

ジャー受容体が TDM のサイトカイン誘導活性を負に制御し、抗炎症効果を発揮すること、また、*Mycobacterium intracellulare* (血清型 7) は糖鎖部分として、3 個の rhamnose を有する特異な構造であったことから、rhamnose 転移酵素遺伝子を標的として、GPL 酵素群を同定した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ozeki, Y., H. Tsutsui, N. Kawada, H. Suzuki, M. Kataoka, T. Kodama, I. Yano, K. Kaneda, and K. Kobayashi. Macrophage scavenger receptor down-regulates mycobacterial cord factor-induced proinflammatory cytokine production by alveolar and hepatic macrophages. *Microb. Pathog.* 40: 171-176, 2006.
- 2) Fujiwara, N., N. Nakata, S. Maeda, T. Naka, M. Doe, I. Yano, and K. Kobayashi. Structural characterization of a specific glycopeptidolipid containing a novel N-acyl-deoxy sugar from *Mycobacterium intracellulare* serotype 7 and genetic analysis of its glycosylation pathway. *J. Bacteriol.* 2007. 印刷中.
- 3) 小林和夫. 感染症の現状と制圧戦略. 都市問題研究 58: 20-32, 2006.
- 4) 阿戸 学、小林和夫. 結核の免疫. 呼吸器 6. 結核・非結核性抗酸菌症 (露口泉夫 編). 新しい診断と治療の ABC. 最新医学 別冊. 大阪: 最新医学社. 55-63, 2006.

2. 学会発表

- 1) 非結核性抗酸菌 MAC 由来血清型 7 型 glycopeptidolipid (GPL) の構造と合成遺伝子の解析. 藤原永年、前田伸司、中田 登、中 崇、矢野郁也、小林和夫. 第 79 回日本細菌学会総会 2006 年 3 月 金沢.
- 2) 結核菌の病原性と制御性 T 細胞 (CD4⁺CD25⁺ regulatory T 細胞) の役割. 尾関百合子、松本壮吉、小林和夫. 第 79 回日本細菌学会総会 2006 年 3 月 金沢.
- 3) 結核菌 DNA による DNA 結合蛋白質の抗原性修飾. 松本壮吉、松本 真、梅森清子、尾関百合子、山本三郎、山田 毅、小林和夫. 第 79 回日本細菌学会総会 2006 年 3 月 金沢.
- 4) 抗酸菌のヒトマクロファージ様細胞 (THP1) 感染におけるグリコサミノグリカンの役割. 平山幸雄、松本壮吉、仁木誠、尾関百合子、西内由紀子、小林和夫. 第 81 回日本結核病学会総会 2006 年 4 月 仙台.
- 5) 結核菌 *KasB* 遺伝子欠損株のミコール酸合成と宿主応答. 藤原永年、前田伸司、小林和夫. 第 81 回日本結核病学会総会 2006 年 4 月 仙台.
- 6) Mycobacterial DNA-binding protein 1 の機能解析. 仁木 誠、松本壮吉、平山幸雄、尾関百合子、西内由紀子、小林和夫. 第 81 回日本結核病学会総会 2006 年 4 月 仙台.

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18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）

マクロファージ内で発現する遺伝子の網羅的検出と細胞壁構造の
構築に関する遺伝子の解析

分担研究報告書

分担研究者

荒川 宜親

（国立感染症研究所・細菌第二部部长）

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

マクロファージ内で発現する遺伝子の網羅的検出と
細胞壁構造の構築に関与する遺伝子の解析

分担研究者 荒川 宜親（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）
研究協力者 森 茂太郎（国立感染症研究所・細菌第二部・研究員）
柴山 恵吾（国立感染症研究所・細菌第二部・第四室長）
持田 恵子（国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官）
朴 貞玉（国立感染症研究所・細菌第二部・流動研究員）

研究要旨.

結核菌における新規な病原性因子の同定を目的として、結核菌の大きな特徴である「マクロファージ内での生存」と「特異的な細胞壁構造」に関する研究を行った。「マクロファージ内での生存」については、抗菌薬に対する耐性を指標とするマクロファージ内発現遺伝子群の新規な網羅的選択法を構築し、結核菌がマクロファージ内で生存するために必須な遺伝子を同定することが可能であることを示した。「特異的な細胞壁構造」に関しては、前年度までに *Mycobacterium smegmatis* においてコロニー形態に関与していることを示した遺伝子（MSMEG6056 遺伝子）が、抗酸菌全体に共通してコロニー形態、すなわち細胞壁構造に関与していることを、*M. bovis* BCG 株を用いた破壊株・相補株の作成により明らかにした。

また、新規抗結核薬の効率的・経済的な開発を目標として、新規抗結核薬の標的候補タンパク質の立体構造解析に着手した。特異的な細胞壁構造に関与する4種類のタンパク質（Rv2610c、Rv2611c、Rv2612c、及び Rv3597c）を標的候補タンパク質として選定し、*Escherichia coli* を宿主とする発現株の構築をおこなった。発現条件を検討した結果、可溶性画分に発現が認められた Rv2610c について、結晶化条件の検討を行い、X線結晶構造解析に適した結晶が得られる可能性を示した。

A. 研究目的

結核菌が引き起こす結核は、世界中において新規感染患者数や死亡者数の増加が懸念されており、今なお至急の対策が必要な感染症である。さらに近年、従来の抗結核薬に耐性を示す多剤耐性結核菌による症例が増加傾向にあり、深刻な問題となっている。そのため、これまでの治療薬にかわる新たな治療薬、特に結核菌に特異的に作用するような抗結核薬の開発が望まれている。そこで本研究では、結核菌の大きな特徴である「マクロファージ内での生存」と「特異的な細胞壁構造」に着目し、結核菌の生育や病原性の発現に必須な遺伝子・タンパク質の同定、並びに解析を行なうことによ

り、新規な結核診断方法や抗結核薬の開発に結びつけることを目標としている。

結核菌はマクロファージに貪食された後、様々な殺菌作用から逃れてマクロファージ内で生存することが可能であり、この生理機能が病原性と深く関連している。従って、結核菌においてマクロファージ内で発現が亢進する遺伝子を特定することは、病原性因子の解明につながるものと期待される。しかしながら、これまでにマクロファージ内で発現が亢進する遺伝子を網羅的に選択する有効な実験手法は得られていなかった。そこで本研究では、細胞内に取り込まれてファゴゾーム内で濃縮される抗菌薬 XXX（新規な網羅的選択法の特許出願に関わる

ため、詳細な抗菌薬名は伏せる。以下同様) に対する感受性を指標とした、マクロファージ内で発現が亢進する遺伝子の新規な網羅的選択法の確立を行なった。

結核菌を含む抗酸菌は、脂質に富む頑強な細胞壁構造をしており、その特徴的な細胞壁構造が生育や病原性の発現に深く関与していると考えられている。そこで、本研究では結核菌に特異的な新規抗結核薬の開発に向けて、その標的となりうる抗酸菌に特有の細胞壁構造を構築する機構を明らかにすることを目的としている。昨年度までに、抗酸菌の一種である *Mycobacterium smegmatis* のコロニー形態変異株を作成して、その変異導入部位の解析を行なうことにより、コロニー形態に関与する遺伝子 (MSMEG6056 遺伝子) を同定している。本遺伝子は他の抗酸菌において高度に保存されているため、抗酸菌に共通してコロニー形態に関与していることが示唆された。そこで本年度は、本遺伝子の解析を目的として、*M. bovis* BCG 株を用いた破壊株・相補株の作成を行なった。

作用機序が明確な新規抗結核薬の効率的・経済的な開発のためには、標的候補タンパク質の立体構造情報、特に活性中心近傍の構造情報が必要とされている。そこで本研究では、結核菌において主要な細胞壁構成成分である Lipoarabinomannan の生合成に関与する3種類のタンパク質 (Rv2610c、Rv2611c、及び Rv2612c) と本研究でコロニー形態に関与していることを明らかにしたタンパク質 (Rv3597c) を新規抗結核薬の標的候補タンパク質として選定して、宿主として *E. coli* を用いた大量発現株を構築し、発現条件の検討、タンパク質の精製、及び結晶化条件のスクリーニングを行なった。

B. 研究方法

1. マクロファージ内で発現が亢進する遺伝子の新規な網羅的選択法の確立

抗酸菌発現ベクターである pvv16 の構成性発現プロモーター (*hsp60*) 下流に、*Staphylococcus aureus* 由来の抗菌薬 XXX 耐性遺伝子を挿入したプラスミドを構築し、*M. smegmatis* に導入することにより、*M. smegmatis hsp60-XXX* 耐性遺伝子株を作成

した。また、上記のプラスミドを用いて、*hsp60* をマクロファージ内で発現が亢進することが報告されている *acr* プロモーターに置き換えたプラスミドを構築し、*M. smegmatis* に導入することにより、*M. smegmatis acr-XXX* 耐性遺伝子株を作成した。作成した両 *M. smegmatis* 形質転換株を用いて、抗菌薬 XXX を含む 7H10 プレート上でのそれぞれの生育状況について調べた。また、THP-1 細胞の培養液中に Phorbol ester (phorbol-12-myristate-13-acetate) を添加して調製したマクロファージに、*M. smegmatis* 野生株と *M. smegmatis acr-XXX* 耐性遺伝子株をそれぞれ取り込ませ、何も処理を加えない場合にマクロファージ内から回収される生菌数と、抗菌薬 XXX で処理した後にマクロファージ内から回収される生菌数について調べた。(新規な網羅的選択法の特許出願に関わるため、詳細な研究方法については伏せる。)

2. 抗酸菌コロニー形態に関与する遺伝子の同定と解析

昨年度の研究結果より、コロニー形態に関与していることが示唆された遺伝子 (*M. smegmatis* : MSMEG6056 遺伝子、*M. bovis* BCG 株 : Mb3628c 遺伝子) の中央部分に pUC4K 由来のカナマイシン耐性カセットを組み込んで調製した遺伝子断片を抗酸菌ベクター pPR27 に挿入して破壊株作成用のプラスミドを構築した。作成したプラスミドをそれぞれ *M. smegmatis*、*M. bovis* BCG 株に導入して、選択培地上で標的遺伝子を破壊した株を取得した。作成した *M. bovis* BCG 株の Mb3628c 遺伝子破壊株 (BCG 破壊株) よりゲノム DNA を抽出し、カナマイシン耐性カセットに対応するプローブを用いたサザンブロッティングを行なった。抗酸菌発現ベクター pvv16 に Mb3628c 遺伝子を挿入したプラスミドを構築し、BCG 破壊株に導入することにより、BCG 破壊株の相補株を作成した。

3. 新規抗結核薬の標的候補タンパク質の結晶化

結核菌由来の標的候補タンパク質 (Rv2610c、Rv2611c、Rv2612c、及び

Rv3597c) をコードする遺伝子を pET30a に挿入したプラスミドを構築し、*E. coli* BL21(DE3)pLysS に導入することにより、それぞれの大量発現株を作成した。発現条件を最適化するため、本培養の温度、時間、及び添加する IPTG の濃度について検討した。タンパク質の精製には FPLC を使用し、Ni キレートカラムとゲルろ過カラムを用いた。市販されているスクリーニング試薬を用いて、約 700 種類の条件で精製タンパク質の結晶化条件を調べた。

倫理面への配慮 本研究は、バイオセーフティーレベルに応じた該当実験室 (P2 レベル) で行った。また、実験を行う際には研究所内の安全講習を受講するとともに、実験計画について安全委員会の承認を受けている。また、大臣確認実験を必要とする実験 (組換え DNA 実験) については、必要書類を文部科学省に提出し認可されている。実際の実験では、関連法令を遵守した上で、安全性等に十分に配慮して行った。

C. 研究結果

1. マクロファージ内で発現が亢進する遺伝子の新規な網羅的選択法の確立

抗菌薬 XXX 耐性遺伝子の上流に構成性発現プロモーター *hsp60* を有するプラスミドで *M. smegmatis* を形質転換した *M. smegmatis hsp60-XXX* 耐性遺伝子株は、抗菌薬 XXX を含む 7H10 プレート上で生育が可能であったのに対して、マクロファージ内で発現が亢進することが報告されている *acr* プロモーターを抗菌薬 XXX 耐性遺伝子上流に有するプラスミドで *M. smegmatis* を形質転換した *M. smegmatis acr-XXX* 耐性遺伝子株では、*M. smegmatis* 野生株と同様に抗菌薬 XXX を含む 7H10 プレート上での生育は認められなかった。

M. smegmatis 野生株と *M. smegmatis acr-XXX* 耐性遺伝子株をそれぞれマクロファージに貪食させ、抗菌薬 XXX 処理を行なった後に、マクロファージ内より回収される生菌数を調べた結果、野生株ではほぼ生菌数がゼロ (5 回の試行中 1 回のみ少数のコロニーが認められた) であったのに対して、*M. smegmatis acr-XXX* 耐性遺伝子株では 5 回の試行とも十分な生菌数が認められた。

一方、マクロファージに貪食させた後に、抗菌薬 XXX による処理を行なわない場合には、*M. smegmatis* 野生株でも *M. smegmatis acr-XXX* 耐性遺伝子株と同等数の生菌がマクロファージ内から回収された。

2. 抗酸菌コロニー形態に関与する遺伝子の同定と解析

M. smegmatis において MSMEG6056 遺伝子を破壊した株のコロニー形態は、昨年度作成した変異株と同様に、*M. smegmatis* 野生株で見られる Rough 型とは異なる Smooth 型であった。また、*M. bovis* BCG 株において、MSMEG6056 遺伝子と高い相同性を示す Mb3628c 遺伝子を破壊した株 (BCG 破壊株) のコロニー形態も *M. bovis* BCG 株の野生株で見られる Rough 型とは異なり Smooth 型であった。サザンブロッティングの結果より、BCG 破壊株では Mb3628c 遺伝子中にカナマイシン耐性遺伝子が挿入されていることが確認された。また、BCG 破壊株において Mb3628c 遺伝子を発現させた相補株では、コロニー形態は *M. bovis* BCG 株野生株と同じ Rough 型に復帰していた。

3. 新規抗結核薬の標的候補タンパク質の結晶化

新規抗結核薬の標的候補として選定した結核菌由来タンパク質、Rv2610c、Rv2611c、Rv2612c、及び Rv3597c について、それぞれ *E. coli* を宿主として用いた発現条件の検討を行った結果、Rv2610c のみが可溶性画分に発現が認められた。一方、他のタンパク質については発現が認められたものの、全て不溶性画分に回収された。そこで、Rv2610c について SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで精製を行なった。得られた精製タンパク質を用いて結晶化条件のスクリーニングを行なった結果、微小ではあるが Rv2610c の結晶の析出が確認された。

D. 考察

本研究では、結核菌由来マクロファージ内発現遺伝子を同定する目的で、新規な網羅的選択法の確立を行なった。抗菌薬 XXX を含む 7H10 プレート上で、*M. smegmatis hsp60-XXX* 耐性遺伝子株は生育が可能であ

ったが、*M. smegmatis* *acr*-XXX 耐性遺伝子株は生育が認められなかったことから、*acr* プロモーターは通常の培養条件下では十分に発現していないことが示された。通常の培養条件に対して、マクロファージに取り込ませた後に抗菌薬 XXX を含む培地で培養した場合は、*M. smegmatis* *acr*-XXX 耐性遺伝子株は生存が可能であったことから、*acr* プロモーターがマクロファージに取り込まれた後に十分に発現していることが明らかとなった。なお、抗菌薬 XXX が細胞内に取り込まれた後、マクロファージ内の菌体に作用していることは、*M. smegmatis* 野生株がマクロファージに貪食後、抗菌薬 XXX による処理を加えない場合にはマクロファージ内での生存が可能であるのに対して、抗菌薬 XXX による処理を行なった場合、マクロファージ内の生菌数はほぼ 0 であったことから確認された。従って、*acr* プロモーターの代わりに結核菌由来遺伝子断片を挿入したプラスミドを用いて *M. smegmatis* を形質転換したスクリーニング株を作成し、本研究で明らかにした条件で培養、並びに抗菌薬 XXX 処理を行ない、マクロファージ内より生菌を回収すれば、その生菌内では抗菌薬 XXX 耐性遺伝子が発現している、すなわち挿入した結核菌由来遺伝子断片中にマクロファージ内で発現が亢進する遺伝子が含まれていることになる。このように、本研究で確立した条件を用いることにより、マクロファージ内で発現が亢進する結核菌由来遺伝子を網羅的に選択することが十分に可能であることが示された。また、この手法を応用することにより、他の細胞内寄生細菌においても同様に病原性因子を同定することが可能になると考えられる。

M. bovis BCG 株を用いた破壊株・相補株の作成結果より、Mb3628c 遺伝子はコロニー形態、すなわち細胞壁構造に関与していることが示された。これまでに、迅速発育菌・非結核性抗酸菌である *M. smegmatis* において MSMEG6056 遺伝子が細胞壁構造に関与していることを示したが、本年度の研究結果より、遅発育菌・結核菌群に属する *M. bovis* BCG 株においても MSMEG6056 遺伝子と高い相同性を示す Mb3628c 遺伝子が

細胞壁構造に関与していることが示されたことから、本遺伝子は抗酸菌全体において共通して細胞壁構造に関与していることが示された。これらことから、抗酸菌に特異的である細胞壁構造に関与している本遺伝子の産物であるタンパク質（結核菌では Rv3597c）は新規抗結核薬の標的になり得ることが示唆された。

立体構造解析を通じた新規抗結核薬の開発に向けて、細胞壁合成に関与している結核菌由来のタンパク質（Rv2610c、Rv2611c、Rv2612c、及び Rv3597c）を標的候補タンパク質として選び、発現条件の検討を行なった。その結果、Rv2610c のみ可溶性画分に回収されが、他のタンパク質も発現は認められているため、発現条件の最適化やシャペロンタンパク質との共発現系を構築することにより、可溶性画分に回収することが可能であると予想される。また、可溶性画分に回収された Rv2610c について結晶化条件のスクリーニングを行なった結果、X 線結晶構造解析には適さないもののタンパクの結晶と思われる結晶が得られた。従って、今後結晶化条件の最適化により、X 線結晶構造解析に適した結晶が得られる可能性が示された。

E. 結論

抗菌薬 XXX に対する耐性を指標とした、マクロファージ内発現遺伝子群の新たな網羅的選択法を構築した。確立した方法を用いて、マクロファージ内で発現が亢進する結核菌由来遺伝子をスクリーニングすることが可能であることを示した。

前年度までに *M. smegmatis* においてコロニー形態に関与していることを示した遺伝子（MSMEG6056 遺伝子）が、抗酸菌全体に共通してコロニー形態、すなわち細胞壁構造に関与していることを、*M. bovis* BCG 株を用いた破壊株・相補株の作成により明らかにした。

Lipoarabinomannan の生合成経路に関与する結核菌由来タンパク質、Rv2610c の結晶化条件の検討を行い、X 線結晶構造解析に適した結晶が得られる可能性を示した。

G. 研究発表

1. 論文発表
投稿準備中

2. 学会発表
発表準備中

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 マクロファージ内で発
現が亢進する遺伝子の新規スクリー
ニング法について出願を準備してい
る

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

平成18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）

新規抗酸菌ワクチンの開発・非結核性抗酸菌遺伝子診断法の確立

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

新規抗酸菌ワクチンの開発・非結核性抗酸菌遺伝子診断法の確立に関する研究

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 向井 徹（国立感染症研究所・病原微生物部・第一室長）

研究要旨.

BCG は、病原性抗酸菌症の発症を抑えるワクチンとして長年用いられてきた。BCG は長所と短所を併せ有するが、近年ではワクチンとしての有効性は極めて低いと考えられている。そのため、BCG の短所を是正し、より有効に作用する新しいリコンビナント BCG の確立が切望されている。昨年度までに、病原性抗酸菌の細胞膜に存在し、宿主 T 細胞を強く活性化させる主要抗原として MMP-II を同定し、MMP-II を感染細胞内で分泌するリコンビナント BCG (BCG-SM) を作製した。さらに、BCG-SM がヒト末梢単球由来樹状細胞に感染するとより強く T 細胞を活性化することを報告してきた。しかし、BCG が生体内で最も親和性を有する免疫担当細胞はマクロファージであるため、BCG-SM がマクロファージに感染した際の抗原提示能に及ぼす影響を親 BCG (ベクターコントロール BCG) と比較検討した。マクロファージは、GM-CSF あるいは M-CSF を用いて作製した。GM-CSF を用いて分化誘導したマクロファージ (GM-M \emptyset) および M-CSF を用いて作製したマクロファージ (M-M \emptyset)、いずれにおいても BCG-SM は親 BCG 株より強く CD4 陽性 T 細胞を活性化した。GM-CSF は、マクロファージの抗原提示能をより強く増強することがこれまでの検索で明らかになっているため、BCG-SM とベクターコントロール BCG (BCG-pMV) の GM-CSF 産生誘導能を検討したところ、BCG-SM は MMP-II を分泌することにより GM-CSF の産生を誘導することが明らかになった。従って、BCG-SM はマクロファージに感染した場合においても、強く T 細胞を活性化し得る有効なワクチンとして貢献する可能性が示唆された。

抗酸菌を同定するための遺伝子検査は、サンプルの採取、保存・移送後、検査室等において、核酸抽出、遺伝子増幅、検出の過程を経る。これまでに、等温遺伝子増幅法である Loop-mediated isotherma Amplification (LAMP) 法による非結核性抗酸菌である *M. kansasii* と *M. gastri* の鑑別および、*M. leprae* 特異検出法を確立し、その簡易検出法の開発を進めてきた。本年度は、臨床サンプルの簡易保存・移送法および核酸抽出法の検討を行った。その結果、特殊化学表面処理を行ったろ紙を用いることにより安定したサンプルの保存が可能であることが示唆された。

A. 研究目的

BCG は牛型結核菌の弱毒化株であり、病原性抗酸菌に対するワクチンとして長年用いられてきた生ワクチンである。しかし、抗酸菌であるが故に多くの欠点を有し、現在では小児の髄膜炎・粟粒結核など一部の

特殊な結核の発症を抑制する上で有効であるものの、成人あるいは高齢者の肺結核に対してはほぼ無効と考えられている。本研究においては、BCG に改良を加え、より有効なリコンビナント BCG を作出することを最終目的としている。

抗酸菌の細胞膜に存在する Major Membrane Protein-II (MMP-II) がヒト抗原提示細胞に導入されると強い免疫原性を発揮し、自己の CD4 陽性 T 細胞も CD8 陽性 T 細胞も強く活性化し、インターフェロンガンマー (IFN- γ) 産生性 T 細胞が活性化される。さらに、MMP-II 遺伝子の近位に結核菌 Ag85B 由来の分泌シグナルを付加した後、BCG に組み込ませたリコンビナント BCG (BCG-SM) を作製したところ、BCG-SM がヒト末梢単球由来樹状細胞に感染すると、リコンビナント MMP-II タンパクと同様に CD4 陽性 T 細胞も CD8 陽性 T 細胞も強く活性化すること、さらに、その作用を親 BCG またはベクターコントロール BCG (BCG-pMV) と比較すると、BCG-SM の方が遥かに優れていて、BCG-SM は抗酸菌ワクチンとしての必要条件を兼ね備えていることを昨年までに報告してきた。

しかし、BCG を生体内に投与した際、最も親和性を有する細胞はマクロファージであり、マクロファージ内で長期にわたり生存し、そのために種々の負の影響を与える可能性も考えられる。一方、マクロファージの分化誘導は、環境サイトカインの影響を強く受け、分化させる上で用いられたサイトカインの種類によって抗原提示能が大きく変わる可能性が示唆されている。そこで本年度は、代表的なサイトカインである M-CSF および GM-CSF を用いてマクロファージを作製し、BCG-SM がマクロファージの抗原提示能に及ぼす影響を検討した。

遺伝子検査は、サンプルの採取、保存・移送後、検査室等において、核酸抽出、遺伝子増幅、検出の過程を経る。これまでに、等温遺伝子増幅法である Loop-mediated isotherma Amplification (LAMP) 法による非結核性抗酸菌である病原性 *M. kansasii* と非病原性 *M. gastri* の鑑別および、*M. leprae* 特異検出法を確立し、その簡易検出法の開発を進めてきた。本年度は、臨床サンプルの簡易保存・移送法および核酸抽出法の検討を行った。

B. 研究方法

MMP-II 分泌型 BCG (BCG-SM) とベクターコントロール BCG (BCG-pMV) は、昨年度作製したものをを用いた。正常健常者末梢血よりプラスチック付着性細胞を分離し単球として用いた。マクロファージは、GM-CSF あるいは M-CSF を用いて分化誘導したが、GM-CSF を用いて誘導したマクロファージを GM-M \emptyset 、M-CSF を用いて作製したマクロファージを M-M \emptyset と称した。GM-M \emptyset および M-M \emptyset を BCG-SM あるいは BCG-pMV を用いて刺激した際に培養上清中に産生される GM-CSF 等のサイトカインは市販 ELISA キットを用いて測定した。リコンビナント BCG 感染マクロファージの抗原提示能は CD4 陽性 T 細胞の活性化で半定量的に測定した。GM-M \emptyset あるいは M-M \emptyset に一定量のリコンビナント BCG を感染させ、さらに 2 日間培養し、マイトマイシン処理した後、自己の CD4 陽性 T 細胞と 4 日間混合培養した。CD4 陽性 T 細胞が産生する IFN- γ は市販の ELISA キットを用いて測定した。マクロファージ表面抗原の発現程度の解析は、FACS Calibur を用いて行った。MHC 抗原・CD86 抗原など抗原提示に関わる分子の発現は、それぞれ市販のモノクローナル抗体を用い、MMP-II の細胞表面への発現は、昨年度までに作出した抗 MMP-II モノクローナル抗体 (M270-13) を用いた。

臨床検体の保存法、核酸抽出法として、紙面の表面を特殊化学処理し FTA カード (Whattmann 社) Classic および Elute を用いた。段階希釈らい菌液 (0, 5, 10, 50, 100, 1,000 菌体) を紙面に添加後、室温にて乾燥した。FTA カード Classic は、2 ミリの disk をパンチアウト後、FTA reagent にて 3 回洗浄、さらに、Tris 緩衝液により 2 回洗浄を行い、disk を直接 LAMP 法もしくは、PCR 法に供した。FTA カード Elute は、3 ミリ disk をパンチアウトした後、蒸留水にて 1 回洗浄後、30 μ l の蒸留水に懸濁し、その 3 μ l を LAMP 法と PCR 法に供し、検出限界菌体数を検討した。

また、ハンセン病流行地域であるインドネシア国東ジャワ州 Puteran 島の住民 297 人より鼻腔洗浄液を採取し、その 5 μ l を各

FTA カードに添加後、LAMP 法と PCR 法による検出率を検討した。

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

GM-M0 にリコンビナント BCG を感染させた際の GM-M0 の抗原提示能を CD4 陽性 T 細胞の活性化を指標に検索すると、BCG-pMV に比し BCG-SM を用いた場合有意に強い T 細胞の活性化 (IFN- γ の産生) が観察された。同様に M-M0 を用いても、BCG-SM より大量の IFN- γ が CD4 陽性 T 細胞から産生された。そこで、リコンビナント BCG を M-M0 に感染させた場合、分泌された MMP-II がマクロファージ表面に発現され得るか検討したところ、BCG-SM 感染により強く MMP-II が発現された。これまでに我々は、らい菌をモデル病原性抗酸菌として用い、マクロファージが T 細胞を活性化し得るか検討したところ、GM-M0 にらい菌が感染した場合のみ有意な T 細胞活性化が認められ、BCG とは明らかに異なる結果が得られた。そこで、M-M0 をリコンビナント BCG を用いて刺激した際に GM-CSF が産生されるか検討した。その結果、BCG-SM を用いた場合明らかに大量の GM-CSF がマクロファージから産生された。従って、BCG-SM が M-M0 に感染すると GM-CSF を産生し、その結果として M-M0 の抗原提示能を増強している可能性が示唆された。さらに、BCG-SM は MMP-II を分泌する作用を有しているため、リコンビナント MMP-II の GM-CSF 産生能を検討したところ、MMP-II はマクロファージを刺激して GM-CSF を産生することが明らかになった。そこで、GM-CSF

中和活性を有する抗体存在下で BCG-SM を M-M0 に感染させ、その CD4 陽性 T 細胞活性化能を検索したところ、GM-CSF 中和抗体存在下では M-M0 の CD4 陽性 T 細胞活性化能は明らかに抑制された。

さらに、これまでに末梢単球に GM-CSF が作用すると、らい菌で刺激しても IL-10 の産生がほぼ完璧に抑制されることを明らかにしてきた。そこで、末梢単球にリコンビナント BCG を作用させた後、M-CSF を添加してマクロファージを分化誘導し、さらにらい菌で刺激したところ、BCG 添加単球から得たマクロファージからの IL-10 産生量は、加えた BCG の量に依存して低下し、同時に BCG-pMV に比し BCG-SM を用いた場合により強く IL-10 の産生は抑制された。さらに、末梢単球に BCG-SM を作用させる際に GM-CSF に対する中和抗体を添加しておくこと、らい菌刺激による IL-10 の産生が可逆的に回復した。従って、BCG-SM が単球に作用すると、その後に病原体が作用しても IL-10 を産生することなく T 細胞を活性化し得る可能性が示唆された。

抗酸菌体を用いた検討では FTA カード Classic および Elute 共に、LAMP 法では、50 菌体、PCR 法では、5 菌体と同様の菌体検出感度を示した。2 週間室温放置した同カードを用いた検討でも同様の結果が得られた。臨床検体を用いた検討では、FTA カード Classic では、PCR 法による陽性数は、13 検体、LAMP 法では、12 検体であった。また、両法共に陽性数は、10 検体であり一致率 66.7%であった。FTA カード Elute では、PCR 法による陽性数は、15 検体、LAMP 法による陽性数は 13 検体であり、また、LAMP 法陽性の検体は、PCR 法により全て陽性を示した。つまり、Elute は、Classic より安定した結果を与える可能性は示唆された。鼻腔洗浄液は粘重で、サンプル中の菌体を均一に攪拌することは困難である。そのため、disk を直接反応に供する FTA カード Classic では、disk 間に菌体数のばらつきが生じ、LAMP 法陽性、PCR 法陰性の結果が得られたと考えられる。しかし、Elute カードでは、disk 上の菌体より抽出された

核酸は、溶液中へ溶出されるため LAMP 陽性サンプルは全て PCR 法で陽性を示したと考えられた。

D. 考察

一般に結核菌等抗酸菌は強い免疫原性を示し、宿主 T 細胞を強く活性化作用を有している。結核菌と同様に牛型結核菌の弱毒化株である BCG も強く T 細胞を活性化作用する。さらに、BCG は樹状細胞に作用すると IL-12 を産生し、抗酸菌の生体外排除に必要な IFN- γ 産生性タイプ 1 T 細胞の活性化を助ける。しかし、BCG は樹状細胞を介してもヒトナイーブ CD8 陽性 T 細胞を活性化作用する能力は弱く、そのために慢性期または潜伏感染した結核菌を殺戮するためのキラー CD8 陽性 T 細胞を効率的に産生する能力に欠けているとされてきた。昨年までに当研究班で開発した MMP-II 分泌型リコンビナント BCG (BCG-SM) は、親 BCG に比し CD4 陽性 T 細胞をより強く活性化作用するばかりか、細胞内で分泌された MMP-II を有効利用し cross-priming 作用により CD8 陽性 T 細胞をも活性化作用する能力を有していた。従って、BCG-SM が樹状細胞に取り込まれた場合は、T 細胞をより効率的に誘導するものと考えられた。

しかし、BCG が生体内でより親和性を有する細胞はマクロファージであり、マクロファージに取り込まれた場合マクロファージが T 細胞を活性化しない限り BCG はマクロファージ内に長い間宿り、IL-10 などの免疫抑制性サイトカインを分泌し、宿主の生体防御反応に負に働く可能性が考えられる。本年度はそのため BCG-SM とマクロファージの抗原提示能に関して検討を加えたが、GM-M0 においても M-M0 においても BCG-SM は CD4 陽性 T 細胞を強く活性化作用することが可能で、これまで考察されてきた BCG の負の要素を払拭し得る可能性が示唆された。BCG-SM がこうした強い抗原提示能をマクロファージに付与する免疫学的要因として GM-CSF の産生誘導が考えられた。BCG-SM がマクロファージに取り込まれると GM-CSF を産生し、より T 細胞を活性化しやすい細

胞へと形質転換しているものと想定された。また、GM-CSF はマクロファージからの IL-10 の産生を抑制作用を有することをこれまでに示してきたが、BCG-SM が単球に作用すると、親 BCG に比しより効率的に IL-10 の産生を抑制でき、病原性抗酸菌の生体外排除を容易にし得るものと推定された。

一般に臨床検体は採取後、その分解や雑菌の増殖等を考慮し、低温状態で移送される。しかし、開発途上国において、検体の検査は、採取地遂行ではなく、長距離の移送後、設備の整った場所において行うことが多い。そのため長時間の低温維持は、コストや設備の面で難があり、その信頼性にも疑問が生じる。今回、用いた FTA カードは、表面の特殊な化学処理により菌体を分解後、その核酸をろ紙に結合させ安定した状態に保ち、室温での移送を可能にする。このカードと新規遺伝子検出法である LAMP 法を組み合わせることにより、開発途上国において、より広範地域においてサンプル採取が行え、信頼性の高い診断に応用が可能と考えられた。

E. 結論

病原性抗酸菌の主要抗原の一つ MMP-II を分泌するリコンビナント BCG は、マクロファージを刺激し、GM-CSF を産生することによって自己の CD4 陽性 T 細胞を活性化し、さらに IL-10 の産生を抑制した。本リコンビナント BCG は、樹状細胞のみならずマクロファージに作用しても有効に T 細胞を活性化した。新しいワクチンとして期待される。

特殊ろ紙による検体保存法と LAMP 法による遺伝子検出法の組み合わせは、開発途上国に応用可能な、迅速・簡易診断法になり得ると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyamoto, Y., T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. Identification and

- characterization of the genes involved in glycosylation pathways of mycobacterial glycopeptidolipids biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 188:86-95, 2006.
- 2) Mukai, T., Y. Miyamoto, T. Yamazaki, and M. Makino. Identification of *Mycobacterium* species by comparative analysis of the *dnaA* gene. *FEMS Microbiol. Lettr.*, 254:232-239, 2006.
 - 3) Makino, M., Y. Maeda, T. Mukai, and S. H. E. Kaufmann. Impaired maturation and function of dendritic cells by mycobacteria through IL-1 β . *Eur. J. Immunol.*, 36:1443-1452, 2006.
 - 4) Suzuki, K., N. Nakata, P. D. Bang, N. Ishii, and M. Makino. High-level expression of pseudogenes in *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol. Lettr.*, 259:208-214, 2006.
 - 5) Makino, M., Y. Maeda, and K. Inagaki. Immunostimulatory activity of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG that secretes Major Membrane Protein II of *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immunity*, 74:6264-6271, 2006.
 - 6) Suzuki, K., F. Takeshita, N. Nakata, N. Ishii, and M. Makino. Localization of COR01A in the macrophages containing *Mycobacterium leprae*. *Acta Histochemica et Cytochemica*, in press, 2007.
 - 7) Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and T. Mukai. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. *Microbes and Infection*, in press, 2007.
 - 8) 牧野正彦. 生体防御機構. 牧野正直・長尾栄治・畑野研太郎編, 総説現代ハンセン病医学, 東海大学出版会, in press, 2007.
 2. 学会発表
 - 1) LipoK activates *Mycobacterium leprae* infected macrophages and dendritic cells. Maeda, Y., M. Kai, and M. Makino. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 18-23 June, 2006, Kyoto, Japan.
 - 2) Development of rapid and simple diagnostic tool for leprosy. Mukai, T., M. Macdonald, C. Ranjit, B. R. Sapkota, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 41st Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kagoshima, Japan, July 19-21, 2006.
 - 3) Immunostimulatory activity of recombinant *M. bovis* BCG expressing the dominant antigen of *Mycobacterium leprae*. Makino, M., Y. Maeda, K. Inagaki, and T. Mukai. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 41st Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kagoshima, Japan, July 19-21, 2006.
 - 4) Clofazimine-induced cell death in macrophages. Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 41st Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kagoshima, Japan, July 19-21, 2006.
 - 5) クロファジミンによるマクロファージの形態変化と細胞死. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第79回日本細菌学会総会 2006年3月 金沢
 - 6) *Mycobacterium avium* 由来 2 型 Glycopeptidolipid の生合成解析. 宮本友司, 向井 徹, 前田百美, 甲斐雅規, 中田 登, 中 崇, 矢野郁也, 牧野正彦. 第79回日本細菌学会総会

- 2006年3月 金沢
- 7) らい菌由来 MMP-II 抗原を分泌する rBCG の作製とその T 細胞活性化能の解析. 前田百美, 稲垣勝也, 牧野正彦. 第 79 回日本細菌学会総会 2006 年 3 月 金沢
- 8) GM-CSF によるらい菌感染マクロファージの抗原提示能の増強. 牧野正彦, 前田百美, 福富康夫, 向井 徹. 第 79 回日本細菌学会総会 2006 年 3 月 金沢
- 9) *Mycobacterium smegmatis* を用いたらい菌遺伝子変異と薬剤感受性に関する解析. 中田 登, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 牧野正彦. 第 79 回日本細菌学会総会 2006 年 3 月 金沢
- 10) クロファジミンによるマクロファージの細胞死と核の形態変化. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第 79 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2006 年 5 月 高松
- 11) リアルタイム PCR 法を利用した耐性変異の多剤同時検出. 甲斐雅規, Nguyen Phuc Nhu Ha, 松岡正典, 牧野正彦. 第 79 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2006 年 5 月 高松
- 12) *Mycobacterium smegmatis* を用いたらい菌 *folP* 遺伝子変異とダブソン感受性に関する解析. 中田 登, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 牧野正彦. 第 79 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2006 年 5 月 高松
- 13) 高免疫原性分子の同定と予防法への応用. 牧野正彦. (シンポジウム; ハンセン病の診断と予防: 最近の進歩) 第 79 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2006 年 5 月 高松
- 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18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）

結核菌体ペプチドによる Th1 生成と結核ワクチン開発への応用研究

分担研究報告書

分担研究者

高津 聖志

（東京大学医科学研究所・免疫調節分野教授）

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

結核菌体ペプチドによる Th1 生成と結核ワクチン開発への応用研究

分担研究者 高津 聖志（東京大学医科学研究所・免疫調整分野・教授）
研究協力者 田村 敏生（国立感染症研究所・病原微生物部・第四室長）
刈米 アイ（東京大学医科学研究所・免疫調整分野・助手）

研究要旨.

本研究は、Th1 免疫応答を惹起しアジュバント活性を示す結核菌由来タンパク質 Ag85B および Peptide-25 とその修飾分子を用い、抗結核免疫を増強する有効な手法を開発することを目的としている。本年度は、（1）Peptide-25 による選択的な Th1 誘導における T-bet の役割を解析し、TCR 刺激による Th1 誘導に T-bet 依存性の経路と非依存性の経路が存在することを初めて見出した。（2）Peptide-25 が共免疫抗原にアジュバント活性を示すか、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の生成を指標に検討した。その結果、Peptide-25 は共免疫抗原のクロスプレゼンテーションと CTL 生成を増強することを初めて明らかにした。

A. 研究目的

Th1 細胞（以下 Th1 と略す）は IFN- γ や TNF- β を産生し抗結核免疫のエフェクター細胞（マクロファージ）を活性化する。Th1 を有効に活性化できる結核菌体成分を探索しそのエフェクター機構を明らかにできれば、抗結核免疫を増強するワクチン開発に資するところが多く、期待される成果も大きい。

本研究は、結核菌由来タンパク質とそのペプチドで、Th1 免疫応答とアジュバント活性を示すものを探索し、抗結核免疫の強化に資するか検討するシステムを確立すること、Th1 誘導の分子機構を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

結核菌の分泌する Ag85B とその C-末端ペプチドである Peptide-25 を I-A^b とともに認識する TCR α -鎖、 β -鎖 (P25 TCR) を発現するトランスジェニックマウス (P25 TCR-Tg) を用いて、そのナイーブ CD4⁺ T 細胞を試験管内で Peptide-25 やその変異ペプチド (APL) で刺激し、IFN- γ や IL-4 産生

を検討した。Peptide-25 のアジュバント活性は、C57BL/6 マウスを卵白アルブミン (OVA) で免疫する際に Peptide-25 を共存させ、OVA 特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の生成に及ぼす効果により判定した。抗原提示細胞 (APC) によるクロスプレゼンテーションは卵白アルブミン (OVA) パルスした APC と CFSE を取り込んだ OVA 特異的 MHC クラス I 拘束性 CD8⁺ OT-I 細胞を共培養し、OT-I の CFSE の輝度を FACS で解析し、評価した。

倫理面への配慮 該当せず

C. 研究結果

(1) Peptide-25 を OVA と共免疫すると OVA 特異的な CTL 生成を増強する。その機構を明らかにするため、OVA を APC に取り込ませる際に P25 TCR Th 細胞と Peptide-25 を 24 時間共培養した。培養後 OVA パルス APC を精製し CFSE 標識 OT-I 細胞を共培養したところ、OT-I 細胞の増殖促進や Granzyme B の発現増強が見られた。この効果は OVA 特異的であり、IFN- γ 欠損 P25 TCR CD4⁺ T 細胞では見られなかった。また、P25 TCR CD4⁺

T細胞とAPCとのCD40/CD40Lを介する相互作用が必須であった。

(2) P25 TCR CD4⁺ T細胞はヒト型結核菌H37Rv感染させたマウスマクロファージと共培養すると増殖し、IFN- γ を産生した。この培養系でAg85Bを欠失したH37Rvを感染させたマクロファージはT細胞を刺激しなかった。P25 TCR CD4⁺ T細胞はAg85Bを特異的に認識することが分かった。

(3) T-bet^{-/-} P25 TCR ナイーブ CD4⁺ T細胞を、抗IL-12抗体と抗IFN- γ 抗体の共存下に、Peptide-25とI-A^b-CHO細胞で刺激しても、IFN- γ 産生細胞が出現した。また、T-bet^{-/-} P25 TCR CD4⁺ T細胞を、Peptide-25とI-A^b-CHO細胞により刺激しても、GATA-3の発現が減弱した。T-bet^{-/-} P25 TCR CD4⁺ T細胞がPeptide-25依存性にTh1分化する際の転写因子に関し、DNAマイクロアレイ法を用いて検索している。

D. 考察

(1) P25 TCR ナイーブ CD4⁺ T細胞は、サイトカインや副刺激のない条件下で、Peptide-25刺激によるTCRを介する直接刺激で、T-bet依存性およびT-bet非依存性にTh1に分化できる。T-bet以外の転写因子がTh1分化に関与するか、またT-betと協調的にTh1を惹起するか、1) シグナル伝達系、2) DNAマイクロアレイ法を用いて解析することにより、ナイーブCD4⁺ T細胞のTh1への分化の決定に関与する、新規制御系を明らかにできると期待している。

(2) APCによるクロスプレゼンテーションの分子機構はほとんど分かっていない。APCがPeptide-25刺激されたP25 TCR CD4⁺ T細胞と直接相互作用することにより、そのOVAクロスプレゼンテーション能が亢進することから、この培養系を利用することにより樹状細胞(DC)がクロスプレゼンテーションする際の調整因子やTLRリガンドによるDC活性化とクロスプレゼンテーションを明らかに出来るかもしれない。

E. 結論

(1) P25 TCR ナイーブ CD4⁺ T細胞はTCR

からの直接刺激により、T-betの発現上昇とGATA-3の発現抑制を誘導し、選択的にTh1へと分化する。Th1への分化にはT-bet依存性と非依存性の経路が存在する。

(2) Ag85BやPeptide-25は、交叉性のない他の抗原と共免疫すると、その抗原に対するTh1応答やCTLの生成を促進する。この効果の一部は、活性化されたP25 TCR CD4⁺ T細胞とAPCのPeptide-25を介する直接接触により媒介され、APCの抗原クロスプレゼンテーション能が増強される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kikuchi, T., S. Uehara, H. Ariga, T. Tokunaga, A. Kariyone, T. Tamura, and K. Takatsu. Augmented induction of CD8⁺ cytotoxic T-cell response and antitumour resistance by T helper type 1-inducing peptide. *Immunology*, 117:47-58, 2006.

2. 学会発表

- 1) Ag85B of *M. tuberculosis* and its peptide elicit effective cytotoxic T cell response and antitumor resistance through activation of robust Th1 immunity. Tamura, T., T. Kikuchi, H. Ariga, T. Tokunaga, A. Kariyone, and K. Takatsu. The 8th FIMSA/IIS Advanced Training Course of Immunology, 1-4 March, 2006, New Delhi, India.
- 2) Role of T-cell receptor signal and T-bet in the induction of Th1 differentiation and cross-priming of antigen. Takatsu, K., H. Ariga, Y. Shimohakamada, M. Nakada, T. Tokunaga, T. Kikuchi, A. Kariyone, and T. Tamura. The RCAI-JSI International Symposium on Immunology, 21-24 June, 2006, Yokohama, Japan.
- 3) Ag85Bとそのペプチドによる免疫制御: Th1誘導とクロスプライミング増

強. 高津聖志. 第 34 回 BCG・BRM 療法研究会 2006 年 7 月 東京

- 4) Delayed induction of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) -specific Th2 immune response in the lung of Mtb-infected TCR-transgenic mice. Yahagi, A., M. Umemura, T. Tamura, D. M Begum, S. Hamada, A. Kariyone, K. Takatsu, and G. Matsuzaki. 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 2006 年 12 月 大阪
- 5) TLR7 リガンドと Th1 エピトープ (Peptide-25) を用いた経皮ペプチド免疫による腫瘍特異的 CTL の誘導. 細井

亮宏, 五字 弘, 竹田やよい, 前川隆司, 高津聖志, 垣見和宏. 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 2006 年 12 月 大阪

- 6) Ag85B 由来 Peptide-25 によるクロスプライミング増強効果の解析. 刈米アイ, 田村敏生, 高津聖志. 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 2006 年 12 月 大阪

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

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
阿戸 学 小林和夫	結核の免疫	露口泉夫	結核・非結核抗 酸菌症. 新しい 診断と治療 のABC.	最新医 学社	大阪	2006	55-63
牧野正彦	生体防御機構	牧野正直・長 尾栄治・畑野 研太郎編	総説現代ハン セン病医学	東海大 学出版 会		2007	in press