



Title	結核菌cord factorに対する抗体の特性と抗cord factor抗体を用いた結核の血清学的迅速診断に関する研究
Author(s)	藤原, 永年
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3169553
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	藤 原 永 年
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 0 3 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 12 年 1 月 14 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	結核菌 cord factor に対する抗体の特性と抗 cord factor 抗体を用いた結核の血清学的迅速診断に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 本 田 武 司 (副査) 教 授 山 元 弘 教 授 那 須 正 夫 教 授 西 原 力

論 文 内 容 の 要 旨

結核を始めとする抗酸菌感染症は抗結核薬の世界的普及により着実に減少傾向を示していたが、最近その減少化傾向が鈍化し、特に HIV/AIDS 合併症、多剤耐性結核菌の出現、集団感染事例の増加等、再興感染症として問題視されている。結核対策における世界戦略として、結核の簡便な迅速診断法、新規薬剤、新規ワクチンの開発が急務であり、筆者は特に結核の迅速診断法についての研究を行った。

結核の診断は患者検体中に抗酸菌を証明することが基本（病原体診断）であり、喀痰塗沫標本を抗酸性染色により抗酸菌を検出するか、或いは培養により抗酸菌を検出することにより診断が確定する。しかし、これらの病原体診断は検出感度の低さ、検査基間（約 8 週間）の長期化に問題があり、診断の遅れが結核医療に支障を来している。また、実際の結核患者のうち半数以上は（喀痰への排菌のない）排菌陰性患者であり、これら患者に対する迅速診断法の開発が望まれている。

抗酸菌の特徴は菌体表層にワックス様の脂質を多量に含み、したがって色素に染色され難く、いったん染色されると酸によっても脱色され難い“抗酸性”を呈することである。この疎水性に関与する菌体表層の構成成分はミコール酸を始めとする各種脂質であるが、ミコール酸は天然では非常にまれな α 位に分岐鎖、 β 位に水酸基を持つ長鎖脂肪酸である。特にトレハロースに 2 分子のミコール酸が結合した cord factor (trehalose 6, 6'-dimycolate, TDM) はその毒性に加え、各種免疫薬理学的な生理活性が報告されている。このように疎水性の強い脂質成分は一般細菌が産生する水溶性タンパク質と異なり、免疫反応を誘導する抗原物質或いは生体調節物質としては馴染み難い構築成分であるが、このような性質が結核や抗酸菌感染症の発症や病変の進展に寄与していると考えられる。

筆者らは、この cord factor に対する抗体が結核または非結核性抗酸菌症患者に特異的に出現し、排菌陽性患者のみならず排菌陰性患者にも高率に上昇していることを見だし、cord factor 抗体を用いた結核の血清学的迅速診断に応用することを目的として、種々検討を行った。抗 cord factor 抗体を実験的にマウス、家兎を用いて作製し、その特性を明らかにした。また、これらの特性を結核の血清学的迅速診断に応用すべく結核患者血清を用いて検討した。

まず、結核菌を始めとする類縁抗酸菌の菌体表層脂質成分として普遍的に含まれるミコール酸含有糖脂質である

cord factor を抗原とした ELISA 法による抗 cord factor 抗体微量測定系を確立した。本 ELISA 法は、従来のタンパク質を用いた抗原抗体反応とは異なり、抗原として疎水性の強い糖脂質を用いることが特徴である。難溶性である抗原 cord factor をあらかじめヘキササンに溶解し、各プレートに適宜添加後（通常1.25 $\mu\text{g}/\text{well}$ ）、ヘキササンを自然乾燥することにより cord factor を固相化（コート）した。以降のブロッキング、抗原抗体反応、基質発色反応はすべて水溶系で行うことができた。本研究ではすべてこの assay 系を用いた。

次に、抗 cord factor 抗体の特性を明らかにするため、マウスにおいて実験的に抗 cord factor 抗体の作製を試み、その血清抗体の反応性を比較した。マウスに *Rhodococcus ruber* R-1 株由来の cord factor（ミコール酸の炭素鎖長は C46 のモノエンが中心）を water in oil in water ミセルの形で腹腔内に頻回少量投与することにより、糖脂質に対する抗体を産生させることができた。本抗体は、cord factor の糖部分であるトレハロースよりも、脂質部分であるミコール酸を強く認識する抗体であった。さらに、同様の性質を有する抗 cord factor モノクローナル抗体を作製した。マウスに cord factor を単独投与すると、肺・脾臓及び肝臓において肉芽腫が形成されるが、抗 cord factor モノクローナル抗体を用いて cord factor 誘導実験的肉芽腫形成に対する影響を調べた。Cord factor 投与の初期に抗体を投与することにより、毒性及び肉芽腫形成は抑制された。また、肉芽腫形成に関与している IL-1、chemotactic factor の活性も抑制された。これらの結果から、結核性肉芽腫に類似する cord factor 誘導肉芽腫が抗 cord factor 抗体により抑制されたことは、抗体（液性免疫）により各種生物活性を調節することが可能であることを示唆するものであった。

マウスにおける抗 cord factor 抗体の特性からミコール酸を認識する抗体であることが明らかになったので、さらに、家兎に結核菌 *M. tuberculosis* 由来 cord factor（MTB-cord factor）及び非結核性抗酸菌 *M. avium* 由来 cord factor（MAC-cord factor）を免疫して得られた2種類の抗 cord factor 抗体の反応性を比較した。これら2種類の cord factor は、構造的には構成成分のミコール酸サブクラスに違いがあり、MTB-cord factor は α -、メトキシ、ケトミコール酸からなるのに対し MAC-cord factor は α -、ケト、ジエステルミコール酸からなっていた。MTB-cord factor で免疫して得られた血清抗体は MTB-cord factor に高い反応性を示したが、MAC-cord factor には低い反応性しか示さなかった。これに対し、MAC-cord factor で免疫して得られた血清抗体は MAC-cord factor に高い反応性を示したが、MTB-cord factor には低い反応性しか示さなかった。したがって、これら2種類の cord factor で免疫して得られた血清抗体は homologous な抗原とのみよく反応し、交差反応性に低いことがわかった。これらの結果から、抗 cord factor 抗体は cord factor におけるミコール酸サブクラスの構造の違いを認識していることが示唆された。特に MTB-cord factor を免疫して得られた家兎血清抗体は、結核菌から単離精製できたミコール酸サブクラスとの反応性から *M. avium* 菌には存在しないメトキシミコール酸と最も強く反応することがわかった。

最後に、実験的に作製した抗 cord factor 抗体の反応性から明らかになった特性をもとに、結核患者に検出される抗 cord factor 抗体について MTB-cord factor 及び MAC-cord factor との反応性を調べたところ、家兎を免疫して得られた抗 cord factor 抗体と同様の性質を有することがわかった。結核患者血清が *M. avium* 菌には含まれないメトキシミコール酸を強く認識することは、結核と非結核性抗酸菌症の鑑別診断にも有用である可能性を示唆するものであった。

本研究での知見をもとに、結核の血清学的迅速診断法として糖脂質である cord factor を抗原とした ELISA キットを開発し、結核の体外診断薬として近日中に発売される予定である。排菌陽性結核患者については陽性率90-95%、排菌陰性結核患者についても陽性率70-75%であり、結核の迅速診断法として感度・特異性において非常に有用であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

申請者は、本研究において抗酸菌の特徴的な菌体表層糖脂質成分である cord factor に対する抗体の微量測定系を開発し、実験動物（マウス、家兎）を免疫して得られた各種抗 cord factor 抗体からその特性を明らかにした。本抗体

は通常のタンパク質抗原を認識する抗体と異なり、長鎖分岐脂肪酸であるミコール酸を認識する抗体であった。また、cord factor 単独投与による結核類似実験的肉芽腫形成（マウス）に抗 cord factor 抗体が抑制的に働くことを見出した。さらに、ヒト結核患者血清中に同様の性質を有する抗 cord factor 抗体が産生されていることを明らかにし、これらの知見のもとに cord factor を抗原とした結核の血清学的迅速検査法を開発した。この血清学的検査法は日常臨床において実施可能であり、排菌陽性患者のみならず排菌陰性患者にも感度・特異性において非常に有用であると考えられた。

以上の成果は再興感染症である結核の早期診断に有益な知見と方法を与え、学術的にも臨床的にも評価され、薬学博士の学位に十分値するものと認められる。