

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

結核菌の新規病原因子に関する分子生物学的解析

研究分担者 松本 壮吉（大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学）
研究協力者 仁木 満美子（大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学）

研究要旨

結核菌は代謝活性の低下した休眠状態で潜伏感染することが知られており、結核発病の多くは潜伏感染からの再燃に起因している。結核の化学療法の問題点の一つとして、現行の抗結核薬の一つであるイソニアジド (INH) が潜伏感染した結核菌に十分な殺菌効果を示さないことがあげられる。我々は、定常期以降の抗酸菌菌体内で発現が増強することが知られているヒストン様蛋白質 Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)が転写・翻訳を抑制する活性を有することに着目し、この分子が菌の抗結核薬感受性に影響を与えるか検討を行った。その結果、MDP1 欠失により菌の INH 感受性が増強することが明らかになった。マイクロアレイを用いた解析では、INH 耐性に関与する遺伝子のうち *katG* の発現が MDP1 欠失により上昇することがわかった。また、リアルタイム RT-PCR を用いた実験でも同様の結果が得られた。抗 KatG 抗体を用いたウエスタンブロット解析では、MDP1 欠失株において KatG 発現量が増強していることが明らかになった。さらに、活性染色により、MDP1 欠失株では KatG による INH の活性化が亢進していることがわかった。MDP1 は定常期以降の菌体で発現が増強することから、潜伏感染菌の INH 耐性化に関わる因子の一つであることが示唆された。

A. 研究目的

多くの細菌感染症において、抗菌薬を用いた化学療法による菌の根絶が治療において不可欠である。しかしながら、結核治療を困難にする最も重大な問題点として、投薬期間が非常に長期にわたること、さらに現行の抗結核薬が潜在性結核には無効であることがあげられる。一般的な結核の化学療法は、初回治療としてまず INH、RFP 及び PZA に SM または EB を加えた 4 剤併用療法を 2 ヶ月間行い、その後 INH 及び RFP の 2 剤併用療法を 4 剤併用療法開始時から 6 ヶ月 (180 日) を経過するまでの期間行うとされているが、それでも治療後の再発率が 2~3%に達するとの報告がある。このような治療長期化の背景には、結核菌の遅発育性と薬剤耐性の獲得があるとされるが、

なかでも潜伏感染菌は長期間宿主内で生存することにより、遺伝子的には変異が見られないものの、表現型のみ薬剤抵抗性を獲得することが知られている。特に定常期以降の抗酸菌は INH に対し抵抗性を示すことが報告されており、治療のうえで問題視されている。

INH 抵抗性の獲得については詳細なメカニズムは解明されていないが、結核菌は潜伏感染する際に、劇的な代謝の制御を行うことで長期間の生存を可能としていることから、INH 標的遺伝子の発現に変化が生じている可能性が疑われる。我々は定常期以降の抗酸菌菌体内に大量に発現する蛋白質であり、染色体の安定化およびストレス防御に関与するとの報告がなされている転写因子である MDP1 に着目し、この分子が

抗酸菌の定常期薬剤抵抗性に関与するか解析を行った。

B. 研究方法

1. 薬剤感受性試験

速育型抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* mc²155 株 (WT) およびそれを親株とした MDP1 欠失株 (KO) ならびに補填株 (Comp) については、LB 液体培地にて OD₆₀₀ = 0.1 相当に調製した。その後、各種抗菌薬を添加した LB 培地に菌液を接種し 37°C で 48 時間培養した。培養後、LB 寒天培地に接種し、CFU を算出して薬剤非添加で培養した際の CFU と比較した。

2. MDP1 欠失による遺伝子発現変化の解析

M. smegmatis WT 株および KO 株菌体は Trizol で懸濁したのち機械的に破碎し、Total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析およびリアルタイム RT-PCR 解析を行った。マイクロアレイはロシュ・ダイアグノスティック株式会社によるカスタムアレイを使用した。ハイブリダイゼーション装置は MAUI (BioMicro 社) を、解析装置は GenePix 4000B (Axon 社)、シグナル解析は NimbleScan ver2.3 (Nimblegen 社) を用いて行った。得られたデータの解析は GeneSpring (アジレント・テクノロジー株式会社) により行った。抽出した各菌株の RNA からの逆転写反応には High-Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いた。SYBR Green によるリアルタイム PCR 解析は ABI 7500 Fast (Applied Biosystems) により行った。

3. SDS-PAGE およびウエスタンブロット解析

各菌株菌体は PBS およびガラスビーズと混合したのち Mini Bead-beater にて破碎し、遠心後の上清を回収した。得られた抽出蛋白質は SDS 含有 12% ポリアクリルアミドゲルにて分離後 PVDF メンブレンに転写した。MDP1 および KatG の検出には、抗 MDP1 マウスモノクローナル抗体および

抗 KatG ウサギポリクローナル抗体を用いた。

4. Native PAGE および Nitroblue tetrazolium を用いた活性染色

INH はカタラーゼ活性を有する抗酸菌蛋白質 KatG により活性化される際、活性酸素を生じることが知られている。この性質を利用し、活性酸素による Nitroblue tetrazolium (NBT) の還元により生じたホルマザンの精製による活性染色を行った。まず、3 で得られた抽出蛋白質を未変性状態で 12% ポリアクリルアミドゲルにより分離後、50 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) に浸漬した。その後 INH、Nitroblue tetrazolium および H₂O₂ を添加し、室温で 30 分震盪した。

(倫理面への配慮)

本研究は該当しない。

C. 研究結果

1. MDP1 欠失株は INH 感受性増強および *katG* の転写亢進が観察される。

M. smegmatis WT, KO, Comp 株において、各種抗生剤に対する感受性を比較した。その結果、RFP, LVFX, EB に対する感受性はすべての株において差が認められなかった。これに対し、INH に対する感受性は MDP1 欠失により増強することがわかった。INH 耐性については、そのメカニズムからいくつかの遺伝子の関与がすでに報告されているため、マイクロアレイ解析によりこれらの遺伝子の発現の変化を MDP1 の有無で比較した。その結果、イソニコチン酸アシルと NADH をカップリングし、INH を活性型に変化させるカタラーゼをコードする遺伝子 *katG* の発現が MDP1 欠失により有意に増強することがわかった。リアルタイム RT-PCR の結果からも、MDP1 欠失により *katG* の発現が 2 倍程度増強することが確認された。以上のことから、MDP1 が *katG* の転写を抑制し、INH が活性型に転じるのを抑制することにより薬剤抵抗性を獲得している可能性が示唆された。

2. MDP1 欠失により KatG の発現が増強し、INH の酸化が促進される。

実際に MDP1 の有無により KatG 蛋白質の発現量に変化があるかを検討するために、抗 KatG 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、MDP1 KO 株においては KatG の発現増強が認められた。次に、KatG の発現増強により INH の活性化が促進されることを確認するために、NBT を基質とした活性染色を行った。その結果、MDP1 KO 株においては他の 2 株と比較して INH 依存的な活性酸素産生による NBT の還元が促進されることが明らかになった。以上より、MDP1 欠失により KatG の発現が増強し、それに伴い菌体内での INH 活性化が亢進することにより感受性が増強することがわかった。

3. MDP1 の発現は経時的に増強し、それに伴い KatG の発現が減弱することにより表現型のみの薬剤抵抗性が生じる。

これまでの研究により、MDP1 は定常期以降に発現が上昇することがわかっている。そこで、MDP1 の経時的な発現の変化が KatG の発現および菌の INH 感受性に影響を与えるかを *M. smegmatis* WT 株を用いて検討した。ウエスタンブロット解析により、対数増殖期と定常期の菌体における MDP1 および KatG の発現の変化を観察したところ、MDP1 が経時的に発現増強するのに反比例し、KatG の発現は経時的に減弱することが明らかになった。同様に、増殖期および定常期の菌体を用いて INH 感受性を比較したところ、定常期の菌体はより INH 抵抗性であることが確認された。以上のことから、定常期における INH 抵抗性は MDP1 の発現増加により KatG 発現が抑制されることにより起こることが明らかになった。

D. 考察

MDP1 は抗酸菌特異的ヒストン様蛋白質であり、結核菌を含む抗酸菌群において広く保存されている。クロマチン結合蛋白質は菌の染色体構造の維持に関与し、同時に

転写や翻訳を制御することが知られていることから、MDP1 も転写因子の一つとして機能していると考えられている。本研究では、MDP1 が INH の活性化に関与する酵素である KatG の発現を制御していることが明らかになった。KatG はカタラーゼ活性を有し、活性酸素である過酸化水素を分解し水と酸素を生じることから、結核菌が宿主内において酸化ストレスを受ける際に抗酸化物質として働き、菌の生存を助けると考えられている。我々のこれまでの研究から、MDP1 もフェロキシダーゼ活性により鉄存在下で過酸化水素を水に変換することが明らかになっている。つまり両蛋白質は、過酸化水素の消去において同様の機能を有する。そのために、KatG と MDP1 の発現は相反して調節されているのではないかと推察される。実際に *M. smegmatis* 野生株において、KatG と MDP1 発現量は相反して調節されており、それが定常期以降の INH 抵抗性をもたらしたのではと考えられる。

MDP1 は、細菌の増殖を抑制する活性があり、静止期や休眠期において発現が増強するとの報告がある。MDP1 の結核菌における発現調節機構は不明であるが、本研究の結果から、ヒト型結核菌においても MDP1 が KatG の発現調節を介して、特に定常期以降の INH 抵抗性に関わる可能性が示唆される。これまでの研究により、MDP1 欠失により休眠期の遺伝子発現に顕著な抑制が観察されることから、この分子による代謝調節が潜伏感染菌の薬剤抵抗性に関与していると考えられている。現行の抗結核薬は増殖期の代謝に関わる分子をターゲットとしたものであり、休眠菌には無効であることが問題となっていた。休眠菌に有効な新規薬剤の開発には休眠期特異的な代謝に関与する分子の同定が必須であると考えられることから、MDP1 の発現により転写の調節が行われる分子を明らかにすることで、休眠期特異的な新規薬剤標的分子の同定が期待される。

E. 結論

MDP1 は定常期以降の表現型 INH 抵抗性

の獲得に関与することが明らかになった。
また、その抵抗性は INH 活性化を担う分子
である KatG の発現抑制によるものである
ことが明らかになった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takatsuka, M., M. Osada-Oka, E.F. Satoh, K. Kitadokoro, Y. Nishiuchi, M. Niki, M. Inoue, K. Iwai, T. Arakawa, Y. Shimoji, H. Ogura, K. Kobayashi, A. Rambukkana, and **S. Matsumoto**. 2011. A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction. PLoS One 6: e20985.
- 2) Ozeki, Y., Y. Hirayama, T. Takii, S. Yamamoto, K. Kobayashi, and **S. Matsumoto**. 2011. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. Vaccine 29: 6881-6887.
- 3) Kasahara, E., A. Sekiyama, M. Hori, K. Hara, N. Takahashi, M. Konishi, E. F. Sato, **S. Matsumoto**, H. Okamura, and M. Inoue. 2011. Mitochondrial density contributes to the immune response of macrophages to lipopolysaccharide via the MAPK pathway. FEBS Lett 585: 2263-2268.
- 4) **松本 壮吉**, 2011. 結核菌の病原性および増殖制御機構の分子遺伝学的解析と応用研究、日本細菌学会誌、66: 531-537.

総説

- 1) Kobayashi, K., M. Ato, and **S. Matsumoto**. 2011. Global threats and the control of multidrug-resistant tuberculosis. J. Disaster Res. 6: 443-450.
- 2) 仁木 満美子、仁木 誠、尾関 百合子、岡 真優子、**松本 壮吉**. 2011. 結核研究の新たな展開—潜在性結核と結核菌：休眠現象の分子メカニズム—、最新医学、Vol66 3号、P149-155.

著書

- 1) 西内 由紀子、立石 善隆、山田 毅、**松本 壮吉**. 2011. 人獣共通感染症、木村 哲、喜田 宏 編集、非結核性抗酸菌症 改訂版、医薬ジャーナル社、337-342.
- 2) Niki M and **Matsumoto S**. 2011. Host and bacterial factors that regulate *Mycobacterium tuberculosis* infection and persistence. Yamamoto S, Maeyama J, and Takii T editors. BCG vaccine and adjuvant, Japan anti-tuberculosis association, Tokyo, 215-238.

2. 学会発表

- 1) **松本壮吉**. 潜在性結核の分子機構と結核制圧研究. 第 28 回日本医学会総会 2011 年 4 月 東京.
- 2) 立石善隆, 北田清悟, 前倉亮治, **松本壮吉**. 結核血清診断の進歩. 第 86 回日本結核病学会総会 2011 年 6 月 東京.
- 3) 森田康裕, **松本壮吉**, 小林和夫, 木下タロウ. マンナン生合成の異常は結核菌細胞壁のバリア機能を弱め、結核菌をβラクタム系薬剤感受性にする. 第 86 回日本結核病学会総会 2011 年 6 月 東京.
- 4) 仁木誠, 仁木満美子, **松本壮吉**. 抗酸菌の薬剤感受性におけるヒストン様蛋白質の機能解析. 第 86 回日本結核病学会総会 2011 年 6 月 東京.
- 5) 西内由紀子, **松本壮吉**, 立石善隆, 北田清悟, 前倉亮治. 環境から分離した *Mycobacterium avium* のバイオフィルム. 第 86 回日本結核病学会総会 2011 年 6 月 東京.
- 6) **Matsumoto, S**. HOST FACTORS HAVING AN IMPACT ON THE GROWTH OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*. International Union Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 7) Nishiuchi, Y., **S. Matsumoto**, Y.

- Tateishi, N. Yamaguchi, M. Nasu. BIOFILM FORMATION OF MYCOBACTERIUM AVIUM ISOLATED FROM LIVING ENVIRONMENT. International Union Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 8) Maeyama, J.-i., S. Iho, M. Osada-Oka, **S. Matsumoto**, M. Isaka, S. Yamamoto. IMMUNE RESPONSES IN GUINEA PIG ADMINISTERED WITH ANTI-TUBERCULOSIS BOOSTER VACCINE CANDIDATE International Union Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 9) Ozeki, Y., **K. Kobayashi, S. Matsumoto**. THE EFFICACY OF BCG MAY BE A TIME-DEPENDENT AFTER THE VACCINATION AND AGE-INDEPENDENT IN MICE. International Union Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 10) 岡真優子, **松本壮吉**, 岩尾洋. 結核菌感染による肺肉芽形成と低酸素応答転写因子の活性化. 第15回酸素ダイナミクス研究会 2011年9月 佐賀.
- 11) **松本壮吉**, 小林和夫. 結核菌の休眠現象と潜在性結核. 第84回日本生化学会 2011年9月 京都.
- 12) **松本壮吉**. 結核菌がゆっくりと長く生きるメカニズムと結核の制圧を目指した研究. 第52回日本熱帯医学会大会・第26回日本国際保健医療学会学術大会 2011年11月 東京.
- 13) **松本壮吉**. 結核菌の増殖制御機構と結核制圧戦略. 第7回霊長類医科学フォーラム 2011年11月 茨城.
- 14) Ozeki, Y., Y. Hirayama, M. Osada-Oka, T. Takii, S. Yamamoto, **K. Kobayashi, and S. Matsumoto**. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. 第64回日本細菌学会関西支部総会 2011年11月 大阪.
- 15) 岡真優子, 合田巨人, 曾我朋義, 尾関百合子, 小林和夫, **松本壮吉**, 岩尾洋. マクロファージ内結核菌増殖における宿主グルコース代謝の重要性. 第64回日本細菌学会関西支部総会 2011年11月 大阪.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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

休眠結核菌の糖脂質代謝と免疫応答に関する研究

研究分担者 杉田 昌彦（京都大学ウイルス研究所・細胞制御研究分野）

研究要旨

脂質に富む結核菌細胞壁の構築は決して静的なものではなく、宿主環境に呼応して動的に変容する。これらの脂質群は宿主の自然免疫受容体あるいはT細胞抗原受容体のリガンドとなるため、その変化は感染病態の形成と維持に大きなインパクトを与える。結核菌に持続感染したヒトの末梢血において、グリセロールミコール酸（GroMM）に対するT細胞応答が検出されることから、GroMMは結核休眠菌特異的な糖脂質として捉えられているが、それに対する生体応答の詳細は不明である。そこで本研究において、GroMMに対する免疫応答を検証するためのモルモットモデルを確立し、皮内テストにおいて誘起される特異的応答の評価を行った。まず、標準培地で培養したBCGにおいてはGroMM産生が検出されないが、標準培地にグリセロールを添加することによりGroMM産生を人為的に誘導できることを見いだした。次に、GroMM高産生BCGをモルモットに接種し、GroMMに対する感作を成立させた。この個体にリポソームに封入したGroMMを皮内接種すると、36時間から48時間をピークとした応答が観察され、浸潤細胞の主体は好酸球であった。さらに所属リンパ節細胞をGroMMで刺激すると、IL-5やIL-10などTH2型サイトカインの転写が誘導された。以上のことから、GroMMに対する顕著な生体応答は、既知の遅延型アレルギー応答と同様に感作が必要であるが、好酸球浸潤を伴うTH2型サイトカイン産生を主体とする点、異なっていた。したがって休眠菌はGroMMを産生することにより、周囲の免疫環境をTH2に導き、免疫制御を回避している可能性が考えられた。

A. 研究目的

トレハロースジミコール酸（TDM）は抗酸菌細胞壁表層に多量に存在するミコール酸含有糖脂質のひとつであり、強力な生物活性を有することから、その生合成の制御は、菌にとってもまた宿主防御においても重要な意味を持つ。抗酸菌細胞壁脂質の構造や組成、生物学的活性を検証したこれまでの研究の多くは、最適化された標準人工培地で培養した菌を用いてきた。しかし、結核菌などの抗酸菌は細胞内寄生細菌であり、宿主との密接な相互作用を通して感染が成立する。したがって、抗酸菌による感染とりわけ長期に宿主環境に暴露される潜

伏感染の理解においては、宿主環境により制御される糖脂質代謝の存在とその分子機構の解明が不可欠である。とくにTDMが持つ極めて強い宿主自然免疫刺激活性（アジュバント活性）は感染の成立に不都合であることから、生体内生育菌あるいは休眠菌ではその産生が負に制御されている可能性が考えられる。実際、研究分担者のこれまでの研究から、宿主生体内において結核菌はTDMの産生を迅速かつ効率的に抑制する機構を有していることが明らかとなった。すなわちミコール酸転移酵素は、1分子のトレハロースモノミコール酸（TMM）からもう1分子のTMMヘミコール酸を転移さ

せることにより、TDM 合成の最終ステップを触媒する酵素である。しかしながら、グルコースが高濃度に存在する宿主生体内においては、グルコースに対するミコール酸転移反応が競合的に行われ、TDM の産生が抑制されるとともに、新たにグルコースモノミコール酸 (GMM) が生成される。GMM は TDM に比して、極めて弱い自然免疫刺激活性しか持たないため、この置換反応は菌による自然免疫からの回避機構を位置づけることができる。一方、GMM はヒト CD1 分子によって T 細胞に提示され、極度に TH1 型サイトカイン産生にシフトした宿主感染制御応答を誘起する。

以上の知見から、休眠菌は TDM や GMM とは異なる細胞壁糖脂質を積極的に産生し、免疫応答を制御して長期の潜伏を許容する可能性が考えられた。最近、GroMM に対する T 細胞応答が結核潜伏感染患者末梢血において認められるとの報告が出されたが、その免疫応答の質的理解は進んでいない。そこで、モルモット評価系を確立し、GroMM に対する生体応答を解明することを目的に、本研究を推進した。

B. 研究方法

BCG の培養 BCG Tokyo 172 株を、0.05% Tween 80、10% ADC エンリッチメントを含有した Middlebrook 7H9 液体培地中で震盪培養した。また、実験目的に応じて液体培地にグリセロールを添加した。OD₆₀₀ が 1~1.5 に達した段階で菌体を回収し、常法 (J Immunol 169: 330, 2002; J Exp Med 200: 1559, 2004) にしたがってクロロホルム/メタノール抽出を行い、脂質分画を得た。次に展開溶媒としてクロロホルム/エチル酢酸 (5:1) を用いた薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。さらに GroMM に相当するスポットをかきとって脂質抽出を行った。この操作を 2~3 回繰り返すことにより純度を高めた。分子種はマスマスペクトロメトリーにより確認した。

リポソームの作製 ステアリン酸付加オクタアルギニンを構成成分としたリポソームは、グルコースモノミコール酸 (GMM)

包含リポソームの作製方法に準じて行った (J Biol Chem 286: 16800, 2011)。GroMM をホスファチジルコリン、コレステロール、ステアリン酸付加オクタアルギニンを 7:3:0.5 の割合で混合し、溶媒を蒸発除去した。得られた脂質膜に蒸留水を加え、ソニケーションによりリポソーム化した。GroMM のリポソームへの封入効率は 65% であり、リポソーム直径ならびにゼータ電位は、それぞれ 148 nm、49 mV であった。

モルモットを用いた皮内テスト 3 週齢のメス Hartley モルモットは、日本 SLC より購入し、SPF 環境下で飼育した。2% グリセロール添加培地中で培養した BCG (5 x 10⁷ CFU) を皮内投与し、6 週後に精製 GroMM (5 µg) 含有リポソームおよびコントロールリポソームを 100 µl の PBS に懸濁して皮内接種した。皮膚反応を経時的に観察し、硬結径を測定した。

組織化学 皮内接種を受けた一部のモルモットから皮膚組織を採取し、常法 (J Immunol 181: 8528, 2008) にしたがってギムザ染色を行った。

サイトカイン mRNA 発現解析 BCG 免疫モルモットの所属リンパ節より細胞を単離し、GMM リポソーム (1 µg/ml) あるいは空リポソームの存在下で培養した。18 時間後に細胞を回収し、キアゲンキットを用いてトータル RNA を単離した。さらに oligo(dT) を用いた常法 (J Biol Chem 286: 16800, 2011) に従い、逆転写反応を行い、鋳型となる一本鎖 DNA を作成した。RT-PCR に用いたプライマーは下記の通りである。IFN-γ: 5'-CTA GCT ACT ACT GCC AGT CAA GAT-3' (sense)、5'-GCT CTG AAA CAG CAT CTG AGT CCT-3' (anti-sense); IL-5: 5'-CCA TGA GGG TGC TTC TGC AGT TGG G-3' (sense)、5'-CTC AGC CTT CAA TTG TCC ATT CCG T-3' (anti-sense); IL-10: 5'-GGC ACG AAC ACC CAG TCT GA-3' (sense) and 5' -TCA CCT GCT CCA CTG CCT TG-3' (anti-sense)。

(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

培地へのグリセロール添加により GroMM の産生誘導ができる BCG を標準 7H9 培地中で培養しても、GroMM は検出されない。しかし、2~10%のグリセロールを添加した 7H9 培地を用いて BCG を培養し、菌体から脂質を抽出して TLC 解析を行ったところ、グリセロール濃度依存的に GroMM と同一の Rf 値を有する脂質分子種の産生誘導を認めた。このスポットを精製し、マススペクトロメトリーによる解析を行ったところ、C84:1 ケトミコール酸を含有した GroMM や他のサブクラス、鎖長のミコール酸を含有した GroMM の存在が確認された。したがって、酵素反応の詳細は不明ながら、BCG は外来性のグリセロールを利用して GroMM を産生することができることが実証された。

GroMM は好酸球の浸潤を主体とした皮膚アレルギー応答を誘起する 標準培地由来の BCG を接種したモルモットの解析において、GroMM 特異的な免疫応答は観察されなかった。その原因として、標準培地由来の BCG が GroMM をほとんど産生しないため、感作が充分ではない可能性が考えられた。そこで、上記の TLC 解析の結果を踏まえ、2%グリセロール存在下で培養した BCG を回収し、モルモットに接種した。6 週後に GroMM リポソームを皮内投与したところ、数時間は皮内反応を認めなかったが、12 時間後には顕著な発赤、腫脹、硬結を認めた。この応答は 36 時間から 48 時間をピークとし、その後消退傾向を示した。このような反応は、空リポソームの皮内投与ではまったく観察されなかった。一方、未感作モルモットに GroMM を皮内投与すると、36 時間後よりわずかな硬結の形成を認めた。この応答は、空リポソームでは観察されなかった。以上の結果から、GroMM に対する生体応答は未感作個体においても

生じるが、感作によりその応答が増強されることが明らかとなった。

GroMM の生体応答の質を評価するため、感作モルモットの GroMM 接種部位より皮膚組織を採取し、組織化学解析を行った。その結果、多くの多型核球の浸潤を認め、そのほとんどは好酸球であった。また顕著ではないが、有意な単核球浸潤も認めた。これらの変化は、空リポソーム投与部位ではまったく認めなかった。また未感作モルモットの GroMM 接種部位に対して同様の組織化学解析を行ったところ、感作モルモットより顕著ではないものの、好酸球浸潤を認めた。

GroMM に対するアレルギー応答は、TH2 型サイトカイン産生にシフトした応答である BCG 接種モルモットの所属リンパ節を GroMM リポソームあるいは空リポソームで刺激し、TH1 型サイトカインである IFN- γ 、TH2 型サイトカインである IL-5 と IL-10 の転写を RT-PCR により検証したところ、IFN- γ の転写は空リポソーム刺激でも検出され、GroMM リポソーム刺激でむしろ減弱していた。一方、IL-5 と IL-10 の転写は空リポソーム刺激でまったく誘導されないのに対し、GroMM リポソーム刺激により顕著に誘導された。以上の結果から、GroMM に対するアレルギー応答は、TH2 型サイトカイン応答にシフトした反応であり、それと連関して好酸球の局所浸潤が起きる可能性が考えられた。

D. 考察

本研究で得られた結果ならびに研究分担者のこれまでの研究成果 (J Bio Chem 283: 28835, 2008; J Immunol 181: 8528, 2008; J Bio Chem 286: 16800, 2011) は、結核菌とヒト免疫系の長期にわたる相互作用と共生の結果として醸成された適応戦略の一端を如実に示している。生体外環境において抗酸菌は TDM を産生するが、生体内においては多量に存在する宿主由来グルコースを基質として用いることにより、アジュバント作用の強い TDM の産生を抑制し、アジュバント作用が微弱な GMM を代替的に産生す

る。しかしこの糖脂質変化は新たな獲得免疫標的抗原の生成をもたらし、GMM 特異的 CD1 拘束性 T 細胞応答が惹起される。この応答は、ツベルクリンに対する応答と比べて極めて TH1 型サイトカイン産生にシフトしたものであり、菌の制御に働くと考えられる。したがって、休眠結核菌は TDM と GMM 両方の産生を抑制している可能性が考えられ、実際、休眠菌誘導モデル (Wayne モデル) により得られた BCG においては TDM と GMM の産生が極度に低下していた。結核潜伏感染と相関した糖脂質として報告 (Chem Biol 16: 82, 2009) された GroMM は、おそらく TDM と GMM の低下に対して代償的に機能し、細胞壁構築の維持に寄与するものと考えられる。

さらに本研究により得られた知見は、休眠結核菌が能動的に免疫系に働きかけ、微小環境を TH1 から TH2 に変容させることにより、持続感染に有利な環境を維持していることを示唆する。したがって、GroMM に対する免疫応答を人為的に抑制することにより、潜伏感染の新たな制御手法が確立できる可能性がある。

E. 結論

休眠菌に特有の糖脂質に対する免疫応答を個体レベルで追究し、潜伏感染における意義を明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hattori, Y., I. Matsunaga, T. Komori, T. Urakawa, T. Nakamura, N. Fujiwara, K. Hiromatsu, H. Harashima, and M. Sugita. 2011. Glycerol monomycolate, a latent tuberculosis-associated mycobacterial lipid, induces eosinophilic hypersensitivity responses in guinea pigs. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 409: 304-307.

2. 学会発表

1. Sugita M. Lipid-specific adaptive immunity in tuberculosis and AIDS. 2011. The 6th International

Symposium of Institute Network. (東京, 6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

休眠期結核菌由来遺伝子を用いたワクチンの開発研究

研究分担者 小出幸夫（浜松医科大学）

研究要旨

休眠期の結核菌が発現する DosR regulon 蛋白質に対する T 細胞応答および血清抗体価を、①結核患者、②潜伏感染者（クオンティフェロン陽性非発症者）、③健常者と比較した。T 細胞応答は潜伏感染者で強い応答を示すものが多く、他の 2 者の一方または両方と比較して有為に強い反応が惹起できた抗原を 12 種類（Rv0080、Rv0081、Rv0570、Rv0574c、Rv1996、Rv2004c、Rv2028、Rv2029c、Rv2031c、Rv2626、Rv3129、Rv3133c）同定した。これらの抗原群は休眠期結核菌を標的としたワクチンの候補抗原として有望と考えられた。一方、血清抗体価は、①>②>③の順で強い反応性を示した抗原が多く、5 種類（Rv2005c、Rv2031、Rv2032、Rv3132c、Rv3133c）を同定した。これらの抗原群に対する抗体価は、患者と潜伏感染者を鑑別するバイオマーカーに応用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

乳幼児粟粒結核などの一次結核に対する BCG の効果は広く認められているが、潜伏感染した結核菌の再燃（二次結核）に対する効果は疑問視されている。成人肺結核の大部分は内因性再燃であり、その制御には休眠期結核菌を標的とした新規ワクチンの開発が非常に有効と考えられる。このようなワクチンが開発できれば、BCG を初回免疫に、休眠期結核菌に対するワクチンを追加免疫に用いることにより、成人の肺結核をも制御できるワクチン戦略の構築が可能となる。

したがって本研究は、休眠期結核菌が特異的に発現する蛋白質群を標的とした新規ワクチンの開発を目的としている。加えて、これらの蛋白質群に対する免疫応答が、結核菌の感染状態（活動状態）をモニターするバイオマーカーとして応用できる可能性についても検討する予定である。本年度は、休眠期の結核菌が発現する DosR regulon 蛋白質に対する免疫応答を活動期結核患者、潜伏感染者および健常者の間で比較した。

B. 研究方法

結核菌ゲノム情報に基づき、休眠期の結核菌が発現する DosR regulon 蛋白質（48 種）遺伝子を PCR によって単離し、大腸菌発現系ベクターである pET28b に挿入した。このうち安定して遺伝子産物を発現できた 33 種について、ヒトの T 細胞応答と抗体価について検討した。

T 細胞応答は、ヒト末梢血単核球を組換え蛋白質で刺激し、IFN- γ 産生を ELISPOT assay で測定して検討した。血清中の抗体は、組換え蛋白質を用いた ELISA により測定した。

ヒト試料は次の 3 群から文書によるインフォームド・コンセントを得た後に採取した。①結核患者（臨床的に結核を発病していると診断された患者：12 名（抗体価については 28 名））、②潜伏感染者（クオンティフェロン陽性の非発症者：14 名）、③健常者（クオンティフェロン陰性者）。

（倫理面への配慮）

本研究は組換え DNA 実験と臨床研究に該当するため、国の指針に準拠して浜松医

科大学が定めた「組換え DNA 実験安全管理委員会」「バイオセーフティ委員会」「ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会」「医の倫理委員会」の規定に従い、当該委員会での承認を得た後に研究を行った。

C. 研究結果

1. T細胞応答

患者や潜伏感染者で、幾つかの抗原に対するT細胞応答が有為に増強しており、そのパターンは以下の2つに大別できた。①結核患者と潜伏感染者の両方で健常者に比べてT細胞応答（中央値）が増強している抗原（結核患者と潜伏感染者の間には統計学的な差はない）：Rv0080、Rv2031c、Rv3129。②潜伏感染者のT細胞応答（中央値）が他の2群に比べて強い抗原：Rv1996、Rv2004c、Rv2029c、Rv3133c（統計学的に他の2群と有為差があるもの）、Rv570、Rv2028（結核患者に対してのみ有為差のあるもの）、Rv0081、Rv0574、Rv2626c（健常者に対してのみ有為差があるもの）。

2. 血清抗体価

T細胞応答と同様に、患者や潜伏感染者で幾つかの抗原に対する血清抗体価が有為に上昇しており、そのパターンは以下の3つに大別できた。①結核患者と潜伏感染者の両方で健常者に比べて抗体価（中央値）が上昇している抗原（結核患者と潜伏感染者の間には統計学的な差はない）：Rv0080、Rv2031c、Rv3129。②結核患者における抗体価（中央値）が他の2群に比べて強い抗原：Rv2031c、Rv2032。③潜伏感染者における抗体価（中央値）が健常者に比べてのみ上昇していた抗原：Rv3133c。

D. 考察

幾つかの抗原に対する潜伏感染者（非発症者）のT細胞応答が結核患者に比べて増強しているという今回の知見は、これらの免疫応答が結核の発症を抑制している可能性を示唆している。したがって、これらの蛋白質群は、休眠期結核菌を標的としたワクチンの抗原として有望であると考えられた。今後は、①これらの抗原を用いたワク

チンの効果を動物の潜伏感染モデルで検証するとともに、②HLAに提示されるエpitepの同定を行い、ワクチンへの応用を考えた場合に、どのくらいの集団をカバーできるかを検討する予定である。

結核菌感染者（結核患者および潜伏感染者）で血清抗体価の上昇が見られた抗原群については、結核患者>潜伏感染者>健常者の順で抗体価が高いものが多かった（6種類中5種類）。これらの抗体価の差異は、結核患者と潜伏感染者を鑑別するバイオマーカーに応用できる可能性がある。

今回は潜伏感染者として、クオンティフェロン陽性非発症者の試料を用いたが、これらの対象者の感染後経過は多岐にわたると考えられ、今後、感染後の経過と DosR regulon 蛋白質に対する免疫応答について、集団を大きくして更に詳細に解析する必要がある。

E. 結論

潜伏感染者（クオンティフェロン陽性非発症者）でT細胞応答が増強している DosR regulon 蛋白質を 12 種類同定した。これらは休眠期結核菌に対するワクチンの標的抗原として有望であると考えられた。一方、結核患者>潜伏感染者>健常者の順で抗体価が上昇している同蛋白質を 5 種類同定した。これらに対する抗体価は、結核患者と潜伏感染者の鑑別に応用できる可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Seto, S., K. Tsujimura, and **Y. Koide**. Coronin-1a inhibits autophagosome formation around *Mycobacterium tuberculosis*-containing phagosomes and assists mycobacterial survival in macrophages. *Cell. Microbiol.* (in press)
- 2) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、**小出幸夫**. 2011. 結核菌の細胞内寄生メカニズム. *日本臨床*. 69: 1373-1377.
- 3) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、**小出幸夫**. 2011. 結核菌ファゴソームの成熟阻

害機構. 化学療法の領域. 27: 1464-1469.

- 4) Sugaya, K., S. Seto, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2011. Mobility of late endosomal and lysosomal markers on phagosomes analyzed by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410: 371-375.
- 5) Kato, M., Y. Nakamura, T. Suda, Y. Ozawa, N. Inui, N. Seo, T. Nagata, Y. Koide, P. Kalinski, H. Nakamura, and K. Chida. 2011. Enhanced anti-tumor immunity by superantigen-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 60: 1029-1038.
- 6) Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. 2011. Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. *Traffic* 12: 407-420.
- 7) Uto, T., K. Tsujimura, M. Uchijima, S. Seto, T. Nagata, T. Suda, K. Chida, H. Nakamura, and Y. Koide. 2011. A novel vaccine strategy to induce mycobacterial antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of heat shock protein 70. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 61: 189-196.

2. 学会発表

- 1) Uchijima, M., T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2012. Analysis of antigen-specific T-cell responses induced by CCR5 targeting vaccine. 第 85 回日本細菌学会 (長崎、3 月発表予定) .
- 2) Hozumi, H., K. Tsujimura, Y. Yamamura, S. Seto, M. Uchijima, T. Nagata, and Y. Koide. 2012. Human T-cell responses against dormancy-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. 第 85 回日本細菌学会 (長崎、3 月発表予定) .
- 3) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2011. 結核菌感染マクロファージにおけるオ

ートファジー誘導阻害機構の解析平成 23 年度日米医学結核・ハンセン病専門部会班会議 (清瀬、12 月) .

- 4) Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. 2011. Localization and function of Coronin-1a in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. 46th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy. (Saitama, Japan, 12 月)
- 5) Osada-Oka, M., Y. Hirayama, Y. Tateishi, Y. Ozeki, S. Kitada, R. Maekura, K. Tsujimura, Y. Koide, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2011. Antibody responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in latent *M. tuberculosis* infection. 46th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy. (Saitama, Japan, 12 月)
- 6) Tsujimura, K., Y. Yamamura, S. Seto, M. Uchijima, T. Nagata, and Y. Koide. 2011. Immunogenicity of DosR regulon proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会. (千葉、11 月) .
- 7) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2011. 結核菌感染マクロファージにおけるオートファジー誘導機構の解析. 平成 23 年度中部乳酸菌研究会. (新潟、11 月) .
- 8) Uchijima, M., T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2011. Analysis of antigen-specific CD8+ and CD4+ T-cell responses induced by chemokine fusion DNA vaccination. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. (Sapporo, Japan, 9 月)
- 9) Tsujimura, K., Y. Yamamura, S. Seto, M. Uchijima, H. Hozumi, T. Nagata, and Y. Koide. 2011. Immunogenicity of dormancy-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. (Sapporo, Japan, 9 月)
- 10) Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. 2011. Localization and function of Coronin-1A in *Mycobacterium*

tuberculosis-infected macrophages. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. (Sapporo, Japan, 9 月)

- 11) Nagata, T., G. Eweda, D. Suzuki, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2011. Identification of T-cell epitopes on low-molecular-mass secretory proteins (CFP11, CFP17, TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. (Sapporo, Japan, 9 月)
- 12) Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. 2011. Image analysis reveals that *Mycobacterium tuberculosis* mediates the differential recruitment of Rab GTPases to its phagosomes during arresting phagosome maturation. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. (Sapporo, Japan, 9 月)
- 13) Tsujimura, K., Y. Yamamura, H. Hozumi, S. Seto, M. Uchijima, T. Nagata, and Y. Koide. 2011. Cellular and humoral immune responses against latency-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. DNA vaccine 2011. (San Diego, CA, USA, 7 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：「結核菌に特異的な T 細胞 (CD8+) を検出するための方法」特許第 4883816 号、発明者：小出幸夫、鈴木美奈、青枝大貴、永田 年、平成 23 年 12 月 16 日登録
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

持続潜伏性肺非結核性抗酸菌症（MAC 症）の新規血清診断法の開発

研究分担者 前倉 亮治（国立病院機構・刀根山病院）

研究協力者 北田 清悟（国立病院機構・刀根山病院）

研究要旨

我々はこれまでに MAC の菌体成分である glycopeptidolipid(GPL)-core に対する IgA 抗体を測定する血清診断キットを開発し、肺 MAC 症の診断的有用性について報告してきた。本研究では、肺 MAC 症治療例を対象に、経時的に血清抗 GPL core IgA 抗体価を測定することによって、治療効果の評価における有用性を明らかにすることを目的とした。肺 MAC 症と診断され、初回標準化学療法を行う患者 37 例を登録した。治療開始前および、治療開始 1,2,3,6,9,12 ヶ月後に経時的に血液を採取し、血清抗 GPL core IgA 抗体価の変化を観察した。治療前の血清 GPL core IgA 抗体価は 8.0 ± 10.3 U/mL で、31 例(83.8%)で陽性(>0.7 U/mL)であった。32 例は少なくとも 12 ヶ月以上の経過観察が可能あり、平均観察期間は 24.0 ± 8.3 月であった。32 例中、27 例 (84.4%)は化学療法により排菌陰性化が得られた。そのうち 5 例は、1 年以内に再排菌した(再発率 :18.5%)。5 例は化学療法にもかかわらず、排菌が持続した。治療開始前の抗体価は、排菌陰性化例 (6.5 ± 7.9 U/mL)と再発および持続排菌例 (8.3 ± 9.4 U/mL)の間で差を認めなかった ($p = 0.597$)。抗体価の変化を、治療前血清抗体陽性例 26 例において観察した。抗体価の変化は個人差が認められたものの、排菌陰性化群患者において、治療前に比べて有意な抗体価の低下が観察された($p < 0.01$)。治療前抗体価と治療効果（細菌学的結果）には関連性が観察されなかった。多剤併用化学療法は、血清抗体価を有意に低下させた。

A. 研究目的

Mycobacterium avium complex (MAC) は環境常在菌であるため、MAC による感染症の診断は結核とは異なり一度の菌検出だけでは不十分である。また肺感染症は肺結核と臨床像が類似しており、結核との鑑別を含め、迅速な診断が必要である。我々はこれまでに MAC の菌体成分である glycopeptidolipid(GPL)-core に対する IgA 抗体を測定する血清診断キットを開発し、国内多施設での肺 MAC 症の診断的有用性についてはすでに報告した。

さらに、米国に於いて、多人種、他地域での有用性の検討を行い、国内の成績と同

様の有用性が確認された。また、持続潜伏性 MAC 感染でも血清抗体陽性となる可能性も示唆された。

血清抗体価は疾患活動性、重症度のある程度反映することは胸部 CT 画像を用いた研究などですでに報告してきている。しかし、化学療法を行った患者において、経時的な抗体価の変化を前向きに検討した報告はない。本研究では、肺 MAC 症に対する化学療法下での血清抗 GPL core IgA 抗体価の変化を観察し、治療効果の評価における有用性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

2008年9月から2010年10月までの期間、国立病院機構刀根山病院にて米国胸部疾患学会の診断基準を満たす肺 MAC 症と診断され、初回標準化学療法を行う患者を対象とした。治療開始前および、治療開始1,2,3,6,9,12ヶ月後に経時的に血液を採取し、血清抗 GPL core IgA 抗体価の変化を観察した。また、臨床像との関連も検討した。

(倫理面への配慮)

国立病院機構刀根山病院の臨床研究倫理委員会の承認を得た。文書による説明、同意を行った。

C. 研究結果

37例の症例を連続的に登録した。男性5例、女性32例、年齢 67.4 ± 9.1 才、Body Mass Index $18.2 \pm 2.5 \text{ kg/m}^2$ 、空洞病変を有する症例は11例(29.2%)であった。感染菌種は *M. avium* 22名 *M. intracellulare* 13名、両方検出されたのが2名あった。

37例の治療前の血清抗体価は $8.0 \pm 10.3 \text{ U/mL}$ であり、カットオフ値を 0.7 U/mL とすると、陽性率は83.8%であった。全例クラリスロマイシンを含む米国胸部疾患/感染症学会推奨の多剤併用化学療法を行った。5例は患者の都合等により3ヶ月未満で転院し追跡中断した。32例中27例(84.4%)は化学療法によって喀痰培養陰性化した。そのうち5例は1年以内に再排菌をみとめ再発した。5例は化学療法にもかかわらず、排菌陰性化を達成できず持続排菌のままであった。治療前の抗体価は排菌陰性化群($n=22, 6.5 \pm 7.9 \text{ U/mL}$)と再発、持続排菌群($n=10, 8.3 \pm 9.4 \text{ U/mL}$)の差は認められなかった($p=0.597$)。抗体価の変化を、治療前血清抗体陽性例26例において観察した。抗体価の変化は個人差が認められたものの、排菌陰性化群患者において、治療前に比べて有意な抗体価の低下が観察された($p<0.01$)。

D. 考察

MAC 菌は環境常在菌であり、しばしば呼吸

器検体に混入することがある。そのため、診断は菌の証明だけでは十分でなく、臨床画像所見と複数回の菌の検出が必要であり、しばしば臨床現場では迅速な診断が困難である。MAC 特異的血清診断は特異度が高く、補助的診断方法として有用性が期待されている。本研究では、肺 MAC 症診断における血清診断の陽性率は83.8%と、これまでの報告とほぼ同様の値であり、有用性が再確認された。

肺 MAC 症の化学療法の効果はマクロライドの登場によって大きく改善した。マクロライドを含んだ多剤併用化学療法は短期的には50-90%の排菌陰性化が得られることが報告されている。一方、長期的には再発する症例も多く、再発率は11.1-56.8%とされている。本研究でも、84.4%の症例において排菌陰性化が達成され、そのうち18.5%が1年以内に再発しこれまでの報告と同様の結果であった。

治療前の抗体価は、排菌陰性化群と再発および持続排菌群では差がなく、治療効果を予測することは可能でなかった。治療成功例において抗体価の平均は低下をみとめ、抗体価は治療効果の指標となる可能性が示唆された。しかし、抗体価の変化は個人差が大きく、胸部画像所見や細菌学的所見をよく反映する症例もあったが、まったく反映しない症例もあることが観察された。肺 MAC 症の化学療法の治療効果の指標としては、喀痰培養結果が用いられているが、喀痰培養には時間を要し、採取された喀痰の質によりコロニー数が変化するなどの問題がある。またコロニーカウントも不正確である。抗体価が治療効果の指標として有用であれば、より簡便に定量的、客観的評価が可能となる。どのような症例で抗体価の経時的観察が有用であるか、今後検討する必要がある。

また MAC の臨床経過は非常に長く、通常5-10年以上の経過をとる場合が多い。抗体価や抗体価の推移が長期的な状態や予後を予測する因子として有用であるかどうかは今後の検討課題である。

E. 結論

治療前抗体価と治療効果（細菌学的結果）には関連性が観察されなかった。多剤併用化学療法は、血清抗体価を有意に低下させた。

血清抗 GPL core IgA 抗体価は治療効果の指標として使用できる可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

- 1) 北田清悟、前倉亮治. 2011. MAC 症診断における血清診断法（妥当性と臨床データ）第 86 回日本結核病学会総会（東京、6 月）.
- 2) 上浪健、北田清悟、各務慎一、立石善隆、藤川健弥、平賀通、前倉亮治. 2011. 結核類似型肺 MAC 症の臨床画像的検討. 第 86 回日本結核病学会総会（東京、6 月）.
- 3) 西内由紀子、松本壮吉、立石善隆、北田清悟、前倉亮治. 2011. 環境から分離して *Mycobacterium avium* のバイオフィルム形成. 第 86 回日本結核病学会総会（東京、6 月）.
- 4) 各務慎一、上浪健、北田清悟、立石善隆、藤川健弥、平賀通、前倉亮治. 2011. 肺 MAC 症および肺結核に対するリファブチンの当院における使用経験. 第 86 回日本結核病学会総会（東京、6 月）.
- 5) 立石善隆、松本壮吉、北田清悟、前倉亮治. 2011. 結核血清診断の進歩. 第 86 回日本結核病学会総会（東京、6 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

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
<u>Niki, M.</u> , <u>S. Matsumoto</u>	Host and bacterial factors that regulate <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection and persistence	Yamamoto S., Maeyama J., Takii T.	BCG vaccine and adjuvant	Japan Anti-Tuberculosis Association	Tokyo	2011	215-238
西内由紀子 立石善隆 山田 毅 松本壮吉	非結核性抗酸菌症	木村 哲 喜田 宏	人獣共通感染症	医薬ジャーナル社	大阪	2011	337-342

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
<u>Kobayashi, K.</u> , <u>M. Ato</u> , <u>S. Matsumoto</u>	Global threats and the control of multidrug-resistant tuberculosis	J. Disaster Res.	6	443-450	2011
Naka, T., S. Maeda, <u>M. Niki</u> , <u>N. Ohara</u> , S. Yamamoto, I. Yano, J.-i. Maeyama, H. Ogura, <u>K. Kobayashi</u> , <u>N. Fujiwara</u>	Lipid phenotype of two distinct subpopulations of <i>Mycobacterium bovis</i> bacillus Calmette-Guérin Tokyo 172 substrain	J. Biol. Chem.	286	44153 - 44161	2011
Naka, T., N. Nakata, S. Maeda, R. Yamamoto, M. Doe, S. Mizuno, <u>M. Niki</u> , <u>K. Kobayashi</u> , H. Ogura, M. Makino, <u>N. Fujiwara</u>	Structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from <i>Mycobacterium intracellulare</i>	J. Bacteriol.	193	5766-5774	2011
Takatsuka, M., <u>M. Osada-Oka</u> , E.F. Satoh, K. Kitadokoro, Y. Nishiuchi, M. Niki, M. Inoue, K. Iwai,	A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction	PLoS One	6	e20985	2011

T. Arakawa, Y. Shimoji, H. Ogura, K. Kobayashi , A. Rambukkana S. Matsumoto					
Ozeki, Y., Y. Hirayama, T. Takii, S. Yamamoto, K. Kobayashi , S. Matsumoto	Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with <i>Mycobacterium bovis</i> bacillus Calmette-Guérin	Vaccine	29	6881-6887	2011
Kasahara, E., A. Sekiyama, M. Hori, K. Hara, N. Takahashi, M. Konishi, E. F. Sato, S. Matsumoto , H. Okamura, M. Inoue	Mitochondrial density contributes to the immune response of macrophages to lipopolysaccharide via the MAPK pathway	FEBS Lett.	585	2263-2268	2011
松本壮吉	結核菌の病原性および増殖制御機構の分子遺伝学的解析と応用研究	日本細菌学会誌	66	531-537	2011
仁木満美子、 仁木 誠、 尾関百合子、 岡 真優子、 松本壮吉	結核研究の新たな展開—潜在性結核と結核菌：休眠現象の分子メカニズム—	最新医学	66	149-155	2011
Hattori, Y., I. Matsunaga, T. Komori, T. Urakawa, T. Nakamura, N. Fujiwara , K. Hiromatsu, H. Harashima, M. Sugita	Glycerol monomycolate, a latent tuberculosis-associated mycobacterial lipid, induces eosinophilic hypersensitivity responses in guinea pigs	Biochem. Biophys. Res. Commun.	409	304-307	2011
Seto S., Tsujiura K., Koide Y.	Coronin-1a inhibits autophagosome formation around <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -containing phagosomes and assists mycobacterial survival in macrophages	Cell. Microbiol.	In press		
瀬戸真太郎、 辻村邦夫、 小出幸夫	結核菌の細胞内寄生メカニズム	日本臨床	69	1373-1377	2011
瀬戸真太郎、 辻村邦夫、 小出幸夫	結核菌ファゴソームの成熟阻害機構	化学療法の領域	27	1464-1469	2011
Sugaya K., Seto S., Tsujiura K., Koide Y.	Mobility of late endosomal and lysosomal markers on phagosomes analyzed by fluorescence recovery after photobleaching	Biochem. Biophys. Res. Commun.	410	371-375	2011

Kato M., Nakamura Y., Suda T., Ozawa Y., Inui N., Seo N., Nagata T., Koide Y. , Kalinski P., Nakamura H., Chida K.	Enhanced anti-tumor immunity by superantigen-pulsed dendritic cells	Cancer Immunol. Immunother.	60	1029-1038	2011
Seto S., Tsujimura K., Koide Y.	Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes	Traffic	12	407-420	2011
Uto T., Tsujimura K., Uchijima M., Seto S., Nagata T., Suda T., Chida K., Nakamura K., Koide Y.	A novel vaccine strategy to induce mycobacterial antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of heat shock protein 70	FEMS Immunol. Med. Microbiol.	61	189-196	2011