

日本細菌学雑誌

70 ( 2 ) : 309-318, 2015

©2015 日本細菌学会

## 地方衛生研究所における細菌学的検査・研究の最新事情

四宮 博人<sup>1</sup>・勢戸 和子<sup>2</sup>・川瀬 遵<sup>3</sup>・有川 健太郎<sup>4</sup>

船渡川 圭次<sup>5</sup>・鈴木 匡弘<sup>6</sup>・久保田 寛顕<sup>7</sup>・調 恒明<sup>8</sup>

<sup>1</sup> 愛媛県立衛生環境研究所

<sup>2</sup> 大阪府立公衆衛生研究所

<sup>3</sup> 島根県保健環境科学研究所

<sup>4</sup> 神戸市環境保健研究所

<sup>5</sup> 栃木県保健環境センター

<sup>6</sup> 愛知県衛生研究所

<sup>7</sup> 東京都健康安全研究センター

<sup>8</sup> 山口県環境保健センター

<sup>1</sup> 〒790-0003 愛媛県松山市三番町8 丁目234 番地

[ 受理 : 2014 年12 月 ]

地方衛生研究所(地衛研)は、都道府県・政令指定都市等に設置され(現在80か所)、地域における感染症発生動向調査及び食中毒の原因究明等において中心的な役割を担うとともに、国立感染症研究所や国立医薬品食品衛生研究所等との緊密な連携により、感染症・病原体監視の全国的なネットワークを形成している。各種感染症や食中毒等の細菌学的検査・研究は、地衛研の基幹的業務であり、その活動から重要な細菌学的知見が見出されることも多い。本稿では、地衛研を中心とした研究機関における細菌学的検査・研究及び事例経験、特に、食中毒・感染性胃腸炎、結核、薬剤耐性に関して、それぞれの地衛研の研究者から最新知見を報告する。

### 新しい病原因子を標的とした結核ワクチンの開発

#### 1) はじめに

結核は世界的にみると依然として最も重要な感染症の一つである。世界人口の1/3にあたる20億人が結核菌に感染しており、年間約860万人が結核を発症し、約130万人が死亡している。現在使用されているワクチンはBCG株のみで、乳児の85%がこれを接種している。BCG株の予防効果は、1977年イギリスに於ける調査では77%、1980年インド(チングルプット)に於ける調査では0%と一定の評価が得られていない。このような背景からBCG株に代わる新世代ワクチンの開発が急務となっている。

カナマイシンは、結核菌16SリボゾームRNA(16SrRNA)解読領域に結合して翻訳を攪乱する。結核発症者の第二選択薬として重要な薬剤である。結核菌の高度にカナマイシン耐性を獲得した臨床分離株は、16SrRNAが変異しており、それらの変異塩基はカナマイシンの2-デオキシストレ

プタミンと6-アミノグルコースに接合している。一方、カナマイシンの3-アミノグルコースに接合する部位の変異は臨床分離株から報告されていない。このことは、当該変異株が生体内淘汰圧に易感受性となっている可能性を示唆している。また、スメグマ菌の16SrRNAの突然変異は、致命的障害を誘導することが報告されている。そこで、臨床分離株で報告されていない16SrRNA解読領域が変異しているヒト型結核菌：NCGM2242株を分離し、弱毒化及びワクチン効果について評価したので報告する。

## 2) 材料および方法

2-1) 供試菌株：*Mycobacterium tuberculosis* ATCC35801 (Erdman株)、Erdman株由来変異株 (NCGM2242)。

2-2) 供試マウス：BALB/c マウス6～8週令♂。

2-3) 親株Erdmanと変異株NCGM2242の全ゲノム比較解析を実施し、NCGM2242株の変異部位を特定した。

2-4) Erdman株とNCGM2242株に発現する蛋白質を網羅解析し、発現量の変化した蛋白質を特定した。

2-5) Erdman株とNCGM2242株のマウス致死活性、サイトカイン誘導能(サイトカイン網羅解析)、ワクチン効果を確認した。

## 3) 結果および考察

3-1) NCGM2242株の変異部位は、結核菌ゲノム内に1つしか存在しない16SrRNAをコードする *rrs* 遺伝子1399番目のチミンがアデニンに置換した点変異 (U1406A) であった。

3-2) NCGM2242株の蛋白質は、Erdman株に比べ、71種の蛋白質が2倍以上に増加し、361種の蛋白質が1/2以下に減少した。NCGM2242株のリボソーム結合蛋白質 (KsgA, IF-3, RbfA) が、過剰に発現しており、未成熟なリボソームが増加した。蛋白質合成破綻の一つにantigen85複合体を含むミコール酸合成酵素群の発現低下があり、これにより細胞壁成分メトキシミコール酸の相対質量半減等、ミコール酸組成の変化が誘導された。さらに、NCGM2242株は、酸性環境 (pH 4.6)、及び一酸化窒素暴露に対して顕著な抵抗性低下を呈し、細胞内寄生の破綻を来した。

3-3) Erdman株 ( $2.0 \times 10^6$  CFU/mouse) をBALBマウスに接種すると、108日後に全てのマウスが死亡したが、NCGM2242株 ( $2.0 \times 10^7$  CFU/mouse) をBALBマウスに接種すると、640日後でも全てのマウスが生残した。このマウスに対する致死活性をLD50で評価すると、Erdman株： $<2.0 \times 10^3$  CFU/mouse、NCGM2242株： $>2.0 \times 10^7$  CFU/mouseと著しい差を呈した。

3-4) Erdman株またはNCGM2242株で初回感染させたマウスから脾臓細胞を摘出、これを単層培養後、Erdman株で再刺激して、産生された炎症性サイトカイン(22種)の網羅解析を実施した。Erdman株由来、NCGM2242株由来脾臓細胞のサイトカイン分泌量に有意差は無く、NCGM2242株の細胞性免疫誘導能は、Erdman株と比べ減衰していないことが示された。

3-5) NCGM2242株の生菌またはBCG株の生菌でBALBマウスを予防接種 ( $2.0 \times 10^4$  CFU/mouse)、4週後Erdman株を抗原接種 ( $2.0 \times 10^4$  CFU/mouse) した場合、非予防接種群は139日後、BCG株接種群は258日後までに全てのマウスが死亡した。一方、NCGM2242株接種群は300日を超えても38%のマウスが生残した。以上のことから、NCGM2242株は、野生株の免疫応答誘導能はそのままに、病原性を激減させており、弱毒生ワクチン株として機能することが示された。