世界の結核研究の動向(37)

結核を「バイオフィルム感染症」として考える

結核研究所抗酸菌部
結核菌情報科研究員　森重 雄太

バイオフィルムは「細胞外の高分子マトリックス（DNAや多糖，タンパク質等）に包まれた対象物の表面に付着する微生物細胞の集合体」と定義されている[1]。例えるならば，生体物質を壁（バリア）とした微生物の「城」である。特に病原微生物においては，バイオフィルムは宿主免疫応答や抗菌薬による攻撃から身を守る絶好の隠れ家となる。バイオフィルムに起因する感染症は多岐にわたる。特に問題となるのは人工関節や心臓ペースメーカー，血管内留置カテーテル等，体内に留置したデバイスの表面に形成されるバイオフィルムで，これらは前述の細胞外マトリックスの存在により宿主免疫応答や抗菌薬の難を逃れ，慢性かつ難治性の「バイオフィルム感染症」を起こし得る[2]。このような背景から，多くの病原細菌・真菌において，バイオフィルム形成機構に注目した研究が広く行われてきた。しかし，結核を含む抗酸菌研究の分野では長らく，バイオフィルムについてはあまり注目されて来なかった。本稿では，近年盛んになりつつある結核菌バイオフィルム研究の動向について解説する。

結核菌バイオフィルム研究の歴史

まず，一般的な細菌バイオフィルム形成過程を示す（図1）。バイオフィルム形成は，浮遊菌の固体表面（例えば，宿主細胞やデバイス表面）への付着を発端とする。ところが，結核菌の場合は少々異なり，気液界面にペリクルと呼ばれる膜状のバイオフィルムを形成する（図2）。結核の病態形成機構とバイオフィルム形成との関連性に疑問を抱く方もあると思う。事実，前述の固体表面への付着を伴うバイオフィルム形成は，結核菌では考えづらい（稀ではあるが，人工関節に関連した結核菌感染の報告は存在する）[3]。このような背景から，結核菌のバイオフィルムは，抗酸菌研究の初期にコッホが詳細に記述したように「菌体が互いに押し付け合い，束になって並んでいる凝集塊」という理解が長らく一般的で，結核研究はマクロファージ内の菌と宿主免疫機構の相互作用に注目が集まった。しかし，結核菌がバイオフィルム形成菌であることを示唆する報告は少なからず存在した[4,5]。

2008年にOjhaらが，結核菌のペリクルは遊離ミコー

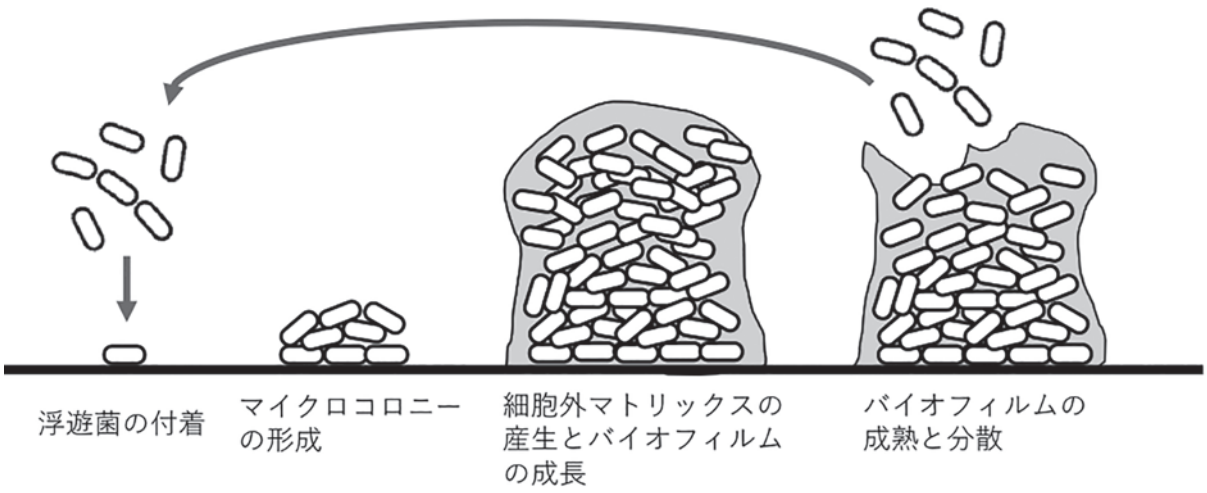

図 1. 一般的な細菌バイオフィルム形成過程

ル酸を豊富に含む細胞外マトリックスであることを示し，その産生が他のバイオフィルム形成細菌と同様に結核菌の薬剤感受性低下を引き起こすことを報告した[6]。この報告が，結核菌の凝集塊を「バイオフィルム」と捉えるようになったきっかけと言えるだろう。以降，他のバイオフィルム形成菌と同様に細胞外DNA等から構成される細胞外マトリックスの産生機構に注目した「バイオフィルム形成菌」としての研究が盛んになっていった[7]。

結核菌が肺内でバイオフィルムを形成する

近年，結核菌にジチオスレイトール（DTT）によって還元ストレスを負荷すると，前述のペリクルとは異なる性質のセルロースを主要分子とするバイオフィルムを形成することがTrivediらによって報告された[8]。驚くべきことに，このセルロースを含む結核菌バイオフィルムは結核感染マウス，サル，引いては結核患者の肺内からも検出された[9]。これは結核菌が生体内でもバイオフィルムを形成する新たな証拠を示し，結核が「バイオフィルム感染症」であると提唱する興味深い報告である。しかし，この現象については未解明の部分も多い。例えば，結核菌のセルロース生合成経路は未同定で，セルロースとして検出された多糖は構造が類似する別の化合物であるとする見解もあり[10]，更なる研究が望まれる。

結核菌バイオフィルム形成能の遺伝的差異

結核菌はその遺伝的背景に基づき，大きく6つの系統（Lineage）に分けられる[11]。前述のChakrabotyらの報告ではLineage 4に分類されるH37Rv株を用いているが，ヒト肺内でセルロースを含むバイオフィルムが見つかった検体のLineageについては言及していない[9]。バイオフィルム形成能の系統間差異や病原性との関連等，興味は尽きない。この点については，従来のペリクル状バイオフィルム形成能を評価したPangらの研究が興味深い[12]。Pangらは結核菌ポリケチド合成酵素遺伝子pks1およびpks15の構造的な差異がバイオフィルム形成に大きな影響を与えることを示している。併せて，これらの遺伝子には変異が高頻度に起きていて，バイオフィルム形成能についても

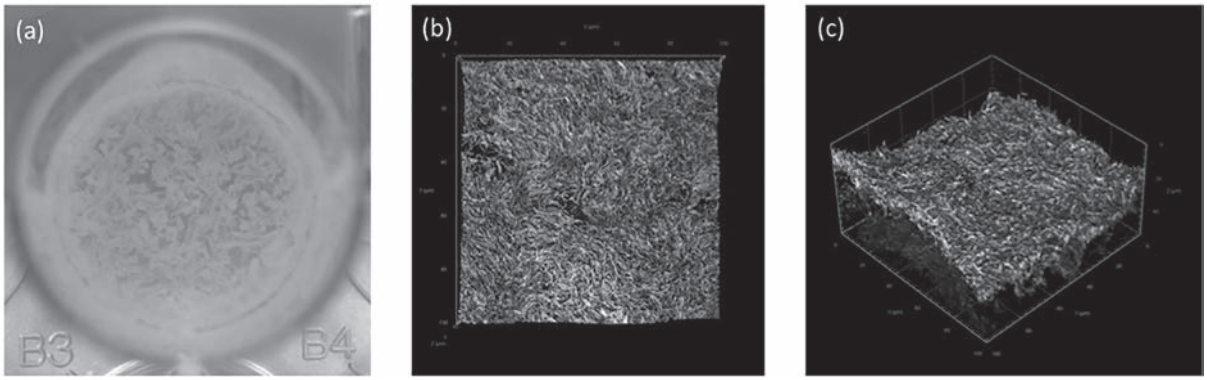

図 2. 結核菌バイオフィルム
ソートン培地に結核菌 H37Rv 株を接種し，37℃ 5% CO2 条件下で 2 ヶ月間培養してペリクル状のバイオフィルムを形成させた(a)。これをスライドガラス上に展開して Auramine-Rhodamine 染色を施し，DPX New で封入して共焦点レーザースキャン顕微鏡で 3D イメージを得た。(b: 平面図 c: 鳥瞰図)

Lineage間およびLineage内でもかなりのばらつきがあることを示している。すなわち，バイオフィルムを形成しやすい，あるいは形成しにくい特定のLineageは無いようである。安定したゲノムを持つ結核菌でこのような表現型の多様性が生ずることは興味深く，さらなる研究が望まれる。また，Richardsらはバイオフィルムの成熟過程においてイソニトリルリポペプチド（INLP）の生合成が必要であり，INLP合成酵素遺伝子群の欠損はバイオフィルムの成熟を阻害することを示した[13]。

このように，一般細菌同様に結核菌においても，バイオフィルム形成機構は徐々に解明されつつある。

結核とバイオフィルムの理解に向けて

結核をバイオフィルム感染症の一つとして考えることで，結核の病態形成機構の解明や新規ワクチン開発，新規抗結核薬創出に新たな知見をもたらすことが期待される。本稿の結語として，結核菌バイオフィルム研究の更なる加速のために「実環境を反映したバイオフィルム実験モデルを用いること」を提唱したい。古典的な培養法は制御が容易であるという点では魅力的だが，実環境（結核研究においては生体内）を正しく反映しているかという点では疑問が残る。近年では，気液界面培養系やマイクロ流路デバイスといった，微小環境を再現する培養システムが容易に利用可能である。これらを駆使し，実環境を反映した実験系を用いることで，結核菌の「本来の姿」が見えるようになり，革新的な結核治療法，診断法，予防法の開発につながると考えている。

参考文献：

1. R. M. Donlan, Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 881–890 (2002).
2. 日本バイオフィルム学会広報委員会, 微生物たちのお城～バイオフィルム（2020），(available at http://www.med.osaka-cu.ac.jp/bacteriology/b-online/biofilm/).
3. J. I. N. Tokumoto, S. E. Follansbee, R. A. Jacobs, Prosthetic Joint Infection Due to Mycobacterium tuberculosis: Report of Three Cases. *Clin. Infect. Dis.* 21, 134–136 (1995).
4. G. Canetti, in *Histobacteriology and its Bearing on the Therapy of Pulmonary Tuberculosis*, R. J. Dubos, W. McDermott, Eds. (Springer Publishing Company Inc., New York, 1955), p. 226.
5. R. L. Hunter, Tuberculosis as a three-act play: A new paradigm for the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis.* 97, 8–17 (2016)
6. A. K. Ojha *et al.,* Growth of Mycobacterium tuberculosis biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol. Microbiol.* 69, 164–74 (2008)
7. A. K. Ojha, W. R. Jacobs, G. F. Hatfull, in *Mycobacteria Protocols,* T. Parish, R. D, Eds. (Humana Press, New York, 2015; https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2450-9_12), pp. 215-226.
8. A. Trivedi, P. S. Mavi, D. Bhatt, A. Kumar, Thiol reductive stress induces cellulose-anchored biofilm formation in Mycobacterium tuberculosis. *Nat. Commun.* 7, 11392 (2016).
9. P. Chakraborty, S. Bajeli, D. Kaushal, B. D. Radotra, A. Kumar, Biofilm formation in the lung contributes to virulence and drug tolerance of Mycobacterium tuberculosis. *Nat. Commun.* 12, 1606 (2021).
10. J. Bacon, S. J. Waddell, M. A. Flores-Valdez, Biofilms in tuberculosis: What have we learnt in the past decade and what is still unexplored? *Tuberculosis.* 132, 102153 (2022).
11. S. Gagneux et al., Variable host–pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 2869–2873 (2006).
12. J. M. Pang *et al.,* The Polyketide Pks1 Contributes to Biofilm Formation in Mycobacterium tuberculosis. *J. Bacteriol.* 194, 715–721 (2012).
13. J. P. Richards, W. Cai, N. A. Zill, W. Zhang, A. K. Ojha, Adaptation of Mycobacterium tuberculosis to Biofilm Growth Is Genetically Linked to Drug Tolerance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63 (2019), doi:10.1128/AAC.01213-19.