

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461159

研究課題名(和文)漢方薬の有効性に関連した非結核性抗酸菌のジェノタイプ・プロテオミクス解析

研究課題名(英文)Proteomic analysis and genotyping of nontuberculosis mycobacteria to investigate effects of traditional Chinese medicines against pathogenesis

研究代表者

佐野 千晶 (SANO, Chiaki)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：70325059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：有効な抗菌薬が限定されている非結核性抗酸菌症に対して、免疫補助療法としての漢方薬の有効性について、基礎的な検討を行った。非結核性抗酸菌の一つであるMycobacterium avium complexの臨床分離株について遺伝子型(ジェノタイプ)解析し、薬剤の最小発育阻止濃度との関連がみられた。また、新規の方法で、非結核性抗酸菌を経胸壁から肺に接種し、ヒトでの病態に類似した肉芽腫を形成させることが出来た。この非結核性抗酸菌感染マウスモデルに、抗菌薬と麻黄湯の併用投与を行ったところ、麻黄湯併用群においては、Th2系サイトカインが低下する傾向が認められた。

研究成果の概要(英文)：Nontuberculosis mycobacterial infections are characterized by the ineffectiveness of antimycobacterial drugs. The disease results in immuno-suppression and infection with dormant types of mycobacteria and, to date, available chemotherapy regimens are limited. The aim of this study was to investigate useful traditional Chinese medicines for adjunctive chemotherapy against refractory mycobacteriosis. First, we investigated whether the drug susceptibility profile of the Mycobacterium avium complex (MAC) is associated with the genotype. Next, we established a human nodular bronchiectatic MAC lung disease model by novel intrapulmonary injection techniques. The oral administration of "Mao-To" decreased the expression of Th2-related cytokines in novel mouse models.

研究分野：細菌学

キーワード：非結核性抗酸菌 漢方薬 免疫補助療法 マウスモデル ジェノタイプ

1. 研究開始当初の背景

Mycobacterium avium complex (MAC) 菌は、水や土壌といった環境中に普遍的に存在し、その一部がヒトへ感染し病原性を示すが、同じ抗酸菌症に分類される結核症と異なりヒト-ヒト感染はないとされている。近年、我が国では基礎疾患のない中高年女性に気管支拡張を伴う中葉・舌区型肺 MAC 症が急増しており新興感染症として問題となっている。肺 MAC 症は、感染初期の数年は不顕性であるが、多くが慢性化し増悪の経過をたどる。

肺 MAC 症に対する化学療法はリファンピシン、エタンブトール、クラリスロマイシンの3剤を基本とした半年から数年に亘る長期併用療法であるが、MAC の薬剤感受性の低さ、再発率の高さ、抗菌薬の副作用の出現などが問題となっている。研究代表者の佐野らは MAC 感染動物モデルにおいてニューキノロン薬の治療効果について検討したが、わずかな治療効果があるにとどまる結果となった (Int J Antimicrobial Agents, 2011)。このような再発を防ぐ有効な治療薬が存在しない現時点においては、既存の抗菌薬による多剤併用療法に加えて、何らかの免疫強化による免疫補助療法を施行することが最も現実的且つ有効な手段である。

MAC 症は起炎菌が体内に長く滞留し徐々にではあるが確実に増悪するという経過をとるため、強力な殺菌作用と有する薬の投与は、その分生体障害作用も強いため、結果としては、かえって抗酸菌に対する Th1 を中心とした細胞性免疫の消退を引き起こしてしまう可能性が大きい。このため、漢方薬を用いて MAC の増殖力を温和な形で抑制しつつ、患者の QOL や症状や一般状態の改善を導くことにより、MAC 症の増悪を年単位で遅らせるといった方策が有効なのではないかと考える。

これまでに研究代表者らは、MAC に対する標準治療法を修飾または代替出来る安価で毒性のない免疫補助剤について検討してきたが、麻黄附子細辛湯に非結核性抗酸菌に対する免疫を up-regulate する作用があることを、in vitro の基礎的実験により見出している(富岡：(総説) Cur Pharm Des, 2005)、(平成 18-19 年度科学研究補助金基盤研究(C) 難治性抗酸菌症に対する漢方薬の有効性についての基礎的研究：研究代表者 佐野千晶)。加えて、我々の教室では MAC のジェノタイプ(遺伝子型)と薬剤感受性に一定の相関があることを報告し(Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011)、さらに、結核類似型、中葉・舌区型といった病型の違い MAC 遺伝子との関連についても明らかにした。さらに、研究分担者らは、実際に臨床的に麻黄附子細辛湯を標準治療との併用投与を行い、症例が少なく検証には至っていないものの、再発率が抑えられる印象を得ている。

難治性抗酸菌症の漢方薬による免疫補助

療法については、いくつかの薬剤についての研究・臨床試験が国内外で行われているが、安全性・価格・持続した温和な免疫増強作用発現といった条件を満たすような免疫補助剤は未だに知られていない。言うまでもなく、MAC 感染症の化学療法への漢方薬の応用に関する研究は、国内外ともほとんど進められていないため、難治性 MAC 症に対する新しい治療プロトコルの開発や確立が希求されている。

2. 研究の目的

今まで、in vitro の実験系を中心に用いて、マクロファージ細胞内における MAC に対する漢方薬等の免疫補助剤の役割を検討してきた。そこで本研究では、肺 MAC 症の臨床病態を反映する実験的マウスモデルの確立し、漢方薬等の免疫補助剤の役割を、ジェノタイプ・プロテオミクス解析手法を用いて明らかにすることを目的とする。

臨床分離 MAC 菌株の多型縦列反復配列 VNTR : variable numbers of tandem repeat 法によるジェノタイプ(遺伝子型)と薬剤感受性、治療効果、ならびに病態との関連を明らかにする。更に、高齢者に多く、慢性炎症を惹起する非結核性抗酸菌による肺感染症に特化したマウスモデルを確立し、漢方薬等の免疫補助剤の効果判定となる病態反映するようなマーカーを探索する。

3. 研究の方法

1) 臨床分離 MAC 菌株のジェノタイプ(遺伝子型)を多型縦列反復配列 VNTR : variable numbers of tandem repeat 法にてクラスター分類を行った。

2) 臨床分離 MAC 菌株の最小発育阻止濃度(MIC; minimum inhibitory concentration)を微量液体希釈法で測定した。7HSF, Mueller Hinton Broth といった培地による変化、pH の変化についての評価を行った。

3) 温度によって形状が変化する基質を利用して胸壁経由といった新規方法により非結核抗酸菌の接種を行った。

4) 3)で確立されたマウスモデルを用いて、生存率、症状発現、血中サイトカイン等を multiplex 法測定などにより、漢方薬の影響についての評価を行った。

5) *Mycobacterium avium* complex (MAC)のマウスモデルの胸壁経由の菌接種方法を応用し、*Mycobacterium abscessus* complex を接種し、肺病理等と臨床病態とを比較した。

6) 血清中の病態反映マーカー候補について質量分析 LC/MS/MS を用いての探索を行った。

4. 研究成果

1) VNTR ジェノタイプと MIC との関連(図 1)

供試した 臨床分離 MAC 菌 24 株が A-C の 3 つのクラスターに分類できた。

マクロライド系薬剤のMICは、Mueller Hinton Brothを用いての測定で7HSF培地よりも低い傾向であった。

EB MICはMueller Hinton Brothを用いての測定で著しく高くなる傾向があり、微量液体着釈法での精度評価が不適であった。

アミノグリコシド系薬剤では、菌株間での変動幅が大きく、MIC評価の方法に改良が必要と考えられた。

Mueller Hinton BrothでのMIC測定は、7HSF培地よりも目視判定が困難であった。

キノロン系薬のMICは、VNTRジェノタイプとの相関を認めた。

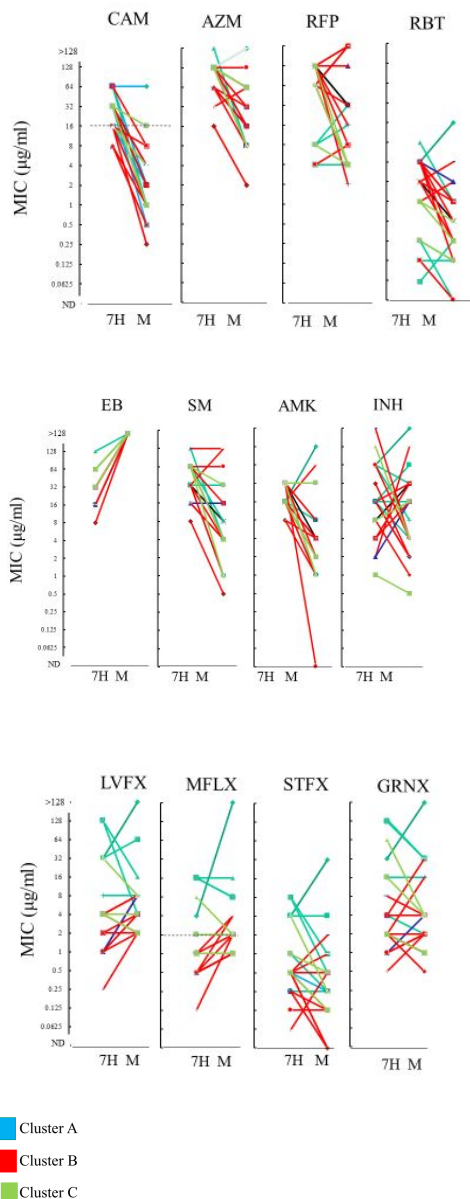


図1 MAC菌のMIC

7H: 7HSF medium (pH 6.6)

M: Mueller Hinton broth (pH 7.3)

CAM(クラリスロマイシン), AZM(アジスロマイシン), RFP(リファンピシン), RBT(リファブチン), EB(エタンブトール), SM(ストレプトマイシン), AMK(アミカシン), INH(イソ

ニアジド), LVFX(レボフロキサシン), MFLX(モキシフロキサシン), STFX(シタフロキサシン), GRNX(ガレノキサシン)

2) 新規感染方法による非結核性抗酸菌症マウスモデルの確立

MAC株: *Mycobacterium intracellulare* N-260 (血清型16, 臨床分離株) 7H9で培養し、遠心洗浄後PBS(-)に 1×10^9 CFU/mlで浮遊させた。基質調整菌液をBALB/c系雄マウス(6~9週齢) *Bcg^s*に、胸脇に小切開をいれ、胸膜を傷つけないように、左肺葉下部に接種した。

注入部位に一致した肉芽形成ならびに葉内に散布状に極小肉芽の形成を認めた。白矢印は注入部位の肉芽、黒矢印は主病巣から離れた極小肉芽を示す(図2)。

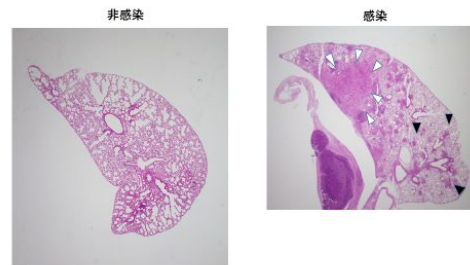


図2 MAC感染マウスの肺病理

MAC感染マウスのサイトカインプロファイルに及ぼす麻黄湯の影響

MAC肺感染モデルマウスに麻黄湯を飲水投与させることにより、感染抵抗性に関わる血清中のサイトカインプロファイルに対する麻黄湯の影響を検討した。麻黄湯投与群では、非投与群に比較して、Th2系サイトカインであるIL-4, IL-5が低下する傾向が認められた。しかしながら、IFN- γ , IL-12 p40といったTh1系のサイトカインには、麻黄湯投与群と非投与群とで差を認めなかった。加えて、麻黄湯投与群と非投与群間での生存率、体重について差を認めなかった。

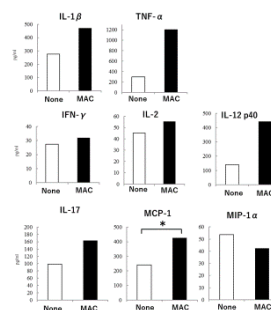


図3 MAC感染マウスの血清におけるサイトカインプロファイル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

1) 富岡治明, 多田納豊, 清水利朗, 佐藤勝昌, 佐野千晶: 抗酸菌症の免疫補助療法 - マクロファージ機能との関連から -. 日本化学療法学雑誌 2017; 65(1):10-16. 査読有

2) Tomioka H, Sano C, Tatano Y: Host-Directed Therapeutics against Mycobacterial Infections. Curr Pharm Des. 2016; 22, Dec 2. 査読有

3) 富岡治明, 多田納豊, 佐野千晶, 清水利朗: M1, M2 マクロファージポピュレーション- 抗酸菌感染で誘導・活性化されるマクロファージとの関連から -. 結核 2016; 91(2); 75-82. 査読有

4) Kataoka S, Muramatsu H, Okuno Y, Hayashi Y, Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Kobayashi M, Sano C, Sato H, Oh-Iwa I, Ito M, Kojima D, Hama A, Takahashi Y, Kojima S.: Extrapulmonary tuberculosis mimicking Mendelian susceptibility to mycobacterial disease in a patient with signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gain-of-function mutation. J Allergy Clin Immunol. 2016 Feb; 137(2):619-622. e1. doi:10.1016/j.jaci.2015.06.028. 査読有

5) Tatano Y, Kanehiro Y, Sano C, Shimizu T, Tomioka H: ATP exhibits antimicrobial action by inhibiting bacterial utilization of ferric ions. Sci Rep. 2015; 5: 8610 | DOI: 10.1038/srep08610. 査読有

6) Tatano Y, Shimizu T, Tomioka H: Unique macrophages different from M1/M2 macrophages inhibit T cell mitogenesis while upregulating Th17 polarization. Sci Rep. 2014; 4:4146. doi: 10.1038/srep04146. 査読有

7) 多田納豊, 佐野千晶, 清水利朗, 佐藤勝昌, 富岡治明: *Mycobacterium avium* complex 感染マウスでの T 細胞と T 細胞の誘導プロフィール. 医学と生物学. 2013; 157(6): 754-758. 査読有

[学会発表](計 17件)

1) 佐野千晶: [シンポジウム 8]: 攻略: 抗酸菌検査ガイド 2016・非結核性抗酸菌の薬剤感受性試験: 第 92 回日本結核病学会総会, 2017.3.24. (東京) 東京国際フォーラム

2) 佐野千晶, 多田納豊, 森 雄亮, 堀田尚誠, 津端由佳里, 濱口 愛, 濱口俊一, 竹山博泰, 磯部 威, 富岡治明: 難治性 *Mycobacterium abscessus* complex 症例分離菌のマウスモデルを用いた基礎的検討: 第 92 回日本結核病学会総会 2017.3.23. (東京) 東京国際フォーラム

3) 多田納豊, 佐野千晶, 梅田 啓, 御手洗聡, 藤原純子, 竹下治男, 富岡治明, 八木秀樹: *Mycobacterium avium* の VNTR 遺伝子型に基づく薬剤感受性迅速予測システムの構築: 第 90 回日本細菌学会総会 2017.3.19. (仙台市) 仙台国際センター

4) T. Isobe, C. Sano, R. Tanino, Y. Tatano, Y. Mori, M. Nakao, Y. Amano, T. Hotta, M. Hamaguchi, T. Okimoto, Y. Tsubata, S. Hamaguchi, H. Takeyama: Mini symposium; Establishment of the Novel Mouse Models of Human Lung Nontuberculous Mycobacterial Infections (Oral). : American Thoracic Society 2016 International Conference, May 18, 2016, SF, USA

5) 佐野千晶, 多田納豊, 森 雄亮, 堀田尚誠, 津端由佳里, 濱口俊一, 濱口愛, 沖本民生, 竹山博泰, 富岡治明, 磯部威: 非結核性抗酸菌症の増悪に関わる宿主因子についての研究: 第 10 回日本結核病学会中国四国支部研究会 2016.12.22. (岡山市) ダイワロイネットホテル岡山駅前

6) 佐野千晶, 多田納豊, 富岡治明: [シンポジウム 1]: 非結核性抗酸菌症の新たな治療展開 次世代の治療法を考える - マクロファージ殺菌能と抗菌薬: 第 91 回日本結核病学会総会 2016.5.26. (金沢市) ホテル日航金沢

7) 佐野千晶, 多田納豊, 沖本民生, 堀田尚誠, 濱口俊一, 竹山博泰, 富岡治明, 磯部威: 新規感染方法による非結核性抗酸菌症マウスモデルについての検討: 第 91 回日本結核病学会総会 2016.5.26. (金沢市) ホテル日航金沢

8) 多田納豊, 金廣優一, 佐野千晶, 清水利朗, 富岡治明: ATP は鉄イオン捕捉作用により抗酸菌に対する増殖阻害作用を示す: 第 91 回日本結核病学会総会, 2016.5.26. (金沢市) ホテル日航金沢

9) 佐野千晶, 多田納豊, 金廣優一, 富岡治明, 吉山裕規: 薬剤感受性試験の培地が *Mycobacterium avium* の MIC 値に及ぼす影響. 第 65 回日本結核病学会中国四国支部会, 2015.2.28. (高知市) 高知市文化かるぼーと

10) 佐野千晶, 多田納豊, 金廣優一, 吉山裕規, 濱口 愛, 沖本民生, 津端由佳里, 三浦聖高, 星野鉄兵, 濱口俊一, 須谷顕尚, 竹山博泰, 久良木隆繁, 富岡治明, 磯部 威:
非結核性抗酸菌症増悪に關与する宿主因子についての基礎的研究: 第 9 回日本結核病学会中国四国支部研究会, 2015.10.31. (岡山市) 岡山コンベンションセンター

11) 佐野千晶, 多田納豊, 金廣優一, 富岡治明, 吉山裕規: *Mycobacterium avium* における VNTR 遺伝子型と薬剤感受性の關連性についての検討: 第 84 回日本感染症学会西日本地方会學術集会 2014.10.24. (岡山市) 岡山コンベンションセンター

12) 多田納豊, 佐野千晶, 金廣優一, 富岡治明: マクロファージのアポトーシスに運動した抗酸菌に対する殺菌増強メカニズムについての検討: 第 88 回日本感染症学会學術講演会・第 62 回日本化学療法学会總会合同学会, 2014.6.18. (福岡市) ヒルトン福岡シーホーク

13) 多田納豊, 富岡治明: [シンポジウム 17] 抗酸菌の生物学・感染症学・免疫学の新しい展開を考える/MAC 感染マクロファージの Th17 分化増強能: 第 89 回日本結核病学会總会, 2014.5.10. (岐阜市) 長良川國際會議場

14) 多田納豊, 佐野千晶, 金廣優一, 富岡治明: 抗酸菌に対するマクロファージのアポトーシスに運動した殺菌能増強作用についての検討: 第 87 回日本細菌学会總会 2014.3.26-27. (東京) タワーホール船堀

15) 佐野千晶, 多田納豊, 金廣優一, 富岡治明: *Mycobacterium avium* におけるクラリスロマイシン薬剤感受性とジェノタイプとの關連性について: 第 83 回日本感染症学会西日本地方会學術集会 2013.11.6. (大阪市) 大阪國際會議場

16) 多田納豊, 佐野千晶, 金廣優一, 富岡治明: 抗酸菌感染マクロファージのアポトーシスに運動した殺菌能増強作用についての検討. 第 7 回日本結核病学会中国四国支部研究会, 2013.10.19. (岡山市) ダイワロイネットホテル岡山駅前

17) 多田納豊, 佐野千晶, 金廣優一, 清水利朗, 富岡治明: *Mycobacterium avium* complex 感染により誘導される免疫抑制性マクロファージの極性についての検討. 第 87 回日本感染症学会總会 2013.6.5. (横浜市) パシフィコ横浜

〔図書〕(計 1 件)

1) 佐野千晶 他, 編集委員, 南江堂,

抗酸菌検査ガイド 2016
大型本: 114 ページ 2016.4.1.
日本結核病学会 抗酸菌検査法検討委員会
御手洗聡編集委員長

〔産業財産権〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 千晶 (SANO, Chiaki)
島根大学・医学部・准教授
研究者番号: 70325059

(2) 研究分担者

多田納 豊 (TATANO, Yutaka)
國際医療福祉大学・薬学部・講師
研究者番号: 70432614

富岡 治明 (TOMIOKA, Haruaki)
安田女子大学・教育学部・教授
研究者番号: 40034045

磯部 威 (ISOBE, Takeshi)
島根大学・医学部・教授
研究者番号: 70284198

金廣 優一 (KANEHIRO, Yuichi)
島根大学・医学部・助教
研究者番号: 60609197

三浦 清高 (MIURA, Kiyotaka)
島根大学・医学部・助教
研究者番号: 90646986

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

谷野 良輔 (TANINO, Ryosuke)
島根大学・医学部・研究員