

201123042A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

潜在性抗酸菌感染症の病態機構の解明及び
診断・治療・予防に関する研究

(H23-新興-一般-008)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 和 夫

平成24 (2012) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

潜在性抗酸菌感染症の病態機構の解明及び
診断・治療・予防に関する研究

(H23-新興-一般-008)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 和 夫

平成24 (2012) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
潜在性抗酸菌感染症の病態機構の解明及び診断・治療・ 予防に関する研究	1
小林 和夫	
II. 分担研究報告書	
長期保存結核菌株の細菌学的解析	11
御手洗 聡	
結核菌の新規病原因子に関する分子生物学的解析	17
松本 壮吉	
休眠結核菌の糖脂質代謝と免疫応答に関する研究	23
杉田 昌彦	
休眠期結核菌由来遺伝子を用いたワクチンの開発研究	27
小出 幸夫	
持続潜伏性肺非結核性抗酸菌症（MAC 症）の新規血清 診断法の開発	31
前倉 亮治	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷	39

I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書-平成 23 年度

潜在性抗酸菌感染症の病態機構の解明及び診断・治療・予防に関する研究
(H23-新興-一般-008)

研究代表者	小林 和夫	(国立感染症研究所・免疫部・部長)
研究分担者	御手洗 聡	(結核研究所・抗酸菌レファレンス部・部長)
研究分担者	松本 壮吉	(大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・准教授)
研究分担者	杉田 昌彦	(京都大学ウイルス研究所・細胞制御研究分野・教授)
研究分担者	小出 幸夫	(浜松医科大学・理事、感染症学・教授)
研究分担者	前倉 亮治	(国立病院機構刀根山病院・副院長)
研究協力者	阿戸 学	(国立感染症研究所・免疫部・第二室長)
研究協力者	松村 隆之	(国立感染症研究所・免疫部・第二室研究員)
研究協力者	岡部 真裕子	(国立感染症研究所・免疫部・第二室研究員)
研究協力者	高橋 宜聖	(国立感染症研究所・免疫部・第四室長)
研究協力者	大西 和夫	(国立感染症研究所・免疫部・主任研究官)
研究協力者	山田 博之	(結核研究所・抗酸菌レファレンス部・細菌検査科)
研究協力者	青野 昭男	(結核研究所・抗酸菌レファレンス部・細菌検査科)
研究協力者	近松 絹代	(結核研究所・抗酸菌レファレンス部・細菌検査科)
研究協力者	星野 仁彦	(国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部・第六室長)
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・講師)
研究協力者	仁木 満美子	(大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・助教)
研究協力者	岡 真優子	(大阪市立大学大学院医学研究科・分子病態薬理学・講師)
研究協力者	松本 真	(大塚製薬微生物研究所・所長)
研究協力者	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	北田 清悟	(国立病院機構刀根山病院・呼吸器内科・医長)

研究要旨

長期培養結核菌（40 年以上低酸素状態）は死菌と休眠状態生菌の混合物と考えられた。形態的に対数増殖期にある結核菌と明らかに異なる特徴が観察された。抗酸菌休眠分子である抗酸菌 DNA 結合蛋白質は isoniazid (INH) 抵抗性の獲得に関与し、その分子機構は INH 活性化分子である KatG の発現抑制によるものであった。休眠菌に特有の糖脂質に対する免疫応答で潜伏感染における意義を明らかにした。潜伏結核菌感染者で T 細胞応答優位な蛋白質を 12 種類同定し、休眠期結核菌に対するワクチン抗原として有望である。他方、結核患者＞潜伏感染者＞健常者で抗体価が上昇している蛋白質を 5 種類同定し、抗体価は結核患者と潜伏感染者の鑑別診断に応用できる可能性を示した。Mycobacterium avium complex (MAC) 感染症の血清診断で血清 MAC-GPL IgA 抗体価の治療前抗体価と治療効果（細菌学的結果）に関連性はなかった。化学療法は血清抗体価を有意に低下させ、抗体価は治療効果の指標となる可能性が示唆された。

今年度の特筆事項として、1) 基礎研究で研究分担者 松本 壮吉が「研究課題：結核菌の病原性および増殖制御機構の分子遺伝学的解析と応用研究」により、平成 23 年 小林 六造 記念賞（日本細菌学会）を受賞し、2) 橋渡し医学研究で平成 23 年 8 月 22 日、活動性 MAC 感染症に関し、MAC-GPL 診断キット（キャピリア® MAC 抗体 ELISA タウンズ）の体外診断用医薬品製造販売が承認・上市（保険点数：120 点）され、保険医療として、臨床使用を開始した。この診断キットの感度：84%、特異度：100%、所要時間の大幅短縮：3 時間（従来法：約 1 か月）、かつ、非侵襲性であり、今後、MAC 感染症の診療に威力を発揮することが期待される。

A. 研究目的

世界で約 20 億人（日本：2,500 万人）が結核菌に既感染、880 万人（日本：2,3 万人）が結核を発病、140 万人（日本：2,1 千人）が死亡し、現在でも、結核は甚大な健康被害を提供している（2010 年）。活動性結核の発病は感染者の約 10% であり、潜在性結核菌感染や発病に対する機構の解明は結核対策に寄与する。

結核の発症機序には「感染後早期に発症する一次性結核」、「潜在性感染から発症する二次性結核（内因性再燃）」や「既感染宿主に再感染し発病（外来性再感染）」があるが、成人結核のほとんど（70%）は「内因性再燃」に起因している。潜在性感染機序の解明は新規診断法、新規抗結核薬や感染曝露後（治療的）ワクチン開発を促進し、結核制圧に寄与することが期待される。

本研究では、潜在性抗酸菌感染に関わる宿主および菌の分子機構を解明し、病態の理解、診断・治療やワクチン標的候補の探索を目的とした。

担当者	研究課題
小林 和夫	研究の総括
御手洗 聡	長期保存結核菌株の細菌学的解析
松本 壮吉	潜在性結核の成立を担う菌と宿主双方の分子とその機能解明
杉田 昌彦	休眠結核菌の脂質代謝と免疫応答
小出 幸夫	休眠結核菌由来遺伝子を用いた DNA ワクチンの開発研究
前倉 亮治	潜在性抗酸菌感染における臨床診断法の開発

B. 研究方法

長期保存結核菌株の細菌学的解析

Sauton 培地に流動パラフィンを上層した状態で 1964 年から 37°C での培養を継続している結核菌 H37Rv 1 株と、同様の培養条件で 1968 年から培養を行っている H37Rv 3 株を使用した。またレファレンス株として 1964 年に凍結保存された H37Rv 株を使用した。長期培養 4 株を培養ボトルから回収し、それぞれ直接 RNA 抽出を実施

した。また液体及び固体培地で好気培養を行い、生菌として回収を試みた。生菌として回復した結核菌については、対数増殖期と Wayne モデルによる短期休眠状態からも RNA 抽出を行った。また対数増殖期と長期培養状態のそれぞれについて急速凍結法によって調製した検体を使用して電子顕微鏡による形態観察を実施した。結核菌の発育促進については H37Rv と *Dermatococcus nishinomiyaensis* の培養上清を使用して、結核菌の発育促進効果を液体培地での発育時間で評価した。

潜在性結核の成立を担う菌と宿主双方の分子とその機能解明

Mycobacterium smegmatis mc²155 株 (WT) およびそれを親株とした抗酸菌 DNA 結合蛋白質 (MDP1) 欠失株ならびに補填株を LB 液体培地で OD₆₀₀ = 0.1 に調製した。抗菌薬添加 LB 培地に菌液を接種し 37°C で 48 時間培養した。培養後、LB 寒天培地に接種し、colony forming units (CFUs) を算出した。

Total RNA を抽出し、マイクロアレイおよびリアルタイム RT-PCR 解析を行った。休眠結核菌の脂質代謝と免疫応答

BCG Tokyo 172 株を、0.05% Tween 80、10% ADC エンリッチメントを含有した Middlebrook 7H9 液体培地中で震盪培養した。培養後、クロロホルム/メタノール抽出を行い、脂質分画を得、薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。

ステアリン酸付加オクタアルギニンを構成成分としたリポソームは、グルコースモノミコール酸 (GMM) 包含リポソームの作製方法に準じて行った (J Biol Chem 286: 16800, 2011)。

Hartley モルモットに BCG (5 x 10⁷ CFU) を皮内投与し、6 週後に精製 GroMM (5 μg) 含有リポソームおよびコントロールリポソームを皮内接種し、硬結径を測定した。

皮内接種を受けた一部のモルモットから皮膚組織を採取し、ギムザ染色を行った。

BCG 免疫モルモットの所属リンパ節より細胞を単離し、RNA を単離、逆転写反応

を行い、鋳型となる一本鎖 DNA を作成後、逆転写核酸増幅反応 (RT-PCR) で解析した。

休眠結核菌由来遺伝子を用いた DNA ワクチンの開発研究

結核菌ゲノム情報に基づき、休眠期の結核菌が発現する DosR regulon 蛋白質 (48 種) 遺伝子を PCR によって単離し、大腸菌発現系ベクターである pET28b に挿入した。このうち安定して遺伝子産物を発現できた 33 種について、ヒトの T 細胞応答と抗体価について検討した。T 細胞応答は、ヒト末梢血単核球を組換え蛋白質で刺激し、interferon (IFN)- γ 産生を ELISPOT assay で測定して検討した。血清中の抗体は、組換え蛋白質を用いた ELISA により測定した。ヒト試料は次の 3 群から文書によるインフォームド・コンセントを得た後に採取した。①結核患者 (臨床的に結核を発病していると診断された患者: 12 名 (抗体価については 28 名)、②潜伏感染者 (クオンティフェロン陽性の非発症者: 14 名)、③健常者 (クオンティフェロン陰性者)。

潜在性抗酸菌感染における臨床診断法の開発

2008 年 9 月から 2010 年 10 月までの期間、国立病院機構刀根山病院にて米国胸部疾患学会の診断基準を満たす肺 MAC 症と診断され、初回標準化学療法を行う患者を対象とした。治療開始前および、治療開始 1、2、3、6、9、12 ヶ月後に経時的に血液を採取し、血清抗 GPL core IgA 抗体価の変化を観察した。また、臨床像との関連も検討した。

倫理面への配慮

生命倫理、動物愛護や遺伝子組換え実験、また、安全対策の観点から、機関で定められた規程に準拠し、機関で承認を得て実施した。なお、利益相反はなかった。

C. 研究結果

長期保存結核菌株の細菌学的解析

現在までに H37Rv 4 株 (NN4: 1964 年培養開始, NN15-17: 1968 年培養開始) につい

て、①直接 RNA 抽出を実施した。②また通常状態での継代培養を実施し、NN15 及び NN17 株の生菌コロニーを回収した。③ NN15 については共同研究者施設にて短期での Wayne モデルを作成し RNA を抽出した。さらに④レファレンス株として 1964 年保存の H37Rv を回復している。②と④の株については対数増殖期からの RNA 抽出を終了した。①~④の検体について遺伝子の発現解析を実施する。長期低酸素培養菌の急速凍結法による電子顕微鏡下での観察では、生菌と死菌の混在状態であると判断され、形態的にも明確な差が認められた。また NN15 株は Tween80 存在下でも分散せず、強い凝集傾向を示した。D. nishinomiyensis の培養上清で結核菌培養促進効果が示唆された。

潜在性結核の成立を担う菌と宿主双方の分子とその機能解明

MDP1 欠失により菌の INH 感受性が増強した。マイクロアレイを用いた解析では、INH 耐性に関与する遺伝子のうち katG の発現が MDP1 欠失により上昇した。抗 KatG 抗体を用いたウエスタンブロット解析では、MDP1 欠失株において KatG 発現量が増強していた。さらに、活性染色により、MDP1 欠失株では KatG による INH 活性化が亢進していた。

休眠結核菌の脂質代謝と免疫応答

標準培地で培養した BCG においては GroMM 産生が検出されないが、標準培地にグリセロールを添加することにより GroMM 産生を人為的に誘導できることを見いだした。次に、GroMM 高産生 BCG をモルモットに接種し、GroMM に対する感作を成立させた。この個体にリポソームに封入した GroMM を皮内接種すると、36 時間から 48 時間をピークとした応答が観察され、浸潤細胞の主体は好酸球であった。

休眠結核菌由来遺伝子を用いた DNA ワクチンの開発研究

T 細胞応答は潜伏感染者で強い応答を示すものが多く、他の 2 者の一方または両方と比較して有為に強い反応が惹起できた抗原を 12 種類 (Rv0080、Rv0081、Rv0570、

Rv0574c、Rv1996、Rv2004c、Rv2028、Rv2029c、Rv2031c、Rv2626、Rv3129、Rv3133c) 同定した。

潜在性抗酸菌感染における臨床診断法の開発

肺 MAC 症と診断され、初回標準化学療法を行う患者 37 例を登録した。治療前の血清 GPL core IgA 抗体価は 8.0 ± 10.3 U/mL で、31 例 (83.8%) で陽性 (>0.7 U/mL) であった。32 例は少なくとも 12 ヶ月以上の経過観察が可能あり、平均観察期間は 24.0 ± 8.3 月であった。32 例中、27 例 (84.4%) は化学療法により排菌陰性化が得られた。そのうち 5 例は、1 年以内に再排菌した (再発率: 18.5%)。5 例は化学療法にもかかわらず、排菌が持続した。治療開始前の抗体価は、排菌陰性化例 (6.5 ± 7.9 U/mL) と再発および持続排菌例 (8.3 ± 9.4 U/mL) の間で差を認めなかった ($p = 0.597$)。抗体価の変化を、治療前血清抗体陽性例 26 例において観察した。抗体価の変化は個人差が認められたものの、排菌陰性化群患者において、治療前に比べて有意な抗体価の低下が観察された ($p < 0.01$)。治療前抗体価と治療効果 (細菌学的結果) には関連性が観察されなかった。多剤併用化学療法は、血清抗体価を有意に低下させた。活動性肺 MAC 感染症の血清抗 MAC-GPL 抗体の検出による血清診断キット (キャピリア MAC 抗体-ELISA、株式会社タウンズ) は体外診断用医薬品として製造承認、保険収載された (保険点数: 120 点)。

D. 考察

潜在性結核菌感染には「結核菌」と「宿主」の要因が関与し、成立していることが考えられる。しかし、活動性結核の発病は感染者の約 10% であり、発病の 70% は潜在性感染に起因している。従って、潜在性抗酸菌感染機構の解明は結核や非結核性抗酸菌感染症対策に寄与することが考えられる。さらに、潜在性結核菌感染者を早期に発見し、治療・予防介入することにより、結核の発病を未然に防止することが可能となる。

長期培養株の遺伝子発現状況について、

同時代の H37Rv をレファレンスとして、好気培養で回復した結核菌とその Wayne モデル休眠菌との比較を試みたが、現時点では解析結果が得られていない。電子顕微鏡による形態学的な観察からは、長期培養株における細胞構造の変化 (DNA やリボゾームの不明瞭化) が認められた。これは休眠期間の長短で異なるのかどうかひとつの疑問としてあげられる。回復した結核菌株からあらたに作製した短期休眠菌との比較を行う必要があると考えられた。また培養促進効果についても濃度の調整など今後の検討課題が示された。

抗酸菌・結核菌休眠分子である MDP1 は定常期以降の菌体で発現が増強することから、潜伏感染菌の INH 耐性化に関わる因子の一つであることが示唆された。

グリセロールミコール酸 (GroMM) に対する顕著な生体応答は、既知の遅延型アレルギー応答と同様に感作が必要であるが、好酸球浸潤を伴う TH2 型サイトカイン産生を主体とする点、異なっていた。したがって休眠菌は GroMM を産生することにより、周囲の免疫環境を TH2 に導き、免疫制御を回避している可能性が考えられた。

幾つかの抗原に対する潜伏感染者 (非発症者) の T 細胞応答が結核患者に比べて増強し、これらの免疫応答が結核の発症を抑制している可能性を示唆している。したがって、これらの蛋白質群は、休眠期結核菌を標的としたワクチンの抗原として有望であると考えられた。

結核菌感染者 (結核患者および潜伏感染者) で血清抗体価の上昇が見られた抗原群については、結核患者 > 潜伏感染者 > 健常者の順で抗体価が高いものが多かった。これらの抗体価の差異は、結核患者と潜伏感染者を鑑別するバイオマーカーに応用できる可能性がある。

肺 MAC 症診断における血清診断の陽性率は 83.8% と、これまでの報告とほぼ同様の値であり、有用性が再確認された。

肺 MAC 症の化学療法の効果はマクロライドの登場によって大きく改善した。マクロライドを含んだ多剤併用化学療法は短期

的には 50-90%の排菌陰性化が得られることが報告されている。一方、長期的には再発する症例も多く、再発率は 11.1-56.8%とされている。本研究でも、84.4%の症例において排菌陰性化が達成され、そのうち 18.5%が 1 年以内に再発しこれまでの報告と同様の結果であった。

治療前の抗体価は、排菌陰性化群と再発および持続排菌群では差がなく、治療効果を予測することは可能でなかった。治療成功例において抗体価の平均は低下をみとめ、抗体価は治療効果の指標となる可能性が示唆された。しかし、抗体価の変化は個人差が大きく、胸部画像所見や細菌学的所見をよく反映する症例もあったが、まったく反映しない症例もあることが観察された。肺 MAC 症の化学療法の治療効果の指標としては、喀痰培養結果が用いられているが、喀痰培養には時間を要し、採取された喀痰の質によりコロニー数が変化するなどの問題がある。またコロニーカウントも不正確である。抗体価が治療効果の指標として有用であれば、より簡便に定量的、客観的評価が可能となる。どのような症例で抗体価の経時的観察が有用であるか、今後検討する必要がある。

また、MAC の臨床経過は非常に長く、通常 5-10 年以上の経過をとる場合が多い。抗体価や抗体価の推移が長期的な状態や予後を予測する因子として有用であるかどうかは今後の検討課題である。

E. 結論

- 長期低酸素培養菌の急速凍結法による電子顕微鏡観察では生菌と死菌が混在し、形態的にも明確な差が認められた。
- 結核菌の細胞内増殖を抑制する宿主因子の同定に成功し、潜在性結核から活動性結核の再燃を予測し得る結核菌抗原を同定した。
- 休眠抗酸菌が産生すると考えられる脂質（グリセロールモノミコール酸）を同定、精製し、BCG 接種モルモットを用い、宿主応答を解明した。
- 潜伏感染者の休眠結核菌関連蛋白質：

Rv570、Rv2004、Rv2028c、Rv3133c に対する T 細胞免疫応答が、結核患者や健常者と比較して上昇していることを明らかにした。

- MAC 感染症迅速免疫診断キット（キャピリア MAC 抗体-ELISA、株式会社タウンズ）は体外診断用医薬品として、製造販売承認、保険医療（保険点数：120 点）として認められた。
- MAC 疾患活動性（菌量、画像所見、炎症反応：赤沈、CRP など）と血清抗体価の推移の関連性を解析したが、有意な相関を認めなかった。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kobayashi, K., M. Ato, and S. Matsumoto. 2011. Global threats and the control of multidrug-resistant tuberculosis. *J. Disaster Res.* 6: 443-450.
- 2) Naka, T., N. Nakata, S. Maeda, R. Yamamoto, M. Doe, S. Mizuno, M. Niki, K. Kobayashi, H. Ogura, M. Makino, and N. Fujiwara. 2011. Structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare.* *J. Bacteriol.* 193: 5766-5774.
- 3) Naka, T., S. Maeda, R. M. Niki, N. Ohara, S. Yamamoto, I. Yano, J.-i. Maeyama, H. Ogura, K. Kobayashi, and N. Fujiwara. 2011. Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin Tokyo 172 substrain. *J. Biol. Chem.* 286: 44153-44161.
- 4) Takatsuka, M., M. Osada-Oka, E.F. Satoh, K. Kitadokoro, Y. Nishiuchi, M. Niki, M. Inoue, K. Iwai, T. Arakawa, Y. Shimoji, H. Ogura, K. Kobayashi, A. Rambukkana, and S. Matsumoto. 2011. A histone-Like protein of mycobacteria possesses ferritin

- superfamily protein-Like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction. PLoS One 6: e20985.
- 5) 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-Guerin. Vaccine 29: 6881-6887.
 - 6) Kasahara, E., A. Sekiyama, M. Hori, K. Hara, N. Takahashi, M. Konishi, E. F. Sato, S. Matsumoto, H. Okamura, and M. Inoue. 2011. Mitochondrial density contributes to the immune response of macrophages to lipopolysaccharide via the MAPK pathway. FEBS Lett 585: 2263-2268.
 - 7) 松本壮吉, 2011. 結核菌の病原性および増殖制御機構の分子遺伝学的解析と応用研究、日本細菌学会誌、66: 531-537.
 - 8) 仁木満美子、仁木 誠、尾関百合子、岡 真優子、松本壮吉. 2011. 結核研究の新たな展開—潜在性結核と結核菌：休眠現象の分子メカニズム—、最新医学 66: 149-155.
 - 9) 西内由紀子、立石善隆、山田 毅、松本壮吉. 2011. 人獣共通感染症、木村 哲、喜田 宏 編集、非結核性抗酸菌症 改訂版、医薬ジャーナル社、337-342.
 - 10) Niki M and Matsumoto S. 2011. Host and bacterial factors that regulate *Mycobacterium tuberculosis* infection and persistence. Yamamoto S, Maeyama J, and Takii T editors. BCG vaccine and adjuvant, Japan anti-tuberculosis association, Tokyo, 215-238.
 - 11) Hattori, Y., I. Matsunaga, T. Komori, T. Urakawa, T. Nakamura, N. Fujiwara, K. Hiromatsu, H. Harashima, and M. Sugita. 2011. Glycerol monomycolate, a latent tuberculosis-associated mycobacterial lipid, induces eosinophilic hypersensitivity responses in guinea pigs. Biophys. Biochem. Res. Commun. 409: 304-307.
 - 12) Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. Coronin-1a inhibits autophagosome formation around *Mycobacterium tuberculosis*-containing phagosomes and assists mycobacterial survival in macrophages. Cell. Microbiol. (in press)
 - 13) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2011. 結核菌の細胞内寄生メカニズム. 日本臨床. 69: 1373-1377.
 - 14) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2011. 結核菌ファゴソームの成熟阻害機構. 化学療法の領域. 27: 1464-1469.
 - 15) Sugaya, K., S. Seto, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2011. Mobility of late endosomal and lysosomal markers on phagosomes analyzed by fluorescence recovery after photobleaching. Biochem. Biophys. Res. Commun. 410: 371-375.
 - 16) Kato, M., Y. Nakamura, T. Suda, Y. Ozawa, N. Inui, N. Seo, T. Nagata, Y. Koide, P. Kalinski, H. Nakamura, and K. Chida. 2011. Enhanced anti-tumor immunity by superantigen-pulsed dendritic cells. Cancer Immunol. Immunother. 60: 1029-1038.
 - 17) Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. 2011. Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. Traffic 12: 407-420.
 - 18) Uto, T., K. Tsujimura, M. Uchijima, S. Seto, T. Nagata, T. Suda, K. Chida, H. Nakamura, and Y. Koide. 2011. A novel vaccine strategy to induce mycobacterial antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of heat shock protein 70. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 61: 189-196.

2. 学会発表

- 1) 小林和夫. 2011. 現代における感染症の脅威と制圧戦略(メインシンポジウム: 次世代の予防戦略に果たす衛生学の役割). 日本衛生学会雑誌、66 : 250-251、2011. 第 81 回日本衛生学会学術総会(東京、3 月—>Web-IT 開催).
- 2) 小林和夫、光山正雄. 2011. 結核研究の最先端(シンポジウム 10-S-4). 学術講演要旨 246、2011. 第 28 回日本医学会総会(東京、4 月—>誌上開催).
- 3) 松本壮吉、岡 真優子、北田清悟、前倉亮治、小林和夫、2011. 結核研究の最先端(シンポジウム 10-S-4). 学術講演要旨 246、2011. 第 28 回日本医学会総会(東京、4 月—>誌上開催).
- 4) 森田康裕、松本壮吉、小林和夫、木下タロウ. 2011. マンナン生合成の異常は結核菌細胞壁のバリア機能を弱め、結核菌をβラクタム系薬剤感受性にする. 結核、86 : 372、2011. 第 86 回日本結核病学会総会(東京、6 月).
- 5) Ohara, N., N. Satoh, M. Nakayama, M. Okabe, and K. Kobayashi. 2011. Gene expression profile in a thymidine synthase ThyX-deletion mutant of *Mycobacterium bovis* BCG (P-BA28-8). 日本細菌学会雑誌、66 : 425、2011. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology-第 84 回日本細菌学会総会(札幌、9 月).
- 6) Satoh, N., M. Ato, T. Matsumura, T. Yamazaki, T. Sekizuka, M. Kuroda, N. Honda, M. Nakayama, K. Tsuchida, K. Kobayashi, and N. Ohara. 2011. 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* (P-BA28-20). 日本細菌学会雑誌、66 : 427、2011. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology-第 84 回日本細菌学会総会(札幌、9 月).
- 7) Okabe, M., N. Ohara, N. Fujiwara, T. Naka, M. Ato, and K. Kobayashi. 2011. Sliding-defect mutants of *Mycobacterium smegmatis* have lower ability to enter nonphagocytic cells (P-BA28-26). 日本細菌学会雑誌、66 : 429、2011. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology-第 84 回日本細菌学会総会(札幌、9 月).
- 8) Ozeki, Y., K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2011. The efficacy of BCG may be a time-dependent after the vaccination and age-dependent I mice (P-BA31-8). 日本細菌学会雑誌、66 : 447、2011. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology-第 84 回日本細菌学会総会(札幌、9 月).
- 9) 小林和夫. 2011. 感染症における宿主免疫応答と橋渡し研究(Workshop 7 感染症、免疫不全・免疫異常症). 日臨免誌、34 : 268、2011. 第 39 回日本臨床免疫学会総会(東京、9 月).
- 10) 松本壮吉、小林和夫. 2011. 結核菌の休眠現象と潜在性結核(Symposium 1S9s 再考 VNC : viable but not-culturable cells! 細菌に学ぶ生残戦略). 生化学、83 : 47、2011. 第 84 回日本生化学会大会(京都、9 月).
- 11) 立石善隆、北田清悟、前倉亮治、松本壮吉. 2011. 結核血清診断の進歩. 第 86 回日本結核病学会総会(東京、6 月).
- 12) 仁木 誠、仁木満美子、松本壮吉. 抗酸菌の薬剤感受性におけるヒストン様蛋白質の機能解析. 2011. 第 86 回日本結核病学会総会(東京、6 月).
- 13) 西内由紀子、松本壮吉、立石善隆、北田清悟、前倉亮治. 2011. 環境から分離した *Mycobacterium avium* のバイオフィルム. 第 86 回日本結核病学会総会(東京、6 月).
- 14) Matsumoto, S. 2011. Host factors

- having an impact on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. International Union Microbiological Societies 2011 Congress (札幌、9月).
- 15) Nishiuchi, Y., S. Matsumoto, Y. Tateishi, N. Yamaguchi, M. 2011. Nasu. Biofilm formation of *Mycobacterium avium* isolated from living environment. International Union Microbiological Societies 2011 Congress (札幌、9月).
 - 16) Maeyama, J.-i., S. Iho, M. Osada-Oka, S. Matsumoto, M. Isaka, S. Yamamoto. Immune responses in guinea pigs administered with anti-tuberculosis booster vaccine candidate. International Union Microbiological Societies 2011 Congress (札幌、9月).
 - 17) Ozeki, Y., K. Kobayashi, S. Matsumoto. The efficacy of BCG may be a time-dependent after the vaccination and age-independent in mice. International Union Microbiological Societies 2011 Congress (札幌、9月).
 - 18) Sugita M. 2011. Lipid-specific adaptive immunity in tuberculosis and AIDS. The 6th International Symposium of Institute Network. (東京、6月).
 - 19) Uchijima, M., T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2012. Analysis of antigen-specific T-cell responses induced by CCR5 targeting vaccine. 第 85 回日本細菌学会 (長崎、3 月発表予定).
 - 20) Hozumi, H., K. Tsujimura, Y. Yamamura, S. Seto, M. Uchijima, T. Nagata, and Y. Koide. 2012. Human T-cell responses against dormancy-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. 第 85 回日本細菌学会 (長崎、3 月発表予定).
 - 21) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2011. 結核菌感染マクロファージにおけるオートファジー誘導阻害機構の解析 平成 23 年度日米医学結核・ハンセン病専門部会班会議 (清瀬、12 月).
 - 22) Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. 2011. Localization and function of Coronin-1a in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. 46th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy (大宮、12 月).
 - 23) Osada-Oka, M., Y. Hirayama, Y. Tateishi, Y. Ozeki, S. Kitada, R. Maekura, K. Tsujimura, Y. Koide, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2011. Antibody responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in latent *M. tuberculosis* infection. 46th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy (大宮、12 月).
 - 24) Tsujimura, K., Y. Yamamura, S. Seto, M. Uchijima, T. Nagata, and Y. Koide. 2011. Immunogenicity of DosR regulon proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会. (千葉、11 月).
 - 25) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2011. 結核菌感染マクロファージにおけるオートファジー誘導機構の解析. 平成 23 年度中部乳酸菌研究会 (新潟、11 月).
 - 26) Uchijima, M., T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2011. Analysis of antigen-specific CD8+ and CD4+ T-cell responses induced by chemokine fusion DNA vaccination. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (札幌、9月).
 - 27) Tsujimura, K., Y. Yamamura, S. Seto, M. Uchijima, H. Hozumi, T. Nagata, and Y. Koide. 2011. Immunogenicity of dormancy-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (札幌、9月).
 - 28) Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. 2011. Localization and function of Coronin-1A in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. International Union of Microbiological

- Societies 2011 Congress(札幌、9月).
- 29) Nagata, T., G. Eweda, D. Suzuki, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2011. Identification of T-cell epitopes on low-molecular-mass secretory proteins (CFP11, CFP17, TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress(札幌、9月).
- 30) Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. 2011. Image analysis reveals that *Mycobacterium tuberculosis* mediates the differential recruitment of Rab GTPases to its phagosomes during arresting phagosome maturation. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress(札幌、9月).
- 31) Tsujimura, K., Y. Yamamura, H. Hozumi, S. Seto, M. Uchijima, T. Nagata, and Y. Koide. 2011. Cellular and humoral immune responses against latency-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. DNA vaccine 2011. (San Diego, CA, USA, 7月).
- 32) 北田清悟、前倉亮治. 2011. MAC 症診断における血清診断法(妥当性と臨床データ)第 86 回日本結核病学会総会(東京、6月).
- 33) 上浪 健、北田清悟、各務慎一、立石善隆、藤川健弥、平賀 通、前倉亮治. 2011. 結核類似型肺 MAC 症の臨床画像的検討. 第 86 回日本結核病学会総会(東京、6月).
- 34) 西内由紀子、松本壮吉、立石善隆、北田清悟、前倉亮治. 2011. 環境から分離して *Mycobacterium avium* のバイオフィルム形成. 第 86 回日本結核病学会総会(東京、6月).
- 35) 各務慎一、上浪 健、北田清悟、立石善隆、藤川健弥、平賀 通、前倉亮治. 2011. 肺 MAC 症および肺結核に対するリファブチンの当院における使用経験. 第 86 回日本結核病学会総会(東京、6月).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「結核菌に特異的な T 細胞(CD8+)を検出するための方法」特許第 4883816 号、発明者：小出幸夫、鈴木美奈、青枝大貴、永田 年、平成 23 年 12 月 16 日登録

2. 実用新案登録 特になし

3. その他 特になし

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

長期保存結核菌株の細菌学的解析

研究分担者	御手洗 聡	（結核予防会 結核研究所・抗酸菌レファレンス部）
研究協力者	星野 仁彦	（国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部）
研究協力者	山田 博之	（結核予防会 結核研究所・抗酸菌レファレンス部・細菌検査科）
研究協力者	青野 昭男	（結核予防会 結核研究所・抗酸菌レファレンス部・細菌検査科）
研究協力者	近松 絹代	（結核予防会 結核研究所・抗酸菌レファレンス部・細菌検査科）

研究要旨

【背景】結核菌は生体内で潜在感染状態となり、場合によっては感染から数十年後に発病する。これは現在日本の高齢者結核で実際に起こっている現象であり、感染制御の目的から長期の潜在感染の生物学的動態を詳細に知る必要がある。結核研究所には1960年代から低酸素状況下で長期培養されている結核菌が保存されており、一つの長期潜在感染状況モデルとして解析可能である。【目的】結核研究所で低酸素状態にて長期間培養されている結核菌を使用し、形態学的、遺伝学的解析を行う。また長期培養株の効果的回復を目的として発育促進物質に関する検討を実施する。【方法】ソートン培地に流動パラフィンを上層した状態で1964年から37°Cでの培養を継続しているH37Rv 1株と、同様の培養条件で1968年から培養を行っているH37Rv 3株を使用した。またレファレンス株として1964年に凍結保存されたH37Rv株を使用した。長期培養4株を培養ボトルから回収し、それぞれ直接RNA抽出を実施した。また液体及び固体培地で好気培養を行い、生菌として回収を試みた。生菌として回復した結核菌については、対数増殖期とWayneモデルによる短期休眠状態からもRNA抽出を行った。また対数増殖期と長期培養状態のそれぞれについて急速凍結法によって調製した検体を使用して電子顕微鏡による形態観察を実施した。結核菌の発育促進については、H37Rvと*Dermatococcus nishinomiyaensis*の培養上清を使用して、結核菌の発育促進効果を液体培地での発育時間で評価した。【結果】現在までにH37Rv 4株（NN4: 1964年培養開始, NN15-17: 1968年培養開始）について、①直接RNA抽出を実施した。②また通常状態での継代培養を実施し、NN15及びNN17株の生菌コロニーを回収した。③NN15については共同研究者施設にて短期でのWayneモデルを作成しRNAを抽出した。さらに④レファレンス株として1964年保存のH37Rvを回復している。②と④の株については対数増殖期からのRNA抽出を終了した。①～④の検体について遺伝子の発現解析を実施する。長期低酸素培養菌の急速凍結法による電子顕微鏡下での観察では、生菌と死菌の混在状態であると判断され、形態的にも明確な差が認められた。またNN15株はTween80存在下でも分散せず、強い凝集傾向を示した。*D. nishinomiyaensis*の培養上清で結核菌培養促進効果が示唆された。【考察・結論】長期培養株の遺伝子発現状況について、同時代のH37Rvをレファレンスとして、好気培養で回復した結核菌とそのWayneモデル休眠菌との比較を試みたが、現時点では解析結果が得られていない。電子顕微鏡による形態学的な観察からは、長期培養株における細胞構造の変化（DNAやリボゾームの不明瞭化）が認められた。これは休眠期間の長短で異なるのかどうかひとつの疑問としてあげられる。回復した結核菌株からあらたに作製した短期休眠菌との比較を行う必要があると考えられた。また培養促進効果についても濃度の調整など今後の検討課題が示された。

A. 研究目的

結核菌は一般細菌感染と異なり、特殊な感染形態をとることがよく知られている。それは主に「潜在感染」と呼ばれる状態であり、基本的には結核菌は休眠状態にあると考えられている。しかしながら、休眠状態（あるいは無症候感染状態・Sub-clinical infection）の実態は良く理解されているとは言いがたい状況にある。一般には Wayne モデルとされる低酸素状況下での結核菌の動態が休眠状態の実験モデルとされているが、ヒトにおいて結核感染後数十年の間を経て発病する可能性があることを考えると、数週から数ヶ月単位のこのようなモデルが必ずしもヒトにおける潜在感染状況を反映しているとは限らない。

休眠状態にある結核菌の性状を理解することは、効果的な潜在性結核感染症の診断及び治療にとって極めて重要である。結核研究所には 1960 年代から低酸素状態にて長期間培養されている結核菌が保管されており、長期休眠状態のひとつの状況をあらわすモデルと考えられる。この研究班では、これらの結核菌に関して表現形質的、形態学的、遺伝学的解析を行うことを目的とする。

休眠結核菌の表現型・形態及び遺伝学的情報を相互に比較することにより、潜在結核感染状態についての新たな知見を得ることができると期待される。

B. 研究方法

[長期培養結核菌株の解析]

1. 長期培養状態の解析

実験に使用する結核菌は結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌検査科に 1960 年代から培養状態で保存されている *M. tuberculosis* H37Rv 4 株を使用した。またレファレンス株として同時期に冷凍保存された同じ H37Rv 株を使用した。長期培養・保存株はソートン培地に接種後、流動パラフィンを上層して酸素の供給を遮断し、そのまま密栓して 37°C で培養を継続しているもので、それらの詳細は以下の通りである。

実験対象検体 (NN: 新規番号, BN: バッグ番号, 菌種, 培養開始年月日)

- NN15/BN22: *M. tuberculosis* H37Rv, 1968/4/17
- NN16/BN24: *M. tuberculosis* H37Rv, 1968/4/17
- NN17/BN25: *M. tuberculosis* H37Rv, 1968/4/17
- NN4/BN6: *M. tuberculosis* H37Rv, 1964/3/26

培養ボトルを開封し、流動パラフィンとソートン培地中間に層状に発育している油膜状の H37Rv を回収し、Tween 80 加 Middlebrook7H9 培地に懸濁し、3,000G, 20min 遠心して集菌した。これを改めて Middlebrook7H9 + 0.05% Tween80 + MycobactinJ 培地及び 2% Kudoh 培地に接種し、37°C で培養を行った。

溶存酸素量確認のため、一部のボトル (NN15 及び NN16) からソートン培地 30ml を回収して他の容器に移し、非接触式溶存酸素測定装置を用いて溶存酸素量 (O₂/% air saturation/ppm) を測定した。

2. 長期培養結核菌からの DNA/RNA の分離回収

上記の結核菌について、採取した結核菌から直接 RNA の分離回収を実施した。抽出には TRIzol[®]Max™ Bacterial RNA Isolation Kit (Invitrogen) を使用した。具体的には 95 °C に加熱した Max Bacterial Enhancement 0.2ml を回収した結核菌と混和し、チューブを 95°C で 4 分間加熱した。その後 1mL の Trizol を加え、よく混和し、5 分間室温に静置した。0.2mL の冷クロロホルムを加え、15 秒間激しく振盪し、さらに室温に 2~3 分放置した。12,000g, 4°C で 15 分間遠心した後、上層を新しい 1.5mL のチューブに移した。次に 0.5mL の ice cold イソプロパノールを加え、転倒混和した。室温で 10 分間静置した後、15,000g, 4°C で 10 分間遠心を行った。上清を除去し、1mL の 75% エタノールで再懸濁し、7,500g, 4°C で 5 分間遠心し、上清を捨て RNA ペレットを風乾して回収した。さらに DNase にて 2 回処理を行った。

3. 結核菌用全転写産物発現解析アレイ解析

ロシュ・ダイアグノスティックスのマイクロアレイ受託解析サービスを利用して、結核菌の遺伝子発現解析を行う。

4. 電子顕微鏡を用いた形態学的解析

長期培養菌検体を直接使用し、急速凍結法で透過型電子顕微鏡にて観察した。(共同研究者：山田博之)

5. 生菌として回収した結核菌の表現形解析

好気性環境にて培養して回収した長期培養菌の表現形について、発育の状態と薬剤感受性を評価した。薬剤感受性検査には標準的な比率法を使用した。対象薬剤は Isoniazid、Rifampicin、Streptomycin 及び Ethambutol とした。

6. 生菌として回収した長期培養株からの Wayne モデル株の作製

1 で回収した長期培養菌から得られた活動性結核菌を用いて Wayne モデルによる休眠菌作製を実施した。具体的には Middlebrook7H9 + Tween80 培地にて OD=0.2 (530nm) に培養した増殖期の結核菌を酸素分圧 1% の状態で 7 日間培養し、2 の方法で RNA 抽出を実施した。(共同研究者：星野仁彦)

[Resuscitation Promoting Factor に関する検討]

Resuscitation promoting factor (rpf) あるいは当科で分離した結核菌 Trans-activating factor を含むと思われる物質の基礎検討を行った。Galina らの方法を参照し、以下の様に実験を行った。(共同研究者：青野昭男)

1. 培養上清の作製

① *M. tuberculosis* (H37Rv) (Rv) 及び *Dermatococcus nishinomiyaensis* (NIS) を Middlebrook7H9 + OADC + 0.05% Tween80 で 14 日間培養し、培養液を 0.2 μm のフィルターで濾過する。濾過した培養上清を二分し、一方を 121°C で 20 分間オートクレーブし、両方を -80°C で凍結する。

2. 培地の作製

① MGIT+PANTA+MGIT supplement

② MGIT+PANTA+MGIT supplement+ 非加熱 Rv/NIS 培養上清

MGIT (7ml) から 1ml を除去し、非加熱 Rv 培養上清を 1ml 添加する。通常通り PANTA 100 μl と MGIT supplement 0.8ml を添加する。

③ MGIT+PANTA+MGIT supplement+ 加熱済 Rv/NIS 培養上清

MGIT (7ml) から 1ml を除去し、加熱済 Rv/NIS 培養上清を 1ml 添加する。通常通り PANTA 100 μl と MGIT supplement 0.8ml を添加する。

3. 検体の接種

① 活動性結核患者から採取した喀痰検体 (塗抹 1+以上) を通常通り NALC-NaOH 処理し、遠心・再懸濁した検体を希釈し、2ml 以上に調製する。

② 上記の通り準備した 4 種類の培地に、0.5ml ずつ接種する。

③ 培養陽性までの時間を測定する。

(倫理面への配慮)

本研究は該当しない

C. 研究結果

[長期培養結核菌株の解析]

現在までにソートン培地に低酸素状態・37°C で培養されている H37Rv 4 株 (No.4: 1964 年培養開始, No.15-17: 1968 年培養開始) について、電顕による観察を実施し、

① 直接 RNA 抽出を実施し、cDNA の作製を行った。② また通常状態での継代培養を実施し、#15 及び #17 株のコロニーを回収した。③ #15 についてはハンセン病研究センター (共同研究者：星野仁彦) にて short range での Wayne モデルを作成中である。さらに④ レファレンス株として 1964 年保存 (凍結) の H37Rv を回復している。② と④ の株については対数増殖期からの RNA 抽出を終了した。①~④ の検体がそろった段階で遺伝子の発現解析を実施する。

溶存酸素量を測定したところ、株 1

(NN15) では 14.6%/70.2%/5.88 ppm (それぞれ%O₂/% air saturation/ppm)、株 2 では (NN17) 15.2%/73.1%/6.12 ppm であった。

長期低酸素培養菌の急速凍結法による電子顕微鏡下での観察では、生菌と死菌の混在状態であると判断され、形態的にも明確な差が認められた(図 1~3)。具体的には図 1 が活発な活動状態(対数増殖期)の H37Rv の所見であり、概して菌体内の電子密度は一様で、直径約 10nm の顆粒が多数散在し、DNA の明瞭な線維状構造が凝集あるいは分散した状態で観察された。また、細胞壁外膜と思われる構造が観察される。これに対して長期培養によって既に死菌と思われる菌体では細胞壁構造が壊れており、さらに内部の電子密度も均一でない(図 2)。これに対して生菌(図 3)と思われる菌体では内部構造が極めて均一・希薄になっているものの、細胞壁構造そのものは保たれており、増殖中の結核菌とは明らかに異なる状態であることが観察された。

図 1 活動性結核菌

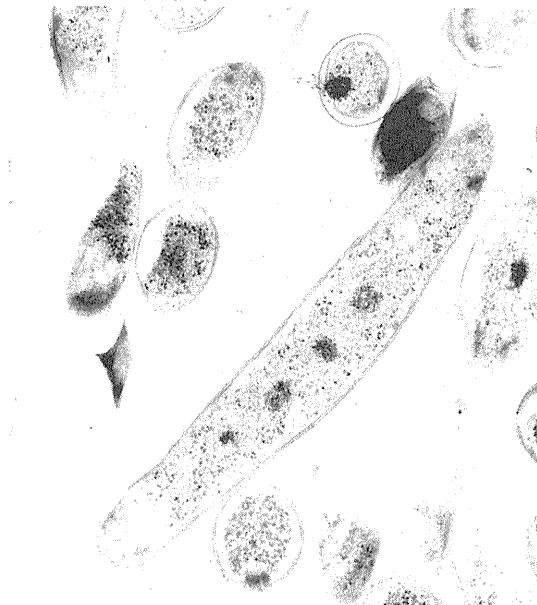
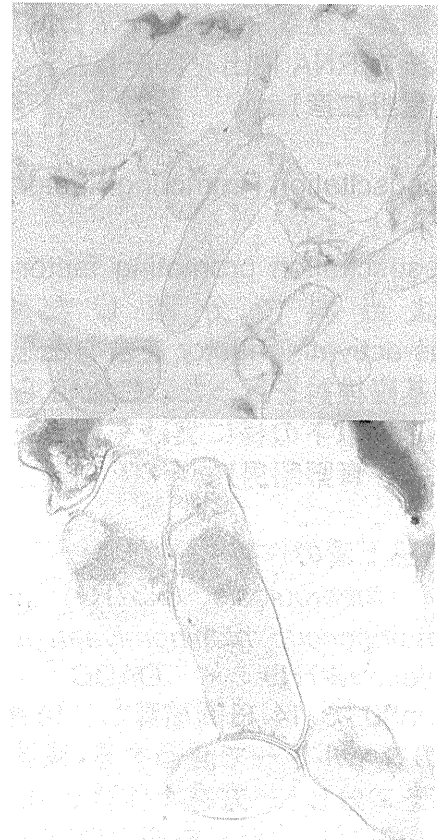


図 2 長期培養菌中既に死菌と思われる結核菌



図 3 長期培養菌中生菌と思われる結核菌



今回好気条件で継代培養を実施した株のうち、NN15 と NN17 の 2 株が生菌として回収可能であったが、生菌として回収されるまでにおよそ 3 ヶ月を要した。NN15 についてさらに液体培地で継代をおこなったところ、通常の結核菌と異なり、0.05% Tween80 存在下でも分散せず、凝塊を形成したまま発育していた。

[Resuscitation Promoting Factor に関する検討]

塗抹陽性の臨床検体を用いて、発育の促進に関する効果を評価した。それぞれの条件での発育時間を表 1 に示した。

表 1 培養上清の添加による発育支持効果

培地	培養陽性までの時間 (日; 時間)			
	検体①	検体②	検体③	検体④
C	10; 13	9; 13	8; 23	9; 21
Rv	10; 16	9; 16	9; 05	9; 01
RvH	9; 22	9; 16	9; 02	9; 14
Dn	9; 11	9; 17	8; 19	8; 21
DnH	9; 17	9; 17	9; 05	9; 01

C: 標準 MGIT 培地, Rv: 非加熱の H37Rv 培養上清を添加, RvH: 加熱処理の H37Rv 上清を添加, Dn: 非加熱の *D. nishinomiyaensis* 上清を添加, DnH: 加熱処理の *D. nishinomiyaensis* 上清を添加

今回の実験では検体①と④で *D. nishinomiyaensis* の培養上清を添加した培地で発育時間が短縮されているように思われたが、明確な差はなかった。また加熱処理した *D. nishinomiyaensis* の培養上清では非加熱の場合よりも培養時間が長い傾向があった。

D. 考察

今回低酸素状態で 40 年以上培養されている結核菌株を用いて、形態学的観察と遺伝子発現解析を試行した。

電子顕微鏡による形態学的な観察からは、長期培養株における細胞構造の変化 (DNA やリボゾームの不明瞭化) が認められた。これは休眠期間の長短で異なるのかどうか

がひとつの疑問としてあげられる。回復した結核菌株からあらたに作製した短期休眠菌との比較を行う必要があると考えられた。また、液体培地中における発育にも変化があり、界面活性剤入りの培地でも分散せずに凝集したままであり、細胞壁構造そのものの変化がある可能性も示唆されている。今後の解析が必要と考えられた。

長期培養株の遺伝子発現状況について、同時代の H37Rv をレファレンスとして、好気培養で回復した結核菌とその Wayne モデル休眠菌との比較を試みた。生菌の回復と調製に時間を要したため、現時点では解析結果が得られていない。溶存酸素の測定値が大気圧の 70% と予想より遙かに高値であったが、これは培地を別の容器に移したため酸素分圧が上昇した可能性が考えられた。新たに滅菌可能なファイバー型の酸素濃度測定装置を使用して再度検討を行う予定である。

RPF の評価については、今回明確な発育促進効果は MGIT 培養では認められなかった。今回の実験では培養上清を使用した。既存の報告では組換え作製した RPF も使用されており、今後検討の必要が考えられた。また添加した培養上清の濃度が不十分であることも考えられ、今後はさらに高濃度を添加して実験を継続する。培養を促進する効果が認められれば、今回好気条件で回復できなかった長期培養菌や臨床検体への応用が期待できる。

E. 結論

結核研究所において 40 年以上低酸素状態で培養している結核菌を使用し、形態的観察と遺伝子発現解析を試行した。また結核菌の発育を促進するとされる物質に関して予備的検討を実施した。

長期培養菌について、死菌と休眠状態にある生菌の混合物であると考えられた。形態的に対数増殖期にある結核菌とは明らかに異なる特徴が観察され、機能的な側面との関連が考えられた。引き続いて形態的变化の原因について研究が必要と考えられた。

発育促進物質については、*M. luteus* と同

様の一般細菌による結核菌の Trans activation の可能性が示された。今後も継続してこの細菌による結核発育促進の効果を検証する必要があると考えられた。

G. 研究発表

なし

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