

換えにより作製した *thyA* あるいは *thyX* 完全欠損菌 $\Delta thyA$ と $\Delta thyX$ を用いた。また *thyA* あるいは *thyX* を抗酸菌発現ベクター pNN2 に挿入し、BCG Tokyo に形質転換することで BCG/p*thyA* と BCG/p*thyX* を作製した。これらはミドルブルック 7H9-ADC-0.05% Tween80 培地およびミドルブルック 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) および種々の濃度のパラアミノサリチル酸を添加した。

2. パラアミノサリチル酸感受性試験

パラアミノサリチル酸に対する感受性は 0 から 200 ug/ml の濃度のパラアミノサリチル酸を含有する 7H10-OADC 寒天培地に供試菌を塗布し、21 日間培養することで行なった。

3. 菌の増殖実験

パラアミノサリチル酸存在下における菌の増殖実験は平底 96 ウェルマルチプレートを用いた。菌液を OD590 における吸光度 0.01 に調整し、0 から 400 ug/ml の濃度のパラアミノサリチル酸を含有する 7H9-ADC 培地で 32 日間培養した。その間、経時的に吸光度の測定を行なった。さらに 32 日後にウェル中の菌をパラアミノサリチル酸を含まない 7H10-OADC 寒天培地に播種し、集落数を測定した。

4. パラアミノサリチル酸耐性株の作製

感受性である BCG Tokyo 株をパラアミノサリチル酸 1 ug/ml および 10 ug/ml を含有する 7H10-OADC 寒天培地に播種し、集落を形成した株を継代することでパラアミノサリチル酸耐性株を取得した。

5. 塩基配列の決定

パラアミノサリチル酸含有培地上で得られた株について *thyA* および *thyX* 領域をそれぞれの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。

6. 遺伝子発現解析

パラアミノサリチル酸耐性株の遺伝子発現解析は BCG Pasteur1173P2 株のゲノム情報をもとに作製したタイリングアレイを用いて行なった。タイリングアレイはプローブ長 60mer、プローブ間隔 12 bp として作製した。

7. 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. チミジル酸合成酵素遺伝子変異のパラアミノサリチル酸に対する感受性

チミジル酸合成酵素遺伝子欠損株 $\Delta thyA$ 、 $\Delta thyX$ 、過剰発現株 BCG/p*thyA*、BCG/p*thyX* を親株である BCG Tokyo 株とともにパラアミノサリチル酸含有 7H10-OADC 培地に塗布し、21 日間培養した (図 1)。 $\Delta thyA$ はこれまでの報告のとおりパラアミノサリチル酸含有培地においても増殖し、200 ug/ml においても増殖の抑制は認められなかった。一方、 $\Delta thyX$ は 1 ug/ml 濃度においても増殖が認められなかった。遺伝子過剰発現株においては BCG/p*thyX* が 200 ug/ml においても耐性を示したのに対し、BCG/p*thyA* は 1 ug/ml 濃度においても増殖が認められなかった。 $\Delta thyA$ と BCG/p*thyX* についてはパラアミノサリチル酸濃度が高いほど増殖が良くなる傾向を示した。

2. 7H9-ADC 培地中での変異株の増殖

$\Delta thyA$ と BCG/p*thyX* が 7H10-OADC 培地寒天培地上においてパラアミノサリチル酸濃度が高いほど増殖が良くなる傾向を示したため、液体培地を用いてパラアミノサリチル酸の影響を検討した。その結果、図 2 に示すとおり、 $\Delta thyA$ と BCG/p*thyX* は高濃度のパラアミノサリチル酸存在下において増殖の促進が認められた。32 日間培養後、パ

ラアミノサリチル酸非含有 7H10-0ADC 培地に播種したところ、パラアミノサリチル酸含有 7H9-ADC 培地中で培養した $\Delta thyA$ と BCG/p $thyX$ のみが集落を形成した。

3. パラアミノサリチル酸耐性株における遺伝子発現

パラアミノサリチル酸含有 7H10-0ADC 培地上に BCG Tokyo 株を播種し、複数の集落を得た。得られた耐性株から 7 株を選択し、その *thyA* および *thyX* 領域の塩基配列を調べたところいずれの株にも変異は認められなかった。その中から 2 株を選択し、パラアミノサリチル酸含有および非含有培地で培養後通法に従って全 RNA を調整し、タイリングアレイで解析したところ、パラアミノサリチル酸の有無での差は認められなかった。しかし、BCG Tokyo 株と比較したところ、cyclic-diGMP の代謝系酵素の発現量が恒常的に上昇していた。

D. 考察

パラアミノサリチル酸に対する耐性機構は長らく不明であったが、2004 年に Rengarajan らによって、チミジル酸合成酵素 ThyA の変異が関与することが報告された。しかし、その詳細なメカニズムについては未だ不明である。また約 6 割のパラアミノサリチル酸耐性菌については原因が不明なままである。今回、もうひとつのチミジル酸合成酵素 ThyX についても、その機能低下が耐性をもたらすことを推測し実験を行なったが、予想に反し $\Delta thyX$ の耐性度は上昇しなかった。このことから ThyA のチミジル酸合成能の低下そのものがパラアミノサリチル酸耐性の原因ではないことが強く示唆された。遺伝子欠損とは逆に *thyX* 遺伝子を過剰発現する BCG/p $thyX$ においてパラアミノサリチル酸に対する耐性が上昇したことから、ThyA と ThyX の酵素活性のバランスがパラアミノサリチル酸に対する耐性に強く影響していることが示唆された。

7H9-ADC 培地を用いたパラアミノサリチル酸に対する感受性試験では、耐性株である $\Delta thyA$ と BCG/p $thyX$ ではパラアミノサ

リチル酸の存在により増殖が顕著に促進され、また長期培養後において非含有培地中の菌が集落を形成できなかったのに対して多数の集落を形成した。サリチル酸合成系を破壊することによってパラアミノサリチル酸に対する感受性が上昇するという報告 (Nagachar and Ratledge, 2010) もあることから、今回の結果はパラアミノサリチル酸を増殖に利用したことによる可能性が考えられる。このことを立証するためにはさらなる検討が必要である。

また今回の結果から別の耐性機構として cyclic-diGMP の代謝が関与する機構についても示唆されたが、その機構については今後の検討が必要である。

もしパラアミノサリチル酸耐性株がパラアミノサリチル酸を増殖に利用するのであれば、臨床の場において起因菌がパラアミノサリチル酸耐性株の場合、その投与が菌の増殖を促進させ、患者の病状を悪化させることとなる。多剤耐性結核菌の蔓延しているアジアにおいて特に注意を必要とする。

E. 結論

抗酸菌は 2 つのチミジル酸合成酵素 ThyA と ThyX の酵素活性のバランスによってパラアミノサリチル酸に対する耐性を獲得することが示唆された。他の耐性機構として cyclic-diGMP の代謝が関与する機構が存在することが示唆された。また耐性株においてはパラアミノサリチル酸を増殖に利用している可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohara N. 2012. Current status of tuberculosis and recombinant bacillus Calmette-Guerin vaccines. J. Oral Biosci., 54: 92-95.
- 2) Osada-Oka, M., Y. Tateishi, Y. Hirayama, Y. Ozeki, M. Niki, S. Kitada, R. Maekura, K. Tsujimura, Y. Koide, N. Ohara, T. Yamamoto, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. Antigen 85A and Mycobacterial DNA-binding

protein 1 are targets of IgG in individuals with past tuberculosis. *Microbiol. Immunol.*, in press.

2. 学会発表

- 1) 佐藤法仁, 阿戸学, 黒田誠, 山崎利雄, 松村隆之, 関塚剛史, 中山真彰, 井上哲圭, 本田尚子, 土田耕三, 小林和夫, 大原直也. 結核菌/BCG のストレプトマイシン耐性・依存性に関する新たな知見. 第 82 回実験結核研究会 2012 年 5 月 広島
- 2) 岡部真裕子, 大原直也, 藤原永年, 中崇, 阿戸学, 小林和夫. 抗酸菌の sliding motility と非貪食細胞への取り込みの関連性. 第 82 回実験結核研究会 2012 年 5 月 広島
- 3) 佐藤法仁, 山崎利雄, 小林和夫, 大原直也. ストレプトマイシン依存性結核菌 18b の依存性に関する遺伝子変異の解明と新たなストレプトマイシン耐性を誘導する変異の発見. 第 87 回日本結核病学会総会 2012 年 5 月 広島
- 4) 藤原永年, 中崇, 前田伸司, 柴田満, 仁木満美子, 大原直也, 前山順一, 矢野郁也, 山本三郎. BCG Tokyo type I, II 株の形態及び脂質分子の分布と機能. 第 87 回日本結核病学会総会 2012 年 5

月 広島

- 5) 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 回日本結核病学会総会 2012 年 5 月 広島
- 6) Naka, T., S. Maeda, M. Niki, N. Ohara, S. Yamamoto, I. Yano, J. Maeyama, H. Ogura, K. Kobayashi, M. Shibata, and N. Fujiwara. Lipid Phenotypes of Two Distinct Subpopulations of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Tokyo 172 Substrain and their Host Responses. American Society for Microbiology 112th General Meeting, 16-19 June, 2012, San Francisco

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

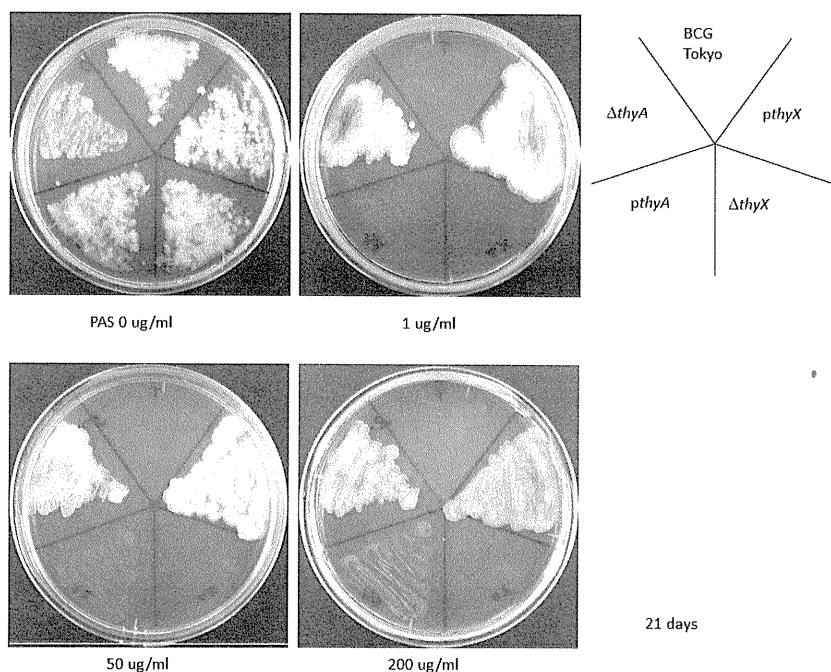


図1. BCG Tokyo 株、 $\Delta thyA$ 、BCG/ $pthyA$ 、 $\Delta thyX$ 、BCG/ $pthyX$ をパラアミノサリチル酸 0, 1, 50, 200 $\mu\text{g/ml}$ 含有 7H10ADC 培地に塗布し、21 日間培養した。

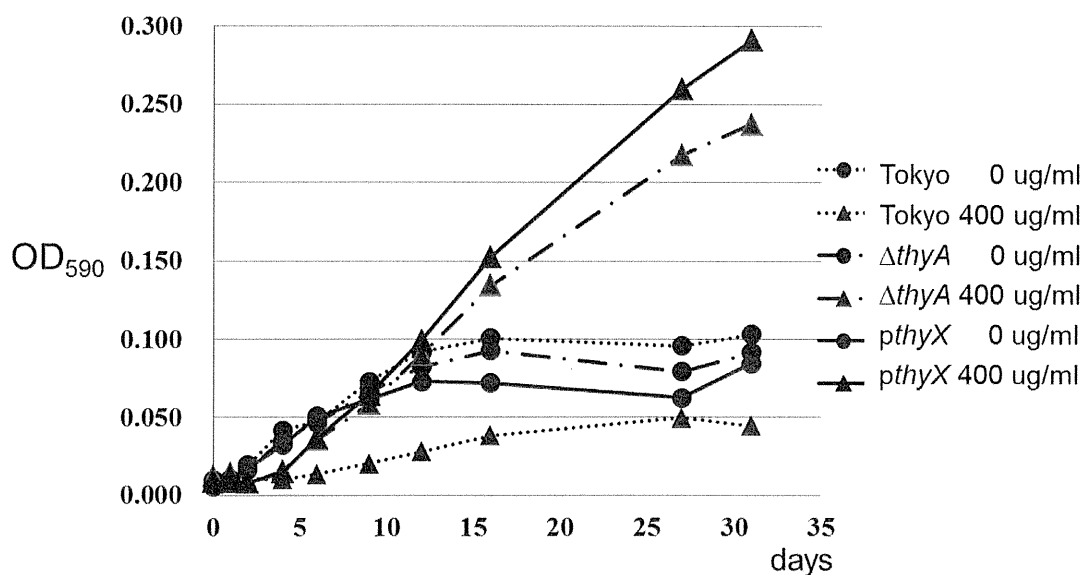


図2. BCG Tokyo 株、 $\Delta thyA$ 、BCG/ $pthyX$ をパラアミノサリチル酸 400 $\mu\text{g/ml}$ 含有あるいは非含有 7H9 ADC 培地中で 32 日間培養し、吸光度を経時的に測定した。

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)

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。これまでの研究から、*M. avium* subsp. *hominissuis* ヒト臨床分離株の地域特性、ヒト臨床分離株と浴室環境分離株との類似性、ヒト臨床分離株とブタ臨床分離株との違いを遺伝的多様性の観点から明らかにした。

今回、我々は、病原性マイコバクテリアの生存戦略(宿主との相互作用など)と深いかかわりがあると推定されている PE/PPE 遺伝子群の一つであり、*M. avium* subsp. *hominissuis* に特異的に存在する MAC PPE12 に着目し、そのメタ解析を通して本遺伝子の特徴付けならびに分離由来の違いとの関連性について検討した。分離由来の異なる 326 株を用いた解析から、MAC PPE12 遺伝子は、1) 核酸レベルで 19 のタイプに、アミノ酸レベルでは 13 のタイプに分類され多様性の高い遺伝子であること、2) 非同義置換の割合が高く、正の選択による新たな機能と構造の獲得を積極的に行っていること、3) 核酸レベルでのバリエーションに富んだ祖先型のアミノ酸タイプ (AA02) と比較的近い過去に出現したものと思われる新興型に大別できること、4) 単一のアミノ酸タイプが異なる遺伝系統 (*hsp65* 遺伝子による分類) に分散して存在しており、遺伝系統分岐とは独立して変異が出現している事を明らかにした。また、MAC PPE12 遺伝子の核酸・アミノ酸タイプを分離由来別に比較した結果から、*M. avium* subsp. *hominissuis* が宿主特異性を高める方向に向かって進化・適応している可能性を見出した。さらに、日本と韓国の臨床分離株の比較からは、新興型のアミノ酸タイプである AA03 の出現頻度に大きな違いが認められており、今後、韓国においてこのタイプの株による感染拡大が潜在的な問題になる可能性を示した。

A. 研究目的

非結核性抗酸菌はヒトを含めた様々な生物種に感染することから日和見感染菌と認識されてきた。しかしながら、近年、本菌による基礎疾患を持たない慢性肺疾患患者が急増しており新興感染症としての認識が強まっている。

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。我々はこれまでに分離由来の異なる *M. avium* subsp. *hominissuis* の遺伝的多様性

解析を行うことで、次の点を明らかにした。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、II) 患者ならびに健常人の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* subsp. *hominissuis* のリザーバーとして重要な役割を果たしている、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、IV) 日韓両国にはそれぞれに特有の *M. avium* subsp. *hominissuis* が人に蔓延している。これらの知見は、*M. avium* subsp. *hominissuis* の感染源・感染経路が地域・生活様式・環境など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。

本年度は、これまでの遺伝的多様性解析から見出された *M. avium* subsp. *hominissuis* の集団特性を細菌学的性質と関連付けることを目的として、新たな遺伝マーカー(MAC PPE12 遺伝子)を用いた集団遺伝学的解析を試みた。PE/PPE 遺伝子群は、マイコバクテリアにのみ存在し、ゲノム上に多数の近縁遺伝子群(多重遺伝子群)が存在することから、病原性マイコバクテリアの生存戦略(宿主との相互作用など)と深いかかわりがあると推定されている。今回、我々が着目した MAC PPE12 は比較ゲノム解析から *M. avium* の 4 亜種のうち *M. avium* subsp. *hominissuis* にのみ存在することが明らかされており、本菌の生物学的特性を担うものと推察される。

B. 研究方法

1. 供試菌株

ヒト臨床分離株：国内の 3 医療機関で分離された 142 株と韓国の 9 都市で分離された 77 株。

浴室環境分離株：MAC 症患者 27 家庭の浴室環境より分離した 37 株。

ブタ臨床分離株：10 府県の養豚場から出荷された 70 頭のブタから分離した 70 株。

2. MAC PPE12 の検出

全ゲノム塩基配列情報が報告されている *M. avium* subsp. *hominissuis* 104 株の配列情報を利用して、MAC PPE12 を増幅するプライマーセットを独自に設計し、MAC PPE12 の PCR 増幅に使用した。

3. MAC PPE12 の塩基配列決定と SNP 領域の特定

MAC PPE12 全長の塩基配列 (1341 base) をダイレクトシーケンス法にて決定した。全供試菌株から得られた塩基配列データを多重整列し、SNP 領域の特定ならびに同義置換・非同義置換別の分類を行った。

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、個人情報への特定が不可能となるように配慮した。

C. 研究結果

1. MAC PPE12 遺伝子の保有状況と多様性

M. avium 亜種間での比較ゲノム解析から MAC PPE12 遺伝子は、*M. avium* subsp. *hominissuis* のみに存在する PPE family gene であることが報告されている。しかしながら、比較ゲノムに用いられた株は 1 株 (104 株) のみであり、本遺伝子が *M. avium* subsp. *hominissuis* に普遍的に存在するものか否かについての検証はなされていない。今回我々は、ヒト・ブタ・環境由来の *M. avium* subsp. *hominissuis* 合計 326 株全てから MAC PPE12 遺伝子を検出し、本遺伝子が普遍的に存在することを確認した。

326 株から得た MAC PPE12 遺伝子(全長 1341 base) の多様性を核酸レベルとアミノ酸レベルで評価した。MAC PPE12 遺伝子は核酸レベルで 19 のタイプに、アミノ酸レベルでは 13 のタイプに分類され、多様性の高い遺伝子あることが示された(表 1)。特に興味深いのは、アミノ酸置換を伴う非同義置換の比率が高い点である。検出された Single-nucleotide polymorphisms (SNP) の合計 31 ケ所の内、15 か所が非同義置換であった。なお、house-keeping gene である *hsp65* 遺伝子では、同一サンプルセットで SNP は 8 ケ所であり全てが同義置換であ

った。このことは、MAC PPE12 遺伝子は「正の選択」を比較的受け易く、新たな機能と構造を積極的に導入している遺伝子であることを示唆するものである。

MAC PPE12 遺伝子のタイプ別をみると、核酸レベルでのバリエーションに富んだアミノ酸タイプは AA02 のみであり、その他のアミノ酸タイプは全て核酸タイプと 1 対 1 で対応していた(表 1)。すなわち、AA02 は祖先型のタイプであり、その出現からある程度長い時間が経過しているのに対して、その他のアミノ酸タイプは比較的近い過去において出現した新興型のタイプであり、その出現の背景に何らかの選択圧の存在が推察される。

次に、*M. avium* subsp. *hominissuis* の遺伝系統分岐を反映している *hsp65* 遺伝子によるタイプ分けと MAC PPE12 遺伝子のタイプ分けの関連性を調べた(表 2)。MAC PPE12 のアミノ酸タイプは複数の *hsp65* code タイプに分布しており、遺伝系統分岐とは独立して派生したもの、すなわち収斂進化の結果であるものと考えられる。

2. MAC PPE12 遺伝子の多様性と分離由来との関連性

MAC PPE12 が *M. avium* subsp. *hominissuis* の生存戦略上意義ある遺伝子であり、また宿主との相互作用に関連していると仮定するならば、その遺伝型と分離由来との間に何らかの関連性が見出されるものと考えられる。我々は、分離由来別の遺伝型出現頻度からこの点について検討した。アミノ酸タイプ別での出現頻度を見ると、ヒト臨床分離株とブタ分離株で大きな違いが認められた(表 1)。すなわち、ヒト臨床分離株では AA02 と AA03 が優占したのに対して、ブタ分離株では、ほとんど全ての株が AA01, AA07, 08, 09 のいずれかのタイプに属した。MAC PPE12 遺伝子からみた宿主嗜好性を良く反映した結果といえる。ヒト浴室環境分離株はヒト臨床分離株と同じく A02 と A03 が優占した。このことは、浴室環境が感染のホットスポットであるというこれまでの知見を支持するもの

である。ヒト臨床分離株を日本と韓国で比較したところ、日本株では AA02 と AA03 の 2 つのアミノ酸タイプが優占したのに対して、韓国株では AA02 のみが優占的に検出され、AA03 の比率は日本株に比べて低い結果となった。同義置換の出現状況から、AA02 は祖先型と考えられるのに対して、AA03 は近い過去に出現したであろうと思われる新興型であると考えられる。このようなタイプが日本においては既に優占しているのに対して韓国では未だマイナーは比率であるという両国間の現状の違いは、今後の *M. avium* 症の推移を考える上で興味深い。

D. 考察

N 末端側に PE (Pro-Glu) と PPE (Pro-Pro-Glu) の保存領域を有する PE/PPE 遺伝子群は、マイコバクテリアにのみ存在し、ゲノム上に多数の近縁遺伝子群(多重遺伝子群)が存在することから、病原性マイコバクテリアの生存戦略(宿主との相互作用など)と深いかかわりがあると推定されている。今回、我々は、*M. avium* subsp. *hominissuis* にのみ存在する PPE 遺伝子である MAC PPE12 に着目し、分離由来の異なる多数のサンプルセット(326 株)を用いたメタ解析から、本遺伝子の特徴付けを試みた。今回得られた結果から、MAC PPE12 遺伝子は、1) 核酸レベルで 19 のタイプに、アミノ酸レベルでは 13 のタイプに分類され多様性の高い遺伝子であること、2) 非同義置換の割合が高く、正の選択による新たな機能と構造の獲得を積極的に行っていること、3) 核酸レベルでのバリエーションに富んだ祖先型のアミノ酸タイプ(AA02)と比較的近い過去に出現したものと思われる新興型に大別できること、4) 単一のアミノ酸タイプが異なる遺伝系統(*hsp65* 遺伝子による分類)に分散して存在しており、遺伝系統分岐とは独立して変異が出現している事を明らかにした。

分離由来別に核酸・アミノ酸タイプの出現頻度を精査することで、MAC PPE12 遺伝子には、同義置換の多い祖先型のアミノ

酸タイプと考えられる AA02 (ヒト・浴室環境で優占)、主としてブタ由来株に認められる AA01, AA07, AA08, AA09、ヒト (日本人) とその浴室環境で優占する AA03、そして散発的に検出される複数の亜型が存在することを明らかにした (表 1)。この状況を進化的に解釈すると、祖先型のアミノ酸タイプ (AA02) は、同義置換が多く認められることから「負の選択 (純化淘汰)」の影響を反映、ヒトあるいはブタという宿主嗜好性を示している新興型のアミノ酸タイプ (A03-ヒト、A07, 08, 09-ブタ) からはより適応的な変異体の出現を反映、そして散発的に出現しているアミノ酸タイプは弱有毒な変異を受け入れた結果を反映しているものと考えられることができる。つまり、MAC PPE12 遺伝子は、純化淘汰の比重がある程度高い遺伝子ではあるが、その比重は house-keeping gene 程ではなく、ある程度のアミノ酸置換 (弱有毒な変異) に寛容な遺伝子であることが推察される。その寛容さゆえに、弱有毒な変異の受け入れを繰り返す中で (トライアンドエラー)、ホストに対してより適応的なものが出現してきたという歴史を辿ってきたのではないと思われる。 *M. avium* 症が急増している日本で、祖先型の AA02 に加えて新興型の AA03 が優占したという状況は、患者数増加の背景に菌側の要因が潜んでいることの科学的裏付けと言えるかもしれない。一方、韓国分離株では、AA02 のみが優占し、AA03 はマイナーな存在比率であった。韓国には我が国とは遺伝的に異なる菌株が蔓延していることを報告した昨年度の本研究班での結果とは異なる結果が MAC PPE12 遺伝子から得られたことになる。より詳細に解析してみると、韓国株に特徴的な株 (*hsp65* code type16 に属し VNTR で特定のクラスターを形成する) のほとんど全てが祖先型の AA02 を示すことが分かった。新興型の AA03 の定着が現在わが国で認められている *M. avium* 症の増加の原動力になっているとすると、今後、韓国での AA03 保有株の推移についてより注意深く監視する必要があるものと思われる。

M. avium は亜種レベルで宿主の特異性が高まっていることが知られている。すなわち、*M. avium* subsp. *avium* はトリ、*M. avium* subsp. *paratuberculosis* はウシ (C-type) と羊 (S-type) を主な宿主としている。今回我々が MAC PPE12 遺伝子のメタ解析から得たデータは、*M. avium* subsp. *hominissuis* においても宿主特性が高まる方向へと進化のベクトルが向かっていることを示唆するものであり、*M. avium* 症の治療・予防・感染対策を考えるうえで、本菌についてのより詳細な解析が不可欠であることを裏付けているものと言える。

E. 結論

病原性マイコバクテリアの生存戦略 (宿主との相互作用など) と深いかかわりがあると推定されている PE/PPE 遺伝子群の一つであり、*M. avium* subsp. *hominissuis* に特異的に存在する MAC PPE12 に着目し、そのメタ解析を通して本遺伝子の特徴付けならびに分離由来の違いとの関連性について検討した。分離由来の異なる 326 株を用いた解析から、MAC PPE12 遺伝子は、1) 核酸レベルで 19 のタイプに、アミノ酸レベルでは 13 のタイプに分類され多様性の高い遺伝子であること、2) 非同義置換の割合が高く、正の選択による新たな機能と構造の獲得を積極的に行っていること、3) 核酸レベルでのバリエーションに富んだ祖先型のアミノ酸タイプ (AA02) と比較的近い過去に出現したものと思われる新興型に大別できること、4) 単一のアミノ酸タイプが異なる遺伝系統 (*hsp65* 遺伝子による分類) に分散して存在しており、遺伝系統分岐とは独立して変異が出現している事を明らかにした。さらに、「正の選択」を受けすることで、宿主特異性を高める方向に進化のベクトルが向かっている可能性を MAC PPE12 遺伝子の核酸・アミノ酸タイプの分離由来別出現傾向から見出した。日本と韓国の臨床分離株の比較からは、新興型のアミノ酸タイプである AA03 の出現頻度に大きな違いが認められており、今後、韓国においてこのタイプの株による感染拡大が潜

在的な問題として提起される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwamoto, T., L. Grandjean, K. Arikawa, N. Nakanishi, L. Caviedes, J. Coronel, P. Sheen, T. Wada, C. A. Taype, M. A. Shaw, D. A. J. Moore, and R. H. Gilman. Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. PLoS ONE, in press.

2. 学会発表

- 1) 岩本朋忠, 有川健太郎, 中西典子. MAC PPE12 遺伝子のメタ解析から見た *M. avium* subsp. *hominissuis* の進化. 第43回結核・非定型抗酸菌症治療研究会 2012年12月 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1. MAC PPE12の核酸・アミノ酸タイプ分類と分離由来別出現頻度

Nucleic acid type	Amino acid type	No. of SNPs to consensus sequence			患者		環境	ブタ
		Total	non synonymous	synonymous	日本	韓国		
NA01	AA01	1	1	0	3	0	0	28
NA02	AA02	0	0	0	59	52	12	2
NA03	AA02	2	0	2	1	4	0	2
NA04	AA02	1	0	1	3	1	0	0
NA05	AA02	2	0	2	2	0	0	0
NA06	AA02	1	0	1	1	0	0	0
NA07	AA02	1	0	1	1	0	0	0
NA08	AA02	2	0	2	0	0	0	1
NA09	AA03	8	3	5	59	10	22	0
NA10	AA04	1	1	0	5	0	2	0
NA11	AA05	3	2	1	1	0	0	0
NA12	AA06	3	1	2	1	0	0	0
NA13	AA07	6	1	5	2	0	0	17
NA14	AA08	8	3	5	4	2	0	15
NA15	AA09	6	3	3	0	0	0	10
NA16	AA10	9	4	5	0	0	1	0
NA17	AA11	2	2	0	0	1	0	0
NA18	AA12	5	2	3	0	1	0	0
NA19	AA13	12	7	5	0	6	0	0

表2. MAH 326株のMAC PPE12アミノ酸タイプとhsp65 コードタイプの分布

MAC PPE 12 amino acid type	Hsp65 code type										
	C1	C2	C3	C7	C9	C15	C16	C17	N1	N2	N3
AA01	29	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AA02	9	64	2	4	3	20	32	2	1	3	1
AA03	1	22	0	0	1	59	2	6	0	0	0
AA04	0	3	0	0	0	3	0	1	0	0	0
AA05	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AA06	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AA07	13	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AA08	11	6	0	0	1	2	1	0	0	0	0
AA09	4	2	0	0	0	0	0	1	3	0	0
AA10	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AA11	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
AA12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
AA13	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0

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)

ハンセン病におけるマクロファージの機能解析

分担研究報告書

研究分担者

福富 康夫

(国立感染症研究所・室長)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
分担研究報告書

ハンセン病におけるマクロファージの機能解析

研究分担者 福富 康夫 (国立感染症研究所・感染制御部・室長)
研究協力者 前田 百美 (国立感染症研究所・感染制御部・主任研究官)
星野 仁彦 (国立感染症研究所・感染制御部・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性細菌である。ヒトにおけるハンセン病の病態は、病巣のシュワン細胞やマクロファージ内でらい菌が増殖する LL 型から菌が稀にしか見られない TT 型まで様々である。らい菌は人工培養できないため *in vitro* での解析が難しく、マクロファージ内での増殖、または排除機構については不明な点が多い。我々は、これまで放射性同位元素標識脂肪酸の代謝活性を生菌の指標としてヒトマクロファージの状態と同細胞中のらい菌の生存率との関係を調べてきた。IFN γ により刺激を受けたマクロファージ中ではらい菌の代謝活性が減少していることから、同細胞では抗らい菌活性が高まっていることが示唆され、さらに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も判明した。さらに、生菌選択的蛍光染色試薬を用いて共焦点レーザー顕微鏡下で細胞内のらい菌の生死を鑑別したところ、IFN γ により活性化したマクロファージでは phox タンパクが細胞質全体に広がり、また、特にらい菌の存在する場所に集積している像がみられた。これらの結果から、phox タンパクがらい菌に *r r* 対する殺菌機構に大きく関わっている可能性が再度示唆された。

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。

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 α 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。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 CTF となって蛍光発色した CTF 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。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。

C. 研究結果

ヒト健康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に分化させた (M-マクロファージ)。そして、IFN γ 存在下でらい菌を添加し貪食させた後、35度にて5日間培養した。ちなみに、らい菌は至適発育温度が32度で培養ヒトマクロファージ内では35度の培養で一か月間はviabilityを高く維持できることを我々は報告している。10秒間のメタノールによる固定後、CTCを添加し3時間培養した。その結果、IFN γ 存在下で培養したマクロファージ中の菌は代謝活性が低下しCTCからCTFへの変換が進まず蛍光色素が対照培養のように現われていない。

次に、phox 発現とらい菌の viability との関係性を調べた。らい菌を貪食したヒトマクロファージを IFN γ 存在下にて一週間35度で培養し、その後菌をオーラミン(緑色)、p47-phox を(青色)、CTC (赤色) で染色した。そして緑色の菌に着目し細胞内での存在箇所を比較した。その結果、phox サブ

ユニットタンパク p47 に対する青の二次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ところ、矢印部分3か所では赤色の CTC、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)。この3か所について3色の蛍光強度を比較したのが Fig. 2 である。phox の集積量が多いほど菌の赤み、即ち viability が低下していた。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。赤い色素は多くみられた。また、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。

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 γ 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) を認めているが、らい菌の viability の評価には放射性同位元素のみでなく蛍光色素も有用であることが分かった。殺菌にかかわる分子として活性酸素 (ROS) や酸化窒素 (NO) が知られているが、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 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。CTC は代謝活性を有す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 で刺激したヒトマクロファージ中のらい菌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、p_{hox}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、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 により誘導されたヒトマクロファージの抗らい菌活性発現の際、活性酸素を産生するNADPH オキシダーゼ(p_{hox}タンパク)の発現が増強して、らい菌周囲へ集積していることが判明した。共焦点レーザー顕微鏡は本研究において非常に有用なツールである。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) 前田百美, 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. らい菌感染した樹状細胞から分泌されるエキソソームの解析. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012年6月 札幌市
 - 2) 向井 徹, 宮本友司, 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. Bioluminescence系の抗酸菌応用への基礎的検討. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012年6月 札幌市

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

Supplement. Fig. 1

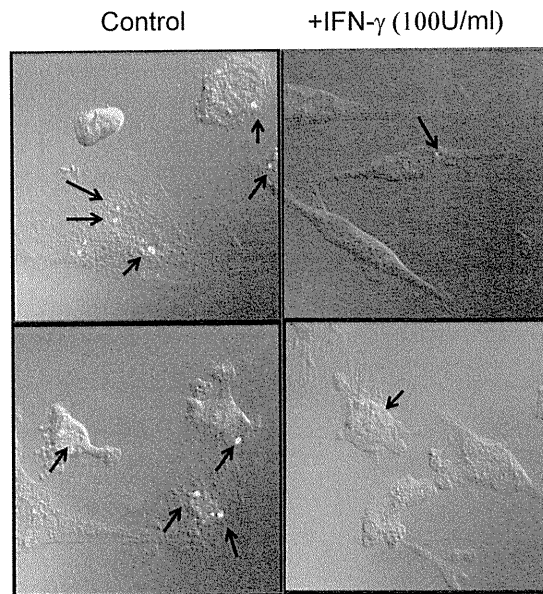


Fig.1. Localization of phox with *M.leprae* in IFN γ -stimulated macrophages

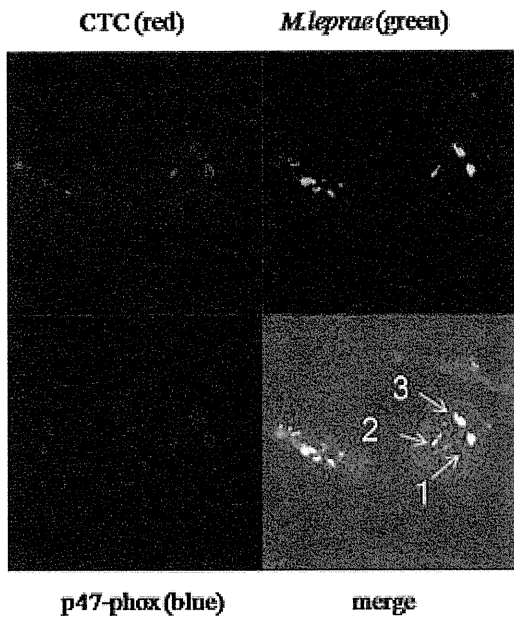
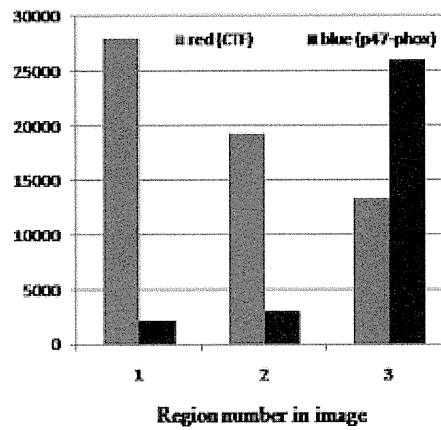


Fig.2. Decreased metabolic activity of *M.leprae* observed with phox accumulation



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)

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)

新規結核ワクチンの開発と応用

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・
臨床研究センター長）

研究要旨.

- (1) カニクイザルにおける HVJ-Envelope/Hsp65 DNA+IL-12 DNA ワクチンの皮内投与と筋肉内投与による結核治療効果を比較した。皮内ワクチン投与方法の方が筋肉内ワクチン投与よりも有効であることが、血沈の改善や生存率で示唆された。
- (2) アジアにおける結核・多剤耐性結核患者に対する新規結核ワクチンの開発が必要である。特にスーパースプレッダーMDR TBが日本のみでなく中国にも存在することを明らかにしたことより結核治療ワクチンの開発も重要である。アジアのタイ国等と HVJ-Envelope/Hsp65 DNA+IL-12 DNA ワクチンの臨床応用の可能性を検討中。アジア諸国で問題となっている多剤耐性結核や超薬剤耐性結核の治療に 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) アジアのタイ国マヒドン大学との共同研究で結核患者の血清中 Granulysin は健常人に比較して低下、特に relapsed TB において血清中 granulysin が低下を示した。
- (4) キラーT細胞から産生される 15kDa 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た。Granulysin レセプターを解析するために、ヒト・キラーT細胞株を樹立した。さらにこれを用いて、酵母 two-hybrid system でヒト T細胞上の 15K granulysin レセプターの解析の試みを開始した。
- (5) 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。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。
また、肺の histopathology においてヒトと同様の granuloma の形成が強く認められた。granuloma 形成が強い群は著明な生存の延長が認められた。
- (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。
- (7) キラーT細胞より産生される Killer-specific secretory protein of 37kDa (Ksp37) を用いて、Granulysin と Ksp37 はキラーT分化相乗効果を発揮した。

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。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. 具体的研究実施計画

- ① 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。
- ② キラーT 細胞上の granulysin レセプターは全く解析されていないが、granulysin レセプターの解明を試みる。方法は、(1)抗原特異的なヒトキラーT 細胞株を樹立する。(2)このキラーT 細胞株より DNA を得、この DNA を用いて酵母 two-hybrid system 法により granulysin レセプターの解明を行う。
- ③ Granulysin 蛋白及び Granulysin DNA を用いて新しい結核治療ワクチンを開発する。
- ④ 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 ワクチンの最も効果的な投与方法の解明及び T 細胞免疫活性化機構の解明。

2. 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 5×10^2 CFU を経気道投与した。その4週間後より、HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンを皮内投与（右

上肢、左上肢、右下肢、左下肢皮内に各々 $100 \mu\text{g}$ の合計 $400 \mu\text{g}$ 投与/1日) した。一方、これと比較するため従来のワクチン投与方法すなわち筋肉内投与（右上肢、左上肢、右下肢、左下肢筋肉内に各々 $100 \mu\text{g}$ の合計 $400 \mu\text{g}$ 投与/1日) した。2週間毎にこのワクチンを合計6回免疫し、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。末梢血リンパ球を HSP65 抗原、PPD、結核死菌 H37Ra 及び PHA-P 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) 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。治療効果の評価は(1)と同じ評価法を用いた。さらに死亡動物又は安楽死動物の肺病理組織学的解析を行った。
- (3) granulysin レセプター単離の試み
 - (a) 抗原特異的ヒトキラーT細胞の確立
 - (b) ヒトキラーT細胞株DNAを用いての酵母 two-hybrid 法による granulysin レセプターの解析

倫理面への配慮

- (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) カニクイザルを用いた、HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンの投与方法の有効性の比較解析。マウスの系で HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンの皮内投与が筋肉内投与や皮下投与よりも結核治療ワクチン効果を強く発揮したことにより、ヒトの結核感染に近いカニクイザルのモデルでこのワクチンの皮内投与と筋肉内投与を比較解析した。このワクチン 400 μ g/回を2週間毎に6回皮内に投与した群は、400 μ g/回を2週間毎に6回筋肉内投与した群と比較して、赤沈の改善効果を示した。結核菌感染8週後、16週後で著明な赤沈改善効果を皮内投与により発揮した。さらに皮内投与ワクチンは筋肉内投与ワクチンよりも延命効果を発揮した。
- (2) 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と比較して肺の結核菌数の相乗的抑制効果を示した。
- (3) アジア(タイ・フィリピン・インド等)におけるHVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンの研究、臨床応用について
タイ NIH Pattom博士、フィリピン レオナルドウッド研究所 Paul Saunderson博士、インド Saudan Singh博士らと臨床応用の可能性を検討中
- (4) 15K Granulysinレセプターの解析 (① GranulysinのキラーT細胞分化因子の作用機構の解析と②ヒトキラーT細胞上のGranulysinレセプターの解析) :
 - ①15K GranulysinのキラーT細胞分化因子の作用機構の解析
C57BL/6マウスT細胞に紫外線照射した

刺激抗原細胞 (H-2^d) 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。また、リコンビナント15K GranulysinはFBL-3癌関連抗原に特異的なキラーT細胞の分化を誘導した。さらに、結核菌抗原に対する生体内キラーT細胞の分化を15K Granulysinはマウスの系で誘導した。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。

②ヒトキラーT細胞上の15K Granulysinレセプターの解析

(a) 抗原特異的ヒト・キラーT細胞の確立

ヒトPBL (1×10^6) をヒトB腫瘍細胞CESS (マイトマイシンC処理) 1×10^5 を Linbro 24 well plate (1wellあたり) で3日間MLTCを行い (J. Immunol 1982 Kaida & Okada) その後IL-2の存在下で多くのLibro 24 well plateにtransferした。14日後⁵¹Cr-release法でCESSに対するキラー活性が極めて強いキラーT細胞株を決定しculture bottleに移して大量培養を行った。その結果4種のキラーT細胞株を確立した。O型5978株、A型2868株、B型2842株、B型7220株を $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 集め、液体N₂でfreezeした。

(b) 15K Granulysinレセプターの解析

これらの凍結細胞からTotal RNAを抽出し、mRNAを調製した。現在、DNA、酵母Two-hybridで用いるcDNAのライブラリーを作製中。Matchmaker Gold Yeast Two-hybrid System等を用いてgranulysinレセプターDNAの解析を行う計画。

- (5) 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