

- K. Fukuda, N. Ohara, and N. Fujiwara. Isolation and characterization of a *rpoZ* mutant of *Mycobacterium smegmatis*. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
- 5) Ohara, N., M. Okabe, S. Yamamoto, T. Takii, N. Fujiwara, J. Maeyama, M. Nakayama, and K. Kobayashi. Analysis of RD16 locus in the BCG Tokyo 172 genome. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
- 6) 大原直也. マイコバクテリアのチミジル酸合成酵素と組換え BCG ワクチン. シンポジウム 口腔と関連器官の感染症 5W1H なぜわたしはこの研究をしているのか. 第 31 回岡山歯学会総会・学術集会 2010 年 9 月 岡山
- 7) 大原直也. 抗酸菌のチミジル酸合成酵素の研究と新たな BCG ワクチン作製の試み. 第 690 回獣医学研究談話会 2010 年 10 月 札幌
- 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22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、異なるホスト（ヒト・ブタ・浴室環境）と地域（日本・欧州）より分離された *M. avium* の遺伝的多様性を比較し、その相同性について考察することで、*M. avium* 症患者に蔓延している株の実態を解明し感染対策に寄与しようとするものである。今回の結果から、わが国では欧州諸国からの報告とは異なり、ヒト分離株とブタ分離株の遺伝的相同性は低く、ブタ感染個体のヒト感染への影響は極めて限局的と考えられた。また、浴室環境分離株とヒト臨床分離株の遺伝的相同性は高く、ヒトへの暴露という観点から、浴室環境は *M. avium* のリザーバーとして重要な役割を果たすものと思われた。さらに、わが国の臨床分離株・浴室環境分離株は欧米からこれまでに報告されている *M. avium* subsp. *hominissuis* とは異なる遺伝学的特徴を有しており、わが国に土着の *M. avium* subsp. *hominissuis* の存在が強く示唆された。特異な遺伝的背景を持つわが国の *M. avium* subsp. *hominissuis* がブタからは検出されず、かつ、浴室環境での定着性が確認されたことは、わが国に特徴的な *M. avium* の生態と本菌へのヒトの暴露様式の存在を強く示唆するものである。

A. 研究目的

非結核性抗酸菌症の主要な起因菌である *M. avium* について、その生態をヒトとのかかわりの視点から検討することで、ヒトが *M. avium* に暴露される様式の解明を目指す。本研究では、ヒト臨床分離株、ブタ由来株、患者浴室環境由来株からなる多検体のサンプルセットを用いて *M. avium* の遺伝的多様性を明らかにするとともに、それらの遺伝的相同性を評価することで、これら異なるホスト間での *M. avium* の循環についてその可能性を検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

2 医療機関で分離されたヒト臨床分離株 129 株、10 府県の養ブタ場から出荷された 70 頭のブタから分離した 70 株、MAC 症患者 27 家庭の浴室環境より分離した 37 株の *M. avium* を解析に用いた。ヒト臨床分離株には HIV 陽性患者は含まれていない。ヒト臨床分離株 129 株のうち 22 株は浴室環境調

査を実施した患者由来株、14 株は CAM 耐性株である。

2. *hsp65* の塩基配列による亜分類

分離株の *hsp65* 遺伝子の 574 塩基目以降の 1059 bp を PCR 増幅し、ダイレクトシーケンス法を用いて塩基配列を決定した。

3. IS *Mav6* 検出

IS901P\_F: 5'-AGG TGA AGG CAA GAC CGA C (position, 514-532) と IS901P\_R: 5'-TAT CCT TGA TCT GGC GAT CC (Position, 970-989)を用いて、IS *Mav6* の挿入の有無を PCR にて検出した。

4. 反復配列多型解析 (VNTR, variable numbers of tandem repeats)

VNTR 解析は、稲垣らが報告した 15 領域 (J. Clin. Microbiol. 47, 2156-2164) と Thibault らが報告した 8 領域 (J. Clin. Microbiol. 45, 2404-2410) のうち、両者に共通の 3 領域と TR-3 を除く 19 領域を対象とした。各菌株

より得られた VNTR パターンを用いて、最小展開木 (Minimum Spanning Tree) を描写し、株間の遺伝的相同性を視覚化した。

#### 倫理面への配慮

本研究に用いた菌株は全て匿名化されており、番号化することで、個人情報の特定が不可能となるように配慮した。

### C. 研究結果

#### 1. *hsp65* の塩基配列による亜分類

ヒト、浴室環境、ブタから分離した *M. avium* は全て、*M. avium* subsp. *hominissuis* に分類された。その、code type 別分布では、ヒト分離株と環境分離株は code 2 と code 15 が優占しており、それぞれ、code 2 (ヒト 42.6%, 環境 24.3%), code 15 (ヒト 34.9%, 環境 64.9%) であった。一方、ブタ分離株では、code 1 が優占し、77.1% を占めた。ブタ分離株の code 2 は 11.4%、code 15 は 0% であり、ヒト及び浴室環境分離株の分布と大きく異なった。

#### 2. IS*Mav6* の保有率

わが国の *M. avium* subsp. *hominissuis* 臨床分離株に特徴的に認められる IS*Mav6* の保有率をそれぞれの分離株別に調べた。ヒト分離株、環境分離株いずれも高率に IS*Mav6* を保有しており、それぞれ、62.8%、86.5% であった。一方、ブタ分離株では IS*Mav6* を保有する株は検出されなかった。IS*Mav6* の保有率を *hsp65* code type 別に調べたところ、code 15 で 89.9% の株が IS*Mav6* を保有することが分かった。その他の code type では、type 2 で 54.2%、code 17 で 50.0%、code 2 で 54.2% であり、code 15 が有意に高い保有率を示した。

#### 3-1. VNTR による多様性解析

まず、既報の VNTR locus set による *M. avium* の菌株識別能力を評価した。稲垣らの 15 loci では多様性指数 (HGDI) = 0.982、Thibault らのセットでは HGDI = 0.949、両セットからオーバーラップする領域を削除した 19 loci では HGDI = 0.988 であった。以上の結果から、本研究では、菌株識別能

が最も優れていた 19 loci の組み合わせによる VNTR を遺伝的多様性解析に使用した。VNTR 法により、ヒト分離株 129 株、環境分離株 37 株、ブタ分離株 70 株はそれぞれ 83 genotype、27 genotype、31 genotype に分類された。ヒト分離株と環境分離株両方で検出されたものは 12 genotype あった。一方、ブタ分離株のうち、ヒトあるいは環境分離株と同一 genotype を示すものは存在しなかった。

#### 3-2. VNTR パターンに基づく MST 解析

各分離株で得られた VNTR プロファイルに基づき、MST を描写したところ、クラナリティーの高い株からなるグループすなわち clonal complex が 2 グループ認められた。これらの complex はヒト分離株と環境分離株から構成されており、ブタ分離株は含まれなかった。ブタ分離株はヒト及び環境分離株と 3 領域以上の違いを示して MST 上に散在し、clonal complex を形成しなかった。

次に、Radomski ら (J. Clin. Microbiol. 48, 1026-1034) が報告したフランスでのブタ分離株 (62 株)、ヒト臨床分離株 (14 株)、Trikkonen ら (Acta Vet. Scand. 52:21, 2010) が報告したフィンランドでのブタ分離株 (16 株)、ヒト臨床分離株 (13 株) のデータを加えて、MST を描写した。興味深いことに、海外のブタ分離株とヒト分離株の VNTR パターンは、本邦のブタ分離株と高い遺伝的相関性を示し、本邦のヒト・環境分離株の特異性が強調される結果となった。

### D. 考察

わが国では、結核罹患率が順調に減少してきたのに反して非結核性抗酸菌症 (NTM 症) は増加の一途をたどっている。全 NTM 症の約 8 割を占める肺 MAC 症は、近年、中高年女性を中心に患者数増加が顕著であるという疫学的特徴を示しており、その背景には、生活様式の変化に伴う暴露機会 (リスク) の増加が推察される。一方で、ヨーロッパ諸国では、ヒト分離株とブタ分離株の遺伝的相同性が高いことが報告されて

おり、両者の間で *M. avium* が直接的あるいは共通の感染源を介して循環している可能性が示されている。本研究では、異なる宿主(ヒト・ブタ・環境) から分離した多検体からなるサンプルセットを解析し、それらの遺伝的多様性と相同性を評価することで、次の点を明らかにした。

- 1) ヒト・ブタ・環境から分離した株は、全て、*M. avium* subsp. *hominissuis* に属した、
- 2) わが国ではヒト分離株とブタ分離株の遺伝的相同性は低く、ブタ感染個体のヒト感染への影響は極めて限局的と考えられる、
- 3) 浴室環境分離株とヒト臨床分離株の遺伝的相同性は高く、ヒトへの暴露という観点から、浴室環境は *M. avium* のリザーバーとしての役割が大きいものと思われる、
- 4) わが国の臨床分離株・浴室環境分離株は欧米からこれまでに報告されている *M. avium* subsp. *hominissuis* とは異なる遺伝学的特徴を有しており、わが国に土着の *M. avium* subsp. *hominissuis* の存在が強く示唆された。

19 loci を対象とした VNTR プロファイルに基づき MST を描写したところ、ヒトおよび環境由来株のほとんどは、2 つの large clonal complex 内に収束したのに対して、ブタ分離株では clonal complex を形成しなかった。このことは、ヒト・環境分離株に比べてブタ分離株は遺伝的関連性の低い多様な菌株からなることを示唆している。一方、フランス、フィンランドのヒト臨床分離株ならびにブタ分離株のデータを外挿して、MST を描写したところ、わが国のブタ分離株は、フランス・フィンランドのヒト・ブタ分離株と遺伝的相同性が高いことが明らかとなった。

わが国のヒト臨床分離株が世界的にみて特異な遺伝的特徴を有することは、稲垣らにより、*hsp65* code type の分布と ISMav6 の保有という観点から報告されている。本研究での *hsp65* code type 別分布と ISMav6 の保有に関する結果は、稲垣らの報告とほぼ一致した。さらに、今回、VNTR パターンからも、その遺伝的特異性が支持される結果となった。このように、特異な遺伝的背景を持つわが国の *M. avium* subsp. *hominissuis*

がブタからは検出されず、かつ、浴室環境での定着性が確認されたことは、わが国に特徴的な *M. avium* の生態と本菌へのヒトの暴露様式の存在を強く示唆するものであり、今後の感染対策上、重要な知見となる。

欧米から報告されている *M. avium* とわが国の MAC 患者から分離される *M. avium* が異なる遺伝的特徴を有するのに対して、ブタ分離株では、海外分離株とわが国分離株で遺伝的関連性が高いという結果が得られた。地域を超えて世界レベルで分布している global type の *M. avium* が存在し、特にブタの間でそれらの株が循環しているものと推察される。これらの株が、はたして自然環境あるいはブタの生息環境中に世界レベルで普遍的に存在しているものなのか、あるいは、欧州からの繁殖用のブタの移動に伴い世界的に拡散された結果なのかは、現時点では結論付けることは出来ない。一方、わが国臨床分離株の特異性は、これらの株が特定の環境、おそらく人為的環境でニッチを効率よく獲得し、ヒトへの感染暴露のチャンスを大きくした結果を反映しているものと推定される。しかしながら、なぜ、これらの株が海外では蔓延していないのかの疑問が残る。また、今回、浴室に定着している *M. avium* が臨床分離株と高い遺伝的関連性を示すことが分かったが、これらの株が自然環境中に広く存在しているのか、あるいは、特定の環境でのみ生残しているものなのか不明である。今後、グローバルレベルでの *M. avium* の分子疫学的解析データが蓄積されることで、これらの疑問に対する答えが得られるものと期待される。

## E. 結論

ヒト臨床分離株、ブタ由来株、患者浴室環境由来株からなる多検体のサンプルセットを用いて *M. avium* の遺伝的多様性を明らかにするとともに、それらの遺伝的相同性を評価することで、これら異なる宿主間での *M. avium* の循環についてその可能性を検討した。本研究の結果から、わが国では欧州諸国からの報告とは異なり、ヒト分離株とブタ分離株の遺伝的相同性は低く、ブ

タ感染個体のヒト感染への影響は極めて限局的と考えられた。また、浴室環境分離株とヒト臨床分離株の遺伝的相同性は高く、ヒトへの暴露という観点から、浴室環境は *M. avium* のリザーバーとして重要な役割を果たすものと思われた。さらに、わが国の臨床分離株・浴室環境分離株は欧米からこれまでに報告されている *M. avium* subsp. *hominissuis* とは異なる遺伝学的特徴を有しており、わが国に土着の *M. avium* subsp. *hominissuis* の存在が強く示唆された。

特異な遺伝的背景を持つわが国の *M. avium* subsp. *hominissuis* がブタからは検出されず、かつ、浴室環境での定着性が確認されたことは、わが国に特徴的な *M. avium* の生態と本菌へのヒトの暴露様式の存在を強く示唆するものであり、今後の感染対策上、重要な知見となる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Saito, H., T. Iwamoto, K. Ohkusu, Y.

Otsuka, Y. Akiyama, S. Sato, O. Taguchi, Y. Sueyasu, Y. Kawabe, H. Fujimoto, T. Ezaki, and R. Butler. *Mycobacterium shinjukuense* sp. Nov.; a slowly growing, nonchromogenic species isolated from human clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., in press.

##### 2. 学会発表

1) 岩本朋忠. 本邦 *M. avium* のヒト・ブタ・環境由来株の遺伝的多様性とその関連性に関する考察. 第41回結核・非定型抗酸菌症治療研究会 2010年12月 東京

#### 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22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)

ハンセン病におけるマクロファージの機能解析

分担研究報告書

研究分担者

福富 康夫

(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研究事業）  
分担研究報告書

ハンセン病におけるマクロファージの機能解析

研究分担者 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）

研究要旨.

ハンセン病を引き起こすらい菌は細胞内寄生菌である。LL 型ハンセン病ではらい菌はマクロファージ内で増殖するが、TT 型では殺菌作用が亢進しているため、病巣内では菌が稀にしかみられない。ヒト細胞内でのらい菌に対する殺菌機構は不明な点が多い。そこで、in vitro におけるヒトマクロファージの活性化と同細胞中のらい菌の生存率との関係を探ったところ、M-CSF 誘導ヒトマクロファージ（M-マクロファージ）において IFN $\gamma$ により抗らい菌活性（らい菌の代謝活性減少）が誘導され、共焦点レーザー顕微鏡による観察で NADPH オキシダーゼを構成する phox タンパクのサブユニットがらい菌周囲へ集積しているのが観察された。また、リソゾームのマーカも集積していた。スーパーオキシドは殺菌分子として知られており、活性化した phox タンパクやリソゾームがらい菌に対して殺菌作用を発揮している可能性が示唆された。

A. 研究目的

ハンセン病において、LL型ではらい菌が宿主細胞であるマクロファージ内で増殖するがTT型では殺菌される。殺菌にはマクロファージの活性化が大きく関与しているが、その機構について詳細は不明である。よって、その機構を調べることを目的とする。

B. 研究方法

ヒトマクロファージの培養：健常人末梢血よりフィコールを用いた比重勾配遠心法により単核球を分離して AIM 培地に浮遊させプラスチック製のフラスコにまき 37 度で 1 時間培養した。ハンクス液にてウェル内を洗浄し非付着細胞を除いて単球を精製し M-CSF を加えた 20%FBS 添加 RPMI1640 培地にて 1 週間培養し単球からマクロファージに分化させた。トリプシン処理をして細胞を回収して、12 穴プレートもしくは 8 ウェルガラスチェンバースライドにまいて培養を継続した。マクロファージへのらい菌やBCG感染：ヌ

ードマウスフットパッドに接種して増殖したらい菌を回収して精製し、マクロファージが張り付いたウェルに添加して貪食させた。培養後マクロファージを可溶化して菌を得てラジオレスピロメトリーにて菌の代謝活性を測定した。なお、マウスの使用については国立感染症研究所動物実験委員会からの承認を得ており、倫理面への配慮がなされている。また、GFPを発現したBCGも用いた。

ラジオレスピロメトリー：Buddemeyerや Franzblauらの方法を改変してらい菌の脂肪酸・酸化反応（基質：1-<sup>14</sup>C-パルミチン酸（NEC075H））を測定した。

共焦点レーザー顕微鏡による観察：らい菌を oregon green にて蛍光標識してマクロファージが入っている 8 ウェルチェンバースライド、もしくはマクロファージの張りついているカバースリップに添加した。培養後、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、メタノール処理後に抗 phox 抗体等や抗 l amp-1 抗体とインキュベートし、洗浄後 Alexa543 もしくは



Alexa633 標識二次抗体を反応させ多重染色を行った。同時に Hoechst33342 による核染色も行った。そして、共焦点レーザー顕微鏡下で細胞を観察した。得られた画像中の各細胞について各チャンネルイメージの overlay を行い各グループにおける細胞の蛍光強度平均値を得た。Photoshop によるイメージ解析も行い蛍光強度の細胞内分布の定量を試みた。

### C. 研究結果

ヒト健常人末梢血より単球を得て、M-CSF を添加し一週間以上培養してマクロファージを得た (M-マクロファージ)。そして、100U/ml の IFN $\gamma$  存在下で5日間培養した M-マクロファージに oregon green で標識したらい菌を添加し48時間培養した。その後抗 phox タンパク抗体で染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察した。矢印は phox タンパク (gp91、パネル A)、(p40、パネル B) とらい菌 (パネル C) であり、それぞれ同一箇所にもみられた (Fig. 1)。一方、対照マクロファージでは phox の発現量 (細胞全体の蛍光量) は低く、らい菌周囲への phox 集積もみられなかった。顕微鏡に付属している解析ソフトウェアにより緑色蛍光 (らい菌) の領域の gp91-phox や p40-phox (赤色、青色蛍光量) を調べデータをヒストグラム化したところ IFN $\gamma$  刺激マクロファージにおいて著明な集積量の増加がみられた (Fig. 2)。BCG 感染においてはそのような増加はみられなかった。ライソゾームのマーカーについては IFN $\gamma$  刺激マクロファージにおいてらい菌のある部分 (緑色蛍光) に lamp-1 の集積が著明であり BCG 感染では集積はみられなかった (Fig. 3)。以上の集積量の増加は photoshop によるイメージの定量でも明らかであった。

### D. 考察

われわれはヌードマウスフットパッドに

らい菌を接種して継代しており、常時 viability の高いらい菌を実験に供与している。本研究では、以前から IFN $\gamma$  刺激したヒトマクロファージ中のらい菌の代謝低下、すなわち抗らい菌活性を認めている。ハンセン病において小菌型である TT 型では病巣で Th1 型サイトカインが主に発現しており、その中で IFN $\gamma$  がマクロファージを活性化して抗らい菌作用を発揮するといわれており、それが本研究で証明された。ヒトにおいてはマクロファージの産生する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> やスーパーオキシドが殺菌作用を有することが報告されている。スーパーオキシド産生は NADPH オキシダーゼに依存している。NADPH オキシダーゼは主にファゴゾーム膜に局在する gp91-phox タンパクと p22-phox タンパク、そして細胞質に存在する p40-phox タンパク、p47-phox タンパクと p67-phox タンパクそれぞれのサブユニットからなり、活性化に伴い細胞質のサブユニットタンパク群はファゴゾーム膜に移動しファゴゾーム膜上の gp91-phox タンパクと p22-phox タンパクと複合体を形成し NADPH オキシダーゼとしての活性を発現すると報告されている。われわれの観察結果ではヒト M-マクロファージの IFN $\gamma$  刺激でこれら phox タンパクが著明に増加しらい菌周囲に同時に集積することが判明した。このことは phox タンパクのサブユニットが複合体を形成し活性型になっている可能性を示唆している。以前の報告で SOD はスーパーオキシドをスカベンジする酵素であるが M-マクロファージにおいて SOD の発現は IFN $\gamma$  刺激でも変化しなかったことから、IFN $\gamma$  添加により phox 発現が特異的に増加することでスーパーオキシドが蓄積する可能性が示唆され、らい菌がスーパーオキシドにさらされていると思われた。また、lamp-1 の集積もあったことからファゴゾームとリソゾームの融合も起こって殺菌作用が増強

している可能性も示唆された。TT型ハンセン病にみられるようなIFN・が強く発現している病巣では殺菌作用が増強されていることを示唆している。一方、BCGにおける観察結果については今後より詳細な解析が必要であるが、in vitroにおいてIFN $\gamma$ 刺激したマクロファージのBCGに対する殺菌作用はみられなかった（データは示していない）。

#### E. 結論

IFN・存在下で培養したM-CSF誘導マクロファージに抗らい菌活性が誘導され、この時スーパーオキシドを産生するNADPHオキシダーゼタンパクサブユニットphoxの発現が増強し、らい菌周囲へのphoxタンパク各サブユニットの集積もみられた。ファゴゾームとリソゾームの融合もみられ、ハンセン病でのらい菌に対する殺菌作用においてphoxタンパクやリソゾームの関与が示唆された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表 なし

##### 2. 学会発表

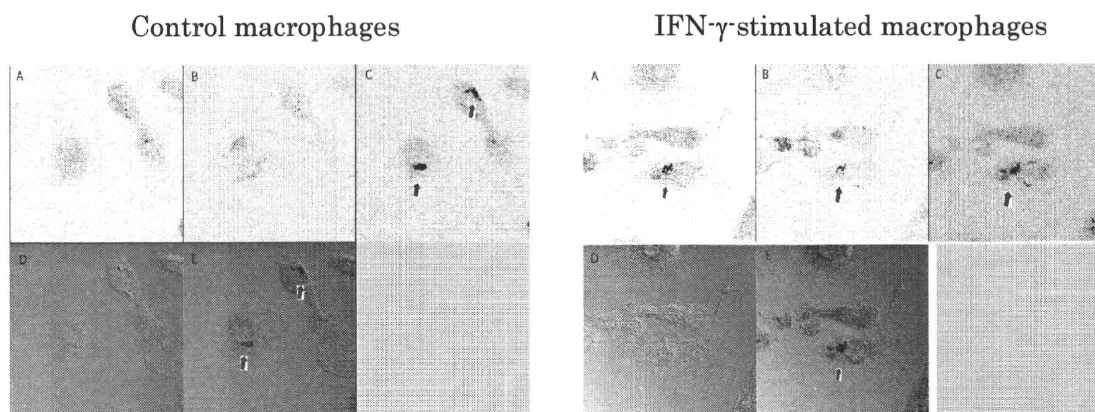
- 1) 福富康夫、前田百美、牧野正彦. ヒトマクロファージの抗らい菌活性発現とphoxタンパクの動態. 第83回日本細菌学会総会 2010年 3月 横浜
- 2) 前田百美、田村敏生、甲斐雅規、福富康夫、牧野正彦. らい菌リポ蛋白由来リポペプチドによる宿主細胞内らい菌の殺戮. 第83回日本細菌学会総会 2010年 3月 横浜
- 3) 向井 徹、前田百美、福富康夫、宮本友司、松岡正典、牧野正彦. 抗酸菌フェージTM4に由来する強力な抗酸菌プロモーターの同定. 第83回日本細菌学会総会 2010年 3月 横浜

- 4) 福富康夫、前田百美、松岡正典、牧野正彦. クロファジミンによる細胞死誘導の機序. 第83回日本ハンセン病学会総会 2010年 4月 鹿児島
- 5) 向井 徹、松岡正典、前田百美、宮本友司、福富康夫、牧野正彦. 抗酸菌フェージプロモーターによるらい菌の蛍光蛋白発現. 第83回日本ハンセン病学会総会 2010年 4月 鹿児島
- 6) Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. Anti-*M. leprae* activity and phox expression in human macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
- 7) Mukai, T., Y. Fukutomi, Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino. Expression of the fluorescent protein in *Mycobacterium leprae*. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
- 8) Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, and M. Makino. The fate of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells. 11<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology. 26-30 September, 2010, Lugano, Switzerland.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

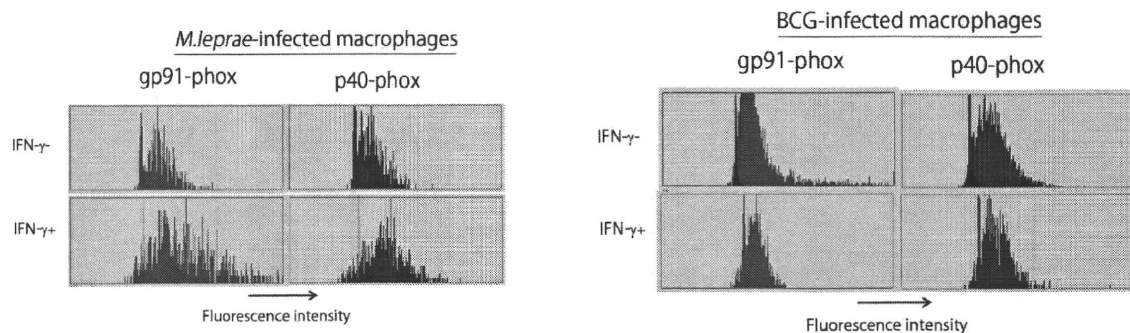
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Fig.1. Colocalization of phox proteins with *M.leprae* in IFN- $\gamma$ -stimulated M-macrophages



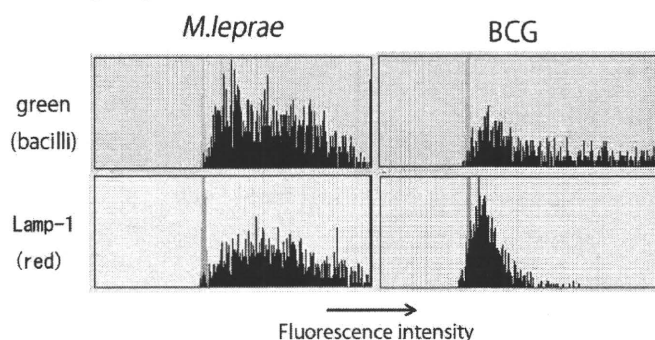
Confocal laser microscopic observation of human M-macrophages infected with fluorescence-labelled *M.leprae*. The cells were fixed and double stained with anti-phox antibodies. (A) gp91-phox (red fluorescence, arrow); (B) p47-phox (blue fluorescence, arrow); (C) *M.leprae* (green fluorescence, arrow); (D) phase contrast image of the cells; (E) merged images.

Fig.2. Colocalization of phox proteins with *M.leprae* or BCG in IFN- $\gamma$ -stimulated macrophages



Photographs of phox-stained macrophages were taken under confocal laser microscopy. Fluorescence intensity corresponding to phox proteins was expressed as histograms in green (*M.leprae* or BCG) -gated area by a software attached to the confocal microscope. Longitudinal axis indicates events (levels) of each fluorescence intensity channel.

Fig.3. Colocalization of lamp-1 with *M.leprae* but not with BCG in IFN- $\gamma$ -stimulated macrophages



Fluorescence intensity was expressed as histograms in green (*M.leprae* or BCG) -gated area. Longitudinal axis indicates events (levels) of each channel.

平成22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)

新規結核ワクチンの開発と応用

分担研究報告書

研究分担者

岡田 全司

(国立病院機構近畿中央胸部疾患センター・センター長)

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）  
分担研究報告書

新規結核ワクチンの開発と応用

研究分担者 岡田全司（NHO 近畿中央胸部疾患センター・臨床研究センター長）

研究要旨.

- (1) 新しい結核治療ワクチン Granulysin ワクチンの開発：  
キラーT細胞から産生される結核菌殺傷タンパク Granulysin は結核治療ワクチン効果を発揮した。Granulysin には 15K Da の Granulysin と 9K Da の Granulysin が存在するが、我々はリコンビナント 15K Granulysin ワクチンを作製した。このリコンビナント 15K Granulysin ワクチンが結核菌 H37Rv をエアロゾル感染させた DBA/1 マウス及び BALB/c マウスに対して結核治療効果を発揮した。すなわち、このワクチンは、肺臓・肝臓・脾臓の結核菌減少効果を示した
- (2) Granulysin はキラーT細胞の分化誘導増強活性を発揮した。  
Granulysin は結核菌殺傷タンパクとして報告されているが、我々はリコンビナント 15K Granulysin は *in vitro* のキラーT細胞の分化を強力に誘導し、キラーT細胞分化因子活性を發揮することを世界に先駆けて発見した。さらに、*in vivo* の系においても結核菌抗原特異的なキラーT細胞分化誘導活性を示した。
- (3) Granulysin は IL-6 と相乗的結核治療効果を発揮した。すなわち、DBA/1 マウスや BALB/c マウスの系で、H37Rv をエアロゾル感染させた後に Granulysin ワクチンと IL-6 ワクチンを治療投与すると相乗的な結核治療効果（結核菌数減少）を認めた。さらに、15K Granulysin は IL-6 とキラーT細胞分化誘導増強作用においても相乗効果を示した。
- (4) HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンはカニクイザル（最もヒト結核感染に近いモデル Nature Med. 1996）の系で、結核治療ワクチン効果を發揮することをすでに報告したが、本年度はその機序について解析を行った。その結果、このワクチン効果は IL-2 産生と相関した。すなわち、このワクチンを治療したサルの上肢末梢血リンパ球からの IL-2 産生を増強した。また生存率と IL-2 産生値が相関した。
- (5) Granulysin Tg マウスを作製した。このマウスは生体内で著明な抗結核作用を發揮した。

A. 研究目的

結核は世界 3 大感染症の 1 つであり、毎年 940 万人が結核発病し、約 180 万人/年が結核で死亡している。また多剤耐性結核は 50 万人（世界で）との報告もある。AIDS や糖尿病患者の免疫不全疾患に高頻度に難治性結核合併、薬剤耐性結核が増え、いわゆ

る難治性結核の対策が早急に望まれている。したがって、新しい治療法の研究が必須である。

すなわち、①新しい治療ワクチンの開発。  
②キラーT細胞の結核免疫に対する詳細なメカニズムや結核治療に関与する解析は不明である。したがって、これらを解明する。

## B. 研究方法

- (1) DBA/1マウス又はBALB/cマウスにH37Rv 100-200CFU/mouseをエアロゾル気道感染もしくは、 $5 \times 10^5$ /mouseをi. v. 投与した後、Granulysinワクチン、IL-6ワクチン、HSP65DNA+IL-12DNAワクチンを3回～6回投与し、治療効果を解析した。エアロゾル感染にはMcMurray博士が開発したエアロゾル・チャンバーを用いた。
- (2) Granulysin transgenic (Tg) マウスを用い、Granulysinの結核治療効果を解析した。ヒト・キラーT細胞から産生される15K Granulysinと9K GranulysinのcDNAを用いCAGベクターを用いて15K Granulysin Tgマウスと9K Granulysin Tgマウスを作製した。このマウスにH37Rvをi. v. 又はエアロゾル感染させ、1～8週後の肺、肝、脾の結核菌数を測定し、生体内抗結核作用を解析した。
- (3) カニクイザルにヒト結核菌Erdman株を経気道投与した。その1週間後より9回このワクチンを生体内投与し治療効果を解析した。結核感染前、後、ワクチン投与後約3週毎に体重、体温、赤沈、胸部X線、ツ反、免疫反応及び生存率を解析した。さらに、本年度はレオナルドウッド研究所より当臨床研究センターに送付されてきた血清中のIFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-6等をELISA法で測定した。さらにカニクイザルの末梢血リンパ球をHSP65抗原(10  $\mu$ g/ml)、PPD(10  $\mu$ g/ml)、結核死菌H37Ra (10  $\mu$ g/ml) 及びPHA-P (0.2%) で刺激し、96well plateで3日間培養した培養上清を、同様にIL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-6をサルサイトカインアッセイキットを用いて測定した。

(倫理面での配慮)

- (1) 実験動物に対して動物愛護上の配慮が十分なされている。国立病院機構近畿中央胸部疾患センター動物実験委規程の規則に従って、3R (Refinement, Replacement, Reduction) の原則に基づ

き動物実験委員会で承認された実験を行なっている。またレオナルドウッド研究所の動物委員会で承認された実験を行っている。

- (2) 当院は呼吸器疾患(結核を含む)の研究ネットワーク・グループリーダー施設として、国立病院機構の約65施設を束ねている。したがって、倫理委員会は院外委員5名(関西学院大学院長、大阪国際大学政経学教授等)及び各方面の医療従事者(事務系の人も含む)の院内委員5名により構成し、倫理面には十分な配慮をしている。

## C. 研究結果

- (1) 新しい結核治療ワクチンGranulysinワクチンの開発
  - (a) Granulysinタンパクワクチン(略して15K Granulysinワクチン)を用いて解析した。マウスにH37Rvをエアロゾル感染した後15K Granulysinワクチンで治療を行った群では肺臓・肝臓・脾臓の結核菌数がコントロール群(生食投与群)に比較して有意差をもって減少を示した。すなわち、15K Granulysinは強力な結核治療ワクチン効果を発揮した。
  - (b) 15K Granulysin DNAワクチンを作製した。CAGベクターを用いて作製した。このワクチンを100  $\mu$ g/匹i. m. 3回治療投与すると、肺臓・肝臓・脾臓の結核菌数が有意に減少した。
  - (c) このワクチンと下記のHVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンを組み合わせて投与すると、単独投与による結核菌数に比較して、有意に結核菌数減少効果すなわち相乗的結核治療ワクチン効果を発揮した。
- (2) 15K GranulysinがキラーT細胞分化因子である世界に先駆けての発見：  
Granulysinは結核菌殺傷タンパクとして報告されているが、リコンビナント15K Granulysinはin vitroのキラーT細胞の分化を強力に誘導し、キラーT細胞

分化因子活性を發揮した。ナイロンウールカラムを用いてenrichしたマウスT細胞に紫外線照射した刺激抗原細胞にリコンビナント15K Granulysinを加えて5日間培養する系（岡田 Proc Natl Acad Sci 1981）を用いてキラーT細胞分化因子活性を測定した。その結果、15K Granulysinは極めて強力なキラーT細胞分化誘導活性を示した。すなわち、15K Granulysinが直接T細胞に作用してキラーT細胞の分化を誘導することが示唆された。

同様にヒト末梢血T細胞を反応性細胞とし、5日培養の系でキラーT細胞を誘導するin vitroの系においても、抗原特異的キラーT細胞を誘導増強した。

これらのことより、Granulysinは直接結核菌を殺傷する作用が報告されているが、キラーTの分化誘導を介して結核免疫を増強し、結核治療ワクチン効果が發揮されることも示唆された。これはGranulysinがT細胞にも作用する因子であるという世界に先駆けての発見である。

さらに、in vivoの系においても結核菌抗原特異的なキラーT細胞分化誘導活性を示した。

(3) GranulysinワクチンとIL-6ワクチンの相乗的結核治療ワクチン効果：

DBA/1マウスやBALB/cマウスの系で、H37Rvをエアロゾル感染させた後にGranulysinワクチンとIL-6ワクチンを治療投与すると相乗的な結核治療効果（結核菌数減少）を認めた。さらに、15K GranulysinはIL-6とキラーT細胞分化誘導増強作用に置いて相乗効果を示した。

上記のキラーT細胞分化誘導アッセイ系（マウス）にリコンビナントIL-6 100u/mlとGranulysinを加えて培養すると著明なキラーT分化相乗効果が認められた。

(4) 15K Granulysinの遺伝子導入マウスと9K Granulysin遺伝子導入マウスをそれぞれ作製し、in vivoの抗結核作用を解析した。15K Granulysin Tgマウスの結

核菌感染後4w後の肺結核菌数（CFU）はwild typeマウスに比較して低下が認められた。また9K Granulysin Tgマウスの肺内結核菌数もwild typeマウスに比較して低下していた。これらの生体内における15K Granulysinと9K Granulysinの結核感染に対する効果は世界に先駆けての発見である。

(5) HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンの結核治療効果にはこのワクチンによるIL-2産生増強が重要であることを示した。

カニクイザルを用いて、HSP65DNA+IL-12DNAワクチンは著明な結核治療効果を發揮した。このワクチン治療群の結核免疫増強メカニズムについて解析した。このワクチン投与群は、コントロール群に比較して赤沈の改善、体重増加のみでなく、カニクイザル末梢血Tリンパ球の増殖増強反応（HSP抗原、PPD抗原や結核死菌抗原に対して）の増強作用を發揮した。さらにこのワクチン治療群は、IFN- $\gamma$ 産生増強のみでなく、コントロール群に比較してIL-2産生（結核死菌H37Ra抗原刺激に対し）の著明な増強効果を示した。さらに、IL-2産生能と生存率（survival）の相関が示唆された。

D. 考察

(1) Granulysinワクチンは強力な結核治療ワクチン効果を示し、他の結核治療ワクチンHSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンやIL-6ワクチンと相乗的結核治療効果を發揮した。したがって、これらの治療法はMDR-TBやXDR-TBに対する治療に有用である可能性が強い。

(2) GranulysinはキラーT細胞分化因子活性を有することを初めて発見した。このGranulysinに対するレセプターがT細胞上に存在することが考えられ、このレセプターに対する解析も重要であると考えられる。また、Granulysinによる結核治療効果はキラーT細胞分化増強による経路も示唆された。

## E. 結論

- (1) Granulysinワクチンは強力な結核治療効果を発揮した。このワクチン効果は(2)に述べるようにキラーT細胞を分化させる機能を有することにより発揮されることが示唆された。
- (2) リコンビナント15K GranulysinはキラーT細胞分化誘導に重要なキラーT細胞分化因子活性を有することを明らかにした。Granulysin Tgマウスを作製した。このマウスは生体内で著明な抗結核作用を発揮した。
- (3) HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンのカニクイザルにおける治療効果はこのワクチンのIL-2産生誘導能に関与することが示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Okada, M., Y. Kita, T. Nakajima, N. Kanamaru, S. Hashimoto, T. Nagasawa, Y. Kaneda, S. Yoshida, Y. Nishida, H. Nakatani, K. Takao, C. Kishigami, S. Nishimatsu, Y. Sekine, Y. Inoue, M. Matsumoto, D. N. McMurray, E. C. Dela Cruz, E. V. Tan, R. M. Abalos, J. A. Burgos, P. Saunderson, and M. Sakatani. Novel therapeutic vaccine: Granulysin and new DNA vaccine against Tuberculosis. Human Vaccine, in press.
- 2) Kita, Y., M. Okada, T. Nakajima, N. Kanamaru, S. Hashimoto, T. Nagasawa, Y. Kaneda, S. Yoshida, Y. Nishida, H. Nakatani, K. Takao, C. Kishigami, S. Nishimatsu, Y. Sekine, Y. Takamori, D. N. McMurray, E. C. Dela Cruz, E. V. Tan, R. M. Abalos, J. A. Burgos, P. Saunderson, and M. Sakatani. Development of therapeutic and prophylactic vaccine against tuberculosis using monkey and granulysin transgenic mice models. Human Vaccine, in press.

### 2. 学会発表

- 1) Okada, M., Y. Kita, N. Kanamaru, S. Hashimoto, T. Nakajima, Y. Kaneda, P. Saunderson, and E. V. Tan. A Novel Therapeutic Vaccine Against Tuberculosis Using the Cynomolgus Monkey Model. 41th IUATLD (The International Union Against Tuberculosis and Lung Disease), 11-15 Nov., 2010, Berlin, Germany.
- 2) Okada, M., Y. Kita, N. Kanamaru, S. Hashimoto, Y. Nishida, H. Nakatani, K. Takao, C. Kishigami, S. Nishimatsu, Y. Sekine, Y. Inoue, T. Nakajima, T. Nagasawa, Y. Kaneda, S. Yoshida, M. Matsumoto, P. Saunderson, E. V. Tan, E. C. D. Cruz, D. McMurray, and S. Hayashi. A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccine against Tuberculosis Using the Cynomolgus Monkey Model and Mouse Model. 4<sup>th</sup> Vaccine Global Congress, 3-5 Oct., 2010, Wien, Austria.
- 3) Okada, M. A Novel Therapeutic Vaccine (HVJ-Envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNA) against Tuberculosis Using Monkey Models. in "Symposium: Host-Directed Therapies in Bacterial and Fungal Infections (Invited Speaker)" 50<sup>th</sup> ICAAC (International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy), 11-15 Sep., 2010, Boston, USA.
- 4) Okada, M. Novel therapeutic vaccines (granulysin and novel DNA vaccine) against Tuberculosis. 7<sup>th</sup> WCVII (WORLD CONGRESS ON VACCINE, IMMUNISATION AND IMMUNOTHERAPY), 26-28 May, 2010, Berlin, Germany.
- 5) Kita, Y., and M. Okada. Novel prophylactic and therapeutic vaccine against Tuberculosis using monkey and transgenic mice models. 7<sup>th</sup> WCVII (WORLD CONGRESS ON VACCINE, IMMUNISATION AND IMMUNOTHERAPY),



- 26-28 May, 2010, Berlin, Germany.
- 6) Kita, Y., N. Kanamaru, S. Hashimoto, Y. Nishida, H. Nakatani, K. Takao, C. Kishigami, S. Nishimatsu, Y. Sekine, Y. Inoue, T. Nakajima, Y. Kaneda, S. Yoshida, D. McMurray, and M. Okada. A novel prophylactic and therapeutic vaccines against tuberculosis in the tuberculosis-sensitive mice and SCID-PBL/hu mice. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 22-27 Aug., 2010, Kobe, Japan.
- 7) Okada, M., Y. Kita, N. Kanamaru, S. Hashimoto, Y. Nishida, H. Nakatani, K. Takao, C. Kishigami, S. Nishimatsu, Y. Sekine, T. Nakajima, Y. Kaneda, P. Saunderson, E. V. Tan, and D. McMurray. A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccine (HVJ-Envelope/Hsp65 DNA + IL-12 DNA) against Tuberculosis Using The Cynomolgus Monkey Model. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 22-27 Aug., 2010, Kobe, Japan.
- 8) Okada, M., Y. Kita, N. Kanamaru, S. Hashimoto, Y. Nishida, H. Nakatani, K. Takao, C. Kishigami, S. Nishimatsu, Y. Sekine, T. Nakajima, T. Nagasawa, Y. Kaneda, S. Yoshida, E. V. Tan, P. Saunderson, E. C. Dela Cruz, D. McMurray, and M. Sakatani. A NOVEL THERAPEUTIC VACCINE (HVJ-ENVELOPE/HSP65 DNA+IL-12 DNA) AGAINST TUBERCULOSIS USING THE MONKEY MODEL. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
- 9) 岡田全司, 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里実, 西田泰子, 仲谷均, 高尾京子, 岸上知恵, 西松志保, 関根有紀, 井上義一, 吉田栄人, 中島俊洋, 金田安史, 坂谷光則. 結核高感受性マウスを用いた新しい結核治療ワクチン (Hsp 65 DNA+IL-12 DNA) の開発. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会 2010 年 4 月 京都
- 10) 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里実, 西田泰子, 仲谷均, 高尾京子, 岸上知恵, 西松志保, 関根有紀, 吉田栄人, 中島俊洋, 坂谷光則, 金田安史, Tan E. V., Saunderson Paul, 岡田全司. ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた新しい結核治療ワクチン開発. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会 2010 年 4 月 京都
- 11) 喜多洋子, 岡田全司, 金丸典子, 橋元里実, 西田泰子, 仲谷均, 高尾京子, 岸上知恵, 西松志保, 関根有紀, 林清二, 吉田栄人, 中島俊洋, 金田安史, E. V. Tan, E. L. C. Dela Cruz, P. Saunderson. ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しい予防・治療ワクチン開発研究. 64 回国立病院総合医学会 2010 年 11 月 福岡
- 12) 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里実, 西田泰子, 仲谷均, 高尾京子, 岸上知恵, 西松志保, 関根有紀, 井上義一, 坂谷光則, 岡田全司. 新しい結核治療ワクチン (HVJ-エンベロープ/Hsp65+IL-12 DNA) 及び granulysin ワクチンの開発. 第 80 回実験結核研究会総会 2010 年 5 月 京都
- 13) 岡田全司, 喜多洋子, 金丸典子, 井上義一, 坂谷光則. 新しい結核治療ワクチン (HVJ-エンベロープ/Hsp65+IL-12 DNA) の開発 (SCID-PBL/hu マウスを用いた). 第 85 回結核病学会総会 2010 年 5 月 京都
- 14) 喜多洋子, 金丸典子, 井上義一, 坂谷光則, 岡田全司. ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しい予防・治療ワクチン開発. 第 85 回結核病学会総会 2010 年 5 月 京都
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

平成22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)

結核菌によるファゴリソソーム形成阻害過程の研究

分担研究報告書

研究分担者

小出 幸夫

(浜松医科大学・理事)

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）  
分担研究報告書

結核菌によるファゴリソーム形成阻害過程の研究

研究分担者 小出幸夫（浜松医科大学・理事）

研究協力者 瀬戸真太郎（浜松医科大学・感染症学・助教）

研究要旨.

本研究において結核菌ファゴソームの小胞輸送機構の解明をめざし、生化学的に単離した結核菌ファゴソームに含まれるタンパク質のプロテオーム解析を行った。結核菌ファゴソームとラテックスビーズファゴソームからタンパク質を抽出して、2次元電気泳動法によって含有タンパク質の比較を行った。ラテックスビーズファゴソーム画分にはカテプシンなどリソソームに多く含まれるタンパク質が優位を占めていた。結核菌ファゴソーム画分には Grp78 や PDI など小胞体を構成するタンパク質が多数含まれていた。次に結核菌ファゴソーム含有タンパク質の網羅的同定を LC-MS/MS をもちいて行った。結核菌ファゴソーム画分には、特異的に Erlin-2 が含まれていることが明らかになった。Erlin-2 ノックダウンマクロファージにおける結核菌増殖の観察結果は、Erlin-2 は結核菌の感染初期におけるマクロファージ内増殖を支持することを示唆した。

A. 研究目的

結核菌は細胞内寄生性細菌である。結核菌は感染マクロファージ内においてファゴソームとリソソームの融合（ファゴリソーム形成）を阻害することによって、増殖能を獲得している。これまで我々は、ファゴソームへのカテプシン D の局在に機能する、もしくはファゴソーム内の酸性化に機能する Rab GTPase が結核菌ファゴソームからかい離することによってファゴソーム熟成が阻害され、その結果、結核菌ファゴソームにおけるファゴリソーム形成が阻害されることを明らかにした。しかし、結核菌がファゴソーム内で増殖するために必要な小胞輸送の改変機構について明らかになっていない。本研究は結核菌ファゴソームの小胞輸送機構の解明を目指し、生化学的に単離した結核菌ファゴソーム画分に含まれるタンパク質のプロテオーム解析を行った。本結果は今後の結核治療薬およびワクチン開発において非常に有用である。

B. 研究方法

1. 結核菌ファゴソーム画分の単離:

Raw264.7 マクロファージに *Mycobacterium tuberculosis* Erdman を貪食させたのち Beatty et al (Cell Microbiol. 2002; 4: 167-76) の方法に従ってファゴソーム画分を単離した。すなわち、結核菌を Raw264.7 マクロファージに 6 時間貪食させて、細胞を回収した。ファゴソーム膜を破壊しないように細胞を破碎した。感染マクロファージ破碎液をショ糖密度勾配遠心分離法、およびフィコール重層遠心分離法を行った。沈殿画分を PBS で洗浄後、結核菌ファゴソーム画分とした。

2. 二次元電気泳動法: ファゴソーム画分抽出タンパク質の二次元電気泳動を行った。一次元目ゲルに抽出タンパク質を浸透させた後、電気泳動を行った。ストリップに含まれるタンパク質を SDS-PAGE によって展開することによって二次元目電気泳動を行った。タンパク質スポットの可視化は銀染色法によって行った。

3. LC-MS/MS によるファゴソーム画分タンパク質の網羅的同定: ファゴソーム画分抽