

氏名	田村 庄平
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5498号
学位授与の日付	平成29年3月24日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	<i>ppsA</i> 遺伝子破壊株を用いた BCG の牛胆汁に対する感受性の研究
論文審査委員	仲野 道代 教授 岡田 正弘 准教授 大原 直也 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

結核菌が引き起こす結核は、地球規模で未だ患者数が多く、AIDS、マラリアとともに3大感染症のひとつに数えられている。結核に対しては現在、生菌ワクチンであるBCGワクチンが唯一のワクチンとして使用されている。BCGワクチンはパスツール研究所から各国に分与されたが、各国が保有する亜株はそれぞれゲノムの一部が欠損しており、その欠損部位が亜株間で異なる。日本における現行のワクチン株BCG Tokyo 172では、亜株間の変異に加えて、亜株内に2つのサブポピュレーションType IとType IIが存在し、そしてロット中におけるType IとType IIの存在比はロット毎に異なることが示唆されている。この比率が変化する原因を明らかにすることは、ワクチンの品質管理の観点から重要と考えた。本研究では、BCGワクチンの製造過程において胆汁を含む培地が使用されること、Type IとType IIでは細胞壁構成成分であるPDIM/PGLの有無が異なることに着目し、BCGワクチンにおいてサブポピュレーションが変化する原因を解析した。

【材料および方法】

1. 使用菌株と培養条件
BCG Tokyo Type I, Type II および Type I を親株として作製した遺伝子変異株を使用した。BCG の培養にはアルブミン・デキストロース・カタラーゼ (ADC) および 0.05% Tween80 添加 Middlebrook 7H9 液体培地と ADC 添加 Middlebrook 7H10 寒天平板培地を用いた。必要に応じて培地にはカナマイシン (終濃度 20 µg/mL)、(終濃度 50 µg/mL) およびアセトアミド (acetamide) (終濃度 20 µg/mL) を添加した。なお、胆汁存在下におけるシードロットの継代には、生物学的製剤基準に基づいて作製したソートン馬鈴薯培地および 5%グリセリン加牛胆汁馬鈴薯培地 (胆汁馬鈴薯培地) を用いた。他の株の胆汁存在下における継代には、マイコブロスを用いた。

2. 遺伝子破壊株の作製

BCG Tokyo Type Iの *ppsA*破壊株 Type I-pVJ53- Δ *ppsA*の作製は、Che9cファージ由来組換え酵素を応用した相同組換えにより行った。

3. 定量PCR

BCG各ロット中におけるType I とType IIの存在比は、RD16領域に存在するRv3405cを標的とした定量PCRを行なうことで計測した。

4. 統計処理

各実験系における統計解析には、対応のない群間の Student's t test を用いた。なお、*p* 値が 0.001 以下をもって有意差ありと判定した。

【結果】

1. 胆汁馬鈴薯培地を用いた継代による Type I と Type II の存在比率の変化

シードロット BCG Tokyo 172-1 株をソートン馬鈴薯培地に接種し、その後胆汁馬鈴薯培地に継代することを繰り返したところ、継代毎 Type I の比率が急上昇した。

2 Type I と Type II の増殖における胆汁の影響

Type I と Type II を、牛胆汁含有培地で培養したところ、両者の増殖は胆汁により抑制され、Type I よりも Type II の方がその影響をより大きく受けた。

3. 胆汁に対する感受性における *ppsA* 破壊の影響

Type I を親株とする Type I-pVJ53 と *ppsA* を破壊した Type I-pVJ53- Δ *ppsA* の増殖を比較したところ、Type I-pVJ53 よりも Type I-pVJ53- Δ *ppsA* の方が胆汁による増殖の抑制効果をより大きく受けることが示された。

【考察】

シードロット Tokyo 172-1 を胆汁馬鈴薯培地を用いて継代することにより、Type I の存在比率が上昇し、また胆汁による増殖の抑制は、Type I よりも Type II の方が強かったことから、胆汁の使用が、ロット中の Type I と Type II の存在比を変化させる原因であることが示唆された。Type I を親株として *ppsA* 遺伝子破壊株 Type I-pVJ53- Δ *ppsA* を作製したところ、胆汁に対する感受性が増加したことから、*ppsA* の変異が胆汁に対する感受性の違いをもたらしていることが考えられた。*ppsA* は PDIM/PGL の合成に必須の遺伝子群であり、*ppsA* に変異が生じると PDIM/PGL が合成されない。そのため、Type II および Type I-pVJ53- Δ *ppsA* における胆汁に対する感受性の増加は PDIM/PGL が存在しないことによる可能性が考えられる。すなわち、PDIM/PGL は BCG の胆汁に対する抵抗性に働いていることが示唆され、PDIM/PGL の有無と胆汁を含む培地の使用が、BCG ワクチンロット中における Type I と Type II の存在比を変化させる一因と考えられた。

論文審査結果の要旨

本邦における現行の BCG ワクチン (BCG Tokyo) は遺伝学的にヘテロの集団であり、その各バイアルには Type I と Type II が主要なサブポピュレーションとして存在する。Type I と Type II の存在比率は各ロットで異なり、継代が進むほど Type I の比率が上昇する傾向にある。これまでに Type I と Type II の性状の違いが解析され、細胞壁糖脂質であるフチオセロールジミコセロセート (PDIM) とフェノール糖脂質 (PGL) は Type I には存在するが Type II には存在しないことや、その原因が Type II においてこれら PDIM/PGL の合成に関わる遺伝子のひとつである *ppsA* の 1 塩基挿入変異によることが明らかになっている。また、BCG ワクチンの製造過程 (培養) には牛胆汁が使用される。以上のことから、PDIM/PGL の有無および胆汁酸の使用が、Type I と Type II の存在比率を変化させる要因であると推測した。そのため PDIM/PGL の有無が胆汁酸存在下における BCG の増殖に与える影響を明らかにすることを目的として実験を行った。

本研究では、①胆汁添加培地を用いて BCG Tokyo 株を継代し、定量 qPCR により Type I と Type II の比率の変遷を調べた。②胆汁存在下における Type I と Type II の各菌株の増殖を調べた。③BCG Tokyo172 Type I を親株として、ゲノム上の *ppsA* にハイグロマイシン耐性遺伝子を挿入した挿入変異株 ($\Delta ppsA$) を作製した。④胆汁存在下における親株と $\Delta ppsA$ の増殖を検討した。

現行のシードロットである BCG Tokyo172-1 を胆汁添加培地で継代したところ、Type I の存在比率が上昇した。7H9-ADC-Tween80 培地中における Type I, Type II, および $\Delta ppsA$ の増殖に顕著な差は認められなかったが、いずれの株も胆汁の存在によって増殖は抑制された。その抑制率は Type I に対して Type II が、また親株 (Type I) に対して $\Delta ppsA$ がそれぞれ高かった。以上の結果から、PDIM/PGL は胆汁による増殖抑制に対して抵抗性に働き、PDIM/PGL の有無が BCG ワクチンのロット内における Type I と Type II の存在比率を変化させる一因となっていることが示唆された。今回の研究は生物学的観点のみならず、BCG ワクチンの品質管理の観点からも有意なものである。

よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。