

ウレアーゼ遺伝子を除去することにした。ウレアーゼはファゴゾーム内の pH 環境を中性に保つ作用を有する。BCG 感染ファゴゾームが、より効率的にライソゾームと融合するためには、ファゴゾーム内の pH をより酸性側に傾ける必要がある。つまり、ウレアーゼ欠損 BCG は、ウレアーゼの pH 調整作用が欠如するため、ファゴゾームとライソゾームの融合を抑制し得ない可能性が考えられる。本年度は、ウレアーゼ欠損 BCG (BCG- Δ UT) がマクロファージあるいは樹状細胞に感染した際、どの程度 T 細胞を活性化し得るか検討した。

B. 研究方法

ウレアーゼ欠損 BCG (BCG- Δ UT) は、BCG (Tokyo 株) よりファージシステムを用い Ure C 遺伝子を除去して作製した。正常健康者末梢血より T 細胞をマグネットビーズ付着抗 CD3 抗体を用いて除去した末梢単核球分画よりプラスティック付着性細胞を分離して単球として用いた。単球に対しリコンビナント (r)M-CSF (10 ng/ml) を添加してマクロファージを分化誘導した。本マクロファージをここでは M-M \emptyset と称した。単球に対して、rGM-CSF 50ng/ml および rIL-4 (10ng/ml) を添加して 4 日間培養することで、未熟樹状細胞を分化誘導した。BCG- Δ UT の CD4 陽性 T 細胞活性化能は、BCG- Δ UT あるいは BCG-Tokyo を M-M \emptyset あるいは樹状細胞に感染させ、感染 2 日後に自己の CD4 陽性 T 細胞と 4 日間混合培養し、培養上清中に産生分泌される IFN- γ を ELISA 法を用いて測定することで検討した。ELISA 法は市販のアッセイキットを用いた。レスポンダー細胞として用いた CD4 陽性 T 細胞は、末梢血単核球より市販の CD4 negative isolation kit を用いて精製した。純度は 95% 以上であった。M-M \emptyset の抗原提示能を増強させる補助因子として、リコンビナント GM-CSF \cdot CD40 リガンド (L) \cdot リコンビナント IFN- γ を検討したが、これらは全て市販のリコンビナントタンパクを用いた。また、IFN- γ レセプター α 鎖 (CD119) に対する抗体を用いて、IFN- γ の補助因子としての役割を検討したが、本抗体も市販の抗体を用いた。樹状細胞およびマクロファージから産生される各種サイトカインも、市販のキットを用いて ELISA 法で測定した。BCG 感染樹状細胞における T 細胞活性化の抗原特異性は、樹状細胞を抗 MHC 抗原抗体および抗 CD86 抗体で処理した際の T 細胞の活性化の減弱の有無で評価した。マクロファージおよび樹状細胞の表面抗原の発現程度の解析は、FACSCalibur を用いた。全て市販の抗体を用いた。

倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者

はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解 (インフォームドコンセント) を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。

C. 研究結果

BCG- Δ UT 感染マクロファージにおけるファゴゾームとライソゾームの融合効率をコンフォーカルマイクロスコープで検索した。ライソゾームのマーカーとして LAMP-1 抗体を用い、マクロファージとして活性化 THP-1 細胞を用いると、BCG- Δ UT は親 BCG (BCG-Tokyo) 株に比し、効率良く Phagosome-Lysosome fusion を誘導し、Lysosome 内に存在する BCG- Δ UT が多数観察された。そこで、BCG- Δ UT を正常健康人由来の M-M \emptyset に感染させた際の自己 CD4 陽性 T 細胞活性化能を検討した。BCG-Tokyo を同様に M-M \emptyset に感染させ比較検討すると、BCG- Δ UT は BCG-Tokyo に比し有意に強く CD4 陽性 T 細胞を活性化させ、IFN- γ の産生を誘導した。しかし、BCG- Δ UT を MOI 0.25 で感染させ、T 細胞対マクロファージ比 5 と比較的生理的に近い状態で T 細胞を刺激しても産生された IFN- γ 量は 40 pg/ml 程度であって期待した程の成果は得られなかった。一方、BCG が M-M \emptyset に感染すると大量の IL-10 を産生した。IL-10 は T 細胞の活性化を抑制することが知られている。そこで、BCG- Δ UT と BCG-Tokyo のマクロファージからの各種サイトカイン産生誘導能を比較検討した。その結果、BCG- Δ UT は IL-10 のみならず GM-CSF \cdot TNF α \cdot IL-1 β の産生をより強く誘導した。そこで、BCG- Δ UT 感染 M-M \emptyset の T 細胞活性化に及ぼす IL-10 の影響を調べた。M-M \emptyset に BCG- Δ UT あるいは BCG-Tokyo を感染させる際、IL-10 に対する中和抗体を添加したところ、マクロファージによる T 細胞活性化能は有意に増強した。このことは、BCG- Δ UT を用いた場合も BCG-Tokyo を用いた場合にも同様に観察された。また、GM-CSF はマクロファージからの IL-10 の産生を抑制する作用を有していることをこれまでに報告してきた。そこで、M-M \emptyset に BCG 感染させる際、マクロファージを予め GM-CSF で前処理した後 BCG を感染させたところ、BCG- Δ UT を用いた場合のみ T 細胞は著しく強く活性化された。ついで、M-M \emptyset に BCG を感染させた際のマクロファージ表面抗原の発現程度の変化を FACSCalibur を用いて検索した。BCG- Δ UT は BCG-Tokyo に比し有意に強く CD14 および CD40 抗原の発現を増強させた。そこで、BCG- Δ UT 感染マクロファージを CD40L で処理したところ、BCG-Tokyo 感染 M-M \emptyset に比し強く T 細胞活性化能が増強した。BCG- Δ UT と

BCG-TokyoのCD40Lに対する感受性の違いは、CD40の発現程度の違いによると考えられた。さらに、BCG- Δ UT感染M-M ϕ を外因性IFN- γ で処理しても、M-M ϕ のT細胞活性化能は著しく増強されたが、IFN- γ による増強はBCG- Δ UTを用いた時のみ観察された。IFN- γ 処理する際にIFN- γ レセプターに対する抗体を添加しておく、IFN- γ の増強作用はキャンセルされた。IFN- γ はマクロファージを活性化する作用を有することが知られている。BCG- Δ UT感染M-M ϕ をIFN- γ で刺激するとT細胞を刺激する際に重要な役割を果たすHLA-DRおよびCD86分子の発現が増強し、BCG- Δ UT感染IFN- γ 刺激M-M ϕ 表面をHLA-DRあるいはCD86に対する抗体で処理すると、本マクロファージのT細胞活性化能は強く抑制された。このことは、本マクロファージは抗原特異的にT細胞を活性化していることも示唆していると考えられる。BCG- Δ UTを末梢単球由来樹状細胞に感染させると、細胞表面のHLA-ABC・HLA-DR・CD86抗原の発現を増強し、さらにCD83抗原を強陽性とした。これらの抗原の発現は、同量のBCG-Tokyoを感染させた樹状細胞に比し、BCG- Δ UT感染で有意に強く増強された。さらに、活性化樹状細胞から産生されるIL-12p70およびIL-1 β の産生誘導を比較検討すると、BCG- Δ UTのサイトカイン産生誘導能は有意に強かった。そこで、BCG感染樹状細胞を抗原提示細胞として用い、自己のメモリーCD4陽性T細胞およびナイーブCD4陽性T細胞をレスポンドーとして混合培養すると、BCG- Δ UTはBCG-Tokyoに比し有意に強くT細胞を活性化し、IFN- γ およびIL-2の産生を誘導した。ワクチンの最も重要な役割は、生体内において病原性抗酸菌に反応し得るメモリーT細胞を産生することである。そこで、BCG- Δ UTおよびBCG-Tokyo株100個をC57BL/6マウスの尾部に皮内接種し、4週間後の脾臓T細胞のリコール抗原あるいはらい菌由来の細胞膜タンパクに対する反応性を検討した。*In vitro*で抗原刺激2日後のT細胞からのIFN- γ およびIL-2産生能を測定すると、BCG- Δ UT接種マウス脾T細胞はBCG-Tokyo株由来の細胞質に反応しIFN- γ を産生した。しかし、BCG-Tokyo株接種マウスの反応性は極めて弱かった。さらに、脾臓T細胞のIFN- γ 産生細胞を特定するために細胞内サイトカイン染色を行うとIFN- γ は主にCD4陽性T細胞から産生されていることが明らかになった。また、BCG接種マウスの病原性抗酸菌に対する交叉反応性を検討するため、脾臓T細胞をらい菌由来細胞膜抗原で刺激すると、BCG- Δ UT接種マウスから得たT細胞のみが本膜タンパクに反応し、大量のIFN- γ を産生した。

D. 考察

ハンセン病においてCD4陽性T細胞を活性化し、ひいては病変の発症を予防する方策としてBCGがしばしば用いられてきた。BCGに対する評価は様々であって地域によって大きく異なる。2006年、Setia等はこれまで報告されてきたBCGの予防効果を網羅的に解析し、その有効性は26%であると報告した。BCGが期待された程有効ではなかった理由は種々考えられるが、その最大の欠点はBCGも抗酸菌に属する生ワクチンであることに起因すると考えられる。すなわち、BCGはマクロファージに対して強い親和性を有し、マクロファージに感染するとファゴソームを形成し、ライソソームとの融合を阻止する能力を身につけていることにある。ライソソームとの融合が十分に生じないと、BCG由来の抗原性分子がMHCクラスII経路を介して運搬されず、その結果として十分にCD4陽性T細胞を活性化し得ないことに繋がる。そこで、BCGのT細胞活性化能を増強する方策として、BCGが有するウレアーゼ遺伝子を人為的に除去し、新たなリコンビナントBCGを作製することを試みた。ウレアーゼ酵素は、ファゴソーム内のpH環境を中性に保つこと、すなわちファゴソームの酸性化を抑制することでライソソームとの融合阻止に寄与していると考えられる。今回作製したウレアーゼ除去リコンビナントBCG(BCG- Δ UT)は、予想した通りライソソームとの融合を促進した。さらに、親BCGであるBCG-Tokyo株より有意に強くCD4陽性T細胞を活性化した。しかし、残念ながらその程度は期待した程ではなく、生理的条件下では40 pg/mlのIFN- γ が産生されたにとどまった。

そこで、BCG- Δ UTによるT細胞の活性化を促進する方策について検討を加えた。BCG- Δ UTがマクロファージに感染すると大量のIL-10が産生される。そこで、本免疫抑制性サイトカインの影響をまず検索した。BCG- Δ UT感染時にIL-10に対する中和抗体を添加しても、またマクロファージを予めGM-CSFで処理することでIL-10の産生を抑制しても、BCG- Δ UTのマクロファージを介したT細胞活性化能は著しく増強した。その増強程度は、BCG-Tokyoに比し有意に強いものであった。さらに、積極的にBCG- Δ UTのT細胞活性化能増強を図るために、マクロファージに対する補助因子(Co-stimulator)について検討を加えた。BCG- Δ UTが感染するとマクロファージ上のCD40抗原の発現が増強するため、BCG- Δ UT感染マクロファージをCD40リガンドで刺激するとT細胞活性化能は増強し、またマクロファージの活性化を誘導する因子として知られるIFN- γ で感染マクロファージを刺激しても、BCG- Δ UT感染マクロファージのT細胞活性化能は著しく増強された。CD40リガンド・IFN- γ 何れの場合においても、BCG-Tokyo

に比し BCG- Δ UT において、その増強効果は明らかに強く、かつ IFN- γ は、全ての抗酸菌感染マクロファージを活性化すると想定されてきた。しかし、らい菌感染マクロファージにおいては IFN- γ の増強効果はきわめて弱く、今回明らかになったように BCG- Δ UT と BCG-Tokyo の間においても IFN- γ に対する感受性は大きく異なっていた。このことは、抗酸菌の種類によって IFN- γ 感受性はそれぞれ異なっており、BCG- Δ UT が非常に強い感受性を示したことは、ウレアーゼの欠損によりライソゾームとファゴゾームの融合が促進されやすい環境になっていたことがその一因である可能性が考えられた。また、これら補助因子は、BCG- Δ UT 感染樹状細胞による T 細胞の活性化で容易に供給できることが明らかになった。

一方、BCG- Δ UT の増強速度は BCG-Tokyo に比し遅い。このことは、ウレアーゼ遺伝子は IFN- γ の感受性に関与し、かつ菌の増強速度を調整する二つの作用を有することを示唆している。すなわち、ウレアーゼ遺伝子は病原性抗酸菌感染症において、免疫-化学コンビネーション療法の良きターゲット遺伝子になるものと想定された。

E. 結論

ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG は、マクロファージおよび樹状細胞を介し、自己 CD4 陽性 T 細胞を強く活性化することが可能であった。

G. 研究発表

3. 論文発表

- 3) Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and T. Mukai. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. *Microbes and Infect.*, 9:70-77, 2007.
- 4) Maeda, Y., T. Mukai, M. Kai, Y. Fukutomi, H. Nomaguchi, C. Abe, K. Kobayashi, S. Kitada, R. Maekura, I. Yano, N. Ishii, T. Mori, and M. Makino. Evaluation of major membrane protein-II as a tool for serodiagnosis of leprosy. *FEMS Microbiol. Lett.*, 272:202-205, 2007.
- 5) Kai, M., Y. Fujita, Y. Maeda, N. Nakata, S. Izumi, I. Yano, and M. Makino. Identification of trehalose dimycolate (cord factor) in *Mycobacterium leprae*. *FEBS Lett.*, 581:3345-3350, 2007.
- 6) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, N. Nakata, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. Characterization of the fucosylation pathway in the biosynthesis of glycopeptidolipids from *Mycobacterium*

avium complex. *J. Bacteriol.*, 189 : 5515-5522, 2007.

- 7) Duthie, M. S., W. Goto, G. C. Ireton, S. T. Reece, L. P. Cardoso, C. M. Martelli, M. M. Stefani, M. Nakatani, R. C. de Jesus, E. M. Netto, M. V. Balagon, E. Tan, R. H. Gelber, Y. Maeda, M. Makino, D. Hoft, and S. G. Reed. Leprosy diagnosis: early serological detection with protein antigens. *Clin. Vaccine Immunol.*, 14:1400-1408, 2007.
- 8) 牧野正彦. NPO 法人バイオメディカルサイエンス研究会編集, バイオセーフティの事典—病原微生物とハザード対策の実際—, みみずく舎/医学評論社, 2007.

2. 学会発表

- 1) Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, T. Mukai, and T. Mori. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42nd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.
- 2) Detection of *M. leprae* DNA in nasal swab samples by LAMP method. Mukai, T., S. Izumi, C. Rosita, I. Agusni, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42nd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.
- 3) Clofazimine-induced cell death in human and mouse macrophages. Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42nd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.
- 4) Clofazimine-induced cell death in macrophages. Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 5) Application of new serological test for leprosy in Vietnam. Kai, M., N. P. N. Ha, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, Y. Maeda, T. Mukai, N. T. Tan, and M. Makino. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.

- 6) Lipopeptide (LipoK) of *Mycobacterium leprae* activated antigen presenting cells and type 1 T cells. Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, M. Kai, and M. Makino. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 7) Inhibition of the multiplication of *Mycobacterium leprae* vaccination with a recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *M. leprae*. Makino, M., Y. Maeda, M. Matsuoka, and T. Tamura. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 8) Utility of MMP-II for diagnosis of leprosy. Maeda, Y., M. Kai, Y. Fukutomi, and M. Makino. 17th International Leprosy Congress, Pre-workshop, New Diagnostics and Molecular Epidemiology, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 9) Search for *Mycobacterium leprae* antigens for sero-diagnosis. Kai, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and M. Makino. 17th International Leprosy Congress, Pre-workshop, Future Research Needs, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 10) ハンセン病におけるマクロファージのサイトカイン産生調節機構. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第 80 回日本細菌学会総会 2007 年 3 月 大阪
- 11) らい菌由来リポ蛋白の抗らい菌生体防御反応に及ぼす影響. 前田百美, 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. 第 80 回日本細菌学会総会 2007 年 3 月 大阪
- 12) 抗酸菌糖脂質生合成における fucose 転移酵素遺伝子の解析. 宮本友司, 向井 徹, 前田百美, 甲斐雅規, 中田 登, 中 崇, 矢野郁也, 牧野正彦. 第 80 回日本細菌学会総会 2007 年 3 月 大阪
- 13) クロファジミンによるマクロファージの細胞死と caspase 活性化. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第 80 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2007 年 5 月 横浜
- 14) 変異検出におけるダイレクトシーケンスとクローン化シーケンスの相違. 甲斐雅規, 倉繁昌浩, 松原久美子, 中田 登, 牧野正彦. 第 80 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2007 年 5 月 横浜
- 15) LAMP 法によるらい菌遺伝子検出の応用. 向井 徹, 和泉眞蔵, 宮本友司, Cita Rosita, Indropo Agusni, 松岡正典, 牧野正彦. 第 80 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2007 年 5 月 横浜
- 16) 結核菌分泌蛋白による Th1 分化誘導機構の解析: TCR による抗原認識の役割. 下袴田陽子, 田村敏生, 牧野正彦, 高津聖志. 第 90 回日本細菌学会関東支部総会 2007 年 10 月 東京
- 17) *Mycobacterium avium* complex における fucose 含有糖脂質抗原の生合成解析. 宮本友司, 向井 徹, 前田百美, 甲斐雅規, 中田 登, 中 崇, 矢野郁也, 牧野正彦. 第 90 回日本細菌学会関東支部総会 2007 年 10 月 東京
- 18) ヒトマクロファージにおける抗らい菌活性誘導. 福富康夫, 牧野正彦. 第 37 回日本免疫学会総会 2007 年 12 月 東京
- 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

ペット用カメから分離される抗酸菌（続報）

分担研究者 後藤義孝

宮崎大学農学部

研究要旨 昨年度の調査において、海外から輸入されたカメは多数の非結核性抗酸菌（MOTT）を保有していることが判明した。これらの抗酸菌に *hsp65 gene* を利用した同定法を応用した結果、*M.terrae* ほかに 13 種が同定されたが、この方法では菌種の同定ができない株も多数見出された。今年度はこの未同定株について、16SrRNA 遺伝子のシークエンス解析による菌種の特定を行うとともに新たに国内 7 か所で生産されたミシシippアカミミガメ 45 匹を入手し、それらの抗酸菌保有状況をしらべた。未同定菌の大部分は 16SrRNA 解析により *Mycobacterium arupense* であることが分かった。また国内産のカメ 45 個体中 42 個体（93.3%）から抗酸菌が分離された。外国産、国産を問わずカメは MOTT のキャリアか active shedder である可能性が示唆された。

A. 研究目的

昨今、エキゾチックペットの飼育が増加しているが、その感染症に関しては世界的にも十分な研究・調査が行われていない。わが国では 2005 年 9 月 1 日から「動物の輸入届出制度」が施行され、それ以後哺乳類および鳥類の輸入数は減少してきている。しかし、愛玩用爬虫類は届出の対象でないため、現在も海外から数多く輸入されている。これまでにカメ等の爬虫類から免疫力の低い老人や子供に非定型抗酸菌（Mycobacteria other than tubercule bacilli : MOTT）である *M. chelonae* が感染した例が報告され、爬虫類がヒトに対して起病性を有する MOTT を保有している可能性について指摘されたが、国内における個体調査報告はない。そこで、昨年度から今年度にかけて、公衆衛生上のリスク評価を目的として、輸入数が多く、リスクの高い年齢層が飼育しているミシシippアカミミガメを主体としたカメの MOTT 保有調査を行った。分離した MOTT の同定は PCR 法によ

る 16SrRNA 遺伝子および *hsp65* 遺伝子の増幅と、後者遺伝子の一部配列を制限酵素によって切断して得られるバンドパターン多様性から分別する PCR amplification-restriction analysis(PRA)法により行った。外国から輸入したカメの 76%から抗酸菌が分離され、輸入カメは抗酸菌を高率に保有していることが分かった（昨年度報告）。今年度は 16SrRNA 遺伝子の PCR において *Mycobacterium* 属菌に特有の 1030bp の位置にバンドが確認されたが、*hsp65* 遺伝子の PCR では目的のバンドが得られなかった 55 株について、16SrRNA 遺伝子のシークエンス解析による菌種の特定を行った。また、それらのうち、ヒトに病原性を有する可能性のある 4 菌種について、ヒト単球系株化細胞内における増殖の有無を *in vitro* 感染系を用いて調べた。ところで、ミシシippアカミミガメは、現在では我が国の河川や湖沼に定着し生息している。そこで今年度は新たに国内で生産されたミシシippアカミミガメを入手し、そ

これらの抗酸菌保有状況についても調べることにした。

B. 研究方法

ミシシippアカミミガメ：今年度は国内産のカメについて昨年と同じ方法で菌の分離を試みた。搬入先は岡山県、徳島県、大阪府などの7業者から合計45個体を搬入した。カメは麻布大学病理学教室にて解剖し、皮膚、肝臓および肺を検体として冷蔵で宮崎大学微生物学教室に搬送、直ちに菌分離を行った。

検体からの菌分離：滅菌 DW100 ml に対してクロラムフェニコールを 0.1 ml (50 μ g/ml)、アンピシリンを 50 μ l (100 μ g/ml) 加え、これを検体処理液とした。滅菌 1.5 ml マイクロチューブ内に細切した検体と 300 μ l の検体処理液を加え、滅菌したマイクロチューブホモジナイザーで破碎、等量の 2%NaOH を加えた後、混合液を 1%小川培地 (日水製薬株式会社) に 100 μ l 接種し、30°C で 2~8 週間培養した。発育したコロニーを抗酸染色し、抗酸菌と確認されたものについて純培養を行い菌株とした。

PCR：16S rRNA 遺伝子のプライマーは岩切らの報告 (岩切, 2001) に基づき作成した。熱ショックタンパク質 (Heat Shock Protein) のうち *hsp65* 遺伝子断片を制限酵素切断すると多様なバンドパターンがみられるが、このパターンにより 32 菌種の MOTT が鑑別できる (Telenti, A *et al.* J. clin. Microbiol. 1993)。

遺伝子断片の増幅：PCR による *hsp65* 遺伝子増幅反応は、94°C 5 分、60°C 1 分、[94°C 1 分、62°C 1 分、72°C 1 分] [] 内を 30 cycle、72°C 10 分、4°C ∞ の条件で行った。

RFLP：増幅遺伝子産物は PCR 産物を制限酵素 (*Bst*E II、*Hae*III) で処理し、5%アガロース for 50~800 bp fragment (ナカライテスク株式会社、京都) に処理サンプルをウェルに 5 μ l ずつ添加し、泳動装置 (Mupid、株式会社アドバンス、東京)

にて 100 V で 60~80 分間泳動を行った。マーカーには 100 bpDNA Ladder (Promega MADISON, WI, U.S.A.) および 25 bp DNA Step Ladder (Promega MADISON, WI, U.S.A.) の二種類を用いた。泳動終了後、UV 照射下で写真撮影 (プリントグラフ、アトー株式会社) を行いバンドパターンを解析した。

DNA 解析：*hsp65* 遺伝子の PCR 産物は QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN) を使用して分離精製を行った。精製した DNA を市販のキット (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)) を用いて PCR を行い、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) による塩基配列解析を行った。データ解析には、Sequence scanner v.1.0 (アプライド バイオシステムズ ジャパン株式会社、東京)、Genetyx-win version5 (ソフトウェア開発株式会社、東京)、Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) を使用した。相同性 97%以上を基準とし、97%より低い、あるいは 97%より高い菌種が 2 種類以上存在する場合はクラスター解析を行い、近縁種とした。

ヒト単球系株化細胞による菌の貪食および細胞内増殖の評価：ヒト単球系株化細胞 THP-1 を菌の貪食および細胞内増殖の評価を行うために用いた。細胞は、ウシ胎児血清 (FBS) 10%、10mM HEPES、1mM sodium pyruvate、4.5 g/l bicarbonate、アンピシリン (100 μ l/ml) およびカナマイシン (100 μ l/ml) を添加した RPMI1640 培地 (日水製薬株式会社、東京) で培養した。感染実験に用いるため、プラスチックフラスコ内で増殖培養した THP-1 をよくピペティングし、24 穴プレートに 1 ウェルあたり 1ml (5 \times 10⁵ 個/ml) ずつ細胞をまいた後、200nM の Phorbol 12-myristate 13 Acetate (PMA) (BIOMOL, USA) 存在下で 3 日間培養した。細胞の状態を倒立顕微鏡で確認後、培養液を除去し、m.o.i 10 で 3 種類

の菌株 (*M. chelonae*, *M. abscessus* 近縁菌、*M. terrae*, *M. fortuitum*) を感染させた。2~3 時間後に菌液を除去して抗生物質無添加の PBS (-) で細胞を 4 回洗った。洗浄後一部のウェルには滅菌 TritonX (0.05%) を 1ml 加え、細胞内生菌数を還元培養法により測定した。残りのウェルには培養液 (*M. terrae* のみ 100 μ l/ml アンピシリンを添加、他は抗生物質無添加の培養液とした) を 1ml ずつ加えて CO₂ インキュベーターで培養を続けた。これら感染細胞は感染 2、4、6 日目に細胞内の生菌数を定量的に調べた。

C. 結果

C-1. 外国から輸入したカメより分離された抗酸菌

結果を表 1 に示す。216 株すべての同定を行った。うち *hsp65* の PCR で菌種の同定ができなかった 58 株については、16S r RNA のシーケンス解

表 1. 輸入カメから分離された MOTT

菌種名	株数
<i>M. terrae</i>	86
<i>M. arupense</i>	49
<i>M. fortuitum</i>	26
<i>M. nonchromogenicum</i>	22
<i>M. septicum</i>	4
<i>M. senegalense</i>	2
<i>M. szulgai</i>	1
<i>M. chelonae</i>	1
<i>M. intracellulare</i>	1
<i>M. septicum</i> 近縁種	7
<i>M. fortuitum</i> 近縁種	5
<i>M. peregrinum</i> 近縁種	5
<i>M. hiberniae</i> 近縁種	5
<i>M. aichiense</i> 近縁種	1
<i>M. abscessus</i> 近縁種	1
計	216

析による同定を行った。その結果、*M. terrae* が 86 株と最も多く、次いで *M. arupense* が 49 株、*M. fortuitum* が 26 株と続きその他 12 の抗酸菌種が 55 株あった。

C-2. 国内産カメからの抗酸菌の分離

93.3%にあたる 43 匹のミドリガメの皮膚、肝臓、肺から計 267 株が分離された。このうち皮膚から分離されたものが最も多く 235 株、肝臓からは 20 株(8 匹/45 匹)、肺からは 12 株(7 匹/45 匹)が分離された。現在これらの株について *hsp65* の RFLP と 16S r RNA のシーケンスにより種の同定を行っている。

C-3. ヒト単球系株化細胞による菌の貪食および細胞内増殖

結果を図 1 に示す。*M. fortuitum* 以外の 3 菌種 (*M. abscessus* 近縁種、*M. chelonae*, *M. terrae*) はいずれも THP-1 細胞内でよく増殖した。最も増殖が著しかったのは *M. abscessus* 近縁種であった。*M. fortuitum* は感染 3 日目までは感染時とほぼ同レベルの菌数を保持したが、その後徐々に減少した。

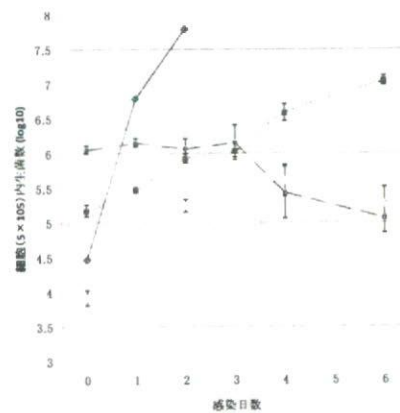


図 1. カメ由来 MOTT のヒト単球株化細胞内における増殖。 *M. abscessus* 近縁種 (◆), *M. chelonae* (■), *M. terrae* (●), *M. fortuitum* (▲) を 200 nM の PMA 存在下で 3 日間培養した THP-1 細胞に c.m.o. 10 の割合で感染させ、所定の日時に細胞内生菌数を還元培養法により求めた。それぞれのポイントは 3 サンプルの平均 ± 標準偏差を示す。

D. 考察

外国から搬入したペット用カメの76%、国内産の95%からMOTTが分離され、愛玩用として販売されているカメの多くがMOTTを保有していることが明らかとなった。これらカメ由来MOTTを同定するためにTelentiらの報告した*hsp65*遺伝子の制限酵素切断パターンによる菌種同定法を応用したが、58株(26.9%)が菌種レベルでの同定ができなかった。16SrRNA塩基配列を調べた結果、最終的には大部分の株が同定できたものの、24株は近縁種レベルにとどまった。これらの中にはもしかするとカメ固有の抗酸菌種が存在するかもしれない。またヒト単球株化細胞を用いた*in vitro*幹線系において、カメからの分離頻度の高い*M.terrae*が増殖すること、分離頻度は低いものの著しい増殖率を示す*M. chelonae*、*M.abscessus*近縁菌が存在することは、ヒトに起病性を有するMOTTがカメに常在している可能性を強く示唆している。*hsp65*遺伝子の制限酵素切断パターンでは同定できなかった株の大部分は16SrRNA解析により*M. arupense*であることが分かった。同菌種は2005年に登録された新種であり、わが国でもヒト患者から分離されたとの報告がある。今回カメから本菌が大量に分離されたことは、環境中にこの菌が存在することを示すものであり、注目すべきことであると思われる。

本調査材料の一部は神奈川県衛生研究所において*Salmonella*菌の保有状況調査に用いられた。幼体の74.2%、成体の9.7%から菌が分離され、Montevideo, Litchfield, Poona, Newport, Typhimuriumなどの血清型が検出された。(黒木ら、第7回人と動物の共通感染症研究会、2007)。カメが保有する*Salmonella*菌についてはすでに公衆衛生の面から注目され、多くの検査が実施されると同時に注意が払われている。今回の調査から明らかのようにカメ(特に幼カメ)は*Salmonella*菌のキャリアであると同時にMOTTのキャリアかactive shedderである可能性が示唆

される。これらのMOTTは、日和見感染症の原因となるほか健康なヒトに感染し病気を起こす可能性があり、カメと接触後は衛生面に気をつける必要がある。

E. 謝辞

本研究に多大なご協力をいただいた麻布大学獣医病理学教室の宇根有美助教授、宮崎大学家畜微生物学講座の芳賀猛助教授、同講座獣医学科の岩瀬祥子さん、小玉慎二君、倉田麻由子さんに感謝いたします。

F. 健康危険情報

同定された抗酸菌のうち*M.fortuitum*、*M.chelonae*、*M.terrae*、*M.szulgai*は文献上ヒトに対する起病性があるとされる。また*M.arupense*は新種であるが、わが国でも非結核性抗酸菌症の患者からの分離例の報告がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamamoto T, Lasco T M, Uchida K, Goto Y, Jeevan A, McFarland C, Ly L, Yamamoto S, McMurray DN (2007). Mycobacterium bovis BCG vaccination modulates TNF- α production after pulmonary challenge with virulent *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pigs. *Tuberculosis*, 87:155-165

Haga T, Murayama N, Shimizu Y, Saito A, Sakamoto T, Morita T, Komase K, Nakayama T, Uchida K, Katayama T, Sinohara A, Koshimoto C, Sato H, Miyata H, Katahira K, Goto Y (2007). Analysis of antibody response by temperature-sensitive measles vaccine strain in the cotton rat model. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, in press

Shimizu Y, Inaba K, Kaneyasu K, Ibuki K, Himeno A, Okoba M, Goto Y, Hayami M, Miura T, Haga T (2007). A genetically engineered live-attenuated simian-human immunodeficiency virus that co-expresses the RANTES gene improves the magnitude of cellular immunity in rhesus macaques. *Virology*, 361:68-79

Kawano K, Okada M, Haga T, Maeda K, **Goto Y**(2007). Relationship between pathogenicity for humans and *stx* genotype in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*, in press

2. 学会発表

Goto y., Iwase S., Une Y, and Haga T. Prevalence of

Mycobacterium spp. in the turtles imported to Japan. US-Japan Cooperative Medical Science Program Forty-second Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zhengzhou, Henan, China Sept, 2007.

後藤義孝、岩瀬祥子、芳賀猛、宇根有美 輸入愛玩用カメから分離される抗酸菌。第7回人と動物の共通感染症研究会学術集会 東京 11月 2007年

北京型結核菌の集団構造解析から推察される系統発生別薬剤耐性化傾向の違い

分担研究者 氏名 岩本 朋忠 神戸市環境保健研究所

研究要旨

北京型結核菌のグループ内進化にともなう薬剤耐性獲得能力の変化について調べた。感受性株での各遺伝系統別出現頻度をバックグラウンドとして比較した場合、多剤耐性菌(MDR)株群・超多剤耐性菌(XDR)株群では祖先型に属する遺伝系統のST2と古来型に属する遺伝系統のST4で出現比率が有意に高い値を示した。一方、感受性株群で最も出現頻度の高かったST6(古来型遺伝系統)はMDR・XDR菌株群で有意に低い値となった。北京型結核菌の集団構造解析から、多剤耐性化しやすい、あるいは、薬剤耐性化後の宿主への定着に有利な遺伝系統の存在が示唆された。

A. 研究目的

北京型結核菌はわが国を含む東アジア地域において高い蔓延状態にあり、その高病原性が懸念されている。遺伝的に保存性の高い系統と考えられてきた北京型結核菌は、遺伝子型別解析手法の進歩により、複数の系統に分岐していることが示された。また、その系統の違いによる表現型や宿主への適応性の違いについての知見が蓄積されつつある。本研究では、北京型結核菌のグループ内進化にともなう薬剤耐性獲得能力の変化について調べることを目的とする。

B. 研究方法

1) 北京型結核菌の系統発生別分類

全薬剤感受性 188 株、多剤耐性 (MDR) 株 97 株 (内 47 株は超多剤耐性 (XDR) 株) を、10 領域の同義的 SNP に基づき系統発生別に分類した。各 SNP のゲノム上のポジションは 797736, 909166, 1477596, 1548149, 1692069, 1892017, 2376135, 2532616, 2825581, 4137829 であり、その変異検出には、**amplification refractory mutation system (ARMS)** 法を用いた。さらに、各系統の分岐を示す遺伝特徴として、NTF 領域への *IS6110* の挿入の有無ならびに、**large sequence polymorphisms (LSR)**

3 領域 (RD 181, RD150, RD142) の検出を行った。

2) 遺伝子型の多様性解析

遺伝子型別解析には、分子疫学的手法としてその有用性が認められている縦列反復配列多型 (**Variable numbers of tandem repeats, VNTR**) 法を用いた。解析対象領域には、国際標準として提唱されている 15 領域を選択した。

3) DNA 修復遺伝子と *katG* 遺伝子変異の検出

結核菌の DNA 修復関連遺伝子と考えられている *mutT2*, *mutT4*, *ogt* 上のコドン 58, 48, 37 における点変異を ARMS 法により検出した。イソニアジド耐性に関与する *katG* コドン 315 でのセリンからスレオニンへのアミノ酸置換を対象領域の塩基配列解析により検出した。

C. 研究結果

1) 遺伝系統別出現比率の比較

供試株 285 株 (感受性株 188 株、MDR 株 97 株) は、10 領域の SNPs 解析により、8 つの系統に分類された。これらの系統を、分岐の古い順に **sequence type (ST) 1-8** としてその出現頻度を調べたところ、感受性株群と MDR 株群、あるいは XDR 株群との間でその分類構成は大きく異なった。感受性株群で

は、ST6 が最も高い頻度で出現し全体の 33.5% を占めたのに対して、MDR 株群、XDR 株群での ST6 の出現頻度は、それぞれ 14.4 %、6.4% と有意に低い値を示した ($P < 0.01$)。一方、MDR 株群、XDR 株群では、ST2 がそれぞれ 22.7%、36.2%、ST4 が 35.1%、42.6% と高頻度で出現し、感受性株群での 4.8%、23.4% と比べてその出現頻度は有意に高い値を示した。

感受性株群と薬剤耐性株群の間で認められた ST 構成の違いが、偶発的に起こった単一クローンによる集団感染事件の影響ではないことを確認するために、VNTR 法による遺伝子型別解析を行った。VNTR 遺伝子型の数に基づく ST 構成の違いを比較したところ、全菌株を対象にした解析結果と同様の違いが認められた。また各遺伝系統別のクラスター形成率ならびに平均クラスターサイズの結果からも ST 構成比率に大きく影響するような偶発的な集団感染事件の存在は認められず、本供試菌株母集団では感染連鎖のバイアスによる影響は無視できることが示された。

2) LSP と NTF 領域の解析による ST 分岐の補足推定

10 SNPs により分類された 8 ST は、LSR ならびに NTF の解析による発生分岐の推定から、祖先型 (ST1,2)、古来型 (ST3-6) と新興出現型 (ST7,8) に分類できることが示された。

3) DNA 変異修復遺伝子、*katG* 遺伝子の変異の ST 構成に及ぼす影響

Rad らは北京型株において DNA 変異修復遺伝子の変異を見出しており、これらの遺伝子変異が北京型株の薬剤耐性化や環境変化に対する適応力に有利に働いているという仮説を提唱した。そこで今回、Rad らにより報告された DNA 変異修復遺伝子である *mufI2*, *mufI4*, *ogt* についてその変異と多剤耐性化との関連を系統発生別に検討した。DNA 変異修復遺伝子の変異は、ST5 以降の系統においてのみ認められた。すなわち、ST5,6 では、*mufI4* と *ogt* に

変異が、ST7,8 では *mufI2* と *mufI4* に変異が見られた。MDR 株群、XDR 株群で高頻度で出現した ST2, ST4 は感受性株群を含む全ての菌株で *mufI2*, *mufI4*, *ogt* の変異は認められなかった。Rad らの提唱した DNA 変異修復遺伝子の変異の蓄積は、系統分岐の順序をうまく説明できるものではあるが、薬剤耐性化に関して有利に働くものとは言えない結果となった。

KatG コドン 315 で起こるセリンからスレオニンへの変異は、カタラーゼ・ペルオキシダーゼ活性を低下することなく高度 INH 耐性を獲得し、その機序は INH とのアフィニティーの低下により説明されている。カタラーゼ活性を保持していることから、その宿主内での生残性、感染性は感受性株と同程度と考えられており、他の INH 耐性株と比べて、宿主へのフィットネスが向上し、その結果としてより複数の薬剤に対する耐性化 (多剤耐性化) に向かいやすい傾向のあることが知られている。遺伝系統別に *katGS315T* 変異の検出を行ったところ、ST2 と ST4 においてその存在比率が高いことがわかった (MDR 群 : ST2 (68.2%)、ST4 (50.0%)、XDR 群 : ST2 (82.4%)、ST4 (60.0%))。一方、ST6 では MDR 群で 23.1%、XDR 群で 33.3% と ST2、ST4 に比べて低い値となった。

D. 考察

北京型結核菌の集団構造を感受性株群、多剤耐性株群 (MDR 株群、XDR 株群) で比較したところ、系統別出現頻度において大きな違いが見出された。感受性株での各遺伝系統別出現頻度をバックグラウンドとして比較した場合、多剤耐性株群では ST2 と ST4 での出現比率が有意に高い値を示した。一方、感受性株群で最も出現頻度の高かった ST6 は多剤耐性株群で有意に低い値となった。また、この違いは、クラスター形成によるバイアスを最小限にした遺伝子型に基づく解析においても同様に認められた。このような集団構造の違いは、北京型結核菌の遺伝系統間での薬剤耐性獲得能力の違いを反映している

ものと考えられ、これまでに報告のない興味深い結果と言える。

katG コドン 315 の変異に関するこれまでの報告から、*katG* S315T 変異株が宿主へのフィットネスに関して他の INH 耐性菌に比べて有利に働き、感染性を維持していることから最終的に多剤耐性化へと効率的に向かう変異であることが示唆されている。我々の結果からも、*katG*S315T 変異の割合は ST2, ST4 で高く、ST6 で低い値を示しており、MDR・XDR 株群での出現頻度の違いを反映したものとなっている。言い換えるならば、ST2、ST4 は *katG* S315T 変異を獲得しやすく、このことが、MDR・XDR 結核群での出現頻度の高さの要因になっているのかもしれない。また、結核菌の薬剤耐性獲得機序はゲノムDNA上の点変異で説明できることから、MDR・XDR 結核菌は高度に遺伝子変異が蓄積した菌株であるといえる。つまり、ST2、ST4 の遺伝系統は他の系統に比べて自然突然変異率が高く、そのために *katG* S315T 変異の高率な出現さらに MDR・XDR 結核群での高頻度の出現という結果を引き起こしているのではないかと推察される。あるいは、薬剤耐性化による宿主へのフィットネス・コストが他の系統に比べて低いためとも考えられる。我々は、Rad らの見出した DNA 変異修復遺伝子の変異を解析したが、その変異と多剤耐性化との相関は認められなかった。今後、新たな変異修復遺伝子を特定するとともに、その遺伝系統間での変異の検討を行う予定である。

本研究により、北京型結核菌はそのグループ内進化に伴い、薬剤耐性獲得能力に違いが生じている可能性が示唆された。なかでも、RD181 を保有する祖先型に属する ST2 と NTF 領域への IS6110 の挿入を認めない古来型に分類できる ST4 が他の系統に比べて多剤耐性化しやすい系統であるものと考えられた。このような系統での薬剤耐性株は遺伝子変異を蓄積しやすく、かつ、宿主への適応力に優れている可能性があり、その制圧がより困難な結核菌であ

るといえるかもしれない。

E. 結論

北京型結核菌の集団構造解析から、多剤耐性化しやすい遺伝系統の存在が示唆された。その要因の一つとして *katG*S315T 変異が考えられた。薬剤耐性化との関連が疑われていた DNA 変異修復遺伝子の変異については、今回の研究結果からその関連性は否定された。

F. 研究発表

1. 学会発表

1) 岩本朋忠：

結核菌北京株の識別能を高める超可変縦列反復領域の特定。第 80 回日本細菌学会総会（大阪）。2007 年 3 月。

2) 岩本朋忠、園部俊明、和田崇之、吉田志緒美、鈴木克洋、藤山理世、田中賀子、河上靖登、白井千香：

新提案 VNTR set を用いた Minimum Spanning Tree とスポリゴタイピングによる結核菌伝播についての考察。第 82 回日本結核病学会総会（大阪）。2007 年 4 月。

3) 岩本朋忠、園部俊明、吉田志緒美、鈴木克洋、藤山理世、田中賀子、河上靖登、白井千香：

新たに提案された国際標準 15-loci と 24-loci VNTR 法の結核菌タイピング能力の評価と超可変 loci 適用の有効性の検証。第 82 回日本結核病学会総会（大阪）。2007 年 4 月。

2. 論文発表

1) Iwamoto, I., Yoshida, S., Suzuki, K., Tomita, M., Fujiyama, R., Tanaka, N., Kawakami, Y., and Ito, M. Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family.

FEMS Microbiol Lett 270:67-74, 2007.

ハンセン病流行地の生活用水中におけるらい菌の定量、定性とその感染源としての意義

分担研究者 松岡 正典 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 室長

研究要旨

ハンセン病の感染様式を解明し、感染防止策を構築するために、その感染源について検討した。ハンセン病の高有病率を示す地域において住民が使用する生活用水中のらい菌について、Real Time-PCRにより定量し、Reverse Transcription-PCRによってそれらの菌の生死を判定した。Real Time-PCRを行なった145検体中98検体に1~3,620菌体/20mlの菌体が存在することが示された、Reverse Transcription-PCRによって14/33検体がRNAの存在を示し、これらの水には生きたらい菌が存在し、感染源となっている可能性が示された。

A. 研究目的

目下のハンセン病対策は患者の早期発見と多剤併用療法を基本として行なわれているが、従来の説で感染源とされる多菌形患者の治療が効果的に行なわれているにもかかわらず、依然として多くの新規感染者が見出されるなど、その感染様式については完全に解明されていない。その抜本的感染防止策の構築のために、感染様式なにかんずく感染源の解明を目的としてハンセン病の高有病率を示す地域において検討を行ってきた結果、日頃住民が使用している生活用水から、らい菌特異的PCR陽性となる結果が得られ、そこが感染源となっていることが強く示唆された。本研究においては生活用水について、らい菌の定量及び生菌の存在の有無について検討し、その感染源としての意義について考察した。

B. 研究方法

インドネシア北スラウェシ州のハンセン病の高有病率を示す島において井戸水を得た。対象集落は戸数450戸、人口2,020名、2003年2004年の新患がそれぞれ10名、7名が記録されている。初年度は145検体を個々の井戸から採取した。20mlの検体を1mlに濃縮し、塗抹検体を作成し、Ziehl-Neelsen染色の後に鏡検を行った。さらに遠心を行い、その沈渣を100ulのLysis bufferに浮遊し、DNAを調整した。RLEP配列、16SrDNAの一部を増幅するPCRにより、検体中のらい菌遺伝子の有無を判定した。同一材料の5ulを用いてRLEP配列の共通配列を標的としたReal-Time PCRを行って一定量中のらい菌を定量した。

初年度、多数のらい菌の存在が示された井戸から33検体を採取した。また東ジャワ州から得た16試料を加えた。20mlの検体の沈渣からRNeasy Minikit,

(QIAGEN, CA) を用いて RNA を調整した。Random hexamers を用いて Reverse Transcription PCR (RT-PCR) により cDNA (SuperScript First-Strand Synthesis System, Invitrogen, CA) を作成し、らい菌特異的 16SrRNA を標的とした PCR を行って rRNA の有無を検討した。ヌードマウス footpad 内増殖らい菌を rifampicin 加 PBS により不活化処理し、RT-PCR negative になることを確認した。

C. 研究結果

145 検体のうち、40 検体に抗酸菌が観察された。また、106 検体が RLEP 配列、16S rDNA の一部を増幅する PCR において陽性を示した。RT-PCR では 101 検体が陽性となり、それらは 1 菌体/20ml から 3,620 菌体/20ml のらい菌が生活用水に存在する結果を示した。

菌液を作成した直後の無処置らい菌は $4.5 \times 10^2 / 2.5 \mu\text{l} / 25 \mu\text{l}$ PCR 反応まで RT-PCR 陽性となり、また 30°C に 1 週間保存した菌も同様に陽性を示した。一方、Rifampicin 処理した菌は完全に不活化され、 $4.5 \times 10^6 / 2.5 \mu\text{l} / 25 \mu\text{l}$ の検体まで RT-PCR 陰性であった。生きた菌が RT-PCR により陽性を示すことが示され、一方不活化された菌は RNA の消失により陰性となることが示された。33 検体中 14 検体が RT-PCR 陽性となり、それらの水には rRNA が存在し、らい菌が生存していることが示された。RT-PCR 陽性を示した井戸水の水温は $27.9 \pm 0.6^\circ\text{C}$ であり、らい菌の至適発育温度に近かった。

考察

ハンセン病は居住を一にする多菌型患

者を感染源とし、濃厚接触によって感染が成立すると説明されてきた。しかしながらこの概念では説明できないいくつかの事実が報告されている。即ち、流行地域では多くの一般住民がらい菌に対する抗体を有し、その陽性率は家族内接触者との間に差が無いこと、またらい菌の遺伝子型別によって同一住居内の患者間でその異同を比較した結果、同一家族内に複数の患者が存在する場合、患者間で異なる遺伝子型のらい菌を保有すること、ハンセン病患者との接触歴が全く無いにもかかわらず、発症する例があること、chemoprophiraxis によっても一定地域のハンセン病発生の低下が見られないことが知られている。

これまで、ハンセン病の感染源について、従来言われてきた説とは異なり、感染者以外であることを想定し、他の多くの抗酸菌症において水からの感染の事実が知られていることから、環境中とりわけ日頃ハンセン病流行地の住民が使用する生活用水におけるらい菌の検出を行なった。いくつかの井戸水がらい菌特異的 PCR 陽性となり、らい菌遺伝子が存在する水を水浴、洗濯に使用している住民の感染危険率はらい菌遺伝子陰性の水を使用する人に比し、3 倍の危険率を示したことを報告してきた。しかしながら、それらは傍証にとどまり、そこにどの程度のらい菌が存在し、またそれらが感染力を有する生きたらい菌であるのかについて明らかにすることが必要であった。本実験において、Real Time-PCR を用いてらい菌の定量を行い、また RT-PCR により RNA の検出を行ってその有無をらい菌の生死の指標として生きたらい菌の存在

について検討を行った。生活用水として利用する多くの井戸水にらい菌が存在し、またそれらが生存していることが明らかとなった。RT-PCR 陽性となった井戸水の水温がらい菌の至適発育温度とされる30°Cに極めて近い値であり、興味ある結果であった。体外に排出されたらい菌が2ヶ月はマウス footpad での増殖力を保持していたことが報告されている。本実験でも30°Cに保存した菌が Buddemeyer 法により、37°Cに保存したものより高い活性を示したことから、らい菌が井戸水中で生存していることが示唆された。

今後、感染源と目される生活用水から得られるらい菌の遺伝子型とそれを利用する患者から得られるらい菌の遺伝子型との比較を行なう必要があると考える。また、どの程度の菌量が感染を起こすために必要なのか、らい菌が自然環境中でどのような生存、増殖機構を有するのかについての解析が必要と考える。

E. 結論

ハンセン病の流行地域の生活用水中にはらい菌が存在し、そこから感染が成立していることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Lopez-Roa R. I., Fafutis-Morris M., and Matsuoka M. Dapsone resistant *Mycobacterium leprae* detected by DNA sequence analysis from a relapsed Mexican leprosy patient. Revista

Latinoamericana de Microbiología. Vol.48
256-259 2006

Matsuoka M., Budiawan T., Khin S A., Kyaw K., Tan VE., dela Cruz EC., Robert Gelber R., Paul Saunderson P., Balagon E, and Pannikar V. The frequency of drug resistance mutations in *Mycobacterium leprae* isolates in untreated and relapsed leprosy patients from Myanmar, Indonesia and the Philippines. Lepr. Rev. Vol 78 343-352
2007

2. 学会発表

Tan, VE., Balagon, E., de la Peña and Matsuoka M. A simple method of detecting drug resistant mutant in *Mycobacterium leprae* by DNA hybridization. The Symposium on Remaining Challenges in Leprosy, Kathmando, Nepal. September, 2007

Matsuoka M., Lopez Roa R.I., Budiawan T., Kyaw K. and Chae G.T. Genotypic Analysis of *Mycobacterium leprae* isolates from Japan and other Asian countries reveals a global transmission pattern of leprosy. 42th US-Japan conference on Tuberculosis and Leprosy. Zhenzhou, China, September, 2007

Mukai T., Izumi S., Rosita C., Agusni I., Miyamoto Y., Matsoka M., Makino M. Detection of *M.leprae* DNA in nasal swab samples by LAMP methods. 42th US-Japan conference on Tuberculosis and Leprosy.

Zhenzhou, China, September, 2007

Matsuoka M., Khin SA., Kyaw K., Tan EV., Balagon MV., Saunderson P., Makino M., Nakajima C. and Suzuki Y. A simple methods for detecting drug resistant *Mycobacterium leprae* based on DNA microarray. 18th International Leprosy Congress. Hyderabad, India, February 2007

Matsuoka M. Molecular biological techniques for detecting drug resistance. Symposium on Chemotherapy and drug resistance. 18th International Leprosy Congress. Hyderabad, India, February 2007

Estrada IC., Matsuoka M., Fasutis-Morris M., Estrada-Para-S. and Estrada I. Genetic analysis of Mexican *Mycobacterium leprae* strains. 18th International Leprosy Congress. Hyderabad, India, February 2007

Izumi S., Indropo A., Rosita C., Budiawan T. and Matsuoka M. Molecure epidemiological analysis of *M.leprae* transmission of leprosy. 18th International Leprosy Congress. Hyderabad, India, February 2007

松岡正典、鈴木定彦、Esterina Tan, Khin Saw Aye : 薬剤耐性らい菌の簡易検出法の開発地上国への移転とそれによる耐性菌の伝播調

査。第 80 回日本ハンセン病学会総会、横浜市、2007 年 5 月

儀同政一 松岡正典、: Moxifloxacin と Garenoxacin の抗らい菌活性。第 80 回日本ハンセン病学会総会、横浜市、2007 年 5 月

向井徹、和泉眞蔵、宮元友司、Cita Rosita, Indropo Agusuni、松岡正典、牧野正彦 : LAMP 法によるらい菌遺伝子検出の応用。第 80 回日本ハンセン病学会総会、横浜市、2007 年 5 月

和泉眞蔵、Indropo Agusuni、Cita Rosita、松岡正典、向井徹 : ハンセン病濃厚流行地健康住民血中からのらい菌の検出。第 80 回日本ハンセン病学会総会、横浜市、2007 年 5 月

Sitti Nur Rahmah、佐藤直哉、藤村響男、与儀ヤス子、松岡正典、増澤幹男、藤岡憲生 : 各種培養ヒト気道上皮細胞に対するらい菌 mce1A 領域と結核菌 mce1A 領域との侵入活性の異同。第 80 回日本ハンセン病学会総会、横浜市、2007 年 5 月

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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

分担研究者 福富康夫

国立感染症研究所ハンセン病研究センター病原微生物部第二室長

研究要旨

ハンセン病における抗らい菌薬であるクロファジミン(B663 ともいう)にはマクロファージに対する細胞死誘導活性が存在した。健常人末梢血単球由来マクロファージやヒトマクロファージ細胞株 THP-1 をクロファジミン存在下にて培養したところ、顕微鏡下で 6 時間後には細胞死が観察された。その過程で細胞質の縮小化や核の縮小化・断片化が認められた。また、ミトコンドリア代謝酵素活性測定による生細胞定量法においても細胞死が確認された。annexinV 染色陽性細胞が現れ、ヌクレオソーム単位の大きさでの DNA 断片化が観察されたことから、この細胞死はアポトーシスであることが判明し、アポトーシスに特徴的な caspase の活性化もみられた。

A. 研究目的

ハンセン病はらい菌に対する様々な免疫反応を呈する慢性感染症であり、宿主の免疫状態により、マクロファージやシュワン細胞内でらい菌が増殖する症例と、反対に殺菌される症例がみられる(それぞれ LL 型と TT 型)。また、マクロファージやリンパ球が菌体成分や抗原に対し過剰な免疫反応(らい反応)を起こすと神経障害をきたしてハンセン病に特徴的な身体障害を生んでしまう。ハンセン病治療に用いられる幾つかの化学療法剤のうち、クロファジミンにはらい菌に対する抗菌作用に加え患者のらい反応などを抑制するといった抗炎症作用も報告されている。マクロファージは炎症性サイトカイン産生細胞としてらい反応に大きく関わっていると思われるが、クロファジミンの抗炎症作用との関係については不明な点が多くそれを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

試薬:クロファジミンは Sigma 社製を用いた。DMSO にて溶解し使用直前まで-20 度に保存した。

ヒトマクロファージの培養:健常人末梢血より二段階の比重勾配遠心法により単球を得て 48 穴プレート(3×10^4 細胞/ウェル)、もしくはカバースリップの入った 24 穴プレートウェル中(1×10^5 /ウェル)にまき培養した。Hanks 液にてウェル内を洗浄し非付着細胞を除いて 20%FBS 添加 RPMI1640 培地にて 1 週間以上培養しモノサイトからマクロファージに分化させてから用いた。また、ヌンク製の 8 ウェルタイプ細胞培養ガラスチェンバーに単核球をまき、同様な方法でマクロファージを得た。さらに、ヒト THP-1 細胞株も用いた。

細胞死の検出:代謝酵素活性測定法(Promega 社製 Cell titier 96 Aqueous Non-radioactive Cell Proliferation Assay)を用

いた。48 穴、もしくは 24 穴プレート内カバー
リップ上で培養しているマクロファージ、もしくは
THP-1 細胞をクロファジミン存在下でフェノ
ールレッド不含 10%FBS 含有 RPMI1640 培地で
一晚培養した後、基質液を添加し、数時間後
の発色をプレートリーダーにて測定した。また、
死細胞からの培地への LDH 放出測定
(Promega 社製)によっても細胞死を評価した。

形態観察:クロファジミンを添加して培養したマ
クロファージをメタノール固定してギムザ染色
を施し顕微鏡にて形態を観察した。また、グル
タルアルデヒド固定した細胞を
Hoechst33342 dye にて核染色し、蛍光顕微鏡
にて核の形態を観察した。

DNA 断片化の検出:クロファジミン存在下で培
養した THP-1 細胞やマクロファージから細胞
抽出液を得、さらに DNA 抽出キットを用いスピ
ンカラムにて DNA を精製した。そしてアガロ
スゲル電気泳動を行い断片化 DNA を検出し
た。

FACS 解析:クロファジミン存在下で培養したヒ
トマクロファージをラバーポリスマンを用いて剥
がして回収し、annexinV と PI にて二重染色し
FACS にて蛍光強度を測定した。

caspase 活性測定:BioVision 社製 Caspase
Colorimetric Assay Kit による呈色反応で調べ
た。反応は 384 穴プレート中で行い、発色量は
テカン社製プレートリーダーにて測定した。

ウエスタンブロット:クロファジミン存在下にて培
養したヒトマクロファージ、もしくは THP-1 細胞
を Sigma 社製 cell lytic M 溶液にて細胞を可溶
化して lysate を得た。SDS 電気泳動を行って l
ysate から分離したタンパクをさらに PVDF 膜に
転写して Cell Signal Technology 社製各種抗
体(抗 caspase 抗体、抗 PARP 抗体、抗 β -actin
抗体)を 4 度にて一晚反応させ、次に HRP 標

識二次抗体を反応させ化学発光による X 線フ
ィルムへの露出で各種タンパクを検出した。検
出後は PVDF 膜を stripping buffer (Pierce 社)
に浸して振とうさせて抗体を除去し再度抗体を
反応させて他のタンパク検出を行った。

C. 研究結果

健康人末梢血単核球からプラスチック附着
性の単球を精製して培養しマクロファージに分
化させた後、濃度 10 μ g/ml 以上のクロファジ
ミン存在下にて培養して倒立顕微鏡下で観察し
たところ、培養開始後数時間内に細胞が収縮
し始め、5 時間目以降ではアポトーシスに
特徴的な小体が出現し、24 時間後には約
80%で細胞が縮小化を伴った顕著な形態異
常を示した。生細胞判定のためのミトコン
ドリア活性を指標とした代謝試験(ホルマ
ザン発色)によってこれらの細胞は代謝活
性を失い死滅していることが確認された。
培養上清中の LDH 量も著明に増加するこ
とから細部死が起こっていることが再確認
された。マウス腹腔マクロファージについ
てもヒトマクロファージと同様な結果が得
られた。また、クロファジミンにて細胞死
を誘導したヒトマクロファージにギムザ染
色を施して顕微鏡下で観察したところ、培
養 6 時間目以降は著明な核の凝縮と細胞質
の縮小がみられ典型的なアポトーシスの形
態を示した。同様に蛍光色素 Hoechst33342
で核染色を施して蛍光顕微鏡で観察したと
ころ、核の縮小化・断片化はより明瞭に観
察された。ヒトマクロファージ細胞株の THP-1
細胞でもクロファジミンにより著明な細胞死が
観察され、FACS による解析からはクロファジ
ミン処理後数時間内に annexinV 染色陽性細胞
が現れた。annexinV 陽性細胞はクロファジミン

存在下で培養した単球由来マクロファージでも現れた。さらに 4-5 時間目に回収したマクロファージから DNA を抽出しアガロース電気泳動を行なったところ、ヌクレオソーム単位の大きさでの DNA 断片化が観察された(Fig.1)。ヒトマクロファージにおいても同様な断片化がみられた(Fig.1)。また、アポトーシス小体も同試薬で染色される傾向にあった。

クロファジミン存在下で 4 時間培養した単球由来マクロファージや THP-1 細胞から lysate を得て caspase の活性を調べたところ、caspase3 については対照細胞と比較して、マクロファージの場合は約 5 倍、THP-1 細胞の場合は約 10 倍の著明な活性増強がみられた。また、ウエスタンブロットにてクロファジミン処理した THP-1 細胞やヒトマクロファージの lysate 中のタンパクを調べたところ、活性化(断片化)した 17kDa と 19kDa の caspase3 のみでなく、断片化して活性化した 35kDa の caspase9 や DNA 修復酵素である PARP の不活性化(断片化)もみられた(Fig.2 and 3)。さらに、細胞がアポトーシスを起こすときに特徴的な BAX の発現もみられた(Fig.3)。

D. 考察

クロファジミンには抗菌活性の他、マクロファージのリゾチーム活性の増強や好中球のスーパーオキシド産生を増強するなど免疫細胞に対する薬理作用があると報告されている。フォスホオリパーゼ A2 の活性化や PGE2 産生増強も報告されている。しかし、らい反応を抑制する機構について直接的な証明はされていない。我々はこれまで、らい菌刺激マウスマクロファージにおいてクロファジミン処理により TNF α 産生が一過性(培養開始 4 時間目まで)に増強することを報告し、その原因が炎症因

子である PGE2 の産生抑制にあることを見出した。しかし、さらにマクロファージの培養を続けると、4 時間目以降細胞死が起こっていることが判明した。また、ヒト単球由来マクロファージやヒトマクロファージ細胞株 THP-1 においても同様の細胞死がみられた。FACS による解析からはアポトーシス誘導時に特徴的にみられる annexinV 染色陽性細胞が出現した。さらに細胞の縮小化や核の縮小化が観察され caspase の活性化や DNA 断片化もみられることから、クロファジミンにより誘導されるマクロファージや THP-1 の細胞死はアポトーシスであることが判明した。

クロファジミンの抗炎症作用についてはラットやモルモットを用いた動物実験において遅延型アレルギー反応を抑制するといった報告がある。また、ヒトにおいてもハンセン病のみならず一部の皮膚疾患では抗炎症剤として用いられている。これまでクロファジミンが宿主側の細胞に対してアポトーシスを誘導するとは理解されておらず、本報告の内容は新知見である。マクロファージは TNF など炎症性サイトカインやプロスタノイドなど炎症因子を産生する細胞であり、らい反応においても大きく関わっている細胞である。クロファジミンによりこの細胞が除去されることは同薬剤の抗炎症作用を考え合わせると興味深い現象である。

蛍光顕微鏡で赤色フィルタを用いてクロファジミン存在下で培養した細胞を観察すると、細胞内にクロファジミンの沈着と思われる赤色素が観察された。FACS 解析でも赤色蛍光のバックグラウンドが著明に上昇した。クロファジミンは疎水性分子で脂質親和性がある。生体でもクロファジミンを処方された患者中組織には沈着がみられる(組織移行性が強い)。クロファジミンが細胞内に移行した後のアポトーシ