

日生研おより

第67巻 第2号(通巻619号) 2021年(令和3年)4月

挨拶・巻頭言

多種多様な「多様性」を考える
.....山手丈至(2)

レビュー

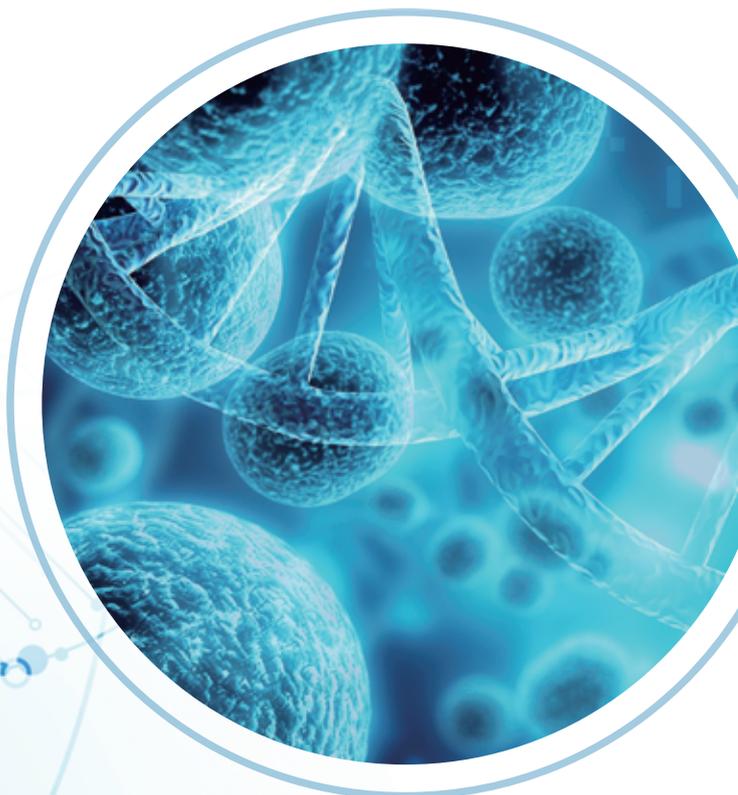
新規ワクチンデザイン
—Bacterial Ghost について—
.....上野晃聖(3)

「結核診断—最近の細胞性免疫機序に
基づく診断法—」
.....古賀早織(8)

おしらせ

訃報.....(12)

編集後記.....(12)



多種多様な「多様性」を考える

山手丈至

「多様性」は、この地球の姿そのものとみなすことができます。生物のみならず社会の営みにおいても基本的な概念であると考えています。

20 数年前にカナダ国ゲルフ大学オンタリオ獣医科大学に留学した際に、大学敷地内に保育所があることに驚きました。男女共同参画基本計画のもと、今や日本でも、大学や企業に保育所を設けることは普通になりつつありますが、子育てをしながら学び・働くことが日本ではまだまだであると感じています。マイノリティと称される LGBT (あるいは SOGI) の人々に対する意識も、現在は、国際社会においては当然の権利として確立されています。大学院で指導したインドネシアからの元留学生の誘いで、学会を兼ねてジャカルタ郊外にあるボゴール農科大学を数回訪問したことがあります。しばしば耳にした言葉が「Unity in diversity」です。私の好きな言葉です。インドネシアは世界最大のムスリム人口を有しますが、仏教、キリスト教など多宗教であり、かつ約 300 の民族が暮らしています。学生たちもそれぞれの宗教・民族色に合わせた生活をし、違和感なく社会が受け入れています。それはパンチャシラのイデオロギーに基づいています。「Unity」という言葉に限れば、今年の 1 月アメリカ第 46 代大統領に就任したジョー・バイデン氏はその式典での挨拶で unity (結束) を多用し、分断が進んだアメリカ社会が抱えるさまざまな課題に対して、国民がひとつになることで共に前に向かって歩む強い姿勢を示しています。また、閣僚の半分が女性であり、トランスジェンダーの人々の米軍入隊を禁じた措置を撤回しています。国を問わず老若男女、すべての人々が「息苦しくない生活を営むことのできる多様性のあるグローバル社会」が求められています。

そのような社会の構築とともに「Biodiversity」の視点も重要です。地球上の動物、植物、微生物などのいかなる生命体も、それぞれが相互に複雑に係わり合うことで生きているとの概念です。すなわち、人類もその一部であり、自分一人、ただ一種だけで生きていくことはできません。未だ終息をみないこの新型コロナウイルス感染症、それに対するワクチン接種により、遺伝学的な多型により感受性や免疫応答性の違いが生じ、ポストコロナ時代には、今とは異なる多種多様な「生老病死」の世界が来るかもしれません。2010 年に発出された「愛知目標」の達成に向けて、あらゆる事業者が生物多様性に与える影響を最小限にとどめる方策を検討しています。これまでの学問領域である工学、農学、理学、文学、経済学などを基幹とし、それぞれの領域を横断的に包括し、深化させる「分野融合型」の学際的領域の研究が進み、特に、ここ数年は DX を含めたより多様性のある教育・研究が求められています。SDGs17 の目標にある持続可能な社会の構築に向けては、グリーンエネルギーの開発、環境負荷の低減や環境リスクの管理などが重要になります。すなわち、脱炭素社会を実現するための科学技術イノベーションを構築する土壌には「多様性」の意識が必須であり、分野融合型の新たな学際領域は、その醸成に寄与するものと信じています。

田舎育ちの私は、身近なところに多くの生き物が棲息し、野山を駆け回っていました。終戦後の社会情勢が未だ厳しい時代に育ちましたが、身なりや生活状態で人を判断してはいけないことを親から学びました。「Nature」を重んじ、「多文化主義政策」を世界で初めて導入した多民族国家であるカナダでそれを体現しました。生物製剤は、人と動物の持続可能な共生社会に向けて、地球に優しい人類の産出物であり、その開発は、この「多様性」という概念に基づいた科学的な常套手段であると考えています。

(評議員)

新規ワクチンデザイン—Bacterial Ghost について—

上野 晃 聖

1. はじめに

現在、我が国では人体用、動物用ワクチンとして弱毒生ワクチン、不活化ワクチン、遺伝子組換え技術に応用したワクチン、コンポーネントワクチン及びトキシイドワクチンが用いられている。いずれのワクチンも免疫原性を高めると、それに伴う副反応として発熱や局所反応も高まり、安全性がトレードオフされる傾向になっていることから、免疫原性及び安全性の双方がバランスよく、更に経済性の高いワクチンの開発が求められている。

本稿では免疫原性及び安全性の双方が高いワクチンの開発につながる可能性がある新しいプラットフォームとしての Bacterial Ghost (以下、BG と略す。) について紹介したい。

2. BG とは

Ghost (ゴースト) とは主に核、細胞質の中身が失われた細胞変性物を指し、幽霊細胞、形骸細胞を意味する。なかでも BG とは細胞内成分を欠いたグラム陰性菌の菌体外皮¹⁾を指し、一般的には大腸菌を宿主とする DNA バクテリオファージ ϕ X174 (PhiX174)

の遺伝子 E²⁾ から発現する 91 アミノ酸の宿主細胞溶解酵素を用いてグラム陰性菌を溶菌させて作製する [14]。1991 年に Szostak らにより BG 作製技術が確立されて以降、その作製の容易さから様々なグラム陰性菌が各種動物に使われ (表 1)、様々な用途が考案されている。

3. BG の作製方法

一般的に BG は次に示す 3 つの段階を経て作製される [6]。

- ① 温度感受性リプレッサーの支配下に置かれるよう PhiX174 の遺伝子 E を組み込んだプラスミドを作製する。
- ② ①で作製したプラスミドを用い、対象となるグラム陰性菌を形質転換する。
- ③ 培養温度を 42℃ にあげ (温度シフト)、形質転換によって導入した E 遺伝子からリプレッサーを外して、溶菌酵素を発現させ、対象菌を溶菌する。

グラム陰性菌内部で PhiX174 の遺伝子 E から発現した宿主細胞溶解酵素は、菌の内膜と外膜とを融合させ、細菌内部と外部を繋げるトンネルを形成す

表 1 BG 化及びその有効性が確認済みのグラム陰性菌 [2]

細菌名	モデル動物
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	豚
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Kpn-3	
<i>Brucella suis</i>	マウス
<i>Pasteurella multocida</i>	牛、マウス、ウサギ
<i>Mannheimia haemolytica</i>	
<i>Escherichia coli</i> O78 : K80	鶏
<i>Salmonella</i> Enteritidis	
<i>Salmonella</i> Gallinarum	
<i>Salmonella</i> Typhimurium	
<i>Helicobacter pylori</i>	マウス
<i>Escherichia coli</i> O157 : H7 BG	
<i>Vibrio cholerae</i>	
<i>Edwardsiella tarda</i>	魚

る。トンネル形成後、細菌内部と外部の浸透圧差により、細菌の内容物が外部へ流出し、細菌は生命活動が停止、すなわち不活化され、BG となる (図 1)。PhiX174 の遺伝子 E を 42°C で結合が外れるリプレッサーの支配下に置くことで、新たなタンパク質発現を誘導することなく、培養液の温度調整のみで遺伝子 E を発現させることができるのがこの方法の利点である。

4. ワクチン抗原としての BG

抗原としてグラム陰性菌を含む従来の不活化ワクチンに対し、BG 法により不活化したワクチンは①免疫誘導能、②投与経路の柔軟性、③タンパク質工学の応用性及び④ワクチン製造コストの 4 点で優位性を示す可能性が示されている。それらを以下に順に述べる。

4.1. 免疫誘導能

BG はホルマリン等を用いた従来の不活化処理とは異なり、化学的処置を経ないことから抗原をより自然な形で提供でき、結果として高い免疫誘導能を示す [9]。動物用ワクチンではもっぱら安価かつ強力な不活化作用を持つホルマリンが広く不活化剤として用いられている。しかし、その不活化機序は、ホルマリンに含まれるホルムアルデヒドがタンパク質のアミノ基に作用してメチレン架橋を形成するというものであるため [1]、架橋により自然免疫の誘導に有効な病原体関連分子パターン (PAMPs³⁾) や獲得免疫の誘導に有効な抗原タンパク質の立体構造が変化し、本来のタンパク質が持つ免疫誘導能を低下させるばかりか、新たな抗原が生じて意図しない

免疫応答を誘導する可能性がある。これに対し、BG の不活化機序は 42°C の加温処理のみであり、この温度条件による PAMPs や抗原タンパク質の立体構造への影響は小さいと考えられる。それゆえ BG は、生体内で生菌と同等の自然免疫、獲得免疫を誘導することが期待される。コンポーネントワクチン、ペプチドワクチンを含め従来の不活化抗原は、投与抗原量の節約、免疫増強の観点からアジュバントを添加することが少なからずあったが、BG はアジュバントを添加することなく高い免疫誘導能を示すことが報告されている [9]。

4.2. 投与経路

BG は菌の構造が自然に近い形で保たれているため一般的な不活化抗原の投与とは異なり、経口・経鼻接種でも高い免疫誘導能を示すことが確認されている [10]。現在最も多く使用されている不活化ワクチンの投与経路である筋肉内接種は、全身性の免疫応答を誘導することで病原体の体内拡散を防いで排除を容易にし、病態の増悪化を抑制できるものの、多くの病原体の初発感染部位である粘膜面への免疫誘導能が低いため、病原体の侵入・感染阻止能は低い。これに対し、一部の生ワクチンの投与経路である経口・経鼻接種は、全身性の免疫応答に加えて呼吸器・消化器粘膜面への免疫誘導能も高いことが知られている [17]。しかし、2020 年現在、我が国では経口・経鼻接種が可能な動物用不活化ワクチンは上市されていない。これは、従来の不活化抗原では十分な粘膜免疫が誘導されないこと、粘膜免疫を誘導する経済的なアジュバントが上市されていないこと等が理由として考えられる。一方 BG は上で述べた通り、不活化抗原でありながら生菌と同等の自然

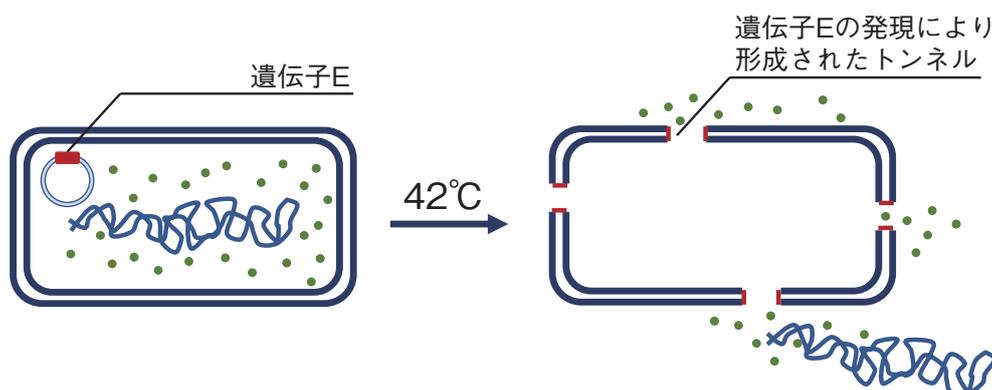


図 1 BG 化のイメージ

免疫系を惹起することが知られており、BG化した *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) を噴霧接種した豚は、APP 攻撃試験において臨床症状を示さなかった。気管支肺胞洗浄液中の抗 APP IgA、IgM 及び IgG 抗体価が非接種群と比較して有意に高い値を示したことがその理由と推察されている [4]。加えて、鶏を用いた試験では、*Salmonella enterica* serovar Gallinarum (SG) の BG を経口投与した群は、SG 攻撃試験において非接種対照群と比較して死亡率が低下し、病理学的にも腎臓及び脾臓の病変スコアが低下する傾向を示したことが確認されている [16]。

4.3. タンパク質工学の応用

BG は任意の外来性抗原を発現させるプラットフォームとしてタンパク質工学的に優れている。近年、遺伝情報を持たない安全な抗原であるウイルス様粒子 (VLP) に様々な外来性抗原を発現させ、外来性抗原を発現させるためのプラットフォームとして VLP を利用する研究結果が報告されている。しかし、VLP の“ウイルス様”という構造上の制約から、20~30 アミノ酸以上のペプチドの発現は困難とされる。そのため、外来性抗原として使用可能な B 細胞エピトープは一次構造エピトープに限られたものになり、複雑な立体構造によって形成されるエピトープについては外来性抗原として用いることは出来ないと考えられている [11]。これに対し BG は、VLP 同様、遺伝情報を持たない安全な抗原であることに加え、“グラム陰性菌そのもの”を不活化したものであるため、VLP では発現できない立体構造エピトープを形成し得る 600 アミノ酸以上のポリペプチドを外来性抗原として発現できる [2] [15]。加えて、外来性抗原を特定のアンカー配列やシグナル配列と融合発現させることで、内膜・ペリプラズム・外膜に局在化できる等、外来性抗原の発現可能な場所が多い点も特徴的である。これらのことから、BG はタンパク質工学を応用しやすい優れたプラットフォームである [9]。

4.4. ワクチン製造コスト

BG を抗原として不活化ワクチンを製造する場合、実製造で必要となる追加処理を踏まえても抗原不活化に要する製造ステップが温度シフトだけと時間的

にも短く、製剤からアジュバントを除ける可能性があるだけでなく、凍結乾燥後の BG は常温での長期保存が可能でもあることから、総じて製造コストを低く抑え得ると考えられている [8, 9]。

4.4.1. 抗原不活化に要する時間の短縮

実験室スケールでは PhiX174 の遺伝子 E によって発現する溶菌酵素による不活化処理がうまく行っても、製造レベルでは全ての細菌が不活化されない可能性がある。生きた菌を残さないため、実製造では追加処理が必要となる [9]。温度シフト処理で生残した菌が存在する場合でも、その後の凍結乾燥の過程で全て死滅することの報告もある。しかし、GMP の観点から実製造においては凍結乾燥前の原液の時点で全ての細菌が完全に不活化されている必要があることから、追加処理として DNA アルキル化剤、たとえば β -プロピオラクトン (BPL) の添加等による細菌内の残存 DNA 分解処理が求められる。BPL の添加については、Langemann ら及び Hjelm らにより、溶菌酵素発現後、任意の 60 分の間に 2 回 BPL (0.01%) を添加することで凍結乾燥前に全ての細菌が不活化されることが確認されている [5, 9]。実験室スケールではあるものの Hjelm らは抗原不活化に要した時間は追加処理を含めて 3 時間であったと報告しており [5]、製造スケールでも従来のホルマリンを用いた不活化処理より短い時間で全ての細菌を不活化できると推察される。また、BPL 処理を BG を抗原とした不活化ワクチンの製造工程に加えたとしてもコスト増加はそれほどないと考えられる。尚、BPL には癌原性があるので取り扱いには注意を要するが、水溶液中で速やかに加水分解されるため、ワクチン中には残留しないと考えられる。BPL で不活化した豚サーコウイルス (2 型) 感染症不活化ワクチン等の既承認ワクチンもあり、BPL の不活化目的での製剤使用は可能である。

4.4.2. アジュバント不添加の利点

上で述べた通り、BG を抗原とした不活化ワクチンを製造する際はアジュバントの添加が不要となり得る。Jawale らは、*Salmonella* Enteritidis (SE) の BG と市販のアジュバント加 SE 不活化ワクチンを鶏の胸部筋肉内に接種した後に SE で攻撃したところ、抗体応答、産卵率、鶏卵のサルモネラ汚染率及

び攻撃試験後の各臓器からの SE 分離数において、BG 接種鶏群は市販のアジュバント加不活化ワクチン接種鶏群と同等の成績を示しただけでなく、市販のアジュバント加不活化ワクチン接種鶏群で見られた沈鬱・食欲低下・接種部位の腫脹といった副反応を示さなかったことを報告している [7]。このことは、BG をワクチン抗原として用いた場合、アジュバントを添加した場合に生じ得る副反応のリスクを低減できる可能性を示している。食肉に供する場合のアジュバントの残留によって生じる問題も回避でき、これらは BG の利点であると考えられる。

4.4.3. 常温下での製品保存

BG や BG をプラットフォームとしたワクチンは凍結乾燥された状態では常温下でも安定とされるため、保存にかかるコストを抑えることができる可能性がある [9, 12]。現時点では BG の抗原性等について経時的な変化を追った報告は無いが、長期間に渡る常温保存が可能となれば、保管や接種現場までの運搬が容易なワクチンとして現場に受け入れられやすいと考えられる。加えて、保存有効期間の長いワクチンとすることも期待できる。

5. アジュバントとしての BG

BG は従来の不活化ワクチンに比べて免疫誘導能が高く、接種後の副反応も少ないことから BG 自身をアジュバントとして使用することも検討もされており、動物用医薬品領域ではニューカッスル病ウイルス (NDV) 不活化抗原と SE の BG を用いた BG のアジュバント能評価試験が報告されている [13]。本報告では SE の BG をアジュバントとして添加した群は、NDV に対する抗体応答能、防御能、ウイルス排泄量の低減能の 3 点で市販の NDV オイルアジュバントワクチン接種群と同等以上の成績を示し、免疫持続能及び細胞性免疫誘導能の 2 点で市販の NDV オイルアジュバントワクチン接種群よりも有意に高い成績を示すことが確認された [13]。細胞性免疫を増強するサイトカインである Th1 細胞で産生される IL-2 及び、Th1 細胞及び NK 細胞で産生される IFN- γ を測定した結果、IL-2 については BG 添加ワクチン接種群が高値を示す傾向にあっ

たが 2 群間に有意差を認めるほどではなかった。一方、IFN- γ については BG 添加ワクチン接種群が有意に高い値を示した。本報告では IL-2 と IFN- γ の産生量になぜ違いが生じたかについて考察されていないが、BG は Th1 細胞及び NK 細胞に IFN- γ の産生誘導作用を示す IL-12 の産生量を有意に高めることが報告されていることから [3]、IL-12 の産生量増加が IL-2 と IFN- γ の測定結果の違いに繋がった可能性があるかと推察する。以上の結果から、BG はワクチンのアジュバントとして使用した場合、液性と細胞性免疫の二つを誘導することが確認され、BG をアジュバントとした不活化混合ワクチンの開発も可能であると考えられる。

6. GMO

BG はその製法上、PhiX174 の遺伝子 E を組み込んだプラスミドで対象となるグラム陰性菌を形質転換する必要がある。自然界に存在しない遺伝子を菌内に移入するため BG は遺伝子改変生物 (GMO) の範疇になる。BG の利用にあたってはカルタヘナ法等の規制に従うことが求められる。PhiX174 の遺伝子 E を組み込んだプラスミドが BG と共に接種され、体内に取り込まれた際の安全性は十分に担保されているわけではない。DNA アルキル化剤である BPL を用いた追加不活化処理によるプラスミドを含めた細菌内の残存 DNA 分解処理が有効であろう。

7. 所感

BG は溶菌という手法で菌を不活化し、自然感染と同等の抗原暴露を行うことで特異性の高い免疫応答を惹起し、感染を防御する。この考え方は有効性と安全性という点で極めて理にかなっており、応用範囲も広く興味深かった。引き続き調査を進めていきたい。

- ¹⁾ bacterial envelope、細胞内膜、細胞壁と外膜からなる。
- ²⁾ ϕ X174 ゲノムには 11 の遺伝子がコードされており、アルファベット順に A から K の名前がつけられている。
- ³⁾ PAMPs は Toll-like-receptor (TLR) 等のパターン認識受容体 (PRRs) により認識され、自然免疫系を

活性化する。

引用文献

1. Brozman, M. 1978. Immunohistochemical analysis of formaldehyde- and trypsin- or pepsin-treated material. *Acta Histochem.* **63** : 251-260.
2. Hajam, I. A., Dar, P. A., Won, G. and Lee, J. H. 2017. Bacterial ghosts as adjuvants : Mechanisms and potential. *Vet. Res.* **48** : 1-13.
3. Hajam, I. A., Dar, P. A., Appavoo, E., Kishore, S., Bhanuprakash, V. and Ganesh, K. 2015. Bacterial ghosts of *Escherichia coli* drive efficient maturation of bovine monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One.* **10** : 1-15.
4. Hensel, A., Huter, V., Katinger, A., Raza, P., Strnitschie, C., Roesler, U., Brand, E. and Lubitz, W. 2000. Intramuscular immunization with genetically inactivated (ghosts) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 protects pigs against homologous aerosol challenge and prevents carrier state. *Vaccine.* **18** : 2945-2955.
5. Hjelm, A., Söderström, B., Vikström, D., Jong, W. S. P., Luirink, J. and de Gier, J. W. 2015. Autotransporter-based antigen display in bacterial ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.* **81** : 726-735.
6. Jaleta, H., Mamo, B. and Disassa, H. 2015. Review on Bacterial Ghost and its Application. *Int. J. Microbiol. Res.* **6** : 200-210.
7. Jawale, C. V. and Lee, J. H. 2014. Comparative evaluation of *Salmonella* Enteritidis ghost vaccines with a commercial vaccine for protection against internal egg contamination with *Salmonella*. *Vaccine.* **32** : 5925-5930.
8. Kraško, J. A., Žilionyte, K., Darinskas, A., Strioga, M., Jabceva, S. R., Zalutsky, I., Derevyanko, M., Kulchitsky, V., Lubitz, W., Kudela, P., Miseikyte-Kaubriene, E., Karaman, O., Didenko, H., Potebnya, H., Chekhun, V. and Pašukoniene, V. 2017. Bacterial ghosts as adjuvants in syngeneic tumour cell lysate-based anticancer vaccination in a murine lung carcinoma model. *Oncol. Rep.* **37** : 171-178.
9. Langemann, T., Koller, V. J., Muhammad, A., Kudela, P., Mayr, U. B. and Lubitz, W. 2010. The bacterial ghost platform system : Production and applications. *Bioeng. Bugs.* **1** : 326-336.
10. Mayr, U. B., Walcher, P., Azimpour, C., Riedmann, E., Haller, C. and Lubitz, W. 2005. Bacterial ghosts as antigen delivery vehicles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57** : 1381-1391.
11. Pascual, E., Mata, C. P., Gómez-Blanco, J., Moreno, N., Bárcena, J., Blanco, E., Rodríguez-Frandsen, A., Nieto, A., Carrascosa, J. L. and Castón, J. R. 2015. Structural Basis for the Development of Avian Virus Capsids That Display Influenza Virus Proteins and Induce Protective Immunity. *J. Virol.* **89** : 2563-2574.
12. Riedmann, E. M., Kyd, J. M., Cripps, A. W. and Lubitz, W. 2007. Bacterial ghosts as adjuvant particles. *Expert Rev. Vaccines.* **6** : 241-253.
13. Si, W., Yu, S., Liu, H., Wang, C., Chen, L., Wang, G., Wu, J. and Liu, S. 2017. A bacterial ghost improves the immunological efficacy of a Newcastle disease virus inactivated vaccine. *Vet. Microbiol.* **203** : 189-195.
14. Szostak, M. P., Hensel, A., Eko, F. O., Klein, R., Auer, T., Mader, H., Haslberger, A., Bunka, S., Wanner, G. and Lubitz, W. 1996. Bacterial ghosts : Non-living candidate vaccines. *J. Biotechnol.* **44** : 161-170.
15. Walcher, P., Cui, X., Arrow, J. A., Scobie, S., Molinia, F. C., Cowan, P. E., Lubitz, W. and Duckworth, J. A. 2008. Bacterial ghosts as a delivery system for zona pellucida-2 fertility control vaccines for brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). *Vaccine.* **26** : 6832-6838.
16. Won, G., Chaudhari, A. A. and Lee, J. H. 2016. Protective efficacy and immune responses by homologous prime-booster immunizations of a novel inactivated *Salmonella Gallinarum* vaccine candidate. *Clin. Exp. Vaccine Res.* **5** : 148.
17. 國澤純、平田宗一郎及び清野宏. 2016. 経粘膜ワクチンデリバリー製剤の開発の現状と今後の展望. *薬剤学.* **76** : 11-17.

(研究員)

「結核診断—最近の細胞性免疫機序に基づく診断法—」

古賀早織

1. 結核とツベルクリン反応検査

結核は結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) が原因となり、肺結核だけではなく、リンパ行性や血行性にリンパ節結核、胸膜炎、気管支結核、脳結核、髄膜炎、関節結核、腎結核および腸結核などの全身に病巣形成を引き起こす全身性の感染症である。日本でも戦後まもない1951年には「国民病」ともよばれ、結核罹患率（人口10万人対新たに結核と診断された人の数）698、死亡率（人口10万人対1年間に結核が原因で死亡した人の数）110.3と非常に多くの人々が結核で苦しんでおり、当時は死亡原因の第一位であった [1]。1951年に「結核予防法」が制定された後、2018年の罹患率は12.3、死亡率は1.8まで低下したが [2, 3]、現在でも集団感染事例が散見され、日本における重要な感染症であることに変わりはない。現在、結核の化学療法は確立されており、イソニアジド (INH)、リファンピシン (RFP)、ピラジナミド (PZA)、ストレプトマイシン (SM) またはエタンブトール (EB) の4剤を組み合わせて6カ月間投与する方法が主にとられている。しかしながら、長期にわたる治療のため、薬の飲み忘れや途中で薬を飲まなくなってしまう事による多剤耐性菌の発生が問題となっている。そのため、世界保健機関 (WHO) は患者に薬を渡すのではなく、毎日来院してもらい、職員の前で服用させる方法、Directly observed treatment, short-course (DOTS) を推奨している [1, 2]。結核の予防法はBCG (Bacille de Calmette et Guérin) ワクチンの接種である。BCGはフランス・パスツール研究所で継代されているウシ型結核菌 (*Mycobacterium bovis*) の弱毒株で、1921年にヒトへの投与が開始され、1924年から世界に広まり、現代でも使用されている [4]。

結核菌に感染し、発症している状態のことを活動性結核感染と呼ぶのに対し、結核菌に感染しても症

状がない状態を潜在性結核感染 (LTBI) とよぶ。LTBIでは結核菌が体内で潜伏感染している状態で、臨床的に結核の症状がなくても、後に活動性結核感染へ転じる可能性がある。WHOでは世界人口の約4分の1に結核菌が潜伏感染していると [5]、日本でも2018年のLTBI患者の新規登録者数は7,414人であった [3]。LTBIは喀痰塗抹検査や培養検査等の細菌検査およびレントゲン検査では結核を疑う所見は得られることはなく、その診断は免疫学的検査を用いなければならない。

一般的な結核の免疫学的検査は、ツベルクリン反応 (ツ反) 検査である。ツ反は皮膚の遅延型アレルギー反応を利用した検査で、結核菌培養ろ液から精製した抗原 (PPD: Purified Protein Derivative) を皮内投与し、48時間後の接種部位の発赤等で判定する。ツ反検査は1912年に開発され、100年以上にわたって世界中で利用されてきた [6]。日本においても、平成15年までは小学校および中学校入学時にツ反検査を行い、ツ反陰性者にはBCGワクチンを再接種していた [1]。しかしながら、結核に対するツ反検査にはいくつかの問題点が存在する。ツ反検査で使用するPPDはヒト型結核菌、ウシ型結核菌および非結核性抗酸菌と共通するいくつかの抗原の混合物であるため、結核菌感染者の他にBCG接種者および非結核性抗酸菌感染者でも陽性反応を惹起し [7]、真の結核菌感染者を診断できない。また、検査を行うにあたり、被検者はPPD接種時と48時間後の判定の2回、医療機関に訪問する必要がある。日本ではツ反検査判定基準を発赤長径が10mm以上の時に陽性としているが [2]、判定者の技術的な差による誤判定を防ぐには、訓練が必要と言われている。さらに、HIV感染等により免疫が抑制されている被検者の場合には、ツ反が弱くなる事も報告されている [8]。

2. インターフェロン- γ 遊離試験 (IGRA : Interferon-gamma release assay)

ツ反検査の問題点を改善する結核菌感染診断の新しい手法として、インターフェロン- γ 遊離試験 (IGRA) が2000年代後半から普及している。IGRAは細胞性免疫応答を利用した検査で、被検者の血液と結核菌抗原を共培養し、血液中のT細胞が産生した結核菌に特異的なインターフェロン- γ (INF- γ) を測定する。結核菌感染者では体内に侵入した結核菌がマクロファージに貪食され、その抗原情報はT細胞へ抗原提示・記憶される。INF- γ がT細胞から産生されるため、その反応をIGRAで測定し、結核菌感染を診断する [9]。現在、日本で承認されているキットは主にクウォンティフェロン (QFT) およびTスポットと呼ばれる2種類であり、INF- γ の測定法として、それぞれELISAおよびELISPOTの技術が用いられている。2つのキットでは結核菌特異抗原として6 kDa early secretory antigenic target (ESAT-6) およびESAT-6-like protein esxB (CFP-10) 等が用いられている。ESAT-6 および CFP-10 は、すべてのBCG株や、*M. kansasii*、*M. szulgai* および *M. murinum* を除くほとんどの非結核性抗酸菌には存在しないため、IGRAではBCGワクチン接種の影響を受けずに結核菌感染を診断することができる [10-14]。また、IGRAは血液を用いて行われるため、被検者は1回の採血のための来院で済む。従来のIGRA診断キットでは、主にCD4⁺T細胞のINF- γ 産生を測定していたが、2018年に日本で新

しく承認されたキット (以降は第4世代QFTと称する) では、CD4⁺T細胞の他にCD8⁺細胞障害性T細胞の細胞性免疫応答を測定可能な別の抗原も使用されている [8]。結核菌特異的CD8⁺T細胞のINF- γ 産生は、HIVと重感染した活動性結核に認められており [15, 16]、HIV感染者のLTBI診断への有用性が期待されている。

3. ツ反検査とIGRAの比較

IGRAが普及し始めた当初、ツ反検査の持つ技術的な問題点を解消するIGRAは新たな検査手法として普及すると考えられていた。しかしながら、国際的にはIGRAがツ反検査に代わる検査法とはならなかった。ここで、いくつかの文献をもとにツ反検査とIGRAについて比較したい。

Haasらは、ツ反検査とIGRAの利点と欠点を表1のようにまとめた [17]。IGRAの大きな欠点は、検査材料のコストが高いこと、血液処理および免疫学的検査を行える施設が必要なことである。日本ではBCGワクチン接種を義務化しており、多くの人々がBCGワクチンを接種しているため、IGRAにより結核感染とBCGワクチン接種が区別できる点は大変好ましい利点である。しかし、諸外国ではBCGワクチン接種は義務化されておらず、ワクチン未接種の人が大多数なため、低コストで実施できるツ反検査の方が実用的である。また、ツ反検査は2回診察を受けられる診療所があれば、多くの人を

表1 ツベルクリン反応検査とIGRAの比較

	ツベルクリン反応検査	IGRA
長所	<ul style="list-style-type: none"> ・ 試薬が低コスト ・ 現場で簡単に実施できる ・ 大人数を短時間で検査できる ・ 低リスク集団における最小の再テスト可変性 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 診察が1回で済む ・ 判定が試験内で出せる ・ 客観的な結果 ・ 試験結果を電子データで作成可能 ・ BCGワクチン接種者でより特異的
短所	<ul style="list-style-type: none"> ・ 診察が2回必要 ・ 判定者および判定者間で変動しやすい主観的な結果 ・ BCGワクチン接種者の低特異性 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 試薬が高コスト ・ 実験室へ検体の輸送が必要 ・ 現場での設定がより困難 (実験室での登録、採血、ラベル付け、検体の実験室への輸送)
共通の課題	<ul style="list-style-type: none"> ・ 活動性結核とLTBIの区別がつかない ・ 活動性結核への短期的な進行を予測する能力が低い ・ 免疫抑制集団における感受性の低下 ・ 過去の感染と新規または進行中の感染を区別できない 	

短時間に診察できる利点がある [17]。

HIV 感染者の LTBI 診断の精度向上に関しては、前述した第 4 世代 QFT キットの登場に期待が寄せられている。HIV 感染者の LTBI 診断において、従来の IGRA 診断キットはツ反検査と同様に診断感度が低くなるといわれており、特に CD4⁺T 細胞が 100 cell/mL 未満の患者で感度が低下する [18, 19]。第 4 世代 QFT では HIV 感染等による免疫抑制で CD4⁺T 細胞が減少しても、CD8⁺T 細胞で産生される INF- γ を測定し、結核菌に特異的な免疫応答を測定できる。数は少ないが、すでに免疫抑制患者を対象として第 4 世代 QFT を用いた研究が報告されている。ザンビアにおける活動性結核患者を対象にした調査では、HIV 感染の有無にかかわらず、第 4 世代 QFT を用いた診断の感度に差は見られなかった (HIV 陽性で 85%、HIV 陰性で 80%) [20]。また、結核の低流行国イタリアにおける活動性結核および LTBI の診断と HIV 感染の影響を調べた調査では、HIV 感染は活動性結核の診断に影響を及ぼさなかったが、LTBI のスクリーニングにおいては、*M. tuberculosis* への曝露時間が長いほど陽性者数が増えることが示唆された。この研究では CD4⁺T 細胞数は、INF- γ 放出量に影響を与えなかった。しかしながら、フローサイトメトリーにおいて第 4 世代 QFT への CD8⁺T 細胞特異的な応答が HIV 感染者と非感染者と同様であったのに対して、CD4⁺T 細胞への応答が HIV 感染者で低下が認められた。このことから、HIV 感染者では CD4⁺T 細胞の応答障害があり、CD8⁺T 細胞による補完的な働きがあったものと考えられた [21]。インドネシアでは免疫不全の小児患者に対する診断を検討し、ツ反検査よりも第 4 世代 QFT で陽性であった患者が有意に多かった。免疫不全の状態では HIV 感染者と同様に CD4⁺T 細胞が減少しているためと考えられる [22]。しかしながら、第 4 世代 QFT は国際的に使用されるようになってからの期間が短く、今回紹介した報告も最近公表され始めたデータのひとつにすぎない。第 4 世代 QFT の有用性についてはさらなる研究が必要となるだろう。

4. 新たな診断法

結核感染の新たな免疫学的診断法として C-Tb 検査法 (Statens Serum Institute、デンマーク) の開発が進んでいる。ツ反検査に用いる抗原 PPD の代わりに ESAT-6 および CFP-10 を皮内に接種し、ツ反と同様に接種部位の発赤で判定する手法で、ツ反検査と IGRA の特性を組み合わせた新世代の診断法である。抗原として IGRA と同様に ESAT-6 および CFP-10 を使用するため、BCG ワクチン接種者に反応せず、結核菌感染者のみを検出することができる。また、IGRA のように ELISA および ELISPOT 等の複雑な操作を行う必要がなく多数の検査を行うことができる [17]。

この診断法は 2008 年から治験が進められており、すでに第 II 相試験まで終了している。2012 年から 2014 年にスペインで実施された第 III 相試験では、979 人の参加者が登録され C-Tb 検査法、ツ反および QFT が比較された。C-Tb 検査法によって皮膚に形成された結節は 5 mm もしくはそれ以上となり、ツ反による反応と同等の大きさを示した。ツ反では BCG ワクチン接種による偽陽性が認められたが、C-Tb 接種法では BCG ワクチン接種による影響を受けることはなかった。QFT との比較では、5 歳以上の 834 人のうち 785 人 (94%) でその結果が一致した。また、抗原接種部位の反応では C-Tb 検査法とツ反にほとんど差はなかったが、血腫の割合がツ反 (2%) に比べて C-Tb 検査法 (14%) の方が有意に高かった。興味深いことに、C-Tb 検査法で血腫が認められた患者のほぼ全て (92%) が、C-Tb 検査陰性の参加者であったことから、その発生機序については更なる研究が必要であろう [23]。

最近の研究では、LTBI から活動性結核感染へ進行するリスクを正確に予測するためのバイオマーカーを特定する研究が進められており、複数の遺伝子マーカーが報告されている [24-26]。まだ実用化されていないが、LTBI の患者の中から活動性結核感染へ進行するリスクが高い患者をスクリーニングすることにより、予防的治療が可能になると期待されている。

引用文献

1. 国立感染症研究所 (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/398-tuberculosis-intro.html>)
2. 公益財団法人結核予防会結核研究所 (<https://www.jata.or.jp>)
3. 結核の統計年報 2018. 公益財団法人結核予防会結核研究所疫学情報センター (<http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/>)
4. Vanessa T. et al. 2013. *Microbiol. Spectrum*. **2** (1) : MGM2-0028-2013.
5. WHO Fact sheet, Media Centre. Reviewed January 2018 Tuberculosis. (<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>)
6. Parul P. et al. 2020. Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing; 2020 Jan-. 2020 Mar 25.
7. Gina G. et al. 2019. *Int. J. Infect. Dis.* **80** : S20-S22
8. Michael J. A. R. et al. 2009. *Lancet Infect. Dis.* **9** : 173-84.
9. インターフェロン- γ 遊離試験キット QuantiFERON[®] TBゴールドプラス 添付文書
10. Andersen P. et al. 1995. *J. Immunol.* **154** (7) : 3359-3372.
11. Sørensen AL. et al. 1995. *Infect. Immun.* **63** (5) : 1710-1717.
12. Berthet F. X. et al. 1998. *Microbiol.* **144** : 3195-3203.
13. Brock I. et al. 2004. *J. Clin. Microbiol.* **42** (6) : 2379-2387.
14. Andersen P. et al. 2000. *Lancet.* **356** : 1099-1104.
15. Chiacchio T. et al. 2014. *J. Infect.* **69** (6) : 533-545.
16. Ongaya A. et al. 2013. *Tuberculosis.* **93** (S1) : S60-S65.
17. Michelle K. H. et al. 2019. *Clin. Chest. Med.* **40** : 829-837
18. Adithya C. et al. 2011. *J. Acquir Immune Defic. Syndr.* **56** (3) : 230-238.
19. Kristen O. et al. 2018. *Tuberc. Respir. Dis.* **81** : 59-72.
20. L. Telisinghe. et al. 2017. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **21** (6) : 690-696.
21. Elisa P. et al. 2020. *J. Infect.* **80** : 536-546.
22. Cory P. et al. 2020. *Pulm. Med.* **10** ; 2020 : 7159485
23. Morten. R. et al. 2017. *Lancet Respir. Med.* **5** (4) : 259-268.
24. Zak. D. et al. 2016. *Lancet.* **387** (10035) : 2312-22.
25. Suliman. S. et al. 2018. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **197** (9) : 1198-208.
26. Warsinske. H. et al. 2018. *JAMA Netw. Open.* **1** (6) : e183779.

(研究員)

訃報

川窪 淳 先生

当所元常務理事の川窪淳先生には、令和2年2月12日に逝去されました（享年93歳）。衷心より哀悼の意を表し、ご冥福をお祈り申し上げます。

先生は昭和22年に麻布獣医畜産専門学校を卒業し、当所に入所されました。昭和36年に医学博士号を取得されました。昭和44年製造部副部長、昭和47年学術部副部長兼ウイルス第一研究室室長、昭和50年研究第4部部長、検査事業部部長を経て昭和62年常務理事に就任されました。特に豚コレラ（豚熱）や日本脳炎に関する研究をご専門として尽力されました。平成5年にご退任後も当所評議員や監査役として当所の運営に協心戮力してくださいました。

改めて川窪先生のご功労を偲び、謹んでご冥福をお祈り申し上げます。

本橋 常正 先生

当所元常務理事の本橋常正先生には、令和2年3月2日に逝去されました（享年90歳）。衷心より哀悼の意を表し、ご冥福をお祈り申し上げます。

先生は昭和27年に北海道大学農学部獣医学科を卒業し、当所に入所されました。昭和36年に獣医学博士号を取得され、昭和44年に研究第1・2部副部長を経、昭和51年に常務理事に就任されました。またタイ国口蹄疫ワクチン製造センター設立への技術協力が認められ、JICA 総裁表彰（昭和57年）及び外務大臣表彰（昭和60年）を受章されました。平成6年にご退任されるまで、ジステンパーワクチンの研究開発、技術協力や視察による諸外国への出張報告など、日生研たよりにも多数の原稿を執筆していただきました。

改めて本橋先生のご功労を偲び、謹んでご冥福をお祈り申し上げます。

編集後記

若草の緑がまぶしい季節となりましたが、皆様におかれましてはいかがお過ごしでしょうか。令和2年度の編集委員で行ってまいりました編集作業は、今号をもって終了となります。関係者の皆様には多大なご協力を賜りましたこと、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。さて、令和3年度は編集委員長を引き続き古澤貴章が務めさせていただき、編集委員を高橋真理、古賀早織が担当いたします。

季節の変わり目でもあります。体調をくずされませんようお気をつけてお過ごしください。今後とも、引き続き日生研たよりをご愛読賜りますよう、よろしく願い申し上げます。



—— テーマは「生命の連鎖」——
生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士による揮毫です。

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(年4回発行)
(通巻619号) 令和3年3月25日印刷 令和3年4月1日発行(第67巻第2号)
発行所 一般財団法人日本生物科学研究所
〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221 番地の1
TEL : 0428(33)1520(経営企画部) FAX : 0428(31)6166
URL : <http://nibs.lin.gr.jp/>
発行人 土屋耕太郎

編集室 委員/古澤貴章(委員長)、篠原みなみ、古賀早織
事務/経営企画部

印刷所 株式会社 精興社
(無断転載を禁ず)