

の属する O 抗原型を標的とする IMS 法を採用した。わが国では 8 種類、世界的規模の場合にはこれら以外の 7 種類を追加した合計 15 種類の O 抗原型を標的とすることが理想的であると判断した。しかし、これらのうち 3 種類の O 抗原に対する特異抗血清が入手困難であったので、本研究では、とりあえず 12 種類の O 抗原を標的とし、それらを同時にスクリーニングできる IMS の系を作成し、*stx* 遺伝子を標的とする LAMP 法を組み合わせ、定性的に標的菌を検出できる系を用いて、IMS 法の細部に微調整をほどこしたところ、簡便性よび特異性に優れた方法を確立できた（論文 1）。

C-II. 平成 26 年日米医学協力コレラ部会合同部会の概要

2015 年 1 月 14 日（水）～16 日（金）の期間に米国フロリダ州のゲインズビルフロリダ大学のフットボールスタジアム横の会議場で合同部会が開催された。本会議の後 2 日間、参加可能な研究者同士が議論を深めるための Post-conference event を催した。19ヶ国から 170 名が登録・参加した。日本からの参加者は 19 名で、口頭で 13 件、ポスターで 4 件の発表をした（添付した表 1 参照）。発表内容は、基礎研究からトランスレーショナル・リサーチに至るまで多岐にわたる分野が含まれていた。アブストラクト集は 379 ページに及ぶ内容の充実したものであった（添付した図 1 参照）。

今回の特徴の 1 つは、第 3 日目に、近年急激に増加したアフリカでのコレラ問題を取りあげた特別セッションを組みこんだので、日本、米国、アジア諸国の参加者のみならず、アフリカからの参加者がかなり見

られた。詳細は、以下のとおりである。

米国、; 112; 日本、19; バングラデッシュ、12; ブルキナファソ、1; カメルーン、1; カナダ、1; フランス、5; ガーナ、1; ハイチ、1; 印度、4; イスラエル、1; 韓国、2; マダガスカル、1; モザンビーク、1; スペイン、2; スウェーデン、3; タイ、1; 英国、1; ジンバブエ、1)

他の特徴は、最近特に注意せねばならない国際的なテロ活動の影響と対策である。今回日本からの参加・発表者として、上記以外に 2 名からの口頭発表演題を予定していたが、発表者は国外（シリア、バングラデッシュ）からの招聘研究者または大学院性（文科省国費留学生）であり、米国へ入国するためのビザが会議開催までは発行されなかった。この問題への対策として、今回はスカイプを介した日本からの口頭発表を試みた。米国の会場では、クリアーに発表を見聞きすることができ、質疑応答も問題なく実施できた。

D. 考察

D-I. 食材中の腸炎ビブリオおよび腸管出血性大腸菌の病原性株の簡便・高感度検査法の確立

本研究で確立できた方法は、上記の特徴のみならず、LAMP 法の試薬は凍結乾燥式になり、室温輸送・保存が可能、DNA 増幅の結果は肉眼判定（ゲル電気泳動不要）が可能であり、熱帯の発展途上国でも使用可能であると言える（Escalante-Maldonado et al., 投稿中）。

D-II. 平成 26 年日米医学協力コレラ部会合同部会の概要

今回は開催場所の選定、アフリカの研究者の参加、発表方法にスカイプを取り入れる（あくまでも緊急手段）など、かねてからの暖められてきた対策から臨機応変処置を含む多くの新しい試みがなされた。今後の参考にしたい。

E. 結論

E-I. 食材中の腸炎ビブリオおよび腸管出血性大腸菌の病原性株の簡便・高感度検査法の確立

アジアを含む世界に蔓延する感染症に対する国際的なレベルでの対処策の一例が示されたと言える。今後の研究方針策定の参考になるであろう。

E-II. 平成 26 年日米医学協力コレラ部会合同部会の概要

変容するアジア状況、日米それぞれの国情・財政状況、および世界的政治情勢に対応した結果を反映した会議であったが、本来の目的は達成できたと言える。

F. 健康危険情報

F-I. 食材中の腸炎ビブリオおよび腸管出血性大腸菌の病原性株の簡便・高感度検査法の確立

本研究で確立した方法を用いて、世界レベルで対象病原性菌株を含む食品の定量検査が、実施されれば、アジアのみならず、世界に蔓延する当該感染症の定量リスクアセスメントが可能になるであろう。腸炎ビブリオに関しては、2014 年 10 月にインドネシア西スマトラ州パダン市で、当該検査法の validation のためのワークショップを自発的に開催し、本法の普及活動を開始し

た。

F-II. 平成 26 年日米医学協力コレラ部会合同部会の概要

本年度の合同会議において、アフリカを中心とするインフラ整備が不十分な国では、依然コレラが重要な疾病であることが確認され、現地への旅行者に徹底すべき情報であると思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kayali, A. Y. O. Escalante-Maldonado, V. Vuddhakul, K. Seto, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. 2015. Development of a method for detection of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* belonging to clinically important twelve O serotypes based on the combination of PickPen-assisted immunomagnetic separation and loop-mediated isothermal amplification. *Int. J. Immunol. Immunother.* 2(1):1-7.
2. Tanaka, N., Y. Iwade, W. Yamazaki, F. Gondaira, V. Vdddhakul, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. 2014. Most-probable-number loop-mediated isothermal amplification-based procedure enhanced with K antigen-specific immunomagnetic separation for quantifying *tdh*⁺ *Vibrio parahaemolyticus* in molluscan shellfish. *J. Food Protect.* 77(7):1078-1085. doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-536.

3. Kongrueng, J., N. Tansila, P. Mitraparp, P. Mitraparp-arthorn, M. Nishibuchi, G. J. Vora, V. Vuddhakul. 2015. LAMP assay to detect *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Aquacult. Int.* DOI 10.1007/s10499-9874-3.
4. Malcolm, T. T. H., Y. K. Cheah, C. W. J. W. M. Radzi, F. A. Kasim, H. K. Kantilal, T. Y. H. John, J. Martinez-Urtaza, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, R. Son. 2015. Detection and quantification of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by using multiplex PCR and loop-mediated isothermal amplification assay. *Food Control.* 47: 664-671
5. Yingkajorn M., N. Sermwitayawong, P. Palitapongarnpimp, M. Nishibuchi, W. P. Robins, J. J. Mekalanos, and V. Vuddhakul. 2014. *Vibrio parahaemolyticus* and its specific bacteriophages as an indicator in cockles (*Anadara granosa*) for the risk of *V. parahaemolyticus* infection in southern Thailand. *Microbil. Ecol.* 67(4): 849-856.
6. Elexson, N., L. Afsah-Hejri, Y. Rukayadi, P. Soopna, H.Y. Lee, T.C. Tuan Zainazor, M. Nor Ainy, Y. Nakaguchi, N. Mitsuaki, R. Son. 2014. Effect of detergents as antibacterial agents on biofilm of antibiotics-resistant *Vibrio parahaemolyticus* isolate. *Food control* 35: 378-385.
7. Lee, H. Y., L. C. Chai, N. A. Mahyudin, M. Nishibuchi, and R. Son. 2014. Transfer of *Listeria monocytogenes* between abiotic surfaces under different weights. *Food Sci. Biotechnol.* 23(4):1237-1241.
2. 学会発表
- Nishibuchi, M.: [Keynote] Recent developments in seafood safety with respect to *Vibrio parahaemolyticus* VIBRIO2014. Edingbrgh, SctInd. April 3, 2014
- Mitsuaki Nishibuchi: [Keynote] Recent Understanding and Progress in the Technologies on the Risk of *Vibrio parahaemolyticus* in Seafood. 7th International Seminar, Indonesian Society for Microbiology 2014 (Padang, Indonesia). 15 October, 2014.
- Nishibuchi, M: How can the area study collaborate with other study fields? –A successful collaboration between the area study respecting “multidisciplinary” and “glocal” concepts and a micro-scale analyses-orientated modern biomedical study—. Kyoto U - UC San Diego Joint Symposium (ANN Crown Plaza, Kyoto, Japan). 2014/3/11.
- 西淵光昭: 世界から腸炎ビブリオ感染症をなくすという夢は現実となるか? 第 88 回日本細菌学会総会ワークショップ「変

- 遷する食中毒」(長良川国際会議場、岐阜) . 2015/3/28.
- Nishibuchi, M..Comparison of two major diarrheagenic *Vibrio* species, *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus*, for the ecology, epidemiology, and disease prevention in Asia. Bandung Symposium on ASEAN University Network (AUN)- Kyoto University (KU) Student Mobility Program toward Human Security Development. Institute of Technology Bandung, Indonesia. June 24-25, 2014
- Oscar R. Escalante-Maldonado, Ahmad Yaman Kayali, Wataru Yamazaki, Varaporn Vuddhakul, Fumio Gondaira, Yoshitsugu Nakaguchi, Mitsuaki Nishibuchi “Improvement of the MPN-IMS-LAMP- based Detection Method for Virulent Strains of *Vibrio parahaemolyticus* from Seafood” 49th Annual Joint Panel Meeting on Cholera & Other Bacterial Enteric Infections Panel Meeting, United States-Japan Cooperative Medical Science Program (University of Florida, Gainesvilles, FL, USA, January 14-16 2015)
- Ahmad Yaman Kayali, Oscar R. Escalante-Maldonado, Kensuke Ozawa, Fumio Gondaira, Akira Ohshima, Varaporn Vuddhakul, Yoshitsugu Nakaguchi, and Mitsuaki Nishibuchi, “Confirmation of the Excellence of the LAMP-IMS-combined Detection Method for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and of the Modified System Using a Dried Reagent Mix” 日本防菌防黴学会第 41 回年次大会 (きゅりあん、東京都品川区、2014 年 9 月 24-25 日)
- Oscar R. Escalante-Maldonado, Ahmad Yaman Kayali, Sawa Yamada, Wataru Yamazaki, Fumio Gondaira, Akira Ohshima, Varaporn Vuddhakul, Yoshitsugu Nakaguchi, and Mitsuaki Nishibuchi, “Improvement of the Immunomagnetic Separation (IMS)- and Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)-based Detection Method for Virulent Strains of *Vibrio parahaemolyticus* from Seafood” 日本防菌防黴学会第 41 回年次大会 (きゅりあん、東京都品川区、2014 年 9 月 24-25 日)
- Ahmad Yaman Kayali, Oscar R. Escalante-Maldonado, Kensuke Ozawa, Fumio Gondaira, Varaporn Vuddhakul, Yoshitsugu Nakaguchi, Mitsuaki Nishibuchi “Detection of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* belonging to clinically important O serotypes by an IMS-LAMP-based method in the retailed beef” 49th Annual Joint Panel Meeting on Cholera & Other Bacterial Enteric Infections Panel Meeting, United States-Japan Cooperative Medical Science Program (University of Florida, Gainesvilles, FL, USA, January 14-16 2015)

- Oscar R. Escalante-Maldonado, Ahmad Yaman Kayali, 山田佐和、山崎渉、権平文夫、Varaporn Vuddhakul、中口義次、西渕光昭 “Prevalence of pathogenic strains of *Vibrio parahaemolyticus* in popular shellfish (molluscan bivalves) marketed in southern Thailand in the 2014 study as demonstrated by a sensitive detection method” 「2014年にタイ南部で人気のある市販二枚貝を対象に高感度検出法を用いて実施した調査において高頻度に検出した病原性腸炎ビブリオ」 第48回腸炎ビブリオシンポジウム（北海道函館市、2014年11月12-13日）
- Ahmad Yaman Kayali, Oscar R. Escalante-Maldonado, Kensuke Ozawa, Fumio Gondaira, Varaporn Vuddhakul, Yoshitsugu Nakaguchi, and Mitsuaki Nishibuchi “Prevalence of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* belonging to enterohemorrhagic O serotypes (O157 and non-O157) in the beef marketed in southern Thailand in years 2013 and 2014” 第67回日本細菌学会関西支部総会（兵庫医科大学西宮キャンパス、兵庫県西宮市、2014年11月22日）
- Oscar R. Escalante-Maldonado, Ahmad Yaman Kayali, Sawa Yamada, Wataru Yamazaki, Fumio Gondaira, Varaporn Vuddhakul, Yoshitsugu Nakaguchi, and Mitsuaki Nishibuchi “Development of trh gene LAMP primers and establishment of IMS-LAMP based method for detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood” 第67回日本細菌学会関西支部総会（兵庫医科大学西宮キャンパス、兵庫県西宮市、2014年11月22日）
- Koichi Shirakawa, Mitsuaki Nishibuchi: Analysis of the mechanism of glucose metabolism inhibition, as a cause of hypoglycemia, in falciparum malaria using a systems biology approach. The 55th Annual Meeting of the Japanese Society of Tropical Medicine (National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan). 1-3 November, 2014.
- Oscar R. Escalante-Maldonado¹, Ahmad Yaman Kayali, Wataru Yamazaki, Fumio Gondaira, Yoshitsugu Nakaguchi, and Mitsuaki Nishibuchi. Improvement of IMS-LAMP-based Detection Method for Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from Seafood. 第88回日本細菌学会総会（長良川国際会議場、岐阜）. 2015/3/28.
- Ahmad Yaman Kayali, Oscar R. Escalante-Maldonado, Fumio Gondaira, Yoshitsugu Nakaguchi, and Mitsuaki Nishibuchi. Optimization of the LAMP-IMS-based detection method for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* from beef. 第88回日本細菌学会総会（長良川国際会議場、岐阜）. 2015/3/28.
- 藤井愛音, 國方千菜美, 安田仁, 中口義次, 西渕光昭, 末澤千草, 奥田潤. 腸炎ビブリオの病原機構の解析 - I. 腸管上皮細

胞層透過活性と溶血毒遺伝子型との関連性. 第9回日本臨床検査学教育学会学術大会. 2014年8月20日-22日. 東京都大田区産業プラザ.

末澤千草, 坂元真美, 藤井愛音, 國方千菜美, 安田仁, 中口義次, 西淵光昭, 奥田潤. 腸炎ビブリオの病原機構の解析 - II. 腸管上皮細胞層透過活性と TTSS 遺伝子群との関連性. 第9回日本臨床検査学教育学会学術大会. 2014年8月20日-22日. 東京都大田区産業プラザ.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図 1. 平成 26 年度日米医学コレラ日米合同部会アブストラクト集 (表表紙および裏表紙)

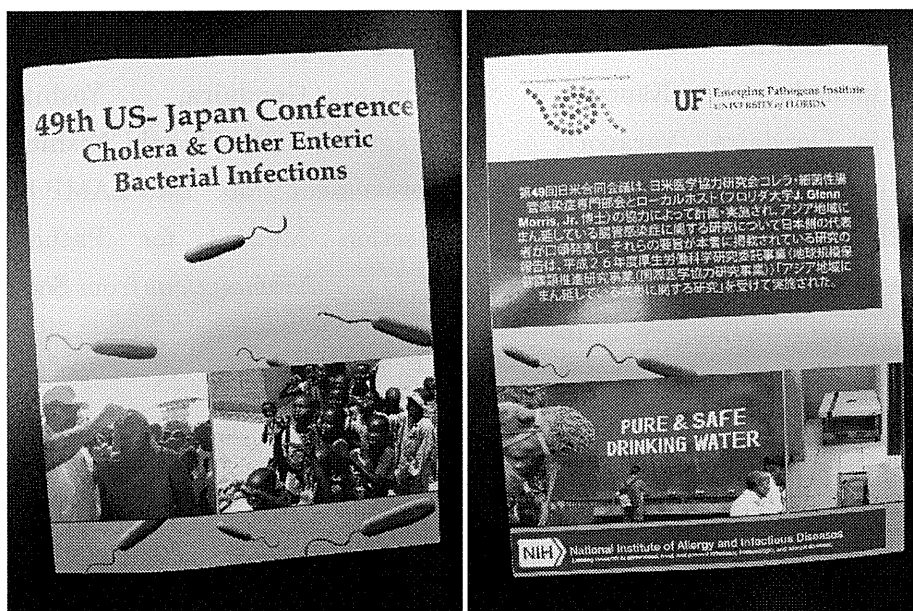


表 1. 平成 26 年度日米医学コレラ日米合同部会で発表された日本側からの発表。

Oral Presentation No.	Abstract		Title of presentation abstract	Participants	
	Designation	No. of pages		Names	Affiliations
C	J-0-1-1	18	Enhanced resistance to oral and ocular stresses in Vibrio cholerae in alternative states	Shinya Yasuhara, Rieko Tamoto, and Hisaaki Tsuda ^{1,2}	Department of Bioreactor Science, Research Center for Food Safety and Security, Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, Rokko-cho 1-1, Nada-ku Kobe, 651-8501, Japan
	J-0-1-2	28			
C	J-0-2-1	18	Sublethal produced by Shiga-toxinigenic Escherichia coli enters the brain and is cell-dependent and stable in the culture	Yoshitaka Yano ¹ , Seiya Tappan ² , Rieko Tamoto ³ , Rieko Tamoto ³ , Akira Sakai ⁴ , Shinya Yasuhara ⁵ , Hisaaki Tsuda ⁶	Department of Food Safety and Food Quality, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, 565-0871, Japan
	J-0-2-2	28			
C	J-0-3-1	18	Shiga toxin B subunit protein as a neuroprotectant to induce stress tolerance in cells	Yoshihiro Kuroki ¹ , Junji Kuroki ² , Tomohiko Akashi ³ , Akira Sakai ⁴ , Shinya Yasuhara ⁵ , Hisaaki Tsuda ⁶	Division of Bacterial Infection Biology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan; Department of Pathology and Comprehensive Cancer Center, University of Tsukuba Medical School, Amakubo, Maebashi, Gunma, Japan; Institute of Health Sciences, University of Tokushima, Tokushima, Japan; Department of Infectious Disease Control, International Research Center for Infectious Diseases, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan; National Institute for Biomedical Research, Tokyo, Japan; Institute of Microbiology, Research Center, Osaka University, Osaka, Japan
	J-0-3-2	28			
C	J-0-4-1	18	Isolation and genetic characterization of Vibrio cholerae O1 carrying an additional <i>STX2</i> -injection	Yasuhiko Chida ¹ , Natsuyuki Nakasathum ² , Nattamon Na-Boon ³ , Nattamon Na-Boon ³ , Jeevanjit Khandoo ⁴ , Jeevanjit Khandoo ⁴ , Sriporn Chantana ⁵ , Shigeyuki Hamada ⁶	Thailand-Japan Research Collaboration Center on Emerging and Re-emerging Infections, Nonthaburi, Thailand; Research Institute for Tropical Diseases, Osaka University, Osaka, Japan; Thai Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand
	J-0-4-2	28			
C	J-0-5-1	18	Highly virulent Vibrio cholerae O1 and O139 strains in the Pacific of a developing aquatic zone	Shi Yamamoto ¹ , Masahiko Nakano ² , Tomoko Nakamura ³ , Naoki Kawano ⁴	Department of Infectious Diseases, Osaka University, Osaka, Japan; National Institute of Health, Tokyo, Japan
	J-0-5-2	28			
C	J-0-6-1	18	The surface sensor SigA of enterohemorrhagic Escherichia coli contributes to the regulation of adherence to HEp-2 cells	Yoshihiro Kuroki ¹ , Junji Kuroki ² , Tomohiko Akashi ³ , Akira Sakai ⁴ , Shinya Yasuhara ⁵ , Hisaaki Tsuda ⁶	Department of Food Safety and Food Quality, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan; Institute of Microbiology, Research Center, Osaka University, Osaka, Japan
	J-0-6-2	28			
C	J-0-7-1	18	The Vibrio parahaemolyticus effector VOP1 promotes cell cycle arrest, neurite formation and invasion in cultured cells	Yoshihiro Kuroki ¹ , Junji Kuroki ² , Tomohiko Akashi ³ , Akira Sakai ⁴ , Shinya Yasuhara ⁵ , Hisaaki Tsuda ⁶	Laboratory of Genetic Research on Pathogenic Bacteria, International Research Center for Infectious Diseases, Research Institute for Tropical Diseases, Osaka University, Osaka, Japan; National Institute of Health, Tokyo, Japan; National Institute of Health, Tokyo, Japan; National Institute of Health, Tokyo, Japan; National Institute of Health, Tokyo, Japan; National Institute of Health, Tokyo, Japan
	J-0-7-2	28			
C	J-0-8-1	18	Genetic characterization of Vibrio parahaemolyticus isolates recovered from human patients	Yoshitaka Yano ¹ , Rieko Tamoto ² , Hisaaki Tsuda ³ , Shinya Yasuhara ⁴ , Hisaaki Tsuda ⁵	Laboratory of Genetic Research on Pathogenic Bacteria, Research Institute for Tropical Diseases, Osaka University, Osaka, Japan; Department of Pathology, Faculty of Health Sciences, Osaka University, Suita, Osaka, Japan; National Institute of Health, Tokyo, Japan; National Institute of Health, Tokyo, Japan
	J-0-8-2	28			
C	J-0-9-1	18	Characterization of Vibrio cholerae and detection of Vibrio cholerae O1 O139 variants in cholera endemic zones of India	Yoshihiro Kuroki ¹ , Junji Kuroki ² , Tomohiko Akashi ³ , Akira Sakai ⁴ , Shinya Yasuhara ⁵ , Hisaaki Tsuda ⁶	Graduate School of Life Science, Osaka University, Suita, Osaka, Japan; National Institute of Health, Tokyo, Japan; National Institute of Health, Tokyo, Japan
	J-0-9-2	28			
C	J-0-10-1	18	The role of glycine in <i>Salmoneella</i> serovar Typhimurium infection	Yoshihiro Kuroki ¹ , Junji Kuroki ² , Tomohiko Akashi ³ , Akira Sakai ⁴ , Shinya Yasuhara ⁵ , Hisaaki Tsuda ⁶	Department of Microbiology, Kagawa University, Takikawa, Kagawa, Japan; Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita, Osaka, Japan; Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita, Osaka, Japan; National Institute of Health, Tokyo, Japan; National Institute of Health, Tokyo, Japan
	J-0-10-2	28			
C	J-0-11-1	18	Genetic characterization of <i>Staphylococcus aureus</i> found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks	Yoshihiro Kuroki ¹ , Junji Kuroki ² , Tomohiko Akashi ³ , Akira Sakai ⁴ , Shinya Yasuhara ⁵ , Hisaaki Tsuda ⁶	Department of Pathology, Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita, Osaka, Japan; Laboratory of Genetic Research on Pathogenic Bacteria and Pathogenic Microbes, International Research Center for Infectious Diseases and Department of Infection Pathogenesis and Control, National Institute of Health, Tokyo, Japan
	J-0-11-2	28			
C	J-0-12-1	18	Identification of the <i>STX2</i> - and <i>LT28</i> -based <i>Vibrio cholerae</i> O139 variant strains of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> from seafood	Yoshihiro Kuroki ¹ , Junji Kuroki ² , Tomohiko Akashi ³ , Akira Sakai ⁴ , Shinya Yasuhara ⁵ , Hisaaki Tsuda ⁶	Graduate School of Medicine and Center for Southeast Asian Studies, Osaka University, Suita, Japan; Department of Veterinary Science, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Miyazaki, Japan; Institute of Health Sciences, University of Tokushima, Tokushima, Japan; National Institute of Health, Tokyo, Japan
	J-0-12-2	28			
C	J-0-13-1	18	Detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli belonging to clonal sequence 2 serotypes by an <i>STX2</i> - <i>LT28</i> -based method in the laboratory	Yoshihiro Kuroki ¹ , Junji Kuroki ² , Tomohiko Akashi ³ , Akira Sakai ⁴ , Shinya Yasuhara ⁵ , Hisaaki Tsuda ⁶	Graduate School of Medicine and Center for Southeast Asian Studies, Osaka University, Suita, Japan; National Institute of Health, Tokyo, Japan; National Institute of Health, Tokyo, Japan
	J-0-13-2	28			
P	J-4-1	18	Characterization of the stable but noninfectious state in Vibrio cholerae	Yoshihiro Kuroki ¹ , Junji Kuroki ² , Tomohiko Akashi ³ , Akira Sakai ⁴ , Shinya Yasuhara ⁵ , Hisaaki Tsuda ⁶	International Research Center of Osaka University for Infectious Diseases in Tokyo and Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Osaka University
	J-4-2	18	Characterization of Shiga toxin B-subunit toxin domain antibodies	Yoshihiro Kuroki ¹ , Junji Kuroki ² , Tomohiko Akashi ³ , Akira Sakai ⁴ , Shinya Yasuhara ⁵ , Hisaaki Tsuda ⁶	Department of Microbiology, National Institute of Health, Tokyo, Japan; School of Health Science, Aichi University
P	J-4-3	18	Proteomic and transcriptomic analysis of <i>Salmonella enterica</i> serotype Typhimurium patients without history of being infected	Yoshihiro Kuroki ¹ , Junji Kuroki ² , Tomohiko Akashi ³ , Akira Sakai ⁴ , Shinya Yasuhara ⁵ , Hisaaki Tsuda ⁶	Department of Infectious Disease, National Institute of Infectious Diseases, National Institute of Infectious Diseases
	J-4-4	18	Relative effects of stressors on the production of a virulence protease by <i>Salmonella</i> spp.	Yoshihiro Kuroki ¹ , Junji Kuroki ² , Tomohiko Akashi ³ , Akira Sakai ⁴ , Shinya Yasuhara ⁵ , Hisaaki Tsuda ⁶	Inst. Sci. and Tech., Hiogo, Japan

結核・ハンセン病の研究・米側との専門協議

分担研究者 鈴木定彦・北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・教授

研究要旨

アジア地域にまん延している結核並びにハンセン病の対策に資する事を目的として研究を実施し、以下の成果を得た。

1. 結核治療薬イソニアジド (INH) とピラジナミド (PZA) に焦点をあてて、耐性獲得機構および作用機序の解明を目的として研究を進めた結果、*katG* 遺伝子や *ndh* 遺伝子上に INH 耐性に関与すると考えられる新しい変異を見出した。また、PZA とその活性型であるピラジン酸がそれぞれキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼおよびニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼの活性を阻害することを見出した。
2. ミャンマーにおいて従来法により多剤耐性と判定された結核菌株の *katG* 遺伝子、*inhA* 遺伝子並びに *rpoB* 遺伝子を分析した結果、ミャンマーにおける薬剤感受性試験法の精度管理に問題がある可能性を示唆するデータを得た。
3. 結核菌による免疫制御機序について検討した結果、PD-1 シグナル経路は、エフェクターおよびエフェクターメモリーT細胞からの IFN- γ 産生を抑制する強い効果があることを明らかにした。また、セントラルメモリーからエフェクターT細胞への分化制御には、Tim3 を介した抑制性経路が重要な役割を果たすことを明らかにした。
4. 新たな結核ワクチンの開発戦略を得ることを目的とし、研究を進め、結核抗原に対して成熟化した樹状細胞が誘導する CTL はエフェクターメモリー様 CTL であること、この樹状細胞の成熟化には Peptide-25 刺激によって誘導される IL-17F のみを産生するレジデントメモリー様 CD4 T 細胞が重要な役割を果たしていること、並びに IL-17F による樹状細胞の成熟化には CD4 T 細胞が産生するなんらかの共因子が必要であることを明らかにした。
5. ハノイ市の医療従事者 109 名について、インターフェロン (IFN)- γ 遊離試験を実施して潜在性結核感染を推定した。さらに、*IL12RB2* のハプロタイプの違いよりイントロン1のスプライシング効率が違う可能性が見いだし、*IL12RB2* 発現の遺伝的背景の違いによる個体差が結核潜在感染成立に関与している可能性を示した。
6. 結核高蔓延国の一つであるケニア共和国における研究により、HDL-cholesterol と潜在性結核の間に有意な正の相関を確認し、これが LTBI に対するリスク因子の一つであることを明らかにした。さらに、HDL-cholesterol は抗結核免疫において重要な役割を担うマクロファージの TNF- α 産生を著しく抑制することを確認した。
7. 重篤なハンセン病を引き起こすと考えられる *M. lepromatosis* の簡易な判別 PCR 法の確立を目指して、*M. lepromatosis* において 128bp の欠損が存在する *icd1* 標的遺伝子とする heminested-PCR を確立した。
8. らい菌が発現する MMP-I 抗原に着目し、血清中の抗 MMP-I 抗体価を測定する新規血清診断法の開発を試みた。従来の MMP-II 抗原を使用したハンセン病の血清診断法と組み合わせることにより、高感度にハンセン病を診断できる可能性が示唆された。
9. らい反応の予防・制御法への応用を最終的な目的として、らい菌 RNA の変化と多剤併用療法との関連性を試みた。その結果、らい菌 RNA 量が多剤併用療法の進行に伴い減少していることが示された。このことは、らい菌 RNA 量がらい反応と密接な関わりを持つ多剤併用療法の効果を

評価する上で、重要な指標となり得ることを示していた。

A. 研究目的

世界の人口の3分の1が結核菌に感染しており、結核の年間の新規発症者数は860万人と推定されている。また、ハンセン病も発症者数は30万人と推定されている。これらの事実は、研究者の様々な見地からの結核並びにハンセン病の研究を通じた対策への貢献の重要性を示すものである。本研究課題では、9つのアプローチにより、アジア地域にまん延している結核並びにハンセン病の対策に資する事を目的として研究を実施した。

1. アジアの結核対策に資する薬剤耐性機構の解明や新規薬剤の開発に関する研究

薬剤耐性結核菌は結核罹患率の高いアジアでは大きな問題となっている。結核治療の第一選択薬としてイソニアジド (INH)、リファンピシン (RFP)、エタンブトール (EB) ならびにピラジナミド (PZA) が用いられている。薬剤耐性菌の迅速検出法を確立するためには、薬剤の作用機序を明らかにすると共に耐性に関わる遺伝子変異を網羅的に解析する事が重要である。そこで本研究課題では、PZA の作用機序の解明と INH 耐性に係る遺伝子変異の検索を試みた。薬剤耐性菌の迅速検出法確立のためのサーベイランス

2. 薬剤耐性結核菌迅速検出法の確立

薬剤耐性結核菌迅速検出法を確立するためには、耐性に関わる遺伝子変異の網羅的探索が重要である。本研究課題では、ミャンマーにおいて従来法により多剤耐性と判定された結核菌株の *katG* 遺伝子、*inhA* 遺伝子並びに *rpoB* 遺伝子の分析による遺伝子変異の網羅的探索を試みた。

3. 免疫制御経路の阻害が及ぼす BCG ワクチン効果への影響に関する研究

結核菌は宿主に感染後速やかに肺、脾臓、および肝臓に到達して食細胞に貪食されるが、ファゴリソソーム融合阻害や、アポトーシスによる細胞死を制御することにより感染細胞内で増殖する。PD-1 は CD28/B7 ファミリーに属する分子で、シグナルレセプターとして機能し、細胞上の特異的リガンド (PD-L1 と PD-L2) と会合することで、T 細胞抗原レセプターを介するシグナル伝達を阻害することが示されている。これまでの PD-1 欠損マウスを用いた結核菌の感染実験

では、結核菌の感染初期に PD-1 を介した抑制経路が働かないと組織傷害を伴う免疫応答が過剰に誘導され、その結果菌の増殖を制御できなくなることが示されている。そこで本研究では、Th1 細胞の IFN- γ 産生能を指標にして、BCG 接種により誘導される免疫制御機序の全体像を把握することを試みた。

4. 新規結核ワクチン及びアジア諸国でも利用可能な簡便で安価なワクチン効果評価システムの開発

本研究課題はメモリーCTL の分化誘導に必要な樹状細胞の成熟化誘導における IL-17F の役割を明らかにすることで新たな結核ワクチンの開発戦略を得ることを目的とした。

5. ベトナム医療従事者の IL-12 受容体 $\beta 2$ 鎖遺伝子 (*IL12RB2*) 多型と潜在結核感染

結核感染成立後、発病に到るまでの期間は、潜在性結核感染 (LTBI) の状態にあり、最終的に約 5-10% の感染者のみが発病するとされる。この過程には個人差が大きく、結核菌と宿主反応の相互作用が深く関わっているものと推測されている。従来より、抗酸菌感染症に対する宿主の防御能として T helper 1 (Th1) 系 T 細胞による細胞性免疫が重要な役割を果たすとされている。これは、ヒトにおいては、インターフェロン γ (IFN- γ) / インターロイキン 12 (IL-12) の系統の遺伝子異常によるメンデル型の遺伝形式による抗酸菌症の易感染性 (Mendelian susceptibility to mycobacterial disease, MSMD) が存在することが、ひとつの根拠となっている。近年、IL-12 受容体をコードする遺伝子 *IL12RB1* の発現制御にはゲノム上の遺伝子配列の違いだけでなく、スプライシングの違いが注目されている。本研究では、*IL12RB2* 遺伝子においても *IL12RB1* と同様のメカニズムが見られる可能性を考え、*IL12RB2* の遺伝的多型を全エクソン領域で解析するとともに、スプライシングパターンとの関連を検討した。

6. 結核菌感染の状況と感染リスクのメカニズム

活動性結核に対するリスク因子は、HIV 感染、流行地への旅行、居住環境、栄養状態、職業など様々な因子が報告されているが、

LTBI に対するリスク因子は未だ報告されていない。そこで本研究は、結核の高蔓延国であるケニア共和国において、LTBI の検出および、リスク因子の特定、さらにリスクのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

7. MMP-I 抗原を使用したハンセン病の

血清診断法の検討

少菌型ハンセン病 (PB leprosy) においては病変部の *M. leprae* が検出されることが知られており、PB leprosy の診断は極めて困難である。そこで、少菌型ハンセン病の高感度での診断法を開発することを目的とした。

8. ハンセン病のもう一つの病原菌 *M.*

lepromatosis の簡易検出法に関する研究 *Mycobacterium lepromatosis* の簡易 検出法に関する研究

ハンセン病の病原菌は、らい菌 *Mycobacterium leprae* (ML) のみが知られてきたが、2008 年もう一つの病原菌として、*M. lepromatosis* (MLT) が報告された。本菌は、ハンセン病の重篤な病型である Diffuse form of lepro matous leprosy (DLL) の 2 患者より同定された。DLL は、進行すると、皮膚の内皮浸食、血管閉塞、広範な皮膚病変、肝・脾臓の浸蝕を主徴とする 1825 年に報告された Lusio 現象を呈し、さらに進行すると四肢末端の潰瘍形成、致死的細菌感染を起こし死の機転をとるとされる。また、このような症状を示すハンセン病は、メキシコ、カリブ諸国に多くみられることが知られている。MLT はこのような症例より同定されたため、病原性が強い可能性が示唆されたが、その細菌学的、分子生物学的詳細は不明な点が多く、疫学のための基本的情報も未整備の状況である。そのため、簡易な ML と MLT の判別 PCR を確立し、疫学調査に資することを目的とした。

9. アジアにおけるハンセン病早期病型診 断法の開発

ハンセン病の治療には、起因細菌であるらい菌に対する多剤併用療法 (MDT) が導入されており、新患者の劇的な減少という顕著な効果を挙げている。しかしながら、一

部の患者において、いわゆる多剤併用療法の副作用である”らい反応”が起こることがあり、ハンセン病治療における大きな問題となっている。らい反応は、多剤併用療法によって生じたら菌の死菌菌体が引き起こす過剰な免疫反応であり、時に深刻な症状を呈する。従って、らい反応の予防及び制御は、特に患者数の多いアジア等の発展途上国において極めて重要であるが、現在のところその効果的な手法は確立されていない。本研究では、ベトナムのハンセン病病院と共同で、現地の設備環境に適したらい反応の予防法を開発することを最終的な目的とした。本年度は、初段階として、らい反応の予測指標となり得るらい菌核酸類、特に RNA を安定的且つ特異的に単離精製する方法を確立し、これらを用いて多剤併用療法の経時的な効果を評価すること試みた。

B. 研究方法

1. アジアの結核対策に資する薬剤耐性機 構の解明や新規薬剤の開発に関する研 究

1-1. INH 耐性獲得機構に関する研究

台湾で分離された、既知の遺伝子変異を持たない 11 株の INH 耐性結核菌のゲノム DNA を抽出した後、次世代シーケンサー (MiSeq 並びに HiSeq) によりゲノム解析を行った。得られたゲノム情報に基づいて、*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株をレファレンス株とした SNP 解析を行い、変異箇所を同定した。

1-2. PZA の作用機序に関する研究

MtQAPRTase と MtNAPRTase を大腸菌内で発現させた後、FPLC を用いて精製した。得られた精製 MtQAPRTase と MtNAPRTase に対する PZA と POA の阻害活性を HPLC により測定した。また、MtQAPRTase と MtNAPRTase の立体構造情報に基づいて PZA と POA の結合部位をドッキングシミュレーション解析により推定した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

2. 薬剤耐性結核菌迅速検出法の確立

2-1. 分離結核菌株

ミャンマー保健省医学研究局において分

離された結核菌のうち培養法により多剤耐性と判定されたもの 178 株を用いた。

2-2. 遺伝子変異の検出

DNA 抽出は常法に従って実施した。抽出 DNA を鋳型として、*katG* 遺伝子、*inhA* 遺伝子並びに *rpoB* 遺伝子を PCR 法により増幅した後、サンガー法により塩基配列を決定し、感受性菌株の遺伝子配列と比較する事により、INH 並びに RFP 耐性に関連する遺伝子変異を同定した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

3. 免疫制御経路の障害が及ぼす BCG ワクチン効果への影響に関する研究

3-1. 感染実験

C57BL/6 マウスに BCG (10^4 cfu) を皮下接種した。その 4 週後に、結核菌 (10^3 cfu) を経鼻感染させ、感染 2 週および 4 週後に肺を回収した。また、C57BL/6 マウスに直接結核菌を感染させ、2 週および 4 週後に肺を回収した。肺ホモジネートを作製し、遠心分離後に上清中の IFN- γ 、TNF- α 、IL-12/23p40、IL-17A、IL-6、IL-10、MCP-1 (CCL2)、RANTES (CCL5)、KC (CXCL1)、MIP-1 α (CCL3)、MCP-3 (CCL7)、および IP-10 (CXCL10) 産生量を ELISA 法で測定した。

3-2. IFN- γ 産生応答

C57BL/6 マウスに BCG (10^4 cfu) を皮下接種し、8 週後に脾臓を回収した。赤血球を破壊した後、脾細胞懸濁液 (5×10^6 cells/ml) を調製し、24 穴培養プレートに加えた (1ml/well)。IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1R1、PD-1、C3、Tim-3、CTLA-4、または IFN- γ に対する中和抗体存在下に PPD で 2 日間刺激し、培養上清を回収した。培養上清中の IFN- γ 産生量は ELISA で測定した。さらに別の実験では、BCG 接種 8 週後のマウスより回収した脾細胞を各種抗体存在下に PPD で 7 日間刺激した。生細胞を回収し、正常マウス脾細胞から得た抗原提示細胞を加えた後 PPD でさらに 2 日間刺激した。培養上清を回収し、IFN- γ 産生量を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、マウスを用いた感染動物実験を含み、実験は京都大学動物実験指針に基づいて行われた。

4. 新規結核ワクチン及びアジア諸国でも利用可能な簡便で安価なワクチン効果評価システムの開発

4-1. Peptide-25 及び CD4 T 細胞との共培養で成熟化した樹状細胞が誘導する CTL の phenotype の検討

Peptide-25 特異的 TCR を発現する Tg マウス (P25 TCR-Tg) 脾臓細胞より CD4 T 細胞 (P25-CD4 T 細胞) を、OVA 特異的 TCR を発現する Tg マウス (OT1) 脾臓細胞より CD8 T 細胞 (OT1-CD8 T 細胞) を、C57BL/6 脾臓細胞より樹状細胞を調製した。樹状細胞に OVA を取り込ませる際に Peptide-25 と P25-CD4 T 細胞を共存させて 1 日培養することで樹状細胞の成熟化を誘導した。成熟した樹状細胞と OT1-CD8 T 細胞と培養し、3 日後に OT1-CD8 T 細胞から mRNA を調製し、Blimp1、Bcl-6 mRNA の発現を Real-Time PCR 法に検討した。

4-2. エフェクターメモリー様 CTL (TEM) 分化誘導における IL-17F のマウス生体内での役割の検討

Peptide-25 と OVA または OVA のみをフロイント不完全アジュバントに懸濁し、C57BL/6 マウスまたは IL-17F 欠損マウス (C57BL/6 バックグラウンド: 琉球大学 梅村正幸博士より分与) の背部皮下に免疫した。免疫 4 週後に回収した脾臓細胞を OVA 遺伝子導入 EL-4 胸腺腫細胞 (E. G7) と 5 日間 *in vitro* で培養した後、生細胞を回収しエフェクター細胞とした。標的細胞として CFSE 標識 E. G7 を、その対照として CFSE 標識 EL-4 を使い、各種濃度のエフェクター細胞と 4 時間共培養し、CFSE (生細胞認識蛍光色素) 及び 7AAD (死細胞認識蛍光色素) の輝度を指標とし、CTL 活性を評価した。

4-3. IL-17F による樹状細胞成熟化誘導機序の解析

樹状細胞を Peptide-25 または TCR に対して低親和性であり、Th2 免疫応答を誘導する活性を有している Peptide-25 変異体 APL:G248A 及び OVA 存在下に P25-CD4 T 細胞と共培養する際にリコンビナント (r) IL-17F を添加した。培養 1 日後の OVA を取り込んだ樹状細胞上の IL-17 受容体 (R) A 鎖、CD70、H-2D^b、H-2K^b の発現量を FACS

にて、IL-17RB 鎖の発現量を Real-Time PCR 法にて定量した。

(倫理面への配慮)

実験に供したマウスの飼育、維持は国立感染症研究所の実験動物指針に従い実施した。

5. ベトナム医療従事者の IL-12 受容体 $\beta 2$ 鎖遺伝子 (*IL12RB2*) 多型と潜在結核感染

ベトナム ハノイ市における国際共同研究の一環として本研究を行った。109 名の研究参加者(医療従事者)のうち、インターフェロン γ (IFN γ) 遊離試験で LTBI ありと判断された医療従事者 41 名、LTBI なしと判断された 68 名について、採血直後に RNA 安定化剤を付加して凍結保存した全血より total RNA を抽出し、研究に使用した。また血球からゲノム DNA を抽出した。

昨年度既に解析が行われたプロモーター領域の遺伝的多型に加え、今年度は、プロモーター解析の結果から代表的なハプロタイプを持つ検体を選択した上で、それらについて、*IL12RB2* の 16 個のエクソン、および、それらのエクソンとイントロンの境界部分を、ゲノム DNA から PCR により増幅し、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。

発現量解析においては、total RNA を SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) と random nonamer で逆転写し、TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Hs00155486_m1) を用いたリアルタイム RT-PCR にて、*IL12RB2* 発現量を解析した。コントロールには *GAPDH* を用い mRNA 相対発現量を $\Delta \Delta Ct$ 法により求めた。スプライシングの解析には、エクソン 1, 3, イントロン 1 に設置したプライマーを用い、RT/PCR とアガロースゲル電気泳動で増幅産物のサイズ確認、PCR 産物のダイレクトシーケンスによるエクソン接合部位の同定を行い、さらに、SYBR Green を用いたリアルタイム PCR での発現量測定を行った。

(倫理面への配慮)

研究計画については、両国の倫理委員会の承認を得た上で実施した。研究対象者に対する説明を十分に行った上で、研究への同意を書面で得た。

6. 結核菌感染の状況と感染リスクのメカニズム

6-1. LTBI の検出

本研究において対象とした population はケニア共和国の Mbita 地区においてランダムに 7 校が選別された standard4 を対象とし、調査を行った。調査対象とした項目は LTBI の検出、血液検査および健康調査とした。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 (Early Secreted Antigenic Target 6 kDa protein; ESAT6、10 kDa culture filtrate protein; 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により行った。また ConcanavalinA (ConA) を陽性コントロールとして用いた。

6-2. リスク因子の特定

上記の LTBI および血液検査の結果を用い、統計解析することにより、LTBI に対するリスク因子の特定を行った。

6-3. In vitro における解析

次に上記により推定されたリスク因子が、マクロファージのサイトカイン産生に与える影響について、ヒト由来細胞株である THP-1、BCG Tokyo 株を用い、検討した。HDL-cholesterol は、健常人の末梢血から、密度勾配遠心法にて採取した。THP-1 を Iphorbor myristate acetate (PMA) を 100 nM になるように添加、24 時間、CO₂ インキュベーターで静置することにより、マクロファージ様細胞へと分化させた。分化後、HDL-cholesterol を培地に添加し、24 時間、CO₂ インキュベーターで静置。24 時間後、調整した菌液を well に添加し、3 時間 CO₂ インキュベーターで静置 (MOI=10)。3 時間後、菌液を除去し、細胞を培地で 3 回洗浄する。洗浄後、任意の時間に培養上清を回収し、ELISA 法にて TNF- α 産生量を測定した。

(倫理面への配慮)

ケニア共和国中央医学研究所で人検体を用いた研究計画書の倫理申請を行い、検者に対してインフォームドコンセントを得て検体を取得し研究を行った。

7. MMP-I 抗原を使用したハンセン病の血清診断法の検討

抗酸菌 *M. smegmatis* に MMP-I を強制発現させ、組換え MMP-I 蛋白質を精製しこれを

抗原として使用した。日本人の MB leprosy (n=72)、PB leprosy (n=72)、および対照群として健康人 (n=78) を使用し、各血清中の抗 MMP-I 抗体価を測定した。ELISA 法を用い、組換え MMP-I 抗原をコートしたプレートに各血清を加え、MMP-I 抗原に結合する血清中の抗 MMP-I 抗体量を吸光度により測定した。抗 MMP-I 抗体量の陽性・陰性を判別する閾値は ROC カーブ解析により決定した。対照として MMP-II 抗原に対する血清中の IgG 抗体量も測定し、MMP-I によるハンセン病血清診断法と MMP-II 血清診断法の感度を比較し、その差をマクネマー検定により解析した。

(倫理面への配慮)

血清はインフォームド・コンセントを行い採取した。また、当研究は国立感染症研究所の倫理審査委員会により承認されている。

8. ハンセン病のもう一つの病原菌 *M. lepromatosis* の簡易検出法に関する研究

これまで報告されている ML および MLT の塩基配列を基に PCR 産物の大小により判別のできる領域を検索した。その結果、pseudo gene である isocitric dehydrogenase 1 をコードする *icd1* 領域に MLT (Acc. # EU839557) において ML (ML0684) と比較し 128-bp の欠失が存在した。この領域を挟む形で複数の primer を設計し、ML、MLT 及びその他の抗酸菌のゲノム DNA を用い、nested PCR の特異性等の検討を行い、さらに、増幅遺伝子産物の遺伝子配列の検討を行った。

(倫理面への配慮)

菌ゲノムによる研究のため該当なし

9. アジアにおけるハンセン病早期病型診断法の開発

ベトナムのビンディン省に位置するクイホーハンセン病病院において、多剤併用療法の各段階のハンセン病患者から、らい菌を含む生体試料を採取し、核酸安定化剤で満たし保存した。生体試料を強固な細胞壁破碎用のジルコニアビーズと簡易的な攪拌工程で物理的に破壊後、らい菌のゲノム DNA 及び rRNA をそれぞれに対応した核酸抽出試薬によって単離精製した。らい菌 rRNA は逆転写反応により cDNA へと合成・変換した。

らい菌由来の hsp18、16SrRNA 及び RLEP 領域をターゲットとした real-time PCR を cDNA 及びゲノム DNA を鋳型として実施した。

(倫理面への配慮)

ハンセン病患者由来の生体試料を用いる実験は、国立感染症研究所倫理委員会の審査を受けた。らい菌含有生体試料提供者のプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないように配慮し、いかなる個人情報も漏出しないように注意を払った。

C. 研究結果

1. アジアの結核対策に資する薬剤耐性機構の解明や新規薬剤の開発に関する研究

1-1. INH 耐性獲得機構に関する研究

台湾で分離された INH 耐性結核菌のゲノムを用いた SNP 解析の結果から、INH 耐性に関わることがこれまでに報告されている遺伝子上で新しい変異を 16 カ所同定した (Table)。特に INH 耐性に重要な *katG* 遺伝子と *ndh* 遺伝子上でそれぞれ 5 カ所と 1 カ所の新規変異を見出した (Table)。

Table. こまでに INH 耐性との関連が報告されている遺伝子において新たに見出した変異

Gene	Mutation	
	Nucleotide N.	Amino Aid
<i>Rv1592c</i>	963_964del	Glu321_Ile322
	AAinsGG	delinsGluVal
<i>ndh</i>	T→C position 2	Ile68Thr
<i>katG</i>	G ad A inserted after position 3	Frameshift
	G→A position 3	Gly111Asp
<i>katG</i>	C→A position 16	Ala479Glu
<i>katG</i>	C→A position 53	His561Gln
<i>katG</i>	G→A position 25	Gly712Asp
<i>Rv1909co</i>	A→G position 1	Thr37Ala
<i>Rv2247</i>	G→A position 9	Glu7Lys
<i>Rv3795</i>	A→G position 9	Met306Val
<i>Rv3795</i>	A→C position D1	Asp354Ala
<i>Rv3795</i>	G→A position 26	Gly406Ser
<i>Rv3795</i>	A→G position 40	Gln497Arg
<i>Rv3795</i>	A→G position 53	Ser565Gly
<i>Rv3795</i>	G→C position B7	Gly603Arg
<i>Rv3795</i>	A→A position 30	Asp1024Asn

1-2. PZA の作用機序に関する研究

阻害活性測定野結果から、PZA が MtQAPRTase の活性を、POA が MtNAPRTase の活性をそれぞれ阻害することを明らかにし

た (Figure 1)。また、ドッキングシミュレーション解析の結果から、PZA と POA はそれぞれ MtQAPRTase と MtNAPRTase の基質結合部位に結合して活性を阻害していることが示された。

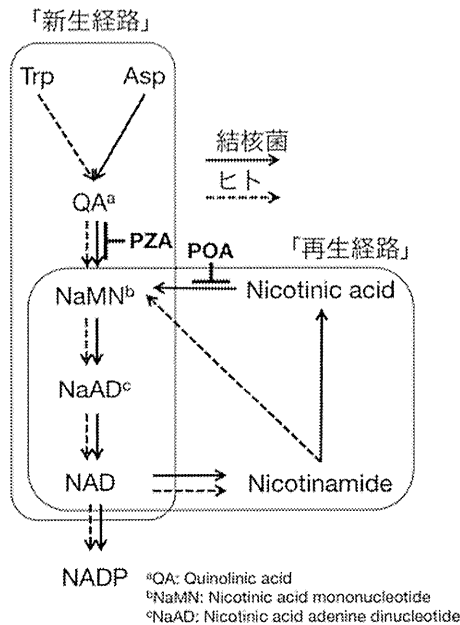


Fig 1. NAD 生合成経路と PZA/POA 作用機序

2. 薬剤耐性結核菌迅速検出法の確立

ミャンマー保健省医学研究局において分離された 178 株の多剤耐性結核菌株の *katG* 遺伝子、*inhA* 遺伝子並びに *rpoB* 遺伝子の塩基配列を分析し、INH 並びに RFP 耐性に係る遺伝子変異を検索した。その結果、約 29.5%の株において *katG* 遺伝子、*inhA* 遺伝子の両方に遺伝子変異が見出されなかった。また、33.1%の株において *rpoB* 遺伝子上に変異が見出されなかった。

3. 免疫制御経路の阻害が及ぼす BCG ワクチン効果への影響に関する研究

3-1. BCG で誘導される感染防御の制御

マウスに結核菌を経鼻感染させると、4 週後の肺では強い炎症性サイトカイン (IFN- γ 、IL-17A、TNF- γ 、IL-6 および IL-12/23p40) およびケモカイン (MCP-1、RANTES、KC、MIP-1 α 、MCP-3、および IP-10) 産生が誘導された。しかし、抑制性サイトカインである IL-10 の産生は認められなかった。一方、BCG 接種 4 週後のマウス

に結核菌を感染させた場合、結核菌感染 2 週間には著明なサイトカインおよびケモカイン産生が観察された。しかし、結核菌感染 4 週間では、多くのサイトカインおよびケモカイン産生レベルが結核菌のみを感染させたマウスで見られたレベル以下であった。この結果から、BCG 接種により強い防御免疫が出現するが、それと同時に免疫応答の抑制に関わる制御機序も亢進されることが示された。

3-2. BCG で誘導される感染防御の制御機序の解析

BCG 接種後に誘導される T 細胞機能制御のメカニズムを解析するため、マウスに BCG を接種し、制御機序が出現する 8 週後の脾 T 細胞を *in vitro* で PPD 刺激した。その際、各種免疫抑制経路の阻害抗体を添加して、T 細胞機能制御にどのような機序が関与しているのかを抗原特異的 T 細胞からの IFN- γ 産生量を指標に解析した。脾 T 細胞を PPD で 2 日間刺激することにより BCG に特異的なエフェクターおよびエフェクターメモリー T 細胞の機能を調べたところ、IL-1 α 、IL-1 β や IL-1R1 に対する抗体は T 細胞機能に影響しないことが示された。また、抑制性シグナル分子として知られる CTLA-4 や Tim-3 に対する抗体の処理によっては IFN- γ 産生に有意な変化は認められなかった。一方、抗 PD-1 抗体を添加した場合には著明な IFN- γ 産生の増強が認められた。従って、PD-1 シグナル経路はエフェクター T 細胞の機能を抑制することで BCG 感染後期の免疫制御に関与することが示された。さらに、セントラルメモリーからエフェクター T 細胞への分化に対する影響を調べるため、BCG 感作マウスの脾 T 細胞を各種抗体存在下に PPD で 7 日間刺激した。その後、得られた T 細胞のエフェクター T 細胞としての能力を PPD 刺激に対する IFN- γ 産生量で解析したところ、抗 PD-1 抗体は T 細胞の分化に影響を及ぼさなかったが、抗 Tim-3 抗体処理により IFN- γ 産生が有意に増強することが示された。一方、C3 および I 型 IFN に対する抗体で処理した場合に IFN- γ 産生が抑制された

ことから、これらが関与するシグナル経路が BCG 感染後期の T 細胞分化に関与することが明らかになった。

4. 新規結核ワクチン及びアジア諸国でも利用可能な簡便で安価なワクチン効果評価システムの開発

4-1. Peptide-25 及び CD4 T 細胞との共培養で成熟化した樹状細胞が誘導する CTL の phenotype の検討

未感作 CD8 T 細胞が CD4 T 細胞の 'Help' 存在下に成熟化した樹状細胞によって抗原提示を受けるとエフェクター CTL へと分化し、一部はさらにメモリー CTL へと分化すると考えられている。メモリー CTL はさらに末梢の非リンパ組織に移行する TEM と 2 次リンパ組織に留まるセントラルメモリー CTL (TCM) に分類される。TEM は転写抑制因子 Blimp1 陽性、Bcl-6 陰性であるのに対し、TCM は Bcl-6 陽性であることが報告されている。そこで、Peptide-25 及び P25-CD4 T 細胞との共培養によって成熟化した樹状細胞によって分化誘導された機能的 CTL の Blimp1 及び Bcl-6 mRNA の発現様式をリアルタイム PCR 法にて検討した。その結果、未感作 CD8 T 細胞に比べ Peptide-25 によって誘導された機能的 CTL では blimp1 mRNA の発現が 3.4 倍に増強されたのに対し、bcl-6 mRNA の発現は 0.7 倍に減弱した。

4-2. TEM 分化誘導における IL-17F のマウス生体内での役割の検討

これまでの *in vitro* 実験系の解析から Peptide-25 と P25-CD4 T 細胞及び OVA 存在下に樹状細胞を培養する際に IL-17F の中和抗体を添加すると IL-17F の中和抗体用量依存的に OVA 特異的 TEM の分化頻度が低下することを明らかにしている。

そこで、マウス生体内での Peptide-25 による TEM 分化誘導における IL-17F の役割に関して IL-17F 欠損マウスを用いて検討した。Peptide-25 と OVA または OVA のみをフロイント不完全アジュバントに懸濁し、IL-17F 欠損マウスに皮下接種し、4 週後の OVA 特異的 CTL 活性を CFSE 及び 7AAD を用いた FACS 解析にて検討した。その結果、OVA 単独免疫によって誘導される OVA 特異的 CTL 活性は正常マウスに比べ IL-17F 欠損マウスでは有意に低下していた。さらに正

常マウスで見られる Peptide-25 による OVA 特異的 CTL 活性の増強効果は IL-17F 欠損マウスでは完全に消失していた。

4-3. IL-17F による樹状細胞成熟化誘導機序の解析

IL-17F による樹状細胞の成熟化誘導機序に関して *in vitro* 実験系で解析した。これまでの解析から IL-17F 産生 CD4 T 細胞の分化を誘導できない APL での刺激系に rIL-17F を加えてもグランザイム B を産生できる TEM の分化は誘導できないことから、Peptide-25 を介して CD4 T 細胞と相互作用した樹状細胞のみが機能的 IL-17F 受容体を発現している可能性が考えられた。そこで、樹状細胞を Peptide-25 または APL 及び OVA 存在下に P25-CD4 T 細胞と共培養する際に rIL-17F を添加し、1 日後の樹状細胞上の IL-17RA 鎖及び B 鎖の発現量を定量した。その結果、いずれのペプチドを用いても A 鎖、B 鎖共に同程度発現していることが明らかとなった。

さらに樹状細胞の成熟化の程度の指標である CD70、抗原提示能の指標である H-2D^b、H-2K^b の細胞表面発現量を比較検討した結果、Peptide-25 と APL 間、Peptide-25 と Peptide-25+rIL-17F 間で有意な差は認められなかった。

5. ベトナム医療従事者の IL-12 受容体 β2 鎖遺伝子 (IL12RB2) 多型と潜在結核感染

表 1 に示すように、エクソン 1、5' -untranslated region 内に 2 つの単塩基多型 (SNP)、エクソン 14 とエクソン 16 にそれぞれ同義置換 SNP を 1 つずつ見いだした。

表 1 ベトナム人における IL12RB2 遺伝子多型スクリーニング
Screening of IL12RB2 polymorphisms in the Vietnamese

upstream	rs12109042	T/T	-1048	ATATTTGGGS...TTTTTTTGTGA
upstream	rs2762325	A/G	-1835	TTTTTGTAAACAGATAAAGAAAA
upstream	rs11976006	T/C	-1823	TTTGTA AAAA...TTTAAAGAAATA
upstream	rs3762316	A/G	-1623	TAAAGAAAATACACTCACTTTA
upstream	rs3834764	G/A	-650	GAGGGGGGGG...ACTTA AAAAA
upstream	rs3762317	A/G	-464	ATAATGSTATACCTTADAATY
Exon1	rs12142823	C/T	5'UTR	GTGGAAACCACTTGGGCCCCC
Exon1	rs11209046	T/C	5'UTR	AGGCGACAGGTCGGTGAATGAC
Exon14	rs2228420	G/A	Synonymous*	TTTTCTCAAC...CATTACTCC
Exon16	rs2228546	G/A	Synonymous**	ACCCAAAGCC...GAAACCCAG

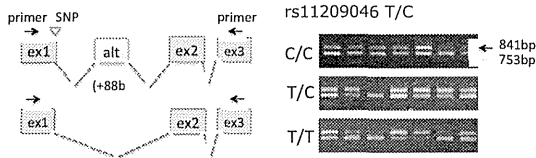
*ACG(Thr)ACAC(Thr), **CCC(Pro)CCAC(Pro)

HapMap database (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) のアジア人 (CHB と JPT) のデ

ータで連鎖不平衡ブロック構造を検討すると、プロモーター領域からイントロン1までが、強い連鎖不平衡の及ぶ範囲であり、今回のベトナム人での結果も同様の傾向であった。この結果から、非同義置換など発現に影響が予想される多型は新たには見いだされず、プロモーターからイントロン1までの範囲の連鎖不平衡ブロック内の多型が発現の個体差に関わると考えられた。

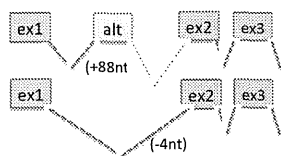
NCBI databaseには、イントロン1内に88塩基長のalternate exonがあるtranscriptが複数登録されている。翻訳開始コドンはイントロン2にあるので、このalternate exonは5' 非翻訳領域になる。エクソン1、エクソン3にプライマーを置いてRT/PCRとアガロースゲル電気泳動を行い、alternate exonの有無を増幅産物のサイズでみたところ、エクソン1のsplice donor近傍のSNP (rs11209046) の遺伝子型による一定の傾向はみられなかった (図1)。

図1 イントロン1内の alternate exonの RT/PCRによる検出と、エクソン1内SNPの遺伝子型



しかしながら、この PCR 産物を両方向からダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定したところ、この alternate exon の有無だけではなく、エクソン2の splice acceptor の位置が、databaseにあるものだけではなく、それより4塩基下流である variant があることがわかった (図2)。

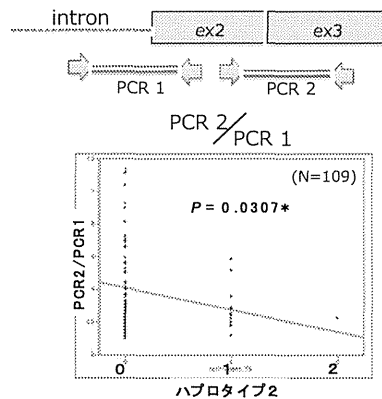
図2 IL12RB2 イントロン1の スプライシング・パターン



イントロン1は約12kbの長さがあり、このような alternate exon の有無、さらには splice acceptor の位置の相違から、そのスプライシング効率はあまり良くなく、

intron retention が起きている可能性が考えられた。図3に示すように、効率良く splicing が行われているとシーケンス結果から判断されるエクソン2~エクソン3と、intron retention が起きれば検出量が多くなるイントロン1~エクソン2をそれぞれ SYBR green を用いたリアルタイム RT/PCR で増幅し、その発現比を求めた。尚、total RNA 抽出時には DNase によって混入したゲノム DNA は消化してあるので、この PCR にてゲノム DNA の増幅はない。その結果、LTBI の有無で intron retention の割合に違いはみられなかったが、プロモーターの多型のハプロタイプ3を有する検体で、intron retention の割合が多い傾向があった。

図3 intron retention とハプロタイプ



6. 結核菌感染の状況と感染リスクのメカニズム

6-1. LTBI の検出

ケニア共和国における、本研究エリアの学生 (standard4) 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、これら結核菌抗原に対して反応性を示した者を LTBI 群と定義した。またこれら75名全て ConA に対して反応性を示した。

6-2. リスク因子の特定

上記の結果と血液検査の結果を用い、統計解析を行ったところ、LTBI と HDL-cholesterol との間に有意な正の相関が確認され ($p=0.028$)、HDL-cholesterol が LTBI のリスク因子の一つであることが

示唆された。

6-3. リスク因子がサイトカイン産生に与える影響

次に我々は上記により LTBI のリスク因子として示唆された HDL-cholesterol の抗結核免疫に与える影響について、in vitro において解析を行った。抗結核免疫においては、結核菌の感染細胞であるマクロファージからのサイトカイン産生が非常に重要であることが知られ、なかでも TNF- α は、主要なマクロファージ活性化サイトカインであり、マウス、ヒトともに重要な役割を担うことが証明されている。そこで HDL-cholesterol が、マクロファージの TNF- α 産生に与える影響について検討した。その結果、コントロール群においては、BCG 感染 24 時間後に約 6,500 pg/ml の TNF- α 産生が認められたが、培地に HDL-cholesterol (50 ug/ml) を添加した群では 200 pg/ml 程しか TNF- α の産生を確認できなかった。つまり HDL-cholesterol は、BCG 感染の際に産生される TNF- α の産生を著しく抑制することが明らかとなった。

7. MMP-I 抗原を使用したハンセン病の血清診断法の検討

7-1. 健康人の血清における MMP-I 血清診断法と MMP-II 血清診断法の比較

78 検体について血清中の抗 MMP-I 抗体陽性率と抗 MMP-II 抗体陽性率を比較した。抗 MMP-I 抗体陽性率は 2.6 %、抗 MMP-II 抗体の陽性率は 11.5 %であった。マクネマー検定による両者の陽性率の差を検定した P 値は $P = 0.0654$ であり、有意な差は見られなかった。

7-2. MB leprosy 血清における MMP-I 血清診断法と MMP-II 血清診断法の比較

72 検体について血清中の抗 MMP-I 抗体陽性率と抗 MMP-II 抗体陽性率を比較した。抗 MMP-I 抗体陽性率は 86.1 %、抗 MMP-II 抗体の陽性率は 80.6 %であった。マクネマー検定による P 値は $P = 0.3877$ であり、有意な差は見られなかった。

7-3. PB leprosy 血清における MMP-I 血清診断法と MMP-II 血清診断法の比較

72 検体について血清中の抗 MMP-I 抗体陽性率と抗 MMP-II 抗体陽性率を比較した。抗 MMP-I 抗体陽性率は 25.6 %、抗 MMP-II 抗体

の陽性率は 41.0 %であった。マクネマー検定による P 値は $P = 0.0518$ であり、有意な差は見られなかった。

7-4. 詳細な解析

上記 7-2, 7-3 で得られた結果を図 1 にプロットした。横軸に抗 MMP-I 抗体の抗体量、縦軸に抗 MMP-II 抗体の抗体量をとり、各血清の値をプロットしている。また、グラフ中の縦線、横線はそれぞれ抗 MMP-I 抗体、抗 MMP-II 抗体の陽性・陰性の閾値である。MB leprosy と比較して、PB leprosy は MMP-I、MMP-II がともに陽性という血清が少なく、MMP-I、MMP-II のいずれかが陽性であるという血清の割合が相対的に高いことが分かる。このことから、PB leprosy 群においては MMP-I の血清診断法により陽性と診断される群と MMP-II の血清診断法により陽性と診断される群が異なる可能性が示唆された。したがって、血清一検体につき MMP-I 抗原による血清診断と MMP-II 抗原による血清診断を行い、いずれかが陽性であれば陽性であるという基準により診断を行うことでより高い感度での診断が可能ではないかと考えられた。実際にこの方法により各群の血清の診断を行うと、健康人は 14.1 %、MB leprosy は 91.7 %、PB leprosy は 53.8 % であり高い陽性率が得られた。

8. ハンセン病のもう一つの病原菌 *M. lepromatosis* の簡易検出法に関する研究

報告されている塩基配列を基に複数の primer pair を設計し ML および MLT のゲノム DNA により検討を行い、予想される大きさの増幅産物が得られた。次に、抗酸菌の各種 ORF 塩基配列による系統樹解析で、他の抗酸菌種より常に ML の近傍に位置する *M. haemophilum* およびその次に位置することの多い結核菌群に属する *M. bovis* BCG のゲノム DNA を用い、PCR の種特異性検討を行った。その結果、*M. haemophilum* ゲノム DNA では、複数の primer pair において、遺伝子産物の増幅が見られた。BCG ゲノムでは、いずれの primer pair を用いても増幅は見られなかった。*M. haemophilum* の *icdI* 塩基配列は未だ報告されていない。そのため得られた PCR 産物の遺伝子配列解析を行い、ML、MLT および *M. haemophilum* の相同性を検討した。

次にその情報を基に primer pair の設計を行い nested PCR の系を検討した。その結果 F icd1-1、R icd1-1 の primer pair では ML で、370bp、MLT では 246bp さらに F icd1-1、R icd1-2 の primer pair では ML で、274bp、MLT では 150bp の増幅産物が得られ判別が可能であった(図)。

図. 判別 heminested PCR 法による電気泳動像

9. アジアにおけるハンセン病早期病型診断法の開発

多剤併用療法の実施前後のハンセン病患者から抽出したらい菌 RNA 画分を鋳型として、hsp18 及び 16SrRNA を増幅した結果、逆転写反応 (RT) を実施した場合のみそれぞれに相当する分子量を示すバンドが出現した。このことは、ゲノム DNA の混入なしに、らい菌 RNA が安定的且つ特異的に単離されたことを示している。さらに上記の手法で単離精製したらい菌 RNA 及びゲノム DNA の 16SrRNA と RLEP 領域を増幅、定量化、比較した。その結果、多剤併用療法の進行に伴いゲノム DNA 由来の RLEP 領域及び 16SrDNA 量はほとんど変化がなかったが、16SrRNA 量は減少する傾向が観察された(図)。

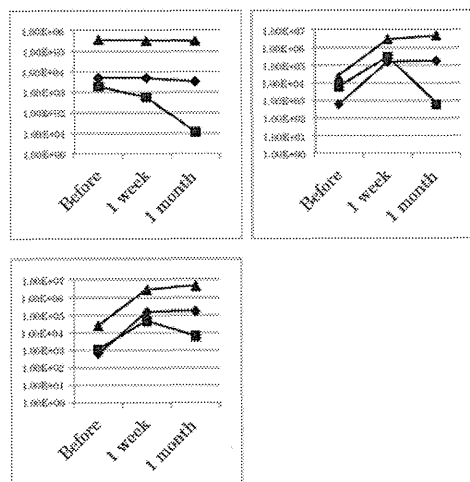


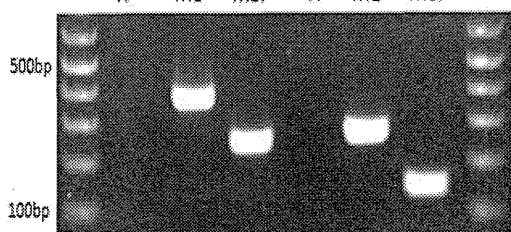
図. 多剤併用療法実施前後のハンセン病患者(3名)由来らい菌 RNA 及び DNA の変化
16SrRNA(■), 16SrDNA(◆), RLEP(▲)

D. 考察

1. アジアの結核対策に資する薬剤耐性機構の解明や新規薬剤の開発に関する研究

katG 遺伝子と *ndh* 遺伝子は INH の作用機序と深く関わっていることから、今回 SNP 解析を行った INH 耐性結核菌で見出された *katG* 遺伝子と *ndh* 遺伝子上の新規変異は、INH 耐性と関わっていることが示唆された。今回得られた知見は、新しい DNA プローブを用いた INH 耐性結核菌の迅速検出法の開発に寄与することが期待される。今後、これらの変異蛋白の機能を解析し、実際に耐性に関与しているかどうかを解析する予定である。一方、MtQAPRTase と MtNAPRTase は結核菌における NAD 生合成経路において重要な役割を担っていることから、NAD 生合成経路が PZA や POA の標的の 1 つであることが示唆された。結核菌とヒトの NAD 生合成経路の一部は異なっていることから、NAD 生合成経路は新規薬剤の標的として考えられている (Figure)。そのため、PZA や POA の構造を基にすることによって、結核菌の NAD 生合成経路を標的とした新規薬剤のデザインに結びつくことが期待される。今後、インシリコスクリーニングなどによって MtQAPRTase と MtNAPRTase の両方の酵素活性を阻害する新規阻害剤のデザインを行う予定である。

Ficd1-1 Ricd1-1			Ficd1-1 Ricd1-2		
H	ML	MLT	H	ML	MLT



産物サイズ

370 246 274 150

2. 薬剤耐性結核菌迅速検出法の確立

解析した 178 株の多剤耐性結核菌株のうち約 29.5%において *katG* 遺伝子、*inhA* 遺伝子の両方に遺伝子変異が見出されず、33.1%の株において *rpoB* 遺伝子上に変異が見出されなかった。バングラデシュにおいて実施した同様の実験においては、*katG* 遺伝子、*inhA* 遺伝子の両方に遺伝子変異が見出されなかった株は僅か 6%、*rpoB* 遺伝子上に変異が見出されなかった株は僅か 5%であった。また、ネパールにおいて実施した同様の実験においても、*katG* 遺伝子、*inhA* 遺伝子の両方に遺伝子変異が見出されなかった株は僅か 5%、*rpoB* 遺伝子上に変異が見出されなかった株は僅か 3%であった。周辺国より報告されている同様なデータでもバングラデシュ、ネパールと同様の低い割合でしか薬剤耐性関連遺伝子変異が検出されない株が見出せなかった。以上の情報をを総合して考えると、ミャンマーにおける結核菌の薬剤感受性試験法の精度が高くないものと推察された。

3. 免疫制御経路の阻害が及ぼす BCG ワクチン効果への影響に関する研究

これまでの解析から、マウスに BCG を接種すると 3 週間後には強い防御免疫が誘導されるが、6 週目以降では、菌が臓器内にまだ存在しているにも拘らず T 細胞機能の明らかな低下が認められている。また、成人結核に対して BCG ワクチンがその効果を有効に発揮できない原因の一つが BCG 接種後に誘導される抑制性機序によることが考えられ、この機序を阻害、あるいは適切にコントロールすることで BCG のワクチン効果を増強できることが期待される。この免疫制御機序を *ex vivo* の実験系を用いて解析したところ、BCG 接種 8 週後では PD-1 を介したシグナル経路が T 細胞機能を抑制することが明らかになった。これまでに慢性ウイルス感染や腫瘍免疫において抗 PD-1 抗体処理により宿主の抵抗性が著明に増強することが示されている。BCG 感染においても PD-1 欠損マウス由来 T 細胞のサイトカイン産生が正常マウス由来の T 細胞よりも強く

誘導されることがわかっている。しかし、PD-1 欠損マウスに BCG 接種してもそれによる感染防御の増強は限定的であったことから、BCG 感染の場合、防御免疫の制御機序には PD-1 以外のシグナル経路が関与することが示唆される。そこで、BCG 接種後の Th1 細胞の機能制御の全体像について解析した。その結果、抗 PD-1 抗体はエフェクター T 細胞への分化に影響を及ぼさなかったが、Tim-3 経路を阻害することにより Th1 細胞の分化が亢進し IFN- γ 産生の明らかな増加が認められた。Tim-3 は PD-1 と同様にエフェクターや機能不全に陥った T 細胞に発現することが示されている。また、T 細胞上に発現した Tim-3 にそのリガンドである galectin9 が会合すると、T 細胞機能が抑制され、T 細胞がアポトーシスやトランスの状態に陥ることが報告されている。従って、エフェクター T 細胞への分化制御には、Tim3 を介した抑制性経路が重要な役割を果たすものと考えられる。一方、抗 C3 抗体を培養系に加える事により、T 細胞分化が抑制されることが示された。最近、活性化 T 細胞が C3 成分を分泌することが報告されている。T 細胞から産生された C3 は C3b に変換された後、抗原と結合して抗原をオプソニン化する。オプソニン化された抗原は T 細胞抗原レセプターによって認識され、同時に C3b は T 細胞表面の CD46 分子に結合してその下流のシグナル経路を活性化する。この C3b と CD46 の結合は、Th1 細胞の増殖やサイトカイン産生応答に重要な役割を果たすことが示されている。これらのことから、C3-CD46 を介したシグナルが BCG 接種後に誘導される T 細胞の分化誘導に重要であることが示唆される。また、本研究では抗 IFN- α/β 抗体処理によりエフェクター T 細胞への分化が抑制されることが示された。これまで、多量に産生された I 型 IFN は Th1 細胞の分化に抑制的に作用することが報告されている。しかし、I 型 IFN は多様な免疫反応の制御に関わっており、正常レベルの I 型 IFN 産生が Th1 型細胞の機能維持に関与する可能性も考えられる。以上の結果

から、BCG 接種後に誘導される T 細胞の機能制御には PD-1 以外の経路も関与することが明らかになった。この機序の全体像を明らかにすることが、ワクチン効果を増強するために必要である。

4. 新規結核ワクチン及びアジア諸国でも利用可能な簡便で安価なワクチン効果評価システムの開発

Peptide-25 及び P25-CD4 T 細胞との共培養で成熟化した樹状細胞は TEM の分化を誘導した。結核感染の場合、感染後の 2 次リンパ組織での獲得免疫の誘導・活性化が他の感染症に比べ遅延するため、結果として感染局所での防御反応が著しく遅延する。したがって、結核ワクチンによって 2 次リンパ組織に留まる TCM への分化が誘導された場合、感染局所での防御反応が誘導されないため、結果として予防効果が発揮できない可能性が考えられる。初回ワクチンによって TEM への分化が効率よく誘導されれば、感染局所での結核菌特異的な CTL の活性化が感染直後に誘導でき、効果的な予防が期待できる。IL-17F によって成熟化した樹状細胞は TEM の分化を効率よく誘導できることから、IL-17F は結核防御に有効な因子であることが示された。このことからワクチン接種後に誘導される IL-17F 産生量を測定するシステムを開発することで簡便な結核ワクチン効果評価システムを提供できる可能性が示唆された。

CTL 分化誘導における IL-17F のマウス生体内での役割を IL-17F 欠損マウスを用いて検討した。その結果、Peptide-25 が誘導する OVA 特異的 CTL 活性の増強効果は IL-17F 欠損マウスでは完全に消失していた。さらに OVA 単独免疫で誘導される OVA 特異的 CTL 活性は野生型に比べ IL-17F 欠損マウスにおいて有意に減弱していた。この事実は機能的 CTL への分化誘導における IL-17F の作用は結核菌体成分である Peptide-25 に特異的な現象ではなく、一般的な蛋白抗原における免疫応答においても IL-17F が重要な役割を果たしていることを示している。

APL 及び P25-CD4 T 細胞との共培養でも CD70 の発現量を指標とした場合には Peptide-25 と同程度の樹状細胞の成熟化が

誘導される。さらに CTL に対する樹状細胞の抗原提示能に重要な H-2D^b 及び H-2K^b の発現量、IL-17RA 鎖及び B 鎖の発現量共に APL と Peptide-25 間では有意な差は認められない。しかしながら APL で成熟化した樹状細胞はメモリー CTL の分化を誘導できない。この事実は IL-17F による樹状細胞の成熟化には CD4 T 細胞が産生する共因子が必要であることを示唆している。この共因子を同定することで、より効果的な結核ワクチンの開発戦略が得られると期待される。

5. ベトナム医療従事者の IL-12 受容体 β2 鎖遺伝子 (IL12RB2) 多型と潜在結核感染

昨年度までの検討で、我々は、*IL12RB2* のプロモーターの遺伝子高発現型として知られるハプロタイプは、非感染群 (n=68) に比して潜在性結核感染群 (n=41) で有意に低頻度であり、また感染群ではこの型と *IL12RB2* 発現量がよく相関していることを見いだした。今年度は、16 個の全エクソン領域で多型のスクリーニングを行ったが、特に機能的意義が想定されるような変異は新たに見いだされなかった。アジア人ではプロモーターからイントロン 1 にかけての連鎖不平衡の強い領域の存在が認められ、この領域のハプロタイプがやはり機能に関連する可能性が考えられた。また、エクソン 1～3 のスプライシングパターンの検討から、イントロン 1 のスプライシング効率がハプロタイプ 3 で悪い可能性が示唆された。今回は、12kb におよぶイントロン 1 の全塩基配列を決定してはならず、直接スプライシングに関わることが考えられるイントロン内の多型は同定されていない。しかし、連鎖不平衡構造から、イントロン内に関連する多型が存在する可能性は高いと考えられる。

最近、次世代シーケンサーによる RNA 解析から、転写産物の多様性の大きさとその重要性が知られるようになってきており、今後、より網羅的に転写産物の発現プロファイルを検討し、多型と発現の関連を明らかにしていく必要があると考えられた。

6. 結核菌感染の状況と感染リスクのメカニズム

我々は本研究より、HDL-cholesterol が