

表2 QFT判定不可例と判定可能例の臨床背景の比較

治療内容	QFT判定不可 (n=17)	QFT判定可能 (n=36)
mPSLパルス療法	1(6%)	1(3%)
経口ステロイド大量	2(12%)	5(14%)
同 中等量	3(18%)	8(22%)
同 少量	4(24%)	6(17%)
免疫抑制剤併用	2(12%)	10(28%)
無治療 (NSAIDsのみを含む)	5(29%)	6(17%)
ツベルクリン反応 (陽性例)	0	1(3%)
末梢血リンパ球数 (μL)	844	1,280*
SLE DAI (平均)	14.4	8.5*

*P<0.05 Mann-Whitney U

表3 結核発病例

症例	疾患	治療内容	QFT	PPD	結核病名・診断根拠
① 64才、男	RA+IP	PSL 25mg	陰性	陰性	結核性胸膜炎・胸水PCR+
② 76才、女	RA+IP	PSL 30 mg +tacrolimus	陰性	陰性	肺結核・喀痰PCR+
③ 76才、女	SSc+ SjS	PSL 30 mg +tacrolimus	陽性	陽性	肺結核・喀痰菌+
④ 81才、女	SjS	NSAIDs, 過去に TNF-α-Antagonist	陽性	n.d.	肺結核・喀痰菌+
⑤ 75才、男	側頭動 脈炎	PSL 17.5mg	陽性	n.d.	粟粒結核・喀痰菌+
⑥ 72才、女	SjS+ HES	PSL 16mg	陽性化	陰性	肺結核・喀痰菌+
⑦ 49才、男	FUO	なし	陽性	陽性	肺結核、結核性腹膜炎 ・喀痰菌+

病ではなく結核と診断された症例である。7例中5例(71.4%)でQFT陽性となり、ツ反は検査実施できた5例中2例(40%)が陽性であった。このうち症例6および7ではQFTの陽性結果が結核症の早期発見に寄与した。

D. 考察

膠原病患者は、ステロイドや免疫抑制剤のほか

最近進歩が著しい生物学的製剤を用いられることが多い。これらは難治性疾患の予後の改善に寄与しているが、副作用として免疫抑制に伴う日和見感染症の発病リスクが高まる。結核感染および発病に関してもハイリスクグループであり、とくにTNFα阻害剤は結核発病のリスクを最大10倍にも上昇させる。

今後、わが国の医療はますます高度化するが、その一方で治療に伴う医原的な免疫抑制患者の増加が予想され、これが結核院内感染のリスクを上昇させると同時に判定を困難なものとしている。

QFT はツ反よりも免疫抑制患者における結核診断に有用と考えられている。Kobayashi ら (ERJ, 2007) は、様々な免疫不全者における QFT の有用性を評価しているが、特に免疫抑制剤使用患者では、判定不可率が高かった (27.8%)。Matulis ら (Ann Rheum Dis, 2008) の膠原病患者を対象とした報告では、判定不可率は 5.6%であり、ステロイドの使用により増加しないと報告している。また Ponce de Leon ら (J Rheumatol, 2008) からの RA 患者を対象とした報告では、判定不可率は 11.5%と報告している。

このように QFT は免疫不全状態、特に免疫抑制剤使用患者において判定不可例が増加する可能性が示唆されていたが、我々の検討では、これらの報告と比べて SLE 患者を除く膠原病患者では判定不可例はきわめて少数であった (6/235 例、2.6%)。しかし、SLE 患者においては 17/63 例 (27.0%) で判定不可となった。判定不可例の多くは Mitogen 刺激の低反応であったが、一部 Control の異常高値が判定不可の原因となる例が見られた。更に、判定可能例との臨床背景の比較検討では、両群の免疫抑制剤治療内容に大きな差はなく、判定不可例では、判定可能例と比較して末梢血リンパ球数が有意に低値であり、SLE の活動性指標が有意に高かった。ツ反はともに 1 例をのぞき陰性であった。また、結核発病患者での陽性率は 71%とやや低値となったが、早期発見に寄与した症例もあり、その有用性が評価できた。

以上より免疫抑制剤使用による QFT の影響は従来の報告よりも軽微であり、結核感染の診断に有用であると考えられた。一方免疫抑制剤の使用とは別に、疾患そのものが示す免疫異常によると考えられる判定不可例が SLE に多く見られ、疾患活

動性低下後に再検する必要があると考えられた。

E. 結 論

膠原病患者における免疫応答では、免疫抑制剤による影響は限定的であるものの、疾患そのものの示す免疫異常により判定不可となる症例が特に活動性の高い SLE 症例では頻度が高く、活動性の低下を待って再検する必要があると考えられた。

免疫不全者が多数存在する入院患者において、疾患そのものの免疫異常による判定不可例は、かなり稀な病態と考えられ、今後ますます増加が予想される免疫抑制患者における結核院内感染管理に、QFT は有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

ツ反による、結核発病者および感染者の判定は免疫抑制患者においては困難であり、偽陰性による本来必要な化学予防の未実施による発病リスクの増大および発病者の発見遅延による集団感染リスクの増大につながる可能性がある。このため、ツ反に代わる感染判定法である QFT を軸とした結核院内感染管理体制の確立が急務である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 飯沼由嗣, VII 医療関連感染, E-4 結核, 感染症専門医テキスト, 日本感染症学会編集, 南江堂, in press.

2. 学会発表

1. 飯沼由嗣, 他. 膠原病患者における QFT-2G の検討. 第 83 回日本結核病学会総会, 東京, 2008.
2. 武田菜穂, 飯沼由嗣, 他. SLE 患者の結核診断における QFT-2G の有用性. 第 52 回日本リウマチ学会総会, 札幌, 2008.
3. 武田菜穂, 飯沼由嗣, 他. SLE の結核診断における QFT の有用性と問題点. 第 106 回日本

- 内科学会総会，東京，2009（予定），
4. 飯沼由嗣，他．要望演題1：QFT，職員接触者
検診におけるQFTの有用性の評価，第84回日本
結核病学会，札幌，2009（予定）．

II. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録、その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
 薬剤耐性菌等に関する研究
 分担研究報告書

***Mycobacterium avium* complex (MAC) 特異的糖蛋白脂質抗原を用いた
 喀痰培養陰性（気管支内視鏡的）肺 MAC 感染症の血清診断**

研究分担者 小林 和夫（国立感染症研究所 免疫部）

研究要旨

喀痰培養陰性（気管支内視鏡的）肺 MAC 感染症において血清抗 GPL 核 IgA 抗体を検出する試作診断キットの血清診断は診断感度：73.6%、特異度：96.5%であった。試作診断キットは1）迅速（所要：約3時間）、2）非侵襲性、安全であり、培養陰性（気管支内視鏡的）肺 MAC 感染症の診断に有用である。

研究協力者

北田 清悟 国立病院機構刀根山病院・
 呼吸器内科医長
 前倉 亮治 国立病院機構刀根山病院・
 副院長

本研究では、気管支内視鏡的 MAC 感染症（陰性：喀痰培養や核酸増幅検査、陽性：内視鏡的気管支洗浄液、経気管支や肺組織生検検体）の血清診断に関し、試作キット（TAUNS Laboratory、静岡）を用い、その有用性を評価した。

A. 研究目的

非結核性抗酸菌感染症は結核など抗酸菌感染症の約20%を占めるが、特に、*Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症は非結核性抗酸菌感染症の70-80%を占め、最頻である。MACは環境菌であり、診断確定に臨床経過を考慮するため、長期間（少なくとも1か月）を要する。また、MACは抗微生物薬に対し多剤耐性を示すため、治療に難渋し、根治は困難である。MAC感染症は「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）」の対象外疾患であるが、多くの肺 MAC 感染症患者は喀痰抗酸菌塗抹陽性の時点で「肺結核」（2類感染症）として届けられ、隔離を余儀なくされているのが実情である。

MACは特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質（GPL）を有し、化学的にGPLは全てのMACに共通なGPL核と可変的な糖鎖部分から構成されている。研究分担者らはGPL抗原やGPL核抗原を用い、患者血清抗GPL核IgA抗体を検出による血清診断を開発してきた。その結果、患者血清抗GPL核IgA抗体価の測定や推移がヒトMAC感染症の迅速診断、病変の広がりや疾患活動性の評価に有用であることを既に報告した（Clin. Infect. Dis. 35: 1328-1335, 2002、Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12: 44-51, 2005、J. Clin. Microbiol. 43: 3150-3158, 2005、Eur. Respir. J. 29: 1217-1223, 2007）。

B. 研究方法

アメリカ合衆国胸部疾患・感染症学会の診断基準（2007）に合致した「喀痰培養陰性（気管支内視鏡的）肺 MAC 感染症：28症例（男/女：0/28、平均年齢：65.8歳）」および対照肺疾患「細菌性肺炎；*Pseudomonas aeruginosa*、*Haemophilus influenzae*、*Streptococcus pneumoniae*、*Staphylococcus aureus*、*Klebsiella oxytoca*、肺結核など：28症例（男/女：10/18、平均年齢：62.5歳）」から得られた血清について抗GPL核-IgA抗体価を測定した。全例、HIV-1および-2抗体は陰性である。なお、研究計画は国立病院機構刀根山病院研究倫理審査委員会で承認され、また、患者血清採取に際し、インフォームドコンセントを得た。試作キット製作企業（TAUNS Laboratory、静岡）など、利益相反はなかった。

表1. 対象患者背景

	MAC PD M-AMC PD-5 (Unclassified: 3)	Non-MAC disease	P value
N	28	28	
Male/female, n (%)	9/23	10/18	P=0.01
Age, years	65.8 ± 8.8	62.5 ± 13.7	NS
BMI	18.7 ± 2.5	15.8 ± 2.3	NS
Smokers, n (%)	0 (0)	7 (25.0)	P<0.05
ESR, mm/hr	24.6 ± 17.6	30.2 ± 20.3	NS
CRP, mg/L	4.05 ± 1.02	3.72 ± 1.45	P=0.01
CRP, mg/dL	0.1 ± 0.0	3.5 ± 3.1	P<0.01

Definition of abbreviations: MAC PD = *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease; BMI = body mass index; ESR = erythrocyte sedimentation rate; NS = not significant; CRP = C-reactive protein; NS = not significant

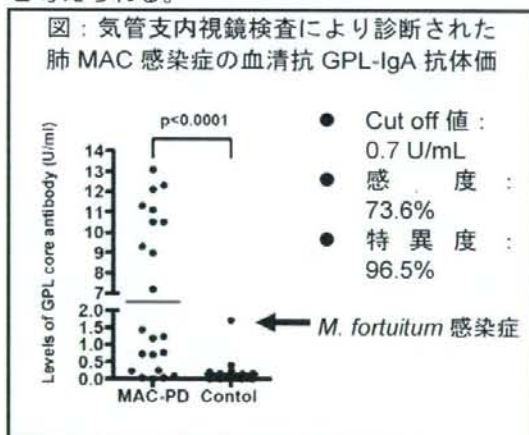
表 2. 非 MAC 感染症

Organisms	n = 28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
<i>Haemophilus influenzae</i>	3
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	2
<i>M. tuberculosis</i>	1
<i>M. fortuitum</i> (Rapid grower)	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
None	13

C. 研究結果

抗体検出の所要時間は約 3 時間であり、大幅に短縮できた（培養：少なくとも 1 か月）。抗体陽性カットオフ値を 0.7 U/mL に設定した場合、気管支内視鏡的肺 MAC 感染症における診断感度：73.6%、特異度：96.5%（図）であり、喀痰培養陽性 MAC 感染症に比し、約 10% の低感度であった。対照肺疾患のうち、1 症例（*M. fortuitum* 感染症）が陽性を示したが、*M. fortuitum* は非結核性抗酸菌、かつ、細胞壁 GPL を有するため、血清抗 GPL 核-IgA 抗体が陽性と考えられる。

図：気管支内視鏡検査により診断された肺 MAC 感染症の血清抗 GPL-IgA 抗体価



D. 考察

気管支内視鏡検査は侵襲性、かつ、苦痛を伴うことが多い。他方、血清診断は体外診断であり、安全、かつ、迅速・簡便である。さらに症例を蓄積し、肺 MAC 感染症における血清診断の有用性を確認・評価する予定である。今後、解析症例数を増加し、血清診断の臨床実用化に向け、多民族や異なる地域における評価、免疫不全（HIV-MAC 重複感染症など）における解析、体外診断薬の承認・認可、さらに、血清診断を診断基準に追加など、進捗させる予定である。なお、Dr. Charles L. Daley（米国胸部疾患

学会診断基準-2007：作成委員）と日米国際共同研究を推進している。

E. 結論

喀痰培養陰性（気管支内視鏡的）肺 MAC 感染症において血清抗 GPL 核 IgA 抗体を検出する試作診断キットの血清診断は診断感度：73.6%、特異度：96.5%であった。試作診断キットは 1）迅速（所要：約 3 時間）、2）非侵襲性、安全であり、培養陰性（気管支内視鏡的）肺 MAC 感染症の診断に有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kitada, S., K. Kobayashi, S. Ichiyama, S. Takakura, M. Sakatani, K. Suzuki, T. Takashima, T. Nagai, I. Sakurabayashi, M. Ito, and R. Maekura. 2008. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium*-complex pulmonary disease using an enzyme immunoassay kit. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177: 793-797.
- Nakata, N., N. Fujiwara, T. Naka, I. Yano, K. Kobayashi, and S. Maeda. 2008. Identification and characterization of two novel methyltransferase genes that determine the serotype 12-specific structure on glycopeptidolipids of *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.* 190: 1064-1071.
- Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P. J. Brennan, K. Kobayashi, M. Makino, S. Matsumoto, H. Ogura, and S. Maeda. 2008. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.* 190: 3613-3621.
- Fujiwara, N., and K. Kobayashi. 2008. Chapter IV. Mycobacterial glycolipids and host responses. *Glycolipids: New Research*. Sasaki, D., editor. Nova Science Publishers: New York/USA. 99-116.
- 松本 壮吉、小林和夫. 2008. 結核ワクチン研究の現状と展望. *臨床検査* 52 : 1149-1153.
- 小林和夫. 2008. 再興した感染症「結核」の診断・治療・予防法. *Biophilia* 4 : 30-34.
- 小林和夫、菅原 勇. 2008. ミニシンポジウム I. ワクチン研究の現在と将来. *結核* 83 : 635-640.

2. 学会発表

1. 小林和夫、菅原 勇. 2008. ワクチン研究の現状と将来 (ミニシンポジウム). 結核, 83 : 245, 2008. 第 83 回日本結核病学会総会 (東京, 4 月).
2. 松本壮吉、藤原永年、吉村満美子、尾関百合子、西内由紀子、小林和夫. 2008. Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)による増殖と細胞壁合成の同調メカニズム. 結核, 83 : 341, 2008. 第 83 回日本結核病学会総会 (東京, 4 月).
3. 平山幸雄、吉村満美子、尾関百合子、菅原 勇、青木俊明、西内由紀子、小林和夫. 2008. ヒアルロン酸の結核病巣における産生と局在. 結核, 83 : 342, 2008. 第 83 回日本結核病学会総会 (東京, 4 月).
4. 仁木 誠、松本壮吉、和田崇之、小林和夫. 2008. 抗酸菌の薬剤感受性における MDP1 の調節機構の解析. 結核, 83 : 342, 2008. 第 83 回日本結核病学会総会 (東京, 4 月).

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)
特に、なし。

薬剤耐性菌等に関する研究班
非結核性抗酸菌の薬剤耐性に関する研究

研究分担者 柴山恵吾 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨

この研究では、*Mycobacterium avium* の薬剤耐性メカニズムについて解析を行ってきたが、その解析の過程で薬剤排出蛋白をコードする MAP0075 遺伝子上流に新しい Insertion Sequence, IS1642 を見出した。この IS は *M. smegmatis* で報告されている IS1549 と高い相同性を持つものだった。この IS はゲノム上に複数コピー存在し、IS に隣接する Direct repeat 配列は一般的な IS のものと大きく異なり、非常に長くまたその長さも様々であった。この IS は比較的頻繁にゲノム上で転移するものであることが分かった。この IS をプローブにして臨床分離 *M. avium* 株を Southern blotting 解析を行ったところ、バンドパターンは非常に様々だった。この結果から、この IS は菌株が同一クローンかどうかの見分け等高い分離能が必要とされる分子疫学解析に用いる事が出来ると考えられた。この IS1642 に関する知見は、FEMS Microbiol Lett. 2009 Feb;291(2):216-21 に発表した。

研究協力者：

森茂太郎、朴貞玉(リサーチレジデント)、和知野純一(国立感染症研究所 細菌第二部)、小川賢二(独立行政法人国立病院機構 東名古屋病院)

A. 研究目的

非結核性抗酸菌、特に臨床的に多く分離される *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) は多くの薬剤に対して耐性で、ゲノム上に薬剤排出蛋白をコードしていると考えられる遺伝子が 30 以上存在する。非結核性抗酸菌の薬剤耐性は、結核菌のように抗菌薬のプレッシャーにより遺伝子に変異をもつものが選択されて出現するのではなく、もともと自然耐性である。この研究では研究の初年度より非結核性抗酸菌の薬剤耐性のメカニズムについて薬剤排出機構に焦点を当てて解析を行ってきた。そしてその過程で、新規の Insertion Sequence IS1642 を見出した。この IS は分子疫学解析のツールとして有用と予想されたので、その基礎

的な解析を行うこととした。

B. 研究方法

1. 菌株、及び IS1642 遺伝子の同定

解析に用いた臨床分離菌株は、地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立呼吸器アレルギー医療センターの松本智成先生と独立行政法人国立病院機構東名古屋病院の小川賢二先生より分与いただいた。その他に、ATCC より購入した *M. avium* ssp. paratuberculosis K-10 (BAA968)、*M. avium* 株 2 株(25291, 15769)、*M. intracellulare* 2 株(13950, 25225)、そして当研究室に保存されていた *M. intracellulare* 5 株、*Mycobacterium marinum*、*Mycobacterium szulgai*、*Mycobacterium simiae*、*Mycobacterium fortuitum*、*Mycobacterium abscessus*、そして *Mycobacterium bovis* BCG 日本株を用いた。IS1642 は、臨床より分離された *M. avium* 株のゲノムを抽出し、MAP0075 遺伝子上流を PCR により増幅して見出した。

2. サザンプロット解析

各株のゲノムを抽出し、PvuII で消化して IS1642 の遺伝子をプローブとしてサザンプロット解析を行った。

3. IS1642 の塩基配列中のプロモーター活性の解析

IS1642 のプロモーター活性は、この IS をクローニング vector の pVV16 にクローニングして、さらにその下流に GFP 遺伝子をクローニングし、発現される GFP 蛋白の蛍光強度を測定することにより調べた。

4. 塩基配列の accession number

IS1642 の全長の塩基配列の accession number は AB453386、IS1642 と 161 bp のダイレクトリピートを含む塩基配列の accession number は AB453387 に登録された。

C. 研究結果

1. 新たな IS の解析

臨床分離 *M. avium* No. 3 株の薬剤排出遺伝子 MAP0075 の上流に、*M. avium* K-10 のゲノムデータベース上には無い新たな IS が見出された。この IS は 1642bp、50%以上の GC content、504 アミノ酸からなる ORF を含んでいるものだった(図 1A)。この遺伝子は *M. smegmatis* で報告されている IS1549 と高い相同性を持っているものだった(塩基配列相同性 75.6%)。この IS の遺伝子構造を図 2A に示した。14bp の terminal inverted repeat があり、その外側に遺伝子の transposition に関わる 161bp の Direct repeat が存在した。*M. avium* ではこれまでにこの IS の報告はないため、他のいくつかの臨床分離株について IS の有無、コピー数を Southern blotting で調べた(図 2)。株によりバンドのパターンは異なり、コピー数も異なった。この IS を持たない株もあった。バンドの数より、この IS は 0-9 コピー存在することが分かった。MAP0075 遺伝子以外の場所に存在するこの IS のコピーについても Direct repeat を調べたところ、他に 2 コピーについては塩基配列を決定する事

が出来、それぞれ長さは 5bp, 59bp だった。なお、*M. intracellulare* およびその他の *Mycobacterium* 属の菌種においては、IS は検出されなかった(図 3, 4)。

2. IS1642 のプロモーター活性

IS は、他の菌種においてはその中にプロモーター活性があり薬剤耐性遺伝子の上流に挿入されて、薬剤耐性の獲得に関与することが知られている。今回見出された IS が同様にプロモーター活性を持ち、薬剤排出遺伝子の発現を上昇させて薬剤耐性獲得に関与しているという可能性を検討するため、この IS のプロモーター活性を調べた。発現 vector の pVV16 の vector 上のプロモーター部位を取り除き、GFP 遺伝子をクローニングし、その GFP 遺伝子の上流に IS をクローニングして *M. smegmatis* を transform し、GFP の発現を調べた。発現は蛍光顕微鏡で菌を観察するとともに、蛍光プレートリーダーにより蛍光強度を定量することにより調べた。*M. smegmatis* は、transform 前の親株も、若干の蛍光が観察された。IS と GFP をクローニングした vector で transform した *M. smegmatis* も、若干の蛍光が観察されたが、親株との差は有意ではなかった。なお、GFP をカナマイシン耐性遺伝子に置き換えた実験も行ったが、有意な耐性上昇は見られなかった。

3. IS1642 の転移の解析

IS1642 を持つ *M. avium* 株を 10 回継代し、ゲノムを抽出してサザンプロットで解析したところ、10 回継代したものはバンドが 1 本増えていた(図 5)。このことから、この IS1642 はゲノム上で比較的高頻度に転移が起こるものと考えられた。

D. 考 察

本研究で H20 年度は新たに見出した IS1642 の基礎的な解析を行った。

この IS1642 にコードされている transposase は、*M. smegmatis* で報告されている IS1549 と相同性が高く、また、この蛋白と相同性が高い蛋

白 IS1623 と IS1634 の間で特によく保存されているアミノ酸配列の構造領域についてもよく保存されていた。これらの transposase はいずれも長くかつ様々な長さの direct repeat を持つことが報告されているので、この特に保存されたアミノ酸配列の構造領域は長くかつ様々な長さの direct repeat の形成に重要な構造と予想される。Direct repeat の長さが長いことの生物学的、遺伝子学的な意義は現在のところ明らかでない。ゲノム上での IS の挿入部位で生成される direct repeat の長さが長ければ、その挿入部位に存在する遺伝子が破壊される確率が低くなり、生存に必須な遺伝子が壊される危険性が低くなると思われるが、一方で direct repeat の長さが長ければ、homologous recombination によりその IS 自体が失われる確率も高くなると考えられる。IS の direct repeat の長さが長く、かつ様々な長さであることの意味については今後のさらなる研究が必要とされる。

この IS1642 のプロモーター活性は検出が出来なかった。この IS は単独ではプロモーター活性がないものと考えられる。一般的に IS は挿入部位においてその部位のゲノムの配列との組み合わせで新たなプロモーター配列が形成され、そしてその下流の遺伝子の転写が活性化されるという事が多いので、この IS1642 についても同様の機序によりプロモーター配列がゲノムの挿入部位で形成されているのかもしれない。IS1642 は比較的頻繁にゲノム上での転移が起こる事から、病原性や薬剤耐性にかかわる遺伝子の転写を ON/OFF する事で環境への適応、in vivo での病原性の発揮などに関与している可能性もあると考えられる。

IS1642 はゲノム上で転移が比較的頻繁に起こり、そして Southern blotting のパターンは菌株により非常に異なることから、この IS は、非常に解像度の強い分子疫学マーカーとして用いることが出来ると考えられる。例えば同一患者において *M. avium* による感染が繰り返される場合、同一の菌株の再燃であるのか別の菌株による再感染であるのかの区別が可能である

と考えられる。

E. 結 論

M. avium より新規の Insertion sequence IS1642 を見出した。この IS1642 は長くかつ様々な長さの Direct repeat を伴うという特徴があった。この IS はゲノム上で比較的高頻度に転移が起こるもので、株によるサザンプロットパターンも非常に多様であったので、解像度の高い分子疫学ツールとして応用が出来ると考えられた。

F. 健康危険情報

現在我が国においては非結核性抗酸菌の感染症は少なくなく、非結核性抗酸菌の中でも *M. avium* は比較的分離頻度が高い。この菌に感染した患者は、再発することがまれではない。このようなケースの感染制御策を考えていく上で、この研究で見出した IS は菌株のタイピングのためのツールとして有用で、感染対策の策定のための情報に資すると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

A novel insertion sequence, IS1642, of *Mycobacterium avium*, which forms long direct repeats of variable length.

Piao Z., Shibayama K., Mori S., Wachino J., Arakawa Y.

FEMS Microbiol. Lett. 291(2009):216-221.

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録、その他

なし



図2. *M. avium*株のIS1642のサザンブロット解析。*M. avium*株よりゲノムDNAを精製し、制限酵素Pvu IIで消化後IS1642の配列をプローブとしてSouthern blottingを行った。Lanes 1 to 9, *M. avium* clinical isolates; lane 10, *M. avium* K-10; Lane 11, *M. avium* ATCC25291; lane 12, *M. avium* ATCC15769. M, molecular size marker, lambda HindIII. このISは *M. avium*に0-数コピー存在することが分かった。

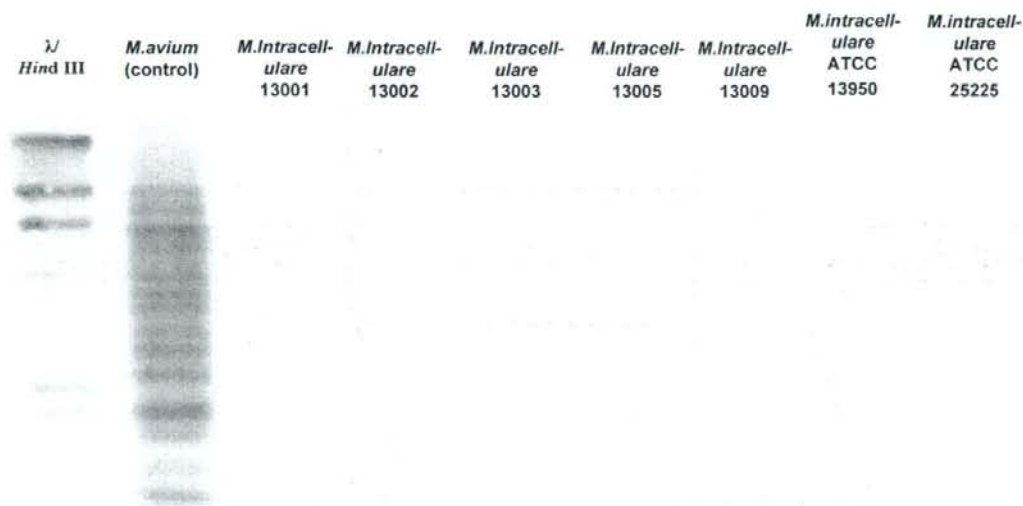


図3. *M. intracellulare*のIS1642のサザンブロット解析。いずれの株もIS1642は存在しなかった。

M. avium (control) *M. marinum* *M. szulgai* *M. simiae* *M. fortuitum* *M. abscessus* *M. bovis* BCG *M. tuberculosis* H37Rv



図4. その他の *Mycobacterium* 属の菌種のIS1642のサザンブロット解析。いずれの菌種もIS1642は存在しなかった。

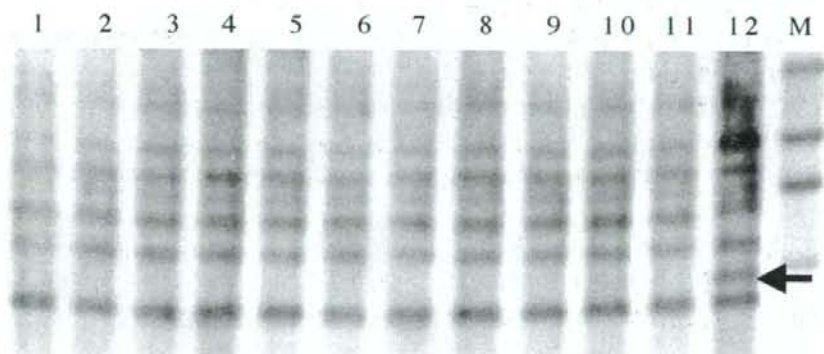


図5. In vitro 継代培養によるIS1642の転移。Lane 1-11, 平板上の11コロニーから遺伝子を抽出したもの。Lane 12, 継代を10回繰り返したもの。矢印の位置のバンドが増えている。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

多剤耐性抗酸菌感染症の治療法の確立の基礎研究

研究分担者 牧野 正彦（国立感染症研究所・病原微生物部）

研究要旨

マクロファージの結核菌に対する防御において重要な役割を果たして一酸化窒素(NO)産生は、CD4⁺ T細胞が産生するIFN- γ 、TNF- α や、CD40リガンド-CD40を介したマクロファージ-CD4⁺ T細胞間相互作用によって調節されると考えられている。昨年度までに①マクロファージはBCG感染によって弱いながらNO産生を誘導できること、②CD4⁺ T細胞との相互作用によってBCG感染マクロファージのNO産生が増強されること、③この相互作用にはIFN- γ 及びCD40-CD40リガンド相互作用は必須ではないことを明らかにした。

結核菌は細胞表面上の糖脂質を介して抗原提示細胞を活性化することでCD4⁺ T細胞をTh1細胞へと分化させる。そこで、本年度はNO産生を増強するマクロファージ-CD4⁺ T細胞間相互作用におけるT細胞抗原受容体(TCR)によるBCG由来特異抗原認識の必要性及び活性化したCD4⁺ T細胞の分化の方向性の役割に関して検討した。その結果、①CD4⁺ T細胞によるBCG感染マクロファージのNO産生増強にはマクロファージ上のBCG由来抗原ペプチド/MHCクラス2分子複合体とT細胞上のT細胞抗原受容体/CD4分子複合体との会合が必須であること、②Th1細胞へと分化したCD4⁺ T細胞が産生するGM-CSFはCD4⁺ T細胞との相互作用によって増強されたBCG感染マクロファージのNO産生を抑制することを明らかにした。

また、GM-CSFで分化誘導したマクロファージの結核菌増殖抑制機構はM-CSFで分化誘導したマクロファージに比べ弱いことが知られている。そこで、CD4⁺ T細胞との相互作用で増強されるNO産生におけるM-CSFの効果を検討した。その結果、M-CSFはCD4⁺ T細胞との相互作用によって増強されたBCG感染マクロファージのNO産生をさらに増強することを明らかにした。

以上の結果より、BCGの持つ特性によって誘導されるTh1分化がマクロファージのNO産生を減弱し、BCGの生存を助長している可能性、M-CSFが結核感染の治療に有効なサイトカインである可能性が示唆された。

研究協力者

田村敏生（国立感染症研究所・病原微生物部）

A. 研究目的

結核の治療は化学療法が主流である。この治療法の問題点は、長期薬剤投与と耐性菌の出現である。

結核菌はまず生体内ではマクロファージ

に親和性を有し感染する。感染個体では結核菌に対する自然免疫及び結核菌特異的な獲得免疫が惹起され、不顕性感染を呈することが多い。したがって、個体が本来有する免疫機能をより効果的に惹起することが、ひいては多剤耐性結核に対する有効な治療法につながると考えられる。しかしながら、結核を発症するヒトの多くはその個体における免疫機能が低下しており、結核に対す

る有効な免疫応答を惹起できない。そこで、本研究は獲得免疫機能不全状態でのマクロファージの活性化を誘導するシステムの開発を最終目的とした。この目的の達成のために、マクロファージの活性化、特に結核菌の排除・封じ込めに重要な役割を果たしている一酸化窒素(NO)産生誘導機序に関して検討を行った。

昨年度までに①マクロファージはBCG感染によって弱いながらNO産生を誘導できること、②CD4⁺T細胞との相互作用によってBCG感染マクロファージのNO産生が増強されること、③この相互作用にはIFN- γ 及びCD40-CD40リガンド相互作用は必須ではないことを明らかにした。

結核菌は細胞表面上の糖脂質を介して抗原提示細胞を活性化することでCD4⁺T細胞をTh1細胞へと分化させる。そこで、本年度はNO産生を増強するマクロファージ-CD4⁺T細胞間相互作用におけるTCRによるBCG由来特異抗原認識の必要性及び活性化したCD4⁺T細胞の分化の方向性の役割に関して検討した。

B. 研究方法

1. *in vitro*におけるBCG感染マクロファージの調製法

C57BL/6Jマウス由来脾臓細胞をプラスチック製ディッシュに浮遊させ、BCG-Tokyo株またはGFP遺伝子を導入したBCG-Tokyo株(GFP-BCG)を添加し37°Cで一晩培養した。非附着性細胞を除去した後、附着性細胞を回収しBCG感染マクロファージ(F4/80⁺CD11b⁺細胞 \geq 98%)として用いた。

2. CD4⁺T細胞の調製

C57BL/6Jマウスまたは結核菌分泌タンパクAg85B由来ペプチド(Peptide-25)を認識するT細胞抗原受容体(TCR)を発現するトランスジェニックマウス(P25 TCR-Tg)由来脾臓細胞よりIMAGシステム(BD Bioscience PharMingen)を用い、CD4⁺T細胞(CD3⁺CD4⁺細胞 \geq 90%)を精製した。

3. NO産生の解析

培養上清中に含まれるNOはNO₂/NO₃ Assay Kit-CII(Griess Reagent Kit、同仁化学研究所)を用いて測定した。

4. マクロファージによるBCG殺りく効果の解析

マクロファージ内でのBCG生菌数はGFP蛍光強度を指標とした。具体的にはBCG感染マクロファージ単独培養及びCD4⁺T細胞と共培養したBCG感染マクロファージのGFP蛍光強度をFACSにて解析した。

5. サイトカイン産生の解析

BCG感染マクロファージとCD4⁺T細胞との共培養後のサイトカイン産生はELISA法または細胞内サイトカイン染色法にて解析した。

倫理面への配慮

国立感染症研究所動物実験指針に基づき、審査を受けて全ての実験を行った。

C. 研究結果

1. マクロファージ-CD4⁺T細胞間相互作用におけるTCRによる特異抗原認識の必要性

マクロファージのNO産生増強に必須のマクロファージ-CD4⁺T細胞間相互作用におけるTCRによる特異抗原認識の必要性を検討した。BCG感染マクロファージとCD4⁺T細胞を共培養する際にマクロファージ上のペプチド-MHCクラス2分子複合体とCD4⁺T細胞上のTCR-CD4分子複合体との結合を阻害する抗CD4抗体を添加し、その影響をGFP-BCGを用いて検討した。その結果、抗体を添加することによって感染6日後のマクロファージ内でのGFPの輝度の低下が見られなくなった。また、培養上清中のNO産生量をGriess法にて検討した結果、抗CD4抗体の添加によりマクロファージ-CD4⁺T細胞間相互作用で増強されたNO産生は完全に抑制された。

2. 抗原特異的に活性化したCD4⁺T細胞の

分化の方向性の役割の検討

結核菌は細胞表面上の糖脂質を介して抗原提示細胞を活性化することで CD4⁺ T 細胞を Th1 細胞へと分化させる。したがって、BCG 抗原特異的に活性化した CD4⁺ T 細胞は Th1 細胞へと分化することが想定される。そこで、BCG の分泌タンパクである Ag85B 由来のペプチドを認識して Th1 細胞へと分化する P25 TCR-Tg マウス由来 CD4⁺ T 細胞を用い、NO 産生における CD4⁺ T 細胞の分化の方向性の寄与に関して検討した。その結果、P25 TCR-Tg 由来 CD4⁺ T 細胞との共培養によって野生型由来 CD4⁺ T 細胞との共培養に比べ IFN- γ 、GM-CSF の産生は増強されるが、マクロファージ内の GFP の輝度の低下が減弱した。

そこで、マクロファージ内での NO 産生における GM-CSF の役割について検討した。BCG 感染マクロファージと野生型 CD4⁺ T 細胞とを共培養する際に GM-CSF を添加し、その影響を検討した。その結果、GM-CSF を添加すると感染 6 日後のマクロファージ内 GFP の輝度の低下が減弱した。

3. CD4⁺ T 細胞との相互作用で増強した BCG 感染マクロファージの NO 産生に対する M-CSF の効果

GM-CSF で分化誘導したマクロファージの結核菌増殖抑制機構は M-CSF で分化誘導したマクロファージに比べ弱いことが報告されている。そこで、マクロファージの NO 産生における M-CSF の役割に関して検討した。BCG 感染マクロファージと野生型 CD4⁺ T 細胞を共培養する際に M-CSF を添加し、その影響を検討した。その結果、M-CSF の添加によって感染 6 日後のマクロファージ内 GFP 輝度の低下が顕著に増大した。

D. 考察

抗 CD4 抗体を添加すると CD4⁺ T 細胞との共培養で誘導される NO 産生の増強が見られなくなることから、NO 産生増強には特異抗原を介したマクロファージ-CD4⁺ T 細胞間相互作用が必須であることが示された。未感作 CD4⁺ T 細胞は特異抗原刺激によって

Th1、Th2、Th17、iTreg 細胞へと分化する。抗酸菌は細胞表面にある糖脂質が TLR を介し抗原提示細胞を活性化し、その結果 Th1 型獲得免疫反応を誘導する。これらのことから CD4⁺ T 細胞は BCG 感染マクロファージによって BCG 由来の抗原刺激を受け、Th1 細胞へと分化することが想定される。そこで、マクロファージの NO 産生における CD4⁺ T 細胞の分化の方向性の寄与を検討した。我々が作出した P25 TCR-Tg 由来 CD4⁺ T 細胞は BCG が分泌する Ag85B 由来ペプチドを認識し、周囲環境に依らず選択的且つ強力に Th1 細胞へと分化する。そこで、この P25 TCR-Tg 由来 CD4⁺ T 細胞を用い、マクロファージの NO 産生への Th1 細胞の寄与を検討した。その結果、BCG 感染マクロファージとの相互作用によって P25 TCR-Tg 由来 CD4⁺ T 細胞は Th1 細胞へと分化し、IFN- γ 、GM-CSF を大量に産生したにも関わらず、マクロファージの BCG 殺りく効果は抑制された。このことは、Th1 細胞への分化がマクロファージの NO 産生を減弱させ、マクロファージ内での BCG の生存を容易にする環境を提供している可能性があることを示している。Th1 細胞との共培養で増強されたサイトカインの内、IFN- γ は NO 産生に対して抑制効果がないことはこれまでの解析より明らかになっている。そこで、GM-CSF の作用に関して検討した。その結果、野生型 CD4⁺ T 細胞との共培養で増強された NO 産生が GM-CSF の添加により減弱した。この知見は GM-CSF で分化誘導したマクロファージの結核菌増殖抑制機構は M-CSF で分化誘導したマクロファージに比べ弱いというこれまでの報告に合致するものである。また、結核菌感染後肺において経時的に GM-CSF の発現量が増加するのに対し、M-CSF の発現量は低下することも報告されている。そこで、マクロファージ-CD4⁺ T 細胞間相互作用で増強される NO 産生への M-CSF の効果を検討した。その結果、野生型 CD4⁺ T 細胞との共培養で増強された NO 産生は M-CSF の添加によりさらに増強した。これらのことから、結核の排除・殺りくを担うとされていた Th1 免疫応答がマクロファージ内での結核菌の生存を

助長する可能性があることが示された。また、マクロファージ-CD4⁺T細胞間相互作用によって増強されるNO産生をM-CSFは正に調節する因子であることも示された。今後、今後、GM-CSF産生を誘導することなくNO産生を誘導・増強するシステムの構築、またM-CSFの治療応用を目指して解析を行なう予定である。

E. 結論

① CD4⁺T細胞によるBCG感染マクロファージのNO産生増強にはマクロファージ上のBCG由来抗原ペプチド/MHCクラス2分子複合体とT細胞上のT細胞抗原受容体/CD4分子複合体との会合が必須であること、

② Th1細胞へと分化したCD4⁺T細胞が産生するGM-CSFはCD4⁺T細胞との相互作用で増強されたBCG感染マクロファージのNO産生を抑制する

③ M-CSFはCD4⁺T細胞との相互作用で増強したBCG感染マクロファージのNO産生をさらに増強する。

以上の結果より、BCGの持つ特性によって誘導されるTh1分化がマクロファージのNO産生を減弱し、BCGの生存を助長している可能性、M-CSFが結核感染の治療に有効なサイトカインである可能性が示唆された。

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) Kai, M., N.H. Nguyen Phuc, T.H. Hoang Thi, A.H. Nguyen, Y. Fukutomi, Y. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, T. Fujiwara, T.T. Nguyen and M. Makino. Serological diagnosis of leprosy in patients in Vietnamese by enzyme-linked immunosorbent assay

with *Mycobacterium leprae*-derived major membrane protein-II. *Clin. Vaccine Immunol.*, 15:1755-1759, 2008.

- 3) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, Y. Miyamoto, and M. Makino. CD4⁺T cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 53:96-106, 2008.
 - 4) Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P. J. Brennan, K. Kobayashi, M. Makino, S. Matsumoto, H. Ogura, and S. Maeda. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.*, 190:3613-3621, 2008.
 - 5) Makino, M., Y. Maeda, M. Kai, T. Tamura, and T. Mukai. GM-CSF mediated T cell activation by macrophages infected with recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, in press, 2009.
 - 6) Fukutomi, Y., Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino. Temperature dependency for survival of *Mycobacterium leprae* in macrophages. *Jpn. J. leprosy*, in press, 2009.
- ##### 2. 学会発表
- 1) CD4⁺T cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant BCG. Makino, M., T. Mukai, Y. Maeda, Y. Miyamoto, and T. Tamura. 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
 - 2) Construction of *ureC*-disrupted BCG

- which expressing *M. leprae* MMP II antigen. Mukai, T., Y. Miyamoto, and M. Makino. 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
- 3) *Mycobacterium avium* complex serovar 8. Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, and M. Makino. 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
 - 4) Genetic analysis of the glycosylation pathway of glycopeptidolipids in *Mycobacterium intracellulare* serotype 16 and serotype 17. Maeda, S., N. Nakata, I. Yano, M. Makino, and N. Fujiwara. ASM Meeting, June, 2008, Boston, USA.
 - 5) The three different methyltransferase genes determine the divergence between *Mycobacterium intracellulare* serotype 7 and 12. Nakata, N., N. Fujiwara, S. Maeda, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. ASM Meeting, June, 2008, Boston, USA.
 - 6) Structure and biosynthesis gene cluster of an antigenic serotype 16 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, K. Kobayashi, M. Makino, and S. Maeda. ASM Meeting, June, 2008, Boston, USA.
 - 7) Vaccines for mycobacterial diseases. Makino, M. The fifth Taiwan-Japan symposium on International Collaboration and TB. September 11-13, 2008, Taipei, Taiwan.
 - 8) *Mycobacterium intracellulare* 由来血清型 7、12 型 glycopeptidolipid 糖鎖合成遺伝子の機能解析. 藤原永年, 中田 登, 前田伸司, 中 崇, 水野浄子, 牧野正彦, 松本壮吉, 矢野郁也. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都
 - 9) *Mycobacterium intracellulare* 血清型 12 の glycopeptidolipid 生合成遺伝子領域の解析. 中田 登, 藤原永年, 前田伸司, 中 崇, 矢野郁也, 小林和夫, 牧野正彦. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都
 - 10) *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
 - 11) 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. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都
 - 12) 遺伝子破壊による BCG 菌ミコール酸のサブクラス変換. 甲斐雅規, 宮本友司, 向井 徹, 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
 - 13) LipoK の細胞障害性 T 細胞の活性化及びエキソゾーム産生に及ぼす影響. 前田百美, 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都
 - 14) らい菌由来免疫原生タンパク、MMP-II を用いた血清診断. 甲斐雅規, 前田百美, 福富康夫, 宮本友司, 向井 徹, 牧野正彦. 第 81 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2008 年 5 月 熊本
 - 15) 常温輸送臨床検体の LAMP 法によるらい菌遺伝子検出. 向井 徹, 和泉真蔵, Teky Budiawan, 宮本友司, Cita Rosita, Indropo Agusni, 松岡正典, 牧野正彦. 第 81 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2008 年 5 月 熊本
 - 16) ヒトマクロファージ内におけるらい菌の生存機構. 福富康夫, 前田百美, 松岡正典, 牧野正彦. 第 81 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2008 年 5 月 熊本

- 17) *Mycobacterium intracellulare* serotype13由来新規特異糖ペプチド脂質の糖鎖構造と生合成. 水野浄子, 中崇, 中田 登, 前田伸司, 合田麗奈, 小林貴美子, 牧野正彦, 藤原永年. 日本生化学・日本分子生物学会合同年会 2008年
- 18) らい菌感染ヒトマクロファージの IFN-

γ 刺激による phox 発現. 福富康夫, 牧野正彦. 第 38 回日本免疫学会総会 2008年12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

非結核性抗酸菌症、特に *Mycobacterium avium* 症における
薬剤耐性機序に関する研究

研究分担者 松本智成（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター臨床研究部）

研究要旨

Mycobacterium (M.) *Avium* 症は、結核症と異なり有効な治療法がない。現在 rifampin (RFP), ethambutol (EB), clarithromycin (CAM) による加療が推奨されているが、クラリスの感受性が治療成績に影響を与えると言われていた CAM 感受性株であっても排菌陰性化しない場合がある。治療抵抗性の肺 *M. avium* 症は、実は繰り返す持続感染発病状態を反映しているのかもしれない。または治療抵抗性の肺 *M. avium* 症は、同じ抗酸菌族でも結核菌とは異なる薬剤耐性機構を有するかもしれない。

本年度は、*M. avium* 慢性持続排菌症例の VNTR を行い、再排菌 1 症例は VNTR パターンが異なっていたが、他の慢性持続排菌症例では、空洞形成肺病変以外の *M. avium* 症においても VNTR パターンが保たれていた事を明らかにした。加療中感受性が変化しても VNTR は同一であった。さらに Virginie 等の VNTR と西森等の VNTR を比較した。Virginie 等の VNTR は 8 領域であり西森等の VNTR の 16 領域に比較し解析領域が少なく解像度も低かった。しかしながら、Virginie 等の VNTR と西森等の VNTR の領域を組み合わせる事により解像度の上昇が認められた。また、系統樹解析を行うと、VNTR において居住歴が異なり接触歴も無いが同一の菌株があり、死亡率も高かったことより何らかの病原性との関連が示唆される。VNTR と HPLC によるミコール酸のタイピングならびに血清型別を比較したが関連性は認められなかった。

研究協力者

阿野裕美（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 臨床研究部）

西内由紀子（大阪市立大学刀根山結核研究所）

西森敬（動物衛生研究所）

A. 研究目的

Mycobacterium (M.) *Avium* 症は、結核症と異なり有効な治療法がない。現在 rifampin (RFP), ethambutol (EB), clarithromycin (CAM) による加療が推奨されているが、クラリスの感受性が治療成績に影響を与えると言われていた CAM 感受性株であっても排菌陰性化しない場合がある。気管支拡張症等の宿主側の因子も関与するであろうが菌側の因子も関与するはずである。また、環境菌でもある非結核性抗酸

菌症の再発は、必ずしも同じタイプの菌であるとは限らず、一旦は排除出来ても外来性再感染にて再発する場合もあり得る。さらに、*M. avium* による肺外感染症は比較的治りやすい傾向にあることより、治療抵抗性の肺 *M. avium* 症は、実は繰り返す持続感染発病状態を反映しているのかもしれない。または治療抵抗性の肺 *M. avium* 症は、同じ抗酸菌族でも結核菌とは異なる薬剤耐性機構を有するかもしれない。

1. 治療抵抗性の慢性持続排菌症例の薬剤耐性機構を検討するため、まず慢性持続排菌例にて、繰り返す再感染発病か否かを VNTR にて検討。
2. 再発は、内因性再燃か外来性再感染かを VNTR にて検討。また外来性再感染の場合、

ル酸の HPLC による型別の相同性を検討する。

B. 研究方法

RFP, EB, CAM 投与にもかかわらず、慢性持続排菌を示す *M. avium* 菌株 (29 株) を時系列で VNTR 測定を行った。薬剤感受性は MIC 測定で判断した。*M. Avium* の VNTR は西森等 [動物衛生研究所報告書、109, pp25-32, 2003], Virginie 等 [JCM, 45(8), p2404-2410, 2007] の方法に従った。血清型別は、抗体ならびに HPLC による糖脂質の解析を用いて行った。系統樹は、Manhattan 法で距離行列を求め、階層的クラスタリングには、fitch により考案された maximum parsimony method にて系統樹を作成した。ミコール酸の HPLC 分析は、クロロフォルムにてミコール酸を抽出し、逆相 HPLC を行った。

C. 研究結果

18 ヶ月加療後に再排菌した nodular bronchoectasis 病変を伴う 1 症例は VNTR パターンが異なっていた、他の慢性持続排菌症例では、空洞形成型肺病変以外の *M. avium* 症においても VNTR パターンが保たれていた。また、これらの症例中に CAM 薬剤感受性が変化した症例も含まれていたが VNTR パターンは同一で、しかも特に肺病変が進展した病型では CAM に対して、一例が感受性が変化し、一例が耐性のままで、残りが感受性のままであり、全て VNTR パターンは同一であり、感受性が変化しても VNTR は同一であった。

Virginie 等の VNTR と西森等の VNTR を比較した。Virginie 等の VNTR は 8 領域であり西森等の VNTR の 16 領域に比較し解析領域が少なく解像度も低かった。しかしながら、Virginie 等の VNTR と西森等の VNTR の領域を組み合わせる事により解像度の上昇が認められた。

また、系統樹解析を行うと、VNTR において居住歴がなく、接触歴も無い同一の菌株が存在し *M. avium* による死亡率が高かった。VNTR 型別と HPLC によるミコール酸のタイピングならびに血清型別を比較したが関連性は認められなかった。

D. 考察

18 ヶ月加療後に再排菌した nodular bronchoectasis 病変を伴う 1 症例は VNTR パターンが異なっており、Wallance 等の報告通り (AM. J. RESPIR. CRIT. CARE MED. 1998;158:1235-1244.), polyclonal 感染、および外来性再感染が疑われたが、他の慢性持続排菌症例では、空洞形成型肺病変以外の *M. avium* 症においても VNTR パターンが保たれており慢性持続感染が示唆された。また、これらの症例中に CAM 薬剤感受性が変化した症例も含まれていたが VNTR パターンは同一で、しかも特に肺病変が進展した病型では CAM に対して、一例が感受性が変化し、一例が耐性のままで、残りが感受性のままであり、全て VNTR パターンは同一であり、感受性が変化しても VNTR は同一であった。

今後、さらなる検討を要するが今回の検討の途中段階では RFP, EB, CAM 投与にもかかわらず慢性持続排菌する症例では、RFP, CAM 感受性菌の単一の菌による感染が多いが何らかの原因による RFP, CAM を含む薬剤抵抗性が示唆された。今回検討した菌株において各患者間の VNTR パターンは異なっていたが、5 組はほぼ同一の VNTR パターン、うち 3 組は完全一致を示しており、居住地域が異なる為に、なんらかの菌的因子が示唆された。これらは系統樹解析にても示された。

Virginie 等の VNTR と西森等の VNTR と比較し解像度が低かったが、これらの領域を組み合わせる事により解像度の上昇が見込まれる。

E. 結論

再排菌 1 症例は VNTR パターンが異なっていた、他の慢性持続排菌症例では、空洞形成型肺病変以外の *M. avium* 症においても VNTR パターンが保たれていた。加療中感受性が変化しても VNTR は同一であった。

Virginie 等の VNTR と西森等の VNTR を比較した。Virginie 等の VNTR は 8 領域であり西森等の VNTR の 16 領域に比較し解析領域が少なく解像度も低かった。しかしながら、Virginie 等の VNTR と西森等の VNTR の領域を組み合わせる事により解像度の上昇が認められた。

また、系統樹解析を行うと、VNTR において同一の菌株があり死亡率も高いことより何らかの病原性との関連が示唆される。