

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18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19(2007)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 阿戸 学（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（国立感染症研究所）	15
分担研究報告書：マクロファージ内で発現する遺伝子の網羅的検出と細胞壁構造の構築に關与する遺伝子の解析 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）	31
研究成果の刊行に関する一覧表	35

平成18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.

病原性抗酸菌感染症は、若干の減少傾向を示しているが未だに猛威を振るい続けている慢性感染症である。本研究班においては、診断・治療・予防法の確立に向けて基礎研究情報を提供するため、これら諸問題に取り組んだ。本年度は、非結核性抗酸菌症の簡易診断法の開発、臨床検体の簡便かつ安全な処理法・保存法の開発、ならびに新しく開発したリコンビナント BCG の初回免疫ワクチンおよび結核菌分泌タンパク（Ag85B）のブースターワクチンとしての有用性の検討、さらにマクロファージ内で薬剤標的となり得る抗酸菌遺伝子の同定を行った。その結果、臨床検体の処理法として特殊化学処理を施した FTA カードが有用であった。また、新しいリコンビナント BCG (BCG-SM) は、マクロファージに感染すると GM-CSF の産生を誘導することで、マクロファージの抗原提示能を増強し、タイプ 1 CD4 陽性 T 細胞を活性化した。同時に病原性抗酸菌感染により誘導される IL-10 の産生を抑制した。Ag85B の活性中心を担う Peptido-25 は異種タンパクに対するキラー T 細胞の産生能を増強するアジュバント効果を有していることを明らかにした。結核菌がマクロファージに感染した時のみに強発現し、良き薬剤ターゲットとなり得る遺伝子を同定するシステムを開発した。また、治療抵抗性非結核性抗酸菌の新たな薬剤ターゲットとして Glycopeptidolipid の酵素群を解明した。

分担研究者

阿戸 学	(国立感染症研究所・免疫部・主任研究官)
荒川 宜親	(国立感染症研究所・細菌第二部・部長)
小林 和夫	(国立感染症研究所・免疫部・部長)
高津 聖志	(東京大学医科学研究所・免疫調節分野・教授)

A. 研究目的

病原性抗酸菌の感染による結核等の抗酸菌症は世界三大慢性感染症の一つであり、現在においても猛威を振るい続けている。診断・治療・予防の何れをとっても大きな問題が山積みされており、これらの解決に向けた基礎研究を網羅的かつ総括的に行う必要性は極めて高い。本研究班においては、非結核性抗酸菌症の診断、病原性抗酸菌のワクチンおよび新しい治療法の開発に向けた基礎的研究を展開することを目的として

いる。診断に関連しては、非結核性抗酸菌症の遺伝子診断に関する研究を中心に行った。非結核性抗酸菌は環境菌であり、遅発育性菌であるため診断に苦慮するケースが多い。また、多くの研究分離株は薬剤耐性を示すことから早期診断が求められる。さらに、全世界的には発展途上国に多く、こうした国々では日和見感染症の原因菌として重要な位置を占めている。そこで、臨床検体採取から検査終了まで、安全かつ迅速に、さらに途上国でも行うことができる遺

伝子診断法の開発を行った。結核の診断法は、オランダのグループから細胞性免疫を利用し IFN- γ の産生を半定量する診断キットが開発・市販され、現在注目を浴びている。しかし、本キットは結核菌感染者の末梢リンパ球が正常に反応するという仮定の下に開発されたものである。現状では、結核を発症する高齢者の多くは T 細胞の機能低下が原因となって発症するため、本キットの信頼性は今後の検討を待たなければならない。そこで、これらキットに使われる結核菌由来の抗原に対するヒトリンパ球がどの程度保持されているか検討するシステムの構築を試みた。成功すれば、二つのキットを組み合わせた検査法が最も信頼できる診断法に成長すると期待される。

ワクチンの研究については、昨年度までに作製された細胞内で抗酸菌由来主要抗原を分泌するリコンビナント BCG (BCG-SM) と結核菌主要分泌抗原の一つ Ag85B の活性中心を担うペプチド (Peptido-25) について、それぞれ初回免疫ワクチン・追加免疫ワクチンの観点からその有用性を検討することを目的とした。BCG-SM はマクロファージとの関連性と IL-10 産生抑制に及ぼす効果、Peptido-25 は CD8 陽性 T 細胞の活性化に焦点を絞り検討した。さらに、結核菌を含む抗酸菌はマクロファージに強い親和性を有し、マクロファージ内で潜伏感染を果たす。潜伏感染を阻止するためには、感染したマクロファージ内で発現する遺伝子を同定し、本遺伝子をターゲットとした薬剤治療が有効と考えられる。そこで、マクロファージ内でいかなる遺伝子が高発現するか検索するシステムを構築すること、さらに薬剤抵抗性非結核性抗酸菌 (*M. intracellulare*) の Glycopeptidolipid (GPL) を新たな薬剤ターゲットとして資するため、その化学構造と合成系の解明を目的とした。

以下に主な研究課題を挙げる。

1. 非結核性抗酸菌の簡易・迅速診断法の開発 (向井・牧野)
2. ヒト末梢 CD8 陽性 T 細胞の機能評価 (阿戸)

3. リコンビナント BCG (BCG-SM) のマクロファージを介した T 細胞活性化能と IL-10 産生に及ぼす影響 (牧野)
4. Ag85B 由来ペプチド (Peptido-25) の CD8 陽性 T 細胞活性化に関する検討 (高津)
5. 抗酸菌感染マクロファージ内に高発現する抗酸菌遺伝子の同定 (荒川)
6. 非結核性抗酸菌 GPL の化学構造と合成系の解明 (小林)

B. 研究方法

1. 抗酸菌感染者臨床検体の簡易処理と安定保存を供するため、表面を特殊化学処理した FTA カードを用いた。FTA カードは、検体塗付後室温・60 分間乾燥させることで DNA 抽出を可能とした。ハンセン病患者鼻汁液は、インドネシア国東ジャワ州の住民 297 人より採取した (向井・牧野)。
2. 磁気細胞分離システムを用いて、末梢単核球より CD14 陽性単球を除去し、さらに樹状細胞マーカー陽性細胞を分離した。樹状細胞および CD8 陽性細胞に Ag85a 組み込みアデノウイルスを添加し 5 時間培養し、上清中の IFN- γ を ELISA 法で測定した (阿戸)。
3. 抗酸菌主要抗原 Major Membrane Protein (MMP)-II 分泌リコンビナント BCG (BCG-SM) をヒト末梢単球より M-CSF を用いて分化誘導したマクロファージ感染させ、抗原提示細胞として用いた。マクロファージの抗原提示能は、自己 CD4 陽性 T 細胞の活性化能 (IFN- γ 産生能) を指標に検討した。BCG-SM 感染単球より M-CSF を用いて作製したマクロファージをらい菌で刺激し、培養上清中の IL-10 を ELISA 方で測定した (牧野)。
4. Ag85B の活性中心ペプチド (Peptido-25) と OVA を共免疫し、OVA 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の生成に及ぼす効果を判定した。CTL 活性は、OVA 遺伝子導入した EL-4 細胞をターゲットとして用い、 ^{51}Cr リリースアッセ

イより評価した（高津）。

5. 抗酸菌発現ベクターpvv16 の hsp60 遺伝子下流に抗酸菌耐性遺伝子を組み込み、*M. smegmatis* に導入した。同様にマクロファージ内で発現が増強する *acr* プロモーターを hsp60 の代わりに導入したのも作製し、得られた *M. smegmatis* を THP-1 細胞に添加した。抗菌薬処理後のマクロファージ内抗酸菌の生菌数を算出した（荒川）。
6. *M. intracellulare* から GPL を単離精製し、ガスクロマトグラフィー等を用いて質量分析した。GPL 合成酵素の遺伝子解析・ゲノム DNA を抽出し、コスミドライブラリーから塩基配列を決定した（小林）。

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. 臨床検体を FTA カードで処理し、LAMP 法に応用した結果、インドネシアの住民約 300 検体では Nested PCR 法と LAMP 法でほぼ同程度の陽性率を示すとともに、両者の一致率も極めて良好であった（向井・牧野）。
2. 末梢血樹状細胞を抗原提示細胞として用いると、Ag85a 組み込みアデノウイルスベクターを感染した樹状細胞のみが、自己の CD8 陽性 T 細胞を活性化し IFN- γ の産生を誘導した。CD8 陽性 T 細胞の機能評価が可能となった（阿戸）。
3. BCG-SM を M-CSF を用いて産生したマクロファージに感染させると、GM-CSF を産生しマクロファージの抗原提示能を

増強することで自己の CD4 陽性 T 細胞を活性化した。また、BCG-SM を予めマクロファージのプレカーサーである末梢血単球に感染しておくこと、その後分化誘導したマクロファージからの IL-10 の産生が極めて強く抑制された。本作用も内因性 GM-CSF 産生によるものであった（牧野）。

4. 結核菌 Ag85B の活性中心ペプチド（Peptido-25）は、共免疫した OVA の特異的な CTL 生成を増強した。本作用は、Peptido-25 により活性化された CD4 陽性 T 細胞上に発現する CD40 リガンドが抗原提示細胞を活性化することで誘導されていることが判明した（高津）。
5. 抗結核抗菌薬耐性遺伝子の^{上流に}、マクロファージ内で発現が亢進することが知られる *acr* プロモーターを有するプラスミドで形質変換した *M. smegmatis* をマクロファージに貪食させると、抗菌薬存在下でも菌は増殖し、マクロファージ内での遺伝子発現が薬剤耐性を与えたことが明らかになった（荒川）。
6. 代表的非結核性抗酸菌（MAC）の血清型 7 型菌から精製した GPL を解析すると、全 MAC に共通して存在する Core 部分に加え、糖鎖部分として 3 個の rhamnose を有す特異な構造を示し、rhamnose 転移酵素遺伝子は薬剤標的として有用であることが判明した（小林）。

D. 考察

結核を中心とした抗酸菌の制御は、全世界の研究者に与えられた重要な研究課題の一つである。より迅速にかつ正確に診断し、的確な治療を施し、かつ予防方策を確立することが求められている。しかし、これら中心研究課題の何れにおいても、現状では満足すべき研究成果は得られていない。当研究班においては、これらの問題の解決に一步でも近づくための努力を行ってきた。結核の診断においては、オランダの研究グループから T 細胞からの IFN- γ の産生を指

標としたクオンティフェロンアッセイ法が提案され、世界中で注目されている。同時に日本を含む多くの国々においてその有用性について検討が加えられている。しかし、本システムは、結核感染者の T 細胞の機能が正常に保たれているという前提の下に行われているものである。本研究班においては、ヒト末梢 T 細胞、とりわけ CD8 陽性 T 細胞の機能を評価するシステムの構築に取り組んだ。モデル抗原に対する CD8 陽性 T 細胞の反応性を試験管内で評価するシステムであるが、CD8 のみならず CD4 陽性 T 細胞の評価システムも構築できれば、クオンティフェロンアッセイと併用されることで、よりの確な診断が可能になるものと想定される。

病原性抗酸菌の多くは遅発育性菌であり、多くの場合診断に至るまでに長い時間を要する。迅速遺伝子診断法の開発は切望されている研究課題である。本研究班では、非結核性病原菌に対し、迅速診断法の一環として、恒温槽のみの使用で所要時間 45 分で診断可能な LAMP 法の開発を行った。さらに、臨床応用を図るため、臨床検体の簡易処理法・保存法を併せ開発に取り組んだ。抗酸菌感染者の多くは開発途上国にあるため、サンプルを容易に処理することが可能であれば、より正確に迅速診断が進むと想定される。そこで、FTA elute card に注目した。本カードは、濾紙のような形状をしており、臨床検体を塗布し、室温で 60 分間乾燥させるのみで DNA 抽出まで完了するものである。ハンセン病をモデルとして、インドネシアで鼻汁液約 300 検体を処理したが、得られたサンプルは nested PCR にも LAMP 法にも応用できるものであった。今後本カードを用い、結核菌も同様に扱うことが可能か検討することが重要と考える。

ワクチンについては、昨年度本研究班で開発されたリコンビナント BCG の研究が展開され、新たな知見が得られた。本リコンビナント BCG は、病原性主要抗原を感染細胞内で分泌し、T 細胞を強くかつ効率的に活性化するものである。用いられた主要抗原は細胞膜に存在する Major Membrane

Protein (MMP)-II であるが、MMP-II は TLR2 に結合するばかりでなく、単球あるいはマクロファージを刺激して GM-CSF を産生誘導するタンパクであった。GM-CSF は、マクロファージの抗原提示能を増強すると同時に、IL-10 の産生を抑制する作用を有する。リコンビナント BCG (BCG-SM) は、樹状細胞ばかりでなくマクロファージに感染しても、現行 BCG より有効に T 細胞を活性化した。本作用は GM-CSF 産生誘導能に起因していた。また、BCG-SM が感染した単球から得たマクロファージは、病原性抗酸菌刺激を受けても IL-10 を産生しなかった。従って、BCG-SM は直接的に T 細胞を活性化するばかりでなく、産生されたメモリー T 細胞が免疫抑制性サイトカインの負の影響を受けることなく活性化し得る免疫環境の整備にも寄与できる可能性が示された。今後の新しい BCG ワクチンの開発の方向性が示唆されたものと考えられる。また、ブースターワクチンの開発においては、結核菌由来高免疫原性分泌タンパク Ag85B の活性中心ペプチド (Peptido-25) の研究が昨年に引き続き展開された。Peptido-25 はアジュバント活性を有し、共免疫された異種タンパク特異的キラー T 細胞の機能を亢進した。このことは、Ag85B が単なる抗原性分子ではなく、Cross-priming 機構を活性化する作用を有していることを示唆するもので、今後ヒトのアッセイ系において、マウス同様に CD8 陽性 T 細胞の活性化を誘導し得るか詳細の検討が待たれる。

結核菌を効率的に殺戮するためには、感染細胞内で強く発現する遺伝子を同定する必要がある。本年は、結核菌が生体内で最も強い親和性を有するマクロファージの中で発現する遺伝子を網羅的に検索するシステムが確立された。今後の研究が期待される。

E. 結論

抗酸菌感染症における診断・予防・治療と幅広い研究が展開された。今後の発展に繋がる成果が得られた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Makino, M., Y. Maeda, T. Mukai, and S. H. E. Kaufmann. Impaired maturation and function of dendritic cells by mycobacteria through IL-1 β . *Eur. J. Immunol.*, 36:1443-1452, 2006.
- 4) Suzuki, K., N. Nakata, P. D. Bang, N. Ishii, and M. Makino. High-level expression of pseudogenes in *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol. Lettr.*, 259:208-214, 2006.
- 5) Makino, M., Y. Maeda, and K. Inagaki. Immunostimulatory activity of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG that secretes Major Membrane Protein II of *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immunity*, 74:6264-6271, 2006.
- 6) 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 type 1-inducing peptide. *Immunology*. 117:47-58, 2006.
- 7) Ozeki, Y., H. Tsutsui, N. Kawada, H. Suzuki, M. Kataoka, T. Kodama, I. Yano, K. Kaneda, and K. Kobayashi. Macrophage scavenger receptor down-regulates mycobacterial cord factor-induced proinflammatory cytokine production by alveolar and hepatic macrophages. *Microb. Pathog.* 40:171-176, 2006.
- 8) 小林和夫. 感染症の現状と制圧戦略. 都市問題研究 58:20-32, 2006.
- 9) 阿戸 学、小林和夫. 結核の免疫. 呼吸器6. 結核・非結核性抗酸菌症 (露口泉夫 編). 新しい診断と治療のABC. 最新医学 別冊. 大阪:最新医学社. 55-63, 2006.
- 10) Suzuki, K., F. Takeshita, N. Nakata, N. Ishii, and M. Makino. Localization of CORO1A in the macrophages containing *Mycobacterium leprae*. *Acta Histochemica et Cytochemica*, in press, 2007.
- 11) Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and T. Mukai. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. *Microbes and Infection*, in press, 2007.
- 12) Fujiwara, N., N. Nakata, S. Maeda, T. Naka, M. Doe, I. Yano, and K. Kobayashi. Structural characterization of a specific glycopeptidolipid containing a novel N-acyl-deoxy sugar from *Mycobacterium intracellulare* serotype 7 and genetic analysis of its glycosylation pathway. *J. Bacteriol.* in press, 2007.
- 13) 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, 2007.

2. 学会発表

- 1) Ag85B of *M. tuberculosis* and its peptide elicit effective cytotoxic T cell response and antitumor resistance through activation of

- robust Th1 immunity. Tamura, T., T. Kikuchi, H. Ariga, T. Tokunaga, A. Kariyone, and K. Takatsu. The 8th FIMSA/IIS Advanced Training Course of Immunology, 1-4 March, 2006, New Delhi, India.
- 2) LipoK activates Mycobacterium leprae infected macrophages and dendritic cells. Maeda, Y., M. Kai, and M. Makino. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 18-23 June, 2006, Kyoto, Japan.
 - 3) Role of T-cell receptor signal and T-bet in the induction of Th1 differentiation and cross-priming of antigen. Takatsu, K., H. Ariga, Y. Shimohakamada, M. Nakada, T. Tokunaga, T. Kikuchi, A. Kariyone, and T. Tamura. The RCAI-JSI International Symposium on Immunology, 21-24 June, 2006, Yokohama, Japan.
 - 4) Development of rapid and simple diagnostic tool for leprosy. Mukai, T., M. Macdonald, C. Ranjit, B. R. Sapkota, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 41st Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 19-21 July, 2006, Kagoshima, Japan.
 - 5) Immunostimulatory activity of recombinant *M. bovis* BCG expressing the dominant antigen of *Mycobacterium leprae*. Makino, M., Y. Maeda, K. Inagaki, and T. Mukai. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 41st Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 19-21 July, 2006, Kagoshima, Japan.
 - 6) Clofazimine-induced cell death in macrophages. Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 41st Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 19-21 July, 2006, Kagoshima, Japan.
 - 7) クロファジミンによるマクロファージの形態変化と細胞死. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第79回日本細菌学会総会 2006年3月 金沢
 - 8) *Mycobacterium avium* 由来 2 型 Glycopeptidolipid の生合成解析. 宮本友司, 向井 徹, 前田百美, 甲斐雅規, 中田 登, 中 崇, 矢野郁也, 牧野正彦. 第79回日本細菌学会総会 2006年3月 金沢
 - 9) らい菌由来 MMP-II 抗原を分泌する rBCG の作製とその T 細胞活性化能の解析. 前田百美, 稲垣勝也, 牧野正彦. 第79回日本細菌学会総会 2006年3月 金沢
 - 10) GM-CSF によるらい菌感染マクロファージの抗原提示能の増強. 牧野正彦, 前田百美, 福富康夫, 向井 徹. 第79回日本細菌学会総会 2006年3月 金沢
 - 11) *Mycobacterium smegmatis* を用いたらい菌遺伝子変異と薬剤感受性に関する解析. 中田 登, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 牧野正彦. 第79回日本細菌学会総会 2006年3月 金沢
 - 12) 非結核性抗酸菌 MAC 由来血清型 7 型 glycopeptidolipid (GPL) の構造と合成遺伝子の解析. 藤原永年, 前田伸司, 中田 登, 中 崇, 矢野郁也, 小林和夫. 第79回日本細菌学会総会 2006年3月 金沢
 - 13) 結核菌の病原性と制御性 T 細胞 (CD4⁺CD25⁺ regulatory T 細胞) の役割. 尾関百合子, 松本壮吉, 小林和夫. 第79回日本細菌学会総会 2006年3月 金沢
 - 14) 結核菌 DNA による DNA 結合蛋白質の抗原性修飾. 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. 第79回日本細菌学会総会 2006年3月 金沢
 - 15) 抗酸菌のヒトマクロファージ様細胞

- (ThP1) 感染におけるグリコサミノグリカンの役割. 平山幸雄、松本壮吉、仁木 誠、尾関百合子、西内由紀子、小林和夫. 第 81 回日本結核病学会総会 2006 年 4 月 仙台
- 16) 結核菌 *KasB* 遺伝子欠損株のミコール酸生合成と宿主応答. 藤原永年、前田伸司、小林和夫. 第 81 回日本結核病学会総会 2006 年 4 月 仙台
- 17) Mycobacterial DNA-binding protein 1 の機能解析. 仁木 誠、松本壮吉、平山幸雄、尾関百合子、西内由紀子、小林和夫. 第 81 回日本結核病学会総会 2006 年 4 月 仙台
- 18) クロファジミンによるマクロファージの細胞死と核の形態変化. 福富康夫、前田百美、牧野正彦. 第 79 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2006 年 5 月 高松
- 19) リアルタイム PCR 法を利用した耐性変異の多剤同時検出. 甲斐雅規, Nguyen Phuc Nhu Ha, 松岡正典, 牧野正彦. 第 79 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2006 年 5 月 高松
- 20) *Mycobacterium smegmatis* を用いたらい菌 *folP* 遺伝子変異とダブソン感受性に関する解析. 中田 登, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 牧野正彦. 第 79 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2006 年 5 月 高松
- 21) 高免疫原性分子の同定と予防法への応用. 牧野正彦. (シンポジウム; ハンセン病の診断と予防: 最近の進歩) 第 79 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2006 年 5 月 高松
- 22) Ag85B とそのペプチドによる免疫制御: Th1 誘導とクロスプライミング増強. 高津聖志. 第 34 回 BCG・BRM 療法研究会 2006 年 7 月 東京
- 23) Delayed induction of Mycobacterium tuberculosis (Mtb)- specific Th2 immune response in the lung of Mtb-infected TCR-transgenic mice. Yahagi, A., M. Umemura, T. Tamura, D. M Begum, S. Hamada, A. Kariyone, K. Takatsu, and G. Matsuzaki. 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 2006 年 12 月 大阪
- 24) TLR7 リガンドと Th1 エピトープ (Peptide-25) を用いた経皮ペプチド免疫による腫瘍特異的 CTL の誘導. 細井亮宏, 五字 弘, 竹田やよい, 前川隆司, 高津聖志, 垣見和宏. 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 2006 年 12 月 大阪
- 25) Ag85B 由来 Peptide-25 によるクロスプライミング増強効果の解析. 刈米アイ, 田村敏生, 高津聖志. 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 2006 年 12 月 大阪
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 マクロファージ内で発現が亢進する遺伝子の新規スクリーニング法について出願を準備している
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

平成18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

阿戸 学

（国立感染症研究所・免疫部主任研究官）

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等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 阿戸 学（国立感染症研究所・免疫部・主任研究官）

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ィ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ィルスを感染させると、既存のアデノウィ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。このアデノウィルスに反応する T 細胞はほとんど CD4 陽性 T 細胞だったことから、このウィルスベクターを用いた系を結核診断法として改良するため、CD4 陽性 T 細胞を除去したヒト末梢血単核球への Ag85a 組み込みアデノウィルス感染による T 細胞免疫応答を検討した。その結果、Ag85a に対する CD8 陽性細胞特異的 IFN γ 産生反応は、コントロールウィルスを感染させた群に比べて有意に増強し、抗酸菌抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞応答を測定するアデノウィルスベクター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、アデノウィ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 組み込みアデノウィ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 組み換えウィ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

デノウィ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み込みアデノウィ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み込みアデノウィルスを感染させ、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ィルスを感染させると、既存のアデノウィルスに対する

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。さらに、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。本研究は、アデノウイルスベクターを用いたシステムの改良を行い、アデノウイルスに対する免疫応答を引き起こさず、抗酸菌抗原に対する免疫応答を測定できるシステムを開発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末梢血単核球への感染

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) CD14 陽性単球除去および末梢血樹状細胞の分離

磁気細胞分離システムを用いて、末梢血単核球より、CD14 陽性単球を除去した。次に、残った末梢血単核球より末梢血樹状細胞表面マーカー (BDCA1, BDCA3, BDCA4) 陽性

樹状細胞を分離した。

(5) CD4 陽性 T 細胞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、末梢血樹状細胞、CD4 陽性 T 細胞を除去した末梢血単核球 2×10^5 に、先に分離した末梢血樹状細胞 2×10^4 を加え、アデノウイルスを感染させ、培養 5 日目に上清中の IFN γ 濃度を ELISA にて測定した。

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

アデノウイルスに対するヒト既存免疫における主たる反応細胞群を検索する目的で、23 歳から 53 歳までの、男女混合の健常人ボランティア (6 名) より末梢血単核球を精製し、CD8 陽性 T 細胞を除去した末梢血単核球に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、CD8 陽性 T 細胞を除去しても、末梢血単核球とほぼ同等のアデノウイルスに対する高い IFN γ 産生が誘導された。このことから、CD8 陽性 T 細胞は既存のアデノウイルスに対する免疫応答に含まれておらず、CD4 陽性 T 細胞が主たる反応を起こしていることが示唆された。

次に、CD4 陽性 T 細胞を除去し、CD8 陽性 T 細胞の抗原特異的免疫応答を測定することによって、アデノウイルスベクターを用いた抗酸菌抗原特異的免疫応答が検出可能か否かを解析する目的で、末梢血単核球より細胞亜群を調整して、Ag85a アデノウイルスベクターに対する免疫応答を解析した。具体的には、Ag85a の発現によって T 細胞反応を抑制する CD14 陽性単球分画と CD4 陽性 T 細胞を除去した末梢血単核球にアデノウイルスを感染させて、IFN γ 産生を測定した。その結果、CD8 陽性細胞はコントロールアデノウイルスに対して反応せず、Ag85a 組み込みアデノウイルスに対してのみ有意な IFN γ 産生上昇を認めた (図)。ま

た、陽性率は67%であった。

以上のことから、Ag85a 組み込みアデノウイルスベクターはヒト CD8 陽性 T 細胞の抗原特異的免疫応答を測定する系として開発しうる可能性が示唆された。

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。

近年、アデノウイルス特異的 CD4 陽性記憶 T 細胞の応答の大部分がウイルス hexon 分子に対することが示された。この知見は、ヒトアデノウイルスの hexon 遺伝子を非ヒトアデノウイルス由来のものに置換するこ

とによって、既存のアデノウイルス免疫に左右されない、高感度の診断補助法として利用できる次世代アデノウイルスベクターの開発が可能であることを示唆する。今後の研究で、改良が期待される。

結核菌特異的蛋白である ESTA-6 と CFP-10 を末梢血単核球と培養して IFN γ 産生を測定し、結核特異的 T 細胞免疫応答を評価する方法である QuantiFERON が高い特異度と感度を示す結核補助診断法として実用化されている。この方法は本研究におけるアデノウイルスベクターと比べ、その簡便性、安全性において優れている。しかし、リコンビナント蛋白を用いていることから、抗原は抗原提示細胞の細胞質内に移行しないため、主要組織適合抗原 (MHC) クラス II 分子のみに提示され、CD4 陽性 T 細胞反応は検出できるが、CD8 陽性 T 細胞反応は検出できないと考えられる。一方、アデノウイルスベクターを用いたシステムにおいて、抗原は抗原提示細胞の食胞、細胞質内両方に存在するため、MHC クラス I およびクラス II 両分子に抗原が提示され、CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の両者に対する T 細胞反応を誘導できると考えられる。事実、結核菌に対する免疫応答のうち、CD4 陽性 T 細胞応答に関しては数多くの研究がある。しかし、ヒトの結核に関する免疫応答において、CD8 陽性 T 細胞機能の評価システムは未だ確立していない。そこで、本研究では、Ag85a 組み込みアデノウイルスベクターが抗結核菌/BCG 免疫記憶に関わる CD8 陽性 T 細胞反応を引き起こしうるか検討した。

ところが、単に抗 CD8 抗体のみを用いて CD8 陽性細胞を正に選択すると、CD8 分子の MHC との結合を阻害し、CD8 陽性 T 細胞反応を修飾する恐れがある。また、CD4 陽性細胞を末梢血単核球から除去すると、CD4 陽性抗原提示細胞である単球および樹状細胞をも除去することになる。さらに、前年度の結果より、Ag85 の単球内発現によって、抗原特異的 T 細胞応答が抑制されることが判明している。そこで、本研究では、上記の方法で単球と CD4 陽性細胞を除去し、アデノウイルスをとりこむ抗原提示細胞とし

て末梢血樹状細胞を用い、CD8 陽性 T 細胞機能の測定を検討した。その結果、既存のアデノウイルスに対する免疫応答には影響されず、抗酸菌抗原に対する CD8 陽性 T 細胞免疫応答を有意に検出することができ、抗酸菌抗原に対する CD8 陽性 T 細胞機能を評価しうるシステムの開発が可能であることが示唆された。この方法により、CD8 陽性細胞の主な機能である感染細胞障害活性を測定できるか、今後評価することを目指す。

本システムは、ウイルスベクター、各細胞分画調製の細胞マーカー、結核菌抗原の選択にさらなる改良の必要が存在するが、新規結核補助診断法として、また抗結核免疫の評価システムとして今後の開発が期待される。Ag85a はヒトおよびマウスで CD8 陽性 T 細胞に対する抗原として認識されることが報告されているが、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、より特異度、感度の高い結核菌抗原を同定し、CD8 陽性 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、結核に対する宿主免疫の評価、さらには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

ツベルクリン反応に代わる結核菌感染補助診断法の確立を目指し、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。この結果、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 T 細胞免疫反応が誘導されることから、現行のシステムの改良が必要となることが判明した。このアデノウイルスに反応する T 細胞はほとんど CD4 陽性 T 細胞だったことから、CD4 陽性 T 細胞を除去したヒト末梢血単核球に Ag85a 組み込みアデノウイルス感染させたところ、Ag85a に対する CD8 陽性細胞特異的 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増強し、抗酸菌抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞応答を測定する系を確立しう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

- 1) 阿戸 学、小林和夫. 結核の免疫 最新医学・別冊 新しい診断と治療の ABC 41 呼吸器 6 結核非結核性抗酸菌症. 55-63. 2006.

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 γ production in human CD8⁺ T cells co-cultured with adenovirus infected-peripheral blood dendritic cells

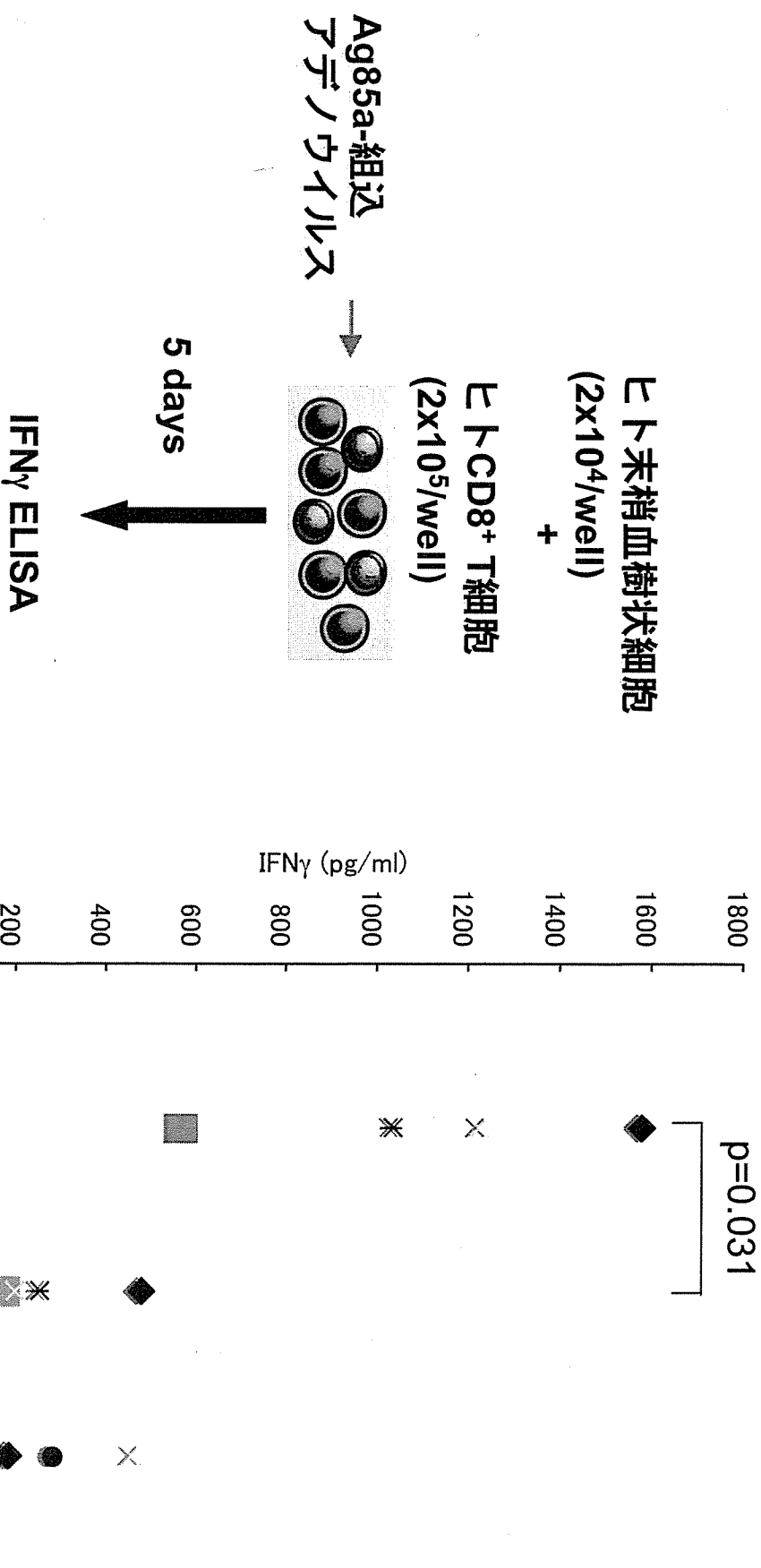


図 アデノウイルスベクターを用いた抗酸菌抗原特異的ヒトCD8⁺T細胞からのIFN γ 産生測定

平成18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

（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

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（国立感染症研究所・免疫部・部長）
研究協力者 松本 壮吉（大阪市立大学大学院医学研究科・感染防御学・
助教授）
研究協力者 藤原 永年（大阪市立大学大学院医学研究科・感染防御学・
講師）

研究要旨.

抗酸菌細胞壁表層構成成分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。抗酸菌由来糖脂質病原因子（tehalose dimycolate : TDM）-宿主応答の分子機序、さらに、血清診断に有用な抗原である *Mycobacterium avium-intracellulare* complex 特異的糖脂質蛋白質（MAC-GPL）の詳細な化学構造や合成系を探索した。その結果、肺胞マクロファージのスカベンジャー受容体が TDM のサイトカイン誘導活性を負に制御し、抗炎症効果を発揮すること、また、*Mycobacterium intracellulare*（血清型 7）は糖鎖部分として、3 個の rhamnose を有する特異な構造であったことから、rhamnose 転移酵素遺伝子を標的として、GPL 酵素群を解明した。

A. 研究目的

抗酸菌感染症には結核、非結核性抗酸菌感染症やハンセン病などがあり、現在でも、多くの抗酸菌感染症患者在り、人類に甚大な健康被害を提供している。抗酸菌の病原性として、1) 宿主防御機構からの逸脱や 2) 遅延型過敏反応（細胞性免疫応答の負の側面）の誘導が特徴的であり、その結果、感染から発病に至る長期の潜伏期間、組織破壊を伴う肉芽腫炎症が特徴的である。

結核菌細胞壁は脂質を豊富に含有し、特に、trehalose dimycolate (TDM) は結核菌表層に特徴的な糖脂質成分、かつ、病原因子である。本研究では、結核菌細胞壁由来 TDM に対する宿主免疫および炎症応答における分子機序を明らかにすることを目的とした。

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 は特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) を有し、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、MAC は糖鎖部分の相異から 28 種の血清型に分類され、多型性を示すこと、また、抗 GPL 抗体の測定や推移がヒト MAC 感染症の診断に有用であることを報告したが、本研究では、GPL 分子の詳細な化学構造や合成系の解明を試みた。

B. 研究方法

ICR 系マウス（野生型およびマクロファージスカベンジャー受容体欠損）由来肺胞マクロファージを結核菌 TDM で刺激培養し、産生される炎症惹起性サイトカイン（腫瘍壊死因子- α : TNF- α ）や cc ケモカイン（マクロファージ炎症性蛋白 1 α :

MIP-1 α) 蛋白質を測定した。また、マウス由来マクロファージ細胞 (J774) 株を用い、スカベンジャー受容体と TDM の結合を解析した。

Mycobacterium intracellulare (血清型 7) 死菌体から GPL をシリカゲル-薄層クロマトグラフィーにより単離精製し、ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーおよびソフトイオン化質量分析をした。GPL 合成酵素の遺伝子解析は菌体からゲノム DNA を抽出し、コスミドライブラリーから塩基配列を決定した。

C. 研究結果

TNF- α や MIP-1 α 産生における TDM 刺激マクロファージ培養系の至適条件は培養時間: 24 時間、TDM 濃度: 5 μ g/well であった。この条件下で、野生型およびマクロファージスカベンジャー受容体 (MSR) 欠損マウスから得られた肺胞マクロファージを TDM 刺激培養した。TDM 不含培養はサイトカインを全く産生誘導しなかったが、TDM 刺激により、野生型マウス由来肺胞マクロファージは TNF- α (約 3 ng/mL) や MIP-1 α (約 0.4 ng/mL) を産生誘導した。野生型マウス由来肺胞マクロファージに比し、MSR 欠損マウス由来肺胞マクロファージは TNF- α (約 10 ng/mL) や MIP-1 α (約 1.4 ng/mL) を産生誘導した。炎症惹起性サイトカイン産生における MSR の役割を確認するため、野生型マウス由来肺胞マクロファージを抗 MSR 単クローン抗体 (2F8) で処理し、TDM 刺激培養した。その結果、抗体処理群において、炎症惹起性サイトカイン産生は顕著に増強した。すなわち、マクロファージ MSR は TDM 誘導サイトカイン産生において、負に制御していた。この分子機序を解明するため、J774 マクロファージ細胞株を TDM 存在下で 24 時間培養し、抗 MSR 単クローン抗体を用い、MSR 発現を定量した。その結果、TDM は非存在下に比し、MSR 発現を約 2 倍誘導することが判明した。

MAC 血清型 7 型菌から得られた精製 GPL は MAC 共通なコア部分 (fatty acyl-D-Phe-D-allo-Thr-D-Ala-L-alaninol

) に加え糖鎖部分として 4-(2' -hydroxy propionamido)-2-O-methyl 4,6 dideoxy hexose \rightarrow rhamnose \rightarrow rhamnose \rightarrow rhamnose \rightarrow 6-deoxy talose が結合した構造であった。ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーおよびソフトイオン化質量分析から、MAC 血清型 7 型菌由来 GPL の分子量は 1,874 であった。血清型 7 型菌の GPL 構造が 3 個の rhamnose を持つことから、rhamnose 転移酵素遺伝子 (*rtfA*) 部分を標的とした PCR でスクリーニングし、GPL 合成酵素群が存在する領域を含むコスミドクローン#49 を分離した。本コスミドは約 38 kb のインサートを有し、その塩基配列から 9 個の open reading frames が判明した。*rtfA* 遺伝子の比較ゲノム解析結果から、*M. intracellulare* (血清型 13) と 98.4%、*M. avium* (血清型 4) と 84%の相同性を有し、糖 (rhamnose) 転移酵素遺伝子群を形成していた。

D. 考察

結核菌の脂質は乾燥菌体重量の 10%以上、細胞壁の 20%以上を構成し、他の一般細菌に比し、極めて多い。事実、結核菌の全ゲノムは約 4.4 Mb (大腸菌: 4.6 Mb) であり、蛋白質を規定している遺伝子は約 4000、脂肪酸代謝に関与している酵素は 250 以上、大腸菌が 50 であることから、結核菌の脂質代謝が極めて旺盛であることが遺伝子情報からも判明している。Trehalose dimycolate (TDM) は結核菌など抗酸菌に特徴的な細胞壁ミコール酸糖脂質であり、抗酸菌-宿主関係における多機能分子である。TDM など、アシル化 trehalose 脂質化合物は結核菌細胞壁表層に存在し、1) 結核菌の宿主細胞内生存、2) 炎症・免疫惹起物質 (肉芽腫炎症、遅延型過敏反応や血管新生など) や 3) アポトーシス誘導活性を發揮する多機能分子であり、結核菌-宿主関係、すなわち、結核の病態形成に重要な役割を演じている。

肉芽腫炎症は発症機序により、異物性 (T 細胞非依存性) および過敏性 (T 細胞依存性) に大別されるが、病理組織学的に「単

核細胞の局所的集積と活性化」、さらに、「炎症惹起性サイトカイン (TNF- α や MIP-1 α)」が共通した特徴である。

本年度の研究結果から、TDM 誘導炎症の制御機序として、TDM がマクロファージスカベンジャー (MSR) 受容体に結合すること、さらに、MSR 受容体は TDM 誘導炎症応答に対し、負の制御していることが判明した。換言すれば、MSR 受容体は過剰な炎症を制御することにより、病変形成や臓器障害を防止している可能性がある。従って、MSR 受容体の発現は結核など抗酸菌感染症における組織傷害を軽減させることが期待される。

GPL 抗原は MAC 特異的抗原であり、かつ、宿主は GPL 抗原に対し抗体産生など液性免疫応答を発現し、血清抗 GPL 抗体を測定することにより、MAC 感染症の迅速診断が可能となった。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 抗体価の測定は MAC 感染症の治療評価にも有用であることも判明している。

しかし、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、糖鎖部分の相異から MAC は 28 種の血清型に分類され、多型性を示すこと、また、抗 GPL 抗体の測定や推移がヒト MAC 感染症の診断に有用であることを報告したが、本研究では、MAC に特徴的な GPL 分子の詳細な化学構造や合成系の解明を試みた。

MAC 血清型 7 型菌から得られた精製 GPL は MAC 共通なコア部分 (fatty acyl-D-Phe-D-allo-Thr-D-Ala-L-alaninol) に加え糖鎖部分として 4-(2'-hydroxy propionamido)-2-O-methyl 4,6 dideoxy hexose \rightarrow rhamnose \rightarrow rhamnose \rightarrow rhamnose \rightarrow 6-deoxy talose が結合した構造であり、分子量は 1,874 であった。先に、GPL 核部分の分子量は 1,024 であることを報告したことから、可変的糖鎖部分の分子量は 850 であった。全ての MAC 由来 GPL の可変的糖鎖部分に talose が共通して存在することから、MAC 血清型 7 型菌由来 GPL の特徴として、可変的糖鎖部分に rhamnose が多く、かつ、反復配列が顕著である。すなわち、GPL

合成系に糖 (rhamnose) 転移酵素 (*rtfA* 遺伝子) 群の関与が示唆される。

この特徴を利用し、糖 (rhamnose) 転移酵素群を同定することに成功した。その塩基配列から 9 個の open reading frames が判明した。*rtfA* 遺伝子の比較ゲノム解析結果から、*M. intracellulare* (血清型 13) と 98.4%、*M. avium* (血清型 4) と 84% の相同性を有し、糖 (rhamnose) 転移酵素遺伝子群を形成していた。すなわち、糖転移酵素遺伝子群の相異が MAC における 28 血清型の多様性に関与していることが明らかとなった。このことは、MAC-GPL 抗原を用いた血清診断において、非可変部分 (GPL 核) を抗原として用いた測定系の優位性に科学的根拠を提供している。従来、報告したように、GPL 核抗原による MAC 感染症の血清診断は血清型に対応した多様な抗原を混合することなく、単一抗原調製などが簡便、かつ、血清抗 GPL 核抗体を測定することにより、MAC 感染症を網羅的に診断できる利点を有する。

GPL 合成系に関与する酵素群が解明されたことから、MAC の増殖や生存と酵素群の関係が今後の課題となる。酵素群が増殖や生存に必須であった場合、これら酵素群は新規薬剤標的となる可能性を示唆する。ほとんどの MAC が既存の抗微生物薬に耐性を示すことから、酵素群を標的とした抗 MAC 薬の開発は新規治療戦略を提供するであろう。

E. 結論

抗酸菌細胞壁表層構成成分の宿主に対する生物学的活性を免疫原性、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。抗酸菌由来糖脂質病原因子 (tehalose dimycolate : TDM) -宿主応答の分子機序、さらに、血清診断に有用な抗原である *Mycobacterium avium-intracellulare* complex 特異的糖脂質蛋白質 (MAC-GPL) の詳細な化学構造や合成系を探索した。

その結果、肺胞マクロファージのスカベン