

3. IFN- γ 産生：MPT51 ペプチド刺激による IFN- γ 産生で、特異的 CD8⁺T 細胞の存在を検討したところ、縦隔リンパ節で大量に、脾臓でも少量産生がみられた。脾臓にも若干特異的 T 細胞が存在すると考えられた。
4. 再刺激による T 細胞の誘導：ワクチン接種 2 ヶ月後に BCG を経気道的に感染させたところ、5 日後に肺に特異的 CD8⁺T 細胞が出現し、記憶 T 細胞が誘導されていることを確認した(図 4)。

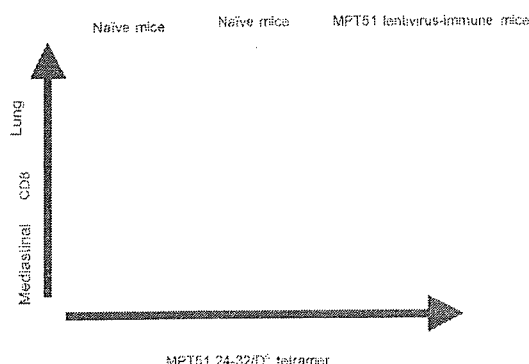


図 4. BCG 感染後の免疫マウスにおける MPT51 特異的 T 細胞。上段：肺、下段：縦隔リンパ節

興味あることに、この際に縦隔リンパ節に特異的 CD8⁺T 細胞は認められず、チャレンジ 2 ヶ月後に再発現した。このことは、記憶 CD8⁺T 細胞が BCG 感染に伴って、縦隔リンパ節から動員されることを意味する。

5. ヘテロ免疫とキラー活性：レンチベクターで感作し、BCG で追加免疫することで、縦隔リンパ節に強

いキラー細胞を誘導できた。このことは、このヘテロ免疫の感染防御における有用性を示唆する。

D. 考察

結核の防御抗原である MPT51 を発現する第三世代レンチウイルスベクターを経気道感染することにより、肺にホーミングする特異的 CD8⁺T 細胞を誘導することが出来た。この特異的 T 細胞の誘導は、肺樹状細胞が縦隔リンパ節に移行し、ナイーブ T 細胞を感作することによって行われると考えられた。また、感作後の記憶 CD8⁺T 細胞は縦隔リンパ節に存在し、感染に伴い肺に動員されると考えられる。BCG とのヘテロ免疫が有効であることが判明したので、今後、BCG で感作し、レンチベクターの経気道免疫で追加免疫して、肺ホーミング性 T 細胞を誘導する実験を計画している。

E. 結論

結核の防御抗原である MPT51 を発現する第三世代レンチウイルスベクターを経気道感染することにより、肺にホーミングする特異的 CD8⁺T 細胞を誘導することが出来た。

F.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aoshi T, Suzuki M, Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Expression

mapping by retroviral vector for CD8⁺ T cell epitopes: definition of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide presented by H2-D^d. J Immunol Methods 298(1-2):21-34, 2005.

- 2) Nagata T, Uchijima M, Uchiyama H, Yamada T, Aoshi T, Koide Y: Immunization with gene encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inserted with a single helper T-cell epitope of an intracellular bacterium induces a specific T-cell subset and protective immunity. Vaccine (in press)
- 3) Nakano H, Nagata T, Suda T, Tanaka T, Aoshi T, Uchijima M, Chida K, Nkamura H, Okada M, Koide, Y: Immunization with dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity specific to a dominant epitope on Antigen 85A. Vaccine (in press)

2.学会発表

- 1.永田 年、青枝大貴、内嶋雅人、小出幸夫：DNA ワクチンを用いた細胞内寄生細菌防御におけるヘルパーT 細胞の解析. 第78回 日本細菌学会総会、平成 17 年 4 月 4-6 日 (東京)
- 2.内嶋雅人、永田 年、青枝大貴、小出幸夫：ケモカイン・抗原融合型抗結核菌 DNA ワクチンの検討. 第78回 日本細菌学会総会、平成 17 年 4 月 4-6 日 (東京) .
- 3 田中高生、喜多洋子、桑山さち子、村木

裕美子、金丸典子、橋元里美、高井寛子、岡田知佳、福永有可里、坂口弥生、古川いづみ、山田恭子、和泉谷美和、武本優次、井上義一、坂谷光則、永田 年、小出幸夫、岡田全司: 新しい抗結核弱毒化リステリアワクチンの開発. 第 45 回日本呼吸器学会学術講演会、東京、 2005 (平成 17 年 4 月 14~16 日) .

- 4.Koide Y, Hashimoto D, Uchijima M, Suda T, Chida K, Miyoshi H, Nagata T: Intratracheal administration of third-generation lentivirus vectors encoding MPT51 and HSP65 from *M. tuberculosis* induce specific T cell responses in the lung. US-Japan cooperative Medical Science Program. Fortieth Tuberculosis and Leprosy Research Conference. Seattle, Washington, July 28-30, 2005.
- 5.Enomoto N, Nagata T, Suda T, Uchijima M, Chida K, Nakamura H, Koide Y: Immunization with dendritic cells loaded with a CTL-epitope peptide and α -galactocylceramide induces strong protective immunity against intracellular bacteria infection. Vaccine Congress Berlin 2005; New Approaches to Vaccine Development From the Bench to the Field. Berlin, Germany, September 8-10, 2005.
6. Koide Y, Hashimoto D, Uchijima M, Suda T, Chida K, Miyoshi H, Nagata T: Intratracheal administration of third-generation lentivirus vectors encoding MPT51 and Hsp65 from *M. tuberculosis* induces specific T cell responses in the lung. Vaccine Congress Berlin 2005; New Approaches to Vaccine Development From the Bench to the Field. Berlin, Germany, September 8-10, 2005.

7. 永田 年、小出幸夫：「ワクチン開発の新戦略」 細胞内寄生菌に対する CD8⁺T 細胞誘導型ワクチン開発の戦略 第 88 回日本細菌学会関東支部総会、浜松、平成 17 年 10 月 20 日～21 日 2006
8. Koide Y, Nagata T, Uchijima M, Aoshi T, Shibata K: Intratracheal administration of a third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *Mycobacterium tuberculosis* induces specific T cell responses in the lung. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会. 横浜、2005 (平成 17 年 12 月 13～15 日). 永田 年、青枝大貴、鈴木美奈、内嶋雅人、柴田 清、小出幸夫: DNA ワクチンを用いた結核菌分泌タンパク MPT51 内 HLA-A*0201 拘束性 CTL エピトープの同定. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会. 横浜、2005 (平成 17 年 12 月 13～15 日).
10. 内嶋雅人、永田 年、青枝大貴、柴田 清、小出幸夫: 結核菌に対するケモカイン・抗原結合型 DNA ワクチンの検討 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会. 横浜、2005 (平成 17 年 12 月 13～15 日)
11. Hashimoto D, Uchijima M, Suda T, Chida K, Miyoshi H, Nagata T, Koide Y: Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *M. tuberculosis* induces lung-homing specific T cells; Determinants of Host Resistance, Susceptibility or Immunopathology to Pathogens: Integrating Knowledge from Experimental Models to Human Disease, Keystone Symposia, Keystone, CO, USA, January 6 - 11, 2006 H. 知的財産権の出願・登録状況なし

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

分担研究報告書

結核の地域伝播に関する分子疫学的解析

分担研究者 長谷 篤 大阪市立環境科学研究所研究副主幹

研究要旨

従来のRFLP解析法と同時に新しい解析法であるVNTR法により市内分離結核菌について分子疫学的解析を行なった。253株について解析した結果、MIRU（12領域）-VNTR法では北京型ファミリーに属する57株が同一型を示した。さらに、ETR（4領域）及びQUB（8領域）におけるVNTR解析を行なうと、QUB領域における解析で良好な成績を示し、RFLP法による解析とほぼ同等の解像度が得られることが明らかになった。

A. 研究目的

大阪市は国内の大都市の中で目立って結核の患者数が多く、様々な結核対策が行われてきているにもかかわらず、罹患率は全国平均の約3倍となっており、最悪であることに変わりはない。本研究の目的は市内における結核蔓延状況及び感染の広がりについて菌株レベルで解析し解明することにより、地域における結核対策に寄与することである。

B. 研究方法

市内で分離された結核菌株をIS6110を用いたRFLP法とVNTR法により型別解析し、患者情報とあわせて、市内で分離される菌株の特徴を明らかにし、結核蔓延状況を解明する。また、VNTR法は欧米で迅速性とデータ交換性の点でRFLP法より優れていると評価されているが、市内

分離菌株についてRFLP法と比較検討し、大阪市の結核の分子疫学的解析における有効性についても調べる。

C. 研究結果

2001年に市内で分離された253株を用いて、MIRU-VNTR解析を行なった結果、北京型ファミリーに属する57株が同一型を示した。これらの菌株を分析できるVNTR多型領域を決定するため、ETR（4領域）及びQUB（8領域）におけるVNTR解析を行なうと、QUB領域における解析で良好な成績を示し、RFLP法による解析とほぼ同等の解像度が得られることが明らかになった。特に、QUB11a、11b、3232の3領域で非常に分解能が高く、これらの領域の解析がMIRU(12)-VNTRの低い解像度を補うために重要であることが示唆された。

D. 考察

VNTR 法は RFLP 法に替る結核の分子疫学的型別手法である。検査機関間での解析比較が難しい RFLP 法による型別解析と異なり、VNTR 法ではその比較が容易であり、広域疫学的解析や長期にわたるデータの蓄積という意味において大きなメリットがある。現在欧米諸国を中心に標準化が進んでおり、MIRU12 領域及び ETRA4 領域（16 領域）の解析が型別解析に有効であるとされている。日本を含むアジア諸国では、北京型と呼ばれる遺伝型ファミリーに属する結核菌の蔓延が明らかにされているが、大阪市内で分離された結核菌株についても約 70%がこの型に属している事が報告されている。また、北京型ファミリーに属する菌株群では上記の 16 領域による VNTR 型別の解像度が低いことも報告されている。したがって、VNTR 解析を有効な手法として確立するためには、更なる領域の拡張と各領域の多型頻度の解析によって地域特性に即した解析領域の決定が必須であると考えられる。今回で QUB 領域における解析で良好な成績を示し、RFLP 法による解析とほぼ同等の解像度が得られ、特に、QUB11a、11b、3232 の 3 領域による解析が MIRU(12)-VNTR 法の低い解像度を補うために重要であることが示唆された。これまでに行なった集団事例由来株においては、RFLP 法と MIRU(12)-VNTR 法による結果は一致しており、集団事例に

おける MIRU(12)-VNTR 法の有用性は明らかになっている。今後更に多くの菌株について解析し、広域的な分子疫学的解析に有用な VNTR 法について検討する必要があると思われる。

E. 結論

市内分離結核菌 253 株について RFLP 解析法と VNTR 法により分子疫学的解析を行なった。MIRU (12 領域) -VNTR 法では北京型ファミリーに属する 57 株が同一型を示したが、さらに QUB (8 領域) を加えることで、RFLP 法による解析とほぼ同等の解像度が得られることが明らかになり、特に 3 種類の QUB 領域の重要性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

和田崇之、長谷 篤、前田伸司、小林和夫、結核菌の分子疫学的手法としての MIRU-VNTR 法の有用性。第 80 回日本結核病学会総会（2005.5. さいたま）（結核、第 80 巻、第 3 号、261 頁、2005 年）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

分担研究報告書

多剤耐性結核の臨床的検出と対策に関する研究

分担研究者 高嶋哲也 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター医務局長

研究要旨

多剤耐性結核は、単剤加療や、加療中断による新たな耐性獲得を作らないことが重要であると言われているが、今後は多剤耐性結核を感染させないことも重要になる。このため分子疫学解析による感染予防が必要になってくる。VNTR は、結核菌遺伝子に存在する多型反復配列を利用した解析法である。現在、ETR 領域と MIRU 領域を利用した解析法が行われているが、最近 QUB 領域が追加発表された。QUB 領域を付加することにより ETR 領域と MIRU 領域をあわせた 16 領域からなる 16VNTR の解像度が上がるか否か、実際の接触者同士の関係を反映するか否かを検討し結核菌データベース構築に有用か否か検討した。QUB 領域を付加する事により 16VNTR よりも VNTR の解像度は上昇した。しかしながら家族内感染の場合でも QUB 領域により一致しなくなる組があった。また PCR 産物長の解読の難しさから付随する再現性の低くなることもあった。これらのことより結核菌データベース構築には現時点では ETR および MIRU からなる 16VNTR が有用であることがわかった。

A. 研究目的 多剤耐性結核は有効な治療が無い場合が多く、診断時点で社会隔離のための入院が必要となり、入院期間も長く患者本人のみならず社会的にも大きな損失を引き起こす。多剤耐性結核は、単剤加療や、加療中断による新たな耐性獲得を作らないことが重要であると言われているが、今後は多剤耐性結核を感染させないことも重要になる。しかも再発多剤耐性結核患者に対して初回多剤耐性患者の薬剤耐性数は高く、診断時に有効な薬剤が全く存在

しないことも認められる。このため分子疫学解析による感染予防が必要になってくる。

IS6110 RFLP が発表されて以来、結核菌の分子疫学解析は感染経路解明のための接触者検診、疫学解析に多大な貢献をしてきた。現在 IS6110 RFLP から、PCR を利用した解析法である MIRU-VNTR, スポリゴタイピングが中心となりつつある。VNTR は、結核菌遺伝子に存在する多型反復配列を利用した解析法である。現在、ETR 領域と MIRU 領域を利用した解析法が行わ

れているが、最近 QUB 領域や Mtub 領域が追加発表された。

アジア間の多剤耐性結核菌感染状況ならびに感染経路を解析する為にも分子疫学解析は重要でありその候補の一つとして VNTR 解析があげられる。QUB 領域を付加することにより ETR 領域と MIRU 領域をあわせた 16VNTR の解像度が上がるか否か、実際の接触者同士の関係を反映するか否かを検討し結核菌データベース構築に有用か否か検討した。

B. 方法 ETR, MIRU 領域からなる 16VNTR は西森等が発表した条件で行った [動物衛生研究所報告書、109, pp25-32, 2003]。QUB 領域の VNTR は、Roring 等の方法に従った [JCM, vol. 40, No. 6, pp2126-2133, 2002]。

C. 研究結果 QUB 領域を付加する事により 16VNTR よりも VNTR の解像度は上昇した。しかしながら家族内感染の場合でも QUB 領域により一致しなくなる組があった。さらに QUB 領域は Roring 等の条件では、PCR で単一のバンドが得られない場合があり PCR 産物長の解読が困難な場合があった。

D. 考察 QUB による解像度の上昇は、QUB 領域の反復配列の増減が、他の ETR 領域ならびに MIRU 領域よりも早い事、ならびにおのおの反復配列の 1 単位が他の領域に比べ短い上に繰り返

し数が多い為に測定誤差も含まれると考察される。このため再現性が低くなる可能性が考えられ、現時点では多施設間の広域結核菌データベース構築には QUB 領域は不向きであると判断する。

E. 結論 QUB 付加により解像度が上昇しても実際の感染経路を反映しない場合があること、および PCR 産物長の解読の難しさから付随する再現性の低さより結核菌データベース構築には現時点では ETR および MIRU からなる 16VNTR が有用である。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tomoshige Matsumoto, Hiromi Ano, Takayuki Nagai, Katsura Danno, Tetsuya Takashima, Izuo Tsuyuguchi IS6110 DNA fingerprinting analysis of individually separated colony, Tuberculosis 2005; 85:207-212.

2. 学会発表

1. 阿野裕美, 松本智成, 永井崇之, 團野桂, 河原邦光, 高嶋哲也, 露口泉夫, DNA マクロアレイを用いた, 抗結核薬 Isoniazide (INH) 耐性遺伝子の検出結果, 結核(0022-9776)80

- 卷 8 号 Page588(2005. 08)
2. 永井崇之, 田村嘉孝, 團野桂, 松本智成, 韓由紀, 高嶋哲也, 露口泉夫, ブロスミック MTB-1 法による INH 判定保留域肺結核症例の検討, 結核(0022-9776)80 卷 8 号 Page588(2005. 08)
 3. 松本智成, 山口統彦, 永井崇之, 團野桂, 韓由紀, 鳥羽宏和, 高嶋哲也, 露口泉夫, レミケード投与後結核発症した患者へのレミケード再投与についての考察: 当院にて行われた世界初の結核発症患者へのレミケード再投与例について, 結核(0022-9776)80 卷 8 号 Page588(2005. 08)
 4. 松本智成, 阿野裕美, 永井崇之, 團野桂, 韓由紀, 石原英樹, 河原邦光, 高嶋哲也, 露口泉夫, 救命救急センターから搬送された人工呼吸管理を要した高度多剤耐性結核患者の 1 例, 結核(0022-9776)80 卷 8 号 Page587-581(2005. 08)
 5. 山口統彦, 岩堀幸太, 韓由紀, 鳥羽宏和, 松本智成, 永井崇之, 團野桂, 高嶋哲也, 症状別に見た抗結核薬の副作用と DLST 検査の陽性率についての検討, 結核(0022-9776)80 卷 3 号 Page303(2005. 03)
 6. 山口統彦, 鳥羽宏和, 松本智成, 永井崇之, 高嶋哲也, 膠原病に対し免疫抑制的治療を施行中に発症した肺結核の臨床的特徴についての検討, 結核(0022-9776)80 卷 3 号 Page272(2005. 03)
 7. 松本智成, 山口統彦, 永井崇之, 團野桂, 西岡克泰, 韓由紀, 高嶋哲也, 露口泉夫レミケード投与中の関節リウマチ患者の結核発症とレミケード再投与, 結核(0022-9776)80 卷 3 号 Page271(2005. 03)
 8. 阿野裕美, 松本智成, 河原邦光, 高嶋哲也, 露口泉夫, 岩本朋忠結核菌 VNTR 解析における, キャピラリー電気泳動装置を聴いた DNA 鎖長測定精度の検討, 結核(0022-9776)80 卷 3 号 Page262(2005. 03)
 9. 松本智成, 阿野裕美, 永井崇之, 團野桂, 韓由紀, 高嶋哲也, 露口泉夫, 西森敬非結核性抗酸菌症(*M. avium* 症)の治療における分子疫学解析の応用, 結核(0022-9776)80 卷 3 号 Page259(2005. 03)
 10. 松本智成, 阿野裕美, 永井崇之, 團野桂, 韓由紀, 高嶋哲也, 露口泉夫, 西森敬大阪に

における多剤耐性結核の分子疫学解析, 結核(0022-9776)80 巻 3 号 Page258(2005. 03)

11. 阿野裕美, 松本智成, 永井崇之, 團野桂, 韓由紀, 河原邦光, 高嶋哲也, 露口泉夫, 西森敬 IS6110 が 5 コピー以下の結核菌株における, 分子疫学的解析法の菌株分離能, 結核(0022-9776)80 巻 3 号 Page256(2005. 03)
12. 阿野裕美, 松本智成, 永井崇之, 團野桂, 韓由紀, 河原邦光, 高嶋哲也, 露口泉夫, 森山和郎 IS6110 RFLP 解析に基づく, 大阪中南部地域の結核感染状況【2001~2003】, 結核(0022-9776)80 巻 3 号 Page256(2005. 03)
13. 松本智成, 阿野裕美, 高嶋哲也, 露口泉夫抗酸菌検査法の臨床への応用 ヒト型結核菌に対する分子疫学的ツール IS6110 RFLP, spoligotyping, 及び VNTR(Molecular epidemiologic tools for tuberculosis: IS6110 RFLP, Spoligotyping, and VNTR), 結核(0022-9776)80 巻 2 号 Page106-110(2005. 02)
14. 松本智成, 山口統彦, 永井崇之, 團野桂, 韓由紀, 高嶋哲

也 免疫不全と肺感染症 レミケード投与中の関節リウマチ患者の結核発症における考察(ミニシンポジウム), 日本呼吸器学会雑誌(1343-3490)43 巻増刊 Page47(2005. 04)

15. 阿野裕美, 松本智成, 西森敬, 吉多仁子, 谷川信子, 河原邦光, 高嶋哲也, 露口泉夫, 結核菌重複感染の迅速な分子疫学的解析方法の検討, 日本臨床微生物学雑誌(0917-5059)14 巻 4 号 Page116(2004. 12)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

該当なし

らい菌による神経病変の病理病態学的解析

分担研究者 後藤 正道 鹿児島大学助教授

研究要旨： らい菌接種ヌードマウスに感作リンパ球を移入することによって、らい性神経炎の動物モデルを開発し、細胞性免疫の発現が神経線維密度低下に関与することを、組織定量によって明らかにした。また、ヒト難治性皮膚疾患であるブルーリ潰瘍(*Mycobacterium ulcerans* 感染症)が無痛性になる原因として、菌の産生する毒性脂質 Mycolactone の関与をマウスモデルで検索し、末梢神経に障害が起きることが明らかになった。

A. 研究目的

(1) らい性神経炎の動物モデルにおける末梢神経病変の定量的解析

らい菌をT細胞欠損ヌードマウスの足底に接種して末梢神経内にらい菌が侵入した後に、同系正常マウスのリンパ球を移入すると、境界反応としてのらい性神経炎が起きる。今回我々は、この神経病変を画像定量的に解析した。

(2) 抗酸菌 *Mycobacterium ulcerans* による神経障害：Mycolactone の役割

Mycobacterium ulcerans 感染によるブルーリ潰瘍(Buruli ulcer)は、熱帯、亜熱帯地域のヒト難治性皮膚疾患であり、大きく深い無痛性の皮膚潰瘍が形成される。我々は、ブルーリ潰瘍が無痛性であることの原因を調べ、マウスでは *M. ulcerans* が末梢神経に侵入すること、一定の時期には知覚低下がおこることを明らかにした。一方、*M. ulcerans* は毒性脂質 Mycolactone を産生し、Mycolactone はモルモットの病変にアポトーシスを引き起こす。そこで今回は、Mycolactone が知覚障害と末梢神経病変をひきおこすかどうかを検討した。

B. 研究方法

(1) らい菌(Thai 53 株 1.1×10^7) を BALB/C 系ヌードマウスの両足底に接種して 5~12 ヶ月後に、同系正常マウスのリンパ球(5×10^5) を腹腔内に移入した。正常マウスにらい菌接種 4 週間後にその脾のリンパ球を移入した脾リンパ球移入群、さらにマグネットビーズ法で CD4 陽性 T 細胞を選別して移入した免疫マウス CD4 陽性 T 細胞移入群、らい菌を接種しない正常マウスの CD4 陽性 T 細胞

を移入した非免疫マウス CD4 陽性 T 細胞移入群、そしてリンパ球移入なし群の 4 群について、グルタルアルデヒドで灌流固定を行い、足底皮膚の電顕ブロックから 1 ミクロン切片を作成した。顕微鏡デジタルカメラ画像から末梢神経線維の面積と有髄神経線維密度を定量化し、実験群間の差異を検討した。

(2) *M. ulcerans* より精製した Mycolactone を、微量のエタノールで溶解後に 7H9 broth で希釈し、6 週齢 BALB/C 雌マウスの左足底に 25ul ずつ接種し、4 日目と 7 日目に局所の変化の観察と、von Frey 法による足底の知覚検査を行った。7 日後に 4%パラフォルムアルデヒドあるいはそれに 1%グルタルアルデヒドを加えた固定液で灌流固定し、足底、脾、胸腺、肝、肺、腎の組織学的検索と、足底のエボン包埋 1 ミクロン切片による検索を行い、エタノールと 7H9 broth のみを接種した陰性対照と比較した。

いずれの実験においても、動物に苦痛が起きないための工夫を行い、倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

(1) 末梢神経の有髄神経線維密度の定量では、脾リンパ球移入群(10.7%)は、リンパ球移入なし群(18.6%)、非免疫マウス CD4 陽性 T 細胞移入群(20.6%)、免疫マウス CD4 陽性 T 細胞移入群(17.5%)よりも神経線維密度が低下した($p < 0.05$)。また、末梢神経の大きさと神経線維密度を比較してみると、リンパ球移入なし群と非免疫・免疫 CD4 移入群では、末梢神経束の面積が大きくなるほど神経線維密度が高くなっていた。それに

対して、脾リンパ球移入群では大きな末梢神経でも神経線維密度は低く、大径神経の障害が明らかになった。

(2) 接種した Mycolactone が 1,3,10ug では、肉眼的にも組織学的にも変化が起きなかった(各群 n=3)。一方、30, 100, 200ug (各群 n=5) では足部の明らかな腫脹(陰性対照, 2.2mm; 30ug, 2.8mm; 100ug, 3.7mm, 200ug, 3.7mm)、発赤とびらんが見られた。知覚検査では、4日目には変化がなかったが、7日目では予想に反して知覚過敏(P=0.02)となった。100, 200ug 接種マウスの脾に軽度の腫大が見られたが、胸腺、肝、肺、腎には肉眼的・組織学的に異常は見られなかった。足底の組織学的検索では、30ug 以上接種では表皮のびらん、浮腫を伴う組織壊死、軽度の好中球浸潤、血管内皮の HEV 化などの、*M. ulcerans* 菌接種時と同様の病変がみられた。びらん周辺の神経束で細胞核の消失が見られ、一部では好中球の浸潤も認められた。エポン包埋 1 ミクロン切片では、一部の神経線維に変性が見られたが、*M. ulcerans* 菌接種に見られたような特徴的なシュワン細胞の空胞状変性は見いだされなかった。

D. 考察

(1) ハンセン病では Th1 型の細胞性免疫によって引き起こされる肉芽腫によって末梢神経障害が起こるといわれているが、らい菌接種ヌードマウスでもリンパ球の移入によって同様の神経炎が起こり、神経線維密度が低下することが今回の解析結果から明らかになった。

(2) Mycolactone の接種によって、ブルーリ潰瘍と類似した病変が接種部位に生じ、知覚過敏が引き起こされることが明らかになった。ブルーリ潰瘍は知覚低下が特徴的ではあるが、経過中のまだ潰瘍ができない丘疹型には痒みのあることがあり、浮腫期には通常痛みがあることを考慮すると、今回の実験で知覚過敏が見られたことは興味深い。今後さらに、臨床所見との比較を行う必要がある。また、一部の神経束の変性も見られたが、シュワン細胞の空胞状変性はなかったため、ブルーリ潰瘍における神経障害の原因としては Mycolactone 以外の物質の関与も推測される。今後の検討が必要である。

E. 結論

らい性神経炎の動物モデルを開発し、細胞性免疫の発現が神経線維密度低下に関与することを、画像定量によって明らかにした。また、ブルーリ潰瘍が無痛性になる原因として、毒性脂質 Mycolactone の関与をマウスモデルで検索し、末梢神経に障害が起きることを明らかにした。

G. 研究発表

1. 著書

1) 後藤正道、ティダアウン、北島信一：ハンセン病の免疫病態 Annual Review 神経 2005 (柳澤信夫、篠原幸人、岩田誠、清水輝夫、寺本明 編集) pp 103-112, 中外医学社、東京 (2005)

2. 論文発表

1) 後藤正道、Thida Aung、北島信一：途上国におけるハンセン病の病理診断 日本ハンセン病学会雑誌 74 (3): 191-198 (2005)

2) Masamichi Goto, Kazue Nakanaga, Thida Aung, Tomofumi Hamada, Norishige Yamada, Mitsuharu Nomoto, Shinichi Kitajima, Norihisa Ishii, Suguru Yonezawa, Hajime Saito: Nerve damage in *Mycobacterium ulcerans* infected mice: probable cause of painlessness in Buruli ulcer. Am J Pathol 168(3): 805-811 (2006)

3. 学会発表

1) Masamichi Goto. Nerve damage in mice inoculated with *Mycobacterium ulcerans*. Annual Meeting of the WHO Global Buruli ulcer Initiative, March 14-17, 2005, Geneva, Switzerland

2) 後藤正道、Thida Aung、北島信一、野元三治、浜田倫史、山田宗茂、米澤傑: Buruli 潰瘍の起因菌 *Mycobacterium ulcerans* 接種マウスにおける末梢神経病変. 第 94 回日本病理学会総会, 2005.4.16, 横浜市

3) 中永和枝、後藤正道、斎藤肇、石井則久: わが国で肺疾患の原因菌として分離された珍しい非結核性抗酸菌のマウスに対する病原性. 第 80 回日本結核病学会総会 2005.5.12-13, さいたま市

4) 後藤正道、Thida Aung、北島信一. 途上国におけるハンセン病の病理診断. (シンポジウム「JICA ハンセン病対策・基礎保健サービス改善プロジェクト」) 第

78 回日本ハンセン病学会総会
(2005.5.20) 青森市

- 5) Hajime Saito, Kazue Nakanaga, Tomotada Iwamoto, Norihisa Ishii, Masamichi Goto, Hiroshi Hakahashi: Virulence for mice of unusual nontuberculous mycobacteria isolated from patients with pulmonary disease in Japan. 26th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology. 2005.6.26-29. Istanbul, Turkey.
- 6) Masamichi Goto, Kazue Nakanaga, Junichiro En, Thida Aung, Tomofumi Hamada, Shinichi Kitajima, Norihisa Ishii, Suguru Yonezawa, Hajime Saito: NERVE DAMAGE IN A MOUSE MODEL OF MYCOBACTERIUM ULCERANS INFECTION - Detection of M. ulcerans-specific DNA from micro-dissected nerve tissue. 40th U.S.-Japan Tuberculosis and leprosy conference, July 28-30, 2005, Seattle, U.S.A.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(特になし)

ハンセン病の進展と疾患感受性遺伝子
- *IL12RB2* 制御領域の多型が宿主防御細胞機能に及ぼす影響 -

（分担）研究者 大山秀樹 兵庫医科大学・講師

研究要旨： L 型ハンセン病患者に高頻度に検出される *IL12RB2* 転写制御領域のある特定の 1 塩基多型（SNPs）は、IL-12Rβ2 鎖遺伝子の転写活性を低下させ、T 細胞の低 IFN-γ 産生を誘導する。L 型ハンセン病患者を易感染性宿主と捉えた場合、これら SNPs が感染防御に対して及ぼす免疫遺伝学的影響、またそれに関わる機序については、何も明らかとなっていない。これらのことを明らかにするために、*IL12RB2* の SNPs が免疫担当細胞機能に及ぼす影響を調べるとともに、それぞれの細胞の転写制御に関わる核タンパクを特定することを試みた。その結果、*IL12RB2* 転写制御領域の SNPs は、NK 細胞における IL-12Rβ2 鎖遺伝子の高発現性および IFN-γ の高産生性と相関し、同領域の遺伝子多型が T 細胞に対して及ぼす影響と全く逆であることが分かった。また、NK 細胞由来の核蛋白と T 細胞由来の核蛋白とでは、*IL12RB2* 転写制御領域の多型の有無によって結合する核蛋白が異なることも示された。

これら結果は、*IL12RB2* 転写制御領域の多型性を指標としたハンセン病に対する早期治療システムの確立さらにはゲノム創薬開発の糸口となり得ることを示唆するものである。

A. 研究目的

IL-12 レセプター（IL-12R）β2 鎖の発現量の違いは、Th1/Th2 細胞の分化誘導において中心的な役割を果たすことが知られている。ハンセン病患者病巣における IL-12Rβ2 分子の遺伝子発現に着目した場合、病型の異なる患者間の遺伝子発現量に差があることが示された（Kim J *et al*, *J Immunol*, 2001）。この現象を免疫遺伝学的観点から解明できれば、ハンセン病に対する感受性

診断に応用することが可能となる。

前年度の本研究課題において我々は、ハンセン病患者を対象とした *IL12RB2* の転写制御領域の多型解析を行った結果、多くの被験者が共通して有する 4 種類の SNPs を検出することに成功した。それら SNPs は、T 型患者に比べて L 型患者において有意に多く検出される。また、これらの多型は、同遺伝子の転写活性を低下させ、T 細胞の低 IFN-γ 産生を誘導することもあわせて

報告した。しかし、これらの遺伝子多型によって低遺伝子発現が誘導される機序、さらにこれらの遺伝子多型がT細胞以外の宿主防御細胞機能に対してどのように影響するかについても、何も分かっていない。

そこで本年度は、検出された *IL12RB2* の転写制御領域の多型が宿主防御に及ぼす影響、さらにはそれに関わる機序を明らかにするために、*IL12RB2* の転写制御領域の多型がNK細胞機能に及ぼす影響を調べるとともに、それぞれの細胞の転写制御に関わる核タンパクを特定することを試みた。

B. 研究方法

1. **被験者**：特記すべき疾患を有さない健常者11名を被験者とした。なお、すべての被験者について、*IL12RB2* 制御領域における -1035, -1023, -650 および -464 の計4部位の多型を解析することによって、各被験者の haplotype を特定した。

2. **NK細胞の調整**：末梢血単核球から付着細胞を除去した後、さらに磁気ビーズを用いた negative selection 法によって分離調整した細胞画分をNK細胞濃縮画分として以下の実験に供した。すなわち、被験者末梢血単核球をFicol-Paque 比重遠心法によって分離調整した後、ヒト血清で表面処理を行なったプレートで2時間 37°C, 5%CO₂ 存在下で培養した。浮遊細胞を回収し、その細胞懸濁液を StemSep[®] NK細胞

濃縮システム (StemCell Technologies 社製) で処理することによって高純度のNK細胞を得た。

3. ***IL12RB2* 制御領域における多型がNK細胞のIFN- γ 産生に及ぼす影響についての評価**：各被験者を *IL12RB2* 制御領域の多型によって分類し、それぞれの被験者におけるNK細胞のIFN- γ 産生量を測定した。すなわち、NK細胞濃縮画分 (1.2x10⁵ cells/well: 96 well plate) をヒトリコンビナント IL-2 (50U/ml) および IL-12 (R&D 社製; 1.0 ng/ml) 存在下で一定時間 (48, 72 時間) 培養し、それぞれの培養上清を回収した。上清に含まれる IFN- γ 量は human IFN- γ ELISA kit (Endogen 社製) を用いることによって測定した。

4. ***IL12RB2* 制御領域における多型がNK細胞のIL-12レセプター β 2分子mRNA発現に及ぼす影響についての評価**：ヒトリコンビナント IL-2 (50U/ml) および IL-12 (1.0 ng/ml) 存在下で一定時間 (24, 48 時間) 培養した後回収した細胞画分を破碎し、TRIZOL[®] を用いることによって全 mRNA を回収した。得られた試料の *IL12RB2* の遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR 法を行ない SNPs の有無と遺伝子発現を比較することによって、それらの相関の有無を評価した。

5. **DNA結合タンパクの同定**：質量分析計を用いて、*IL12RB2* 制御領域の多型の有無によってDNA結合性が影響を受ける核タンパクの特定をT細胞お

よびNK細胞それぞれについて試みた。すなわち、健常者末梢血T細胞画分およびNK細胞画分のそれぞれから抽出した核タンパクとビオチン標識した合成2本鎖オリゴDNAとを一定時間結合させた後、アビジン・コートされたアガロースビーズと共培養することによって、DNA-タンパク複合体をビーズ上に結合させた後に回収し、高塩濃度バッファーを用いることによってタンパクのみを回収し、質量分析計にかけることによって特定することを試みた。なお、T細胞由来の核タンパクは、抗CD3抗体+抗CD28抗体およびリコンビナントIL-12存在下で1時間培養した健常者末梢血T細胞画分から、またNK細胞由来の核タンパクはヒトリコンビナントIL-2およびIL-12存在下で1時間培養したNK細胞からそれぞれ精製した。

(倫理面への配慮)

本研究課題は、埼玉医科大学倫理委員会および岡山大学倫理委員会において、倫理的側面から検討がなされ、実施についての承認を得ている。さらに、研究の実施にあたっては、本研究課題の目的を提示した上で、各ドナーに対して遺伝子および細胞を採取することによって考えら得る全ての利益、不利益を十分に説明した上で十分にインフォームド・コンセントが得られたドナーからのみ、試料の提供を受けた。

C. 研究結果

1. ***IL12RB2* 制御領域における多型がNK細胞のIFN- γ 産生に及ぼす影響についての評価**：各被験者を*IL12RB2*制御領域の多型の有無によって分類し、それぞれの被験者におけるNK細胞のIFN- γ 産生量を測定した結果、以下のことが明らかとなった。

1) *IL12RB2* 転写制御領域に多型を有さないハプロタイプ（ハプロタイプ1）のホモ接合体の被験者から採取したNK細胞に比べて、ハプロタイプ1以外のハプロタイプのヘテロ接合体およびホモ接合体の被験者から採取したNK細胞は、有意に高いIFN- γ 産生を示した ($p<0.01$)。

2) *IL12RB2* 転写制御領域にハプロタイプ1以外のハプロタイプのホモ接合体の被験者から採取したNK細胞は、ヘテロ接合体の被験者から採取したNK細胞に比べて、高いIFN- γ 産生を有する傾向を示した。

以上の結果から、同領域の遺伝子多型は、NK細胞とT細胞のIFN- γ 産生に全く逆の影響を及ぼすことが示された。

2. ***IL12RB2* 制御領域における多型がNK細胞のIL-12レセプター β 2分子mRNA発現に及ぼす影響についての評価**：健常被験者の末梢血単核球からNK細胞濃縮画分を分離調整し、ヒトリコンビナントIL-2 (50U/ml) およびIL-12 (1.0 ng/ml) 存在下で一

定時間（0, 24, 48時間）培養した細胞画分から全 mRNA を回収し、リアルタイム PCR を行なうことによって *IL12RB2* の遺伝子発現量を各被験者間で比較した。その結果、ハプロタイプ1のホモ接合体から採取した NK 細胞に比べて、ハプロタイプ1以外のハプロタイプのヘテロ接合体およびホモ接合体から採取した NK 細胞の *IL12RB2* の遺伝子発現は、0, および 24 時間後において高い傾向を示した。48 時間後においては、被験者群間において発現量の差はなかった。

3. **DNA 結合タンパクの同定**：質量分析計を用いて、*IL12RB2* 制御領域の多型の有無によって DNA 結合性が影響を受ける核タンパクの特定を T 細胞および NK 細胞のそれぞれから精製した核タンパクを用いて行った。その結果、精製することができたタンパク量が少なかったため特定するには至らなかったが、1) -650G DNA - T細胞由来の核タンパク、2) -464A DNA - T細胞由来の核タンパク、および3) -464G DNA - NK 細胞由来の核タンパクのそれぞれの組み合わせにおいて、特異的に結合するタンパクの存在が示唆された。

D. 考察

昨年度の本研究課題において、*IL12RB2* の転写制御領域に検出した -1035 A>G, -1023 A>G, -650 delG および -464 A>G の計 4 種類の SNPs が、同遺伝子の転

写活性を低下させ、T細胞の低 IFN- γ 産生を誘導することを示した。さらにこれら SNPs は、L 型患者において有意に多く検出されたことから、これら SNPs が L 型患者の低細胞免疫応答性の遺伝的背景を説明する上での一つの拘束要因になり得ることを示唆するに至った。しかし、本年度の結果によって、検出した SNPs が、T細胞においては *IL-12R β 2* 鎖遺伝子の低発現、またそれに伴う低 IFN- γ 産生を誘導するのに対して、NK 細胞においては、*IL-12R β 2* 鎖遺伝子の高発現、および IFN- γ の高産生性と相関する可能性が示唆された。これら SNPs が NK 細胞における遺伝子発現に及ぼす直接的な影響は、今後 NK 細胞株を宿主細胞とした reporter gene assay 等を行うことによって明らかとなるであろう。

T細胞由来核タンパクには、SNPs を含まない -650G DNA および -464A DNA と結合するが、SNP を含む -650 delG DNA および -464G DNA とは結合が弱い核タンパクが含まれる。一方、NK 細胞由来の核タンパクには、SNP を含む -464G DNA とは結合するが、SNPs を含まない -464A DNA とは結合しない核タンパクが含まれる。以上の結果から、T細胞とNK細胞との間で、*IL-12R β 2* 鎖遺伝子の発現に関与する核タンパクが全く異なることによって、IFN- γ 産生能が全く逆となっている可能性がある。また、T細胞由来の核タンパクには -650G DNA および -464A

DNA のそれぞれに結合する核タンパクが存在することから、-650 および-464 番目の塩基によるハプロタイプが、T細胞の IL-12R β 2 鎖遺伝子の発現を規定しているのかもしれない。

近年、van Rietschoten らは、*IL12RB2* の転写制御領域に-464 A>G SNP が存在すること、またその変異は GATA-3 binding site を消失させることにより、その転写活性を増幅させることを報告した (van Rietschoten JG et al, Tissue Antigens, 2004)。本年度の我々の結果と彼女らの仮説は、NK 細胞の系において合致する。このことから、NK 細胞の転写活性には GATA-3 が関与しているのかもしれない。今年度において、タンパク量が少なかったため、核タンパクを特定するにいたらなかった。実験系を改良することによって、これらのことを明らかにしたい。

L型患者の多くは、*IL12RB2* 転写制御領域に多型性を有する。前年度、T細胞に着目することによって、それら患者の低細胞性免疫応答性の一遺伝素因となり得ることを示した。本年度は、NK 細胞に着目して同様の解析を行った。その結果、*IL12RB2* 転写制御領域に多型は、T細胞のそれと全く逆に影響することが示された。これらのことから、*IL12RB2* 転写制御領域に多型を有する高感受性宿主に対して予防および早期治療を展開する場合、NK 細胞の IFN- γ 産生を早期に誘導することこそが鍵を握ると考えられる。抗酸菌感

染症において NK 細胞は、菌由来の糖タンパクおよび脂質を直接認識することによって、IFN- γ 産生が誘導されることが報告されているが (Estin S et al, Immunology, 2004)、我々の結果では、NK 細胞の IFN- γ 産生には、IL-2 および IL-12 双方の存在が必要であることが示されている。菌の感染を受けた場合、IL-12 産生はマクロファージにおいて誘導されると考えると、*IL12RB2* 転写制御領域に多型を有する高感受性宿主に対して、low-dose IL-2 を局所投与し、NK 細胞の IFN- γ 産生を誘導することは、病気の進展を食い止める上で有効な手段となり得るかもしれない。これらのことについては今後更なる解析によって、その全様がつかめるであろう。

E. 結論

IL12RB2 転写制御領域の遺伝子多型は、NK 細胞における IL-12R β 2 鎖遺伝子の高発現性および IFN- γ の高産生性と相関する。これらの結果は、*IL12RB2* 転写制御領域の遺伝子多型がT細胞のそれらに対して及ぼす影響と全く逆であった。また、NK 細胞由来の核蛋白とT細胞由来の核蛋白とでは、*IL12RB2* 転写制御領域の多型の有無によって結合する核蛋白が異なることも示された。これら結果は、*IL12RB2* 転写制御領域の多型性を指標としたハンセン病に対する早期治療システムの確立さらにはゲノム創薬開発の糸口となり得ること

を示唆するものである。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamura, Y., Yamada, N., Ohyama, H., Nakasho, K., Nishizawa, Y., Okamoto, T., Futani, H., Yoshiya, S., Okamura, H., Terada, N. Effect of interleukin-18 on metastasis of mouse osteosarcoma cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2006, in press.
2. Yamada, N., Tsujimura, T., Ueda, H., Hayashi, S., Ohyama, H., Okamura, H., Terada, N. Down-regulation of osteoprotegerin production in bone marrow macrophages by macrophage colony-stimulating factor. *Cytokine.* 31(4):288-297, 2005.
3. Ohyama, H., Ogata, K., Takeuchi, K., Namisato, M., Fukutomi, Y., Nishimura, F., Naruishi, H., Ohira, T., Hashimoto, K., Liu, T., Suzuki, M., Uemura Y., Matsushita, S. Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor β 2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. *J. Clin. Pathol.*, 58(7),740-743, 2005.
4. Kuhara, A., Yamada, N., Sugihara, A., Ohyama, H., Tsujimura, T., Hayashi, S., Terada, N. Fos plays no role in apoptosis of epithelia in the mouse male accessory sex organs and uterus. *Endocr J.*, 52(1):153-158, 2005.
5. Kato, N., Ohyama, H., Nishimura, F., Matsushita, S., Takashiba, S., Murayama, Y. Role of helper T cells in the humoral immune responses against 53-kDa outer

membrane protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.*, 20(2), 112-117, 2005.

6. Liu, T., Kohsaka, H., Suzuki, M., Takagi, R., Hashimoto, K., Uemura, Y., Ohyama, H., Matsushita, S. Positional Effect of Amino Acid Replacement on Peptide Antigens for the Increased IFN- γ Production from CD4T cells. *Allergol. International.* 54(1)117-122, 2005.
7. 植村靖史, 劉天懿, 鈴木元晴, 成田弥生, 大山秀樹, 松下祥: インバリアント NKT 細胞による Th1/Th2 バランスの調整. *臨床免疫*, 44(6) 682-688, 2005.

2. 学会発表

1. Ohyama, H., Ogata, K., Takeuchi, K., Uemura, Y., Oyama, M., Ohara, N., Namisato, M., Kogoe, N., Yamada, N., Terada, N., Matsushita, S. Polymorphism on the 5' flanking region of the IL-12 receptor β 2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. US-Japan Cooperative Medical Science Program. Fortieth Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (Seattle, USA) 2005 July, Proceedings, 100-104.
2. 大山秀樹: 歯肉および歯根膜線維芽細胞に発現するクラス II HLA 分子が細胞機能に果たす役割. 第 48 回秋季歯周病学会秋季学会 (札幌), 2005 年 9 月, 日本歯周病学会誌, 47(秋季特別号), 47.
3. 大山秀樹, 緒方是嗣, 畑中加珠, 並里まさ子, 中村佳照, 山田直子, 辻村亨, 寺田信行, 松下祥: *IL12RB2* 転写制御領域の遺伝子多型がハンセン病患者の病型成立機序に及ぼす影響. 第 94 回日本病理学会総会 (横浜), 2005 年 4 月, 日本病理学会会誌, 94(1), 225.

4. 中村佳照, 山田直子, **大山秀樹**, 辻村亨, 西沢恭子, 岡村春樹, 寺田信行: Interleukin-18 によるマウス骨肉腫細胞 (LM8) の肺転移抑制. 第 94 回日本病理学会総会 (横浜), 2005 年 4 月, 日本病理学会会誌, 94(1), 226.
 5. 辻村亨, 佐竹真, **大山秀樹**, 藤元治朗, 寺田信行: 膝再生における *c-kit* レセプターチロシンキナーゼの役割. 第 94 回日本病理学会総会 (横浜), 2005 年 4 月, 日本病理学会会誌, 94(1), 230.
 6. 吉澤さゆり, 西村英紀, 目黒道生, 畑中加珠, **大山秀樹**, 高柴正悟: ヒト歯肉線維芽細胞上に発現する HLA-DR 抗原と会合するリン酸化タンパク質の性状解析. 第 48 回秋季歯周病学会秋季学会 (札幌), 2005 年 9 月, 日本歯周病学会誌, 47(秋季特別号), 114.
 7. Yoshizawa, S., Nishimura, F., Meguro, M., Takeuchi-Hatanaka, K., **Ohyama, H.**, Takashiba, S. Signal Transduction Molecules in Gingival Fibroblast via HLA-II molecules. 53rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (Okayama) 2005 November, Program and Abstracts of Papers, 130.
 8. 劉天懿, 植村靖史, 鈴木元晴, 成田弥生, 中野和久, 涌井昌俊, **大山秀樹**, 松下祥: エストロゲンが DC を介して Th 応答性に及ぼす影響の評価. 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (盛岡), 2005 年 10 月, Japanese J. Allergology, 54 (8・9), 1092.
 9. 植村靖史, 劉天懿, 鈴木元晴, 成田弥生, 中野和久, 涌井昌俊, **大山秀樹**, 松下祥: ビスフェノール A およびノニルフェノールが DC を介して Th 応答性に及ぼす影響の評価. 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (盛岡), 2005 年 10 月, Japanese J. Allergology, 54 (8・9), 1092.
 10. 劉天懿, 植村靖史, 鈴木元晴, 成田弥生, **大山秀樹**, 中野和久, 涌井昌俊, 松下祥: エストロゲン受容体シグナルがヒト樹状細胞に与える機能的影響の解析. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 (横浜), 2005 年 12 月, 日本免疫学会総会・学術集会記録, 35, 150.
 11. 植村靖史, 劉天懿, 鈴木元晴, 成田弥生, **大山秀樹**, 中野和久, 涌井昌俊, 松下祥: V α 24 インバリアント NKT 細胞サブセットによる DC を介した免疫制御機構の解析. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 (横浜), 2005 年 12 月, 日本免疫学会総会・学術集会記録, 35, 155.
 12. 成田弥生, 植村靖史, 劉天懿, 鈴木元晴, **大山秀樹**, 中野和久, 涌井昌俊, 菊地博達, 松下祥: ヒト樹状細胞におけるリアノジン受容体サブタイプの発現と免疫応答性への関与の可能性. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 (横浜), 2005 年 12 月, 日本免疫学会総会・学術集会記録, 35, 155.
 13. 鈴木元晴, 植村靖史, 劉天懿, 成田弥生, **大山秀樹**, 松下祥: 脱落膜 non-invariant NKT 細胞の妊娠子宮 Th2 環境維持における役割. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 (横浜), 2005 年 12 月, 日本免疫学会総会・学術集会記録, 35, 266.
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得 (申請中)
名称; 「インターフェロンガンマ (IFN- γ) 低産生に関わる IL12R プロモーター領域の多型とその検出方法」
発明考案者; 緒方是嗣, 大山秀樹, 松下祥, 山本卓志
 2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし