

により強制分散させた GMM と GMM リポソームを用い、GMM 特異的 T 細胞抗原受容体を再構築した Jurkat 細胞株の活性化を検証したところ、抗原提示細胞として樹状細胞を用いた場合には 10 倍程度、また CD1b をトランスフェクとした B 細胞株を用いた場合には数百倍程度、GMM リポソームにおいて良好な抗原提示活性が観察された。

BCG 免疫モルモットに GMM リポソームを皮内接種することにより、遅延型アレルギー応答が誘起できる BCG 接種モルモットに PPD ならびに GMM リポソームを皮内接種したところ、おおよそ 2 日目をピークとした皮膚の硬結を観察した。この皮膚反応は BCG 非接種モルモットでは誘起されないことから、前感作を必要とするメモリー応答であることが明らかとなった。また接種部位の組織染色を行ったところ、PPD 接種、GMM リポソーム接種ともに単核球の顕著な浸潤が見られ、ヘルパー/インデューサー T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の有意な浸潤が認められた。以上より、GMM リポソーム接種により遅延型アレルギー応答が誘起されることが実証され、糖脂質が遅延型アレルギー応答の新しい化学クラスの標的抗原となることがはじめて示された。

GMM に対する遅延型アレルギー応答は CD1 依存的である BCG 接種モルモットの所属リンパ節細胞を *ex vivo* において GMM リポソームで刺激すると、IFN-g の転写が亢進した。そこでこの培養を抗モルモット pan-CD1 抗体およびコントロール抗体の存在下で行ったところ、抗モルモット pan-CD1 抗体存在下において IFN-g 転写は完全に抑制された。したがって、この GMM 特異的応答は CD1 に拘束した応答であることが示された。

GMM に対する遅延型アレルギー応答は、高度に TH1 サイトカイン産生にシフトした応答である BCG 接種モルモットの所属リンパ節を PPD あるいは GMM リポソームで刺激し、TH1 サイトカインである IFN-g と TNF- α 、TH2 サイトカインである IL-5 と IL-10 の転写を RT-PCR により検証したと

ころ、PPD 刺激では TH1 サイトカイン、TH2 サイトカインの両方が誘導されたのに対し、GMM リポソーム刺激では TH1 サイトカインのみが誘導され、それに対して抑制的に働くと思われる TH2 サイトカインはまったく誘導されなかった。以上の結果から、GMM に対する遅延型アレルギー応答は、極度に TH1 サイトカイン応答にシフトした反応であることが明らかとなった。

D. 考察

休眠菌は年余にわたり生体内環境に暴露されることから、低いながらも維持され続けている菌の生存に必須の糖脂質代謝は、宿主環境の影響を強く受けることが予想される。その意味で、生体内環境での菌の代謝変化に着目した本研究のアプローチは、休眠菌の本態の一端を明らかにする研究と言える。

外界環境下での抗酸菌は、TDM を多量に産生して堅牢な細胞壁を構築し、菌集塊やバイオフィルムを形成することにより、種々の物理的あるいは化学的ストレスに対応することができる。しかし一旦宿主体内に入ると、TDM は mincle あるいは TLR2 依存的にマクロファージを活性化し NO の産生を誘導するため、菌にとって極めて不都合である。菌はこの生体応答を回避するため、既存の酵素と宿主由来グルコースを最大限に活用して迅速に TDM を GMM に置換し、基本骨格を保持しながらも宿主自然免疫刺激活性の弱い細胞壁を構築するものと考えられる。

休眠菌のように長期に生体内グルコースに暴露された場合、細胞壁 TDM はほとんど消失し、GMM が主体となることが予想される。この変化は、菌が宿主自然免疫を回避するうえで極めて有効である。一方、本研究から明らかのように、宿主免疫系は GMM を標的とした強い遅延型アレルギー応答を惹起し、強い TH1 サイトカイン産生へのシフトにより菌を制御しようとする機構が働く可能性が考えられる。この応答がメモリー T 細胞応答であることを考慮すると、

GMM が新たな抗結核ワクチンとして有効である可能性も考えられ、今後の研究展開が期待される。

ツベルクリン反応が、必ずしも結核免疫の成立と相関しないことは周知の事実である。その理由は、TH1 サイトカインとともにその働きを抑制する TH2 サイトカインが同時に誘導されることが考えられる。これに対して GMM に対する応答は、高度に TH1 サイトカイン応答にシフトしたものであることから、「脂質バージョンのツベルクリン反応」である GMM 皮内テストは、有効な結核免疫成立の指標となる可能性がある。

E. 結論

生体内環境に暴露された菌に特異的な糖脂質を同定し、それに対する遅延型アレルギー応答の存在ならびに感染防御における意義を明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) **Sugita M.** 2010. Mycolyltransferase from *Mycobacterium leprae* excludes mycolate-containing glycolipid substrates. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (Boston, MA, U.S.A., 7月).
- 2) **杉田昌彦.** 2010. ミコール酸含有糖脂質の生合成と免疫認識～抗酸菌バイオロジーの新たな世界～ 第85回日本結核病学会（京都、5月）
- 3) **杉田昌彦.** 2010. 結核菌脂質を標的とした新しい免疫応答 第53回日本感染症学会中日本地方会学会（京都、10月）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

休眠性非結核性抗酸菌における菌体構成分子の解析

研究分担者 宮本 友司（国立感染症研究所ハンセン病研究センター・主任研究官）

研究要旨

非結核性抗酸菌症の代表的な起因細菌である *Mycobacterium avium* complex (MAC) には約 30 種類に及ぶ血清型が存在し、それらは主要糖脂質である glycopeptidolipid (GPL) の糖鎖部分によって規定されている。血清型の違いすなわち GPL 糖鎖の違いによって病原性に差が生じることも知られており、休眠性等の性質とも関連することが指摘されている。そこで、GPL 糖鎖の違いが生み出す影響を解明することを目的とし、GPL 糖鎖を安定的且つ特異的に発現する組換え *M. smegmatis* 株の作製及びそれらを利用した性状比較を行った。その結果、異なる GPL 糖鎖を発現する組換え *M. smegmatis* 株間において、凝集形態に顕著な差が観察された。これらのことから、GPL の糖鎖構造は菌体の生化学的な性状に影響を与え得る因子の一つであることが示唆された。

A. 研究目的

Glycopeptidolipid (GPL) は非結核性抗酸菌 *Mycobacterium avium* complex (MAC) の菌体表層に存在する主要な糖脂質抗原であり、様々な構造からなる糖鎖部分が約 30 種に及ぶ血清型を規定している。一方、GPL は MAC の休眠性等を含む病原性に関わる菌体構成分子であることも知られており、血清型、すなわち糖鎖構造の違いによって病原性に差異が認められることも疫学的な調査により指摘されている。しかし、そのメカニズムについては依然として不明な点も多く、糖鎖が宿主に与える影響を解明することが求められている。

MAC 株自身は、それぞれの血清型に応じた特有の糖鎖を GPL の一部分として発現している。しかしながら、糖鎖機能を比較・評価する上でこれらの MAC 株を直接利用し比較することは、GPL 以外の因子（例：ゲノム構造、タンパク質、他糖脂質成分等）において株間で様々な違いを有するために適当ではない。そこで、遺伝的、生化学的バックグラウンドが同一で GPL の糖鎖のみ

が異なる株を作製、利用する必要がある。そこで、本研究では、組換えの手法により代表的な血清型 GPL 糖鎖をそれぞれ安定的に発現する株の構築を目的とし、さらにこれらの株間でどのような違いが認められるか、生化学的な側面から検討を行った。

B. 研究方法

BCG 由来 *hsp60* プロモーター及びその制御化で発現する *rtfA* 遺伝子 (MAC ATCC25291 株由来) を含む DNA 断片を作製した。本 DNA 断片を抗酸菌ファージ組換え酵素を用いた手法により、野生型 *M. smegmatis* mc²155 株の *gtf3* 遺伝子領域と入れ換え、1 型 GPL 生産株とした。ATCC25291 株由来 *mdhA*, *merA*, *mtfF*, *mtfE* 及び *gtfD* の 5 遺伝子 (2 型 GPL 生合成遺伝子) を pMV261a へ挿入することにより作製した発現プラスミドベクターを 1 型 GPL 生産株へ導入し、2 型 GPL 生産株とした。上記 5 遺伝子の内、*mtfE* を除く 4 遺伝子を持つ発現プラスミドベクター、さらに ATCC35767 株由来 *hlpA4* と ORF2 遺伝子

(4 型 GPL 生合成遺伝子) を持つ染色体組み込み発現ベクターをそれぞれ構築し、両ベクターを 1 型 GPL 生産株へ導入することにより、4 型 GPL 生産株とした。また、ATCC35771 から *gftTB*, ORF3 及び ORF4 (8 型 GPL 生合成遺伝子) を単離し、3 遺伝子を保持する染色体組み込み発現ベクターを 1 型 GPL 生産株へ導入することにより 8 型 GPL 生産株とした。作製した各株 (1、2、4、8 型 GPL 生産株) によって生産された GPL の確認は TLC によって行った。各株は LB 又は 7H9+ADC 培地にて液体培養を行い、菌体性状を観察した。

倫理面への配慮

特になし

C. 研究結果

GPL に含まれる糖鎖は MAC の血清型を規定するとともに、病原性を発揮する上で、宿主細胞との相互作用において役割を担うことが推測されている。そこで、本研究では糖鎖の機能を探るべく *M. smegmatis* に代表的な血清型 GPL を安定的且つ特異的に発現させることを試みた。本来、野生型 *M. smegmatis* mc²155 株は、MAC に認められる血清型 GPL とは糖鎖構造が異なる非血清型 GPL のみを生産する。従って、野生株 *M. smegmatis* に MAC 由来血清型 GPL 生合成遺伝子を導入して組換え株を作製した場合、血清型 GPL と同時に非血清型 GPL も多く生産されるため、この現象は血清型 GPL の機能を特異的に評価する面においては適していない。さらに、様々な血清型 GPL を再現するには目的の糖鎖構造に応じて生合成遺伝子を複数セット導入する必要があり、基盤となる株は全ての血清型 GPL に共通な糖鎖を既に発現するようにしておくことが求められる。そこでまず初めに、野生型 mc²155 株において非血清型 GPL の生合成に関与する *gft3* 遺伝子を、MAC 血清型 GPL 生合成の最初の経路 (1 型 GPL 生成) に関わる遺伝子 *rtfA* と交換することを目指

した。相同組換えによる手法を用いた結果、染色体上の *gft3* 遺伝子が *rtfA* 遺伝子と入れ替わって 1 型 GPL を生産するように変化した株を取得することが出来た。続いて、この 1 型 GPL 生産株に血清型 2、4、8 型 GPL 糖鎖生合成遺伝子をそれぞれ導入し血清型組換え株を構築、解析した結果、野生型 mc²155 株に導入した場合に比べ、非血清型 GPL は著しく低下し、各血清型 GPL がそれぞれ特異的に生産されていた。

一方、各血清型 GPL に含まれる糖鎖構造の影響を観察するために血清型 GPL 組換え株を二種類の液体培地で培養し、菌体の状態を比較した。その結果、LB 培地においては組換え株間で変化は認められなかったが、7H9+ADC 培地で培養した場合に 4 及び 8 型血清型組換え株が 2 型血清型組換え株に比べ著しく凝集していた。

D. 考察

GPL の機能については、いくつかの報告がなされているがその代表的なものとして、GPL は Toll-like receptor の ligand の一つであることが挙げられる。さらにそのシグナル伝達は、血清型 GPL の種類すなわち含有される糖鎖構造によって大きく異なる。このことは MAC の血清型株の違いによってその病態に多様性が生み出されていることを支持する一つの知見であるといえる。しかし、このような血清型の違いがもたらす病原性の多様性は、一つの因子のみでは説明しきれない面もはらんでいる。さらに、これまでに報告のある GPL 糖鎖構造と宿主細胞との相互作用解析については、菌体から分離した状態で評価が行われており、菌体に含有される状態での解析はほとんど行われていない。その意味では、本研究で作製した GPL 血清型組換え株は、一つの *M. smegmatis* 株をベースにしているので糖鎖構造に焦点を絞った解析には適しており、より MAC 本来の状態に近いモデルを再現できる可能性がある。

一方、本組換え株を作製するにあたり、

M. smegmatis 内在性の非血清型 GPL の生合成をブロックし、血清型 GPL への生合成へ導く方策を採用した。これにより血清型 GPL の生産率が著しく向上したことから、非血清型若しくは血清型 GPL へ分岐する生合成段階が GPL 全体の生合成を見渡した場合に重要な段階であることが考えられる。さらに、各種血清型 GPL 糖鎖発現組換え株の菌体性状を比較した結果、特定の液体培地で培養した場合に糖鎖構造の違いによる凝集性の差が認められた。このことは糖鎖部分が培地成分との相互作用によって、菌体表層における疎水性・親水性の度合いを規定した結果、凝集性に差が生じたと考えられる。また、特定の培地でのみ差が認められたことは単に糖鎖構造に起因するのではなく、菌が増殖する環境と糖鎖構造が互いに影響を及ぼしあいながら菌体性状に変化させていることを示している。さらに、細胞性免疫による抗酸菌の認識において菌体の凝集性が大きな影響を与えることが報告されている。つまり、MAC においては GPL 糖鎖によって凝集性を制御し、宿主による排除機構に対峙している可能性が考えられる。

E. 結論

MAC の血清型 GPL 糖鎖を安定的且つ特異的に発現する組換え株を構築した。また、これらの株間で糖鎖構造の違いにより菌体性状（凝集性）に差が認められた。

G. 研究発表

- 1) 論文発表
 - 1) Miyamoto, Y., T. Mukai, T. Naka, N. Fujiwara, Y. Maeda, M. Kai, S. Mizuno, I. Yano, and M. Makino. 2010. Novel rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. J. Bacteriol., 192: 5700-5708.
 - 2) Komine-Aizawa, S., T. Yamazaki, T.

Yamazaki, S. Hattori, Y. Miyamoto, N. Yamamoto, S. Haga, M. Sugitani, M. Honda, S. Hayakawa, and S. Yamamoto. 2010. Influence of advanced age on *Mycobacterium bovis* BCG vaccination in guinea pigs aerogenically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Vaccine Immunol. 17:1500-1506.

- 3) Kai, M, N. H. Nguyen Phuc, A. H. Nguyen, B. D. H. Pham Thi, K. H. Nguyen, Y. Miyamoto, Y. Maeda, Y. Fukutomi, N. Nakata, M. Matsuoka, M. Masahiko, and T. T. Nguyen. 2011. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium leprae* in an endemic area of Vietnam. Clin. Infect. Dis. 52: e127-e132.

2. 学会発表

- 1) 甲斐雅規, 松岡正典, 宮本友司, 牧野正彦. 2010. 次世代シーケンス解析によるらい菌株のゲノム配列比較. 第 83 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 (鹿児島、5 月).
- 2) 向井 徹, 松岡正典, 前田百美, 宮本友司, 福富康夫, 牧野正彦. 2010. 抗酸菌ファージプロモーターによるらい菌の蛍光蛋白発現. 第 83 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 (鹿児島、5 月).
- 3) Miyamoto, Y. and M. Makino. 2010. Characterization of the glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium avium* complex serovar 20. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (Boston, United States of America、7 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

休眠期結核菌由来遺伝子を用いた DNA ワクチンの開発研究

研究分担者 小出幸夫（浜松医科大学・理事）

研究要旨

休眠期結核菌関連抗原の免疫原性の検討：休眠期の結核菌が発現する DosR regulon 蛋白（48 種）および再活性化時に発現する resuscitation promoting factor (Rpf) 蛋白（5 種）の DNA ワクチン・ライブラリーを作製した。現在までに DosR regulon 蛋白 32 種類についてマウスを用いた免疫原性の検討を終え、C57BL/6 で 9 種類、BALB/c で 12 種類の抗原が T 細胞応答を誘導できた（両系統で誘導できたものは 7 種類）。また、C57BL/6 で 3 種類、BALB/c で 13 種類の抗原が抗体産生を誘導できた（同 3 種類）。特に Rv3132c は両系統で両免疫応答を誘導でき、有望な候補抗原と考えられた。

分子融合型ワクチンの開発：樹状細胞による抗原の特異的取り込みの促進を目的として、heat shock protein (HSP) 70 を利用した分子融合型ワクチンを開発した。

A. 研究目的

結核菌感染に対するワクチンとしては、BCG が依然として用いられており、世界の人口の約半分がこの接種を受けている。しかし、BCG の乳幼児粟粒結核に対する有効性は確認されているが、成人の肺結核に対する有効性は疑問視されている。これは BCG の効果が長くても 10~20 年しか維持できないため、「長期潜在性・持続感染から発症する二次性結核（内因性再燃）」が主体である成人の肺結核には対応できないためと考えられる。

結核菌は約 4,000 の遺伝子を保有するが、増殖期に発現する遺伝子と休眠期に発現する遺伝子は異なることが知られている。そこで、本研究では休眠期の結核菌が発現する DosR regulon 蛋白（48 種）や結核菌の再活性化に関与する resuscitation promoting factor (Rpf) 蛋白（5 種）等を標的として、結核菌の再燃を抑制する新規ワクチンの開発を計画した。本研究は、これらの検索を通じて、BCG を初回免疫に、抗潜伏期ワクチンを追加免疫に用いることで、成人の肺結核をも制御できるワクチン戦略

の構築を目的としている。

B. 研究方法

1. 休眠期結核菌関連抗原を標的とした DNA ワクチンの作製と免疫効果の検討

結核菌ゲノム情報に基づき、DosR regulon 蛋白および Rpf 蛋白をコードする遺伝子を PCR によって単離し、哺乳類細胞用の発現ベクターである pCI に挿入して、DNA ワクチン・ライブラリーを作成した。また、それと平行して目的遺伝子を pET28b ベクターに挿入し、大腸菌発現系によって目的蛋白を調製した。

遺伝子銃を用いて、作成した DNA ワクチンでマウス（BALB/c および C57BL/6）を免疫（2μg、2 週間隔で 3 回）した。最終免疫 2 週間後、免疫マウスの脾細胞を対応する組換え蛋白で 37°C、48 時間刺激し、培養上清中の IFN-γ 産生を指標として、免疫の効果を検討した。

2. Heat shock protein (HSP) 70 との分子融合ワクチン

結核防御抗原である MPT51 と HSP70 の融合蛋白をコードする遺伝子を pCI に挿入

し、遺伝子銃を用いて BALB/c および C57BL/6 マウスを免疫した。最終免疫の2週後、マウスの脾臓細胞を既に同定した MPT51 由来抗原ペプチドで刺激し、IFN- γ 産生を指標にして抗原特異的な T 細胞応答を検討した。抗原ペプチドとして、MPT5124-32 (H2-D^d 拘束性) および MPT51171-190 (H2-A^b 拘束性) をそれぞれ BALB/c (CD8⁺ T 細胞応答) および B6 (CD4⁺ T 細胞応答) の脾細胞刺激に使用した。さらに HSP70 の ① 全長、② N 末端側、③ C 末端側と MPT51 を融合させた3種類の遺伝子を構築して同様の解析を行い、増強活性の存在する部位について検討した。

倫理面への配慮

1 および 2 の遺伝子組換え実験および動物実験に関しては、それぞれ「研究開発二種省令」および「浜松医科大学動物実験規定」に従って行った。

C. 研究結果

1. 潜伏期結核菌関連抗原を標的とした DNA ワクチンの作製と免疫効果の検討

2 系統のマウスを用いて候補抗原の免疫原性について検討し、T 細胞応答および抗体産生について以下の結果を得た (右の表参照)。

① T 細胞応答を惹起できた抗原群 (下線は両系統で陽性のものを示す)

1) C57BL/6 (9/32 種類) : Rv0079, Rv0081, Rv1998c, Rv2031c, Rv2032, RV2623, Rv2624c, Rv3127, Rv3132c

2) BALB/c (12/32 種類) : Rv0079, Rv0571c, Rv1738, Rv1998c, Rv2031c, Rv2032, RV2623, Rv2624c, Rv2626c, Rv2628, Rv3131, Rv3132c

② 抗体産生を惹起できた抗原群 (同上)

1) C57BL/6 (3/21 種類) : Rv2029, Rv2626c, Rv3132c

2) BALB/c (13/26 種類) : Rv0079, Rv0080, Rv0081, Rv1738, Rv1998c, Rv2029, Rv2031c, Rv2623, RV2624, Rv2626c, Rv3127, Rv3131c, Rv3132c (同上)

スクリーニング結果の概略

	C57BL/6		BALB/c	
	T細胞	抗体	T細胞	抗体
Rv0079	〇〇	未解析	〇×	〇〇
Rv0080	××	××	××	〇〇
Rv0081	〇〇	未解析	××	〇〇
Rv0569	××	未解析	××	未解析
Rv0571c	××	××	〇×	××
Rv0572c	××	××	××	××
Rv0574c	××	××	××	××
Rv1734c	××	××	××	××
Rv1738	××	××	〇〇	〇〇
Rv1996	××	××	××	××
Rv1998c	〇〇	××	〇〇	〇〇
Rv2005c	××	××	××	××
Rv2007c	××	××	××	××
Rv2028c	××	××	××	××
Rv2029c	××	〇〇	××	〇〇
Rv2030c	××	××	××	××
Rv2031c	〇〇	未解析	〇〇	〇〇
Rv2032	〇〇	××	〇〇	××
Rv2623	〇〇	未解析	〇〇	〇〇
Rv2624c	〇〇	未解析	〇×	〇〇
Rv2626c	××	〇〇	〇〇	〇〇
Rv2628	××	××	〇〇	××
Rv2629	××	××	××	××
Rv2630	××	××	××	××
Rv2631	××	××	××	××
Rv3126c	××	未解析	××	未解析
Rv3127	〇〇	××	××	〇〇
Rv3129	××	××	××	××
Rv3131	××	××	〇×	〇×
RV3132c	〇〇	〇〇	〇〇	〇〇
Rv3133c	××	未解析	××	未解析
Rv3134c	××	××	××	××

各群マウス2匹ずつについて検討した。

各シンボルは個体の結果を示す(〇:陽性 ×:陰性)。

③ T 細胞応答/抗体産生の両方が惹起できた抗原群 (同上)

1) C57BL/6 : Rv3132c

2) BALB/c : Rv0079, Rv1738, Rv1998c, Rv2031c, Rv2623, Rv2624, Rv2626, Rv3132c

2. HSP70 との分子融合ワクチン

HSP70 と MPT51 の融合タンパクで免疫したマウスでは、MPT51 単独で免疫したマウスと比較して、CD4⁺ T 細胞による抗原特異的な IFN- γ 産生の増強が見られた。また、HSP70 の C 末端側に免疫増強活性があることが明らかとなった。

D. 考察

1. 潜伏期結核菌関連抗原を標的とした DNA ワクチンの作製と免疫効果の検討

これまでに、C57BL/6 と BALB/c の両系統で T 細胞応答を誘導できる抗原を 7 種類同定した。今後、これらの抗原群について抗原エピトープの同定を行うと同時に、動物モデルを用いた感染実験とヒトでの免疫応答の検討を行う予定である。特に Rv3132c は、(1) 2 系統のマウスで細胞性および体液性免疫応答の両方を誘導することが可能であること、(2) *dosS/desS* をコードしている遺伝子であり、潜伏期において遺伝子産物が発現している可能性が高いことから、有望な候補抗原と考えられる。加えて、スクリーニングが終了していない抗原群についてもスクリーニングを継続する。

一部の蛋白（特に Rpf 蛋白群）については大腸菌での発現が困難で、研究遂行上での律速段階となっている。ベクター／プロモーター／大腸菌宿主／使用コドンの最適化等についての条件検討を行ったが、大腸菌や *M. smegmatis* を用いた産生系では、発現を改善することはできなかった。現在、バキュロウイルスや酵母の産生系での調製を試行中である。

2. HSP70 との分子融合ワクチン

HSP70 の C 末端と結核防御抗原の融合蛋白を用いることにより、CD4⁺ T 細胞を効率良く活性化するワクチンを開発できる可能性が示された。しかしながら、本法では抗原特異的 CD8⁺ T 細胞を活性化することはできず、他の方法との併用の必要性が示唆された。

E. 結論

休眠期結核菌関連遺伝子 (DosR regulon 遺伝子群 48 種および Rfp 遺伝子群 5 種) の DNA ワクチン・ライブラリーを完成した。そのうち、32 種類の DosR regulon 抗原の免疫原性を 2 系統のマウスで検討し、C57BL/6 と BALB/c の両系統で T 細胞応答を誘導できる抗原を 7 種類同定した。中でも Rv3132c は両系統で T 細胞応答／抗体産生の両方を誘導でき、有望な候補抗原と考えられた。

樹状細胞を標的とした新規免疫法として、HSP70 を利用した分子融合ワクチンを開発した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Seto, S., K. Tsujimura, and **Y. Koide**. 2011. Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. Traffic (in press)
- 2) Uto, T., K. Tsujimura, M. Uchijima, S. Seto, T. Nagata, T. Suda, K. Chida, H. Nakamura, and **Y. Koide**. 2011. A novel vaccine strategy to induce mycobacterial antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of Heat Shock Protein 70. FEMS Immunol. Med. Microbiol. (in press)
- 3) Yamamura, Y., S. Seto, M. Uchijima, H. Hozumi, T. Nagata, K. Tsujimura, and **Y. Koide**. 2010. Immunogenicity of dormancy-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. Procedia Vaccinology 3: 19-26.
- 4) Nagata, T., and **Y. Koide**. 2010. Induction of specific CD8 T cells against intracellular bacteria by CD8 T-cell-oriented immunization Approaches. J. Biomed. Biotechnol. 764542.
- 5) 永田 年、**小出幸夫**. 2010. 結核菌に対する T 細胞誘導ワクチンの試み. 日

本細菌学雑誌 65: 309-324.

- 6) 辻村邦夫、小出幸夫. 2010. 結核菌抗原認識とT細胞免疫. 結核 85: 509-514.
- 7) Eweda, G., D. Suzuki, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secretory proteins (CFP11, CFP17, and TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 28: 4616-4625.
- 8) Seto, S., S. Matsumoto, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Interaction of lysosomal markers with phagosome containing *Mycobacterium tuberculosis* in macrophage. *Microbiol. Immunol.* 54: 170-174.
- 9) Suzuki, D., T. Nagata, G. Eweda, S. Matsumoto, M. Matsumoto, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) using DNA vaccination. *Vaccine* 28: 2020-2025.
- 10) Wang, L.-X., T. Nagata, K. Tsujimura, M. Uchijima, S. Seto, and Y. Koide. 2010. Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51 overlapping peptides screening and DNA vaccination. *Vaccine* 28: 2026-2031.

2. 学会発表

- 1) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2010. プロテオミクスによる結核菌ファゴソームにおける小胞輸送機構の解析. 第93回日本細菌学会関東支部総会(東京、10月).
- 2) Koide, Y., S. Seto, and K. Tsujimura. 2010. Proteomic analysis reveals the interaction of endoplasmic reticulum with the phagosome containing *Mycobacterium tuberculosis*. 45th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy. (Boston, USA, 7月)
- 3) Yamamura, Y., S. Seto, M. Uchijima, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Immune responses against dormancy-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. 45th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy. (Boston, USA, 7月)
- 4) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2010. イメージ解析とプロテオミクスによる結核菌ファゴソームの分子解剖. 第85回結核病学会総会(京都、5月).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
 分担研究報告書

持続性潜在結核菌感染を検出する臨床診断法の開発に関する研究

研究分担者 前倉 亮治 (国立病院機構刀根山病院)
 研究分担者 北田 清悟 (国立病院機構刀根山病院・呼吸器内科)
 研究協力者 立石 善隆 (国立病院機構刀根山病院・呼吸器内科)
 研究分担者 松本 壮吉 (大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学)
 研究協力者 岡 真優子 (大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学)

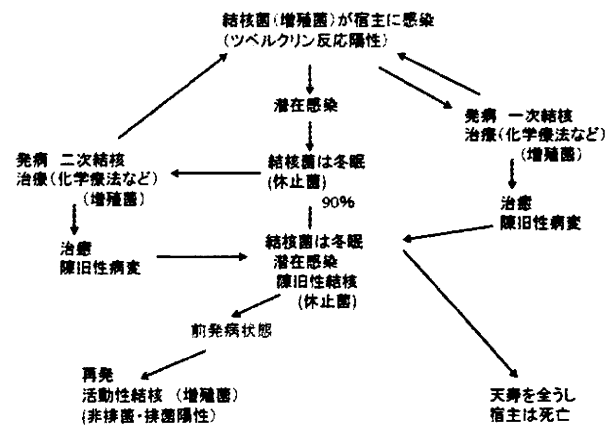
研究要旨

2007年には、新登録結核罹患率は10万人中20を切り中蔓延国の仲間入りしたが、70歳以上の高齢者の発病と結核死亡の比率は増加している。これらの多くは肺結核の既往歴を持つ陳旧性肺結核患者の再発である。この潜在感染から発病に至る前発病状態を診断することが出来れば、予防内服の手段も可能になる。今回、陳旧性肺結核患者を対象に、活動性肺結核患者と健常人を対照として、休止菌により多く産生されるMDP1を始めとする各種菌体成分を抗原とした血清診断法の有用性を臨床的に検討した。MDP1抗体価は、陳旧性肺結核患者と非結核性抗酸菌症患者で健常人および活動性肺結核患者と比較して有意に高値を示した。活動性肺結核患者で陽性は2例のみであった。CFP10抗体価は、活動性肺結核患者で他の群と比較して有意に高値を示した。MDP1抗体の産生は、結核結節の壊死組織で認められ、陳旧性肺結核で抗体価が高値を示すことから、休止菌による潜在結核菌感染をより強く示唆する。しかし、MAC菌感染でも陽性を示しGPLcore抗体等を使った鑑別診断が必要である。

A. 研究目的

本邦における肺結核の罹患率は近年低下傾向にあり、人口10万人当たり10人を切って低蔓延国になる日が近く訪れることが予想される。このとき、感染性のある活動性肺結核患者を隔離して治療することと同じように、潜在結核菌感染を発病前に診断し予防することが重要になってくる(図1)。そこで、潜在結核菌感染を正確かつ迅速に診断する方法を確立することを目的に研究を行う。

図1 結核菌感染と発病:



B. 研究方法

対象；陳旧性肺結核患者17例と鑑別診断が必要な非結核性抗酸菌症患者17例（主にMAC症）とし、健常人（学生）17例と活動性肺結核患者14例を対照とし、TBGL・LAM、1) ESAT-6（結核菌の増殖期

に発現)、2) CFP10 (増殖期に発現)、3) MDP1 (常に発現、休眠期で増)、4) Acr (低酸素で誘導、5) GlnA1 (低酸素で誘導)、6) HSP(Rv0251c (後期休眠期に発現)、7) Rv2658c (後期休眠期に発現)、8) GPL-core (MAC) を抗原とする抗体産生と QFT 法を比較検討した。Cut-off 値は、健常者値の mean + 2SD とした。

C. 結果

MDP1 抗体価は、陳旧性肺結核患者と非結核性抗酸菌症患者で健常人および活動性肺結核患者と比較して有意に高値を示した (表 1)。活動性肺結核患者で陽性は 2 例のみであった (図 2)。CFP10 抗体価は、活動性肺結核患者で他の群と比較して有意に高値を示した。陳旧性肺結核に合併した非結核性抗酸菌症患者と気管支拡張型の非結核性抗酸菌症患者とでは、MDP1 抗体価と CFP10 抗体価に有意差を認めなかった (図 3) MDP1 抗体価と CFP10 抗体価は、共に対象群の中で TBGL 抗体および GPL core 抗体と有意な相関は認めなかった。

表 1 各群間における MDP1-IgG 抗体価と CFP10-IgG 抗体価の比較

血清抗体	陳旧性肺結核 (n=17)	活動性肺結核 (n=14)	NTM 感染 (n=17)	健常者 (n=17)
MDP1 抗体	0.51 ± 0.22*	0.27 ± 0.15	0.56 ± 0.32*	0.12 ± 0.14
CFP10 抗体	0.18 ± 0.31	0.66 ± 0.84*	0.23 ± 0.26	0.07 ± 0.09

★: p<0.01

図 2 各群間における MDP1-IgG 抗体価と CFP10-IgG 抗体価の比較

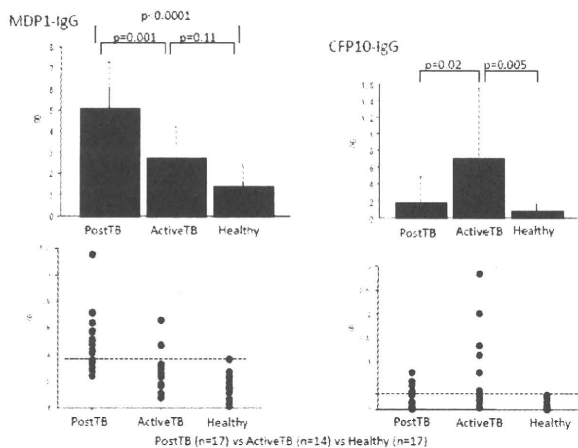
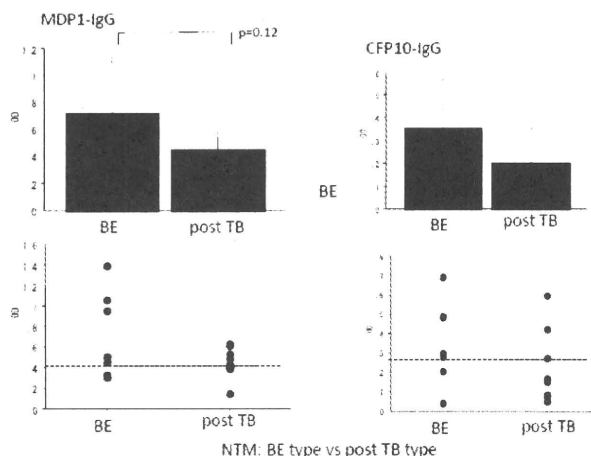


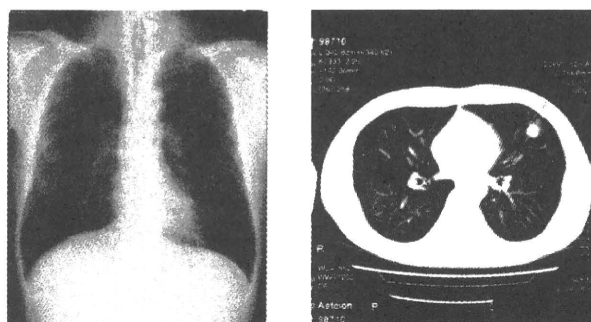
図 3 NTMタイプ別のMDP1-IgG抗体価とCFP10-IgG抗体価の比較



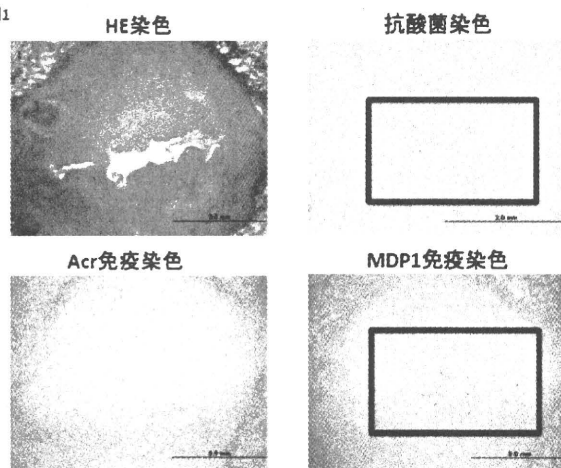
D. 考察

症例 1 : 結核結節の壊死組織の中に、抗酸菌が染色されその中央部が MDP1 免疫染色で茶褐色に染色された。

症例 1 54才男性、舌区の結節影の胸腔鏡下肺生検: 結核結節



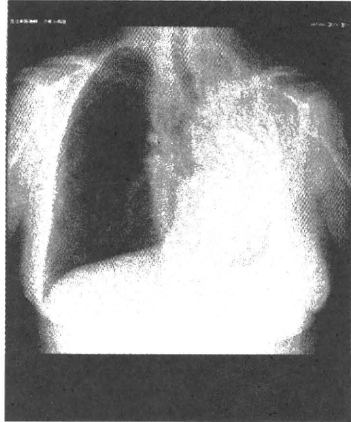
症例 1



症例 2 : MDR-TB 術後 10 年経過して TBGL 抗体価は明らかに低下しているが、各種抗体価が QFT も含め陽性であるため 6 ヶ月ごとの経過観察をしている。

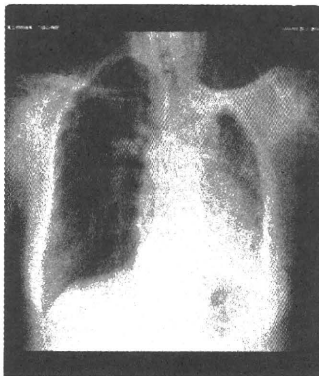
症例2 57才女性 MDR-TB
47才左肺全摘術、TBGL>32

MDP1 : 0.436(+)
CFP10 : 0.030(-)
TBGL : 4 (+)
LAM : (+)
QFT : (+)
GPL-core (MAC) : 0.02 (-)

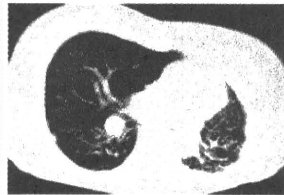


症例3 : MDP1 抗体価が高く、他の抗体価は弱陽性であり QFT が陰性であることから休止菌による潜在感染と考える。

症例3 74才女性 陳旧性肺結核 (胸郭形成術後)



MDP1 1.157(+)
CFP10: 0.324(±)
TBGL 5(+)
LAM : (+)
QFT : (-)
GPL-core (MAC) : 0.01 (-)



症例4 : CFP10 抗体価と TBGL が高く QFT も陽性であり、MDP1 抗体価が弱陽性であることから、再発の危険があり予防内服の適応を考える。

症例4 73才男性 陳旧性結核+COPD



MDP1 : 0.417(+)
CFP10: 0.786(+)
TBGL : 14.4(+)
LAM : (+)
QFT : (+)
GPL-core (MAC) : 0.02 (-)

症例5 : MDP1 抗体価が高く他の抗体価と QFT が陰性であることから休止菌による潜

在感染であり、再発の危険は少ないと考える。

症例5 84才男性 陳旧性結核



MDP1 0.720(+)
CFP10 0.306(+)
TBGL 1.8(-)
LAM : (-)
QFT : (-)
GPL-core (MAC) : 0.12 (-)



全症例で GPLcore 抗体が陰性であり、MAC 菌感染はないものとする。

E. 結論

MDP1 抗体の産生は、結核結節の壊死組織（低酸素）で認められ、陳旧性肺結核で抗体価が高値を示すことから、休止菌による潜在結核菌感染をより強く示唆する。しかし、MAC 菌感染でも陽性を示し GPLcore 抗体等を使った鑑別診断が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitada, S., K. Kobayashi, Y. Nishiuchi, K. Fushitani, K. Yoshimura, Y. Tateishi, K. Miki, M. Miki, H. Hashimoto, M. Motone, T. Fujikawa, T. Hiraga, and **R. Maekura**. 2010. Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex proven by bronchial wash culture. Chest 138: 236-237.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

持続潜伏性肺非結核性抗酸菌症（MAC 症）の新規血清診断法の開発

研究分担者 北田 清悟（国立病院機構刀根山病院・呼吸器内科・医長）

研究要旨

我々はこれまでに MAC の菌体成分である glycopeptidolipid(GPL)-core に対する IgA 抗体を測定する血清診断キットを開発し、肺 MAC 症の診断的有用性について報告してきた。本研究では、肺 MAC 症に対する化学療法下での血清抗 GPL core IgA 抗体価の変化を観察し、治療効果の評価における有用性を明らかにすることを目的とした。肺 MAC 症と診断され、初回標準化学療法を行う患者 43 例を登録した。治療開始前および、治療開始後経時的に血液を採取し、血清抗 GPL core IgA 抗体価の変化を観察した。登録後 6 ヶ月以上経過した症例 28 例について抗体価の変化を検討した。治療開始後 6 ヶ月後、抗体価が治療開始時と比較して低下していたのは、18 例(67.9%、低下率 $57.2 \pm 8.8\%$)、であった。血清 GPL core IgA 抗体は抗酸菌化学療法実施に伴い低下傾向を示す症例が多く認められ、疾患活動性を反映し、治療効果を客観的に評価するのに有用である可能性が示唆された。今後、より長期の細菌学的検査、臨床経過との比較検討を要する。

A. 研究目的

Mycobacterium avium complex (MAC) は環境常在菌であるため、MAC による感染症の診断は結核とは異なり一度の菌検出だけでは不十分である。また肺感染症は肺結核と臨床像が類似しており、結核との鑑別を含め、迅速な診断が必要である。我々はこれまでに MAC の菌体成分である glycopeptidolipid(GPL)-core に対する IgA 抗体を測定する血清診断キットを開発し、国内多施設での肺 MAC 症の診断的有用性についてはすでに報告した。

さらに、米国に於いて、多人種、他地域での有用性の検討を行い、国内の成績と同様の有用性が確認された。また、持続潜伏性 MAC 感染でも血清抗体陽性となる可能性も示唆された。

血清抗体価は疾患活動性、重症度のある程度反映することは胸部 CT 画像を用いた研究などですでに報告してきている。しかし、化学療法を行った患者において、経時的な抗体価の変化を前向きに検討した報告はない。本研究では、肺 MAC 症に対する

化学療法下での血清抗 GPL core IgA 抗体価の変化を観察し、治療効果の評価における有用性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

2008 年 9 月から 2010 年 10 月までの期間、国立病院機構刀根山病院にて米国胸部疾患学会の診断基準を満たす肺 MAC 症と診断され、初回標準化学療法を行う患者を対象とした。治療開始前および、治療開始後経時的に血液を採取し、血清抗 GPL core IgA 抗体価の変化を観察した。また、臨床像との関連も検討した。

倫理面への配慮

国立病院機構刀根山病院の臨床研究倫理委員会の承認を得た。文書による説明、同意を行った。

C. 研究結果

43 例の症例を登録した。男性 6 例、女性 37 例、年齢 67.0 ± 10.8 才、Body Mass Index 18.0 ± 2.6 、肺に基礎疾患を有さない

1 次型は 38 名であった。31 例は喫煙経験がなかった。感染菌種は *M. avium* 29 名 *M. intracellulare* 13 名、両方検出されたのが 1 名あった。全例マクロライドを含む米国胸部疾患/感染症学会推奨の多剤併用化学療法を行った。

2 例は患者の都合等により 3 ヶ月未満で転院し追跡中断した。登録後 6 ヶ月以上経過した症例 28 例について抗体価の変化を検討した。治療前の抗体価は 5.94 ± 5.50 (最小 0.03-最大 14.0) U/mL であり、カットオフ値を 0.7u/mL とすると、陽性率は 76.3% であった。治療開始後 6 ヶ月後、抗体価が治療開始時と比較して低下していたのは、18 例(67.9%, 低下率 $57.2 \pm 8.8\%$)であった。その 18 症例のうち、1 ヶ月後の抗体価が、治療開始前に比べて上昇していた症例は 4 例あり、抗体価が一旦上昇した後、低下する症例があることが観察された。

D. 考察

肺 MAC 症の治療効果は通常、胸部 X 線の変化や、喀痰培養結果に基づいて評価される。しかし、胸部 X 線の定量的評価は困難であり、評価方法の標準方法は現時点では存在しない。また喀痰検査は培養結果判明までに時間を要する。固形培地ではコロニー数を測定することは可能であるが、喀痰検体の質に依存し定量的評価はしばしば困難である。

肺 MAC 症に対する化学療法は、多剤併用療法においても効果は十分とはいえない。マクロライドを含む標準化学療法を行った場合は、初期の排菌陰性化率は 56-92% であるが、再発率は 11-56.8% である。長期的な成績はほとんど報告がないが、より高率に再発することが経験される。治療期間は、排菌陰性化後 12 ヶ月が推奨されているが、根拠は十分ではない。再発率の高さなどから、個々の治療効果に応じた治療期間の設定が必要と考えられる。そのためにも、客観的な治療効果の評価が必要である。

抗 GPL core IgA 抗体は、治療開始に伴い 67.8% で 6 ヶ月後の抗体価の低下が認められた。治療により疾患活動性が低下したこ

とによって、抗体価が低下したと考えられる。1 ヶ月後に抗体価の一時的に上昇を認めた症例が観察されたが、これは抗菌剤使用によって菌破壊が生じ一次的な抗原量増加に伴うものであると推察される。血清抗 GPL core 抗体価は治療効果を評価する指標となる可能性が示唆された。今後、より長期の細菌学的検査、臨床経過との比較検討を要する。

E. 結論

血清 GPL core IgA 抗体は抗酸菌化学療法実施に伴い低下傾向を示す症例が多く認められ、疾患活動性を反映し、治療効果を客観的に評価するのに有用である可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kitada, S., K. Kobayashi, Y. Nishiuchi, K. Fushitani, K. Yoshimura, Y. Tateishi, K. Miki, M. Miki, H. Hashimoto, M. Motone, T. Fujikawa, T. Hiraga, and R. Maekura. Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex proven by bronchial wash culture. Chest 2010; 138; 236-237.

2. 学会発表

- 1) S. Kitada, A. Levin, M. Hiserote, B.J. Clark, R.J. Harbeck, K.A. Lichtenstein, C.A. Czaja, G.A. Huitt, S.H. Kasperbauer, C.M. Perez-Velez, C.L. Daley. 2010. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in the United States. American Thoracic Society International Conference (New Orleans LA, USA, 5 月)
- 2) 上浪 健、北田清悟、好村研二、各務慎一、立石善隆、元根正晴、三木真理、三木啓資、平賀 通、前倉亮治. 2010. 長期にわたり経過観察し得た肺 MAC 症の臨床的検討. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会(京都、4 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
松本壮吉	分子生物学から見た結核研究の現在	四元秀毅、倉島篤行	結核 Up to Date 改訂3版	南江堂	東京	2010	183 - 189

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
Suzuki, D., T. Nagata, G. Eweda, S. Matsumoto , M. Matsumoto, K. Tsujimura, Y. Koide .	Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) using DNA vaccination.	Vaccine	28	2020 - 2025	2010
Seto, S., S. Matsumoto , K. Tsujimura, Y. Koide .	Differential recruitment of CD63 and Rab7-interacting-lysosomal-protein to phagosomes containing <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in macrophages.	Microbiol Immunol	54	170 - 174	2010
Sena, C. B., T. Fukuda, K. Miyanagi, S. Matsumoto , K. Kobayashi , Y. Murakami, Y. Maeda, T. Kinoshita, Y. S. Morita.	Controlled expression of branch-forming mannosyltransferase is critical for mycobacterial lipoarabinomannan biosynthesis.	J Biol Chem	285	13326 - 13336	2010
Ozeki, Y., I. Sugawara, T. Udagawa, T. Aoki, M. Osada-Oka, Y. Tateishi, H. Hisaeda, Y. Nishiuchi, N. Harada, K. Kobayashi , S. Matsumoto .	Transient role of CD4 ⁺ CD25 ⁻ regulatory T cells in mycobacterial infection in mice.	Int Immunol	22	179 - 189	2010
Jalilian, B., A. R. Omar, M. H. Bejo, N. B. Alitheen, M. Rasoli, S. Matsumoto .	Development of avian influenza virus H5 DNA vaccine and MDP-1 gene of <i>Mycobacterium bovis</i> as genetic adjuvant.	Genet Vaccines Ther	8	4	2010

Kai, M, N. H. Nguyen Phuc, A. H. Nguyen, B. D. H. Pham Thi, K. H. Nguyen, Y. Miyamoto , Y. Maeda, Y. Fukutomi, N. Nakata, M. Matsuoka, M. Makino, and T. T. Nguyen	Analysis of drug-resistant strains of <i>Mycobacterium leprae</i> in an endemic area of Vietnam.	Clin Infect Dis	52	e127 - e132	2011
Miyamoto, Y. , T. Mukai, T. Naka, N. Fujiwara, Y. Maeda, M. Kai, S. Mizuno, I. Yano, and M. Makino.	Novel rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from <i>Mycobacterium avium</i> complex.	J Bacteriol	192	5700 - 5708	2010
Komine-Aizawa, S., T. Yamazaki, T. Yamazaki, S. Hattori, Y. Miyamoto , N. Yamamoto, S. Haga, M. Sugitani, M. Honda, S. Hayakawa, S. Yamamoto	Influence of advanced age on <i>Mycobacterium bovis</i> BCG vaccination in guinea pigs aerogenically infected with <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	Clin Vaccine Immunol	17	1500 - 1506	2010
Seto S., Tsujimura K., Koide Y.	Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes.	Traffic	In press		2011
Uto T., Tsujimura K., Uchijima M., Seto S., Nagata T., Suda T., Chida K., Nakamura H., Koide Y.	A novel vaccine strategy to induce mycobacterial antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of heat shock protein 70.	FEMS Immunol Med Microbiol	In press		2011
Yamamura Y., Tsujimura K., Seto S., Uchijima M., Hozumi H., Nagata T., Koide Y.	Immunogenicity of latency-associated antigens of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in DNA-vaccinated mice.	Procedia Vaccinology	3	19-26	2010
Nagata T., Koide Y.	Induction of specific CD8 ⁺ T cells against intracellular bacteria by CD8 ⁺ T-cell-oriented immunization approaches.	J Biomed Biotechnol		76454 - 2	2010
永田 年、小出幸夫	結核菌に対するT細胞誘導ワクチンの試み.	日本細菌学雑誌	65	309 - 324	2010
辻村邦夫、小出幸夫	結核菌抗原認識とT細胞免疫.	結核	85	509 - 514	2010
Eweda G., Suzuki D., Nagata T., Tsujimura K. Koide Y.	Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secretory proteins (CFP11, CFP17, and TB18.5) of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	Vaccine	28	4616 - 4625	2010
Wang L.-X., Nagata T., Tsujimura K., Uchijima M., Seto S., Koide Y.	Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> using MPT51 overlapping peptides screening	Vaccine	28	2026 - 2031	2010

	and DNA vaccination.				
<u>Kitada, S.</u> <u>K. Kobayashi,</u> Y. Nishiuchi, K. Fushitani, K. Yoshimura, Y. Tateishi, K. Miki, M. Miki, H. Hashimoto, M. Motone, T. Fujikawa, T. Hiraga, <u>R. Maekura.</u>	Serodiagnosis of pulmonary disease due to <i>Mycobacterium avium</i> complex proven by bronchial wash culture.	Chest	138	236 - 237	2010
<u>小林和夫</u>	感染症の現状と制圧戦略.	昭和医会誌	70	70 - 73	2010