

*ppsA*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

田村庄平

Study on the effect of ox bile on the growth of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) using a *ppsA* mutant.

Shohei TAMURA

(平成28年12月15日受付)

緒言

結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* 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¹⁾。World Health Organization (WHO) の報告では、2015 年には世界における結核新規患者数は 1,040 万人で、180 万人が結核のために死亡している²⁾。この死亡数の中にはヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus, HIV) 感染症を合併し罹患した者 40 万人が含まれている。日本でも平成 27 年における結核罹患率は 14.4 であり、低蔓延国の水準値である 10 を上回っている³⁾。また平成 27 年の新登録結核患者数は 18,280 人であり、死亡数は 1,955 人であった³⁾。結核は、国内においては減少傾向にあるものの、未だ国内外において人々の健康の脅威となっている感染症である。

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。定期的 BCG 接種は生後 1 歳に達するまでに接種し、標準的な接種期間は生後 5 ヶ月～8 ヶ月である⁴⁾。

BCG ワクチンは、フランスのパスツール研究所の Albert Calmette 博士と Camille Guérin 博士により強毒であるウシ型結核菌 *Mycobacterium bovis* を 1908 年から 1921 年までの 13 年間、230 代に亘り継代培養して得られた弱毒株であり、両博士の名前に因み bacillus Calmette-Guérin (BCG) と名付けられた。結核菌は疎水性・集塊発育性の性状を持つため凝集しやすく、均一な菌液を作ることが困難である⁵⁾。両博士は 1908 年に試験的に培地にウシ胆汁を加え、結核菌の凝集が容易に分散し均一な菌液を得られることを発見した。それ以降、グリセリン加胆汁馬鈴薯培地にて継代培養を繰り返すことで毒力が低下することを確認している⁶⁾。

BCG ワクチンはパスツール研究所から各国に分与され、日本へは 1924 年に志賀潔によって導入された⁷⁾。1947 年には国立予防衛生研究所 (現国立感染症研究所) に移されたが、この年から凍結乾燥 BCG ワクチンが製造され、そして、予防衛生研究所に導入後 172 代目

の菌を Tokyo 172 としてシードロット化した⁸⁾。現在はその次の世代株である Tokyo 172-1 がシードロットとして使用されている。実際にヒトに投与される商業ロットはシードロットを元に作製される。

ところで、各国で継代された株は亜株として固有の名前が付されているが、それぞれの亜株は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ことが明らかにされている^{9,10)}。さらに日本のワクチン株である BCG Tokyo 172 では2つのサブポピュレーション Type I と Type II が存在する^{11,12)}。Type I は滑沢なコロニー形態を示し、RD16 の Rv3405c 遺伝子に 22 塩基の欠損を有し、Type II は粗造なコロニー形態を示し、Rv3405c 遺伝子は完全長を有する¹²⁾。さらに Type II では 5,631 塩基からなる *ppsA* 遺伝子中の 379 番目の塩基に 1 塩基の挿入が生じたためにフレームシフトが起き、その結果 129 番目のアミノ酸残基に終止コドンが生じて PpsA は部分タンパク質となっている。*ppsA* は *pps* オペロン (*ppsABCDE*) の最も上流に位置し、*drr* オペロン (*drrABC*)、*fadD26*、*papA5* および *mas* とともに細胞壁構成成分である phthiocerol dimycocerosate (PDIM) と phenolic glycolipid (PGL) の合成に必須の遺伝子群である。そのため、PpsA が部分タンパク質となっている Type II では細胞壁に PDIM と PGL が存在しないことが報告されている¹³⁾。この PDIM はポリケタイドの一種であり結核菌では病原性に関与しており、またレドックスストレスに対する抵抗性や抗生物質の耐性に関与している¹⁴⁾。シードロット、商業ロットともに Type I、Type II が存在することが確認されており、その存在比率はロット間で異なることが示唆され^{11,15)}、BCG Tokyo 172 株では、Type II よりも Type I の割合が多いことが報告されている¹⁵⁾。この存在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 と 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することとした。

材料および方法

1. 使用菌株, 使用プラスミドおよび培養条件

大腸菌 *Escherichia coli* DH5 α 株はカナマイシン (Kanamycin: KM) 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ またはカルベニシリン (Carbenicillin: Car) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有 Luria-Bertani (LB) 液体培地と LB 寒天培地 (ともにナカライテスク) で培養した。

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 (Difco) (7H9-ADC-Tween80 液体培地), ADC 添加 Middlebrook 7H10 寒天平板培地 (Difco) (7H10-ADC 寒天培地), あるいはソートン (Sauton's) 培地 {0.5 g KH_2PO_4 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.0 g クエン酸, 4.0 g L-アスパラギン, 60 mL グリセリン, 0.05 g クエン酸鉄アンモニウム (それぞれ 1 リットル当たり), pH7.4}を用いた。なお必要に応じて培地には KM (終濃度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ハイグロマイシン (Hygromycin: Hyg) (終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) およびアセトアミド (acetamide) (終濃度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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¹⁶⁾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 (以下, 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 (極東製薬工業) を用いた。胆汁は新鮮な牛胆のうから穿刺により採取し, 5 個から得たものを混合して使用した。また乾燥粉末品 (biomedical 社製 ox bile extract) も使用した。

2. 遺伝子操作

特別な記載がない限り遺伝子操作は, 分子生物実験で使用されている一般的な方法に従った。また BCG への核酸導入は ECM399 (BTX) を用いて電気穿孔法で行った¹⁷⁾。なお, 本研究で使用したプライマーを表 1 に示した。

3. 遺伝子破壊株の作製

BCG の *ppsA* 破壊株の作製は, van Kessel と Hatfull の方法に従った¹⁸⁾。はじめに, BCG Tokyo 172-1 Type II のゲノム上の *ppsA* の上流領域 1,630 bp と *ppsA* の開始コドンから 3,650 bp までの領域をプライマーセット PpsCL1 と PpsCL2 を用いて polymerase chain reaction (PCR) 法により増幅した。得られた PCR 産物を Zero Blunt® TOPO® PCR クローニングキット (ThermoFisher Scientific) を用いて pCR®-Blunt II-TOPO® にクローニングした。SpeI と XbaI で消化後, あらかじめ XbaI で切断したのちアルカリフォスファターゼ処理を行なった pUC19 に挿入した。そして *ppsA* の一部が挿入された pUC19 を NheI と NspV で切断し, SpeI サイトをもつ Linker A を挿入した。Linker A はオリゴヌクレオチド LA1 と LA2 を 50 pM で混合し, 95°C で 3 分間加熱後徐冷し, アニーリングさせることにより作製した。得られた Linker A をもつプラスミドの SpeI サイトに, XbaI で切断したハイグロマイシン耐性遺伝子カセットを挿入することにより pPpsA-HYG を作製した。pPpsA-HYG は HindIII と XbaI で消化することにより線状化し, *ppsA* 破壊用 DNA 断片とした。

pVJ53 を保持した BCG Tokyo 172-1 Type I は, pVJ53 を同株へ電気穿孔法で導入し, KM 含有 7H10-ADC 寒天培地に播種することにより作製した。作製した株を TypeI-pVJ53 とした。

TypeI-pVJ53 のゲノム上の *ppsA* を破壊するために, まず TypeI-pVJ53 を 15 mL の KM 含有 7H9-ADC-Tween80 液体培地で 24 時間前培養し, その一部を新鮮な 20 mL の KM 含有 7H9-ADC-Tween80 液体培地に OD₅₉₀=0.2 になるように加えて継代した。24 時間後, 終濃度 20 µg/mL になるように 20%アセトアミド溶液を加え, さらに 24 時間培養することにより, pJV53 上の組換え酵素遺伝子 gp60 と gp61 の発現を誘導した。この菌を調製し, 電気穿孔法用のコンピート細胞とした¹³⁾。調整したコンピート細胞に *ppsA* 破壊用 DNA 断片を電気穿孔法で導入後, Hyg 含有 7H10-ADC 寒天培地に播種した。3 週間後, 生じた集落をプライマーセット PpsCH1a と PpsCH1b, PpsCH2a と PpsCH2b, および

PpsCH3a と PpsCH3b を用いた PCR 法で確認し, 相同組換えによりゲノム上の *ppsA* が破壊された株を選択した。

4. 定量 PCR

Type I と Type II の存在比率は, Wada ら¹⁵⁾の方法により, 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。独立した 3 回の実験を行ない, 得られた結果を統計学的に処理した。使用したプライマーおよびプローブは表 2 に示す。

5. 統計処理

各実験系における統計解析には, 一元配置分散分析および Turkey の検定 (IBM SPSS Statics, Ver19) を用いて有意水準 5% で検討した。

結果

1. BCG 変異株の作製

アセトアミドの添加・誘導により TypeI-pVJ53 の gp60 と gp61 を発現させた状態で、ダブルクロスオーバーによる相同組換え法を行ったところ、*ppsA* のオープンリーディング内に Hyg 耐性遺伝子が挿入された遺伝子破壊株 TypeI-pVJ53-Δ*ppsA* が作製された。この株において、目的どおりに相同組換えが行われたことを PCR により確認した (図 1)。*ppsA* の上流および下流領域、および Hyg 耐性遺伝子と入れ替えた領域それぞれにプライマーセットを設計し、PCR を行なったところ、*ppsA* の上流および下流領域に設計したプライマーセットを用いた場合には、TypeI-pVJ53 と同様に TypeI-pVJ53-Δ*ppsA* においても予測される大きさの増幅産物が得られた。しかし、Hyg 耐性遺伝子と入れ替えた領域に設計したプライマーセットを用いたところ、TypeI-pVJ53 の場合には野生型遺伝子で予測される大きさの増幅産物が得られたが、TypeI-pVJ53-Δ*ppsA* においては増幅産物が得られなかった。以上のことから TypeI-pVJ53-Δ*ppsA* は *ppsA* の一部が欠失した株であることが確認された。

2. 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、27 日後に胆汁馬鈴薯培地に継代した。その後 14 日毎に新鮮な胆汁馬鈴薯培地に継代することを繰り返した。各世代における菌体を破壊し、Type I と Type II の存在比を定量 PCR で測定した (図 2)。ソートン馬鈴薯培地上では Type I の比率が 21%であったが、胆汁馬鈴薯培地に継代したところ、Type I の比率が急増し 72%であった。その後も Type I の比率は増加し、胆汁馬鈴薯培地に継代後 6 世代においては Type I の比率は 99%に達した。このことから、胆汁馬鈴薯培地においては Type I のほうが Type II よりも生存に有利であることが示唆された。

3. Type I と Type II の増殖における胆汁の影響

前項の結果から、Type I と Type II では胆汁に対する感受性が異なる可能性がある。このことを明らかにするため、マイコブロスを用いて $OD_{590}=0.05$ に調整した Type I と Type II の菌液を、 37°C で 14 日間培養した。そして、牛胆汁を含む培地で培養した場合と、胆汁を含まない培地で培養した場合の濁度を比較した。胆汁を含まない培地で培養したときの菌液の濁度を 1 とした場合、8%牛胆汁を含む培地で培養した菌液は Type I では 0.60, Type II では 0.20 であった(図 3)。また、凍結乾燥胆汁 2 mg/mL を含む培地で培養した菌液は Type I では 0.58, Type II では 0.15 であった。以上のことから、BCG Tokyo 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ることが示された。

4. 胆汁に対する感受性における *ppsA* 破壊の影響

Type II では *ppsA* に 1 塩基の挿入があることにより、その遺伝子産物が機能していないことが示されていることから、Type I と Type II の胆汁に対する感受性の違いは *ppsA* が原因となっている可能性がある。このことを明らかにするため、Type I の *ppsA* 破壊株を作製して胆汁に対する感受性を検討した。野生型 *ppsA* を持つ TypeI-pVJ53 と *ppsA* を破壊した TypeI-pVJ53- Δ *ppsA* を胆汁存在下で培養し、経時的にそれらの濁度を測定した(図 4A)。胆汁非含有培地では TypeI-pVJ53 と TypeI-pVJ53- Δ *ppsA* の間に差は認められなかった。しかし、胆汁存在下では両者ともに増殖速度は遅くなり、TypeI-pVJ53- Δ *ppsA* の方が TypeI-pVJ53 よりも遅延した。培養 13 日後においては胆汁を含まない培地で培養したときの菌液の濁度を 1 とした場合、8%牛胆汁を含む培地で培養した菌液は TypeI-pVJ53 では 0.31, TypeI-pVJ53- Δ *ppsA* では 0.08 であった(図 4B)。また、凍結乾燥胆汁 2 mg/mL を含む培地で培養した菌液は TypeI-pVJ53 では 0.69, TypeI-pVJ53- Δ *ppsA* では 0.07 であった。以上のことから、TypeI-pVJ53 よりも TypeI-pVJ53- Δ *ppsA* の方が胆汁の影響をより大きく受けることが示された。

考察

BCG ワクチンは 1921 年に世界で初めてヒトに接種されて以降今日に至るまで、世界中で最も多くの人に接種されたワクチンであり、これまでに延べ 30 億回以上接種されている¹⁹⁾。そのため、効果および安全性の程度が把握されており、また製造コストが低いという利点を有する²⁰⁾。結核発症に対する予防効果としては一般的に、成人の肺結核症に対する効果は限定的とされているが、粟粒結核や結核性髄膜炎を含む小児の重症型結核症に対して有効とされている。また泌尿器科領域においては、潜在性膀胱癌に対して BCG の膀胱療法が実施されており、効果を上げている²¹⁾。

世界各国に分与された BCG はそれぞれの国において長年に亘り継代されているため、それぞれの亜株においてゲノムに欠失部位が生じ、その違いにより遺伝学的に多様性を示している^{9,10)}。そしてこれらの遺伝学的差異は表現型に影響し、細胞壁脂質、炭素代謝、抗原性が亜株間で異なることが報告されている^{10,22-26)}。この遺伝学的多様性は、培地中や長期に亘る保存中における安定性に影響を与える可能性がある。

亜株間の多様性に加え、亜株内においても多様性が生じていることが報告されており¹⁰⁻¹²⁾、日本の現行のワクチン株である BCG Tokyo においては Type I と Type II のサブポピュレーションの存在が明らかになっている^{11,12)}。BCG Tokyo のそれぞれのロット中に Type I と Type II の異なるサブポピュレーションが存在することから、Type I と Type II 以外のサブポピュレーションがさらに存在する可能性が考えられ、また継代している間にサブポピュレーションの存在比率が変化することが考えられる。そのため Wada らは BCG Tokyo の前シードロットである Tokyo 172、現行のシードロット Tokyo 172-1、それぞれのシードロットから作製された商業ロット、さらに日本から分与されたタイ王国および台湾の商業ロットの各バイアルに含まれる全菌の染色体 DNA を次世代シーケンサーによって解析した。その結果、Type I と Type II 以外のサブポピュレーションは見つからず、両者においてはゲノム上に 7 カ所の変異が存在することを報告している¹⁵⁾。しかし、

Type I と Type II の存在比はロット間で異なり、世代を経るにつれて Type I の比率が上昇していた^{11, 15)}。この理由についてはこれまで明らかにされていないが、ワクチンの品質管理の観点からは、存在比率が変化することは好ましくなく、またその理由を明らかにする必要はある。

BCG ワクチンの製造過程においては胆汁を含む培地が使用されること¹⁶⁾、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¹³⁾に着目した。なお、Epstein らは胆汁の構成成分であるコール酸、リトコール酸、デオキシコール酸、およびケノデオキシコール酸が結核菌の増殖を抑制することを報告している²⁷⁾。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 (図 2)、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 (図 3)、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 と Type II のゲノムで異なる 7 カ所の中で、細胞壁構成成分の合成に直接関係するものは *ppsA* 遺伝子である。*ppsA* は *pps* オペロン (*ppsABCDE*) の最も上流に位置し、*drr* オペロン (*drrABC*)、*fadD26*、*papA5* および *mas* とともに PDIM や PGL の合成に必須の遺伝子群であり²⁸⁾、*ppsA* が機能しなければ PDIM と PGL は合成されない¹³⁾。胆汁感受性に対する *ppsA* の影響を調べるため、Type I を親株としてファージ由来組換え酵素を保持した Type I-pVJ53 を作製し、さらにこの株から相同組換えにより *ppsA* 遺伝子破壊株 Type I-pVJ53-Δ*ppsA* を作製した。胆汁による増殖の抑制は、Type I-pVJ53 よりも Type I-pVJ53-Δ*ppsA* の方が強かったことから (図 4)、*ppsA* の破壊は胆汁に対して感受性を強めることが示された。このことから PDIM/PGL は胆汁に対する抵抗性に働いていることが示唆される。なお、ビフィドバクテリウムにおいては胆汁酸が菌体外ポリサッカライドの合成に影響を与えることが報告されている²⁹⁾が、抗酸菌においては細胞壁の構成成分の合成に対する胆汁の影響を調べた報告は調べた限りにおいては無く、PDIM/PGL の合成に対する胆汁の影響を明らかにすることは今後の課題である。

今回の実験結果から、日本の現行の結核ワクチンである BCG Tokyo に含まれるサブポピュレーション Type I と Type II の存在比率が変化する要因として、細胞壁成分 PDIM/PGL の有無、およびそれによる胆汁に対する感受性の違いが示された。

結語

ppsA 遺伝子が胆汁による増殖抑制に対して抵抗性に働くことが示された。また BCG ワクチンのロット内における Type I と Type II の存在比率の変化に *ppsA* 遺伝子の有無が一因となっている可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なるご指導と御高閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻口腔微生物学分野大原直也教授に深甚なる謝意を表します。また様々な面にわたり貴重なご助言と御協力を下さいました、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻顎口腔再建外科学分野飯田征二教授、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻口腔微生物学分野中山真彰助教ならびに口腔微生物学分野、顎口腔再建外科学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) 三大感染症について．外務省． Available at : <http://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/kansen/kansen.html>. Accessed February 9, 2017.
- 2) World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. Available at : http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Accessed Dec 12, 2016.
- 3) 厚生労働省．平成 27 年結核登録者情報調査年報集計結果． Available at : <http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000132952.html>. Accessed Dec 12, 2016.
- 4) 国立感染症研究所．予防接種情報． Available at : <http://www.nih.go.jp/niid/ja/vaccine-j.html>. Accessed Dec 12, 2016.
- 5) 松葉隆司, 中島千絵, 鈴木定彦 : 結核菌のエンベロープ構造と成分. 日本細菌学雑誌 **65**,355-368,2010.
- 6) Albert, C. La vaccination preventive contre la tuberculose par le "BCG". Masson, Paris, 1927,p66-105.
- 7) 渡邊義政.: カルメット氏 B C G 「ワクシン」ヲ以テセル結核免疫試験(第一回報告) . 結核, **7**, 496-511, 1929.
- 8) Jackson M, Yamamoto S. Historical background of *Mycobacterium bovis* BCG. In Takii T, Maeyama J-I, Yamamoto S, eds. : BCG-vaccine and adjuvant- JATA, Tokyo, 2011, p3-12.
- 9) Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM.: Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*. **284**, 1520-1523, 1999.
- 10) Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST.: Genome plasticity of

- BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**, 5596-5601, 2007.
- 11) Shibayama K, Mochida K, Yagi T, Mori S, Arakawa Y, Yamamoto S.: Quantification of two variant strains contained in freeze-dried Japanese BCG vaccine preparation by real-time PCR. *Biologicals*. **35**, 139-143, 2007.
- 12) Honda I, Seki M, Ikeda N, Yamamoto S, Yano I, Koyama A, Toida I.: Identification of two subpopulations of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo172 substrain with different RD16 regions. *Vaccine*. **24**, 4969-4974, 2006.
- 13) Naka T, Maeda S, Niki M, Ohara N, Yamamoto S, Yano I, Maeyama J, Ogura H, Kobayashi K, Fujiwara N.: Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Tokyo 172 substrain. *J Biol Chem*. **286**, 44153-44161, 2011.
- 14) Chan, J., and Flynn, J.L. : Nitric oxide in Mycobacterium tuberculosis infection. In Fang F.C. ed ; Nitric Oxide and Infection. Springer US, New York, 1999, p281–310.
- 15) Wada T, Maruyama F, Iwamoto T, Maeda S, Yamamoto T, Nakagawa I, Yamamoto S, Ohara N.: Deep sequencing analysis of the heterogeneity of seed and commercial lots of the bacillus Calmette-Guérin (BCG) tuberculosis vaccine substrain Tokyo-172. *Sci Rep*. **5**, 17827, 2015.
- 16) 国立感染症研究所. 生物学的製剤基準 (平成 16 年 3 月 30 日 厚生労働省告示 第 155 号, 最終改正 : 平成 28 年 3 月 28 日 厚生労働省告示 第 106 号). Available at : <http://www.nih.go.jp/niid/ja/mrbp.html>. Accessed Dec 12, 2016.
- 17) Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, Tasaka H, Terasaka K, Totsuka M, Kobayashi K, Yukitake H, Yamada T.: Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. *Infect Immun*. **58**, 4049-4054, 1990.
- 18) van Kessel JC, Hatfull GF.: Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Methods*. **4**, 147-152, 2007.

- 19) Fine PEM.: The BCG story: lessons from the past and implication for the future. *Rev Infect Dis.* **11**, S253-S359, 1989.
- 20) Bloom, B.R. and Fine, P.E.M. : The BCG Experience: Implications for Future Vaccines against Tuberculosis. In Bloom B.R. ed ; Tuberculosis. ASM Press, Washington, DC, 1994, p531-557.
- 21) Kamat AM, Hahn NM, Efstathiou JA, Lerner SP, Malmström PU, Choi W, Guo CC, Lotan Y, Kassouf W.: Bladder cancer. *Lancet.* **388**, 2796-2810, 2016.
- 22) Hayashi D, Takii T, Mukai T, Makino M, Yasuda E, Horita Y, Yamamoto R, Fujiwara A, Kanai K, Kondo M, Kawarazaki A, Yano I, Yamamoto S, Onozaki K.: Biochemical characteristics among *Mycobacterium bovis* BCG substrains. *FEMS Microbiol Lett.* **306**, 103-109, 2010.
- 23) Aguirre-Blanco AM, Lukey PT, Cliff JM, Dockrell HM.: Strain-dependent variation in *Mycobacterium bovis* BCG-induced human T-cell activation and gamma interferon production in vitro. *Infect Immun.* **75**, 3197-3201, 2007.
- 24) Belley A, Alexander D, Di Pietrantonio T, Girard M, Jones J, Schurr E, Liu J, Sherman DR, Behr MA.: Impact of methoxymycolic acid production by *Mycobacterium bovis* BCG vaccines. *Infect Immun.* **72**, 2803-2809, 2004.
- 25) Orduña P, Cevallos MA, de León SP, Arvizu A, Hernández-González IL, Mendoza-Hernández G, López-Vidal Y.: Genomic and proteomic analyses of *Mycobacterium bovis* BCG Mexico 1931 reveal a diverse immunogenic repertoire against tuberculosis infection. *BMC Genomics.* **12**, 493, 2011.
- 26) Dubos RJ, Pierce CH.: Differential characteristics in vitro and in vivo of several substrains of BCG. IV. Immunizing effectiveness. *Am Rev Tuberc.* **74**, 699-717, 1956.
- 27) Epstein D, Mistry K, Whitelaw A, Watermeyer G, Pettengell KE.: The effect of physiological concentrations of bile acids on in vitro growth of *Mycobacterium*

tuberculosis. *S Afr Med J*. **102**, 522-524, 2012.

28) Trivedi OA, Arora P, Vats A, Ansari MZ, Tickoo R, Sridharan V, Mohanty D, Gokhale RS.: Dissecting the mechanism and assembly of a complex virulence mycobacterial lipid. *Mol Cell*. **17**, 631-643, 2005.

29) Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Arigoni F, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A.: Bile affects the synthesis of exopolysaccharides by *Bifidobacterium animalis*. *Appl Environ Microbiol*. **75**, 1204-1207, 2009.

表 1. 本研究に使用した PCR プライマー

名 称	配 列 (5'-3')
PpsCL1	GCTTGACTTGGTCGCAGGTCTACAGTCGTG
PpsCL2	ACGACATCGCCGAGCGATATCTGCTCGATG
PpsCH1a	ATTACCTTACATTTGCGGGCTAGGCATAGC
PpsCH1b	TCCCATTCGGCTTTCTGGCGTTCACTATG
PpsCH2a	TTTTGCCCGACATCGACGCCTTCGAC
PpsCH2b	CGGACACCCGCTGCATAGTCTTG
PpsCH3a	GCTTCGATAACGGGCTCTGGACTTTG
PpsCH3b	GCAAGGCCCCACAGGAAACTCTG
LA1	CGAAGACTAGTG
LA2	CTAGCACTAGTCTT

表 2. 定量 PCR に用いたプライマーおよびプローブ

	配列
プライマー	
Type II 特異的フォワード	CGAAGCTGACCAGACTGTTGC
Type I 特異的フォワード	CTCGATCACCTGGGCACTC
リバーズ(共通)	GGTCGAGAGCCCGTTCG
プローブ	FAM-TGATGTCAGCGGGCGCCT-TAMRA

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 顎口腔再建外科学分野

(指導 飯田 征二教授)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔微生物学分野

(委託 大原 直也教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 69 回日本細菌学会中国・四国支部総会 (2016 年 10 月, 香川)

図の説明

図1 BCG Tokyo Type I と TypeI-pVJ53-ΔppsA のゲノム上の *ppsA* 遺伝子座の模式図

A. BCG Tokyo Type I と TypeI-pVJ53-ΔppsA のゲノム上の *ppsA* 遺伝子座を模式図に示す。a, b, c は遺伝子の相同組換えが目的どおりに行なわれたことを確認するために行った PCR の増幅領域を示す。使用したプライマーセットは, a: PpsCH1a - PpsCH1b, b: PpsCH2a - PpsCH2b, c: PpsCH3a - PpsCH3b である。 B. A で示す a, b, c の領域の PCR の結果を示す。

図2. 胆汁馬鈴薯培地での継代による Type I の存在比の変化

BCG Tokyo 172-1 をソートン馬鈴薯培地に接種し, 4 週後に胆汁馬鈴薯培地に継代した。その後 14 日毎に新鮮な胆汁馬鈴薯培地に継代することを繰り返した。継代時に菌体の一部を採取し, そのゲノムを定量 PCR で解析し, Type I が存在する割合を算定した。1, ソートン馬鈴薯培地接種 27 日後; 2, 胆汁馬鈴薯培地初代継代 14 日後; 3, 胆汁馬鈴薯培地 2 代継代 14 日後; 4, 胆汁馬鈴薯培地 3 代継代 14 日後; 5, 胆汁馬鈴薯培地 4 代継代 14 日後; 6, 胆汁馬鈴薯培地 5 代継代 14 日後; 7, 胆汁馬鈴薯培地 6 代継代 14 日後。

図3. Type I と Type II の増殖に対する胆汁酸の影響

Type I と Type II を 7H9-ADC-Tween80 液体培地で前培養し, 濁度を 0.25 に調整した。その 1 mL をマイコブロス 4 mL と混合し, 胆汁を添加して培養した。2 週間後の結果を示す。胆汁を添加しない場合の濁度を 1 とし, それに対する比率を示した。異なるアルファベット間では $p < 0.05$ で有意に差があることを示す。■, Type I; □, Type II。

図4. Type I-pVJ53 と Type I-pVJ53-ΔppsA の増殖に対する胆汁酸の影響

A. Type I-pVJ53 と Type I-pVJ53-ΔppsA を 7H9-ADC-Tween80 液体培地で前培養し, 濁度を 0.25 に調整した。その 1 mL をマイコブロス 4 mL と混合し, 胆汁を添加して培養し, 経時的に濁度を測定した。●, 胆汁無添加; ■, 凍結乾燥胆汁 2 mg/mL 含有培地; ▲, 胆汁 8 %含有培地。 B. 2 週間後の結果を示す。胆汁を添加しない場合の濁度を 1 とし, それに対する比率を示した。異なるアルファベット間では $p < 0.05$ で有意に差があることを示す。■, Type I-pVJ53; □, Type I-pVJ53-ΔppsA。