

厚生科学研究費補助金
(新興・再興感染症研究事業)

結核症及び非結核性抗酸菌症における生体防御機構
の解明とその予防・診断・治療への応用に関する研究

平成 12 年度
総括・分担研究報告書

平成 13(2001)年 3 月

主任研究者 山本 三郎
国立感染症研究所 細菌・血液製剤部

1/2冊

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

結核症及び非結核性抗酸菌症における生体防御機構の
 解明とその予防・診断・治療への応用に関する研究班

平成 12 年度 研究組織

研究者名	分 担	所 属	役 職
山本 三郎	班 長	国立感染症研究所 細菌・血液製剤部	室 長
小林 和夫	班 員	大阪市立大学 医学部 細菌学教室	教 授
光山 正雄	班 員	京都大学大学院 医学研究科	教 授
本多 三男	班 員	国立感染症研究所 エイズ研究センター 第一研究グループ	グ ル - プ 長
赤川 清子	班 員	国立感染症研究所 免疫部 免疫工学室	室 長
芳賀 伸治	班 員	国立感染症研究所 細菌部 泌尿生殖器系細菌室	室 長
菅原 勇	班 員	(財)結核予防会 結核研究所 分子病理学科	科 長
後藤 義孝	班 員	宮崎大学 農学部 微生物学講座	助 教 授
山崎 利雄	班 員	国立感染症研究所 ハンセン病研究センター 病原微生物部	主任研究官
持田 恵子	班 員	国立感染症研究所 細菌・血液製剤部	主任研究官
中田 光	班 員	国際医療センター-研究所 呼吸器疾患研究部	室 長
内藤真理子	班 員	長崎大学 歯学部 口腔細菌学教室	助 手
山本十糸子	協 力 研 究 者	国立感染症研究所 細菌・血液製剤部	
梅森 清子		国立感染症研究所 細菌・血液製剤部	
野島 康弘		国立感染症研究所 細菌・血液製剤部	
大石 和恵		東京大学 海洋研究所	
山崎 剛		国立感染症研究所 細菌部	
山田 毅		長崎大学名誉教授	
大原 直也		長崎大学 歯学部	助 教 授
佐藤由紀夫		福島県立医科大学 医学部	教 授
野間口博子		国立感染症研究所 ハンセン病研究センター	室 長
伊保 澄子		福井医科大学 医学部	助 手
谷口 初美		産業医科大学 医学部	教 授
David N. McMurray		Texas A&M University	Professor

目 次

I. 総括研究報告書

- 結核症及び非結核性抗酸菌症における生体防御機構
の解明とその予防・診断・治療への応用に関する研究 1 (1/2 冊)
主任研究者：山本 三郎 (国立感染症研究所 細菌・血液製剤部)

II. 分担研究報告書

1. 抗結核ワクチンの開発と評価に関する研究 18
分担研究者：山本 三郎 (国立感染症研究所 細菌・血液製剤部)
2. 結核菌由来 trehalose dimycolate (TDM) に対する多彩な宿主応答：
TDM は異物性および過敏性肉芽腫を誘導する 26
分担研究者：小林 和夫 (大阪市立大学 医学部)
3. BCG 生菌と死菌刺激における Th1 型サイトカイン誘導能の違いと
その産生誘導機序の解析 29
分担研究者：光山 正雄 (京都大学大学院 医学研究科)
4. 新しいタイプの抗結核ワクチンの構築とその発現に関する研究 32
分担研究者：本多 三男 (国立感染症研究所 イズ* 研究センター)
5. 結核菌の殺菌機構に関する研究 35
分担研究者：赤川 清子 (国立感染症研究所 免疫部)
6. 結核の新ワクチン評価の為に肺結核症動物モデル開発及び、感染、発病、
防御の代理マーカーの検討 38
分担研究者：芳賀 伸治 (国立感染症研究所 細菌部)
7. 結核菌感染における好中球、NK 細胞、NKT 細胞の役割 40
分担研究者：菅原 勇 ((財)結核予防会結核研究所)
8. *Mycobacterium intracellulare* 感染マウスに誘導されるナチュラルキラー
細胞と *NRAMP-1* 遺伝子の役割 42
分担研究者：後藤 義孝 (宮崎大学 農学部)
9. 結核菌群からの *Mycobacterium bovis* BCG の鑑別同定法の確立に関する研究 53
分担研究者：山崎 利雄 (国立感染症研究所 ハンセン病研究センター)
10. 有毒結核菌病原性発現の解析 56
分担研究者：持田 恵子 (国立感染症研究所 細菌・血液製剤部)
11. HIV/結核重感染の病理に関する研究 58
分担研究者：中田 光 (国際医療センター-研究所 呼吸器疾患研究部)
12. 改良型抗結核ワクチンの開発：Ag85 complex の応用に関する研究 64
分担研究者：内藤真理子 (長崎大学 歯学部)

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	66
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷	1 (2/2 冊)

I. 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

結核症及び非結核性抗酸菌症の生体防御機構の解明と予防・診断・治療への応用

主任研究者 山本三郎 国立感染症研究所 室長

研究要旨 BCG由来 α 抗原遺伝子ファミリーを組み込んだリコンビナントBCG (rBCG)でモルモットを免疫し、有毒結核菌噴霧感染に対する結核菌感染防御能を検討した。その結果、いずれのrBCGも親株BCGと同等以上の防御効果をもたらした。とくに3種類の抗原遺伝子 (Ag85A+Ag85B+MPB51)を同時発現させたBA51-rBCGによる感染防御能は他に比べて有意に高く優れた感染防御能を示した。さらに誘導される結核菌遺伝子の中からIFN- γ の誘導能に富むESAT6及び10kD蛋白遺伝子を組込んだrBCG結核ワクチンを作成発現されることができた。結核菌群に特異的なプライマーMT-1, -2, PT-1, -2, MPB64-T2, -T6, pncA-7, -10, pncA-7, -11Cの5組のプライマーを用いたPCRと、SenX3-regX3遺伝子間のシーケンスにより結核菌とBCGの鑑別同定法を確立した。*M.intracellulare*感染症においてNK細胞はNRAMP1遺伝子型に関わらずIFN- γ を介した免疫応答に深くかかわっている可能性が強く示唆された。BCG生菌による宿主サイトカイン刺激には、マクロファージレベルでのIL-12, IL-18の発現誘導が重要であるが、その経路にはToll-like receptorを介さない機序の関与が示唆された。ヒト単球由来M \cdot M ϕ は結核菌の殺菌を誘導すること、しかしGM \cdot M ϕ は逆に結核菌の増殖を促すことが知られた。M \cdot M ϕ の結核菌殺菌活性はH₂O₂やNOによらないこと、またM \cdot M ϕ とGM \cdot M ϕ ではNRAMP1の遺伝子発現が異なることから、M \cdot M ϕ の結核菌感染抵抗性はこの遺伝子発現と関連する可能性が示唆された。HIV結核の病巣部におけるウイルス産生調節機構としてこれまでNF- κ Bが重要とされてきたが、さらにC/EBP β によるウイルス産生抑制の解除機構が重要であることが示唆された。

分担研究者

小林和夫	大阪市立大学医学部教授	本多三男	国立感染症研究所エイズ研セ
光山正雄	京都大学大学院医学研究科教授		グループ長
後藤義孝	宮崎大学農学部助教授	赤川清子	国立感染症研究所免疫部室長
菅原勇	(財)結核予防会結核研究所室長	芳賀伸治	国立感染症研究所細菌部室長
中田光	国立国際医療セ研究所室長	山崎利雄	国立感染症研究所ハセン病研究セ
内藤真理子	長崎大学歯学部助手		主任研究官
		持田恵子	国立感染症研究所細菌血液
			製剤部主任研究官

A. 研究目的

結核菌・非結核性抗酸菌感染に対する生体防御反応や病変形成は、菌側および宿主側の諸因子が複雑に関与する宿主/寄生体関係を介して成立することから、宿主防御機構の解明を踏まえた結核の予防・診断・治療における新しい手段の開発は結核制圧の重要なステップである。本研究では、まず感染初期における宿主の抵抗性/感受性を規定する *NRAMP-1* 遺伝子の解析を行なう。*NRAMP-1* が感受性因子としてどのように関わっているかを明らかにすることによって、難治性疾患とされる抗酸菌感染症の予防・治療に新たな方策を見出すことができる。次に、結核菌や非結核性抗酸菌の増殖の場であるとともに殺菌のエフェクター細胞でもあるマクロファージにおける菌の増殖と殺菌の制御機構を解明する。また感染マクロファージでは抗原提示機能の低下がみられるが、この機序を明らかにする。マクロファージが産生する IL-18 は、マクロファージの活性化状態に依存するが、同時に結核菌感染において重要な役割を演じていることから、IL-18 の *in vivo* 作用を調べるとともに、IL-18 の結核治療への応用を検討する。一方、抗酸菌と宿主の相互作用は、ある場合は生体防御を導き、またときには病変形成をもたらすことが知られている。菌側因子としてリステリオリシン (LLO) や結核菌由来オリゴ DNA による NK 細胞活性化と IFN- γ 誘導の分子機構を解析し、毒性のない T 細胞免疫誘導型アジュバントの発現機構を明らかにするとともに、菌の毒力因子による生体防御・病変形成の関係を解析する。さらに、現行の BCG ワクチンの抗結核効果を増幅するため、新しいタイ

プの組換え型 BCG を作成する。また標的抗原の発現が優れているプラスミドに抗原タンパク質遺伝子を挿入するなどによりワクチンの強化・安定化をはかる。これら新規ワクチン評価のため、モルモットを用いた結核菌の気道感染系の確立を行う。一方、結核菌と BCG の鑑別診断技術は結核低蔓延国である我が国の状況から、患者の治療ならびに行政の対策上必要であり、分子遺伝学的技術を応用してその迅速化を図る。また AIDS に合併する結核はアジア・アフリカを中心に非常に深刻な状況であるが、結核が HIV 感染に及ぼす影響は不明の点が多い。HIV と結核菌の重感染者において、ウイルスの産生増強が、どの病変部位で起こるかを明らかにすることは患者の治療に貢献できると思われる。

B. 研究方法

NRAMP-1 遺伝子機能の解析：株化マクロファージを用いた抗酸菌感染系の確立：大腸菌にクローニングした抗酸菌抵抗性マウス由来の *NRAMP-1* 遺伝子を感受性マウスマクロファージ株化細胞やヒト由来マクロファージ株化細胞に発現させる。抗 *NRAMP-1* 抗体作成：*NRAMP-1* 遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列をもとにペプチドを合成し、ウサギに免疫して得た抗体が示す *NRAMP* タンパクとの反応性や細胞における同タンパクの局在についてウエスタンブロット法や免疫染色法等を用いて検討する。また、ブタマクロファージの抗酸菌に対する感受性と、これまでの研究で得られたブ

タ *NRAMP-1* 遺伝子情報をもとに *NRAMP-1* 遺伝子の構造解析を進める（後藤班員）。結核菌の殺菌機構の解析：M-M ϕ 及び GM-M ϕ における BCG、*M. avium* 感染感受性の違い、活性酸素産生能、*iNOS* 遺伝子の発現及び NO 産生能との関連、*NRAMP-1* 遺伝子の発現と感染感受性の関連、両マクロファージの *NRAMP-1* 遺伝子の発現を検討する。また結核菌 H37Rv や BCG に対しても同様の感受性を示すか否かを検討するとともに、マクロファージにおける結核菌の増殖抑制を誘導する機構を解明する（赤川班員）。結核菌の宿主応答機構：肺胞マクロファージ株化細胞に結核菌を感染させ、菌の細胞内動態および分子の発現を免疫染色後 CCD カメラによる画像解析、Western Blot により明らかにする。菌の毒性発現に関わる分子の機能を遺伝子組換え法により阻害・増強し、毒性の機序を解析する（持田班員）。結核の病理と発症抑制に関する研究：IL-18 欠損マウスに結核菌を気道感染させ、7 週後にマウスを解剖し、病態を病理学、免疫学的に調べる。同時に肺組織を培養して結核菌のコロニー数を求める（菅原班員）。抗酸菌感染症の新規治療法の開発：マウスに結核菌毒力因子であるコードファクターなどの脂質を投与し、宿主防御および炎症応答を分子医学的に解析する。構造一活性連関から防御を選択的に誘導する脂質成分を決定する（小林班員）。

結核菌の免疫賦括に関する研究：LLO および相同性の高いファミリー遺伝子を改変して発現させ、得られた各種リコンビナント標品を用いてサイトカイン誘発の最小活性単位の決定、サイトカインカスケードを解析する。CpG モチーフに富むオリゴ DNA 標品が *in vitro*, *in vivo* ではどのような動態で NK 細胞を活性化し IFN- γ 産生を誘発するかを明らかにする（光山班員）。抗結核ワクチン開発に関する研究：各種 r BCG ワクチン及びプラスミド DNA ワクチンの構築を行う。防御免疫誘導能の検討及び抗結核効果の解析を行う（山本班員、本多班員、内藤班員）。新規ワクチン評価のための感染動物モデル系の樹立：結核菌のモルモットへの噴霧感染モデル系を確立し、肺結核に対する新ワクチンの効果と安全性の評価法を検討する（芳賀班員）。モルモットの抗結核免疫能評価のため、各種サイトカイン測定法を確立する（山本班員）。結核菌と BCG を鑑別する新規診断法の確立：*M. bovis* 及び BCG 株に特異的塩基配列の検索を行ない、*M. bovis* を用いて PCR 法により特異遺伝子の増幅を行う。*M. bovis* から BCG 株を判別可能な塩基配列を検索し、BCG であると同定する方法を樹立する（山崎班員）。HIV 感染に合併する結核症に関する研究：患者の剖検臓器の病理組織標本から PCR 法を用いて HIV 特異的なプローブを作製し、*in situ* hybridization 法によ

って、結核病巣部のウイルス分布を調べる。ついで、病理組織においてウイルスを産生している細胞を *in vitro* で培養し、ウイルス産生抑制性の転写因子の誘導を試みる（中田班員）。

（倫理面への配慮）

国立感染症研究所及び大学での動物実験は各動物委員会の審査・承認により行われた。

C. 研究結果

ワクチン開発に関する研究：BCG 由来 α 抗原遺伝子ファミリーを組み込んだリコンビナント BCG(rBCG)でモルモットを免疫し、有毒結核菌噴霧感染に対する結核菌感染防御能を検討した。その結果、いずれの rBCG も親株 BCG と同等以上の防御効果をもたらした。とくに 3 種類の抗原遺伝子 (Ag85A + Ag85B + MPB51) を同時発現させた BA51-rBCG による感染防御能は他に比べて有意に高く、かつ親株 BCG より優れた感染防御能を示した。また抗原遺伝子 (Ag85A、Ag85B、Ag85C、MPB51、MPB51 + Ag85A、HSP65、MPB64、MDP1) を発現する DNA ワクチンを構築し感染防御能を検討した。さらに結核免疫の解析に有用でありながら、これまでヒト・マウスと異なり解析が遅れていたモルモットサイトカインのうちインターフェロン測定系を樹立した (山本班員)。

1) 分泌型抗原遺伝子発現リコンビナント結核ワクチンの作製：すでに α 抗原及び MPB64、MPB70 分泌蛋白遺伝子の発現はリコンビナント BCG 培養濾液を用い、その中に分泌された蛋白抗原を各々の特異抗体で結合性を見ることにより、Western Blot 法で確認することができた。2) ESAT6 遺

伝子をベクターに組み込んで Western Blot 法で確認することができた。10kD 蛋白遺伝子を挿入して分泌蛋白として BCG 菌から遊離できるかどうかを現在確認中である。3) ESAT6 をマウスに接種してその発現をペプチドに対して誘導されるかどうかを検討し、マウスの strain に特異的なヘルパーエпитープを同定した (本多班員)。改良型抗結核ワクチンの開発：Ag85 complex の応用に関する研究：現在用いられている抗結核ワクチンである BCG のその効果の評価は各調査ごとにばらついている。共通なのは BCG を上回る、より効果的な抗結核ワクチンの開発が必要とされることである。そこで、近年、結核防御抗原として注目を集める Ag85 complex に注目した。そこで本研究においてこの Ag85 complex 抗原をもちいた改良型抗結核ワクチンの開発を目指した。また抗酸菌の病原性を解析する為、抗酸菌の増殖調節に関わる因子の検索を行う (内藤班員)。結核の新ワクチン評価の為の肺結核症動物モデル開発及び、感染、発病、防御の代理マーカーの検討：昨年引き続きモルモット系統間における結核菌感染に対する応答の差異を検討したところ次に示す成績及び結論が得られた。すなわち、Hartley は炎症反応を強めることで菌の増殖伝搬を防ぎ、Strain 13 は炎症反応はあまり強くないが菌の増殖伝搬を防ぐことができ、Strain 2 は炎症反応があまり強くない、菌の増殖伝搬を防ぎきれないことが観察された。これらの成績と PPD ツベルクリン反応の成績がきわめてよく相関していた。なお、噴霧感染群でも同様の傾向であった。Hartley はもとより Strain 2、Strain 13 は結核研究においてきわめて有用な実験動物であることが実証された (芳賀班員)。結核菌と BCG の鑑別診断に関する研

究：結核菌群からの *Mycobacterium bovis* BCG の鑑別同定法の確立に関する研究：結核菌群の *SenX3-regX3* 遺伝子間領域のシーケンズを行い、この領域中に存在する 77bp-MIRU の数と 53bp の MIRU の有無を調べ、結核菌群から BCG を鑑別同定する方法を確立した(山崎班員)。結核の治療に関する研究：結核菌由来 trehalose dimycolate (TDM) に対する多彩な宿主応答：TDM は異物性および過敏性肉芽腫を誘導する。抗酸菌感染に対する細胞性免疫応答が宿主防御に貢献している。しかし、細胞性免疫応答発現機序は不明である。本研究では、抗酸菌成分、特に、細胞壁由来糖脂質に注目し、炎症および免疫惹起性を解析した。結核菌やその他の抗酸菌由来糖脂質、trehalose dimycolate が血管新生、肉芽腫炎症および細胞性免疫を惹起することが判明した。抗酸菌感染において、血管新生、肉芽腫炎症および細胞性免疫の発現は宿主防御に必須の構成要素である。従って、抗酸菌由来糖脂質は防御抗原であり、難治性抗酸菌感染症に対する免疫介入療法（ワクチンを含む）の開発に有望な戦略になる可能性を示している（小林班員）。結核の生体防御機構に関する研究：BCG 生菌と死菌刺激における Th1 型サイトカイン誘導能の違いとその産生誘導機序の解析。*Mycobacterium bovis* BCG 菌体刺激に対するマウス腹腔浸出細胞のサイトカイン応答を、生菌と死菌の違いについて解析した。生菌刺激で認められる脾細胞からの IFN- γ 産生は死菌刺激では低く、その違いはマクロファージレベルでの IL-12, IL-18 に規定されていると思われた。これらのサイトカイン応答には、マクロファージの CD14 や

LPS シグナル応答系の関与は低いことが示唆された（光山班員）。結核菌の殺菌機構に関する研究：ヒト単球より M-CSF 及び GM-CSF で誘導した、M-M ϕ 及び GM-M ϕ の結核菌 H37RV に対する殺菌能を検討した結果、ヒト肺胞 M ϕ に形質が似ている GM-M ϕ は、結核菌の増殖の場として作用すること、また M-M ϕ は、結核菌の殺菌を促すことを見つけた。H $_2$ O $_2$ や NO は、M-M ϕ の殺菌能とは関連しなかった。しかし、マウスの BCG 感染に対する自然抵抗性を規定している *Nramp-1* 遺伝子のヒトホモログである *NRAMP-1* 遺伝子の mRNA は、M-M ϕ で発現していたが、GM-M ϕ では発現が認められなかったことより、*NRAMP-1* 遺伝子の発現の違いが両 M ϕ における殺菌活性の違いと関連する可能性が示唆された（赤川班員）。*Mycobacterium intracellulare* 感染マウスに誘導されるナチュラルキラー細胞と *NRAMP-1* 遺伝子の役割：*Mycobacterium avium* (*M.avium*) や *M.intracellulare* に感染したマウスは *NRAMP-1* 遺伝子型によりその運命が決定される。我々の感受性 (*Bcg^{s/s}*) と抵抗性 (*Bcg^{r/r}*) マウス実験モデルにおける感受性差は *NRAMP-1* 遺伝子上のわずか 1 塩基の違いに基づいている。同遺伝子の転写物 (mRNA) は感受性、抵抗性にかかわらず体内の諸臓器に分布するマクロファージにより発現し、LPS やサイトカイン刺激はその量的変化をもたらす。我々は両抗酸菌種を用いた *in vitro* 感染実験において、異なる *NRAMP-1* 遺伝形質をもつマクロファージ内での増殖パターンが異なることを見出した。すなわち *M.avium* は *Bcg^{s/s}* マウス由来マクロファージでのみ増殖がみられるのに対し、*M.intracellulare*

では *Bcg^{tr}* 由来のマクロファージでも感受性のそれと同様、菌増殖を許してしまうことが分かった。このことは *in vivo* でみられる感染初期抵抗性が単にマクロファージ内における菌増殖の差異によってのみ生じるものではないことを示している。*NRAMP-1* 遺伝子型の差はマウスの抗酸菌に対する免疫応答性のみならずマクロファージが産生するサイトカインにも種々の影響を及ぼす。*M. avium* 感染マウスにおけるサイトカインプロファイルを比較してみると、感染初期における Th1 ならびに Th2 型ヘルパー T 細胞の誘導と分化に関するインターロイキン 10 (IL-10) と IL-12 のマクロファージからの産生量が *Bcg^{sls}* と *Bcg^{tr}* とではかなり異なっていることが分かった。自然抵抗性に関連して、*NRAMP-1* 遺伝子型の異なる NK 細胞はネズミチフス菌の刺激に対して IFN- γ の産生能力が異なるという報告がなされている。そこで我々は *M. intracellulare* 感染における NK 細胞の働きと *NRAMP-1* 遺伝子との関係をしらべた。その結果、NK 細胞数は感染早期 (~48 時間) に有意に増加すること、*in vitro* における感染実験では感染後 12 ないし 48 時間で大量の IFN- γ 産生が誘導されることが分かった。ただしいずれも *NRAMP-1^{sls}* マウスと *NRAMP-1^{tr}* マウスとの間で有意差がみられなかった。*M. intracellulare* 感染症において NK 細胞は *NRAMP-1* 遺伝子型に関わらず IFN- γ を介した免疫応答に深くかかわっている可能性が強く示唆された (後藤班員)。有毒結核菌病原性発現の解析：有毒結核菌 (H37Rv) およびワクチン株 (BCG) は、ラット肺マクロファージ細胞株 (NR8383) に感染し細胞死を誘導

する。細胞死誘導に必要な細菌因子を同定するため、ガンマー線照射および加熱による不活化菌の NR 細胞増殖に対する効果を検討した。NR 細胞感染早期 (2 日目) の細胞数は加熱 BCG > ガンマー線照射 BCG = BCG 生菌の順であったが、感染後期 (7 日目) では加熱 BCG > ガンマー線照射 BCG > BCG 生菌の順になった。このことより、感染早期における病原性はガンマー線照射による影響を受けないが、感染期間の持続によりその影響は有意に発現することが明らかにされた。また、宿主細胞死誘導には感染細胞内での菌の増殖は必須ではなく、熱に感受性の菌体表層分子が重要である可能性が示唆された (持田班員)。結核菌感染における好中球、NK 細胞、NKT 細胞の役割：結核菌感染過程における好中球、NK 細胞、NKT 細胞が果たしている役割は、まだ十分に解明されているとは言い難い。本研究は、これら細胞の役割に焦点を当てた。好中球除去ラット、ベージュマウス、NKT 欠損マウスを結核菌でエアロソール感染させた。肺病変の程度を野生ラット、マウスと比較検討した。好中球除去ラットと NKT 欠損マウスでは結核菌誘導肉芽腫性病変がより顕著だったが、ベージュマウスでは有意差が認められなかった (菅原班員)。HIV 感染者における日和見感染症の合併はエイズの発症を惹起し、その予後を著しく不良にすることが知られている。これは炎症により HIV 感染細胞からのウイルス産生が亢進することが一因と考えられている。結核は、AIDS の合併症のなかでは CD4 数が $300/\text{mm}^3$ の付近から頻発し、急速に免疫不全を進行させる。その機序として、炎症に伴い誘導される転写促進因子 NF- κ B が HIV-LTR に結合し、プロウイルス

の転写が促進する機構が知られている。また、われわれは転写抑制の機序としてC/EBP β の16 Kd short form は HIV-LTR の negative regulatory element (NRE)に特異的に結合し、転写が抑制されることを見出し、HIV 感染者の肺洗浄液を用いた検討で健常肺中の細胞と組織ではC/EBP β 16Kdが発現しているが、結核病巣では発現がみられず、かつ HIV 産生が昂進していることを報告してきた。今回われわれは、HIV/結核重感染の病巣部を病理学的に検討し、細胞相と上記転写因子の発現の関係について調査した(中田班員)。

D. 考察

結核免疫では、生菌ワクチンは有効であるが、死菌ワクチンはアレルギー誘導だけで、防御免疫は誘導できないとの指適があり、BCG 生菌によるワクチン接種の理論付けとして考えられてきた。DNA ワクチンによる免疫誘導は、細胞内で生産される抗原タンパク質が断片化して抗原提示されるため、あたかも生菌が細胞内で抗原タンパク質を生産すると同様に、MHC クラス I を介した CD8 キラーT 細胞の誘導が行われる。また、細胞外に分泌された抗原タンパク質は、MHC クラス II を介して CD4 のヘルパー細胞の活性化をもたらすことも可能とされている。このように、長所としては体液性免疫と細胞性免疫を誘導できること、感染性がなくワクチンデザインが容易であること、大量生産が可能、品質の安定性は従来型ワクチン以上であること、製造・輸送コストが安いことなどがあげられている。一方、短所としてはメカニズムが不明、DNA の持続性や体内でのプラスミドの安定性などに

難点が挙げられている。

モルモット IFN はこれまで α 、 β 、 γ のいずれの型も精製品もリコンビナントも知られていない。ここで述べたバイオアッセイ法からリコンビナントのモルモット IFN あるいはそれから得られる抗モルモット IFN 抗体の力価に生物学的な保証を与えるばかりでなく、簡単にモルモット IFN を測定できる系が見出されたことで、モルモットを使つての結核免疫の研究分野でさらなる発展が期待できる。

Hartley はもとより Strain 2、Strain 13 は結核研究においてきわめて有用なモルモットであることが改めて実証された。一方、ヒトにおいても BCG 接種後に PPD への応答性の差が見られることから、今後これらモルモット間の遺伝的背景がゲノム解析などにより明らかになれば、ヒトでの結核菌への感受性の差異を示す因子の同定などに役立つと考えられる。

PEC を BCG 生菌で刺激すると IFN- γ 産生が認められたが、抗 IL-12 および抗 IL-18 抗体により抑制されたことから、BCG 生菌がマクロファージからの IL-12 および IL-18 産生を誘導し、IFN- γ はそれらに反応した NK 細胞あるいは $\gamma\delta$ T 細胞や CD8 陽性 T 細胞などが産生したものと考えられる。また、BCG 生菌で誘導されるサイトカイン産生は抗 CD14 抗体や E5531 で抑制されなかったことから、BCG 生菌は Toll-like receptor (TLR)2 や TLR4 を介さない、別な経路でマクロファージのサイトカイン産生を刺激することが示唆された。BCG 生菌による Th1 型サイトカイン産生誘導のメカニズムを明らかにするため、それらのサイトカイン産生誘導に関与する生菌因子につい

て解析していくことが必要である。

M・Mφは殺菌を GM・Mφは増殖を誘導することを認めた。GM・Mφは、ヒトの肺胞マクロファージに似た形質であることを既に述べたが、このマクロファージで、結核菌の増殖が強いことは、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。

結核菌由来 TDM は非特異的異物性炎症応答のみならず、特異性および記憶を特徴とする細胞性免疫応答も惹起すること、さらに、T 細胞依存性抗原であることが判明した。すなわち、結核性肉芽腫炎症は異物性および過敏性機序の関与した混合性病変である。TDM は、肉芽腫炎症に加えて、血管新生やアポトーシスも誘導し、結核の病原体-宿主関係における多機能分子である。TDM が抗結核免疫の効果機能分子である IL-12 や IFN- γ を誘導したことは、TDM が防御抗原であり、従って、ワクチンなど免疫介入療法の開発に寄与するであろう。すなわち、TDM は結核菌由来糖脂質であり、化学的にも安定、かつ、生菌ワクチンと異なり、安全なワクチン候補になる可能性を示している。

本研究から、BCG 感染による宿主マクロファージの細胞死に必ずしも BCG の複製が必要ではないことが解った。しかしながら、加熱による不活化菌では宿主細胞に病原性を示さなかったことより、加熱による表面蛋白質の変性や分子構造の変化などが病原性の減弱に寄与する可能性が示唆される。ガンマ線照射および加熱直後の BCG の RNA 量は非照射菌と同程度であったが、DNA は著しく減少した。このことより、菌の増殖能力は消失しても蛋白質合成能は保持さ

れていることが示唆される。

M. tuberculosis H37Rv と BCG-Tokyo をモルモットに重感染させた動物実験でも、前述プライマーを用いて、PCR 増幅バンドの検出パターンにより、両者の肺における分布菌数がわかるようになった。このことは、結核のワクチン開発や、BCG の免疫効果の解析に非常に役立つ所見となるであろう。

E. 結論

BCG 由来 α 抗原遺伝子ファミリーを組み込んだリコンビナント BCG(rBCG)でモルモットを免疫し、有毒結核菌噴霧感染に対する結核菌感染防御能を検討した。その結果、いずれの rBCG も親株 BCG と同等以上の防御効果をもたらした。抗原遺伝子 (Ag85A, Ag85B, Ag85C, MPB51, MPB51 + Ag85A, HSP65, MPB64, MDP1) を発現する DNA ワクチンを構築した。モルモットインターフェロン測定系を樹立した (山本班員)。

MPB64, MPB70, α 抗原の三つの蛋白遺伝子を BCG 東京株に発現させ、各々の rBCG を作成した。さらに結核菌遺伝子のサブトラクションにより、誘導される結核菌遺伝子の中から γ インターフェロンの誘導能に富む ESAT6 及び 10kD 蛋白遺伝子に着目し、それらの遺伝子を組込んだ rBCG 結核ワクチンを作成し、発現されることができた (本多班員)。

M.intracellulare 感染症において NK 細胞は NRAMP-1 遺伝子型に関わらず IFN- γ を介した免疫応答に深くかかわっている可能性が強く示唆された (後藤班員)。

BCG 生菌による宿主サイトカイン刺激には、マ

クロファージレベルでの IL-12, IL-18 の発現誘導が重要であるが、その経路には Toll-like receptor を介さない機序の関与が示唆された (光山班員)。

ヒト単球由来 M-Mφ は結核菌の殺菌を誘導すること、しかし GM-Mφ は逆に結核菌の増殖を促すことが知られた。M-Mφ の結核菌殺菌活性は H₂O₂ や NO によらないこと、また M-Mφ と GM-Mφ では NRAMP1 の遺伝子発現が異なることから、M-Mφ の結核菌感染抵抗性はこの遺伝子発現と関連する可能性が示唆された (赤川班員)。

抗酸菌由来糖脂質 (TDM) は宿主防御抗原であり、従って、本研究の成果は難治性抗酸菌感染症に対する免疫介入療法 (ワクチンを含む) の開発に有望な基盤を提供した (小林班員)。

結核の進展に好中球、NKT は一定の役割を担うが、NK 細胞はそれほどの役割を果たさない (菅原班員)。

ガンマー線照射 BCG は生菌と同程度の宿主細胞死誘導活性を有していた。宿主マクロファージへの病原性の発現には菌の増殖は必須ではなく、菌体表面の熱感受性分子の関与が示唆された (持田班員)。

結核菌群に特異的なプライマー MT-1, -2, PT-1, -2, MPB64-T2, -T6, pncA-7, -10, pncA-7, -11C の 5 組のプライマーを用いた PCR 結果と、SenX3-regX3 遺伝子間のシークエンスにより BCG までの鑑別同定法を確立した。わが国では、分離された抗酸菌が、M. bovis のパターンをとり、senX3-regX3 の遺伝子間領域を増幅するプライマー C5, C3 を用いた PCR 増幅産物の大きさが 353bp であり、シークエンスの結果、77bp の MIRU が 3 個存在し、53bp の MIRU が存在しな

ければ、BCG-Tokyo と断定して差し支えないと思われる (山崎班員)。

HIV 結核の病巣部におけるウイルス産生調節機構としてこれまで NF-κB が重要であると言われてきたが、それに加えて C/EBPβ によるウイルス産生抑制の解除という機構が重要であると思われる (中田班員)。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto, S., Yamamoto, T. and Tokunaga, T.: Oligodeoxyribonucleotides with 5'-ACGT-3' or 5'-TCGA-3' sequence induce production of interferons. Current Topics Microbiol. Immunol. Immunobiology of Bacterial CpG-DNA 247:23-39, 2000.
2. Yamamoto, S., Yamamoto, T. and Tokunaga, T.: The discovery of immunostimulatory DNA sequence. Springer Seminars in Immunopathology. 22:11-19, 2000.
3. Yamamoto, S., Yamamoto, T., Iho, S. and Tokunaga, T.: Activation of NK cell (human and mouse) by immunostimulatory DNA sequence. Springer Seminars in Immunopathology. 22:35-43, 2000.

4. 山本十糸子, Phalen, S., 内田和幸, 梅森清子, 野島康弘, 堀内善信, 後藤義孝, McMurray, D.N., 山本三郎: BCG Tokyo 172 株の抗結核効果: 結核菌噴霧感染によるモルモット肺結核実験モデルを用いた防御効果の検討. 結核 75(5):379-388, 2000.
5. 山本三郎: 結核 DNA ワクチン. ワールド・フォーカス (バイオメディカル サイエンス研究会) 14: 1-2, 2000.
6. 山本三郎: 結核菌感染後の発症予防. 日本薬学会ホームページ ホットニュース, www.pharm.or.jp/hot-news/
7. 伊保澄子, 山本三郎: 非メチル化 CpG-DNA による NK 細胞の活性化. Annual Review 免疫 2001:137-146, 2000.
8. Naka, T., N. Fujiwara, E. Yabuuchi, M. Doe, K. Kobayashi, K. Kato, and I. Yano.: A novel sphingolipid containing galacturonic acid and 2-hydroxy fatty acid in cellular lipids of *Sphingomonas yanoikuyae*. J. Bacteriol. 182: 2660-2663, 2000.
9. Hamasaki, N., K. Isowa, K. Kamada, Y. Terano, T. Matsumoto, T. Arakawa, K. Kobayashi, and I. Yano.: In vivo administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits. Infect. Immun. 68: 3704-3709, 2000.
10. Lu, J., T. Kasama, K. Kobayashi, Y. Yoda, F. Shiozawa, M. Hanyuda, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi.: Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis. J. Immunol. 164: 5922-5927, 2000.
11. Saita, N., N. Fujiwara, I. Yano, K. Soejima, and K. Kobayashi.: Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces corneal angiogenesis in rats. Infect. Immun. 68: 5991-5997, 2000.
12. Yamagami, H., T. Matsumoto, N. Fujiwara, T. Arakawa, K. Kaneda, I. Yano, and K. Kobayashi.: Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body- and hypersensitivity-type granulomas in mice. Infect. Immun. 69: 810-815, 2001.
13. 小林 和夫: 結核菌感染防御における interleukin 12 の役割. 臨床免疫 35: 1-7, 2001.
14. Kayama S, Mitsuyama M, Sato N & Hatakeyama K: Overgrowth and

- translocation of Escherichia coli from intestineduring prolonged external feeding in rats. *Journal of Gastroenterology*. 35(1): 15-19, 2000.
15. Ishiguro, T., Naito, M., Yamamoto, T., Hasegawa, G., Gejo, F. Mitsuyama, M. Suzuki, H. & Kodama, T.: Role of macrophage scavenger receptors in response to *Listeria monocytogenes* infection in mice. *American Journal of Pathology*. 158: 179-188, 2001.
 16. Baba H, Kawamura I, Kohda C, Nomura T, Kimoto T, Ito M, Watanabe I & Mitsuyama M.: Essential role of domain 4 of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* in cytolytic activity as determined by truncated proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 281: 37-44, 2001.
 17. Akagawa, K.S., Komuro, I., Yamazaki, T. and Haga, S.: M-CSF-but not GM-CSF-induced human monocyte-derived macrophages inhibit growth of *M. tuberculosis*. *Proceedings of Thirty-fourth U.S.-Japan Tuberculosis and Leprosy Research Conference*, p. 115-118, 2000.
 18. 赤川清子: 結核の免疫, *Pharma Medica* Vol. 18 (10): 19-25, 2000.
 19. 赤川清子, 小室 巖, 持田恵子: 単球由来マクロファージの多様性、炎症と免疫 Vol. 8 360-366, 2000.
 20. 持田恵子、赤川清子: 結核菌特異的キラーT細胞誘導における抗原提示細胞臨床免疫 33, 18-23, 2000.
 21. Mari Takizawa, Jo Chiba, Shinji Haga, Toshihiko Asano, and Mitsuo Honda: Expansion of Ia-positive activated T cells in primary response to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) in guinea pigs and its biological significance. *Cytometry Research*, 10(2):43-48, 2000.
 22. I. Sugawara, S. Mizuno, H. Yamada, M. Matsumoto and S. Akira: Disruption of nuclear factor-IL6, a transcription factor, results in severe mycobacterial infection. *Am. J. Pathol.*, 158:361-366, 2001.
 23. 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。 *Kekkaku*, 75:463-469, 2000.
 24. H. Yamada, S. Mizuno, R. Horai, Y. Iwakura and I. Sugawara: Protective role of IL-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. *Lab. Invest.*, 80: 759-767, 2000.

25. I. Sugawara, H. Yamada, S. Mizuno and Y. Iwakura: IL-4 is required for defense against mycobacterial infection. *Microbiol. Immunol.*, 44:971-979, 2000.
26. K. Ohtomo, S. Wang, A. Masunaga, A. Iwamoto and I. Sugawara: Secondary infections of AIDS autopsy cases in Japan with special emphasis on *Mycobacterium-avium-intracellulare* complex infection. *Tohoku J. Exp. Med.*, 192:99-109, 2000.
27. I. Sugawara: IL-18 and infectious diseases, with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens. *Microbes Infect.*, 2:1257-1263, 2000.
28. T. Koura, Y. Gon, S. Hashimoto, A. Azuma, S. Kudoh, Y. Fukuda, I. Sugawara, J. Yodoi and T. Horie: Expression of thioredoxin in granulomas of sarcoidosis: possible role in development of T lymphocyte activation. *Thorax*, 55:755-761, 2000.
29. 山本十糸子, S. Phalen, 内田和幸, 梅森清子, 野島康弘, 堀内善信, 後藤義孝, D.Mcmurray, 山本三郎: BCG Tokyo 172 株の抗結核効果: 結核菌噴霧感染によるモルモット肺結核実験モデルを用いた防御効果の検討。結核, 75 (5) : 379-388, 2000.
30. Nakata, K., Honda, Y. and Weiden, M.: Involvement of Interferon in Transcriptional Regulation of HIV production in macrophages co-infected with *M. tuberculosis*. Thirty-fourth U.S.-Japan cooperative medical science program: Tuberculosis-leprosy research conference, San Francisco, 40-44, 1999.
31. Nakata, K., Tanaka, N., Honda, Y., Pine, R. and Weiden, M.: The *Mycobacterium tuberculosis* effect on interferon signaling pathway and C/EBP β expression. Thirty-fifth U.S.-Japan cooperative medical science program: Tuberculosis-leprosy research conference, Yokohama, 143-148, 1999.
32. Weiden, M., Tanaka, N., Qiao, Y., Honda, Y., Nakata, K., Rom, W.N. and Pine, R.: Differentiation of monocytes to macrophages switches the *Mycobacterium tuberculosis* effect on HIV-1 replication from stimulation to inhibition: modulation of interferon response and CCAAT/enhancer binding protein b expression. *Journal of Immunology*, 165:2028-2039, 2000.
33. 中田 光: 結核-21世紀の展望、現代医療。31(7):116-120, 1999。
34. 中田 光, 本田芳広, 田中直彦, Michael Weiden, 慶長直人: AIDS に合併する

- 結核、日本結核病学会誌。75(9):547-556, 2000。
35. 中田 光: エイズと結核、日本ハンセン病学会誌。69:87-92, 2000。
 36. 中田 光: AIDS と結核、皮膚病診療。22(9):802-805, 2000。
 37. 中田 光: エイズと結核、Pharma Media。 18(10):61-65, 2000。
2. 学会発表
1. 梅森清子、野島康弘、松本壮吉、山田毅、山本十糸子、山本三郎: ミコバクテリア DNA 結合性タンパク質(MDP1)による細菌 DNA の免疫活性の調節および抗結核 DNA ワクチンへの応用。第70回実験結核研究会 平成12年4月、大阪。
 2. 野島康弘、梅森清子、山本十糸子、大原直也、佐藤由紀夫、山田毅、山本三郎: ミコバクテリア感染防御抗原遺伝子を用いた抗結核 DNA ワクチンの作製。第70回実験結核研究会 平成12年4月、大阪。
 3. 山本十糸子、梅森清子、野島康弘、堀内善信、山本三郎、内田和幸、Susan Phalen、David N. McMurray. BCG 東京172株の抗結核効果: 結核菌噴霧感染によるモルモット肺結核モデルを用いた防御効果の検討。第75回日本結核病学会総会 平成12年4月、大阪。
 4. 山本十糸子、梅森清子、野島康弘、山本三郎: インターフェロン γ によるモルモット結核免疫の解析。第73回日本細菌学会総会 平成12年5月、札幌。
 5. 梅森清子、野島康弘、山本十糸子、山田毅、山本三郎: CpGモチーフによる免疫活性を増強するミコバクテリア由来タンパク質。第73回日本細菌学会総会 平成12年5月、札幌。
 6. 野島康弘、梅森清子、山本十糸子、大原直也、山田毅、山本三郎: 第73回日本細菌学会総会 平成12年5月、札幌。
 7. Yamamoto, T., Phalen, S., Uchida, K., Umemori, K., Nojima, Y., Horiuchi, Y., Goto, Y., McMurray, N.D. and Yamamoto, S.: Protective efficacy of Tokyo 172 and Copenhagen 1331 BCG vaccines in the guinea pig against pulmonary tuberculosis. Thirty-fifth Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, Yokohama, July 2000.
 8. 山崎剛、山崎利雄、山本三郎、芳賀伸治: 結核菌濃厚感染に対するBCGワクチンの防御効果。第83回日本細菌学会関東支部総会 平成12年11月、東京。
 9. 山崎利雄、山崎剛、芳賀伸治、赤川清子、山本三郎: 結核菌とBCGの鑑別同定法。第83回日本細菌学会関東支部総会 平成12年11月、東京。

10. 山本三郎、山本十糸子、梅森清子、野島康弘、大原直也、山田毅、McMurray, D.N.: リコンビナント BCG の抗結核効果: 結核菌噴霧感染によるモルモット肺結核実験モデルを用いた防御効果の検討. 第 4 回日本ワクチン学会学術集会 平成 12 年 11 月、横浜.
11. 山本三郎: 結核予防に関する世界現況抗結核 DNA ワクチンの開発. 第 4 回日本ワクチン学会学術集会教育講演 平成 12 年 11 月、横浜.
12. 山本三郎: DNA ワクチンの可能性と問題点. (シンポジウム結核) 第 21 回衛生微生物技術協議会研究会 平成 12 年 7 月、郡山.
13. 山本十糸子、梅森清子、野島康弘、山本三郎: モルモットインターフェロン測定法の確立と結核免疫の解析. 第 30 回日本免疫学会学術集会 平成 12 年 11 月、仙台.
14. 梅森清子、野島康弘、山本十糸子、山田毅、山本三郎: 細菌 DNA による免疫活性を増強するミコバクテリア由来 DNA 結合タンパク質. 第 30 回日本免疫学会学術集会 平成 12 年 11 月、仙台.
15. 野島康弘、梅森清子、山本十糸子、大原直也、山田毅、山本三郎: ミコバクテリア抗原遺伝子を用いた DNA ワクチン及びリコンビナント BCG ワクチンの抗結核効果. 第 30 回日本免疫学会学術集会 平成 12 年 11 月、仙台.
16. 伊保澄子、高橋隆幸、山本三郎: 非メチル化 CpG-DNA のヒト免疫調節機構に関する研究: CpG-DNA の作用は標的細胞に依存して発現される. 第 30 回日本免疫学会学術集会 平成 12 年 11 月、仙台.
17. 高氏留美子、伊保澄子、山本十糸子、松木孝澄、山本三郎: CpG モチーフを有するオリゴ DNA の免疫調節機構の検討. ヒトサイトカインの誘導. 第 30 回日本免疫学会学術集会 平成 12 年 11 月、仙台.
18. 原田登之、樋口一恵、小林和夫、関谷幸江、森下加奈. 2000. 結核菌死菌のマウスに対する免疫効果. 結核、75: 306、2000. 第 75 回日本結核病学会総会 (大阪、4 月).
19. 佐藤明正、藤原永年、小林和夫、矢野郁也. 2000. *Mycobacterium avium-intracellulare* complex 症患者分離株の血清型地域特異性. 結核、75: 320、2000. 第 75 回日本結核病学会総会 (大阪、4 月).
20. 中 崇、藤原永年、小林和夫、藪内英子、加藤敬香、矢野郁也. 2000. *Sphingomonas yanoikuyae* から分離された新規スフィンゴ糖脂質. 日本細菌学会雑誌、55: 342、2000. 第 73 回日本細菌学会総会 (札幌、5 月).
21. 小林和夫、有田 齊. 2000. 炎症疾患と肉芽腫 (ワークショップ). 炎症、20:

- 400、2000. 第 21 回日本炎症学会総会 (東京、7 月) .
22. 藤原永年、山上博一、濱崎尚子、齋田典夫、矢野郁也、小林和夫. 2000. 抗酸菌性肉芽腫炎症の分子制御機構、炎症疾患と肉芽腫 (ワークショップ)、炎症、20 : 401、2000. 第 21 回日本炎症学会総会 (東京、7 月) .
23. 山上博一、藤原永年、矢野郁也、小林和夫. 2000. 結核菌由来 cord factor/trehalose 6,6'-dimycolate による肉芽腫炎症と分子機構. 炎症、20 : 494、2000. 第 21 回日本炎症学会総会 (東京、7 月) .
24. 木村博昭、虎谷 聡、松岡正典、小林和夫、福富康夫. 2000. マクロファージにおける抗らい菌活性発現に関わる分子の解析. 日本免疫学会・学術集会記録、30 : 288、2000. 第 30 回日本免疫学会総会・学術総会 (仙台、11 月) .
25. 光山正雄 : 細胞内寄生菌に対する防御免疫、第 73 回日本ハンセン病学会総会シンポジウム。
26. 光山正雄 : 抗酸菌のエスケープ機構と宿主免疫応答、第 75 回日本結核病学会総会シンポジウム。
27. 光山正雄 : 細胞内寄生菌のエスケープ機構と bacterial modulin、第 74 回日本感染症学会総会特別講演。
28. 光山正雄 : グラム陽性菌の溶血タンパク毒素に対するマクロファージのサイトカイン応答と感染防御、第 40 回日本リンパ網内系学会総会シンポジウム。
29. 光山正雄 : リステリアのエスケープ因子の菌側、宿主側にとっての異なる役割、第 53 回日本細菌学会九州支部総会シンポジウム。
30. Masao Mitsuyama : Essential role of hemolysin (LLO) of *Listeria monocytogenes* in the generation of protective immunity of the host . French -Japanese Workshop on Molecular Aspects of Bacterial Infections(Paris, France, May , 2000.)
31. Kawamura, I and Mitsuyama M : Characterization of bacterial toxin as an immunomodulator : Effect of listeriolysin O on host defense and analysis of its cytokine-inducing activity. 35th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy(Yokohama, Japan, July , 2000.)
32. Masao Mitsuyama : Thiol-activated cytolysins from gram-positive bacteria as a possible new bacterial modulin : Implication in the immune response. 5th Korea-Japan International Symposium on Microbiology(Kyongju, Korea, October, 2000.)