

- mycobacterial infection depends on interferon  $\gamma$  and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J.Exp.Med.* 181:1615.
4. Fratazzi, C. et al. 1997. Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. *J.Immunol.* 158:4320.
  5. Klingler, K. et al. 1997. Effect of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes. *Infect.Immun.* 65:5272.
  6. Kremer, L. et al. 1997. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin infection prevents apoptosis of resting human monocytes. *Eur J Immunol* 27: 2450.
  7. Ladel C.H, et al. 1997. Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *Infect.Immun.* 65:1936.
  8. Medina E, et al. 1996. Evidence inconsistent with a role for the *Bcg* (*Nramp*) gene in resistance of mice to infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Exp.Med.* 183:1045.
  9. Molly, A. et al. 1994. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *J Exp Med.* 180:1494.
  10. Roach, T.I, et al. 1991. Role of inorganic nitrogen oxides and tumor necrosis alpha in killing *Leishmania donovani* amastigotes in gamma interferon-lipopolysaccharide activated macrophage from Lsh<sup>s</sup> and Lsh<sup>r</sup> congenic mouse strains. *Infect. Immun.* 59:3935.
  11. Rojas, M. et al. 1997. Differential induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in resistant and susceptible murine macrophages. *J.Immunol.* 159:1352.
  12. Rojas, M. et al. 1999. TNF- $\alpha$  and IL-10 Modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *J.Immunol.* 162:6122.
  13. Xu, D. L, et al. 1995. Establish of *Bcg<sup>r</sup>* congenic mice and their susceptibility/resistance to mycobacterial infection. *Vet.Microbiol.* 50:73.
- F. 研究発表**
1. 論文発表
 

Nakanaga K., Maeda S., Myojin Y., Xu D. L. and Goto Y. Sequence analysis and expression of *Nramp-1* gene in *Bcgr* and *Bcgs* mice. *J.Vet.Med.Sci.* 61(6):717-720, 1999.

Izu K., Yoshida S., Miyamoto H., Chang B., Ogawa M., Yamamoto H., Goto Y. and Taniguchi H. Grouping of 20 reference strains of *Legionella* species by the growth ability within mouse and guinea pig macrophages. *FEMS Immunol.Microbiol.* 26: 61-68, 1999.

岩切章、瀬戸山定三、斎藤宏、年増美保、後藤義孝、新城敏晴 南九州における豚抗酸菌症の原因菌。日本獣医師会雑誌、52 : 663-666、1999
  2. 学会発表
 

許徳龍、後藤義孝、新城敏晴 *Nramp-1* 遺伝子が *M.avium* 感染により産生されるサイトカインに及ぼす影響。第72回日本細菌学会総会、平成11年3月、東京。

前淵恭子、岩切章、後藤義孝、新城敏晴 豚の *Mycobacterium avium* 感染症に対する *Nramp-1* 遺伝子の影響。第72回日本細菌学会総会、平成11年3月、東京。

岩切章、長友亜樹子、前淵恭子、許徳龍、後藤義孝、新城敏晴 豚抗酸菌症(野外例)における免疫応答。第127回日本獣医学会、平成11年4月、相模原市、神奈川。

岩切章、玉得良信、後藤義孝、新城敏晴 南九州地区における豚から分離される抗酸菌。平成11年度日本獣医公衆衛生学会、平成12年2月、静岡。

後藤義孝 抗酸菌に対する宿主の感受性  
『細胞内寄生細菌に対する生体応答』。第 73  
回日本ハンセン病学会総会、平成 12 年 3 月  
9～11 日、鹿屋市、鹿児島。

Goto Y. and Xu D.L. Cytokine profiles of  
resistant and susceptible mice infected  
with avian or mammalian type of  
mycobacteria. In "International Workshop  
on the potential application of  
recombinant cytokine and DNA vaccines  
for the control of infectious diseases of  
domestic animals." International  
veterinary cytokine and vaccine  
conference. March 16<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> , 2000,  
Tsukuba, Ibaraki

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

結核菌の殺菌機構に関する研究

分担研究者 赤川清子 国立感染症研究所

免疫工学室長

研究要旨

ヒト単球由来 GM-Mφは、患者由来 *M. avium* の増殖の場として作用すること、しかし M-Mφ は増殖抑制活性が強いことが知られた。BCG はその毒力が弱いことと一致して GM-Mφ でもあまり増殖を認めなかった。GM-Mφ は、ヒトの肺胞マクロファージに似た形質を示すことより、このマクロファージで、患者由来 *M. avium* の増殖が強いことは、非定型抗酸菌や結核菌がヒトの肺で良く増殖することと関連する可能性が示唆された。HIV の増殖は M-Mφ で強く GM-Mφ では抑制されることを既に報告したが、今回の結果より、抗酸菌と HIV のマクロファージでの増殖パターンは逆であることが知られた。

A. 研究目的

ヒト単球、及び単球由来マクロファージは、結核菌の増殖や殺菌に重要な役割を果たすと共に、結核菌抗原を T 細胞に提示し、結核免疫の成立に重要な役割を果たしている。ヒト単球、マクロファージにおける結核菌の増殖と殺菌を制御する機構を解明し、殺菌作用を増強する方法を見つけることは、結核の治療への応用に有用である。我々は、ヒト単球を M-CSF 及び GM-CSF などのコロニー刺激因子 (CSF) で培養することにより形態、細胞表面マーカーの発現 (CD14 の発現の有無等) 及び機能 (HIV 感染感受性、活性酸素産生能、抗原呈示機能等) の異なる 2 種類のマクロファージへの分化が誘導されることを報告した。また、昨年度ヒト単球への *M. avium* 感染は、M-CSF による単球のマクロファージへの分化はあまり抑制しないが、

GM-CSF によるマクロファージ分化は抑制し、単球の細胞死を誘導することも明らかにした。今年度は、マクロファージの結核菌に対する増殖及び殺菌機構の解明をめざす一端として、ヒト単球由来マクロファージの BCG 及び *M. avium* に対する感染感受性を検討した。

B. 研究方法

リコンビナントヒト (rh) GM-CSF は、Shaeing Plau 社より、rhM-CSF は、森永乳業よりそれぞれ供与された。ヒト単球の調整は、末梢血よりリンホブレップにて分離した単核球より、CD14 ビーズ抗体と MACS により CD14 陽性の単球画分を分離精製した。これら単球を GM-CSF (500U/ml) または M-CSF (104 U/ml) 存在下に 7 日間培養することによりマクロファージへの分化を

誘導した。M-CSF 及び GM-CSF で誘導したマクロファージは、それぞれ M-Mφ 及び GM-Mφ と以後称する。BCG は日本株を、*M. avium* は、NIHJ-1605 株及び患者由来の 3 株 (No. 3, No. 6, No.14) を用いた。これらの菌をマクロファージに moi1-10 で感染させ、5 日間培養後、マクロファージ内外の生菌数を測定した。一部の実験においては、感染 2 時間で細胞外の菌を洗浄除去後、さらに 5 日間培養し生菌数を OADC 添加 Middle brook 7H10 寒天平板培地に接種、CFU 数を数えた。ヒト単球由来マクロファージにおける Nramp 1 遺伝子の発現は、ノーザンブロット (Nramp 1 cDNA は山口大学岸博士より供与) で検討した。

### C. 結果

ヒト単球由来 GM-Mφ 及び M-Mφ に BCG を感染させ、5 日後の細胞外及び細胞内菌数を CFU にて測定した結果、M-Mφ、GM-Mφ とも、細胞外及び細胞内から回収される菌数は、感染時菌数に比べ著明に減少していた。しかし GM-Mφ の減少の程度は、M-Mφ に比べ小さかった。一方、感染 2 時間で細胞外にいる BCG 菌を洗浄除去した場合の 5 日後の菌数を調べたところ、M-Mφ では、この場合も著明に減少していたが、GM-Mφ では減少が認められなかった。M-Mφ における菌の増殖抑制及び GM-Mφ における菌の生存の傾向は、*M. avium* 感染においても認められ、特に患者分離株 (No. 6 と No. 14) では、GM-Mφ の細胞内外で増殖が強く認められ感染時菌数を大幅に上回る菌数が回収された。しかし、患者分離株 No.3 は、両マクロファージで菌の増殖パターンはほとんど変わらず、しかも BCG 同様細胞外での増殖はほとんど認められなかった。これらの結果は、M-Mφ は、GM-Mφ に比べ BCG や *M. avium* に対する増殖抑制活性が強いこと、GM-Mφ は、むしろこれらの菌の生存ある

いは増殖の場として作用することが知られた。

### D. 考察

GM-Mφ はヒトの肺マクロファージに似た形質であることを我々は既に述べたが、このマクロファージで、患者由来 *M. avium* の増殖が強いことは、非定型抗酸菌や結核菌がヒトの肺で良く増殖することと考えあわせ興味深い結果である。BCG は、GM-Mφ でもあまり増殖が認められなかったが、これは日本株 BCG はその毒力が弱いことと一致している。*M. avium* のマクロファージへの感染力の強さはストレインにより大きく異なり、患者分離株は、特に GM-Mφ での増殖が強いものがあるが、これら *in vitro* における Mφ への感染力の違いが、*M. avium* のヒト生体における毒力と相関するか否か興味ある点である。

AIDS 患者に結核菌や非定型抗酸菌が感染すると HIV の増殖が増強し病気が進行することが知られていることより、抗酸菌感染と AIDS の関係は注目を浴びている。先に我々は、HIV の増殖は M-Mφ で強く GM-Mφ では増殖抑制が起きることを報告したが、今回の結果より、抗酸菌と HIV のマクロファージでの増殖パターンが逆であることは、両者に対する殺菌、殺ウイルス機構が異なることを示しており興味深く、現在それぞれの機構について検討中である。

### E. 結論

ヒト単球由来 GM-Mφ は、患者由来 *M. avium* の増殖の場として作用すること、しかし M-Mφ は増殖抑制活性が強いことが知られた。BCG はその毒力が弱いことと一致して GM-Mφ でもあまり増殖が認められなかった。GM-Mφ は、ヒトの肺マクロファージに似た形質を示すことより、このマクロファージで、患者由来 *M. avium* の増殖が強いことは、非定型抗酸菌や結核菌がヒトの肺で良く

増殖することと関連する可能性が示唆された。  
HIV の増殖は M-Mφ で強く GM-Mφ では  
抑制されることを既に報告したが、今回の結  
果より、抗酸菌と HIV のマクロファージで  
の増殖パターンは逆であることが知られた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

Akagawa K.S.: Functional heterogeneity  
of human monocyte-derived  
macrophages. VIIIth International  
Symposium on the Molecular Cell Biology  
of Macrophages '99, Tokyo, 1999, June

赤川清子、山崎利雄：ヒト単球よりのマクロ  
ファージ形成への Mycobacterium avium  
感染の影響、第 74 回日本結核病学会、19  
99 年 4 月、宇都宮市

赤川清子、山崎利雄、芳賀伸治：ヒト単球由  
来マクロファージの BCG 及び  
Mycobacterium avium 感染感受性、第  
75 回日本結核病学会(発表予定、2000 年 4  
月)

□

有毒結核菌病原性発現の解析

分担研究者 持田恵子 国立感染症研究所

**研究要旨** ラット肺胞マクロファージ細胞株（NR8383）への有毒結核菌（H37Rv）およびワクチン株（BCG）の感染性とファゴソーム／リソソーム融合を制御する細胞内分子の動態を検討した。NR 細胞感染後、細胞内 H37Rv の生菌数は低下しなかったが、BCG の生菌数は経時的に減少した。早期エンドソームに発現する GTP 結合蛋白質 Rab5 は H37Rv 感染により早期に低下し、BCG によってはより遅れて低下する傾向を示した。マクロファージの抗菌活性を高めることが知られている interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 処理した NR8383 細胞の Rab5 発現量は濃度依存的に減少した。有毒結核菌による早期の Rab5 減少とマクロファージ内での菌の抵抗性との関連を明らかにする予定である。

A. 研究目的

結核発症の主たる臓器である肺の中でも肺胞マクロファージ (M $\phi$ ) は結核菌感染の最初の標的細胞として、末梢の M $\phi$  とは性状が異なる可能性が示唆されている。しかしながら、これまでの多くの研究は末梢 M $\phi$  あるいは骨髓細胞由来 M $\phi$  を用いて *in vitro* 実験がなされており、なぜ、肺胞 M $\phi$  で結核菌が増殖あるいは持続的潜伏感染が容易であるかの解答は得られなかった。本研究では、正常肺胞 M $\phi$  を用いて本来ヒトが示す結核菌感受性 (BCG には抵抗性であり H37Rv には感受性) の原因を探るべく菌を取り込んだファゴソームがリソソームと融合する過程で発現する M $\phi$  細胞内分子の動態を調べた。

B. 研究方法

ラット肺胞 M $\phi$  細胞株 (NR8383) を ATCC より購入した。この細胞は正常ラット肺胞 M $\phi$  を肺組織由来増殖因子で長期間培養することにより増殖因子非依存性増殖能を獲得した細

胞であり、血清濃度にものみ依存して試験管内で増殖する。この細胞に BCG あるいは H37Rv を感染させ (MOI=1~5) 経時的に細胞を回収し、抗酸染色および還元培養により菌の感染と増殖を、アガロースゲル電気泳動およびウエスタンブロッティングにより宿主細胞のアポトーシス (DNA 断片化) と細胞内分子の発現を調べた。

C. 研究結果

感染させる菌量と感染率の検討をした。最初に加える菌の細胞に対する比率を 2~4 とした時、2~4 時間の感染で約 30% の細胞が菌を取り込むことがわかった。同程度の感染率を達成するためには H37Rv に比べ BCG はより多い菌数を必要とした。感染率が 60% を超える条件下で感染を持続させると、感染後 8 時間以降に DNA の断片化を特徴とする細胞死が誘導され、細胞内分子の変化を調べることはできなかった。以後の実験では、感染 2 時間で約 30% 感染する条件を設定した。

SDS で可溶化した感染細胞溶解液を還元

培養し、宿主細胞内での菌の増殖・生存を調べた。BCG は感染後 8 時間をピークにその後菌の生存数は減少した。一方、H37Rv は最初に取り込んだ菌数を感染後 5 日目まで維持した。このことより、今回用いた NR8383 細胞はヒトが本来示す結核菌感受性と同じであることが示された。

早期エンドソームマーカの一かつである低分子量 GTP 結合蛋白質 Rab5 の発現が結核菌感染で変化するか否かを検討した。BCG 感染に比べ、H37Rv 感染では Rab5 の減少が早期に起こった。Mφの抗菌活性を増強する IFN- $\gamma$  を NR8383 細胞に作用させ、Rab5 の変化を調べた。IFN- $\gamma$  は濃度依存性に Rab5 の発現を抑制した。後期エンドソームマーカである Lamp-1 も同様に IFN- $\gamma$  により抑制された。IFN- $\gamma$  の Mφ細胞内での菌の増殖に対する効果については今後検討する予定である。

#### D. 考察

NR8383 細胞において BCG は増殖できず H37Rv は増殖するという、ヒトが本来示す結核菌感受性が NR8383 を用いて再現できた。従来最もよく用いられてきたマウス Mφ腫瘍細胞 J774.1 では BCG も増殖でき、有毒菌と非有毒菌との違いは明らかにされないと考えられる。H37Rv と同じ感染率を達成するために BCG はより多量の菌を必要としたことは、

有毒菌と BCG とでは Mφ侵入効率が異なる可能性を示しており、毒性因子の一つと考えられる。多量の菌の感染は早期に宿主細胞死を誘導するが、少量の菌の感染によっても長期間の培養後には同様に宿主細胞死が誘導された。これらの、急性および慢性アポトーシス誘導がどのような機序によるものかは今後の課題であるが、抗酸染色および細胞形態の観察より必ずしも感染細胞が死に至るわけではないことがわかった。結核菌感染と宿主細胞死の誘導が菌の直接および間接的作用により制御されている可能性が示唆される。

Rab5 とファゴ/リソソーム融合との関連についてはリステリア菌および BCG を用いた研究成果が報告されているが、有毒結核菌による解析は未だなされていない。今回の解析から、結核菌感染はファゴソームマーカを減少させることが明らかにされた。Mφ活性化因子である IFN- $\gamma$  によっても Rab5 が低下することが宿主の感染抵抗性とどのように関連するかは今後の検討課題である。

#### E. 結論

ラット肺胞 Mφ NR8383 は、ヒトの肺結核研究の *in vitro* 実験系として適していることが明らかにされた。有毒結核菌が宿主細胞内で生存できることと宿主細胞ファゴソーム膜蛋白質 Rab5 の消失との関連性が示唆された。

厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

分担研究報告書

## 結核とHIVの重感染におけるウイルス動態

単球系細胞株 THP-1 を用いた *in vitro* の検討

研究者名 中田 光

所属 東京大学医科学研究所微生物株保存施設

### 研究要旨

結核菌感染後に単球は 37 kD の stimulatory C/EBP $\beta$  を誘導するが、マクロファージは dominant negative 16kD C/EBP $\beta$  を誘導し、HIV の転写を抑制してしまう。ex vivo の解析では、炎症部の肺胞マクロファージは何らかの機序により C/EBP $\beta$  の発現全体が低下しており、NF- $\kappa$ B による LTR の転写促進の機序が優先されるために HIV の産生が亢進しているものと思われる。これに対し、非炎症部の肺胞マクロファージでは constitutive に C/EBP $\beta$  16 kD が発現していて、HIV の転写が亢進しないように蓋がされている状態である。今回、我々は C/EBP $\beta$  16 kD の発現をインターフェロン $\beta$  が誘導することに注目し、インターフェロンのシグナル伝達蛋白を単球とマクロファージを用いて調べた。結核菌感染により、STAT1 あるいは STAT2 と IRF-9 の heterodimer である ISGF-3 がマクロファージ内で形成され、核へ移行し、ISRFB 部位に結合し、それが引き金となって C/EBP $\beta$  16kD の転写が促進されるのではないかと考えられた。一方、単球においては、結核菌感染後も ISGF-3 が形成されない。これは、細胞内の IRF-9 のレベルが低いためであると考えられた。単球は、結核菌刺激により、NF- $\kappa$ B を強く発現することから、病巣部に遊走してくる単球に HIV が感染していると C/EBP $\beta$  16kD による抑制がかかっていないために HIV の産生が亢進してしまう可能性も考えられる。



## A. 研究目的

HIV感染者が肺結核を合併すると気管支肺胞洗浄液中にもまた細胞中にも著しくHIVウイルスが増加する。ところが、*in vitro* のHIVと結核のマクロファージへの重感染系では、正反対に感染させる結核菌量に依存的にHIV産生が抑制される。この理由は結核菌感染によりHIVのプロモーターであるLTRに存在するnegative regulatory element (NRE) にC/EBP $\beta$  (NF-IL6) の16kD short form (C/EBP $\beta$ は本来37kD) が結合することにより、HIVプロウイルスの転写が抑制されるためであることを提唱してきた。結核病巣部より得られる肺胞マクロファージにはC/EBP $\beta$  short formが発現しておらず、非病巣部のマクロファージに強く発現している。また、C/EBP $\beta$  16kD short formの発現は結核感染後早期に産生されるインターフェロン $\beta$ によっても誘導されることから、autoclineの機序でC/EBP $\beta$ が誘導されているのではないかと考えられた。

単球系細胞株THP-1 (以下THP-1単球と呼ぶ) は、サイトカインや転写因子の発現などの点において抹消血単球とよく似た性質を持つが、Phorbol myristate acetate (PMA) を添加して培養すると、付着性の肺胞マクロファージによく似たマクロファージ (以下THP-1マクロファージと呼ぶ) へ分化する。我々は、この系を用いて、結核菌感染がどのようにマクロファージの抑制性の転写因子を誘導するのかを検討したので報告する。

## B. 研究方法

THP-1、肺胞マクロファージ、単球由来マクロファージ: ATCCより供与されたTHP-1単球はRPMI1640培地/10%FCS中にsusupendし、継代した。THP-1マクロファージはこれに20ng/mlのPMAを添加し、1昼夜培養することにより、付着性のマクロファージへと分化させた。ヒト肺胞マクロファージは気管支肺胞洗浄法により得た洗浄液からプラスチックシャーレ付着法により精製した。健康者ヒト単球はヘパリン血50mlよりFicoll Hypaque 比重遠心法により単核球を分離し、プラスチックプレート付着法により分離後、 $1 \times 10^5$ /mlの密度で24穴プレートまたは96穴プレートに撒いた。

結核の*in vitro* 感染実験: 単球はM-CSF 1000 U/ml の存在下でRPMI/10%FCS中で7日間培養し、培地を交換し、さらに7日間培養した後、H37RvをMOI 0.1-1.0で感染させた。

細胞と核の抽出: 細胞の抽出はPBS/1% NP40/0.5% deoxycholate/30 ul/ml aprotinin/1mM Na orthovanadate に30分暴露し、21ゲージの注射針を通すことにより行った。核はNP40により分離し、高塩濃度で核内物質を抽出した。

Immunoblotting: 100 mgの蛋白を10-20%のグラデIENTアクリルアミドゲルで電気泳動した後、蛋白はナイロン膜に転写し、ウサギポリクローナル抗C/EBP $\beta$ 抗体 (Santa Cruz Biotechnology社) または、抗NF-kB p65抗体と二次抗体としてHRP抗ウサギ抗体を用いてイムノブロットした。

Electromobility gel shift assay (EMSA): DNAプローブはKlenow DNA polymeraseを用いて [ $\alpha$ P32dCTP]で以下のISRE、GAS、NF-KBに対応するoligonucleotideをラベルした。

ISRE: 5'CTCGGAAAGGGAAACCGAAACTGAAGCC3',

GAS: 5'TACAACAGCCTGATTTCCCGAAATGACGGCC3'

NF-KB: 5'TGGGCTGGGGAATCCCGCTAA3'

nonspecificなcompetitorとして以下のプローブも合成した。5'CTCTCTGCAAGGGTCATCAGTAC3', 105 cpmのラベルされたDNAを10  $\mu$ gの蛋白抽出液、poly dl/dc 2.5  $\mu$ g gel mobility shift bufferに加え、1  $\mu$ gの抗体を反応させた。DNA/蛋白複合体は6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、オートラジオグラフィにて解析した。一部はdensitometerでバンドの強度を測定した。

倫理面での配慮

末梢血、肺胞マクロファージは書面で患者に研究目的を伝え、インフォームドコンセントを取り、採取した。

## C. 研究結果

すでに、我々はマクロファージにおけるHIVの産生抑制がそのプロモーターであるLTRのnegative regulatory element(NRE)と細胞側の転

写因子C/EBP $\beta$  short formとの結合により起こることを示唆してきたが、結核菌感染とマクロファージの分化の双方がC/EBP $\beta$  short formの発現に影響することを見出した。THP-1単球が結核菌感染もPMA刺激も受けない場合は、図1aのlane1と6に示すように37kDと16kDのC/EBP $\beta$ の発現がほとんどみられない。THP-1単球は、結核菌感染後に37kDのC/EBP $\beta$ を強く発現するが、C/EBP $\beta$ 16kD short formの発現は非常に弱い(図1a, lane 2-4)。これに対し、THP-1マクロファージは結核菌感染48時間後に37kDと16kDのC/EBP $\beta$ の両方を発現する(図1a, lane5)。しかしながら、THP-1マクロファージは結核菌感染がなければ、C/EBP $\beta$  short formを発現しない。それゆえ、抑制性の転写因子C/EBP $\beta$  short formの発現は結核菌感染により惹起されていると考えられる。

A.

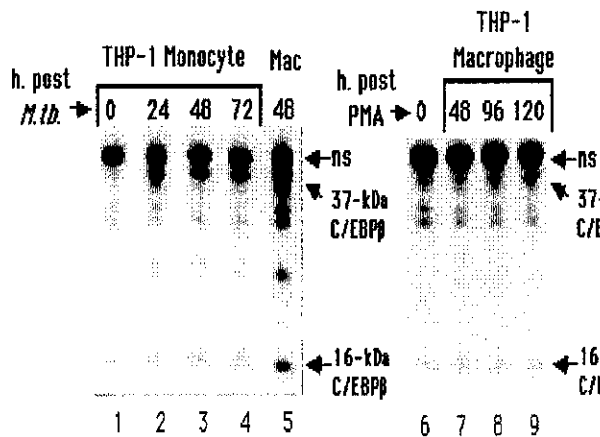


図1：抗C/EBP $\beta$ 抗体を用いた細胞核抽出物のイムノブロット。

一方、末梢血由来単球と単球由来マクロファージを用いて同様の検討を行った。THP-1単球と同様に末梢血単球はほとんどC/EBP $\beta$ 16kD short formを発現していないが、単球由来マクロファージは弱く発現しており、結核菌を感染させるとさらに発現が増強した。

我々は、すでにインターフェロン $\beta$ によっても

C/EBP $\beta$  short formが誘導されること、結核菌感染によりインターフェロン $\beta$ が放出されることを報告したが、THP-1単球はインターフェロン $\beta$ の刺激によってC/EBP $\beta$  short formが誘導されず(図2C, lane 1-3)、THP-1マクロファージにおいて刺激後強く誘導されてくる(図2C, lane 4)。結核菌感染の場合と異なるのは、結核菌の場合、イムノブロット上、誘導されるのに48時間かかるが、インターフェロンでは3時間後に現れ、48時間後にピークとなることである。

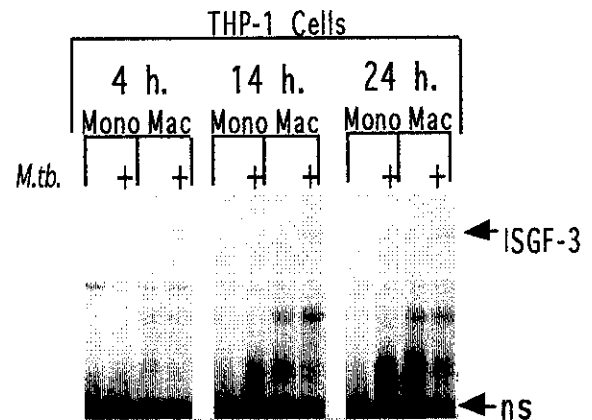


図2A

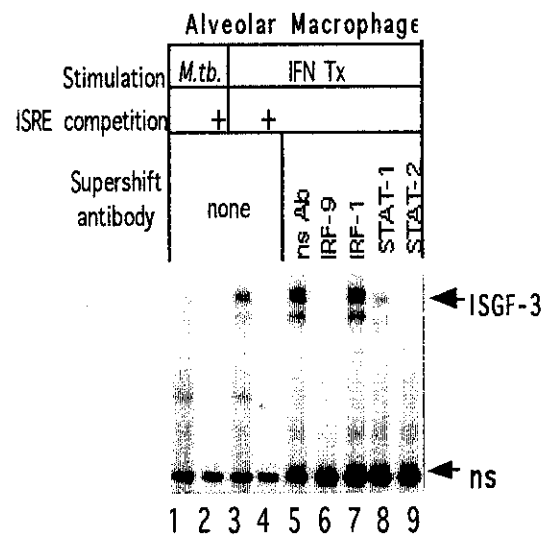


図2B

以上の結果から、単球からマクロファージへの分化がインターフェロン $\beta$ への反応性を変化させるのではないかと考え、細胞内のシグナル伝達を調

べた。インターフェロン $\beta$ の受容体からの刺激によりSTAT1とSTAT2の活性化による転写因子の複合体が形成される。すなわち、STAT1またはSTAT2とIRF-9のheterodimer複合体であるISGF-3が形成され、核内に移動し、ISRE部位に結合することが知られているが、結核菌感染は、この反応を促進する。結核菌感染4時間後に、ISGF-3はTHP-1マクロファージの核内に現れるが、THP-1単球の核内には見られなかった(図2A, lane 4, lane 2)。この現象は14-24時間まで増強し続けた。また、THP-1マクロファージでは、インターフェロンによる刺激後にもISGF-3の核内移動を認めたが、THP-1単球では見られなかった。一般的に単球は、感染刺激によりインターフェロンを産生することが、知られているが、マクロファージとの違いは結核菌感染後にISGF-3を形成できないことかもしれない。このことを確認するために、THP-1マクロファージをインターフェロンで刺激するか、または結核菌感染させるとISGF-3を活性化した(図2B, lane 5, 6)。

THP-1が単球とマクロファージのモデルとして適当かどうかを調べるために、単球と肺泡マクロファージからの核抽出物に対し、EMSAを行った。結核菌感染後に単球はISGF-3が誘導されず(図2B, lane8)、肺泡マクロファージでは感染前に比べて4倍のISGF-3が誘導された(図2B, lane11)。肺泡マクロファージはrestingの状態でも低レベルのISGF-3を発現していた(図2B, lane9)。肺泡マクロファージの核内抽出物のEMSAは過剰量のISRE oligonucleotideによりbandが消失し、抗STAT1, STAT2, IRF-9の抗体によりsupershiftした(図2C, lane 1, 2)。

インターフェロンの刺激により、ISGF-3の形成→ISRE sequenceへの結合というシグナル経路以外にSTAT1 homodimerの形成→GAS sequenceへの結合という経路があるが、STAT1 homodimerの形成はTHP-1単球、THP-1マクロファージともに結核菌感染により誘導されなかった。これらの結果からマクロファージにおける結核菌の感染に際してインターフェロンのシグナル伝達経路は、主としてISGF-3→ISRE sequenceへの結合であると考えられた。

単球において結核菌感染後にISGF-3後にISGF-3の形成がないのは、複合体を形成するIRF-9のレベルが低いためかもしれない。なぜなら、単球においても結核菌感染やインターフェロン刺激によりSTAT1およびSTAT2は誘導されてくるからである。そこで、結核菌感染後THP-1単球からの抽出物にrecombinant IRF-9を添加し、EMSAを行うと、THP-1単球ではコントロールよりも多くのISGF-3の形成がみられた(図3, lane 2)。末梢血単球からの抽出物もISGF-3の形成がみられないが、IRF-9を添加すると形成された(図3, lane 3)。これに対し、肺泡マクロファージからの抽出物は無刺激でもISGF-3を形成していた。

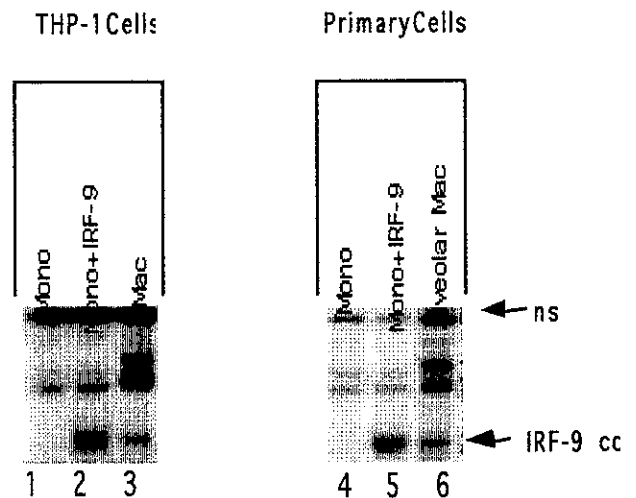


図3

以上のようにIRF-9の発現がISGF-3の形成に不可欠であると考えられたので、単球とマクロファージのIRF-9の蛋白量をimmunoblotを用いてインターフェロン刺激前後で調べた。THP-1単球と末梢血単球のIRF-9はほとんど検出できないが(図4, lane1, 4)、THP-1マクロファージと肺泡マクロファージでは検出された(図4, lane 2, 6)。また、末梢血単球に結核菌を感染させても検出できないが(図4, lane 5)、肺泡マクロファージに結核菌を感染させたものではさらに増加した(図4, lane 7)。

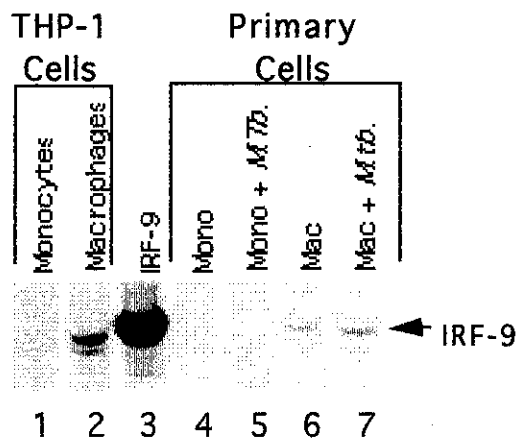


図 4

#### D. 考察

結核菌感染後に単球は 37 kD の stimulatory C/EBP $\beta$  を誘導するが、マクロファージは dominant negative 16kD C/EBP $\beta$  を誘導し、HIV の転写を抑制してしまう。ex vivo の解析では、炎症部の肺胞マクロファージは何らかの機序により C/EBP $\beta$  の発現全体が低下しており、NF- $\kappa$ B による LTR の転写促進の機序が優先されるために HIV の産生が亢進しているものと思われる。これに対し、非炎症部の肺胞マクロファージでは constitutive に C/EBP $\beta$  16 kD が発現している状態である。今回、我々は C/EBP $\beta$  16 kD の発現をインターフェロン $\beta$  が誘導することに注目し、インターフェロンのシグナル伝達蛋白を単球とマクロファージを用いて調べた。結核菌感染により、STAT1 あるいは STAT2 と IRF-9 の heterodimer である ISGF-3 がマクロファージ内で形成され、核へ移行し、ISRF 部位に結合し、それが引き金となって C/EBP $\beta$  16kD の転写が促進されるのではないかと考えられた。一方、単球においては、結核菌感染後も ISGF-3 が形成されない。これは、細胞内の IRF-9 のレベルが低いためであると考えられた。単球は、結核菌刺激により、NF- $\kappa$ B を強く発現することから、病巣部に遊走してくる単球に HIV が感染していると C/EBP $\beta$  16kD による抑制がかかっていないために HIV の産生が亢進してしまう可能性も考えられる。

#### E. 結論

結核菌がマクロファージに感染すると抑制性の転写因子 C/EBP $\beta$  が誘導され HIV の転写が抑制されるが、この反応はインターフェロンのシグナル伝達経路を介し、ISGF-3 の形成と核への移行によると考えられる。単球ではこの反応が起こらず、従って HIV 産生が亢進してしまう可能性が高い。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Low copy number and limited variability of proviral DNA in alveolar macrophages from HIV-1 infected patients: *Molecular Medicine*, 1(7), 744-757, 1995, Koh Nakata, Michael Weiden, Timothy Harkin, David Ho, and William N. Rom.

2) Mycobacterium tuberculosis enhances human immunodeficiency virus-1 replication in the lung; *Am J Respir Crit Care Med* 155:996-1003, 1997, Koh Nakata, William N. Rom, Yoshihiro Honda, Rany Condos, Shiro Kanegasaki, Yunchen Cao, and Michael Weiden.

3) Type 1 interferon induces inhibitory 16-kD CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP) $\beta$ , Repressing the HIV-1 long terminal repeat in macrophages: *Pulmonary tuberculosis alters C/EBP expression, enhancing HIV-1 replication*. Yoshihiro Honda, Linda Rogers, Koh Nakata, Ben-Yang Zhao, Richard Pine, William N. Rom, and Michael Weiden. *J. Exp. Med.*, vol.188, 1255-1265, 1998,

##### 2. 学会発表

\*Striking synergy in HIV replication with tuberculosis co-infection, poster discussion, International conference of American Thoracic Society, Seattle  
*Am. Rev. Resp. Dis.* 152, A796, 1995

**Koh Nakata**, Michael Weiden, Timoty Harkin, David Ho, and William N. Rom

\*Low copy number and limited variability of proviral DNA in alveolar macrophages from HIV-1 infected patients: poster presentation, Keystone Meeting, Colorado, 1995

**Koh Nakata**, Michael Weiden, Timoty Harkin, David Ho, and William N. Rom

\**M. tuberculosis* co-infection augments the production of T lymphocyte tropic HIV-1 but suppresses production of macrophage tropic HIV-1 in peripheral blood mononuclear cells. International conference of American Thoracic Society, San Francisco, *Am. Rev. Resp. Dis.* 155, :A22, 1997

Koh Nakata, Michael Weiden, Yoshihiro Honda, and William N. Rom

\*Tuberculosis and promoter regulation of HIV-1 long terminal repeat by NF-IL6 in vitro and in vivo poster presentation International conference of American Thoracic Society, San Francisco, *A. Rev. Resp. Dis.* 155, :A337, 1997

Yoshihiro Honda, Koh Nakata, Michael Weiden, and William N. Rom

\**Mycobacterium tuberculosis* enhances human immunodeficiency virus-1 replication in the lung

Thirty -second U.S.-Japan cooperative medical science program :Tuberculosis-leprosy research conference, Cleveland, Ohio, July 21-23, 1997

Koh Nakata, William N. Rom, Yoshihiro Honda, Rany Condos, Shiro Kanegasaki, and Michael Weiden

\*Transcriptional Regulation of HIV-1 in Macrophages coinfectd with *M. tuberculosis*  
Thirty -third U.S.-Japan cooperative medical science program :Tuberculosis-leprosy research conference, Osaka, July 8-10, 1998

Koh Nakata, Yoshihiro Honda, William N. Rom, and Michael Weiden

\*Transcriptional Regulation of HIV-1 in Macrophages coinfectd with *M. tuberculosis*

Thirty -forth U.S.-Japan cooperative medical science program :Tuberculosis-leprosy research conference, San Fransisco, June 27-30, 1999

**Koh Nakata**, Yoshihiro Honda, William N. Rom, and Michael Weiden

Molecular mechanisms in mycobacteria-HIV interaction in macrophages

5th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Chennai, India, January 7-9, 2000

**Koh Nakata**

## A. 研究目的

HIV感染者が肺結核を合併すると気管支肺胞洗浄液中にもまた細胞中にも著しくHIVウイルスが増加する。ところが、*in vitro* のHIVと結核のマクロファージへの重感染系では、正反対に感染させる結核菌量に依存的にHIV産生が抑制される。この理由は結核菌感染によりHIVのプロモーターであるLTRに存在するnegative regulatory element (NRE) にC/EBP $\beta$ (NF-IL6) の16kD short form (C/EBP $\beta$ は本来37kD) が結合することにより、HIVプロウイルスの転写が抑制されるためであることを提唱してきた。結核病巣部より得られる肺胞マクロファージには C/EBP $\beta$  short form が発現しておらず、非病巣部のマクロファージに強く発現している。また、C/EBP $\beta$  16kD short formの発現は結核感染後早期に産生されるインターフェロン $\beta$ によっても誘導されることから、autoclineの機序でC/EBP $\beta$ が誘導されているのではないかと考えられた。

単球系細胞株THP-1 (以下THP-1単球と呼ぶ) は、サイトカインや転写因子の発現などの点において抹消血単球とよく似た性質を持つが、Phorbol myristate acetate (PMA) を添加して培養すると、付着性の肺胞マクロファージによく似たマクロファージ (以下THP-1マクロファージと呼ぶ) へ分化する。我々は、この系を用いて、結核菌感染がどのようにマクロファージの抑制性の転写因子を誘導するのかを検討したので報告する。

## B. 研究方法

THP-1、肺胞マクロファージ、単球由来マクロファージ: ATCCより供与されたTHP-1単球はRPMI1640培地/10%FCS中にsuspendedし、継代した。THP-1マクロファージはこれに20ng/mlのPMAを添加し、1昼夜培養することにより、付着性のマクロファージへと分化させた。ヒト肺胞マクロファージは気管支肺胞洗浄法により得た洗浄液からプラスチックシャーレ付着法により精製した。健常者ヒト単球はヘパリン血50mlよりFicoll Hypaque 比重遠心法により単核球を分離し、プラスチックプレート付着法により分離後、 $1 \times 10^5$ /mlの密度で24穴プレートまたは96穴プレートに撒いた。

結核の*in vitro* 感染実験: 単球はM-CSF 1000 U/ml の存在下でRPMI/10%FCS中で7日間培養し、培地を交換し、さらに7日間培養した後、H37RvをMOI 0.1-1.0で感染させた。

細胞と核の抽出: 細胞の抽出はPBS/1%NP40/0.5% deoxycholate/30 ul/ml aprotinin/1mM Na orthovanidate に30分暴露し、21ゲージの注射針を通すことにより行った。核はNP40 により分離し、高塩濃度で核内物質を抽出した。

Immunoblotting: 100 mg の蛋白を10-20%のグラディエントアクリルアミドゲルで電気泳動した後、蛋白はナイロン膜に転写し、ウサギポリクローナル抗C/EBP $\beta$  抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社) または、抗NF-kB p65 抗体と二次抗体としてHRP抗ウサギ抗体を用いてイムノブロットした。

Electromobility gel shift assay (EMSA): DNAプローブはKlenow DNA polymerase を用いて[ $\alpha$  P32dCTP]で以下のISRE、GAS、NF-KBに対応するoligonucleotide をラベルした。

ISRE: 5'CTCGGAAAGGGAAACCGAAACTGAAGCC3',

GAS: 5'TACAACAGCCTGATTTCCCGAAATGACGGC3'

NF-kB: 5'TGGGCTGGGGAATCCCGCTAA3'

nonspecific なcompetitor として以下のプローブも合成した。5'CTCTCTGCAAGGGTCATCAGTAC3', 105 cpm のラベルされたDNAを10  $\mu$ g の蛋白抽出液、poly dl/dC 2.5  $\mu$ g gel mobility shift buffer に加え、1  $\mu$ g の抗体を反応させた。DNA/蛋白複合体は6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、オートラジオグラフィーにて解析した。一部はdensitometer でバンドの強度を測定

した。

#### 倫理面での配慮

末梢血、肺胞マクロファージは書面で患者に研究目的を伝え、インフォームドコンセントを取り、採取した。

#### C. 研究結果

すでに、我々はマクロファージにおけるHIVの産生抑制がそのプロモーターであるLTRのnegative regulatory element(NRE)と細胞側の転写因子C/EBPβ short formとの結合により起こることを示唆してきたが、結核菌感染とマクロファージの分化の双方がC/EBPβ short formの発現に影響することを見出した。THP-1単球が結核菌感染もPMA刺激も受けない場合は、図1aのlane1と6に示すように37kDと16kDのC/EBPβの発現がほとんどみられない。THP-1単球は、結核菌感染後に37kDのC/EBPβを強く発現するが、C/EBPβ16kD short formの発現は非常に弱い(図1a, lane 2-4)。これに対し、THP-1マクロファージは結核菌感染48時間後に37kDと16kDのC/EBPβの両方を発現する(図1a, lane5)。しかしながら、THP-1マクロファージは結核菌感染がなければ、C/EBPβ short formを発現しない。それゆえ、抑制性の転写因子C/EBPβ short formの発現は結核菌感染により惹起されていると考えられる。

## A.

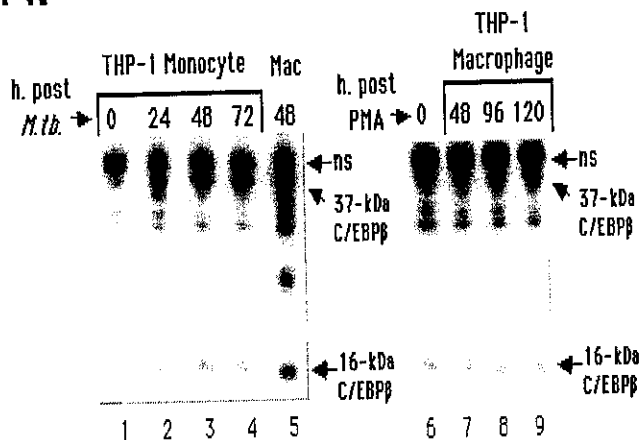


図1：抗C/EBPβ抗体を用いた細胞核抽出物のイムノブロット。

一方、末梢血由来単球と単球由来マクロファージを用いて同様の検討を行った。THP-1単球と同様に末梢血単球はほとんどC/EBPβ16kD short formを発現していないが、単球由来マクロファージは弱く発現しており、結核菌を感染させるとさらに発現が増強した。

我々は、すでにインターフェロンβによってもC/EBPβ short formが誘導されること、結核菌感染によりインターフェロンβが放出されることを報告したが、THP-1単球はインターフェロンβの刺激によってC/EBPβ short formが誘導されず(図2C, lane 1-3)、THP-1マクロファージにおいて刺激後強く誘導されてくる(図2C, lane 4)。結核菌感染の場合と異なるのは、結核菌の場合は、イムノブロット上、誘導されるのに48時間かかるが、インターフェロンでは3時間後に現れ、48時間後にピークとなることである。

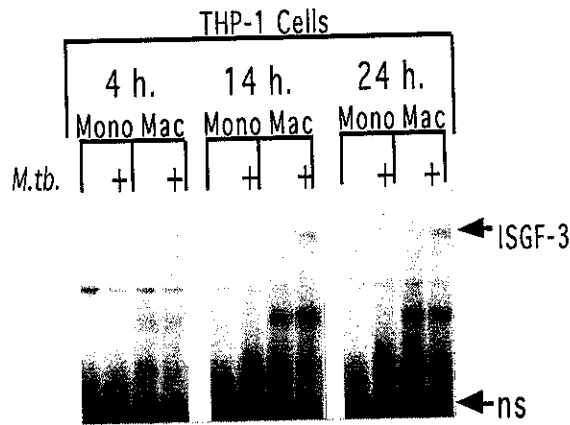


図 2 A

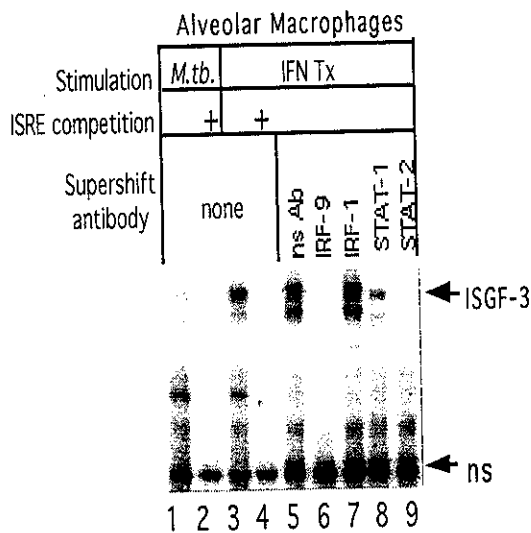


図2B

以上の結果から、単球からマクロファージへの分化がインターフェロン $\beta$ への反応性を変化させるのではないかと考え、細胞内のシグナル伝達を調べた。インターフェロン $\beta$ の受容体からの刺激によりSTAT1とSTAT2の活性化による転写因子の複合体が形成される。すなわち、STAT1またはSTAT2とIRF-9のheterodimer複合体であるISGF-3が形成され、核内に移動し、ISRE部位に結合することが知られているが、結核菌感染は、この反応を促進する。結核菌感染4時間後に、ISGF-3はTHP-1マクロファージの核内に現れるが、THP-1単球の核内には見られなかった(図2A, lane 4, lane 2)。この現象は14-24時間まで増強し続けた。また、THP-1マクロファージでは、インターフェロンによる刺激後もISGF-3の核内移動を認めたが、THP-1単球では見られなかった。一般的に単球は、感染刺激によりインターフェロンを産生することが知られているが、マクロファージとの違いは結核菌感染後にISGF-3を形成できないことかもしれない。このことを確認するために、THP-1マクロファージをインターフェロンで刺激するか、または結核菌感染させるとISGF-3を活性化した(図2B, lane 5、6)。



THP-1が単球とマクロファージのモデルとして適当かどうかを調べるために、単球と肺胞マクロファージからの核抽出物に対し、EMSAを行った。結核菌感染後に単球はISGF-3が誘導されず(図2B, lane8), 肺胞マクロファージでは感染前に比べて4倍のISGF-3が誘導された(図2B, lane11)。肺胞マクロファージはrestingの状態でも低レベルのISGF-3を発現していた(図2B, lane9)。肺胞マクロファージの核内抽出物のEMSAは過剰量のISRE oligonucleotideによりbandが消失し、抗STAT1, STAT2, IRF-9の抗体によりsupershiftした(図2C, lane 1, 2)。

インターフェロンの刺激により、ISGF-3の形成→ISRE sequenceへの結合というシグナル経路以外にSTAT1 homodimerの形成→GAS sequenceへの結合という経路があるが、STAT1 homodimerの形成はTHP-1単球、THP-1マクロファージともに結核菌感染により誘導されなかった。これらの結果からマクロファージにおける結核菌の感染に際してインターフェロンのシグナル伝達経路は、主としてISGF-3→ISRE sequenceへの結合であると考えられた。

単球において結核菌感染後にISGF-3後にISGF-3の形成がないのは、複合体を形成するIRF-9のレベルが低いためかもしれない。なぜなら、単球においても結核菌感染やインターフェロン刺激によりSTAT1およびSTAT2は誘導されてくるからである。そこで、結核菌感染後THP-1単球からの抽出物にrecombinant IRF-9を添加し、EMSAを行うと、THP-1単球ではコントロールよりも多くのISGF-3の形成がみられた(図3, lane 2)。末梢血単球からの抽出物もISGF-3の形成がみられないが、IRF-9を添加すると形成された(図3, lane 3)。これに対し、肺胞マクロファージからの抽出物は無刺激でもISGF-3を形成していた。

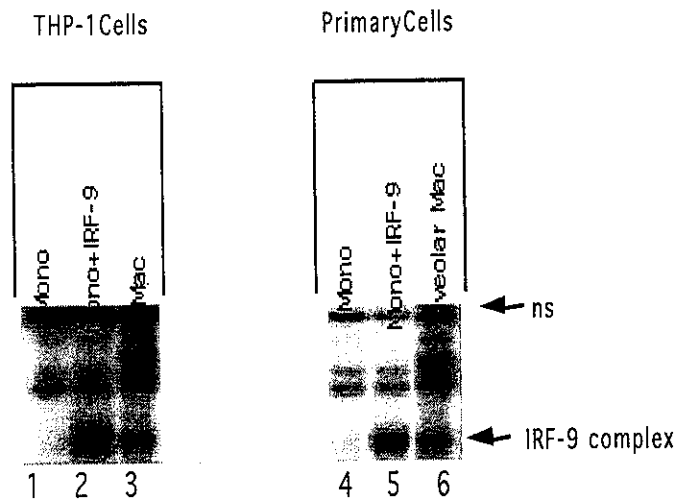


図3

以上のようにIRF-9の発現がISGF-3の形成に不可欠であると考えられたので、単球とマクロファージのIRF-9の蛋白量をimmunoblotを用いてインターフェロン刺激前後で調べた。THP-1単球と末梢血単球のIRF-9はほとんど検出できないが(図4, lane1, 4)、THP-1マクロファージと肺胞マクロファージでは検出された(図4, lane 2, 6)。また、末梢血単球に結核菌を感染させても検出できないが(図4, lane 5)、肺胞マクロファージに結核菌を感染させたものではさらに増加した(図4, lane 7)。

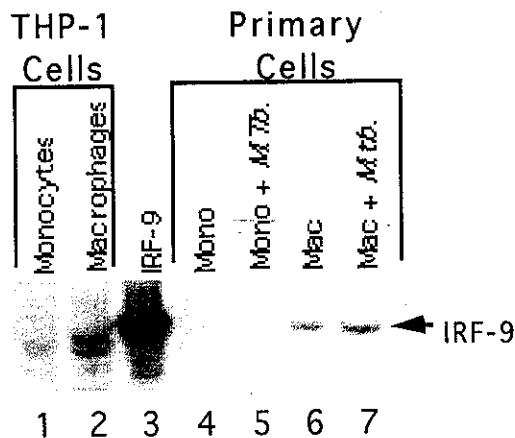


図4

#### D. 考察

結核菌感染後に単球は37 kDのstimulatory C/EBP $\beta$ を誘導するが、マクロファージはdominant negative 16kD C/EBP $\beta$ を誘導し、HIVの転写を抑制してしまう。ex vivoの解析では、炎症部の肺胞マクロファージは何らかの機序によりC/EBP $\beta$ の発現全体が低下しており、NF- $\kappa$ BによるLTRの転写促進の機序が優先されるためにHIVの産生が亢進しているものと思われる。これに対し、非炎症部の肺胞マクロファージではconstitutiveにC/EBP $\beta$  16 kDが発現している、HIVの転写が亢進しないように蓋がされている状態である。今回、我々はC/EBP $\beta$  16 kDの発現をインターフェロン $\beta$ が誘導することに注目し、インターフェロンのシグナル伝達蛋白を単球とマクロファージを用いて調べた。結核菌感染により、STAT1あるいはSTAT2とIRF-9のheterodimerであるISGF-3がマクロファージ内で形成され、核へ移行し、ISRF部位に結合し、それが引き金となってC/EBP $\beta$  16kDの転写が促進されるのではないかと考えられた。一方、単球においては、結核菌感染後もISGF-3が形成されない。これは、細胞内のIRF-9のレベルが低いためであると考えられた。単球は、結核菌刺激により、NF- $\kappa$ Bを強く発現することから、病巣部に遊走してくる単球にHIVが感染しているとC/EBP $\beta$  16kDによる抑制がかかっていないためにHIVの産生が亢進してしまう可能性も考えられる。

#### E. 結論

結核菌がマクロファージに感染すると抑制性の転写因子C/EBP $\beta$ が誘導されHIVの転写が抑制されるが、この反応はインターフェロンのシグナル伝達経路を介し、ISGF-3の形成と核への移行によると考えられる。単球ではこの反応が起こらず、従ってHIV産生が亢進してしまう可能性が高い。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Low copy number and limited variability of proviral DNA in alveolar macrophages from HIV-1 infected patients: *Molecular Medicine*, 1(7),744-757, 1995, Koh Nakata, Michael Weiden, Timothy Harkin, David Ho, and William N. Rom.

2) *Mycobacterium tuberculosis* enhances human immunodeficiency virus-1 replication in the lung; *Am J Respir Crit Care Med* 155:996-1003, 1997, Koh Nakata, William N. Rom, Yoshihiro

Honda, Rany Condos, Shiro Kanegasaki, Yunchen Cao, and Michael Weiden.

3) Type 1 interferon induces inhibitory 16-kD CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP) $\beta$ , Repressing the HIV-1 long terminal repeat in macrophages: Pulmonary tuberculosis alters C/EBP expression, enhancing HIV-1 replication. Yoshihiro Honda, Linda Rogers, Koh Nakata, Ben-Yang Zhao, Richard Pine, William N. Rom, and Michael Weiden. *J. Exp. Med.*, vol.188, 1255-1265, 1998,

## 2. 学会発表

\*Striking synergy in HIV replication with tuberculosis co-infection, poster discussion, International conference of American Thoracic Society, Seattle  
*Am. Rev. Resp. Dis.* 152, :A796, 1995

Koh Nakata, Michael Weiden, Timothy Harkin, David Ho, and William N. Rom

\*Low copy number and limited variability of proviral DNA in alveolar macrophages from HIV-1 infected patients:, poster presentation, Keystone Meeting, Colorado, 1995

Koh Nakata, Michael Weiden, Timothy Harkin, David Ho, and William N. Rom

\**M. tuberculosis* co-infection augments the production of T lymphocyte tropic HIV-1 but suppresses production of macrophage tropic HIV-1 in peripheral blood mononuclear cells. International conference of American Thoracic Society, San Francisco, *Am. Rev. Resp. Dis.* 155, :A22, 1997

Koh Nakata, Michael Weiden, Yoshihiro Honda, and William N. Rom

\*Tuberculosis and promoter regulation of HIV-1 long terminal repeat by NF-IL6 in vitro and vivo, poster presentation International conference of American Thoracic Society, San Francisco, *Am. Rev. Resp. Dis.* 155, :A337, 1997

Yoshihiro Honda, Koh Nakata, Michael Weiden, and William N. Rom

*\*Mycobacterium tuberculosis* enhances human immunodeficiency virus-1 replication in the lung.

Thirty -second U.S.-Japan cooperative medical science program :Tuberculosis-leprosy research conference, Cleveland, Ohio, July 21-23, 1997

Koh Nakata, William N. Rom, Yoshihiro Honda, Rany Condos, Shiro Kanegasaki, and Michael Weiden

\*Transcriptional Regulation of HIV-1 in Macrophages coinfectd with *M. tuberculosis*  
Thirty -third U.S.-Japan cooperative medical science program :Tuberculosis-leprosy research conference, Osaka, July 8-10, 1998

Koh Nakata, Yoshihiro Honda, William N. Rom, and Michael Weiden

\*Transcriptional Regulation of HIV-1 in Macrophages coinfectd with *M. tuberculosis*

Thirty -forth U.S.-Japan cooperative medical science program :Tuberculosis-leprosy research conference, San Fransisco, June 27-30, 1999

Koh Nakata, Yoshihiro Honda, William N. Rom, and Michael Weiden

Molecular mechanisms in mycobacteria-HIV interaction in macrophages

5th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Chennai, India, January 7-9, 2000

Koh Nakata