
シンポジウム

感染症研究の新たな展開

New Phases of Infectious Disease Research

第734回新潟医学会

日 時 平成30年10月20日(土) 午後2時から
会 場 新潟大学医学部 有壬記念館

司 会 菊地利明教授(呼吸器・感染症内科学)

演 者 立石善隆(細菌学), 青木信将(呼吸器・感染症内科学)

小泉 健(新潟地域医療学), 青木亜美(千葉大学大学院医学研究院免疫発生学)

1 細菌学からみた非結核性抗酸菌症の研究

立石 善隆

新潟大学医学部細菌学教室

Bacteriological Research of Non-tuberculous Mycobacteriosis

Yoshitaka TATEISHI

Department of Bacteriology, Niigata University School of Medicine

要 旨

代表的な非結核性抗酸菌である *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC 菌) は、環境常在菌・人獣共通病原体である点で結核菌と大きく異なる。近年、肺 MAC 症は中高年女性を中心に現在急増している(罹患率15以上/10万人年)にもかかわらず、菌の増殖・生存機構といった基本的な細菌学的性状が未解明であるため、感染対策ならびに新規治療法の開拓が阻まれている。当教室では、MAC 菌が低酸素・富栄養条件下でバイオフィルムを形成することを解明した。さらに、トランスポゾン変異導入システムと次世代シーケンサーを利用した解析

Reprint requests to: Yoshitaka TATEISHI
Department of Bacteriology,
Niigata University School of Medicine,
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,
Niigata 951-8510, Japan.

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学医学部細菌学教室

立石 善隆

により、バイオフィーム形成必須因子として、糖質・脂質代謝経路の再構築、ストレス応答性の転写開始因子、ならびにプロテアソーム系を構成する遺伝子が挙がってきた。MAC菌の細菌学研究により、新規薬剤標的の発見などの臨床に還元できる成果を目指したい。

キーワード：非結核性抗酸菌, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, バイオフィーム, トランスポゾン-シーケンシング

はじめに

昨今、患者数の急増に伴い俄かに注目されてきた非結核性抗酸菌 (NTM) であるが、豊富な臨床診療経験を持った三人の邦人学者 (東村道雄, 矢野郁也, 前倉亮治の三博士) が、研究の緒を開いたことは銘記すべきである。当教室では、これらの業績を評価・継承しながら、微生物生態学ならびに機能ゲノム学を利用した NTM の細菌学研究を立ち上げたので、その一端を紹介する。

NTM 研究の足跡

一人目は、東村道雄博士 (旧国立療養所中部病院) である。東村博士は、全国の旧国立療養所 (現在の国立病院機構) に呼びかけ共同研究版を立ち上げ、日本における非結核性抗酸菌症の疫学的・細菌学的調査を行い、1980 年に誌上報告した¹⁾。当時は、培養陽性結核患者が 10 万人当たり 20-30 人に対して、非結核性抗酸菌症患者が 2 人程度であった。しかし、1971 年から 1978 年の調査で、結核患者の漸減傾向に反比例して、非結核性抗酸菌症患者が漸増していることを初めて明らかにした。現在の非結核性抗酸菌症患者の増加を予知したのは、画期的である。また、東村博士は、細菌分類学の面でも *Tukamurella* というあらたな属の菌を発見しており、基礎一臨床両面において著名な功績を残した²⁾。

二人目は、矢野郁也博士 (元新潟大学細菌学教授, 元大阪市立大学細菌学教授) である。矢野博士は、後述する国立療養所刀根山病院での勤務のち研究の道に入り、抗酸菌脂質の質量分析研究の先駆者となった。また、抗酸菌脂質の免疫学的活性についても業績を残し、その一つに、代表的

な非結核性抗酸菌 *Mycobacterium avium* の両親媒性糖脂質 glycopeptidolipid (GPL) の phagosome-lysosome fusion (P-L fusion) 阻害作用の発見がある³⁾。GPL でコートされた黄色ブドウ球菌では、GPL でコートされていない菌に比べて、融合した phagosome 中の菌数が GPL 濃度依存的に減少することから、GPL が P-L fusion を阻害していることを示した。また、矢野博士は、芳香族化合物の分解細菌である *Sphingomonas yanoikuyae* および *Sphingobium yanoikuyae* にも名を残されている。

三人目は、前倉亮治博士 (元国立病院機構刀根山病院, 現大阪滋慶学園滋慶医療科学大学院大学教授) である。前倉博士は、GPL 血清型 4 型の *M. avium* に感染した肺 MAC 症患者では、他の血清型の *M. avium* 感染患者に比べて、臨床的予後が不良であることを報告した⁴⁾。これは GPL の血清型 (具体的には GPL の糖鎖) が MAC の病原性を決定づけること、ならびに GPL の血清型が診断ないしは予後の指標になりうることを示している。その後、臨床現場では、糖鎖をもたない *M. avium* 感染例 (apolar GPL 症例) の割合が多くなり、血清型自体はマーカーになり得ない結果となった。しかし、前倉博士は、GPL の糖鎖以外の構造 (GPL core: ペプチド鎖および脂肪酸側鎖) に着目し、apolar GPL 症例も含めた患者血清の多くが GPL core に対して抗体産生反応を起こしていることを発見し、世界初の肺 MAC 症血清診断キットであるキャピリア® MAC 抗体 ELISA の開発につながった。さらに、前倉博士は、大阪市立大学刀根山結核研究所の西内由紀子博士とともに、パルスフィールドゲル電気泳動において、患者由来菌株と浴室環境由来菌株のゲノム型が一致したことを報告し、浴室とくにシャワーヘッドと浴槽給湯口が MAC 菌の感染源であることを証明した⁵⁾。

MAC 菌のバイオフィルム形成条件

このように、臨床現場における非結核性抗酸菌症の重要度、ならびに細胞壁糖脂質 GPL に焦点を当てた MAC 菌の細菌学的性質が理解されたものの、環境中における MAC 菌の生育状況および

MAC 菌のゲノム微生物学ならびに分子生物学からみた病原因子は未だ解明されていない。

黄色ブドウ球菌、緑膿菌、大腸菌などの多くの一般細菌は、バイオフィルムを形成することで環境中ならびに宿主内に定着および感染持続状態を作り出す。そして、バイオフィルムの形成は、抗

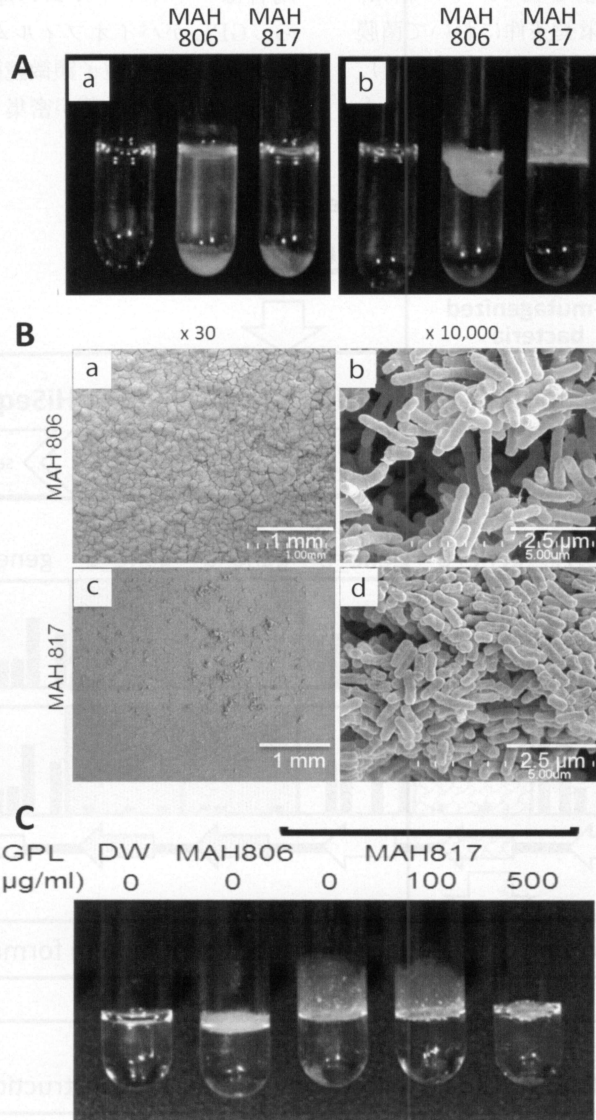


図1 MAC 菌の菌膜型バイオフィルム形成

A: 大気条件 (a) および 5% 酸素条件 (b) における増殖形態の差異。後者においてのみ、菌膜型のバイオフィルム形成を認める。MAH817 は MAH806 由来のラフ型菌株 (glycopeptidolipid 非産生菌株) である。B. バイオフィルム形成菌の走査型電子顕微鏡像。C. Glycopeptidolipid のバイオフィルム発育促進作用。MAH817 に glycopeptidolipid を添加すると、野生型である MAH806 に似た、肥厚したバイオフィルムを形成する。

菌薬抵抗性の獲得につながる。また、抗酸菌の感染病巣では、多核巨細胞および類上皮細胞に囲まれた乾酪性肉芽腫が形成され、病巣内部が低酸素状態となる。我々は、MAC 菌が環境中に常在するには、低酸素条件においてバイオフィルムの形成が起こるのではないかと考え、MAC 菌のバイオフィルム形成条件を検討した⁶⁾。その結果、MAC 菌は、低酸素かつ富栄養条件において菌膜型のバイオフィルム (pellicle) を形成した (図1)。一方、結核菌群に属する BCG では低酸素よりも

むしろ抗炭酸ガス条件下でバイオフィルムを形成したことから、低酸素かつ富栄養条件でのバイオフィルム形成は MAC 菌に特徴的なものと考えた。また、ラフ型といわれる GPL 欠損株では、バイオフィルムの厚みが野生株よりも減少し、また、ラフ型菌株に対して GPL を外的に添加した場合はバイオフィルムの厚みが増加したことから、GPL がバイオフィルムの発育を促進することが分かった。電子顕微鏡観察では、野生株のほうが、より多くの菌が密集し、強固な菌叢構造を

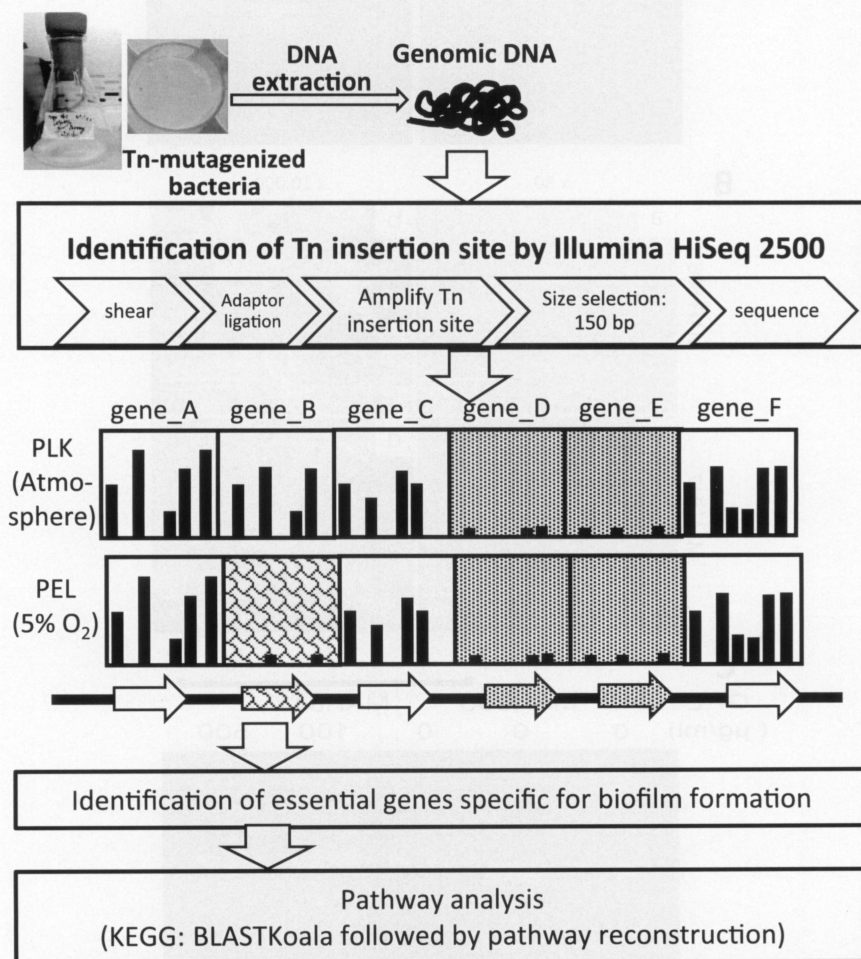


図2 トランスポゾンシーケンシングの概要

トランスポゾンコードする抗酸菌ファージを MAC 菌に感染させ、約 1×10^5 個のコロニーを一塊で回収し、変異株プールの。このプールから、対数増殖菌とバイオフィルム形成菌を作成し、ゲノム DNA 抽出する。そして、次世代シーケンサーとゲノム配列へのマッピングにより、トランスポゾン挿入部位および挿入数を全ゲノムにわたり算出し、バイオフィルム形成に特異的な必須遺伝子を同定する。

示した。また、野生株でもラフ型菌株でもバイオフィルムを形成した菌は、代表的消毒薬である次亜塩素酸ナトリウムに抵抗性を示した。以上より、MAC 菌でのバイオフィルム形成条件は解明できたが、一方で GPL を欠損していてもバイオフィルムを形成したことから、GPL 以外の（未知の）バイオフィルム形成因子を探索する必要があると考えた。

MAC 菌のバイオフィルム形成必須因子の探索

真核細胞の研究では、DNA マイクロアレイ（DNA から mRNA への転写活性）やプロテオミクス（一次元ないし二次元電気泳動・質量分析による蛋白レベルの評価）により標的因子を絞り込むことが多いが、膨大な情報量の中から真の標的を探索のはしばしば困難である。我々は、トランスポゾン変異システム-次世代シーケンシング解析手法を採用し、必須遺伝子の同定を試みた（図 2）⁷⁾。カナマイシン耐性カセットを持つトランスポゾンをコードした抗酸菌ファージ phAE180 を MAC 菌に感染させ、約 1×10^5 個の変異株コロニーを一塊で回収し、変異株プールとした。このプールから、大気条件で対数増殖菌、5% 濃度の酸素条件でバイオフィルムを形成した菌を得て、ゲノム DNA を抽出した。トランスポゾン挿入部位配列を PCR で増幅した後、Illumina HiSeq 2500 でトランスポゾン挿入部位のシーケンスを行った。得られたリード配列をゲノム配列にマッピングすることで、トランスポゾン挿入部位と挿入リード数を算出し、各増殖形態における必須遺伝子を同定した。

その結果、対数増殖期に比べて、バイオフィルム菌においてトランスポゾン挿入数が著減ないし消失している遺伝子、すなわちバイオフィル特異的必須遺伝子を 57 遺伝子検出した。

KEGG データベースを使ってパスウェイ解析を行ったところ、57 遺伝子のうち 32 遺伝子がパスウェイにアノテートされた。細胞内プロセス、糖質、脂質、アミノ酸代謝を含めた広範囲なパスウェイにアノテートされた。具体的には、糖質代謝では糖新生ならびにトレハロース合成、脂質代

謝ではトリアシルグリセロール合成、コレステロール分解、ならびに脂肪酸の菌体内取込みに係る type VII 分泌装置 (mycP)、アミノ酸代謝ではグリシン分解系、グルタミン合成・分解系、分岐鎖アミノ酸分解およびメチオニン合成、細胞内プロセスでは転写開始因子 (σ_B)、その他、プロテアソーム系 (Proteasome 20S subunit α および β , accessory factor B, Prokaryotic ubiquitin-like proteasome amidohydrolase) がヒットした。本結果は、バイオフィルム形成における必須代謝経路を機能ゲノム学的に示しており、個々の機能解析を行う上で重要な基盤情報となる。

以上のように、ようやく非結核性抗酸菌の生態が解明されはじめてきた。MAC 菌の増殖・生存維持機構の詳細な解析に加えて、宿主における感染成立・維持機構の解明もこれからの重要な課題である。トランスポゾン-シーケンシングを利用することで、生体における菌の必須遺伝子を同定できれば、新たな薬剤標的の発見にもつながり、臨床への還元も期待できる。

参考文献

- 1) 束村道雄, 下出久雄, 喜多舒彦, 川上景司, 伊藤忠雄, 中島直人, 近藤弘子, 山本好孝, 松田徳, 田村正敏, 吉本五勇, 代田伯光, 久世彰彦: 日本における肺非定型抗酸菌症の疫学・細菌学的研究. 結核 55: 273-280, 1980.
- 2) Johns Hopkins University: Johns Hopkins Microbiology Newsletter 24, 2005.
- 3) 矢野郁也: 抗酸菌に関する基礎的事項 抗酸菌・菌体成分の生化学と生物活性. 日本臨床 12: 3008-3016, 1998.
- 4) Maekura R, Okuda Y, Hirotsu A, Kitada S, Hiraga T, Yoshimura K, Yano I, Kobayashi K and Ito M: Clinical and prognostic importance of serotyping *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex isolates in human immunodeficiency virus-negative patients. J Clin Microbiol 43: 3150-3158, 2005.
- 5) Nishiuchi Y, Maekura R, Kitada S, Tamaru A, Taguri T, Kira Y, Hiraga T, Hirotsu A,

Yoshimura K, Miki M and Ito M: The recovery of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) from the residential bathrooms of patients with pulmonary MAC. Clin Infect Dis 45: 347-351, 2007.

- 6) Totani T, Nishiuchi Y, Tateishi Y, Yoshida Y, Kitanaka H, Niki M, Kaneko Y and Matsumoto S: Effects of nutritional and ambient oxygen

condition on biofilm formation in *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* via altered glycolipid expression. Sci Rep 7: 41775, 2017.

- 7) DeJesus MA, Ambaduoudi C, Baker R, Sassetti C and Ierger TR: TRANSIT-A software tool for Himar1 TnSeq Analysis. PLoS Comput Biol 11: e1004401, 2015.

2 耐性菌への新たなアプローチ—抗菌薬腎障害の解決

青木 信将

新潟大学医歯学総合病院 救急科

Nobel Approach Against Antimicrobial Resistance; Inhibition of the Nephrotoxicity Induced by Antimicrobials

Nobumasa AOKI

Division of Emergency and Critical Care Medicine Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science

キーワード：メガリン，シラスタチン，腎障害

緒 言

抗菌薬に対する耐性菌の出現と蔓延が世界的な問題となっている。しかし、効果的な薬剤の開発については滞っており、限られた治療薬を適正に使用することが重要となっている。治療手段が限定されることは、一方で有害事象の発現にもつながっており、中でも抗菌薬腎障害はしばしば問題となる。多剤耐性グラム陰性菌感染が社会問題となったのは記憶に新しいが、その特効薬といえるコリスチンでは高率な腎障害発症が報告されている。また、MRSA 感染症に対するキードラックであるバンコマイシンについても腎毒性は臨床上の課題となっている。腎障害の軽減が高用量使用

など新たな治療戦略につながると考え検討を行った。

近位尿管に発現するエンドサイトーシス受容体であるメガリンに注目した。メガリンは糸球体濾過された物質の再吸収を担うが、アミノグリコシド系薬等ではメガリンによる再吸収の結果、尿管に蓄積することで腎障害を来すことが知られている。メガリンを標的とした予防法の可能性を探索した。

結果と考察

- ①コリスチン及びバンコマイシンはメガリンリガンドである

Reprint requests to: Nobumasa AOKI
Department of Respiratory Medicine
and Infectious Diseases, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences,
1-757, Asahimachi-dori, Chuo-ku,
Niigata 950-8510, Japan.

別刷請求先：〒950-8510 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学医歯学総合病院 呼吸器・感染症内科
青木 信将