

表1 リファンピシン用オリゴヌクレオチド配列

配列1	17mer	GCTGAGCAAATTCATGG (m 1)
配列2	17mer	GCTGAGCGAATTCATGG (m 2)
配列3	17mer	GCTGAGCTAATTCATGG (m 3)
配列4	17mer	GCTGAGCCCATTTCATGG (m 4)
配列5	19mer	AATTCATGGTCCAGAACAA (m 5)
配列6	19mer	AATTCATGGAACAGAACAA (m 6)
配列7	17mer	GAACAACCTCGCTGTCGG (m 7)
配列8	15mer	CCGCTGTTGGGGTTG (m 8)
配列9	17mer	GGTTGACGCCCCAGCGC (m 9)
配列10	17mer	GGTTGACCAACAAGCGC (m 10)
配列11	17mer	GGTTGACCGACAAGCGC (m 11)
配列12	17mer	GGTTGACCTACAAGCGC (m 12)
配列13	17mer	GGTTGACCCCCAAGCGC (m 13)
配列14	17mer	GGTTGACCCGCAAGCGC (m 14)
配列15	17mer	GGTTGACCCAAAAGCGC (m 15)
配列16	17mer	GGTTGACCCAGAAGCGC (m 16)
配列17	15mer	CGACTGTGGGCGCTG (m 17)
配列18	15mer	CGACTGTGGGCGCTG (m 18)
配列19	14mer	TCGGCGCCGGGGCC (m 19)

2) リファンピシン耐性結核菌検出様プローブの合成

ON99-002およびON99-003を用いてPCRを行った。鑄型としては結核菌標準菌株H37Rvおよび臨床分離株より抽出したDNAを用いた。PCR反応には、宝酒造社製のZ-Taq DNAポリメラーゼを用いた。本プライマーペアにより用いた臨床分離株全てにおいて良好なDNA増幅が見られた。増幅されてくるDNA断片の長さは予想された様に約100塩基対であった。増幅に要する時間は約45分であった。

3) ハイブリダイゼーションおよび検出
PCR反応により得られたビオチン化プローブ100ngをエタノール沈澱後10%デキストラン硫酸/5xSSC溶液またはArrait Unihyb溶液に溶解した。プローブを変性させた後27、32、37、42℃のいずれかの温度にて3時間のハイブリダイゼーションを行った。その後、2xSSC/0.1%SDSにて室温5分、2xSSC室温5分の洗浄し、ビオチン化プローブの検出を行った。この結果をフラットベットスキャナによりコンピュータに取込み、画像解析ソフトNIHイメージ1.59PPCにて解析を行った。その結果Arrait Unihyb溶液により10%デキストラン硫酸/5xSSC溶液にくらべて良好な結果が得られた。ハイブリダイゼーションの温度は42℃がもっともバックグラウンドの低い結果が得られた。洗浄は2xSSC/0.1%SDSよりも3Mテトラメチルアンモニウムクロライド溶液によるほうが高いコントラストが得られた。また、検出方法はペルオキシダーゼ標識ビオチニルチラミドキット、ABC-ペルオキシダーゼキットおよびABC-アルカリフォスファターゼキットのどれにおいても同様な高感度が得られた。ただし、ペルオキシダーゼ標識ビオチニルチラミドキットを用いた場合にはその捜査時間が約2時間半必要となる。これにくらべてABC-ペルオキシダーゼキットおよびABC-アルカリフォスファターゼキットでは約1時間と短い。また、ABC-アルカリフォスファターゼキットではシグナルの均一性がABC

B	19 W1	16 m1	17 m2	18 m3	18 m4					B	
	19 W2	18 m5	17 m6								
	21 W3	16 m7									
	17 W4	15 m8									
	18 W6	16 m9	16 m10	16 m11	17 m12	20z m13	18 m14	17 m15	17 m16		
	17 W7	14 m17	14 m18								
B	17 W8	14 m19									B

図2. リファンピシン耐性結核菌迅速鑑別のためのDNAチップにおけるスポットの配列

ーペルオキシダーゼキットをもちいたばあいより優れていた。以上の結果よりハイブリダイゼーションおよび検出の条件は、ハイブリダイゼーション温度：42℃、洗浄：3Mテトラメチルアンモニウムクロライド溶液、検出：ABC-アルカリフォスファターゼキットとした。以上の条件下に様々なリファンピシン耐性臨床分離株の迅速鑑別試験を行った。その流れを図3に、代表的な結果を図4に示す。

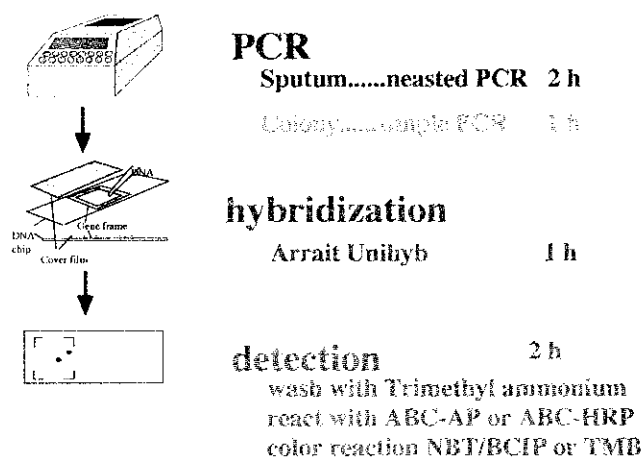


図3. DNAチップによる薬剤耐性結核菌迅速鑑別のための流れ図

リファンピシン耐性に関係する様々な変異を本DNAチップにて検出できることが判明した。

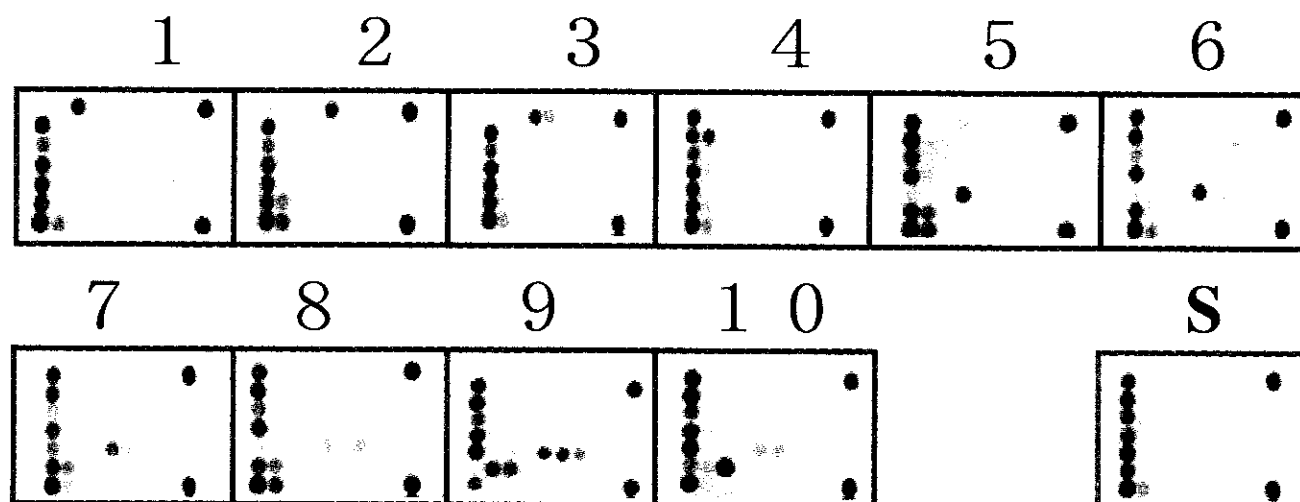


図4. DNAチップによるリファンピシン耐性結核菌迅速鑑別。1から10は耐性菌、Sは感受性菌よりえられた結果

4) 他の薬剤に対する耐性検出のためのDNAチップの作成

リファンピシン耐性結核菌における *rpoB* 遺伝子上の変異と同様にストレプトマイシン耐性と16SリボゾームRNA遺伝子およびリボゾーム蛋白S12遺伝子、イソニアジド耐性とカララーゼ・ペルオキシダーゼ遺伝子および *inhA* 遺伝子、エタンブトールとアラビノシルトランスフェラーゼ遺伝子、カナマイシン耐性と16SリボゾームRNA遺伝子それぞれにおける特定の変異の関係が明かとされている。これらを検出するためのオリゴヌクレオチドをリファンピシン耐性結核菌検出DNAチップと同様に合成し、DNAチップ基盤上に結合させた。チップ上のスポットの配列を図5に示した。

5) 他の薬剤に対する耐性検出のためのプローブの合成

図6に示すようにPCR様にプライマーを合成し、これらを用いてPCRを行った。鋳型としては結核菌標準菌株H37Rvおよび臨床分離株より抽出したDNAを用いた。PCR反応には、宝酒造社製のZ-Taq DNAポリメラーゼを用いた。反応液はポリメラーゼ添付されているものを用いた。これに、10ngの結核菌由来DNAを加え、PCRを行った。反応は98℃-5秒、55℃-5秒、72℃-15秒のサイクルを35回行った。本プライマーペアにより用いた臨床分離株全てにおいて

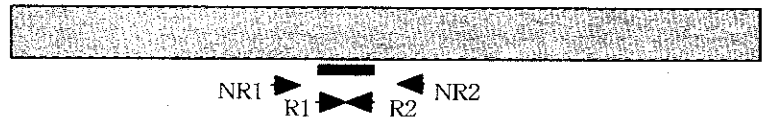
B	19 W1	16 m1	17 m2	18 m3	18 m4											B
	19 W2	18 m5	17 m6													
	21 W3	16 m7														
	17 W4	15 m8														
	18 W6	16 m9	16 m10	16 m11	17 m12	20z m13	18 m14	17 m15	17 m16							
	17 W7	14 m17	14 m18													
B	17 W8	14 m19											B			
B	inh A ¹⁷ w1	inh A ¹⁷ 1m1	inh A ¹⁷ 1m2											B		
	inh A ¹⁹ w2	inh A ¹⁹ 2m1	inh A ¹⁹ 2m1													
B	K1 ²⁰ w1	K1 ¹⁸ w1m											B			
	K1 ¹⁷ w2	K1 ¹⁷ w2m														
B	K2 ²¹ w3	K2 ¹⁹ w3m	K2 ²¹ w3m'											B		
	K2 ¹⁴ w4	K2 ¹⁴ 4m1	K2 ¹⁵ 4m2													
	K2 ¹⁷ w5	K2 ¹⁵ w5m														
	K2 ¹⁶ w6	K2 ¹⁷ w6m														
B	K3 ¹⁸ w7	K3 ¹⁶ w7m											B			
	K3 ¹⁷ w8	K3 ¹⁴ w8m														
	K3 ¹⁴ w9	K3 ¹⁴ w9m														
B	K4 ²⁰ w10	K4 ¹⁹ w10m											B			
B	K5 ¹⁷ w11	K5 ¹⁷ w11m1	K5 ¹⁸ w11m2	K5 ¹⁷ w11m3											B	
	K5 ¹⁷ w12	K5 ¹⁵ w12m														
B	K6 ¹⁸ w13	K6 ¹⁶ w13m											B			
	K6 ²⁰ w14	K6 ¹⁷ w14m														
B	K7 ²⁰ w15z	K7 ¹⁶ w15m											B			
B	K7 ¹⁸ w16	K7 ¹⁷ w16m											B			

B	530 ¹⁸ 1W	530 ¹⁶ 1m1											B	
	530 ¹⁶ 2WT	530 ¹⁶ 2m1	530 ¹⁷ 2m2	530 ¹⁵ 2m3	530 ¹⁶ 2m4									
	915 ¹⁸ 2W	915 ¹⁸ 2m1	915 ¹⁷ 2m2	915 ¹⁵ 2m3										
	915 ¹⁷ 1W	915 ¹⁵ 1m1												
	rps ²⁰ 1W	rps ¹⁶ 1m1	rps ¹⁶ 1m2											
B	rps ¹⁶ 2WT	rps ¹⁵ 2m1	rps ¹⁵ 2m2	rps ¹⁴ 2m3							B			
	140 ¹⁹ 1W	140 ¹⁸ 1m1	140 ¹⁸ 1m2	140 ¹⁸ 1m3										
B	140 ¹⁶ 2WT	140 ¹⁶ 2m1											B	
B	EB ¹⁷ 1WT	EB ²⁰ 1m1	EB ¹⁸ 1m2	EB ¹⁸ 1m3	EB ¹⁸ 1m4	EB ¹⁸ 1m5					B			
	EB ¹⁶ 2WT	EB ¹⁶ 2m												
B	Tub-P ¹⁸	Tub-N ¹⁸	avi-P ¹⁸	avi-N ¹⁸							B			

図5. リファンピシン、イソニアジド、ストレプトマイシン、カナマイシン、エタンブトール耐性結核菌迅速鑑別のためのDNAチップにおけるスポットの配列

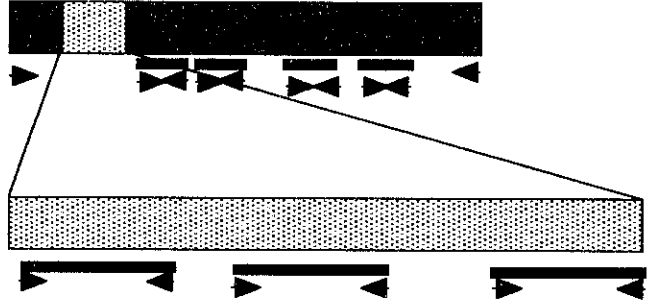
RFP

rpoB gene 3534 bp
RNA polymerase beta subunit

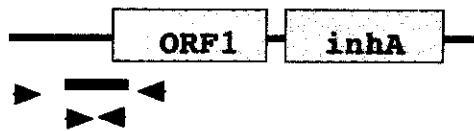


INH

katG gene 2205 bp
catalase-oxidase

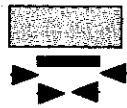


inhA locus
orf1 744 bp
3-ketoacyl-acyl carrier protein
protein
inhA 810 bp
enoyl-[acyl-carrier-protein]
reductase

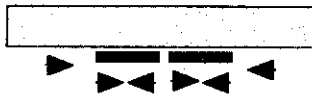


SM

rpsL gene
372 bp

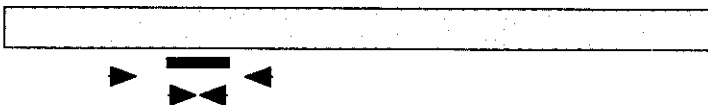


rrs gene
1464 bp



EB

embB gene
3296 bp



KM

rrs gene
1464 bp

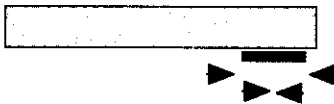


図6. リファンピシン、イソニアジド、ストレプトマイシン、カナマイシン、エタンブトール耐性結核菌迅速鑑別のためのプローブ増幅のためのストラテジー

良好なDNA増幅が見られた。増幅されてくるDNA断片の長さはそれぞれ予想された長さであった。増幅に要する時間は約45分であった。

6) ハイブリダイゼーションと検出

リファンピシン耐性結核菌検出DNAチップの場合と同様に行った。ただし、ハイブリダイゼーション温度：42℃、洗浄：3Mテトラメチルアンモニウムクロライド溶液、検出：ABC-アルカリフォスファターゼキットとした。以上の条件下に様々な臨床分離株100株の迅速鑑別試験を行った。これらの判定結果と小川培地を用いた耐性試験の結果との整合性に問する検討を行った。その結果を表2に示した。

表2. DNAチップによる耐性判定結果. ○：一致、△：判定不能、×：不一致、R：耐性、S：感受性

		RFP	INH	SM	EB	KM
R	○	64/72	51/80	37/60	15/53	18/27
	△	0/72	15/80	2/60	30/53	1/27
	×	8/72	14/80	21/60	8/53	8/27
S	○	28/28	9/20	36/40	7/48	68/73
	△	0/28	10/20	3/40	25/48	5/73
	×	0/28	1/20	1/40	16/48	0/73

この方法によりリファンピシン耐性菌の約89%が鑑別可能であった。さらにイソニアジド耐性菌では約64%、ストレプトマイシン耐性菌では約62%、カナマイシン耐性菌では約67%、エタンブトール耐性菌では約28%が鑑別可能であった。

D. 考察

本研究では薬剤耐性結核菌の迅速鑑別の法法として、DNAチップの構築を試みた。本年度はまずリファンピシン耐性結核菌検出チップの作成と臨床分離株を用いた研究を行った。これにより得られた最適条件を加味してイソニアジド耐性、ストレプトマイシン耐性、カナマイシン耐性、エタンブトール耐性結核菌検出チップの作成と臨床分離株を用いた研究を行った。結果の項で示した様にそれぞれの薬剤で異なった検出率が得られた。これまでにリファンピシン耐性：約95%、イソニアジド耐性：約80%、ストレプトマイシン耐性：約80%、カナマイシン耐性：約70%、エタンブトール耐性：約70%において耐性に

関係する変異が報告されている。これを考えあわせるとリファンピシンおよびカナマイシン耐性の鑑別率はほぼ予想どおりであった。イソニアジドおよびストレプトマイシン耐性の鑑別率は予想より若干低いように思われた。エタンブトール耐性の鑑別のためには大きな改良が必要であると考えられた。

E. 結論

本研究の結果はさらに改良の余地はあるものの幅広い範囲でDNAチップによる薬剤菌の検出が可能であることを示すものである。今後、マルチプレックスPCR（1本のチューブで一度にプローブの合成を行う）によりプローブを作成する方法の検討を行う必要がある。また、検出率をさらに高めるためにはキャプチャーオリゴヌクレオチドの改良、追加も必要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Katsuki Ohtani, Yasuhiko Suzuki, Takao Kawai, Souji Eda, Tetsuo Kase, Takashi Sakamoto, and Nobutaka Wakamiya. High-level and effective production of human mannan-binding protein (MBP) in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *J. Immunol. Methods* 1999, 222: 135-144

Katsuki Ohtani, Yasuhiko Suzuki, Souji Eda, Takao Kawai, Tetsuo Kase, Hiroshi Yamazaki, Tsutomu Shimada, Hiroyuki Keshi, Yoshinori Sakai, Atsushi Fukuou, Takashi Sakamoto, Nobutaka Wakamiya. Molecular cloning of a novel human collectin from liver (CL-L1). *J. Biol. Chem.* 1999, 274:13681-13689

Tetsuo Kase, Yasuhiko Suzuki, Takao Kawai, Takashi Sakamoto, Katsuki Ohtani, Souji Eda, Akiko Maeda, Yoshinobu Okuno, Takashi Kurimura, and Nobutaka Wakamiya. Human mannan-binding lectin inhibits the infection of influenza A virus without

complement. Immunology 1999, 97:385-392

M. Kurita, M. Matsumoto, S. Tsuji, M. Kawakami, Y. Suzuki, H. Hayashi, K. Toyoshima, and T. Seya. Antibody-independent classical complement pathway activation and homologous C3 deposition in xeroderma pigmentosum cell lines. Clin. Exp. Immunol. 1999, 116:547-53

Shida K, Nomura M, Matsumoto M, Suzuki Y, Toyoshima K, Seya T. The 3'-UT of the ubiquitous mRNA of human CD46 confers selective suppression of protein production in murine cells. Eur J Immunol 1999, 29; 3603-8

鈴木定彦、市原竜生、田丸亜貴、Amin Ruhul、勝川千尋、牧野正直、阿部千代治。DNAチップによる結核菌の耐性診断。バイオインダストリー in press

鈴木定彦、勝川千尋。結核および非定型抗酸菌症。まこと in press

2. 学会発表

鈴木定彦、勝川千尋、田丸亜貴、Amin Ruhul、陵本功子、田村俊秀。DNAチップを用いた薬剤耐性結核菌迅速鑑別法の開発。第52回日本細菌学会関西支部総会 1999年11月 大阪

鈴木定彦結核菌の薬剤耐性に関与する遺伝子の解析と迅速診断への応用。第75回日本結核 日本病学会総会 2000年4月 大阪

陵本 功子、鈴木 定彦、下山 孝、田村 俊秀。結核菌青山B株整列クローンライブラリーの作成。第75回日本結核病学会総会 2000年4月 大阪

.Amin Md. Ruhul, Isako Okamoto, Toshide Tamura, Aki Tamaru, Yasuhiko Suzuki .
COMPARISON OF SELF- LIGATION

MEDIATED POLYMERASE CHAIN REACTION AND MIXED-LINKER POLYMERASE CHAIN REACTION IN MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF TUBERCULOSIS. . 第75回日本結核病学会総会 2000年4月 大阪

Yasuhiko Suzuki, Souji Eda, Takao Kawai, Katsuki Ohtani, Tetsuo Kase, Takashi Sakamoto, Masanao Makino and Nobutaka Wakamiya. High Serum Mannose Binding Lectin Concentration in Leprosy Patients in Japan. アジアオセアニア免疫・アレルギー学会総会 2000年1月 バンコク

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

結核菌 virulence の in vitro における評価に関する研究

分担研究者 小野寄菊夫 名古屋市立大学薬学部教授
研究協力者 瀧井猛将、田村綾子 名古屋市立大学薬学部
P. J. Brennan コロラド州立大学
阿部千代治 結核研究所

BCG や結核菌の virulence を知ることは、ワクチンの開発、結核患者の治療や感染予防上重要である。本来、virulence は in vivo における菌の増殖や発症をもつて評価されるものである。しかし、感染動物実験を行うことは色々な問題がある。我々は、ヒト胎児由来2倍体肺線維芽細胞株を virulence の異なる BCG(Pasteur, Tokyo)株や結核菌株と培養後、IL-1 や TNF- α で処理すると、菌の virulence に比例して細胞死が起こることを見だし、本実験系が結核菌や BCG の in vitro における virulence の評価やワクチンの開発に応用できると考えられた。去年は、本方法により臨床分離結核菌株の virulence の評価を試み、薬剤感受性株、多剤耐性菌株を含む薬剤耐性株について調べた結果、感受性株、耐性株何れも H37Rv 株とほぼ同様な virulence を示した。更に、多剤耐性株について、カタラーゼ活性陽性と陰性株について比較したが、同様な virulence であった。従って、本アッセイ系で見る限り薬剤耐性結核菌も感受性菌も同等の virulence を持っていると考えられた。今年は、さらに臨床分離 *Mycobacterium avium* complex(MAC)に付いても、同様な方法で virulence を調べた。その結果、MAC は結核菌に比べて、明らかに virulence が弱いことが明らかになった。さらに、結核菌が、宿主の細胞から細胞死誘導因子の産生を促していることが明らかになった。

A. 研究目的

BCG や結核菌の virulence を知ることは、ワクチンの開発、結核患者の治療や感染予防上重要である。我々は、ヒト胎児由来2倍体肺線維芽細胞株 (MRC-5, MRC-9) を virulence の異なる BCG(Pasteur, Tokyo)株、結核菌 H37Rv や H37Ra 株と培養後、IL-1 や TNF- α で処理すると、菌の virulence に比例して細胞死が誘導されることを見だし

ている。従って本実験系は、結核菌や BCG の in vitro における virulence の評価やワクチンの開発に応用できると考えられた。以上の知見をふまえ、本方法により臨床分離結核菌株、薬剤感受性株、多剤耐性を含む薬剤耐性株について調べた結果、感受性株、耐性株何れも H37Rv 株とほぼ同様な virulence を示した。更に、多剤耐性株につ

いて、カタラーゼ活性陽性株と陰性株について比較したが、同様な virulence であった。以上の結果、本アッセイ系で見ると薬剤耐性結核菌も感受性菌も同等の virulence を持っていると考えられた。

今回、同様な方法で、臨床分離 *M. avium* complex(MAC)の virulence の評価を試みた。さらに、本現象が宿主細胞から蛋白性細胞死誘導因子の産生を介している可能性について検討した。

B. 研究方法

In vitro における菌の virulence の判定法

96穴培養プレートに標的細胞をまき、細胞を付着させた後に菌を加え、16～18時間培養した。次に TNF- α を加え2日間培養したのち、細胞をクリスタルバイオレット、で染色し、プレートリーダーで吸光度を測定した。

菌株は BCG の Pasteur、Tokyo 株及び、結核菌の H37Rv、H37Ra 株の生菌、及びオートクレイブ死菌を用いた。また、臨床分離結核菌株並びに *M. avium* complex(MAC)を用いた。

結果のグラフの横軸は細胞当たりの菌数、縦軸は菌を加えず、かつ IL-1 や TNF- α を加えていない細胞の吸光度を100%として示した。

C. 研究結果および考察

1) 臨床分離結核菌株、多剤耐性結核菌株、MAC の virulence の比較

ヒト線維芽細胞株 MRC-9 を結核菌臨床分離 11株(MTB-1～11)、薬剤耐性分離5株(DR-1～5)、多剤耐性分離9株(MDR1～9)、並びに臨床分離 MAC6株(MAC1-6)で処理後、TNF α を添加し、細胞の生存率を比較することにより、これら菌の virulence を比較した。従来の結果から、菌の virulence が強いほど、強い細胞死が認められる。

その結果、昨年報告したように、結核菌は、薬剤感受性株、耐性株何れも同様な活性を示し、両者間に差は認められなかった(図1a, b)。それに比べ、MACは弱い活性しか示さなかった(図2)。以上の結果、MACの virulence は結核菌に比べて明らかに弱いと考えられる。この結果は、ヒトにおける両菌の virulence の差を良く反映している。

2) 培養上清中にみられる細胞死誘導活性

次に、結核菌により誘導される細胞死が、細胞死を誘導する因子の産生を介しているかどうか検討した。強毒株 H37Rv 株をヒト線維芽細胞株 MRC-5 細胞に加え、その後 TNF を添加した培養上清をとり、無処理の線維芽細胞の培地中に添加すると、生菌では菌数依存的に宿主細胞の細胞死を誘導する活性が上清中に認められた。一方、死菌で同様に細胞を処理した培養上清中には、細胞死誘導活性は全く見られなかった。 γ 線照射した菌は高い菌数で若干の細胞死誘導能が認められた(図3)。一方、BCG では、生菌でもこのような細胞死誘導能は認められなかった。従って、この細胞死は菌の virulence に関係していると考えられる。

この現象は、生菌でしか見られないことから、菌が宿主細胞内に取り込まれた後

に、細胞死誘導因子を作り出すか、もしくは宿主細胞にこの因子の産生を誘導させている可能性がある。 γ 線照射した後も、細胞壁や細胞膜にある酵素活性が残っていることが報告されていることから、 γ 線照射した菌に若干の細胞死誘導活性がある理由として、これらの酵素が宿主細胞の細胞死を誘導することが考えられる。高温・高圧滅菌した菌にこの活性が認められないのは、滅菌操作により大きく細胞壁や細胞膜の構造や分子構造が変化したためかもしれない。

次に、ヒト線維芽細胞に H37Rv を感染させた後、この細胞死誘導因子がどの分画に現れるかを調べた。その結果、培養上清中に活性が認められた (図 4)。一方、宿主細胞破碎液中には活性を認められなかった。このことは、この因子が細胞中に存在するときには不活性型の前駆体として存在し、修飾を受けた後、活性型として細胞外に分泌されることが予想される。本因子は菌数依存的、時間依存的に培養上清に現れることがわかった。

また、この因子はヒト線維芽細胞だけでなく、他のヒト由来のマクロファージ系の細胞にも作用し、細胞死を誘導することも示された。更に、宿主細胞としてヒト由来のマクロファージ系の細胞を用いた場合にも、同様に H37Rv 生菌で細胞死が誘導され、死菌では認められないことから、この現象は線維芽細胞に限ったものではないことが示された (図 5)。

次に本因子が菌由来なのか、宿主細胞由来なのかを調べるために、真核細胞内の蛋白合成器官であるリボソームに結合することにより蛋白合成阻害作用を示すサイク

ロヘキシミドを用いて同様の実験を行った。その結果、サイクロヘキシミドは濃度依存的に、この現象を阻害した (図 6)。

さらに、この因子の熱安定性を調べた結果、90℃、5分間の熱処理により活性が失活した。この結果を別の視点から確認するために、フィルターを通して菌体を除いた H37Rv の培養液、H37Rv から抽出した細胞質分画、細胞壁分画を用いて宿主細胞に対する細胞死誘導活性を調べたが、いずれの分画にも活性は認められなかった。以上の結果から、本因子は蛋白性因子であり、菌ではなく宿主細胞由来であることが証明された。

D. 結論

以上の結果、本 *in vitro* 法により、MAC の virulence は、結核菌に比べて弱いことが示された。これは、ヒトに対する両菌の virulence の差を考える上で興味深い。また、細胞死誘導物質は強毒菌の生菌のみで誘導されることから、菌の病原性と関係があることが強く示唆される。さらに、本因子を同定し、その性状を明らかにすることは菌の毒力の判定のみならず、結核の診断や治療にもつながることが期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 瀧井猛将、阿部千代治、小野寄菊夫. 結核菌・BCG virulence の *in vitro* 評価法

の開発 BCG・BRM療法研究会誌 21、
31-36、1997.

2. T.Takii, C. Abe, A. Tamura, S. Ramayah and
K. Onozaki In vitro evaluation of virulence of
Mycobacterium Bovis BCG, Mycobacterium
Tuberculosis and Clinically Isolates of
multidrug-resistant M. Tuberculosis.

投稿中

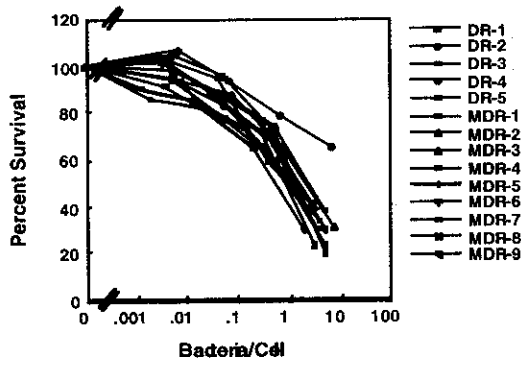
2. 学会発表

1. T.Takii, C. Abe, A. Tamura, S. Ramayah and
K. Onozaki An in vitro method for
evaluation of virulence of mycobacteria.

U.S.-Japan Cooperative Medical Science
Program, Proc. thirty-third research conference
on tuberculosis and leprosy, 79-82, 1998.

2. 田村綾子、瀧井猛将、小野寄菊夫、阿
部千代治 結核菌・BCG virulence の in
vitro 評価法の開発 日本薬学会第 119
年会 1999 年 3 月、徳島

a) MDR- and DR-MTB



b) DS-MTB

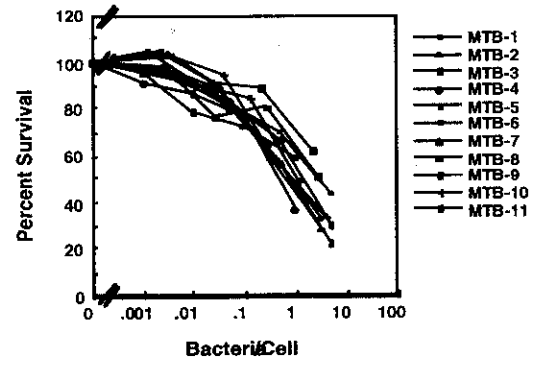


図1 薬剤感受性、耐性結核菌による細胞死誘導活性

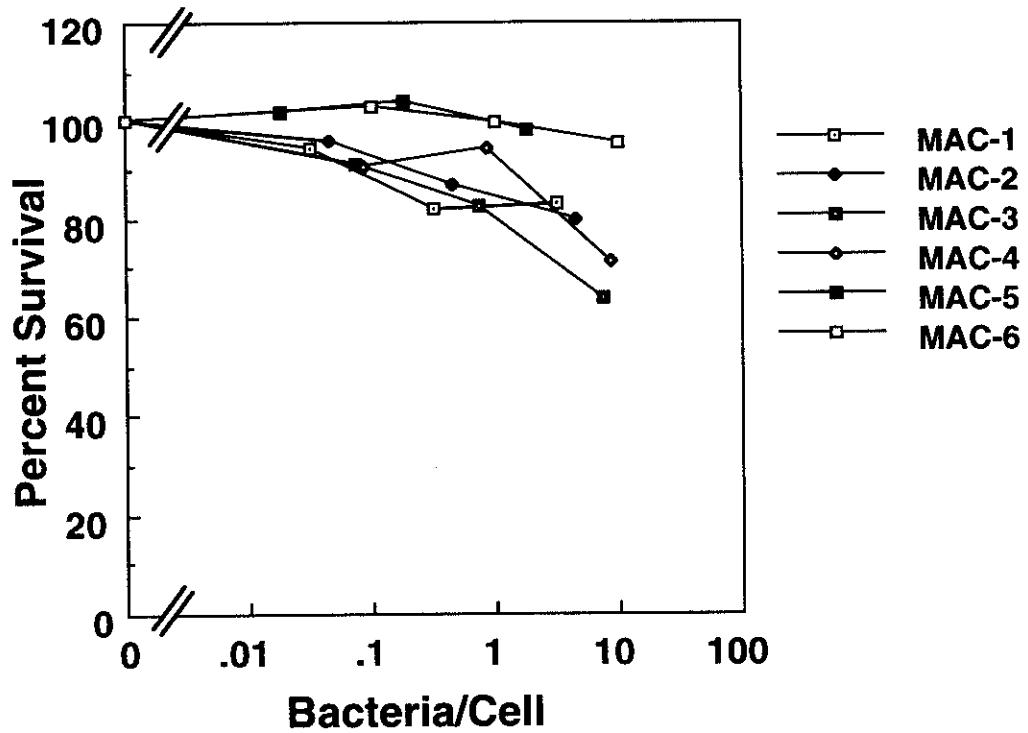


図2 MACによる細胞死誘導活性

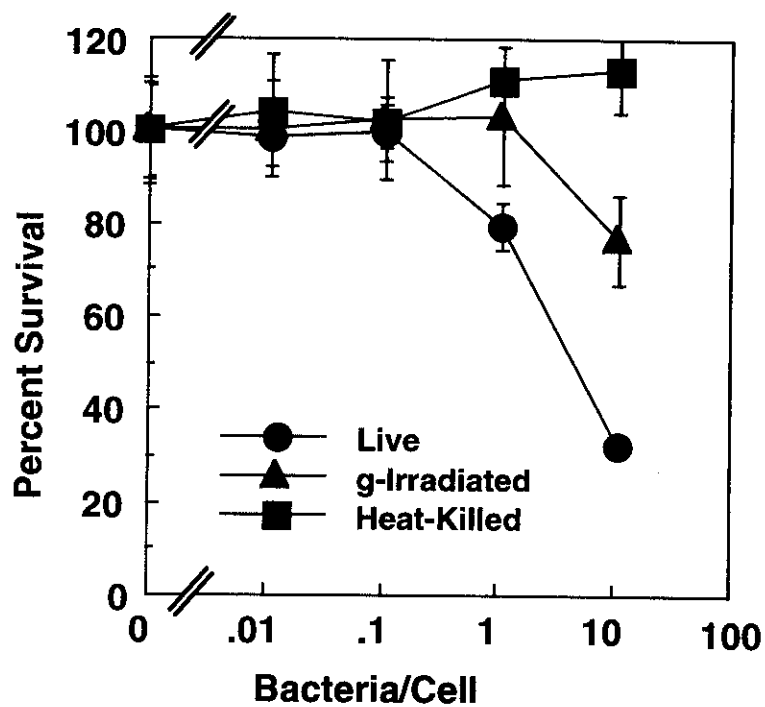


図3 H37Rv 株による細胞死誘導活性

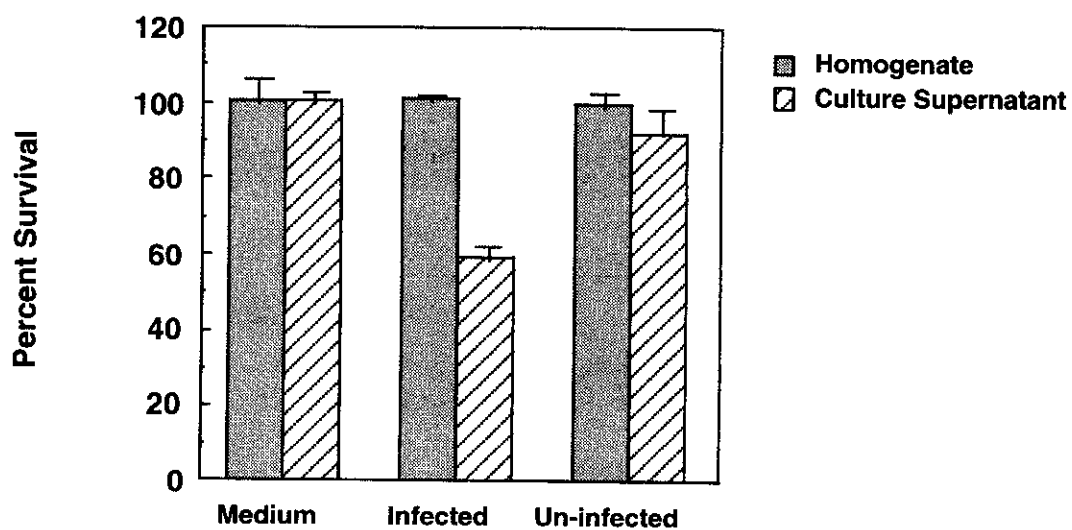


図4 感染細胞、非感染細胞からの培養上清、及び、細胞破碎液中の細胞死誘導活性

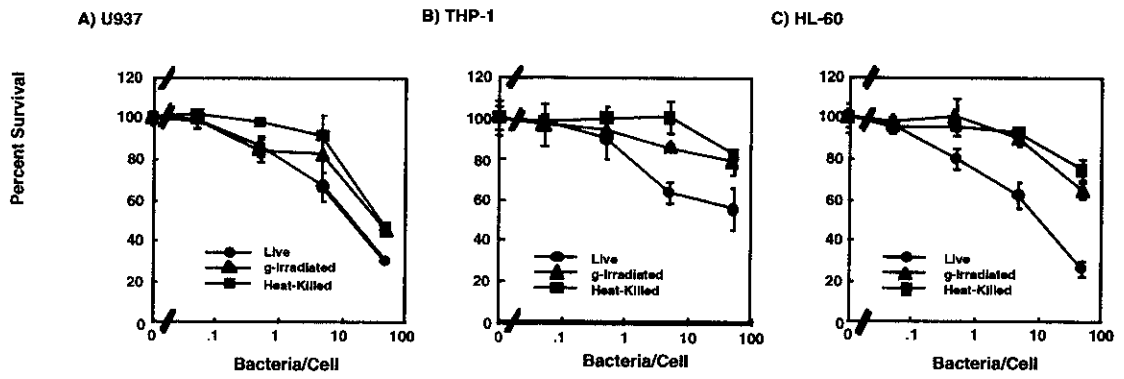


図5 ヒト単球・マクロファージ系細胞における細胞死誘導効果

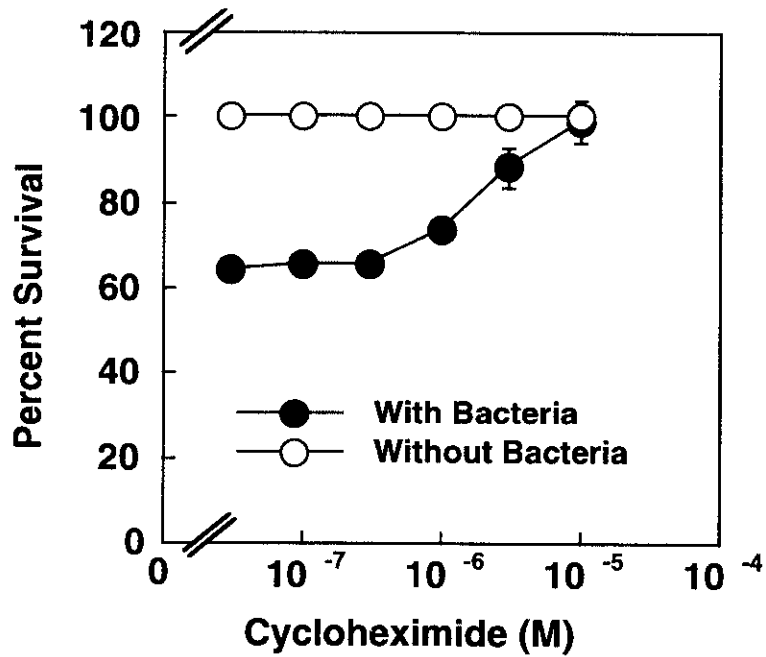


図6 サイクロヘキシミドによる細胞死誘導活性の阻害

（分担）研究報告書

多剤耐性結核における長期生存例に関する研究

主任研究者 阿部千代治 結核予防会結核研究所部長

研究要旨：

現在の化学療法ではいかんともし難い多剤耐性結核治療法を模索して、従来の視点とは逆に宿主側から検討し治療に役立つ因子を探り出すことを試みた。即ち、同じ結核患者であるにもかかわらず治癒した患者と多剤耐性患者との宿主としての免疫応答の違いをサイトカインの面より検討した。その結果、多剤耐性結核患者では、簡単に治癒傾向に向かっている患者や略治癒した患者に比し血清のIFN- γ 値は、有意（5%の危険率）に低く、TGF- β 1値は、逆に有意（5%の危険率）に高かった。これは、両群間に結核菌に対する応答に差があることを示唆している。Th1/Th2比には有意差はみられなかった。このことから多剤耐性結核患者では、Th1細胞の機能減弱が推測され、サイトカイン補充療法が考えられる一つの理由でもある。

分担研究者 毛利昌史
国立療養所東京病院病院長
研究協力者佐藤紘二
国立療養所熊本南病院副院長

し、多剤耐性結核治療の一助とすることを目的にした。

A. 研究目的

多剤耐性結核患者の中には、急激な悪化を来すこともなく、長年持続排菌を続けている患者群がある。このような患者と同じ程度の排菌者でありながら支障無く結核は治癒してしまう症例との間にどのような違いが有るのか、宿主の結核菌に対する応答に関与するサイトカイン（IFN- γ 、TGF- β 1）およびTh1細胞を通して検討

B. 研究対象と方法

対象は、国立療養所東京病院と国立療養所熊本南病院に入院或いは外来通院したことのある患者の中で少なくともINHとRFPの二剤以上の耐性結核菌患者21症例である。対照症例としては結核が治りつつある患者か簡単に略治癒した21症例である。宿主の検体検査としては結核の発症と防御に関連する因子（IFN- γ 、TGF- β 1、Th0細胞、Th1細胞、Th2細胞）を調べた。更に単核球を分離調整しBCG添加群とPPD添

加群を24時間培養し、その上清中のIFN- γ を測定した。これらの検査結果を基に多剤耐性結核の特徴を把握し、順調に治癒した症例と比較して多剤耐性結核の治療に役立つ要因がないか検討した。

C. 研究結果

1) 血清中のIFN- γ

持続排菌している多剤耐性結核患者群と軽快中か略治癒した患者群のIFN- γ の測定値は末尾のグラフの通りである。この両群の平均をt検定で比較すると5%の危険率で有意差が認められた。即ち、多剤耐性結核患者群の方が低値となっていた。

2) 血清中のTGF- β 1

この測定値について、同じく両群間の平均の比較をt検定すると5%の危険率で有意差があり、多剤耐性結核患者群の方が高くなっていてIFN- γ とは逆の傾向を示した。

3) Th1/Th2比

IFN- γ 値に差があったため、Th1/Th2比にも差があるのではないかと思われたが、両群間の平均値に差は認められなかった。ここではサイトカイン産生パターンよりIFN- γ (+)でIL-4(-)をTh1細胞としIFN- γ (-)でIL-4(+)をTh2細胞としている。

4) 培養単球におけるBCG刺激による上清中IFN- γ の産生量

BCGは生菌のためか刺激を受けた単球は、かなり激しく反応してIFN- γ を産生している。しかし、個々の症例の産生量にばらつきが大きく、また両群間の平均値に差は認められなかった。

5) 培養単球におけるPPD刺激による上清中IFN- γ の産生量

BCG刺激の時の上清中IFN- γ の産生量と比較するために同じ数の単球数に調整して

PPD刺激をしたが、BCG程の刺激効果はなくIFN- γ 産生は低値で、しかも、多剤耐性と治癒症例の両群間の平均値に差は認められなかった。

D. 考察

近年、CD4⁺T細胞はその産生するサイトカインのパターンから3つ(Th0/Th1/Th2)の亜集団に分類されるようになっている。結核防御免疫は、T細胞の中でもTh1が主体であるとされ、Th1, Th2サブセットの概念が一般に受け入れられている。そこでIFN- γ はTh1の分化に必須の役割をすることが分かっているので感染抵抗性Th1細胞(抗原特異的IFN- γ 産生性T細胞)の誘導機構として抗原特異的T細胞を高いIFN- γ 産生性T細胞へ分化させることが必要になる。通常、生体内でTh1, Th2は相互に抑制し合うことによりバランスを保ち生体の恒常性を維持しているため、生体にとってこのバランスは重要な意味を有しているといえる。今回の検討では、多剤耐性結核症例においては、略治癒症例に比しIFN- γ 産生量は低く、TGF- β 産生量は高い結果が得られた。Th1/Th2比には、両者間に差がなかったことから推測すると、Th1細胞自身の機能減弱によるIFN- γ 誘導能の低下か、或いは高いTGF- β がTh0細胞から結核菌特異的Th1細胞への分化を抑制することによりIFN- γ の誘導が少なくなったとも考えられる。いずれにしろIFN- γ が通常の結核患者よりも低値であることは、エフェクター細胞の機能低下を意味する。多剤耐性結核の治療にサイトカイン補充療法が考えられる所以でもある。

E. 結論

(1) 多剤耐性結核患者では、排菌が在っているにもかかわらず誘導されるIFN- γ は、軽快中の患者や略治癒した患者の値よりも有意差をもって低く、TGF- β 1は逆に有意差をもって高かった。このことは、結核菌の抗原刺激があるにもかかわらずマクロファージの活性化に必要な抗原特異的なIFN- γ 産生が少ないことを示している。即ち多剤耐性患者では、結核防御免疫の誘導と発現機構が弱体化している可能性がある。

(2) 従って将来的には、多剤耐性結核患者に対する抗原特異的なIFN- γ によるサイトカイン補充療法も考えられる。

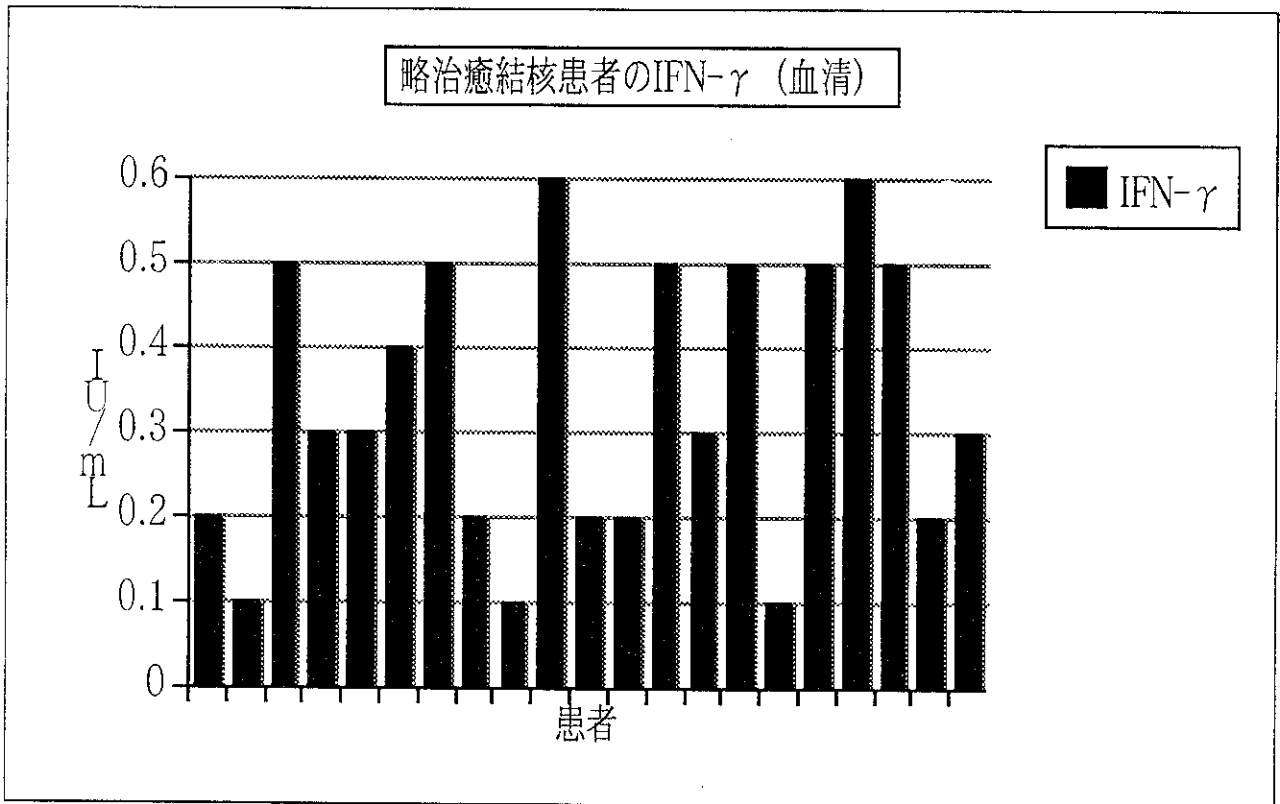
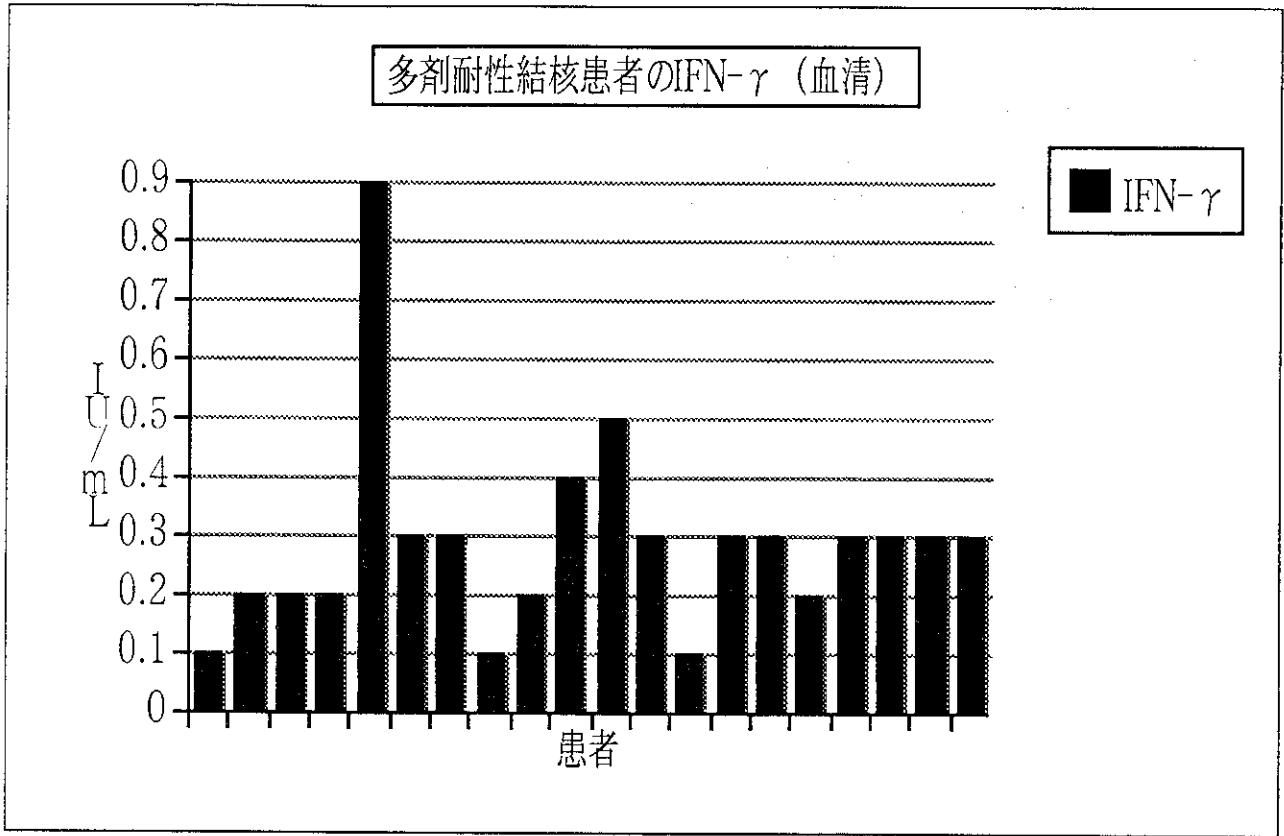
F. 研究発表

学会発表

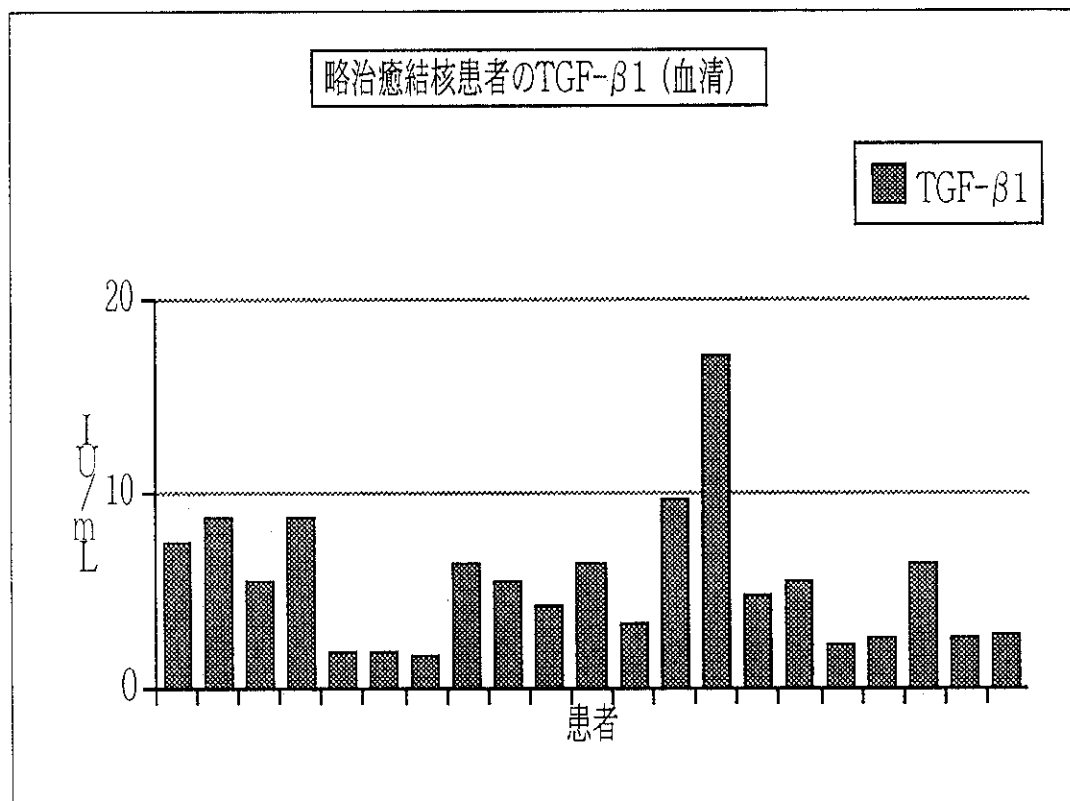
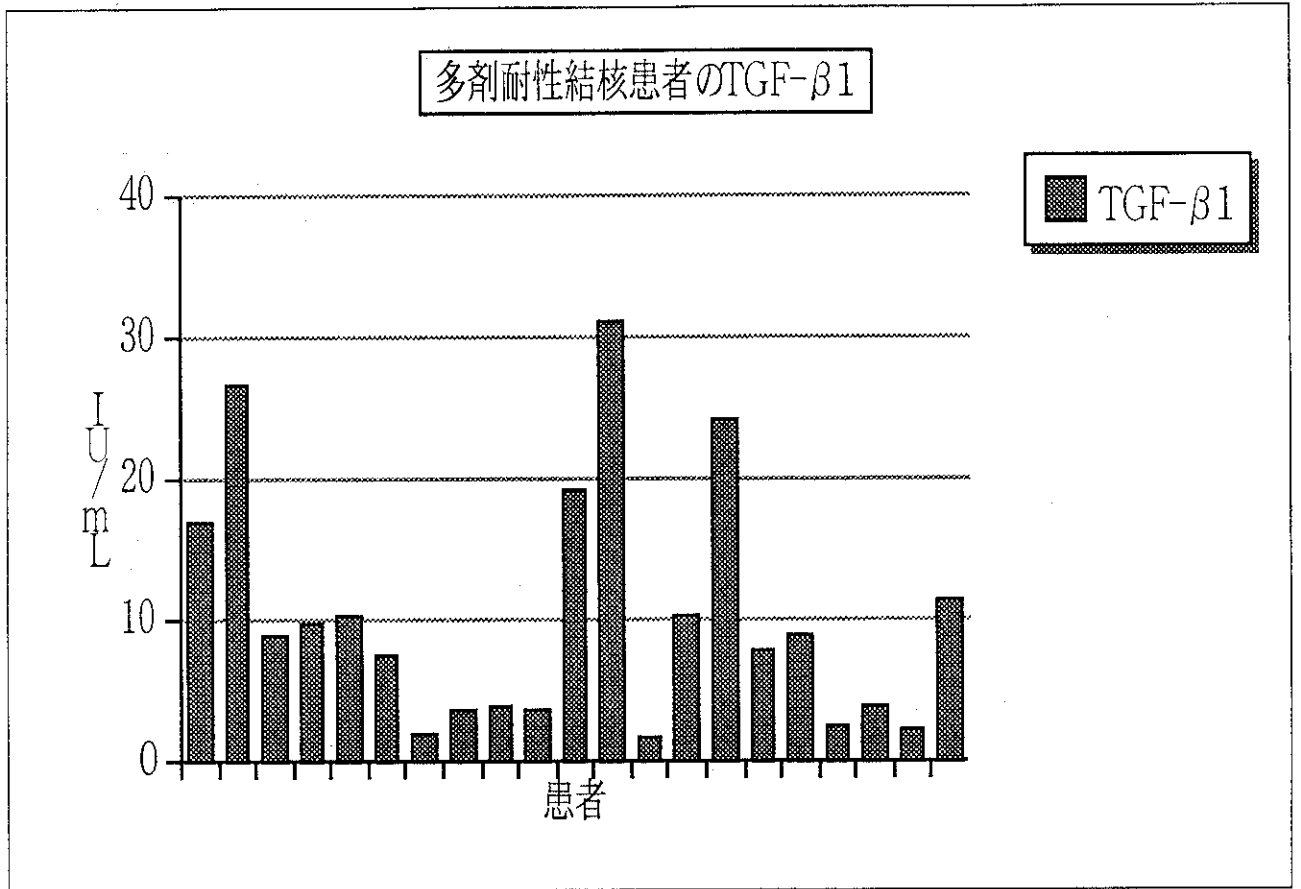
- 1) 佐藤紘二、毛利昌史、他：多剤耐性結核患者が辿った化学療法歴。日本結核病学会総会. 1999.
- 2) 佐藤紘二、毛利昌史、他：宿主応答からみた多剤耐性結核患者と治癒患者。日本呼吸器学会総会. 2000.

G. 知的所有権の取得状況

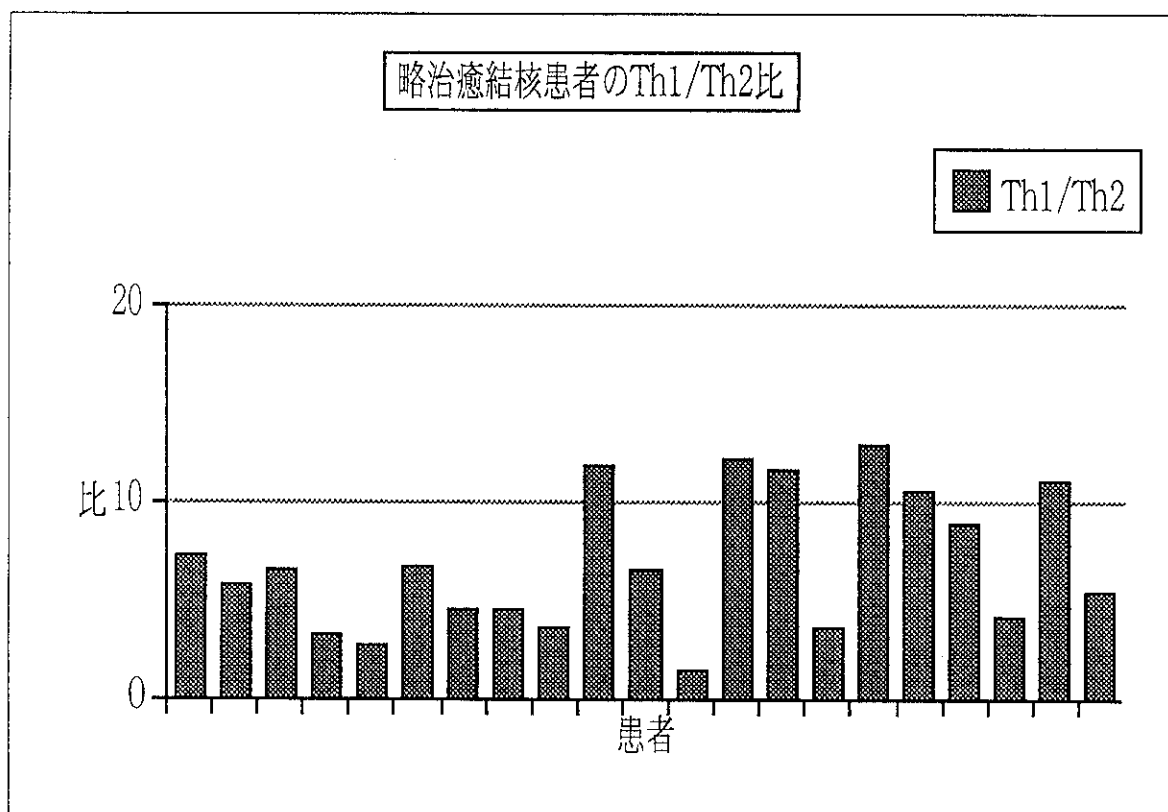
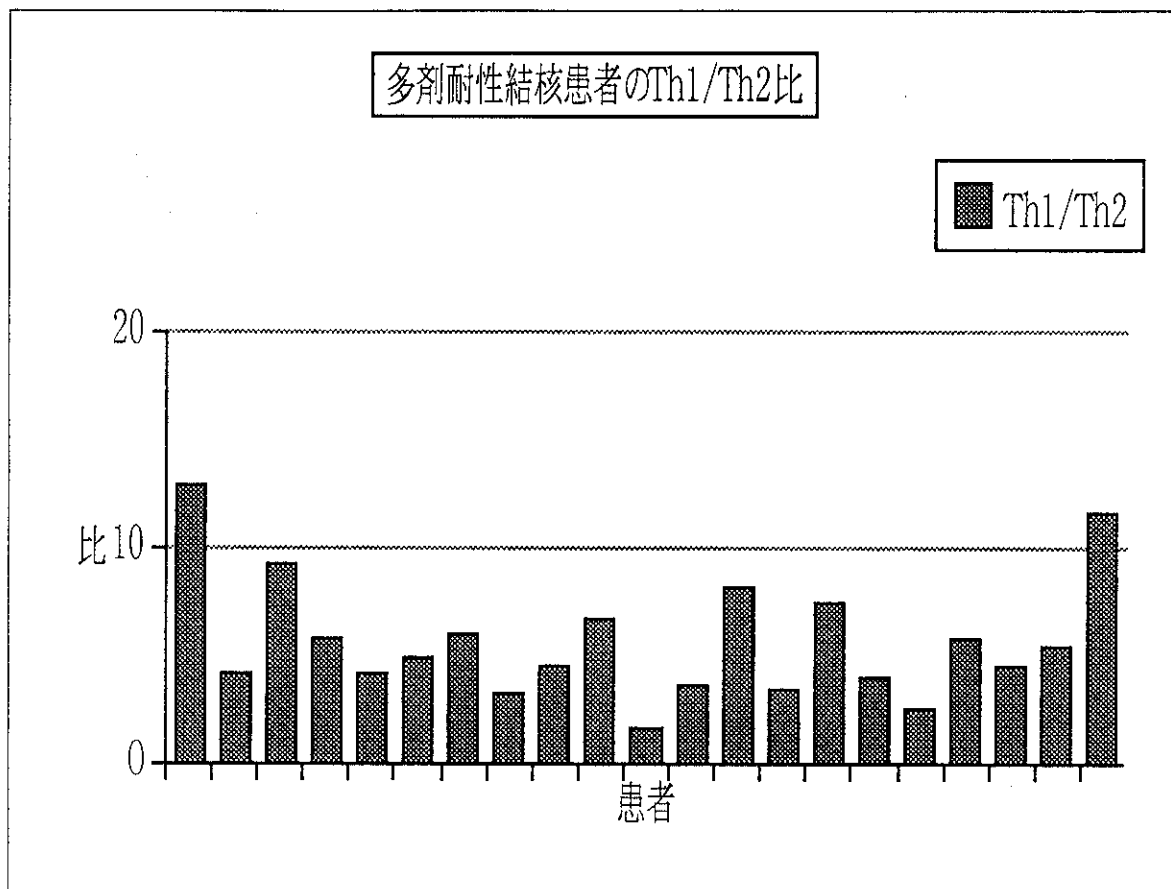
無し。



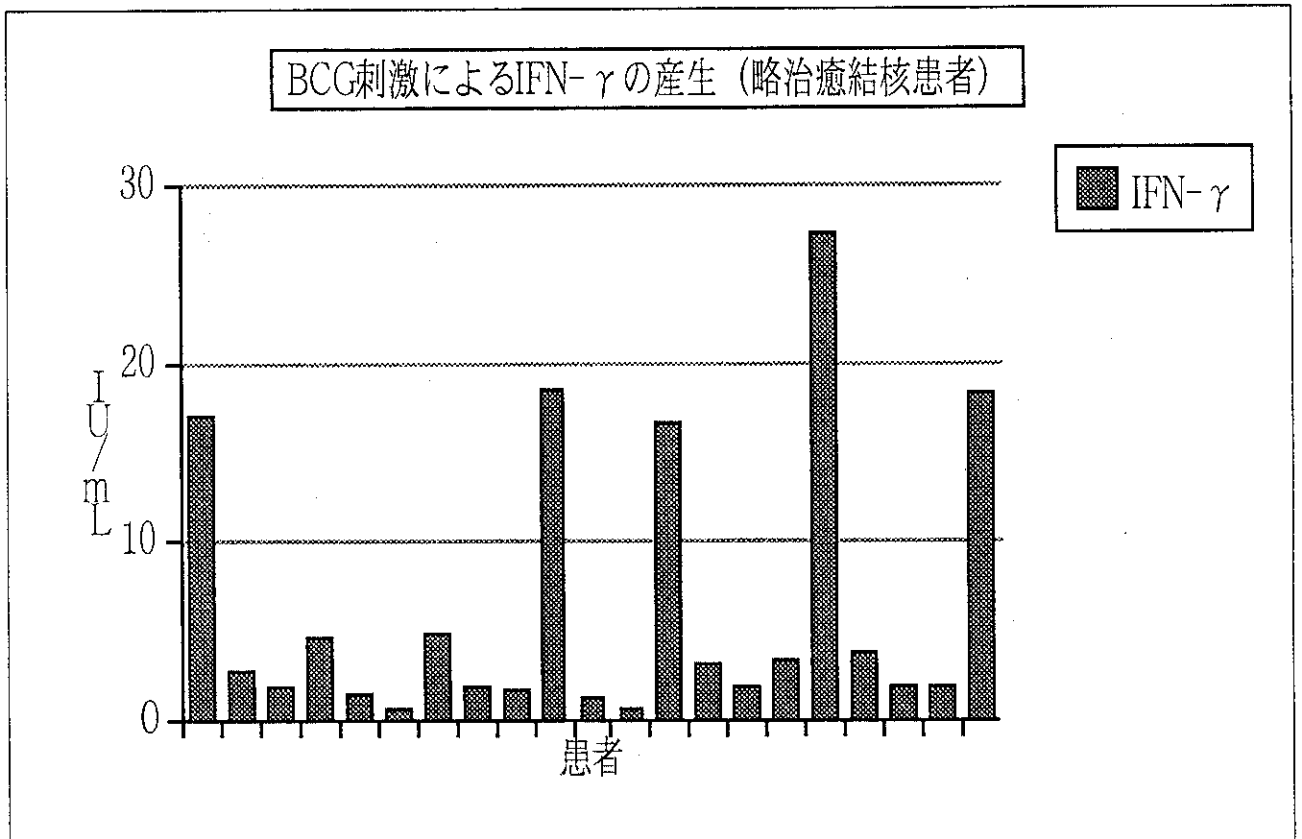
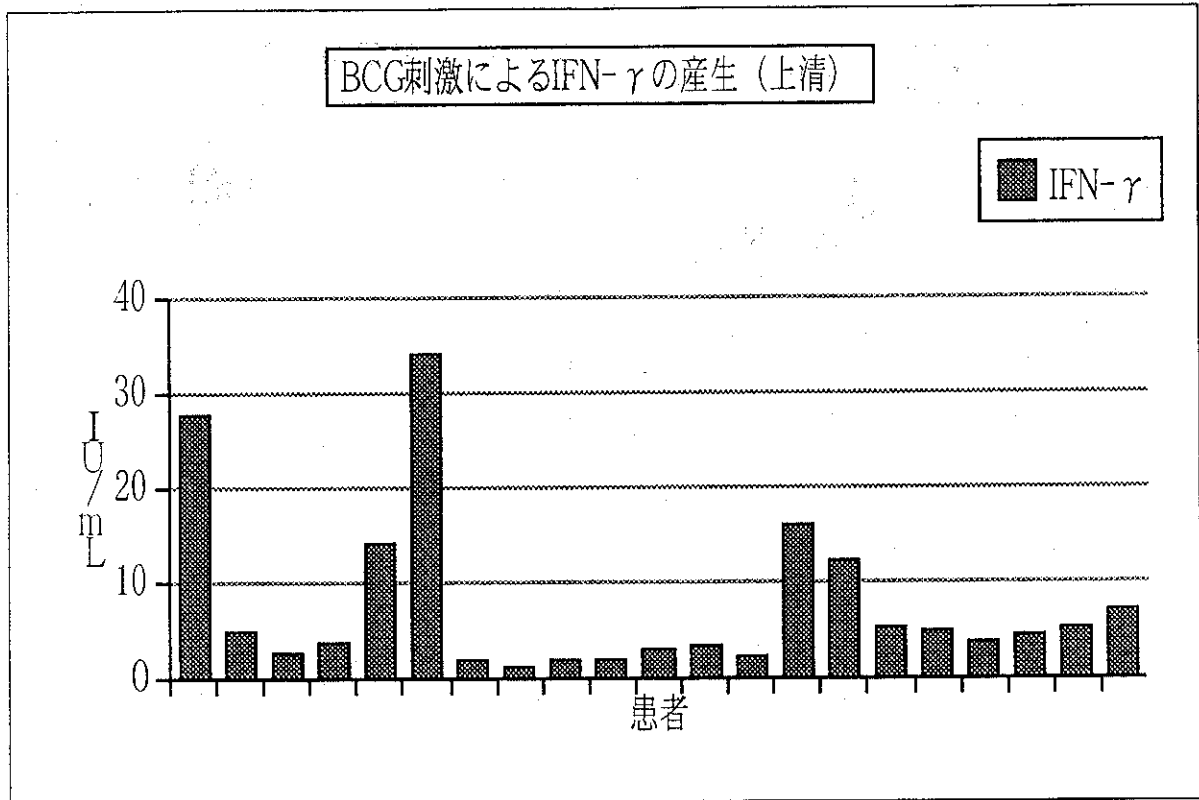
多剤耐性結核患者と略治癒中の結核患者の血清中IFN- γ には、T検定において5%の危険率をもって有意差が認められた。



多剤耐性結核患者と略治癒中の結核患者の血清中TGF- β 1には、T検定において5%の危険率をもって有意差が認められた。



上2図のデータ間には有意差は認められなかった。



上2図のデータ間には有意差は認められなかった。