

201318008A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿 戸 学

平成26 (2014) 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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿 戸 学

平成26 (2014) 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 阿戸 学	1
II. 分担研究報告書	
長期保存結核菌株の細菌学的解析 御手洗 聡	9
潜在性結核の成立を担う菌と宿主双方の分子と その機能解明に関する研究 松本 壮吉	15
休眠結核菌の糖脂質代謝と免疫応答に関する研究 杉田 昌彦	21
休眠期結核菌由来抗原に対するヒトの免疫応答 小出 幸夫	25
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 前倉 亮治	29
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	31
IV. 研究成果の刊行物・別刷	35

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 25 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	阿戸 学	(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	(新潟大学大学院医歯学総合研究科・細菌学・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	松村 隆之	(国立感染症研究所・免疫部・主任研究官)
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	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	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	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	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	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	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	王 亜軍	(大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・博士研究員)
研究協力者	平山 幸雄	(大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・研究員)
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	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・教授)
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	瀬戸 真太郎	(浜松医科大学・感染症学・助教)
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)
研究協力者	小林 和夫	(社会福祉法人あそか会・あそか病院・副院長)

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 860 万人（日本：2.1 万人）が結核を発病、130 万人（日本：0.21 万人）が死亡し、結核は甚大な健康被害を与え続けている（2012 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、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臨床的有用性が多数例示された。

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、860 万人（日本：2.1 万人）が結核を発病、130 万人（日本：2.1 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（2012 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
阿戸 学	潜在性結核菌感染モデルの樹立と研究総括
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および宿主応答解析
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

結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科に1960年代から低酸素培養状態で保存されている *M. tuberculosis* H37Rv 4株を使用した。培養ボトルから結核菌を回収、RNAを精製し、Whole Transcriptome AmplificationでcDNAを増幅し、Agilent社のカスタム合成マイクロアレイにより遺伝子発現解析を行った。

回収した長期低酸素培養菌（NN15株）から得られた活動性結核菌を培養し、低酸素濃度下で休眠菌作製を実施し、RNA抽出ののち遺伝子発現解析を実施した。

結核菌 H37Rv からプロトプラスト様の菌

体を作成した。培養後、Ziehl-Neelsen 染色にて抗酸性を確認し、さらに Middlebrook 7H9+OADC 培地に再接種し、発育した結核菌の形態と染色性を確認した。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

各種結核菌蛋白質は、遺伝子導入した大腸菌から抽出を行った。精製した結核菌蛋白質は、ELISA 法による抗体価測定用の抗原として用いた。

結核既往歴のない 17 名の非感染健常者、活動性結核患者 15 名を対象とした。血清を ELISA 法により抗体価を測定した。

ホルマリン固定ヒト肺切片を、ヘマトキシリン・エオシン染色、抗酸性（チール・ネールゼン染色）、抗 MDP1 抗体、抗 Antigen85 抗体で染色し、顕微鏡下で観察した。

休眠結核菌の脂質代謝と免疫応答

BCG Tokyo 172 株を、5% グリセロール、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。クロロホルム/メタノール抽出を行い、脂質分画を得た。この分画を薄層クロマトグラフィーにより展開し、GroMM に相当するスポットをかきとって脂質抽出を行った。分子種はマススペクトロメトリーにより確認した。

GroMM、ホスファチジルコリン、コレステロール、ステアリン酸付加オクタアルギニンを混合し、溶媒を蒸発除去、蒸留水を加え、ソニケーションによりリポソーム化した。

2B4-NFAT-GFP レポーター細胞（山崎晶博士・九大生体防御医学研究所より恵与）に種々の Mincle 遺伝子あるいは変異遺伝子を導入し、リガンド脂質を固相化したプレートで培養した後、フローサイトメトリーを用いて GFP 陽性細胞を検出した。また、抗ヒト Mincle 特異的抗体クローンを単離した。

ヒト Mincle 遺伝子トランスジェニックマウスを作製した。さらにこのマウスをマウス Mincle ノックアウトマウスと掛け合わせることにより、ヒト Mincle のみを発現した

マウス系統を樹立した。GroMM 皮内接種を受けたマウスから皮膚組織を採取し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびギムザ染色を行った。

休眠結核菌由来遺伝子を用いた DNA ワクチンの開発研究および宿主応答解析

結核菌 Erdman 株を感染させた樹状細胞を固定後、抗 LC3 抗体、抗 p62 抗体、抗ユビキチン抗体などで免疫染色を行った。LS-1 共焦点レーザー顕微鏡システムを用いて観察した。

樹状細胞の遺伝子ノックダウン実験は siRNA をトランスフェクションすることによって行った。

潜在性抗酸菌感染における臨床診断法の開発

1) 肺 MAC 症診断に対するキャピリア MAC 抗体 ELISA の有用性を、多数例を用いて再検証した。

2) 結核菌接触感染の危険が高い結核病棟に勤務する医師および看護師の内、1 年以内に QFT が陽転化した 13 例を早期潜在感染(Recent LTBI)例とし、休眠菌と増殖菌に由来する各種抗原に対する抗体価を測定した。

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

NN15、NN16、NN17 及び NN19 株について発現解析結果が得られた。このうち NN19 株については発現を検出できない遺伝子が多数認められたため、解析上不適切と考慮して対象から除外した。NN15 を基準として、NN16 及び NN17 と各遺伝子の発現量について有意差は無く、本法の再現性が確認された。

長期低酸素培養 NN15 株 (長期 NN15) から直接 RNA を抽出した検体と、酸素濃度を 2.5~10% で調整して短期間 (21 日間) 培養

した NN15 (短期 NN15 O₂ 2.5%、5% 及び 10%) について相互比較を行った。クラスター解析により、短期 NN15 の発現状態が最も近似していた。酸素濃度と発現の関係を解析するため、短期培養株間での発現の変動を解析した。酸素濃度の上昇に従って発現が増加する遺伝子群が 897、逆に低下する遺伝子群が 1,356 認められた。

長期低酸素培養結核菌の形態を検討するために、同様に抗酸性の低下・消失したプロトプラストを作成し、長期低酸素培養株と電子顕微鏡下で比較した。長期培養株及びプロトプラストは増殖期の結核菌に比べて内部構造が単純化しており、細胞壁の厚さも異なっており形態的にも一定でない。しかしながら、プロトプラストではリボソームと思われる顆粒が増殖期の結核菌と同程度観察されるのに対し、長期培養菌では殆ど認められなかった。

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

ケニア共和国における、ビクトリア湖畔 Mb QFT 試験で用いられている結核菌抗原、ESAT6 と CFP10 に対する血清抗体を検出した。その結果、T 細胞の IFN- γ 産生検出同様に、ESAT6 と CFP10 に対する抗体応答は活動性結核患者で顕著であることが判明した。

低酸素センサーである DosR で誘導される蛋白質 (DosR-regulon) 16 種類の蛋白質のうち Acr に対して、一定の高い抗体価が認められ、非感染健常者と活動性結核患者間および非感染健常者と陳旧性肺結核間で有意差が検出された。

Antigen 85A と MDP1 については、陳旧性肺結核患者で高い抗体の産生が認められ、これらの抗体価測定が、発症ハイリスクグループの検出に有用である可能性が示された。

結核菌感染による結核種の肺組織切片の染色を行った結果、結核種中央部が抗酸性染色に濃染し、同部位を Antigen85 抗体が若干、MDP1 抗体が強く染色することが分かった。本結果から、未発症の結核菌感染者の結核肉芽腫内で、実際に Antigen85 や

MDP1 が産生されていることが判明した。

休眠結核菌の脂質代謝と免疫応答

ヒト Mincle 遺伝子をトランスフェクトした 2B4-NFAT-GFP 細胞を、GroMM あるいは TDM を固相化したプレートで培養すると、GroMM あるいは TDM 濃度依存的に GFP 陽性細胞が出現し、ヒト Mincle は TDM と GroMM を認識することが明らかになった。

一方、マウス Mincle はヒト Mincle と異なり、GroMM のみを認識する自然免疫受容体として機能する可能性が示唆された。

そこで、ヒト Mincle トランスジェニックマウスを作製し、ヒト Mincle トランスジェニック/マウス Mincle ノックアウトマウス (hMincle+ マウス: ヒト Mincle のみを発現)、ヒト Mincle による GroMM 認識能の比較検討を行った。

マウスの皮膚に GroMM リポソームを接種したところ、hMincle+マウスにおいては、多数の細胞の浸潤を認めた。そのうち概ね 40%が好酸球であった。したがって、GroMM に対する好酸球優位の組織応答は、Mincle 依存的に誘起されると結論づけた。

休眠結核菌由来遺伝子を用いた DNA ワクチンの開発研究

樹状細胞に結核菌を感染させると、結核菌を含むファゴソームにオートファゴソーム形成が行われていることが明らかになった。

樹状細胞結核菌ファゴソームにはオートファジーアダプタータンパク質である p62 が局在し、結核菌オートファゴソームの成熟によってオートファゴリソーム形成が起こるとともに、結核菌抗原の抗原提示が促進されることを示唆する。

潜在性抗酸菌感染における臨床診断法の開発

1) 肺 MAC 症 485 例、肺結核 133 例、肺カンサシ症 23 名、健常コントロール 265 名を対象に検討した。感度は 78.6%、特異度 96.9%であり、従来 of 報告と同様の結果が得られ、補助診断としての有用性が確認された。

2) 休眠菌感染由来の抗体価は他の職

員に比して有意に上昇しており、両関連抗体は有意な正の相関関係を示した。接触感染による結核菌潜在感染も、休眠菌と増殖菌が共存した状態で感染しているものと考えられた。このうち 1 例が発病し、この抗体価は 95%確立楕円外に増殖菌関連抗体価が陽性方向に大きく外れた症例であった。

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 low 酸素であることが確認された。遺伝子発現解析と微小形態解析では一般的な 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。また、未発症者の結核種肺切片を用いて、Antigen 85 と MDP1 の発現を確認した。これらの結果から、Antigen 85 と MDP1 に対する抗体の検出によって結核発症ハイリスクグループを特定できる可能性が示された。

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的な菌側応答であり、GroMM はヒト自然免疫受容体 Mincle を介して微小環境を 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。

休眠期結核菌を標的としたワクチン戦略

として、樹状細胞における抗原提示能の増強は重要である。結核菌オートファゴソーム形成機構と抗原提示能の関係を明らかにして、潜在性結核菌免疫応答を正に調節する因子をアジュバントとして使用することによって、潜在性結核に対するワクチン開発を目指す。

肺 MAC 症診断に対するキャピリア MAC 抗体 ELISA の有用性を、多数例を用いて再検証した。今後、MAC 抗体価が、治療開始や治療終了の指標となるかどうかの検討が課題とされる。

結核菌の休眠菌(MDP1、Acr)と増殖菌(CFP10,ESAT6,Ag85A)感染に由来する抗原を使って、潜在感染から発病の危険が高い前発病状態を正確に診断出来る血清診断キットの開発に本研究の成果を応用できると考えられる。また、結核のより明確な予防内服基準を作成することが可能である。今回は単施設での成績であるので、今後、多施設での検討が必要になる。

E. 結論

- 長期培養株に特異的な発現を示す遺伝子と特徴ある形態が同定された。
- ヒト潜在性結核感染症血清では Ag85A および MDP1 抗原に対する高い抗体応答が認められ、これらの因子をもちこれらの因子を用いた潜在性感染血清診断開発の可能性が示唆された。
- 休眠菌が産生する GroMM はヒト自然免疫受容体 Mincle に認識され、Th2 応答を誘導し、潜在性抗酸菌感染の維持に重要である。
- 結核菌感染樹状細胞では、オートファジーが殺菌と抗原提示に影響を及ぼす因子とである可能性が示唆された。
- キャピリア MAC 抗体 ELISA 検査を非結核性抗酸菌症の診断・治療ガイドラインに反映することが期待される。
- 結核菌の休眠菌と増殖菌感染に由来する抗原を使って、潜在感染から発病の危険が高い前発病状態を正確に診断できるキットを開発し、結核のより明確な予防内服基準の作成に寄与すること

が期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shu, C.C.*, Ato, M.*, Wang, J.T., Jou, R., Wang, J.Y., Kobayashi, K., Lai, H.C., Yu, C.J., Lee, L.N., K.T., Lue. (*S.C.C. and M.A. contributed equally to this work). 2013. Sero-diagnosis of Mycobacterium avium complex lung disease using serum immunoglobulin A antibody against glycopeptidolipid antigen in Taiwan. PLoS One 8(11): e80473.
2. Fukuda, T.*, Matsumura, T.*, M. Ato, M. Hamasaki, Y. Nishiuchi, Y. Murakami, Y. Maeda, T. Yoshimori, S. Matsumoto, K. Kobayashi, Kinoshita T, Y.S. Morita (*T.F. and T.M. contributed equally to this work). 2013. Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. mBio. 4(1):e00472-12.
3. Nishiuchi, Y., Tamaru, A., Suzuki, Y., Kitada, S., Maekura, R., Tateishi, Y., Niki, M., Ogura, H., and Matsumoto, S. 2013. Direct detection of *Mycobacterium avium* in environmental water and scale samples by loop-mediated isothermal amplification. J Water Health, in press.
4. Manabu I, Nagi S., Chadeka E., Mutungi F., Osada-Oka M., Ono K., Oda T., Michinori T., Ozeki Y., Dan Justin Yombo K., Okabe M., Niki M., Hirayama Y., Fukui M., Kobayashi K., M. Matsumoto, M. Shimada, S. Kaneko, H. Ogura, Y. Ichinose, SM. Njenga, S. Hamano, and S. Matsumoto. 2013. Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* and hookworm infections among school children in Mbita, Kenya, J Trop Dis. in press.
5. Yamashita, Y., Y. Hoshino, M. Oka, S. Matsumoto, H. Ariga, H. Nagai, M. Makino, K. Ariyoshi, and Y. Tsunetsugu-Yokota. 2013. Multicolor flow cytometric analyses of CD4(+) T cell

- responses to *Mycobacterium tuberculosis*-related latent antigens. *Jpn J Infect Dis* 66:207-215.
6. Tateishi, Y., A. Tamaru, Y. Ogura, M. Niki, T. Wada, T. Yamamoto, K. Hirata, T. Hayashi, and S. Matsumoto. 2013. Whole-genome sequence of the potentially hypertransmissible multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain OM-V02_005. *Genome Announc* 1 e00608-13.
 7. Taniguchi, K., T. Takii, S. Yamamoto, J. Maeyama, S. Iho, M. Maruyama, N. Iizuka, Y. Ozeki, S. Matsumoto, T. Hasegawa, Y. Miyatake, S. Itoh, and K. Onozaki. 2013. Reactivation of immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* by boosting with the CpG oligomer in aged mice primarily vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG. *Immun Ageing* 10:25.
 8. 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. 2013. Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of immunoglobulin G in individuals with past tuberculosis. *Microbiol Immunol* 57:30-37.
 9. Fukuda, T., T. Matsumura, M. Ato, M. Hamasaki, Y. Nishiuchi, Y. Murakami, Y. Maeda, T. Yoshimori, S. Matsumoto, K. Kobayashi, T. Kinoshita, and Y. S. Morita. 2013. Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. *MBio* 4:e00472-00412.
 10. 仁木 満美子, 松本 壮吉. 2013. 鉄代謝およびイソニアジド耐性にかかわる結核菌分子の機能と治療法開発の可能性. *化学療法の領域*, Vol29 2号、P119-124.
 11. Morita, D., Miyamoto, A., Hattori, Y., Komori, T., Nakamura, T., Igarashi, T., Harashima, H., Sugita, M. 2013. Th1-skewed tissue responses to a mycolyl glycolipid in mycobacteria-infected rhesus macaques. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441: 108-13.
 12. 瀬戸真太郎, 辻村邦夫, 堀井俊伸, 小出幸夫. 2013. 結核菌の細胞内寄生戦略. *医学のあゆみ*. 246: 474-478.
 13. Hozumi H, Tsujimura K, Yamamura Y, Seto S, Uchijima M, Nagata T, Miwa S, Hayakawa H, Fujisawa T, Hashimoto D, Inui N, Suda T, Chida K, Koide Y. 2013. Immunogenicity of dormancy-related antigens in individuals infected with *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *Int J Tuberc Lung Dis.* 17:818-824.
 14. Seto S, Tsujimura K, Horii T, Koide Y. 2013. Mycobacterial survival in macrophages in the lung as a result of coronin-1a inhibition of autophagosome formation. In *AUTOPHAGY: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, and Infection*. Hyatt MA. edited. Elsevier. 161-170.
 15. Seto S, Sugaya K, Nagata T, Horii T, Koide Y. 2013. Rab39a interacts with phosphatidylinositol 3-kinase and negatively regulates autophagy induced by lipopolysaccharide stimulation in macrophages. *PLoS One.* 8:e83324.
 16. Seto S, Tsujimura K, Horii T, Koide Y. 2013. Autophagy adaptor protein p62/SQSTM1 and autophagy-related gene Atg5 mediate autophagosome formation in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection in dendritic cells. *PLoS One*.8: e86017.
2. 学会発表
 1. 北田清悟, 前倉亮治, 藤川健弥. 2013. 肺 MAC 症診断におけるキャピリア®MAC 抗体 ELISA の臨床的有用性. 第 88 回日本結核病学会総会 (千葉, 3月).
 2. 岡 真優子, 松本 壮吉, 尾関 百合子, 市川 寛, 南山 幸子. 2013. 結核菌感染に対するマクロファージの生体防御機構. 第 66 回日本酸化ストレス学会 (名古屋市, 6月).
 3. 岡 真優子, 松本 壮吉, 尾関 百合子, 南山 幸子. 2013. 宿主細胞内で増殖する結核菌のエネルギー産生と増殖機構.

- 第7回細菌学若手コロッセウム。(広島県三原市、8月)。
4. Nishiuchi, Y. and S. Matsumoto. 2013. *Mycobacterium avium* Infects Human Erythrocytes *in vitro*. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. (札幌、8月)。
 5. Osada-Oka, M., S. Matsumoto, Y. Ozeki, Y. Minamiyama. 2013. Ferritin superfamily protein-like activity in mycobacterial DNA-binding protein 1. 6th Joint Meeting of The Societies for Free Radical Research Australasia and Japan. (Sydney, Australia、9月)。
 6. 松本 壮吉. 2013. 抗酸菌の潜伏感染や薬剤抵抗性に関わる分子メカニズム. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会. (さいたま市、9月)。
 7. Mitarai S, Hoshino Y, Kato T, Aono A, Chikamatsu K, Yamada H. 2013. Gene expression analysis of 40-years' hypoxic culture of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuber Lung Dis 2013; 17: S528. 44th world conference on lung health of the international union against tuberculosis and lung disease. (Paris, France. 10月)。
 8. Kitada, S K. Yoshimura, K. Miki, M. Miki, M. Mori and R. Maekura. 2013. Utility of a serodiagnostic kit for diagnosing *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in Japan The 44th Union World Conference on Lung Health(Paris France 、10月)
 9. 戸田 彩季、瀬戸 俊之、時政 定雄、新宅 治夫、松本 壮吉. 2013. BCG ワクチン接種が原因と思われる骨髄炎の幼児. 第54回日本熱帯医学会大会. (長崎市、10月)。
 10. 井上 学、岡 真優子、仁木 満美子、尾関 百合子、一瀬 休生、濱野 真二郎、松本 壮吉. 2013. ケニア共和国 Mbita 地区の児童における結核菌感染と鉤虫感染の関連. 第54回日本熱帯医学会大会. (長崎市、10月)。
 11. 岡 真優子、立石 善隆、平山 幸雄、尾関 百合子、前倉 亮治、小林 和夫、松本 壮吉. 2013. 潜在性結核のバイオマーカーとしての抗 Antigen85 および Mycobacterial DNA-binding protein 1 抗体. 第54回日本熱帯医学会大会. (長崎市、10月)。
 12. 前山 順一、山崎 利雄、山本 十糸子、林 大介、松本 壮吉、網 康至、伊保 澄子、山本 三郎. 2013. 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 MDP1 および TLR9 リガンド G9.1 アジュバントの結核菌噴霧感染による評価. 第17回日本ワクチン学会学術集会. (津市、11月)。
 13. 杉田昌彦. 2013. CD1 と獲得免疫. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会. (東京、11月)。
- 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
 3. その他 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、形態学的あるいは遺伝学的解析を行う。

【方法】長期低酸素培養結核菌 NN15, 16, 17 及び 19 について直接 RNA 抽出を行い、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。また、回収・増殖させた NN15 を酸素濃度 2.5%, 5%, 10% で 21 日間培養し、RNA を抽出して上記と同じ条件で発現解析を行った。さらに形態を比較検討するため、L-glycine 及び Lysozyme/Driserase を含む培地で結核菌 H37Rv を培養し、プロトプラストを作成して染色性及び形態を観察した。

【結果】NN15, 16 及び 17 には相互に発現に類似性があり、検体としての再現性が認められた。また異なる酸素濃度で短期的に培養された NN15 株も相互に高い発現類似性をしめしたものの、長期低酸素培養 NN15 株の発現とは異なるプロファイルであることが示された。結核菌のプロトプラストは抗酸性を示さず、形態的にも長期低酸素培養結核菌と類似していたが、リボソームの密度は保たれていた。

【考察・結論】長期低酸素培養結核菌は検体として再現性をもち、今回の解析は定量性の点で問題があると思われるものの、短期的に作成された低酸素休眠菌とは異なる発現プロファイルであると考えられ、標本として特異的と思われた。

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、潜在感染状態（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。潜在感染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。

2012年度までに、当該長期培養株が比較的低酸素（大気圧の約50%）であり、一般的な1%酸素濃度で作成するWayne modelの休眠結核菌とも遺伝子発現状態が異なっていることが示された。これを元に、2013年度は長期低酸素培養株間の再現性の評価と、酸素濃度による長期培養株の遺伝子発現状態の再現を試みた。

B. 研究方法

[長期培養結核菌株間の再現性解析]

1. 対象長期低酸素培養株

実験に使用する結核菌は結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科に1960年代から低酸素培養状態で保存されているM. tuberculosis H37Rv 4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: 新規検体番号, 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

NN19/BN8: 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。これを改めてマイクロス培地（極東製薬）及び2% Kudoh培地（極東製薬）に接種し、37°Cで培養を行った。

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

マイクロアレイによる結核菌の遺伝子発現解析にはAgilent社のカスタム合成マイクロアレイを用いた。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 (Ovation RNA amplification system V2, NuGEN Technologies)でcDNAを増幅し、その全量を用いてSureTag DNA Labeling kit (Agilent)を用いてラベリングを行った。ハイブリダイゼーションはAgilent社の推奨プロトコルに従った。

得られたデータはバックグラウンドノイズを補正後quantile法により正規化し、相互に比較を行った。

[酸素濃度変更による長期低酸素培養株の発現状態の再現]

1 で回収した長期低酸素培養菌 (NN15 株) 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 2.5%、5% 及び 10% の状態で 21 日間培養し、有機溶媒洗浄を除いた 2 の方法で RNA 抽出を実施した (共同研究者: 星野仁彦)。抽出した RNA を用いて、3 の方法と同様に遺伝子発現解析を実施した。

[結核菌プロトプラストと長期低酸素培養株の形態比較]

有働が 1981 年に報告した迅速発育菌のプロトプラスト作成法を応用し、結核菌 H37Rv を用いてプロトプラスト様の菌体を作成した。使用した培地の組成は以下の通りである。

Protoplast 作製用培地 (1 L)

Sucrose, 120g
 Glucose, 10g
 L-glycine, 12g
 Amino acid mixture 10ml (L-arginine, L-histidine, and L-leucine, 5 mg/ml each)
 K2SO4, 1g
 MgCl2·6H2O, 2.03g
 CaCl2·2H2O, 3.68g
 KH3PO4, 0.1g
 0.5M TES buffer (pH 7.2) 50ml
 Lysozyme, 0.05g
 Driserase, 20 0.03g

上記培地中で H37Rv をおよそ 3 週間培養し、Ziehl-Neelsen 染色にて抗酸性を確認し、さらに Middlebrook7H9+OADC 培地に再接種し、発育した結核菌の形態と染色性を確認した。

倫理面への配慮

本研究は結核菌のみを利用した実験室内での研究であり、倫理的要素を含まない。

C. 研究結果

[長期培養結核菌株間の再現性解析]

NN15、NN16、NN17 及び NN19 株について発現解析結果が得られた。このうち NN19 株については発現を検出できない遺伝子が多数認められたため、解析上不適当と考えて対象から除外した。NN15 を基準として、NN16 及び NN17 と各遺伝子の発現量について t 検定を行った。結果として、NN15 と NN16 の発現には相関係数 0.831 が認められ、 $p = 0.823$ であった (図 1)。NN15 と NN17 との相関係数は 0.322 で $p = 0.770$ であった。Wilcoxon の符号付順位検定でもそれぞれ $p = 0.232$ 及び $p = 0.514$ であり、各対応に有意差はないと考えられた。

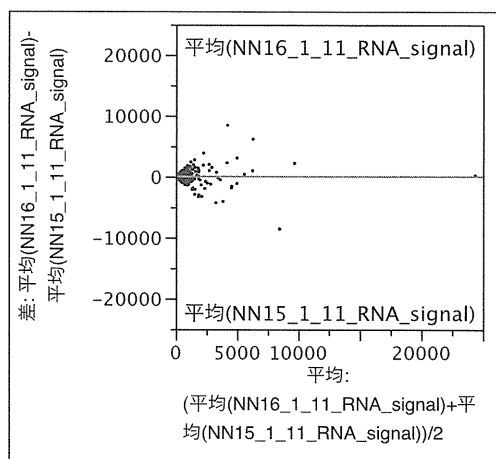


図 1 NN15 と NN16 の発現相関

[酸素濃度変更による長期低酸素培養株の発現状態の再現]

長期低酸素培養 NN15 株 (長期 NN15) から直接 RNA を抽出した検体と、酸素濃度を 2.5~10% で調整して短期間 (21 日間) 培養した NN15 (短期 NN15 O₂ 2.5%、5% 及び 10%) についてデータを正規化し、相互比較を行った。クラスター解析により、短期 NN15 の 5% 及び 10% 酸素培養株の発現状態が最も近似しており、次いでそれらの株と短期 2.5% 酸素培養株の発現プロファイルが近似していた。t 検定では短期 NN15 O₂ 2.5% と 5% の間に相関係数 0.948 が認められ、5% と 10% との間には相関係数 0.942 が認められた。長期 NN15 株と短期培養株との間の相関係数は、2.5%、5% 及び 10% のそれぞれについて、0.502、0.462、0.500 であり、t 検定上は有意差がないものの、Wilcoxon 検定で

は各々の組み合わせで $p < 0.0001$ の有意差が認められた。

酸素濃度と発現の関係を解析するため、短期培養株間での発現の変動を解析した。酸素濃度の上昇に従って発現が増加する遺伝子群が 897、逆に低下する遺伝子群が 1,356 認められた。正規化後の発現量を \log_2 変換し、1 以上の発現差が線形に（単調減少あるいは単調増加）観察された遺伝子群を表 1 に示した。

表 1 酸素濃度により 2 倍以上の単調増加あるいは単調減少を示す遺伝子群

単調増加	単調減少
Rv1734c	Rv1119c
Rv2104c	Rv2304c
Rv1813c	Rv0233 (<i>nrdB</i>)
Rv0307c	Rv1795
Rv2021c	Rv0067c
Rv0617	Rv0390
Rv1404	Rv1275 (<i>lprC</i>)
Rv1176c	Rv0038
Rv1951c	Rv0602c (<i>trcA</i>)
Rv1395	Rv0015c (<i>pknA</i>)
Rv0030	Rv3322c
Rv0591 (<i>mce2C</i>)	Rv0235c
	Rv0993 (<i>galU</i>)
	Rv0521
	Rv0738

[結核菌プロトプラストと長期低酸素培養株の形態比較]

長期低酸素培養結核菌の形態を検討するために、同様に抗酸性の低下・消失したプロトプラストを作成し、比較を行った。

プロトプラスト用 P 培地で培養した H37Rv は発育が遅かったものの、3 週間程度で適度な濁度まで発育した。形態的には図 2 のようにほぼ球菌～桿菌の形態であった。また Z-N 染色で定型的抗酸性を示さなかった (図 3)。

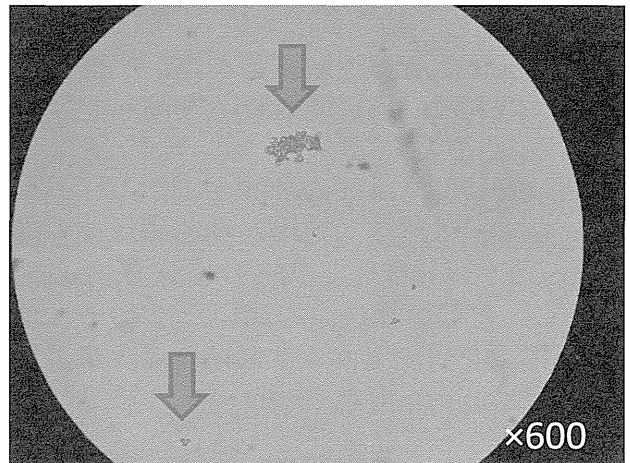


図 2 プロトプラストと思われる結核菌の光学顕微鏡下での形態 (矢印: 600x)

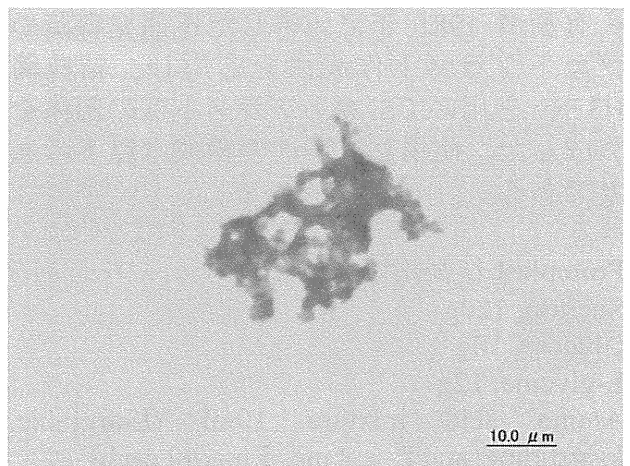


図 3 プロトプラスト (と思われる) 結核菌の Ziehl-Neelsen 染色写真

図 3 の結核菌を Middlebrook 7H9 培地に再接種したところ、通常の桿菌形態となり抗酸性も再獲得された。

結核菌プロトプラストと長期低酸素培養株を電子顕微鏡下で比較すると (図 4)、長期培養株及びプロトプラストは増殖期の結核菌に比べて内部構造が単純化しており、細胞壁の厚さも異なっていて形態的にも一定でない。しかしながら、プロトプラストではリボソームと思われる顆粒が増殖期の結核菌と同程度観察されるのに対し、長期培養菌では殆ど認められなかった。

D. 考察

長期低酸素培養結核菌の遺伝子発現状態について本年度も継続して解析を行った。長期低酸素培養結核菌の形態的变化を検討

するため結核菌のプロトプラスト作成を試みた。結果として形態及び染色性で両者は類似性を示しており、この結果から考えて、RNA 抽出時には脂質の除去さえ適切に行えば単純な Trizol 抽出で十分である可能性が考えられた。

昨年度解析を実施した長期培養株 (NN15) の異なる標本での発現の再現性について新たに 3 株を用いて解析したが、1 株は標本の培養・保存状態あるいは RNA の回収に問題があったためこれを除外し、他の 2 株との比較を行った。結果として同時期に作成した長期培養結核菌株の遺伝子発現は株間でほぼ同等であり、再現性はあるものと考えられた。

一方、異なる低酸素状態で短期的に作成した結核菌株の遺伝子発現は、短期培養株間では高度な発現類似性があったものの、酸素濃度により 2 倍以上の発現変化（増加あるいは減少）を示す遺伝子群も認められた。Galagan らが 2013 年に Nature に発表した低酸素から好気培養への移行時の遺伝子発現と比較すると、脂質代謝に関連する Rv3281 (accE5) や Rv399c (accD4)、Rv1483 (fabG1) などは酸素濃度に従って up-regulate されていたが、Transcriptional factor で低酸素時に up-regulate されていると考えられている Rv2711 (ideR) や Rv3133c (devR) では必ずしも低い酸素濃度で相対的に高発現していなかった。この結果は昨年解析した長期低酸素培養 NN15 株の直接発現解析と、同じ株で新たに作成した 1%低酸素培養及び好気条件培養での発現解析の比較でも同様であった。今回比較的短期間に低濃度酸素条件で作成した休眠結核菌モデルが長期低酸素培養菌と異なった遺伝子発現プロファイルを示したことと併せて考えると、長期低酸素培養株は解析対象としてユニークであり、低酸素条件と好気条件の混在を示唆していると考えられた。

今回得られた結果から長期低酸素培養結核菌の特異性と検体の再現性が示されたことから、引き続き長期低酸素培養結核菌の発現データを解析し、リアルタイム PCR 等で定量的に変動を確定する必要があると考

えられた。

E. 結論

1968 年から 37°C で低酸素培養を継続している結核菌 H37Rv 株について、異なる株間での遺伝子発現での類似性（再現性）を確認し、同時に短期低酸素培養では酸素濃度を複数設定しても同様の発現状態を作成しづらいことが示され、特異性が示された。他の報告との比較などから考えると、長期低酸素培養結核菌は嫌気及び好気状態が混在している可能性があり、遺伝子の発現は均一でなく、総体として既報とは異なるプロファイルを示していることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
 1. Mitarai S, Hoshino Y, Kato T, Aono A, Chikamatsu K, Yamada H. 2013. Gene expression analysis of 40-years' hypoxic culture of Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuber Lung Dis 2013; 17: S528. 44th world conference on lung health of the international union against tuberculosis and lung disease. (Paris, France. 10 月).

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

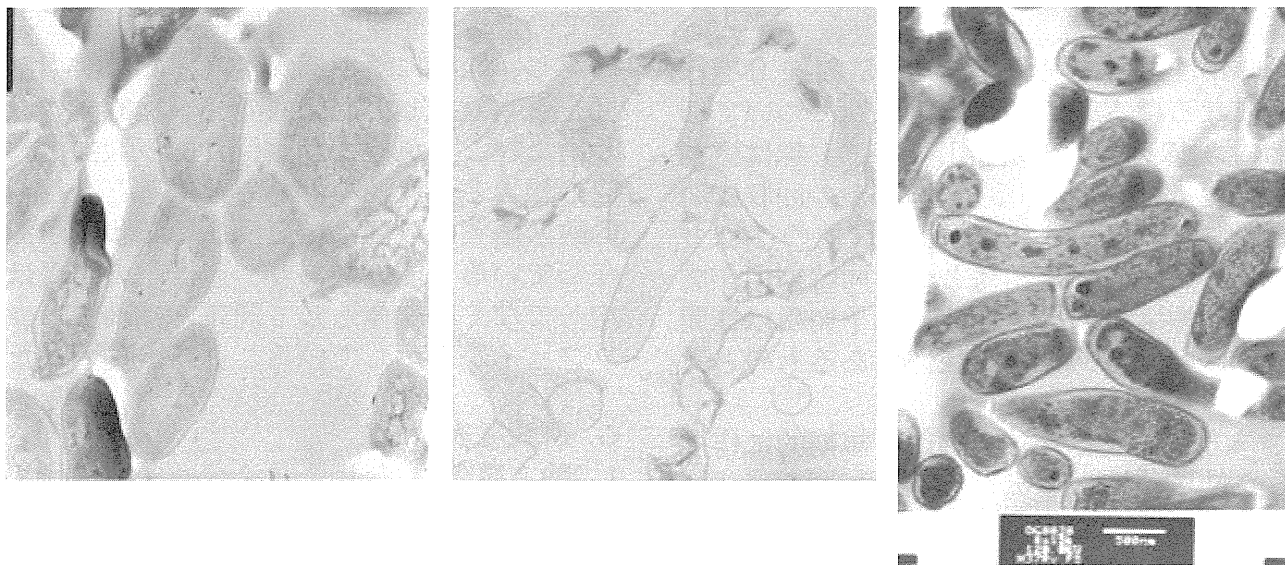


図4 結核菌 H37Rv 株の電子顕微鏡画像 (左:プロトプラスト, 中:長期低酸素培養 NN15, 右:対数増殖期)

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に関する研究

研究分担者	松本 壮吉	(新潟大学大学院医歯学総合研究科・細菌学・教授)
研究協力者	岡 真優子	(京都府立大学大学院・食環境安全性学・准教授)
研究協力者	王 亜軍	(大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・博士研究員)
研究協力者	平山 幸雄	(大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・研究員)
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	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・教授)
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	辻村 邦夫	(浜松医科大学・微生物学・准教授)
研究協力者	小出 幸夫	(浜松医科大学・理事)
研究協力者	北田 清吾	(国立病院機構刀根山病院・医長)
研究協力者	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・部長)
研究協力者	小林 和夫	(あそか病院・副院長)

研究要旨

世界人口の 1/3 が、国内では 1/5 が結核菌の無症候感染者である。無症候感染者の 5-10%が将来に結核を発症することから、未発症感染者は潜在性結核とよばれる。潜在性結核は、結核病原体の源泉であり、活動性結核に加え潜在性結核に対処することなしに疾患の制圧は困難である。膨大な無症候感染者に予防投薬を行うのは現実的でないため、発症リスクの高い人を特定できれば、効果的な対策を構築できるが、そのような診断法は現在まで開発されていない。潜在期の結核菌の多くが休眠状態にあることから、我々はこれまで本研究班にて結核菌が休眠期に産生する蛋白質を解析してきた。本成績を元に、増殖期蛋白質に加え休眠期蛋白質に対する免疫応答を測定することによって潜在性結核や発症ハイリスクグループを特定できる可能性がある。特に抗体応答は、生体内の病原体量に比例して増大することから、発症ハイリスクグループを特定できる可能性がある。陳旧性肺結核は、一般の潜在性結核に比べ、結核発症リスクが 5 倍程高いことが知られている。本研究では、非感染健常者、活動性結核患者、陳旧性結核群における、結核菌抗原各種に対する抗体価の測定を行った。その結果、陳旧性結核群において、Antigen 85A と Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) に対する有意な抗体価の上昇が観察された。また未発症者の結核種肺切片を用いて、Antigen 85 と MDP1 の発現を確認した。これらの結果から、Antigen 85 と MDP1 に対する抗体の検出によって結核発症ハイリスクグループを特定できる可能性が示された。

A. 研究目的

無症候の結核菌感染者（潜在性結核、
Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection、

LTBI) は、人類の 1/3、日本人の 1/5 におよんでおり、将来一定の割合で結核を発症する可能性がある。結核菌の住み処はヒトで

あり、活動性結核に加え、潜在性結核に対処しなければ、結核の制圧は困難である。我々はこれまで、厚生労働科学研究費補助金の支援を受け、潜在性結核における潜伏感染結核菌のフェノタイプである休眠菌の性質を、菌側および宿主側双方の責任分子について解析をおこなってきた。休眠菌とは、生体内で主に肉芽腫内の低酸素化によって結核菌が増殖を停止した状態であるが、長期間生存が可能で、現行の抗結核薬が殺傷できない増殖相である。

我々は、菌側分子として、発現が増強すると抗酸菌の増殖を停止させる活性がある **Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)** が、結核の一次選択薬であるイソニアジドに対する抵抗性を賦与することを明かにし、昨年度成果を公表した。イソニアジドは結核菌内で菌の酵素である **KatG** によって活性化されなければならないが、MDP1 は休眠期など静止期以降の抗酸菌で発現が上昇し、**KatG** の発現を抑制することで結核菌はイソニアジド抵抗性となる（仁木等、*J Bio Chem* 2012）。一方、結核菌の細胞内増殖を抑制する宿主側分子を同定しそのメカニズムをおおよそ明かにしたが、その結果については論文発表前であるので、今回の報告書には記載を差し控える。

潜在性結核は、人類の 1/3 に及ぶため、近い将来に発症が予測される発症ハイリスク群を特定し、対処することが現実的と考えられる。最も結核発症のリスクが高いのは HIV との重感染者で、非感染者に比べ、およそ 10 倍の発症率（年率 10%）である。次ぎにリスクが高いのが、現行の短期化学療法以外の治療を過去に施されたり、投薬せずに治癒した陳旧性結核群で、一般の潜在性結核に比べ、およそ 5 倍の発症リスクがある。

一方、免疫学的に結核菌感染を検出するには T 細胞応答や B 細胞応答（抗体価）を検査するが、T 細胞応答は長期間記憶される傾向があるのに対して、抗体応答は、病原体の量に応じて変動しやすい性質がある。現在、結核菌感染はクオンティフェロン試験（QFT）など T 細胞応答での検出が主流

であるが、病原体の生体内増殖に鋭敏な抗体応答の検出は、結核の前発症状態、すなわち発症ハイリスク群を特定できる可能性がある。

本研究では、本研究班内での共同研究により、MDP1 など休眠期結核菌が産生している蛋白質抗原に対して発症ハイリスク群である陳旧性肺結核者の抗体価を測定し、非感染健常者や活動性結核群に比べ、有意に抗体産生の標的となっているかを検討した。本研究の目的は、結核発症ハイリスク群を診断するためのバイオマーカー抗原の同定である。

B. 研究方法

各種結核菌蛋白質の発現用組み換え大腸菌をカルベニシリン 100 µg/ml 含有 LB 培地にて培養し、増殖期（吸光度 0.4-0.8）培養菌液に、0.5 mM となるように IPTG を加えて 22 度にて 12 時間、追加培養を行った。培養菌液から遠心操作によって大腸菌体を回収し、ニッケルカラム結合緩衝液にて懸濁した後、大腸菌の超音波破碎を行う。再度、遠心操作にて、不溶性画分を除き、上清を Ni-NTA カラムにアプライした。イミダゾールを 10 ないし 30 mM 含有するニッケルカラム結合緩衝液にてカラムを洗浄することで非結合性蛋白質を除去した後、300 mM のイミダゾールを含有するリン酸緩衝液にて蛋白質の抽出を行った。

精製した結核菌蛋白質をリン酸緩衝液中で 5~0.5 µg/ml となるように調整し、室温で 2 時間、96 穴プレートに固相化を行った。洗浄後、5%スキムミルクでブロックし、抗体価測定用のプレートとして用いた。

QFT 試験陰性の結核既往歴のない 大阪市立大学医学部学生 17 名（年齢 20-24 歳、男性 9 名、女性 8 名）を非感染健常者とした。活動性結核患者は、QFT 試験陽性で、刀根山病院で痰中に結核菌が検出された 15 名（年齢 35-71 歳、男性 13 名、女性 2 名）を対象とした。5 年以上前に肺結核の既往がある 15 名で現在、痰中に結核菌を認めず、咳・熱などの症状がない者を陳旧性結核とした。陳旧性結核群の年齢は 42-91 歳で、