

微生物学

1 構 成 員

	平成 13 年 3 月 31 日現在	
教授	1 人	
助教授	1 人	
助手（うち病院籍）	2 人	(0 人)
大学院学生（うち他講座から）	4 人	(3 人)
研究生	0 人	
外国人客員研究員	2 人	
技官	1 人	
その他（技術補佐員等）	0 人	
合計	11 人	

2 教官の異動状況

- 小出 幸夫（教授）（期間中現職）
 永田 年（助教授）（期間中現職）
 内嶋 雅人（助手）（期間中現職）
 青枝 大貴（助手）（期間中現職）

3 研究業績

	平成 12 年度	
(1) 原著論文数（うち邦文のもの）	5 編	(0 編)
そのインパクトファクターの合計	15.475	
(2) 論文形式のプロシーディングズ数	1 編	
(3) 総説数（うち邦文のもの）	3 編	(2 編)
そのインパクトファクターの合計	1.210	
(4) 著書数（うち邦文のもの）	1 編	(1 編)
(5) 症例報告数（うち邦文のもの）	0 編	(編)
(6) 国際学会発表数	2 編	

(1) 原著論文（当該教室所属の者に下線）

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. Yoshida A., Nagata T., Uchijima M., Higashi T., Koide Y.(2000) Advantage of gene gun-mediated over intramuscular inoculation of plasmid DNA vaccine in reproducible induction of specific immune responses. *Vaccine* 18(17):1725-1729.

インパクトファクターの小計 [3.173]

B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの（学内の共同研究）

1. Nakamura S., Ohnishi K., Yoshida H., Shinjo K., Takeshita A., Tohyama K., Ohno R., Koide Y. (2000) Retrovirus-mediated gene transfer of granulocyte-colony stimulating factor receptor (G-CSFR) cDNA into MDS cells and induction of their differentiation by G-CSF. *Cytokines Cell. Mol. Ther.* 6: 61-70.
2. Yokota N., Uchijima M., Nishizawa S., Namba H., Koide, Y. (2001) Identification of differentially expressed genes in rat hippocampus after transient global cerebral ischemia using subtractive cDNA cloning based on PCR. *Stroke* 32: 168-174.
3. Kageyama Y, Koide Y., Nagata T., Uchijima M., Yoshida A, Arai T, Miura T, Miyamoto C, Nagano A. (2001) Toxic shock syndrome toxin-1 accelerated collagen-induced arthritis in mice. *J Autoimmun.* 16(2):125-31.

インパクトファクターの小計 [9.403]

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

1. Hotta C, Nagata T., Nakazawa M, Fujimaki H, Yoshinari M, Minami M (2000) Impaired expression of MHC class I molecules on mouse testicular germ cells is mainly caused by the post-transcriptional mechanism. *Immunogenetics* 51:624-631.

インパクトファクターの小計 [2.899]

D. 筆頭著者、共著者とも浜松医科大学に所属していなかったが、当該教室に所属する者が含まれるもの

(2) 論文形式のプロシーディングズ

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. Koide Y., Yoshida A., Nagata T., Yamada T., Uchijima M.: Induction of protective cytotoxic T lymphocytes by gene gun DNA immunization with minigenes encoding epitopes of *Listeria monocytogenes*. (2000) In: Thirty-fifth Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, US-Japan Cooperative Medical Science Program, p.165-169.

B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの（学内の共同研究）

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

D. 筆頭著者、共著者とも浜松医科大学に所属していなかったが、当該教室に所属する者が含まれるもの

(3) 総 説

- A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの
 - 1. 永田 年, 小出幸夫 (2000) キラーT 細胞, ヘルパーT 細胞指向性 DNA ワクチン. 臨免疫, 33 (5) : 594-600.
 - 2. Koide Y., Nagata T., Yoshida A., Uchijima M. (2000) DNA vaccines. Jpn. J. Pharmacol. 83 : 167-174.
 - 3. 内嶋雅人, 小出幸夫 : 細菌 DNA と Th1/Th2 バランス (2000) 臨免疫, 34 (6) : 767-773.

- B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し, 共著者が当該教室に所属していたもの (学内の共同研究)

- C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し, 共著者が当該教室に所属していたもの

- D. 筆頭著者, 共著者とも浜松医科大学に所属していなかったが, 当該教室に所属する者が含まれるもの

(4) 著 書

- A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの
 - 1. 小出幸夫 (2001) DNA ワクチン. 光山正雄 (編), 結核 医薬ジャーナル社 p.189-201.

- B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し, 共著者が当該教室に所属していたもの (学内の共同研究)

- C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し, 共著者が当該教室に所属していたもの

- D. 筆頭著者, 共著者とも浜松医科大学に所属していなかったが, 当該教室に所属する者が含まれるもの

(5) 症例報告

- A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

- B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し, 共著者が当該教室に所属していたもの (学内の共同研究)

- C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し, 共著者が当該教室に所属していたもの

- D. 筆頭著者, 共著者とも浜松医科大学に所属していなかったが, 当該教室に所属する者が含まれるもの

るもの

(6) 国際学会発表

1. Koide, Y., Yoshida, A., Nagata, T., Yamada, T., Uchijima, M. (2000) Induction of protective cytotoxic T lymphocytes by plasmid DNA vaccines encoding epitopes of *Listeria monocytogenes*. American Society for Microbiology 100th General Meeting, May, Los Angeles.
2. Koide Y., Yoshida A., Nagata T., Yamada T., Uchijima M. (2000) Induction of protective cytotoxic T lymphocytes by gene gun DNA immunization with minigenes encoding epitopes of *Listeria monocytogenes*. Thirty-fifth Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, US-Japan Cooperative Medical Science Program, July, Yokohama.

4 特許等の出願状況

	平成 12 年度
特許取得数 (出願中含む)	0 件

5 医学研究費取得状況

	平成 12 年度
(1) 文部省科学研究費	1 件 (120 万円)
(2) 厚生省科学研究費	0 件 (万円)
(3) 他政府機関による研究助成	1 件 (30 万円)
(4) 財団助成金	1 件 (50 万円)
(5) 受託研究または共同研究	1 件 (250 万円)
(6) 奨学寄附金その他 (民間より)	2 件 (55 万円)

(1) 文部省科学研究費

永田 年 (代表者) 基盤研究(C)(2)「細胞内寄生菌に対する遅延型細胞性免疫誘導型 DNA ワクチンの開発」120 万円 (継続)

(3) 他政府機関による研究助成

小出幸夫 (分担者) 日米医学協力計画 結核・ハンセン病専門部会 「細胞内寄生菌に対する DNA ワクチン」30 万円 代表者 京都大学大学院医学研究科教授 光山正雄

(4) 財団助成金

小出幸夫 (代表者) 財団法人静岡総合研究機構学術教育研究推進事業費補助金「DNA ワクチンによる結核の予防と治療」50 万円

(5) 受託研究または共同研究

小出幸夫(代表者) 科学技術振興財団(地域研究開発促進拠点支援事業)「結核・悪性腫瘍の治療に有効なキラーT細胞誘導型DNAワクチンの開発」 250万円

6 特定研究などの大型プロジェクトの代表, 総括

7 学会活動

	平成12年度
(1) 特別講演・招待講演回数	1件
(2) 国際・国内シンポジウム発表数	1件
(3) 学会座長回数	0件
(4) 学会開催回数	0件
(5) 学会役員等回数	5件

(1) 学会における特別講演・招待講演

小出幸夫(2000) 細胞内寄生菌に対する指向性DNAワクチン. 第37回日本細菌学会中部支部総会, 2000年9月, 岐阜

(2) 国際・国内シンポジウム発表

小出幸夫(2000) 細胞内寄生菌感染に対する指向性DNAワクチンの開発. 第24回皮膚科免疫セミナー, 東京

(5) 役職についている学会名とその役割

小出幸夫 日本細菌学会(評議員)
小出幸夫 日本細菌学会関東支部会(評議員)
小出幸夫 日本免疫学会(評議員)
小出幸夫 日本組織適合学会(評議員)
小出幸夫 東海遺伝子医療研究会(評議員)

8 学術雑誌の編集への貢献

	平成12年度
学術雑誌編集数	0件

9 共同研究の実施状況

	平成12年度
(1) 国際共同研究	1件
(2) 国内共同研究	1件
(3) 学内共同研究	6件

(1) 国際共同研究

1. Raz, E. (UCSD) 「免疫賦活性 DNA によって発現誘導される遺伝子の解析」

(2) 国内共同研究

1. 大原直也 (長崎大学歯学部) 「結核に対するエピトープ DNA ワクチンの開発」

(3) 学内共同研究

1. 山田 孝, 内山 啓, 須田隆文, 千田金吾 (第二内科) 「細胞内寄生菌に対するエピトープ DNA ワクチンの研究」
2. 戸澤孝太郎, 杉本 健, 花井洋行 (第一内科) 「炎症性腸炎の発症機序と治療法の研究」
3. 三鬼慶太, 中村 達 (第二外科) 「リステリアをキャリアーとした結核に対する新規 DNA ワクチンの開発」
4. 中村祐太郎, 須田隆文, 千田金吾 (第二内科) 「組換えレトロウイルス導入樹状細胞を用いた細胞内寄生菌に対する感染防御免疫の誘導」
5. 横田尚樹, 難波宏樹 (脳神経外科) 「ラット海馬に一過性虚血によって発現する遺伝子の同定」
6. 影山康徳, 宮本繁仁, 長野 昭 (整形外科) 「慢性関節リウマチの発症機序と治療法の研究」

10 産学共同研究

	平成 12 年度
産学共同研究	1 件

浜松ホトニクス株式会社中央研究所「細菌の迅速分子タイピング(molecular typing)法の開発」

11 受賞 (学会賞等)

12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

1. 胞内寄生菌感染に対するエピトープ DNA ワクチンの研究

1-1 細胞傷害性 T 細胞(CTL)誘導型 DNA ワクチン：エピトープ・ヒエラルキーの CTL および感染防御免疫誘導に及ぼす影響

[目的]細胞内寄生菌である *Listeria monocytogenes* の感染防御には、細胞性免疫、特に CTL と 1 型ヘルパーT(Th1)細胞の両者が有効である。本研究では、CTL に着目し、ヒエラルキーを示す 3 種の CTL エピトープを別個に発現する DNA ワクチンを作製し、その CTL 誘導の機序、CTL 誘導能、感染防御能を検討した。

[概要]CTL 誘導型 DNA ワクチンとして、LLO 91-99, p60 217-225, p60 449-457 (H-2K^d拘束性) の 3 種の CTL エピトープを別個に発現するプラスミドを構築した。これらの DNA ワクチンを BALB/c マウスの剃毛した腹部に 1 週毎に 3 回遺伝子銃で免疫 (2 μ gDNA/回) し、⁵¹Cr 遊離法で CTL 活性を測定した。また、ELISPOT による抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の検出により、CTL の細胞数を測定した。感染防御能は *L. monocytogenes* 経静脈的感染後 2 日の脾臓および肝臓の菌数を測定することで判定した。

[目的の達成度] (1) LLO 91-99 を発現する DNA ワクチンは、遺伝子銃で接種した場合 CD8⁺CTL を強力に誘導したが、この誘導には CD4⁺T 細胞およびプラスミドの CpG モチーフは関与しなかった。(2) 3 種の CTL エピトープを発現する DNA ワクチンの CTL 誘導能を比較したところ、dominant エピトープである LLO 91-99, p60 217-225 が強く、subdominant エピトープである p60 449-457 は弱かった。また、dominant/ subdominant エピトープ反応性 T 細胞間の干渉は、CTL 活性、特異的 T 細胞数の何れでも認めなかった。(3) 感染防御能は CTL 活性と相関したが、3 種の CTL エピトープを同時に免疫しても LLO 91-99 によって誘導された感染防御能を超えることはなかった。このことより、CTL 誘導型ワクチンに関しては、最も優勢(dominant)なエピトープのみの使用で十分な効果が得られることが判明した。

[研究担当者] 山田 孝, 永田 年, 小出幸夫

1-2 遅延型細胞性免疫誘導型 DNA ワクチンの効果の検討

[目的] 単一のヘルパーT細胞(Th) エピトープに特異的に反応する Th 集団のみを誘導する DNA ワクチンを作製する。またそれを用い、主に細胞内寄生細菌(リステリア) 感染における効率的で有効な DNA ワクチンを開発すると同時に、感染防御における Th の役割を明らかにする。

[概要] 既知の Th エピトープのみをコードするオリゴヌクレオチドを不変鎖(Ii 鎖) cDNA 内に組み込み、この組換え cDNA を DNA ワクチンとして遺伝子銃法を用いてマウスに免疫する。免疫効果は、免疫マウス脾細胞の抗原特異的増殖反応、抗原特異的サイトカイン発現、マウスのリステリア感染実験で評価する。

[目的の達成度] オブアルブミン(OVA)およびリステリアの防御抗原であるリステリオリジン O, p60 タンパクの既知の優勢 Th エピトープを組み込んだ組換え Ii 鎖 cDNA を作製し、これをマウスに遺伝子銃法で免疫することによりマウス個体で特異的 Th 細胞の誘導を確認した。またリステリア由来 Th エピトープの種類によって感染防御能に違いのあることが明らかになった。さらに多くのリステリア由来 Th エピトープを組み込んだ組換え Ii 鎖 DNA ワクチンの比較検討、および細胞傷害性 T 細胞(CTL)誘導型 DNA ワクチンとの併用の効果の検討を行っている。

[研究担当者] 永田 年, 鈴木美奈, 青枝大貴, 小出幸夫

2. 弱毒細胞内寄生細菌をキャリアとした抗結核菌 DNA ワクチンの開発

[目的] 弱毒細胞内寄生細菌を DNA ワクチンのキャリアとした DNA ワクチンを開発する。BCG 由来感染防御抗原遺伝子(Ag85A, Ag85B, MPB51)を弱毒細胞内寄生細菌に組み込み感染防御免疫の誘導、特に CTL を含めた細胞性免疫の誘導を図る。

[概要] 弱毒細胞内寄生細菌内で安定に維持される真核細胞用発現プラスミドに BCG 由来 Ag85A, Ag85B, MPB51 遺伝子を組み込みさらにこれらプラスミドを導入した弱毒細胞内寄生細菌を作製する。これをマウスに経口ないし経静脈的に感染させた後、抗 BCG 免疫が誘導できたかどうか細胞傷害性 T 細胞試験、抗原特異的サイトカイン発現、マウスの BCG 感染実験で評価する。

[目的の達成度] 現在、弱毒細胞内寄生細菌内で安定に維持される DNA ワクチン用プラスミドの構築、およびそれに BCG 由来 Ag85A, Ag85B, MPB51 遺伝子を導入した。またこれらプラスミドを導入した弱毒細胞内寄生細菌を作製した。

[研究担当者] 三鬼慶太, 永田 年, 鈴木美奈, 小出幸夫

3. 細菌由来免疫賦活性 DNA (ISS) の作用機構の解析

[目的]ISS は自然免疫を誘導するばかりでなく, 獲得免疫における強いアジュバントとしての作用をもっている。しかしながら, ISS による宿主応答活性化機構について十分な知見は得られてはいない。本研究では ISS により発現が誘導される遺伝子の検索とその転写調節機構の解析をおこなった。

[目的の達成度]<1>サブトラクション法により, ISS により p105(NF- κ B), IRF-1, PA28 β , MyD88, IRG2 がマクロファージや樹状細胞で発現誘導されることを明らかにした。<2>iNOS 遺伝子のプロモーター領域の解析により, AP-1 様配列が ISS 応答配列のひとつであることが明らかとなった。AP-1 ファミリーの比較により, c-Jun ホモダイマーがこのシグナル伝達経路に関与することが示唆された。<3>: インターフェロン γ により Toll 様レセプター 9 (TLR9) の mRNA 発現が抗原提示細胞で誘導されることを明らかにした。

[研究担当者] 内嶋雅人, Eyal Raz, 永田年, 青枝大貴, 小出幸夫

4. CTL エピトープマッピング法の開発

[目的]抗原蛋白の種々の断片を発現する細胞セットをレトロウイルスを用いて作成し, リンパ球反応分画を INF- γ 産生で特定後, 挿入されている蛋白断片をコードする DNA を PCR で増幅し, エピトープの含まれる蛋白部分を絞り込み, エピトープ予測プログラムと組み合わせることで, エピトープの迅速でシステムティックな同定法を確立する。

[目的の達成度]現在, レトロウイルスを作製中

[研究担当者]青枝大貴, 永田 年, 小出幸夫

5. 記憶 T 細胞機能研究のモデル開発

[目的]記憶 CD8 細胞をレトロウイルスベクターにより GFP でラベリングした後 adoptive transfer し, 生体内における挙動を解析する。テトラマーと組み合わせることで, ナイブ細胞と記憶細胞の質的, 量的違いを解析できると考えられる。

[目的の達成度] (1) レトロウイルスベクターにより GFP でラベルした特異的 T 細胞の生体内での挙動は解析中である。(2) 現在テトラマーの作成中である。

[研究担当者] 青枝大貴, 永田 年, 小出幸夫

6. マウス TNBS 大腸炎における Interferon- γ と Interleukin-12 の役割

[目的]Knockout マウスと中和抗体を用いた 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)大腸炎発症機序の検討。

[概要] IFN- γ R^{-/-} マウスおよび IL-12p40^{-/-}マウスを使用。また単クローン抗体をハイブリドーマ IFN- γ (R4-6A2) および IL-12(C17.8)より精製し 2mg を野生型マウスに腹腔内投与。TNBS 大腸炎は TNBS2.5mg を 50%エタノールに溶解, その 100 μ l を 1 回注腸し作成。

[目的の達成度]TNBS 注腸後野生型マウスは大腸炎を認めた。次に, IFN- γ R^{-/-}マウスに TNBS を注腸すると大腸炎症が生じ, IFN- γ の中和抗体を投与した野生型マウスでも同様に大腸炎を認めた。同様に

IL-12p40^{-/-}マウスおよび IL-12 の中和抗体を投与した野生型マウスに TNBS 注腸を行ったが、大腸炎は認めなかった。誘発された TNBS 大腸炎において大腸炎症局所に CD4 陽性 T 細胞の浸潤を確認した。また RT-PCR で、TNBS 大腸炎組織では IFN- γ の mRNA の発現増強が認められた。一方、IL-4mRNA の発現は認めなかった。以上より、TNBS 大腸炎の発症に IL-12 は必要であるが、IFN- γ は必ずしも必要ないと考えられた。

[研究担当者] 戸澤孝太郎, 杉本 健, 小出 幸夫

13 この期間中の特筆すべき業績, 新技術の開発

1. CTL 誘導型エピトープ DNA ワクチンにより, 以下の事実を明らかにした。1) エピトープ・ワクチンは抗原全長を発現する DNA ワクチンよりも強力に CTL を誘導する。2) エピトープ・ヒエラルキーは免疫によって誘導される CTL 活性および感染防御能と平行する。すなわち, 優勢エピトープがもっとも強い CTL 活性および感染防御能を誘導する。また, 感染防御には優勢エピトープ単独の接種で十分であることが判明した。
2. Th 細胞誘導型 DNA ワクチン: Th エピトープを Ii 鎖に組み込んだ組換え DNA ワクチンは効率よく Th 細胞を誘導し, リステリアに対する感染防御能も誘導できた。

14 研究の独創性, 国際性, 継続性, 応用性

1. エピトープ DNA ワクチンにより, CTL または Th のどちらかを任意に誘導できる DNA ワクチン作製技術を確立した。これにより, 目的の病原体の排除に必要な細胞性免疫のみを選択誘導できる。
2. 現在, HLA トランスジェニック・マウスを用いることで, 臨床応用可能なエピトープ DNA ワクチンの開発中である。
3. エピトープ DNA ワクチンは臨床応用のみならず, CTL と Th 細胞の相互作用の解明にも有用である。

15 新聞, 雑誌等による報道