

B. 研究方法

抗酸菌株およびその培養 American Type Culture Collection より得た *M. avium* (serovar 4) (以下 M.av と記載)は、0.05% Tween 80 および 10% ADC を含有した 7H9 メディウム中で、37 度にて培養した。また、*C. matrucotii* (JCM 9386) (Japan Collection of Microorganisms)は 5%トレハロース添加 brain-heart infusion 液体培地を用い培養を行った。

脂質精製 菌体より抽出した総脂質をクロロホルム/メタノール(2:1, v/v)に溶解したのち冷アセトンを加え、不溶画分を回収した。さらにこの画分を薄層クロマトグラフィー(TLC)により展開し、TDM、GMM および TMM を含んだ分画を単離精製した。

Ag85A リコンビナントタンパク質の作製

M. avium ゲノム遺伝子あるいは *M. leprae* (*M.le*) (Thai53 株)ゲノム遺伝子を鋳型とし、シグナル配列を欠く Ag85A タンパク質をコードする遺伝子を PCR 法により増幅した。また単離した遺伝子を pET-21c プラスミドベクターに挿入し、BL21(DE3)大腸菌株をトランスフォームすることにより、C 末端に His タグを組み込んだリコンビナント Ag85A タンパク質を発現させた。大腸菌を破碎した後可溶画分を回収し、Ni-レジンカラムを用いてタンパク質精製を行った。

ミコール酸転移酵素活性の測定

すでに報告された方法 (Lett. Appl. Microbiol. 34: 233, 2002)に準拠し、酵素として *M.av* あるいは *M.le* 由来リコンビナント Ag85A タンパク質、基質として精製 TMM および D-グルコースを用いて 37°C、1 時間の反応を行った。反応後、抽出した脂質を TLC プレート上に展開し、50%硫酸を噴霧してオーブン中で焼き付けることにより生成物を検出した。

倫理面への配慮

本研究は、生命倫理や動物愛護、安全対策の観点から、機関で定められた規定に則り、当該委員会での承認を得て遂行した。

C. 研究結果

M.le Ag85A は、ミコール酸転移酵素としての機能が減弱している

M.av 由来 Ag85A と *M.le* 由来 Ag85A のミコール酸転移酵素としての機能を比較するため、天然に存在する長鎖 TMM を基質とした in vitro の酵素測定を施行し、反応溶液中の脂質を TLC で展開することにより、生成物を評価した。既報の通り、*M.av* 由来 Ag85A リコンビナントタンパク質は、グルコース非存在下では TDM を、またグルコース存在下では GMM を効率的に産生した。一方、同量の *M.le* 由来 Ag85A リコンビナントタンパク質により産生される TDM、GMM は、微量であった。このことは、*M.le* のミコール酸転移酵素としての機能がきわめて弱いことを示唆している。

M.le Ag85A は、直鎖脂肪酸の転移反応を効率的に触媒できる

M.le Ag85A の機能をさらに詳細に解析するため、非分岐短鎖脂肪酸である C12 トレハロースモノラウリン酸(TML)および分岐短鎖脂肪酸である *C. matrucotii* 由来 TMM を基質とした in vitro 脂肪酸転移反応を行った。まず *M.av* 由来 Ag85A リコンビナントタンパク質は、長鎖 TMM と同様、短鎖 TMM の転移反応を効率的に触媒した。一方、*M.le* 由来 Ag85A リコンビナントタンパク質のミコール酸転移活性は、長鎖・短鎖を問わず減弱していた。しかしながら、C12 TML を基質とした場合、*M.le* 由来 Ag85A リコンビナントタンパク質は、*M.av* 由来 Ag85A リコンビナントタンパク質と同等の脂肪酸転移活性を示し、ほぼ等量の最終生成物(トレハロースジラウリン酸; TDL)の産生を認めた。以上の結果から、*M.le* 由来 Ag85A のミコール酸転移活性の低下は、酵素タンパク質自体の機能異常によるものではなく、ミコール酸基質に対して特異的に認められる現象であることが明らかとなった。

M.le Ag85A 130 位ロイシン残基はミコール酸含有基質の結合を阻害する

結核菌由来ミコール酸転移酵素の結晶構造解析より、基質が含有するミコール酸分岐鎖を結合するポケット構造が同定されている。これをもとに M.le Ag85A のトンネル構造のモデリングを試みたところ、トンネル側壁を構成する 130 位ロイシン残基の側鎖がトンネル内腔を閉塞することがわかった。結核菌や M.av 由来 Ag85A においてはこの部位のアミノ酸がセリンであり、その側鎖はトンネル内腔に突出しない。以上のことから、セリンからロイシンへのアミノ酸置換によりミコール酸含有基質の結合が制約されているとの可能性を考え、同部位に変異を持つリコンビナントタンパク質を作製してその酵素機能を検証した。まず M.av 由来 Ag85A において 130 位セリンをロイシンに置換 (M.av Ag85A S130L) すると、TML を基質とした脂肪酸転移反応は阻害されなかったが、TMM を基質としたミコール酸転移反応は強く阻害された。一方、M.le 由来 Ag85A において 130 位ロイシンをセリンに置換 (M.le Ag85A L130S) すると、TML を基質とした脂肪酸転移反応には変化なかったが、TMM を基質としたミコール酸転移反応は増強した。短鎖 TMM を基質とした酵素活性のカイネティックスの検討から、野生型 M.le Ag85A と M.le Ag85A L130S の Vmax 値はほとんど変わらないが、Km 値がそれぞれ 459 μ M、43 μ M であったことから、アミノ酸変異の導入によって TMM 基質の変異酵素に対する親和性が増大したと結論づけられた。

D. 考察

休眠菌は年余にわたり生体内環境に暴露されることから、低いながらも維持され続けている糖脂質代謝は、宿主環境の影響を強く受けることが予想される。M.le のように宿主体内環境においてのみ生育が可能な病原性抗酸菌における糖脂質代謝の解析は、休眠菌の理解に重要な示唆を与えることが期待される。本研究において、M.le は Ag85A のミコール酸転移活性を遺伝子レベルで制御することにより、宿主自然免疫活性の強

い TDM や獲得免疫の標的となる GMM の産生を抑制していることが明らかとなった。Wayne の方法で作製した休眠モデル菌においてもこれらのミコール酸含有糖脂質群の産生が低下していることから、休眠菌の病態解明においてミコール酸転移酵素の機能とその活性を評価することが重要であり、その人為的活性化は休眠菌の制御に貢献する可能性が考えられる。

らい菌は進化の過程で多くの遺伝子を欠失させ、生育および病原性の発揮に最低限要求される機能遺伝子を維持してきた。そこには、多くの遺伝子活性を抑制し低代謝レベルを維持している休眠結核菌と共有の特質が推定される。高度の reduction evolution の後、らい菌が Ag85 のミコール酸転移酵素活性を抑制しながらも直鎖脂肪酸の転移活性を維持してきたことは大変興味深い。おそらくこの直鎖脂肪酸の転移によって生成される脂質分子は、らい菌の生育あるいは病原性の発揮において minimal requirement として機能する分子であると想像できる。その意味で、この分子を同定し、休眠菌における挙動とその制御機構を解明することは、潜伏感染の理解に大きく貢献することが期待される。

らい菌患者 tuberculoid 型皮膚病変において、GMM 特異的 CD1b 拘束性 T 細胞の存在が明らかとなっている。おそらく宿主生体内で微量に産生された GMM が獲得免疫の標的となり、特異的 T 細胞が活性化されたものと推察される。したがってこの T 細胞応答はきわめて鋭敏な応答である。休眠菌は年余にわたって宿主グルコース基質に暴露されることを考えると、低代謝の休眠菌においても微量の GMM が産生され、それに対する特異的 T 細胞応答が惹起されることが考えられる。この視点は、潜伏感染の免疫診断の観点から重要である。

以上の考察をもとに研究分担者は、GMM や関連するミコール酸含有糖脂質に対する T 細胞応答 (皮膚反応も含む) と液性免疫応答を鋭敏にモニターすることが、潜伏感

染の免疫診断に有用であると考え、次年度以降の研究を立案、遂行する予定である。また Ag85 による直鎖脂肪酸転移反応の生成物の同定を進める。

E. 結論

重要な生物学的特質を休眠結核菌と共有するらい菌において、Ag85 のミコール酸転移酵素としての機能が抑制されていることを明らかにした。一方、直鎖脂肪酸の転移活性は維持されていることから、この反応において生成される分子の同定と機能解析、免疫認識機構の解明が、らい菌および休眠菌の理解に重要と考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakao, H., I. Matsunaga, D. Morita, T. Aboshi, T. Harada, Y. Nakagawa, N. Mori, and M. Sugita. 2009. Mycolyltransferase from

Mycobacterium leprae excludes mycolate-containing glycolipid substrates. J. Biochem. 146: 659-665.

2. 学会発表

- 1) Sugita, M. Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in mycobacteria. 2009. Forty-four Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (福岡, 7月).
- 2) 松永勇、中尾瞳、森田大輔、杉田昌彦. 2008. らい菌のミコール酸転移酵素によるミコール酸糖脂質の産生. 第82回日本生化学会総会 (神戸, 12月).

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

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

休眠性非結核性抗酸菌における菌体構成分子の解析

研究分担者 宮本 友司（国立感染症研究所ハンセン病研究センター・主任研究官）

研究要旨

非結核性抗酸菌 *Mycobacterium avium* complex (MAC) には主要な糖脂質抗原として glycopeptidolipid (GPL) が存在し、その多様な糖鎖構造が約 30 種に及ぶ血清型を規定している。さらに GPL は休眠性を含む MAC の病原性に関わる分子であることが知られている。本研究では、生合成の側面から GPL の機能を解明すべく代表的な血清型として最も多く分離され且つ高病原性として認識されている 4 型血清型 GPL に注目した。まず、未解明である糖鎖生合成について、PCR 等により増幅・単離した 6.8 kb の遺伝子領域を 2 型血清型 GPL 生産組換え *M. smegmatis* 株に導入し、各遺伝子の機能を生化学的解析により同定した。その結果、2 つの遺伝子が 4 型血清型 GPL 糖鎖に特徴的な rhamnose 残基の形成に関与することが判明した。また、休眠状態と関連する環境条件が 4 型血清型 GPL 生合成に及ぼす影響を評価した結果、低栄養や低酸素状態等によりその生合成が大きく変化することが明らかとなった。

A. 研究目的

結核菌を含む抗酸菌の菌体表層には多種多様な糖脂質成分が豊富に存在する。これらの成分は、抗酸菌の休眠性等を含む病原性への関与が指摘されている菌体構成成分の一つである。糖脂質成分に含まれる各分子は、それぞれが様々な役割を担っていることが知られているが、依然としてその機能や生合成には不明なものも多い。非結核性抗酸菌 *Mycobacterium avium* complex (MAC) には主要糖脂質の一つとして glycopeptidolipid (GPL) が存在する。GPL は宿主に対して様々な免疫応答を誘導する能力があることが知られており、MAC の病原性に関与することが示唆されている。また、GPL は単に免疫応答のみならず休眠性などの宿主への抵抗性と関連する菌体の生化学的性状にも大きな影響を及ぼすことも知られている。本研究では、MAC の休眠状態への移行に GPL がどのように関わっているかについて生合成の側面から解析を行

い、その役割について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ATCC35767 株を MAC 4 型血清型標準株として採用し、PCR 用のゲノム DNA 調製等へ使用した。他の血清型で判明しているゲノム配列情報を利用し、特異性を示す領域を増幅するように複数のプライマーセットを設計した。増幅された DNA 断片の塩基配列を決定し、frame plot 解析により ORF 予測を行った。*rtfA*, *mdhA*, *merA* 及び *gftD* の 4 遺伝子が同時に発現するように設計したプラスミドベクターを作製し *M. smegmatis* mc²155 株に導入することにより 2 型血清型 GPL 生産株を構築した。増幅断片に含まれる各 ORF を、染色体組み込みベクター pYM301a を用いて 2 型血清型 GPL 生産株に導入し、得られたそれぞれの株から GPL 成分を単離・精製した。GPL 成分は TLC、GC/MS 及び MALDI-TOF/MS

によって解析し、それぞれに含まれる糖鎖構造を決定した。MAC 4 型血清型株の培養については、グルコース含有培地 (Middlebrook 7H9 Broth + 10% ADC enrichment) 及び 無グルコース培地 (Middlebrook 7H9 Broth + 0.2% Bovine Albumin Fraction V + 0.085% NaCl) を調製して使用し、それぞれに接種を行い、37°C、10 日間培養を行った。また、低酸素培養については、Dubos broth medium で好氣的に培養したものを低酸素環境下へ移動し、さらに培養を行って菌体を調製した。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

GPL と休眠状態との関連を探る上で、最初にその生合成について解析を行った。GPL には多くの血清型タイプが存在しそれらは糖鎖部分の構造により規定されている。中でも最も頻繁に分離される 4 型血清型 GPL の糖鎖生合成は依然として不明である。これまでに解明された血清型の GPL 生合成遺伝子領域を比較すると、それらの多くは共通しているがそれぞれの血清型に特異性を示す領域がある。そこで、4 型血清型株におけるこれらの領域を PCR によって単離するため様々なプライマーを作製し増幅を試みた。その結果、約 6.8 kb の DNA 断片が増幅され、6 つの ORF が含まれることが塩基配列の解析により判明した。BLAST を利用した相同性検索の結果、ORF1 は 2 型血清型株に存在する hemolysin-like protein と約 70 % の相同性を示すタンパク質をコードしていた。また、ORF2 はいくつか細菌由来の methyltransferase と低い相同性を示し、ORF3 は GPL 生合成に必須である糖転移酵素 GtfB の一部領域と相同性を示すことが判明した。さらに、ORF4,5,6 は既に明らかとなっている 3 つの 8 型 GPL 糖鎖生合成酵素とそれぞれが一致することが明らかとなった。

次に 6 つの ORF の中から、機能的に予測

ができない ORF1 (*hlpA4* と命名) 及び ORF2 を選択し、2 型血清型 GPL 生産株への導入を行った。導入株由来の GPL 成分を TLC 解析した結果、*hlpA4* 導入株では、コントロール株で認められる 2 型血清型 GPL が存在せず、構造的に変化した新たな物質が生産されていた。一方、*hlpA4* 及び ORF2 の 2 遺伝子を同時に導入した株では、単独に *hlpA4* を導入した株で認められた生産物がさらに構造的変化を受けている様子が確認された。このことから、*hlpA4* 及び ORF2 の遺伝子産物は 2 型血清型 GPL を構造的に修飾する酵素であることが示唆された。さらに各 ORF 導入株に含まれる GPL 成分の糖鎖を GC/MS によって解析した。その結果、*hlpA4* 導入株ではコントロールと (2 型 GPL の糖鎖と) 同種類の糖鎖が認められたが、rhamnose の相対検出強度がコントロールに比べ大きく観察された。このことは *hlpA4* 導入株の GPL 糖鎖に、コントロールのものに比べエクストラな rhamnose が含まれることを表しており、言い換えれば、*hlpA4* により 2 型 GPL の糖鎖に rhamnose が転移された可能性を示していた。一方、*hlpA4* と ORF2 の同時導入株では、2 型 GPL の糖鎖に加え 4 型 GPL に特徴的な 4-O-methyl-rhamnose が検出された。従って、これらの GC/MS の結果を総合すると、*hlpA4* により 2 型 GPL 糖鎖に rhamnose が転移され、さらに ORF2 がコードする methyltransferase の働きにより rhamnose の 4-O-methyl 化が行われたことが示唆された。すなわちこれらの両遺伝子が 4 型 GPL の特異的糖鎖を形成する能力を有することが明らかとなった。さらに、*hlpA4* の糖転移酵素遺伝子としての機能を確認するため、*hlpA4* 導入株で認められた生産物を精製し、重水素メチル化処理後 GC/MS 解析を行った。その結果、重水素メチル基が導入されたマススペクトルのパターン解析から、本生産物の糖鎖構造は 2 型血清型 GPL の末端 fucose 残基に rhamnose が 1,4 結合で連結していること

が判明し、MAC 由来 4 型 GPL 糖鎖に認められる結合様式と一致していた。これらの結果から、*hlpA4* は、4 型 GPL の特異的糖鎖形成に関与する rhamnosyltransferase 遺伝子をコードすることが確認された。

一方、休眠状態と関係する環境条件について 4 型 GPL の生合成に与える影響を評価した。その結果、栄養欠乏状態を反映する無グルコース培地において、4 型 GPL の生産量がグルコース含有培地に比較して著しく増加していた。また、好気状態から低酸素状態への移行により、それまで菌体に蓄積していた 4 型 GPL が量的に低下する現象が観察された。

D. 考察

休眠性や持続性といった MAC 自身の生理学的又は生化学的特徴と深く関わる性質を解明する上では、菌体構成成分の解析は一つのアプローチと成り得る。本研究では、MAC の主要糖脂質成分である GPL に注目し、生合成とそれを制御する環境条件の解析を試みた。GPL は MAC の血清型を規定する分子である。それらの中でも、本研究で採用した血清型 4 型は最も多く分離される血清型であることから、この血清型 GPL を解析することは MAC 全体を見据えた解明へとつながる可能性がある。

4 型 GPL 生合成の中でも、4 型血清型の様々な特性を決定する特異的糖鎖 4-O-methyl-rhamnose の形成過程及び関与遺伝子についてはこれまで不明であった。候補遺伝子の選定及び 2 型 GPL 生産株を用いた発現解析の結果、*hlpA4* (rhamnosyltransferase ----- 2 型 GPL fucose 残基への rhamnose 転移酵素) 及び ORF2 (methyltransferase ----- *hlpA4* によって転移された rhamnose の 4 位メチル化酵素) の二つを同定した。*hlpA4* については、他の研究によりそのホモログが 2 型 GPL 生合成遺伝子領域内に存在することが示されていた。一方、このアミノ酸配列は他のバクテリアで同定された hemolysin に相同性を示すことから、これらのホモログは GPL

生合成とは関係しない遺伝子であると推測されていた。しかしながら、本研究で hemolysin に相同性を示す遺伝子が糖転移酵素として機能することが示されたことは、酵素化学的な側面からも非常に興味深い。さらに、*hlpA4* の BLAST 検索により、2 型 GPL で確認された以外のホモログの多くが抗酸菌とは異なるシアノバクテリアに認められることが明らかとなった。このことは、MAC が環境細菌として様々なバクテリア群から遺伝子の水平伝播を受けてきた一端を表していると考えられる。また 4 型 GPL 糖鎖生合成遺伝子として今回同定された *hlpA4* 及び ORF2 の隣接領域には、かつて 8 型 GPL 糖鎖生合成遺伝子群として機能が確認されている 3 つの遺伝子がほぼ保存された状態で存在することが判明した。このことは、4 型血清型株が本来 8 型血清型 GPL を生産する能力を保持していたが、*hlpA4* や ORF2 を含む他の遺伝子群の取り込み等によって、8 型から 4 型血清型へと変化した可能性も示している。GPL 糖鎖の改変に伴う血清型の変化は、MAC 自身の生化学的性状に大きな影響を与えることから、病原性の獲得・進化の機構を解明する上においてもこの観察結果は重要な意味を持つと思われる。また、無グルコース培地で GPL 成分が増加し低酸素状態で減少するという結果は、MAC が休眠性と関係する環境状態を感知し生合成の調節を行う機構が存在する可能性を示している。今後は、さらにメカニズムを解明するために、生合成解析で判明した関与遺伝子の発現がどの段階で増減し、また環境因子からのシグナル伝達がどのように生産量へ影響を及ぼしているなどについて詳細な解析が必要と思われる。

E. 結論

MAC の 4 型血清型株が有する GPL の糖鎖生合成について、2 つの関与遺伝子を同定した。また、休眠状態を反映した環境条件が GPL の生合成に影響を与えることが判明した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hatta M., M. Makino, M. Ratnawati, Mashudi, Yadi, M. Sabir, N. Tandirogang, L.M.M. Rusyati, M. Kai, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, T. Mukai, and Y. Maeda. 2010. Detection of serum antibodies to *Mycobacterium leprae* major membrane protein-II in leprosy patients from Indonesia. *Lepr. Rev.* In press.
2. 学会発表
 - 1) 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. 2009. *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（名古屋、3 月）.
 - 2) 甲斐雅規、藤原永年、宮本友司、向井徹、矢野郁也、牧野正彦. 2009. BCG 菌のミコール酸サブクラス合成遺伝子の解析. 第 82 回日本細菌学会総会（名古屋、3 月）.
 - 3) 向井 徹、宮本友司、前田百美、牧野正彦. 2009. 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（出雲、5 月）
 - 4) 前田百美、M. Hatta、R. M. Yadi、M. Sabir、N. Tandirogang、L. M. M. Rusyati、甲斐雅規、向井 徹、宮本友司、福富康夫、牧野正彦. 2009. 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（出雲、5 月）

- 5) Miyamoto, Y., and M. Makino. 2009. Biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* Complex. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and leprosy Research Conference (福岡, 7 月)

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

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
研究分担報告書

休眠期結核菌由来遺伝子を用いた DNA ワクチンの開発研究

研究分担者 小出 幸夫（浜松医科大学・理事）

研究要旨

成人結核のほとんどが内因性再燃に起因するため、結核菌の再燃を抑制する新規ワクチンの開発を試行中である。潜伏期の結核菌が発現する DosR regulon 蛋白（48 種）および結核菌の再活性化に関与する Resuscitation promoting factor (Rpf) 蛋白（5 種）を候補抗原として、DNA ワクチン・ライブラリーを作製した。現在、これらの候補抗原に対する細胞性および体液性免疫応答を、2 系統のマウスを用いて検討中である。32 種類について T 細胞応答のスクリーニングを終えた時点で、C57BL/6 で 9 種類、BALB/c で 12 種類の抗原が T 細胞応答を誘導し、そのうち 7 種類が両系統で T 細胞応答を誘導することができた。加えて一部の抗原について抗体産生を検討したところ、少なくとも C57BL/6 で 2 種類、BALB/c で 11 種類の抗原が抗体産生を誘導できた（2 種類が両系統で抗体産生を誘導）。また、同一系統で両方の免疫応答を誘導できた抗原は C57BL/6 で 1 種類、BALB/c で 7 種類であった。その中でも、Rv3132 (*dosS/desS*) は両系統のマウスで T 細胞応答と抗体産生を共に誘導でき、有望な候補抗原であると考えられた。

A. 研究目的

結核菌感染に対するワクチンとしては、BCG が依然として用いられており、世界の人口の約半分がこの接種を受けている。しかし、BCG の乳幼児粟粒結核に対する有効性は確認されているが、成人の肺結核に対する有効性は疑問視されている。これは BCG の効果が長くても 10~20 年しか維持できないため、「長期潜在性・持続感染から発症する二次性結核（内因性再燃）」が主体である成人の肺結核には対応できないためと考えられる。

結核菌は約 4,000 の遺伝子を保有するが、増殖期に発現する遺伝子と潜伏期に発現する遺伝子は異なることが知られている。そこで、本研究では潜伏期の結核菌が発現する DosR regulon 蛋白（48 種）および結核菌の再活性化に関与する Resuscitation promoting factor (rpf) 蛋白（5 種）を標的として、結核菌の再燃を抑制する新規ワクチ

チンの開発を計画した（潜伏感染および再燃に関連する蛋白についても随時追加する予定）。本研究は、これらの検索を通じて、BCG を初回免疫に、抗潜伏期ワクチンを追加免疫に用いることで、成人の肺結核をも制御できるワクチン戦略の構築をすることを目的としている。

B. 研究方法

結核菌ゲノム情報に基づき、DosR regulon 蛋白および Rpf 蛋白をコードする遺伝子を PCR によって単離し、哺乳類細胞用の発現ベクターである pCI に挿入して、DNA ワクチン・ライブラリーを作成した。また、Histidine-tag を付加した抗原遺伝子を pET28b ベクターに挿入し、目的蛋白を大腸菌発現系によって産生させ、Ni-NTA column を用いて精製した。

遺伝子銃 (Helios Gene-Gun) を用いて、作成した DNA ワクチンでマウス (BALB/c

および C57BL/6) を免疫 (2 μ g、2 週間隔で 3 回) した。最終免疫 2 週間後、免疫マウスの脾細胞を対応する組換え抗原蛋白で 37°C、48 時間刺激し、培養上清中に産生された IFN- γ 量を ELISA 法にて測定して、T 細胞応答を検討した。加えて、免疫マウス血清中の抗原特異的な抗体価を、組換え蛋白を抗原とした ELISA 法にて測定した。

C. 研究結果

スクリーニングの途中経過

	C57BL/6		BALB/c	
	T細胞	抗体	T細胞	抗体
Rv0079	○○	未解析	○×	○○
Rv0080	×	×	×	○○
Rv0081	○○	未解析	×	○○
Rv0569	×	未解析	×	未解析
Rv0571c	×	×	○×	×
Rv0572c	×	×	×	×
Rv0574c	×	×	×	×
Rv1734c	×	×	×	×
Rv1738	×	×	○○	○○
Rv1996	×	×	×	×
Rv1998c	○○	×	○○	○×
Rv2005c	×	×	×	×
Rv2007c	×	未解析	×	未解析
Rv2028c	×	×	×	×
Rv2029c	×	○○	×	○○
Rv2030c	×	×	×	×
Rv2031c	○○	未解析	○○	○○
Rv2032	○○	×	○○	×
Rv2623	○○	未解析	○○	○○
Rv2624c	○○	未解析	○×	○○
Rv2626c	×	未解析	○○	未解析
Rv2628	×	×	○○	×
Rv2629	×	×	×	×
Rv2630	×	×	×	×
Rv2631	×	×	×	×
Rv3126c	×	未解析	×	未解析
Rv3127	○○	×	×	○○
Rv3129	×	×	×	×
Rv3131	×	未解析	○×	未解析
RV3132c	○○	○○	○○	○○
Rv3133c	×	未解析	×	未解析
Rv3134c	×	×	×	×

各群マウス2匹ずつについて検討した。

各シンボルは個体の結果を示す。

DosR regulon 遺伝子群 48 種および Rfp 遺伝子群 5 種を結核菌から単離し、pCl へ挿入して DNA ワクチン・ライブラリーを完成した。2 系統のマウスを用いて、これらの抗原性について検討し、T 細胞応答および抗体産生について以下の結果を得た (左表参照)。

1. T 細胞応答を惹起できた抗原群 (下線は両系統で陽性のものを示す)

1) C57BL/6 (9/32 種類) : Rv0079, Rv0081, Rv1998c, Rv2031c, Rv2032, RV2623, Rv2624c, Rv3127, Rv3132c

2) BALB/c (12/32 種類) : Rv0079, Rv0571, Rv1738, Rv1998c, Rv2031c, Rv2032, RV2623, Rv2624c, Rv2626c, Rv2628, Rv3131, Rv3132c

2. 抗体産生を惹起できた抗原群 (同上)

1) C57BL/6 (2/21 種類) : Rv2029, Rv3132c

2) BALB/c (11/26 種類) : Rv0079, Rv0080, Rv0081, Rv1738, Rv1998c, Rv2029, Rv2031c, RV2623, Rv2624, Rv3127, Rv3132c (同上)

3. T 細胞応答/抗体産生の両方が惹起できた抗原群 (同上)

1) C57BL/6 : Rv3132c

2) BALB/c : Rv0079, Rv1738, Rv1998c, Rv2031c, RV2623, Rv2624, Rv3132c

D. 考察

1. 現時点でのスクリーニングの総括と今後の予定

これまでに、T 細胞応答と抗体産生の両方を惹起できる抗原を C57BL/6 で 1 種類、BALB/c で 7 種類同定した。今後、これらの抗原群を中心に、動物モデルを用いた感染実験とヒトでの免疫応答の検討を行う予定である。特に Rv3132c は、(1) 2 系統のマウスで細胞性および体液性免疫応答の両方を誘導することが可能であること、(2) *dosS/desS* をコードしている遺伝子であり、潜伏期において遺伝子産物が発現している可能性が高いことから、有望な候補抗原と考えられる。加えて、スクリーニングが終了していない抗原群についても、スクリーニングを継続する。

ニングを継続する。

2. 研究遂行上での問題点と対応

一部の蛋白（特に Rpf 蛋白群）については大腸菌での発現が困難で、研究遂行上での律速段階となっている。ベクター／プロモーター／大腸菌宿主／使用コドンの最適化等についての条件検討を行ったが、大腸菌を用いた産生系では、残念ながら発現を改善することはできなかった。その対策として、現在 *M. smegmatis* での蛋白発現系の樹立を試みているが、予備実験で発現の改善が見られたものもあり、引き続き検討する予定である。また、それでも発現が不可能なものについては、バキュロウイルスや酵母の産生系で対応を試みる予定である。

E. 結論

休眠期結核菌由来遺伝子（DosR regulon 遺伝子群 48 種および Rfp 遺伝子群 5 種）の DNA ワクチン・ライブラリーを完成した。そのうち、32 種類の候補抗原の免疫原性を 2 系統のマウスで検討し、T 細胞応答／抗体産生の両方で免疫反応を惹起できる抗原を、C57BL/6 で 1 種類、BALB/c で 7 種類同定した。中でも Rv3132c は両系統で両方の免疫応答を誘導でき、有望な候補抗原と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ichikawa, T., Y. Kageyama H. Kobayashi, N. Kato, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Etanercept treatment reduces the serum levels of interleukin-15 and interferon-gamma inducible protein-10 in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* (in press)
- 2) Seto, S., S. Matsumoto, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Interaction of lysosomal markers with phagosome containing *Mycobacterium tuberculosis* in macrophage. *Microbiol. Immunol.* (in press)
- 3) Suzuki, D., T. Nagata, G. Eweda, S.

Matsumoto, M Matsumoto, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) using DNA vaccination. *Vaccine* (in press)

- 4) Wang, L.-X., T. Nagata, K. Tsujimura, M. Uchijima, S. Seto, and Y. Koide. 2010. Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51 overlapping peptides screening and DNA vaccination. *Vaccine* (in press)
- 5) Tsujimura, K., Y. Ikehara, T. Nagata, Y. Koide, and N. Kojima. 2009. Induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposomes targeting to peritoneal macrophages. *Procedia Vaccinology* 1: 127-134.
- 6) Seto, S., S. Matsumoto, I. Ohta, K. Tsujimura, Y. Koide. 2009. Dissection of Rab7 localization on *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Biochem Biophys Res Commun* 387: 272-277.
- 7) Aoshi, T., J. A. Carrero, V. Konjufca, Y. Koide, E. R. Unanue, and M. J. Miller. 2009. The cellular niche of *Lesteria monocytogenes* infection changes rapidly in the spleen. *Eur. J. Immunol.* 39: 417-425.

2. 学会発表

- 1) Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Proteomic analysis revealed the interaction of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome with ER. 第 83 回日本細菌学会（横浜、3 月）.
- 2) Nagata, T., G. Eweda, D. Suzuki, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. 第 83 回日本細菌学会

- (横浜、3月) .
- 3) Nagata, T., G. Eweda, D. Suzuki, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. 第 83 回日本細菌学会 (横浜、3月) .
 - 4) Yamamura, Y., S. Seto, M. Uchijima, H. Hodumi, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Immune responses against latency-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. 第 83 回日本細菌学会 (横浜、3月) .
 - 5) Uto, T., M. Uchijima, S. Seto, T. Nagata, T. Suda, K. Chida, H. Nakamura, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Genetic fusion of *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 to a mycobacterial antigen MPT51 augments the antigen-specific T cell responses. 第 83 回日本細菌学会 (横浜、3月) .
 - 6) Yamamura, Y., S. Seto, M. Uchijima, H. Hodumi, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Immunogenicity of dormancy-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. DNA vaccine 2010. (New Orleans, U.S.A., 3月)
 - 7) Eweda, G, D. Suzuki, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secreted proteins (CFP11, CFP17, and TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis* with DNA immunization. DNA vaccine 2010. (New Orleans, U.S.A., 3月)
 - 8) Yamamura, Y., S. Seto, M. Uchijima, H. Hodumi, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2009. Immunogenicity of latency-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会. (大阪、12月)
 - 9) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2009. 結核菌ファゴソームのプロテオミクスによる分子解剖. 第 92 回日本細菌学会関東支部総会. (東京、11月) .
 - 10) Uto, T., M. Uchijima, S. Seto, T. Nagata, T. Suda, K. Chida, H. Nakamura, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2009. Genetic fusion of heat-shock protein 70 to a mycobacterial antigen enhances the antigen-specific T cell responses. Vaccine 3rd Global Congress. (Singapore, Singapore, 10月).
 - 11) Seto, S. and Y. Koide. 2009. Alternative localization of Rab GTPases to phagosome containing *Mycobacterium tuberculosis* in inhibition of phagolysosome biogenesis. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (東京、11月).

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 |

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

持続性潜在抗酸菌感染を検出する臨床診断法の開発に関する研究

研究分担者 前倉 亮治（国立病院機構刀根山病院・副院長）
研究協力者 北田 清悟（国立病院機構刀根山病院・呼吸器科・医長）

研究要旨

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。日本国内における多施設共同研究により、MAC 特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL 核) 抗原に対する血清 IgA 抗体の検出の診断的有用性は感度：84%、特異度：100%であることは既に報告した。MAC 感染症の罹患や宿主免疫応答に地域や人種による差異を解析するため、今回、異なる人種・地域（国立ユダヤ医療研究センター：デンバー市、コロラド州、アメリカ合衆国と国際共同研究）、さらに、潜在性 MAC 感染における有用性について検証した。対象者（総数：124 名、年齢：54.2 ± 16.9、男：女 = 96：28、人種：白人；110、アジア系；8、アフリカ系；3、その他；3 名）であり、活動性肺 MAC 感染症（47 例）における血清抗体価は 2.95 ± 3.86 IU/mL、非活動性肺 MAC 感染症（10 例）における血清抗体価は 1.63 ± 2.83 IU/mL、非 MAC 感染症（8 例）：0.1 ± 0.06 IU/mL、なお、健常者（52 例）は 0.22 ± 1.11 IU/mL であった。これら成績から、感度：77%、特異度：94%であることが判明した。非活動性肺 MAC 感染症（10 例）における陽性率（カットオフ値 > 0.3 U/mL を示す割合）は 59%、さらに、健常者（52 例）における陽性率は 6%であり、潜在性 MAC 感染症を示唆する成績を得ることができた。肺 MAC 感染症の血清抗 MAC-GPL 抗体の検出による血清診断は異なる人種・地域、さらに、潜在性 MAC 感染の診断に有用であることが判明した。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<—現行診断基準：1 か月以上）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。

A. 研究目的

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。日本国内における多施設共同研究により、MAC-GPL 核抗原に対する血清 IgA 抗体の検出の診断的有用性は感度：84%、特異度：100%であることを既に報告した。

MAC 感染症の罹患や宿主免疫応答に地域や人種による差異を解析するため、今回、異なる人種・地域、さらに、潜在性 MAC 感染における有用性について検証した。

B. 研究方法

Mycobacterium avium complex (MAC) 感染症の血清診断（有用性：感度や特異度）に関し、地域や人種差を確認するため、国立ユダヤ医療研究センター：デンバー市、コロラド州、アメリカ合衆国と国際共同研究を実施した。対象者（総数：124 名、年齢：54.2 ± 16.9、男：女 = 96：28、人種：

白人；110、アジア系；8、アフリカ系；3、その他；3名）を登録した。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（47例）非活動性 MAC 感染（10例）、非 MAC 疾患（8例）、および健常者（52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。

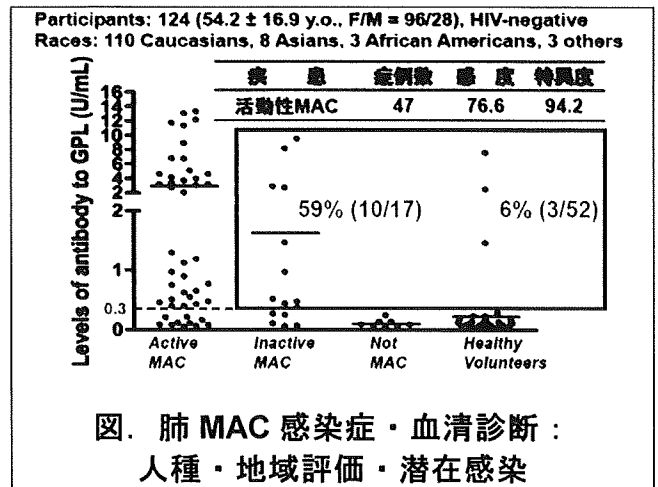
（倫理的配慮）

患者血清採取に際し、医療機関（国立病院機構刀根山病院：大阪府豊中市、国立ユダヤ医療研究センター：デンバー市、コロラド州、アメリカ合衆国）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。

C. 研究結果

血清抗 MAC-GPL 核-IgA 抗体価の陽性・陰性カットオフ値を 0.3 U/mL に設定した。活動性肺 MAC 感染症（47例）における血清抗体価は 2.95 ± 3.86 IU/mL、非活動性肺 MAC 感染症（10例）における血清抗体価は 1.63 ± 2.83 IU/mL、非 MAC 感染症（8例）： 0.1 ± 0.06 IU/mL、なお、健常者（52例）は 0.22 ± 1.11 IU/mL であった。これら成績から、国立ユダヤ医療研究センターにおける感度：77%、特異度：94%であることが判明した。

非活動性肺 MAC 感染症（10例）における陽性率（カットオフ値 > 0.3 U/mL を示す割合）は 59%、さらに、健常者（52例）における陽性率は 6%であり、潜在性 MAC 感染症を示唆する成績を得ることができた。



D. 考察

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。日本において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。他方、アメリカ合衆国では検査室における MAC など非結核性抗酸菌の検出頻度は結核菌検出数を凌駕しており、MAC 感染症は漸増している。MAC は環境菌であり、診断確定に臨床所見（症状、画像所見、複数の各単培養陽性）を考慮するため、長期間（少なくとも 1 か月）を要する。また、MAC は抗微生物薬に対し多剤耐性を示すため、治療に難渋し、根治は困難である。MAC 感染症は「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）」の対象外疾患であるが、多くの肺 MAC 感染症患者は喀痰抗酸菌塗抹陽性の時点で「肺結核」（2 類感染症）として届けられ、隔離を余儀なくされているのが実情である。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%）。

血清抗 MAC-GPL 核-IgA 抗体価の陽性・

陰性カットオフ値を 0.3 U/mL に設定した。活動性肺 MAC 感染症 (47 例) における血清抗体価は 2.95 ± 3.86 IU/mL、非活動性肺 MAC 感染症 (10 例) における血清抗体価は 1.63 ± 2.83 IU/mL、非 MAC 感染症 (8 例) : 0.1 ± 0.06 IU/mL、なお、健常者 (52 例) は 0.22 ± 1.11 IU/mL であった。これら成績から、感度 : 77%、特異度 : 94% であることが判明した (図)。

非活動性肺 MAC 感染症 (10 例) における陽性率 (カットオフ値 > 0.3 U/mL を示す割合) は 59%、さらに、健常者 (52 例) における陽性率は 6% であり、潜在性 MAC 感染症を示唆する成績を得ることができた (図 : 赤枠)。

肺 MAC 感染症の血清抗 MAC-GPL 抗体の検出による血清診断は異なる人種・地域、さらに、潜在性 MAC 感染の診断に有用であることが判明した。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 < 現行診断基準 : 1 か月以上) 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

肺 MAC 感染症の血清抗 MAC-GPL 抗体の検出による血清診断は異なる人種・地域、さらに、潜在性 MAC 感染の診断に有用であることが判明した。血清診断は体外診断であるため安全、そして、簡便・迅速 (所要 : 約 3 時間 < 現行診断基準 : 1 か月以上) であり、有用性が高いと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.

- 2) Nishiuchi Y, A. Tamura, **S. Kitada**, T. Tagur, **S. Matsumoto**, Y. Tateishi, M. Yoshimura, Y. Ozeki, N. Matsumura, H. Ogura, and **R. Maekura**. 2009. *Mycobacterium avium* complex organisms predominantly colonize in the bathtub inlets of patients' bathrooms. *Jpn J Infect Dis.* 62: 182-186.

- 3) **Kitada, S.**, K. Kobayashi, Y. Nishiuchi, K. Fushitani, K. Yoshimura, Y. Tateishi, K. Miki, M. Miki, H. Hashimoto, M. Motone, T. Fujikawa, T. Hiraga, and **R. Maekura**. Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex proven by bronchial wash culture. *Chest* In press.

2. 学会発表

- 1) 西内由紀子、田栗貴博、**松本壮吉**、立石善隆、**北田清悟**、田丸亜貴、鈴木定彦、**前倉亮治**. 肺 *Mycobacterium avium* complex 症患者由来 *M. avium* と豚由来 *M. avium* の血清型比較. 第 84 回日本結核病学会総会 2009 年 5 月 札幌

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小林和夫	マイコバクテリウム属 (抗酸菌)	平松啓一、 中込 治	標準微生物学 第10版	医学書院	東京	2009	286 - 298
大原直也、 小林和夫	抗酸菌 (マイコバクテリア) 感染症.	井上修二、 上原誉志夫、 金澤真雄、川 口 実、代田 常道	コンパクト内 科学	金芳堂	京都	2009	418 - 420

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Seto, S., S. Matsumoto , I. Ohta, K. Tsujimura, and Y. Koide	Differential recruitment of CD63 and Rab7-interacting-lysosomal-protein to phagosomes containing <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in macrophages	Microbiol Immunol	印刷中		2010
Ozeki, Y., I. Sugawara, T. Udagawa, T. Aoki, M. Osada-Oka, Y. Tateishi, H. Hisaeda, Y. Nishiuchi, N. Harada, K. Kobayashi , and S. Matsumoto .	Transient role of CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatory T cells in mycobacterial infection in mice	Int Immunol	印刷中		2010
Suzuki D., T. Nagata, G. Eweda, S. Matsumoto , M. Matsumoto, K. Tsujimura, Y. Koide .	Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) using DNA vaccination	Vaccine	印刷中		2010
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 .	Mycobacteria exploit host hyaluronan for efficient extracellular replication	PLoS Pathog	5	e1000643	2009
Tateishi, Y., Y. Hirayama, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura, J.	Virulence of <i>Mycobacterium avium</i> complex strains isolated from immunocompetent patients	Microb Pathog	46	6 - 12	2009

Kang, A. Shibata, K. Hirata, S. Kitada, R. Maekura, H. Ogura, K. Kobayashi , and S. Matsumoto					
Wada, T., S. Fujihara, A. Shimouchi, M. Harada, H. Ogura, S. Matsumoto , and A. Hase	Virulence of <i>Mycobacterium avium</i> complex strains isolated from immunocompetent patients	Tuberculosis	89	252 - 255	2009
Okazaki, M., K. Ohkusu, H. Hata, H. Ohnishi, K. Sugahara, C. Kawamura, N. Fujiwara, S. Matsumoto , Y. Nishiuchi, K. Toyoda, H. Saito, S. Yonetani, Y. Fukugawa, M. Yamamoto, H. Wada, A. Sejimo, A. Ebina, H. Goto, T. Ezaki, and T. Watanabe.	<i>Mycobacterium kyorinense</i> sp. nov., a novel, slow-growing species, related to <i>Mycobacterium celatum</i> , isolated from human clinical specimens	Int J Syst Evol Microbiol	59	1336 - 1341	2009
Seto, S., S. Matsumoto , I. Ohta, K. Tsujiwara, and Y. Koide	Dissection of Rab7 localization on <i>Mycobacterium tuberculosis</i> phagosome	Biochem Biophys Res Commun	387	272 - 277	2009
Nishiuchi, Y., A. Tamura, S. Kitada, T. Taguri, S. Matsumoto , Y. Tateishi, M. Yoshimura, Y. Ozeki, N. Matsumura, H. Ogura, and R. Maekura	<i>Mycobacterium avium</i> complex organisms predominantly colonize in the bathtub inlets of patients' bathrooms	Jpn J Infect Dis	62	182 - 186	2009
Kitamura, A., S. Matsumoto , and I. Asahina	Growth inhibition of HeLa cell by internalization of <i>Mycobacterium</i> <i>bovis</i> Bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo	Cancer Cell Int	9	30	2009
Nakao H., I Matsunaga, D Morita, T Aboshi, T Harada, Y Nakagawa, N. Mori, M Sugita	Mycolytransferase from <i>Mycobacterium leprae</i> excludes mycolate-containing glycolipid substrates	J Biochem	146	659 - 665	2009
Hatta M., M. Makino, M. Ratnawati, Mashudi, Yadi, M.	2010. Detection of serum antibodies to <i>Mycobacterium leprae</i> major membrane protein-II in leprosy patients from Indonesia	Lepr Rev	印刷中		2010

Sabir, N. Tandirogang, L.M.M. Rusyati, M. Kai, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto , T. Mukai, and Y. Maeda					
Ichikawa T., Y. Kageyama, H. Kobayashi, N. Kato, K. Tsujimura, Y. Koide .	Etanercept treatment reduces the serum levels of interleukin-15 and interferon-gamma inducible protein-10 in patients with rheumatoid arthritis	Rheumatol Int	印刷中		2010
Seto S., S. Matsumoto, K. Tsujimura, Y. Koide .	Interaction of lysosomal markers with phagosome containing <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in macrophage	Microbiol Immunol	印刷中		2010
L.-X. Wang, T. Nagata, K. Tsujimura, M. Uchijima, S. Seto, Y. Koide .	Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> using MPT51 overlapping peptides screening and DNA vaccination	Vaccine	印刷中		2010
Tsujimura K., Y. Ikehara, T. Nagata, Y. Koide , N. Kojima.	Induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposomes targeting to peritoneal macrophages	Procedia Vaccinol	1	127 - 134	2009
Aoshi, T. J. A. Carrero, V. Konjufca, Y. Koide , E. R. Unanue, M. J. Miller	The cellular niche of <i>Listeria monocytogenes</i> infection changes rapidly in the spleen	Eur J Immunol	39	417 - 425	2009
Kitada, S. , K. Kobayashi , Y. Nishiuchi, K. Fushitani, K. Yoshimura, Y. Tateishi, K. Miki, M. Miki, H. Hashimoto, M. Motone, T. Fujikawa, T. Hiraga, and R. Maekura	Serodiagnosis of pulmonary disease due to <i>Mycobacterium avium</i> complex proven by bronchial wash culture	Chest	印刷中		2010

IV. 研究成果の刊行物・別刷

⑥ クリプトバクテリウム属 *Cryptobacterium* 属

C. curtum の1菌種よりなる。ユウバクテリウム様の性状を持つ。嫌気要求度が強い菌である。ヒト歯周ポケットから分離されるが、歯周病との関連は不明である。

⑦ エガテラ *Eggerthella* 属

E. lenta (従来の *Eubacterium lentum*) の1菌種よりなる。膿瘍、創傷感染部、血液などから混合感染菌の1つとして本菌が分離される。

⑧ ホルデマニア *Holdemania* 属

H. filiformis の1菌種よりなる。ユウバクテリウム様の性状を持つ。ヒト糞便中から分離される。

⑨ モギバクテリウム *Mogibacterium* 属

M. timidum (従来の *Eubacterium timidum*)、*M. pumilum*、*M. vesicum* など5菌種よりなる。フェニル酢酸塩を産生するのが特徴である。ヒト歯周病患者から分離されるが、本症との関連は不明である。

⑩ スラキア *Slackia* 属

S. exigua (従来の *Eubacterium exiguum*) と *S. heliotrinireducens* の2菌種よりなる。アトポビウム属、エガテラ属と類似した性状を持つ。ヒト歯周病患者から分離されるが、本症との関連は不明である。 (神谷 茂)

C マイコバクテリウム属 (抗酸菌)

▶ 分類

抗酸菌は分類学的に、真菌(myco-)と細菌(bacterium)の中間に位置する微生物群を意味する。抗酸菌属の分類や同定には、① 発育・増殖速度、集落の性状(形状、色調や光反応性)、② 生化学的性状(代謝・酵素活性、鉄取り込み、食塩耐性、脂質)、さらに、③ 遺伝子解析などが有用である。なお、基準菌種は結核菌 *M. tubercu-*

losis である(表 IV-52)。

② 疫学

世界の年間総死亡数は約5,800万人、その内訳として、循環器疾患：約1,750万人、感染症：約1,400万人、悪性新生物：約760万人であり、感染症は現在でも全世界の総死亡の約1/4を占め、人類に大きな健康被害を招来している。感染症による死亡(約1,400万人/年)の主要な原因として、急性呼吸器感染症(肺炎など)：376万人、後天性免疫不全症候群(エイズ AIDS：結核の合併を含む)：283万人、下痢性疾患：168万人、結核：141万人、マラリア：89万人や麻疹(はしか)：55万人などがある(表 IV-53)。

抗酸菌感染症には結核 tuberculosis、非結核性抗酸菌 nontuberculous mycobacteria (NTM) 感染症やハンセン病 leprosy (Hansen's disease) などがあり、現在でも、多くの抗酸菌感染症患者が存在し、人類に甚大な健康被害を与えている。

③ 形態・染色性

抗酸菌は桿菌で(0.2~0.6×1~10 μm)細胞壁は脂質に富み、そのため、アニリン色素に難染色性、グラム染色陽性である。いったん染色されると、酸アルコールに脱色されにくい(抗酸性：acid-fastness, 図 IV-53)。なお、“抗酸性”を示す細菌として、抗酸菌 *Mycobacterium* 属、*Nocardia* 属、*Corynebacterium* 属、*Actinomyces* 属や *Rhodococcus* 属があり、抗酸性染色で“赤染桿菌”として観察されるので、注意を要する。

④ 生物学的性質

抗酸菌 *Mycobacterium* 属は *Mycobacteriaceae* 科に属し、DNA塩基構成の特徴として guanine + cytosine (GC) 含有量(62~70%)が高い。また、偏性好気性、芽胞非形成、非運動性である。増殖倍加時間は菌種により異なるが、2~20時間以上であり、集落形成に2日~8週間を要し、至適発育温度は30~45°Cである。なお、らい菌 *M. leprae* は人工培地における培養は成功していない。

紫外線照射を回避した場合、抗酸菌は環境中で数週間~数か月、生存可能である。加熱処理(65°C以上、30分以上)や紫外線照射(日光曝露を