

微生物学

1 構成員

	平成17年3月31日現在
教授	1人
助教授	1人
講師（うち病院籍）	0人（0人）
助手（うち病院籍）	2人（0人）
医員	0人
研修医	0人
特別研究員	2人
大学院学生（うち他講座から）	3人（3人）
研究生	0人
外国人客員研究員	0人
技術職員（教務職員を含む）	0人
その他（技術補佐員等）	1人
合 計	10人

2 教官の異動状況

- 小出 幸夫（教授）（H8.4.1～現職）
 永田 年（助教授）（H9.9.1～現職）
 内嶋 雅人（助手）（H5.4.1～現職）
 青枝 大貴（助手）（H12.7.1～現職）

3 研究業績

数字は小数2位まで。

	平成16年度
(1) 原著論文数（うち邦文のもの）	8編（0編）
そのインパクトファクターの合計	28.90
(2) 論文形式のプロシーディングズ数	2編
(3) 総説数（うち邦文のもの）	4編（2編）
そのインパクトファクターの合計	2.01
(4) 著書数（うち邦文のもの）	0編（0編）
(5) 症例報告数（うち邦文のもの）	0編（0編）
そのインパクトファクターの合計	0

(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. Suzuki M, Aoshi T, Nagata T, Koide Y : Identification of H2-D^d- and H2-A^b-restricted T-cell

epitopes on a novel protective antigen, MPT51, of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 72 (7) : 3829-3837, 2004.

2. Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M, Koide Y : Induction of protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 complex and MPB/MPT51. Infect Immun 72(4) : 2014-2021, 2004.
3. Uchijima M, Nagata T, Aoshi T, Koide Y : Interferon- γ overcomes low responsiveness of myeloid dendritic cells to CpG-DNA. Immunol Cell Biol 83 : 92-95, 2005.
4. 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.

インパクトファクターの小計 [13.03]

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. Uenoyama, S, Kobayashi T, Takenouchi Y, Yamashita K, Kazui T, Koide Y : Improvement of intestinal motility using S-methylisothiourea sulfate in a caine postoperative ileus model. Am J Surg 187 (1) : 93-937, 2004.
2. Kageyama Y, Koide Y, Uchijima M, Nagata T, Yoshida A, Aoshi T, Miura T, Nagafusa T, Nagano A : Plasmid encoding interleukin-4 in the amelioration of murine collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum. 50(3) : 968-975, 2004.
3. Miki K, Unno N, Nagata T, Uchijima M, Konno H, Koide Y, Nakamura S : Butyrate suppresses hypoxia-inducible factor-1 activity in intestinal epithelial cells under hypoxic conditions. Shock 22 : 446-452, 2004.
4. Matsuda H, Suda T, Sato J, Nagata T, Koide Y, Chida K, Nakamura H : α -Galactosylceramide, a Ligand of Natural Killer T Cells, Inhibits Allergic Airway Inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol. 33(1) : 22-31.

インパクトファクターの小計 [15.87]

(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, Suzuki M, Aoshi T, Nagata T : Identification of MHC-restricted T-cell epitopes on a novel protective antigen, MPT51, of *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis, 8 : s38, 2004.
2. Suzuki M, Aoshi T, Nagata T, Koide Y : Identification of H2 and HLA-restricted T-cell epitopes on a novel protective antigen, MPT51, of *Mycobacterium tuberculosis*. Fortieth Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program p.137, 2004.

(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. Nagata T, Aoshi T, Uchijima M, Suzuki M, Koide Y : Cytotoxic T-lymphocyte-, and helper T-lymphocyte-oriented DNA Vaccine. DNA and cell Biology, 23(2) : 93-106, 2004.
2. 小出幸夫, 永田 年 : Ag85分子DNAワクチンによる抗結核細胞性免疫の誘導 Annual Review 免疫2004, 中外医学社, p.233-243, 2003.
3. Nagata, T, Miki, K, Koide, Y : Attenuated bacteria as transfer vehicles of DNA vaccines. Recent Res Devel Biophys Biochem 4 : 189-207, 2004.
4. 小出幸夫 : DNAワクチンによる感染防御. 今日の移植 17 (5) : 625-636, 2004.

インパクトファクターの小計 [2.01]

4 特許等の出願状況

	平成16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16年度
(1) 文部科学省科学研究費	2件 (920万円)
(2) 厚生科学研究費	1件 (120万円)
(3) 他政府機関による研究助成	1件 (20万円)
(4) 財団助成金	2件 (1,840万円)
(5) 受託研究または共同研究	1件 (533万円)
(6) 奨学寄附金その他 (民間より)	1件 (30万円)

(1) 文部科学省科学研究費

小出幸夫 (代表者) 基盤研究 (C) 肺ホーミング性Th1細胞, CTLを誘導する抗結核抗原DNAワクチンの開発 120万円 (継続)

永田 年 (代表者) 基盤研究 (B) 結核菌由来T細胞エピトープの同定とマルチエピトープDNAワクチンの開発 800万円 (新規)

(2) 厚生科学研究費

小出幸夫 (分担者) 厚生科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業 120万円 (継続)
代表者 独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター センター長 岡田全司

(3) 他政府機関による研究助成

小出幸夫 (分担者) 厚生労働省 日米医学協力研究会結核ハンセン病専門部会 20万円 (継続)
代表者 京都大学大学院医学研究科微生物感染症学 光山正雄

(4) 財団助成金

小出幸夫（代表者） Broad Medical Research Program Inflammatory Bowel Disease Grants
The Eli and Edythe L. Broad Foundation (Los Angeles) A randomized clinical trial
of curcumin in the therapy of ulcerative colitis 1,810万円

小出幸夫（代表者） 中部乳酸菌研究会 30万円

(5) 受託研究または共同研究

小出幸夫（分担） 経済産業省 地域新生コンソーシアム研究開発事業 有毒物質を用いない
医療用非加熱滅菌機の開発 533万円 管理法人 ジーマ株式会社

7 学会活動

	国際学会	国内学会
(1) 特別講演・招待講演回数	0件	0件
(2) シンポジウム発表数	0件	0件
(3) 学会座長回数	0件	1件
(4) 学会開催回数	0件	0件
(5) 学会役員等回数	0件	6件
(6) 一般演題発表数	4件	

(1) 国際学会等開催・参加

5) 一般発表

口頭発表

1. Suzuki M, Aoshi T, Nagata T, Koide Y : Identification of H2 and HLA-restricted T-cell epitope on a novel protective antigen, MPT51, of *Mycobacterium tuberculosis*. Fortieth Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program. December 7-10, 2004, Kyoto (Japan).

ポスター発表

1. 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. DNA Vaccines 2004. November 17-19, 2004, Monte Carlo (Monaco).
2. Koide Y, Nakamura Y, Nakano H, Aoshi T, Suda T, Uchijima K, Nagata T : Induction of protective cell-mediated immunity against intracellular bacteria with dendritic cells transduced with bacterial genes. Keystone Symposia February 1-7, 2005, Vancouver (Canada).
3. Koide Y, Hanai H, Iida T, Uchijima M, Nagata T, Ohashi K : A randomized clinical trial of curcumin in the maintenance therapy of ulcerative colitis. Third Annual Broad Medical Research Program Investigator Meeting, February 24-25, 2005, Los Angeles (USA)

(1) 国内学会の開催・参加

4) 座長をした学会名

日本細菌学会総会

(3) 役職についている国際・国内学会名とその役割

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，学術集会委員会委員長）

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・再生医療研究会（評議員）

小出幸夫 中部乳酸菌研究会（幹事）

8 学術雑誌の編集への貢献

	国内	外国
学術雑誌編集数（レフリー数は除く）	0件	0件

(3) 国内外の英文雑誌のレフリー

小出幸夫 4回 Biochem Biophys Res Commun. (Elsevier) 1回

Vaccine (英国) 2回

Microbiol Immunol (日本) 1回

9 共同研究の実施状況

	平成16年度
(1) 国際共同研究	2件
(2) 国内共同研究	2件
(3) 学内共同研究	4件

(1) 国際共同研究

1) 「DNA vaccines against Cancer」, Arya Biragyn , Ph.D., National Cancer Institute /National Institutes of Health (米国), Feb., 2003～, 研究材料の交換

2) 「Two-photon imaging of T-lymphocytes in vivo」, Mark Miller Ph.D., Washington University (米国), Feb, 2004～, 資料の交換, 研究者の派遣

(2) 国内共同研究

1) 岡田全司（独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター）「レンチウイルスベクターを用いた結核に対するワクチンの開発」

2) 永津雅章（静岡大学工学部 電気・電子工学科）「マイクロ波放電を用いた低温プラズマ滅菌のメカニズム解明とその医療応用」

(3) 学内共同研究

- 1) 花井洋行（光学医療診療部，第一内科）「炎症性大腸炎の発症機序と治療法の研究」
- 2) 榎本紀之，橋本 大，須田隆文，千田金吾（第二内科）「 α -GalCerを用いた樹状細胞ワクチンの研究」
- 3) 橋本 大，須田隆文，千田金吾（第二内科）「レンチウイルスベクターを用いた結核に対するワクチンの開発」
- 4) 堀井俊伸（検査部）「新しいフィンガープリント法を用いた細菌の迅速同定法」

10 産学共同研究

	平成16年度
産学共同研究	2件

1. 新しいフィンガープリント法を用いた細菌の迅速同定法：浜松フォトニクス，ASTI社，パルステック社
2. 画像処理を用いた細菌検査システムの開発（経産省：地域新規産業創造技術開発費補助事業），テクノシステム(株)

12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

1. 結核に対する樹状細胞ワクチンの開発

〔目的〕 樹状細胞（Dendritic Cells; DC）は生体で最も抗原提示能の高い細胞であることが知られている。そこで細胞内寄生菌に対する感染防御にとって必須である強力な細胞性免疫を誘導するため，感染防御抗原遺伝子をレンチウイルスベクター系を用いて導入した autologous DCを調製しそれをマウスに免疫し，その免疫効果を検討する。感染防御抗原として結核菌の主要感染防御抗原であるAg85A, Ag85Bを用いる。

〔概要〕 結核菌の主要防御抗原であるAg85A, Ag85B遺伝子を導入したレンチウイルスを作製し，それを骨髄由来DCに形質導入する。そのAg85A, Ag85B発現DCを用いたワクチンをマウスに免疫し，抗結核細胞性免疫の誘導，結核菌に対する感染防御効果について検討した。

〔目的の達成度〕 Ag85A, Ag85B遺伝子導入DCワクチン免疫により結核菌特異的細胞性免疫が誘導されることを，ツベルクリン液（PPD），精製Ag85タンパクを用いた脾細胞増殖反応，IFN- γ 産生能を検討することにより確認した。

（中野秀樹，永田 年，青枝大貴，内嶋雅人，小出幸夫）

2. 細胞内寄生細菌に対するCTL指向性樹状細胞ワクチンにおける α -ガラクトシルセラミド（ α -GalCer）のアジュバンド効果

〔目的〕 これまで当研究室では，細菌由来タンパク遺伝子を導入した樹状細胞（Dendritic Cells; DC）をワクチンとしてマウスに免疫したところ，強力な抗原特異的CTL（細胞傷害性T細胞）が誘導できることを報告してきた。本研究では，樹状細胞ワクチン投与時のNKT細胞による免疫アジュバンド効果について検討する。

〔概要〕 リステリア菌の主要CTLエピトープであるリステリオリジンO（LLO）91-99ペプチド

(LLO p91-99) を骨髄由来DCにパルスしたDCワクチンに、CD1d 分子のリガンドでありNKT細胞を誘導できる α -GalCer を同時にパルスし、それをマウスに免疫する。免疫マウスにおける抗リステリア菌細胞性免疫の誘導、リステリア菌に対する感染防御効果について検討する。

[目的の達成度] (1) LLO p91-99ペプチドパルスDC細胞を 2 週おき 2 回マウスに静脈注射することにより、強いLLO p91-99特異的CTLの誘導を観察した。なお皮下注射では強いCTLの誘導はできなかった。(2) α -GalCer 同時パルスDCワクチン免疫でより強力なCTLの誘導を観察した。特に 1 回目の免疫 (プライミング) 時にのみ α -GalCer をパルスした群でその傾向が強かった。現在、そのメカニズムを解析中である。

(榎本紀之, 永田 年, 内嶋雅人, 小出幸夫)

3. レンチウイルスベクターを用いた肺指向性抗結核菌ワクチンの研究

[目的] 結核菌, レジオネラ, クラミジアなどの細胞内寄生細菌による呼吸器感染症においては、肺において感染防御に有効な細胞性免疫を誘導することが必須である。本研究では、結核菌抗原をウイルスベクターを用いて経気道免疫することにより、肺にホーミングする結核菌特異的T細胞を誘導するワクチンを開発し、またそれを用いて肺にホーミングする結核菌特異的T細胞の特性を検討する。

[概要] 結核菌の主要感染防抗原分子であるMPT51およびHSP65分子を第3世代レンチウイルスベクターに組み込んだ組換えレンチウイルスを作製する。それを経気道免疫した後の、肺、縦隔リンパ節、脾臓での抗原特異的T細胞の動態を追う。また、BCG菌に対する感染防御効果を検討する。

[目的の達成度] (1) MPT51およびHSP65遺伝子を導入した組換えレンチウイルスを作製した。これをマウスに 1 回経気道免疫することにより、縦隔リンパ節でMPT51 p24-32特異的CTLの誘導を観察した。縦隔リンパ節での免疫応答の方が脾臓での免疫応答よりも強い傾向があった。

(2) BCG菌に対する感染抵抗性は、MPT51遺伝子導入組換えレンチウイルス免疫マウスで、非免疫マウスに比べ高い傾向があった

(橋本 大, 永田 年, 内嶋雅人, 小出幸夫)

4. 結核菌由来感染防御抗原分子, MPT51のヒトT細胞エピトープの同定

[目的] 結核菌の主要な分泌タンパクのひとつであり、当教室でその感染防御効果を認めたMPT51分子のヒトT細胞エピトープを同定する。

[概要] HLA-A*0201トランスジェニックマウスにMPT51を発現するDNAワクチンを遺伝子銃法で免疫する。免疫マウス脾細胞をMPT51分子の overlapping peptide library で刺激しIFN- γ の産生を指標としてMPT51のT細胞エピトープの同定をする。

[目的の達成度] (1) MPT51 DNAワクチン免疫HLA-A*0201トランスジェニックマウス脾細胞は、MPT51 p51-70ペプチドに反応してIFN-g を産生した。さらにMPT51 p51-70ペプチド内の、TLAGKGISVVの10mer ペプチドがT細胞エピトープであることが明らかとなった。(2) 実際にヒトにおいて、このペプチド反応性T細胞が存在するか 4 人の結核患者末梢血を用いて検討したところ、1 人の末梢血で弱いながらこのペプチド刺激に対するIFN- γ の産生を認めた。

(青枝大貴, 永田 年, 橋本 大, 内嶋雅人, 小出幸夫)

5. ケモカインを用いた抗結核菌ワクチンの開発

分子標的型ワクチンを目的として作製したケモカイン・抗原融合型DNAワクチンを、遺伝子銃を用いてBALB/c マウスに接種し、その効果を解析した。ケモカイン融合型にすることでMPT51抗原特異的CD8細胞が増加した。融合DNAワクチンは、抗原特異的IFN- γ の mRNAおよびタンパク質発現量も、抗原とケモカインを個々に発現させたものよりもさらに増加した。これらのことから、融合型ワクチンにより、細胞性防御免疫誘導における効果が増強されることが明らかになった。さらに解析をすすめるための融合型タンパク質の合成をおこない、解析をすすめている。

(内嶋雅人, 永田年, Arya Biragyn, 青枝大貴, 小出幸夫)

6. 細菌由来免疫賦活性CpG-DNA (ISS) の作用機構の解析

細菌やウイルスなどに特有な構成成分は宿主免疫系細胞により認識される。これらは宿主の自然免疫を誘導するばかりではなく、感染後誘導される獲得免疫系にも影響を与える。これらの認識には樹状細胞 (DC) やマクロファージの細胞膜上のToll様レセプター (TLR) や細胞質内の結合タンパク質などが関与している。結核菌などのゲノムDNA中の非メチル化CpG配列はTLR9により認識され、サイトカインなどの産生を誘導することからワクチンの強力なアジュバントとしても用いられている。本研究では、ISSに対する宿主応答機構を明らかにするために、ISSにより発現誘導される遺伝子およびISSの作用に関与する遺伝子の解析をすすめた。

これまでに、ISSによる iNOS遺伝子の発現誘導に c-Jun の経路が関与することをプロモーターアッセイにより明らかにしてきた。TLRが関与する遺伝子発現誘導のシグナル伝達経路にはMyD88依存性、非依存性のふたつの経路が存在する。そこで、野生型およびMyD88ノックアウトマウスの骨髄由来マクロファージを合成ISSで刺激し、iNOS遺伝子発現を解析した。野生型みられる iNOS遺伝子の発現誘導がノックアウトマウスのもものでは全く観測されなかった。このことから、ISSによる iNOS遺伝子発現はMyD88依存的事であることが明らかになった。

(内嶋雅人, 青枝大貴, 永田年, 小出幸夫)

強力な抗原提示細胞である樹状細胞には、細胞表面抗原や機能の違いにより多くのサブタイプが存在する。マウス樹状細胞の場合、大別すると5種類に分類され、発現するTLRの違いにより細菌構成成分に対する応答性も異なる。plasmacytoid DCのみがISSに対する高い応答性を示すということが報告されている。我々はこれまでにIFN- γ がTLR9の発現を誘導する事を示してきたが、ISSに対する応答性が低いとされる myeloid DCをIFN- γ 環境下においた後、ISSに対する応答性をIL-6 mRNA, IL-12 mRNAおよびタンパク質量の測定により解析した。その結果、myeloid DCにおいてもIFN- γ 環境下では、ISSに対する高応答性を示すようになることが明らかになった。

(内嶋雅人, 永田年, 青枝大貴, 小出幸夫)

7. ユビキチン化GFPトランスジェニックマウスの作出

GFP発現リンパ球を用いた免疫応答機構解析のため、ユビキチン化GFPトランスジェニックマウスを作出した。遺伝子を導入した数十匹のうち、10匹で導入遺伝子が確認できた。タンパク質

発現の解析をすすめるとともに、繁殖をおこなっている。

(内嶋雅人, 青枝大貴, 永田年, 小出幸夫)

8. リステリア感染の組織学的解析

マウスのリステリア感染における脾臓およびリンパ節での菌の解剖学的な分布と免疫応答の関連性を蛍光顕微鏡および多光子励起顕微鏡を用いて解析している。多光子励起顕微鏡ではマウスを生かしたまま、脾臓およびリンパ節での菌とリンパ球の相互作用を観察できる。これらの目的を達成するため、GFP発現リステリアや各種蛍光標識法、GFPトランスジェニックマウスなどの準備を進めている。

(青枝大貴, Mark Miller, 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. 細胞内寄生細菌に対する感染防御においては細胞性免疫特にCTLの誘導が重要である。我々は結核菌、リステリア菌の抗原分子を使ったDCワクチンを用いて効率よくCTLが誘導されることを明らかにしてきた。さらにDCワクチン投与時に a-GalCer を用いることにより、より強力なCTL誘導能を認めた。これらのことは、細胞内寄生細菌に対する有効な細胞性免疫の誘導のメカニズムの解明に重要な知見である。またMPT51分子のHLA-A*0201拘束性のCTLエピトープが明らかとなった。これは今後の抗結核菌ワクチンの開発において重要な知見であると考えられる。
2. 自然免疫に関与するTLRが注目されているが、我々はIFN- γ 存在下では通常TLR9の発現が低いmyeloid DCもTLR9を発現し、ISSに応答するようになることを発見した。すなわちDC亜集団は環境に応じて異なった役割を果たすことを明らかにした。

14 研究の独創性, 国際性, 継続性, 応用性

1. 当教室は、これまで遺伝子銃および弱毒細菌（リステリア）をキャリアとしたを用いたDNAワクチンにより細胞内寄生細菌に対する細胞性免疫の誘導について研究してきた。平成16年度は、樹状細胞ワクチン、レンチウイルスベクターを用いた粘膜ワクチン等に研究を広げ、より有効な細胞性免疫の誘導を試みている。特に a-GalCer をCTL指向性ワクチンのアジュバンドとして用いる点、レンチウイルスベクターを用いた肺指向性抗結核菌ワクチンの開発は注目される点である。
2. 前述のように細胞内寄生菌の感染にたいしてはCTLが重要な役割を果たすが、どのようにしてCTLが菌を排除するのかは明らかでない。近年、多光子励起顕微鏡を用いて生きたマウスの臓器内の蛍光標識された細菌、リンパ球の挙動を観察できるようになった。そこで、この分野の第一人者であるワシントン大学のMark Miller 博士と生体内の菌とリンパ球の相互作用の観察に関する共同研究を開始した。

15 新聞、雑誌等による報道

1. 「院内感染菌素早く特定―静大と浜松医大一」日本経済新聞 2004年11月9日
2. 「細菌検査システム開発事業を本格化 テクノシステム 浜松医大と共同」 日刊工業新聞
2004年7月30日
3. 「細菌検査 画像処理で自動化 テクノシステム、開発に着手」日経産業新聞 2004年12月8日
4. 「細菌検査の技術開発へ テクノシステム 浜松医大の支援受け」静岡新聞 2004年8月13日