

着・侵入に関する結核菌や宿主細胞の分子機構はほとんど不明である。結核菌を吸入しても、宿主細胞に接着・侵入を阻止することにより、感染成立や発病を回避することが理論的に可能である。すなわち、結核菌の接着・侵入機構である MDP1-グリコサアミノグリカンには有望な治療・予防標的候補であり、その阻害は結核の治療・予防戦略になることが期待される。薬剤標的遺伝子を改変することにより生ずる耐性結核菌にも同様な接着・侵入機構が機能していることが想定され、接着・侵入機構の阻害は薬剤耐性結核にも有効な治療・予防戦略となるであろう。従って、殺菌・静菌を目的とした抗結核化学療法とはまったく異なり、結核菌の細胞接着・侵入機構の阻害を目的とした抗結核療法を狙う戦略であり、従来にない独創的なアプローチであると考えられる。

E. 結論

MAC 特異的抗原を用いた迅速・簡便血清診断法を開発した。血清抗 GPL 核抗体の測定は MAC 感染症の診断や疾患活動性の評価に有用である。血清抗体の測定は体外診断であり、安全、迅速(所要時間：約3時間)、簡便、かつ、多検体処理が可能であり、MAC 特異的抗原を用いた血清診断は MAC 感染症の診療に有用である。

抗酸菌の宿主細胞への接着・侵入は抗酸菌特異的 DNA 結合蛋白質と宿主細胞表面グリコサアミノグリカン相互作用に依存していた。予備的な *in vivo* 感染実験結果は抗 MDP1 抗体や GAG の感染前や感染後投与でも有効、すなわち、抗酸菌の宿主細胞接着・侵入機構の阻害は新規新規治療・予防戦略として有望である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitada, S., R. Maekura, N. Toyoshima, T. Naka, N. Fujiwara, M. Kobayashi, I. Yano, M. Ito, and K. Kobayashi. 2005. Use of glycopeptidolipid core antigen for serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in

immunocompetent patients. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12:44-51.

- 2) Wada, T., S. Maeda, A. Tamaru, S. Imai, A. Hase, and K. Kobayashi. 2004. Dual-probe assay for rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 42:5277-5285.
- 3) Aoki, K., S. Matsumoto, Y. Hirayama, T. Wada, Y. Ozeki, M. Niki, P. Domenech, K. Umemori, S. Yamamoto, A. Mineda, M. Matsumoto, and K. Kobayashi. 2004. Extracellular mycobacterial DNA binding protein 1 participates in *Mycobacterium*-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. J. Biol. Chem. 279:39798-39806.
- 4) 小林和夫. 2004. 抗酸菌病原因子と宿主応答の分子機序. 日本ハンセン病学会雑誌 73: 263-270.
- 5) 小林和夫. 2004. 結核. 世界最大の感染症. 今日の移植 17: 509-515.

2. 学会発表

- 1) 知っておきたい話題の感染症(シンポジウム). 抗酸菌感染症. 小林和夫. 日本細菌学会雑誌, 59: 63, 2004. 第77回日本細菌学会総会 2004年4月大阪.
- 2) 結核基礎研究の最前線(シンポジウム). 結核, 光山 正雄, 小林和夫. 79: 161, 2004. 第79回日本結核病学会総会 2004年4月 名古屋.
- 3) マクロファージの機能と肉芽腫性炎(ワークショップ). 抗酸菌病原因子と宿主応答の分子機序. 小林和夫. 日本ハンセン病誌, 73: 125, 2004. 第77回日本ハンセン病学会総会 2004年5月さいたま.

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

平成16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）

結核菌特異抗原に対する胸水中のリンパ球の反応を指標とした

結核性および癌性胸膜炎の鑑別診断法の検討

分担研究報告書

分担研究者

荒川 宜親

（国立感染症研究所・細菌第二部部長）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

結核菌特異抗原に対する胸水中のリンパ球の反応を指標とした
結核性および癌性胸膜炎の鑑別診断法の検討

分担研究者 荒川 宜親（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）
協力研究者 小澤 良之（国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官）
石川 暁志（国立感染症研究所・細菌第二部・流動研究員）

研究要旨.

非定型抗酸菌において、プラスミドの保有状況に関して検討した。用いた菌種は、非定型抗酸菌のうち迅速型発育菌15種、遅発型発育菌6種で、環境中及び臨床的に分離された計438株について検討した。プラスミドの保有株は、いずれも MAC (*Mycobacterium intracellulare* & *avium* complex) で、MAC 152 株中 11 株にプラスミドの存在が認められた。プラスミドの *SaII*, *SmaI*, *PstI* 制限酵素切断泳動パターンから、得られたプラスミドは4つの type に分類された。これらの4つの type のプラスミドは、*Sau3AI* による partial digestion によるクローン解析の結果、いずれも *Mycobacterium intracellulare*, BCG において、複製可能であった。このうち1つの type のプラスミドは、さらに迅速発育型である *Mycobacterium smegmatis* についても複製可能であった。

一方、pET29a プラスミドベクターにヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子 (HSV1-tk, VZV-tk) をクローニングし、*Escherichia coli* K-12 株を形質転換した。その形質転換体の抗ヘルペスウイルス薬感受性を調べたところ、VZV-tk を導入した株では、コントロール株に比べ増殖が抑制されることが分かった。この結果をもとにして、マイコバクテリア中で増殖可能な pvv16 プラスミドに HSV1-tk, VZV-tk を *hsp60* プロモータ直下に組み込み *M. smegmatis* を形質転換し、抗ウイルス薬の感受性を調べたところ、コントロールとの明らかな差は確認されなかった。現在、適切なチミジンキナーゼおよび抗ウイルス薬の選択を行っている。

A. 研究目的

結核菌に関しては、今までのところプラスミドの保有報告例はないが、非定型抗酸菌のうち、*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus* に関しては、circular type のプラスミドの存在が報告されている。また、*Mycobacterium brancleri*, *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium avium* に関しては、linear type のプラスミドの存在が知られて

いる。HIV に合併した MAC 患者に関しては、特に高率にプラスミドを保有していることが欧米より報告されており、プラスミド自体の病原性への関与が示唆されているが、プラスミドに存在する病原性因子の報告例は、きわめて少ないのが現状である。また、MAC のうち、*M. intracellulare* に関しては、今まで適当なベクター等が開発されておらず、十分な基礎的な研究がなされていない。そこで、非定型抗酸菌におけるプラスミドの解析をすすめることで、プラスミド上に存在する病原性因子の同定や、*M. intracellulare* における新たな研究用ベクターを開発しこれを用いることで、

M. intracellulare による病原性の基礎的研究をすすめることを本研究の目的とした。

一方、非結核性抗酸菌感染症や結核の治療に有効な化学療法薬として、リファンピシン、イソニアジド、エタンブトール等があげられるが、近年これらに対する耐性菌の出現が報告されており、いずれかの薬剤の耐性頻度は、初回治療においておよそ 10%、再治療においてはおよそ 40%である。多剤耐性結核菌の確認もされており、そのことが治療を困難にしている。それゆえに、結核の新規治療方法が必要とされている。これまでの報告により、ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼを導入した *E. coli* が抗ヘルペスウイルス薬である塩基アナログに対して感受性を示すことが知られている。本研究では、結核菌にヘルペスウイルスのチミジンキナーゼをファージベクターを用いて導入し、その菌体に抗ヘルペスウイルスを作用させる方法で殺菌することを目標にしている。この治療法が確立すれば、既存の抗結核薬に加え、塩基アナログによる治療が選択肢に含まれることになるため、その意義は大きいと考えられる。

今回、その予備実験として *E. coli* および迅速発育型抗産菌の *M. smegmatis* にプラスミドベクターを用いてヘルペスウイルスチミジンキナーゼを導入し、抗ウイルス薬の感受性を調べた。

B. 研究方法

プラスミド解析に用いた菌株は、迅速型発育菌 15 菌種 (*M. chelonae* 21 株、*M. fortuitum* 25 株、*M. smegmatis* 20 株、*M. neoaurum* 9 株、*M. flavescens* 19 株、*M. thermoresistibile* 22 株、*M. rhodesiae* 5 株、*M. gadium* 5 株、*M. phei* 19 株、*M. porcinum* 10 株、*M. gilvum* 4 株、*M. aichiense* 5 株、*M. tokaiense* 7 株、*M. pulveris* 16 株) また、*Mycobacterium* 属の近縁種である *Rhodococcus aurantiaca* 21 株である。また遅発型発育菌 6 種 (*Mycobacterium intracellulare* & *avium* complex 152 株、*M. kansasii* 31 株、*M. marinum* 24 株、*M. xenopi* 15 株、*M.*

haemophilum 5 株) である。プラスミドの DNA 抽出方法としては、1%グリシン加培養法及び菌体の前処置としてアセトン洗浄を用いたアルカリ少量法変法を用いた。プラスミド DNA は *SaII*, *SmaI*, *PstI* にて切断後、0.8%TAE agar にて電気泳動し、プラスミドの typing をおこなった。また、pUC18 に Km 耐性遺伝子を挿入し、*SaII*、あるいは *Sau3A-I* による partial digestion した各プラスミド DNA fragment のクローニング用ベクターに用いた。得られたクローンによって、BCG, *M. intracellulare*, *M. smegmatis* を形質転換し、各宿主内でのプラスミドの複製の可能性を検討した。

他方、1型ヘルペスウイルスおよび、varicella zoster ウイルスのチミジンキナーゼがコードされている遺伝子を PCR 法にて増幅させた後、pET29a プラスミドベクターにクローニングを行った。そのプラスミドで *E. coli* K-12 株を形質転換を行い、*E. coli* pET29a:HSV1-tk および、*E. coli* pET29a:VZV-tk を作成した。

形質転換体の抗ヘルペスウイルス薬感受性を調べるために、最終濃度で 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアシクロビル、ガンシクロビル添加培地をそれぞれ作成し、2 mM IPTG で発現誘導を行った株と、コントロール株との増殖の差を比較した。

同様に、抗産菌発現ベクター pvv16 プラスミドに、HSV1-tk および VZV-tk を組み込み、*M. smegmatis* を形質転換を行った。*E. coli* と用いた物と同じ条件の培地にて、*M. smegmatis* pvv16:HSV1-tk および、*M. smegmatis* pvv16:VZV-tk の増殖を pvv16 のみ導入したコントロール株との増殖の比較を行った。

C. 研究結果

用いた迅速型発育菌においては、いずれもプラスミドの保有株は、認められなかった。*Mycobacterium* 属の近縁種である *Rhodococcus aurantiaca* 21 株中、2 株にプラスミドを認めた。プラスミドの電気泳動パターンから、これら 2 株のプラスミドは同一のもと思われた。このプラスミドか

ら得られたクローンは、いずれも *M. intracellulare*, *M. smegmatis*, BCG 内での複製は認められなかった。遅発型発育菌においては、*M. intracellulare* & *avium* complex 152 株中、11 株にプラスミドの存在が認められた。これらのプラスミドはその電気泳動パターンから、4 種に分類された。このうち 3 種においては、クローンの解析から、*M. intracellulare* 及び BCG において複製可能であった。また、他の 1 種のみ、さらに *M. smegmatis* においても複製可能であった (表 1、2)。

一方、アシクロビルもしくはガンシクロビル添加培地における、*E. coli* pET29a:VZV-tk の増殖はコントロール株と比べて、遅いことが分かった (図 1)。しかしながら、抗ヘルペスウイルス薬添加培地における、*M. smegmatis* pvv16:HSV-tk および、*M. smegmatis* pvv16:VZV-tk の増殖はコントロール株と比べて差が認められなかった。

D. 考 察

本邦で環境中あるいは臨床的に分離された非定型抗酸菌について、プラスミドの保有状況について分析した結果、遅発型発育である MAC のみにプラスミドの存在が確認された。MAC はもともと環境菌であり、人—人感染はないとされているが、非定型抗酸菌症の中で最も高率に認められる原因菌であり、結核菌との鑑別も含め臨床的にも重要である。今回、MAC に認められたプラスミドは、BCG, *M. intracellulare* においても複製可能であり、また、迅速型発育菌である *M. smegmatis* においても複製可能なものも認められるなど、今後 *M. intracellulare* 用のベクター開発に十分貢献するものと考えられる。また、今回同定されたプラスミドの解析を続けることで、プラスミド上に存在する遺伝子の解明を進め、プラスミドによる MAC 感染症の病原性への関与の解明へと発展することを期待したい。

他方、VZV-tk を導入することにより、抗ヘルペスウイルス薬に対して、増殖抑制効

果を持たせることが可能であることが分かった。このことは、活性を持ったアシクロビルおよびガンシクロビルが DNA polymerase を阻害していると考えられる。*M. smegmatis* に関しては、HSV1-tk および VZV-tk 導入後も増殖に影響を与えることができなかった。原因として、*M. smegmatis* 内において、導入したチミジンキナーゼが働かず抗ヘルペスウイルス薬のリン酸化が行われていない可能性、*M. smegmatis* の DNA polymerase は活性化した抗ヘルペスウイルス薬の阻害を受けないことなどが考えられるが、詳細は不明である。今後、導入するチミジンキナーゼの種類、および抗ヘルペスウイルス薬の選択を検討する予定である。また、今回は迅速発育型抗産菌での判定であるため、今後 BCG などの遅発型に導入し、効果を判定する予定である。

E. 結 論

本邦で環境中及び臨床的に分離された非定型抗酸菌について、プラスミド保有状況について検討したところ、MAC 152 株中 11 株にプラスミドの存在が認められた。これらのプラスミドは 4 種に分類され、BCG, *M. intracellulare* あるいは *M. smegmatis* においても複製可能であった。

また、*E. coli* に株に varicella zoster ウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子を導入することによって、抗ヘルペスウイルス薬により、菌の増殖に影響を及ぼすことができることが分かった。しかしながら、*M. smegmatis* に対しては予想されるような結果を得ることが出来なかった。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

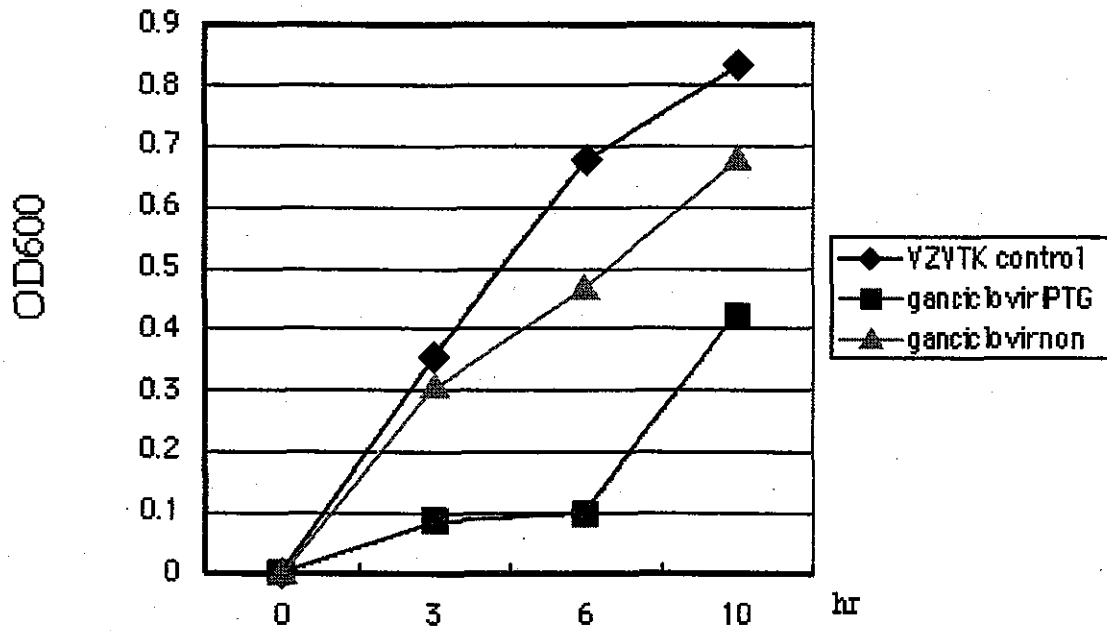
表 1 . *M. Intracellulare* & *avium* plasmids

Plasmid type	plasmid	Colony morphology	origin	region
type1	13-1872	Wet, white, smooth	Cattle	S50, 帯広
	13080	Wet, white, smooth	Human	
	13082	Wet, white, smooth	Human	
type2	13037	Wet, yellow, smooth	Human	S46, 中部病院 S46, 中部病院 S54, 神戸 S55, 中部病院 S60, 中部病院
	13892	Dry, yellow, smooth		
	13898	Dry, white, rough		
	13-2712	Dry, white, rough		
	13-3106	Dry, white, rough		
	13-3996	Dry, white, smooth		
Type 3	13034	Dry, white, rough	Human	S36, 名大
Type 4	13079	Wet, white, smooth	Human	

表 2 . Replication in *Mycobacterium*

	<i>M. intracellulare</i>	BCG	<i>M. smegmatis</i>
Type1 13082	(+)	(+)	(-)
Type2 13037	(+)	(+)	(+)
Type3 13034	(+)	(+)	(-)
Type4 13079	(+)	(+)	(-)

A



B

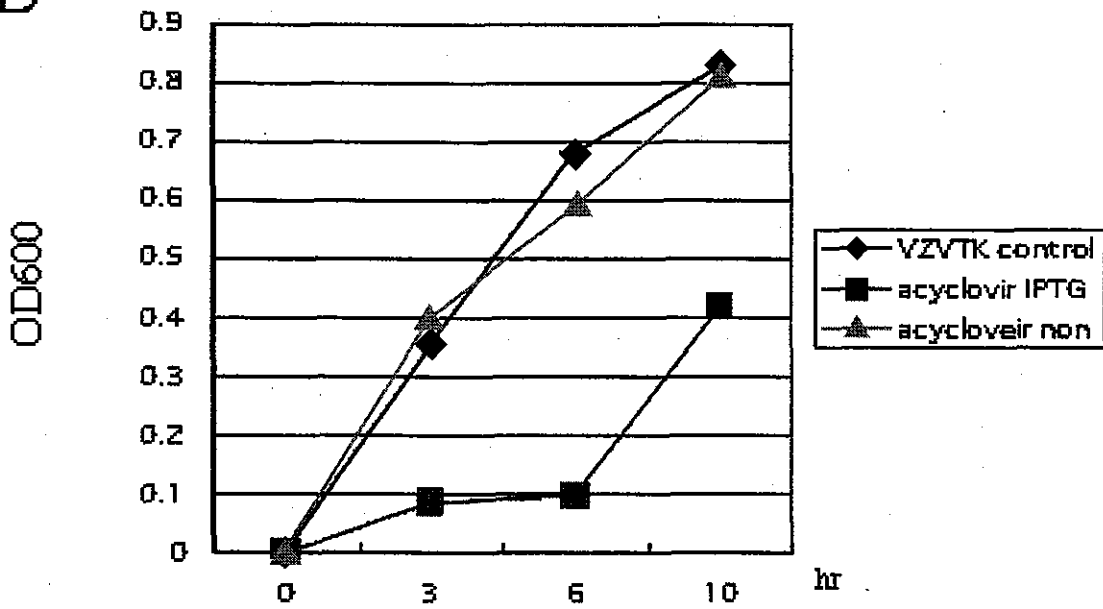


図1 *E. coli* pET29a:VZV-tkに対する抗ヘルペスウイルス薬の影響
 A) acyclovir添加時の増殖曲線
 B) ganciclovir添加時の増殖曲線

平成16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）

新規抗酸菌ワクチンの開発・非結核性抗酸菌遺伝子診断法の確立

分担研究報告書

分担研究者

牧野 正彦

（国立感染症研究所・病原微生物部部長）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

新規抗酸菌ワクチンの開発・非結核性抗酸菌遺伝子診断法の確立に関する研究

分担研究者 牧野 正彦（国立感染症研究所・病原微生物部部長）

研究協力者 向井 徹（国立感染症研究所・病原微生物部・第一室室長）

研究要旨.

抗酸菌に対する生体防御反応を司る上で樹状細胞及び樹状細胞が産生する IL-12 は極めて重要な役割を果たす。樹状細胞は末梢単球から分化・誘導されるが、その際単球が産生するサイトカインにより、その成熟過程は大きく影響を受ける。一方、単球は抗酸菌に対し強い感受性を有し、抗酸菌感染を受けると IL-1 β など種々のサイトカインを産生する。これらのサイトカインの中で IL-1 β は、成熟樹状細胞に作用すると活性化し IL-12 を産生させる。しかし、IL-1 β が単球に作用した場合、樹状細胞に対し生体防御反応を司る上でどのような影響を与えるかこれまで明らかにされていなかった。本研究では、この点を明らかにすることを目的とした。CD14 陽性単球に IL-1 β を 100 pg/ml と極めて微量作用させたところ、未熟期樹状細胞に抗酸菌を感染させても十分に自己 CD4 陽性 T 細胞を活性化し得なかった。そこで、IL-1 β 処理単球由来樹状細胞と非処理単球由来樹状細胞を細胞表面抗原の発現程度及び IL-12p70 産生能で比較検討した。その結果、IL-1 β 処理樹状細胞では、CD86 及び CD83 抗原の発現程度が有意に低下していた。さらに、LPS (TLR4 リガンド)、Peptidoglycan (TLR2 リガンド)、*M. bovis* BCG 及び IL-1 β 刺激により産生誘導される IL-12p70 は著しく低下していた。従って、ワクチン開発にあたり、末梢単球に親和性を有し、IL-1 β を産生する分子は、樹状細胞の機能を障害し、生体防御反応に悪影響を与える可能性が示唆された。

抗酸菌感染症の約 20% は、非結核性抗酸菌症である。しかし、菌同定による確定診断までに長期を要するため、迅速な鑑別診断法の開発が望まれている。迅速かつ簡易な遺伝子診断法開発のため、等温遺伝子増幅法 (LAMP 法) を用い、抗酸菌検出法の開発を行った。*M. kansasii* と *M. gastri* の遺伝子鑑別は、500 ゲノムコピーの検出感度で確立された。ついで、ハンセン病原菌である *M. leprae* の検出系は、菌ゲノムに複数存在する RLEP を標的遺伝子としたプライマーの設計・検討の結果、検出感度 30 分の反応時間で 5 コピーまで検出可能であった。LAMP 法による非結核性抗酸菌の迅速鑑別診断が可能となった。

A. 研究目的

抗酸菌は 20 世紀最大の恐怖を与えた慢性感染症であり、現行の BCG に代わる新たなワクチンの開発は全世界が切望する最重要課題の一つである。BCG は、わが国では広く用いられてきたが、その有効性は限られており小児の粟粒結核のみを予防するこ

とが可能とされている。我々はこれまでに、抗酸菌共通抗原である Major Membrane Protein-II (MMP-II) は、強い抗原性を有し樹状細胞およびマクロファージなど Professional な抗原提示細胞を強く活性化することを報告してきた。一方、BCG が何故有効に作用しないのか、その機構は十分

に明らかにされていない。BCG に代わるワクチンを構築する際に、BCG replacement および BCG repair が基本的概念となる。しかし、BCG は安全なベクターとして確立されたワクチンであるため、MMP-II 等免疫強化分子を BCG へ組み込むなど BCG repair 法によるワクチン開発が望ましいと考えられる。しかし、その際には BCG の有する欠点を十分に明らかにしなければならない。また、ワクチンの最大の目的は、結核など病原性抗酸菌が体内に侵入した時、迅速に対応できるメモリータイプ T 細胞を作製することにあるが、そのためには樹状細胞が有効に作用しなければならない。抗酸菌は、末梢単球に感染すると様々なサイトカインを産生するが、それらサイトカインが樹状細胞の成熟および活性化にどのように作用するか明らかにされていない。本年度は、単球由来サイトカイン、とりわけ IL-1 β に焦点を当てて、抗抗酸菌生体防御反応の観点から樹状細胞の機能にどのような影響を与えるか検討した。

さらに、非結核性抗酸菌の迅速鑑別診断法の開発を目的とし、等温遺伝子増幅法 (LAMP) 法により病原性である *M. kansasii* と非病原性である *M. gastri* の鑑別法およびハンセン病原因菌である *M. leprae* の同定法の開発を目的とした。

B. 研究方法

正常健常者末梢血よりプラスチック付着せい細胞を分離し、単球として用いた。単球由来樹状細胞は、rGM-CSF および rIL-4 を用いて誘導した。マクロファージは、単球に対し rM-CSF を作用させ得た。単球、樹状細胞およびマクロファージにらい菌を感染させた際に産生される IL-1 β は、ELISA 法により市販のキットを用いて測定した。IL-1 β 処理単球および非処理単球から分化・誘導した樹状細胞を LPS, Peptidoglycan, MMP-II, IL-1 β および *M. bovis* BCG で刺激し、IL-12p70 の産生を誘導した。IL-12p70 は市販のキットを用いて ELISA 法で測定した。らい菌感染樹状細胞の抗原提示能は、自己 CD4 陽性 T 細胞をレ

スポンダー細胞として用いた際に T 細胞から産生される IFN- γ を指標とした。IFN- γ も上記と同様に市販のキットを用い ELISA 法で測定した。樹状細胞の表面抗原の解析は、市販の抗体を用いて FACScaliber にて解析した。MMP-II に対するモノクローナル抗体は、マウスに精製 MMP-II を免疫してミエローマ細胞と融合させて得た。

M. kansasii と *M. gastri* の鑑別 LAMP 法に用いる増幅標的遺伝子領域として、*dnaA* 領域に存在する抗酸菌種特異領域を選択した。プライマー設計プログラムにより、特異性を考慮し、両菌種各々 5 候補プライマーを設計した。27 抗酸菌種ゲノム DNA を用い、標的菌種のみを増幅するプライマーセットを選択した。増幅産物は、領域内に存在する単一制限酵素サイトにより特異性の確認を行った。ついで、各標的菌ゲノム DNA の希釈液を用い検出感度の検討を行った。ハンセン病原因菌である *M. leprae* の特異検出系を確立するためゲノム DNA に複数存在する RLEP 遺伝子を標的遺伝子として設定し、種特異性および検出感度について PCR 法との比較を行った。また、臨床分離株を用い、種内検出安定性の検討を行った。

倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解(インフォームドコンセント)を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。

C. 研究結果

活性化成熟樹状細胞は、ヒト悪性腫瘍に対する免疫治療剤として広く用いられ、かつ抗酸菌感染症に対する生体防御反応を誘導する上でも極めて重要な役割を果たして

いる。樹状細胞の活性化には、生体内では IL-1 β が用いられているが、樹状細胞のプレカーサーである CD14 陽性単球に及ぼす影響については十分明らかにされていない。そこで、IL-1 β を単球に作用させた場合の樹状細胞の成熟及び活性化に及ぼす影響を調べ、以下の通り結果を得た。

- ① 抗酸菌を単球あるいは単球より M-CSF を用いて誘導したマクロファージに感染させると IL-1 β を産生したが、未熟あるいは成熟樹状細胞に感染させても IL-1 β は産生されなかった。
- ② CD14 陽性単球を少量 (100 あるいは 300 pg/ml) の IL-1 β に処理した後、サイトカインを用いて樹状細胞を誘導し抗酸菌を感染させ、さらに LPS を用いて成熟樹状細胞を誘導した。この樹状細胞を用い、自己 CD4 陽性 T 細胞の活性化を検討したが、その程度は IL-1 β 非処理単球由来樹状細胞に比し著しく低下していた。
- ③ サイトカインを用いて誘導した未熟樹状細胞を、細胞表面抗原の発現程度及び抗酸菌どん食能を検討したが、IL-1 β 処理の影響は観察されなかった。
- ④ 未熟樹状細胞に LPS を添加して得た成熟樹状細胞を検討すると、IL-1 β 処理により CD86 及び CD83 抗原の陽性率及び発現程度は著しく低下していた。
- ⑤ 樹状細胞の活性化を IL-12p70 の産生能で評価した。LPS・Peptidolycan・*M. bovis* BCG・IL-1 β を成熟樹状細胞に作用させると IL-12p70 を産生するが、IL-1 β 処理単球より得た樹状細胞では、これら全ての刺激に対する IL-12p70 産生応答能が極めて強く低下していた。
- ⑥ 未熟樹状細胞に IL-1 β を作用させても、その後分化させた成熟樹状細胞から産生される IL-12p70 は減少していた。
- ⑦ 抗酸菌感染により単球から産生される他

のサイトカイン (IL-6・IL-10・TNF α) では、樹状細胞の IL-12p70 産生能を抑制する働きは認められなかった。

- ⑧ 単球に対し IL-1 β 産生誘導剤である LPS を 1 pg/ml 作用させた後樹状細胞を作製すると、その IL-12p70 産生能は IL-1 β 添加単球と同様に著しく低下した。一方、IL-1 β 産生を誘導しない、らい菌由来細胞質タンパクを単球に 1 μ g/ml (LPS の 1,000,000 倍) 作用させても樹状細胞からの IL-12p70 産生能は低下せず、LPS と細胞質タンパクの両者を単球に作用させると、IL-12p70 産生は低下した。

以上より、IL-1 β は樹状細胞の成熟段階に作用すると樹状細胞の活性化を低下させるファクターであると考えられた。

M. kansasii と *M. gastri* の鑑別 LAMP 法用プライマーの検討の結果、*M. kansasii* 検出には dna Kan 32 が、*M. gastri* では、dna Gas583 が各々種特異的に遺伝子増幅され、他抗酸菌 27 種ゲノム DNA 200 ピコグラムでは、遺伝子増幅はされなかった。標的遺伝子特異増幅確認のため、増幅産物を、*M. kansasii* では、*Nae* I、*M. gastri* では *Hae* II による制限酵素処理を行ったところ、1 バンドに縮合し、特異的に増幅された (図 1)。希釈ゲノム DNA を用いた検出感度検討では、*M. kansasii* および *M. gastri* は、共に 500 コピーゲノム DNA が検出限界であった (図 2)。*M. leprae* 検出用プライマーセットは、特異性を検討し RLEP154 を選択した。また、制限酵素 *Bcn* I 処理により単一バンドを形成した (図 3)。遺伝子検出は、30 分の反応においてゲノム DNA 5 コピーまで可能であった。同領域を標的にする PCR 法では、1 コピーまで検出可能であったが、反応時間は 4 時間であった (図 4)。*M. leprae* 臨床分離株 8 株を用い反応を行ったところ、全株において、特異的な増幅が認められた。

D. 考察

抗酸菌に対する生体防御反応は、細胞性

免疫が中心に営まれ、その中でもタイプ 1 CD4 陽性 T 細胞が主要な役割を果たしている。タイプ 1 T 細胞の活性化には、樹状細胞およびそこから産生される IL-12p70 が不可欠であり、樹状細胞の分化・誘導は生体内とりわけ単球から産生されるサイトカインによって大きく影響される。一般に、抗酸菌は末梢単球に対し強い親和性を有し、感染すると種々のサイトカインを産生する。そこで、単球由来サイトカインの樹状細胞の成熟および活性化に及ぼす影響を検索したところ、単球に IL-1 β を少量作用させても樹状細胞の成熟化を著しく阻害し、種々の刺激に対する IL-12p70 の産生能を極めて強く抑制した。樹状細胞の成熟阻害は、CD86 あるいは CD83 抗原陽性細胞率の低下およびそれらの発現程度の低下より明らかであった。また、IL-12 の産生は種々の機序により誘導されるため、TLR4 リガンドである LPS、TLR2 リガンドである Peptidoglycan および MMP-II、さらに抗酸菌 *M. bovis* BCG、さらに癌に対する免疫療法剤である IL-1 β を用いて、IL-12p70 の産生を試みたが、IL-1 β 処理単球より得た樹状細胞では全ての刺激に対して抵抗性を示した。一方、ある種の病原体は、樹状細胞の機能を抑制することが知られている。Measles ウイルスは樹状細胞のアポトーシスを誘導し、HIV-1 は IL-10 を産生することで樹状細胞の機能を抑制することが報告されている。しかし、IL-1 β 処理単球より得た樹上細胞では、こうした現象は観察されなかった。IL-12p70 の産生には、細胞核の NF- κ B の活性化が要求されるが、IL-1 β 処理単球由来樹上細胞では、種々の刺激を加えても NF- κ B の活性化が十分に誘導されず、その結果として IL-12p70 の産生低下が誘導されたものと考えられる。

ワクチンを生体内に投与した場合、目的としたターゲット細胞以外の細胞にも作用する可能性が極めて高い。単球を刺激し IL-1 β を産生する抗原をワクチンとして用いた場合、そこから得られた樹状細胞は機能不全を示す可能性が極めて大きいことが本研究から明らかになった。BCG もまた単球

に感染し IL-1 β 産生を誘導することから、BCG が十分にワクチン効果を示すことができない原因の一つと考えられた。

PCR 法は、現在最も頻用されている遺伝子増幅法である。しかし、遺伝子増幅を行い鑑別診断するためには高価な温度可変装置を必要するため、広く普及するには至っていない。LAMP 法は、63°C の温度を一定に保つ恒温槽により遺伝子増幅操作を完結することが可能であり、国内のみならず開発途上国においても簡易に導入することが可能と考えられる。今回の検索により、抗酸菌 *M. kansasii*, *M. gastri* 及び *M. leprae* を特異的に検出する方法の開発ができたこと、今後さらに多菌種の抗酸菌を鑑別するシステムを開発し、それらを組み合わせることが可能となれば、より迅速に、そしてより容易に抗酸菌を同定するキットの確立に結びつくものと考えられる。

E. 結論

外来性および内在性 IL-1 β 感作単球より、抗酸菌生体防御反応上中心的役割を果たす樹状細胞を分化・誘導すると、T 細胞の活性化に不可欠な IL-12p70 が十分産生されず機能不全を示す。ワクチン開発に重要な知見と考えられた。

M. kansasii と *M. gastri* および *M. leprae* を特異的に検出する LAMP 法を確立した。多種抗酸菌種を同時に鑑別する方法が確立されれば、より完全な鑑別キットの開発に繋がる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maeda, Y., P. J. Brennan, and M. Makino. Studies of lipoproteins of *Mycobacterium leprae*. Jpn. J. Leprosy, 73: 15-21, 2004.
- 2) Kai, M., Y. Maeda, S. Maeda, Y. Fukutomi, K. Kobayashi, Y. Kashiwabara, M. Makino, M. A. Abbasi, M. Z. Khan, and P. A. Shah. Active surveillance of leprosy contacts in

- country with low prevalence rate. Intl. J. Lepr. Other Mycobact. Dis., 72(1):50-53, 2004.
- 3) 牧野正彦. 結核・ハンセン病. 倉田毅編, ネオエスカ 感染症・アレルギーと生体防御, 同文書院出版, 2005, in press.
 - 4) 牧野正彦, 鈴木幸一, 福富康夫, 山下康子, 前田百美, 宮本友司, 向井 徹, 中田 登, 甲斐雅規, 山崎利雄, 儀同政一, 松岡正典. ハンセン病基礎医学研究のトピックス. Jpn. J. Leprosy, 74:3-22, 2005.
 - 5) Miyamoto, Y., T. Mukai, F. Takeshita, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, and M. Makino. Aggregation of mycobacteria caused by disruption of fibronectin-attachment protein-encoding gene. FEMS Microbiol. Letters, 236:227-234, 2004.
 - 6) Kimura, H., Y. Maeda, F. Takeshita, L. E. Takaoka, M. Matsuoka, and M. Makino. Upregulation of T-cell-stimulating activity of mycobacteria-infected macrophages. Scand. J. Immunol., 60:278-286, 2004.
 - 7) Yamashita, Y., Y. Maeda, F. Takeshita, P. J. Brennan, and M. Makino. Role of the polypeptide region of 33 kDa mycobacterial lipoprotein for efficient IL-12 production. Cell. Immunol., 229:13-20, 2004.
 - 8) Maeda, Y., T. Mukai, J. Spencer, and M. Makino. Identification of Immunomodulating Agent from *Mycobacterium leprae*. Infect. Immunity, 2005, in press.
2. 学会発表
- 1) Development of a new vaccine candidate against mycobacteria. Makino, M., M. Maeda, T. Mukai, and N. Ishii. 4th The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 30 August-2 September, 2004, Awaji Island, Hyogo, Japan.
 - 2) Study of the interaction of *M. leprae* with Schwann cells. Maeda, Y., M. Endoh, K. Terao, and M. Makino. 4th The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 30 August-2 September, 2004, Awaji Island, Hyogo, Japan.
 - 3) The genes involved in glycosylation steps of mycobacterial glycopeptidolipids. Miyamoto, Y., T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yana, and M. Makino. 4th The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 30 August-2 September, 2004, Awaji Island, Hyogo, Japan.
 - 4) Identification of anti-mycobacterial host defense-associated antigen and assessment of its immunological significance. Makino, M., Y. Maeda, and T. Mukai. Fortieth Anniversary US-Japan Cooperative Medical Science Program. 39th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, December 7-10, 2004.
 - 5) Loop-mediated isothermal amplification of the *dnaA* sequence for rapid detection of *Mycobacterium leprae*. Mukai, T., Y. Miyamoto, M. Matsuoka, T. Yamazaki, and M. Makino. Fortieth Anniversary US-Japan Cooperative Medical Science Program. 39th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, December 7-10, 2004.
 - 6) Regulation by clofazimine of cytokine production in *M. leprae*-infected macrophages. Fukutomi, Y., F. Takeshita, M. Matsuoka, and M. Makino. Fortieth Anniversary US-Japan Cooperative Medical Science Program. 39th

Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, December 7-10, 2004.

- 7) らい菌由来抗原 MMP-II 分泌型 BCG 株の作製とその免疫学的性状解析. 稲垣勝也, 前田百美, 牧野正彦. 日本農芸化学会 2004 年度 (平成 16 年度) 大会 2004 年 3 月 広島
 - 8) らい菌ゲノム DNA の株間における多様性の検討. 中田 登, 松岡正典, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
 - 9) らい菌由来抗原 MMP-II の分泌型および脂質付加型発現抗酸菌株の作製. 稲垣勝也, 前田百美, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
 - 10) サルシュワン細胞のらい菌感受性の検討. 前田百美, 牧野正彦, 遠藤真澄, 寺尾恵治. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
 - 11) 抗酸菌糖脂質 Glycopeptidolipids (GPLs) 糖酵素遺伝子の破壊株作製とその機能解析. 宮本友司, 向井 徹, 武下文彦, 中田 登, 甲斐雅規, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
 - 12) らい菌由来 Major Membrane Protein-II による自然免疫および獲得免疫の活性化. 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹, 武下文彦, 山下康子, 稲垣勝也, 石井則久. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
 - 13) らい菌由来リポ蛋白 LpK の IL-12 産生活性中心の解析. 山下康子, 前田百美, 武下文彦, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
 - 14) DC-SIGN を介した抗酸菌感染の解析. 向井 徹, 宮本友司, 前田百美, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
 - 15) *M. smegmatis katG* 変異株の機能. 福富康夫, 甲斐雅規, 中田 登, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
 - 16) LAMP 法によるらい菌遺伝子の検出. 向井 徹, 宮本友司, 武下文彦, 牧野正彦. 第 77 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2004 年 5 月 大宮
 - 17) らい菌ゲノム DNA の多様性についての検討. 中田 登, 松岡正典, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 牧野正彦. 第 77 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2004 年 5 月 大宮
 - 18) クロファジミンによるマクロファージのサイトカイン産生調節. 福富康夫, 武下文彦, 松岡正典, 牧野正彦. 第 77 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2004 年 5 月 大宮
 - 19) 抗酸菌感染マクロファージにおける菌の細菌内寄生と排除に関わる分子機構. 鈴木幸一, 武下文彦, 中田 登, 松岡正典, 牧野正彦. 第 45 回日本組織細胞化学学術集会 2004 年 10 月 鹿児島
 - 20) 自然免疫および獲得免疫の活性化能を有する新たな抗酸菌抗原の同定. 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹, 山下康子, 石井則久. 第 34 回日本免疫学会総会 2004 年 12 月 札幌
 - 21) ヒトマクロファージのらい菌貪食とサイトカイン産生. 福富康夫, 牧野正彦. 第 34 回日本免疫学会総会 2004 年 12 月 札幌
- 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

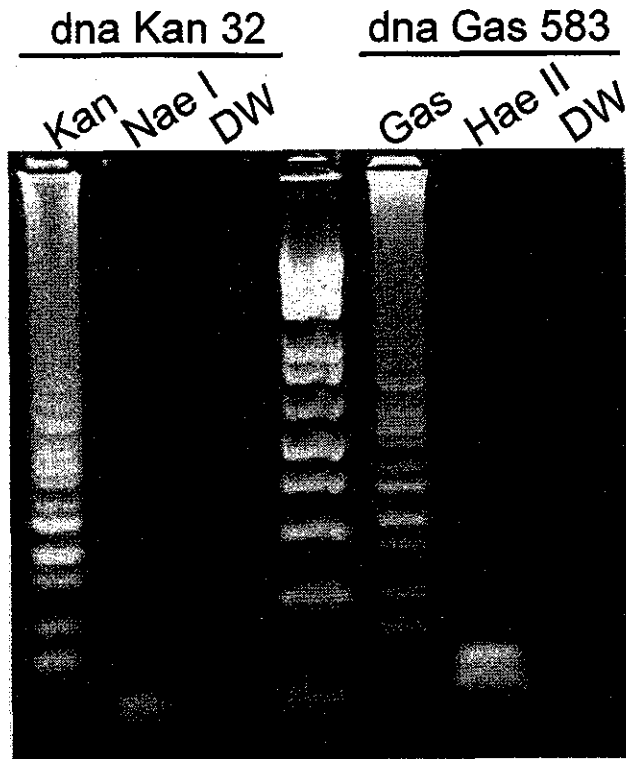


図1. *M. kansasii* 及び *M. gastri* のLAMP法による増幅産物泳動像

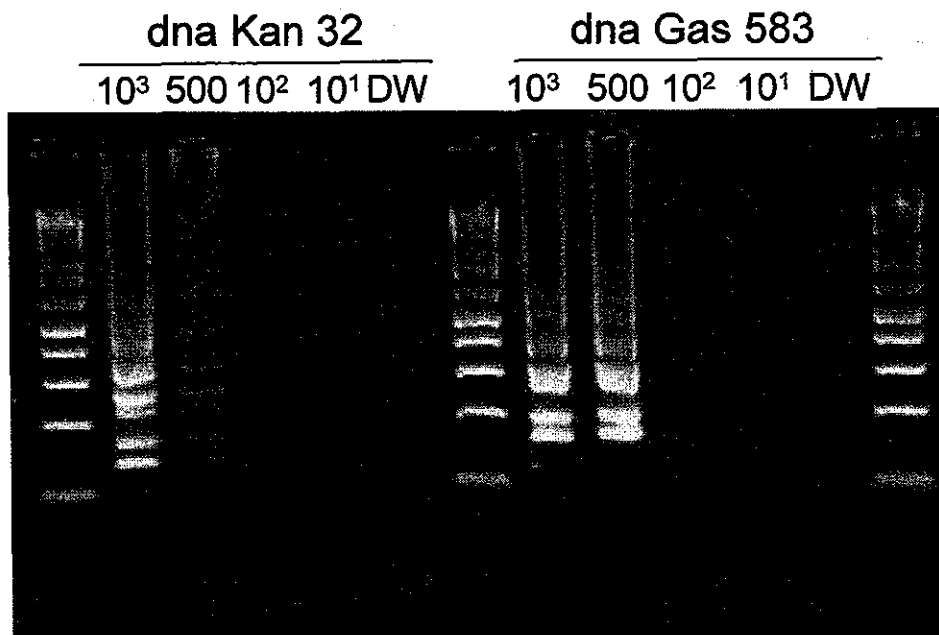


図2. LAMP法による *M. kansasii* 及び *M. gastri* の検出感度検討

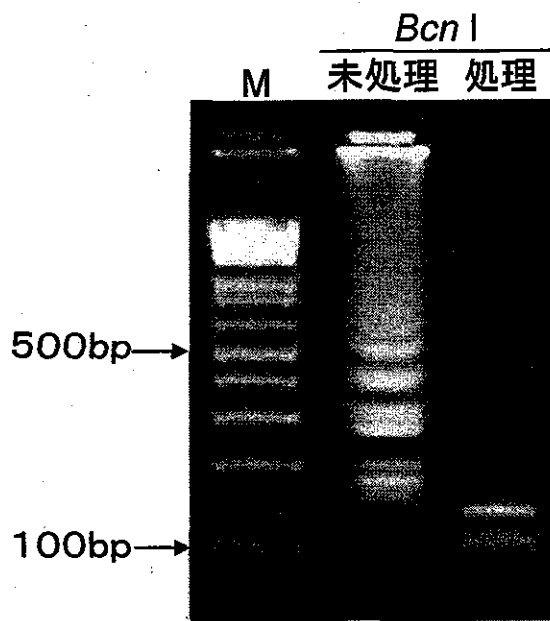


図3. *M. leprae*特異LAMP法の泳動像

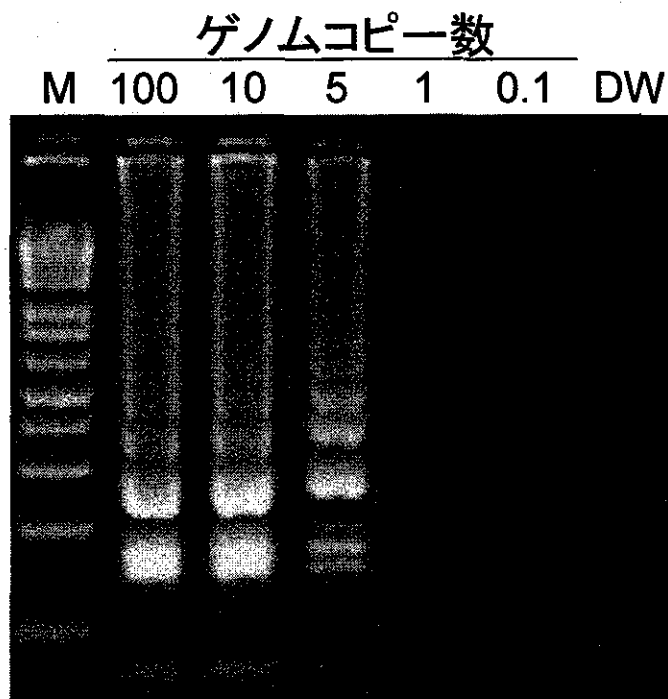


図4. *M. leprae*特異LAMP法の検出感度検討

平成16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）

結核菌体ペプチドによる Th1 生成と結核ワクチン開発への応用研究

分担研究報告書

分担研究者

高津 聖志

（東京大学医科学研究所・免疫調節分野教授）

厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

結核菌体ペプチドによる Th1 生成と結核ワクチン開発への応用研究

分担研究者 高津 聖志（東京大学医科学研究所・教授）

研究要旨.

本研究は、Th1 免疫応答を惹起しアジュバント活性を示す結核菌由来タンパク質 Ag85B の主たる T 細胞エピトープである Peptide-25 とその修飾分子を用い、抗結核免疫を増強する有効な手法を開発することを目的としている。また、Peptide-25 と I-A^b を認識する TCR (P25 TCR) を発現する TCR-Tg マウスを作出し、ナイーブ T 細胞から Th1 への分化の運命づけに関与する分子機構を遺伝的背景も含め明らかにすることも、目的としている。

本年度は Peptide-25 と I-A^b 分子を認識する TCR を発現する遺伝子導入マウス (P25 TCR-Tg) を作出し、そのリンパ球を Peptide-25 刺激すると選択的に Th1 に分化すること、その初期シグナルは主として TCR 刺激に依存することを初めて見出した。

A. 研究目的

Th1 細胞（以下 Th1 と略す）は IFN γ や TNF- β を産生し抗結核免疫のエフェクター細胞（マクロファージ）を活性化する。Th1 を有効に活性化できる結核菌体成分を探索しそのエフェクター機構を明らかにできれば、抗結核免疫を増強するワクチン開発に資するところが多く、期待される成果も大きい。

本研究は、結核菌の抗原ペプチドで、Th1 免疫応答とアジュバント活性を示すものを探索し、抗結核免疫の強化に資するか検討するシステムを確立すること、Th1 誘導の分子機構を明らかにすることを、目的としている。

B. 研究方法

結核菌の分泌する Ag85B の C-末端ペプチドである Peptide-25 を認識する T 細胞株 (BP1) より TCR α -鎖、 β -鎖 (P25 TCR) をコードする cDNA をそれぞれ単離した。単離した P25 TCR cDNAs を株化 T 細胞に遺伝子導入し、機能的な TCR を再構築できるか、I-A^b マウスの抗原提示細胞存在下に Peptide-25 刺激し、IL-2 産生を指標に確

認した。P25 TCR 発現するトランスジェニック (P25 TCR-Tg) マウスを作出し、その CD4⁺ ナーブ T 細胞を試験管内で Peptide-25 やその変異ペプチドで刺激し、IFN γ や IL-4 の産生を検討した。

C. 研究成果

(1) Peptide-25 に応答する株化 T 細胞 (BP1) より P25 TCR の α -鎖 (Va5), β -鎖 (V β 11) cDNA をそれぞれ単離した。それらが機能的な TCR を再構築できることを TCR を発現していない株化 T 細胞 (TG40) に遺伝子導入し、確認した。その細胞は Peptide-25 に濃度依存性に IL-2 を産生した。Peptide-25 の TCR 会合に必要なアミノ酸残基の一つに変異を導入したペプチド (APL) で T 細胞株を刺激しても IL-2 の産生は低かった。(2) P25 TCR の α -鎖 および β -鎖 cDNA を用いて、P25 TCR 過剰発現マウス (P25 TCR-Tg) を作出した。(3) P25 TCR-Tg マウスの CD4⁺ ナーブ T 細胞は中性条件下で Peptide-25 に応答し Th1 に分化し、IL-4 存在下に Peptide-25 で刺激すると Th2 に分化した。(4) P25 TCR-Tg マウスの CD4⁺ ナ

ナイーブ T 細胞が中性条件下で Peptide-25 刺激する際、抗 IL-12, 抗 IL-18, 抗 IFN- γ 抗体を添加しても Th1 への分化はさほど影響を受けなかった。また、I-A^b を発現した CHO 細胞と Peptide-25 で T 細胞を刺激しても Th1 への分化が見られた。以上より、P25 TCR-Tg マウスを用いたモデル実験系において、Th1 への分化の決定に TCR からのシグナルが一義的に重要であり、抗原提示細胞からのサイトカインや副刺激は必ずしも必要でないことが明らかになった。(5) P25 TCR-Tg マウスの CD4⁺ ナイーブ T 細胞を Peptide-25 と I-A^b CHO 細胞で刺激後、Th1 への分化に必須と考えられている転写因子、T-bet の発現を定量的 PCR 法により調べた。T-bet の発現は Peptide-25 刺激後 3 時間目と 15 時間目 (刺激 3 時間目がピーク) に見られ、2 相性に T-bet が発現することが分かった。早期の T-bet の発現には IFN- γ / STAT1 刺激や IL-12 刺激は必要でなかった。

D. 考察

(1) P25 TCR を発現させた TG40/BP1 細胞は CD40 を発現していないが I-A^b の抗原提示細胞存在下に Peptide-25 に応答して IL-2 を産生する。CD40 を P25 TCR とともに発現させた TG40/BP1-CD4 細胞はより低濃度の Peptide-25 に応答し IL-2 を産生した。しかし、APL への応答性は低かった。これらの結果は、Peptide-25/I-A^b と P25 TCR の親和性が非常に強く、CD40 分子が存在しなくても TG40/BP1 細胞を活性化し IL-2 産生を惹起しうると考えられる。Peptide-25 と APL の刺激力の違いは P25 TCR との親和性の違いに起因すると考えている。(2) P25 TCR-Tg マウスの CD4⁺ ナイーブ T 細胞が、サイトカイン (IL-12, IL-18, IFN- γ) や副刺激のない、中性条件下で Peptide-25 刺激により選択的に Th1 に分化する結果はこれまでの Th1 分化のセントラルドグマとは異なる。P25 TCR Tg マウスにおける Th1 分化の機構を解析することにより、ナイーブ T 細胞の Th1 への分化の決定に関する新規制御系を明らかにできると期待している。

(3) P25 TCR-Tg マウスの T 細胞を野生マウスに移入する実験により、マウスの抗結核免疫に關与する細胞群、Peptide-25 の重要性とワクチンとしての有用性を明らかに出来ると思われる。

E. 結論

(1) Ag85B 由来の Peptide-25 は強い免疫原性を示し選択的に Th1 応答を惹起するのみならず、交叉性のない他の抗原に対する Th1 応答や細胞傷害性 T 細胞の生成を著明に亢進する活性を示す。(2) P25 TCR-Tg マウスの CD4⁺ ナイーブ T 細胞は至適な刺激条件下で Th1 にも Th2 にも分化しうるが、中性条件下で Peptide-25 刺激により選択的に Th1 に分化する。その場合、抗原提示細胞由来のサイトカイン (IL-12, IL-18, IFN- γ) や副刺激は必須でない。また、Peptide-25 刺激により、2 相性の T-bet 発現が見られ、早期の T-bet 発現に TCR シグナルが主たる役割を果たし、IL-12, IL-18, IFN- γ 刺激や副刺激は必須でない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kubo-Akashi, C., M. Iseki, S-M. Kwon, H. Takizawa, K. Takatsu, and S. Takaki. Roles of conserved family of adaptor proteins, Lnk, SH2-B and APS for mast cell development growth and functions: APS-deficiency causes impaired degranulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315:356-362, 2004.
- 2) Iseki, M., C. Kubo, S-M. Kwon, A. Yamaguchi, Y. Kataoka, M. Yoshida, K. Takatsu, and S. Takaki. Negative regulatory role of APS, adaptor molecule containing PH and SH2 domains in B-1 cells and B cell receptor-mediated proliferation. *Mol. Cell. Biol.* 24:2243-2250, 2004.
- 3) Tamura, T., H. Ariga, T. Kinashi,

- S. Uehara, T. Kikuchi, M. Nakada, T. Tokunaga, W. Xu, A. Kariyone, A. Saito, T. Kitamura, G. Maxwell, S. Takaki, and K. Takatsu. The role of antigenic peptide in CD4⁺ T helper phenotype development in a T cell receptor transgenic model. *Int. Immunol.* 16: 1691-1699, 2004.
- 4) Moon, B-Y., S. Takaki, K. Miyake, and K. Takatsu. The role of IL-5 for mature B-1 cells in homeostatic proliferation, cell survival, and Ig production. *J. Immunol.* 172:6020-6029, 2004.
- 5) Hirano, M., Y. Kikuchi, S. Nisitani, A. Yamaguchi, A. Sato, T. Ito, H. Iba, and K. Takatsu. Btk enhances transcriptional co-activation activity of BAM11, a Btk associated molecule of a SWI/SNF complex. *Int. Immunol.* 16:747-57, 2004.
- 6) Tanaka, H., M. Komai, K. Nagao, M. Ishizaki, D. Kajiwara, K. Takatsu, G. Delespesse, and H. Nagai. Role of IL-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* 31:62-8, 2004.
- 7) Wen, X., D. Zhang, Y. Kikuchi, Y. Jiang, K. Nakamura, H. Tsurui, K. Takahashi, M. Abe, M. Ohtsuji, H. Nishimura, K. Takatsu, T. Shirai, and S. Hirose. Transgene-mediated over-expression of IL-5 inhibits autoimmune disease, but increases the risk of B-cell chronic lymphocyte leukemia in a model of murine lupus. *Eur. J. Immunol.* 34:2740-2749, 2004.
- 8) Moon, B-M., S. Takaki, T. Yamamoto, and K. Takatsu. Abrogation of autoimmune disease in Lyn-deficient mice by the deletion of IL-5 receptor α chain gene. *Cell. Immunol.* 228:110-118, 2004.
- 9) Inoue, H., R. Kato, S. Fukuyama, A. Nonami, K. Taniguchi, K. Matsumoto, T. Nakano, M. Tsuda, M. Matsumura, M. Kubo, F. Ishikawa, K. Takatsu, Y. Nakanishi, and A. Yoshimura. Spred-1 negatively regulates allergen-induced airway eosinophilia and hyperresponsiveness. *J. Exp. Med.* 201:73-82, 2005.
2. 学会発表
- 1) Kariyone, A., M. Nakada, T. Tamura, and K. Takatsu. Immunogenicity of Peptide-25 of Ag85B in Th1 development: Analysis of TCRV $\alpha 5^+V\beta 11^+$ T cells by anti-idiotypic antibody, KN7. 12th Int. Cong. Immunol. July, 2004, Montréal
- 2) Kikuchi, T., T. Tamura, S. Uehara, H. Ariga, Xu Wen, A. Kariyone, and K. Takatsu. Enhancement of anti-tumor immunity by Th1-inducible peptide from *Mycobacterium tuberculosis*. 12th Int. Cong. Immunol. July, 2004, Montréal.
- 3) Ariga, H., T. Tamura, T. Kikuchi, X. Wen, M. Nakada, A. Kariyone, and K. Takatsu. Role of T cell receptor and Peptide/MHC interaction in Th1 development by Peptide-25. 12th Int. Cong. Immunol. July, 2004, Montréal
- 4) 仲田真己代、有賀晴之、田村敏生、徳永岳志、刈米アイ、高津聖志：TCR シグナルによる Th1 分化の制御：TRC トランスジェニックマウスを用いた解析、第34回日本免疫学会、12, 2004, 札幌
- 5) 菊池剛史、田村敏生、上原秀一郎、刈米アイ、高津聖志：Th1 ペプチドである Peptide-25 による抗腫瘍免疫増強効果、第34回日本免疫学会、12, 2004, 札幌
- 6) 刈米アイ、仲田真己代、田村敏生、高