

*Mycobacterium avium* complex 由来 glycopeptidolipid の生合成解析

研究分担者 牧野 正彦（国立感染症研究所・病原微生物部・部長）

研究協力者 宮本 友司（国立感染症研究所・病原微生物部・主任研究官）

研究要旨.

非結核性抗酸菌 *Mycobacterium avium* complex (MAC) に存在する血清型 glycopeptidolipid (GPL) は、病原性との関連が指摘されている菌体構成分子の一つであるがその生合成には不明な点が多い。血清型 GPL は、その糖鎖構造の違いにより約 30 種類に分類される。本研究では、糖鎖形成の重要なステップの一部である fucose 及び glucose 転移の過程について注目した。他の生合成過程の遺伝子情報を基に、代表的な fucose 及び glucose 含有 GPL (2 型及び 8 型血清型 GPL) 生産株より関与が予想される遺伝子領域をそれぞれ PCR 等により増幅・単離した。各領域に含まれる遺伝子群を 1 型血清型 GPL 生産株に導入し GPL 成分の TLC 及び GC/MS 分析、遺伝子機能の推定を行った。その結果、各血清型 GPL 生産株において、糖鎖に含まれる fucose 及び glucose 残基の形成に関与する生合成遺伝子群を同定した。

A. 研究目的

Glycopeptidolipid (GPL) は、*Mycobacterium avium* complex (MAC) や *Mycobacterium smegmatis* などの非結核性抗酸菌に存在する糖脂質抗原である。特に MAC の GPL は血清型を規定する菌体成分構成分子であり、さらには病原性因子としての側面も持つことが知られている。また、GPL は糖鎖構造の違いにより約 30 種類のタイプが存在し、その糖鎖構造の違いが病原性に影響を与えているとされる。しかし、この構造の違いを生み出す糖鎖生合成には不明な点も多く、病原性との関連を検討する上でも糖鎖生合成を解明することは不可欠である。本研究では、糖鎖の多様性を生み出す fucose 及び glucose の転移過程に注目し、これらに関わる生合成遺伝子の同定を通して複雑な GPL の糖鎖生合成を解明することを目的とした。

B. 研究方法

MAC 株については、fucose 含有 GPL 生産株 (2 型血清型) として ATCC25291 株を、

glucose 含有 GPL 生産株 (8 型血清型) としては、ATCC35771 株をそれぞれ使用した。PCR 用ゲノム DNA を両株から調製し、これらを鋳型として他の生合成遺伝子からの情報を基に設計したプライマーを用い推定領域を増幅した。各領域の塩基配列を決定し、FramePlot 解析等により含まれる ORF の予測を行った。1 型血清型 GPL が fucose 及び glucose 含有 GPL の前駆体に相当することから、*M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 株に *rtfA* 遺伝子を導入することにより 1 型血清型 GPL 生産株を構築した。各 ORF または推定領域から各 ORF を欠失させた領域を持つ発現ベクターを作製し、1 型血清型 GPL 生産株に導入した。それぞれの組換え株から GPL 成分を単離・精製した。GPL 成分は TLC 及び GC/MS によって解析し、それぞれに含まれる糖鎖構造を決定した。導入 ORF と生成された糖鎖構造との関係から、各遺伝子機能の推定及び同定を行った。

倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、

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

### C. 研究結果

Fucose 含有 GPL 生産株については、生合成に関与する約 22 kb の遺伝子領域が既に判明しているが、fucose 残基の形成に関わる遺伝子については不明である。そこで、本研究ではこの中から他の細菌由来の fucose 生合成酵素遺伝子と相同性を示す遺伝子を含む約 5 kb の領域について注目した(図 1)。PCR による増幅後、5 kb 全体及び 5 つの ORF それぞれ欠失させた領域を 1 型血清型 GPL 生産株へ導入・発現させ、GPL 成分を GC/MS 解析した(図 2)。その結果、5 kb 全体を導入した株で fucose の存在が認められ(図 2F)、3 ORF の欠失で fucose が検出されなかったことから(図 2B, C, E)、これらの ORF に対応する遺伝子が fucose 残基形成に不可欠であることが判明した。ORF2 及び ORF3 については、これらの欠失により fucose が消失したこと、さらに相同性検索の結果を総合すると両 ORF は mannose から fucose への合成過程に関与する GDP-D-mannose-4, 6-dehydratase (ORF2) 及び GDP-6-deoxy-4-keto-D-mannose-3, 5-epimerase-4-reductase (ORF3) をコードする遺伝子であることが示唆された。さらに 3 遺伝子の中で、唯一糖転移酵素のモチーフを持つ ORF5 (*gtfD* 遺伝子) の機能を解析するため、導入株より精製した GPL を重水素メチル化処理し、GC/MS により糖鎖結合部位を解析した。その結果、本 GPL は 1 型 GPL の rhamnose 残基に 1, 3 結合で fucose が結合していることが判明し、*gtfD* がこの糖鎖転移に関与していることが確認された。

Glucose 含有 GPL の生合成遺伝子につい

てはこれまで全く未解明であるため、遺伝子探索にはこれまで判明している他の血清型 GPL 生合成遺伝子の情報を利用した。多くの血清型 GPL 生合成遺伝子領域には *gtfB-drrC* と呼ばれる領域が存在し且つ血清型毎に特徴的な遺伝子配列を持つ。従って、glucose 含有 GPL 生合成遺伝子もこの領域に存在する可能性があることから、PCR による増幅を目指した。GTFB-U4 及び DRRC-A をプライマーとして用い PCR を実施した結果、約 4.6 kb の DNA 断片の増幅が認められた(図 4)。塩基配列の決定により、増幅断片は *gtfB* 及び *drrC* に挟まれる形で構成されていること、さらには 4 つの ORF が含まれることが判明した(図 4)。相同性検索の結果、ORF1 は *gtfD* と相同性を示す糖転移酵素を、ORF2 は *gtfTB* として登録されている糖転移酵素をそれぞれコードすることが明らかとなった。一方、ORF3 及び ORF4 は他の抗酸菌や細菌に存在する polysaccharide pyruvyltransferase 及び methyltransferase 遺伝子と高い相同性が認められた。

次に 4 つの ORF の中から、ORF2 (*gtfTB*)、ORF3 及び ORF4 を選択し、1 型血清型 GPL 生産株への導入を行い各導入株に含まれる GPL 成分の GC/MS 解析を行った(図 5)。その結果、*gtfTB* 導入株(図 5B)で過剰な glucose の存在が認められ、*gtfTB* が 1 型血清型 GPL への glucose 転移に関与する糖転移酵素遺伝子であることが推測された。一方、3 遺伝子導入株(図 5C)及びポジティブコントロールとして使用した MAC 8 型血清型株(図 5D)からは、8 型血清型 GPL の糖鎖に特徴的な 4, 6-O-(1-carboxyethylidene)-3-O-methyl-glucose が検出された。従ってこれらの結果から、3 遺伝子はこの糖鎖形成に関与することが示唆された(図 6)。さらに、*gtfTB* の糖転移酵素遺伝子としての機能を確認するため、*gtfTB* 導入株で認められた生産物を精製し、重水素メチル化処理後 GC/MS 解析を行った。その結果、本生産物は glucose が 1, 3 結合で 1 型血清型 GPL の rhamnose 残基に結合していることが判明し、*gtfTB* は

glucosyltransferase 遺伝子であることが確認された。

#### D. 考察

Fucose 含有 GPL の生合成については、これまでに大まかな領域については推定されていたが、関与する個々の生合成遺伝子については不明であった。本研究では、焦点を絞った 5 kb 領域に含まれる 3 遺伝子が fucose 残基形成に不可欠であることを示しその過程を解明した (図 3)。一方、fucose 残基を持つ抗酸菌糖脂質としては、GPL 以外では結核菌の phenolic glycolipid (PGL) が挙げられるが、これらの生合成についても依然として不明である。しかしながら、本研究で同定した 3 遺伝子のホモログが結核菌においても存在することから、これらを解析することより、PGL の fucose 残基形成過程が解明できる可能性がある。従って、本研究で明らかになった fucose 転移の過程は、GPL に留まらず他の糖脂質の生合成解明へも寄与するものであると考えられる。

Glucose 残基形成に関わる糖転移酵素遺伝子として機能することが判明した *gtfTB* は、1 型及び 4 型血清型 GPL 生産株にも存在する。しかしながら、これらの血清型 GPL には 8 型 GPL に見られる glucose 残基は存在しないことから、これらの株では、*gtfTB* が機能しない状態へ変化していると考えられる。事実、1 型血清型 GPL 生産株においては *gtfTB* の上流領域にトラスポゾンに関与する塩基配列が挿入されていることから、これらの現象は転写・翻訳等のレベルで制御されている可能性もある。

8 型血清型 GPL の glucose 残基には、特徴的な側鎖として 4,6-*O*-(1-carboxyethylidene) 及び 3-*O*-methyl 基が導入されている。これらの側鎖が果たす役割については未だ不明であるが、他の細菌では菌体の物理化学的性状を変化させる重要な因子とされている。従って、本血清型生産株においては、これらの側鎖の存在が休眠性に深く関わる細胞内寄生という病原性に何らかの影響を与えて

いることも考えられる。

本研究では、fucose 及び glucose 含有 GPL の生合成について、関与する遺伝子の解析を中心に実施した。Fucose 及び glucose は GPL に含まれる糖鎖として主要な構成要素であり、その存在が GPL の機能に影響を与えていることが指摘されている。また、これら糖鎖やその結合様式は多くの血清型糖鎖の基本構造となるものでもあることから、これらを解明することは構造と機能との関係を探る上でも重要であると考えられる。

#### E. 結論

MAC の fucose 及び glucose 含有 GPL の糖鎖について、それらの生合成に関わる遺伝子を解析・同定した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. *Mycobacterium avium* complex *gtfTB* gene encodes a glucosyltransferase required for the biosynthesis of serovar 8-specific glycopeptidolipid. *J. Bacteriol.*, 190:7918-7924, 2008.

##### 2. 学会発表

- 1) *Mycobacterium avium* complex serovar 8. Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, and M. Makino. 43<sup>rd</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
- 2) *Mycobacterium avium* complex 血清型 8 型株における糖脂質抗原の生合成経路の解析. 宮本友司, 向井 徹, 甲斐雅規, 前田百美, 中 崇, 矢野郁也, 牧野正彦. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都

#### 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

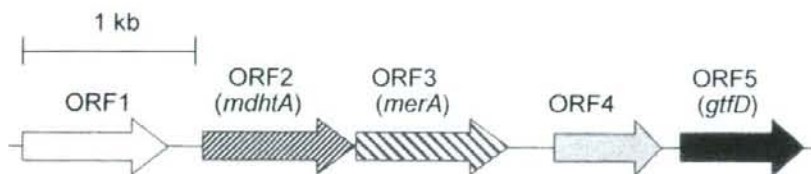


図1. fucose 含有 GPL 生産株より単離した 5kb 領域

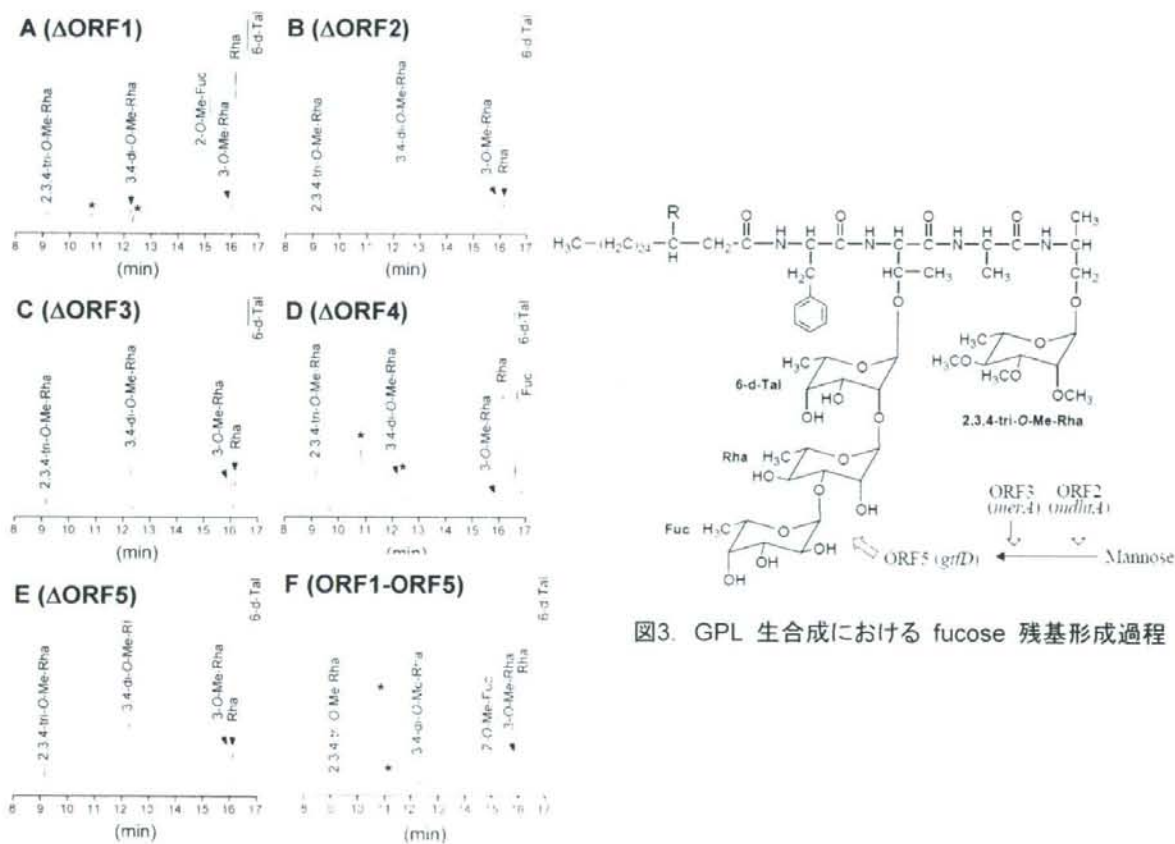


図3. GPL 合成における fucose 残基形成過程

図2. ORF欠失領域導入株由来GPL成分のGC/MS分析

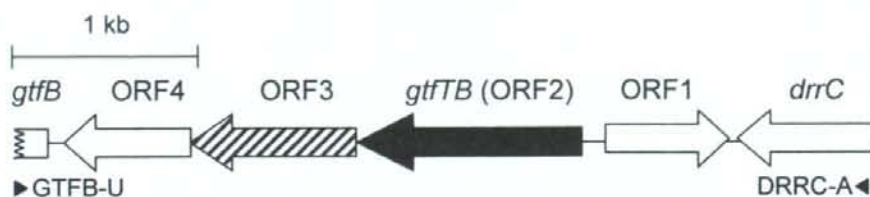


図4. 8型血清型GPL (glucose 含有) 生産株の *gtfB*-*drrC* 領域

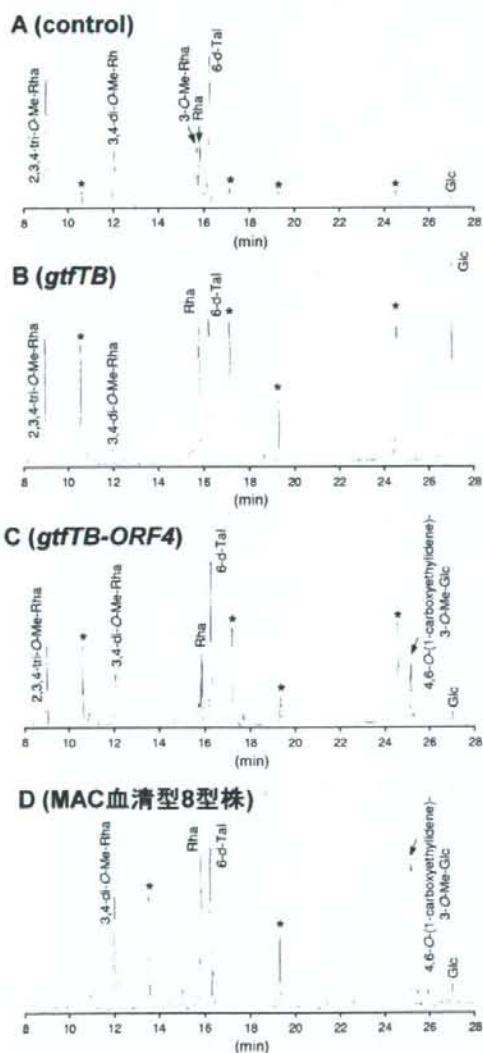


図5. ORF導入株由来GPL成分のGC/MS分析

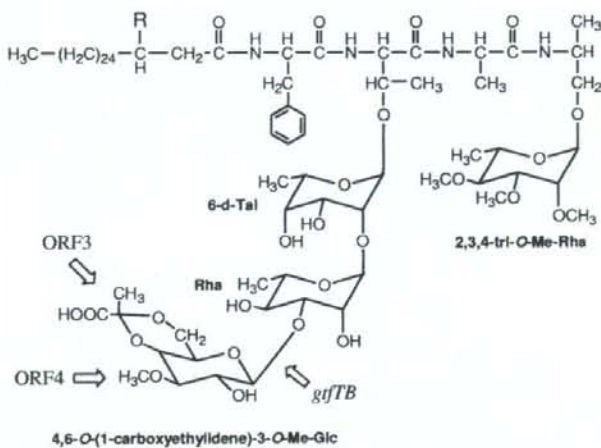


図6. GPL 合成における glucose 残基形成過程

ネコマクロファージ系株化細胞 Fcwf-4 の免疫学的特性と同細胞を用いた *in vitro* 抗酸菌感染系の確立

分担研究者 後 藤 義 孝 宮崎大学農学部

**研究要旨** 猫は人が感染する多くの抗酸菌に感受性を示すが、抗酸菌感染症の動物モデルとして取り扱うのは難しい。しかしマクロファージ Mφ を用いた *in vitro* の感染モデルは様々な情報を提供してくれると考え、ネコ Mφ 系株化細胞 Fcwf-4 を用いた抗酸菌感染系の確立を目指した。同細胞に *M. avium* 2 株、*M. intracellulare* 1 株の計 3 株をそれぞれ感染させ細胞内菌増殖を調べた。Fcwf-4 は低レベルではあるが TNF-α、IL-6、IL-10、IL-12p35 の mRNA 発現が認められ、そのうち TNF-α と IL-6 は LPS 刺激により発現量が増加した。Fcwf-4 からの NO 産生は全体的に少なかったが IFN 刺激により増加した。Fcwf-4 はこれら 3 株の抗酸菌を貪食し、細胞内での菌増殖を許した。菌増殖率は菌株間で差がみられ、抗酸菌の病原性の指標のひとつになり得ると思われる。また LPS、IFN による活性化が Fcwf-4 において認められ、ネコプライマリー細胞と同様にサイトカインや NO 産生が見られた。同細胞を抗酸菌の *in vitro* 感染系モデルとして応用するためには、本感染系の長期間安定化が課題として残された。

### A. 研究目的

非定型抗酸菌(Atypical Mycobacteria: AM)は結核菌群(*Mycobacterium tuberculosis* complex)、らい菌(*M. leprae*)、鼠らい菌あるいは猫らい菌(*M. lepraemurium*)、ヨーネ菌(*M. avium* subsp. *paratuberculosis*)を除く抗酸菌の総称であり、土壌、河川、海水など世界中の環境に広く分布している。ヒトや動物の非定型抗酸菌症(AM症)の主な病原菌は *M. avium* complex (MAC)であり、ヒトでは免疫力低下宿主における日和見感染症として多く認められ、特に AIDS 患者で問題となっている。また動物では豚や鳥で多発し、犬、猫、霊長類などの感染例も報告されている(1,4)。ヒトからヒト、ヒトから動物あるいは動物からヒトへの感染は今のところ確実な報告はないが、同居猫間における伝播を示唆する報告がある。感染動物は人を含む他の動物へ

の感染源や排菌による環境の汚染源となり得るため、潜在的なズーノーシスの可能性が考えられている。

猫の MAC 感染症例は数こそ少ないものの欧米や日本で散発的に報告されており、環境中に存在する菌が経口、経鼻或いは傷口から侵入し発症すると考えられている。猫の MAC 感染症は皮膚限局性の場合と全身性の場合があり、限局性病変から播種性へ発展することもある。限局性 MAC 感染症は付属リンパ節炎を伴う皮膚或いは皮下の結節性病変が特徴であり、付近の傷口からの感染が最も疑われる。全身性 MAC 感染症は発熱、沈鬱、体重減少など非特異的な症状に加え、呼吸器症状や腹腔内マス(多くが腫大した腸間膜リンパ節)が確認されることもしばしばであり、肺や腸が侵入門戸となったと考えられる。猫 MAC 感染症は難治性疾患であることが多く、ヒトへの

感染も考えられることから、予防法、治療法の研究が大切である。

**Fcwf-4** 細胞は猫由来のマクロファージ (Mφ) 系株化細胞で、特性はあまり明らかにされていないが、これまで猫コロナウイルスや猫免疫不全ウイルスの分離培養やブラークアッセイ、中和抗体測定などに用いられてきた。ヒトやマウスの Mφ を使った抗酸菌感染系と同様に、この Fcwf-4 細胞を用いた *in vitro* 感染系の確立は猫 MAC 感染症の病態解明の一助となると考え本実験を行った。

## B. 研究方法

**株化細胞**：ネコ Mφ 系株化細胞 Fcwf-4(ATCC CRL-2787)は、山口大学獣医微生物学講座の前田健准教授より分与を受けた。細胞はウシ胎仔血清(FBS)10%を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)培地(日本製薬、東京)で培養し、実験に使用するまで液体窒素にて保存した。

**抗酸菌**：全身性播種性抗酸菌症の牛から分離された *M. avium*TKBov-01 株、Chester TMC724(S)株(ATCC 25291)(以下TMC724株)、全身性抗酸菌症の猫の肉芽腫から分離された *M. intracellulare*MJFel-01 株の計3株を用いた。

**Fcwf-4 細胞への菌感染ならびに同細胞内における生菌数の測定**：10%FBS 加 DMEM 培地に浮遊させた Fcwf-4 細胞 ( $1.0 \times 10^5$ /ml)にそれぞれの菌株を m.o.i.10 の割合で感染させ 37°C 2.5 時間培養した。遠心洗浄により細胞に貪食されなかった菌を除去した後ゲンタマイシン加 10%FBS 加 DMEM 培地に再浮遊し、24well プレートに分注、した。5%CO<sub>2</sub> 存在下 37°C、所定

の期間培養を行い細胞内の生菌数を求めた。

**LPS**：*Salmonella enterica* serotype Typhimurium 由来のリポ多糖 (LPS)(SIGMA-ALDRICH, USA)を滅菌生理食塩水で希釈して使用した。

**インターフェロン(IFN)**：組換え型ネコ IFN 製剤インターキャット(共立製薬株式会社、東京)、組換え型イヌインターフェロン-ガンマ製剤インタードッグ(共立製薬株式会社、東京)を使用した。バイアルは 4°C で保存し、使用時に 10%FBS 加 DMEM 培地あるいは滅菌生理食塩水で、インターキャットとインタードッグの凍結乾燥粉末を溶解した。0.45 μm フィルターで濾過した後、適宜 10 倍段階希釈を行い実験に使用した。

**Real-time PCR**：細胞からの RNA 抽出は QIA shredder(QIAGEN)、RNesay Mini Kit(QIAGEN)を用いて行い、方法はキットに添付されたプロトコールに従った。

被検体中の RNA 量をナノドロップ(旭テクノグラス株式会社、東京)で測定後、TaqMan Reverse Transcription Reagent(Applied Biosystem, USA)を用いて逆転写による cDNA 合成を行った。1 つのサンプルにつき SYBR Green PCR Master Mix(×2)(Applied Biosystem, USA)10 μl、蒸留水 4.8 μl、Forward and Reverse Primer(10 μM) cDNA サンプル 5 μl の合計 20 μl とし、7300 Real Time PCR System(Applied Biosystem, USA)で 95°C 10min、次に 95°C 15sec、60°C 1min を 40cycle の条件で PCR を行った。

使用した TNF-α、IL-6、IL-10、IL-12 p35、GAPDH の各プライマーは Taglinger らの方法 [Taglinger K. et al. Vet Immunol Immunopathol.122: 216-30, 2008] に基づ



いて作成した (Table-1)。

Table-1 Primers used for real-time RT-PCR

	Forward (Sense) Primer Reverse (Anti-sense) Primer	Amplicon size (bp)
TNF- $\alpha$	CACATGGCTGCTGCACTAATC AGCTTCGGGGTTGCTACTAC	104
IL-6	CTCCACAAGCGCTTC TGCAAGGTTGAGTGTAGTC	127
IL-10	ACITTAAGGGTTACCTGGGTTG CGTCTGTTTGTATGTCGG	108
IL-12p35	AATGTTCCAGTGCCTCAACC CTAGAGTTTGTCTGGCTTCFG	80
GAPDH	GCTGCCAGAACATCATCC GTCAATCCACBACGGACAC	134

サイトカインの増減の評価は  $\Delta\Delta Ct$  法によった。GAPDH をハウスキーピング遺伝子とし、“ $\Delta Ct = \text{サンプル Ct} - \text{GAPDH Ct}$ ”の式より各サイトカインサンプルの発現量を補正した。次に比較の基準とするキャリブレーションサンプルを決め、“ $\Delta\Delta Ct = \text{サンプル } \Delta Ct - \text{キャリブレーションサンプル } \Delta Ct$ ”を求めた。最後に  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  に代入し、キャリブレーションサンプルの発現量を 1 とした場合のターゲットサンプルの相対発現量を算出した。各時間における無刺激サンプルをキャリブレーションサンプルとして用い、LPS や IFN 刺激処理による mRNA 発現量の変化を評価した。

### C. 研究結果

#### Fcwf-4 細胞への菌感染ならびに同細胞内における菌の増殖

結果を Fig.1 に示す。抗生物質非添加の場合、菌は培養液中でもよく増殖したため、ゲンタマイシンを添加して細胞外における増殖を阻止し細胞内のみにおける増殖状態を評価できるよう工夫した。その結果、MJFel-01 株は他の 2 株に比べ、感染直後の細胞への取り込みが有意に低かった。い

ずれも菌株も細胞内でのみ増殖したが、感染 6 日目の菌数を直後のそれと比較すると TKBov-01 株、TMC724 株、MJFel-01 株でそれぞれ約 4.1 倍、約 28.5 倍、約 64.6 倍の増加が見られ、特に MJFel-01 株の増え方が他の菌株に比べ大きかった。

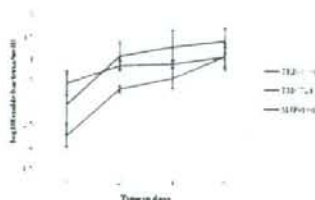


Fig.1 Growth of three strains of mycobacteria in Fcwf-4 (m.o.i.10,  $1.0 \times 10^6$  cells/well) cultured with Gentamycin (TKBov-01:10 $\mu$ g/ml, TMC724:5 $\mu$ g/ml, MJFel-01:2.5 $\mu$ g/ml). Each point represents mean of bacterial count ( $\log_{10}$ )  $\pm$  SD.

#### Fcwf-4 細胞内の菌増殖に及ぼす IFN の影響

菌を感染させた Fcwf-4 細胞をイヌまたはネコ IFN で処理後 3 日目の細胞内菌数を調べた。菌数は IFN 処理群、未処理 (対照) 群のいずれにおいても 0 日目から 3 日目にかけてほぼ同程度に増加した。細胞の形態や菌貪食に対しても IFN 処理による影響は認められなかった。

#### Fcwf-4 細胞からのサイトカイン mRNA 発現

リアルタイム PCR 産物の電気泳動より、無刺激コントロール、LPS 単独刺激、IFN+LPS 刺激いずれの Fcwf-4 からも TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10、IL-12p35 の mRNA のバンドが確認され、特に IL-10 の発現が強かった。TNF- $\alpha$  は LPS 濃度依存的に発現量が増加し、刺激後 6 時間目の発現が顕著に増大した。IL-6 も LPS 濃度に相関した発現量の増加が見られたが、TNF- $\alpha$  と比べて増加の程度は小さかった。また TNF- $\alpha$  と異なり、最

も増大したのは刺激後 2 時間目であった。IFN と LPS の共刺激において、IL-10 では LPS 刺激のみの場合と同じく各 LPS 濃度の刺激条件に関わらず mRNA 発現量にほぼ変化はなかった。IL-12p35 は刺激から 2 時間後にやや増加が見られた (Fig2)。

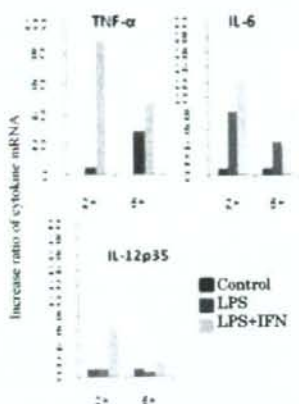


Fig.2 Cytokine mRNA expression of Fcwf-4 cells. Cells were stimulated with or without LPS, LPS+IFN for 2 and 6h in vitro. Then RT-PCR was performed as described in Material and Methods.

#### Fcwf-4 細胞からの NO 産生

全体的に OD 値は低く、NO の産生は弱かった。予め IFN で刺激すると NO の産生が増加した。LPS 刺激後時間毎に NO 産生量の変化を調べたが、産生量に変化はほとんど見られなかった。

#### D. 考察

インターキャットは組換え型ネコ IFN- $\omega$  製剤であり、抗ウイルス活性を有しネコカリシウイルス感染症およびイヌパルボウイルス感染症の治療に使用されている。インタードッグは組換え型イヌ IFN- $\gamma$  製剤であり、犬のアトピー性皮膚炎治療において症状緩和の目的で用いられる。これらの IFN 刺激は、Fcwf-4 細胞における細胞内

MJFel-01 株の増殖に影響を及ぼさなかった。抗酸菌感染において、IFN- $\gamma$  は M $\phi$  からの RNI の産生やファゴライソソームの酸性化を促進し、細胞内抗酸菌の増殖を抑制する。一方 *M. avium* 感染により M $\phi$  は IFN- $\gamma$  のシグナル伝達が阻害され、応答が弱められる。今回 IFN 刺激が菌増殖に影響を与えなかったのは、Fcwf-4 からの NO 産生が少なく効果的な殺菌が誘導されなかったからかもしれない。あるいは IFN 刺激による活性化が不十分であった可能性も考えられる。

Fcwf-4 細胞は無刺激状態でも TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10、IL-12p35 の mRNA 発現が認められたが、全体的に TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12p35 は発現が弱く IL-10 は発現量が多かった。また LPS や IFN 刺激の影響はサイトカインの種類によって異なっていた。

TNF- $\alpha$  は LPS 濃度依存性に mRNA の産生が促進され、その効果は予め IFN で刺激した場合さらに増強された。ネコ骨髄由来 M $\phi$  では LPS 誘発性の TNF- $\alpha$  産生が見られるという報告があり、これはヒト単球系株化細胞でも同様である。また IL-6 は M $\phi$  から構成的に分泌され、抗原、TNF、IL-1 などの刺激によっても産生されることが知られており、マウス M $\phi$  でも LPS 刺激による分泌亢進が認められる。今回 IL-6 も TNF- $\alpha$  同様 LPS 濃度依存性の発現量の増加が見られ、IFN 刺激によりさらに産生は増大した。一方、IL-10 mRNA は LPS、IFN いずれの刺激によっても産生量は変化しなかった。ヒト単球系株化細胞やマウス M $\phi$  では LPS 刺激によって IL-10 は顕著に増加するとの報告がある。今回異なる結果が得られた理由は不明だが、M $\phi$  の動物種差によるものか、あるいは LPS の刺激方法の違いによる

可能性が考えられる。

NO 産生についてみると、LPS 単独刺激は Fcwf4 細胞の NO 産生に影響を与えないが、予め IFN により刺激しておくことで産生がやや促進された。しかしその量は僅かであり Fcwf4 細胞はもともと NO 産生能が低いことが示唆された。Ponti らは、ネコ骨髄由来 Mφ は LPS 刺激のみでは NO 産生は検出レベルに達しないが、リコンビナントネコ IFN-γ により刺激を加えその後 LPS 処理すると NO が検出され、その産生量は IFN-γ の濃度依存性に高くなることを示し、ネコ Mφ はマウス Mφ と同様に IFN-γ により NO 産生が促進されるが、全体的な NO 産生量は低くこれはヒト Mφ と似ていると述べている [Ponti W. et al. Vet Immunol Immunopathol. 82:203-14, 2001]。今回 Fcwf4 細胞で IFN 刺激により NO 産生が増強された点や全体的に低いレベルの産生量であった点は、Ponti W らの報告と一致しており、本細胞がネコ骨髄由来 Mφ と共通する性質を持つことを示している。

以上、Fcwf4 細胞の諸性状は、ネコのマクロファージのもつ性状と類似しており、同細胞のネコの *in vitro* 感染系モデルとしての有用性が示唆された。また猫由来の MJFel-01 株が他の菌株より高感受性を示したことから、本感染系は猫に対する MAC 病原性の指標のひとつとなり得ると考えられる。

## E. 結論

Fcwf4 細胞の諸性状とくに菌の貪食、TNF-α 発現や NO 産生は、ネコのマクロファージのもつ性状と類似しており、同細胞のネコの *in vitro* 感染系モデルとしての有

用性が示唆された。

## 謝 辞

本研究に全面的に協力いただいた宮崎大学農学部獣医学科 6 年生の小野寺澄子さんに感謝します。

## F. 健康危険情報

*M. avium* や *M. intracellulare* はヒトに対する起病性があるが、わが国で保有動物から人へ直接感染した例は知られていない。

## G. 研究発表

(論文発表)

Huang L, Ikejiri A, Shimizu Y, Adachi T, Goto Y, Toyama J, Tanaka H, Akashi R, Uchida K, Miyata H, Haga T: Immunoadjuvant activity of crude lectin extracted from *Momordica charantia* seed. J Vet Med Sci 2008, 70:533-535.  
Huang L, Adachi T, Shimizu Y, Goto Y, Toyama J, Tanaka H, Akashi R, Sawaguchi A, Iwata H, Haga T: Characterization of lectin isolated from *Momordica charantia* seed as a B cell activator. Immunol Lett 2008, 121:148-156.  
Kawano K, Okada M, Haga T, Maeda K, Goto Y: Relationship between pathogenicity for humans and stx genotype in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. Eur J Microbiol Infect Dis 2008 27: 227-232.

(学会発表)

コットンラットにおける骨髄由来マクロファージの性状解析。福山紗千子、芳賀 猛、後藤義孝、片山哲郎、堀井洋一郎、宮田博規、第 146 回日本獣医学会学術集会 2008.9 宮崎

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

結核菌北京型株の多剤耐性変異頻出遺伝系統に関する研究

分担研究者 岩本 朋忠 神戸市環境保健研究所 微生物部

#### 研究要旨

北京型結核菌の集団遺伝学的解析から示唆された多剤耐性変異頻出型の遺伝系統（ST26, ST3）について、リファンピシン耐性関連遺伝子（*rpoB*）と INH 耐性関連遺伝子（*katG*）の変異ならびに自然突然変異出現頻度について検討し、多剤耐性化に有利に働く要因について考察した。薬剤耐性化関連遺伝子の変異に関しては、ST26 では特定の変異（*rpoB*S531L と *katG*S315L）に集中しているのに対して ST3 では変異の分布は多岐にわたっていた。また、ST26 では自然突然変異出現率が通常約 100 倍という高い変異頻度を持つ株の存在が認められたのに対して、ST3 の自然突然変異出現率は通常レベルであった。これらの結果は、多剤耐性化において優位性をもたらすメカニズムが両遺伝系統で異なることを示唆するものである。

## A. 研究目的

昨年度の研究において、北京型結核菌の集団遺伝学的解析から多剤耐性変異が高頻度に出現する遺伝系統の存在が示唆された。本年度は、多剤耐性変異頻出型の遺伝系統について、その遺伝学的特徴と表現型特徴を精査することを目的として、リファンピシン耐性関連遺伝子 (*rpoB*) と INH 耐性関連遺伝子 (*katG*) の変異ならびに自然突然変異出現頻度について検討した。

## B. 研究方法

### 1) 供試菌株

10 領域の一塩基多型 (SNPs) に基づき系統発生別に分類した北京型結核菌多剤耐性 (MDR) 株 97 株 (内 47 株は超多剤耐性 (XDR)) を用いた。

### 2) 塩基配列の解析

リファンピシン耐性に関与する *rpoB* 上の 81bp のホットスポット領域 (RRDR 領域) とイソニアジド耐性に関与する *katG* コドン 315 の変異を塩基配列解析により検出した。

### 3) 自然突然変異出現頻度の算出

多剤耐性変異頻出型の遺伝系統 (ST26, ST3) とその他の遺伝系統 (STK, ST2, ST19, ST10, ST22) および H37Rv 株の自然突然変異出現頻度を Luria-Delbruck fluctuation test により求めた。各遺伝系統株を McFarland No.1 濁度に培養し、約  $10^4$  CFU/ml に希釈した菌液 100 $\mu$ l を 5ml 7H9 プロスに接種し 37°C で培養後、INH 含有 (0.2 $\mu$ g/ml) 7H10 プレートに 50  $\mu$ l を接種し、4 週間培養後のコロニー数を算出した。同時に、薬剤無添加 7H10 培地を用いて CFU を算出し、INH 含有培地上のコロニー数との比率から自然突然変異株出現頻度を算出した。

## C. 研究結果

### 1) RRDR と *katG* 315 変異の分布

遺伝子変異によるフィットネス・コストが低い *rpoB* S531L と *katG* S315L 変異の分布をみると、多剤耐性変異頻出型の遺伝系統である ST26 と ST3 の間で異なる傾向が認められた (Table)。ST26 では、*rpoB* S531L と *katG* S315L 変異の占める割合が、それぞれ、85.7%、71.4% と高い値を示したのに対して、ST3 では 23.5%、50% であった。ST26 はフィットネス・コストの低い変異が頻出するのに対して、ST3 はその他の変異の占める割合が高く、多剤耐性

化において優位性をもたらすメカニズムが両遺伝系統で異なることを示唆するものである。

### 2) 自然突然変異出現頻度

ST26 と ST22 の 2 つの遺伝系統で、高頻度の自然突然変異出現率が認められた。それぞれ、 $7.8 \times 10^{-3}$ 、 $2.81 \times 10^{-3}$  の頻度であり、その他の遺伝系統 (ST3;  $1.54 \times 10^{-5}$ , STK;  $1.25 \times 10^{-5}$ , ST19;  $1.43 \times 10^{-5}$ , ST10;  $3.31 \times 10^{-9}$ ) や H37Rv ( $2.48 \times 10^{-9}$ ) に比べて約 2 オーダー高い値を示した。このような、高頻度の自然突然変異出現株が結核菌においても認められたのは、極めて興味深い知見である。ST26 の多剤耐性化における優位性を支持するものである。一方、多剤耐性変異頻出型のもう一つの遺伝系統である ST3 の自然突然変異出現率は H37Rv などと同等であった。

## D. 考察

結核菌の薬剤耐性化はゲノム DNA 上の特定領域における自然突然変異により引き起こされることから、自然突然変異出現率の高い株は、多剤耐性化においても有利に働くものと推察される。今回、集団遺伝学的解析から多剤耐性変異が高頻度に出現する遺伝系統である ST26 において、自然突然変異出現率が通常に比べて約 100 倍高い株の存在が認められたのは極めて興味深い。多剤耐性変異頻出型のもう一つの遺伝系統である ST3 では、今回の検討からは自然突然変異出現率の高い株の存在は認められていない。ST26 と ST3 は、ともに多剤耐性変異頻出型の遺伝系統であると推察されるが、その有利さに関連するメカニズムはおそらく異なるものと考えられる。薬剤耐性化関連遺伝子 (*rpoB*, *katG*) の変異出現の様相と自然突然変異出現率の結果から、ST26 では自然突然変異率の高さが多剤耐性化に有利に働く原動力になっているものと推察される。その変異率の高さから、ヒト体内において突然変異株が出現しやすく、化学療法下においては必然的に最もフィットネス・コストの低い変異が選択されると考えると、この遺伝系統で認められた *rpoB* S531L と *katG* S315L 変異の高い割合をうまく説明できるものと思われる。しかしながら、同様に自然突然変異率の高い株が、ST22 においても認められた。ST26 の多剤耐性化への有利性には自然突然変異以外の要因も関与しているものと考えられる。なお、我々の集団遺伝学的解析からは、ST22 の遺伝系統は、多剤耐性化においてやや有利に働くもの ( $P = 0.059$ ) と考えられる。

一方、多剤耐性変異頻出型のもう一つの遺伝系統である ST3 では、自然突然変異率は通常レベルであった。この遺伝系統では、多剤耐性化に関与する遺伝子の変異に対するフィットネス・コストのかかり方に対する寛容性が高く働く何らかの因子、たとえば、補償的変異 (compensatory mutation) の存在が多剤耐性化に有利に働いているのかもしれない。ST3 では、一般にフィットネス・コストが低いと考えられている *rpoB* S531L の変異の割合は 23.5% と低く、また、*rpoB* の RRDR 領域での変異の分布は多岐にわたっていることから、何らかの補償的変異の存在が疑われる。今後、近接ゲノム比較を行い、多剤耐性化や自然突然変異率の違いに関するメカニズムを遺伝子レベルで解明してゆきたいと考えている。

#### E. 結論

結核菌北京型株の集団遺伝学的解析から、多剤耐性変異頻出型と推察された 2 遺伝系統 (ST26, ST3) について、その薬剤耐性関連遺伝子の変異出現様式と自然突然変異出現率を比較したところ、両遺伝系統では多剤耐性化に有利に働くメカニズムに違いがあるものと推察された。ST26 では自然突然変異出現率の高さが多剤耐性化への原動力になっているものと思われる。一方、ST3 では多剤耐性化に関与する遺伝子の変異に対する寛容性が高く働く補償的変異の存在が予想される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tomotada Iwamoto, Shiomi Yoshida,

Katsuhiko Suzuki, and Takayuki Wada  
Population structure analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family indicates an association between certain sublineages and multidrug resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 3805-3809 (2008)

Takayuki Wada, Tomotada Iwamoto and Shinji Maeda

Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in East Asia revealed through refined population structure analysis.

*FEMS Microbiology Letters* 291, 35-43 (2009)

#### 2. 主要な学会発表

岩本朋忠、和田崇之、吉田志緒美

結核菌北京型ファミリーのグループ内進化にともなう多剤耐性獲得能力の変化

第 81 回日本細菌学会総会、京都 (2008.3.24-26)

日本細菌学会雑誌、第 63 巻、第 1 号、139 頁、2008 年

岩本朋忠、吉田志緒美、鈴木克洋、和田崇之  
北京型結核菌の遺伝系統別分類とサブグループ間での多剤耐性結核菌出現頻度の比較

第 83 回日本結核病学会総会、東京 (2008.4.24-25)

結核、第 83 巻、第 3 号、317 頁、2008 年

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

TABLE. Mutations in rifampicin-resistance determining region (RRDR) and *katG*: 315

Mutation <sup>a</sup>		No. (%) of MDR TB isolates									
<i>rpoB</i> mutations	<i>katG</i> : 315 mutation	ST26	STK	ST3	ST25	ST19	ST10	ST72			
Leu 511 Pro (CTG → CCG)	None		1 (12.5)								
	Ser 315 Thr										
Gln 513 Lys (CAA → AAA)	None										
	Ser 315 Thr		1 (12.5)	1 (2.9)							
Asp 516 Val (GAC → CTC)	None	1 (4.8)	3 (37.5)	1 (2.9)							
	Ser 315 Thr		1 (12.5)	11 (32.4)							
Ser 522 Leu (TCG → TTG)	None			3 (8.8)							
	Ser 315 Thr			1 (2.9)							
525 (ACG insertion)	None										
	Ser 315 Thr			2 (5.9)					4 (40)		
His 526 Ser (CAC → AGC)	None										
	Ser 315 Thr			1 (2.9)							
His 526 Pro (CAC → CCC)	None										
	Ser 315 Thr								2 (25)		
His 526 Arg (CAC → CGC)	None										
	Ser 315 Thr										
His 526 Leu (CAC → CTC)	None		1 (4.8)								
	Ser 315 Thr										
His 526 Leu (CAC → TTG)	None										
	Ser 315 Thr								1 (12.5)		
His 526 Asp (CAC → GAC)	None										
	Ser 315 Thr				1 (100)						
His 526 Tyr (CAC → TAC)	None		1 (12.5)	2 (5.9)							
	Ser 315 Asn (AGC → AAC)			1 (2.9)							
His 526 Cys (CAC → TGC)	None										
	Ser 315 Thr										
Ser 531 Leu (TCG → TTG)	None										
	Ser 315 Thr	4 (19.0)	1 (12.5)	5 (14.7)					1 (12.5)	4 (40)	
Leu 533 Pro (CTG → CCG)	None	14 (66.7)		3 (8.8)					3 (37.5)		
	Ser 315 Thr										
Ser 512 Ile (AGC → ATC)	None										
	Ser 315 Thr								1 (7.1)		
His 526 Pro (CAC → CCC)	None								9 (64.3)		
Asp 516 Glu (GAC → GAA)	None										
Ser 522 Leu (TCG → TTG)	None										
	Ser 315 Thr			1 (2.9)							
Asp 516 Ala (GAC → GCC)	None										
	Ser 315 Thr								1 (7.1)		
Leu 533 Pro (CTG → CCG)	None										
Mixed peak in 516 (CAC, GTC), 526 (CAC, CAA), 530 Wild-type RRDR	None			1 (2.9)							
	Ser 315 Thr								1 (7.1)	1 (12.5)	
	Ser 315 Thr										
	Ser 315 Thr	1 (4.8)									

<sup>a</sup> The mutant codon is indicated, followed by the nucleotide change.

らい菌による神経病変の病理病態学的解析

分担研究者 後藤 正道 鹿児島大学准教授

研究要旨:ハンセン病の中でも皮疹のない純神経型ハンセン病(Pure Neural Leprosy, 以下 PNL)に注目し、ミャンマーにおいて PNL の頻度・症状・経過について検討した。2005 年 5 月から 2.5 年間のハンセン病新患 752 例中、PNL は 46 例(6.1%)であった。PNL の 46%は 15-30 歳で、87%は男性、52%に神経炎が見られた。治療経過中、3 例に神経炎、2 例に新たな皮疹の出現が見られた。これらの結果より、PNL はハンセン病の発症初期状態と推測される。

A. 研究目的

ハンセン病の多くは皮膚病変と末梢神経障害が合併するが、皮疹を伴わない純神経型ハンセン病(Pure Neural Leprosy, 以下 PNL)も報告されている。ハンセン病の病態とくに発症機序を解明するため、ハンセン病多発国であるミャンマーにおいて、PNL 症例の皮膚病変について検討した。

B. 研究方法

ヤンゴン総合病院ハンセン病外来(CSSC)において、2005 年 5 月から 2 年 6 ヶ月間のハンセン病新患中の PNL 全例を対象とし、全例について同意の上で皮膚組織液の抗酸菌塗抹検査、麻痺はあるが皮疹のない皮膚の生検を施行した。また、全例について WHO/MDT のプロトコールに基づいた化学療法を行い、神経炎合併例はステロイドを併用した。

C. 研究結果

調査期間中の CSSC 新患総数 752 例中、PNL は 46 例(6.1%)であった。これらの 46 例の年齢  $31.0 \pm 13.7$  歳(分布は 8-66 歳)で、男性 40 例、女性 6 例であった。病院からの紹介が 16 例、整形外科からの紹介、一般医外来からの紹介、自発的受診が各々 9 例、皮膚科外来からの紹介は 3 例であった。発症から受診までの期間は 1-182 ヶ月と幅が大きかった。初診時の症状としてはしびれ感が 78%、麻痺が 12%、不全麻痺が 13%、足底などの潰瘍が 11%、神経圧痛が 9%、神経腫大が 7%であった。33 例(72%)では侵されている神経幹の数は 1 本で、残りは複数であった。尺骨神経と総腓骨神経の障害がそれぞれ 57%と 37%に認められた。24 例(52%)に神経炎が見

られた。障害されている神経に左右差はなかった。

皮膚からの塗抹抗酸菌染色は全例に陰性であった。生検では 8 例(17.4%)にハンセン病特異的な組織病理所見が認められた。その内訳は I 群 1 例、TT 1 例、BT 6 例であった。また、12 例に非特異性炎症の組織所見が見られた。

46 例中の 38 例(83%)が治療を終了したが、治療経過中、3 例に神経炎が出現し、2 例に新たな皮疹が出現が見られた。皮疹は神経肥厚部の近くの紅斑であり、境界反応と考えられた。

D. 考察

PNL は、ハンセン病新患の 6.1%と比較的高頻度に認められた。比較的若年の男性に PNL の頻度が高いこと、また皮疹を伴う普通のハンセン病と比べて、整形外科からの紹介率が高いのが注目される。

治療経過中、皮疹が出現する症例が 2 例(4.3%)あったことを考慮すると、PNL はハンセン病の感染・発症モードのなかでは、比較的初期の状態と推測される。

今後、生検標本の詳細な検索により、ハンセン病の確定診断率の向上を目指したい。

E. 結論

ミャンマーにおいて純神経型ハンセン病 PNL の頻度・症状・経過について検討したところ、PNL はハンセン病新患の 6.1%に見られた。治療経過中、新たな皮疹の出現が見られる症例があったことなどを考慮すると、PNL はハンセン病の発症初期状態と推測される。



## G. 研究発表

### 1. 著書

後藤正道：新臨床内科学 第9版（分担執筆）「ハンセン病」（高久史磨ら編集）、pp 1335-1336, 医学書院、東京(2009)

### 2. 論文発表

Junichiro En, Masamichi Goto, Kazue Nakanaga, Michiyo Higashi, Norihisa Ishii, Hajime Saito, Suguru Yonezawa, Hirofumi Hamada, Pamela L. C. Small: Mycolactone is responsible for the painlessness of *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer) a murine study. *Infect Immun* 76:2002-7 (2008)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(特になし)

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

らい菌に対するマクロファージ応答の機構に関する研究

分担研究者 福富康夫

国立感染症研究所ハンセン病研究センター病原微生物部第二室長

研究要旨

ハンセン病における抗らい菌薬であるクロファジミン(B663 ともう)にはマクロファージに対する細胞死誘導活性が存在した。らい菌感染細胞においてもクロファジミンにより細胞死が起こった。そして、この細胞死はアポトーシスであり、クロファジミンの細胞質沈着に伴った小胞体ストレス関連タンパク質発現を伴っていた。一方、クロファジミンの核質への沈着はみられなかった。また、Aurintricarboxylic acid (ATA)はクロファジミンによるアポトーシス誘導を抑制した。ATA にはエンドヌクレアーゼ阻害活性などがあることが報告されているが、クロファジミンの細胞沈着を抑制することが判明し、分光光度計による解析からATAとクロファジミンは会合している可能性が示唆された。さらに、Radiorespirometry によりクロファジミンの抗らい菌活性が確認されたが、ATA は同活性性に対し抑制作用を示し、かつクロファジミンの菌への沈着が抑制されていたことから、細胞やらい菌への沈着は類似の機構が存在する可能性が示唆された。

## A. 研究目的

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

## B. 研究方法

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

**ヒトマクロファージの培養:**健康人末梢血より二段階の比重勾配遠心法により単球を得て 48 穴プレート(3X10<sup>4</sup>細胞/ウェル)、もしくはカパスリップの入った 24 穴プレートウェル中(1X10<sup>6</sup>/ウェル)にまき培養した。Hanks 液にてウェル内を洗浄し非付着細胞を除いて 20%FBS 添加 RPMI1640 培地にて 1 週間以上培養しモノサイトからマクロファージに分化させてから用いた。また、ヌンク製の 8 ウェルタイプ細胞培養ガラスチェンバーに単核球をまき、同様な方法でマクロファージを得た。さらに、ヒト THP-1 細胞株やマウスマクロファージ細胞株 J774 も用いた。

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

いた。48 穴、もしくは 24 穴プレート内カパスリップ上で培養しているマクロファージ、もしくは THP-1 細胞をクロファジミン存在下でフェノールレッド不含 10%FBS 含有 RPMI1640 培地で一晚培養した後、基質液を添加し、数時間後の発色をプレートリーダーにて測定した。また、死細胞からの培地への LDH 放出測定 (Promega 社製)によっても細胞死を評価した。**形態観察:**クロファジミンを添加して培養したマクロファージをメタノール固定してギムザ染色を施し顕微鏡にて形態を観察した。また、グルタルアルデヒド固定した細胞を Hoechst33342 dye にて核染色し、蛍光顕微鏡にて核の形態を観察した。同時に長波長域での励起、吸光条件でクロファジミンの細胞内局在を観察した。

**FACS 解析:**クロファジミン存在下で培養した THP-1 細胞を PBS にて洗浄し、FACS にて赤色蛍光強度を測定した。

**ウエスタンブロット:**クロファジミン存在下にて培養したヒトマクロファージ、もしくは THP-1 細胞を Sigma 社製 cell lytic M 溶液にて細胞を可溶化してライセートを得た。SDS 電気泳動を行ってライセートから分離したタンパクをさらに PVDF 膜に転写して Cell Signal Technology 社製各種抗体(抗小胞体ストレス関連タンパク抗体、抗 caspase 抗体、PARP 抗体、抗β-actin 抗体)を 4 度にて一晚反応させ、次に HRP 標識二次抗体を反応させ化学発光による X 線フィルムへの露出で各種タンパクを検出した。検出後は PVDF 膜を stripping buffer (Pierce 社)に浸して振とうさせて抗体を除去し再度抗体を反応させて他のタンパク検出を行った。

**らい菌生存率測定:** radiorespirometry にて菌の代謝活性を測定した。Buddemeyer 法を用い Franzblau らの方法を改変した。Wheaton 社製の 2ml ガラスバイアルにらい菌を含んだ 1μCi/ml の 1-<sup>14</sup>C-パルミチン酸 (NEC075H) 含有抗菌菌培養用 7H12 培地を 1ml 加え、雑菌の増殖を防ぐためにアンピシリンとアンフォテリシン B

(Sigma 社製) を添加した。よく混合後、バイアルのキャップをゆるめて、シンチレータ含有 20ml 容量プラスチックバイアル中にこのバイアルを挿入した。プラスチックバイアルのキャップを強く閉め、ふ卵器にて 33 度で静置培養した。そしてシンチレーションカウンターにて一週間後の放出されたアイソトープ総量を測定した。

### C. 研究結果

健常人末梢血単核球からプラスチック付着性の単球を精製して培養しマクロファージに分化させた後、濃度 10  $\mu$ g/ml 以上のクロファジミン存在下にて培養すると、24 時間後には約 80% で細胞が縮小化を伴った顕著な形態異常を示した。生細胞判定のためのミトコンドリア活性を指標とした代謝試験(ホルマザン発色)によってこれらの細胞は代謝活性を失い死滅していた。培養上清中の LDH 量も著明に増加することから細胞死が起こっていることが再確認された。この細胞死はらい菌を感染させたマクロファージでも起こった(Fig.1)。マウスマクロファージ細胞株 J774 でもクロファジミンにより細胞死が起こったがウエスタンブロットによる解析からカスパーゼの発現と共に小胞体ストレス関連タンパク質の発現も強く起こった(Fig.2)。さらに、ギムザ染色による顕微鏡下での形態観察からアポトーシスに特徴的な核の凝縮がみられた。同様に蛍光色素 Hoechst33342 で核染色を施して蛍光顕微鏡で観察したところ、核の縮小化・断片化はより明瞭に観察された。また、長波長域で観察したところ細胞質にクロファジミンの沈着がみられたが、核質には沈着がみられなかった(Fig.3)。ヒトマクロファージ細胞株の THP-1 細胞でもクロファジミンにより著明な細胞死が観察され、FACS による解析からはクロファジミン処理後 1 時間目ですでにクロファジミンが沈着し、細胞から発せられる赤色蛍光が捕らえられた (Fig.4)。

aurintricarboxylic acid (ATA) はエンドヌクレアーゼ等の阻害剤として知られている。本研究において、クロファジミン誘導アポトーシスが抑制されたが、FACS による解析からクロファジミンの細胞への沈着が阻害されていることが判明した(Fig.4)。分光光度計にてクロファジミンの吸収スペクトルを測定したところ紫外域と可視域 440nm 付近にピークがあった。ATA 共存下では 440nm 付近のピークが長波長方向に大きくシフトした(Fig.5)。興味あることに、radiorespirometry を用いた抗らい菌活性測定法でクロファジミンの抗らい菌活性(らい菌の代謝活性抑制が指標)が ATA により著明に抑制された(Fig.6)。

### D. 考察

クロファジミンには抗菌活性の他、マクロファージのリゾチーム活性の増強や好中球のスーパーオキシド産生を増強するなど免疫細胞に対する薬理作用があると報告されている。フォスホリパーゼ A2 の活性化や PGE2 産生増強も報告されている。しかし、らい反応を抑制する機構について直接的な証明はされていない。クロファジミンの抗炎症作用についてはラットやモルモットを用いた動物実験において遅延型アレルギー反応を抑制するといった報告がある。また、ヒトにおいてもハンセン病のみならず一部の皮膚疾患では抗炎症剤として用いられている。我々は、ヒト単球由来マクロファージやヒトマクロファージ細胞株 THP-1、マウスマクロファージにおいてクロファジミンによる細胞死が起こることを見出した。細胞の縮小化や核の縮小化が観察されカスパーゼの活性化や DNA 断片化もみられることから、クロファジミンにより誘導されるマクロファージや THP-1 の細胞死はアポトーシスであることが判明した。マクロファージは TNF など炎症性サイトカインやプロスタノイドなど炎症因子を産生する細胞であり、らい反応においても大きく関わっている細胞である。クロファジミンによりこの細胞が除去されることは同薬剤の抗炎症