

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580448

研究課題名(和文) 抗酸菌感染症の早期診断法ならびに予後診断法の開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic methods for early and prognosis of mycobacterial infection

研究代表者

後藤 義孝 (Goto, Yoshitaka)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：30142136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：豚の抗酸菌症はMycobacterium avium subsp. hominissuis (Mah)によって内臓に結核類似病変を形成する感染性疾患である。公衆衛生上問題となるため、屠場で獣医師により摘発され、病変部は廃棄される。ただ、肉眼による診断のみに頼っているため新しい診断方法の開発が望まれる。我々はMah感染豚で産生される特異性の高いサイトカインを探索し、それらの定量により診断できないかと考えた。候補となったサイトカインは感染の時期や病変の程度により産生量に違いがみられた。感染豚におけるこれらサイトカインの誘導パターンの違いを利用した感染状態の診断法について我々は現在考案中である。

研究成果の概要(英文)：Mycobacteriosis of pigs caused by Mycobacterium avium subsp. by hominissuis (Mah) is an infectious disease which forms the granulomatous lesions similar to tuberculosis in visceral organs. So far only discovery by the naked eye of veterinarians in slaughterhouses has become a decisive diagnosis and such infectious organs have been discarded. Therefore, it appears to be necessary to develop a new diagnostic method. We has been looking for the cytokines which were induced by Mah infection. Qualitative or quantitative assay of these cytokines seems to be useful for diagnosis of porcine mycobacterial infection. We found several cytokines as candidates. Types and amounts of cytokines produced varied with the time of Mah infection and progress of the disease. We are currently being developed for diagnosis of infectious conditions utilizing the difference in the inducing pattern of these cytokines in the infected pigs.

研究分野：獣医微生物学

キーワード：豚 抗酸菌 感染症 診断 サイトカイン mycobacterium avium hominissuis

## 1. 研究開始当初の背景

豚の抗酸菌症は *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (Mah) を主な原因とする豚の慢性肉芽種性疾病で、全国で発生がみられる。日本全国の屠場において豚の抗酸菌症が散見されること、近年ヒトの Mah 感染症が増加していることから、我が国の家畜の飼育環境はもとより我が国の住環境が Mah によって汚染されており、公衆衛生上問題となっている。豚 Mah 感染症では、肉眼的病変が限局性である場合、病巣部分は廃棄されるが、他は食肉として供される。顕微鏡レベルでの病巣部は見逃されている。食の安全が今まで以上に求められている今日、食肉として供用される家畜の健康度を科学的に評価する方法が必要不可欠となっている。

## 2. 研究の目的

Mah 感染症の確定診断は、細菌学的検査法が主流で、分離培養された菌を PCR 法で同定する[1]。検査材料から直接 PCR を行なう例は非常に少ない。その理由は、肉眼病変部をそのまま PCR 材料として用いたとしても検出感度が低いためである。従って確定診断までに数週間を要する。そこで、細菌学的方法以外の確定診断ならびに予後診断により食肉の安全性を担保する方法として宿主の免疫応答を利用する方法について検討した。

## 3. 研究の方法

宮崎県の食肉処理場に搬入された豚（交雑種）のうち、病理学的（リンパ節における結節性病変等の確認）ならびに細菌学的（菌の分離培養と分子生物学的解析による同定）に Mah 感染症と診断したものを MI 群、抗酸菌症とその他の細菌感染症併発例を CI 群、抗酸菌以外の細菌感染症例を OI 群、健常豚を N 群とし、各群の豚の脾臓とリンパ節を採取、

それぞれ単球、リンパ球浮遊液を作成、半分を抗原 (Mah、Mino 株生菌) 刺激あり、半分を抗原刺激なしとし、それぞれの細胞培養上清中に産生されるサイトカイン量を ELISA 法により定量した。調査対象としたサイトカインは成果の項で述べる

## 4. 研究成果

MI、OI、N の各群における IL-12 および IL-10 の産生を個体ごとに調べた (図1)。抗原の二次刺激後 24 時間において、MI 群では著しい IL-12 産生の増加 (10<sup>6</sup> 細胞あたり約 300-600 pg/ml) がみられた (抗原非刺激では <10 pg/ml)。一方、IL-10 はいずれの群においても抗原刺激なしで 20~60 pg/ml にとどまったこと、N 群の 1 例を除き抗原刺激による産生促進は概ね 2 倍以下であることから、豚はマウスや人と同様、Mah 感染において Th1 細胞が優位に誘導されていると考えられた。

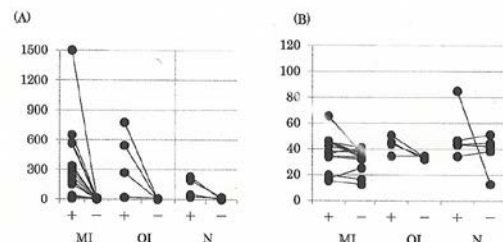


図1. MI、OI、N群におけるIL-12 (A) およびIL-10 (B) の産生。(単位はpg/ml)。脾細胞浮遊液を10<sup>6</sup>mlに調整後、Mah刺激あり(+)となし(-)で48時間培養、上清中のサイトカインをELISA法により定量した。●は各個体を示し、抗原刺激による変化が分かるように線で結んでいる。なおこの実験ではCI群は含まれていない。

次に MI、CI、OI、N 各群における IFN- $\gamma$  ならびに TNF- $\alpha$  産生についてみると、MI 群の多くの個体では抗原 (Mah) の *in vitro* 二次刺激に対し非常に高い IFN- $\gamma$  ならびに TNF- $\alpha$  産生がみられたのに対し、CI 群では IFN- $\gamma$  産生は顕著でなく、TNF- $\alpha$  も MI 群ほど顕著な産生はみられなかった (図2)。CI 群は全例が Mah 感染に加えて他のグラム陰性菌やマイコプラズマ等による激しい腹膜炎や

肺炎がみられ、その結果、免疫細胞が Mah 抗原刺激に対し抑制的に作用した可能性がある。一方 OI 群は Mah 陰性で、CI 群と同レベルの細菌性腹膜炎や肺炎がみられたもので、Mah 刺激による IFN- $\gamma$  産生がほとんどみられないが、CI 群以上に TNF- $\alpha$  産生が顕著な個体がみられた。また N 群のなかに Mah 抗原刺激により IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  が産生された個体が 2 例あったが、これらについてはその後の精密検査で Mah 感染症が疑われた。

Mah 以外の細菌感染豚(OI 群)でも *in vitro* の抗原(Mah)刺激により TNF- $\alpha$  (>500 pg/ml) や IL-12 (50~100 pg/ml) が産生されたが、細胞集団中に含まれる活性化マクロファージの反応ではないかと考えられた。TNF- $\alpha$  は急性炎症反応の主要なメディエーターであり、Mah をはじめとする抗酸菌、グラム陽性菌、グラム陰性菌によって刺激された健康な人の末梢血単核球からも TNF- $\alpha$  が産生される。よって、Mah のみが感染した MI 群はもとより Mah に加えて他の感染症を併発した CI 群、腹膜炎や肺炎がみられた OI 群においても、抗原特異的あるいは非特異的に活性化されたマクロファージから TNF- $\alpha$  が産生されたと考えられる。一方、肉眼的に健常豚と診断されたにも関わらず IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  を産生する個体や MI 群にもかかわらず IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  の産生量がすくない個体がわずかながら存在した。食肉検査所の日常検査において、Mah が通常の腸間膜リンパ節以外のリンパ節(咽頭リンパ節や肺門リンパ節)やその他の臓器に感染していても、病変を形成しない例があるという。こうした野外例ではサイトカイン産生量が個体によってばらつくことは、感染時期が不特定であることに加え、脾細胞中に誘導される感作細胞の数とそれらのサイ

トカイン産生能力に差があるためであろうと考えられる。実際、健常豚や MI 感染豚におけるリンパ球サブセットを解析してみると、全リンパ球に占める T 細胞の割合はもとより CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>細胞の割合も個体によってかなり異なっていることが分かった。Mah 感染豚において、原因菌の主要な標的器官である腸間膜リンパ節と脾臓とでは T 細胞亜集団の割合が異なる可能性は十分考えられる。また免疫記憶は CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low+</sup>T 細胞が担っているとの報告もあり[2]、本研究では実施できなかったが、IFN- $\gamma$  の産生細胞をこれら T 細胞亜集団から特定し、亜集団相互の関連性を追究することで、Mah 感染豚における防御機構を明らかにする必要があると思われる。

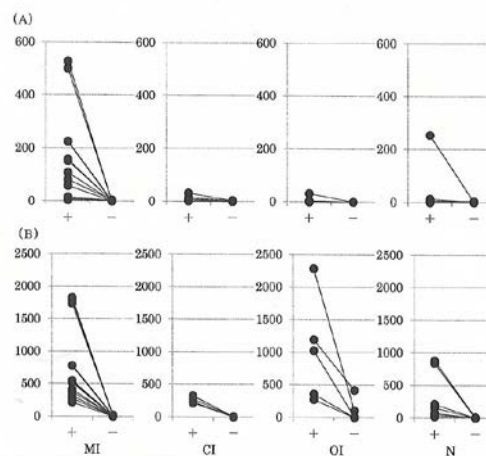


図2. MI, CI, OI, N 群各個体における IFN- $\gamma$  (A) および TNF- $\alpha$  (B) の産生 (pg/ml). 各個体より採取した脾細胞 10<sup>6</sup>/ml に調整し、Mah 刺激あり (+) なし (-) で 48 時間培養後に上清中の産生量を ELISA により定量した。

これまで得られた個体ごとのサイトカインプロファイルとそれぞれの個体における病態とから、これらを診断に利用することの可否について考察してみたい。今回 TNF- $\alpha$  産生が顕著であった個体は、病態(肉芽腫形成)が進展した状態であり、肉芽腫の維持形成に関与している可能性が示唆された。MI 群では IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  の有意な産生がみられたこと

から、Mah 刺激によって脾細胞が両サイトカインを産生したことが分かる。一方、OI 群は TNF- $\alpha$  の反応値のみが有意に上昇しており、MI 群とは Mah (刺激抗原) への対応が同じでないことを示しており、IFN- $\gamma$  ならびに TNF- $\alpha$  の両サイトカインを同時測定することで Mah 感染症と他の感染症とを識別することが可能であると考えられた。ヒトでは、結核感染を評価するクオンティフェロン QuantiFERON アッセイが、また、牛の結核症の診断には感染牛から産生される IFN- $\gamma$  の ELISA アッセイ法が利用されている[3,4]。今回の豚 Mah 感染症の場合も、MI 群において Mah 特異的な T 細胞 (Th1) 集団が誘導され、*in vitro* における抗原刺激に対して特異的に IFN- $\gamma$  を産生することは既に知られている[5]。ただし、今回の結果からも明らかのように、MI 群や CI 群のなかにも IFN- $\gamma$  が非常に微量しか産生されない個体が存在することがあり、IFN- $\gamma$  のみでの抗酸菌症の確定診断には限界があるように思われる。MI 群で IFN- $\gamma$  産生がみられない個体の場合、Th1 がまだ十分に誘導されていない感染初期の可能性や、免疫抑制が生じている可能性が考えられる。また CI 群で IFN- $\gamma$  産生がみられない場合、Mah 以外の病原菌に対する免疫応答が T 細胞亜集団を変化させ、Mah 特異的 Th1 細胞が十分に誘導されなかった可能性や、T 細胞の抗原 (Mah) 刺激に対する応答性が低下している可能性などが考えられる。いずれにせよ、IFN- $\gamma$  低応答性の機序については今後詳細な研究により解明する必要がある。

肉眼病変がみられなかったにも関わらず IFN- $\gamma$ をはじめ TNF- $\alpha$  や IL-17 を産生し、臓器から Mah 感染が確認された個体があり、現在、屠畜場で行われている肉眼による判定

で健常豚と診断されたなかに Mah 感染事例が少なからず存在することが判明した。今回の豚抗酸菌症例では、Mah 感染豚の病態の進行した (陳旧化した病巣を有する) 個体では、抗原刺激による IL-17 産生よりも IFN- $\gamma$  産生が顕著である傾向がみられた。むしろ、Mah 感染のあるステージ (おそらく感染初期) においてのみ IL-17 が産生され、マウス同様、豚においても Th17 の分化は IFN- $\gamma$  により抑制されている可能性が考えられた。

MCP-1 は豚の脾細胞では常に産生されているが、興味あることに、MI 群の多くの個体では抗原刺激により産生量が有意に低下しており、Mah 感染個体では二次刺激により産生が抑制される傾向があることが示された。ヒトの結核患者では、抗原刺激により IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  産生増強と並行して MCP-1 の有意な産生がみられる[6]というが、豚の Mah 感染における MCP-1 の応答性はヒトの結核のそれとは異なり、逆に抑制的に作用するのかもしれない。この可能性については、今後の課題として詳細な検討が必要である。

Mah 感染症を含めた動物の抗酸菌症の生前診断法として血中抗体を測定する方法やツベルクリン皮内反応がある。我々は残念ながら豚の Mah 症 (野外例) においてこれら診断法と今回のサイトカインプロファイルとのデータ比較をおこなっていないため、検出感度を含めた詳細な考察は難しいが、一部個体から得た末梢血リンパ球を用いても脾臓リンパ球と同様のサイトカイン産生パターンを得ていることから、生前診断に十分応用可能であると考えている。我々はこれまでに種々のマウスモデルを用いて異なる病態を作出し、それぞれ血中抗体の推移、サイトカインプロファイル、ツベルクリン足蹠反応について解析

をしている。血中抗体は、菌がリンパ系臓器で増殖を示す感受性個体で高値を示すが、病変をほとんど示すことがない抵抗性の系統であっても上昇する。このため、感染の有無を知ることは可能だが、個体の病態を推定することは難しかった。またツベルクリン足蹠反応は Mah に同じ感受性を示すマウスであっても系統による感度の違いが大きかった（データ未発表）。一方、本研究で取り上げたサイトカインは肉芽腫形成を中心とした病態の変化や感染の推移に対応して変化が明瞭だった。

以上、Mah 感染豚の大部分はサイトカインプロファイルを利用して Mah 感染と診断できたが、一部 IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  をほとんど産生しない Mah 感染豚が存在することが確認され、こうした個体の多くは Mah 以外の細菌による肺炎や腹膜炎を併発していた。Mah 単独感染で、サイトカイン低産生性の個体も存在したが、その理由は不明であった。そうした個体でも病理組織検索と細菌検査の併用によって確定診断は可能であったが、判定までに 1 週間以上を要した。こうした個体の確定診断を如何に短期間で行えるようにするかが今後の課題として残された。

#### 引用文献

- [1] Shin S J et al., J. Clin. Microbiol., 48:4057-4062, 2010.
- [2] Gerner W et al., Develop. Comp. Immunol., 33:310-320, 2009.
- [3] Sreeton J A et al., Int. J. Tuberc. Lung Dis., 2:443-450, 1998.
- [4] Wood PR et al., Aust. Vet J. 68:286-90, 1991.
- [5] Faldyna M et al., J. Vet. Diag. Invest. 24:376-378, 2012

[6] Arias M A et al., J. Immunol., 179: 8381-8391, 2007.

#### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(なし)

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① 水谷友香、渡邊真治、芳賀猛、後藤義孝 抗酸菌症の豚から分離される *M. avium* subsp. *hominissuis* の多様性について、第 156 回日本獣医学会、2013 年 9 月（岐阜）
- ② 福家直幸、平井卓也、山口良二、後藤義孝 レッサーパンダの T 細胞リンパ腫を併発した *Mycobacterium gastri* 感染症の一例、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月（札幌）
- ③ 岡本理、渡邊真治、後藤義孝 抗酸菌感染症豚の脾細胞から分泌されるサイトカイン、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月（札幌）
- ④ 小川翔大、小川賢二、大原直也、後藤義孝、瀧井猛将、酸性条件下における *Mycobacterium avium* の *arcA* mRNA 発現誘導の解析、第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月（千葉）

〔図書〕(計 1 件)

福所秋雄ほか編集『動物微生物検査学』  
抗酸菌と放線菌 p16-18, 近代出版 2014 年

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 義孝 (GOTO, Yoshitaka)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：30142136

(2) 研究分担者

芳賀 猛 (HAGA, Takeshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：20315360