

平成21年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

抗酸菌の病原性と免疫誘導機構

分担研究報告書

研究分担者

光山 正雄

(京都大学・教授)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業研究事業）  
分担研究報告書

抗酸菌の病原性と免疫誘導機構

研究分担者 光山 正雄（京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・教授）  
研究協力者 河村伊久雄（京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・准教授）  
研究協力者 酒井 俊介（京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・研究生）

研究要旨.

抑制性補助因子である PD-1 は、その特異的リガンドである PD-L1 との会合を介して T 細胞の活性化を抑制することが知られている。この抑制経路は、self-tolerance に関与し、自己免疫病の発症を抑えるための重要な役割を果たしている。昨年度の BCG を用いた感染実験では、PD-1 シグナル経路の活性化が BCG 感染後に誘導され、抗原特異的 T 細胞の活性を抑制して菌の長期生存に関与することを明らかにした。そこで本年度は、結核菌肺感染モデルを用いて PD-1 経路の関与について解析した。結核菌 H37Rv を Wild type (WT) および PD-1 欠損マウスに感染させ、その後の生存率を調べたところ、PD-1 欠損マウスは感染後早期に死亡することがわかった。臓器内菌数を測定したところ、WT マウスに比較して PD-1 欠損マウスの肺では著明な菌数の増加が認められた。また、マクロファージおよび好中球を中心とした炎症細胞の著明な浸潤と、壊死を伴う炎症性病変が観察された。さらに、PD-1 欠損マウスの肺では各種炎症性サイトカインおよびケモカイン産生の著明な亢進が認められた。以上の結果から、結核菌感染では PD-1 経路が肺における防御免疫応答を正常に維持するために重要な役割を果たしているものと考えられた。

A. 研究目的

結核菌は感染しても多くの場合結核を発症せず、そのまま長期間に渡り体内で生存し続ける。高齢化、栄養不良、糖尿病あるいは HIV 感染などにより宿主の抵抗性が低下すると感染した菌が再び増殖し、結核を発症する。一方、結核菌が感染した宿主では、感染数週間後には抗原特異的 Th1 型 T 細胞が誘導され、防御免疫が発現する。しかし、防御免疫が発現しても菌の増殖を抑えることはできるが、菌を体内から排除することは容易ではない。結核を撲滅するためには、この結核菌が有する宿主防御免疫に抵抗するメカニズムを明らかにすることが必要であり、そこから得られた知見は必ず新たな治療法や予防法の構築に有益な情報となる。

昨年度、BCG を用いた感染実験を行い、菌がまだ存在しているにもかかわらず、感染 3 週後をピークとして感染防御能が低下することが示された。これは菌数の減少に伴い免疫応答が終息していく過程を示しているのではなく、感染した菌により抗原特異的 T 細胞応答が抑制された結果であると考えられた。そこでこの抑制機序について解析した結果、抑制性補助因子である PD-L1 とそのレセプターである PD-1 を介したシグナルが抗原特異的 T 細胞のサイトカイン産生応答を抑制することを見出した。PD-1 経路の活性化は、PD-L1 の発現が上昇する感染 3 週間目以降に認められたことから、PD-1 シグナル経路による T 細胞機能の抑制は、持続的な炎症反応をおさえるための防御反応であると考えられる。しかし、

BCG 感染では感染 3 週目以降でも臓器内に菌が存在することから、この時期のサイトカイン産生の低下が逆に菌の生存を可能にする要因になっているものと考えられた。また、この抑制性シグナル経路を適切に制御することで、防御免疫やワクチンの効果を亢進させることが可能になると考えられた。

昨年度は BCG を用いて解析を行ったが、BCG はヒトに病原性を示さないワクチン株であり、PD-1 経路が病原性を有する結核菌の感染でも同様に防御免疫の発現調節に関与するか否かは今のところ明らかではない。そこで本年度は、BCG 感染実験で得られた成績を踏まえて、結核菌のマウス感染モデルを用いて、感染後に誘導される免疫応答の制御に PD-1/PD-L1 シグナル経路が関与するか否かについて解析を行った。

## B. 研究方法

### 結核菌感染実験

C57BL/6 (wild type) および PD-1 欠損マウスに結核菌 (300 cfu) が肺内に入るように経鼻感染させ、その後感染 250 日目までマウスの生存数を調べた。さらに、感染後経時的に肺、脾臓および肝臓を採取し、各臓器中の結核菌生菌数を測定した。また、感染 21 日目および 32 日目に肺を採取し、HE 染色および Ziehl-Neelsen 染色を施して、炎症の程度および菌数の変化を比較した。肺内への炎症性細胞の浸潤を調べるため、肺をコラゲナーゼ処理した後、回収された細胞の表面抗原を FACS で解析した。

### サイトカインおよびケモカイン産生応答

結核菌感染後経時的に WT および PD-1 欠損マウスより肺を採取し、ホモジネートを作製してそこに含まれる各種サイトカイン量を ELISA で測定した。また、感染後経時的に採取した肺より RNA を抽出し、各種ケモカインの発現量を real-time RT-PCR で解析した。さらに、感染マウスの肺における抗原特異的 Th1 型 T 細胞の誘導を明らかにするため、感染後経時的に肺より T 細胞を回収し、抗原提示細胞と共に特異的ペプチド抗原で刺激し、産生される IFN- $\gamma$  量を

ELISA で測定した。

### IL-17 中和実験

WT および PD-1 欠損マウスに結核菌を経鼻感染させた。感染後 15 日目より 2 日毎に IL-17 に対する中和抗体を 3 回腹腔内投与し、感染後 21 日目に肺における菌数およびマクロファージや好中球の肺への細胞浸潤の程度について解析した。

### 倫理面への配慮

本研究は、マウスを用いた感染動物実験を含み、実験は京都大学動物実験指針に基づいて行われた。

## C. 研究結果

### 結核菌感染後の WT および PD-1 欠損マウスの生存率と臓器内菌数

C57BL/6 および PD-1 欠損マウスに結核菌 H37Rv 懸濁液 (50  $\mu$ l) を経鼻感染させた。この方法により、平均して 300 cfu の菌が肺内に感染することが確認された。感染後、マウスの生存率を調べたところ、感染 250 日を経過しても WT マウスには死亡例は認められなかったが、PD-1 欠損マウスは平均生存日数 33.8 日で全て死亡した。感染後の臓器内菌数を経時的に調べたところ、感染 3 週目までは肺、脾臓および肝臓の菌数に違いは認められなかった。しかし、感染 3 週目以降では PD-1 欠損マウスの脾臓及び肝臓の菌数は WT マウスより増加傾向にあった。また感染 3 週目以降では、PD-1 欠損マウスの肺内生菌数は WT マウスの菌数に比較して著明に増加することが示された。

### 結核菌感染後の病変形成

結核菌感染 32 日後、WT マウスの肺には目立った所見は見当たらなかったが、PD-1 欠損マウスの肺には多数の病変部位が認められた。肺組織切片を HE 染色して観察したところ、感染後 21 日目の WT マウス肺には炎症性細胞の浸潤を伴う肉芽腫様の炎症像が認められ、感染後 32 日目にも同様の所見が観察された。一方、PD-1 欠損マウスの肺では、感染後 21 日目より広範な炎症像が認められ、感染 32 日目にはその範囲がさらに拡大し、中心部にネクロシスを伴う炎症像が観察された。また、感染 32 日目の肺を

Ziehl-Neelsen 染色して観察したところ、WT マウスの肺に比較して PD-1 欠損マウスの肺には多数の結核菌が認められた。

WT マウスと PD-1 欠損マウスの肺では感染後の病変形成および細胞浸潤に著しい違いが認められたので、結核菌感染後経時的に浸潤細胞数を調べるとともにその分類を行った。WT および PD-1 欠損マウスの肺では、感染後 14 日目から 21 日目にかけて浸潤してくる細胞数の増加が認められ、その数は PD-1 欠損マウスの肺で明らかに多いことが示された。浸潤してくる細胞の種類を解析したところ、B 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞数には目立った変化は認められなかった。しかし、 $\alpha\beta$ T 細胞数は両マウス肺で増加し、PD-1 マウスの方が有意に多いことが明らかとなった。また、PD-1 欠損マウス肺ではマクロファージおよび好中球の著明な増加が認められ、特にマクロファージは全浸潤細胞の半数以上を占めることが明らかとなった。

#### サイトカイン産生応答

これまでの解析から、PD-1 欠損マウスの肺では結核菌感染を引き金として強い炎症反応が誘導されるものと考えられた。そこで、結核菌感染後経時的に WT と PD-1 欠損マウスの肺ホモジネートを調製し、肺におけるサイトカイン産生を調べた。感染後 21 日から 27 日目にかけて IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17A および IL-6 産生誘導が認められた。これらサイトカイン産生はいずれも WT に比べて PD-1 欠損マウスで高値を示した。一方、抑制性サイトカインである IL-10 産生については WT と PD-1 欠損マウスの間で明らかな差は認められなかった。この結果、PD-1 欠損マウスでは、感染後に強い炎症性サイトカイン産生を伴う炎症反応が誘導されていることが明らかとなった。

さらに、PD-1 欠損マウスでは結核菌感染後にマクロファージや好中球の著しい浸潤がみられたことから、肺におけるケモカイン産生が WT よりも PD-1 欠損マウスで亢進していることが予想された。そこで、感染後経時的に肺における各種ケモカイン mRNA 発現量を real-time RT-PCR で調べた。その結果、Ccl11 (KC)Ccl12 (MCP-1)、Ccl13

(MIP-1a)、Ccl15 (RANTES)、Ccl11 (Eotaxin)、Cxcl12 (MIP-2)、Cxcl19 (MIG)、Cxcl10 (IP-10)のいずれの発現も WT より PD-1 欠損マウスの方が高く、感染後 17 日目から 28 日目にかけて著しい発現の上昇が認められた。

最近、炎症反応の惹起に IL-17 が関与することが明らかにされている。また、本研究成績でも、IL-17A 産生が WT マウスよりも PD-1 欠損マウスの肺で高いことが示されたことから、PD-1 欠損マウスでみられる強い炎症反応には IL-17 が関与する可能性が考えられた。そこで、結核菌感染後、IL-17 に対する中和抗体をマウスに投与し、その後の肺内生菌数と細胞浸潤への影響を調べた。その結果、抗 IL-17 抗体は産生された IL-17 を完全に中和することができたが、PD-1 欠損マウスの肺でみられる菌数の増加や細胞浸潤を抑制することはできなかった。この結果から、IL-17 は、PD-1 欠損マウスの肺における炎症反応には関与しないことが示唆された。

WT および PD-1 欠損マウス肺において、結核に対する防御免疫に関与する Th1 および Tc1 細胞の出現を調べるため、結核菌感染後経時的に肺より T 細胞を回収し、抗原提示細胞存在下に ESAT-6<sub>1-20</sub> (CD4<sup>+</sup> T 細胞エピトープ)や TB10.4<sub>3-11</sub> (CD8<sup>+</sup> T 細胞エピトープ)で刺激後の IFN- $\gamma$ 産生量を測定した。その結果、CD4<sup>+</sup> T および CD8<sup>+</sup> T 細胞の IFN- $\gamma$ 産生は感染 17 日目以降に認められ、17 日目および 21 日目の IFN- $\gamma$ 産生量はいずれも PD-1 欠損マウスで有意に高いことが明らかとなった。この結果から、PD-1 欠損マウスの肺ではより早期に抗原特異的 T 細胞が誘導されることが示された。

#### D. 考察

本研究では、結核菌感染後の防御免疫誘導における PD-1 シグナル経路の役割について解析を行った。WT マウスと PD-1 欠損マウスに結核菌を経鼻感染したところ、WT マウスは感染後 250 日を経過しても全例生存していたが、PD-1 欠損マウスは肺における菌数の著明な増加を特徴として感染後約

1ヶ月で全例死亡した。肺の組織染色から、PD-1 欠損マウスの肺では中心部の壊死を伴う広範な炎症反応が起きており、マクロファージを中心とする細胞の浸潤が強く誘導されることが示された。また、感染後 14 日目以降で炎症性サイトカインやケモカインの産生が PD-1 欠損マウスでは強く誘導されていたことから、PD-1 経路が肺における防御免疫応答を正常に維持するために重要な役割を果たしているものと考えられた。

PD-1 は抑制性補助因子である PD-L1 のレセプターであり、PD-1 を介したシグナルが T 細胞抗原受容体からのシグナルを抑制することで抗原特異的 T 細胞のサイトカイン産生応答を阻害することが示されている。この PD-1 シグナル経路は、自己免疫疾患の発症を抑えるための免疫抑制システムとして見いだされた。しかし最近の研究では、長期間宿主体内で生存可能なウイルスや細菌感染の成立にも PD-1 シグナル経路が関与していることが報告されている。我々も昨年、BCG 感染では WT マウスに比較して PD-1 欠損マウスで菌の排除が亢進することを明らかにした。一方、BCG 感染実験の成績から PD-1 欠損マウスは結核菌感染でも WT マウスより抵抗性を示すものと考えられたが、予想に反して PD-1 欠損マウスは感受性であった。今のところこの原因を説明することはできない。しかし、予備実験の結果、結核菌感染では感染後 7 日目には肺における PD-1 の発現が増強されるが、BCG にはその能力が無いことが示されている。従って、BCG 感染では肺の PD-1 シグナル経路が機能しないにも関わらず結核菌感染で見られる炎症反応がおこらないことから、これは両菌の間に存在する病原性の違いを示すものと考えている。一方、結核菌感染では、病原性に相関して強い炎症反応が惹起されるが、これを制御するためには PD-1 経路の活性化が必要になるものと考えられる。このように、PD-1 シグナル経路は結核菌の感染あるいは宿主防御免疫の制御において重要な役割を果たしていると考えられる。今後さらに解析を進め、PD-1 シグナル経路の役割を分子レベルで明確にしていきたい。

## E. 結論

結核菌感染に対して PD-1 欠損マウスは高い感受性を示した。その原因は、肺における過剰な免疫応答の結果であると考えられる。従って、抑制性シグナル分子である PD-1 は、肺における防御免疫応答を正常に維持するために重要な役割を果たしているものと考えられた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kurenuma, T., I. Kawamura, H. Hara, R. Uchiyama, S. Daim, S. R. Dewamitta, S. Sakai, K. Tsuchiya, T. Nomura, and M. Mitsuyama. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to activation of caspase-1 via induction of potassium ion efflux in infected macrophages. *Infect. Immun.*, 77:3992-4001, 2009.

### 2. 学会発表

- 1) LLO-dependent entry of *Listeria monocytogenes* into cytoplasm is essential for calcium dependent calpain activation and IL-1 $\alpha$  secretion in infected macrophages. Dewamitta, S. R., 野村卓正, 原英樹, 土屋晃介, 暮沼武士, 申艶那, S. Daim, 酒井俊祐, 屈慧新, 山本武司, 河村伊久雄, 光山正雄. 第 20 回日本生体防御学会学術総会 2009 年 7 月 東京
- 2) マクロファージのリステリア貪食能の TLR2 シグナルによる増幅. 野村卓正, 申艶那, 土屋晃介, 原英樹, 酒井俊祐, 屈慧新, 河村伊久雄, 光山正雄. 第 20 回日本生体防御学会学術総会 2009 年 7 月 東京
- 3) PD-1-dependent signal impairs protective T cell response in chronic *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice. Kawamura, I., S. Sakai, and M. Mitsuyama. US-Japan cooperative medical science program.

The 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.

- 4) TLR2-dependent signal is involved in the efficient phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by macrophages. Yanna, S., T. Nomura, K. Tsuchiya, H. Hara, S. Sakai, H. Qu, S. Daim, S. R. Dewamitta, T. Yamamoto, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. 第39回日本免疫学会総会 2009年12月 大阪
- 5) Mechanism of the inflammasome activation upon infection with *Listeria monocytogenes*. Tsuchiya, K., H. Hara, T. Nomura, S. D. Dewamitta, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. 第39回日本免疫学会総会 2009年12月 大阪
- 6) LLO participates in caspase-1 activation in *Listeria monocytogenes*-infected macrophages via induction of IFN- $\beta$  production. Hara, H., K. Tsuchiya, I. Kawamura, T. Yamamoto, T. Nomura, and M. Mitsuyama. 第39回日本免疫学会総会 2009年12月 大阪
- 7) RD1 locus in *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to

the activation of caspase-1 via induction of potassium efflux in infected macrophages. Dewamitta, S. R., I. Kawamura, H. Hara, R. Uchiyama, S. Daim, S. Sakai, K. Tsuchiya, T. Nomura, and M. Mitsuyama. 第39回日本免疫学会総会 2009年12月 大阪

- 8) Bacterial cytoplasmic entry-inducing intracellular calcium signaling is required for IL-1 $\alpha$ / $\beta$  production in *Listeria monocytogenes*-infected macrophages. Nomura, T., S. R. Dewamitta, H. Hara, K. Tsuchiya, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. 第39回日本免疫学会総会 2009年12月 大阪
- 9) The PD-1:PD-L1 coinhibitory pathway is a critical determinant of host resistance to pulmonary tuberculosis. Sakai, S., I. Kawamura, K. Tsuchiya, T. Okazaki, and M. Mitsuyama. 第39回日本免疫学会総会 2009年12月 大阪

#### 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

平成21年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

抗酸菌感染における免疫防御誘導機構

分担研究報告書

研究分担者

吉開 泰信

(九州大学・教授)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進感染症研究事業）  
分担研究報告書

抗酸菌感染における免疫防御誘導機構

研究分担者 吉開 泰信（九州大学生体防御医学研究所・感染防御学・教授）

研究要旨.

BCG ワクチンは、成人の慢性結核症の防御に対しては不完全である。その原因の一つに感染防御を担うメモリーT細胞の維持が難しいことがあげられる。インターロイキン(IL)-15はエフェクターCD8T細胞のアポトーシスを抑制することによってメモリーCD8+T細胞の産生を促進するとともに、homeostatic proliferationを誘導することによって、メモリーCD8+T細胞増殖維持因子として働く。今回、BCGワクチンを接種してcontraction phaseに相当する時期にレコンビナントIL-15を投与することでエフェクターCD8T細胞のアポトーシスを抑制することによってメモリーCD8+T細胞の産生を促進できるか、さらに結核気道感染におけるBCGワクチン効果を増強できるかを検討した。BCGワクチン投与後のcontraction phaseでのIL-15の投与はマイコバクテリア抗原特異的メモリーCD8+T細胞を有意に増加させたが、強い結核防御を誘導することには不十分であると考えられた。

A. 研究目的

インターロイキン(IL)-15はエフェクターCD8<sup>+</sup>T細胞のアポトーシスを抑制することによってメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞の産生を促進するとともに、homeostatic proliferationを誘導することによって、メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖維持因子として働く。一般に微生物感染後のT細胞応答はexpansion phase, contraction phase, maintenance phaseに分けられる。我々はIL-15が*Listeria monocytogenes*の急性感染症では、感染7日から14日にかけてのcontraction phaseにエフェクターCD8<sup>+</sup>T細胞のアポトーシスをIL-15が防止することを見いだした。<sup>1-4)</sup> 今回、*Mycobacterium bovis* BCGワクチンを接種してcontraction phaseに相当する時期にレコンビナントIL-15を投与することでエフェクターCD8<sup>+</sup>T細胞のアポトーシスを抑制することによってメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞の産生を促進できるか、さらに結核気道感染におけるBCGワクチン効果を増強できるかを検討した。

B. 研究方法

C57BL/6マウスの腹腔に $5 \times 10^6$ の卵白アルブミン(OVA)発現BCG(BCG-OVA)ワクチンを接種して肺、肝臓と腹腔の菌数をMiddlebrook 7H10 agarで測定した。接種21日目から42日目にレコンビナントIL-15(0.5 $\mu$ g/日)を投与し、91日目から4週間イソチアニド(0/1g/L)を飲ませ後に、127日目に*M. tuberculosis* H37Rvを気道感染させた。BCG投与後および*M. tuberculosis* H37Rv感染後、経時的に腹腔内、肺、肝臓の菌数をカウントした。肺をEDTAとコラゲナーゼ処理してリンパ球を集めた。経時的にOVA抗原(SIINFEKL peptide,)テトラマーで染色し、またOVA抗原とマイコバクテリア抗原(TB-2, MPT-64, Ag85B, およびPPD)特異的T細胞をサイトカインFACSで調べた。病理組織組織は、緩衝10%ホルマリンで保存し、パラフィン封埋・切断後、ヘマトキシリン・エオジン染色した。



### C. 研究結果

脾臓および腹腔の OVA 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞は BCG/OVA 投与して 21 日目にピークとなりその後次第に減少して 42 日目で安定した数で推移した。rIL-15 投与後の OVA 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞は 90 日目で脾臓と肺で有意に増加していた。この時期の CD8<sup>+</sup>T 細胞の Bcl-2 の発現が有意に高く、Annexin-V で染まるアポトーシス細胞も有意に少なかった。BCG/IL-15 による免疫によって長期間、結核菌に対し感染防御免疫を誘導することができるかどうか評価するために、BCG を投与して、90 日目に isoniazid (0.1g/L) を飲水として 4 週間投与した後、BCG 投与 127 日目に  $2 \times 10^5$  *M. tuberculosis* H37Rv を気道内に感染させた。感染直前 (BCG 投与 127 日) の PPD 特異的 IFN- $\gamma$  産生 CD8<sup>+</sup>T 細胞、MHC クラス Ia 拘束性 MPT64190-198 CD8<sup>+</sup>T 細胞数は 90 日目に比べ減少していたが、IL-15 投与群ではまだ有意にコントロール群より多かった。感染 28 日目の肺と脾臓での PPD 特異的 IFN- $\gamma$  産生 CD8<sup>+</sup>T 細胞、MHC クラス Ia 拘束性 MPT64190-198 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞は有意に増加していたが、PPD や peptide 25 特異的 IFN- $\gamma$  産生 CD4<sup>+</sup>T 細胞数は増加していなかった。*M. tuberculosis* H37Rv 感染 28 日目と 10 週目のマウスの肺での臓器内菌数は CG/IL-15 免疫マウスで、肺での菌数は、BCG 免疫マウスに比べて有意差は認められなかった。*M. tuberculosis* H37Rv 気道内感染後の肺病理組織では肉芽腫形成や肺胞壁の構造は相対的に破壊に差は認められなかった。

### D. 考察

結核菌などの細胞内寄生性細菌に対する感染防御機構では、 $\gamma$  インターフェロン ( $\gamma$  IFN) 産生の CD4<sup>+</sup>Th1 細胞に加えて、一方、CD8<sup>+</sup>キラー T 細胞は慢性感染症の肺における菌の排除に重要であることが報告されている<sup>5,6)</sup>。抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞は結核のワクチンデザインにおいて重要な対象となる。IL-15 は活性化マクロファージ、樹状細胞や上皮系細胞から産生され、そのレセプターは IL-15R $\alpha$  と IL-2R $\beta$ / $\gamma$ c であ

り、その生物活性は IL-2 と類似している。IL-15 遺伝子ノックアウトマウスでは NK 細胞、NK T 細胞や  $\gamma$   $\delta$  型腸管上皮間リンパ球の分化が阻害されていることに加えて、メモリー型 CD8<sup>+</sup>T 細胞の減少が認められた<sup>7)</sup>。IL-15 はメモリー型 CD8<sup>+</sup>T 細胞の産生維持に関与していると考えられる。我々は *Listeria monocytogenes* の急性感染症モデルで、感染 7 日から 14 日にかけての contraction phase にレコンビナント IL-15 を投与することでエフェクター CD8<sup>+</sup>T 細胞のアポトーシスを防止し、その結果、メモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞を増加させることを見いだした。<sup>1-4)</sup> さらに IL-15 KO, IL-15Tg マウスを用いた BCG 感染実験から IL-15 は BCG 感染後エフェクターメモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞の非リンパ組織での維持に重要であり、長く持続する抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞を誘導し、結核菌の気道内感染から防御することを明らかにしている<sup>8,9)</sup>。今回、BCG ワクチン投与後、contraction phase に相当すると考えられる 21 日目から 42 日目にレコンビナント IL-15 を投与することで、エフェクター CD8<sup>+</sup>T 細胞の減少とメモリー型 CD8<sup>+</sup>T 細胞ともに産生を増強させた。これは IL-15 が CD8<sup>+</sup>T 細胞に直接働いてエフェクタータイプ CD8<sup>+</sup>T 細胞のアポトーシスを抑制し、メモリータイプ CD8<sup>+</sup>T 細胞の増殖を誘導したと考えられる。一方、isoniazid を投与して BCG を完全に排除すると、メモリー型 CD8<sup>+</sup>T 細胞が著減したことから BCG ワクチンでのメモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞の維持には抗原が重必要であると考えられる。結核感染後 IL-15 投与群ではメモリー型 CD8<sup>+</sup>T 細胞の再活性化が有意に高かったが、結核菌の有意の低下は認められなかった。その原因として IL-15 の contraction phase だけの投与ではメモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞の維持に不十分であること、IL-15 は CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性化にも関与しており<sup>10)</sup>、contraction phase だけの投与では CD4<sup>+</sup>T 細胞の維持に不十分の可能性などが考えられる。

### 参考文献

1. Yajima, T., Nishimura, H., Ishimitsu, R., Yamamura, K., Watase, T., D. H.

- Busch, E. G. Pamer, Kuwano, H., and Yoshikai, Y. : Memory phenotype CD8+T cells increased in IL-15 transgenic mice are involved in early protection against a primary infection with *Listeria monocytogenes*. *Eur. J. Immunol.*, 31:757-766, 2001.
2. Yajima, T., Nishimura, H., Ishimitsu, R., Watase, T., Busch, D.H, Pamer, E.G., Kuwano, H., and Yoshikai, Y. : Overexpression of IL-15 in vivo Increases antigen-driven memory CD8+T cells following a microbe exposure. *J. Immunol.*, 168:1198-203, 2002.
  3. Yajima T., Nishimura H., Sad S., Shen.H. , Kuwano H., and Yoshikai Y. Critical role of IL-15 in early activation of memory CD8+ CTL after re-infection. *J. Immunol.*, 174:3590-7, 2005.
  4. Yajima T., Yoshihara K., Nakazato K., Kumabe S., Koyasu S., Sad,S., Shen H., Kuwano H., and Yoshikai IL-15 regulates CD8+ T cell contraction during primary infection *J. Immunol.*, 176:507-15, 2006.
  5. Yoshikai Y. Immunological protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Crit. Rev. Immunol.*, 26:515-26, 2006
  6. Kaufmann SH. Tuberculosis: back on the immunologists' agenda. *Immunity*, 24:351-357, 2006.
  7. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 191:771-80, 2000.
  8. Saito, K, Yajima T, Kumabe S, Doi T, Nishimura H, Sad S, Shen H and Yoshikai Y. Impaired protection against *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin infection in IL-15 deficient mice *J. Immunol.*, 176:2496-2504, 2006.
  9. Umemura M., Nishimura H., Saito K., Yajima T., Matsuzaki G., Mizuno S., Sugamura I., and Yoshikai Y. Interleukin-15 as an immune adjuvant to increase efficacy of Bacillus Calmette-Guérin vaccination. *Infect. Immun.*, 71:6045-6048, 2003.
  10. Tang C., Yamada H., Shibata K., Maeda N., Yoshida S., Wajjwalku W., Ohara N., Yamada, T. and Yoshikai Y. Efficacy of recombinant BCG vaccine secreting IL-15/Ag85B fusion protein on protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infectious Dis.*, 197:1263-1274, 2008.
- E. 結論
- BCG ワクチン投与後の contraction phase での IL-15 の投与はマイコバクテリア抗原 特 的 メ モ リ ー CD8+T 細胞を有意に増加させたが、強い結核防御を誘導することにはまだ不十分であると考えられた。
- G. 研究発表
1. 論文発表
    - 1) Itsumi, M., Y. Yoshikai, and H. Yamada. IL-15 is critical to the maintenance and functions of self-specific memory-phenotype CD8 T cells. *Eur. J. Immunol.*, 39:1784-1793, 2009.
    - 2) Tang, C., H. Yamada, K. Shibata, S. Yoshida, W. Wajjwalku, and Y. Yoshikai. IL-15 protects antigen-specific CD8+ T cell contraction after *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin infection. *J. Leuko. Biol.*, 86:187-194, 2009.
  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

平成21年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

抗酸菌感染症と神経障害

分担研究報告書

研究分担者

後藤 正道

(国立療養所星塚敬愛園・園長)

## 抗酸菌感染症と神経障害

研究分担者 後藤 正道（国立療養所星塚敬愛園・園長）

### 研究要旨.

ヒト難治性皮膚疾患であるブルーリ潰瘍(抗酸菌 *Mycobacterium ulcerans* 感染症) に対する化学療法の効果についての組織学的研究は少ない。そこで (1) *M. ulcerans* 接種マウスに rifalazil 投与を行った病理組織の検討ならびに (2) ヒトのブルーリ潰瘍に対して化学療法を行う前後の病理組織の検討を行った。rifalazil 投与マウスでは未治療群にあった潰瘍はなく、肉芽腫が観察された。ヒトでは化学療法によって線維化がおり、多核巨細胞と肉芽腫が観察された。動物でもヒトでも治癒過程には肉芽腫形成を伴うことが明らかになった。

### A. 研究目的

我々は、長年にわたってハンセン病における神経障害について病理学的手法を用いて研究を行ってきた。ヒト難治性皮膚疾患であるブルーリ潰瘍(抗酸菌 *Mycobacterium ulcerans* 感染症) はハンセン病と同様に痛みがないが、局所の末梢神経が変性することによって無痛性になることを動物実験で示した。また、ガーナのブルーリ潰瘍皮膚について電顕を含めた検索を行い、動物同様にシュワン細胞の空胞変性を含む神経病変がヒトにも起きることを明らかにしてきた。

ブルーリ潰瘍に対しては広範切除術が行われてきたが、近年は化学療法との併用あるいは化学療法のみが行われるようになってきた。しかし、化学療法の効果についての基礎となる組織学的研究はまだ少ない。そこで本年度は、ブルーリ潰瘍に対する化学療法の病理学的評価のために (1) *M. ulcerans* 接種マウスに rifalazil (RLZ) 投与を行った病理組織の検討ならびに (2) ブルーリ潰瘍に対して化学療法を行う前後の病理組織の検討を行った。

### B. 研究方法

#### (1) 動物実験の病理学的検討

*M. ulcerans* 97-107 株の 32°C、7H9 培養

から調整した菌浮遊液 (CFU=1.3X10<sup>6</sup>/ml) の 25ml をマウス (BALB/c、雌) の両後足蹠内に接種し、局所に明らかな発赤・腫脹がみられるようになった 33 日目から RLZ の懸濁液 (2.5% アラビアゴム, 0.2% Tween80 加 PBS) 0.2ml を 1 日 1 回、週 5 回、15 週間経口投与 (5 及び 10mg/kg/日) し、経時的にフォルマリンで固定して後足をヘマトキシリン・エオジン染色と Fite 法抗酸菌染色で観察した。(参照: 中永和枝、斎藤 肇、石井 則久、後藤 正道 *Mycobacterium ulcerans* 感染マウスに対する rifalazil および rifampicin の発症阻止効果の比較 結核 79:333-339, 2004)

#### (2) ヒト病変の病理学的検討

抗酸菌培養あるいは PCR で確定診断されたガーナのブルーリ潰瘍患者 5 名 (結節型 1 名、潰瘍型 3 名、浮腫型 1 名) に対して、WHO のガイドラインに従い、6 週間のストレプトマイシン (15mg/kg) とリファンピシン (10mg/kg) を併用療法を行った (Dr. Richard Phillips)。治療直前と治療終了直後の皮膚病変より 4mm パンチ生検を行い、フォルマリン固定パラフィン標本を作成した。ヘマトキシリン・エオジン染色、Fite 法抗酸菌染色に加えて、マクロファージマーカー (CD68) の免疫染色を行った。

#### 倫理面への配慮

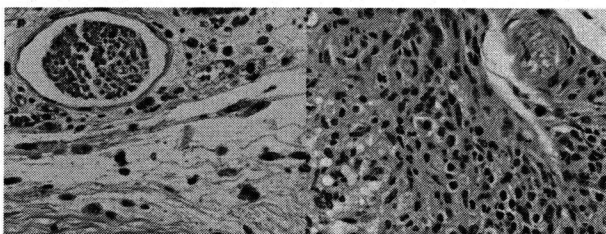
ヒト検体に関しては、現地において担当医から説明を行い、同意の得られた患者について皮膚生検を行った。

### C. 研究結果

#### (1) 動物実験の病理学的検討

未治療群では、*M. ulcerans* 接種後 33 日目に皮膚潰瘍はわずかがあるが、皮下組織の広範な浮腫が見られ、その中にフィブリンの滲出が認められた。少数の好中球と単球が浮腫性の間質に認められた。肉芽腫性炎症は見られなかった。抗酸菌は少数認められ、充実型で集簇し、単球内と間質に見られた。*M. ulcerans* 接種後 87 日目では、広範な皮膚潰瘍と皮下組織の浮腫が見られ、多数の長く充実型の抗酸菌が集簇していた。肉芽腫の形成は認められなかった。

一方、RLZ 治療群では投薬開始 1 週後に菌形態が充実型から変性を示す顆粒型となり、3、6、及び 9 週後では未治療群で観察された潰瘍はみられず、間質の浮腫及びフィブリンは吸収され、肉芽腫形成による病変治癒の過程が観察された。



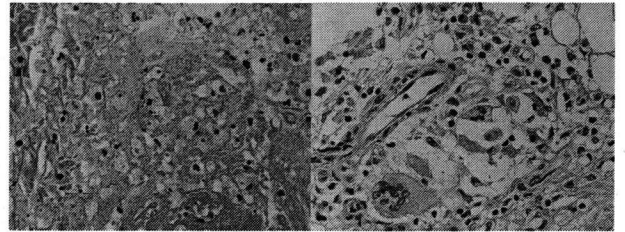
未治療のマウス 浮腫+ 肉芽腫-      RLZ 治療後のマウス 浮腫- 肉芽腫+

#### (2) ヒト病変の病理学的検討

治療前の真皮と皮下組織には、壊死、フィブリンの析出、好中球の軽度から中等度の浸潤が認められたが、多核巨細胞は認められなかったが、CD68 陽性細胞は皮下組織を中心に中等度認められた。抗酸菌染色では 1 例のみに多数の抗酸菌が認められたが、他の 4 例では抗酸菌は陰性かごく少数であった。

治療後の真皮と皮下組織には、線維化、CD68 陽性の類上皮細胞と多核巨細胞の浸潤、リンパ球と形質細胞の浸潤などが認められ

たが、15cm 以上の大きな潰瘍を示した 1 例では、壊死と好中球の浸潤が残存していた。



治療前の症例 壊死+ 肉芽腫-      治療後の症例 多核巨細胞+

### D. 考察

今回の動物実験とヒト症例の治療前後の組織所見を比較すると、治療前には壊死やフィブリンの析出が見られ、治療後には類上皮細胞肉芽腫形成が見られるなどの、動物とヒトには共通点が多いものの、相違点も見られる。動物では治療後も多核巨細胞の出現は見られていないが、これはマウスにおいてはヒトに比べて類上皮細胞の分化傾向が乏しいことを配慮すると矛盾はしない。今回のヒト組織では治療前にもかなりの好中球浸潤が認められる症例が多かったが、これは組織内に抗酸菌が少なかったためにマイコラクトンの産生が少なく、好中球が死滅から免れたことによると推測された。

### E. 結論

*M. ulcerans* 接種マウスに rifalazil 投与を行った病理組織と、ヒトのブルーリ潰瘍に対して化学療法を行う前後の病理組織の比較により、動物でもヒトでも治癒過程には肉芽腫形成を伴うことが明らかになった。

### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表
  - 1) ハンセン病の運動麻痺に対する総合電流刺激装置 (EMS) を用いた治療法の検討. 圓 純一郎, 増田 宏, 後藤正道,

北島信一, 加納達雄, 有川 勲. 第82  
回日本ハンセン病学会総会 2009年5  
月 出雲

- 2) ハンセン病の神経障害総論と最近の知見 (シンポジウム「ハンセン病神経障害の理解と後遺症予防」). 後藤正道. 第82回日本ハンセン病学会総会 2009年5月 出雲
- 3) ミャンマーにおける純神経型ハンセン病の皮膚病変. 後藤正道, Kyaw Kyaw, Thida Aung, 圓純一郎, 北島信一. 第50回日本神経病理学会総会 2009年6月 高松
- 4) Analysis of pure neural leprosy in

Myanmar. Kyaw, K., S. Y. Y. Swe, T. Aung, J, En, T. Sameshima, T. Hiraki, S. Kitajima, M. Goto. 44th U.S. - Japan Tuberculosis and leprosy conference, July 29-31, 2009, Fukuoka, Japan.

#### 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

平成21年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

結核菌の分子遺伝学

分担研究報告書

研究分担者

谷口 初美

(産業医科大学・教授)



厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業研究事業）  
分担研究報告書

結核菌の分子遺伝学

研究分担者 谷口 初美（産業医科大学医学部・微生物学・教授）  
研究協力者 藤原 永年（大阪市立大学大学院医学研究科・感染制御学・講師）  
研究協力者 大原 直也（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・  
口腔微生物学・教授）  
研究協力者 福田 和正（産業医科大学医学部・微生物学・講師）  
研究協力者 小川 みどり（産業医科大学医学部・微生物学・講師）

研究要旨.

広く分子遺伝学的解析に用いられている *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 はマウスマクロファージ系 J774 細胞内で生残することができないが、*M. smegmatis* J15cs は生残することができる。我々は、細胞内増殖性に影響する抗酸菌遺伝子の解析を行うためのホストベクター系 *M. smegmatis* J15cs-pYT923hyg を構築した。今回、ホストである J15cs 株の細胞壁成分の解析と *rpoZ* 変異株を作製し、各種性状と細胞内増殖性への影響をみた。細胞壁成分の解析において、*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 と *M. smegmatis* J15cs の両株で、ミコール酸、リン脂質、糖脂質に差はなかった。しかし、mc<sup>2</sup>155 株と異なり、J15cs 株では apolar GPL が欠落していた。また、J15cs の *rpoZ* 変異株は、コロニー形態、growth curve、sliding motility において、親株と顕著な差は認められなかったが、SDS 感受性になり、電子顕微鏡像と細胞内増殖様式が異なっていた。以上の結果より、J15cs 株の J774 細胞での生残性には apolar GPL の欠落が関与していること、RNA ポリメラーゼの  $\omega$  サブユニットである *rpoZ* 遺伝子が細胞内増殖性に影響を与えることが示唆された。

A. 研究目的

我々は、細胞内増殖に影響を及ぼす結核菌の遺伝子解析を行うため、ホストベクター系 *Mycobacterium smegmatis* J15cs-pYT923hyg を構築している。抗酸菌の分子遺伝学的研究に広く使用されている *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 は、マクロファージ内で生残することができないが、J15cs は生残することができ、電子顕微鏡による解析で、両株の細胞壁の構造が異なっていることを明らかにしている。今回は、細胞壁成分の組成について調べた。また、結核菌遺伝子 Rv1388-Rv1389-Rv1390 (*rpoZ*) が *M. smegmatis* J15cs に休眠類似の状態を引き起こすことを見出しているが、*M.*

*smegmatis* J15cs 側にも *rpoZ* に相当する遺伝子が存在するため、その破壊株を作製し、ホストとして使用することを目的とした。

B. 研究方法

1) 細胞壁成分の解析:

*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 および *M. smegmatis* J15cs を普通寒天培地で7日間培養し、遠心集菌した。

・ミコール酸分析

1M水酸化テトラブチルアンモニウム溶液で90℃、16時間アルカリ加水分解した。6M塩酸で中和後、ヘキサン抽出によりミコール酸画分を分取し、さらにジアゾメタンでメチルエステル化した。薄層クロマトグラフ

イー (TLC) で展開 (Hexane/diethyl ether, 90:15 by vol. x3 runs or benzene x3 runs) し、その移動度からミコール酸サブクラスを検出した。展開した TLC 上の単一スポットを精製し、各サブクラスミコール酸メチルエステルを MALDI/TOF MS 分析し、質量数を検定した。TLC での移動度と質量数から各ミコール酸のサブクラスと分子種を同定した。

#### ・脂質画分の抽出と比較

菌体を超音波破碎後、Folch 法に準じて chloroform/methanol (3:1, 2:1, by vol) と H<sub>2</sub>O で二層分配し、有機層を回収、濃縮して総脂質画分を得た。総脂質画分を TLC で二次元展開 (1<sup>st</sup> chloroform/methanol/H<sub>2</sub>O, 65:25:4 by vol; 2<sup>nd</sup> chloroform/methanol/acetic acid/H<sub>2</sub>O, 40:6:7.5:2 by vol.) し、主要脂質成分を網羅的に比較検討した。リン脂質は Dittmer 試薬、アミノ基は Ninhydrin 試薬、糖脂質は 20%硫酸で検出した。

#### ・アルカリ安定脂質の検出

総脂質画分を 0.2N NaOH/methanol で 37°C、2 時間アルカリ加水分解してアルカリ安定脂質を得た。アセトン沈澱、Sep-pack カラム処理を行い、糖ペプチド脂質 (glycopeptidolipid, GPL) 画分を抽出した。TLC (chloroform/methanol, 90:10 by vol. or chloroform/methanol/H<sub>2</sub>O, 60:16:2 by vol.) で展開し、20%硫酸で GPL のスポットを検出した。

#### 2) J15cs*rpoZ*変異株の作成:

pUCMSRPO (Gm<sup>r</sup>, *sacB*, *rpoZ*:Km<sup>r</sup>) を使用し、2 段階の相同組換えにより染色体上の *rpoZ* 遺伝子に変異を起こさせた。カナマイシン耐性、ゲンタマイシン感受性で選択した組換え体を得た。確認は *rpoZ* 部分に組換えが起きていることを内部に primer を設計し、PCR 産物のサイズにより確認した。

#### 3) 変異株と親株の各種性状比較:

##### ・コロニーの性状

普通寒天培地上でのコロニーを肉眼および実体顕微鏡で観察した。

##### ・Growth curve の作成

0.05% Tween80 加 LB broth を使用し、growth curve を作成した。普通寒天培地で 7 日間培養した菌を PBS にケン濁し、単個菌にするため 5 $\mu$ m フィルターを通した。L 字管に約 5X10<sup>5</sup>CFU/ml を調整し、37°C で振とう培養し、経時的に OD<sub>600</sub> を測定した。

##### ・Sliding motility

LB 0.3% agar plate の中央部分に約 5X10<sup>7</sup>CFU/ml に調整した菌液 (フィルター処理済) を 10 $\mu$ l 接種し、37°C で培養した。

##### ・SDS 耐性

普通寒天培地に 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.01% に SDS を加えた普通寒天培地を作製し、約 5X10<sup>7</sup>CFU/ml、5X10<sup>6</sup>CFU/ml、5X10<sup>5</sup>CFU/ml の菌液 (フィルター処理済) をそれぞれ 0.1ml ずつスプレッダーで塗り拡げ、37°C で培養した。

##### ・走査型電子顕微鏡による解析

普通寒天培地で 7 日間培養した *rpoZ* 変異株を PBS にケン濁後、その上清を使用した。2% グルタルアルデヒドおよび 1% オスミック酸固定を行い、アセトン脱水、*t*-ブチルアルコールで置換後、凍結乾燥した。オスミック酸コーティングを行い、走査電子顕微鏡 (HITACHI, S-4500) で観察し、J15cs 株の走査電頭像と比較した。

4) 細胞内増殖性: マウスマクロファージ系 J774 細胞を 24 穴 plate と Lab-Tek chamber slide に、ほぼ monolayer になるように調整した (10% FCS 加 RPMI1640, 37°C、5% CO<sub>2</sub>、2 日間)。普通寒天培地で 37°C、7 日間培養した菌を PBS にケン濁し、5 $\mu$ m フィルターを使用し単個菌を調整、菌を感染させた (約 1X10<sup>6</sup>CFU/well)。感染 3 時間後に PBS で 2 回洗浄し、さらに 200 $\mu$ g/ml アミカシン加 5% FCS RPMI で 2 時間処理し、細胞外の菌を除き、2 $\mu$ g/ml アミカシン加 5% FCS RPMI に交換した。この時点を目とした。Lab-Tek chamber slide は Ziehl-Neelsen 染色を行い、抗酸性と形態観察を行った。また、24 穴 plate に関しては、0.2% Triton-X-100 とラバーポリスマンで処理し、普通寒天培地にプレーティングして 37°C で 3~5 日培養後、菌数 (CFU) を測定した。

## C. 研究結果

### 1) 細胞壁成分の解析

*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155、*M. smegmatis* J15cs 株間のミコール酸組成に大差はなく、 $\alpha$ 、 $\alpha'$ 、エポキシミコール酸の3種類のサブクラスを発現していた。 $\alpha$  ミコール酸は C78-83、 $\alpha'$  ミコール酸は C62-65、エポキシミコール酸は C78-82 を中心としたクラスターを形成した。総脂質画分の二次元 TLC の結果、主要リン脂質として phosphatidylethanolamine (PE), cardiolipin (CL), phosphatidyl-inositol-mannoside (PIM)、糖脂質として trehalose-monomycolate (TMM) をそれぞれ検出した。2 株間でこれらリン脂質、糖脂質の分布に差はなかった。次に、アルカリ安定脂質の TLC において、*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 株からは、apolar GPL のスポットが検出されたが、*M. smegmatis* J15cs 株においては GPL が全て欠落していた。

### 2) J15cs*rpoZ*変異株の作成

J15cs の染色体上の *rpoZ* 遺伝子に組換えを起こし、*rpoZ* 変異株を得た。

### 3) 変異株と親株の各種性状比較

J15cs 株と *rpoZ* 変異株の普通寒天培地上のコロニー形態は、いずれも rough 型で類似していた。また、0.05% Tween80 加 LB broth での growth curve は変異株の立ち上がりが遅れたが、最終的には OD<sub>600</sub> は一致した。両株間で、培地での増殖に特に差は認められなかった。また、親株および *rpoZ* 変異株の sliding motility は制限され、両株間で特に差は認められなかった。SDS 耐性に関しては、親株は 0.008% SDS まで増殖したが、変異株は 0.004% SDS までしか増殖が認められず、*rpoZ* 変異株は親株より感受性であった。普通寒天培地で 7 日間培養した J15cs*rpoZ* 変異株の形態を走査型電子顕微鏡で観察したが、J15cs では菌体が連結した像が観察されたが、菌体が融合したような像は認められず、それぞれの菌体が識別できた。しかし、菌体表面あるいは周囲に菌体とは別の多数の構造物が観察された。

### 4) 細胞内増殖性

マウスマクロファージ系 J774 細胞に親株と *rpoZ* 変異株を感染させた。6 日目まで細胞内菌数に差は認められなかったが、親株は菌体が拡散した状態で生残し、*rpoZ* 変異株はらい球様の凝集塊を形成していた。また、*rpoZ* 変異株では、J774 細胞が菌塊の周りに集積している像が多数観察された。

## D. 考察

結核菌をはじめとする抗酸菌の大きな特徴は細胞壁に多量のワックス様脂質分子を含むことであり、これら細胞壁を構成する脂質分子は菌表層の疎水性や抗酸性に寄与するばかりでなく、食細胞内での長期間の生残を可能にしていることが推察される。今回、*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 株と *M. smegmatis* J15cs 株の網羅的脂質画分の比較において、ミコール酸や主要リン脂質、糖脂質の分布に差はなかったが、apolar GPL の存否に差があった。*M. avium-intracellulare* complex (MAC) 菌は血清型特異 GPL を産生するが、*M. smegmatis* はそのコア部分に相当する apolar GPL を産生することが知られている。また、GPL の菌の性状や宿主応答への寄与が指摘されている。*M. smegmatis* J15cs 株において apolar GPL 画分が完全に欠落したことが細胞壁構成の変化をもたらし、*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 株と異なる性状を示したと考えられる。*M. smegmatis* J15cs 株がマクロファージ内で長期に生残できることは、GPL 欠損による細胞壁の変化、宿主応答からの回避によるものと考えられた。我々が構築したホストベクター系 *Mycobacterium smegmatis* J15cs-pYT923hyg を使用し、結核菌の Rv1388-Rv1389-Rv1390 (*rpoZ*) 遺伝子がマウスマクロファージ系 J774 細胞内で、*M. smegmatis* J15cs に休眠類似の状態を引き起こすことを見出している。今回、我々は J15cs の Rv1390 (*rpoZ*) 相当遺伝子の変異株を作成し、細胞内増殖性への影響をみた。J15cs の *rpoZ* 変異株は、コロニー形態や growth curve、sliding motility に顕著な差は認められなかったが、SDS に感受性になっていた。走査型電子顕微鏡による解析

で、*rpoZ*変異株は各菌体が別々に認識できた。J15cs は、細胞壁の最外層で連結しているため、それぞれの菌体をはっきりと観察することができない。*rpoZ*変異株の菌体表面と周囲に認められた構造物に関しては、透過電子顕微鏡による解析等を行い、その正体を明らかにしていきたい。細胞内増殖性に関しては、親株とは明らかに異なる増殖様式を示した。*rpoZ*遺伝子は、RNA ポリメラーゼの $\omega$ サブユニットをコードし、菌体表面の変化を引き起こし、SDS 耐性およびマウスマクロファージ系 J774 細胞内増殖様式に影響している可能性が考えられた。また、この結果は、結核菌の Rv1390 遺伝子が細胞内増殖性に影響している可能性を支持するものであると考えられた。*rpoZ*変異株を感染させた場合、J774 細胞が菌塊の周りに集積している像が観察された。J774 細胞に囲まれた菌塊がこの後死滅するのかさらに増殖するのかは現段階では明らかでないが、medium 交換等により J774 細胞を長期維持し、その後の経過を調べる予定である。

#### E. 結論

マウスマクロファージ系 J774 細胞内で生残することができる *Mycobacterium smegmatis* J15cs は apolar の GPL が欠落していることが明らかになった。また、J15cs の *rpoZ* 変異株は親株とは異なる増殖様式を示し、*rpoZ*遺伝子が細胞内増殖様式に影響を与えることが示唆された。

#### G. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) Nomoto, M., M. Ogawa, K. Fukuda, H. Miyamoto, and H. Taniguchi. A host-vector system for molecular study of the intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in phagocytic cells. *Microbiol. Immunol.*, 53:550-558, 2009.
  2. 学会発表
    - 1) 食細胞内での結核菌増殖に関する分子遺伝学的研究のための宿主・ベクター系. 野本摩利、小川みどり、福田和正、宮本比呂志、谷口初美. 第 62 回日本細菌学会九州支部総会 2009 年 9 月 佐賀
    - 2) *Mycobacterium smegmatis* J15cs の結核菌細胞内増殖の分子遺伝学的研究への応用 (1) : 宿主・ベクター系の構築. 野本摩利、小川みどり、福田和正、宮本比呂志、谷口初美. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月発表予定
    - 3) *Mycobacterium smegmatis* J15cs の結核菌細胞内増殖の分子遺伝学的研究への応用 (2) : 小川みどり、大原直也、野本摩利、福田和正、谷口初美. *rpoZ* mutant の解析. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月発表予定

#### 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