

月 大阪.

- 6) ヒアルロン酸の抗酸菌増殖に対する作用. 平山幸雄、吉村満美子、仁木 誠、松本壮吉、尾関百合子、菅原 勇、青木俊明、和田 崇之、西内由紀子、小林和夫. 第 82 回日本結核病学会総会 2007 年 6 月 大阪.
- 7) BCG 感染時における Th1/Th2 バランス

への STAT6 の役割. 尾関百合子、松本壮吉、小林和夫. 第 82 回日本結核病学会総会 2007 年 6 月 大阪.

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19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）

新規 BCG ワクチンの開発

分担研究報告書

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）

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

新規 BCG ワクチンの開発

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.

病原性抗酸菌症に対する新しいワクチンの開発を BCG をベースとして行った。結核菌あるいはらい菌に対するワクチンとして *Mycobacterium bovis* BCG (BCG) が長年用いられてきたが、その有効性は結核およびハンセン病いずれにおいても極めて限局されており、より有効で信頼し得る新しいワクチンの開発が切望されている。ここでは、BCG に改良を加え新しいリコンビナント BCG を 2 種類作製し、その有効性を評価した。抗酸菌に対する生体防御反応は、CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の両者により司られており、ワクチンは両サブセット強く活性化し、メモリー T 細胞を作製する能力が強く求められる。第 1 のリコンビナント BCG は、BCG が有するウレアーゼを除去することで、抗原提示細胞内で BCG 感染ファゴゾームが効率的にライソゾームと結合し、その結果として MHC クラス II 経路を賦活し、CD4 陽性 T 細胞の活性化を促進させることを目的とした。樹状細胞を用い本 BCG を評価すると、作製したリコンビナント BCG (BCG- Δ UT) は樹状細胞を活性化し、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を活性化した。さらに、C57BL/6 マウス生体内で病原性抗酸菌由来タンパクと交叉反応するメモリー CD4 陽性 T 細胞を効率的に作製した。第 2 のリコンビナント BCG は、樹状細胞内で病原性抗酸菌の主要抗原による Cross-priming 効果を促進し、より有効に CD8 陽性 T 細胞を活性化することを目的として作製した。そのため、抗酸菌の主要抗原の一つ Major Membrane Protein (MMP)-II 遺伝子上流に抗酸菌由来の HSP70 遺伝子を繋げ BCG に導入した (BCG-70M の作製)。BCG-70M 感染により樹状細胞は活性化し、MHC class I・CD86・CD83 抗原の発現が増強され、CD8 陽性 T 細胞の活性化を賦活する IL-12p70 が産生された。さらに、BCG-70M 感染樹状細胞によりナイーブ CD8 陽性 T 細胞は強く活性化され、大量の IFN- γ を産生した。このナイーブ CD8 陽性 T 細胞の活性化は、BCG 感染樹状細胞表面に発現する MHC class I および CD86 抗原をマスクすることにより抑制されたことより、抗原特異的反応であることが示唆された。以上より、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞活性化は、BCG の改良により、強く誘導することが可能であることが示唆された。

A. 研究目的

結核菌およびハンセン病を予防するワクチンとして、*Mycobacterium bovis* BCG (BCG) が長い間地球規模で使われてきた。しかし、その有効性は極めて限られており、結核においては小児の粟粒結核および結核性髄膜炎の発症予防にのみ有効であって、成人および高齢者の肺結核には全く無効で

あると報告されている。ハンセン病においては、昨年これまでの全世界の研究レポートが網羅的にコンピューター解析され、全体としての有効性は 26% にすぎなかったと報告された。結核菌およびらい菌に対する生体防御反応は共通であって、抗酸菌感染初期には CD4 陽性 T 細胞、特にインターフェロンガンマー (IFN- γ) 産生性タイプ 1

CD4 陽性 T 細胞が働き、生体内における抗酸菌量を一定水準に保ち、抗酸菌を細胞内へ潜伏化させる。一方、感染後期すなわち潜伏化した抗酸菌が何らかの機序により再活性化した場合には、CD8 陽性 T 細胞が重要な役割を演じ、抗酸菌を生体外へ排除する役割を担う。

BCG は、牛型結核菌に由来する弱毒化生ワクチンであり、生体内においては抗原提示細胞に対し強い親和性を有する。しかし、抗原提示細胞内ではファゴゾームを形成しライソゾームとの結合を阻止することで、MHC クラス II 経路の活性化を抑制し、さらに Cross-priming 機構を通じて CD8 陽性 T 細胞の活性化を抑制する。したがって、CD4 陽性 T 細胞の活性化・CD8 陽性 T 細胞の活性化の両面において改良の余地を残す生ワクチンである。本研究班では、より効率良く CD4 陽性 T 細胞を活性化させる目的で、BCG の有するウレアーゼ遺伝子を除去したリコンビナント BCG (BCG- Δ UT) を作製した。ウレアーゼは、ファゴゾームの pH 環境を中性に保つ機能を有するため、Phagosome-Lysosome fusion (P-L fusion) が促進され、そのために MHC class II 経路の活性化が促進すると理論的に考えられる。一方、CD8 陽性 T 細胞の活性化には Cross-priming 機構の活性化が重要であり、HSP70 がシャペロン効果を発揮し、HSP70 存在下では Cross-priming 効果が促進されると期待される。そこで、病原性抗酸菌に共通して存在する主要抗原の一つである MMP-II 遺伝子に HSP70 遺伝子を結合させ、BCG に遺伝子導入した新しいリコンビナント BCG を作製した。BCG- Δ UT および BCG-70M の樹状細胞を介した T 細胞の活性化を評価することを目的とした。

B. 研究方法

BCG-Tokyo 株を親株として、ウレアーゼ欠損 BCG (BCG- Δ UT) 株を作製した。ウレアーゼ遺伝子の除去には、ファージシステムを用いた。らい菌由来 MMP-II 遺伝子に HSP-70 遺伝子を結合させ、BCG (Tokyo 株) に遺伝子導入しリコンビナント BCG

(BCG-70M) を作製した。正常健康人末梢血より、CD3 モノクローナル抗体付着ダイナビーズを用い T 細胞を除去した後、プラスチック付着性単球を得て樹状細胞のプレカーサーとして用いた。単球に対して、リコンビナント (r) GM-CSF 50ng/ml および rIL-4 (10ng/ml) を添加して 4 日間培養することで、未熟樹状細胞を分化誘導した。この未熟樹状細胞に対して、リコンビナント BCG または親 BCG あるいはベクターコントロール BCG を感染させ、GM-CSF および IL-4 存在下で、さらに 2 日間培養することで成熟樹状細胞を得た。BCG 感染樹状細胞の T 細胞活性化能は、BCG 感染樹状細胞をマイトマイシン C 処理した後、自己の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞と 4 日間混合培養し、T 細胞が産生する IFN- γ および IL-2 を ELISA 法で測定して評価した。T 細胞は、CD4 モノクローナル抗体あるいは CD8 モノクローナル抗体付着ダイナビーズを用いて精製し、ナイーブ T 細胞分画は、これら T 細胞から CD45RO 陽性 T 細胞を除去して得た。CD45RO 抗体は市販の抗体を用い、さらに抗マウス IgG 抗体ダイナビーズ抗体 (市販) を用いて精製した。IFN- γ および IL-2 の ELISA は、市販のキットを用いて測定した。樹状細胞から産生される各種サイトカインも市販のキットを用いて ELISA 法で測定した。BCG 感染樹状細胞における T 細胞活性化の抗原特異性は、樹状細胞を抗 MHC 抗原抗体および抗 CD86 抗体で処理することで T 細胞の活性化の減弱の有無で評価した。樹状細胞表面の抗原の発現程度は、FACSCalibur を用いて行った。抗体は市販の抗体を用いた。

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

ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG (BCG- Δ UT) の T 細胞活性化能を検討した。BCG- Δ UT を末梢単球由来樹状細胞に感染させると、細胞表面の HLA-ABC・HLA-DR・CD86 抗原の発現を増強し、さらに CD83 抗原を強陽性とした。これらの抗原の発現は、同量の BCG-Tokyo を感染させた樹状細胞に比し、有意に高い発現を誘導した。さらに、活性化樹状細胞から産生される IL-12p70 および IL-1 β の産生誘導を比較検討すると、BCG- Δ UT のサイトカイン産生誘導能は有意に強かった。そこで、BCG 感染樹状細胞を抗原提示細胞として用い、自己のメモリー CD4 陽性 T 細胞およびナイーブ CD4 陽性 T 細胞をレスポンドーとして混合培養すると、BCG- Δ UT は BCG-Tokyo に比し有意に強く T 細胞を活性化し、IFN- γ および IL-2 の産生を誘導した。ワクチンの最も重要な役割は、生体内において病原性抗酸菌に反応し得るメモリー T 細胞を産生することである。そこで、BCG- Δ UT および BCG-Tokyo 株 100 個を C57BL/6 マウスの尾部に皮内接種し、4 週間後の脾臓 T 細胞のリコール抗原あるいはらい菌由来の細胞膜タンパクに対する反応性を検討した。*In vitro* で抗原刺激 2 日後の T 細胞からの IFN- γ および IL-2 産生能を測定すると、BCG- Δ UT 接種マウス脾 T 細胞は BCG-Tokyo 株由来の細胞質に反応し IFN- γ を産生した。しかし、BCG-Tokyo 株接種マウスの反応性は極めて弱かった。さらに、脾臓 T 細胞の IFN- γ 産生細胞を特定するために細胞内サイトカイン染色を行うと IFN- γ は主に CD4 陽性 T 細胞から産生されていることが明らかになった。また、BCG 接種マウスの病原性抗酸菌に対する交叉反応性を検討するため、脾臓 T 細胞をらい菌由来抗原で刺激すると、BCG- Δ UT 接種マウスから得た T 細胞のみが本膜タンパクに反応し、大量の IFN- γ を産生した。

次いで、HSP70-MMP-II 融合遺伝子挿入リコンビナント BCG (BCG-70M) のナイーブ CD8

陽性 T 細胞活性化能を検討した。BCG- Δ UT 同様 BCG-70M は、親 BCG-Tokyo に比し有意に強く樹状細胞を活性化し、樹状細胞表面の HLA-ABC・HLA-DR・CD86・CD83 抗原の発現を増強させ、同時に IL-12p70 および TNF α の産生を誘導した。これらサイトカインは、タイプ 1 T 細胞の活性化に必須なサイトカインである。そこで、BCG-70M 感染樹状細胞を用い、自己のメモリー CD8 陽性 T 細胞およびナイーブ CD8 陽性 T 細胞を刺激した。メモリー CD8 陽性 T 細胞をレスポンドーとして用いた場合、BCG-70M も BCG-Tokyo も IFN- γ 産生を誘導したが、その程度は BCG-70M を用いた場合明らかに強かった。また、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞をレスポンドーとして用いると、BCG-70M を用いた場合のみ IFN- γ の産生が誘導され、この系において BCG-70M 感染樹状細胞表面の MHC class I 抗原あるいは CD86 抗原の発現を抗体を用いてマスクすると、ナイーブ T 細胞の IFN- γ 産生はほぼ 100% 抑制された。したがって、BCG-70M によるナイーブ CD8 陽性 T 細胞の活性化は抗原特異的に誘導されていることが判明した。

D. 考察

病原性抗酸菌が感染した際に生体外排除を誘導する機構として、免疫系が極めて重要な役割を果たすことは明らかである。近年 BCG の有効性が疑問視されるに至り、病原体の生体外排除と免疫系の関与をさえ疑う声もあるが、これらは明らかに間違いであり、T 細胞が生体防御機構に中心的役割を果たしていることは種々の実験結果から揺るがすことができない事実としてコンセンサスが得られている。さらに、T 細胞分画の中で CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞のどちらがより有効に作用するかといった議論も繰り返されているが、どちらも病原性抗酸菌の生体外排除には必須な役割を果たしており、両者の存在によって初めて有効な病原体コントロールが可能となる。とりわけ、CD4 陽性 T 細胞は感染初期に、一方 CD8 陽性 T 細胞は感染後期に主に働く。従来用いられてきた BCG の必要性は証明さ

れているものの、CD4 陽性 T 細胞を活性化
するワクチンと位置づけられている。しか
し、その程度は極めて弱く、特にマクロフ
ァージに感染した場合には、免疫学的不応
答性 T 細胞を産生する等、負の作用をも有
している。さらに、ナイーブ CD8 陽性 T 細
胞を全く活性化することができない大きな
欠点を有している。

そこで、本研究班では CD4 陽性 T 細胞も
CD8 陽性 T 細胞も活性化し得るリコンビナ
ント BCG の作製を目指した。CD4 陽性 T 細
胞の活性化においては、P-L fusion を促進
させ MHC class II 経路を活性化するため、
BCG のウレアーゼを除去した (BCG- Δ UT)。
BCG- Δ UT は、樹状細胞を介してナイーブ T
細胞を強く活性化したばかりか、病原性抗
酸菌に強く反応するメモリー T 細胞を産生
した。このことは、従来の BCG では観察さ
れていない現象であり極めて重要な知見と
考える。CD8 陽性 T 細胞の活性化誘導には、
HSP70 の有するシャペロン効果を期待し、
病原性抗酸菌共通抗原である MMP-II を用
い Cross-priming 効果の増強を図った。そ
の結果として、BCG-70M は極めて強いナイ
ーブ CD8 陽性 T 細胞の抗原特異的活性化を
誘導することが可能であった。CD8 陽性 T
細胞の Cross-priming には、細胞内シグナ
ル伝達系として種々の経路が知られている。
今後、これらの経路を明らかにするととも
にワクチン効果の判定を急ぐ必要性が高い
と考えられる。

E. 結論

病原性抗酸菌症に対するワクチン開発を
目的として、2 つのリコンビナント BCG を
作製した。ウレアーゼ欠損 BCG- Δ UT は、CD4
陽性 T 細胞の活性化・病原性抗酸菌反応性
メモリー CD4 陽性 T 細胞の産生に有効であ
り、MMP-II-HSP70 導入 BCG-70M はナイーブ
CD8 陽性 T 細胞の活性化を誘導した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 Infect.*,
9:70-77, 2007.

- 2) Maeda, Y., T. Mukai, M. Kai, Y.
Fukutomi, H. Nomaguchi, C. Abe, K.
Kobayashi, S. Kitada, R. Maekura, I.
Yano, N. Ishii, T. Mori, and M.
Makino. Evaluation of major membrane
protein-II as a tool for
serodiagnosis of leprosy. *FEMS
Microbiol. Lett.*, 272:202-205,
2007.
- 3) Kai, M., Y. Fujita, Y. Maeda, N.
Nakata, S. Izumi, I. Yano, and M.
Makino. Identification of trehalose
dimycolate (cord factor) in
Mycobacterium leprae. *FEBS Lett.*,
581:3345-3350, 2007.
- 4) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, N.
Nakata, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and
M. Makino. Characterization of the
fucosylation pathway in the
biosynthesis of glycopeptidolipids
from *Mycobacterium avium* complex. *J.
Bacteriol.*, 189:5515-5522, 2007.
- 5) Duthie, M. S., W. Goto, G. C. Ireton,
S. T. Reece, L. P. V. Cardoso, C. M.
T. Martelli, M. M. A. Stefani, M.
Nakatani, R. C. de Jesus, E. M. Netto,
M. V. F. Balagon, E. Tan, R. H. Gelber,
Y. Maeda, M. Makino, D. Hoft, and S.
G. Reed. Use of Protein Antigens for
early serological diagnosis of
leprosy. *Clin. Vaccine Immunol.*,
14:1400-1408, 2007.

2. 学会発表

- 1) Contribution of GM-CSF on the
enhancement of the T
cell-stimulating activity of
macrophages. Makino, M., Y. Maeda,
Y. Fukutomi, T. Mukai, and T. Mori.
US-Japan Cooperative Medical
Science Program. 42nd Tuberculosis

- and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.
- 2) Detection of *M. leprae* DNA in nasal swab samples by LAMP method. Mukai, T., S. Izumi, C. Rosita, I. Agusni, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42nd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.
 - 3) Clofazimine-induced cell death in human and mouse macrophages. Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42nd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.
 - 4) Clofazimine-induced cell death in macrophages. Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
 - 5) Application of new serological test for leprosy in Vietnam. Kai, M., N. P. N. Ha, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, Y. Maeda, T. Mukai, N. T. Tan, and M. Makino. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
 - 6) Lipopeptide (LipoK) of *Mycobacterium leprae* activated antigen presenting cells and type 1 T cells. Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, M. Kai, and M. Makino. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
 - 7) Inhibition of the multiplication of *Mycobacterium leprae* vaccination with a recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *M. leprae*. Makino, M., Y. Maeda, M. Matsuoka, and T. Tamura. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
 - 8) Utility of MMP-II for diagnosis of leprosy. Maeda, Y., M. Kai, Y. Fukutomi, and M. Makino. 17th International Leprosy Congress, Pre-workshop, New Diagnostics and Molecular Epidemiology, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
 - 9) Search for Mycobacterium leprae antigens for sero-diagnosis. Kai, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and M. Makino. 17th International Leprosy Congress, Pre-workshop, Future Research Needs, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
 - 10) ハンセン病におけるマクロファージのサイトカイン産生調節機構. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第80回日本細菌学会総会 2007年3月 大阪
 - 11) らい菌由来リポ蛋白の抗らい菌生体防御反応に及ぼす影響. 前田百美, 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. 第80回日本細菌学会総会 2007年3月 大阪.
 - 12) 抗酸菌糖脂質生合成における fucose 転移酵素遺伝子の解析. 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80回日本細菌学会総会 2007年3月 大阪.
 - 13) クロファジミンによるマクロファージの細胞死と caspase 活性化. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第80回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2007年5月 横浜.
 - 14) 変異検出におけるダイレクトシーケンスとクローン化シーケンスの相違. 甲斐雅規, 倉繁昌浩, 松原久美子, 中田 登, 牧野正彦. 第80回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2007年5月 横浜.
 - 15) LAMP 法によるらい菌遺伝子検出の応

- 用. 向井 徹, 和泉眞蔵, 宮本友司, Cita Rosita, Indropo Agusni, 松岡正典, 牧野正彦. 第 80 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2007 年 5 月 横浜.
- 16) 結核菌分泌蛋白による Th1 分化誘導機構の解析: TCR による抗原認識の役割. 下袴田陽子, 田村敏生, 牧野正彦, 高津聖志. 第 90 回日本細菌学会関東支部総会 2007 年 10 月 東京.
- 17) Mycobacterium avium complex における fucose 含有糖脂質抗原の生合成解析. 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 90 回日本細菌学会関東支部総会 2007 年 10 月 東京.
- 18) ヒトマクロファージにおける抗らい菌活性誘導. 福富康夫, 牧野正彦. 第 37 回日本免疫学会総会 2007 年 12 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 なし

平成19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）

新規ワクチン開発のための基礎研究

－長期生存型 CD8 記憶細胞の分化誘導機序の解析－

分担研究報告書

分担研究者

田村 敏生

（国立感染症研究所・病原微生物部室長）

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

新規ワクチン開発のための基礎研究
-長期生存型 CD8 記憶細胞の分化誘導機序の解析-

分担研究者 田村 敏生（国立感染症研究所・病原微生物部・室長）

研究要旨.

ワクチンの目的は主に獲得免疫を惹起し、最終的には長期生存型細胞障害性 CD8 記憶細胞を効果的に誘導することである。この長期生存型細胞障害性 CD8 記憶細胞の分化誘導はナイーブ CD8⁺ T 細胞が最初に抗原感作を受ける時点で決定され、その際に CD4⁺ T 細胞による 'Help' が必須であることが示されているが、その機序については未だ明らかではない。本研究では、我々が見出した Th1 型免疫応答を選択的に惹起するペプチド：Peptide-25（結核菌分泌タンパク Ag85B 由来）を用いて、長期生存型 CD8 記憶細胞誘導における CD4⁺ T 細胞の 'Help' 機能を明らかにすることで、新たな結核ワクチンの開発戦略を得ることを研究目的とした。

本年度は、（1）CD8⁺ T 細胞の活性化を誘導する CD4⁺ T 細胞と抗原提示細胞との相互作用に関して解析し、Th1 型活性化 CD4⁺ T 細胞と抗原提示細胞との相互作用によってのみ CD8⁺ T 細胞にグランザイム B の発現を伴う機能的活性化を誘導できることを見出した。また、（2）BCG 細胞壁画分に未感作 CD8⁺ T 細胞の活性化を誘導できる分子が含まれていることを明らかにした。

A. 研究目的

ワクチンの目的は主に獲得免疫を惹起し、結果として長期生存型細胞障害性 CD8 記憶細胞を効果的に誘導することである。

この長期生存型 CD8 記憶細胞はエフェクター細胞障害性 CD8 細胞からさらに分化すると考えられているが、この分化はナイーブ CD8⁺ T 細胞が最初に抗原提示細胞より抗原の情報を受け取る時点で決定される。この決定には CD4⁺ T 細胞の存在が不可欠であり、CD4⁺ T 細胞の 'Help' が存在しない場合には CD8 記憶細胞の分化が誘導されないことが報告されている。しかしながら、CD4⁺ T 細胞による 'Help' の機序に関しては未だ明らかではない。

本研究では、我々が見出した Th1 型免疫応答を選択的に惹起するペプチド：Peptide-25（結核菌分泌タンパク Ag85B 由

来）を用いて、長期生存型 CD8 記憶細胞誘導における CD4⁺ T 細胞の 'Help' 機能を明らかにすることで、新たな結核ワクチンの開発戦略を得ることを研究目的とした。

B. 研究方法

(1) マウスの免疫法

Peptide-25 (FQDAYNAAGGHNAVF) と卵白アルブミン (OVA) または T 細胞抗原受容体 (TCR) に対して低親和性の Peptide-25 変異体 APL:G248A (FQDAYNAAAGGHNAVF) と OVA をフロイント不完全アジュバントに懸濁し、C57BL/6 マウス腹部皮下の同一場所、もしくは左右別々の部位に免疫した。また別の実験では、PBS に懸濁した Peptide-25 または APL を Peptide-25 特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウス (P25 TCR-Tg マウス：C57BL/6 バックグラウンド) 腹腔に投与

した。

(2) サイトカイン産生の検出

抗原免疫 10 日後に脾臓細胞を回収し、*in vitro* で固相化抗 CD3 抗体再刺激を行った。再刺激 1 日後の CD4⁺ T 細胞の IFN- γ 、IL-4 産生を細胞内サイトカイン染色法にて検討した。

(3) *in vivo* における細胞障害性 CD8 細胞誘導及び活性の評価

抗原免疫 10 日後に回収した脾臓細胞を OVA 遺伝子導入 EL-4 胸腺腫細胞 (E. G7) と 5 日間 *in vitro* で培養した。培養後に生細胞を回収し、標的細胞として E. G7 を、対照として EL-4 を用いた 4 時間の ⁵¹Cr 遊離試験にて OVA 特異的細胞障害性 CD8 細胞の活性を検討した。

(4) *in vitro* における細胞障害性 CD8 細胞の誘導及び活性の評価

P25 TCR-Tg マウス脾臓細胞より IMag システム (BD Bioscience) を用い、CD4⁺ T 細胞を調製した。OVA 特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウス (OT-1 : C57BL/6 バックグランド) 脾臓細胞より IMag システムを用い CD8⁺ T 細胞を調製した。C57BL/6 マウス脾臓細胞より IMag システムを用いて樹状細胞を調製し、抗原提示細胞として用いた。

P25 TCR-Tg 由来 CD4⁺ T 細胞と Peptide-25 または APL が共存する条件で樹状細胞に OVA を取り込ませた。培養 1 日後、P25 TCR-Tg 由来 CD4⁺ T 細胞及び余剰の抗原を取り除き、CFSE 標識した OT-1 由来 CD8⁺ T 細胞と培養した。培養 3 日後の OT-1 由来 CD8⁺ T 細胞の細胞分裂回数及びグランザイム B 産生を指標に細胞障害性 CD8 細胞の誘導及び活性化を評価した。

(5) 未感作 CD8⁺ T 細胞の活性化を誘導する BCG 由来抗原の検索

未感作 C57BL/6 マウス脾臓細胞より IMag システムを用い CD8⁺ T 細胞および樹状細胞を調製した。

in vitro にて CD8⁺ T 細胞を樹状細胞存在下に BCG-Tokyo (生菌、死菌、細胞膜画分、細

胞壁画分、細胞質画分) を加え培養した。

培養 3 日後の CD8⁺ T 細胞の IFN- γ 産生を細胞内サイトカイン染色法にて検討した。

倫理面への配慮

実験に供したマウスは国立感染症の動物実験指針に基づき行った。

C. 研究結果

(1) PBS に懸濁した Peptide-25 または APL を P25 TCR-Tg マウス腹腔に免疫し、10 日後に脾臓細胞を回収し、*in vitro* にて固相化抗 CD3 抗体刺激を行い、Peptide-25 及び APL の *in vivo* における CD4⁺ T 細胞分化誘導能を評価した。その結果、*in vivo* において Peptide-25 は Th1 分化を、APL は Th2 分化を選択的に誘導することが明らかになった。

(2) フロイント不完全アジュバントに懸濁した Peptide-25 と OVA または APL と OVA を C57BL/6 マウス腹部皮下に免疫し、10 日後に脾臓細胞を回収し、常法に従い OVA 特異的細胞障害性 CD8 細胞の活性化を評価した。その結果、Peptide-25 と OVA を共免疫すると OVA 特異的な細胞障害性 CD8 細胞の活性が OVA 単独免疫に比べ増強した。一方、APL と OVA の共免疫では OVA 特異的細胞障害性 CD8 細胞の活性の増強は見られなかった。また、Peptide-25 と OVA を別々の部位に免疫すると Peptide-25 による OVA 特異的細胞障害性 CD8 細胞の活性化増強効果が全く見られなかった。

(3) Peptide-25 による細胞障害性 CD8 細胞の活性化増強機構を明らかにするため、*in vitro* での OVA 特異的細胞障害性 CD8 細胞の分化・活性化誘導システムを構築した。まず、OVA を樹状細胞に取り込ませる際に P25 TCR-Tg 由来 CD4⁺ T 細胞と Peptide-25 または APL を 1 日共培養した。培養後 CD4⁺ T 細胞と取り込まれなかった抗原を除き OVA パルス樹状細胞として用いた。CFSE 標識 OT-I 細胞と OVA パルス樹状細胞を共培養し、3 日後の OT-I 細胞の分裂回数およびグランザイム B の発現を検討した。その結果、Peptide-25 と共培養した OVA パルス樹状細胞を用いた場合には、OT-I 細胞の増殖促進

やグランザイム B の発現増強が見られた。一方、APL と共培養した OVA パルス樹状細胞では OT-I 細胞の増殖は同程度に誘導されたが、グランザイム B の発現は誘導されなかった。

(4) Peptide-25 または APL と共培養した OVA パルス樹状細胞上の表面分子の発現を比較検討したが、CD40、CD54、CD80、CD86、H-2K^b、I-A^b の発現には差は見られなかった。

(5) 未感作 C57BL/6 マウスより調製した CD8⁺ T 細胞を C57BL/6 マウス脾臓由来樹状細胞存在下に BCG-Tokyo (生菌) と共に培養すると、CD8⁺ T 細胞の IFN- γ 産生が誘導された。また、死菌を用いた場合にも同様に CD8⁺ T 細胞の IFN- γ 産生が誘導された。そこで、BCG より細胞壁画分、細胞膜画分、細胞質画分を調製し、CD8⁺ T 細胞の IFN- γ 産生誘導を検討した。その結果、細胞壁画分のみ IFN- γ 産生誘導能があることが明らかになった。

D. 考察

(1) Peptide-25 及び APL は共に生体内で CD4⁺ T 細胞の活性化を誘導できることが明らかになった。そこで、Peptide-25 および APL 刺激で活性化した CD4⁺ T 細胞が OVA 特異的細胞障害性 CD8 細胞の活性化を誘導・増強する 'Help' 機能を有しているか検討した。その結果、Peptide-25 と OVA を共免疫した場合にのみ生体内で OVA 特異的細胞障害性 CD8 細胞の活性化が増強されることが明らかとなった。この際、Peptide-25 と OVA を別々の部位に免疫するとこの作用が全く見られなくなることから、Peptide-25 と OVA が同一抗原提示細胞に取り込まれることが必要であることが示唆された。そこで、Peptide-25 による OVA 特異的細胞障害性 CD8 細胞の活性化増強機構を *in vitro* にてさらに解析した。抗原提示細胞としてナイーブ CD4⁺ T 細胞及びナイーブ CD8⁺ T 細胞の活性化を誘導できる樹状細胞を用いた。

その結果、Peptide-25 で活性化し Th1 細胞へと分化した CD4⁺ T 細胞と共培養した樹状細胞は OVA 特異的 CD8⁺ T 細胞の分裂増殖を

誘導し、さらにグランザイム B の産生を誘導した。このことから、Peptide-25 で誘導された Th1 型 CD4⁺ T 細胞は機能的な CD8⁺ T 細胞の活性化を誘導できる 'Help' 活性を有していることが明らかになった。一方、APL で誘導された Th2 型 CD4⁺ T 細胞と共培養した樹状細胞では OVA 特異的 CD8⁺ T 細胞の分裂増殖は誘導できるもののグランザイム B の産生は誘導できなかった。このことから、機能的な CD8⁺ T 細胞の活性化を誘導するためには Th1 型の CD4⁺ T 細胞による 'Help' が必要であることが示された。

この Th1 型 CD4⁺ T 細胞と Th2 型 CD4⁺ T 細胞による 'Help' の違いを明らかにするために、それぞれの T 細胞との相互作用によって誘導される樹状細胞の表面分子の発現を検討した。その結果、相互作用によって誘導される CD40、CD54、CD80、CD86、H-2K^b、I-A^b といった表面分子の発現には差異が見られなかった。このことから、これら表面分子は分裂増殖の誘導には寄与している可能性はあるものの、グランザイム B の産生誘導には寄与していないことが示唆された。したがって、①上記以外の Th1 型 CD4⁺ T 細胞との相互作用によってのみ誘導される樹状細胞に発現する表面分子と CD8⁺ T 細胞との相互作用が重要な役割を果たしている可能性、②Th1 型 CD4⁺ T 細胞との相互作用によってのみ誘導される樹状細胞からのサイトカインが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後、上記の可能性に関して検討を加える予定である。

(2) CD8⁺ T 細胞の活性化を誘導する BCG に含まれる抗原分子を検索した。これまで BCG に未感作 CD8⁺ T 細胞を活性化できる分子が含まれているかに関する報告はない。そこで、未感作 C57BL/6 マウス脾臓細胞より CD8⁺ T 細胞を精製し、脾臓由来樹状細胞存在下に BCG と共に培養した。その結果、BCG には未感作 CD8⁺ T 細胞を活性化できる分子が含まれることが明らかになった。この分子が CD8⁺ T 細胞に対してマイトジェニックに作用する可能性が考えられたが、樹状細胞非存在下では BCG との共培養による CD8⁺ T 細胞の活性化が誘導されないことか

ら、マイトジェニックな反応である可能性は低い。また、樹状細胞の抗原取り込み能を阻害することで CD8⁺ T 細胞の活性化が見られなくなることから、樹状細胞が BCG を取り込み分解することが必要であることが示唆された。そこで、BCG より細胞壁画分、細胞膜画分、細胞質画分と粗精製し、CD8⁺ T 細胞の活性化能を検討した。その結果、細胞壁画分にのみ CD8⁺ T 細胞活性化誘導能が存在することが明らかとなった。今後、細胞壁画分に存在する CD8⁺ T 細胞活性化誘導分子の同定を行う予定である。

E. 結論

- (1) CD8⁺ T 細胞の分裂増殖の誘導には Th1、Th2 細胞に依らず活性化 CD4⁺ T 細胞と樹状細胞の相互作用によって誘導される表面分子の発現増強が重要な役割を果たしている。
- (2) CD8⁺ T 細胞の細胞障害性機能、すなわちグランザイム B の発現誘導には Th1 型活性化 CD4⁺ T 細胞と樹状細胞との相互作用によって誘導される樹状細胞の活性化が重要な役割を果たしている。
- (3) BCG 細胞壁画分に未感作 CD8⁺ T 細胞の活性化を誘導できる分子が含まれている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wolf, A. J., B. Linas, G. J. Trevejo-Nuñez, E. Kincaid, T. Tamura, K. Takatsu, and J. D. Ernst. *Mycobacterium tuberculosis* Infects dendritic cells with high frequency and impairs their function *in vivo*. *J. Immunol.*, 179:2509-2519, 2007.
- 2) Ariga, H., Y. Shimohakamada, M. Nakada, T. Tokunaga, T. Kikuchi, A. Kariyone, T. Tamura, and K. Takatsu.

Instruction of naive CD4⁺ T-cell fate to T-bet expression and T helper 1 development: roles of T-cell receptor-mediated signals. *Immunology*, 122:210-221, 2007.

- 3) Wolf, A. J., L. Desvignes, B. Linas, N. Banaiee, T. Tamura, K. Takatsu, and J. D. Ernst. Initiation of the adaptive immune response to *M. tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J. Exp. Med.*, in press.

2. 学会発表

- 1) 結核菌分泌蛋白による Th1 分化誘導機構の解析：TCR による抗原認識の役割。下袴田陽子，田村敏生，牧野正彦，高津聖志。第 90 回日本細菌学会関東支部総会 2007 年 10 月 東京。
- 2) P25 CD4⁺ T 細胞活性化とクロスプライミング増強の解析。刈米アイ，田村敏生，高津聖志。第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 2007 年 11 月 東京。
- 3) IL-10 delayed induction of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)-specific Th1 immune response in the lung of Mtb-infected TCR-transgenic mice. Yahagi, A., M. Umemura, T. Tamura, M. D. Begum, S. Hamada, K. Oshiro, Y. Okamoto, A. Kariyone, K. Takatsu, G. Matsuzaki. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 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 | なし |

平成19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）

ワクチンの検定と結核を増悪させる病態の解析

分担研究報告書

分担研究者

菅原 勇

（結核予防会結核研究所・抗酸菌レファレンスセンター長）

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

ワクチンの検定と結核を増悪させる病態の解析

分担研究者 菅原 勇（結核予防会結核研究所・
抗酸菌レファレンスセンター・センター長）

研究要旨.

1型糖尿病個体が結核に罹患したときに、増悪するかを、正常個体と比較検討した。Komedal型糖尿病(KDP)ラットとその野生ラットに結核菌を感染させて7週後、病理学、分子生物学、細菌学的手法を用いて、両群間で、統計的有意差があるかを追求した。KDP糖尿病ラットは、野生ラットに比較して、7週より以前に死亡した。肺内、脾内結核菌数も、KDP糖尿病ラットで、有意に増加していた。また、IL-1beta, IFN-gamma, TNF-alpha mRNA発現も KDP ラット肺内で、有意に増加していた。

A. 研究目的

糖尿病は結核のハイリスク要因と言われる。1型糖尿病個体が、結核を発病する時に、結核を増悪させるか否かを調べることを目的とする。

B. 研究方法

1) エアロソール感染

1型 KDP 糖尿病ラットと野生ラットを、結核菌でエアロソール感染させた。エアロソール感染には、Inhalation Exposure System (HIS, Glas-Col Inc., Terre Haute, IN, USA)を使用した。感染直後の肺還元培養では、200CFU が肺内に認められた。この KDP ラットは、豚のランゲルハンス島に、リンパ球の浸潤（豚島炎）を認めた。尿中、血中グルコース値で、糖尿病の程度の推移を追跡した。感染したラットは血清グルコースレベルが150mg/dlであった。感染7週後、感染ラットの肺組織を病理組織学的に詳細に調べた。

2) 肺および脾内結核菌数

摘出された肺、脾病変部の重さを測った後、肺または脾病片をすりつぶし、純水で希釈した。10倍希釈した組織を1%小川培地上に播き、出現してきたコロニーを、培養4週後に計数した。前もって測ってあった

肺、脾重量あたりに換算して全コロニー数を求めた。

3) 肺病変内の IFN-gamma, TNF-alpha, IL-1beta mRNA 発現レベル

感染肺から組織片を摘出し、血をぬぐった後、素早くすりつぶした。1mlのTriZolを入れて、その後、定法に従いRNA抽出した。その後、逆転写で、cDNAを作製し安定化させた。IFN-gamma, TNF-alpha, IL-1beta 特異的プライマーを用いて Real-time PCR (ABI PRISM Model7900)を行い、mRNA発現をを詳細に調べた。内部コントロールとしては、beta2-microglobulin RNAを用いた。その後、野生ラットの mRNA 発現レベル比較検討した。

倫理面への配慮 ラットを殺すときは、麻酔薬を用いて、安楽死させた。

C. 研究結果

1) 発病経過と組織病理学検査

糖尿病結核菌感染ラットは、感染後7週以内に死亡した。病理組織像を比べると、KDPラットで肉芽腫の大きさが増大し、数個の肉芽腫が、融合しているものも認められた。中心性壊死は認められず、またランゲルハンス巨細胞も認められなかった。Ziehl-Neelsen 染色では、明らかに KDP ラ

ットの肉芽腫内に、結核菌が増加していた。この結核発病ラットの血清グルコース値は、感染前に比べて上昇した（すなわち悪化した）。

2) 肺、脾内結核菌数の算定

臓器内結核菌数を、客観的に評価するため、肺、脾組織を摘出し、ホモジェナイズした後、蒸留水で希釈しその 0.5ml を 1% 小川培地に播いて 4 週間、37 度で培養した。その後出現したコロニー数を数えて、肺、脾全体あたりの結核菌数を算定した。肺内、脾内結核菌数ともに、FDP 糖尿病ラットで、有意に増加していた。すなわち、KDP ラットの肺では、 $1 \times 10^{8.5}$ CFU に対して、野生ラットの肺では、 1×10^6 CFU であった。KDP ラットの脾では、 1×10^6 CFU に対して野生ラットの脾では、 2×10^4 CFU だった。p<0.01 で統計的有意差が認められた。

3) 結核菌感染肺病巣中のサイトカイン mRNA 発現

次に、肺病変を摘出して、病変内の IFN- γ , TNF- α , IL-1 β mRNA 発現を、real-time PCR を使用して調べた。KDP ラット肺病変内で、IFN- γ , TNF- α mRNA 発現が、野生ラットのそれより増加しており、病変の増悪が示唆された。すなわち、野生ラット肺での mRNA 発現を 1 とすると、KDP ラット肺の TNF- α , IFN- γ , IL-1 β mRNA 発現は、それぞれ、3、3.5、8 倍だった。従って、糖尿病を発症した KDP ラットは、結核菌に感染すると、病変が有意に大きくなり、それにつれて病変が悪化することが示唆された。

D. 考察

この糖尿病ラットは、結核菌を感染させると、結核が増悪することから、やはり、糖尿病は、結核のハイリスク要因である。この増悪の原因は、1) グルコースが、結核菌の増殖を促進させる、2) 肺胞マクロファージの活性化の程度が、野生ラットのそれより低い、である。なぜ、肺胞マクロファージの活性化が、うまく行われなかったのかの原因の究明は、今後の課題である。先

に、我々は、2 型糖尿病ラットモデルである Goto-Kakizaki ラットで結核菌感染後の肺病変を、経時的に追求したところ、2 型糖尿病ラットで、やはり、肺胞マクロファージが活性化していないことを見いだした (I. Sugawara *et al*: Pulmonary tuberculosis in spontaneously diabetic Goto Kakizaki rats. *Tohoku J. Exp. Med.*, 204: 135-145, 2004.)。

さらに、PubMed で文献を調べたところ、ヒト糖尿病でも、肺胞マクロファージが活性化されていないという報告がある。残念ながら、この原因は、わかっていない。

少なくとも、結核菌の標的細胞は、肺胞マクロファージであり、KDP ラットが結核菌感染で、病変が増大したことから、この KDP ラットの肺胞マクロファージの機能が低下していることが示唆される。ところが、H37Rv を採取した肺胞マクロファージに 10^6 CFU 加えて 24 時間後の食能を調べた。標本を作って Ziehl-Neelsen 染色を施して肺胞マクロファージ内の結核菌数を調べた実験を行ったところ、KDP ラット、野生ラット間差が見られなかった (未発表データ)。従って、食食以外のプロセスで、マクロファージ活性化の差が出るのだろう。サイトカインを調節する転写因子、他のサイトカインの産生能の差を両群で、調べる必要がある。

糖尿病患者で血中グルコースレベルを正常に近く保つと、結核菌に掛かりにくいという臨床的観察がある。今後、この KDP ラットをインスリンで治療して、その後で、結核菌感染させ、本当に、結核が増悪しないのか調べる予定である。

調べた IFN- γ , TNF- α , IL-1 β mRNA レベルは、KDP 肺病変部で、野生ラット肺病変部より、有意に上昇していた。このことは、これらサイトカインが炎症の程度を表していると考えられる。たとえば、結核菌感染初期では、IFN- γ は、肺胞マクロファージを活性化して、結核菌を殺す方向に作用するが、結核後期では、むしろ炎症の程度を示すマーカーとなりうる。

我々の研究は、糖尿病は、結核のハイリスク要因であることを、強く示唆している。

可能であれば、全国結核調査行い、結核患者がどの位、糖尿病にかかっているのかを調べ、次にその患者の予後、結核薬治療反応性、結核薬耐性度がどうなっているかを調査されることを切望する。

E. 結論

ヒト結核で示唆されているとおり、糖尿病動物モデルを使っても、糖尿病は、結核のハイリスク要因であることが、証明された。このデータは、将来のヒト結核対策に有用と考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugawara, I., Z. Li, L. Sun, T. Udagawa, and T. Taniyama. Recombinant BCG Tokyo (Ag85A) protects cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) infected with H37Rv *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 87:518-525, 2007.
- 2) Shi, R., J. Zhang, K. Otomo, G. Zhang, and I. Sugawara. 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.
- 3) Yamada, H., S. Mizuno, A. Ross, and I. Sugawara. Retinoic acid therapy attenuates the severity of tuberculosis while altering

lymphocyte and macrophage numbers and cytokine expression in rats infected with *M. tuberculosis*. *J. Nutr.*, 137:2696-2700. 2007.

- 4) Shi, R., J. Zhang, C. Li, Y. Kazumi, and I. Sugawara. Detection of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China as determined by denaturing HPLC analysis and DNA sequencing. *Microbes Infect.*, 9:1538-1544, 2007.
- 5) Sugawara, I., Yamada, H., and Mizuno, S. BCG vaccination enhances resistance to *M. tuberculosis* infection in guinea pigs fed a low casein diet. *Tohoku J. Exp. Med.*, in press.
- 6) Hibiya, K., Y. Kazumi, I. Sugawara, and J. Fujita. Histopathological classification of systemic *Mycobacterium avium* complex infections in slaughtered domestic pigs. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, in press.

2. 学会発表

- 1) 菅原 勇、宇田川忠、谷山忠義. 武漢大学で行われたカニクイサル結核菌感染実験. 第82回日本結核病学会 2007年6月 大阪市.

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19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）

結核菌を含む抗酸菌の細胞壁の生合成に不可欠な
遺伝子の検索と解析

分担研究報告書

分担研究者

荒川 宜親

（国立感染症研究所・細菌第二部部長）

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

結核菌を含む抗酸菌の細胞壁の生合成に不可欠な遺伝子の検索と解析

分担研究者 荒川 宜親（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）
研究協力者 森 茂太郎（国立感染症研究所・細菌第二部・研究員）
研究協力者 柴山 恵吾（国立感染症研究所・細菌第二部・室長）
研究協力者 朴 貞玉（国立感染症研究所・細菌第二部・流動研究員）

研究要旨.

本研究課題では、結核菌を含む抗酸菌が有している特異的な細胞壁構造に着目して、結核症を含む抗酸菌症に対する新規治療法や診断法の開発を目指した研究を行っている。本年度は「細胞壁構造に関連する新規遺伝子の同定」と「細胞壁に関連した遺伝子を用いた抗酸菌の新規検出・鑑別法の開発」に関する研究を行った。「細胞壁構造に関連する新規遺伝子の同定」では、抗酸菌のゲノム情報に基づいて細胞壁構造に関与していると予想される遺伝子を選定し、*Mycobacterium smegmatis* を用いて、選定した遺伝子（MSMEG2936 遺伝子；結核菌では Rv2609c 遺伝子に相当）を破壊した株、並びに Rv2609c 遺伝子を用いた相補株を作成した。その結果、破壊株のコロニー形態は野生株とは大きく異なる Smooth 型を示し、相補株は野生株と同様の Rough 型を示した。このことから、本遺伝子（MSMEG2936 / Rv2609c 遺伝子）が細胞壁構造に関与していることが示された。本遺伝子はリポアラビノマンナンの生合成に関与していることが報告されている遺伝子群と同じオペロン上に存在していることから、本遺伝子もリポアラビノマンナンの生合成に関与していることが予想された。一方、「細胞壁に関連した遺伝子を用いた抗酸菌の新規検出・鑑別法の開発」においては、PCR 反応後の電気泳動によって得られるバンドのサイズが抗酸菌の菌種によって異なるように、細胞壁に関連する遺伝子に対応したプライマーを設計した。21 菌種 102 株の抗酸菌を用いた PCR 反応と電気泳動の結果から、本研究で確立した新規検出・鑑別法では、抗酸菌を特異的に検出できるとともに 6 つのグループに簡易に鑑別することが可能であることが示された。本検出・鑑別法は、16SrRNA の遺伝子情報に基づいた既存の簡易鑑別法と比較して、ヒトに対して抗酸菌症を引き起こす菌種である *M. kansasii* を鑑別出来る点で優れていた。

A. 研究目的

Mycobacterium tuberculosis（結核菌）が引き起こす結核症は、世界中において新規感染患者数や死亡者数の増加が懸念されており、今なお至急の対策が必要な感染症である。さらに近年、従来抗結核薬に耐性を示す多剤耐性結核菌による結核症例や、有効な治療薬が存在しない *M. avium* や *M. intracellulare*、*M. kansasii* 等の非結核抗酸菌による感染症例が年々増加しており深刻な

問題となっている。また、結核症を含めた抗酸菌症における原因菌を迅速に検出・鑑別することが難しいことも問題となっている。そのため、これまでの治療薬にかわる新たな治療薬、特に抗酸菌に特異的に作用するような新規抗菌薬の開発や、抗酸菌の菌種を迅速に判別する新規鑑別法の開発につながる研究が望まれている。そこで本研究では、抗酸菌に特異的な細胞壁構造に着目して研究を行うことにより、新規抗菌薬

や新規鑑別法の開発に結びつけることを目標としている。

結核菌を含む抗酸菌は、脂質に富む頑強な細胞壁構造をしており、その特徴的な細胞壁が抗酸菌の生育や病原性の発現に深く関与していることが報告されている。また、その細胞壁構造は抗酸菌の菌種間において若干の違いが見られることも明らかになっている。従って、抗酸菌の細胞壁構造は抗酸菌に特異的に作用するような新規抗菌薬の標的や抗酸菌を迅速に検出・鑑別する新規鑑別法の標的として適していると考えられる。

抗酸菌の細胞壁構造には 150 種類以上の遺伝子・タンパク質が関与していると予想されているものの、未だ明らかにされていない生合成経路が多く残されている。そこで本研究では、細胞壁の合成に関与している新規遺伝子を同定することを目的として、抗酸菌のゲノム情報に基づいて細胞壁構造に関連していると予想される遺伝子を選定し、抗酸菌の一種である *M. smegmatis* を用いて破壊株と相補株の作成を行った。また、本研究において細胞壁構造に関与していると予想した遺伝子群について抗酸菌における保存性について調べた結果、結核菌のゲノム上に存在する Rv3783、Rv3789 遺伝子は抗酸菌において高度に保存されていたが、その間に存在する遺伝子（結核菌のゲノム上では Rv3784-Rv3788 遺伝子）の個数や長さについては、結核菌、*M. avium*、及び *M. smegmatis* において差があることを見いだした。そこで、抗酸菌の新規検出・鑑別法の開発を目的として、Rv3783 と Rv3789 に対応するプライマーを作成し、PCR 反応と電気泳動を行った。

B. 研究方法

1. 抗酸菌に特異的な細胞壁構造に関与する新規遺伝子の同定

抗酸菌のゲノム情報を基に、細胞壁構造に関与していると予想される遺伝子を選定した。選定した遺伝子は、これまでに明らかにされている細胞壁関連遺伝子と同じ発現調節を受けていると予想される 5

つの機能未知遺伝子（結核菌のゲノム上では Rv2609c 遺伝子、Rv2613c 遺伝子、Rv3779 遺伝子、Rv3780 遺伝子、及び Rv3785 遺伝子に相当）である。これらの遺伝子中にカナマイシン耐性カセットを組込んで調製した遺伝子断片を抗酸菌ベクター pPR23、あるいは pPR27 に挿入して破壊株用プラスミドを作成した。作成したプラスミドをエレクトロポレーション法によって、*M. smegmatis* mc²155 に導入し、選択培地・温度上で標的遺伝子が破壊された株を取得した。作成した破壊株よりゲノム DNA を抽出し、標的遺伝子に対応したプライマーを用いた PCR 法によりカナマイシン耐性カセットの挿入を確認した。また、抗酸菌用発現ベクター pvv16 に結核菌由来の Rv2609c 遺伝子を挿入したプラスミドを構築し、破壊株にエレクトロポレーション法を用いて導入することにより、相補株を作成した。

2. 細胞壁に関連した遺伝子を用いた抗酸菌の新規検出・鑑別法

抗酸菌のゲノム上で高度に保存されており、細胞壁関連遺伝子と予想される 2 つの遺伝子（結核菌のゲノム上では Rv3793 遺伝子と Rv3789 遺伝子）に対応するプライマーを設計した。設計に際しては、結核菌、*M. avium*、及び *M. smegmatis* のゲノム情報を基にして、3 つの菌種間で 100% 保存されている部分に対応するようにそれぞれ設計した。PCR 反応条件の最適化は、結核菌、*M. avium*、*M. smegmatis*、及び *Escherichia coli* のゲノムを用いて行った。さらに、決定した条件を用いて、ATCC より分与された株を含めた 18 種類の抗酸菌 (*M. scrofulaceum*、*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. marinum*、*M. xenopi*、*M. gordonae*、*M. abscessus*、*M. kansasii*、*M. szulgai*、*M. flavescens*、*M. fortuitum*、*M. thermoresistibile*、*M. chelonae*、*M. shimoidei*、*M. malmoense*、*M. nonchromogenicum*、*M. mucogenicum*、及び *M. smegmatis*) のコロニーをテンプレートとした PCR 反応と電気泳動、並びに臨床分離株を含めた 12 菌種 84 株 (*M. avium* 15 株、*M. kansasii* 9 株、*M. marinum* 6 株、*M. scrofulaceum* 5 株、*M.*