

フィリピン、中国、日本における結核菌感染拡大阻止に関する研究

研究分担者	服部俊夫	東北大学	災害科学国際研究所	教授
研究協力者	白鳥ベアタ	東北大学	災害科学国際研究所	
	趙景格	東北大学	災害科学国際研究所	
	浩日勒	東北大学	災害科学国際研究所	
	臼澤基樹	東北大学	災害科学国際研究所	

研究要旨

結核感染拡大阻止に向けて、結核菌の遺伝子解析とそれに対する免疫反応の解析をフィリピン、中国、日本の検体を用いて行った。マニラにおける、マニラ型の流布を確認した。また中国の検体では北京型特異的な抗体反応の存在を認めた。我が国の検体では潜在性結核・活動性結核の鑑別に関する研究を行った。

A. 研究目的

フィリピン、中国、日本における結核菌 (MTB) 遺伝子型の同定によりアジア諸国間での結核菌の感染ルートを解析し感染の拡大を阻止する手立てを講ずることを目指した。またバイオマーカーを用いて各国の結核患者の免疫反応の特徴を特定し適切な結核治療ガイドラインの作成に役に立つと思われる。北京型特異的配列を有する Rv0679c 抗原の変異・非変異型蛋白、あるいは変異領域を含む overlapping peptide で MTB の北京型と非北京型を宿主反応から検出することを目標にした。

B. 研究方法

フィリピン・マニラのサンラザロ病院 (50人の結核患者と30人の正常人)、上海公衆衛生臨床センター、復旦大学と金山病院 (45人の肺結核患者、26人の肺外結核患者、16人のエイズ/結核患者と39人の正常人)、複十字病院、東北大学病院 (35人結核患者、6人潜在性結核、15正常人) の検体を用いて Rv0679c 抗体と30種以上のバイオマーカーを測定した。フィリピンの患者の喀痰を用いて結核菌を LAMP法で確認し、spoligo typing 法で遺伝子型を同定した。

日本の結核患者、潜在性結核感染者、正常人の末梢血リンパ球を ESAT-6, CFP-10, HBHA, ACR, MDP-1, Ag85A, Ag85B 結核

菌由来抗原の 20 アミノ酸配列 overlapping peptide で刺激し、ELISPOT 法で IFN- γ を測定し、潜在性結核特異的な抗原を同定することを目指した。

(倫理面への配慮)

本研究内容は東北大学倫理委員会 (2010-442号、2012-1-597号、2012-1-322号)、複十字病院倫理委員会 (免疫刺激状態の個体における galectin-9 及び他のバイオマーカー・サイトカインの発現様式研究。2012-7-6号で上海の復旦大学と金山病院によって承認され、2013年) サンラザロ病院倫理委員会 (Molecular typing and detection of biomarkers among HIV-TB patients in the Philippines, 2011) で研究許可を得た。

C. 研究結果

フィリピンの未治療結核患者の喀痰を用いて DNA を抽出し、LAMP 法ですべての 53 例において結核菌感染症を同定した (図 1)。同じ DNA 検体の spoligo typing 解析によつてすべてマニラ型結核菌が検出された。

結核グループと正常人との間の最も特徴的なバイオマーカーを同定するため、多変量判別方法で判別関数解析を行った。OPN、IP-10、好中球、IL-6、IL-8、TNF- α 、MCP-1、血小板、gal-9 と WBC が高い判別性があった。

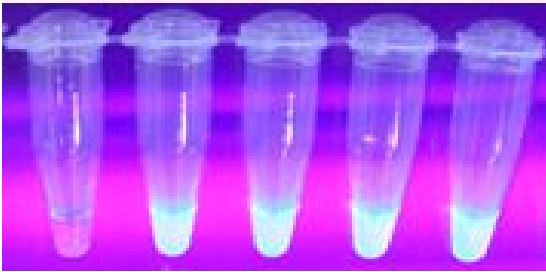


図 1 Loop isothermal amplification assay (LAMP 法)の結果

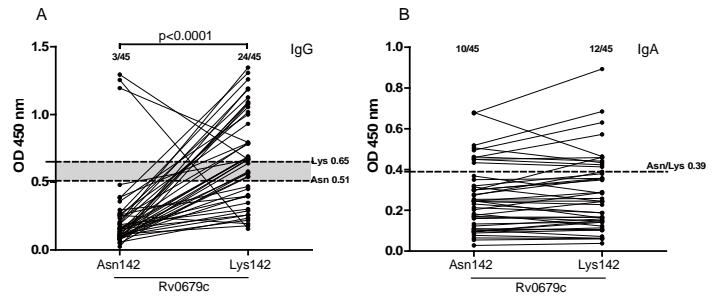


図 2 Rv0679c 抗体反応の比較

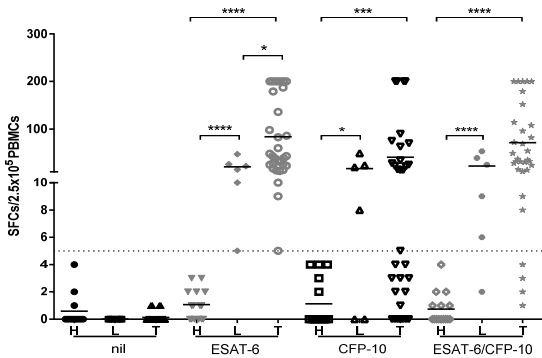


図 3 IFN- γ ELISPOT の結果

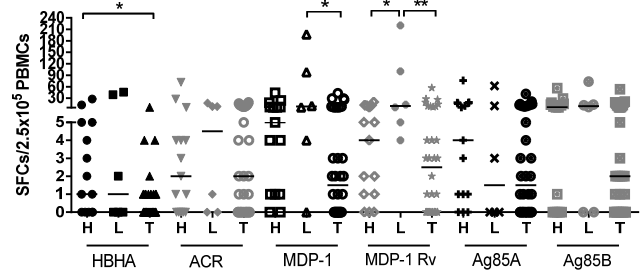


図 4 潜在性結核特異的な抗体の反応

これらのマーカーの組み合わせによって、すべての結核患者と健常者の 96.3%が正しく識別できる。

中国の結核遺伝子型を血清学的に識別するため我々は大腸菌を用いて Rv0679c の遺伝子を導入することによって精製した組換え蛋白質 Rv0679c を得て、ELISA を行った。またこの ELISA 法の結果を抗 TBGL IgG・IgA 抗体測定キットとの比較分析を行った。正常人に比べて肺結核患者において高値の抗 Rv0679c IgA 抗体が検出された。多くの肺結核患者では抗 Rv0679c の Lys 型に対しての IgG 抗体は見られたが Asn 型に対する IgG 抗体は低値であった。また抗 Asn 型 IgG と抗 Lys 型 IgG との間では相関は認められなかったが、Asn 型の IgA と Lys 型 IgA との間で相関関係 ($P < 0.0001$, $R = 0.71$) を認めた。Rv0679c のタイターと臨床バイオマーカーとの分析を行い、Rv0679c-Lys の IgG のタイターは、炎症性因子である C 反応性蛋白質レベルと相関していることが分かった (図 2)。

我が国の感染者の潜在性結核感染者 (L) と結核患者 (T) のリンパ球を用いて、種々の結核菌由来抗原を用いて、T-Spot を行った。ESAT-6 に対する結核患者の反応は潜在性結核感染者に比べて高かった。CFP-10 の反応性は ESAT-6 に比べて劣った。年齢とともに ESAT-6 の反応は下がり、ESAT-6 と ESAT-6/CFP-10 の反応はリンパ球数に依存していることが分かった (図 3)。

HBHA に対する反応は結核患者に比べて正常人グループでは有意に高かった。ACR, Ag85A, Ag85B の陽性反応はそれぞれのグループで陽性に出たが、有意差は見られなかった。日本など、BCG 接種が日常的に使用される国では、HBHA, ACR, Ag85A と Ag85B の診断ユーティリティは低いと考える。MDP-1 と MDP-1H37Rv によって我々は潜在性感染者と結核感染者を鑑別できた (図 4)。

D. 考察

フィリピンでは近代以降の数百年間に、中

国人、日本人、スペイン人などがフィリピンと交流し、様々な結核菌型の輸入に影響を与えた可能性があると考えられる。しかし、ここで示した均一な菌の流布は結核がむしろ小さいコミュニティの中で伝染しているとも考えられる。またマニラの中心に居住する患者は古くからのフィリピン在住人である可能性が高い。潜在性結核の休眠期で発現する

Mycobacteria DNA binding protein 1 (MDP1) は全細胞タンパク質の 7% の主要な細胞タンパク質である。我々の結果を踏まえて MDP-1 と MDP-1H37Rv 抗原は、潜在性結核感染の断に用いられことが期待される。多数の北京型結核に感染している中国では、大部分の患者は北京型結核特有なタンパク質 Rv0679c Lys142 に対する免疫を生ぜるといふ推測が上海のサンプルの実験に示された。すなわち、45 人の中、24 人は Rv0679c Lys142 に対する高いレベルの IgG を検出した一方、4 人は Rv0679c Asn142 IgG を検出できなかった (図 2)。しかし、上海のサンプルの菌株を同定できず、Lys142 IgG で北京型結核を診断できるという直接の証拠は得られなかった。Rv0679c Asn142 と Lys142 両方に対する IgA 抗体を検出した。Rv0679c の抗体ではクラススイッチを生ずる可能性がある。さらに、マウス抗体を用い Rv0679c を epitope mapping して、2 つの epitopes を発見した。つまり、Rv0679c Asn142 と Lys142 の共通 epitope である Rv0679c の 31-50 アミノ酸間の直線 epitope と Rv0679c Asn142Lys を含む conformational epitope である。ちなみに、人間でも Rv0679c IgA は共通 epitope を認識するばかりか、Rv0679c IgG は Asn142 と Lys142 それぞれ conformational epitope を識別できると期待される。そのうえ、Lys142 IgG は CRP に関係があるのは北京型結核感染が炎症を関連しやすく、重症をもたらすと考えられた。

E. 結論

LAMP 法と spoligo typing 法は途上国の結核をさらに低価格で平易に monitoring できる方法である。診断法として使用することを我々は提案し、その導入の最終決定を得るた

め準備を進めている。

結核の発病をより効果的に防止するため潜在性結核感染者を同定することは必要だ。Screening された休眠期抗原の中 MDP-1 は潜在性結核感染の診断に用いられことは期待する。

北京型結核が流行する地域において、多数の患者は Rv0679c Lys142 IgG が検出された。そのような結果は北京型結核に感染するの間に合うかどうか将来の実験に確かめなければならない。長い時間がかかる菌培養で北京型を spoligo type に診断する伝統な方法を避け、北京型の特徴なタンパク質に基づく簡易な実験方法の開発を続ける。

F. 健康危険報告

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakajima C, Tamaru A, Rahim Z, Poudel A, Maharjan B, Aye K, Ling H, Hattori T, Yamamoto T, Fukushima Y, Suzuki H, Suzuki Y, and Matsuba T: A simple multiplex PCR for the identification of Beijing family of Mycobacterium tuberculosis with a lineage-specific mutation in Rv0679c. *J Clin Microbiol*. Epub ahead 2013 Apr 17.

2. 学会発表

1. Shiratori B., Leano, S., Zhao, J., Chagan-Yasutan, H., Niki, T., Hirashima, M., Telan, E., and Hattori, T.: Increased production of galectin-9 in treatment naïve pulmonary TB patients in Metro Manila. NIH-Tohoku University-JSPS Symposium. Sendai, Japan. 9-11th May 2013.

2. Shiratori, B. and Hattori, T.: Immunological status of treatment-naïve sputum positive TB patients in Manila. The 1st meeting of Ministry of

Health, Labour and Welfare science research grants (Emerging and re-emerging infectious disease research project). Osaka, Japan. 5th July 2013.

- 3 . Shiratori, B., Leano, S., Zhao, J., Chagan-Yasutan, H., Niki, T., Hirashima, M., Telan, E., and Hattori, T.: Immunological status of Treatment-Naïve Sputum Positive Pulmonary TB Patients in Metro Manila. US-JAPAN Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel. Sapporo, Japan. 17th August 2013.
- 4 . Shiratori, B., Leano, S., Chagan-Yasutan, H., Niki, T., Okada, M., Nakajima C., Suzuki, Y., Telan, E., and Hattori, T.: Molecular and immunological status of sputum positive TB in Philippines. 67th Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology. Tohoku Branch. Sendai, Japan. 30-31st August 2013.
- 5 . Shiratori, B., Okumura, M., Yanai, H., Yoshiyama, T., Chagan-Yasutan, H., Tanaka, M., Matsumoto, M., and Hattori, T.: Attempt to distinguish between LTBI and active TB by latency-related antigens and biomarkers. The Third Bizan Immunology Symposium at The University of Tokushima (BISUT3) 'Immune System Development, Deviation, and Regulation'. Tokushima, Japan. 13-14th February 2014.
- 6 . Shiratori, B., Hasibuan, FM., Senoputra, AM., Alisjahbana B., and Hattori, T.: Attempt to find novel biomarkers for LTBI diagnosis - Indonesia study. The

3rd Conference on Otsuka-Biotec Collaborative Research of the Strategic Japanese-Thailand Cooperative Programme

"Development of new diagnostic and drug for latent tuberculosis or non-replicating tuberculosis". Tokushima, Japan. 15th February 2014.

- 7 . Shiratori, B., Leano, S., Nakajima C., Chagan-Yasutan, H., Niki, T., Suzuki, Y., Telan, E., and Hattori, T.: High levels of OPN, IP-10 and neurophilia in LAMP confirmed TB patients in Manila. 87th Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology. Tokyo, Japan. 26-28th March 2014.

その他

・ DVD 教材

サハラ以南アフリカにおける感染症 - グローバル感染症入門 -

【企画】厚生労働科学研究費補助金 地球規模保健課題推進事業

サハラ以南アフリカにおけるエイズ・結核研究ネットワーク構築に関する研究班

【原案監修】服部俊夫 (東北大学 教授)

【学術協力】鈴木定彦 (北海道大学 教授)

井戸栄治 (東京医科歯科大学 特任教授)

松岡正典 (国立感染症研究所 ハンセン病研究センター)

後藤正道 (鹿児島大学鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 国立療養所星塚敬愛園 園長)

圓純一郎 (鹿児島大学鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 国立療養所星塚敬愛園)

【企画協力】喜田宏 (北海道大学 特任教授)

【制作】(株)医学映像教育センター

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願番号: 特願 2013-046197

発明者: 大島吉輝 服部俊夫 他 6 名

発明の名称: ジクチオピロン誘導体又はジヒドロジクチオピロン誘導体を有効成分とするオステオポンチン産

生阻害剤

出願人： 国立大学法人東北大学 国立大学
法人群馬大学 扶桑薬品工業株式
会社

出願日： 2013年3月8日