

における IFN- γ および TNF- α 産生も結核菌感染のみの場合と比較して高い傾向にあった。さらに、抗 PD-1 抗体を投与した結核菌感染マウスは感染約 7 ヶ月後より死亡が認められ、感染後約 10 ヶ月で全てのマウスが死亡した。一方、マウスを予め BCG 免疫した後結核菌を感染させた群では、結核菌のみを感染させた群と比較して感染 4 週後の肺内生菌数は明らかに少なく、感染 400 日を経過した時点でのマウス生存率は 60% であった。また、BCG 免疫した群では結核菌感染 2 週間より IFN- γ やケモカイン (MCP-1、MCP-3、IP-10) 産生が誘導され、感染 4 週間後も持続して産生が認められた。しかし、そのレベルは結核菌単独感染群および結核菌感染後に抗 PD-1 抗体を投与した群と比較すると明らかに低いことが示された。抗 PD-1 抗体の BCG ワクチンに対する影響を調べる目的で、BCG 免疫後に抗 PD-1 抗体を投与し、その後結核菌を感染させた。その結果、結核菌感染 4 週後の肺内生菌数は、BCG 免疫のみの場合と比較して有意な違いは認められず、各種サイトカインおよびケモカイン産生においても抗 PD-1 抗体投与の効果は明らかではなかった。また、BCG 免疫後に抗 PD-1 抗体を投与した群の結核菌感染後の生存率は 80% であり、BCG 免疫単独群と比較して有意な違いは認められなかった。

本研究は、2 名の中国人留学生 (屈 慧新、須 艶婷) の協力のもとに行われた。両名は研究の遂行に当たり必要な細菌学、免疫学および分子遺伝学的手法を習得しており、帰国後はそれぞれの基礎および臨床研究において中心的な役割を果たすことができると考えている。

D. 考察

これまでの研究成績から、正常マウスに比べて PD-1 欠損マウスは結核菌感染に感受性を示し、結核菌感染早期の肺では炎症性サイトカインやケモカイン産生の亢進と、マクロファージや好中球を中心とした炎症細胞の著明な浸潤、および壊死を伴う広範な炎症性病変が形成されることがわかって

いる。また、PD-1 欠損マウスの肺では IFN- γ 産生能を有する抗原特異的 CD4⁺ T 細胞数が増加し、この細胞を移入されたマウスは結核菌に対する感受性が亢進することが示されている。これらの結果は、PD-1 を介した抑制性シグナルが働かないと、結核菌感染後の肺では抗原特異的 CD4⁺ T 細胞が過剰な炎症反応を惹起するため、感染した菌を制御することができなくなることを示しており、PD-1 経路は結核菌感染初期に誘導される CD4⁺ T 細胞の機能を適度に制御し、過剰な炎症反応を引き起こさないための重要な役割を果たしていると考えられる。一方、結核感染の慢性期に抗 PD-1 抗体を投与しても菌の感染動態には影響がないことが報告されていることから (IAI 77: 4621-4630, 2009)、結核菌感染では PD-1 を介したシグナルはナイーブ CD4⁺ T 細胞のエフェクター細胞への分化を正常に誘導するために必要であり、すでにエフェクター/メモリー細胞に分化した細胞の機能制御にはその効果を発揮しないことが考えられる。

一方、結核菌感染とは異なり、BCG 感染の場合には PD-1 経路の障害は菌の排除を亢進させることが示されており、PD-1 を介したシグナル制御が BCG ワクチン効果の増強に繋がると考えられる。さらに、PD-1 欠損マウスに BCG 免疫すると、その後の結核菌の攻撃感染に対する抵抗性が増強する。また、少なくとも BCG 感染では結核菌感染でみられる炎症反応による肺の組織傷害は観察されず、PD-1 シグナル経路の障害が感染の増悪には結びつかないことが示されている。今後は、PD-1 を介したシグナル制御のワクチンへの応用を可能にするため、これらの点については更に詳細な解析を行い、PD-1 シグナルの障害によるメリット・デメリットを明らかにすることで結核に対するワクチン開発に有用な情報を提供していきたい。

E. 結論

PD-1 欠損マウスに BCG を感染させると、正常マウスに比較して菌の排除が亢進し、

BCG 免疫後の結核菌による攻撃感染に対しても強い抵抗性を示したことから、PD-1 シグナル経路を制御することで BCG ワクチンの効率が増強できる可能性が示されている。そこで本研究では、抗 PD-1 抗体を用いて PD-1 シグナルを阻害した場合の BCG 免疫への影響を検討した。結核菌感染後に抗 PD-1 抗体を投与すると、感染マウスの肺では炎症性サイトカインやケモカイン産生が増強し、結核菌感染のみの群と比較して早期に死亡することが示された。この結果から、PD-1 欠損マウスでみられる結核菌に対する感受性の亢進は抗 PD-1 抗体投与により再現できることが示された。一方、マウスを BCG 免疫し、その後抗 PD-1 抗体を投与して結核菌の攻撃感染に対する宿主応答を調べた。その結果、抗 PD-1 抗体投与による BCG ワクチンの増強効果は明確には認められず、更なる検討が必要であることが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hernandez-Cuellar, E., K. Tsuchiya, H. Hara, R. Fang, S. Sakai, I. Kawamura, S. Akira, and M. Mitsuyama. 2012. Nitric Oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. *J. Immunol.*, 189: in press.

2. 学会発表

- 1) 河村伊久雄, 酒井俊祐, 光山正雄. PD-1 シグナル経路による抗結核防御免疫の制御. 第 82 回実験結核研究会 2012 年 5 月 広島
- 2) 河村伊久雄, 光山正雄. 結核菌による宿主感染防御の発現制御. 第 87 回日本結核病学会 2012 年 5 月 広島
- 3) 原 英樹, 河村伊久雄, 土屋晃介, 光山正雄. リステリア感染における主要病原因子 listeriolysin O 依存的なインフラマソーム応答の役割. 第 23 回日本生体防御学会学術総会 2012 年 7 月東京
- 4) Hernandez-Cuellar, E., K. Tsuchiya,

H. Hara, R. Fang, S. Sakai, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. Nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. 第 65 回日本細菌学会 関西支部総会 2012 年 11 月 神戸

- 5) Qu, H., H. Hara, I. Kawamura, R. Fang, E. Hernandez-Cuellar, K. Tsuchiya, Y. Xu, and M. Mitsuyama. Critical role of listeriolysin O in clpain activation, which is triggered after evasion of *Listeria monocytogenes* from the phagosome into the cytoplasm of infected macrophages. 第 65 回日本細菌学会 関西支部総会 2012 年 11 月 神戸
- 6) Hernandez-Cuellar, E., K. Tsuchiya, H. Hara, R. Fang, S. Sakai, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. Nitric oxide-dependent suppression of the NLRP3 inflammasome activation. 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012 年 12 月 神戸
- 7) Hara, H., K. Tsuchiya, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. Involvement of the domain 3 of listeriolysin O in inflammasome activation induced by *Listeria monocytogenes* infection. 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012 年 12 月 神戸
- 8) Tsuchiya, K., H. Hara, S. Sakai, E. Hernandez, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. The inflammasome adaptor ASC plays a host-detrimental role in lethal infection with *Listeria monocytogenes*. 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012 年 12 月 神戸

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24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)

薬剤耐性結核菌の迅速検出法

分担研究報告書

研究分担者

鈴木 定彦

(北海道大学・教授)

薬剤耐性結核菌の迅速検出法

研究分担者 鈴木 定彦（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・教授）

研究協力者 中島 千絵（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・特任助教）

研究要旨.

超多剤耐性結核菌の出現は地球規模での結核の征圧に大きな障害となる。ネパールで分離された多剤耐性結核菌の薬剤耐性に係る遺伝子変異に関する報告はあるものの、超多剤耐性結核菌の薬剤耐性に係る変異ならびに遺伝子型に関する報告はこれまでになかった。そこで本研究では、ネパールで分離された 13 株の超多剤耐性結核菌を解析した。リファンピシン、イソニアジド、オフロキサシンならびにカナマイシン耐性に係る遺伝子変異で最も頻繁に検出されたのは、それぞれ RNA ポリメラーゼ β サブユニットの 531 番目のアミノ酸のセリンをロイシンに置換する変異 (92.3%)、カタラーゼの 315 番目のアミノ酸のセリンをスレオニンに置換する変異 (92.3%)、DNA ジャイレースの 94 番目のアミノ酸のアスパラギン酸をグリシンに置換する変異 (53.9%) ならびに 16S リボソーム RNA の 1400 番目の塩基アデニンをグアニンに置換する変異 (61.5%) であった。Spoligotyping の結果より 69 % が北京遺伝子型である事が明らかとなった。これに、26 カ所の Variable number tandem repeat 解析ならびに 10 カ所の multilocus sequence typing の結果をあわせると、ネパールでは超多剤耐性結核菌のヒト-ヒト伝播があることが示唆された。

A. 研究目的

結核はネパールにおける重要疾患の一つである。2008 年の新規登録者の割合は 10 万人当り 173 と非常に高く、塗抹陽性患者も 10 万人当り 77 人と高い値を示している。1996 年から 2007 年の間に 4 回の薬剤耐性結核のサーベイランスが実施されたが、多剤耐性結核の割合は 1.1% から 3.7% であった。

ネパールで多剤耐性結核ならびに超多剤耐性結核の対策を立てるためには、これらの遺伝的性状を明らかにする必要がある。ネパールではこれまでに多剤耐性結核菌の薬剤耐性関連遺伝子変異に関する報告はあるものの、超多剤耐性結核菌に関する同様の報告はこれまでになかった。

そこで本研究では、ネパールにおける超多剤耐性結核菌の分離と遺伝子解析を目的とした。

B. 研究方法

結核菌：ドイツ-ネパール結核プロジェクトで保存しているネパールで 2007 年から 2010 年に分離した多剤耐性結核菌のうち 109 株をランダムに抽出し、用いた。

薬剤感受性試験：WHO の指針に則って Löwenstein-Jensen 培地を用いた薬剤感受性試験を実施した。使用薬剤はイソニアジド 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、リファンピシン 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ストレプトマイシン 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、エタンブトール 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、オフロキサシン 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、カナマイシン 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、カプレオマイシン 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。

DNA 抽出：PCR に供する DNA はガラスビーズ法を用いて抽出した。0.5g のガラスビーズ、0.5ml の TE バッファーならびに 0.5ml のクロロホルムの入ったスクリュウキャップバイアルに結核菌コロニーを取り、

トミー精工の Micro smash を用いて1分間震盪して結核菌を破砕した。破砕の後、遠心分離により得た上清をエタノール沈殿させ、その沈渣を100 µl の TE バッファーに溶解した。

薬剤耐性関連遺伝子の PCR による増幅: PCR は 1 x GoTaq バッファー、0.25 mM の各 dNTPs、0.5 M のベタイン、0.5 µM の各プライマー (表 1)、1 U の GoTaq DNA Polymerase ならびに 1 µl の DNA を含む反応液にて実施した。反応は変性 96 ° C、60 秒の後、96 ° C-10 秒、55 ° C-10 秒、72 ° C-30 秒を 1 サイクルとしてこれを 35 回実施した。PCR 産物はライフテクノロジー社製 Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いてマニュアルにしたがってシーケンス反応に供した。シーケンス反応産物はライフテクノロジー社製 ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer にて分析した。得られた塩基配列は野生型の遺伝子配列をと比較して遺伝子変異を特定した。遺伝系統解析: Spoligotyping は昨年度の本会の報告書に掲載した方法で実施した。Spoligotype は SpolDB4 データベースに登録されたものと比較する事により遺伝子型を特定した。もう一つの遺伝子型解析法として 26 カ所の Variable number tandem repeat (VNTR) 解析を常法に従って実施した。得られた結果は Applied Maths 社製 Bionumerics software を用いて解析した。また、10 カ所の multilocus sequence typing (MLST) は常法に従って実施した。倫理面への配慮 臨床分離株を用いた研究である。

C. 研究結果

薬剤感受性パターン: 分析した 109 株の多剤耐性菌のうち 13 株が超多剤耐性菌であった (表 2)。このうち 3 名 (患者 84、90 ならびに 123) には第二次選択薬剤による治療歴がなかった。残りの 96 株のうちの 41、1 ならびに 1 株は、オフロキサシン、カナマイシンならびにカプレオマイシンに耐性のいわゆるプレ長多剤耐性結核菌であった。

超多剤耐性結核の地理的分布: 超多剤耐性結核患者は全てネパールの 5 つの主要都市の何れかに居住していた (図 1)。

内訳は Kathmandu に 7 名、Pokhara に 3 名、Butwal に 1 名、Bhairahawa に 1 名、Dhangadhi に 1 名であった (表 2)。超多剤耐性結核患者の数はそれぞれの都市の人口と関連していた。

RNA ポリメラーゼ β サブユニット、カタラーゼ、アシルキャリアー蛋白質還元酵素、DNA ジャイレース A サブユニット、同 B サブユニットならびに 16S リボソーム RNA 遺伝子上の変異: リファンピシン、イソニアジド、オフロキサシンならびにカナマイシン耐性に係る遺伝子変異で最も頻繁に検出されたのは、それぞれ RNA ポリメラーゼ β サブユニットの 531 番目のアミノ酸セリンをロイシンに置換する変異 (rpoB-Ser531Leu ; 92.3%)、カタラーゼの 315 番目のアミノ酸セリンをスレオニンに置換する変異 (katG-Ser315Thr ; 92.3%)、DNA ジャイレースの 94 番目のアミノ酸アスパラギン酸をグリシンに置換する変異変異 (gyrA-Asp94Gly ; 53.9%) ならびに 16S リボソーム RNA の 1400 番目の塩基アデニンをグアニンに置換する変異 (rrs-A1400G ; 61.5%) であった。それ以外で見出された変異は、rpoB-Asp516V、アシルキャリアー蛋白質還元酵素遺伝子開始コドンから 15 塩基上流のシトシンをチミンに置換する変異 (inhA-C-15T)、gyrA-Ser91Pro、gyrA-Asp94Ala、gyrA-Asp94Asn、gyrA-Asp94His、gyrA-Asp94Tyr ならびに rrs-C1401T であった (表 2)。

Spoligotyping ならびに MLST : Spoligotyping の結果から超多剤耐性結核菌の中では北京遺伝子型を持つ菌株が多数 (9/13) を占めていることがわかった。これに加えて一株は CAS 遺伝子型、2 株は T 遺伝子型と同定された。残りの 1 株はこれまでに見つかっていない遺伝子型を示していた。MLST 解析の結果、北京遺伝子型を持った 9 株のうち 8 株が modern 型に属している事が判明した。

VNTR によるクラスター解析: VNTR 解析の

結果、13株の超多剤耐性結核菌は7つのユニークな型と2つのクラスターに分類された(図2)。2つのクラスターにはどちらも北京遺伝子型を持った3株が含まれていた。クラスター1に属する株名86ならびに103の菌株は同一の薬剤耐性関連遺伝子変異(*rpoB*-Ser531Leu、*katG*-Ser315Thr、*gyrA*-Asp94Glyならびに*rrs*-C1401T)を有していたが株名84は異なった遺伝子変異*rrs*(A1400G)を有していた。同様に、クラスター2に属する株名118ならびに161の菌株も同一の薬剤耐性関連遺伝子変異(*rpoB*-Ser531Leu、*katG*-Ser315Thr、*gyrA*-Asp94Glyならびに*rrs*-A1400G)を有していたが、株名123の菌株は別個の遺伝子変異パターン(*rpoB*-Ser531Leu、*inhA*-C-15T、*gyrA*-Asp94Asnならびに*rrs*-G1483T)を示した。

D. 考察

本研究では、ネパールで分離された超多剤耐性結核菌における薬剤耐性関連遺伝子変異ならびに遺伝子型を明らかにした。それと同時にプレ超多剤耐性結核が多数存在する事も明らかにした。プレ超多剤耐性結核が多いことは、ネパールでの薬剤の使用が適切でない事を意味している。特にキノロン耐性を有するプレ超多剤耐性結核が多いことは、キノロン剤が最も頻繁に気道感染の治療に処方されている事と良く一致している。結核菌は段階的に薬剤耐性を獲得する事が知られている。プレ超多剤耐性結核が多いことは、ネパールでの超多剤耐性結核蔓延の危険性を示すものである。

薬剤耐性関連遺伝子の塩基配列を決定した結果ネパールの超多剤耐性結核菌では*rpoB*-Ser531Leu、*katG*-Ser315Thr、*gyrA*-Asp94Glyならびに*rrs*-A1400Gの変異が頻繁に見られる事が判明した。他の国における研究でも同様な報告が為されているが、結核菌の生育等に影響の少ない変異が選択されたものと考えられる。

spoligotyping と MLST を用いた遺伝子型別の結果からは modern 型の北京遺伝

子型を持った超多剤耐性結核菌がネパールで蔓延している事が示唆された。同様な現象は南アフリカ、インド、中国から報告されている。一方、日本で分離される超多剤耐性結核菌には ancient 型の北京遺伝子型菌が多数を占めている。

北京遺伝子型の超多剤耐性結核菌が他の遺伝子型を持ったものに比べてより若年層で見られた事(23.1 ± 4.8 対 39.5 ± 4.9)は、北京遺伝子型の超多剤耐性結核菌が若年層間で伝播しやすい可能性も示唆している。

本研究で VNTR による遺伝子型ならびに薬剤耐性関連遺伝子変異が完全に一致した菌株が見出された事はネパールにおいて超多剤耐性結核菌のヒト-ヒト間伝播がある可能性を示唆するものである。今回の研究では、Kathmandu で分離された超多剤耐性結核菌と同一の遺伝子型ならびに薬剤耐性関連遺伝子変異を持ったものが Kathmandu から 650 km 以上離れた Dhangadhi (図1)に住む結核患者からも分離された。Kathmandu は首都であるため、多くの人々の行き来がある。実際に株名161の菌株が分離された患者は Kathmandu を訪れたていたことが確認された。プレ超多剤耐性結核菌の存在と遺伝子型が完全に一致した超多剤耐性結核菌の存在は、ネパールにおいて不適切な治療による超多剤耐性結核菌の出現とそのヒト-ヒト間伝播が同時に起こっている事を示すものであった。

E. 結論

本研究で分析した超多剤耐性結核菌株の多くは北京遺伝子型に分類された。この遺伝子型を有する結核菌は他の遺伝子型の菌に比べて若年層で見られる割合が多いことが知られている。更に、VNTR ならびに薬剤耐性関連遺伝子変異が同一の菌株がみられることから、ネパールにおいては超多剤耐性結核菌がヒト-ヒト感染を引き起こしている事が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Poudel, A., B. Maharjan, C. Nakajima, Y. Fukushima, B. D. Pandey, A. Beneke, and Y. Suzuki. Characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Nepal. Tuberculosis, in press.
 - 2) Rahim, Z., C. Nakajima, R. Raqib, K. Zaman, H. P. Endtz, A. G. M. van der Zanden, and Y. Suzuki. 2012. Molecular Mechanism of Rifampicin and Isoniazid Resistance in *M. tuberculosis* from Bangladesh. Tuberculosis, 92: 529-534.
 - 3) Poudel, A., C. Nakajima, Y. Fukushima, H. Suzuki, B. D. Pandey, B. Maharjan, and Y. Suzuki. 2012. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolated in Nepal. Antimicrob. Agents Chemother., 56: 2831-2836.
2. 学会発表
 - 1) Poudel, A., C. Nakajima, B. Maharjan, B. D. Pandey, and Y. Suzuki. Drug Resistance Pattern and Genotypic Characteristics of Extremely Drug-resistant Tuberculosis Strains from Nepalese Patients. International Conference for Antimicrobial Agents and Chemotherapy. September 2012, San Francisco, USA.
- 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. 本研究に用いたプライマー

Locus	Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Target region	Product size (bp)
<i>rpoB</i>	TB <i>rpoB</i> S	CAGGACGTGGAGGCGATCAC	1519 - 1599*	278
	TB <i>rpoB</i> AS	GAGCCGATCAGACCGATGTTGG		
<i>katG</i>	TB <i>katG</i> S	ATGGCCATGAACGACGTCCGAAAC	823 - 1140	392
	TB <i>katG</i> AS	CGCAGCGAGAGGTCAGTGGCCAG		
<i>inhA regulatory region</i>	TB <i>inhA</i> S	TCACACCGACAAAACGTCACGAGC	-50 - -1	231
	TB <i>inhA</i> AS	AGCCAGCCGCTGTGCCGATCGCCA		
<i>gyrA</i>	TB <i>gyrA</i> S	AGCGCAGCTACATCGACTATGCG	220-339	321
	TB <i>gyrA</i> AS	CTTCGGTGTACCTCATCGCCGCC		
<i>gyrB</i>	TB <i>gyrB</i> S	CGGCACGTAAGGCACGAGAG	1373-1770	398
	TB <i>gyrB</i> AS	GAACCCGGAACAACAACGTCAAC		
<i>rrs</i>	TB <i>rrs</i> S	AGTCCCAGCAACGAGCGCAACCC	1350 - 1550	665
	TB <i>rrs</i> AS	GATGCTCGCAACCACTATCCA		

* Corresponding E. coli numbering was used for *rpoB*.

表2. 超多剤耐性結核菌の薬剤感受性パターン、耐性関連遺伝子変異、Spoligo type、居住地域ならびに由来患者の年齢

Strain No.	Drug susceptibility profile*							Mutation pattern in different drug-target genes or regions†						Spoligo type based clade with ST	Geographical location	age of patient
	RFP	INH	STR	EMB	OFX	KAN	CAP	<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>inhA</i> regulatory region	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rrs</i>			
84	R	R	R	R	R	R	R	Ser531Leu	Ser315Thr	wt [‡]	Asp94Gly	wt	A1400G	Beijing (Modern)	Kathmandu	21
86	R	R	R	R	R	R	R	Ser531Leu	Ser315Thr	wt	Asp94Gly	wt	C1401T	Beijing (Modern)	Kathmandu	16
90	R	R	R	R	R	R	R	Asp516Val	Ser315Thr	wt	Ser91Pro	wt	A1400G	Beijing (Ancient)	Kathmandu	26
103	R	R	R	R	R	R	R	Ser531Leu	Ser315Thr	wt	Asp94Gly	wt	C1401T	Beijing (Modern)	Kathmandu	24
108	R	R	S	S	R	R	R	Ser531Leu	Ser315Thr	wt	Asp94Gly	wt	A1400G	CAS	Kathmandu	40
118	R	R	R	R	R	R	R	Ser531Leu	Ser315Thr	wt	Asp94Gly	wt	A1400G	Beijing (Modern)	Kathmandu	25
123	R	R	R	R	R	R	R	Ser531Leu	wt	C-15T	Asp94Asn	wt	G1483T	Beijing (Modern)	Kathmandu	21
139	R	R	R	R	R	R	R	Ser531Leu	Ser315Thr	wt	Asp94Ala	wt	A1400G	Beijing (Modern)	Pokhara	25
140	R	R	R	R	R	R	R	Ser531Leu	Ser315Thr	wt	Asp94Ala	wt	A1400G	T2	Pokhara	33
142	R	R	R	R	R	R	R	Ser531Leu	Ser315Thr	wt	Asp94Tyr	wt	G1483T	New	Pokhara	45
151	R	R	R	R	R	R	R	Ser531Leu	Ser315Thr	wt	Asp94His	wt	A1400G	T1	Bharaiahawa	40
155	R	R	R	R	R	R	R	Ser531Leu	Ser315Thr	wt	Asp94Gly	wt	A1400G	Beijing (Modern)	Butwal	18
161	R	R	R	R	R	R	R	Ser531Leu	Ser315Thr	wt	Asp94Gly	wt	A1400G	Beijing (Modern)	Dhangadhi	32

*INH, isoniazid, RFP, rifampicin, STR, streptomycin, EMB, ethambutol, OFX, ofloxacin.

KAN, kanamycin, CAP, capreomycin, R, resistant, S, susceptible.

†Mutations in *rpoB*, *katG* and *gyrA* are presented as amino acid changes with codon position.

‡Mutations in *rrs* gene and *inhA* promoter region are presented as nucleotide changes with mutation position.

[§]WT, wild type.



図1. 超多剤耐性結核患者の地理的分布
超多剤耐性結核患者の居住地を●で表示。

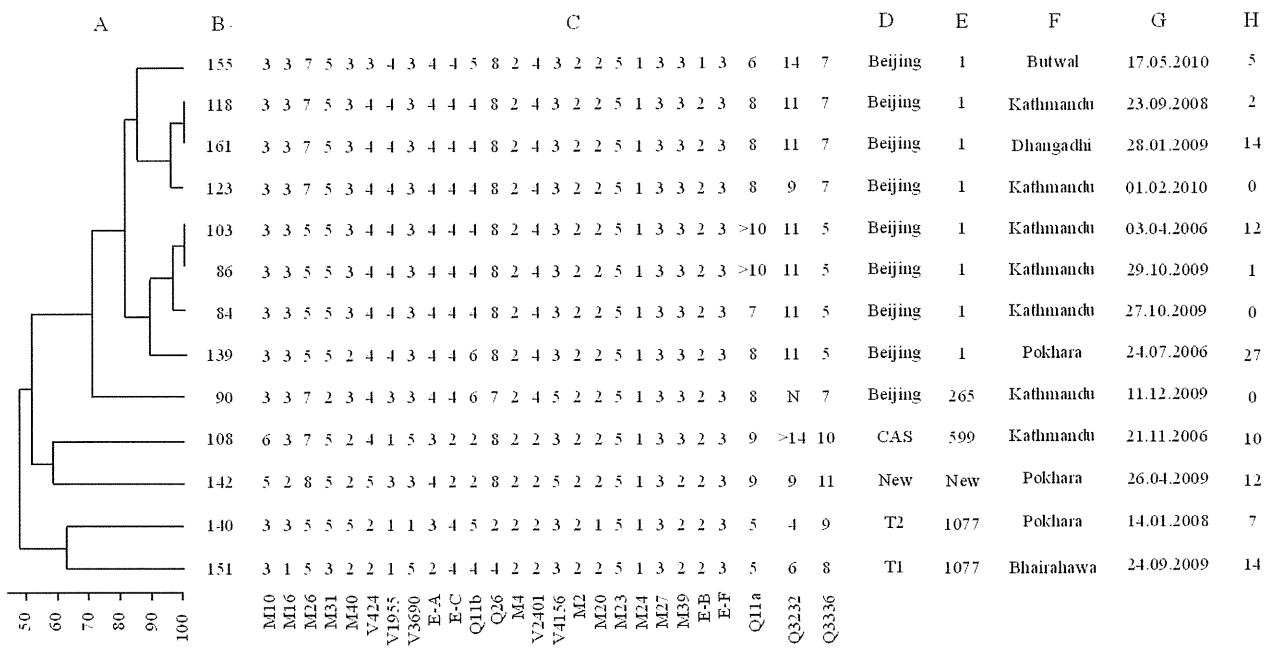


図2. ネパールで分離された超多剤耐性結核菌の分子系統樹

A: 系統樹, B: 菌株名, C: VNTR, D: Spoligotypeのクレード, E: Spoligotypeの国際型、患者の居住地、検体採取日、第二次抗結核剤治療(月)

平成24年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

抗酸菌感染症と神経障害

分担研究報告書

研究分担者

後藤 正道

(国立療養所星塚敬愛園・園長)

抗酸菌感染症と神経障害

研究分担者 後藤 正道（国立療養所星塚敬愛園・園長）
研究協力者 圓 純一郎（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・客員研究員）

研究要旨.

抗酸菌 *Mycobacterium ulcerans* による難治性皮膚疾患であるブルーリ潰瘍は痛みがない。菌の産生する毒性脂質 Mycolactone が神経組織を傷害する機序の検討を行った。培養シュワン細胞と線維芽細胞に Mycolactone A/B を投与し、アポトーシスのシグナル伝達に重要な Caspase-3 の発現を Western blotting と蛍光抗体法で比較したところ、投与後短時間ではシュワン細胞に線維芽細胞よりも強い Caspase-3 の発現が認められた。ブルーリ潰瘍では、シュワン細胞のアポトーシスが神経障害に関与していると考えられる。を産生し、結核菌に対する生体防御反応を高めることが明らかとなった。

A. 研究目的

ブルーリ潰瘍は、*Mycobacterium ulcerans* (*M. ulcerans*) 感染によって引き起こされる難治性皮膚疾患であり、主に熱帯、亜熱帯地域で見られる。大きく深い無痛性の皮膚潰瘍が形成され、重篤な身体後遺症を残すことが多いことからハンセン病と同様に社会的な偏見を受けやすく、予防と治療法の確立が望まれている。WHOは、結核・ハンセン病に次ぐ重要な抗酸菌感染症としてブルーリ潰瘍の対策を行っている。

これまでアジアにおいては、オーストラリア、中国、インドネシア、日本、マレーシア、パプアニューギニア、スリランカなどからブルーリ潰瘍が報告されている。日本では32症例の報告があるが、そのほとんどは数年以内の症例であり、国内での症例報告が急増している。本疾患に対する認識が進めば、アジア諸国でも対策が必要な感染症となる可能性が高く、その病態の解明と予防対策・治療法の開発が望まれる。

ブルーリ潰瘍では巨大な潰瘍にもかかわらず痛みがない理由は長く不明であった。我々はハンセン病の神経障害と比較しながらブルーリ潰瘍の病変を検索し、末梢神経への菌の侵入と神経組織の変性を見出した。

また *M. ulcerans* は毒性脂質 Mycolactone を産生するが、Mycolactone 投与によってマウスにブルーリ潰瘍と同様の末梢神経障害が起きることを報告した。本研究では、ブルーリ潰瘍における無痛性病変成立のメカニズムを解明し、治療を目指した研究基盤の確立を目的とする。

Mycolactone は線維芽細胞とマクロファージにアポトーシスを誘導することが報告されている。我々は昨年度、人工合成した Mycolactone を用いて、末梢神経の主要な構成細胞であるシュワン細胞に対する細胞傷害性を検討し、線維芽細胞への傷害性との比較検討を行なったところ、アポトーシスと壊死の両者が関与している可能性が高くなった。

そこで本年度は、この研究をさらに進め、Mycolactone 投与後短時間において、アポトーシスのシグナル伝達に重要な Caspase-3、Cleaved PARP (poly ADP ribose polymerase)、Phospho-Histone H2A.X の発現を Western blot を用いて検討した。また、Caspase-3 については蛍光抗体法での検出も試みた。

B. 研究方法

1) 培養シュワン細胞と線維芽細胞への Mycolactone 投与

シュワン細胞：SW10 mouse Schwann cells (ATCC CRL-2766) を 10% ウシ胎仔血清を含む Dulbecco 's Modified Eagle' s Medium を用いて、CO₂ 濃度 5%、33.0°C にて細胞培養を行った。

線維芽細胞：L929 mouse fibroblast cells (ATCC CCL1) を、10% ウマ血清を含む Eagle' s Minimum Essential Medium を用いて、CO₂ 濃度 5%、37.0°C にて細胞培養を行った。

合成した Mycolactone A/B を 100% エタノール (EtOH) で 1mg/ml に希釈 (ハーバード大学の Prof. Yoshito Kishi より供与) し、さらに培地で段階希釈した。各細胞 4x10⁵ を 60mm ディッシュで 24 時間培養し、培地で段階希釈した Mycolactone A/B の 4ml を入れ、それぞれ 3ng/ml、30ng/ml、300ng/ml の最終濃度になるようにした。

対照として 100% EtOH を同様に培地で希釈して最終濃度 300ng/ml に調整し、培養細胞に加えた。Mycolactone A/B を投与後、12、24、48、72 時間後に解析を行った。

2) Western blot によるアポトーシスの検出

各細胞 4x10⁵ を 60mm ディッシュで 24h 培養し、培地で段階希釈した Mycolactone A/B の 4ml を入れ、それぞれ 3ng/ml、30ng/ml、300ng/ml の最終濃度になるようにした。12、24、48、72 時間後にそれぞれの濃度の細胞の処理を行った。

60mm ディッシュの上清を 15ml チューブに集め、1200 rpm で 5 分間遠沈させ、遠沈後に上清を取り除き、冷たい PBS で 2 回洗浄した後に 80ul の RIPA buffer を加えて、攪拌した。

また 60mm ディッシュを PBS で 2 回洗浄した後に、各ディッシュに 80 ul の RIPA buffer を加えた。セル・スクレーパーを用いて細胞を剥離し、1.5ml チューブに集め、先ほどの 15ml チューブのものと合わせて更に攪拌した後、5 分間 4°C 下に置いた。10000G で 5 分間遠沈させた後に、それぞれ

の上清を 1.5ml チューブに取り出し、-80°C 下にて保存した。

BCA Assay 後、Rabbit anti-Cleaved Caspase-3 (Cell Signaling #9661)、Rabbit anti-Cleaved PARP (poly ADP ribose polymerase, Cell Signaling #5625)、Rabbit anti-Phospho-Histone H2A.X (Cell Signaling #2577)、Mouse monoclonal Anti- α -Tubulin (Sigma T-9026) にて Western blot を行った。

3) 蛍光抗体法によるアポトーシスの検出

2 穴のスライドチャンバーに各細胞を 24h 培養し、培地で段階希釈してそれぞれ 3ng/ml、30ng/ml、300ng/ml の最終濃度になるようにした Mycolactone A/B の 2ml を入れ、12、24 時間後に細胞をパラホルムアルデヒドと Triton X で処理した後に、Caspase-3 を Rabbit anti-Cleaved Caspase-3 (1:1000) と Alexa Fluor 594 Goat Anti-Rabbit IgG (A-11037) で赤色蛍光、核 DNA を DAPI (4',6-diamidino -2-phenyl indole) で青色蛍光、細胞内アクチンを Alexa Fluor 488 Phalloidin で緑色蛍光に染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

倫理面への配慮 本研究では、実験株として既に安全性が確立された細胞株を使用し、感染性を有する実験材料は使用していない。また、廃棄物処理や実験場所に関して、関係法令・指針および研究施設の設けた基準を遵守して行った。

C. 研究結果

1) Mycolactone 投与による細胞形態の変化

線維芽細胞では、実験開始 48 時間後までは全ての濃度においてほとんど変化は見られなかったが、72 時間後に、30ng/ml では一部の細胞が浮遊してきた。

一方、シュワン細胞では、実験開始 24 時間後には Mycolactone A/B 濃度 30ng/ml、では細胞が萎縮して球形になり、培地上に多数浮遊してきており、細胞死が確認された。対照のエタノールと 3ng/ml では浮遊細

胞はほとんど確認されなかった。30ng/ml では 48 時間後は一部が残っていたが、72 時間後ではほとんどの細胞が剥離・浮遊していた (図 1)。

2) Western blot によるアポトーシスの検出

線維芽細胞では、anti-Cleaved Caspase-3、anti-Cleaved PARP、anti-Phospho-Histone H2A.X、anti- α -Tubulin に正常対照と比べて変化は見られなかった。

シュワン細胞では、12 時間後、24 時間後の anti-Cleaved Caspase-3 でバンドが検出できた (図 2) が、anti-Cleaved PARP、anti-Phospho-Histone H2A.X では正常対照と比べて変化が見られなかった。しかし、Anti- α -Tubulin では 30ng/ml の 48 時間後、72 時間後においてバンドの消失が見られた (図 3)。

3) 蛍光顕微鏡によるアポトーシスの検出

Mycolactone 投与後 12、24 時間後の Caspase-3 の細胞レベルにおける発現を比較したが、Mycolactone 30ng/ml の 12 時間後においてのみ、一部のシュワン細胞に発現を認めた。発現している細胞は形態学的には特に変化は認められず、アポトーシスの初期段階に相当する所見であった (図 4)。

D. 考察

我々はマウスへの *M. ulcerans* 接種と Mycolactone 投与で末梢神経障害が起きることを報告したが、Mycolactone が神経系細胞に及ぼす影響について、細胞レベルで解析することで機序の解明をしようとしている。

昨年度は、末梢神経障害に最も関与すると思われるシュワン細胞と線維芽細胞に対する Mycolactone の細胞障害性を、トリパンブルー染色と TUNEL 法 (アポトーシスを検出) で定量的に比較したところ、24、48、72 時間後のいずれにおいても、シュワン細胞により強い細胞壊死とアポトーシスが認められた。しかし、壊死とアポトーシスが同時に起こることは稀のため、アポトーシ

スが先行して起こり、二次的に壊死が起きているのではないかと推測した。

そこで本年度は、Mycolactone 投与後 12、24 時間後を中心に、アポトーシス関連物質の発現についてウェスタンブロッティングで検討したところ、Caspase-3 は線維芽細胞では検出されなかったが、Mycolactone 30ng/ml と 300ng/ml 投与後 12、24 時間のシュワン細胞ではバンドが検出された。また、Caspase-3 の免疫細胞化学では、形態学的に変性所見の見られない紡錘形シュワン細胞の一部に、シグナルは弱いながらも陽性染色が認められた。

一方、Caspase-3 によって切断される (Cleaved) PARP と、DNA 損傷時にリン酸化を受け、アポトーシス初期のマーカーと考えられているリン酸化 Histone H2A.X については、Mycolactone による影響は認められなかった。これらについては、さらなる検討が必要と考えられる。

細胞の微小管は、 α -と β -Tubulin が重合した二量体で構成される。Tubulin の重合阻害薬はアポトーシスによる細胞死を誘導することが知られている。当初、Tubulin は内部対照として用いたが、Mycolactone 投与によって、線維芽細胞の Tubulin 発現には変化は見られなかったものの、シュワン細胞の Tubulin 発現は著明に抑制された。このことから Tubulin が Mycolactone による細胞傷害に関与している可能性が新たに示唆された。

E. 結論

培養シュワン細胞と線維芽細胞を用いて、Mycolactone A/B のアポトーシス誘導能を比較検討したところ、Mycolactone A/B はシュワン細胞に Caspase-3 の発現を誘導し、Tubulin の発現を抑制した。ブルーリ潰瘍における無痛性は、Mycolactone がシュワン細胞にアポトーシスを引き起こすためと示唆される。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

感染症)における神経障害機構の研究
 ~培養細胞における Mycolactone の細胞毒性について~. 第 85 回日本ハンセン病学会総会 2012 年 6 月 札幌市

2. 学会発表
- 1) 後藤正道, 杉尾由希子, 澤田誠一, 吉永裕一郎, 宮内孝浩, 増田宏. ハンセン病後遺症の末梢神経障害性疼痛に対するプレガバリンの使用状況と効果 第 85 回日本ハンセン病学会総会 2012 年 6 月 札幌市
 - 2) 圓純一郎, 北本祥, 岸義人, 米澤傑, 後藤正道. ブルーリ潰瘍 (*M. ulcerans*

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

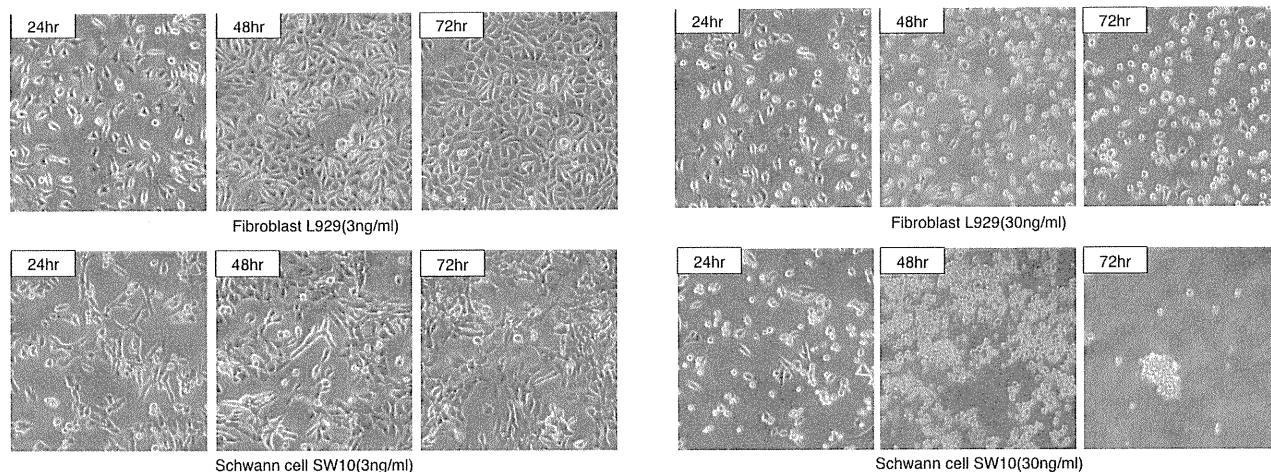


図 1. 培養線維芽細胞 (上段) とシュワン細胞 (下段) への合成 Mycolactone A/B (左パネル: 3ng/ml, 右パネル: 30ng/ml) 投与後の細胞壊死の経時的比較

Mycolactone A/B (30ng/ml) 投与後のシュワン細胞により多くの壊死細胞が観察される。

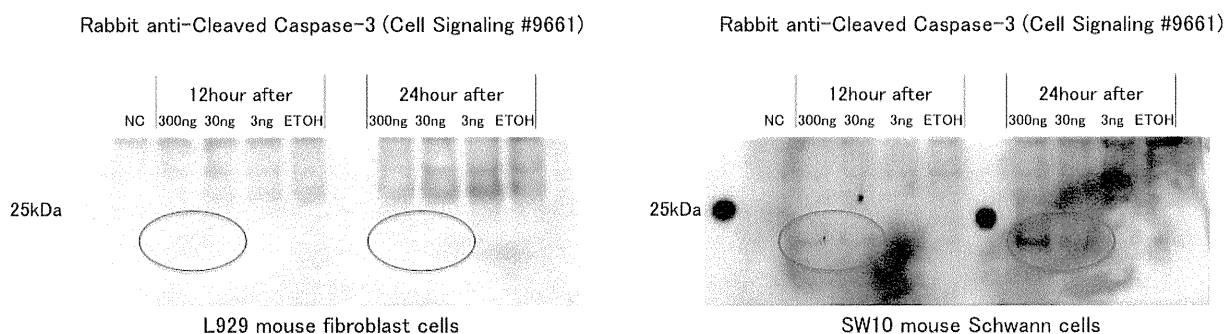


図 2. 培養線維芽細胞 (左) とシュワン細胞 (右) への合成 Mycolactone A/B 投与 12 時間後と 24 時間後の Western blot による Caspase-3 の発現の比較

Caspase-3 の発現マーカー付近において、線維芽細胞ではバンドが検出されないが、シュワン細胞の 300ng/ml と 30ng/ml では 12 時間後、24 時間後ともにバンドが検出された。

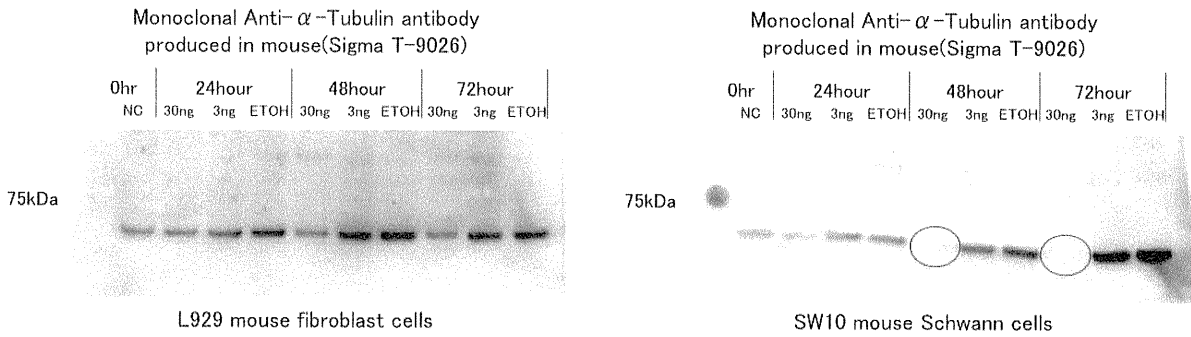


図3. 培養線維芽細胞（左）とシュワン細胞（右）への合成 Mycolactone A/B 投与 24 時間後、48 時間後、72 時間後の Western blot による Tubulin の発現の比較

Tubulin の発現マーカー付近において、線維芽細胞ではバンドが検出されたが、シュワン細胞の 30ng/ml では 48 時間後、72 時間後でバンドが検出されなかった。

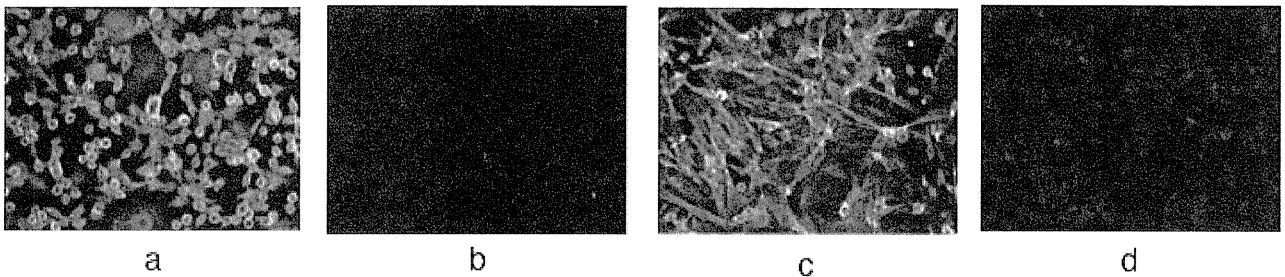


図4. 培養線維芽細胞 (a, b) とシュワン細胞 (c, d) への合成 Mycolactone A/B 投与 12 時間後の Caspase-3 の発現の比較 (a, c: アクチン、b, d: Caspase-3)

シュワン細胞では、弱いながらも Caspase-3 の発現が見られる (d)。

平成24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)

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・生体防御機能学・准教授）

研究要旨.

アジアへの貢献としてインドの研究者との新規抗菌薬の探索の共同研究を行った。

A. 研究目的

結核はエイズに次ぐ世界最大級の感染症であり、世界保健機関(World Health Organization; WHO)の報告では2011年に世界中で約870万人の新規結核患者が発生し、約140万人が亡くなっている。アジア諸国ではエイズの感染が広がっていることから結核との二重感染が大きな問題となっている。また、既存の薬剤に対する耐性菌の出現が結核症の制圧の大きな障害となっている。本邦でも新規登録結核患者の薬剤耐性頻度が6%~10%(平成20年~平成22年)に上昇してきており、薬が効かない結核に感染する(いきなり耐性結核)事例も増えていることから抗菌剤の適切な使用が求められ、さらに新規抗結核薬の開発が強く望まれている。

研究分担者は結核菌強毒株がヒト培養細胞株に細胞傷害活性を持つことを見出している(J Interferon Cytokine Res. 2001)。この活性を利用して抗結核薬のスクリーニング系、薬剤感受性試験法を開発した(Antimicrob Agents Chemother. 2002、2005)。また、研究分担者は現在までに抗菌活性をもつ化合物の探索の行い、4つの化合物を見出しているOCT359 (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007)、OCT313 (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009)、OCT313HK (*Bioorg Med Chem Lett.* 2011)、disulfiram (DSF) (*Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012)。今回、インドの Maharaja Krishnakumarsinhji Bhavnagar 大の Dr. NC Desai より抗結核化合物の探索の共同研究の申し込みを受けた。本年は24の化合物の

抗菌の測定を行った。

B. 研究方法

化合物：化合物(KR-1~KR-24)は Maharaja Krishnakumarsinhji Bhavnagar 大(インド)から提供された。

抗菌活性の評価：*Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Escherichia coli*に対する直接抗菌活性を液体培地希釈法で測定を行った。

細胞毒性の評価：化合物の細胞傷害をMRC-5(ヒト線維芽細胞株)、A-549(ヒト肺胞上皮細胞株)に対する細胞傷害活性をクリスタルバイオレット染色法もしくはMTT法にて測定した。

倫理面への配慮 本研究は個人情報と連結したヒト材料は用いておらず、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

24の化合物の *M. smegmatis*, *E. coli*については最小増殖阻止濃度MICが $250 \mu\text{g}/\text{m l}$ 以上であった。BCGについてはMICが $100 \mu\text{g}/\text{m l}$ 以上であった。細胞毒性(TD50)はMRC-5、A549いずれに対しても $500 \mu\text{g}/\text{m l}$ 以上であった。

D. 考察

今回のインドの Maharaja Krishnakumarsinhji Bhavnagar 大の Dr. NC Desai より頂いた24の化合物の細胞毒性は小さいことが示唆されたが、抗菌活性は認められなかった。

E. 結論

アジアへの貢献としてインドの Maharaja Krishnakumarsinhji Bhavnagar 大の Dr. NC Desai との共同研究として新たな抗結核薬の探索を行った。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Horita, Y., T. Takii, T. Yagi, K. Ogawa, N. Fujiwara, E. Inagaki, L. Kremer, Y. Sato, R. Kuroishi, Y. Lee, T. Makino, H. Mizukami, T. Hasegawa, R. Yamamoto, and K. Onozaki. 2012. Antitubercular activity of disulfiram, an antialcoholism drug, against multidrug- and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56: 4140-4145.

2. 学会発表

- 1) 花村菜月, 瀧井猛将, 宮田江里香, 筑比地慧, 伊藤佐生智, 山本龍二, 堀田康弘, 小川賢二, 八木哲也, 西森敬, 大原直也, 藤原永年, 前田伸司, 山崎利雄, 後藤義孝, 小野寄菊夫. トリ型結核菌 *Mycobacterium avium* の増殖とアンモニア産生に関する研究. フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロ

ジーシンポジウム 2012 年 10 月 名古屋

- 2) 小川翔大, 瀧井猛将, 伊藤佐生智, 山本龍二, 堀田康弘, 花村菜月, 宮田江里香, 小川賢二, 八木哲也, 大原直也, 後藤義孝, 藤原永年, 前田伸司, 西森敬, 山崎利雄, 小野寄菊夫. 非結核性抗酸菌 *Mycobacterium avium* の pH 環境変化における *arcA* 遺伝子発現の解析. 第 24 回微生物シンポジウム 2012 年 9 月 大阪
- 3) 花村菜月, 堀田康弘, 小川賢二, 八木哲也, 西森敬, 大原直也, 藤原永年, 前田伸司, 山崎利雄, 伊藤佐生智, 瀧井猛将. *Mycobacterium avium* 亜種 (*avium*・*hominissuis*) 間での酸性環境下における菌体外 pH 上昇に関するアンモニア産生経路の研究. 第 87 回結核病学会 2012 年 5 月 広島
- 4) 長谷川倫宏, 堀田康弘, 伊藤佐生智, 瀧井猛将. 抗結核作用を示すジチオカルバメート糖誘導体 OCT313 の動態解析. 第 87 回 日本結核病学会 2012 年 5 月 広島

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24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）
 中山 真彰（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・口腔微生物学・助教）
 井上 哲圭（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・口腔微生物学・助教）

研究要旨.

抗結核剤パラアミノサリチル酸に対する耐性機構の検討を行なった。BCGを用いて検討したところこれまでに報告されているチミジル酸合成酵素ThyAの変異とは異なる耐性機構が異なることが示唆された。もうひとつのチミジル酸合成酵素であるThyXの過剰発現によりパラアミノサリチル酸に耐性となることが示された。また実験的にThyAおよびThyXに変異を持たないパラアミノサリチル酸耐性株を作製したところcyclic-diGMP代謝系酵素の発現が上昇していたことから、パラアミノサリチル酸耐性へのcyclic-diGMPの関与も示唆された。さらにパラアミノサリチル酸を培地中に添加することにより耐性株の増殖の増加が観察された。アジアに広く蔓延している多剤耐性結核菌の治療に古典的な治療薬であるパラアミノサリチル酸の使用が考えられるが、以上の結果はその使用を慎重にすべきであることを示唆している。

A. 研究目的

チミジル酸合成酵素はウリジル酸 (dUMP) からチミジル酸 (dTMP) への反応を触媒する細胞の生存に必須の酵素であり、原核細胞、真核細胞ともに保有している。チミジル酸合成酵素にはThyAとThyXの2種類の酵素が存在するが、多くの生物種がいずれか一方のみを持つものに対して結核菌を始めとする抗酸菌は例外的に両者を持つ。そしてThyAは必須で無いものの、ThyXは生存に必須であり、特に宿主内生存において重要な分子であると考えられている。我々はBCGのThyXを持たない変異株の作製を試みたところ、その遺伝子 $thyX$ を完全に欠損した株 $\Delta thyX$ を得ることに成功し、ThyXが抗酸菌の生存に必ずしも必須でないことを明らかにした。

ところで、ThyAは抗酸菌の生存に必須で無いことがすでに示されているが、Rengarajanら(2004)によりThyAに変異があると古典的な抗結核剤のひとつパラア

ミノサリチル酸に耐性を示すことが示され、その後、パラアミノサリチル酸に耐性の臨床分離株中、約37%の株がThyAに変異を持つことが示されている。残りの約67%については耐性機構が現在も不明なままである。

パラアミノサリチル酸は現在においては使用頻度の低い抗結核剤であるが、そのために逆に、多剤耐性結核菌の中で現在汎用されている多くの薬剤に耐性を示す株についてはその使用が期待される。本研究ではThyAの変異以外のパラアミノサリチル酸に対する耐性機構を明らかにし、アジアに蔓延している多剤耐性菌に対する適切な抗結核剤の使用に資することを目的とし、そしてアジアでの結核対策に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

1. 使用菌株

BCG Tokyo株を親株とし、2段階の相同組