

ミニ特集「免疫と結核」

キラー T細胞・granulysin による結核免疫とワクチン
(HSP65+IL-12 DNA ワクチン等) 開発

岡田 全司 喜多 洋子

要旨：1998年，米国 CDC および ACET は新世代の結核ワクチン開発の必要性を発表した。しかしながら，BCG ワクチンに代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。われわれは BCG ワクチンをはるかに凌駕する10,000倍強力な結核予防ワクチン効果を示す新しい DNA ワクチン (HVJ-エンベロープ/Hsp65+IL-12 DNA ワクチン) やリコンビナント BCG ワクチンを開発した。このワクチンはマウスで長期にわたり，結核菌由来の HSP65 蛋白抗原および結核菌抗原に対して特異的な CD8 陽性キラー T細胞の分化を増強した。一方，BCG ワクチンはキラー T細胞の分化をほとんど誘導しなかった。さらに，結核治療ワクチン効果も示した。多剤耐性結核のみならず超薬剤耐性結核に対しても治療効果（延命効果・結核菌数減少）を示した。さらに，ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザル (Nature Med. 1996) を用い，HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンの強力な有効性を得た。カニクイザルにワクチン接種後ヒト結核菌を経気道投与し，1年以上経過観察した。リンパ球増殖反応・サイトカイン (IFN- γ ，IL-2等) 産生の増強および胸部 X線所見・血沈，体重の改善効果が認められた。さらに生存率改善・延命効果も認められた。プライム-ブースター法を用い，この DNA ワクチン投与群は100%の生存率を示した。一方，BCG 投与群は33%の生存率であった。さらに，サルの系で世界に先駆けて結核治療ワクチン効果を得た。この DNA ワクチン治療群では100%の生存を示したが，生食投与群では60%の生存率であった。一方，キラー T細胞から産生される結核菌殺傷タンパク granulysin は結核治療ワクチン効果を発揮した。さらに granulysin transgenic mice は結核菌殺傷効果を発揮した。これらについての概要を述べる。

キーワード：キラー T細胞，グラニューライシン，新規結核ワクチン

I. はじめに

1998年，米国 CDC は結核に対し，政府・学術機関・企業が一体となって新世代の結核ワクチン開発の必要性を強く主張する発表をした。また，ACET は国民の健康に対する大敵である結核撲滅のためには，BCG に代わる有効なワクチンが必要であることを示した。しかしながら，BCG に代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない^{1)~4)}。われわれは BCG よりもはるかに強力な DNA ワクチンやリコンビナント BCG ワクチンの開発に成功した (Fig. 1)^{5)~8)}。したがって，新しい抗結核ワクチン開発と結核感染免疫におけるキラー T細胞

および granulysin (キラー T細胞より産生される結核菌殺傷タンパク) の機能解明についても述べる。

II. キラー T細胞と結核

CD8あるいは β_2 ミクログロブリン遺伝子や TAP 遺伝子ノックアウトマウスでは抗結核免疫が十分でなく，動物は死亡する。すなわち，結核における CD8⁺T細胞はマウスで抗結核免疫に重要である (Fig. 2)^{1) 3) 4) 8)~13)}。

キラー T細胞の一つの役割として IFN- γ を分泌して抗結核免疫に寄与するが，次に述べる結核感染 M ϕ を殺して，結核菌の増殖の場をなくし結核菌を殺す役割のほうが重要である。CD8⁺T細胞が結核菌で感染した M ϕ

を Fas-independent, granule-dependent の機構で溶かし、最終的には結核菌を殺すことが報告されている⁹⁾。この T 細胞は CD1-restricted でミコール酸, LAM, phosphatidyl inositol mannoside, glucose monomycolate, isoprenoid glycolipid (Cd1c と結合) 等の結核菌 lipid と lipoglycan を認識する。このキラー T の顆粒内の蛋白である granulysin は直接細胞外の結核菌を殺す。

一方、キラー T の TRAIL とパーフォリンが抗結核免

疫に重要である興味深い結果を得た (Fig. 2)。

Ⅲ. granulysin と結核

キラー T の顆粒内の蛋白である granulysin は直接細胞外の結核菌を殺す。この機序は結核菌細胞膜を不完全な状態にすることによる。granulysin は病原細菌, 真菌, 寄生虫の生存を減少させる。さらにパーフォリンとの共存下で Mφ 内の結核菌も殺すと考えられている。これ

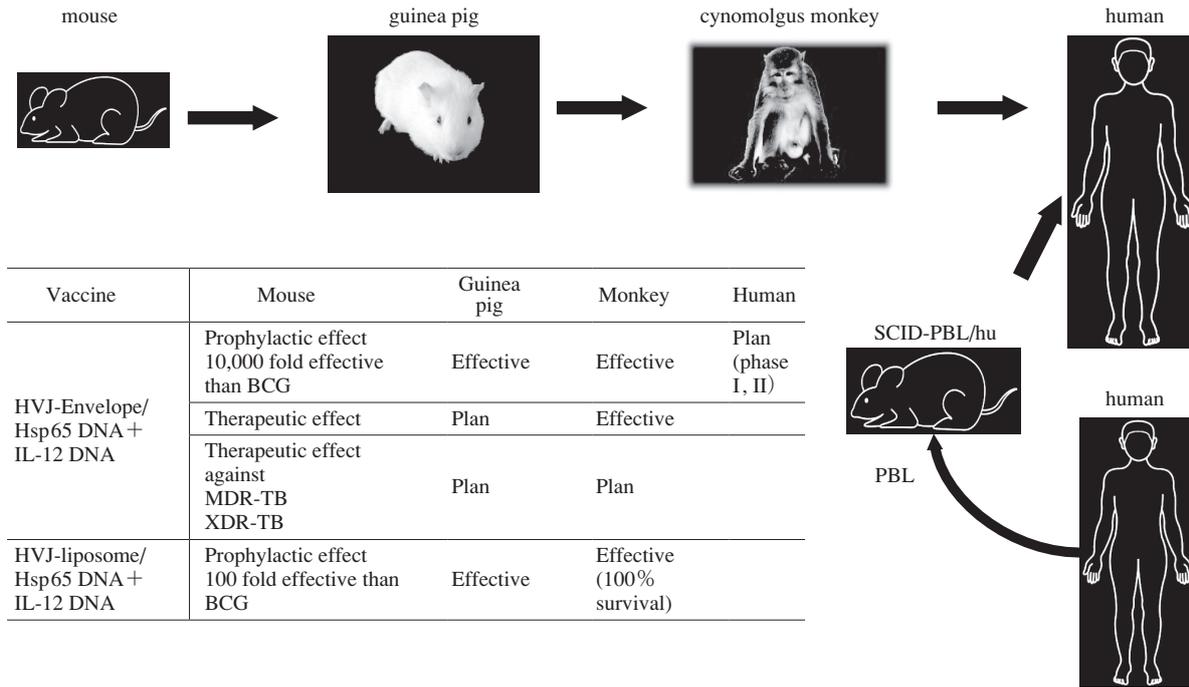


Fig. 1 The development of novel vaccines for *M. tuberculosis* using animal models

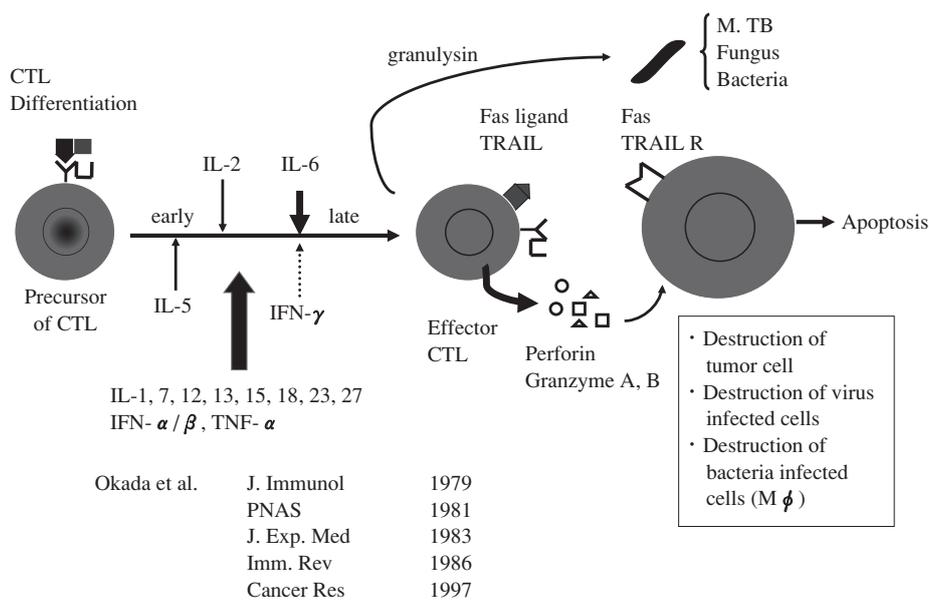


Fig. 2 Induction of cytotoxic T cells and killing mechanism

Table 1 Induction of decrease in TB number *in vivo* and CTL differentiation by 15K Granulysin and 9K Granulysin

Two kinds of Granulysin Function	Decrease in TB number	Induction of CTL against TB	Proliferation of T cells against TB	IFN- γ production	Granulysin expression in CD8 ⁺ T	
					Patients with MDR-TB	Patients with Drug-sensitive TB
15K Granulysin	++ (strong augmentation)	++	++	++	↓↓	↓
9K Granulysin	++	+ (augmentation)	+	++	N.D	N.D

++; strong augmentation, +; augmentation
 ↓↓; strong suppression, ↓; suppression

はパーフォリンより M ϕ に穴が開き, M ϕ 内の結核菌に直接 granulysin が作用するためと思われる。われわれは結核患者, 特に多剤耐性結核患者ではキラー T リンパ球の mRNA の発現および蛋白の発現が低下していることを明らかにした¹⁴⁾¹⁶⁾。すなわち, われわれはキラー T 細胞の granulysin (分子量 9000) 産生低下が多剤耐性結核発症と大きな関連があるのではないかと考えている。

一方, granulysin がキラー T 分化因子の一つであることを発見し, マウスで結核治療効果を示した (特許取得)。granulysin 遺伝子導入マウスを作製した。

IV. 新しい結核ワクチン (HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン, granulysin ワクチン等) 開発

結核ワクチンは, ①サブユニットワクチン, ② DNA ワクチン, ③リコンビナント BCG ワクチン (弱毒化結核菌を含む), その他に大別される。

(1) DNA ワクチン: BCG ワクチンより 1 万倍強力な結核予防ワクチン

マウスの結核感染系では BCG ワクチンをはるかに凌駕する新しい結核ワクチンはきわめて少ない。われわれは Hsp65 DNA+IL-12 DNA (HVJ-エンベロープベクター) のワクチンは BCG ワクチンよりも 1 万倍強力な結核予防ワクチンであることを世界に先駆けて明らかにした。

この HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンでマウスを免疫して結核菌を投与すると, マウス肺の結核菌数が BCG ワクチン投与の 1 万分の 1 以下となった。これを 1 万倍強力という。

さらに, 結核菌に対する CD8 陽性キラー T 細胞の分化誘導を増強した⁴⁾。この強力なワクチン効果とキラー T 活性が相関した。また Th1 細胞の分化誘導, IFN- γ 産生の増強をこのワクチンが発揮することも明らかにした。

この新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され, WHO STOP TB Partnership および WHO STOP TB WGND (Working Group on New Drugs) に選出された。

(2) リコンビナント BCG ワクチン

Table 2 Therapeutic efficacy against tuberculosis by 15K granulysin Transgenic mice and 9K granulysin Transgenic mice

Tg mouse	CFU of TB (log)
15K Granulysin Tg mouse	5.3±0.1*
wild type C57BL/6 mouse	5.9±0.2
9K Granulysin Tg mouse	5.8±0.4*
wild type C57BL/6 mouse	6.7±0.2
Secreted 9K Granulysin Tg mouse	5.7±0.6*
wild type C57BL/6 mouse	6.7±0.2

CFU: Colony Forming Unit

*: significant (P<0.05) by Student's Test

BCG 東京菌に, 種々の遺伝子を導入しリコンビナント BCG を作製した。われわれは Ag85A+Ag85B+MPB 51 リコンビナント BCG は BCG よりも強力なワクチンであることを明らかにした⁵⁾。

さらに, サブユニットワクチンでサルレベルで強力な予防効果が得られた Mtb72f 融合タンパク質の DNA を導入した 72f リコンビナント BCG の作製に成功した。この 72f rBCG ワクチンはサルでも結核予防効果を示した (Fig. 1)⁶⁾。

(3) granulysin ワクチン (Table 1, Table 2)

キラー T 細胞は結核感染防御に重要な働きをする³⁾⁴⁾ (Fig. 2)。granulysin 蛋白発現を多剤耐性結核や糖尿病患者の難治性結核の PBL の培養上清中の活性で検討した。その結果 IL-6, IFN- γ , IL-2 のキラー T 細胞分化因子のみでなく granulysin (15K Granulysin) の産生低下を認め¹⁴⁾¹⁵⁾。

さらにわれわれは 15K Granulysin が CD8⁺キラー T 細胞から直接分泌され, ヒトの M ϕ に直接入り, M ϕ 内の結核菌を殺傷することを明らかにした¹⁴⁾¹⁵⁾。薬剤感受性結核患者 PBL 中の CD8 陽性 T 細胞の 15K Granulysin 蛋白発現と mRNA の発現は健康人よりも有意に低下していた¹⁴⁾¹⁵⁾ (Table 1)。さらに, 多剤耐性結核患者 PBL 中の CD8 陽性 T 細胞の 15K Granulysin 蛋白発現と mRNA の発現は, 有意差をもって, 薬剤感受性結核患者のそれらよりも低下していた (Table 1)。また, 多剤耐性結核患者の PBL を PHA-P, ConA, アロ抗原 (CESS), PPD 抗

原で刺激すると、15K Granulysinの培養上清中への分泌が低下していることを明らかにした (Table 1)。

15K Granulysinの遺伝子導入マウスと9K granulysin 遺伝子導入マウスをそれぞれ作製し、*in vivo*の抗結核作用を解析した。Table 2に示したごとく、15K Granulysin transgenic (Tg) マウスの結核菌感染4週間後の肺結核菌数 (CFU) は wild type マウスと比較して低下が認められ

た。また9K Granulysin Tg マウスの肺内結核菌数も wild type マウスと比較して低下していた (Table 2)。さらに、これらの2つのTgマウス (15K Granulysin Tgと9K Granulysin Tg) は *in vivo*のキラー T誘導 (結核に対する)の増強、結核に対するT細胞増殖反応の増強やIFN- γ 産生の増強等を示した。これらの生体内における15K Granulysinと9K Granulysinの結核感染に対する効果は世

Table 3

A. Priming, Pre-Exposure	
1. Phase I: 現在—2008年	特徴
a. rBCG30	リコンビナント 85B BCG
b. rBCG30ΔureC: Hly (VPM1002)	リコンビナント listeriolysin BCG
c. AERAS-407	リコンビナント perfringiolysin
d. rBCG30ARMF, rBCG Mtb B30, rBCG h IFN γ	リコンビナント 85B BCG
e. Nas L3/Htk BCG	鼻粘膜ワクチン/heat killed whole BCG コペンハーゲン株
f. mc ² 6220, mc ² 6221, mc ² 6222, mc ² 6231	nor-replicating, <i>M. tuberculosis</i> strain (Δ lys A Δ pan CD)
g. mc ² 5059	replicating pro-apoptotic <i>M. bovis</i> BCG株 (Δ nuoG)
2. Phase I 2009 or Later	メチル化 21-K Da 蛋白
a. HBHA (heparin-binding haemagglutinin)	弱毒化ヒト結核菌 (virulence geneの pho Pの不活性)
b. Attenuated Live Vaccine based on Phop	anti-apoptotic 酵素活性を減弱
c. paBCG (pro-apoptotic BCG)	
B. Boosting, Pre-Exposure	
1. Phase I: 現在—2008年	特徴
a. MVA85A	リコンビナント MVA (Ag85Aを発現した)
b. M72	Mtb32+Mtb29の fusion 蛋白
c. AERAS-402	Replication-incompetent adenovirus 35 vector expressing <i>M. tuberculosis</i>
d. SSI Hybrid-1	antigens Ag85A,
e. SSI HyVac4/AERAS-404	Ag85B, and TB 10.4.
f. AERAS-405	fusion 蛋白 (Ag85B-ESAT-6)
g. r30	fusion 蛋白 (Ag85B-TB10.4)
h. Nas L3/Htk BCG	Shigella-delivered recombinant double-stranded RNA nucleocapsid (Ag85A,
	85B, Rv3407, latency antigen)
2. Phase I: 2009 or Later	リコンビナント Ag85B 蛋白
a. Hsp C TM TB Vaccine	Heat shock protein antigen complexes (Hsp Cs)
b. HBHA (heparin-binding haemagglutinin)	Nasal vaccine/Man capped
c. NasL3/AM85B conjugate	Arabinomannan oligosaccharide
d. PP1, PP2, PP3	BCG boosting
f. AC ₂ SGL Diacylated Sulfoglycolipids	AC ₂ SGL Mycobacterial lipids
g. HVJ-liposome/Hsp65 DNA + IL-12 DNA	M.Okada, 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
C. Post Exposure — Immunotherapy	
1. Phase I: 現在—2008年	特徴
a. Mycobacterium vaccae Heat-Killed	Fragmented <i>M. tuberculosis</i> cells
b. MVA85A	naked hsp 65 DNA vaccine
c. RUTI	Chimeric ESAT6/Ag 85A DNA ワクチン
d. Nas L3/Htk BCG	Recombinant BCG overexpressing chimeric ESAT6/Ag85A fusion protein
2. Phase I: 2009 or Later	Recombinant Sendai virus overexpressing chimeric ESAT6/Ag85A fusion protein
a. NasL3/AM85B conjugate	Epitope-based DNA-prime/peptide-boost vaccine. (liposome と CpG アジュバント)
b. hspDNA vaccine	
c. HG856A	
d. HBHA (heparin-binding haemagglutinin)	
e. HG856-BCG	
f. HG856-SeV	
g. TB Vax	
h. F36, F727	
i. Mycobacterium vaccae Heat-Killed	
j. AC ₂ SGL Diacylated Sulfoglycolipid	

界に先駆けての発見である。実際リコンビナント granulysin ワクチンや granulysin DNA ワクチンはマウスで結核治療効果を示した¹⁴⁾¹⁵⁾。したがって granulysin ワクチン治療は MDR-TB や XDR-TB に対しきわめて有用な治療法となるであろう。

V. 新しい結核ワクチンの開発状況（臨床応用）

(1) Stop TB Partnership

Stop TB Partnership (WHO) は2008年に現在進行中で、しかも臨床応用に有望な新しい結核ワクチン開発のリストを発表した。

われわれの HVJ/Hsp65 DNA+IL-12 DNA ワクチンも

候補の一つとしてその中に推奨されている (Table 3)。表内で太字で示したワクチンが評価されている。

2006~2015年 Global Plan to Stop TBとして新しい有効な結核ワクチン開発、2050年までに結核撲滅、が WHO の目標である。

(2) 結核ワクチンの応用の可能性

①新しい結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル (cynomolgus monkey, 最もヒトの肺結核に近いモデル, Nature Medicine 2, 430, 1996参照) を用い BCG よりもはるかに強力な予防ワクチン効果 (生存率, 血沈, 体重, 肺の組織) を示すワクチン2種を開発した⁶⁾⁸⁾。すなわち, 現在最も有力なものとしてHVJリ

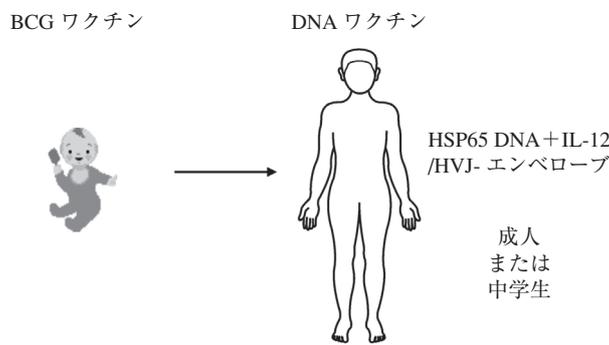


Fig. 3 新しい結核予防ワクチン(案) (DNA ワクチン)

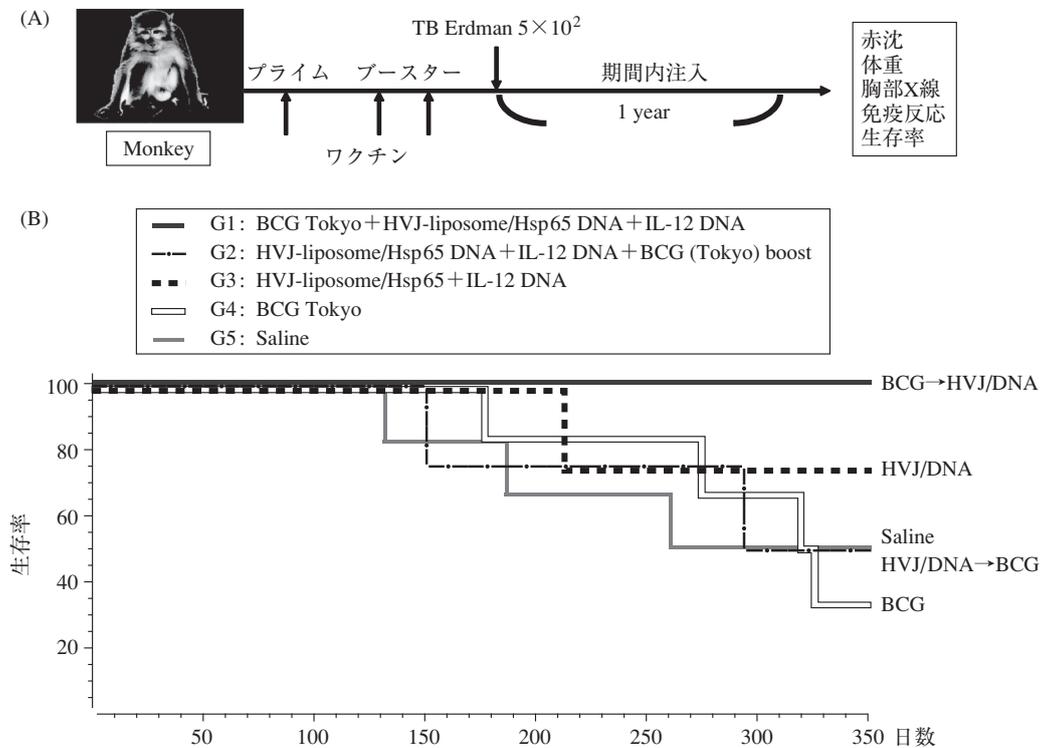


Fig. 4 ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルを用いた HVJ-リポソーム/HSP-65 DNA + IL12 DNA ワクチンの結核予防効果

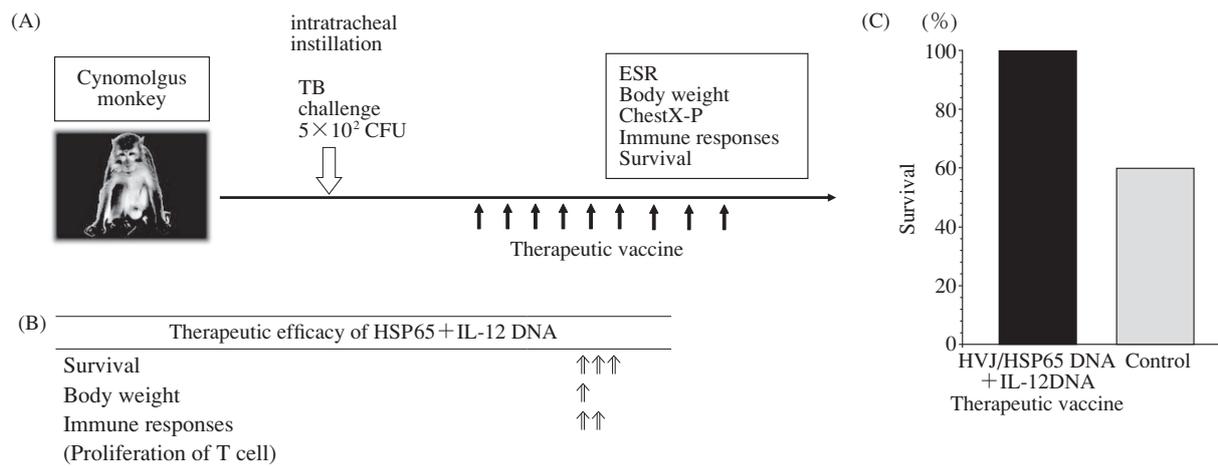


Fig. 5 Therapeutic effect of HVJ-Envelope/HSP65 DNA + IL-12DNA vaccine on TB-infected cynomolgus monkeys

ボソーム/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンおよび, r72f BCG ワクチンがあげられる。Ag85B-ESAT-6融合タンパク質 (Anderson 博士ら) も報告されているが, モルモット, サルでは効果は不明である。一方 Huygen の Ag85A DNA ワクチンはマウス・モルモットで有効であったがサルの結核感染予防に対し有効でなかったという。72f 融合タンパクサブユニットワクチン¹⁶⁾, ワクシニアウイルスに 85A DNA を導入したワクチンは第 II 相, r85B BCG (Horowitz ら) は第 I 相 clinical trial となっている¹⁶⁾。Dr. A. Hill らのワクシニアウイルス-85A DNA ワクチンは, アフリカでの第 I 相 clinical trial では, 85A DNA 蛋白に対する免疫応答増強が認められた¹⁷⁾。

②プライミング-ブースター法 (乳幼児 BCG—成人 HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン)

さらに BCG ワクチンをプライムし, 新しいワクチンをブースターする方法を用いた。サルでこのプライミング-ブースター法で 100% の生存を示した³⁾ (Fig. 2)。一方, BCG ワクチン単独投与群は 33% の生存率であった³⁾。このように, ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルを用いた実験系で, 強力な新しい結核ワクチンをわれわれは世界に先駆けて開発した。すなわち, 本邦では乳幼児に BCG 接種が義務づけられていることにより, プライミングワクチンとして BCG ワクチンを用い, 成人ワクチン (中学生, 成人, 老人) としてこの DNA ワクチンをブースターワクチンとして用いる結核ワクチンの臨床応用案である (Fig. 3)。

③治療ワクチン (Fig. 4, Fig. 5)

感染したカニクイザルの系で HVJ-エンベロープ/Hsp65 DNA + ヒト IL-12 DNA ワクチンを投与した。この群では 5 頭中 5 頭 100% の生存率が認められた。一方コントロール群の生食投与群では, 60% の生存率であっ

た。この DNA ワクチン投与群では, 体重増加が認められ, 末梢血 T 細胞の増殖増強反応が認められた。Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは最もヒトの結核感染症モデルに近いカニクイザルの系において予防ワクチンならびに治療ワクチン効果を示した。生存率・免疫能を増強した。したがってこのワクチンはヒト MDR-TB, XDR-TB の治療剤としてきわめて有用であることが示された。

VI. おわりに

HSP65 DNA + IL-12 DNA/HVJ エンベロープワクチンが優れていることより, このワクチンが結核の発症予防や治療に役立つ日を夢見ている。厚生科研, 文部科研, 大阪結核予防会研究費等により支援を受けた。

文 献

- 1) 岡田全司: 結核 “分子予防環境医学: 生命科学研究の予防・環境医学への統合” (分子予防環境医学研究会編). 本の泉社, 東京, 2003, 150-161.
- 2) Flynn JL, Chan J: Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 93-129.
- 3) Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine.* 2007; 25: 2990-2993.
- 4) Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, et al.: DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* by T cell activation. *Vaccine.* 2006; 24: 1191-1204.
- 5) 岡田全司: The development of novel vaccines against tuberculosis. *Jpn J Clin Immunol.* 2008; 31: 356-368.
- 6) Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, et al.: Novel recombinant BCG

- and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine*. 2005 ; 23 : 2132–2135.
- 7) 岡田全司：結核ワクチン。「結核」第4版，泉 孝英，網谷良一編，医学書院，東京，2006，50–58.
 - 8) Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: Novel prophylactic and therapeutic vaccine against tuberculosis. *Vaccine*. 2009 ; 27 : 3267–3270.
 - 9) Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al.: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*. 1998 ; 282 : 121–125.
 - 10) Tanaka F, Abe M, Akiyoshi T, et al.: The anti-human tumor effect and generation of human cytotoxic T cells in SCID mice given human peripheral blood lymphocytes by the *in vivo* transfer of the Interleukin-6 gene using adenovirus vector. *Cancer Res*. 1997 ; 57 : 1335–1343.
 - 11) Okada M, Yoshimura N, Kaieda T, et al.: Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981 ; 78 : 7718–7721.
 - 12) Okada M, Sakaguchi N, Yoshimura N, et al.: B cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas. Two distinct kinds of B cell growth factor and their synergism in B cell proliferation. *J Exp Med*. 1983 ; 157 : 583–590.
 - 13) Okada M, Kitahara M, Kishimoto S, et al.: IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the *in vitro* induction of cytotoxic T cells. *J Immunol*. 1988 ; 141 : 1543–1549.
 - 14) Okada M, Kita Y: Tuberculosis vaccine development: The development of novel (preclinical) DNA vaccine. *Human Vaccine*. 2010 ; 6 : 1–12.
 - 15) Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: *Procedia in Vaccinology*. Vol. 2, 3rd. Vaccine Global Congress, Singapore, 2009.
 - 16) Skeiky YA, Alderson MR, Ovendale PJ, et al.: Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *J Immunol*. 2004 ; 172 : 7618–7628.
 - 17) McShane H, Pathan AA, Sander CR, et al.: Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med*. 2004 ; 10 : 1240–1244.

ANTI-TUBERCULOSIS IMMUNITY BY CYTOTOXIC T CELLS · GRANULYSIN
AND THE DEVELOPMENT OF NOVEL VACCINES
(HSP-65 DNA + IL-12 DNA)

Masaji OKADA and Yoko KITA

Abstract CDC and ACET in U.S.A. reported that novel vaccines instead of BCG are required for the protection against infection of *Mycobacterium tuberculosis* worldwide. However, no novel vaccine for clinical use has not yet been developed in the world including U.S.A. and Europe.

We have developed a novel tuberculosis (TB) vaccine; a combination of the DNA vaccines expressing mycobacterial heat shock protein 65 (HSP65) and interleukin 12 (IL-12) delivered by the hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-envelope and -liposome (HSP65+IL-12/HVJ). This vaccine provided remarkable protective efficacy in mouse compared to the BCG vaccine on the basis of C.F.U of number of TB, survival, an induction of the CD8 positive CTL activity and improvement of the histopathological tuberculosis lesions. This vaccine also provided therapeutic efficacy against multi-drug resistant TB (MDR-TB) and extremely drug resistant TB (XDR-TB) in murine models. Furthermore, we extended our studies to a cynomolgus monkey model, which is currently the best animal model of human tuberculosis. This novel vaccine provided a higher level of the protective efficacy than BCG based upon the assessment of mortality, the ESR, body weight, chest X-ray findings and immune responses. Furthermore, the BCG priming and HSP65+IL-12/HVJ vaccine (booster)

by the priming-booster method showed a synergistic effect in the TB-infected cynomolgus monkey (100% survival). Furthermore, this vaccine exerted therapeutic efficacy (100% survival) and augmentation of immune responses in the TB-infected monkeys. These data indicate that our novel DNA vaccine might be useful against *Mycobacterium tuberculosis* including XDR-TB and MDR-TB for human therapeutic clinical trials.

The review also provides recent advances of the precise studies of induction of immunity including CD8 positive cytotoxic T cells and effector molecules such as granulysin by these vaccines, against multi-drug resistant tuberculosis and extremely drug resistant tuberculosis.

Key words: Killer T cell, Granulysin, New TB vaccine

Clinical Research Center, National Hospital Organization
Kinki-chuo Chest Medical Center

Correspondence to: Masaji Okada, Clinical Research Center,
National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical
Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591-
8555 Japan. (E-mail: okm@kch.hosp.go.jp)