

201318008B

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23年度～平成25年度 総合研究報告書

研究代表者 阿 戸 学 平成25年度
研究代表者 小 林 和 夫 平成23～24年度

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23年度～平成25年度 総合研究報告書

研究代表者 阿 戸 学 平成25年度
研究代表者 小 林 和 夫 平成23～24年度

平成26（2014）年3月

目 次

I. 総合研究報告書

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(平成25年度) 小林 和夫(平成23～24年度)	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	11
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	17
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	27
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	35
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	41

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
---------------------	----

I. 総合研究報告書

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）
総合研究報告書-平成 23-25 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、平成25年度)
研究代表者	小林 和夫	(国立感染症研究所・免疫部・部長、平成23, 24年度)
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	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	仁木 誠	(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	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	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、平成25年度)

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、薬剤耐性機構や宿主免疫応答を解明した。潜伏結核菌感染者で T 細胞応答優位な蛋白質を 12 種類同定し、休眠期結核菌に対するワクチン抗原として有望である。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、特に結核発症を予測可能なバイオマーカーの同定や結核と近縁 *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国内外で示さ

れ、診断基準への採用が期待される。特筆事項として、1) 基礎研究で研究分担者 松本 壮吉が「研究課題：結核菌の病原性および増殖制御機構の分子遺伝学的解析と応用研究」により、平成 23 年 小林 六造 記念賞（日本細菌学会）を受賞し、2) 橋渡し医学研究で平成 23 年 8 月 22 日、活動性 MAC 感染症に関し、MAC-GPL 診断キット（キャピリア® MAC 抗体 ELISA タウンズ）の体外診断用医薬品製造販売が承認・上市（保険点数：120 点）され、保険医療として、臨床使用を開始した。この診断キットの感度：84%、特異度：100%、所要時間の大幅短縮：3 時間（従来法：約 1 か月）、かつ、非侵襲性であり、今後、MAC 感染症の診療に威力を発揮することが期待される。

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の総括 (平成 25 年度)
小林 和夫	潜在性結核菌感染モデルの樹立と研究総括 (平成 23、24 年度)
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

長期培養結核菌株の解析

結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科に 1960 年代から培養状態で保存されている *M. tuberculosis* H37Rv 株を使用した。この培養状態を確認するため、溶存酸素量を測定した。

培養ボトルを開封し、菌層から RNA を抽出し、遺伝子発現解析にはマイクロアレイを使用した。この際、発現の比較対象として、分離回収した NN15 株を使用して様々な酸素濃度下での培養株、結核菌プロトプラストを作製し、同様に発現解析を実施した。長期培養株の形態を観察するため、電子顕微鏡による解析を行った。

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

速育型抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* mc²155 株 (WT) およびそれを親株とした MDP1 欠失株 (KO) ならびに補填株 (Comp) に対する各種抗菌薬の影響を解析し、Total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析およびリアルタイム RT-PCR 解析を行った。

各菌株菌体から得られた抽出蛋白質は SDS 含有 12% ポリアクリルアミドゲルにて分離後ウェスタンブロッティング法で

MDP1 および KatG を検出した。Isoniazid (INH)の KatG による活性染色を行った。

17名を非感染健常者の、15名の活動性結核患者を対象とした。血清を用いて精製した結核菌蛋白質抗原に対するELISAを行った。

ホルマリン固定ヒト肺切片を、ヘマトキシリン・エオジン染色、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

培養した BCG 菌体を回収し、常法にしたがってクロロホルム/メタノール抽出を行い、脂質分画を得た。この画分を適切な展開溶媒を用いて薄層クロマトグラフィーにより展開し、GMM あるいは 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。

アカゲザルに BCG を皮内接種することにより免疫を行った。GMM あるいは GroMM を含むリポソムの皮内接種には、50 µg を用いた。アカゲザル末梢血単核球のサイトカイン産生細胞を同定するとともに、ELISPOT 法で IFN-γ 産生を解析した。また、サル皮膚組織から RNA を抽出し、常法にしたがい RT-qPCR 法で定量した。

BCG を免疫したアカゲザルに、CFSE による標識した GMM 特異的 T 細胞株を静脈注射し、4 日後に免疫部位の皮膚における免疫組織化学的解析を行った。

Hartley モルモットに BCG を皮内投与し、6 週後に精製 GroMM 含有リポソームおよびコントロールリポソームを皮内接種し、皮膚硬結径を測定した。BCG 免疫モルモットの所属リンパ節より細胞を単離し、GMM リポソームあるいはコントロールリポソーム存在下で培養した。18 時間後に細胞を回収し、RNA を単離した。さらに常法に従い、RT-qPCR 法でサイトカイン RNA 発現を解析した。

2B4-NFAT-GFP レポーター細胞（山崎晶博士・九州大学より恵与）に種々の Mincle

遺伝子あるいは変異遺伝子を導入し、リガンド脂質とともに培養し、フローサイトメトリーを用いて GFP 陽性細胞を検出した。

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により、ヒト Mincle のみを発現したマウス系統を樹立した。皮内接種を受けた動物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。

DosR レギュロンタンパク質に対する T 細胞応答

33 種類の組換え DosR レギュロンタンパク質を用いて、ヒト末梢単核球を刺激した。産生された IFN-γ を ELISPOT 法によって測定した。ヒト試料はインフォームド・コンセントを得た結核患者（12 名）、潜伏感染者（14 名）、非感染者から得た。

結核菌感染樹状細胞におけるオートファゴソーム形成の解析

結核菌 Erdman 株を感染させた樹状細胞をパラフォルムアルデヒドで固定した後、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。

潜在性抗酸菌感染における臨床診断法の開発

- (1) 疾患活動性のモニタリングにキャピリア MAC 抗体 ELISA が有用かどうかを、治療例検体を用いて前向きに検討した。
- (2) 肺 MAC 症診断に対するキャピリア MAC 抗体 ELISA の有用性を、多数例を酸素培養株間で用いて再検証した。
- (3) 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同定した。
- (4) 陳旧性肺結核患者において、休眠菌に由来する抗 Acr 抗体と抗 MDP1 抗体、増殖菌に由来する抗 ESAT6 抗体と抗 CFP10 抗体を測定した。
- (5) 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 年以内に末梢血リンパ球 interferon-gamma 遊離試験：Quatiferon (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。

(6) 肺 MAC 症患者の血清中の抗 MDP1 抗体を測定した。

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

長期培養結核菌株の解析

長期低酸素培養菌の急速凍結法による電子顕微鏡下での観察では、生菌と死菌の混在状態であると判断され、形態的にも明確な差が認められた。長期低酸素培養菌の酸素濃度は10.8%であり、大気圧のおよそ50%であった。長期培養 H37Rv NN15 株の培養酸素濃度による遺伝子発現解析によって、酸素濃度に伴って発現が上昇する 27 genes、酸素濃度に伴って発現が低下する 15 genes、長期培養 NN15 のみで相対的に高発現している 63 genes を特定した。

長期低酸素培養結核菌の形態を検討するために、プロトプラストを作成した。長期低酸素培養株の形態的には球菌～桿菌の形態であった。また Ziehl-Neelsen 染色で定型的抗酸性を示さなかった。電子顕微鏡下で比較すると、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かった。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

M. smegmatis WT, KO, Comp 株において、各種抗生剤に対する感受性を比較した。その結果、INH に対する感受性は MDP1 欠失により増強することがわかった。その機序として、INH を活性型に変化させるカタラ

ーゼをコードする遺伝子 *katG* の発現が MDP1 欠失により有意に増強することが確認された。対数増殖期と定常期の菌体における MDP1 および KatG の発現の変化を観察したところ、MDP1 が経時的に発現増強するのに反比例し、KatG の発現は経時的に減弱することが明らかになった。同様に、定常期の菌体は増殖期の菌体より INH 抵抗性であることが確認された。以上のことから、定常期における INH 抵抗性は MDP1 の発現増加により KatG 発現が抑制されることにより起こることが明らかになった。

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 種類について血清抗体を検出したところ、Rv2031(Acr)については、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。

さらに、Antigen 85A、Antigen 85B、MDP1 について、活動性結核患者と陳旧性結核患者間、および非感染健常者と陳旧性肺結核間で有意な抗体の上昇が検出された。Antigen 85A と MDP1 については、活動性結核患者に比べ陳旧性肺結核患者で有意に高い抗体の産生が認められた。

非感染健常者と比較して、陳旧性肺結核、すなわち高い結核発症リスク群に対する抗体の検出感度を ROC 曲線を作成して解析した。陳旧性肺結核を比較した結果、Antigen85A と MDP1 については 96.5%と 97.3%であった。Antigen85A と MDP1 に対する抗体価測定が、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。

Antigen85 と MDP1 の未発症者肺での発現を免疫組織学的に検討した結果、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。

グルコースモノミコール酸(GMM)グリセロールモノミコール酸 (GroMM) に対する免疫応答

BCG接種アカゲザル末梢血単核球において、GMM 特異的 T 細胞は CD4 陽性、CD8 陽性亜群にわたって広く存在し、またそのほとんどは IFN- γ と TNF- α を同時に産生する細胞であった。CD1c 拘束性 GMM 特異的 T 細胞株は、BCG 接種局所に形成された肉芽腫様組織内に浸潤し、CD1c 分子を強発現するマクロファージとの共局在を認めた。

BCG 接種アカゲザルの皮膚に GMM を皮内接種すると局所に炎症応答が誘起され、組織染色により単核球の顕著な浸潤を観察した。この皮膚組織における RNA 発現を解析したところ、IFN- γ 、granulysin や perforin の発現上昇を認め、IL-4 や IL-10 の発現低下していた。

BCG は外来性のグリセロールを利用して GroMM を産生することができること判明したため、グリセロール存在下で培養した BCG をモルモットに接種し、6 週後に GroMM リポソームを皮内投与したところ、組織学的に多くの好酸球の浸潤を認めた。

BCG 接種モルモットの所属リンパ節細胞を GroMM リポソームあるいは空リポソームで刺激し、サイトカインの転写を RT-PCR により検証したところ、IFN- γ の転写は GroMM リポソーム刺激で減弱していた。一方、IL-5 と IL-10 の転写は GroMM リポソーム刺激により顕著に誘導された。以上の結果から、GroMM に対するアレルギー応答は、TH2 型応答であり、それと関連して好酸球の局所浸潤が起きる可能性が考えられた。

ヒトまたはマウス Mincle 遺伝子をトランスフェクトしたレポーター細胞を、TDM を固相化したプレートで培養すると、TDM 濃度依存的に GFP 陽性細胞が出現した。ヒト Mincle 発現細胞は GroMM 濃度依存的に GFP 陽性細胞が出現したが、マウス Mincle 発現細胞は GroMM に対する反応性を失うことを確認した。以上の結果から、ヒト Mincle はマウス Mincle と異なり、GroMM 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。ヒト Mincle トランスジェニックマウスの TDM や GroMM に対する応答の比較検討から、生理的条件下においてヒト Mincle が GroMM を認識すると結論づけた。また、マウスの皮膚に GroMM リポソームを接種し、2 日後に組織を採取して組織学的解析を行ったところヒト Mincle をもつマウスにおいてのみ、多数の好酸球浸潤を認めた。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。

DosR レギュロンタンパク質に対する T 細胞応答

結核患者と潜伏感染者において T 細胞応答が増強している抗原として、Rv0080、Rv2031、Rv3129 を同定した。これらの抗原では結核患者と潜伏患者では応答の差は認められなかった。また、潜伏感染者において強い T 細胞応答が見られた抗原として、Rv570、Rv2004c、Rv2029、Rv3133c を同定できた。潜伏感染者が結核患者と比較して強く反応した抗原として、Rv570、Rv2028 を同定した。潜伏感染者が非感染者にのみ反応した抗原として、Rv0081、Rv0574、Rv2626c を同定した。

結核菌感染樹状細胞におけるオートファゴソーム形成の解析

樹状細胞に結核菌を感染させると、結核菌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。オートファジーアダプタータンパク質である p62 は LC3 局在結核菌ファゴソームに共局在した。また、感染後リソソームマーカータンパク質である LAMP1 と MHC クラス II 分子が共局在するオートファゴソームの経時的増加がみとめられた。p62 をノックダウン樹状細胞の解析から結核菌オートファゴソームの形成は p62 依存的に起こることが判明した。潜在性抗酸菌感染における臨床診断法の開発

抗 MAC 治療有効例において治療後の抗体価は、治療前の抗体価に比べ有意に低下しており、抗体価は疾患活動性を反映することが示唆された。

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、従来との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。

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同定した。

陳旧性肺結核患者において、休眠菌に由来する抗 Acr 抗体と抗 MDP1 抗体は、増殖菌に由来する抗 ESAT6 抗体と抗 CFP10 抗体との間に Acr - ESAT6; $r = 0.92$ $p < 0.0001$, Acr - CFP10; $r = 0.86$ $p < 0.0001$, MDP1 - ESAT6; $r = 0.85$ $p < 0.0001$, MDP1 - CFP10; $r = 0.72$ $p < 0.0001$ の有意な相関を認めた。この結果、陳旧性肺結核の抗酸菌感染は、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。

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、早期潜在感染(Recent LTBI)例は、休眠菌感染由来の抗体価が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。

肺 MAC 症患者の血清中に抗 MDP1 抗体が有意に上昇していた。これは、肺 MAC 感染症にも休眠 MAC 菌の潜在感染が存在する事が示唆された。

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。

抗酸菌・結核菌休眠分子である MDP1 は定常期以降の菌体で発現が増強することから、潜伏感染菌の INH 耐性化に関わる因子の一つであることが示唆された。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。ハイリスク群で MDP1 抗体が高いことは、細菌量の増加を示唆し、それは発症の前段階にあると考えられるべきかもしれない。本研究成果をうけて、今後の課題として、①より多くのサンプルで検討、②T 細胞応答との比較検討、③前向き研究による発症の有無の検討を実施し、潜在性結核や高発症リスク群診断法を確立すべきと思われる。

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、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。また、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 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) は民間臨床検査機関である BML の受託項目となり、普及が期待される (保険点数: 120 点)。さらに、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。

- 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。
- 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。
- 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。
- 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)。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. Kobayashi, K., M. Ato, and S. Matsumoto. 2011. Global threats and the

- control of multidrug-resistant tuberculosis. *J. Disaster Res.* 6: 443-450.
2. Naka, T., N. Nakata, S. Maeda, R. Yamamoto, M. Doe, S. Mizuno, M. Niki, **K. Kobayashi**, H. Ogura, M. Makino, and N. Fujiwara. 2011. Structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.* 193: 5766-5774.
 3. Naka, T., S. Maeda, R. M. Niki, N. Ohara, S. Yamamoto, I. Yano, J.-i. Maeyama, H. Ogura, **K. Kobayashi**, and N. Fujiwara. 2011. Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin Tokyo 172 substrain. *J. Biol. Chem.* 286: 44153-44161.
 4. Takatsuka, M., M. Osada-Oka, E.F. Satoh, K. Kitadokoro, Y. Nishiuchi, M. Niki, M. Inoue, K. Iwai, T. Arakawa, Y. Shimoji, H. Ogura, **K. Kobayashi**, A. Rambukkana, and S. Matsumoto. 2011. A histone-Like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-Like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction. *PLoS One* 6: e20985.
 5. Ozeki, Y., Y. Hirayama, T. Takii, S. Yamamoto, **K. Kobayashi**, and S. Matsumoto. 2011. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Vaccine* 29: 6881-6887.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. **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II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
 14. 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.
 15. 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.

分担者の業績：一覧表・各報告書を参照

2. 学会発表

1. **小林和夫**. 2011. 現代における感染症の脅威と制圧戦略（メインシンポジウム：次世代の予防戦略に果たす衛生学の役割）. 日本衛生学会雑誌、66：250-251、2011. 第81回日本衛生学会学術総会（東京、3月—>Web-IT開催）.
2. **小林和夫**、光山正雄. 2011. 結核研究の最先端（シンポジウム 10-S-4）. 学術講演要旨 246、2011. 第28回日本医学会総会（東京、4月—>誌上開催）.
3. 松本壮吉、岡 真優子、北田清悟、前倉亮治、**小林和夫**、2011. 結核研究の最先端（シンポジウム 10-S-4）. 学術講演要旨 246、2011. 第28回日本医学会総会（東京、4月—>誌上開催）.
4. 森田康裕、松本壮吉、**小林和夫**、木下タロウ. 2011. マンナン生合成の異常は結核菌細胞壁のバリア機能を弱め、結核菌をβラクタム系薬剤感受性にする. 結核、86：372、2011. 第86回日本結核病学会総会（東京、6月）.
5. Ohara, N., N. Satoh, M. Nakayama, M. Okabe, and **K. Kobayashi**. 2011. Gene expression profile in a thymidine synthase ThyX-deletion mutant of *Mycobacterium bovis* BCG (P-BA28-8). 日本細菌学会雑誌、66：425、2011. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology-第84回日本細菌学会総会（札幌、9月）.
6. Satoh, N., **M. Ato**, T. Matsumura, T. Yamazaki, T. Sekizuka, M. Kuroda, N. Honda, M. Nakayama, K. Tsuchida, **K. Kobayashi**, and N. Ohara. 2011. Identification of the novel mutations in 16S rRNA gene of the substrains of a streptomycin-dependent *Mycobacterium tuberculosis* strain 18b which confer streptomycin resistance in *Mycobacterium* (P-BA28-20). 日本細菌学会雑誌、66：427、2011. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology-第84回日本細菌学会総会（札幌、9月）.
7. Okabe, M., N. Ohara, N. Fujiwara, T. Naka, **M. Ato**, and **K. Kobayashi**. 2011. Sliding-defect mutants of *Mycobacterium smegmatis* have lower ability to enter nonphagocytic cells (P-BA28-26). 日本細菌学会雑誌、66：429、2011. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology-第84回日本細菌学会総会（札幌、9月）.
8. Ozeki, Y., **K. Kobayashi**, and S. Matsumoto. 2011. The efficacy of BCG may be a time-dependent after the vaccination and age-dependent I mice (P-BA31-8). 日本細菌学会雑誌、66：447、2011. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology-第84回日本細菌学会総会（札幌、9月）.
9. **小林和夫**. 2011. 感染症における宿主免疫応答と橋渡し研究（Workshop 7 感染症、免疫不全・免疫異常症）. 日臨免誌、34：268、2011. 第39回日本臨床免疫学会総会（東京、9月）.
10. 松本壮吉、**小林和夫**. 2011. 結核菌の休眠現象と潜在性結核（Symposium 1S9s 再考 VNC：viable but not-culturable cells! 細菌に学ぶ生残戦略）. 生化学、83：47、2011. 第84回日本生化学会大会（京都、9月）.
11. Ozeki, Y., **K. Kobayashi**, S. Matsumoto. The efficacy of BCG may be a time-dependent after the vaccination and age-independent in mice. International Union Microbiological Societies 2011 Congress（札幌、9月）.
12. Osada-Oka, M., Y. Hirayama, Y. Tateishi, Y. Ozeki, S. Kitada, R. Maekura, K. Tsuijima, Y. Koide, **K. Kobayashi**, and

- S. Matsumoto. 2011. Antibody responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in latent *M. tuberculosis* infection. 46th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy (大宮、12月) .
13. 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) .
14. 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) .

分担者の業績：一覧表・各報告書を参照

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

分担者については、各報告書を参照

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）
総合研究報告書

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・抗酸菌部・細菌科）
研究協力者 青野 昭男（結核予防会結核研究所・抗酸菌部・細菌科）
研究協力者 近松 絹代（結核予防会結核研究所・抗酸菌部・細菌科）

研究要旨

【目的】臨床的に観察される結核感染後の長期にわたる潜在感染状態のひとつのモデルとして、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】1960～1970年代に結核研究所で培養を開始・継続している結核菌 H37Rv を使用した。当該株はソートン培地に流動パラフィンを上層して嫌気状態としており、37℃で培養されていた。計6本の培養ボトルから流動パラフィンと培地を菌層と共に回収し、菌株の生菌としての回収と RNA の直接抽出を行った。生菌として回収した結核菌は 1%、2.5%、5%および 10%酸素濃度下で 14～21 日間培養し、同様に RNA 抽出を行い、前述の検体と共に結核菌用マイクロアレイを利用して全ゲノムの発現解析を行った。これらの増殖性及び長期低酸素培養結核菌について電子顕微鏡下での形態観察を行った。また、resuscitation promoting factor の検討のため、*Dermatococcus nishinomiyaensis* の培養上清による結核菌の発育促進効果を評価した。

【結果】長期培養結核菌の培地中の酸素濃度は 10.8%であり、一般的に作製する低酸素培養株の酸素条件（1%）と比較すると、やや好氣的であった。同時期に培養を開始した 3 標本の遺伝子発現を相互に比較すると高い近似性を示していた。また、2.5～10%酸素濃度で短期培養した結核菌と長期低酸素培養結核菌の発現を比較すると、短期培養株同士は比較的近似していたが、長期低酸素培養結核菌の発現プロファイルはそれらとは異なっていた。長期低酸素培養状態から回収して増殖期とした結核菌と、同時期に凍結保存したレファレンス株（どちらも同じ H37Rv）の増殖期の発現は相互に近似しており、一方長期培養状態から回収して再び 1%で短期間低酸素培養した結核菌と長期低酸素培養結核菌の発現プロファイルは比較的近似していたことから、長期培養結核菌はやはり低酸素状態の発現に近いことが示された。しかしながら、長期低酸素培養結核菌の発現プロファイルは 2.5～10%酸素濃度で短期培養した結核菌とのプロファイルとは異なっており、プロファイルとして特異的であった。電子顕微鏡での形態観察では長期培養株で菌体の内部構造が極めて均一・希薄になっており、総体的に代謝が低下している状態

が示された。*D. nishinomiyaensis* の培養上清を添加した検体で結核菌の発育が促進される傾向が観察された。

【考察】遺伝子の発現プロファイルの解析から、長期培養結核菌は検体としての再現性を有しており、増殖期よりも低酸素培養状態に近いことが示された。総体として好気あるいは嫌気状態の混合である可能性があり、特異な培養状態として潜在結核感染の評価への利用が考えられた。今後リアルタイムPCR 等で定量的評価を確定する必要があるものの、長期低酸素培養結核菌で相対的に高発現している遺伝子の解析を継続的に進める必要が考えられた。

A. 研究目的

結核は現在も世界的に主要な感染症の一つであり、毎年全世界でおおよそ 880 万人が発病するとされている。本法では 2012 年に 21,283 人が結核として登録されており、罹患率は 16.7/10 万人となっている。発病の多くは高齢者であり、主に過去の結核感染の再燃と考えられている。

結核菌は感染してもすぐには発病せず、多くはいわゆる潜在感染状態（Latent Tuberculosis Infection: LTBI）となる。潜在感染状態の結核菌では総体として代謝が低下し、抗酸性（染色性）が失われるなどの性質が知られているが、その他の詳細は明らかではない。

結核菌の潜在感染状態の詳細を明らかにすることは、同菌の再燃を効果的に抑制あるいは予測する方法の開発につながる可能性がある。結核研究所には低酸素状態で 40 年以上培養を継続している結核菌株が存在し、感染から長期間経過した潜在感染状態を反映している可能性がある。今回、この結核菌株の性状を解析することを主目的として研究を行った。

B. 研究方法

〔長期培養結核菌株の解析〕

実験には結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科に 1960 年代から培養状態で保存されている *M. tuberculosis* H37Rv 株を使用した。また比較のための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ある。以下の株について検討を行った。

- 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

培養状態を確認するため、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。

培養ボトルを開封し、流動パラフィン、菌層及び培地をまとめて 2 mL 程度すくい取り、クロロホルム・エタノールで洗浄後、TRIzol[®]Max[™] Bacterial RNA Isolation Kit (Invitrogen) を使用して RNA を抽出し、DNase にて 2 回処理を行った。

遺伝子発現解析にはマイクロアレイ（NimbleGen 及び Agilent カスタムアレイ）を使用した。

発現の比較対象として、分離回収した NN15 株を使用して 1%、2.5%、5% 及び 10% 酸素濃度下と通常の好気状態（酸素濃度 21%）での培養株を作製し、同様に発現解析を実施した。

長期培養株の形態を観察するため、電子

顕微鏡による解析を行った。

[Resuscitation Promoting Factor に関する検討]

Resuscitation promoting factor (rpf)あるいは当科で分離した結核菌 Trans-activating factor を含むと思われる細菌培養液の基礎検討を行った。Galina らの方法を参照し、*M. tuberculosis* (H37Rv) (Rv) 及び *Dermatococcus nishinomiyaensis* (NIS)の培養上清を作製し、結核菌の培養促進効果について塗抹陽性の喀痰検体を用いて検討した。培養には MGIT960 (ベクトン・ディッキンソン) を使用し、培養陽性までの時間を比較した。

[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 (per litre)

- 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

[長期培養結核菌株の解析]

長期低酸素培養菌の急速凍結法による電子顕微鏡下での観察では、生菌と死菌の混在状態であると判断され、形態的にも明確な差が認められた。活発な活動状態 (対数増殖期) の H37Rv の所見では概して菌体内の電子密度は一様で、直径約 10nm の顆粒 (リボソーム) が多数散在し、DNA の明瞭な線維状構造が凝集あるいは分散した状態で観察された。また、細胞壁外膜と思われる構造が観察された。一方長期培養によって既に死菌と思われる菌体では細胞壁構造が壊れており、さらに内部の電子密度も均一でなかった。これに対して生菌と思われる菌体では内部構造が極めて均一・希薄になっているものの、細胞壁構造そのものは保たれており、増殖中の結核菌とは明らかに異なる状態であることが観察された。

長期低酸素培養菌の酸素濃度は 10.8% であり、大気圧のおよそ 50% であった。使用した長期培養 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。

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、長期培養からの直接検体、レファレンスとしての対数増殖期にある H37Rv と NN15 からの検体で比較を行った。対数増殖期の H37Rv と NN15 ではほぼ同じ発現プロファイルを示した。1%酸素濃度培養、長期培養 (酸素濃度 10.8%) 及び対数増殖期の NN15 での発現を相互に比較し、三種類のパターンによるクラスターを同定した。第 1 のクラスター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 のクラスター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 のクラスターでは長期培養 NN15 のみで相対的に高発現している 63 genes を特定した。

低酸素長期培養菌の株間の再現性をみるため、NN15、NN16、NN17 及び NN19 (発

現を解析できない遺伝子群が多発したため比較対象からは除外) について発現プロファイルの比較を行ったが、NN15、NN16、NN17 の株間で有意な発現の違いは認められなかった。また、新たに酸素濃度を変えて (2.5%~10%) 作製した低酸素培養株間での発現は比較的近似していたものの、長期培養株 (NN15) での発現と比較すると Wilcoxon 検定で有意差のある結果であった。

[Resuscitation Promoting Factor に関する検討]

塗抹陽性の喀痰検体 (n = 4) を用い、液体培地による発育陽性までの時間を比較した。*D. nishinomiyaensis* の培養上清を添加した培地で発育時間が短縮されているように思われたが、明確な差はなかった。また加熱処理した *D. nishinomiyaensis* の培養上清では非加熱の場合よりも培養時間が長い傾向があった (2011 年度)。

[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、プロトプラストと思われる株を作成し、比較を行った。

プロトプラスト用培地で培養した 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。形態的には球菌~桿菌の形態であった。また Ziehl-Neelsen 染色で定型的抗酸性を示さなかった。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、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かった。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

潜在感染状態にある結核菌の性状を理解するため、結核研究所で 1960 年代から継続して培養している長期低酸素培養株の解析

を実施した。培養株の低酸素状態は一般に短期的に休眠結核菌を作製する場合と異なり、大気圧の 50%程度と比較的好気的であった。同時期に培養を開始した複数の標本間での遺伝子発現プロファイルは相互に類似しており、標本間の再現性もあるものと思われた。長期低酸素培養結核菌の遺伝子発現プロファイルは短期的に作製した結核菌株のプロファイルと異なり、特異的なものであった。しかしながら、好気状態の NN15 と H37Rv (凍結保存) の発現プロファイルがほぼ同じであり、さらに短期及び長期の低酸素培養株同士が比較的類似した発現プロファイルを示したことから、長期低酸素培養結核菌株は一般的に考える休眠状態菌により近いものと考えられた。今後リアルタイム PCR 等での検証が必要と思われるが、長期低酸素培養結核菌が示す遺伝子発現状態は、これまで 1%酸素下で培養された結核菌株で報告されているものとは異なる遺伝子発現も認められており、好気及び嫌気状態の混合物としての総体を示している可能性が考えられた。

結核菌の発育を促進する因子については、今回の研究で *D. nishinomiyaensis* の培養上清に RPF 様の物質が含まれている可能性が示唆された。今後組換え RFP の作製を含め、抗酸菌培養感度の改善を目的として発育因子の研究が必要と思われた。

結核菌のプロトプラストについては、浸透圧試験等で確認を行う必要があるものの、通常培養での抗酸性の復旧など、細胞壁の性状変化はあるものと思われた。今回の実験系で長期培養結核菌株からの RNA 抽出に TRIzol MAX を使用したが、プロトプラストと長期培養株が形態的に類似していることから考えると、脂質処理後は通常の TRIzol 抽出でも問題ないのかも知れない。比較検討の必要があるものと思われた。

E. 結論

結核研究所抗酸菌部において 40 年以上低酸素状態で培養されている結核菌株は、1%酸素濃度で作製した休眠菌や増殖期の結核菌とは異なる発現プロファイルを示し、

同等の酸素濃度での短期培養株とも異なるプロファイルを示した。この長期低酸素培養結核菌株が臨床的に潜在結核感染状態を反映するのか、それとも Sub-clinical な活動性結核を表現しているのか不明であるが、今回の研究で得られたデータを基に特異発現している遺伝子を特定し、臨床的評価を行う必要があると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

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 Tuberc Lung Dis 2013; 17: S528. 44th world conference on lung health of the international union against tuberculosis and lung disease, Paris, France. 30 October – 3 November.

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