

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
飯田 征二 印	研究結果の評価
大原 直也 印	論文の総括指導
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野顎口腔再建外科学	身分 大学院生	氏名 田村 庄平
論 文 題 名 <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		
論文内容の要旨（2000字程度）		
<p>【緒言】</p> <p>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。</p> <p>【材料および方法】</p> <p>1. 使用菌株と培養条件</p> <p>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50µg/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。</p>		

論文内容の要旨（2000字程度）

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 TypeI-pVJ53 と *ppsA*を破壊した TypeI-pVJ53- Δ ppsA の増殖を比較したところ、TypeI-pVJ53 よりも TypeI-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。