

図1. CDABE operon概要図. ↑: plasmid配列と登録配列のアミノ酸相違部. ○: 発光に影響を及ぼす変異位置

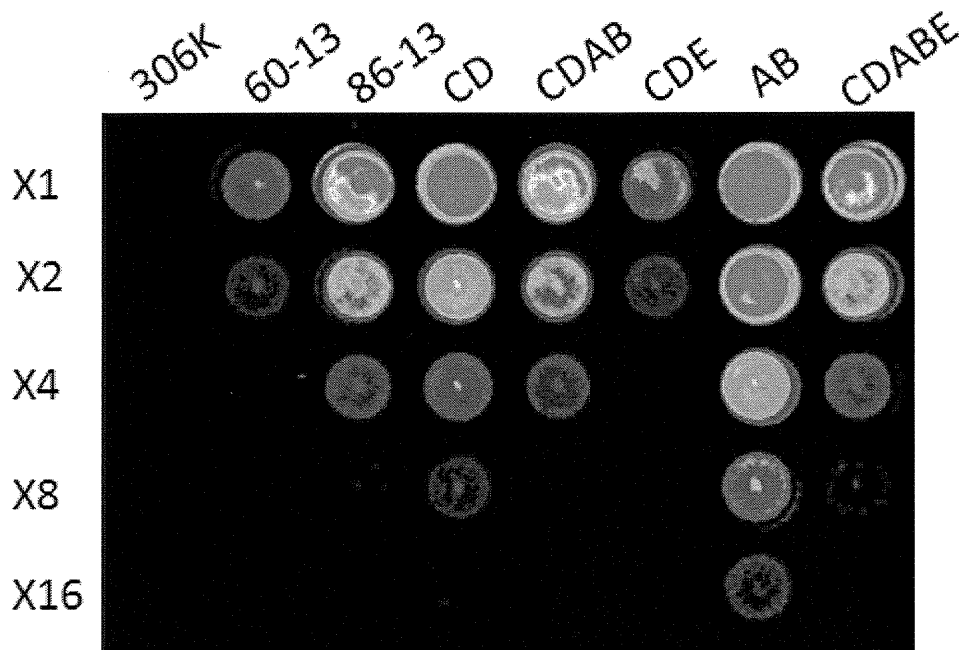


図2. BCGを宿主とした各種BCG至適化ORFによる菌液の発光. 縦軸は、菌液希釈率.

平成23年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

結核菌由来因子による宿主免疫応答の誘導機構に関する研究

分担研究報告書

研究分担者

田村 敏生

(国立感染症研究所・室長)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）  
分担研究報告書

結核菌由来因子による宿主免疫応答の誘導機構に関する研究

研究分担者 田村 敏生 （国立感染症研究所・感染制御部・室長）

研究要旨

本研究は、Th1 免疫応答を選択的に誘導することで、長期生存型メモリーCD8<sup>+</sup>細胞傷害性 T 細胞の分化を誘導する活性を有するペプチドを結核菌分泌タンパクより検索し、その誘導機序を明らかにすることで抗結核免疫応答を強化するシステムを確立することを目的としている。

昨年度までに結核菌分泌タンパク Ag85B 由来のペプチド：Peptide-25 が①選択的かつ強力に Th1 分化を誘導できること、②この分化には Peptide-25 刺激によって誘導される TATA box binding protein associated factor である TAF7 が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

また、Peptide-25 特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウス及び卵白アルブミン(OVA)特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウスを用いた *in vitro* CD8<sup>+</sup>細胞傷害性 T 細胞分化誘導実験系による解析から①Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞との相互作用によって活性化した樹状細胞のみが CD8<sup>+</sup> 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、②Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 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に IL-17F が関与する可能性を明らかにしてきた。

本年度は Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 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における IL-17F の役割を明らかにすることを目的とし解析を行なった結果、IL-17F が樹状細胞の活性化誘導能を有していることが明らかとなった。さらに①IL-17F 産生細胞は IFN- $\gamma$  産生細胞とは異なる細胞集団であること、③IL-17F の産生誘導には Th1 分化を誘導する TCR からの活性化シグナルに加え、副刺激分子間相互作用が必要であることが明らかとなり、IL-17F が CD8<sup>+</sup> T 細胞の機能的活性化を誘導する樹状細胞の活性化に必須の因子である可能性が示された。

A. 研究目的

結核ワクチンの目的は結核菌特異的獲得免疫を惹起し、長期生存型メモリーCD8<sup>+</sup>細胞傷害性 T 細胞(CTL)を効果的に誘導することである。この長期生存型メモリーCTLの誘導には IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ を産生する CD4<sup>+</sup> Th1 細胞の'Help'が不可欠であるが、この'Help'の本態に関しては未だ明らかではない。したがって、より効果的な結核ワクチンを開発するためには CD4<sup>+</sup> Th1 細胞の'Help'機能を明らかにすることが重要である。

結核菌の分泌タンパクである Ag85B はヒト、マウスに対して強い免疫原性を有し、このタンパクのみの投与で強力に Th1 分化を誘導することが知られている。そこで本研究では、Th1 免疫応答を選択的に誘導することで、長期生存型メモリーCTLを誘導する活性を有するペプチドを Ag85B より検索し、その CTL 誘導機序を明らかにすることで抗結核免疫応答を強化するシステムを確立することを目的としている。

アジアにおいて感染症で死亡する患者の死因の第 1 位は結核である。この研究によ

って明らかとなる長期生存型メモリーCTLの誘導機序から BCG に代わる新たな結核ワクチンの開発戦略が得られるものと考ええる。この結核ワクチンは有効性が増強し、更に有効期間が延長されることが期待され、アジア地域での結核の予防に大いに貢献できるものと考ええる。

これまでに、①Ag85B のヘルパーエpiteープを検索し、15 個のアミノ酸からなる Peptide-25 (アミノ酸配列:FQDAYNAAGGHNAV) が、I-A<sup>b</sup> 拘束性に選択的かつ強力に Th1 免疫応答を誘導できること、②Peptide-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) を用いた解析から、Peptide-25 を介した TCR からのみの刺激によってサイトカイン非依存的、副刺激分子非依存的、さらに T-bet 非依存的な Th1 分化が誘導されること、③この T-bet 非依存的な Th1 分化には TATA box binding protein associated factor である TAF7 が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。

さらに卵白アルブミン (OVA) 特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウス (OT-1) を用いた *in vitro* CTL 分化誘導実験系による解析から①Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞との相互作用によって活性化した樹状細胞のみが CD8<sup>+</sup> 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、②Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 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に CD4<sup>+</sup> T 細胞が産生する IL-17F が関与する可能性を明らかにしてきた。

本年度は Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 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における IL-17F の役割を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

(1) *in vitro* における CD8<sup>+</sup> 細胞傷害性 T 細胞の分化誘導及び活性の評価

P25 TCR-Tg (C57BL/6 バックグランド) 脾臓細胞より IMag システム (BD Bioscience) を用い、CD4<sup>+</sup> T 細胞を調製した。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<sup>+</sup> 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-CD4<sup>+</sup> T 細胞と Peptide-25 または TCR に対して低親和性であり、Th2 免疫応答を誘導する活性を有しているの Peptide-25 変異体 APL:G248A (FQDAYNAAAGHNAV) が共存する条件で樹状細胞に OVA を取り込ませた。実験によってはこの際、IL-17F に対する中和抗体もしくはリコンビナント (r) IL-17F を添加した。培養 1 日後、P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞及び余剰の抗原、抗体及び rIL-17F を取り除いた OVA を取り込んだ樹状細胞を OT-1-CD8<sup>+</sup> T 細胞と培養した。培養 3 日後の OT-1-CD8<sup>+</sup> T 細胞のグランザイム B 産生を指標に細胞傷害性 CD8 細胞の活性化を評価した。

(2) Peptide-25 刺激による CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-17F 産生誘導機序の検討

抗原提示細胞として樹状細胞または I-A<sup>b</sup> 分子を遺伝子導入した Chinese hamster ovary 細胞 (I-A<sup>b</sup>-CHO) 存在下に P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞または T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を Peptide-25 または APL で刺激した。培養 1 日後に CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-17F 産生を細胞内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の飼育、維持は国立感染症研究所の実験動物指針に従い実施した。

## C. 研究結果

(1) CD8<sup>+</sup> T 細胞の機能的分化に必須の樹状細胞の活性化を誘導する CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞間相互作用における IL-17F の役割の検討

グランザイム B の発現を伴う CD8<sup>+</sup> T 細胞の機能的細胞傷害性 T 細胞への分化には Th1 細胞への分化を誘導するような環境下での CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞との IFN- $\gamma$ 、IL-12、CD40-CD40 リガンド相互作用以外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こと、こ

の相互作用を司る因子を DNA マイクロアレイ法にて検索した結果、27 種類の候補遺伝子を得たこと、そのうち Th1 分化を選択的に誘導する Peptide-25 刺激でのみ CD4<sup>+</sup> T 細胞に *il-17f* mRNA が発現誘導されることをこれまでに明らかにしてきた。

そこで、CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞間相互作用における IL-17F の役割を明らかにするために P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞と Peptide-25 及び OVA 存在下に樹状細胞を培養する際に IL-17F の中和抗体を添加し、CD8<sup>+</sup> T 細胞のグランザイム B の産生に対する影響を検討した。その結果、IL-17F の中和抗体用量依存的に CD8<sup>+</sup> T 細胞からのグランザイム B の産生が部分的に抑制された。

さらに樹状細胞を suboptimal 用量の Peptide-25 または optimal 用量の APL と共に培養する際にリコンビナント IL-17F を添加した。その結果、suboptimal 用量の Peptide-25 と共に培養する際に rIL-17F を添加すると CD8<sup>+</sup> T 細胞からのグランザイム B 産生が rIL-17F の用量依存的に増強された。一方、optimal 用量の APL との培養の場合には、Peptide-25 との培養で産生される IL-17F の 2 倍量の rIL-17F (2ng/ml) を加えても CD8<sup>+</sup> T 細胞からのグランザイム B 産生は誘導されなかった。

そこで、P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞と Peptide-25 または APL 及び OVA 存在下に樹状細胞を 1 日培養した後の樹状細胞上の IL-17 受容体の発現を FACS にて検討した。その結果、Peptide-25、APL いずれの場合も同程度の IL-17 受容体の発現を誘導した。

#### (2) Peptide-25 刺激による CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-17F 産生誘導機序の検討

IL-17F は IL-17A と共に Th17 細胞から産生されることがよく知られている。そこで、樹状細胞存在下に P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を Peptide-25 で刺激し、1 日後の IFN- $\gamma$ 、IL-17A、IL-17F 産生を細胞内染色法にて検討した。その結果、Peptide-25 刺激では IL-17F と IFN- $\gamma$  の産生が誘導されるものの IL-17A の産生は全く見られなかった。ELISA 法による解析でも同様の結果を得た。また、IL-17F と IFN- $\gamma$  はそれぞれ異なる細

胞群から産生され、両方のサイトカインを産生する細胞は検出されなかった。

P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生は TCR からの活性化シグナルのみで十分に誘導される。そこで、抗原提示細胞として既知のサイトカイン分泌能及び副刺激分子発現能を有しない I-A<sup>b</sup>-CHO 細胞を用い、P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞から IL-17F 産生におけるサイトカイン及び副刺激分子間相互作用の関与を検討した。その結果、抗原提示細胞として I-A<sup>b</sup>-CHO 細胞を用いた場合には IFN- $\gamma$  産生は誘導されるものの、IL-17F 産生は全く見られなかった。ELISA 法による解析でも同様の結果を得た。

また P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生には T-bet 非依存的な誘導機構が存在することをこれまでに明らかにしてきた。そこで、T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いて IL-17F 産生における T-bet の役割を検討した。その結果 T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞においても野生型と同程度の IL-17F を産生した。

#### D. 考察

IL-17F は IL-17 ファミリーに属し、活性化 T 細胞及び自然免疫担当細胞からホモダイマーまたは IL-17A とのヘテロダイマーとして分泌される。IL-17F ホモダイマーの作用として細胞傷害活性を増強することで腫瘍の増悪を防ぐこと、また最近の知見で細菌感染防御に関与することが報告されている分子である。

本研究の *in vitro* CTL 分化誘導実験系による解析から、IL-17F に対する中和抗体を添加することによって Peptide-25 刺激で活性化した樹状細胞による CD8<sup>+</sup> T 細胞からのグランザイム B 産生は部分的ではあるものの抗体の用量依存的に阻害された。また suboptimal 用量の Peptide-25 で刺激する際に rIL-17F を添加し培養した樹状細胞は CD8<sup>+</sup> T 細胞からのグランザイム B 産生を増強した。以上のことから、IL-17F には樹状細胞の機能的活性化を誘導する活性があることが示された。現在 IL-17F 欠損 P25 TCR-Tg マウスの作出を進めており、このマ

ウス由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いることで CD8<sup>+</sup> T 細胞の機能的活性化を誘導する樹状細胞の活性化における IL-17F の役割を確定させる予定である。

IL-17A を産生する Th17 細胞への分化は IFN- $\gamma$  によって阻害されることが知られている。Peptide-25 刺激の場合、IFN- $\gamma$  共存下に IL-17F 産生が誘導されること、また IL-17A 産生は全く見られないことから、Peptide-25 刺激で誘導される IL-17F 産生細胞は Th17 細胞とは異なる亜集団である可能性が考えられる。今後、IL-17F 産生細胞の characterization を行い、Th17 細胞との相同性に関して検討を行う予定である。

Peptide-25 刺激では IL-17F 産生が誘導されるのに対し、Th2 分化を誘導する APL 刺激では IL-17F 産生は誘導されないこと、I-A<sup>b</sup>-CHO を用いた解析から Th1 分化を誘導できる TCR からの活性化シグナルのみでは IL-17F 産生は誘導できないことから、IL-17F 産生には Th1 分化を誘導する TCR からの活性化シグナルに加え、副刺激分子間相互作用が必要であることが示された。今後、IL-17F 産生を誘導する副刺激分子の同定を進める予定である。

APL 刺激の際に IL-17F を添加してもグラナザイム B の産生は誘導できなかったことから①APL 刺激では樹状細胞に IL-17 受容体の発現を誘導できない可能性、②IL-17F の作用には他の共役因子が必要である可能性が示された。そこで、Peptide-25 及び APL 刺激後の樹状細胞の IL-17 受容体の発現を検討した結果、APL 刺激または Peptide-25 刺激、いずれの刺激でも同程度に IL-17 受容体が発現していたことから、IL-17F の作用には他の共役因子が必要である可能性が示された。今後樹状細胞に対する IL-17F の作用機序に関して検討を行う予定である。

## E. 結論

IL-17F が樹状細胞の活性化誘導能を有していることが明らかとなった。さらに①IL-17F 産生細胞は IFN- $\gamma$  産生細胞とは異なる細胞集団であること、③IL-17F の産生誘導には Th1 分化を誘導する TCR からの活

性化シグナルに加え、副刺激分子間相互作用が必要であることが明らかとなった。以上の結果より、IL-17F が CD8<sup>+</sup> T 細胞の機能的活性化を誘導する樹状細胞の活性化に必須の因子である可能性が示された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tsukamoto, Y., M. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. 2011. Immunostimulatory activity of major membrane protein II from *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Vaccine Immunol., 18: 235-242.

### 2. 学会発表

- 1) Tamura, T., and M. Makino. Peptide-25 of Ag85B induces Th1 differentiation in a T-bet- independent manner. 13<sup>th</sup> International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 6-10 September, 2011. Sapporo, Japan.
- 2) Maeda, Y., T. Tamura, M. Kai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Induction of intracellular killing of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells by a lipopeptide-mediated activation of T cells. 13<sup>th</sup> International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 6-10 September 2011. Sapporo, Japan.
- 3) Tsukamoto, Y., M. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. Activation of human naive T cells of both CD4 and CD8 subsets by *Mycobacterium tuberculosis* major membrane protein II. 13<sup>th</sup> International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 6-10 September 2011. Sapporo, Japan.
- 4) 田村敏生, 牧野正彦. 結核菌分泌蛋白由来 Peptide-25 による T-bet 非依存的 Th1 分化誘導機構の解析. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会 2011 年 11 月 千葉.

5) Immunostimulatory Activity of Major Membrane Protein II from *Mycobacterium tuberculosis*. Tsukamoto, Y., T. Tamura, and M. Makino. 第40回日本免疫学会総会・学術集会 2011年11月 千葉.

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23年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

結核疫学解析、結核の臨床研究

分担研究報告書

研究分担者

松本 智成

(大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター・部長)



厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）  
分担研究報告書

結核疫学解析、結核の臨床研究

研究分担者 松本 智成（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター・  
臨床研究部・部長）

研究要旨.

結核感染診断には、ツベルクリン反応(ツ反)が行われていたが、アジア諸国で接種されるBCG接種や非結核性抗酸菌症の影響を受けやすいという問題があった。従ってアジアにおいては、BCG接種や非結核性抗酸菌症の影響を受けない検査の開発普及が求められた。QuantiferON-TB 3 Generation (QFT-3G)は、QFT-2Gの後継診断試薬であり、QFT-2GとQFT-3Gの性能比較試験の結果、QFT-3Gの特異度はQFT-2Gと同等に高く、さらに QFT-3Gの感度はQFT-2Gより高いことが示されている。しかしながら、QFT-3Gでは、QFT-2Gと比較して判定保留が多いという報告がみられた。今回、当センター職員120人の同一職員からの血液検体におけるQFT2Gと3Gとの比較試験を行う。さらに、当該職員における過去のQFT-2G検査と今回のQFT-2Gの結果の比較を行う。2011年8月1日から9月30日まで大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター120名の職員に対して、QFT2Gならびに3Gを同時に採血し、その検査結果を比較した。過去にQFT2Gを測定した職員55名の前回と今回のQFT2Gの結果をWilcoxon符号付順位和検定にて比較した。QFT 2G vs. 3Gにおける同一被験者120名直接比較では、33名(27.5%)の結果が乖離し、統計学的に有意差が認められた。判定保留は2Gが13名に対して3Gが21名であった。この事により統計学上QFT2Gと3Gは全く別の検査であると判断でき、2Gの結果を3Gのそれに当てはめることができないことがわかった。経時的QFT2G測定被験者55名において5名が陽性から陰性化、4名が判定保留から陰性化した(total 16%)。このことより過去のQFTが陽性であっても、今回測定が陽性であるとは限らない。統計学上QFT2Gと3Gは全く別の検査であり、過去の2Gの結果を3Gとは比較できない。同じ2Gであっても、過去のQFTの結果は確実性に欠けるので、結核患者に暴露時は直後にQFTを測定し、陰性であれば、その数ヶ月後に再びQFTを測定し結核暴露を判断すべきである。

A. 研究目的

結核感染診断には、ツベルクリン反応(ツ反)が行われていたが、アジア諸国で接種されるBCG接種や非結核性抗酸菌症の影響を受けやすいという問題があった。従ってBCG接種や非結核性抗酸菌症の影響を受けない検査の開発普及がアジアにおける結核制圧の第一歩になる。

2006年1月1日にクオンティフェロンTB2G (QuantiferON-TB2G) が日本国内にて保険

収載された。この検査は、全血を結核菌特異的な蛋白 (ESAT-6およびCFP-10) で刺激し、結核菌特異的T細胞の産生するインターフェロンの産生量をみることで、結核感染を診断する検査である。BCGや非結核性抗酸菌感染の影響を受けず、感度89%、特異度98%と報告される。検査時には検体の温度管理を行う必要がある(採血から搬入までの時間10時間以内、搬送温度は摂氏17から

27度)。また、数時間から一両日で検査結果を出すことが出来るとされている。

さらに、その改良版として2010年4月1日にクオンティフェロン TB3G (QuantiFERON-TB3G) が保険収載された。このQFT-3Gは、QFT-2Gの後継診断試薬であり、正式名はQuantiFERON®-TB Gold In-Tubeと呼ばれる。QFT-3Gでは刺激抗原として、QFT-2Gと同じ結核菌抗原ESAT-6とCFP-10に加え、やはり結核菌特異抗原であるTB7.7が追加されている。また、あらかじめ刺激抗原が塗布された3組の専用採血管(陰性コントロール・結核菌抗原・陽性コントロール)により採血を行い、十分攪拌後37℃の保温器に入れることにより採血後直ちに培養を開始することが可能になる。あるいは、採血後室温保存条件であれば16時間以内の培養開始でも可能とされている。また、培養後も採血管は2℃から27℃の条件で3日間保存できる。このように、QFT-3Gでは現状のQFT-2G検査過程における血液培養の段階が大幅に改善される。QFT-2GとQFT-3Gの性能比較試験の結果、QFT-3Gの特異度はQFT-2Gと同等に高く、さらにQFT-3Gの感度はQFT-2Gより高いことが示されている。

しかしながら、QFT-3Gでは、QFT-2Gと比較して判定保留が多いという報告がみられた。そこで、今回、当センター職員120人における同一血液検体からQFT2Gと3Gとの比較試験を行うことを第一目標とする。

結核感染対策は、結核病床を保有する病院のみならず保有しない医療機関においても大切な問題である。その中でも看護師、医師、薬剤師を中心とした医療従事者は結核感染の機会が多い。前回の我々の研究において結核病棟勤務の医療従事者は、結核病棟勤務を経験した事の無い医療従事者と比較してQFT陽性数が少ないことが明らかとなった。今回、その結果が維持されているか否かを評価するために、さらには結核病棟外勤務者の結核菌暴露を結核病棟勤務とで比較評価して今後の結核病棟外勤務の感染対策に役立てる。今回、QFT-2GとQFT-3Gを同時に測定する事により、以前測定したQFT-2Gの結果と直接比較出来、さらに

QFT-3Gを測定する事により今後のQFT-3Gの結果と比較する橋渡し試験ともなる。

そこで、今回、当センター職員120人(結核病棟勤務60名、結核病棟外勤務60名)における同一被験者の血液検体からQFT2Gと3Gとの比較試験ならびにアンケート調査を行った。

## B. 研究方法

試験参加を希望する当センター職員120人(結核病棟勤務者60名、結核病棟外勤務者60名)に対して、同一日に、同一被験者からの血液をQFT2G用に4mlとQFT 3G用に3mlを採取した。採取された検体は、当センター検査科に運ばれ、測定のための検体処理を行い、測定は、それぞれの添付文章上の方法に従って測定した。

過去にQFT2Gを測定した職員55名の前回と今回のQFT2Gの結果をWilcoxon符号付順位和検定にて比較した。

さらに、今回参加した職員に対して、過去の結核治療に関するアンケートを行った。

倫理面への配慮

大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターの倫理委員会の承認を得た。職員でかつ、以前、QFT検査を行った者、ならびに結核病棟勤務者で本人の希望があり文章にて同意が得られた者を対象に行った。

## C. 研究結果

QFT 2 G vs. 3Gにおける同一被験者120名直接比較では、33名(27.5%)の結果が乖離し、統計学的に有意差が認められた。判定保留は2Gが13名に対して3Gが21名であった。この事により統計学上QFT2Gと3Gは全く別の検査であると判断でき2Gの結果を3Gに当てはめることができないことがわかった。経時的QFT2G測定被験者55名において5名が陽性から陰性化、4名が判定保留から陰性化した(total 16%)。また、結核加療を行った者のうち、今回のQFTが陽性者は、8名、判定保留者は、2名、陰性者は1名であることがアンケート調査にて判明した。

#### D. 考察

QFT 2G vs. 3Gにおける同一被験者120名直接比較で有為差が認められた。この事により統計学上QFT2Gと3Gは全く別の検査であると判断でき、2Gの結果を3Gに当てはめることができないことがわかった。

経時的QFT2G測定被験者55名において5名が陽性から陰性化、4名が判定保留から陰性化した(total 16%)こと、結核加療歴があっても陰性化していることより過去のQFTが陽性であっても、今回測定が陽性であるとは限らないことが明らかとなった。

QFTは、BCG接種や非結核性抗酸菌症の影響を受けにくい為に、アジアにおける結核感染有無の評価に期待がもたれている。過去のQFT測定の結果ならびに2Gと3Gの結果に互換性がないことが明らかになった事はアジアの結核対策において重要な知見を提供するものと判断する。

#### E. 結論

統計学上QFT2Gと3Gは全く別の検査であり、過去の2Gの結果を3Gと比較できない。同じ2Gであっても、過去のQFTの結果は確実性に欠けるので、結核患者に暴露時は直後にQFTを測定し、陰性であれば、その数ヶ月後に再びQFTを測定し結核暴露を判断すべきである。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tabuchi, T., T. Takatorige, Y. Hirayama, N. Nakata, S. Harihara, A. Shimouchi, K. Fujita, H. Yoshida, Y. Tamura, T. Nagai, T. Matsumoto, T. Takashima, and H. Ito. 2011. Tuberculosis infection among homeless persons and caregivers in a high-tuberculosis-prevalence area in Japan: a cross-sectional study. BMC Infectious Diseases, 11: 22

##### 2. 学会発表

- 1) 松本智成. Variable Number Tandem Repeats (VNTR) 法による結核の疫学. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会(感染症学会指導医教育指定講演) シンポジウム「基礎と臨床の融合」. 2011年 ザ・プリンス パークタワー・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23年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

結核病態に関する分子生物学的研究

分担研究報告書

研究分担者

松本 壮吉

(大阪市立大学・准教授)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）  
分担研究報告書

病態に関する分子生物学的研究

研究分担者 松本 壮吉（大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・准教授）  
研究協力者 仁木 満美子（大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・助教）  
研究協力者 小林 和夫（国立感染症研究所・免疫部・部長）

研究要旨

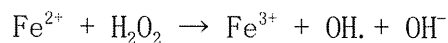
結核は鉄を増殖に必要とすることから、生体内における鉄の獲得と利用は、結核の発症と関連する。一方、過度の鉄は2価鉄からのフェントン反応により生じる活性酸素が生体に有害である。この問題点を解消するために、細胞内寄生性菌を含む多くの生物は ferritin superfamily protein という分子群による鉄代謝メカニズムを有している。これらの分子はそのフェロキシダーゼ活性により  $Fe^{2+}$  を  $Fe^{3+}$  に変換し、分子内に鉄イオンを内包する形で貯蔵している。本研究では、遅発育性や休眠現象に関係する抗酸菌のヒストン様蛋白質 Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) に ferritin superfamily protein 様の活性があること、すなわちフェントン反応を阻害することでヒドロキシラジカルの産生を抑制し、直接  $Fe^{3+}$  と結合して鉄の貯蔵に関係することを明らかとした。以上の結果から、結核菌の病原性に関わる新しい鉄代謝メカニズムが判明した。

A. 研究目的

結核菌は細胞内増殖を行う際にマイコバクチン（宿主から鉄を奪う鉄キレーター）が必要であることや、過剰の鉄採取が、結核の発症と相関があることが知られる。このように発症と関係している結核菌の鉄の獲得や代謝を理解することは、アジア地区を始めとする結核症の効率的な対策の構築に寄与する可能性がある。

鉄は生命にとって必須元素であり、2価および3価のイオンとして存在することが可能である。この性質から種々の酸化還元反応を触媒する酵素の活性中心として働くことが知られている。一方で、過剰な鉄の存在は細胞にとって有害であるため、生体内での鉄イオンレベルは厳密に制御されている。なかでも2価鉄 ( $Fe^{2+}$ ) は活性酸素種 (ROS) および活性窒素種 (RNS) の産生に関与し、それによりDNAや蛋白質などの生体構成分子を傷害することが知られている。活性酸素のなかでも最も生体に有害とされ

るのがヒドロキシルラジカルであり、鉄存在下で酵素非依存的なフェントン反応により産生される。



生体はこういったラジカルに対する防御機構を備えており、なかでも ferritin superfamily protein に属する蛋白質はそのフェロキシダーゼ活性により  $Fe^{2+}$  を  $Fe^{3+}$  に変換して貯蔵する中心的な役割を果たしている。細菌の ferritin superfamily protein のうち、ヘムを含むものは ferritin-like protein あるいは bacterioferritin と呼ばれ、含まないものは miniferritin もしくは DNA-binding protein in starved cells (Dps) と呼ばれる。

DNAは最も重要な生体構成分子の一つであるため、結核菌のような細胞内寄生菌は宿主細胞が産生する活性酸素から受けるDNAの傷害を回避する必要がある。しかしながら結核菌にはDpsを有しておらず、未知の分子がDNAの保護を行っていると考えられる。

てきた。抗酸菌特異的ヒストン様蛋白質であり、染色体の安定化およびストレス防御に関与するとの報告がなされている転写因子であるMDP1に着目し、この分子が抗酸菌の鉄貯蔵および解毒について何らかの役割を担うかについて解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. Biacore を用いた表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析

ウシ型結核菌弱毒株 *Mycobacterium bovis* BCG 型 MDP1 (BCG-MDP1) と金属の相互作用について Biacore (GE) を用いて解析を行った。反応はすべて 150 mM NaCl、1% BSA、3 mM EDTA および 0.005% surfactant P20 を含む 10 mM HEPES buffer (HBSEP buffer、pH 7.4) 中で行われた。BCG-MDP1 はアミンカップリングキットを用いて CM5 センサーチップ (GE) に固定化した。クエン酸鉄アンモニウム、CuSO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、MnCl<sub>2</sub>、ZnSO<sub>4</sub> および FeSO<sub>4</sub> は最終濃度 1 mM になるように HBSEP buffer に溶解した。

### 2. 放射性同位体 <sup>55</sup>Fe を用いた鉄結合試験

BCG-MDP1 および結核菌型 MDP1 (Mtb-MDP1) は 5 μg/ml になるようにホウ酸緩衝液 (pH 9.2) で調製し、96 穴 ELISA プレートに固相化した。プレートを PBS で洗浄したのち、1 ウェルあたり 1 μCi の <sup>55</sup>FeCl<sub>3</sub>/PBS を添加し、30 分静置した。その後プレートを PBS/0.05% tween 20 で洗浄し、1% SDS を含む 10 mM クエン酸アンモニウムを加え懸濁した。各ウェルの放射線量は液体シンチレーション計数器 (Aloka) で計測した。

### 3. フェロキシダーゼ活性測定

MDP1 が O<sub>2</sub> を酸化剤として Fe<sup>2+</sup> を Fe<sup>3+</sup> に変換する活性を有するかを測定した。MDP1 および FeSO<sub>4</sub> は最終濃度がそれぞれ 1.4 mM および 0.4 mM (pH 3.5) になるように 150 mM NaCl 含有 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) で調製した。305 nm での UV 吸光度は分光光度計 U-3000 (HITACHI) を用いて測定した。

### 4. ヒドロキシラジカル測定

フェントン反応により産生されたヒドロキシラジカルは L-012 を用いて定量した。まず、BCG-MDP1 および Mtb-MDP1 は 50 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液中で 25-50 μM FeSO<sub>4</sub> および 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と混合し、L-012 を添加した。その後、CHL 強度を光度計 BLR-201 (Aloka) で測定した。CuSO<sub>4</sub> および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加した際のヒドロキシラジカル産生も同様に行った。

### 5. MDP1 による DNA 酸化阻害実験

酸化ストレスおよび酵素分解による DNA 分解を MDP1 が阻害するか解析を行った。pUC19 プラスミド DNA は MDP1 と混合し、25-50 μM FeSO<sub>4</sub> および 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、もしくは 50-100 μg/ml の DNase I (Sigma) と混合し、室温で 30 分間静置した。その後 1% SDS で反応を停止させたのち Pronase K で蛋白質を分解し、サンプル中の DNA をアガロースゲル電気泳動で観察した。

倫理面への配慮 本研究は該当しない。

## C. 研究結果

1. MDP1 は Fe<sup>2+</sup> には結合せず、Fe<sup>3+</sup> に結合する。

MDP1 は DNA や蛋白質への結合能を有することから、金属イオンへの結合能についても有するかを検討した。その結果、Fe<sup>3+</sup> を添加したときのみ SPR の上昇が認められた。一方で、を添加した際には SPR が徐々に減少するのがわかった。Cu<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> ではこのような現象は認められなかった。この変化が蛋白質-金属複合体の形成時に蛋白質の2次構造が変化することに由来するものではないことを確認するために、放射性同位体を用いた結合実験を行った。その結果、<sup>55</sup>Fe は BSA を固相化した ELISA プレートには結合しないが、MDP1 を固相化したプレートには結合することがわかった。ところが、アスコルビン酸処理により Fe<sup>3+</sup> を Fe<sup>2+</sup> に変換したものでは MDP1 との結合が確認されなかった。

2. MDP1 はフェロキシダーゼ活性を有する。

SPR 解析から、MDP1 は  $\text{Fe}^{2+}$  とは結合しないものの、その数値の減少から  $\text{Fe}^{2+}$  存在下で何らかの反応が起こっている可能性が示唆された。MDP1 にはフェロキシダーゼモチーフは存在しないことがわかっているが、フェロキシダーゼとしての生物活性を有している可能性があるか検討を行った。鉄イオンは  $\text{Fe}^{2+}$  から  $\text{Fe}^{3+}$  に変換されるときに 2 核鉄錯体を形成するため、波長の変化を 305 nm において観察した。その結果、 $\text{Fe}^{2+}$  を含む緩衝液に MDP1 を添加することにより、急激な波長の変化が認められた。

3. MDP1 はフェントン反応を阻害する。

フェロキシダーゼは  $\text{Fe}^{2+}$  を  $\text{Fe}^{3+}$  に変換することでフェントン反応を阻害することが知られている。そこで、MDP1 も同様の活性を有するか検討を行った。フェントン反応により生じたヒドロキシラジカルと 8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3, 4-d]pyridazine-1, 4-(2H, 3H) dione (L-012) が反応することによって生じる化学発光を測定したところ、MDP1 添加によりヒドロキシラジカルの産生が顕著に抑制されることがわかった。この現象が MDP1 のフェロキシダーゼ活性によるものであることを確認するために、 $\text{CuSO}_4$  および  $\text{H}_2\text{O}_2$  によるヒドロキシラジカル産生に対する影響を調べたところ、MDP1 による抑制は認められなかった。

4. MDP1 は活性酸素および酵素による DNA の分解を阻害する。

MDP1 により DNA の分解が阻害されるかについて、同様に DNA 結合蛋白質であるヒストン H1 とその作用を比較した。その結果、MDP1 は DNase1 による DNA 分解も阻害するが、フェントン反応により生じたヒドロキシラジカルによる DNA 分解も同様に阻害することがわかった。これに対し、ヒストン H1 は DNase1 による分解は阻害するものの、ヒドロキシラジカルによる分解は MDP1 ほど阻害しなかった。以上の結果から、MDP1 は DNA と結合して物理的に酵素による分解

を阻害すると同時に、フェントン反応を阻害することでヒドロキシラジカルによる DNA 分解を阻害する作用を有することが明らかになった。

#### D. 考察

生体内において鉄は諸刃の剣であり、必須元素であると同時に生体傷害性を有している。そのため、生物は体内での鉄濃度恒常性を維持するため様々な鉄無毒化機構および鉄貯蔵機構を有している。本研究では抗酸菌特異的ヒストン様蛋白質である MDP1 が ferritin-superfamily protein 様の活性を有し、フェントン反応で産生されるヒドロキシラジカルによる DNA の分解を阻害することを示した。

MDP1 は抗酸菌構成分子のうち大きな割合を示す蛋白質であり、DNA やラミニン、グリコサミノグリカンなどと結合し、遺伝子発現や宿主細胞への接着、細胞壁の安定化などに関与することが報告されている。MDP1 は系統発生的には ferritin superfamily protein とは異なる分子であり、それぞれの分子による鉄貯蔵メカニズムは異なっている。MDP1 は  $\text{Fe}^{3+}$  と直接結合するが、ferritin は分子中のフェロキシダーゼ活性中心において  $\text{Fe}^{2+}$  を酸化したのち貯蔵することが明らかになっている。そのため、MDP1 はフェロキシダーゼの力を借りることなく分子に鉄を貯蔵することができる。本研究は我々が知る限り ferritin superfamily protein 以外で鉄を酸化・貯蔵できる分子の存在を初めて明らかにしたものである。

#### E. 結論

遅発育性や休眠現象に関わる結核菌のヒストン様蛋白質に、鉄の偽害性を低減するとともに貯蔵する活性があること明らかにした。鉄代謝は、結核の発症と密接に関わることから、アジア地区を含め新しい結核対策に資する分子メカニズム情報と考えられる。

#### G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takatsuka, M., M. Osada-Oka, E. F. Satoh, K. Kitadokoro, Y. Nishiuchi, M. Niki, M. Inoue, K. Iwai, T. Arakawa, Y. Shimoji, H. Ogura, K. Kobayashi, A. Rambukkana, and S. Matsumoto. 2011. A Histone-Like Protein of Mycobacteria Possesses Ferritin Superfamily Protein-Like Activity and Protects against DNA Damage by Fenton Reaction. PLoS. One, 6: e20985.
- 2) Ozeki, Y., Y. Hirayama, T. Takii, S. Yamamoto, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2011. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin. Vaccine, 29: 6881-6887.

2. 学会発表

- 1) 松本壮吉. 潜在性結核の分子機構と結核制圧研究. 第 28 回日本医学会総会 2011 年 4 月 東京
- 2) 立石善隆, 北田清悟, 前倉亮治, 松本壮吉. 結核血清診断の進歩. 第 86 回日本結核病学会総会 2011 年 6 月 東京
- 3) 森田康裕, 松本壮吉, 小林和夫, 木下タロウ. マンナン生合成の異常は結核菌細胞壁のバリア機能を弱め、結核菌を  $\beta$ ラクタム系薬剤感受性にする. 第 86 回日本結核病学会総会 2011 年 6 月 東京
- 4) 仁木誠, 吉村満美子, 松本壮吉. 抗酸菌の薬剤感受性におけるヒストン様蛋白質の機能解析. 第 86 回日本結核病学会総会 2011 年 6 月 東京
- 5) 西内由紀子, 松本壮吉, 立石善隆, 北田清悟, 前倉亮治. 環境から分離した *Mycobacterium avium* のバイオフィルム. 第 86 回日本結核病学会総会 2011 年 6 月 東京
- 6) Sohkichi Matsumoto. HOST FACTORS HAVING AN IMPACT ON THE GROWTH OF

*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*.

- International Union Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 7) Yukiko Nishiuchi, Sohkichi Matsumoto, Yoshitaka Tateishi, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu. BIOFILM FORMATION OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* ISOLATED FROM LIVING ENVIRONMENT. International Union Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
  - 8) Jun-Ichi Maeyama, Sumiko Iho, Mayuko Osada-Oka, Sohkichi Matsumoto, Masanori Isaka, Sabuso Yamamoto. IMMUNE RESPONSES IN GUINEA PIG ADMINISTERED WITH ANTI-TUBERCULOSIS BOOSTER VACCINE CANDIDATE CONSISTING OF RECOMBINANT PROTEINS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* AND ADJUVANTS. International Union Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
  - 9) Yuriko Ozeki, Kazuo Kobayashi, Sohkichi Matsumoto. THE EFFICACY OF BCG MAY BE A TIME-DEPENDENT AFTER THE VACCINATION AND AGE-INDEPENDENT IN MICE. International Union Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
  - 10) 岡真優子, 松本壮吉, 岩尾洋. 結核菌感染による肺肉芽形成と低酸素応答転写因子の活性化. 第 15 回酸素ダイナミクス研究会 2011 年 9 月 佐賀
  - 11) 松本壮吉, 小林和夫. 結核菌の休眠現象と潜在性結核. 第 84 回日本生化学会 2011 年 9 月 京都
  - 12) 松本壮吉. 結核菌がゆっくりと長く生きるメカニズムと結核の制圧を目指した研究. 第 52 回日本熱帯医学会大会・第 26 回日本国際保健医療学会学術大会 2011 年 11 月 東京
  - 13) 松本壮吉. 結核菌の増殖制御機構と結



核制圧戦略. 第7回霊長類医科学フォーラム 2011年11月 茨城

- 14) Yuriko Ozeki, Yukio Hirayama, Osada-Oka mayuko, Takemasa Takii, Saburo Yamamoto, Kazuo Kobayashi, and Sohkichi Matsumoto. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. 第64回日本細菌学会関西支部総会 2011年11月 大阪

- 15) 岡真優子, 合田亘人, 曾我朋義, 尾関百合子, 小林和夫, 松本壮吉, 岩尾洋. マクロファージ内結核菌増殖における宿主グルコース代謝の重要性. 第64回日本細菌学会関西支部総会 2011年11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23年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

抗酸菌脂質の免疫認識の分子機序

分担研究報告書

研究分担者

杉田 昌彦

(京都大学ウイルス研究所・教授)

## 抗酸菌脂質の免疫認識の分子機序

研究分担者 杉田 昌彦（京都大学・ウイルス研究所・教授）

### 研究要旨

抗酸菌細胞壁には、抗酸菌に固有の脂質群が存在する。近年、これらの脂質を認識する宿主免疫経路の存在が明らかとなり、それを利用した診断法や感染制御法が模索されている。しかし、感染個体において、抗酸菌がどのような脂質を産生し、これらを標的とした宿主免疫経路が病態形成や制御にどのように関わっているのかに、十分な知見は得られていない。体内増殖結核菌は宿主グルコースを基質としたミコール酸転移反応により、グルコースモノミコール酸（GMM）を産生する。そしてこのGMMを特異的に認識するCD1b拘束性T細胞の存在が知られている。そこで本研究では、BCG接種モルモット皮膚にGMMを接種し、そこに誘導される免疫応答の評価を行った。その結果、GMMに対する遅延型アレルギー応答の存在が初めて明らかになった。さらにこの免疫反応はTH1型サイトカイン産生に高度にシフトしたメモリー応答であることから、結核防御の指標としての意義が示唆された。加えて、GMMが結核に対する脂質サブユニットワクチンとして活用される可能性があり、アジア・アフリカ地域を含めたグローバルな結核制御に貢献することが考えられる。

### A. 研究目的

タンパク質抗原を標的としたMHCクラスI拘束性CD8陽性キラーT細胞とMHCクラスII拘束性CD4陽性ヘルパーT細胞は、獲得免疫機構の中心的なエフェクター細胞である。結核を含め、多くの病原体に対する生体防御がこの経路を介して行われ、さらにこの経路の賦活化を目指したワクチンの開発も進められている。一方、最近の研究から、結核菌脂質を標的とした新しい獲得免疫機構の存在が明らかとなってきた。ヒトグループ1CD1分子（CD1a、CD1b、CD1c）は、結核菌の宿主細胞である樹状細胞や活性化マクロファージにおいて発現し、結核菌脂質抗原を結合する。これによって活性化されたグループ1CD1拘束性T細胞群は、感染細胞のアポトーシス誘導や殺菌物質、インターフェロン $\gamma$ （IFN- $\gamma$ ）の産生を介して結核防御に大きな役割を果たしていることがin vitroの実験結果から示唆されている。

しかし、実験動物として頻用されるマウスやラットはグループ1CD1に相当する分子を欠如しているため、結核菌脂質抗原を標的としたT細胞応答のin vivoでの解析研究はほとんど進んでいない。

このような背景から、分担研究者の杉田は、モルモットやアカゲザルを用いた結核菌脂質免疫応答の研究を開始し、その基盤構築を行ってきた。その結果、生体内増殖結核菌が宿主由来グルコースを基質として産生する脂質分子（グルコースモノミコール酸 glucose monomycolate; GMM）を同定し、それに対する免疫応答を検証する実験システムを確立した。

そこで本課題では、BCG感染モルモット皮膚にGMMを接種し、そこに誘導されるT細胞応答を解析することにより、結核菌脂質特異的T細胞応答の特質を明らかにすることを目的とする。

## B. 研究方法

GMM の精製 *Mycobacterium avium* (serovar 4) を Middlebrook ADC enrichment 添加 7H9 培地にて培養し、菌体を回収した。乾燥菌体をクロロホルム：メタノール (2:1)、クロロホルム：メタノール (1:1)、クロロホルム：メタノール (1:2) に順次懸濁し上清を回収した。これらの上清をまとめて窒素ガス下で乾固し、新たにクロロホルム：メタノール (2:1) に溶解したのち、さらに氷冷アセトン添加により沈殿する脂質分画を回収した。得られた脂質分画をクロロホルム/メタノール/アセトン/酢酸 (90:10:10:1, v/v/v/v) を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィー (TLC) により展開し、GMM に対応したスポットから脂質を抽出した。調製した GMM サンプルをマススペクトロメトリーにて解析し、GMM に相当するシグナルを確認した。また GMM サンプル中のタンパク質の混入は、SDS-PAGE 銀染色ならびに Bradford 法により検出されなかった。

GMM リポソームの調製 クロロホルムに溶解した GMM にホスファチジルコリン、コレステロール、ステアリン酸付加オクタアルギニンを加え、溶媒を蒸発させることにより脂質フィルムを形成した。さらに脂質フィルムに蒸留水を加えたのち、ソニケーション操作によりリポソーム形成を促進した。GMM のリポソームへの封入率はおおよそ 60% から 85% であった。リポソームの直径と電位は、それぞれ 120 nm、40 mV であった。

モルモットの感染実験および皮内テスト モルモットは 3 週齢のメスハートレーを用い、SPF 環境下で飼育した。BCG 東京 172 株は 7H9 培地中で培養し、増殖中期に回収した (生存率 70% 以上)。 $5 \times 10^7$  CFU/animal の BCG をモルモット皮内に接種し、感染を成立させた。

感染 6 週後にモルモット左側腹部皮膚を脱毛し、GMM リポソーム (5  $\mu$ g) ならびに相当量の空リポソームを皮内接種した。また比較対象として PPD (0.5  $\mu$ g) を接種した。接種後、皮膚の硬結径を経時的に計測

した。すべての動物実験は機関の承認のもと、ガイドラインに従って行った。

組織学的解析 抗原接種部位の皮膚を採取し、4%パラホルムアルデヒドにより固定したのちパラフィン封埋を行った。組織切片をヘマトキシリンエオジン染色し、顕微鏡下で観察した。また一部の皮膚サンプルに対して OCT コンパウンドを用いて凍結ブロックを作製し凍結切片を準備した。蛍光染色において、抗モルモット CD8 抗体 (CT6)、抗モルモットヘルパー/インデューサー T 細胞抗体 (CT7) を使用し、2 次抗体として FITC 標識ロバ抗マウス IgG 抗体を用いた。蛍光染色を施した皮膚切片はマウントメディアウムに封埋し、蛍光顕微鏡下で観察した。陽性細胞数は、無作為に選んだ 3 視野において計測した。

サイトカイン mRNA の発現解析 BCG 感染モルモットより鼠径リンパ節を採取した。リンパ節細胞を 1  $\mu$ g/ml の GMM リポソーム存在下あるいは非存在下で刺激した。また一部の実験においては、抗モルモット CD1 抗体 (CD1F2/6B5) あるいはネガティブコントロール抗体 (P3) を 10  $\mu$ g/ml の最終濃度で添加した。培養 18 時間後に細胞を回収し、RNA を単離して常法に従い RT-PCR を行った。使用したプライマーは下記の通りである。IFN- $\gamma$  センスプライマー 5'-CTA GCT ACT ACT GCC AGT CAA GAT-3'、IFN- $\gamma$  アンチセンスプライマー 5'-GCT CTG AAA CAG CAT CTG AGT CCT-3'、TNF- $\alpha$  センスプライマー 5'-CCA TGA GCA CAG AAA GCA TGA TCC G-3'、TNF- $\alpha$  アンチセンスプライマー 5'-CTC ACA GGG CAA TGA CCC CAA AGT A-3'、IL-5 センスプライマー 5'-CCA TGA GGG TGC TTC TGC AGT TGG G-3'、IL-5 アンチセンスプライマー 5'-CTC AGC CTT CAA TTG TCC ATT CCG T-3'、IL-10 センスプライマー 5'-GGC ACG AAC ACC CAG TCT GA-3'、IL-10 アンチセンスプライマー 5'-TCA CCT GCT CCA CTG CCT TG-3'。PCR 条件は 94°C 1 分、60°C (IL-5 のみ 63°C) 1 分、72°C 1 分を 35 サイクルで、最後に 72°C 10 分の操作を加えた。PCR 産物を 1.2% アガロースゲル上で泳動し、エチジウムブロマイドを用いて核酸染色を行った。