

平成24年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

抗酸菌感染症の予防・診断に関する研究

分担研究報告書

研究分担者

向井 徹

(国立感染症研究所・室長)

抗酸菌感染症の予防・診断法に関する研究

研究分担者 向井 徹 （国立感染症研究所・感染制御部・室長）

研究要旨.

らい菌、結核菌等の抗酸菌は、一般に生育速度が非常に遅く、また、取扱に高度な知識と技術を要する。そのため、新規薬剤開発の生菌を用いた莫大な数の候補物質のスクリーニングでは、短時間かつ効率的な結果判定が望まれる。Bioluminescent による発光マーカーは、簡便に生死の直接的観察が可能なが知られ、その抗酸菌への応用を行った。発光強度は、これまでになく強い系を確立したが、未だ発現の安定性に問題があることが判明した。このシステムの開発は、アジアに存在する伝統薬や生物資源由来の未知の候補化合物の薬剤効果判定を容易にし、新薬開発に大きく寄与すると考えられた。

A. 研究目的

ハンセン病や結核における薬剤耐性菌の出現・蔓延、さらに既存の抗生物質の効果が弱い非結核性抗酸菌症の治療に対し、新規治療薬の開発が進められている。その中で東南アジアをはじめとする亜熱帯・熱帯地域には、多種多様な微生物や植物等が存在し、その産生物の薬効の検討が可能である。しかし、抗酸菌の生育速度は非常に遅いため、莫大な数の新規抗菌薬候補物質のスクリーニングを短時間で効率的に行う手法の開発が必要とされる。薬効を検討するための迅速な菌の生死判定に、発光マーカー発現菌の利用がある。発光マーカーは、発光シグナルで直接判定が可能のため、その有用性が知られている。

発光マーカーとして、蛍光蛋白や luciferase の利用が検討されている。蛍光蛋白は、検出に励起光発生装置が必要であり、また、luciferase の使用では、培養系への基質添加が必要である。一方、自家発光系である Bioluminescent は、励起光も基質添加も必要としないため、測定系の簡素化が可能である。しかし、その大きな遺伝子単位から、その応用研究はあまり進められていない。

本研究では、これまで、Bioluminescent

の抗酸菌応用として lux オペロン遺伝子配列の検討、抗酸菌 codon 最適化の検討を進めてきた。さらに、promoter の選択と実際の使用に影響を及ぼすと考えられる薬剤耐性遺伝子の除去を進めた。

B. 研究方法

発光蛋白として Bioluminescent、pXen13 (Caliper、MA、USA) にコードされた *Photobacterium luminescens* 由来 G(-) 最適化 luxCDABE オペロンを基にした。同オペロンの塩基配列を BCG の codon usage に最適化 (TAKARA) した。発現用ベクターとして、抗酸菌組込み型である pMV306K および pMV306K より *int* を除き、Kan<sup>R</sup> を Hyg<sup>R</sup> に置換した p3HΔII plasmid 系を使用した (図 1)。プロモーターとして *hsp60* promoter、もしくは抗酸菌ファージ由来 promoter P86、P79 を用いた。各プロモーターの下流に pXen13 由来オペロンを持つ p3K 60-13 をコントロールとした。BCG codon usage 最適化した 5 種の ORF の組み合わせによる plasmid を構築し、*M. bovis* BCG に導入した。さらに、BCG ゲノム中に組込まれた Hyg<sup>R</sup> の除去のため、pYUB870 を導入し、Hyg 感受性菌を選択後、pYUB870 脱落株の選択を行った。プレートに形成されたコロニーの発

光強度測定は、Light capture II (ATTO) により画像を取り込み、CS Analyzer ver 3.0 (ATTO) を用い解析した。また、液体培養の発光測定は、MicroLumat Plus LB96V (ベルトール JAPAN) を用いた。

倫理面への配慮 本研究では、ヒト由来サンプルもしくは動物を使用した実験は行われていない。

### C. 研究結果

これまでの GFP 蛍光蛋白および p3K86-13 による promoter 強度比較結果より、P79, P86 promoter は、*hsp60* promoter より遥かに発光強度が強いことを示してきた。オペロン CDABE の中で、C, D, E は基質合成に、A, B は、発光酵素をコードしている。そのため、各種 ORF の BCG 至適化による影響検討は、CD, AB, CDE, CDABE の組み合わせにより pMV306K を用い検討した。その結果、ORF AB を抗酸菌 codon usage 至適化したクローンが、菌液 16 倍希釈まで検出可能であり、他の ORF 抗酸菌至適化クローンより強い発光シグナルが検出された (図 2)。しかし、その 2 週間後同クローンは、4 倍希釈の検出に発光度は低下していた。つまり、安定性に欠けることが判明した。原因として、ゲノムに組込まれた pMV306K 上の integrase が、ORF の切り出しに関与していると考えられた。そのため、trans に integrase が供給され、ゲノム上には、integrase の存在しない組換え BCG 構築した。p3HΔII plasmid を用い、P86 をプロモーターとし、各種組換え BCG を構築した。さらに薬剤耐性遺伝子である *Hyg<sup>r</sup>* その除去を試みた。しかし、*Hyg<sup>r</sup>* 遺伝子除去の過程において、発光するクローンの選択はできず、安定性は確保できなかった。次に P86 が非常に強すぎたためと考え、promoter の強度が弱い P79 に変更し、その integrase free のクローン構築を進めている。

### D. 考察

アジアをはじめとする亜熱帯、熱帯の地域には、未だ調べられていない植物、微生物等が産生する様々な生物活性物質が存在

する。これら莫大な種類の中から目的の活性を持つ物質を短時間かつ効率的に screening する手法の開発は、非常に重要である。抗酸菌に対する新規抗菌薬の screening では、菌の生育速度が非常に遅いため、可能な限りの時間短縮が求められる。さらに、結核菌は、非常に強い病原性から取扱いに高度な知識と技術が要求される。これらの理由より、新規 screening 法の開発では、高感度かつ操作の簡便性・単純化が必須と考えられる。

今回、菌の生死判定マーカーとして、Bioluminescence の応用を進めた。これは、既存の発光マーカーである蛍光蛋白に比べ励起光発生装置が不要であること、また、luciferase の系では必須である基質の添加過程が不要であることが大きな利点として挙げられる。しかし、他の蛋白に比較し LUX は 5 種の ORF のオペロンから構成された長い遺伝子単位であり、プロモーターの選択、codon usage の至適化、遺伝子のゲノムへの組み込み法の開発、コロニーの形成に 3 週間を要する非常に生育速度の遅い BCG の使用等様々な検討が必要である。これらの理由により、抗酸菌を用いた実用性のある Bioluminescence の系開発は未だ確立していない。既に発表された Bioluminescence の系と比較し、本研究は、飛躍的な高感度が期待されるが、未だ安定性の改良が必要であった。この新規系の実用化とその技術移転は、東南アジアなどの亜熱帯・熱帯に多く存在する生物資源や伝統薬など未知の化合物を、現地のラボにおいて検討可能な簡易新薬開発法に繋がると考えられた。

### E. 結論

抗酸菌に適した Bioluminescent の開発は、開発途上国でも可能な新薬開発に有用と考えられた。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Yokoyama, K., H. Kim, T. Mukai, M. Matsuoka, C. Nakajima, and Y. Suzuki. 2012. Impact of Amino Acid

Substitutions in B Subunit of DNA Gyrase in *Mycobacterium leprae* on Fluoroquinolone Resistance. PLoS. Negl. Trop. Dis., 6: e1838.

- 2) Yokoyama, K., H. Kim, T. Mukai, M. Matsuoka, C. Nakajima, and Y. Suzuki. 2012. Amino acid substitutions at position 95 in GyrA can add fluoroquinolone resistance to *Mycobacterium leprae*. Antimicrob. Agents. Chemother., 56: 697-702.

## 2. 学会発表

- 1) 牧野正彦, 向井 徹. Enhanced activation of T lymphocytes by urease-deficient recombinant

bacillus Calmette-Guérin producing heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. 第81回日本ハンセン病学会総会 2012年6月札幌

- 2) 向井 徹, 宮本友司, 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. Bioluminescence系の抗酸菌応用への基礎的研究. 第81回日本ハンセン病学会総会 2012年6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

図1 integrase trans供給系の概略

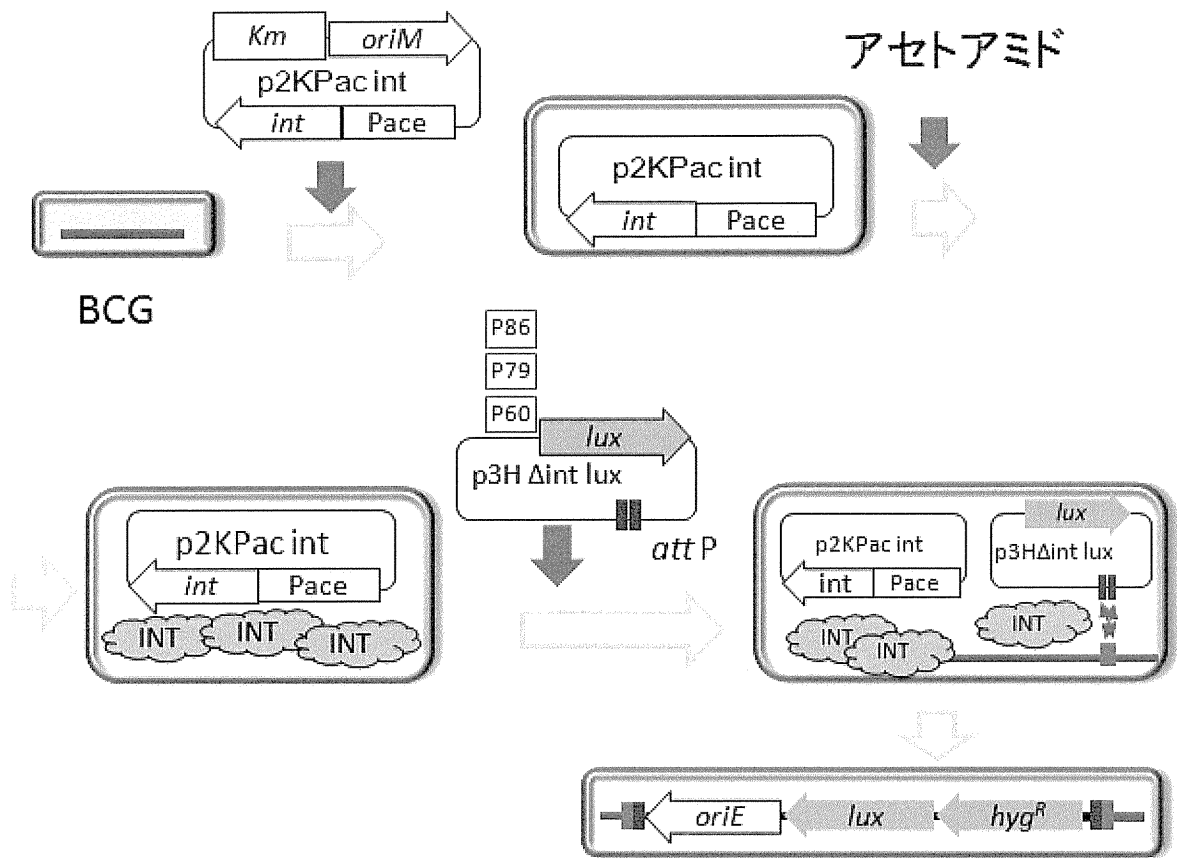
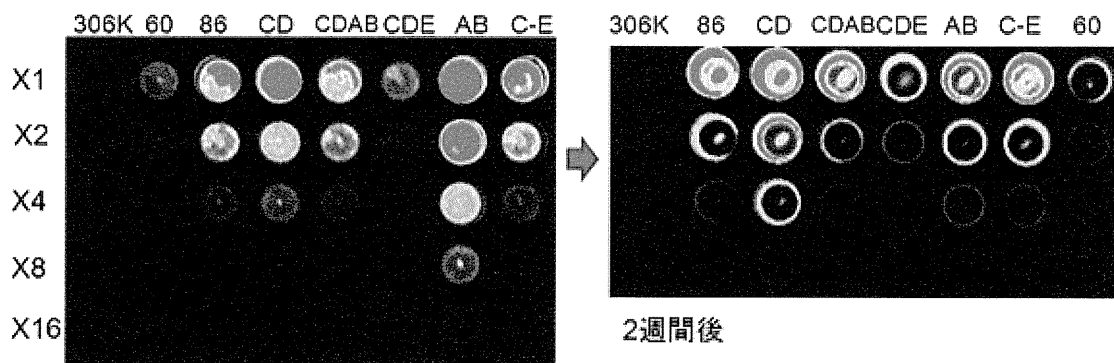


図2 lux発現BCGの発光安定性



平成24年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

結核菌由来因子による宿主免疫応答の誘導機構に関する研究

分担研究報告書

研究分担者

田村 敏生

(国立感染症研究所・室長)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）  
分担研究報告書

結核菌由来因子による宿主免疫応答の誘導機構に関する研究

研究分担者 田村 敏生 （国立感染症研究所・感染制御部・室長）

研究要旨

本研究は長期生存型メモリーCD8<sup>+</sup>細胞障害性 T 細胞(CTL)の分化誘導に不可欠と考えられている CD4<sup>+</sup> Th1 細胞の 'Help' 機能を明らかにすることで新規結核ワクチンの開発戦略を得ること及びその機能を司る因子の中から結核ワクチンの効果を判定しうる因子を同定することを目的としている。

昨年度までに結核菌分泌蛋白 Ag85B 由来のペプチド: Peptide-25 が①選択的かつ強力に Th1 分化を誘導できること、②この分化には Peptide-25 刺激によって誘導される TATA box binding protein associated factor である TAF7 が重要な役割を果たしていること、また、Peptide-25 特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウス及び卵白アルブミン(OVA)特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウスを用いた *in vitro* CTL 分化誘導実験系による解析から③Peptide-25 を介した CD4<sup>+</sup> T 細胞との相互作用によって活性化した樹状細胞のみがグランザイム B の発現を伴う機能的 CTL 分化を誘導できること、④この樹状細胞の活性化には Peptide-25 刺激によって CD4<sup>+</sup> T 細胞が産生する IL-17F が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。

本年度は Peptide-25 特異的 IL-17F 産生細胞の分化誘導機序、IL-17F 産生細胞の分化形態及び IL-17F 産生量と CTL からのグランザイム B 産生量の相関性を明らかにすることを目的とし解析を行なった結果、①Peptide-25 特異的 IL-17F 産生細胞の分化誘導には既知の Th1 分化誘導因子は必須ではないこと、②IL-17F 産生細胞は Th17 細胞とは異なるヘルパー T 細胞亜集団であること、③IL-17F 産生細胞はレジデントメモリー様の分化形態を示すこと、④CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-17F 産生量と CTL からのグランザイム B 産生量は正の相関を示すことが明らかになった。以上の結果より、新たなヘルパー T 細胞亜集団である IL-17F 産生細胞が CTL 分化誘導に必須である可能性及び IL-17F が結核ワクチン接種後の CTL の機能を推定出来る因子である可能性が示された。

A. 研究目的

結核ワクチンの目的は結核菌特異的獲得免疫を惹起し、長期生存型メモリーCD8<sup>+</sup>細胞障害性 T 細胞(CTL)を効果的に誘導することである。

BCG は現在実用化されている唯一の結核ワクチンであるが、ワクチン効果が短く、成人に対する有効性が低いなどの問題点がある。この問題点を解決するためには長期

生存型メモリーCTL を効率良く効果的に誘導するワクチンを開発する必要がある。長期生存型メモリーCTL の分化には IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  を産生する CD4<sup>+</sup> Th1 細胞の 'Help' が不可欠であると考えられているが、この 'Help' の本態に関しては未だ明らかではない。したがって、新たな結核ワクチンを開発するためには CD4<sup>+</sup> Th1 細胞の 'Help' 機能を明らかにすることが重要である。

また BCG のワクチン効果を判定する方法は現在のところツベルクリン反応検査だけであり、この結果が 10mm 以下の場合には免疫がないか十分ではないと考えられているが、ツベルクリン反応とワクチン効果の程度の相関性には不明な点が多い。そこで、長期生存型メモリーCTL の分化誘導に関わる因子の中からその産生量と CTL 機能が正の相関を示す液性因子を同定し、結核ワクチンの効果判定の要素となるか検討する。

アジアにおいて感染症で死亡する患者の死因の第 1 位は結核である。この研究によって明らかとなる長期生存型メモリーCTL の誘導機序から BCG に代わる新たな結核ワクチンの開発戦略が得られるものと考ええる。この結核ワクチンは有効性が増強し、更に有効期間が延長されることが期待され、アジア地域での結核の予防に大いに貢献できるものと考ええる。また、ワクチン効果を判定する因子が CTL 分化誘導を調節する液性因子の中から同定されれば、ELISA 法などの簡便な方法にてワクチン効果の判定が可能となり、アジア地域でのワクチン接種の効率化を推し進める要素となるものと考ええる。

結核菌の分泌蛋白である Ag85B はヒト、マウスに対して強い免疫原性を有し、この蛋白のみの投与で強力に Th1 分化を誘導することが知られている。これまでに、① Ag85B のヘルパーエピトープを検索し、15 個のアミノ酸からなる Peptide-25 (アミノ酸配列: FQDAYNAAGGHNAVF) が、I-A<sup>b</sup> 拘束性に選択的かつ強力に Th1 免疫応答を誘導できること、② Peptide-25 特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウス (P25 TCR-Tg) を用いた解析から、Peptide-25 を介した TCR からのみの刺激によってサイトカイン非依存的、副刺激分子非依存的、さらに T-bet 非依存的な Th1 分化が誘導されること、③ この T-bet 非依存性の Th1 分化には TATA box binding protein associated factor である TAF7 が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。

さらに卵白アルブミン (OVA) 特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウス

(OT-1) を用いた *in vitro* CTL 分化誘導実験系による解析から① Peptide-25 を介した CD4<sup>+</sup> T 細胞との相互作用によって活性化した樹状細胞のみがグランザイム B の発現を伴う機能的 CTL 分化を誘導できること、② この樹状細胞の活性化には Peptide-25 刺激によって CD4<sup>+</sup> T 細胞が産生する IL-17F が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。

本年度は Peptide-25 特異的 IL-17F 産生細胞の分化誘導機序、IL-17F 産生細胞の分化形態、IL-17F の産生量と CTL からのグランザイム B 産生量の相関性を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

(1) Peptide-25 刺激による CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-17F 産生誘導機序及び分化形態の検討

P25 TCR-Tg (C57BL/6 バックグランド) 脾臓細胞より IMag システム (BD Bioscience) を用い、CD4<sup>+</sup> T 細胞を調製した。OT-1 (C57BL/6 バックグランド) 脾臓細胞より IMag システムを用い CD8<sup>+</sup> T 細胞を調製した。C57BL/6 マウス脾臓細胞より IMag システムを用いて樹状細胞を調製し抗原提示細胞として用いた。

樹状細胞及び OVA 存在下に P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞または IFN- $\gamma$  欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞または T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を Peptide-25 で刺激し、6 時間後及び 12 時間後の全細胞から RNeasy (Qiagen) を用いて mRNA を調製し、リアルタイム PCR 法にて *tgf- $\beta$ 1*、*tgf- $\beta$ 2*、*tgf- $\beta$ 3* 及び *il-6* mRNA の発現を検討した。さらに培養 1 日後に CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-17F 産生を細胞内染色法にて、CD4<sup>+</sup> T 細胞表面上の CD44 及び CD62L の発現をそれぞれの分子特異的抗体にて染色し検討した。

(2) *in vitro* における CTL 分化誘導及び機能性の評価

P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞と Peptide-25 が共存する条件で樹状細胞に OVA を取り込ませた。実験によってはこの際、リコンビナント (r) IL-17F を添加した。培養 1 日後に、



P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞及び余剰の抗原及び rIL-17F を取り除いた OVA を取り込んだ樹状細胞を OT-1-CD8<sup>+</sup> T 細胞と培養した。培養 3 日後の OT-1-CD8<sup>+</sup> T 細胞のグランザイム B 産生を指標に CTL への分化及び機能性を評価した。

#### 倫理面への配慮

実験に供したマウスの飼育、維持は国立感染症研究所の実験動物指針に従い実施した。

### C. 研究結果

#### (1) Peptide-25 特異的 IL-17F 産生細胞の分化誘導機序の検討

ナイーブ CD8<sup>+</sup> T 細胞のグランザイム B の発現を伴う機能的 CTL への分化には①Th1 細胞への分化を誘導するような環境下での CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞との相互作用によって誘導される樹状細胞の活性化が重要な役割を果たしていること、②この相互作用を司る因子を DNA マイクロアレイ法にて検索した結果、27 種類の候補遺伝子を得たこと、そのうち Th1 分化を選択的に誘導する Peptide-25 刺激でのみ CD4<sup>+</sup> T 細胞に *il-17f* mRNA が発現誘導されることを明らかにしてきた。

IL-17F 産生細胞は Peptide-25 刺激で Th1 細胞と共に分化誘導される。そこで、IL-17F 産生細胞の分化誘導に Th1 細胞が分泌する IFN- $\gamma$  が関与しているか検討した。IFN- $\gamma$  欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を樹状細胞と OVA 存在下に Peptide-25 で刺激し、1 日後の IL-17F 産生を細胞内染色法にて検討した。その結果、IFN- $\gamma$  欠損 CD4<sup>+</sup> T 細胞においても野生型とほぼ同程度に IL-17F 産生が誘導されることが明らかになった。さらにこの条件で活性化された樹状細胞の CTL 分化誘導能を検討した結果、野生型と同程度の機能的 CTL の分化が誘導された。

また Peptide-25 による Th1 分化には我々が見い出した TAF7 に加え、T-bet も関与することをこれまでに明らかにしてきた。そこで、T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いて IL-17F 産生における T-bet の役割を検討した。その結果、T-bet 欠損 P25

TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞においても野生型と同程度の IL-17F 産生が誘導され、またこの条件下で活性化された樹状細胞も機能的 CTL の分化を誘導した。

CD4<sup>+</sup> T 細胞亜集団において IL-17F は IL-17A と共に Th17 細胞が産生すると考えられている。この Th17 細胞への分化には TGF- $\beta$  と IL-6 の存在が不可欠である。そこで、P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を樹状細胞と OVA 存在下に Peptide-25 で刺激し、6 時間後及び 12 時間後のこれらサイトカイン mRNA の発現をリアルタイム PCR 法にて検討した。その結果、*il-6* mRNA は Peptide-25 刺激 6 時間後、12 時間後いずれに時間においてもその発現が認められるのに対し、*tgf- $\beta$*  (1, 2, 3) mRNA はいずれの時間においても発現が全く誘導されないことが明らかになった。

#### (2) Peptide-25 特異的 IL-17F 産生細胞の分化形態の検討

Peptide-25 特異的 IL-17F 産生細胞の分化形態を検討するために、P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を樹状細胞と OVA 存在下に Peptide-25 で刺激した後の CD4<sup>+</sup> T 細胞表面上の CD44 及び CD62L の発現を検討した。その結果、Th1 細胞は CD44 陽性 CD62L 弱陽性のエフェクターメモリー T 細胞様の形態を示すのに対し、IL-17F 産生細胞は CD44 強陽性 CD62L 弱陽性のレジデントエフェクター細胞様の形態を示すことが明らかになった。

#### (3) CD4<sup>+</sup> T 細胞の IL-17F 産生量と CTL からのグランザイム B 産生量との相関性の検討

CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-17F 産生量と CTL からのグランザイム B 産生量に正の相関性が認められれば、結核菌特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-17F 産生量が結核ワクチンの効果を判定する因子となりうる。そこで、Peptide-25 特異的 IL-17F 産生細胞の IL-17F 産生量と CTL のグランザイム B 産生量との相関を検討するために、樹状細胞を P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞と OVA 存在下に各種濃度の Peptide-25 と共に培養した。その結果、Peptide-25 の用量依存的に CTL からの

グランザイム B 産生量が増強した。さらに樹状細胞を指摘濃度の Peptide-25 と共に培養する際に各種濃度のリコンビナント IL-17F を添加した。その結果、rIL-17F の用量依存的に CTL からのグランザイム B 産生が増強された。

#### D. 考察

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または IL-17A とのヘテロダイマーとして分泌される。本研究結果から IL-17F には樹状細胞の活性化を誘導する活性があることが示されている。現在 IL-17F 欠損 P25 TCR-Tg マウスの作出を進めており、このマウス由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いることで機能的 CTL の分化を誘導する樹状細胞の活性化における IL-17F の役割を確定させる予定である。

Peptide-25 刺激は Th1 分化を誘導する。そこで、IL-17F 産生細胞の分化誘導における Th1 分化誘導因子及び細胞内分化調節因子の関与を検討した。その結果、Th1 細胞が産生する IFN- $\gamma$ 、Th1 分化を調節する細胞内因子 T-bet は IL-17F 産生には必須ではないことが示された。我々は Peptide-25 による Th1 分化には TAF7 が重要な役割を果たしていることをこれまでに明らかにしてきた。今後レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターを用いた miRNA 導入法にて TAF7 欠損 P25 TCR-Tg CD4<sup>+</sup> T 細胞を作成し、IL-17F 産生細胞分化における TAF7 の関与を検討する予定である。

IL-17A を産生する Th17 細胞への分化は IFN- $\gamma$  によって阻害されることが知られている。Peptide-25 刺激の場合、IFN- $\gamma$  共存下に IL-17F 産生が誘導されること、また IL-17A 産生は全く見られないこと、さらに Peptide-25 刺激条件下では Th17 細胞の分化に必須の TGF- $\beta$  の産生が誘導されないことから、Peptide-25 刺激で誘導される IL-17F 産生細胞は Th17 細胞とは異なる亜集団であることが示された。

さらに IL-17F 産生細胞の分化形態を検討した結果、Peptide-25 で誘導される Th1

細胞がエフェクターメモリー細胞様の形態を示すのに対し、IL-17F 産生細胞はレジデントメモリー細胞様の形態を示すことが明らかになった。レジデントメモリー T 細胞は感染局所に留まり、再感染時に即時応答する細胞集団である。今後は論文に示されている CD8<sup>+</sup> レジデントメモリー T 細胞の特徴 (CD69 陽性、CD103 陽性) が CD4<sup>+</sup> IL-17F 産生細胞に認められるか検討していく予定である。

CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-17F の産生量と CTL からのグランザイム B の産生量に正の相関が認められた。このことは BCG 接種によって誘導された BCG 特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-17F 産生量を定量することで結核菌特異的 CTL の機能的活性化能を推測できる可能性を示している。今後、ヒト末梢血を用い末梢血単球と BCG 接種効果と相関を検討していきたいと考えている。

#### E. 結論

本年度の研究から①Peptide-25 特異的 IL-17F 産生細胞の分化誘導には既知の Th1 分化誘導因子は必須ではないこと、② IL-17F 産生細胞は Th17 細胞とは異なるヘルパー T 細胞亜集団であること、③ IL-17F 産生細胞はレジデントメモリー様の分化形態を示すこと、④ CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-17F 産生量と CTL からのグランザイム B 産生量は正の相関を示すことが明らかになった。以上の結果より、新たなヘルパー T 細胞亜集団である IL-17F 産生細胞が CTL 分化誘導に必須である可能性及び IL-17F が結核ワクチン接種後の CTL の機能を推定出来る因子である可能性が示された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 前田 百美、田村 敏生、福富 康夫、牧野 正彦. らい菌感染した樹状細胞から分泌されるエキソソームの解析. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術集会

2012年6月 札幌

2) Shimohakamada, Y., T. Tamura, and M. Makino. Enhancing effect of Peptide-25 on the induction of functional activation of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. 第41回日本免疫学会総

会・学術集会 2012年12月 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成24年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

結核疫学解析、結核の臨床研究

分担研究報告書

研究分担者

松本 智成

(大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター・部長)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）  
分担研究報告書

結核疫学解析、結核の臨床研究

研究分担者 松本 智成 （大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター・臨床研究部・部長）  
研究協力者 仲 哲治 （医薬基盤研・研究部・プロジェクトリーダー）  
世良田 聡 （医薬基盤研・研究部・主任研究員）  
藤本 穰 （医薬基盤研・研究部・主任研究員）

研究要旨.

【はじめに】 Leucin rich  $\alpha 2$  glycoprotein (LRG) は、医薬基盤研究所の仲等によって同定された蛋白質で、炎症反応時に IL-6 非依存性に好中球、マクロファージ・リンパ球等から分泌される。IL-6 非依存性であるゆえに CRP とは、独立に反応するという特徴があり、CRP が上昇しづらい炎症性疾患時や生物学的製剤投与時の疾患活動性マーカーや感染症併発時のバイオマーカーとして期待される。

結核は、活動時に比較的 CRP が上昇しづらい疾患として知られている。また、肺結核症においては治療評価に採取された喀痰の質に大きく依存する塗抹培養検査が用いられ喀痰以外の検体による評価法が望まれている。特にアジア、アフリカ等の国においては、喀痰塗抹検査のみで結核の診断、治療効果判定を行う国があり、血清等からのバイオマーカー測定による診断並びに効果判定が求められている。結核治療時の血清 LRG 値の変化は今迄に報告はない。そこで、結核治療時の血清 LRG 値の変化を測定した。

【方法】 結核菌排菌が確認された肺結核患者 33 名に対して 3 剤もしくは、4 剤の抗結核薬による標準化学療法を行い血清 LRG 値を治療開始前、開始後 1, 3 ヶ月後に測定した。なお、患者選定には、肺結核が中心で他に合併症のない患者を選定した。

患者の個人情報には十分の注意を払った。

【結果】 治療経過と共に血清 LRG 値が低下し、その結果は喀痰塗抹培養検査と矛盾しなかった。

【結語】 現在、治療効果の判定は喀痰塗抹、培養検査が主流であるが喀痰の質に検査精度が依存する事、培養結果を得るのに時間がかかるという問題がある。その点、血液検査で結果の出る LRG は、検査日に結果が得られ迅速である。血清 LRG 値は、結核治療時の喀痰検査に依存しない結核活動性のマーカーとなる可能性が明らかになった。

A. 研究目的

Leucin rich  $\alpha 2$  glycoprotein (LRG) は、医薬基盤研究所の仲等によって、炎症反応時に IL-6 非依存性に好中球やマクロファージ・リンパ球などから分泌される新たな炎症性タンパク質として同定された。IL6 非依存性に誘導されることから、IL-6 以外の因

子により惹起される炎症性疾患や IL-6R 阻害抗体使用時などの生物学的製剤投与時の炎症マーカー、また感染症併発時のサロゲートマーカーとして期待される。IL6 非依存性であるゆえに CRP とは、独立に反応するという特徴があり、CRP が上昇しづらい炎症性疾患時や生物学的製剤投与時の疾患活動性

マーカーや感染症併発時のバイオマーカーとして期待される。

今まで、中等によってLRGは関節リウマチ(RA)患者血清中で上昇し、治療に反応して低下する。LRGはRA患者以外の炎症性疾患においても高値となる。また、LRGはRA患者において、CRPより疾患活動性と相関する事がしめされ、さらに、LRGは、IL-6非依存性に発現する事が示されてきた。

結核は、活動時に比較的CRPが上昇しづらい疾患として知られている。また、治療評価に採取された喀痰の質に大きく依存する塗抹培養検査が用いられ喀痰以外の検体による評価法が望まれている。特にアジア、アフリカ等の国においては、喀痰塗抹検査のみで結核の診断、治療効果判定を行う国があり血清等からのバイオマーカー測定による診断並びに効果判定が求められている。結核患者における血清LRG値並びに結核加療時の血清LRG値の変化は今迄に報告はない。そこで、結核患者における血清LRG値並びに結核治療時の血清LRG値の変化を測定した

## B. 研究方法

大阪府立呼吸器アレルギー医療センターにて、結核菌培養陽性にて排菌が確認され結核病棟に入院した肺結核患者160名と健常人50名の血清LRGを測定比較した。また、大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター結核病棟にて、結核菌排菌が確認された肺結核患者33名に対して、3剤もしくは4剤の抗結核薬による標準化学療法を行い血清LRG値を治療開始前、開始後1, 3ヶ月後に測定した。LRG測定は、中等が確立したELISA法にて医薬基盤研究所にて行った。なお、患者選定には、肺結核が中心で他に合併症のない患者を選定した。

倫理面への配慮 患者の個人情報には十分の注意をはらい、データは匿名化して外部に個人情報が出ないように留意した。

## C. 研究結果

大阪府立呼吸器アレルギー医療センター結核病棟にて、結核菌排菌が確認された

肺結核患者160名の血清LRG平均値は5.481( $\mu\text{g/ml}$ )であり、それに対する健常人血清の平均値は3.07( $\mu\text{g/ml}$ )であった( $p < 0.001$ )。結核治療開始前の結核菌排菌患者のLRG値が12.25( $\mu\text{g/ml}$ )であったのに対して治療経過と共に血清LRG値は、一ヶ月後では9.31( $\mu\text{g/ml}$ )、三ヶ月後では6.04( $\mu\text{g/ml}$ )と低下した。そして、その結果は喀痰塗抹培養検査と矛盾しなかった。

## D. 考察

肺結核症においては治療評価に採取された喀痰の質に大きく依存する塗抹培養検査が用いられ喀痰以外の検体による評価法が望まれている。特に、アジアにおいては、レントゲン検査や培養検査を行わない国が多く、喀痰結核菌塗抹検査にて治療評価を行う場合がほとんどであるが、もっと客観的な検査法が望まれている。

LRGはIL-6非依存性に誘導されることから、IL-6以外の因子により惹起される炎症性疾患やIL-6阻害抗体使用時などの生物学的製剤投与時の炎症マーカー、また感染症併発時のサロゲートマーカーとして期待される。IL-6非依存性であるゆえにCRPとは、独立に反応するという特徴があり、CRPが上昇しづらい炎症性疾患時や生物学的製剤投与時の疾患活動性マーカーや感染症併発時のバイオマーカーとして期待されている。結核患者における血清LRG値並びに結核加療時の血清LRG値の変化は今迄に報告はない。したがって、結核活動性マーカーとしてLRGが機能するかの判断する事は重要である。

## E. 結論

現在、治療効果の判定は喀痰塗抹、培養検査が主流であるが喀痰の質に検査精度が依存する事、培養結果を得るのに時間がかかるという問題がある。その点、血液検査で結果の出るLRGは、検査日に結果が得られ迅速である。血清LRG値は、結核治療時の喀痰検査に依存しない結核活動性のマーカーとなる可能性が明らかになりアジアに

における結核治療の指標として有効である可能性がみとめられた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tatano, Y., C. San, K. Yasumoto, K. Sato, K. Nishimoto, T. Matsumoto, S. Yano, H. Takeyama, and H. Tomioka. 2012. Correlation between variable-number tandem-repeat-based genotypes and drug susceptibility in *Mycobacterium avium* isolates. *European J. Clin. Microbiol. y & Infect. Dis.*, 31: 445-454.
- 2) Mitarai, S., S. Kato, H. Ogata, A. Aono, K. Chikamats, E. Toyota, A. Sejimo, K. Suzuki, S. Yoshida, T. Saito, A. Moriya, A. Fujita, S. Sato, T. Matsumoto, H. Ano, T. Suetake, Y. Kondo, T. Kirikae, and T. Mori. 2012. Comprehensive multicenter evaluation of a new line probe assay kit for identification of *Mycobacterium* species and detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, 50: 884-890.

### 2. 学会発表

- 1) Tomoshige Matsumoto. Anti-TNF therapy in twelve patients with tuberculosis. 2012年4月 神戸市

- 2) 松本智成. グローバル時代の感染症：多剤耐性結核の現状と改良 BCG ワクチン開発. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会 第 60 回日本化学療法学会学術集会 2012年4月 長崎市
- 3) 松本智成, 平山 幸雄, 白山 敬之, 岡藤 浩平, 板東 千昌, 久光 由香, 福村 恵, 平田 明美, 田中 久美, 黒川 雅史, 田村 嘉孝, 永井 崇之, 太田 三徳, 川瀬 一郎. 当センター職員同一血液検体における QFT2G と 3G との比較試験、および 5 年前の QFT2G 結果との比較検討. 第 87 回日本結核病学会総会 2012年5月 広島市
- 4) 黒川 雅史, 田村 嘉孝, 韓 由紀, 松本 智成, 永井 崇之, 川瀬 一郎. 当院における結核菌薬剤耐性率の推移について. 第 87 回日本結核病学会総会 2012年5月 広島市
- 5) 松本 智成. 結核合併関節リウマチ患者 12 名に対する抗 TNF 製剤投与の安全性と有効性：続報. 第 87 回日本結核病学会総会 2012年5月 広島市
- 6) 永井 崇之, 黒川 雅史, 田村 嘉孝, 韓 由紀, 松本 智成, 川瀬 一郎. 「当院における多剤耐性肺結核 89 例の治療成績」. 第 87 回日本結核病学会総会 2012年5月 広島市

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成24年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

結核病態に関する分子生物学的研究

分担研究報告書

研究分担者

松本 壮吉

(大阪市立大学・准教授)



厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）  
分担研究報告書

結核病態に関する分子生物学的研究

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・准教授)
研究協力者	井上 学	(大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・大学院生)
	仁木 満美子	(大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・助教)
	濱野 真二郎	(長崎大学熱帯医学研究所・寄生虫学・教授)
	嶋田 雅暁	(長崎大学熱帯医学研究所・ケニア拠点・教授)
	一瀬 休生	(長崎大学熱帯医学研究所・ケニア拠点・拠点長)
	凧 幸世	(長崎大学熱帯医学研究所・寄生虫学・大学院生)
	岡 真優子	(京都府立大学大学院・食環境安全性学・准教授)
	尾関 百合子	(園田学園女子大学・人間健康学部食物栄養学科・教授)
	岡部 真裕子	(国立感染症研究所・免疫部・研究員)
	小林 和夫	(国立感染症研究所・免疫部・部長)
	野内 英樹	(結核予防会複十字病院・科長)
	原田 登之	(結核予防会結核研究所・研究主幹)

研究要旨.

結核はグラム陽性菌である *Mycobacterium tuberculosis* によって引き起こされ、人々の健康に重篤な被害を与える三大感染症(AIDS、結核、マラリア)の一つである。2010年においては880万人が新規発生し、110万人が結核によって死亡している。また感染後、大多数の感染者(95%)は発症せず、長期間の潜伏感染が持続するが、5-10%の無症候感染者は内因性再燃によって結核を発症する。それゆえ潜在性結核(LTBI)は病原体の主要なリザーバーであり、LTBIをコントロールすることが結核を対処する上で重要であると考えられ、アジアやアフリカ地区など、結核の流行地域において潜在性結核を把握することが重要である。

一方蔓延地域では、寄生虫感染の蔓延が一般的であり、これらが結核の高蔓延に影響を与えることが知られている。近年の研究において、慢性的なhelminth感染はBCGの抗結核効果を減弱させることも報告され、さらに高helminth感染蔓延地域と結核菌蔓延地域は相関を示すことから、helminth感染は結核菌感染を促す可能性が報告され、またその逆も同様である。しかしLTBIとhelminth感染の関係性はいまだ未解明のままである。本研究ではタイ王国で、潜在性結核検出系の確立を目的として結核菌の休眠期抗原に対する抗体応答を、アフリカケニア共和国においてはLTBIと寄生虫感染の関係性についての調査を行った。

A. 研究目的

ケニア共和国やタイ王国は、世界結核高負担国22カ国の中でそれぞれ13番目と19番目に位置する。ケニア共和国においては様々な寄生虫感染症罹患率が高いことも報告されている。本研究において、これら感

染症高蔓延国であるケニア共和国のLTBI、寄生虫感染の検出とLTBIのリスクファクターの特定を目的とし、調査を行った。

一方、タイ王国では、臨床疫学情報が正確に管理されたコホートが存在する。本研究では、そのようなコホートを活用し、潜

在性結核に関わる可能性のある結核菌抗原に対する抗体応答を検出した。タイ王国では、進化系統的にも日本と異なる結核菌が蔓延していることから、世界的な基準で、潜在性結核診断の確立にむけた知見を得ることを目的とした。

## B. 研究方法

本研究において対象とした population はケニア共和国の Mbita 地区においてランダムに7校が選別された standard4 を対象とし調査を行った。調査対象とした項目は LTBI、寄生虫感染の検出および、健康調査とした。

LTBIの検出には対象とした学生から血液を採取し、分離された末梢血単核球を結核菌抗原(Early Secreted Antigenic Target 6 kDa protein; ESAT-6、10 kDa culture filtrate protein; CFP10 )で24時間刺激し、産生されたインターフェロン $\gamma$ をイムノクロマト法によって検出することによる行った。また culture filtrate protein A (ConA)を陽性コントロールとして用いた。

蠕虫、原虫の検出には、3日間連続採取された糞鞭をkato-katz法に従い行った。

マラリア原虫感染の検出には、ギムザ染色標本の顕微鏡観察により原虫感染の有無、およびその形態学的特徴から熱帯マラリア、三日熱マラリア、卵形マラリアおよび四日熱マラリアの4種の原虫種鑑別を行った。

ヘモグロビン、赤血球、ヘマトクリットの測定は、BM6050(JEOL, Japan)を用いて測定し、これらの値から平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素濃度を計算した。

さらにこれらの結果を統計解析することにより、LTBIに対するリスクファクターの特定を行った。

タイ王国チェンライ県において、HIV非感染者185名から採血を行い、結核の診断とQFT試験を実施した。結核に関しては、結核症状(発熱、長期の咳)に加え、喀痰中の抗酸菌の検出を指標に結核と診断した。HIV感染については、血清中抗体がHIVの少なくとも2種の抗原に対する抗体が検出されていることを指標にHIV感染と診断した。

結核菌抗原に対するELISAを下記の方法

にて実施した。185名のうち、56検体について、各種結核菌抗原に対する反応をELISAにて検討した。56検体のQFT試験陰性者は20名、残る36名は陽性者であった。

各種結核菌抗原を、リン酸緩衝液(PBS)に、それぞれ5  $\mu\text{g/ml}$ の濃度で溶解し(MDP1については、2.5  $\mu\text{g/ml}$ )、96穴ELISAプレート(スミトモ)に室温にて2時間固相化した。次にブロッキングを行い、5%スキムミルクを加え低温(4°C)にて終夜静置した。血清を、1%スキムミルク、0.05% Tween20含有のリン酸緩衝液で、100倍に希釈し、抗原を固相化したウエルに加え、37度にて1時間反応させた。次にウエルを0.05% Tween20含有のリン酸緩衝液にて洗浄し、ワサビペルオキシダーゼ標識—抗ヒトIgG抗体(Dako)を1%スキムミルク、0.05% Tween20含有のリン酸緩衝液で4,000倍希釈してウエルに加えた。37度にて1時間加温後、ウエルを0.05% Tween20含有のリン酸緩衝液にて洗浄した。SureBlueを各ウエルに加え、3分間反応させた。発色反応を1N塩酸にて停止させ、吸光度を450 nm(対照波長690 nm)にて測定した。

統計解析には IBM SPSS 20.0 software を使用した。

倫理面への配慮 本研究計画は、ケニア共和国医学研究所やタイ国立衛生研究所の倫理委員会の承認を得て実施した。検者およびその両親や保護者に、英語およびルオ語で説明し同意を得た者を対象として試験を行った。

## C. 研究結果

ケニア共和国における、本研究エリアの学生(standard4)において、BCG接種者は240名中167名(53.8%)であった。またPPDによる抗原刺激で反応性を示した者は191名(79.6%)、結核菌抗原(ESAT6 and/or CFP10)に対しては75名(31.3%)であり、これら結核菌抗原(ESAT6 and/or CFP10)に対して反応性を示したものをLTBI群と定義した。またこれら75名全てConAに対して反応性を示した。

さらに寄生虫感染に関しては hookworm

感染者が 18 名、*Ascaris lumbricoides* 感染者が 6 名、*Trichuris trichiura* 感染者が 12 名、*Schistosoma mansoni* 感染者が 178 名、*Plasmodium falciparum* 感染者が 31 名、*P. malariae* 感染者が 1 名、*P. ovale* 感染者が 0 名、*P. vivax* 感染者が 0 名、*Entamoeba coli* 感染者が 17 名、*E. histolytica* / *E. dispar* / *E. moshkovskii*、*Iodameba* 感染者が 31 名、*Giardia intestinalis* 感染者が 11 名、*Balantidium* 感染者が 5 名、*Coccidia* 8 名、*Blastocystis* 感染者が 3 名確認された。

さらにこれらの結果を用いて統計解析を行ったところ、LTBI と hookworm 感染との間に有意な相関が示され( $p=0.021$ )、さらにオッズ比を算出したところ、hookworm 感染によって結核菌感染リスクが hookworm 非感染者と比較し、3.019 倍上昇すること示された。

タイ王国において QFT 陰性群の各抗原に対する抗体価は、ESAT6 (28.19±9.9)、CFP10 (27.23±10.9)、Antigen85B (35.95±17.8)、MDP1 (40.9±19.0)、Acr (32.0±12.9)、PPD (38.2±19.3) であった。QFT 陰性群の各抗原に対する抗体価の平均は、ESAT6 (29.37±9.9)、CFP10 (64.41±100)、Antigen85B (41.69±14.1)、MDP1 (54.4±23.7)、Acr (74.92±110)、PPD (55.27±30.5) であった。結核非発症者の QFT 陰性群の各抗原に対する抗体価は、ESAT6 (26.84±10.4)、CFP10 (25.06±9.0)、Antigen85B (33.11±17.1)、MDP1 (38.05±17.3)、Acr (28.14±7.6)、PPD (32.06±13.4) であった。結核非発症者の QFT 陽性群の各抗原に対する抗体価は、ESAT6 (24.29±9.1)、CFP10 (25.8±11.3)、Antigen85B (34.72±10.49)、MDP1 (45.52±15.39)、Acr (71.6±120)、PPD (45.2±23.8) であった。結核発症者の QFT 陰性群の各抗原に対する抗体価は、ESAT6 (35.88±14.9)、CFP10 (39.5±12.4)、Antigen85B (52.07±12.03)、MDP1 (57.13±20.2)、Acr (53.74±14.7)、PPD (72.96±7.74) であった。結核発症者の QFT 陽性群の各抗原に対する抗体価は、ESAT6 (31.7±9.3)、CFP10 (81.38±116.9)、Antigen85B (44.75±14.3)、

(58.36±25.35)、Acr (76.24±105.35)、PPD (59.88±32.1) であった。

#### D. 考察

蠕虫病を含む様々な寄生虫感染症は、NTDs として認識され、*Ancylostoma duodenale* や *Necator americanus* のような hookworm 感染はアジア、アフリカ、ラテンアメリカのような発展途上国において、常習的に感染が報告されており、世界中で約 7 億 4 千万人の人々がこれらの寄生虫に感染していると推定されている。

hookworm を含む helminth による感染は様々な免疫応答を引き起こすが、一般的には T ヘルパー2(Th2)免疫応答を誘導すると考えられている。例えば filaria、hookworm または *Ascaris lumbricoides* のような helminth は感染に伴い、宿主において Th2 依存的好酸球性肺炎が頻繁に確認される。しかし、エンデミックエリアにおけるこれら helminth 感染者は Th1 サイトカインが優位に産生されていることが、エンデミックエリアの hookworm 感染者由来末梢血単核球のサイトカイン産生量により確認されている。さらにマウスモデルにおいても同様に Th1 応答を刺激する原虫感染、または細菌感染との重感染の際、helminth 感染によって誘導された Th2 応答が結果として、原虫感染、細菌感染によって引き起こされた Th1 応答によって抑制されるということも報告されている。本研究においても、helminth 感染者において Th2 免疫応答の指標とされる好酸球の有意な増加は確認されなかった。これは、蔓延地域において人々は Th1 応答を誘導する病原体への暴露が一般的であることから、helminth との重感染の際、Th1 応答が優位な状態を示すことが推察される。しかし helminth と結核菌の重感染の際、Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  産生の産生が抑制されることも報告されていることから、hookworm の感染によって、結核菌感染に対して防御的に働く Th1 応答を抑制し、また結核菌感染によって、hookworm 感染に対して防御的に働く Th2 応答を抑制し、それゆえ hookworm と結核

菌の共存が可能となることも推察される。

hookworm のみならず *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* のような helminth の感染においても hookworm 同様の強固な Th2 応答を引き起こすことが知られているが、本研究において、*Ascaris lumbricoides* や *Trichuris trichiura* と LTBI の間で有意な関連は示さなかったことから、hookworm 感染による Th1 応答の抑制が LTBI 影響を与える唯一の原因ではないことが推測される。

一方、免疫抑制性サイトカインとして知られ、結核菌感染に対して宿主防御免疫を抑制する IL-10 において、その産生量が Hookworm の再感染者、治癒者(虫卵陰性)においては有意に高いことが知られ、この IL-10 産生量の増加に起因した IFN- $\gamma$  産生の抑制が生じた結果、抗結核免疫に負の影響を与えている可能性も否定できない。

このように hookworm 感染と LTBI の関連の原因は現段階では明らかではない。今回の学生の population で得られた結果が、成人の population においても同様の結果が得られるかどうか調査を行い、hookworm 感染が種特異的に LTBI に影響を与える原因を明らかにする必要がある。さらに helminth 感染者は結核を発症するリスクが高いということが報告されていることから、hookworm 感染は LTBI の拡大にのみ起因しているのか、helminth 感染同様に結核の発症自体にも影響を与えるのかどうかについても検討する必要があるであろう。

一方、タイ王国では、結核菌と HIV の重感染者が多く、また進化系統的にも日本と異なる結核菌が蔓延していることから、国内で得られたデータの普遍性を検証し、新しい結核菌感染検出法の確立にむけた知見を得ることを目的とした前試験的に採血した185名の献体のうち、56名の血清について結核菌抗原に対する抗体の存在を検討した。

各種抗原 (ESAT6, CFP10, MDP1, Antigen 85, Acr) に対する抗体応答を ELISA 法で検出した結果、抗体(IgG)は検出されたものの、QFT 陽性者と陰性者間での有意差は検出できなかった。これは、QFT 試験自体に問題があり結核菌感染者を正確に検出できてい

ないためなのか、抗体応答では潜在性結核菌感染者の検出が難しいためであるのか不明である。今後、例数を増やすとともに細胞性応答を加え、系の改善や構築を検討していきたい。

## E. 結論

ケニア共和国西部のビクトリア湖畔 Mbita 地区で小学生を対象とした研究調査を実施した結果、hookworm 感染と潜在性結核に相関があることが明らかとなった。

タイ王国で、QFT 陽性者(36名)と陰性者(20名)における各種結核菌抗原 (ESAT6, CFP10, MDP1, Antigen 85, Acr) に対する抗体応答を検出したが、QFT 陽性者と陰性者間で明瞭な違いは検出できなかった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tateishi, Y., S. Kitada, K. Miki, R. Maekura, Y. Ogura, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Niki, T. Hayashi, K. Hirata, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2012. Whole-genome sequence of a hypervirulent clinical *Mycobacterium intracellulare* strain, M. i.198. J. bacterial., in press.
- 2) Niki, M., M. Niki, Y. Tateishi, Y. Ozeki, T. Kirikae, A. Lewin, Y. Inoue, M. Matsumoto, J. L. Dahl, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2012. A novel mechanism of growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria. J. Biol. Chem., 287: 27743-27752.
- 3) Tamaru, A., C. Nakajima, T. Wada, Y. Wang, M. Inoue, R. Kawahara, R. Maekura, Y. Ozeki, H. Ogura, K. Kobayashi, Y. Suzuki, and S. Matsumoto. 2012. Dominant Incidence of Multidrug and Extensively Drug-Resistant Specific *Mycobacterium tuberculosis* Clones in Osaka Prefecture, Japan. PLoS One, 7: e42505.