

一方、シュワン細胞では、線維芽細胞同様に对照のエタノールと 3ng/ml では 24, 48 時間後共にアポトーシスはほとんど見られなかったが、30ng/ml と 300ng/ml では線維芽細胞よりも陽性細胞数は明らかに増加し、300ng/ml の 48 時間後では 91% がアポトーシスを示した (図 3、図 4)。

#### D. 考察

我々はマウスへの Mycolactone 投与で末梢神経障害が起きることを報告したが、Mycolactone が神経系細胞に与える影響を解析することによってその機序を解明しようとしている。

昨年度は人工合成した Mycolactone A/B の供与を受け、線維芽細胞とマクロファージへの合成 Mycolactone の細胞毒性を検討した。精製 Mycolactone と比較して、合成 Mycolactone が細胞障害を引き起こす最小濃度はやや高い傾向が観察されたが、培養 24 時間後の線維芽細胞とマクロファージでは 30-300ng/ml であり、培養 60 時間後の線維芽細胞とマクロファージでは 3-30ng/ml で形態学的変化が認められた。

本年度は、これらの実験データを元に、抹消神経障害に最も関与すると思われるシュワン細胞に対する Mycolactone の細胞障害性を、線維芽細胞と定量的に比較することで、ブルーリ潰瘍で観察される神経組織の損傷が非特異的に起こったものなのか、それとも Mycolactone が神経障害に一定の親和性を持つために起こったものなのかを解明しようと考えた。

今回の細胞壊死とアポトーシスの定量的解析結果から、*M. ulcerans* の産生する毒性脂質 Mycolactone は、シュワン細胞に対して強い細胞傷害性を持つことが示された。

#### E. 結論

培養シュワン細胞と線維芽細胞を用いて、人工合成 Mycolactone A/B の細胞傷害性を比較検討したところ、Mycolactone A/B はシュワン細胞に強い細胞壊死とアポトーシスを引き起こした。このことから、ブルーリ潰瘍における無痛性が Mycolactone のシュワン細胞毒性によることが示唆された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 圓 純一郎、Kyaw Kyaw、北島信一、後藤正道、石田裕. ミャンマー国 Central Special Skin Clinic (CSSC), Yangon General Hospital における Nerve Conduction Studies (NCS) (神経伝導検査) 報告 (第 1 報). 第 84 回日本ハンセン病学会総会 2011 年 5 月 岡山
- 2) 後藤正道、山下美奈子、加納達雄、尾崎元昭、野上玲子. 日本におけるハンセン病の病型・病勢の変遷 - 過去の診療録を読み解くために. 第 84 回日本ハンセン病学会総会 2011 年 5 月 岡山
- 3) Masamichi Goto, and Junichiro En. Cytotoxic effect of mycolactone produced by *M. ulcerans*. Annual Meeting of the WHO Global Buruli ulcer Initiative, 2011 年 3 月, Geneva

#### 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

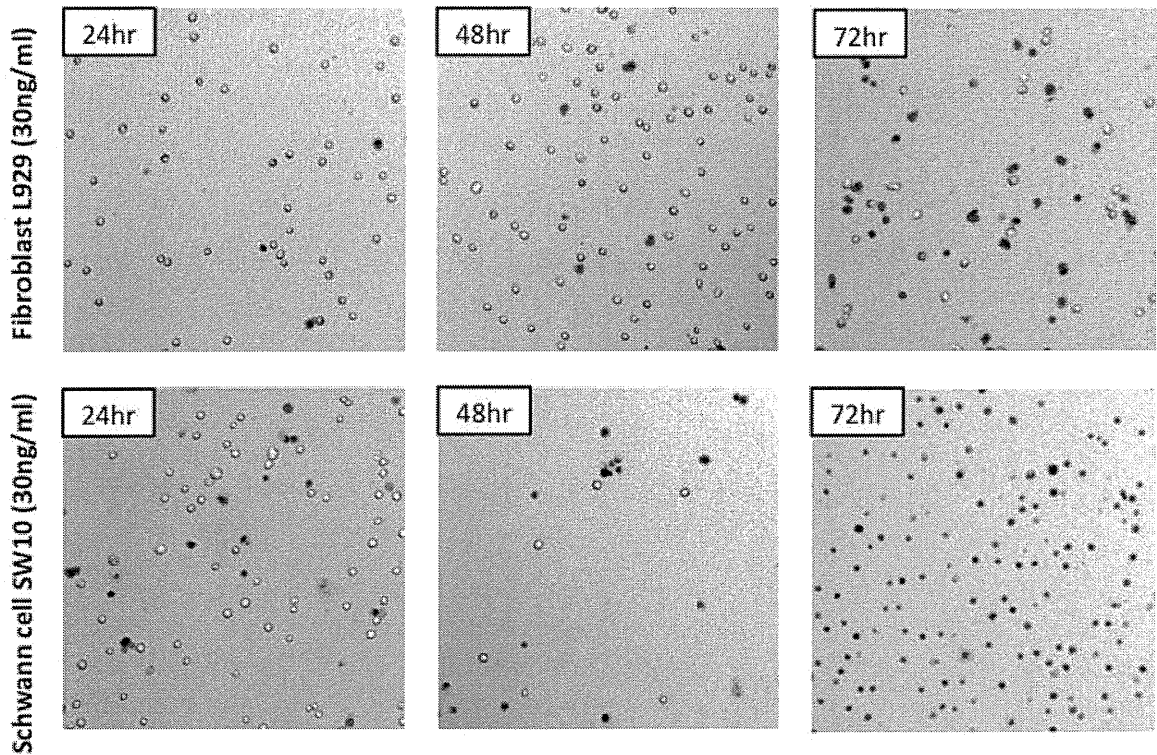


図1. 培養線維芽細胞（上段）とシュワン細胞（下段）への合成 Mycolactone A/B (30ng/ml) 投与後のトリパンブルーによる細胞壊死の経時的比較

黒く染まっているのが壊死細胞で、白く抜けているのが残存細胞を示す。シュワン細胞により多くの壊死細胞が観察される。

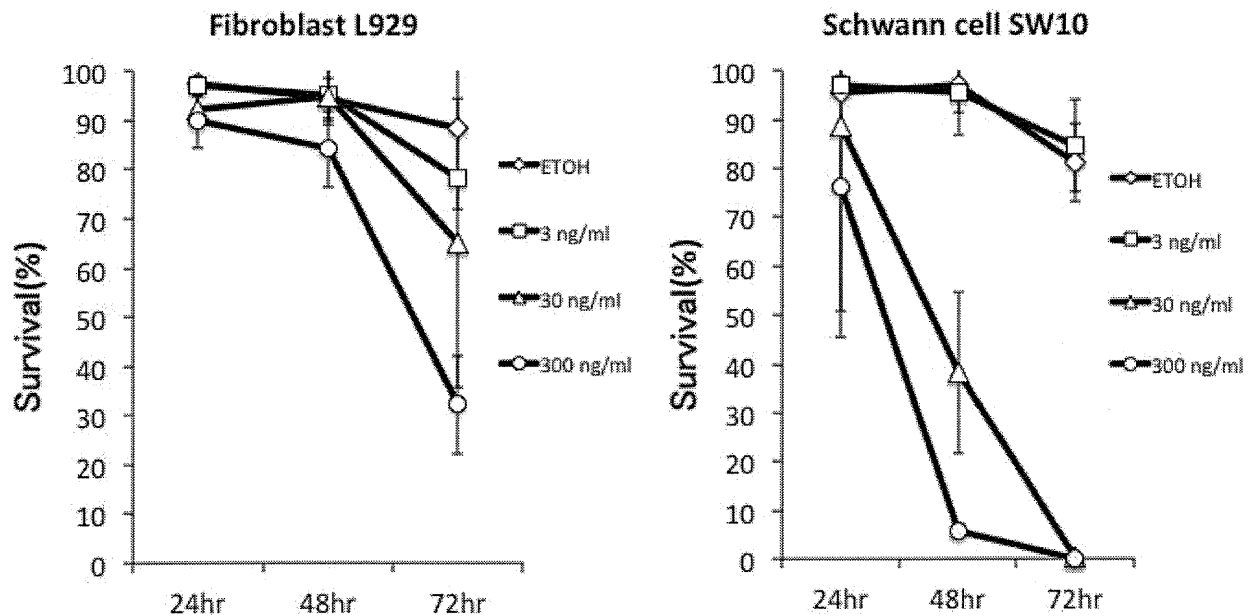


図2. 培養線維芽細胞（左）とシュワン細胞（右）への合成 Mycolactone A/B 投与後の生存細胞の経時的比較

トリパンブルー染色による定量結果を示す。線維芽細胞は Mycolactone に比較的強い耐性を示すが、シュワン細胞は強い感受性を示し、30ng/ml と 300ng/ml では 72 時間後には全ての細胞が壊死していた。

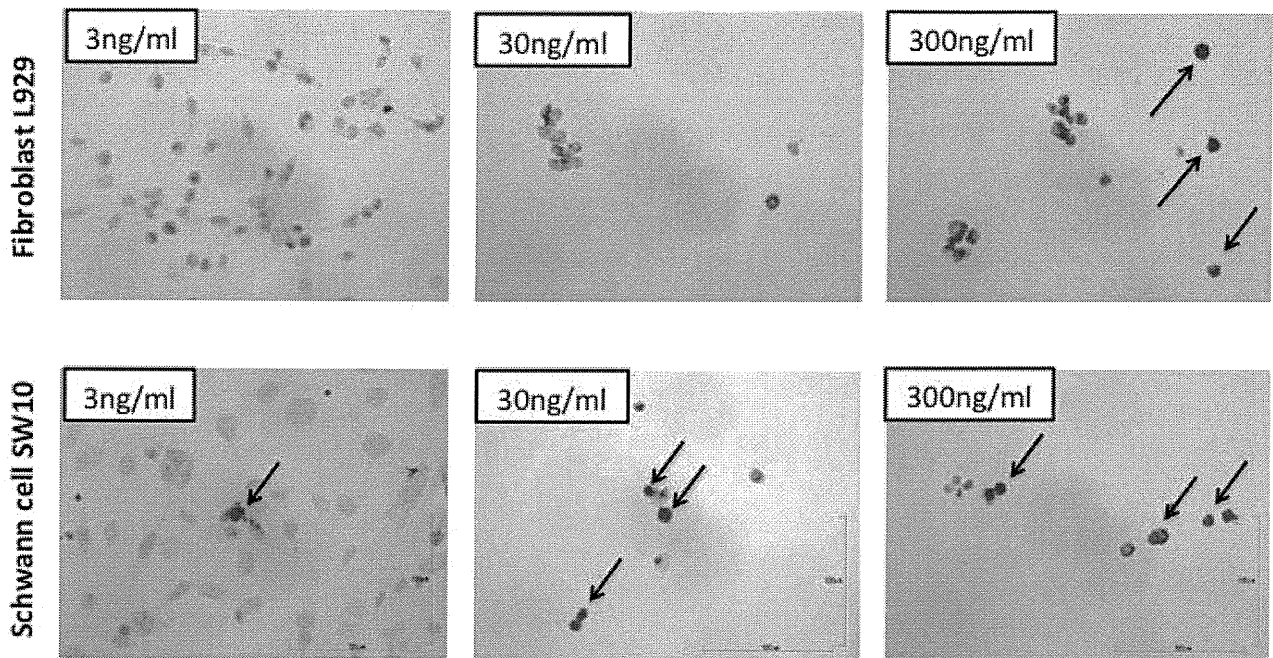


図 3. 培養線維芽細胞（上段）とシュワン細胞（下段）への合成 Mycolactone A/B diastereomer 投与 48 時間後の TUNEL 法染色によるアポトーシスの比較  
 アポトーシスを示す細胞を→で示す。シュワン細胞には、低濃度から多くのアポトーシス細胞が観察される。

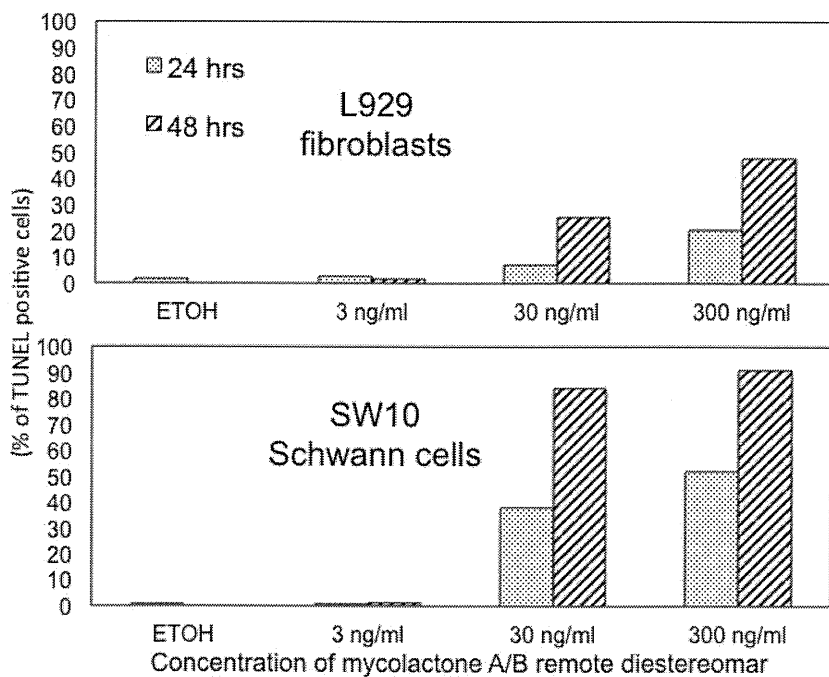


図 4. 培養線維芽細胞（上段）とシュワン細胞（下段）への合成 Mycolactone A/B diastereomer 投与後のアポトーシスの比較  
 TUNEL 法染色による定量結果を示す。線維芽細胞に比べてシュワン細胞には、同一濃度の Mycolactone A/B に対して、より多くのアポトーシス細胞が観察される。

平成23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）  
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・細菌学分野・講師)
	大原 直也	(岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・ 口腔微生物学分野・教授)
	福田 和正	(産業医科大学・医学部・微生物学・講師)
	小川 みどり	(産業医科大学・医学部・微生物学・講師)

研究要旨.

*Mycobacterium smegmatis* J15cs は J774 細胞内で生残する。さらに *rpoZ* 変異株は親株に比べ、J774 細胞内でさらに高い増殖性を示すことが顕微鏡で観察された。しかし、細胞内菌数は親株と変異株で違いがみられなかった。そこで、今回は 30 分間の超音波処理後細胞内菌数を測定し、*rpoZ* 変異株は J15cs 株の約 10 倍の細胞内菌数を示すことを明らかにした。また *rpoZ* 変異株は、J15cs 株に比べ、アミドグリコシド系の抗菌薬に耐性であった。さらに、脂質の流出を避けるため、脱水過程を必要としないイオン液体法により、コロニーを走査型電子顕微鏡で観察した。mc<sup>2</sup>155 株はコロニー表面に菌体が観察されたが、J15cs 株と *rpoZ* 変異株はコロニーが構造物で覆われ、その内部に菌体が観察され、J15cs 株は *rpoZ* 変異株より厚い構造物で覆われていた。以上の結果より、J15cs 株の RNA ポリメラーゼの  $\omega$  サブユニットをコードする *rpoZ* 遺伝子は、細胞内増殖性や薬剤感受性に影響を与え、J15cs 株と *rpoZ* 変異株のコロニー表面が脂質と考えられる構造物に覆われていることが示唆された。

A. 研究目的

結核は現在もなお最大の感染症であり、アジア地域の患者発生数は、全世界の患者発生数の半数を超え、多剤耐性結核や超多剤耐性結核の感染が急速に拡大し、問題となっている。結核菌は細胞内増殖性を有し、そのメカニズムを明らかにすることは、非常に重要である。

我々は、細胞内増殖性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 を構築した。抗酸菌の分子遺伝学的解析に広く使用されている mc<sup>2</sup>155 株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、J15cs 株は生残できることを明らかにしている。mc<sup>2</sup>155 株

の細胞壁には apolar GPL が存在し、その刺激は TLR2 を介してシグナル伝達が行われている。一方、J15cs 株の細胞壁には apolar GPL が欠落しており、宿主の免疫応答から逃れることにより細胞内生残性を有していると考えられる。迅速発育抗酸菌である J15cs 株が J774 細胞内で生残するメカニズムを明らかにすることは、結核菌の細胞内増殖性のメカニズムを知る上で有用な情報になると考えられる。また、このホスト・ベクター系を用いて、結核菌遺伝子 Rv1388-Rv1389-Rv1390 (*rpoZ*) が *M. smegmatis* J15cs に休眠類似の状態を誘導することを報告している。*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、ストレス状態での遺伝子発現に関与し、細

胞内に取り込まれた際の遺伝子発現にも影響していると考えられる。しかし、結核菌の *rpoZ* 遺伝子は必須であり、欠損株を取ることができない。そこで、*M. smegmatis* J15cs の *rpoZ* に相当する遺伝子を破壊し、その影響をみる、あるいは *rpoZ* 変異株に *rpoZ* 遺伝子を導入し親株の性状に戻るかどうかをみることにより、*rpoZ* 遺伝子の役割を明らかにすることができると考えられる。

前回、顕像では、*rpoZ* 変異株が J15cs 株より細胞内増殖性が增大していたが、細胞内菌数に差は認められなかったと報告した。そこで、今回は、*rpoZ* 変異株が J15cs 株より細胞内増殖性があるかどうかを明らかにするために、細胞内菌数を測定する際の処理方法を変更し、顕像を反映した細胞内菌数 (CFU) の差を出すことを目的とした。また、両株の薬剤感受性についても検討した。さらに、脱水過程による脂質の流出を避けるため、最近開発されたイオンリキッド法を用い、mc<sup>2</sup>155 株、J15cs 株、*rpoZ* 変異株のコロニーを走査型電子顕微鏡で観察し、脂質に富む細胞壁を持つ抗酸菌の本来のコロニー形態を得ることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) 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 μm フィルターを使用し、単個菌を調整し、菌を感染させた (約 1 × 10<sup>6</sup> CFU/well)。感染 3 時間後に PBS で 2 回洗浄し、さらに 200 μg/ml アミカシン添加 5% FCS 加 RPMI で 2 時間処理し、細胞外の菌を除き、5 μg/ml アミカシン添加 5% FCS 加 RPMI に交換した。この時点を目 0 日目とした。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、medium を H<sub>2</sub>O に交換し、ラバーポリスマンで細胞を剥がし、30 分間超音波処理を行った。普通寒天培地にプレーティングして菌数 (CFU) を測

定した。また、超音波処理により生菌数が減少するかどうかを検討した。普通寒天培地上で増殖した菌 (7 日培養) を 30 分間超音波処理したものと無処理のもので、菌数 (CFU) を比較した。また、細胞内菌数を測定する際の超音波処理後の菌液について、Ziehl-Neelsen 染色を行い、プレーティング前の菌の状態を確認した。

### 2) 薬剤感受性試験

アミカシン、ゲンタミシン、トブラマイシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリンを添加した (0.5 μg ~ 2 μg/ml) 普通寒天培地を用意した。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 μm フィルターを使用し、単個菌を調整し (約 1 × 10<sup>5</sup> CFU/well)、培地に 20 μl ずつ滴下後、37°C で 7 日間培養し、増殖の有無をみた。

### 3) イオン液体法による電子顕微鏡解析

普通寒天培地で 5 日間培養し、寒天培地を含め、適当なサイズに切り出し、オスミック酸で蒸気固定した。イオン液体を滴下し、余分な液をろ紙で吸い取り、日立 S-4500 走査型電子顕微鏡で観察した。

## C. 研究結果

### 1) 細胞内増殖性

先ず、普通寒天培地で培養した菌を PBS にケン濁後 5 μm フィルターを使用して単個菌にし、30 分間の超音波処理による菌への影響をみた。mc<sup>2</sup>155 株については、無処理で 9.1 × 10<sup>7</sup> CFU/ml、超音波処理後で 8.2 × 10<sup>7</sup> CFU/ml、J15cs については、無処理で 1.0 × 10<sup>8</sup> CFU/ml、処理後 9.8 × 10<sup>7</sup> CFU/ml であり、超音波処理により菌数が減少することはなかった。

J774 細胞に mc<sup>2</sup>155 株、J15cs 株と *rpoZ* 変異株を感染させた場合の細胞内菌数は、感染 2 日目で J15cs 株は 2.2 × 10<sup>5</sup> CFU/well、*rpoZ* 変異株は 2.5 × 10<sup>5</sup> CFU/well で両株間に差はなかったが、mc<sup>2</sup>155 株は 2.2 × 10<sup>4</sup> CFU/well で他と比べ 1/10 に減少していた。感染 8 日目には J15cs 株と *rpoZ* 変異株の菌数もある程度減少するが、J15cs 株は 2.1 × 10<sup>3</sup> CFU/well、*rpoZ* 変異株は 3.3 × 10<sup>4</sup> CFU/well となり、明らかに *rpoZ* 変異株の細

胞内菌数が多かった。8日目の  $mc^2155$  株については、1~3個のコロニーが出現したのみで ( $2.3 \times 10$  CFU/well)、ほとんど死滅していた。また、30分間超音波処理後のプレーティング前の菌液の Ziehl-Neelsen 染色を行ったところ、*rpoZ*変異株には J15cs 株より多くの菌塊が残っていた。

## 2) 薬剤感受性試験

アミカシン ( $2 \mu\text{g/ml}$ )、ゲンタミシン ( $2 \mu\text{g/ml}$ )、トブラマイシン ( $2 \mu\text{g/ml}$ )、ストレプトマイシン ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) を添加した普通寒天培地に *rpoZ* 変異株は増殖したが、J15cs 株の増殖は認められなかった。また、テトラサイクリンについては、両株とも  $1 \mu\text{g/ml}$  添加培地には増殖したが、 $2 \mu\text{g/ml}$  添加培地には増殖は認められず、両株間に差はなかった。*rpoZ* 変異株は、アミノグリコシド系薬剤に対し、J15cs 株より耐性であった。

## 3) イオン液体法による電子顕微鏡解析

イオン液体を使用し、有機溶剤による脱水処理をすることなく、普通寒天培地上のコロニーの形態を走査型電子顕微鏡で観察した。 $mc^2155$  株はコロニー表層に菌体が観察されたが、J15cs 株と *rpoZ* 変異株はコロニー表層に構造物があり、菌体は観察されなかった。その構造物がない部分で、内部に菌体が観察された。また、J15cs 株の方が厚い構造物を有していた。

## D. 考察

マウスマクロファージ系 J774 細胞内で、*rpoZ* 変異株は Ziehl-Neelsen 染色で菌塊を J15cs 株より多く形成しており、細胞内増殖性を増大していると考えられた。しかし、TritonX-100 処理による細胞内菌数は同程度であり差は認められなかった。今回は TritonX-100 ではなく 30 分間の超音波処理を行い、細胞内菌数を測定したところ、感染 8 日目に明らかな細胞内菌数の差が認められた。また、超音波処理を行ったプレーティング前の菌液を Ziehl-Neelsen 染色により観察すると、 $mc^2155$  株は単個菌になっていたが、J15cs 株と *rpoZ* 変異株は菌塊が残っていた。また、*rpoZ* 変異株は J15cs 株

より多くの菌塊を有し、菌塊による細胞内菌数の減少の影響は *rpoZ* 変異株の方が J15cs 株より大きいと考えられる。Ziehl-Neelsen 染色像より、1 個の菌塊は 100 個以上の菌からなっていると考えられ、菌塊を単個菌にすることができれば、光顕像を反映した *rpoZ* 変異株と J15cs 株の差が明らかになるのではないかと考えられる。

我々は今までの研究で *M. smegmatis* J15cs の *rpoZ* 遺伝子がコロニー性状、SDS 感受性、細胞壁構造等の多様な性状に影響を与えることを示してきた。今回は薬剤感受性に対しても影響を与えることを示した。SDS に対しては J15cs 株が *rpoZ* 変異株より耐性であったが、アミノグリコシド系薬剤に対しては *rpoZ* 変異株の方が耐性であった。

イオン液体を使用し、コロニー形態を走査型電子顕微鏡で観察した。本法は脱水過程が必要でないため、脂質の流失を避けることができ、抗酸菌の本来のコロニー形態を観察できるのではないかと考えられる。前回報告した脂質固定のためのイミダゾール法による透過電子顕微鏡解析の結果でも菌体の細胞壁最外層に厚い脂質層が存在しており、J15cs 株は、*rpoZ* 変異株より厚い脂質層を有していた。また、コロニー内部の菌体に比べ、コロニー表層の菌体において脂質層が厚くなっていた。イオン液体法の結果と同様であり、コロニー表層の厚い構造物は脂質であると考えられる。これらの像は通常法では観察されない。通常法では、J15cs 株と *rpoZ* 変異株の細胞壁構造は、結核菌に類似していた。イミダゾール法やイオン液体法を結核菌に用いれば、厚い脂質層有した結核菌本来の電顕像を得ることができると考えられ、非常に興味深い。

ヒト型結核菌は病原性が強いいため、特別の感染実験施設 (P3) を必要とする。また、遅発育菌であるため、実験に時間を要する。*M. smegmatis* J15cs 株は弱毒性の迅速発育菌であるため、特別な実験施設を要せず、短時間で研究成果を上げることができる。また、*M. smegmatis*  $mc^2155$  株に比べ、J15cs 株はマクロファージ内でより長い期間生残することができる。この生残性の違いはマ



ウス実験でも観察されている（宮崎大学・後藤義孝教授）。したがって、J15cs 株は、ヒト型結核菌や非結核性抗酸菌の細胞内生残性を解明する上で有用と考えられる。一方、ゲノム解析で、J15cs 株は mc<sup>2</sup>155 株とほぼ同一であることを明らかにした（宮崎大学・林哲也教授）。このことは *M. smegmatis* のマイクロアレイを利用することによって、遺伝子発現制御の機構を明らかにすることができることを示している。つまり、ヒト型結核菌や非結核性抗酸菌の細胞内生残性、再燃の機構を明らかにする上で、J15cs 株は極めて有用と考えられる。

#### E. 結論

J15cs 株の RNA ポリメラーゼの  $\omega$  サブユニットをコードする *rpoZ* 遺伝子の細胞内増殖性への影響を細胞内菌数の差で示した。また、薬剤感受性やコロニー性状にも影響を与えることが明らかになった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Fujiwara N., T. Naka, M. Ogawa, R. Yamamoto, H. Ogura and H. Taniguchi. 2011. Characteristics of *Mycobacterium smegmatis* J15cs strain lipids. Tuberculosis, in press.

##### 2. 学会発表

1) Ogawa, M., M. Nomoto, K. Fukuda, N. Ohara, N. Fujiwara, and H. Taniguchi. Characterization of a *rpoZ* mutant of *Mycobacterium smegmatis* J15cs. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特願：2011-119506

出願日：平成 23 年 5 月 27 日

「新規な抗酸菌生育阻害剤」

##### 2. 実用新案登録 なし

##### 3. その他 なし



平成23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・教授）

研究要旨.

非結核性抗酸菌のうち *Mycobacterium smegmatis* は迅速発育型抗酸菌のひとつで、遺伝子組換えをはじめさまざまな遺伝学的研究に用いられている。本菌種による動物感染モデルを開発することで、有用なワクチン開発や抗酸菌症における肉芽腫病変形成の機序解明などへの貢献が期待できる。そこで、広く国内外で使用されている J15cs 株および mc<sup>2</sup>155 株のマウスに対する病原性ならびに免疫応答性を調べ、感染モデル動物としての有用性について検討した。大量に静脈内感染させた場合、両株とも肝臓や肺からは速やかに排除されるが、脾臓には残存すること、肝臓や脾臓に多数の肉芽腫を形成することが分かった。また両株ともにマウスに対し強い TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  誘導能力を保持しており、非結核性抗酸菌症の有用なモデルとなり得ると思われる。

A. 研究目的

*M. smegmatis* は迅速発育型抗酸菌のひとつで動物の体表部や土壌から分離される。多くの株は非病原性であるが、まれに動物に日和見感染を起こすことがある。*M. smegmatis* には多くの株が知られているが、このうち J15cs 株と mc<sup>2</sup>155 (mc<sup>2</sup>) 株は遺伝子組換えをはじめさまざまな遺伝学的研究に用いられている。特に mc<sup>2</sup> 株は、高い割合で変異を起こすことから、抗酸菌の分子解析の材料として広く国内外で使われている。一方、J15cs 株は我が国で分離された動物由来の Jucho 株を始祖としており、*in vitro* で培養されたマウスマクロファージ内で mc<sup>2</sup> 株より長く生存することができる。J15cs 株のコロニーは R 型ドライコロニーで、これは mc<sup>2</sup> のものとは形態的に異なり、他の多くの株に比べても凝集を起こしやすいなどの特徴をもつ。J15cs 株を用いた鶏への実験感染では定型的結核病変を作らず、またモルモット、ウサギに対する病原性もみられない。本菌種による動物感染モデルが確立できれば、遺伝子組換えによる有用な抗結核ワクチン開発や結核症

や非定型抗酸菌症における病変形成の機序解明への貢献が期待できる。そこで、広く国内外で使用されている J15cs 株および mc<sup>2</sup>155 株のマウスに対する病原性ならびに免疫応答性を調べ、感染モデル動物としての有用性について検討した。

B. 研究方法

**菌** : *M. smegmatis* J15cs 株および mc<sup>2</sup> 株は産業医科大学微生物学教室より分与を受けた。両株は普通寒天培地にて継代後、

**マウスへの感染実験** : *M. smegmatis* J15cs 株および mc<sup>2</sup> 株のマウス体内での増殖能を比較するため前者は 106 cfu/0.2 ml、後者は 108 cfu/0.2 ml をそれぞれ 4 週齢、雌の C57BL/6 (B6) の静脈内に注射した。J15cs 株については 4 週齢の B6、BALB/c (BALB)、DBA/2 (DBA) に感染させ、同株に対するマウス系統間における感受性の違いを調べた。

**臓器内生菌数の測定** : マウスは感染後定期的にエーテル麻酔殺し、肝臓、脾臓、肺を無菌的に採取、重量測定後、ホモジナイザーにより乳剤とし、10 倍段階希釈を行って、

各希釈液 0.1 ml を普通寒天培地に接種、3 日間培養後に形成される集落数を計測することにより臓器内菌数を求めた。

**病理組織学的検索：**採材した肝臓、肺の一部は 10% PBS ホルマリンにて固定、パラフィン包埋後 4  $\mu\text{m}$  の厚さの標本とし、ヘマトキシリン - エオシン染色を行って、臓器内に形成された肉芽腫数とその大きさ特徴などを光学顕微鏡下で観察した。

#### **マウス脾細胞上清中のサイトカイン測定：**

無菌的に摘出した脾臓から RPMI1640 培養液にて細胞浮遊液とした。2 回洗浄した後、 $1 \times 10^7/\text{ml}$  に調製し、抗原刺激として生菌を加えたものと、加えない陰性コントロールを作り、 $37^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$  インキュベーターで 24 時間培養、回収した培養上清中に含まれるサイトカインを市販の ELISA キットを用いて測定した。

**倫理面への配慮** 使用する病原体については、宮崎大学の病原体安全委員会の承認を受けており、感染症法に定める基準に従って同委員会が承認した実験施設内ですべての実験を行った。マウスを用いた感染実験については、宮崎大学の動物実験委員会に実験計画を提出し、動物に対する苦痛を与えないこと、安全性に配慮し、指定された施設内で実験ならびに感染動物の飼育を行うことを条件に、病原体の使用ならびに感染実験の許可を得た。

### C. 研究結果

**J15cs 株および mc2 株の B6 マウスにおける比較：**J15cs 株も mc2 株も肝臓では増殖できず、菌は速やかに減少した (Fig.1)。J15cs 感染マウスでは感染後 1 - 2 週にかけて  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-12p70}$ 、 $\text{IL-10}$ 、 $\text{IFN-}\gamma$  の産生がみられたが、 $\text{IFN-}\gamma$  を除き 2 週目の産生量は減少した。mc2 感染マウスでも感染後 1 - 2 週にかけてこれらサイトカイン産生がみられたが、J15cs 感染マウスと異なり、 $\text{IFN-}\gamma$  を除き 2 週目のほうが 1 週目より産生量は増加した。次に肝臓における病変について比較してみると、mc2 株では感染後 24 時間以内の肝臓に好中球ならびに

マクロファージの集積像が、また J15cs 株では小壊死巣が散見された (Fig.2, a と b)。感染後 10 日目にはいずれの株を感染させたマウスにおいてもマクロファージとリンパ球を主体とした肉芽腫が多数形成されていた (Fig.2c と d)

**マウス系統間の J15cs 株に対する感受性差：**少量菌 ( $10^3\text{cfu}$ ) 感染させた場合ではいずれの系統のマウスにおいても臓器重量に変化は見られなかった。 $10^6\text{cfu}$  以上感染させた場合には *Nramp-1<sup>s</sup>* の BALB、B6 では感染後 7 - 10 日目に一過性に脾腫がみられた。一方、*Nramp-1<sup>s</sup>* の DBA では脾腫は見られなかった。同時期の肝臓には肉芽腫が形成された。で病変を比較すると C57BL よりも BALB の方が病変は小さく、数も少なかった。また DBA は BALB よりもさらに肉芽腫数は少なかった。感染後 7-10 日目をピークとしていずれの系統のマウスの肺にも病変 (軽度の細胞浸潤) がみられたが、病変の程度に差はみられなかった。興味あることに  $10^6$  感染群では、感染 1 日目から好中球やマクロファージの集積像が見られた。

### D. 考察

J15cs 株は mc2 株と同じように B6 マウス体内から速やかに排除されるが、その程度は mc2 株に比べてやや緩やかであるように思われる。肝臓における mc2 株の排除は非常に速やかで、J15cs 株の 100 倍量を感染させても 10 日目には検出限界以下となった。mc2 株は遺伝子組み換え実験における安全な宿主細胞として広く用いられているが、今回の実験においてもそのことが証明された。しかしその一方、mc2 株を大量 ( $10^8$ ) に感染させた場合は J15cs 株と同じように肝臓や脾臓に肉芽腫病変を形成することが分かった。今回は両株の菌数を揃えた感染実験を行っていないので、病原性の比較を単純に行うことはできないが、肉芽腫形成能力や  $\text{TNF-}\alpha$  や  $\text{IFN-}\gamma$  誘導能力は両株ともに保持していると思われる。J15cs 株は mc2 株と異なり、主な TLR2 リガンドの 1 つである apolar GLP (無極性糖ペプチ

ド脂質)が欠損しており、TLR2 を介したマクロファージからの TNF- $\alpha$ 産生が起こりにくいという。TNF- $\alpha$ は肉芽腫形成に重要なサイトカインであるが、今回の *in vivo* 感染系で、感染脾細胞からの TNF- $\alpha$ 産生量を見る限り、J15cs 株も mc<sup>2</sup> 株と同じく十分な TNF- $\alpha$ 誘導能力を保持していると思われる。しかしその一方で、*Nramp-1* の機能が欠損した B6 や BALB マウスは *M. avium* に感受性を示し、同遺伝子の機能が正常な DBA は抵抗性を示す。*M. smegmatis* J15cs 株をこれらマウスに感染させると、臓器内菌数の推移を指標とした場合、*M. avium* 感染のような系統差は見られず、同株による感染は *Nramp-1* による感受性/抵抗性の支配下にはないと思われる。一方、*M. avium* や結核菌含む多くの抗酸菌の感染に対して B6 は Th1 型の細胞性免疫を誘導しやすく、BALB は Th2 型の体液性免疫を誘導しやすいことが分かっており、前者は後者よりも肉芽腫形成能力に優れている。J15cs 株を感染させた BALB と B6 において、IL-12 誘導能力は後者が IL-10 誘導能力は前者のほうが優れていた。

また感染後の肝臓や脾臓に形成された肉芽腫数は B6 のほうが BALB よりも多かった。このことから *M. smegmatis* 感染においても、他の抗酸菌と同じような免疫誘導がそれぞれの系統のマウスに起こると考えられる。また *M. smegmatis* 感染では *M. avium* 感染よりも早い病理変化が見られた。すなわち mc<sup>2</sup> 株では感染後 24 時間以内の肝臓に好中球ならびにマクロファージの集積像が、また J15cs 株では小壊死巣が散見された。株による病変の違いは先に述べた菌体成分の違いによる宿主側の免疫応答性の違いを反映しているのかもしれない。この点については今後明らかにしなければならない課題である。

## E. 結論

有用なワクチン開発や抗酸菌症における肉芽腫病変形成の機序解明に資するためのマウスを用いた *M. smegmatis* 感染モデルを考案した。広く国内外で使用されている J15cs 株および mc<sup>2</sup>155 株は、大量菌を接種しても、一部脾臓で残存するのみでマウス体内でほとんど増殖せず、大部分が排除された。その一方で、両株とも感染早期に IL-12 や TNF- $\alpha$ 産生などを強く促すことで、マウスの肝臓や脾臓に肉芽腫形成を誘導し、生菌がほぼ排除された後も肉芽腫は長期間維持された。以上の結果より、J15cs 株および mc<sup>2</sup>155 株はいずれも比較的強い免疫誘導能を有することが分かった。以上の結果は、*M. smegmatis* J15cs 株および mc<sup>2</sup>155 株を感染させた B6 マウスは非結核性抗酸菌症の有用なモデルとなり得ることを示している。

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

- 1) Goto, Y. *In vitro* screening of potentially pathogenic mycobacteria isolated from environment. Forty-sixth tuberculosis and leprosy research conference, Saitama, Japan Dec. 7-9, 2011

## 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

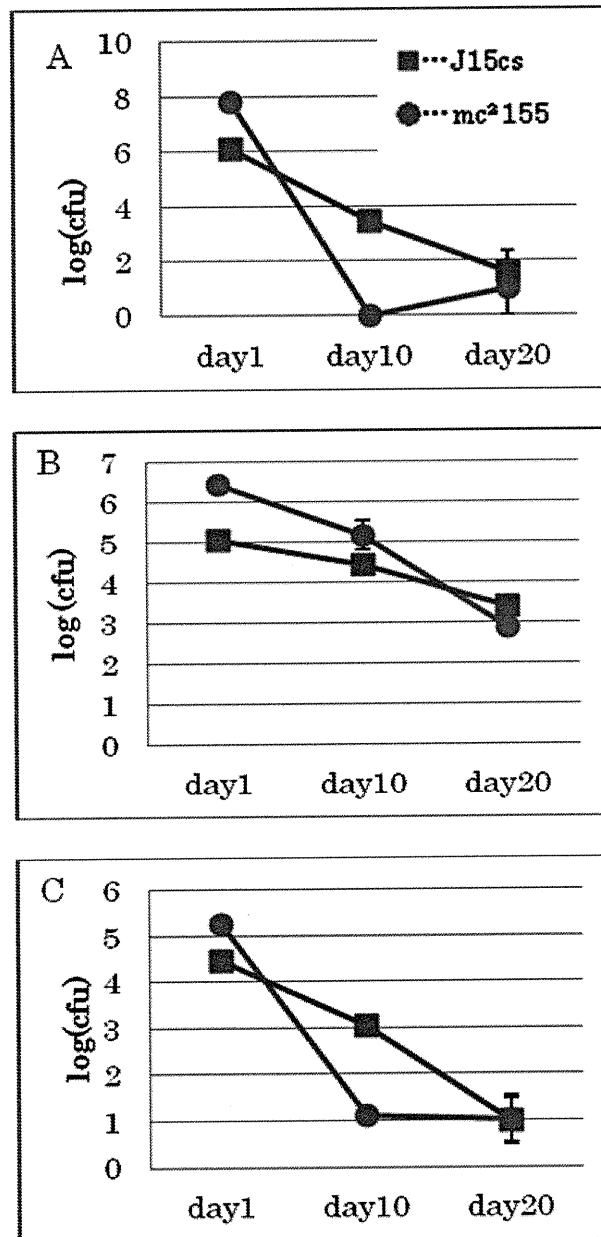


Fig.1 B6 マウスにおける臓器内菌数の推移. (A)肝臓, (B)脾臓, (C)肺. J15cs は  $10^6$ 、mc<sup>2</sup>155 は  $10^8$  を微静脈に感染させた

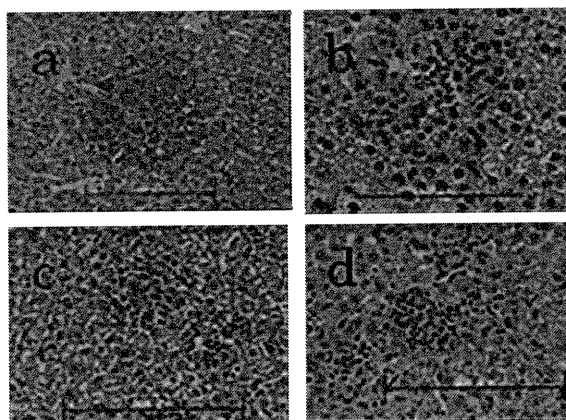


Fig.2 *M. smegmatis* 感染 B6 マウスの肝臓の病理組織像. a と c は J15cs 株を感染、b と d は mc<sup>2</sup>155 を感染させたもの、a と b は感染 1 日目、c と d は感染 10 日目の病変を示す.

平成23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）  
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.

BCG 亜株間での獲得免疫誘導能は細胞壁構成成分であるメトキシミコール酸の産生に關与する *mma3* に変異が入る以前の株が高い。

A. 研究目的

BCG ワクチンは、ウシ型結核菌の強毒株（Nocard 株）を 13 年間、230 代培養することにより弱毒化させた、生ワクチンであり、長期継代培養により BCG の形質が変化することが予想される。Behr らにより、BCG 亜株には、各国で独自に継代培養される間に変異や欠落が起こったことが報告されている。現在は毎年、凍結乾燥されたシードからワクチン製造がされるため、品質の担保がされている。世界保健機関（World Health Organization；WHO）では、BCG の有効性について、乳幼児、小児における粟粒結核の予防のために接種を推奨しているが、成人肺結核に対する予防効果については不定としている。後半の有効性不定の理由として、野外調査に使用した株、対象者の質、地域的な違いによる影響などが指摘されている。

BCG Tokyo 172 株は副作用事例が少ない優秀なワクチンであるが、他の亜株では腋下リンパ節の腫脹などの報告も複数報告されている。

安全性や品質の安定性の面から、国際参照株としてロシア、デンマーク、日本株の 3 株が WHO から選定されている。台湾、タイでは日本株が使用されており、アジア諸国の国民の結核予防に貢献している。

WHO は BCG の有効性、安全性について、科学的なデータをもとに検証を進めることを求めており、BCG 亜株間の細菌学的、免疫学的な比較研究は本邦だけでなく、アジア諸国や地球規模での感染症予防に關係する

重要な研究である。

本研究では、BCG 亜株間のワクチン能の評価指標の一つとして *in vitro* での抗原提示能の比較研究を行った。

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 株は山本三郎博士より供与された。*M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv 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。

抗原提示能の評価：マウス骨髄細胞を GM-CSF で分化させた樹状細胞を抗原提示細胞とし、BCG 添加 (MOI 10) 24 時間後、ConA で刺激した脾細胞との共培養を行った。BCG 添加 3 日後に抗原提示された T リンパ球活性化の指標として IFN- $\gamma$  と IL-12 を ELISA で測定した。

倫理面への配慮

本研究はヒト材料を用いておらず、ヒト材料の使用における倫理面の配慮は該当しない。



### C. 研究結果

*mma3*に変異が入る以前の株を前期分与株 (Russia, Moreau, Japan (Tokyo 172), Sweden, Birkhaug)、変異が入った後の株を後期分与株 (Danish, Glaxo, Mexico, Tice, Connaught, Phipps, Australia, Pasteur) を用いて比較検討を行った。各 BCG をマウス骨髄由来マクロファージに感染させて、自然免疫誘導活性に関与するサイトカインである IL-12、TNF- $\alpha$  の産生を測定したところ、前期分与株感染マクロファージからのこれらのサイトカインの産生が高いことから、前期分与株は自然免疫誘導活性が強いことが示唆された。次に、自然免疫から獲得免疫の誘導への関連性を調べるため、樹状細胞での抗原提示能について検討を行った。前期分与株刺激樹状細胞からの IFN- $\gamma$  と IL-12 の産生が高かったことから、本邦で使用されている現行の BCG ワクチン株 (Tokyo 172) を含む初期分与株の抗原提示能が優れていることが示された。

### D. 考察

BCG 亜株を細胞壁成分にあるメトキシミコール酸の有無で分類すると前期分与株は *in vitro* でのマクロファージでの自然免疫誘導能と樹状細胞の抗原提示能を強く誘導した。この活性がメトキシミコール酸であるか、否か、については今後検討する必要がある。

### E. 結論

本研究では、BCG 亜株のうち Tokyo 172 を含む初期分与株が *in vitro* で自然免疫誘導活性と獲得免疫に関与する抗原提示誘導活性が高いことが示された。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Ozeki, Y., Y. Hirayama, T. Takii, S. Yamamoto, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2011. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus

Calmette-Guérin. Vaccine, 29: 6881-6887.

- 2) Horita, Y., T. Takii, R. Kuroishi, T. Chiba, K. Ogawa, L. Kremer, Y. Sato, Y. Lee, T. Hasegawa, and K. Onozaki. 2011. Synthesis and evaluation of anti-tubercular activity of new dithiocarbamate sugar derivatives. Bioorg. Med. Chem. Lett., 21: 899-903.

#### 2. 学会発表

- 1) 谷口 恵一、瀧井 猛将、林 大介、伊藤 佐生智、矢野 郁也、山本 三郎、丸山 光生、小野 寄 菊夫. BCG の免疫持続に関する研究. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 千葉
- 2) 谷口 恵一、須田 早紀、林 大介、山本 三郎、伊藤 佐生智、瀧井 猛将、小野 寄 菊夫. 結核ワクチン株 *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo-172 I, II 型における酸化ストレスの影響 フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー. 2011 年 10 月 金沢
- 3) Ogawa, S., Takii, T., Yamamoto, R., Horita, Y., Hanamura, N., Ogawa, K., Yagi, T., Ohara, N., Goto, Y., Fujiwara, N., Maeda, S., and Onozaki, K. Production of ammonia by *Mycobacterium avium* in acidic condition. The International Union of Microbiological Societies 2011 Congress 2011 年 9 月 札幌
- 4) 長谷川 倫宏、瀧井 猛将、堀田 康弘、千葉 拓、森 雅美, Angala Shiva, Chatterjee Delphi, Dean Crick, 小野 寄 菊夫. ジチオカルバメート糖誘導体の抗結核作用に関する研究 第 23 回微生物シンポジウム. 2011 年 9 月 千葉
- 5) 谷口 恵一、林 大介、伊藤 佐生智、矢野 郁也、山本 三郎、瀧井 猛将. BCG 亜株の抗原提示能の差異に関する研究. 第 86 回結核病学会 2011 年 6 月 東京
- 6) 伊藤 佐生智、山本 龍二、堀田 康弘、小川 賢治、八木 哲也、大原 直也、瀧井 猛

将. トリ型結核菌亜種 *hominissuis* の  
アンモニア産生と宿主細胞内生存能と  
の関連性 第 86 回結核病学会 2011  
年 6 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23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）  
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 松村 隆之（国立感染症研究所・免疫部・研究員）  
研究協力者 山崎 利雄（国立感染症研究所・バイオセーフティー管理室・  
主任研究官）

研究要旨.

ストレプトマイシン依存性結核菌の起因遺伝子の解析を行なった。またストレプトマイシン依存性結核菌で認められた変異を導入した BCG を作製し、解析をおこなった。その結果、16S rRNA 塩基配列 512 位の後にシトシンの挿入がされるとストレプトマイシン耐性/依存性になること、13G あるいは 555A 変異は依存性を解除することが示された。また 13G あるいは 555A 単独変異はストレプトマイシン耐性を誘導することが示された。

A. 研究目的

結核菌の増殖を薬剤によりコントロールできれば、結核菌の細胞内動向を研究する上でたいへん有用なツールとなることが考えられる。このような菌としてストレプトマイシン依存性菌が知られており、ストレプトマイシンの存在下でのみ増殖する。18b 株は臨床分離株 H2 株から作製されたストレプトマイシン依存性菌である。この株を宿主-寄生体関係に関する実験に使用することを計画したが、その第一段階として 18b 株の遺伝学的性状を解明することを目的とした。

ところで多剤耐性結核菌（少なくともリファンピシンとイソニアジドの両剤に耐性）、超多剤耐性結核菌（リファンピシンとイソニアジドに加え二次抗結核薬のうちフルオロキノロン系製剤に耐性でかつ注射剤であるアミカシン、カナマイシン、カプレオマイシンの三剤のうち少なくとも一剤に耐性）は世界レベルでの分布を広げ、患者数を増加させており、特にインド、中国をはじめとするアジアでの増加は激しい。結

核菌の薬剤耐性 / 依存性メカニズムの解明は間接的ではあるがアジアでの結核対策に貢献するものと考えられる。

B. 研究方法

1. 使用菌株

結核菌 18b 株は国立感染症研究所保存株を使用した。また BCG Tokyo 株を使用した。これらはミドルブルック 7H9-ADC-0.05% Tween80 培地および 7H10-OADC 寒天培地を用いて培養した。なお、必要に応じてカナマイシン (20 ug/ml) およびストレプトマイシンを添加した。

遺伝子組換え実験には大腸菌 DH5alpha を用い、Luria-Bertani 培地を用いて培養した。なお、必要に応じてカナマイシンおよびカルベニシリンを添加した。

2. 遺伝子実験

記載のない限り遺伝子操作および分子生物学的手法は一般的な方法に従った。

3. 18b 株サブタイプの分離

18b 冷凍保存菌株を 7H9-ADC-0.05% Tween80 培地を用いて限界希釈し、50 ug/ml

のストレプトマイシン含有あるいは非含有 7H10-OADC 寒天培地に播種した。

#### 4. 塩基配列の決定

16S rRNA 遺伝子 *rrsA*、リボゾームタンパク質 S12 遺伝子 *rpsL*、メチレーズ *GidB* 遺伝子 *gidB* 領域を各遺伝子領域特異的プライマーを用いて PCR 法により増幅し、ダイレクトシーケンシング法により直接塩基配列の決定を行なった。

#### 5. 遺伝子変異株作製用プラスミドの構築

BCG Tokyo 株ゲノム DNA を鋳型として PCR 法で増幅した転写調節領域を含むリボゾーム RNA オペロンを大腸菌クローニングベクター-pCR-BluntII-TOPO プラスミドにクローニングした。塩基配列確認後、カナマイシン耐性遺伝子 *aphII* およびスクロース感受性遺伝子 *sacB* が挿入された pUC19 プラスミドに入れ換えた。*rrsL* 遺伝子への変異導入にはタカラバイオ PrimeSTAR Mutagenesis Basal kit を使用し、変異を導入したプライマーを用いることで行なった。

#### 6. 相同組換えによる BCG ゲノムへの変異導入

BCG ゲノムへの変異導入は 2 段階選択法に従って行なった。まず *rrsL* に変異を導入した遺伝子変異株作製用プラスミドを電気穿孔法により BCG Tokyo 株に導入した。シングルクロスオーバーによりリボゾーム RNA オペロン領域に正しく並列するように導入された株を選択、7H9-ADC-Tween80 培地で継代し、ストレプトマイシン含有あるいは非含有 7H10-OADC 寒天培地に播種した。出現したコロニーの中でゲノム内相同組換えによりもとの（野生型）リボゾーム RNA オペロンが脱落した株を選択した。

7. 寒天培地上における BCG 変異株の増殖  
BCG Tokyo 株および *rrsL* 変異導入株を 200 ug/ml 濃度のストレプトマイシン含有あるいは非含有 7H9-ADC-Tween80 培地で増殖し、段階希釈後ストレプトマイシンを 0~800 ug/ml 含有する 7H10-OADC 寒天培地に播種した。

8. 液体培地中における BCG 変異株の増殖  
BCG Tokyo 株および *rrsL* 変異導入株を 200 ug/ml 濃度のストレプトマイシン含有ある

いは非含有 7H9-ADC-Tween80 培地で増殖させ、菌液の濃度を OD 0.1 に調整後ストレプトマイシンを 0~800 ug/ml 含有する同培地で培養した。菌液の濃度を 24 時間毎に測定した。

BCG 512CC 変異導入株については 200 ug/ml 濃度のストレプトマイシン含有培地で培養後ストレプトマイシン非含有培地に培地交換を行い、その後の増殖を観察した。また、ストレプトマイシン非含有培地で培養した BCG 512CC 変異導入株を 200 ug/ml 濃度のストレプトマイシン含有培地に培地交換を行い、その後の増殖を観察した。

#### 9. 統計処理

データの解析には SPSS を使い、Tukey 試験により検定した。

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. 18b サブタイプの分離

これまでの報告によると 18b 株はストレプトマイシン非存在下では増殖しない。しかし、今回 18b 冷凍保存株を小川培地に接種したところ、菌量は大きく異なるもののストレプトマイシンの存在に関わらず増殖が観察された。このことから 18b 冷凍保存株には複数のタイプの菌が混在している可能性を考え、それらを分離することを計画した。ストレプトマイシン含有および非含有培地に 7H9-ADC-0.05% Tween80 培地で希釈した 18b 冷凍保存株を播種したところ、いずれの培地からも集落が得られた。得られた各集落の菌についてストレプトマイシン耐性に関与することが報告されている遺伝子、すなわち *rrsA*、*rpsL*、*gidB* の塩基配列を調べたところ *rrsA* のみにバリエーションが認められた。バリエーションの認められた塩基は 13 位、512 位、そして 555 位であり、その変異パターンから 3 つのグループに分類された。第 1 のパターンは 13A、512CC、555C で、既報の 18b の配列と同じであり、18b-1 とした。第 2 および第 3 のパターンはそれぞれ 13G、512CC、555C および 13A、512CC、555A であり、18b-2 および 18b-3 と