

主任研究員 山田博之

結核菌を電子顕微鏡による観察で可視化して、想定される現象がどこで起きているのか、どのような分子、構造が関与しているのか、菌体による違いはないかどうかを研究しています。

最近、同一の遺伝子構成を持つクローン抗酸菌細胞でも表現型に差が生じるというデータが報告されています。一卵性双生児でも指紋が異なることから考えると当然のことですが、それを裏付けるには形態学的観察が必須です。光学顕微鏡で形態的概要はわかりますが、より詳細な観察をするには電子顕微鏡観察が必要です。できるだけ生きた状態に近い標本を作製して電子顕微鏡を用いて高倍率で観察することで、これまでわかっていなかった現象を定性的、定量的に研究していきたいと考えています。

最新の論文では、生きた状態に近い形態を保持できる急速凍結・凍結置換法で調製した結核菌をエポキシ樹脂に包埋し、その超薄連続切片を透過型電子顕微鏡観察した詳細データを報告しました。

また、結核菌塗抹検査に携わる技師さんのトレーニング用に、培養細胞、ポリアクリルアミドと液体培養してホルマリン固定した結核菌を使って人工痰を開発しました。この人工痰を使って陽性度を調節したパネルテストスライドを作製しています。

結核菌の電子顕微鏡写真の掲載をご希望のマスコミ、出版関係の方、人工痰、パネルテストスライドを使ってみたい方はご連絡下さい。（E-mail: hyamada@jata.or.jp）

原著論文等

1. 山田博之. 単一菌体の時間的・空間的連続観察から得られた新知見と将来展望. 顕微鏡. 2015. 50:80.
2. 山田博之. ストラクトーム解析による結核菌の基礎的形態データとリボソーム定量 顕微鏡. 2015. 50:92-97.
3. [Yamada H, Yamaguchi M, Chikamatsu K, Aono A, Mitarai S. Structome analysis of virulent *Mycobacterium tuberculosis*, which survives with only 700 ribosomes per 0.1 fl of cytoplasm. PLoS One. 2015 Jan 28;10\(1\):e0117109. doi: 10.1371/journal.pone.0117109. eCollection 2015.](#)
4. [Aono A, Chikamatsu K, Yamada H, Kato T, Mitarai S. The association between pncA gene mutations, pyrazinamidase activity, and pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2014 May 27. AAC.02394-14. \[Epub ahead of print\] PubMed PMID: 24867972.](#)
5. Nishiyama H, Aono A, Sugamoto T, Mizuno K, Chikamatsu K, Yamada H, Mitarai S. Optimization of the microscopic observation drug susceptibility assay for four first-line drugs using *Mycobacterium tuberculosis* reference strains and clinical isolates. J Microbiol Methods. 2014. 101:44-8.
6. Chikamatsu K, Aono A, Yamada H, Kato T, Mitarai S. [Evaluation of the use of SPEED-OLIGO Mycobacteria for identification of Mycobacterium species]. Kekkaku. 2014 ;89:45-50.
7. [Chikamatsu K, Aono A, Yamada H, Sugamoto T, Kato T, Kazumi Y, Tamai K, Yanagisawa H, Mitarai S. Comparative evaluation of three immunochromatographic identification tests for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex. BMC Infect Dis. 2014. 1;14:54.](#)
8. Yamada H, Chikamatsu K, Aono A, Mitarai S. Pre-fixation of virulent *Mycobacterium tuberculosis* with glutaraldehyde preserves exquisite ultrastructure on transmission electron microscopy through cryofixation and freeze-substitution with osmium-acetone at ultralow temperature. J Microbiol Methods. 2014 ;96:50-5.
9. [Hoshino A, Hanada S, Yamada H, Mii S, Takahashi M, Mitarai S, Yamamoto K, Manome Y. *Mycobacterium tuberculosis* escapes from the phagosomes of infected human osteoclasts, and reprograms osteoclast development via dysregulation of](#)

- [cytokines and chemokines. Pathog. Dis. 2013. doi: 10.1111/2049-632X.12082.](#)
10. [山田博之. 電子顕微鏡観察で可視化される結核菌の素顔. 顕微鏡. 2013. 48:51-56.](#)
 11. 青野昭男、近松絹代、山田博之、村田正太、結城篤、三澤成毅、小栗豊子、御手洗聡. 抗酸菌塗抹検査外部精度評価の試み. 日本臨床微生物学会雑誌. 2012. 22:279-283.
 12. [Yamada H, Bhatt A, Danev R, Fujiwara N, Maeda S, Mitarai S, Chikamatsu K, Aono A, Nitta K, Jacobs WR Jr, Nagayama K. Non-acid-fastness in *Mycobacterium tuberculosis* *AkasB* mutant correlates with the cell envelope electron density. Tuberculosis. 2012. 92:351-7.](#)
 13. Mitarai S, Karinaga R, Yamada H, Mizuno K, Chikamatsu K, Aono A, Sugamoto T, Hatano T. TRICORE, a novel bead-based specimen concentration method for the culturing of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Microbiol. Methods. 2012. 90:152-155.
 14. 近松絹代、青野昭男、山田博之、御手洗聡. GenoType® MTBDRsl による結核菌の fluoroquinolone, aminoglycoside および ethambutol 感受性検査に関する精度評価. 結核. 2012. 87:641-647.
 15. Abe A, Yamada H, Moriya S, Miyazawa K. The β -carboline alkaloid harmol induces cell death via autophagy but not apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. Biol. Pharm. Bull. 2011. 34:1264-1272.
 16. [Yamada H, Mitarai S, Wahyunitisari MR, Mertaniasih NM, Sugamoto T, Chikamatsu K, Aono A, Matsumoto H, Fujiki A. Improved polyacrylamide-based artificial sputum with formalin-fixed tubercle bacilli for training of tuberculosis microscopists. J. Clin. Microbiol. 2011. 49: 3604-3609.](#)
 17. 近松絹代、水野和重、青野昭男、山田博之、菅本鉄広、西山裕之、御手洗聡. GenoType® MTBDRplus による多剤耐性結核菌同定 に関する検討. 結核. 2011. 86:697-702.
 18. Yamada H, Mitarai S, Chikamatsu K, Mizuno K, Yamaguchi M. Novel freeze-substitution electron microscopy provides new aspects of virulent *Mycobacterium tuberculosis* with visualization of the outer membrane and satisfying biosafety requirements. J. Microbiol. Methods. 2010. 80:14-18.
 19. [Murase Y, Maeda S, Yamada H, Ohkado A, Chikamatsu K, Mizuno K, Kato S, Mitarai S. Clonal expansion of multidrug-resistant and extensively drug-resistant](#)

- [tuberculosis, Japan. Emerg. Infect. Dis. 2010. 16:948-954.](#)
20. Abe A, Yamada H. Harmol induces apoptosis by caspase-8 activation independently of Fas/Fas ligand interaction in human lung carcinoma H596 cells. *Anticancer Drugs*. 2009. 20:373-381.
 21. 水野和重 近松絹代 青野昭男 東由桂 山田博之 御手洗聡. 発光ダイオードを使用した蛍光顕微鏡による抗酸菌塗抹検査精度. *結核*. 2009. 84:627-629.
 22. 水野和重、山田博之、御手洗聡. 多剤耐性結核菌. *臨床検査*. 2008. 52:1133-1138.
 23. 山田博之, 松本宏子, 御手洗聡, 藤木明子. ポリアクリルアミドを用いた人工痰の長期保存と塗抹鏡検所見の再現性. *結核*. 2008. 83:65-7.
 24. Al-Akhali A, Ohkado A, Fujiki A, Mitarai S, Yamada N, Masui T, Otomo K, Yamada H, Seita A, Mori T, Al-Absi AN. Nationwide survey on the prevalence of anti-tuberculosis drug resistance in the Republic of Yemen, 2004. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*. 2007. 11:1328-1333.
 25. [Sugawara I, Yamada H, Mizuno S. BCG vaccination enhances resistance to *M. tuberculosis* infection in guinea pigs fed a low casein diet. *Tohoku J. Exp. Med.* 2007. 211: 259-268.](#)
 26. [Yamada H, Mizuno S, Ross AC, Sugawara I. Retinoic acid therapy attenuates the severity of tuberculosis while altering lymphocyte and macrophage numbers and cytokine expression in rats infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Nutr.* 2007. 137:2696-2700.](#)
 27. Yamada H, Mitarai S, Aguilan L, Matsumoto H, Fujiki A. Preparation of mycobacteria-containing artificial sputum for TB panel testing and microscopy of sputum smears. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*. 2006. 10: 899-905.
 28. Shi R, Otomo K, Yamada H, Tatsumi T, Sugawara I. Temperature-mediated heteroduplex analysis for the detection of drug-resistant gene mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by denaturing HPLC, SURVEYOR nuclease. *Microbes Infect*. 2006. 8:128-135.
 29. Sugawara I, Yamada H, Mizuno S. Nude rat (F344/N-rnu) tuberculosis. *Cell Microbiol*. 2006. 8:661-677.
 30. [Yamada H, Udagawa T, Mizuno S, Hiramatsu K, Sugawara I. Newly designed primer sets available for evaluating various cytokines and iNOS mRNA expression](#)

- [in guinea pig lung tissues by RT-PCR. *Exp. Anim.* 2005. 54:163-172.](#)
31. [Sugawara I, Otomo K, Yamada H, Wang G, Du C, Shi R, Zhang G. The molecular epidemiology of ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Henan Province, China. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2005. 58:393-395.](#)
 32. Sugawara I, Yamada Shi R. Pulmonary tuberculosis in various gene knockout mice with special emphasis on roles of cytokines and transcription factors. *Current Respiratory Medicine Reviews*, 2005, 1: 7-13.
 33. 大友幸二、鹿住祐子、山田博之、御手洗聡、菅原勇. 結核の病理診断. 検査と技術、2004, 32:423-428.
 34. [Sugawara I, Yamada H, Mizuno S. STAT1 knockout mice are highly susceptible to pulmonary mycobacterial infection. *Tohoku J. Exp. Med.* 2004. 202:41-50.](#)
 35. [Lasco TM, Turner OC, Cassone L, Sugawara I, Yamada H, McMurray DN, Orme IM. Rapid accumulation of eosinophils in lung lesions in guinea pigs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 2004. 72:1147-1149.](#)
 36. Sugawara I, Udagawa T, Yamada H. Rat neutrophils prevent the development of tuberculosis. *Infect. Immun.* 2004. 72:1804-1806
 37. Sugawara I, Yamada H, Mizuno S. Pathological and immunological profiles of rat tuberculosis. *Int. J. Exp. Pathol.* 2004 ;85:125-34.
 38. [Sugawara I, Yamada H, Mizuno S. Pulmonary tuberculosis in spontaneously diabetic goto kakizaki rats. *Tohoku J. Exp. Med.* 2004. 204:135-145.](#)
 39. [Sugawara I, Yamada H, Mizuno S. Relative importance of STAT4 in murine tuberculosis. *J. Med. Microbiol.* 2003. 52:29-34.](#)
 40. Sugawara I, Yamada H, Li C, Mizuno S, Takeuchi O, Akira S. Mycobacterial infection in TLR2 and TLR6 knockout mice. *Microbiol. Immunol.* 2003. 47:327-36.
 41. [Turner OC, Keefe RG, Sugawara I, Yamada H, Orme IM. SWR mice are highly susceptible to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 2003. 71:5266-5272.](#)
 42. Sugawara I, Yamada H, Udagawa T, Huygen K. Vaccination of guinea pigs with DNA encoding Ag85A by gene gun bombardment. *Tuberculosis.* 2003. 83:331-337.
 43. Sugawara I, Yamada H, Mizuno S, Takeda K, Akira S. Mycobacterial infection in MyD88-deficient mice. *Microbiol. Immunol.* 2003. 47:841-847.

44. Abe A, Yamane M, Yamada H, Sugawara I. The omega-hydroxy palmitic acid induced apoptosis in human lung carcinoma cell lines H596 and A549. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 2002. 6:37-43.
45. [Sugawara I, Udagawa T, Hua SC, Reza-Gholizadeh M, Otomo K, Saito Y, Yamada H. Pulmonary granulomas of guinea pigs induced by inhalation exposure of heat-treated BCG Pasteur, purified trehalose dimycolate and methyl ketomycolate. *J. Med. Microbiol.* 2002. 51:131-137.](#)
46. Sugawara I, Yamada H, Mizuno S, Li CY, Nakayama T, Taniguchi M. Mycobacterial infection in natural killer T cell knockout mice. *Tuberculosis.* 2002. 82:97-104.
47. Yamada H, Mizuno S, Sugawara I. Interferon regulatory factor 1 in mycobacterial infection. *Microbiol. Immunol.* 2002. 46:751-760.
48. [Sugawara I, Mizuno S, Yamada H, Matsumoto M, Akira S. Disruption of nuclear factor-interleukin-6, a transcription factor, results in severe mycobacterial infection. *Am. J. Pathol.* 2001. 158:361-366.](#)
49. [Yamada H, Mizuno S, Reza-Gholizadeh M, Sugawara I. Relative importance of NF-kappaB p50 in mycobacterial infection. *Infect. Immun.* 2001. 69:7100-7105.](#)
50. Sugawara I, Yamada H, Hua S, Mizuno S. Role of interleukin (IL)-1 type 1 receptor in mycobacterial infection. *Microbiol. Immunol.* 2001. 45: 743-750.
51. 菅原勇, 山田博之. 【NKT 細胞の基礎と臨床 新しく発見されたリンパ球】結核菌生菌による結節形成と NKT 細胞. *医学のあゆみ.* 2001. 199: 496.
52. Turner OC, Sugawara, Yamada H, Cummings B, Orme IM. Crystalloid inclusions in the cytoplasm of alveolar macrophages of the SwR/J mouse. A possible cause of susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis*? *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 2001. 33:217-219.
53. 樋口 一恵, 原田 登之, 山田 博之, 小林 和夫, 竹田 稔. 非貧食細胞に対する結核菌の侵入 結核. 2000. 75:649-659.
54. Yamada H, Mizumo S, Horai R, Iwakura Y, Sugawara I. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. *Lab. Invest.* 2000. 80:759-767.
55. 菅原 勇, 山田 博之, 大友 幸二, 青木 俊明, 水野 悟, 宇田川 忠. 自動吸入暴露感染装置を用いた実験的結核モデル確立のための最適条件とその応

- 用例 結核. 2000. 75:463-469.
56. Sugawara I, Yamada H, Mizuno S, Iwakura Y. IL-4 is required for defense against mycobacterial infection. *Microbiol. Immunol.* 2000. 44:971-979.
 57. Kaneko H, Yamada H, Mizuno S, Udagawa T, Kazumi Y, Sekikawa K, Sugawara I. Role of tumor necrosis factor-alpha in Mycobacterium-induced granuloma formation in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice. *Lab. Invest.* 1999. 79:379-386.
 58. 池田のりこ、本田育郎、山田博之、矢野郁也、戸井田一郎. マウスモデルにおける「イムノブラダー勝注用」と「IMMUCYST」との抗腫瘍効果の比較. *BCG・BRM 療法研究会会誌.* 2000. 24: 45-53.
 59. [Sugawara I, Yamada H, Kaneko H, Mizuno S, Takeda K, Akira S. Role of interleukin-18 \(IL-18\) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. *Infect. Immun.* 1999. 67:2585-2589.](#)
 60. Yoshinari K, Aoki T, Yamada H, Sugawara I. Human monoclonal antibody 28K29 highly reactive with lung adenocarcinomas of all grades of differentiation and with large cell carcinomas. *Lung Cancer.* 1999. 25:95-103.
 61. 難波聡、大久保貴、高木章美、石原理、関博之、竹田省、菅原勇、山田博之、木下勝之. 後腹膜原発の悪性線維性組織球腫の 1 例. *産科と婦人科.* 1999. 93:687-692.
 62. [Yoshida S, Yamada H, Sugawara I, Takeda K. Effect of dibromochloropropane \(DBCP\) on the hormone receptors of the male rat reproductive system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998. 62:479-483.](#)
 63. [Sugawara I, Yamada H, Kazumi Y, Doi N, Otomo K, Aoki T, Mizuno S, Udagawa T, Tagawa Y, Iwakura Y. Induction of granulomas in interferon-gamma gene-disrupted mice by avirulent but not by virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Microbiol.* 1998. 47:871-877.](#)
 64. [Yamada H, Hashimoto H, Akiyama M, Kawabata Y, Iwai K. Talc and amosite/crocidolite preferentially deposited in the lungs of nonoccupational female lung cancer cases in urban areas of Japan. *Environ. Health. Perspect.* 1997. 105:504-508.](#)
 65. 河端美則、坂本祥一、海野剛、福島一雄、大友幸二、山田博之、青木俊明、中島由槻. 肺扁平上皮癌は肺内で肺胞基底膜と肺胞上皮間で発育する. 日本

- 胸部疾患学会雑誌. 1996. 34:878-884.
66. 山田博之、河端美則、大友幸二、坂本祥一、中島由槻、北川寛、菅原勇、肺腺癌における fucosylceramide 発現の免疫組織化学的検討. 肺癌 1996. 36:131-137.
 67. Hiroyuki Yamada, Yoshinori Kawabata, Hiroshi Kitagawa, Shinji Itoyama, Isamu Sugawara. Ultrastructural localization of immunoreactive fucosylceramide in normal and adenocarcinoma cells. Acta. Histochem. Cytochem. 1996. 26:591-596.
 68. 池田のりこ, 戸井田一郎, 山田博之. Bacillus Calmette-Guerin(BCG)と膀胱癌細胞の Interaction. Biotherapy. 1996. 10: 879-884.
 69. Sugawara I, Yamada H, Nakamura H, Sumizawa T, Akiyama S, Masunaga A, Itoyama S. Preferential expression of the multidrug- resistance-associated protein (MRP) in adenocarcinoma of the lung. Int. J. Cancer. 1995. 20;64:322-325.
 70. Nakamura H, Yamada H, Kitagawa H, Masunaga A, Itoyama S, Sugawara I. Immunoreactive fucosylceramide as a B-cell differentiation marker. Immunol. Lett. 1993. 37:119-122.
 71. [Yamada H, Ishihara H, Kitagawa H, Kawabata Y, Itoyama S, Sugawara I. Preferential expression of immunoreactive fucosylceramide in adenocarcinoma of the lung. Cancer Res. 1992. 52:4408-4412.](#)
 72. 山田博之, 岩井和郎, 橋本尚子, 河端美則. 大都市・地方都市の肺癌・非肺癌患者肺組織における鉍物繊維の定性・定量的比較分析. 大和ヘルス財団研究業績集. 1992. 16: 71-78.
 73. 池田のりこ, 山田博之, 戸井田一郎. 膀胱癌細胞と BCG との *in vitro* interaction. BCG・BRM療法研究会会誌. 1992. 16: 55-64.
 74. Ikebe, C., Kuro-o, M., Yamada, H., and Kohno, S. Cytogenetic studies of Hynobiidae (Urodela). X Morphological variation of chromosome 10 in ten pond-type *Hynobius* from Korea and Japan, with comments on phylogenetic relationships. J. evol. Biol. 1990. 3:155-170.
 75. 山田 博之, 橋本 尚子, 河端 美則, 岩井和郎, 杉田博宜, 小山明, 水口国雄, 村田嘉彦, 長尾光修, 大石不二雄. 免疫組織化学から見た特発性 BOOP. 日本胸部疾患学会雑誌. 1989. 27:1133-1139.
 76. 宍戸真司, 岩井和郎, 真田仁, 塚越兼吉, 山田博之, 守純一, 河端美則, 佐藤瑞枝. 石綿を取扱う工事現場監督者に発症し下肺野腫瘤影を呈した悪性胸

膜中皮腫の 1 例. 日本胸部疾患学会雑誌. 1986. 24:810-816

77. Iwai K, Udagawa T, Yamagishi M, Yamada H. Long-term inhalation studies of diesel exhaust on F344 SPF rats. Incidence of lung cancer and lymphoma. Dev Toxicol Environ Sci. 1986;13:349-60.