

ーとして有効であることが示された。中国東北部においては、何らかの薬剤耐性を持つ結核菌が半数を占めていたことから、同地においては、不完全な治療による結核菌の薬剤耐性獲得が進んでいることが示唆された。タイとの共同研究によって、TBGLとKL-6の高い症例を得た。X線全肺野にpatchyなconsolidationが無数あり、その他に薄い間質影と小結節影多数認められた。左肺に胸水もあり、結核のdisseminationを強く疑わせた。しかし、他の感染症や、心不全もないとは言えないことから断定はできない。CTでは、脳室の拡大があり、実質は、後頭葉に大きなlowがあるようにも見えるが、造影効果なく感染所見かどうか不明である。脳室が拡大していることから、結核性髄膜炎の可能性がある。

#### E. 結論

国内外の研究ネットワークを活用して、薬剤耐性結核の検出と抗TBGL抗体と病態の関連に関する解析を行った。共同研究を行う施設により得られる情報が限られていたが、細菌学的検索（ハルピン医科大学）と病態学的検索（タイ国立子供病院）の双方を行うことができ、有用な情報が得られた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ashino Y, Guio H, Iwamoto A, Yano I, Matsumura T, and Hattori T. Serological response against MAC glycolipid antigens in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Microbiology and Immunology*, (in press).
2. Mizusawa M, Kawamura M, Takamori, M Kashiyama T Fujita A, Usuzawa M, Saitoh H, Ashino Y, Yano I, Hattori T. Increased synthesis of anti-TBGL IgG and IgA with cavity formation in pulmonary tuberculosis. *Clinical Vaccine and Immunology*. (in press)
3. Shishido Y, Mitarai S, Otomo K, Seki M, Sato A, Yano I, Koyama A, Hattori T. Anti-tuberculosis drug susceptibility testing of Mycobacterium bovis BCG. *Int J Tuberc Lung Dis*. 11(12): 1334-8,2007
4. Inoue Y, Tanaka N, Tanaka Y, Inoue S, Morita K, Zhuang M, Hattori T, Sugamura, K. Clathrin-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into target cells expressing ACE2 with the cytoplasmic tail deleted. *J. Virol*. 2007. Aug;81(16):8722-9.
5. Zhang J, Yamada O, Kawagishi K, Yoshida H, Arakia H, Yamaoka S, Hattori T, and Shimotohno K. Up-regulation of hepatitis C virus replication by human T-cell leukemia virus type I-encoded Tax protein. *Virology*, 369(1): 198-205,2007
6. Zhang J, Hattori T. Small RNA Molecules as Therapeutic Gents for Viral Infectious Diseases, *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2: 103-113,2007
7. Usami O, Ashino Y, Komaki Y, Tomaki M, Irokawa T, Tamada T, Hayashida T, Teruya K, Hattori T. Efavirenz-induced neurological symptoms in rare homozygote CYP2B6 \*2/\*2 (C64T). *Int. J. STD AIDS*. 2007 Aug;18(8):575-6.
8. Tamada T, Nara M, Tomaki M, Ashino J, Hattori T. Secondary bronchiolitis obliterans organizing pneumonia in a patient with carbamazepine-induced hypogammaglobulinemia. *Thorax*, Jan. 62: 100,2007
9. Tomaki M, Sugiura H, Koarai A, Komaki Y, Akita T, Matsumoto T, Nakanishi A, Ogawa H, Hattori T, Ichinose M. Decreased expression of antioxidant enzymes and increased expression of chemokines in COPD lung. *pulmonary pharmacology & Therapeutics*. 20: 596-605,2007
10. Guio, H.; Okayama, H.; Ashino, Y.; Saitoh, H.; Xiao, P.; Miki, M., Yoshijara, N., Nakanowatari, S., Hattori, T. Method for efficient storing and transport of sputum specimens for molecular testing of tuberculosis *The Int J Tb Lung Dis*. 2006, 10:906-10.
11. Nara M, Sano K, Ogawa H, Tamada T, Nagaoka M, Okada K, Watanabe M, Moriya T, Miki H, Nakata K, Ichinose M, Hattori T. Serum Antibody Against Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor and KL-6 in Idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Tohoku J Exp Med*. 2006, Apr;208(4):349-54.
12. Case Report O. Usami, M. Nara, T. Tamada, T. Kitamuro, M. Tomaki, Y. Ashino, K. Onodera, S. Miyazaki, T. Moriya and T. Hattori. Systemic Sarcoidosis Associated with Double Cancers of the Esophagus and Stomach. *Internal*

- Medicine, Vol.46 (2007) , No. 24.
13. 服部俊夫、巽浩一郎、岩垣博己、佐久間光江. ウイルス感染とバイオディフェンス. *Mebio*. 24: 16-21,2007
  14. Usami, O., Xiao, P., Hong Ling, H. and Hattori, T. Competitive Study of Monoclonal Antibodies Against the HIV-1 Gp41 Core Structure. *Microbiology and Immunology*. 50: 131-134, 2006.
  15. Di Li1, Hong-Xi Gu1, Shu-Yun Zhang2, Zhao-Hua Zhong1, Min Zhuang1, Toshio Hattori3. YMDD mutations and genotypes of HBV in Northern China. *J J Infectious Diseases*. 59: 42-45, 2006.
  16. 服部 俊夫: Method for efficient storing and transport of sputum specimens for molecular testing of tuberculosis. *The Int. J. Tb Lung Dis*. 10:906-910,2006.
  17. 芦野 有悟, 服部 俊夫. 補中益気湯のリンパ球活性化作用と臨床症状の軽快を観察した難治性非定型抗酸菌症患者の1例. *治療学*. 40(4): 117(465)-120(468),2006.
  18. 服部 俊夫, 芦野 有悟, 宇佐美 修, 古田 里佳. HIVの感染と増殖のメカニズム. *診断と治療*. 94(12): 24-29,2006.
  19. Usami O, Xiao P, Ling H, Lui Y, Naksone T, and Hattori T. Properties of anti- gp41 core structure antibodies, which compete with sera of HIV-1 infected patients. *Microbes and Infection*. 4: 650-7, 2005.
  20. Komaki Y, Sugiura H, Koarai A, Tomaki M, Ogawa H, Akita T, Hattori T, Ichinose M. Cytokine-mediated xanthine oxidase upregulation in chronic obstructive pulmonary disease's airways. *Pulm Pharmacol Ther*. 18(4): 297-302,2005.
  21. Nishimaki K, Nawata J, Okada S, Hattori T, Ohno I. Neutrophil survival-enhancing activity in sputum from patients with diffuse panbronchiolitis. *Respir Med*. 99: 910-917,2005.
  22. Ashino J, Ashino Y, Guio H, Saitoh H, Mizusawa M, and Hattori T. Low antibody response against tuberculous glycolipid (TBGL) in elderly gastrectomized tuberculosis patients. Low antibody response against tuberculous glycolipid (TBGL) in elderly gastrectomized tuberculosis patients. 9: 1052-3,2005.
  23. Zhou Haizhou, Li Yan, Ling Hong, Liu Yangcheng, Huang Bingcheng, Toshio Hattori. Cloning and analysis of HIV-1 envelope CHNHLJ03009 isolated from an infected individual in Heilongjiang province. *J Microbiol Immunol*. 3(4): 254-259,2005.
  24. 奈良 正之, 長岡 深雪, 玉田 勉, 田村 弦, 服部 俊夫. 気道平滑筋のイオンチャネル. *Asthma Frontier*. 4: 38-47,2005.
  25. 西巻 雄司, 服部 俊夫. ステロイド療法と副作用としての感染症. *総合臨牀*. 54(7): 2059-2064,2005.
  26. 服部 俊夫. S A R Sを含む新興感染症. *日本内科学会雑誌*. 94(9): 211-216,2005.
  27. Nara M, Sasamori K, Shimura S, Ogawa H, Ishigaki-Suzuki S, Nagaoka M, Tamada T, Ichinose M, Tamura G, Hattori T. Long-term use of corticosteroid eye drops delays the spontaneous remission of pulmonary sarcoidosis. *Tohoku J Exp Med*. 202(4): 275-82,2004.
  28. Ling H, Xiao P, Usami O and Hattori T. Thrombin activates envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and enhances fusion. *Microbes and Infection*. 6: 414-420,2004.
  29. H Ling, T. Hattori, H-X Gu, J. Ashino, Y-C Liu, C. Liu. Surveillance of humoral immune response to TBGL in TB and HIV infected individuals. *Proceeding of XV International AIDS Conference*, 2004
  30. Bangkok E710L7812. XV International AIDS Conference. 53-56,2004.
  31. Ling Hong Gu Hongxi, Li Dianjun and Toshio Hattori. Enhanced function of human immunodeficiency virus type I V3 loop for viral entry. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*. 24: 275-278,2004.
  32. 奈良 正之, 服部 俊夫. 気道炎症とリモデリングからみた喘息重症化の機序について. *ICUとCCU*. 28(1): 11-18,2004.
  33. 芦野 有悟, 服部 俊夫. 抗インフルエンザ薬の進歩. *総合臨牀*. 53(2): 361-362,2004.

34. 服部 俊夫. 研究の周辺から. 呼吸. 23(4): 255-256,2004
35. 奈良 正之, 玉田 勉, 笹森 寛, 服部 俊夫. 気道炎症と分泌調整. 分子呼吸器病. 8(2): 21(109)-26(114),2004.
36. 奈良 正之, 山内 広平, 服部 俊夫. IL-13とCOPDのかかわり —喘息とCOPDの接点. 呼吸器科. 5(4): 372-375,2004.
37. 服部俊夫, AIDSとはどういう病気か, 井村裕夫(編), わかりやすい内科学(第3版), 文光堂, 東京, 441-443, 2008.
38. 服部俊夫, 巽浩一郎, 岩垣博己, 佐久間光江. ウイルス感染とバイオディフェンス. Mebio. 24: 16-21,2007
39. 服部俊夫, 岡田信司. 内部障害のリハビリテーション. 佐藤徳太郎編 医師薬出版株式会社 HIV感染症. 213-228,2007
2. 学会発表
1. Usuzawa M, Haorile, Imamura J, Pyanoot J, Warunya P, Medina P, Demetria CS, Miranda ME, Suzuki Y, Oshitani H, Hattori T. ANTI-RABIES ANTIBODIES IN JAPANESE VOLUNTEERS IMMUNIZED WITH IMPORTED VACCINE. Health Security in the tropics. 29-30 November 2007, Bangkok
2. Hattori T, Peng X, Usami O, Ling H, Zhuang M, Suzuki H. Isolation of CD4-independent HIV-1 from a patient with Pneumocystis pneumonia that can efficiently enter and replicate in primary cultured human hepatocytes through CXCR4. Late breaker presentation. 4<sup>th</sup> IAS Conference on HIV pathogenesis, Treatment and Prevention. 22-25 July 2007, Sydney , Australia
3. Hattori, Y. Suzuki, O. Usami, H. Saitoh, Y. Ashino, A. Theo, H. Kikuchi, Y. Oshima, L. Obi. Towards the discovery of novel anti-HIV agents in South-African herbs Application of a novel CD4 independent isolate SDA-1 1st Tohoku University Innovation Forum, San Francisco, 2007. 招待講演
4. Usami O, Xiao P, Nakasone T, Hattori T. Anti-gp41 immunity of pneumocystis (pc) patients. ATS, San Diego, 2006.
5. Toshio Hattori, X Peng;H Ling;M Zhuang.The inhibitory effect of chinese herb on SARS pseudotyped virus infection. Lipid raf t s and cell function. March 23-28, 2006. Steamboat, Keystone symposium.
6. 庄敏, 蔣虹, 古田理佳, 肖鵬, 服部俊夫.The inhibitory effect of medical herbs on SARS-CoV entry in vitro. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 11月19日-21日, 2006, 名古屋国際会議場 イベントホール
7. Theo Andros, 鈴木康弘, 菊地晴久, 今村淳治, 大島吉輝, 服部俊夫. 南アフリカの薬用植物からの抗HIV成分の単離. 第21回日本エイズ学会学術集会・総会. 2007.11.28, 広島
8. 今村淳治, 鈴木康弘, 肖鵬, 宇佐美修, Warunya Promjunyakul l, 服部俊夫. 初代培養正常ヒト肝細胞およびB細胞に感染増殖するCD4非依存性HIV-1臨床株SDA-1の検討. 第21回日本エイズ学会学術集会・総会. 2007.11.28, 広島
9. 鈴木康弘, 横山勝, 佐藤祐徳, Warunya Promjunyakul l, 今村淳治, 服部俊夫. CD4非依存性HIV-1臨床分離株SDA-1の責任領域のコンピューター及び分子生物学的な解析. 第21回日本エイズ学会学術集会・総会.2007.11.28, 広島
10. Min Zhuang, Yasuhiro Suzuki, Toshio Hattori. Medicinal herb extract inhibits internalization of Transferrin receptor. TOWARD ADVANCED USE OF AFRICAN RESOURCES IN PLANT SCIENCE. 2007.11.20, 横浜
11. 井上雄喜, 田中伸幸, 井上真吾, 森田公一, 庄 敏, 服部俊夫, 菅村和夫. ACE2細胞内領域欠損受容体を介したSARS-CoV感染機構. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 2007.10.21-23, 札幌
12. 庄 敏, 鈴木康弘, 蔣 虹, 張 連峰, 秦 川, 服部俊夫. 桂皮のブタノール画分とタンニン酸はトラスフェリンのエンドサイトーシスを阻害し、SARSウイルスの感染も阻止する. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 2007.10.21-23, 札幌
13. 服部俊夫. ウイルス感染とバイオディフェンス—注目される補中益気湯の可能性—. インフルエンザ ストラテジー 2007 ~漢方医学から考える~. 2007.10.20, 盛岡
14. 井上雄喜, 田中伸幸, 田中義乃, 井上真吾, 森田公一, 庄 敏, 服部俊夫, 菅村和夫. SARS-CoV感染における受容体ACE2細胞内領域の役割. 第61回日本細菌学会東北支部総会.

2007.8.23-24, 仙台

15. 玉田 勉、奈良 正之、服部 俊夫. 気道分泌腺の水・電解質分泌に関わる調節機構. 第5回肺研究フォーラム21 (気道分泌研究の新しい潮流).  
2007.5.12, 東京

16. 玉田 勉、奈良 正之、服部 俊夫. 内因性NOの気道分泌における調節機構. 第47回日本呼吸器学会総会.

G. 知的所有権の取得状況  
なし

## 〔Ⅳ〕 インド・デリーの多剤耐性結核菌に関する研究拠点の確立に関する研究

分担研究者 大阪大学大学院医学系研究科 高鳥毛敏雄 特任教授（常勤）  
研究協力者 大阪府立公衆衛生研究所 田丸亜貴 研究員

### 研究要旨

インドにおける治療失敗例結核菌の分子遺伝学的特徴の把握し結核菌株の特徴を明らかとすることを目的とした。そのため過去3年間結核菌の共同研究を行うための研究拠点を確立するための現地の視察と研究体制の確立のための交渉をすすめてきた。しかし、インドでは結核菌についてルーチンに培養、同定、感受性の各検査が行われておらず、菌株を収集することができない現状にあった。また医科大学における政府の関与力が大きく、研究者間の交渉だけでは共同研究体制を確立することができない現状にあった。結核菌を生物活性のない不活化DNAであっても国外に持ち出すにはインド政府科学技術省の許可が必要であった。そのために現地に検査資材を持ち込み、検査の技術移転して検査を行うことを計画して訪印を行った。技術移転についてもインド政府の研究許可が下りないとできないというのが現実であった。そこで、最終年度は日本、インドの両政府に共同研究について研究申請を行うこととした。その結果、平成20年2月に、平成20年度からはインド政府の研究許可を得る見通しとなった。過去3年間の取り組みにより、漸くインドにおいて地域ベースの結核菌研究が行える見通しがついた。本研究事業の得られた大きな成果と考えられる。

### A. 研究目的

①population based studyによるインド由来結核菌の分子遺伝学的特徴の把握及び感染経路の解明を行う。これまで、地域ベースにすべての排菌患者の菌株を分析されていない。②分子生物学的手法を用いたインドにおける治療失敗例結核菌の分子遺伝学的特徴の把握する。③日印の技術交流によるインドの検査施設において菌検査の技術移転を行い、インドにおける研究体制を確立する。④日印の結核菌株について分子生物学的に流行株の相違について比較分析を行う。この4点を目的として研究を推進した。

### B. 研究方法

#### 1) 平成17年度

インドにおける共同研究者を確保し、現地の状況を視察し、研究協力体制を確立することを計画した。インド北東部のウッタラプラデーシュ州ゴラクプル(Gorakhpur)にあるBRD Medical CollegeのPrincipal & DeanであるSaudan Singh教授の研究を得てGorakhpurにおける結核の疫学状況、結核の保健医療資源、結核菌の検査体制について調査を行なった。

#### 2) 平成18年度

平成18年度に調査を行ったゴラクプルでは研究を行うためには多くの設備投資と研究体制の整備が必要であり即研究を行うことは困難であることがわかったために、ニューデリーのVardhman Mahavir Medical Collegeはインド最大の病床数を有するSafdarjung Hospitalを母胎にしてつくられた医科大学であり、この病院に地域の結核センターが併設さ

れており、また結核菌検査も行う地域の感染症病理検査センターを併設しており、本研究を行うには拠点となりうる可能性があると判断し、訪印して病院、大学関係者と協議した結果、共同研究について合意を得ることができた。しかし、インドから結核菌株を日本に移送するにはインド政府の許可が必要であるとされ、さらに現地において日本人の研究者が結核菌の分析を行うにもインド政府の許可が必要であることが明らかとなった。結核菌検査を行うためにはインド科学技術省の許可が必要であり、そのために訪印して協議を行った。その結果、日印の双方の政府に新たな研究を申請を行い、承認を得るしか選択肢がないことが明らかとなった。

#### 3) 平成19年度

訪印直前に現地の研究協力者からまだインド政府との交渉中の状況であり、ここで許可なく研究を行うと研究申請が承認されなくなる可能性があるとの状況が示された。平成19年度はインドの結核菌株の分析を行うことは断念し、LAMP検査試薬500検体分を日本から持ち込み、日本からの結核菌標準株を使い結核菌DNAのLAMP法の検査について、現地の検査センターに対する検査技術移転し、現地で結核菌を分析してもらえるようにすることを目標として訪印した。しかしインド政府の許可がなければ検査のデモンストレーションも行うことができないとのことであり、技術移転を行うことも出来なかった。

(倫理面への配慮)

日本側では、分担研究施設において「抗酸菌の分子

疫学」の研究課題名で倫理審査を受け、承認を受けている。

## C. 研究結果

### 1) 平成17年度

インドにおける共同研究者を確保し、現地の状況を視察し、研究協力体制を確立することを計画し、インド北東部のウッタラプラデーシュ州ゴラクプル(Gorakhpur)にあるB R D Medical College が研究協力を得られる見通しとなった。そこで、現地を訪問し、Gorakhpurの医科大学およびその中の地域結核センターとの協力体制をつくるための交渉を行った。結核の疫学状況、結核の保健医療資源、結核菌の検査体制について調査を行なった。その結果、地域の結核センターでは顕微鏡検査により塗抹陽性検査は行われていたが、培養検査を行う設備はなく、また検体を保存、搬送するためには冷蔵庫などの設備が必要であり、さらに検痰容器の供与、また検査技師の研修も必要であり、現地で結核菌株に関わる研究を行うためには多くの器材や検査設備の投資が必要な状況にあり、即研究を行うことはできない状況にあることが明らかになった。インドにおいて即研究を行える研究拠点を獲得するためにAgraのS.N. Medical CollegeのPrincipal, Dean & Chief of Hospitalで、インドの公衆衛生学会理事長のDeonki Nandan教授と会い交渉を行った。アグラか、デリーなどの都市部で研究設備の整った拠点を定めることが適当との助言を得た。

### 2) 平成18年度

インドの現実の経験を踏まえニューデリーで研究拠点を探すこととした。その結果、Vardhman Mahavir Medical Collegeはインド最大の病床数を有するSafdarjung Hospitalを母胎にしてつくられた医科大学であり、この病院の外来診療棟に地域の結核センターが併設されており、さらに結核菌検査も行う地域の感染症病理検査センターを併設していることから本研究を行うには最適の研究拠点となりうると判断した。しかし、インドから結核菌株を日本に移送するにはインド政府の許可が必要であり、また現地において日本人の研究者が結核菌の分析を行うにもインド政府の許可が必要であることが現地で協議を進める中で明らかとなった。次に政府の許可を得るために再度訪印し、インド科学技術省で担当官と直接交渉することとした。インド科学技術省における協議の結果日本学術振興会が進める日印の共同研究事業としてインド、日本の両政府に研究申請することが適切との判断が示されたことから、新たな研究申請を行うことになった。一方で、現地の研究者と政府の許可が得られた後にただちに研究を推進していくために両国の研究者で役割分担を取り決めた。インドの結核センターにおいて塗抹陽性喀痰の処理済み沈査およびMDR-TB菌株の加

熱死菌を収集、保管し、分析は日本で行うことから始める。インドにおいても結核菌検査技術の向上のために日本からインドの検査施設にLAMP法による結核菌同定とVNTR法による遺伝子型別法の技術提供を行い、基本的な結核菌の分析はインドにおいて行えるようにすることとした。

### 3) 平成19年度

#### ①インドにおける結核菌同定検査の実施について

平成19年度はLAMP法を研究協力施設で実施するべくLAMP検査試薬500検体分を購入して持参し、現地で日本から持っていった結核菌標準株のDNAによるLAMP法のデモンストレーションを実施し、現地の検査者に対する検査技術を移転し、現地の検査施設で現地の検査者により結核菌の分析を行えるようにすることを計画した。しかし、インド政府の許可がなければ検査の技術移転を行うこともできなかった。

#### ②共同研究協力施設の再調査

平成18年度から医科大学の新校舎の建設がはじまり新校舎の中に細菌学研究施設がつけられた。これまでの検査施設とあわせて、インドの研究協力施設の抗酸菌核酸検査室の検査設備について再調査を行った。しかし、核酸検査には旧型のサーマルサイクラーを使用しており、また電気泳動槽・恒温槽等の設備も他の検査室との共用使用であり、多数の菌株を取り扱い、菌検査の精度管理を行っていくことは現状では困難な状況にあることが明らかとなった。協議を進める中で医科大学において微生物学教室の実験施設についてPCR検査等の検査設備を整えてもらえる見通しが得ることができた。インドでは結核菌のルーチン検査として同定検査、感受性検査が行われておらず、MDR-TBと思われる一部の検体だけしか結核菌同定検査が行われていない状況にある。地域ベースの結核菌株を収集して結核菌の分析を行うためには日印の政府による研究費の投入が不可欠な状況にあったことが明らかとなった。

#### ③インド政府からの研究許可について

平成19年度は現地に検査器材、検査試薬を持っていき、研究を実施する予定であったが、インド政府の許可がなかなか下りないためインドにおける結核菌の同定、感受性、分子型別分析を行うことができずに3年間の研究は終了した。しかし、平成20年2月になりインド・デリーにおいて結核菌に関する共同研究を行うことについて政府の許可が得られる見通しになった。過去3年間の訪印しての交渉により、結核菌について共同研究を行うための拠点の形成という最小限の目標は達成することができた。

## D. 考察

インドは世界の中で最も多くの結核患者を有する地域である。インドにおける多剤耐性結核菌の状況を明

らかにすることは、経済のグローバル化、人々の移動の自由化などに伴い世界の多剤耐性結核菌対策のための重要な研究課題と考えられる。本研究は、アジア結核高蔓延地域であるインドにおいて結核菌の遺伝子型、薬剤耐性を明らかにし、その流行状況を明らかにすることを目的とした。またわが国の薬剤耐性菌株との比較分析を行うことにより多剤耐性結核菌流入のモニタリングを行うわが国の結核対策に対しても資することを目的とした。最終的にはインド・ニューデリーの Vardhman Mahavir Medical CollegeのProf.Saudan Singhの協力を得て、同大学公衆衛生学講座、Safdarjung Hospital併設結核センター、同病院感染症病理検査センターの細菌検査室（以下、研究協力施設）との研究協力の関係を構築し、インド臨床分離結核株と日本における臨床分離株について菌株の遺伝子型別分析を行うために必要な、分子疫学に最適なVNTR対象locusの研究を実施することになった。政府の許可が得られた後に、インドの研究協力施設における結核患者の塗抹陽性喀痰の処理済み沈査をすべて収集、保管してもらい、提供してもらい、提供検体を日本で結核菌同定、耐性遺伝子検出、遺伝子型別分析を実施することからはじめ、最終的にはLAPM法による結核菌同定とVNTR法による遺伝子型別法をSafdarjung Hospital細菌検査室において実施できるように技術提供を行い、基本的な研究は現地で行うことを目標とした。インドの対象地域の結核検査技術を移転することによりインドにおける結核対策の推進方策の向上にも寄与することができると考えた。しかし、本研究の計画実施時期は、知的財産保護、病原体に関わる研究について両国政府の関与が厳しくなってくる時期と重なり、日印双方とも共同して結核菌の分析研究を推進することが出来ない状況の中で3年間の研究期間が終了してしまった。幸いにも、3年間の訪印しての協議と調整を繰り返した結果、平成20年度からは共同研究を行うことについて両国の許可が得られることになったことできた。日印の共同研究を行うための拠点形成を確立したことが本研究の成果となった。

#### E. 結論

インドにおける共同研究を行う研究拠点を確保するために、平成17年度はインドの中都市であるゴラクプール、アグラ、平成18年度はデリーにおいて、関係する医科大学および医療施設の関係者と協議を進め、デリーにおいて協力施設を確保することができた。平成19年度は、現地に検査資材を持ち込み、検査技術の移転を行い現地で結核菌分析研究をすすめようと訪印した。現地では大学の許可は得ることができたが、インド政府の研究許可を得るには半年程度の時間が必要とされ、研究の実施はできなかった。平成19年度の研究期間の終了時期に平成20年2月にインド政府の研究許可を得る見通しとなり、平成20年度からはインドにお

いて地域ベースの結核菌研究が行える見通しがついた。このことが本研究事業の大きな成果と考えている。インドは中国と並び世界の2大結核大国であり、結核ワクチンが実用化された際結核ワクチンを使った新たな結核対策の推進拠点となることも期待される。

#### F. 研究発表

1. 論文発表
  1. 中田信昭、梶史明、中村夫左央、針原重義、平山幸雄、鈴木陽、下内昭、高鳥毛敏雄:結核高罹患地域における医療施設外来受診者に対する結核検診の意義.結核,82(5),455-458,2007.
  2. 高鳥毛敏雄、逢坂隆子、山本繁、西森琢、藤川健弥、黒田研二、磯博康:ホームレス者の結核の実態とその対策に関わる研究—結核検診の3年間の実践から. 結核,82(1),19-25,2007.
  3. S. Okamoto, A. Tamaru, C. Nakajima, K. Nishimura, Y. Tanaka, S. Tokuyama, Y. Suzuki and K. Ochi. Loss of conserved 7-methylguanosine modification in 16SrRNA confers low-level streptomycin resistance. Mol. Microbiol. 63(4), 1096-1106, 2007.
  4. 高鳥毛敏雄. 高田敏・桑原洋子・逢坂隆子編 ホームレス研究—釜ヶ崎からの発信—、「7 ホームレスの健康と保健・医療」,172-187,信山社,2007.
  5. 高鳥毛敏雄. 結核:世界と日本の現状.新しい診断と治療のABC 呼吸器6 結核・非結核性抗酸菌症. p18-26.最新医学別冊.2006.
  6. 高鳥毛敏雄.ドイツにおける一般対策の及びにくい人々に対する保健所活動.公衆衛生,70(2),106-109,2006.
  7. 鈴木定彦、田丸重貴、中島千絵、西原みづき、福島由華里、松葉隆司、「多剤耐性結核の菌検出法の進歩」、化学療法の領域、(1705-1713)、2006.
  8. B. Pandey, A. Poudel, T. Yoda, A. Tamaru, Naozumi Oda, Y. Fukushima, B. Lekhak, B. Risal, B. Acharya, B. Sapkota, C. Nakajima, T. Taniguchi, B. Phetsuksiri and Y. Suzuki. Development of in-house Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of Mycobacterium tuberculosis and evaluation in sputum samples of Nepalese patients. JMM in press.
  9. Y.Nishiuchi, R.Maekura, S.Kitada, A.Tamaru, (その他、7名). The recovery of avium-intracellulare complex (MAC) from the

residential bathroom of patients with pulmonary MAC. Clin. Infect. Dis., 45(3), 347-51, 2007

本結核病学会総会 2007年、大阪

G. 知的財産権の出願・登録状況  
特記すべきことなし

2. 学会発表

1. Yasuhiko Suzuki, Aki Tamaru, Takashi Matsuba, Yoshinori Tanaka, Construction of a new method for molecular epidemiological analysis of Mycobacterium tuberculosis by using DNA microarrays. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 41 Tuberculosis and leprosy, Research Conference, Kagoshima, Japan, July 19-20, 2006.
2. 高鳥毛敏雄、西森琢、田村嘉孝、藤川健弥、山本繁、逢坂隆子、黒田研二、野宿生活者に対する結核対策の強化策－3年連続検診の実績から－、第81回日本結核病学会総会.2006.
3. 高鳥毛敏雄、西森琢、下内昭、田村嘉孝、藤川健弥、撫井賀代、逢坂隆子、山本 繁、黒田研二、日雇い労働者の結核の発見から治療まで－3年間の実践から－、第97回日本結核病学会近畿地方会、2006.
4. 高鳥毛敏雄、石川信克、加藤誠也、大角晃弘、結核対策の制度の日英比較研究 その1 －保健医療体制－、第65回日本公衆衛生学会総会、富山、10月25日-27日、2006.
5. 加藤誠也、大角晃弘、田中慶司、石川信克、高鳥毛敏雄、結核対策制度の日英比較研究 その2－英国の結核対策、第65回日本公衆衛生学会総会、富山、10月25日-27日、2006.
6. 田丸亜貴、大阪府南部地域の結核地域分子疫学、第81回日本結核病学会総会、仙台、4月27日-28日、2006.
7. 柴田仙子、松本恵美子、藤井史敏、安井良則、福田雅一、富田元久、田丸亜貴、堺市における結核菌株のRFLP, VNTR解析について、第65回日本公衆衛生学会総会、富山、10月25日-27日、2006.
8. 田丸亜貴 「結核集団発生事例および地域集積株のVNTR型別」 第82回日本結核病学会総会 2007年、大阪
9. 西内由紀子、田丸亜貴、他3名、「肺Mycobacterium avium complex(MAC)症患者の家庭浴室内におけるMACの検出」 第82回日本結核病学会総会 2007年、大阪
10. 河原隆二、田丸亜貴 「接触者健診事例に対する QuantiFERON TB-2Gの結果の解析」 第82回日



## 〔V〕北タイ・チェンライにおけるHIV結核発症の宿主側要因と

### 多剤耐性結核に関する臨床免疫学的研究

分担研究者 櫻田紳策 国立国際医療センター（研究所）呼吸器疾患研究部細菌性呼吸器疾患研究室長  
分担研究者 慶長直人 国立国際医療センター（研究所）呼吸器疾患研究部

#### 研究要旨

タイ・チェンライ県におけるHIV結核における宿主側危険因子を同定し、多剤耐性結核との関連性を明らかにするためにチェンライ市に実験室を整備し、研究拠点とした。また、臨床免疫学的研究を実施するための共同研究体制をタイNIH、マヒドン大学熱帯医学部、チェンライ病院、メーチャン病院の間で確立した。宿主側要因の検討のため、平成20年2月25日までに74名を登録して採血を行い、単球、リンパ球等の血液細胞を分離し、それぞれ細胞生物学的・免疫学的な解析を行った。また、分離された血漿は保存され今後の解析を待っている状態である。今後、平成20年3月末まで患者登録を継続し、併せて試料の解析も行う予定である。

#### A. 研究目的

結核とHIV結核患者における宿主側危険因子の同定および多剤耐性結核との関連を明らかにする。

#### B. 研究方法

リンパ球、単球等の血液細胞の培養と単球からマクロファージへの分化の形態学的観察ならびにフローサイトメーターによるリンパ球の表面マーカーの解析を全例に行う。血漿中ならびに細胞培養上清中のgranulysin、IFN- $\gamma$ 等結核免疫関連タンパク質のELISAによる定量とBCG感染後マクロファージからのmRNAの抽出を行い、活性型ビタミンD<sub>3</sub>関連遺伝子を含む結核免疫関連分子の遺伝子発現をRT-PCRを用いてmRNAレベルで検討する。

#### （倫理面への配慮）

タイにおけるHIV結核患者サンプルを用いた臨床免疫学研究を実施するにあたり、タイ公衆衛生省ならびにチェンライ県チェンライ病院の倫理委員会にて本研究は倫理審査を受け、それぞれ平成19年5月と6月に承認された。また本研究は国立国際医療センター倫理委員会にて平成18年12月に承認された。

#### C. 研究結果

(1) 末梢血単球ならびに末梢血単球由来マクロファージにおけるosteopontin発現解析は健康者血液サンプルを用いて、すでに基礎検討を終えた。Osteopontinは単球からマクロファージの分化過程で発現し、二つの表現型M型とGM型マクロファージの間に発現レベルで差がなかった。また、BCGのCFUアッセイを実施したところM型がBCGを効率的に殺菌するのに対して

GM型は有意に殺菌効率が低かった。

(2) チェンライ県における臨床免疫学研究を実施する実験室の移転と整備を完了した。

(3) タイにおける一連の研究遂行のために、研究者個人レベルの連携だけでなく、所属組織レベルの連携体制を確立した。平成18年11月に、国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部、結核予防会結核研究所、タイNIH、タイマヒドン大学熱帯医学部、四者における連携 (consortium) に向けての話し合いが持たれた。平成19年3月、国立国際医療センター総長とタイ公衆衛生省の部局との間にMinutes of Understandingが締結された。

(4) 患者登録はH19年6月より開始し、平成20年2月25日現在74名が登録され、採取された試料を用いて以下の検討を行った。i)末梢血単球由来マクロファージの分化パターンの検討。ii)末梢血単球由来マクロファージにおけるosteopontinの発現解析。iii)末梢血結核菌抗原刺激(PPD)により血漿中に遊離されるgranulysin、perforin、granzyme BとTh1サイトカインINF- $\gamma$ 、IL-18レベルの検討とフローサイトメトリーによるNK細胞、NKT細胞、g9Vd2T細胞、CD8+ CTLのpopulation study。iv)血漿中の25OHDの測定と末梢血単球由来マクロファージにおけるvitamin D receptor、cathelicidinの発現解析。iv)以外のすべての検討が現在進行中であるが、対照群と比較して結核患者では有意にマクロファージは活性化しているのに対してHIV感染者では結核を発症していてもマクロファージの活性化のレベルが低かった。また、結核患者ではリンパ球中の $\gamma$ 9V $\delta$ 2TCRT細胞の増加が見られ、一方HIV感染者では減少が見られた。

#### D. 考察

本研究では、granulysinの測定が重要なポイントである。細胞レベルの検索と併せてgranulysinのレベルの高低がHIV結核ならびにHIV非感染結核発症のリスク要因たるか注目される。今後、HIV結核患者を含めて、これらエフェクター分子の発現レベルの検討をさらに進めていく。一方、菌側の情報としては、全例が塗末検査陽性培養陽性の患者のみ対象としているため、薬剤耐性に関する情報を結核データベースから確実に得ることができる。従って、多剤耐性結核とgranulysin, osteopontinといったエフェクター分子ならびにTh1サイトカインについてHIV結核と非HIV結核の双方において有用な知見が得られると想定される。

現在の課題は研究の継続すなわち、HIV結核患者の登録、試料採取、実験、データ解析、症例のフォローアップ、とくに多剤耐性菌等の細菌学的検索結果を含めたより包括的な分析が必要である。

#### E. 結論

タイNIH、マヒドン大学熱帯医学部、チェンライ病院、メーチャン病院との共同研究体制を構築し、HIV結核に関する臨床免疫学的研究を開始した。患者登録と臨床試料の採取を行った。試料の解析は現在進行中であり、最終的な結果を得るのは次年度になる。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
該当なし

#### 2. 学会発表

1. Riduruechai C., Sakurada S. et al. "Effect of BCG Infection and Colony-Stimulating Factors on Osteopontin Secretion from Human Monocytes-derived Macrophages." US-Japan Cooperative Medical Science Program, 41<sup>st</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference in Kagoshima, Japan 2006
2. 「ヒト末梢血単球由来マクロファージにおけるオステオポンチン産生に対するBCG感染とコロニー刺激因子の作用」櫻田紳策、松下育美、土方美奈子、赤川清子、山崎利雄、慶長直人、第47回日本呼吸器学会 東京、2007

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし

#### 3. その他 該当なし

## 〔VI〕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。TLRを介した自然免疫系の活性化が消失するTRIF/MyD88二重欠損マウスを用いて、結核感染における自然免疫系の関与について検討した。正常マウス、MyD88欠損マウス、TRIF欠損マウスではBCG感染による肺病変は観察されないが、MyD88/TRIF二重欠損マウスの肺では、BCG菌数の増加を伴う多数の壊死性病変が観察され、約半数が死亡した。また結核菌 MtbH37Ra株の経気道的感染でも、TRIF/MyD88二重欠損マウスは感受性が高かった。この結果は、TLRを介した自然免疫系の活性化が結核感染防御にも生体レベルで重要な役割を担っていることを示している。結核感染においては、Th1応答が感染防御に重要な役割を担っている。MyD88欠損マウスでは、BCG感染後のTh1応答が正常と比べて3分の1程度に低下するが、TRIF/MyD88二重欠損マウスでもTh1応答の障害は同程度しか認められなかった。この結果は、TLRを介した自然免疫シグナル以外にもTh1誘導機構が存在し、さらに自然免疫系がTh1誘導以外の分子機構により結核感染を制御していることを示唆している。

また、結核感染により、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感染の第一戦の防御機構を担っていることが明らかになった。

### A. 研究目的

自然免疫系は、病原体の宿主内への侵入を最初に察知し、種々の炎症・免疫応答を誘導する重要な免疫系である。しかしながら、B, T細胞が主役を演じる獲得免疫系の分子機構が詳細に解析されてきているのに対し、自然免疫系の作動メカニズムはほとんど理解されていない。最近、Toll-like receptor (TLR)ファミリーが、病原体の構成成分の認識に関与していることが明らかになってきた。結核菌に対する生体防御においても、TLRファミリーによる結核菌の認識が重要な役割を果たす可能性が考えられる。本研究では、自然免疫系による結核などの病原体の生体内への侵入を察知するメカニズムをToll-like receptor (TLR)を中心とした受容体の解析から明らかにし、結核感染における免疫系作動の分子機構を解明することを目的とする。

### B. 研究方法

これまで、TLRを介した自然免疫系の活性化機構の解析から、TLRを介したシグナル伝達経路では、TIRドメインを有するアダプターMyD88とTRIFが重要な役割を担っていて、TRIF/MyD88二重欠損マウスでは、TLRシグナルが完全に消失することを明らかにしている。そこで、TLRを介した自然免疫系の活性化の結核感染防御における役割を、TRIF/MyD88二重欠損マウスを作製し解析した。正常マウス、TRIF欠損マウス、MyD88欠損マウス、およびTRIF/MyD88二重欠損マウスにワクチン株であるBCGを感染させ、肺病変を解析し、また感染後の生存率を測定した。また結核菌 MtbH37Ra株を経気道的に感染させ、肺内の菌数を測定し、また生存率を測定した。

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 3 3 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 3 3 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

マウスにワクチン株である BCG を感染させたところ、正常マウス、TRIF 欠損マウス、MyD88 欠損マウスでは肺組織に著明な変化は認められないが、TRIF/MyD88 二重欠損マウスでは感染 2 週間以内に壊死を伴った病理変化が観察された。抗酸菌染色を行ったところ TRIF/MyD88 二重欠損マウスの肺では、多数の抗酸菌が観察された。生存率を測定しても、他のマウスと異なり、TRIF/MyD88 二重欠損マウスは約半数が死亡した。また、結核菌 MtbH37Ra 株を感染させたところ、MyD88 欠損マウスは正常マウスよりやや感受性が高いが、TRIF/MyD88 二重欠損マウスはさらに感受性が高くなっており、肺内の結核菌数も多くなり、生存率も低下していた。これらのことから、TRIF/MyD88 二重欠損マウスは結核感染に高感受性を示すことが明らかになった。この結果は、自然免疫系の活性化シグナルが、結核菌感染防御に重要な役割を担っていることを示している。BCG 感染による Th1 応答を、CD4 陽性 T 細胞からの IFN-gamma 産生を指標に解析したところ、MyD88 欠損マウスでは正常に比べて 1/3 程度に低下していたが、

TRIF/MyD88 二重欠損マウスでも MyD88 欠損マウスと同程度の低下しか認めず、有意に Th1 応答が観察された。このことは、結核感染においては TLR 非依存性に Th1 細胞の分化が誘導されることを示している。

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<sub>3</sub>) 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。

TRIF/MyD88 二重欠損マウスを用いた結核感染実験から、TLR を介した自然免疫系の活性化が、結核感染防御に重要であることが明らかになった。さらに結核感染に対する Th1 応答には、TLR 非依存的なメカニズムが存在することも明らかになった。今後、TRIF/MyD88 二重欠損マウスが結核感染に高感受性になる分子機構、Th1 分化の誘導機構を解析する。

また、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

自然免疫系の TLR を介した活性化が、結核感染防御に重要であることが明らかになった。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. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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. 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).
2. 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).
3. Nemoto, Y., Kanai, T., Makita, S., Okamoto, R., Totsuka, T., Takeda, K., and Watanabe, M.: Bone marrow retaining colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology* 132, 176-189 (2007).
4. Koga, R., Hamano, S., Kuwata, H., Atarashi, K., Ogawa, M., Hisaeda, H., Yamamoto, M., Akira, S., Himeno, K., Matsumoto, M., and Takeda, K.: TLR-dependent induction of IFN- $\beta$  mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 177, 7059-7066 (2006).
5. Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K. J., Yamaoka, S., Kawai, T., Matsuura, Y., Takeuchi, O., and Akira, S.: Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat. Immunol.* 7, 962-970

- (2006).
6. Uematsu, S., Jang, M. H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., Hemmi, H., Coban, C., Kawai, T., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Miyasaka, M., Takeda, K., and Akira, S.: Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat. Immunol.* 7, 868 – 874 (2006).
  7. Yoshimatsu, T., Kawaguchi, D., Oishi, K., Takeda, K., Akira, S., Masuyama, N., and Gotoh, Y.: Non-cell-autonomous action of STAT3 in maintenance of neural precursor cells in the mouse neocortex. *Development* 33, 2553-2563 (2006).
  8. Miyatsuka, T., Kaneto, H., Shiraiwa, T., Matsuoka, T. A., Yamamoto, K., Kato, K., Nakamura, Y., Akira, S., Takeda, K., Kajimoto, Y., Yamasaki, Y., Sandgren, E. P., Kawaguchi, Y., Wright, C. V., and Fujitani, Y.: Persistent expression of PDX-1 in the pancreas causes acinar-to-ductal metaplasia through Stat3 activation. *Genes Dev.* 20, 1435-1440 (2006).
  9. Takegahara, N., Takamatsu, H., Toyofuku, T., Tsujimura, T., Okuno, T., Yukawa, K., Mizui, M., Yamamoto, M., Prasad, D. V., Suzuki, K., Ishii, M., Terai, K., Moriya, M., Nakatsuji, Y., Sakoda, S., Sato, S., Akira, S., Takeda, K., Inui, M., Takai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Kumanogoh, A., and Kikutani, H.: Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat. Cell Biol.* 8, 615-622 (2006).
  10. Nakamura, K., Miyagi, K., Koguchi, Y., Kinjo, Y., Uezu, K., Kinjo, T., Akamine, M., Fujita, J., Kawamura, I., Mitsuyama, M., Adachi, Y., Ohno, N., Takeda, K., Akira, S., Miyazato, A., Kaku, M. and Kawakami, K.: Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47, 148-154 (2006).
  11. Yu, Q., Tang, C., Xun, S., Yajima, T., Takeda, K. and Yoshikai, Y.: MyD88-dependent signaling for IL-15 production is important for the development of CD8 $\alpha\alpha$  and TCR $\gamma\delta$  intestinal intraepithelial T lymphocytes. *J. Immunol.* 176, 6180-6185 (2006).
  12. Inoue, H., Ogawa, W., Asakawa, A., Okamoto, Y., Nishizawa, A., Matsumoto, M., Teshigawara, K., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Notohara, K., Katayose, K., Okamura, H., Kahn, C. R., Noda, T., Takeda, K., Akira, S., Inui, A. and Kasuga, M.: Role of hepatic STAT3 in brain insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab.* 3, 267-75 (2006).
  13. Kinoshita, D., Hirota, F., Kaisho, T., Kasai, M., Izumi, K., Bando, Y., Mouri, Y., Matsushima, A., Niki, S., Han, H., Oshikawa, K., Kuroda, N., Maegawa, M., Irahara, M., Takeda, K., Akira, S. and Matsumoto, M.: Essential role of I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  in thymic organogenesis required for the establishment of self-tolerance. *J. Immunol.* 176, 3995-4002 (2006). Santos, L. L., Milenkovski, G. P., Hall, P. H., Leech, M., Sharma, L., Takeda, K., Akira, S., Kitching, A. R., and Morand, E. F.: IL-18 is redundant in T-cell responses and in joint inflammation in antigen-induced arthritis. *Immunol. Cell Biol.* 84, 166-173 (2006).
  14. Owaki, T., Asakawa, M., Kamiya, S., Takeda, K., Fukai, F., Mizuguchi, J. and Yoshimoto, T.: IL-27 suppresses CD28-mediated IL-2 production through Suppressor of Cytokine Signaling 3. *J. Immunol.* 176, 2773-2780 (2006).
  15. Kuwata, K., Matsumoto, M., Atarashi, K., Morishita, H., Hirotani, T., Koga, R., and Takeda, K.: I $\kappa$ BNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity* 24, 41-51 (2006).
  16. Ogawa, A., Tagawa, T., Nishimura, H., Yajima, T., Abe, T., Arai, T., Taniguchi, M., Takeda, K., Akira, S., Nimura, Y., and Yoshikai, Y.: Toll-like receptors 2 and 4 are differentially involved in Fas-dependent apoptosis in Peyer's patch and liver at an early stage after bile duct ligation in mice. *Gut* 5, 105-113 (2006).
  17. Wieland, C. W., Florquin, S., Maris, N. A., Hoebe, K., Beutler, B., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T.: The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing

- nontypeable haemophilus influenzae from the mouse lung. *J. Immunol.* 175, 6042-6049 (2005).
18. Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S.: Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 6, 1087-1095 (2005).
  19. Wieland, C. W., Florquin, S., Maris, N. A., Hoebe, K., Beutler, B., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T.: The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable Haemophilus influenzae from the mouse lung. *J. Immunol.* 175, 6042-6049 (2005).
  20. Yukawa, K., Tanaka, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Bai, T., Maeda, M., Takeda, K., Akira, S., and Iso, H.: Reduced prepulse inhibition of startle in STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 16, 673-675 (2005).
  21. Matsukawa, A., Kudo, S., Maeda, T., Numata, K., Watanabe, H., Takeda, K., Akira, S., and Ito, T.: Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. *J. Immunol.* 175, 3354-3359 (2005).
  22. Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S.: Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23, 19-28 (2005).
  23. Ohkawara, T., Takeda, H., Nishihira, J., Miyashita, K., Nihiwaki, M., Ishiguro, Y., Takeda, K., Akira, S., Iwanaga, T., Sugiyama, T., and Asaka, M.: Macrophage migration inhibitory factor contributes to the development of acute dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 knockout mice. *Clin. Exp. Immunol.* 141, 412-421 (2005).
  24. Weiss, D. S., Takeda, K., Akira, S., Zychlinsky, A., and Moreno, E.: MyD88, but not Toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of Brucella abortus. *Infect. Immun.* 73, 5137-5143 (2005).
  25. Yang, S., Takahashi, N., Yamashita, T., Sato, N., Takahashi, M., Mogi, M., Uematsu, T., Kobayashi, Y., Nakamichi, Y., Takeda, K., Akira, S., Takada, H., Udagawa, N., and Furusawa, K.: Muramyl dipeptide enhances osteoclast formation induced by lipopolysaccharide, IL-1b, and TNF- $\alpha$  through nucleotide-binding oligomerization domain 2-mediated signaling in osteoblasts. *J. Immunol.* 175, 1956-1964 (2005).
  26. Shindou, H., Ishii, S., Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., and Shimizu, T.: Priming effect of lipopolysaccharide on acetyl-coenzyme A: lyso-platelet-activating factor acetyltransferase is MyD88 and TRIF independent. *J. Immunol.* 175, 1177-1183 (2005).
  27. Kitching, A. R., Turner, A. L., Wilson, G. R., Semple, T., Odobasic, D., Timoshanko, J. R., O'sullivan, K. M., Tipping, P. G., Takeda, K., Akira, S., and Holdsworth, S. R.: IL-12p40 and IL-18 in crescentic glomerulonephritis: IL-12p40 is the key Th1-defining cytokine chain, whereas IL-18 promotes local inflammation and leukocyte recruitment. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 2023-2033 (2005).
  28. Yang, R., Murillo, F. M., Delannoy, M. J., Blosser, R. L., Yutzy, W. H. 4th, Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., Roden, R. B.: B lymphocyte activation by human papillomavirus-like particles directly induces Ig class switch recombination via TLR4-MyD88. *J. Immunol.* 174, 7912-7919 (2005).
  29. Yang, R., Wheeler, C. M., Chen, X., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Pastrana, D. V., Viscidi, R. P., and Roden, R. B.: Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *J. Virol.* 79, 6741-6750 (2005).
  30. Xu, A. W., Kaelin, C. B., Takeda, K., Akira, S., Schwartz, M. W., and Barsh, G. S.: PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J. Clin. Invest.* 115, 951-958 (2005).
  31. Yukawa, K., Iso, H., Tanaka, T., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: Down-regulation of dopamine transporter and abnormal behavior in

- STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 15, 819-825 (2005).
32. Kumanogoh, A., Shikina, T., Suzuki, K., Uematsu, S., Yukawa, K., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Yamamoto, M., Takamatsu, H., Ko-Mitamura, E. P., Takegahara, N., Marukawa, S., Ishida, I., Morishita, H., Prasad, D. V., Tamura, M., Mizui, M., Toyofuku, T., Akira, S., Takeda, K., Okabe, M., and Kikutani, H.: Nonredundant roles of Sema4A in the immune system: Defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in Sema4A-deficient mice. *Immunity* 22, 305-316 (2005).
33. Hirotsu, T., Lee, P. Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S., and Takeda, K.: The nuclear I $\kappa$ B protein I $\kappa$ BNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J. Immunol.* 174, 3650-3657 (2005).
34. Araki, A., Kanai, T., Ishikura, T., Makita, S., Uraushihara, K., Iiyama, R., Totsuka, T., Takeda, K., Akira, S., and Watanabe, M.: MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J. Gastroenterol.* 40, 16-23 (2005).
35. Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Haro, T., Kakumitsu, H., Yoshie, M., Yamamoto, M., Takeda, K., Matsuda, T., Akira, S., Ogawa, K., and Harada, M.: Roles of Stat3 and ERK in G-CSF Signaling. *Stem Cells* 23, 252-263 (2005).
36. Yukawa, K., Kishino, M., Goda, M., Liang, X. M., Kimura, A., Tanaka, T., Bai, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Ueyama, T., Ichinose, M., Maeda, M., Takeda, K., and Akira, S.: STAT6 deficiency inhibits tubulointerstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 225-230 (2005).
37. Akamine, M., Higa, F., Arakaki, N., Kawakami, K., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A.: Differential roles of Toll-like receptors 2 and 4 in in vitro responses of macrophages to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 73, 352-361 (2005).
38. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 73-78 (2005).
39. Vossenkämper, A., Went, T., Alvarado-Esquivel, C., Takeda, K., Akira, S., Pfeffer, K., Alber, G., Lochner, M., Förster, I. and Liesenfeld, O: Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii* but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. *Eur. J. Immunol.* 34, 3197-3207 (2004).
40. Yokozeki, H., Wu, M. H., Sumi, K., Awad, S., Satoh, T., Katayama, I., Takeda, K., Akira, S., Kaneda, Y., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of transcription 6 (STAT6)-binding site ameliorates IgE-mediated late-phase reaction in an atopic dermatitis mouse model. *Gene Ther.* 11, 1753-1762 (2004).
41. Sumi, K., Yokozeki, H., Wu, M. H., Satoh, T., Kaneda, Y., Takeda, K., Akira, S., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of the transcription 6 (STAT6) binding site ameliorates the response of contact hypersensitivity. *Gene Ther.* 11, 1763-1771 (2004).
42. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 73-78 (2005).
43. Takeda, K.: Toll-like receptors and their adaptors in innate immunity. *Cur. Med. Chem. AIAA.* 4, 3-11 (2005).
44. Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14 (2005).



45. Takeda, K.: Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 11, 51-55 (2005).
2. 学会発表
1. Kiyoshi Takeda, Regulation of inflammatory responses by nuclear I $\kappa$ B proteins. 8th International Society of Exercise and Immunology Symposium, 2007.10.25, Sendai, Japan
  2. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. The 9<sup>th</sup> 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
  6. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. Awaji Forum, 2006.9.3-6, Hyogo, Japan
  7. Kiyoshi Takeda, Innate immune responses against mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program, 41<sup>st</sup> Tuberculosis and leprosy research conference, 2006.7.19-21, Kagoshima, Japan
  8. Kiyoshi Takeda, Role of TLR in innate and acquired phase of IBD. 2006 SMI Annual Meeting, 2006.6.1, San Francisco, USA
  9. Kiyoshi Takeda, Nuclear I $\kappa$ B protein-mediated regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa (symposium), 第36回日本免疫学会学術集会, 2006.12.11-13、大阪
  10. 香山尚子、竹田 潔, Epigenetic regulation of Toll-like receptor-dependent gene expression. 第36回日本免疫学会学術集会, 2006.12.11-13、大阪
  11. 財賀大行、竹田 潔, Lipocalin 2 mediates anti-mycobacterial immune responses. 第36回日本免疫学会学術集会, 2006.12.11-13、大阪
  12. 古賀律子、竹田 潔, IFN-beta-dependent innate immune response against *Trypanosoma cruzi*, 第36回日本免疫学会学術集会, 2006.12.11-13、大阪
  13. 竹田 潔, 自然免疫系によるトリパノソーマ原虫の感染制御機構, 第59回日本寄生虫学会, 2006.10.28、福岡
  14. 竹田 潔, 自然免疫系の活性制御機構 (シンポジウム), 第2回食品免疫学会, 2006.10.23、東京
  15. 竹田 潔, 自然免疫系の活性制御機構 (特別講演), 第43回補体シンポジウム, 2006.8.19、福岡
  16. 竹田 潔, 粘膜免疫の今後の展望 (イブニングセミナー), 第43回日本消化器免疫学会総会, 2006.8.3-4、青森
  17. 竹田 潔, 自然免疫系による炎症制御, 日本動脈硬化学会, 2006.7.13-14、東京
  18. 竹田 潔, I型IFNによる細胞内寄生性原虫の感染防御機構, 第71回インターフェロンサイトカイン学会, 2006.7.7-8、兵庫
  19. Kiyoshi Takeda, The roles of STATs in inflammatory responses: Lessons from the knockout mouse. (symposium, invited), American Thoracic Society 2005, 2005.5-20-25, San Diego, USA
  20. Kiyoshi Takeda, Makoto Matsumoto, Toll-like receptor-dependent innate immune responses in mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program. 40<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 2005.7.28-30, Seattle, USA
  21. Kiyoshi Takeda, Regulation of Toll-like receptor-mediated gene expression by nuclear I $\kappa$ B proteins. The 6th EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting, 2005.9.28-10.2, Heidelberg, Germany
  22. 竹田 潔, Toll-like receptors and pathogen recognition (Symposium, invited) 第78回日本細菌学会総会, 2005.4.4-6、東京
  23. 竹田 潔, Toll-like receptor と結核感染 (シンポジウム) 第80回日本結核病学会, 2005.5.12-13、埼玉
  24. 竹田 潔, 自然免疫シグナルの制御機構 (ワークショップ、招待講演) 第5回日本蛋白質科学会年会、

2005.7.1、福岡

25. 竹田潔, Toll-like receptor を介した自然免疫系の制御 (特別講演) 第 45 回日本リンパ網内系学会総会、2005.7.14-15、福岡
26. 竹田潔, 自然免疫系と炎症性腸疾患 (シンポジウム、招待講演) 第 42 回日本消化器免疫学会総会、2005.8.4-5、東京
27. Kiyoshi Takeda: Regulation of innate immune responses against intracellular pathogen infection (Symposium) 第 35 回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
28. 桑田啓貴、竹田潔、Regulation of Toll-like receptor dependent gene induction by nuclear IκB protein IκBNS. 第 35 回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
29. 古賀律子、濱野真二郎、松本真琴、久枝一、審良静男、姫野國介、竹田潔、Involvement of Toll-like receptor-dependent activation of innate immunity in Trypanosoma cruzi infection. 第 35 回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
30. 松本真琴、桑田啓貴、山本雅裕、審良静男、吉開泰信、竹田潔、The role of Toll-like receptor signaling in mycobacterial infection. 第 35 回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
31. 竹田潔、IκBNS による自然免疫系の活性制御と消化管炎症 (シンポジウム、招待講演)、第 79 回日本薬理学会年会、2006.3.9、横浜
32. 竹田潔、脊椎動物の自然免疫系の活性制御機構 (シンポジウム、招待講演)、第 141 回日本獣医学会学術集会、2006.3.21、つくば
33. 竹田潔、細胞内寄生菌に対する宿主自然免疫応答の分子機構 (シンポジウム、招待講演)、第 79 回日本細菌学会総会、2006.3.29、金沢

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  
なし

## 〔Ⅷ〕多剤耐性結核の薬剤耐性遺伝子の解析

分担研究者 阿部千代治 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社・技術顧問

### 研究要旨

BACTEC MGIT 960 AST(MGIT AST)の評価中にイソニアジド(INH)に対する検査で、小川比率法との間で不一致の結果を示す株がみられた。それらはすべてMGIT ASTで耐性しかし小川比率法で感受性の結果であった。Middlebrook 7H10寒天培地によるMIC測定および耐性に関する遺伝子の解析からこれらはINH低レベル耐性菌であることが証明された。遺伝子解析の結果からINH低レベル耐性には $inhA$ 遺伝子のプロモーター領域の変異、高レベル耐性には $katG$ 遺伝子コドン315の変異が関与することも明らかになった。シンガポール総合病院との共同研究で、シンガポールにも低レベル耐性菌が存在することが明らかになった。

### A. 研究目的

適切な患者管理と治療のために薬剤耐性菌を早急に同定することが必須である。わが国では薬剤感受性検査を小川比率法で行っているが、結果の報告までに4週間を要している。近年、液体培地を用いるBACTEC MGIT 960 AST (MGIT AST)が開発された。MGIT ASTを評価中に小川比率法との間でイソニアジド(INH)に対する検査で不一致の結果を示す株がみられた。不一致を示した分離株はすべてMGIT ASTで耐性、しかし小川比率法で感受性の結果であった。この種の菌が全国各地に存在するか、耐性遺伝子に変異がみられるか、活動性結核にINHを含む標準治療は有効化、INHによる潜在性結核の治療は有効か、この種の菌がアジア諸国にも存在するかを調べる。

### B. 研究計画

WHO/IUATLDで薬剤感受性検査の外部精度評価に使用している菌株を用いMGIT ASTを評価した。また全国各地で分離された結核菌を用いMGIT ASTと日本で標準法としている小川比率法の結果を比較した。2法で不一致の結果を示した株について、Middlebrook 7H10寒天培地を用いMICを測定した。INH耐性に関することが知られている遺伝子、 $katG$ および $inhA$ の変異を調べた。シンガポール総合病院との共同でシンガポールにおける薬剤耐性結核の状況を調べる。

### C. 研究結果と考察

#### 1. 外部精度管理株を用いたMGIT ASTの評価(平成17年度)

WHO/IUATLDのSupranational Reference Laboratory network (SRLN)で精度管理に使用している50株を用いてMGIT ASTの精度を評価した。INHとRFPの感受性検査について、MGIT ASTの成績はSRLNの結果と完全に一致した。感度、特異性、一致率、PV-R、

PV-Sはすべて100%であった。SMに対する感受性検査で不一致となった菌株は1株認められ、それはSRLNで耐性と判定した株をMGIT ASTで感受性と判定していた。SRLNの結果との一致率は97.9%であった。EBに対する検査で不一致の結果を示した株は4株認められた。これらはいずれもSRLNで耐性と判定していたものを感受性と判定していた。SRLNとの一致率は91.7%であった。また、結果が得られるまでに要した日数は6日から11日の範囲であり、中央値は7日であった。これらの結果はMGIT ASTは正確に薬剤耐性菌を迅速に同定できることを示している。

#### 2. MGIT AST と小川比率法の結果の比較(平成17年度)

北海道から九州までの12施設で分離された結核菌1,112株を用い2法の結果を比較した。MGIT ASTで96株(8.6%)、小川比率法で66株(5.9%)がINH耐性と判定された。すなわち、MGIT ASTでINH耐性と判定された96株のうち30株(31.3%)は小川比率法で感受性と判定されたことが分かった。不一致を示した株の割合は初回治療例で48.1%、既治療例で11.4%であり、初回治療例で4倍高かった。不一致の結果は全国各地でみられ、分離頻度に大きな差はみられなかった。

#### 3. 不一致株のMIC測定(平成18年度)

不一致の結果を示した30株についてMiddlebrook 7H10寒天培地を用いMICを測定した。10株は $0.4\mu\text{g/ml}$ 、18株は $0.8\mu\text{g/ml}$ のMIC値を示し、感受性検査に用いている検査濃度の近くにMICを持つ菌株であることが分かった。米国のClinical Laboratory Standard Institute (CLSI)はMiddlebrook 7H10を用いる比率法を標準法に指定している。MIC測定から、30株中28株(93.3%)はINH耐性と判定され、MGIT ASTの検査精度が確認された。2株は $0.2\mu\text{g/ml}$ のMICを示し、感受性の表現型であった。

#### 4. 不一致株の katG と inhA 遺伝子解析 (平成 18 年度)

不一致株についてINHの耐性に関与するkatGとinhA遺伝子の変異を調べた。INH低レベル耐性菌28株の中で15株(53.5%)の遺伝子に変異が認められた。残りの13株には調べた領域に変異を検出できなかった。変異を持つ株の中で2株は2つの遺伝子に、13株は単一の遺伝子に変異を持っていた。katG遺伝子のコドン315の変異はINH高度耐性に関与することが知られている。3株はkatG遺伝子に変異を示したが、コドン315に変異を持つ株はみられなかった。INH低レベル耐性菌28株の中で13株(46.4%)はinhA遺伝子のプロモーター領域(-15)にC→Tの変異を持っていた。しかし、inhAの構造遺伝子(ORF)に変異を持つ株はみられなかった。このことは、inhAのプロモーター領域の変異がINH低レベル耐性に関与しているとする報告を支持している。

#### 5. MGIT AST と小川比率法の両方で耐性を示した株の katG と inhA の解析 (平成 19 年度)

2つの感受性検査法でINH耐性を示した66株について遺伝子を調べた。38株はkatG遺伝子に変異を示した。katGコドン315の変異が最大であり、27株に認められた。他に、コドン198、217、285、337、344に変異が認められた。5株はPCR増幅が認められず、遺伝子の欠失が起こっていることを示している。inhAのプロモーター領域の変異が12株に認められた。また、inhAのORFの変異が3株にみられたが、3株いずれもkatGまたはinhAのプロモーター領域の変異を伴っていた。MGIT ASTでINH耐性を示した96株を小川比率法の結果により次のように3グループに分けた; 0.2 μg/mlの検査で感受性(低濃度-S)、0.2 μg/mlで耐性しかし1.0 μg/mlで感受性(低濃度-R・高濃度-S)、1.0 μg/mlで耐性(高濃度-R)。低濃度-Sの43.3%はinhAのプロモーター部に変異を示したが、katGコドン315に変異を持つ株は認められなかった。これに対し、高濃度-Rでは、51.1%の株はkatGコドン315に変異を持っており、inhAのプロモーター部の変異は4.3%のみであった。低濃度-R・高濃度-S株ではkatGコドン315とinhAのプロモーター部の両者に変異を持っていた。これらの結果は、inhAのプロモーター領域の変異はINH低濃度耐性、katGコドン315の変異は高濃度耐性に関与することを示唆している。

#### 6. シンガポールとの共同研究 (18,19 年度)

シンガポールにもINH低レベル耐性菌が存在するかどうかシンガポール総合病院と共同で研究した。シンガポール総合病院では薬剤感受性検査にBACTEC 460 TBを用いている。BACTEC 460 TBによる検査でINH耐性を示した49株を研究に用いた。1株は黄色コロニーが含まれていたことから結果の比較から除外した。日

本から送付した小川比率法の簡便法であるウエルパック培地を用い検査し、その結果を比較した。両法の一致率は60.4% (29/48)、19株 (39.6%) は不一致の結果であり、シンガポールにも低レベル耐性菌が存在することが分かった。わが国で分離された結核菌について、MGIT ASTと小川比率法との不一致率は31.2%であり、シンガポール分離株の不一致株の割合が幾分高い結果であった。これは、シンガポール総合病院側でバイオセーフティを考慮し、いくつかの多剤耐性菌を除外したこと、BACTEC 460 TBとMGIT ASTシステムの違いからきていることが考えられる。感受性を確かめるためにMICを測定中である。

#### D. 結論

1. 外部精度管理株を用いた評価から MGIT AST は迅速で信頼性の高い薬剤感受性検査システムである。
2. MGIT AST と小川比率法の結果を比較したところ、不一致の結果を示す株がみられた。
3. 不一致を示した株の 93.3% は Middlebrook 7H10 寒天培地による MIC 測定から INH 低レベル耐性菌であることが明らかになった。
4. INH 耐性に関与する遺伝子である katG および inhA 遺伝子の解析から不一致株の 50% は 2 つの遺伝子のいずれかに変異を持っていた。
5. MGIT AST と小川比率法の両方で耐性を示した株の遺伝子解析から inhA のプロモーター領域の変異は INH 低レベル耐性に、katG のコドン 315 の変異は高レベル耐性に関与することが示唆された。
6. シンガポール総合病院との共同研究で、シンガポールにも INH 低レベル耐性菌が存在することが明らかになった。その割合はシンガポール分離株で幾分か高かった。

#### E. 研究発表

1. 論文発表
  1. Hirano K, Aono A, Takahashi M, and Abe C: Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of Capilia TB-negative Mycobacterium tuberculosis isolates. J Clin Microbiol 2004; 42: 390-392.
  2. Kim SJ, Espinal MA, Abe C, Bai GH, Boulahbal F, Fattorini L, Gilpin C, Hoffner S, Kam KM, Martin-Gasabona N, Rigouts L, and Vincent V: Is second-line anti-tuberculosis drug susceptibility testing reliable? Int J Tuberc Lung Dis 2004; 8: 1157-1158.
  3. Takii T, Hamasaki S, Hirano K, Abe C, and Onozaki K: Simple fibroblast-based assay to test the pyrazinamide susceptibility of