

作用を考え合わせると興味深い現象である。

蛍光顕微鏡で赤色フィルタを用いてクロファジン存在下で培養した細胞を観察すると、細胞質内にクロファジンの沈着と思われる赤色素が観察された。FACS 解析でも細胞をクロファジンとともに培養すると1時間以内に赤色蛍光のバックグラウンドが著明に上昇しクロファジンが沈着することが分かった。細胞質内での沈着がストレスを惹起し、小胞体ストレス関連タンパク質の発現、さらにはカスパーゼの活性化を誘導しアポトーシスが起るものと予想される。クロファジンは水に溶けにくく脂質親和性がある。生体でもクロファジンを処方された患者中組織、特に脂肪組織には沈着がみられる(組織移行性が強い)。本研究ではATAによりクロファジンの細胞沈着が阻害された。ATAには水酸基が多く、クロファジンが水酸基と会合する可能性のある部分、すなわちフェナジン構造の窒素原子と水素結合をした結果、細胞への沈着が阻害された可能性が考えられる。分光光度計による測定結果でもクロファジンにATAが結合していると推察される(吸収波長ピークのシフト)。抗らい菌作用もATAにより抑制されたことから(Fig.6)、クロファジンの分子の中で、組織親和性を決定する部分とらい菌への親和性を決定する部分が同じ箇所にあるのかもしれない。今後、この点についてさらなる解析を進めたい。

## E. 結論

クロファジンにより誘導されるマクロファージの細胞死は細胞質へのクロファジン沈着によるストレス関連タンパク質の発現が誘因となりカスパーゼ活性化を伴ったアポトーシスであることが判明した。マクロファージは炎症性サイトカインを産生する細胞でもあることから、クロファジンによるマクロファージのアポトーシス誘導はその抗炎症作用と深い関係があると思われた。また、フェナジン構造が細胞親和性を決定する重要な部分であることが示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kai M, Nguyen Puc NH, Hoang Thi TH, Nguyen AH, Fukutomi Y, Maeda Y, Miyamoto Y, Mukai T, Fujiwara T, Nguyen TT, and Makino M.: Serological Diagnosis of Leprosy in Patients in Vietnam by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with *Mycobacterium leprae*-Derived Major Membrane Protein II. Clin Vaccine Immunol 15: 1755-1759, 2008.

Yasuo Fukutomi, Yumi Maeda, Masanori Matsuoka, and Masahiko Makino: Temperature Dependency for Survival of *Mycobacterium leprae* in Macrophages. Jpn J lepr 78(1): 7-16, 2009.

### 2. 学会発表

福富康夫・前田百美・牧野正彦：クロファジンにより誘導されるマクロファージの細胞死とcaspase等細胞内情報伝達分子の動態、第81回日本細菌学会総会、京都、2008年3月

前田百美、田村敏生、福富康夫、牧野正彦：LipoKの細胞障害性T細胞活性化及びエキソソーム産生に及ぼす影響、第81回日本細菌学会総会、大阪、2008年3月

福富康夫・前田百美・牧野正彦：ヒトマクロファージ内におけるらい菌の生存機構、第81回日本ハンセン病学会総会、熊本、2008年5月

Yasuo Fukutomi and Masahiko Makino: Enhanced phox expression in *M.leprae*-infected human macrophages stimulated with IFN- $\gamma$ . 第38回日本免疫学会総会・学術大会、京都、2008年12月

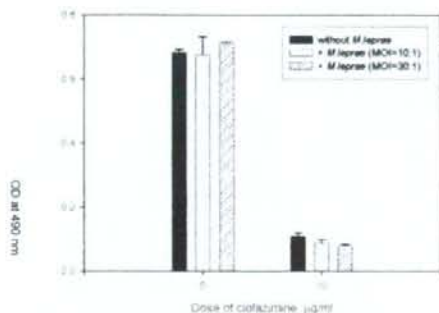


Fig. 1. Cell death-inducing activity of clofazimine in *M. leprae* infected-macrophages by MTS/PMS analysis.

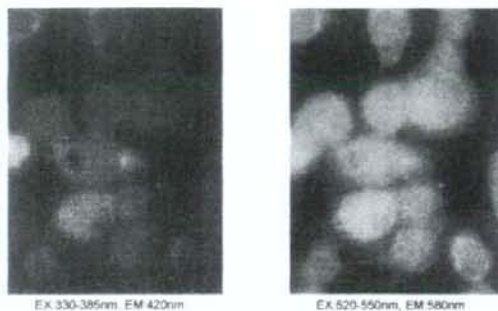
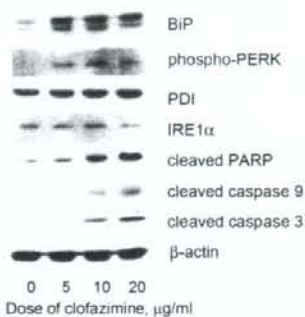


Fig 3. Fluorescence micrograph of human macrophages cultured in the presence of clofazimine for 4 hr. The cells were stained by Hoechst 33342 dye.



When protein folding is disturbed inside ER, synthesis is increased.  
 , an eIF2  $\alpha$  kinase, is a transmembrane protein resident in ER membrane and couples ER stress signals to translation inhibition.  
 is a marker for its activation status.  
 (disulfide isomerase) catalyzes the formation and isomerization of disulfide bonds.  
 mediates the rapid degradation of mRNAs.

Fig. 2. Western blot analysis of expression of ER stress proteins in J774 cells incubated with clofazimine for 7 hr.

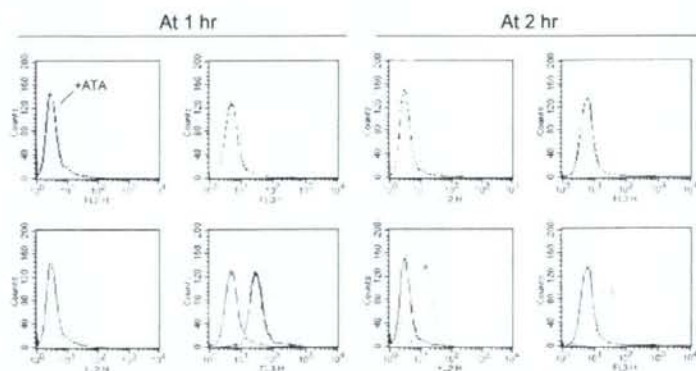


Fig 4. Aurintricarboxylic acid (ATA)-mediated inhibition of clofazimine binding to THP-1 cells. Lower panels: profile on the left, none; profile on the right, +clofazimine; profile on the center, +clofazimine+ATA.

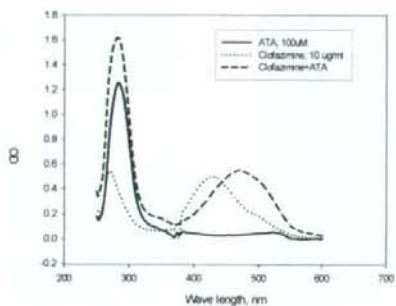


Fig.5. Effect of aurintricarboxylic acid (ATA) on absorption profile of clofazimine in RPMI1640 medium containing 10% FBS.

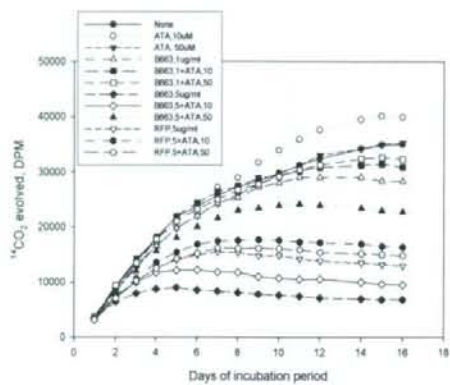


Fig.6. Effect of ATA on Anti-*M leprae* activity of clofazimine (B663) and rifampin by radiorespirometry.

結核菌の細胞内増殖機構の解析における *M. smegmatis* J15cs-pYT923hyg の 有用性

分担研究者 谷口 初美 産業医科大学教授

#### 研究要旨

結核菌の休眠状態の解明には、細胞内増殖性を解析するための適当な host-vector system が必要である。抗酸菌の分子遺伝学的解析に広く使用されている *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 は J774 細胞内で生残できないが、教室保存株 J15cs は生残する。これを宿主としたベクターを開発するため、*Escherichia coli*-*Mycobacterium* shuttle vector pYT923 より pYT923hyg を作成した。この vector は、アンピシリン・ヒグロマイシン・カナマイシン耐性遺伝子とクローニング site を持ち、液体培養においても J774 細胞に感染させても安定に保持された。J774 細胞と J15cs-pYT923hyg のシステムを使用し、細胞内増殖性に影響を与える結核菌の遺伝子を見出した。本システムは、結核菌の細胞内増殖機構の解明に有用であると考えられた。

#### A. 研究目的

生体の感染防御システムをくぐり抜けた結核菌は生体内で生残し、休眠状態となり、生体の免疫力の低下に伴い再燃する。休眠状態の結核菌には抗結核剤の効果が期待できず、このことが結核根絶を困難にしている。この問題を解決するためには結核菌の食細胞内での生残のメカニズムを知る必要がある。結核菌の細胞内増殖性を遺伝学的に解明するためには、貪食細胞内で生残する宿主と安定なベクターとの組み合わせの宿主・ベクターシステムが必要となる。そのため *Mycobacterium bovis* BCG、*M. avium* 等の系が用いられる。しかしこれらは遅発育菌であり、MAC は病原菌である。そこで

広く分子遺伝学的解析に使用されている *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 を改良して J774 細胞内で生残する変異株を分離するなどの試みがなされている。以前、我々は *M. smegmatis* J15cs と pYT シリーズの宿主・ベクター系を構築し、報告している。このベクター系を用いた研究の過程で、J15cs 株が J774 細胞内で生残する傾向を見出した。そこで本研究では、*M. smegmatis* J15cs の細胞内増殖性を検討し、*E. coli*-*Mycobacterium* shuttle vector pYT923 の改良を試み、結核菌の細胞内増殖機構の解析のために有用なシステムを構築することとした。

#### B. 研究方法

菌株および vector

菌株は、*Mycobacterium smegmatis* J15cs と mc<sup>2</sup>155 を使用した。Vector は *E. coli*-*Mycobacterium* shuttle vector pYT923 (Km<sup>r</sup>)、pAL5000 由来の pYUB76 (Km<sup>r</sup>)、*E. coli* plasmid pHP45 Ωhyg (Amp<sup>r</sup>, Hyg<sup>r</sup>)、を使用した。Rv1388, Rv1389, Rv1390 遺伝子は *M. tuberculosis* H37Rv から PCR で増幅したものを用いた。

細胞内増殖

約  $1 \times 10^7$  CFU/well の菌をマウスマクロファージ系細胞 J774 に 3h 感染後、洗浄、200μg/ml アミカシンで 2h 処理し、さらに 2μg/ml アミカシン・5%FCS 加 RPMI で 6 日間培養した。経時的に Ziehl-Neelsen 染色で鏡検し、Triton-X 処理後菌数計測を行った。

電子顕微鏡 (TEM)

グルタルアルデヒド・オスミウムによる二重固定、脱水、包埋、切片を作製し、ウラン・鉛電子染色を行い、JEM-1200EX で観察した。

pYT923hyg と pYT923hyg-Rv1388、pYT923hyg-Rv1388, Rv1389, Rv1390 の作成

pYT923 と pHP45hyg を *Pst*I で切断後 ligation し、pYT923hyg を作成した。また、結核菌の Rv1388 遺伝子とその promoter (916bp)、Rv1388, Rv1389, Rv1390 遺伝子とその promoter を含む断片 (2016bp) を PCR で増幅し、pYT923hyg の Km<sup>r</sup> の *Eco*T22I site に挿入し、pYT923hyg-Rv1388 および pYT923hyg-Rv1388, 1389, 1390 を持った *E. coli* KP7600 の transformant を作成した。Plasmid を精製し、*M. smegmatis* J15cs にエレクトロポレーションにより導入した。

plasmid の安定性

ヒグロマイシンの入っていない 0.05% Tween80-LB broth で培養後、ヒグロマイシン含有または無しの培地でコロニー数を計測し、ヒグロマイシン耐性を示す菌の割合

により、プラスミドの安定性を示した。In vitro の安定性は、Tween80-LB broth で 3 回継代培養して、経時的に算出した。また、J774 細胞内での安定性は 5 日培養後を調べた。

## C. 研究結果

### 1) *Mycobacterium smegmatis* J15cs の細胞内増殖性の検討

感染 2 日後の J774 細胞内生残率は、J15cs 株で 80% であったのに対し、mc<sup>2</sup>155 株は 17%、6 日後には 22% に対し 0.2% であった。J15cs 株は、J774 細胞内で生残するが、mc<sup>2</sup>155 株は殺菌された。また、普通寒天培地で培養した菌を感染させると高い生残率を示したが、小川培地、7H11、LB broth は生残率を低下させた。いずれの培地でも J15cs 株は mc<sup>2</sup>155 株に比べ高い生残率を示した。

### 2) J15cs 株の細胞壁の微細構造

普通寒天培地および小川培地で培養した菌の細胞壁を電子顕微鏡で観察したところ、普通寒天培地で培養した J15cs 株において、一層多く高電子密度層が観察された。小川培地で培養した J15cs、普通寒天培地、小川培地で培養した mc<sup>2</sup>155 にはそのような像は観察されなかった。普通寒天培地で培養した J15cs 株の像は J774 細胞内でも観察された。

### 3) vector の改良と安定性

pYT923 のカナマイシン耐性に加え、アンピシリン・ヒグロマイシン耐性を有し、カナマイシン部分にクローニング site を持つ *E. coli*-*Mycobacterium* shuttle vector pYT923hyg を構築した。このベクターは宿主の in vitro growth, J774 細胞内での生残性に影響を及ぼさなかった。また、pYT923hyg は LB broth での継代および J774 細胞内で約 100% の安定性を示した。

### 4) J774 細胞・J15cs-pYT923hyg システムの応用

本システムを使用し、結核菌遺伝子 Rv1388-1390 を持つ transformant を J774 細胞に感染させた場合、桿状から球状菌体に変化を示すことを見出した。vector や Rv1388 の transformant ではそのような変化は認められなかった。

#### D. 考察

*Mycobacterium smegmatis* J15cs はマウスマクロファージ系細胞 J774 内で生残したが、mc<sup>2</sup>155 は生残できなかった。また、普通寒天培地で培養した菌を感染させた場合に、小川培地での培養に比べより効率よく生残することができた。感染させた菌を電子顕微鏡で観察すると、J15cs の細胞壁は、mc<sup>2</sup>155 や小川培地で培養した場合には見られない高電子密度層を有していた。この細胞壁の構造は生残と関係していると考えられた。

我々は J15cs 株で複製できる *E. coli*-*Mycobacterium* shuttle vector pYT923 を構築していた。しかし、pYT923 はカナマイシン耐性部分にクローニング site を持ち、他の耐性遺伝子を持っていなかった。そこで、さらにアンピシリンとヒグロマイシン耐性を付加した。また、この vector pYT923hyg は液体培地での培養や J774 細胞に感染させても安定に保持され、有用な vector を構築することができた。

J774 細胞・J15cs-pYT923hyg システムを使用し、結核菌遺伝子 Rv1388. 1389. 1390 を持つ *M. smegmatis* J15cs を J774 細胞に感染させた場合に特徴的な形態変化が認められた。これらは operon を形成し、Rv1388

のみと同じ promoter 部位を有するので、結核菌の遺伝子が *M. smegmatis* J15cs で発現されていると考えられた。本システムは結核菌の細胞内増殖性に影響する遺伝子、特に knockout mutant の作成ができない増殖に必須である遺伝子のスクリーニングに有効である。

#### E. 結論

細胞内増殖性に影響を及ぼす結核菌の遺伝子をスクリーニングするための J774・J15cs-pYT923hyg システムを作成した。

#### F. 健康危険情報

主任研究者が記入

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

福田和正, 小川みどり, 宮本比呂志, 谷口初美: 16S rDNA 塩基配列に基づく細菌叢解析手法の検証. 第 80 回日本細菌学会総会, 大阪, 2007

小川みどり, 谷口初美: マクロファージにスメグマ菌を感染させた際の形態学的解析. 医学生物学電子顕微鏡技術学会第 23 回学術講演会および総会, 北九州, 2007

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

新規結核ワクチンの開発と応用：HVJ/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチン

研究分担者 岡田全司 NHO 近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター長

研究者名 岡田全司<sup>1)</sup>、喜多洋子<sup>1)</sup>、金丸典子<sup>1)</sup>、橋元里実<sup>1)</sup>、西田泰子<sup>1)</sup>、仲谷 均<sup>1)</sup>、高尾京子<sup>1)</sup>、岸上知恵<sup>1)</sup>、井上義一<sup>1)</sup>、坂谷光則<sup>1)</sup>、吉田栄人<sup>2)</sup>、金田安史<sup>3)</sup>、中島俊洋<sup>4)</sup>、松本 真<sup>5)</sup>、Babie Tan<sup>6)</sup>、Eiourado de la Cruz<sup>6)</sup>、Paul Saunderson<sup>6)</sup>、David McMurray<sup>7)</sup>

所 属 <sup>1)</sup>国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター <sup>2)</sup>自治医科大学医動物学 <sup>3)</sup>大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療 <sup>4)</sup>ジェノメディア研究所 <sup>5)</sup>大塚製薬研究所 <sup>6)</sup>Leonard Wood Memorial 研究所 <sup>7)</sup>Texas A&M 大学

研究要旨

(1) 新しい治療ワクチンの開発：この HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは初めて結核治療ワクチンとしても有効であることが示された。マウスに結核菌を感染した後、ワクチンを投与し、結核菌減少効果が肺・肝・脾で認められた。カンクイザルに結核菌を気道感染させた後ワクチンを投与し、延命効果及び免疫反応増強が認められ、治療ワクチン効果が認められた。

(2) 新しい結核予防ワクチンの開発 HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンの強力なワクチンを開発した。

新しい HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは、カンクイザル（最もヒト結核感染に近いモデル Nature Med. 1996）で強力な結核予防効果を示した。HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン、はサルで延命効果、胸部 X 線所見（結核病巣）、血沈、体重で強い改善傾向がみられた。さらにリンパ球増殖反応の増強や、IL-2、IL-6、IFN- $\gamma$  の産生増強が示された。

(3) HVJ-エンベロープ / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンを用い、BCG の priming-booster 法で BCG 単独より 1 万強力な結核予防ワクチンを得た。

(4) カンクイザルの系で HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは BCG プライミング、この HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンブースターで著明な延命効果（100%）が認められた。一方、BCG 単独群は 33% の生存率であった。

A. 研究目的

結核罹患率の増加、集団感染が頻発、AIDS や糖尿病患者の免疫不全疾患に高頻度に合併、薬剤耐性結核が増え、いわゆる難治性結核の対策が早急に望まれている。したがって、新しい予防・診断・治療の研究が必須である。

すなわち、①BCG よりも強力な新しい DNA ワクチンやリコンビナント BCG ワクチンの開発を行い、新しい予防・治療の臨床研究を目的とする。②キラー T 細胞の結核免疫に対するメカニズムや本当の重要性に関する研究は不明である。したがって、キラー T 細胞活性と結核発病を分子・遺伝子レベルで解明するとともに、③これらを用いた結核予後診断、難治性診断を行う。

B. 研究方法

- (1) IL-12 gene 及びヒト結核菌由来 H37Rv Hsp (heat shock protein) 65 DNA を HVJ-liposome ベクターに導入した。これらを BALB/C マウス (H-2<sup>d</sup>) に 3 回免疫した後、ヒト結核菌 H37Rv  $5 \times 10^5$ /mouse を i.v 投与した。
- (2) DBA/1 マウスに H37Rv  $5 \times 10^5$ /mouse を i.v 投与した後、HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンを 3 回投与し、治療効果を解析した。
- (3) カンクイザルにヒト結核菌 Erdman 株を経気道投与した。その 1 週間後より 9 回このワクチンを生体内投与し治療効果を解析した。結核感染前、後、ワクチン投与後約 3 週毎に体重、体温、血沈、胸部 X 線、ツ反、免疫反応及び生存率を解析した。
- (4) カンクイザルにこのワクチンを 3 回生

体内投与し、最終免疫4週後にヒト結核菌 Erdman株を経気道投与した。ワクチン投与前、中、感染後約3週毎に体重、体温、血沈、胸部X線、ツ反及び生存率を解析し1年以上経過観察した。

(倫理面での配慮)

- (1) 当院は呼吸器疾患(結核を含む)準ナショナルセンターとして、国立病院機構政策医療呼吸器ネットワーク54施設を東ねている。したがって、倫理委員会は院外委員5名(関西学院大学総長、大阪国際大学政経学教授等)及び各方面の医療従事者(事務系の人も含む)の院内委員5名により構成し、倫理面には十分な配慮をしている。
- (2) DNAワクチン、新しい化学療法、新しい診断法等、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除やインフォームドコンセントに関する文面も記載されている。
- (3) DNAワクチンの臨床応用は、各国の倫理委員会や組換えDNA安全委員会の承認を得てから施行する。
- (4) 治験届の提出とGCPに基づき実施する。
- (5) 実験動物に対しても動物愛護上の配慮が十分なされている。国立病院機構近畿中央胸部疾患センター動物実験委規程の規則に従って、3R(Refinement, Replacement, Reduction)の原則に基づき動物実験委員会で承認された実験を行っている。

C. 研究結果

- (1) HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンは、カニクイザル(最もヒト結核感染に近いモデル Nature Med. 1996)で強力な抗結核予防効果を示した。延命効果、胸部X線所見(結核病巣)、血沈、体重で強い改善傾向がみられた。
- (2) Priming-Booster法で最も強力な新しい結核ワクチンを作製しつつある。本邦では乳幼児にBCG接種を行う。したがって成人におけるboosterワクチンとして上記のワクチンをサル系の系で行った。PrimingはBCG東京ワクチンを用いた。さらにBCGワクチンと新ワクチンのプライミングブースター法で100%の生存を示した。一方BCGワクチン単独群の生存率は33%であった。このように、ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルを用いた実験系で、強力な

新しい結核ワクチンを我々は世界に先駆けて開発した。すなわち、本邦では乳幼児にBCG接種が義務づけられていることにより、プライミングワクチンとしてBCGワクチンを用い、成人ワクチン(小学生、中学生、成人、老人)として切れ味のするどい我々が開発したHVJ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンをブースターワクチンとして用いることにより強力な新しい結核ワクチンの臨床応用が可能となる案を計画中である。

- (3) さらに、カニクイザルを用い、治療ワクチン効果を得た。このHVJ-エンベローブ/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン生存率の改善効果が結核菌投与19週まで得られた。さらに体重増加及び免疫反応の増強の治療効果を得た。
- (4) DBA/1マウスにH37Rvをi.v感染させた後、HVJ-エンベローブ/HSP65DNA+IL-12DNAで治療すると、肺・肝・脾の結核菌数の有意な減少を認めた。すなわち、治療ワクチン効果が得られた。さらに、超薬剤耐性結核菌(Extremely Drug Resistant TB: XDR-TB)をマウスに感染させた後、このワクチンを投与すると、コントロール群に対して有意差をもって延命効果を示した(Log Rankテスト)。すなわち、XDR-TBに対しても治療ワクチン効果を得た。
- (5) 我々が世界に先駆けて開発したSCID-PBL/huの系で結核患者リンパ球をSCIDマウスに生着させ、種々の結核蛋白で免疫し、画期的な結核菌に対する生体内ヒトT細胞免疫解析モデルを開発した。さらに、IL-2レセプターγ鎖ノックアウトSCID-PBL/huのモデルでヒト多剤耐性結核治療モデルを世界に先駆けて開発した。このモデルを用いてHVJ-エンベローブ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチン結核治療効果を得た。

D. 考察

- (1) 新しい結核治療ワクチンの開発 HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンは、治療ワクチン効果を示すことがマウス及びサル(カニクイザル)でも示された。世界の最先端のワクチンであることが示された。
- (2) 新しい結核ワクチン①HSP65DNA+IL-12 DNAワクチン、②リコンビナントBCGワクチンは世界に先駆けてカニクイザルの系でBCGよりも有効な結核予防ワクチンであることを明らかにした。
- (3) これらのワクチンの臨床応用を計画してい



る。

- (4) これらの研究等が極めて高く評価され WHO (World Health Organization : 世界保健機関) より Global Partnership to stop TB (WHO TB stop Partnership) に選出された。さらに WHO STOP TB Vaccine Meeting のメンバー (WGND : Working group on new drug) に選出された。したがってこれらの新しい結核ワクチンを本邦のみでなく全世界に供給して国際貢献を行う用意がある。

## E. 結論

- (1) 新しい治療ワクチンの開発 : この HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは初めて結核治療ワクチンとしても有効であることが示された。マウスに結核菌を感染した後、ワクチンを投与し、結核菌減少効果が肺・肝・脾で認められた。カニクイザルに結核菌を気道感染させた後ワクチンを投与し、延命効果及び免疫反応増強が認められ、治療ワクチン効果が認められた。
- (2) 新しい結核予防ワクチンの開発 HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンの強力なワクチンを開発した。  
新しい HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは、カニクイザル (最もヒト結核感染に近いモデル Nature Med. 1996) で強力な結核予防効果を示した。HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン、はサル系の系で延命効果、胸部 X線所見 (結核病巣)、血沈、体重で強い改善傾向がみられた。さらにリンパ球増殖反応の増強や、IL-2、IL-6、IFN- $\gamma$  の産生増強が示された。
- (3) HVJ-エンベロープ / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンを用い、BCG の priming-booster 法で BCG 単独より 1 万強力な結核予防ワクチンを得た。
- (4) カニクイザルの系で HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは BCG プライミング、この HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンブースターで著明な延命効果 (100%) が認められた。一方、BCG 単独群は 33% の生存率であった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Inoue Y, Matsumoto M,

McMurray D.N, Dela Cruz E.C, Tan E.V, Abalos R.M, Burgos J.A, Saunderson P, Sakatani M. : Novel prophylactic and therapeutic vaccine against Tuberculosis. Vaccine. (in press)

2. Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Sakatani M, Okada M. : The study of Novel Vaccination using Granulysin transgenic mice. Vaccine. (in press)
3. Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Kajiki A, Nagai H, Kurashima A, Oketani N, Hayakawa H, Takemura T, Nakata K, Ito H, Morita T, Matsushita I, Hijikata M, Sakurada S, Sasazuki T, Inoko H. : Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary Mycobacterium avium complex infection. J.Infect. Dis. (in press).
4. Kobayashi K, Sugawara I, Okada M, Hussey G, Andersen P, Sadoff J C. : Research and Development of vaccines against Tuberculosis. Kekkaku. 2008;83:635-640
5. Kannan-Hayashi Y, Okamura K, Hattori S, Uwamura M, Higuchi E, Terayama H, Moriyama M, Mukamoto M, Okada M, Ohsugi Y and Nakamura Y. : Neuritogenic Effects of T Cell-Derived IL-3 on Mouse Splenic Sympathetic Neurons In Vivo. The Journal of Immunology. 2008, vol.180, p4227-p4234.
6. Yoshida S, Suzuki K, Tsuyuguchi K, Iwamoto T, Tomita M, Okada M, Sakatani M. : Evaluation of the INNO-LiPA Mycobacteria v2 for Mycobacterial identification, Kekkaku (in press)
7. Yoshida S, Suzuki K, Tsuyuguchi K, Tomita M, Okada M, Sakatani M. : Evaluation of the discrepant Mycobacterium tuberculosis strains between any ordinary susceptibility testing and rpoB gene analysis by the line probe assay. Kekkaku. 83:577-583.2008
8. Minamoto S, Tsuyuguchi K, Suzuki K, Okada M, Sakatani M. : An adolescent case of pulmonary MAC infection, found 3 years later from bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome. Kekkaku. 2008;83(8):585-90.
9. 岡田全司、喜多洋子、金丸典子、橋元里実、西田泰子、仲谷均、高尾京子、岸上知恵. : 感染症に対するワクチン開発とその免疫理論.

臨床免疫・アレルギー科。  
50(5):533-542.2008.

10. 岡田全司: 特異抗原をターゲットとした Immunotherapy. 日本臨床免疫学会誌. 31(5):356-368.2008.

## 2. 学会発表

1. Okada M, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nomura T.: Induction of CTL and anti-tumor effect by recombinant granulysin, granulysin DNA in mice and SCID mice. 日本癌学会. 10月28~30日

2. 岡田全司、喜多洋子、金丸典子、井上義一、坂谷光則. 新しい結核治療ワクチン (HVJ-エンベロープ/Hsp65+IL-12 DNA) の開発. 日本結核病学会. 4月24・25日

3. 喜多洋子・金丸典子・井上義一・坂谷光則・岡田全司. ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しい治療ワクチン開発:HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン. 日本結核病学会. 4月24・25日

4. 岡田全司、喜多洋子、金丸典子、橋元里実、西田泰子、仲谷均、高尾京子、栖原里佳、岸上知恵、井上義一、吉田栄人、中島俊洋、坂谷光則. 結核に対する新しいワクチン (Hsp65+IL-12 DNA) の効果と CD8 陽性 T 細胞の重要性. 日本呼吸器学会. 6月15~17日

5. 喜多洋子、金丸典子、橋本里実、西田泰子、仲谷均、高尾京子、栖原里佳、岸上知恵、吉田栄人、中島俊洋、坂谷光則、金田安史、E. V. Tan, D.L.C. DelaCruz, 岡田全司. ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた新しい結核ワクチン開発:HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン. 日本呼吸器学会. 6月15~17日

6. 岡田全司. 結核におけるサイトカインの関与. 日本臨床免疫学会イブニングセミナー. 10月17日

7. 岡田全司. 特異抗原をターゲットとした Immunotherapy. 日本臨床免疫学会シンポジウム. 10月17日

8. Masaji Okada, Yoko Kita, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Yasuko Nishida, Hitoshi Nakatani, Kyoko Takao, Kishigami Chie, Yoshikazu Inoue, Toshihiro Nakajima. Activation of CD8 positive T-cells by a novel vaccine (HSP65 DNA+ IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey and mice. 日本免疫学会 (12月1~3日)

9. Masaji Okada, <sup>1</sup>Yoko Kita, <sup>1</sup>Noriko

Kanamaru, <sup>1</sup>Satomi Hashimoto, <sup>1</sup>Yasuko Nishida, <sup>1</sup>Hitoshi Nakatani, <sup>1</sup>Kyoko Takao, <sup>1</sup>Ritsuko Asai, <sup>1</sup>Rika Suhara, <sup>1</sup>Chie Kishigami, <sup>1</sup>Yoshikazu Inoue, <sup>2</sup>Toshihiro Nakajima, <sup>2</sup>Tetsuji Nagasawa, <sup>3</sup>Yasuhumi Kaneda, <sup>4</sup>Shigeto Yoshida, <sup>5</sup>Makoto Matsumoto, <sup>6</sup>Robert Gelber, <sup>6</sup>Esterlina V. Tan, <sup>6</sup>E.C. Dela Cruz, <sup>7</sup>David McMurray, <sup>1</sup>Mitsunori Sakatani.: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. TBV (TB vaccines for the world, TBV 2008) . 4/19~21 (Atlanta, USA)

10. Masaji Okada.: A novel PROPHYLATIC AND THERAPEUTIC vaccine (HVJ-envelope/HSP65 DNA+ IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model. ICWO. 9/23~25. 6<sup>th</sup> ICWO (Italia, Milan)

11. Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Sakatani M, Okada M. :The study of Novel Vaccination using Granulysin transgenic mice. ICWO. 9/23~25. 6<sup>th</sup> ICWO (Italia, Milan)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

岡田全司、高森靖、小川一行、永田欽也

「感染症治療剤 15K granulysin」

WO 03/070268 A1

2002年

岡田全司、吉田栄人、中島俊洋

DNA ワクチン組成物 (結核ワクチン

HVJ-liposome/Hsp65 DNA+IL-12 DNA)

提出日:平成17年9月27日

整理番号: MED-AO504 受付番号:

50501768464

出願番号通知:特願2005-280379

2005年

岡田全司、吉田栄人、松本真

「抗酸菌症ワクチン baculo virus/Hsp65DNA」

2005年

岡田全司、大杉義征、三原昌彦

「キラーT細胞の誘導抑制剤」  
特許申請中

岡田全司、大杉義征、三原昌彦  
「心臓移植における拒絶反応抑制剤」  
特許申請中

2. 実用新案登録
3. その他

## 結核菌感染マクロファージにおける Rab GTPase の網羅的局在解析

研究分担者 小出 幸夫 浜松医科大学理事

本研究において結核菌によるファゴリソソーム形成阻害機構の解明をめざし、結核菌感染マクロファージにおけるファゴソーム局在性 Rab GTPase の網羅的解析をおこない、局在変化のあった Rab 遺伝子のファゴリソソーム形成における機能を明らかにした。20 のファゴソームに局在する Rab タンパク質のうち、15 の Rab タンパク質が結核菌感染マクロファージにおいてその局在が変化した。これらのドミナントネガティブ変異体を発現するマクロファージにおいて、ファゴソームの酸性化とファゴソームへのカテプシン D の局在を調べることによってファゴソーム熟成における機能を明らかにした。以上の結果は、ファゴソーム熟成とファゴリソソーム形成に数種類の Rab GTPase が関与すること、結核菌はこれらの Rab GTPase の細胞内局在を変化させることによって細胞内寄生を獲得していることを示唆する。

## 研究目的

結核菌は細胞内寄生性細菌で、この増殖能はファゴリソソーム形成を阻害することによって獲得している。このことは、結核菌は感染したマクロファージの小胞輸送機構を変調させていることを示唆する。本研究において結核菌感染マクロファージにおける Rab GTPase の網羅的局在解析を行うことによって結核菌が標的とする Rab 遺伝子を明らかにして、今後のワクチン開発に有効な情報を得る。

## 研究方法

1. GFP 融合 Rab GTPase 発現マクロファージ: pEGFP-C1 にマクロファージ発現 Rab GTPase をクローニングしたプラスミドを作成した。これらのプラスミドをもちいて、Raw264.7 マクロファージ細胞に電気穿孔法によって遺伝子導入した。2. 結核菌感染マクロファージの顕微鏡観察: 遺伝子導入を行ったマクロファージ細胞に結核菌を感染させた。結核菌感染マクロファージを 1% パラフォルムアルデヒドを含む PBS で固定して、PBS で洗浄後に顕微鏡観察を行った。顕微鏡観察は LS-1 共焦点レーザー顕微鏡システム (横河電機) を用いて行った。3. 免疫染色: 結核菌感染マクロファージを 3% パラフォルムアルデヒドを含む PBS で固定して、PBS で洗浄した後、カテプシン D 抗体を用いて免疫染色を行った。その後、顕微鏡観察を行った。

## 研究結果

1. 40 のマクロファージ発現性 Rab GTPase を GFP 発現プラスミドベクターにクローニングした。マクロファージにおいてこれらの GFP 融合 Rab GTPase の発現を確認できた。2. 黄色ブドウ球菌ファゴソームと結核菌ファゴソームに局在する Rab 遺伝子を比較した。黄色ブドウ球菌ファゴソームには 20 の Rab 遺伝子が局在したが、結核菌ファゴソームにはそのうちの 15 の Rab 遺伝子に局在変化を確認した。3. これらのドミナントネガティブ変異体を発現するマクロファージにおいて、ファゴソームの酸性化とファゴソームへのカテプシン D の局在を調べた。Rab7、Rab20、Rab39 はファゴソームの酸性化に、Rab7、Rab20、Rab32、Rab34、Rab38 がカテプシン D のファゴソームへの局在に関与することが明らかになった。

## 考察

これまで、結核菌ファゴソームには初期エンドソームタンパク質は局在するが、後期エンドソームタンパク質やリソソームタンパク質は局在せず、ファゴソーム熟成が阻害されていると考えられていた。本研究において、ファゴソーム熟成と

ファゴリソソーム形成に数種類の Rab タンパク質が関与すること、結核菌はこれらの Rab タンパク質の細胞内局在を変化させることによって細胞内寄生を獲得していることを示唆する。

## 結論

本研究の結果は、結核菌は感染マクロファージの小胞輸送機構を変調させることによって、持続的なファゴリソソーム形成を阻害して、マクロファージ内で増殖を行うことを示唆する。

## 研究発表

### 1. 論文発表

- Aoshi, T., J. A. Carretero, V. Konjufca, Y. Koide, E. R. Unanue, and M. J. Miller. 2009. The cellular niche of *Listeria monocytogenes* infection changes rapidly in the spleen. *Eur. J. Immunol.* Jan 7. [Epub ahead of print]
- Aoshi, T., B. H. Zinselmeyer, V. Konjufca, J. N. Lynch, X. Zhang, Y. Koide, and M. J. Miller. 2008. Bacterial entry to the splenic white pulp initiates antigen presentation to CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity* 29: 476-486.
- Uchijima, M., T. Nagata, and Y. Koide. 2008. Chemokine receptor-mediated delivery of mycobacterial MPT51 protein efficiently induces antigen-specific T-cell responses. *Vaccine* 26: 5165-5169.
- Nagata, T., T. Aoshi, M. Uchijima, and Y. Koide. 2008. In vivo hierarchy of individual T-cell epitope-specific helper T-cell subset against an intracellular bacterium. *Vaccine* 26: 5123-5127.
- Hashimoto, D., T. Nagata, M. Uchijima, S. Seto, T. Suda, K. Chida, H. Miyoshi, H. Nakamura, and Y. Koide. 2008. Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *Mycobacterium tuberculosis* induces specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses in the lung. *Vaccine* 26: 5095-5100.
- Aoshi, T., T. Nagata, M. Suzuki, M. Uchijima, D. Hashimoto, A. Rafiei, T. Suda, K. Chida, and Y. Koide. 2008. Identification of an HLA-A\*0201-restricted T-cell epitope on the MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium*

*tuberculosis*, by MPT51 overlapping peptide screening. *Infect. Immun.* 76: 1565-1571.

11. Ikehara, Y., N. Shiuchi, S. Kabata-Ikehara, H. Nakanishi, N. Yokoyama, H. Takagi, T. Nagata, Y. Koide, K. Kuzushima, T. Takahashi, K. Tsujimura, and N. Kojima. 2008. Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal phagocytic cells. *Cancer Lett.* 260: 137-145.
2. 学会発表
1. 右藤智啓、内嶋雅人、永田 年、辻村邦夫、小出幸夫. 2009. 結核菌の Heat-shock protein 70 (HSP70) を結核菌抗原 MPT51 に結合させた分子融合型 DNA ワクチンは抗原特異的 T 細胞を効率よく誘導する. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋、3 月発表予定).
2. 内嶋雅人、永田 年、辻村邦夫、小出幸夫. 2009. ケモカイン融合型 DNA ワクチンにより誘導される抗原特異的 CD8+ および CD4+ T 細胞の解析. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋、3 月発表予定).
3. 瀬戸真太郎、小出幸夫. 2009. 結核菌によるファゴソーム局在性 Rab GTPase の局在変化とファゴリソーム形成阻害機構の解析. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋、3 月発表予定).
4. 永田 年、鈴木大介、辻村邦夫、小出幸夫. 2008. DNA ワクチンを用いた結核菌低分子量分泌蛋白のマウス T 細胞エピトープの同定. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋、3 月発表予定).
5. 鈴木大介、永田 年、辻村邦夫、松本壮吉、小出幸夫. 2008. DNA ワクチンを用いた *Mycobacterium* DNA-binding protein 1 (MDP1) のマウス T 細胞エピトープの同定. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋、3 月発表予定).
6. Seto, S., and Y. Koide. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* modulates the network of Rab GTPases in attenuation of phagosome maturation. Keystone symposium. (Keystone, USA, 1 月)
7. Nagata, T., L.-X. Wang, and Y. Koide. 2008. Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51 overlapping peptides screening. *DNA Vaccines* 2008. (Las Vegas, USA, 12 月)
8. Suzuki, D., T. Nagata, S. Matsumoto, and Y. Koide. 2008. Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1). *DNA Vaccines* 2008. (Las Vegas, USA, 12 月)
9. Tsujimura, K., Y. Ikehara, T. Nagata, Y. Koide, and N. Kojima. 2008. Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposomes targeting to intraperitoneal macrophages. *Vaccine* 2nd Global Congress. (Boston, USA, 12 月)
10. Suzuki, D., T. Nagata, S. Matsumoto, and Koide Y. 2008. Characterization of murine T-cell epitopes in Mycobacterial DNA-binding protein 1. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 (京都、12 月).
11. Uto, T., M. Uchijima, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. Genetic fusion of Heat-shock protein 70 to a mycobacterial antigen enhances the antigen-specific T cell responses. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 (京都、12 月).
12. Uchijima, M., T. Nagata, K. Tsujimura, K. Shibata, and Y. Koide. Analysis of antigen-specific CD8+ and CD4+ T-cell responses induced by MIP-1a-MPT51 fusion DNA vaccination. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 (京都、12 月).
13. 瀬戸真太郎、小出幸夫. 2008. 結核菌感染マクロファージにおける Rab GTPase の網羅的局在解析. 第 91 回細菌学会関東支部総会 (千葉、10 月).
14. Seto, S., and Y. Koide. 2008. *Mycobacterium tuberculosis*

modulates the network of Rab GTPases to inhibit phagolysosome biogenesis in macrophage. 第8回あわじ感染症・免疫フォーラム (淡路、9月).

15. Seto, S., and Y. Koide. 2008. Live *Mycobacterium tuberculosis* inhibits phagolysosome biogenesis in macrophages by modulating localization of Rab GTPase proteins on its phagosomes. 43<sup>rd</sup> US-Japan conference on tuberculosis and leprosy. (Baltimore, USA, 7月

厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業）

結核菌の同定、耐性検査へのマイクロアレイの応用に関する研究  
-バングラデシュにおいてサルより分離された結核菌群菌の遺伝学的解析-

分担研究者 鈴木定彦 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター教授  
研究協力者 中島千絵 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター  
研究協力者 福島由華里 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター  
研究協力者 **Mohammad Zeaur Rahim** バングラデシュ国際下痢症共同研究センター

研究要旨 結核菌群菌の人獣共通感染症起因性を追求するためには、結核様疾患にて斃死した動物よりその起因菌を分離・同定し、得られたデータを蓄積してゆく必要がある。本研究では、バングラデシュの首都ダッカにある動物園猿舎において斃死した2頭のアカゲサルより得られた抗酸菌2株の遺伝学的性状を解析し、得られた菌株がこれまでに種として登録されていない結核菌群菌の一種である可能性を示した。また、類似した遺伝子型を持つ結核菌群菌が他国の結核様疾患のヒトの臨床検体およびオリックスの病変部より分離されており、広い宿主域を有している可能性も示唆された。



## A.

### 研究目的

抗酸菌は重要な人獣共通感染症起因病原体のひとつと考えられており、動物および人における抗酸菌症とその起因菌のサーベイランスは重要な課題と考えられている。本年度の研究では、結核様疾患を有する動物における起因病原体に焦点を絞り、研究を進めた。

## B. 研究方法

**抗酸菌株：** バングラデシュの首都ダッカにある動物園で斃死した2頭のアカゲザル (*Macaca mulatta*) 肺病変部より従来の処理法により得られた沈渣をレーウエンシュタイン-ヤンセン (L-J) 培地で培養して得られた菌株を用いた。

**DNA調整：** 上記で得られた2菌株よりフェノールクロロフォルム法を用いてDNAを抽出した。

### Region of Difference (RD) の解析：

結核菌群菌をさらに詳細に鑑別するためには、結核菌群菌の祖先から分化してゆく過程で不可逆的に喪失した染色体上の領域の解析を進めるのが最適と考えられたため、Region of Difference (RD) を標的として選定した。*M. africanum*、*M. caprae*、*M. bovis*はそれぞれ、RD9、RD9+RD12、RD9+RD12+RD4を欠いている(図1)。

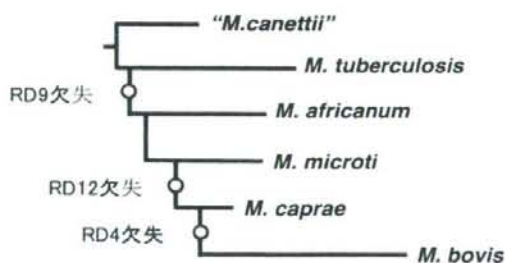


図1. 結核菌群菌におけるRDの欠失

また、*M. bovis* BCGではRD9+RD12+RD4に加えてRD1の欠失も見られる。本研究ではそれぞれのRDを特異的に増幅できるプライマーを用いたPCRにより、アカゲザル由来抗酸菌にお

けるこれらの存在の有無を確認した。用いたプライマーセットとPCRの条件を表1に示した。

表1 本研究に用いたプライマー

|          |                                  |
|----------|----------------------------------|
| RD1-F    | 5'-CGACGGGTCTGACGGCCAAACTCATC    |
| RD1-R    | 5'-CTTGCTCGGTGGCCGGTTTTTCAGC     |
| RD4-F    | 5'-GTGCGCTCCACCCAAATAGTTGC       |
| RD4-R    | 5'-TGTCGACCTGGGGCCAAATCAGTC      |
| Rv3120-F | 5'-GGTATTGCGCCCATATCCTG          |
| Rv3120-R | 5'-CCTGGCTTCAAGCACCATTCC         |
| mmpL6F   | 5'-GTATCAGAGGGACCCGAGCAG         |
| mmpL6R   | 5'-CATAGATCCCAGGACATGGTG         |
| gyrBF    | 5'-TCGGACGCGTATGCGATATC          |
| gyrBR    | 5'-ACATACAGTTCGGACTTGGCG         |
| TbD1F    | 5'-CGTTCAACCCCAACAGGTA           |
| TbD1R    | 5'-AATCGAACTCGTGGAAACACC         |
| PPE55F   | 5'-AGGACAACCCCGACAGCTGCTACCAACAT |
| PPE55R   | 5'-AGCGTCACTGTCGGCCCTATCCTG      |

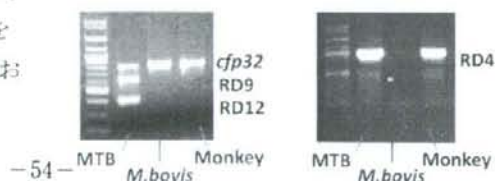
**遺伝子多型解析：** RD解析に加えて、結核菌群菌鑑別に頻用される遺伝子多型解析を実施した。標的遺伝子としては、mmpL6、gyrB、TbD1およびPPE55を対象とした。PCRにより目的遺伝子断片を増幅させた後、PCRに用いたプライマーによりPCR産物の塩基配列を直接決定した。

**スポリゴタイピング：** 以前の報告 (Proc. US-Japan cooperative medical science program, p15-19, 2006)に従って実施した。

## C. 研究結果

**バングラデシュにおいてサルより分離された抗酸菌の特徴** ダッカ市内の動物園猿舎において2頭のアカゲザルが斃死した。解剖の結果、肺に結核様病変が見られたためL-J培地を用いて分離培養を実施したところ、結核菌様のコロニーが見られたため、チール・ネールゼン染色-鏡したところ、抗酸菌が検出された。さらに、16SリボゾームRNA遺伝子の塩基配列を決定したところ、結核菌群菌であることが強く示唆された。

**RDの存在様式** RD検出PCRを実施した結果、RD1陽性、RD4陽性、RD9陰性、RD12陰性であった(図2)。



そのため、被検菌株はどちらも*M. caprae*かその近縁種である可能性が示唆された。

**遺伝子多型解析** 以上の結果から更に詳細な解析が必要なものと考えられたことから、*mmpL6*、*gyrB*、*TbD1*および*PPE55*を対象として遺伝子多型解析を実施した。塩基配列を決定し、既知の結核菌群のそれと比較したところ、*mmpL6*の1653番目の塩基がGであり。また、*gyrB*、*TbD1*および*PPE55*のPCR産物の塩基配列は種としては登録されていない結核菌群*Oryx bacillus*と同一であった。

**スポリゴタイピング:** 図3に示すパターンが得られた。

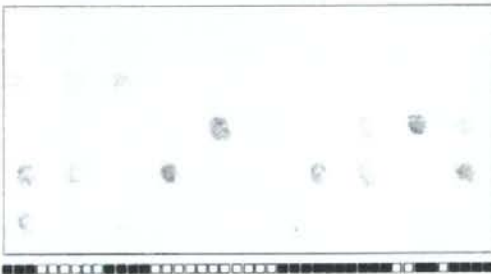


図3 アカゲザル結核病変由来菌株のスポリゴタイプ

#### D. 考察

以上に得られたデータは、バングラデシュにおいてアカゲザル2頭より分離された結核菌群が以前オランダにおいてオリックスおよびヒト、サウジアラビアにおいてオリックスの結核様疾病の原因となった*Oryx bacillus*と同一菌種である可能性を強く示唆するものであった。本報告書では示さないが、共同研究者のMohammad Zeaur Rahim博士がバングラデシュにおいてウシの肺病

変から検出した結核菌群のスポリゴタイプの一部も同一であった。また、ヒト由来株のスポリゴタイプデータベース中にもアカゲザル由来株のスポリゴタイプと同一のパターンを示すものが7つ見られた。以上の結果は、ヒト、サル、ウシ、オリックスにおいて結核様疾患の共通起病原体となる可能性を持つ結核菌群が存在していることを示唆するものであった。また、バングラデシュにおいて見られたアカゲザルおよびウシ、オランダにおけるヒトおよびオリックス、サウジアラビアにおけるオリックスにおいていずれも肺病変から菌が検出されていることから、気道感染の可能性が示唆された。

#### E. 結論

本研究でアカゲザルより見いだされた結核菌群は、ヒトにおいて結核様疾病の原因となっている可能性が考えられ、人獣共通感染症起病原体としての重要性が示された。今後、ヒト結核患者由来菌株を対象としたサーベイランスの必要があるものと考えられた。

#### F. 健康危険情報

宿主域の広い結核菌群が人獣共通感染症原因菌としてヒト-動物間で伝播している可能性がある。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Edagawa A, Kimura A, Doi H, Tanaka H, Tomioka K, Sakabe K, Nakajima C, Suzuki Y. (2008) Detection of culturable and nonculturable *Legionella* species from hot water systems of public buildings in Japan. *J. Appl. Microbiol.* 105:2104-2114
- 2) Matsuoka M, Aye KS, Kyaw K, Tan EV, Balagon MV, Saunderson P, Makino M, Nakajima C, Suzuki Y. (2008) A novel method to simply detect mutations conferring drug resistance in *Mycobacterium leprae* based on a DNA microarray, and its applicability in developing countries. *J. Med. Microbiol.* 57: 1213-1219 (Co-first author).

- 3) Motomura W, Yoshizaki T, Ohtani K, Okumura T, Fukuda M, Fukuzawa J, Ogasawara M, Jang S-J, Nomura N, Yoshida Y, Suzuki Y, Kohgo Y, Wakamiya N. (2008) Immunolocalization of novel collectin CL-K1 in murine tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 56: 243-52.
- 4) Pandey BD, Poudel A, Yoda T, Tamaru A, Oda N, Fukushima Y, Lekhak B, Risal B, Acharya B, Sapkota B, Nakajima C, Taniguchi T, Phetsuksiri B, Suzuki Y. (2008) Development of an in-house loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of Mycobacterium tuberculosis and evaluation in sputum samples of Nepalese patients. *J. Med. Microbiol.* 57: 439-43. (Corresponding author)
- 5) Higuchi M, Matsuo A, Shingai M, Shida K, Ishii A, Funami K, Suzuki Y, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. (2008) Combinational recognition of bacterial lipoproteins and peptidoglycan by chicken Toll-like receptor 2 subfamily. *Dev. Comp. Immunol.* 32:147-55.
- 6) 鈴木定彦、中島千絵、福島由華里、田丸亜貴、松葉隆司. (2008) 結核の化学予防 *臨床と微生物* 25:669-675 (First author, Corresponding author)
- 7) 鈴木定彦、大谷克城、張成宰、本村旦、若宮伸隆. (2008) 新規コレクチン CL-L1, CL-P1, CL-K1 の構造と機能. *臨床検査* 52: 861-869. (First author)
- 8) 鈴木定彦、中島千絵. (2008) 結核菌群リファンピシン耐性遺伝子同定検査. *臨床検査項辞典* (櫻林郁之介他編、医歯薬出版) 分担執筆 p644-645. (First author, Corresponding author)

## 2. 学会発表

- 1) 中島千絵、鈴木定彦. マルチプレックス PCR 法を用いたバングラデシュにおける結核菌群菌の侵陰度調査. 日本感染症学会. 2008年4月、松江

## 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

分担研究報告書

ゲノム疫学の創出を目的とした結核菌の遺伝的多様性解析

分担研究者 長谷 篤 大阪市立環境科学研究所微生物保健担当課長

研究要旨

日本国内で主として分離される結核菌を遺伝型別解析に基づいて系統分類し、代表的な5株を選択して全ゲノム比較解析を行った。

A.研究目的

日本国内で分離される結核菌は、大部分が北京型 (Beijing family) と呼ばれる系統群に属していることが知られている。同系統群は点突然変異 (SNPs) やゲノム欠失など、種々の遺伝的特徴により系統的に細分化され、国内由来株では大まかに5つの小系統群に分類できることが明らかとなった。これらは日本に特有の集団構造であり、分子進化的には段階的に系統分岐してきた微小進化群であることが示唆されている。本研究目的は、これらの小系統群それぞれのゲノム情報を比較解析することである。疫学的情報から推察される細菌学的性質の遺伝的要因の同定や、日本特有の宿主・社会現象を経て定着してきた結核菌集団構造の多様性について、俯瞰的な情報の集積が期待される。

B.研究方法

日本国内で全体の約10%以上を構成する各小系統群 (B5, B3, B1, B2/T, B4) から、典型的な VNTR genotypes を呈する代表株を各1株ずつ選択し、マイクロアレイ CGH (Comparative Genomic Hybridization) による全ゲノム (約4.4 Mb) 変異マッピングを行った。具体的には、H37Rv の既知ゲノム配列 (Genbank ID AL123456) に基づいてタイリングアレイを設計し (オリゴ長 29 mer、インターバル 7 bp)、H37Rv および解析株ゲノムDNAから作成された蛍光プローブによる競合的ハイブリダイゼーションによって変異領域の推定を行った。

C.研究結果

1) ゲノム欠失領域の同定

CGH 解析によって広域にわたって変異が検出されたゲノム領域は解析株において遺伝子の欠失が生じていることが予想される。このような領域は既知の欠失領域も含めて33箇所認められ、各株において多様な遺伝子欠失が生じていることが明らかとなった (表1)。変異が断続的に疑われる領域は遺伝子重複などによる蛍光シグナルの乱れに起因する可能性があり (表2)、慎重に塩基配列解析を行う必要があると考えられた。

2) 各菌株における SNPs

H37Rv ゲノム配列に対して、点突然変異、すなわち SNPs であることが推定される部位を抽出した。全株に共通して検出された SNPs は988ヶ所で、現在全ゲノム配列が解明されている結核菌 (3株) において確認される SNPs と共通の箇所が多数含まれていた (H37Rv: 341ヶ所, CDC1551: 66ヶ所, および F11: 3ヶ所)。この結果はこれまでに推定された北京型結核菌の系統分岐とよく相関している。一方で、各株にはそれぞれ特異的な SNPs も多数検出されており、欠失変異と同様、多様なゲノム個性が形成されていることが伺われる。

D. 考察

欠失や SNPs を含む遺伝子の機能は多岐にわたっており、各株のゲノム個性が細菌学的な特性に影響を与えていると考えられた。特に、菌体表面タンパク質をコードし、抗原特異性との関連性