

8. 免疫部

部長 阿戸 学

概要

免疫部は感染症、すなわち、病原体—宿主関係を宿主応答の視点から感染症の制圧研究を推進している。

「Translational medical research (橋渡し医学研究)を推進することにより、研究室で得られた研究成果を医療や社会に還元し、健康増進や感染症によるヒトの健康被害の減少」を究極の目標として、部員一同、邁進している。また、国立感染症研究所において、免疫部は感染免疫の学問領域から所内横断的協力体制に、加えて、人材育成や国際化に対応するため、研修や国際協力にも参加している。

免疫部では、ウイルス、細菌など、多種多様な病原体感染症に関する研究、生物毒生物毒素および抗毒素治療に関する研究、や免疫機能に関する研究を実施した。また、品質管理に関する業務、国際協力関係業務、研修業務や共同利用機器管理にも寄与した。

免疫部で実施された研究・業務の概要は以下のとおりである。

調査・研究

I. ウイルス感染症

1. ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の増殖制御と病態に関する研究
2. 麻疹に関する研究
3. インフルエンザに関する研究
4. ノロウイルスに関する研究
5. ワクチンに関する基礎的研究
6. respiratory syncytial virus (RSV) 感染症における免疫応答に関する研究

II. 細菌感染症

1. 抗酸菌感染症に関する研究
2. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症に関する研究
3. 類鼻疽の宿主防御に関する研究

III. 免疫機能に関する研究

1. 抗原認識多様性獲得の分子機構におけるプレ B 細胞受容体の機能に関する研究
2. 免疫記憶形成過程における BILL カドヘリン分子の機能に関する研究
3. RP58 遺伝子の造血及び免疫担当細胞に於ける機能解析

IV. 生物毒素および抗毒素治療に関する研究

1. セアカゴケクモ抗毒素の力価試験の開発

I. 国家検定

II. 標準品交付

III. 体外診断薬委員会業務

国際協力関係業務

研修業務

共同利用機器管理

人事異動として、平成 27 年 4 月 01 日に免疫部第一室任期付研究員として小林美栄が任用された。

業績

調査・研究

I. ウイルス感染症

1. ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の増殖制御と病態に関する研究

(1) ヒト化マウスを用いた *in vivo* における HIV 感染機構の解析

これまでに我々は、HIV-1 感染ヒト化マウスモデルでの血中ウイルス動態解析において、初期感染ウイルス伝播に CD4 陽性 T 細胞数は関連しないことを見出してきた。そこで我々は、マクロファージ・樹状細胞といった骨髄系細胞の関与に着目し、ヒト GM-CSF、Flt3-L をそれぞれ発現するプラスミドを *in vivo transfection* 法によりヒト化マウスに導入して骨髄系細胞を分化誘導させた状況下でのウイルス伝播について検討した。その結果、誘導群では非誘導群と比較して感染後 1 週目の血中ウイルス量が有意に高く、感染前の末梢血単球数と感染後 1 週目の血中ウイルス量との間で正の相関が認められた。現在は骨髄系細胞について集団レベルでの解析を進めている。

また、HIV 感染症の病態への関与として bystander CD4 陽性 T 細胞死が示唆されていることから、HIV-1 初期感染時の細胞死誘導についてヒト化マウスモデルでの解析を開始した。これまでのところ、ウイルス感染の進行に伴い CD4 陽性 T 細胞の細胞死が誘導されることを確認している。

[寺原和孝、池野翔太(早稲田大学大学院、研究生)、岩渕龍太郎(早稲田大学、実習生)、竹山春子(早稲田大学先進理工学部生命医科学科、阿戸 学、横田恭子(客員研究員)]

(2) HIV が潜伏感染するナイーブ CD4⁺ T 細胞のウイルス制御機構の解析

サイトカインによる CD4⁺ T 細胞長期維持培養下に GFP 発現 HIV の潜伏感染系を確立した。この培養条件で、GFP 蛋白発現陰性の静止期ナイーブ T 細胞集団は低レベルの GFP mRNA を発現し、TCR 刺激や脱アセチル化剤 SAHA による再活性化を認めないのに対し、T 細胞受容体 (TCR) 刺激後に一度静止化して GFP 陰性となった記憶 T 細胞に SAHA を加えると GFP mRNA や蛋白発現細胞集団が再度出現した。従って、一度 TCR 刺激を受けた記憶 T 細胞とナイーブ T 細胞の感染制御機構は異なることが示唆された。このような HSP 条件下で静止期のまま長期維持される HIV 潜伏ナイーブ T 細胞集団が、生体内で容易には再活性化されない HIV

潜伏細胞として病態に関与しているのか、あるいは HIV ゲノムをもちながら発現を完全にシャットダウンしているのかを明らかにするため、細胞内制御分子について検討している。

[横田恭子(客員研究員)、小林(石原)美栄、寺原和孝、池野翔太(早稲田大学大学院、研究生)、竹山春子(早稲田大学先進理工学部生命医科学科)、Javier P. Martinez (Pompeu Fabra 大学、スペイン)、Andreas Meyerhans (Pompeu Fabra 大学、スペイン)]

(3) HIV 潜伏化におけるウイルス由来アンチセンス鎖 RNA の発現解析

近年、HIV プロウイルスのセンス鎖に加え、アンチセンス鎖からも RNA(asRNA)が転写され、センス鎖 RNA(sRNA)の転写を抑制していることがわかってきた。そこで我々は、一細胞レベルで HIV の sRNA 及び asRNA の発現を解析した。本解析のため、それぞれの RNA 発現を異なる蛍光タンパク質によりモニターできるモデル HIV を作製し、T 細胞株に感染させた。この結果、感染細胞は①sRNA のみを発現する細胞群、②asRNA のみを発現する細胞群、③どちらも発現しない細胞群に分画された。従って、HIV 由来 asRNA は潜伏化細胞の一部で発現しており、asRNA の機能が HIV 潜伏化の成立及び維持に影響を及ぼしている可能性があると思われた。

[小林(石原)美栄、寺原和孝、阿戸 学、横田恭子(客員研究員)]

2. 麻疹に関する研究

(1) 麻疹ウイルスワクチン株が誘導する免疫応答のヒト化マウスを用いた解析

これまでの解析から、麻疹ウイルスに対するヒト T 細胞応答をヒト化マウスで解析する系の確立のためには骨髄系細胞の分化・増殖を補う必要があることが示唆された。そこでヒト GM-CSF、IL-4、Flt3-L 発現プラスミドを *in vivo transfection* 法でヒト化マウスに導入した。麻疹ウイルスに対する CD4⁺ T 細胞の応答誘導には十分ではなかったものの、*in vivo transfection* により血中ヒト単球や骨髄中の樹状細胞は明らかに一過性に増加した。更に条件を検討することにより、ヒト免疫応答の誘導改善も可能であると思われる。

[池野翔太(早稲田大学大学院、研究生)、寺原和孝、駒瀬勝啓(ウイルス3部)、竹山春子(早稲田大学先進理工学部生命医科学科)、森川裕子(北里大学生命科学研)、横田恭子(客員研究員)]

3. インフルエンザに関する研究

(1) 免疫原性を改善した H7N9 ワクチンの開発

H7N9 ウイルスによるパンデミックの発生が危惧されているが、H7N9 ウイルスの抗体惹起能は低く、従来型のワクチンでは、十分な防御免疫を賦与できない可能性が高い。免疫原性を改善した H7N9 ワクチンを開発するため、バイオインフォマティクス的手法によりヒト免疫原性を改善するために最適な H7 アミノ酸

一次配列をデザインした。この配列をもとに、変異型 H7 ヘマグルチニンタンパクを作製したところ、ヒト化マウスにおいて免疫原性の改善効果が確認され、より高濃度の抗ヘマグルチニン抗体が惹起された。しかし、試験管内中和試験ではウイルス中和効果が観察されなかったため、変異型 H7 ヘマグルチニンタンパクが惹起する抗ヘマグルチニン抗体は、典型的な中和抗体と異なる抗原部位を認識していると考えられた。実際、惹起された抗体の一部は、ヘマグルチニンシステム部分という特殊な抗原領域を認識しており、この部位に結合することによって生体内での感染防御に寄与することが期待された。

[和田倭(研究生)、信澤枝里(インフルエンザウイルス研究センター)、竹山春子(早稲田大学)、Anne De Groot (EpiVax)、阿戸学、高橋宜聖]

(2) インフルエンザウイルスへの交差防御に寄与する記憶 B 細胞に関する研究

インフルエンザウイルス経鼻感染後の肺において、交叉防御能に優れた B 細胞が胚中心において産生されることをこれまでに見いだした。気道に形成される胚中心は、構造的に通常の胚中心と異なることや、その中で B 細胞がより活発に分裂していることを明らかにした。急性感染であるインフルエンザウイルスは、通常感染後 2 週間以内に生体から排除されると考えられているが、一ヶ月を経過した後でも気道組織ではウイルス RNA が検出されていることを見いだした。この気道選択的な持続感染が胚中心の性質に大きな影響を与えていると考えられる。

[安達悠、小野寺大志、阿戸学、高橋宜聖]

(3) インフルエンザ交叉性免疫に特有の免疫パラメーター解析

複数のヘマグルチニンに交叉結合する B 細胞と抗体を迅速かつ網羅的に解析する新技術をヒト末梢血細胞に応用し、ヒト交叉性 B 細胞と抗体を迅速かつ網羅的に開発する技術開発を行った。その結果、ヒト交叉性 B 細胞に特有の表現型を明らかにするとともに、交叉性抗体が認識する抗原構造を見だし、経鼻インフルエンザワクチンの評価に応用可能な新規免疫パラメーターを同定した。

[Rajni Kant Shukla (流動研究員)、小野寺大志、安達悠、長谷川秀樹(感染病理部)、阿戸学、高橋宜聖]

4. ノロウイルスに関する研究

(1) ノロウイルス防御免疫応答に関する研究

ノロウイルスをコントロールするためには、ワクチン開発が重要となる。しかし、防御免疫機構の詳細は不明な点が多く、防御機能と相関する免疫パラメーターはこれまで特定されていない。本研究では、現在開発の進められている VLP ワクチンに着目し、ヒト化マウスを用いて VLP ワクチンの免疫原性と有効性を評価した結果、IgG と IgA からなる液性免疫を誘導可能な免疫原性を有することを明らかにした。さらに、ノロウイルス防御免疫の主体をなすリンパ球を同定する技術開発に成功した。

[小野寺大志、三木元博（ウイルス第二部）、片山和彦（ウイルス第二部）、三好龍也（堺市衛生研究所）、小林和夫（堺市衛生研究所、客員研究員）、阿戸学、高橋宜聖]

5. ワクチンに関する基礎的研究

（1）サルエイズワクチンモデルにおける T 細胞反応の解析

新たなエイズ予防ワクチンとして、センダイウイルスベクターを用いた CTL 誘導型ワクチンが注目を浴びている。これまで、このワクチン接種アカゲサルでのサル免疫不全ウイルス（SIV）感染前後における SIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞反応についての解析から、SIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞のうち CD107a 陰性画分はその多くが SIV 感染標的として死滅する一方、CD107a 誘導画分は感染抵抗性を示すことを見出した。そこでさらに多機能性について解析を進めたところ、CD107a 誘導画分の多機能性はワクチン誘導後（SIV 感染前）と比較して低下していた。このことから、CD107a 誘導画分は SIV 感染を契機にセントラルメモリー型からエフェクターメモリー型へ分化成熟した可能性が示唆された。

[寺原和孝、横田恭子（客員研究員）、俣野哲朗（エイズ研究センター）]

（2）エイズ予防ワクチンの腸管粘膜免疫誘導に関する解析

これまで、サル腸管粘膜固有層から単核球を分取するにあたりコラゲナーゼを主体とした細胞分散法（従来法）を確立したが、新たに gentleMACS（Miltenyi）法について検討した。その結果、分取された細胞の生存性は従来法と gentleMACS 法で同等であるものの、細胞数は gentleMACS 法の方が 2-5 倍多かった。さらに、PMA/ionomycin 刺激下での T 細胞における IFN- γ /IL-17A 産生について解析した結果、gentleMACS 法の方が高い反応性を示した。以上の結果から、腸管粘膜 T 細胞の免疫誘導・応答を解析するにあたり、gentleMACS 法による細胞分取が有用であることが強く示唆された。

[寺原和孝、石井 洋（エイズ研究センター）、俣野哲朗（エイズ研究センター）]

（3）インフルエンザ・ワクチン免疫に応答する抗体レパトリーの網羅的解析

我々が新規に開発した次世代シーケンサ（NGS）により抗体レパトアを網羅的に解析する技術をもちいて、インフルエンザ・ワクチンの免疫によって惹起される抗体群を網羅的に解析した。鶏卵製造ワクチンと培養細胞製造ワクチンの免疫によって誘導される抗体群は、それぞれのワクチン免疫で共通に誘導されるレパトアとそれぞれのワクチン特異的に誘導されるレパトアが明瞭に区別された。それらの特徴的なレパトアに分類される抗体を遺伝子合成して発現させ、ワクチン成分との反応性を検討することにより、製造法の異なるワクチンの免疫賦与能の差を解析している。本方法を用いて、ワクチンやワク

チン製造株の特性に応じた性能を評価する品質管理試験を確立すれば、ワクチンが一定の品質で供給され国民の健康や医療費の抑制などに貢献できる。[大西和夫、孫琳、河野直子（インフルエンザウイルス研究センター）、板村繁之（インフルエンザウイルス研究センター）]

（4）ワクチン起因性の自己免疫反応回避に向けた評価系構築に関する研究

ワクチン接種や病原体感染が自己免疫疾患発症の起因の一つとなり得ることが示唆されているが、ここに関わる自己反応性リンパ球の免疫寛容破綻機構に関してはほとんど明らかになっていない。このメカニズムを明らかにし、そこに関わる基底因子の評価系を構築することは、より安全なワクチンを提供する上で必須の課題である。近年の知見から自己免疫疾患発症には自己反応性 B 細胞の記憶化が関与している事が示唆されているが、その動態を追跡するシステムは皆無であった。我々は自己抗原として知られている SmD1, hnRNP をベースとした蛍光プローブを作出し、生体内における自己反応性記憶型 B 細胞の動態を追跡する事に成功した。また、この技術を応用し、SLE モデルマウスにおける自己反応性記憶型 B 細胞の蓄積と疾患発症との相関を解析した結果、疾患発症には自己反応性 B 細胞の記憶化ではなく、抗体産生細胞への分化過程における制御機構の破綻が大きく関わっている可能性を明らかにした。[小野寺大志、鏗田武志（東京医科歯科大学）、阿戸学、高橋宜聖]

6. Respiratory syncytial virus (RSV) 感染症における免疫応答に関する研究

（1）ホルマリン固定 RSV(formalin-inactivated RSV: FI-RSV) ワクチン接種に伴う病態増悪 (vaccine enhanced-disease: VED) モデルの作製

現在 RSV ワクチンは存在しない。1969 年に臨床試験が行われたが、FI-RSV ワクチンを接種した乳幼児がその後 RSV に自然感染すると、かえって病態を悪化させた。それ以来安全かつ効果的なワクチンの開発には至っていない。そこで、この病態悪化機構を解明するために、FI-RSV VED マウスモデルの作製を試みた。FI-RSV をアラムと共に皮下投与することで免疫し、その後 RSV を感染させた。感染 4 日、8 日後に免疫学的解析を行ったところ、気道抵抗性 (AHR) の亢進、2 型ヘルパー T (Th2) サイトカインである interleukin (IL)-4、IL-5、IL-13 産生の促進が認められた。またそれに伴う血中 IgE 濃度の上昇や好酸球浸潤の増大、粘液産生細胞増生といったアレルギー性気道炎症の症状がみられ、FI-RSV VED モデルの作製に成功したことが確認された。

[柴田岳彦、阿戸 学]

（2）Growth arrest-specific gene 6 (Gas6)/Axl シグナルの FI-RSV VED への関与

これまで我々は、アポトーシス細胞の貪食や細胞増殖に関与する Gas6/Axl シグナルが、免疫応答の

制御においても重要な役割を果たすことを示した。その新規役割の一つとして、Gas6/Axl シグナルは Th2 免疫応答を増強し、真菌誘導アレルギー性気道炎症を促進することを明らかにした。すなわち、Gas6/Axl シグナルが FI-RSV VED の誘導にも関与することが予想された。実際、FI-RSV VED モデルのマウス肺では未処理マウスと比較して高濃度の Gas6 が検出された。さらに、FI-RSV により免疫されたマウスからリンパ節細胞を調製し、RSV により再刺激したところ、多量の Gas6 が産生された。Gas6 は樹状細胞に RSV を感染させたとき、あるいは FI-RSV 処理でも同様に産生が誘導された。以上の結果より、樹状細胞の Gas6/Axl シグナルが FI-RSV VED の誘導に関与する可能性が示唆された。

[柴田岳彦、阿戸 学]

(3) 抗 Axl 抗体投与による FI-RSV VED への影響

Gas6/Axl シグナルが FI-RSV VED の誘導に関与するか検証するため、FI-RSV 免疫時に抗 Axl 抗体を投与し、そのシグナルを阻害したときの応答を解析した。結果、抗 Axl 抗体投与により FI-RSV VED モデルにおける AHR や Th2 サイトカイン産生の亢進、粘液細胞過形成が対照群と比較して有意に抑制された。一方、抗 Axl 抗体投与は、interferon- γ 産生を促進し、RSV fusion タンパク質特異的 IgG2a 産生を促進した。なお、FI-RSV 処理した樹状細胞は、Th0 細胞を Th1 細胞に分化させる IL-12 の産生を誘導しなかったが、抗 Axl 抗体処理した樹状細胞を FI-RSV で処理すると、IL-12 産生が誘導された。この結果は、抗 Axl 抗体投与による Th2 から Th1 免疫へのシフト機構を説明する一つとなる。以上の結果より、Gas6/Axl は RSV 感染に伴う免疫応答制御機構において非常に重要な役割を担い、それを標的としたさらなる研究は RSV ワクチンの開発へとつながることが期待される。

[柴田岳彦、阿戸 学]

(4) RSV による Gas6 産生誘導機構と Th1 免疫応答抑制機構の解明

RSV の glycoprotein(G protein)により Th2 免疫応答が誘導されることはよく知られているが、これまでその機構は不明であった。我々は、リコンビナント RSV G protein の添加により、樹状細胞から Gas6 が産生されることを発見した。一方、RSV の fusion(F)protein は toll-like receptor 4 からのシグナルを惹起することが知られているが、樹状細胞へのその添加は、ナイーブ T 細胞から Th1 細胞に分化させる IL-12 の産生を誘導することを見出した。一方、F protein により誘導された IL-12 は、G protein の添加により有意に抑制された。また、RSV や FI-RSV 処理ではほとんど IL-12 産生が誘導されなかったが、あらかじめ樹状細胞を抗 Axl 抗体で処理すると、IL-12 産生の増大がみられた。すなわち、RSV G protein により Gas6 が誘導され、Gas6 は Axl を介して F protein により誘導される IL-12 産生を抑制し、免疫応答を Th1 から Th2 にシフトさせることが示唆

された。以上の結果より、FI-RSV VED における Th2 免疫応答誘導機構の一部が解明され、現在世界的に進められている G protein を除いた F protein ワクチン開発にさらに意味をもたせることとなった。

[柴田岳彦、阿戸 学]

II. 細菌感染症

1. 抗酸菌感染症に関する研究

(1) 非結核性抗酸菌に特異的な糖脂質 GPL の役割
抗酸菌は菌体表面に厚い脂質の層を持ち、増殖に伴って表面を広がる sliding 能を示す。作成した sliding 能欠損変異株では細胞における菌の取り込みが減少し、変異株の一つでは非結核性抗酸菌に特異的な糖脂質の GPL が欠落していた。これまで GPL は環境中での生存に重要であると言われていたが、同様に感染の際は細胞へのアプローチに貢献していると推察される。

[岡部真裕子、大原直也(岡山大学大学院医歯薬総合研究科、客員研究員)、藤原永年・中 崇(大阪市立大学大学院医学研究科)、阿戸 学、小林和夫(堺市衛生研究所、客員研究員)]

(2) 菌体外構造物の電子顕微鏡による観察

電子顕微鏡を用いて抗酸菌 *M. smegmatis* の観察を行なったところ、菌体表面に繊維状の構造物が発現しているのが観察された。これらは栄養過多な培養条件において多数確認され、形態から pili と推察される。結核菌では細胞への接着に関与する pili の報告があるが、pili 様構造物は GPL 欠損株では見られなかったことから、sliding や細胞との相互作用に関与している可能性がある。

[岡部真裕子、川本晃大・難波啓一(大阪大学大学院生命機能研究科)、大原直也(岡山大学大学院医歯薬総合研究科、客員研究員)、小林和夫(堺市衛生研究所、客員研究員)、阿戸 学]

(3) 非結核性抗酸菌症罹患率調査

非結核性抗酸菌症の罹患率の増加が懸念されており、平成 26 年度に我々が行った臨床機関へのアンケート調査により、非結核性抗酸菌症の罹患率は推定 14.7 人/10 万人と同時期に報告された結核よりも多いということが明らかになった。平成 27 年度は、主要検査センター3 社にデータセットの抽出を依頼し、抗酸菌症診断例の性年齢分布、地域差、菌種分布および感受性検査データを直接解析した。期間有病率は 9.01/10 万と、死亡統計からの推定値と比較して低値であった。この原因として、院内検査室を持たない小規模医療機関が本調査の主な対象となり、大規模専門病院でのデータが含まれないバイアスが考えられた。菌の地域別構成や性・年齢分布はアンケートによる調査とほぼ一致し、全国の本疾患状況が別の視点からも確認できた。

[阿戸 学、森本耕三(複十字病院)、南宮 湖、長谷川直樹(慶應大学呼吸器内科)、倉島篤行、星野仁彦(ハンセン病研究所)、御手洗聡(結核研究所)]

2. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症に関する研究

(1) 劇症型溶連菌感染症における新規未熟骨髄系細胞の役割

A群レンサ球菌 (Group A *Streptococcus*: GAS) は、通常、上気道粘膜もしくは皮膚表面で局所感染を引き起こすが、劇症型溶血性レンサ球菌感染症では急激なショックと菌血症を伴う致死的全身感染となる。劇症型感染臨床分離株において遺伝子発現パターンに変化が認められる一方、発症には宿主要因の関与が示唆されている。しかし、劇症型溶血性レンサ球菌感染発症と病態に対する炎症メディエーターの関与は不明な点が多い。我々は劇症型レンサ球菌感染マウスモデルにおいて、宿主防御的に働く新規インターフェロン γ (IFN- γ) およびインターロイキン6 (IL-6) 産生未熟骨髄系細胞 (Immature myeloid cells: IMCs) を発見した。さらに、IFN- γ 欠損マウスおよびIL-6欠損マウスを用いた半致死感染モデルにおいて、野生型マウス由来のIMCsに類似した細胞群 (IMC-like cells) を同定した。野生型IMCsを養子細胞移植したマウスにおいては劇症型感染に抵抗性を示したが、IFN- γ 欠損IMC-like cellsあるいはIL-6欠損IMC-like cellsを養子細胞移植したマウスにおいては劇症型感染に抵抗性を示さなかった。また、野生型IMCsと比べ、IFN- γ 欠損IMC-like cellsおよびIL-6欠損IMC-like cellsはGASに対する初期応答に異常があることが示された。IFN- γ およびIL-6の欠損がIMCsの初期応答に影響することから、これらのサイトカインは細胞の活性化あるいは分化に寄与することが示唆された。また、このことは野生型マウスに比べ、IFN- γ 欠損マウスおよびIL-6欠損マウスはGASに抵抗性がない一つの理由であると考えられた。

[松村隆之、池辺忠義・大西真 (細菌第一部)、阿戸学]

3. 類鼻疽の宿主防御に関する研究

(1) 類鼻疽感染好中球における新規殺菌機構の解析

類鼻疽は類鼻疽菌 *Burkholderia pseudomallei* の細胞内寄生によって起こる重篤で治療困難な感染症 (感染症法4類感染症) である。好中球が防御因子であることが知られているが、その防御メカニズムは不明であった。我々は、好中球食胞に取り込まれた類鼻疽菌が、細胞質内へ脱出することなく、LC3陽性オートファゴソームが食胞近傍に形成され菌を含む食胞と融合して、殺菌するという事を明らかにした。また、このオートファゴソーム形成誘導は、類鼻疽菌の持つIII型分泌装置に依存していた。以上、好中球の新規オートファゴソーム関連殺菌機構を発見した。

[Darawan Rinchai, Donporn Ripaya, 小川道永 (細菌第一部)、谷田以誠 (細胞科学部)、Ganjana Lertmemongkolchai (Khon Kaen 大学医療学部、タイ王国)、阿戸学]

III. 免疫機能に関する研究

1. 次世代シーケンサを用いて予測された有用抗体

を人工合成して発現する技術の開発

ワクチン抗原に対する免疫応答において重要な役割を果たす抗体を検出するために次世代シーケンサ

(NGS) を用いた網羅的な抗体H鎖(IgH)解析を行っている。検出された重要な抗体遺伝子を合成して分子発現する系を確立するために、IgHの抗原特異性に影響せずに幅広いIgHレパートリーと適合するユニバーサルIgLの作製を進めている。抗体産生B細胞の分化初期に発現する代替L鎖は理論的に任意のIgH鎖と組み合わせることができる。この性質を利用していわゆる「ユニバーサルIgL」のモデルを複数作製して性能評価を行っている。有用な抗体の人工合成技術が確立すれば、感染症に対する免疫応答に重要な役割を持つ抗体の利用に新しい方法論を与えることになる。[大西和夫、孫琳、薛漢兵、野口保 (東京薬科大学)、藤本浩文 (品質管理保証室)、藤博幸 (産業技術総合研究所)、傅舟一 (筑波大学大学院生命環境科学)、Lill Martensson (バブラハム研究所、英国)、Fritz Melchers (マックス・プランク感染生物学研究所、ドイツ連邦共和国)]

IV. 生物毒素および抗毒素治療に関する研究

1. セアカゴケグモ抗毒素の力価試験、品質管理試験

セアカゴケグモ咬傷は、咬傷部の疼痛が主な症状であるが、その後の疼痛増強や全身に多彩な症状が認められることがある。治療は、対症療法とウマ抗毒素の投与であるが、我が国では抗毒素が薬事承認されていないので、製造元であるオーストラリアCSL社から医師の個人輸入により、抗毒素の保管・投与が行われているのが実情である。しかし、国内への抗毒素輸入が必ずしも確実でないことから、国産抗毒素を製造し、その有効性を確認することになった。セアカゴケグモ抗毒素の製造に関しては、CSL社からは製造法が供与されなかったために、公表された文献情報から免疫計画や品質管理試験を計画することになった。昨年のウサギでの試験的な免疫試験結果を参考にして、1956、1961年に発表された論文を参照した無処置毒素とリン酸アルミニウムアジュバントの組み合わせと化血研で行われていた免疫方法を参考にして、複数の免疫法を施行し、力価の高いサンプルを採用して製剤化を行うという方針を採用した。その結果、トキシド増量追加免疫法で最も高い中和抗体価が測定された。また、免疫終了後部分採血を行った場合、急速に血漿中抗体価が低下することが明らかになった。結果として、製剤化によっても十分な収量と力価が期待できる血漿を原材料としてセアカゴケグモ抗毒素の製品化が実施され、必要とされる力価を維持し、かつ安定な抗毒素小分け製品が確保された。

[松村隆之、山本明彦 (細菌第二部)、阿戸学]

品質管理に関する業務

I. 国家検定

乾燥まむしウマ抗毒素1ロットの書類審査を行った。
[松村隆之、阿戸学]

II. 標準品交付

標準はぶ抗毒素 (抗致死、抗出血 I 及び抗出血 II)、まむし抗毒素 (抗致死、抗出血) を配布した。

[松村隆之、岡部真裕子、阿戸 学]

III. 体外診断薬委員会業務

承認前検査担当項目として、承認申請のあった A 型肝炎ウイルス (HAV) 抗体測定用キットについて感度、特異性及び再現性試験を標準血清パネルを用いて行うことになっている。また、この検査に必要な HAV 抗体国内血清パネルの整備を行う。また体外診断薬委員会に提出された各種体外診断薬の承認前検査申請について審査を行う。

[高橋宜聖、阿戸 学]

I. A 型肝炎ウイルス (HAV) 検体パネルの整備

HAV 感染予防対策の基礎となる感染診断法のうち最も多用されるのは IgM 型および IgG 型 HAV 抗体検出キットで、A 型肝炎診断補助検査全体の 95% 以上を占める。これらのキットは数年ごとに感度・特異性の向上が図られ、新しいバージョンが開発されている。そのため、新しい HAV 抗体検出キットを継続的に性能評価することが必要とされ、免疫部ではその性能評価の基礎となる感染症検体パネル (IgM、IgG 型 HAV 抗体パネル) の整備を進めている。平成 27 年度は、日本赤十字社の協力をえて新規に血漿検体を収集するとともに、これまで収集した検体パネルの再評価を行った結果、IgG 型 HAV 抗体陽性血漿、陰性血漿ともに 60 以上の検体からなる IgG 型 HAV 抗体陽性、陰性パネルを整備することができた。また、国立病院機構の協力を得て、急性 HAV 発生時に IgM 抗体陽性国内検体を収集するシステムの構築を行った。

[高橋宜聖、正木尚彦 (国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター)、八橋弘 (国立病院機構長崎医療センター)、阿戸学]

国際協力関係業務

I. 台湾 CDC-抗酸菌センターおよび国立台湾大学医学院附設医院内科と肺 MAC 感染症の血清診断について台湾においても本診断法が有用であることが示された。[阿戸 学、周 如文 (台湾行政院衛生署疾病管制局)、北田清悟・前倉亮治 (国立病院機構刀根山病院)]

II. Khon Kaen 大学 (タイ王国) と細菌感染症 (特に、類鼻疽) の免疫応答について共同研究を推進し、Khon Kaen 大学の博士課程 (後期) 大学院生 1 名を研究生として受け入れ、実験手技と共同研究の指導にあたった。[高橋宜聖、阿戸 学]

研修業務

I. 医師卒後臨床研修

医師卒後研修として「結核など抗酸菌感染症」に関し、10 月 26 日、講義した [阿戸 学]

II. 大学など教育機関における講義や研修

大阪市立大学医学部 (4 月 15 日)、新潟大学医学部、理学部 (5 月 15 日)、慶応大学医学部 (5 月 21 日)、知の市場：感染症総合管理 1b、9 月 1 日)、東京大学大学院農学研究科 (11 月 13 日)、岡山大学大学院医歯薬総合研究科 (2 月 16 日)、山口大学共同獣医学部 (2 月 17 日) などで招請講義した。[阿戸 学]

筑波大学生命環境学群 (5 月 11 日、18 日)、筑波大学大学院生命科学研究科 (11 月 5 日) で講義を行った。

[大西和夫]

共同利用機器管理

所内・所外の利用者による機器の利用を円滑にするため、機器の使用に関する予約と使用記録を管理・保存した。さらに、機器の定期的な保守、点検を行い、故障等のトラブルには早急に対処した。とくに新規使用者や、特殊な操作法を希望する使用者に関しては、個別に技術指導を行った。平成 27 年度の使用実績は、1023 回、2680 時間であった。

[泉山枝里子 (非常勤職員)、高橋宜聖、阿戸学]

広報委員会 (広報運営委員会) において、所の広報活動全般 (見学研修、Info 対応、所内行事記録、「知の市場」の連絡・会場設営、一般公開等) の企画・運営に参画した。[大西和夫]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Mitsuki Y-y, Yamamoto T, Mizukoshi F, Momota M, Terahara K, Yoshimura K, Harada S, Tsunetsugu-Yokota Y. 2016. A novel dual luciferase assay for the simultaneous monitoring of HIV infection and cell viability. *J. Virol. Methods*. 231: 25-33.
- 2) Li, Y., Takahashi, Y., Fujii, S., Zhou, Y., Hong, R., Suzuki, A., Tsubata, T., Hase, K., Wang, J.-Y. 2016 EAF2 mediates germinal center B cell apoptosis to suppress excessive immune responses and prevents autoimmunity. *Nat. Commun.* 7, 10836.
- 3) Terahara K, Ishige M, Ikeno S, Okada S, Kobayashi-Ishihara M, Ato M, Tsunetsugu-Yokota Y. 2015. Humanized mice dually challenged with R5 and X4 HIV-1 show preferential R5 viremia and restricted X4 infection of CCR5⁺CD4⁺ T cells. *Microbes Infect.* 17: 378-386.
- 4) Tada, T., Zhang, Y., Koyama, T., Tobiume, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yamaoka, S., Fujita, H., Tokunaga, K. 2015. March8 inhibits HIV-1 infection by reducing virion incorporation of envelope glycoproteins. *Nat. Med.*, 21:1502-1507.
- 5) Hagiwara, K., Ishii, H., Murakami, T., Takeshima, S., Chutiwitoonchai, N., Kondoh, Y., Honda, K., Osada, H., Tsunetsugu-Yokota, Y., Suzuki, M., Aida, Y. 2015. Synthesis of Vpr-binding derivative as a novel HIV-1 inhibitor: Vpr is potential target for development of antiviral agent. *PLoS One* 10(12):1-15.
- 6) Matsuda Y, Kobayashi-Ishihara M, Fujikawa D, Ishida T, Watanabe T, Yamagishi M. 2015. Epigenetic heterogeneity in HIV-1 latency establishment. *Scientific Reports* 5:7701.
- 7) Varney, M.E., M. Niederkorn, H. Konno, T. Matsumura, J. Gohda, N. Yoshida, T. Akiyama, S.

- Christie, J. Fang, D. Miller, A. Jerez, A. Karsan, J.P. Maciejewski, R.A. Meetei, J. Inoue, and D.T. Starczynowski. 2015. Loss of Tifab, a del(5q) MDS gene, alters hematopoiesis through derepression of Toll-like receptor-TRAF6 signaling. *J Exp Med.* 212(11):1967-1985.
- 8) Adachi, Y., Onodera, T., Yamada, Y., Daio, R., Tsuiji, M., Inoue, T., Kobayashi, K., Kurosaki, T., Ato, M., Takahashi, Y. 2015 Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape. *J. Exp. Med.*, 212, 1709-1723.
 - 9) Sato M, Sasaki N, Ato M, Hirakawa S, Sato K, Sato K. Microcirculation-on-a-chip: a microfluidic platform for assaying blood- and lymphatic-vessel permeability. *PLoS One.* 2015 Sep 2;10(9):e0137301. doi: 10.1371/journal.pone.0137301.
 - 10) Buddhisa S, Rinchai D, Ato M, Bancroft G, Lertmemongkolchai G. Programmed Death-Ligand 1 on *Burkholderia pseudomallei* infected human polymorphonuclear neutrophils impairs T cell functions. *J Immunol.* 2015 May 1;194(9):4413-21. doi: 10.4049/jimmunol.1402417.
 - 11) Rinchai D, Riyapa D, Buddhisa S, Utispan K, Titball RW, Stevens MP, Stevens JM, Ogawa M, Tanida I, Koike M, Uchiyama Y, Ato M*, Lertmemongkolchai G*. Macroautophagy is essential for killing of intracellular *Burkholderia pseudomallei* in human neutrophils. *Autophagy.* 2015 May 4;11(5) 748-755. doi: 10.1080/15548627.2015.1040969.
 - 12) Hifumi T, Sakai A, Kondo Y, Yamamoto A, Morine N, Ato M, Shibayama K, Umezawa K, Kiriu N, Kato H, Koido Y, Inoue J, Kawakita K, Kuroda Y. Venomous snake bites: clinical diagnosis and treatment. *J Intensive Care.* 2015 Apr 1;3(1):16. doi: 10.1186/s40560-015-0081-8. eCollection 2015. Review.
 - 13) Hifumi T, Taki H, Yamamoto A, Ato M, Koido Y, Kuroda Y. Update of antivenom supply for redback spider bites in Japan. *J Intensive Care.* 2015 Feb 11;3(1):7. doi: 10.1186/s40560-014-0070-3. eCollection 2015.
 - 14) Funakoshi S, Shimizu T, Numata O, Ato M, Melchers F, Ohnishi K. BILL-1 cadherin/cadherin-17 contributes to the survival of memory B cells *PLoS One.* 2015 Jan 22;10(1):e0117566. doi: 10.1371/journal.pone.0117566. eCollection 2015.
2. 和文発表
 - 1) 阿戸 学, 池辺忠義. A 郡溶血性レンサ球菌の細菌学的特徴 こどもの感染症 3(2). 74-8. 2015
 - 2) 松村隆之, 阿戸 学. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症における宿主免疫応答 ファルマシア 51(8) 760-64. 2015
 - 3) 阿戸 学 重症・劇症型感染症の診断と治療 劇症型溶血性レンサ球菌感染症. 感染症 45(2) 77-83,73-76. 2015.
 - 4) 高橋宜聖, 安達悠 細胞工学 ウイルス抗原変異に対抗する新しい防御抗体 516-520、第 34 巻・第 5 号、2015
 - 5) 小野寺大志. 2015. スパイク内部の gp120 を抗体の両手の間隔を調整して架橋し、HIV の抗体回避を克服. 細胞工学、秀潤社、p407、vol.34 No.4.
 - 6) 小野寺大志. 2015. IL-3 は急性炎症応答を増強する:敗血症のあらたな治療ターゲット. 細胞工学、秀潤社、p507、vol.34 No.5.
 - 7) 小野寺大志. 2015 ミトコンドリア DNA ストレスは抗ウイルス自然免疫応答を刺激する. 細胞工学、秀潤社、p594、vol.34 No.6.
 - 8) 小野寺大志. 2015. 同種異型 IgG 抗体により活性化される樹状細胞は抗腫瘍 T 細胞免疫を誘導する. 細胞工学、秀潤社、p687、vol.34 No.7.
 - 9) 小野寺大志. 2015. 全身性エリテマトーデスにおける自己抗体産生細胞の多様性と細胞起源の同定. 細胞工学、秀潤社、p795、vol.34 No.8.
 - 10) 小野寺大志. 2015. Th17 細胞は炎症反応の収束過程において制御性 T 細胞へ分化転換する. 細胞工学、秀潤社、p890、vol.34 No.9.
 - 11) 小野寺大志. 2015. 腸内共生細菌は ROR γ 陽性制御性 T 細胞を誘導する. 細胞工学、秀潤社、p981、vol.34 No.10.
 - 12) 小野寺大志. 2015. 好中球の老化は腸内細菌叢によって調整される. 細胞工学、秀潤社、p1074、vol.34 No.11.
 - 13) 小野寺大志. 2016. 組織局在性自然リンパ球の供給・維持過程の解明. 細胞工学、秀潤社、p56、vol.35 No.1.
 - 14) 小野寺大志. 2016. ポリシアル酸化によるケモカイン認識制御が樹状細胞の遊走をコントロールする. 細胞工学、秀潤社、p228、vol.35 No.3.
- ## II. 学会発表
1. 国際学会.
 - 1) Naoya Ohara, Mayuko Okabe, Chie Nakajima, Manabu Ato, Masaaki Nakayama, Tetsuyoshi Inoue, Yoshihiko Suzuki and Kazuo Kobayashi, Effect of Para-Aminosalicylic Acid (PAS) on the Growth of PAS Resistant Mycobacteria. US-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan 平成 28 年 1 月、米国
 - 2) M.ATO, Immunogenocotu assessment influenza vaccines by humanized mouse system. 9th Annual Vaccin Renaissance Conference 平成 27 年 11 月、米国
 - 3) K. Morimoto, N. Hasegawa, K. Izumi, H. Namkoong, K. Uchimura, Y. Hoshino, A. Kurashima, J. Sokunaga, S. Shibuya, M. Shimojima, M. Ato, S. Mitarai. Laboratory Based Survey for Pulmonary Non-Tuberculous Mycobacteriosis in Japan: 2012-2013. American Thoracic Society 2015 International Conference,

平成 27 年 5 月、米国

2. 国内学会

- 1) 松村隆之, 池辺忠義, 大西 真, 阿戸学. 2016. Immature myeloid cells are the producers of host protective factors in severe invasive group A streptococcal infections. 第 89 回細菌学会総会(大阪、3 月)
- 2) 阿戸学, 松村隆之, 本田尚子, 黒田誠, 大原直也, 小林和夫. 2016. ストレプトマイシン依存性結核菌 18b を用いた潜在性結核研究. 第 89 回細菌学会総会(大阪、3 月)
- 3) 小林一石原美栄, 寺原和孝, 池野翔太, 阿戸学, 横田一恒次恭子. 2015. アンチセンス鎖を介した HIV-1 潜伏化制御について 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸、12 月)
- 4) Adachi, Y., Onodera, T., Ato, M., Takahashi, Y. Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape. 第 44 回日本免疫学会総会 (札幌 11 月)
- 5) Shibata T. and Ato M. The role of Gas6/Axl signaling during formalin-inactivated RSV vaccine enhanced disease in mice. 2015. 第 44 回日本免疫学会総会 (札幌 11 月)
- 6) 松村隆之, 阿戸学. 2015. Immature myeloid cells are the producers of host protective factors in severe invasive group A streptococcal infections. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会(札幌、11 月)
- 7) SUN Lin, KONO Naoko, SHIMIZU Takeyuki, OHNISHI Kazuo. 2015. Search for a Universal-IgL that is able to associate with wide range of IgH species and the optimization of NGS-predicted antibody synthesis. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Sapporo, November 18-20, 2015.
- 8) KONO Naoko, XUE Hanbing, SUN Lin, SHIMIZU Takeyuki, OHNISHI Kazuo. 2015. Deep Sequence Landscape of Antibody Repertoire and its Antigen Responding Dynamics of Individual Mice Analyzed by Next Generation Sequencer (NGS). Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Sapporo, November 18-20, 2015.
- 9) 高橋宜聖 B 細胞の分化・活性化と液性免疫記憶 Overview Talk 第 44 回日本免疫学会総会シンポジウム (札幌 11 月)
- 10) Wada, Y., Okada, S., Ato, M., Takahashi, Y. Low immunogenicity of influenza H7N9 vaccines as revealed by hu-SCID mouse system. 第 44 回日本免疫学会総会 (札幌 11 月)
- 11) Miyauchi, K., Sugimoto-Ishige, A., Takahashi, Y., Hasegawa, H., Takemori, T., Kubo, M. Germinal centers and follicular helper T cells are dispensable for a protective antibody response to acute influenza A virus infection. 第 44 回日本免疫学会総会 (札幌 11 月)
- 12) Adachi, T., Yoshikawa, S., Karasuyama, H., Onodera, T., Takahashi, Y., Kikuta, J., Ishii, M., Tedder, T. Intravital imaging of Ca²⁺ signals in lymphocytes of the Ca²⁺ biosensor YC3.60 transgenic mice. 第 44 回日本免疫学会総会 (札幌 11 月)
- 13) Onodera, T., Adachi, T., Tsubata, T., Ato, M., Takahashi, Y. Visualization of anti-nuclear Ab producing B cells by flow-cytometry in a SLE mouse model. 第 44 回日本免疫学会総会(札幌 11 月)

知的財産権の出願・登録状況

なし