

- 460 TB method and the agar plate method of proportion. J Clin Microbiol. 2002 ; 40 : 607-610.
- 9) Kontos F, Maniati M, Costopoulos C, et al. : Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for the susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs: a multicenter study. J Microbiol Methods. 2004 ; 56 : 291-294.
- 10) Aono A, Hirano K, Hamasaki S, et al. : Evaluation of BACTEC MGIT 960 PZA medium for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide (PZA) : compared with the results of pyrazinamidase assay and Kyokuto PZA test. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002 ; 44 : 347-352.
- 11) Pfyffer GE, Palicova F, Rüscher-Gerdes S : Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide with the nonradiometric BACTEC MGIT 960 system. J Clin Microbiol. 2002 ; 40 : 1670-1674.
- 12) Tsukamura M, Tsukamura S : Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by *p*-nitrobenzoic acid susceptibility. Tubercle. 1964 ; 45 : 64-65.
- 13) Rastogi N, Goh KS, David HL : Selective inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by *p*-nitro- $\alpha$ -acetylamino- $\beta$ -hydroxypropiophenone (NAP) and *p*-nitrobenzoic acid (PNB) used in 7H11 agar medium. Res Microbiol. 1989 ; 140 : 419-423.
- 14) Abe C, Hirano K, Tomiyama T : Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 1999 ; 37 : 3693-3697.
- 15) Hirano K, Aono A, Takahashi M, et al. : Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of Capilia TB-negative *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol. 2004 ; 42 : 390-392.
- 16) Wayne LG : Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. Am Rev Respir Dis. 1974 ; 109 : 147-151.
- 17) Laszlo A, Siddiqi SH : Evaluation of a rapid radiometric differentiation for the *Mycobacterium tuberculosis* with *p*-nitro- $\alpha$ -acetylamino- $\beta$ -hydroxypropiophenone. J Clin Microbiol. 1984 ; 19 : 694-698.
- 18) 入江章子, 木下幸保, 富田元久, 他 : 新しい抗酸菌検査導入に伴う諸問題 (1) -抗酸菌液体培養法 (MGIT) を導入した時のコスト-. 医療の広場. 2001 ; 11 : 34-39.

## BCG を用いた抗酸菌の抗原性および病原性に関する研究

大原直也

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔病原微生物学分野  
〒 852-8588 長崎県長崎市坂本 1-7-1

BCG ワクチンは結核に対する安全なワクチンとして、1948 年以降延べ 25 億人以上の人々に使用されてきた。その効果については疑問が持たれており、現行の BCG にかわる著効なワクチンの開発が望まれている。また、抗酸菌による感染症の中で 2 番目に患者数の多いハンセン病についてもワクチンの開発が望まれている。本研究では、BCG の産生する感染防御抗原である Ag85 complex を過剰発現させることで BCG の免疫効果を高めることができることを明らかにした。また、結核菌の特徴である宿主内における休眠状態に同菌の持つ 2 種類の低分子ストレス蛋白質 HspX (Acr) と HrpA が関係し、菌の休眠および再活性化と相関があることを明らかにした。HrpA は一度酸素飢餓状態に陥った後に再度酸素に触れることにより発現することから、菌の再活性化に関与することが示唆された。さらに、骨結核および BCG 接種の副作用である骨炎に関連し、BCG 感染骨芽細胞が、TNF- $\alpha$  受容体ファミリーの 4-1BB (CD137) を産生すること、4-1BB は破骨細胞前駆細胞上の 4-1BB L (CD137L) を介して逆向きのシグナルを細胞内に伝達することにより、破骨細胞への分化・成熟を抑制することを明らかにした。TNF- $\alpha$  受容体ファミリーの、いわゆるリバースシグナルの伝達経路は全く不明であったが、Akt の経路を介すること、NFAT2 の転写を抑制することが明らかになった。

### はじめに

ヒトと抗酸菌とのつきあいは長く、一般には 1 万年から 1 万 5 千年前くらい前からとされている。さらに 10 万年前にはすでに関わり合いを持っていたとする説もある。Robert Koch が 1882 年に結核菌を発見してから 120 年が過ぎ、そのゲノム配列が解明されてから、すでに 7 年が経つ。らい菌が Gerhard Amauer Hansen により発見されたのは結核菌よりも 8 年前で、そのゲノムが解明されたのは 2001 年のことである。しかし、未だに両菌が原因である結核およびハンセン病に悩まされている人の数は多い。WHO の統計によれば、世界人口の 3 分の 1 が結核菌に感染しており、全世界で新たに発生する結核患者は年間 850 万人で、約 180 万人が結核で死亡している。結核による死亡者の 98% 以上は発展途上国であり、特にエイズの合併が拍車をかけている。また多剤耐性結核菌が蔓延しており、その感染者数は約 5000 万人にのぼると考えられている。

結核菌は呼吸器を介して感染するが、感染後すぐに発症

するのは感染者の約 10% であり、ほとんどは持続生残菌 (persister) として冬眠状態 (dormancy) のまま数十年にわたって潜伏している。その中で二次結核 (内因性再燃) として発症するのは 5% 程度のみで、残りの大半のケースはそのまま発症することもなく、宿主の死とともに死滅する。

一方、ハンセン病の日本における最近の年間新規患者数は、日本人では 5 名前後、在日外国人では 10 名前後であり、きわめて少ない。しかし世界的に見れば、現在治療を受けているハンセン病患者は 110 カ国 46 万人であり、また、新規患者数は 2002 年 1 年間に 62 万人と報告されている。2002 年の国外における新患としては、インド (473,658)、ブラジル (38,365)、ネパール (13,830)、タンザニア (6,492)、モザンビーク (5,830)、マダガスカル (5,482) に多数の発生が見られ、これら 6 カ国で世界の 88% を占める。このように結核およびハンセン病は今なお重要な感染症であり、新たな治療法の開発とともに予防法の確立、特に新規ワクチンの開発が強く望まれている。

結核に対しては生菌ワクチンである BCG が広く使用されている。これはパスツール研究所の Albert Calmette と Carnille Guérin によって、強毒菌である牛型結核菌 (*Mycobacterium bovis*) を 15 年間、231 代にわたってグリセリン胆汁馬鈴薯培地に継代培養して得られた病原性のない弱毒菌である。これまでに 30 億人以上に接種され、持続

Naoya OHARA  
Study on antigenicity and pathogenicity of mycobacteria  
Division of Microbiology and Oral Infection, Nagasaki University  
Graduate School of Biomedical Sciences, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki  
852-8588

性が長く、安価であり、しかも安全性についても十分に証明されているワクチンである。当初は経口投与であったが、すぐに経皮投与に切り替えられ現在に至っている。また、結核だけでなく、他の抗酸菌による感染症に対しても有効と考えられている。しかし、さまざまな疫学調査の結果等からすると、BCG ワクチンの効果については疑問視されており、乳幼児に対しては有効であるが、成人の肺結核に対しては効果があまり無いというのが一般的な見解となっている。

現在の抗酸菌をめぐる問題点として、今述べた、著効なワクチンがないこと、薬剤耐性菌が蔓延していること、他の疾患、特に AIDS との合併による重篤化がある。またどのようにして、どのような状態で長期間ヒト体内に潜伏しているかについては謎の部分が多く、ヒト体内での長期にわたる冬眠状態のメカニズムの解明が重要な課題である。

### 1. 抗酸菌の $\alpha$ 抗原

BCG による感染防御免疫は生菌の接種によって得られるが、死菌では得られないことがよく知られている。生菌と死菌の違いとして、菌体外へ産生分泌される成分の有無があげられる。すなわち、生菌では分泌蛋白質と総称される種々の蛋白質が持続的に菌体外に産生・分泌されるが、死菌ではそれらの分泌はほとんど無い。Pal と Horwitz は結核菌の分泌蛋白質で免疫することによりある程度の結核菌の感染防御ができたことを報告している (30)。分泌蛋白質によって誘導される感染防御免疫はらい菌の感染に対しても有効である (16)。

結核菌、BCG の培養上清中にはさまざまな蛋白質が含まれる。この中で  $\alpha$  抗原は最もよく研究されてきた分泌蛋白質である。 $\alpha$  抗原は約 40 年前に大阪大学微生物病研究所の米田博士と福井博士によって精製、同定された (49)。その結果、結核菌の主要蛋白質抗原であることが明確に示された。 $\alpha$  抗原は抗酸菌に広く分布する蛋白質であり、それぞれの菌種の  $\alpha$  抗原は血清学的に区別することができる (44)。その後、1989 年に当時同研究所にいた山田毅博士と味の素株式会社中央研究所によって BCG の  $\alpha$  抗原遺伝子がクローニングされた (15)。さらにその後海外のグループにより構造の類似した蛋白質抗原が複数あることがわかり、Ag85 complex と総称されている。Ag85 complex は 85A, 85B= $\alpha$  抗原, 85C の 3 種類の蛋白質からなり、結核菌では全分泌蛋白質の約 30% を占める。*M. kansasii* や *M. avium*, *M. intracellulare* では 85B= $\alpha$  抗原の分泌量は結核菌に比し極度に多く、逆に 85A と 85C の産生は僅かである (27)。Nagai らは MPT51 の N 末端アミノ酸配列が Ag85 complex に類似していることを報告したが、その遺伝子クローニングの結果、蛋白質全体にわたり相同性を有することから、Ag85 complex に準ずる蛋白質であることが明らかとなった (17, 22)。

ところで、非結核性抗酸菌の数菌種について  $\alpha$  抗原遺伝

子のクローニングをおこなってみると、 $\alpha$  抗原 C 末端部位に種特異的エピトープが存在していた (10, 11, 21, 23, 41)。菌にとっても Ag85 complex は重要な蛋白質であり、ミコール酸の合成に携わる酵素であることが明らかとなり (3)、また、フィブロネクチン結合能が強いことから感染に重要な役割をしていることが示唆されてきた (20)。Ag85 complex は IFN- $\gamma$  の産生を誘導し、感染を予防する防御抗原であることもわかってきた (7)。Ag85 complex の感染防御免疫誘導能は高く、マウスの感染実験では 85A,  $\alpha$  抗原, 85C のいずれの蛋白質も 2 mg 前後の免疫でらい菌の増殖を抑制した (19)。

### 2. 組換え BCG ワクチン

この約 20 年間に様々なタイプの結核ワクチンの開発が世界中でおこなわれてきた。主要なものとして、DNA ワクチン、菌体蛋白質あるいは細胞壁脂質等を使用したサブユニットワクチン、免疫惹起能の強い蛋白質あるいはサイトカインを産生する組換え BCG ワクチン、弱毒 (栄養要求株) 化したマイコバクテリア、非定型抗酸菌の利用がある。我々が後述の組換え BCG ワクチンを作製した段階で現行の BCG ワクチンを凌駕するものはなかった。

組換え BCG ワクチンの作製は 1980 年後半、抗酸菌に遺伝子組み換え技術が導入されたことによって可能となった。まず米国 Bloom のグループが BCG に形質転換可能な抗酸菌一大腸菌シャトルベクターを開発した (36)。ほぼ同時にフランスパスツール研究所でも同様のベクターが開発された (31)。1991 年、Bloom のグループと Young のグループによって、これらのベクターを利用して外来遺伝子を導入した BCG を作成し、宿主に免疫応答を誘導させた報告がなされた (1, 37)。前述の山田毅博士と味の素株式会社中央研究所のグループは  $\alpha$  抗原の分泌シグナルを応用し、外来抗原を BCG 菌体外に分泌する系を開発した (14)。Stover らは 1993 年に *Borrelia burgdorferi* の表層リポ蛋白質を発現する BCG を動物に投与し、感染を防御できたと報告したが、これが組換え BCG による感染防御の最初の報告である (38)。これまでにさまざまな病原体および疾患を対象に組換え BCG の作製が行われている (29)。

BCG ワクチンの特徴に長期にわたる免疫の持続性があるが、組換え BCG でもその特徴が受け継がれている。HIV-1 の gag p17 の B 細胞エピトープと  $\alpha$  抗原のキメラ蛋白質を発現する組換え BCG を接種したマウスでは最終免疫後このエピトープを認識する抗体の産生が 14 ヶ月以上持続した (47)。またマラリアのエピトープに対しても 7 ヶ月以上にわたり抗体の産生が持続した (13)。

ところで、菌体成分の中で感染防御抗原が明らかとなれば、それを多く産生させることで、BCG のワクチンとしての効果を上昇できる可能性がある。Ag85 complex が感染防御抗原であることから、Ag85 complex 過剰発現株は現行の BCG を上回るワクチン効果を有することが期待できる。Ag85 complex の遺伝子をつないだプラスミドで BCG を形質

転換することによって Ag85 complex 過剰産生株を作製した。BCG の Ag85 complex 遺伝子を使用したが、自身のプロモータを使用した場合には過剰発現するものの、その発現量は十分ではない (26)。そこで、強力なプロモータである *M. kansasii* と *M. avium* の  $\alpha$  抗原プロモータを用いたところ、発現量は増加した (25)。Ag85A 過剰発現株 rBCG/85A あるいは Ag85A,  $\alpha$  抗原 (=85B) および MPB51 の 3 抗原を過剰発現する rBCG/BA51 について感染防御実験をおこなった。rBCG/85A と rBCG/BA51 の免疫効果は C57BL/6 マウスのフットパッドに感染させたい菌の増殖抑制効果で判定した。これらの組換え BCG を  $5.0 \times 10^7$  個接種し、1ヵ月後フットパッドに  $5.0 \times 10^3$  個のらい菌を感染させる。そして 25 週後の抗酸菌数を数える。らい菌の増殖速度が遅いため、実験には長期間必要とする。その結果、親株である BCG Tokyo 株を越える効果があった (図 1) (24)。さらにその効果は初回免疫 5ヵ月後に同じ rBCG/85A を追加免疫することで増強された。抗酸菌に対する感染防御には Th1 タイプの免疫が重要であるが、rBCG/85A 接種マウス脾細胞の IFN- $\gamma$  および NO 産生能は長期間保たれており、BCG 接種マウスよりも強力であった。それでは 1 つの菌から複数の感染防御抗原を過剰発現すればより高い効果が得られるのか。rBCG/BA51 は上述のように 3 種類の抗原を過剰発現しているが、rBCG/BA51 による免疫応答は rBCG/85A によるものよりも高い結果となった (図 2) (25)。なお Horwitz らはほぼ同時期に異なる作製法により Ag85B を過剰発現する組換え BCG を作製し、結核菌に対する感染防御効果が強いことを報告している (6)。

### 3. 低分子ストレス蛋白質

結核菌に感染したほとんどの人の体内では結核菌は持続生残菌 (persister) として冬眠状態 (dormancy) のまま数十年にわたって潜伏している。どのようにして、どのような状態で長期間ヒト体内に潜伏しているか、また何がきっかけで冬眠状態の菌が目覚め、増殖を始めるのか、未だに解明されていない部分が多い。冬眠状態につながる環境として、酸素飢餓状態が言われている (32, 35, 48)。結核菌は好気性菌であるが、徐々に酸素分圧が低下した場合では嫌気状態下でも死滅することなく長期間生存する。他に栄養物の枯渇 (4)、低 pH (5)、酸化窒素の低下 (46) 等の環境との関係が示されている。

ストレス蛋白質は種々の環境の変化、適応に必要であるが、低分子ストレス蛋白質である  $\alpha$ -crystallin (HspX) は酸素飢餓にしたがい発現してくる (39, 50)。 $\alpha$ -crystallin はマクロファージ内での菌の生存に必要であることが示されている (51)。さらに、蛋白質合成の場であるリボソームと結合する (39)。これらのことから  $\alpha$ -crystallin は結核菌の dormancy と密接に関係していると考えられている。ところで、BCG に熱ストレスを与えると様々なストレス蛋白質が誘導される。そのひとつ HrpA は熱ストレスで発現するとともにリボソームへ集積してくる (28)。N 末端のアミノ酸

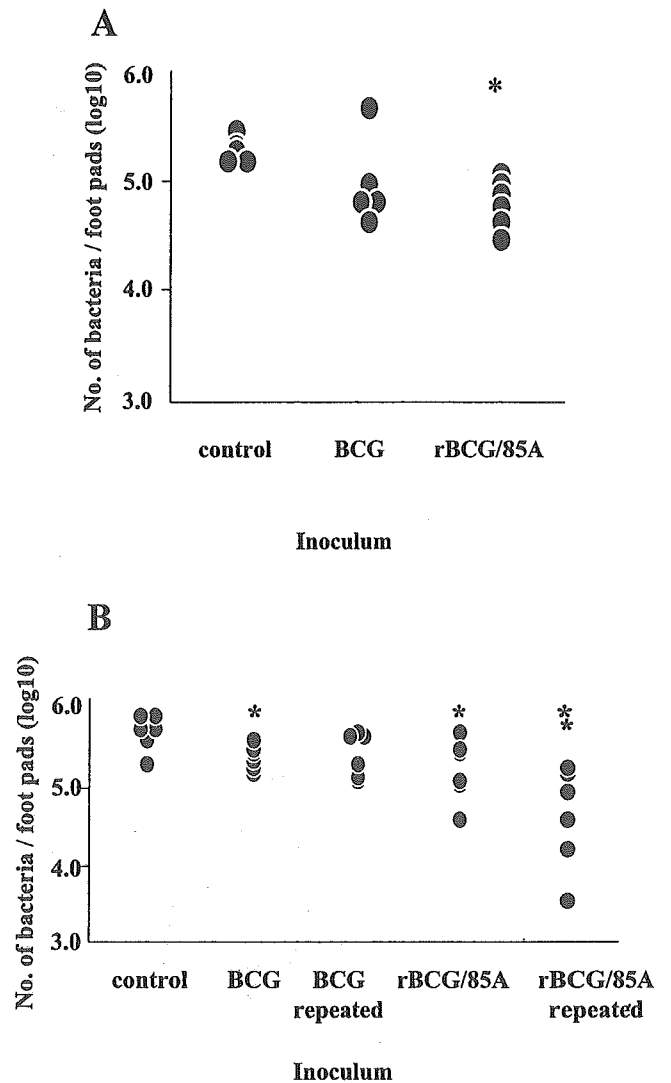


図 1. らい菌感染に対する rBCG/85A 免疫による感染防御効果。(A) 短期間における免疫効果。親株である BCG あるいは rBCG/85A を 6 週齢の C57BL/6 マウスの胸部皮内に 1 個体につき  $5.0 \times 10^7$  個接種した。1ヵ月後、各群のマウスのフットパッドに  $5.0 \times 10^3$  個の *M. leprae* 生菌を接種し、25 週後にフットパッドから検出された抗酸菌数を測定した。rBCG/85A 接種群では対照群と比較して検出される菌数が有意に ( $P < 0.01$ ) 減少した。(B) BCG あるいは rBCG/85A を接種した 5ヵ月後、各群の半数のマウスに同量の BCG あるいは rBCG/85A を接種した。さらに 1ヵ月のうちに(最初の接種から 6ヵ月後)、各群のマウスのフットパッドに  $5.0 \times 10^3$  個の *M. leprae* 生菌を接種し、30 週後にフットパッドから検出された抗酸菌数を測定した。rBCG/85A 接種群では対照群と比較して検出される菌数が有意に (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ) 減少した。黒丸はフットパッド中の抗酸菌数を示す。文献 25 より引用、改変。

配列から HrpA は  $\alpha$ -crystallin のホモログであることがわかった。 $\alpha$ -crystallin とは異なり酸素飢餓によって誘導されることはなかったが、興味深いことに BCG を一定期間酸素飢餓状態にした後に、再度酸素に暴露することで発現量が増加した (図 3) (40)。このことは菌の再燃化と関係があることを示唆するが、具体的な役割については不明である。

### 4. 抗酸菌の感染と骨代謝の関係

ところで結核菌は肺以外にも感染し、ほぼすべての臓器

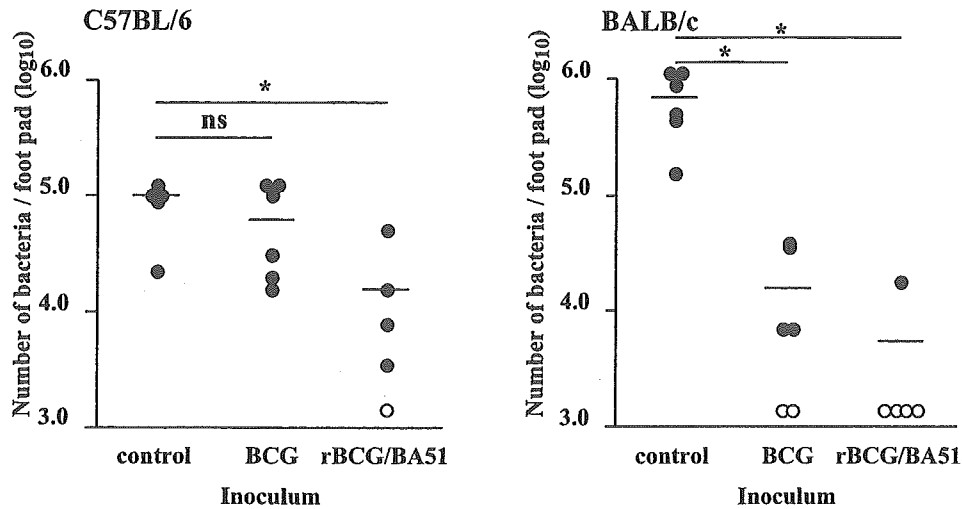


図2. らい菌感染に対する rBCG/BA51 免疫による感染防御効果。黒丸はフットパッド中の抗酸菌数を示す。白丸はフットパッド中に抗酸菌が認められなかったことを示す。文献 25 より引用。

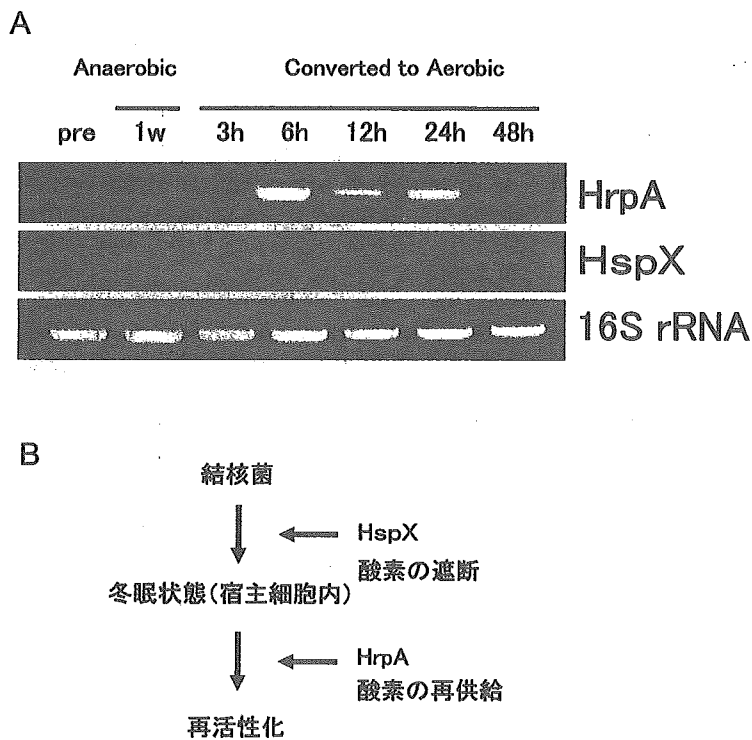


図3. 酸素分圧の変化に対する BCG 低分子ストレス蛋白質の変化。(A) BCG より RNA を抽出し、RT-PCR をおこなった。Sauton 培地で好氣的に 2 週間培養した BCG を嫌気ジャーの中に移動させると HspX が発現し、一週間後においてもメッセージ RNA は存在している (Anaerobic 1W)。その後好気状態に戻しても変化しない (converted to aerobic)。一方 HrpA は嫌気条件下では発現しないが、好気状態に戻すと一時的に発現する。(B) HspX と HrpA の働きについての模式図。HspX と HrpA は同じ低分子ストレス蛋白質ファミリーであるが、菌の冬眠状態に対しては異なる働きをしている可能性がある。

に感染しうる。特に骨組織に感染した場合には脊椎カリエス等の特徴的な病理像を呈する。また BCG ワクチンの副作用として骨炎を生じる。このような病理像がどのようにして生じてくるのかは不明である。このことへの興味がかきかけで骨関連細胞の研究を始めた。骨組織の中で骨芽細胞は骨添加に、破骨細胞が骨吸収を担う中心的でかつ直接的な細胞であり、健全な骨は両者がバランスよく働いている。このバランスが崩れると骨の過形成あるいは過吸収

となる。破骨細胞を主にコントロールしているのは骨芽細胞である。破骨細胞は骨芽細胞から産生される M-CSF と RANKL の刺激により前駆細胞である単球・マクロファージ系の前駆細胞から単核の破骨細胞に分化し、その後破骨細胞相互に融合を繰り返す、多核の成熟破骨細胞となる。破骨細胞分化のマーカーの 1 つに酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) が知られている。

ところで、BCG は骨芽細胞に効率よく感染する (9)。感染骨芽細胞ではその分化マーカーの発現が抑制されるとともに、急性の炎症に関わる蛋白質の発現が顕著に増加した (33)。また TNF 受容体ファミリーである 4-1BB (CD137) が産生されるようになる。4-1BB は抗原提示の際の補助刺激分子として知られている。*in vitro* の M-CSF/RANKL 刺激による破骨細胞形成系において 4-1BB は濃度依存的に破骨細胞の形成を顕著に抑制した。(図 4)

4-1BB の作用は単球・マクロファージ系細胞の細胞膜上にあるリガンド (4-1BBL (CD137L)) を介するリバースシグナルにより、破骨細胞分化に必須の転写因子である NFAT2 の産生が抑制されることによる。TNF スーパーファミリーのリバースシグナルの伝達経路は不明であった。4-1BBL の場合、TRAF6, NF $\kappa$ B シグナリング, MAP キナーゼカスケードに非依存性であるが, Akt を抑制することがわかった。また, 4-1BBL 分子内のカゼインキナーゼドメインの活性化を介してフォスファターゼが活性化することが必要であることが明らかになった。しかし, Akt のカスケー

ドが実際に 4-1BB による破骨細胞形成抑制に働いているのかを含め, シグナル伝達経路は虫食い状態であり, 今後明らかにしていく必要がある。またリアルタイムに生細胞内における菌の動きをダイナミックに追うことも必要であろう (12, 34)。ところで, 細菌感染により骨芽細胞から 4-1BB が産生されるという現象は抗酸菌に特異的ではなかった。また, 一般に細菌感染による炎症では骨吸収の方向に進むと考えられている。今回の破骨細胞の形成抑制は逆の方向性を示している。さらに, これまでに INF- $\beta$ , INF- $\gamma$ , IL-12, IL-18 等のサイトカインが同様に破骨細胞の形成を抑制することが示されている (8, 18, 42, 43, 45)。推測の域を出ないが, 骨への感染が起きた場合にこれらの破骨細胞分化抑制性のサイトカインが産生されることにより, 骨代謝の平衡状態が保たれる。しかし, 炎症が進みサイトカインのバランスが崩れると骨吸収が促進されることになる。また結核による特異的な病態形成については長期にわたる慢性感染の間に繰り返される急性期に吸収が進み, それが積み重なることによってできあがると考えられる。このことを

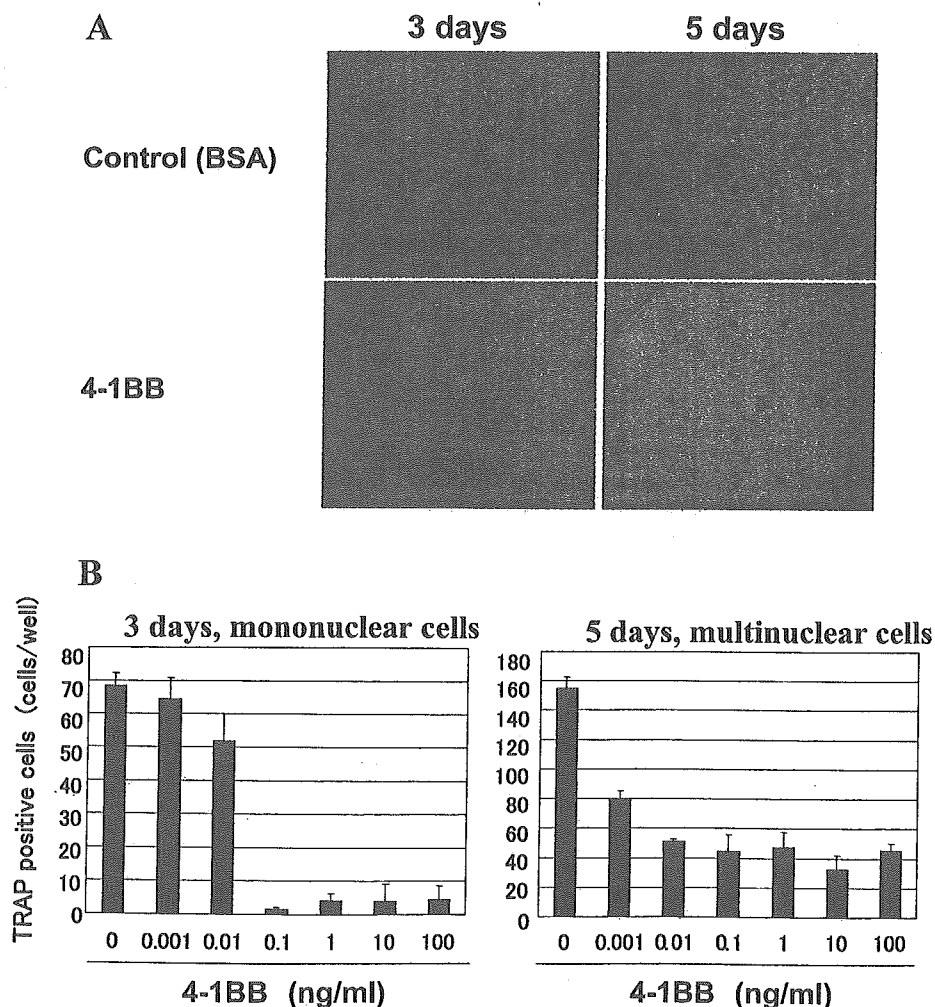


図 4. 4-1BB の破骨細胞分化に対する抑制効果。G-10 カラムを通過したマウス骨髄培養を BSA あるいは 4-1BB でコートしたプレート上で M-CSF (10 ng/ml) と RANKL (20 ng/ml) 存在下に 3 日間あるいは 5 日間培養した。(A) BSA でコートしたプレート上では 3 日目に TRAP 陽性の単核細胞が, 5 日目に TRAP 陽性の多核細胞が多数観察されるが, 4-1BB でコートしたプレート上では 3 日目における TRAP 陽性単核細胞, および 5 日目における TRAP 陽性多核細胞の形成が著しく阻害される。(B) 4-1BB による単核および多核の TRAP 陽性細胞の形成阻害は濃度依存的である。文献 33 より引用。

証明できる動物モデルを構築して示していきたい。

## おわりに

冒頭にも述べたように Gerhard Amauer Hansen が 1874 年にらい菌を発見し、Robert Koch が 1882 年に結核菌を発見してから今日まで多くのことが解明されてきた。しかし、基本的なことがまだ解明されていないことが多いことも事実である。たとえば、抗酸菌は発育速度が遅い。特に病原性の強い菌にこの傾向が強い。なぜ遅発育性になったのか、遅発育性を担っているメカニズムは何か。これは細菌学的には基本的な疑問であろう。Matsumoto らによって発見された MDP1 が重要な鍵を握っているようであるが (2)、未だに明確な解答は得られていない。らい菌は未だ培養が成功していない菌である。逆に結核菌は Sauton 培地というアスパラギン、クエン酸ナトリウム、リン酸水素二カリウム、硫酸マグネシウム、クエン酸鉄アンモニウム、グリセリンのみからなる培地で十分に増殖する。この違いは何に依存するのか。両菌ともにヒトの体内に住み着くことに高度に適応した菌である。らい菌がその生活を宿主に完全に依存するが如く、ゲノム上の遺伝子をそぎ落としていった結果だと言い切ってしまうのかもしれない。本研究に関連したことで、どのようなかたちで長期間ヒトの体内に姿をくらし生きていくのか、未だに謎である。また特異的な骨病変ができあがる過程も不明である。今挙げた以外にも基本的なことではあるが、いまだに解明されていないことは多い。今後もこれらの謎解きに挑戦していきたい。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導いただきました山田毅名誉教授（長崎大学）に深く感謝いたします。また、本賞に御推薦いただきました小林和夫教授（大阪市立大学大学院医学研究科）に厚く御礼を申し上げます。最後に本研究に協力してくださいました中山浩次教授をはじめ教室員の方々および共同研究で御協力いただきました先生方に感謝の意を捧げます。

## 文献

- 1) Aldovini, A., Young, R.A. (1991): Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. *Nature* **351**, 479-482.
- 2) Aoki, K., Matsumoto, S., Hirayama, Y., Wada, T., Ozeki, Y., Niki, M., Domenech, P., Umemori, K., Yamamoto, S., Minoda, A., Matsumoto, M., Kobayashi, K. (2004): Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in mycobacterium-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* **279**, 39798-39806.
- 3) Belisle, J.T., Vissa, V.D., Sievert, T., Takayama, K., Brennan, P.J., Besra, G.S. (1997): Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* **276**, 1420-1422.
- 4) Betts, J.C., Lukey, P.T., Robb, L.C., McAdam, R.A., Duncan, K. (2002): Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol. Microbiol.* **43**, 717-731.
- 5) Fisher, M.A., Plikaytis, B.B., Shinnick, T.M. (2002): Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J. Bacteriol.* **184**, 4025-4032.
- 6) Horwitz, M.A., Harth, G., Dillon, B.J., Maslesa-Galic', S. (2000): Recombinant bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 13853-13858.
- 7) Horwitz, M.A., Lee, B.W., Dillon, B.J., Harth, G. (1995): Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 1530-1534.
- 8) Horwood, N.J., Elliott, J., Martin, T.J., Gillespie, M.T. (2001): IL-12 alone and in synergy with IL-18 inhibits osteoclast formation *in vitro*. *J. Immunol.* **166**, 4915-4921.
- 9) Hotokezaka, H., Kitamura, A., Matsumoto, S., Hanazawa, S., Amano, S., Yamada, T. (1998): Internalization of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin into osteoblast-like MC3T3-E1 cells and bone resorptive responses of the cells against the infection. *Scand. J. Immunol.* **47**, 453-458.
- 10) Kitaura, H., Ohara, N., Matsuo, T., Tasaka, H., Kobayashi, K., Yamada, T. (1993): Cloning, sequencing and expression of the gene for  $\alpha$  antigen from *Mycobacterium intracellulare* and use of PCR for the rapid identification of *Mycobacterium intracellulare*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 1466-1473.
- 11) Kitaura, H., Ohara, N., Naito, M., Kobayashi, K., Yamada, T. (1998): Serological analysis of C-terminal region of  $\alpha$  antigen from *Mycobacterium avium-intracellulare* complex and *Mycobacterium tuberculosis*. *APMIS* **106**, 893-900.
- 12) Lee, J.-S., Kamijo, K., Ohara, N., Kitamura, T., Miki, T. (2004): MgcRacGAP regulates membrane blebbing through RhoA during cytokinesis. *Exp. Cell. Res.* **293**, 275-282.
- 13) Matsumoto, S., Yanagi, T., Ohara, N., Wada, N., Kanbara, H., Yamada, T. (1996): Stable expression and secretion of the B-cell epitope of rodent malaria from *Mycobacterium bovis* BCG and induction of long-lasting humoral response in mouse. *Vaccine* **14**, 54-60.
- 14) Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A., Tasaka, H., Terasaka, K., Totsuka, M., Kobayashi, K., Yukitake, H., Yamada, T. (1990): Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. *Infect. Immun.* **58**, 4049-4054.
- 15) Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A., Tasaka, H., Yamada, T. (1988): Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular  $\alpha$  antigen. *J. Bacteriol.* **170**, 3847-3854.
- 16) Matsuoka, M., Nomaguchi, H., Yukitake, H., Ohara, N., Matsumoto, S., Mise, K., Yamada, T. (1997): Inhibition of multiplication of *Mycobacterium leprae* in mouse foot pads by immunization with ribosomal fraction and culture filtrate from *Mycobacterium bovis* BCG. *Vaccine* **15**, 1214-1217.
- 17) Nagai, S., Wiker, H.G., Harboe, M., Kinomoto, M. (1991): Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **59**, 372-382.
- 18) Nagata, N., Kitaura, H., Yoshida, N., Nakayama, K. (2003): Inhibition of RANKL-induced osteoclast formation in mouse bone marrow cells by IL-12: involvement of IFN- $\gamma$  possibly induced from non-T cell population. *Bone* **33**, 721-732.
- 19) Naito, M., Matsuoka, M., Ohara, N., Nomaguchi, H., Yamada, T. (1999): The antigen 85 complex vaccine against experimental

- Mycobacterium leprae* infection in mice. *Vaccine* **18**, 795–798.
- 20) Naito, M., Ohara, N., Matsumoto, S., Yamada, T. (1998): The novel fibronectin-binding motif and key residues of mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **273**, 2905–2909.
  - 21) Naito, M., Ohara, N., Matsumoto, S., Yamada, T. (1998): Immunological characterization of  $\alpha$  antigen of *Mycobacterium kansasii*: B-cell epitope mapping. *Scand. J. Immunol.* **48**, 73–78.
  - 22) Ohara, N., Kitaura, H., Hotokezaka, H., Nishiyama, T., Wada, N., Matsumoto, S., Matsuo, T., Naito, M., Yamada, T. (1995): Characterization of the gene encoding the MPB51, one of the major secreted protein antigens of *Mycobacterium bovis* BCG, and identification of the secreted protein closely related to the fibronectin binding 85 complex. *Scand. J. Immunol.* **41**, 433–442.
  - 23) Ohara, N., Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A., Tasaka, H., Yamada, T. (1993): Cloning and sequencing of the gene for  $\alpha$  antigen from *Mycobacterium avium* and mapping of B-cell epitopes. *Infect. Immun.* **61**, 1173–1179.
  - 24) Ohara, N., Matsuoka, M., Nomaguchi, H., Naito, M., Yamada, T. (2000): Inhibition of multiplication of *Mycobacterium leprae* in mouse foot pads by recombinant Bacillus Calmette-Guérin (BCG). *Vaccine* **18**, 1294–1297.
  - 25) Ohara, N., Matsuoka, M., Nomaguchi, H., Naito, M., Yamada, T. (2001): Protective responses against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice induced by recombinant Bacillus Calmette-Guérin over-producing three putative protective antigen candidates. *Vaccine* **19**, 1906–1910.
  - 26) Ohara, N., Nishiyama, T., Ohara-Wada, N., Matsumoto, S., Matsuo, T., Yamada, T. (1997): Characterization of the transcriptional initiation regions of genes for the major secreted protein antigens 85C and MPB51 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Microb. Pathog.* **23**, 303–310.
  - 27) Ohara, N., Ohara-Wada, N., Kitaura, H., Nishiyama, T., Matsumoto, S., Yamada, T. (1997): Analysis of the genes encoding the antigen 85 complex and MPT51 from *Mycobacterium avium*. *Infect. Immun.* **65**, 3680–3685.
  - 28) Ohara, N., Ohara, N., Naito, M., Miyazaki, C., Matsumoto, S., Tabira, Y., Yamada, T. (1997): HrpA, a new ribosome-associated protein which appears in heat-stressed *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *J. Bacteriol.* **179**, 6495–6498.
  - 29) Ohara, N., Yamada, T. (2001): Recombinant BCG vaccines. *Vaccine* **19**, 4089–4098.
  - 30) Pal, P.G., Horwitz, M.A. (1992): Immunization with extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* induces cell-mediated immune responses and substantial protective immunity in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.* **60**, 4781–4792.
  - 31) Ranes, M.G., Rauzier, J., Lagranderie, M., Gheorghiu, M., Gicquel, B. (1990): Functional analysis of pAL5000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum*: construction of a “mini” mycobacterium-*Escherichia coli* shuttle vector. *J. Bacteriol.* **172**, 2793–2797.
  - 32) Rosenkrands, I., Slayden, R.A., Crawford, J., Aagaard, C., Barry, C.E.III, Andersen, P. (2002): Hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins. *J. Bacteriol.* **184**, 3485–3491.
  - 33) Saito, K., Ohara, N., Hotokezaka, H., Fukumoto, S., Yuasa, K., Naito, M., Fujiwara, T., Nakayama, K. (2004): Infection-induced up-regulation of the costimulatory molecule 4-1BB in osteoblastic cells and its inhibitory effect on M-CSF/RANKL-induced *in vitro* osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 13555–13563.
  - 34) Saito, S.I., Liu, X.-F., Kamijo, K., Razziudin, R., Tatsumoto, T., Okamoto, I., Chen, X., Lee, C.-C., Lorenzi, M.V., Ohara, N., Miki, T. (2004): Deregulation and mislocalization of the cytokinesis regulator ECT2 activate the Rho signaling pathways leading to malignant transformation. *J. Biol. Chem.* **279**, 7169–7179.
  - 35) Sherman, D.R., Voskuil, M., Schnappinger, D., Liao, R., Harrell, M.I., Schoolnik, G.K. (2001): Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding  $\alpha$ -crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 7534–7539.
  - 36) Snapper, S.B., Lugosi, L., Jekkel, A., Melton, R.E., Kieser, T., Bloom, B.R., Jacobs, W.R.Jr. (1988): Lysogeny and transformation in mycobacteria: stable expression of foreign genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 6987–6991.
  - 37) Stover, C.K., de la Cruz, V.F., Fuerst, T.R., Burlein, J.E., Benson, L.A., Bennett, L.T., Bansal, G.P., Young, J.F., Lee, M.H., Hatfull, G.F., *et al.* (1991): New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* **351**, 456–460.
  - 38) Stover, C.K., Bansal, G.P., Hanson, M.S., Burlein, J.E., Palaszynski, S.R., Young, J.F., Koenig, S., Young, D.B., Sadziene, A., Barbour, A.G. (1993): Protective immunity elicited by recombinant bacille Calmette-Guérin (BCG) expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: a candidate Lyme disease vaccine. *J. Exp. Med.* **178**, 197–209.
  - 39) Tabira, Y., Ohara, N., Ohara, N., Kitaura, H., Matsumoto, S., Naito, M., Yamada, T. (1998): The 16-kDa  $\alpha$ -crystallin-like protein of *Mycobacterium bovis* BCG is produced under conditions of oxygen deficiency and is associated with ribosomes. *Res. Microbiol.* **149**, 255–264.
  - 40) Tabira, Y., Ohara, N., Yamada, T. (2000): Identification and characterization of the ribosome-associated protein, HrpA, of Bacillus Calmette-Guérin. *Microb. Pathog.* **29**, 213–222.
  - 41) Takano, M., Ohara, N., Mizuno, A., Yamada, T. (1994): Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the gene for  $\alpha$  antigen from *Mycobacterium scrofulaceum*. *Scand. J. Immunol.* **40**, 165–170.
  - 42) Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, K., Suzuki, H., Suzuki, T., Sato, K., Yokochi, T., Oda, H., Nakamura, K., Ida, N., Wagner, E.F., Taniguchi, T. (2002): RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon- $\beta$ . *Nature* **416**, 744–749.
  - 43) Takayanagi, H., Ogasawara, K., Hida, S., Chiba, T., Murata, S., Sato, K., Takaoka, A., Yokochi, T., Oda, H., Tanaka, K., Nakamura, K., Taniguchi, T. (2000): T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- $\gamma$ . *Nature* **408**, 600–605.
  - 44) Tasaka, H., Nomura, T., Matsuo, Y. (1985): Specificity and distribution of  $\alpha$  antigens of *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and related species of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* **132**, 173–174.
  - 45) Udagawa, N., Horwood, N.J., Elliott, J., Mackay, A., Owens, J., Okamura, H., Kurimoto, M., Chambers, T.J., Martin, T.J., Gillespie, M.T. (1997): Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. *J. Exp. Med.* **185**, 1005–1012.
  - 46) Voskuil, M.I., Schnappinger, D., Visconti, K.C., Harrell, M.I., Dolganov, G.M., Sherman, D.R., Schoolnik, G.K. (2002): Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J. Exp. Med.* **198**, 705–713.
  - 47) Wada, N., Ohara, N., Kameoka, M., Nishino, Y., Matsumoto, S.,



- Nishiyama, T., Naito, M., Yukitake, H., Okada, Y., Ikuta, K., Yamada, T. (1996): Long-lasting immune response induced by recombinant bacillus Calmette-Guérin (BCG) secretion system. *Scand. J. Immunol.* **43**, 202-209.
- 48) Wayne, L.G., Hayes, L.G. (1996): An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect. Immun.* **64**, 2062-2069.
- 49) Yoneda, M., Fukui, Y. (1965): Isolation, purification, and characterization of extracellular antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. Rev. Respir. Dis.* **92**, 361-370.
- 50) Yuan, Y., Crane, D.D., Barry, C.E.III. (1996): Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial  $\alpha$ -crystallin homolog. *J. Bacteriol.* **178**, 4484-4492.
- 51) Yuan, Y., Crane, D.D., Simpson, R.M., Zhu, Y.Q., Hickey, M.J., Sherman, D.R., Barry, C.E.III. (1998): The 16-kDa  $\alpha$ -crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 9578-9583.