

# ヨーネ病の 早期診断法に用いる遺伝子組換え抗原

ヨーネ病研究チーム

永田 礼子

NAGATA, Reiko

鳥型結核菌の1亜種であるヨーネ菌の経口感染により起こる反芻獣のヨーネ病は、現在我が国で最も発生の多い法定伝染病であり、摘発淘汰により防疫が進められているが、発生数の減少をみるには至っていないのが現状である。平成16年には国内での摘発頭数が千頭を超え、過去最高の頭数となった。ヨーネ菌は長期持続感染をおこし、予防・治療は困難なため、感染動物の早期診断、伝播防止のための衛生管理が効果的な防疫手段となる。感染早期の現行診断法としてヨーニン皮内反応があるが、これに代わるインターフェロン・ガンマ (IFN- $\gamma$ ) 検査法は細胞性免疫を指標とした高い感度を有する診断法である。また、抗酸菌感染宿主において抗原特異的T細胞が産生するIFN- $\gamma$ がマクロファージを活性化して細胞内での殺菌作用を高めることが知られている。従って、ヨーネ菌由来の抗原で末梢血単核球 (PBMC) を刺激し、一定時間培養後の上清中IFN- $\gamma$ 濃度を測定することにより、その抗原に対する宿主の細胞性免疫の状態を知ることが可能である。

本研究では、ヨーネ病の新たな診断法・予防法に繋がるヨーネ菌成分の同定を試みることを目的として、ヨーネ菌の遺伝子ライブラリーの構築と、IFN- $\gamma$ 誘導能を指標としたスクリーニングを行った。

ヨーネ菌ゲノムDNA (約4.8 Mbp) を制限酵素で限定分解し、平均4~5 KbpのDNAフラグメントをファージベクターにライゲーション、パッケージングしてファージライブラリーを作製し、大腸菌へ導入した。全ゲノムを網羅するように、1,200クローンの組換え大腸菌を20クローンずつ60グループに分け、プールした浮遊菌液でヨーネ菌実験感染牛由来のPBMCを刺激し、培養上清中に産生されたIFN- $\gamma$ をELISA法にて測定した。最終的に得られたIFN- $\gamma$ 産

生を誘導する2つのクローンについてBLAST検索を行ったところ、共に結核菌で報告されているPPE family proteinと高い相同性を示し、特徴的な配列からヨーネ菌のPPE family proteinであることが示唆された。PPE family proteinとは、その名前の由来でもあるプロリン (P)-プロリン (P)-グルタミン酸 (E) をN末側に保存しており、C末側は多様なタンパク質の総称である。その機能はまだあまりよく知られていないが、T細胞エピトープやB細胞抗原としての報告がある。さらに、マウスやモルモットを用いたワクチン試験で結核菌感染を防御した結果が報告されている。

ヨーネ菌PPE family proteinとして発現が予想された2種のタンパク質についてアミノ酸コード領域を再クローニングし、組換えタンパク質を大腸菌で作出、それぞれを分子量に従ってMap39及びMap41と命名した。組換え抗原に対するモノクローナル抗体も作製し、Immunoblotting法でこれらMap39及びMap41が実際にヨーネ菌でも発現されていることを証明した。さらに、他の抗酸菌との交差反応を調べるために、Map39及びMap41の配列に特異的なプライマーを用いたPCRを実施したところ、鳥型結核菌にはこれらの配列が検出されたが、他の多くの抗酸菌では検出されなかった。

実験感染牛由来PBMCを組換え抗原で刺激したときの培養上清中には、非感染対照牛のものに比べて有意に高い濃度のIFN- $\gamma$ が検出された (図1)。また細胞内二重染色法により、このときのIFN- $\gamma$ 産生細胞はCD4+細胞であることが判明した。最近、ヨーネ菌感染と免疫抑制能を有するサイトカインであるインターロイキン10 (IL-10) との関係が注目されている。ヨーネ病発症期にはIL-10が、潜伏期では



IFN- $\gamma$  の mRNA がそれぞれ腸管局所で高発現しており、感染後期の IFN- $\gamma$  産生低下と IL-10 産生亢進が、宿主における細胞性免疫から液性免疫応答へのシフトの一因とされている。また、鳥型結核菌と比較してヨーネ菌に感染した宿主マクロファージからは、有意に IL-10 が産生されるとの報告もある。さらに、抗牛 IL-10 抗体添加によりヨーネ菌 purified protein derivatives(PPD) 抗原刺激後の IFN- $\gamma$  産生が亢進することから、IL-10 の IFN- $\gamma$  産生抑制作用が証明されている。Map39 及び Map41 の組換え抗原においても、PPD と同様に IL-10 抗体添加による IFN- $\gamma$  産生が増加することから (図 2)、これらの抗原も IL-10 誘導活性を有することが明らかとなっている。従来の IFN- $\gamma$  検査法に用いられているヨーネ菌 PPD 抗原が多数の抗原物質を含有しているのに対し、Map39 及び Map41 組換え抗原は単一のタンパク質抗原であり、PPD に代わる IFN- $\gamma$  検査用抗原として利用可能である。また抗 IL-10 抗体添加により高感度に IFN- $\gamma$  が検出できることから、診断法への応用が期待できる。

今後は自然感染牛についても組換え抗原を用いた IFN- $\gamma$  検査を行いたい。また、作製したヨーネ菌ゲノムライブラリーを利用して、ヨーネ病の診断法の改良や、発病機構の解明などに有用な抗原遺伝子をクローニングしていきたい。

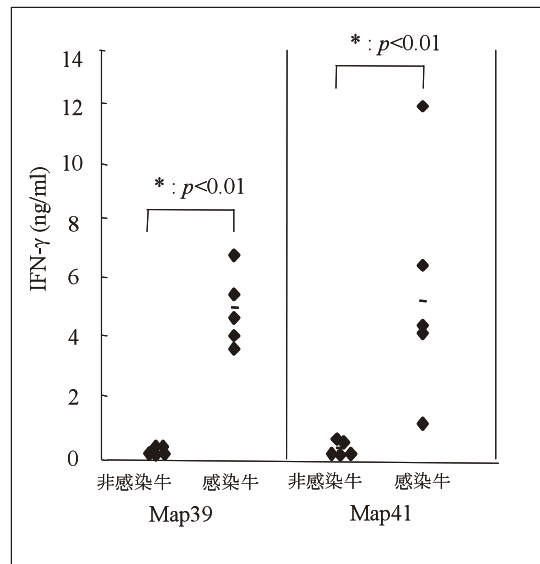


図 1. 遺伝子組換え抗原 Map39, 41 に対するヨーネ菌実験感染牛及び非感染牛の IFN- $\gamma$  応答の比較

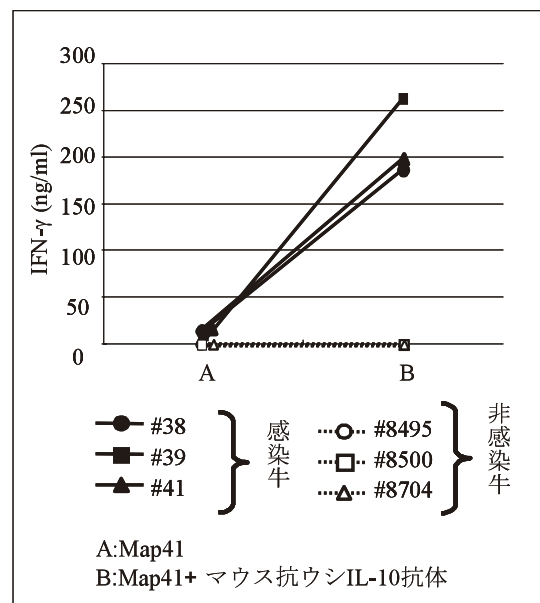


図 2. 抗牛 IL-10 抗体添加による組換え抗原 Map41 誘導 IFN- $\gamma$  産生の増加