

した。なお、データベースに登録の結核菌 H37Rv 株、BCG Tokyo 株、BCG Pasteur 株はすべて 13A、512C、555C であった。

2. 7H10-OADC 寒天培地上における 18b サブタイプの増殖

得られた 18b-1 から 18b-3 のストレプトマイシン耐性および依存性を調べるためにストレプトマイシン 50 ug/ml 含有あるいは非含有 7H10-OADC 寒天培地に播種した。18b-1 はストレプトマイシン含有寒天培地上で集落を形成したが、非含有寒天培地では集落は認められなかった。しかし、18b-2 と 18b-3 はストレプトマイシン含有寒天培地上でも非含有寒天培地上でも集落を形成した。すなわち 18b-1 はストレプトマイシン耐性/依存性であるが、18b-2 と 18b-3 はストレプトマイシン耐性ではあるがストレプトマイシン依存性ではないことが示された。

3. BCG 変異株の作製と寒天培地上での増殖

以上の結果を確認するために BCG を用いて 18b サブタイプで見られた変異を導入した変異株を作製し、実験を行なった。次の 5 株を作製した。BCG 13G、BCG 512CC、BCG 555A、BCG 13G plus 512CC、BCG 512CC plus 555A であり、それぞれ名称に付した変異が導入された。

これら 5 株を 200 ug/ml 濃度のストレプトマイシン含有 7H9-ADC-0.05% Tween80 培地で培養後希釈し、0~800 ug/ml 含有の 7H10-OADC 寒天培地に播種した。BCG 512CC はストレプトマイシン非含有およびストレプトマイシン濃度 200 ug/ml 未満の寒天培地上では集落を形成しなかった。このことから 512CC 変異はストレプトマイシン耐性/依存性をもたらすことが示唆された。残りの 4 株はストレプトマイシン非含有培地上においても 800 ug/ml 濃度までのすべてのストレプトマイシン含有培地上においても集落を形成した。すなわちストレプトマイシン耐性/非依存性であることが示された。以上の結果は 18b サブタイプで得られた結果とは矛盾しない。

4. BCG 変異株の液体培地上での増殖

上記で得られた BCG 変異株 5 株をさまざ

まな濃度のストレプトマイシンを含有する 7H9-ADC-0.05% Tween80 培地で培養した。BCG 512CC はストレプトマイシン非含有培地では増殖せず、130 ug/ml 以上のストレプトマイシンを含有する培地中でのみ増殖した。BCG 13G、BCG 555A、BCG 512CC plus 555A はストレプトマイシン非含有培地中においてもストレプトマイシン含有培地中においても増殖し、しかも増殖速度はストレプトマイシンの濃度には依存しなかった。BCG 13G plus 512CC もストレプトマイシン非含有および含有培地のいずれにおいても増殖したが、その増殖速度はストレプトマイシンの濃度に依存した。

5. 培地交換による BCG 変異株の増殖への影響

BCG 512CC 変異株のストレプトマイシン依存性を確認するために更なる実験を行なった。ストレプトマイシン非含有 7H9-ADC-0.05% Tween80 培地で培養中に BCG 512CC は増殖しなかった。この菌を集菌し、ストレプトマイシン 200 ug/ml 含有培地に交換したところ、菌は増殖を始めた。次にストレプトマイシン 200 ug/ml 含有培地中で増殖中の菌を集菌、洗浄後、ストレプトマイシン非含有培地に交換したところ、5 日後に増殖は停止した。これらのことから BCG 512CC はその増殖がストレプトマイシン依存性であることが確認された。

D. 考察

ストレプトマイシン依存性は 1940 年代から知られている。結核菌 18b は 1955 年に樹立されたが、ストレプトマイシン依存性の機序は長く明らかにされていなかったが、1995 年に Honore らにより 16S rRNA の塩基配列 512 位の後にシトシンが挿入されていることを発見し、これがストレプトマイシン依存性の原因であることが推測された。しかし、この変異がストレプトマイシン依存性の原因であることの実証は今日までなされていなかった。多くの菌においてそれぞれのゲノム上にリボゾーム RNA オペロンは複数存在するが、結核菌、BCG のゲノムにはリボゾーム RNA オペロンがひとつであり、

遺伝子変異を導入することが理論的には比較的容易と考えられる。そのため、18b 株に存在する変異を明らかにし、BCG ゲノムに変異を導入することで、ストレプトマイシン依存性の原因を明らかにすることを考えた。今回作製した BCG 変異株の性状から Honore らが提唱した 512CC 変異がストレプトマイシン依存性の原因であることが実証された。

18b の塩基配列を決定する段階で 512CC 変異 (18b-1) 以外のサブタイプ 18b-2、18b-3 が存在した。これらがどのようにして生じたかは不明であるが、18b-2、18b-3 はともに 512CC 変異を含み、さらに他の変異、13G 変異あるいは 555A 変異を含むこと、また、18b-1 はストレプトマイシン耐性/依存性であるが、18b-2 と 18b-3 はストレプトマイシン耐性/非依存性であることから 18b-1 にさらなる変異 13G 変異あるいは 555A 変異が導入されて生じたことが推測される。なお、これらのことは BCG 512CC、BCG 13G plus 512CC、BCG 512CC plus 555A を使用した増殖試験の結果からも推測される。

なぜストレプトマイシン依存性になるかの分子メカニズムについては今回明らかにされなかったが、16S rRNA の変異によりリボゾームの構造が変化することは容易に推測される。このメカニズムを明らかにすることでストレプトマイシンおよびリボゾームを標的とする抗結核剤の耐性機序および新たな抗結核剤の開発に結びつくものと考えられる。

なお、13G 単独変異が抗酸菌においてストレプトマイシン耐性を誘導する報告はこれまでになく、555A 単独変異のストレプトマイシン耐性誘導は我々の知る限りすべての細菌ではじめての報告である。

E. 結論

結核菌、BCG 16S rRNA の塩基配列 512 位の後にシトシンが挿入されるとストレプトマイシン耐性/依存性になることが確認された。13G 変異あるいは 555A 変異はストレプトマイシン依存性を回避することが示された。さらに 13G 変異および 555A 変異はそれぞれ単独でストレプトマイシン耐性を付

与することが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Naka, T., S. Maeda, M. Niki, N. Ohara, S. Yamamoto, I. Yano, J. I. Maeyama, H. Ogura, K. Kobayashi, and N. Fujiwara. 2011. The Lipid Phenotype of two Distinct Subpopulations of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Tokyo 172 Substrain. J. Biol. Chem., in press.

2. 学会発表

- 1) 佐藤法仁, 中山真彰, 岡部真裕子, 小林和夫, 大原直也. 抗酸菌におけるセカンドメッセンジャーの利用. 第 81 回実験結核研究会 2011 年 6 月 東京.
- 2) 伊藤佐生智, 山本龍二, 堀田康弘, 小川賢二, 八木哲也, 大原直也, 瀧井毅将. 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 回日本結核病学会総会 2011 年 6 月 東京.
- 3) Ogawa, M., Nomoto, M., Fukuda, K., Ohara, N., Fujiwara, N., and H. Taniguchi. Characterization of a *rpoZ* mutant of *Mycobacterium smegmatis* J15cs. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September, 2011, Sapporo, Japan.
- 4) Sato, N., Ato, M., Matsumura, T., Yamazaki, T., Sekizuka, T., Kuroda, M., Nakayama, M., Kobayashi, K. and Ohara, N. Identification of the novel mutations in 16S rRNA gene of the substrains of a streptomycin-dependent *Mycobacterium tuberculosis* strain 18b which confer streptomycin resistance in *Mycobacterium*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied

- Microbiology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September, 2011, Sapporo, Japan.
- 5) Ogawa, S., Yamamoto, R., Horita, Y., Hanamura, N., Ogawa, K., Yagi, T, Ohara, N., Goto, Y., Fujiwara, N., Maeda, S. and T. Takii. Production of ammonia by *Mycobacterium avium* in acidic condition. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September, 2011, Sapporo, Japan.
- 6) Ohara N., Satoh N., Nakayama, M., Okabe, M. and K. Kobayashi. Gene expression profile of in a thymidine synthase ThyX-deletion mutant of *Mycobacterium bovis* BCG. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September, 2011, Sapporo, Japan.
- 7) Okabe, M., Ohara N., Fujiwara, N., Naka, T., Ato, M. and K. Kobayashi. Sliding-defect mutants of *Mycobacterium smegmatis* have lower ability of enter nonphagocytic cells. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September, 2011, Sapporo, Japan.
- 8) Naka, T., Maeda, S., Yamamoto, R., Niki, M., Ohara, N., Yano, I., Yamamoto, S., Maeyama, J.-I., Ogura, H. and N. Fujiwara. Comparative phenotypes in two subpopulations of bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo 172 substrain. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September, 2011, Sapporo, Japan.
- 9) 佐藤法仁, 阿戸学, 松村隆之, 山崎利雄, 関塚剛史, 黒田誠, 中山真彰, 井上哲圭, 本田尚子, 土田耕三, 小林和夫, 大原直也. Streptomycin 依存性結核菌における遺伝子変異の解明と Streptomycin 耐性を誘導する新たな遺伝子変異. 第64回日本細菌学会中国・四国支部総会 2011年10月 岡山.
- 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)

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.

非結核性抗酸菌症は 1990 年頃から世界的に感染者数が増加しており、アジア諸国においても、その重要性は今後ますます増大するものと思われる。我々はこれまでに、ヨーロッパにおいては *M. avium* 症患者分離株と家畜分離株の遺伝子型が近いのに対し、日本においては患者分離株と患者浴室分離株の遺伝子型が近いことを明らかにした。本年度は、健常人浴室環境由来株、河川水由来株ならびに韓国のヒト臨床分離株を解析対象に加えて遺伝的多様性解析を行い、*M. avium* 症感染のホットスポットについて検討をした。

M. avium subsp. *hominissuis* ヒト臨床分離株の解析から、日本と韓国には、欧米型の遺伝子型 (code type 2) に加えて、各国に特有の遺伝子型が高蔓延していることが分かった (日本-code type 15, 韓国-code type 16)。これら日韓両国で土着性の株は欧米型のものに比べて遺伝的多様性が低いことから、比較的短期間に感染拡大したものと推察された。隣接する両国で、異なる遺伝子型の株が蔓延しているという結果は、*M. avium* の感染源・感染経路が生活様式や環境により変化することを示唆しており、その要因の解明に向けたさらなる研究が必要となる。

患者浴室分離株、健常人浴室分離株、河川水分離株を解析したところ、いずれの環境においても、わが国に特有の遺伝子型 (code 15) が優先し、欧米型はほとんど分離されなかった。また、これらの株は臨床分離株と高い遺伝的相同性を示した。浴室環境は、わが国に土着性を示す株のホットスポットで有る可能性が高いと思われる。

A. 研究目的

わが国を含む先進諸国では、結核罹患率の減少に反して 1990 年頃から非結核性抗酸菌症が増加しており、社会問題化している。アジア諸国においても、その重要性は今後ますます増大するものと思われるが、感染源や感染経路が不明であるため、予防のための方策は定まっていない。本研究では、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、*M. avium* 症の発生要因の解明を目指している。これまでの研究により我々は、i) わが国では欧州諸国からの報告とは異なりブタ感染

個体のヒト感染への影響は極めて限局的であること、ii) 患者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、浴室環境が *M. avium* のリザーバーとして重要な役割を果たしていること、iii) わが国の臨床分離株・浴室環境分離株は欧米諸国とは異なる遺伝学的特徴を有していることを明らかにした。

本年度は、環境分離株とヒト臨床分離株との遺伝的関連性についてさらなる知見を得るために、健常人浴室環境分離株と自然環境(河川水)分離株を解析対象に加えて、遺伝的多様性解析を行った。さらに、アジアでの *M. avium* 症の発生要因を考察するた

めに、韓国のヒト臨床分離株の解析を行った。

B. 研究方法

1. 供試菌株

a) ヒト臨床分離株：韓国の9都市で分離されたヒト臨床分離株 78 株。

b) 健常人浴室分離株：7 家族 9 か所から分離した合計 117 株から、各サンプリング地点における同一遺伝子型株を除いた 17 株。

c) 河川水分離株：2 河川水サンプルから分離した合計 16 株から、各サンプリング地点における同一遺伝子型株を除いた 6 株。

上記分離株に、前年度の解析に使用したヒト臨床分離株(日本人)146 株、患者浴室環境分離株 37 株、ブタ由来分離株 75 株のデータを加えて解析を行った。

2. *hsp65* の塩基配列による亜分類と *ISMav6* の検出

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。*ISMav6* の挿入の有無は下記プライマーを用いて PCR にて検出した。

ISMav6_F: 5'- TAC CGG TCG GAT CTG ATG ACG (position, 638-658) 、
ISMav6_R: 5'- AGT GTG ATT GTC TGG CCG GCC (Position, 909-889)。

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 (MST, 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* 遺伝子の code type 別分布と *ISMav6* 保有率

1-1. *M. avium* subsp. *hominissuis* ヒト由来株の日韓比較

韓国のヒト由来株は、*hsp65* 遺伝子の code type 16 が優先するという特徴を認めた(表 1)。この遺伝子型はわが国ではまれなタイプであり、韓国の *M. avium* 症患者に特徴的なものといえる。一方、わが国に特徴的な code type 15 は韓国ではマイナーな存在であった。欧米型の遺伝子型 (code type 2) は、日本、韓国いずれにおいてもヒト臨床分離株から高頻度に検出され、世界的に蔓延している遺伝子型であると思われる。

本邦分離株の特徴として報告されている *ISMav6* 保有株が韓国株でも検出された。*ISMav6* 保有株の分離比率は全体の 55% であり、わが国のヒト由来株とほぼ同じ分離比率であった(表 1)。

1-2. *M. avium* subsp. *hominissuis* 患者浴室分離株と健常人浴室ならびに河川水分離株との比較

これまでに我々は、患者浴室から *M. avium* subsp. *hominissuis* が高頻度で分離され、それらが臨床分離株と高い遺伝的関連性を示すことを報告した。浴室環境に定着した *M. avium* への暴露が *M. avium* 感染・発病のリスクであることを示唆しているが、浴室環境定着株の由来が患者による持ち込みなのか、水系環境由来なのかの疑問が残る。この点を考察するために、本研究では、健常人の浴室環境ならびに河川水から分離した株と患者浴室分離株、ヒト臨床分離株との比較を行った(表 1)。ヒト臨床分離株は code type 2 と 15 の 2 つの遺伝子型が優先した。これに対して、環境分離株は、患者浴室、健常人浴室、河川水いずれも code type 15 のみが優先し、code type 2 の分離比率は低かった。つまり、患者浴室環境からの分離株の遺伝子型別分布は、ヒ

ト臨床分離株での分布とは異なり、健常者浴室環境からの分布に類似した。このことは、患者浴室環境から分離された株の起源は水系環境に由来するものであり、浴室環境での本菌への暴露が *M. avium* 感染・発病のリスクとなりうることを示唆するものである。また、code type 15 の遺伝子型はヒト、環境いずれの分離株においても ISMav6 の保有率が高いことから、ISMav6 を有する code type 15 の菌株は、浴室環境を介した感染経路におけるハイリスク株として注意する必要があるかもしれない。

2. VNTR による多様性解析

ヒト臨床分離株（日本・韓国）、患者浴室分離株、健常人浴室分離株、河川水分離株で得られた VNTR プロファイルに基づき、MST を描写したところ、遺伝的関連性の高い株で形成されるグループ、すなわち clonal complex が 2 グループ認められた。分離株の由来に関わらず、ほぼすべての株は、これら 2 つの clonal complex に含まれた。各 clonal complex の構成は、わが国に土着性を示す code type 15 からなる branch、韓国株の特徴である code type 16 からなる branch、さらに、code type 2 を主とする複数の branch に大別された。Code type 15, 16 に属する株は遺伝的多様性が code 2 に比べて低いことから、各地域（日本、韓国）において比較短期間の間にヒトへの感染が広まったのではないかと推察される。一方、環境分離株（患者浴室、健常人浴室、河川水）では分離由来を反映した特定の branch は認められず、モザイク状に各株が存在し、かつ、ヒト臨床分離株と高い相同性を示した。環境由来株がヒトへの感染源になっていることを反映しているものと思われる。

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。我々はこれまでに、ヨーロッパにおいては *M. avium* 症患者分離株と家畜分離株の遺伝子型が近いのに対し、日本においては患者分離株と患者住居分離株の遺伝子型が近いことを明らかにした。

本年度は、環境分離株とヒト臨床分離株との遺伝的関連性についてさらなる知見を得るために健常者浴室分離株と河川水分離株の解析を行った。さらに、アジアでの *M. avium* 症の発生要因を考察するために、韓国のヒト臨床分離株の解析を行った。本年度の研究により新たに以下の点を解明した。

- 1) 患者浴室環境からの分離株の遺伝子型別分布は、ヒト臨床分離株での分布とは異なり、健常者浴室環境や河川水からの分離株の分布に類似した。このことは、患者浴室環境から分離された株の起源は患者由来というよりも、水系環境に由来するものであり、浴室環境の患者発生への関与を示唆するものである。
- 2) 環境分離株のほとんどはわが国に土着性を示す遺伝子型（code type 15）であり、浴室環境は、この遺伝子型のホットスポットとしてヒトへの感染源になっているものと思われる。
- 3) 韓国のヒト臨床分離株では、わが国とは異なる遺伝子型の *M. avium* subsp. *hominissuis* が高頻度に検出された。世界的にもほとんど報告例のないものであり、韓国に土着性の株が存在するものと思われる。
- 4) わが国と韓国それぞれの地域で土着性を示す株は、世界的な蔓延が疑われる code type 2 の株に比べて遺伝的多様性が低く、比較的短期間に感染が拡大したものであることが VNTR のデータから推察される。

わが国と同様に、韓国においても土着性を示す株が *M. avium* 症患者に蔓延しているのは、本症の地域性を考える上で興味深

い。*Hsp65* 遺伝子の SNP typing により両者は区別されるが、ともに、*ISMav6* の保有率が高く、遺伝的多様性が低いという共通性も認められる。多様性が低いのは、比較的短期間に感染拡大が起こったためではないかと推察される。わが国に土着性を示す株は、今回調査した3つの環境(患者浴室、健常人浴室、河川水)で高頻度に分離されており、患者由来株との遺伝的相同性も高かった。このことから、浴室環境が感染のホットスポットになっているものと考えられる。近年の *M. avium* 症患者増加の原動力の一つになっているかもしれない。一方、欧米で分離報告の多い code type 2 に属する株が日韓両国でもヒト臨床分離株から高頻度に分離された。しかしながら、この遺伝子型は、環境サンプルからはほとんど分離されなかったことから、今回対象とした水系のサンプル以外にホットスポットとなりうる環境が存在するものと思われる。本研究により、日韓両国には、それぞれに特有の *M. avium* subsp. *hominissuis* がヒトに蔓延していることが明らかになった。わが国においては、その感染源として浴室環境が強く示唆された。近接する両国で、異なる遺伝子型の株が蔓延しているという結果は、*M. avium* の感染源・感染経路が生活様式や環境により変化することを示唆しており、その要因の解明に向けたさらなる研究が必要となる。

E. 結論

我々はこれまでに、患者浴室分離株とヒト臨床分離株との比較から浴室環境が *M. avium* 感染のホットスポットである可能性を見出してきた。本研究では、この可能性をさらに検証するために、健常人浴室分離株と河川水分離株を解析対象に加えて、遺伝的多様性解析を行った。また、アジアでの *M. avium* 症の発生要因を考察するために、韓国のヒト臨床分離株の解析を行った。

環境分離株(患者浴室、健常人浴室、河川水)とヒト臨床分離株の比較から、浴室環境は、本邦に特徴的な遺伝子型を示す株(土着性の株)のホットスポットであること

が明らかとなった。一方、臨床分離株において優先するもう一つの遺伝子型 (code type 2) は、いずれの環境においても分離比率が低く、浴室以外に感染源が存在するものと思われる。韓国のヒト臨床分離株の解析により、日韓両国には、それぞれに特有の *M. avium* subsp. *hominissuis* がヒトに蔓延していることが明らかになった。わが国においては、その感染源として浴室環境が強く示唆された。近接する両国で、異なる遺伝子型の株が蔓延しているという結果は、*M. avium* の感染源・感染経路が生活様式や環境により変化することを示唆しており、その要因の解明に向けたさらなる研究が必要となる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwamoto, T., C. Nakajima, Y. Nishiuchi, T. Kato, S. Yoshida, N. Nakanishi, A. Tamaru, Y. Tamura, Y. Suzuki, and M. Nasu. 2011. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* strains isolated from human, pigs, and human living environment. *Infect. Genet. Evol.*, in press.

2. 学会発表

- 1) Iwamoto, T., C. Nakajima, T. Kato, Y. Nishiuchi, S. Yoshida, N. Nakanishi, Y. Suzuki, and M. Nasu. Genetic relatedness of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* strains isolated from human, swine, and environment. 4th Congress of European Microbiologists FEMS 2011, June 26-30, 2011, Geneva, 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

表1. *M. avium* subsp. *hominissuis* の分離由来別hsp65 code type 分布とISMav6の保有率

hsp65 code	Human		Environment			Pig (n=75)	Turenne et al.	Alvarez et al.
	Japan (n=146)	Korea (n=78)	Patients (n=37)	Healthy (n=18)	River (n=6)		USA/Canada	Spein
Code 1	7	0	0	0	0	57	9	7
Code 2	63	27	9	2	0	10	11	26
Code 3	1	5	0	0	0	2	5	1
Code 7	0	2	0	0	0	0	0	0
Code 9	4	0	0	0	0	1	0	0
Code 15	50	10	24	13	6	0	0	1
Code 16	9	30	1	0	0	0	0	0
Code 17	8	0	2	3	0	2	0	0
Code N1	1	0	0	0	0	3	0	0
Code N2	2	1	1	0	0	0	0	0
Code N3	1	0	0	0	0	0	0	0
Code N4	0	2	0	0	0	0	0	0
Code N5	0	1	0	0	0	0	0	0
% ISMav6	61%	55%	86%	100%	67%	0%	0%	0%

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)

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・第二室長）
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 星野仁彦（国立感染症研究所・感染制御部・第六室長）

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。ヒトにおけるハンセン病の病態は、らい菌が増殖する LL 型から菌が稀にしか見られない TT 型まで様々である。らい菌は培養できないため、宿主細胞であるマクロファージ内での増殖、若しくは排除される機構について不明な点が多い。我々は、*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調べたところ、IFN γ 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、殺菌分子として知られている活性酸素を産生する phox タンパクが、らい菌周囲に集積していることが分かった。また、IFN γ により活性化したマウスマクロファージにおいても phox タンパク発現増強と共に抗酸菌に対する抗菌活性が高まっていることがわかった。これらの観察結果から、phox タンパクがらい菌など抗酸菌に対する殺菌機構に大きく関わっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒトにおけるハンセン病の病態は様々である。らい菌に対する免疫応答の違いが大きな要因となって、細胞内寄生菌として宿主細胞であるマクロファージ内でらい菌が増殖する場合（LL 型）と、菌が稀にしか見られない場合（TT 型）がある。菌の増殖にはマクロファージの活性化が大きく関与していると思われるが、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血清不含 RPMI1640 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、ガラスのカバースリップを入れた 24 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結核菌などの感染：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、結核菌 H37Rv や *M. avium complex* (MAC) 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：1-¹⁴C-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：らい菌や抗酸菌を感染させたマクロファージが張りついている 8 ウェルチェンバースライド、もしくはカバースリップをメタノールで迅速処理した後、oregon green もしくは auramine を添加して菌を蛍光標識した。さらに抗 phox 抗体とインキュベートし、洗浄後 Alexa633 標識二次抗体を反応させ多重染色を行った。同時に Hoechst33342 による核酸染色も行った。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。また、細胞内に存在している菌を cyano-tetrazolium chloride (CTC) と共にインキュベートし、呼吸代謝により蛍光発色した CTC を保有している菌を生菌として評価する生菌鑑別法も併用した。

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、IFN γ 存在下でoregon greenで標識したらい菌を添加し貪食させた後、48時間培養した。メタノールによる固定後、phoxサブユニットタンパクp22とp47に対する2種の抗体で多重染色を施し共焦点レーザー顕微鏡で観察した。元のイメージはカラーでありグレースケール変換した本イメージでは分らないが、矢印部分では赤色のp22と青色のp47、そして緑色のらい菌が同一場所に認められた (Fig. 1)。一方、対照マクロファージではphoxの発現量は低く、らい菌周囲へのphoxタンパクの集積も少なかった。また、昨年度の本報告と同様な方法で、解析ソフトウェアにより各色の蛍光強度を数値化してヒストグラム表示したところIFN γ 刺激マクロファージにおいて菌周囲への各phoxタンパクの著明な集積がみられた。

次にCTCを用いてマクロファージ内に存在している抗酸菌の生存の程度を調べた。

マウス腹腔マクロファージに結核菌 H37Rv を IFN γ 存在下で貪食させ 2 日間培養した。そして、CTC を加え 2 時間培養した後共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、対照培養では蛍光を発していた菌が多くみられたが、IFN γ 処理した細胞内結核菌の発色はほとんどみられなかった (Fig. 2)。同様に、ヒトマクロファージに *M. avium complex* を貪食させ IFN γ 存在下で 7 日間培養した後 CTC を加えてみた結果が Fig. 3 である。IFN γ 非存在下では蛍光を発している菌がみられるのに対し、IFN γ 刺激した細胞内には発色した菌が少なかった (Fig. 3)。さらに、Hoechst 色素による核酸染色により、IFN γ 刺激した細胞内の菌が多く染まっていることから死菌となって菌体内の核酸が露出している可能性が示唆された。

D. 考察

らい菌は培養できないためアルマジロかヌードマウスに接種して in vivo で増殖させて得るが、我々はヌードマウスフットパッドで増殖した 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 \cdot 刺激したヒトマクロファージの抗らい菌活性発現 (らい菌の代謝低下) を認めている。殺菌にかかわる分子として活性酸素 (ROS) や酸化窒素 (NO) が知られている。ROS は従来細胞毒として宿主に悪影響を与えると考えられていたが、近年微生物を殺菌する免疫機構の一つとして認識されている。ROS を供給する主要な機構の一つに NADPH オキシダーゼ (Nox) 酵素による機序がある。このうち Nox2 による殺菌機構は比較的解明が進んでいる。Nox2 は、定常 (休止) 状態では不活性型であるが細菌貪食やサイトカイン刺激により活性化され、NADPH を用いて酸素から活性酸素への化学反応を触媒する。その結果生成された活性酸素が強力な殺菌分子として作用することになる。Nox2 による活性化には、ファゴゾーム膜上の gp91^{phox} と p22^{phox} に、細胞質由来の p40^{phox}、p47^{phox}

、Rac2 等の会合が必要である。われわれの観察結果ではヒト M-マクロファージの

IFN γ 刺激でこれら phox タンパクが細胞内で著明に増加し、さらにらい菌周囲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。そして、TT 型ハンセン病にみられるような IFN γ 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。CTC は呼吸している生菌により還元反応を受けると蛍光を発するので、細胞内に存在する菌の生死判別に用いることができる。今回の実験では IFN γ で刺激したヒトやマウスのマクロファージ中の結核菌や MAC の代謝活性が失われていることから、抗菌活性が誘導されていることが判明した。らい菌を感染させたマクロファージでも同様な結果が得られている（データは示していない）。今後、phox の細胞内局在と菌の CTC 還元反応による蛍光分子生成を共焦点レーザー顕微鏡で詳細に調べることで、NOX の殺菌作用への関わりがより詳細に解明できると思われる。

E. 結論

IFN γ によりヒトマクロファージに抗らい菌活性が誘導され、活性酸素を産生する NADPH オキシダーゼを構成する各 phox タンパクの発現が増強して、らい菌周囲へのこれらタンパクの集積がみられた。共焦点レーザー顕微鏡を利用した観察で、結核菌など他の抗酸菌に対する抗菌活性も IFN γ で増強していることが明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukutomi Y., Y. Maeda, and Makino M. 2011. Apoptosis-inducing activity of clofazimine in macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55: 4000-4005.

2. 学会発表

- 1) 福富康夫, 前田百美, 松岡正典, 牧野正彦. ハンセン病におけるマクロファージのらい菌に対する殺菌機構の解明. 第84回日本ハンセン病学会総会 2011年 5月 岡山
- 2) 向井 徹, 松岡正典, 前田百美, 宮本友司, 福富康夫, 牧野正彦. 蛍光蛋白発現らい菌構築のための検討. 第84回日本ハンセン病学会総会 2011年 5月 岡山
- 3) Mukai, T., M. Matsuoka, Y. Maeda, Y. Miyamoto, Y. Fukutomi, and M. Makino. Identification of novel promoter of mycobacteriophage TM4 to obtain fluorescent- *Mycobacterium leprae*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 4) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Characterization of intracellular metabolites from *Mycobacterium leprae*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 5) Maeda, Y., T. Tamura, M. Kai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Induction of intracellular killing of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells by a lipopeptide-mediated activation of T cells. 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 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- γ -stimulated M-macrophages

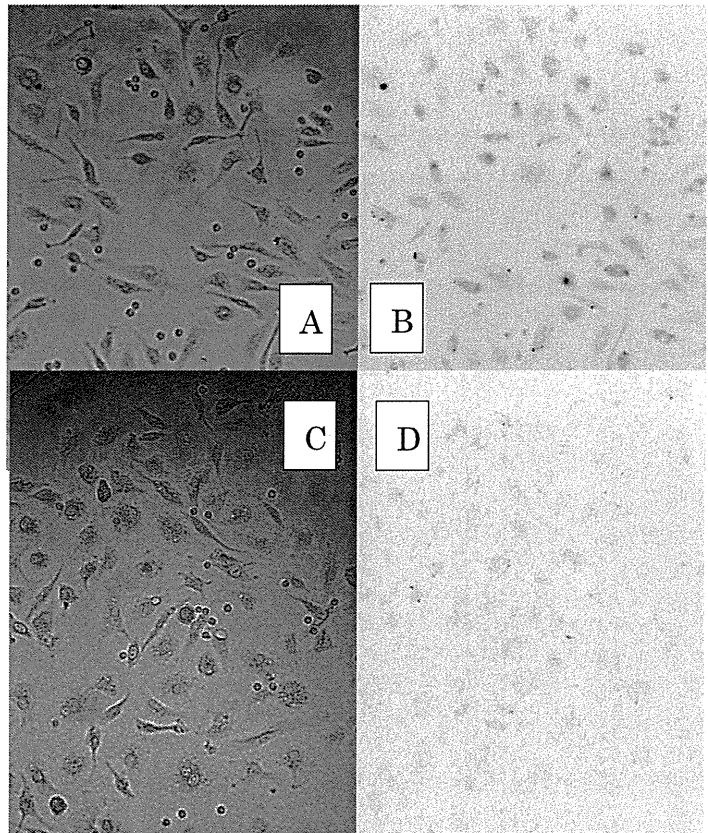


Fig.2. Effect of IFN γ on viability of *M. tuberculosis* in mouse macrophages (A and C; phase contrast image of control and IFN γ macrophages, respectively; B and D; CTC fluorescence in control and IFN γ macrophages, respectively.)

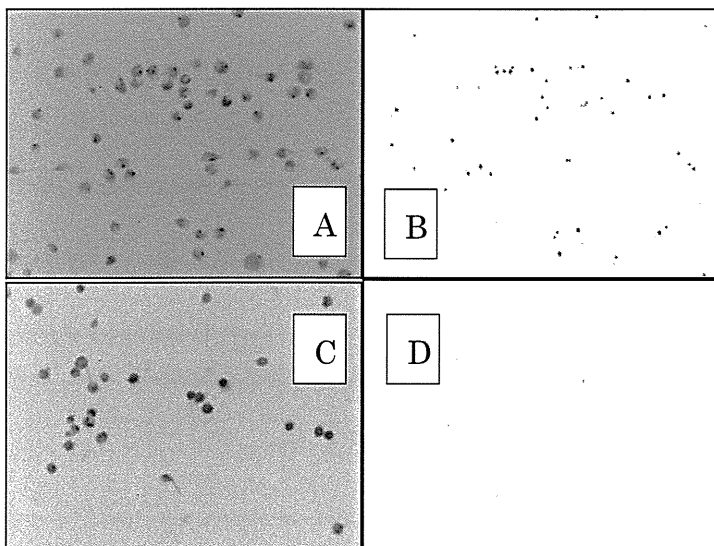


Fig.3. Effect of IFN γ on viability of *M. avium compes* in human macrophages (A and C; phase contrast image of control and IFN γ -treated macrophages, respectively. B and D; CTC fluorescence in control and IFN γ -treated macrophages, respectively.)

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)

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) キラーT 細胞から産生される 15kD の結核菌殺傷蛋白 Granulysin 及び Granulysin DNA を用いて新しい結核治療ワクチン開発が進展した。また Granulysin 自身がキラーT 分化誘導作用を発揮することを見出し、この機構を解析した。
- (2) アジア諸国では多剤耐性結核や超薬剤耐性結核が大きな問題となっており、これらの治療に HSP65+IL-12DNA ワクチンや Granulysin ワクチンが有効である可能性が示唆された。
- (3) 新しい結核治療ワクチン Granulysin ワクチンをカニクイザルモデルを用いて開発した。結核感染させたカニクイザルに、1ヶ月後に HVJ-エンベロープ/15K Granulysin DNA ワクチンを治療投与 (i.m) した。その結果、長期間（1年間）における生存率の改善効果をコントロール群に比較して認めた。
- (4) 15K Granulysin DNA ワクチンはカニクイザルの実験モデルにおいても末梢血 T 細胞の結核菌抗原タンパクに対する増殖を増強した。
- (5) 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マウスに対しても結核治療効果を発揮した。肺臓・肝臓・脾臓の結核菌数減少効果を示した。Granulysin は IL-23 と相乗的結核治療効果（結核菌数減少）を発揮した。また、Granulysin は IL-6 や IL-27 と相乗的結核治療効果を発揮した。さらに、15K Granulysin は IL-6、IL-23 と各々キラーT 細胞分化誘導増強作用においても相乗効果を示した。リコンビナント 15K Granulysin は *in vitro* 及び *in vivo* 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発揮することを発見した。
- (6) HVJ-エンベロープ/HSP65+IL-12DNA ワクチンは INH (Isoniazid) と相乗的治療効果を示した。マウスの結核菌エアロゾル感染の系で、このワクチンと INH の併用治療群は肺の結核菌数の相乗的抑制効果を示した。このワクチンは i.m (筋肉内) 投与よりも i.d (皮内) 投与の方がマウスの系で治療効果がより強力であることを明らかにした。この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、ワクチン接種サルの PBL からの IFN- γ 産生量と結核ワクチン予防効果が相関することを明らかにした。一方、この治療ワクチン効果は IL-2 産生と相関した。
- (7) キラーT 細胞より産生される Killer-specific secretory protein 37 (Ksp37) が結核免疫に関与することを明らかにした。結核患者の血清中では Ksp37 の低下を認めた。さらに、リコンビナント Ksp37 蛋白を作製し、Ksp37 はマウスの系でキラーT 細胞の分化を誘導した。Granulysin と分化相乗効果を発揮した。また、Ksp37 は IL-2、IFN- γ 、

IL-6の産生を増強した。Granulysin DNA ワクチンと Ksp37 DNA ワクチンは *in vivo* キラーT細胞分化相乗効果を示した。さらに Ksp37 遺伝子導入マウスを作製し、このマウスは結核感染抵抗性で生体内抗結核効果を発揮した。

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。特にアジア諸国においては、多剤耐性結核や超薬剤耐性結核が問題となっている。

したがって、

1. 平成 23 年度における具体的研究実施計画

- ① キラーT細胞から産生される結核菌殺傷蛋白 Granulysin 及び Granulysin DNA を用いて新しい結核治療ワクチンを開発する。また Granulysin 自身がキラーT分化誘導作用を発揮することを見出したが、この機構を解明する。さらに、Granulysin と相乗効果を発揮する Ksp37（キラーT細胞から産生）についてのワクチン効果を解析する。
- ② ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルモデルを用いて結核予防・治療効果を示した、HVJ-エンベロープ/HSP65+IL-12DNA ワクチンのT細胞免疫活性化機構の解明。

2. 平成 23 年度におけるアジア諸国の感染症研究への協力事項

アジアで大問題の多剤耐性結核の治療ワクチン共同研究。

を研究目的とする。

B. 研究方法

- (1) カニクイザルにヒト結核菌 Erdman 株を経気道投与した。その4週間後より6回、2週間毎にHVJ-エンベロープ/15K

Granulysin DNA ワクチン (Granulysin DNA 400ug/サル/回) 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4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。さらに血清中のIFN- γ 、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 (10ug/ml)、PPD (10ug/ml)、結核死菌H37Ra (10ug/ml) 及びPHA-P (0.2%) で刺激し、3日間培養した培養上清中のサイトカインを測定した。

- (2) 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、 5×10^5 /mouseを*i. v.*投与した後、Granulysinワクチン、IL-23 ワクチン、IL-27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。
- (3) Granulysin transgenic (Tg) マウスを用い、Granulysinの結核治療効果を解析した。
- (4) キラーT細胞から産生されるKsp37のcDNAとCAGベクターを用いKsp37 Tgマウスを作製した。このKsp37Tgマウスを用い、Ksp37の結核治療効果を解析した。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。

(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員会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名により構成され、倫理面には十分な配慮をしている。

C. 研究結果

- (1) カニクイザルモデルを用いた、新しい結核治療ワクチン（Granulysinワクチン）の開発：結核感染させたカニクイザルに、1ヶ月後にHVJ-エンベロープ/15K Granulysin DNAワクチンを治療投与（i.m）した。その結果、長期間（1年間）における生存率の改善効果をコントロール群に比較して認めた。すなわち1年後（365日後）の生存率はGranulysin DNAワクチン投与群では25%であったが、コントロール群では0%（全頭死亡）であった。
- (2) Granulysin DNAワクチン治療カニクイザルは末梢血T細胞の結核菌抗原に対する増殖反応を増強した。15K Granulysin DNAワクチンで6回治療を受けたサルのパル（PBL）をHSP65抗原で刺激し、³H-TdR取り込みで判定した。その結果コントロールの生食投与群に比較して、有意差（ $P < 0.05$ ）をもって、15K Granulysin DNAワクチン投与群がPBLの増殖増強を示した。
- (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-23ワクチン又はIL-27ワクチン又は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。
- (4) 15K GranulysinのキラーT細胞分化因子の役割とIL-23、IL-27、IL-6との相乗効

果：

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発揮した。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された。

同様にヒト末梢血T細胞のin vitroの系においても、Granulysinは抗原特異的キラーT細胞を誘導増強した。in vivoの系においてもGranulysinは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。

さらに、15K GranulysinはIL-6、IL-23、IL-27と各々キラーT細胞分化誘導増強作用においても相乗効果を示した。

- (5) HVJ-エンベロープ/HSP65+IL-12DNAワクチンはINHと相乗的治療効果を示した。マウスの結核菌エアロゾル感染の系で、このワクチンとINH（Isoniazid）の併用治療群はINH単独投与群やワクチン単独投与群に比較して肺の結核菌数の相乗的抑制効果を示した。このHSP65+IL-12DNAワクチンはi.m（筋肉内）投与よりもi.d（皮内）投与の方がマウスの系で治療効果がより強力であることを明らかにした。

HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンの結核予防効果において、カニクイザルのモデルで、ワクチン接種サルのPBLからのIFN- γ 産生量及びIL-2産生量と結核ワクチン予防効果が相関することを明らかにした。BCGプライム-HSP65DNA+IL-12DNAワクチンブースト群では1年以上100%生存の結核予防ワクチン効果を発揮したが、この群ではPBLのIFN- γ 産生及びIL-2産生量（HSP65抗原、結核死菌H37Ra抗原に対し）が最も増

強していることを明らかにした。(BCG 単独投与群や生食投与群に比較して)。一方、HSP65DNA+ IL-12DNAワクチンは著明な結核治療効果を発揮したが、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。

- (6) キラーT細胞より産生されるKiller-specific secretory protein 37 (Ksp37)が結核免疫に関与することを明らかにした。結核患者の血清中ではKsp37の低下を認めた。さらに、リコンビナントKsp37蛋白を作製し、Ksp37はマウスの系で*in vitro*キラーT細胞の分化を誘導した。Granulysinと分化相乗効果を発揮した。また、Ksp37は*in vitro*の系でT細胞からのIL-2、IFN- γ 、IL-6の産生を増強した。また、Ksp37 DNAワクチンは*in vivo*キラーT細胞分化を誘導した。Granulysin DNAワクチンとKsp 37 DNAワクチンは*in vivo*キラーT細胞分化相乗効果を示した。さらにKsp37遺伝子導入マウスを作製した。このKsp37 Tgマウスは結核感染抵抗性で生体内抗結核効果を発揮した。結核菌エアロゾル感染後(2週間後)の肺臓の結核菌数の減少がコントロール群に比較して認められた。

D. 考察

- (1) GranulysinワクチンやHSP65+IL-12DNAワクチンはヒトの結核感染に最も類似のカニクイザルモデルを用い、強力な結核治療ワクチン効果を示した。したがって、これらの治療法はアジア諸国で大きな問題となっている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による結核治療効果に関して、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発揮されることも示唆された。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、共同研究でこのレセプター解析を行いつつある。

- (3) キラーT細胞からGranulysinのみでなくKsp37も分泌される。このKsp37の生理学的機能や免疫学的機能は不詳である。我々はリコンビナントKsp37蛋白及びKsp37 DNAワクチンを作製した。これらを用い、Ksp37はキラーT細胞分化誘導作用を發揮することを明らかにした。さらに、Granulysinと相乗的キラーT分化誘導効果を發揮することを明らかにした。Ksp37 Tgマウスを作製し、結核治療ワクチンとしてKsp37は有用であることが示唆された。

E. 結論

- (1) Granulysinワクチンはマウスのみでなくカニクイザルの系においても強力な結核治療効果を発揮した。このワクチン効果はマウスではキラーT細胞を分化させる機能を有することにより發揮されることが示唆された。
- (2) 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。IL-6、IL-23、IL-27ワクチンとGranulysinワクチンは各々相乗的結核治療効果を示した。結核治療効果とキラーT細胞分化誘導効果との関連が示された。
- (3) HSP65+IL-12DNAワクチンはINHと相乗的治療効果を示した。マウスの結核菌エアロゾル感染の系で、このワクチンとINHの併用治療群は肺の結核菌数の相乗的抑制効果を示した。このワクチンは*i. m*投与よりも*i. d*投与の方がマウスの系で治療効果がより強力であることを明らかにした。
- (4) キラーT細胞より産生されるKsp37が結核免疫に関与することを明らかにした。Ksp37はマウスの系でキラーT細胞の分化を誘導した。Granulysinと分化相乗効果を発揮した。Granulysin DNAワクチンとKsp37 DNAワクチンは*in vivo*キラーT細胞分化相乗効果を示した。

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, D. N. McMurray, and M. Sakatani. 2011. Novel prophylactic vaccine using a prime-boost method and hemagglutinating virus of Japan-envelope against tuberculosis. Clin. Dev. Immunol., 2011:ID 549281, 11 pages.
- 2) Pitabut, N., S. Mahasirimongkol, H. Yanai, C. Ridruechai, S. Sakurada, P. Dhepakson, P. Kantipong, S. Piyaworawong, S. Moolphate, C. Hansudewechakul, N. Yamada, N. Keicho, M. Okada, and S. Khusmith. 2011. Decreased plasma granulysin and increased interferon-gamma concentrations in patients with newly diagnosed and relapsed tuberculosis. Microbiol. Immunol., 55(8): 565-573.

2. 学会発表

- 1) Okada M. A Novel Therapeutic Vaccine (HVJ-Envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNA) Against Tuberculosis Using the Cynomolgus Monkey Model. Gordon Research Conferences, 3-8 Jul, 2011, Lucca, Italy.
- 2) M Okada, Y Kita, N Kanamaru, S Hashimoto, S Nishimatsu, T Nakajima, Y Kaneda, P Saunderson, E V. Tan, D McMurray. A Novel Therapeutic Vaccine (HVJ-Envelope/HSP65 DNA+ IL-12 DNA) against Tuberculosis by the Augmentation of Immune Responses Using Monkey Models. 51th ICAAC

(Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy), 17-20 Sep, 2011, Chicago, USA.

- 3) Okada M. A novel therapeutic and prophylactic vaccines against tuberculosis by the activation of CTL in monkey models and murine models. Phacilitate vaccine forum, 19-21 Sep, 2011, Singapore.
- 4) M Okada, T Nakajima, Y Kaneda, P Saunderson, E V. Tan. A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccines against Tuberculosis Using the Cynomolgus Monkey Model and Mouse Model. 5th Vaccine and ISV Annual Global Congress, 2-4 Oct, 2011, Seattle, USA.
- 5) M Okada, Y Kita, N Kanamaru, S Hashimoto, T Nakajima, Y Kaneda, P Saunderson, E V. Tan. Novel therapeutic vaccines against tuberculosis using the cynomolgus monkey model. 42th IUATLD (The International Union Against Tuberculosis and Lung Disease), 11-15 Nov, 2011, Lille, France.
- 6) 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、林清二、金田安史、E. V. Tan, E. C. Dela Cruz, Paul Saunderson, 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と免疫機構解析. 第51回日本呼吸器学会学術講演会. 2011年4月22・23日 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