

201225030A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 和 夫

平成25 (2013) 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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 和 夫

平成25 (2013) 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	9
御手洗 聡	
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	15
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	21
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	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 24 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・副学長)
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	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	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	加藤 朋子	(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	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	井上 学	(大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・大学院生)
研究協力者	岡 真優子	(京都府立大学大学院生命環境科学科・准教授)
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	濱野 真二郎	(長崎大学熱帯医学研究所・寄生虫学・教授)
研究協力者	嶋田 雅暁	(長崎大学熱帯医学研究所・ケニア拠点・教授)
研究協力者	一瀬 休生	(長崎大学熱帯医学研究所・ケニア拠点・拠点長)
研究協力者	凧 幸世	(長崎大学熱帯医学研究所・寄生虫学・大学院生)
研究協力者	辻村 邦夫	(浜松医科大学・感染症学・准教授)
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

世界で約 20 億人（総人口の約 30%、日本：0.25 億人）が結核菌に無症候・潜在性既感染、年間 870 万人（日本：2.3 万人）が結核を発病、140 万人（日本：0.22 万人）が死亡し、結核は甚大な健康被害を与え続けている（2011 年）。90%の感染宿主は無症候潜在性結核菌感染として経過し、発病は約 10%である。結核を制圧するため、活動性結核の発生母体である無症候潜在性結核菌感染対策は必須となるが、病態の把握、診断、治療や予防は不十分である。基礎研究成果として、潜在性（休眠）結核菌の生物学的特性、遺伝子発現、薬剤耐性機構や宿主免疫応答を解明した。橋渡し研究成果として、ヒト潜在性結核菌感染の免疫血清診断や結核と近縁 *Mycobacterium avium* complex 感染症の血清診断キットの開発・体外診断用医薬品製造販売承認および臨床的有用性が示された。

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、870 万人（日本：2,3 万人）が結核を発病、140 万人（日本：2,2 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（2011 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 培地で培養し、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、さらに 1974 年から培養している H37Rv 2 株使用した。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 6 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 1%酸素濃度培養による短期休眠状態からも RNA 抽出を行った。液体培地中の酸素濃度測定を Optical O₂ sensor で測定した。

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

抗酸菌由来蛋白質抗原（増殖期および休眠期）を用い、ヒトにおける抗体免疫応答や血清診断の可能性を検索した。

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。non-human primates であるアカゲザルを用い、分裂増殖期グルコースモノミコール酸（GMM）と休眠菌特有のミコール酸含有細胞壁脂質としてグリセロールモノミコール酸（GroMM）に対する免疫応答を比較解析した。

休眠結核菌由来遺伝子を用いた DNA ワクチンの開発研究

休眠期の結核菌が発現する DosR regulon 蛋白質に対する T 細胞応答を、結核患者、潜伏感染者、非感染者で比較した。。
潜在性抗酸菌感染における臨床診断法の開発

国立病院機構刀根山病院において 2006 年 12 月から 2012 年 6 月までの期間で、肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症と診断され、MAC 特異的抗原（糖ペプチド脂質：GPL）による血清診断を実施している 485 例を対象とした。疾患対照として同期間に抗酸菌培養で確認された肺結核症 133 例、肺 *M. kansasii* 症 23 例を対象とした。健常対照は 265 名の検診受診者とした。

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

溶存酸素量をプローブにより直接測定したところ、NN15 では酸素大気圧の 51.6% (酸素濃度 10.8%) であった。現時点で NN15、NN16、NN17 について生菌の回復 (培養) が可能であった。このうち最初に回復した NN15 について、新規に作成した 1%酸素濃度による培養検体 (NN15 New hypoxia)、長期培養からの直接検体 (NN15 Long hypoxia)、レファレンスとしての対数増殖期にある NN15 (NN15 active) を作製した。NN15 New hypoxia 及び Long hypoxia 株で高発現している遺伝子を対象とし、active な H37Rv をレファレンスとしてクラスター解析を実施して 458 の遺伝子を同定した。さらに NN15 active のデータでソートすると、70 の遺伝子群が同定された。また、酸素濃度に伴って発現が Linear up-regulation pattern を示す 27 遺伝子、Linear down-regulation pattern を示す 15 genes、さらに NN15 Long hypoxia のみで相対的に高発現している 63 遺伝子を特定した。

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

ヒト陳旧性結核患者血清は結核菌 Ag85A (分裂増殖期) および MDP1 (休眠期) に対する IgG 抗体を含有していた。ケニア共和国における疫学調査から、鉤虫感染と潜在性結核菌感染 (LTBI) の相関が認められた。

休眠結核菌の脂質代謝と免疫応答

GMM に対するアカゲザル T 細胞反応は Th1 サイトカイン応答にシフトした反応であることが明らかとなった。一方 GroMM に対する宿主反応は、モルモットと同様に好酸球の局所浸潤を伴い、Th2 (IL-10 や eotaxin 1) 応答が主体となることが分かった。

休眠結核菌由来遺伝子を用いた DNA ワクチンの開発研究

各抗原に対する T 細胞応答は全般的に潜伏感染者で強く、活動性結核患者や非感染者の両方または何れかに対して統計学的に有為差を示す抗原を 12 種類 (Rv0080、Rv0081、Rv0570、Rv0574c、Rv1996、Rv2004c、Rv2028、Rv2029c、Rv2031c、Rv2626、Rv3129、Rv3133c) 同定できた。このうち、Rv2031c に由来するペプチドが、HLA-A2 および HLA-DR4 に提示されることを明らかにした。また、結核感染者の免疫系が認識している抗原を同定すべく、結核菌の遺伝子産物を発現するファージ・ライブラリーを結核患者および潜伏感染者の血清でスクリーニングし、各々 30 および 23 抗原を選定した。

潜在性抗酸菌感染における臨床診断法の開発

血清 GPL core IgA 抗体価は肺 MAC 症群において有意に上昇を認め、肺 MAC 症診断における血清診断キットの感度、特異度はそれぞれ 78.6%、96.9% であった。気管洗浄液培養にて診断した 50 例において、抗体価は喀痰培養診断症例に比し、有意に低値 (感度: 54.0%) であった。なお、2012 年 9 月から、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) は診療検査機関である BML 受託臨床検査項目となった (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。

休眠結核菌は長期培養条件として比較的低酸素であることが確認された。遺伝子発現解析では一般的な 1%酸素濃度下での短期培養株や好気培養株とプロファイルが異

なり、いくつかの遺伝子の発現状況からは半休眠状態が想定された。長期培養株に特異的な発現を示す遺伝子も同定されており、潜在結核感染症の理解と診断に有用性が期待される。

ヒト陳旧性や潜在性結核菌感染患者血清は分裂増殖期(Ag85)および休眠期(MDP1)結核菌抗原に対する抗体を含有し、潜在性感染には分裂増殖期および休眠期結核菌が混在している可能性が考えられる。Th1(細胞性免疫)とTh2(抗体免疫)細胞応答は拮抗制御されている。抗酸菌感染防御はTh1依存性である。鉤虫感染はTh2細胞優位免疫応答を誘導し、Th1応答が減弱し、抗酸菌の持続・潜在感染に関与している。

休眠菌によるGroMM産生が潜在性抗酸菌感染の維持に合目的な菌側応答であり、微小環境をTh2優位にすることによりTh1サイトカイン応答による制御を長期に回避する手段として捉えることができる。

幾つかの抗原に対する潜在感染者(非発症者)のT細胞応答が活動性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。

肺MAC感染症における血清診断の有用性を過去の報告よりも多数例(MAC症群485例、対照群421例)で再検証した。肺MAC症診断の血清診断キットの感度、特異度はそれぞれ78.6%、96.9%であり、加えて、所要時間は約3時間(従来法:1か月以上)であり、補助診断としての有用性が再確認された。特異度は高く、臨床画像所見が類似した肺結核や肺*M. kansasii*症との鑑別にも有用である。MAC感染症の迅速免疫血清診断キット(キャピリアMAC抗体-ELISA、株式会社タウンズ)はBMLの臨床検査受託項目となり、普及が期待される(保険点数:120点)。

E. 結論

- 長期培養株に特異的な発現を示す遺伝子も同定された。

- ヒト陳旧性や潜在性結核感染症血清は分裂増殖期および休眠期結核菌抗原に対する抗体を含有し、血清診断の可能性が示唆された。
- 多細胞性寄生虫(特に、鉤虫)感染と潜在性結核菌感染は相関することが判明した。
- 休眠菌が産生するGroMMはTh2応答を誘導し、潜在性抗酸菌感染の維持に重要である。
- 潜在感染者でT細胞応答が亢進しているDosR regulon蛋白質を12種類同定し、その1つであるRv2031cに由来するペプチドが、HLA-A2およびHLA-DR4に提示されることを明らかにした。結核患者および潜伏感染者のプール血清でスクリーニングし、各々30および23抗原を選定した。
- MAC特異的血清診断キットは良好な感度や特異度を示し、肺MAC症診断における臨床的有用性が確認された。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BMLの臨床検査受託項目となり、普及が期待される(保険点数:120点)。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. 2012. Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of IgG in individuals with past tuberculosis. *Microbiol. Immunol.* In press.
2. Tateishi, Y., S. Kitada, K. Miki, R. Maekura, Y. Ogura, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Niki, T. Hayashi, K. Hirata, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2012. Whole-genome sequence of the hypervirulent clinical

- strain *Mycobacterium intracellulare* M.i.198. J. Bacteriol. 194: 6336.
3. Tamaru, A., C. Nakajima, T. Wada, Y. Wang, M. Inoue, R. Kawahara, R. Maekura, Y. Ozeki, H. Ogura, K. Kobayashi, Y. Suzuki, and S. Matsumoto. 2012. Dominant incidence of multidrug and extensively drug-resistant specific *Mycobacterium tuberculosis* clones in Osaka prefecture, Japan. PLoS One 7: e42505.
 4. Niki, M., M. Niki, Y. Tateishi, Y. Ozeki, T. Kirikae, A. Lewin, Y. Inoue, M. Matsumoto, J. L. Dahl, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2012. A novel mechanism of growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria. J. Biol. Chem. 287: 27743-27752.
 5. Fujii, J., M. Naito, T. Yutsudo, S. Matsumoto, D. P. Heatherly, T. Yamada, H. Kobayashi, S. Yoshida, and T. Obrig. 2012. Protection by a recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin vaccine expressing Shiga toxin 2 B subunit against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in mice. Clin. Vaccine Immunol. 19: 1932-1937.
 6. 松本 壮吉、尾関 百合子、小林 和夫. 2012. 新しい結核ワクチン開発の展望. 臨床と微生物. 39:131-136.
 7. Morita, D., Y. Hattori, T. Nakamura, T. Igarashi, H. Harashima, and M. Sugita. 2013. Major T cell response to a mycolyl glycolipid is mediated by CD1c molecules in rhesus macaques. Infect. Immun. 81: 311-316.
 8. Hozumi, H., K. Tsujimura, Y. Yamamura, S. Seto, M. Uchijima, T. Nagata, S. Miwa, H. Hayakawa, T. Fujisawa, D. Hashimoto, N. Inui, T. Suda, K. Chida, and Y. Koide. 2013. Identification of dormancy-related antigens that induce immune responses in individuals infected with *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. Int. J. Tuberc. Lung Dis. (in press)
 9. Seto, S., K. Tsujimura, T. Horii, and Y. Koide. 2013. Mycobacterial survival in alveolar macrophages in the lung as a result of coronin-1a inhibition of autophagosome formation. Autophagy: cancer, other pathologies, inflammation, immunity, and infection. Hyatt M. A., editor. Elsevier: Amsterdam/Netherlands. (in press)
 10. Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. 2012. Coronin-1a inhibits autophagosome formation around *Mycobacterium tuberculosis*-containing phagosomes and assists mycobacterial survival in macrophages. Cell. Microbiol. 14: 710-727.
 11. Nagata, T., and Y. Koide. 2013. Chapter 22. Identification of T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* with biolistic DNA vaccination. Methods in Molecular Biology. Volume 940. Biolistic DNA Delivery. Methods and Protocols. Sudowe, S., and A. B. Reske-Kunz, editors. Humana Press: New York/USA. 285-303. ISBN: 978-1-62703-109-7
 12. Nagata, T., and Y. Koide. 2012. Chapter 17. Immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* and the vaccine strategies. Understanding tuberculosis – Analyzing the origin of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. Cardona, P. -J., editor. InTech: Rijeka/Croatia. 391-414. ISBN: 978-953-307-942-4
 13. 瀬戸真太郎、辻村邦夫、堀井俊伸、小出幸夫. 2012. アクチン結合性タンパク質 coronin-1a による結核菌ファゴソームへのオートファゴソーム形成阻害機構. 生体の科学 63: 494-495.
 14. Kitada S, Uenami T, Yoshimura K, Tateishi Y, Miki K, Miki M, Hashimoto H, Fujikawa T, Mori M, Matsuura K, Kuroyama M, Maekura R. 2012. Long-term radiographic outcome of nodular bronchiectatic *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 16:660-664.
 15. Kitada S, Levin A, Hiserote M, Harbeck RJ, Czaja CA, Huitt G,

- Kasperbauer SH, Daley CL. 2012. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in the United States. *Eur. Respir. J.* In press.
16. Yano Y, Kitada S, Mori M, Kagami S, Taguri T, Uenami T, Namba Y, Yoneda T, Yokota S, Maekura R. 2012. Pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria: a retrospective study of 44 cases in Japan. *Respiration*. In press.
 17. 松村隆之、阿戸 学、小林和夫. 2012. 解説. 結核および非結核性抗酸菌感染症の診断. *リウマチ科* 47 : 427-435.
 18. 小林和夫、松村 隆之、阿戸 学. 2012. 解説. 結核や非結核性抗酸菌感染症の動向や最近の話題. *JBSA Newsletter* 2 (3) : 6-10.
 19. 小林和夫. 2012. マイコバクテリウム属 (抗酸菌). *標準微生物学* 第11版 (平松啓一、中込 治、神谷 茂 編) 東京 : 医学書院. 282-295. ISBN: 978-4-260-01471-7
- ## 2. 学会発表
1. 穂積宏尚、辻村邦夫、山村泰弘、瀬戸真太郎、内嶋雅人、永田 年、三輪清一、早川啓史、橋本 大、藤澤朋幸、榎本紀之、乾 直輝、中村祐太郎、須田隆文、千田金吾、小出幸夫. 2013. 結核休眠期抗原 (DosR antigen) に対するヒト T 細胞応答の検討. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会. 2012. (神戸、4 月) .
 2. 松本壮吉. 2012. 結核菌の休眠現象と潜在性結核診断の可能性. 第 2 回結核感染診断研究会 (広島、5 月) .
 3. 仁木満美子、松本壮吉. 2012. 定常期抗酸菌にみられるイソニアジド抵抗性獲得メカニズムの解析. 第 82 回実験結核研究会 (広島、5 月) .
 4. Kitada, S., K. Yoshimura, K. Miki, M. Miki, Y. Tateishi, T. Fujikawa, K. Matsuura, M. Kuroyama, H. Hashimoto, M. Mori, R. Maekura. 2012. American Thoracic Society: A longitudinal study of glycopeptidolipid core IgA antibody levels in MAC pulmonary disease patients treated with CAM containing regimen (San Francisco, USA, 5 月).
 5. 北田清悟. 2012. 肺 MAC 症の新規血清診断法. 第 87 回日本結核病学会総会 (名古屋 5 月) .
 6. 佐藤法仁、山崎利雄、小林和夫、大原直也. 2012. ストレプトマイシン依存性結核菌 18b 株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遺伝子発見の発見. *結核*, 87 : 231, 2012. 第 87 回日本結核病学会総会 (広島、6 月) .
 7. 西内由紀子、戸谷孝洋、立石善隆、前倉亮治、松本壮吉. 2012. 非結核性抗酸菌が形成するバイオフィルムの生態学的特徴. 第 26 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会 (大阪、7 月) .
 8. 松本壮吉. 2012. 結核菌の増殖、長期生存、および静止期以降の薬剤抵抗性獲得の分子メカニズム. 第 26 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会 (大阪、7 月) .
 9. 松本壮吉. 2012. 休止期結核菌の性状と、休止期抗原を利用した結核菌感染検出の試み. 第 44 回関西抗酸菌研究会 (大阪、8 月) .
 10. Sugita, M., D. Morita, and T. Igarashi. 2012. 19th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research. (Seoul, Korea, 8 月) .
 11. Nishiuchi Y., S. Kitada, S. Matsumoto, and R. Maekura. 2012. Recovery and genetic polymorphism of *Mycobacterium avium* complex (MAC) in the Bathroom. *Tuberculosis* 2012. (パリ、フランス共和国、9 月) .
 12. Inoue M., S. Nagi, E. Faith, M. Osada-Oka, K. Ono, Y. Ozeki, M. Niki, K. Kobayashi, M. Matsumoto, M. Shimada, S. Kaneko, Y. Ichinose, S. Njenga, S. Hamano, and S. Matsumoto. 2012. ケニア共和国における、学生の潜在性結核菌感染と様々な寄生虫感染. 第 53 回日本熱帯医学会

大会（北海道、9月）。

3. その他

特になし

13. **Matsumoto S.** 2012. Functions of mycobacterial DNA binding protein and its contribution to the persistent infection of Mycobacterium tuberculosis. The 11th Korea-Japan International Symposium on Microbiology. (Buyeo, Korea, 9月) .
14. **北田清悟.** 2012. RA 診療における各種合併症対策 呼吸器障害.第 22 回日本リウマチ学会近畿支部 (大阪 9月)
15. **前山順一、伊保澄子、岡 真優子、松本壮吉、山本三郎.** 2012. 結核ブースターワクチンとしての結核菌組換えタンパク質およびアジュバントの評価. 第 16 回日本ワクチン学会学術集会 (神奈川、11月)
16. **瀬戸真太郎、辻村邦夫、堀井俊伸、小出幸夫.** 2013. イメージ解析で明らかになった結核菌感染マクロファージと樹状細胞におけるオートファゴソーム形成機構の解析. 第 118 回日本解剖学会総会 (高松、3月発表予定) .
17. **辻村邦夫、瀬戸真太郎、内嶋雅人、永田 年、堀井俊伸、小出幸夫.** 2013. 休眠期結核菌関連抗原に対する日本人結核感染者の免疫応答. 第 86 回日本細菌学会総会 (千葉、3月発表予定) .
18. **瀬戸真太郎、辻村邦夫、堀井俊伸、小出幸夫.** 2013. 結核菌感染樹状細胞におけるオートファジーアダプタータンパク質 p62 依存的オートファゴソーム形成の解析. 第 86 回日本細菌学会総会 (千葉、3月発表予定) .
19. **内嶋雅人、永田 年、辻村邦夫、堀井俊伸、小出幸夫.** 2013. 第 86 回日本細菌学会総会. ケモカインレセプターを標的とするワクチンにより誘導される結核菌の MPT51 抗原特異的 T細胞応答の解析. 第 86 回日本細菌学会総会 (千葉、3月発表予定) .

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 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	加藤 朋子	（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。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 年代から低酸素状態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。

【方法】ソートン培地中で培養し、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、さらに 1974 年から培養している H37Rv 2 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 6 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 1%酸素濃度培養による短期休眠状態からも RNA 抽出を行った。液体培地中の酸素濃度測定を Optical O₂ sensor で測定した。

【結果】溶存酸素量をプローブにより直接測定したところ、NN15 では酸素大気圧の 51.6%（酸素濃度 10.8%）であった。現時点で NN15、NN16、NN17 について生菌の回復（培養）が可能であった。このうち最初に回復した NN15 について、新規に作成した 1%酸素濃度による培養検体（NN15 New hypoxia）、長期培養からの直接検体（NN15 Long hypoxia）、レファレンスとしての対数増殖期にある NN15（NN15 active）を作製した。NN15 New hypoxia 及び Long hypoxia 株で高発現している遺伝子を対象とし、active な H37Rv をレファレンスとしてクラスター解析を実施して 458 の遺伝子を同定した。さらに NN15 active のデータでソートすると、70 の遺伝子群が同定された。また、酸素濃度に伴って発現が Linear up-regulation pattern を示す 27 genes、Linear down-regulation pattern を示す 15 genes、さらに NN15 Long hypoxia のみで相対的に高発現している 63 genes を特定した。

【考察・結論】これらの結核菌は培養条件として少なくとも比較的低酸素であることが確定した。遺伝子発現解析では一般的な 1%酸素濃度下での短期培養株や好気培養株とプロファイルが異なり、いくつかの遺伝子の発現状況からは半休眠状態が想定された。長期培養株に特異的な発現を示す遺伝子も

同定されており、潜在結核感染症の理解と診断に有用性が期待される。

A. 研究目的

結核菌は宿主において潜在感染する。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。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 年代から低酸素培養状態で保存されている *M. tuberculosis* H37Rv 6 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
- NN19/BN8: *M. tuberculosis* H37Rv, 1974/2/5
- NN20/BN7: *M. tuberculosis* H37Rv, 1974/2/5

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）で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. 長期培養結核菌等からの 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。上層された流動パラフィンごと培養菌層を回収し、Chloroform/Ethanol (2:1)にて一度洗浄した。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

上記で精製した RNA では直接発現解析を実施可能なほどの検体が得られなかったため、Whole Transcriptome Amplification (WTA2, Sigma-Aldrich) で増幅した。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 (NimbleGen) を利用して、結核菌の遺伝子発現解析を行った。

4. 生菌として回収した長期培養株からの休眠状態菌の作製

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酸素濃度をコントロール可能なチャンバーを用いた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 14 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)

(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]

溶存酸素量をプローブにより直接測定したところ、NN15 では酸素大気圧の 51.6% (酸素濃度 10.8%) であった。

使用した H37Rv 6 株について、生菌の回収を試みたが、NN15、NN16 及び NN17 のみ発育を認めた。NN16、NN17 については継代にて発育が不十分であり、以降の実験には NN15 を使用した。

NN15 の遺伝子発現解析では、新規に作成した 1% 酸素濃度による培養検体 (NN15 New hypoxia)、長期培養からの直接検体 (NN15 Long hypoxia)、レファレンスとしての対数増殖期にある H37Rv (H37Rv active) と NN15 (NN15 active) からの検体で、図 1 のヒートマップに示すような発現情報を得た (3,988 genes)。±2 fold change (NN15 New vs Long hypoxia) で遺

伝子を選択し (1,175 genes)、K 平均法で複数回クラスタリングを行った。NN15 株での遺伝子発現について、長期培養及び新たに作成した休眠株で高発現している遺伝子を対象とし、active な H37Rv をレファレンスとしてクラスタ解析を実施して 458 の遺伝子を同定した。さらに NN15 active のデータでソートすると、70 の遺伝子群が同定された。この遺伝子群には機能的に Regulatory proteins; 3 genes、Intermediary metabolism and respiration; 14 genes、Conserved hypotheticals; 26 genes、PE_PPE families; 5 genes、Lipid metabolism; 3 genes、Cell wall and cell processes; 11 genes、Information pathway; 4 genes、Insertion seqs and phages; 4 genes の各遺伝子が含まれていた。

また、NN15 active と H37Rv active を比較検討したところ、相関係数 $R^2=0.9208$ で発現はほぼ同じであった。そこでこれらの株は発現状態として同じと考え、NN-15 の 3 条件 (1% New hypoxia, Long hypoxia, active) の直接比較を行った (図 2)。前述の方法と同様に ±4 fold difference で NN15 New vs Long hypoxia での遺伝子選択を実施し、三種類のパターンによるクラスタを同定した。第 1 のクラスタは酸素濃度に伴って発現が Linear up-regulation pattern を示すもので、27 genes を同定した。第 2 のクラスタは酸素濃度に伴って発現が Linear down-regulation pattern を示すもので、15 genes を同定している。さらに第 3 のクラスタでは NN15 Long hypoxia (unique up-regulation) のみで相対的に高発現している 63 genes を特定した (表 1)。

D. 考察

結核研究所が保有している低酸素・長期培養結核菌 (*M. tuberculosis* H37Rv) について、遺伝子の発現状態を解析した。

酸素濃度の解析からは、今回検討している長期培養株の培地中の酸素濃度が大気圧の 50% 程度であり、一般に Dormant な状態にある結核菌を短期間に作製する際に 1%

程度の酸素濃度下におくことを考えると、この酸素濃度は相対的に高い状態であった。いわゆる Self-generating, Gradual O₂ withdrawal モデル (Wayne の方法) においても結核菌の自然な増殖と酸素消費によって嫌気的な状態 (O₂ 飽和度 1%以下) になっているが、この場合はソートン培地に流動パラフィンを上層し、さらにプラスチックバッグに封入している。複数の測定で同様の結果を得ていることから再現性はあり、この状態でこれほどの液体中酸素濃度が得られていることがひとつの疑問である。この点は、今後嫌気チャンバーで酸素濃度を複数設定 (1, 5, 10, 20%) した実験系での再現性から判断する。いずれにしても、ある程度の嫌気状態で長々期培養した結核菌の潜在感染モデルは特異であると言える。

今回の発現解析の結果では、長期培養条件にある結核菌で最も相対的な発現量が多かった遺伝子として複数の *devR* regulon (Rv0552, Rv1191, Rv2422 等) を含む遺伝子群が同定された。この中には *hupB* (MDP-1) や *rpfC* (Rv1884c; probable resuscitation promoting factor) も含まれており、dormancy と resuscitation の中間的状态であることが示唆された。*devR* (*dosR*) 自体は新しく調製した 1%酸素濃度培養株で最も発現が高かった (Fold change 3.54 vs NN15 Long)。また unique up-regulation category にあった Rv1580c などは Function category としては Insertion seqs and phages に属しており、*Paenibacillus mucilaginosus* の遺伝子に相同性を持っていることから、microbial fertilizer (growth promoting factor) としてこの結核菌の状態維持に関与している可能性が示唆された。その他、Isoprene biosynthesis に関与する Rv2153c (*murG*) と Rv2157c (*murF*) の up-regulation も確認された。

今回 NN15 株を使用することで低酸素長期培養で特異的に発現亢進すると思われる遺伝子を同定した。またこの培養状態が臨床的な潜在感染の一面を表している可能性が示唆された。今後、これらの遺伝子の発現について種々の酸素条件及び培養期間に

て検討する必要があると考えられる。

E. 結論

結核研究所にて長期培養されている結核菌について性状を含めて解析を行った。これらの結核菌は 1960~70 年代に培養を開始されており、培養条件としては少なくとも比較的低酸素であることが確定した。遺伝子発現解析では一般的な 1%酸素濃度下での短期 (~14 日) 培養株や好気培養株とプロファイルが異なり、いくつかの遺伝子の発現状況からは半休眠状態が想定された。長期培養株に特異的な発現を示す遺伝子も同定されており、潜在結核感染症の理解と診断に有用性が期待される。

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

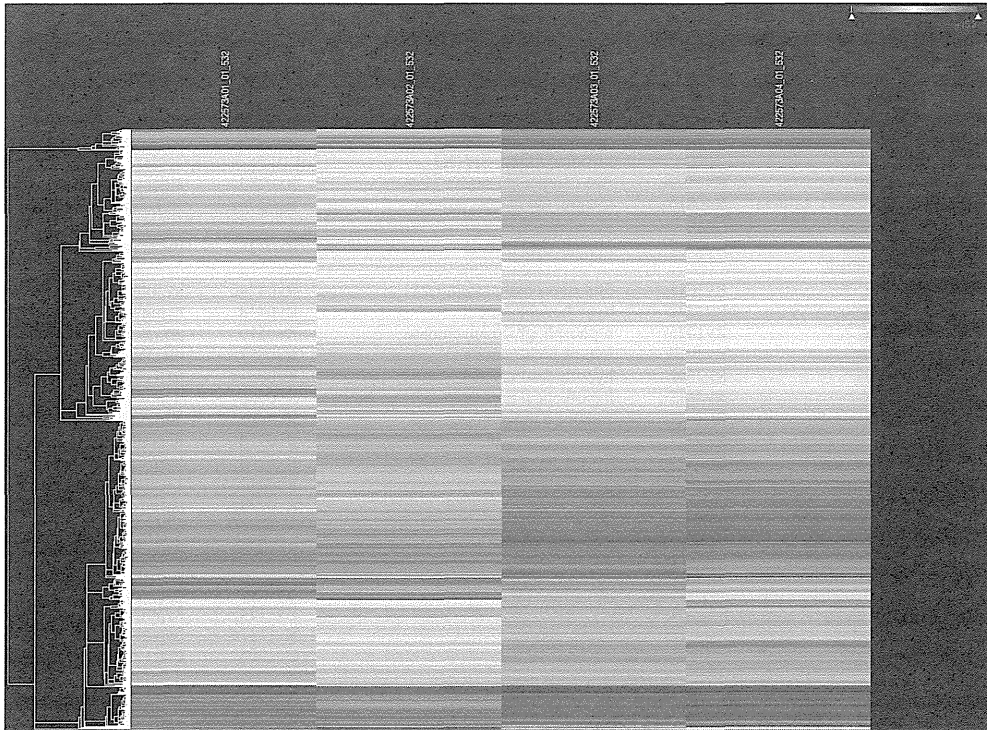


図 1 *M. tuberculosis* NN15 株 3,788 遺伝子の発現プロファイルヒートマップ（左から NN15 による新規作成 Wayne、長期保存状態、対数増殖期の H37Rv、長期保存状態から回復し対数増殖期にある NN15） 低酸素状態（1%低酸素培養及び長期培養）と対数増殖期の各 2 株はお互に類似した発現プロファイルである

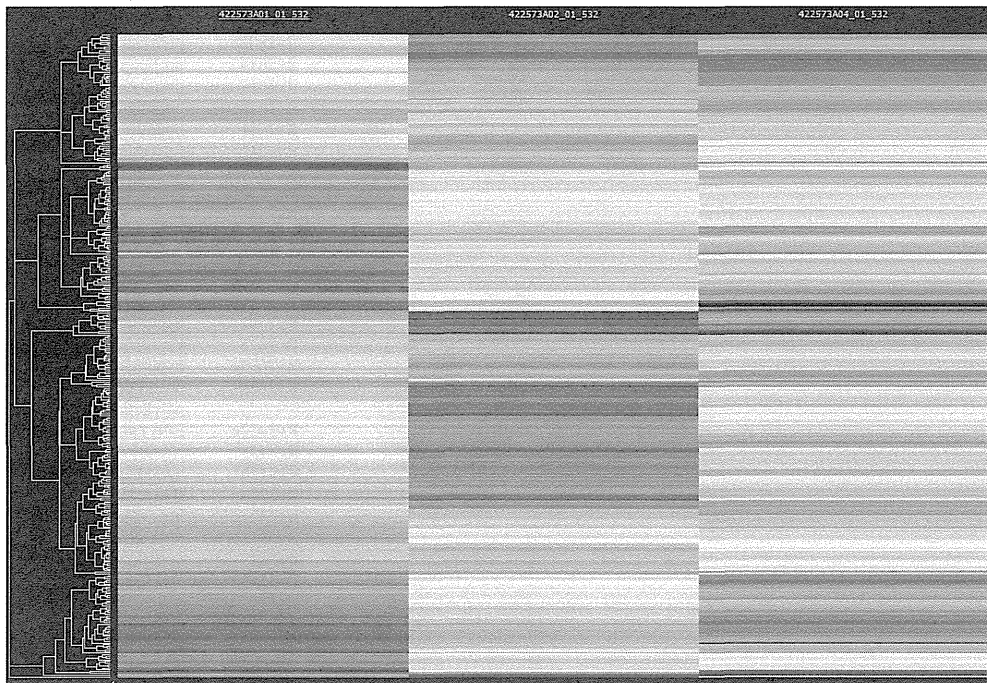


図 2 *M. tuberculosis* NN15 株について 1%低酸素培養と長期培養状態で 4-fold change が示された 382 遺伝子群のヒートマップ（左から NN15 による 1%低酸素培養、長期保存状態、長期保存状態から回復し対数増殖期にある NN15） 酸素濃度条件により発現が異なる

表 1 異なる培養状態にある *M. tuberculosis* NN15 株に特徴的な発現パターンを示す遺伝子群

O₂ dependent up-regulation		O₂ dependent down-regulation		Unique up-regulation in long hypoxia	
Gene ID	Description	Gene ID	Description	Gene ID	Description
Rv0095c	hypothetical protein	Rv0054	ss DNA-binding protein	Rv0105c	50S ribosomal protein L28
Rv0164	hypothetical protein	Rv0333	hypothetical protein	Rv0192A	hypothetical protein
Rv0174	MCE-family protein MCE1F	Rv0490	putative two component sensor histidine kinase SENX3	Rv0203	hypothetical protein
Rv0404	acyl-CoA synthetase	Rv0600c	two component sensor kinase	Rv0223c	aldehyde dehydrogenase
Rv0450c	transmembrane transport protein MmpL4	Rv0615	integral membrane protein	Rv0296c	sulfatase
Rv0637	(3R)-hydroxyacyl-ACP dehydratase subunit HadC	Rv0787	hypothetical protein	Rv0326	hypothetical protein
Rv0762c	hypothetical protein	Rv1015c	50S ribosomal protein L25	Rv0424c	hypothetical protein
Rv0830	hypothetical protein	Rv1322	hypothetical protein	Rv0498	hypothetical protein
Rv1476	hypothetical protein	Rv1445c	6-phosphogluconolactonase	Rv0510	porphobilinogen deaminase
Rv1501	hypothetical protein	Rv2010	hypothetical protein	Rv0557	mannosyltransferase PIMB
Rv1505c	hypothetical protein	Rv2602	hypothetical protein	Rv0601c	two component sensor kinase
Rv1506c	hypothetical protein	Rv2617c	hypothetical protein	Rv0666	hypothetical protein
Rv1508A	hypothetical protein	Rv2641	cadmium inducible protein	Rv0681	TetR family transcriptional reg.
Rv2107	PE family protein	Rv3221A	anti-sigma factor	Rv0712	hypothetical protein
Rv2307A	glycine rich protein	Rv3897c	hypothetical protein	Rv0739	hypothetical protein
Rv2709	transmembrane protein			Rv0952	succinyl-CoA synthetase subunit alpha
Rv2735c	hypothetical protein			Rv0974c	acetyl-/propionyl-CoA carboxylase subunit beta
Rv2755c	type I restriction/modification system specificity determinant			Rv1056	hypothetical protein
Rv2808	hypothetical protein			Rv1060	hypothetical protein
Rv2928	thioesterase TESA			Rv1134	hypothetical protein
Rv2945c	lipoprotein LppX			Rv1137c	hypothetical protein
Rv2987c	isopropylmalate isomerase small subunit			Rv1305	F0F1 ATP synthase subunit C
Rv3113	phosphatase			Rv1311	F0F1 ATP synthase subunit epsilon
Rv3124	transcriptional regulatory prot.			Rv1314c	hypothetical protein
Rv3377c	cyclase			Rv1376	hypothetical protein
Rv3465	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase RmlC			Rv1541c	lipoprotein LprI
Rv3826	acyl-CoA synthetase			Rv1558	hypothetical protein
				Rv1563c	maltooligosyltrehalose synthase
				Rv1580c	phiRv1 phage protein
				Rv1582c	phiRv1 phage protein
				Rv1602	imidazole glycerol phosphate synthase subunitHisH
				Rv1608c	peroxidoxin BcpB
				Rv1614	prolipoprotein diacylglycerol transferase
				Rv1617	pyruvate kinase
				Rv1676	hypothetical protein
				Rv1711	hypothetical protein
				Rv1716	hypothetical protein
				Rv2077A	hypothetical protein
				Rv2290	lipoprotein lppO
				Rv2308	hypothetical protein
				Rv2331	hypothetical protein
				Rv2419c	phosphoglycerate mutase
				Rv2478c	hypothetical protein
				Rv2526	hypothetical protein
				Rv2597	hypothetical protein
				Rv2635	hypothetical protein
				Rv2694c	hypothetical protein
				Rv2935	phenolphthiocerol synthesis type-I polyketidesynthase PPSE
				Rv3022c	PPE family protein
				Rv3155	NADH dehydrogenase subunit K
				Rv3178	hypothetical protein
				Rv3224	short chain dehydrogenase
				Rv3321c	hypothetical protein
				Rv3513c	fatty-acid-CoA ligase
				Rv3517	hypothetical protein
				Rv3548c	short chain dehydrogenase
				Rv3724A	cutinase precursor
				Rv3751	integrase
				Rv3773c	hypothetical protein
				Rv3788	nucleoside diphosphate kinase regulator
				Rv3836	hypothetical protein
				Rv3901c	hypothetical protein
				Rv3920c	hypothetical protein

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

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

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）
研究協力者	井上 学	（大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学）
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）
研究協力者	濱野 真二郎	（長崎大学熱帯医学研究所・寄生虫学）
研究協力者	嶋田 雅暁	（長崎大学熱帯医学研究所・ケニア拠点）
研究協力者	一瀬 休生	（長崎大学熱帯医学研究所・ケニア拠点）
研究協力者	凧 幸世	（長崎大学熱帯医学研究所・寄生虫学）
研究協力者	岡 真優子	（京都府立大学大学院・食環境安全学）
研究協力者	尾関 百合子	（園田学園女子大学・人間健康学部食物栄養学科）
研究協力者	岡部 真裕子	（国立感染症研究所・免疫部）
研究協力者	小林 和夫	（国立感染症研究所・免疫部）

研究要旨

結核菌の感染後、大多数の感染者(95%)は発症せず、長期間の潜伏感染が持続するが、5～10%の無症候感染者は内因性再燃によって結核を発症する。それゆえ潜在性結核(Latent tuberculosis infection ; LTBI)は病原体の主要なリザーバーであり、LTBI をコントロールすることが結核を対処する上で極めて重要である。日本は中程度蔓延国にあり予断を許さない状況であるが、アジアやアフリカ地区の途上国における結核の惨禍はさらに著しく、積極的な対応が希求される。

結核が蔓延する途上国では、寄生虫感染の蔓延が一般的であり、これらが結核の高蔓延に影響を与えることが知られている。近年の研究において、慢性的な多細胞性寄生虫感染は BCG の抗結核効果を減弱させることも報告された。さらに多細胞性寄生虫蔓延地域と結核蔓延地域は相関を示すことが報告されている。しかしながら LTBI と寄生虫感染の関連性はいまだ未解析である。

これまでの国内における本研究班の成果を基に、本研究では、結核高蔓延地区の一つであるケニア共和国の Mbita 地区において小学生を対象に、LTBI と各種寄生虫感染の調査を行った。その結果、LTBI と鉤虫感染に相関が認められた。

A. 研究目的

無症候結核菌感染者が人類の 1/3 にのぼると推定されており、その 5-10%が結核を発症することから潜在性結核と定義されている。結核菌はヒトの寄生菌であることから、潜在性結核(Latent tuberculosis infection ; LTBI)は病原体の主要なリザーバーであり、

LTBI をコントロールすることは結核の根本的な制圧戦略上、極めて重要である。

日本は結核中程度蔓延国にあり結核は予断を許さない状況であるが、アジアやアフリカ地区の途上国における結核の惨禍はさらに著しく、積極的な対応が希求される。結核が蔓延する発展途上国の多くでは、寄

生虫感染率も高値で、これらが結核の蔓延に影響を与えることが知られている。近年の研究において、慢性的な多細胞性寄生虫感染は BCG の抗結核効果を減弱させることが報告され、さらに高多細胞性寄生虫蔓延地域と結核菌蔓延地域は相関を示すことが示されている。しかしながら潜在性結核と多細胞性寄生虫感染の関連性はいまだ未解析のままである。

ケニア共和国は、世界結核高負担国 22 カ国の中で 13 番目に位置する、高蔓延国の一つである。ケニア共和国においては様々な寄生虫感染症の罹患率が高いことも報告されている。

これまで研究分担者等は本研究班において、潜在性結核の分子機構解析やそれをベースとして、潜在性結核の検出技術の開発等を行ってきた。本研究では、途上国における結核対策の拠点の構築を目的として、ケニア共和国において末梢血中の単核白血球細胞を現地にて培養し、結核菌特異的抗原である Early Secreted Antigenic Target 6 kDa protein (ESAT6) と 10 kDa culture filtrate protein (CFP10) に対する免疫応答で結核菌感染者の検出を行った。また、長崎大学熱帯医学研究所 寄生虫学分野 濱野 真二郎 博士等との共同実施により、各種寄生虫感染を検出し、寄生虫感染と潜在性結核になんらかの相関があるかを検討した。

B. 研究方法

ケニア共和国の Mbita 地区において無作為に 7 校を選別し、その第四学年 (standard 4) の学生を対象とし調査を行った。調査対象とした項目は、一般の健康調査 (問診、身長、体重、発熱の有無) に加え、BCG の接種状況、血液生化学試験による貧血の有無、さらに LTBI と寄生虫感染の検出を行った。

LTBI の検出には対象とした学生から血液を採取し、分離された末梢血単核球を結核菌抗原 (ESAT-6 および CFP10) で 24 時間刺激し、産生されたインターフェロン γ をイムノクロマト法によって検出す

ることを行った。またマイトジェンである Concanavalin A (ConA) を陽性コントロールとして用いた。

蠕虫や原虫の検出は、学生より 3 日間連続で糞鞭を採取し、kato-katz 法を実施して行った。

マラリア原虫感染の検出には、ギムザ染色標本の顕微鏡観察により原虫感染の有無、およびその形態学的特徴から熱帯マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫および四日熱マラリア原虫の 4 種の原虫種鑑別を行った。

ヘモグロビン、赤血球、ヘマトクリットの測定は、BM6050 (JEOL, Japan) を用いて測定し、これらの値から平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球色素濃度を計算した。

さらにこれらの結果を統計解析することにより、LTBI に対するリスクファクターの特定を行った。統計解析には IBM SPSS 20.0 software を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究計画は、ケニア共和国医学研究所の承認を得て実施した。検者およびその両親や保護者に、英語およびルオ語で説明し同意を得た者を対象として試験を行った。

C. 研究結果

ケニア共和国における、ビクトリア湖畔 Mbita 地区の学生 (standard 4) において、BCG 接種者は 240 名中 167 名 (53.8%) であった。また PPD による抗原刺激で反応性を示した者は 191 名 (79.6%)、結核菌抗原 (ESAT6 and/or CFP10) に対しては 75 名 (31.3%) であり、これら結核菌抗原 (ESAT6 and/or CFP10) に対して反応性を示した学生は、咳や熱の症状が認められなかったため LTBI と判定した。またこれら 75 名全て ConA に対して反応性を示し、CD4 細胞数から後天性免疫不全症候群である可能性は否定された。

寄生虫感染に関しては鉤虫感染者が 18 名、*Ascaris lumbricoides* 感染者が 6 名、*Trichuris trichiura* 感染者が 12 名、*Schistosoma mansoni* 感染者が 178 名、