

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

結核菌病原因子と宿主応答

分担研究者 小林 和夫（大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学・
教授）

研究要旨. *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) 感染症は結核など抗酸菌感染症の約 20%を占める。MAC は環境菌であり、普遍的に存在するため、臨床および病原体診断を確定には臨床経過を考慮し、長期間を要する。本研究では MAC 特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) 抗原を用いた迅速・簡便血清診断法を開発した。その結果、肺 MAC 感染症に対する感度は 92.3%、特異度は 98.5%であり、感度および特異度ともに良好な成績を示した。また、陽性予測力（陽性適中力：陽性結果が出た場合、当該疾患の存在する確率）は 90.0%、陰性予測力（陰性適中力：陰性結果が出た場合、当該疾患の存在しない確率）は 97.5%であった。また、血清抗 GPL 抗体価は MAC 感染症の疾患活動性を反映した。従って、GPL 抗原を用いた血清診断は MAC 感染症の診断や疾患活動性の評価に有用である。

A. 研究目的

Mycobacterium avium-intracellulare complex (MAC) 感染症は結核など抗酸菌感染症の約 20%を占める。MAC は環境菌であるため、臨床および病原体診断を確定には臨床経過を考慮するため、長期間を要する。また、MAC は抗微生物薬に対し多剤耐性を示すため、治療に難渋し、根治は困難である。行政的に、ヒト・ヒト感染がないため、「結核予防法」による隔離を要しないが、多くの MAC 患者は抗酸菌塗抹陽性の時点で保健所長に届けられ、隔離を余儀なくされているのが実情である。本研究では、MAC 特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) 抗原を用いた迅速・簡便血清診断法の開発を目的とした。

B. 研究方法

米国胸部疾患学会および国立療養所非定型抗酸菌研究班の診断基準に合致した肺 MAC 感染症（78例）、無症候性 MAC 感染（12例）、肺 *M. kansasii* 感染症（30例）、喀痰培養陽性結核（72例）および健常者（131例）由来治療前血清を用い、

MAC 特異的 GPL 抗原に対する IgG 抗体を酵素抗体法により測定した。

11 標準菌株の MAC から GPL 抗原を分離・精製し、薄層クロマトクロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーにて、化学構造を決定した。

なお、患者血清採取に際し、インフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

カットオフ値は Receiver-Operator 曲線から 0.119 に設定し、陽性および陰性を判定した。その結果、肺 MAC 感染症（78例）における血清抗体陽性者は 72例（92.3%）であった。また、無症候性 MAC 感染（12例）の陽性者は 0例（0%）、肺 *M. kansasii* 感染症（30例）の陽性者は 1例（3.3%）、喀痰培養陽性結核（72例）の陽性者は 5例（6.9%）および健常者（131例）の陽性者は 2例（1.5%）であった。なお、多くの健常者が BCG 既接種であることから、抗 GPL 抗体の測定は BCG 接種の影響を受けないことも判明した。すなわち、血清抗 GPL 抗体の測定は主要な肺抗酸菌感染症 (MAC

感染症、*M. kansasii* や結核) を安全、迅速、かつ、効率的に診断することに寄与していた。

次に、抗 GPL 抗体価と疾患活動性に関し、解析した。すなわち、抗微生物化学療法により、喀痰 MAC 陰性が 6 ヶ月以上持続した患者の治療前 (活動期) および後 (非活動期) の血清を用い、抗 GPL 抗体価を測定した。治療前抗体高値症例は治療後に抗体価の減少が顕著であった。個々の症例で変動はあるが、全体として、治療後に抗体価の有意な減少を示した。すなわち、血清抗 GPL 抗体価の測定は MAC 感染症の診断のみならず、MAC 感染症の疾患活動性を反映することが示唆された。

D. 考察

肺 MAC 感染症 (78 例)、無症候性 MAC 感染 (12 例)、肺 *M. kansasii* 感染症 (30 例)、喀痰培養陽性結核 (72 例) および健常者 (131 例) 由来治療前血清を用い、MAC 特異的 GPL 抗原に対する IgG 抗体を測定した。なお、カットオフ値は Receiver-Operator 曲線から 0.119 に設定した。その結果、肺 MAC 感染症に対する感度は 92.3%、特異度は 98.5% であり、感度および特異度ともに良好な成績を示した。また、陽性予測力 (陽性適中力: 陽性結果が出た場合、当該疾患の存在する確率) は 90.0%、陰性予測力 (陰性適中力: 陰性結果が出た場合、当該疾患の存在しない確率) は 97.5% であった。また、血清抗 GPL 抗体の変動は MAC 感染症の疾患活動性を反映することも判明した。従って、血清抗 GPL 抗体の測定は MAC 感染症の診断や疾患活動性の評価に有用である。血清抗 GPL 抗体の測定は体外診断であり、安全、迅速 (所要時間: 約 3 時間)、かつ、効率的に MAC 感染症を診断することに寄与している。

今後、より簡便な GPL 抗原を用いた血清診断キットの開発、大規模臨床試験による評価、GPL 抗原の抗原決定基、抗 GPL 抗体の出現時期、抗体クラス (IgG、IgA、IgM) や抗 GPL 抗体の宿主防御における生物学的

意義を解明したい。

E. 結論

MAC 特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) 抗原を用いた迅速・簡便血清診断法を開発した。肺 MAC 感染症に対する感度は 92.3%、特異度は 98.5% であり、感度および特異度ともに良好な成績を示した。また、陽性予測力は 90.0%、陰性予測力は 97.5% であった。また、血清抗 GPL 抗体価は MAC 感染症の疾患活動性を反映した。GPL 抗原を用いた血清診断は MAC 感染症の診断や疾患活動性の評価に有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitada, S., R. Maekura, N. Toyoshima, N. Fujiwara, I. Yano, T. Ogura, M. Ito, and K. Kobayashi. Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex with an enzyme immunoassay that uses the mixture of glycopeptidolipid antigens. Clin. Infect. Dis. 35: 1328-1335, 2002.
- 2) 前田伸司、小林和夫. 医学細菌の分類・命名の情報. 12. 病原性抗酸菌の新種. 感染症学雑誌 76: 413-415, 2002.
- 3) 小林和夫. 21 世紀における感染症の脅威と制圧戦略. 日本臨床内科医会誌 17: 233-238, 2002.

2. 学会発表

- 1) 松本壮吉、小林和夫. 抗酸菌感染に対する宿主防御と病変形成機序. 細胞内寄生菌に対する感染防御免疫 (シンポジウム). 日本細菌学会雑誌, 57: 69, 2002. 第 75 回日本細菌学会総会 2002 年 4 月 横浜.
- 2) 前田伸司、松岡正典、中田 登、甲斐雅規、前田百美、橋本 研、小林和夫、柏原嘉子. ハンセン病における薬剤耐性検査法の確立. 日本細菌学会雑誌, 57: 123,

2002. 第 75 回日本細菌学会総会 2002 年
4 月 横浜.

- 3) 小林和夫. 結核菌菌体成分に対する炎症
および免疫応答. 結核免疫の動向と課題
(シンポジウム). 結核、77:92、2002.
第 77 回日本結核病学会総会 2002 年 4 月
東京.
- 4) 小林和夫. 21 世紀における感染症の脅
威と制圧戦略 (教育講演). 日本臨床内
科医会会誌、17:246. 第 16 回日本臨
床内科医学会 2002 年 9 月 和歌山.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成 14 年度 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

新しい診断法及び予防法の開発のための病原性及び
抗原性因子の研究

分担研究報告書

分担研究者

牧野 正彦（国立感染症研究所・病原微生物部部長）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

新しい診断法及び予防法の開発のための病原性及び抗原性因子の研究

分担研究者 牧野 正彦（国立感染症研究所・病原微生物部部長）
研究協力者 前田 百美（感染研病原微生物部・研究員）
 中田 登（感染研病原微生物部・研究員）
 向井 徹（感染研病原微生物部・第一室長）
 鈴木 幸一（感染研病原微生物部・第四室長）

研究要旨. 抗酸菌感染症に対する新しい診断法および予防法開発のため、病原性因子ならびに抗原性因子の探索を以下の通り展開した。1) 非結核性抗酸菌感染症の迅速鑑別法の開発研究。迅速鑑別診断法の開発を目的とし、増幅候補遺伝子の検索を行った。*dnaA* 遺伝子領域内の約 200bp を候補領域とした。この約 200 bp 種特異的配列に基づく 27 種の抗酸菌の系統樹解析より、迅速発育群および遅発育群は各々独自のクラスターを形成した。臨床的に鑑別が必要である *M. avium* と *M. intracellulare*、および *M. kansasii* と *M. gastri* 特異的なプライマーを設計したところ、臨床分離株の鑑別も可能であった。2) 抗酸菌病原性因子の検討。大腸菌—抗酸菌シヤトルコスミドベクターを用いたらい菌ゲノム DNA ライブラリについて、引き続き分析を行い新たに約 300 クローンについてらい菌ゲノム地図上へのマッピングを行った。しかし、クローンが得られていない領域が 17 箇所あったため、新たに約 600 のクローンを分離・分析し、その結果全ゲノム領域の 98%以上をカバーするクローンのセットが得られた。また、*M. smegmatis* の増殖を著しく遅延させるコスミドクローンを分析したところ、*trxB/A* 遺伝子上流から *rpmH* 遺伝子上流までの約 9kb の領域が関与していた。3) 抗酸菌感染による宿主遺伝子の変化。抗酸菌感染細胞の DNA マイクロアレイ解析によって発現量の変化が認められた多数の遺伝子について、クラスタリングを行い、RT-PCR にてそれらの発現量を解析した。その結果、インスリン様成長因子受容体(IGFR)の発現量が、抗酸菌感染後の時間経過とともに増強した。感染細胞では IGF やインスリンに対する感受性が高まっており、持続感染や排除に関連する可能性が考えられた。4) 病原性因子およびワクチン開発に関する研究。らい菌特異的リポタンパク LpK のタイプ 1 細胞性免疫応答誘導能を検索した。LpK は、ヒト正常健常者末梢単球由来樹状細胞(DC)を刺激し、MHC class I・class II・CD86 抗原の発現を増強させ、活性化サイトカイン IL-12p70 を産生した。Truncated LpK を作成したところ、LpK の領域が細胞性免疫応答を誘導する際に重要な役割を果たし、N 末端に付加される Lipid が DC からの IL-12p70 産生を増強し、たんぱく質と脂質の両者が相互的に働き、強い細胞性免疫を誘導することが明らかとなった。抗酸菌はマクロファージに親和性を示し寄生性感染を果たす。しかし、抗酸菌感染したマクロファージは、タイプ 1 細胞性免疫を惹起することができず、抗酸菌の生体外排除に大きな障害となっている。そこで、感染マクロファージを DC 様細胞に形質転換したところ、細胞表面

に抗酸菌菌膜由来抗原を発現し、自己の CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞を活性化させ、IFN- γ の産生を誘導した。さらに、抗酸菌菌膜特異的 CD8 陽性キラーT 細胞の細胞障害活性に強い感受性を示すようになった。従って、抗酸菌感染マクロファージを DC 様に形質転換することは、抗酸菌に対する生体防御反応を高める上で重要であった。

A. 研究目的

病原性は弱いとされている非結核性抗酸菌は、近年、高齢化や医療の進歩に伴い、日和見感染症として増加の傾向にある。しかし、現在市販されている鑑別診断キットは、多種の鑑別性と迅速性の両方を兼ね備えていない。そのため、多種の抗酸菌迅速鑑別診断キットの開発に用いる遺伝子領域の同定、鑑別性および株内での配列の安定性の検討を行った。

らい菌ゲノム中には病原性を規定している遺伝子が存在すると考えられるが、その本体は明らかではない。らい菌は人工培養できないためらい菌遺伝子の機能について解析するには近縁の菌種に遺伝子を発現させる必要がある。昨年度までにらい菌のシャトルコスミドライブラリの構築を行い、コスミドクローンを約 100 クローン分析した。本年度はさらにクローンの解析を進め、らい菌ゲノムの全領域をカバーするライブラリの作製をめざす。また *M. smegmatis* の増殖遅延を引き起こすらい菌コスミドクローンについて解析をすすめる。

DNA マイクロアレイ法により、抗酸菌感染に伴って発現量が変化する宿主遺伝子を網羅的に明らかにし、そのデータを解析することにより、より重要な分子検索を試みる。その候補分子が、あたらな予防・診断および治療の標的とすべき宿主細胞因子となりうるかどうか評価を行う。

これまで、らい菌ゲノムデータベースより脂質附加を受けることが予想されるタンパク LpK をコードする遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いて発現させ精製リポタンパク LpK を得た。そこで、抗原提示細胞である樹状細胞を用いて、らい菌特異的リポタンパク LpK の生体防御反応に関する

免疫学的性状を明らかにし、さらに、リポタンパクの脂質の役割について解析を加える。抗酸菌が有するリポタンパクの役割を免疫応答の観点より探る。

抗酸菌に対する生体防御反応は、IFN- γ 産生性 CD4 陽性 T 細胞が中心となっていると考えられている。このタイプ 1 CD4 陽性 T 細胞の抗原特異的活性化には、抗酸菌に感受性を示す抗原提示細胞が必要である。マクロファージは、抗酸菌に対し最も強い感受性を示す抗原提示細胞であるが、マクロファージに取り込まれた抗酸菌は、ファゴゾームを形成するものの vacuolar H と ATPase が少ないために Lysosome との結合を妨げ、抗酸菌のプロセッシングを阻害することが報告されている。プロセッシングが阻害される結果、抗酸菌由来抗原の細胞表面への発現は抑制され、そのため T 細胞の活性化が阻止され、最終的には抗酸菌の寄生性感染を許すことになる。一方、抗酸菌感染症に対する免疫療法の開発及び抗酸菌に対する生体防御反応の高揚のためには、抗酸菌感染マクロファージはキラーT 細胞により効率よく殺戮される必要がある。抗酸菌感染マクロファージがこれらキラーT 細胞に認識されるためにも、マクロファージは、抗酸菌抗原を細胞表面に発現しなければならない。本研究においては、抗酸菌感染マクロファージを樹状細胞様細胞 (MACDC) に形質転換し、その抗原提示能及びキラーT 細胞に対する感受性を検討した。

B. 研究方法

1) 非結核性抗酸菌感染症の迅速鑑別法の開発研究。昨年度同定された、*dnaA* 遺伝子内の約 600 bp 領域内に、さらに種特異性の強い約 200 bp を増幅候補領域とした。その

両端の領域に、S-2、AS-2 プライマーを設計したところ(図1、表2)、供試27種(表1)のうち24菌種で増幅が可能であった。得られたPCR産物を、アガロースゲル電気泳動後、抽出精製し、塩基配列の決定を行い、新たにU1F、U1Rのプライマーの設計を行った(図1)。供試全27菌株より、遺伝子産物が増幅され、塩基配列の解析が可能となった。さらに、*M. avium*と*M. intracellulare*、*M. kansasii*と*M. gastri*各菌種を特異的に増幅するプライマーの設計を行った(表2)。*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. kansasii*の臨床分離株を用いその特異性の検討を行った。

2) 抗酸菌病原性因子の検討。大腸菌-抗酸菌シャトルコスミドベクターは染色体組込型のpYUB412、およびプラスミド型のpYUB415を用いた。それぞれの大腸菌クローンから抽出・精製したコスミドは、ベクター部の配列を利用して挿入DNA断片の両末端部のDNA配列を決定し、コンピュータソフトウェアを使用して既報のらい菌TN株ゲノムDNA配列と比較解析し、ゲノム地図上にマッピングした。コスミドクローンの*M. smegmatis*への導入はエレクトロポレーションによって行い、増殖の速度と形態の変化について観察した。トランスポゾン挿入変異はGPS-1(New England BioLabs)を用いた。

3) 抗酸菌感染による宿主遺伝子の変化。DNAマイクロアレイ解析によって発現量の変化が認められた約160個の遺伝子について、それらの機能をデータベースから検索しクラスタリング解析を行った。その中で特に感染との関連で有用と思われるものを選びプライマーを設計した。種々のマクロファージ培養細胞株にらい菌やBCGなどを感染させ、経時的にmRNAを調整し、逆転写酵素によりcDNAを作製してRT-PCR法にて発現量を解析した。

4) 病原性因子およびワクチン開発に関する研究。正常健常者末梢血単球より分化誘導したDCを精製したLpK抗原で刺激し、FACScaliburにてDC表面抗原を解析した。

LpK由来のtruncatedタンパクは大腸菌DH5 α でクローニング及び発現し、Ni-カラム、ゲル濾過カラムを用いて精製した。また、LpKの検出はウエスタンブロッティング法により抗His抗体(Qiagen)を用いて行った。各種サイトカイン(IFN- γ 、IL-10及びIL-12-p70)はPharmingenのOptEIAキットを用いて定量化した。

正常健常者末梢単球を得て、20% FCS medium存在下で*in vitro*でマクロファージの分化を誘導した。モデル抗酸菌として、らい菌を用いた。らい菌(Thai53株)は、ヌードマウスを用いて増殖させ、定法により分離精製した。らい菌感染及び非感染マクロファージのDC様細胞(MACDC)への形質転換は、マクロファージをIFN- γ (300 U/ml)で活性化した後、リコンビナント(r)GM-CSFとrIL-4を用い行なった。またMACDCの活性化にはLPS(30 μ g/ml)あるいは可溶性CD40リガンド(1 μ g/ml)を用いた。マクロファージ及びMACDC表面抗原の解析にはFACScaliburを用い、抗原提示機能に關与する抗原に対する抗体は市販の抗体を用い、らい菌分画に対する抗体はコロラド州立大学Brennan教授より供与を受けた。MACDCの抗原提示能は刺激された細胞の増殖応答及びIFN- γ 産生能で測定した。CD8陽性特異的キラーT細胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)は、CD8陽性をらい菌菌膜パルス樹状細胞でIL-2存在下で10日間刺激して得た。らい菌感染マクロファージ及びMACDCのキラーT細胞感受性は、LDH release assay(5時間)で測定した。

倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解(インフォームドコンセント)を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知

りたくない権利を守った。

C. 研究結果

1) 非結核性抗酸菌感染症の迅速鑑別法の開発研究(担当: 向井 徹)。S-2、AS-2のプライマーにより増幅された24菌株のPCR産物の塩基配列より、5'側と3'側の相似性が強く保存された領域に挟まれる領域に、変異に富む領域(308から498bp)が存在した(図1)。両端の保存領域を検索すると、5'側の140bp、3'側の207bpは塩基配列上よく保存されていて、菌種間で塩基の欠失や付加は見られなかった。S-2、AS-2の増幅産物より新たに設計したU1F、U1R(表2)を用いると、供試全27菌種の変異領域を増幅することが可能であった。この変異領域の塩基配列を解析すると、塩基の欠失や付加が見られ、かつ増幅産物の電気泳動像は均一のものではなかった(図2)。検索した菌の変異領域の長さを検討すると、最短の*M. triviale*(154bp)から最長の*M. kansasii*(232bp)まで約50bpの差が観察された。菌種の相似性を調べてところ、*M. leprae*と*M. vaccae*間で最も低く28.2%であった。従って、この領域は菌種特異性に富んでいると結論できた(表3)。結核菌群では、BCGに1塩基の置換が認められたが、他の3菌種は同一であり、本領域も強く保存されていた。本解析結果より、系統樹解析を行うと、迅速発育菌種は一つのクラスターを形成し遅発育菌種群からは独立したグループとして同定されることが判明した(図3)。临床上*M. avium*-complex(MAC)として分離される*M. avium*および*M. intracellulare*は、非結核性抗酸菌症の中では最も頻度が高い病原体である。この2菌種は、鑑別困難な病原体でもある。MACに次いで高頻度に分離される*M. kansasii*は、非病原性である*M. gastri*との鑑別を必要とされる。そこで、これら4菌種の鑑別を行うため、菌種特異的プライマーを設定した(表2)。その結果、各菌種特異的プライマーは、対応菌DNAのみを増幅したが、他の3菌種のDNAをは増幅しなかった(図

4a)。*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. kansasii*の各菌の臨床分離株由来DNAを用い、プライマーの特異性を検討したところ、標準株と同様に、種特異的な増幅が認められた。代表的な泳動像を図4bに示す。さらに、*M. avium*11株、*M. intracellulare*6株、*M. kansasii*3株の各臨床分離株を、それぞれの標準株を対象として、本領域の塩基配列を比較すると、*M. avium*は97.7-100%、*M. intracellulare*は96.0-100%、*M. kansasii*では100%の相似性を示した(表4)。従って、本領域は菌種間では低い相似性を示すにもかかわらず、同一菌種内ではよく保存され、鑑別診断に適した領域であった。

2) 抗酸菌病原性因子の検討(担当: 中田 登)。分離したらい菌ゲノムDNAライブラリのうち、これまで約100クローンについてらい菌ゲノム地図上へのマッピングを行ったが、本年度はさらに300クローンについて追加分析を行った。その結果、らい菌ゲノム全体の約94%をカバーするライブラリが得られたことが判明したが、クローンが得られていない17領域が不連続領域として存在することがわかった。らい菌ゲノム全域(100%)をカバーするクローンを得ることが遺伝子解析上不可欠なため、pYUB412を用いてらい菌ゲノムDNAライブラリをさらに約600クローン分離した。不連続領域が含まれているコスミドクローンを同定するため、これら領域に特異的なオリゴDNAプライマーを作製し、新たに得られたクローンを鋳型としてPCRを行った。PCR陽性のクローンについてベクター挿入断片の末端シーケンシングを行った。その結果、これまで得られたクローン中約200クローンを用いると、らい菌全ゲノム領域の98%以上をカバーすることが可能となった。一方、得られたコスミドクローン中のB90クローンは、迅速発育性非病原性抗酸菌*M. smegmatis*の増殖を著しく阻害することをこれまでに見出したが、新たにトランスポゾン挿入し、約60のクロ

ーンを分離した。これらのクローンを *M. smegmatis* へ導入し、コロニー形成能の変化について検索した。その結果、*parB* 遺伝子から *ML2710* 遺伝子までの領域にトランスポゾンが挿入されると、*M. smegmatis* に対する増殖遅延惹起能が失われた。従って、クローン B90 中この領域に含まれる遺伝子が、らい菌の増殖遅延に関与している可能性が示唆された(図 5)。そこで、コスミドクローン B90 から種々の長さの DNA 断片を調製して増殖遅延責任遺伝子の同定を試みた。コスミドクローン B90 の中で *dnaA* 遺伝子の開始コドンより 2bp 上流部から下流を全て除去しても増殖遅延をもたらしたのに対し(図 5b)、*rpmH* 遺伝子の中央部から *gyrB* 遺伝子側を除くと増殖遅延惹起能は減少し(図 5c)、*ML2710* 遺伝子の中央部から *gyrB* 遺伝子側を除くと完全に失われた(図 5d)。そこで今度は逆に、増殖遅延をもたらしたクローン切片(*dnaA* 遺伝子以下を除いたクローン B90、図 5b)について、切断部より *trxB/A* 遺伝子上流側の検索を行った。図 5b の断片について、各 *KpnI*、*PvuII*、*SpeI* 認識部位から *trxB* 遺伝子上流側を除去した断片を作製し、同様に増殖遅延惹起能を調べた。B90 クローンの最上流部分より *KpnI* 部位まで除いた断片はコスミドクローン B90 とほぼ同程度の増殖遅延惹起能を示したのに対し(図 5e)、*PvuII* 部位まで除いたものではわずかに(図 5f)、*SpeI* 部位まで除くと完全に増殖遅延惹起能は失われた(図 5g)。

3) 抗酸菌感染による宿主遺伝子の変化(担当：鈴木幸一)。DNA アレイ解析で変化を認められた遺伝子をクラスタリングした結果、インスリンシグナルを初めとした細胞内シグナル伝達系や DNA 合成や細胞増殖系の遺伝子群の発現変化が見い出された。それら遺伝子について、感染後の発現変化をより詳細に検討した結果、インスリン様成長因子受容体(IGFR)の発現量が、感染後 48 時間まで増加することを見出した。さらに、IGFR 下流の主要なシグナルの一つである

MAP キナーゼ遺伝子の発現量も IGFR と平行して増加していた。一方、甲状腺ホルモン受容体などは、マイクロアレイでは変化が見られたにもかかわらず、RT-PCR では変化が明らかではなかった。

4) 病原性因子およびワクチン開発に関する研究(担当：前田百美、牧野正彦)。正常健常ヒト末梢血単球から樹状細胞を分化誘導した後、精製リポタンパク LpK をパルスすると、DC 細胞表面の HLA-ABC、HLA-DR、CD80、CD83、CD86 の発現が LpK 濃度依存的に上昇した(図 6)。さらに、樹状細胞を LpK で刺激すると、IL-12p70 が加えた LpK の濃度に依存して産生された(図 7)。そこで、LpK パルスした樹状細胞を抗原提示細胞として用い、自己の CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞を刺激し、その活性化程度を IFN- γ 産性能を指標に検索すると、図 8 で示すように、有意な T 細胞の活性化が得られた。LpK は、Lipid 部分とらい菌特異的アミノ酸配列を有しているため、観察された T 細胞活性化に、Lipid 部分がどのような役割を果たしているか検討した。Lipid 部分の有無を異にする Truncated LpK を作製した(図 9)。最初に、N 末端にあるシステイン残期を持たない LpK(nl)(Lipid を保有しない)を発現精製した。LpK(nl)を樹状細胞にパルスしても IL-12p70 産生は誘導されなかった。LpK の末端にある脂質または脂質付加領域は樹状細胞の活性化に重要な役割を果たしている想定された。この点を明らかにするため、次いで、N 末端の脂質付加領域を含む 82 アミノ酸のみ(N-LpK(1)(Lipid +))を発現精製し、樹状細胞にパルスすると、IL-12p70 産生が誘導されたが、同じアミノ酸配列を有するにもかかわらず Lipid を欠くタンパク(N-LpK(nl)(Lipid -))では、IL-12p70 の産生程度は N-LpK(1)よりも減弱した。さらに、C 末端の 179-371 アミノ酸部分(C-LpK(nl))で樹状細胞を刺激しても、IL-12p70 は全く産生されなかった。以上より、LpK を構成する N 末端アミノ酸配列が IL-12p70 産生を誘導し、Lipid がその程度を増強させていると考えられた。

らい菌感染マクロファージと感染 MACDC の抗原提示能を検索するため、自己 T 細胞が刺激され活性化されて培養上清中に産生する IFN- γ を測定した。マクロファージは IFN- γ の産生を全く誘導しなかったのに対し、らい菌感染 MACDC はらい菌量依存性に CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞を刺激し IFN- γ の産生を誘導した。その際、らい菌量と T 細胞活性化の間には“ヘル現象”が観察され、MOI 20 以下の比較的少量のらい菌がマクロファージに感染した時にのみ有意な T 細胞の活性化が観察された。また MACDC は、マクロファージと異なり、CD40 リガンド刺激により活性化 IL-12p70 を産生した。そこで MACDC の細胞表面抗原の発現を検索すると、MACDC ではマクロファージマーカーである CD14 抗原の発現が消失し、代わりに CD86 抗原の発現が増強され、CD1a 及び CD83 抗原の発現が誘導されていた。これらの結果は、MACDC は単球由来樹状細胞(DC)に極めてよく似た性状を有していることを示している。さらに MACDC は、らい菌の感染により CD1a 及び CD83 抗原の発現を増強させた。また、らい菌感染 MACDC とらい菌抗原の関係を検索すると MACDC は、細胞表面にハンセン病患者血清と反応する抗原及びらい菌菌膜に対するポリクローナル抗体により認識される抗原を発現していた。MACDC の誘導に際し、IFN- γ 、GM-CSF、IL-4 を用いたが、この中で IFN- γ は、マクロファージ表面への CD1a の発現を誘導しかつ CD86 抗原の発現を増強させた。GM-CSF と IL-4 は、不可欠な要素であり、かつ DC の活性化に用いる LPS や CD40L を MACDC に作用させると MACDC の抗原提示能は増強した。最後に、らい菌感染 MACDC のらい菌特異的キラーT 細胞に対する感受性を検索すると、らい菌感染マクロファージに比し、より強い細胞障害をうけた。

D. 考察

DnaA タンパクは、その機能ドメインにより Domain 1 から 4 に分けられている (図 1)。この中で、Domain 2 が各菌種に特異

的な配列を有していて、今回鑑別診断としてその有用性を検索した結果も、Domain 2 が最も有用と結論された。これまでには、DnaA タンパクと抗酸菌の関係については、*M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. smegmatis* の 3 菌種のみが比較検討されているだけであり、他の抗酸菌属 27 菌種あるいは臨床分離株についての解析はなされていない。さらに、鑑別診断への応用を意図したものも存在しない。現在、国内では、4 種の抗酸菌鑑別診断キットが入手可能である。この中で、3 種は結核菌群もしくは *M. avium* complex の同定が可能であり、他の 1 種は 18 菌種の鑑別が可能であるが、コロニー形成を必要とするため、迅速性に欠ける。国外においては、本研究と同様の視点から様々な遺伝子領域の検索が行われ、*rpo B* や *rec A* 領域を解析した報告がなされている。今回、塩基配列解析した領域は、いずれの報告よりも相似性が低いため、より鑑別性に優れた領域と考えられる。また、16 S-23 S ribosomal RNA spacer region 領域を標的遺伝子領域にした研究も進められているが、菌種内における変異が発生し易い領域のため、変異株を見逃す可能性が否定できない。*dnaA* 領域のコードする DnaA は、細菌ゲノムの複製に必須の蛋白であるため、理論上変異導入率は非常に低いものと考えられる。また、本研究の結果においても臨床分離株間の遺伝子変異幅は極めて狭く、*M. kansasii* では供試した 4 株間で 100%の一致を見た。従って、非常に安定した検査結果が期待される。非結核性抗酸菌症の原因菌種は MAC について *M. kansasii* 感染症が多い。しかし、現行の鑑別キットでは、病原性の *M. kansasii* と非病原性の *M. gastri* の鑑別は困難である。今回、遺伝子増幅法を用い、簡便に両菌種を鑑別し得るプライマーが設計された。高価な検査キットを日常的に使用することが困難である開発途上国においても使用可能なキットを開発できるものと期待される。

コスミドは 40kb-50kb の DNA 断片をクローニングすることができるため、理論

上 100 クローン以下でらい菌ゲノム全域をカバーすることが可能であり、らい菌遺伝子の新規の機能を解析する上で有用である。一般に細菌の病原性に関わる表現型はゲノム上で連続した複数の遺伝子群により制御されているため、連続した複数の遺伝子を同時にクローニングできる点からもコスミドは有用と考えられる。本研究により約 200 クローンでらい菌ゲノムの 98%以上をカバーするクローンのセットが得られた。このライブラリは抗酸菌に導入し、さらに遺伝子発現を行うことが可能なため、らい菌の遺伝子機能解析に利用可能であり、特に神経親和性などらい菌特有の病原性の解析を行うことが可能となった。コスミド B90 による *M. smegmatis* の増殖遅延には *trxB/A* 遺伝子上流から *rpmH* 遺伝子上流までの約 9kb の領域の関与が示されたが、この領域には菌の分裂時の染色体分配など、増殖にかかわると考えられている遺伝子が含まれている。病原性抗酸菌は一般に遅発育性であり、このことは抗酸菌が病原性を発揮する際に重要であると考えられている。菌の分裂速度に影響を与える要因は様々知られているが、菌の分裂に関与する遺伝子領域が分裂の速度をおおむね規定する機能を持つことは十分考えられる。従って、菌の分裂を規定する遺伝子群の機能を明らかにすることにより、病原性を規定する遺伝子を同定し得る可能性が生まれ、さらに診断ワクチン開発へも応用可能となる。

IGFR 発現量増加により、感染により IGF やインスリンに対する感受性が増大することが考えられた。IGFR は、細胞増殖や分化を促進するとともに細胞機能の維持に重要なシグナルを伝達する。そのシグナルは受容体のチロシンリン酸化を経て、大きく Ras/MAP キナーゼの経路と PI3 キナーゼ/Akt 経路があるが、MAP キナーゼの発現量も IGFR と同様に増加を認めたことは、このシグナル伝達系が、感染により実際に活性化されることを示唆する。また、RT-PCR は

簡便ではあるが定量性が低いために、変化が明らかではなかった遺伝子に関してはノーザン解析など、より定量的な評価が必要と考えられた。

抗酸菌感染症を予防するワクチン、とりわけ抗酸菌の寄生性感染を抑制するワクチンの開発は、全世界的に切望されている。既存の抗原性分子を用いた DNA ワクチン法が開発標的とされ、一定の成果が上げられている一方で、これらの抗原に対し疑問をいただく声も強い。新たな分子の開発が望まれるところである。抗酸菌感染症の中でも、ハンセン病は発展途上国を中心に年間数十万人の新患患者が発生しており、ハンセン病に苦しみ悩まされた日本に対し、国際貢献が強く求められている。本研究を通じ同定された、らい菌特異的リポタンパク LpK のワクチン候補分子としての有用性をここでは検討した。抗酸菌に対する生体防御反応は、タイプ 1 細胞性免疫が中心に営まれているが、その中でも T 細胞から産生される IFN- γ と抗原提示細胞から産生される IL-12p70 が中心的役割を果たす。この点について LpK を検討した結果、LpK は両者の産生を誘導する極めて重要な新規抗原であると結論された。LpK は Lipid とタンパクの複合体であるが、この中のタンパク成分が特異性を与えると同時に IL-12 産生の引き金となり、Lipid 部分が IL-12 産生を増幅し、結果として強いタイプ 1 細胞性免疫応答を CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の両者にもたらすことが明らかとなった。

マクロファージ及び DC は抗酸菌感染症に対する生体防御反応を誘導する際、抗原提示細胞として重要な働きをしている。しかし、マクロファージは主に IL-10 を産生し、結核性の granuloma 形成に重要な役割を果たすものの、T 細胞の活性化には大きな役割を果たすことができない。一方 DC は、抗酸菌感染をうけると IL-12 を産生しタイプ 1 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を活性化することが明らかにされている。これらの T 細胞から産生される IFN- γ は、マクロファージを活性化し、抗菌作用を誘導

することが知られていて、マクロファージと DC は生体内にあって異なる作用を示し、両者がお互いの弱点を補いながら生体防御にあたっている。しかしながら、らい菌感染症においては、我々はこれまでに、DC は T 細胞の活性化を誘導するためには大量の菌が感染する必要があることを報告し、マクロファージでは T 細胞を効率よく活性化し得ないことを報告してきた。このことは少量の菌が感染しても（すなわち感染初期）、有効に T 細胞を活性化する抗原提示細胞を生体内で産生しなければならないことを示している。今回、我々は、らい菌感染マクロファージを IFN- γ 、GM-CSF、IL-4、LPS あるいは CD40L を用いて DC 様細胞に分化させると、少量の菌が感染した場合においても効率よく T 細胞を活性化することを示した。また、この形質転換したマクロファージではキラー T 細胞により容易に殺戮されたことから極めて重要な生体防御反応を惹起し得る可能性を有しているものと考えられた。

E. 結論

抗酸菌を遺伝子増幅法に基づき鑑別可能な領域を *dnaA* 遺伝子領域内に同定した。この領域について抗酸菌属 27 種について遺伝子解析を行い、鑑別の困難な *M. avium*、*M. intracellulare* および *M. kansasii*、*M. gastri* の鑑別可能なプライマーの設計した。これらことから、*dnaA* 内の領域は、迅速な非結核性抗酸菌症鑑別診断法の開発に有用と考えられた。約 200 クローンでらい菌ゲノムの 98% 以上をカバーするシャトルコスミドクロノンのセットが得られた。これらのコスミドクロノンの中から、迅速発育性抗酸菌 *M. smegmatis* の増殖速度を著しく低下させるクロノンについて解析を行い、*trxB/A* 遺伝子上流から *rpmH* 遺伝子上流までの約 9kb の領域の約 9kb の領域の関与が示された。今回、IGFR シグナル伝達系という一つの標的候補が見いだされた。今後、これが菌の持続感染や排除にどのように関わっていくかについて具体的に検討すると

ともに、他の候補分子の検索も平行して行う必要があると考えられた。らい菌特異的リポタンパク LpK は樹状細胞を刺激し、タイプ 1 細胞性免疫を強く武活することが明らかとなり、ハンセン病のワクチン候補分子として有用であることが示唆された。らい菌感染マクロファージを樹状細胞様に形質転換することは、らい菌に対する生体防御反応を高め、かつ免疫療法の開発に有効な手段になるものと想定された。

F. 健康危険情報

宮崎大学 後藤助教授より供与された豚由来 *M. avium* 5 分離株（異なった 3 地域より分離）の *dnaA* 変異領域の塩基配列の検討を行ったところ、5 株は 100% の一致であり、ヒトより分離された標準株とは、99.1% の相似性であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawamura, M., T. Naito, M. Ueno, T. Akagi, K. Hiraishi, I. Takai, M. Makino, T. Serizawa, K. Sugimura, M. Akashi, and M. Baba. Induction of mucosal immunity following intravaginal administration of inactivated HIV-1-capturing nanospheres in mice. *J. Med. Microbiology*, 66:291-298, 2002.
- 2) Maeda, Y., M. Makino, D. C. Crick, S. Mahapatra, S. Srisungnam, T. Takii, Y. Kashiwabara, and P. J. Brennan. Novel 33-Kilodalton Lipoprotein from *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immunity*, 70(8):4106-4111, 2002.
- 3) Shimokubo, S., S. Wakamatsu, Y. Maeda, M. Baba, and M. Makino. Fusion of Mature Dendritic Cells and Human T-Lymphotropic Virus Type-I-Infected T cells: its Efficiency as an Antigen-Presenting Cell. *Virology*, 301:13-20, 2002.
- 4) Hashimoto, K., Y. Maeda, H. Kimura, K. Suzuki, A. Masuda, M. Matsuoka, and M. Makino. *Mycobacterium leprae* Infection in Monocyte-Derived Dendritic Cells and Its Influence on Antigen-Presenting Function. *Infect. Immunity*, 70(9):5167-5176, 2002.

- 5) Nomaguchi, H., T. Mukai, F. Takeshita, M. Matsuoka, Y. Maeda, T. M. Aye, N. Jahan, Y. Yogi, M. Endo, Y. Sato, and M. Makino. Effect of hsp65 DNA vaccination carrying immunostimulatory DNA sequences (CpG motifs) against *Mycobacterium leprae* multiplication in mice. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, 73(3):182-190, 2002.
- 6) Umemura, M., H. Nishimura, T. Yajima, W. Wajjwalk, T. Matsuguchi, M. Takahashi, Y. Nishiyama, M. Makino, Y. Nagai, and Y. Yoshikai. Overexpression of imterleukin-15 prevents the development of murine retrovirus-induced acquired immunodeficiency syndrome. *FASEB*, 16:1755-1763, 2002.
- 7) 牧野正彦. ハンセン病—Hansen's Disease, Leprosy. 小早川隆敏編, 新版・感染症マニュアル, 176-179, 2002.
- 8) 牧野正彦. らい菌と樹状細胞の相互作用. *臨床免疫* 38(5), in press, 2003.
2. 学会発表
- 1) 前田百美, 柏原嘉子, 牧野正彦. らい菌のリポ蛋白をコードする遺伝子の発現とその機能的役割. 第75回日本細菌学会総会 2002年4月 横浜
- 2) 牧野正彦, 前田百美, 松岡正典. らい菌と正常健常者末梢単球由来樹状細胞の相互作用. 第75回日本細菌学会総会 2002年4月 横浜
- 3) 前田百美, 鈴木幸一, 川津邦雄, 牧野正彦. らい菌のリポ蛋白の発現とその生理的役割. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 4) 鈴木幸一, 武下文彦, 中田 登, 川津邦雄, 松岡正典, 石井則久, 牧野正彦. ファゴゾーム・ライソゾーム融合阻止に関わる因子 TACO の宿主細胞内らい菌潜伏における役割. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 5) 牧野正彦, 前田百美, 儀同政一. らい菌菌膜の細胞性免疫誘導能の検討. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 6) 武下文彦, 向井 徹, 牧野正彦. らい菌 Fibronectin Attachment Protein の免疫原性およびその宿主細胞侵入抑制効果. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 7) 向井 徹, 武下文彦, 牧野正彦. 経鼻腔粘膜ワクチンの開発. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 8) 鈴木幸一, 前田百美, 中田 登, 松岡正典, 牧野正彦. DNA マイクロアレイを用いたらい菌感染細胞の遺伝子発見プロファイリング. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 9) 中田 登, Khairul A. Hashim, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 柏原嘉子, 前田伸司, 牧野正彦. 大腸菌—抗酸菌シャトルコスミドを用いたらい菌ゲノム DNA バンクの作製と遺伝子解析. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 10) 甲斐雅規, 中田 登, Patrick J. Brennan, 牧野正彦. らい菌ゲノム上に存在する2成分制御系 (ML2439-ML2440) の発現と機能解析. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 11) Makino, M., and Y. Maeda. Dendritic cell-mediated production of IL-12 and IFN- γ by *Mycobacterium leprae*-derived cell membrane. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 37th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, August 21-23, 2002.
- 12) Maeda, Y., Y. Kashiwabara, K. Suzuki, D. C. Crick, P. J. Brennan, and M. Makino. Characterization of *Mycobacterium leprae* 33 kD lipoprotein and its immunological significance. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 37th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, August 21-23, 2002.
- 13) Nakata, N., K. A. Hashim, M. Kai, K. Suzuki, M. Matsuoka, S. Maeda, Y. Kashiwabara, and M. Makino.

Construction and analyses of a shuttle cosmid library of *Mycobacterium leprae* (Thai 53). US-Japan Cooperative Medical Science Program. 37th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, August 21-23, 2002.

- 14) Makino M. Monocyte-derived dendritic cell-mediated antigenicity of *M. leprae* subcellular fractions. Pre workshop, 16th International Leprosy Congress, 4-9 August, 2002, Salvador, Bahia, Brasil.
- 15) Maeda Y., M. Gidoh, N. Ishii, and M. Makino. Dendritic cell-mediated production of IL-12 and IFN- γ by *Mycobacterium leprae*-derived cell

membrane. 16th International Leprosy Congress, 4-9 August, 2002, Salvador, Bahia, Brasil.

- 16) Maeda Y., M. Makino, D. C. Crick, Y. Kashiwabara, and P. J. Brennan. A novel 33 KD Lipoprotein Antigen from *Mycobacterium leprae*. 16th International Leprosy Congress, 4-9 August, 2002, Salvador, Bahia, Brasil.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表 1. 供 試 抗 酸 菌 属 種

Species	strains	GenBank accession number
<i>M. abscessus</i>	JATA 63-01 (ATCC 19977)	AB087684
<i>M. africanum</i>	KK 13-02 (ATCC 25420)	AB087685
<i>M. avium</i>	JATA 51-01 (ATCC 25291)	AB087686
<i>M. avium</i>	clinical isolate 11 strains	
<i>M. bovis</i>	JATA 12-01 (ATCC 19210)	AB087687
<i>M. chelonae</i>	JATA 62-01 (ATCC 35752)	AB087688
<i>M. fortuitum</i>	JATA 61-01 (ATCC 6841)	AB087689
<i>M. gastri</i>	KK 44-02 (ATCC 15754)	AB087690
<i>M. goodnae</i>	JATA 33-01 (ATCC 14470)	AB087691
<i>M. intracellulare</i>	JATA 52-01 (ATCC 13950)	AB087692
<i>M. intracellulare</i>	clinical isolate 6 strains	
<i>M. kansasii</i>	KK 21-01 (ATCC 12478)	AB087693
<i>M. kansasii</i>	clinical isolate 3 strains	
<i>M. leprae</i>	Thai 53	AB087694
<i>M. malmoense</i>	JATA 47-01 (ATCC 29571)	AB087695
<i>M. marinum</i>	JATA 22-01 (ATCC 927)	AB087696
<i>M. microti</i>	KK 14-01 (ATCC 19422)	AB087697
<i>M. nonchromogenicum</i>	JATA 45-01 (ATCC 19530)	AB087698
<i>M. parafortuitum</i>	ATCC 25807	AB087699
<i>M. phlei</i>	ATCC 19249	AB087700
<i>M. scrofulaceum</i>	JATA 31-01 (ATCC 19981)	AB087701
<i>M. simiae</i>	KK 23-08 (ATCC 25275)	AB087702
<i>M. smegmatis</i>	JATA 64-01	AB087703
<i>M. szulgai</i>	JATA 32-01	AB087704
<i>M. terrae</i>	KK 46-01 (ATCC 15755)	AB087705
<i>M. triviale</i>	KK 50-02 (ATCC 23292)	AB087706
<i>M. tuberculosis</i>	JATA 11-01 (H37Rv)	AB087707
<i>M. ulcerans</i>	KK 43-01	AB087708
<i>M. vaccae</i>	KK 66-01	AB087709
<i>M. xenopi</i>	KK 42-01 (ATCC 19250)	AB087710

All strain was kindly gifted from Dr Kashiwabara, NIID.

表 2. 抗酸菌属および種特異的プライマー配列

Primers	Target species	sequence
S-2	all species	5'-CKCAGCAAAGRGCNTGGCT-3'
AS-2		5'-SAGCGAGTTRATGAAGTCGTT-3'
U1 F	all species	5'-GTSCARAACGARATCGARCG-3'
U1 R		5'-CCBGAYTCRCCCCAGATGAA-3'
Kan F	<i>M. kansasii</i>	5'-ACGGGAAACGTCACCCGA-3'
Kan R		5'-CAAAGAGGTGAGTTTTGCC-3'
Gas F	<i>M. gastri</i>	5'-AAATCTCCCGGGAACCCG-3'
Gas R		5'-CAAGAGGTGAGTTTTCCCG-3'
Avi F	<i>M. avium</i>	5'-CACCGACGCCGCCCTGT-3'
Avi R		5'-GCATGCCGGGGAAGAGC-3'
Int F	<i>M. intracellulare</i>	5'-GGATCCGACGGTTCSWTTC-3'
Int R		5'-GCATCCCCGGGAACAGG-3'

表 3. Interspecies pairwise %similarity of partial *dnaA* sequences

species	bp	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
1 <i>M. tuberculosis</i>	211	100.0	99.5	100.0	43.0	40.8	52.6	50.2	48.3	49.7	46.4	45.9	45.1	45.0	47.3	40.3	47.1	41.1	40.2	43.6	42.6	37.4	41.4	56.8	45.9	36.4	42.1	1
2 <i>M. africanum</i>	211		99.5	100.0	43.0	40.8	52.6	50.2	48.3	49.7	46.4	45.9	45.1	45.0	47.3	40.3	47.1	41.1	40.2	43.6	42.6	37.4	41.4	56.8	45.9	36.4	42.1	2
3 <i>M. bovis</i> BCG	211			99.5	44.1	41.9	52.1	50.2	47.3	48.8	46.4	45.9	46.1	45.0	46.4	40.3	47.1	41.1	37.0	43.6	42.6	38.3	40.4	55.9	44.8	35.8	42.1	3
4 <i>M. microti</i>	211				43.0	40.8	52.6	50.2	48.3	49.7	46.4	45.9	45.1	45.0	47.3	40.3	47.1	41.1	40.2	43.6	42.6	37.4	41.4	56.8	45.9	36.4	42.1	4
5 <i>M. abscessus</i>	181					86.1	49.1	39.7	46.4	48.8	43.6	40.8	42.5	38.6	40.8	43.6	35.3	33.1	41.5	44.7	45.8	46.4	37.0	42.5	39.2	35.9	43.0	5
6 <i>M. chelonae</i>	181						49.1	39.7	41.9	49.1	44.7	38.6	40.8	38.6	38.6	46.9	31.4	33.1	40.9	34.2	37.0	45.8	40.3	41.4	39.7	37.0	37.5	6
7 <i>M. xenopi</i>	190							45.2	45.2	50.5	45.2	43.6	42.1	47.3	49.1	44.3	39.4	42.8	36.8	38.4	44.2	39.4	48.4	45.7	37.5	44.2	7	
8 <i>M. szulgai</i>	229								51.6	55.1	45.7	44.1	50.9	42.3	49.3	41.9	51.1	45.7	46.1	36.8	38.1	38.1	34.7	47.9	43.8	39.1	40.2	8
9 <i>M. avium</i>	217									78.3	47.1	45.1	51.9	52.0	58.5	43.6	51.6	46.8	46.7	41.0	41.9	40.0	39.3	57.6	45.9	38.5	43.6	9
10 <i>M. intracellulare</i>	223										44.8	43.9	55.2	52.0	64.0	46.9	48.8	45.7	46.1	41.8	42.7	42.2	39.8	59.9	44.3	38.5	47.3	10
11 <i>M. gastr</i>	214											83.6	42.7	45.3	48.5	43.6	48.3	39.4	42.2	50.0	51.4	38.7	38.3	47.6	38.2	38.0	36.9	11
12 <i>M. kansasii</i>	232												45.6	44.2	44.7	40.3	49.4	42.8	42.2	53.6	55.0	37.2	38.3	41.4	39.7	36.9	32.2	12
13 <i>M. goodii</i>	208													50.4	51.4	44.1	52.8	42.8	50.0	46.1	47.1	39.4	39.3	55.2	38.7	42.3	42.3	13
14 <i>M. simiae</i>	217														49.3	40.8	44.9	45.1	44.1	42.3	42.8	39.1	36.2	59.9	39.7	38.5	38.3	14
15 <i>M. scrofulaceum</i>	217															43.0	44.3	41.1	44.1	42.8	42.3	36.8	37.8	66.8	45.9	42.3	45.4	15
16 <i>M. phlei</i>	181																38.7	37.7	46.7	36.4	38.6	54.1	57.4	43.6	30.9	45.3	49.7	16
17 <i>M. terrae</i>	178																	65.7	42.2	46.0	47.7	42.6	41.0	49.4	35.9	42.6	45.5	17
18 <i>M. nonchromogenicum</i>	175																		45.4	34.2	36.0	38.2	33.1	45.7	32.5	41.1	37.1	18
19 <i>M. triviale</i>	154																			35.0	39.6	42.2	42.8	42.2	36.3	34.4	41.5	19
20 <i>M. marinum</i>	220																				97.7	36.8	35.2	42.3	34.1	39.1	37.9	20
21 <i>M. ulcerans</i>	220																					37.2	36.2	43.7	34.2	39.1	39.8	21
22 <i>M. fortuitum</i>	220																						48.7	40.0	31.6	48.9	56.8	22
23 <i>M. parafortuitum</i>	193																							41.4	30.5	53.2	58.0	23
24 <i>M. mageritense</i>	217																								47.9	38.5	48.8	24
25 <i>M. leprae</i>	196																									28.2	32.1	25
26 <i>M. vaccae</i>	184																										47.8	26
27 <i>M. smegmatis</i>	211																											27

* The length of PCR products corresponding to the region of 209 to 508 bp in *Mycobacterium tuberculosis*

表 4. 各種抗酸菌臨床株および標準株間における変異領域の相似性

Species	number of strain	Range of % similarity
<i>M. avium</i>	12	97.7-100
<i>M. intracellulare</i>	7	96.0-100
<i>M. kansasii</i>	4	100

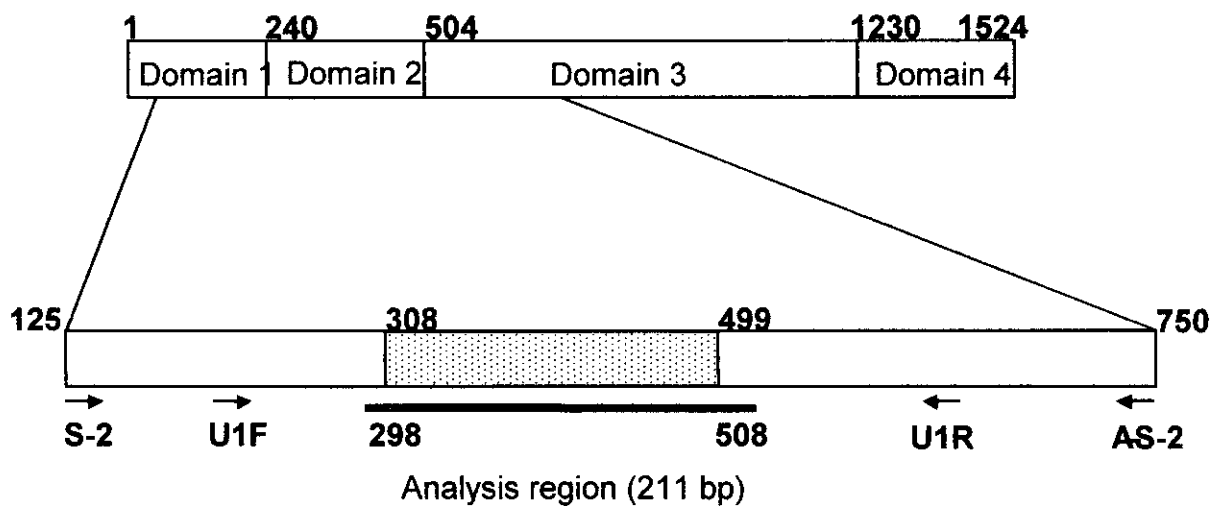


図 1. 全 *dnaA* 領域と変異領域の相関図

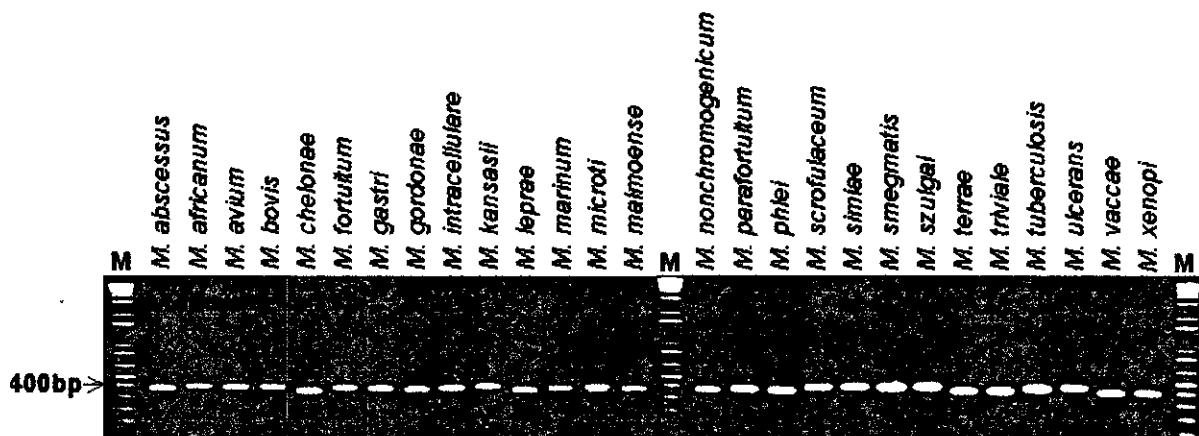


図 2. 変異領域の PCR 電気泳動像

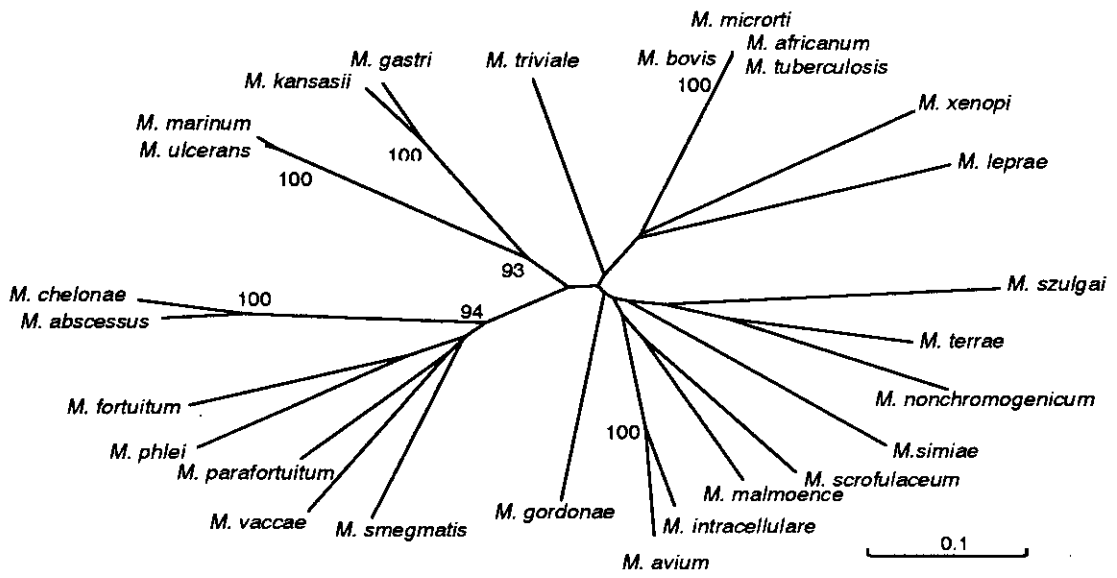


図3. 変異領域に基づいた系統樹解析

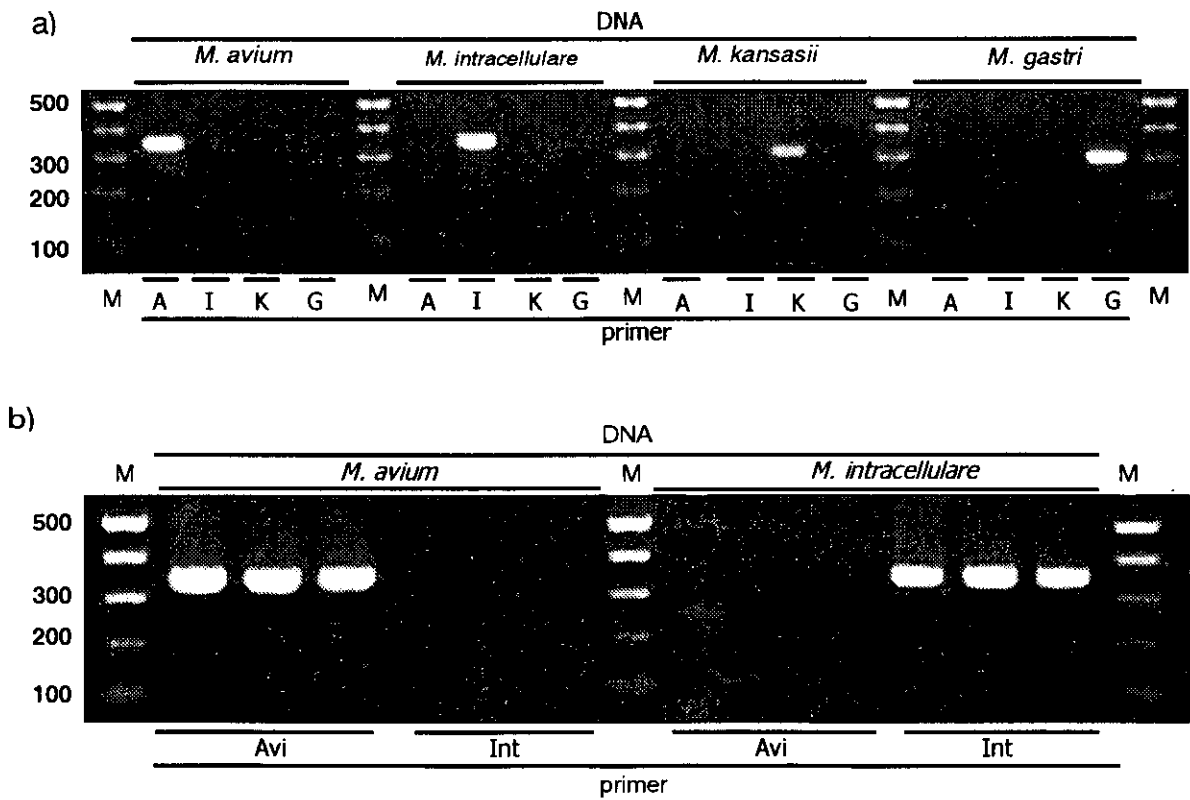


図4 a. 4菌種特異プライマーの特異性の検討 A; Avi F, Avi R, I; Int F, Int R, K; Kan F, Kan R, G; Gas F, Gas R b. 臨床分離株を用いた *M. avium* *M. intracellulare* 各菌種特異プライマーの特異性の検討