

核菌はc f p 3 2 (+)、RD 9 (-)、RD 1 2 (-) となった。カネッティ菌はc f p 3 2 (+)、RD 9 (+)、RD 1 2 (+) であった(図2)。これらの結果は当初の予想と合致するものであった。

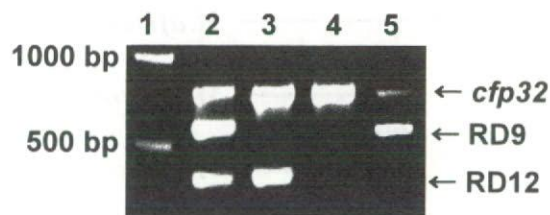


図2 マルチプレックスPCRによる結核菌群菌の詳細な型別

レーン1:分子量マーカー(100塩基ラダー)、レーン2-5:PCR産物。レーン2:結核菌、レーン3:アフリカ結核菌、レーン4:ウシ型結核菌、レーン5:カネッティ菌

バングラデシュにおけるヒトおよびウシ由来結核菌群菌のサーベイランス: 上記の様に本研究で開発したマルチプレックスPCRにより結核菌群菌の詳細な鑑別が可能となったため、これを用いてバングラデシュにおけるヒトおよびウシ由来結核菌群菌の鑑別を実施した所、ヒト由来の結核菌群菌が全て*M. tuberculosis*であることが判明した。一方、ウシより分離された2株の結核菌群菌は*M. bovis*ではなく*M. tuberculosis*であった。

D. 考察

本研究で得られた結果は、*M. tuberculosis*のヒト-ウシ間の伝播を示唆する非常に興味深いものである。

E. 結論

今後、ウシ由来菌の数を更に増やして分析する必要があるものと考えられた。

F. 健康危険情報

バングラデシュにおいては、ウシが結核菌に感染している可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

Rungrat Nintasen, Fuangfa Utrarachkij, Kanokrat Siripanichgon, Adisak Bhumiratana, Yasuhiko Suzuki, Orasa Suthienkul 2007 Enhancement of *Legionella pneumophila* Culture Isolation from Microenvironments by Macrophage Infectivity Potentiator (*mip*) Gene-Specific Nested Polymerase Chain Reaction. Microbiol. Immunol. 51:777-785.

Higuchi M, Matsuo A, Shingai M, Shida K, Ishii A, Funami K, Suzuki Y, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. 2008. Combinational recognition of bacterial lipoproteins and peptidoglycan by chicken Toll-like receptor 2 subfamily. Dev Comp Immunol. 32(2):147-55.

Ikuo Shiratori, Yasuhiko Suzuki, Hiroyuki Oshiumi, Nasim A. Begum, Takashi Ebihara, Misako Matsumoto, Kaoru Hazeki, Ken Kodama, Yasuo Kashiwazaki and Tsukasa Seya Recombinant interleukin-12 and interleukin-18 antitumor therapy in a guinea-pig hepatoma cell implant model. Cancer Sci. in press

Motomura, W., Yoshizaki, T., Ohtani, K., Okumura, T., Fukuda, M., Fukuzawa, J., Ogasawara, M., Jang, S-J., Nomura, N., Yoshida, Y., Suzuki, Y., Kohgo, Y., Wakamiya, N. Immunolocalization of novel collectin CL-K1 in murine tissues. J Histochem Cytochem in press

Basu Dev Pandey, Ajay Poudel, Tomoko Yoda, Aki Tamaru, Naozumi Oda, Yukari Fukushima, Binod Lekhak, Basista Risal, Bishnu Acharya, Bishwa Sapkota, Chie

Nakajima, Tooru Taniguchi, Benjawan Phetsuksiri and Yasuhiko Suzuki 2008 Development of an in-house loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and evaluation in sputum samples of Nepalese patients. J. Med. Microbiol. *in press*

Suzuki, Y., Ohtani, K., Wakamiya, N. 2007 The novel collectins, CL-L1, CL-P1 and CL-K1. in "An Emerging Topic in Immunology" Kilpatrick D. edd. Research Spotlight, Kerala, India.

鈴木定彦 2007 らい菌抗原とハンセン病の分子生物学 総説現代ハンセン病医学 (牧野正直他編、東海大学出版会) pp20-40

鈴木定彦、中島千絵 2008 臨床検査項辞典 分担執筆、1項目担当 (櫻林郁之介他編、医歯薬出版)

2. 学会発表
なし

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（社会保障国際協力推進研究事業）

分担研究報告書

結核の地域伝播に関する分子疫学的解析

分担研究者 長谷 篤 大阪市立環境科学研究所 研究副主幹

研究要旨

結核菌のゲノム上には反復配列 (STR, Short tandem repeat) を含む多型領域 (VNTR, Variable numbers of tandem repeat) が数十箇所存在している。我々はこれまで、これらの解析に基づいた臨床分離株の型別同定法の検討ならびに分子系統解析への導入を進めてきた。とりわけ、日本国内において高度に定着した系統群である北京型結核菌に着目し、大阪市・神戸市で分離された北京型結核菌 (355株) を用いてVNTR系統樹構築を試み、そのトポロジーについて遺伝学的客観性が高いことを確認した。この結果に基づいて、大阪市内ホームレス患者由来株のVNTR系統解析を行った。その結果、同患者群において特定のサブグループに属する株が蔓延に強く関連している可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々はこれまでの結核菌分子疫学解析の過程において、日本国内由来の北京型結核菌が他国由来株と集団レベルで大きく異なることを見出した (投稿中)。日本に特異的な集団構造は宿主 (=日本人) との関連性 (共進化) を仮定する上で重要な前提となり、その詳細な解析に明確な意義を与えるものである。そこで、国内患者由来の北京型結核菌株 (355 株) を国内由来株のモデル集団として捉え、VNTR 型別を解析し、分子系統樹の構築とその評価を行なった。また、同様の手法を用いて大阪市内ホームレス患者由来株を系統解析し、集団構造から推定される結核菌の伝播状況に関する推定を試みた。

B. 研究方法

2001-04年に大阪市・神戸市で分離された、患者由来北京型結核菌 (355 株) につい

て VNTR 解析 (15 箇所 : Supply's standard) を行なった。系統樹構築は Bionumerics software による MST (Minimum spanning tree) 計算法を適用した。得られたトポロジーの正当性・客観性について、他の遺伝型別 (SNP 解析、LSP 解析、IS 挿入解析など) による系統分岐との整合性を確認した。ホームレス患者由来株の解析は、2002-04年に分離された 277 株について VNTR 解析を行い、そのうち北京型結核菌と判定された 216 株 (78.0%) について系統解析を行った。

研究結果

(1) 集団モデル (355 株) における VNTR 系統解析とその評価

MST 計算法に基づいて VNTR 系統樹を構築したところ、そのトポロジーは 4 つの明瞭な枝に属するサブグループ (Branch

1-4) と、やや分散した不明瞭な領域 (RST2)、ならびに枝を形成しない中心部 (RST6) の 6 サブグループに分類可能であった。これらのサブグループ分類を他の遺伝型による系統分岐と比較するため、すべての株について SNP (10 領域) の同定を行なったところ、SNP による系統分岐群 (ST1-8) と極めて高い相関性が認められた (Table 1)。すなわち、VNTR 型別に基づいた MST 系統樹は、北京型結核菌の分子進化ならびに系統分岐を反映したトポロジーを構築しうることを意味している (投稿中)。

(2) ホームレス患者由来株の VNTR 系統解析

VNTR-MST 系統解析の結果、ホームレス患者由来の北京型結核菌においても同様に 6 サブグループに分類されることが確認された。その比率および各サブグループ内における VNTR クラスタリングをまとめた (Table 2)。その結果、Branch 4 に属する株が最も多く (78 株、36.1%)、さらにクラスター率 (75.3%)、クラスター数 (11 クラスター) において他のサブグループよりも高いことが明らかとなった。

考察

本研究結果は、日本国内における結核菌の VNTR 型別解析が系統分岐を反映する分子進化的マーカーとして機能しうることを示唆している。このような知見は、VNTR 各領域における変化が株間の遺伝学的距離 (近似性) を与える情報となることを意味しており、今後の結核菌の分子疫学的解析や病原菌としての進化・変化・適応を研

究する上で有用なデータとなる。ホームレス患者由来株における Branch 4 で観察された高いクラスター率から、同群における結核菌の伝搬性の高さが懸念される。海外では同群の株が高頻度で検出されることもあり、今後の集団構造の変遷を継続して解析していく必要があるだろう。

結論

日本国内由来北京型結核菌の VNTR 分子系統樹は、分離菌株の VNTR 解析から得られる情報が型別分類に留まらず、系統分岐をも示唆しうるものであることを明らかにした。このような知見は、ホームレス患者由来株での解析で行なったように、分子疫学的展開に波及するとともに、今後発展するであろう細菌学的 (遺伝学的) 多様性・近縁株解析における 1 つのアプローチとして期待される。

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表

Takayuki Wada, Shinji Maeda, Atsushi Hase, and Kazuo Kobayashi.

Evaluation of Variable Numbers of Tandem Repeat as Molecular Epidemiological Markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan.

Journal of Medical Microbiology, 56, 1052-1057 (2007)

和田崇之、前田伸司.

抗酸菌の分子疫学法.

呼吸器科 13(1), 92-98 (2008)

2. 主要な学会発表

和田崇之、長谷 篤、前田伸司、Shi Ruiru、菅原勇、松本壮吉、岩本朋忠。

日本国内の北京型結核菌に見られる遺伝的特異性。

第 82 回日本結核病学会総会、大阪市 (2007.6.4-6)

結核、第 82 巻、第 4 号、372 頁、2007 年

和田崇之、長谷 篤、平山幸雄、前田伸司
大阪市内の行旅患者から分離された結核菌の遺伝型別解析。

第 82 回日本結核病学会総会、大阪市 (2007.6.4-6)

結核、第 82 巻、第 4 号、373 頁、2007 年

和田崇之、岩本朋忠、吉田志緒美、長谷 篤
結核菌北京型ファミリー内における微小分子進化とミニサテライト多型解析。

第 81 回日本細菌学会総会、京都市 (2008.3.24-26)

日本細菌学会雑誌、第 63 巻、第 1 号、175 頁、2008 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1.

国内由来北京株 (355 株) における VNTR-MST 系統樹分類と SNP 型別 (ST) 系統分岐の相関性

VNTR サブグループ	株数	ST (types of sequences)							
		ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8
計	355	4	28	51	84	2	111	61	14
分類不能 (樹形外に分布)	4	4	0	0	0	0	0	0	0
Branch 1	84	0	0	0	82	0	2	0	0
Branch 2	51	0	0	0	0	1	50	0	0
Branch 3	51	0	0	49	2	0	0	0	0
Branch 4	78	0	0	0	0	0	3	61	14
RST2	28	0	28	0	0	0	0	0	0
RST6	59	0	0	2	0	1	56	0	0

Table 2.

ホームレス患者由来北京型結核菌のサブグループ分布比率およびラスティング

VNTR サブグループ	株数	非クラスター株数	クラスター率 (%)	クラスターの個数	最大クラスターの構成株数
計	216	85	60.6	30	16
Branch 1	34 (15.7%)	20	41.2	5	4
Branch 2	37 (17.1%)	11	70.3	4	16
Branch 3	16 (7.4%)	14	12.5	1	2
Branch 4	78 (36.1%)	20	75.3	11	11
RST2	17 (7.8%)	7	58.8	3	4
RST6	34 (15.7%)	13	61.8	6	5

結核菌による臓器侵襲の分子機構

分担研究者 大原 直也 国立感染症免疫部室長

研究要旨 結核菌は培養した時と宿主内に存在する時では遺伝子の発現パターンが異なることが知られている。SassetiとRubinによるトランスポゾンを用いた結核菌遺伝子のスクリーニングによれば、チミジル酸合成酵素 *thymidylate synthase* (TS)の遺伝子のひとつ*thyX*は宿主内での生存に必須と推測されている（Sasseti, CM and Rubin EJ, PNAS 100, 12989, 2003）。本菌における*thyX*の役割を明らかにするため、BCGを用いて*thyX*を欠損株の作製を行い、栄養要求性と増殖について検討した。*thyX* 破壊株はSauton培地で増殖することから栄養要求性ではないことが明らかになった。また7H10-OADC培地上での集落性状および増殖速度は親株のものと類似していた。さらにマウスマクロファージJ774内での生存率も親株と差がなかった。しかし、7H9-ADC-Tween80用いた振とう培養ではその増殖が大きく阻害された。このことからThyXは酸化ストレス時の菌の増殖に大きく関与していることが推測された。

A. 研究目的

結核菌は培養した時と宿主内に存在する時では遺伝子の発現パターンが異なることが知られている。このことは結核菌による臓器侵襲性の菌側の要因を考える際に重要である。結核菌が宿主に侵入した時に発現が上昇する遺伝子で、これまでに解析がされている遺伝子も多いが、まだ解析の進んでいない遺伝子が多いのも現状である。チミンの合成系はほとんどの生物にとって必須であり、古くから解析されてきた代謝系である。その中のチミジル酸合成酵素 *thymidylate synthase* (TS)であるThyAは細菌からヒトまで広く保存されている酵素である。しかし、古細菌を中心にThyAを持たない細菌の存在が知られ、それらはThyAと同じ活性を持ちながらThyAとは相同性が無く、補酵素としてFADを必要とするThyXを持つことが明らかになった。さらに、*Mycobacterium*と*Corynebacterium*は例外的にThyAとThyXの両者を持つことが明らかになった。ところで、SassetiとRubinによるトランスポゾンを用いた結核菌遺伝子のスクリーニングにより、*thyX*は宿主内での生存に必須と推測されているが、結核菌におけるThyXの必要性および生存に対する役割の直接的な実験結果はまだない。本研究では結核菌でのThyXの役割を明らかにする

目的で、BCGを用いて*thyX*欠損株を作製し、栄養要求性および培養条件に対する*thyX*の影響を検討する。

B. 研究方法

BCGの*thyA*および*thyX*の発現はRT-PCRで検討した。

チミジル酸合成酵素 *thymidylate synthase* (TS) の遺伝子 *thyA*および *thyX*はBCG Tokyo株のゲノムからそれぞれの遺伝子の上流および下流の領域約2 kbを含めてPCRで増幅し、大腸菌プラスミドpUC19のマルチクローニングサイトにクローニングした。クローニングしたDNA断片から*thyA*あるいは*thyX* ORFを取り除いた。次にクローニングした*thyA*あるいは*thyX* DNA断片に隣接するようにカナマイシン耐性遺伝子 (*aphII*) およびショ糖感受性遺伝子 (*sacB*) を挿入した。このプラスミドをBCGに導入し、シングルクロスオーバーでプラスミド全体がゲノム上に組み込まれた株を選択した。得られたカナマイシン耐性株をカナマイシン非含有7H9-ADC培地で継代し、さらに10% ショ糖平板含有7H10-OADCに塗布することにより、ゲノム上で相同組換えを起こし、カナマイシン感受性、ショ糖耐性となった株を得た。PCRで確認することにより、*thyA*あるいは

*thyX*が欠損した株を選択した。

クローニングした*thyX*遺伝子をプロモーターおよびターミネーターを含めて切断し、大腸菌-抗酸菌シャトルベクターに挿入した。上述のように作製した*thyX*欠損株をこのプラスミドで形質転換し、形質転換体をカナマイシン含有培地で選択した。

作製された株を最小培地であるSauton培地、富栄養培地である7H10-OADC平板培地および7H9-ADC-Tween80培地で培養し、それぞれの培地における増殖を観察した。

ThyAおよびThyXの酵素活性の有無は、それぞれの遺伝子を大腸菌発現用プラスミドに挿入し、大腸菌*thyA*欠損株に形質転換後、最小培地で増殖することを指標に調べた。

マウスマクロファージへのBCGの感染はMOI 100で行った。1時間感染後、ゲンタマイシン含有培地で洗浄、計時的に感染細胞から菌を回収し、7H10-OADC培地に塗布し、CFUを計測した。

(倫理面への配慮)

該当しない。遺伝子組み換え実験については一般の組み換えDNA実験に準じ、機関内承認を得た。

C. 研究結果

まずBCG培養時の*thyA*および*thyX*の発現をRT-PCRで確認したところ、最小培地、富栄養培地いずれにおいても両遺伝子が発現されていることが確認された。

次に*thyA*および*thyX* ORFを大腸菌発現ベクターに挿入後、大腸菌*thyA*欠損株に形質転換したところ、最小培地M9平板で増殖した。

BCGTokyo株ゲノムから上流下流それぞれ2 kbを含む*thyA*および*thyX*遺伝子領域を大腸菌クローニングベクターにクローニングした。次にこれらプラスミド*thyA*および*thyX*遺伝子開始点および終結点を含むプライマーを通常とは逆に、外側に対してPCRにより増幅した。増幅したDNAを自己結合させることにより、欠損型*thyA* ($\Delta thyA$) および*thyX* ($\Delta thyX$) を作製した。 $\Delta thyA$ および $\Delta thyX$ に隣接させシヨ糖感受性遺伝子*sacB*を挿入後、環状プラスミドをBCG Tokyo株に形質転換した。その結果、*thyA* ($\Delta thyA$) および*thyX* ($\Delta thyX$) 領域に正しく挿入された株をそれぞれ2株および4株得た。次にその中から1株ずつを選択し、dTMP含有7H9-ADC-Tween80培地で培養後、10%シヨ糖含有7H10-OADC平板培地上で集落を得た。PCRにより*thyA*および*thyX*の遺伝子型を調べたところ、*thyA*欠損株、*thyX*欠損株はそれぞれ、196株中3株、196株中2株であった。

次に、作製した*thyX*欠損株に*thyX*発現カセット

を挿入した大腸菌-抗酸菌シャトルベクターで形質転換したところ、カナマイシン含有培地で多くの集落を得た。3クローンを選択し、RT-PCRで調べたところ、*thyX*が転写されており、*thyX*が相補されていることが確認された。

培地での増殖は*thyA*欠損株、*thyX*欠損株ともに最小培地であるSauton培地で増殖したことから、これまでの推測とは異なり、いずれもBCGにとって必須ではなく、またチミン要求性でないことが示された。また増殖速度は7H10-OADC平板およびSauton培地上では親株であるTokyo株と*thyX*欠損株では有意差は認められなかった。また集落の性状にも大きな差は認められなかった。しかし、*thyX*欠損株は7H9-ADC-Tween80培地を用いた振とう培養では増殖が著しく抑制された。また*thyX*相補株はTokyo株と*thyX*欠損株とは異なり、7H10-OADC平板上においてスムーズで小型の集落を形成した。

マウスマクロファージ内での生存率はTokyo株と*thyX*欠損株の間で有意な差は認められなかった。

D. 考察

抗酸菌*thyA*欠損株についてはRengaraian, Jら
が既に報告しており (Mol Microbiol 53, 275, 2004)、増殖に必須でないことが示されている。一方*thyX*についてはトランスポゾンを使用したスクリーニングにより結核菌の増殖に必須と推測されてきた (Sasseti, CM and Rubin EJ, PNAS 100, 12989, 2003)。しかし、本実験において*thyX*欠損株がチミン、チミジル酸を含まない合成培地でも増殖したことから、抗酸菌に必須ではないことが示された。またSauton培地および7H10-OADC平板における増殖速度が親株との間に大きな違いがないことから、チミジル酸合成におけるThyX役割は大きくないことが推測される。しかし、7H9-ADC-Tween80培地を用いた振とう培養では大きく異なり、*thyX*欠損株はその増殖が著しく抑制された。ThyAとThyXはアミノ酸の配列に相同性がないものの、チミジル酸合成の酵素としては同じ活性を持つ。このことはいずれの遺伝子も大腸菌ThyA欠損株を相補することからも示された。しかし、ThyAと異なり、ThyXはFADを補酵素として必要とし、またその反応にNADPHを必要とする。NADPHは解糖系、TCAサイクル、それに引続く電子伝達系によって多く産生されるが、特に酸素存在下での代謝で増加すると考えられる。一方酸素を必要としない発酵においてはNADPHからNADPへの反応が優位と考えられる。我々は以前に静置培養においては、酸素分圧の低下で発現が増加するタンパク質Acrの濃度が上昇すること、7H9-ADC-Tween80培地を用

いた振とう培養ではAcrは全く発現していないことを報告した (Res Microbiol, 149, 255, 1998)。これらのことから、thyXは酸素分圧が低下している環境ではその寄与は少なく、酸素分圧が上昇している環境において主に働いている可能性がある。そのため、thyX欠損株は酸素が豊富な振とう培養では増殖が阻害された可能性が考えられる。もしそうであれば活動期あるいは休眠状態でThyAとThyXを使い分けている可能性もあり、この菌の生理を考える上で興味深い。今後更なる検討が必要である。

ところで大腸菌等ではthyA欠損株はチミン要求性である。しかし、BCGではthyA欠損株、thyX欠損株はともにチミン要求性を示さなかった。チミン要求性を示すためにはthyAおよびthyXの二重欠損になる必要があると考えられる。そこで、thyX欠損株をもとにthyA領域の単純な相同組換えによるthyA欠損(二重欠損)株の作製を試みたが、目的の株を得ることができなかった。このことは、二重欠損株がチミン要求性であることの反映であると受け止めている。

E. 結論

BCGのチミジル酸合成酵素thymidylate synthase (TS) thyAとthyXについて、その遺伝子破壊株を作製して検討した。thyAとthyXいずれか一方の欠損では致死あるいは栄養要求性にはならなかった。FAD依存性TSのThyX欠損株は7H9-ADC-Tween80培地を用いた振とう培養での増殖が顕著に抑制された。マウスマクロファージ内での増殖は親株とThyX欠損株の間で大きな違いは見出されなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hotokezaka H, Sakai E, Ohara N, Hotokezaka Y, Gonzales C, Matsuo K, Fujimura Y, Yoshida N, Nakayama K: TNF-alpha, lipopolysaccharide, and peptidoglycan induce cell fusion independently of RANKL at the latest step of differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells, J Cell Biochem 101: 122-134, 2007

Fukusaki T, Ohara N, Hara Y, Yoshimura A, Yoshiura K: Evidence for association between a Toll-like receptor 4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population, J Periodont Res 42: 541-545, 2007

Tang C, Yamada H, Shibata K, Maeda N, Yoshida S, Wajiwalku W, Ohara N, Yamada T, Kinoshita T, Yoshikai Y: Efficacy of Recombinant BCG Vaccine Secreting IL-15/Ag85B fusion protein on Protection against Mycobacterium tuberculosis, J Infect Dis, in press.

岡部真裕子、大原直也、小林和夫. 結核, 保健の科学 49:691-697,2007(総説)

2. 学会発表

Kondo Y, Yoshimura M, Ohara N, Shoji M, Yukitake H, Naito M, Fujiwara T, Koji Nakayama K: One of the bacterial tetratricopeptide repeat-containing proteins is involved in virulence of the periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science, Feb 2007. Sendai, Japan.

Ohara N, Yoshimura M, Okabe M, Nakayama K, Kobayashi K: Construction and characterization of the thymidylate synthase mutants derived from BCG. China-Japan-US Tuberculosis Seminar and Forty-second Tuberculosis and Leprosy Research Conference: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. Sep 2007. Zhengzhou, China.

Tang C, Yamada H, Shibata K, Maeda N, Yoshida S, Wajiwalku W, Ohara N, Yamada T, Yoshikai Y: Efficacy of recombinant BCG vaccine secreting IL-15/Ag85B fusion protein on protection against Mycobacterium tuberculosis. China-Japan-US Tuberculosis Seminar and Forty-second Tuberculosis and Leprosy Research Conference: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. Sep 2007. Zhengzhou, China.

Ohara N: Recombinant BCG vaccines: current status. 2nd Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases. Nov 2007. Nagasaki, Japan.

内藤真理子、平川英樹、山下敦士、大原直也、庄子幹郎、中山恵介、吉村文信、久原哲、服部正平、林哲也、中山浩次: Porphyromonas gingivalis ATCC33277株の全ゲノム塩基配列決定、第1回日本ゲノム微生物学会、2007年3月

大原直也: 細菌による破骨細胞分化の制御. ワークショップ骨と感染症研究の新展開、第80回日本細菌学会総会、2007年3月

内藤真理子、大原直也、庄子幹郎、中山恵介、吉村文信、林哲也、中山浩次: Porphyromonas gingivalis ATCC33277株の全ゲノム塩基配列決定、第80回日本細菌学会総会、2007年3月

近藤好夫、吉村満美子、大原直也、庄子幹郎、雪竹英治、内藤真理子、藤原卓、中山浩次: Porphyromonas gingivalis のTPRドメイン蛋白質欠損株の解析、第80回日本細菌学会総会、2007年3月

北里海雄、布施隆行、大原直也、渡辺健、小林信之：MIP-T3と微小管との結合機構の解析、平成19年度日本生化学会九州支部例会、2007年5月

菊池有一郎、大原直也、上田青海、平井要、柴田幸永、中山浩次、藤村節夫：Porphyrromonas gingivalis ECFシグマ因子群の遺伝子挿入変異株の作製、第49回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2007年8月

内藤真理子、大原直也、庄子幹郎、吉村文信、中山浩次：Porphyrromonas gingivalis ATCC33277株の全ゲノム塩基配列決定、第49回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2007年8月

Yoshimura A, Yamaguchi R, Kaneko T, Ohara N：日本人におけるTLR4 遺伝子多型と中等度および重度歯周炎との関連/Association between a TLR4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population. 第36回日本免疫学会総会・学術集会、2007年11月

G. 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

特記なし

厚生労働科学研究補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

非結核性抗酸菌症(MAC 症)疾患感受性遺伝子研究の展開

分担研究者 慶長直人（国立国際医療センター）

研究協力者 庄嶋淳子、松下育美、土方美奈子、櫻田紳策（国立国際医療センター）

研究要旨

これまで、非結核性抗酸菌症(MAC 症)のゲノムワイド関連解析により、HLA 領域の MHC class1 chain-related A (MICA)が疾患感受性候補遺伝子として選出されてきたが、MICA 遺伝子周辺 100 kb に位置し、連鎖不平衡を示す可能性のある HLA-B と HLA-DRB1 遺伝子には、MICA A6 アリル以上に疾患との関連を示すアリルは認められなかった。ヒト気管支上皮培養細胞 MICA の A6/non-A6 をともに有する 42 検体において、A6 アリル由来 mRNA は、non-A6 アリル由来に比べ、相対的に発現量が増加していた。また、抗 MICA 抗体を用いた肺組織の免疫染色では、細気管支上皮と肺泡マクロファージに発現が認められ、肺 MAC 症の中心病変である肉芽腫の類上皮細胞や多核巨細胞にも染色性が認められた。今後、抗酸菌症における MICA 遺伝子の病変形成における役割を十分に検討する必要があると思われた。

A. 研究目的

肺に病変をつくり、ヒトの健康を害する肺抗酸菌症の中で、非結核性抗酸菌症の 7 割以上を占める *Mycobacterium avium complex* (MAC) 症は、明らかな免疫学的異常を検出できない中高年の女性に多く、難治性、薬剤抵抗性であることから、結核罹患率の低下した国々で、その病態解明と新しい治療法の開発が望まれている。

抗酸菌感染症の成立と発症には環境、菌側の要因、宿主側の要因が複雑に関係する。肺 MAC 症においては、弱毒菌にも関わらず、健康な宿主に感染し発症することから、内的な素因が発症に重要と推測されてきた。この遺伝的素因については HLA、*NRAMP1*、*CFTR* 遺伝子などが報告されているが明確ではない。我々は、これまで、近畿中央胸部疾患センターおよび国立病院機構の関連施設、国立病院機構東京病院、東海大学医学部猪子英俊教授、国立国際医療センター病院との共同研究として、肺 MAC 症の疾患感受性領域のゲノムワイドな探索を行い、NKG2D 受容体のリガンドの一つである MICA 分子の A6 アリルが、MAC 症と関連を示すことを見いだしてきた。本年度、その遺伝子多型の機能的意味を探求した。

B. 方法

マーカー周囲 100 kb 内上下流に位置する既知候補遺伝子 HLA-B と HLA-DRB1 遺伝子について、患者と対照それぞれ 300 例の解析を行った

アリル特異的な mRNA 発現比の定量に際しては、MICA 遺伝子の A6 アリルと nonA6 アリルをヘテロで有する 42 手術肺に由来するヒト気管支上皮細胞を初代培養し、MICA-TM と完全な連鎖不平衡にある exon3 の G/C SNP を含む領域の RT-PCR 産物を、SSCP 法により分離して、A6 由来と non A6 由来の蛍光強

度の比を対数変換した後、一標本 t 検定により、テンプレートの A6/non-A6 比が 1 以上となることを推定した。

肺 MAC 症患者病変部と肺癌患者非癌部のホルマリン固定パラフィン包埋切片上の MICA の発現分布については、抗ヒト MICA-extracellular domain 特異抗体(R&D Systems)と、対照ヤギ血清(免疫生物研究所)を一次抗体に、内因性ペルオキシダーゼ反応を阻害した後、ペルオキシダーゼ標識抗ヤギ抗体(シンブルステイン MAX-PO(G)液;ニチレイ)、3-Amino-9-Ethyl Carbazole (AEC) Liquid Substrate Chromogen (Dako)を基質として発色し、ヘマトキシリンで対比染色し、鏡検した。

ヒト検体を用いた検討については、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に準拠して、関連施設の倫理委員会の承認を得た。

C. 結果

これまでの肺 MAC 症のゲノムワイド関連解析から、P 値が最も小さく HLA 領域の MHC class1 chain-related A (MICA) 遺伝子の exon5 に存在する D6S0009i マーカー (MICA-TM マーカー; A6 アリル; P=0.0007, OR=1.53)を疾患感受性アリルの候補として選出してきたが、本年度、まず初めに、MICA 遺伝子周辺に真の感受性遺伝子アリルが推定されるか否か検討するため、100 kb 内上下流に位置する既知候補遺伝子 HLA-B と HLA-DRB1 遺伝子について解析を行ったが、有意なアリルは検出されなかった。MICA-A6 を含めたハプロタイプは、B*5201-A6-DRB1*1502 と B*4403-A6-DRB1*1302 の二つに分かれたが、いずれも統計学的に MAC 症と有意な関連を示さなかった。すなわち、HLA-B、MICA-TM、-DRB1 の 3 遺伝子のうち、MICA-A6 アリルが最も強

く MAC 症と関連していた。

次に有意アリル A6 の機能的意義を調べるため、正常なヒト気管支上皮培養細胞におけるアリル特異的な mRNA レベルの発現解析を行った。A6/nonA6 ヘテロ接合型の 42 細胞の MICA 遺伝子 mRNA に由来する RT-PCR 産物の A6 と non A6 由来バンドの蛍光度を比較した結果、A6/non-A6 発現比は有意に 1 以上となることが示された。

最後に、肺 MAC 症患者病変部と肺癌患者非癌部の病理組織に対し抗 MICA 抗体を用いて免疫染色を行った結果、細気管支上皮と肺泡マクロファージは両組織にて染色が認められ、肺 MAC 症の中心病変である肉芽腫の類上皮細胞や多核巨細胞でも染色陽性であった (図 1)。

D. 考察

MICA 分子は NK 細胞、 $\gamma \delta$ T 細胞、CD8 陽性 T 細胞上の NKG2D 受容体のリガンドの一つであり、上皮細胞や単球、樹状細胞、マクロファージが様々なストレスを受けることにより発現し、免疫反応を引き起こすことが知られている。MICA-TM マーカーは第 6 染色体短腕の HLA 領域の MICA 遺伝子上に存在する。MICA 分子の細胞膜貫通領域をコードする exon5 に存在する GCT の 3 塩基リピートであり、リピート数の違いによって異なるアリル (A4、A6、A5.1、A6、A9) となる。疾患と関連を認めたアリルは A6 アリルであった。MICA 分子は、最近ヒトの気道上皮細胞に酸化ストレスにより発現することが報告されている。単球への発現や LPS 存在下でマクロファージへの発現も報告されている。また樹状細胞での MICA 発現が結核菌感染により増大したとも報告されている。

ベーチェット病、潰瘍性大腸炎などの自己免疫性疾患の遺伝子解析において、本研究と同様に A6 アリル頻度が患者集団で高いことが繰り返し報告されていることから、アリル特異的な mRNA レベルでの発現解析を行い、A6/non A6 のヘテロ接合型の気管支上皮細胞における A6 アリルの mRNA レベルでの発現が、他方の non A6 アリルに比し有意に高いことを示した。本法は、同一条件の細胞集団の mRNA 発現比を測定するため、細胞要素や培養条件の違いを考慮せずにアリル比を検討することができる有用な方法である。

また、今回の免疫染色の結果から、MICA の細気管支上皮での発現と、肺 MAC 症の肉芽腫を構成する類上皮細胞、多核巨細胞の染色性が確認された。マクロファージ系細胞での検討も必要であるが、A6 アリルまたは A6 アリルを含むハプロタイプが、強い気道での炎症反応を惹起し、肺 MAC 症の疾患感受性因子となる可能性について、今後、さらに検討する必要がある。

E. 結論

関連解析、機能解析、発現局在の検討の結果、MICA 遺伝子は、肺抗酸菌症の疾患感受性候補遺伝子の一つとして念頭に置くべきものと思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表なし

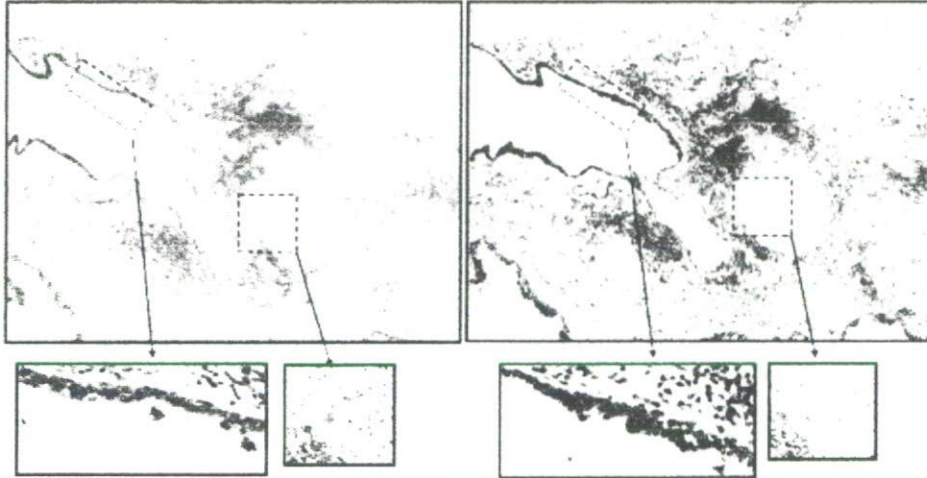
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 肺MAC症患者の肺病理組織

左：抗MICA抗体

右：対照(正常肺)



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

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 大阪大学大学院医学系研究科教授

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。特に、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から産生される lipocalin 2 の抗結核作用の機序を解析した。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。過剰の鉄イオンあるいは、鉄イオンの取り込みを司る mycobactin 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 mycobactin を介した取り込みを抑制すること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、組織解析から、lipocalin 2 ノックアウトマウスでは、肺胞上皮層に結核菌の存在が明らかに認められた。正常マウスでは、肺胞上皮層に結核菌はほとんど認められず、また肺胞マクロファージに BCG を感染させても、正常マウスとノックアウトマウス間で有意な差はみとめられないことから、Lipocalin 2 欠損により、肺胞上皮内で抗結核感染防御機構が障害されていることが考えられた。そこで II 型肺胞上皮細胞を単離し、BCG 感染させると、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。Lipocalin 2 を加えると、細胞内に取り込まれ、BCG の細胞内の増殖を抑制した。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線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かった。近年、Toll-like receptor (TLR) の機能解析から、自然免疫系が微生物の感知を特異的に行い、獲得免疫系の活性化をも制御していることが明らかになってきた。そこで、自然免疫系の結核菌感染防御における役割を明らかにし、自然免疫系を中心とした新たな結核菌感染防御法の確立に対する基礎的分子基盤を提供することを、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検索した。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 ($FeCl_3$) 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。また、過剰の mycobactin を加えても、Lcn2 による増殖抑制は解除された。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。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。また、肺組織をチールネルゼン法により染色したところ、正常マウスでも Lcn2 ノックアウトマウスでも、granuloma 様な変化を起こした組織や、マクロファージ様の形態の細胞では、赤染する抗酸菌の数が、ほぼ同じ密度

で観察された。一方、肺胞上皮層内には、正常マウスではチールネルゼン法で結核菌を認めることはなかったが、Lcn2 ノックアウトマウスでは、肺胞上皮層に有意に結核菌を認めた。また、肺胞マクロファージを単離し、BCG を感染させても、正常マウスとノックアウトマウス間で有意な差は認められなかった。これらの結果から、Lcn2 ノックアウトマウスで結核感染に対する感受性が高くなるのは、肺胞上皮での結核感染防御機構が、主に障害されているためであることが示唆された。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いた。[3H]uracil を用いて、BCG の細胞内での増殖を測定しても、ノックアウトマウス由来の細胞で、BCG の増殖能が増加していた。組み換え体の Lcn2 を加えると、BCG の細胞内増殖を抑制した。また、Lcn2 が細胞内にエンドサイトーシスにより取り込まれた。そこで、エンドサイトーシスの inhibitor を加えると、Lcn2 による BCG の細胞内増殖は阻害された。

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。さらに Lcn2 が、肺胞上皮細胞に取り込まれ、肺胞上皮内で侵入した結核菌の増殖を抑制することにより、結核感染防御の最初の砦を築いていることも明らかになった。このように、Lcn2 の結核感染防御機構の解析から、肺胞上皮の重要性が明らかになった。

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

1. 論文発表

1. Kayama, H., Rairez-Carrozzi, V. R., Yamamoto, M., Mizutani, T., Kuwata, H., Iba, H., Matsumoto, M., Honda, K., Smale, S. T., and Takeda, K.: Class-specific regulation of pro-inflammatory genes by MyD88 pathways and IkBz. J. Biol. Chem. in press
2. Nakamura, K., Miyazato, A., Gang, X., Hatta, M., Inden, K., Aoyagi, T., Takeda, K., Akira, S., Saijo, S., Iwakura, Y., Adachi, Y., Ohno, N., Suzuki, K., Fujita, J., Kaku, M., and Kawakami, K: Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. J. Immunol. in press
3. Nishimura, J., Saiga, H., Sato, S., Okuyama, M., Kayama, H., Kuwata, H., Matsumoto, S., Nishida, T., Sawa, Y., Akira, S., Yoshikai, Y., Yamamoto, M., and Takeda, K.: Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. J. Immunol. in press
4. Hisaeda, H., Tetsutani, K., Imai, T., Moriya, C., Tu, L., Hamano, S., Duan, X., Chou, B., Ishida, H., Aramaki, A., Shen, J., Ishii, K., J., Coban, C., Akira, S. Takeda, K., Yasutomo, K., Torii, M., and Himeno, K.: Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. J.

Immunol. in press

5. Owaki, T., Asakawa, M., Morishima, N., Mizoguchi, I., Fukai, F., Takeda, K., Mizuguchi, J. and Yoshimoto, T.: STAT3 is indispensable to IL-27-mediated cell proliferation but not to IL-27-induced Th1 differentiation and suppression of proinflammatory cytokine production. *J. Immunol.* in press
6. Yamamoto, M., Uematsu, S., Okamoto, T., Matsuura, Y., Sato, S., Kumar, H., Satoh, T., Saitoh, T., Takeda, K., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Kawai, T., and Akira, S.: Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J. Exp. Med.* 204, 2233-2239 (2007).
7. Sakamori, R., Takehara, T., Ohnishi, C., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Takeda, K., Akira, S., Hayashi, N.: STAT3 signaling within hepatocytes attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice. *Hepatology* 46, 1564-1573 (2007).
8. 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* 132, 176-189 (2007).

2. 学会発表

1. Kiyoshi Takeda, Regulation of inflammatory responses by nuclear IκB proteins. 8th International Society of Exercise and Immunology Symposium, 2007. 10. 25, Sendai, Japan
2. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. The 9th International Colloquium on Paratuberculosis, 2007. 10. 29, Tsukuba, Japan

3. 竹田潔, 自然免疫系による結核感染防御機構, 第60回日本細菌学会九州支部総会、2007. 10. 12、長崎
4. Kiyoshi Takeda, Lipocalin 2 mediates host defense against Mycobacterial infection. 42th US-Japan Conference on Tuberculosis and leprosy, 2007. 9. 11-14, Henan, China
5. 竹田潔, 自然免疫シグナルの制御機構第28回日本炎症・再生医学会、2007. 8. 2、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

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

ハンセン病の予防・診断法の開発

分担研究者 向井 徹 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 ハンセン病の遺伝子診断法開発のため、等温遺伝子増幅法である LAMP 法によるらい菌の同定法を確立してきた。LAMP 法に供する検体の簡易保存・移送法の検討を行うため、ハンセン病流行地域の病院にて採取された smear sample 4 5 検体を LAMP 法と PCR 法による検出率を比較検討した。その結果、nested-PCR 法陽性は、3 5 検体、LAMP 法陽性は 3 3 検体であり、LAMP 法陽性検体は全て nested-PCR 法において陽性であった。これら検出法、検体保存運搬法は、経済的かつ簡易な遺伝子検査法の開発を可能にすると考えられた。

A. 研究目的

ハンセン病の診断の一助として、らい菌の遺伝子同定法が行われる。その同定を行うために、skin smear 等、臨床検体を採取後、検査施設へ移送する必要がある。一般に、検体の移動は低温下で行われ、冷蔵庫などの設備や器具を必要とする。しかし、ハンセン病の流行地域は、一般に施設の整った病院より遠距離にあることが多い。そのため、臨床検体を簡易にかつ安定した状態で保管・移送する方法が必要とされる。本研究では、これまでに、確立してきた等温遺伝子増幅法である loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法に応用可能な検体保存法の検討を目的とした。

B. 研究方法

インドネシア国東ジャワ州スラバヤの大学病院に通院する患者より採取された skin smear を検体として用いた。手術用メスにより採取した skin smear、4 5 サンプルを特殊化学表面処理を施した FTA カード (Watman 社) Elute に塗布した。塗布領域より一辺 3 mm の紙片を刃先使い捨てカッターにより切り出し、蒸留水にて 1 回洗浄後、30 μ l の蒸留水に懸濁を行い、その 2 μ l を LAMP 法および PCR 法に用いた。(図 1) 増幅産物は、Fluorescent Detection 試薬(栄研化学)により検出した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施は倫理委員会の承認を得て行われた。検体採取においては、研究の目的・意義について説明し、同意が得られた場合にのみ材料の提供を受けた。

C. 研究結果

検討の結果、nested-PCR 法陽性は、3 5 検体、LAMP 法陽性は 3 3 検体であり、LAMP 法陽性検体は全て nested-PCR 法において陽性であった。

D. 考察

これまでに、特殊処理ろ紙による遺伝子検査用サンプルの処理法の検討を進め改良を加えてきた。本年度は、保存紙からサンプル塗布領域の切り出し法の改良を行った。昨年度までは、円形に切り出されるパンチを使用していたが、洗浄を行い繰り返し使用していたが、前サンプルの汚染が否定できず、また、パンチの価格も安いものではなく、経済性に問題を有していた。そのため、今回は、一般にされるカッターを用いた。これを用いることにより、サンプルごとに新しい刃先の使用により、前サンプルの汚染は、解決したものと考えられた。

2 検体において PCR 陽性 LAMP 法陰性の結果が得られた。当該検体の B I は、0 + と非常に菌数の少ないものであり、LAMP 法の検出限界より低いと考えられた。治療等の判定では、この領域の菌数は、大きな問題は無いと考えられるため、LAMP 法であっても十分な遺伝子検査能を信施舌と考えられた。

E. 結論

らい菌特異検出 LAMP 法は、FD 試薬による迅速検出と FTA カード Elure による検体の室温保存・運搬法の改善により、途上国にも応用可能な、経済的かつ簡易なハンセン病の遺伝

子診断システムに成り得ることを示した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2) 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.

3) 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.

2. 学会発表

1) 向井 徹、和泉眞蔵、宮元友司、Cita Rosita, Indropo Agusni, 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

2) 和泉眞蔵、Indropo Agusni, 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

3) Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, T. Mukai, and T. Mori. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science

Program. 42nd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.

4) Mukai, T., S. Izumi, C. Rosita, I. Agusni, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. Detection of *M. leprae* DNA in nasal swab samples by LAMP method. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42nd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.

5) Kai, M., N. P. N. Ha, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, Y. Maeda, T. Mukai, N. T. Tan, and M. Makino. Application of new serological test for leprosy in Vietnam. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.

6) 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. 抗酸菌糖脂質合成における fucose 転移酵素遺伝子の解析. 第 80 回日本細菌学会総会 2007 年 3 月 大阪

7) 向井 徹, 和泉眞蔵, 宮本友司, Cita Rosita, Indropo Agusni, 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・学術大会 2007 年 5 月 横浜

8) 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. *Mycobacterium avium* complex における fucose 含有糖脂質抗原の合成解析. 第 90 回日本細菌学会関東支部総会 2007 年 10 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

図1. 簡易保存・抽出法



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

結核菌由来因子による宿主免疫応答の誘導機構に関する研究

分担研究者 田村 敏生（国立感染症研究所ハンセン病研究センター 第四室長）

研究要旨

本研究は、結核菌分泌タンパクよりTh1免疫応答を選択的に誘導することで、長期生存型メモリーCD8⁺細胞障害性T細胞を誘導する活性を有するペプチドを検索し、抗結核免疫応答を強化するシステムを確立することを目的としている。

本年度は結核菌分泌タンパクAg85B由来ペプチド(Peptide-25)による選択的Th1分化誘導の分子機構に関してPeptide-25特異的T細胞抗原受容体(TCR)を発現するトランスジェニックマウス(P25 TCR-Tg)を用い検討した。その結果、Peptide-25はMHC分子を介したTCRとの会合により、ZAP-70、ERKの活性化を誘導しTh1分化のマスターレギュレーターであるT-bet及びT-betと同様の機能を有する未同定のTh1分化誘導因子の発現を誘導することでナイーブCD4⁺T細胞をTh1細胞へと分化させる特性を有していることを明らかにした。

A. 研究目的

ワクチンの目的は主に獲得免疫を惹起し、長期生存型メモリーCD8⁺細胞障害性T細胞(CTL)を効果的に誘導することである。この長期生存型メモリーCTLの誘導にはIFN- γ 、TNF- α を産生するCD4⁺Th1細胞の存在が不可欠であると考えられている。

本研究は、結核菌分泌タンパクよりTh1免疫応答を選択的に誘導することで、長期生存型メモリーCTLを誘導する活性を有するペプチドを検索し、抗結核免疫応答を強化するシステムを確立することを目的としている。

これまでの解析から、①結核菌分泌タンパクAg85Bのヘルパーエピトープを検索し、15個のアミノ酸からなるPeptide-25が、I-A^b拘束性に強力且つ選択的にTh1免疫応答を誘導できること、②Peptide-25特異的TCRを発現するトランスジェニックマウス(P25 TCR-Tg)を用いた解析から、Peptide-25はIL-12やIFN- γ などのサイトカイン非依存的なTh1分化を誘導できること、③Peptide-25のTCR結合部位の1アミノ酸を置換させTCRに対する親和性を低下させた変異ペプチド(APL)はTh2分化を誘導すること、④Peptide-25刺激したP25 TCR-Tg ナイーブCD4⁺T細胞では一過性のT-betの発現上昇とGATA-3の持続的な発現抑制が見られるのに対し、APL刺激ではT-betの発現上昇は見られず、ナイーブCD4⁺T細胞に既に高濃度発現しているGATA-3の発現が維持されることを明らかにしてきた。

本年度はPeptide-25による選択的Th1分化誘

導の分子機構及びPeptide-25が誘導するTh1分化におけるT-betの役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 細胞：野生型またはT-bet欠損P25 TCR-TgよりIMagシステム、FACSARIA(共にBeckton Dickinson)を用い、ナイーブCD4⁺T細胞を調製した。抗原提示細胞としてI-A^b遺伝子を導入したChinese Hamster Ovary(I-A^b-CHO)細胞(九州大学生体医学防御研究所 福井 宣規博士より供与された)を用いた。

(2) TCR- ζ 鎖のチロシンリン酸化の検討：P25 TCR-Tg ナイーブCD4⁺T細胞をPeptide-25(FQDAYNAAGHNAV)またはAPL(FQDAYNAAAGHNAV)を予め取り込ませたI-A^b-CHO細胞で2分間または10分間刺激した後、可溶化した。TCR- ζ 鎖に対する抗体で免疫沈降を行なった後、リン酸化チロシンに対する抗体を用いたウェスタンブロット法にてTCR- ζ 鎖のチロシンリン酸化を検討した。

(3) ZAP-70の活性化の検討：P25 TCR-Tg ナイーブCD4⁺T細胞をPeptide-25またはAPLを予め取り込ませたI-A^b-CHO細胞で2分間または10分間刺激した後、可溶化した。ZAP-70に対する抗体で免疫沈降を行なった後、リン酸化チロシンに対する抗体を用いたウェスタンブロット法にてZAP-70のチロシンリン酸化を検討することで、ZAP-70の活性化を評価した。