

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～平成18年度 総合研究報告書

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

### 総合研究報告書

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

研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 27

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

総合研究報告書

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）  
総合研究報告書

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.

抗酸菌感染症の診断・予防に関し、以下の研究を展開した。  
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が存在し、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。抗酸菌-宿主関係において、細胞壁表層糖脂質や抗酸菌 DNA 結合蛋白質などの細胞壁表層分子が関与していると考えられている。これらは抗酸菌や宿主に対する多機能分子であり、その分子群の機能や役割の解明は病原性発現機序の理解、さらに、新規診断や治療方法、加えて、ワクチン開発に寄与するであろう。非結核抗酸菌は抗酸菌症の約 20%を占めるが、菌の培養同定に長期を要し、迅速な同定法が望まれている。そのため、非結核性抗酸菌の迅速・簡易遺伝子同定法の開発を行った。その結果、特殊化学表面処理ろ紙を用いたサンプル保存・移送法、さらに等温遺伝子増幅法 loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による *M. kansasii*, *M. gastri* の鑑別およびらい菌の特異検出系を樹立した。両法を組み合わせた迅速・簡易検出法は、国内のみならず、開発途上国での応用が期待されると考えられた。ツベルクリン反応に代わる結核菌感染補助診断法を確立するため、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・感染させたヒト末梢血単核球を用い 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 細胞の活性化が起こり、多量のインターフェロンガンマ (IFN- $\gamma$ ) が産生された。Ag85a に対する CD8 陽性細胞特異的 IFN $\gamma$  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アデノウイ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。抗酸菌に対する生体防御反応を司る上で樹状細胞は極めて重要な役割を果たす。樹状細胞は末梢単球から分化・誘導されるが、その際単球が産生するサイトカインにより、その成熟は大きく影響を受ける。とりわけ、IL-1 $\beta$  が作用すると、その機能を著しく低下することが明らかになった。従って、ワクチン開発にあたり、末梢単球に親和性を有し、IL-1 $\beta$  を産生する分子は、樹状細胞の機能を障害し、生体防御反応に悪影響を与える可能性が示唆された。ついで、病原性抗酸菌に対する新しいワクチンの開発を行った。抗酸菌の抗原性を担う主要抗原 Major Membrane Protein-II (MMP-II) 遺伝子上流に Antigen 85B 由来のタンパク分泌シグナルを付加した後 BCG に組

み込んだ (BCG-SM の作製)。BCG-SM は、ベクターコントロール BCG (BCG-pMV) に比し、樹状細胞を介しメモリータイプ T 細胞のみならず、ナイーブ T 細胞をも強く活性化した。ついで、BCG が生体内で最も親和性を有する免疫担当細胞はマクロファージであるため、BCG-SM がマクロファージに感染した際の T 細胞活性化能を検討したところ、樹状細胞と同様に BCG-SM はマクロファージに感染しても T 細胞を強く活性化した。その機序は、BCG-SM が MMP-II を分泌することにより GM-CSF の産生を誘導することにあつた。従って、BCG-SM は従来の BCG に比べ、より有効なワクチン効果をもたらすものと期待される。Th1 免疫応答を惹起しアジュバント活性を示す結核菌由来タンパク質 Ag85B および Peptide-25 とその修飾分子を用い、抗結核免疫を増強する有効な手法を開発することを目的としている。3年間に (1) Peptide-25 と I-A<sup>b</sup> を認識する TCR (P25 TCR) を発現する TCR-Tg マウスを作出し、ナイーブ T 細胞から Th1 への分化の運命づけに TCR と Peptide/I-A 分子間の強い親和性が重要であり、サイトカインや副刺激分子は Th1 前駆細胞の増殖や極性化に重要であることを見出した。TCR 刺激による Th1 誘導に T-bet 依存性の経路と非依存性の経路が存在することを初めて見出した。(2) Peptide-25 はアジュバント活性を示し、共免疫抗原のクロスプレゼンテーションと CTL 生成を増強することを初めて明らかにした。新規な結核診断法や治療方法の確立を目標として、結核菌を含む抗酸菌における病原性因子の同定と新規抗結核薬の開発に関する研究を行った。非結核性抗酸菌が保有するプラスミド DNA の解析では、抗酸菌 21 菌種 414 株についてプラスミド DNA の抽出を行ない、11 株中にプラスミド DNA が存在していることを明らかにするとともに、その遺伝子型は 4 種類に分類出来ることを示した。マクロファージ内で発現が亢進する遺伝子の新規な網羅的選択法の確立については、抗菌薬に対する耐性を指標とした新規な網羅的選択法を構築し、結核菌がマクロファージ内で生存するために必須な遺伝子を同定することが可能であることを示した。抗酸菌コロニー形態に関与する遺伝子の同定と解析に関しては、*M. smegmatis*、並びに *M. bovis* BCG 株を用いた変異株・破壊株・相補株の作成から、新規抗結核薬の標的候補タンパク質の立体構造解析については、細胞壁構造に関与している結核菌由来タンパク質、Rv2610c の結晶化条件の検討を行い、X 線結晶構造解析に適した結晶が得られる可能性を示した。

#### 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

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が存在し、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。抗酸菌細胞壁は脂質を豊富に含有し、特に、trehalose dimycolate (TDM) や

糖ペプチド脂質 (GPL) などは特徴的な糖脂質成分である。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。MAC は特異的細胞壁表層 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 感染症の診断や疾患活動性の評価に有用であることを報告した。しかし、多型性のため、種々の血清型 MAC から精製した GPL を混合するなど、抗原調整に欠点がある。本研究では、GPL 抗原決定基の同定、さらに、GPL 核抗原を用いた血清診断キットの開発を目的とした。結核など抗酸菌感染症の新規治療・予防方法の開発を目的に、従来の抗微生物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 (細胞壁表層蛋白質) を標的とした新規戦略の開発に着手した。抗酸菌感染症の約 20% は、非結核性抗酸菌を起因菌とすることが知られている。しかし、非結核性抗酸菌症は、菌の分離同定に長期を要し、その迅速な同定法が望まれている。そこで、抗酸菌の簡易・迅速なサンプル保存・移送法および遺伝子同定法の開発を目的とした。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、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を計測するシステムの確立を目指した。診断法の確立には最終的に真核高等動物細胞のコードン読み枠に変換した結核菌特異的遺伝子 ESAT6 または CFP10 組み込みアデノウイルスベクターが必要である。この方法の有用性を検討する第一ステップとして、モデル実

験で検討した。抗酸菌特異的遺伝子 Ag85a 組み換えウイルスを樹状細胞に感染させ、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、さらにヒト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。抗酸菌は 20 世紀最大の恐怖を与えた慢性感染症であり、現行の BCG に代わる新たなワクチンの開発は全世界が切望する最重要課題の一つである。BCG は、わが国では広く用いられてきたが、その有効性は限られており小児の粟粒結核のみを予防することが可能とされている。これまでに、抗酸菌共通抗原である MMP-II は、強い抗原性を有し樹状細胞およびマクロファージなどの抗原提示細胞 (APC) を強く活性化することを報告してきた。一方、BCG が何故有効に作用しないのか、その機構は十分に明らかにされていない。BCG に代わるワクチンを構築する際に、BCG replacement および BCG repair が基本的概念となる。しかし、BCG は安全なベクターとして確立されたワクチンであるため、MMP-II 等免疫強化分子を BCG へ組み込むなど BCG repair 法によるワクチン開発が望ましいと考えられる。そこで、MMP-II を BCG に組み込み、さらに BCG の持つ欠点を補うために、細胞内感染後細胞内に MMP-II が分泌されるようにタンパク分泌シグナルを同時に組み込ませた。この新しいリコンビナント BCG (BCG-SM) の T 細胞活性化能について検討することを目的とした。結核菌由来タンパク質とそのペプチドで、Th1 免疫応答とアジュバント活性を示すものを探索し、抗結核免疫の強化に資するか検討するシステムを確立すること、Th1 誘導の分子機構を明らかにすることを、目的としている。近年、従来の抗結核薬に耐性を示す多剤耐性結核菌による症例が増加傾向にあり、深刻な問題となっている。そのため、新たな治療薬の開発が望まれている。そこで、新規な結核診断法や治療方法の確立を目標として、結核菌を含む抗酸菌における病原性因子の同定と新規抗結核薬の開発に関す

る研究を行った。非結核性抗酸菌の一部についてはプラスミド DNA の存在が報告されており、プラスミド DNA 自体の病原性への関与も示唆されている。非結核性抗酸菌では、今まで適当なベクター等が開発されていない。そこで、非結核性抗酸菌が保有するプラスミド DNA を解析することにより、新たな研究用ベクターの開発や、病原性因子の同定につなげることを目的とした。結核菌はマクロファージに貪食された後、マクロファージ内で生存することが可能であり、この生理機能が病原性と深く関連している。結核菌においてマクロファージ内で発現が亢進する遺伝子を特定することは、病原性因子の解明につながる。細胞内に取り込まれてファゴゾーム内で濃縮される抗菌薬 XXX に対する感受性を指標として、マクロファージ内で発現が亢進する遺伝子の網羅的選択法の確立を行った。抗酸菌は、脂質に富む頑強な細胞壁構造をしており、生育や病原性の発現に深く関与している。結核菌に特異的な新規抗結核薬の開発に向けて、その標的となり得る細胞壁構成に関わる新規遺伝子の同定と解析を目的として、*Mycobacterium smegmatis* のコロニー形態変異株の取得と変異導入部位の解析を行なった。また、*M. bovis* BCG 株の破壊株を作成することにより、同定した遺伝子が抗酸菌において普遍的にコロニー形態に関与しているのかを調べた。作用機序が明確な新規抗結核薬の効率的・経済的な開発のためには、標的候補タンパク質の立体構造情報、特に活性中心近傍の構造情報が必要とされている。そこで、結核菌において主要な細胞壁構成成分である Lipoarabinomannan の生合成に関与する 3 種類のタンパク質 (Rv2610c、Rv2611c、及び Rv2612c) と本研究でコロニー形態に関与していることを明らかにしたタンパク質 (Rv3597c) を新規抗結核薬の標的候補タンパク質として選定して、発現条件の検討、タンパク質の精製、及び結晶化条件のスクリーニングを行なった。

## 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 核抗原に対する血清抗体を酵素抗体法により測定した。標準菌株 (血清型 4、7、16、20) 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。結核菌や BCG 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、MDP1 の治療・予防効果：動物感染実験および免疫学的奏功機序) を解析した。非結核性抗酸菌の遺伝子診断法を開発するため、高価な温度制御装置を必要としない等温遺伝子増幅法である、LAMP 法による *M. kansasii*, *M. gastri* の鑑別およびらい菌の特異検出系の開発および臨床検体の簡易保存法の開発を行った。結核の補助診断法を開発を目的として、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。健常人ボランティアの血液より末梢血単核球を精製し、アデノウイルスを MOI50 の条件下で感染させ、LPS 存在下で 3 日間培養した。培養上清中の IFN- $\gamma$  の濃度を ELISA にて測定した。Ag85a アデノウイルス感染単球上のヒト組織適合抗原 (HLA) の発現程度は FACS で検討した。末梢血樹状細胞は、末梢血樹状細胞表面マーカー (BDCA1, BDCA3, BDCA4) 陽性細胞を分離し用いた。

正常健常者末梢血よりプラスティック附着性細胞を分離し、単球として用いた。単球由来樹状細胞は、rGM-CSF および rIL-4 を用いて誘導した。マクロファージは、単球に対し rM-CSF あるいは rGM-CSF を作用させ得た。M-CSF を用いて作製したマクロファージを M-M $\emptyset$ 、GM-CSF を用いて作製したマクロファージを GM-M $\emptyset$  と称した。単球・樹状細胞およびマクロファージにらい菌を感

染させた際に産生されるサイトカイン、あるいは T 細胞から産生されるサイトカインは、ELISA 法により市販のキットを用いて測定した。樹状細胞およびマクロファージの表面抗原の解析は、市販の抗体を用いて FACScaliber にて解析した。MMP-II に対するモノクローナル抗体は、マウスに精製 MMP-II を免疫してミエローマ細胞と融合させて得た。MMP-II の細胞表面への発現は、本抗体を用いて検索した。

BCG パスツール株を用いてリコンビナント BCG を作製した。MMP-II 遺伝子上流に Antigen 85B 由来タンパク分泌シグナルをコードする遺伝子を組み込み、カナマイシン耐性遺伝子とともに BCG に組み込んだ。遺伝子組み込み BCG をカナマイシン存在下 7H10 培地で培養し、クローニングを行いリコンビナント BCG (BCG-SM) を得た。BCG-SM のメモリー T 細胞の産生能は C57BL/6 マウスを用いて行った。本マウスに BCG-SM あるいは BCG-pMV を皮下接種し、7 および 13 週後に脾臓 T 細胞のリコンビナント MMP-II に対する反応性を検索した。T 細胞の活性化は IFN- $\gamma$  の産生量を指標とした。

結核菌の分泌する Ag85B とその C-末端ペプチドである Peptide-25 を I-A<sup>b</sup> とともに認識する TCR  $\alpha$ -鎖、 $\beta$ -鎖 (P25 TCR) を発現するトランスジェニックマウス (P25 TCR-Tg) を作出し、そのナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を試験管内で Peptide-25 やその変異ペプチド (APL) で刺激し、Th1 や Th2 への分化を IFN- $\gamma$  や IL-4 産生を指標に検討した。Peptide-25 のアジュバント活性は、C57BL/6 マウスを卵白アルブミン (OVA) で免疫する際に Peptide-25 を共存させ、OVA 特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の生成に及ぼす効果により判定した。抗原提示細胞のクロスプレゼンテーションは卵白アルブミン (OVA) パスルした APC と CFSE を取り込んだ OVA 特異的 MHC クラス I 拘束性 CD8<sup>+</sup> OT-I 細胞を共培養し、OT-I の CFSE の輝度を FACS で解析した。非結核性抗酸菌が保有するプラスミド DNA の解析に関して、迅速発育菌 15 菌種 187 株 (*M. chelonae* 21 株、*M. fortuitum* 25 株、*M. smegmatis* 20 株、*M.*

*neoaurum* 9 株、*M. flavescens* 19 株、*M. thermoresistibile* 22 株、*M. rhodesiae* 5 株、*M. gadium* 5 株、*M. phei* 19 株、*M. porcinum* 10 株、*M. gilvum* 4 株、*M. aichiense* 5 株、*M. tokaiense* 7 株、*M. pulveris* 16 株)、抗酸菌属の近縁種である *Rhodococcus aurantiaca* 21 株、及び遅発育菌 6 菌種 227 株 (*M. intracellulare* & *avium* complex 152 株、*M. kansasii* 31 株、*M. marinum* 24 株、*M. xenopi* 15 株、*M. haemophilum* 5 株) についてプラスミドの保有状況を調べた。プラスミド DNA は、アルカリ少量法変法を用いて抽出した。プラスミド DNA は、制限酵素 *SaII*、*SmaI*、及び *PstI* で切断後、遺伝子型のタイピングを試みた。マクロファージ内で発現が亢進する遺伝子の新規な網羅的選択法の確立について、抗酸菌発現ベクターである pvv16 の構成性発現プロモーター (*hsp60*) 下流に、*Staphylococcus aureus* 由来の抗菌薬 XXX 耐性遺伝子を組み込んだプラスミドを構築し、*M. smegmatis* に導入することにより、*M. smegmatis hsp60-XXX* 耐性遺伝子株を作成した。また、上記のプラスミドを用いて、*hsp60* をマクロファージ内で発現が亢進することが報告されている *acr* プロモーターに置き換えたプラスミドを構築し、*M. smegmatis acr-XXX* 耐性遺伝子株を作成した。作成した形質転換株を用いて、抗菌薬 XXX を含むプレート上での生育状況について調べた。THP-1 細胞の培養液中に phorbol-12-myristate-13-acetate を添加したマクロファージに、*M. smegmatis* 野生株と *M. smegmatis acr-XXX* 耐性遺伝子株を取り込ませ、抗菌薬 XXX で処理した後にマクロファージ内から回収される生菌数を調べた。抗酸菌コロニー形態に関与する遺伝子の同定と解析は、パスツール研究所より分与された、phAE94 を用いて、*M. smegmatis* ATCC607 のランダム変異株を作成した。コロニー形態が通常株 (Rough 型) とは異なる変異株 (Smooth 型) を取得した。得られた変異株ゲノム DNA 上のトランスポゾン挿入位置は、DNA Walking *SpeedUp*<sup>TM</sup> Premiv Kit (Seegene, Korea) を用いて決定した。さらに、MSMEG6056 遺伝子、並びに MSMEG6056

遺伝子と高い相同性を示す Mb3628c 遺伝子の中央部分に、pUC4K 由来のカナマイシン耐性カセットを組み込んだ遺伝子断片を抗酸菌ベクター pPR27 に挿入して破壊株作成用のプラスミドを構築した。*M. bovis* BCG 株の Mb3628c 遺伝子破壊株ゲノム DNA を抽出し、カナマイシン耐性カセットに対応するプローブを用いたサザンブロッティングを行なった。抗酸菌発現ベクター pvv16 に Mb3628c 遺伝子を挿入したプラスミドを構築し、BCG 破壊株の相補株を作成した。新規抗結核薬の標的候補タンパク質の結晶化は、結核菌由来の標的候補タンパク質をコードする遺伝子を pET30a に挿入したプラスミドを構築し、*E. coli* BL21 (DE3) pLysS に導入することにより、大量発現株を作成した。タンパク質の精製には FPLC を使用し、Ni キレートカラムとゲルろ過カラムを用いた。市販されているスクリーニング試薬を用いて、約 700 種類の条件で精製タンパク質の結晶化条件を調べた。

倫理面への配慮 国立感染症研究所及び当該研究施設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

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ことから、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。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ず、GPL

抗原の抗原決定部位は GPL 核であることが判明し、GPL 核抗原を用いた血清診断キット (試作) の開発と有用性の検討に着手した。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。健常者や検体提供者の多くが 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。血清抗 GPL 核抗体の測定は主要な肺抗酸菌感染症を安全、迅速、かつ、効率的に鑑別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の関連性を解析した。抗菌化学療法反応群 (治療による菌陰性化、14 例) と非反応群 (菌陽性持続、13 例) における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 感染症の疾患活動性をも反映することが示唆された。MAC 多型性、すなわち、GPL 多型性に関し解析した。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→rhamnose→rhamnose→rhamnose→6-deoxy talose が結合した構造であった。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 合成酵素群を同定した。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。

抗酸菌表層 MDP1 は宿主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-宿主細胞の接着・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、結核菌が宿主細胞に接着・侵入している。マウスを用いた *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、感染後投与は感染生菌数を有意に減少 (約 1-3/10) させ、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。

次に、MDP1 を標的としたワクチン開発に着手した。MDP1 単独や MDP1-DNA 複合体でマウスを前免疫し、その後、結核菌を接種し、菌数や免疫学的指標からワクチン効果を評価した。MDP1-DNA 複合体前投与により、菌数を有意に減少させた。MDP1-DNA 複合体の免疫学的作用機序を解析したところ、(1) 抗 MDP1 抗体および (2) IFN- $\gamma$  産生誘導が認められた。

*M. kansasii*, *M. gastri* の鑑別法開発では、*dna A* 遺伝子を標的とし、数種のプライマーセットの検討の結果、*dna Kan 32* および *dna Gas 583* のセットを選択した。両プライマーセットは、27 抗酸菌ゲノム DNA を用いた結果、標的菌種特異的であり 500 ゲノムまで検出可能であった。

らい菌の特異検出系では、1 菌体に少なくとも 20 から 30 コピー存在するとされる RLEP 配列を基に設計を行った。その結果、RLEP154-41 プライマーセットは、らい菌特異的であり、50 菌体まで検出可能であることを示した。

LAMP 法は、その遺伝子増幅効率の良さより、産物の実験室汚染が非常に深刻なものである。そのため、PCR 法の検出に用いられる電気泳動法による判定では、操作が煩雑になる。そこで蛍光目視判定薬 Fluorescent Detection 試薬を用いること

により、電気泳動法と同様の検出感度を簡易に検出できることを示した。

検体の簡易保存・移送法の開発では、特殊な表面化学処理の施された、FTA カード Elute を利用することにより、室温において保存をされたサンプルより遺伝子の検出が可能であることを、臨床検体を用いて示した。

23 歳から 65 歳までの、男女混合の健常人ボランティアより末梢血単核球を精製し、Ag85a 組み込みアデノウイルスを感染させて産生される IFN- $\gamma$  の濃度を測定した。その結果、コントロールアデノウイルス感染によって高い IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  産生が低下した (図 1)。

アデノウイルスに対する T 細胞性免疫反応と抗 5 型アデノウイルス IgG 抗体力価を測定したが、抗体価と IFN- $\gamma$  産生能の間には相関が認められなかった (図 2)。

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た。その結果、単核球からの IFN- $\gamma$  産生は上昇した。また、コントロールアデノウイルス感染に対する IFN- $\gamma$  産生低下は消失した (図 3)。

アデノウイルス感染による単球の機能変化を検討するため、末梢血単核球にアデノウイルスを感染させ、単球表面 HLA の発現を解析した。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た。

次に、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。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- $\gamma$  産生上昇を認めた (図 4)。陽性率は 67%であった。

活性化成熟樹状細胞は、ヒト悪性腫瘍に対する免疫治療剤として広く用いられ、抗酸菌感染症に対する生体防御反応を誘導する上でも極めて重要な役割を果たしている。樹状細胞の活性化には、生体内では IL-1 $\beta$  が用いられているが、樹状細胞のプレカーサーである CD14 陽性単球に及ぼす影響については十分明らかにされていない。そこで、IL-1 $\beta$  を単球に作用させた場合の樹状細胞の成熟及び活性化に及ぼす影響を検索したところ、IL-1 $\beta$  が樹状細胞の成熟段階に作用すると樹状細胞の活性化を著しく低下させることが明らかになった。

ついで、BCG-SM あるいはベクターコントロール BCG (BCG-pMV) を樹状細胞に感染させ T 細胞の活性化誘導能を測定した。BCG-SM と BCG-pMV の間には大きな差が認められ、ナイーブ T 細胞およびメモリー T 細胞は、BCG-SM を用いた時有意に強く活性化された。さらに、Cytotoxic T lymphocyte のマーカーである Perforin の細胞内産生能を BCG-SM と BCG-pMV で比較検討した。その結果、BCG-SM を用いるとより大量の Perforin が CD8 陽性 T 細胞内に産生された。BCG-SM を樹状細胞に感染させると、BCG-pMV に比し有意に強く MMP-II が樹状細胞表面に発現した。さらに、BCG-SM を樹状細胞に感染させると BCG-pMV に比し有意に高い HLA-ABC・HLA-DR・CD80 および CD86 抗原の発現が誘導された。BCG-SM あるいは BCG-pMV を C57BL/6 マウスに皮下接種し、その 7 あるいは 13 週後にマウス脾臓 T 細胞のリコンビナント MMP-II あるいは BCG に対する反応性を検討した。その結果、BCG に対する反応性は両者において有意の差はなかったが、MMP-II に対する反応性すなわち IFN- $\gamma$  産性能は BCG-SM 投与群において有意に高く、BCG-SM はより有効にメモリー T 細胞を産生することが明らかになった。

GM-M $\phi$  に BCG-SM を感染させた際の CD4 陽性 T 細胞の活性化を検索すると、BCG-pMV

に比し有意に強い T 細胞の活性化が観察された。M-M $\phi$  を用いても、BCG-SM を用いた場合により大量の IFN- $\gamma$  が CD4 陽性 T 細胞から産生された。そこで、M-M $\phi$  をリコンビナント BCG を用いて刺激した際に GM-CSF が産生されるか検討した。その結果、BCG-SM を用いた場合明らかに大量の GM-CSF が産生された。そこで、GM-CSF 中和活性を有する抗体存在下で BCG-SM を M-M $\phi$  に感染させ、その CD4 陽性 T 細胞活性化能を検索したところ、GM-CSF 中和抗体存在下では M-M $\phi$  の CD4 陽性 T 細胞活性化能は明らかに抑制された。

Ag85a 由来 Peptide-25 に関して、(1) P25 TCR ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞は自然中立条件下の培養で Peptide-25 に応答し Th1 に、APL 刺激により Th2 に分化した。RAG2<sup>-/-</sup> P25 ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を Peptide-25 刺激する際、抗 IL-12, 抗 IL-18, 抗 IFN- $\gamma$  抗体を添加しても Th1 への分化は影響を受けなかった。また、抗原提示細胞 (APC) として IL-12/IL-18<sup>-/-</sup> マウスの脾細胞を用い、Peptide-25 刺激しても Th1 への分化が見られた。更に、P25 TCR ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を、既知の副刺激分子の発現やサイトカイン産生が認められない、I-A<sup>b</sup>-CHO 細胞と Peptide-25 で刺激しても Th1 分化が見られた。

(2) P25 TCR ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を Peptide-25 と I-A<sup>b</sup>-CHO 細胞で刺激後、T-bet, GATA-3 の発現を定量的 RT-PCR 法により調べた。T-bet の発現は Peptide-25 刺激後 3 時間目と 15 時間目 (刺激 3 時間目がピーク) に見られた。GATA-3 の発現は刺激時間とともに減弱した。

(3) T-bet<sup>-/-</sup> P25 TCR ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を Peptide-25 と I-A<sup>b</sup>-CHO 細胞で刺激しても、有為な IFN- $\gamma$  産生細胞が出現した。また、T-bet<sup>-/-</sup> P25 TCR T 細胞を Peptide-25 と I-A<sup>b</sup>-CHO 細胞により刺激しても GATA-3 の発現減弱が観察された。

(4) Peptide-25 を OVA と共免疫すると OVA 特異的な CTL 生成を増強した。OVA を APC に取り込ませる際に P25 TCR Th 細胞と Peptide-25 を 24 時間共培養した。培養後

OVA パルス APC を精製し CFSE 標識 OT-I 細胞を共培養したところ、OT-I 細胞の増殖促進と活性化が見られた。この効果は OVA 特異的で IFN- $\gamma$  依存性であった。また、P25 TCR Th 細胞と APC との CD40/CD40L を介する相互作用が必須であった。

(5) P25 TCR-Tg マウスの CD4<sup>+</sup> T 細胞は、ヒト型結核菌 H37Rv 感染させたマウスマクロファージと共培養すると増殖し、IFN- $\gamma$  を産生した。Ag85B を欠失した H37Rv を感染させたマクロファージは T 細胞を刺激しなかった。P25 TCR CD4<sup>+</sup> Th 細胞は Ag85B を特異的に認識することが分かった。

非結核性抗酸菌が保有するプラスミド DNA の解析では、MAC152 株中、11 株にプラスミド DNA の存在が認められた。これらのプラスミド DNA はその電気泳動パターンから、4 種類に分類された。このうち 3 種類においては、クローンの解析から、*M. bovis* BCG 株、並びに *M. intracellulare* において複製可能であった。マクロファージ内で発現が亢進する遺伝子の新規な網羅的選択法の確立では、*M. smegmatis* hsp60-XXX 耐性遺伝子株は、抗菌薬 XXX 存在下で生育が可能であったのに対して、*M. smegmatis* acr-XXX 耐性遺伝子株では、野生株と同様に抗菌薬存在下では菌の生育は認められなかった。野生株と *M. smegmatis* acr-XXX 耐性遺伝子株をマクロファージに貪食させ、抗菌薬 XXX 処理を行なった後に、マクロファージ内より回収される生菌数を調べた結果、野生株では生菌数がゼロであったのに対して、*M. smegmatis* acr-XXX 耐性遺伝子株では十分な生菌数が認められた。抗酸菌コロニー形態に関与する遺伝子の同定と解析においては、*M. smegmatis* のランダム変異株を作成した結果、コロニー形態が Smooth 型に変化した変異株を 5 株取得された。得られた変異株 5 株中 2 株はそれぞれ、MSMEG1402 と MSMEG6056 にトランスポゾンが挿入されていた。また、*M. bovis* BCG 株において、MSMEG6056 遺伝子と高い相同性を示す Mb3628c 遺伝子を破壊した BCG 破壊株でもコロニー形態が変化した。新規抗結核薬の標的候補タンパク質の結晶化につい

ては、新規抗結核薬の標的候補として選定した結核菌由来タンパク質、Rv2610c、Rv2611c、Rv2612c、及び Rv3597c について、それぞれ *E. coli* を宿主として用いた発現条件の検討を行った結果、Rv2610c のみが可溶性画分に発現が認められた。微小ではあるが Rv2610c の結晶の析出が確認された。

#### D. 考察

GPL 核抗原は MAC 特異的抗原であり、かつ、宿主は GPL 核抗原に対し抗体産生など液性免疫応答を発現し、MAC 感染症の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 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。その中間結果報告は本報告書に示した成績と殆ど同等であり、有用性が確認されつつある。今後、解析症例数を増加し、また、胸部 X 線所見と抗体価の関連など、臨床実用化に向け、進捗させる予定である。

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・貪食が必須となる。宿主細胞の結核菌貪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、接着・侵入に関する結核菌や宿主細胞の分子機構はほとんど不明であった。結核菌を吸入しても、宿主細胞に接着・侵入を阻止することにより、感染成立や発病を回避することが理論的に可能である。MDP1-DNA 複合体は宿主に（1）抗 MDP1 抗体や（2）IFN- $\gamma$  を誘導した。抗 MDP1 抗体は結核菌表層 MDP1 を被覆することにより結核菌の接着/侵入を阻害し、他方、IFN- $\gamma$  は抗結核菌防御活性を増強し、ワクチン効果を発揮したことが考えられる。新規結核ワクチン候補として、MDP1-DNA 複合体は現行 BCG などの生菌と異

なり、成分ワクチンであるため、HIV 感染者や AIDS 患者などの免疫不全者に対しても安全である。現状の課題として BCG に比し、ワクチン効果が劣ることである。今後、他の接着／侵入分子も探索し、MDP1-DNA 複合体を含め、安全で有効なワクチン開発を指向する予定である。

結核菌の接着・侵入分子である MDP1 は有望な治療・予防標的候補であり、その阻害は結核の治療・予防戦略になることが期待される。薬剤標的遺伝子を改変することにより生ずる耐性結核菌にも同様な接着・侵入機構が機能していることが想定され、接着・侵入機構の阻害は薬剤耐性結核にも有効な治療・予防戦略となるであろう。従って、殺菌・静菌を目的とした抗結核化学療法とはまったく異なり、結核菌の細胞接着・侵入機構の阻害を目的とした抗結核療法を狙う戦略であり、従来にない独創的なアプローチであると考えられる。

臨床検体を用いた遺伝子検査は、サンプルの採取、保存・移送、遺伝子の抽出、増幅、検出の過程に分かれる。各過程の操作の簡易・迅速化は、コストの削減と信頼性の向上と結びつく。特に、開発途上国での応用を考慮すると、検体を採取した場所とその検査を行う場所は、非常に遠距離であることが想定される。本研究で樹立されたシステムは、以下のようになる。特殊化学処理された紙面へサンプルを添加することにより、菌体を破壊・核酸抽出し安定した状態で紙面に結合させる。この紙片を、室温で移送し、紙片より核酸を蒸留水へ抽出し、そのまま LAMP 法に応用する。60 分の反応終了と同時に判定を行う。LAMP 法は、等温状態において PCR 法と同様な検出が可能であり、コストの面からも有利な方法である。本研究により開発された簡易・迅速検出法は、国内のみならず、開発途上国での応用が期待されると考えられた。

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。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感染に対して強く反応し、大量の IFN- $\gamma$  を産生した。マウスとヒトの反応の違いは、ヒトではベクターとして用いた 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いることを示唆する。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。今後の研究で、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改良が期待される。

Ag85a はヒトおよびマウスで CD8 陽性 T 細胞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 細胞免疫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。

抗酸菌に対する生体防御反応は、細胞性免疫が中心に営まれ、その中でもタイプ 1 CD4 陽性 T 細胞が主要な役割を果たしている。タイプ 1 T 細胞の活性化には、樹状細胞およびそこから産生される IL-12p70 が不可欠であり、樹状細胞の分化・誘導は生体内とりわけ単球から産生されるサイトカインによって大きく影響される。一般に、抗酸菌は末梢単球に対し強い親和性を有し、感染すると種々のサイトカインを産生する。そこで、単球由来サイトカインの樹状細胞の成熟および活性化に及ぼす影響を検索したところ、単球に IL-1 $\beta$  を少量作用させ

でも樹状細胞の成熟化を著しく阻害し、種々の刺激に対する IL-12p70 の産生能を極めて強く抑制した。樹状細胞の成熟阻害は、CD86 あるいは CD83 抗原陽性細胞率の低下およびそれらの発現程度の低下より明らかであった。IL-12p70 の産生には、細胞核の NF- $\kappa$ B の活性化が要求されるが、IL-1 $\beta$  処理単球由来樹上細胞では、種々の刺激を加えても NF- $\kappa$ B の活性化が十分に誘導されず、その結果として IL-12p70 の産生低下が誘導されたものと考えられた。ワクチンを生体内に投与した場合、目的としたターゲット細胞以外の細胞にも作用する可能性が極めて高い。単球を刺激し IL-1 $\beta$  を産生する抗原をワクチンとして用いた場合、そこから得られた樹状細胞は機能不全を示す可能性が極めて大きいことが本研究から明らかになった。BCG もまた単球に感染し IL-1 $\beta$  産生を誘導することから、BCG が十分にワクチン効果を示すことができない原因の一つと考えられた。

BCG はこれまでに抗酸菌に対するワクチンとして長年用いられてきた。しかし、その有効性は極めて限られている。BCG の持つ欠点は多く、その中で最も根本的かつ重大な欠点は、BCG が抗原提示細胞に貪食されると phagosome を形成し lysosome との融合を阻み十分にプロセッシングされないこと、すなわち T 細胞を十分に活性化し得ないことにある。そこで、BCG のこうした欠点を補うため、BCG が抗原提示細胞に感染した後、その細胞内で生体防御反応を引き起こすタンパク抗原を分泌するリコンビナント BCG を作製した。さらに、タンパク抗原として抗酸菌共通抗原であり、種々存在するタンパク抗原の中で生体防御上重要な役割を果たす MMP-II を用いた。作製したリコンビナント BCG (BCG-SM) は、細胞内で MMP-II を分泌し、lysosome 内の酵素によりプロセッシングされ、主要組織適合抗原と結合した型で樹状細胞の表面に発現された。さらに、BCG-SM はコントロール BCG に比し、より強く樹状細胞を活性化した。その機序は一部不明であるが、MMP-II は TLR-2 と結合し、樹状細胞の NF- $\kappa$ B を活性化する働き

を有していることから、phagosome 内で分泌された MMP-II が phagosome 膜に存在する TLR-2 に結合して、樹状細胞をより強く活性化したものと想定された。

また、BCG が生体内でより親和性を有する細胞はマクロファージであり、マクロファージに取り込まれた場合マクロファージが T 細胞を活性化しない限り BCG はマクロファージ内に長い間宿り、IL-10 などの免疫抑制性サイトカインを分泌し、宿主の生体防御反応に負に働く可能性が考えられる。そのため BCG-SM とマクロファージの抗原提示能に関して検討を加えたが、BCG-SM は CD4 陽性 T 細胞を強く活性化することが可能で、これまで考察されてきた BCG の負の要素を払拭し得る可能性が示唆された。BCG-SM がこうした強い抗原提示能をマクロファージに付与する免疫学的要因として GM-CSF の産生誘導が考えられた。BCG-SM がマクロファージに取り込まれると GM-CSF を産生し、より T 細胞を活性化しやすい細胞へと形質転換しているものと想定された。

Ag85a 由来 Peptide-25 に関して、(1) P25 TCR ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞は、サイトカインや副刺激のない条件下で、Peptide-25 刺激による TCR を介する直接刺激で、T-bet 依存性および T-bet 非依存性に Th1 に分化できる。T-bet 以外の転写因子が Th1 分化に関与するかまた T-bet と協調的に Th1 を惹起するか、1) シグナル伝達系、2) DNA マイクロアレイ法を用いて解析することにより、ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞の Th1 への分化の決定に関与する、新規制御系を明らかにできると期待している。

(2) APC によるクロスプレゼンテーションの分子機構はほとんど分かっていない。APC が Peptide-25 刺激された P25 TCR Th 細胞と直接相互作用することにより、その OVA クロスプレゼンテーション能が亢進することから、この培養系を利用することにより樹状細胞がクロスプレゼンテーションする際の調整因子や TLR リガンドによる DC 活性化とクロスプレゼンテーションを明らかに出来るかもしれない。

(3) GFP 結合ヒト型結核菌を用いた感染実

験により結核菌に感染する標的細胞の同定が可能になり、P25 TCR CD4<sup>+</sup> T 細胞を結核菌感染マウスに移入しその増殖応答を追跡することにより抗結核免疫への関与が明らかにできると考える。

本邦で環境中あるいは臨床的に分離された非結核性抗酸菌について、プラスミド DNA の保有状況について分析した結果、遅発菌である MAC のみにプラスミド DNA の存在が確認された。MAC に認められたプラスミド DNA は、*M. bovis* BCG 株、並びに *M. intracellulare* においても複製可能であり、今後抗酸菌用のベクター開発に十分貢献するものと考えられる。また、今回分離されたプラスミド DNA の詳細な解析が、MAC 感染症の病原性解明へつながることが期待される。

結核菌由来マクロファージ内発現遺伝子を同定する目的で、新規な網羅的選択法の確立を行なった。抗菌薬存在下で、*M. smegmatis hsp60-XXX* 耐性遺伝子株は生育が可能であったが、*M. smegmatis acr-XXX* 耐性遺伝子株は生育が認められなかった。しかし、マクロファージに取り込ませた後に抗菌薬を含む培地で培養した場合は、*M. smegmatis acr-XXX* 耐性遺伝子株は生存が可能であったことから、*acr* プロモーターがマクロファージに取り込まれた後に十分に発現していることが明らかとなった。*acr* プロモーターの代わりに結核菌由来遺伝子断片を挿入したプラスミドを用いて *M. smegmatis* を形質転換したスクリーニング株を作成し、本研究で明らかにした条件で培養、並びに抗菌薬処理を行ない、マクロファージ内より生菌を回収すれば、その生菌内では抗菌薬耐性遺伝子が発現している、すなわち挿入した結核菌由来遺伝子断片中にマクロファージ内で発現が亢進する遺伝子が含まれていることになる。本研究で確立した条件を用いることにより、マクロファージ内で発現が亢進する結核菌由来遺伝子を網羅的に選択することが十分に可能であることが示された。

また、抗酸菌中で高度に保存されている遺伝子 (*M. smegmatis*: MSMEG6056 遺伝子、*M. bovis* BCG 株 : Mb3628c 遺伝子) がコロ

ニー形態、すなわち細胞壁構造に関与していることを明らかにした。抗酸菌に特異的である細胞壁構造に関与している本遺伝子の産物であるタンパク質 (結核菌では Rv3597c) は新規抗結核薬の標的になり得ることが示唆された。

立体構造解析を通じた新規抗結核薬の開発に向けて、細胞壁合成に関与している結核菌由来のタンパク質 (Rv2610c、Rv2611c、Rv2612c、及び Rv3597c) を標的候補タンパク質として選び、発現条件の検討を行なった。可溶性画分に回収された Rv2610c について結晶化条件のスクリーニングを行なった結果、X 線結晶構造解析には適さないもののタンパクの結晶と思われる結晶が得られた。

## E. 結論

MAC 特異的抗原を用いた迅速・簡便血清診断キットを開発した。抗酸菌の宿主細胞への接着・侵入に抗酸菌特異的 DNA 結合蛋白質 (MDP1) が必須の役割を演じ、MDP1 を分子標的とした介入は新規新規治療・予防戦略として有望である。

FTA カードによる検体保存・移送法を用いた、LAMP 法による非結核性抗酸菌 *M. kansasii*, *M. gastri* の鑑別およびらい菌の特異検出は、国内のみならず、広く開発途国での簡易・迅速診断法になることを示した。

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たが、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。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。

外来性および内在性 IL-1 $\beta$  感作単球より、抗酸菌生体防御司る上で中心的役割を果たす樹状細胞を分化・誘導すると、樹状細胞の機能不全を誘導した。抗酸菌共通抗原である MMP-II を細胞内で分泌する新しいリコンビナント BCG は、樹状細胞を介してより強く T 細胞を活性化しメモリー T 細胞を産生した。同時に、マクロファージを刺激し、GM-CSF を産生することによってマ

クロファージの抗原提示能を増強した。  
BCG-SM は、新しいワクチンとして期待される。また、

Ag85B は、ブースター用ワクチンとしての有用性が示唆された。

本邦で環境中及び臨床的に分離された非結核性抗酸菌のプラスミド保有状況を明らかにした。抗菌薬に対する耐性を指標とした、マクロファージ内発現遺伝子群の新規な網羅的選択法を構築し、マクロファージ内で発現が亢進する結核菌由来遺伝子をスクリーニングすることが可能であることを示した。*M. smegmatis*、並びに *M. bovis* BCG 株を用いた変異株・破壊株・相補株の作成から、抗酸菌全体に共通して細胞壁構造に参与している遺伝子を同定した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Maeda, Y., P. J. Brennan, and M. Makino. Studies of lipoproteins of *Mycobacterium leprae*. Jpn. J. Leprosy, 73 : 15-21, 2004.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Tamura. T., H. Ariga, T. Kinashi, S. Uehara, T. Kikuchi, M. Nakada, T. Tokunaga, W. Xu, A. Kariyone, T. Saito, T. Kitamura, G. Maxwell, S. Takaki, and K. Takatsu. The role of antigenic peptide in CD4<sup>+</sup> T helper phenotype development in a T cell receptor transgenic model. Int. Immunol., 16:1691-1699, 2004.
- 7) 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. Extracellular mycobacterial DNA binding protein 1 participates in *Mycobacterium*-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. J. Biol. Chem. 279: 39798-39806, 2004.
- 8) Wada, T., S. Maeda, A. Tamaru, S. Imai, A. Hase, and K. Kobayashi. Dual-probe assay for rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 42: 5277-5285, 2004.
- 9) 小林和夫. 抗酸菌病原因子と宿主応答の分子機序. 日本ハンセン病学会雑誌 73: 263-270、2004.
- 10) 小林和夫. 結核. 世界最大の感染症. 今日の移植 17: 509-515、2004.
- 11) Maeda, Y., T. Mukai, J. Spencer, and M. Makino. Identification of immunomodulating agent from *Mycobacterium leprae*. Infect. Immunity, 73:2744-2750, 2005.
- 12) Makino, M., Y. Maeda, and N. Ishii.

- Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from *Mycobacterium leprae*. Cell. Immunol., 233:53-60, 2005.
- 13) Fujiwara, N., and K. Kobayashi. Macrophages in inflammation. Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy 4: 281-286, 2005.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) Maekura, R., Y. Okuda, A. Hirotsani, 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 小林和夫. 抗酸菌細胞壁分子を標的とした抗酸菌感染症の診断・治療方法の開発. BCG・BRM療法研究会会誌 29: 9-15, 2005.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) Makino, M., Y. Maeda, T. Mukai, and S. H. E. Kaufmann. Impaired maturation and function of dendritic

- cells by mycobacteria through IL-1  $\beta$ . Eur. J. Immunol., 36:1443-1452, 2006.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) Kikuchi, T., S. Uehara, H. Ariga, T. Tokunaga, A. Kariyone, T. Tamura, and K. Takatsu. Augmented induction of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-cell response and antitumour resistance by T helper type 1-inducing peptide. Immunology. 117:47-58, 2006.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) Suzuki, K., F. Takeshita, N. Nakata, N. Ishii, and M. Makino. Localization of COR01A in the macrophages containing *Mycobacterium leprae*. Acta Histochemica et Cytochemica, in press, 2007.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) Kitada, S., Y. Nishiuchi, T. Hiraga, H. Hashimoto, K. Yoshimura, K. Miki, M. Miki, M. Motone, T. Fujikawa, K. Kobayashi, I. Yano, and R. Maekura. Serological test and chest computed tomography findings in patients with *Mycobacterium avium* complex lung disease. Eur. Respir. J. in press, 2007.
- 37) 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) Development of a new vaccine candidate against mycobacteria. Makino, M., M. Maeda, T. Mukai, and N. Ishii. 4<sup>th</sup> The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 30 August-2 September, 2004, Awaji Island, Hyogo, Japan.
- 2) Study of the interaction of *M. leprae* with Schwann cells. Maeda, Y., M. Endoh, K. Terao, and M. Makino. 4<sup>th</sup> The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 30 August-2 September, 2004, Awaji Island, Hyogo, Japan.

- 3) The genes involved in glycosylation steps of mycobacterial glycopeptidolipids. Miyamoto, Y., T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yana, and M. Makino. 4<sup>th</sup> The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 30 August-2 September, 2004, Awaji Island, Hyogo, Japan.
- 4) 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. 39<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, December 7-10, 2004, Kyoto, Japan.
- 5) 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. 39<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, December 7-10, 2004, Kyoto, Japan.
- 6) Regulation by clofazimine of cytokine production in *M. leprae*-infected macrophages. Fukutomi, Y., F. Takeshita, M. Matsuoka, and M. Makino. Fortieth Anniversary US-Japan Cooperative Medical Science Program. 39<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, December 7-10, 2004, Kyoto, Japan.
- 7) 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
- 8) らい菌ゲノム DNA の株間における多様性の検討. 中田 登, 松岡正典, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 9) 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
- 10) サルシュワン細胞のらい菌感受性の検討. 前田百美, 牧野正彦, 遠藤真澄, 寺尾恵治. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 11) 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
- 12) 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
- 13) らい菌由来リポ蛋白 LpK の IL-12 産生活性中心の解析. 山下康子, 前田百美, 武下文彦, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 14) DC-SIGN を介した抗酸菌感染の解析. 向井 徹, 宮本友司, 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
- 15) *M. smegmatis katG* 変異株の機能. 福富康夫, 甲斐雅規, 中田 登, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 16) 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. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 17) Real-time PCR を用いた薬剤耐性結核菌検出システムの開発. 和田崇之, 前田伸司, 長谷 篤, 小林和夫. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪

- 18) 抗酸菌におけるホスファチジルセリン合成酵素欠損による表現型の変化. 前田伸司、中田 登、中 崇、小林和夫. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 19) 抗酸菌の肺胞上皮細胞接着における分子機構. 平山幸雄、松本壮吉、青木圭子、和田崇之、尾関百合子、松本 真、小林和夫. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 20) 結核基礎研究の最前線 (シンポジウム). 光山正雄、小林和夫. 第 79 回日本結核病学会総会 2004 年 4 月 名古屋
- 21) 抗酸菌の肺胞上皮細胞接着/侵入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、小林和夫、西内由紀子. 第 79 回日本結核病学会総会 2004 年 4 月 名古屋
- 22) 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
- 23) らい菌ゲノム DNA の多様性についての検討. 中田 登、松岡正典、甲斐雅規、鈴木幸一、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
- 24) クロファジミンによるマクロファージのサイトカイン産生調節. 福富康夫、武下文彦、松岡正典、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
- 25) 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. 第 77 回日本ハンセン病学会総会 2004 年 5 月 さいたま
- 26) 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
- 27) 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
- 28) 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
- 29) Instruction of CD4<sup>+</sup> T cell fate to Th1 development by Th1 inducing peptide: Roles of T cell receptor-mediated signals. Takatsu, K. The 3<sup>rd</sup> FIMSA Congress, 16-18, April, 2005, Hangzhou, P. R. China.
- 30) Functional counteraction between toll-like receptor 2 and CORO1A that affects intracellular survival of mycobacteria. Suzuki, K., F. Takeshita, N. Nakata, N. Ishii, and M. Makino. The 14<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage 2005, 3-4 June, 2005, Saitama, Japan.
- 31) Role of IL-5 in the immune system and disease control. Moon, B-M., T. Kouro, Y. Ooe-Kikuchi, S. Takaki, and K. Takatsu. The Uehara Memorial Foundation Symposium: The Innate Immune System: Strategies for Disease Control, 11-13 July, 2005, Tokyo, Japan.
- 32) Role of TCR signal in the Th1/Th2 regulation: A P25 TCR transgenic model. Takatsu, K. The 22<sup>nd</sup> US-Japan Cooperative Medical Science Program, 17-18 July, 2005, Seattle, USA.
- 33) 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. 40<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 28-30 July, 2005, Seattle, USA.
- 34) Rapid detection of *Mycobacterium*