

200500080A

厚生労働科学研究研究費補助金
国際医学協力研究事業

抗酸菌感染の国際的対応への貢献を目指した基盤に関する研究
(H17-国医-4)

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 光山 正雄

平成18(2006)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	1-4
光山正雄	
II. 分担研究報告	
1. 結核菌生菌によるIFN- γ 産生誘導機序の解析に関する研究	5-8
光山正雄	
2. 結核菌Rv1388 (<i>mIHF</i>), Rv1389, Rv1390が	9-11
<i>Mycobacterium smegmatis</i> の細胞内増殖に及ぼす影響	
谷口初美	
3. 結核菌の新規病原因子に関する分子生物学的解析	12-15
松本壮吉	
4. 初期ラット結核菌感染で発現する遺伝子の探索—血清サイトカインとの比較	16-18
菅原勇	
5. 自然免疫系による結核感染防御機構に関する研究	19-23
竹田 潔	
6. 結核菌による臓器侵襲の分子機構	24-28
大原直也	
7. 抗酸菌感染における免疫防御誘導機構	29-31
吉開泰信	
8. 抗酸菌DNAの宿主免疫賦活機構	32-35
山本三郎	
9. 結核菌由来因子による宿主免疫応答の誘導機構に関する研究	36-40
田村敏生	
10. マクロファージの結核菌殺菌能の分化制御	41-45
赤川清子	
11. 非結核性抗酸菌症とCFTR遺伝子	46-47
慶長直人	
12. IL-12系と抗酸菌症感受性に関する研究	48-50
白川太郎	
13. 抗酸菌感染に関わる動物感受性と病原因子に関する研究	51-58
後藤義孝	

14. <i>Mycobacterium bovis</i> BCG亜株間の一酸化窒素 (NO) 感受性、 及び細胞内増殖能力に関する研究 小野 寄 菊夫	----- 59-64
15. 結核菌の同定、耐性検査へのマイクロアレイの応用に関する研究 -DNAマイクロアレイを用いた結核菌の分子疫学的解析法の構築- 鈴木定彦	----- 65-69
16. 新規結核ワクチンの開発と応用：HVJ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチン 岡田全司	----- 70-74
17. 結核菌の主要防御抗原MPT51を発現する第三世代レトロウイルスの 経気道免疫による肺ホーミング性特異的T細胞の誘導に関する研究 小出幸夫	----- 75-79
18. 結核の地域伝播に関する分子疫学的解析 長谷 篤	----- 80-81
19. 多剤耐性結核の臨床的検出と対策に関する研究 高嶋哲也	----- 82-85
20. らい菌による神経病変の病理病態学的解析 後藤正道	----- 86-88
21. ハンセン病の進展と疾患感受性遺伝子 - <i>IL12RB2</i> 制御領域の多型が宿主防御細胞機能に及ぼす影響 - 大山秀樹	----- 89-96
22. 薬剤耐性らい菌の簡易検出法の開発と伝播状況 松岡正典	----- 97-99
23. 抗酸菌に対する宿主免疫応答 牧野正彦	----- 100-103
24. らい菌に対するマクロファージ応答の機構に関する研究 福富康夫	----- 104-107
25. ハンセン病の新規診断検査法の開発 向井 徹	----- 108-110
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 111-117
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 118-535

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成 18 年 3 月 31 日

厚生労働大臣 尾辻 秀久 殿

住 所 〒610-1103京都市西京区御陵峰ヶ堂町2-20-11

フリカ`ナ ミツヤマ マサオ

研究者 氏 名 光山 正博

(所属機関 京都大学医学研究科)



平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金 (国際医学協力 研究事業) に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) : 抗酸菌感染の国際的対応への貢献を目指した基盤に関する研究 (H17-国医-4)

国庫補助金精算所要額 : 金 14,827,000 円也 (うち間接経費 0 円)

1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添1のとおり)
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次 (別添2のとおり)
3. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書 (別添3のとおり)
4. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (別添4のとおり)
5. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添5のとおり)
6. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況
(総括研究報告書、分担研究報告書の中に、書式に従って記入すること)
7. 健康危険情報

・研究の結果、得られた成果の中で健康危険情報 (国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものがある場合や、研究過程において健康危険情報を把握した場合には、国民の生命、健康に重大な影響を及ぼすと考えられる内容と理由を簡潔に記入するとともに、その情報源 (研究成果、研究者名、学会発表名、雑誌等の詳細) について記述すること。

・既に厚生労働省に通報した健康危険情報であっても、本研究報告書の提出の時点において健康危険情報に該当すると判断されるものについては記述すること。

・分担研究者、研究協力者の把握した情報・意見等についても主任研究者がとりまとめ、一括して総括研究報告書に記入すること。

・なお、交付基準額等決定通知の添付文書において、健康危険情報を把握した際には、一定の書式で速やかに厚生労働省健康危機管理官まで通報していただくよう協力をお願いしているため、本件とともに留意すること。

(作成上の留意事項)

1. 「5. 研究成果の刊行に関する一覧表」に記入した書籍又は雑誌は、その刊行物又は別刷り一部を添付すること。
2. 「1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙」から「5. 研究成果の刊行に関する一覧表」までの報告書等、及び「5. 研究成果の刊行に関する一覧表」に記入した書籍又は雑誌の刊行物又は別刷りは、一括して製本すること。ただし、一冊に製本することが困難な場合は複数の分冊ごとに製本することとし、各々の分冊に表紙を付けるとともに分冊の番号 (1/n 冊、2/n 冊、一等) を表示すること。
3. 研究報告書 (当該報告書に含まれる文献等を含む。以下本留意事項において同じ。) は、国立国会図書館及び厚生労働省図書館並びに国立保健医療科学院ホームページにおいて公表されるものであること。
4. 研究者等は当該報告書を提出した時点で、公表について承諾したものとすること。
5. その他
 - (1) 手書きの場合は、楷書体で記入すること。
 - (2) 氏名は、自署又は記名押印で記入すること。
 - (3) 日本工業規格A列4番の用紙を用いること。各項目の記入量に応じて、適宜、欄を引き伸ばして差し支えない。

研究要旨

我国で最も大きな再興感染症である結核と、アジア地域ではいまなお重要かつ不幸な感染症であるハンセン病という2大抗酸菌感染について、その国内専門家を組織し、抗酸菌の病原機構、宿主免疫応答機構などの基礎的研究、分離菌株の分子疫学解析や疾患の臨床病理学的集団遺伝学的解析などの臨床志向的研究と、新規の診断法やワクチンの開発研究を行った。日米医学研究協力計画の米国側専門部会員との合同会議を通して情報交換と共同研究を行った。さらに汎太平洋新興感染症国際会議における成果講演と情報収集をおこなった。以上の活動により、今後のアジア地域における結核とハンセン病への国際的対応へ貢献をより可能とする基盤研究が推進された。

A. 研究目的

結核は世界の3分の1が感染していると想定され、年間800万人の新患と200万人の死者をみるグローバルには極めて重大な伝染性感染症であり、我国でも年間4万人もの新患発生がみられ、過去数年来減少率の鈍化が著明になっている再興感染症である。成人に対するBCG予防効果の低さや多剤耐性結核菌の増加から、今後の動向には大きな懸念が抱かれてきている。一方結核菌と同じ抗酸菌であるらい菌によるハンセン病は、近隣アジア諸国では今なお多くの要治療患者と多数の新規発生をみている。このような現状に鑑みて、近年著しく発展した分子微生物学、免疫学、分子疫学的手法を活用し、新たな対応へ貢献できる基礎的臨床的研究が急務の課題となっている。本申請研究では、結核、ハンセン病の2大抗酸菌感染を標的とし、40年来培われてきた日米医学協力計画における個別研究・共同研究の蓄積を活用しつつ、種々の新たな研究手法により、我国のみならず特に近隣諸国での新たな対応へも貢献できる、総合的な基盤的研究を展開することが目的である。

B. 研究方法

結核菌／結核に関する研究

- ① 結核菌が何故強い病原性を発揮し、さらに慢性持続感染（潜在化）するのかの機構を、細菌遺伝子のノックアウト、候補遺伝子産物のリコンビナント蛋白作製などの手法で解析する（光山、谷口、松本）。
- ② 結核における組織傷害、肉芽腫形成などの病態にはサイトカインを主体とした宿主応答が大きく関与する。その分子機構について動物モデルを用いて主に免疫学的、分子生物学的手法を用いて解明する（菅原、竹田、大原）。
- ③ 結核に対する防御免疫はマクロファージとT細胞に依存する。このような細胞性防御免疫の誘導と発現の機構につき、免疫生物学的観点から解析し、新たな理解を深めるとともに、ワクチンも含めた免疫治療への基礎理論を構築する（吉開、山本、田村、赤川）。
- ④ 結核や非結核性抗酸菌症の発症や進展には個人の遺伝的素因が関与すると想定されてきたが未だ明確でない。そこで、集団遺伝学と候補遺伝子のSNP検索の技法を用いて、疾患

感受性遺伝子の特定に迫る（慶長、白川）。

また動物種による感受性や病態の違いから、系統発生的なアプローチを試みる（後藤義）。

- ⑤多剤耐性結核の増加はグローバルに進行し脅威となってきた。しかし培養に長期間を要する結核菌の耐性検査には迅速化と確実性が要求される。耐性や病原性検出の新たな手法を開発する（小野寄、鈴木）。
- ⑥ 急務であるBCGに代わる強力で安全な新規ワクチンの開発をさらに進める（岡田、小出）
- ⑦結核多発地域での分子疫学から、市中における伝播様式を探り、臨床的対応の方法論を確立する（長谷、高嶋）。

らい菌／ハンセン病に関する研究

- ① ハンセン病の標的組織である末梢神経の侵襲機構について、臨床材料とモデル感染を平行して病理学的に解析する（後藤正）。
- ② ハンセン病でもTT, LLなど極端に異なった病型と予後が存在する機構について、疾患感受性候補遺伝子のSNP解析からアプローチする（大山）。
- ③ ハンセン病の治療上問題となるが細菌として培養不能のために検査が困難な薬剤耐性について、マウス感染モデルによる耐性検査法の確立と耐性機構の分子遺伝学的解析を行う（松岡）。
- ④ らい菌が宿主に誘導する免疫応答の機構につき、主に動物細胞レベルで解析する（牧野、福富）。
- ⑤らい菌特有の因子を用いた、新規でかつ迅速な診断検査法を確立する（向井）。

C. 研究結果

結核／結核菌に関する研究成果

- ・ 結核菌が示す強い宿主Th1型サイトカイ

ン誘導活性には、既知の細胞壁成分とは別に、菌の代謝に依存した誘導機構があることが結核菌SM依存型変異株を用いて証明された（光山）。

- ・ 結核菌で新たに判明したRv1388-Rv1389-Rv1390遺伝子が、スメグマ菌への導入実験により、菌の細胞内増殖の調節に関与することが示された（谷口）。
- ・ 結核菌由来のDNA結合タンパクとして発見したMDP-Iに新たなアジュバント活性が見出され、ワクチンへの応用への可能性が示された（松本）。
- ・ ラットでの結核菌気道感染モデルを確立し、感染後早期に発現が亢進される遺伝子を探索した結果、mRNAの動きを早期診断へ応用する可能性が示された（菅原）
- ・ 抗酸菌に対する自然免疫応答において、TLRを介したシグナル以外にもTh1誘導機構が存在し、さらに自然免疫系がTh1誘導以外の分子機構により結核感染を制御していることを示唆する成績が得られた（竹田）。
- ・ 抗酸菌感染における骨病変発生の機序に関し、破骨細胞の分化時期に応じた感染後の変化は、Myd88依存的事であることが示された（大原）。
- ・ マウスでのBCG感染実験により、BCG感染後エフェクターメモリーCD8⁺ T細胞の非リンパ組織での維持にはIL-15が重要であることが判明した（吉開）。
- ・ 結核菌核酸由来のCpG DNAの活性につき解析し、ヒトPDCでのIFN- γ 産生においてCpG DNAはNF- κ Bとp38 MAPKの相互活性化を起こしIRF-7の誘導と活性化にも関わり、そのためIFNAR非依存性の経路でIFN- γ が産生されると考えられた（山本）。

- 結核菌分泌タンパクAg85B由来のPeptide-25を認識するT細胞レセプタートランスジェニックマウスを用いて、この抗原に対する選択的TH1細胞分化にはT-bet依存的、非依存的な誘導機構が存在することが判明した（田村）。
- 結核菌に対する増殖制御活性の異なる2種のヒト単球由来マクロファージの活性の違いに、カタラーゼが重要な役割を果たしていることが示唆された（赤川）。
- MAC症感受性に関与する遺伝子候補としてCFTR遺伝子を解析し、5TアレルとlongTGリピートが一部疾患発症に関与する可能性が示された（慶長）。
- MAC症例と結核症患者のIL-12系遺伝配列を解析比較し、非結核性抗酸菌症の一部にはIL-12/IL-23-IFN γ システム内に遺伝子変異・欠損を持つ可能性が示唆された（白川）。
- 感染感受性の異なるB6とBALB系マウスを比較し、感染により産生されるTh1細胞誘導因子およびマクロファージ活性化因子の量的差が影響していることが示された（後藤義）。
- 世界でワクチンに使用されているBCGの亜株を収集してその各種性生化学的性状と一酸化窒素感受性の違いを詳細に検討し、BCGワクチンの再評価における基礎的知見を提示した（小野寄）。
- 結核菌遺伝子の直列反復配列領域のスペーサー配列とIS6110挿入位置に関するデータを蓄積し、これを基にしてDNAマイクロアレイを作成した。今後の更なる改良の方向性を検討した（鈴木）。
- 各種新規結核ワクチンの候補標品を開発し、マウスでの効果をもとに一部をサルでの効果検証実験を行った結果、HSP65DNA+IL-12DNAワクチンが著明な防御効果を示した（岡田）。
- レンチウイルスベクターに結核菌由来MP T51遺伝子を挿入したワクチンを開発し、マウスでの気道接種により肺結核の予防や治療に有効と思われる効果が得られた（小出）。
- 新たな解析法であるVNTR法により市内分離結核菌について分子疫学的解析を行ない、従来のRFLP法による解析とほぼ同等の解像度が得られることが明らかになった（長谷）。
- VNTR法による結核菌の分子疫学的解析における標的遺伝子を検討し、QUB領域を付加する利点と問題点を明らかにした（高嶋）。

ハンセン病／らい菌に関する研究

- 抗酸菌感染のひとつであるブルーリ潰瘍モデルを作製し、原因菌の*M. ulcerans*が産生する毒性脂質が末梢神経障害に関与することが判明した（後藤正）。
- ハンセン病の病型と*IL12RB2*転写制御領域の特定の1塩基多型（SNPs）の関係を解析し、*IL12RB2*転写制御領域の多型性を指標として、ハンセン病早期治療システムの確立やゲノム創薬開発が可能となることが示唆された（大山）。
- 日本およびアジアにおける薬剤耐性らい菌の伝播状況について、数種の薬剤の標的遺伝子変異を解析から、分離菌の感受性検査の有用性と必要性が示された（松岡）。
- らい菌細胞膜抗原であるMMP-IIの遺伝子を組み込んだリコンビナントBCGを作製し、樹状細胞への刺激が強く、そのワクチン効

- ・ 果が期待された（牧野）。
- ・ 抗らい薬のクロファミジンの薬効機序に関して研究し、本薬剤は細胞にアポトーシスを誘導することが判明した（福富）。
- ・ ハンセン病の遺伝子診断法開発のため、LAMP法によるらい菌の同定法を確立し、LAMP法に供する検体の簡易保存・移送法について比較的良好な検出保存法を作製した（向井）。

D. 考察

上記のごとく、当初計画の個別研究では、目的に沿った形で研究が進められ、それぞれに特筆すべき成果や知見が得られた。とくにワクチンの開発や新規診断法では、近い将来近隣諸国でも役立つと思われる成果がえられた。分子細菌学、分子病態学、免疫学的な研究成果の多くは質の高いもので、評価の高い国際学術雑誌に掲載されたものが多数みられた。

主要な成果は日米結核・ハンセン病合同専門部会や汎太平洋新興感染症国際会議でも発表紹介され、何れも高い評価を得ることができた。また、これらの国際会議において、米国専門家とさらに共同研究体制が強化され、さらに近隣アジア諸国の中心的研究者との情報交換を通じて今後の協力体制への基礎がさらに固められた。

E. 結論

分担配当研究費がかなり小さい研究組織ではあるが、抗酸菌研究者としてはそれぞれ日本を代表する個々の研究者は、研究費配当額以上の成果をあげており、目的に沿った形での研究が進行し、十分な成果が上がったと判断できる。今後の更なる発展が期待できよう。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1 論文発表

総勢25名の研究者により平成17年度には100編以上の原著論文が公表された。そのうちとくに本厚労科研申請計画の基づいて助成交付金により行われた直接的成果が公表されたのは、別途刊行一覧表に記載されたように、和文7編、英文38編である。

2 学会発表

それぞれの研究者による研究成果は、国内では主に日本細菌学会、日本免疫学会、日本結核病学会、日本ハンセン病学会、日本感染症学会、日本生体防御学会などの総会で発表された。また海外では、第40回日米医学結核・ハンセン病専門部会合同会議（米国シアトル市）や第10回汎太平洋新興感染症国際会議（ベトナム、ハノイ市）などに置おいて発表された。

H. 知的財産の出願登録

1. 特許取得

「インターフェロンガンマ（IFN- γ ）低産生に関わるIL12Rプロモーター領域の多型とその検出方法」

発明考案者； 緒方是嗣， 大山秀樹，

松下祥， 山本卓志

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究要旨

結核菌感染後早期に産生されるIFN- γ は、防御免疫を司るT細胞の誘導に重要なサイトカインである。このIFN- γ 産生は生菌感染では容易に誘導されるが、死菌にはその誘導能がない。今回、この生菌にのみ認められるIFN- γ 産生誘導能が、菌の代謝活性に依存したものであるか否かを調べるため、ストレプトマイシン(SM)要求性結核菌18b株を用いて解析を行った。18bは、Middlebrook 7H10培地で培養した場合、増殖に0.05 mg/ml以上のSMが必要であった。また、SM非存在下で3週間培養した後、SMを添加してさらに培養を続けたところ菌の増殖が確認された。この結果から、18bはSM非存在下では増殖することはできないが、その代謝活性が抑制された状態で生存できることが示された。18bで腹腔滲出細胞(PEC)を刺激したところ、SM非存在下ではIFN- γ 産生はほとんど認められなかった。しかし、SMを添加すると18bはIFN- γ 産生誘導能を発揮し、1 mg/mlのSM存在下で最も強いIFN- γ 産生を誘導した。また、IFN- γ 産生が認められた培養条件で細胞内SM濃度は、菌の増殖に必要な濃度以上になることが明らかとなった。これらの結果から、感染した細胞内で結核菌が活発に代謝を行うことが、IFN- γ 産生の誘導に重要であることが示された。

A. 研究目的

結核に対する防御免疫を誘導するためには、生菌でマウスを免疫する必要がある。死菌や菌体成分で免疫した場合には、マクロファージの活性化を介した一過性の非特異的防御反応や、結核菌に対する遅延型過敏反応は出現しても、防御免疫は誘導されない(1)。この生菌と死菌にみられる防御免疫誘導能の違いについて解析した結果、結核に対する感染防御は、抗原特異的IFN- γ 産生性CD4⁺T細胞によって担われていることが明らかになった。また、この感染抵抗性T細胞の誘導には感染早期に産生されるIFN- γ が重要で、死菌免疫の場合には、免疫早期にIFN- γ 産生が誘導されないため、感染抵抗性T細胞への分化が起こらないことが示された(3, 4)。今のところ生菌と死菌におけるIFN- γ 産生誘導能の違いを説明することはできないが、現行のBCGワク

チンに代わりうるより有効なワクチンを開発するためにも、この感染抵抗性T細胞の分化誘導に関与する生菌由来因子を明らかにしなければならない。本研究では、この点を解析する手段として、ストレプトマイシン(SM)要求性結核菌18b株を用いて実験を行った。この株は、1955年に国立予防衛生研究所で臨床分離菌株H2より分離され、その分子遺伝学的特徴として16S rRNAをコードする遺伝子*rrs*の530ループにシトシンの一塩基の挿入があることが報告されている(4, 5)。この18bをMiddlebrook 7H10培地で培養した場合、増殖に最低0.05 mg/mlのSMが必要であったが、SM非存在下でも3週間は死滅しないことが示された。この結果から、18bはSM非存在下では増殖することはできないが、その代謝活性が抑制された状態で生存は可能であることが示された。

そこで本研究では、SM存在下あるいは非存在下でマウス腹腔滲出細胞（PEC）を18bで刺激し、培養上清中のIFN- γ 産生量を調べて、生菌のIFN- γ 産生誘導能における菌の代謝活性の重要性について検討した。

B. 研究方法

菌液の調整

結核菌 18b 株を SM 0.2 mg/ml を添加した Middlebrook 7H9 液体培地で培養し、回収後 3 回洗浄した。滅菌ガラスビーズ（直径 5 mm、約 20 個）入りの丸底フラスコで菌塊をほぐし、液体培地約 30 ml に懸濁した後、氷中にて一晩静置した。沈澱した菌塊を除いた上清部分を回収し、-80°C で保存した。また、H37Rv 株は SM を含まない Middlebrook 7H9 液体培地で培養し、同様に処置して菌液を作製した。生菌数は一度凍結した菌液を解凍後、Middlebrook 7H10 寒天培地で培養し、出現したコロニー数より算出した。また、得られた菌液を 70°C、2 時間加熱処理したものを加熱死菌として実験に用いた。

マウス

雌性 C3H/HeN マウスを日本エスエルシー株式会社より購入し、7~12 週齢で実験に使用した。

IFN- γ および TNF- α 産生量の測定

チオグリコレート培地（3%）を C3H/HeN マウス腹腔内に注射し、3 日後に PEC を回収した。細胞を 3 回洗浄後、48 ウェルの平底プレートに 5×10^5 個/ウェルで撒き、各結核菌株を MOI = 2 で 18 時間感染させた。培養上清を回収し、TNF- α および IFN- γ 産生量を ELISA で測定した。

細胞内 SM 濃度の測定

各種濃度の SM で 18 時間細胞を処理した後、1%

Tween 20 を含む lysis buffer を加えて cell lysate を調製した。lysate 中の SM 濃度を RIDASCREEN Streptomycin（アズマックス（株）、千葉）を用いて調べた。

（倫理面への配慮）

本研究で行った動物実験および実験動物の飼育に関しては、すべて京都大学動物実験に関する指針に則って行った。

C. 研究結果

18b 株の SM 依存性

Middlebrook 7H10 に 18b を塗抹・培養したが、SM 非存在下では増殖を確認できなかった。しかし、培地に 0.05 mg/ml 以上の SM を添加した場合には、18b は増殖してコロニーを形成した。この 18b の増殖は、SM 濃度が 1 mg/ml でも同様に観察された。また、SM を添加していない小川培地に菌を接種し、21 日間 37°C で培養してコロニーが観察できないことを確認した後、SM を最終濃度 0.20 mg/ml になるように加えて培養を継続したところ、コロニー形成が認められた。以上の結果から、18b はその増殖に少なくとも 0.050 mg/ml の SM を必要とし、SM が存在しない場合でも 3 週間は生存できることが示された。

結核菌 18b の IFN- γ および TNF- α 産生誘導能

PEC を H37Rv および 18b で刺激し、18 時間後に培養上清中のサイトカイン産生量を測定した。H37Rv で刺激した場合には、強い IFN- γ および TNF- α 産生が認められた。一方、SM を加えずに 18b で PEC を刺激した場合には、TNF- α 産生は認められたが、IFN- γ 産生はほとんど誘導されなかった。しかし、SM 存在下に PEC を 18b で刺激すると、SM 濃度に依存して IFN- γ 産生が誘導され、1 mg/ml の SM を添加した場合に最も高い産生が

認められた。

18b刺激によるIFN- γ 産生誘導に高濃度のSMが必要な理由を調べるため、細胞を各濃度のSMを含む培地で18時間培養した後、細胞内SM濃度を測定した。その結果、細胞内のSM濃度は培養液に添加したSM濃度よりも低く、培養液のSM濃度を1 mg/mlにした場合にはじめて細胞内の濃度が18bの増殖に適した0.1 mg/ml以上に達することが示された。

D. 考察

本研究では、結核菌生菌のIFN- γ 産生誘導機序を明らかにすることを目的として、菌の代謝活性がIFN- γ 産生誘導にどのように影響するのかをSM要求性変異株18bを用いて解析した。その結果、18bは増殖に0.05 mg/mlのSMを必要とし、そのIFN- γ 産生誘導能はSM濃度に依存して高くなることが示された。また、培養液に1 mg/mlのSMを添加した場合に、はじめて細胞内SM濃度は18bの増殖に必要な濃度以上になり、菌は強いIFN- γ 産生誘導能を示すことが明らかとなった。SM濃度が0.1 mg/mlになるように培養液にSMを添加すると、細胞外の菌の代謝活性は亢進するものと考えられるが、この場合には弱いIFN- γ 産生しか認められなかった。これらの結果から、IFN- γ 産生を誘導するためには、結核菌が感染した細胞内で活発に代謝することが重要であることが示された。

一方、18bで誘導されるTNF- α の産生はSM非存在下でも認められた。また、このTNF- α 産生は生菌だけでなく、死菌で刺激した場合にも誘導されることが示された。近年、lipomannan、lipoarabinomannan、phosphatidylinositol mannoside、19-kDa lipoproteinなどの結核菌体成分がToll-like receptor 2 (TLR2) を介して炎症性サイトカインの産生を誘導することが報告されている (6)。

18b刺激で認められるTNF- α 産生にはこれらTLR2リガンドが関与するものと考えられる。しかし、SM非存在下にPECを18bで刺激してもIFN- γ 産生は誘導されなかったことから、IFN- γ 産生の誘導にはTLR以外の別なシグナル伝達系の関与が示唆される。最近、TLR以外に細胞内にもパターン認識レセプターが存在することが明らかにされており、マクロファージに取り込まれた結核菌がそれらレセプター分子を刺激する可能性も考えられる (7)。今のところ、結核菌の細胞内での代謝活性の亢進がどのようにIFN- γ 産生誘導へと結びつくのかは明確ではないが、この反応は結核に対する感染防御反応の誘導において重要であることは間違いなく、早急にその機序を明らかにしていかなければならないと考えている。

参考文献

1. J. Immunol. **148**: 2887-2893, 1992.
2. J. Immunol. **155**: 5728-5735, 1995.
3. Immunology **91**: 529-535, 1997.
4. 結核 **30**:4-8, 1995.
5. Antimicrob. Agents Chemother. **39**: 769-770, 1995.
6. Microbes Infect. **6**:946-959, 2004.
7. Nat. Rev. Immunol. **3**:371-382, 2003.

E. 結論

結核菌に対する防御免疫を担うT細胞の分化には、感染初期のIFN- γ が重要な役割を果たしている。このIFN- γ 産生誘導には、感染したマクロファージ内で菌が活発に代謝を行うことが必要で、結核菌が産生する代謝産物がマクロファージのTh1型サイトカイン産生応答を惹起するものと考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Fukasawa, Y., et al. Streptomycin-dependent exhibition of cytokine-inducing activity in streptomycin-dependent *Mycobacterium tuberculosis* strain 18b. *Infect. Immun.* 73 (10): 7051-7055, 2005.

2. 学会発表

ストレプトマイシン要求性結核菌18b株のストレプトマイシン依存的IFN- γ 産生誘導

深澤豊、河村伊久雄、野村卓正ほか6名
日本細菌学雑誌 Vol. 61 p72, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

結核菌 Rv1388 (*mIHF*), Rv1389, Rv1390 が *Mycobacterium smegmatis* の
細胞内増殖に及ぼす影響

分担研究者 谷口 初美 産業医科大学教授

研究要旨

結核菌の Rv1388-Rv1389-Rv1390 遺伝子と growth phase variation との関係を明らかにすることを目的とした。弱毒性で迅速発育菌である *Mycobacterium smegmatis* の実験系を確立し、結核菌の Rv1388-Rv1389-Rv1390 遺伝子は、*M. smegmatis* J15CS 株の細胞内での増殖を抑制することが分かった。

A. 研究目的

結核対策が困難な理由の一つに、結節空洞内での休眠状態への導入と再活性化という growth phase variation の問題がある。細菌の growth phase variation については、抗酸菌に分類学的に近縁である放線菌において抗生物質産生時に起きることが知られている。我々は結核菌の Rv1388 および Rv1390 遺伝子が、*Streptomyces kasugaensis* の growth phase variation に関する遺伝子と高いホモロジーを示すことに着目し、結核菌のこれらの遺伝子とその growth phase variation との関係を明らかにすることを目的とした。遺伝子の機能を解析するためには、変異株の分離が通常の実験方

法であるが、これらの遺伝子は growth に必須である可能性が高く、knock out 変異株を作成することが困難であることが予測された。そこで弱毒性で迅速発育菌である *Mycobacterium smegmatis* の実験系を確立し、前年度までに報告してきた。*M. smegmatis* J15CS 株は *M. smegmatis* であるにもかかわらず、他の *M. smegmatis* と異なり、マウスマクロファージ系 J774-1 細胞内で、殺菌されることなく、抗酸性を有する伸長した形態を示す。この菌に結核菌の Rv1388-Rv1389-Rv1390 遺伝子を導入し、J774-1 細胞内での形態を観察した結果、これらの遺伝子は J774-1 細胞内での *M.*

smegmatis J15CS 株の増殖を抑制することが分かった。つまり J774-1 細胞内でのその菌体は抗酸性が弱く、短くなっていた。しかし、コロニー形成能を有する菌数に差は認められなかった。これらのことより、結核菌の Rv1388-Rv1389-Rv1390 遺伝子は *M. smegmatis* J15CS 株を J774 細胞内で休眠状態に導入する可能性が示された。今回、我々は J774-1 細胞感染後の食胞内での菌の状態、その菌の微細構造を電子顕微鏡で観察し、また感染後寒天培地上で増殖したコロニーの形態の違いを見た。

B. 研究方法

M. tuberculosis H37Rv の Rv1388 および Rv1388-Rv1389-Rv1390 遺伝子を *M. smegmatis* J15CS 株 (MsJ) に導入した形質転換体 MsJ/Rv1388、MsJ/Rv1388-1390 を作成した。コントロールとして宿主 MsJ、ベクターを導入した MsJ/vector についても調べた。マウスマクロファージ系 J774-1 細胞に感染させ、3 日後の透過型電子顕微鏡（超薄切片）観察を行った。また、感染後の生菌数（CFU）測定時のコロニー形態を実体顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

形質転換体を J774-1 細胞に感染さ

せた時の電子顕微鏡観察により、いずれも J774-1 細胞の食胞内に取り込まれていること、MsJ/Rv1388-1390 は菌体内に膜様構造の形成が認められることが分かった。また感染後の寒天培地上で増殖したコロニーは、他の菌に比べて小さく、他の菌の扁平なコロニーに比べ、中央が高くなった tubular 型のコロニーを形成した。

D. 考察

電子顕微鏡観察およびコロニー形態より、MsJ/Rv1388-1390 は細胞壁の変化が起こっていると考えられた。そこで、これら遺伝子は食細胞で休眠状態に入る時は菌体内に膜様構造を形成し、再活性化して増殖する時はコロニーの形態から細胞壁成分の合成を調節している可能性が考えられた。今後これらの遺伝子の growth phase variation 時における膜様成分、細胞壁成分などの合成の調節機構を解析する予定である。

E. 結論

弱毒性で迅速発育菌である *Mycobacterium smegmatis* の実験系を確立し、結核菌の Rv1388-Rv1389-Rv1390 遺伝子は、J774-1 細胞内での *M. smegmatis* J15CS 株の増殖を抑制することが分かった。

F. 健康危険情報

主任研究者が記入

G. 研究発表

1. 論文発表

谷口初美：結核菌の病原性に関する分子遺伝学的研究、日本結核病学会誌、80(9): 621-623, 2005

2. 学会発表

野本摩利、小川みどり、福田和正、宮本比呂志、谷口初美：結核菌 Rv1388-Rv1389-Rv1390 遺伝子が *Mycobacterium smegmatis* の細胞内増殖に及ぼす影響(1)、第 79 回日本細菌学会総会、2006

小川みどり、野本摩利、福田和正、宮本比呂志、谷口初美：結核菌 Rv1388-Rv1389-Rv1390 遺伝子が *Mycobacterium smegmatis* の細胞内増殖に及ぼす影響(2)、第 79 回日本細菌学会総会、2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

結核菌の新規病原因子に関する分子生物学的解析

分担研究者 松本壮吉（大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学・助教授）

研究要旨

Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)は、結核菌の増殖調節に関わる蛋白質分子で、結核菌の潜伏感染の成立に重要な役割を果たすと考えられている。定常期の結核菌は大量（菌体蛋白質の7%以上）のMDP1を発現しているがこれまでにMDP1の宿主応答における役割は解析されていない。そこでMDP1の抗原性について解析した。結核菌感染マウスの血清中の抗MDP1抗体を測定した結果、顕著な抗体産生を認めたが、MDP1単独免疫では低いレベルでしか検出されなかった。次に、MDP1と結核菌DNAを混合してマウスに免疫した結果、顕著な抗MDP1抗体産生が観察された。すなわち、DNAの介在は抗MDP1抗体産生を促すことが判明した。5 µgのMDP1を免疫する際、5-50 ngのDNAを添加することで十分な増強効果が認められた。このような少量のDNAによる作用は、その他の結核菌由来蛋白質であるα抗原やHrpAでは認められなかった。DNAの添加免疫はMDP1特異的T細胞のIFN-gamma産生を増強させることも判明した。また試験管内でMDP1は、Toll-like receptor 9依存的なCpG-オリゴDNAによる炎症性サイトカインの発現を顕著に増強することが分かった。マウスを用いた感染実験において、MDP1単独免疫の効果を認めなかったが、MDP1-DNA複合体免疫は肺内の結核菌増殖を有意に抑制した。以上の結果から、MDP1はDNAとの結合で抗原性を増強し、結核菌感染時の宿主応答を修飾すると考えられる。また、MDP1-DNA複合体による新規のワクチン開発が可能であることも示唆される。

A. 研究目的

結核菌や結核ワクチンBCG(牛型結核菌弱毒株)の菌体成分には、免疫活性化物質が含まれる。それらは、新規結核ワクチンの成分候補であり、また難病に対する免疫療法への応用が期待されている。

Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)は、ヒト型結核菌やBCGが定常期以降に最も発現する蛋白質分子で、菌の増殖や非貪食性細胞への侵入に関わることが明らかにされているが、抗原性については解析されていない。本年度は、結核菌感染やBCG免疫時におけるMDP1の抗原性を検討した。

B. 研究方法

マウス

A/J, BALB/c, C3H/HeJ, C57BL/6 マウスは日本 SLC から購入した。TLR-9 欠失マウス(C57BL/6 マウス由来)は、大阪大学、審良 静男 教授より分与された。

細菌と培養

BCG 東京株および結核菌 Kurono 株は、7H9-ADC 液体培地 (Difco) もしくは、7H11-OADC 固形培地 (Difco)にて培養した。また、試料の精製のためのBCGと結核菌H37Rv株の培養はソートン培地で行った。大腸菌

BL21-DE3 株は、クロラムフェニコールとテトラサイクリン含有のLB培地にて培養し、プラスミッドpET21-b(+)およびその派生構築プラスミッドによる形質転換株は、更にカルベニシリンを加えて培養した。

抗原

組み換えMDP1蛋白質(rMDP1)は以下の方法で大腸菌から精製した。pET21b(+)-*mdp1*で大腸菌の形質転換を行い、カルベニシリン耐性株を得た。IPTGでMDP1遺伝子の発現を誘導後、菌体を破碎し、ニッケルカラムにてrMDP1を精製した。純度はSDS-PAGEにて確認した。また、抗酸菌由来のMDP1をBCGより以下の方法で精製した。ソートン培地で培養したBCGを集菌し、超音波破碎機で菌体を粉碎した後、0.25Nの塩酸で処理し可溶化される蛋白質を遠心分離にて集めた。次に、水酸化ナトリウムにて試料を中和し、陽イオン交換カラムにて分離した。MDP1が最も多く含まれる画分を採取し、それを更にゲル濾過カラムに添加し分離した。Heat-stress-induced ribosome binding protein A (HrpA)、Antigen 85B (Ag85B)はそれぞれ大原直也(長崎大学)、永井定(大阪大学)博士より供与されたものを用いた。ウシ由来ヒストンH1, H2A, H3は、ロッシュより購入した。DNAは、ソートン培地で培養した結核菌H37Rv株を用い、脂質を除去後、菌体をドジデ

ル硫酸ナトリウムとリゾチームで破壊し、蛋白質をプロナーゼ K で消化後、フェノールクロロフォルム法にて抽出精製した。合成オリゴ DNA は、日清紡社に合成を依頼し購入した。CpG 配列を有する oligo B (配列; GGGGGGAACGTTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG) と C をメチル化した Me-oligo B を合成した。

抗原投与および血清採取

蛋白質抗原は、マウス 1 匹あたり $5\mu\text{g}$ をリビアジュバント (RIB) (Corixia) を用いて腹腔に投与した。初回投与時のマウスの週令は 6-7 週とした。3 週間後同様の方法で同量の抗原をマウス腹腔に投与し、更に 3 週間経過した後、眼下静脈より血液を採取した。37 度にて血液を 1 時間保温してフィブリンを凝結させた後に遠心し、血清を得た。保存は、 -80 度で行った。BCG の抗原投与および抗 BCG 抗血清の採取も同様の方法で行った。

酵素免疫測定法 (ELISA) による血清中の抗 MDP1 抗体価の測定

BCG より精製した MDP1 を $4\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で ELISA プレートに固相化した。抗血清をリン酸緩衝液にて希釈し MDP1 固相化 ELISA プレートに加え 4 度で 16 時間反応させた。非結合イムノグロブリン (Ig) を洗浄した後、ヤギ由来、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識-抗マウス IgG 抗体を反応させた。再度、プレートを洗浄し、*o*-phenyldiamine dihydrochloride を基質として発色させた。

リンパ節細胞の培養と ELISA によるサイトカインの定量

抗原接種マウスのリンパ節を摘出し、細胞培養用 96 穴プレートにて、1 穴あたり 5×10^5 細胞となるように加え、37 度、5% 二酸化炭素存在下で 5 日間培養した。上清中のインターフェロンガンマ (IFN-gamma) を ELISA キット (Genzyme) にて測定した。

マウスでのワクチン効果の検討

蛋白質抗原はマウス 1 匹あたり $5\mu\text{g}$ 、陽性コントロールの BCG はマウスあたり 10^6 集落形成単位 (CFU) を初回免疫時に皮下に投与し、3 週間後追加免疫を腹腔に行った。更に三週間後、尾部静脈より 10^6 CFU の結核菌クロノ株を感染させた。感染後、14 日目および 28 日後に肺と脾臓を摘出しホモジナイズした後、段階希釈して 7H11-OADC 寒天培地上に塗布した。3 週間 37 度にて培養し、各臓器中の生菌数を集落数から算定した。

CpG オリゴ DNA 刺激による炎症性サイトカイン産生の測定

C57BL/6 マウスおよび TLR9 欠失マウスから脾臓を摘出し、脾細胞を牛血清 10% 含有の RPMI1640 培地を用い細胞培養用 24 穴プレート

にて培養した。この系に rMDP1 およびオリゴ DNA をそれぞれ $0.5\mu\text{M}$ と $1\mu\text{M}$ の濃度で加え 24 時間培養し、上清に放出されたサイトカイン tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) と interleukin 6 (IL-6) の量を ELISA 法にて定量した。

C. 研究結果

BCG もしくは結核菌を感染させたマウスから血清を採取し、ウエスタンブロットおよび酵素抗体法により抗体産生を検出した。検討した三種類のマウスは、いずれも抗 MDP1 抗体を産生した。一方、BCG から精製した MDP1 をマウスに投与しても十分な抗体価の上昇は認められなかった。MDP1 は DNA 結合性蛋白質であり、結核菌 DNA 中には、免疫賦活作用を有する CpG DNA 配列が存在する。そこで、精製 MDP1 と抗酸菌由来 DNA の複合体の免疫を検討した。その結果、DNA が MDP1 に対する抗体産生を顕著に増強することが分かった。MDP1 の人工合成ペプチドを用いた解析から、MDP1 単独免疫と複合体免疫 (DNA との) で産生される MDP1 抗体の認識部位は異なり、BCG を免疫した場合には複合体免疫のパターンが見られることから、BCG 菌体内で一部の MDP1 は DNA と結合していることが示された。

次に結核予防に有効な生体機能分子インターフェロンガンマ (IFN- γ) 産生能を検討した。BCG 免疫マウス由来の脾細胞は MDP1 刺激に対し優位に IFN- γ を産生した。また、MDP1 単独免疫でも IFN- γ 産生が認められたが、DNA の介在でさらに産生量が増強した。次に実際に MDP1 を生体に投与することで結核防御が可能であるかを検討した。マウスに MDP1 を投与すると、単独で効果はないが、DNA との複合体で免疫した場合は顕著に結核菌の肺内増殖を抑制することが分かった。つまり、MDP1 は、結核予防抗原であることが明らかとなった。

最後に CpG-DNA の活性に対する MDP1 の作用を検討した。その結果 MDP1 は、CpG-DNA の免疫賦活作用を顕著に増強することが分かった。CpG-DNA は、感染症にとどまらず、癌やアレルギーの治療に向け臨床応用開発が進められている。本研究から、MDP1 が結核ワクチンの成分として、また、CpG-DNA の免疫賦活物質 (アジュバント) として有効であることが判明した。

D. 考察

結核ワクチン BCG や結核菌の主要菌体蛋

白質である MDP1 の抗原性を解析した。まず、MDP1 に対する抗体産生を調べた。BCG 免疫マウスや結核菌が感染したマウスの血清中には抗 MDP1 抗体が産生されていた。しかし、精製した MDP1 を C3H/He マウスに投与しても、強い抗体産生は見られなかった。MDP1 は、グアニンやシトシン(CG) 塩基を介して DNA に結合する。DNA のシトシン-グアニン配列は強い免疫賦活活性があり、BCG や結核菌を免疫した際の MDP1 の抗原性に関わる可能性が考えられた。そこで、MDP1 と結核菌 DNA を混合し、MDP1-DNA 複合体として C3H/He マウスに免疫すると生菌免疫で見られるような顕著な抗 MDP1 抗体の上昇が認められた。同様の現象は、A/J, BALB/c, C57BL/6 マウス等でも見られ、また別種のアジュバントを用いても見られることから、マウスの種やアジュバントで限定されない現象であることが分かった。MDP1 単独と MDP1-DNA 複合体で免疫した場合、同種のマウス間で抗体のエピトープに違いが見られ、BCG 免疫マウスでは両方のパターンが見られることから、MDP1 は *in vivo* に投与した菌体内で実際に DNA に結合し、その複合体が宿主により認識されていることが判明した。

MDP1 の抗体産生増強における最適な DNA 量を検討した結果、非常に少量で (5-50 ng/マウス) 強い増強活性があることが分かった。BCG 由来抗原である HrpA や Ag85B、また牛由来の DNA 結合性蛋白質 Histone H1, Histone H2a, Histone H3 に対しては、少量の DNA が抗体産生を増強するような現象は見られなかった。したがって、本現象は全ての蛋白質抗原に対してみられるものではなく、MDP1 はユニークな蛋白質抗原であることが判明した。少量の DNA で MDP1 の抗原性が増強される機構は大変興味深い。以下に考察すると、まず MDP1 の CpG-DNA の免疫賦活作用、すなわち炎症性サイトカインの産生の亢進作用が原因の一つと推測される。炎症性サイトカインの発現は、抗体産生や抗原特異的な T 細胞の増殖を促し獲得免疫の成立に必須であるからだ。また第 2 の可能性は、MDP1 が DNA に結合することで DNA 分解酵素による分解から DNA を保護することである。CpG-DNA が免疫賦活活性を現すには 6 ベース以上の塩基が必要であり、通常 DNA は生体内で分解され活性を示さない。MDP1 が DNA の分解を阻害することで、CpG-DNA の免疫賦活活性が発揮されると考えられる。第 3 に、MDP1 の細胞接着活性がある。MDP1 は細胞表面のグリコサミノグリカンを介して細胞表面に結合する。CpG-DNA が免疫賦活作用を発揮するためには、TLR9 を発現しているマクロファージ等の貪食細胞に取り込まれなければならない。MDP1 の細胞接着性が CpG-DNA の細胞への取

り込みを助長することで効率良い活性発現を促すと考えられる。

DNA は MDP1 への抗体産生のみならず Th1 型細胞応答で最も重要なサイトカイン、IFN-gamma 産生の増強を促した。BCG を投与したマウス由来のリンパ球は MDP1 刺激により IFN-gamma を産生し、IFN-gamma がクラススイッチに必須の IgG2a サブタイプの抗体産生を顕著に促進することから、MDP1 は、BCG の抗結核免疫の一部を担う抗原であることが示唆された。実際に MDP1 と DNA の複合体を投与することで、BCG には及ばないが、明らかに結核菌の臓器内増殖を抑制することが分かった。MDP1 単独投与では、防御効果は認められず、DNA が MDP1 の抗原性を増強することで防御効果が得られることが分かった。

このように MDP1 は BCG の防御免疫の一端を担う抗原で、生菌免疫における MDP1 の抗原性に DNA が強く関わることを示唆された。DNA による MDP1 の抗原性増強機構の解明は今後の課題であるが、本成果は、MDP1 が結核に対する成分ワクチンとして有用であることを示している。また MDP1 が逆に CpG-DNA の活性を増強する作用のあることが分かった。このような活性を有する蛋白質の報告は現在までなかった。細菌由来 DNA の活性と類似の作用を有するオリゴ DNA は、安価で効果的な免疫賦活剤として、感染症のみならず、癌やアレルギー治療への応用が期待されている。本成果は、MDP1 が CpG オリゴ DNA のアジュバントとして利用できる可能性も示している。

E. 結論

結核菌や結核ワクチン BCG の主要蛋白質である MDP1 は、DNA と結合することで抗原性が増強され、結核菌感染に対する防御免疫の誘導を促す。

F. 健康危機情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Matsumoto S, Matsumoto M, Umemori K, Ozeki Y, Furugen M, Tatsuo T, Hirayama Y, Yamamoto S, Yamada T, Kobayashi K. DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Mice. J Immunol. 2005 Jul 1;175(1):441-9.

Kanekiyo M, Matsuo K, Hamatake M, Hamano T, Ohsu T, Matsumoto S, Yamada T, Yamazaki S, Hasegawa A, Yamamoto N,

Honda M. Mycobacterial codon optimization enhances antigen expression and virus-specific immune responses in recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin expressing human immunodeficiency virus Type 1 Gag. J Virol. 2005 Jul;79(14):8716-23.

Ami Y, Izumi Y, Matsuo K, Someya K, Kanekiyo M, Horibata S, Yoshino N, Sakai K, Shinohara K, Matsumoto S, Yamada T, Yamazaki S, Yamamoto N, Honda M. Priming-Boosting Vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin and a nonreplicating vaccinia virus recombinant leads to long-lasting and effective immunity. J Virol. 2005 Oct;79(20):12871-12879.

Oiso R, Fujiwara N, Yamagami H, Maeda S, Matsumoto S, Nakamura S, Oshitani N, Matsumoto T, Arakawa T, Kobayashi K. Mycobacterial trehalose 6,6'-dimycolate preferentially induces type 1 helper T cell responses through signal transducer and activator of transcription 4 protein. Microb Pathog. 2005 Jul;39(1-2):35-43.

2. 学会発表

平山幸雄、松本壮吉、和田崇之、尾関百合子、梅森清子、山本三郎、西内由紀子、松本真、小林和夫。2005。結核菌の肺胞上皮細胞への接着／侵入におけるヒアルロン酸-MDP1結合の役割（ワークショップ）。日本細菌学会雑誌、60：104、2005。第77回日本細菌学会総会（東京、4月）。

尾関百合子、松本壮吉、小林和夫。2005。結核菌感染における抑制性T細胞（CD4⁺CD25⁺ regulatory T細胞）の役割（ワークショップ）。日本細菌学会雑誌、60：156、2005。第77回日本細菌学会総会（東京、4月）。

松本壮吉、松本真、梅森清子、尾関百合子、山本三郎、山田毅、小林和夫。2005。結核菌の核酸結合性蛋白質とDNAの複合体に対する免疫応答解析。日本細菌学会雑誌、60：157、2005。第77回日本細菌学会総会（東京、4月）。

大磯龍太、藤原永年、前田伸司、松本壮吉、小林和夫。2005。結核菌由来 cord factor は転写因子STAT4蛋白質を介してTh1応答を誘導する。日本細菌学会雑誌、60：163、2005。第77回日本細菌学会総会（東京、4月）。

松本壮吉、小林和夫、松本真、尾関百合子、山本三郎、山田毅。2005。結核菌のヒストン様蛋白質 mycobacterial DNA-binding protein 1の抗原性におけるDNA介在の意義。結核、80：266、2005。第80回日本結核病学会総会（さいたま、5月）。

尾関百合子、松本壮吉、小林和夫、菅原勇、宇田川忠。2005。抑制性T細胞（CD4⁺CD25⁺ regulatory T細胞）の結核菌感染における役割。結核、80：267、2005。第80回日本結核病学会総会（さいたま、5月）。

平山幸雄、松本壮吉、小林和夫、和田崇之、尾関百合子、西内由紀子、山本三郎。2005。抗酸菌の肺胞上皮細胞侵入における mycobacterial DNA-binding protein 1（MDP1）とヒアルロン酸の役割。結核、80：268、2005。第80回日本結核病学会総会（さいたま、5月）。

Ozeki, Y., S. Matsumoto, K. Umemori, S. Yamamoto, and K. Kobayashi. 2005. Extracellular occurring mycobacterial DNA-binding protein 1 in involved in *Mycobacterium*-lung epithelial cell interaction through binding to hyaluronic acid. 日本免疫学会・学術集会記録、35：69、2005。第35回日本免疫学会総会・学術総会（横浜、12月）。

Matsumoto, S., K. Umemori, Y. Ozeki, S. Yamamoto, T. Yamada, and K. Kobayashi. 2005. The role of mycobacterial DNA-binding protein-1-DNA complex in the host protection against *Mycobacterium tuberculosis*. 日本免疫学会・学術集会記録、35：171、2005。第35回日本免疫学会総会・学術総会（横浜、12月）。

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

特に、なし。

厚生労働科学研究費補助金 (国際医学協力研究事業)
分担研究報告書

初期ラット結核菌感染で発現する遺伝子の探索—血清サイトカインとの比較
分担研究者 菅原 勇 (財) 結核予防会結核研究所

研究要旨

結核菌感染初期の病態を把握するには、結核菌感染ラットから得られた血清を用いた血清診断は有用ではなく、DNA microarray を用いて結核菌感染後に発現する mRNA の経時変化を調べた方が、結核早期診断を行える可能性がある。

A. 研究目的

結核は、滲出性炎—繁殖性炎—増殖性炎と漸次進行する慢性特異性炎症である。一般に、滲出性炎段階で、結核と診断するのは困難であるが、診断できると早期診断、早期治療につながり有益である。本研究は、この滲出性炎の段階で、DNA microarray による肺胞マクロファージ由来 mRNA に特徴的な変化が存在するかを調べることを目的とする。同時に、血清中のサイトカイン産生に特徴的な変化が存在するか比較検討することを目的とする。

B. 研究方法

M. tuberculosis, *M. avium* 感染後 1 日、7 日のラット肺胞マクロファージから mRNA を抽出し、Cy3, Cy5 で標識した。この Cy3, Cy5 標識 RNA をプローブとしてスライド上にスポットされた DNA chip(Takara Bio)と一晚ハイブリダイズさせた。よく洗った後、このスライドを DNA scanner で解析した。解析ソフトは、Jaguar,

Imagene, Genesight light を用いた。シグナルは、対照に比較して 2 倍以上を活性化されている、2 分の 1 以下を抑制されていると判定して遺伝子を検索した。またラットを結核菌でエアロソル感染させ、感染後 1 日と 7 日後の血清を得た。これを抗体で結合させた蛍光標識ビーズを利用したフローサイトメータ (Bio-Plex Cytokine Assay) で測定した。測定項目は、IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α であり、測定感度は、0.2-3,200pg/ml である。

(倫理面への配慮)

ラットを殺す場合は、麻酔薬を用いて安楽死させる。

C. 研究結果

感度の良い測定装置 Bio-Plex を用いても感染後 7 日の血清中の TNF- α (50 pg/ml)を除いて、すべて測定値は、0.2pg/ml 未満であった。それに反して、DNA microarray では *M. avium* 感染では誘導されない *M. tuberculosis*