

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 と鉤虫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、鉤虫感染によって結核菌感染リスクが鉤虫非感染者と比較し、3.019 倍上昇すること示された。

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* のような鉤虫感染はアジア、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いる。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。

鉤虫を含む多細胞性寄生虫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*、鉤虫または *Ascaris lumbricoides* のような多細胞性寄生虫は感染に伴い、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、高度蔓延地区におけるこれら多細胞性寄生虫感染者は Th1 サイトカインが優位に産生されていることが、高度蔓延地区の鉤虫感染者由来末梢血単核球のサイトカイン産生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、多細胞性寄生虫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、多細胞性寄生虫感染者において Th2 免疫応答の指標のひとつで

あ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、多細胞性寄生虫との重感染の際、Th1 応答が優位な状態を示すことが推察される。しかし多細胞性寄生虫と結核菌の重感染の際、Th1 サイトカインである IFN- γ 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、鉤虫の感染によって、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、鉤虫感染に対して防御的に働く Th2 応答を抑制する相助的な関係ゆえに鉤虫と結核菌の共存が助長される可能性がある。

鉤虫のみならず *Ascaris lumbricoides*、*Trichuris trichiura* のような多細胞性寄生虫の感染においても鉤虫同様の強固な 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、鉤虫感染による 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、その産生量が鉤虫の再感染者、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- γ 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。

このように鉤虫感染と LTBI の関連の原因は現段階では明らかではない。今回の学生を対象として得られた結果が、成人においても同様であるかどうか調査を行う必要があるだろう。さらに多細胞性寄生虫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、鉤虫感染は LTBI の拡大にのみ起因しているのか、多細胞性寄生虫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べきと思われる。

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、鉤虫感染と潜在性結核に相関があることが明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Osada-Oka, M., Y. Tateishi, Y. Hirayama, Y. Ozeki, M. Niki, S. Kitada, R. Maekura, K. Tsujimura, Y. Koide, N. Ohara, T. Yamamoto, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2012. Antigen 85A and Mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of IgG in individuals with past tuberculosis. *Microbiol Immunol* In press.
2. 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 the hypervirulent clinical strain *Mycobacterium intracellulare* M.i.198. *J Bacteriol* 194:6336.
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.
4. 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.
5. Fujii, J., M. Naito, T. Yutsudo, S. Matsumoto, D. P. Heatherly, T. Yamada, H. Kobayashi, S. Yoshida, and T. Obrig. 2012. Protection by a recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin vaccine expressing Shiga toxin 2 B subunit against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in mice. *Clin Vaccine*

Immunol 19:1932-1937.

6. 松本 壮吉、尾関 百合子、小林 和夫. 2012. 新しい結核ワクチ開発の展望. *臨床と微生物*. Vol39 2号. P131-136.

2. 学会発表

1. 松本 壮吉. 2012. 結核菌の休眠現象と潜在性結核診断の可能性. 第2回結核感染診断研究会(広島、5月).
2. 仁木 満美子、松本 壮吉. 2012. 定常期抗酸菌にみられるイソニアジド抵抗性獲得メカニズムの解析. 第82回実験結核研究会(広島、5月).
3. 西内 由紀子、戸谷 孝洋、立石 善隆、前倉 亮治、松本 壮吉. 2012. 非結核性抗酸菌が形成するバイオフィルムの生態学的特徴. 第26回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会(大阪、7月).
4. 松本 壮吉. 2012. 結核菌の増殖、長期生存、および静止期以降の薬剤抵抗性獲得の分子メカニズム. 第26回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会(大阪、7月).
5. 松本 壮吉. 2012. 休止期結核菌の性状と、休止期抗原を利用した結核菌感染検出の試み. 第44回関西抗酸菌研究会(大阪、8月).
6. Nishiuchi Y., S. Kitada, S. Matsumoto, and R. Maekura. 2012. Recovery and genetic polymorphism of *Mycobacterium avium* complex (MAC) in the Bathroom. *Tuberculosis* 2012. (パリ、フランス共和国、9月).
7. Inoue M., S. Nagi, E. Faith, M. Osada-Oka, K. Ono, Y. Ozeki, M. Niki, K. Kobayashi, M. Matsumoto, M. Shimada, S. Kaneko, Y. Ichinose, S. Njenga, S. Hamano, and S. Matsumoto. 2012. 第53回日本熱帯医学会大会(北海道、9月).
8. Matsumoto S. 2012. Functions of mycobacterial DNA binding protein and its contribution to the persistent infection of *Mycobacterium tuberculosis*. The 11th Korea-Japan

International Symposium on
Microbiology. (Buyeo, Korea, 9月).

9. 前山 順一、伊保 澄子、岡 真優子、松本 壮吉、山本 三郎. 2012. 結核ブースターワクチンとしての結核菌組換えタンパク質およびアジュバントの評価. 第16回日本ワクチン学会学術集会 (神奈川, 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

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

結核菌細胞壁には多量の脂質・糖脂質群が存在し、菌の生存や病原性に深く関わっている。宿主内増殖菌は、宿主体内に高濃度で存在するグルコースを基質としたミコール酸転移反応により、グルコースモノミコール酸（GMM）を新生する。一方、休眠菌は主要な細胞壁糖脂質であるトレハロースモノミコール酸（TDM）や GMM をほとんど産生しない。最近の研究から、休眠菌特有のミコール酸含有細胞壁脂質としてグリセロールモノミコール酸（GroMM）が同定されつつあるが、その生物学的意義は不明な点が多い。研究分担者の杉田は、BCG 接種モルモットを用い、増殖菌特異的糖脂質である GMM と休眠菌特異的脂質である GroMM に対する免疫応答の研究を進めてきた。その結果、GMM はいわゆる遅延型アレルギー応答を誘起し、単核球の局所浸潤を主体とした TH1 サイトカイン応答を引き起こすのに対し、GroMM によって誘起される炎症応答は、好酸球の浸潤を主体とし、TH1 サイトカインよりむしろ TH2 サイトカインが優位であることを明らかにした（J. Biol. Chem. 286: 16800-16806, 2011; Biochem. Biophys. Res. Commun. 409: 304-307, 2011）。本研究では、ヒト結核の制御と潜伏感染病態の理解を視野に、non-human primates であるアカゲザルを用い、GMM と GroMM に対する免疫応答の比較検証を行った。その結果、GMM に対するアカゲザル T 細胞反応は極度に TH1 サイトカイン応答にシフトした反応であることが明らかとなった。一方 GroMM に対する宿主反応は、モルモットと同様に好酸球の局所浸潤を伴い、IL-10 や eotaxin 1 の応答が主体となることが分かった。以上の結果から、休眠菌による GroMM の特異的産生は、宿主の TH1 応答の抑制を介した長期生存戦略であると考えられた。

A. 研究目的

ミコール酸は結核菌に代表される抗酸菌に特有の細胞壁脂質であり、他の生物体にはみられない長鎖脂肪酸である。アラビノガラクトタンと共有結合することにより cell wall skeleton を構成するとともに、トレハロースなどの糖修飾を受けた遊離糖脂質として細胞壁内に存在する。トレハロースジミコール酸（TDM）は代表的なミコール酸含有糖脂質であり、菌の生育や病原性に関与すると考えられている。さらに TDM は、宿主自然免疫受容体である Mincle や TLR

のリガンドとして機能し、強力なアジュバント作用を有することから、結核免疫病態の形成にも深く関与している。

興味深いことに、病原性結核菌は生体内において、宿主由来グルコースをミコール酸転移反応の競合的基質として用いることにより TDM 産生を能動的に抑制するとともにグルコースモノミコール酸（GMM）を新たに産生する。すなわち、GMM は生体内増殖菌のマーカー脂質として捉えることができる。

一方、休眠結核菌においては、おそらく

その低代謝レベルを反映して、TDM や GMM など多くの脂質の産生が著減する。しかし、ごく一部の脂質群はその産生が維持あるいは亢進することが最近知られるようになってきた。なかでもグリセロール骨格に一分子のミコール酸が付加されたグリセロールモノミコール酸 (GroMM) は休眠菌特有の脂質と考えられ、それに対する免疫応答は潜伏感染の指標となる可能性が示唆されている。

このような学術的背景と新展開を鑑み、研究分担者の杉田は、生体内増殖菌のマーカー脂質である GMM と休眠菌のマーカー脂質である GroMM に対する免疫応答の質的評価を、主としてモルモットを用いて行ってきた。その結果、GMM が結核防御に働く TH1 サイトカイン応答を強く誘起する機能を有するのとは対照的に、GroMM は結核感染の遷延化をもたらす TH2 応答を誘起する可能性が示唆され、潜伏感染の免疫学的背景をうまく説明できる可能性が出てきた。

ヒトの結核病態の新理解と制御には霊長類モデルが極めて重要である。そこでアカゲザルを用いて GMM と GroMM に対する生体応答を検証することを目的として、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ルコースあるいは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。この画分を適切な展開溶媒を用いて薄層クロマトグラフィー (TLC) により展開し、GMM あるいは 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の作製は、既報 (J Biol Chem 286: 16800, 2011) にしたがって行った。GMM あるいは 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。

動物および免疫方法 BCG 1×10^8 cfu を皮内接種することにより免疫を行った。GMM リポソームおよび GroMM リポソームの皮内接種には、50 μ g を用いた。

IFN- γ ELISPOT 法 ヒト・サル IFN- γ ELISPOT キット (Mabtech) を用い、指示書にしたがって行った。

フローサイトメトリー 末梢血単核球を抗原存在下で 6 時間刺激し、さらに brefeldin A を加えて 6 時間培養した。細胞を抗 CD8 抗体 (PE-Cy7) と抗 CD4 抗体 (eFluor 450) で標識したのち、固定と透過処理を行った。引き続き、抗 IFN- γ 抗体 (PE) と抗 TNF- α 抗体 (FITC) による標識を行い、BD FACS Cantoll を用いて解析した。

組織化学 皮内接種を受けたアカゲザルから皮膚組織を採取し、常法 (J Immunol 181: 8528, 2008) にしたがってヘマトキシリン・エオジン染色およびギムザ染色を行った。

リアルタイム PCR サル皮膚組織 (100mg) を Micro Smash (トミー) とステンレスビーズ (直径 5mm) を用いて破碎したのち、RNeasy Fibrous Tissue Midi Kit (Qiagen) を用いトータル RNA を抽出した。続いて、トータル RNA (1 μ g) より常法にしたがい cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型として各遺伝子の mRNA 発現量を Thunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いて定量した。変性処理 (95°C、60 秒) ののち、変性 (95°C、15 秒)、伸長 (60°C、35 秒) の 2 ステップ PCR (40 サイクル) を行った (Applied Biosystems 7500)。用いた

各プライマーの配列は下記の通りである。
IFN- γ : GAC ATC TTG AGG AAT TGG
AAA G (sense), TTT GGA TCC TCT GGT
CAT CTT (antisense); IL-4 : AGC TGA
TCC GAT TCC TGA AA (sense), GCT
GGC TTC CTT CAC AGG AC (antisense);
IL-10 : TGC CTT CAG CAG AGT GAA GA
(sense), GCA ACC CAG GTA ACC CTT
AAA (antisense); eotaxin 1 : GGG CTC
ACT GGG CCA GAT TC (sense), TCT
CCA GTC GCT GAA GGG GT (antisense);
granulysin : TCG ACT GCA AGA TCT GTC
TGA G (sense), ACT TCA CCA TCC TAC
ACA CAC G (antisense); perforin : GAG
TGC CGC TTC TAC AGT TAC CA (sense),
CAG CCC GGA TGA AGT GGG TG
(antisense); GAPDH : GAA GCC CCA TCA
CCA TCT TCC AGG (sense), GAG CCC
CAG CCT TCT CCG TG (antisense)。

養子移入 (adoptive transfer) GMM 特異的 T 細胞株を樹立し、37°C 10 分間 CFSE による標識を行った。T 細胞株を樹立したのと同様のアカゲザル個体の皮膚に BCG を接種するとともに、CFSE 標識 T 細胞 1×10^7 を静脈注射した。4 日後に皮膚を切除したのち、固定を行い、免疫組織化学的解析を行った。

(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、実験実施機関の規定に則り、当該委員会での承認を得て遂行された。本研究の主体となるアカゲザル動物実験にあたっては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づいた「京都大学における動物実験の実施に関する規定」を遵守し行った。アカゲザルの使用については、「特定外来生物による生態系等に係わる被害の防止に関する法律」の規定に基づき、環境大臣より許可を受けている。また、「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」の輸入禁止地域等を定める省令に基づき輸入サル飼育施設の指定を受けている。加えて、「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守して、研究を行った。なお、本研究において、ヒトから提供を受けた組織・細胞等の試料は使

用していない。

C. 研究結果

GMM に対する免疫応答 BCG 接種アカゲザル末梢血単核球を用いた IFN- γ ELISPOT 法において、GMM 特異的 T 細胞の存在を容易に検出することができた。そこで末梢血単核球を in vitro において GMM で刺激したのち、フローサイトメトリーにより T 細胞マーカー分子の発現やサイトカイン産生を検証したところ、GMM 特異的 T 細胞は CD4 陽性ポピュレーションや CD8 陽性ポピュレーションにわたって広く存在すること、またそのほとんどは IFN- γ と TNF- α を同時に産生した。

BCG 接種アカゲザルの皮膚に GMM を皮内接種すると局所に炎症応答が誘起され、組織染色により単核球の顕著な浸潤を観察した。皮膚組織より RNA を抽出しリアルタイム PCR 法によるサイトカイン応答の検証を行ったところ、IFN- γ の顕著な発現亢進を認め、IL-4 や IL-10 の発現はむしろ低下していた。また、細胞傷害性 T 細胞因子である granulysin や perforin の発現上昇を認めた。

アカゲザル個体より CD1c 拘束性 GMM 特異的 T 細胞株を樹立し、それを CFSE で標識したのち同一個体静脈中に adoptive transfer を行ったところ、BCG 接種局所に形成された肉芽腫様組織内に浸潤することがわかった。また肉芽腫を形成するマクロファージは CD1c 分子を強発現することを免疫組織化学法により確認した。

GroMM に対する免疫応答 末梢血単核球を用いた IFN- γ ELISPOT 法により、GroMM 特異的 T 細胞を認めなかった。

一方、BCG 接種アカゲザルに GroMM を皮内接種したところ、軽度の硬結と腫脹を観察した。組織においては多型核球の浸潤が見られ、キムザ染色における染色性から好酸球と判断した。単核球の浸潤は極めて軽微であった。

GroMM 接種皮膚組織より RNA を抽出しリアルタイム PCR を行った。その結果、GMM に対する応答とは対照的に、IL-10 や

eotaxin 1 の発現上昇を認めた。

D. 考察

本研究で得られたアカゲザルの解析結果およびこれまでのモルモットの解析成果 (J Bio Chem 283: 28835, 2008; J Immunol 181: 8528, 2008; J Bio Chem 286: 16800, 2011) は、高等動物の免疫系と細胞内寄生細菌である結核菌の長期にわたる相克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。グルコースがほとんど存在しない生体外環境において抗酸菌は TDM を産生するが、生体内においては高濃度に存在する宿主由来グルコースを競合的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。これによって菌は宿主自然免疫系から巧みにエスケープする。しかしこの糖脂質変換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 (ヒトでは CD1b 分子、アカゲザルでは CD1c 分子が働く)。この応答は、ツベルクリン応答などこれまで知られている結核菌抗原特異的応答と比して極めて 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。加えて、本研究では初めて、GMM 特異的 T 細胞が感染局所に形成された肉芽腫様組織に深く浸潤することを示した。局所では GMM の新生とマクロファージの CD1 発現が起きていることから、浸潤した GMM 特異的 T 細胞は高度に活性化し、IFN- γ や TNF- α を産生することにより感染防御に大きく貢献することが考えられる。さらに GMM 接種部位では granulysin など菌の直接の制御に働く殺菌因子の産生も亢進することから、サイトカイン経路とは異なる感染防御機構の存在も推察される。以上の観察と GMM 特異的 T 細胞応答がメモリー応答であることを考えると、GMM が脂質をベースとした新しいタイプの抗結核ワクチンとして機能する可能性が高まる。実際、研究分担者は適切なアジュバントとともに GMM を接種することによりアカゲザルに

GMM 特異的応答を誘導することに成功しており、脂質サブユニットワクチン開発の手がかりが得られつつある。

一方、潜伏感染において休眠結核菌は、低代謝あるいは特異的な発現制御機構を介して TDM と GMM 両方の産生を抑制し、TDM による自然免疫、GMM による獲得免疫から免れている。結核潜伏感染と深く関連したミコール酸含有脂質として報告 (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。したがって、GroMM に対する生体応答の研究は、潜伏感染病態の理解と制御に極めて重要である。BCG 免疫アカゲザルに GroMM を皮内接種すると、GMM に対する応答とは異質の応答が観察された。すなわち TH2 サイトカイン応答が主体となり、TH1 サイトカイン応答は顕著に抑制されていた。このことは、休眠菌による GroMM 産生が合目的的な菌側応答であり、微小環境を TH2 優位にすることにより TH1 サイトカイン応答による制御を長期に回避する手段として捉えることができる。

GroMM により誘起される TH2 応答の分子機序、言い換えれば GroMM 受容体の identity は不明である。これが同定されれば潜伏感染病態の理解が飛躍的に進むだけでなく、潜伏感染の制御に向けた新たなストラテジーを構築することができると期待される。研究分担者は現在この分子候補を同定しつつあり、来年度に向けてさらに研究を展開する予定である。

E. 結論

宿主内増殖菌特異的脂質 GMM と休眠菌特異的脂質 GroMM に対する応答を、アカゲザルモデルを用いて検証した。その結果、前者は TH1 サイトカイン応答を誘起するのに対し、後者は TH2 サイトカイン応答を誘起することが明らかとなった。すなわち GroMM 産生は、休眠菌が TH1 サイトカインによる制御を回避するための長期生存手段と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Morita, D., Y. Hattori, T. Nakamura, T. Igarashi, H. Harashima, and **M. Sugita**. 2013. Major T cell response to a mycolyl glycolipid is mediated by CD1c molecules in rhesus macaques. *Infect. Immun.* 81: 311-316.

2. 学会発表

1. **Sugita, M.**, D. Morita, and T. Igarashi. 2012. 19th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research. (Seoul, Korea, 8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

研究分担者 小出 幸夫（浜松医科大学）

研究協力者 辻村 邦夫（浜松医科大学）

研究要旨

休眠期の結核菌を標的として再燃を制御できる抗結核ワクチンの樹立を目指し、その候補抗原の検索を行った。

休眠期の結核菌が発現する DosR regulon 蛋白質に対する T 細胞応答を、①結核患者、②潜伏感染者、③非感染者で比較した。各抗原に対する T 細胞応答は全般的に潜伏感染者で強く、①③の両方または何れかに対して統計学的に有為差を示す抗原を 12 種類（Rv0080、Rv0081、Rv0570、Rv0574c、Rv1996、Rv2004c、Rv2028、Rv2029c、Rv2031c、Rv2626、Rv3129、Rv3133c）同定できた。このうち、Rv2031c に由来するペプチドが、HLA-A2 および HLA-DR4 に提示されることを明らかにした。

また、結核感染者の免疫系が認識している抗原を同定すべく、結核菌の遺伝子産物を発現するファージ・ライブラリーを結核患者および潜伏感染者の血清でスクリーニングし、各々30 および 23 抗原を選定した。

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用いた新規ワクチンの開発を目的としている。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、潜伏感染者および非感染者の間で比較し、結核患者または潜伏感染者で T 細胞応答が亢進している抗原の同定を行った。さらに、その中の代表的な抗原であった Rv2031c

ならびに Rv3133c の T 細胞 epitope を検索した。また、結核菌遺伝子断片を含むファージ・ライブラリーを結核患者または潜伏感染者血清でスクリーニングすることにより、各感染者群の免疫系が認識する抗原群の同定を行った。

B. 研究方法

1. DosR regulon 蛋白質の抗原性の解析

1) 結核菌感染者の T 細胞応答：組換え DosR regulon 蛋白質 33 種でヒト末梢単核球を刺激し、IFN- γ 産生を ELISPOT assay で測定して検討した。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）、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非感染者（クオンティフェロン陰性者）。

2) T 細胞 epitope の検討：HLA-A*0201 遺伝子導入マウスと HLA-DRB1*0401 遺伝子導入マウスを Rv2031c または Rv3133c

の遺伝子を含むプラスミドで免疫した (Helios Gene-gun を使用)。免疫マウスの脾臓細胞を、Rv2031c ならびに Rv3133c に由来する overlapping peptides で刺激し、培養上清中に放出される IFN- γ 量 (ELISA で測定) を指標にして、T 細胞が認識する peptides を同定した。

2. 結核菌感染者で抗体価が上昇している結核菌抗原の解析

dsDNA Fragmentase (NEB) で断片化した結核菌のゲノム遺伝子を用いてファージ・ライブラリー (T7 Select® Phage Display System, Novagen) を構築し、結核患者または潜伏感染者の血清 (各群 10 名分をプールしたもの) によるプラーク・ハイブリダイゼーションでスクリーニングした。次いで、陽性ファージのうち、非感染者血清とは反応しないものを選定し、挿入された遺伝子の同定を行った。

(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. DosR regulon 蛋白質の抗原性の解析

1) 結核菌感染者の 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非感染者に比べて 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 (非

感染者に対してのみ有為差があるもの)

2) T 細胞 epitope の検討：1) において強い免疫応答が観察できた Rv2031c と Rv3133c について、HLA-A*0201 遺伝子導入マウスおよび HLA-DRB1*0401 遺伝子導入マウスと両抗原の overlapping peptides を用いて抗原 epitope を検索した。その結果、これらの HLA 遺伝子産物に提示される epitope を含む Rv2031c 由来の peptide を各々 1 つ同定できた (HLA-A*0201: 91-110 番目の peptide、HLA-DRB1*0401: 11-30 番目の peptide)。一方、免疫した何れの HLA 遺伝子導入マウスの脾臓細胞を Rv3133c 由来の overlapping peptides で刺激しても、T 細胞の活性化は観察できなかった。

2. 結核菌感染者で抗体価が上昇している結核菌抗原の解析

結核患者および潜伏感染者のプール血清を用いたスクリーニングにより、それぞれ、30 および 23 抗原を選定した。

D. 考察

1. DosR regulon 蛋白質の抗原性の解析

今回の解析により、Rv2031c に由来するペプチドが HLA-A2 (HLA-A*0201 がコード) および HLA-DR4 (HLA-DRB1*0401 が β 鎖をコード) に提示されることが明らかとなった。結核菌に対する免疫には CD4 陽性 T 細胞の応答が重要とされており、その抗原提示分子である HLA-DR4 拘束性のペプチドの同定は重要な意味を持つと考えられる。一方、Rv3133c 由来の overlapping peptides では、*in vitro* で免疫マウスの T 細胞を活性化できなかった。Rv3133c 遺伝子で免疫した何れの遺伝子導入マウスの T 細胞も組換えタンパク質でも刺激できず、Rv3133c は HLA-A2 ならびに HLA-DR4 に提示されるエピトープを含まないと考えられた。今後は他の抗原についてもエピトープの同定を継続する予定である。また、エピトープが同定できた抗原については、そのワクチン効果について、対応する遺伝子導入マウスを用いた潜伏感染モデルで検証していく予定である。

2. 結核菌感染者で抗体価が上昇している結核菌抗原の解析

これまでに選定した結核菌抗原は、結核患者および潜伏感染者のプール血清を用いたスクリーニングによるものであり、各群のどの程度の割合が反応しているかについては不明である。したがって、スクリーニングの継続と平行して、候補抗原が各感染者群のどの程度の割合で認識されているかについて、個々人の血清を用いて検討していく必要がある。また、本研究のスクリーニングでは、2次抗体としてHRP 標識した抗ヒト IgG 抗体を用いているので、候補抗原は CD4 陽性 T 細胞にも認識されている可能性が高い (IgG クラスへのクラススイッチには、同じ抗原を認識する CD4 陽性 T 細胞のヘルプが必要なため)。よって上記の解析で有望と判断された抗原に対する T 細胞応答についても順次検討して行く予定である。

E. 結論

潜伏感染者で T 細胞応答が亢進している DosR regulon 蛋白質を 12 種類同定し、その 1 つである Rv2031c に由来するペプチドが、HLA-A2 および HLA-DR4 に提示されることを明らかにした。

結核菌遺伝子を含むファージ・ライブラリーを結核患者および潜伏感染者のプール血清でスクリーニングし、各々 30 および 23 抗原を選定した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hozumi, H., K. Tsujimura, Y. Yamamura, S. Seto, M. Uchijima, T. Nagata, S. Miwa, H. Hayakawa, T. Fujisawa, D. Hashimoto, N. Inui, T. Suda, K. Chida, and Y. Koide. 2013. Identification of dormancy-related antigens that induce immune responses in individuals infected with *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* (in press)
2. Osada-Oka, M., Y. Tateishi, Y. Hirayama, Y. Ozeki, M. Niki, S. Kitada,

- R. Maekura, K. Tsujimura, Y. Koide, N. Ohara, T. Yamamoto, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2013. Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of IgG in individuals with past tuberculosis. *Microbiol. Immunol.* (in press)
3. Seto, S., K. Tsujimura, T. Horii, and Y. Koide. 2013. Mycobacterial survival in alveolar macrophages as a result of coronin-1a inhibition of autophagosome formation. *Autophagy: cancer, other pathologies, inflammation, immunity, and infection.* Hyatt M. A., editor. Elsevier: Amsterdam/Netherlands. (in press)
4. Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. 2012. Coronin-1a inhibits autophagosome formation around *Mycobacterium tuberculosis*-containing phagosomes and assists mycobacterial survival in macrophages. *Cell. Microbiol.* 14: 710-727.
5. Nagata, T., and Y. Koide. 2013. Chapter 22. Identification of T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* with biolistic DNA vaccination. *Methods in Molecular Biology.* Volume 940. Biolistic DNA Delivery. Methods and Protocols. Sudowe, S., and A. B. Reske-Kunz, editors. Humana Press: New York/USA. 285-303. ISBN: 978-1-62703-109-7
6. Nagata, T., and Y. Koide. 2012. Chapter 17. Immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* and the vaccine strategies. *Understanding tuberculosis – Analyzing the origin of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity.* Cardona, P.-J., editor. InTech: Rijeka/Croatia. 391-414. ISBN: 978-953-307-942-4
7. 瀬戸真太郎, 辻村邦夫, 堀井俊伸, 小出幸夫. 2012. アクチン結合性タンパク質 Coronin-1a による結核菌ファゴソームへのオートファゴソーム形成阻害機構. *生体の科学* 63: 494-495.

2. 学会発表

1. 瀬戸真太郎、辻村邦夫、堀井俊伸、小出幸夫. 2013. イメージ解析で明らかになった結核菌感染マクロファージと樹状細胞におけるオートファゴソーム形成機構の解析. 第 118 回日本解剖学会総会（高松、3 月発表予定）.
2. 辻村邦夫、瀬戸真太郎、内嶋雅人、永田 年、堀井俊伸、小出幸夫. 2013. 休眠期結核菌関連抗原に対する日本人結核感染者の免疫応答. 第 86 回日本細菌学会総会（千葉、3 月発表予定）.
3. 瀬戸真太郎、辻村邦夫、堀井俊伸、小出幸夫. 2013. 結核菌感染樹状細胞におけるオートファジーアダプタータンパク質 p62 依存的オートファゴソーム形成の解析. 第 86 回日本細菌学会総会（千葉、3 月発表予定）.
4. 内嶋雅人、永田年、辻村邦夫、堀井俊伸、小出幸夫. 2013. 第 86 回日本細菌学会総会. ケモカインレセプターを標的とするワクチンにより誘導される結核菌の MPT51 抗原特異的 T 細胞応答の解析. 第 86 回日本細菌学会総会（千葉、3 月発表予定）.
5. 穂積宏尚、辻村邦夫、山村泰弘、瀬戸真太郎、内嶋雅人、永田 年、三輪清一、早川啓史、橋本 大、藤澤朋幸、榎本紀之、乾 直輝、中村祐太郎、須田隆文、千田金吾、小出幸夫. 2013. 結核休眠期抗原（DosR antigen）に対するヒト T 細胞応答の検討. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会. 2012.（神戸、4 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

【背景】 *Mycobacterium avium* complex (MAC)特異的血清診断キットであるキャピリア[®]MAC 抗体 ELISA が 2011 年に本邦にて上梓された。同検査は、MAC の菌体成分である glycopeptidolipid core に対する患者血清中 IgA 抗体を酵素抗体法にて測定するキットである。開発時の多施設研究で、肺 MAC 症診断において感度 84.3%、特異度 100%との結果が得られ、補助診断として有用であることが報告されている。当施設では、開発時から同検査を日常検査として実施してきており、多数例の情報の集積がある。

【目的】 MAC 特異的血清診断キットの臨床的有用性を、再検証すること。

【方法】 当院において 2006 年 12 月から 2012 年 6 月までの期間で、肺 MAC 症と診断され、血清診断を実施している 485 例を対象とした。疾患コントロールとして同期間に培養確認された肺結核症 133 例、肺 *M. kansasii* 症 23 例を対象とした。健常コントロールとしては、265 名の検診受診者を対象とした。

【成績】 抗体価は肺 MAC 症群において有意に上昇を認めており、肺 MAC 症診断における血清診断キットの感度、特異度はそれぞれ 78.6%、96.9%であった。気管洗浄液培養にて診断した 50 例において、抗体価は喀痰培養診断例に比べ有意に低値であり感度は 54.0%であった。

【結論】 MAC 特異的血清診断キットは良好な感度、特異度を示し、肺 MAC 症診断における臨床的有用性が確認された。

A. 研究目的

MAC 特異的血清診断であるキャピリア[®]MAC 抗体 ELISA が 2011 年に本邦にて上梓された。同検査は、MAC の菌体成分である glycopeptidolipid-core (GPL-core)に対する患者血清中 Immunoglobulin A(IgA)抗体を酵素抗体法にて測定するキットである。開発時の多施設研究で、肺 MAC 症診断において感度 84.3%、特異度 100%との結果が得られ、補助診断として有用であることが報告された。一方、関節リウマチ患者を対象を限定した研究ではあるが、感度 43%、特異度 100%と感度が低い報告もある。ま

た米国における非 AIDS 肺 MAC 症患者を対象とした同様の研究でも、カットオフ値を同一にすると感度は 51.7%と低値であった。

当施設では、開発時から同検査を日常検査として実施してきており、多数例の情報の集積がある。今回、肺 MAC 症患者を対象に血清診断の臨床的有用性を再検証する目的で本研究を実施した。

B. 研究方法

国立病院機構刀根山病院において 2006 年 12 月から 2012 年 6 月までの期間、MAC 菌の同定検査が実施された症例は 1174 例あり、そのうち、抗 GPL-core 抗体を測定

していたのは 620 例あった。肺 MAC 症の診断基準を満たさない 129 例と、結核菌、*M. kansasii* を同時に検出したそれぞれ 3 例は除外し、485 例を肺 MAC 症群とした。

疾患コントロールとして同期間に培養確認し抗 GPL-core 抗体を測定していた肺結核症 133 例、肺 *M. kansasii* 症 23 例を対象とした。さらに健常コントロールとして、当院職員 265 名から職員検診時に血清の提供を受けた。職員検診で胸部画像異常所見を呈した参加者は除外した。

血清診断(抗 GPL-core 抗体)

血清中抗 GPL-core 抗体は、キャピリア[®]MAC 抗体 ELISA(株式会社タウンズ、静岡県)を用いて測定した。以下簡単に手順を示す。MAC 細胞壁由来 GPL-core 抗原が固相化されたマイクロプレートのウェルに、希釈調製した被検血清を加え、血清中に存在する特異抗体を反応させた。ウェルの洗浄操作の後、パーオキシダーゼ標識抗ヒト IgA 抗体を加え、固相化 GPL core 抗原に結合した血清中の IgA 特異抗体と免疫複合体を形成させた。ウェルの洗浄操作の後、発色液を加えて発色させ、反応停止液を添加して呈色反応を停止させた。反応停止後、450nm の吸光度を測定し、標準抗体液の吸光度をもとに作成した検量線から、被検血清の抗 GPL-core IgA 抗体濃度 (U/mL) を求めた。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立病院機構刀根山病院の臨床研究倫理審査委員会において審議され、承認された。

統計学的事項：

各群の背景因子、抗 GPL 抗体価を統計学的に比較検討した。抗体価および年齢は平均±標準偏差で表示した。解析方法は離散変数では χ^2 検定または Fisher の正確検定、連続変数ではノンパラトリック検定を用いた。有意水準は $p < 0.05$ とした。解析は SAS-JMP 8.0(SAS Institute Inc.,USA)または GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc, USA)を用いて行った。

C. 研究結果

対象背景

肺 MAC 症群は 485 例 (男性 126 例、女性 395 例、平均年齢 72.1 ± 10.5 才)であった。485 例中 *M. avium* は 295 例(60.8%)、*M. intracellulare* は 157 例(32.4%)、両者検出されものが 33 例(6.8%)あった。

疾患コントロールは、肺結核群 133 例(男性 76 例、女性 57 例 平均年齢 62.1 ± 21.0 才)、肺 *M. kansasii* 症群 23 例(男性 17 例、女性 6 例、平均年齢 60.7 ± 17.2 才)とした。健常人コントロールとして、265 名(男性 52 例、女性 213 例、平均年齢 37.4 ± 10.5 才)。男女構成比は肺 MAC 症群と比較して、肺結核群、肺 *M. kansasii* 症群で有意差を認めた。また、年齢は肺 MAC 症群に比べ、他の群は有意に若かった($P < 0.05$)。

血清診断の有用性

血清抗 GPL-core 抗体価の各群での値はそれぞれ、肺 MAC 症群にて 7.23 ± 10.83 U/mL、肺結核群 0.398 ± 2.06 U/mL、肺 *M. kansasii* 群 0.16 ± 0.47 U/mL、健常コントロール群 0.08 ± 0.13 U/mL であり、肺 MAC 症群で有意($p < 0.0001$)に上昇していた。キット規定のカットオフ値 0.7 U/mL での感度、特異度はそれぞれ 78.6 %、96.9%であった。

疾患コントロール群でカットオフ値を上回った症例は、肺結核で 9 例(6.1%)、肺 *M. kansasii* 症で 1 例(4.3%)、健常コントロールでは 4 例(1.5%)あった。肺結核の 9 例(男性 2 例、女性 7 例)のうち、6 例は平均年齢 70.2 ± 21.6 才の女性で中葉舌区に多発小結節気管支拡張所見を有していた。*M. kansasii* 症の 1 例は結核後遺症の高度な気管支拡張症に続発する 81 才女性症例であった。健常コントロールでの陽性者は全例女性(平均年齢 40.5 ± 10.7 才)で、呼吸器症状はなく胸部単純 X 線において異常所見は指摘されていなかった。

肺 MAC 症群における抗 GPL-core 抗体価・陽性率

肺 MAC 症群において菌種による抗体価の有意差は認めなかった。*M. avium* 群と *M. intracellulare* 群の抗体価はそれぞれ、

7.24±10.4 U/mL、7.306±11.2U/mL であり有意差は認めず(p=0.598)、陽性率はそれぞれ 78.6%、75.8%であった。

気管洗浄液培養診断 50 例および喀痰培養診断 435 例の抗体価はそれぞれ 2.62±3.87U/mL、7.76±11.24 U/mL であり有意(p<0.0001)に前者で低値であり、陽性率はそれぞれ 54.0%と 81.3%であった。喀痰培養診断例を喀痰塗抹陰性(249 例)、喀痰塗抹陽性(±以上)(186 例)に分類すると、抗体価はそれぞれ 6.099±8.215 U/mL、9.986±14.05 U/mL であり塗抹陽性例の抗体価は有意に高かった(p=0.0025)く、陽性率はそれぞれ 78.3%と 84.4%であった。

D. 考察

肺 MAC 症における血清診断の有用性を肺 MAC 症群 485 例、対照群 421 例という過去の報告よりも多数例で再検証した。肺 MAC 症診断の血清診断キットの感度、特異度はそれぞれ 78.6%、96.9%であり、補助診断としての有用性が再確認された。特異度は高く、臨床画像所見が類似した肺結核や肺 *M. kansasii* 症との鑑別にも有用である。血清診断はキャピリア[®]MAC 抗体 ELISA として上梓されており、保険診療で使用可能であり今後広く日常診療で使用されることが期待される。

疾患コントロール群で少数の偽陽性例が観察されたが、その大部分は MAC 感染に特徴的な画像所見を呈しており、MAC 菌の検出はないものの混合感染の可能性も否定できなかった。また、気管支拡張所見などの肺や気道の構造改変が高度な症例が多く、このような症例には MAC の潜在感染が生じやすいことが推定される。健常コントロール群でも抗体価は高値ではないものの 4 例(1.5%)の偽陽性が観察された。その原因として MAC の無症候性感染(感作)の可能性が挙げられる。MAC は自然環境に常在しており、日常生活のなかで MAC に暴露される機会がある。したがって、MAC 抗原に対する免疫応答が生じる可能性がある。実際、MAC 抗原を使用した米国の健常人を対象とした皮内テストの研究では

11.2-16.6%が陽性を示したという報告もある。他の可能性としては、極初期の肺 MAC 症感染が挙げられる。胸部単純 X 線写真では明らかな異常は指摘されていなかったが、特に NB 型の初期は単純写真ではとらえられないことが多い。

MAC は *M. avium* と *M. intracellulare* からなるが、菌種によって分布に地理的偏りがあり、東北日本では *M. avium* が多く、南西日本では *M. intracellulare* が多い。今回の菌種による血清診断の有用性には差がなく、全国的に使用することができる。本キットは *M. avium* 由来の GPL-core を抗原としているが、GPL-core は *M. intracellulare* とも共通の抗原であり、妥当な結果である。

気管洗浄液培養結果での診断例の血清診断陽性率は 54.0%と、喀痰培養診断例に比べ低値であった。気管洗浄液培養診断例は、症状にとぼしく、複数回の喀痰検査で診断がつかないために気管支鏡検査を実施している症例が多く、より疾患活動性が低いことが原因と考えられる。過去の気管洗浄液検査例の陽性率は 78.6%とより高値であったが、本研究の方が対象患者数が多く信憑性が高い。今後さらなる検証が必要である。気管支鏡検査は、侵襲性もあり、合併症を有する高齢者等には実施しにくい。このような症例に対し、血清診断で診断することができれば有用性は高い。

血清診断を既存の診断基準と組み合わせることでより簡便に確定診断をつけることができる。例えば、喀痰検査であれば、診断基準では 2 回の陽性確認が必要であったが、血清診断陽性とあわせることで 1 回の確認でよいかもしれない。臨床現場でよく使用されている抗酸菌遺伝子検査(PCR 法、TRC 法など)と組み合わせればさらに短期間での判定が可能となる。小結節気管支拡張所見などの特徴的な画像診断と血清診断陽性の組み合わせがあれば、細菌学的情報がなくても確定診断してもよい症例もあると考える。一方、細菌学的に MAC が証明されていても血清診断が陰性であれば、定着/混入の可能性も考慮すべきである。

E. 結論

MAC 特異的血清診断は肺 MAC 症の補助診断として有用である。

今後改訂される診断基準に MAC 特異的血清診断が組み入れられることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kitada S, Uenami T, Yoshimura K, Tateishi Y, Miki K, Miki M, Hashimoto H, Fujikawa T, Mori M, Matsuura K, Kuroyama M, Maekura R. 2012. Long-term radiographic outcome of nodular bronchiectatic *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. Int J Tuberc Lung Dis. May;16(5):660-4.
2. Kitada S, Levin A, Hiserote M, Harbeck RJ, Czaja CA, Huitt G, Kasperbauer SH, Daley CL. 2012. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in the United States. Eur Respir J. Oct 25.
3. Yano Y, Kitada S, Mori M, Kagami S, Taguri T, Uenami T, Namba Y, Yoneda T, Yokota S, Maekura R. 2012. Pulmonary Disease Caused by Rapidly Growing Mycobacteria: A Retrospective Study of 44 Cases in Japan. Respiration. Aug 11.

2. 学会発表

1. S. Kitada, K. Yoshimura, K. Miki, M. Miki, Y. Tateishi, T. Fujikawa, K. Matsuura, M. Kuroyama, H. Hashimoto, M. Mori, R. Maekura. 2012. American Thoracic Society: A Longitudinal Study of Glycopeptidolipid Core IgA Antibody Levels in MAC Pulmonary Disease Patients Treated with CAM containing regimen (San Francisco, USA, 5月).

2. 北田清悟. 2012. 肺 MAC 症の新規血清診断法. 第 87 回日本結核病学会総会 (名古屋 5月).

3. 北田清悟. 2012. RA 診療における各種合併症対策 呼吸器障害. 第 22 回日本リウマチ学会近畿支部 (大阪 9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
Seto S, <u>Tsujimura, K</u> Horii T, <u>Koide Y.</u>	Mycobacterial survival in alveolar macrophages as a result of coronin-1a inhibition of autophagosome formation	Hyatt M. A.	Autophagy: cancer, other pathologies, inflammation, immunity, and infection	Elsevier	Amsterdam	2013	In press
Nagata T, <u>Koide Y.</u>	Chapter 22. Identification of T cell epitopes of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> with biolistic DNA vaccination	Sudowe S, Reske-Kunz AB.	Methods in Molecular Biology. Volume 940. Biolistic DNA Delivery. Methods and Protocols.	Humana Press	New York	2013	285 - 303
Nagata T, <u>Koide Y.</u>	Chapter 17. Immune responses against <i>Mycobacterium tuberculosis</i> and the vaccine strategies	Cardona P.-J.	Understanding tuberculosis- Analyzing the origin of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pathogenicity	InTech	Rijeka	2012	391 - 414
<u>小林和夫</u>	マイコバクテリアウム属（抗酸菌）	平松啓一 中込 治 神谷 茂	標準微生物学第11版	医学書院	東京	2012	282 - 295

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
M. Osada-Oka , Y. Tateishi, Y. Hirayama, Y. Ozeki , M. Niki , S. Kitada , R. Maekura , K. Tsujimura , Y. Koide , N. Ohara , T. Yamamoto, K. Kobayashi , S. Matsumoto	Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of IgG in individuals with past tuberculosis	Microbiol. Immunol.		In press	2013
Y. Tateishi, S. Kitada , K. Miki, R. Maekura , Y. Ogura, Y. Ozeki , Y. Nishiuchi, M. Niki , T. Hayashi, K. Hirata, K. Kobayashi , S. Matsumoto .	Whole-genome sequence of a hypervirulent clinical strain <i>Mycobacterium intracellulare</i> M.i.198	J.Bacteriol.	194	6336	2012
M. Niki, M. Niki, Y. Tateishi, Y. Ozeki , T. Kirikae, A. Lewin, Y. Inoue, M. Matsumoto , J. L. Dahl, H. Ogura, K. Kobayashi , S. Matusmoto	A novel mechanism of growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria	J.Biol.Chem.	287	27743 - 27752	2012
A. Tamaru, C. Nakajima, T. Wada, Y. Wang, M. Inoue, R. Kawahara, R. Maekura , Y. Ozeki , H. Ogura, K. Kobayashi , Y. Suzuki, S. Matsumoto	Dominant incidence of multidrug and extensively drug-resistant specific <i>Mycobacterium tuberculosis</i> clones in Osaka prefecture, Japan	PLoS One	7	e42505	2012
J. Fujii, M. Naito, T. Yutsudo,	Protection by a recombinant <i>Mycobacterium bovis</i> bacillus Calmette-Guérin vaccine	Clin. Vaccine. Immunol.	19	1932-1937	2012

S. Matsumoto , D. P. Heatherly, T. Yamada, H. Kobayashi, S. Yoshida, T. Obrig	expressing Shiga toxin 2 B subunit against Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> in mice				
松本壮吉、 尾関百合子、 小林和夫	新しい結核ワクチン開発の展望	臨床と微生物	39	131-136	2012
松村隆之、 阿戸 学、 小林和夫	結核および非結核性抗酸菌感染症の診断	リウマチ科	47	427-435	2012
小林和夫、 松村隆之、 阿戸 学	解説. 結核や非結核性抗酸菌感染症の動向と最近の話題	JBSA Newsletter	2	6-10	2012
Morita, D., Y. Hattori, T. Nakamura, T. Igarashi, H. Harashima, M. Sugita .	Major T cell response to a mycolyl glycolipid is mediated by CD1c molecules in rhesus macaques	Infect. Immun.	81	311-316	2013
Hozumi H, Tsujimura K , Yamamura Y, Seto S, Uchijima M, Nagata T, Miwa S, Hayakawa H, Fujisawa T, Hashimoto D, Inui N, Suda T, Chida K, Koide Y.	Immunogenicity of dormancy-related antigens in individuals infected with <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in Japan	Int. J. Tuberc. Lung Dis.		In press	2013
Seto S, Tsujimura K , Koide Y.	Coronin-1a inhibits autophagosome formation around <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -containing phagosomes and assists mycobacterial survival in macrophages	Cell. Microbiol.	14	710-727	2012
瀬戸真太郎、 辻村邦夫、 堀井俊伸、 小出幸夫	アクチン結合性タンパク質 Coronin-1a による結核菌ファゴソームへのオートファゴソーム形成阻害機構	生体の科学	63	494-495	2012
Kitada S , Uenami T, Yoshimura K, Tateishi Y, Miki K, Miki M, Hashimoto H, Fujikawa T, Mori M, Matsuura K, Kuroyama M, Maekura R.	Long-term radiographic outcome of nodular bronchiectatic <i>Mycobacterium avium</i> complex pulmonary disease	Int. J. Tuberc. Lung Dis.	16	660-664	2012
Kitada S ,	Serodiagnosis of <i>Mycobacterium</i>	Eur. Respir. J.		In press	2013