

遺伝子を挿入した。これらプラスミドをリン酸カルシウム沈殿法で、パッケージング細胞株である Phoenix 細胞に導入し、培養上清中に ecotropic retrovirus を得た。これらのレトロウイルスを 2) で得た DC に spin infection 法 (2,000g, 2 時間) で感染させ、その後、GM-CSF と IL-4 の存在下で 48 時間培養した。

- 4) DC ワクチンの接種と免疫能の測定：
1× 10⁶ 個の DC ワクチンをマウス尾静脈より、2 週間隔で 2 回接種し、最終免疫 2 ヶ月後に PPD に対する抗体産生能、T 細胞増殖性反応、IFN-γ 産生能を測定した。
- 5) 組換えリステリア・ワクチンの経鼻免疫：昨年度の研究で得られた弱毒リステリア Δ 株に結核菌の主要防御抗原である MTB51(=MPT51)を発現する DNA ワクチンを導入した組換えリステリア・ワクチンを用いた。この組換えリステリア(10⁶CFU/15 μl PBS) を 3 週間隔で 2 回経鼻免疫した。
- 6) ケモカイン融合ワクチンの作製：ケモカイン CCL3 を 14 アミノ酸のスペーサーを挟んで MTB51 と結合させたケモカイン融合蛋白を発現する DNA ワクチンを構築した。

(倫理面への配慮)

この研究で行った動物実験は浜松医科大学動物実験指針に沿って計画され、動物実験委員会で承認を受けた。

C. 研究結果

1. レトロウイルス導入 DC ワクチン

- 1) GFP を発現するレトロウイルスを用いて、DC への感染効率を検討したところ、我々のシステムでは 30 ~ 40 % と高率に感染することが判明した(図 1)。

また、レトロウイルス感染細胞の表面抗原を検討したところ、MHC クラス II, CD40, CD80, CD86 分子を強く発現しており、成熟 DC の形質を示した(図 2)。

- 2) 抗体産生：Ag85A または Ag85B DC ワクチンで免疫したマウスの血清中の PPD に対する抗体価を ELISA で測定したところ、BCG 免疫マウスと同等の抗体価が得られた。コロラド州立大学の J. T. Belisle 博士より供与された精製 Ag85A および Ag85B 蛋白に対しても同様の結果が得られた。
 - 3) T 細胞増殖反応：DC ワクチンを免疫したマウスの脾細胞を PPD で刺激したところ、Ag85A, Ag85B 共にナイーブ・マウス脾細胞に比し、有意に強い増殖性反応を示し、これらの反応は BCG に匹敵するものであった(図 3)。
 - 4) IFN-γ 産生：図 3 に示すように、Ag85A または Ag85B DC ワクチン免疫マウス脾細胞は PPD 刺激により、強い IFN-γ 産生能を示し、これらの反応は BCG 免疫マウスのそれを上回るものであった。また、特異性を検討するため、精製 Ag85A および精製 Ag85B 蛋白で刺激を行ったところ、PPD と同様に免疫脾細胞に IFN-γ 産生能が認められた(図 4)。
 - 5) 感染 4 週後の体重では、非免疫マウスおよびコントロール DC 免疫マウスは正常マウスに比し、著しく体重が減少したが、Ag85A+Ag85B-DC, Ag85A-DC, Ag85B-DC, BCG 免疫マウスでは何れも正常マウスと同程度であり(図 5)、これらの免疫の有効性を示した。
2. 組換えリステリア・ワクチンの経鼻免疫

肺指向性 T 細胞を感作するため、経鼻免疫を行った。昨年度の研究で我々が作製した弱毒リステリア株をキャリアとする DNA ワクチンは、リステリア自身が粘膜面に感染し、DNA ワクチンを抗原提示細胞の細胞質に運搬するので、経鼻免疫に最適と考えた。

組換えリステリア (MPB51) 経鼻免疫マウスの脾細胞、肺、縦隔リンパ節のリンパ球を分離し、p24-32 ペプチド (MPB51 の BALB/c マウス CD8+T 細胞エピトープ)、PPD, LLO91-99 ペプチド (リステリアの CD8+T 細胞エピトープ) で刺激した。p24-32 ペプチドに対する反応は MPB51 特異的であるが、IFN- γ 産生能は肺、縦隔リンパ節のリンパ球のみならず、脾臓リンパ球でも認められた。しかし、これらの反応はコントロール・リステリア免疫マウスでは認めなかった (図 6)。LLO91-99 ペプチドに対する反応はキャリアであるリステリアに対する免疫応答を示すが、検索した臓器全てのリンパ球で反応が認められた。

次に、この経鼻免疫を経静脈免疫と比較した。経静脈免疫では MPB51(p24-32) 特異的 T 細胞が脾臓リンパ球で効率よく誘導されたが、肺および縦隔リンパ節のリンパ球の感作は経鼻免疫に比して有意に低かった (図 7)。

3. ケモカイン融合ワクチンの作製

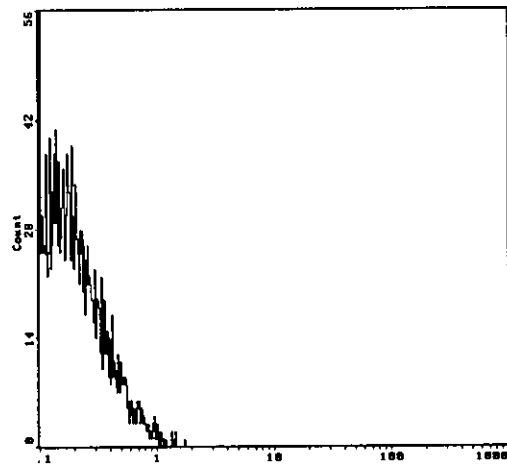
ケモカインの1つである CCL3 は未熟 DC に発現している受容体 CCR5 に結合する。また、T 細胞に直接作用して、Th1 細胞に分化させることが知られている。そこで CCL3 を 14 アミノ酸のスペーサーを挟んで MTB51 と結合させたケモカイン融合蛋白を発現する DNA ワクチンを構築した (図 8)。これにより、結核の免疫防御に重要な Th1 細胞を効率よく誘導することが期待される。このワクチンは現在マウス

に免疫中である。

4. アデノキメラウイルス・ワクチンの作製

アデノウイルス・ベクターは気道粘膜に効率良く感染するため、結核に対するワクチン作製用ベクターとしては最適であると考えられる。しかし、アデノウイルス・ワクチンは既存の抗体によって排除されること、および DC への感染効率が悪い等の問題点が指摘されている。そこで、我々はアデノウイルスのファイバーを DC に結合するものに変換したアデノキメラウイルス・ベクターを用いて、MPB51 および HSP65 を発現するワクチンを作製した。

Control



GFP(34%)

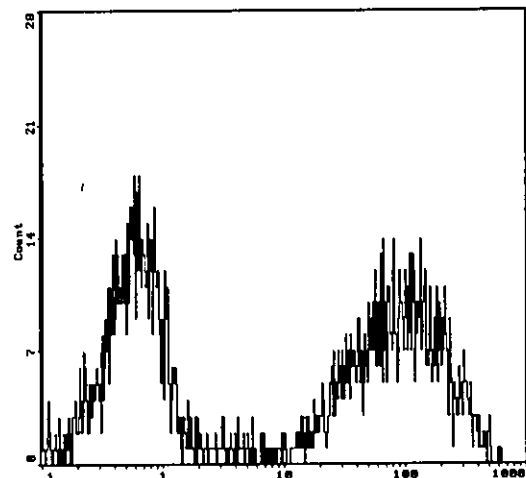


図1. レトロウイルスベクターの DC への感染効率

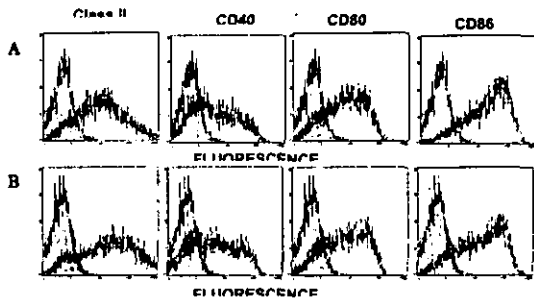


図2. レトロウイルス感染(B)及び非感染(A)DCにおけるMHCクラスII, CD40, CD80, CD86の発現

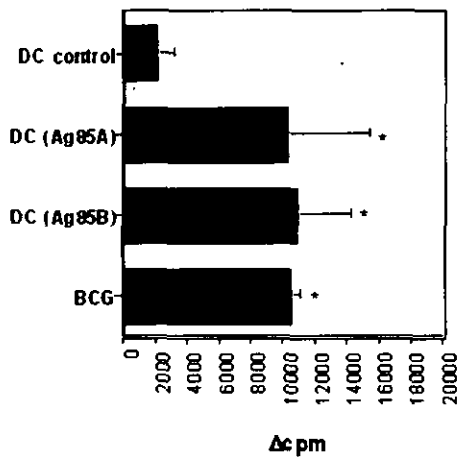


図3. 免疫脾細胞の増殖性反応

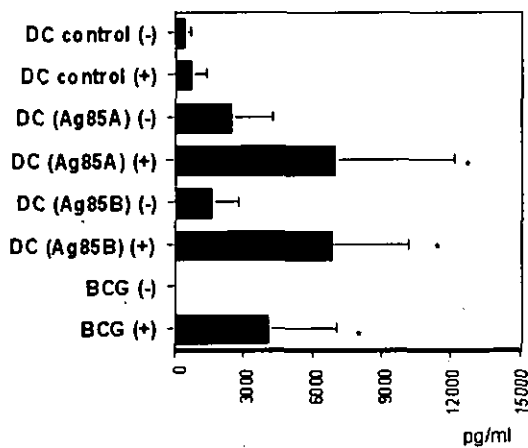


図4. 免疫脾細胞によるPPD特異的IFN- γ 産生
+: PPD刺激
-: PPD非刺激

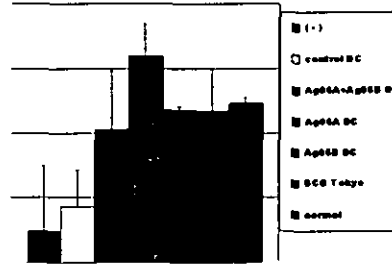


図5. 免疫及び非免疫マウスにおける結核菌感染4週後の体重

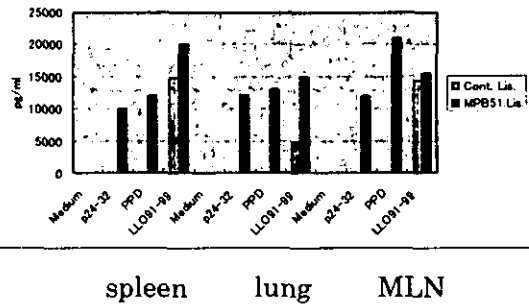


図6. 組換えリステリアワクチンの経鼻投与による脾臓、肺、縦隔リンパ節のリンパ球の感作。リンパ球をMBT51(p24-32ペプチド)、PPD、LLO91-99ペプチドで刺激し、IFN- γ 産生能をELISAで測定した

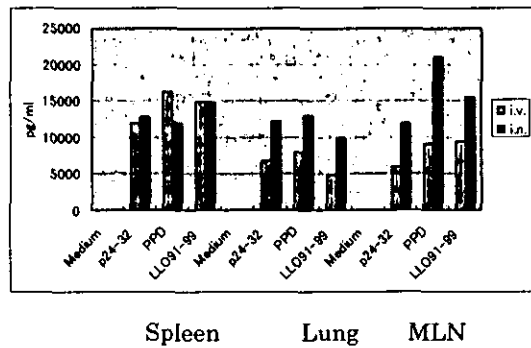


図7. 組換えリステリアワクチンの経鼻接種と経静脈接種の比較。免疫能はIFN- γ ELISAで検討した。

SS CCL3 14aa MPB51 遺伝子
図8. ケモカイン融合ワクチン

D. 考察

1. レトロウイルス導入 DC ワクチン

DC はナイーブ T 細胞に対する強力な抗原提示細胞として知られている。実際、腫瘍免疫では腫瘍抗原をパルスした DC がワクチンとして用いられている。我々はこれを更に進化させた DC ワクチンを作製した。このワクチンでは抗原を恒常的に発現させるためにレトロウイルス・ベクターを用いて結核の防御抗原 (Ag85A, Ag85B) 遺伝子を DC に導入し、抗原を強制発現させた。この DC ワクチンの静脈接種はマウスに特異的抗体、T 細胞増殖性反応、IFN- γ 産生を示した。このように Type I の免疫応答が誘導されるため、この免疫法は結核の感染防御を誘導されると考えられる。この感染防御能については、現在検討中である。この DC ワクチンはその性質上、多剤耐性結核などに対する治療用ワクチンとして有望であると考えられる。

2. 組換えリステリアワクチンによる経鼻接種

結核の防御免疫に有効な肺、気道粘膜の細胞性免疫を誘導させるため、リステリアをキャリアーとした MPB51 DNA ワクチンを経鼻接種した。その結果、経鼻免疫は気道免疫のみならず、全身免疫をも誘導することが判明した。しかし、経鼻免疫は経静脈免疫に比し、気道免疫を有効に誘導できることが判明した。このため、この方法は結核菌のエアロゾル感染に有効と考えられる。

ケモカイン融合ワクチン、アデノキメラウイルス・ワクチンは作製済みで、現在マウスに免疫中である。

以上の各種ワクチンを用い、最も有効な「感作—ブースター法」を確立する予定で

ある。また、接種法としては経鼻免疫を行う予定である。

E. 結論

結核の防御抗原を恒常的に強制発現させた、レトロウイルス導入 DC ワクチンはマウスに効率よく特異的細胞性免疫を誘導できることが判明した。組換え抗結核リステリアワクチンの点鼻は肺、縦隔リンパ節などの局所免疫のみならず、systemic な免疫を誘導することが判明した。

F. 健康危険情報

特記すべきものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koide Y, Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M.: Induction of protective cellular immunity against Mycobacterium tuberculosis by recombinant attenuated self-destructing Listeria monocytogenes strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 complex and MPB/MPT51. Keystone Symposia: Rational Design of Vaccine and Immunotherapeutics, 2004, p.67.
2. Tozawa K, Hanai H, Sugimoto K, Baba S, Sugimura H, Aoshi T, Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Evidence for the critical role of interleukin-12 but not interferon- γ in the pathogenesis of experimental colitis in mice. J Gastroenterol Hepatol 18(5):578-587, 2003.
3. Nakamura Y, Suda T, Nagata T, Aoshi T, Uchijima M, Yoshida A,

- Chida K, Koide Y, Nakamura H: Induction of protective immunity to *Listeria monocytogenes* with dendritic cells retrovirally transduced with a cytotoxic T lymphocyte epitope minigene. *Infect Immun* 71: 1748-1754, 2003.
4. Nagata T, Aoshi T, Suzuki M, Uchijima M, Koide Y: Induction of antigen-specific T-cell subsets by DNA vaccination. *Recent Research Development in Biophysics and Biochemistry*. 3: 89-106, 2003.
 5. Koide Y, Miki K, Nagata T, Suzuki M, Aoshi T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Okada M: Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using a DNA vaccine encoding MPB51 antigen carried by attenuated suicide *Listeria monocytogenes* and identification of T-cell epitopes of the antigen. Thirty-eighth Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, US-Japan Cooperative Medical Science Program 2003, p.32-38.
 6. Nagata T, Aoshi T, Uchijima M, Suzuki M, Koide Y: Cytotoxic T-lymphocyte-, and helper T-lymphocyte-oriented DNA Vaccine. *DNA and cell Biology*. 2004 23(2)93-106.
 7. Teramoto K, Kontani K, Ozaki Y, Sawai S, Tezuka N, Nagata T, Fujino S, Itoh Y, Taguchi O, Koide Y, Ohkubo I, Asai T, Ogasawara K: DNA Encoding a Pan-MHC Class II Peptide Analogue Augmented Antigen-specific Cellular Immunity and Suppressive Effects on Tumor Growth Elicited by DNA Vaccine Immunotherapy. *Cancer Res* 63: 7920- 7925, 2003.
 8. Nagatsu M, Terashita F, Koide Y: Low-temperature sterization with surface-wave-excited oxygen plasma. *Jpn J Appl Phys*. 42: L856-859, 2003.
 9. Uenoyama, S, Kobayashi T, Takenouchi Y, Yamashita K, Kazui T, Koide Y: Improvement of intestinal motility using S-methylisothiurea sulfate in a canine postoperative ileus model. *Am J Surg* 187 (1):93-937, 2004.
 10. Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M, Koide Y: Induction of protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 complex and MPB/MPT51. *Infect Immun* 2004 72(4) 2014-2021
 11. Suzuki M, Aoshi T, Nagata T, Koide Y: Identification of H2-Dd- and H2-Ab-restricted T-cell epitopes on a novel protective antigen, MPT51, of *Mycobacterium tuberculosis* (submitted for publication)
 12. 小出幸夫、永田 年: Ag85 分子 DNA ワクチンによる抗結核細胞性免疫の誘導 *Annual Review 免疫* 2004, 中外医学社 (印刷中)
2. 学会発表
 1. Nagata T, Aoshi T, Suzuki M,

- Uchijima M, Uchiyama T, Koide Y: Induction of a single helper T-cell epitope-specific T cells by Th-oriented minigene DNA vaccine against *Listeria monocytogenes*. American Society for Microbiology 103th General Meeting, May 18-22, 2003. (Washington DC)
2. Koide Y, Miki K, Nagata T, Suzuki M, Aoshi T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Okada M: Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using a DNA vaccine encoding MPB51 antigen carried by attenuated suicide *Listeria monocytogenes* and identification of T-cell epitopes of the antigen. Thirty-eighth Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, US-Japan Cooperative Medical Science Program, July 21-22, 2003. (Newark, New Jersey, USA)
 3. Suzuki M, Aoshi T, Nagata T, Koide Y: Identification of MHC-restricted T-cell epitopes in a novel protective antigen, MPT51, of *Mycobacterium tuberculosis*. 7th Asia-Oceania Histocompatibility Workshop and Conference, Sept. 16-19, 2003 (Karuizawa, Japan)
 4. Koide Y, Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M: Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 complex and MPB/MPT51. Keystone Symposia: Rational Design of Vaccine and Immunotherapeutics (Workshop 2), Jan. 6-11, 2004 (Keystone, Colorado, USA)
 5. Koide Y, Suzuki M, Aoshi T, Nagata T: Identification of MHC-restricted T-cell epitopes on a novel protective antigen, MPT51, of *Mycobacterium tuberculosis*. 11th International Congress on Infectious Diseases, March 4-7, 2004 (Cancun, Mexico)
 6. Nagata T, Miki K, Tanaka T, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M, Koide Y: Induction of protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 complex and MPB/MPT51. Keystone Symposia: The Pathogen-Host Standoff: Persistent and Latent Infection. March 25-30, 2004. (Taos, New Mexico, USA)
 7. 青枝大貴、鈴木美奈、永田 年、内嶋雅人、小出幸夫: T細胞エピトープ DNA ワクチンと全長蛋白発現 DNA ワクチンの免疫誘導能の比較. 第76回 日本細菌学会総会、2003年4月1-3日 (熊本)
 8. 内嶋雅人、永田 年、青枝大貴、小出幸夫: インターフェロンのγによるマウス TLR9 遺伝子発現誘導. 第76回 日本細菌学会総会、2003年4月1-3日 (熊本)
 9. 永田 年、青枝大貴、内嶋雅人、小出幸夫: 組換えレトロウイルス導入樹状細胞を用いた細胞内寄生菌に対する感

- 染防御免疫の誘導. 第 76 回 日本細菌学会総会、2003 年 4 月 1 - 3 日 (熊本)
10. 鈴木美奈、永田 年、青枝大貴、内嶋雅人、大原直也、小出幸夫：DNA ワクチンを用いた *Mycobacteria* 主要分泌タンパク MPB/MPT51 の T 細胞エピトープの同定. 第 76 回 日本細菌学会総会、2003 年 4 月 1 - 3 日 (熊本)
 11. 永田 年、青枝大貴、内嶋雅人、小出幸夫：組換えレトロウイルス導入樹状細胞を用いた結核菌特異免疫の誘導. 第 86 回 日本細菌学会関東支部会、2003 年 10 月 30、31 日 (横浜)
 12. 細井 茂、古木路子、細井俊伸、永田年、小出幸夫：新しいフィンガープリント法を用いた細菌の迅速同定法. 第 86 回 日本細菌学会関東支部会、2003 年 10 月 30、31 日 (横浜)
 13. 永田 年、田中高生、大原直也、内嶋雅人、岡田全司、小出幸夫：弱毒リステリアをキャリアとした Ag85 ファミリー分子 DNA ワクチンによる抗結核菌細胞性免疫の誘導. 第 33 回 日本免疫学会、平成 15 年 12 月 8 - 10 日 (福岡)
 14. 鈴木美奈、青枝大貴、永田 年、大原直也、小出幸夫：結核菌の新規感染防御抗原である MPT51 の H-2 および HLA-A 拘束性 T 細胞エピトープの同定. 第 33 回 日本免疫学会、平成 15 年 12 月 8 - 10 日 (福岡)
 15. 内嶋雅人、青枝大貴、永田 年、鈴木美奈、小出幸夫：免疫賦活性 CpG-DNA 配列により発現誘導される iNOS 遺伝子の転写調節機構. 第 26 回 日本分子生物学会、平成 15 年 12 月 10 - 13 日 (神戸)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 1. 「結核菌防御抗原 MPT51 の HLA-A*0201 拘束性 T 細胞エピトープ」
 2. 「新規遺伝子解析法による細菌の迅速同定法」

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

（研究協力者）研究報告書

結核菌感染ヒトマクロファージにおける NRAMP1 の発現及び MAP カイネース活性化の解析に関する研究

研究協力者 赤川清子 国立感染症研究所 免疫部 第4室 室長

研究要旨

ヒト単球より M-CSF で誘導した M 型 M ϕ は、結核菌の殺菌を誘導するとともに、結核菌感染により NRAMP1 の発現が増強し、p38MAPK、ERK1/2、JNK のいずれの MAP キナーゼも活性化が強く認められた。一方、ヒト単球より GM-CSF で誘導した GM 型 M ϕ はヒトの肺胞 M ϕ に形質が似ているが、この M ϕ は、結核菌の増殖を誘導し、結核菌感染により NRAMP1 の発現が抑制され、またいずれの MAP キナーゼの活性化もほとんど認められなかった。これらの結果より、NRAMP1 遺伝子の発現の違いや MAP カイネースの活性化の違いが M 型 M ϕ と GM 型 M ϕ における結核菌殺菌活性の違いと関連する可能性が示唆された。

A. 研究目的

マクロファージ(M ϕ)は、結核菌の増殖や殺菌に重要な役割を果たしている。ヒト M ϕ 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、抗原提示機能等) の異なる 2 種類の M ϕ (それぞれ M 型 M ϕ 及び GM 型 M ϕ と称す) への分化が誘導されること、また、GM 型 M ϕ は、ヒトの肺胞 M ϕ に形質が似ていることを報告した。これらの 2 種類の M ϕ の結核菌に対する感染感受性を検

討した結果、M 型 M ϕ は殺菌を GM 型 M ϕ は菌の増殖を誘導することを認めた。マウスでは M ϕ の結核菌殺菌機構として、iNOS の活性化と NO 産生が重要なことが報告されているが、M 型 M ϕ の結核菌の殺菌作用は、NO とは関係ないこと、またカタラーゼ添加でも結核菌殺菌能はほとんど影響されなかったことより、NO や H₂O₂ は M 型 M ϕ の殺菌活性とは関連しないことが知られた。これらの結果は、必ずしもヒト M ϕ の結核菌殺菌機構はマウス M ϕ のそれと同じでないことを示している。

そこで、本研究では、ヒト単球由来の 2 つの M ϕ における結核菌感染感受性の相違が、マウスの BCG 感染感受性を規定している自然抵抗性遺伝子 (Nramp1) のヒトホモログである NRAMP1 遺伝子の発現や、細胞内シグナル伝達機構 (MAP キナ

ーゼの活性)の活性化と関連するか否か検討を行った。

B. 研究方法

リコンビナントヒト (rh) GM-CSF は、Schering-Plough 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、正常ボランティアの末梢血よりリンホプ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 M-CSF (100ng/ml) および GM-CSF (50 ng/ml)存在下に 10%FCS を含む RPMI1640 培地で 1 週間培養し、M 型 M ϕ 及び GM 型 M ϕ を作製した。これらの M ϕ にヒト型結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv を moi 1-2 で感染させ、感染 6 日後に結核菌の CFU を測定して、菌の殺菌あるいは増殖を調べた。また、結核菌を感染させた M ϕ を SDS サンプルバッファーで溶解し、Western blot により NRAMP1 の発現及び MAP キナーゼの活性化を調べた。NRAMP1 の発現は、ヒト NRAMP1 に対する抗体 (鹿児島大学岸 文雄博士より供与) を用いて、また活性化 MAP キナーゼは、抗リン酸化 p38 MAP キナーゼ、抗リン酸化 p42/44 MAP キナーゼ、抗リン酸化 JNK キナーゼ 抗体を用いて検出した。

(倫理面への配慮)

正常ボランティアよりの血液の採取に関しては、インフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

M 型 M ϕ 及び GM 型 M ϕ の結核菌 H37Rv に対する殺菌能を検討した結果、GM 型 M ϕ は、結核菌の増殖の場として作

用すること、また M 型 M ϕ は、結核菌の殺菌を促すことが知られた。(図 1)

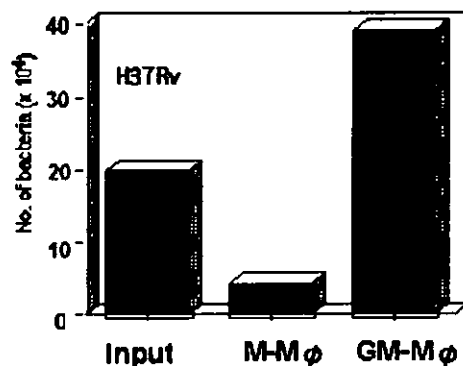


図1. Growth of *M. tuberculosis* in monocyte-derived macrophages

結核菌感染前には、M 型 M ϕ 及び GM 型 M ϕ のいずれにおいても、NRAMP1 の発現はある程度認められたが、結核菌感染後は、M 型 M ϕ では、その発現はさらに増強が認められたのに対し、GM 型 M ϕ では、逆に発現が抑制されることが知られた。(図 2)

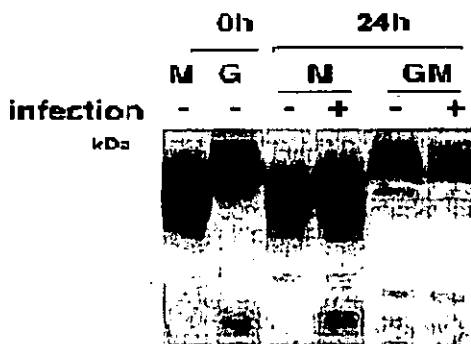


図2. NRAMP1 expression in *M. tuberculosis* infected human monocyte-derived macrophages

結核菌感染時の M ϕ 内の MAP キナーゼ

の活性化は、M型M ϕ において p38MAPK、ERK1/2、JNK のいずれも活性化が強く認められたが、GM型M ϕ では活性化はほとんど認められなかった。(図3)

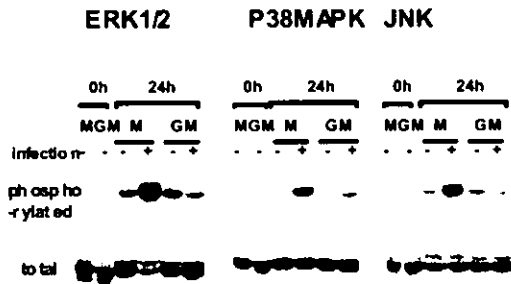


図3. Activation of MAPK in M.tuberculosis-infected human monocytes derived macrophages

D. 考察

NRAMP1 遺伝子のプロモータには多様性があることが知られているが、それらの多様性とヒトの結核感受性とが関連する可能性を示唆する患者の解析結果が、世界的にもいくつか報告されており、また日本の結核患者を用いた解析からも報告されている。今回の我々の単球由来M ϕ を用いた実験結果も、M ϕ の結核菌感染感受性とヒトのNRAMP1 遺伝子の発現が関連する可能性を示唆している。特に、結核菌が増殖するGM型M ϕ では、感染によりNRAMP1の発現が低下し、逆に殺菌活性が誘導されるM型M ϕ ではその発現が増強したことは、NRAMP1の発現が殺菌と直説関連する可能性を強く示唆する。また、M型M ϕ では感染によりMAPカインースの活性化が強く認められたのに、GM型M ϕ では活性化が認められなかったことより、MAPカインースの活性化も殺菌活性の活性化と関連すると考えられる。今後は、M ϕ の結核菌殺菌活性におけるNRAMP1の発現と

それぞれのMAPカインースの活性化の役割を明らかにするとともに、GM型M ϕ における結核菌の増殖を抑制し、殺菌を誘導する機構を開発することが大事であろう。

また既に、HIV-1の増殖はM型M ϕ で強くGM型M ϕ では抑制されることを報告したが、結核菌とHIV-1のM ϕ での増殖パターンは、今回報告したように異なる。HIV-1感染においては、Srcカインースの一つであるHck及び転写因子であるC/EBP β の2つのM ϕ における発現の違いが、それらのM ϕ におけるHIV-1の増殖の違いと関連することを既に明らかにしたが、結核菌の感染においてHckやC/EBP β の発現がどのように関連するのかも今後明らかにしなければいけないであろう。

E. 結論

結核菌の殺菌を誘導する、ヒト単球由来M型M ϕ は、結核菌感染により、NRAMP1の発現増強とMAPキナーゼの活性化を認めたが、結核菌の増殖を誘導するGM型M ϕ は、結核菌感染によりNRAMP1の発現は抑制され、MAPキナーゼの活性化はほとんど認められなかった。これらの結果より、NRAMP1遺伝子の発現の違いやMAPカインースの活性化の違いがM型M ϕ とGM型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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Komuro, I., Yokota, Y., Yasuda, S., Iwamoto, A., and Akagawa, K.S.: CSF-induced and HIV-1-mediated distinct regulation of Hck and

C/EBP represent a heterogeneous susceptibility of monocyte-derived macrophages to M-tropic HIV-1 infection (J. Exp. Med., 198: 443-453, 2003

2. Akagawa k. S. , Kanazawa H., Yamazaki T., Kishi F. and Haga S.: Differential activation of bactericidal activity, MAP kinase signaling and NRAMP1 expression in M-CSF-induced but not GM-CSF-induced human monocyte derived macrophages after infection with M.tuberculosis H37Rv. (in preparation)
3. Mitsuyama M, Akagawa K, Kobayashi K, Sugawara I, Kawakami K, Yamamoto S, Okada M.: Up-to-date understanding of tuberculosis immunity. Kekkaku. 2003, 78(1): 51-5.

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

（研究協力者）研究報告書

結核・非定型抗酸菌症患者血液を用いた予後・治療効果の予測

研究協力者 鈴木克洋 国立療養所近畿中央病院 臨床研究センター部長

研究要旨

結核患者、特に多剤耐性結核患者において、キラー T 細胞の殺傷タンパクである *granulysin* や *TRAIL* や *killer secretory protein 37(KSP37)* の発現が低下している事を明らかにした。難治抗酸菌症の発症、治療経過、予後に特に T リンパ球や血清中の *granulysin* 濃度が関連していることが予想され、その結果は難治抗酸菌症の発症要因や予後・治療効果の予測に際して、臨床上有益な知見をもたらす可能性が高いと思われた。一方、世界に先駆けてスーパー・スプレッター多剤耐性結核菌を発見した。この菌を用いて患者の免疫応答を解析中である。さらに岡田らは特異的なモノクローナル抗体や *KSP37* に特異的なモノクローナル抗体を作製したことにより患者の PBL と血清を用いて迅速な予後診断が可能となった。さらに呼吸器ネットワークを用い全国規模で検体を集める計画を立案した。

A. 研究目的

抗酸菌症の現在の問題点は、1) 各種免疫低下状態を背景とした難治・重症例の増加、2) 多剤耐性結核や *M. avium complex* 症を中心とした、現在の化学療法に高度に抵抗する菌株による感染症の蔓延、の 2 点にまとめられる。当院は大阪地区という全国で最も結核罹患率の高い地域の中核に位置しており、また塵肺等の基礎疾患を背景とした抗酸菌症例も多く、年間約 500 例の結核、約 200 例の非定型抗酸菌症の入院患者を経験している。結核例中には約 30-40 例の多剤耐性結核症も含まれている。さらに当院は全国の国立病院・療養所の呼吸器疾患の中心と位置づけられており、約 50 病院と呼吸器ネットワークを形成し、共同研究や標準的な治療法の開発・普及を実施している。

結核の感染防御において T リンパ球が

重要な役割を演じることは言うまでもないことであるが、その詳細は不明である。キラー T 細胞から産生される結核殺傷タンパクを解析して詳細を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法と研究結果及び考察

結核患者、特に多剤耐性結核患者において、キラー T 細胞の殺傷タンパクである *granulysin* や *TRAIL* や *killer secretory protein 37(KSP37)* の発現が低下している事を明らかにした。さらに、当院に豊富に存在する抗酸菌症例を利用し、特に難治感染症である多剤耐性結核と肺 MAC 症患者の末梢血を採取し、各種リンパ球の *granulysin*、*TRAIL*、*perforin*、*KSP37* の発現を FACS を用いて検討するとともに、血清中の濃度を当センターで開発した抗体を用いて測定した。さらに岡田らは

KSP37 に特異的なモノクローナル抗体を作製したことにより患者の PBL と血清を用いて迅速な予後診断が可能となった。難治抗酸菌症の発症、治療経過、予後に特に T リンパ球や血清中の granulysin 濃度が関連していることが予想され、その結果は難治抗酸菌症の発症要因や予後・治療効果の予測に際して、臨床上有益な知見をもたらす可能性が高いと思われた。さらに呼吸器ネットワークを用い全国規模で検体を集めることで、研究をより広範・精密にしておく予定である。

E. 結論

結核患者、特に多剤耐性結核患者において、キラー T 細胞の殺傷タンパクである granulysin や TRAIL の発現が低下している事を明らかにした。難治抗酸菌症の発症、治療経過、予後に特に T リンパ球や血清中の結核菌殺傷蛋白濃度が関連していることが予想され、その結果は難治抗酸菌症の発症要因や予後・治療効果の予測に際して、臨床上有益な知見をもたらす可能性が高いと思われた。さらに呼吸器ネットワークを用い全国規模で検体を集める計画を立案した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Okada M, Shigeto E, Harada N, Mitarai S, Suzuki K, Inoue Y, Tsuyuguchi K, Sasaki Y, GH Mazurek, Tsuyuguchi I.: Simple and accurate detection of tuberculosis infection in BCG vaccinated individuals using a whole blood interferon- γ assay and the Mycobacterium tuberculosis specific proteins ESAT-6 and CFP-10. Am.

J. Resp & Crit. Care Med. 2004, (in press).

2. Yotsumoto H, Yonemaru M, Suzuki K, Kawabe Y, Sasaki Y, Toyoda E, Yamagishi F, Kudoh K, Kurasawa T, Ito M, Kawashiro T, Sakatani M, Mori M.: A clinical study on tuberculosis among young adults in Japan: analysis on patients admitted to national hospitals in Kanto and Kinki-areas in the year 2000. Kekkaku. 2003, 78(8): 525-31.
3. Niimi A, Matsumoto H, Ueda T, Takemura M, Suzuki K, Tanaka E, Chin K, Mishima M, Amitani R: Impaired cough reflex in patients with recurrent pneumonia. Thorax 2004 58(2) 152-3
4. 鈴木克洋: 気管支結核、気管支鏡 医学書院 印刷中、2004
5. 鈴木克洋: Nursin Selection 呼吸器疾患感染症 肺結核、肺炎・肺化膿症 (木村謙太郎、松尾ミヨ子編) p94-105 2003
6. 露口一成、鈴木克洋: 抗結核薬「治療薬ガイド 2003-2004」抗結核薬 (和田攻、大久保昭行、矢崎義雄、大内尉義編) p591-594, 2003
7. 露口一成、鈴木克洋: 第 18 章 びまん性陰影を呈する感染性疾患 びまん性肺疾患の臨床・診断・管理・治療と症例・第 3 版(泉孝英監修) p230-239, 2003.
8. 露口一成、鈴木克洋, 坂谷光則: びまん性肺陰影を読む 非結核性抗酸菌感染症. 総合臨床 52 巻 6 号 Page1979-1984, 2003.06
9. 露口一成、鈴木克洋: 実地診療にすぐ役立つ 実践 抗生物質・抗菌薬療法ガイド 感染症別・原因菌別・薬剤

別 個別診療の全て 抗生物質・抗菌薬の特徴と使いかたのコツとポイント 抗結核薬. Medical Practice20 巻 臨増 Page186-190, 2003.08

2. 学会発表

1. 馬渡秀徳、新井徹、高藤淳、安藤守秀、林清二、坂谷光則、審良正則、山本暁、井上儀一、鈴木克洋: 急性腸炎が急性憎悪の原因と考えられた特発性肺線維症の一例. 第 170 回日本内科学会近畿地方会 2003.6
2. 坂谷光則、黒田修、井内敬二、井上義一、鈴木克洋、木村謙太郎: 気管支動脈塞栓術後の再咯血機序に関して示唆的であった気管支拡張症の一例. 第 91 回日本結核病学会第 61 回日本呼吸器学会近畿地方会 2003.6
3. 村井隆太、井上康、木村剛、西山明秀、高藤淳、新井徹、林清二、坂谷光則、露口一成、井上義一、鈴木克洋、木村謙太郎: 人工呼吸管理を要した急性呼吸不全合併肺結核症の臨床的検討. 第 91 回日本結核病学会第 61 回日本呼吸器学会近畿地方会 2003.6
4. 露口一成、鈴木克洋、馬渡秀徳、南誠剛、新井徹、安藤守秀、村井隆太、林清二、井上義一、岡田全司、木村謙太郎、坂谷光則、佐々木秀文、後藤正志、奥村明之進、松村晃秀、井内敬二: 当院での肺アスペルギルス症に対するミカファンギンナトリウムの治療成績. 第 91 回日本結核病学会第 61 回日本呼吸器学会近畿地方会 2003.6
5. 新井徹、山内勢津子、安藤守秀、林清二、坂谷光則、井上義一、鈴木克洋、木村謙太郎、審良正則、山本暁: 肺結核治療後に発症し、早期の HRCT 像を検討し得た Pulmonary Langerhans'-cell histiocytosis の一例. 第 91 回日本結核病学会第 61 回日本呼吸器学会近畿地方会 2003.6
6. 石川秀雄、木村剛、安藤守秀、井上義一、鈴木克洋、林清二、岡田全司、木村謙太郎、井内敬二、坂谷光則: 気管支動脈塞栓術の IDC(interlocking detachablecoil)導入による成績向上について. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.03
7. 井上義一、審良正則、田中勲、新井徹、中田光、源誠二郎、松本久美、安藤守秀、鈴木克洋、林清二、岡田全司、木村謙太郎、坂谷光則: 三次元 CT による特発性肺胞蛋白症肺内リポプロテイン様物質定量の試みとその意義. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.03
8. 鈴木克洋、露口一成、村井隆太、井上康、高藤淳、新井徹、安藤守秀、源誠二郎、井上義一、林清二、坂谷光則: 症状が乏しく入院時発熱と有意な炎症反応がないため他疾患が疑われた細菌性肺炎の 6 症例. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.03
9. 岡田全司、田中高生、鈴木克洋、井上義一、露口一成、喜多洋子、木藤孝、RothelJim、露口泉夫、森享、坂谷光則、桑山さち子、村木裕美子、稲永由紀子、金丸典子、橋元里実、高井寛子、岡田知佳、渡邊悠子、森珠里、石崎邦子、松本久美、岡美穂、黒川恵理: QF2G(ESAT-6,CFP10)を用いた、新しい結核診断法の開発、及び ESAT-6 peptide 投与 SCID-PBL/hu による生体内免疫応答の解析. 第 78 回日本結核病学会総会 2003.4
10. 鈴木克洋: じん肺と結核 肺結核とじん肺. 第 78 回日本結核病学会総会 2003.4
11. 田中壽一、井内敬二、松村晃秀、奥村明之進、田村光信、後藤正志、出口寛、鈴木

克洋, 坂谷光則: 当院における非結核性肺抗酸菌症に対する外科治療成績. 第 78 回日本結核病学会総会 2003.4

12. 田村光信, 井内敬二, 松村晃秀, 奥村明之進, 田中壽一, 出口寛, 後藤正志, 鈴木克洋, 坂谷光則: 明らかな結核性病変が認められなかった気管支結核の 1 切除例. 第 78 回日本結核病学会総会 2003.4
13. 新井徹、安藤守秀、高藤淳、井上康、馬渡秀徳、南誠剛、鈴木真優美、林清二、坂谷光則、井上義一、鈴木克洋、露口一成、木村謙太郎、審良正則、山本暁、平田陽彦: 無症状で多発性浸潤陰影を示した女性の 1 例. 第 102 回びまん性肺疾患研究会 2003.08
14. 露口一成, 鈴木克洋, 坂谷光則, 坪井知正, 佐藤敦夫, 倉澤卓也, 岡村英生, 田村猛夏: 外来性再感染も含む多剤耐性結核菌による院内集団感染事例. K-net 近畿地区研究会 (第 33 回研究会) 2003.7

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

（研究協力者）研究報告書

IL-18 と感染免疫防御機構

研究協力者 柏村信一郎 兵庫医科大学・先端医学研究所
生体防御部門、講師

研究要旨

IL-18 がマラリア感染患者血清中で高値をしめす事が明らかとなった。マウスにおいて IL-18 の投与が強毒株のマラリア原虫感染に対して宿主抵抗性を亢進させる事、あるいは IL-18 遺伝子ノックアウトマウスでは宿主抵抗性が著しく低下する事がすでに明らかとなっており、これらの結果はヒトにおいても IL-18 が感染防御に重要な働きを持つことを示唆するものと考えられた。更に IL-18 が生体内における炎症マーカーとして臨床的に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

種々の疾患・病態に於ける IL-18 の発現を解析し、疾患・病態との関連を明らかにするとともに生理的意義を検討した。同時に IL-18 の感染抵抗性・宿主抵抗性に及ぼす影響を解析し、IL-18 遺伝子の DNA ワクチンのコンポーネントとしての応用の可能性を検討した。

B. 研究方法

種々の疾患の血清中 IL-18 濃度を ELISA 法にて測定し、病態との関連を検討した。また同時に IL-12 と IL-18 を単独もしくは、同時投与した場合の影響、血清中の各種サイトカイン、NO などのガス状メデイエーターの産生誘導および免疫担当細胞のカイネティックスについての解析をおこなった。またマラリア原虫感染マウスの系を用いて IL-18 の投与が宿主抵抗性に及ぼす影響を検討した。更に、IL-18 遺伝子ノックアウトマウスにマラリア原虫を感

染させた場合の宿主抵抗性についても検討を行った。同時にマラリア患者の血清中の IL-18 の濃度の測定を行った。

C. 研究結果・考察

IL-18 がマラリア感染患者血清中で高値をしめす事が明らかとなった(Nagamine Y., et al.)。我々の昨年度の研究の結果、マウスにおいて IL-18 の投与が強毒株のマラリア原虫感染に対して宿主抵抗性を亢進させる事、あるいは IL-18 遺伝子ノックアウトマウスでは宿主抵抗性が著しく低下する事がすでに明らかとなっており、これらの結果はヒトにおいても IL-18 が感染防御に重要な働きを持つことを示唆するものと考えられた。更に IL-18 が生体内における炎症マーカーとして臨床的に有用であることが示唆された (Kawasaki D. Et al., Kaneda M., et al)。この事は子宮内膜症との関連からも強く示唆される結果となった (Oku H. Et al.)。

平成 16 年度は以下の研究を計画している。

IL-18 の DNA ワクチンコンポーネントとしての可能性を検討する目的で分泌型 IL-18 をコードするプラスミドを作製する。作製したプラスミドを大原先生と吉田先生にこれを供与し、新たな DNA ワクチン用のプラスミドの構築を行う。

IL-18 は 24kDa の前駆体として産生され、caspase-1 によって N 末端の 32 アミノ酸が切断され生理活性を持つ IL-18 へと変換される。この 32 アミノ酸を取り除いた cDNA を PCR 法にて作製し TA-cloning vector (pCRII-TOPO, Invitrogen 社) をもちいてクローニングする。このベクターより成熟型 IL-18 遺伝子を切り出し、さらに免疫グロブリンの分泌シグナル配列を有するプラスミド、pSecTag2 (Invitrogen 社) の multiple cloning site に insert 後、配列の確認、培養細胞へのトランスフェクション、分泌の確認を行う。同時にプラスミドを大原先生と吉田先生に供与し、新たなワクチン用プラスミドの構築とその効果の検討を依頼する。

E. 結論

IL-18 がマラリア感染患者血清中で高値をしめす事が明らかとなった。マウスにおいて IL-18 の投与が強毒株のマラリア原虫感染に対して宿主抵抗性を亢進させる事、あるいは IL-18 遺伝子ノックアウトマウスでは宿主抵抗性が著しく低下する事がすでに明らかとなっており、これらの結果はヒトにおいても IL-18 が感染防御に重要な働きを持つことを示唆するものと考えられた。更に IL-18 が生体内における炎症マーカーとして臨床的に有用であることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagamine Y., Hayano M., Kashiwamura S., Okamura H., Nakanishi K., Krudsod S., Wilairatana P., Looareesuwan S. and Kojima S. Involvement of interleukin-18 in severe Plasmodium falciparum malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 2003, 97, 236-241
2. Kawasaki D., Tsujino T., Morimoto S., Fujioka Y., Naito Y., Okumura T., Matsunami M., Shimizu H., Yuba M., Ueda A., Ohyanagi M., Kashiwamura S., Okamura H. And Iwasaki T. Usefulness of circulating interleukin-18 concentration in acute myocardial infraction as a risk factor for late restenosis after emergency coronary angioplasty. Am. J. Cardiol., 2003, 91, 1258-1261
3. Kaneda M., Kashiwamura S., Ueda H., Sawada K., Sugihara A., Terada N., Kimura-Shimmyo A., Fukuda Y., Shimoyama T. and Okamura H. Inflammatory liver steatosis caused by IL-12 and IL-18. J. Interferon Cytokine Res., 2003, 23, 155-162
4. Oku H., Tsuji Y., Kashiwamura S-I., Adachi S., Kubota A., Okamura H. and Koyama K. Role of IL-18 in pathogenesis of endometriosis. Human Reproduction 19(3):709-14, 2004

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

（研究協力者）研究報告書

後天性免疫不全症候群(AIDS)患者の結核発症と
非結核性抗酸菌症患者の血清学的結核診断

研究協力者 服部俊夫 東北大学大学院医学系研究科感染病態学分野 教授

研究要旨

（目的）アジア各国での HIV 感染者の AIDS 発症における結核感染者、日本の非結核性抗酸菌患者の血清学的診断が可能か否か検討する。

（方法）中国東北部からの結核患者血清とカンボジアから結核発症の HIV 感染者血清を用いて抗結核抗体（TBGL 抗体）を測定を測定した。日本での非結核性抗酸菌患者にて現在日本 BCG 研究所で開発中の抗原を用いて非結核性抗酸菌患者の血清学診断が可能か否か検討した。

（結果）TBGL 抗体は中国東北部からの結核患者血清は 141 人中 75 人陽性であった。カンボジアからの結核発症患者及び HIV 陽性結核発症患者血清は 5 人中 1 人、20 人中 4 人がそれぞれ陽性であった。

日本での非結核性抗酸菌患者の非結核性抗酸菌抗原 6 種類について検討したところ、10 人中 9 人が少なくとも 1 種類以上の抗原に対し抗体が陽性となった。

（考察）中国、カンボジアからの結核患者血清の抗 TBGL 抗体陽性率は日本（昨年報告）より低く、菌種や患者の背景因子を検討する必要があると考えられた。また、非結核性抗酸菌症の血清診断は、日本では有用であると思われた。

共同研究者 芦野有悟 東北大学大学院医学系研究科感染病態学分野 助手

A. 研究目的

2000 年の統計では、世界で結核は 170 万人の命を奪っている。その中でアジア各国の結核ワクチン使用適応者で、問題となるのは HIV 感染者の AIDS 発症の結核症である。ワクチンは予防のみならず治療効果も期待できることから、我々は、ワクチンを投与するには、被験者ないし患者の結核の診断を迅速につけること、また、HIV 感染患者では、感染後疾患の治療中、免疫再構築症候群が起きることから患者の免疫

能を知ることが重要と考えた。結核の診断は抗酸菌の排出の有無が必要であるが鑑別の一番にあげねばならぬものに非定型抗酸菌がある。アジア各国の地方都市では PCR 検査もままならず、結核の診断、鑑別診を行う検査は安価で確実であることが要求される。そこで抗結核抗体（TBGL 抗体）を測定しアジア各国での結核ないし AIDS 患者に対する免疫応答を検討し、さらに、日本の非結核性抗酸菌患者にて現在日本 BCG 研究所で開発中の Mycobacterium

avium(M. Avium)抗原を用いて非結核性抗酸菌患者の血清学診断が可能か否か検討した。

B. 研究方法

I-1 アジア各国での結核診断における抗 TBGL 抗体の測定； 中国東北部からの血清を入手した。内訳は結核患者 141 人、HIV 感染者 31 人、健常者 87 人であった。また、カンボジアから結核を発症している HIV 感染者 20 人、結核単独発症者 5 人の血清を得た。(国立感染研：吉原先生より)。これらの患者にて TDM (トレハロース 6, 6'-ジマイコレート) を中心とした結核菌菌体膜の糖脂質抗原に対する血清中の抗体 (抗 TBGL 抗体) をエンザイムイムノアッセイにより検出した。

II-1 日本における非結核性抗酸菌患者の非結核性抗酸菌抗原に対する各種抗体の測定； 当院に通院中の非結核性抗酸菌症患者で排菌(M. Avium)陽性者 9 人に対して日本 BCG 研究所の矢野先生の協力にて非結核性抗酸菌抗原、排菌は認めないが気管支拡張像を呈し非結核性抗酸菌病が強く疑われる患者 1 人に対して PL-1 (tetraacyl phosphatidyl inositol dimannosides)、TDM-T (trehalose 6,6'-dimycolate)、TMM-T (trehalose 6-monomycolate)、TMM-M (trehalose 6-monomycolate)、GPL (glycopeptidolipid) に対する抗体を測定した。

C. 研究結果

I-2 測定結果； 中国東北部の結核患者 141 人の内抗 TBGL 抗体陽性者は 75 人であった。陽性率 53 %。HIV 感染者は 31 人中 3 人、陽性率 10 %。健常者 87 人中陽性者 7 人、陽性率 7 %であった。

カンボジアからの血清の測定では、HIV 感染 AIDS 発症の結核患者 20 人中 4 人が陽性で、結核のみの患者は 5 人中 1 人が陽性であった。

中国東北部の結核患者血清において抗 TBGL 抗体が上昇していることから診断に抗 TBGL 抗体の測定は有用の可能性はある。HIV 感染者の 10 %が陽性であったが、結核感染の有無は確定できなかった。しかしカンボジアの AIDS 発症結核患者では陽性率が低く、AIDS を伴わない結核患者でも同様であり、カンボジアで抗 TBGL 抗体の陽性率が低い理由は不明であり、今後の検討が必要である。

II-2 測定結果； 非結核性抗酸菌の排菌陽性者 10 人中 9 人が陽性を示した。排菌陰性者 1 人も陽性を示した。非結核性抗酸菌症の血清診断は、日本では有用である可能性が示唆された。今後、健常者での陽性率を測定し更に検討を加える必要があると思われる。

D. 考察

中国東北部の結核患者血清において抗 TBGL 抗体は高値を示した。しかし中国、カンボジア共に結核患者の抗 TBGL 抗体の陽性率は日本におけるそれより (昨年報告) 低く、抗 TBGL 抗体価の結果に各国間で違いが見られた。そこでまず各国での違いについて結核菌種によるものか、また我々が、昨年報告したように、栄養、特に葉酸代謝が測定結果に影響しているのか、宿主の背景因子を追求する必要がある。さらに抗 TBGL 抗体の産生機序を解明し測定結果の有効性を高める事が求められた。

非結核性抗酸菌症の血清診断は、日本では有用であると思われる。気管支拡張症の患者で排菌陰性であったにもかかわらず血清診断で陽性を示し、非結核性抗酸菌症が

十分示唆され、非排菌者における非結核性抗酸菌症の診断に結びつく可能性があった。今後海外の患者での血清にて検討が必要と思われた。

E. 結論

中国東北部の結核患者の診断に抗 TBGL 抗体測定は有用と考えられた。しかし日本の結核患者と比較して中国東北部とカンボジア結核患者の抗体陽性率は低く、この理由についてのさらなる検討が必要であった。

非結核性抗酸菌病患者の診断に非結核性抗酸菌病由来の 6 種の抗原に対する抗体検査は有用であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sano K, Shirota H, Terui T, Hattori T, and Tamura G.: Oligodeoxynucleotides without CpG Motifs Work as Adjuvant for the Induction of Th2 Differentiation in a Sequence-Independent Manner. *Journal of Immunology* Mar 1;170 (5):2367-73, 2003
2. Nishimaki K, Okada S, Miyamura K, Ohno I, Ashino Y, Sugawara T, Kondo T and Hattori T: The possible involvement of human herpesvirus type 6 in obliterative bronchiolitis after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 32:1103-1105, 2003
3. Ling H, Usami O, Xiao P, Gu H-G and Hattori T: The N-terminal of the V3 loop in HIV-1 gp120 is responsible for its conformation-dependent interaction with cell surface molecule(s) *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 20(2):213-8, 2004
4. Ashino J, Ashino Y, Okada S, Ohno I, Shiiba K, Sasaki I, Hattori T: Serum folate and Immunoglobulin status, and Clinical Course After Onset of Tuberculosis in Gastrectomized patients. submit
5. Takahashi T, Ichinose M, Inoue H, Shirato K, Hattori T, Takishima T.: Underdiagnosis and undertreatment of COPD in primary care settings. *Respirology.* 2003, 8(4):504-8.
6. Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, Koarai A, Tomaki M, Ogawa H, Komaki Y, Barnes PJ, Shirato K, Hattori T: Xanthine oxidase inhibition reduces reactive nitrogen species production in COPD airways. *Eur Respir J.* 2003, 22(3):457-61.
7. Sugiura H, Ichinose M, Yamagata S, Koarai A, Shirato K, Hattori T: Correlation between change in pulmonary function and suppression of reactive nitrogen species production following steroid treatment in COPD. *Thorax.* 2003, 58(4):299-305.
8. Koarai A, Ichinose M, Ishigaki Suzuki S, Yamagata S, Sugiura H, Sakurai E, Makabe-Kobayashi Y, Kuramasu A, Watanabe T, Shirato K, Hattori T, Ohtsu H.: Disruption of L-histidine decarboxylase reduces airway eosinophilia but not hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003, 167(5):758-63.
9. 芦野純子、芦野有悟、吉川健二郎、服部俊夫：抗酸菌感染症 結核 *日本臨床* 第 61 卷 増刊号 2 518-522, 2003