

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
総合研究報告書

休眠期結核菌由来遺伝子を用いた DNA ワクチンの開発研究

研究分担者 小出幸夫（浜松医科大学・理事）

研究要旨

休眠期結核菌関連抗原の免疫原性の検討：休眠期の結核菌が発現する DosR regulon 蛋白（48 種）および再活性化時に発現する resuscitation promoting factor (Rpf) 蛋白（5 種）の DNA ワクチン・ライブラリーを作製した。現在までに DosR regulon 蛋白 32 種類についてマウスを用いた免疫原性の検討を終え、C57BL/6 で 9 種類、BALB/c で 12 種類の抗原が T 細胞応答を誘導できた（両系統で誘導できたものは 7 種類）。また、C57BL/6 で 3 種類、BALB/c で 13 種類の抗原が抗体産生を誘導できた（同 3 種類）。特に Rv3132c は両系統で両免疫応答を誘導でき、有望な候補抗原と考えられた。

Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) の T 細胞エピトープの同定：MDP1 に対する T 細胞応答をマウスで検討し、C57BL/6 の最小 CD8⁺ T 細胞エピトープおよび BALB/c の最小 CD4⁺ T 細胞エピトープをそれぞれ 1 つ決定した。

新規ワクチン技術の開発：樹状細胞による抗原の取り込み促進を目的として、heat shock protein (HSP) 70 や macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α を利用した分子融合型ワクチンを開発した。また、新たな抗原送達システムとして糖鎖被覆リポソームを開発した。

A. 研究目的

結核菌感染に対するワクチンとしては、BCG が依然として用いられており、世界の人口の約半分がこの接種を受けている。しかし、BCG の乳幼児粟粒結核に対する有効性は確認されているが、成人の肺結核に対する有効性は疑問視されている。これは BCG の効果が長くても 10~20 年しか維持できないため、「長期潜在性・持続感染から発症する二次性結核（内因性再燃）」が主体である成人の肺結核には対応できないためと考えられる。

結核菌は約 4,000 の遺伝子を保有するが、増殖期に発現する遺伝子と休眠期に発現する遺伝子は異なることが知られている。そこで、本研究では休眠期の結核菌が発現する DosR regulon 蛋白（48 種）や結核菌の再活性化に関与する resuscitation promoting factor (Rpf) 蛋白（5 種）等を標的として、結核菌の再燃を抑制する新規ワ

クチンの開発を計画した。本研究は、これらの検索を通じて、BCG を初回免疫に、抗潜伏期ワクチンを追加免疫に用いることで、成人の肺結核をも制御できるワクチン戦略の構築を目的としている。

B. 研究方法

1. 休眠期結核菌関連抗原を標的とした DNA ワクチンの作製と免疫効果の検討

結核菌ゲノム情報に基づき、DosR regulon 蛋白および Rpf 蛋白をコードする遺伝子を PCR によって単離し、哺乳類細胞用の発現ベクターである pCI に挿入して、DNA ワクチン・ライブラリーを作成した。また、それと平行して目的遺伝子を pET28b ベクターに挿入し、大腸菌発現系によって目的蛋白を調製した。

遺伝子銃を用いて、作成した DNA ワクチンでマウス（BALB/c および C57BL/6）を免疫（2 μ g、2 週間隔で 3 回）した。最終免

疫の2週後、免疫マウスの脾細胞を対応する組換え蛋白で37°C、48時間刺激し、培養上清中のIFN- γ 産生を指標として、免疫の効果を検討した。

2. Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) のT細胞エピトープの同定

MDP1 遺伝子(大阪市大・松本壮吉先生より分与)をpCIに挿入し、1.と同様のプロトコールでマウス(BALB/c、C57BL/6およびC3H/He)を免疫した。免疫マウスの脾細胞をオーバーラッピング・ペプチド(20mer長、松本壮吉先生より分与)で刺激し、IFN- γ 産生を指標として、免疫の効果とT細胞エピトープを検討した。さらに、同定した候補ペプチドについては、BIMAS/SYFPEITHI/RANKPEPの3つのアルゴリズムの予想に基づいて、より短い抗原ペプチドを合成し、T細胞応答を検討して最小エピトープを決定した。

3. 新しい免疫方法の開発

1) オリゴマンノース被覆リポソーム(OML): ovalbumin (OVA) を封入したOMLでC57BL/6マウスを免疫(2週間隔で腹腔内注射、3回)し、その抗原特異的免疫誘導能を検討した。免疫マウスの脾細胞をH-2K^b拘束性(257-264番目のアミノ酸)またはH-2A^b拘束性(323-339番目のアミノ酸)のOVAペプチドで刺激して、その免疫誘導効率を非免疫マウスおよびOML非被覆リポソーム封入OVAで免疫したマウスと比較した。また、免疫マウスにOVA遺伝子導入EL4細胞(EG.7-OVA)とEL4を接種し、マウスの生存を観察した。さらにC57BL/6マウスをEL4 lysateを封入したOMLで免疫し、EL4特異的な抗腫瘍活性が誘導できるか検討した。(東海大学・小島および産総研・池原との共同研究)

2) Heat shock protein (HSP) 70 との分子融合ワクチン: 結核防御抗原であるMPT51とHSP70の融合蛋白をコードする遺伝子をpCIに挿入し、遺伝子銃を用いてBALB/c

およびC57BL/6マウスを免疫した。最終免疫の2週後、マウスの脾細胞を既に同定したMPT51由来抗原ペプチドで刺激し、IFN- γ 産生を指標にして抗原特異的なT細胞応答を検討した。抗原ペプチドとして、MPT5124-32(H2-D^d拘束性)およびMPT51171-190(H2-A^b拘束性)をそれぞれBALB/c(CD8⁺T細胞応答)およびB6(CD4⁺T細胞応答)の脾細胞刺激に使用した。さらにHSP70の①全長、②N末端側、③C末端側とMPT51を融合させた3種類の遺伝子を構築して同様の解析を行い、増強活性の存在する部位について検討した。

3) Macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α との分子融合ワクチン: MPT51とMIP-1 α の融合蛋白をコードする遺伝子を構築し、2)と同様に、その免疫増強効果を検討した。

倫理面への配慮

1~3の遺伝子組換え実験および動物実験に関しては、それぞれ「研究開発二種省令」および「浜松医科大学動物実験規定」に従って行った。

C. 研究結果

1. 潜伏期結核菌関連抗原を標的としたDNAワクチンの作製と免疫効果の検討

2系統のマウスを用いて候補抗原の免疫原性について検討し、T細胞応答および抗体産生について以下の結果を得た(次頁の表参照)。

① T細胞応答を惹起できた抗原群(下線は両系統で陽性のものを示す)

1) C57BL/6(9/32種類): Rv0079, Rv0081, Rv1998c, Rv2031c, Rv2032, RV2623, Rv2624c, Rv3127, Rv3132c

2) BALB/c(12/32種類): Rv0079, Rv0571c, Rv1738, Rv1998c, Rv2031c, Rv2032, RV2623, Rv2624c, Rv2626c, Rv2628, Rv3131, Rv3132c

スクリーニング結果の概略

	C57BL/6		BALB/c	
	T細胞	抗体	T細胞	抗体
Rv0079	OO	未解析	O×	OO
Rv0080	×	×	×	OO
Rv0081	OO	未解析	×	OO
Rv0569	×	未解析	×	未解析
Rv0571c	×	×	O×	×
Rv0572c	×	×	×	×
Rv0574c	×	×	×	×
Rv1734c	×	×	×	×
Rv1738	×	×	OO	OO
Rv1996	×	×	×	×
Rv1998c	OO	×	OO	OO
Rv2005c	×	×	×	×
Rv2007c	×	×	×	×
Rv2028c	×	×	×	×
Rv2029c	×	OO	×	OO
Rv2030c	×	×	×	×
Rv2031c	OO	未解析	OO	OO
Rv2032	OO	×	OO	×
Rv2623	OO	未解析	OO	OO
Rv2624c	OO	未解析	O×	OO
Rv2626c	×	OO	OO	OO
Rv2628	×	×	OO	×
Rv2629	×	×	×	×
Rv2630	×	×	×	×
Rv2631	×	×	×	×
Rv3126c	×	未解析	×	未解析
Rv3127	OO	×	×	OO
Rv3129	×	×	×	×
Rv3131	×	×	O×	O×
Rv3132c	OO	OO	OO	OO
Rv3133c	×	未解析	×	未解析
Rv3134c	×	×	×	×

各群マウス2匹ずつについて検討した。

各シンボルは個体の結果を示す(O:陽性 ×:陰性)。

② 抗体産生を惹起できた抗原群 (同上)

1) C57BL/6 (3/21 種類) : Rv2029, Rv2626c, Rv3132c

2) BALB/c(13/26 種類): Rv0079, Rv0080, Rv0081, Rv1738, Rv1998c, Rv2029, Rv2031c, Rv2623, Rv2624, Rv2626c, Rv3127, Rv3131c, Rv3132c (同上)

③ T細胞応答/抗体産生の両方が惹起できた抗原群 (同上)

1) C57BL/6 : Rv3132c

2) BALB/c : Rv0079, Rv1738, Rv1998c, Rv2031c, Rv2623, Rv2624, Rv2626, Rv3132c

2. Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) の T細胞エピトープの同定

BALB/c (CD4⁺ T細胞エピトープ1個)、C57BL/6 (CD4⁺ T細胞エピトープ2個および CD8⁺ T細胞エピトープ1個) および C3H/He (CD4⁺ T細胞エピトープ3個) のすべてのマウスで候補ペプチドを同定した。さらに、C57BL/6 の最小 CD8⁺ T細胞エピトープ (MDP123-31) および BALB/c の CD4⁺ T細胞エピトープ (MDP146-65) を決定した。

3. 新しい免疫方法の開発

1) オリゴマンノース被覆リポソーム: OML に封入した OVA は、非封入 OVA の約 1/50 量で効率良く細胞性免疫応答を誘導し、アジュバントを特に必要としなかった。加えて、OVA を封入した OML で免疫したマウスは、OVA 陽性腫瘍 (EG.7-OVA) を抗原特異的に拒絶した。また、免疫原性の弱い腫瘍 (EL4) の lysate を封入した OML でマウスを免疫すると、EL4 特異的な免疫応答が効率良く誘導された。

2) HSP70 との分子融合ワクチン: HSP70 と MPT51 の融合タンパクで免疫したマウスでは、MPT51 単独で免疫したマウスと比較して、CD4⁺ T細胞による抗原特異的な IFN- γ 産生の増強が見られた。また、HSP70 の C 末端側に免疫増強活性があることが明らかとなった。

3) MIP-1 α との分子融合ワクチン: MIP-1 α と MPT51 の融合タンパクで免疫したマウスでは、MPT51 単独で免疫したマウスと比較して、CD8⁺ T細胞による抗原特異的な IFN- γ 産生の増強が見られた。

D. 考察

1. 潜伏期結核菌関連抗原を標的とした DNA ワクチンの作製と免疫効果の検討

これまでに、C57BL/6 と BALB/c の両系統で T 細胞応答を誘導できる抗原を 7 種類同定した。今後、これらの抗原群について抗原エピトープの同定を行うと同時に、動物モデルを用いた感染実験とヒトでの免疫応答の検討を行う予定である。特に Rv3132c は、(1) 2 系統のマウスで細胞性および体液性免疫応答の両方を誘導することが可能であること、(2) *dosS/desS* をコードしている遺伝子であり、潜伏期において遺伝子産物が発現している可能性が高いことから、有望な候補抗原と考えられる。加えて、スクリーニングが終了していない抗原群についてもスクリーニングを継続する。

一部の蛋白（特に Rpf 蛋白群）については大腸菌での発現が困難で、研究遂行上での律速段階となっている。ベクター／プロモーター／大腸菌宿主／使用コドンの最適化等についての条件検討を行ったが、大腸菌や *M. smegmatis* を用いた産生系では、発現を改善することはできなかった。現在、バキュロウイルスや酵母の産生系での調製を試行中である。

2. Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) の T 細胞エピトープの同定

最小エピトープが未決定のものについて、その決定を急ぐとともに、ヒトにおける MDP1 の抗原エピトープの決定を試みる予定である。さらに、1. で同定できた抗原とともに、MDP1 を用いた免疫による抗結核菌効果をマウスの潜伏感染モデルで検証する予定である。

3. 新しい免疫方法の開発

1) オリゴマンノース被覆リポソーム：仮想抗原で良好な結果が得られたため、そのアジュバント効果について、1. で同定できた抗原を用いてマウスの潜伏感染モデルで検証する予定である。

2) HSP70 および 3) MIP-1 α との分子融合ワクチン：HSP70 の C 末端または MIP-1 α と結核防御抗原 MPT51 の融合蛋白を用い

ることにより、それぞれ CD4⁺ または CD8⁺ T 細胞を抗原特異的に効率良く活性化するワクチンを開発できる可能性が示された。今後これらの組み合わせによる相乗効果について、マウスの潜伏感染モデルで検証する予定である。

E. 結論

休眠期結核菌関連遺伝子 (DosR regulon 遺伝子群 48 種および Rfp 遺伝子群 5 種) の DNA ワクチン・ライブラリーを完成した。そのうち、32 種類の DosR regulon 抗原の免疫原性を 2 系統のマウスで検討し、C57BL/6 と BALB/c の両系統で T 細胞応答を誘導できる抗原を 7 種類同定した。中でも Rv3132c は両系統で T 細胞応答／抗体産生の両方を誘導でき、有望な候補抗原と考えられた。

MDP1 に対する T 細胞応答をマウスで検討し、C57BL/6 の最小 CD8⁺ T 細胞エピトープおよび BALB/c の最小 CD4⁺ T 細胞エピトープをそれぞれ 1 つ決定した。

新規免疫法として、オリゴマンノース被覆リポソーム (OML) と HSP70 や MIP-1 α を利用した分子融合ワクチンを開発した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. 2011. Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. *Traffic* (in press)
- 2) Uto, T., K. Tsujimura, M. Uchijima, S. Seto, T. Nagata, T. Suda, K. Chida, H. Nakamura, and Y. Koide. 2011. A novel vaccine strategy to induce mycobacterial antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of Heat Shock Protein 70. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (in press)
- 3) Yamamura, Y., S. Seto, M. Uchijima, H. Hozumi, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Immunogenicity of dormancy-related antigens of

- Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. *Procedia Vaccinology* 3: 19-26.
- 4) Nagata, T., and Y. Koide. 2010. Induction of specific CD8 T cells against intracellular bacteria by CD8 T-cell-oriented immunization Approaches. *J. Biomed. Biotechnol.* 764542.
 - 5) 永田 年、小出幸夫. 2010. 結核菌に対するT細胞誘導ワクチンの試み. *日本細菌学雑誌* 65: 309-324.
 - 6) 辻村邦夫、小出幸夫. 2010. 結核菌抗原認識とT細胞免疫. *結核* 85: 509-514.
 - 7) Eweda, G., D. Suzuki, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secretory proteins (CFP11, CFP17, and TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 28: 4616-4625.
 - 8) Seto, S., S. Matsumoto, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Interaction of lysosomal markers with phagosome containing *Mycobacterium tuberculosis* in macrophage. *Microbiol. Immunol.* 54: 170-174.
 - 9) Suzuki, D., T. Nagata, G. Eweda, S. Matsumoto, M. Matsumoto, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) using DNA vaccination. *Vaccine* 28: 2020-2025.
 - 10) Wang, L.-X., T. Nagata, K. Tsujimura, M. Uchijima, S. Seto, and Y. Koide. 2010. Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51 overlapping peptides screening and DNA vaccination. *Vaccine* 28: 2026-2031.
 - 11) Tsujimura, K., Y. Ikehara, T. Nagata, Y. Koide, and N. Kojima. 2009. Induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposomes targeting to peritoneal macrophages. *Procedia Vaccinology* 1: 127-134.
 - 12) Seto, S., S. Matsumoto, I. Ohta, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2009. Dissection of Rab7 localization on *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387: 272-277.
 - 13) Ozawa, Y., T. Suda, T. Nagata, D. Hashimoto, Y. Nakamura, N. Enomoto, N. Inui, Y. Koide, H. Nakamura, and K. Chida. 2009. Mucosal vaccine using CTL epitope-pulsed dendritic cell confers protection for intracellular pathogen. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 41: 440-448.
 - 14) Aoshi, T., J. A. Carrero, V. Konjufca, Y. Koide, E. R. Unanue, and M. J. Miller. 2009. The cellular niche of *Lesteria monocytogenes* infection changes rapidly in the spleen. *Eur. J. Immunol.* 39: 417-425.
 - 15) Nagata, T., and Y. Koide. 2008. Chapter 15. Anti-infective vaccine strategies. Liu, D., Editor. CRC Press: Boca Raton/USA. 449-480. ISBN: 978-1-4200-5140-7.
 - 16) Aoshi, T., B. H. Zinselmeyer, V. Konjufca, J. N. Lynch, X. Zhang, Y. Koide, and M. J. Miller. 2008. Bacterial entry to the splenic white pulp initiates antigen presentation to CD8⁺ T cells. *Immunity* 29: 476-486.
 - 17) Uchijima, M., T. Nagata, and Y. Koide. 2008. Chemokine receptor-mediated delivery of mycobacterial MPT51 protein efficiently induces antigen-specific T-cell responses. *Vaccine* 26: 5165-5169.
 - 18) Nagata, T., T. Aoshi, M. Uchijima, and Y. Koide. 2008. In vivo hierarchy of individual T-cell epitope-specific helper T-cell subset against an intracellular bacterium. *Vaccine* 26: 5123-5127.
 - 19) Hashimoto, D., T. Nagata, M.

- Uchijima, S. Seto, T. Suda, K. Chida, H. Miyoshi, H. Nakamura, and Y. Koide. 2008. Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *Mycobacterium tuberculosis* induces specific CD8+ T-cell responses in the lung. *Vaccine* 26: 5095-5100.
- 20) Aoshi, T., T. Nagata, M. Suzuki, M. Uchijima, D. Hashimoto, A. Rafiei, T. Suda, K. Chida, and Y. Koide. 2008. Identification of an HLA-A*0201-restricted T-cell epitope on the MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis*, by MPT51 overlapping peptide screening. *Infect. Immun.* 76: 1565-1571.
- 21) Ikehara, Y., N. Shiuchi, S. Kabata-Ikehara, H. Nakanishi, N. Yokoyama, H. Takagi, T. Nagata, Y. Koide, K. Kuzushima, T. Takahashi, K. Tsujimura, and N. Kojima. 2008. Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal phagocytic cells. *Cancer Lett.* 260: 137-145.
- 2. 学会発表**
- 1) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2010. プロテオミクスによる結核菌ファゴソームにおける小胞輸送機構の解析. 第93回日本細菌学会関東支部総会(東京、10月).
- 2) Koide, Y., S. Seto, and K. Tsujimura. 2010. Proteomic analysis reveals the interaction of endoplasmic reticulum with the phagosome containing *Mycobacterium tuberculosis*. 45th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy. (Boston, USA, 7月)
- 3) Yamamura, Y., S. Seto, M. Uchijima, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Immune responses against dormancy-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. 45th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy. (Boston, USA, 7月)
- 4) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2010. イメージ解析とプロテオミクスによる結核菌ファゴソームの分子解剖. 第85回結核病学会総会(京都、5月).
- 5) Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Proteomic analysis revealed the interaction of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome with ER. 第83回日本細菌学会(横浜、3月).
- 6) Nagata, T., G. Eweda, D. Suzuki, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. 第83回日本細菌学会(横浜、3月).
- 7) Yamamura, Y., S. Seto, M. Uchijima, H. Hodumi, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Immune responses against latency-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. 第83回日本細菌学会(横浜、3月).
- 8) Uto, T., M. Uchijima, S. Seto, T. Nagata, T. Suda, K. Chida, H. Nakamura, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Genetic fusion of *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 to a mycobacterial antigen MPT51 augments the antigen-specific T cell responses. 第83回日本細菌学会(横浜、3月).
- 9) Yamamura, Y., S. Seto, M. Uchijima, H. Hodumi, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Immunogenicity of dormancy-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. DNA vaccine 2010. (New Orleans, USA, 3月)
- 10) Eweda, G, D. Suzuki, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secreted proteins (CFP11, CFP17, and TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis* with DNA immunization. DNA vaccine 2010.

- (New Orleans, USA, 3月)
- 11) Yamamura, Y., S. Seto, M. Uchijima, H. Hodumi, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2009. Immunogenicity of latency-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪、12月).
 - 12) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2009. 結核菌ファゴソームのプロテオミクスによる分子解剖. 第92回日本細菌学会関東支部総会 (東京、11月).
 - 13) Uto, T., M. Uchijima, S. Seto, T. Nagata, T. Suda, K. Chida, H. Nakamura, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2009. Genetic fusion of heat-shock protein 70 to a mycobacterial antigen enhances the antigen-specific T cell responses. Vaccine 3rd Global Congress. (Singapore, Singapore, 10月)
 - 14) Seto, S., and Y. Koide. 2009. Alternative localization of Rab GTPases to phagosome containing *Mycobacterium tuberculosis* in inhibition of phagolysosome biogenesis. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (東京、11月)
 - 15) 右藤智啓、内嶋雅人、永田年、辻村邦夫、小出幸夫. 2009. 結核菌の Heat-shock protein 70 (HSP70) を結核菌抗原 MPT51 に結合させた分子融合型 DNA ワクチンは抗原特異的 T 細胞を効率よく誘導する. 第82回日本細菌学会総会 (名古屋、3月).
 - 16) 内嶋雅人、永田年、辻村邦夫、小出幸夫. 2009. ケモカイン融合型 DNA ワクチンにより誘導される抗原特異的 CD8+ および CD4+ T 細胞の解析. 第82回日本細菌学会総会 (名古屋、3月).
 - 17) 瀬戸真太郎、小出幸夫. 2009. 結核菌によるファゴソーム局在性 Rab GTPase の局在変化とファゴリソーム形成阻害機構の解析. 第82回日本細菌学会総会 (名古屋、3月).
 - 18) 永田年、鈴木大介、辻村邦夫、小出幸夫. 2008. DNA ワクチンを用いた結核菌低分子量分泌蛋白のマウス T 細胞エピトープの同定. 第82回日本細菌学会総会 (名古屋、3月).
 - 19) 鈴木大介、永田年、辻村邦夫、松本壮吉、小出幸夫. 2008. DNA ワクチンを用いた *Mycobacterium* DNA-binding protein 1 (MDP1) のマウス T 細胞エピトープの同定. 第82回日本細菌学会総会 (名古屋、3月).
 - 20) Seto, S., and Y. Koide. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* modulates the network of Rab GTPases in attenuation of phagosome maturation. Keystone symposium. (Keystone, USA, 1月)
 - 21) Nagata, T., L.-X. Wang, and Y. Koide. 2008. Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51 overlapping peptides screening. DNA Vaccines 2008. (Las Vegas, USA, 12月)
 - 22) Suzuki, D., T. Nagata, S. Matsumoto, and Y. Koide. 2008. Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1). DNA Vaccines 2008. (Las Vegas, USA, 12月)
 - 23) Tsujimura, K., Y. Ikehara, T. Nagata, Y. Koide, and N. Kojima. 2008. Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposomes targeting to intraperitoneal macrophages. Vaccine 2nd Global Congress. (Boston, USA, 12月)
 - 24) Suzuki, D., T. Nagata, S. Matsumoto, and Koide Y. 2008. Characterization of murine T-cell epitopes in *Mycobacterium* DNA-binding protein 1. 第38回日本免疫学会総会・学術集会 (京都、12月).
 - 25) Uto, T., M. Uchijima, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. Genetic fusion of Heat-shock protein 70 to a mycobacterial antigen enhances the antigen-specific T cell responses. 第

38 回日本免疫学会総会・学術集会（京都、12 月）。

- 26) Uchijima, M., T. Nagata, K. Tsujimura, K. Shibata, and Y. Koide. Analysis of antigen-specific CD8+ and CD4+ T-cell responses induced by MIP-1 α -MPT51 fusion DNA vaccination. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会（京都、12 月）。
- 27) 瀬戸真太郎、小出幸夫. 2008. 結核菌感染マクロファージにおける Rab GTPase の網羅的局在解析. 第 91 回細菌学会関東支部総会（千葉、10 月）。
- 28) Seto, S., and Y. Koide. 2008. *Mycobacterium tuberculosis* modulates the network of Rab GTPases to inhibit phagolysosome biogenesis in macrophage. 第 8 回あわじ感染症・免

疫フォーラム（淡路、9 月）。

- 29) Seto, S., and Y. Koide. 2008. Live *Mycobacterium tuberculosis* inhibits phagolysosome biogenesis in macrophages by modulating localization of Rab GTPase proteins on its phagosomes. 43rd US-Japan conference on tuberculosis and leprosy. (Baltimore, USA, 7 月)

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

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
総合研究報告書

持続性潜在結核菌感染を検出する臨床診断法の開発

研究分担者 前倉 亮治（国立病院機構刀根山病院・副院長）
研究分担者 北田 清悟（国立病院機構刀根山病院・呼吸器内科・医長）
研究協力者 岡 真優子（大阪市立大学大学院医学研究科細菌学・研究員）
研究協力者 松本 壮吉（大阪市立大学大学院医学研究科細菌学・准教授）

研究要旨

肺結核の既往歴を持ち活動性肺結核が否定され症例から、TBGL, LAM の抗酸菌抗体・QFT-2G の結果を用いて持続性潜在結核菌感染例を抽出し、若年健常者・非結核性抗酸菌症例と活動性肺結核例を比較対象として、休眠結核菌が産生する蛋白質組換え体（16 種の DosR regulon, HBHA, HrpA, MDP1）・増殖期に産生される蛋白質の組換え体（ESAT-6, CFP-10, Antigen85A, Antigen85B）を抗原として調整し、ELISA 法により血清中の抗体価を測定した。測定結果から潜在結核菌感染（前発病状態）を診断する抗原として、Rv3132（DosS）・MDP1・Antigen85A および Antigen85B が有用であった。2 例の結核菌再排菌を含めた持続性潜在結核菌感染 34 例の追跡血清が得られたので、これらの抗原を用いてより正確な潜在結核菌感染（前発病状態）を診断する方法を、詳細に検討する。

A. 研究目的

本邦における肺結核の罹患率は近年低下傾向にあり、人口 10 万人当たり 20 人を切って低蔓延国になる日が近く訪れることが予想される。このとき、感染性のある活動性肺結核患者を隔離して治療することと同じように、潜在結核菌感染を発病前に診断し予防することが重要になってくる（前発病状態）。そこで、潜在結核菌感染（前発病状態）を正確かつ迅速に診断する方法を確立することを目的に研究を行う。

B. 研究方法

1) 持続性潜在結核菌感染例の抽出
肺結核の既往歴を持ち、喀痰：塗抹培養検査・遺伝子増幅検査・胸部レントゲンなどで活動性肺結核が否定され症例を対象とした。結核の既往歴・家族歴・接触歴のない若年健常者を対照者とし、非結核性抗酸菌症と活動性肺結核患者を鑑別が必要な症例として抽出した。TBGL, LAM の抗酸菌抗体・QFT-2G の測定と休眠結核菌が産生す

る蛋白質組換え体（16 種の DosR regulon, HBHA, HrpA, MDP1）・増殖期に産生される蛋白質の組換え体（ESAT-6, CFP-10, Antigen85A, Antigen85B）を抗原として調整し、ELISA 法により血清中の抗体価を測定した。さらに、*Mycobacterium avium* complex(MAC) 症を鑑別する目的で MAC-GPL-core を測定した。

2) 持続性潜在結核菌感染例における各種抗体価の長期経過観察と INH 予防内服の効果を検討する。

倫理面への配慮

国立病院機構刀根山病院の臨床研究倫理委員会の承認を得た。文書による説明、同意を行った。

C. 研究結果

1) 潜在性結核菌感染者（old TB）（n=17）および健常者（healthy control; HC）（n=17）、活動性結核患者（active TB）（n=15）の血清中の抗体価を測定した。19 種の休眠期結

核菌抗原を用いた結果より、Rv3132 (DosS) と MDP1 抗体レベルは、HC に比べ old TB 群の方が高かった (DosS ; HC : 0.139 ± 0.126 , old TB : 0.174 ± 0.108 ($p < 0.01$), MDP1 : HC: 0.117 ± 0.137 , old TB : 0.535 ± 0.280 ($p < 0.01$))。また、興味深いことに old TB 群のこれら抗体レベルは、active TB 群よりも高かった (DosS ; active TB : 0.136 ± 0.072 ($p < 0.01$ vs old TB), MDP1 : active TB: 0.269 ± 0.141 ($p < 0.01$ vs old TB))。次に、増殖期抗原を用いた ELISA の結果では、active TB 群の ESAT-6 および CFP-10 抗体レベルは、HC または old TB の値より高かったが、HC と old TB 両群で有意な差はなかった。一方、old TB 群での Antigen85A ならびに 85B 抗体レベルは、HC 群または active TB 群よりも高かった (Antigen85A ; HC : 1.007 ± 0.560 , active TB : 1.899 ± 0.928 , old TB : 2.896 ± 0.836 , Antigen85B ; HC : 0.832 ± 0.425 , active TB : 1.110 ± 0.630 , old TB : 1.613 ± 0.522)。そこで、休眠期結核菌に発現が増大する DosS に対する抗体レベルと、MDP1、Antigen85A または 85B に対する抗体レベルを比較した。その結果、3 種の抗体レベルは、DosS に対してそれぞれ正の相関性が得られた。以上の結果より、23 種の休眠期および増殖期抗原に対する抗体レベルにおいて、old TB 群で最も高い値を示したのは、DosS、Antigen85A および Antigen85B の 3 種であった。

(MAC) 感染症は非結核性抗酸菌感染症の 70-80% を占め、最頻である。日本国内における多施設共同研究により、MAC 特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL 核) 抗原に対する血清 IgA 抗体の検出の診断的有用性は感度 : 84%、特異度 : 100% であることは既に報告した。今回、異なる人種・地域 (国立ユダヤ医療研究センター : デンバー市、コロラド州、アメリカ合衆国と国際共同研究)、さらに、潜在性 MAC 感染における有用性について検証した。活動性肺 MAC 感染症 (64 例) における血清抗体価は 2.79 ± 3.66 IU/mL、非活動性肺 MAC 感染症 (10 例) における血清抗体価は $1.56 \pm$

2.76 IU/mL、非 MAC 感染症 (8 例) : 1.11 ± 3.68 IU/mL、なお、健常者 (52 例) は 0.22 ± 1.11 IU/mL であった。これら成績から、感度 : 75.9%、特異度 : 94.2% であることが判明した。非活動性肺 MAC 感染症 (23 例) における陽性率 (カットオフ値 > 0.3 U/mL を示す割合) は 56.5%、さらに、健常者 (52 例) における陽性率は 6% であり、潜在性 MAC 感染症を示唆する成績を得ることができた。

2) 持続性潜在結核菌感染例の抽出を目的に、肺結核の既往歴を持ち結核菌感染を疑われる症例に対して、結核菌感染を診断する目的で TBGL, LAM および QFT-2G の検査を行った。検査結果から、活動性肺結核および他疾患が否定され、潜在結核菌感染の有りとした 34 例について、TBGL, LAM および QFT-2G の検査を経時的に追跡している。19 例で複数の検査結果が陽性であった。TBGL 5 unit 以上は 13 例であり、このうち 8 例で無作為抽出の 2 群間比較で INH 予防内服効果を検討中である。また、34 例中 2 例で経過中に結核菌の再排菌を認めた。

D. 考察

潜在結核菌感染 (前発病状態) を正確かつ迅速に診断する方法として、TBGL, LAM の抗酸菌抗体・QFT の測定に加え Rv3132 (DosS) ・MDP1 ・Antigen85A および Antigen85B を抗原とする抗体産生を測定することが有用と考えた。今後、2 例の結核菌再排菌を含めた追跡血清を用いて Rv3132 (DosS) ・MDP1 ・Antigen85A および Antigen85B などの抗体産生を測定することにより、より正確な潜在結核菌感染 (前発病状態) を診断する方法が確立されると考える。

E. 結論

休眠結核菌が産生する蛋白質組換え体 (16 種の DosR regulon, HBHA, HrpA, MDP1) ・増殖期に産生される蛋白質の組換え体 (ESAT-6, CFP-10, Antigen85A, Antigen85B) の抗原から Rv3132 (DosS) ,MDP1,Antigen85A および

Antigen85B の潜在結核菌感染（前発病状態）を診断するのに有用な抗原を選出した。結核菌再排菌例2例を含めた34例分の持続性潜在結核菌感染例追跡血清が調整できた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Kitada S**, Kobayashi K, Nishiuchi Y, Fushitani K, Yoshimura K, Tateishi Y, Miki K, Miki M, Hashimoto H, Motone M, Fujikawa T, Hiraga T, **Maekura R**. 2010. Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex proven by bronchial wash culture. *Chest*. Jul;138(1):236-7.

2. 学会発表

- 1) Mayuko Osada-Oka, Yukio Hirayama, **Seigo Kitada**, Yoshitaka Tateishi, **Ryoji Maekura**, Haruhiko Sugimura, Yukio Koide, Kazuo Kobayashi, Sohkiichi Matsumoto. Clinical practice for the diagnosis of latent mycobacterium tuberculosis infection. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program: 14th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim: Next Generation Diagnostics for Infectious Diseases. (Penang, Malaysia), 2010. 10
- 2) **S. Kitada**, A. Levin, M. Hiserote, B.J. Clark, R.J. Harbeck, K.A. Lichtenstein, C.A. Czaja, G.A. Huitt, S.H. Kasperbauer, C.M. Perez-Velez, C.L. Daley. 2010. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in the United States. American Thoracic Society International Conference (New Orleans LA, USA, 5月)
- 3) 上浪健、北田清悟、好村研二、各務慎一、立石善隆、元根正晴、三木真理、三木啓資、平賀通、**前倉亮治**. 2010. 長期にわたり経過観察し得た肺 MAC 症の臨床的検討. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会(京都、4月)

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Nagata T. <u>Y. Koide.</u>	Chapter 15. Anti-infective vaccine strategies.	Liu D.	Handbook of <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	CRC Press	Boca Raton	2008	449 - 480
<u>Fujiwara, N.</u> , <u>K. Kobayashi.</u>	Chapter IV. Mycobacterial glycolipids and host responses.	Sasaki, D.	Glycolipids: New Research ISBN: 978-60456-216-3	Nova Science Publishers	New York USA	2008	99 - 116
<u>大原直也</u> , <u>小林和夫.</u>	結核菌.	バイオメディ カルサイエン ス研究会	バイオセーフ ティーの辞典. 病原微生物とハ ザード対策の実 際 ISBN: 978-4-87211-903-9	みみずく舎	東京	2008	194 - 197
<u>小林和夫.</u>	マイコバクテリウム 属 (抗酸菌) .	平松啓一 中込 治	標準微生物学 第 10 版 ISBN: 978-4-260-00638-5	医学書院	東京	2009	286 - 298
<u>大原直也</u> , <u>小林和夫.</u>	抗酸菌 (マイコバク テリウム) 感染症.	井上修二 上原誓志夫 金澤真雄 川口 実 代田常道	コンパクト内科学 ISBN: 978-4-7653-1382-7	金芳堂	京都	2009	418 - 420
<u>松本壮吉.</u>	分子生物学から見た 結核研究の現在.	四元秀毅 倉島篤行	結核 Up to Date 改訂3版	南江堂	東京	2010	183 - 189

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Saiga, H., J. Nishimura, H. Kuwata, M. Okuyama, S. Matsumoto , S. Sato, M. Matsumoto , S. Akira, Y. Yoshikai, K. Honda, M. Yamamoto, and K. Takeda.	Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium.	J Immunol	181	8521 - 8527	2008
Nishimura, J., H. Saiga, S. Sato, M. Okuyama, H. Kayama, H. Kuwata, S. Matsumoto , T. Nishida, Y. Sawa, S. Akira, Y. Yoshikai, M. Yamamoto, and K. Takeda.	Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor.	J Immunol	180	4032 - 4039	2008
Fujiwara, N. , N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P. J. Brennan, K. Kobayashi , M. Makino, S. Matsumoto , H. Ogura, and S. Maeda.	Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from <i>Mycobacterium intracellulare</i> .	J Bacteriol	190	3613 - 3621	2008
Matsunaga I. , Naka T, Talekar RS, McConnell MJ, Katoh K, Nakao H, Otsuka A, Behar SM, Yano I, Moody DB, Sugita M.	Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in mycobacteria.	J Biol Chem	283	28835 - 28841	2008
Morita D, Katoh K, Harada Y, Nakagawa Y, Matsunaga I. , Miura T, Adachi A, Igarashi T, Sugita M.	Trans-species activation of human T cells by rhesus macaque CD1b molecules.	Biochem Biophys Res Commun	377	889 - 893	2008
Otsuka A, Matsunaga I. , Komori T, Tomita K, Toda Y, Manabe T, Miyachi Y, Sugita M.	Trehalose dimycolate elicits eosinophilic skin hypersensitivity in mycobacteria-infected guinea pigs.	J Immunol	181	8528 - 8533	2008
Miyamoto, Y. , T. Mukai, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino.	The <i>Mycobacterium avium</i> complex <i>gtfTB</i> gene encodes a glucosyltransferase required for the biosynthesis of serovar 8-specific glycopeptidolipid.	J Bacteriol	190	7918 - 7924	2008

Kai, M., Phuc N. H. Nguyen, Thi T. H. Hoang, A. H. Nguyen, Y. Fukutomi, Y. Maeda, <u>Y. Miyamoto</u> , T. Mukai, T. Fujiwara, T. T. Nguyen, and M. Makino.	Serological diagnosis of leprosy in patients in Vietnam by enzyme-linked immunosorbent assay with <i>Mycobacterium leprae</i> -derived major membrane protein II.	Clin Vaccine Immunol	15	1755 - 1759	2008
Mukai T., Y. Maeda, T. Tamura, <u>Y. Miyamoto</u> , and M. Makino.	CD4 ⁺ T-cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant <i>Mycobacterium bovis</i> bacillus Calmette-Guérin.	FEMS Immunol Med Microbiol	53	96 - 106	2008
Aoshi T., Zineselmeyer B. H., Konjufca V., Lynch J. N., Zhang X. <u>Koide Y.</u> , Miller M. J.	Bacterial entry to the splenic white pulp initiates antigen presentation to CD8 ⁺ T cells.	Immunity	29	476 - 486	2008
Uchijima M., Nagata T., <u>Koide Y.</u>	Chemokine receptor-mediated delivery of mycobacterial MPT51 protein efficiently induces antigen-specific T-cell responses.	Vaccine	26	5165 - 5169	2008
Nagata T., Aoshi T., Uchijima M., <u>Koide Y.</u>	In vivo hierarchy of individual T-cell epitope-specific helper T-cell subset against an intracellular bacterium.	Vaccine	26	5123 - 5127	2008
Hashimoto D., Nagata T., Uchijima M., Seto S., Suda T., Chida K., Miyoshi H., Nakamura H., <u>Koide Y.</u>	Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> induces specific CD8 ⁺ T-cell responses in the lung.	Vaccine	26	5095 - 5100	2008
Aoshi T., Nagata T., Suzuki M., Uchijima M., Hashimoto D., Rafiei A., Suda T., Chida K., <u>Koide Y.</u>	Identification of an HLA-A*0201-restricted T-cell epitope on the MPT51 protein, a major secreted protein derived from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , by MPT51 overlapping peptide screening.	Infect Immun	76	1565 - 1571	2008
Ikehara Y., Shiuchi N., Kabata-Ikehara S., Nakanishi H., Yokoyama N., Takagi H., Nagata T., <u>Koide Y.</u> , Kuzushima K., Takahashi T., Tsujimura K., Kojima N.	Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal phagocytic cells.	Cancer Lett.	260	137 - 145	2008

<u>Kitada, S. K.</u> <u>Kobayashi, S.</u> Ichiyama, S. Takakura, M. Sakatani, K. Suzuki, T. Takashima, T. Nagai, I. Sakurabayashi, M. Ito, and <u>R. Maekura.</u>	Serodiagnosis of <i>Mycobacterium avium</i> -complex pulmonary disease using an enzyme immunoassay kit.	Am J Respir Crit Care Med	177	793 - 797	2008
<u>松本杜吉、小林和夫.</u>	結核ワクチン研究の現状と展望.	臨床検査	52	1149 - 1153	2008
<u>小林和夫.</u>	再興した感染症「結核」の診断・治療・予防法.	Biophilia	4	30 - 34	2008
Wada, T., S. Fujihara, A. Shimouchi, M. Harada, H. Ogura, <u>S. Matsumoto,</u> and A. Hase.	High transmissibility of the modern Beijing <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in homeless patients of Japan.	Tuberculosis(Edinb)	89	252 - 255	2009
<u>Tateishi, Y., Y.</u> Hirayama, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, <u>M. Yoshimura,</u> J. Kang, A. Shibata, K. Hirata, <u>S. Kitada, R. Maekura,</u> H. Ogura, <u>K. Kobayashi,</u> and <u>S. Matsumoto.</u>	Virulence of <i>Mycobacterium avium</i> complex strains isolated from immunocompetent patients.	Microb Pathog	46	6-12	2009
Seto, S., <u>S. Matsumoto,</u> I. Ohta, K. Tsujimura, and <u>Y. Koide.</u>	Dissection of Rab7 localization on <i>Mycobacterium tuberculosis</i> phagosome.	Biochem Biophys Res Commun.	387	272 - 277	2009
Okazaki, M., K. Ohkusu, H. Hata, H. Ohnishi, K. Sugahara, C. Kawamura, <u>N. Fujiwara,</u> <u>S. Matsumoto,</u> Y. Nishiuchi, K. Toyoda, H. Saito, S. Yonetani, Y. Fukugawa, M. Yamamoto, H. Wada, A. Sejimo, A. Ebina, H. Goto, T. Ezaki, and T. Watanabe.	<i>Mycobacterium kyorinense</i> sp. nov., a novel, slow-growing species, related to <i>Mycobacterium celatum</i> , isolated from human clinical specimens.	Int J Syst Evol Microbiol	59	1336 - 1341	2009

Nishiuchi, Y., A. Tamaru, S. Kitada , T. Taguri, S. Matsumoto , Y. Tateishi , M. Yoshimura , Y. Ozeki, N. Matsumura, H. Ogura, and R. Maekura .	<i>Mycobacterium avium</i> complex organisms predominantly colonize in the bathtub inlets of patients' bathrooms.	Jpn J Infect Dis	62	182 - 186	2009
Kitamura, A., S. Matsumoto , and I. Asahina.	Growth inhibition of HeLa cell by internalization of <i>Mycobacterium bovis</i> Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo.	Cancer Cell Int	9	30	2009
Hirayama, Y., M. Yoshimura , Y. Ozeki, I. Sugawara , T. Udagawa, S. Mizuno, N. Itano, K. Kimata, A. Tamaru, H. Ogura, K. Kobayashi , and S. Matsumoto .	Mycobacteria exploit host hyaluronan for efficient extracellular replication.	PLoS Pathog	5	e1000643	2009
Nakao H, Matsunaga I , Morita D, Aoshi T, Harada T, Nakagawa Y, Mori N, Sugita M .	Mycolytransferase from <i>Mycobacterium leprae</i> excludes mycolate-containing glycolipid substrates.	J Biochem	146	659 - 665	2009
Hatta M., M. Makino, M. Ratnawati, Mashudi, Yadi, M. Sabir, N. Tandirogang, L.M.M. Rusyati, M. Kai, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto , T. Mukai, and Y. Maeda.	Detection of serum antibodies to <i>M. leprae</i> major membrane protein-II in leprosy patients from Indonesia.	Lepr Rev	80	402 - 409	2009
Tsujimura K., Ikehara Y., Nagata T., Koide Y. , Kojima N.	Induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposomes targeting to peritoneal macrophages.	Procedia Vaccinology	1	127 - 134	2009
Ozawa Y., Suda T., Nagata T., Hashimoto D., Nakamura Y., Enomoto N., Inui N., Koide Y. , Nakamura H., Chida K.	Mucosal vaccine using CTL epitope-pulsed dendritic cell confers protection for intracellular pathogen.	Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.	41	440 - 448	2009
Aoshi T., Carrero J. A., Konjufca V., Koide Y. , Unanue E. R., Miller M. J.	The cellular niche of <i>Listeria monocytogenes</i> infection changes rapidly in the spleen.	Eur. J. Immunol.	39	417 - 425	2009

Suzuki, D., T. Nagata, G. Eweda, S. Matsumoto , M. Matsumoto, K. Tsujimura, and Y. Koide .	Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) using DNA vaccination.	Vaccine	28	2020 - 2025	2010
Seto, S., S. Matsumoto , K. Tsujimura, and Y. Koide .	Differential recruitment of CD63 and Rab7-interacting-lysosomal-protein to phagosomes containing <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in macrophages.	Microbiol Immunol	54	170 - 174	2010
Sena, C. B., T. Fukuda, K. Miyanagi, S. Matsumoto , K. Kobayashi , Y. Murakami, Y. Maeda, T. Kinoshita, and Y. S. Morita.	Controlled expression of branch-forming mannosyltransferase is critical for mycobacterial lipoarabinomannan biosynthesis.	J Biol Chem	285	13326 - 13336	2010
Ozeki, Y., I. Sugawara , T. Udagawa, T. Aoki, M. Osada-Oka , Y. Tateishi , H. Hisaeda, Y. Nishiuchi, N. Harada, K. Kobayashi , and S. Matsumoto .	Transient role of CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatory T cells in mycobacterial infection in mice.	Int Immunol	22	179 - 189	2010
Jalilian, B., A. R. Omar, M. H. Bejo, N. B. Alitheen, M. Rasoli, and S. Matsumoto .	Development of avian influenza virus H5 DNA vaccine and MDP-1 gene of <i>Mycobacterium bovis</i> as genetic adjuvant.	Genet Vaccines Ther	8	4	2010
Miyamoto, Y. , T. Mukai, T. Naka, N. Fujiwara , Y. Maeda, M. Kai, S. Mizuno, I. Yano, and M. Makino.	Novel rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from <i>Mycobacterium avium</i> complex.	J Bacteriol	192	5700 - 5708	2010
Komine-Aizawa, S., T. Yamazaki, T. Yamazaki, S. Hattori, Y. Miyamoto , N. Yamamoto, S. Haga, M. Sugitani, M. Honda, S. Hayakawa, and S. Yamamoto.	Influence of advanced age on <i>Mycobacterium bovis</i> BCG vaccination in guinea pigs aerogenically infected with <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	Clin Vaccine Immunol	17	1500 - 1506	2010
Yamamura Y., Tsujimura K., Seto S., Uchijima M., Hozumi H., Nagata T., Koide Y.	Immunogenicity of latency-associated antigens of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in DNA-vaccinated mice.	Procedia Vaccinology	3	19-26	2010

Nagata T, Koide Y.	Induction of specific CD8 ⁺ T cells against intracellular bacteria by CD8 ⁺ T-cell-oriented immunization approaches.	J Biomed Biotechnol		764542	2010
Eweda G, Suzuki D., Nagata T., Tsujimura K., Koide Y.	Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secretory proteins (CFP11, CFP17, and TB18.5) of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	Vaccine	28	4616 - 4625	2010
Wang L.-X., Nagata T., Tsujimura K., Uchijima M., Seto S., Koide Y.	Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> using MPT51 overlapping peptides screening and DNA vaccination.	Vaccine	28	2026 - 2031	2010
Kitada S, Kobayashi K, Nishiuchi Y, Fushitani K, Yoshimura K, Tateishi Y, Miki K, Miki M, Hashimoto H, Motone M, Fujikawa T, Hiraga T, Maekura R.	Serodiagnosis of pulmonary disease due to <i>Mycobacterium avium</i> complex proven by bronchial wash culture.	Chest	138	236 - 237	2010
永田 年、 小出幸夫.	結核菌に対するT細胞誘導ワクチンの試み.	日本細菌学雑誌	65	309 - 324	2010
辻村邦夫、 小出幸夫.	結核菌抗原認識とT細胞免疫.	結核	85	509 - 514	2010
小林和夫.	感染症の現状と制圧戦略.	昭和医学会誌	70	70 - 73	2010
Kai, M, N. H. Nguyen Phuc, A. H. Nguyen, B. D. H. Pham Thi, K. H. Nguyen, Y. Miyamoto, Y. Maeda, Y. Fukutomi, N. Nakata, M. Matsuoka, M. Makino, and T. T. Nguyen.	Analysis of drug-resistant strains of <i>Mycobacterium leprae</i> in an endemic area of Vietnam.	Clin Infect Dis	52	e127 - e132	2011
Seto S., Tsujimura K., Koide Y.	Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes.	Traffic	In press		2011
Uto T., Tsujimura K., Uchijima M., Seto S., Nagata T., Suda T., Chida K., Nakamura H., Koide Y.	A novel vaccine strategy to induce mycobacterial antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of heat shock protein 70.	FEMS Immunol. Med. Microbiol.	In press		2011

<u>Kobayashi, K. M. Ato,</u> <u>S. Matsumoto.</u>	Global threats and control of multidrug-resistant tuberculosis.	J Disaster Res	In press		2011
--	---	----------------	----------	--	------