

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)

非結核性抗酸菌の感染・発病に関する基礎的研究

分担研究報告書

研究分担者

後藤 義孝

(宮崎大学・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

非結核性抗酸菌の感染・発病に関する基礎的研究

研究分担者 後藤 義孝 （宮崎大学農学部・獣医微生物学・教授）
研究協力者 芳賀 猛 （宮崎大学農学部・獣医微生物学・准教授）

研究要旨.

M. avium は抗結核剤や抗生物質に対して耐性を示すため、ヒトや伴侶動物が難治性となり問題となっている。我々は遺伝的背景の異なる3種の近交系マウス BALB/c、C57BL/6、DBA/2 を用いて病型の異なる *M. avium* 感染モデルを作出し、リファンピシン (RFP)、レボフロキサシン (LVFX) およびクラリスロマイシン (CAM) の三剤併用療法を試みるとともに、それらマウスにおける菌の増減や肉芽腫形成といった病態の変化とサイトカイン産生を中心とした免疫動態との関係を調べた。三剤併用療法は細胞免疫誘導能において C57BL/6 に劣る BALB や DBA/2 で著効を示した。治療の効果は病理組織学的にも明らかで、BALB の治療群では対照群に比べ肉芽腫数は有意にすくなく、また個々のサイズも小さくなった。サイトカインの産生パターンから C57BL は BALB に比べ早期に Th1 を誘導し、肉芽腫形成を増強させ抗酸菌への防御免疫を高めたと思われるが、逆に薬剤の菌への到達を遅らせるなどして治療効果を弱めることになった可能性がある。本実験により抗菌薬による治療効果と免疫動態にはマウスの系統差があることが分かった。

A. 研究目的

M. avium は諸種の抗菌薬剤に対して耐性を示し、本菌による感染症は一般に難治性である。*M. avium* 感染症に対する治療では、各種抗菌薬を単剤で使用した場合、クラリスロマイシン (CAM) を除き、*in vitro* で認められたのと同程度の治療効果が *in vivo* でた例は非常に少ない。さらに単剤投与では耐性菌が出現しやすいことから、*M. avium* 感染症に対しての抗菌薬の単剤投与は推奨されていない。American Thoracic Society は *M. avium* 感染症治療に対してリファンピシン（またはリファブチン、CAM またはアジスロマイシン、エタンブトールにストレプトマイシンを加えた3剤または4剤併用療法を推奨しているが、この方法においてさえ成功例（治療終了後、数年間再燃しないという病原体の根絶例）は約55%でしかない。

これまでにウサギ、モルモット、マウス

などの実験動物を使った結核症モデルや非結核性抗酸菌症モデルが数多く考案されてきた。その中でもマウスは遺伝的背景がはっきりとしており、感染モデルにおいてみられる様々な免疫反応を解析することにより、人や家畜の抗酸菌症における防御システムの一端を明らかにするのに役立ってきた。

実験的にマウスに *M. avium* を感染させると、系統間で感受性が異なり、*Nramp-1* の機能が正常なマウスに *M. avium* を感染させると、感染初期から菌の体内増殖は抑制され、肝臓や脾臓、肺といった臓器において肉芽腫はほとんど形成されない。一方、*Nramp-1* 機能欠損マウスに *M. avium* を感染させると、感染初期から菌は肝臓や脾臓、肺といった臓器内で増殖し、数週間以内に肉芽腫が形成される。肉芽腫は菌の他の臓器への播種を防ぎ、活性化マクロファージを維持する作用を持つ事から、その形成は

感染防御において重要であると考えられている。*Nramp-1* 機能欠損マウスとして C57BL/6 や BALB/c マウスが知られているが、過去の研究により、前者は Th1 型の細胞性免疫を誘導しやすいこと、また後者は Th2 型の体液性免疫を誘導しやすいことが分かっている。*Nramp-1* 抵抗性マウスとして DBA/2 が知られており、BALB/c 同様 Th2 型の体液性免疫を誘導しやすいことが分かっている。そこで、これら遺伝的背景の異なる 3 種の近交系マウスを用いて病型の異なる *M. avium* 感染モデルを作出し、これらのマウスにリファンピシン (RFP)、レボフロキサシン (LVFX) およびクラリスロマイシン (CAM) の三剤併用療法を試み、それらマウスにおける菌の増減や肉芽腫形成といった病態の変化とサイトカイン産生を中心とした免疫動態との関係を調べた。

B. 研究方法

マウスへの感染と臓器内菌数測定 : C57BL/6 (B6)、BALB/c (BALB) および DBA/2 (DBA) マウスは日本チャールズリバー株式会社より購入、7~8 週齢の雌を実験に供した。またマウスへの感染実験には *Mycobacterium avium* MINO 株を用いた。菌の濃度が 5.0×10^6 CFU/ml になるように滅菌蒸留水に浮遊しマウス尾静脈内に 1 匹あたり 0.2ml 接種した。所定の時期に肝臓、脾臓、肺を採取し、重量測定後、肝臓と脾臓内の生菌数を算定した。

抗菌薬の投与 : ブロスミック NTM にて感受性と判定された RFP、LVFX、CAM を混合し、所定の時期に半数のマウスに投与、投与群とした。投与量は RFP : 25mg/kg/day、CAM : 16mg/kg/day、LVFX : 25mg/kg/day 投与方法は供試菌感染後、4 週間目から自由飲水投与とし、全てのマウスへの 3 日間の投与量が等しくなるように必要に応じてゾンデにより追加投与した。残りの半数は溶液のみを与え対照群とした。

病理組織学的検査 : 肝臓、脾臓および肺を、10%ホルマリン液に 1 週間浸漬して固定した。パラフィン包埋後、3 μ m に薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色した。光学顕

微鏡 ($\times 200$) 1 視野あたりの肉芽腫数を求めると同時に肉芽腫を形成する細胞の特徴を調べた。

サイトカイン産生 : 感染マウスの脾臓を採取し、 1×10^7 /ml の脾細胞浮遊液とした。5% CO₂、37°C で 24 時間培養し、上清中に産生された IL-10、IL-12 (p70)、IFN- γ 、TNF- α 量について、Mouse ELISA kit (Invitrogen Life Technologies Japan Ltd., Tokyo,) を用いて測定した。

倫理面への配慮 本感染実験は宮崎大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

M. avium が感染したマウスに対する 3 剤併用療法は、臓器重量の減少、臓器内菌数増加の抑制、肉芽腫の病理組織学的評価の改善という点において系統差がみられ、Th1 よりも Th2 の誘導能に優れた BALB や DBA といった系統において著効を示した。一方、体液性免疫より細胞性免疫の誘

導に優れた能力をもつ B6 では治療群の脾臓および肺の臓器重量、脾臓、肺における臓器内菌数が対照群に比べ有意に減少したものの、そのいずれも BALB に比べると治療効果は小さく、肝臓では治療効果がほとんど認められなかった。

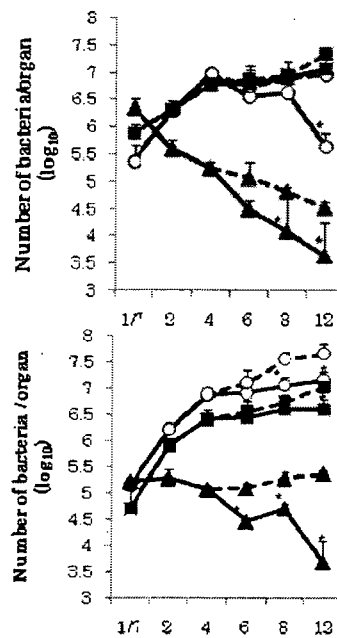


図1. 肝臓(上図)および脾臓(下図)における *M. avium* MINO 株の増殖。BALB (○)、B6 (■)、DBA (▲) に 10^6 CFU を感染させた。感染4週目以降、治療群(実線)と対照群(破線)とに分け、前者には RFP、LVFX、CAM の三剤を混合して毎日経口投与した。*は対照群に比べ有意差 ($p < 0.01$) があることを示す。

また B6 治療群のいずれの臓器でも、病理組織学的に、対照群のものとは比べ肉芽腫サイズが小型化し炎症の程度が軽くなったが、肉芽腫数の有意な減少は認められなかった。

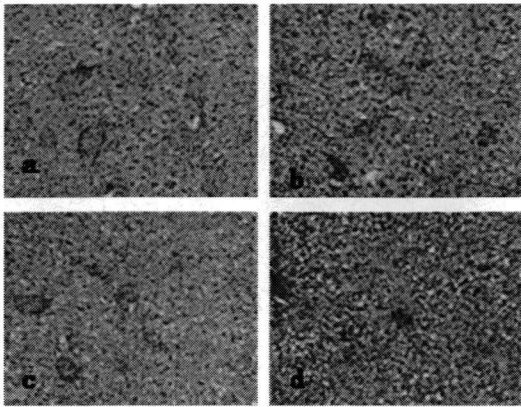


図 2 肝臓に形成された肉芽腫。 10^6 CFU の *M. avium* を iv 接種した B6 (a, b) と BALB (c, d) を感染後 4 週目以降 2 群に分け、一方の群に RFP・LVFX・CAM の三薬剤による治療を行った (a と c は対照群、b と d は治療群)。

サイトカイン IL-12p70 の産生量についてみると、DBA の感染後 6 週目において治療群での IL-12p70 の産生量が対照群に比べ有意に増加した。しかし、これを除いて BALB、B6、DBA いずれの系統でも対照群と治療群との間に有意差は認められなかった。感染期間を通して B6 での IL-12p70 産生量が最も高く推移した。一方 IL-10 は BALB と B6 において治療群での産生量が対照群に比べ有意に減少した。DBA では BALB、B6 とは逆に治療群での産生量が対照群に比べ有意に増加した。IFN- γ は感染後 12 週目の DBA を除き、感染期間を通していずれの系統でも治療群と対照群との間に有意差は認められなかった。TNF- α の産生は、BALB ではいずれの時期においても検出されないのに対し、B6 では対照群、治療群ともに検出されたうえ、治療群は対照群に比べて有意に産生量が増加していた。

D. 考察

同じ *Nramp-1* 感受性であるにもかかわらず BALB と B6 において治療効果の差が生じた理由のひとつとして、B6 は BALB に比べて Th1 型の細胞性免疫に傾きやすいという性質が原因となったのではないかと考えら

れる。実際、BALB と B6 の両系統マウスにおける *M. avium* 感染後のサイトカイン産生パターンをみると、IL-12p70 および IL-12p40 といった細胞性免疫を誘導するために必要なサイトカインが BALB よりも B6 でより多く産生されていた。IL-12 は抗原刺激を受けたマクロファージから産生され、naïve T cell を Th1 に分化させるとともに、NK cell からの IFN- γ および TNF- α 産生を促すことが知られている。一方、体液性免疫の誘導に重要な働きをする IL-10 は、BALB、B6 ともに感染後長期間にわたって脾細胞から産生されていたが、どちらの系統のマウスにおいても治療により産生量が減少した。これらの実験結果は、BALB、B6 ともに治療により IL-12/IL-10 バランスが大きく変化したことを示しており、どちらの系統のマウスも IL-12 の比重が増し、BALB では Th2 優勢から Th1 型へと傾き、B6 では Th1 がより増強される結果となったと思われる。*M. avium* 感染マウスとくに BALB や B6 など *Nramp-1* 感受性マウスは体内で菌がよく増殖する結果、*Nramp-1* 抵抗性マウスに比べて大量の抗 *M. avium* 抗体を産生する。今回の実験では産生される抗体レベルを比較しなかったが、もし Th1/Th2 バランスの変化が細胞性免疫または体液性免疫誘導能に影響を及ぼすとすると従来 of 仮説が正しければ、治療群とりわけ BALB における抗 *M. avium* 抗体のレベルが対照群のそれや B6 に比べて低くなると予想される。この点については今後の研究課題としたい。

次に、BALB では対照群で多数観察された肉芽腫が治療により明らかにその数を減じたのに対し、対照群で BALB を凌ぐ肉芽腫数を認めた B6 では治療を行ったにもかかわらずその数をほとんど減ずることがなかった点について考察する。抗酸菌感染において肉芽腫は菌を局所に封じ込め、全身への播種を防ぐという点においてきわめて重要な働きをする。

肉芽腫は活性化したマクロファージが感染部位に集積することによりその構造を維持しているが、マクロファージ系細胞の局所への誘導や活性化にはさまざまなサイト

カインが必要となる。とりわけ TNF- α は肉芽腫の形成に非常に重要な働きをする。TNF- α は抗酸菌感染にあつては、菌体成分やサイトカインによる刺激を受けたマクロファージから産生され、同細胞の活性化と感染部位への集積による肉芽腫の構築と肉芽腫構造を維持することにより感染を局所に抑え込む。TNF- α 産生についてみると生菌による二次刺激がない状態では BALB では検出されないのに対し、B6 では対照群、治療群ともに検出されたうえ、治療群は対照群に比べて有意に産生量が増加していた。このことから、BALB では少なくとも感染後 4 週目以降は肉芽腫形成誘導が抑えられたのに対し、B6 では感染後 4 週目以降でもさらなる肉芽腫形成誘導が起きており、それは治療群でより顕著であったのではないかと思われる。つまり、B6 では BALB に比べ、感染期間を通して過度に肉芽腫形成が起っていた可能性がある。B6 で治療効果が有意に得られなかった原因のひとつとして、局所病巣部における過剰な細胞性免疫誘導が長期にわたる肉芽腫形成を維持する結果、十分な薬剤が肉芽腫内部に存在する菌にまで到達することができず、結果的に治療効果を弱めることになった可能性が考えられる。最後に *Nramp-1* 遺伝子の治療効果に及ぼす影響について考えてみたい。*Nramp-1* は、マクロファージ内において菌を取り込んだファゴソームとリソソームの融合や二価の鉄やマンガンの輸送に関わっていると考えられ、*M. avium* の感染初期防御とりわけ菌の細胞内増殖抑制に大きな役割を果たしている。治療薬が菌に直接影響を与えるとするならば、ファゴソーム内にこれら薬剤が送りこまれる必要があるが、今回の実

験結果では感受性 (*Nramp-1*^{S/S}) の BALB と抵抗性 (*Nramp-1*^{L/L}) の DBA いずれも同じように治療効果が認められたことから、同遺伝子の影響はほとんどないと思われる。今後は治療効果の乏しかった B6 において効果を上げる工夫ならびに一定の効果が得られた BALB や DBA においてもより一層効果を高める方法等を検討する必要がある。

E. 結論

抗菌薬の効果とそれに伴う免疫動態にはマウス系統差があり、*M. avium* 感染においては、細胞性免疫ならびに肉芽腫形成誘導能に優れた B6 は BALB や DBA に比べ治療効果が劣ることが分かった。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1) Establishment of in vitro infection models using feline macrophage cell line Fcw-4 cells and atypical mycobacterial species isolated from various animals. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 29-31 July, 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)

抗酸菌症に対する予防、診断、治療に関する

細菌学的・免疫学的な基礎研究

分担研究報告書

研究分担者

瀧井 猛将

(名古屋市立大学・准教授)

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

抗酸菌症に対する予防、診断、治療に関する細菌学的・免疫学的な基礎研究

研究分担者 瀧井 猛将（名古屋市立大学大学院薬学研究科・
生体防御機能学・准教授）

研究要旨.

入手可能な 14 株の BCG 亜株（Russia, Moreau, Japan, Sweden, Birkhaug, Danish, Glaxo, Mexico, Tice, Connaught, Montreal, Phipps, Australia, Pasteur）を用いて細菌同定法に用いられている生化学試験法での差異、酸化ストレス、一酸化窒素（NO）ストレスによる感受性、及び pH 変化による生存能の差異について検討した。世界保健機関（WHO）が推奨する BCG ワクチンの世界標準株（Russia, Japan, Danish）が宿主免疫応答や環境によるストレスに対して抵抗性があることが推察された。

A. 研究目的

現在、*Mycobacterium bovis* bacilli Calmette Guérin (BCG) が結核に対するワクチンとして唯一利用されている。BCG ワクチンの有効性について少なくとも乳幼児結核や結核性髄膜炎など血行性に広まる結核病変について阻止する効果が認められているが、成人肺結核に対する有効性については意見が分かれている。BCG の効果にばらつきがみられる理由として、調査を行った地域での結核流行の程度、環境中に生育している抗酸菌の量、流行している結核菌の菌株の違い、ヒトの遺伝的素因など様々な要因が挙げられる。中でもワクチンに使用している BCG 株の違いが大きな要因になっているのではないかと考えられる。

現行の BCG ワクチンをより有効に活用するために、BCG ワクチン亜株間の細菌学的、免疫学的な差異の比較、および有用な亜株の選定が急務であると考えられる。世界保健機関 {World Health Organization (WHO)} は BCG ワクチンの世界標準株を設定することを取り決め、Tokyo172 株、Danish 株、Russia 株を候補とした。

優れたワクチンの条件としては、接種後、宿主内で生存し長期にわたって免疫能を持続できることが求められる。そこで本研究

では、BCG ワクチン世界標準株の選定における基礎的な知見を得るために、*in vitro* での BCG 亜株の生化学試験による細菌学的な特徴の解析と酸化ストレスと一酸化窒素（NO）に対する感受性について検討を行った。

B. 研究方法

菌株：*Mycobacterium bovis* BCG 亜株（Australia ATCC 35739、Connaught ATCC 35745、Danish ATCC 35733、Glaxo ATCC 35741、Mexico ATCC 35738、Montreal ATCC 35735、Pasteur ATCC 35734、Phipps ATCC 35744、Russia ATCC 35740、Tice ATCC 35743）、Australia vaccine seed、Sweden 株は国立感染症研究所の山本三郎博士より供与された。*M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 25618、Colorado State University より供与された。*M. bovis*, *M. bovis* BCG Brazil, *M. smegmatis* は結核研究所より供与された。各菌株は Middlebrook 7H9 Broth/0.25 % Tween 80/10% ADC 培地にて培養した。生化学試験：硝酸塩還元、カタラーゼ、tween80 水解、ウレアーゼ、ピラジナミダーゼ、PAS 分解試験、TCH 耐性の各試験は新結核菌検査指針 2007 (結核予防会) に従って行った。

倫理面への配慮

本研究は BCG ワクチンに由来する株であり、ATCC より購入した株、及び、ワクチンとして販売されている株を用いており、患者情報などの個人情報に含まれていない。

C. 研究結果

14 株の BCG 亜株について生化学試験を行った結果を表 1 に示した。硝酸塩還元試験では Birkhaug 株が陽性、Tice、Australia、Pasteur 株が陰性であり、他の株はすべて微陽性であった。ナイアシン試験の結果では、Russia、Moreau、Japan、Sweden、Birkhaug、Montreal、Phipps 株が陽性であり、他の株はすべて陰性であった。Tween80 水解試験では、Moreau、Sweden、Danish、Connaught、Montreal、Phipps、Australia、Pasteur 株が微陽性であり、他は陰性であった。ウレアーゼはすべての株で陽性であり、ピラジナミダーゼ、パス分解試験はすべて陰性であった。TCH 耐性試験では TCH の濃度 $1\mu\text{g/ml}$ ではすべて陽性、 $10\mu\text{g/ml}$ ではすべて陰性であった。カタラーゼ試験の結果では、BCG 亜株すべて低カタラーゼ群に分類されるが、泡沫高が 10mm を超える株が Japan 株と Birkhaug であった。体熱カタラーゼ試験はすべて、陰性であった。BCG 亜株の生育至適 pH について検討したところ亜株間で違いが見られ分与時期が近い株同士で同じ傾向が見られた (表 2)。In vitro での一酸化窒素ストレス、及び酸化ストレスに対する感受性試験を行った結果、Japan、Danish、Glaxo、Pasteur 株が一酸化窒素に対して比較的耐性であり、Russia、Japan、Birkhaug、Connaught 株が過酸化ストレスに対して比較的耐性を示した (図 1)。

D. 考察

生化学試験の結果、Pasteur 研究所からの分与時期の近縁の株間で形質がよく似ていることが明らかとなった。Pasture 研究所からの分与時期が早い株 (Russia、Japan) は酸化ストレスに対する耐性が高いことが示された。ヒトとマウスでは殺菌機構に違いがあり、ヒトの細胞では活性窒素中間体

より活性酸素中間体が殺菌に働いていると言われていることから、酸化ストレスに耐性を示す株が宿主細胞内で生存しやすいことが示唆される。

E. 結論

本研究の成果は BCG 亜株間の *in vitro* での性質の一部を明らかにした基礎的な知見である。今後、実際に使用されているワクチン株について同様に比較することにより、現行のワクチン行政に貢献することが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hayashi, D., T. Takii, N. Fujiwara, F. Yukiko, I. Yano, S. Yamamoto, M. Kondo, E. Yasuda, E. Inagaki, K. Kanai, A. Fujiwara, A. Kawarazaki, T. Chiba, and K. Onozaki. Comparable Studies of Immunostimulating Activities In Vitro among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) Sub-strains. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 56:116-128, 2009.
- 2) Horita, Y., T. Takii, T. Chiba, R. Kuroishi, Y. Maeda, Y. Kurono, E. Inagaki, K. Nishimura, Y. Yamamoto, C. Abe, M. Mori, and K. Onozaki. Synthesis of new sugar derivatives and evaluation of their antibacterial activities against *Mycobacterium tuberculosis*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 19:6313-6316, 2009.

2. 学会発表

- 1) BCG ワクチン亜株の生化学的、免疫学的な性状の比較検討. 安田恵美, 林大介, 瀧井猛将, 矢野郁也, 山本三郎. 第 84 回日本結核病学会総会 2009 年 7 月 札幌
- 2) 黒石隆司, 堀田康弘, 瀧井猛将. アミノ糖誘導体新規化合物の抗結核作用機

序の解析. 第 84 回日本結核病学会総会
2009 年 7 月 札幌

- 3) Comparable studies in vitro among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) sub-strains. Takii, T. US-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM-Forty four Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 2009, July 30, Hakata, Japan.
- 4) BCG 亜株の生化学的性状と宿主内生存能力の比較検討. 安田恵実, 瀧井猛将, 林 大介, 谷口恵一, 伊藤佐生智, 矢野郁也, 山本三郎, 小野寄菊夫. 第 21 回微生物シンポジウム 2009 年 9 月 広島
- 5) Comparable Sstudy between Conventional Biochemical Tests and Susceptibility to Environmental Stresses among *Mycobacterium bovis*/ BCG Sub-strains. Takii, T., Hayashi, D., M. Yasuda, Y. Horita, R. Yamamoto, T. Mukai, A. Fujiwara, K. Kanai, M. Konodo, A. Kawarazaki, I. Yano, S. Yamamoto, and K. Onozaki. Keystone symposia Overcoming the

crisis of TB and AIDS. October 20-25, 2009. Arusha, Tanzania.

- 6) Synthesis and Biological Evaluation of a New sugar Derivative as Antibacterial Agents for *Mycobacterium tuberculosis*. Horita, Y., T. Takii, T. Chiba, R. Kuroishi, R. Yamamoto, I. Inagaki, C. Abe, M. Mori, and K. Onozaki. Keystone symposia Overcoming the crisis of TB and AIDS. October 20-25, 2009. Arusha, Tanzania.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

- 1) 出願番号：特願 2009-037185 「抗結核化合物、及びその利用」
発明者：瀧井猛将、堀田康弘、小野寄菊夫、千葉 拓、森 雅美
 - 2) 出願番号：特願 2009-021026 「抗結核薬及びその用途」
発明者：瀧井猛将、堀田康弘、稲垣衣美、小野寄菊夫、千葉 拓、森 雅美
2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

表1 BCG 亜株間の生化学試験の結果

Table 1. Conventional biochemical test for BCG sub-strains

Organisms	Nitrate reduction	Niacin test	Tween 80 hydrolysis	Urease	Pyrazinamidase		PAS degradation	Resistance to TCH		Catalase (room temp.)		68 °C Catalase
					Day 4	Day 7		1 µg mL ⁻¹	10 µg mL ⁻¹	Bubble column (mm)	Activity	
BCG												
Russia	±	+	-	+	-	-	-	+	-	9.3 ± 2.4	low	-
Moreau	±	+	±	+	-	-	-	+	-	7.1 ± 1.8	low	-
Japan	±	+	-	+	-	-	-	+	-	14.8 ± 2.3	low	-
Sweden	±	+	±	+	-	-	-	+	-	6.7 ± 1.7	low	-
Birkhaug	+	+	-	+	-	-	-	+	-	11.8 ± 2.3	low	-
Danish	±	-	±	+	-	-	-	+	-	9.4 ± 2.4	low	-
Glaxo	±	-	-	+	-	-	-	+	-	7.4 ± 1.1	low	-
Mexico	-	-	-	+	-	-	-	+	-	6.4 ± 1.8	low	-
Tice	±	-	-	+	-	-	-	+	-	6.3 ± 1.6	low	-
Connaught	±	-	±	+	-	-	-	+	-	7.9 ± 1.9	low	-
Montreal	±	+	±	+	-	-	-	+	-	6.0 ± 2.3	low	-
Phipps	-	+	±	+	-	-	-	+	-	6.0 ± 2.2	low	-
Australia	-	-	±	+	-	-	-	+	-	6.1 ± 2.1	low	-
Pasteur	-	-	±	+	-	-	-	+	-	7.3 ± 2.6	low	-
<i>M. bovis</i>	-	-	-	+	-	-	-	+	-	5.4 ± 0.7	low	-
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	+	+	±	+	+	+	-	+	+	8.4 ± 1.1	low	-
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	+	+	±	+	+	+	-	+	+	10.0 ± 1.6	low	-
<i>M. avium</i> 724S	-	-	-	-	+	+	-	+	+	35.8 ± 13.0	low	-
<i>M. avium</i> 2151SmO	-	-	-	-	+	+	-	+	+	27.6 ± 3.5	low	+
<i>M. smegmatis</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	+	14.0 ± 1.3	low	-

Methods of the conventional biochemical tests for mycobacterium were described in the part of materials and methods. Experiments were conducted more than three times. Representative results were indicated. ^aBCG sub-strains, which were historically distributed from Pasteur Institute, are aliened in the chronicle order.

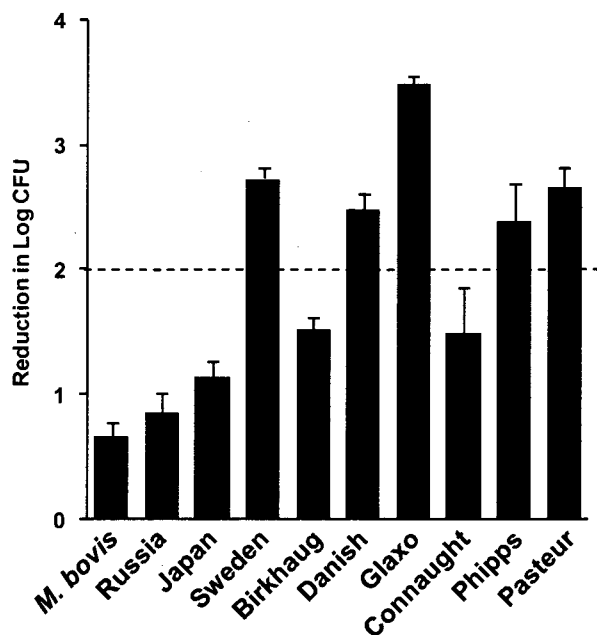
表2 BCG 亜株間の生育に及ぼす培地中の pH の影響

Table 2. The range of pH permissible for growth of BCG and the other mycobacteria

Organisms / broth pH	3	4	5	5.4	5.7	6.2	6.6	7	8	9	10	11	12
BCG													
Russia													
Moreau													
Japan													
Sweden													
Birkhaug													
Danish													
Glaxo													
Connaught													
Phipps													
Pasteur													
<i>M. bovis</i>													
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv													
<i>M. avium</i> TMC724S													
<i>M. avium</i> 2151SmO													
<i>M. smegmatis</i>													

BCG, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium* and *M. smegmatis* were cultured in 7H9 broth at indicated pH for 21 days with monitored its optical density (OD) at 530 nm every 3 days. The pH ranges that the broth OD was above 0.1 were represented in gray and was maximal were in black.

(a) H₂O₂



(b) NaNO₂

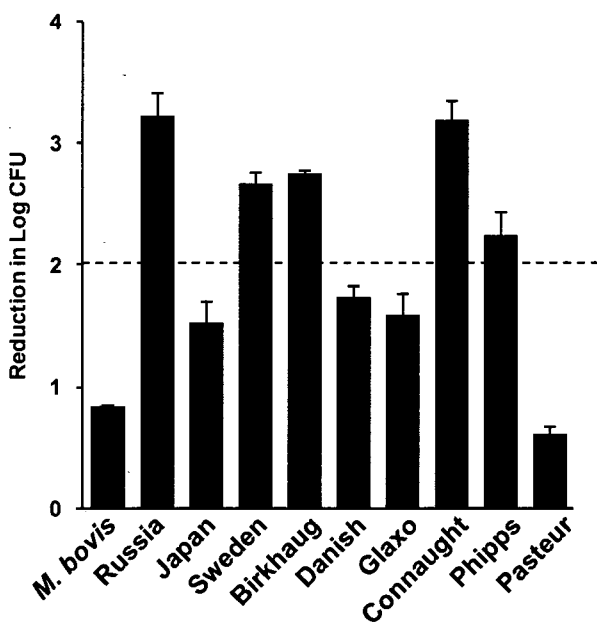


図1 過酸化ストレス及び酸化窒素ストレスに対する感受性

2 x 10⁶ CFU の *M. bovis* もしくは BCG sub-strains を(a) H₂O₂ (10 mM) で6時間処理したもの、(b) NaNO₂ (10 mM) で3日間処理した後、コロニーアッセイを行ったもの。

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)

宿主への侵入および宿主内生存に関わる抗酸菌の

分子と宿主要因に関する研究

分担研究報告書

研究分担者

大原 直也

(岡山大学・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

宿主への侵入および宿主内生存に関わる抗酸菌の分子と宿主要因に関する研究

研究分担者 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 小林 和夫（国立感染症研究所・免疫部・部長）
研究協力者 阿戸 学（国立感染症研究所・免疫部・室長）
研究協力者 岡部真裕子（国立感染症研究所・免疫部・研究員）

研究要旨.

すべての生物に必須のチミジル酸の合成を担う酵素は古くから知られている ThyA と、近年その存在が明らかになった ThyX がある。現在ゲノムが明らかになっている生物の中で抗酸菌とその近縁種のみが ThyA と ThyX を同時に持つ。BCG の ThyA 欠損株は種々の条件下でも発育するが、富栄養である 7H10 を基本とした培地上で ThyX 欠損株を発育させるためにはカタラーゼを含有させることが必要である。これは ThyX の持つ NADPH 酸化活性が喪失したことによることが示唆された。さらにこの原因を明らかにするために DNA マイクロアレイを用いて発現遺伝子の解析を行なった。ThyX 欠損株では 30 遺伝子の発現が恒常的に増加していた。これらの遺伝子の半数はゲノムの 3 部位に局在しており、変異型株の発育抑制に関与していることが示唆された。一方 ThyX を喪失させることで BCG は特定の培地において発育しないことを利用し、*thyX* 遺伝子を発現するプラスミドをベクター、 Δ ThyX を宿主、カタラーゼを含有しない 7H10-ADS 寒天培地を選択培地とする宿主-ベクターシステムの構築を試みた。その結果、このシステムが機能する可能性が示された。

A. 研究目的

細胞内寄生菌である結核菌が宿主に感染したときには培地で培養した時とは異なる遺伝子の発現プロファイルを示す。さらに宿主細胞内に潜伏感染している状態では感染初期とも異なる遺伝子の発現プロファイルを示すことが推測される。そして潜伏(持続)感染している際に発現している遺伝子群は宿主内における本菌の生存に重要な遺伝子であると考えられる。一方、宿主内で長期生存しているときの環境は低酸素状態であることが推測されており、好気条件下で発育する本菌が低酸素状態で長期生存するためには、酸化還元に関わる分子が長期生存に重要であることが考えられる。核酸はすべての生物にとって必須である。

従って核酸の構成成分のひとつチミンの合成経路もほとんどの生物にとって必須であり、古くから解析されてきた代謝系である。その中のチミジル酸合成酵素 thymidylate synthase (TS) である ThyA は細菌からヒトまで広く保存されている酵素である。しかし、古細菌を中心に ThyA を持たない細菌の存在が知られ、それらは ThyA の代わりに ThyX を持つことが明らかになった。さらに、*Mycobacterium* とその近縁種である *Corynebacterium*、*Nocardia*、*Rhodococcus* は例外的に ThyA と ThyX の両者を持つことが明らかになった。ThyA と ThyX は同じチミジル酸合成活性を持ちながら両者に相同性は無く、また ThyA と異なり ThyX は補酵素として FAD を必要とし、その反応に NADPH

オキシダーゼ反応を伴うことが明らかになっている。NADPH/NADP⁺はNADH/NAD⁺とともに、その酸化還元反応が細胞のさまざまな代謝経路に使用されていることから ThyX は単にチミジル酸の合成ということ以外に菌体内の恒常性の維持に関わっていることが推測される。BCG *thyX* 欠損株を用いた我々のこれまでの実験では、同株が液体培地である 7H9-ADC-Tween80 用いた振とう培養では発育できないこと、また富栄養の固形培地である 7H10-ADC 寒天培地では発育するが、この培地からカタラーゼを除去した 7H10-ADS 寒天培地では発育しないことを明らかにした。本研究ではこの原因を明らかにする一助としてマイクロアレイによる解析を行なった。BCG における ThyX の存在意義を明らかにする目的でさらなる解析を行った。一方、ThyX 欠損株が特定の培地では発育しないという性状を利用した組換え BCG のための宿主 - ベクターシステムの作製を試みた。

B. 研究方法

1. 使用菌株および培養条件

BCG Tokyo 株を親株とした *thyX* の遺伝子欠損株 Δ ThyX はショ糖感受性遺伝子 (*sacB*) を利用した 2 段階の相同組み換えによって行なった。遺伝子相補株 Δ ThyX: *thyX*/pNN は Δ ThyX をプラスミド pNN-*thyX* で形質転換することにより作製した。BCG Tokyo 株および変異株は完全合成培地である Sauton 培地で 2 週間表面培養を行なった。

2. DNA マイクロアレイ

マイクロアレイは NCBI に公開されている BCG パスツール 1173P2 株のゲノム情報をもとに 3,951 遺伝子、プローブ長 60 塩基の発現アレイをロッシュ社に作製依頼した。

菌体内全 RNA は TRIzol 試薬を用いて行ない、DNaseI により混在する DNA を消化後、RNeasy を使用して不純物の除去を行なった。

3. *thyX* 遺伝子を保持した形質転換用プラスミド

pAL5000 の複製起点を含む 1.3 kb を PCR で増幅し、pUC19 にクローニングした。クローニング後、PCR により複製に影響しな

い 0.8 kb を消失させ pNN3 を作製した。BCG *thyX* 発現カセットを作製するために、BCG *thyX* ORF を PCR で増幅し、pSC-B (ストラタジーン) にクローニングした。このプラスミドにカナマイシンメチル化酵素のプロモーター領域および大腸菌リボゾーム RNA オペロン転写終結領域を挿入することにより *thyX* 発現カセットを作製した。この発現カセットを制限酵素を用いて切り出し、pNN3 に挿入することにより pNN4 を作製した。

形質転換効率を求める指標のために pNN4 に緑色蛍光タンパク質 (GFP) の遺伝子およびカナマイシン耐性遺伝子を pNN4 に挿入し、pNN5 を完成させた。

4. 形質転換効率の検討

pNN4 の BCG Δ ThyX への導入はエレクトロポレーション法により行なった。導入後 7H9-ADC-Tween80 培地で 1 日静置培養後、カナマイシン含有および非含有 7H10-ADS 寒天培地に播種した。4 週間培養後、集落数を数えた。

5. プラスミド保持の検討

前項により GFP を産生しているクローンを選択し、カナマイシン含有および非含有 7H10-ADS 寒天培地で 6 カ月間継代した。その後フローサイトメーターにより GFP を発現している菌数の割合を算出した。

(倫理面への配慮)

該当しない。遺伝子組み換え実験については機関内承認を得た。

C. 研究結果

1. *thyX* の遺伝子欠損株 Δ ThyX の遺伝子発現プロファイル

BCG Tokyo 株、 Δ ThyX、遺伝子相補株 Δ ThyX: *thyX*/pNN の遺伝子発現プロファイルを比較検討した。BCG Tokyo 株と遺伝子相補株 Δ ThyX: *thyX*/pNN の比較では相補株において *thyX* が 46.18 と高い値を示し、*thyX* が過剰発現していることを示している以外は大きな変動は見られなかった。このことから今回のマイクロアレイのデータは信頼性が高いことが示された。

BCG Tokyo 株と Δ ThyX の比較では両者に

顕著な差がみられた。ΔThyXで発現量の減少していた遺伝子(カットオフ値0.50)は3951遺伝子中49遺伝子であった。またΔThyXと遺伝子相補株の間で、ΔThyXで発現量の減少した遺伝子は120遺伝子であった。そして両者に共通する遺伝子は26遺伝子であり、これらが*thyX*の欠損により発現量に影響を受けた遺伝子と考えられる。9遺伝子は機能の全く未知な遺伝子であった。他の遺伝子の産物は、putative transmembrane protein recombinase A putative type I restriction/modification systemspecificity determinant hsdS' acyl-CoA synthetase、putative ESAT-6 like protein 5 chaperonin GroEL (2遺伝子) two component sensor histidine kinase devS FOF1 ATP synthase subunit epsilon putative transmembrane alanine and leucine richprotein putative methyltransferase putative sulphate-transport transmembraneprotein ABC transporter putative lipoprotein lprF guanylate kinase putative hydrolase mutT1 putative oxidoreductase であつた。またこれらの遺伝子はゲノムに散在して存在していた。

BCG Tokyo株に比しΔThyXで発現量の増加していた遺伝子(カットオフ値2.00)は3951遺伝子中58遺伝子であった。またΔThyXと遺伝子相補株の間で、ΔThyXにおいて発現量の増加していた遺伝子は81遺伝子であった。そして両者に共通する遺伝子は30遺伝子であり、これらが*thyX*の欠損により発現量に影響を受けた遺伝子と考えられる。15遺伝子は機能の全く未知な遺伝子であった。他の遺伝子の産物は、putative transcriptional regulatory protein 3遺伝子

LuxR family transcriptional regulator 2遺伝子
PE family protein 1遺伝子
PE-PGRS family protein 5遺伝子
putative monooxygenase 1遺伝子
putative oxidoreductase 1遺伝子
putative succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit beta scoB 1遺伝子

であつた。ゲノムでの位置においては15遺伝子は3か所に局在していたが、他の15遺伝子はゲノムの様々な位置に散在していた。

2. *thyX*遺伝子産物を指標とした抗酸菌の宿主-ベクターシステム

ΔThyXはカタラーゼを含有しない富栄養培地では発育しなかったことから、*thyX*遺伝子を発現するプラスミドをベクター、ΔThyXを宿主、カタラーゼを含有しない7H10-ADS寒天培地を選択培地とする宿主-ベクターシステムが成立することが考えられた。このために*thyX*を発現するカセットを構築し、抗酸菌での複製起点ともに大腸菌クローニング用プラスミドに挿入した。さらに形質転換効率を求める目的でGFP遺伝子およびカナマイシン耐性遺伝子を挿入しpNN5を作製した。pNN5をエレクトロポレーションによりΔThyXに導入し、7H10-ADS寒天培地に播種した。

1ugのプラスミドを使用したところ、カナマイシン非含有7H10-ADS寒天培地上では 4.0×10^3 の集落を得た。またカナマイシン含有7H10-ADS寒天培地上では 3.4×10^3 の集落を得た。またプラスミドを用いなかった場合には、カナマイシン非含有7H10-ADS寒天培地上では 6.0×10^2 の集落を得た。またカナマイシン含有7H10-ADS寒天培地上では集落は全く得られなかった。以上のことから、疑陽性率(プラスミド非含有であるが集落を形成した菌の割合)は15%であった。

次にカナマイシン非含有7H10-ADS寒天培地上で得られたGFP発現クローンをカナマイシン非含有およびカナマイシン含有7H10-ADS寒天培地上で6カ月継代したところ、6カ月後においても紫外線照射により

緑色に発光していた。6 カ月後に集落上の菌を集め、フローサイトメーターを用い GFP を発光している菌の比率を算定した。GFP を発光している菌の比率はカナマイシン非含有で継代した場合 84.79 %であり、カナマイシン含有 7H10-ADS 寒天培地では 84.42 %であったことから、プラスミドの脱落率はほとんどないことが示された。

D. 考察

これまでの研究で BCG を最小培地および富栄養培地において *thyA* および *thyX* が発現していること、また両遺伝子は大腸菌 *thyA* 欠損株を相補できることからチミジル酸合成酵素としての活性を有していることが明らかにされている。

thyA、*thyX* それぞれの遺伝子欠損株 Δ ThyA および Δ ThyX はともにカタラーゼを含有した 7H10-ADC 寒天培地で発育した。しかし、カタラーゼを含有しない 7H10-ADS 寒天培地上では Δ ThyA は発育したものの Δ ThyX は発育しなかった。このことから ThyX はチミジル酸の合成活性とともに菌体内の酸化還元電位の恒常性に寄与していることが推測された。このことは ThyX の酵素反応に NADPH の酸化反応を伴うこと、チミジル酸合成活性は消失しているが NADPH 酸化能を持つ変異型 *thyX* 遺伝子を相補することにより ThyX は 7H10-ADS 寒天培地上で発育することからも推測される。しかし、NADPH は NADH とともに代謝系の様々な代謝経路に使用されているため、どの代謝経路に携わっているかは不明である。そのため、マイクロアレイでの解析を試みた。その結果 *thyX* の欠損により発現量の減少した 26 遺伝子増加した 30 遺伝子を抽出した。減少した遺伝子はいずれも減少率が低くしかもゲノムに散在していることから 7H10-ADS 寒天培地上での発育の抑制に関与していない、あるいは関与が少ないことが示唆される。一方、発現の増加した遺伝子群は増加率が顕著に高く（最大約 200 倍）、その半数がゲノムの 3 カ所に局在していることから 7H10-ADS 寒天培地上での発育の抑制に大きく関与していることが示唆される。また

“putative”であるが、monooxygenase、oxidoreductase が含まれていることから 7H10-ADS 寒天培地上での発育の抑制は菌体内の酸化還元電位の変化が関与していることが強く示唆される。ところで、転写調節因子をコードしていると考えられる遺伝子も 5 種類含まれている。現時点ではどの遺伝子を調節しているかは不明であるが、今後明らかにすることで、これらが菌体内の酸化還元電位の恒常性に関わっているのか、関わっているとすればどのようなメカニズムで調節しているのかを明らかにすることが期待できる。また PE family protein、PE-PGRS family protein も複数含まれており、細胞壁への影響も考えられる。

ThyX は 7H10-ADS 寒天培地上で発育しないことから抗生物質耐性遺伝子の代わりに ThyX を指標とした宿主 - ベクターシステムの構築を試みた。BCG Δ ThyX を宿主、*thyX* を保持した pNN5 をベクター、7H10-ADS 寒天培地を選択培地とした組み合わせでは 85 %でプラスミド保有株を得ることができた。このことは簡便な 2 次スクリーニングを行なうことで目的のクローンが得られることを意味しており、この宿主 - ベクターシステムを利用できる可能性を示している。形質転換 6 カ月後のプラスミドの保持率を調べたところ、カナマイシンで選択した場合と同様の保持率であったことから、長期にわたりプラスミドが保持されていること、すなわち安定な宿主 - ベクターシステムであることが示された。しかしながら、15%の疑陽性が存在していたため、さらに安定なシステムとして、*thyA* と *thyX* をともに欠損した変異株を作製し、チミジル酸合成（チミン要求性）を指標としたシステムを構築することが望ましいと考えられる。

E. 結論

BCG のチミジル酸合成酵素 ThyX はチミジル酸合成活性のみでなく NADPH 酸化活性が BCG の生理機能に重要であることが示唆された。その原因遺伝子として複数の候補遺伝子を明らかにした。*thyX* 欠損株を用いることで ThyX の NADPH 活性を指標とした宿主

- ベクターシステムを構築した。

Medical Science Program. 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) Construction of a host-vector system in *Mycobacterium* using alternative thymidylate synthase ThyX. Ohara, N., Okabe, M., Yoshimura M., Sugawara, I., Nakayama, K., and Kobayashi, K. Forty-four Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.
 - 2) BCG Tokyo 172-1 に存在する 2 種類のサブポピュレーション間での遺伝子発現の比較検討. 大原直也, 岡部真裕子, 山本三郎, 瀧井猛将, 佐藤法仁, 井上哲圭, 苔口進, 渡辺朱理, 小林和夫. 第 62 回日本細菌学会中国四国支部総会 2009 年 10 月 広島

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・非結核性抗酸菌の遺伝的多様性と

その進化・疫学・臨床的意義の解明

分担研究報告書

研究分担者

岩本 朋忠

(神戸市環境保健研究所・副部長)

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

結核菌・非結核性抗酸菌の遺伝的多様性とその進化・疫学・臨床的意義の解明

研究分担者 岩本 朋忠（神戸市環境保健研究所・微生物部・副部長）

研究要旨

本研究は、結核菌北京型株の新興型遺伝系統が BCG 誘導免疫からの回避能力に優れている可能性を分子疫学的に推察したものである。新興型は他の遺伝系統と比べて有意に高いクラスター形成率を示しており、近年わが国で感染伝播が盛んに起こっていることが示された。感染伝播・発症に優れていると思われる新興型株の蔓延は近年頻発している集団感染の一因と考えられるかもしれない。新興型株での傾向とは逆に、近代結核対策導入により、急激にその分離頻度が減少した遺伝系統の存在（古来型株 B3 遺伝系統）も明らかになった。これら遺伝系統の違いによる表現型的特性の違いは、今後の結核対策をより効果的に進める上で十分に考慮すべきものとなるであろう。

A. 研究目的

病原体の集団遺伝学的解析手法を結核菌に適用して、現在・過去・未来にわたる流行株の変遷を遺伝系統別に推察することで、集団感染が頻発する現在の結核感染様式や近代結核対策の効果を経験者側の因子から考察する。

B. 研究方法

1) 供試菌株

積極的疫学調査の一環として神戸市が取り組んでいる菌バンク事業の対象株、すなわち、新規結核登録患者由来の分離株から、2002-2007 年に収集された 909 株を対象とした。

2) 集団遺伝学的解析

スポリゴタイピング法により Region of Difference (RD) 207 の欠失に伴う典型的なパターンを示した株を北京型株とした。北京型株の内部系統分岐はゲノム上の 10 領域の同義的一塩基置換 (sSNPs)、NTF 領域内の IS6110 の挿入、RD181 の有無により特定した。NTF 領域内に IS6110 を保有する株を新興型、保有しない株を古来型とした。古来型はさらに sSNPs と RD181 の有無によ

りもともと初期の段階で分岐した祖先型 (B5 group, RD181+) とその他の古来型 3 グループ (B1, B2_T, B3 group) に分類した。

感染連鎖の検出には、菌株識別能力が最大となるように組み合わせた反復配列多型解析 (VNTR, variable numbers of tandem repeats) を用いた。すなわち、国際標準 15 領域に、高頻度変異領域 (QUB-11a, QUB-3232, VNTR-3820, VNTR-4120) を加えた 19 領域の VNTR パターンが完全に一致したものを同一クローン株由来の感染とした。倫理面への配慮 疫学研究に関する倫理規定に則って研究を実施した。患者データは個人を特定できないように配慮した。

C. 研究結果

909 株を解析したところ、北京型株は 714 株 (78.5%) を占めた。北京型、非北京型間で、患者平均年齢、男女比、多剤耐性結核菌存在比、VNTR のクラスター形成率に有意な違いは認められなかった。

結核菌北京型株 714 株の内部系統分岐別の内訳は、祖先型 53 株 (7.4%)、古来型の B1, B2_T, B3 はそれぞれ、182 株 (25.5%)、200 株 (28.0%)、111 株 (15.5%)、新興型

168 株 (23.5%) であった。感染連鎖の活発さを示す VNTR パターンのクラスター形成率を比較すると、新興型で有意に高く、逆に、祖先型の B3 は有意に低い値を示した。

祖先型、古来型の 3 グループ、新興型からなる結核菌北京型株の集団構造、すなわち各遺伝系統グループの存在比率を患者の誕生年コフォート別に比較した。誕生年コフォートの内訳は、1925 年以前の生誕者 133 名、1926-1935 年 202 名、1936-1945 年 119 名、1946-1964 年 154 名、1965 年以降 106 名である。結核高蔓延期に感染した結核の内因性再燃を主要因とする患者群 (高齢者グループ) と現在感染拡大を認める患者群 (中・若年者グループ) で集団構造を比較したところ、新興型の北京型結核菌の出現頻度が若年者層で有意に上昇したのに対して、古来型の北京型結核菌である B3 系統は逆に若年者層で出現頻度が有意に減少した。

D. 考察

わが国の結核疫学は、戦前の結核高蔓延時代と戦後導入された本格的な結核対策 (集団検診、BCG 接種、化学療法など) による急激な罹患率・死亡率の低下ならびに人口構成の超高齢化を背景として、高齢者患者の割合が圧倒的に高いという特徴を持つ。高齢者結核の大部分は、内因性再燃である。そのため、わが国の結核患者の分布は、高齢者層で認められるピークと、20-40 歳代でのピークの 2 峰性を示す。それぞれのピークを形成する患者は、内因性再燃を主要因とする患者群 (高齢者グループ) と現在感染拡大を認める患者群 (中・若年者グループ) と考えられる。そこで、わが国における結核菌集団構造を誕生年コフォート別に比較することで、結核高蔓延時代の集団構造の推察、現在活発に感染伝播を認める遺伝系統群の特定、ならびに結核菌集団構造の将来像予測を試みた。

2002 年から 2007 年の間に神戸市内で分離された新規登録結核患者由来の結核菌 909 株を用いて、誕生年コフォート別に結核菌集団構造を比較したところ、新興型の

北京型結核菌の出現頻度が若年者層で有意に上昇したのに対して、古来型の北京型結核菌である B3 は若年者層で出現頻度が有意に減少することが分かった。また、高頻度変異領域を含む 19 loci を用いた VNTR 解析から、新興型は他の遺伝系統と比べて有意に高いクラスター形成率を示しており、近年わが国で感染伝播が盛んに起こっていることが示された。これらを考え合わせると、祖先型・古来型が優占する現在のわが国の北京型結核菌集団構造には、戦前の結核高蔓延時代に感染拡大した菌株の影響が大きく影響しているものと判断できる。さらに、その集団構造は安定したものではなく時代とともに変遷しており、今後、新興型がその勢力を拡大する可能性が考えられる。

高齢者層と若年者層での集団構造の違いを引き起こした原因の一つとして、BCG 接種の可能性も示唆される。すなわち、新興型は BCG 接種によるワクチン効果からの回避能力が優れているのに対して古来型の B3 は BCG 接種の導入により大きな選択圧を受けた遺伝系統であると推察できる。結核菌の遺伝系統の違いと BCG によるワクチン効果の関連性は、今後の研究課題といえる。

E. 結論

北京型結核菌集団構造を誕生年コフォート別に比較したところ、若年者層と高齢者層の間で結核菌集団構造は大きく異なることが明らかとなった。新興型遺伝系統は他の系統と比べて有意に高いクラスター形成率を示しており、近年わが国で感染伝播が盛んに起こっていることが示された。一方、BCG 接種に代表される近代結核対策導入により、急激にその分離頻度が減少した遺伝系統の存在 (古来型株 B3 遺伝系統) も明らかになった。これら遺伝系統の違いによる表現型的特性の違いは、今後の結核対策をより効果的に進める上で十分に考慮すべきものとなるであろう。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwamoto, T., R. Fujiyama, S. Yoshida,