

表1

事例	初発患者	検診対象者	人数	年齢	ツ反発赤長径		QFT 結果			
				分布	30mm 未満	30mm 以上	陰性	判定 保留	陽 性	判定 不能
16	G 5 x 5M	IT研修受講者	40	21-53	25	15(3)	35	2	3	0
17	G 9 x 2.5M	バンド仲間	5	25-30	0	5(1)	3	1	1	0
18	G 5 x 3M	塗装会社従業員	7	21-63	4	3	7	0	0	0
19	G 5 x 1M	病院職員	16	23-48	9	7(1)	15	0	1	0
20	G 5 x 1M	清掃作業員	7	31-45	5	2	6	1	0	0
21	G 5 x 2M	生徒(1名QFTせず)	56	14-18	54(4)	2	42	9	4	0
22	G 2 x 2M	大学院同級生	40	21-36	23	17(1)	36	3	1	0
23	G 10 x 12M	鍍金工場従業員	20	35-75	17	3	19	1	0	0
24	G 6 x 5M	夜間高校 (3名ツ反せず)	35	16-73	26(1)	6(1)	31	2	2	0
25	G 5 x 3M	遊び仲間	13	13-21	8(2)	5	11(3)	0	2	0
				239	171	65	205	19	14	0

D. 考察

QFT陽性者は結核に感染していると考えられた。ただし、治療歴のある者や、以前から陰影をいわれているものも存在し、過去の感染であると考えられた例もある。また、ツベルクリン反応発赤長径が30mm未満でもQFT陽性の例もあり、ツ反では感染者を実際より多く判断してしまう反面、QFTでは感染と判断できる者を見落としている可能性があり、QFT検査の方が、ツベルクリン反応検査より、正しく結核感染を診断出来ると考えられた。中学生以下を含む集団ではQFT陰性者でツ反発赤径の大きい者がみられ、QFTだけで判断してよいとは言い難く思われ、年齢や地域の罹患率、接触状況を考慮にいった総合判断が必要であると考えられた。さらに対象者数を蓄積し、またQFT陰性者か

ら発病がないことを確認する必要があると考えられた。

E. 結論

QFT-2G検査は結核感染の有無を診断するのに有用な検査である。

特に陽性であった場合に結核感染があることは確実である。但し、いつ感染したかはQFT-2G検査では判定できないため、臨床情報を組み合わせた総合判断が必要である。

F. 健康危険情報

検査に伴う健康の危険はなかった。
予防内服の適応者を適切に判断でき、薬による健康被害の発生の可能性を抑制できたと考える。

結核の感染と発病診断におけるQuantiferon TB第二世代の有用性の検討

研究協力者 鈴木克洋 近畿中央胸部疾患センター 感染症研究部長

研究要旨

BCG接種が広範に普及している我が国で、ツベルクリン反応を用いて結核感染を正確に判定することは難しい。特に結核病棟をもつ病院職員では、ほとんど不可能と考えられる。近年結核菌特異的な抗原を用いてリンパ球を刺激し、インターフェロングamma産生量からBCGの影響を受けずに結核感染を正確に判定できるQuantiferon TB第二世代(QFT2G)が開発され、その有用性が内外で報告されている。本研究は結核病棟をもち常時結核菌にさらされている当院職員の結核感染対策におけるQFT2Gとツベルクリン反応の有用性を比較するために計画された。また胸部レントゲン上肺結核が疑われる症例の発病診断における有用性も認められた。

A. 研究目的

結核病棟をもつ病院での感染対策の柱の一つは結核を発病した職員を早期に発見することである。そのために半年に一度胸部レントゲンを撮影するとともに、結核の初期症状を十分に教育する必要がある。さらに発病前の感染の段階で発見し、発病を防止するために化学予防を実施することが求められている。しかし全国民にBCGを最大3回接種してきた我が国では、ツベルクリン反応で結核感染を正確に判定することが難しいことは周知の事実である。20歳のツベルクリン反応陽性率は80%に近いが、そのほとんどがBCGによる陽性であると考えられている。特に結核病棟を持つ旧国立療養所である当院職員は常時結核菌に曝露されており、ブースター効果のためツベルクリン反応が増強されていると思われるため、感染の有無を判定することは不可能に近い。近年BCGには存在せず結核菌に特異的な抗原であるESAT-6とCFP-10が遺伝子工学的手法で開発された。試験管内でリンパ球をこの2抗原で刺激し産生されるインターフェロングgamma (IFN) 量から、結核菌特異的な細胞性免疫の有無を判定する検査キットであるQuantiferon TB第二世代(QFT2G)が開発され、その有用性が内外で報告されている。結核菌特異的な細胞性免疫の存在は間接的に結核感染を示しているため、同キットを用いて結核の診断や集団感染事例での感染者の選定が可能になる。そこで結核病棟を多数もつ旧療養所である当院職員の結核感染がQFT2Gを用いて正確に判定できるのかツベルクリン反応と比較検討することを計画した。

また臨床的に結核の発病が疑われる症例に同検査を試行し、発病診断における有用性の検討も行った。

B. 研究方法

当院職員全員(約450名)に当計画を詳細に説明し、研究参加に同意した259名を対象とした。QFT2Gの測定はキットの説明書に従い実施した。ESAT-6、CFP-10のいずれかの抗原刺激でのIFN産生量が0.35

以上を陽性、0.1未満を陰性、間を疑陽性とした。

QFT2G採血後に通常通りにマントー法によるツベルクリン反応を実施した。判定も通常通り行い、発赤10mm以上を陽性、30mm以上を強反応、二重発赤・水泡・壊死がある場合を強陽性と判定した。結核感染を判定するゴールドスタンダードが存在しないため、QFT2Gとツベルクリンの妥当性は以下の二つの視点から判断した。

1) 結核罹患率の推移から計算した推定感染率との合致: 20歳で1.4%、30歳で3.3%、40歳で6.7%、50歳で14.9%が推定値である。一般に医療従事者での結核罹患率は一般人の2-3倍である事を勘案すると、当院職員の結核感染率は10-20%程度と推測される。

2) 臨床的な要因との相関の有無: 年齢が高いほど陽性率が高い、治療や化学予防の既往歴がある場合陽性率が高い、感染の危険性が高い(経験年数や職種など)ほど陽性率が高い、などの関係が認められるはずである。発病診断における有用性は、各種肺疾患にQFT2Gを施行し、最終診断と検査結果を突き合わせて検討した。

C. 研究結果

QFT2Gは12%が陽性(疑陽性も含めると21%)、一方ツベルクリン反応は、陽性96%、強反応(強陽性も含む)57%、強陽性34%であった。推定値に近いのはQFT2G陽性もしくは陽性+疑陽性であり、ツベルクリン反応は現在用いられているどの基準でも過剰に判断していると考えられた。年代ごとの推移を検討すると、QFT2G陽性率と疑陽性+陽性率ともに高齢になるほど上昇しているのに対して、ツベルクリン強陽性は30代で、強陽性+強反応は40代でそれぞれピークとなりその後低下している。結核治療や化学予防の有無との関係を検討したところ、QFT2Gの陽性率は有る群で無い群の3倍以上であったのに対してツベルクリン強陽性率は高々1.3倍であった。結核病棟をもつ病院での勤務年数5年未満と以上との比較をしたところ、QFT2G陽性率が以上群で約2.5倍であったのに対して、ツベルク

リン強陽性率にはほとんど差がなかった。職種ごとの検討では、QFT2G陽性者は医師・看護師・看護助手・検査技師に多く、事務職と薬剤師には皆無であった。一方ツベルクリン反応ではQFT2Gほど顕著な差を認めなかった。

当院で診断された結核患者でのQFT2Gの陽性と判定保留の割合は87%であり、臨床的に有用と考えられた。

D. 考察

結核罹患率が低下しているため、今後結核対策の重点を感染・未発病者への積極的な化学予防へとシフトしていく必要がある。特に結核感染の危険性が高い結核病棟を持つ病院職員は、早期に感染を見つけて化学予防を実施し、発病を極力阻止することが重要である。結核が発病し、入院患者へ感染を広げる危険性をなくすためである事は言うまでもない。しかしBCG接種を広範に実施してきた我が国で結核感染を正確に判定する方法がない点が問題であった。ツベルクリン反応を用いるとどのような基準でも、結核感染を過剰に判定することは専門家の常識である。これは少量の結核菌に常時曝露されている医療従事者では、感染に至らない場合でも、ブースター効果によりツベルクリン反応が増強されているためである。近年結核菌には存在するがBCGには存在しない抗原が開発され、それを用いてリンパ球を試験管内で刺激し産生されるIFN γ 量から、BCG免疫と関わりなく結核感染を判定する、QFT2Gキットが発売されその有用性が内外で報告されている。本研究は結核病棟を多数もつ病院での職員の結核感染の判定にQFT2Gが有用かどうか、ツベルクリン反応と比較するものである。計画は2年間で今回は中間報告となる。来年度再度QFT2Gとツベルクリン反応を実施して新たな感染者の発見への有用性を検討する。

今回の検討では、QFT2G陽性率は12%、一方ツベルクリン強陽性者は34%であり、一般人の結核感染推定率から予想した10-20%の範囲内であったのはQFT2Gであった。年齢が高いほどQFT2G陽性率は上昇したが、ツベルクリン反応の強さは30-40代にピークを持ち以後低下した。結核治療や化学予防歴があるとQFT2G陽性率は明らかに高かったが、ツベルクリン反応の強さには差がなかった。結核病棟をもつ病院での勤務年数、また職種での検討でもQFT2Gがより正確に結核感染を判定していることは明らかであった。結核病棟を多数抱える当院職員の結核感染の判定は最も難しいものと考えられる。当院職員においてQFT2Gの有用性が明らかになれば、今後同法の結果を我が国でのゴールドスタンダードとして用いることが可能となるであろう。また肺結核の発病診断においても判定保留も陽性とする事で、感度が87%となり臨床的に有用と判定された。

E. 結論

当院職員の結核感染の有無を判定する方法として、QFT2Gはツベルクリン反応より明らかに優れていた。今後同法を用いて感染早期の未発病職員を発見し積極的に化学予防することが、結核院内感染対策の重要な柱になるであろう。また結核の発病診断にも有用であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, Tomita M, Fujiyama R, Tanaka N, Kawakami Y, Ito M. : Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on Mycobacterium tuberculosis strains predominated by the Beijing family. FEMS Microbiol Lett. 270(1):67-74. 2007
2. 御手洗聡、小林郁夫、阿部千代治、和田雅子、鈴木克洋、高島哲也、川辺芳子、町田和子、田野正夫、瀧川修一、鎌田有珠、重藤えり子、藤井俊司、森健一、須山尚史、矢野修一、川城丈夫、尾形英雄. バクテックMGIT960結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ (MGIT AST) および小川標準法によるイソニアジド低濃度薬剤感受性検査の判定不一致に関する検討. 結核82(5):449-454, 2007
3. 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岡田全司、坂谷光則: 結核菌の分子疫学的解析—多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌の比較— 結核 82:531-550, 2007
4. 鈴木克洋: わが国における結核の現状とクオノンフェロン検査. Schneller 62:20-25, 2007
5. 鈴木克洋: 結核患者院内発生時の対応— QuantiFERONの可能性も含めて. 感染症37(3): 105-108, 2007
6. 審良正則、鈴木克洋、喜久山綾乃: 肺結核の典型像、非典型像. 日本医事新報 4358:53-56, 2007
7. 鈴木克洋、審良正則、喜久山綾乃: 肺非結核性抗酸菌症の画像所見. 日本医事新報 4362:53-56, 2007
8. 鈴木克洋: 非結核性抗酸菌症、小児科診療 71(1):83-88, 2008

2. 学会発表

1. 鈴木克洋：肺カンサシ症の病態と治療 「ワークショップ 非結核性抗酸菌症の病態と治療」第47回日本呼吸器学会学術講演会 (2007 5.12 東京)
2. 鈴木克洋：そこが知りたい結核の臨床 「呼吸器学会・結核病学会合同プログラム 未来に繋がる結核対策」第47回日本呼吸器学会学術講演会 (2007 5.11 東京)
3. 鈴木克洋：非結核性抗酸菌症の診断と治療 教育講演 第81回日本感染症学会 (2007 4.10 京都)
4. 鈴木克洋：多剤耐性結核 教育講演 第82回日本結核病学会学術講演会 (2007、6.6 大阪)
5. 鈴木克洋：難治抗酸菌感染症の治療 「合同シンポジウム感染症成立機構と化学療法—難治感染症の克服」第50日本感染症学会中日本地方会・第55回日本化学療法学会西日本支部総会 (2007.10.30. 神戸)
6. 鈴木克洋：肺真菌症の診断と治療—新しい抗真菌薬を中心に—教育セミナー 第70回日本呼吸器学会近畿地方会・第100回日本結核病学会近畿地方会 (2007.12.8、京都)

費用対効果の高い新規結核ワクチンの開発研究

研究協力者 吉田 栄人 自治医科大学 講師

研究要旨

ヒトへの臨床治験に向けて、安全でコストパフォーマンスに優れた改良型DNAワクチン (Hsp65遺伝子とヒトIL12p40p35遺伝子の両遺伝子を一つのプラスミドに挿入) を構築した。GMPレベルで、この改良型DNAワクチンを包埋したHVJエンベロープを生産し、サル実験を開始した。またNon-human viral vectorとして昆虫ウイルスの一種であるバキュロウイルス(AcNPV)を用いた新規結核ワクチンの開発を行っている。本年度はHsp65遺伝子を導入した3種類のAcNPVをマウスに接種し、その免疫応答および感染防御効果を検討した。その結果、明確な感染防御効果は見られなかった。

A. 研究目的

費用対効果に優れたBCGに代わる強力な新規結核ワクチンを開発する。

B. 研究計画

IL-12遺伝子を”DNAアジュバンド”としたHsp65結核DNAワクチンをHVJエンベロープに包埋し (Hsp65+IL-12/Env)、これを実験モデル動物 (マウス、モルモット、カニクイザル) に接種する。結核菌のエアゾル感染を行い、ワクチン効果を解析する。これらの動物実験結果をもとに、プロトタイプの改良および臨床試験申請のためのデータをまとめる。またDNAワクチンとは別に新規ワクチンベクターとしてバキュロウイルスベクターの改良を行う。

C. 研究成果とD. 考察

費用対効果のさらなる効率化を目指し、生産コストが非常に安価なワクチンベクターとしてバキュロウイルスの改良型ベクターを開発した。バキュロウイルスはヒトに感染しない安全性の高いウイルスベクターである。昨年度作製した (i) Hsp65タンパクをウイルスピリオン上に提示した組換えバキュロウイルス (AcNPV-Hsp65surf) (ii) Hsp65遺伝子をCMVプロモーター下流に挿入した組換えバキュロウイルス (AcNPV-CMV-Hsp65)の二種類の組換えバキュロウイルスに加え、AcNPV-Hsp65surfとAcNPV-CMV-Hsp65を合わせ持つ組換えバキュロウイルス (AcNPV-Dual-Hsp65) を構築した。これらのAcNPVをマウスに接種し、強毒結核菌でチャレンジを行った。その結果、AcNPV-Hsp65surf接種マウスではHsp65に対してIFN- γ 産生細胞が出現していることがELISPOT assayで確認された。しかし、肺からの菌分離ではコントロール群と有意な差は見られず、ワクチン効果は観察されなかった。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshida S, Shimada Y, Kondoh D, Kouzuma Y, Ghosh AK, Jacobs-Lorena M, Sinden RE.: Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. PLoS Pathogens (2007) in press.
2. Yoshida S, Sudo T, Niimi M, Tao L, Sun B, Kambayashi J, Watanabe H, Enjou L, Matsuoka H.: Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline anti-platelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. Blood 111:2007-14, 2008.
3. Yoshida S, Shimada Y, Watanabe H.: Novel approach toward infectious diseases--combating malaria by using genetically engineered mosquitoes. Nippon Rinsho 5:1715-26, 2007.
4. Yoshida S :Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. Vaccine 25 (16):2990-2993, 2007
5. 吉田栄人: マラリア防圧—遺伝子操作蚊からのアプローチ— (総説) . 治療2007 in press.
6. 吉田栄人: マラリアコントロールへの新たな挑戦—遺伝子操作によるマラリア非媒介蚊作製— (総説) . Medical Bio 4:70-77, 2007.

2. 学会発表

1. Yoshida S.: Generation of genetically

engineered mosquitoes refractory to malaria parasites –Challenge for malaria control through the genetic manipulation of its vector–. International Congress of Insect Biotechnology & Industry (2007) Korea.

2. Yoshida S, Sudo T, Watanabe H, Luo E, Matsuoka H, Ishii A.: An inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline anti-platelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. EMBO WORKSHOP 2007 “Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Diseases Vectors” (2007) Greece.
3. 吉田栄人: 遺伝子操作蚊を用いたハマダラカマラリア原虫の寄生適応性の解明 —マラリアコントロールに向けての新規戦略—。第48回日本熱帯医学学会特別講演 (2007) 大分。
4. 荒木一美、吉田栄人: ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii*) の merozoite surface protein-1₁₉ をウイルスベリオン上に提示した組換えバキュロウイルスのワクチン効果。第48回日本熱帯医学学会 (2007) 大分。
5. 嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、Eappen G. Abraham, Marcelo Jacobs-Lorena, Robert E. Sinden、吉田栄人: 海洋生物由来のレクチン CEL-III を発現する遺伝子操作蚊のマラリア伝播阻止効果。第76回日本寄生虫学会 (2007) 大阪。
6. 吉田栄人、周藤俊樹、松岡裕之、嶋田陽平、川崎昌則、長村芳恵、林秀樹、問可和之、山田能久: ハマダラカ唾液に含まれる抗血小板凝集活性を有する Anopheles Anti-Platelet Aggregation Protein。第59回日本衛生動物学会 (2007) 大阪。

F. 特許

1. 国際特許 PTC/JP2007/51295号 「Novel vaccine vector」 (2007年) Yoshida S, Ohba Y, Hariguchi T, Mizukoshi M, Kawasaki M, Matsumoto M.

G. その他 (新聞・雑誌報道)

1. 吉田栄人 「トランスジェニック蚊を駆使して人類の敵マラリア撲滅に挑む」 Techno Innovation (社団法人 農林水産先端技術産業振興センター) 66:52-53, 2007.

新規結核ワクチンとしてのリコンビナントBCGに関する研究

研究協力者 大原直也 国立感染症研究所 免疫部 室長

研究要旨

これまでに多種のリコンビナントBCG (rBCG) ワクチンが作製された。これらのrBCGを実用化するために薬剤耐性遺伝子をマーカーとして使用しない、栄養要求性を指標としたBCG宿主-ベクター系構築のための研究を行った。このためBCGチミン要求株とチミン合成遺伝子をマーカーとして保持しているプラスミドを作製した。その途上、これまで示唆されていることとは異なり、チミン合成経路の酵素thymidylate synthaseの遺伝子欠損株は必須ではないことが明らかになった。

A. 研究目的

現行のBCGワクチンは乳幼児に対して有効であるが、成人に対してはその効果が疑問視されている。そのため、現行のBCGに代わる著効なワクチンの開発が望まれている。組換えBCGは現行のBCGが持つ、長期・大人数の使用実績、安全性、安価といった利点を受け継ぎ、しかも効果を高めたワクチンとなりうる可能性が十分にある。その基礎研究は結核対策に直接的につながるものである。これまでに数多くの新規結核ワクチンの候補が作製されてきたが、その中で遺伝子組み換えによるリコンビナントBCG (rBCG) ワクチンは有力な候補として位置づけられている。rBCGは感染防御に有効な抗原あるいはサイトカイン等の遺伝子をBCGに導入したものであるが、これまでのrBCGのほとんどは、導入された遺伝子を乗せたベクターの保持の選択を、同時に導入した薬剤耐性マーカーを指標としている。特に結核の治療薬であるカナマイシン耐性遺伝子が多用されているのが現状である。rBCGの実用化を考えると薬剤耐性に関わる遺伝子を除くことが望ましい。そのため薬剤耐性遺伝子をマーカーとして使用しない、栄養要求性を指標としたBCG宿主-ベクター系の構築をおこなう。

B. 研究方法

BCGのチミジン合成に関与する酵素thymidylate synthase (TS) の遺伝子thyAおよびthyXの遺伝子をそれぞれの遺伝子上流および下流の領域を含めてクローニングする。昨年作製したthyX欠損株をもとにthyAとthyX ORFの二重欠損株を作製する。thyA 遺伝子に隣接した位置にカナマイシン耐性遺伝子 (aphII) に置換し、さらにthyA ORFとカナマイシン耐性遺伝子 (aphII) を挟む形でその前後に大腸菌λファージ組み換え酵素Creの認識配列であるlox配列を挿入したプラスミドを構築する。このプラスミドからthyA領域全体を切り出し、BCG thyX欠損株に導入する。カナマイシン耐性を指標として、ゲノム上のthyA領域が導入した

DNAに置換された株を選択する。次にアセトアミドで誘導されるスメグマ菌アセトアミダーゼ転写調節領域にCre遺伝子ORFをつなぎ、このcre発現カセットを抗酸菌-大腸菌シャトルベクターに挿入する。lox配列挿入株に導入をこのプラスミドで形質転換後、培地へのアセトアミド添加によりCre組換え酵素を発現させ、lox配列に挟まれたthyA領域をゲノムから取り除く。その後継代することによりCre発現用プラスミドを脱落させ、薬剤耐性遺伝子を含有しないチミン要求性株を作製する。

チミン合成遺伝子を乗せたプラスミドは大腸菌および抗酸菌で機能するプロモーターにthyAおよびthyXを結合させた発現カセット、大腸菌での複製起点および抗酸菌での複製起点より構成されるプラスミドを作製する。このプラスミドは大腸菌チミン要求株を用いることにより、薬剤耐性マーカーを含めずに構築する。

(倫理面への配慮)

特記なし

C. 研究結果

thyX欠損株をもとにthyA欠損株の作製を試みた。まずthyAあるいはthyXの単独欠損株を作製したと同様の方法で二重欠損株の作製を試み400個以上のクローンをスクリーニングしたが、目的の株を得ることはできなかった。次に、厳密に部位特異的組換えを起こすことが可能な大腸菌λファージのCre-loxシステムを応用した。研究方法に述べた方法で、ゲノム上にlox配列を挿入後、Cre発現プラスミドの導入を行なった。アセトアミドの添加によりCre組み換え酵素の発現が確認された。

thyXを選択マーカーとしたベクターは抗酸菌での複製起点としてpAL5000の最小領域、大腸菌での複製起点としてpBlueScriptIIの最小領域を用いて作製し、大腸菌チミン要求株でこのプラスミド保持の選択が確認された。

D. 考察

これまでの研究でチミン要求性を指標とした宿主-ベクター系を完成させるためにはthyAとthyX両遺伝子二重欠損株を作製する必要性が示された。しかしthyX欠損株の単純な相同組換えによるthyA欠損(二重欠損株)作製を試みたが目的の株は得られなかった。その理由としては、二重欠損株はチミン要求性であるので、発育速度が非常に遅く、選択できなかったことが考えられる。次に試みたCre-loxシステムは組み換え効率が高いため、目的のクローンを得られる可能性が高い。現時点で最終のスクリーニングをおこなっているところであり、近日中に作業を終える予定である。

E. 結論

チミン要求性を指標としたBCG宿主-ベクター系構築のための研究を行った。BCGではTSとしてthyAおよびthyXの両者を持つ。遺伝子欠損株による栄養要求株作製には両遺伝子欠損二重欠損株の作製が必要であったが、そのための組み換え法としては部位特異的高効率の組み換えシステムが必要であった。なお、大腸菌栄養要求株を用いたモデル実験でチミン要求性を指標とした宿主-ベクター系が成立することが示された。

F. 健康危険情報

一般の組み換えDNA実験に準ずる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hotokezaka H, Sakai E, Ohara N, Hotokezaka Y, Gonzales C, Matsuo K, Fujimura Y, Yoshida N, Nakayama K: TNF- α , lipopolysaccharide, and peptidoglycan induce cell fusion independently of RANKL at the latest step of differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells, *J Cell Biochem* 101: 122-134, 2007
2. Fukusaki T, Ohara N, Hara Y, Yoshimura A, Yoshiura K: Evidence for association between a Toll-like receptor 4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population, *J Periodont Res* 42: 541-545, 2007
3. Tang C, Yamada H, Shibata K, Maeda N, Yoshida S, Wajjwalku W, Ohara N, Yamada T, Kinoshita T, Yoshikai Y: Efficacy of Recombinant BCG Vaccine Secreting IL-15/Ag85B fusion protein on Protection against Mycobacterium tuberculosis, *J Infect Dis*, in press.
4. 岡部真裕子, 大原直也, 小林和夫, 結核, 保健の科学 49:691-697, 2007(総説)

2. 学会発表

1. Kondo Y, Yoshimura M, Ohara N, Shoji M, Yukitake H, Naito M, Fujiwara T, Koji Nakayama K: One of the bacterial tetratricopeptide repeat-containing proteins is involved in virulence of the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science, Feb 2007. Sendai, Japan.
2. Ohara N, Yoshimura M, Okabe M, Nakayama K, Kobayashi K: Construction and characterization of the thymidylate synthase mutants derived from BCG. China-Japan-US Tuberculosis Seminar and Forty-second Tuberculosis and Leprosy Research Conference: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. Sep 2007. Zhengzhou, China.
3. Tang C, Yamada H, Shibata K, Maeda N, Yoshida S, Wajjwalku W, Ohara N, Yamada T, Yoshikai Y: Efficacy of recombinant BCG vaccine secreting IL-15/Ag85B fusion protein on protection against Mycobacterium tuberculosis. China-Japan-US Tuberculosis Seminar and Forty-second Tuberculosis and Leprosy Research Conference: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. Sep 2007. Zhengzhou, China.
4. Ohara N: Recombinant BCG vaccines: current status. 2nd Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases. Nov 2007. Nagasaki, Japan.
5. 内藤真理子, 平川英樹, 山下敦士, 大原直也, 庄子幹郎, 中山恵介, 吉村文信, 久原哲, 服部正平, 林哲也, 中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 株の全ゲノム塩基配列決定, 第1回日本ゲノム微生物学会, 2007年3月
6. 大原直也: 細菌による破骨細胞分化の制御. ワークショップ骨と感染症研究の新展開, 第80回日本細菌学会総会, 2007年3月
7. 内藤真理子, 大原直也, 庄子幹郎, 中山恵介, 吉村文信, 林哲也, 中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277株の全ゲノム塩基配列決定, 第80回日本細菌学会総会, 2007年3月
8. 近藤好夫, 吉村満美子, 大原直也, 庄子幹郎, 雪竹英治, 内藤真理子, 藤原卓, 中山浩次:

Porphyromonas gingivalis のTPRドメイン蛋白質欠損株の解析、第80回日本細菌学会総会、2007年3月

9. 北里海雄、布施隆行、大原直也、渡辺健、小林信之：MIP-T3と微小管との結合機構の解析、平成19年度日本生化学会九州支部例会、2007年5月
10. 菊池有一郎、大原直也、上田青海、平井要、柴田幸永、中山浩次、藤村節夫：Porphyromonas gingivalis ECFシグマ因子群の遺伝子挿入変異株の作製、第49回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2007年8月
11. 内藤真理子、大原直也、庄子幹郎、吉村文信、中山浩次：Porphyromonas gingivalis ATCC33277株の全ゲノム塩基配列決定、第49回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2007年8月
12. Yoshimura A, Yamaguchi R, Kaneko T, Ohara N：日本人におけるTLR4 遺伝子多型と中等度および重度歯周炎との関連/Association between a TLR4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population. 第36回日本免疫学会総会・学術集会、2007年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特記なし

有用な結核対策（BCG及び結核感染特異的診断に関する費用対効果分析等）に関する研究

研究協力者 露口一成 NHO近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター室長

研究要旨

近年新たに開発された結核感染診断法であるクオンティフェロンTB-2G（以下QFT）につき、医療従事者および患者に対して施行しその有用性を検討した。医療従事者における検討では、ツベルクリン反応と比較してよりQFTが真の結核感染を反映していると考えられた。患者における検討では、QFTの陽性率は6割台であった。

A. 研究目的

クオンティフェロンTB-2G(以下QFT)は、近年新たに開発された結核感染の診断法であり、従来のツベルクリン反応（以下ツ反）に比べてBCGによる偽陽性がなく特異性に優れるという特徴がある。しかし、結核感染のgold standardが存在しない以上、その評価は相対的なものとならざるを得ない。今回、当近畿中央胸部疾患センターにおいて医療従事者および患者を対象としてQFTを行い、その背景因子との相関を検討することによりQFTの有用性を評価した。

B. 研究方法

当院において職員を対象としてツ反とQFT検査を同時に施行し、職員の年齢、職種等との関連を検討した。また、当院において患者を対象としてQFTを行い、その臨床的有用性につき検討した。

C. 研究結果

当院の職員を対象とした検討では、年代別のQFT陽性率/ツ反強陽性率は、それぞれ20代で6.1%/32.5%、30代で11.1%/42.0%、40代で16.7%/37.0%、50歳以上で24.4%/30.0%でありQFTは高年齢となるほど陽性率が高くなるのに対しツ反ではそのような傾向がみられなかった。また、結核病棟勤務年数、職種等との関係をもみても、より暴露機会が多い群においてQFT陽性率が高い傾向がみられたがツ反では必ずしも強陽性率との関連はみられなかった。

一方、患者を対象とした検討では、排菌陽性結核におけるQFT陽性率は67.4%、排菌陰性結核では60.6%、陈旧性肺結核では26.1%、肺M. avium complex症では7.1%、肺M. kansasii症では17.4%、肺腫瘍では24.2%、間質性肺炎・サルコイドーシスでは0%であった。

D. 考察

当院職員における検討では、より結核感染率が高いと予想される群において概ねQFT陽性率がより高いのに対しツ反はそのような傾向がみられず、ツ反よりQFTのほうが真の結核感染を反映していると考えられ

た。また、患者における検討では、排菌陽性結核における感度は6割台であった。また、肺腫瘍など非結核性疾患でも陽性例が少なからず存在することには注意が必要と考えられた。

E. 結論

QFT検査は、潜在性結核感染、結核症いずれにおいても結核感染を判定する上でツ反より有用であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岡田全司、坂谷光則：結核菌の分子疫学的解明 -多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌との比較- 結核. 2007; 82(6): 531-538
2. 新井徹、井上義一、安藤性實、井上幸治、露口一成、鈴木克洋、林清二、北市正則、審良正則、坂谷光則：胸部 CT にて多発性リング状陰影 (“reversed halo sign”)を呈した特発性器質化肺炎の1例 日本呼吸器学会雑誌. 2007; 45(8): 621-6
3. 露口一成、鈴木克洋：肺 M. avium complex (MAC) 症の診断と最近の動向. 日本胸部臨床. 66(7): 541-548, 2007
4. 露口一成、坂谷光則：非結核性抗酸菌（非定型抗酸菌）感染症. Circles. 2(8): 12-14, 2007
5. 露口一成：そのほかの結核の治療. 診断と治療. 95(11): 1981-5, 2007
6. 露口一成：Mycobacterium kansasii 株における分子疫学的解明 結核. 82:103-110, 2007
7. 露口一成：第 81 回総会シンポジウム III. 肺結核患者の新退院基準 -実際の運用と問題点について- 2.国立病院機構退院基準の実際と運用にお

2. 学会発表

1. 飯沼由嗣、露口一成、猪狩英俊、鈴木公典：アンケート調査結果からみた結核院内感染暴露のリスクアセスメント. 結核 82(4) p385. 第 82 回日本結核病学会総会、大阪、2007 年 6 月 5 日
2. 露口一成、吉田志緒美、鈴木克洋、岡田全司、坂谷光則：当院における多剤耐性結核の分子疫学的検討. 結核 82(4) p375. 第 82 回日本結核病学会総会、大阪、2007 年 6 月 6 日
3. 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岡田全司、富田元久、坂谷光則、末竹寿紀：ピラジナミド耐性遺伝子検出キットの有用性の検討. 結核 82(4) p416. 第 82 回日本結核病学会総会、大阪、2007 年 6 月 5 日
4. 露口一成、吉田志緒美、鈴木克洋、岡田全司、坂谷光則：血液透析を必要とする腎不全に合併した結核患者の臨床的検討. 結核 82(4) p442. 第 82 回日本結核病学会総会、大阪、2007 年 6 月 6 日
5. 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岡田全司、富田元久、坂谷光則：Line Probe Assay を用いた抗酸菌同定キットの有用性の検討. 第 99 回日本結核病学会近畿地方会、大阪、2007 年 6 月 30 日
6. 露口一成、吉田志緒美、源誠二郎、鈴木克洋、岡田全司、洪泰浩、林清二、坂谷光則：INH の予防内服により INH 耐性が誘導されたと考えられた結核の 1 症例. 第 99 回日本結核病学会近畿地方会、大阪、2007 年 6 月 30 日
7. 新井徹、井上義一、大塚淳司、高藤淳、源誠二郎、露口一成、鈴木克洋、林清二、坂谷光則、審良正則、北市正則：Hermansky-Pudlak 症候群の 1 例. 第 69 回日本呼吸器学会近畿地方会、大阪、2007 年 6 月 30 日
8. 香川智子、西山明秀、露口一成、鈴木克洋、林清二、坂谷光則、富田元久、北市正則. 喀痰塗沫陽性、Tb-PCR 偽陰性となった肺結核の一症例. 第 100 回日本結核病学会近畿地方会、京都、2007 年 12 月 8 日

研究成果の刊行に関する一覧表

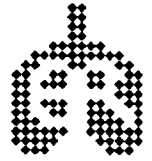
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
坂谷光則	Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB.	Vaccine	25(16)	2990-3	2007
坂谷光則	Pulmonary Mycobacterium avium complex infection associated with the IVS8-T5 allele of the CFTR gene.	Int J Tuberc Lung Dis	11(7)	808-13	2007
坂谷光則	Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models.	Vaccine	25(16)	3038-40	2007
坂谷光則	Molecular Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis- Comparison between Multidrug-Resistant Strains and Pan-Sensitive Strains.	Kekkaku	82(6)	531-8	2007
坂谷光則	Molecular epidemiological analysis of Mycobacterium kansasii isolates.	Kekkaku	82(2)	103-10	2007
坂谷光則	Novel Vaccination (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) Against Tuberculosis Using Cynomolgus Monkey.	" 13 th International Congress of Immunology " Edit Jorge Kalil, Edecio Cunha-Neto, Luiz Viente Rizzo, MEDIMOUUD Intern		119-122	2007
矢野郁也	Identification of trehalose dimycolate (cord factor) in Mycobacterium leprae.	FEBS Lett	581 (18)	3345-3350	2007
矢野郁也	Characterization of the fucosylation pathway in the biosynthesis of glycopeptidolipids from Mycobacterium avium complex.	J. Bacteriol	188	5515-6622	2007
矢野郁也	Evaluation of major membrane protein-II as a tool for serodiagnosis of leprosy.	FEMS Microbiol Lett	272	202-205	2007

矢野郁也	New packaging method of mycobacterial cell wall using octaarginine-modified liposomes: enhanced uptake by and immunostimulatory activity of dendritic cells.	J Controlled Res	120	60-69	2007
矢野郁也	Molecular and supra-molecular structure related differences in toxicity and granulomatogenic activity of mycobacterial cord factor in mice.	Microb Pathog	43(1)	10-21	2007
矢野郁也	Serological test and chest computed tomography findings in patients with Mycobacterium avium complex lung disease.	Eur Respir J	29	1217-1223	2007
矢野郁也	Structural characterization of a specific glycopeptidolipid containing a novel N-acyl-deoxy sugar from mycobacterium intracellulare serotype 7 and genetic analysis of its glycosylation pathway.	J Bacteriol	189(3)	1099-1108	2007
宮野前 健	小児結核感染診断におけるQuantiFERON TB-2Gの有用性に関する検討.	日本小児呼吸器疾患学会雑誌	18	127-136	2007
宮野前 健	症例に学ぶ-診断に苦慮する長引く発熱疾患 結核.	小児内科	39	2022-2026	2007
倉島篤行	Diagnosis of Active Tuberculous Serositis by Antigen-Specific Interferon-gamma Response of Cavity Fluid Cells.	Clinical Infectious Diseases	45	1559-1567	2007
原 寿郎	Association of IL12RB1 polymorphisms with susceptibility to and severity of tuberculosis in Japanese: a gene-based association analysis of 21 candidate genes.	Int J Immunogenet	34(1)	35-44	2007
原 寿郎	Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity.	J Exp Med	204 (10)	2407-2422	2007
原 寿郎	Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome.	Nature	448 (7157)	1058-1062	2007
原 寿郎	H2-M3-restricted CD8+ T cells induced by peptide-pulsed dendritic cells confer protection against Mycobacterium tuberculosis.	J Immunol	178(6)	3806-3813	2007

原 寿郎	原発性免疫不全症の遺伝子とコモンディジェーズ:UNC93B1と熱性痙攣 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業原発性免疫不全症候群に関する調査研究平成18年度総括・分担研究報告書			87-90	2007
原 寿郎	結核菌/非結核性抗酸菌に対する易感染性とIFN- γ /IL-12経路	日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会雑誌	27	9-19	2007
鈴木克洋	Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on Mycobacterium tuberculosis strains predominated by the Beijing family.	FEMS Microbiol Lett	270(1)	67-74	2007
鈴木克洋	非結核性抗酸菌症	小児科診療	71(1)	83-88	2008
鈴木克洋	Mycobacterium kansasii株における分子疫学的解析	結核	82(2)	103-110	2007
鈴木克洋	バクテックMGIT960結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ(MGIT AST)および小川標準法によるイソニアジド低濃度薬剤感受性検査の判定不一致に関する検討	結核	82(5)	449-454	2007
鈴木克洋	結核菌の分子疫学的解析－多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌の比較－	結核	82	531-550	2007
鈴木克洋	わが国における結核の現状とクオンチフェロン検査	Schneller	62	20-25	2007
鈴木克洋	結核患者院内発生時の対応－QuantiFERONの可能性も含めて	感染症	37(3)	105-108	2007
鈴木克洋	肺結核の典型像、非典型像	日本医事新報	4358	53-56	2007
鈴木克洋	肺非結核性抗酸菌症の画像所見	日本医事新報	4362	53-56	2007
吉田栄人	Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development.	PLoS Pathogens	3(12)	192	2007
吉田栄人	Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline anti-platelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito.	Blood	111	2007-2014	2007
吉田栄人	Novel approach toward infectious diseases--combating malaria by using genetically engineered mosquitoes.	Nippon Rinsho	5	1715-1726	2007
吉田栄人	Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB.	Vaccine	25(16)	2990-2993	2007

吉田栄人	マラリア防圧——遺伝子操作蚊からのアプローチ——(総説)	治療			2007 in press
吉田栄人	マラリアコントロールへの新たな挑戦——遺伝子操作によるマラリア非媒介蚊作製——(総説)	Medical Bio	4	70-77	2007
大原直也	TNF-alpha, lipopolysaccharide, and peptidoglycan induce cell fusion independently of RANKL at the latest step of differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells	J Cell Biochem	101	122-134	2007
大原直也	Evidence for association between a Toll-like receptor 4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population.	J Periodont Res	42	541-545	2007
大原直也	Efficacy of Recombinant BCG Vaccine Secreting IL-15/Ag85B fusion protein on Protection against Mycobacterium tuberculosis.	J Infect Dis			2007 in press
大原直也	結核	保健の科学	49	691-697	2007
露口一成	Mycobacterium kansasii株における分子疫学的解明	結核	82	103-110	2007
露口一成	第81回総会シンポジウム III. 肺結核患者の新退院基準 -実際の運用と問題点について- 2.国立病院機構退院基準の実際と運用における問題点	結核	82	129-132	2007
露口一成	結核菌の分子疫学的解明 - 多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌との比較-	結核	82(6)	531-538	2007
露口一成	胸部CTにて多発性リング状陰影 (“ reversed halo sign”)を呈した特発性器質化肺炎の1例	日本呼吸器学会雑誌	45(8)	621-626	2007
露口一成	肺M. avium complex (MAC)症の診断と最近の動向	日本胸部臨床	66(7)	541-548	2007
露口一成	非結核性抗酸菌(非定型抗酸菌)感染症.	Circles	2(8)	12-14	2007
露口一成	そのほかの結核の治療	診断と治療	95(11)	1981-1985	2007



Serological test and chest computed tomography findings in patients with *Mycobacterium avium* complex lung disease

S. Kitada*, Y. Nishiuchi[#], T. Hiraga*, N. Naka*, H. Hashimoto*, K. Yoshimura*, K. Miki*, M. Miki*, M. Motone*, T. Fujikawa*, K. Kobayashi[†], I. Yano[‡] and R. Maekura*

ABSTRACT: The present authors have previously reported the usefulness of a serodiagnostic test to detect serum glycopeptidolipid (GPL) core antibody in diagnosing *Mycobacterium avium* complex (MAC) lung disease in immunocompetent patients. The aim of the present study was to investigate correlations between the levels of antibody against GPL core and chest computed tomography (CCT) findings in patients with MAC lung disease.

A total of 47 patients with MAC-positive culture from their sputum and who had radiographic abnormalities were investigated. Thirty-three patients met the American Thoracic Society criteria for MAC disease; 14 did not. All patients underwent both CCT examination and the serodiagnostic test for MAC at the same time.

Small nodular shadows were seen on CCT in all 47 patients and bronchiectasis shadows were seen in 39 (83%) of them. There was a significant positive correlation between the extent of the disease and the level of GPL core immunoglobulin (Ig)A antibody. The levels of GPL core IgA antibody were significantly elevated in patients who had nodular shadows (10–30 mm) compared with patients who had small nodular shadows (<10 mm).

The present results document that the levels of immunoglobulin A antibody against glycopeptidolipid core correlate with the chest computed tomography findings of *Mycobacterium avium* complex lung disease.

KEYWORDS: Early stage, enzyme immunoassay, glycopeptidolipid, mycobacteria

It has long been recognised that *Mycobacterium avium* complex (MAC) is an important pathogen causing chronic pulmonary infection in immunocompetent individuals [1] and that the incidence of the disease has increased recently in Japan [2] and other countries [1, 3]. The diagnosis and management of MAC lung disease is therefore becoming a matter of increasing concern among respiratory physicians.

The present authors previously reported the usefulness of a serological test for diagnosis of MAC lung disease with a glycopeptidolipid (GPL) core antigen that was used for enzyme immunoassay [4]. The GPL core is a common structure of the GPL antigen, which is a major cell surface antigen in MAC and which is not present in the cell wall of either *M. tuberculosis* complex or *M. kansasii* [5, 6]. The present authors examined the usefulness of the GPL serodiagnostic test in immunocompetent patients with lung disease

and found that MAC lung disease could be clearly differentiated from colonisation with MAC and from lung diseases caused by either *M. tuberculosis* or *M. kansasii*. The sensitivity and specificity of the test for diagnosing MAC lung disease were 92.5 and 95.1%, respectively, for immunoglobulin (Ig)A. Combining this serodiagnostic test with the criteria advocated by the American Thoracic Society (ATS) for nontuberculous mycobacterial respiratory disease in 1997 [7] facilitated easier and more rapid definitive diagnosis of MAC lung disease.

Moreover, the levels of GPL core antibodies reflected disease activity because they decreased in MAC patients responding to chemotherapy [4]. However, correlations between levels of GPL core antibody and radiographic findings have not been evaluated thus far. Therefore, the present authors assess herein the levels of GPL core antibody in relation to chest computed tomography (CCT)

AFFILIATIONS

*Dept of Internal Medicine, National Hospital Organization Toneyama National Hospital, and
*Toneyama Institute for Tuberculosis Research, Osaka,
[#]Dept of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, and
[†]Japan BCG Laboratory, Tokyo, Japan.

CORRESPONDENCE

S. Kitada
Dept of Internal Medicine
National Hospital Organization
National Toneyama Hospital
5-1-1 Toneyama
Toyonaka-shi
Osaka 560-8552
Japan
Fax: 81 668533127
E-mail: kitadas@
toneyama.hosp.go.jp

Received:

May 09 2006

Accepted after revision:

January 09 2007

STATEMENT OF INTEREST

None declared.

European Respiratory Journal
Print ISSN 0903-1936
Online ISSN 1399-3003

findings in patients with MAC-culture positive sputum whose radiographic findings were infiltrate, nodular cavitory lesions or bronchiectasis and/or multiple small nodules.

MATERIAL AND METHODS

Study subjects

A total of 47 patients were enrolled at the National Hospital Organization (NHO) National Toneyama Hospital (Osaka, Japan) between September 2001 and May 2004. They fulfilled the following criteria: 1) MAC-positive cultures from sputum; 2) abnormal shadows that were infiltrate, nodular cavitory lesions or bronchiectasis and/or multiple small nodules on their chest radiographs; and 3) no predisposing lung disease. Patients were divided into two groups (the MAC disease group and the MAC-culture positive group) based on the guidelines advocated by the ATS (table 1) [7]. The individuals who had a single and small amount of culture-positive MAC but did not have clinical symptoms and had no abnormal lesions on CCT findings were excluded from the present study as contaminated respiratory specimens. These cases did not have evidence of active disease.

Of the 47 patients with MAC-positive cultures, 30 met the ATS criteria at enrolment. Patients who did not meet these criteria were followed up for 12 months with monthly radiographic and sputum examination with Ziehl-Neelsen stains and cultures on Ogawa egg medium. Three patients met the criteria; 14 patients still had not over the 12-month follow-up period after enrolment. Based on these observations, the subjects were divided into the MAC disease group, which was composed of 33 patients who met the ATS criteria, and the MAC-culture positive group, which was composed of 14

patients who did not. All patients underwent CCT examination and a serodiagnostic test at the same time. These took place when the diagnosis of MAC lung disease was made in the MAC disease group or when the follow-up period ended in the MAC-culture positive group. Clinical data were collected from each patient at the time of computed tomography (CT); these included sex, age, body mass index, smoking history, drinking history, complications, past history and laboratory data, including erythrocyte sedimentation rate, and GPL core IgG, IgA and IgM antibody. The present authors investigated whether there was a correlation between GPL core antibody level and CCT findings. Of the MAC disease group, 15 patients had previously received combination chemotherapy for mycobacterial diseases recommended by the ATS guideline before enrolment, but they had positive cultures of MAC at enrolment. All patients were seronegative for HIV types 1 and 2. Informed consent was obtained from all patients. The present study was approved by the NHO National Toneyama Hospital institutional review board for experimentation on human subjects and complies with international guidelines for studies involving humans.

CCT findings

All patients underwent conventional CT examination. CCT scans were obtained using a Toshiba Asteion TSZ-021A CT scanner (Toshiba, Tokyo, Japan). The CCT findings were categorised into small nodular shadow (<10 mm), nodular shadow (10–30 mm), large nodular shadow (>30 mm) or infiltrate, bronchiectasis, cavity and atelectasis. CCT findings were assessed by a consensus reading performed by two individual respiratory physicians without prior knowledge of the clinical or laboratory data. To assess the extent of disease,

TABLE 1 Criteria for diagnosis of *Mycobacterium avium* complex lung disease

Clinical criteria	<ol style="list-style-type: none"> 1) Compatible signs and symptoms (coughing, fatigue more common; weight loss, haemoptysis and shortness of breath may be present, particularly in advanced disease) with documented deterioration of the patient's clinical state if a base condition is present, and 2) Reasonable exclusion of other disease (e.g. tuberculosis, cancer, histoplasmosis) to explain condition or adequate treatment of other condition with increasing signs/symptoms
Radiographic criteria	<ol style="list-style-type: none"> 1) Any of the following chest radiographic abnormalities; if baseline films are >1 yr old, should be evidence of progression: <ul style="list-style-type: none"> Infiltrates with or without nodules (persistent for >2 months or progressive) Cavitation Nodules alone (multiple) 2) Any of the following high-resolution computed tomography abnormalities: <ul style="list-style-type: none"> Multiple small nodules Multifocal bronchiectasis with or without small lung nodules
Bacteriological criteria	<ol style="list-style-type: none"> 1) At least three available sputum/bronchial wash samples within 1 yr, as follows: <ul style="list-style-type: none"> Three positive cultures with negative AFB smears, or Two positive cultures and one positive AFB smear, or A single available bronchial wash and inability to obtain sputum samples, as follows: <ul style="list-style-type: none"> Positive culture with 2+, 3+ or 4+ growth, or Positive culture with a 2+, 3+ or 4+ AFB smear, or 3) Tissue biopsy, as follows: <ul style="list-style-type: none"> Any growth bronchopulmonary tissue biopsy Granuloma and/or AFB on lung biopsy with one or more positive cultures from sputum/bronchial wash Any growth from usually sterile extrapulmonary site

For a diagnosis of pulmonary disease, all three criteria (clinical, radiographic and bacteriological) must be satisfied. AFB: acid-fast bacilli.

the lung was divided into 18 segments on conventional CCT according to the anatomical segment as follows. Right upper lobe (RUL) apical segment, RUL posterior segment, RUL anterior segment, middle lobe (ML) lateral segment, ML medial segment, right lower lobe (RLL) superior segment, RLL medial basal segment, RLL anterior basal segment, RLL lateral basal segment, RLL posterior basal segment, left upper lobe (LUL) apicoposterior segment, LUL anterior segment, lingular superior segment, lingular inferior segment, left lower lobe (LLL) superior segment, LLL anterior medial basal segment, LLL lateral basal segment and LLL posterior basal segment. The extent of the lesions was expressed as the number of involved CCT segments in which MAC lesions were present.

GPL core antibody

GPL core antibody was measured as previously described [4]. Briefly, microtitre plates (Nunc Products, Roskilde, Denmark) were coated with $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{well}^{-1}$ of GPL core of *M. avium* serotype 4, which had been prepared according to a previously described method [4]. Serum samples were diluted 40-fold with PBS containing 1% bovine serum albumin. Diluted serum samples were added, followed by incubation for 1 h at 37°C . Plates were washed, then peroxidase-conjugated $\text{F}(\text{ab}')_2$ of goat antibody against human IgG, IgA or IgM (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added and plates were incubated for 2 h at 37°C . Unbound labelled antibody was removed by washing and the substrate, *o*-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma), was added. Following colour development, the optical densities (OD) of the wells on the plates were read for absorbance at 492 nm (model 550; Bio-Rad Laboratories, Tokyo, Japan).

Statistical analysis

All data were analysed and all values are given as mean \pm SD. The Mann-Whitney U-test was used to compare the differences between groups. The Chi-squared test was used to compare the difference in CCT findings between groups. Correlation coefficients were calculated using Spearman's rank method. A *p*-value of <0.05 was considered significant.

RESULTS

Clinical background and laboratory data

The clinical background and laboratory data are shown in table 2. A total of 33 patients met the ATS criteria (MAC disease group) and 14 patients did not (MAC-culture positive group). Of these patients, 46 were female, who tended to be thin, there was only one smoker and none were alcohol abusers or had severe systemic complications. The main symptoms were coughing (19 patients), sputum (21 patients), bloody sputum (nine patients), chest pain (four patients) and dyspnoea (three patients). Of the subjects, 40.4% had past histories of major surgery that included myomectomy (seven patients), appendectomy (five patients), mastectomy (three patients), cholecystectomy (two patients), gastrectomy (two patients) and oophorectomy (one patient). There were no statistically significant differences in clinical characteristics between the two groups.

Levels of GPL core antibody

IgG, IgA and IgM antibodies specific for GPL core antigen were measured (fig. 1). The levels of IgG against GPL core antigen were 0.219 ± 0.292 OD for MAC disease and 0.268 ± 0.372 OD for

the MAC-culture positive group. The values for IgA were 0.547 ± 0.438 OD and 0.452 ± 0.345 OD, respectively, and for IgM 0.628 ± 0.362 OD and 0.535 ± 0.213 OD, respectively. Applying the cut-off value 0.064 OD for IgG, 0.072 OD for IgA and 0.312 OD for IgM in the present authors' previous study [4], the positive rate was 66.7% for IgG, 81.8% for IgA and 78.1% for IgM in the MAC disease group, and 71.4% for IgG, 100% for IgA and 84.6% for IgM in the MAC-culture positive group. There were no statistically significant differences between the MAC disease and MAC-culture positive groups for any Ig isotype.

CCT findings

The CCT findings are summarised in table 3. Abnormal CCT were similar in the MAC disease and MAC-culture positive groups, with the exception of findings related to large nodules or infiltrate, which were more frequent in the former ($p < 0.05$). Small nodules <10 mm in diameter were seen in all patients. Analysis of the distribution of the lesions showed that MAC frequently involved the ML lateral segment (33 out of 47 patients, 70.2%), ML medial segment (33 patients, 70.2%) and lingular inferior segment (30 patients, 63.8%). The mean numbers of involved segments in each finding were similar regardless of large nodules or infiltrate. The total numbers of involved segments were 6.7 ± 4.2 and 5.0 ± 4.3 in the MAC disease group and the MAC-culture positive group, respectively. From these results of clinical characteristics, serodiagnosis using GPL core antibody and CCT findings, it could be considered that the patients of the MAC-culture positive group had an active MAC lung disease.

Correlation between CCT findings and level of GPL core antibody

Table 4 shows the correlation coefficients between the numbers of involved CCT segments, representing the extent of disease, and the level of GPL core antibody in the MAC disease group and the MAC-culture positive group. There is a significant positive correlation between the extent of disease and the level of GPL core IgA antibody in both groups (fig. 2). Next, the level of GPL core antibody was compared with each CCT finding, including the occurrence of a small nodular shadow (<10 mm), a nodular shadow (10–30 mm), a large nodular shadow (>30 mm) or infiltrate, bronchiectasis and atelectasis. The levels of GPL core IgA antibody were significantly elevated in patients who had nodular lesion(s) (≥ 10 mm) compared with patients who had small nodular lesion(s) (<10 mm) in both groups (fig. 3). There were no differences in GPL core antibody levels correlating with other findings. These results document that a higher level of GPL core IgA indicated a wider extent of MAC disease and larger nodule formation on CCT.

DISCUSSION

The present study is the first to assess a correlation between GPL core antibody levels and radiographic findings. A total of 47 patients with MAC-positive culture from sputum and abnormal shadow on chest radiographs were examined. The present authors found that the level of IgA antibody against GPL core antigen was associated with CCT findings: a higher level of GPL core IgA antibody indicated a wider extent of MAC disease and larger nodule formation on CCT. Obviously, in order to establish this new knowledge, further studies with a

TABLE 2 Clinical data of patients with *Mycobacterium avium* complex (MAC)-positive cultures

	MAC disease	MAC-culture positive
Subjects n	33	14
Sex male/female	1/32	0/14
Age yrs	65.3 ± 10.6	71.4 ± 6.0
BMI kg·m ⁻²	19.2 ± 3.0	18.5 ± 2.2
Cigarette smoking	0	1
Alcohol abuse	0	0
Past history of major surgery	15 (45.5)	4 (28.5)
ESR mm·h ⁻¹	33.2 ± 24.7	26.7 ± 17.3
MAC species		
<i>M. avium</i>	21	12
<i>M. intracellulare</i>	9	2
Both	3	0

Data are presented as n or mean ± sd. BMI: body mass index; ESR: erythrocyte sedimentation rate.

larger number of patients are required due to the low value of the correlation coefficients between the extent of disease and levels of GPL core IgA ($r=0.514$) and a small number of study subjects.

The ATS criteria published in 1997, consisting of clinical, radiographic and bacteriological criteria, are the best guide to diagnosis and treatment of pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria, including MAC [7]. All three elements are required for the diagnosis of MAC disease. The bacteriological criterion requires multiple positive cultures for MAC, or a positive culture from a lung biopsy or histologically proven lung biopsy positivity. In the present study, it was not possible to carry out lung biopsy or bronchial washings on all patients in the MAC-culture positive group, especially on those with minimal symptoms or on elderly subjects, because informed consent for the bronchoscopic examination had not been obtained. Bronchoscopic examination is invasive and expensive. In elderly patients, the diagnosis for MAC lung disease may be less important with respect to the long-term survival because, for MAC lung disease patients with progressive radiographic abnormalities, the 50% survival rate was 175 months [8]. Thus, MAC-culture positive patients were defined based on an observation with monthly radiographic and sputum examination for 12 months.

Most patients in the MAC-culture positive group were elderly, nonsmoking, thin females with no severe systemic complications; these clinical features are consistent with those of patients with MAC lung disease with nodular bronchiectasis [9]. The combination of multiple small nodules on CCT with bronchiectasis, particularly in the middle lobe and/or lingual lobe, should suggest the diagnosis of MAC lung disease [10–12]. In the present study, the clinical background and laboratory findings, including GPL core antibody, were similar between the MAC disease group and the MAC-culture positive group. A GPL core IgA antibody was positive in all patients of the MAC-culture positive group. Moreover, all patients in the

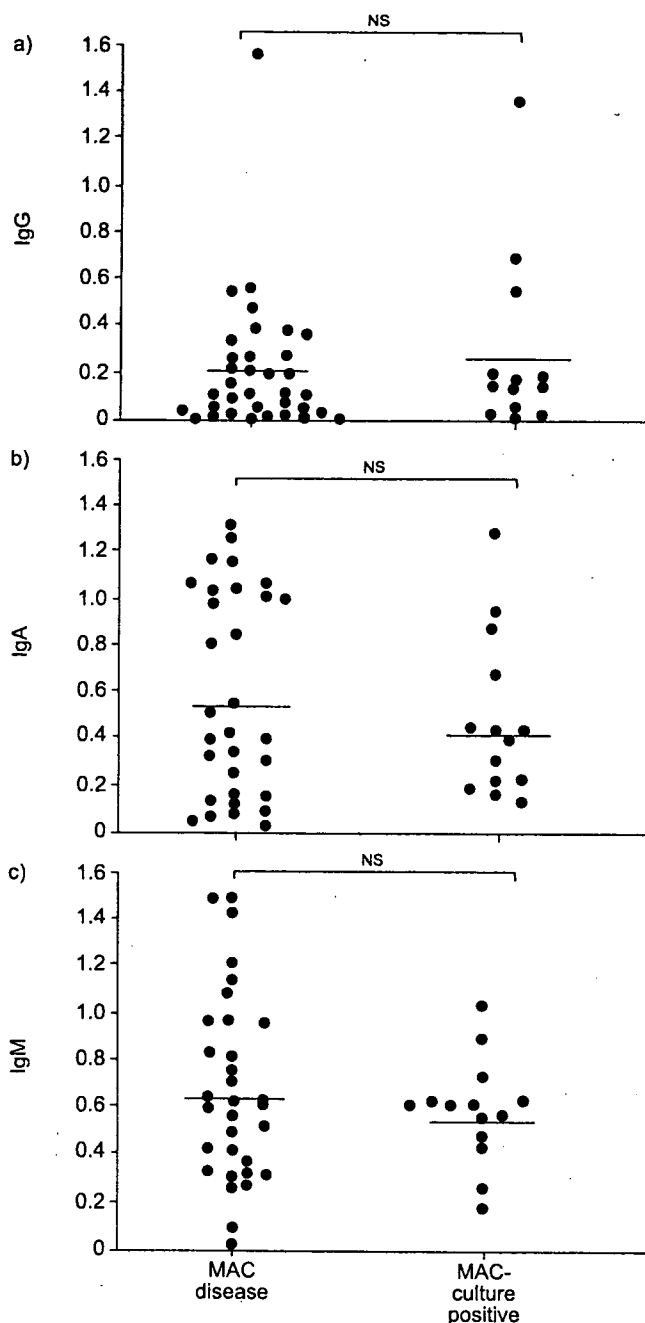


FIGURE 1. The distribution of serum levels of glycopeptidolipid core antibody in patients with *Mycobacterium avium* complex (MAC) disease and in the MAC-culture positive group in the a) immunoglobulin (IgG), b) IgA and c) IgM groups. The mean of each group of values is indicated by a horizontal line. There was no statistically significant difference between the IgG, IgA and IgM groups. NS: nonsignificant.

MAC-culture positive group had findings of small nodules on CCT. Some careful investigation of CCT and histological findings revealed that small nodular lesions were caused by granulomas formed as a specific response to mycobacterial infection [13, 14]. Furthermore, the individuals with MAC colonisation, who had a single and small amount of culture-positive MAC but did not have clinical symptoms or abnormal lesions on CCT findings, were excluded from the present study

TABLE 3 Chest computed tomography findings

Abnormalities	MAC disease		MAC-culture positive	
	Patients with findings	Involved segments	Patients with findings	Involved segments
Small nodule (<10 mm)	33 (100)	6.5±4.2 (1-17)	14 (100)	4.3±3.7 (1-12)
Nodule (10-30 mm)	17 (51.5)	1.2±1.3 (1-4)	3 (21.4)	0.7±1.5 (0-4)
Large nodule (>30 mm) or infiltrate*	8 (24.2)	0.5±1.3 (0-5)	0 (0)	0
Bronchiectasis	29 (87.9)	3.1±2.5 (0-14)	10 (71.4)	2.7±3.1(0-10)
Cavity	4 (12.1)	0.3±1.1 (0-6)	2 (14.3)	0.2±0.6 (0-2)
Atelectasis	13 (39.4)	0.5±0.7 (0-2)	3 (21.4)	0.2±0.4 (0-1)
Other	4 (12.1)	0.2±0.6 (0-3)	0 (0)	0
Total	33 (100)	6.7±4.2 (1-17)	14 (100)	5.0±4.3 (1-12)

Data are presented as n (%) or mean±sd (range). MAC: *Mycobacterium avium* complex. *: p<0.05.

at enrolment. The present authors have previously reported that GPL core antibody was not detectable in cases of MAC colonisation [4]. From results, it was considered that the patients of the MAC-culture positive group had an active MAC lung disease. It could be argued that patients are suffering from MAC lung disease when they: 1) exhibit a positive respiratory culture for MAC; 2) have chest radiographic findings of infiltrate, nodular cavitory lesions or bronchiectasis and/or multiple small nodules; and 3) show positive results for GPL core antibody. When using GPL core antibody it is not necessary to continue collecting respiratory specimens for acid-fast bacilli analysis or to observe chest radiographs and/or CCT over a 12-month period of time.

In the MAC disease group, eight patients had a large nodular shadow (>30 mm) or infiltrate, whereas none in the MAC-culture positive group had these findings. Thus, the MAC-culture positive group might be considered to represent early stage MAC disease because serial CCT scanning in MAC lung disease has shown that the development of infiltrate is preceded by the appearance of nodules [15]. It might be recommended for patients in both groups to be administered with immediate multidrug chemotherapy and/or surgical therapy in the context of the patient's general condition and

TABLE 4 Correlation coefficients between numbers of involved chest computed tomography segments versus glycopeptidolipid (GPL) core antibody level

	Correlation coefficients		
	Total	MAC disease	MAC-culture positive
GPL core IgG antibody OD	0.150	0.070	0.268
GPL core IgA antibody OD	0.514***	0.487**	0.788*
GPL core IgM antibody OD	0.217	0.306	0.153

MAC: *Mycobacterium avium* complex; Ig: immunoglobulin; OD: optical density.

*: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001.

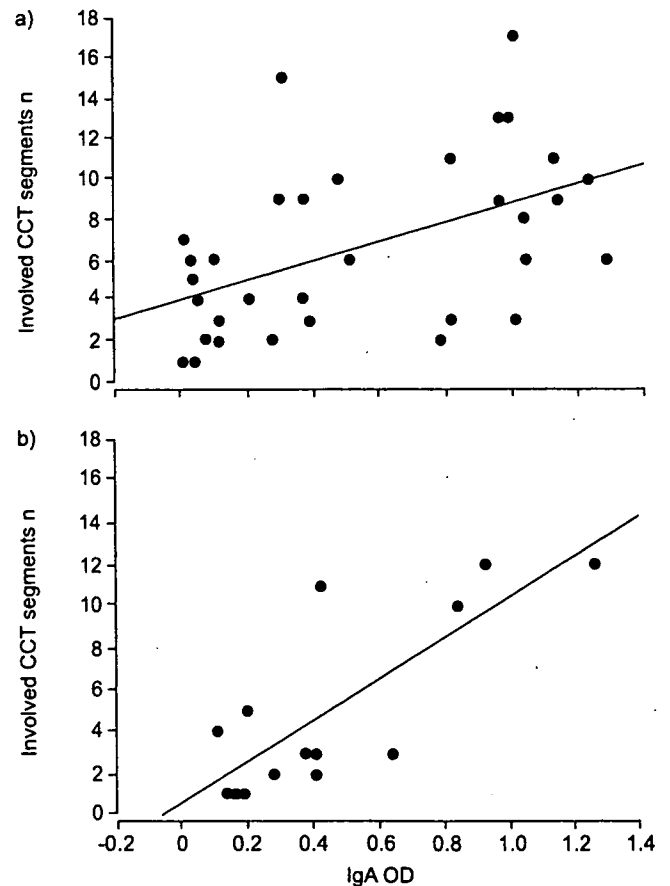


FIGURE 2. Correlation between the levels of glycopeptidolipid (GPL) core-specific immunoglobulin (Ig)A antibody and the number of involved chest computed tomography (CCT) segments in patients with a) *Mycobacterium avium* complex (MAC) lung disease and b) in the MAC-culture positive group. Significant positive correlations were found between the level of GPL core IgA antibody and the number of involved computed tomography segments in the MAC disease group ($r=0.487$, $p<0.01$), in the MAC-culture positive group ($r=0.788$, $p<0.05$), and in both of them ($r=0.514$, $p<0.001$). OD: optical density.