

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

インドにおける多剤耐性結核菌に関する分子生物学的研究

分担研究者 高鳥毛敏雄（大阪大学大学院医学系研究科社会環境医学講座公衆衛生学）
研究協力者 田丸亜貴（大阪府立公衆衛生研究所感染症部細菌課）

研究要旨

インドにおける治療失敗例結核菌の分子生物学的特徴を分析し結核耐性菌株の特徴を明らかとすることを目的として研究を行った。インドにおいては地域においては結核菌株を収集し分析することは一般的に行われていない現状にある。結核菌の地域ベースの共同研究を行うには地域結核センター、および研究施設の協力体制を確立し、共同研究施設における検査体制の整備が必要である。本年度は研究協力施設を定め、結核菌研究を行う施設の整備と研究者の確保を行った。インドで収集した結核菌を国外に持ち出すことはインド政府の許可が必要であり、本年度中には許可を得ることができず菌株を持ち帰り分析するには至らなかった。次年度にはインドの研究施設において共同研究を行うように研究調整を行った。

A. 研究目的

世界の新規結核症例の4分の1の約200万人がインドで発生している。新規登録患者由来株の1.0%から3.3%が耐性菌(MDR-TB)であると報告されている。本研究では、インドにおける地域ベースの治療失敗例由来結核菌株の分子生物学的特徴を把握し、わが国の結核菌株との相違を明らかとすることを目的とした。本年度は、①研究協力してもらえる共同研究施設を確保する、②日印の研究施設において結核菌の分子生物学的研究を実施するため共同研究体制を構築する、③日印で結核菌の共同研究を行うための研究施設の倫理審査や研究許可の手続きを行う、などの3点を行うことを計画した。

B. 研究方法

インド国ニューデリー都に存在する Vardhman Mahavir Medical Collegeの Prof.Saudan Singhの協力を得て、同大学地域医療学講座、Safdarjung Hospital併設結核センター、同病院感染症病理検査センターの細菌検査室（以下、研究協力施設）に対し、本研究の研究協力をしてもらう交渉のために、2回訪印し、施設の状況、研究者の状況を確認した。共同研究をすすめるための関係者の理解を深め、研究の役割分担について確認を得ることができた。インドにおける結核株の遺伝子型別を日本の床分離株と比較分析するためにVNT Rを用いて対象locus分析を行った。

(倫理面への配慮)

分担研究施設において「抗酸菌の分子疫学」の研究課題名で倫理審査を受け、承認を受けている。

C. 研究結果

研究協力施設から、結核菌株の提供および共同研究に対する合意を得ることができた。実際に結核菌株の提供をしてもらうためには政府に申請して許可を得る必要があり、日本に菌株を搬送してもらうのは、許可取得後となる。訪印し結核菌検査を行う研究者と十分な協議を行い、共同研究を行う検査施設を視察し、そこで行われている検査内容を確認した。共同研究を行うためには、日本の方から培地・試薬等の資材の提供は必要であるが、基本的な共同研究を行う設備は整えられてきている。役割分担として、1) 結核菌遺伝子型のpopulation based studyの実施に向けて、研究協力施設における塗抹陽性喀痰の処理済み沈査をすべて収集保管し提供してもらう、2) 2006年度分離のMDR-TB菌株の加熱死菌の提供してもらう、3) 提供検体については、日本で研究分担者・協力者(高鳥毛、田丸)による結核菌同定、耐性遺伝子検出、遺伝子型別分析を実施する、4) LAPM法による結核菌同定とVNTR法による遺伝子型別法をSafdarjung Hospital細菌検査室において実施できるように技術提供を行うこと、を取り決めた。上記に関しては、インド政府の許可が下り次第実施する予定である。

菌検査を実施に当たっての費用負担等も今後協議の上詳細を決定することにしていく。VNTR型別についてはRFLP分析と同等以上の解析能を有する18loci-VNTR型別法を確立した。18loci-VNTR型別は遺伝的類似の高い大阪府内の結核分離株につい

てすでに実施しており、インド臨床分離株に対しても分析することは有用性である。

D. 考察

1) 今年度は分担研究者、研究協力者、主任研究者が訪印し、インドにおける結核菌検査担当者と直接協議を行った。今後、インド分離結核株の研究を具体的に進めていく道筋ができた。研究協力施設に隣接する地域の結核センターにおける塗抹陽性喀痰検体数は100程度、肺外結核由来株を入れても年間150程度確保できると推定され研究解析を行うには十分な数を得ることが可能である。

2) インドにおいては治療失敗例のみが後方の結核菌検査センターに結核菌が回されることになっており、すべての塗抹陽性患者の菌検査を行う流れになっていないが、共同研究をすすめる中ですべての塗抹陽性患者の菌株を研究対象として実施できるようにしていくことが課題として残されている。

3) MDR-TB以外の結核菌株については、結核菌のIncidence、薬剤感受性パターン等は現在のインドにおける検査体制では明らかにできる状況にはなかった。

4) 国内における結核高蔓延地域における抗酸菌症起因菌の種類、MDR-TBを含む薬剤耐性菌の耐性遺伝子変異部位の調査についての結核菌の分子疫学研究をすすめ、インドにおける結核菌研究に応用していくことを計画している。

5) Safdarjung Hospital細菌学研究室においてLAMPによる結核菌同定、VNTR法による遺伝子型別の検査の実施を望んでいた。現在建物を新築し結核菌検査設備は整備されてきており、来年度はインドにおいて基礎的な分子生物学的検査を実施し、そこでできない詳細な分子遺伝学的な研究を日本

の研究施設で行っていくような研究分担ですすめていく。

E. 結論

インドにおける共同研究を行う研究施設、研究者との協議を行い、研究協力体制が確立できた。インド政府の許可が下り次第、研究の実施が可能となった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 高島毛敏雄、逢坂隆子、山本繁他、ホームレス者の結核の実態とその対策に関わる研究－結核検診の3年間の実践から－、結核, 82,1, 19-25, 2007.
2. 高島毛敏雄。結核：世界と日本の現状。新しい診断と治療のABC 呼吸器6 結核・非結核性抗酸菌症。p18-26. 最新医学別冊。2006
3. 高島毛敏雄。ドイツにおける一般対策の及びにくい人々に対する保健所活動。公衆衛生, 70(2), 106-109, 2006.
4. 鈴木定彦、田丸亜貴、中島千絵、西原みづき、福島由華里、松葉隆司、「多剤耐性結核の菌検出法の進歩」、化学療法の領域、(1705-1713)、2006
5. S. Okamoto, A. Tamaru, C. Nakajima, K. Nishimura, Y. Tanaka, S. Tokuyama, Y. Suzuki and K. Ochi. Loss of conserved 7-methylguanosine modification in 16SrRNA confers low-level streptomycin resistance. Mol.

Microbiol. 63(4), 1096-1106, 2007

2. 学会発表

1. Yasuhiko Suzuki, Aki Tamaru, Takashi Matsuba, Yoshinori Tanaka, "Construction of a new method for molecular epidemiological analysis of Mycobacterium tuberculosis by using DNA microarrays." US-Japan Cooperative Medical Science Program, 41 Tuberculosis and leprosy, Research Conference, Kagoshima, Japan, July 19-20, 20006
2. Aki Tamaru, Yasuhiko Suzuki, "Molecular epidemiological analysis of tuberculosis in three regions in Osaka prefecture: The three common IS6110-RFLP patterns in Osaka." US-Japan Cooperative Medical Science Program, 41 Tuberculosis and leprosy. Research Conference, Kagoshima, Japan, July 19-20, 20006
3. 高島毛敏雄、西森琢、田村嘉孝、藤川健弥、山本繁、逢坂隆子、黒田研二、野宿生活者に対する結核対策の強化策－3年連続検診の実績から－、第81回日本結核病学会総会。2006
4. 高島毛敏雄、西森琢、下内昭、田村嘉孝、藤川健弥、撫井賀代、逢坂隆子、山本繁、黒田研二、日雇い労働者の結核の発見から治療まで－3年間の実践から－、第97回日本結核病学会近畿地

方会、2006.

5. 高鳥毛敏雄、石川信克、加藤誠也、大角晃弘、結核対策の制度の日英比較研究 その1 -保健医療体制-、第65回日本公衆衛生学会総会、富山、10月25日-27日、2006年
6. 加藤誠也、大角晃弘、田中慶司、石川信克、高鳥毛敏雄、結核対策制度の日英比較研究 その2 -英国の結核対策、第65回日本公衆衛生学会総会、富山、10月25日-27日、2006年
7. 田丸亜貴、大阪府南部地域の結核地域分子疫学、第81回日本結核病学会総会、仙台、4月27日-28日、2006年
8. 柴田仙子、松本恵美子、藤井史敏、安井良則、福田雅一、富田元久、田丸亜貴、堺市における結核菌株のRFLP, VNTR解析について、第65回日本公衆衛生学会総会、富山、10月25日-27日、2006年

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

アジア地域との研究ネットワークの活用による多剤耐性結核の
制御に関する研究

分担研究者 櫻田 紳策 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 室長

分担研究者 慶長 直人 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 部長

研究要旨

HIV結核症例におけるマクロファージの自然免疫を中心とした宿主免疫に関する研究を実施するため、すでに結核症例の疫学研究の実施体制の整備されている北タイのチェンライ県に免疫学的研究のできる実験室を整備した。HIV結核合併例、非HIV感染結核例、対照群としてのHIV感染非結核例、健常者からの検体収集とそれらの検体を用いた細胞生物学的、免疫学的研究をタイ国内で実施するために、日本の国立国際医療センター、タイ公衆衛生省ならびにチェンライ病院における倫理委員会からの承認を得るべく手続きを進め、平成19年2月に前二者から承認を得た。チェンライ病院については現在承認取得のため交渉中である。またタイにおける本臨床研究の一部について基礎的検討を日本国内で行った。

A. 研究目的

北タイ・チェンライ県における多剤耐性結核を含むHIV結核患者ならびに非HIV感染結核患者から得られた末梢血単球由来マクロファージを用いて、HIV結核発症の宿主要因として①マクロファージの分化と自然免疫に関与する遺伝子発現の検討。②NK細胞、NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞を標的としたフローサイトメトリーによるpopulation analysisと結核菌死菌による全血刺激後の血漿中granulysin等の細胞障害性顆粒物質ならびに血漿中のTh1サイトカインレベルの検討。③血漿中活性型ビタ

ミンDレベルと①で分化誘導を受けたマクロファージにおけるビタミンDによる活性化関連遺伝子発現の検討。

B. 研究方法

北タイ・チェンライに免疫学的実験が可能な実験室をセットアップする。次に、結核患者の登録台帳からHIV合併症例（HAART 有無の2群）と非HIV感染結核例（同じくHAART有無の2群）を洗い出し、細菌学的データと臨床データを含む患者資料の整備を行う。対照群としてHIV感染非結核例と健常例の2群が同様に研究対象

になる。

次に、各々の患者群ならびに健常者群から末梢血を採取し、そこから血漿、単球、リンパ球を分離する。血漿は血中サイトカイン (IFN- γ 、IL-18) 量をELISA による測定に、リンパ球は γ 9 δ 2T細胞レセプター、NK細胞、NKT細胞等の特異的表面マーカーの検索に使用する。マグネットビーズ法 (CD14によるpositive selection) により分離された単球はそれぞれGM-CSF、M-CSFの存在下に培養し、分化した段階で、BCGによる感染実験を行い標的分子 (osteopontin、VDR、cathelicidins等) の発現解析をmRNAレベルではRT-PCR法、タンパクレベルではスライド上にて培養された細胞を用いた免疫染色法にて行う。また培養マクロファージの培養上清中のサイトカイン量 (前述) をELISA法にて測定する。患者検体 (全血) の一部は結核菌死菌とともに培養後、血漿分離してgranulysin等をELISA法にて測定する。

基本的に細胞培養やBCG、結核菌死菌による刺激培養実験ならびにフローサイトメトリーによる細胞集団の解析はチェンライにおいて検体採取後速やかに行われる。凍結血漿、凍結培養上清、凍結細胞溶解液などはバンコックに凍結状態のまま移送されタイNIHにおいてELISA、RT-PCR、HPLCによる測定等に使用される。

(倫理面への配慮)

参加者 (患者) からの検体収集は末梢血の採取であり、採取量も最大21mlである。従って、検体採取には特別な危険は伴わない。すべての小児例ならびに採血が臨床的に不適切と判断される場合 (高度の貧血例や全身状態が採血に耐えられない例等) は研究対象から除外される。臨床研究コーディネーターから本研究について十分に説明を受けた参加者本人からインフォーム

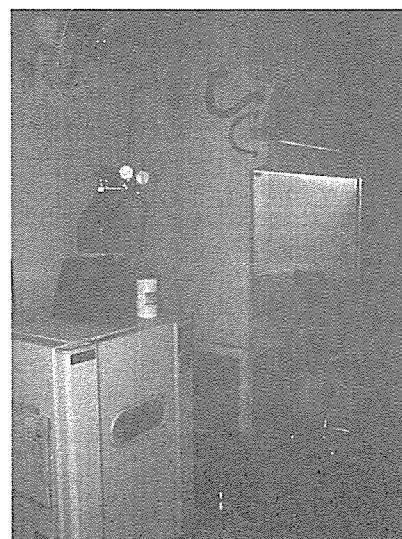
ドコンセント (文章) が得られた場合のみ研究対象者とする。研究からの離脱は参加者の完全な自由選択で、いついかなる場合でもそれを妨げられることはない。また得られた検体はすべて匿名化され、個人情報保護は保護される。

得られた検体を用いた細胞生物学的、免疫学的研究をタイ国内で実施するために、タイの公衆衛生省、チェンライ病院ならびに日本の国立国際医療センターにおける倫理委員会からの承認を得る。

マクロファージ自然免疫に関する研究では、基礎的検討として日本国内で、分化したマクロファージ (M型ならびにGM型) におけるostopontin遺伝子の発現をRT-PCRとELISAとWestern blottingで確認する。さらにosteopontin遺伝子の発現がBCGの殺菌と関連しているかどうかを感染実験後にCFU アッセイを実施して検討する。

C. 研究結果

一昨年、チェンライ市内の施設において整備された実験室は、現地事情から平成18年12月に移転・再整備された (図1、2)。



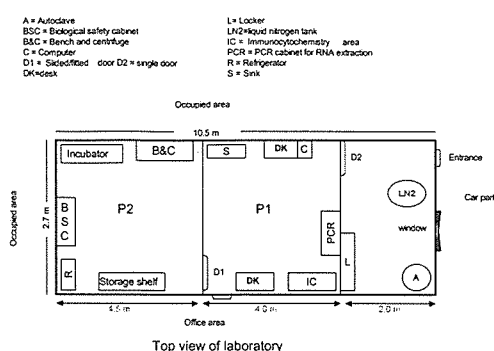


図 2

健常者（タイ側の共同研究者と分担研究者 櫻田）の末梢血単球を分離し、GM-CSF ならびにM-CSF存在下で分化誘導を試みた。結果、検体のうち何例かからは国内と同様に良好な分化したマクロファージが得られた。また、単球を採取した後の残りの末梢血単核球を用いてフローサイトメトリーによるCD4陽性T細胞その他の解析も併せて行った。同じチェンライ県内で分離直後の細胞をフローサイトメトリーにより定量的に解析できる道筋がついた。

国立国際医療センターではタイで実施する臨床研究の基礎的検討として分化した二種類の異なった表現型のマクロファージ（M型とGM型）を使用して抗結核免疫、とくに細胞の運動、菌の貪食、細胞内殺菌等に関与していると考えられている osteopontinの発現についてmRNAレベルとタンパクレベルで検討した。

その結果、単球ではRT-PCR法とELISA法双方にて検出限界以下であった osteopontinはM型とGM型の双方のマクロファージにおいて分化にともなって発現レベルが上昇し、7～8日間の培養でプラトーに達すした。BCG感染によって、さらにそのレベルは著明に増強されるが、mRNAレベルでは感染後3日間でM型マク

ロファージにおいて発現レベルの著明な増強が観察された。一方、GM型マクロファージはBCG感染前から発現レベルは高く、感染による発現レベルの増強は観察されたが、M型と比較して増強の程度は弱かった。

これに対して、タンパクレベルでは培養後3日目ないしは6日目においても培養上清中に分泌された、或いは細胞内に存在するosteopontinのタンパク量はむしろGM型マクロファージにおいて高かった。

BCGの殺菌に関しては、この実験と同時にCFU アッセイを行い、培養上清中ならびにマクロファージ内のBCG生菌数を感染後1日、2日、3日、6日と数えた。赤川等がすでに発表しているように、M型において有意に効率的に殺菌されたが、GM型においては菌数の減少は緩やかであった。

双方のマクロファージの細胞溶解液と培養上清を用いて、osteopontinに対するWestern blottingを行ったが、M型とGM型の間にosteopontinの分子量の違いはなく、また培養上清中に分泌されたものと細胞内のものを比較した場合もM型とGM型の間にパターンの違いは認められなかった。

倫理申請については、平成18年12月27日にタイ公衆衛生省倫理委員会に対して当研究の申請を行った。平成19年2月28日現在、部分修正にて本年3月中の承認の見通しが立っている。また同申請を平成18年12月国立国際医療センター倫理委員会に対して行い、平成19年2月15日研究計画書の部分修正とタイ側の最終版説明書と同意書の日本語訳文章の提出を条件に承認された。

D. 考察

健常者であっても単球からマクロファージへの分化には、形態学上の或いはサイトカイン等の産生における差異が存在する。一応、タイにおける分化実験は成功したが、日本国内で実施した予備実験の結果から、患者検体を使用した場合、さらに大きな差異が認められる可能性が予測される。

今後のタイ国内での研究を成功させる鍵はチェンライ-バンコックの間の検体の移送システムにあると考えられるため、移送システムの整備を急いでいる。今のところ、現地共同研究者が定期的にバンコックに検体を移送する方法が考えられている。検体のすべてはタイNIHに保管され、実験の大半もそこで実施されることから、このシステムの運用が非常に重要であることは言うまでもない。

国立国際医療センターではタイで実施する臨床研究の基礎的検討として分化した二種類の異なった表現型のマクロファージ（M型とGM型）を使用して抗結核免疫、とくに細胞の運動、菌の貪食、細胞内殺菌等に関与していると考えられている。osteopontinの発現についてmRNAレベルとタンパクレベルにおいて検討した。その結果、双方の型のマクロファージにおいて単球からマクロファージへの分化過程で遺伝子発現が起きること、BCG感染によって発現が著明に増強されるが、M型とGM型の間にはmRNAレベルとタンパクレベルの発現の間に乖離が観察されたことは注目に値する。GM型に比較してM型がBCGを効率的に殺菌するにもかかわらず、osteopontinのタンパクレベルの発現量の多寡は、殺菌効率とパラレルにはなっていない。またWestern blottingから二つの異なるマクロファージのタイプが産生するosteopontinの分子量に違いがないことが

分かっている。このことから、osteopontinは細胞の運動や菌の貪食に関わってはいても、殺菌には直接関わっていない可能性が示唆された。

E. 結論

臨床免疫研究を開始する環境が整ってきたことから、平成19年4ないし5月には研究をスタートさせることが可能である。タイ国内における共同研究体制、ネットワーク形成もある程度確立した。平成19年3月中には国立国際医療センターとタイNIHの間にMemorandum of Understandingが締結される運びとなっている。

日本国内での基礎的検討の結果、osteopontinのM型、GM型マクロファージにおける発現パターンが明らかとなり、また殺菌機構との関連性についても検討された。

F. 健康危険情報

本研究ではHIV感染検体を含む感染検体を使用する可能性が高い。従って、タイ国内の指針に合わせた実験操作が要求される。現時点では、オートクレーブを含む滅菌設備、バイオハザードタイプの安全キャビネットの使用、手袋の使用など感染検体の扱いは、共同研究施設の設備の使用を含めて問題がないと考える。結核菌に関しては、生菌はチェンライの実験施設内にては扱わない。また、BCG感染実験はチェンライ病院内の抗酸菌専用の施設（バイオハザードタイプの安全キャビネットが設置されている）を使用する予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表
準備中

2. 学会発表

1. Riduruechai C., Sakurada S. et al.

“Effect of BCG Infection and Colony-Stimulating Factors on Osteopontin Secretion from Human Monocytes-derived Macrophages.”

US-Japan Cooperative Medical Science Program, 41st

Tuberculosis and Leprosy

Research Conference in

Kagoshima, Japan 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

自然免疫系による結核感染防御機構に関する研究

分担研究者 竹田 潔 九州大学生体防御医学研究所 教授

研究要旨

結核菌感染において生体防御の最前線を担う自然免疫系の役割を解析した。結核菌感染により、肺胞上皮細胞および肺胞マクロファージがlipocalin 2を産生し、肺胞腔に分泌することを見出した。Lipocalin 2は、鉄イオンと会合したsiderophoreと結合し、細菌による鉄イオン取り込みを抑えることが知られている。結核菌、BCGの試験管内の培養液中にlipocalin 2を加えると、増殖を濃度依存性に抑制した。過剰の鉄イオンを加えると、lipocalin 2による結核菌の増殖抑制が解除されることから、lipocalin 2による結核菌の増殖抑制は鉄イオンの取り込み抑制によるものであることが示唆された。次に、lipocalin 2ノックアウトマウスに正常マウスがほとんど死なない数の結核菌を感染させると、大半が50日以内に死亡した。また、肺や肝臓で、結核菌数が有意に上昇していた。このように、lipocalin 2ノックアウトマウスは結核菌感染に対する感受性が高くなっていた。さらに、最初に結核菌が生体内に侵入する標的となるII型肺胞上皮細胞を単離し、BCG感染させると、lipocalin 2が産生された。また、lipocalin 2ノックアウトマウス由来のII型肺胞上皮細胞は、BCG感染後の菌数が増加していた。これらの結果から、結核菌感染により、ごく初期に肺胞に分泌されるlipocalin 2が、肺胞上皮層において結核菌感染の第一戦の防御機構を担っていることが明らかになった。

A. 研究目的

自然免疫系は、病原体の宿主内への侵入を最初に察知し、種々の炎症・免疫応答を誘導する重要な免疫系である。しかしながら、B, T細胞が主役を演じる獲得免疫系の分子機構が詳細に解析されてきているのに対し、自然免疫系の作動メカニズムはほとんど理解されていない。最近、Toll-like receptor (TLR)ファミリーが、病原体の構成成分の認識に関与していることが明らかになってきた。結核菌に対する生体防御においても、TLRファミリーによる結核菌の

認識が重要な役割を果たす可能性が考えられる。本研究では、自然免疫系による結核菌などの病原体の生体内への侵入を察知するメカニズムをToll-like receptor (TLR)を中心とした受容体の解析から明らかにし、結核菌感染における免疫系作動の分子機構を解明することを目的とする。

B. 研究方法

自然免疫系の結核菌感染防御への関与について、これまでTLRを介したシグナルの消失するMyD88/TRIF欠損マウスを用い

て解析し、自然免疫系の活性化の重要性を明らかにしてきた。これまでの解析は、マクロファージ、樹状細胞を標的としてきたが、自然免疫応答はこれら貪食細胞に限らず、最初に結核菌に出会う上皮細胞も深く関与している。そこで、結核菌の気道感染により上皮細胞で誘導される遺伝子を探索した。さらに、この遺伝子 (Lcn2) を発現ベクターに組み込み、組み換え分子を作製し、結核菌やワクチン株BCGの試験管内で増殖に及ぼす影響を解析した。次に、Lcn2遺伝子のノックアウトマウスを用いて、結核菌の気道感染を行い、感染感受性を解析した。また、正常マウスおよびノックアウトマウスよりII型肺胞上皮細胞を単離し、試験管内で結核感染への感受性を解析した。通常マウスからは肺胞上皮細胞株の単離は困難なため、IFN-gammaで誘導されるClass II遺伝子のプロモーター下に33度でタンパクが発現するSV40遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを用い、肺組織から肺胞上皮細胞を精製し、種々の成長因子とともにIFN-gamma存在下で33度で約1ヶ月培養することにより、surfactant protein C陽性の肺胞上皮細胞株を作製した。これらの、解析により肺胞上皮細胞から産生されるLcn2の結核感染防御における役割を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整ったSPF環境化で週に1回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

BCGの気道感染によりマウスの肺で、lipocalin 2 (Lcn2)のmRNAが感染2日目をピークに誘導された。さらに、肺のどの細胞がLcn2を発現するかを、BCG気道感染2日目の肺組織を抗Lcn2抗体で免疫染色したところ、分泌能を有するII型肺胞上皮細胞で強く染色された。次に、Lcn2が結核感染により肺胞腔内に分泌されているかを解析するため、気道感染0, 1, 2, 3日後に気管支肺胞洗浄液(BALF)を回収し、その液をwestern blot法によりLcn2の発現を解析したところ、感染2日目をピークにBALF中にLcn2が含まれていることが明らかになった。このように、Lcn2は結核菌の気道感染により、II型肺胞上皮細胞から産生され肺胞腔へ分泌されていることが明らかになった。自然免疫担当細胞として、肺胞マクロファージが肺胞腔に少数存在しているが、結核感染によりその数が著明に増加した。この肺胞マクロファージでもLcn2 mRNAの発現が著明に亢進していた。結核菌などの細菌は、増殖などのために鉄イオンを必要とし、それを宿主から取り込む。そのため、種々の細菌は鉄イオンと会合するsiderophoreを産生し、鉄イオンを取り込む。大腸菌もその増殖には鉄イオンが必要でenterobactinと呼ばれるsiderophoreを産生する。一方Lcn2は、鉄-siderophore複合体に会合し、大腸菌による鉄取り込みをブロックしていることが報告されている。結核菌も、鉄を取り込むためにmycobactinと呼ばれるsiderophoreを産生することから、結核感染により肺胞マクロファージや肺胞上皮細胞から産生されるLcn2が鉄の取り込みを抑制することにより、結核菌の感染を抑制しているかどうかを解析した。結核菌(*M. tuberculosis* H37Ra株)あるいはBCG東京

株を7H9液体培地で試験管内で20日間培養し、そこに種々の濃度のLcn2を加えた。そうすると、MtbH37Ra, BCGの増殖が濃度依存性に抑制された。そこに鉄イオン(FeCl₃)を加えると、濃度依存性にLcn2による増殖抑制が解除された。MtbH37Ra, BCGともに鉄イオンのキレーターを加えると増殖が抑制されることから、Lcn2は、結核菌の増殖を鉄イオンの取り込みをブロックすることにより抑制していることが示唆された。

次に個体レベルでのLcn2の結核感染における役割を解析するため、Lcn2ノックアウトマウスに結核菌MtbH37Raを気道感染させた。野生型マウスがほとんど死なない数の感染により大半のLcn2ノックアウトマウスは感染後50日以内に死亡した。また、感染2週後に肺と肝臓の結核菌数を測定したところ、Lcn2ノックアウトマウスで菌数が増加していた。感染1週後の肺組織を解析すると、Lcn2ノックアウトマウスで炎症細胞の浸潤を伴うgranuloma様な変化が数多くまた大きく誘導されていた。また、肺組織をチールネルゼン法により染色したところ、Lcn2ノックアウトマウスで、赤染する抗酸菌の数が増加していた。これらの結果から、Lcn2ノックアウトマウスは結核感染に対する感受性が高くなっていることが示された。マクロファージが結核感染防御に重要であることはよく知られているが、最初の生体内への侵入経路でもある肺胞上皮細胞が抗結核応答にどのように関与しているかは不明な点が多い。そこで、実際にII型肺胞上皮細胞を単離し、上皮細胞のBCG感染に対する感受性を解析した。Lcn2ノックアウトマウス由来の肺胞樹皮細胞では、正常マウス由来の細胞に比べて有意にBCG感染後の菌数が増加しており、肺胞上皮細胞から分泌されるLcn2

の重要性が明らかになった。

D. 考察

自然免疫系に属するマクロファージや樹状細胞はT細胞を中心とした獲得免疫系との連携などにより、結核感染防御に深く関与している。しかし、今回の研究から、結核菌の呼吸器感染において、最初の侵入サイトとなる肺胞上皮細胞が、抗結核応答の最前線の応答場所としてLcn2を分泌することにより、極めて重要な役割を担っていることが明らかになった。Lcn2は、一度分泌されたあと、細胞内に受容体を介して取り込まれ、細胞のアポトーシスを抑制することが報告されている。そのため、結核感染の最前線でも上皮細胞内に侵入した結核菌を細胞内でその増殖を抑制している可能性もあるのではないかと考えている。

E. 結論

結核菌の感染において、肺胞上皮細胞から分泌されるLcn2が、鉄イオンの取り込みをブロックすることにより増殖を抑え、感染の最前線において自然免疫防御機構の一端を担っていることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koga, R., Hamano, S., Kuwata, H., Atarashi, K., Ogawa, M., Hisaeda, H., Yamamoto, M., Akira, S., Himeno, K., Matsumoto, M., and Takeda, K.: TLR-dependent induction of IFN- β mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*.

- J. Immunol. 177, 7059–7066 (2006).
- 2 . Nemoto, Y., Kanai, T., Makita, S., Okamoto, R., Totsuka, T., Takeda, K., and Watanabe, M.: Bone marrow retaining colitogenic CD4⁺ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology* in press
 - 3 . Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K. J., Yamaoka, S., Kawai, T., Matsuura, Y., Takeuchi, O., and Akira, S.: Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat. Immunol.* 7, 962–970 (2006).
 - 4 . Uematsu, S., Jang, M. H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., Hemmi, H., Coban, C., Kawai, T., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Miyasaka, M., Takeda, K., and Akira, S.: Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c⁺ lamina propria cells. *Nat. Immunol.* 7, 868 – 874 (2006).
 - 5 . Yoshimatsu, T., Kawaguchi, D., Oishi, K., Takeda, K., Akira, S., Masuyama, N., and Gotoh, Y.: Non-cell-autonomous action of STAT3 in maintenance of neural precursor cells in the mouse neocortex. *Development* 33, 2553–2563 (2006).
 - 6 . Miyatsuka, T., Kaneto, H., Shiraiwa, T., Matsuoka, T. A., Yamamoto, K., Kato, K., Nakamura, Y., Akira, S., Takeda, K., Kajimoto, Y., Yamasaki, Y., Sandgren, E. P., Kawaguchi, Y., Wright, C. V., and Fujitani, Y.: Persistent expression of PDX-1 in the pancreas causes acinar-to-ductal metaplasia through Stat3 activation. *Genes Dev.* 20, 1435–1440 (2006).
 - 7 . Takegahara, N., Takamatsu, H., Toyofuku, T., Tsujimura, T., Okuno, T., Yukawa, K., Mizui, M., Yamamoto, M., Prasad, D. V., Suzuki, K., Ishii, M., Terai, K., Moriya, M., Nakatsuji, Y., Sakoda, S., Sato, S., Akira, S., Takeda, K., Inui, M., Takai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Kumanogoh, A., and Kikutani, H.: Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat. Cell Biol.* 8, 615–622 (2006)
 - 8 . Nakamura, K., Miyagi, K., Koguchi, Y., Kinjo, Y., Uezu, K., Kinjo, T., Akamine, M., Fujita, J., Kawamura, I., Mitsuyama, M., Adachi, Y., Ohno, N., Takeda, K., Akira, S., Miyazato, A., Kaku, M. and Kawakami, K.: Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus*

- neoformans. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47, 148-154 (2006).
9. Yu, Q., Tang, C., Xun, S., Yajima, T., Takeda, K. and Yoshikai, Y.: MyD88-dependent signaling for IL-15 production is important for the development of CD8 $\alpha\alpha$ and TCR $\gamma\delta$ intestinal intraepithelial T lymphocytes. *J. Immunol.* 176, 6180-6185 (2006).
 10. Inoue, H., Ogawa, W., Asakawa, A., Okamoto Y., Nishizawa, A., Matsumoto, M., Teshigawara, K., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Notohara, K., Katayose, K., Okamura, H., Kahn, C. R., Noda, T., Takeda, K., Akira, S., Inui, A. and Kasuga, M.: Role of hepatic STAT3 in brain insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab.* 3, 267-75 (2006).
 11. Kinoshita, D., Hirota, F., Kaisho, T., Kasai, M., Izumi, K., Bando, Y., Mouri, Y., Matsushima, A., Niki, S., Han, H., Oshikawa, K., Kuroda, N., Maegawa, M., Irahara, M., Takeda, K., Akira, S. and Matsumoto, M.: Essential role of I κ B kinase α in thymic organogenesis required for the establishment of self-tolerance. *J. Immunol.* 176, 3995-4002 (2006).
 - Santos, L. L., Milenkovski, G. P., Hall, P. H., Leech, M., Sharma, L., Takeda, K., Akira, S., Kitching, A. R., and Morand, E. F.: IL-18 is redundant in T-cell responses and in joint inflammation in antigen-induced arthritis. *Immunol. Cell Biol.* 84, 166-173 (2006).
 12. Owaki, T., Asakawa, M., Kamiya, S., Takeda, K., Fukai, F., Mizuguchi, J. and Yoshimoto, T.: IL-27 suppresses CD28-mediated IL-2 production through Suppressor of Cytokine Signaling 3. *J. Immunol.* 176, 2773-2780 (2006).
 13. Kuwata, K., Matsumoto, M., Atarashi, K., Morishita, H., Hirotsu, T., Koga, R., and Takeda, K.: I κ BNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity* 24, 41-51 (2006).
2. 学会発表
1. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. Awaji Forum, 2006.9.3-6, Hyogo, Japan
 2. Kiyoshi Takeda, Innate immune responses against mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program, 41st Tuberculosis and leprosy research conference, 2006.7.19-21, Kagoshima, Japan
 3. Kiyoshi Takeda, Role of TLR in innate and acquired phase of IBD. 2006 SMI Annual Meeting, 2006.6.1, San Francisco, USA

4. Kiyoshi Takeda, Nuclear IκB protein-mediated regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa (symposium), 第36回日本免疫学会学術集会、2006.12.11-13、大阪
5. 香山尚子、竹田潔, Epigenetic regulation of Toll-like receptor-dependent gene expression. 第36回日本免疫学会学術集会、2006.12.11-13、大阪
6. 財賀大行、竹田潔, Lipocalin 2 mediates anti-mycobacterial immune responses. 第36回日本免疫学会学術集会、2006.12.11-13、大阪
7. 古賀律子、竹田潔, IFN-beta-dependent innate immune response against *Trypanosoma cruzi*, 第36回日本免疫学会学術集会、2006.12.11-13、大阪
8. 竹田潔, 自然免疫系によるトリパノソーム原虫の感染制御機構, 第59回日本寄生虫学会、2006.10.28、福岡
9. 竹田潔, 自然免疫系の活性制御機構 (シンポジウム), 第2回食品免疫学会、2006.10.23、東京
10. 竹田潔, 自然免疫系の活性制御機構 (特別講演), 第43回補体シンポジウム、2006.8.19、福岡
11. 竹田潔, 粘膜免疫の今後の展望 (イブニングセミナー), 第43回日本消化器免疫学会総会、2006.8.3-4、青森
12. 竹田潔, 自然免疫系による炎症制御, 日本動脈硬化学会、2006.7.13-14、東京
13. 竹田潔, I型IFNによる細胞内寄生性原虫の感染防御機構, 第71回インターフェロンサイトカイン学会、2006.7.7-8、兵庫
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

多剤耐性結核の薬剤耐性遺伝子の解析

分担研究者 阿部千代治 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社・技術顧問
共同研究者 小林 郁夫 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社
尾形 英雄 結核予防会複十字病院
和田 雅子 結核予防会結核研究所
御手洗 聡 結核予防会結核研究所
川辺 芳子 国立病院機構東京病院
高嶋 哲也 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター
鈴木 克洋 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
Sng Li-Hwei Singapore General Hospital
Wang Suxing Singapore General Hospital

研究要旨

結核菌の迅速検査は適切な患者管理と治療にとって重要である。迅速薬剤感受性検査システムBACTEC MGIT 960 ASTの評価中にイソニアジド (INH)に対する検査でMGIT 960 ASTで耐性しかし小川比率法で感受性の結果を示す株の存在が明らかになった。MIC測定の結果、これらの90%以上はINH低レベル耐性菌であることが分かった。INH耐性に関与することが知られている遺伝子の検索から、46.4%の株にINH低レベル耐性に関与すると考えられている*inhA*遺伝子のプロモーター領域に変異がみられた。これらの結果は、MGIT 960 ASTの有用性を示唆している。INH低レベル耐性結核菌がシンガポールにも存在することがSingapore General Hospitalとの共同研究で明らかになった。

A. 研究目的

イソニアジド (INH)は最も重要な一次抗結核薬であり、INH耐性菌で発病した患者の治療は容易でない。迅速薬剤感受性検査システムであるBACTEC MGIT 960 ASTの評価中にINHに対する感受性検査でMGIT ASTと小川比率法の間で不一致の結果を示す株の存在が認められた。それらはMGIT ASTで耐性、しかし小川比率法で

感受性の表原型を示すINH低レベル耐性菌であった。昨年の報告で、この種の菌は全国各地に存在することを明らかにした。今年にはINH耐性に関与する遺伝子に変異がみられるか、またアジア諸国にも存在するかを調べる。

B. 研究材料および方法

1. 使用菌株

全国各地から分離された結核菌でMGIT ASTと小川比率法の間で不一致の結果を示した30株の結核菌を研究に用いた。また低レベルINH 耐性菌がアジア諸国にも存在するかどうか調べるためにSingapore General Hospital(SGH)で分離された50株のINH耐性菌を研究に用いた。

2. MICの測定

MICはMiddlebrook 7H10寒天培地で測定した。McFarland No. 0.5に調整した菌液を滅菌蒸留水で100倍希釈し、薬剤添加培地への接種菌液とした。コントロール用培地への接種菌液はさらに100倍希釈したものをを用いた。菌液を各培地に塗布後、5% CO₂条件下で培養し、培養3週目に判定した。

3. カタラーゼ試験

中試験管に垂直位で加熱凝固した小川培地に被検菌液を接種し、37℃で2週間培養した。菌苔表面にツイン80・過酸化水素試薬を加え、5分後に発生する泡の高さを測定した。

4. INH耐性に関与する遺伝子の変異

INH耐性に関与することが知られている遺伝子katG、inhA、ahpCの変異を調べた。プライマーは、katG遺伝子でコドン315を含む1,073 bpフラグメント、inhA遺伝子のプロモーターを含む217 bpおよびinhAの構造遺伝子(ORF) 460 bpフラグメント、ahpC遺伝子のプロモーターを含む264 bpフラグメントを増幅するように設計した。小川培地増殖結核菌をTris-EDTA bufferに懸濁し、水浴を用い60℃で30分保温後にボルテックス、その後95℃で10分間加熱処理し、遺伝子変異分析に用いた。塩基配列分析反応にはBig Dye Terminator Cycle Sequencing kitを用いた。増幅産物

をApplied Biosystems 3137x1 Genetic Analyzerで分析した。

5. シンガポールとの共同研究

SGHのCentral Tuberculosis Laboratory (CTBL)で分離された結核菌を研究に用いた。BACTEC 460TBによる感受性検査でINH耐性結核菌を-80℃に保存した。検査時にレーベンシュタイン・イエンセン卵培地で培養した菌から接種菌を作製した。薬剤感受性検査のために薬剤感受性検査用ウエルパック培地Sを日本からシンガポールに送付し、検査に供した。感受性検査用培地に菌接種、37℃で4週間培養後に結果を判定した。

C. 結果および考察

1. INH 低レベル耐性菌の性状

MGIT ASTで耐性・小川比率法で感受性の表現型を示した30株の結核菌の性状を調べた。2つの検査法で用いているINHの検査濃度が異なることからMiddlebrook 7H10寒天培地でMICを測定した。不一致の結果を示した30株のうち、9株は0.4 μg/ml、19株は0.8 μg/mlのMICを示した。この結果は、28株は低レベルINH耐性菌であることを示している。残りの2株は0.2 μg/mlのMICを示し感受性の表現型であった。

INH高度耐性株はカタラーゼ活性を完全に失っているとする報告がある。2検査法で不一致の結果を示した株のカタラーゼ活性を半定量カタラーゼ試験で調べた。産生量に差はみられたがすべての株がカタラーゼ活性を有していた。

さらに性状を確認するために、INH耐性に関与することが知られているkatG、inhA、ahpC遺伝子の変異を調べた。INH低レベル耐性菌28株の中で15 (53.5%) 株の遺伝子に変異がみられた。残りの13株に

は調べた領域に変異を検出できなかった。変異を持つ株の中で2株は2つの遺伝子 (katG + ahpC、katG + inhA) に、13株は単一の遺伝子に変異を示した。katG遺伝子のコドン315の変異がINH高度耐性に関与していることが知られている。3株はkatG遺伝子に変異を示したがコドン315に変異を持つ株はみられなかった。INH低レベル耐性菌28株の中で13株 (46.4%) は inhA 遺伝子のプロモーター領域 (-15) に C→T の変異を持っていた。しかし、inhA 遺伝子の ORF に変異を持つ株はみられなかった。このことは、inhA 遺伝子のプロモーター領域の変異がINH低レベル耐性に関与しているとする報告を支持している。

2. シンガポールとの共同研究

SGHはベッド数1,600のシンガポール最大の総合病院である。本研究のカウンターパートであるSGHのCTBLではシンガポールの抗酸菌検査の90%が行われている。培養にはBACTEC MGIT 960を、薬剤感受性検査にはBACTEC 460TBを用いている。シンガポールにもINH低レベル耐性菌が存在するかどうかがCTBLと共同で研究した。2006年1月から7月までにCTBLで分離された結核菌でBACTEC 460TBによる感受性検査でINHに耐性を示した50株を研究に用いた。1株は黄色コロニーが含まれていたことから除外した。ウエルバック培地との一致率は59.1% (29/49)であった。20株 (40.8%)は不一致の結果であり、それらはBACTEC 460TBで耐性しかし小川比率法で感受性であった。わが国で分離された結核菌について、BACTEC MGIT 960 ASTと小川比率法の結果の不一致率は31.2%であり、シンガポール分離株の一致率が幾分低い結果となった。これはCTBL側でバイオセーフティを考え一部

の多剤耐性菌を除外していることから考えていると考えられる。これらの結果はシンガポールにもINH低レベル耐性菌が存在することを示している。不一致株のMIC測定および遺伝子の検索は次年度に計画している。

D. 結論

1. BACTEC MGIT 960 ASTの評価中に小川比率法の結果との間で不一致の結果を示す結核菌の存在が明らかになった。
2. MIC測定の結果、不一致株の90%以上はINH低レベル耐性菌であることが分かった。
3. INH耐性に関与する遺伝子を検索したところ、不一致株の53.5%は単独または2つの遺伝子に変異を持っていた。それらの大部分 (86.7%) は inhA 遺伝子のプロモーター領域の変異であった。
4. シンガポールにもINH低レベル耐性菌が存在することがSingapore General Hospitalとの共同研究で明らかになった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 小林郁夫, 阿部千代治, 御手洗聡: 結核菌薬剤感受性検査のための BACTEC MGIT 960 AST の評価: 外部精度管理菌株を用いた研究. 結核, 81: 57-62, 2006.
2. Takii T, Abe C, Chiba T, Nishimura K, Yamamoto K, Ishiguru S, Kondo M, and Onozaki K: Synthesis of new

sugar derivatives from *Stachys sieboldi* Miq and antibacterial evaluation against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, and *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*. (in press).

3. 御手洗聡, 小林郁夫, 阿部千代治, 和田雅子, 鈴木克洋, 高嶋哲也, 川辺芳子, 町田和子, 田野正夫, 瀧川修一, 鎌田有珠, 重藤えり子, 藤井俊司, 森健一, 須山尚史, 矢野修一, 手塚隆善, 川城丈夫, 尾形英雄: バクテック MGIT 960 結核菌薬剤感受性検査の判定齟齬に関する検討. 結核 (印刷中)

2. 学会発表

1. Abe C, Kobayashi I, Mitarai S, Wada M, Ogata H, and Sng Li-Hwei: Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low-level resistance to isoniazid. 27th Annual Congress of European Society of Mycobacteriology, 9-12 July 2006, London.
2. 阿部千代治: 結核感染に対する検査室の安全対策. セッション 3. 病院・検査室バイオセーフティ「検査室のその後の対応と改善に向けての対策」. 第6回日本バイオセーフティ学会総会, 24-25 November 2006, 東京都.
3. 小林郁夫, 阿部千代治, 御手洗聡: バクテック MGIT 960 AST による二次抗結核薬に対する結核菌の感受性検査. 第18回日本臨床微生物学会総会, 17-18 February 2007, 長崎市.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

新しい結核ワクチン、結核治療ワクチンによる臨床応用
（国立病院機構政策医療呼吸器ネットワークを利用した）計画に関する研究

分担研究者 坂谷光則 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 院長
研究協力者 螺良英郎 （財）大阪結核研究会 理事長

研究要旨

[I] 結核治療ワクチン：HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンはマウスの系で治療効果を示した。さらにHSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン+BCGワクチンもマウスの系で強い治療ワクチン効果を示した。したがって①HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン ②HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNA+BCG ワクチン、を中心に治療ワクチンの開発計画を立案した。

さらに、

[II] 多剤耐性結核菌に対する治療ワクチン

多剤耐性結核菌を感染させたマウスにおいて、HVJ-エンベロープ/HSP65DNA + IL-12 DNAワクチンは、強力な結核治療効果（結核治療ワクチン）を示した。

さらに、(HVJ-エンベロープ/HSP 65DNA + IL-12 DNA)ワクチン+BCGワクチンも強力な結核治療効果を示した。更に、超薬剤耐性結核（XDR-TB）に対しても、治療ワクチン効果を示す画期的な成果を得た。

[III] 結核予防ワクチン：すでに、マウス、モルモットの結核感染モデル動物実験のみならずヒトの結核感染に最も近いと折り紙つきのカニクイザル(Nature Medicine 1996)のレベルで新しい結核ワクチン①HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン ②リコンビナント72f BCG等が結核予防ワクチンとして有効である事が示された。したがって、結核予防ワクチンの臨床応用としてPhase I study（健常人で行う PPD皮内反応 副作用 PBL免疫反応）Phase II study [日本（当国立病院機構近畿中央胸部疾患センターを中心として政策医療呼吸器ネットワーク） フィリピン ブラジル インド 南アフリカ等結核発生率の低下]、Phase III、Phase IVを行う計画をたてた。結核予防効果の判定には最低数年以上かかる。