

201318041A

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

若年及び高齢者の結核制御を目指した生体防御反応解明と

新規予防法・治療法の開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部长)

平成26(2014)年3月

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

若年及び高齢者の結核制御を目指した生体防御反応解明と

新規予防法・治療法の開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部長)

平成26(2014)年3月

## 目 次

総括研究報告書：若年及び高齢者の結核制御を目指した生体防御反応解明と新規予防法・治療法の開発 牧野 正彦（国立感染症研究所）	1
分担研究報告書：新規リコンビナント BCG ワクチンの作出と評価 牧野 正彦（国立感染症研究所）	10
分担研究報告書：結核等抗酸菌の新規薬剤開発のための標的分子の探索とその構造機能解析 柴山 恵吾（国立感染症研究所）	15
分担研究報告書：追加免疫法の開発に向けた樹状細胞による細胞障害性メモリーT 細胞の分化調節機構の解析 田村 敏生（国立感染症研究所）	20
分担研究報告書：結核の発症に関わる分子の機能解析とワクチンへの応用 松本 壮吉（新潟大学大学院）	25
分担研究報告書：PD-1 経路のシグナル伝達制御による抗結核感染防御増強へのアプローチ 河村 伊久雄（京都大学大学院）	30
分担研究報告書：結核感染肺における IL-17 依存性肉芽腫形成メカニズムの解明 梅村 正幸（琉球大学）	35
研究成果の刊行に関する一覧表	40

平成25年度 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)

若年及び高齢者の結核制御を目指した生体防御反応解明と

新規予防法・治療法の開発

総括研究報告書

研究代表者

牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部長)

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）  
総括研究報告書

若年及び高齢者の結核制御を目指した生体防御反応解明と新規予防法・治療法の開発

研究代表者 牧野 正彦（国立感染症研究所・感染制御部・部長）

研究要旨.

結核は全人類の恐怖となっている再興感染症であり、的確な制御法の確立は広く全世界の人々への福音となる。本研究班においては、結核発症予防法の樹立に有用な生体防御反応の解析、初回免疫及び追加免疫ワクチンの開発、さらに新規抗結核薬の開発を通じ、地球規模での厚生行政への貢献を果たすことを目的とした。抗酸菌を一定箇所へ封じ込め全身伝播を防ぐためには、肉芽腫が重要な役割を果たすが、肉芽腫形成における IL-17A の果たす役割を検討し、IL-17A の産生が成熟化肉芽腫形成に必須であることを見出した。また、初回免疫ワクチンとしての BCG の改良を目的として、これまでに部分的に結核菌の肺内増殖を抑制する HSP70-MMP-II 連結遺伝子に、さらに PEST 配列を付加することで、結核菌の肺内増殖を 5% に抑えることが可能なリコンビナント BCG が作出された。また、追加免疫ワクチンの目的としては長期生存型メモリー CD8 陽性 T 細胞を産生することが重要であり、その産生には IL-17F が関与し、さらに IL-17F を産生し得る蛋白は追加免疫ワクチンとして有用であることが判明した。また、潜伏化した結核菌に発現する MDP-1 をワクチンとして投与すると結核菌の増殖を抑制し得ることを見出し、その増殖抑制機構の解析が追加免疫ワクチンの確立に極めて重要であることが判明した。さらに、ワクチン接種時に宿主の免疫抑制性シグナルの活性化を抑制し、タイプ 1 CD4 陽性 T 細胞免疫反応を増強させることがワクチン効果を高めることが明らかとなった。Rv2613c をターゲットとする新規薬剤開発のための重要なステップであるリード化合物が同定された。以上、結核の予防法及び治療法の開発において、結核制御に向けた新展開がもたらされた。

研究分担者

柴山 恵吾（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）  
田村 敏生（国立感染症研究所・感染制御部・室長）  
河村 伊久雄（京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・准教授）  
松本 壮吉（新潟大学大学院医歯学総合研究科・教授）  
梅村 正幸（琉球大学熱帯生物圏研究センター・生体防御学・准教授）

A. 研究目的

結核は 20 世紀最大の恐怖を与えた慢性感染症であり、最重要再興感染症の一つとして数えられている。牛型弱毒化結核菌である BCG がワクチンとして広く使用され、第二次世界大戦直後には結核ワクチンとして極めて有効であると高い評価が与えられ、

BCG ワクチンにより結核は制御し得ると考えられるようになった。その一方で、これを契機として全世界的に結核の研究が急速に減速していった。しかし、公衆衛生学的な環境が整備された現代では、BCG のワクチンとしての有効性は小児の極悪性結核に留まり、成人の肺結核に対してはほとんど

効力がないと考えられるに至っている。新規リコンビナント BCG の開発は、10~15 年前には盛んに行われたが、現行の BCG をはるかに凌駕し得る画期的な BCG の作出には未だに至っておらず、さらに、その難しさから断念を余儀なくされている研究者も決して少なくない。しかし、改良型 BCG の作出は極めて重要であり、たとえ大幅な前進はすぐには期待できずとも、一步一步改良を加え将来の成人を結核から救う手立てを講じることは極めて重要である。一方、乳幼児期に一回のみ接種した BCG に 70~80 歳の高齢者の結核発症を防ぐことを求めることは理論上無理があり、成青年層の免疫応答能が確立されている時期に接種する追加免疫ワクチンも大きなウエートを占める。現在では、この追加免疫ワクチンの開発が世界的に華々しく行われているが、その理論背景は決して十分に明らかにされているわけではなく、本研究班においては、理論的背景に立脚した追加免疫ワクチンの開発を目指すこと、またワクチンの効果を数十倍引き上げる宿主免疫応答修飾法の開発及び結核菌を封じ込めるに足る宿主生体防御反応機構の解明をも目的の一つとした。また、現在日本で観察される多剤耐性菌は中国のそれと比し伝播力が弱いと考えられている。しかし、ひとたび形質転換が図られ高い伝播力を獲得した場合は、現行の抗結核薬で充分封じ込められるか甚だ疑問である。こうした観点に立って、新規抗結核薬の開発も重要な柱の一つとして研究班を構成した。

以下に主な研究課題を挙げる。

1. 結核感染肺における IL-17 依存性肉芽腫形成機構の解析 (梅村)
2. 結核の発症に関わる分子の機能解析とワクチン開発への応用 (松本)
3. 結核発症予防に貢献する新規リコンビナント BCG ワクチンの作出と評価 (牧野)
4. 追加免疫法の開発に向けた樹状細胞による細胞障害性メモリー T 細胞の分化調節機能の解析 (田村)
5. 免疫抑制経路のシグナル伝達制御によ

- る抗結核感染防御増殖法の開発 (河村)
6. 新規抗結核薬開発のための標的分子の探索と構造機能解析 (柴山)

## B. 研究方法

1. IL-17A 欠損及び野生型 C57BL/6 マウスに *Mycobacterium bovis* BCG を経気道感染させ、肉芽腫形成に重要な因子を探索するため、肺より total RNA を調整し real-time PCR 法を用いて細胞間接着分子及び細胞走化性分の発現レベルを測定し、さらにマイクロアレイ解析により発現レベルの異なる遺伝子候補を検索した (梅村)。
2. 低酸素下で結核菌を休眠させる Wayne モデルを用いて、BCG を休眠させ、マウス由来マクロファージを刺激しサイトカイン産生量を測定した。休眠菌と増殖菌より脂質画分を抽出し、一次元及び二次元薄層クロマトグラフィーで糖脂質の解析を行った (松本)。
3. BCG 菌の改良にあたり、外来遺伝子をプラスミド型で BCG の細胞質へ導入すると外来遺伝子の脱落が頻繁に生ずる。この問題を防ぐため、外来遺伝子である HSP70-MMP-II 連結遺伝子を BCG のクロモソームへ導入した BCG-DHTMI を作製した。また、リコンビナント BCG から分泌される HSP70-MMP-II 融合蛋白のプロセッシングを増強するため、上記連結遺伝子の両端に PEST 配列を付加し UreC ノックアウト BCG に導入し、BCG-PEST を作製した。これら BCG の T 細胞活性化能を評価した (牧野)。
4. 結核菌 Ag85B 由来タイプ 1 T 細胞エピートープ Peptide-25 特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウスを用いて、マウス骨髄由来未熟樹状細胞の成熟化機構、成熟化した樹状細胞によるメモリー CTL の分化誘導能及びメモリー CTL の分化誘導における IL-17F のマウス生体内での役割を解析した (田村)。
5. 結核菌に対する生体防御反応におけるインフラマソームの活性化及び PD-1 シグナルの意義を明らかにするため、

PD-1 欠損マウス、NLRP3 欠損マウス及び ASC 欠損マウスに結核菌を感染させ、肺内結核菌数の測定、サイトカイン・ケモカイン産生応答、生存率などを解析した（河村）。

6. Rv2613c の特異的な基質結合部位と相互作用する化合物をインシリコスクリーニングシステムを用いて行った。結核菌 RD4 領域を標的とした新規抗結核薬を開発する目的で、種々の遺伝子の発現系を構築した（柴山）。

**倫理面への配慮** 国立感染症研究所および当該研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解（インフォームドコンセント）を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。動物実験は、当該研究施設の動物実験委員会の承認を得た上で、実験動物倫理指針に基づいて実施した。

### C. 研究結果

1. 野生型および IL-17A 遺伝子欠損 (KO) マウスに BCG を経気道感染させ、経時的に肺組織から RNA を精製し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、IL-17A KO マウスでは細胞間接着分子以外にマトリックスメタロプロテアーゼの発現低下が認められた（梅村）。
2. 潜在期結核菌のモデルとして、BCG を低酸素下においてイソニアジド完全耐性の休眠菌を作成した。その含有糖脂質のパターンを検討した結果、トリアシルグリセロールの増加とミコール酸含有糖脂質の低下を確認した（松本）。
3. BCG-DHTMI は HSP70-MMP-II 連結遺伝子を 1 コピーのみ有するものの、高発現プロモーターの制御を受け HSP70-MMP-II 融合蛋白を分泌し、樹状

細胞及び未感作 T 細胞を強く活性化した。BCG-PEST は PEST 配列を有さない BCG-DHTM に比し、より強く樹状細胞・マクロファージ・未感作 T 細胞を活性化し大量の IFN- $\gamma$  の産生を誘導するとともに、肺内での結核菌の増殖をコントロール群に比し 5% に抑えた (95% の抑制) (牧野)。

4. 機能的 CTL 分化を誘導する樹状細胞の活性化は Th1 誘導型ペプチドによって分化誘導される新たなヘルパー T 細胞亜集団 (ThX) が産生する IL-17F 以外に ThX 細胞からの共刺激が必要であることを明らかにした（田村）。
5. 結核菌初感染後の宿主応答とメモリー T 細胞応答では、抑制性 PD-1 シグナルの影響が異なることが示された。この結果から、PD-1 以外の抑制性経路のメモリー T 細胞応答への関与を明らかにすることが、結核に対するワクチン効果の増強に必要となることが示された（河村）。
6. 約 800 万種類の化合物のデータを用いたインシリコスクリーニングを行い、結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素の新規阻害剤の候補として 74 種類の化合物を選んだ。抗酸菌に特異的な細胞壁構造や病原性に関わるタンパク質 (15 種類) の発現系を構築した（柴山）。

### D. 考察

結核は全人類の恐怖であり、適切に制御する方策を勝ち取ることは全世界の人々にとって福音となる。そうした意味において抗酸菌研究者は大きな重責を担っている。しかし、一世紀以上に及ぶ全世界を上げての研究によっても未だに確固たるストラテジーは残念ながら勝ち得ていない。この目的を達成するためには、結核菌を生体外排除するために必要十分な生体防御反応を理解し、それに基づいた予防法を確立するとともに、多剤耐性菌に対しても充分有効に作用する新規薬剤を開発しなければならない。

一方、結核に対するワクチンとして用いられてきた BCG 菌の有効性を鑑み、かつ費用対効果を考えて、BCG のワクチンとしての使用を制限しようとする動きがヨーロッパを中心に起こっている。結核は依然として高齢者の病気であり、発症平均年齢は 60～70 歳を超える。BCG ワクチン接種を中止した場合、その是非が判明するには半世紀以上におよぶ年月が必要である。したがって、抗酸菌研究者は可能な限り早く現行の BCG に代わる新しい予防方策を確立するか、BCG に改良を加えより有効に作用する BCG の実用化を図るかによって、後世に不安を残さないことが極めて重要となる。

BCG が充分その効果を発揮できない最大の理由は、BCG には固有の欠点があり、BCG 由来の抗原が十分に有効利用されないことにある。本研究班においてはこの点を中心に研究がおこなわれ、少なくともマウスを用いた実験系においては、現行の BCG よりはるかに有効な BCG が作製されたことは大きな発展と考えられる。しかし、当然のことながら、遺伝子組換え技法が BCG 改良に用いられており、実用化に向けては大きなハードルが残されている。

一方、追加免疫用ワクチンの開発は世界を通じて盛んに行われていて、有効なワクチン候補が作製されつつある。しかし、その理論背景は薄く、本研究班においてはその理論構築を行い、かつ、これまでの研究班の研究成果に基づいた候補ワクチンのテストが行われつつある。これらが合体した時、真に信頼できる追加免疫ワクチンが樹立されると考えられる。また、接種したワクチンの有効性を生体内で高める方策も重要である。宿主の免疫応答能を修飾することは大きなハードルに直面する可能性が大きい。結核菌特異的方策が樹立されれば大きな武器となると考えられる。

新規抗結核薬の開発においては、抗酸菌特異的ヌクレオチド加リン酸分解酵素の基質結合部位に結合し得る化合物を現在地球上に存在する全ての化合物 800 万種のスクリーニングの結果 74 種類を選択し得た。この酵素は、現在多剤治性菌において変異が

観察されていないことから、近い将来新しい多剤耐性菌用薬剤の誕生が期待される。

#### E. 結論

結核に対する予防法・治療法の開発に一定の成果が得られた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Mukai, T., Y. Tsukamoto, Y. Maeda, T. Tamura, and M. Makino. 2013. Efficient Activation of Human T Cells of Both CD4 and CD8 Subsets by Urease Deficient-Recombinant BCG that Produced Heat Shock Protein 70-*Mycobacterium tuberculosis*-Derived Major Membrane Protein-II Fusion Protein. Clin. Vaccine Immunol., in press.
- 2) Umamura, M., and G. Matsuzaki. 2013. Innate and acquired immune responses to mycobacterial infections: involvement of IL-17A/IL-23 axis in protective immunity. Jpn. J. Lepr., in press.
- 3) Yang, R., C. Xi, D. R. Sita, S. Sakai, K. Tsuchiya, H. Hara, Y. Shen, H. Qu, R. Fang, M. Mitsuyama, and I. Kawamura. 2013. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to the maturation and secretion of IL-1 $\alpha$  from infected macrophages through the elevation of cytoplasmic calcium levels and calpain activation. Pathog Dis., in press.
- 4) Tamura, T., Y. Shimohakamada, and M. Makino. 2013. Towards novel tuberculosis and leprosy vaccine development : The role of Th1-inducing peptide in cytotoxic T cell differentiation. Japanese

- Journal of Leprosy, in press.
- 5) Wang, H., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and M. Makino. 2013. An *in vitro* model of *Mycobacterium leprae* induced granuloma formation. BMC Infectious Diseases, 13: 279.
  - 6) Kai, M., N. Nakata, M. Matsuoka, T. Sekizuka, M. Kuroda, and M. Makino. 2013. Characteristic mutations found in the ML0411 gene of *Mycobacterium leprae* isolated in Northeast Asian countries. Infection, Genetics and Evolution, 19: 200-204.
  - 7) Hara, H., K. Tsuchiya, I. Kawamura, R. Fang, E. Hernandez-Cuellar, Y. Shen, J. Mizuguchi, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, and M. Mitsuyama. 2013. Phosphorylation of ASC acts as a molecular switch controlling the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. Nature Immunol., 14: 1247-1255.
  - 8) Yokobori, N., B. Lopez, L. Geffner, C. Sabio y Garcia, P. Schierloh, L. Barrera, S. de la Barrera, S. Sakai, I. Kawamura, M. Mitsuyama, V. Ritacco, and C. Sasiain Mdel. 2013. Two genetically-related multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains induce divergent outcomes of infection in two human macrophage models. Infect. Genet. Evol., 16: 151-156.
  - 9) Yamashita, Y., Y. Hoshino, M. Oka, S. Matsumoto, H. Ariga, H. Nagai, M. Makino, K. Ariyoshi, and Y. Tsunetsugu-Yokota. 2013. Multicolor Flow Cytometric Analyses of CD4(+) T Cell Responses to *Mycobacterium tuberculosis*-Related Latent Antigens. Jpn. J. Infect. Dis., 66: 207-215.
- 1) Makino, M. Novel vaccine development against leprosy. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress, 16<sup>th</sup>-19<sup>th</sup> September, 2013, Brussels, Belgium.
  - 2) Tsukamoto, Y. Evaluation of major membrane protein-I for the serodiagnosis of leprosy. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress, 16<sup>th</sup>-19<sup>th</sup> September, 2013, Brussels, Belgium.
  - 3) Tamura, T., Y. Shimohakamada, and M. Makino. Enhancing effect of Peptide-25 on the induction of functional activation of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
  - 4) Shimohakamada, Y., T. Tamura, M. Makino, and S. L. Nutt. The role of follicular helper T cell in mycobacterial infection. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
  - 5) Tsukamoto, Y., Y. Maeda, T. Tamura, T. Mukai, and M. Makino. Development of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG for the inhibition of *M. tuberculosis* multiplication in lung. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
  - 6) Mukai, T., Y. Miyamoto, M. Matsuoka, Y. Maeda, and M. Makino. Construction of stable recombinant BCG which secretes HSP70-MMP-II fusion protein by chromosomal integration of the gene for leprosy vaccine. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel
2. 学会発表

- Meeting in Japan. 17–18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 7) Maeda, Y., T. Tamura, T. Mukai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Exosomes derived from *Mycobacterium leprae* infected dendritic cells stimulated with a lipopeptide participate in intercellular communication. US–Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17–18 August, 2013, Sapporo, Japan.
  - 8) Miyamoto, Y., T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Biosynthetic characterization of glucuronic acid-containing glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. US–Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17–18 August, 2013, Sapporo, Japan.
  - 9) Umemura, M., S. Touyama, M. Fukui, A. Yahagi, S. Nakae, Y. Iwakura, and G. Matsuzaki. Involvement of IL-17A-producing TCR  $\gamma\delta$  T cells in late protective immunity against pulmonary mycobacterial infection. IMMUNOLOGY 2013, 3–7 May, 2013, Hawaii, USA.
  - 10) Fukui, M., M. Umemura, and G. Matsuzaki. Eicosapentaenoic acid induces apoptosis in human pancreatic cancer cells; Role of ROS accumulation, caspase 8 activation, and autophagy induction. IMMUNOLOGY 2013, 3–7 May, 2013, Hawaii, USA.
  - 11) Matsuzaki, G., Y. Okita, T. Shiono, S. Hamada, and M. Umemura. Mechanism of IL-17A-mediated enhancement of protective immunity against *Listeria monocytogenes* infection. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 22–27 August, 2013, Milan, Italy.
  - 12) Tamura, T., Y. Shimohakamada, and M. Makino. The role of *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein in the induction of Th1 immune response. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology. 22–27 August, 2013, Milano, Italy.
  - 13) Shimohakamada, Y., T. Tamura, M. Makino, and S. L. Nutt. The role of follicular helper T cells in mycobacterial infection. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology. 22–27 August, 2013, Milano, Italy.
  - 14) Mori, S., H. Kim, E. Rimbara, and K. Shibayama. Structural insights into a diadenosine tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv for the design of new anti-tuberculosis drugs. International Conference on Structural Genomics. 29 July–1 August, 2013, Sapporo, Japan.
  - 15) Mori, S., H. Kim, E. Rimbara, and K. Shibayama. Structural insights into a novel diadenosine tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis*. US–Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17–18 August, 2013, Sapporo, Japan.
  - 16) Kawamura, I., S. Sakai, and M. Mitsuyama. Blockade of PD-1 signal pathway causes exacerbation of *Mycobacterium tuberculosis* infection via excessive IFN- $\gamma$  production by antigen-specific Th1 type CD4<sup>+</sup> T cells. US–Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17–18 August, 2013, Sapporo, Japan.
  - 17) Kawamura, I., and M. Mitsuyama. Blockade of PD-1 signal pathway causes exacerbation of

- Mycobacterium tuberculosis* infection via excessive IFN- $\gamma$  production by antigen-specific Th1 type CD4<sup>+</sup> T cells. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology. 22-27 August, 2013. Milan, Italy.
- 18) Osada-Oka, M., S. Matsumoto, Y. Ozeki, and Y. Minamiyama. Ferritin superfamily protein-like activity in mycobacterial DNA-binding protein 1. 6<sup>th</sup> Joint Meeting of The Societies for Free Radical Research Australasia and Japan. 12-14 September, 2013, Sydney, Australia.
- 19) 甲斐雅規, 中田 登, 松岡正典, 関塚剛史, 黒田 誠, 牧野正彦. SNPs 解析により示されたらい菌日本株ゲノムの特徴. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 20) 向井 徹, 宮本友司, 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 組換えらい菌株構築への基礎的検討. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 21) 牧野正彦. 結核ワクチン作製の試み. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 22) 田村敏生, 下袴田陽子, 牧野正彦. 新たな結核・ハンセン病ワクチン開発に向けて—Th1 分化誘導型ペプチドによる細胞障害性記憶 T 細胞の分化誘導機構の解析—. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 23) 福富康夫, 前田百美, 松岡正典, 牧野正彦. 蛍光色素を利用したマクロファージの抗らい菌活性発現機構の解明. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 24) 下袴田陽子, 田村敏生, Stephan Nutt, 牧野正彦. 抗酸菌感染における濾胞ヘルパーT細胞の動態. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 25) 鮫島朝之, 前田百美, 後藤正道, 牧野正彦. 皮疹の出現前後に MMP-II 血清抗体価の変化が観察できたハンセン病少菌型の 1 例. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 26) 宮本友司, 松岡正典, 福富康夫, 向井徹, 甲斐雅規, 前田百美, 牧野正彦. *Mycobacterium leprae* のメタボローム解析. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 27) 鈴木幸一, 谷川和也, Yang Degang, 赤間 剛, 川島 晃, 石藤雄子, 牧野正彦, 石井則久. らい菌感染マクロファージ内の脂質維持機構とクロファジミンによる阻害. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 28) 前田百美, 向井 徹, 福富康夫, 田村敏生, 牧野正彦. らい菌感染樹状細胞が細胞外放出するエキソソームを構成するタンパクの分析. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 29) Umemura, M., S. Touyama, M. Fukui, Y. Yoshida-Okamoto, A. Yahagi, C. Fukui, S. Nakae, Y. Iwakura, and G. Matsuzaki. Role of interleukin-17F in pulmonary mycobacterial infection. 第 78 回日本インターフェロン・サイトカイン学会/第 21 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム合同学術集会 2013 年 5 月 東京都
- 30) 梅村正幸, 松崎吾朗. マイコバクテリア感染に対する IL-17A 産生 T 細胞の防御機構の解明. 第 86 回日本ハンセン病学会学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 31) 梅村正幸, 當山清悟, 福井雅之, 福井知穂, 中江進, 岩倉洋一郎, 松崎吾朗. マイコバクテリア感染肺における IL-17F 産生細胞の同定とその局在性. 第 24 回日本生体防御学会学術集会

- 2013年7月 熊本市
- 32) 梅村正幸. 結核菌感染における IL-17 ファミリーサイトカインの役割. 沖縄感染免疫シンポジウム 2013 2013年7月 沖縄県西原町
- 33) Umemura, M., S. Touyama, M. Fukui, C. Fukui, S. Nakae, Y. Iwakura, and G. Matsuzaki. Identification of IL-17F-producing cells during mycobacterial infection. 第42回日本免疫学会総会・学術集会 2013年12月 千葉市
- 34) Fukui, M., M. Umemura, T. Miyata, T. Harakuni, T. Arakawa, and G. Matsuzaki. Induction of early immunity against pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice by combination of BCG priming vaccine and boosting micosal vaccine with a recombinant mycobacterial antigen. 第42回日本免疫学会総会・学術集会 2013年12月 千葉市
- 35) Matsumura, K., K. Ishii, N. Miyamura, Y. Nakamura, T. Tamura, and K. Kawakami. Generation of transgenic mice expressing TCRab specific for mannoprotein from *Cryptococcus neoformans*. 第42回日本免疫学会総会・学術集会 2013年12月 千葉市
- 36) 森茂太郎, 金玄, 林原絵美子, 柴山恵吾. Functions and structures of MAV\_3489 from *Mycobacterium avium* and MSMEG\_2932 from *M. smegmatis*. 第87回日本細菌学会総会. 2014年3月 東京
- 37) 河村伊久雄. 結核菌に対する宿主感染防御の発現制御. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013年5月 さいたま市
- 38) 河村伊久雄. 結核菌に対する宿主感染防御の発現制御. The impact of PD-1 inhibitory signal on the resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. 第87回日本細菌学会総会 2014年3月 東京都
- 39) 松本 壮吉. 抗酸菌の潜伏感染や薬剤抵抗性に関わる分子メカニズム. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013年5月 さいたま市
- 40) 岡 真優子, 松本 壮吉, 尾関 百合子, 市川 寛, 南山 幸子. 結核菌感染に対するマクロファージの生体防御機構. 第66回日本酸化ストレス学会 2013年6月 名古屋市
- 41) 岡 真優子, 松本 壮吉, 尾関 百合子, 南山 幸子. 宿主細胞内で増殖する結核菌のエネルギー産生と増殖機構. 第7回細菌学若手コロッセウム 2013年8月 広島県三原市
- 42) 前山 順一, 山崎 利雄, 山本 十糸子, 林 大介, 松本 壮吉, 網 康至, 伊保澄子, 山本 三郎. 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 MDP1 および TLR9 リガンド G9.1 アジュバントの結核菌噴霧感染による評価. 第17回日本ワクチン学会学術集会 2013年11-12月 津市
- 43) 戸田 彩季, 瀬戸 俊之, 時政 定雄, 新宅 治夫, 松本 壮吉. BCG ワクチン接種が原因と思われる骨髄炎の幼児. 第54回日本熱帯医学会大会 2013年10月 長崎市
- 44) 井上 学, 岡 真優子, 仁木 満美子, 尾関 百合子, 一瀬 休生, 濱野 真二郎, 松本 壮吉. ケニア共和国 Mbita 地区の児童における結核菌感染と鉤虫感染の関連. 第54回日本熱帯医学会大会. 2013年10月 長崎市
- 45) 岡 真優子, 立石 善隆, 平山 幸雄, 尾関 百合子, 前倉 亮次, 小林 和夫, 松本 壮吉. 潜在性結核のバイオマーカーとしての抗 Antigen85 および Mycobacteri DNA-binding protein 1 抗体. 第54回日本熱帯医学会大会 2013年10月 長崎市
- 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25年度 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)

新規リコンビナント BCG ワクチンの作出と評価

分担研究報告書

研究分担者

牧野 正彦

(国立感染症研究所・部長)

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

新規リコンビナント BCG ワクチンの作出と評価

研究分担者 牧野 正彦 （国立感染症研究所・感染制御部・部長）  
研究協力者 塚本 裕美子 （国立感染症研究所・感染制御部・主任研究官）

研究要旨.

弱毒化牛型結核菌 (*Mycobacterium bovis* BCG (BCG) 菌) が長い間結核のワクチンとして全世界的に使われてきた。しかし、今日では BCG の有用性は乳幼児の極悪性結核の予防に留まり、成人・高齢者の肺結核を予防し得るとは考えにくい。我が国の結核は、都市部で集団発症が頻繁に生ずる一方、主体は依然として高齢者にある。これら結核の発症を予防するためには、従来の BCG に代わる改良型リコンビナント BCG の開発・実用化が必須である。これまでに、BCG から *UreC* 遺伝子を取り除き、ウレアーゼ活性を消失させたリコンビナント BCG に HSP70-MMP-II 連結遺伝子を導入したリコンビナント BCG (BCG-DHTM) を作出し、BCG-DHTM は現行の BCG-Tokyo 株に比し、有意に強く結核菌の肺内増殖を抑制する可能性があることを見い出してきた。しかし、BCG-DHTM のように外来遺伝子をプラスミドフォームで BCG の細胞質内へ導入した場合、導入した遺伝子は非常に高い確率で脱落する可能性があり、ワクチンとして広く安定供給する際に大きな妨げとなる。そこで、*UreC* 遺伝子ノックアウト BCG の DNA へ HSP70-MMP-II 遺伝子を導入し、かつ外来遺伝子導入 BCG を選択する際に必要となる薬剤耐性遺伝子を除去したリコンビナント BCG (BCG-DHTMI) を作製し、その T 細胞活性化能を評価した。その結果、BCG-DHTMI は BCG-DHTM とほぼ同程度の T 細胞活性化能を有しており、結核ワクチンとして有望な候補となり得ると考えられた。

A. 研究目的

結核ワクチンの目的は、未感作 CD4 陽性 T 細胞及び未感作 CD8 陽性 T 細胞を強く活性化して、メモリー機能を有するこれらサブセットの T 細胞を作出することにある。しかし、現在日本国内で使用されている BCG-Tokyo 株は、未感作 T 細胞の活性化能は弱く充分量の IFN- $\gamma$  を産生することができず、そのためワクチンとして十分な効果を与えることができないと考えられている。そこで、BCG-Tokyo 株の T 細胞活性化能を強化した新しいリコンビナント BCG の開発と実用化が強く求められている。これまでに *UreC* 遺伝子をノックアウトし、ファゴゾームの酸性化を抑制するウレアーゼを取り

除いたリコンビナント BCG に HSP70-MMP-II (ともに BCG 菌由来) 連結遺伝子をプラスミド型導入し、ファゴゾームあるいはファゴライソゾーム内で HSP70-MMP-II 融合蛋白を分泌するリコンビナント BCG (BCG-DHTM) を作出したところ、BCG-DHTM は肺内での結核菌の増殖を BCG-Tokyo 株に比し有意に強く抑制する可能性があり、さらに HSP70-MMP-II 融合蛋白を 3 回、アジュバント (TLR4agonist) とともに皮下接種すると、その後にエアロゾル感染させた結核菌の増殖を有意に強く抑制可能であることを見い出してきた。しかし、外来性遺伝子を BCG 菌の細胞質にエレクトロポレーション法等によりプラスミド型で導入すると、導入し

た遺伝子は著しく高確率で脱落することも判明した。こうした現象は、ワクチンを世界的に広く供給する際に大きな障害となる。そこで、今回は *UreC* ノックアウト BCG の DNA の中に HSP70-MMP-II 外来遺伝子を導入するインテグレーション型導入リコンビナント BCG を作製し、その T 細胞活性化能を評価することを目的とした。しかし、BCG の DNA 内へ外来遺伝子を導入する場合、通常 1 コピーしか導入できない。そこで、抗酸菌ファージを解析し、強いプロモーター活性を有する遺伝子を同定し利用した。

## B. 研究方法

*UreC* 遺伝子欠損リコンビナント BCG の DNA に、結核菌由来 MMP-II 遺伝子と BCG 由来の HSP-70 遺伝子を結合させ、遺伝子導入しリコンビナント BCG (BCG-DHTMI) を作製した。正常健常人末梢血より、抗 CD3 抗体付着ダイナビーズを用い T 細胞を除去した後、プラスチック付着性単球を得てリコンビナント (r)GM-CSF 50ng/ml および rIL-4 (10ng/ml) を添加して樹状細胞を産生した。この樹状細胞に対して、リコンビナント BCG あるいはクローニングした BCG-Tokyo 株 (BCG-clone A) を感染させ成熟樹状細胞を得た。BCG 感染樹状細胞の T 細胞活性化能は、BCG 感染樹状細胞をマイトマイシン C 処理した後、自己の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞と 4 日間混合培養し、T 細胞が産生する IFN- $\gamma$  および IL-2 を ELISA 法で測定して評価した。T 細胞は、抗 CD4 抗体あるいは抗 CD8 抗体付着ダイナビーズを用いて精製した。ナイーブ T 細胞は、これら T 細胞から CD45RO 陽性 T 細胞を除去して得た。CD45RO 抗体は市販の抗体を用いた。IFN- $\gamma$  および IL-2 は、市販の ELISA 用キットを用いて測定した。樹状細胞から産生される各種サイトカインも市販のキットを用いて ELISA 法で測定した。BCG 感染樹状細胞における T 細胞活性化の抗原特異性は、樹状細胞を MHC 抗原に対する抗体および CD86 に対する抗体で処理した際の T 細胞の活性化の減弱の程度で評価した。樹状細胞表面の抗原の発現程度は、FACSCalibur を

用いて行った。抗体は市販の抗体を用いた。BCG-DHTMI 感染 DC による T 細胞活性化機構を探索する目的で、DC を市販の Chloroquine、Brefeldin A、Lactacystin で処理し、T 細胞の活性化抑制能を T 細胞からの IFN- $\gamma$  の産生量により評価した。さらに、BCG-DHTMI のメモリー T 細胞産生能を測定する目的で、C57BL/6 マウスに BCG-DHTMI および BCG-clone A を皮下接種し、4 週間後に脾臓を摘出し、脾中 CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を *in vitro* で MMP-II タンパクで刺激した際に、細胞内に IFN- $\gamma$  を産生している細胞を FACSCalibur を用いて測定し算出した。

倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解(インフォームドコンセント)を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。

## C. 研究結果

BCG-DHTMI は菌体外へ HSP70-MMP-II 融合蛋白を分泌し、樹状細胞に感染させると IL-12p70・INF  $\alpha$ ・IL-1 $\beta$  などのサイトカインを BCG-clone A に比し効率的に産生誘導した。また、樹状細胞の細胞表面の抗原を解析すると、MHC クラス I 及び II・CD86 さらに CD83 抗原を強く発現させ、さらに M-CSF を用いて分化誘導したマクロファージからも大量の IL-12p40・IL-1 $\beta$ ・TNF  $\alpha$  及び GM-CSF を産生させた。さらに、BCG-DHTMI を樹状細胞及びマクロファージに感染させると細胞表面に MMP-II を発現させ、これら抗原提示細胞を酸性化抑制剤であるクロロキニンで前処理すると MMP-II の発現は抑制された。また、BCG-DHTMI を樹状細胞に感染させた後、ヒト未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を刺激する

と大量の IFN- $\gamma$  を産生し、T 細胞からの IFN- $\gamma$  の産生は、BCG-DHTMI 感染樹状細胞を抗 MHC 抗体あるいは抗 CD86 抗体で処理すると抑制され、さらにクロロキニンで樹状細胞を処理しても抑制された。また、BCG-DHTMI 感染樹状細胞を用いて未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を刺激すると CCR7<sup>low</sup> あるいは CD27<sup>low</sup> のメモリータイプ CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞が効率的に産生された。さらに、C57BL/6 マウスに BCG-DHTMI を皮下接種し、4 週あるいは 12 週後に脾 T 細胞を分離し、*in vitro* で MMP-II・HSP70 あるいは結核菌 H37Rv 由来細胞質蛋白で再刺激すると、大量の IFN- $\gamma$  を産生した。

#### D. 考察

BCG 菌の DNA 内へ外来遺伝子を導入したインテグレーション型リコンビナント BCG (BCG-DHTMI) は、同一遺伝子を BCG 菌の細胞質へ導入したプラスミド型リコンビナント BCG (BCG-DHTM) とほぼ同程度の未感作 T 細胞活性化能を有していた。通常プラスミド型遺伝子導入した場合は、外来遺伝子は多コピー導入可能なため、外来遺伝子がコードする蛋白質はより大量に発現される。しかし、今回は抗酸菌フェージの高発現プロモーターを用いたため、1 コピーの導入であってもほぼ同程度の蛋白発現が得られ、そのためプラスミド型導入 BCG と同程度の T 細胞活性化能が得られたものと想定される。また、プラスミド型導入 BCG を用いる限り、遺伝子保有 BCG を選択するためのマーカー（通常薬剤耐性遺伝子）を除去することはできず、このマーカーがヒト生体内においては毒性因子となる可能性が極めて高く、安全なワクチンを供給する際に大きな妨げとなる。今回作製した BCG-DHTMI では、薬剤耐性遺伝子は除去できており、その点安全性が確保されている。さらに、BCG-DHTMI は数代にわたり継代培養しても、その T 細胞活性化能が損なわれることはなかった。したがって、本研究で得られた方策は、遺伝子導入リコンビナント BCG をワクチンとして全世界へ供給する際、大

きな役割を担うことが可能でと考えられる。今後、BCG-DHTM に更なる改良を加え、より有効なワクチンを作成し、さらに本年度の成果で得られた安全供給のための方策を導入することで、日本初の信頼される結核ワクチンに近い将来作製され、実用化されるものと期待される。

#### E. 結論

BCG DNA へ外来遺伝子を組み込み、マーカー遺伝子を除去したインテグレーション型リコンビナント BCG 菌の作出戦略が確立された。遺伝子導入リコンビナント BCG の安定供給が可能となった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Mukai, T., Y. Tsukamoto, Y. Maeda, T. Tamura, and M. Makino. 2013. Efficient Activation of Human T Cells of Both CD4 and CD8 Subsets by Urease Deficient-Recombinant BCG that Produced Heat Shock Protein 70-*Mycobacterium tuberculosis*-Derived Major Membrane Protein-II Fusion Protein. Clin. Vaccine Immunol., in press.
- 2) Wang, H., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and M. Makino. 2013. An *in vitro* model of *Mycobacterium leprae* induced granuloma formation. BMC Infectious Diseases, 13: 279.
- 3) Kai, M., N. Nakata, M. Matsuoka, T. Sekizuka, M. Kuroda, and M. Makino. 2013. Characteristic mutations found in the ML0411 gene of *Mycobacterium leprae* isolated in Northeast Asian countries. Infection, Genetics and Evolution, 19: 200-204.

##### 2. 学会発表

- 1) Makino, M. Novel vaccine development against leprosy. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress, 16<sup>th</sup>-19<sup>th</sup> September,

- 2013, Brussels, Belgium.
- 2) Tsukamoto, Y. Evaluation of major membrane protein-I for the serodiagnosis of leprosy. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress, 16<sup>th</sup>-19<sup>th</sup> September, 2013, Brussels, Belgium.
  - 3) Tamura, T., Y. Shimohakamada, and M. Makino. The role of *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein in the induction of Th1 immune response. 15th International Congress of Immunology. August, 2013. Milano, Italy.
  - 4) Tamura, T., Y. Shimohakamada, and M. Makino. Enhancing effect of Peptide-25 on the induction of functional activation of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
  - 5) Shimohakamada, Y., T. Tamura, M. Makino, and S. L. Nutt. The role of follicular helper T cell in mycobacterial infection. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
  - 6) Tsukamoto, Y., Y. Maeda, T. Tamura, T. Mukai, and M. Makino. Development of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG for the inhibition of *M. tuberculosis* multiplication in lung. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
  - 7) Mukai, T., Y. Miyamoto, M. Matsuoka, Y. Maeda, and M. Makino. Construction of stable recombinant BCG which secretes HSP70-MMP-II fusion protein by chromosomal integration of the gene for leprosy vaccine. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
  - 8) Maeda, Y., T. Tamura, T. Mukai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Exosomes derived from *Mycobacterium leprae* infected dendritic cells stimulated with a lipopeptide participate in intercellular communication. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
  - 9) Miyamoto, Y., T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Biosynthetic characterization of glucuronic acid-containing glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
  - 10) 甲斐雅規, 中田 登, 松岡正典, 関塚剛史, 黒田 誠, 牧野正彦. SNPs 解析により示されたらい菌日本株ゲノムの特徴. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
  - 11) 向井 徹, 宮本友司, 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 組換えらい菌株構築への基礎的検討. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
  - 12) 牧野正彦. 結核ワクチン作製の試み. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
  - 13) 田村敏生, 下袴田陽子, 牧野正彦. 新たな結核・ハンセン病ワクチン開発に向けて—Th1 分化誘導型ペプチドによる細胞障害性記憶 T 細胞の分化誘導機構の解析—. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さい

- たま市
- 14) 福富康夫, 前田百美, 松岡正典, 牧野正彦. 蛍光色素を利用したマクロファージの抗らい菌活性発現機構の解明. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013年5月 さいたま市
- 15) 下袴田陽子, 田村敏生, Stephan Nutt, 牧野正彦. 抗酸菌感染における濾胞ヘルパーT細胞の動態. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013年5月 さいたま市
- 16) 鮫島朝之, 前田百美, 後藤正道, 牧野正彦. 皮疹の出現前後にMMP-II血清抗体価の変化が観察できたハンセン病少菌型の1例. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013年5月 さいたま市
- 17) 宮本友司, 松岡正典, 福富康夫, 向井徹, 甲斐雅規, 前田百美, 牧野正彦. *Mycobacterium leprae*のメタボローム解析. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013年5月 さいたま市
- 18) 鈴木幸一, 谷川和也, Yang Degang, 赤間剛, 川島晃, 石藤雄子, 牧野正彦, 石井則久. らい菌感染マクロファージ内の脂質維持機構とクロファジミンによる阻害. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013年5月 さいたま市
- 19) 前田百美, 向井徹, 福富康夫, 田村敏生, 牧野正彦. らい菌感染樹状細胞が細胞外放出するエキソソームを構成するタンパクの分析. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013年5月 さいたま市
- 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25年度 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)

結核等抗酸菌の新規薬剤開発のための標的分子の探索と  
その構造機能解析

分担研究報告書

研究分担者

柴山 恵吾

(国立感染症研究所・部長)