

FIG 1. Time course analysis of DNA gyrase activity.

次に、上記組み換え DNA ジャイレースの反応系に CPFx、LVFX および GTFx を様々な濃度で添加して IC50 を決定した (表 2)。74 番目および 94 番目のコドン 2 重変異をもつ A サブユニットを構成成分とする DNA ジャイレースに対して 94 番目のコドン単独変異のそれよりも低かった。

TABLE 2. Fluoroquinolone activities against mutant *M. tuberculosis* DNA gyrase

Mutation	Inhibition of DNA supercoiling (IC ₅₀ µg/ml)		
	GTFx	CPFx	LVFX
WT gyrase	9	18	34
A74S	7	17	34
D94G	76	196	310
A74S+D94G	48	107	171

IC₅₀: half maximal inhibitory concentration
GTFx; Gatifloxacin, CPFx; Ciprofloxacin, LVFX; Levofloxacin

D. 考察

本実験で得られた結果より、74 番目と 94 番目のコドンの両方に同時に変異をもつ A サブユニットを成分とする DNA ジャイレースでは、94 番目のコドンに変異をもつ A サブユニットを成分とするものに比べてニューキノロン剤に対する耐性は低いものの、DNA ジャイレースの活性は高い事が判明した。これとは反対に A サブユニットの 74 番目と 94 番目のコドンの両方に同時に変異をもつ菌株では、94 番目のコドンに変異をもつ菌株に比べて各種ニューキノロン剤の MIC 高く、耐性度が高い事が報告されてい

る。以上の事実を総合して考えると、ニューキノロン剤に対する菌株レベルでの結核菌の耐性の度合いは、DNA ジャイレースのニューキノロン剤に対する感受性とジャイレース活性が相まって決定される事が推測された。

E. 結論

ニューキノロン剤に対する高度耐性化には DNA ジャイレースのニューキノロン剤に対する感受性のみでなく DNA ジャイレースの酵素活性も深く係っている事が示唆された。今後、変異導入菌株を作出して詳細に検討してゆく必要があるものと考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Adhikari, B. R., B. D. Pandey, P. Shrestha, B. Ghimire, M. Khadka, T. Yoda, and Y. Suzuki. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the direct detection of human pulmonary infections with environmental (nontuberculosis) mycobacteria. *Jpn. J. Infect. Dis.*, May;62:212-4, 2009.

2. 学会発表

- 1) Characterization of a New Mycobacterial Species Belonging to *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolated from Monkeys in Bangladesh. Nakajima, C., Z. Rahim, Y. Fukushima, H. Suzuki, and Y. Suzuki. The 44th joint research conference on tuberculosis and leprosy, US-Japan cooperative medical science program, July, 2009, Fukuoka.

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)

ゲノム疫学の創出を目的とした結核菌の遺伝的多様性解析

分担研究報告書

研究分担者

長谷 篤

(大阪市立環境科学研究所・課長)

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

ゲノム疫学の創出を目的とした結核菌の遺伝的多様性解析

研究分担者 長谷 篤 （大阪市立環境科学研究所・微生物保健担当・課長）
研究協力者 和田 崇之 （大阪市立環境科学研究所・微生物保健担当・研究主任）

研究要旨.

日本国内の結核患者から分離される結核菌臨床株は、約8割が「北京型」と呼ばれる単一の系統群に属している。詳細な遺伝型別に基づいて多数の菌株を系統分類する集団構造解析によって、本邦の北京型結核菌は大きく5種類の亜系統群に分類されることがわかってきた。また、多剤耐性結核やホームレス患者群、年齢別コホートなどの様々な患者母集団における集団構造解析からは、これらの亜系統群がそれぞれ多様な疫学的特性を示すことが示唆されている。本課題ではこれらの亜系統群からそれぞれ代表的な株を選出し、マイクロアレイ技術を応用した全ゲノムワイドな遺伝的特性の検出同定を行った。その結果、各株ともに約1,100箇所の特異変異(SNP)が確認され、このうち約200箇所が各株に特異的なSNPであることが明らかになった。全SNPの約半数は遺伝子産物のタンパク質一次構造(アミノ酸配列)に変異を及ぼすものであり、結核菌の分子進化ではアミノ酸変異による選択的淘汰圧の影響が低いことが示唆された。変異が見出された遺伝子の機能は多岐に渡り、各亜系統群が示す疫学的特性と関連性のある変異を含むと考えられた。疫学的知見とゲノム比較解析を結びつける手法は感染症研究としても新規性が高く、細菌学的研究シーズとしての網羅的情報を提供するのみならず、同定された変異領域をターゲットとした分子疫学的展開、および次世代シーケンサーを用いた臨床株ゲノム比較研究への進展が期待される。

A. 研究目的

結核患者から臨床的に分離される結核菌は、遺伝多型解析手技の向上が進んだ1990年度まではほぼ同一と考えられ、その細菌学的性質や遺伝子個性についての議論は希薄であった。世界各地より分離された結核菌株の遺伝多型解析によって、各地域において優先的に分離される結核菌系統はそれぞれ異なることが明らかとなり、結核菌は各地域内での限局的な伝播と定着を経ながら、地理特異的(あるいは宿主(民族)特異的)な適応進化をそれぞれの地域内で確立してきたと推測されている。

日本国内の結核菌では、東アジア地域で優先的に分離される「北京型」と呼ばれる系統群が多数検出されることが知られてい

る(全体の約8割)。国内の北京型結核菌は、詳細な遺伝系統分類によってさらに5つの亜系統群(系統発生順にG2, G3, G4, G6, G7-9)に細分類可能である。これらの亜系統群はそれぞれ遺伝的に単系統で、分子進化学的には段階的に分岐しながら国内で定着してきたことが推定される。多剤耐性の頻出や、ホームレス患者群のような高密度患者集団における高い伝播頻度など、各亜系統群には様々な疫学的性質を示すものが含まれている。これらの疫学的特性は、それぞれの遺伝的個性、ゲノム特性が起因していると考えられる。疫学的情報からゲノム特性を分析し、その結果から推定される菌株の病原菌としての個性を把握することは、結核という感染症を抜本的に理解・制

圧する上で極めて重要な情報を提供しうる。また、ゲノム特性は各菌株が伝播・拡散を経て進化学的に蓄積してきたものである。したがって、その遺伝的多様性や分子進化、ゲノム構造レベルでの可塑性を理解する上で貴重な指標を与える。

前年度から、本邦の北京型結核菌を構成する各亜系統群のゲノム特性を網羅的に解析するため、代表株（各1株）を選んで比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH, comparative genomic hybridization）法による変異マッピングを行っている。本年度は点突然変異（SNP）の正確な位置と置換塩基を決定することを目的として、変異マッピングから得られた変異部位情報を元に、詳細なリシークエンスアレイ解析を行なった。正確な SNP 情報は変異遺伝子のアミノ酸配列への影響に関する情報を与え、各菌株の細菌学的特性についての重要な知見となりうるものである。

B. 研究方法

CGH 法では、既知ゲノム配列に基づいて作成されたタイリングアレイを用いて、ゲノム全域にわたって被検株の突然変異を検出する。実験室株 H37Rv のゲノム配列（Genbank Accession no. AL123456.2）を対照とした CGH 変異マッピングでは、計5株の被検株において複数の株に共通の点突然変異（SNP）および各株特異的な SNP がそれぞれ見出されていた。

変異マッピングにおいて少なくとも2株以上の株において SNP が検出された領域（1133箇所）と、各株において特異的な SNP 領域として検出された領域（それぞれ約200箇所）について、1 bp ごとに変異を導入したオリゴ DNA をアレイ化し、変異箇所と置換塩基の確定を行った（CGH 法によるリシークエンスアレイ解析）。

決定された SNP のうち、単系統進化を支持しない部位（つまり、系統発生が連続的でない複数の亜系統群において検出された SNP）については5'側、3'側双方にプライマーを設計して PCR 増幅を行い、従来のサンガー法を用いた塩基配列解析による確

認を行なった。

C. 研究結果

リシークエンスアレイ解析の結果、変異マッピングによって SNP として認識されていた領域のうち、多数の変異箇所および置換塩基が明らかとなった。本解析によって確認された SNP 数は以下の通りである。

[1] 5株全てにおいて確認された SNP 数は850箇所となった。[2] 5つの亜系統群間で進化学的に蓄積されてきた SNP は、4株（G3, G4, G6, G7-8）の共通 SNP 数が37, 3株（G4, G6, G7-9）の共通 SNP 数が41, 2株（G6, G7-9）の共通 SNP 数が24であった。[3] 各菌株それぞれに特異的な SNP 数については、G2: 219, G3: 191, G4: 199, G6: 168, G7-8: 199であった。[4] 5つの亜系統群間で進化学的分岐順に従わない SNP が1部位のみ確認された（H37Rv のゲノム配列番号 909166, C → T）。この部位では5株のうち G4 のみ変異が見出されず、同一部位における homoplasy（同一非相同）変異か、G4 群における復帰変異である可能性が示唆された。以上の SNP 数を各菌株別に表すと以下のとおりになる。G2 株: 1070, G3 株: 1079, G4 株: 1127, G6 株: 1121, G7-9 株: 1152。

検出された SNP は、H37Rv ゲノム配列に基づいた遺伝子アノテーションに従って、アミノ酸配列に影響を及ぼさない変異（synonymous SNP, sSNP）と影響を与える変異（non-synonymous SNP, nsSNP）に分類された。各株ともに nsSNP の割合が高かった（G2 株: 611/1070 (58.1%), G3 株: 610/1078 (56.6%), G4 株: 637/1127 (56.5%), G6 株: 632/1121 (56.4%), G7-9 株: 660/1152 (57.3%)）。この傾向は各株特異的な SNP でも同様であり（G2 株: 128/219 (58.4%), G3 株: 107/191 (56.0%), G4 株: 112/199 (56.3%), G6 株: 97/168 (57.7%), G7-9 株: 125/199 (62.8%)）、変異の新旧に関わらずアミノ酸変化の速度は一定であることが示された。以上のことから、北京型結核菌の系統進化過程では、多数の遺伝子におけるアミノ酸置換による淘汰圧の影響が低いことが示唆された。この結果は過去のゲノム

配列解析 (CDC1551, F11 株など, 既に全ゲノム塩基配列が公開されている株情報) と合致しており, 結核菌の遺伝的多様性における特性と考えられる。

H37Rv ゲノム配列は遺伝子のアノテーションにおける更新情報がウェブ上で継続的に公開されており (TubercuList, <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>), そこでは全ての遺伝子が 11 のカテゴリー (機能未知含む) に分類されている。本課題によって検出された SNP は各カテゴリーにほぼ均一に分布しており, ゲノム全体にわたって変異が分散していることが明らかとなった。

D. 考察

本年度の成果は, 前年までの臨床分離結核菌株におけるゲノム比較の結果から SNP であることが予測されていた変異領域に着目し, マイクロアレイ技術を応用してその変異箇所, 置換塩基を同定したことである。わが国において分離される北京型結核菌は海外からの報告と比較すると著しく遺伝的多様性に富み, そのゲノム個性の解明は今後様々な研究展開の基本情報として, 以下のような活用が見込まれる。

(1) CGH マイクロアレイ技術と次世代シーケンス解析データの整合性について

近年, 次世代シーケンサーの信頼性向上と低価格化により, 微生物ゲノム配列情報が爆発的な勢いで集積されつつある。結核菌においても, 世界各地で分離された臨床株が解析されてきており, 中でも Niemannらは中央アジア地域で分離された北京型結核菌のゲノム解析結果を報告している (PLoS ONE 4(10): e7407.)。彼らが検出した 1211 箇所の SNP のうち, CGH 解析によって検出されていた SNP は 1016 箇所 (83.9%) であった。この中には G7-9 株の特異 SNP として検出されていた部位が 108 箇所含まれており, このことから中央アジア由来北京型株が G7-9 群の下流で分岐していることが示唆される。

一般的に, 次世代シーケンサーによって得られる解析配列量は結核菌ゲノム (約

4.5 Mb) を解析する上で過剰である。そのため, 一回の解析で複数の菌株由来ゲノム情報を獲得できる「マルチプレックス化」がコストパフォーマンス向上に最適である。来年度には複数のシーケンサー (Genome Analyzer IIX, Illumina/ The SOLiD3 System, Applied Biosystems など) によるマルチプレックス化の機能向上が予定されており, 劇的な低価格化が見込まれている。今後, 次世代シーケンサー解析によるゲノム配列情報を蓄積してゆくことにより, 本課題で得られた CGH 解析結果の精度検証を行うと共に, 結核菌ゲノム比較に基づいた分子疫学的応用の進展が期待される。

(2) SNP 情報から推定される菌株の個性 (表現型) について

本課題の解析対象として選択された 5 つの亜系統群は, 日本で分離される臨床由来結核菌の俯瞰的全体像を構成しているだけでなく, 各患者の疫学的傾向にも特徴が見出されている。具体的には, 多剤耐性 (MDR)・超多剤耐性 (XDR) 結核菌が高頻度である G2 群, 患者が高齢者に多い G3 群, 国外では特に検出頻度が低い G4, G6 群, および若年性結核に多く, ホームレス患者集団内での伝播力が高いことが示唆される G7-9 群といったように, それぞれに際立った特徴が判明しつつある。これらの疫学的特性は, 各亜系統群に属する菌株に共通する何らかの生物学的個性が関与していることが予測される。CGH ゲノム解析に供した菌株はそれぞれの亜系統群を代表する遺伝型別であり, そのような疫学的特性を支持する表現型と関連した遺伝型の同定に役立つと期待される。ゲノム個性を疫学的知見と融合することは, (1)に記載したような次世代シーケンサーの低価格化に伴って, 今後新たな被検株に対してゲノム解析を行っていく「結核ゲノム疫学」として展開していくだろう。

(3) 遺伝型マーカーとしての用途について

今回確認されたゲノム個性を直接的に遺伝型マーカーとして利用することも, 「結核ゲノム疫学」の展開する新たなベクトルである。近年, 従来の遺伝型別法では完全

一致株として判定される結核菌株が日本各地において（患者居住地に関わらず）一定割合で出現することが示されている。このような株は、過去における集団感染とその再燃による地理的拡散か、同株の保有する高伝播力に起因するアウトブレイクである可能性を示唆する。このような株についてゲノム比較解析を行うことによってその一致性を検証することは、結核菌の伝播経路を推定する上で極めて重要である。本課題では、G6 株と G7-9 株がそのような検出パターンを示す株であり、今後のゲノム比較における基礎データとして有用である。

各株特異的な SNP が約 200 箇所ずつ同定された。それぞれの亜系統群に属する複数の臨床分離株においてこれらの変異の有無を調べることにより、それぞれの亜系統群内で共通する変異箇所が明らかになる。そのような変異は亜系統群全体の共通的特性を与えると同時に、亜系統群の拡散時期を推定するために重要である。共通変異の個数によって各亜系統群における遺伝的多様性の度合いを推定することが可能である。遺伝的多様性が高い亜系統群は、菌株集団として日本国内でより長期間に渡って定着し、安定的に伝播を繰り返してきたことが推定できる。一方、遺伝的多様性が低い亜系統群では、短期間のうちに単一の菌株が伝播・拡散してきたことが示唆される。長期的定着による免疫原性の変遷経緯、短期的拡散を支持する伝播力・病原性の要因が、菌株のゲノム情報を通じて明らかになるかもしれない。

E. 結論

わが国の臨床分離結核菌株のうち、代表的な北京型株（5 株）について網羅的な SNP 情報を獲得した。実験室株 H37Rv との SNP は各株とも約 1,100 箇所が同定され、そのうち約 200 箇所は各株固有の変異として検出された。

これらの情報は各株の細菌学的個性を推定する基礎的なデータとなると同時に、本

邦の臨床分離株の遺伝的多様性を検証する上で有用な遺伝型マーカーとしての用途が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wada, T., S. Fujihara, A. Shimouchi, M. Harada, H. Ogura, S. Matsumoto, and A. Hase. High transmissibility of the modern Beijing *Mycobacterium tuberculosis* in homeless patients of Japan. *Tuberculosis*, 89:252-255, 2009.

2. 学会発表

- 1) 地域的に限局されない VNTR 型別結核菌の同定と広範的分子疫学へのアプローチ. 和田崇之, 前田伸司, 岩本朋忠, 長谷 篤. 第 84 回日本結核病学会総会 2009 年 7 月 札幌
- 2) Mutation mapping of evolutionary-sequential *M. tuberculosis* clinical strains using comparative genomic hybridization (CGH). Wada, T., T. Iwamoto, S. Yoshida, S. Maeda, and A. Hase. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.
- 3) Comprehensive analysis of *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains in Japan: the evolution, epidemiological characteristics, and genomic comparison. 和田崇之, 岩本朋忠, 吉田志緒美, 長谷 篤, 前田伸司. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 横浜.

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)

自然免疫系による結核感染防御機構の解析

分担研究報告書

研究分担者

竹田 潔

(大阪大学・教授)

自然免疫系による結核感染防御機構の解析

研究分担者 竹田 潔（大阪大学大学院医学系研究科・免疫制御学・教授）

研究要旨.

結核菌の感染により肺で早期に誘導される遺伝子産物、リポカリン2および secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)の機能を解析した。マウスに結核菌の感染を感染させると、気道上皮細胞から気道腔内、肺胞腔内にリポカリン2およびSLPIが2日目をピークに分泌される。リポカリン2は、肺胞上皮細胞に受容体依存性エンドサイトシスにより取り込まれ、上皮内に侵入した結核菌の増殖を鉄イオンの取り込みを抑制することによりブロックする。一方、SLPIは、結核菌の細胞膜の透過性を亢進させることにより殺菌作用を示し、in vitroでの結核菌の増殖を抑制した。SLPIは2つの whey acidic protein (WAP)ドメインを有しているが、各WAPドメインが結核菌の増殖を抑制した。さらに、WAPドメイン内の陽性電荷を有するアミノ酸が増殖抑制に必須であることが明らかになった。このように、結核感染防御において、リポカリン2やSLPIが重要な役割を担っていることが明らかになった。

A. 研究目的

自然免疫系は、病原体の宿主内への侵入を最初に察知し、種々の炎症・免疫応答を誘導する重要な免疫系である。最近、Toll-like receptor (TLR)ファミリーの機能解析により、自然免疫系の活性化機構が明らかになり、TLRを介した自然免疫系の活性化の生体防御における重要性が明らかになった。結核菌に対する生体防御においても、自然免疫系が結核菌の認識が重要な役割を果たす可能性が考えられる。本研究では、自然免疫系による結核感染防御機構を明らかにし、自然免疫系の活性化を利用した新規治療法の開発への基盤を提供することを目的とする。

B. 研究方法

自然免疫系の結核感染防御への関与について、これまでTLRを介したシグナルの消失するMyD88/TRIF欠損マウスを用いて解析し、自然免疫系の活性化の重要性を明らかにしてきた。これまでの解析は、マクロ

ファージ、樹状細胞を標的としてきたが、自然免疫応答はこれら貪食細胞に限らず、最初に結核菌に出会う上皮細胞も深く関与している。そこで、結核菌の気道感染により上皮細胞で誘導される遺伝子を検索した。さらに、この遺伝子(secretory leukocyte protease inhibitor: SLPI)を発現ベクターに組み込み、組み換え分子を作製し、結核菌やワクチン株BCGの試験管内で増殖に及ぼす影響を解析した。次に、SLPIによる結核菌増殖抑制機構を解析するため、走査電子顕微鏡による結核菌の形態変化、さらに1-N-phenyl-naphthylamine (NPN)を用いた細胞膜透過性亢進試験を行った。また、SLPIタンパク質の結核菌増殖抑制に必須の部位を種々の変異タンパク質を作製し解析した。最後に、SLPI遺伝子のノックアウトマウスを用いて、結核菌の気道感染を行い、感染感受性を解析した。これらの、解析によりSLPIの結核感染防御における役割を検討した。

倫理面への配慮

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に1回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

これまで結核感染に際し、肺胞上皮細胞から分泌されるリポカリン2が、鉄イオンの取り込みを阻害することにより、結核菌増殖を抑制していることを見出した。さらに、結核感染に際し、肺で遺伝子発現が上昇する secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)の結核感染防御における役割を解析した。SLPIは、試験管内で結核菌の増殖を抑制した。さらにその増殖抑制機構を解析したところ、SLPIは結核菌の細胞膜の透過性を亢進させることにより細胞膜を破壊し、殺菌していることが明らかになった。SLPIは、Whey acidic protein (WAP) domainが二つ並んだ分子であるが、どちらのWAPドメインも細胞膜の透過性を亢進させた。WAPドメインのアミノ酸配列を解析すると、WAPドメインのN末側の陽性電荷を有するアミノ酸が、膜透過性亢進に必要であることが明らかになった。陽性電荷を有したアミノ酸が、陰性電荷の結核菌細胞膜に会合し、膜透過性を亢進させていることが考えられた。また、SLPIの個体レベルでの結核感染における役割を解析するため、SLPIノックアウトマウスに結核菌を感染させたところ、感染感受性が正常マウスに比べて極めて高くなっていることが明らかになった。このように、SLPIはリポカリン2とは異なる分子機構で、結核感染に対する自然免疫応答を担っていることが明らかになった。

さらに、SLPI、リポカリン2以外に結核

感染で誘導される遺伝子を同定しており、現在その機能を解析している。

D. 考察

結核感染に際し、最前線となる上皮系細胞から分泌されるSLPIやリポカリン2が結核菌の増殖抑制作用を異なる分子機構により発揮していることが明らかになった。今後、SLPI、リポカリン2以外にも、自然免疫系による結核感染防御機構を担う分子を同定していきたい。

E. 結論

結核菌の感染において、SLPIが、抗結核作用を担っている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. Commensal bacteria-derived ATP mediates development of intestinal Th17 cells. Takeda, K. RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2009, 9-10 July, 2009, Yokohama, Japan.

2. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor mediates anti-mycobacterial responses. Takeda, K. 44th US-Japan cooperative medical science program, 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)

抗酸菌症発症の宿主要因解明のための研究

分担研究報告書

研究分担者

慶長 直人

(国立国際医療センター研究所・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

抗酸菌症発症の宿主要因解明のための研究

研究分担者 慶長 直人（国立国際医療センター研究所・
呼吸器疾患研究部・部長）
研究協力者 櫻田 紳策（国立国際医療センター研究所・
呼吸器疾患研究部・室長）

研究要旨.

抗酸菌症発症には、宿主の免疫状態が重要な影響を与えている。HIV 陰性と陽性結核患者の病態と細胞障害性顆粒の関連を明らかにするため、国際共同研究の一環として、タイ人の HIV 陰性結核患者と HIV 結核合併患者血漿中及び同一患者の末梢血単核球を PPD 及び結核死菌で刺激した培養上清中の granulysin、perforin、granzyme B の濃度を ELISA により測定した。併せて、フローサイトメトリーにより同一患者同一血液検体を用いて、患者末梢血単核球の表面マーカーの解析を行った。細胞障害性顆粒の血漿中濃度と刺激による遊離の程度は疾患群によって乖離があり、特に HIV 結核合併患者では、血漿中の granulysin の明らかな増加に関わらず、*in vitro* での granulysin の遊離は健常者と同程度であり、HIV 結核合併時の、細胞障害性顆粒の生体内での分布や産生細胞のちがいなどを今後、病態と関連づけて、解析する必要があるものと思われた。

A. 研究目的

抗酸菌症発症には、宿主の免疫状態が重要な影響を与えている。NK 細胞や T 細胞による結核菌感染細胞の破壊は、結核免疫の中軸を成していると考えられる。今回、タイとの国際共同研究の一環で、結核と HIV 陽性結核（HIV 結核合併）細胞障害性顆粒の遊離に注目し、患者の病態との関連を明らかにするために研究を計画し、実施した。

B. 研究方法

タイ北部・チェンライ県において、結核患者 23 名、anti-retrovirus therapy (ART) 未実施(-)の HIV 陽性者 11 名、ART 実施中(+)の HIV 陽性者 18 名、さらに ART 未実施(-)の HIV 陽性結核患者 6 名、健常対照者 26 名、合計 84 名を登録し、採血を実施した。HIV 結核合併例を含む全結核は、細菌学的な診断が得られた新規症例であった。結核および HIV 結核合併例では、抗結核治

療開始前に採血し、末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cells; PBMC)を分離してフローサイトメトリーにより表面マーカーの解析を実施した。また、同じ血液検体由来の PBMC に purified protein derivative of tuberculin (PPD) または結核死菌 (H37Rv) を加えて 40 時間 37°C にて培養した上清と同時に得られた血漿中の granulysin、perforin、granzyme B の濃度を ELISA により測定した。

倫理面への配慮

ヒト臨床検体を用いた研究であるため、検体の採取にあたって、書面によるインフォームド・コンセントを取得した。その他の倫理的配慮は、タイ公衆衛生保健省の定める指針に準拠した。本研究に関する検体採集に関しては、実施前に、国立国際医療センター倫理委員会、タイ公衆衛生省、チェンライ病院の倫理委員会からそれぞれ承認を得ている。

C. 研究結果

1) 対照集団の背景

表 1 : 研究対象者の年齢性別構成

Group	N	Sex		Age (year)	Median	SD
		M	F			
Normal	26	16	10	21-52	34.5	8.7
TB	23	14	9	18-58	44.0	11.8
HIVART(-)	7.0	11	6	5	31-53	36.0
HIVART(+)	6.3	18	9	9	27-52	38.5
TB-HIV	6	5	1	30-47	43.0	6.5
TOTAL	84	50	34	18-64	39.2	8.1

対照集団の年齢性別を表 1 に示した。

いずれの集団も年齢に大きな偏りは見られなかった。結核患者は、男性優位な傾向が認められた。

2) granulysin の測定

血漿中 granulysin の濃度は、健常群と比較して結核、HIV 結核合併、HIVART(+) の 3 群で有意に上昇していた ($P < 0.05$)。特に HIV 結核合併では、他の疾患群と比較して著明に上昇していた ($P < 0.01$)。一方、分離した PBMC を *in vitro* で PPD により刺激した場合は、結核群では健常群と比較して有意に高濃度の granulysin が遊離測定されたが ($P < 0.05$)、HIV 結核合併群では健常群との有意差はなかった。H37Rv により刺激した場合は、健常群と比較して結核群、HIV 結核合併群で有意に高い濃度の granulysin が遊離されたが ($P < 0.05$)、結核群と HIV 結核合併群の間に差はなかった。一方、各々の検体の未刺激培養上清中濃度との比較においては、HIVART(-)を除く全ての群で、刺激による有意な遊離 granulysin 濃度の上昇を認めた ($P < 0.05$)。このように、HIV 結核合併群に関しては、血漿 (*in vivo*) と結核特異的な刺激に対する反応後の培養上清 (*in vitro*) との間には、乖離が見られた。

さらに、結核患者群において抗結核化学療法前後に血漿中の granulysin の濃度を測定した結果、治療前に比して、治療後に

有意な血漿中 granulysin の濃度の上昇が認められた ($P < 0.05$)。

3) perforin の測定

血漿 perforin 濃度は、健常群と比較して結核群では有意に低下していた ($P < 0.05$)。また結核を合併しない HIV 感染群と比較しても結核群における濃度は有意に低下していた ($P < 0.05$)。一方、HIV 結核合併群では、健常群との有意差は認められなかった。PPD にて刺激した培養上清中の濃度は、結核群と HIVART(+) 群において健常群より有意に高く ($P < 0.05$)、HIV 結核合併群では反対に有意に低下していた ($P < 0.05$)。H37Rv による刺激では、疾患群間の有意差は認められなかった。各々の検体の未刺激上清中濃度との比較において有意差は認められなかった。

4) granzyme B の測定

血漿 granzyme B 濃度は、疾患群間に有意差は認められなかった。PPD と H37Rv による *in vitro* の刺激では、結核群において健常群と他疾患群に対して有意にその濃度が上昇していた ($P < 0.05$)。また、同じ結核検体の未刺激上清中濃度との比較においても有意に上昇していた ($P < 0.05$)。一方、HIV 結核合併群では、健常群との間に有意差を認めなかった。

5) リンパ球表面マーカーの測定 (フローサイトメトリー)

HIV 結核合併結核群及び HIV 陽性群では、有意に CD4 陽性 T 細胞数が減少していた ($P < 0.05$)。特に結核を含む ART(-) 群では著明に減少していた ($P < 0.01$)。CD8 陽性 T 細胞数は、リンパ球全体に対する比率ではすべての HIV 陽性疾患群で増加していたが ($P < 0.05$)、数では HIVART(+) でのみ有意に増加していた ($P < 0.05$)。結核と HIV 結核合併群では、健常群との間で細胞数に有意差はなかった。結核群では単球数が有意に上昇していたが ($P < 0.01$)、HIV 結核合併群では有意差はなかった。NK 細胞数ならびに $V\gamma 9V\delta 2T$ 細胞数は結核、HIV 結核合

併群双方で有意に減少していた ($P < 0.01$)。また、 $V\alpha 24$ 陽性 iNKT 細胞数はすべての HIV 陽性患者群において有意に減少していた ($P < 0.01$)。

D. 考察

本研究において、患者血漿中の granulysin、perforin、granzyme B といった細胞障害性顆粒濃度は、各疾患群で、かなりのばらつきが認められた。特に granulysin については、血漿中 granulysin 濃度は結核患者において、結核化学療法開始時に明らかに上昇していたが、同時期にタイで実施された別の結核再発例での研究では、結核患者の血漿 granulysin の濃度は治療前であっても健常者と比較して有意には上昇していないという結果が得られており、さらに症例数を増やした検討が必要と思われる。

in vitro の結核菌抗原特異的な刺激による PBMC からの細胞障害性顆粒の遊離反応については、結核患者では granulysin、perforin、granzyme B のいずれも健常者に比して、増強されていることが確認された。

一方、PBMC からの granulysin の遊離に関して、HIV 結核合併例では、*in vitro* の結核菌抗原特異的な応答は、結核ならびに HIVART(+) と比較して有意に低下していたが、反対に血漿 granulysin の濃度は著明に上昇するという、著しい乖離が認められた。

この点に関しては、フローサイトメトリーの解析結果から、HIV 結核合併例においては、NK 細胞、 $V\gamma 9V\delta 2T$ 細胞、 $V\alpha 24$ 陽性 iNKT 細胞、CD4 陽性 T 細胞数が有意に減少していたのに対して、末梢血中の CD8 陽性 T 細胞数はよく保たれていた (健常者との有意差なし)。このことから、血漿中 granulysin の主たる産生細胞は CD8 陽性 T 細胞である可能と考えられる。

本研究と同時に同じ患者の同じ検体を使用して、osteopontin(OPN)の産生を疾患群で比較検討する研究が実施されているが、その検討でも、HIV 結核合併例では血漿中 OPN 濃度と *in vitro* での BCG 生菌刺激単球由来マクロファージ培養上清中 OPN 濃度と

の間に大きな乖離があった。これらの *in vitro* と *in vivo* での結核関連マーカー濃度の乖離は、HIV 結核合併の病態を究明する上で、手がかりになるかもしれないので、注目される。

E. 結論

結核発症に関わる宿主側因子を明らかにする上で、結核ないしその発症に著しい影響を与える HIV 感染の合併患者の血液中の免疫エフェクター分子の動向を観察することは、さらなる病態解析のための重要な示唆を与えるものと期待される。

本研究では、結核菌抗原特異的に細胞障害性顆粒の遊離反応が促進していた。また化学療法による結核の治癒過程と granulysin の増減が関連している可能性も示唆された。一方、HIV 結核合併例では著明な血漿 granulysin 濃度の上昇が認められたが、*in vitro* の結核菌抗原特異的な刺激応答では、結核と比較しても、granulysin 遊離反応は高くないことなどが、HIV 合併結核の病態を明らかにするための手がかりとなるものと思われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Increased osteopontin levels in plasma of patients with tuberculosis and co-infection with HIV and monocyte-derived macrophages *in vitro*. Ridruechai, C., S. Sakurada, S. Khusmith, and N. Keicho. 第49回日本呼吸器病学会総会 2009年6月東京

2) Osteopontin levels in plasma and monocyte-derived macrophages stimulated with BCG *in vitro* from patients with tuberculosis and HIV co-infection in Chiang Rai, Thailand. Sakurada, S., C. Ridruechai, S. Khusmith, and N. Keicho. 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)

抗酸菌感染症の予防・診断に関する研究

分担研究報告書

研究分担者

向井 徹

(国立感染症研究所・室長)

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

抗酸菌感染症の予防・診断に関する研究

研究分担者	向井 徹	（国立感染症研究所・感染制御部・室長）
研究協力者	福富 康夫	（国立感染症研究所・感染制御部・室長）
研究協力者	前田 百美	（国立感染症研究所・感染制御部・主任研究官）
研究協力者	松岡 正典	（国立感染症研究所・感染制御部・再任用職員）
研究協力者	牧野 正彦	（国立感染症研究所・感染制御部・部長）

研究要旨.

永年の使用より安全性が高い結核ワクチンである BCG の組変え体による新規のワクチン開発において、抗原を十分量安定した形で発現することは実用化には重要なことである。そのため菌染色体へ integrate した外来遺伝子でも十分量の抗原を発現する強力なプロモーターを抗酸菌ファージより screening した。その結果 5 領域を同定し、同領域は、*hsp60* プロモーターの plasmid 型発現より強力であり、また、その発現強度は、*M. smegmatis* および BCG 両菌で同様のものであった。また、同領域は、*M. leprae* に蛍光蛋白を発現させることが可能であった。これらの結果、本領域を利用することにより抗生物質非存在下でも安定した十分量の抗原発現が BCG において可能であると考えられた。

A. 研究目的

M. bovis 由来の Bacillus Calmette-Guérin (BCG) は、結核の予防ワクチンとして 90 年近く使用されている。しかし、現在では、小児結核の予防に一定の効果が認められるが、その他の結核への効果は不明であるとされている。ハンセン病に対する BCG のワクチンとしての予防効果は、いまだ議論の中にある。しかし、BCG の使用は永年の蓄積を持ち、免疫不全症を除き、その安全性は非常に高いと考えられれ組換え BCG による新規ワクチン開発を進めている。

菌体内における抗原蛋白発現用外来遺伝子の維持は、plasmid 等核外遺伝子を用いた extrachromosome 型と細菌ゲノムに組込まれる integrate 型がある。extrachromosome 型は、菌の継代や、選択用薬剤除去などにより菌体より外来遺伝子が脱落する恐れがある。しかし、菌体は複数コピーの外来遺伝子を保有するため、産

生される蛋白量は多い。一方、integrate 型は、外来遺伝子の維持に選択用薬剤は不要であるが、遺伝子数は 1 コピーのため、蛋白産生量はプロモーター活性に大きく依存する。しかし、抗酸菌属より分離された既存の抗酸菌プロモーターでは、integrate 型による大量蛋白発現は、望めない。そのため、1 コピーでも充分量の蛋白を発現させる新規プロモーターの検索・同定を行った。

B. 研究方法

抗酸菌ファージ全ゲノムを保有する pHA87 を超音波処理し、0.5-1.5kb 断片を精製後、平滑末端処理を行った。蛍光蛋白 Orange が組み込まれた integrate 型発現ベクター pMV306 を *EcoR* I 切断・平滑末端処理後、ファージゲノム断片と ligation し、*M. smegmatis* mc² へ遺伝子導入を行った。7 日後、蛍光灯下で赤色を呈するコロニーを選択し、塩基配列解析を行いゲノム上へマ

ッピングを行った。

同定された領域の配列を基に、350bp の領域を増幅し、pMV306-EGFP の EGFP 配列上流に組込んだ。*M. smegmatis*, BCG, *M. leprae* へ遺伝子導入を行い、その発現強度をプラスミド型発現ベクターpMV261-EGFP と比較した。さらに、組み換え BCG を用い、マウス腹腔内マクロファージ、ヒト末梢血由来樹状細胞感染時における発現強度の比較を共焦点レーザー顕微鏡、FACS および蛍光プレートリーダーで検討した。

倫理面への配慮

血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払う。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測および拒否し得ることを十分に説明し理解（インフォームドコンセント）を得る。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守る。動物を用いた実験系と動物由来初代細胞培養を用いた実験系を遂行する際は、当該施設の動物実験指針に従い施行する。

C. 研究結果

蛍光灯下において 27,200 コロニーの screening を行い 12 の赤色を示すコロニーを選択した。塩基配列解析の結果、ゲノム DNA 中央部と右側に集約された (図 1)。

プロモーター活性領域と予想される 350bp による EGFP の強度比較より、5 領域が、*hsp60* プロモーター領域より強い発現を示した。この傾向は、*M. smegmatis* および BCG で同様のものではあった (図 2)。また、この 3 領域を保有する BCG 株の発現は、ヒト由来樹状細胞、およびマウス腹腔内投与感染マクロファージでも同様の強度を示した。

M. leprae への遺伝子導入では、対照として用いた plasmid 型発現である BCG 由来 *hsp60* プロモーターおよび *M. leprae* 由来 *hsp60* プロモーターいずれも蛍光を示さなかった。しかし、ファージ由来の 3 領域で

はいずれの領域を用いた integrate 型の発現が蛍光として観察された (図 3)。

D. 考察

これまで抗酸菌の組換えを利用した研究では、BCG 由来 *hsp60* プロモーターの plasmid 型発現が、頻用されてきた。これは、*in vitro* の酵素活性などの生化学的解析には十分発現能力をもつためである。また、免疫などの多量の抗酸菌蛋白調整には、*M. smegmatis* を宿主とし、誘導発現型である *acetamidase* プロモーターが用いられている。しかし、生体への投与を考えた時 plasmid 型では、抗生物質非存在下のため plasmid の菌体からの脱離がおき、発現を示さない菌が大勢を占めることとなる。既存のプロモーターでは、integrate 型発現では、検出に十分量の蛋白発現望めない。今回同定したプロモーター領域は、非常に発現能力が強いため、十分な免疫が得られると考えられた。さらに、今回同定された領域は、*M. leprae* において蛍光観測に十分な発現能を示した。これまで、plasmid 型の *hsp60* プロモーターでは、*M. leprae* では、蛍光が観察されなかった。*M. leprae* の継代は、ヌードマウスの足蹠で行われ、いわゆる animal passage を繰り返している。そのため菌体外則を取りまく糖脂質等が堅固なため、詳細な遺伝子導入の条件検討が必要とされていた。しかし、今回、同定された領域により発現が観察されたことから、*hsp60* プロモーターは菌体内に導入されていたが、その発現能力が、*M. leprae* 内では非常に弱いため検出ができなかったと考えられる。今後、ソーターなどの使用により蛍光蛋白発現 *M. leprae* の濃縮が可能であり発現菌株の樹立により、ハンセン病の病原性解析や予防法の開発に資すると考えられた。

E. 結論

抗酸菌ファージゲノムより抗酸菌で非常に強く働くプロモーター領域を同定した。これは、*M. leprae* においても蛍光蛋白の観察に十分量の発現力であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. Induction of cross-priming of naïve CD8⁺ T lymphocytes by recombinant *Bacillus Calmette-Guérin* that secretes heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. *J. Immunol.*, 183:6561-6568, 2009.
- 2) 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.*, 55:39-46, 2009.

2. 学会発表

- 1) Identification of Strong Mycobacterial Promoters from Mycobacteriophage TM4. Mukai, T., Y.

Maeda, Y. Miyamoto, and M. Makino. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.

- 2) らい菌蛋白調整に用いる発現用プロモーターの同定. 向井 徹, 宮本友司, 前田百美, 牧野正彦. 第82回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009年5月 出雲市
- 3) 抗酸菌感染症ワクチンの開発～高発現組換え BCG の構築～. 向井 徹 第5回霊長類医科学フォーラム 2009年12月 つくば
- 4) 抗酸菌ファージTM4に由来する強力な抗酸菌プロモーターの同定. 向井 徹, 前田百美, 福富康夫, 宮本友司, 松岡正典, 牧野正彦 第83回日本細菌学会総会 2010年3月 横浜

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 選択されたクローンのゲノムマッピング

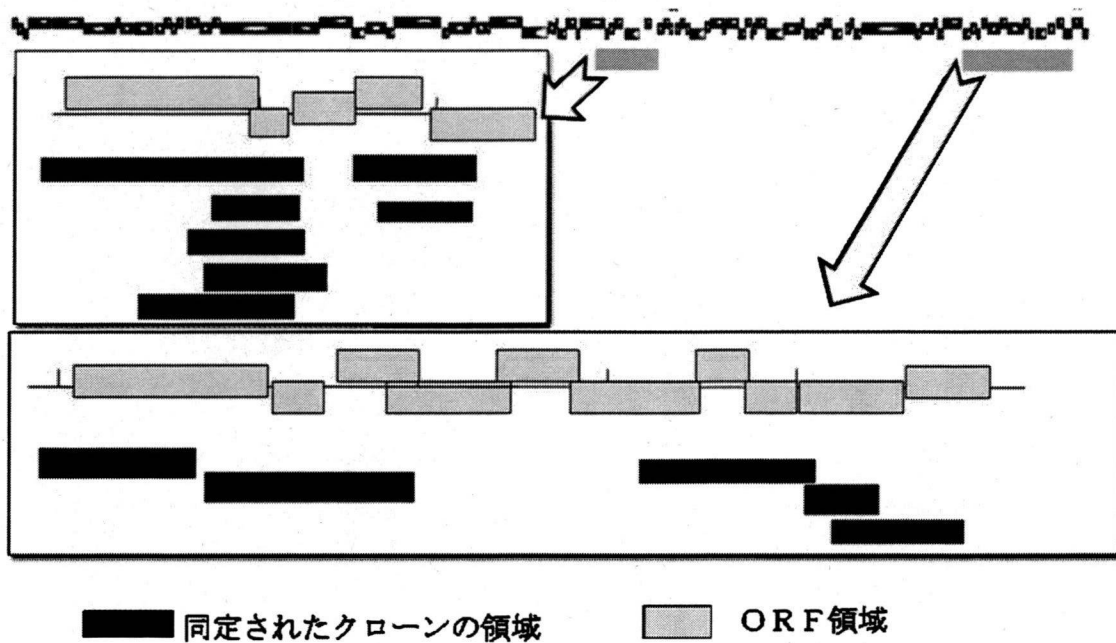


図2 BCGにおける各種プロモーターの蛍光発現比較

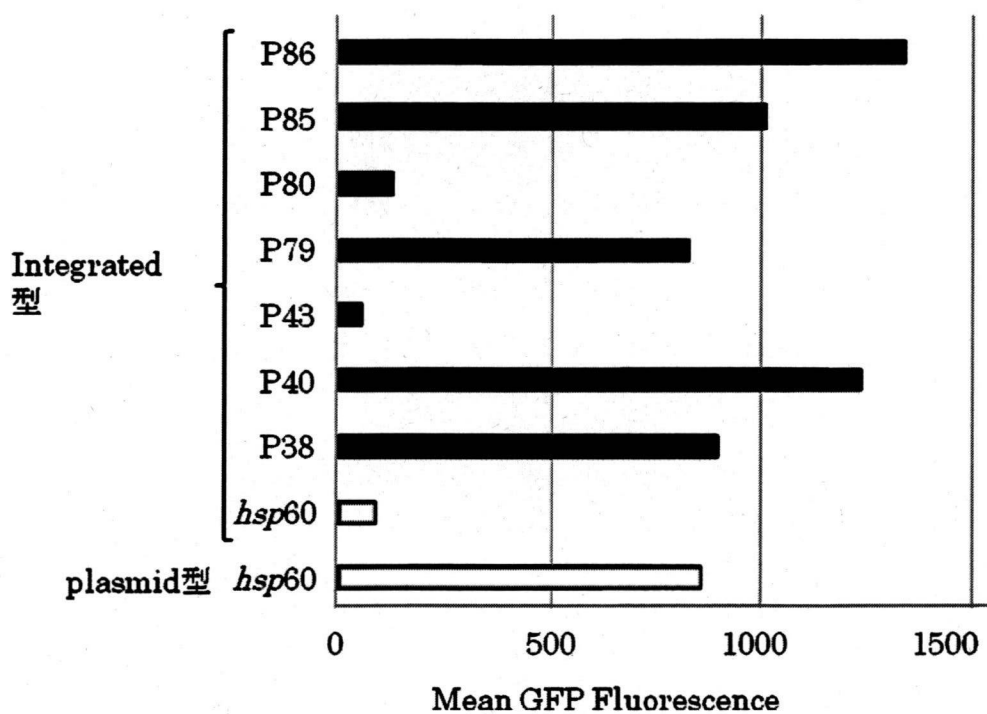
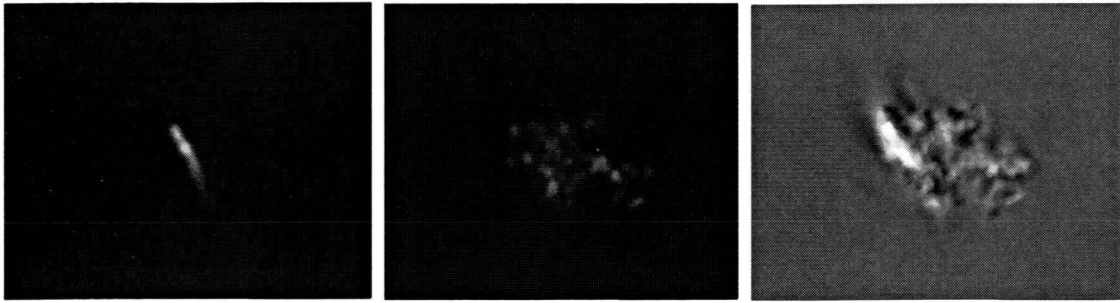


図3 らい菌における蛍光蛋白発現



EGFP発現

抗-PGLI mAb染色

merge