

潜在性結核感染症研究の進歩

森重 雄太¹⁾ 御手洗 聡²⁾¹⁾結核研究所抗酸菌部結核菌情報科 研究員 ²⁾結核研究所抗酸菌部 部長

潜在性結核感染症 (Latent Tuberculosis Infection; LTBI) とは、結核菌が体内で潜伏感染している状態を一つの疾患と捉えたものである。世界保健機関は、世界人口の約3分の1がLTBIであり、患者数(一千万人/年)よりも遥かに多く、これらLTBI患者群が活動性結核の予備軍と報告している。結核根絶のためには、LTBIを適切に治療して発病と伝搬を予防することが肝要である。

LTBIと休眠状態

LTBIでは結核菌は休眠状態にあると考えられる。これは細菌に一般的な現象であり、概念的に2つに分けられる。

ひとつはPersister cellsと呼ばれるもので、培養可能な菌集団から、一時的に増殖を止めて抗菌薬抵抗性となる菌が確率的に出現する。その発見は1942年まで遡る。Meyerらは黄色ブドウ球菌集団の1%はペニシリンによる殺菌を回避していることを見出した¹⁾。その制御はトキシン-アンチトキシン(TA)システムという機構による²⁾。結核菌は88種類ものTAシステムを持ち、Persister cellsの出現も確認されている³⁾。

もうひとつはVBNC (Viable But Non-Culturable) cellsと呼ばれる。これは1982年にRR Colwellらが大腸菌及びコレラ菌で示した概念で、通常は培養可能である細菌がストレスによって培養不能となる⁴⁾。抗酸菌のVBNC化も報告されている⁵⁾。VBNCとは仮死状態ではなく、環境が増殖に適した状態となるまで「鳴りを潜めて」いるような状態と考えると良い。その証拠に、菌種によって条件は異なるが、VBNC菌は温度や化合物による刺激によって再増殖可能となることが多数報告されている⁶⁾。1996年に、Colwellらは健常人にVBNCコレラ菌ワクチン株を経口摂取させ、それらがヒトの腸管を經由して増殖可能な状態へ再活性化し、病原性を発揮することを報告した⁷⁾。これは、培養不能な「見えない敵」であるVBNC菌が、感染症の大きなリスクとなることを示唆する衝撃的な報告である。

Persister cellsとVBNC菌の違いについては議論が絶えない。2018年にOliverとAyrapetyanはこれらの現象を制御する共通のメカニズムがポリリン酸蓄積

と、それによるClp/Lonプロテアーゼによる遊離トキシシン量の増加であることを示した。そして環境ストレスの強度に応じてまずPersister cellsが⁸⁾、次いでVBNC菌が出現すると仮説を立てている⁸⁾。

休眠結核菌に発現する分子

結核菌は肉芽腫内で休眠状態にあると考えられる。それを実験的に再現する方法として、低酸素曝露法が広く用いられている。その際に α -クリスタリン様タンパク質Acrが顕著に発現誘導されることをBarryらは発見した⁹⁾。更に松本らは休眠結核菌においてヒストン様タンパク質MDP1が大量に発現することを発見し、これが休眠導入及び維持に関与すると報告した¹⁰⁾。また当研究室では43年間低酸素培養した結核菌の網羅的遺伝子発現解析を行い、長期休眠状態で複数の遺伝子の発現量が上昇していることを示し、休眠結核菌のモデルとして汎用されるWayneモデルとの発現プロファイルの差異を認めた。これらの結果は、休眠状態が完全に代謝を止めているのではなく、環境に適応するための遺伝子群を発現していることを示唆する¹¹⁾。

休眠結核菌の再増殖を刺激する因子

休眠結核菌の再増殖促進因子のひとつにResuscitation Promoting Factor (Rpf) がある。これは元々*Micrococcus luteus*で発見されたペプチドグリカンリコシダーゼ活性を持つタンパク質で、細胞壁の構成成分であるペプチドグリカンのリモデリングに寄与すると考えられる。結核菌では5つのサブタイプ(A~E)が見つかっている。Mukamolovaらはこのうち、RpfDが再増殖に最も寄与することを見出した¹²⁾。また、Robertsonらは、サブタイプの菌体内における発現の局在性を解析し、各サブタイプが細胞の異なる場所に局在することを見出した¹³⁾。

休眠細菌の検出方法の進歩

休眠細菌の検出とは、菌の代謝活性を指標に生死を判別することである。Bertozziらは、蛍光色素標識トレハロース誘導体が、生菌に特異的に取り込まれる性質を応用し、生きた抗酸菌を特異的に染色する方法を報告している。また抗結核薬処理後には本法で染色されないことから、迅速な薬剤感受性試験法としての可

能性を示唆している。抗酸菌特異的かつ生菌選択的な本法は、新たな抗酸菌検査法のみならず、休眠結核菌の代謝活性解析法としても期待される¹⁴。

潜在性結核感染症と活動性結核

本邦でも2013年以降毎月約600件のLTBIが発生（届出数）している¹⁵。これらは主に活動性結核患者に接触して感染し、LTBIと診断されている。多くのLTBI患者は生涯結核を発症しないが、10～30%程度は感染から2年以内に発病する確率が高い。しかし2年間で全ての患者が発病する訳ではなく、発病リスクは常にある。LTBI状態の結核菌が休眠状態から活発に分裂増殖する相変化する機構は、前述の様に複数指摘されているものの、全体としては明らかでない。しかし、HIV感染症や糖尿病、塵肺等により発病リスクが数倍から170倍程度まで上昇することを考えると、宿主の細胞性免疫の低下が強く関与していると思われる。

潜在性結核感染症診断法の進歩

LTBI状態の結核菌は培養できないため、感染している結核菌を分離同定することはほぼ不可能である。古典的にはツベルクリン反応検査が感染診断に用いられたが、BCGワクチンとの交叉反応で偽陽性が多く出現する欠点がある。結核菌成分全体から結核菌特異的でBCGにはない抗原を抽出して免疫反応の評価に利用したのが、いわゆるInterferon gamma release assay (IGRA) である。結核感染が疑われる人から血液を採取し、特異抗原とリンパ球とを試験管内で作用させ、インターフェロン γ の放出量を調べる。現在ではQuantiferon Gold Plus (QFT-Plus, キアゲン) とT.SPOT-TB (オックスフォード・イムノテック) が利用できる。臨床性能評価ではQFT-Plusの感度と特異度は、各々94%及び97%と報告されている。同様にT.SPOT-TBでは81%と59%とされている¹⁶。

潜在性結核感染症の治療

一般的に休眠中の結核菌には抗結核薬は効果が乏しいが、LTBIでも特に感染初期には抗結核薬による発病予防効果が高いと考えられる。接触者健診などで新たにLTBIと診断された場合、イソニアジドによる6～9カ月の治療あるいはリファンピシンによる4カ月の治療が行われる。結核療法研究協議会の研究によ

ると、イソニアジドよりもリファンピシンの方が副作用が少なく、治療効果も高いとされる¹⁷。WHOは2018年にLTBI治療指針を発表し、本邦のような比較的結核罹患率が低い地域では、イソニアジド単剤に代えてイソニアジドとリファンピシンの併用を3～4カ月実施する方法を示している¹⁸。

文献

1. Meyer, K. *et al.* ON PENICILLIN. *Science* 96, 20-1 (1942).
2. Moyed, H. S. & Bertrand, K. P. hipA, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J. Bacteriol.* 155, 768-75 (1983).
3. Gomez, J. E. & McKinney, J. D. M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis (Edinb).* 84, 29-44 (2004).
4. Colwell, R. R. *et al.* Viable but Non-Culturable *Vibrio cholerae* and Related Pathogens in the Environment: Implications for Release of Genetically Engineered Microorganisms. *Nat. Biotechnol.* 3, 817-820 (1985).
5. Oliver, J. D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 34, 415-425 (2010).
6. Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D. & Faucher, S. P. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 5, 258 (2014).
7. Colwell, R. R. *et al.* Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 28-31 (1996).
8. Ayrapetyan, M., Williams, T. & Oliver, J. D. Relationship between the Viable but Nonculturable State and Antibiotic Persister Cells. *J. Bacteriol.* 200, (2018).
9. Yuan, Y., Crane, D. D. & Barry, C. E. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J. Bacteriol.* 178, 4484-92 (1996).
10. Matsumoto, S. *et al.* Identification of a Novel DNA-Binding Protein from *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin. *Microbiol. Immunol.* 43, 1027-1036 (1999).
11. 結核研究所抗酸菌レファレンス部. 長期保存結核菌株の細菌学的解析. 結核研究所 研究業績集 2011-2012 19 (2012).
12. Loraine, J., Pu, F., Turapov, O. & Mukamolova, G. V. Development of an In Vitro Assay for Detection of Drug-Induced Resuscitation-Promoting-Factor-Dependent Mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 6227-6233 (2016).
13. Uhiá, I., Krishnan, N. & Robertson, B. D. Characterising resuscitation promoting factor fluorescent-fusions in mycobacteria. *BMC Microbiol.* 18, 30 (2018).
14. Kamariza, M. *et al.* Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum with a solvatochromic trehalose probe. *Sci. Transl. Med.* 10, eaam6310 (2018).
15. 結核研究所疫学情報センター. 登録月別, 潜在性結核感染症届出推移. 結核の統計 2017 (結核研究所, 2019).
16. Sester, M. *et al.* Interferon- γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. J.* 37, 100-11 (2011).
17. 結核療法研究協議会内科会. 日本における潜在性結核感染症治療の状況. 結核 93, 447-458 (2018).
18. World Health Organization. Treatment options for latent tuberculosis infection. in *Latent tuberculosis infection - Updated and consolidated guidelines for programmatic management* 23-27 (2018).