

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

免疫不全マウスでの人工リンパ組織による効果的な T 細胞免疫の誘導に関する研究

分担研究者 末松 佐知子 独立行政法人医薬基盤研究所

研究要旨：多くのウイルス感染後の治癒過程においてはウイルス感染細胞に対する T 細胞免疫が重要である。今回、人工リンパ組織によって免疫不全マウスに抗原特異的な T 細胞免疫を導入できるか否かを、免疫不全マウスに移植した腫瘍に対する腫瘍免疫の実験系により検討した結果、人工リンパ組織による抗腫瘍効果は免疫不全状態の強いマウスにおいてより顕著であることが分かった。

A. 研究目的

独自に開発した人工リンパ組織構築法を応用して、免疫不全個体においてウイルス特異的な T 細胞免疫機能を賦活し、ウイルス感染症の予防や治療に応用すること。

B. 研究方法

人工リンパ組織により免疫不全マウスに抗原特異的な T 細胞免疫を導入できるか否かを、同じく抗原特異的 T 細胞免疫が腫瘍細胞増殖の抑制に中心的な役割を果たす腫瘍免疫の実験系を用いて検討した。

我々の常法に従って、ある腫瘍特異的抗原で予め一次免疫した正常マウスを用いて人工リンパ組織を構築した。この「腫瘍特異

的人工リンパ組織」を免疫不全マウスに移植した後に当該腫瘍を皮内に投与し、人工リンパ組織による抗腫瘍効果を腫瘍特異的樹状細胞投与（樹状細胞療法）と比較検討した。免疫不全マウスとしては T 細胞欠損マウス（ヌードマウス）と重症複合型免疫不全（SCID）マウスを用いた。

（倫理面への配慮）

本研究の動物実験は医薬基盤研究所動物実験指針に基づいた研究計画に従って行われた。

C. 研究結果

樹状細胞療法は腫瘍を移植したヌードマウスに対しては多少の抗腫瘍効果をもたら

したが、より免疫不全状態の強い SCID マウスには全く効果がなかった。それに対して、腫瘍特異的人工リンパ組織を移植した場合にはヌードマウス、SCID マウス共に明らかな抗腫瘍効果が観察された。

D. 考察

我々の予測通り、癌細胞特異的なリンパ球を取り込んだ人工リンパ組織を免疫不全マウスに移植すると腫瘍に対する T 細胞免疫能を導入可能であり、腫瘍を縮小させ得ることが分かった。

E. 結論

免疫不全個体では様々な理由で抗原特異的な T 細胞免疫を効率よく誘導できず、ウイルスに対するワクチンを投与してもその効果が思わしくないことが少なくない。今回の結果から、人工リンパ組織を応用すれば免疫不全状態でのウイルス感染症予防あるいは治療の可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

人工リンパ組織構築とは何か

末松 佐知子

Organ Biology (印刷中)

2. 学会発表

1. 末松 佐知子

「ストローマ細胞を用いたマウス人工リンパ組織の構築」日本組織培養学会第 80 回大会
大阪 2007 年 5 月

2. 末松 佐知子

「ストローマ細胞を用いたマウス人工リンパ組織の構築」第 34 回臓器保存生物医学会
札幌

2007 年 11 月 シンポジウム 5 「遺伝子工学と組織再生」

3. Yuki Hattori and Sachiko Suematsu
Functional Lymphatic Vessel Formation in Tissue-Engineered Secondary Lymphoid Tissue-Like Organoids in Mice.

第 37 回日本免疫学会総会 東京 2007 年 11 月

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（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

水痘帯状疱疹ウイルス特異的細胞性免疫評価による予防接種時期の検討に関する研究

分担研究者 羽田敦子 （財）田附興風会医学研究所北野病院 第1研究部 主任研究員

研究要旨：加齢や免疫不全状態で発症しやすい帯状疱疹を効果的に予防するため、水痘帯状疱疹ウイルス特異的免疫能を評価し、特に発症危険度の高い群への予防を勧奨する。

A. 研究目的

安全で効率良く疾病を予防するために健常者及び免疫不全状態患者における水痘帯状疱疹ウイルスに対する細胞性免疫応答の状況を把握した上で適切な時期にワクチン接種を推奨していく。

B. 研究方法

1. ワクチン接種の必要性の根拠となる疾患別帯状疱疹発症頻度、重症度を調査。
2. 健常者及び発症リスクが高い疾患を持つ患者に接種。
3. 細胞性免疫能を評価。

C. 研究結果

病院ベースの疫学調査では、84,996人の入院・外来患者で17疾患発症後の帯状疱疹発症リスクは、単変量解析、多変量解析によるオッズ比は糖尿病 1.58、1.48、高血圧 1.56、1.36、腎不全 1.62、1.56、悪性リンパ腫 3.99、4.46、乳癌 2.00、1.92、結

腸・直腸癌 1.87、1.62、呼吸器系の癌 2.23、1.78、白内障 0.97、0.73であった。治療と比較した予防による経済効果を研究の予定。

D. 考察

疾患別帯状疱疹リスク評価により、糖尿病、高血圧、腎不全、癌がリスクであった。2007年国民衛生の動向によると平成17年10月日本の疾患患者数は、糖尿病 250万人、高血圧 780万人、癌 140万人、2005年人工透析患者 25万人であり、効率的な予防が望まれる。

E. 結論

帯状疱疹発症高リスクが比較的高く化学療法・免疫抑制剤などは使用されていない糖尿病患者はワクチンにより帯状疱疹を安全に予防できる疾患群であると考えられた。

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

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

健常人および有病者における水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) 特異的細胞性免疫能の測定

分担研究者 森 康子（医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト・
チーフプロジェクトリーダー）

協力研究者 定岡 恵（医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト・特任研究員）、岡本成史
（医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト・プロジェクト研究員）、羽田敦子（財団法人田
附興風会医学研究所・第1研究部・主任研究員）、吉川哲史（藤田保健衛生大学医学部小児
科・准教授）、浅野喜造（藤田保健衛生大学医学部小児科・教授）

研究要旨：VZV に対する感染予防には、VZV 抗原反応性ヘルパー 1 型 T 細胞による細胞性免疫応答が重要であることが示唆されている。そこで我々は、健常人および帯状疱疹を発症しやすい有病者において、皮内テストまたは IFN- γ ELISPOT 法を用いて VZV 特異的細胞性免疫能を測定した。その結果、健常人における皮内テストと IFN- γ ELISPOT 法の結果には相関が見られ、どちらの結果も VZV 特異的細胞性免疫能が年齢に伴って低下することが示された。また、有病者においては、健常人と比較して VZV 特異的細胞性免疫能が低下しており、この事が帯状疱疹を好発する原因である可能性が示唆された。

A. 研究目的

1) 20 代から 60 代の健常人において皮内テスト、IFN- γ ELISPOT 法の二つの方法で VZV 細胞性免疫を測定し、両者の相関性について検討する。

2) 帯状疱疹を好発する疾患患者における VZV 細胞性免疫を IFN- γ ELISPOT 法で測定し、健常人と比較することで、VZV 再活性化と細胞性免疫能の相関性を明らかにする。

（倫理面への配慮）

本研究は、臨床研究に関する倫理指針を遵守し、各研究機関における倫理委員会において承認を得た上で研究を行った。研究対象者に対しての個人の不利益・危険性が伴わないように配慮し、また研究の目的、個人の不利益、危険性に対しては十分に説明し、各研究機関の倫理委員会によって承認されたインフォームドコンセントにサイン或いは捺印を得た上で研究を行った。

B. 研究方法

1. 対象

健常人ボランティア 151 人（男性 83 人、女性 68 人、平均年齢（49.1 歳）、疾患患者 40 人を対象とした。

2. PBMC の分離と IFN- γ ELISPOT 法

採血した血液より末梢血単核球 (PBMC) を分離した。

IFN- γ ELISPOT 法は、以下に示す方法で行った。

抗ヒトIFN- γ 抗体(clone2G1, Endogen)をコートした96穴メンブレンプレート(ミリポア)にPBMCを 2×10^6 個または 4×10^6 個加え、その上にVZVワクチン原液(阪大微研、 9×10^5 pfu/ml)を感染力価 3×10^4 pfuになるように添加した。一方、PHAによる刺激も行った。37°C, 5% CO₂条件下で36時間培養した後、プレートを洗浄し、ビオチン標識抗ヒトIFN- γ 抗体(clone B133.5, Endogen)、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(1:1000, BD)、TMB-H発色液(Moss)を反応させ、スポットを得た。スポット数の測定はKS-ELISPOT測定装置(Karl Zeiss)により行った。

3. 皮内テスト

0.1mLの水痘抗原(阪大微研)を1回皮内に注射した。皮内反応の判定は注射後およそ24時間後と48時間後に判読した。

4. 血清中の抗VZV抗体価の測定

抗体価の測定は、gpELISA法により行った。

C. 研究結果

1) VZV特異的細胞性免疫の評価

151人の健常人ボランティアにおいて皮内テスト、IFN- γ ELISPOT法によりVZV特異的細胞性免疫を、gpELISA法により血中の抗VZV抗体価を調べた。抗体価は全ての人において陽性であったが、細胞性免疫は年代が上がるに従って低下する傾向が、皮内テスト、IFN- γ ELISPOT法の両者において見られた。男女毎の比較では有意な差は見られなかった。

2) 皮内テストとIFN- γ ELISPOT法の相関

皮内テスト、IFN- γ ELISPOT法、gpELISA法で得られた各値をグラフにプロットした所、皮内テストとIFN- γ ELISPOT法の結果に正の相関が見られた(data not shown)。一方で、gpELISAの結果はIFN- γ ELISPOT法とは弱い相関が、皮内テストとは全く相関がなかった。そこで、皮内テス

トの結果をスコア化し、IFN- γ ELISPOTおよびgpELISAの結果と比較した(図1)。その結果、ELISPOTの値は、皮内テストのスコアに比例して増加しており(図1)、両者に有意な相関がある事が示唆された。皮内テストとgpELISAの結果の間には相関は見られなかった(図1)。

3) 有病者におけるVZV特異的細胞性免疫能の低下

基礎疾患をもつ患者(糖尿病、乳がん、慢性腎不全、自己免疫疾患)と健常人コントロールから採取したPBMC 2×10^6 個を用いてIFN- γ ELISPOT法にてVZV特異的細胞性免疫能を調べた(図2)。その結果、いずれの疾患においても健常人と比較してVZV特異的細胞性免疫能が低値であった(図2)。特に、糖尿病患者においては、PHAに対する反応性が良好に保たれているのに対してVZVに対する反応性が低下している傾向にあることが分かった。

D. 考察

VZV感染に対する感染防御効果は細胞性免疫によることが示唆されている。細胞性免疫能を測定する方法としては、皮内テスト、IFN- γ ELISPOT法があるが、両者の相関性については現在まで全く報告がない。そこで今回我々は、健常人151人について二つの方法を用いてVZV細胞性免疫能の測定を行った。その結果、両者には正の相関が見られ、どちらの測定方法も妥当である事が示唆された。特に皮内テストはIFN- γ ELISPOT法と比較すると、煩雑な細胞培養操作が必要なく、判定法も簡便であるため、今後は皮内テストを用いて、さらに大規模な調査をしていくことで、VZV特異的細胞性免疫能の低下と帯状疱疹の発症の関係を明らかにできると考えられる。

また、有病者と健常人における比較の結果から、糖尿病患者では免疫状態が健常人に近いにもかかわらず、VZV特異的な細胞性免疫が低下している傾向が見られ、このような患者においては、水痘ワクチンの接種が帯状疱疹発症を防ぐために

有効である可能性が示唆された。今後この傾向を確認するために、さらに検体数を増やして検討していく予定である。

E. 結論

1. 皮内テストは IFN- γ ELISPOT 法と同様に VZV 特異的細胞性免疫を調べるのに適切な方法であり、簡便かつ迅速な判定ができる点で特に有効な方法であることが確認された。

2. 基礎疾患をもつ患者においては健常人と比較して VZV 特異的細胞性免疫能が低下している傾向が見られ、この事が帯状疱疹を好発する原因である可能性が示唆された。

F. 健康危機管理情報

特に問題なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 定岡恵、岡本成史、羽田敦子、吉川哲史、浅野喜造、山西弘一、森康子. ELISPOT法による水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)特異的細胞性免疫能の評価 第22回ヘルペスウイルス研究会2007年6月14日-16日、福岡

2) 定岡恵、岡本成史、羽田敦子、吉川哲史、浅野喜造、山西弘一、森康子. ELISPOT法による水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)特異的細胞性免疫能の評価 第55会日本ウイルス学会学術集会2007年10月21日-23日 札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

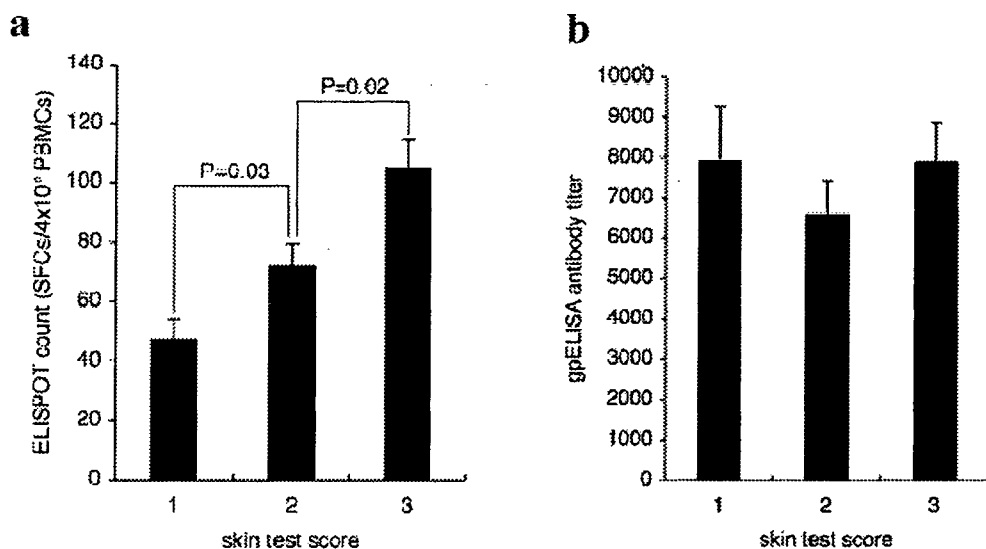


図1. スコア化した皮内テストの結果と ELISPOT、gpELISA との相関
 10mm 未満の腫脹：スコア1、10mm 以上の腫脹（硬結なし）：スコア2、
 10mm 以上の腫脹（硬結あり）：スコア3

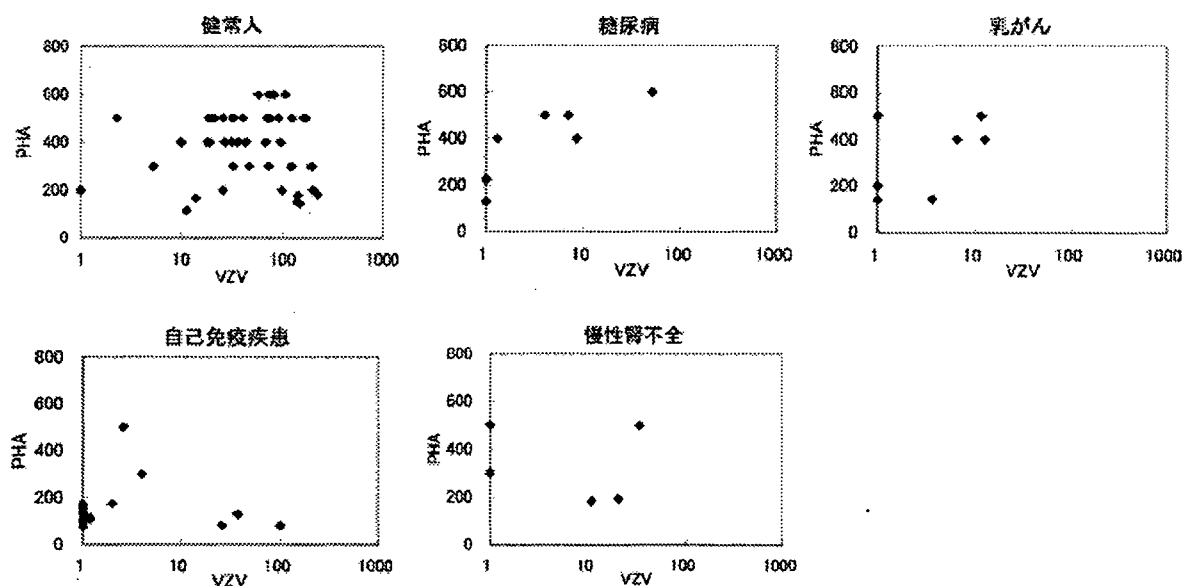


図2. 有病者と健常人における ELISPOT の結果
 健常人においては大部分の人が VZV 刺激に対する反応スポット数が 10 個以上、PHA 刺激に対する反応スポット数が 200 個以上である。一方、有病者においては、VZV 刺激に対する反応スポット数が 10 個以下の人が多い。

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

HHV-6 の感染機構の解析

分担研究者 森 康子（医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト・
チーフプロジェクトリーダー）

協力研究者 武本眞清（医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト・研究員）

研究要旨：ヒトヘルペスウイルス6（HHV-6）の生体内伝播に樹状細胞が寄与している可能性を検討した。まず単球由来樹状細胞（MoDC）にHHV-6が感染すると、成熟化やマクロファージへの分化が抑制された状態が維持される。MoDC内でのHHV-6の感染状態は、DNA合成と核内のカプシド形成は起きているが、細胞質で成熟ウイルス粒子が観察されないことが、リアルタイムPCRと電子顕微鏡観によって明らかとなった。しかしながら感染MoDCとCD4⁺ T細胞とを共培養するとウイルスは高率にT細胞へ感染し感染性ウイルス粒子を産生することから、MoDCはHHV-6のT細胞への伝播を担っていると考えられた。同様の結果はMyeloid DC（MDC）とPlasmacytoid DC（PDC）でも得られ、マクロファージ（Mφ）では伝播が起きないか、起きても軽微であることから、HHV-6の生体内伝播に主要な役割を果たしているのは樹状細胞であることが示唆された。

A. 研究目的

DCは抗原提示細胞として感染免疫において重要な役割を果たすが、一方で微生物の侵入経路として利用され得ることが、近年明らかになってきた。HHV-6感染におけるDCの役割を検討した。

B. 研究方法

末梢血由来単核球（PBMC）より単球を分離し、GM-CSFおよびIL-4存在下にて未熟MoDCを、M-CSF存在下でM-Mφを、GM-CSF存在下でGM-Mφを得た。またMDCとPDCはPBMCより直接分離した。HHV-6 HST株をMoDCに感染させ、FACS解析によって表面マーカーの発現を、Cytometric Bead Array（CBA）によ

って炎症性サイトカインの産生を測定した。さらに感染MoDCからDNAを抽出しリアルタイムPCRを行い、また感染5日後の細胞を電子顕微鏡によって観察した。ウイルス伝播は感染細胞とPHAにより刺激したPBMC由来CD4⁺ T細胞とを1:5の割合で混ぜ、FACSとTCID₅₀法によって確認した。

（倫理面への配慮）

ヒト検体の取り扱いに際しては、本研究機関における倫理委員会の承認を得た上で、倫理指針を遵守しつつ研究を行った。

C. 研究結果

1) MoDCはHHV-6が感染してもTNF-α、IL-1β、IL-6、IL-12等炎症性サイトカインを産生せず、成熟化マーカーであるCCR7の

発現も起こさない。また非感染 MoDC はサイトカイン刺激を除去すると CD14 の発現が上昇し M ϕ 様形態へと変化するが、感染 MoDC ではそのような変化を起こさない。以上の結果から HHV-6 感染 MoDC は成熟化も M ϕ への分化も抑制されていると考えられる。

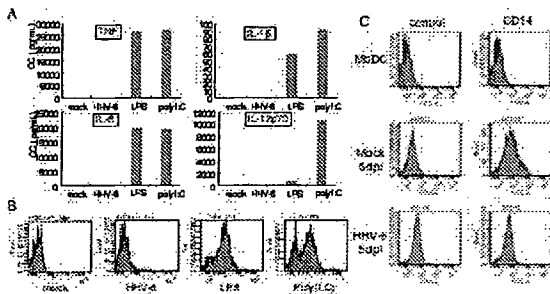


図1. HHV-6感染およびLPS、poly(I:C)刺激によるMoDCからのサイトカイン産生(A)とCCR7の発現経緯(B)、またHHV-6感染5日後のCD14の発現(C)。

2) MoDC中でのHHV-6 感染の状態を調べると、リアルタイムPCRでは細胞内でのウイルスDNA合成が認められたが、感染性ウイルス粒子の産生が起きていないことがTCID₅₀法で示された。また電子顕微鏡観察では、核内でのカプシド形成は起きているが細胞質における成熟ウイルス粒子の存在は確認できなかった。

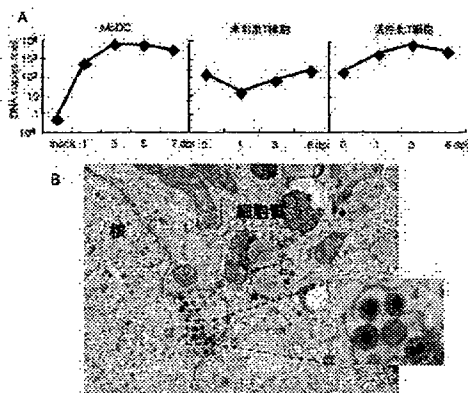


図2. リアルタイムPCRによるHHV-6感染細胞内のウイルスDNAの定量(A)、およびHHV-6感染5日後のMoDCの電子顕微鏡像(B)。

3) MoDCからのHHV-6 の伝播能を見

るために、感染MoDCとCD4⁺ T細胞とを1:5の割合で共培養したところ、T細胞でのHHV-6 の複製と培養上清中への感染性ウイルス粒子の産生が認められた。同様にしてT細胞へのHHV-6 伝播はMDCとPDCからは確認できたが、M-M ϕ からはわずかし、またGM-M ϕ からは全く起きていないことが示された。

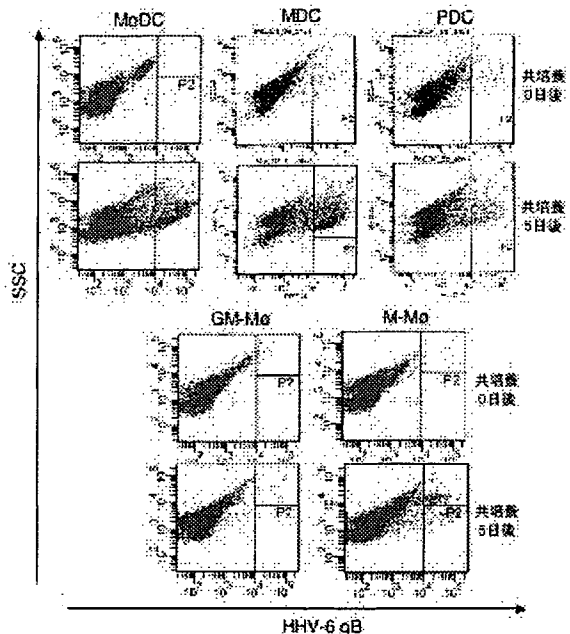


図3. HHV-6感染各細胞とCD4⁺ T細胞との共培養後の、HHV-6 gB発現細胞の出現率。

D. 考察

HHV-6 を末梢粘膜組織で捕捉してCD4⁺ T細胞へ伝播させているのは主にDCであることが示唆された。しかしながらCCR7 の発現がない状態では通常DCのリンパ節への遊走は起きないため、HHV-6 はそれを補完する何らかの機序をはたかしている可能性が考えられる。

E. 結論

HHV-6 の生体内伝播において DC が主要な役割を果たしていることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 武本眞清、今澤孝喜、山西弘一、森康子

ヒトヘルペスウイルス 6 は単球由来樹状細胞に感染し T 細胞へ伝播する。

第 22 回ヘルペスウイルス研究会
(2007 年 6 月 14 日～16 日、福岡県福岡市)

2) Takemoto, M., Imazawa, T., Yamanishi, K., and Mori, Y. Monocyte-derived

dendritic cells infected with human herpesvirus 6 have a role for virus transmission to CD4+ T cells.

32nd International Herpesvirus Workshop (2007 年 7 月 7 日～12 日、Asheville, NC, USA)

3) 武本眞清、山西弘一、森康子

ヒトヘルペスウイルス 6 は単球由来樹状細胞に感染し T 細胞へ伝播する。

第 55 回日本ウイルス学会 (2007 年 10 月 21 - 23 日、北海道札幌市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
K. Kondo and Yamanishi K.	HHV-6A, 6B, and 7: molecular basis of latency and reactivation.	Ann Arvin et.al. editors.	Human Herpesviruses.	Cambridge University Press		2007	843-849
K. Kondo.	Chronic Fatigue Syndrome and Herpesvirus Infection.		Fatigue Science for Human Health	Springer Press		2008	137-152

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishibashi K, Tokumoto T, Tanabe K, Shirakawa H, Hashimoto K, Kushida N, Yanagida T, Inoue N, Yamaguchi O, Toma H, Suzutani T	Association of the outcomes of renal transplantation with antibody responses to cytomegalovirus strain-specific glycoprotein H epitopes.	Clin. Infect. Dis.	45	60-67	2007
Kumar N, McLean K, Inoue N, Moles DR, Scully C, Porter SR, Teo CG	Human Herpesvirus 8 genotype prevalence in populations at disparate risks of Kaposi's sarcoma.	J. Med. Virol.	79	52-59	2007
Ohashi M, Sugata K, Ihira M, Asano Y, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Yoshikawa T	Human herpesvirus 6 infection in adult living related liver transplant recipients.	Liver Transplant.	14	100-109	2008
Hasegawa H, Ichinohe T, Tamura SI, Kurata T	Development of a mucosal vaccine for influenza viruses: preparation for a potential influenza pandemic	Expert Rev. Vaccines	6	193-201	2008
Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura SI, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H	Prophylactic effects of chitin microparticles on highly pathogenic H5N1 influenza virus	J. Med. Virol.	79	811-819	2007
Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura SI, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T, Hasegawa H	Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge.	Microbes Infect.	9	1333-1340	2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakamura, H., Ishii, C., Suehiro, M., Iguchi, A., Kuroda, K., Shimizu, K., Shimizu, N., Imadome, K., Yajima, M., Fujiwara, S	The Latent Membrane Protein 1 (LMP1) Encoded by Epstein-Barr Virus Induces Expression of the Putative Oncogene Bcl-3 Through Activation of the Nuclear Factor- κ B.	Virus Res.	131	170-179	2008
Phromjai J, Aiba N, Suzuki M, Sato H, Takahara T, Kondo S, Shiraki K	Infection and direct injury in human hepatocyte explants and a hepatoblastoma cell line due to hepatiticomimetic (non-hepatitis) viruses	J. Med. Virol.	79	413-425	2007
Shimada Y, Suzuki M, Shirasaki F, Saito E, Sogo K, Hasegawa M, Takehara K, Phromjai J, Chuhjo T, Shiraki K	Genital herpes due to acyclovir-sensitive herpes simplex virus caused secondary and recurrent herpetic whitlows due to thymidine kinase-deficient/temperature-sensitive virus	J. Med. Virol.	79	1731-1740	2007
末松 佐知子	人工リンパ組織構築とは何か	Organ Biology			印刷中