

論文の内容の要旨

論文題名 遺伝子組換え抗原を用いる牛ヨーネ病の免疫学的診断法に関する研究

氏名 永田 礼子

ヨーネ病はヨーネ菌 (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) の経口感染により起こるウシ、ヤギ、ヒツジ等の反芻獣の慢性消化器感染症であり、長い潜伏期間（半年～数年）の後、持続性の下痢、栄養状態の悪化による消瘦等を起こし、やがて死に至る。感染動物の多くは発症せず無症状に経過するが、その糞便中にはヨーネ菌が排菌されることがあるため、それらが農場内における感染源となり、本病蔓延の原因となる可能性がある。本病は現在世界中に蔓延しているが、我が国ではいわゆる「撲滅対象疾病」として法に基づく診断・淘汰による防疫対策を実施しているため、諸外国に比べるとその感染率は極めて低いレベルに保たれているものの、現在でも年間数百頭がヨーネ病患者畜として摘発されている。また、化学療法による治療は困難であり国内外で実用化はされておらず、ワクチンについては、予防効果は低いため、海外では発症阻止のために使用されている。

ヨーネ病の診断には、培養検査、リアルタイム PCR による遺伝子検査の他、ヨーニン皮内反応検査、インターフェロン・ガンマ (IFN- γ) 検査、あるいは抗体検査等が用いられている。前者 2 者が糞便中のヨーネ菌を検出する診断法として現在主に用いられているが、これらの検査では発症前の排菌陰性の潜伏期間における感染牛の摘発は不可能である。また、IFN- γ 検査や抗体検査等の免疫学的診断法は、感染早期の細胞性免疫応答の検出が可能である点、あるいは多検体処理が可能な点で有用な診断法ではあるが、現行の方法では非特異的反応の出現や感度の低さが問題視されている。これらの問題を解決するため、ヨーネ菌特異的な抗原の同定や組換えタンパク質を用いる診断法の開発が試みられ、数多くの候補抗原が報告されているにも関わらず現在なお、それらの実用化には至っていない。そこで、本研究では、ヨーネ菌感染牛における細胞性免疫応答ならびに抗体応答を指標として、ヨーネ菌抗原遺伝子を解析し、感染早期における特異性の高い免疫学的診断法を開発した。

第 1 章では、ヨーネ菌遺伝子発現ライブラリーを作製し、宿主の細胞性免疫応答において重要な役割を果たす IFN- γ 誘導能を有する抗原の遺伝子探索とクローニングを行った。さらに、当該遺伝子の組換えタンパク質を作出し、免疫応答能を評価した。まず、ヨーネ菌遺伝子発現ファージライブラリーを構築す

ること得られた組換え大腸菌を用いてヨーネ菌実験感染牛由来の末梢血単核球 (PBMC) を刺激し、IFN- γ 産生誘導能を指標にスクリーニングを行った結果、最終的に2つの陽性クローン (#37-16, #60-3) が得られた。 β -galactosidase 融合タンパク質の一部として発現が推測されたヨーネ菌由来塩基配列は、クローン#37-16 では 264 bp, クローン#60-3 では 1,248 bp であった。塩基配列の相同性解析および推定されたアミノ酸配列の解析により、クローン#60-3 の配列は結核菌が保有する PPE family protein と高い相同性を示した。さらに、クローン#37-16 の 264 bp DNA 断片の相補鎖配列が PPE family protein と高い相同性を示すことも明らかとなった。PPE family protein は結核菌感染などの抗酸菌感染症において重要な T 細胞抗原として認識されていることから、クローン#37-16 の相補鎖側にコードされていた PPE family protein を含む3種の遺伝子組換え抗原 MAP10 (88 アミノ酸 (aa)), MAP39 (416 aa), および MAP41 (420 aa) を作出した。これら3種の組換えタンパク質は、ヨーネ菌実験感染牛において有意な IFN- γ 産生誘導を認めた。これらの結果から、ヨーネ菌における PPE family protein が IFN- γ 誘導能を有することを初めて明らかにした。

次に、Map39 および Map41 に対するモノクローナル抗体を作製し、イムノブロットング法によりヨーネ菌菌体での Map39 および Map41 の発現とヨーネ菌実験感染牛由来 PBMC における特異的な IFN- γ 産生を確認した。組換え抗原により産生される IFN- γ の主要な産生細胞は CD4+細胞であった。ヨーネ菌が属する *M. avium* 種では各亜種間の塩基配列相同性が高く、Map39 および Map41 等の PPE protein family についても *M. avium* 種が共通して保有していると考えられた。従来の IFN- γ 検査では、感作抗原として多数の抗酸菌共通抗原を含有するヨーネ菌 PPD を用いているため、ヨーネ菌が属する *M. avium* だけでなく他の多くの抗酸菌抗原との交差反応が懸念されていた。しかし、遺伝子組換えによって作出された Map39 または Map41 をそれぞれ単一抗原とする新たな IFN- γ 検査では、PPD を用いる検査に比べ、特異性の高いヨーネ菌感染牛の診断が可能になるものと期待される。

第2章では、第1章で作製した組換えタンパク質 Map41 がヨーネ菌感染牛由来 PBMC に対して IFN- γ だけでなく免疫抑制に働くサイトカインであるインターロイキン10 (IL-10) も特異的に産生誘導することを見出した。組換え抗原に反応する IFN- γ 及び IL-10 産生細胞は、それぞれ CD4+T 細胞及びマクロファージ系の CD14+細胞であった。また、Map41 抗原刺激による PBMC における IL-10 発現誘導は、既報のヨーネ菌感染マクロファージにおける IL-10 mRNA 発現の細胞内伝達と同様に、MAPK^{p38} 経路によるものであることも明らかにした。

実験感染牛においてMap41を抗原としたIL-10検査を経時的に実施した結果、感染2~6週後にIL-10産生量が増加し、感染2~6カ月後から陽性となるIFN- γ 検査よりも早期にヨーネ菌感染を検出することが可能であった。さらに、これらサイトカイン検査の特異性を検討するため、モルモットに各種抗酸菌を予め接種し、脾細胞でのMap41刺激による各サイトカインのmRNA発現を相対的に解析したところ、ヨーネ菌または鳥型結核菌を接種したモルモット間ではIFN- γ のmRNA発現に有意な差がなかったが、IL-10のmRNA発現はヨーネ菌接種モルモットで特異的に認められた。また、各種抗酸菌を接種した子牛由来PBMCをMap41で刺激したところ、ヨーネ菌接種子牛において明らかに高いIL-10産生を認めた。以上の結果から、ヨーネ菌PPE family proteinの組換え抗原を用いたIL-10検査によりIFN- γ 検査より早期かつ特異的にヨーネ菌感染を検出できる可能性が示唆された。

第3章では、第1章において構築したヨーネ菌遺伝子発現ライブラリーのヨーネ菌感染牛血清によるスクリーニングから、液性免疫を誘導する抗原としてEchA12_2を同定した。EchA12_2は哺乳類のミトコンドリアや抗酸菌に存在する脂肪酸代謝に関わる酵素である。その遺伝子組換え抗原Map-echAに対する抗体応答について感染牛および非感染牛血清を用いて評価したところ、Map-echAに対する抗体価は、他の抗酸菌を接種した子牛血清と比較してヨーネ菌接種子牛血清でのみ高かった。また、抗酸菌共通抗原を多く含む菌体破砕物を抗原とする現行のプルキエELISAと比較して、単一のMap-echAを抗原として用いるMap-echA ELISAは感度、特異度が共に高く、特に非特異反応が疑われる血清（細菌学的検査陰性個体の抗体検査陽性血清）に対する反応性が低く、さらに排菌量の少ない罹患牛血清でも高い陽性率を示す点が優れていた。また、プルキエELISAではヨーネ菌実験感染における抗体上昇は発症期に認められるが、Map-echA ELISAではプルキエELISAで陽性となる時期より2~7カ月早期に抗体上昇が認められた。以上の結果から、Map-echA抗原を用いる抗体検査は、感染早期かつ特異的に感染牛を診断できる新しい検査法となることが期待される。また、鳥型結核菌にも、ヨーネ菌のEchA12_2と相同なタンパク質が存在するが、ヨーネ菌感染時にのみMap-echAに対する特異的な抗体応答が認められたことから、*in vivo*での遺伝子発現調節やタンパク質の機能が抗酸菌種間で異なる可能性が示唆された。

本研究では、感染牛における免疫応答を指標にヨーネ菌遺伝子発現ライブラリーをスクリーニングすることで、感染早期の細胞性免疫応答の指標となるIFN- γ を誘導する抗原、さらにヨーネ菌感染特異的にIL-10を産生誘導する抗

原，また早期かつ特異的に抗体応答を誘導する抗原を同定することに成功した。これらの遺伝子組換え抗原を用いて感染牛及び非感染牛における免疫応答を調べた結果，従来の検査法より早期かつ特異性の高い反応を確認した。IFN- γ 産生誘導能を有する抗原 Map41，あるいは感染抗体と強く反応する抗原 Map-echA は，鳥型結核菌にも非常に高い相同性を示す遺伝子が存在するが，ヨーネ菌感染個体にのみ組換え抗原に対する特異的な応答が認められたことから，類似抗原であっても宿主との相互作用の機序が異なる可能性が考えられた。このように近縁種間で遺伝子が保存されている抗原であっても，宿主体内における免疫応答は亜種間で異なる場合もあることから，本研究で用いた抗原スクリーニング手法は疾病特異的な抗原を見出す手段として有用であることを示している。また，類似抗酸菌におけるこのような遺伝子産物の機能の違いは，病原性や発症機構を解析する上でも重要な知見になるものと思われる。

以上より，本研究で同定された PPE family protein や EchA12_2 酵素の組換えタンパク質は，新たな免疫学的診断法の抗原としての有用性が高く，今後広く応用されることが期待される。また，これらの方法を用いて，ヨーネ病の感染から発症に至るまでの宿主の免疫応答をより精密に解析することが可能となるなど，本研究成果は今後のヨーネ病の発症機構解明研究に不可欠な解析手段を提供するものと考えられる。