

図1 結核は飛沫核(空気)感染である

は封じ込めが未完成であり、軽度な感染防御力の低下(過労、ストレスなど)で菌が再増殖するためと理解される。感染2年以後発病率は低下し、明らかな感染防御力の低下(糖尿病、腎不全、免疫抑制剤の投与、高齢)がある場合に限り発病する。結核の感染と発病の概略を図2に示した。

肺結核の診断

臨床医が結核を診断するプロセスを表1に呈示した。現在結核の8割は有症状で医療機関を受診

表1 肺結核診断のプロセス

- 1) 2週間以上続く典型的な症状
- 2) 発病リスク要因の存在
- 3) 典型的な画像所見の存在
- 4) 排菌患者との接触歴
- 5) ツベルクリン反応, QFT2G, 抗酸菌抗体
- 6) 慢性炎症を示唆する血液検査
- 7) 抗酸菌検査(喀痰, 胃液, 気管支鏡検体)
- 8) 類上皮細胞肉芽腫の検出

し発見され、検診発見の結核は全体の1割に過ぎない。肺結核の典型的な症状は、2週間以上続く咳・痰・発熱である。熱は37°C台であることが多いが、38~39°C台のことも稀ではない。他に血痰・咯血・胸痛・労作時呼吸困難・寝汗・全身倦怠感・体重減少などが代表的な症状である。

結核の基礎疾患として最も重要なのが糖尿病であり、当院結核入院患者の15%以上を占めるまでになった。他に慢性肝炎、悪性腫瘍、腎透析、塵肺、ステロイドや免疫抑制剤の投与などがある。70歳以上の高齢者であることも発病の重要な要因である。また、2年以内にガフキー陽性患者と接触があった場合、特に結核を疑う必要があることは先述した基礎知識からも明らかであろう。

典型的な症状があり、特に上述した要因をもつ場合、肺結核を強く疑い胸部X線写真を撮る。

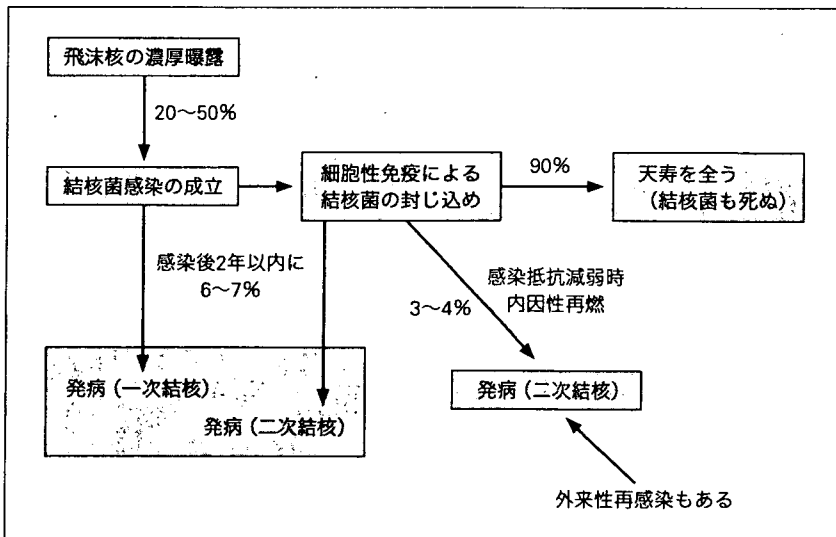


図2 結核の感染と発病

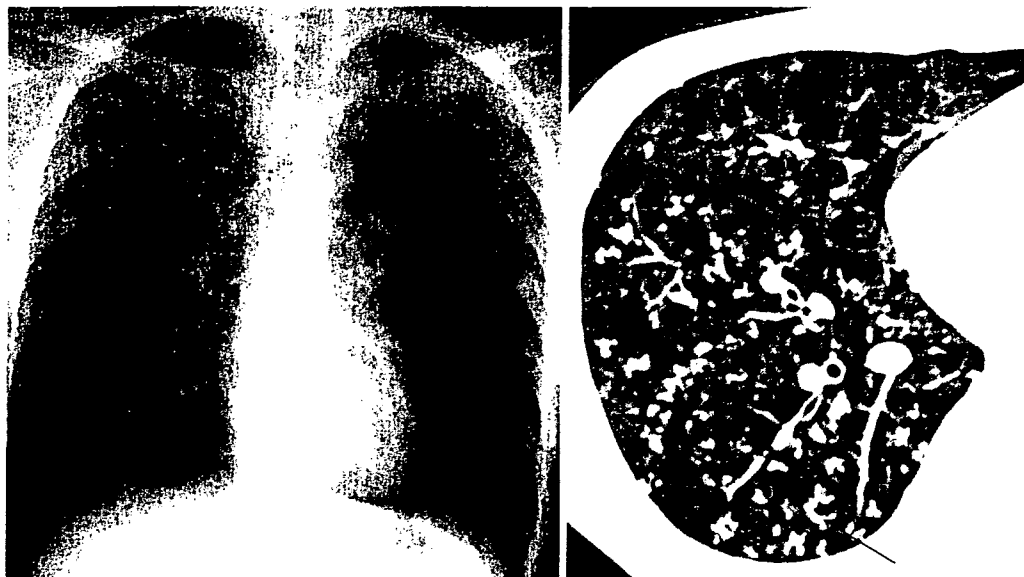


図3 22歳男性，肺結核．全肺野に木の芽様所見が多発している．

肺結核の典型像は，肺尖から上肺野の境界が比較的明瞭な多発性結節影で時に空洞を伴うというものである．近年 HRCT が普及し，呼吸器疾患の鑑別診断に威力を発揮している．結核も例外ではなく，活動性結核に特徴的な所見として木の芽様所見 (tree in bud appearance) と小葉中心性粒状影が Im, Itoh らにより報告され，臨床の現場で多用されている (図3)<sup>3,4)</sup>．

次に喀痰検査をする．臨床検体から結核菌が培養されることが結核診断のゴールドスタンダードであることは現在も全く変わっていない．喀痰が出ない場合，まず胃液を採取し，ついで気管支鏡検査を考慮する．各種検体の抗酸菌塗抹陽性は必ずしも結核菌の検出を意味しない．非結核性抗酸菌の検出が急増しているためであることは言うまでもない．核酸増幅法で結核菌の核酸が検出されることは結核の有力な証拠であるが，偽陽性が数%存在することを認識し<sup>5)</sup>，臨床背景や画像診断も併せた総合的判断をしなければならない．

気管支鏡などによる生検で類上皮細胞肉芽腫が検出された場合も結核の可能性が高いが，非結核性抗酸菌症，サルコイドーシス，クリプトコッカスなどの可能性も否定できない．組織の培養を必ず提出し，結核の確定診断と薬剤感受性の確認

に努めなければならない．組織の塗抹と核酸増幅法のみ提出する臨床医が増加しているが，基本を忘れた態度と言わざるを得ない．

ツベルクリン反応陽性は，結核発病の前提となる感染を示すものとして，診断の際にもしばしば用いられている．しかし，本邦では広範に BCG を接種してきたため，健康人の8割以上が陽性である．健康な大学生でも，強反応者が2割以上存在するとの報告もあり，結核の診断にはあまり役立たない．逆に結核確定例の約8%がツベルクリン反応陰性であったとの報告もある<sup>6)</sup>．粟粒結核などの重症結核，また HIV 合併結核に代表される免疫低下状態の結核の際に，しばしばツベルクリン反応が陰性化することも常識であろう．

最近，QuantiFERON TB-2G (QFT2G) 検査が発売された．これは末梢血リンパ球を結核菌にはあるが BCG にはない2種類の抗原で刺激し，分泌されるインターフェロン $\gamma$ 量を測定することで，BCG の影響を受けずに結核菌感染の有無を正確に判定する方法である．一度の採血ですみ，痕跡が残らず，以前の検査の影響を受けないなどの利点もあり，ツベルクリン反応に代わる検査法としてその有用性が続々と報告されている<sup>7,8)</sup>．現時点では健康保険が適応されていないうえに，

表2 肺結核診断の遅れの原因

- 1) 慢性の咳嗽や喀痰があるのに X 線写真や喀痰検査をしない
- 2) 肺に陰影があるも肺炎と考えてしまう
- 3) 肺に陰影があるも以前の写真と直接比較をせずに陳旧性病巣と判断してしまう
- 4) 喀痰検査を実施するが、よい喀痰が提出されていない
- 5) 気管支結核を喘息と間違える

検査できる施設が限られているため普及していない。早急な保健適応が望まれる。

結核菌の脂質成分に対する抗体を検討する検査法が保健適応となり普及している。ツベルクリン

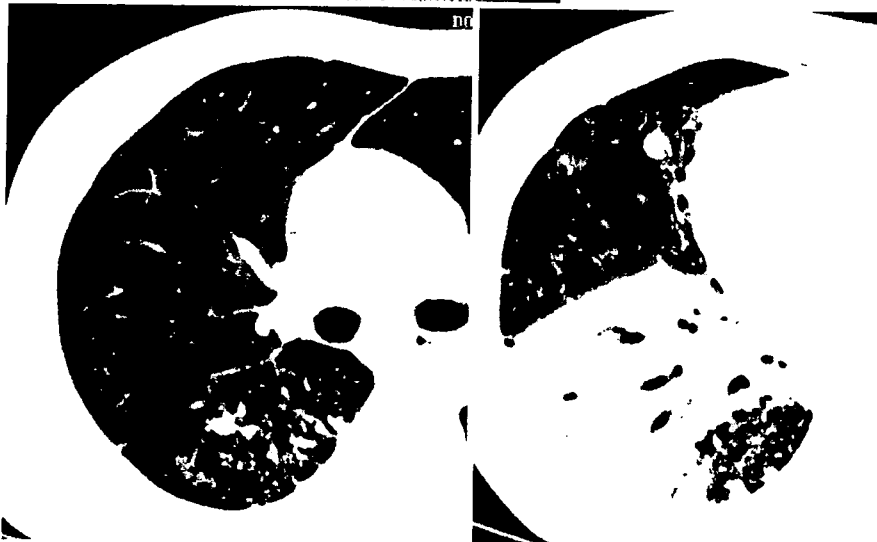


図4 47歳女性  
39°Cの発熱、WBC 13,500、  
CRP 7.0、肺炎の治療で改善せず。

反応や QFT2G と異なり発病しないと陽性にならないし、BCG の影響を受けないため結核診断の補助的有用性はある。しかし、感度が低いため偽陰性が多く、一方、治療終了後も長期間陽性が続くなど、診断に絶対的意味を持つわけではない<sup>9,10)</sup>。また、非結核性抗酸菌症でも同様の反応をするため両者の鑑別には全く役立たない。

先述したように、臨床検体から結核菌が培養されると結核の確定診断となる。また、結核菌の核酸増幅法陽性や結核に合致する組織像が得られた場合も有力な証拠となる。一方、気管支鏡などを実施しても結核の証拠が得られないこともある。CT 像や臨床経過から結核が強く疑われるが証拠が得られない場合、補助的検査も含めて総合的に判断し治療に踏み切る。2~3カ月の治療で画像所見の改善が得られた場合、肺結核の最終診断とする。

#### 肺結核の診断の遅れ

当院で紹介されてくる症例をとおして考えられる肺結核診断の遅れの原因を表2に示した。

2週間以上咳・痰が続くが X 線写真を撮らず、上気道炎の治療を漫然と1~2カ月継続する例がある。X 線写真には明らかな陰影があり、慌てて紹介されてくることも多い。症状が慢性で1~2週間の治療で改善が思わしくない場合、X 線写

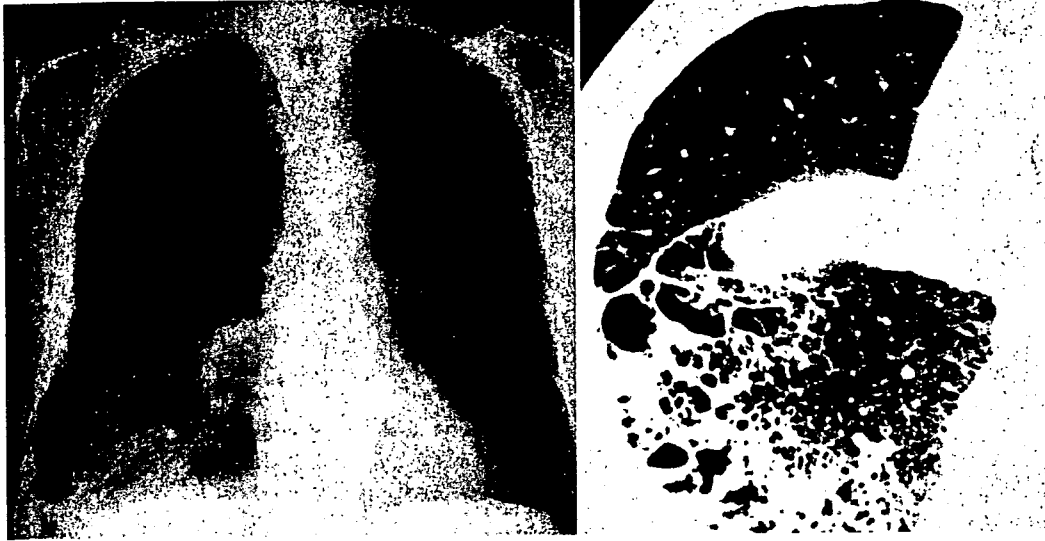


図5 68歳男性。前医で肺炎の治療するも陰影改善しないため転院となる。前医の喀痰3回すべてガフキー0号、PCR-TB(-)、WBC 12,500、CRP 10.5、39°Cの発熱あり。

真をとるか専門医に紹介しなければならない。

X線写真で異常陰影を認識するも肺炎と診断し、改善傾向が明らかでないにもかかわらずエンピリック治療を継続する例がある。比較的若年者で症状や炎症所見が強い例に多い。図4に47歳女性症例のX線写真とCTを提示する。39°C以上の発熱と咳・痰があり、白血球数13,500・CRP 7.0であった。市中肺炎としてエンピリック治療したが、症状などの改善が思わしくない。ガフキーは陰性であった。最終的に気管支鏡検査で肉芽腫と結核菌を検出し診断された。CTでは右下葉の容量減少を伴うコンソリデーションが目立つが、やや上のスライスに木の芽様所見が明らかである。容量減少を伴うコンソリデーション(特に上葉)は結核で時々認められる所見である。

図5は68歳男性、喫煙者のX線写真とCTである。肺気腫を背景として右下葉に広範なコンソリデーションを認める。結節影や木の芽様所見は明らかではない。数回肺炎での入院歴があり、いつもどおりエンピリック治療をしたが全く改善しないため紹介となった。白血球12,500、CRP 10.5、39°C以上の発熱と強い咳が2週間以上続いていた。前医で喀痰検査を3回実施し塗抹・核酸増幅法ともに陰性と紹介状に記載されている。肺

気腫に合併した肺炎として、カルバペネム系とマクロライド系抗生剤の併用療法を開始したが72時間後も発熱・咳ともに全く改善しないため、再度喀痰検査を実施しガフキー6号を検出した。肺気腫が背景にあると結核に特徴的なCT所見が出にくいことが知られている。もう一つ重要な点は、喀痰の質が悪いと中等症以上の症例でも、ガフキーや核酸増幅法が陰性になりうるということである。膿性の部分が多い喀痰を提出するように指導し、できるだけ喀痰の品質評価をする体制を構築しておく。

図6に28歳女性、気管支喘息と誤診された気管支結核例の画像所見を提示した。X線写真でも左下葉の広範な陰影は明らかであるが、胸部X線写真に習熟していない場合、陰影を見逃す危険性が皆無ではない。本例は咳、喘鳴があり、当初気管支炎として一般抗菌薬を、その後気管支喘息としてステロイドの投与を受けている。症状が改善しないため別の病院に入院となり、ガフキー2号を検出。当院転院後気管支鏡で左下葉に気管支結核の合併が確認された。気管支結核の大部分は肺結核に合併するため画像で見逃されることは少ないが、時に気管支結核単独例があり診断に難渋することがある。症状的に喘息と間違われ

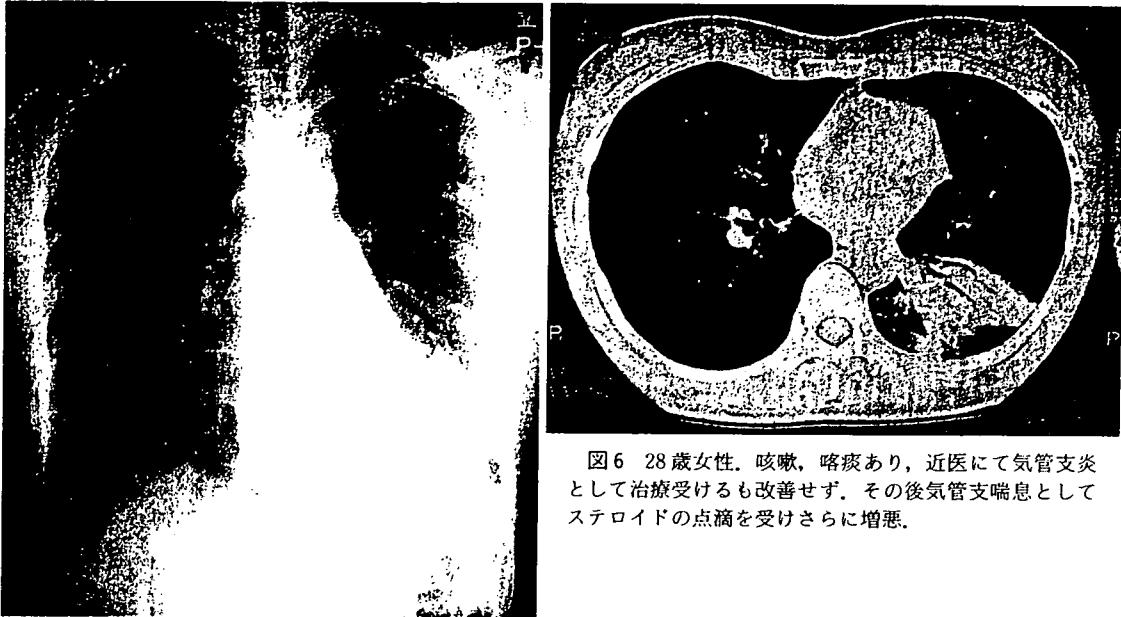


図6 28歳女性。咳嗽、喀痰あり、近医にて気管支炎として治療受けるも改善せず。その後気管支喘息としてステロイドの点滴を受けさらに増悪。



図7 48歳男性、検診発見(a. 42歳時, b. 48歳時) 精査するも診断できず。以後検診のたびに異常を言われていた。6年後陰影が急速に悪化。

る危険性があるうえ、排菌量が一般的に多く院内感染対策上問題になる疾患である。逆にいうと喀痰検査をしておけば見逃されにくいともいえる。

肺結核を疑いX線写真を撮影し異常陰影を認識するが、安直に陳旧性病巣と判断してしまう例も散見する。高齢者には現在でも陳旧性病巣がしばしば認められるが、現在50歳未満の推定結核感染率は10%未満であり、まして治療歴のない

陳旧性病巣はほとんど存在しないと考えたほうがよい。「前から古い傷跡を指摘されている」との患者の申告を鵜呑みにしてはならない。

図7に特に基礎疾患のない48歳男性の画像経過を提示した。42歳時検診で異常影を指摘され精査したが診断つかず経過観察となった。以後毎年X線写真を撮るも、陳旧性病巣として経過観察になっていた。6年後の検診で初めて陰影の急

速な悪化を認め紹介された。精査入院直後にガフキー4号、後に結核菌が培養され確定診断となる。陳旧性病巣と判断するためには少なくとも1年以上前のX線写真と比較して全く変化がないことか、HRCTで活動性結核を示唆する所見がないことを確認する必要がある。確認された場合でも、治療歴のない例では完全に活動性結核が否定された訳ではないので、慎重に経過観察しなければならない。

#### おわりに

肺結核の見落としをなくすためには、結核の感染と発病の基礎知識と診断の基本プロセスを理解することがまず必要である。ついでしばしば認められるピットフォールを実感することが大切である。しかし、結核罹患率はますます低下し、結核を「体で覚える」機会は減る一方である。忘れたころにガフキー陽性結核がやってくる事態となりかねない。そのため万が一に備えた結核の院内感染対策を普段から実施しておく必要がある。紙数の都合で院内感染対策には言及しなかったので、拙著を含めた文献<sup>11-13)</sup>を参照し実行していただきたい。

#### 文 献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症科監修：結核の統計 2004。財団法人結核予防会，東京，2004
- 2) 鈴木克洋：結核の感染と発病。結核(泉 孝英，網谷良一編)，医学書院，東京，pp37-41，1998
- 3) Im JG, Itoh H, Shim YS, et al: Pulmonary tuberculosis: CT findings, early active disease and sequential change with antituberculous therapy. Radiology 186: 653-660, 1993
- 4) 審良正則：結核の診断法，胸部X線分類とCT画像。化学療法の領域 17S-1: 65-69, 2001
- 5) 鈴木克洋，網谷良一：呼吸器感染症の遺伝子診断とその意義。特集 高齢者の呼吸器感染症：診断と治療の進歩。日内会誌 87: 236-242, 1998
- 6) 倉澤卓也，久世文幸，鈴木克洋，他：各種呼吸器疾患患者のツベルクリン反応—第1編 結核患者のツベルクリン反応。日胸 49: 567-572, 1990
- 7) Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, et al: Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. Am J Respir Crit Care Med 170: 59-64, 2004
- 8) 原田登之，森 亨，穴戸真司，他：集団感染事例における新しい結核感染診断法 QuantiFERON TB-2G の有効性の検討。結核 79: 637-643, 2004
- 9) 豊田丈夫，大角光彦，青柳昭男，他：抗結核菌糖脂質抗原(抗 TBGL 抗原)抗体による結核の血清診断。結核 71: 655-661, 1996
- 10) 螺良英郎，山中正彰，坂谷光則，他：抗酸菌抗体検出法の臨床的有用性に関する共同研究。結核 72: 611-615, 1997
- 11) 鈴木克洋：病院感染対策の進歩—結核菌。日本臨牀 60: 2172-2176, 2002
- 12) CDC: Guidelines for preventing the transmission of Mycobacterium tuberculosis in health-care facilities. MMWR 43: 1-132, 1994
- 13) Davis YM, McCray E, Simone PM: Hospital infection control practice for tuberculosis. Clin Chest Med 18: 19-33, 1997

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

## 標準微生物学 第9版

監修 山西弘一  
編集 平松啓一・中込 治

●B5 頁696 2005年  
定価7,350円(本体7,000円+税5%)  
[ISBN4-260-10453-5]

病原微生物の基本的事項を詳細に解説する点は初版以来の精神を継承しつつ、「微生物の基礎知識」が「感染症学」という臨床にどう展開されるかを理解できるように配慮した。目次を再編し、各章の内容バランスを是正。疫学に関する章を新設するなど、関連分野とのつながりも深め、最近の医学教育の変革に対応する構成とした。

## ○診療の秘訣○

### ツベルクリン反応の解釈

鈴木 克洋 近畿中央胸部疾患センター  
臨床研究センター感染症研究部長

ツベルクリン反応（ツ反）は結核菌抗原に対する皮膚の遅延型アレルギー反応から、結核菌特異的な細胞性免疫の有無を判定する検査である。液体培地中に分泌された100種類以上のタンパクの精製物（PPD）を皮内に接種し、48時間後の発赤・硬結の大きさを判定する方法が一般的に使用されている。発赤10mm未満が陰性、10mm以上が陽性であることは医療関係者の常識であろう。また硬結をともなう陽性を中等度陽性、水泡・壊死・二重発赤のどれかをともなう陽性を強陽性、何もない陽性を弱陽性と呼んでいる。ところでツ反陽性は何を意味しているのだろうか。先述したように、結核菌に対する細胞性免疫の存在、そして間接的に結核菌に感染している事実を示しているはずである。

結核菌とヒトとの関係には、感染と発病の2段階が存在する。結核菌の濃厚暴露を受けたヒトの20～50%で非特異的な防御起序を突破してマクロファージ内で結核菌が増殖し、感染が成立する。その後結核菌特異的な細胞性免疫の成立により、結核菌は肉芽腫内に封じ込められて増殖を停止する。感染者の90%はそのまま生涯発病せずに死ぬ。10%の感染者ではその後封じ込めが何らかの理由で破綻し、結核菌が再増殖して病気としての結核となる（発病）。ツ反陽性は発病の前提となる感染の存在を示すとして結核の診断に用いられ、また感染・未発病者を見極めるために多用されてきた。

しかしBCG接種を広範に実施してきたわが国では、ツ反陽性は決して結核感染を意味していない。各年代の結核罹患率の推移から推定した2000年の

結核感染率はたかだか20歳で1.3%、30歳で3.1%である。ところが滋賀大学や東北大学で学生に行ったツ反では約80%が陽性と報告されている。陽性者の大部分がBCGのために陽性になっていることは言うまでもない。PPD中にBCGと結核菌の共通抗原が多数含まれているためである。

そこで強陽性と発赤径30mm以上を併せて強反応とし、真に結核感染を示すものとする判断基準が提唱された。結核の接触者検診で、化学予防の対象となる感染・未発病者を選ぶ際しばしば使用されているが、この基準が正しいという証拠はない。

近年遺伝子工学的手法により結核菌にはあるがBCGにはない抗原が複数開発された。それらの抗原でリンパ球を刺激し分泌されるインターフェロンガンマ量から、BCG接種に影響されずに結核菌特異的な細胞性免疫の有無を判定する検査法（QFT-2G）が市販され、その有用性に関する報告がなされている。ツ反陽性率83%（強陽性率26%）の健常な看護学生のQFT-2G陽性率は2%であり、はるかに推定値に近い。一方排菌陽性の結核確定例のツ反陽性率92%に対して、QFT-2G陽性率は89%とほぼ遜色ない数字となっている。その他集団感染事例や病院職員の院内感染対策に応用され、ツ反よりも有用性が高いことが判明しつつある。同時にわが国ではツ反から結核感染の有無を判定することがほとんど不可能に近いこともはっきりしてきた。今後QFT-2Gが広く用いられることで、結核を取り巻く誤解の一部が晴らされることを期待したい。

## バクテック MGIT 960による薬剤感受性検査 における接種菌量の検討と検査の再現性

<sup>1</sup>富田 元久   <sup>1</sup>竹野 華   <sup>1</sup>鈴木 克洋   <sup>1</sup>坂谷 光則  
<sup>2</sup>木下 幸保   <sup>3</sup>小林 郁夫

**要旨：**〔目的〕結核菌の迅速薬剤感受性検査であるミジットシリーズでは分離用 MGIT が陽性になってから、1～2日後はそのまま、3～5日後は5倍希釈液を接種菌液とすることになっており、菌量が安定せず、薬剤感受性検査の結果が変動する危険性が考えられた。今回われわれは、分離用 MGIT 陽性チューブから調製した接種菌液を用いて、主要5薬剤 (INH, RFP, SM, EB, PZA) の感受性結果を比較した。〔対象・方法〕当院で結核の治療中に依頼された19例の検体を用いた。分離用 MGIT が陽性を示した後1日目、3日目、5日目の菌液での再現性とミジットシリーズと従来法との比較を行った。〔結果・考察〕分離用 MGIT が陽性を示した後1日目、3日目、5日目のチューブから調製した接種菌液の平均菌量 (CFU/ml) はそれぞれ  $3.6 \times 10^6$ ,  $1.6 \times 10^6$ ,  $3.1 \times 10^6$  であった。3接種菌でミジットシリーズの結果は完全に一致した。さらに主要5薬剤についてミジットシリーズと従来法の全体の一致率は90%以上であった。これらの結果は、バクテック MGIT 960 システムは薬剤耐性結核の迅速診断に有用であることを示している。

**キーワード：**結核菌, バクテック MGIT 960, ミジットシリーズ, 薬剤感受性検査, 再現性

### はじめに

1993年に米国の疾病対策予防センター (CDC) は、結核菌検査に携わる施設に対して薬剤感受性検査結果を15日～30日以内に臨床医に報告するように勧告した<sup>1)</sup>。わが国では2000年の結核菌検査指針改訂で、世界で広く用いられている卵培地による比率法を採用したが<sup>2)</sup>、この方法では判定までに最長4週間を費やすため、迅速性において CDC の勧告を満足するものではない。結核菌検査指針を改訂した時点では、液体培地を用いる感受性検査法として MGIT (日本ベクトン・ディッキンソン) 培地によるマニュアル法 (目視判定) が発売されていたが、あまり普及していなかった。2000年以降は分離用 MGIT へ添加するサプリメントに界面活性剤 (ステアリン酸ポリオキシエチレン) を加えたことで、分離用 MGIT から別途菌液の調整をせずに薬剤感受性検査に移行できるようになった<sup>3)</sup>。さらに2002年には、結果判定

が自動化されたバクテック MGIT 960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ (以下ミジットシリーズ) が発売された。ミジットシリーズでは、ストレプトマイシン (以下 SM), イソニアジド (以下 INH), リファンピシン (以下 RFP), エタンプトール (以下 EB) の4薬剤 (以下 SIRE) とピラジナミド (以下 PZA) を加えた計5薬剤の検査が可能であり、今後 CDC の勧告を満足する薬剤感受性検査としてわが国でも普及していくものと思われる。

ミジットシリーズによる薬剤感受性検査の有用性について、保存菌株を用いた成績はすでに多数報告されているが<sup>4)~11)</sup>、臨床検体から直接分離した菌液を用いての検討報告は少ない。また、ミジットシリーズの取扱説明書では分離用 MGIT が陽性を示してから1～2日後はそのままの培養液を、3～5日後では培養液を滅菌生理食塩水で5倍希釈したものを接種菌液として薬剤感受性検査に用いることとされている。しかしこの方法では菌量

<sup>1</sup>独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター, <sup>2</sup>独立行政法人国立病院機構大阪南医療センター, <sup>3</sup>日本ベクトン・ディッキンソン株式会社福島ラボラトリー

連絡先: 富田元久, 独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター研究検査科, 〒591-8555 大阪府堺市長曾根町1180 (E-mail: mhtomita@kch.hosp.go.jp)

(Received 7 Jul. 2004 / Accepted 4 Oct. 2004)



が一定せず、ひいては薬剤感受性結果に影響を与える恐れがあると考えられた。今回われわれは上記諸点を解明すべく次の項目について基礎的検討を試みたので報告する。①分離用 MGIT が陽性を示してから、1日後、3日後、5日後のチューブから調製した接種菌液の菌数とそれらを用いたミジットシリーズでの薬剤感受性検査の一致率、②ミジットシリーズの薬剤感受性結果と小川培地による比率法、極東結核菌感受性ピットスペクトル-SR、極東結核菌感受性 PZA 液体培地、ピラジナミダーゼ試験の結果の比較。

### 対象と方法

#### (1) 試験検体

今回の基礎検討には薬剤耐性菌が必要なことから、当院で薬剤感受性検査が既に終了し入院治療中の患者19例(うち薬剤耐性結核8例)の喀痰を用いた。また感受性検査の標準株として結核菌 H37Rv (ATCC 27294)、結核菌 INH 高度耐性株 (ATCC 35822)、結核菌 SM 高度耐性株 (ATCC 35820)、結核菌 EB 高度耐性株 (ATCC 35837) を用いた。

#### (2) ミジットシリーズによる検査

喀痰を CCE 液 (日本 BCG サプライ) で雑菌処理し、一定量を3本の分離用 MGIT チューブに接種し、バクテック MGIT 960 で培養した。陽性となった分離用 MGIT について塗抹検査で抗酸菌の確認を行った。雑菌混入の除外は滅菌綿棒を用いてチョコレート寒天培地に培養液の一部を塗布することで実施した。非結核性抗酸菌の混入は PNB 培地 (極東製薬) 上にコロニーの形成がないことで除外した<sup>12)13)</sup>。結核菌の同定はキャピリア TB (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いて行い<sup>14)15)</sup>、菌数の定量はミドルブルック 7H10 寒天培地を用いて菌数 (CFU) の定量を行った。ミジットシリーズの取扱説明書に従い分離用 MGIT が陽性を示した後1日目はそのまま、3日目と5日目の培養液は滅菌生理食塩水で5倍に希釈し接種菌液とし、0.5 ml を薬剤含有 MGIT 培地に、さらに100倍希釈した接種菌液0.5 ml を Growth Control 培地に接種した。ミジットシリーズの判定はバクテック

MGIT 960 で行った。

#### (3) 他の方法による検査

陽性になった分離用 MGIT の培養液をマイコプロス (極東製薬) に接種し、マックファーランド 0.5 に達するまで培養した菌液を用い、極東結核菌用感受性一濃度培地 (以下、小川比率法)、極東結核菌感受性ピットスペクトル-SR 培地 (以下ピットスペクトル)、極東結核菌感受性 PZA 液体培地 (以下、極東 PZA) による薬剤感受性検査を実施した。ピラジナミダーゼ試験は、分離用 MGIT 陽性の菌液を小川培地で純培養し、発育したコロニーを用い、Wayne により記述された方法<sup>16)</sup>に従って実施した。薬剤感受性検査に用いた各培地の薬剤濃度は Table 1 に示すとおりである。

#### (4) 結果の統計解析

平均値の差の検定は Student の t 検定を用い、 $p < 0.05$  を有意と考えた。

## 結 果

#### (1) ミジットシリーズの菌液調整についての検討

19例の患者検体の培養で3本の分離培地のすべてが陽性であったのは17例であり、2例は分離培地3本のうち1本が陰性であった。分離用 MGIT 陽性後1日目、3日目、5日目の培養液から調製した菌液を接種した17例中3接種菌液のいずれでも判定可能であったのが15例、3種のうちいずれかの Growth Control 培地の発育がみられず判定不能となったのが2例であった。これら4例のうち3例は MDR-TB であった。今回の比較には3接種菌液いずれでも判定できた15例を用いた。

Table 2 に示すように1日後の菌量は  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 、3日後 (5倍希釈) では  $8 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 、5日後 (5倍希釈) では  $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$  の範囲であった。それらの平均菌量はそれぞれ  $3.6 \times 10^6$ 、 $1.5 \times 10^6$ 、 $3.1 \times 10^6$  であり、3接種菌の菌量に有意の差は認められなかった ( $p > 0.1$ )。次にミジットシリーズに接種してから判定までに要した日数を比較した (Table 3)。ミジットシリーズ SIRE (SM, INH, RFP, EB 薬剤感受性) で1日後の菌液を用いた場合、その中央値は6日、3日後の菌液で

Table 1 Drug concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) used for susceptibility testing

Drug	BACTEC MGIT 960 AST	Proportion method <sup>a</sup>	Modified <sup>b</sup> proportion method	Kyokuto PZA test
Isoniazid	0.1	0.2, 1.0	0.2, 1.0	
Rifampin	1.0	40	40	
Streptomycin	1.0	10	10	
Ethambutol	5.0	2.5	2.5	
Pyrazinamide	100			100

<sup>a</sup> Proportion method on Ogawa egg slant.

<sup>b</sup> Modified proportion method using a 48-well microplate.

**Table 2** BACTEC MGIT 960 AST set inoculum from positive MGIT culture (n=15)

Positive MGIT day	No. of CFU/ml			
	Median	Minimum	Maximum	Mean
1	$3 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^7$	$3.6 \times 10^6$
3	$1 \times 10^6$	$8 \times 10^4$	$5 \times 10^6$	$1.6 \times 10^6$
5	$1 \times 10^6$	$2 \times 10^5$	$2 \times 10^7$	$3.1 \times 10^6$

Specimens were processed with CCE pretreatment solution (Japan BCG Supply, Tokyo). Each of the treated samples was incubated into 3 MGIT tubes, and they were incubated at 37°C. Cultures on day 3 and 5 post positivity were diluted 1 : 5 with saline.

**Table 3** Days required for BACTEC MGIT 960 AST results (n=15)

Positive MGIT day	SIRE test		PZA test	
	Median (range)	Mean	Median (range)	Mean
1	6 (4-6)	5.5	6 (4-8)	6.4
3	7 (6-8)	6.6	8 (5-12)	7.9
5	6 (6-8)	6.4	7 (4-13)	7.6

**Table 4** Comparison of the results with BACTEC MGIT 960 AST with those of other methods

Drug	MGIT vs Proportion method <sup>a</sup>				MGIT vs Modified proportion method <sup>b</sup>				
	MGIT Prop.	S	R	Concordance rate (%)	MGIT Mod.	S	R	R	Concordance rate (%)
INH		11	4	100		11	0	4	100
RFP		13	2	100		13	0	2	100
SM		11	4	100		11	1	3	93.3
EB		12	3	100		12	0	3	100

Drug	MGIT vs Pzase <sup>c</sup>				MGIT vs Kyokuto PZA <sup>d</sup>			
	MGIT Pzase	S	R	Concordance rate (%)	MGIT Kyokuto	S	R	Concordance rate (%)
PZA		12	3	100		12	3	100

<sup>a</sup>Proportion method on Ogawa egg slant.

<sup>b</sup>Modified proportion method on Ogawa egg medium using a 48-well microplate.

<sup>c</sup>Pyrazinamidase activity was assayed according to Wayne<sup>9</sup>.

<sup>d</sup>Kyokuto PZA test medium: 4 ml modified Middlebrook 7H9 broth (pH 6.0).

は7日, 5日後では6日であった。それらの平均値は5.5日, 6.6日, 6.4日であった。ミジットシリーズ PZA (PZA 薬剤感受性) の中央値は, 同じく1日後は6日, 3日後8日, 5日後7日, 平均値は6.4日, 7.9日, 7.6日で有意差はみられなかった ( $p > 0.1$ )。15例の薬剤感受性結果は, INH感受性11例, 耐性4例, RFP感受性13例, 耐性2例, SM感受性11例, 耐性4例, EB感受性12例, 耐性3例, PZA感受性12例, 耐性3例であり, 分離用MGITで陽性後1日目, 3日目, 5日目の菌液を接種した感受性検査の結果は100%一致した。

#### (2) 他の検査法との比較

ミジットシリーズによる薬剤感受性検査と小川比率法, ビットスペクトル, 極東PZA, ピラジナミダーゼ試験の比較成績をTable 4に示した。ミジットシリーズSIREと小川培地比率法の結果は4薬剤すべて一致した。ミジットシリーズSIREとビットスペクトルの比較で,

SMについては93.3%で95%以下であったが, INH, RFPとEBの試験の一致率は100%であった。またミジットシリーズPZAは極東PZAおよびピラジナミダーゼ試験の結果と完全に一致した。なお標準株である結核菌H37Rv, 結核菌INH高度耐性株, 結核菌SM高度耐性株, 結核菌EB高度耐性株を用いた試験では, ミジットシリーズ, 小川比率法, ビットスペクトルの成績は100%一致した。

#### 考 察

固形培地を用いる結核菌の薬剤感受性検査では菌液濃度を濁度計で計測し, 接種する菌量を一定に調整して検査を行っている。一方ミジットシリーズの取扱説明書では分離用MGITが陽性になってから, 1日から2日後ではMGITの培養液をそのまま接種菌液とし, 3日から5日後ではMGITの培養液を5倍希釈して接種することに

なっている。これは MGIT 陽性チューブからこのように調製した接種する菌液濃度がほぼ  $2 \times 10^5$  CFU/ml に相当するという成績から設定されたものである。しかしこの菌液調整法では接種菌量が安定せず薬剤感受性結果が変動する危険性が考えられた。今回のわれわれの検討では、菌数は  $8 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$  と有意差はないものばらつきがみられ、菌数の中央値は1日目では  $3 \times 10^6$ 、3および5日目では  $1 \times 10^6$  であり、設定の基となった菌量よりも約10倍多い結果となった。しかし、分離培地陽性からの日数によらず主要5薬剤で薬剤感受性検査の結果がすべて一致したことは、取扱説明書どおりの方法による菌液調整で問題がないことを示している。

次にミジットシリーズの薬剤感受性結果と、従来法の結果との比較を試みた。検体数は15例と少数ではあったが、現在の標準法である小川比率法の結果とミジットシリーズ SIRE は100%一致した。また PZA の薬剤感受性結果も、現在の標準法であるピラジナミダーゼ試験および極東 PZA 培地の結果と完全に一致した。そのうえミジットシリーズ SIRE の結果判明までに要した日数の中央値は6日、PZA の結果判明までの中央値は7日と従来の小川培地を用いる方法に比べて大幅な迅速化が可能であった。以上の結果は、ミジットシリーズが迅速、簡便なうえに従来の方法の結果とよく一致する薬剤感受性検査であることを示している。今回は取扱説明書どおりの方法による菌液調整を重点に検討したため、現行の標準法との比較には例数が少なかった。今後例数を増やした追加検討が必要である。

指定期日以内に Growth Control 培地に発育がみられず判定不能になった2例は、INH, RFP, SM, EB の4薬剤耐性であり、小川培地での薬剤感受性検査でも対照培地に発育せず判定不能であった。当院で2002年8月から2004年3月までにミジットシリーズで薬剤感受性検査を実施した850例中(重複なし) Growth Control に発育せず判定不能となったのはミジットシリーズ SIRE で4例(0.4%)、PZA で7例(0.8%)のみであった。これらの結核菌の背景は長期治療中の多剤耐性菌で入院治療中に薬剤感受性検査の依頼があった例と当院に初入院した時点で治療がすでに他院で開始されていた例であった。このことから未治療の結核例で判定不能になる例はなく、薬剤感受性検査用ミジットシリーズを日常検査に使用して問題ないと考えられる。

ミジットシリーズでは分離から薬剤感受性検査まですべて液体培地で行うことから、一般細菌や非結核性抗酸菌の混入により起こる間違った薬剤感受性成績の報告を避けるためにこれまで以上に注意を払わねばならない。今回の検討では PNB 培地試験<sup>12)13)</sup>により非結核性抗酸菌混在の除外を行ったが、同培地の判定には3週間を要

するため迅速性に欠けてしまう。従来から欧米で用いている BACTEC 460TB では、NAP 試験<sup>13)17)</sup>により結核菌群と非結核性抗酸菌を迅速に鑑別しているが、MGIT 960 では今のところ NAP 試験を採用していない。今後非結核性抗酸菌の混在を迅速に確認できる方法の開発に期待したい。

また、技術的に習熟することが重要であり、定期的に精度管理を行うことが必要である。

使用直前にサプリメントや各薬剤を MGIT チューブに添加する作業が煩雑であること、小川培地と比べてコストが高い点が問題点となる<sup>18)</sup>。

いくつかの問題点はあるものの、分離用 MGIT の菌液をそのまま用いることで薬剤感受性検査に移行する時間が短縮され、結果判定が自動化されているバクテック MGIT960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズは、従来の標準法とよく一致する結果が迅速に得られ、臨床的にきわめて有用な方法である。

## 謝 辞

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社の高橋洋氏の御協力に深謝いたします。

なお本論文の趣旨は、第79回日本結核病学会総会(2004年4月21日、名古屋)で発表した。

## 文 献

- 1) Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al.: Guest Commentary. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? J Clin Microbiol. 1993; 1: 767-770.
- 2) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会: 「新結核菌検査指針」. 結核予防会, 東京, 2000.
- 3) 富田元久, 元田博子, 竹野 華, 他: バクテック 960 専用サプリメントの基礎的検討. 機器・試薬. 2002; 25: 265-267.
- 4) 鈴木克洋, 露口一成, 松本久子, 他: Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) による結核菌の迅速薬剤感受性検査. 結核. 1997; 72: 187-192.
- 5) 阿部千代治, 青野昭男, 平野和重: BACTEC MGIT 960 システムによる結核菌の迅速薬剤感受性試験: 固形培地を用いる比率法との比較. 結核. 2001; 76: 657-662.
- 6) 阿部千代治: 薬剤感受性検査. 臨床と微生物. 2001; 28: 311-321.
- 7) Bemer P, Palicova F, Rüscher-Gerdes S, et al.: Multicenter evaluation of fully automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2002; 40: 150-154.
- 8) Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, et al.: Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC

- 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, Rüschi-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- $\alpha$ -acetyl-amino- $\beta$ -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- $\alpha$ -acetyl-amino- $\beta$ -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 4-1BBL (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

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

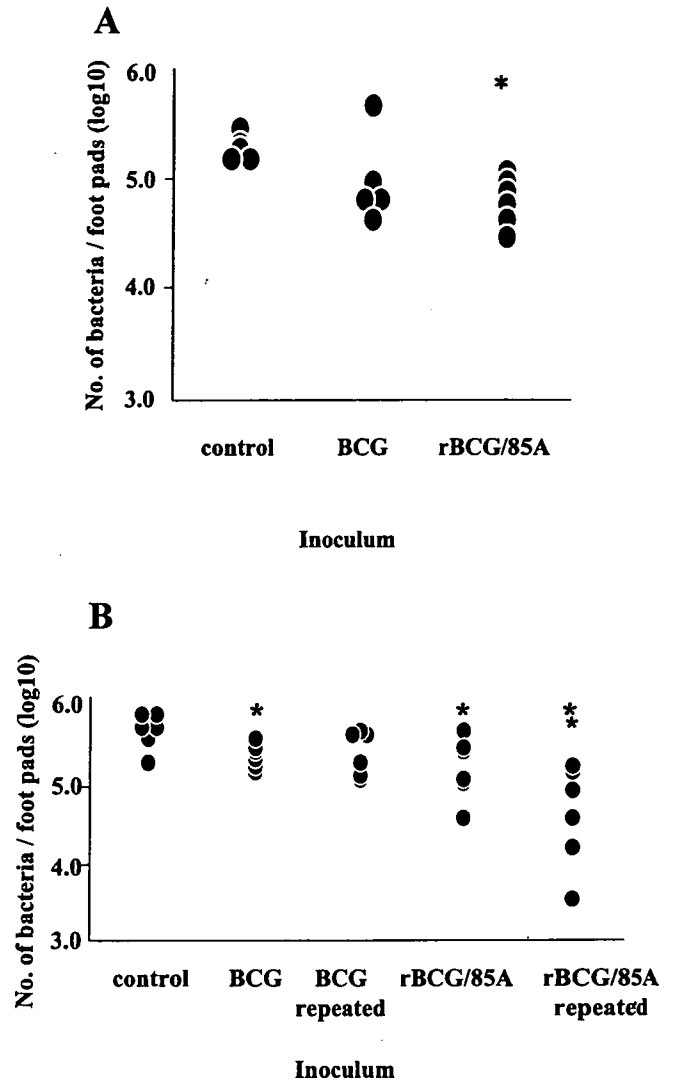


図 1. らい菌感染に対する rBCG/85A 免疫による感染防御効果。(A) 短期間における免疫効果。親株である BCG あるいは rBCG/85A を 6 週齢の C57BL/6 マウスの胸部皮内に 1 個体につき  $5.0 \times 10^7$  個接種した。1 ヵ月後、各群のマウスのフットパッドに  $5.0 \times 10^3$  個の *M. leprae* 生菌を接種し、25 週後にフットパッドから検出された抗酸菌数を測定した。rBCG/85A 接種群では対照群と比較して検出される菌数が有意に ( $P < 0.01$ ) 減少した。(B) BCG あるいは rBCG/85A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

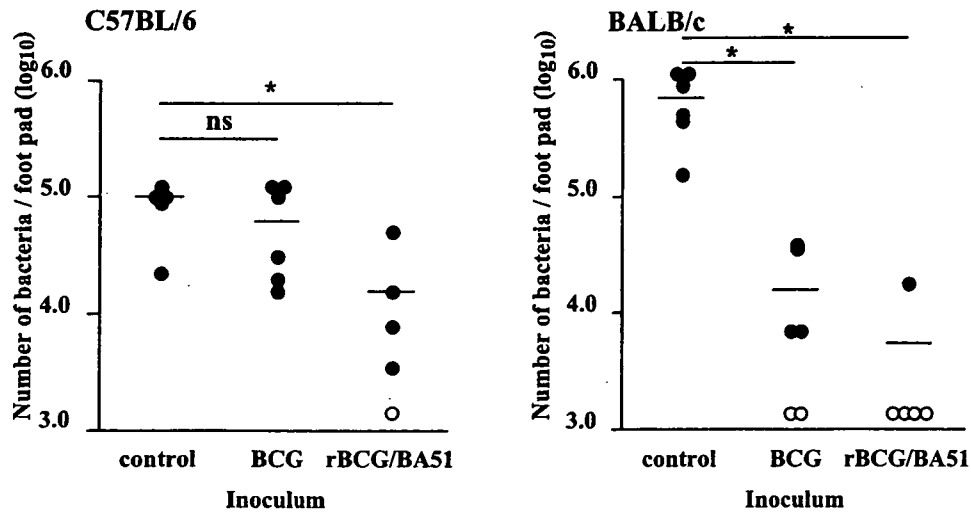


図2. らい菌感染に対する rBCG/BA51 免疫による感染防御効果。黒丸はフットパッド中の抗酸菌数を示す。白丸はフットパッド中に抗酸菌が認められなかったことを示す。文献25より引用。

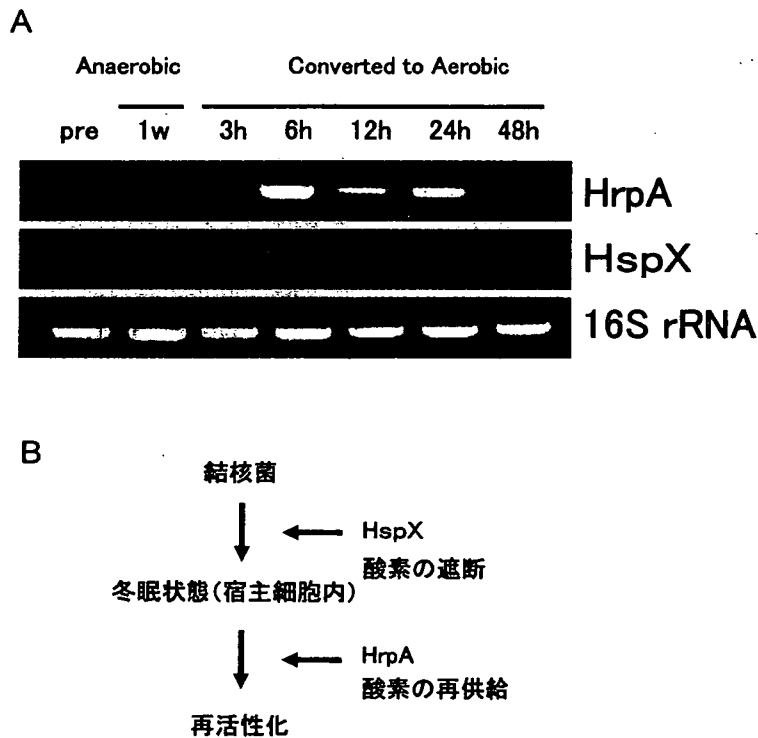


図3. 酸素分圧の変化に対する BCG 低分子ストレス蛋白質の変化。(A) BCG より RNA を抽出し、RT-PCR をおこなった。Sauton 培地で好氣的に2週間培養した BCG を嫌気ジャーの中に移動させると HspX が発現し、一週間後においてもメッセージ RNA は存在している (Anaerobic 1W)。その後好気状態に戻しても変化しない (converted to aerobic)。一方 HrpA は嫌気条件下では発現しないが、好気状態に戻ると一時的に発現する。(B) HspX と HrpA の働きについての模式図。HspX と HrpA は同じ低分子ストレス蛋白質ファミリーであるが、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っかけて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核・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し、多核の成熟破骨細胞となる。破骨細胞分化のマーカートの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, それが集積することによってできあがると考えられる。このことを

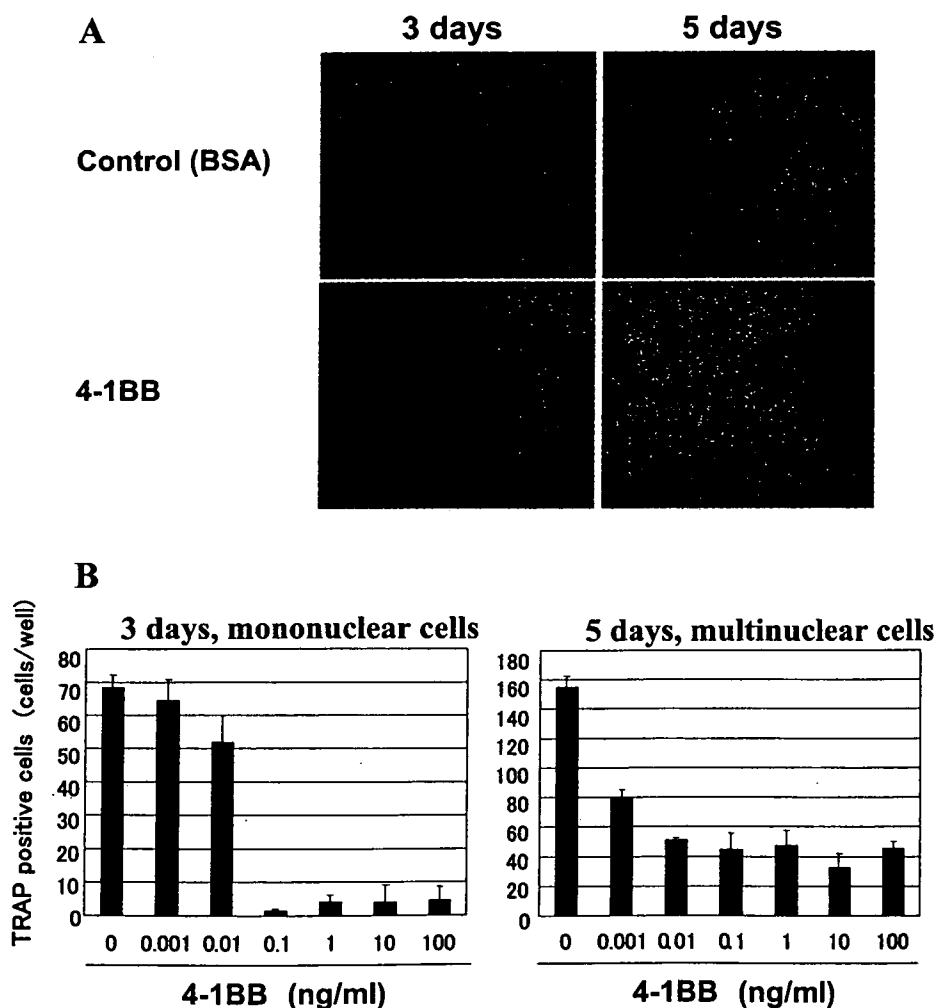


図 4. 4-1BB の破骨細胞分化に対する抑制効果。G-10 カラムを通過したマウス骨髄培養を BSA あるいは 4-1BB でコートしたプレート上で M-CSF (10 ng/ml) と RANKL (20 ng/ml) 存在下に 3 日間あるいは 5 日間培養した。(A) BSA でコートしたプレート上では 3 日目に TRAP 陽性の単核細胞が, 5 日目に TRAP 陽性の多核細胞が多数観察されるが, 4-1BB でコートしたプレート上では 3 日目における TRAP 陽性単核細胞, および 5 日目における TRAP 陽性多核細胞の形成が著しく阻害される。(B) 4-1BB による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