

(4) ERK 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 分間刺激した後、細胞をホルマリンで固定し、リン酸化 ERK に対する抗体を用いた細胞内染色法にて ERK のリン酸化を検討することで、ERK の活性化を評価した。

(5) *ifn-γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングの検討:P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T 細胞、及び Peptide-25 を予め取り込ませた I-A^b-CHO 細胞で刺激し 6 日間培養した P25 TCR-Tg CD4⁺ T 細胞の *ifn-γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングをクロマチン免疫沈降法にて検討した。

(5) IL-12 受容体β2 鎖の発現誘導の検討: Peptide-25 を予め取り込ませた I-A^b-CHO 細胞で 39 時間刺激した P25 TCR-Tg CD4⁺ T 細胞上の IL-12 受容体β2 鎖の発現を FACS を用いて検討した。

倫理面への配慮

実験に供したマウスの飼育、維持は東京大学医科学研究所及び国立感染症研究所の実験動物指針に従い実施した。

C. 研究結果

(1) CD4⁺ T 細胞が抗原を認識すると TCR に会合するチロシンキナーゼ Fyn や CD4 に会合するチロシンキナーゼ Lck の活性化が誘導され TCR-ζ 鎖の ITAM 領域のチロシン残基がリン酸化される。リン酸化された ITAM 領域に ZAP-70 が会合し Fyn や Lck によって ZAP-70 がリン酸化を受けることにより一連の活性化シグナルカスケードが活性化される。まず、Th1 分化を誘導する Peptide-25 と Th2 分化を誘導する APL 刺激後の TCR-ζ 鎖のチロシンリン酸化を検討した。Peptide-25 で P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T 細胞を刺激すると、刺激 2 分後から 23KDa 付近に見られる TCR-ζ 鎖の完全なリン酸化が誘導されるのに対し、APL 刺激では 23KDa 付近のリン酸化は極弱くしか見られなかった。次に、チロシンリン酸化を指標に ZAP-70 の活性化を検討した。その結果、Peptide-25 刺激では ZAP-70 のチロシンリン酸化が強く検出されるのに対し、APL 刺激では全く見られなかった。さらに、ERK のリン酸化を指標に ERK の活性化を細胞内染色法にて検討した結果、Peptide-25 刺激では ERK のリン酸化が検出されるのに対し、APL 刺激では全く見られなかった。

(2) T-bet は *ifn-γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導すると共に IL-12 受容体β2 鎖の発現を誘導することによって Th1 分化を誘導するマスターレギュレーターであると考えられている。そこで、Peptide-25 が誘導する Th1 分化における T-bet の役割を検討するために T-bet 欠損 P25 TCR-Tg マウスを作製した。T-bet 欠損 P25 TCR-Tg

ナイーブ CD4⁺ T 細胞を Peptide-25 を予め取り込ませた I-A^b-CHO 細胞を用いて刺激すると、野生型に比べ 1/3 程度に頻度は減弱するものの Th1 細胞への分化が誘導された。そこで、T-bet 欠損 P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T 細胞における *ifn-γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングを検討した結果、野生型と同様に Peptide-25 刺激により *ifn-γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングが誘導され、*ifn-γ* mRNA の転写が誘導されていることが明らかになった。さらに IL-12 受容体β2 鎖の発現誘導を検討した結果、T-bet 欠損 P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T 細胞においても野生型より減弱するものの十分な IL-12 受容体β2 鎖の発現が誘導された。

D. 考察

Peptide-25 刺激では TCR-ζ 鎖のチロシンリン酸化に続き ZAP-70 の活性化、ERK の活性化が誘導されるのに対し、APL 刺激では TCR-ζ 鎖のチロシンリン酸化は部分的にしか誘導されず、その結果 ZAP-70、ERK の活性化が誘導されないことが明らかになり、ペプチド/MHC 複合体との相互作用を介して TCR から Th1、Th2 特異的分化誘導シグナルが伝達されることが示唆された。この Peptide-25 を介した TCR からの Th1 分化誘導シグナル伝達機構が結核菌分泌タンパクである Peptide-25 特異的な現象であるかを今後解析していく予定である。

また、Peptide-25 による Th1 分化誘導における T-bet の役割を検討した結果、T-bet 欠損 P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T 細胞を Peptide-25 で刺激すると減弱はするものの依然として Th1 分化が誘導されたことから、Peptide-25 による Th1 分化には T-bet は必須な因子ではないことが明らかになった。また、T-bet 欠損 P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T 細胞においても Peptide-25 刺激により *ifn-γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリング、IL-12 受容体β2 鎖の発現が誘導されたことから、Peptide-25 は T-bet と同様の機能を有する未同定の転写因子の発現を誘導している可能性が示唆された。今後この未同定の因子の同定を行なう予定である。

E. 結論

Peptide-25 は TCR を介し P25 TCR-Tg ナイーブ CD4⁺ T 細胞のチロシンリン酸化酵素の活性化を誘導し、TCR-ζ 鎖のリン酸化、それに続き ZAP-70、ERK の活性化を誘導し、T-bet 及び T-bet と同様の機能を有する未同定転写因子の発現を誘導することで、*ifn-γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリング、IL-12 受容体β2 鎖の発現を誘導し、Th1 細胞へと分化させることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特記事項なし

3. その他 : なし

G. 研究発表

4. 論文発表

- 1) Wolf, A. J., B. Linas, G. J. Trevejo- Nuñez, E. Kincaid, T. Tamura, K. Takatsu, J. D. Ernst. *Mycobacterium tuberculosis* Infects dendritic cells with high frequency and impairs their function *in vivo*. *J. Immunol.* 179:2509-2519, 2007.
- 2) Ariga, H., Y. Shimohakamada, M. Nakada, T. Tokunaga, T. Kikuchi, A. Kariyone, T. Tamura, K. Takatsu. Instruction of naive CD4⁺ T-cell fate to T-bet expression and T helper 1 development : roles of T-cell receptor-mediated signals. *Immunology* 122:210-221, 2007.
- 3) Wolf, A. J., L. Desvignes, B. Linas, N. Banaiee, T. Tamura, K. Takatsu, J. D. Ernst. Initiation of the adaptive immune response to *M. tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J. Exp. Med.* 205:105-115, 2008.
- 4) Xu, W., T. Tamura, K. Takatsu. CpG ODN mediated prevention from ovalbumin-induced anaphylaxis in mouse through B cells pathway. *Int. Immunopharma.* 8:351-361, 2008.

2. 学会発表

- 1) 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, 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
- 2) P25 CD4⁺ T 細胞活性化とクロスプライミング増強の解析. 刈米アイ, 田村敏生, 高津聖志. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 2007年11月 東京
- 3) IL-10 delayed induction of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)- specific Th1 immune response in the lung of Mtb-infected TCR-transgenic mice. Yahagi, A., M. Umemura, T. Tamura, M.D. Begum, S. Hamada, K. Oshiro, Y. Okamoto, A. Kariyone, K. Takatsu, G. Matsuzaki. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 2007年11月 東京2006年12月、大阪.

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

『大阪における薬剤耐性菌の分子疫学解析』

分担研究者 松本智成

大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 臨床研究部長

A. 研究目的

XDR-TBとは、当初はINH, RFP耐性以外に、主要な2次抗結核薬6グループ (aminoglycosides, polypeptides, fluoroquinolones, thioamides, cycloserine, and para-aminosalicylic acid) のうち少なくとも3グループが耐性のMDR-TBと定義され(1)。最近になってINH, RFP耐性以外に、Fluroquinolone耐性と注射薬であるcapreomycin, kanamycin, amikacinのうち一つ耐性を満たす耐性結核菌と新たに定義された(2)。

我々はMDR-TB, XDR-TBは感染によって拡大蔓延すると既に報告しているがどのようにコミュニティ内で形成、伝播されているのかは不明である。当院受診加療歴があり、現在菌株が残っている多剤耐性肺結核患者172名のうちのXDR-Tbの頻度を新、旧の定義で検討する。

MDR-TB, ならびにXDR-TBがコミュニティ内で形成、伝播されているのかを検討する為に、感受性株、MDR-TB株、XDR-TB株においてクラスター形成率を求めおのこの株における感染蔓延度を検討する。また、INH(R)-TB、SM-INH(R)-TBとMDR-TB, XDR-TBとの関連性を検討する。

B. 研究方法

小川法にてINHは0.2($\mu\text{g/ml}$)以上を耐性と判断。他の薬剤はRFP 40, SM 10, EB 2.5, KM 20, EVM 20, TH 20, CS 30, PAS 0.5($\mu\text{g/ml}$)以上を耐性としfluoroquinolonesは、液体培地にて2($\mu\text{g/ml}$)以上を耐性とした。さらにAminoglycosidesおよびfluoroquinolonesは、グループ内の一剤でも耐性であれば耐性とした。測定されていない薬剤は便宜上感受性とした。また薬剤感受性が経時的に変化する場合、一度でも耐性と判断されたら耐性とした。

当センターにて2001年から得られた結核菌株についてIS6110 RFLP解析ならびに15-optimized MIRU VNTRでクラスター形成率を検討した。

系統樹は、Manhattan法で距離行列を求め、階層的クラスタリングには、fitchにより考案されたmaximum parsimony methodおよび、斎藤、根井により考案されたNeighbor-Joining法で求め無根および有根系樹を書き比較検討した。

C. 研究結果

65名が新XDR-TBの基準をみたし、172人中89名(51.7%)が旧XDR-TBの基準をみたした。薬剤感受性株1403株中498株(35.5%)、MDR-TB株66株中29株(43.9%)、XDR-TB株66株中20株(69.0%)がクラスター形成した。H(R)-TB、SM(R)-TB、MDR-TBが近縁クラスターを形成したり、MDR-TB、XDR-TB単独でクラスター群を形成していた。

D. 考察

新基準にてXDR-TB数が少なくなるのは、古い菌株においてfluoroquinoloneの感受性を行っていない事も原因である。

今回の検討にて、MDR-TBやXDR-TB単独で感染拡大している事。さらに個々の治療失敗でMDR-TB化したのではなく地域集団全体としての治療失敗にてINH耐性から多剤耐性化が起こり得る事がわかった。特にINH-SM耐性結核菌はMDR-TBと近縁にクラスター形成をしている事が多く、MDR化へのリスクファクターである事が今回確認出来た。これは、かつてのINH-PAS-SMによる治療のなごりであり、初回治療導入時にINH-RFP-SMによる加療は絶対に慎み、INH-RFP-EB-PZAの4剤標準療法を行わなければならない。またPZAが使用出来ない場合、INH-RFP-EB-X加療も考慮されるべきである。

多剤耐性肺結核、特にXDR-TBは、感受性結核菌に比べ適切な治療法が無いばかりではなく、現時点では治療法よりもいかに感染を防ぐかという公衆衛生学的手法に依存することの大きい疾患である。MDR-TBやXDR-TBほど警戒はされていないが、INH-SM(R)TBはMDR化への危険因子であり地域で情報を共有して、INH-SM耐性結核菌の頻度の高い地域は4剤による標準化学療法を徹底しなければならない。

E. 結論

我々が常々述べているMDR-TBならびにXDR-TBを広げないことは勿論である。しかしながら、今迄の考え方は個々での不適切な治療による失敗が議論されていたが、分子疫学解析を用いる事により、コミュニティ全体として、不適切な治療によりMDR-TBならびにXDR-TBを作らない対策も重要である事が明らかになった。

(1). CDC. MMWR. 2006 Mar 24;55(11):301-5.

(2). WHO. Wkly Epidemiol Rec. 2006 Nov 10;81(45):430-2.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 結核菌の分子疫学, 松本智成, 結核 82巻12号 Page933-940(2007.12)
2. 特発性肺線維症の急性増悪に対するPMX(Polymyxin B-immobilized Fiber Column)-DHP(Direct Hemoperfusion)の効果 2症例の比較, 吉田健史, 児玉昌身, 田村慶朗, 宍戸克子, 宍戸直彦, 石原英樹, 松本智成, 林下浩士, 鍛冶有登, 日本呼吸器学会雑誌 45巻11号 Page890-897(2007.11)
3. 結核菌の分子疫学, 松本智成, 結核 82巻4号 Page304(2007.04)
4. 結核菌の分子疫学, 松本智成, 呼吸器科 11巻4号 Page398-408(2007.04)

2. 学会発表

1. 当院受診歴のあるeXtensively Drug Resistant Tuberculosis(XDR-TB:高度多剤耐性結核)の状況, 松本智成, 阿野裕美, 山口統彦, 永井崇之, 田村嘉孝, 感染症学雑誌 81巻6号 Page767-768(2007.11)
2. IS6110-RFLPを用いた分子疫学解析に基づく、超多剤耐性結核(XDR-TB)の感染状況, 阿野裕美, 松本智成, 河原邦光, 高嶋哲也, 臨床化学 36巻Suppl.2 Page187(2007.10)
3. 当センターにおける人工呼吸管理を要した肺結核症例の臨床的検討, 久原華子, 山口徹, 田村嘉孝, 永井崇之, 松本智成, 高嶋哲也, 結核 82巻10号 Page802(2007.10)
4. 多剤耐性肺結核の治療成績, 永井崇之, 久原華子, 山口徹, 田村嘉孝, 松本智成, 高嶋哲也, 結核 82巻10号 Page801(2007.10)
5. 結核臨床におけるQFT-2GのPerformanceについて, 田村嘉孝, 山口徹, 久原華子, 永井崇之, 韓由紀, 松本智成, 高嶋哲也, 結核 82巻10号 Page801(2007.10)
6. 結核発症関節リウマチ患者における抗TNF- α 製剤治療, 松本智成, 山口統彦, 日本臨床免疫学会会誌 30巻4号 Page307(2007.08)
7. 肺結核を有する食道癌に対して同時に積極的に治療をおこなった2例, 平良高一, 田村嘉孝, 松本智成, 鈴木秀和, 福田晴之, 町田浩久, 富永和作, 渡辺俊男, 藤原靖弘, 荒川哲男, 日本癌治療学会誌 42巻2号 Page692(2007.09)
8. 抗酸菌感染症臨床と細菌学 同一患者から経時的に分離した結核菌株による、16VNTRとIS6110-RFLPの安定性の検討, 阿野裕美, 松本智成, 永井崇之,

- 田村嘉孝, 高嶋哲也, 感染症学雑誌 81巻4号 Page516-517(2007.07)
9. 感染症とサイトカイン レミケード投与により結核発症した関節リウマチ患者へのレミケード再投与(その後の経過), 松本智成, 山口統彦, 永井崇之, 田村嘉孝, 感染症学雑誌 81巻4号 Page508(2007.07)
 10. 膠原病の肺合併症 高蔓延地域大阪での膠原病治療中の結核患者50症例の検討, 山口統彦, 松本智成, 鳥羽宏和, アレルギー 56巻3-4 Page318(2007.04)
 11. QFT-2Gによる活動性結核補助診断の落とし穴, 松本智成, 久原華子, 山口徹, 田村嘉孝, 永井崇之, 高松勇, 土居悟, 阿野裕美, 河原邦光, 高嶋哲也, 結核 82巻6号 Page552(2007.06)
 12. 粟粒結核11症例におけるQFT-2Gの有用性の検討, 久原華子, 山口徹, 田村嘉孝, 永井崇之, 松本智成, 高嶋哲也, 結核 82巻6号 Page552(2007.06)
 13. 結核発症関節リウマチ患者に対するインフリキシマブ投与, 松本智成, 山口統彦, 史賢林, 日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集51回・16回 Page250(2007.04)
 14. 膠原病、関節リウマチ治療中の結核発症についての検討(続報), 山口統彦, 松本智成, 永井崇之, 田村嘉孝, 高嶋哲也, 石原英樹, 南俊行, 鳥羽弘和, 日本呼吸器学会雑誌 45巻増刊 Page198(2007.04)
 15. レミケード投与により結核発症した関節リウマチ患者へのレミケード再投与(その理論と実際)の経過, 松本智成, 山口統彦, 阿野裕美, 永井崇之, 田村嘉孝, 高嶋哲也, 結核 82巻4号 Page442(2007.04)
 16. 膠原病治療中に発症した結核感染症についての検討(後報), 山口統彦, 松本智成, 永井崇之, 田村嘉孝, 高嶋哲也, 鳥羽宏和, 結核 82巻4号 Page441(2007.04)
 17. 抗結核化学療法中の副作用の原因薬剤の特定について DLST検査の特異度についての検討, 山口統彦, 永井崇之, 田村嘉孝, 松本智成, 高嶋哲也, 鳥羽宏和, 結核 82巻4号 Page413(2007.04)
 18. 当院受診歴のあるeXtensively Drug Resistant Tuberculosis(XDR-TB:高度多剤耐性結核)の状況, 松本智成, 阿野裕美, 永井崇之, 田村嘉孝, 高嶋哲也, 西森敬, 結核 82巻4号 Page375(2007.04)
 19. 多剤耐性結核の伝播とINH耐性遺伝子変異(katGS315T)の関連性の検討, 阿野裕美, 松本智成, 永井崇之, 田村義孝, 吉多仁子, 高嶋哲也, 結核 82巻4号 Page374(2007.04)
 20. 同一患者から経時的に分離した結核菌株による、16VNTRとIS6110-RFLPの安

定性の検討, 阿野裕美, 松本智成, 永井崇之, 田村義孝, 高嶋哲也, 西森敬, 結核
82巻4号 Page369(2007.04)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

該当なし

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 准教授

研究要旨; ヒアルロン酸の存在下で結核菌の増殖が増強されること、その際に菌がヒアルロン酸を分解しC源として利用することを明らかにした。

のモニタリング

A 研究目的

ヒアルロン酸は、Nアセチルグルコサミンとグルクロン酸の直鎖状高分子多糖である。軟骨や細胞外マトリックスの主要成分であり、気道表面にも粘膜繊毛エレベーターに逆らって繫留されている。結核気道上の存在も推定されるが、結核の病態形成における役割はこれまで解析されることがなかった。

我々は、定常期以降の結核菌が大量に含有する蛋白質分子 mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) が結核菌の細胞壁にも存在し、宿主細胞表面のヒアルロン酸と結合することで、細胞(特に、II型肺胞上皮細胞)への菌の接着/侵入促すことを見いだした(Aoki K et al, J Biol Chem 2004)。ヒアルロン酸はグリコサミノグリカン(GAG)の一種であり、ヒアルロン酸以外にも肺にはヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸などのGAGが存在するが、我々のデータは結核菌がMDP1を介してヒアルロン酸を好んで接着することを示していた。なぜ、結核菌がヒアルロン酸を細胞接着/侵入の足がかりとするのか、今回、細胞感染後における菌の増殖に対するヒアルロン酸の作用や、結核病巣におけるヒアルロン酸合成酵素の発現とヒアルロン酸の産生についての解析を行ない、その理由を考察した。

B 研究方法

細胞培養、BCGの調整と感染、増殖

10%牛胎児血清含有RPMI1640培地にて5%炭酸ガス存在下37°CにてA549細胞の継代培養を行なった。ルシフェラーゼ発現組み換えBCG(J. Bacteriol 2007, vol 189, p8241-8249にて作成済み)は、カナマイシンを10 µg/ml含有する7H9-ADC培地で培養し、対数増殖期の菌をグリセロール15%溶液で-80°Cにて保存して使用前に融解し感染に使用した。A549細胞を 2×10^5 /ml/穴/24穴プレート(ファルコン社)に播種し、ルシフェラーゼを発現する組み換えBCGを 2×10^6 集落形成数(CFU)/mlの濃度で加え16時間37°Cで保温後、細胞外の菌を取り除きヒアルロン酸を様々な量(0, 1 µg, 10 µg, 100 µg/穴など)加え、経時的にトライトンX(最終0.5%)で処理して細胞を溶解させ、組み換えBCG由来のルシフェラーゼ活性を測定、もしくは菌液を段階希釈して7H11-OADC培地上にちょう菌し37°Cにて20-25日間培養後、生菌数を算定した。

C 源枯渴培地

7H9培地に食塩のみを加えた培地をC源枯渴培地とした。またC源枯渴培地にヒアルロン酸、グルコース、ヘパラン硫酸、ヘパリンをそれぞれ0.5 mg/mlになるように加えた培地を作成し菌の培養を行なった。

ヒアルロン酸合成酵素トランスフェクタント細胞

ヒト由来ヒアルロン酸合成酵素(HAS1、HAS2、HAS3)のトランスフ

エクトアント細胞およびコントロールの空ベクター(Mock)を導入した 3Y1 細胞を、10%不活化牛胎児血清、0.05 mM メルカプトエタノール、L-グルタミン酸、50U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン含有 D-MEM 培養液にて 5%炭酸ガス存在下 37°Cにて培養した。各トランスフェクタント細胞を 2.5x10⁵/well に播種し、A549 細胞と同様の系にて BCG を感染させ、感染後の菌の増殖をモニターした。

ヒアルロン酸合成酵素の転写解析

M. tuberculosis Erdman 株を BALB/c マウスにエアロゾル感染させ、経時的に肺を摘出し、肺組織由来 cDNA を作成後、ヒアルロン酸合成酵素の遺伝子発現を RT-PCR 法で解析した。DNA 増幅用プライマーは、シグマゲノミクス社に合成を依頼し購入した。PCR 法は、かい離反応 94°C で 1 分、結合反応 57°C で 1 分、伸長反応 72°C で 3 分の反応を 35 回繰り返した。

ベータアクチン

F5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC
R5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG

HAS1

F5'-GCTCTATGGGGCGTTCCTC
R5'-CACACATAAGTGGCAGGGTCC

HAS2

F5'-TGGAACACCGGAAAATGAAGAAG
R5'-GGACCGAGCCGTGTATTTAGTTGC

HAS3

F5'-CCATGAGGCGGGTGAAGGAGAG
R5'-ATGCGGCCACGGTAGAAAAGTTGT

ヒアルロン酸の組織染色

マウス肺組織切片をキシレンとエタノールに 5 分間浸漬後、TBS に 5 分間浸漬し、抗原賦活のためのトリプシン処理を行い、一部の標本に対しては HAase 処理を行った。標本上に 1%の BSA 溶液を加え室温にて 1 時間放置後に 2 µg/ml のビオチン標識ヒアルロン酸結合性蛋白質 HABP 溶液を加え 2 時間室温で反応させた。洗浄後、蛍光色素標識ストレプトア

ビジン溶液を加えて室温で 15 分間反応させた後、洗浄後脱色封入した。試料を乾燥後、光学顕微鏡にて観察した。

C. 研究成果

ヒアルロン酸は、A549 細胞に感染した BCG の増殖を増強する BCG を A549 細胞に感染後、ヒアルロン酸を加え、経時的に菌の発育をルシフェラーゼ活性にてモニターすると、ヒアルロン酸の濃度依存的な菌の増殖増強が観察された。次に、ヒアルロン酸による増殖増強効果が、細胞内増殖菌に対するものか、細胞外増殖菌に対するものかを明らかにするためゲンタマイシン処理を行った。細胞外の菌を殺傷するゲンタマイシンを加えることで、BCG の増殖やヒアルロン酸による増殖加速は、ほぼ完全に消失した。このことから、BCG は A549 細胞に感染後、細胞表面で増殖し、ヒアルロン酸は細胞外の菌の増殖を助長させることが判明した。

BCG はヒアルロン酸を C 源として増殖することができる ヒアルロン酸は多糖であることから、BCG がヒアルロン酸を C 源として利用することで増殖性を増す可能性について次に検討した。C 源を含まない 7H9 培地にヒト由来ヒアルロン酸を加え、経時的に BCG の増殖をモニターした結果、ヒアルロン酸の濃度依存的に BCG が増殖することが分かった。ヒアルロン酸以外の GAG、すなわちヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸についても同様の試験を行なった。その結果、BCG はヘパリンもしくはヘパラン硫酸入りの培地で増殖できず、コンドロイチン硫酸入りの培地では増殖できるが、ヒアルロン酸添加培地での増殖率に及ばないことから、BCG はヒアルロン酸を最も好んで C 源として利用することが判明した。

抗酸菌種特異的なヒアルロン酸の利用能 次に複数の抗酸菌について、ヒアルロン酸の利用能を検討した。ヒト型結核菌(H37Rv)、*Mycobacterium smegmatis*、*Mycobacterium avium* を C 源枯渇-ヒアルロン酸添加培地で増殖させた結果、結核菌のみが増殖した。この事実から一部の病原性抗酸菌がヒアルロン酸を C 源として利用できることが判明した。

BCG のヒアルロン酸分解酵素活性 ヒアルロン酸は高分子の繰り返し多糖であるため BCG が C 源として利用するには切断する必要があると考えられる。そこで BCG がヒアルロン酸分解酵素を有するかを次に検討した。BCG 抽出蛋白質とヒアルロン酸を混合後 37°C にて保温し、ヒアルロン酸を抽出後、ゲルにて展開した。その結果、ヒアルロン酸単独では加温しても分解は生じないが、BCG 抽出蛋白質の存在下で切断が生じることが判明し、BCG がヒアルロン酸分解酵素を有することが分かった。また既存のヒアルロン酸分解酵素の阻害物質を加えると BCG のヒアルロン酸分解酵素の活性が顕著に阻害されることも判明した。

ヒアルロン酸の分解は、BCG のヒアルロン酸依存的増殖に必須である 次にヒアルロン酸分解酵素の阻害物質が、ヒアルロン酸依存的な BCG の増殖に及ぼす影響について検討した。阻害物質は、通常の 7H9-ADC 培地 (C 源; グリセロールとツイーン 80) における BCG の増殖を抑制しないが、ヒアルロン酸を C 源とする培地において発育を顕著に抑制した。このことからヒアルロン酸分解が、ヒアルロン酸を C 源として増殖する際に必須であることを突き止めた。次にヒアルロン酸の分解を阻害することで、A549 細胞に感染した菌の増殖を抑制できるかを検討した。BCG を A549 細胞に感染させた後にヒアルロン酸を加えて増殖させる系

に阻害物質を加えると顕著に菌の増殖を抑制することが判明した。一方、ヒアルロン酸を加えない系においては阻害物質による作用は認められなかった。これらの結果から、A549 細胞に感染後のヒアルロン酸による増殖促進は、ヒアルロン酸を BCG が積極的に C 源として利用することによることが判明した。

BCG は HAS1 と HAS3 で合成されたヒアルロン酸を利用できる 上記の実験から BCG や結核菌が精製したヒアルロン酸を C 源として利用することが明らかとなった。次に我々は、宿主細胞が実際に産生するヒアルロン酸を利用できるか否かを検討した。ほ乳類は 3 種類のヒアルロン酸合成酵素を有しており、HAS1, HAS2, HAS3 と呼ばれる。それぞれの遺伝子を 3Y1 細胞に導入したトランスフェクタント細胞に BCG を感染させ、感染後の菌の増殖をモニターした。その結果、BCG は HAS1 のトランスフェクタント細胞で最も顕著に増殖し、次に HAS3 のトランスフェクタント細胞で増殖したが、HAS2 のトランスフェクタント細胞では Mock トランスフェクタント細胞感染時と同様に増殖しなかった。この結果から、BCG は HAS1 と HAS3 で合成されるヒアルロン酸を C 源として利用できるが、HAS2 によって合成されるヒアルロン酸を利用できないことが示唆された。

マウス肺におけるヒアルロン酸合成酵素の発現とヒアルロン酸の産生 最後に我々は、肺におけるヒアルロン酸合成酵素とヒアルロン酸の産生を検討した。結核菌 Erdman 株をエアロゾルにてマウスに感染させ経時的に RNA を抽出し、HAS1, HAS2, HAS3 それぞれの特異的なプライマーにて増幅して発現の有無を検討した。その結果、肺における主要なヒアルロン酸合成酵素は HAS1 で、結核菌の感染後その発現量はさらに増大するこ

とが判明した。実際のヒアルロン酸の産生と局在を、免疫組織学的手法により解析した。結核菌 Erdman 株の感染時、および感染後 21 日のマウス肺を摘出し、ビオチンにて標識したヒアルロン酸結合性蛋白質にて染色した。その結果、ヒアルロン酸は感染前の細気管支内腔や肺胞内腔に存在し、感染後は、病巣である肉芽腫に大量に蓄積することが判明した。これらの結果から、結核菌の感染部位や増殖部位にヒアルロン酸が存在することが明らかとなった。

D. 考 察

結核菌はマクロファージ以外にも II 型肺胞上皮細胞に接着／侵入することが明らかとなっていたが、我々は結核菌の A549 細胞への試験管内感染系において、菌がヒアルロン酸を介して細胞に接着／侵入することを見だし、結核領域において初めてヒアルロン酸の重要性を示した (J Biol Chem 2004)。今回更に解析を継続し、結核菌がヒアルロン酸を足がかりとする意義について検討した結果、結核菌や BCG などの一部の病原性抗酸菌がヒアルロン酸を C 源として利用し増殖することを発見した。また BCG はヒアルロン酸分解酵素を有し、それはヒアルロン酸を C 源として増殖する際に必須であることを明らかにした。

本報告は、一部の病原性抗酸菌がヒアルロン酸分解酵素を有すること示した最初の報告である。しかしながら結核菌ゲノムにヒアルロン酸分解酵素はアノテートされておらず、他菌種のヒアルロン酸分解酵素様遺伝子も検出できていない。したがって結核菌のヒアルロン酸分解酵素は新しいタイプの酵素である可能性が高い。

我々のデータは、BCG が利用しやすいのは HAS1 と HAS3 によって合成されたヒアルロン酸であることを示している。

HAS2 は細胞外マトリックスを形成するヒアルロン酸の合成酵素で、最も効率良く最も長いヒアルロン酸を合成する酵素である。BCG が HAS2 で合成されたヒアルロン酸を利用できにくい理由は不明だが、大量に合成された長鎖ヒアルロン酸が高次構造を形成し菌のヒアルロン酸分解酵素が切断できない、もしくは切断に時間を要するなどの可能性が考えられる。

一方、HAS1 や HAS3 は HAS2 に比べヒアルロン酸合成能に劣り、合成されるヒアルロン酸も短い。肺における主要なヒアルロン酸合成酵素が HAS1 であることから、結核菌はヒアルロン酸を効率良く利用し増殖に利用できることが示唆され、ヒアルロン酸は結核の増悪因子であることが示唆される。実際、我々は気道感染時にヒアルロン酸を菌と同時に投与すると定着を抑えるが、逆に BCG 感染後にヒアルロン酸を静注すると肺の生菌数が上昇することを見出している。HAS1 は免疫担当細胞などが発現するヒアルロン酸合成酵素である。肺や結核病態においてどのような細胞がヒアルロン酸を合成しているかは今後の検討課題である。

ヒアルロン酸は気道における感染防御に重要な役割を担うことが示されていたが、結核領域において、その役割は未解析であった。本研究で我々は、主に肺の病原体である結核菌が気道系のヒアルロン酸を利用し、己の生存／増殖に利用できることを示した。我々のデータはヒアルロン酸が結核病変に蓄積していることを示しており、ヒアルロン酸を C 源として利用できる菌に生存のアドバンテージがあることを示唆している。ヒアルロン酸分解酵素の阻害剤など、菌のヒアルロン酸代謝酵素は、結核菌の生体内増殖に強く関わると考えられ、それらの阻害剤は新たな薬剤標的となりうるであろう。そのため、ヒアルロン酸分解酵素や代謝酵素の同定が今後の重要課題と考えられる。

E. 結 論

本研究は、人型結核菌やウシ型結核菌弱毒株BCGがヒアルロン酸を分解してC源として利用し増殖することができることを示した。また、結核気道上にはヒアルロン酸が存在し、感染後の結核病巣(肉芽腫)にヒアルロン酸が蓄積することを明らかにした。これらの結果から、ヒアルロン酸が結核病態の形成において重要な役割を担っていることが判明した。

F. 研究発表

論文発表

原著論文

1. Tomoya Katsube, Sohkichi Matsumoto, Masaki Takatsuka, Megumi Okuyama, Yuriko Ozeki, Mariko Naito, Yukiko Nishiuchi, Nagatoshi Fujiwara, Mamiko Yoshimura, Takafumi Tsuboi, Motomi Torii, Nobuhide Oshitani, Tetsuo Arakawa, and Kazuo Kobayashi. Control of cell wall assembly by a histone-like protein in mycobacteria. *J Bacteriol.* 2007 189(22):8241-8249.
2. Jun-ichi Nishimura, Hiroyuki Saiga, Shintaro Sato, Megumi Okuyama, Hisako Kayama, Hirotaka Kuwata, Sohkichi Matsumoto, Toshiro Nishida, Yoshiki Sawa, Shizuo Akira, Yasunobu Yoshikai, Masahiro Yamamoto, Kiyoshi Takeda. Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *J Immunol*, in press.

総説

1. 松本 壮吉. 結核における特異性炎の形成メカニズムと結核対策研究の現在、医学のあゆみ、Vol 223 p611-614, 2007.

2. 松本 壮吉、尾関 百合子、小林 和夫. 結核菌の新規病原因子 MDP1 の感染病態への関わり、感染 炎症 免疫 Vol 37 p98-101, 2007.
3. 松本 壮吉、平山 幸雄、小林 和夫. 結核菌の潜伏感染と内因性再燃の分子機構、新感染症学、日本臨床 65 巻 増刊号 p 124-128、2007.

学会発表

1. 松本 壮吉、小林 和夫. 結核菌病原因子による病変形成と感染防御。結核、82:4. 第 82 回日本結核病学会 (大阪、6 月)。
2. 仁木 誠、吉村 満美子、和田 崇之、小林 和夫、松本 壮吉. 抗酸菌の蛋白質発現と薬剤抵抗性における MDP1 の役割。結核、82:4. 第 82 回日本結核病学会 (大阪、6 月)。
3. 尾関 百合子、小林 和夫、松本 壮吉. BCG 感染時における Th1/Th2 バランスへの STAT6 の役割。結核、82:4、第 82 回日本結核病学会 (大阪、6 月)。
4. 平山 幸雄、吉村 満美子、尾関 百合子、菅原 勇、青木 俊明、和田 崇之、西内 由紀子、小林 和夫、松本 壮吉. ヒアルロン酸の抗酸菌増殖に対する作用。結核、82:4、第 82 回日本結核病学会 (大阪、6 月)。
5. 松本 壮吉、尾関 百合子、西内 由紀子、藤原 永年、吉村 満美子、和田 崇之、小林 和夫. 結核菌糖脂質の合成制御における mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) の役割。結核、82:4、第 82 回日本結核病学会 (大阪、6 月)。
6. 藤原 永年、前田 伸司、矢野 郁也、松本 壮吉、小林 和夫. ミコール酸分子の構造修飾と宿主応答。結核、82:4、第 82 回日本結核病学会 (大阪、6 月)。
7. 平山 幸雄、吉村 満美子、尾関 百合子、菅原 勇、青木 俊明、和田 崇之、西内 由紀子、小林 和夫、松本 壮吉

吉。抗酸菌の増殖に対するヒアルロン酸の作用。日本細菌学会雑誌、62:1、2007。第80回日本細菌学会総会（大阪、3月）。

8. 松本 壮吉、尾関 百合子、西内 由紀子、藤原 永年、吉村 満美子、和田 崇之、小林 和夫。結核菌の細胞壁合成における mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)の役割。日本細菌学会雑誌、62:1、2007。第80回日本細菌学会総会（大阪、3月）。
9. 西内 由紀子、松本 壮吉、鈴木 定彦。家庭浴室の *Mycobacterium avium* complex の検出—培養法、PCR法およびLAMP法の比較—。日本細菌学会雑誌、62:1、2007。第80回日本細菌学会総会（大阪、3月）。
10. 奥山めぐみ、川崎 昌則、松本 真、小林 和夫、松本 壮吉。新規抗結核薬 OPC-67683 の抗菌活性に関わる分子同定の試み。日本細菌学会雑誌、62:1、2007。第80回日本細菌学会総会（大阪、3月）。
11. 尾関 百合子、小林 和夫、松本 壮吉。BCG感染におけるSTAT6の役割。日本細菌学会雑誌、62:1、2007。第80回日本細菌学会総会（大阪、3月）。
12. Nishimura Junichi, Saiga Hiroyuki, Matsumoto Sohkiichi, Kuwata Hirotaka, Yoshikai Yasunobu, Yamamoto Masahiro, Kiyoshi Takeda. Critical role of mouse secretory leukocyte protease inhibitor in mycobacterial infection. 日本免疫学会雑誌37刊、第37回日本免疫学会総会（横浜、11月）。

G. 知的所有権の取得状況

5 特許取得

なし

ú 実用新案登録 なし

á 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

抗酸菌脂質に対する遅延型アレルギー応答に関する研究

分担研究者 杉田 昌彦

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究要旨

抗酸菌細胞壁には、抗酸菌に固有の脂質、糖脂質群が存在し、その多くは菌の生存や病原性を規定している。近年、これらの脂質、糖脂質を認識する宿主免疫経路の存在が明らかとなり、それを利用した診断法や感染制御法が模索されている。タンパク質抗原に対する顕著な遅延型アレルギー応答は抗酸菌感染症の特徴であり、臨床的にも重要である。本研究では、抗酸菌脂質に対する遅延型アレルギーの存在とその実態の解明を目指し、主として抗酸菌感染モデル動物を用いた研究を展開した。その結果、抗酸菌細胞壁糖脂質であるトレハロースジミコール酸が抗酸球の浸潤を特徴とした新しいタイプの遅延型アレルギー応答を惹起することを明らかにした。この応答は感染病態や宿主防御に深く関わると考えられ、今後抗酸菌感染の診断法や制御法の確立に向けた研究展開が期待される。

A. 研究目的

結核菌などの抗酸菌感染に伴い、タンパク質抗原に対するTh1優位のT細胞応答が惹起されることはよく知られた事実である。この応答の一部は、特異抗原の再チャレンジにより遅延型アレルギー応答として検出することが可能であり、臨床的にはツベルクリン反応として結核の診断や免疫病態の把握に活用されている。

一方、最近の研究から、抗酸菌脂質に特異的なT細胞応答を誘導する新しい抗原提示システムの存在が明らかとなってきた。樹状細胞や活性化マクロファージに発現したヒトグループ1CD1分子(CD1a、CD1b、CD1c)は、ミコール酸やリポアラビノマンナンなど結核菌の主要な細胞壁脂質を結合し、それらを特異的に認識するT細胞群を活性化する。これらのT細胞は、結核菌感染細胞の排除に働くことから、防御免疫を担う重要なコンポーネントであると考えられている。

しかし、これらの抗酸菌脂質を標的とした遅延型アレルギー応答の存在や実態は未だ不明である。脂質が抗酸菌の生存や病原性を規定する重要なファクターであることを考え合わせると、抗酸菌脂質特異的遅延型アレルギー応答の実証は、これまでにはない新しい診断法や感染制御法の確立へと結実する可能性を有している。そこで本研究では、*Mycobacterium avium* complex (MAC)感染やBCG接種によって個体内に誘起される脂質特異的遅延型アレルギー応答の検証を行った。免疫実験に有用なマウスやラットは、ヒトグループ1CD1に相当する分子を欠如しているため、本研究では主としてモデル動物を用いて解析を展開した。

B. 研究方法

モデル動物は、4週齢から5週齢のメスストレイン2を用いた。MAC serovar 4株あるいはBCG Tokyo172株 1×10^8 cfu

を後肢皮内に接種し、6週後に側腹部皮内に種々の脂質を投与して2日後の皮膚反応を評価した。すべての動物実験プロトコールは、当該施設の動物委員会の承認を得たのち実施された。

脂質標品の精製については、定法に従って行った。MAC菌体よりクロロホルム・メタノールを用いて総脂質を抽出し、さらにシリカカラムに結合させた後、クロロホルム、アセトン、メタノールを用いて段階的に溶出し、それぞれクロロホルム分画（主として中性脂質を含有する）、アセトン分画（主として糖脂質を含有する）およびメタノール分画（主として極性の高い脂質群を含有する）を得た。さらにアセトン分画に含まれる主要な糖脂質として、トレハロースジミコール酸（TDM）、グルコースモノミコール酸（GMM）、グリコペプチドリピド（GPL）を精製した。

皮膚応答の評価は、硬結径の測定、組織所見ならびに皮膚局所より得たRNAを用いたRT-PCRによりサイトカインのメッセージを検出することにより行った。また感染モルモットより脾臓を採取し、抗原刺激に対する応答をRT-PCRを用いて検証した。

C. 研究結果

MAC感染モルモット皮内にMAC由来の総脂質を接種すると、即時型応答は見られなかったが、2日後に皮膚の硬結を伴う顕著な炎症反応が観察された。この反応は非感染モルモットでは見られないことから、先行感染を必要とする遅延型アレルギー応答と符号するものであった。総脂質をクロロホルム分画、アセトン分画、メタノール分画に分け、それぞれの活性を検証したところ、アセトン分画に強い活性が認められた。このことから、この炎症反応を惹起する物質は糖脂質である可能性が高くなった。そこでアセトン分画の主要糖脂質であるTDM、GMM、GPLを精製し、感染モルモットを用いて活性を

検証したところ、TDM（図1）においてのみ顕著な皮膚反応が認められた。同様の応答はBCG接種モルモットにBCG由来TDMを皮内投与した場合にも再現されたことから、抗酸菌感染に共通の宿主応答と考えられた。

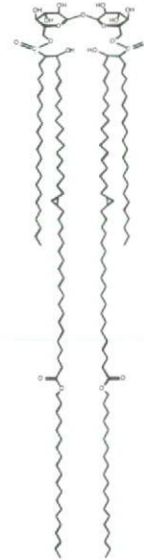


図1 TDMの構造

ツベルクリン反応に代表されるタンパク質特異的遅延型アレルギー応答はTh1タイプのT細胞やマクロファージなど単核球の浸潤を特徴とする。一方、TDMによって誘起される遅延型アレルギー応答の組織学的な解析を行ったところ、多型核白血球の顕著な浸潤を認めた。この多型核白血球の多くはギムザ染色で赤染する細胞内顆粒を有し、顆粒内には典型的なcrystalloid structureが認められたことから抗酸球であることが判った。これと符号して、感染モルモットのTDM接種皮膚局所では、抗酸球の動員ならびに活性化に働くサイトカインであるTNF- α とIL-5のメッセージが特異的に上昇していることが確認された。また感染モルモット由来脾臓T細胞をTDMで刺激するとIL-5の特異的な発現が検出さ

れた。この応答は、抗モルモット CD1 抗体により阻害を受けなかったことから、CD1 非依存的経路の存在が示唆された。

D. 考察

抗酸菌感染に伴い、TDM などの脂質を標的とした遅延型アレルギー応答が誘起されることが明らかとなった。この応答は抗酸球の浸潤を主体とする点、タンパク質抗原を標的とした古典的遅延型アレルギー応答とは質的に異なることから、私たちは eosinophilic delayed-type hypersensitivity と呼称することを提唱している。

これまで抗酸菌感染に伴う病態形成には Th1 応答を主体とした T 細胞やマクロファージの活性化が重要とされてきた。しかし、TDM が抗酸菌細胞壁の主要な脂質成分であること、また結核菌感染局所において抗酸球の浸潤が認められることを考えると、本研究で明らかとなった TDM に対する遅延型アレルギー応答が、病態形成に深く関わっている可能性が示唆される。さらに抗酸球細胞質顆粒に含まれるペルオキシダーゼは抗酸菌に対して殺菌的に働く報告を考えると、感染防御の一翼を担っている可能性も考えられる。TDM を特異的に認識して IL-5 を産生する T 細胞サブセット群の同定とその活性化を指標とした診断法の確立、ならびにこのサブセットを活性化するワクチン開発が今後の課題となろう。

E. 結論

本研究により、抗酸菌感染に伴い脂質特異的に誘起される新しい遅延型アレルギー応答の存在が実証された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sugita M, Barral DC, Brenner MB. Pathways of

CD1 and lipid antigen delivery, trafficking, processing, loading and presentation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 314: 143-164, 2007.

Matsunaga I, Sugita M. Lipid-specific immune responses against tuberculosis: from basic science to medical applications. *Curr. Immunol. Rev.* 3: 145-150, 2007.

2. 学会発表

大塚篤司、松永勇、小森崇矢、富田和沙、戸田好信、真鍋俊明、宮地良樹、杉田昌彦：Eosinophilic DTH: 脂質を標的とした新しい皮膚免疫応答 第 33 回免疫カンファレンス (京都市) 2007 年 11 月 17 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Mycobacterium bovis BCG の亜株の自然免疫誘導活性と生化学的特徴の解析

分担研究者 瀧井猛将 名古屋市立大学 大学院薬学研究科

研究要旨 BCG 亜株間の自然免疫誘導活性の差異について検討するために、各 BCG 亜株感染宿主細胞からの各種サイトカインを測定したところ、BCG 初期分与株に IL-8 産生誘導活性が認められた。Pasture 株に IL-1 β に誘導活性がみられた。これら、ケモカインや炎症性サイトカインの早期誘導活性は、BCG の副作用と関係していることが示唆された。BCG 亜株の中で、Pasture 研究所からの初期分与された株はナイアシン試験の陽性の形質を良く保存していた。この形質は結核菌と共通していることから、宿主細胞での生存に関与、BCG の生着能との関連が示唆された。

分担研究者氏名 瀧井猛将
所属機関名 名古屋市立大学大学院薬学研究科
職名 講師

A. 研究目的

現在使用されている結核予防ワクチン BCG (bacille Calmette-Guérin) は現在実用化されている唯一のワクチンであり、BCG はフランスの医師 Calmette と獣医 Guérin が *Mycobacterium bovis* (ウシ型結核菌) を 13 年間 231 代にわたって継代培養し、1921 年に完成された弱毒化生ワクチンである。わが国への導入は、志賀潔が 1925 年にパスツール研究所より持ち帰ったものとされる。1937 年にその安全性と有効性が国内で確認され、1942 年から集団接種が行われるようになった。1943 年からは凍結乾燥が試みられるようになり、1950 年から BCG-Tokyo として凍結乾燥ワクチンが用いられた。

現在は世界各国で導入され、年間約 1 億人に投与されている BCG の原株はパスツール研究所由来であるが、世界各国に広まり継代されていく間に、やや異なる性質が固定されていったと考えられている。BCG は変異を起こしやすく、Calmette と Guérin が継代培養を開始してわずか 15 代目にはコロニー形態の異なる変異株が得られ、その株の仔ウシやモルモットに対する病原性は低下していたと言われている。継代による菌の変異をできるだけ少なくするため、現在は菌体の凍結乾燥によるシードロット制が取り入れられ、常に一定の性質を持った「BCG ワクチン」を提供できるシステムとなっている。現在世界では日本の Tokyo-172 の他、Glaxo、Copenhagen、Pasteur が主なシードとしてワクチン製造に使われているが、それらの細菌学的・免疫学的性質は異なることが知られている。また、近年の分子生物学の進歩によって、これら BCG 亜株間の差異が遺伝子レベルで明らかとなり、1998 年に *M. tuberculosis* H₃₇Rv 株の全ゲノム配列が明らかにされた。この配列を基準として *M. bovis* や

BCG を DNA マイクロアレイ法で調べたところ、少なくとも 11 の領域が *M. bovis* には見られず、さらに *M. bovis* には見られる 5 つの領域が、大半の BCG では欠失していることが 1999 年に報告された (Figure 1)。

BCG ワクチンは、小児の結核性髄膜炎や粟粒結核などの発病・重症化を極めて有効に阻止するが、成人の結核に対する評価は不定で、有効性は 50% 程度、免疫持続期間は 10~15 年と言われており、現在 BCG の成人肺結核に対する有効性は疑問視されている。しかし、高い安全性が示され、唯一の結核予防ワクチンである BCG はこれからも継続して投与されていくことが予想される。より効果的に BCG ワクチンを利用するためには、各国の BCG 亜株を同一条件で再評価することが必要である。

そこで本研究では、現在ワクチンとして使用されている BCG 亜株の自然免疫系に対する作用と、生化学的な性状について比較検討を行った。

B. 研究方法

菌株: *Mycobacterium bovis* BCG 亜株 (Australia ATCC 35739、Connaught ATCC 35745、Danish ATCC 35733、Glaxo ATCC 35741、Mexico ATCC 35738、Moatral ATCC 35735、Pasteur ATCC 35734、Phipps ATCC 35744、Russia ATCC 35740、Tice ATCC 35743)、Australia vaccine seed、Sweden 株は国立感染症研究所の山本三郎博士より供与された。*Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 25618、Colorado State University より供与された。*Mycobacterium bovis*、*M. bovis* BCG Brazil、*Mycobacterium smegmatis* は結核研究所より供与された。各菌株は Middlebrook 7H9 Broth/0.25 % Tween 80/10% ADC 培地にて培養した。

Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA 法) による培養上清中のサイトカインタンパクの測定: ヒト肺胞上皮細胞株 A549、ヒト単球系培養細胞株 U937 に BCG を Multiplicity of infection(MOI)=10 で感染させ、72 時間後に培養上

清を回収し、ろ過滅菌後 Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) 法で測定した。ヒト探求系細胞株 U937 に BCG を MOI=10 で感染させ、140 時間後に培養上清を回収し、ろ過滅菌を行い ELISA 法で測定を行った。1×10⁵ cells/well の A549 細胞を 24 Well プレートにまき、37 °C、24 時間培養後、MOI=10 相当の菌を含む DMEM(+ Penicillin、5 % FBS) を細胞に加え、37 °C で培養した。12、24、48、72 時間後の培養上清を回収し、ろ過滅菌を行い ELISA 法で測定した。Human IL-6 ELISA Set (BD Biosciences)、Human IL-8 ELISA Set (BD Biosciences)、Human TNF- α ELISA Set (BD Biosciences)、Human IL-1 β ELISA Set (BD Biosciences)、Human IP-10 ELISA Set (BD Biosciences) を使用し、使用法は添付の方法に従って行った。

硝酸塩還元試験：小川培地で培養した各 BCG 亜株に基質液を加え、37 °C 水浴でインキュベートした後、1/2 HCl.Sol、20 % Sulfanyl Amide、0.1 % *N*-Naphthyl Ethylene Diamine を加え、液の色調が桃色に変化することを観察した。

鉄イオン取り込み試験：小川培地 2 本ずつに、各 BCG 亜株の微菌濁液を接種した。うち 1 本の培地には、ろ過で滅菌した 20 % クエン酸鉄アンモニウム水溶液を加えた。3 週間培養した後、コロニーの色の違いを観察した。

ナイアシン試験：小川培地で培養し十分な菌量がある培地上に熱した超純水を注ぎ、培地表面が水平にした状態で 15~30 分静置し、ナイアシンの抽出を行った。抽出液を密栓可能な小試験管に移し、ナイアシン検出用試験紙を入れ、直ちに密栓し、試験紙の上端まで自然に吸水させた。15 分間反応させた後、陽性コントロール液と抽出液の色調とを比較した。

(倫理面への配慮) 当該研究は全て商品として販売されているものであり倫理面への配慮は不要。

C. 研究結果

1) 感染宿主細胞からのサイトカイン産生能の比較

BCG 亜株感染 A549 細胞からの IL-6、IP-10、および TNF α の産生量は亜株間にあまり差が見られなかった。一方 IL-8 産生量は Connaught 株ではその 2.5 倍(約 1,000 pg/ml)、Tokyo 株、および Moreau 株では 3 倍程度(約 1,300 pg/ml)の IL-8 産生誘導がみられた。また、IL-1 β 産生量は Pasteur 株(約 100 pg/ml)、Tokyo 株(約 75 pg/ml)、および Moreau 株(約 60 pg/ml)で産生量が高かった。BCG 感染 U937 細胞でも類似した結果が得られた。

2) 生化学試験

BCG 亜株間で生化学的性質に違いがみられるのか検討するため、硝酸塩還元試験、鉄イオン取り込み試験、およびナイアシン試験を行った。硝酸塩還元試験において、BCG-Phipps を除くすべての BCG 株で陰性であった。しかし、BCG-Phipps

に関しては時間が経つと桃色が濃くなった。このため、BCG-Phipps は他の BCG 亜株と比較して、硝酸を亜硝酸に還元する酵素の発現が上昇しているのではないかと考えられる。

鉄イオン取り込み試験ではすべての BCG 株は陰性であり、BCG 亜株間において鉄イオンの取り込みに差異はみられなかった。本試験は *M. bovis* では陰性とされているので、BCG に関する結果も妥当であると思われる。

本研究では、BCG 亜株間でナイアシン試験を行った。BCG 株によってナイアシン蓄積量に違いがあることが示された。ヒト型結核菌のほとんど全てがナイアシン試験陽性になるが、ウシ型、およびトリ型抗酸菌はナイアシンを代謝分解するため、ほぼ全てが陰性となるとされている。しかし、BCG-Tokyo については弱陽性を示すとの報告がある。今回の結果では Tokyo 株以外にも陽性となる株があることがわかった。Russia 株、Tokyo 株、Sweden 株、Birkhaug 株など比較的早い段階で分与された BCG 株が陽性になる傾向にあった。一方で、分与の遅い BCG 株すなわち RD2 が欠失している株では陰性となる傾向にあった。後期に分与された RD2 欠失株である Australia 株、Connaught 株は陽性を示した。陽性株と陰性株とで何か性質に違いがあるかどうかは不明であるが、代謝系等で RD2 の有無が関係している可能性も考えられる。

D. 考察

IL-8 については初期分与株の方が高い傾向が見られた。IL-1 β については Pasture 株が強い誘導活性がみられた。本結果は、BCG の副作用と関連している可能性が示唆されるとともに、アジュバント活性とも関係していることが示唆される。現段階では特定の BCG 亜株が最も優れていると評価することはできないが、炎症性メディエーターの誘導能、生化学的性質とも BCG 亜株によって違いがみられることがわかった。特に、RD2 欠損、もしくは *mma3* 変異が入る前の初期分与株(Russia 株、Moreau 株、Tokyo 株)は、類似した性質を有することがわかった。本研究でみられた BCG 亜株間の性質の違いが、野外調査での BCG ワクチン有効性のばらつきと関係しているのかは不明である。ワクチンは医薬品であり、Good Manufacturing Practice(GMP)の観点からも物理学的な安定性と、生物学的な力価に対する安定性について詳しく検討する必要があることが明らかとなった。今後、マウスなどの実験動物を用いて、初期分与株と後期分与株の *in vivo* での性質(生着能、獲得免疫誘導能)や感染防御能を比較し、*in vitro*、*in vivo* での BCG 亜株間の特徴の違いについて検討を行うことが大切である。

E. 結論

本研究の結果、サイトカイン誘導活性の強さ、ナイ

アシシ試験の結果と BCG 亜株の遺伝背景との間に相関関係があることが示唆された。特に RD2 に欠損がある株と無い株での違いがみられたことから、RD2 にコードされている遺伝子との関係が示唆された。ナイアシシ試験陽性の性質は結核菌にも保存されている。本研究の成果は BCG 亜株間で副作用や宿主への生着能に差があることを示しており、今後のワクチン行政に貢献できる知見である。

F. 健康危険情報

本研究の遂行に当たり健康被害報告等の危険情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chiba, T., Takii, T., Nishimura, K., Yamamoto, Y., Morikawa, H., Abe, C., and Kikuo Onozaki:
Synthesis of new sugar derivatives from *Stachys sieboldi* Miq and antibacterial evaluation against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, and *Staphylococcus aureus*.
Bioorg. Med. Chem. Lett., 17(9), 2487-91 (2007).
- 2) Itoh, Y., Hayashi, H., Xu, J., Takii, T., Miyazawa, K., Ariga, H., Akahoshi, T., Waguri-Nagaya, Y., Otsuka, T., Okamoto, T., and K. Onozaki:
Dihydrotestosterone inhibits tumor necrosis factor α induced interleukin-1 α mRNA expression in rheumatoid fibroblast-like synovial cells.
Biol. Pharm. Bull., 30(6), 1140-1143 (2007).
- 3) Enya K, Hayashi H, Takii T, Ohoka N, Kanata S, Okamoto T, and K Onozaki:
The interaction with Sp1 and reduction in the activity of histone deacetylase 1 are critical for the constitutive gene expression of IL-1 α in human melanoma cells.
J. Leukoc. Biol. 83(1):190-199(2008).

2. 学会発表

1) 瀧井猛将、山本三郎、矢野郁也

Mycobacterium bovis BCG 亜株間のミコール酸組成と一酸化窒素 NO 産生誘導能に関する研究

第 80 回日本細菌学会総会。
2007 年 3 月 26 日 (大阪)

- 2) Takemasa Takii, Daisuke Hayashi, Maki Kondo, Keita Kanai, Ayako Fujiwara, Saburo Yamamoto, Yukiko Fujita, Ikuya Yano and Kikuo Onozaki
Analysis of subsets of mycolic acids among *Mycobacterium bovis* BCG (bacilli Calmette-Guérin) strains and their nitric oxide inducing activity from human lung epithelial cell line

Keystone Symposia, Tuberculosis: From Lab Research to Field Trials

2007 年 3 月 20-25 日 (バンクーバー、カナダ)

- 3) 瀧井猛将、林 大介、藤原綾希子、森川裕子、矢野郁也、山本三郎、千葉 拓、小野寄菊夫

Mycobacterium bovis BCG 亜株間の遺伝背景からみた生化学的、生物学的差異の検討

日本薬学会第 127 年会。

2007 年 3 月 28 日 (富山)

- 4) 伊藤 司、林 大介、瀧井猛将、二田真由美、堀田康弘、飯塚成志、岡田全司、大岡静衣、野本明男、吉田栄人、小野寄菊夫

結核菌抗原を安定発現するポリオウイルスワクチンベクターの開発

第 19 回微生物シンポジウム。

2007 年 9 月 7 日 (東京)

- 5) Takemasa Takii, Daisuke Hayashi, Tsukasa Itoh, Mayumi Mita, Yasuhiro Horita, Masaji Okada, Akio Nomoto, Seii Ohka, Narushi Iizuka, Shigeto Yoshida, and Kikuo Onozaki

Expression of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in poliovirus vector

China-Japan-US tuberculosis seminar and

US-Japan cooperative medical science program, 42th tuberculosis and leprosy research conference.

2007 年 9 月 11-14 日 (鄭州、中国)

- 6) Takemasa Takii, Daisuke Hayashi, Maki Kondo, Keita Kanai, Akiko Fujiwara, Saburo Yamamoto, Yukiko Fujita, Ikuya Yano and Kikuo Onozaki

Comparative study of biochemical characters with immunostimulatory activities among *Mycobacterium bovis* BCG strains

Keystone Symposia, Challenges of Global Vaccine Development 2007 年 10 月 8-13 日 (ケープタウン、南アフリカ)

- 7) 中條里美、砂原良平、伊藤友香、瀧井猛将、林 秀敏、早川和一、小野寄菊夫

タバコと関節リウマチに関する研究

フォーラム 2007 : 衛生薬学・環境トキシコロジー。2007 年 11 月 1,2 日 (大阪)

- 8) 林 大介、瀧井猛将、山本三郎、矢野郁也、小野寄菊夫

Evaluation of *Mycobacterium bovis* BCG strains by assessment of the susceptibility of the strains to NO.

第 37 回日本免疫学会総会。

2007 年 11 月 22 日 (東京)

- 9) 金田伸弥、塩谷和明、大岡伸通、瀧井猛将、林 秀敏、岡本 尚、小野寄菊夫

メラノーマ細胞からの構成的インターロイキン 1 α 産生における HDAC1 の関与

平成 19 年度日本薬学会東海支部例会。

2007 年 12 月 8 日 (岐阜)

H. 知的財産権の出願・登録状況 1. 特許取得
特許出願中：結核菌に抗菌活性を示す N-アシル
-D-ヘキソサミニルジアルキルジチオカーバメ
イト誘導