

MAR/2003

- 27 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 3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 福岡国際会議場 平成15年3月13日-15日 日本呼吸器学会雑誌 VOL41 MAR/2003
- 28 内田寛治、中田光、寺川貴裕、濱野栄美、井上義一、山田芳嗣、慶長直人 Flashplate Plusで同定した特発性肺胞蛋白症患者血清中の抗GSP自己抗体の認識部位と重症度との関連 第43回日本呼吸器学会総会 福岡国際会議場 平成15年3月13日-15日 日本呼吸器学会雑誌 VOL41 MAR/2003
- 29 新井徹、井上義一、田中勲、源誠二郎、林清二、山本暁、審良正則、田澤立之、中田光、木村謙太郎、坂谷光則 肺胞蛋白症に対するGM-CSF吸入療法の有用性-血清マーカー、画像、肺機能による病勢評価 第43回日本呼吸器学会総会福岡国際会議場 平成15年3月13日-15日 日本呼吸器学会雑誌 VOL41 MAR/2003
- 30 桑山さち子、田中高生、河原正明、松村晃秀、井内敬二、細江重人、川口知哉、小河原光正、井上義一、喜多洋子、村木裕美子、稲永由紀子、金丸典子、橋元里美、松本久美、坂谷光則、岡田全司、新しい肺癌ワクチン開発のための生体内ヒト抗腫瘍免疫解析モデル(SCID-PBL/hu)の確立 第43回日本呼吸器学会総会 福岡国際会議場平成15年3月13日-15日 日本呼吸器学会雑誌 VOL41

MAR/2003

- 31 岡田全司、田中高生、井上義一、喜多洋子、桑山さち子、村木裕美子、稲永由紀子、金丸典子、橋元里美、松本久美、坂谷光則 新しい結核ワクチンと生体内ヒト抗結核T細胞免疫解析モデルの開発 第43回日本呼吸器学会総会 福岡国際会議場 平成15年3月13日-15日 日本呼吸器学会雑誌 VOL41 MAR/2003
- 32 田中高生、井上義一、喜多洋子、桑山さち子、村木裕美子、稲永由紀子、金丸典子、橋元里美、松本久美、坂谷光則、吉田栄人、大原直也、山田毅、岡田全司 ELISPOT assay(自動解析)を用いた新しい結核ワクチンによるT細胞活性化機構の鋭敏な解析法 第43回日本呼吸器学会総会 福岡国際会議場 平成15年3月13日-15日 日本呼吸器学会雑誌 VOL41 MAR/2003
- 33 松本久美、井上義一、岡田全司、田中高生、岡美穂、木村謙太郎、山本暁、坂谷光則 マスト細胞と線維芽細胞からのMatalloproteinase(MMP)-2産生 肺の線維化病変での役割 第43回日本呼吸器学会総会 福岡国際会議場 平成15年3月13日-15日 日本呼吸器学会雑誌 VOL41 MAR/2003
- 34 鈴木克洋、露口一成、村井隆大、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 症状か乏しく入院時発熱と有意な炎症反応かないため他疾患か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 福岡国際会議場 平成15年3月13日-15日 日本呼吸器学会雑誌 VOL41 MAR/2003
- 35 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、

木村謙人郎、井内敬一、坂谷光則  
気管支動脈寒栓術の IDC (interlocking detachable coil) 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 福岡国際会議場 平成 15 年 3 月  
13 日 - 15 日 日本呼吸器学会雑誌  
VOL41 MAR/2003

- 36 横野栄美、中田光、内田寛治、寺川真  
裕、飯倉元保、井上義一、慶長直人  
特発性肺胞蛋白症患者血清中の  
GM-CSF 中和能の連続測定 第 43 回  
日本呼吸器学会総会 福岡国際会議  
場平成 15 年 3 月 13 日 - 15 日 日本  
呼吸器学会雑誌 VOL41 MAR/2003
- 37 林清二、井上義一、森雅秀、山本暎、  
坂谷光則 肺組織中肝癌由来増殖因  
子発現細胞種の検討 第 43 回日本呼  
吸器学会総会 福岡国際会議場 平  
成 15 年 3 月 13 日 - 15 日 日本呼吸  
器学会雑誌 VOL41 MAR/2003

平成 14 年度 厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業 岡田全司班  
研究協力者

Steven Reed Corixa 研究所 副所長

「結核に対する新しいワクチンの開発及び動物を用いた安全性試験」

Steven Gillis Corixa 研究所 所長

「結核に対する新しいワクチンの開発及び動物を用いた安全性試験」

Richard C Mulligan ハーハート大学医学部 遺伝子学 教授

「結核に対する新しい DNA ワクチン(遺伝子治療)法の確立。骨髄 stem cell plasticity による肺 stem cell の結核後遺症の新しい再生医療法の開発」

鈴木 克洋 国立療養所近畿中央病院 臨床研究センター 薬剤耐性結核感染症研究部 部長

「多剤耐性結核に対する新しい治療法の開発」

金田 安史 大阪大学大学院医学研究科 分子治療学 教授

「HVJ-liposome を用いた新しい DNA ワクチンの開発」

服部 俊夫 東北大学大学院医学研究科 内科病態学 感染症内科 教授

「結核に対する新しい診断法 治療法の開発」

竹田 潔 大阪大学大学院医学研究科 微生物病研究科 助手

「Toll like レセプターによる多剤耐性結核症、非定型抗酸菌症の病態解明」

小出 幸夫 浜松医科大学 微生物学 教授

「新しい結核経口ワクチンの開発」

柏村信一郎 兵庫医科大学先端医学研究所 生体防御研究部門 講師

「サイトカイン(IL-18)を用いた抗結核免疫の解明」

松本 真 大塚製薬 微生物研究所 所長

「結核に対する多種の新しいワクチンの比較効果試験。動物を用いた安全性試験。多剤耐性結核に対する新しい化学療法の開発」

姫野 國祐 九川大学大学院医学研究科 病態医学部門 微生物免疫学講座 教授

「新しい結核ワクチンの innate immunity の病態解明と効果」

# 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

### 結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究

研究協力者 竹田 潔 大阪大学微生物病研究所 助手

#### 研究要旨

TLR を介した細胞内シグナル伝達経路にも各 TLR に特異的なシグナルの存在が明らかになった。

#### A. 研究目的

自然免疫系は、病原体の宿主内への侵入を最初に察知し、種々の炎症・免疫応答を誘導する重要な免疫系である。しかしながら、B, T 細胞が主役を演じる獲得免疫系の分子機構が詳細に解析されてきているのに対し、自然免疫系の作動メカニズムはほとんど理解されていない。最近、Toll-like receptor (TLR)ファミリーが、病原体の構成成分の認識に関与していることが明らかになってきた。結核菌に対する生体防御においても、TLR ファミリーによる結核菌の認識が重要な役割を果たす可能性が考えられる。本研究では、自然免疫系による結核などの病原体の生体内への侵入を察知するメカニズムを Toll-like receptor (TLR)を中心とした受容体の解析から明らかにし、結核感染における免疫系作動の分子機構を解明することを目的とする。

#### B. 研究方法

TLR を介した細胞内シグナルでは、MyD88 がすべての TLR を介した炎症反応の誘導に必須であるが、MyD88 非依存性のシグナルの存在も明らかになっている。最近 MyD88 と同じ TIR ドメインを有する

アダプターとして TIRAP が同定され、細胞レベルの解析から、TLR4 に特異的に会合することが示された。TIRAP の生理機能を遺伝子欠損マウスを作製することにより解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、SPF 環境化で週に2回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。

#### C. 研究結果

TIRAP 欠損マウスでは、LPS による炎症性サイトカインの産生が、MyD88 欠損マウスと同様に認められなかった。TLR3, TLR7, TLR9 リガンドへの反応性は正常であった。しかしながら、TLR2 リガンドによる炎症性サイトカインの産生も顕著に障害されていた。次に、細胞内のシグナル活性化を解析したところ、TLR2 リガンド刺激では、NF- $\kappa$ B, MAP kinase の活性化が認められないが、LPS 刺激では MyD88 欠損マウスと同様に活性化が遅れて観察された。また、LPS 刺激により、MyD88 非依存性に誘導される IFN 誘導性遺伝子の発

現や樹状細胞の成熟が TIRAP 欠損マウスでも正常に誘導された。さらに TIRAP/MyD88 二重欠損マウスでも、IFN 誘導性遺伝子の発現や樹状細胞の成熟が正常と同様に観察された。

#### D 考察

以上の結果から、TIRAP は TLR2 と TLR4 を介した MyD88 依存性のシグナル伝達に特異的に関与していることが明らかになった。また、TIRAP が MyD88 非依存性のシグナルには関与していないことが明らかになった。このことは、TIR トメインを有するアダプター TIRAP が TLR2, TLR4 のシグナルの特異性を規定していることを示しており、他にも TIR トメインを有するアダプターが、他の TLR ファミリーの細胞内シグナルや、MyD88 非依存性のシグナルに関与している可能性を示唆している。

#### E 結論

TLR を介した細胞内シグナル伝達経路にも各 TLR に特異的なシグナルの存在が明らかになった。

#### F 健康危険情報

なし

#### G 研究発表

##### 1 論文発表

- 1 Uematsu, S, Matsumoto, M, Takeda, K, and Akira, S (2002) LPS-dependent prostaglandin E<sub>2</sub> production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E<sub>2</sub> synthase gene induced by the TLR4/MyD88/NF-IL6 pathway J Immunol 168, 5811-5816
- 2 Takeuchi, O, Sato, S, Horiuchi, T, Hoshino, K, Takeda, K, Dong, Z,

- Modlin, R L, and Akira, S (2002) Role of TLR1 in mediating immune response to microbial lipoproteins J Immunol 169, 10-14
- 3 Sato, S, Takeuchi, O, Fujita, T, Tomizawa, H, Takeda, K, Akira, S (2002) A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and -independent pathways Int Immunol 14, 783-791
- 4 Suzuki, K, Nakajima, H, Kagami, S, Suto, A, Ikeda, K, Hirose, K, Hiwasa, T, Takeda, K, Saito, Y, Akira, S and Iwamoto, I (2002) Proteolytic processing of Stat6 signaling in mast cells as a negative regulatory mechanism J Exp Med 196, 27-38
- 5 Wang, T, Lafuse W P, Takeda, K, Akira, S, and Zwilling, B S (2002) Rapid chromatin remodeling of Toll-like receptor 2 promoter during infection of macrophages with Mycobacterium avium J Immunol 169, 795-801
- 6 Nakagawa, R, Naka, T, Tsutsui, H, Fujimoto, M, Kimura, A, Abe, T, Seki, E, Sato, S, Takeuchi, O, Takeda, K, Akira, S, Yamanishi, K, Kawase, I, Nakanishi, K, Kishimoto, T (2002) SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses Immunity 17, 677-687
- 7 Takeda, K, Takeuchi, O, and Akira, S (2002) Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors J Endotoxin Res 8, 459-463
- 8 Yamamoto, M, Sato, S, Hemmi, H, Sanjo, H, Uematsu, S, Kaisho, T, Hoshino, K, Takeuchi, O, Kobayashi,

- M, Fujita, T, Takeda, K, and Akira, S (2002) Essential role for TIRAP in activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4 Nature 420, 324-329
- 9 Yamamoto, M, Sato, S, Mori, K, Takeuchi, O, Hoshino, K, Takeda, K, and Akira S (2002) A novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor that preferentially activates the IFN- $\beta$  promoter in the Toll-like receptor signaling J Immunol 169, 6668-6672
- 10 Sanjo, H, Takeda, K, Tsujimura, T, Ninomiya-Tsuji, J, Matsumoto, K and Akira, S (2003) TAB2 is essential for prevention of apoptosis in fetal liver but not for IL-1 signaling Mol Cell Biol 23, 1231-1238
- 11 Prinz, M, Heikenwaelder, M, Schwarz P, Takeda, K, Akira, S, and Aguzzi, A (2003) Prion pathogenesis in the absence of Toll-like receptor signaling EMBO Rep 4, 195-199
- 2 学会発表
- 1 Kiyoshi Takeda, Masaya Kobayashi, and Shizuo Akira IL-12 is essential for development of chronic enterocolitis in macrophage-specific Stat3-deficient mice Keystone symposia, Microbial -epithelial-lymphocyte interaction in mucosal immunity 2002 4 5-10, Breckenridge, USA
- 2 Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira Innate immune recognition by Toll-like receptors 7th Biennial Conference of the International Endotoxin Society 2002 7 18-21, Washington DC USA
- 3 松川昭博、藤原 - 典、竹田 馨、番長静男、Mice with targeted disruption of Stat3 in macrophages and neutrophils are susceptible to septic peritonitis 第 32 回日本免疫学会総会、2002 12 4-6
- 4 山本雅裕、佐藤 博太郎、辺見弘明、山条秀樹、植松智、改訂 恒康、星野克明、竹田 馨、番長静男、TIRAP/Mal は TLR4 シグナルだけでなく、TLR2 シグナルにも関わっている、第 32 回日本免疫学会総会、2002 12 4-6
- 5 植松智、松本貞琴、竹田 馨、番長静男、膜結合型 PGE2 合成酵素の発現様式とノックアウトマウスの解析、第 32 回日本免疫学会総会、2002 12 4-6
- 6 佐藤 博太郎、竹田 馨、番長静男、Toll-like receptor (TLR) を介して種々の菌体成分が誘導する LPS トレランスの成立機構の解析、第 32 回日本免疫学会総会、2002 12 4-6
- 7 竹田 馨、山本雅裕、番長静男、Toll-like receptor による病原体の認識とそのシグナル伝達、第 24 回日本分子生物学会 2002 12 14, 横浜
- H 知的財産権の出願 登録状況
- 1 特許取得  
特願 2002-330972 号「ウイルス由来二重鎖 RNA による免疫賦活に関わるシグナル伝達タンパク質及びその遺伝子」平成 14 年 11 月 14 日
- 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（新興 再興感染症研究事業）

## （研究協力者）研究報告書

### 弱毒リステリアをキャリアとした抗結核菌 DNA ワクチンの研究

研究協力者 小出幸夫 浜松医科大学 教授

#### 研究要旨

弱毒リステリア D2 株をキャリアとして用いた抗結核菌 DNA ワクチンにより結核菌特異的細胞性免疫の誘導を認めた。本研究で、結核菌の主要分泌タンパク質かつ防御抗原である Ag85A, Ag85B, 及び MPB51 の発現プラスミドを持つ弱毒リステリア D2 株を C57BL/6 マウスに腹腔投与することにより、免疫マウスに PPD 特異的足蹠反応、および免疫脾細胞に PPD 特異的細胞増殖反応及び IFN- $\gamma$  産生能を認めた。

#### A 研究目的

結核に対する新規ワクチンとして、DNA ワクチンの研究は世界中で盛んに行われている。本研究では、DNA ワクチンのキャリアとして細胞内寄生性の弱毒非病原性細菌である弱毒リステリアをキャリアとして用いることにより、より効果的な抗結核菌 DNA ワクチンの投与方法を開発することを目的とした。

#### B 研究方法

1) DNA ワクチン用プラスミドの構築  
BCG 由来の Ag85A, Ag85B, MPB51 遺伝子 (BCG 菌と結核菌で相同な遺伝子) を PCR により単離し、リステリア、大腸菌両方にて増幅するプラスミド p3L118R のサイトメカロウイルスプロモーター/エンハンサーの下流にサフクロニングすることにより DNA ワクチン用プラスミド p3L118R-Ag85A, p3L118R-Ag85B, p3L118R-MPB51 を構築した。

2) DNA ワクチン用プラスミドの弱毒リステリアへの導入  
上記 DNA ワクチン用プラスミドを弱毒リステリア D2 株に電気穿孔法を用いて導入した。この組換えプラス

ミド導入弱毒リステリアをマクロファージ細胞株に感染させた後、細胞内での Ag85 遺伝子の発現を RT-PCR で確認した。

3) マウスへの接種とワクチンの効果判定  
組換えプラスミド導入弱毒リステリアを C57BL/6 マウスに 1 週間隔で 3 回腹腔注射した。最終免疫から 1 ヶ月以上経過後、PPD 特異的遅延型足蹠反応、脾細胞の細胞増殖反応、サイトカイン産生量を検討した。

（倫理面への配慮）

マウスを用いた実験はすべて浜松医科大学動物実験施設動物実験指針に則って計画し、動物実験委員会にて許可された。

#### C 研究結果

最終免疫から 1 ヶ月後に PPD を用いて足蹠反応を検討したところ、免疫マウスで PPD に反応して有意な腫脹を認めた。免疫マウス脾細胞を分離し PPD による刺激後、細胞増殖試験を行ったところ、免疫マウスで PPD に反応して有意な細胞増殖を認めた。さらに PPD 刺激後の培養上清中のサイトカイン量 (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5) を検討したところ、IFN- $\gamma$  量が有意に増加

していた。

#### D. 考察

1) リステリア自体の性質として 1) Th1 タイプの免疫応答の増強、2) マクロファージ等の professional APC への局在、が報告されているが、本研究では弱毒リステリアを DNA ワクチンのキャリアとして用いることにより効率のよい抗原提示及び免疫脾細胞の IFN- $\gamma$  の産生を指標とした Th1 タイプの免疫誘導を認めた。この Th1 タイプの反応は抗結核防御免疫に重要である。なお、本研究で用いた弱毒リステリア D2 株の安全性に関しては、大量 ( $10^8$  CFU 程度)のこの菌株を IFN- $\gamma$  レセプターノックアウトマウスに投与してもマウスに変化がないことを確認している。

2) 本研究では、結核菌の主要分泌タンパクである Ag85 ファミリー分子をワクチンの標的分子として用いた。従来から、Ag85A, Ag85B 分子が感染防御抗原であることが報告されているが、本研究で、MPB51 分子も Ag85A, Ag85B 分子と同様感染防御抗原であることを確認した。

#### E. 結論

弱毒リステリア D2 株をキャリアとして用いた抗結核菌 DNA ワクチンにより結核菌特異的細胞性免疫の誘導を認めた。

#### F. 健康危険情報

(該当なし)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nakamura Y, Suda T, Nagata T, Aoshi T, Uchijima M, Yoshida A, Chida K, Koide Y, Nakamura H: Induction of protective immunity against an intracellular bacterium using dendritic cells

retrovirally transduced with a minigene encoding a CTL epitope. *Infect Immun* (in press)

2. Nagata T, Aoshi T, Suzuki M, Uchijima M, Kim YH, Yang Z, Koide Y: Induction of protective immunity to *Listeria monocytogenes* by immunization with plasmid DNA expressing a helper T-cell epitope that replaces the class II-associated invariant chain peptide of the invariant chain. *Infect Immun*. 70(5):2676-2680, 2002.

3. Sugimoto K, Hanai H, Tozawa K, Aoshi T, Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Curcumin ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) - induced colitis in mice. *Gastroenterology* 123: 1912-1922, 2002.

4. Li B, Koide Y, Uchijima M, Ohtawara Y, Fujita K: Pretreatment of recipients with mitomycin-C-treated dendritic cells induces significant prolongation of cardiac allograft survival in mice. *Transplant. Proc.* 34(8): 3426-3428, 2002.

5. Uchiyama H, Nagata T, Yamada T, Uchijima M, Aoshi T, Suda T, Chida K, Nakamura H, Koide Y: Endosomal/lysosomal targeting of a single helper T-cell epitope of an intracellular bacterium by DNA immunization induces a specific T-cell subset and partial protective immunity in vivo. *FEMS Microbiol. Lett.* 216:91-97, 2002.

6. Uenoyama, S, Kobayashi T, Takenouchi Y, Yamashita K, Kazui T, Koide Y: Improvement of intestinal motility using S-methylisothiourrea sulfate in a canine postoperative ileus model. *Am J Surg* (in press)



- 7 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-g in the pathogenesis of experimental colitis in mice J Gastroenterol Hepatol (in press)
- 2 学会発表
- 1 永田 年、大原直也、内嶋雅人、小出幸夫 弱毒リステリアをキャリアとした Ag85A 及び Ag85B DNA ワクチンによる抗結核菌細胞性免疫の誘導 第 75 回 日本細菌学会総会 2002、4 月 4～6 日、横浜
- 2 鈴木美奈、永田 年、青枝大貴、内嶋雅人、小出幸夫 抗リステリア Th エピトープ DNA ワクチンを用いた感染防御におけるエピトープ ヒエラルキーの検討 第 75 回 日本細菌学会総会 2002、4 月 4～6 日、横浜
- 3 Sugimoto K, Hanai H, Aoshi T, Tozawa K, Uchijima M, Nagata T, Koide Y Curucumin ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in mice Digestive Disease Week, May 19-22, 2002 (San Francisco, Calif)
- 4 Nagata T, Miki K, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Koide Y Induction of specific cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 family molecules In Thirty-seventh Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, US-Japan Cooperative Medical Science Program, August 21-23, 2002 (Kyoto)
- 5 永田 年、内山 啓、青枝大貴、鈴木美奈、内嶋雅人、小出幸夫 DNA ワクチンによる細胞内寄生菌由来エピトープ特異的ヘルパー T 細胞の誘導 第 85 回 日本細菌学会関東支部総会、2002 年 11 月 21, 22 日 (東京)
- 6 内嶋雅人、永田 年、青枝大貴、小出幸夫 インターフェロン- $\gamma$  による TLR9 遺伝子発現誘導 第 32 回 日本免疫学会総会、2002 年 12 月 4 日～6 日 (東京)
- 7 永田 年、大原直也、内嶋雅人、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 32 回 日本免疫学会総会、2002 年 12 月 4 日～6 日 (東京)
- 8 Koide Y, Yoshida A, Nagata T, Uchijima M Protective CTL response is induced in the absence of CD4<sup>+</sup> T cells and CpG motif by gene gun DNA vaccination with a minigene encoding a CTL epitope of *Listeria monocytogenes* Keystone Symposia (Linking Innate with Adaptive Immune Responses ), Jan 30 - Feb 4, 2003 (Taos Convention Center, Taos, New Mexico, USA)
- 9 Uchijima M, Raz E, Carson DA, Nagata T, Koide Y Identification of immunostimulatory DNA-induced genes by suppression subtractive hybridization Keystone Symposia (Linking Innate with Adaptive Immune Responses ), Jan 30 - Feb 4, 2003 (Taos Convention Center, Taos, New Mexico, USA)
- H 知的財産権の出願 登録状況 (予定を含む。)
- 1 特許取得  
「細菌の全自動迅速同定法」(特許出願中)

# 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 鈴木克彦 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 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か予想され、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、臨床に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。

#### A 研究目的

抗酸菌症の現在の問題は、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つけられており、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か、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

を解析して明らかにすることを目的とする。

#### B 研究結果と考察

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 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 の発現を FACS を用いて検討するとともに、血清中の granulysin 濃度を当センターで開発した抗 granulysin 抗体を用いて測定した。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か予想され、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、臨床に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 精密にしていく予定である。

### C 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 granulysin 濃度が関連していることか予想され、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る。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。

### D 研究発表

#### 1 論文発表

- 1 Aiko Niumi, Hisako Matsumoto, Tetsuya Ueda, Masaya Takemura, Katsuhiko Suzuki, Eisaku Tanaka, Kazuo Chin, Michiaki Mishima, Ryoichi Amitani Impaired cough reflex in patients with recurrent pneumonia Thorax in press, 2003
- 2 Katsuhiko Suzuki, Akira Yoshida, Kazunari Tsuyuguchi, Mitsunori Sakatani PULMONARY DISEASE DUE TO NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA IN JAPAN Thirty-seventh joint research conference on tuberculosis and leprosy, the United States-Japan cooperative medical science program 2002, pp12-16
- 3 Tanaka E, Kimoto T, Tsuyuguchi K, Suzuki K, Amitani R Successful treatment with faropenem and clarithromycin of pulmonary Mycobacterium abscessus infection J Infect Chemother 2002, 8(3) 252-5

- 4 鈴木克洋 病院感染対策の進歩ー結核菌 日本臨床 2002、60 (11) 2172-2176
  - 5 鈴木克洋、富田元久、木下幸保、吉田亮、吉田志緒美、露口一成、入江章子、山本暁、坂谷光則 薬剤耐性菌感染症の現状と検査室の対応ー結核菌感染症ー 臨床病理 2002、50 (9) 847-852
  - 6 露口一成、井上義一、鈴木克洋、坂谷光則 画像でせまる呼吸器疾患 非定型抗酸菌症 Medicina 39(12)
  - 7 露口一成、鈴木克洋 抗結核薬 「治療薬カイト 2003-2004」、文光堂 東京、印刷中、2002
  - 8 鈴木克洋 気管支結核、気管支鏡 医学書院 印刷中、2002
  - 9 鈴木克洋 Nursin Selection呼吸器疾患感染症 肺結核、肺炎 肺化膿証 (木村謙太郎、松尾ミヨ子編) 学研、東京 印刷中
  - 10 鈴木克洋、坂谷光則 「呼吸器疾患の治療と看護」非定型抗酸菌症。(工藤翔二編) P205-207。南江堂 東京、2002
- #### 2 学会発表
- 1 吉田亮、新井徹、藤田悦生、井上義一、鈴木克洋、坂谷光則 当院における最近の肺 M kansasi 症について 医療 56 (2) Page242、2002 09
  - 2 鈴木克洋、湊良彰、村井隆大、井上康、吉田亮、新井徹、安藤守秀、藤田悦生、露口一成、源誠二郎、井上義一、林清二、岡田全司、木村謙太郎、坂谷光則 多剤耐性結核の臨床的検討 結核 77 (10) 700、2002
  - 3 露口一成、鈴木克洋、湊良彰、村井隆大、井上康、吉田亮、新井徹、安藤守秀、藤田悦生、源誠二郎、井上義一、林清二、岡田全司、木村謙太郎、坂谷光則 喀痰から M szulgai が検出された症例の検討 結核 77(10) 699、2002

- 4 藤田悦生、井上義一、田中勲、審良正則、源誠二郎、新井徹、井上幸治、奈良彰、鈴木克彦、木村謙太郎 慢性肺気腫患者における 3D-CT による気腫化(%LAA)と肺機能検査との比較 日本呼吸器学会雑誌 40 118, 2002
- 5 奈良彰、新井徹、井上義一、小原九郎、吉田亮、鈴木克彦、審良正則、山本暁、木村謙太郎、坂谷光則 ひまん片汎細気管支炎剖検 11 例の臨床病理学的検討 日本呼吸器学会雑誌 40 83, 2002
- 6 新井徹、井上義一、井上幸治、桑名みどり、吉田亮、藤田悦生、源誠二郎、鈴木克彦、山本暁、木村謙太郎、坂谷光則 Follicular bronchiolitis の疾患活動性マーカーとしての血清 CA125 の有用性 日本呼吸器学会雑誌 40 83, 2002
- 7 鈴木克彦 院内感染対策の現状と問題 感染症学雑誌 76(2) 135, 2002
- 8 吉田亮、丸尾一、新井徹、井上義一、鈴木克彦、坂谷光則 当院における初回治療例の結核菌薬剤感受性検査の推移について 結核 77(3) 317, 2002
- 9 木下幸保、田元久、鈴木克彦、坂谷光則 蛋白膨潤作用を有する抗酸菌前処理液(CCE 液)の評価 MGIT と 2% 小川培地における NALC-NaOH 液との比較 結核 77(3) 259, 2002
- 10 木下幸保、田元久、鈴木克彦、坂谷光則 抗酸菌の略染均質化集菌塗抹法の有用性 結核 77(3) 258, 2002
- 11 鈴木克彦 結核の医学教育 結核病棟を持つ療養所からみた結核 教育への提言 結核 77(3) 227 2002

## 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

#### サイトカイン(IL-18)を用いた抗結核免疫の解明に関する研究

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 が生体内で広くストレスに抵抗する為の因子として重要な役割を果たしている事がしめされた。この作用は IL-18 刺激によって産生か誘導されるサイトカイン、Interferon- $\gamma$ 、そして Interferon- $\gamma$  刺激によって活性化マクロファージから産生されるカス状メデイエーター、NO の作用によるものである事が強く示唆された。また、IL-18 刺激によって直接的に刺激されたNK細胞のNK活性も宿主抵抗性に重要である事が示された。以上の研究結果から、IL-18 はDNA ワクチンの補助分子として有効である可能性が強く示唆されたものと我々は判断した。

#### A 研究目的

ヒトでの種々の疾患 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する。動物実験の系では感染実験等を行い、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 ワクチン応用の可能性を検討する。

#### B 研究方法

種々の患者血清中（リュウマチ、精神的ストレス下、および骨髄移植後 GVH 病発症例）の IL-18 濃度を ELISA 法にて測定し、患者の病態との関連を検討する。同時に IL-18 受容体の発現の変化を RT-PCR 法にて解析する。動物実験の系ではマラリア原虫の感染系を用い、宿主の感染抵抗性を IL-18 が増強するか否かについて検討する。更に nude mouse に腫瘍細胞を接種し、IL-18 による宿主抵抗性の誘導を検討する。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、カ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クスについての解析をおこなう。

#### C 研究結果

我々の研究の結果から、IL-18 は関節リュウマチなどの炎症性疾患（Futani H, et al J Immunother 2002）、GVH 病などの免疫的疾患（Fujimori Y, et al J Interferon Cytokine Res 2002）のみならず、パニクedisオーダー時にも産生か誘導されることか明らかとなった（Kokai M Et al J Immunother 2002）。この結果は IL-18 が広く生体のストレス反応をコントロールするサイトカインである事を示唆するものと考えられた。また、動物実験の系では IL-18 と IL-12 の投与により大量のサイトカイン、Interferon- $\gamma$ 、カス状メデイエーター、NO の産生か誘導される事が示された（Kimura-Shimmyo A, et al J Immunother

2002)。またこの時血液中のリンパ球のポピュレーションが大きく変動する事が明らかとなった( Hosohara K., et al. Clin. Diag. Lab. Immunol. 2002)。

一方、宿主の感染抵抗性に関する解析から、外からの IL-18 の投与が有効にマラリア原虫の血液内での増殖を抑制する事、IL-18 遺伝子欠損マウスではマラリア原虫の毒性が著しく増強される結果がえられた( Singh R.P., et al. J. Immunol. 2002)。このメカニズムとしては、NK 活性の増強やインターフェロンを介した細胞性免疫の活性化によるものと考えられた。また、同様に腫瘍細胞を接種された nude mouse においても外からの IL-18 の投与は、腫瘍細胞の増殖・骨転移を有効に抑制する事が明らかとなった( Iwasaki T., et al. J.

Immunother. 2002)。この結果は IL-18 が NK 細胞に作用し、その NK 活性の増強やインターフェロンの産生誘導を介して生体防御・宿主抵抗性の獲得に重要な役割を果たしていることを示唆するものと考えられた。

#### D. 考察・結論

以上の研究結果から、IL-18 が生体内で広くストレスに抵抗する為の因子として重要な役割を果たしている事がしめされた。遺伝子欠損マウスが感染や腫瘍に対する宿主抵抗性を著しく低下させる事、外因性の IL-18 の投与が宿主抵抗性を増強する事が明らかとなった。この作用は IL-18 刺激によって産生が誘導されるサイトカイン、Interferon- $\gamma$ 、そして Interferon- $\gamma$  刺激によって活性化マクロファージから産生されるガス状メディエーター、NO の作用によるものである事が強く示唆された。また、IL-18 刺激によって直接的に刺激された NK 細胞の NK 活性も宿主抵抗性に重要である事が示された( Kashiwamura S., et al.

J. Immunother. 2002)。以上の研究結果から、IL-18 は DNA ワクチンの補助分子として有効である可能性が強く示唆されたものと我々は判断した。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Singh R.P., Kashiwamura S., Rao P., Okamura H., Mukherjee A., Chauhan V.S. The Role of IL-18 in blood-stage immunity against malaria Plasmodium yoeli 265 and Plasmodium berghei ANKA. J. Immunol. 168; 4674-4681, 2002
2. Kashiwamura S., Ueda H., Okamura H. Roles of interleukin-18 in tissue destruction and compensatory reactions. J. Immunother. 25; Suppl-1, 4-11, 2002
3. Kimura-Shimmyo A., Kashiwamura S., Ueda H., Ikeda T., Kanno S., Akira S., Nakanishi K., Mimura O., Okamura H. Cytokine-induced injury of the lacrimal and salivary glands. J. Immunother. 25; Suppl-1, 42-51, 2002
4. Iwasaki T., Yamashita K., Tsujimura T., Kashiwamura S., Tsutsui H., Kaisho T., Sugihara A., Yamada N., Mukai M., Yoneda T., Okamura H., Akedo H., Terada N. Interleukin-18 inhibits osteolytic bone metastasis by human lung cancer cells possibly through suppression of osteoclastic bone-resorption in nude mice. J. Immunother. 25; Suppl-1, 52-60, 2002
5. Futani H., Okayama A., Mastui K., Kashiwamura S., Sasaki T., Hada T., Nakanishi K., Tateishi H., Maruo S., Okamura H. Relation between interleukin-18 and PGE2 in synovial fluid of osteoarthritis : a potential therapeutic

- target of cartilage degradation J Immunother 25, Suppl-1, 61-64, 2002
- 6 Kokai M, Kashiwamura S, Okamura H, Morita Y Plasma interleukin-18 levels in patients with psychiatric disorders J Immunother 25, Suppl-1, 68-71, 2002
  - 7 Hosohara K, Ueda H, Kashiwamura S, Yano T, Ogura T, Murakawa S, Okamura H Interleukin-18 induces acute biphasic reduction in the levels of circulating leukocytes in mice Clin Diag Lab Immunol 9, 777-783, 2002
  - 8 Fujimori Y, Yoshimoto T, Matsui K, Tsutsui H, Okamoto T, Kashiwamura S, Hada T, Okamura H, Kakishita E, Hara H, Nakanishi K Increased expression of interleukin-18 receptor on T lymphocytes in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation J Interferon Cytokine Res 22, 751-754, 2002

# 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

### 胃切除後結核発症者の免疫応答 — 新たなワクチン開発に向けてのヒトへの応用の課題 —

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 教授

#### 研究要旨

今日の結核発症は高齢者、HIV 感染者、他の疾患のために栄養状態が悪化した者など免疫不全状態に陥った者に多い。従来より結核発症の危険因子の一つに胃切除術後患者があげられてきた。しかしこれらの個々の免疫、栄養状態未だ明らかとされていない。我々は、ワクチン開発に向け、結核発症患者の個々の免疫状態を探るために、今回は、術後結核発症患者（OP&TB）の免疫状態とそれに伴う臨床経過を胃切除術を伴わない結核発症患者（TB）、胃切除を受け結核を発症していない非結核発症者、正常者と比較検討した。免疫状態において TB 群、OP&TB 群でリンパ球数は正常者を下回り ( $p<.05$ )、また、 $\gamma$ -globulin および抗 TBGL (Tuberculous Glycolipid) 抗体は TB 群では著しく増加するが、OP&TB 群は TB 群比しに増加に抑制が見られた ( $p<.05$ )。葉酸値の低下は両群で見られたが OP&TB 群でより低下する 4ng/ml 以下の個体が多く見られた ( $p<.05$ )。血清葉酸値 4ng/ml 以下の個体群を抗 TBGL 抗体産生を検討すると TB 群に比して OP&TB 群は有意に抗 TBGL 抗体の産生が低下していた。これは、同じ結核患者でもその背景により抗原への抗体産生に差を認めた。

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  
共同研究者 芦野有悟 芦野純子 宇佐美修 西巻雄司 岡田信司  
大野 勲 東北大学医学部附属病院感染症呼吸器内科

#### A. 研究目的

1993 年の結核非常事態宣言後、BCG に勝る新たな結核予防システムの確立が必要となった。そこでこれまでとは違う結核抗原タンパクを効果的に生体内で発現させるために違う手段にて投与する試み、すなわち DNA ワクチン開発をおこなってきた。我々臨床家が結核発症患者において危惧するのは結果患者の免疫状態である。結核ワクチンが生体内で機能し、抗体産生に至るためには一連の宿主免疫応答が重要とな

る。しかし結核患者のなかには Th1 タイプのサイトカインの減弱が誘導されているものがあると言われているように何らかの免疫異常の存在が明らかになりつつある。さらには従来から取り上げられているように免疫に深く関与する要因の一つとして栄養の問題をのべている者も多い。中でも葉酸は古くから細胞性免疫、液性免疫に重要な要因の一つとして取り上げられており、現在では DNA の合成に関わってきていることが明らかとなった。そこで平成 14 年



度は個々の背景をもつ結核患者の免疫能を知る一環として、古くから結核の危険因子とされてきた胃切除を施行された患者を選択し、栄養、特にその術後に低下をもたらすとされる葉酸値が胃切除後の結核発症の免疫能及び臨床経過に影響を与えるのか否か検討した。

## B 研究方法

対象としたのは、当院および近隣の結核患者収容施設にて結核にて入院中の者(TB群)、胃切除後で特に胃切除を受けた患者は別群(OP&TB)とした。また任意の健康者(Control)とは別に胃の手術か生体に与える影響を検討するため、胃手術後で結核を発症していないもの(OP)を対象とした。

これらで全ての群でリンパ球数、免疫グロブリン、血清葉酸値を測定し更に、結核に対する液性免疫として抗 TBGL (Tuberculous Glycolipid) 抗体を細胞性免疫の指標としてノヘルクリン反応を比較検討し、また葉酸の健康人末梢血単核球への直接の影響を *in vitro* にて観察した。

結核発症後の臨床経過の検討は結核の生体への拡がりや治療の指標として、Gaffky 号数と胸部X線所見上肺結核による浸潤の程度を病変の占拠する肺葉数を数値化して評価した。さらに治療の指標として Gaffky 陽性持続期間並びに在院日数を算出した。これらを OP&TB 群と TB 群間で比較検討した。

*In Vitro* 実験では、健康者の末梢血単核球を各葉酸 (0,12,24,60,120,10<sup>4</sup>nM) 濃度下で1週間培養し apoptosis を観察した。本研究は東北大学倫理委員会の承認を得て行われており、検体の提供者とは十分インフォームドコンセントをとり、検査成績は機密の為連結匿名で保管されている。

## C 研究結果

TB 群では末梢血リンパ球数は有意に低下し、 $\gamma$ グロブリンは上昇していた。同じ結核発症群でも OP&TB 群は末梢血リンパ球数、 $\gamma$ グロブリンは TB 群と比較し低下を示す症例が多かった( $p < 0.05$ )。抗 TBGL 抗体とノヘルクリン反応は結核発症者の中で比較すると胃切除はその陽性率に影響を及ぼさなかったか、抗 TBGL 抗体価は TB 群に比して OP&TB 群で低値を示していた( $p < 0.05$ )。栄養状態の指標として測定した葉酸値は Control 群、OP 群に比へ結核発症した両群にて低値を示し、特に OP&TB 群で「より低値 (4ng/ml 以下) を示す者が多かった( $p < 0.05$ )。しかし OP 群では葉酸は低値とならず Control 群と同様であり、胃切除によって葉酸が低下し結核を発症するという仮説には結びつかなかった。このことより結核を発症した患者において、葉酸が低下するのは、結核発症した後に葉酸が消費される為である可能性が示唆された。そこで結核発症2群の中で血清葉酸値 4ng/ml 以下となった者を抗 TBGL 抗体価との関係を見ると、OP&TB 群で有意に低下していた。

臨床経過では、Gaffky 号数、胸部X線所見上肺結核による浸潤の程度、在院日数、院内死亡数に差は見られなかった。

*In vivo* 実験では葉酸濃度の低下に応じて末梢血単核球の apoptosis の増加がみられた。

## D 考察

従来から胃切除術後の栄養不良が結核発症に結びつくと言われてきた。しかし今回の検討で葉酸低下が各種免疫能に影響を与え、結核発症にまた発症後の臨床経過にも影響するという仮説は、否定された。現在の術前、術後の医療管理や食生活においては胃の切除のみでは栄養の障害、特に葉酸

の低下をもたらさず、むしろ結核発症が葉酸を招いている可能性を示唆させた。しかし結核発症の2群にて比較検討を行うと、TB群は末梢血リンパ球数の低下と葉酸の低下が平行して動いている。しかし葉酸はガンマグロブリンと抗TBGL抗体価とは逆の動きが見られ、葉酸低下が即免疫能の低下を意味しない。これは葉酸が何らかの要請によりγグロブリン産生のために消費されることを想定させる。従来より低葉酸血漿者ではγグロブリンの低値が報告されていることから、葉酸がγグロブリンの産生に関わることは知られてきた。葉酸はDNA合成に重要な役割を演じ、タンパク合成にも関わっている。本研究で注目すべき点はOP&TB群では、血清葉酸値も低下するが、末梢血リンパ球数、γグロブリン、抗TBGL抗体価も低い事である。これは術後の葉酸の体内蓄積の低下等の様々な解釈がされるが、術後葉酸値の低下をOP群にて認められないことから、次なる仮説が浮かびあった。γグロブリンや抗TBGL抗体産生に葉酸が使用されるがOP&TB群では消費効率が悪い為、葉酸をうまく利用できずγグロブリンや抗TBGL抗体産生をされないという仮説である。つまりこのような症例ではDNA-Replikationsが葉酸代謝の面から大きく障害されてい可能性を示唆、ワクチンを投与しても抗体を産生する効率が悪い人間の存在の可能性を明らかとした。葉酸代謝の中でメチレンテトラヒドロキシ還元酵素に遺伝子多型が存在し、それが葉酸の利用効率を低下させる結果として、動脈硬化、癌、痴呆などの疾患に結びついていくとされている。今回の結果は胃切除患者にもこのような存在を示唆するものであった。さらに葉酸低下は我々のin vitro実験で示したように末梢血単核球のapoptosisを引き起こした。このことはOP&TB群においてリンパ球の一層の低下

をもたらささらなる免疫不全状態を引き起こすことも考えられた。もちろん様々な刺激がリンパ球を活性化させる一方で刺激の一つがDeth-ligandに及びapoptosisを起こすことも想定されるが、葉酸低下も影響している可能性を示唆した。今日、結核診療において問題となってくるのは、高齢者、及び糖尿病や膠原病、HIV感染者等により免疫能に低下が見られる者の結核発症である。このような免疫低下状態の人間に対するワクチンの使用は、正常の免疫能を持った人間とは異なった反応をすることを念頭に開発に当たらなければならない。しかしこのようなOP&TB群においても臨床経過においては、TB群と差はなく、術後の嚴重なる経過観察が結核早期発見につながりよりの確な治療が救命に役立っているものと考えられた。今回の結果は個々人の免疫状態の違いに対してきめ細かいワクチン開発の必要性を示唆した。

## E. 結論

個々の免疫状態を知る為に今回は胃切除後結核発症患者を対象として栄養、抗体産生能、臨床経過の面から検討した。結果、抗体産生能、末梢血リンパ球数の低下が見られ、その原因に細胞内の葉酸代謝系の障害が示唆された。ワクチン開発にあたり、個々の背景にある基礎疾患を念頭に置くことの重要性を考えさせられた。しかし臨床経過に差を認めなかったことは、このような免疫能低下者においても早期の発見と的確な治療の重要であることを示したものであった。

## F. 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

- 1 Shirota H, Sano K, Hirasawa N, Terui T, Ohuchi K, Hattori T, and Tamura G B Cells Capturing Antigen Conjugated with CpG Oligodeoxynucleotides Induce Th1 Cells by Elaborating IL-12 J Immunol Jul 15,169(2) 787-794, 2002
- 2 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

日本語論文リスト

- 1 Ashino J, Ohno I, Okada S, Nishimaki K, Saito Y, Endo M, Kaku M, Sasano H, and Hattori T Along culture period was necessary for identification of mycobacteria tuberculosis in a patient with disseminated tuberculosis Kekkaku 77 73-77, 2002

2 学会発表

国際学会発表

- 1 Liu Y, Usami O, Hattori T V3 Loop Peptides Enhance HIV-1 Entry The Second Collaborative Research Seminar on HIV and other Viral Entry Inhibitors, NY, May 3-5, 2002
- 2 Hattori T Tuberculosis and retrovirus diseases (HIV and HTLV 1) in Japan The Third National Seminar on Diagnosis and Therapy of Tuberculosis, China, June 16-22, 2002

国内学会発表

- 1 Hong L, Xu Y, Hattori T Analysis of HIV-1 entry using derived peptides 第

- 22 回東北免疫研究会、仙台、2002 年
- 2 芦野純子、大野勲、岡田信司、服部俊夫 結核菌培養検査で陽性となるまでに時間をした全身播種結核患者の一例 第 77 回日本結核病学会総会、東京、2002 年
- 3 宇佐美修、杉浦久敏、服部俊夫 カリニ肺炎を併発した AIDS 症例の臨床症状と分離ウイルス 第 167 回日本内科学会東北地方会、仙台、2002 年
- 4 芦野純子 ひまん性汎細気管支炎 (DPB) の治療経過中に多発性軟骨炎を合併した 1 例 第 1 回南東北マクロライト研究会、仙台、2002 年
- 5 大野勲 肺炎球菌の組織侵入機構 第 7 回南東北科学療法シンポジウム、仙台、2002 年
- 6 宇佐美修、凌虹、服部俊夫 HIV 感染における gp41 の立体構造変化を認識する抗体の特性 第 16 会日本エイズ学会シンポジウム 9 感染成立とその防御、名古屋、2002
- 7 服部俊夫 免疫再構築症候群-現状と考察- 第 16 会日本エイズ学会シンポジウム 11 Immune Reconstitution Syndrome にどう対するか、名古屋、2002 年
- 8 凌虹、服部俊夫 第 16 会日本エイズ学会一般演題 V3 ループペプチドによる gp120 の活性化機構、名古屋、2002 年

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

結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究

研究協力者 姫野國祐 九州大学大学院医学研究院 教授

研究要旨

一般的に結核やトキソプラズマのような細胞内寄生病原体に対する防御免疫には CD8<sup>+</sup>T 細胞を中心とした細胞性免疫の誘導が必須である。しかしそれらの病原体のペプチド抗原を用いた従来の免疫方法では体液性免疫は誘導されるが、上記のような細胞性免疫の誘導はきわめて困難である。なおこれらの病原体には化学療法が困難で、また薬剤耐性の場合が多く、ワクチンの開発が急務である。

A. 研究目的

本プロジェクトでは上記知見を基盤とし、結核菌由来の MPB51 遺伝子、マラリア原虫由来の MSP-1 遺伝子、トキソプラズマ原虫由来の SAG-1 遺伝子等とユビキチン遺伝子との融合遺伝子を構築する。ついで各々の感染宿主に対してそれらの融合 DNA を用いて遺伝子ワクチンを行い、その遺伝子産物であるユビキチン化された病原体抗原がプロテアソームでプロセッシングを受けることによりその病原体に特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞を強力に誘導するフュージョン DNA ワクチンを開発する。

A. 研究方法

- 1) まずトキソプラズマ抗原遺伝子である SAG-1 遺伝子とユビキチン遺伝子の融合を行った後に COS-7 細胞にそのフュージョン DNA を定常発現させ、抗 SAG-1 抗体で免疫沈降させた後に抗ユビキチン抗体を用い Western blotting で確認した。
- 2) ついで、ユビキチン遺伝子と SAG-1 遺伝子を融合させることにより、

SAG-1 遺伝子産物がプロテアソームで processing を受けることを 1) で用いた COS-7 細胞とプロテアソーム阻害剤である MG-132 を用いて間接的に証明した。

- 3) 結核菌に対する同様の DNA ワクチンを開発するため結核菌由来の Ag85B および HSP65 遺伝子とユビキチンの融合遺伝子の構築を完成した。

（倫理面への配慮）

実験に使用するマウスは実験終了後、エーテル麻酔により安楽死させる。

B. 研究結果

本融合遺伝子で BALB/c マウスに 2 週間毎に 4 回、遺伝子銃を用いて DNA ワクチンを行い、最終ワクチンの 2 週間後にトキソプラズマ RH 株を感染させた。SAG-1 遺伝子による DNA ワクチンでは全く効果がなかったが、ユビキチン-SAG-1 融合遺伝子による DNA ワクチンでは 90 % 以上のマウスが生存し、強いワクチン効果が証明された。さらにユビキチン-SAG-1 遺伝子ワクチン群では SAG-1 を標的とした強い