

*asiaticum*, *M. parafortuitum*)、MACのグループ (*M. avium* & *M. intracellulare*)、*M. scrofulaceum* のグループ (*M. scrofulaceum* & *M. smegmatis*)、*M. rhodesiae* のグループ (*M. rhodesiae*)、及び *M. malmoense* のグループ (*M. malmoense*) の6種類のグループに明確なバンドパターンに基づいて鑑別することが可能であることが示された。また、結核菌、MAC、及び *M. kansasii* といった主要な病原性抗酸菌に対して、本鑑別法の特異度・感度は全て96%以上であった(表1)。

結核菌のゲノム上に存在する機能未知遺伝子 *Rv2613c* がコードするタンパク質について、大量発現・精製・機能解析を行った。その結果、加リン酸分解活性を diadenosine polyphosphate 等のヌクレオチドに対して示すことが明らかとなった。従って、本タンパク質は結核菌由来の新規 diadenosine polyphosphate 加リン酸分解酵素であった。種々の dinucleoside polyphosphate を基質として利用し、リン酸の鎖長は4または5が最適であった。速度論的解析の結果、diadenosine tetraphosphate に対する  $K_m$  値は0.10 mMであり、リン酸に対する  $K_m$  値は0.94 mMであった。本酵素の活性発現には2価の金属イオンが必須であり、特にマンガン存在下で著しい活性を示した。至適pHは8.0、至適温度は30°Cであり、65°C10分の処理によってその活性は完全に失われた。これまでに報告されている酵母由来の diadenosine polyphosphate 加リン酸分解酵素と比較した場合、本酵素は至適pHや至適温度については類似していたものの、アミノ酸残基数が少なく、モチーフ構造が異なる等の一次構造上の特徴を有していた。さらに、本酵素は加リン酸分解反応の逆反応を触媒しない点で既知の diadenosine polyphosphate 加リン酸分解酵素とは大きく異なっていた。本酵素の立体構造を決定するため、結晶化条件のスクリーニングを行い、結晶構造解析に適した結晶が得られた(図3)。次に、作製したセレノメチオン誘導体を用いた単波長異常分散法により初期位相を求め、モデルの構築と精密化

を繰り返すことによって、本酵素の立体構造を決定した(図4)。決定した本酵素の立体構造を構造既知の diadenosine polyphosphate 関連酵素と比較した結果、構造骨格部分では相同性が示されたが、活性中心部位ではアミノ酸残基の種類が異なっていることが明らかになった。

ラット糖尿病モデルを結核菌で噴霧感染させた場合、病変の程度は、野生ラットより、顕著で、肉芽腫内に、より多くの結核菌が含まれていた。肺内結核菌数は、糖尿病ラットで有意に多く、同じ傾向は、脾でも見られた。インターフェロン $\gamma$ とTNF $\alpha$  mRNA発現も高く、炎症の程度が強いことを示唆した。糖尿病ラット由来肺胞マクロファージは、結核菌により活性化されにくく、IL-1, TNF $\alpha$ の産生も低かった。

1年間で2,141例の結核患者を調べた。1,464例がスミア培養とも陽性で、20.2%がスミア陰性培養陽性であった。男女比は、3.2対1であった。職業は、農民、サラリーマン、無職であり、平均年齢は、42.7歳であった。結核患者中203例が糖尿病患者であった。すでに糖尿病を発病しており、結核菌感染後糖尿病にかかった例はなかった。1型が7名で、2型は196名であった。治療は、レギュラーインスリンまたはSU剤で治療された。114名が、スミア培養とも陽性で、47名がスミア陰性培養陽性であった。糖尿病の血糖レベルは、200-700mg/dlであった。糖尿病の治療で血糖をコントロールしたのち、isoniazid, rifampicin, pyrazinamide, ethambutol, streptomycinで治療された。表1に示すように、糖尿病結核患者の36名が多剤耐性結核患者であった。これは、17.7%にあたり、非糖尿病結核患者の9.3%に比べて、有意に高かった。多剤耐性結核は、糖尿病コントロール不良群で多かった(32対4)。さらに詳細に調べてみると、標準化学療法を受けた167名の糖尿病結核患者のうち、退院後2年以内に20名が再発した。グルコースが結核菌増殖促進作用があるか否かを調べるために、患者血清を100倍に希釈し、それに結核菌H37Rvを加えて、1週間培養した後、1%小

川培地で4週間培養し、出てきたコロニー数を比べた。ある場合には、グルコースを加えて、グルコース添加の影響を調べた。1型、2型糖尿病患者とも、結核菌数は、正常血清に比べて、有意に増加した。その程度は、1型糖尿病で顕著だった。さらに、0.1%グルコースを加えて培養したところ、結核菌が増加した(図5)。

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 (His) 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6)。

ヒト結核病変の免疫組織学的解析結果において、乾酪壊死部に結核菌由来 MDP1 や宿主由来低酸素誘導因子 (HIF-1) が高く共発現していることが確認された。すなわち、結核病変部位は低酸素状態であることが考えられた。分裂増殖期結核菌が産生・分泌する蛋白質 (CFP10) や休眠期結核菌が発現する非分泌性蛋白質 (MDP1) を抗原として、ヒト血清における IgG 抗体の検出を試みた。被験血清として、活動性肺結核：14例、治癒後・陳旧性肺結核：17例、健常大学生：17例を登録した。血清抗 CFP10-IgG 抗体価は活動性肺結核： $0.66 \pm 0.84$  であり、治癒後結核： $0.18 \pm 0.31$  に比し、有意に高値を示した。他方、血清抗 MDP1-IgG 抗体価は治癒後結核： $0.51 \pm 0.22$  であり、活動性肺結核： $0.27 \pm 0.15$  に比し、有意に高値を示した(表2)。なお、健常者では両抗体価ともに低値を示した。

血清抗 GPL 核 IgA 抗体価は喀痰培養(複数回)陽性肺 MAC 感染症において、他の疾患群(肺結核、慢性閉塞性肺疾患、特発性間質性肺炎、肺がん、細菌性肺炎、サルコ

イドーシスや気管支拡張症)および健常者に比し、有意に高値を示した( $p < 0.0001$ )。血清抗 GPL 核 IgA 抗体価のカットオフ値を  $0.7 \text{ U/mL}$  に設定した場合、多施設(6医療機関)から得られた成績は感度：84.3%、特異度：100%であった(図7)。すなわち、血清診断は喀痰培養陽性肺 MAC 感染症を高感度・特異的に検出し、無症候性 MAC 感染、肺結核、その他の肺疾患(慢性閉塞性肺疾患、特発性間質性肺炎、肺がん、細菌性肺炎、サルコイドーシス、気管支拡張症)および健常者は検出感度以下であった。

喀痰培養陰性、気管支洗浄液培養陽性ヒト肺 MAC 感染症において、血清抗 GPL 核 IgA 抗体価のカットオフ値を  $0.7 \text{ U/mL}$  に設定した場合、感度：73.6%、特異度：96.5%であった(図8)。なお、非 MAC 感染症で GPL 保有 *M. fortuitum* 感染症(1例)のみが高値を示した。MAC 感染症の血清診断の所要時間は約3時間、簡便、迅速であった。

#### D. 考察

これまでに結核菌の病原性およびネクロシス誘導能に RD1 領域が関与することが示されてきた。しかし、その機序は必ずしも明らかではなかった。本研究では、RD1 とネクロシス誘導およびサイトカイン産生の関係について解析した。その結果、RD1 はミトコンドリア内膜傷害を引き起こし、細胞の ATP 合成能を低下させることが、ネクロシスの原因であると考えられた。また、RD1 は細胞内カリウムの遊離を促すことでカスパーゼ1の活性化を誘導し、IL-18 および IL-1 $\beta$  の成熟を促すことが明らかとなった。その分子機序については今なお不明であるが、RD1 領域には分泌装置 (ESX-1) を構成するタンパク質がコードされており、この分泌装置により分泌される菌体成分が重要な役割を果すものと考えられる。

PD-1 シグナル経路の役割について解析を行った。WT マウスと PD-1 欠損マウスに結核菌を経鼻感染したところ、WT マウスは感染後 250 日を経過しても全例生存していたが、PD-1 欠損マウスは肺における菌数の著明な増加を特徴として感染後約 50 日で全

例死亡した。肺の組織染色から、PD-1 欠損マウスの肺では中心部の壊死を伴う広範な炎症反応が起きており、マクロファージを中心とする細胞の浸潤が強く誘導されることが示された。また、感染後 14 日目以降で炎症性サイトカインやケモカインの産生が PD-1 欠損マウスでは強く誘導されていたことから、PD-1 経路が肺における防御免疫応答を正常に維持するために重要な役割を果たしているものと考えられた。

PD-1 は抑制性補助因子である PD-L1 のレセプターであり、PD-1 を介したシグナルが T 細胞抗原受容体からのシグナルを抑制することで抗原特異的 T 細胞のサイトカイン産生応答を阻害することが示されている。この PD-1 シグナル経路は、長期間宿主体内で生存可能なウイルスや細菌感染の成立に関与していることが報告されている。我々も、BCG 感染では WT マウスに比較して PD-1 欠損マウスで菌の排除が亢進することを明らかにした。一方、BCG 感染実験の成績から PD-1 欠損マウスは結核菌感染でも WT マウスより抵抗性を示すものと考えられたが、予想に反して PD-1 欠損マウスは感受性であった。今のところこの原因を説明することはできないが、両菌の間に存在する病原性の違いを示すものと考えている。

また、本研究では PD-1 欠損マウスと同様に ASC 欠損マウスでも結核菌感染後の肺で過剰な免疫反応が誘導されることが示され、ASC が結核に対する感染防御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。ASC は PYRIN ドメインと CARD ドメインを有し、各種 NLR 分子と caspase-1 の結合を仲介して inflammasome を形成することで caspase-1 活性化に関与することがわかっている。しかし本研究結果から、caspase-1 の活性化は結核に対する感染防御には必要ないことが示された。従って、ASC は感染防御に重要な他のシグナル経路の活性化に関与するものと考えられる。また、臓器内菌数の測定結果から、感染防御における ASC の必要性は肺において特に高いことが示された。今のところこの原因を説明することはできないが、今後さらに解析を進め、ASC

および PD-1 シグナル経路がどのように結核菌に対する感染防御の制御に関与するのかを分子レベルで明確にしていきたい。

病原性抗酸菌が感染した際に生体外排除を誘導する機構として、T 細胞が中心的役割を果たしている。T 細胞分画の中で CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞は、ともに必須であり、両者の存在によって初めて有効な病原体コントロールが可能となる。とりわけ、CD4 陽性 T 細胞は感染初期に、一方 CD8 陽性 T 細胞は感染後期に主に働く。従来ワクチンとして用いられてきた BCG は、CD4 陽性 T 細胞を活性化するワクチンと位置づけられている。しかし、その程度は極めて弱く、特にマクロファージに感染した場合には、免疫学的不応答性 T 細胞を産生する等、負の作用をも有している。さらに、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞を全く活性化することができない大きな欠点を有している。このことは、BCG は抗原提示細胞内でファゴゾームを形成しライソゾームとの融合を阻止するため、BCG 由来の抗原が細胞表面に発現されず、また BCG の菌体成分が細胞質に放出されないために、CD8 陽性 T 細胞の活性化に必須の Cross-presentation 機構が活性化されないことに起因している。

そこで、本研究班では CD4 陽性 T 細胞も CD8 陽性 T 細胞も活性化し得るリコンビナント BCG の作製を目指した。CD4 陽性 T 細胞の活性化においては、P-L fusion を促進させ MHC class II 経路を活性化するため、BCG のウレアーゼを除去した BCG- $\Delta$ UT-11-3 は、樹状細胞を介してナイーブ T 細胞を強く活性化したばかりか、病原性抗酸菌に強く反応するメモリー T 細胞を産生した。このことは、従来の BCG では観察されていない現象であり極めて重要な知見と考える。CD8 陽性 T 細胞の活性化誘導には、HSP70 の有するシャペロン効果を期待し、病原性抗酸菌共通抗原である MMP-II を用い Cross-priming 効果の増強を図った。その結果として、BCG-70M は極めて強いナイーブ CD8 陽性 T 細胞の抗原特異的活性化を誘導することが可能であった。T 細胞の活性化には、BCG-70M が菌体外に分泌する

HSP70-MMP-II 融合タンパクが大きな役割を果たしていた。さらに、BCG-70M は種々の BCG-70M 由来抗原に反応する T 細胞をポリクローナルに産生していた。このことは、ワクチン接種を受けるヒトの主要組織適合抗原の多様性を考えれば重要なことと考えられる。HSP70 は免疫担当細胞を活性化するばかりか、分泌能を併せ有している。そのため、HSP70 と MMP-II が融合した型で分泌されたものと考えられた。BCG が T 細胞を強く活性化できない最大の原因は、BCG が抗原提示細胞に取り込まれた場合、ファゴゾームを形成しライソゾームとの融合を阻止することで、機能的な Phago-lysosome を形成し得ないことにある。この欠点を凌駕するため、我々は上記のような取り組みを行ってきたが、基本となる考え方は二つに大別される。一つは、BCG 感染ファゴゾームを酸性化することでライソゾームとの融合を促進させることであり、この目的のためには、*UreC* 遺伝子を欠損させた BCG- $\Delta$ UT-11-3 の作製が有効であった。第二の試みは、ファゴゾームの中でタンパクを分泌させることであった。分泌されたタンパクにより、CD8 陽性 T 細胞がより強く活性化されることであり、MMP-II と HSP70 が融合したタンパクをファゴゾームの中で分泌し得るリコンビナント BCG (BCG-70M) が極めて有効であった。そこで、両方法を組み合わせた新しいリコンビナント BCG (BCG-D70M) を作製した。BCG-D70M は、*UreC* 遺伝子を欠く一方で、HSP70-MMP-II 融合タンパクをコードする遺伝子を持つ BCG である。結果として BCG-D70M は、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞もナイーブ CD8 陽性 T 細胞も非常に強く活性化し、その程度は BCG- $\Delta$ UT-11-3 及び BCG-70M より強力であった。この T 細胞の活性化は抗原特異的であり、BCG-D70M は BCG-70M と同様に HSP70-MMP-II 融合タンパクを分泌していたことから、本融合タンパクが両サブセット T 細胞の活性化に強く関与しているものと考えられた。その最大の理由は、BCG-D70M は *UreC* 遺伝子を欠くため、BCG-D70M はファゴゾーム内に留まらず、ライソゾームへ容易に取り込

まれ、ライソゾーム内で融合タンパクを分泌したため、分泌タンパクがより効率良くプロセッシングを受けたためと想定された。

したがって、BCG の固有の欠点であるライソゾームとの融合阻止を凌駕する二つの独立した方策は、相乗的に有用して強い T 細胞の活性化を誘導したものと考えられた。

Peptide-25 及び APL は共に生体内で CD4 陽性 T 細胞の活性化を誘導できることが明らかになった。そこで、Peptide-25 および APL 刺激で活性化した CD4 陽性 T 細胞が OVA 特異的細胞傷害性 CD8 細胞の活性化を誘導・増強する 'Help' 機能を有しているか検討した。その結果、Peptide-25 と OVA を共免疫した場合にのみ生体内で OVA 特異的細胞傷害性 CD8 細胞の活性化が増強されることが明らかとなった。この際、Peptide-25 と OVA を別々の部位に免疫するとこの作用が全く見られなくなることから、Peptide-25 と OVA が同一抗原提示細胞に取り込まれることが必要であることが示唆された。そこで、Peptide-25 による OVA 特異的細胞傷害性 CD8 細胞の活性化増強機構を *in vitro* にてさらに解析した。抗原提示細胞としてナイーブ CD4 陽性 T 細胞及びナイーブ CD8 陽性 T 細胞の活性化を誘導できる樹状細胞を用いた。その結果、Peptide-25 で活性化し Th1 細胞へと分化している CD4 陽性 T 細胞と共培養した樹状細胞は OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞の分裂増殖を誘導し、さらにグランザイム B の産生を誘導した。このことから、Peptide-25 で誘導された Th1 型 CD4 陽性 T 細胞は機能的な CD8<sup>+</sup> T 細胞の活性化を誘導できる 'Help' 活性を有していることが明らかになった。一方、APL で誘導された Th2 型 CD4 陽性 T 細胞と共培養した樹状細胞では OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞の分裂増殖は誘導できないもののグランザイム B の産生は誘導できなかった。このことから、機能的な CD8 陽性 T 細胞の活性化を誘導するためには Th1 型の CD4 陽性 T 細胞による 'Help' が必要であることが示された。この Th1 型 CD4 陽性 T 細胞と Th2 型 CD4 陽性 T 細胞による 'Help' の違いを明らかにするために、それぞれの T 細胞と

の相互作用によって誘導される樹状細胞の表面分子の発現を検討した。その結果、相互作用によって誘導される CD40、CD54、CD80、CD86、H-2K<sup>b</sup>、I-A<sup>b</sup> といった表面分子の発現には差異が見られなかった。このことから、これら表面分子はグランザイム B の産生誘導には寄与していないことが示された。Peptide-25 を介した P25 TCR-Tg-CD4 陽性 T 細胞と樹状細胞の相互作用によって Th1 分化に重要な役割を果たす IFN- $\gamma$ 、IL-12 が産生され、さらに CD40L の発現が誘導される。一方、APL を介した相互作用では IFN- $\gamma$ 、IL-12 産生は誘導されず、CD40L の発現量も Peptide-25 に比べ半減していた。これら Th1 分化に重要な役割を果たしている分子が樹状細胞の活性化に関与している可能性を考え、リコンビナントタンパクや中和抗体を添加し、その影響を検討した。その結果、いずれの場合もリコンビナントタンパクや中和抗体を加えても影響を受けなかったことから、CD8 陽性 T 細胞の機能的活性化を誘導する樹状細胞の活性化には IFN- $\gamma$ 、IL-12、CD40-CD40L 相互作用は必須ではないことが明らかとなった。

そこで DNA マイクロアレイ法にて、この樹状細胞の活性化を誘導する Th1 型 CD4 陽性 T 細胞と樹状細胞との相互作用を司る因子の同定を試みた。その結果、27 種の候補因子が絞り込まれたが、mRNA の発現を Real-Time PCR 法にて確認した結果、IL-17F が Th1 分化を誘導する Peptide-25 刺激でのみ CD4 陽性 T 細胞に発現が誘導される因子として同定された。IL-17F は IL-17 ファミリーに属し、活性化 T 細胞及び自然免疫担当細胞からホモダイマーとして分泌され、細胞傷害活性を増強することで腫瘍の増悪を防ぐこと、また最近の知見で細菌感染防御に関与することが報告されている分子である。今後 siRNA を用い IL-17F を欠損させた CD4 陽性 T 細胞を用い、IL-17F の機能を確定させる予定である。

ナイーブ CD4 陽性 T 細胞が Th1 細胞へと分化するためには IFN- $\gamma$  が産生できるように *ifn- $\gamma$*  遺伝子座のクロマチンリモデリングが誘導されること、さらにその機能を固

定するためには IL-12-IL-12R-STAT4 を介したシグナルが必要であると考えられている。しかしながら、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞は IL-12R $\beta$ 2 鎖を発現していないため機能的な IL-12R を構成できず、IL-12 に反応することができない。そのため、Th1 細胞への分化を固定するためには IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現を誘導しなければならない。DNA マイクロアレイ法にて絞り込んだ転写調節活性を有した候補遺伝子 3 種類の内の TAF7 が *ifn- $\gamma$*  遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導し、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を Th1 細胞へと分化させる機能を有していることが示された。クロマチン免疫沈降法を用いた解析結果から、TAF7 には *ifn- $\gamma$*  遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導する活性があることが確認された。しかしながら、IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現誘導能に関しては、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法では効率が非常に悪く、TAF7 の IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現誘導活性を確定させるには至らなかった。今後は非分裂ナイーブ CD4 陽性 T 細胞に対しても遺伝子導入効率が良いことが報告されているレンチウイルスベクターを用い、再検討して行く予定である。

STAT4 は IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現を誘導する活性を有していることが報告されている。我々の実験系では IL-12 産生能が全くない I-A<sup>b</sup>-CHO 細胞を抗原提示細胞として用いているため、IL-12 を介して STAT4 が活性化される可能性はないが、Peptide-25 を介した TCR シグナルが STAT4 の活性化を誘導する可能性が考えられる。そこで、Peptide-25 刺激で誘導される Th1 分化における STAT4 の関与を検討した。その結果、刺激 24 時間後に STAT4 の活性化の指標である 693 番目のチロシン残基のリン酸化が誘導されていた。T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を Peptide-25 で刺激した際の IL-12R $\beta$ 2 鎖のタンパクレベルでの発現は刺激 39 時間後初めて確認できることから、Peptide-25 刺激 24 時間後に誘導された STAT4 の活性化が IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後は TAF7 の STAT4 の関わり合い、ま

た、TCR を介した STAT4 の活性化誘導機序に関して詳細に解析していく予定である。

MAC 感染患者由来のリン種分離株から見いだした新規 IS1642 は、頻繁に転移を起こし、菌株間においてバンドパターンが多様であることから、本 IS は、非常に強い識別力を持つ遺伝子タイピングのツールとして用いることが出来ると考えられた。MAC 感染患者における感染源の追跡調査や、複数回 MAC 感染症を発症した同一患者の菌株が内因性再燃であるのか外因性再感染であるかを調べるのに有用であるものと考えられ、MAC の感染対策のための情報に資することが期待出来る。本研究課題で確立した抗酸菌の新規鑑別法は、既存の遺伝子検査と比較して、より多くの種類の病原性抗酸菌を簡便に鑑別可能だった。また、主要な病原性抗酸菌の鑑別において、既存の遺伝子検査法よりも感度と特異度が優れていた。臨床現場では迅速な菌種の同定が求められることから、本鑑別法は今後、そのような要望に応える新規診断法の開発につながることを期待される。

結核菌由来 *Rv2613c* 遺伝子が、新規 diadenosine polyphosphate 加リン酸分解酵素をコードしていることを明らかにした。本酵素は他の diadenosine polyphosphate と比較して、特徴的な一次構造と活性を有していた。さらに、*Rv2613c* 遺伝子を欠損させることにより、結核菌の生育能が著しく低下することが報告されていることから、*Rv2613c* は結核菌に特異的に作用するような新規抗結核薬の標的になり得ることが示された。*Rv2613c* を標的とする新規抗結核薬の開発に向けて、本タンパク質の立体構造を明らかにした。構造既知の diadenosine polyphosphate 関連酵素と比較した結果、構造骨格部分では相同性が示されたが、活性中心部位ではアミノ酸残基の種類が異なっていることが明らかになった。今後は、*Rv2613c* の機能を損なわせるような化合物をデザインすることによって、新規抗結核薬の開発に結びつくことが期待される。

「糖尿病と結核感染」の関係について、動物モデルとヒト結核患者の実態調査を行

った。その結果判明したことは、糖尿病にかかった個体は、結核菌に感染しやすく、病変の程度も強かった。ロムとギャレーにより編集された結核の教科書に、臨床的に、糖尿病患者は、結核菌に感染しやすく、しかも悪化しやすいことが示された。従って、糖尿病は、結核の高危険要因である。同様な研究が、1 つ、日本で、2000 年に行われており、644 人の結核患者の内、116 人の糖尿病患者がいた。糖尿病結核患者のうち 6.0%が多剤耐性結核であった。退院後 30 ヶ月後の再発率は、10.3%出会ったと報告している。この研究は、例数が少ないが、まとまった報告である。我々の報告は、対象症例数が多いが、糖尿病結核患者は 9.5%であり、この報告の 18.0%より少ない。この 2 つの報告で、1 型、2 型の比率は同じで、圧倒的に 2 型が多い。多剤耐性結核の頻度は、17.7%で、この報告の 6.0%より有意に高い。再発した例も、再発期間が違うので、明確に比べられないが、我々の方が、有意に高い。動物レベルとヒトの研究から、「糖尿病患者と結核」に関する全国の実態調査を、できるだけ行うことを行政サイドに提案したい。

潜在性結核菌感染機構には「結核菌」と「宿主」の要因が関与し、成立していることが考えられる。活動性結核の発病は感染者の約 10% (90%は無症候性潜在性結核菌感染) であり、発病に対する宿主防御機構の解明は結核対策に寄与することが考えられる。さらに、多くの活動性結核が潜在性結核菌感染からの内因性再燃に起因していることから、潜在性結核菌感染者を早期に発見し、治療・予防介入することにより、結核の発病を未然に防止することが可能となる。Trehalose dimycolate (TDM) など糖脂質は結核菌に特徴的であるため、糖脂質関連酵素 ( $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein synthase : KasB) の潜在性結核菌感染における役割を解明した。*kasB* 欠損結核菌株の細菌学的性状として、1) 小型集落形成、2) 抗酸性の消失、3) 紐状発育 (病原性結核菌で増強) の消失や 4) TDM 炭素鎖長の短縮 (親株に比し < 10) が認められた。

*kasB* 欠損株に対する宿主応答として、1) 病理組織学的に肉芽腫形成の減弱・消失、2) 組織内で抗酸性の消失、3) 感染マウスの生存延長、4) 肺内生菌数の定常的低下を示し、親株と対比的であった。結核菌糖脂質関連酵素 (KasB) は「抗酸性」、「病原性」や「休眠および潜在性結核菌感染」に重要であり、KasB を標的とした抗結核化学療法薬の開発や宿主免疫応答の解明は潜在性結核菌感染対策に基盤を提供している。

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% O<sub>2</sub>) 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) を発現していることが判明した。

現在、潜在性結核菌感染を検出する方法として 1) ツベルクリン皮内反応および 2) 末梢血細胞を用いた interferon-gamma 産生遊離試験 (IGRA、Quantiferon-2G) が頻用されている。1) ツベルクリン皮内反応は抗酸菌由来精製蛋白質群を診断抗原としているため、結核菌感染のみならず、非結核性抗酸菌感染や BCG 接種でも陽性となる。他方、2) 末梢血細胞を用いた interferon-gamma 産生遊離試験は結核菌特異的蛋白質抗原を用いているが、この特異抗原は分泌性蛋白質のため、分裂・増殖期結核菌に発現し、休眠期結核菌感染の検出には不十分である。本研究において、低酸素環境における休眠結核菌に発現する蛋白質を誘導し、分離精製することが可能となった。活動性肺結核において分裂増殖期結核菌が産生・分泌する蛋白質 (CFP10) に対する血清 IgG 抗体価は活動性肺結核 > 治癒後・陳旧性肺結核、他方、休眠期結核菌が発現する非分泌性蛋白質 (MDP1) に対する血清 IgG 抗体価は活動性肺結核 < 治癒後・陳旧性肺結核であり、今後、症例を蓄積し、活動性と治癒後・陳旧性肺結核 (潜在性結

核菌感染) における血清診断の有用性を検索する。

MAC 感染症の診断はアメリカ合衆国胸部疾患学会・感染症学会の診断基準 (2007) に準拠する。多施設共同研究により、ヒト肺 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。喀痰培養が陰性の場合、診断には気管支内視鏡を用いた洗浄液の培養や開胸肺生検試料の培養が必要となる。気管支内視鏡や開胸肺生検は侵襲性であり、かつ、培養を要するため、検査結果 → 確定診断に少なくとも約 2 週間以上を要する。他方、血清診断は体外診断であるため安全、そして、迅速 (所要: 約 3 時間) であり、有用性が高いと考えられる。また、手技も簡便、かつ、多検体処理が可能である。今後、症例を蓄積し、MAC 感染症における血清診断を普及させる予定である。

## E. 結論

病原性の強い結核菌はマクロファージのネクロシスを誘導する能力が高く、それには RD1 領域が重要な役割を果たしている。しかし、感染初期に結核菌はカスパーゼ 9 の活性化を誘導してネクロシスを抑制し、細胞内増殖を可能にする。また、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-1β 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 週目以降では 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考えられた。

一方、結核菌感染に対して ASC および PD-1 欠損マウスは高い感受性を示した。その原因は、肺における過剰な免疫応答の結果であると考えられる。従って、抑制性シグナル分子である PD-1 および ASC は、肺における防御免疫応答を正常に維持するために重要な役割を果たしているものと考えられた。

BCG の T 細胞活性化能を向上させる上で、*UreC* 遺伝子の除去、HSP70 及び MMP-II 遺伝子の導入は極めて有効であって、強い T 細胞活性化能を有する BCG を作製することが可能となった。

Th1 細胞へと分化している CD4 陽性 T 細胞が産生する IL-17F がグランザイムの発現を伴うエフェクター細胞傷害性 CD8 細胞への分化を誘導する樹状細胞の活性化を制御している可能性が示唆された。TCR 刺激で誘導される TAF7 が *ifn- $\gamma$*  遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導し、その後活性化した STAT4 が IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現を誘導することで Th1 分化が決定されるというサイトカイン非依存的な Th1 分化誘導機構が存在することが示された。

MAC 感染症に対する遺伝子タイピングのツールとして有用な新規 IS を見出した。多くの病原性抗酸菌を簡便に鑑別可能な新規鑑別法を確立した。結核菌由来 Rv2613c の詳細な機能と構造を明らかにした。

糖尿病は明らかに結核の増悪因子であった。

結核菌潜伏感染の分子機構、特に、菌情報に関し、低酸素環境で誘導した休眠菌から、遺伝子・蛋白質発現や精製に成功した。これらの結核菌由来蛋白質に対するヒト血清抗体価の測定は活動性と治癒後・陳旧性肺結核（潜在性結核菌感染）の鑑別に可能性がある。ヒト肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症における MAC 特異的 GPL 核を抗原に用いた血清 IgA の検出は書く痰培養陽性、さらに、喀痰培養陰性、気管支洗浄液培養陽性 MAC 感染症の安全・迅速・簡便な血清診断として有用である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and T. Mukai. 2007. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. *Microbes and Infect.*, 9: 70-77.
- 2) Maeda, Y., T. Mukai, M. Kai, Y. Fukutomi, H. Nomaguchi, C. Abe, K. Kobayashi, S. Kitada, R. Maekura, I. Yano, N. Ishii, T. Mori, and M. Makino. 2007. Evaluation of major membrane protein-II as a tool for serodiagnosis of leprosy. *FEMS Microbiol. Lett.*, 272: 202-205.
- 3) Kai, M., Y. Fujita, Y. Maeda, N. Nakata, S. Izumi, I. Yano, and M. Makino. 2007. Identification of trehalose dimycolate (cord factor) in *Mycobacterium leprae*. *FEBS Lett.*, 581: 3345-3350.
- 4) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, N. Nakata, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. 2007. Characterization of the fucosylation pathway in the biosynthesis of glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium* complex. *J. Bacteriol.*, 189: 5515-5522.
- 5) Duthie, M. S., W. Goto, G. C. Ireton, S. T. Reece, L. P. V. Cardoso, C. M. T. Martelli, M. M. A. Stefani, M. Nakatani, R. C. de Jesus, E. M. Netto, M. V. F. Balagon, E. Tan, R. H. Gelber, Y. Maeda, M. Makino, D. Hoft, and S. G. Reed. 2007. Use of Protein Antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clin. Vaccine Immunol.*, 14: 1400-1408.
- 6) Kaku, T., I. Kawamura, R. Uchiyama, T. Kurenuma and M. Mitsuyama. 2007. RD1 region in mycobacterial genome is involved in the induction of necrosis in infected RAW264 cells via mitochondrial membrane damage and ATP depletion. *FEMS Microbiol. Lett.*, 274: 189-195.



- 7) Uchiyama, R., I. Kawamura, T. Fujimura, M. Kawanishi, K. Tsuchiya, T. Tominaga, T. Kaku, Y. Fukasawa, S. Sakai, T. Nomura and M. Mitsuyama. 2007. Involvement of caspase-9 in the inhibition of necrosis of RAW 264 cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, 75: 2894-2902.
- 8) Bhatt, A., N. Fujiwara, K. Bhatt, S. S. Gurcha, L. Kremer, B. Chen, J. Chan, S. A. Porcelli, K. Kobayashi, G. S. Besra, and W. R. Jacobs, Jr. 2007. Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 5157-5162.
- 9) Katsube, T., S. Matsumoto, M. Takatsuka, M. Okuyama, Y. Ozeki, M. Naito, Y. Nishiuchi, N. Fujiwara, M. Yoshimura, T. Tsuboi, M. Torii, N. Oshitani, T. Arakawa, and K. Kobayashi. 2007. Control of cell wall assembly by a histone-like protein in mycobacteria. *J. Bacteriol.*, 189: 8241-8249.
- 10) Wolf, A. J., B. Linas, G. J. Trevejo-Nuñez, E. Kincaid, T. Tamura, K. Takatsu, and J. D. Ernst. 2007. *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function *in vivo*. *J. Immunol.*, 179: 2509-2519.
- 11) Ariga, H., Y. Shimohakamada, M. Nakada, T. Tokunaga, T. Kikuchi, A. Kariyone, T. Tamura, and K. Takatsu. 2007. Instruction of naive CD4<sup>+</sup> T-cell fate to T-bet expression and T helper 1 development : roles of T-cell receptor-mediated signals. *Immunology*, 122: 210-221.
- 12) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, Y. Miyamoto, and M. Makino. 2008. CD4<sup>+</sup> T cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 53: 96-106.
- 13) 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. 2008. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.*, 190: 3613-3621.
- 14) Kai, M., N. P. N. Ha, H. T. T. Huong, N. H. An, Y. Fukutomi, Y. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, T. Fujiwara, N. T. Tan, and M. Makino. 2008. Serological diagnosis of leprosy in patients in Vietnamese by enzyme-linked immunosorbent assay with *Mycobacterium leprae*-derived major membrane protein-II. *Clin. Vaccine Immunol.*, 15: 1755-1759.
- 15) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. 2008. *Mycobacterium avium* complex *gtfTB* gene encodes a glucosyltransferase required for the biosynthesis of serovar 8-specific glycopeptidolipid. *J. Bacteriol.*, 190: 7918-7924.
- 16) Kitada, S., K. Kobayashi, S. Ichiyama, S. Takakura, M. Sakatani, K. Suzuki, T. Takashima, T. Nagai, I. Sakurabayashi, M. Ito, and R. Maekura. 2008. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium*-complex pulmonary disease using an enzyme immunoassay kit. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 177: 793-797.
- 17) Nakata, N., N. Fujiwara, T. Naka, I. Yano, K. Kobayashi, and S. Maeda.

2008. 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.
- 18) Wolf, A. J., L. Desvignes, B. Linas, N. Banaiee, T. Tamura, K. Takatsu, and J. D. Ernst. 2008. Initiation of the adaptive immune response to *M. tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J. Exp. Med.*, 205: 105-115.
- 19) Sugawara, I., and S. Mizuno. 2008. Higher susceptibility of type 1 diabetic rats to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tohoku J. Exp. Med.*, 216: 363-370.
- 20) Maeda, Y., T. Tamura, M. Matsuoka, and M. Makino. 2009. Inhibition of the multiplication of *Mycobacterium leprae* by vaccination with a recombinant *M. bovis* BCG strain that secretes major membrane protein-II in mice. *Clin. Vaccine Immunol.*, 16: 1399-1404.
- 21) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. 2009. Induction of cross-priming of naïve CD8<sup>+</sup> T lymphocytes by recombinant Bacillus Calmette-Guérin that secretes heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. *J. Immunol.*, 183: 6561-6568.
- 22) Fukutomi, Y., Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino. 2009. Temperature dependency for survival of *Mycobacterium leprae* in macrophages. *Jpn. J. leprosy*, 78: 7-16.
- 23) Makino, M., Y. Maeda, M. Kai, T. Tamura, and T. Mukai. 2009. 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.*, 55: 39-46.
- 24) Hatta, M., M. Makino, Ratnawati, Mashudi, Yadi, M. Sabir, N. Tandirogang, L. M. M. Rusyati, M. Kai, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, T. Mukai, and Y. Maeda. 2009. Detection of serum antibodies to *M. leprae* Major Membrane Protein-II in leprosy patients from Indonesia. *Leprosy Review*, in press.
- 25) Kurenuma, T., I. Kawamura, H. Hara, R. Uchiyama, S. Daim, S. R. Dewamitta, S. Sakai, K. Tsuchiya, T. Nomura, and M. Mitsuyama. 2009. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to activation of caspase-1 via induction of potassium ion efflux in infected macrophages. *Infect. Immun.*, 77: 3992-4001.
- 26) Tateishi, Y., Y. Hirayama, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura, J. Kang, A. Shibata, K. Hirata, S. Kitada, R. Maekura, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2009. Virulence of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from immunocompetent patients. *Microb. Pathog.*, 46: 6-12.
- 27) Hirayama, Y., M. Yoshimura, Y. Ozeki, I. Sugawara, T. Udagawa, S. Mizuno, N. Itano, K. Kimata, A. Tamaru, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2009. Mycobacteria exploit host hyaluronan for efficient extracellular replication. *PLoS Pathog.*, 5: e1000643.
- 28) Sugawara, I., T. Udagawa, T. Aoki, and S. Mizuno. 2009. Establishment of a guinea pig model of latent tuberculosis with GFP-introduced *M. tuberculosis*. *Tohoku J. Exp. Med.*, 219: 257-262.

- 29) Zhang, Q., H. Xiao, and I. Sugawara. 2009. Tuberculosis complicated by diabetes mellitus at Shanghai pulmonary hospital, China. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 62: 390-391.
- 30) Sugawara, I. 2009. Why does tuberculosis lead to specific inflammation? *Jpn. J. leprosy*, 78: 263-269.
- 31) Sugawara, I., J. Zhang, and C. Li. 2009. Cross-resistance of *M. tuberculosis* isolates among streptomycin, kanamycin and amikacin. *Ind. J. Exp. Biol.*, 47: 520-522.
- 32) Piao, Z., K. Shibayama, S. Mori, JI. Wachino, and Y. Arakawa. 2009. A novel insertion sequence, IS1642, of *Mycobacterium avium*, which forms long direct repeats of variable length. *FEMS Microbiol. lett.*, 29: 216-221.
- 33) Mori, S., K. Shibayama, JI. Wachino, and Y. Arakawa. 2010. Purification and molecular characterization of a novel diadenosine 5', 5' ' ' -P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-tetrphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Protein Expr. Purif.*, 69: 99-105.
- 34) Mori, S., K. Shibayama, JI. Wachino, and Y. Arakawa. 2010. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the diadenosine 5', 5' ' ' -P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-tetrphosphate phosphorylase of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Acta Crystallogr. Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.*, in press.
2. 学会発表
- 1) Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, T. Mukai, and T. Mori. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42<sup>nd</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.
- 2) Mukai, T., S. Izumi, C. Rosita, I. Agusni, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. Detection of *M. leprae* DNA in nasal swab samples by LAMP method. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42<sup>nd</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.
- 3) Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. Clofazimine-induced cell death in human and mouse macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42<sup>nd</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.
- 4) Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. Clofazimine-induced cell death in macrophages. 17<sup>th</sup> International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 5) Kai, M., N. P. N. Ha, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, Y. Maeda, T. Mukai, N. T. Tan, and M. Makino. Application of new serological test for leprosy in Vietnam. 17<sup>th</sup> International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 6) Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, M. Kai, and M. Makino. Lipopeptide (LipoK) of *Mycobacterium leprae* activated antigen presenting cells and type 1 T cells. 17<sup>th</sup> International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 7) Makino, M., Y. Maeda, M. Matsuoka, and T. Tamura. Inhibition of the

- multiplication of *Mycobacterium leprae* vaccination with a recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *M. leprae*. 17<sup>th</sup> International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 8) Maeda, Y., M. Kai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Utility of MMP-II for diagnosis of leprosy. 17<sup>th</sup> International Leprosy Congress, Pre-workshop, New Diagnostics and Molecular Epidemiology, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
  - 9) Kai, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and M. Makino. Search for *Mycobacterium leprae* antigens for sero-diagnosis. 17<sup>th</sup> International Leprosy Congress, Pre-workshop, Future Research Needs, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
  - 10) Makino, M., T. Mukai, Y. Maeda, Y. Miyamoto, and T. Tamura. CD4<sup>+</sup> T cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant BCG. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 43<sup>rd</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
  - 11) Mukai, T., Y. Miyamoto, and M. Makino. Construction of *ureC*-disrupted BCG which expressing *M. leprae* MMP II antigen. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 43<sup>rd</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
  - 12) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, and M. Makino. *Mycobacterium avium* complex serovar 8. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 43<sup>rd</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
  - 13) Maeda, S., N. Nakata, I. Yano, M. Makino, and N. Fujiwara. Genetic analysis of the glycosylation pathway of glycopeptidolipids in *Mycobacterium intracellulare* serotype 16 and serotype 17. ASM Meeting, Boston, USA, June, 2008.
  - 14) Nakata, N., N. Fujiwara, S. Maeda, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. The three different methyltransferase genes determine the divergence between *Mycobacterium intracellulare* serotype 7 and 12. ASM Meeting, Boston, USA, June, 2008.
  - 15) Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, K. Kobayashi, M. Makino, and S. Maeda. Structure and biosynthesis gene cluster of an antigenic serotype 16 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. ASM Meeting, Boston, USA, June, 2008.
  - 16) Makino, M. Vaccines for mycobacterial diseases. The fifth Taiwan-Japan symposium on International Collaboration and TB. Taipei, Taiwan, September 11-13, 2008.
  - 17) Kawamura, I., T. Kaku, R. Uchiyama, T. Kurenuma, and M. Mitsuyama. RD1 region in mycobacterial genome is involved in the induction of necrosis in infected macrophages via mitochondrial membrane damage and ATP depletion. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 43<sup>rd</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
  - 18) Kawamura, I., T. Kaku, R. Uchiyama,

- and M. Mitsuyama. Regulatory mechanism of necrosis induction in macrophages by virulent *Mycobacterium tuberculosis*. XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology in IUMS 2008, Istanbul, Turkey, August 5-9, 2008.
- 19) Tamura, T., Y. Shimohakamada, M. Makino, and K. Takatsu. The role of T cell receptor-mediated signals in Th1 subset differentiation of naïve CD4+ T cells primed with Peptide-25 of Ag85B. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, 29-31 July, 2009.
- 20) Mukai, T., Y. Maeda, Y. Miyamoto, and M. Makino. Identification of Strong Mycobacterial Promoters from Mycobacteriophage TM4. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan 29-31 July, 2009.
- 21) Miyamoto, Y., and M. Makino. Biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan 29-31 July, 2009.
- 22) Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. Apoptosis-inducing activity of clofazimine in macrophages and expression of ER stress proteins in the cells. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan 29-31 July, 2009.
- 23) Maeda, Y., Y. Fukutomi, H. Wang, T. Tamura, and M. Makino. The fate of mycobacteria in human dendritic cells and macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.
- 24) Kawamura, I., S. Sakai, and M. Mitsuyama. PD-1-dependent signal impairs protective T cell response in chronic *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan 29-31 July, 2009.
- 25) 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. ハンセン病におけるマクロファージのサイトカイン産生調節機構. 第80回日本細菌学会総会 2007年3月 大阪
- 26) 前田百美, 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. らい菌由来リポ蛋白の抗らい菌生体防御反応に及ぼす影響. 第80回日本細菌学会総会 2007年3月 大阪
- 27) 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. 抗酸菌糖脂質合成における fucose 転移酵素遺伝子の解析. 第80回日本細菌学会総会 2007年3月 大阪
- 28) 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. クロファジミンによるマクロファージの細胞死と caspase 活性化. 第80回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2007年5月 横浜
- 29) 甲斐雅規, 倉繁昌浩, 松原久美子, 中田 登, 牧野正彦. 変異検出におけるダイレクトシーケンスとクローン化シーケンスの相違. 第80回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2007年5月 横浜
- 30) 向井 徹, 和泉眞蔵, 宮本友司, Cita Rosita, Indropo Agusni, 松岡正典, 牧野正彦. LAMP 法によるらい菌遺伝子検出の応用. 第80回日本ハンセン

- 病学会総会・学術大会 2007年5月  
横浜
- 31) 下袴田陽子, 田村敏生, 牧野正彦, 高津聖志. 結核菌分泌蛋白による Th1 分化誘導機構の解析: TCR による抗原認識の役割. 第 90 回日本細菌学会関東支部総会 2007年10月 東京
- 32) 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. *Mycobacterium avium* complex における fucose 含有糖脂質抗原の生合成解析. 第 90 回日本細菌学会関東支部総会 2007年10月 東京
- 33) 福富康夫, 牧野正彦. ヒトマクロファージにおける抗らい菌活性誘導. 第 37 回日本免疫学会総会 2007年12月 東京
- 34) 暮沼武志, 内山良介, 河村伊久雄, 光山正雄. 結核菌感染マクロファージのネクロシス誘導における病原遺伝子領域 RD1 の関与とその誘導機序について. 第 18 回日本生体防御学会 2007年7月 福岡
- 35) Uchiyama, R., I. Kawamura, K. Tsuchiya, T. Tominaga, S. Sakai, T. Nomura, and M. Mitsuyama. Involvement of caspase-9 in the inhibition of necrosis of peritoneal macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. 第 37 回日本免疫学会総会 2007年11月 東京
- 36) Kurenuma, T., R. Uchiyama, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. 結核菌の RD1 領域はミトコンドリア傷害と ATP 枯渇により感染マクロファージのネクロシス誘導に関与する. 第 37 回日本免疫学会総会 2007年11月 東京
- 37) 岡田全司, 小林和夫. 抗酸菌研究の最前線 (シンポジウム). 第 82 回日本結核病学会総会 2007年6月 大阪
- 38) 松本壮吉, 小林和夫. 結核菌病原因子による病変形成と感染防御. 抗酸菌研究の最前線 (シンポジウム). 第 82 回日本結核病学会総会 2007年6月 大阪
- 39) 松本壮吉, 藤原永年, 吉村満美子, 尾関百合子, 西内由紀子, 和田 崇之, 小林和夫. 結核菌糖脂質の合成制御における mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) の役割. 第 82 回日本結核病学会総会 2007年6月 大阪
- 40) 仁木 誠, 吉村満美子, 平山幸雄, 松本壮吉, 和田 崇之, 小林和夫. 抗酸菌の蛋白質発現と薬剤抵抗性における mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) の役割. 第 82 回日本結核病学会総会 2007年6月 大阪
- 41) 藤原永年, 松本壮吉, 前田伸司, 矢野郁也, 小林和夫. ミコール酸分子種の異なる cord factor の宿主応答. 第 82 回日本結核病学会総会 2007年6月 大阪
- 42) 平山幸雄, 吉村満美子, 仁木 誠, 松本壮吉, 尾関百合子, 菅原 勇, 青木俊明, 和田 崇之, 西内由紀子, 小林和夫. ヒアルロン酸の抗酸菌増殖に対する作用. 第 82 回日本結核病学会総会 2007年6月 大阪
- 43) 尾関百合子, 松本壮吉, 小林和夫. BCG 感染時における Th1/Th2 バランスへの STAT6 の役割. 第 82 回日本結核病学会総会 2007年6月 大阪
- 44) 下袴田陽子, 田村敏生, 高津聖志. 結核菌分泌蛋白による Th1 分化誘導機構の解析: TCR による抗原認識の役割. 第 90 回日本細菌学会関東支部総会 2007年10月 東京
- 45) 刈米アイ, 田村敏生, 高津聖志. P25 CD4<sup>+</sup> T細胞活性化とクロスプライミング増強の解析. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 2007年11月 東京
- 46) Yahagi, A., M. Umemura, T. Tamura, M. D. Begum, S. Hamada, K. Oshiro, Y. Okamoto, A. Kariyone, K. Takatsu, and G. Matsuzaki. IL-10 delayed

- induction of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)- specific Th1 immune response in the lung of Mtb-infected TCR-transgenic mice. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 2007 年 11 月 東京
- 47) 藤原永年, 中田 登, 前田伸司, 中 崇, 水野浄子, 牧野正彦, 松本壮吉, 矢野郁也. *Mycobacterium intracellulare* 由来血清型 7、12 型 glycopeptidolipid 糖鎖合成遺伝子の機能解析. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都
- 48) 朴貞玉, 柴山恵吾, 森茂太郎, 荒川宜親. *Mycobacterium avium* より見出された新規 Insertion Sequence の解析. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都
- 49) 河村伊久雄, 角泰人, 内山良介, 暮沼武士, 光山正雄. 結核菌 RD1 領域の感染マクロファージへの作用. 第 78 回実験結核研究会 2008 年 4 月 東京
- 50) 酒井俊祐, 河村伊久雄, 内山良介, 光山正雄. 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. 第 19 回日本生体防御学会学術集会 2008 年 7 月 札幌
- 51) Sakai, S., I. Kawamura, R. Uchiyama, T. Okazaki, and M. Mitsuyama. The PD-1:PDL-1 pathway inhibits the protective immunity and contributes to the bacterial persistence in mycobacterial infection. 第 38 回日本免疫学会総会 2008 年 12 月 京都
- 52) 小林和夫, 菅原 勇. ワクチン研究の現状と将来 (ミニシンポジウム). 第 83 回日本結核病学会総会 2008 年 4 月 東京
- 53) 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. 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. 第 83 回日本結核病学会総会 2008 年 4 月 東京
- 54) 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. ヒアルロン酸の結核病巣における産生と局在. 第 83 回日本結核病学会総会 2008 年 4 月 東京
- 55) 仁木 誠, 松本壮吉, 和田崇之, 小林和夫. 抗酸菌の薬剤感受性における MDP1 の調節機構の解析. 第 83 回日本結核病学会総会 2008 年 4 月 東京
- 56) 矢作綾野, 梅村正幸, 田村敏生, Dilara Begum, 大城清哲, 岡本祐子, 刈米アイ, 高津聖志, 松崎吾朗. 結核菌肺感染における免疫応答制御機構への抑制性サイトカインの関与. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都
- 57) 宮本友司, 向井 徹, 中 崇, 甲斐雅規, 前田百美, 矢野郁也, 牧野正彦. *Mycobacterium avium* complex における glycopeptidolipid 生合成遺伝子群の転写制御解析. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 58) 甲斐雅規, 藤原永年, 宮本友司, 向井徹, 矢野郁也, 牧野正彦. BCG 菌ミコール酸のサブクラス合成遺伝子の解析. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 59) 藤原永年, 中田 登, 中 崇, 水野浄子, 合田麗奈, 牧野正彦, 吉村満美子, 松本壮吉, 前田伸司. *Mycobacterium intracellulare* 由来血清型 7, 12, 13 型糖ペプチド脂質の構造類似性とオリゴ糖解析. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 60) 前田百美, 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. Evaluation of exosomes derived from *Mycobacterium leprae* infected dendritic cells. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 61) 大崎敬子, 甲斐雅規, 米澤英雄, 牧野正彦. *Helicobacter pylori luxS* 変異株の外膜蛋白の解析. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 62) 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. クロファジミンにより誘導されるマクロ

- ファージの細胞死と小胞体ストレスタンパクの動態. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 63) 下袴田陽子, 田村敏生, 牧野正彦, 高津聖志. 抗酸菌分泌タンパク Ag85B 由来 Peptide-25 による Th1 型免疫応答誘導機序の解析. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 64) 甲斐雅規, 中田 登, 松岡正典, 椎名隆, 猪子英俊, 牧野正彦. らい菌 Thai53 ゲノム由来新規 SNPs の探索. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲市
- 65) 向井 徹, 宮本友司, 前田百美, 牧野正彦. らい菌蛋白調整に用いる発現用プロモーターの同定. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲市
- 66) 前田百美, Mochammad Hatta, Ratnawati, Mashudi, Yadi, Muhammad Sabir, Nataniel Tandirogang, Luh Made Mas Rusyati, 甲斐雅規, 向井 徹, 宮本友司, 福富康夫, 牧野正彦. Major membrane Protein-II を用いた血清診断法. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲
- 67) 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. 結核・ハンセン病に対するワクチンの開発研究の最前線. (シンポジウム) 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲市
- 68) 暮沼武士, 河村伊久雄, 原英樹, 内山良介, Sylvia Daim, Sita R. Dewamitta, 酒井俊祐, 土屋晃介, 野村卓正, 光山正雄. 結核菌ゲノム領域 RD1 が関与するカスパーゼ 1 活性化の機序について. 第 7 回感染症沖縄フォーラム 2009 年 2 月
- 69) Sakai, S., Kawamura, I., R. Uchiyama, and M. Mitsuyama. The PD-1:PD-L1 pathway is involved in the persistent infection of *Mycobacterium bovis* BCG. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 70) Daim, S., I. Kawamura, H. Hara, Y. Shen, T. Kurenuma, and M. Mitsuyama. *Mycobacterium tuberculosis* PPE37 protein alters the early cytokine response of macrophages. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 71) Dewamitta, S. R., 野村卓正, 原英樹, 土屋晃介, 暮沼武士, 申艶那, S. Daim, 酒井俊祐, 屈慧新, 山本武司, 河村伊久雄, 光山正雄. LLO-dependent entry of *Listeria monocytogenes* into cytoplasm is essential for calcium dependent calpain activation and IL-1 $\alpha$  secretion in infected macrophages. 第 20 回日本生体防御学会学術総会 2009 年 7 月 東京
- 72) 野村卓正, 申艶那, 土屋晃介, 原英樹, 酒井俊祐, 屈慧新, 河村伊久雄, 光山正雄. マクロファージのリステリア食能の TLR2 シグナルによる増幅. 第 20 回日本生体防御学会学術総会 2009 年 7 月 東京
- 73) Shen, Y., T. Nomura, K. Tsuchiya, H. Hara, S. Sakai, H. Qu, S. Daim, S. R. Dewamitta, T. Yamamoto, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. TLR2-dependent signal is involved in the efficient phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by macrophages. 第 39 回日本免疫学会総会 2009 年 12 月 大阪
- 74) Tsuchiya, K., H. Hara, T. Nomura, S. D. Dewamitta, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. Mechanism of the inflammasome activation upon infection with *Listeria monocytogenes*. 第 39 回日本免疫学会総会 2009 年 12 月 大阪
- 75) Hara, H., K. Tsuchiya, I. Kawamura, T. Yamamoto, T. Nomura, and M. Mitsuyama. LLO participates in caspase-1 activation in *Listeria monocytogenes*-infected



- macrophages via induction of IFN- $\beta$  production. 第 39 回日本免疫学会総会 2009 年 12 月 大阪
- 76) Dewamitta, S. R., I. Kawamura, H. Hara, R. Uchiyama, S. Daim, S. Sakai, K. Tsuchiya, T. Nomura, and M. Mitsuyama. RD1 locus in *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to the activation of caspase-1 via induction of potassium efflux in infected macrophages. 第 39 回日本免疫学会総会 2009 年 12 月 大阪
- 77) Nomura, T., S. R. Dewamitta, H. Hara, K. Tsuchiya, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. Bacterial cytoplasmic entry- inducing intracellular calcium signaling is required for IL-1 $\alpha/\beta$  production in *Listeria monocytogenes*-infected macrophages. 第 39 回日本免疫学会総会 2009 年 12 月 大
- 78) Sakai, S., I. Kawamura, K. Tsuchiya, T. Okazaki, and M. Mitsuyama. The PD-1:PD-L1 coinhibitory pathway is a critical determinant of host resistance to pulmonary tuberculosis. 第 39 回日本免疫学会総会 2009 年 12 月 大阪
- 79) 松本壮吉、小林和夫. Tuberculosis, from biology to development of control strategies (シンポジウム). From the functions of a protein to molecular pathogenesis of mycobacteria (国際シンポジウム). 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 80) 立石善隆、平山幸雄、尾関百合子、西内由紀子、吉村満美子、小林和夫、松本壮吉. 抗酸菌感染症研究における新たな視点 (ワークショップ 15). 急速な臨床経過に合致した高病原性 *Mycobacterium avium-intracellulare* complex 菌株の同定. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 81) 平山幸雄、吉村満美子、尾関百合子、菅原 勇、小林和夫、松本壮吉. 抗酸菌感染症研究における新たな視点 (ワークショップ 15). 結核菌の増殖に対するヒアルロン酸の作用. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 82) 大原直也、岡部真裕子、吉村満美子、尾関百合子、中山浩次、小林和夫. 抗酸菌感染症研究における新たな視点 (ワークショップ 15). BCG におけるチミジル酸合成酵素 ThyX の意義. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 83) 岡部真裕子、大原直也、山本三郎、小林和夫. BCG Tokyo 172-I 型および-II 型における sliding 能の差異. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 84) 岡 真優子、小林和夫、松本壮吉. 結核菌感染マクロファージにおける hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  の作用機構. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 85) 仁木 誠、吉村満美子、小林和夫、松本壮吉. 抗酸菌の薬剤感受性における MDP1 の調節機構の解析. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 86) 尾関百合子、原田 誠、西内由紀子、山本三郎、小林和夫、松本壮吉. 抗結核薬スクリーニング系の確立と実践. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 87) Yahagi, A., M. Umemura, T. Tamura, D. Begum, Y. Yoshida-Okamoto, K. Shinjo, A. Kariyone, K. Takatsu, and G. Matsuzaki. The influence of CD11c<sup>+</sup> lung cells in induction of mycobacterial Ag- specific Th1 response to the lung. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 2009 年 12 月 大阪
- 88) 森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、朴貞玉、荒川宜親. 結核菌由来の新規又

- クレオチド加水分解酵素に関する研究. 第82回日本細菌学会総会 2009年3月 名古屋
- 89) 森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、朴貞玉、荒川宜親. 結核菌由来新規ヌクレオチド加水分解酵素の機能解析. 日本農芸化学会 2009年度大会 2009年3月 福岡
- 90) 森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、荒川宜親. 結核菌由来新規 diadenosine

5',5''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-tetrphosphate 加リン酸分解酵素の結晶構造解析. 日本農芸化学会 2010年度大会 2010年3月 東京

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

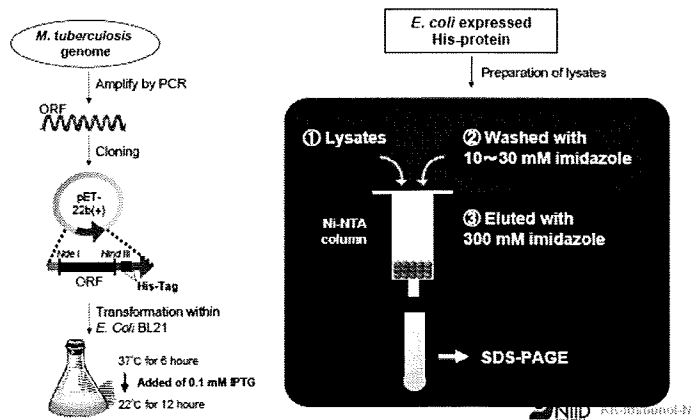
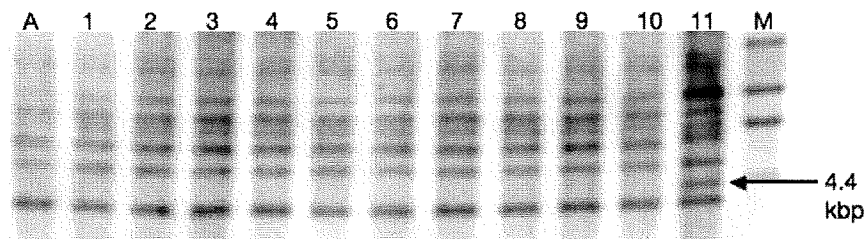
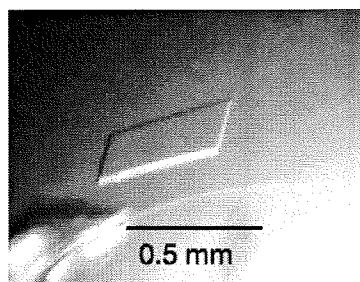


図 1. 低酸素環境における休眠結核菌蛋白質発現の精製

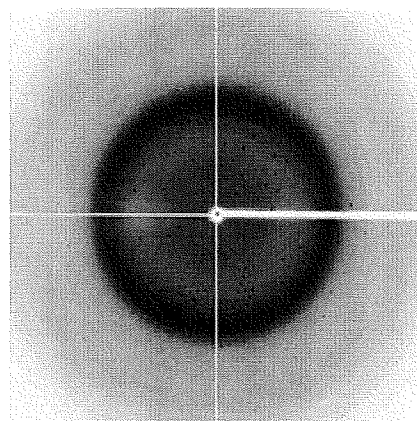


Lane A, 継代前の *M. avium*  
 Lanes 1-10, それぞれ1回継代培養を行ったコロニー  
 Lane 11, 10回継代培養を行ったコロニー  
 Lane M, 分子量マーカー  $\lambda$ /HindIII

図 2 継代培養による IS1642 のサザンブロットパターンの変化



Rv2613c (Native) の結晶



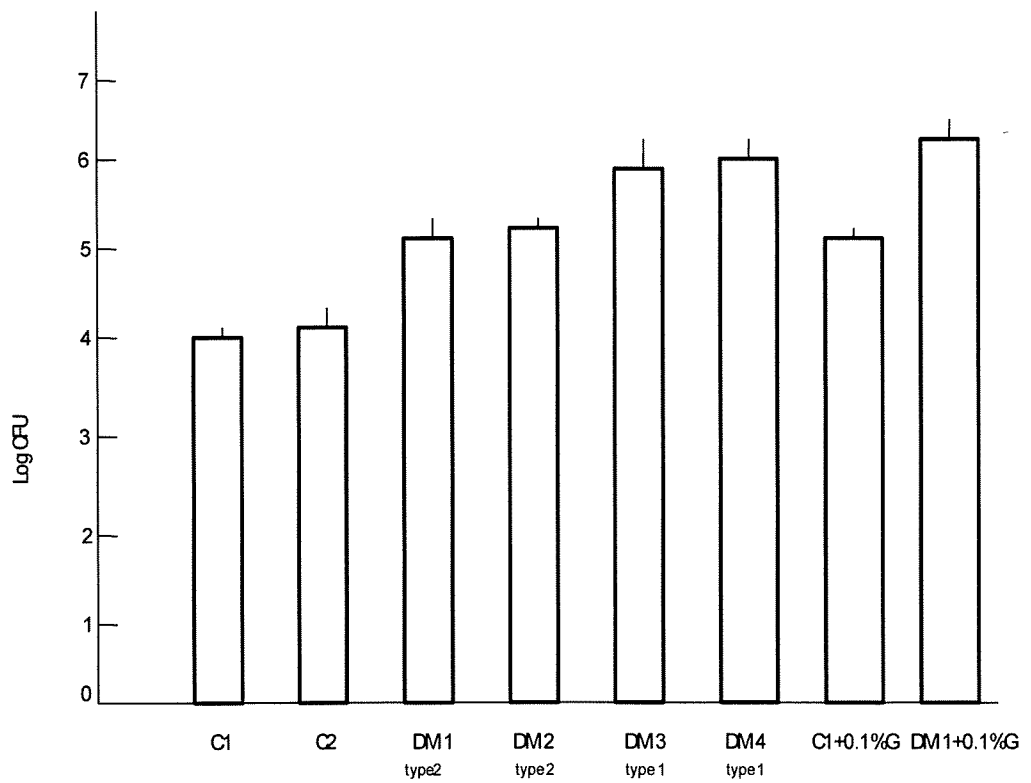
X線回折像

図 3 Rv2613c の結晶と X線回折像



Cドメイン： $\alpha/\beta/\alpha$ 構造

図4 Rv2613c のリボンモデル



注：DM、糖尿病；C、対照者；G、グルコース

図5 結核菌増殖促進に及ぼす糖尿病患者(DM)（1型と2型）血清添加の効果