

ヒトでも、同様なことが生じていると推察される。結核患者の何人が、糖尿病患者であり、何人が死んだかの詳しい統計解析はない。このように、「糖尿病と結核増悪」には相当な因果関係があるので、全国的な実態調査をすべきと提案したい。

糖尿病患者には、肥満が多く見られ、同時に、高コレステロール血症や高脂血症を有することが多い。メタボリックシンドロームの重要な構成要因である。今回用いた糖尿病ラットは、脂質代謝に異常は見られなかった。従って、本糖尿病モデルラットは、メタボリックシンドロームの疾患モデルとはならない。

#### E. 結論

「糖尿病と結核増悪」には、実験的に証明がなされ、因果関係が認められた。しかしながら、インスリンで糖尿病をコントロールすると、結核の増悪が防止できた。ヒトでも同様なことが生じていると推察できる。「糖尿病と結核増悪」に関する全国の実態調査の早急な施行が望まれる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sugawara, I., S. Mizuno. Higher susceptibility of type 1 diabetic rats to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tohoku J. Exp. Med.*, 216: 363-370, 2008.
- 2) Murase, Y., S. Mitarai, I. Sugawara, Kato, S. Maeda. Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Microbiol.*, 57:873-880, 2008.
- 3) Hibiya, K., Y. Kazumi, I. Sugawara, J. Fujita. Histological classification of systemic *Mycobacterium avium* complex infections in slaughtered domestic pigs. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 31:347-366, 2008.
- 4) Li, Y. J., H. Takizawa, A. Azuma, T. Kohyama, Y. Yamauchi, S. Takahashi,

M. Yamamoto, T. Kawada, S. Kudoh, I. Sugawara. Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to airway inflammatory responses induced by low-dose diesel exhaust particles in mice. *Clin. Immunol.*, 128:366-373, 2008.

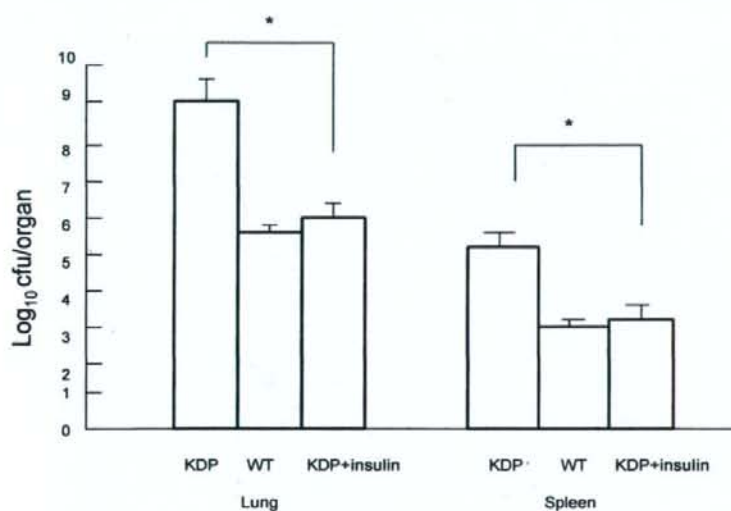
- 5) Sugawara, I., L. Sun, S. Mizuno, T. Taniyama. Protective efficacy of recombinant BCG Tokyo (Ag85A) in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) infected intratracheally with H37Rv *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, in press, 2009.
- 6) 長野誠、市村禎広、伊藤伸子、富井貴之、鹿住祐子、武井勝明、阿部千代治、菅原 勇. 16S rRNA 遺伝子および ITS-1 領域をターゲットとした Invader 法による 23 菌種の抗酸菌の同定. *結核*, 83: 487-496, 2008.

2. 学会発表  
なし

#### 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. 1型糖尿病ラット(KDP)、野生ラットおよびインスリン治療1型糖尿病ラットの結核菌感染に対する抵抗性。 (\*  $p < 0.01$  で有意差あり)



平成20年度 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

結核菌を含む抗酸菌の細胞壁の生合成に不可欠な  
遺伝子の検索と解析

分担研究報告書

研究分担者

荒川 宜親

（国立感染症研究所・細菌第二部部長）

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

結核菌を含む抗酸菌の細胞壁の生合成に不可欠な遺伝子の検索と解析

研究分担者	荒川 宜親	（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）
研究協力者	森 茂太郎	（国立感染症研究所・細菌第二部・研究員）
	柴山 恵吾	（国立感染症研究所・細菌第二部・室長）
	朴 貞玉	（国立感染症研究所・細菌第二部・流動研究員）
	和知野 純一	（国立感染症研究所・細菌第二部・研究員）

研究要旨

本研究では、結核菌を含む抗酸菌に特異的な細胞壁構造を新規抗結核薬の標的候補として位置づけて、細胞壁構造に関連する新規遺伝子・タンパク質の探索と詳細な解析を行っている。本年度は、野生株とはコロニー形態が異なるランダム変異株を作成してその変異導入部位を調べることにより、細胞壁構造に関与する新規遺伝子を2種類同定した。同定した2種類の遺伝子は、1次構造上のモチーフ解析から、それぞれPE/PPEファミリータンパク質とO-methyltransferaseをコードしていることが予想された。また、結核菌において細胞壁合成に関わっていることが報告されている遺伝子群と同じ発現調節を受ける機能未知遺伝子が新規ヌクレオチド加水分解酵素(diadenosine polyphosphate hydrolase)をコードしていることも明らかにした。本酵素は、1次構造上にHistidine triadモチーフが存在するため、HITスーパーファミリーに属すると考えられるが、本ファミリーに属する原核生物由来のdiadenosine polyphosphate hydrolaseに関する研究例はこれまでになく、本研究が初めてであった。

抗酸菌症の治療方法は原因となる抗酸菌の種類に応じて異なるため、臨床現場では原因菌の迅速な特定が望まれている。そこで本研究では、細胞壁に関連する遺伝子の情報を用いて抗酸菌新規鑑別法の開発も行っている。本年度は、昨年度に開発した鑑別法を改良し、既存の遺伝子検査と比較して鑑別可能な病原性抗酸菌の数がより多い新規鑑別法を確立した。ATCC株と臨床分離株等を用いた解析結果より、本鑑別法の特異度・感度はともに96%以上であった。さらに、*Mycobacterium avium*感染患者より見いだした新規挿入配列(IS)が、ゲノム上で比較的頻繁に転移すること、並びに本ISを用いたATCC株と臨床分離株における遺伝子タイピングのパターンが多様であることを明らかにし、本ISが識別力を持つ遺伝子タイピングのツールとして用いることが出来る可能性も示した。

A. 研究目的

結核菌を含む抗酸菌の細胞壁構造は、抗酸菌に特異的であり病原性とも深く関わっていることから、新規抗結核薬の標的部位として考えられている。しかしながら、その生合成経路を含め、抗酸菌における細胞壁構造の全容解明には未だ至っておらず、詳細な解析が求められている。そこで本研

究では、抗酸菌の細胞壁構造に関連する新規遺伝子・タンパク質の同定と機能未知遺伝子・タンパク質の詳細な解析を行うことにより、細胞壁構造に関する新たな知見を得るとともに、新規抗結核薬の開発に結びつけることを最終的な目的としている。本年度は、細胞壁構造に関連する新規遺伝子・タンパク質の同定を目的として、野生

株とはコロニー形態が異なるランダム変異株を作成し、その変異導入部位の解析を行った。また、機能未知遺伝子・タンパク質の解析では、結核菌のゲノム上に存在する1つのオペロン (Rv2609c 遺伝子-Rv2613c 遺伝子) に着目した。本オペロン上にある5種類の遺伝子のうち、3種類の遺伝子 (Rv2610c、Rv2611c、及び Rv2612c 遺伝子) については、これまでに結核菌の細胞壁構造との関連性が報告されていることから、残りの2種類の遺伝子 (Rv2609c、並びに Rv2613c 遺伝子) も細胞壁構造に関連していると考えられる。2種類の遺伝子のうち、Rv2613c 遺伝子がコードしているタンパク質については、1次構造上に Histidine Triad モチーフが存在することから、HIT スーパーファミリーに属していることが推測された。HIT スーパーファミリーに属するタンパク質はヌクレオチドを加水分解する活性を示すことから、本タンパク質もヌクレオチド加水分解酵素であることが予想されたものの、原核生物由来の本ファミリーに属するタンパク質の研究例は1例しかなく、ほとんど知見が得られていない。そこで本年度は、Rv2613c 遺伝子がコードするタンパク質についての詳細な機能解析を行った。

抗酸菌症の治療では、原因となる抗酸菌の種類によって隔離の有無や治療薬の選択等が異なるため、臨床現場では迅速な原因菌の特定が求められている。そこで本研究では、抗酸菌の細胞壁構造には菌種によって異なっている点があることに着目して、細胞壁に関連する遺伝子の情報に基づいて設計したプライマーを用いたPCR反応による抗酸菌新規鑑別法の開発も行っている。具体的には、抗酸菌の細胞壁構造に関連している2種類の遺伝子 (結核菌では Rv3783 遺伝子と Rv3789 遺伝子に相当) に着目して、新規鑑別法の開発を行っている。この2種類の遺伝子における塩基配列は主要な病原性抗酸菌において高度に保存されているものの、2種類の遺伝子間に存在する ORF の数は菌種により大幅に異なっている。従って、この2種類の遺伝子に対応したプライマーでPCR反応を行い、得られたバンドの

サイズを比較することにより、主要な病原性抗酸菌を鑑別することが可能であると予想された。昨年度までの結果では、開発した新規鑑別法は抗酸菌の中でも、結核菌群、*Mycobacterium kansasii*、MAC (*M. avium* & *M. intracellulare*)、*M. scrofulaceum* といった主要な病原性抗酸菌を鑑別することが可能であることが示された。しかしながら、本鑑別法では結核菌群と *M. kansasii* の区別が困難であったことから、本年度はこの2種類も容易に鑑別できるように改良を行い、ATCC 株と臨床分離株等を用いてその有効性を調べた。

非結核抗酸菌症、特に MAC 感染症においては、原因菌である *M. avium* や *M. intracellulare* が通常的环境中に存在する菌種であることから、感染源を特定することや複数回 MAC 感染症を発症した同一患者の原因菌が内因性再燃であるのか外因性再感染であるのかを調べることは非常に重要である。そこで本研究では、MAC 感染患者由来の *M. avium* から見いだした新規挿入配列 (IS) について、疫学的調査を目的とした遺伝子タイピング等のツールとして応用が可能か検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) 抗酸菌の細胞壁構造に関与している新規遺伝子の同定

*M. bovis* BCG Tokyo 株のゲノム上にある遺伝子に、市販のキット (EZ-Tn5 <KAN-2> Tnp Transposome Kits; EPICENTRE) を用いて、ランダムにカナマイシン耐性遺伝子を導入した変異株を作成した。作成したランダム変異株をカナマイシン含有 7H10 寒天培地上で培養し、野生株とは明らかにコロニー形態が異なる変異株を選抜した。選んだ変異株より抽出したゲノムをテンプレートとして、挿入されたカナマイシン耐性遺伝子に対応したプライマーを用いたPCR反応により、変異導入部位近傍の塩基配列を増幅させた後、DNA シークエンスを行い、カナマイシン耐性遺伝子が挿入された部位の塩基配列を決定した。得られた塩基配列の情報を用いて相同性検索を行い、カナマ

インシ耐性遺伝子の挿入によりその機能が損なわれたと考えられる遺伝子を同定した。また、同定した遺伝子がコードするタンパク質について1次構造上のモチーフ解析を行い、その機能について類推した。

## 2) 結核菌由来機能未知遺伝子の機能解析

結核菌の細胞壁構造に関与していることが報告されている遺伝子群と同一のオペロン上に存在する機能未知遺伝子である、Rv2613c 遺伝子を pCold I ベクター (TaKaRa) に組み込んだプラスミドを作成した。調製したプラスミドを *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS に導入して、Rv2613c 遺伝子がコードするタンパク質の大量発現株 (MS2613c 株) を構築した。2 L の LB 培地で培養した MS2613c 株の菌体を集菌した後に、超音波処理と遠心操作を行い、抽出画分を得た。本発現系で大量発現させた Rv2613c 遺伝子がコードするタンパク質は、pCold I 由来の His タグを N 末端に有していることから、得られた抽出画分を His タグに対するアフィニティーカラムである Ni<sup>2+</sup> カラムに通した。次に、溶出画分をゲルろ過カラムにかけることにより、SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで、本タンパク質を精製した。

Rv2613c 遺伝子がコードする本タンパク質は、1 次構造上のモチーフ解析より、ヌクレオチド加水分解活性を有することが予想されることから、様々なヌクレオチドに対する加水分解活性の測定を行った。活性測定は、HPLC を用いて分解された基質の量を定量することにより行い、基質となるヌクレオチドを1分間に 1  $\mu$  mol 分解する活性を 1U と定義した。また、リン酸鎖長が異なる diadenosine polyphosphate に対する本タンパク質の速度論的解析を行うとともに、酵素学的諸性質も決定した。

## 3) 病原性抗酸菌の新規鑑別法

昨年度までに行った本研究では同一に判定されてしまう結核菌群と *M. kansasii* を区別する方法として、結核菌では Rv1330 に相

当する遺伝子に着目した。本遺伝子の配列は、結核菌群においてのみ N 末端部位が長いことが分かっていることから、N 末端部分に対応したプライマーを設計することにより、結核菌群のみを特異的に検出することが可能であることが予想された。そこで、新たに設計したプライマーと、昨年度に設計したプライマー (結核菌では Rv3783、並びに Rv3789 遺伝子に対応) を用いて PCR 反応を行った後に、電気泳動でバンドを確認することによって、病原性抗酸菌の鑑別を試みた。PCR 反応条件の最適化は、結核菌、*M. avium*、*M. smegmatis*、及び *E. coli* のゲノムを用いて行った。決定した条件を用いて、ATCC より分与された株を含めた 21 種類の抗酸菌 (*M. bovis* BCG、*M. kansasii*、*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. scrofulaceum*、*M. smegmatis*、*M. rhodesiae*、*M. marinum*、*M. xenopi*、*M. goodii*、*M. abscessus*、*M. szulgai*、*M. flavescens*、*M. fortuitum*、*M. thermoresistibile*、*M. chelonae*、*M. shimoidei*、*M. malmoense*、*M. nonchromogenicum*、*M. mucogenum*、及び *M. ulcerans*)、並びに臨床分離株を含めた 15 菌種 94 株 (*M. tuberculosis* 5 株、*M. bovis* 6 株、*M. kansasii* 9 株、*M. avium* 14 株、*M. intracellulare* 7 株、*M. scrofulaceum* 6 株、*M. smegmatis* 7 株、*M. rhodesiae* 5 株、*M. marinum* 6 株、*M. goodii* 5 株、*M. nonchromogenicum* 5 株、*M. neoaurum* 7 株、*M. goodii* 6 株、及び *M. szulgai* 6 株) のコロニーをテンプレートとした PCR 反応と電気泳動を行い、新規鑑別法の有効性について評価した。

## 4) *M. avium* より見いだした新規 IS の疫学的調査への応用の検討

MAC 感染患者由来の *M. avium* より見いだした新規 IS が転移を起こす頻度を調べるため、新規 IS を保有する *M. avium* の継体培養を行い、各継体段階の菌体から抽出したゲノムを用いたサザンブロッティングにより、新規 IS のバンドパターンを調べた。また、*M. avium* の ATCC 株と臨床分離株、合計 12 株について新規 IS を指標とした遺伝子タイピングを行った。

倫理面への配慮 本研究は、バイオセーフティーレベルに応じた該当実験室 (P2 レベルまたは P3 レベル) で行った。実験を行う際には研究所内の安全講習を受講するとともに、実験計画について安全委員会の承認を受けている。また、大臣確認実験を必要とする実験 (組換え DNA 実験) については、必要書類を文部科学省に提出し認可されている。実際の実験では、関連法令を遵守した上で、安全性等に十分に配慮して行った。

### C. 研究結果

#### 1) 抗酸菌の細胞壁構造に関与している新規遺伝子の同定

野生株と比較して著しくコロニー形態が異なっている変異株を 2 株取得した。カナマイシン耐性遺伝子が挿入されたことにより、その機能が損なわれたと考えられる遺伝子を同定した結果、それぞれ *M. bovis* のゲノム上に存在する、Mb0156c、並びに Mb1931c 遺伝子であることが明らかとなった。塩基配列の相同性検索からは、どちらの遺伝子においても、相同性を示す機能既知の遺伝子は見つからなかった。しかしながら、1 次構造上のモチーフ解析を行ったところ、Mb0156c 遺伝子は PE/PPE ファミリータンパク質を、Mb1931c 遺伝子は O-methyltransferase をそれぞれコードしていることが推測された。

#### 2) 結核菌由来機能未知遺伝子の機能解析

結核菌由来の Rv2613c 遺伝子がコードする機能未知タンパク質を大腸菌内で大量発現させて、精製を行った。ゲルろ過後の SDS-PAGE 上におけるバンドサイズは、本タンパク質の 1 次構造から予想される分子量と一致した。また、ゲルろ過カラムの溶出位置から、本タンパク質は溶液中で 4 量体を形成していることが明らかとなった。活性測定の結果、本タンパク質は種々のヌクレオチドに対して加水分解活性を有していたことから、新規ヌクレオチド加水分解酵素であることが明らかとなった (Table 1)。

特に、diadenosine polyphosphate を良好な基質として利用したことから、本酵素は diadenosine polyphosphate hydrolase であると考えられた。速度論的解析の結果 (Table 2) より、diadenosine polyphosphate のうち、リン酸の鎖長が 4 つ、並びに 5 つの化合物を本酵素は効果的に基質として利用していた。酵素学的諸性質を検討した結果、活性の発現には 2 価の陽イオンが必須であり、 $Mn^{2+}$  を用いた場合の活性が最も高いことが明らかになった。また、至適 pH は 8.0、至適温度は 30°C であり、65°C 10 分の処理によりその活性は完全に失われた。

#### 3) 病原性抗酸菌の新規鑑別法

昨年度に設計したプライマーセットと本年度に設計したプライマーセットの 2 種類のプライマーセットを同時に利用して PCR 反応を行った後、バンドのパターンを調べることにより、抗酸菌の鑑別を行った。ATCC 株 21 菌種のコロニーを PCR 反応のテンプレートとして用いた結果から、本鑑別法により、結核菌群、*M. kansasii*、MAC (*M. avium* & *M. intracellulare*)、*M. scrofulaceum* & *M. smegmatis*、及びその他、の 5 種類に抗酸菌を分類することが可能であることが示された。また、ATCC 株と臨床分離株をあわせて 26 菌種 115 株のコロニーをテンプレートとして PCR 反応と電気泳動を行った結果より、本鑑別法の特異度・感度は全ての場合において 96% 以上であった (Table 3)。

#### 4) *M. avium* より見いだした新規 IS の疫学的調査へ応用の検討

新規 IS を見いだした MAC 感染患者由来の *M. avium* について、10 回の継体培養を行い、各継体段階の菌株についてそれぞれサザンブロッティングにより解析したところ、継体培養 10 回目の菌株由来のゲノム上に本 IS の新しいバンドが認められた。このことから、本 IS は比較的頻繁に転移することが明らかとなった。また、ATCC 株と臨床分離株、計 12 株についてサザンブロッティングを行い、本 IS のバンドパターンを比較

したところ、菌株によって多様であることが分かった。

#### D. 考察

本年度、新たに抗酸菌の細胞壁合成に関与していることを示した2種類の遺伝子(*M. bovis*においてMb0156c、並びにMb1931c遺伝子)は、その1次構造上のモチーフから、それぞれPE/PPEファミリータンパク質とO-methyltransferaseコードしていることが推測された。PE/PPEファミリータンパク質は複数回の膜貫通ドメインを有していることから、タンパク質そのものが細胞壁構造に関連していることが予想された。一方、細胞壁構造には糖鎖のメチル化が関わっていることから、O-methyltransferaseは細胞壁構造の生合成経路に関与していると考えられる。

結核菌由来の機能未知遺伝子(Rv2613c遺伝子)がHITスーパーファミリーに属する新規ヌクレオチド加水分解酵素(diadenosine polyphosphate hydrolase)をコードしていることを明らかにした。HITスーパーファミリーに属するタンパク質の研究は、真核生物において主に進められており、原核生物由来のHITスーパーファミリーに属するタンパク質の報告例は、これまで*E. coli*由来の1例のみであり、特にdiadenosine polyphosphate hydrolaseとしての解析例は本研究が初めてであった。本酵素の速度論的解析結果(Table 2)より、diadenosine polyphosphateにおけるリン酸鎖長の違いは、 $K_m$ 値よりも $K_{cat}$ 値に影響を与えていた。このことから、基質結合部位において、結合自体にはdiadenosine polyphosphateのリン酸鎖長は大きな影響を与えていないものの、触媒過程においてリン酸鎖長が大きく影響していることが示唆された。

本年度に改良した新規鑑別法では、主要な病原性抗酸菌(結核菌群、*M. kansasii*、MAC、及び*M. scrofulaceum*)を簡便に鑑別することが可能であった。また、ATCC株と臨床分離株を用いた有用性の検討から、本鑑別法は十分に有効であることが示され

た。本鑑別法は、現行の同様な遺伝子検査と比較して、主要な病原性抗酸菌である*M. kansasii*を特異的に鑑別できる点で優れていた。

患者由来の*M. avium*より見いだした新規ISは、頻繁に転移を起こし、菌株間においてバンドパターンが多様であることから、本ISは、非常に強い識別力を持つ遺伝子タイピングのツールとして用いることが出来ると考えられた。*M. avium*感染患者における感染源の追跡調査や、複数回*M. avium*感染症を発症した同一患者の菌株が内因性再燃であるのか外因性再感染であるかを調べるのに有用であるものと考えられ、*M. avium*の感染制御対策の策定に資することが期待出来る。

#### E. 結論

抗酸菌に特異的な細胞壁構造に関与している2種類の新規遺伝子を同定した。2種類の遺伝子は、それぞれPE/PPEファミリータンパク質とO-methyltransferaseをコードしていると考えられた。

結核菌由来機能未知遺伝子が新規ヌクレオチド加水分解酵素をコードしていることを示すとともに、その詳細な酵素学的諸性質を原核生物由来の同酵素として初めて明らかにした。

病原性抗酸菌の新規鑑別法を確立し、現行の方法と比較して、鑑別可能な病原性抗酸菌の菌種数が多く、臨床現場での応用に有効であることを示した。

*M. avium*から見いだした新規ISが、*M. avium*感染症の疫学的調査に有用であることを示唆する結果を得た。

#### G. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) Piao, Z., K. Shibayama, S. Mori, J. Wachino, and Y. Arakawa. A novel insertion sequence, IS1642, of *Mycobacterium avium*, which forms long direct repeats of variable length. FEMS Microbiol. Lett., in press, 2009.
2. 学会発表



- 1) 結核菌由来の新規ヌクレオチド加水分解酵素に関する研究. 森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、朴貞玉、荒川宜親. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 2) 結核菌由来新規ヌクレオチド加水分解酵素の機能解析. 森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、朴貞玉、荒川宜親. 日本農芸化学会 2009 年度大会 2009 年 3 月 福岡

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 |

Table 1 結核菌由来新規ヌクレオチド加水分解酵素の基質特異性

基質	活性 (U/mg)	基質	活性 (U/mg)	基質	活性 (U/mg)
AP3A	0.91 ± 0.003	ATP	0.008 ± 0.0005	GDP	ND
AP4A	4.67 ± 0.012	ADP-Rib	0.0008 ± 0.0003	GMP	ND
AP5A	4.97 ± 0.002	P4G	0.033 ± 0.0014	dATP	ND
AP6A	1.19 ± 0.033	GTP	0.013 ± 0.0006	dGTP	ND
AP4G	4.68 ± 0.007	GDP-Glu	0.004 ± 0.0001	CTP	ND
AP5G	3.54 ± 0.052	GDP-Man	0.001 ± 0.0001	NAD	ND
GP4G	5.00 ± 0.007	ADP	ND	NADH	ND
GP5G	4.95 ± 0.002	ADP-Glu	ND	NADP	ND
P4A	0.017 ± 0.0002	AMP	ND	NADPH	ND

略称; AP<sub>3</sub>P, diadenosine-5', 5''-P<sup>1</sup>, P<sup>3</sup>-triphosphate; AP<sub>4</sub>P, diadenosine-5', 5''-P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-tetraphosphate; AP<sub>5</sub>P, diadenosine-5', 5''-P<sup>1</sup>, P<sup>5</sup>-pentaphosphate; AP<sub>6</sub>P, diadenosine-5', 5''-P<sup>1</sup>, P<sup>6</sup>-hexaphosphate; GP<sub>4</sub>G, diguanosine-5', 5''-P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-tetraphosphate; GP<sub>5</sub>G, diguanosine-5', 5''-P<sup>1</sup>, P<sup>5</sup>-pentaphosphate; AP<sub>4</sub>G, P<sup>1</sup>-(5'-adenosyl)P<sup>4</sup>-(5'-guanosyl) tetraphosphate; AP<sub>5</sub>G, P<sup>1</sup>-(5'-adenosyl)P<sup>5</sup>-(5'-guanosyl) pentaphosphate; P<sub>4</sub>A, adenosine tetraphosphate; P<sub>4</sub>G, guanosine tetraphosphate; ND, Not Detected.

Table 2 結核菌由来新規ヌクレオチド加水分解酵素の速度論的解析

基質	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> (U/mg)	K <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub>
AP3A	94 ± 4.6	2.18 ± 0.038	0.84 ± 0.016	9
AP4A	66 ± 8.1	7.65 ± 0.344	2.90 ± 0.132	116
AP5A	51 ± 2.8	7.18 ± 0.120	2.75 ± 0.046	140
AP6A	167 ± 16.8	1.82 ± 0.0878	0.70 ± 0.033	5

Table 3 ATCC 株と臨床分離株に対する新規鑑別法の有効性

菌種	感度 (%)	特異度 (%)
結核菌群	100	100
MAC	96	99
<i>M. kansasii</i>	100	100
<i>M. scrofulaceum</i> & <i>M. smegmatis</i>	100	99
合計	98	98

研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
大原直也、 小林和夫	結核菌.	バイオメデ ィカルサイ エンス研究 会	バイオセーフ ティの辞典. 病原微生物と ハザード対策 の実際	みみず く舎	東京	2008	194- 197

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>I. Kawamura</u>	Advances in understanding of the virulence mechanism of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Jpn. J. Leprosy	77	219-224	2008
S. Shoma, K. Tsuchiya, <u>I. Kawamura</u> , T. Nomura, H. Hara, R. Uchiyama, S. Daim and M. Mitsuyama	Critical involvement of pneumolysin in production of interleukin-1 $\alpha$ and caspase-1 dependent cytokines in infection with <i>Streptococcus pneumoniae</i> in vitro: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation	Infect. Immun.	76	1547-1557	2008
H. Hara, K. Tsuchiya, T. Nomura, <u>I. Kawamura</u> , S. Shoma and M. Mitsuyama	Dependency of caspase-1 activation induced in macrophages by <i>Listeria monocytogenes</i> on cytolysin, listeriolysin O, after evasion from phagosome into the cytoplasm	J. Immunol.	180	7859-7868	2008
S. Kitada, <u>K. Kobayashi</u> , S. Ichiyama, S. Takakura, M. Sakatani, K. Suzuki, T. Takashima, T. Nagai, I. Sakurabayashi, M. Ito, R. Maekura.	Serodiagnosis of <i>Mycobacterium avium</i> -complex pulmonary disease using an enzyme immunoassay kit.	Am. J. Respir. Crit. Care Med.	177	793-797	2008
N. Nakata, N. Fujiwara, T. Naka, I. Yano, <u>K. Kobayashi</u> , S. Maeda.	Identification and characterization of two novel methyltransferase genes that determine the serotype 12-specific structure on glycopeptidolipids of <i>Mycobacterium intracellulare</i> .	J. Bacteriol.	190	1064-1071	2008
N. Fujiwara, N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P. J. Brennan, <u>K. Kobayashi</u> , <u>M. Makino</u> , S. Matsumoto, H. Ogura, S. Maeda.	Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from <i>Mycobacterium intracellulare</i> .	J. Bacteriol.	190	3613-3621	2008

T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, Y. Miyamoto, M. Makino.	CD4 <sup>+</sup> T cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant <i>Mycobacterium bovis</i> bacillus Calmette-Guérin.	FEMS Immunol. Med. Microbiol.	53	96- 106	2008
M. Kai, N. P. N. Ha, H. T. T. Huong, N. H. An, Y. Fukutomi, Y. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, T. Fujiwara, N. T. Tan, M. Makino.	Serological diagnosis of leprosy in patients in Vietnamese by enzyme-linked immunosorbent assay with <i>Mycobacterium</i> <i>leprae</i> -derived major membrane protein-II.	Clin. Vaccine Immunol.	15	1755- 1759	2008
Y. Miyamoto, T. Mukai, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, M. Makino.	<i>Mycobacterium avium</i> complex <i>gtfTB</i> gene encodes a glucosyltransferase required for the biosynthesis of serovar 8-specific glycopeptidolipid.	J. Bacteriol.	190	7918- 7924	2008
I. Sugawara, S. Mizuno	Higher susceptibility of type 1 diabetic rats to <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> infection	Tohoku J. Exp. Med.	216	363- 370	2008
Y. Murase, S. Mitarai, I. Sugawara, S. Kato, S. Maeda	Promising loci of variable numb ers of tandem repeats for typing Beijing family <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i>	J. Med. Microbiol.	57	873- 880	2008
K. Hibiya, Y. Kazumi, I. Sugawara, J. Fujita	Histological classification of systemic <i>Mycobacterium avium</i> complex infections in slaughtered domestic pigs	Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.	31	347- 366	2008
Y. J. Li, H. Takizawa, A. Azuma, T. Kohyama, Y. Yamauchi, S. Takahashi, M. Yamamoto, T. Kawada, S. Kudoh, I. Sugawara	Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to airwa y inflammatory responses induc ed by low-dose diesel exhaust particles in mice.	Clin. Immunol.	128	366-3 73	2008
長野誠、 市村禎宏、 伊藤伸子、 富井貴之、 鹿住祐子、 武井勝明、 阿部千代治、 菅原 勇	16SrRNA および ITS-1 領域を ターゲットとした Invader 法 による 23 菌種の抗酸菌の同定	結核	83	487- 496	2008

松本壮吉、 小林和夫	結核ワクチン研究の現状と展望.	臨床検査	52	1149- 1153	2008
小林和夫	再興した感染症「結核」の診断・ 治療・予防法.	Biophilia	4	30-34	2008
Y. Fukutomi, Y. Maeda, M. Matsuoka, M. Makino.	Temperature dependency for survival of <i>Mycobacterium leprae</i> in macrophages.	Jpn. J. leprosy	in press		2009
M. Makino, Y. Maeda, M. Kai, T. Tamura, T. Mukai.	GM-CSF mediated T cell activation by macrophages infected with recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of <i>Mycobacterium leprae</i> .	FEMS Immunol. Med. Microbiol.	in press		2009
I. Sugawara, L. Sun, S. Mizuno, T. Taniyama	Protective efficacy of recombinant BCG Tokyo (Ag85A) in rhesus monkeys ( <i>Macaca mulatta</i> ) infected intratracheally with H37Rv <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis	in press		2009
Z. Piao, K. Shibayama, S. Mori, J. Wachino, Y. Arakawa	A novel insertion sequence, IS1642, of <i>Mycobacterium avium</i> , which forms long direct repeats of variable length	FEMS Microbiol. lett.	in press		2009

## 13 結核菌

### 【病原体の特性, BSL】(表1)

結核は古代から人類を脅かしてきた感染症であるが、未だ制圧されていない。結核菌既感染者は全世界で約20億人(日本:2,500万人)、年間新規患者数は880万人(日本:2.6万人)、罹患率(対人口10万人)は140(日本:20.6)、年間死亡者数は200万人(日本:0.23万人)であり、現在においても甚大な健康被害を提供している。病変部位により、肺結核、肺外結核、粟粒(全身播種性)結核に分類される。

結核菌は *Mycobacterium* 属(抗酸菌)に属し、非運動性、芽胞や荚膜を形成しない好気性グラム陽性桿菌(長さ:2~4  $\mu\text{m}$ 、幅:0.3~0.6  $\mu\text{m}$ )である。ゲノムサイズは約4.4 MbでGC比65.6%である。遺伝学的にきわめて近縁の *M. bovis*、*M. africanum* や *M. microti* とともに結核菌群 *Mycobacterium tuberculosis complex* を形成している。結核菌群は生化学的にナイアシンを産生することで、非結核性抗酸菌やらい菌等の他の抗酸菌と区別される。抗酸菌細胞壁は脂質に富むため(乾燥菌量の10~40%、細胞壁の20~60%)、通常のグラム染色法では染色されにくく、Ziehl-Neelsen法や蛍光等の特殊染色(抗酸性染色)によって染色される。しかし、いったん染色されると塩酸等でも脱色されにくいことから抗酸菌(acid-fast bacilli)と呼ぶ。細胞壁糖脂質、特に、ミコール酸(mycolic acid)は染色性や細胞壁の疎水性に最も関与している。菌体表層の強い疎水性のため、乾燥、凍結や酸・アルカリ、消毒剤等に強い抵抗性を示し、宿主体内外で長期間にわたり生存する。

発育には適度の酸素(20%)を必要とし、炭酸ガス(5%)は発育を促進させる。しかし、嫌気状態でも完全に死滅することはなく、休眠状態

(dormancy)として生存する。37~38℃を発育至適温度とし、至適pHはpH6.8~7.0である。固形培地として、小川培地やLowenstein-Jensen培地等の卵培地、あるいは、Middlebrook 7H10や7H11培地が使用されるが、遅発育性であり(倍加時間:16~18時間)、コロニーの肉眼的な検出に2~3週間以上を要する。遅発育性は検体培養による結核の診断を遅らせる一因となる。小川培地表面では「ロウ状」の光沢を持ったR型コロニーを形成し、乳白色~淡黄色の色調を呈する。界面活性剤を加えずに液体培地に培養した場合、培地表面に肉眼的にコード状に発育する(cord形成)。

喀痰に含まれる結核菌の飛沫核(空気)感染により、結核はヒト-ヒト感染伝播する。結核菌は病原性の高い細菌であり、わずか数個の菌を吸入することで感染が成立する。感染しても発病は生涯を通じて約10%で、90%は感染した結核菌が休眠状態で宿主体内に残存する(persister)。

結核菌は外毒素や内毒素を産生せず、その病原性は宿主感染防御機構から逸脱して細胞内生存や増殖をすること、遅延型過敏反応を誘導することにより表現される。結核菌は細胞内寄生菌であり、宿主マクロファージに貪食された後、殺菌されずに増殖する。マクロファージ内では食胞体(ファゴソーム)内に留まるが、ファゴソームとリソソームの融合(ファゴリソーム融合)を阻害することで、細胞内殺菌機構から逸脱する。

すべての結核菌株はBSL-3である。

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等の一部を改正する法律(改正感染症法)では、結核菌は特定病原体等に指定され、四種病原体等に、多剤耐性結核菌は三種病原体等に分類されるので、管理・取扱いに際し、同法を遵



表1 結核菌の特徴

細胞内寄生性	ファゴリソゾーム融合を阻害し、マクロファージ内ファゴソーム中で生存
遅発育性	倍加時間 16~18 時間 コロニー形成に 2~3 週間以上
細胞壁	脂質に富み(乾燥菌量の 10~40%、細胞壁の 20~60%)、抗酸性を呈する種々の環境や化学物質に抵抗性を示す
運動性	非運動性、芽胞非形成性、莢膜なし
遺伝子	ゲノムサイズ約 4.4 Mb、GC 比 65.6%
感染形式	エアロゾル：飛沫核(空気)感染
好気性	発育には酸素を要求し、酸素分圧の高い肺等で増殖 酸素が枯渇しても死滅せず、休眠状態となる
病態	慢性炎症、肉芽腫形成、乾酪壊死、空洞形成、線維化

表2 結核菌曝露に対する応急措置、及び事故対応

バイオセーフティレベル	BSL-3	
感染経路	結核菌を含む飛沫核(空気)感染	
針刺し・怪我	血液を絞り出し、流水で洗浄後、傷口を消毒	
応急処置	皮膚	流水で洗浄後、消毒
	口	うがい
	眼	流水あるいは滅菌生理食塩水で洗浄
	鼻	鼻腔洗浄
感染事故対応	応急処置と施設管理者への報告、医療機関を受診	
緊急投薬	なし	
有効な薬剤	発病予防にはイソニアジド(INH)投与、INH 耐性菌の場合、リファンピシン(RIF)投与	
経過観察	定期健診による胸部 X 線撮影検査 結核菌特異抗原による末梢血 interferon- $\gamma$ 遊離試験 ツベルクリン皮内反応検査 経過観察、曝露後 2 年間	
臨床症状	針刺し・外傷局所では感染部位の炎症、所属リンパ節の腫脹 症状は 2 週間以上持続する咳嗽、喀痰や発熱が最も多く、その他、全身倦怠、血痰、胸痛、体重減少、寝汗や食欲低下等	

表3 結核菌感染に対する予防措置

ワクチンの接種	BCG ワクチン	
特異免疫反応試験	TST	ツベルクリン皮内反応(Mantoux) 48 時間後判定：遅延型皮内反応
	IGRA：QFT	末梢血細胞 IFN- $\gamma$ 産生・遊離試験(IGRA, Quantiferon <sup>®</sup> ): <i>in vitro</i> 抗原：ESAT-6, CFP-10
発病予防内服	感染曝露が確認された場合、INH (300 mg/日、6~9 ヶ月) 投与、INH 耐性菌の場合、リファンピシン(RIF)投与	
滅菌法	使用した器具はオートクレーブ 121℃、30 分による滅菌	
消毒薬	アルコール類、フェノール類、アルデヒド類による消毒	

守する。

#### 【実験室のハザード及び予想されるリスク】(表2)

結核菌は飛沫核(エアロゾル)により感染伝播するので、実験室においてはエアロゾルの発生及び吸引に留意する。1979～1999年における実験室感染の原因病原体の中で、結核菌は最も頻度が高かった。針刺し、外傷等により菌が体内に入った可能性のある場合、緊急処置を必要とする。また、有効な抗微生物薬の投与を行う。針刺しや外傷では感染部位の炎症、所属リンパ節の腫脹が生じる。針刺しや外傷に対しては、血液を絞り出し、流水で洗浄後、創部を消毒する。体表面への付着が懸念される場合には流水で洗浄し、可能であれば消毒する。口腔内に入った可能性がある場合には十分にうがいを行う。感染事故対応は、針刺し事故等の場合には応急処置と施設管理者への報告、医療機関の受診を行う。なお、結核予防法は改正感染症法に統合され、結核は二類感染症に位置づけられた。この規程により、結核患者あるいは結核の疑い患者と診断するに足る高度の蓋然性が認められる場合、診察した医師は届出を直ちに行わなければならない。

臨床症状としては2週間以上持続する咳嗽、咯痰や発熱が最も多い。全身倦怠、血痰、胸痛、体重減少、寝汗や食欲低下等を伴うこともある。なお、約20%は自覚症状の有無に関わらず、健康診断で発見される。

本菌の潜伏期間は長く、若年層の一次感染では4～18ヶ月、既感染者の二次感染では長期経過後の発症もある。そのため、感染が懸念される場合、胸部X線撮影検査、感染曝露6～8週間後、結核菌特異抗原による末梢血 interferon- $\gamma$  遊離試験(Quantiferon<sup>®</sup>陽性:0.35IU/mL以上)やツベルクリン皮内反応検査(陽性、日本:紅斑 $\geq$ 直径10mm以上、欧米:硬結 $\geq$ 直径5mm以上)等を行い、2年間経過観察する。なお、ツベルクリン皮内反応陽性は結核菌感染のみならず、BCG接種や非結核性抗酸菌感染でもみられ、逆に、活動性結核の約25%は陰性である。陰性は真の陰性(結核菌未感染)や偽陰性(結核菌既感染にも

かかわらず、陰性)を包含し、偽陰性として、栄養障害、高齢者、免疫疾患、リンパ系悪性腫瘍、副腎皮質ステロイド薬療法、慢性腎不全、サルコイドーシス、HIV感染者(AIDSを含む)や重症結核(播種性)等がある。従って、ツベルクリン皮内反応は結核の補助診断である。ツベルクリン皮内反応陽性は感染防御の指標とならないことも留意する。

#### 【予防法—消毒・滅菌法—】(表3)

結核の予防ワクチンとして、弱毒ウシ型結核菌由来生ワクチンのBCGが汎用されている。乳幼児におけるBCG接種は有効とされているが、成人への効果は疑問視されている。結核菌を扱う業務に従事する前には、結核菌既感染の有無を確認しておくことが望ましい。確認にツベルクリン皮内反応、特に、結核菌特異抗原による末梢血単核細胞 interferon- $\gamma$  遊離試験が推奨される。予防内服にはイソニアジド(INH)が投与される。感染を受けたと判断される場合、INH300mgを1日量として6～9ヶ月投与する。感染結核菌がINH耐性の場合、リファンピシン(RIF)を投与する。

結核菌は熱湯による煮沸10分間で完全に殺菌できるが、オートクレーブ(121℃、30分)による滅菌が最も望ましい。消毒薬ではアルコール類、フェノール類、アルデヒド類が有効である。滅菌不可能な器具はグルタルアルデヒドに30分以上浸して消毒する。[大原直也・小林和夫]

#### ◎文献

- 1) 泉孝英監修、富岡洋海編：結核(第4版)、医学書院、2006。
- 2) 光山正雄編：結核、医薬ジャーナル社、2001。
- 3) 小林和夫：マイコバクテリウム(抗酸菌)と感染症、山西弘一監修、平松啓一・中込 治編、標準微生物学(第9版)、pp279-292、医学書院、2005。
- 4) 露口泉夫編：最新医学別冊 新しい診断と治療のABC 41/呼吸器6 結核・非結核性抗酸菌症、最新医学社、2006。
- 5) 四元秀毅・山岸文雄：医療者のための結核の知識(第2版)、医学書院、2005。
- 6) Morens D M et al: *Nature* **430**: 242-249, 2004。
- 7) Stop TB Partnership. <http://www.stoptb.org/>
- 8) 厚生労働省。平成18年結核発生動向調査年報集計結

果. <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou03/06.html>

- 9) World Health Organization. Tuberculosis  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>
- 10) エイズ予防情報ネット  
<http://api-net.jfap.or.jp/>
- 11) 厚生労働省. 結核・感染症に関する情報.  
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou.html>
- 12) Centers for Disease Control and Prevention. TB guidelines. Infection contrl.  
[http://www.cdc.gov/tb/pubs/mmwr/Maj\\_guide/infectioncontrol.htm](http://www.cdc.gov/tb/pubs/mmwr/Maj_guide/infectioncontrol.htm)

#### **COLUMN 多剤耐性結核菌 (MDR-TB) と超多剤耐性結核菌 (XDR-TB)**

結核菌においても抗微生物薬耐性が問題となっているが、薬剤耐性結核菌で、INHとRIFに同時耐性菌を多剤耐性結核菌 (Multidrug-resistant TB : MDR-TB)、多剤耐性結核菌でフルオロキノロン耐性、かつカナマイシン、アミカシン、カプレオマイシン等、注射可能薬の少なくとも1剤以上に耐性の菌を超多剤耐性結核菌 (Extensively drug-resistant TB : XDR-TB) という。薬剤耐性、特に、XDR-TBは抗結核化学療法がほとんど無効であり、生命予後も不良である。薬剤耐性結核菌に有効な新規抗結核薬の開発が希求されている。

# 結核菌のマクロファージ内生存機構

河村伊久雄\*

京都大学大学院医学研究科微生物感染症学

[受付・掲載決定：2008年6月30日]

キーワード：アポトーシス、オートファジー、結核菌、ファゴソーム、マクロファージ

## はじめに

WHOはこれまでに世界の約30%が結核の感染を受け、毎年約880万人の結核患者が発生していると推定しており、結核は世界的にみて今なお単一の病原体による最大の感染症であるといえる。(www.who.int/tb/publications/global\_report)。現在、結核患者発生の多くはアフリカおよびアジアの発展途上国にみられるが、今後HIVの増加や、結核蔓延国からの人的流入などにより、我が国においても結核の増加が懸念される。

結核の原因菌である結核菌は宿主に感染後、主にマクロファージに貪食される。しかし、この菌はマクロファージの殺菌機構に抵抗して、細胞内で生存し続けることができる。一方、結核菌感染に伴い、宿主では抗原特異的CD4<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>T細胞を中心とした細胞性免疫が発現する。これらT細胞は抗原刺激を受けると大量のIFN- $\gamma$ を産生し、マクロファージの活性化を強く誘導する。従って、感染抵抗性T細胞が出現すると、マクロファージの殺菌活性が飛躍的に高まる。また、CD8<sup>+</sup>T細胞はgranulysinの産生を介して、あるいはキラー活性を発揮して菌の増殖の場を奪うこ

とにより、防御免疫に関与することが示されている。しかし、結核菌は、このような防御免疫が発現しても感染宿主体内から容易には排除されず、数年から数十年の潜伏期を経て5~10%の感染宿主で慢性結核を発症するのである。このように、結核菌には強いアジュバント活性があることや、宿主免疫応答を強く活性化することはよく知られているが、宿主の感染防御反応を抑制する強い活性を有することも忘れてはならない。そして、この機序を解明することこそが、結核の撲滅に結びつくのである。

## 結核菌の殺菌抵抗性

### 1. ファゴリソソーム融合阻害

結核菌は宿主体内に侵入後、肺胞マクロファージ、樹状細胞(dendritic cell, DC)あるいは単球に積極的に侵入する。この細胞内侵入にはマクロファージ表面の補体レセプターやマンノースレセプターなど様々なレセプターが関与することが知られている。また、結核菌は菌体表面のmycobacterial mammalian cell entry protein 1Aやmycobacterial DNA-binding protein 1を介して非貪食細胞である肺胞上皮細胞に侵入する<sup>1,2)</sup>。これら結核菌侵入因子がマクロファージへの感染にどの程度関与するのかわかではないが、病原体を排除する能力が弱い上皮細胞への侵入は、結核菌の宿主体内での長期生存をより容易にするものと考えられる。

\*Corresponding author:

京都大学大学院医学研究科微生物感染症学

〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町

TEL: 075-753-4447 FAX: 075-753-4446

E-mail: ikuo\_kawamura@mb.med.kyoto-u.ac.jp