

200704002A

厚生労働科学研究費補助金  
社会保障国際協力推進研究事業

**抗酸菌感染症への国際的学術貢献  
を目指した基盤研究**

平成19年度 総括・分担研究報告書

**研究代表者 菅原 勇**

日米医学協力計画

結核・ハンセン病専門部会

U.S.-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM  
TUBERCULOSIS AND LEPROSY PANEL

## 目次

平成 19 年度活動概要 .....	1
平成 19 年度結核・ハンセン病専門部会構成員一覧 .....	2 - 4
研究実績報告 (構成員名簿順)	
菅原 勇 ((財)結核予防会結核研究所) .....	5 - 6
光山 正雄 (京都大学大学院医学研究科微生物感染症学) .....	7 - 10
後藤 正道 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科先進治療科学専攻腫瘍講座) .....	11 - 12
吉開 泰信 (九州大学生体防御医学研究所) .....	13 - 16
牧野 正彦 (国立感染症研究所ハンセン病研究センター) .....	17 - 21
後藤 義孝 (宮崎大学農学部微生物学講座) .....	22 - 26
岩本 朋忠 (神戸市環境保健研究所) .....	27 - 30
松岡 正典 (国立感染症研究所ハンセン病研究センター) .....	31 - 34
福富 康夫 (国立感染症研究所ハンセン病研究センター) .....	35 - 39
谷口 初美 (産業医科大学微生物学教室) .....	40 - 43
岡田 全司 (近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター) .....	44 - 50
小出 幸夫 (浜松医科大学微生物学教室) .....	51 - 55
鈴木 定彦 (北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター) .....	56 - 59
長谷 篤 (大阪市立環境科学研究所) .....	60 - 63
大原 直也 (国立感染症研究所免疫部) .....	64 - 67
慶長 直人 (国立国際医療センター研究所) .....	68 - 70
竹田 潔 (大阪大学医学部感染免疫講座) .....	71 - 74
向井 徹 (国立感染症研究所ハンセン病研究センター) .....	75 - 76
田村 敏生 (国立感染症研究所ハンセン病研究センター) .....	77 - 79
松本 智成 (大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター) .....	80 - 84
松本 壮吉 (大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学) .....	85 - 90
杉田 昌彦 (京都大学ウイルス研究所) .....	91 - 93
瀧井 猛将 (名古屋市立大学大学院薬学研究科生体防御機能学) .....	94 - 97
42nd Tuberculosis and Leprosy Research Conference (Zhengzhou, Henan, China) Program .....	98 - 111

Meeting report

平成 19 年度日米医学協力計画結核・ハンセン病専門部会国内会議（清瀬市、東京）

プログラム ..... 112

12th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim

(Haiko, Hainan, China) Program

同会議報告

国際医学協力事業（菅原 勇部会長）研究報告 ..... 127

(付)

発表論文集 ..... 133

## 平成 19 年度の活動概況

平成 19 年度から、研究事業の名称が変更された。すなわち国際医学協力研究事業から社会保障国際協力推進研究事業に変わった。平成 19 年度の採択研究課題は、「抗酸菌感染症への国際的学術貢献を目指した基盤研究 (H19—国医—指定—002)」である。

我々の専門部会は、5 名の部会員、18 名の研究員から成り立っており、専攻別に分けると、結核研究者が 18 名、ハンセン病研究者が 5 名ということになる。平成 19 年度から、2 名の先生（高嶋哲也先生と大山秀樹先生）が抜けて、2 名の先生、松本智成先生（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター）と岩本朋忠先生（神戸市環境保健研究所）がメンバーとして新しく加わった。

第 42 回日米結核・ハンセン病専門部会合同会議が、日米以外で、初めて中国河南省鄭州市興亜建国ホテルで、平成 19 年 9 月 11 日から 14 日の日程で、開催された。中国は、エイズも多いので、エイズ研究者を数名招いた。また中国の結核研究者も招いた。会は、成功裏に終わった。

第 12 回汎太平洋新興感染症国際会議が、中国海南島海口市で 12 月 4 日から 6 日まで 3 日間「Antimicrobial resistance」のテーマの下に開催された。広くアジアの研究者を、招いたので活発な議論が展開した会議となった。今回は、アメリカ側が、会議費用を負担した。

菅原 勇部会長が、国際共同研究事業による補助金を受け、中国上海市肺科病院の Xiao Heping 教授と共同で、「上海における多剤耐性結核の頻度と現状」のテーマのもとで共同研究を行った。

鄭州市で行われた会議のプログラムと会議報告、海口市の会議のプログラムと会議報告、国際共同研究事業の研究報告書は、本書の最後に載せられている。鄭州市での会議の概要は、日米の部会長である、菅原と David McMurray が共同で書き、雑誌 Tuberculosis に電子出版されている。

国内会議が、平成 20 年 2 月 29 日から 3 月 1 日の日程で、(財)結核予防会結核研究所 4 階講堂で開催された。このプログラムも、併せて掲載されている。

平成 19 年度日米医学協力計画 結核・ハンセン病専門部会 構成員

氏名 (バネル就 任)	所属・職・メールアドレス	郵便番 号	住所	電話番号 (FAX 番号)	入会年度	最終学歴 博 士号
菅原 勇 (H17~)	結核予防会結核研究所抗酸菌レフェレンスセン ター長 sugawara@jata.or.jp	204-002 2	清瀬市松山 3-1-24	0424-93-5075 (0424-92-4600)	H12	東京大学大学院 昭和55年 医 博
光山 正雄 (H3~)	京都大学大学院医学研究科微生物感染症学 教授 mituyama@med.kyoto-u.ac.jp	606-850 1	京都市左京 区吉田近衛 町	075-753-4441 (075-753-4446)	S61	九州大学昭和48 年 医博
後藤 正道 (H13~)	鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 先進治 療科学専攻腫瘍学講座 人体がん病理学 助教 授 masagoto@m2.kufm.kagoshima-u.ac.jp	890-854 4	鹿児島市桜 ヶ丘 8-35-1	099-275-5270 (099-265-7235)	H8	鹿児島大学大 学院昭和58年 医 博
吉開 泰信 (H16~)	九州大学生体防御医学研究所(所長) 附属 感染防御研究センター感染制御学分野 教授 yoshikai@bioreg.kyushu-u.ac.jp	812-858 2	福岡市東区 馬出 3-1-1	092-642-6972 (092-642-6973)	H5	九州大学大学院 昭和57年 医博
牧野 正彦 (H18 ~)	国立感染症研究所ハンセン病研究センター病 原微生物部 部長 mmaki@nih.go.jp	189-000 2	東村山市青 葉町 4-2-1	042-391-8059 (042-391-8212 )	H13	新潟大学大学院 平成3年 医 博
後藤 義孝	宮崎大学農学部微生物学講座 教授 a0d502u@cc.miyazaki-u.ac.jp	889-215 5	宮崎市学園 木花台西 1-1	0985-58-7275 (0985-58-7275)	S59	東京大学大学院 昭和55年 農 博
岩本朋 忠	神戸市環境保健研究所 微生物部 kx2t-iwmt@asahi-net.or.jp	650-004 6	神戸市中央 区港島中町 4-6	078-302-6251	H19	大阪大学大学院 平成12年薬博
松岡 正典	国立感染症研究所ハンセン病研究センター生 体 防御部第一研究室 室長 matsuoka@nih.go.jp	189-000 2	東村山市青 葉町 4-2-1	042-391-8628 (042-394-9092)	H8	日本獣医畜産大 学昭和46年 医 博
福富 康夫	国立感染症研究所ハンセン病研究センター病 原微生物部第二研究室 室長 fukutomi@nih.go.jp	189-000 2	東村山市青 葉町 4-2-1	042-391-8211 (042-394-9092)	H8	筑波大学大学院 昭和61年 医博

谷口 初美	産業医科大学微生物学教室 教授 hatsumi@med.uoeh-u.ac.jp	807-855 5	北九州市八 幡西区 医生丘 1-1	093-691-7242 (093-602-4799)	H10	九州大学大学院 昭和49年 医博
岡田 全司	国立療養所近畿中央胸部疾患センター 臨床 研究センター長 okm@kch.hosp.go.jp	591-855 5	堺市長曾根 町 1180	072-251-2153 (072-251-6957)	H12	大阪大学大学院 昭和52年 医博
小出 幸夫	浜松医科大学微生物学教室 教授 koidelb@hama-med.ac.jp	431-319 2	浜松市半田 町 1-20-1	053-435-2334 (053-435-2335 )	H12	名古屋市立大学 昭和47年 医博
鈴木 定彦	北海道大学大学院獣医学研究科内 人獣共通 感染症リサーチセンター教授 suzuki@czc.hokudai.ac.jp	060-081 8	札幌市北区 北18条西9 丁目	011-706-5173 (011-706-5190)	H14	大阪大学大学院 昭和63年 医博
長谷 篤	大阪市立環境科学研究所微生物保健課 研究 副主幹 a-hase@city.osaka.lg.jp	543-002 6	大阪市天王 寺区 東 上町 8-34	06-6771-3148 (06-6772-0676 )	H14	甲南大昭和56年 医博
大原 直也	国立感染症研究所免疫部第4室長 oharan@nih.go.jp	162-864 0	東京都新宿 区戸山1- 23-1	03-5285-1187 (H12-13 )	H15	長崎大学平成2年 歯博
慶長 直人	国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究 部 部長 Keicho@ri.imcj.go.jp	162-865 5	東京都新宿 区戸山 1-21-1	03-3202-7181 (03-3207-1038 )	H15	東京大学昭和59 年 医博
竹田 潔	大阪大学医学部感染免疫講座 教授 ktakeda@ongene.med.osaka-u.ac.jp	565-087 1	大阪市山田 丘 2-2	06-6879-3980	H15	大阪大学大学院 平成4年 医博
向井 徹	国立感染症研究所ハンセン病研究センター 病 原 微生物部第1室 室長 tmukai@nih.go.jp	189-000 2	東村山市青 葉町 4-2-1	042-391-8211 (042-394-9092 )	H15	大阪大学昭和63 年 医博
田村 敏生	国立感染症研究所ハンセン病研究センター 病 原微生物部第4室長 toshikit@nih.go.jp	189-000 2	東村山市青 葉町 4-2-1	042-391-8211 (042-391-8807 )	H16	東京大学平成5年 医博
松本智 成	大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター部長 tom_matsumoto@sutv.zaq.ne.jp	583-858 8	大阪府羽曳 野市 は びきの 3-7-1	0729-57-2121	H18	大阪大学平成5年
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 sohkichi@med.osaka-cu.ac.jp	545-858 5	大阪市阿倍 野区 旭町	06-6645-3746 (06- 6645-3747)	H17	長崎大学平成4年 医博・歯博

			1-4-3			
杉田昌彦	京都大学ウイルス研究所がんウイルス研究部 門細胞制御学 教授 msugita@virus.kyoto-u.ac.jp	606-850 7	京都市左京区 聖護院川原町53	075-751-4028 (075-752-3232 )	H18	京都大学大学院 平成2年 医博
瀧井猛将	名古屋市立大学大学院薬学研究生体防衛機 能学 講師 ttakii@phar.nagoya-cu.ac.jp	467-860 3	名古屋市瑞穂区 田辺通 3-1	052-836-3421 (052-836-3419)	H18	名古屋市立大学 大学院平成4年 薬博

アカゲサル結核に対する BCG Tokyo[Ag85A]ワクチンの感染防御効果

主任 研究者 菅原 勇 (財)結核予防会結核研究所

研究要旨 アカゲサルに 50 万 CFU を BCG Tokyo[Ag85A]皮内接種しても、有意に結核菌感染予防効果が認められた。肺および脾内結核菌数も、BCG Tokyo 接種群では、陰性対照群より、有意に減少していた。BCG Tokyo[Ag85A]ワクチンは、BCG Tokyo よりも良い。

A. 研究目的

BCG Tokyo (Ag85A) がアカゲサルに対して、結核菌感染予防効果があるか否かを検証することを目的とする。

B. 研究方法

中国武漢大学実験動物センターで飼育されたアカゲサル(雄、8.5-9kg)を結核菌感染実験に使用した。前もって、old tuberculin を施行し、反応が陰性なアカゲサルを実験に供した。アカゲサル6頭を、2群に分けた。グループ1は、PBSを皮内に100マイクロ接種した。グループ2は、BOG Tokyo[Ag85A]を50万CFU皮内に接種した。8週後、サルをケタミンで麻酔した後、3,000CFUの結核菌H37Rvを気管内接種した。感染後1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、それぞれold tuberculin test, 結核血清診断、血沈、胸部X線写真を行い、また6ヶ月後にサルの解剖を行い、生存率を調べた。病理組織標本を作り、臓器内肉芽腫の有無を調べた。肺組織、脾組織を10小片取り、肺、脾内の結核菌を、4週間、1%小川培地で培養することにより求めた。

C. 研究結果

結核菌感染後2ヶ月を過ぎてからグループ1のアカゲサルは、死亡し始めた。死亡後すぐ感染個体を、deep freezer内に凍結保存した。結核血清診断の結果は、感染後1ヶ月で、グループ1、2とも陰性だったが、2ヶ月では、陽性で、グループ2のほうが、弱かった。グループ1で、old tuberculinの反応は強く出

たが、グループ2で弱かった。

グループ1で血沈は促進したが、グループ2で1時間値1-2ミリだった。

肺内の結核菌数は、グループ1で10の8乗のオーダーだったが、グループ2では、10の6乗のオーダーであり、統計的に有意差が認められた。脾内の結核菌数は、グループ2で、減少傾向が見られたが有意差は認められなかった。胸部X線写真は、感染後2ヶ月で、グループ1に小結節陰影が認められたが、グループ2では、肺炎像が見られるのみで、小結節陰影は、認められなかった。グループ1の肺、脾、肝に肉芽腫が見られ、中心性壊死が見られたが、ラングハンス巨細胞は、見られなかった。グループ2では、肉芽腫が見られたが、グループ1に比較して、数が少なかった。

D. 考察

アカゲサルを用いた BCG Tokyo[Ag85A]ワクチンの感染予防実験は、未だ無く、貴重な経験と考える。以前、カニクイサルを用いた結核菌予防実験を行い、有意に予防効果が見られたことを報告した。アカゲサルでも、同様な予防効果が得られたことは、特記に値する。

我々は、今後、機会があれば、多施設試験を行い、この組み替えワクチンの効果を、詳しく分析したい。

E. 結論

BCG Tokyo[Ag85A]ワクチンは、アカゲサル結核に対して、防御効果を示した。



F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugawara I, Yamada H, Mizuno S. BCG vaccination enhances resistance to *M. tuberculosis* infection in guinea pigs fed a low casein diet. *Tohoku J Exp Med*, 211: 259-268, 2007.
2. Ono N, Oshio S, Niwata Y, Yoshida S, Tsukue N, Sugawara I, Takano H, Takeda K. Prenatal exposure to diesel exhaust impairs mouse spermatogenesis. *Inhal Toxicol*, 19: 275-281, 2007.
3. Hoshino H, Sugawara I, Ohmori M, Wada M. Evaluation of accuracy of clinical diagnosis of TB by annual autopsy report. *Kekkaku*, 82: 165-171, 2007.
4. Li Y, Kawada T, Matsumoto A, Azuma A, Kudoh S, Takizawa H, Sugawara I. Airway inflammatory responses to oxidative stress induced by low-dose diesel exhaust particle exposure differ between mouse strains. *Exp Lung Res*, 33: 227-244,

2007.

5. Hibiya K, Kazumi Y, Sugawara I, Fujita J. Histological classification of systemic *Mycobacterium avium* complex infections in slaughtered domestic pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2007 (in press).
6. Sugawara I, Li Z, Sun L, Udagawa T, Taniyama T. Recombinant BCG Tokyo (Ag85A) protects cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) infected with H37Rv *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 87: 518-525, 2007.
7. Shi R, Zhang J, Otomo K, Zhang G, Sugawara I. Lack of correlation between embB mutation and ethambutol minimal inhibitory concentration in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China. *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 4515-4517, 2007.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

結核菌による感染マクロファージのネクロシス誘導とその制御機序に関する研究

分担研究者 光山 正雄（京都大学大学院医学研究科微生物感染症学）

研究要旨.

結核菌 *M. tuberculosis* 強毒株 H37Rv は、感染マクロファージにネクロシスを誘導する能力が高いが、ゲノム上の RD1 領域を欠損した株は病原性が弱く、ネクロシス誘導能も低いことが示されている (*Hsu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 12420-12425, 2003*)。この結果は、結核菌感染マクロファージのネクロシス誘導には菌の病原性に関与する RD1 領域が重要であることを示している。そこで本研究では、H37Rv と RD1 領域欠損株のネクロシス誘導能を比較し、RD1 がどのような機序で細胞のネクロシス誘導に関与するのかを調べた。マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 細胞に結核菌 H37Rv を感染させたところ、LDH の遊離および PI 陽性に染色される細胞数が増加し、細胞がネクロシスに陥ることが示された。しかし、RD1 欠損変異株の感染ではネクロシスの誘導は認められず、感染マクロファージのネクロシス誘導に RD1 が関与することが確認された。さらに解析を進めた結果、H37Rv 感染細胞では RD1 に依存したミトコンドリア内膜傷害および細胞内 ATP 量の減少が観察され、これがネクロシスの原因であることが示された。また、H37Rv 感染初期にはカスパーゼ 9 の活性化が誘導され、このカスパーゼ 9 がネクロシスの抑制に関与することが示された。この結果から、病原性の強い結核菌は RD1 に依存したネクロシス誘導能を有するが、その一方で感染初期に菌の細胞内増殖を可能にするため、結核菌はカスパーゼ 9 に依存したネクロシス抑制機序を有することが示唆された。

A. 研究目的

結核菌は感染宿主体内では細胞内寄生性を示し、マクロファージに食食されてもその殺菌機構に抵抗して長期間生存することが可能である。また、結核菌感染宿主では、抗原特異的 T 細胞を中心とした強い防御免疫が誘導されるが、結核菌は防御免疫が発現しても宿主体内から容易に排除されずに生存し続けることができる。多剤耐性菌の増加や結核蔓延国からの人的流入などにより今後結核患者の増加が懸念される現状にあるなか、結核を撲滅するために菌の抵抗性メカニズムの早期解明が望まれている。その抵抗性メカニズムのひとつとして、結核菌が長期間にわたり体内で生存し続けるために宿主細胞であるマクロフ

ァージの細胞死を制御するメカニズムが重要であると考えられる。しかしその一方で、病原性の強い結核菌株は感染マクロファージにネクロシスを誘導する能力が高いことが示されている。結核菌が宿主細胞のネクロシスを誘導する意義や、そのメカニズムについては必ずしも明確ではないが、これは菌の病原性発現に関連する重要な機序であると考えられる。最近、結核菌の病原性に関与する RD1 遺伝子領域が菌のネクロシス誘導に重要であることが示された。そこで本研究では、RD1 によるネクロシス誘導メカニズムについて解析した。

## B. 研究方法

感染マクロファージの細胞死誘導 マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 に結核菌 H37Rv、H37Rv の RD1 欠損株および RD1 欠損株に RD1 領域を相補した RD1 相補株を MOI=10 で感染させた。細胞のネクローシスは、感染 24 時間後に上清中に遊離した lactate dehydrogenase (LDH) 量および感染細胞の propidium iodide (PI) 染色性を指標にして解析した。感染マクロファージのアポトーシスは、感染 24 時間後の oligonucleosome 量を ELISA で測定して調べた。また、感染後の細胞内生菌数は、感染 24 時間後に cell lysate を調製し、Middlebrook 7H10 培地に塗抹後 3 週間培養して得られたコロニー数より算出した。

ミトコンドリア内膜傷害 RAW264 細胞に結核菌を感染後、ミトコンドリアに局在性を示す 3, 3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DIOC<sub>6</sub>(3)) で染色し、経時的にその蛍光強度を測定してミトコンドリア内膜傷害の程度を調べた。また、結核菌感染後の細胞内活性酸素量は、活性酸素により酸化されると蛍光を発する dichlorodihydrofluorescein (DCFH<sub>2</sub>) の蛍光強度を指標にして解析した。

細胞内 ATP 量 結核菌を感染させた RAW264 細胞を 0.5% トリクロロ酢酸溶液で溶解し、cell lysate を調製した。cell lysate 中の ATP 量は、ENLITEN ATP assay system bioluminescence detection kit (Promega) で測定した。

各種カスパーゼ阻害剤のネクローシス誘導への影響 各種カスパーゼ阻害剤の存在下、RAW264 細胞に結核菌 H37Rv を感染させ (MOI=1)、経時的に感染細胞のネクローシスを PI 染色性により解析した。結核菌感染後のカスパーゼの活性は、各種カスパーゼ特異的な発光性基質の分解の結果得られる発光強度に基づいて調べ

た。

倫理面への配慮 本年度の研究は、すべてマウス腹腔マクロファージおよびマクロファージ細胞株を用いた実験である。マウスの使用に関しては、動物実験委員会の承認を得た上で、京都大学実験動物倫理指針に基づいて実施した。

## C. 研究結果

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 に結核菌 H37Rv を感染させたところ、LDH の遊離が認められた。しかし、結核菌の病原性関連遺伝子領域である RD1 欠損株の感染では、感染細胞からの LDH の遊離は認められなかった。また、RD1 相補株の感染では H37Rv 感染の場合と同様に感染細胞から LDH の遊離が観察された。これら 3 菌株の感染では、感染後の細胞内生菌数に有意な違いが認められず、細胞内 oligonucleosome 量の増加も観察されなかった。これらの結果から、結核菌感染後の LDH の遊離はアポトーシスではなく、ネクローシスによることが明らかとなった。またこの結果は、結核菌感染後の RAW264 細胞に誘導されるネクローシスに RD1 が重要な役割を果たすことを示すものである。さらに、H37Rv および RD1 相補株の感染では、感染 2 時間後よりミトコンドリア内膜傷害を示す DIOC<sub>6</sub>(3) の蛍光強度の低下が認められ、その程度は時間経過とともに増大することが示された。一方、このようなミトコンドリア傷害は RD1 欠損株の感染では認められなかった。さらに、H37Rv および RD1 相補株の感染では、感染 6 時間後には細胞内 ATP 量の減少が観察された。しかし、RD1 欠損株感染では ATP 量の減少は認められなかった。これらの結果から、RD1 領域の遺伝子産物がミトコンドリア膜傷害に関与し、その結果細胞内 ATP 量が減少することが示された。

上述の感染実験では、MOI (MOI=10) で H37Rv

を感染させることで菌のネクロシス誘導能について解析を行った。しかし、低い MOI (MOI=1) で結核菌を感染させた場合には、激しいネクロシス様の細胞形態の変化は認められなかったことから、結核菌のネクロシス誘導能が細胞内菌数に依存して発揮されることを示された。一方、結核菌を MOI=1 で感染させる系に広域カスパーゼ阻害剤  $\alpha$ -VAD-fmk を加えると感染細胞にネクロシスが誘導されることが示された。このことから、結核菌は感染初期にカスパーゼを介してネクロシスを抑制する機序を有することが示唆された。各種特異的カスパーゼ阻害剤を用いて同様の実験を行った結果、カスパーゼ 9 がネクロシスの抑制に関与することが明らかとなった。また、カスパーゼ 9 の活性化は H37Rv 感染早期より誘導されることが確認された。一方、弱毒株である H37Ra 感染ではカスパーゼ 3 やカスパーゼ 8 の活性化は強く誘導されるが、カスパーゼ 9 の活性化は誘導されないことが明らかとなった。

#### D. 考察

病原性の強い結核菌は、感染したマクロファージにネクロシスを誘導する高い能力がある。その機序として、これまでに細胞内 ATP 量の減少がネクロシスの原因となることが報告されていることから (Koterski et al. *Infect. Immun.* 73: 504-513, 2005)、結核菌感染の場合も感染した菌がミトコンドリア内膜傷害を引き起こし、細胞の ATP 合成能を低下させたことが、ネクロシスの原因であると考えられた。このネクロシス誘導機序には RD1 領域の遺伝子産物が関与する。RD1 領域には分泌装置 (ESX-1) を構成するタンパク質と分泌因子 (ESAT-6 および CFP-10) がコードされている。また最近、ESAT-6 と CFP-10 以外にもこの分泌装置により分泌される成分が存在することが示されている (Xu et al. *Mol.*

*Microbiol.* 66: 787-800, 2007)。これまでの報告で、結核菌と同様にマクロファージのファゴソーム内で生存可能な *Salmonella Typhimurium* は、III 型分泌装置を使ってエフェクター分子 (sopB) を細胞質内に分泌しマクロファージ殺菌機構を回避することが明らかにされている (Kuijl et al. *Nature* 450: 725-730, 2007)。今のところ RD1 によるネクロシス誘導の機序は明らかではないが、結核菌もそれ自身の分泌機構を介してマクロファージ機能を制御する可能性が考えられる。この観点から、ESX-1 を介して分泌される因子が実際に細胞質内に分泌され、ネクロシス誘導あるいはミトコンドリア傷害に関与するか否かを明らかにすることは、マクロファージと菌の相互作用を明らかにするための重要な基本情報となるものと考えている。

また本研究では、カスパーゼ 9 の活性化が H37Rv 感染で誘導され、ネクロシスの誘導を阻害することが示された。これに対して弱毒株である H37Ra 感染ではカスパーゼ 9 の活性化は誘導されないが、カスパーゼ 8 やカスパーゼ 3 の活性化が強く誘導され、細胞はアポトーシスに陥る。この菌の病原性に関係したカスパーゼ 9 の活性化の誘導が、どのような機序によるのかを明らかにすることも今後取り組んでいかなければならない重要な課題である。

#### E. 結論

病原性の強い結核菌はマクロファージのネクロシスを誘導する能力が高く、それには RD1 領域が重要な役割を果たしている。しかし、感染初期に結核菌はカスパーゼ 9 の活性化を誘導してネクロシスを抑制し、細胞内増殖を可能にする。一方、一旦菌が細胞内で増殖した後は細胞にネクロシスを誘導することで菌は細胞外に拡散し、感染を拡大するものと考えられる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kaku, T., I. Kawamura, R. Uchiyama, T. Kurenuma and M. Mitsuyama. RD1 region in mycobacterial genome is involved in the induction of necrosis in infected RAW264 cells via mitochondrial membrane damage and ATP depletion. *FEMS Microbiol. Lett.*, 274 : 189-195, 2007.
- 2) Uchiyama, R., I. Kawamura, T. Fujimura, M. Kawanishi, K. Tsuchiya, T. Tominaga, T. Kaku, Y. Fukasawa, S. Sakai, T. Nomura and M. Mitsuyama. Involvement of caspase-9 in the inhibition of necrosis of RAW 264 cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, 75: 2894-2902, 2007.

### 2. 学会発表

- 1) 結核菌感染マクロファージのネクロシス誘導における病原遺伝子領域 RD1 の関与とその誘導機序について 暮沼武志、内山良介、河村伊久雄、光山正雄 第 18 回日本生体防御学会 2007 年 7 月 福岡

- 2) Involvement of caspase-9 in the inhibition of necrosis of peritoneal macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Uchiyama, R., I. Kawamura, K. Tsuchiya, T. Tominaga, S. Sakai, T. Nomura, and M. Mitsuyama. 第 37 回日本免疫学会総会 2007 年 11 月 東京
- 3) 結核菌の RD1 領域はミトコンドリア傷害と ATP 枯渇により感染マクロファージのネクロシス誘導に関与する Kurenuma, T., R. Uchiyama, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. 第 37 回日本免疫学会総会 2007 年 11 月 東京

## 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    | 特になし |

らい菌による神経病変の病理病態学的解析

分担研究者 後藤 正道 鹿児島大学准教授

研究要旨：ヒト難治性皮膚疾患であるブルーリ潰瘍(*Mycobacterium ulcerans* 感染症)はハンセン病と同様に痛みがないが、このことが診断と治療を遅らせると原因となっている。局所の末梢神経が変性することによって無痛性になることを動物実験で明らかにしてきたが、今回はガーナの皮膚検体について電顕を含めた検索を行い、動物同様にシュワン細胞の空胞変性を含む神経病変がヒトにも起きることを明らかにした。

A. 研究目的

抗酸菌 *Mycobacterium ulcerans* による神経障害：

ブルーリ潰瘍(Buruli ulcer)は *Mycobacterium ulcerans* 感染によって引き起こされる、熱帯、亜熱帯地域のヒト難治性皮膚疾患であり、わが国でも4例の報告がある。ブルーリ潰瘍では大きく深い無痛性の皮膚潰瘍が形成されるが、マウスでは *M. ulcerans* が末梢神経に侵入すること、一定の時期には知覚低下がおこることを明らかにした(Goto M *et al. Am J Pathol* 2006)。一方、*M. ulcerans* は毒性脂質 Mycolactone を産生するが、マウスへの Mycolactone の単独投与によっても知覚障害と末梢神経病変が起きることを、経時的検討によって明らかにした (En J *et al. Infect Immun in press*)。

今年度は、ガーナからの臨床皮膚検体について光顕・電顕的に観察を行うことによって、動物実験に類似した末梢神経の変性と線維化が起きているかどうかを検討した。

B. 研究方法

ガーナにおいて臨床診断の確定しているブルーリ潰瘍7症例（結節期2例、潰瘍期3例、浮腫期2例）について、化学療法開始直前と、WHOのガイドラインに沿って6週間の streptomycin (15mg/kg) + rifampicin (10mg/kg) の治療を行った後の皮膚について、生検を行い、ホルマリン固定・パラフィン切片と、グルタルアルデヒド固定・エポソ包埋1ミクロン切片の検索を行った。この研究の当初の目的は、治療によって菌が変性してマクロファージに取り込まれるかどうかを明らかにすることであった。

C. 研究結果

皮膚における炎症と抗酸菌の動態：

治療開始前は大部分の検体において広範な壊死と軽度の好中球浸潤が認められたが、6週間の治療後には、線維化とリンパ球浸潤あるいは類上皮細胞肉芽腫の形成が見られた。抗酸菌は浮腫期の1例の治療前の一部のみに細胞外に陽性で、抗BCG抗体免疫組織化学も陽性であったが、治療後は陰性となった。1ミクロン切片と電顕では、菌は治療前も治療後も認められなかった。

皮膚における末梢神経の検索：

皮内の神経を注意深く観察すると、治療前と治療後のいずれの検体においても、末梢神経の変性と空胞変性が認められた。これらの病変は、我々が *Mycobacterium ulcerans* 接種したマウスに観察した変化と類似していた。

D. 考察

ブルーリ潰瘍においては、骨に達する大きな皮膚潰瘍が形成されるにもかかわらず、局所に痛みがないために、診断や治療が遅れ留事が多く、重篤な後遺症を残しやすい。ハンセン病に見られる足底潰瘍は、*M. leprae* の神経親和性によって引き起こされる神経障害が原因であるが、ブルーリ潰瘍の無痛性の機序は全く不明であった。我々は *M. ulcerans* 接種マウスで菌の神経内侵入と神経の変性、さらに知覚低下を初めて報告し(Goto M *et al. Am J Pathol* 2006; 168: 805-811)。さらに、マ Mycolactone の単独投与によっても知覚障害と末梢神経病変がおこることを見出した (En J *et al. Infect Immun in press*)。

最近になってヒトのブルーリ潰瘍の組織学的検索で神経炎の存在が見い出されているが (Rondini S *et al. J Pathol* 2006; 208: 119-128)、神

経の空胞変性についての報告はなかった。今回の我々の研究では、細胞内に貪食された抗酸菌を同定することは出来なかったが、マウスに見られたのと同様の神経の空胞変性を明らかにすることができた。これらの研究成果は、ブルーリ潰瘍の病態を明らかにし、診断やよりよい治療につながるものと考えられる。

#### E. 結論

ブルーリ潰瘍の治療前後の皮膚について詳細に組織学的な検索を行い、末梢神経に変性が起こることと、治療によってリンパ球浸潤や肉芽腫が形成されることを明らかにした。

#### G. 研究発表

##### 1. 著書

- 1) 後藤正道：新臨床内科学 第9版（分担執筆）「ハンセン病」（高久史磨ら編集）、医学書院、東京(2008) 印刷中

##### 2. 論文発表

- 1) Thida Aung, Shinichi Kitajima, Mitsuharu Nomoto, Junichiro En, Suguru Yonezawa, Isao Arikawa, Masamichi Goto: Mycobacterium leprae in Neurons of the Medulla Oblongata and Spinal Cord in Leprosy. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 284-294 (2007)
- 2) Nakanaga K, Ishii N, Suzuki K, Tanigawa K, Goto M, Okabe T, Imada H, Kodama A, Iwamoto T, Takahashi H, Saito H: Mycobacterium ulcerans subsp. shinshuense" isolated from a skin ulcer lesion: identification based on 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* 45: 3840-3843 (2007)
- 3) Junichiro En, Masamichi Goto, Kazue Nakanaga, Michiyo Higashi, Norihisa Ishii, Hajime Saito, Suguru Yonezawa, Hirofumi Hamada, Pamela L. C. Small: Mycolactone is responsible for the painlessness of Mycobacterium ulcerans infection (Buruli ulcer) a murine study. *Infect Immun (in press)*

##### 3. 学会発表

- 1) Masamichi Goto, Junichiro En, Kazue Nakanaga, Norihisa Ishii, Suguru Yonezawa, Hajime Saito, Pamela Small: Nerve damage induced by mycolactone in mouse model of Buruli ulcer. Annual Meeting of the WHO

Global Buruli ulcer Initiative, April 2-4, 2007, Geneva, Switzerland

- 2) Masamichi Goto, Thida Aung, Kyaw Kyaw, Suguru Yonezawa: Does normally looking skin of pure neuritic leprosy reflect carrier status of Mycobacterium leprae? - A combined histopathological and PCR study. 42nd U.S.-Japan Tuberculosis and leprosy conference, Zhengzhou, China, 2007.9.11-14
- 3) 圓 純一郎、Pamela Small、中永和枝、石井則久、斎藤 肇、有川 勲、浜田博文、後藤正道：Mycobacterium ulceransによる神経障害-Mycolactoneの役割について-。第80回日本ハンセン病学会、2007.5.18-19、横浜市
- 4) Thida Aung, Kyaw Kyaw, Shinichi Kitajima, Masamichi Goto: Does Normal Looking Skin of Pure Neuritic Leprosy Reflect Carrier Status of Mycobacterium Leprae?- a Combined Histopathological and PCR Study-Part (1) 第80回日本ハンセン病学会、2007.5.18-19、横浜市
- 5) 中永和枝、鈴木幸一、谷川和也、石井則久、岡部 勉、今田英明、児玉朱実、岩本朋忠、後藤正道、長野 誠、斎藤 肇：M. shinshuenseとM. lepraeの分子生物学的検討。第80回日本ハンセン病学会、2007.5.18-19、横浜市
- 6) 後藤正道、Thida Aung、圓 純一郎、米澤傑：中枢神経内へのらい菌の感染-免疫組織化学とPCRによる証明。第48回日本神経病理学会総会、2007.5.30-6.1、東京
- 7) 中永和枝、斎藤肇、岩本朋忠、後藤正道、児玉朱実、飯沼由嗣、石井則久：肘関節部にみられたMycobacterium shinshuense皮膚潰瘍の一症例：主として病巣部の菌の遺伝子検査について。第82回日本結核病学会総会、2007.6.5-6、大阪市
- 8) Junichiro En, Stephen Sarfo, Richard O. Phillips, Mark Wansbrough-Jones, Masamichi Goto: Pathological findings of Buruli ulcer lesions during antibiotic treatment. Annual Meeting of the WHO Global Buruli ulcer Initiative, March 31-April 2, 2008, Geneva, Switzerland

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (特になし)

## 抗酸菌感染の国際的対応への貢献を目指した基盤に関する研究

（分担）研究者 吉開泰信 九州大学生体防御医学研究所

### 【要約】

IL-15 はエフェクターCD8T 細胞のアポトーシスを抑制することによってメモリーCD8+T 細胞の産生を促進するとともに、homeostatic proliferation を誘導することによって、メモリーCD8+T 細胞増殖維持因子として働く。BCG ワクチンは、成人の慢性結核症の防御に対しては不完全であり、それゆえ、BCG の代わる結核ワクチンの開発が早急に必要とされている。我々は結核菌由来の防御抗原である Ag85B とメモリーCD8T 細胞の増殖維持因子である IL-15 の融合蛋白質を分泌するレコンビナント(r)BCG ワクチンを作成して、IL-15/Ag85B 融合蛋白質産生 rBCG ワクチンの結核感染に対する防御効果をマウスで検討した。IL-15/Ag85B 融合蛋白質産生 rBCG ワクチンはマイコバクテリア抗原特異的メモリーCD8+T 細胞のみならず抗原特異的メモリーCD4+T 細胞数を有意に増加させ、その結果、強い結核防御を誘導することが明らかとなった。

### A. 研究目的

結核感染防御機構において Th1 型 CD4+T 細胞がマクロファージ活性化や肉芽腫形成を介して主要な役割を担う。一方、キラー型 CD8+T 細胞も結核感染防御の一翼を担うことが明らかになりつつある。特に成人慢性結核症での潜伏感染の再燃の防御に重要であることが報告されている。BCG ワクチンは、成人の慢性結核症の防御に対しては不完全であり、それゆえ、BCG の代わる結核ワクチンの開発が早急に必要とされている。Interleukin (IL)-15 は、NK、NKT、腸管上皮型 $\gamma\delta$ 型 T 細胞だけでなくメモリータイプ CD8T 細胞の分化増殖因子として知られている。我々は結核菌由来の防御抗原である Ag85B とメモリー CD8+T 細胞の増殖維持因子である IL-15 の融

合蛋白質を分泌するレコンビナント(r)BCG ワクチンを作成して、その結核感染に対する防御効果をマウスで検討した。

### B 研究方法

IL-15/Ag85B 融合蛋白質産生 rBCG は *E. coli*-mycobacteria shuttle vector pNN2 に Ag85 遺伝子とマウス IL-15 cDNA を組み込んだプラスミドを BCG (東京株) にエレクトロポレーションで導入してカナマイシンで選択して得た。コントロールとしてプラスミドのみを導入した BCG (東京株) および Ag85 遺伝子のみを組み込んだプラスミドを導入した Ag85B-BCG (東京株) を用いた。

超音波破碎菌体と培養上清中の IL-15/Ag85B 融合蛋白質の発現を抗 IL-15 抗体と抗 Ag85 抗体と SDS-PAGE で調べた。



6-8週齢の C57BL/6 マウスの腹腔に  $5 \times 10^6$  CFU の rBCG-Ag85B-IL15, rBCG-Ag85B または BCG-plasmid-vector rBCG を投与して、90日目に isoniazid (0.1g/L) を飲水として 4週間投与した後、 $2 \times 10^5$  *M. tuberculosis* H37Rv を気道内に感染させた。rBCG 投与後および *M. tuberculosis* H37Rv 感染後、経時的に腹腔内、肺、肝臓の菌数を Middlebrook 7H10 agar でカウントした。肺を EDTA とコラゲナーゼ処理してリンパ球を集めた。経時的にマイコバクテリア抗原 (TB-2, MPT-64, Ag85B, および PPD) 特異的 T 細胞を サイトカイン FACS で調べた。病理組織組織は、緩衝 10%ホルマリンで保存し、パラフィン封埋・切断後、ヘマトキシリン・エオジン染色した。

### C 研究結果

#### rBCG の IL-15/Ag85B 融合蛋白質の発現

rBCG-Ag85B-IL15, rBCG-Ag85B または BCG-plasmid-vector rBCG の超音波破碎菌体と培養上清中の IL-15/Ag85B 融合蛋白質の発現を抗 IL-15 抗体と抗 Ag85 抗体と SDS-PAGE で調べたところ、rBCG-Ag85B-IL15 の菌体と培養上清に抗 IL-15 抗体と抗 Ag85B 抗体に反応する 40kD の蛋白質が検出できた。一方、rBCG-Ag85B では抗 Ag85B 抗体に反応する 30kD の蛋白質が検出された。

#### rBCG-Ag85B-IL15, rBCG-Ag85B の菌増殖パターン

Middlebrook 7H9 培地での rBCG-Ag85B-IL15, rBCG-Ag85B の増殖速度に差は認められなかった。一方、マウスの腹腔内に投与して 21日目の肺と腹腔内菌数は、rBCG-Ag85B-IL15 で有意に低下していた。脾臓の菌数でも投与 42日目と 70日目で rBCG-Ag85B-IL15 が有意に低下していた。

#### rBCG-Ag85B-IL15, rBCG-Ag85B 投与マウスでの T 細胞の動態

マウスの腹腔に  $5 \times 10^6$  CFU の rBCG-Ag85B-IL15, rBCG-Ag85B または BCG-plasmid-vector rBCG を投与して、肺、腹腔内、脾臓での CD44+CD8+T 細胞数の変化を FACS を調べたところ、rBCG-Ag85B-IL15 投与 21日目で肺と腹腔で、70日目で脾臓で有意に CD44+CD8+T 細胞数が増加していた。CD44+CD8+T 細胞数も rBCG-Ag85B-IL15 群で rBCG-Ag85B 群、BCG-plasmid-vector 群に比べて有意に多かった。

#### rBCG-Ag85B-IL15, rBCG-Ag85B 投与マウスでの抗原特異的 IFN- $\gamma$ 産生 T 細胞の動態

マウスの腹腔に  $5 \times 10^6$  CFU の rBCG-Ag85B-IL15, rBCG-Ag85B を投与して、肺、腹腔内、脾臓での抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生 T 細胞数の変化をサイトカイン FACS を調べたところ、PPD 特異的 IFN- $\gamma$  産生 CD8<sup>+</sup>T 細胞、PPD 特異的 IFN- $\gamma$  産生 CD4<sup>+</sup>T 細胞、H2-M3 拘束性 TB2 ペプチド特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞、MHC クラス I a 拘束性 MPT64<sub>190-198</sub> CD8<sup>+</sup>T 細胞、および peptide 25 特異的 IFN- $\gamma$  産生 CD4<sup>+</sup>T 細胞数は rBCG-Ag85B-IL15 投与後 21日目で肺と腹腔で、70日目で脾臓、肺において rBCG-Ag85B 投与群に比べて有意に増加していた。

#### rBCG ワクチンの結核菌感染に対する防御効果

rBCG による免疫によって長期間、結核菌に対し感染防御免疫を誘導することができるかどうか評価するために、rBCG-Ag85B-IL15, rBCG-Ag85B または BCG-plasmid-vector rBCG を投与して、90日目に isoniazid (0.1g/L) を飲水として 4週間投与した後、rBCG 投与 127日目に  $2 \times 10^5$  *M. tuberculosis* H37Rv を気道内に感染させた。感染 28日目の肺と脾臓で

の PPD 特異的 IFN- $\gamma$  産生 CD4<sup>+</sup>T 細胞, H2-M3 拘束性 TB2 ペプチド特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞, MHC クラス Ia 拘束性 MPT64<sub>190-198</sub> CD8<sup>+</sup>T 細胞、および peptide 25 特異的 IFN- $\gamma$  産生 CD4<sup>+</sup>T 細胞数は rBCG-Ag85B-IL15 投与群で rBCG-Ag85B 投与群に比べて有意に増加していた。

*M. tuberculosis* H37Rv 感染 10 週目のマウスの肺での臓器内菌数は rBCG-Ag85B-IL15 投与群で rBCG-Ag85B 投与群に比べて有意に低下していた。*M. tuberculosis* H37Rv 気道内感染後の肺病理組織では rBCG-Ag85B-IL15 投与群で rBCG-Ag85B 投与群に比べて、肉芽腫形成が局在しており、肺胞壁の構造は相対的に破壊が避けられていた。

#### D 考察

結核菌などの細胞内寄生性細菌に対する感染防御機構では、 $\gamma$  インターフェロン ( $\gamma$  IFN) 産生の CD4 Th1 細胞に加えて、一方、CD8 キラー T 細胞は慢性感染症の肺における菌の排除に重要であることが報告されている<sup>1)</sup>。抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞は結核のワクチンデザインにおいて重要な対象となる。IL-15 は活性化マクロファージ、樹状細胞や上皮系細胞から産生され、そのレセプターは IL-15R $\alpha$  と IL-2R $\beta/\gamma c$  であり、その生物活性は IL-2 と類似している。IL-15 遺伝子ノックアウトマウスでは NK 細胞、NKT 細胞や  $\gamma\delta$  型腸管上皮間リンパ球の分化が阻害されていることに加えて、メモリー型 CD8 T 細胞の減少が認められた<sup>2)</sup>。我々は、既に IL-15 KO マウスを用いた BCG 感染実験から IL-15 は BCG 感染後エフェクターメモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞の非リンパ組織での維持に重要であり、長く持続する抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞を誘導し、

結核菌の気道内感染から防御することを明らかにしている<sup>3)</sup>。マウスの結核菌感染モデルにおいて、IL-2, IL-18 または IFN- $\gamma$  産生 rBCG を利用したワクチンに関するいくつかの研究がある<sup>(4-7)</sup>。これらの rBCG は Th1 応答の増強は認めるものの、実際に結核菌に対する防御できるか実証されていない。

今回の研究において、rBCG-Ag85B-IL15 は H2-M3 拘束性 TB2 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞および MHC クラス Ia 拘束性 MPT64<sub>190-198</sub> 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞ともに産生を増強させた。これは IL-15 が CD8<sup>+</sup>T 細胞に直接働いてエフェクタータイプ CD8<sup>+</sup>T 細胞のアポトーシスを抑制し、メモリータイプ CD8<sup>+</sup>T 細胞の増殖を誘導すると考えられる。一方、rBCG-Ag85B-IL15 は PPD 特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞、peptide 25 特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞数を増加させることがわかった。最近、IL-15 はメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖にも関与しているという報告がある。また IL-15 は樹状細胞を活性化する可能性もあり、抗原提示能力が増強したためとも考えられる。

#### E. 参考文献

1. Kaufmann SH. Tuberculosis: back on the immunologists' agenda. **Immunity** 2006; 24: 351-357
2. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. **J Exp Med** 2000; 191:771-80
3. Saito, K, Yajima T, Kumabe S, Doi T, Nishimura H, Sad S, Shen H and Yoshikai Y. 2006 Impaired protection against *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin infection in IL-15

- deficient mice *J.Immunol* 176: 2496-2504
4. Young SL, O'Donnell MA, Lockhart E, et al. Manipulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* by vaccination with IL-2- and IL-18-secreting recombinant bacillus Calmette Guérin. *Immunol Cell Biol* 2002; 80: 209-15.
  5. Yamada H, Matsumoto S, Matsumoto T, Yamada T, Yamashita U. Murine IL-2 secreting recombinant Bacillus Calmette-Guérin augments macrophage-mediated cytotoxicity against murine bladder cancer MBT-2. *J Urol* 2000; 164: 526-31.
  6. Moreira AL, Tsenova L, Murray PJ, Freeman S, Bergtold A, Chiriboga L, Kaplan G. Aerosol infection of mice with recombinant BCG secreting murine IFN-gamma partially reconstitutes local protective immunity. *Microb Pathog* 2000; 29: 175-85.
  7. Young SL, O'Donnell MA, Buchan G. IL-2-secreting recombinant bacillus Calmette Guérin can overcome a Type 2 immune response and corticosteroid-induced immunosuppression to elicit a Type 1 immune response. *Int Immunol* 2002; 14: 793-800.
- F. 結論
- IL-15/Ag85B 融合蛋白質産生 rBCG ワクチンはマイコバクテリア抗原特異的メモリーCD8+T 細胞のみならず抗原特異的メモリーCD4+T 細胞数を有意に増加させ、その結果、強い結核防御を誘導することが明らかとなった。
- G 研究発表
1. Doi T, Yamada H., Yajima T., Wajjwalku W., Hara H., and Yoshikai Y. Peptide-pulsed dendritic cells for MHC class Ib-restricted CD8+T cells confer protection against *Mycobacterium tuberculosis* *J.Immunol* 178:3806-13 2007
  2. Li W., Yamada H., Yajima T., Nakagawa R., Shimoda K., Nakayama K., and Yoshikai Y., Tyk2 signaling is important for contraction of antigen-specific CD8<sup>+</sup>T Cells following a microbial infection *J.Immunol.* 178:4482-4488. 2007
  3. Tang C., Yamada H., Shibata K., Maeda N., Yoshida S., Wajjwalku W., Ohara N., Yamada, T. and Yoshikai Y. Efficacy of recombinant BCG vaccine secreting IL-15/Ag85B fusion protein on protection against *Mycobacterium tuberculosis* *J.Infectious Dis* in press 2008

厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業）  
分担研究報告書

ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG による T 細胞の活性化の検討

分担研究者 牧野 正彦（国立感染症研究所・病原微生物部・部長）

研究要旨.

ハンセン病の起因菌であるらい菌は、免疫系細胞群においてはマクロファージに強い親和性を有し、細胞内に寄生性感染し長く生体内に宿る。マクロファージ内に感染したららい菌を殺戮するためには、インターフェロンガンマー (IFN- $\gamma$ ) が必須な役割を果たし、IFN- $\gamma$  は主に CD4 陽性 T 細胞から産生される。したがって、らい菌が感染した直後にらい菌を生体外へ排除するためには、予防的ワクチンの投与により予め作製されたメモリー T 細胞が、効率良く再活性化される必要性が高い。そこで、予防的ワクチンとして改良型リコンビナント BCG (BCG- $\Delta$ UT) を作製し、マクロファージおよび樹状細胞を介した T 細胞活性化能を検討した。リコンビナント M-CSF を用いて作製したマクロファージ (M-M0) に BCG- $\Delta$ UT を感染させると CD4 陽性 T 細胞の活性化が誘導され、その程度は親 BCG である BCG Tokyo 株 (BCG-Tokyo) よりも強かった。しかし、BCG- $\Delta$ UT による CD4 陽性 T 細胞の活性化は、比較的弱く期待された程ではなかった。そこで、BCG- $\Delta$ UT 感染マクロファージにより T 細胞をより強く活性化するための補助因子の同定を試みた。GM-CSF はマクロファージからの IL-10 の産生を抑制することが知られるため、M-M0 を予め GM-CSF で処理すると BCG- $\Delta$ UT 感染 M-M0 の CD4 陽性 T 細胞活性化能は有意に増強された。さらに、BCG- $\Delta$ UT が M-M0 に感染すると、M-M0 表面の CD40 抗原の発現が増強したため、BCG- $\Delta$ UT 感染 M-M0 に CD40 リガンドを作用させたところ、M-M0 の抗原提示能は有意に増強した。また、外因性 IFN- $\gamma$  は M-M0 を活性化することが知られているため、BCG- $\Delta$ UT 感染マクロファージを IFN- $\gamma$  処理すると、CD4 陽性 T 細胞はより強く活性化された。CD40 リガンドおよび外因性 IFN- $\gamma$  のマクロファージ抗原提示能に及ぼす影響は、BCG-Tokyo 株に比し BCG- $\Delta$ UT を用いた場合、より強く観察された。また、BCG- $\Delta$ UT は樹状細胞を活性化し、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を活性化し、IFN- $\gamma$ ・GM-CSF を産生し、CD40 リガンドを CD4 陽性 T 細胞に発現させた。したがって、BCG- $\Delta$ UT は強く T 細胞を活性化することが可能であり、T 細胞活性化因子として従来の BCG に比し、より有効に作用する可能性があると思定された。

A. 研究目的

らい菌は他の抗酸菌に比し抗原性が弱く、初回感染時 CD4 陽性 T 細胞を十分に活性化することができない。しかし、らい菌を生体外へ排除する抗らい菌生体防御反応において、中心的な役割を果たす因子は CD4 陽性 T 細胞から産生される IFN- $\gamma$  であると思定されている。したがって、らい菌感染時メモリー T 細胞が有効に作用し、より速くらい菌を殺戮できる環境を作ることが、ハンセン病の予防に有効と考えられる。メモリー T 細胞は、らい菌抗原と反応する抗原性分子を予め投与することで作製され、メモリー T 細胞の産生を目的として BCG がワクチンとして特定の地域で用いられてきた。2006 年 Setia 等は、これまでの BCG のワクチンとしての効果に関する論文を網羅的に集積し解析した (meta-analysis) 結果、BCG のハ

ンセン病に対するワクチンとしての有効性は、26%にとどまると報告した。このことは、BCG に改良を加えるとより有効に作用するワクチンを作製し得ることを意味している。そこで、我々は BCG の改良を目的としたリコンビナント BCG を作製し、その有効性を測定することを目的とした。

BCG が十分その効果を発揮できない理由として種々考えられるが、最大の原因は BCG も抗酸菌であることから、マクロファージに対して非常に強い親和性を有し、マクロファージに感染すると細胞内でファゴゾームを形成しライソゾームとの融合を阻止することにある。ファゴゾーム-ライソゾーム融合が欠如すると、BCG 由来の主要抗原がマクロファージ表面に十分に発現されず、そのために CD4 陽性 T 細胞を十分に活性化し得ない。BCG のこの最大の欠点を凌駕するため、BCG より