

厚生労働省科学研究補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
研究分担報告書

次世代シーケンサーを用いた感染性が高いと考えられる
結核菌のゲノム解析

研究分担者

前田伸司 結核予防会結核研究所抗酸菌リファレンス部
結核菌情報科 科長

研究要旨

集団感染事例で分離された株を使い、遺伝系統及び型別分析を行った。本研究例では疫学調査によって、初発患者から家族内 2 名、出張先の同僚 1 名が感染し結核症を発症したものと考えられた。また、もう 1 人の家族もクオインティフェロン陽性となった。初発患者株は入手できなかったが、他の 3 株は IS6110 制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析で同一パターンだった。これらの株の Large Sequence Polymorphisms (LSP) 及び遺伝系統を調べると、RD181 陰性、RD150 陰性の北京型-Modern 株だった。本菌株の遺伝系統は、RD181 陰性で北京型-modern 株という欧米において多剤耐性に関連しているといわれている菌株と同一遺伝型であったが、RD150 の分析で本領域は陰性というマイナーな系統であった。集団感染事例で同一感染源由来と判定されたにも関わらず、36 箇所の反復配列多型 (VNTR) 分析で、一箇所だけ VNTR-3232 ローカスのコピー数が異なることがわかった。また、これら 3 株を次世代シーケンサー (NGS) で一塩基多型 (SNP) 分析を行い、結核菌の進化系統と疫学調査結果の関連を調べた。

A. 研究目的

結核菌が持つ病原性因子に関する報告が数多く存在している。しかし、結核菌についての病原性を評価できる統一した方法はなく、現在は実験動物への感染実験で動物の生存数や臓器内の残存菌数の比較等で評価されている。

何を指標として病原性を評価するかで、その原因因子が異なることから因子の同定は難しい。一般にヒトに対して病原性が高い菌は、ヒトからヒトに容易に感染が起こり、結果として集団感染が起こるものと考えられる。特に、1) 結核感染事例でも同一遺伝子型株による感染者数が多い場合、

2) 疫学調査の結果により接触時間が短いと判明した場合、等ではその菌株は感染性が高いものと客観的に評価することができない。

そこで、本研究では、感染力が高い株を対象に、通常結核菌と比較することで感染性に関与する因子のスクリーニングを試みた。つまり、集団感染を起こした株を次世代シーケンサー (NGS) で詳細に遺伝子解析を行い、感染力と相関すると考えられる遺伝子同定を進めた。

B. 研究方法

・本研究の分析に用いた結核菌株について

疫学調査により、感染源となった本人（9月登録）から子供（8月登録、分離菌はM-1と表記）、同じく子供（9月登録、分離菌はS-1と表記）に感染し結核を発症、もう1人はQFT陽性でLTBI登録された。また、本人は出張先の同僚と3回（8時間/回）接触があり、この同僚（12月登録、分離菌はT-1と表記）も発症した（図1）。今回は、残念ながらIndex caseの菌株が入手できなかった。そのため、M-1、S-1、T-1の3株について培養後、菌体からゲノムDNAの精製を行った。

・菌株の遺伝子型

3株の分離菌ともスポリゴタイピング及び北京型結核菌進化の主要経路におけるLarge Sequence Polymorphisms (LSP)を調べた。RD181及びRD150はPCR法を利用して、その領域の有無を調べた。また、NTF領域へのIS6110の挿入の有無を調べることで、Ancient型かModern型かの型別を行った。

・反復配列多型 (VNTR) 分析

36ローサイ (VNTRs-0424, 1955, 2074, 2163b, 2372, 3155, 3336, 4052, 4156, 2163a, 3232, 3820, 4120, 1612, 1895, 2401c, 2347, 3171, 3690, 1982, MIRU 2, MIRU 4, MIRU 10, MIRU 16, MIRU 20, MIRU 23, MIRU 24, MIRU 26, MIRU 27, MIRU 31, MIRU 39, MIRU 40, ETR A, ETR B, ETR C, ETR F) について、VNTR法で分離株のコピー数を調べた。

・次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析

精製した各ゲノムDNA 2ugを超音波処理して断片化し、末端にアダプターを結合させた。この得られたDNAフラグメントをHiSeq 2000 (イルミナ社) でシーケンス分析した。

C. 研究結果

1. 感染した株の遺伝子型

スポリゴタイピング法で3株の菌体DNAを調べると、すべての株が北京型 (36から43のDRがすべて陽性) であった。また、NTF領域にIS6110の挿入があり、世界的に広まっているModern型の結核菌だった。LSP分析では、北京型結核菌で主流のRD181領域を欠損した遺伝型であるが、RD150領域も欠損しており、北京型結核菌ではマイナーな系統の株であることがわかった。

2. 結核菌の型別分析

疫学調査で集団感染事例と疑われた株について、VNTR等で型別を行うと、同一感染源から広まった株同士なら同一パターンとなることが知られている。本研究でもIS6110制限酵素断片長多型 (RFLP) で同一パターンであることは確認されている。手技が異なるVNTR法を用いて、これら3株のDNAを分析した。分析ローカスについては、本研究所で解析に使っているハイパーバリアブル (HV) を含めた36ローサイとした。HVの1箇所を除き、調べた35ローサイのコピー数はすべて3株間で一致した。しかし、VNTR-3232では、家族内で感染が起こったM-1株とS-1株はコピー数18で一致していたが、会社同僚の短時間接触例のT-1株では14で、他の2株と異なった (図2)。

3. 全ゲノム解析

M-1、S-1、T-1株についてNGSで全ゲノム解析を行い3株間でのSNP部位とその数を調べた。変異の解析では、多型性の高いPE/PPE遺伝子ファミリーのオープンリーディングフレーム (ORF) 中の変異は除いた。家族内での感染 (M-1とS-1) と出張先の同僚 (T-1) 間では5箇所のnon-synonymous SNPが存在した (①1324962: A → G [Rv1184c, 217: V => A]、②1445783: C → A [Rv1291c, 18: A => S]、③1808677 C → G [trpE, 259: Q => E]、④1835947 A → G [coaE, 312: D => G]、⑤3374817 A → G [Rv3015c, 283: V => A])。これら5箇所のSNPは、M-1とS-1に存在し、T-1には存在しなかった。また、M-1のみ

に存在して他の2株(S-1とT-1)に存在しないSNPが1箇所(4211195 C → A [Rv3765c, 197: R ⇒ L])あった。一方、S-1のみに存在、あるいはT-1のみに存在するSNPはなかった。

D. 考察

疫学調査やIS6110 RFLP法による型別分析で集団感染事と確認された結核菌を使って本研究を行った。菌株の系統解析では、近年、ヨーロッパや米国などで世界的に広まっている北京型-Modern株であり、日本国内で主要な遺伝型である北京型-Ancient株ではなかった。また、本株は、結核菌進化の主要経路から外れたRD150欠損株で日本国内では出現頻度が低い系統の菌だった。

集団感染かどうか判別するための型別法として結核菌では、通常IS6110 RFLPやVNTR法等が用いられている。それぞれの型別法では分析原理が異なるため、結果に齟齬が出るケースがあることが報告されている。さらにVNTR法では分析ローカス数やその選択によって識別能が大きく異なることが知られている。HVローサイについては、集団感染(家族内感染を含む)で異なる例がいくつか報告されており、分析結果とその解釈に注意を要する。今回の例でも、RFLP分析では同一パターンだったが、HVのローカスのVNTR-3232でコピー数が異なった。

結核菌の増幅に伴いゲノム上に変異が入り、時間経過によってSNPが蓄積していくことになる。NGSによるゲノム解析で家族内感染株(S-1とM-1)間のSNPは1箇所だけなので、ほぼ同じ株による感染が起こったと考えられる。また、ゲノム上に存在するSNP数で、M-1、S-1及びT-1を系統的に並べると、変化度合が低いものから順にT-1、S-1、M-1(T-1<S-1=M-1)となる。ゲノム解析によるT-1と家族内感染株間でのSNP有無からT-1が先に存在して、その後5箇所のSNPが生じて本家族内感染株が生じたと考えられる。一方、疫学調査では初

発患者が、家族と同僚に感染させたことになっている。

これらの結果からゲノム解析から得られた菌株への変異導入(進化)の方向性と疫学調査による感染の方向性は一致しないように考えられる。この結果を説明するためには、初発患者は均一な結核菌(同一系統で同じ遺伝型)を持っていたのではなく、一部遺伝子型が異なる結核菌も持っており、これらの結核菌によって出張先の同僚の感染発症が起こったものと推定される。あるいは、T-1株は家族感染株とほとんど同じパターンの結核菌であるが疫学的関連は無い株である可能性もある。

今後、初発患者の結核菌分析ができれば、これらの関連を明らかにすることができると考えられる。

E. 結論

集団感染事例と確認された株のLSP、スポリゴタイピング、VNTR及び次世代シーケンサーによるゲノム解析を行った。VNTR分析ではローカスによって、コピー数変化頻度が異なりHV領域のローカスでは家族内感染事例でも異なることが確認できた。また、NGSを使ったゲノム解析によるSNP分析で、得られた遺伝系統と疫学調査結果を比較することで株間の関連を明らかにすることができる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Yamada H, Bhatt A, Danev R, Fujiwara N, Maeda S, Mitarai S, Chikamatsu K, Aono A, Nitta K, Jacobs WR Jr, Nagayama K: Non-acid-fastness in *Mycobacterium tuberculosis* ΔKasB mutant correlates with the cell envelope electron density. *Tuberculosis*, 2012, 92: 351-357.
2. Wada T, Maeda S: Multiplex agarose gel electrophoresis system for variable number of

tandem repeats genotyping: Analysis example using *Mycobacterium tuberculosis*.

Electrophoresis, 2013, (in press)

(2) 学会発表

1. 前田伸司、和田崇之：反復配列多型分析法による型別結果比較の際の問題点とその対策. 第87回 日本結核病学会、広島、2012
2. 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 172 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、広島、2012
3. 前田伸司、中崇、藤原永年：反復配列多型 (VNTR) 分析を利用した結核菌群の同定と型別. 第86回 日本細菌学会、千葉、2013
4. 藤原永年、中崇、柴田満、前田伸司：抗酸菌における形態、宿主応答と連関した脂質生化学的一考察. 第88回 日本結核病学会、千葉、2013
5. 山田博之、前田伸司、近松絹代、青野昭男、御手洗聡：電子顕微鏡を用いた結核菌の形態計測標準データの試行. 第88回 日本結核病学会、千葉、2013
6. 前田伸司、櫻田紳策、小林信之、慶長直人：日本国内とベトナム（ハノイ地区）で分離された結核菌における遺伝系統の比較. 第88回 日本結核病学会、千葉、2013
7. Mitsuru Shibata, Takashi Naka, Shinji Maeda, Hisashi Ogura, Nagatoshi Fujiwara : Production and Characterization of Polyclonal Rabbit Antibodies to Mycobacterial Lipid Antigens. 112th General Meeting, American Society for Microbiology 2012, San Francisco, USA
8. Shinji Maeda, Noboru Nakata, Takashi Naka, Masanori Kai, Nagatoshi Fujiwara : Isolation and Characterization of the Phosphatidylserine Synthetase Knock-out Mutants of Mycobacteria. 112th General Meeting, American Society for Microbiology 2012, San Francisco, USA
9. Takashi Naka, Shinji Maeda, Mamiko Niki, Naoya Ohara, Saburo Yamamoto, Ikuya Yano, Jun-ichi Maeyama, Hisashi Ogura, Kazuo

Kobayashi, Mitsuru Shibata, Nagatoshi

Fujiwara : Lipid Phenotypes of Two Distinct

Subpopulations of *Mycobacterium bovis*

Bacillus Calmette-Guérin Tokyo 172 Substrain

and their Host Responses. 112th General

Meeting, American Society for Microbiology

2012, San Francisco, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

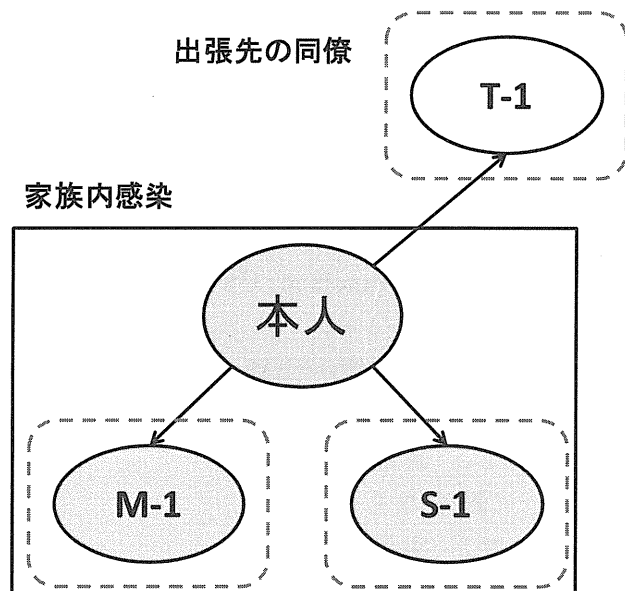


図 1. 疫学調査から推定された結核菌の感染経路
波線は、実際に解析を行った株

ID	JATA No.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	0424	M10	1955	2074	2163b	2372	M26	3155	M31	3336	4052	4156
M-1	4	2	4	3	6	1	7	4	5	7	8	3
S-1	4	2	4	3	6	1	7	4	5	7	8	3
T-1	4	2	4	3	6	1	7	4	5	7	8	3

ID	HV											
	2163a	3232	3820	4120	M2	M4	M16	M20	M23	M24	M27	M39
M-1	8	18	16	12	2	2	3	1	5	1	3	3
S-1	8	18	16	12	2	2	3	1	5	1	3	3
T-1	8	14	16	12	2	2	3	1	5	1	3	3

ID	M40	EA	EB	EC	EF	1612	1895	2401c	2347	3171	3690	1982
M-1	2	2	2	4	3	7	4	4	4	3	4	8
S-1	2	2	2	4	3	7	4	4	4	3	4	8
T-1	2	2	2	4	3	7	4	4	4	3	4	8

図 2. 分離株の VNTR 分析

ハイパーバリアブル(HV)のローカスを含めて 36 箇所のコピー数を比較した

結核菌株の遺伝背景と臨床・疫学・細菌学的特徴との関連性の解明

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

結核菌の薬剤耐性化獲得能力を評価するために、自然突然変異率の算出と、活動休止期に誘導される薬剤耐性の定量的検出を行った。結核菌北京型株の 6 遺伝系統をカバーする 18 株を用いた解析から、新興型に属する 1 株 (KC162 株) が、イソニアジドに対する耐性獲得能力に優れている事を見出した。全ゲノム領域を対象とした比較ゲノム解析により、63 ヶ所の遺伝子変異が、この菌株個性の責任遺伝子候補として特定された。今後、KC162 株と同じ菌株個性を有する株を複数株検出することで、比較ゲノム解析の精度を高め、責任遺伝子の特定につなげたい。今回開発した「パーシスター変異誘導法」は、活動休止状態の菌の薬剤耐性化を簡便に検出できるものであり、潜在性結核治療における耐性菌出現の危険性を事前に評価できる方法として期待される。

A. 研究目的

結核の多彩な疫学像・臨床像の根源となる結核菌株個性の多様性をゲノム情報と関連付けて解明することで、公衆衛生上の対策に資することを大目的としている。本年度は公衆衛生上の脅威となり得る菌株個性として、薬剤耐性獲得能力に着目した。薬剤耐性獲得能力の違いを客観的に評価し、その違いを生み出すゲノム情報の抽出を目的として、(1) 耐性獲得能力を評価するための手法の確立、(2) 耐性化能力の高い菌株の選定、(3) 比較ゲノム解析による責任遺伝子の特定を目指した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

異なる 6 遺伝系統 (ST26, STK, ST3, ST19, ST10, ST22) からなる結核菌北京型株 18 株を使用し、薬剤耐性獲得能力の違いを下記により評価した。

2. 薬剤耐性獲得能力の評価

2-1. 自然突然変異率の算出

結核菌の薬剤耐性獲得はゲノム DNA 上の突然変異で説明されることから、自然突然変異率の違いが薬剤耐性獲得能力の違いを反映するものと考え、上記菌株に対して、Luria-Delbruck fluctuation test を実施した。変異の検出には 0.2 ug/ml 濃度のイソニアジドを含有する培地を用いた。

2-2. 活動休止菌が受ける遺伝子変異の評価
薬剤への曝露を経て活動休止状態として生き残った菌(パーシスター)が、曝露時間の経過とともに誘発される遺伝子変異の頻度を定量的に評価するための手法を開発し、「パーシスター変異誘導法」と呼称した。BD バクテック MGIT AST 法をベースとして、測定期間を AST 判定終了後 3 週目まで継続し、全測定期間中の CFU と耐性菌の計数、ならびに耐性関連変異を検出するものである。今年度は、本手法の予備的評価を行った。

3. 比較ゲノム解析

次世代シーケンサー (イルミナ GAIIx, HiSeq) を用いて、全ゲノム領域の数十から数百倍に相当する配列情報を取得した。BWA を用いて、得ら

れた配列情報を参照ゲノム配列(結核菌 H37Rv 株)に貼りつけるマッピング解析を行い、遺伝子変異を検出した。

(倫理面への配慮)

本研究に用いた菌株は全て匿名化されており、番号化することで、個人情報の特定が不可能となるように配慮した。

C. 研究結果

供試菌 18 株と基準株(H37Rv 株) の自然突然変異率を測定し、基準株に対する相対的自然突然変異率を算出した。供試菌 18 株中 1 株 (KC162 株) が基準株の約 100 倍という高い突然変異率を示した。KC162 株と同じ遺伝系統群に属する他の 3 株は 0.25-1.2 の値であり、本特徴は遺伝系統共通の特徴ではなく、菌株固有の特徴であろうと推察された。

次に「パーシスター変異誘導法」を KC162 株 (高頻度自然突然変異出現株) と H37Rv 株 (基準株) に適応した。いずれの菌株においても、イソニアジドへの曝露初期には菌の死滅による CFU の減少が起こり、その後、一定の生き残り株 (パーシスター) のみの存在する期間を経て、最終的には CFU 値が V 字回復するという現象を捉えることに成功した。また、CFU 値の V 字回復までに要する時間は、KC162 株では薬剤感受性判定後約 2 日であったのに対して、H37Rv では約 5 日と明確な違いが認められた。

上記の評価において、KC162 株は、少なくともイソニアジドに対する耐性獲得能力に優れた株であると推察された。また、今回の実験において、KC162 株と同一の VNTR プロフィール(遺伝型)を示すものの変異出現率は基準株と同等である株(K207 株) が検出された。そこで、これら 2 株の間での全ゲノムワイドな変異の比較を行い、KC162 株の遺伝的特徴付けを試みた。全ゲノム比較により、KC162 株に特有の一塩基多型として 108 か所の変異が特定された。アミノ酸置換に関連する変異は 63 か所であり、そのうちの 4 か所が DNA の修復、組み換え、複製に関与する遺伝子上での変異であった (dnaA, recC, helZ, ligB)。

D. 考察

結核菌の薬剤耐性化獲得能力を菌株の表現型として評価するために、イソニアジド含有培地を用いた fluctuation test を実施するとともに、独自に開発した「パーシスター変異誘導法」を試みた。結核菌北京型株の 6 遺伝系統をカバーする 18 株を用いた解析から、新興型に属する 1 株(KC162 株)が、イソニアジドに対する耐性獲得能力に優れている事を見出した。KC162 株と同一の VNTR パターンを示す 1 株 (K207 株) を含む新興型の他の 3 株では、耐性獲得能力は基準株と同等であったことから、KC162 株が示した特徴は、菌株固有のものであり、遺伝系統群に共通する性質ではないものと思われる。

さらに今回、薬剤への曝露時間の経過とともにパーシスターとして生き延びた活動休止菌が薬剤耐性化する現象を定量的にとらえるための「パーシスター変異誘導法」を確立した。未だ、予備実験データではあるが、本手法を用いることで、自然突然変異率が高い KC162 株が基準株に比べてイソニアジドによる遺伝子変異の誘導を受け易いという結果が得られた。活動休止状態の菌の薬剤耐性化に関する貴重な知見であり、潜在性結核治療における耐性菌出現の危険性を事前に評価できる方法として期待される。

薬剤耐性獲得能力が優れていると推定された KC162 株の全ゲノム解析を行い、近縁株 (K207 株) との比較ゲノム解析を行った。KC162 株に特有の一塩基多型として、アミノ酸置換に関連する変異を 63 か所特定した。自然突然変異率の上昇に寄与しうる変異として、DNA の修復、組み換え、複製に関与する遺伝子に着目すると、KC162 株は 4 つの遺伝子(dnaA, recC, helZ, ligB)に変異を有することが分かった。

KC162 株の個性は自然突然変異率の上昇、あるいは、イソニアジドによる変異誘導の受け易さにより説明されると思われる。これらの個性の根源を担う遺伝情報の特定のためには、同様の菌株個性を有する複数株を用いた解析が必要になる。今回開発した「パーシスター変異誘導法」は通常薬剤感受性試験法をベースにしたものであり、手技の簡便さから、多検体での評価を可能とするものである。今後、多検体を解析することで、KC162 株と同じ特徴を持つ株を検出することで、その責

任遺伝子の特定は精度を高めるものと考えている。

E. 結論

イソニアジド含有培地を用いた fluctuation test と独自に開発した「パーシスター変異誘導法」を用いることで、結核菌の薬剤耐性獲得能力の違いを定量的に評価出来た。本研究により、イソニアジドへの耐性獲得能力が他の株に比べて著しく高い株の存在が確認された。比較ゲノム解析により、63ヶ所の遺伝子変異が、この菌株個性の責任遺伝子候補として特定された。今回開発した「パーシスター変異誘導法」は、活動休止状態の菌の薬剤耐性化について新たな知見を提供するものであり、潜在性結核治療における耐性菌出現の危険性を事前に評価できる方法として期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. **Tomotada Iwamoto**, Louis Grandjean, Kentaro Arikawa, Noriko Nakanishi, Luz Caviedes, Jorge Coronel, Patricia Sheen, Takayuki Wada, Carmen A. Taype, Marie-Anne Shaw, David A.J. Moore, and Robert H. Gilman. PLoS ONE 7(11):e49651 doi:10.1371/journal.pone.0049651 (2012)

2) Evolutionary robust SNPs reveal the misclassification of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family strains into sublineages. Noriko Nakanishi, Takayuki Wada, Kentaro Arikawa, Julie Millet, Nalin Rastogi, and **Tomotada Iwamoto**. Infection, Genetics and Evolution 16:174-177 (2013)

2. 学会発表

1) **T. Iwamoto**, L. Grandjean, K. Arikawa, N. Nakanishi, J. Coronel, L. Caviedes, P. Sheen, T. Wada, C. Taype, MA. Shaw, DAJ Moore, RH Gilman. Genetic diversity of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru compared with that of strains from East Asia
11 th International Conference on Molecular

Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases, October 30 – November 2, 2012, New Orleans, USA

2) 中西典子、和田崇之、有川健太郎、**岩本朋忠** 結核菌北京型 1,054 株を用いた遺伝的系統解析法の評価

第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月 18-20 日、幕張メッセ 千葉

知的財産権の出願・登録状況
なし

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
研究分担報告書

多様な研究シーズを想定した結核菌臨床分離株のゲノム情報集積

研究分担者

和田 崇之 長崎大学熱帯医学研究所国際保健学 助教

研究要旨

結核菌の臨床分離株には遺伝的多様性があり、各菌株には点変異や遺伝子欠損など、ゲノムレベルでの様々な個性が存在している。こうした違いは菌株の性質（病原性や抗原性、その他未知の生化学性状など）と密接に関連することから、そのゲノム情報は結核研究において新しい研究シーズとして活用する。本課題では、本邦において分離された結核菌株を系統分類に基づいて選択し、その遺伝的多様性を効率よく網羅することを目的とした。本年度は 16 株を選択してゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサー HiSeq2000 を用いたショートリード解析に供した。先行研究によって得られたゲノム情報と統合することにより、本邦における結核菌株、特に北京型結核菌および T3-Osaka のゲノム情報が多数集積され、菌株個性解析や分子疫学領域において有用なデータ基盤が構築された。

研究協力者

鈴木 定彦（北大人獣共通感染症リサーチ
センター・国際疫学部門・教授）
中島 千絵（同・特任助教）

A. 研究目的

結核患者から分離される結核菌株には様々な遺伝子レベルの多型性がある。菌株間の遺伝的差異は菌株個性（病原性の違い、薬剤感受性など）、分子進化（宿主適応などに関わる菌株変化）、分子疫学（感染源・伝搬経路の同定）など、多岐にわたる研究目的に即した情報源となりうる。近年、次世代シーケンサー（NGS, Next Generation Sequencer）の発達に伴い、結核菌でもゲノム塩基配列全域を対象とした比較（ゲノム比較）が容易になってきた。比較ゲノムでは、菌株ごとの遺伝的個性を網羅的に抽出・検索できるだけでなく、その変異情報

を他の菌株で検証することにより、極めて高精度な異同判定、相同性解析が可能となる。

東アジア地域では、「北京型」と呼ばれる系統群に属する結核菌株（北京株）が高頻度で分離されることが知られている。北京株は大きく「祖先型」「新興型」に分類される。世界各国で分離された北京株についてこれまでも詳細な遺伝型別解析が数多く報告されているが、日本では祖先型が優先的に分離されることが特徴的である。逆に、新興型の報告は東アジア地域のみならず、世界全域で分離される傾向にあり、地球規模での拡散が懸念されている。このような地理生物学的特性の理由は現時点において定かではなく、病原性や抗原性をはじめ、様々な実験検証が進められつつある状況である。

これまで、我々は国内の臨床分離株を詳細に分析し、本邦の北京型結核菌が既知の

点変異多型 (SNPs) によって 6 群 (系統発生順に ST11/26, STKr, ST3r, ST19/25, ST10, ST22) に分類可能であることを見出している (Nakanishi et al., Infect Genet Evol. 2013.). このうち ST11/26, STKr, ST3r, ST19/25 が祖先型に, ST10, ST22 群が新興型に属している. これらの系統群はすべて遺伝的に単系統であり, それぞれが分岐しながら独立的に派生してきたことが示唆されている. 一方, 非北京型結核菌では, 「T3-Osaka」と名付けられた菌株群が本邦固有に定着している可能性があり, 祖先型北京株の定着に対する比較として興味深いところである.

本研究課題の目的は, 臨床分離株のゲノム比較データを効率的に蓄積し, 我が国における結核菌の遺伝的多様性を効率的に網羅することである. そうした変異情報を共同研究者と共有, もしくは公開することにより, 様々な結核研究シーズとして役立つと共に, 変異検出技術に適用させることによって結核菌型別の抜本的に向上させ, 結核公衆衛生に寄与することを目的とした.

B. 研究方法

ゲノム比較対象株の選択. 先行研究により, 本邦で多く分離される北京型系統群 (ST11/26, STKr, ST3r, ST19/25, ST10) はそれぞれ 3~5 群にさらに細分化されることが示されている (図 1. Wada et al., Infect Genet Evol. 2012 より再編). 本課題では, これまで比較ゲノム解析が未実施の小系統群に属する菌株をあらかじめ選別し, 分析対象とした (表 1).

シーケンシング. 各菌株を小川培地にて培養後集菌し, ゲノム DNA を精製した. 各株由来 DNA はそれぞれ断片化処理後にタグ配列を付加し, マルチプレックス解析 (複数のサンプルを一度に配列解読し, 取得データをタグ配列に準じて各株由来データとして解析を行う方法) を行った. 本課題では, HiSeq2000 (Illumina 社) によるショートリード解読 (100 bp×2, ペアエンド) を実施した.

変異抽出. 実験室株 H37Rv の既知ゲノム配列 (AL123456.2) を対照として Burrows-Wheeler Aligner (BWA) ver.0.5.8c を用いてマッピングし, データファイル (bam 形式) を得た. 各 bam ファイルから, Genome Traveler ver.1.2 を用いて固有の点変異 (SNPs) 情報を抽出した. このうち, マッピング精度が低い重複遺伝子群 (PE/PPE 遺伝子など) を除去し, より信頼性の高い変異箇所を分析対象とした.

倫理面への配慮. 本研究に供試された結核菌株は, 共同研究者の所属機関において継続的に集積されているものである. 各菌株については, 個人情報の特定が不可能となるように番号をつけ匿名化し, プライバシーに配慮している. 本課題における菌株とその遺伝型別の利用は, 未知の結核感染源推定に重要な情報を与えるものであり, 感染症法 15 条および 17 条により規定される「積極的疫学調査」に適合している.

C. 研究結果

マルチプレックス解析による取得リード. 各菌株の取得データ量は表 1 の通りであった. 平均カバレッジは 252.7~484.3 となり, マッピングによる変異情報抽出に十分な情報量が獲得できた. また, 抽出された SNPs 情報からは, 各系統分類を支持する変異の有無を確認できた.

「多様性包囲網」の分析現況. 先行研究によって取得した国内臨床株のゲノム情報は, 集約・統合することによって, 多様な研究展開からの需要に対して情報提示できるように整備する必要がある. 現時点において統合可能な菌株 (本課題の 16 株を含め, 計 54 株) の系統関係を図 2 に示した.

T3-Osaka (3 株) の遺伝的多様性. T3-Osaka 株 (3 株) について, 各株に検出された SNPs を詳細に検討した. 3 株に共通する SNPs (H37Rv をコントロール配列とする) は 785 箇所認められた. それに対して, 各株固有の変異は 78 箇所, 93 箇所, 100 箇所認められ, 3 株のうち 2 株に共通する SNPs は検出されなかった (表 2).

D. 考察

本年度は、北京型結核菌の内部系統分岐に基づいて選別された菌株のゲノム情報を集積し、今後の基幹となるデータ取得に注力した。各データの分析はまだ途上であるが、現時点での菌株レパトリーは国内北京株の遺伝的多様性を網羅しており、今後実施される菌株個性解析や SNPs 多型に基づく菌株同定の基盤が構築された段階にあると言える。一方で、本分析で用いた菌株はその由来が関西地区にほぼ限局されており、遺伝系統的には妥当性が高いものの、国内全域を見通した菌株の地理的分散を考慮する上で疑念の余地がある。今後、各地域での臨床分離株を対象とした分析を進め、本データを基盤とした比較分析を実施することにより、地域的な菌株の拡散、定着といった状況の把握が可能になるだろう。そうした情報を実地疫学情報と結びつけることにより、結核菌の伝搬挙動、変動をより正確に記述しうる分子疫学（ゲノム疫学）の革新的な発展に繋がることを期待される。

反復配列数 (VNTR) 多型解析は、結核菌株の異同判定、すなわち集団事例における感染源調査において信頼性の高い結果をもたらす。しかしながら、偶発的な型別変化や、型別収斂（本来無関係な株間でも同一の型別を呈するケース）が起こる可能性が高く、サーベイランス(不特定多数の結核菌株を対象とした型別分析)や広域間比較、未知の定着要因の究明といった分子疫学が本来目指すべき研究展開において限界がある。ゲノム比較によって見いだされた SNPs を菌株の異同判定に用いれば、そうした懸念は払しょくされ、極めて精度の高い菌株調査が可能となる。どのような SNPs レパトリーが効率よく菌株分類を実現できるか、また、より簡便に SNPs を検出・同定できるかといった技術的向上（結核分子疫学への SNP タイピング導入）が期待されるところである。

T3-Osaka は、スポリゴタイピング法による菌株型別において、本邦固有のタイプと

してデータベース (SpolDB4) に登録されたものである。分離頻度は低いものの、関西地域以外での分離例もあり、北京株結核菌と同様に国内の広い範囲で拡散、定着している可能性が高い。本課題において比較検討した 3 株の SNPs が「3 株すべてに共通の変異」と「各株固有の変異」に分別されたことから、これらが同じタイミングで拡散し、その後変異を伴いつつ伝搬を繰り返した経緯が推定される。こうした結果は、結核菌株ゲノム比較が「過去におけるアウトブレイク」と「その原因菌株の同定」について、有力な手がかりを提供しうることを示すものである。今後さらにデータを積み重ねることで、本邦における結核の履歴と経緯を探る上で重要な知見が得られるかもしれない。

疫学情報から推定される菌株個性の同定のみならず、臨床分離株を用いた基礎実験では、その仮定もしくは結果と関連する遺伝子の探索が不可欠である。そのような目的においては、本課題で集積された菌株変異データがその情報源として有用である。今後、データ公開の方法を模索するとともに、そうした課題との共同研究を構築することにより、本研究課題における利用価値の向上に努めたい。

E. 結論

先行的に検討されていた系統分類にしたがって結核菌臨床株を選択し、NGS によってそのゲノム情報を獲得した。本データは菌株の正確な系統分類、異同判定をはじめとした分子疫学的活用、菌株個性に着目した結核菌の病原性研究などに活用しうるとともに、本邦における結核菌伝搬の履歴、分子進化など、多様な研究シーズとして役立つことが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwamoto, T., Grandjean, L., Arikawa, K., Nakanishi, N., Caviedes, L., Coronel, J., Sheen, P., Wada, T., Taype, CA., Shaw,

- MA., Moore, DA., Gilman, RH. 2012. Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. PLoS One. 7(11): e49651.
- 2) Wada, T., Maeda, S. 2013. Multiplex agarose gel electrophoresis system for variable number of tandem repeats genotyping: Analysis example using *Mycobacterium tuberculosis*. Electrophoresis. In Press.
- 3) Nakanishi, N., Wada, T., Arikawa, K., Millet, J., Rastogi, N., Iwamoto, T. 2013. Evolutionary robust SNPs reveal the misclassification of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family strains into sublineages. Infection, Genetics and Evolution. 16: 174-177.

2. 学会発表

- 1) 前田伸司, 和田崇之. 反復配列多型法による型別結果比較における問題点とその対策. 第 87 回日本結核病学会総会 2012 年 5 月 広島
- 2) 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 林清二, 岩本朋忠, 和田崇之. 半世紀前における結核患者由来病理組織標本からの結核菌 DNA 抽出の試み. 第 87 回日本結核病学会総会 2012 年 5 月 広島
- 3) Wada, T., Yoshida, S., Iwamoto, T., Yamamoto, T., Hase, A., Kitaichi, M., Suzuki, K., Tsuyuguchi, K. Looking into the past: genetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* from FFPE specimens embedded several decades prior. MEEGID XI: 11th International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases, October 30 – November 2, 2012, New Orleans, USA.
- 4) Iwamoto, T., Grandjean, L., Arikawa, K., Nakanishi, N., Caviedes, L., Coronel, J., Sheen, P., Wada, T., Taype, CA., Shaw,

MA., Moore, DA., Gilman, RH. Genetic diversity of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru compared with that of strains from East Asia. MEEGID XI: 11th International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases, October 30 – November 2, 2012, New Orleans, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし.

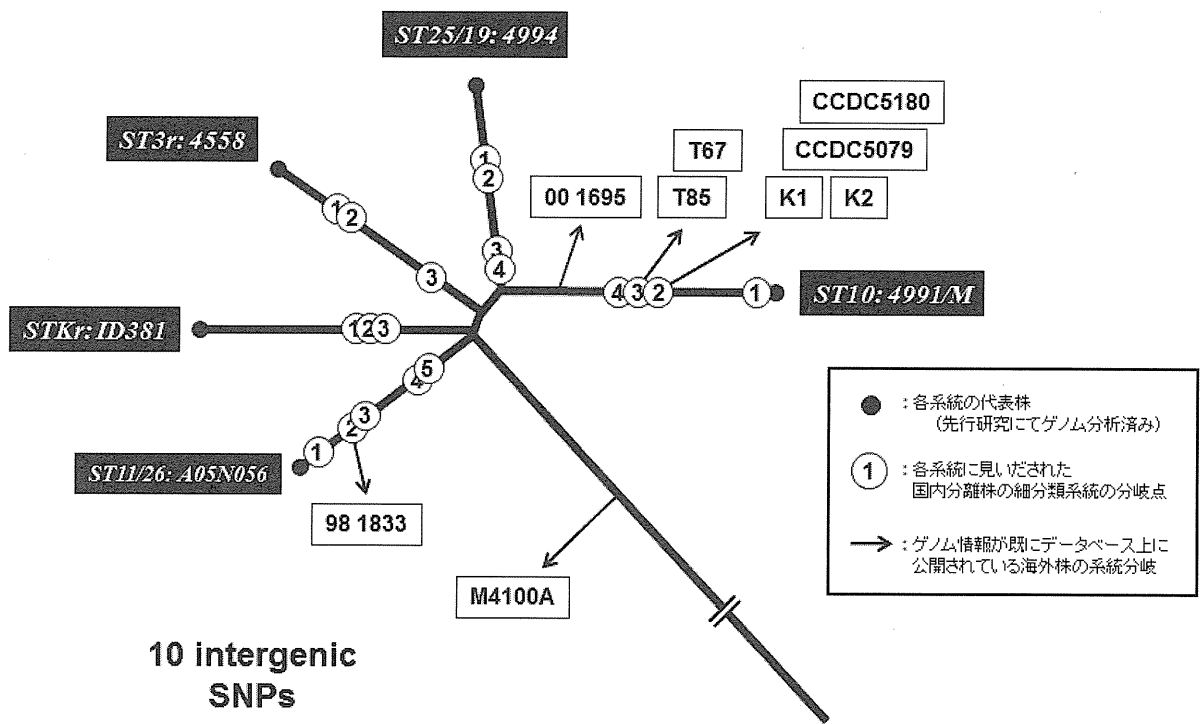


図 1. 本邦で分離される北京型結核菌（5 群）の内包系統群. 各群ともに 3~5 群に細分類されることが明らかとなっている. ST22 は ST10-3 が分岐点であることが判明しているが、本図には記載していない.

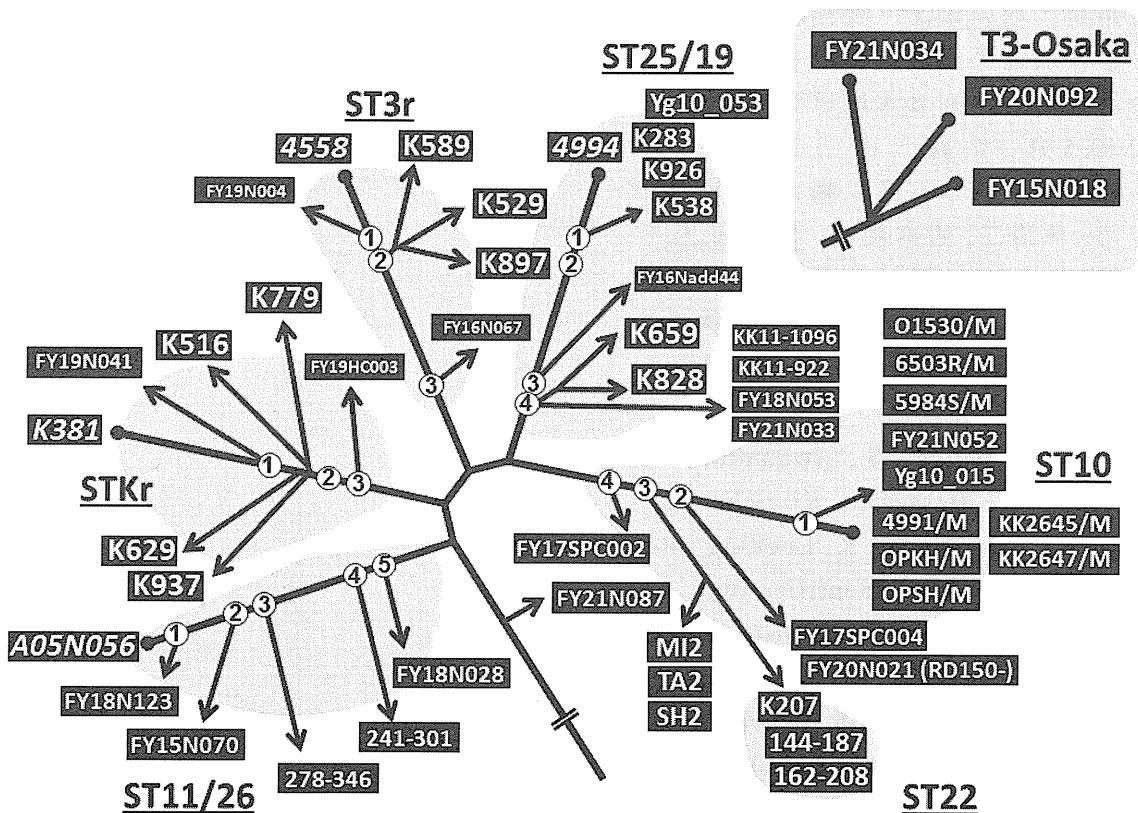


図 2. 現時点でゲノム解析データが統合可能な結核菌臨床分離株（54 株）における系統模式図. 各系統群の構成株数は以下の通り. RD207+: 1 株, ST11/26: 6 株, STK1r: 7 株, ST3r: 6 株, ST25/19: 12 株, ST10: 16 株, ST22: 3 株, T3-Osaka: 3 株.

表1 本課題においてNGS解析した16株の取得リード数および塩基配列数

株	系統	リード数	平均カバレッジ*
FY21N087	RD207+†	11,463,284	259.8
FY18N123	ST11/26-1	14,265,758	323.4
FY15N070	ST11/26-2	14,971,788	339.4
278-346	ST11/26-3	21,364,164	484.3
FY18N028	ST11/26-5	16,120,086	365.4
FY19N041	STKr-1	16,041,056	363.6
FY19HC003	STKr-3	14,880,176	337.3
FY19N004	ST3r-1	15,593,108	353.5
FY16N067	ST3r-3	16,608,686	376.5
FY16Nadd44	ST25/19-3	15,700,724	355.9
FY17SPC004	ST10-2	15,475,260	350.8
FY20N021	ST10-2‡	11,149,720	252.7
162-208	ST10-3	13,025,494	295.3
FY17SPC002	ST10-4	16,035,524	363.5
FY20N092	T3_Osaka	17,425,690	395.0
FY21N034	T3_Osaka	15,762,756	357.3

* H37Rvゲノム (4,411,529 bp) に対してマッピングした場合における1 bpあたりの配列解読数.

†北京型と同系統に属するが、スポリゴタイピングにおける特性を保持しない群. 同系統において最も初期に分岐したと考えられる.

‡特徴的な塩基配列欠損 (RD150) を呈することが確認された菌株.

表2 T3-Osaka (3株) のゲノム比較で
検出された点突然変異 (SNPs)

株	検出SNP数
FY15N018	78
FY20N092	93
FY21N034	100

結核菌の病原性と微細形態学的特徴との関連に関する研究

研究分担者

山田博之 結核予防会結核研究所

抗酸菌レファレンス部 主任研究員

研究要旨

昨今の結核菌の基礎研究の多くは、他の細菌を含む広範な医学生物学分野の研究と同様に分子生物学的手法に頼ることなく行うことは不可能である。しかし、原核生物である結核菌といえども多くの構成要素の有機的な統合により菌体としての生命現象を維持していると考えられ、単一あるいは少数の遺伝子の発現、変異や特定の分子の発現、構造解析で最終的な生きた菌体としての表現型の全てを説明することは困難である。

本研究では、透過型電子顕微鏡による急速凍結法で調製した結核菌標準菌株の超薄連続切片観察により、菌体の全体像を高分解能で可視化し、菌体構成成分の定量を行うとともに、3次元構築を目指す。急速凍結法は、菌体の微細構造の保存に有効であるが、その場で急速凍結処理を施行できない施設で分離された菌への応用に問題があった。この問題を克服するために、予めグルタルアルデヒドで前固定した菌の急速凍結標本を作製し、前固定無しの原法と比較して遜色ない像が得られることを示す。また、電子顕微鏡を用いたいくつかの手法で菌体計測データを取得して、比較検討し、最も信頼できる手法を探る。更に、走査型電子顕微鏡を用いて固形培地に生育した非結核性抗酸菌コロニーの形態観察を行い、単個菌の形態および病原性とコロニー性状との関連を検討する。

将来、遺伝子変異株の表現型観察を行うにあたり、可視化を伴った標準形態計測データとして利用可能なアーカイブ構築を最終的な目的とする。

A. 研究目的

昨今の結核菌の基礎研究の多くは分子生物学的手法を用いて行われている。原核生物である結核菌といえども多くの構成要素の有機的な統合により各個体としての生命現象を維持していると考えられる。単一の遺伝子の発現、変異、単一の分子の発現、構造解析で表現型の全てを説明することは困難である。本研究では、透過型電子顕微鏡による結核菌の超薄連続切片観察により、菌体の全体像を細胞壁外膜、菌体内部構造を含めて高分解能で可視化し、菌体構成要

素の局在と分子生物学的数据との連携により結核菌の病原性発現の解明を目指す。

また、結核菌コロニーの特徴であるコード形成を走査型電子顕微鏡で観察し、非結核性抗酸菌コロニーと比較して、病原性との関連を検討する。

更に、結核菌のより正確な形態計測データを取得するために最も適した標本調製方法を検討するため、同じ菌をCryo-TEM、通常の走査電子顕微鏡、Negative染色による透過型電子顕微鏡観察で形態計測し比較検討する。

最後に、急速凍結法の改良法として、グルタルアルデヒドで予め固定した菌をリン酸緩衝液で洗浄してから急速凍結する調製法の有用性について検討する。

B. 研究方法

【連続超薄切片作製】結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*) H37Rv株(ATCC 25618)をMiddlebrook 7H9液体培地(OADC, 0.05 % Tween 80添加)で約2週間培養し、遠心にて濃縮した沈渣約1 μ lを親水化処理した銅製単孔グリッドに滴下し、もう1枚の単孔グリッドで挟み、液体窒素で冷却した液体プロパンに投入して急速凍結置換標本(サンドイッチ法)を作製した。 -85°C で2%オスミウム・アセトンにより置換固定し、徐々に室温に戻して、純アセトンで洗浄後、Spurr樹脂に包埋、重合した。Reichert Ultracut Eで厚さ55 nmの超薄連続切片を作製し、Maxtaform HF49単孔グリッドに載せ、フォルムバル支持膜で裏打ちした。酢酸ウランと鉛で電子染色し、JEOL JEM1230透過電子顕微鏡で観察した。観察像をImageJソフトウェアで形態計測した(図1)。

【コロニーのコード形成観察】H37Rv株及び非結核性抗酸菌ATCC標準株を2%小川培地または7H10で培養し発育したコロニーを2.5 % glutaraldehyde (in 100 mM, リン酸緩衝液 (PB)、pH 7.4)で固定、PBで洗浄後、1 % OsO₄で後固定(4 $^{\circ}\text{C}$ 、1時間)、エタノール上昇系列で脱水した。純エタノールで脱水後、純エタノール:t-butyl alcoholの1:1混合液で処理し、純t-butyl alcoholで置換した後、凍結乾燥、金蒸着して走査電子顕微鏡JEOL JSM-5800で観察した(図2)。

【サンプル調製法による菌体形態計測

値の比較】結核菌CDC1551株をOADCおよび0.05% Tween 80添加Middlebrook 7H9培地で約2週間培養した。2.5% glutaraldehyde (0.1 M リン酸緩衝液, pH7.4, PB)で固定後、PBで洗浄した沈渣を観察標本として用いた。

観察方法:(1)Quantifoilグリッド上に上記沈渣を付着させFEI Vitrobotにて急速凍結した氷包埋標本をJEOL JEM-3100FFC Cryo-TEM(自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター)にて観察、(2)上記沈渣を親水化した支持膜を張ったグリッドに付着させ、酢酸ウランを用いてネガティブ染色しJEM-1230透過電子顕微鏡にて観察、(3)上記沈渣を1%四酸化オスミウムで固定後、エタノール脱水、t-butyl alcoholによる凍結乾燥、金蒸着を行い、JSM-5800走査電子顕微鏡にて観察し、写真撮影した。上記3法で得られた観察像を元にImageJソフトウェアを用いて直径、菌体長、aspect ratioを計測し、比較検討した(図3)。

【glutaraldehyde固定後に急速凍結法を施行した結核菌の透過電顕像観察】材料:0.05% Tween 80添加7H9で培養し充分増殖した結核菌*M. tuberculosis* H37Rv株。方法:上記結核菌液を約1 ml分取し、microcentrifuge tubeを用いて、約10,000gにて遠心した沈渣に2.5 % glutaraldehyde (GA、0.1 N リン酸緩衝液(PB, pH 7.4))を約1 ml加えvortex後、4 $^{\circ}\text{C}$ で1時間以上固定し、遠心および上記PBによる洗浄を3回行った。(1)この遠心沈渣の1 μ l以下を急速凍結法サンドイッチ法により急速凍結し、2%OsO₄-アセトン溶液を用いて -85°C で凍結置換固定した標本、(2)GA固定、PB洗浄後、通常の化学固定と同様に、1%OsO₄で4 $^{\circ}\text{C}$ で1時間後固定し、再度PBにて洗浄後、急速凍結し、 -85°C の純アセトンで処理する標本、(3)(2)の標本を急速凍結せずに -85°C の純アセトンで処理し

た標本を、徐々に室温に戻してSpurr樹脂に包埋した。超薄切片を電子染色してJEOL JEM-1230にて観察した(図4)。

C. 研究結果

【超薄連続切片作製】グリッド12枚、総計500枚以上の連続超薄切片を作製し、そのうち、観察に適した約250枚の連続切片内の菌体を高倍率(60,000倍)で観察した。1つの菌体について24枚の連続切片を作製、観察し、菌体長1.32 μm 、菌体直径0.37~0.46 μm 、aspect ratio 2.89、平均菌体断面積 0.13 μm^2 、菌体体積0.18 μm^3 、菌体表面積1.83 μm^2 、ribosome数864のデータを得た(図5, 6, 表1)。

【コロニーのコード形成観察】抗酸菌コロニー内の菌塊の形態に基づいて4つの群に分けた。

I:結核菌のコード形成と類似した3次元の強い湾曲を伴う菌塊構造を示す3菌種(図7, 8)

II: Iより菌塊の密集に規則性が乏しいが時にコード形成と類似した構造を形成する9菌(図9, 10)

III:個々の菌体の配列は規則性に乏しいが平面的なコード形成様構造を形成する7菌種(図11, 12)

IV:殆どの菌が不規則に分布し統一された構造を形成しない15菌種(図13, 14)

各グループの平均幅(μm)はそれぞれ0.41 \pm 0.16, 0.45 \pm 0.05, 0.38 \pm 0.04, 0.40 \pm 0.06, また平均菌体長(μm)はそれぞれ1.59 \pm 0.48, 1.93 \pm 1.01, 1.94 \pm 0.70, 2.30 \pm 1.65で、Aspect ratioはそれぞれ、4.16 \pm 1.20, 4.26 \pm 1.91, 5.23 \pm 2.04, 6.14 \pm 4.94であったが、群間及び結核菌(それぞれ、0.41 \pm 0.06, 2.33 \pm 0.29, 5.65 \pm 0.92)との比

較でいずれも有意差はなかった(図15, 16)。また、病原性菌と非病原性菌の比較ではいずれも有意差はなかったが、迅速発育菌と遅発育菌の比較では、遅発育菌の菌体長が有意に長く($p < 0.05$)、aspect ratioも遅発育菌が有意に大きかった($p < 0.005$)(図17, 18)。

【サンプル調製法による菌体形態計測値の比較】Cryo-TEM、ネガティブ染色、SEM観察による直径はそれぞれ0.54 \pm 0.04 μm 、0.53 \pm 0.08 μm 、0.35 \pm 0.05 μm 、菌体長はそれぞれ、2.87 \pm 0.61 μm 、2.35 \pm 0.60 μm 、1.91 \pm 0.35 μm 、aspect ratioはそれぞれ、5.36 \pm 1.41, 4.51 \pm 1.25, 5.59 \pm 1.14であった。直径に関してはSEM観察の値がCryo-TEM、ネガティブ染色観察の値と比較して有意に小さく、菌体長に関してはCryo-TEM観察の値が他の2法と比較して有意に長く、SEM観察値はネガティブ染色法と比較して有意に小さかった。ネガティブ染色とSEM観察では菌体の収縮が示唆され、Cryo-TEM観察値が標準データとしての信頼性が高いと考えられた(図19, 20)。

【glutaraldehyde固定後に急速凍結法を施行した結核菌の透過電顕像観察】

GA>RFSで作製した結核菌標本は、CF標本と比較して本来のRFS標本に匹敵する微細構造の保存が認められた。即ち細胞質は電子密度が一様でその中に直径約20 nmのリボソームが充満し、DNAと思われる繊維状の構造も観察された。一部、periplasm領域の拡がりやCF標本でしばしば観察される細胞質内の膜構造を認める細胞もあった。また、GA固定後、1%OsO₄(4°C)で後固定する通常の化学固定を行った後、急速凍結して-85°Cの純アセトンで処理した標本及び、化学固定後急速凍結せずに-85°Cの純アセトンで処理した標本は化学固定標本と同等の菌体像を呈した(図21)。

D. 考察

【超薄連続切片作製】急速凍結法で調製した結核菌の超薄連続切片作製、透過電子顕微鏡観察を行った。急速凍結法による結核菌の観察は既に何人かの研究者から報告があるが、超薄連続切片の観察はこれまで例がない。また、広く微生物を対象としても、真核生物である酵母で超薄連続切片による透過型電子顕微鏡観察の報告はあるが細菌を対象とした報告はこれまで例がない。

今回観察した菌は厚さ55 nmの超薄切片24枚に収まるもので、結核菌としては短い菌と考えられる。今後、更に観察菌数を増やし、結核菌の基本的な形態データを得るとともに、菌体の構成成分の定量とともに3次元構築を試みたい。

【コロニーのコード形成観察】

結核菌のコード形成と最も類似した菌塊構造を示したIグループに属する *M. abscessus*, *M. gallinarum*, *M. haemophilum* はいずれも病原性が報告されている菌であったが、ほとんどコード

形成様の菌塊構造を示さなかったVIグループに分類された菌種の中にも *M. avium*, *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M. xenopi* など病原性が報告されている菌種もあり、コード形成を誘導する菌の特徴が何に由来するのか、更に検討を進めたい。

【サンプル調製法による菌体形態計測値の比較】ネガティブ染色とSEM観察では菌体の収縮が示唆され、Cryo-TEM観察値が標準データとしての信頼性が高いと考えられたが、Cryo-TEMは一般的な装置ではないため、ネガティブ染色標本観察による計測データを参考値として利用することも考慮されるべきである。

【glutaraldehyde固定後に急速凍結法を施

行した結核菌の透過電顕像観察】今回のGA>RFS処理標本の電顕像は、GA固定せずに急速凍結した標本と同等で、GAによる前固定が、その後の急速凍結と液体窒素温度 \sim -80 $^{\circ}$ Cにおける2%OsO₄-アセトン凍結置換固定を妨げず、良好なTEM像を得られることを証明するものである。更に、GAだけでなく4 $^{\circ}$ Cでの1%OsO₄固定（化学固定）を行った後でRFSした標本作製し、電顕像を観察したが、この標本は従来の化学固定標本と同等の菌体構造を示した。これらの結果はRFSによる結核菌微細構造の保存は、GAによる前固定により阻害されないことおよび超低温での2%OsO₄-アセトンによる置換固定が極めて重要であり、アセトンによる低温置換だけでは良好な微細構造の保存は困難であることを示している。

今回試行したRFSの変法は、培養不能な菌や、その場でRFS処理を行えず輸送が必要な多剤耐性菌のRFS-TEM標本作製に有用であると考えられた。

E. 結論

結核菌及び非結核性抗酸菌の電子顕微鏡観察及び標本調製法の改良を行った。これらの菌が示す微細構造を電子顕微鏡を用いて可視化して解析することは、菌の基本的な特徴を理解する上で極めて重要であり、標準菌株を用いて得られたこれらのデータは、将来様々な変異株での表現型の研究において対照となる基本データとして極めて重要であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamada H, Bhatt A, Danev R, Fujiwara N, Maeda S, Mitarai S, Chikamatsu K, Aono A, Nitta K, Jacobs WR Jr, Nagayama K. Non-acid-fastness in *Mycobacterium tuberculosis* $\Delta kasB$ mutant correlates with the cell envelope electron density. *Tuberculosis*. 2012.92:351-357.

2. Mitarai S, Karinaga R, Yamada H, Mizuno K, Chikamatsu K, Aono A, Sugamoto T, Hatano T. TRICORE, a novel bead-based specimen concentration method for the culturing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods*. 2012. 90:152-155

3. Chikamatsu K, Aono A, Yamada H, Mitarai S. Evaluation of Genotype MT BDRsl for testing resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to fluoroquinolone, aminoglycoside, and ethambutol. *Kekkaku*. 2012. 87:641-7.

4. 青野昭男、近松絹代、山田博之、村田正太、結城 篤、三澤成毅、小栗豊子、御手洗 聡 抗酸菌塗抹検査外部精度評価の試み 日本臨床微生物学雑誌 2012. 22:279-283.

2. 学会発表

1. 山田博之、近松絹代、青野昭男、御手洗聡. Glutaraldehyde固定後に急速凍結置換固定した結核菌標本の透過電顕

観察 第87回日本結核病学会総会 2012.5. 広島市.

2. 山田博之、近松絹代、青野昭男、御手洗聡. 固形培地で生育した抗酸菌コロニーの走査型電子顕微鏡観察日本顕微鏡学会 第68回学術講演会 2012.5. つくば市

3. Yamada H., Chikamatsu K., Aono A., Mitarai S. Transmission electron microscopy sample preparation by rapid freeze-substitution of glutaraldehyde-fixed tubercle bacilli provides excellent ultrastructure compared to the samples prepared by conventional chemical fixation. *UltraPath XVI* 2012. 8. レーゲンスブルグ (ドイツ)

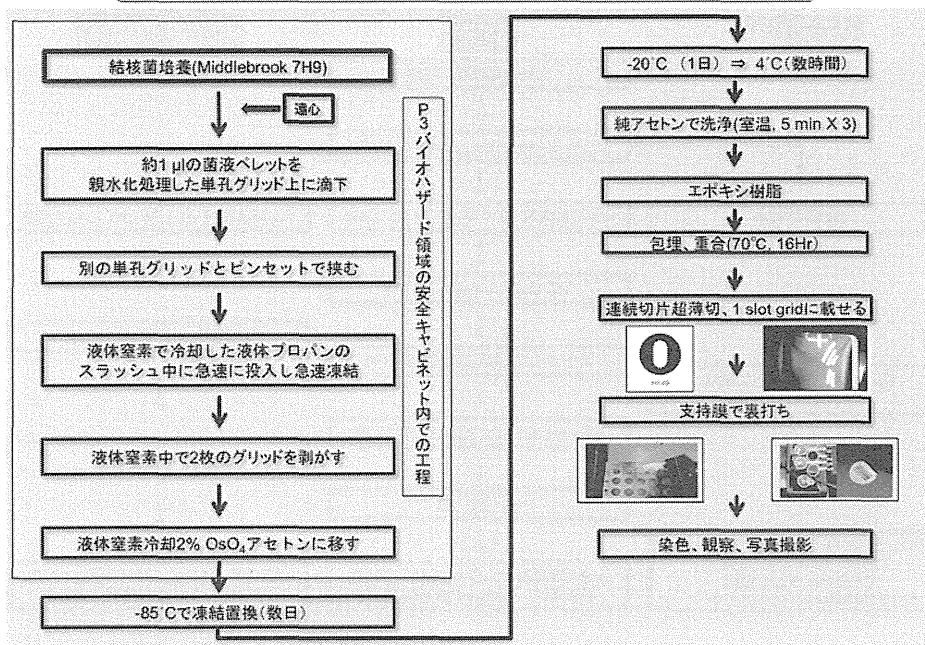
4. 山田博之、近松絹代、青野昭男、御手洗聡. Glutaraldehydeで固定した結核菌の急速凍結置換標本の透過電顕観察 第44回日本臨床分子形態学会、2012.9. 高知市.

5. 山田博之、前田伸司、近松絹代、青野昭男、御手洗聡、永山國昭. 電子顕微鏡観察による結核菌形態計測データの比較 日本顕微鏡学会第37回関東支部講演会,2013. 3. 東京.

6. 山田博之、前田伸司、近松絹代、青野昭男、御手洗聡. 電子顕微鏡を用いた結核菌の形態計測標準データの試行 第88回日本結核病学会総会、2013.3. 千葉市.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

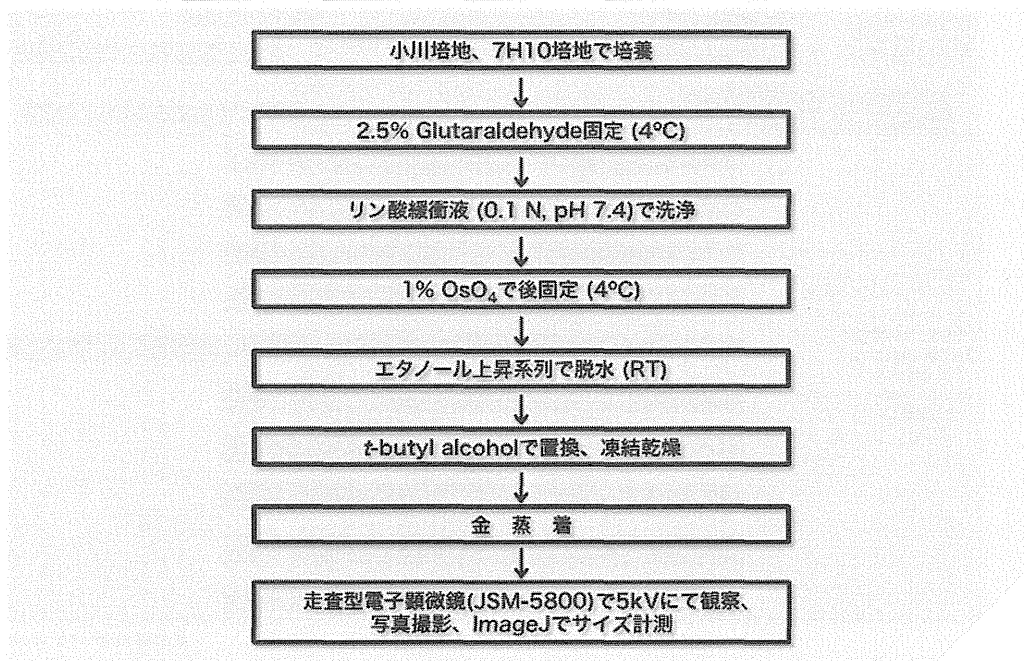
材 料 と 方 法



厚生科学研究事業124年度 研究報告書

図1. 急速凍結法による結核菌超薄連続切片作製方法

材 料 と 方 法
(Scanning electron microscopy)



厚生科学研究事業124年度 研究報告書

図2. 非結核性抗酸菌 ATCC 株コロニーの走査電子顕微鏡観察方法