual U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 40th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Seattle, USA, July 28-30, 2005.

4) Instruction of CD4⁺ T cell fate to Th1 development by Th1 inducing peptide: Roles of T cell receptor-mediated signals. Takatsu, K. "3rd FIMSA Congress", Hangzhou, April, 2005.

5) Role of TCR signal in the Th1/Th2 regulation: A P25 TCR transgenic model, Takatsu, K. "22nd US-Japan Cooperative Medical Science Program", Seattle, July, 2005.

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17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 BCG 感作 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 細胞の活性化に伴い、多量のインターフェロンガンマ (IFN γ) が産生された。このため、このウイルスベクターを用いた系は、現在の系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。そこで、ヒトが免疫をもたないセンダイウイルスベクターの使用を検討したが、アデノウイルスと同様に IFN γ 産生が認められたため、このベクターも現時点では診断法のベクターとして適さ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有意に低下し、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。その機序として、単球を除去した末梢血単核球ではこの T 細胞応答抑制が認められないことから、Ag85a は単球の機能阻害を介して、T 細胞応答を抑制する可能性が示された。また、単球除去末梢血単核球を用いた診断法の開発の可能性が示唆された。

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抗酸菌感作 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。次のステップとしてヒト末梢血単核球に組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した。その結果、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。本研究は、システムの改良を行うとともに、Ag85a が T 細胞免疫応答を抑制するメカニズムを解析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 Simplified 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。

(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、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。

(4) センダイウイルスの樹状細胞への感染と T 細胞反応

末梢血単核球 1×10^6 にセンダイウイルスを MOI3 の条件下で感染させ、培養上清中の IFN γ 濃度を ELISA にて測定した。

(5) 単球除去末梢血単核球を用いた T 細胞反応

磁気細胞分離システムを用いて単球を除去した末梢血単核球 1×10^6 にアデノウイルスを感染させ、培養上清中の IFN γ 濃度を ELISA にて測定した。

(6) Ag85a アデノウイルス感染単球上のヒト組織適合抗原 (HLA) 発現

末梢血単核球 1×10^6 にアデノウイルスまたは加えて、1 日間培養し、CD14, HLA-A, B, C, HLA-DR に対する抗体で染色した後、フローサイトメトリーを用いて CD14 陽性単球上の HLA 発現を解析した。

倫理面への配慮 保存される検体試料や研究データに対しては個人情報情報を削除し匿名化を行った。ボランティアには十分な研究内容の説明を口頭と文書の両方で伝え、承諾を確認した。

C. 研究結果

既存の免疫に影響を受けないウイルスベクターの導入を検討する目的で、23 歳から 65 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、単核球に直接ヒトに病原性のないセンダイ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、アデノウイルスの感染と同様、センダイウイルス感染によって高い IFN γ 産生を誘導する検体が複数存在ことが明らかとなった。(図 1)。

Ag85a が T 細胞免疫応答を抑制するメカニズムを解析する目的で、末梢血単核球より CD14 陽性単球分画を除去し、この反応系において単核球の IFN γ 産生を測定した。その結果、単球除去によって、単核球からの IFN γ 産生は上昇した。また、Ag85a 組み込みアデノウイルスの感染でみられたコントロールアデノウイルス感染に対する IFN γ 産生

低下は消失し、末梢血単核球中の単球と Ag85a による IFN γ 産生低下が相関することが判明した (図 2)。

以上のことから、Ag85a 組み込みアデノウイルスに感染した単球がアデノウイルスに対する T 細胞反応を抑制することが示唆された。このアデノウイルス感染による単球の機能変化を検討する目的で、末梢血単核球にアデノウイルスを感染させ、1 日後の単球表面 HLA 発現を活性化の指標として解析した。その結果、アデノウイルスの感染によって HLA 発現が増強するが、Ag85a 組み込みアデノウイルスの感染ではコントロールアデノウイルスの感染に比べて HLA 発現が有意に低いことが判明し、Ag85a がアデノウイルス感染単球の活性化を抑制していることが示唆された (図 3)。

D. 考察

前年度までの結果より、抗酸菌特異的遺伝子 Ag85a を組み込んだアデノ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。

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行のシステムでは適さないことが判明した。そこで、ヒトに感染を起こさず、かつ樹状細胞指向性の強いセンダイウイルスに着目し、ベクターとしての使用可能性を検討したが、アデノウイルスと同様、一部の検体で強い IFN γ 産生が認められた。これは、センダイウイルスがヒトに感染する 2 型パラミクソウイルスと交差反応し、パラミクソウイルスに対する免疫記憶により T 細胞が活性化されたと考えられた。今後、ヒトへの免疫原性が低く、かつ樹状細胞指向性が高いベクターの探索が必要である。

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。

本研究で、単球除去により抗原特異的 T 細胞応答が回復したという結果より、単球での Ag85a 発現が T 細胞抑制と相関することが判明した。さらに、Ag85a 組み込みアデノウイルス感染単球ではコントロールアデノウイルス感染によって起こる HLA 分子発現の増強が障害されることより、Ag85a は単球内での発現により、単球のアデノウイルスによる活性化を阻害する可能性が示唆された。今後、単球除去末梢血単核球を用いた診断法の開発可能性を検討する必要がある。また、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を、結核診断法として用いるためには改良が必要であることが判明した。

これに対応しセンダイウイルスベクターの導入を検討したが、センダイウイルスもヒトの既存の免疫応答を誘導するため、このシステムも適切でないことが判明した。また、末梢血への Ag85a 導入により、Ag85a が他の抗原特異的 T 細胞応答を抑制するこ

とが示唆されたが、その機序として、Ag85a の単球での発現により、単球のアデノウイルスによる活性化阻害が生じることによる可能性が示唆された。

今後、システムの改良を継続するとともに、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

1. 論文発表
なし
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

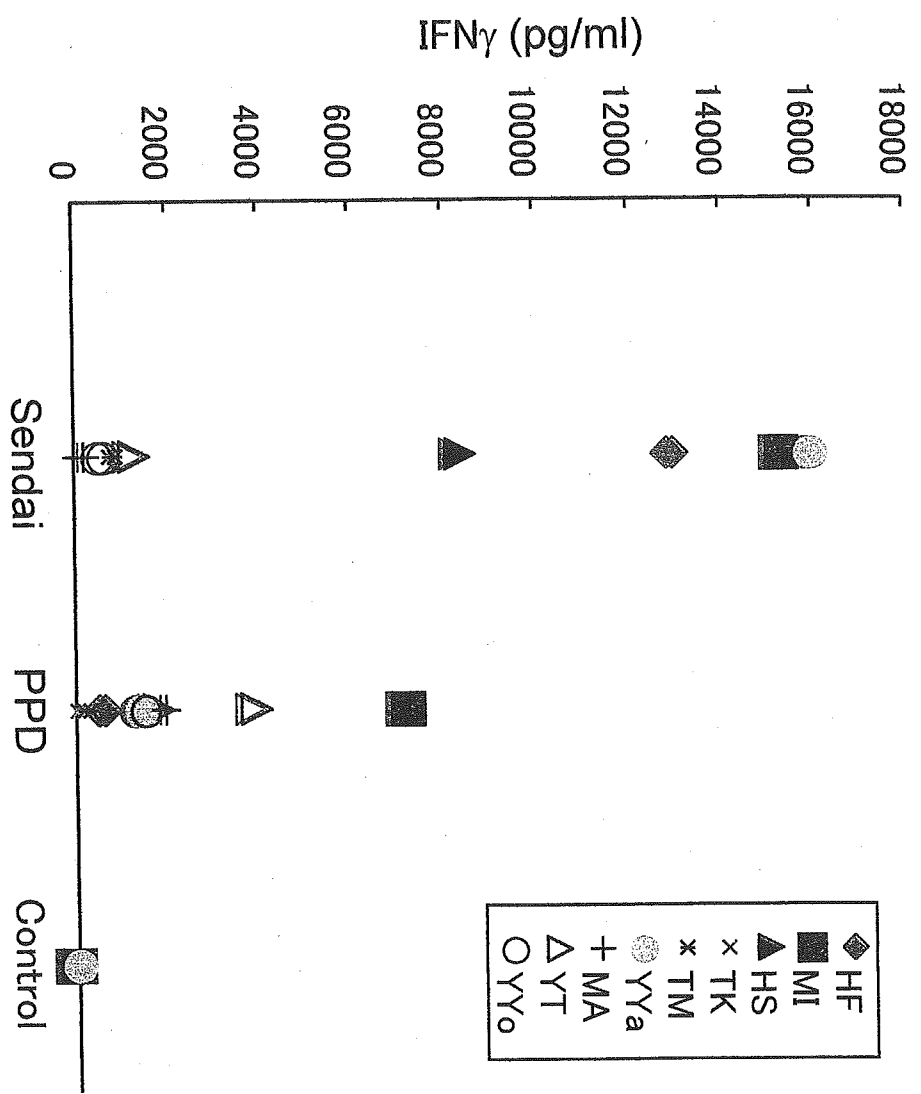


図1 センダイウイルスベクターによる末梢血単核球のIFN γ 産生

Depletion of monocytes from PBMC restores adenovirus-specific T cell immune response

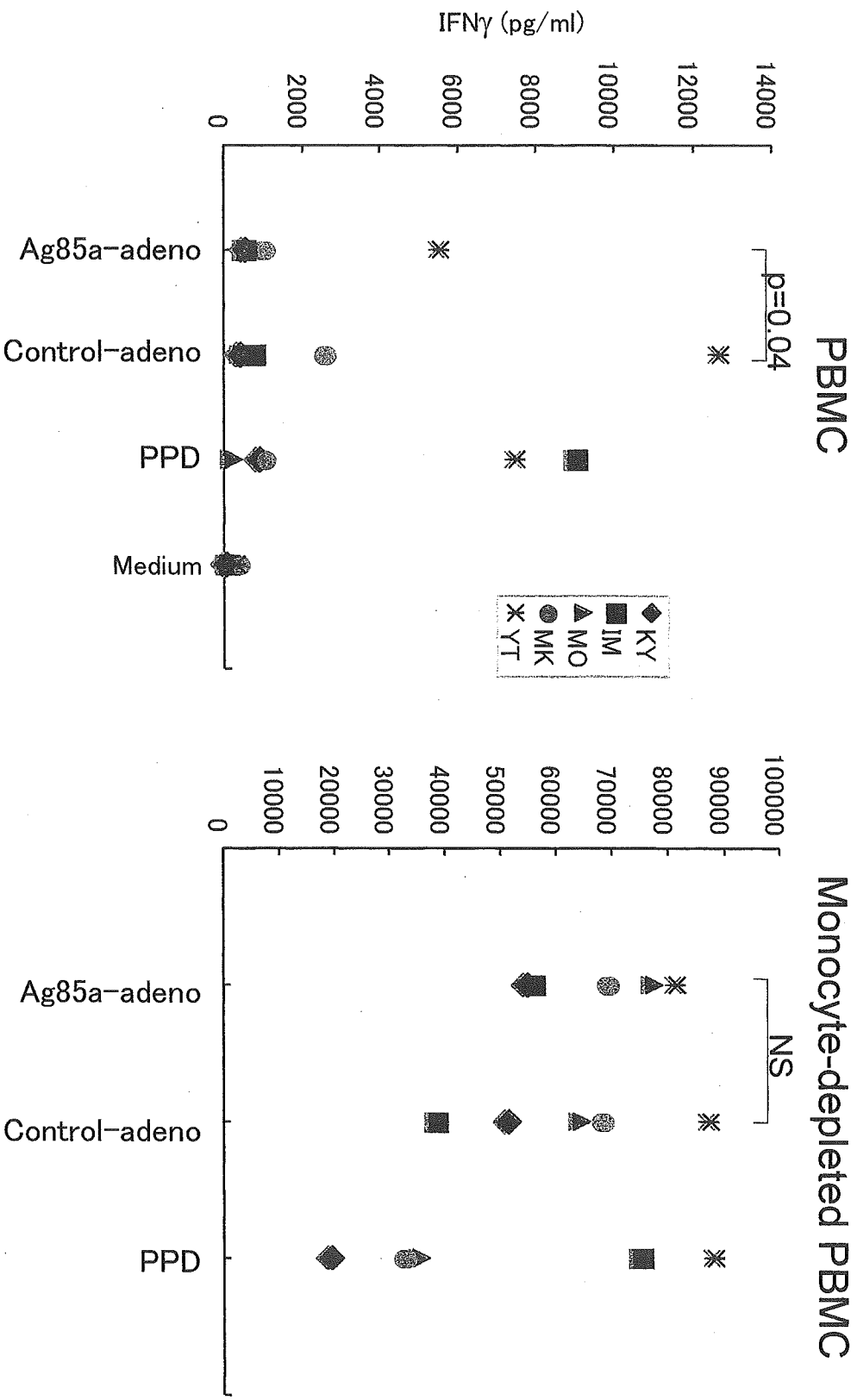
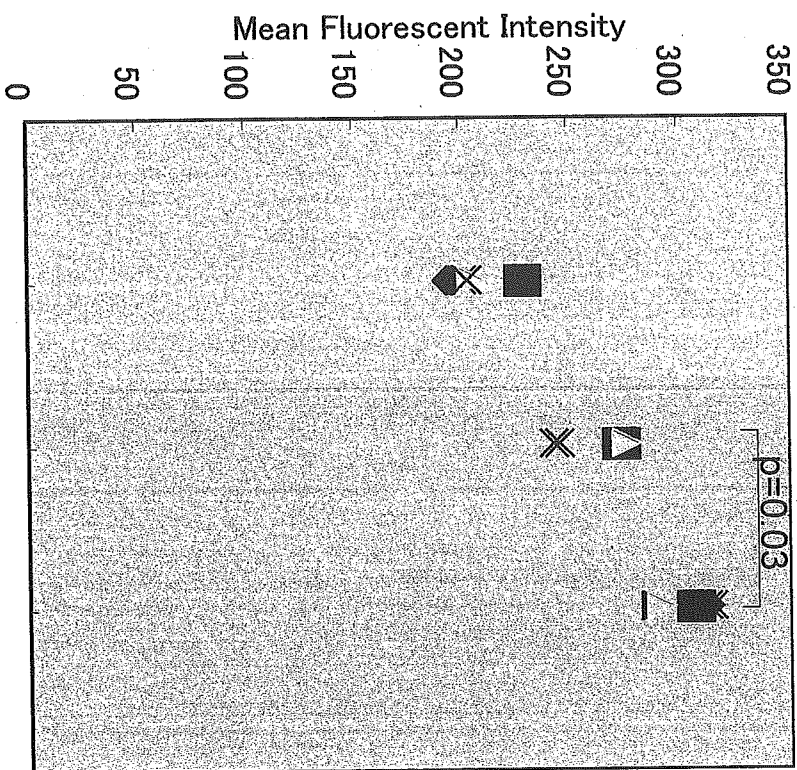


図2 単球除去末梢血単核球に組み込みウイルスをMOI50で感染させたときのIFN γ 産生量

Upregulation of HLA expression on monocytes was impaired by transduction of Ag85a

HLA-A, B, C



HLA-DR

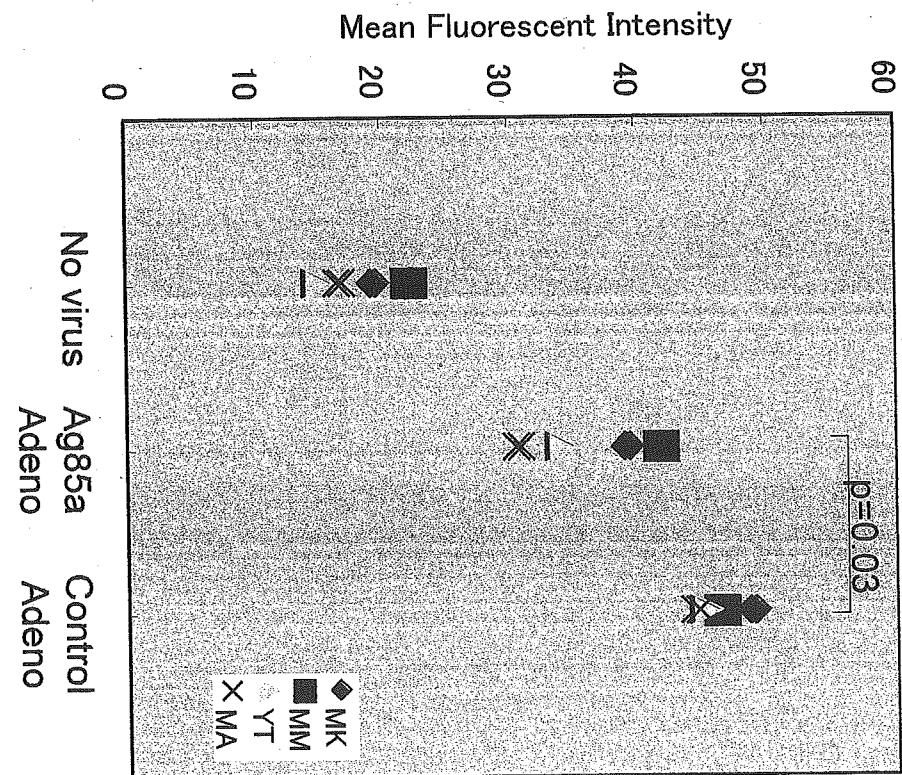


図3 組み込みウイルスベクター感染単球上のHLA発現

平成17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）