

200829021A

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

抗酸菌感染症の発症・診断・治療・新世代予防技術に
係わる分子機構に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牧野 正彦

(国立感染症研究所・病原微生物部部長)

平成21(2009)年3月

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

抗酸菌感染症の発症・診断・治療・新世代予防技術に
係わる分子機構に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牧野 正彦

(国立感染症研究所・病原微生物部部長)

平成21(2009)年3月

目 次

総括研究報告書：抗酸菌感染症の発症・診断・治療・新世代予防技術に係わる分子機構に関する研究 牧野 正彦（国立感染症研究所）	1
分担研究報告書：抗酸菌感染症への新たな対応戦略の基盤となる感染病態の分子機構に関する研究 河村 伊久雄（京都大学）	9
分担研究報告書：結核菌潜伏感染の分子機構と治療・予防戦略の開発 小林 和夫（国立感染症研究所）	15
分担研究報告書：新規 BCG ワクチンの開発 牧野 正彦（国立感染症研究所）	21
分担研究報告書：新規ワクチン開発のための基礎研究 —長期生存型 CD8 記憶細胞の分化誘導機序の解析— 田村 敏生（国立感染症研究所）	27
分担研究報告書：ワクチンの検定と結核を増悪させる病態の解析 菅原 勇（結核予防会結核研究所）	33
分担研究報告書：結核菌を含む抗酸菌の細胞壁の生合成に不可欠な遺伝子の検索と解析 荒川 宜親（国立感染症研究所）	37
研究成果の刊行に関する一覧表	45

平成20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）

抗酸菌感染症の発症・診断・治療・新世代予防技術に
係わる分子機構に関する研究

総括研究報告書

研究代表者

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）
総括研究報告書

抗酸菌感染症の発症・診断・治療・新世代予防技術に係わる
分子機構に関する研究

研究代表者 牧野 正彦（国立感染症研究所・病原微生物部・部長）

研究要旨.

近年感染症においては、新型インフルエンザに代表されるような新興感染症が脚光を浴び、病原性抗酸菌に代表される再興感染症は既に制圧されたかのように考えられがちであるが、結核をはじめとする抗酸菌症は未だに猛威を振るい続けている。病原性抗酸菌のコントロールは、細菌学あるいは免疫学などを主眼とした所謂一元的なアプローチでは不十分であり、抗酸菌と宿主の生命維持を賭した長くかつ複雑な凌ぎあいを理解して初めて可能となる。また近年では、抗酸菌の生体排除あるいは病変の潜伏化・持続化に係る分子機構が、少しずつ紐解きかけられており、本研究班ではそうした世界の進歩を先取りしながら病原性抗酸菌感染症の制御に貢献すべく研究課題に取り組んだ。診断技術の開発・改良においては、*Mycobacterium avium* complex (MAC)の血清診断用キットを開発し、多施設においてその有用性を検討し良好な成績が得られた。さらに、*M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* および *M. kasasii* を一回の検査で鑑別可能な遺伝子領域の同定に成功した。今後、臨床検体を用いその有用性を検討する。抗酸菌の持続潜伏感染機構の解析は極めて重要な研究分野であるが、当班においては結核菌因子と宿主因子の両面において検討を加えた。菌側の因子としては、積極的に潜伏化を誘導する正の因子として MDP-1 が重要であり、逆に、その存在が潜伏化を回避する方向で働く負の因子として *kasB* 遺伝子が重要な役割を果たすことを突き止めた。さらに宿主因子として、結核菌感染により活性化した T 細胞表面に PD-L1 抗原が発現すると、抗原提示細胞表面に常時発現している PD-L1 抗原との相互作用により T 細胞の活性化は沈静化され、結果として結核菌はマクロファージなどの細胞内に長く宿ることが判明した。病原性抗酸菌症の発症を抑制するワクチンの開発は、発症予防方策を樹立する上で必要不可欠である。抗酸菌に対する生体防御反応には、獲得免疫の活性化が必要であり、その中心をなす CD4 陽性 T 細胞は感染初期に、CD8 陽性 T 細胞は感染後期に重要な役割を果たす。昨年、CD4 陽性 T 細胞を効率的に活性化する BCG の開発に成功したため、本年度は CD8 陽性 T 細胞に焦点を絞って検討を加えた。その結果、HSP70 遺伝子を病原性抗酸菌共通主要抗原 Major Membrane Protein-II (MMP-II) をコードする遺伝子上流に連結し、BCG に組み込ませることが極めて有効であることを新たに見出した。さらに、メモリー CD8 陽性 T 細胞は一旦活性化した CD8 陽性 T 細胞から産生されるが、その際細胞障害活性を有する実効型 T 細胞にまで一旦活性化させ、その後メモリー T 細胞へと分化させることが、最も効果的メモリー T 細胞の産生に繋がると考えられる。そこで、実効型の CD8 陽性 T 細胞の産生機構に関して詳

細な分子機構の解析を行った。その結果、従来から知られる T 細胞の活性化誘導分子とは異なる分子が存在することが明らかとなった。こうした分子の同定が、より効率的な結核発症予防方策の開発に直接的に結びつくと考えられる。結核を悪化させるリスク因子の同定は臨床上極めて重要であるが、1 型糖尿病ラットを用い、糖尿病が結核の増悪高危険因子である直接的証明に成功した。

研究分担者

河村 伊久雄	(京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・准教授)
小林 和夫	(国立感染症研究所・免疫部・部長)
田村 敏生	(国立感染症研究所・病原微生物部・室長)
菅原 勇	(結核予防会結核研究所・研究主幹)
荒川 宜親	(国立感染症研究所・細菌第二部・部長)

A. 研究目的

病原性抗酸菌感染症は、20 世紀最大の恐怖を与えた細菌感染症であり、現在尚、世界の人口の約 3 分の 1 の人が結核菌を体内に保持している。抗酸菌に対する生体防御反応は、インターフェロンガンマー (IFN- γ) を産生するタイプ 1 の T 細胞を中心として営まれている一方、全ての抗酸菌は感染するとタイプ 1 T 細胞を活性化する能力を有している。つまり、抗酸菌は自らを死に至らしめるような宿主反応を誘導しつつ、感染した細菌はそのほとんどが生体内に宿る結果を勝ち取る。こうした抗酸菌の英知を理解した上で、さらには生体内の免疫反応のナチュラルヒストリーを理解した上で、包括的に抗酸菌対策を樹立することが必要不可欠となる。本年度は種々取り残されている結核を中心とした諸問題について、焦点を絞り研究を推進させた。目的の第一は、より良い診断法の開発である。抗酸菌は生体内に長く宿り、慢性的に宿主リンパ球を刺激し続けることに着目して、非結核性抗酸菌に特異的に発現する細胞壁表層分子 Glycophospholipid (GPL) に対する抗体を測定する血清診断法を樹立し、多施設においてその有用性を評価した。さらに、細胞壁の生合成経路を司る遺伝子に着目して、結核菌および各種主要非結核性抗酸菌を鑑別する遺伝子診断法を開発することを目的とした。第 2 に、抗酸菌の潜伏化に関する宿主因子の同定を目的とした。結核菌感染

後 CD4 陽性 T 細胞は一過性に活性化する。しかし、活性化されたリンパ球は、全ての抗酸菌が生体外へ排除される前に沈静化されてしまう。脱活性化は何故おこるのか、その責任因子を突き止めることを目的とした。第 3 の目的は、予防方策の開発である。BCG はその安全性が確立されたワクチンであるが、信頼に足る効力を発揮するためには改良が必要である。とりわけ、結核菌感染後期、すなわち老齢化とともに発症する結核を予防するためには CD8 陽性 T 細胞が重要な役割を果たす。この CD8 陽性 T 細胞の活性化およびメモリー T 細胞の活性化に関して 2 つのアプローチを行った。1 つは、BCG を改良して CD8 陽性 T 細胞を活性化する方策の開発であり、第 2 はメモリー T 細胞として質の高い T 細胞を作製するために必須な分子の同定である。第 4 の目的として、結核を増悪させる宿主の因子の同定である。本年度は日本人に多い糖尿病との相互作用について直接的因果関係を明らかにするため、糖尿病ラットモデルを用いて検索することを目的として掲げた。

以下に主な研究課題を挙げる。

1. 結核菌感染に伴い活性化した CD4 陽性 T 細胞の脱活性化を誘導する分子機構の解析 (河村)
2. MAC 細胞壁表層に発現する GPL を用いた血清診断用キットの確立のための多施設間評価 (小林)
3. ヒト未感作 CD8 陽性 T 細胞を強く活性

化する新規リコンビナント BCG の作製 (牧野)

4. 細胞障害活性を有する実効型 CD8 陽性 T 細胞を容易に作製するメモリー CD8 陽性 T 細胞を産生する分子機構の解明 (田村)
5. 結核菌および主要非結核性抗酸菌を鑑別診断する遺伝子領域の同定とそれを用いた鑑別診断用キットの作製 (荒川)
6. 結核病変増悪化因子としての糖尿病の果たす役割解明と病変悪化機構の解析 (菅原)

B. 研究方法

1. C57BL/6 および PD-1 欠損マウスに BCG を感染させ、その後の肺および脾臓の菌数の変化を測定した。BCG 感染し、3, 6, 12 週後の脾 CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生能および正常マウスに移入した際の結核菌 H37Rv の生体外排除能を検索した (河村)。
2. MAC 感染症の血清診断に関し、アメリカ合衆国胸部疾患学会・感染症学会の診断基準 (2007 年) に合致したヒト肺 MAC 感染症 (70 例)、無症候性 MAC 感染 (18 例)、肺結核 (36 例)、その他の疾患 (慢性閉塞性肺疾患など) および正常健常者 (76 例) 由来治療前血清を用い、MAC 特異的 GPL 核抗原に対する IgA 抗体を酵素抗体法により測定した (小林)。
3. らい菌の主要抗原 MMP-II をコードする遺伝子の近位に BCG 菌由来 HSP70 遺伝子を連結し BCG に組み込ませることで、HSP70-MMP-II 融合タンパクを分泌する新規リコンビナント BCG (BCG-70M) を作製した。BCG-70M の樹状細胞を介したヒト未感作 CD8 陽性 T 細胞の活性化能を IFN- γ の産生を指標に解析した。BCG-70M の CD8 陽性 T 細胞活性化機構を Chloroquinin, Brefeldin A, Lactacystin を用いて解析した (牧野)。
4. 結核菌分泌タンパク Ag85B の抗原性を規程するペプチド Peptide-25 (P25) と

P25 特異的 T 細胞抗原受容体 (TCR) を発現するトランスジェニックマウス (P25 TCR-Tg) および OVA 特異的 TCR を発現する TG マウス (OT-1) を用いて抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の分裂回数およびグランザイム B 産生能を指標とした CD8 陽性 T 細胞の活性化を評価した (田村)。

5. 結核菌の Rv1330 に相当する遺伝子に着目し、結核菌、*M. kansasii*、その他の非結核性抗酸菌を鑑別する PCR 法の有効性について、ATCC より分与された株を 21 種類の抗酸菌と臨床分離株を含めた 15 菌種 94 株を用いて検討した (荒川)。
6. 1 型糖尿病ラット (KDP ラット) およびワイルドタイプラットを用い、結核菌感受性を比較検討した。病理組織学的検索、Real-time 法によるサイトカイン mRNA の定量、肺および脾臓の結核菌数の算定、さらに結核菌感染 KDP ラットに対するインスリン治療の結核病変に与える効果を検討した (菅原)。

倫理面への配慮 国立感染症研究所および当該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。動物実験は、当該研究施設の動物実験委員会の承認を得た上で、実験動物倫理指針に基づいて実施した。

C. 研究結果

1. BCG 感染後 3 週の C57BL/6 マウス由来 CD4 陽性 T 細胞は、比較的良好な結核菌生体外排除能を示した。しかし、その程度は 6 および 12 週と時間の経過とともに低下した。また、C57BL/6 マウ

スに BCG を感染させると免疫抑制性に働く PD-L1 抗原が感染後 3 週で抗原提示細胞に発現し、6 週・12 週と維持された。そこで、PD-L1 のレセプターである PD-1 を欠損するマウスに BCG を接種すると、感染後 12 週を経過しても CD4 陽性 T 細胞の結核菌生体外排除能は維持されていた (河村)。

2. 血清抗 GPL 核抗体価は肺 MAC 感染症において、他の肺疾患および正常健康者に比し有意に高値を示した ($p < 0.0001$)。また、6 医療機関から得られた成績は、MC 感染症は、感度 84.3%、特異度 100% であった。肺 MAC 感染症患者の血清抗体価と胸部 CT 断層撮影 (CT) 解析による罹患部位数の間には相関関係があった (小林)。
3. BCG-70M は、MMP-II および HSP70 に対するモノクローナル抗体に反応する HSP70-MMP-II 融合タンパクを菌体外に分泌し、分泌された融合タンパクは TLR2 を介して樹状細胞を活性化し、IL-12p70 の産生を誘導した。BCG-70M は、樹状細胞を活性化すると同時に未感作 CD4 陽性 T 細胞および未感作 CD8 陽性 T 細胞を活性化し、大量の IFN- γ の産生を誘導した。樹状細胞を Chloroquinin, Brefeldin A, Lactacystin で処理すると CD8 陽性 T 細胞の活性化は阻害されたことから、BCG-70M は TAP 依存性・プロテオソーム依存性に cytosolic 経路を介したクロスプレゼンテーション機構により CD8 陽性 T 細胞を活性化することが明らかとなった (牧野)。
4. CD8 陽性 T 細胞に対しグランザイム B の発現を伴う機能的活性化を誘導するためには、未知の分子を介したタイプ 1 CD4 陽性 T 細胞と樹状細胞の相互作用による樹状細胞の活性化が必須であった。さらに、活性化した樹状細胞が CD4 陽性 T 細胞非存在下で CD8 陽性 T 細胞を活性化して細胞障害活性を付与するためには、未知の分子の樹状細胞表面への発現が重要であった (田村)。

5. PCR 用プライマーセット 2 種類を同時に利用した PCR 法を樹立したところ、結核菌群、*M. kansasii*、MAC、*M. scrofulaceum*/*M. smegmatis* およびその他の 5 種類に分類することが可能であった。本鑑別法の特異度および感度は 96% 以上であった (荒川)。
6. KDP ラットは、ワイルドタイプラットに比し結核菌に対する感受性が増大し、肉眼的には肺において灰白色の結節数が増加し、組織学的には大きな中心壊死を欠く肉芽腫が観察された。肺および脾臓から分離される結核菌数も KDP ラットは有意に上昇していた。その原因として、肺胞マクロファージの結核菌刺激による NO 産生能の低下が考えられた。さらに、結核菌感染 KDP ラットをインスリン治療すると病変および結核菌数もワイルドラットのそれと同程度にまで減少した (菅原)。

D. 考察

抗酸菌と宿主の戦いは、長い道のりを経て少しずつその全貌が明らかにされようとしている。宿主はタイプ 1 T リンパ球を活性化することで IFN- γ を産生し、CD8 陽性 T 細胞に細胞障害活性を賦与することで抗酸菌を生体外へ排除しようとする。一方、抗酸菌は自ら一旦宿主リンパ球の活性化を助長した上で、極めて賢くその活性化を終焉させ、やがては非活動性リンパ球を産生することで、自らの身を安全に休息させる場を勝ち取る。宿主のリンパ球が高齢化とともに活性化することができないと判断されれば、盛んに増殖して種の保存を図る方策を採る。近年の目覚ましい免疫学・分子生物学の発展に伴い、結核菌を生体外へ排除する際に最も有効と考えられる T リンパ球が同定された。それは、IFN- γ ばかりでなく TNF α ・IL-2 などのサイトカインを同時に産生し得る多機能型のリンパ球である。こうした多機能型リンパ球を効率的に産生する分子免疫学的機構を解析することが重要である。BCG の持つ潜在的な能力に外来性因子を加えることで、多機能型リンパ球

の産生を追求する方策は理にかなったことと考えられる。本年度は、こうした過程の中で HSP70 と抗酸菌主要抗原を融合させたタンパクを分泌する BCG が作製し評価した。当初の目的とした未感作 CD8 陽性の強い活性化が得られた。今後の予防方策および免疫療法の開発に大きな知見を与えるものと期待される。さらに、より効率的なメモリー T 細胞を産生するためには、CD4 陽性 T 細胞と樹状細胞が未同定の分子を介して相互作用することで、樹状細胞表面に CD8 陽性 T 細胞を細胞障害活性を有する実効細胞にまで分化誘導し得る分子が発現することを見出した。このことは、今後の研究を推進する上で極めて重要な研究成果となった。また、一旦活性化した T 細胞がどのような機序により脱活性化されるか、その分子機構が明らかになった。抗酸菌の潜伏化あるいは免疫療法を考える際のターゲット分子となり得る可能性を秘めており、重要な研究成果と考える。非結核性抗酸菌の血清診断および遺伝子診断用キットの確立も現実的となりつつあり、世界に向けて大きな発信ができるものと期待される。

E. 結論

非結核性抗酸菌症の血清診断キットの確立および主要病原性抗酸菌の遺伝子診断の開発に一定の成果が得られた。ヒト未感作 CD8 陽性 T 細胞を強力に活性化する新規リコンビナント BCG の作製、実効型 CD8 陽性 T 細胞を効率的に産生するメモリー CD8 陽性 T 細胞の産生に関する分子機構の解析、結核菌の潜伏化をもたらす宿主リンパ球の脱活性化機構が明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hara, H., K. Tsuchiya, T. Nomura, I. Kawamura, S. Shoma, and M. Mitsuyama. Dependency of caspase-1 activation induced in macrophages by *Listeria*

monocytogenes on cytolysin, listeriolysin O, after evasion from phagosome into the cytoplasm. *J. Immunol.* 180:7859-7868, 2008.

- 2) Kitada, S., K. Kobayashi, S. Ichiyama, S. Takakura, M. Sakatani, K. Suzuki, T. Takashima, T. Nagai, I. Sakurabayashi, M. Ito, and R. Maekura. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium*-complex pulmonary disease using an enzyme immunoassay kit. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177:793-797, 2008.
- 3) Nakata, N., N. Fujiwara, T. Naka, I. Yano, K. Kobayashi, and S. Maeda. Identification and characterization of two novel methyltransferase genes that determine the serotype 12-specific structure on glycopeptidolipids of *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.* 190:1064-1071, 2008.
- 4) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, Y. Miyamoto, and M. Makino. CD4⁺ T cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 53:96-106, 2008.
- 5) Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P. J. Brennan, K. Kobayashi, M. Makino, S. Matsumoto, H. Ogura, and S. Maeda. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.*, 190:3613-3621, 2008.
- 6) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. *Mycobacterium avium* complex *gtfTB* gene encodes a glucosyltransferase required for the biosynthesis of serovar 8-specific

- glycopeptidolipid. *J. Bacteriol.*, 190:7918-7924, 2008.
- 7) Makino, M., Y. Maeda, M. Kai, T. Tamura, and T. Mukai. GM-CSF mediated T cell activation by macrophages infected with recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, in press, 2009.
 - 8) Sugawara, I., S. Mizuno. Higher susceptibility of type 1 diabetic rats to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tohoku J. Exp. Med.*, 216: 363-370, 2008.
 - 9) Murase, Y., S. Mitarai, I. Sugawara, Kato, S. Maeda. Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Microbiol.*, 57:873-880, 2008.
 - 10) Hibiya, K., Y. Kazumi, I. Sugawara, J. Fujita. Histological classification of systemic *Mycobacterium avium* complex infections in slaughtered domestic pigs. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 31:347-366, 2008.
 - 11) Sugawara, I., L. Sun, S. Mizuno, T. Taniyama. Protective efficacy of recombinant BCG Tokyo (Ag85A) in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) infected intratracheally with H37Rv *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, in press, 2009.
 - 12) Piao, Z., K. Shibayama, S. Mori, J. Wachino, and Y. Arakawa. A novel insertion sequence, IS1642, of *Mycobacterium avium*, which forms long direct repeats of variable length. *FEMS Microbiol. Lett.*, in press, 2009.
2. 学会発表
- 1) RD1 region in mycobacterial genome is involved in the induction of necrosis in infected macrophages via mitochondrial membrane damage and ATP depletion. Kawamura, I., T. Kaku, R. Uchiyama, T. Kurenuma, and M. Mitsuyama. The 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 8-10 July, 2008, Baltimore, USA.
 - 2) Regulatory mechanism of necrosis induction in macrophages by virulent *Mycobacterium tuberculosis*. Kawamura, I., T. Kaku, R. Uchiyama, and M. Mitsuyama. XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology in IUMS 2008, 5-9 August 2008, Istanbul, Turkey.
 - 3) CD4⁺ T cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant BCG. Makino, M., T. Mukai, Y. Maeda, Y. Miyamoto, and T. Tamura. 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
 - 4) Construction of *ureC*-disrupted BCG which expressing *M. leprae* MMP II antigen. Mukai, T., Y. Miyamoto, and M. Makino. 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
 - 5) Vaccines for mycobacterial diseases. Makino, M. The fifth Taiwan-Japan symposium on International Collaboration and TB. September 11-13, 2008, Taipei, Taiwan.
 - 6) 結核菌 RD1 領域の感染マクロファージへの作用. 河村伊久雄, 角泰人, 内山良介, 暮沼武士, 光山正雄. 第78回実験結核研究会 2008年4月 東京
 - 7) 結核菌の病原性機序-細胞内寄生戦略- 河村伊久雄. 第83回日本結核病学会総会 2008年4月 東京
 - 8) 結核菌のマクロファージ内生存機構. 河村伊久雄. 第81回日本ハンセン病学

会総 2008年4月 熊本

- 9) 結核菌およびBCGの持続感染における免疫抑制受容体PD-1の役割. 酒井俊祐, 河村伊久雄, 内山良介, 光山正雄. 第19回日本生体防御学会学術集会 2008年7月 札幌
 - 10) The PD-1:PDL-1 pathway inhibits the protective immunity and contributes to the bacterial persistence in mycobacterial infection. Sakai, S., I. Kawamura, R. Uchiyama, T. Okazaki, and M. Mitsuyama. 第38回日本免疫学会総会 2008年12月 京都
 - 11) Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)による増殖と細胞壁合成の同調メカニズム. 松本壮吉、藤原永年、吉村満美子、尾関百合子、西内由紀子、小林和夫. 第83回日本結核病学会総会 2008年4月 東京
 - 12) ヒアルロン酸の結核病巣における産生と局在. 平山幸雄、吉村満美子、尾関百合子、菅原 勇、青木俊明、西内由紀子、小林和夫. 第83回日本結核病学会総会 2008年4月 東京
 - 13) 抗酸菌の薬剤感受性におけるMDP1の調節機構の解析. 仁木 誠、松本壮吉、和田崇之、小林和夫. 第83回日本結核病学会総会 2008年4月 東京
 - 14) 遺伝子破壊によるBCG菌ミコール酸のサブクラス変換. 甲斐雅規、宮本友司、向井 徹、矢野郁也、牧野正彦. 第81回日本細菌学会総会 2008年3月 京都
 - 15) 結核菌由来の新規ヌクレオチド加水分解酵素に関する研究. 森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、朴貞玉、荒川宣親. 第82回日本細菌学会総会 2009年3月 名古屋
 - 16) 結核菌由来新規ヌクレオチド加水分解酵素の機能解析. 森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、朴貞玉、荒川宣親. 日本農芸化学会2009年度大会 2009年3月 福岡
- 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20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）

抗酸菌感染症への新たな対応戦略の基盤となる感染病態の

分子機構に関する研究

分担研究報告書

研究分担者

河村 伊久雄

（京都大学・准教授）

抗酸菌感染症への新たな対応戦略の基盤となる感染病態の分子機構に関する研究

研究分担者 河村伊久雄（京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・准教授）
研究協力者 暮沼 武士（京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・大学院生）
酒井 俊祐（京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・大学院生）

研究要旨

結核菌 H37Rv をマクロファージに感染させると IL-18、IL-1 β 、IL-6 や TNF- α の産生が誘導される。しかし RD1 欠損株の感染では IL-6 や TNF- α 産生は認められるが、その産生に活性型カスパーゼ 1 による成熟化が必要な IL-18 と IL-1 β の産生が著しく低いことが示された。このメカニズムを解析した結果、RD1 はマクロファージ細胞質内からのカリウムの遊離を誘導することでカスパーゼ 1 の活性化に関与することが示された。

BCG をマウスに感染させると 3 週間後には強い防御免疫が発現するが、菌は容易には排除されない。この菌の抵抗性機序を解析した結果、BCG 感染 3 週目以降では PD-1/PD-L1 経路を介した抑制性シグナルが感染防御に関与する CD4⁺T 細胞の機能を阻害することがわかった。この反応は過剰な Th1 応答を抑制する正常な宿主応答であると思われるが、BCG はこのメカニズムを利用して、感染を維持しているものと考えられた。

A. 研究目的

結核菌の病原菌としての特徴は、健常者に感染しても多くの場合結核の症状を発症せず、そのまま長期間にわたり体内で生存し続けることにある。高齢化や HIV 感染などにより宿主免疫能が低下すると感染した菌は宿主体内で増殖を始め、その結果 2 次感染を引き起こすことで感染のサイクルを維持している。一方、結核菌が感染した宿主では、ただ菌の侵入・増殖を許しているのではなく、感染数週間後には強力な Th1 型の防御免疫が発現する。しかし、結核菌は防御免疫成立後に抗原特異的 T 細胞から大量の IFN- γ や TNF- α が産生され、マクロファージの殺菌活性が著しく亢進している環境においても容易に排除されない。その結果として人類は結核の蔓延を許し、宿主の免疫能の低下を転機として結核が発症するのである。近年、抗結核薬による治療が困難な多剤耐性結核菌の出現が報告され、その感染の拡大が懸念されているなかで、結核菌が有する宿主防御免疫に抵抗するメカ

ニズムを明らかにすることは、結核に対する新たな治療および感染防御戦略を構築し、結核を撲滅するために重要である。

最近、弱毒ワクチン株である *Mycobacterium bovis* BCG 株と結核菌のゲノム配列の比較から、BCG には存在しない RD 領域が結核菌ゲノムに 16 領域存在することが明らかとなり、これらが結核菌の病原性に重要であると考えられている。特に RD1 領域には、結核菌の分泌装置である ESX-1 の構成因子や、結核菌の主要な T 細胞抗原である ESAT-6 あるいは CFP-10 をコードする遺伝子が含まれており、結核菌の病原性や宿主防御免疫の発現に寄与する重要な領域であることが明らかにされている。そこで、本研究ではこの RD1 領域が結核菌感染後のサイトカイン産生にどのような影響を有するかを明らかにするため、結核菌 H37Rv と RD1 欠損株 H37Rv Δ RD1 のサイトカイン誘導能を比較した。その結果、両菌株で刺激した場合の IL-6 や TNF- α 産生に違いは認められなかったが、H37Rv Δ RD1

刺激後の IL-18 や IL-1 β の産生は、H37Rv に比べて著しく低下していることが示された。本研究ではこのメカニズムについてさらに解析を行った。

結核菌や BCG に対する感染防御には IFN- γ や TNF- α が重要な役割を果たしている。BCG をマウスに感染すると、抗原特異的 T 細胞の分化に伴ってこれらサイトカインの強い産生が誘導されるが、その産生は、感染 3 週目をピークとしてその後低下することが明らかになった。感染 3 週目以降でも臓器内に菌は存在していることから、この IFN- γ や TNF- α 産生の低下は、菌数の減少に伴い免疫応答が終息していく過程を示しているのではなく、BCG により抗原特異的 T 細胞のサイトカイン産生応答が抑制されたためであると考えられる。最近、免疫応答の抑制に細胞表面の抑制性補助分子の関与が示されている。そこで、BCG 感染後の各分子の発現を解析したところ、PD-L1 分子の発現が感染 3 週目以降で増加することが示され、PD-L1 とそのレセプターである PD-1 を介した抑制経路がこの IFN- γ や TNF- α 産生の低下に関与することが示された。PD-1/PD-L1 による抑制経路はウイルスや寄生虫に対する感染防御の制御にも関与することが示されている。本研究では、BCG に対する感染防御において PD-1/PD-L1 経路がその抑制に関与するか否かを明らかにする。

B. 研究方法

結核菌感染マクロファージのサイトカイン産生における病原性関連遺伝子領域 RD1 の関与 C57BL/6 または I 型インターフェロン (IFN) レセプター欠損マウスの腹腔内に 3% チオグリコロート培地を注射し、4 日後に腹腔滲出細胞 (PEC) を回収した。PEC を 24 穴組織培養用プレートで 2 時間培養後、非附着性細胞を除去してマクロファージを得た。マクロファージに結核菌 H37Rv および RD1 欠損株を感染させ、その後の各種サイトカイン (IL-6、TNF- α 、IL-18 と IL-1 β) の遺伝子発現とそれらの産生を RT-PCR および ELISA で測定した。また、カスパーゼ

1 の活性化はカスパーゼ 1 に対する抗体を用いた Western blotting により解析した。

BCG に対する感染防御の制御における PD-1/PD-L1 シグナル経路の関与 C57BL/6 および PD-1 欠損マウスに BCG を感染させ、その後の肺および脾臓における菌数の変化を測定した。また、BCG 感染 1, 3, 6, 12 週後に脾 CD4⁺T 細胞を回収し、抗原刺激後の IFN- γ および TNF- α 産生を測定した。さらに、得られた CD4⁺T 細胞を正常マウスに移入後、結核菌 H37Rv を感染させた。感染 10 日後に脾内生菌数を測定して、CD4⁺T 細胞の感染抵抗性 T 細胞としての能力を調べた。また、BCG 感染マウス脾臓中の I-A 陽性抗原提示細胞上の表面抗原を FACS により解析した。

倫理面への配慮 本研究は、マウスを用いた動物実験を含む。本研究は、京都大学動物実験委員会に承認を受けており、京都大学動物実験指針に基づいて行われた。

C. 研究結果

結核菌感染マクロファージのサイトカイン産生における RD1 の関与 マウス腹腔マクロファージに結核菌強毒株 H37Rv を感染させ、24 時間後の培養上清中のサイトカイン産生を測定した。その結果、IL-6、TNF- α 、IL-18 および IL-1 β の産生が認められた。一方、RD1 領域を欠損した H37Rv Δ RD1 の感染では IL-6 および TNF- α 産生は認められたが、IL-18 と IL-1 β 産生は認められなかった。しかし、H37Rv Δ RD1 感染後の IL-18 および IL-1 β mRNA の発現は、H37Rv 感染の場合と同程度に誘導されることが示された。従って、H37Rv Δ RD1 感染で IL-18 と IL-1 β 産生が誘導されないのは、これらサイトカインの成熟化が進まないためであると考えられた。IL-18 および IL-1 β の成熟過程には、カスパーゼ 1 が関与することが示されている。そこで、H37Rv および H37Rv Δ RD1 感染後のカスパーゼ 1 の活性化を調べた。その結果、活性型のカスパーゼ 1 は H37Rv 感染では誘導されるが、H37Rv Δ RD1 感染では誘導されることが明らかになった。さらに解析を進めた結果、カスパーゼ 1 の活性化が細胞外

塩化カリウム濃度の増加に応じて阻害され、カリウムイオンの流出を誘導するnigericin存在下にH37Rv Δ RD1を感染させると、カスパーゼ1の活性化が誘導されることが明らかとなった。また、I型IFNレセプター欠損マクロファージでもH37Rv感染によりカスパーゼ1の活性化が誘導されたことから、結核菌の感染ではI型IFN非依存的にカスパーゼ1の活性化が誘導されることがわかった。以上の結果から、RD1にはカリウムイオンを細胞外に流出させる活性があり、このためカスパーゼ1が活性化され、IL-18やIL-1 β の産生が誘導されるものと考えられた。

BCGに対する感染防御におけるPD-1/PD-L1シグナル経路の役割 C57BL/6マウスにBCGを感染させると、感染3週後にはIFN- γ およびTNF- α 産生能を有するTh1型T細胞が誘導される。また、この細胞を含むCD4⁺T細胞集団を正常マウスに移入すると、レシピエントマウスが結核菌による攻撃感染に対して強い抵抗性を示した。これらの結果は、BCG感染3週後には感染抵抗性T細胞が誘導されていることが示すものである。しかし、BCG感染後に誘導されるIFN- γ およびTNF- α 産生能を有するT細胞およびそのT細胞によって担われる防御免疫応答は、菌がまだ存在しているにも関わらず、その後の時間経過とともに低下することが示された。感染後の脾臓における制御性T細胞数に変化はなく、抑制性サイトカインであるIL-10産生は防御免疫の低下がみられる感染6週後以降では認められなかった。しかし、抗原提示細胞上の抑制性補助因子であるPD-L1の発現が感染3週目以降で増加することが示された。PD-L1はPD-1のリガンドであり、T細胞上に発現したPD-1にPD-L1が結合することにより、T細胞に抑制性シグナルがはいることが示されている。そこで、BCG感染後期に誘導されるT細胞機能の抑制へのPD-1/PD-L1経路の関与を明らかにするため、PD-1欠損マウスにBCGを感染させ、同様の解析を行った。その結果、PD-1欠損マウスでは正常マウスと異なり、Th1型T細胞由来のIFN- γ および

TNF- α 産生の持続的な産生や、菌の排除の亢進が認められた。これらの結果から、BCGに対する感染防御において、PD-1/PD-L1経路はその抑制に関与することが明らかになった。

D. 考察

結核菌をマクロファージに感染させると種々の炎症性サイトカイン産生が誘導される。これらのうちIL-18およびIL-1 β の成熟過程に必要な活性化カスパーゼ1の誘導にはRD1が必要であることが本研究から明らかとなった。RD1は細胞内カリウムの遊離を促すことでカスパーゼ1の活性化を誘導するが、その機序については今のところ明らかではない。これまでに、細胞内カリウムの遊離がNALP3/ASCにより構成されるinflammasomeを形成すること。また、このinflammasome形成にはリソソームからのカテプシンBの放出が必要であることが報告されている。さらに、細胞内カリウムの減少はASCの重合によるpyroptosomeを形成し、これがカスパーゼ1の活性化を誘導することが示されている。また、RD1領域には結核菌分泌装置ESX-1の成分およびその分泌因子(ESAT-6およびCFP-10)がコードされている。従って、ESX-1より分泌された結核菌因子が細胞内カリウムの遊離を引き起し、それがカスパーゼ1の活性化を誘導するものと考えられる。これまでの報告では、10種類以上の結核菌因子がESX-1より分泌されることが示されており、そのうちESAT-6とCFP-10には細胞質膜を傷害する活性が報告されている。今のところ、カスパーゼ1の活性化を誘導する責任因子を同定するまでには至っていないが、RD1とカスパーゼ1活性化の関係は結核に対する感染防御を制御する上で重要であり、今後その分子機序を明らかにしなければならないと考えている。

BCGに対する感染防御にはIFN- γ とTNF- α が重要な役割を果たしている。BCGをマウスに感染すると、抗原特異的T細胞の分化に伴ってIFN- γ とTNF- α の強い産生が誘導されるが、この産生は、感染3週目

をピークとしてその後低下し、このサイトカイン産生の抑制には PD-L1 とそのレセプターである PD-1 を介した抑制経路が関与することを本研究で示した。抗原提示細胞上の PD-L1 の発現は IFN- γ 刺激により増強され、T 細胞上の PD-1 の発現は T 細胞抗原レセプターからの刺激で高まることが示されている。従って、PD-1/PD-L1 シグナル経路による T 細胞機能の抑制は、持続的な炎症反応を抑えるための一種の防御反応であると考えられる。一方、BCG 感染では感染 3 週目以降でも臓器内に菌は存在していることから、この時期のサイトカイン産生の低下が逆に BCG の生存を可能にする要因となっている。また、PD-1 欠損マウスの実験から、PD-1 は、感染初期の防御反応に影響しないことがわかった。この抑制性シグナル経路を適切に制御することで、防御免疫の発現やワクチン効果を亢進させることが可能になると考えられ、さらにこの分子メカニズムの解析を進める予定である。

E. 結論

これまでに、結核菌や BCG の宿主細胞であるマクロファージの活性化を誘導することで菌の排除が亢進することが *in vitro* の実験で示されているが、実際の *in vivo* の感染では、防御免疫が誘導されてマクロファージの殺菌活性が飛躍的に高まる環境においても菌は容易に排除されない。本研究ではこの結核菌の抵抗性メカニズムを明らかにするため、菌がいかにかマクロファージ機能や免疫応答を修飾して宿主体内での生存を可能にしているのかを分子レベルで明らかにすることを目的として解析を行った。その結果、結核菌の病原性関連遺伝子領域 RD1 が細胞内カリウムの遊離を亢進し、その結果カスパーゼ 1 の活性化および IL-18 や IL-1 β の産生が誘導されることが明らかとなった。また、BCG 感染 3 週以降では PD-1/PD-L1 経路を介した抑制性シグナルが Th1 型免疫応答を抑制することが示された。この反応は過剰な Th1 応答を抑制する正常な宿主応答であると思われるが、このメカニズムは BCG が長期間に渡り生体内

での生存を可能にする要因になっていることが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawamura, I. Advances in understanding of the virulence mechanism of *Mycobacterium tuberculosis*. Jpn. J. Leprosy, 77: 219-224, 2008.
- 2) Shoma, S., K. Tsuchiya, I. Kawamura, T. Nomura, H. Hara, R. Uchiyama, S. Daim, and M. Mitsuyama. Critical involvement of pneumolysin in production of interleukin-1 α and caspase-1-dependent cytokines in infection with *Streptococcus pneumoniae* in vitro: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation. Infect. Immun., 76: 1547-1557, 2008.
- 3) Hara, H., K. Tsuchiya, T. Nomura, I. Kawamura, S. Shoma, and M. Mitsuyama. Dependency of caspase-1 activation induced in macrophages by *Listeria monocytogenes* on cytolysin, listeriolysin O, after evasion from phagosome into the cytoplasm. J. Immunol. 180: 7859-7868, 2008.

2. 学会発表

- 1) RD1 region in mycobacterial genome is involved in the induction of necrosis in infected macrophages via mitochondrial membrane damage and ATP depletion. Kawamura, I., T. Kaku, R. Uchiyama, T. Kurenuma, and M. Mitsuyama. The 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 8-10 July, 2008, Baltimore, USA.
- 2) Regulatory mechanism of necrosis induction in macrophages by virulent *Mycobacterium tuberculosis*. Kawamura, I., T. Kaku, R. Uchiyama, and M. Mitsuyama. XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology in IUMS 2008, 5-9 August 2008, Istanbul, Turkey.
- 3) 結核菌 RD1 領域の感染マクロファージへの作用. 河村伊久雄, 角泰人, 内山良介, 暮沼武士, 光山正雄. 第 78 回実験結核研究会 2008 年 4 月 東京

- 4) 結核菌の病原性機序- 細胞内寄生戦略-
河村伊久雄. 第 83 回日本結核病学会総
会 2008 年 4 月 東京
- 5) 結核菌のマクロファージ内生存機構.
河村伊久雄. 第 81 回日本ハンセン病学
会総 2008 年 4 月 熊本
- 6) 結核菌および BCG の持続感染における
免疫抑制受容体 PD-1 の役割. 酒井俊祐,
河村伊久雄, 内山良介, 光山正雄. 第 19
回日本生体防御学会学術集会
2008 年 7 月 札幌
- 7) The PD-1:PDL-1 pathway inhibits the
protective immunity and contributes to the

bacterial persistence in mycobacterial
infection. Sakai, S., I. Kawamura, R.
Uchiyama, T. Okazaki, and M. Mitsuyama.
第 38 回日本免疫学会総会 2008 年 12
月 京都

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20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）

結核菌潜伏感染の分子機構と治療・予防戦略の開発

分担研究報告書

研究分担者

小林 和夫

（国立感染症研究所・免疫部部長）

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

結核菌潜伏感染の分子機構と治療・予防戦略

研究分担者	小林 和夫	(国立感染症研究所・免疫部・部長)
研究協力者	前倉 亮治	(国立病院機構刀根山病院・副院長)
	北田 清悟	(国立病院機構刀根山病院・内科・医長)
	松本 壮吉	(大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・准教授)
	藤原 永年	(大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・講師)
	大原 直也	(国立感染症研究所・免疫部・室長)
	阿戸 学	(国立感染症研究所・免疫部・室長)
	大西 和夫	(国立感染症研究所・免疫部・主任研究官)
	高橋 宜聖	(国立感染症研究所・免疫部・主任研究官)
	岡部 真裕子	(国立感染症研究所・免疫部・研究員)

研究要旨

結核菌潜伏感染の分子機構を解明するため、増殖分裂や代謝活性の低下した休眠期結核菌の蛋白質発現に関し、低酸素環境 (1% O₂) 培養により休眠菌を誘導し、遺伝子や蛋白質発現を分裂増殖期結核菌と比較解析した。その結果、休眠菌は抗酸菌 DNA 結合蛋白質 1 (MDP1)、alpha crystalline-like protein (Acr)、heat-stress-induced ribosome binding protein A (HrpA、Acr2) や heparin binding haemagglutinin (HBHA) を遺伝子・蛋白質発現していることが判明した。

多施設共同研究により、ヒト肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症の診断における免疫学的血清診断に MAC 特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) 核抗原および抗 GPL 核血清 IgA 抗体の検出 (酵素抗体法) が有用であることが確認された (感度: 84.3%、特異度: 100%)。さらに、肺 MAC 感染症の病型 (結節-気管支拡張型、線維空洞型) では、結節-気管支拡張型が線維空洞型に比し、有意に高値であることも判明し、血清 IgA 抗体の検出は診断のみならず、病型分類にも有用であった。アメリカ合衆国胸部疾患学会の診断基準 (2007) に準拠した場合、臨床所見と複数回の喀痰培養を必要とするため、肺 MAC 感染症の確定診断には数か月を要するが、抗体検出の所要時間は約 3 時間であり、迅速、手技も簡便、かつ、多検体処理が可能である。加えて、体外診断であるため、安全性についても問題はなく、血清診断は MAC 感染症の診断に極めて有用性が高いと考えられる。

A. 研究目的

世界で約 20 億人 (日本: 2,500 万人) が結核菌に既感染、920 万人 (日本: 2,5 万人) が結核を発病、200 万人 (日本: 2,2 千人) が死亡し、現在でも、結核は甚大な健康被害を提供している (2007 年)。結核の発症機序には「感染後早期に発症する一次性結核」、「潜在性感染から発症する二次

性結核 (内因性再燃)」や「既感染宿主に再感染し発病 (外来性再感染)」があるが、成人結核のほとんどは「内因性再燃」に起因している。潜在性感機序の解明は新規抗結核薬や感染曝露後 (治療的) ワクチン開発を促進し、結核制圧に寄与することが期待される。本研究では、潜在性感染における分裂や代謝活性の低下した休眠期結核

菌の蛋白質発現を解析し、治療やワクチン標的候補の探索を目的とした。

非結核性抗酸菌感染症は結核など抗酸菌感染症の約 20% を占めるが、特に、*Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症は非結核性抗酸菌感染症の 70-80% を占め、最頻である。MAC は特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) を有し、化学的に GPL は全ての MAC に共通な GPL 核と可変的な糖鎖部分から構成される。感度や特異度を指標として、MAC 共通抗原である GPL 核抗原に対する血清 IgA 抗体の検出がヒト MAC 感染症の診断に関し、多施設共同研究から、有用性について検証した。

B. 研究方法

潜在性感染における分裂や代謝活性の低下した休眠期結核菌の蛋白質発現に関し、低酸素環境 (1% O₂) 培養により休眠菌を人工的に誘導し、遺伝子や蛋白質発現を分裂増殖期結核菌 (20% O₂) と比較解析した。また、発現遺伝子を大腸菌 BL21 株に導入し、遺伝子組み換え蛋白質を発現、精製した。なお、遺伝子操作に関し、DNA 組み換え実験指針に準拠し、機関承認を得て、実施した。

Mycobacterium avium complex (MAC) 感染症の血清診断に関し、アメリカ合衆国胸部疾患学会・感染症学会の診断基準 (2007) に合致したヒト肺 MAC 感染症 (70 例)、無症候性 MAC 感染 (18 例)、肺結核 (36 例)、その他の肺疾患 (慢性閉塞性肺疾患: 15 例、特発性間質性肺炎: 11 例、肺がん: 11 例、細菌性肺炎: 4 例、サルコイドーシス: 2 例、気管支拡張症: 2 例) および健康者 (76 例) 由来治療前血清を用い、MAC 特異的 GPL 核抗原に対する血清抗体を酵素抗体法により測定した。なお、被験対象者は全例 HIV-1 および-2 抗体陰性である。標準菌株の MAC から GPL 核抗原を分離・精製し、薄層クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーにて、化学構造を決定した。なお、患者血清採取に際し、各医療機関 (国立病院機構刀根山病院、国立病院機構近畿中央胸部疾患センター、大阪

府立病院機構大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター、自治医科大学埼玉医療センター、京都大学医学部附属病院、坂本病院) で倫理審査の承認後、インフォームドコンセントを得た。なお、診断キットは株式会社タウンズ (静岡県沼津市) が試作したものを使用した。なお、利益相反は存在しなかった。

表 1. 患者背景

	MAC PD	MAC Contamination	Pulmonary TB	Other Lung Disease	Healthy Subjects
Number	70	18	36	45	76
Age, mean yr ± SD	68.0 ± 9.6	64.6 ± 11.4	52.9 ± 16.6*	66.3 ± 10.9	38.1 ± 12.0*
Age range, yr	30-90	26-78	24-76	29-82	20-85
Sex, no. (male/female)	25/45	10/8	26/10*	34/11*	41/35*
Duration of disease, mean yr ± SD	4.8 ± 4.8	10/8	0.3 ± 0.2	2.2 ± 2.4	41/35*

* P < 0.001.

C. 研究結果

休眠期結核菌は抗酸菌 DNA 結合蛋白質 1 (MDP1)、alpha crystalline-like protein (Acr)、heat-stress-induced ribosome binding protein A (HrpA, Acr2) や heparin binding haemagglutinin (HBHA) を発現した。他方、分裂増殖期結核菌は early secreted antigen target 6-kDa (ESAT-6) や culture-filtrate protein 10 kDa (CFP-10) を発現した。これらの遺伝子をクローニングし、DNA 配列を確認後、pET22b+ に挿入しヒスチジンタグの融合蛋白質とし発現するベクターを構築した。大腸菌 BL21 株に各プラスミドを導入し、各蛋白質が発現することを確認した (図 1、2)。

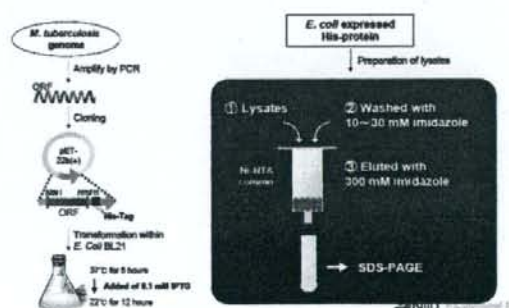


図 1. 低酸素環境における休眠結核菌蛋白質発現の精製