

ことができるスーパー樹状細胞の作製が不可欠であると考えられた。

以前我々の行った報告で T-bet 遺伝子は IFN- γ 遺伝子に対する強いプロモーター活性を有していることを示したが、T-bet 遺伝子を導入した樹状細胞はスーパー樹状細胞として有用である可能性が考えられた。我々は T-bet 遺伝子を導入したセンダイウイルスベクターを開発し、マウス樹状細胞への導入を今回検討してみた。マウスの骨髄細胞へ直接 SeV-GFP を導入すると導入効率は 30 ~ 40%であったが、培養時の T 細胞や異種蛋白の除去により 50 ~ 80%まで導入効率を上げることが期待できるため、効率の良い導入方法の確立をさらに検討する予定である。

E. 結論

結核菌抗原感作 DC 投与により細胞性免疫が誘導され抗酸菌易感染性患者あるいは多剤耐性結核菌患者など難治性結核患者に対するワクチン療法として利用できる可能性が示唆された。また T-bet 遺伝子を導入した DC による細胞性遺伝子療法の試みは技術的に十分可能であり、今後結核感染マウスモデルにおいてその有用性を検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto J, Ihara K, Nakayama H, Hikino S, Satoh K, Kubo N, Iida T, Fujii Y, Hara T: Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: organs-specific distribution and variable induction patterns in

mononuclear cells. *Life Sciences* 2004 74(8) 1039-49

2. Takada H, Kanegane H, Nomura A, Yamamoto K, Ihara K, Takahashi Y, Tsukada S, Miyawaki T, Hara T: Female agammaglobulinemia due to Bruton's tyrosine kinase deficiency caused by extremely skewed X chromosome inactivation. *Blood*. 2004 (in press)

3. Kusahara K, Nomura A, Nakao F, Hara T: Tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome with a novel mutation in the TNFRSF1A gene in a Japanese family. *Eur J Pediatr* 2004 163(1) 30-2.

4. Ohga S, Takada H, Nomura A, Hara T: Lymphoproliferative Disease in Childhood: Clinical and biological role of cytokines. *Research Advances in Blood*" by GLOBAL RESEARCH NETWORK, 2004 (in press)

5. Suminoe A, Matsuzaki A, Hattori H, Koga Y, Kinukawa N, Ishii E, Hara T: mRNA Expression of Apoptosis-Associated Genes in Infant Acute Lymphoblastic Leukemia: Low Fas Expression is an Independent Predictor for Poor Prognosis. *Leukemia*, 2004 18(2) 365-8

6. Bassuny WM, Ihara K, Kimura J, Ichikawa S, Kuromaru R, Miyako K, Kusahara K, Sasaki Y, Kohno H, Matsuura N, Nishima S, Hara T: Association study between interleukin-12 receptor beta1/beta2 genes and type 1 diabetes or asthma in the Japanese population.

- Immunogenetics 55(3): 189-192, 2003
7. Jin C, Kusuhara K, Yonemitsu Y, Nomura A, Okano S, Takeshita H, Hasegawa M, Sueishi K, Hara T: Recombinant Sendai virus provides a highly efficient gene transfer into human cord blood-derived hematopoietic stem cells. *Gene Therapy* 10: 272-277, 2003.
 8. Torisu H, Kusuhara K, Kira R, Bassuny WM, Sakai Y, Sanefuji M, Takemoto M, Hara T: Functional MxA promoter polymorphism associated with subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *Neurology*. 62(3):457-60, 2004.
 9. Takahata Y, Takada H, Nomura A, Nakayama H, Ohshima K, Hara T: Detection of interferon- γ -inducible chemokines in human milk. *Acta Paediatr*. 92:659-665, 2003
 10. Mizuno Y, Takada H, Nomura A, Jin CH, Hattori H, Ihara K, Aoki T, Eguchi K, Hara T: Th1 and Th1-inducing cytokines in Salmonella infection. *Clin Exp Immunol*. 131:111-117, 2003
 11. Ohga S, Nomura A, Ihara K, Takahata Y, Akeda H, Shibata R, Okamura J, Kinukawa N, Hara T: Cytokine imbalance in hyper-IgE syndrome: reduced expression of transforming growth factor- β and interferon- γ genes in circulating activated T cells. *Br J Haematol* 121:324-331, 2003
 12. Takada H, Takahata Y, Nomura A, Ohga S, Mizuno Y, Hara T: Increased serum levels of interferon- γ -inducible protein 10 and monokine induced by gamma interferon in patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Clin Exp Immunol* 133:448-453, 2003
 13. Ohga S, Nomura A, Takada H, Kato J, Ideguchi H, Hattori Y, Suda M, Suita S, Hara T: Dominant β -thalassemia with Hb Hradec Kralove: enhanced hemolysis in the spleen. *Int J Hematol* 2003 78(4) 329-34
 14. Ishizaki Y, Tezuka J, Ohga S, Nomura N, Suga N, Kuromaru R, Kusuhara K, Mizuno Y, Kasuga N, Hara T: Quantification of circulating varicella zoster virus-DNA for the early diagnosis of visceral varicella. *J Infect* 47:133-138, 2003
 15. Kammezaki K, Shimoda K, Numata A, Aoki K, Kato K, Takase K, Nakajima H, Ihara K, Haro T, Ishikawa F, Imamura R, Miyamoto T, Nagafuji K, Gondo H, Hara T, Harada M: The lipocalin 24p3, which is an essential molecule in IL-3 withdrawal-induced apoptosis, is not involved in the G-CSF withdrawal-induced apoptosis. *Eur J Haematol* 71:412-417, 2003
 16. Takahata Y, Nomura A, Takada H, Ohga S, Hikino S, Nakayama H, Sakaguchi S, Hara T: Human cord blood CD25+CD4+ T cells: a novel immunoregulatory population with naive phenotype. *Exp Hematol* 2003.
 17. Furuno K, Ohno T, Masuda M, Hara T: Asthma-like Attacks Resulting from the Isolated Congenital Left

- Pulmonary Artery Agenesis with Right Main Bronchus Stenosis. *Pediatr Cardiol.* 24:507-509. 2003
18. Suminoe A, Matsuzaki A, Kira R, Fukunaga N, Nishio T, Hoshina T, Hara T: Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome in children with cancers. *J Pediatr Hematol Oncol* 25: 236-9, 2003
 19. Khajooe V, Ihara K, Kira R, Takemoto M, Torisu H, Sakai Y, Guan Jun J, Hee PM, Tokunaga K, Hara T: Founder effect of the C9 R95X mutation in Orientals. *Hum Genet* 112:244-8, 2003
 20. Khajooe V, Kariyazono H, Ohno T, Ihara K, Mizuno Y, Kusahara K, Hara T: Inducible and endothelial constitutive nitric oxide synthase gene polymorphisms in Kawasaki disease. *Pediatr Int* 2003, 45(2)130-4.
 21. Sasaki Y, Nomura A, Kusahara K, Takada H, Ahmed S, Obinata K, Hamada K, Okimoto Y, Hara T: Genetic basis of patients with Bacille Calmette-Guerin osteomyelitis in Japan: Identification of dominant partial IFN- γ R1 deficiency as a predominant type. *J Infect Dis.* 2002, 185:706-9.
 22. 原 寿郎 (分担執筆): 小児の急性脳症、ライ症候群 今日の治療指針 2004年版
 23. 原 寿郎 (分担執筆): 小児の成長小児の発達 標準小児科学 第5版 医学書院 2003年
 24. 原 寿郎、水野由美 (分担執筆): 細菌・真菌感染症 小児科学 (第9版) 文光堂 2003年
 25. 原 寿郎 (分担執筆): 高IgE症候群 総合アレルギー学 南山堂 2003年
 26. 原 寿郎 (分担執筆): 免疫疾患 小児科学・新生児学テキスト 診断と治療社 改訂第四版 2003年
 27. 原 寿郎 (分担執筆): 小児疾患 日常診療にすぐ役立つ各科常用最新処方 大道学館 2003年
 28. 原 寿郎、楠原浩一、水野由美: 分担執筆: ママからのありがたくないプレゼントー母子感染ー小児疾患のとりえかたー眼でみるベッドサイドの病態生理ー 文光堂 2003年
 29. 原 寿郎 (分担執筆): リウマチ熱 今日の治療指針 2003年版 ー私はこう治療している 医学書院
 30. 原 寿郎 (分担執筆): 先天性免疫不全症 PART V 病弱教育の視点からの医学事典 ジアース教育新社 2003年
 31. 野村明彦、高田英俊、大賀正一、水野由美、原 寿郎: $\alpha\beta$ 型T細胞レセプター欠損による複合免疫不全症 臨床免疫 40:2003
 32. 菅 尚浩、高田英俊、大賀正一、金兼弘和、宮脇利男、原 寿郎: リンパ球の活性化制御とパーフォリンー家族性血球貪食リンパ組織球症の成因ー 臨床免疫, 40:110-116, 2003
 33. 佐々木由佳、楠原浩一、原 寿郎: 細胞内寄生菌に対する易感染性を示す免疫不全症 Impaired interferon gamma-mediated immunity and susceptibility to intracellular pathogen. 小児内科 第34巻 増刊号 小児疾患診療のための病態生理 1 2004.
 34. 野村明彦、高田英俊、大賀正一、水野由美、原 寿郎: 新しくみつかった遺伝

子異常による免疫不全症 分子機能解明への意義 $\alpha\beta$ 型 T 細胞レセプター欠損による複合免疫不全症. 臨床免疫 2003, 40(1):24-28.

2. 学会発表

1. Hara T: Genetic susceptibility to pediatric infectious diseases. The 53rd Korean Pediatric Society, Oct 24-25, 2003
2. Hara T: Regulation of the immune system. The Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease, Oct 25, 2003.
3. Kariyazono H, Ohno T, Khajooe V, Ihara K, Hara T: Genetic factors in the development of coronary artery lesions in Kawasaki Disease. XIX International Congress of Genetics, Melbourne, Australia 2003.7.6-11
4. Hara T, Khajooe V, Ihara K, Kira R, Tokunaga K. Founder effect of the C9 R95X mutation in Orientals XIX International Congress of Genetics Melbourne, Australia 2003.7.6-11
5. Ohga, Nomura A, Takada H, Ohga S, Hara T: Immunological aspects of chronic active Epstein-Barr virus infection: The International Symposium on Infection and Immunity in Childhood at the 106th Annual Meeting of the Japan Pediatric Society, April 26, 2003, Fukuoka, Japan
6. Taro Nagatomo, Hidetoshi Takada, Shouichi Ohga, Akihiko Nomura, Shunji Hikino, Koichi Oshima and Toshiro Hara: cDNA Microarray Analysis of Cellular Cytokine Gene Expression in Human Milk: A Prominent Expression of Osteopontin XIX International Congress of Genetics (2003.7.6-11, Melbourne, Australia)
7. Kusuhara K, Yonemitsu Y, Sueishi K, Hara T: Gene therapy with recombinant Sendai virus. Hot Spring Harbor Symposium 2003. Dec 15-16, 2003, Fukuoka
8. Jin CH, Kusuhara K, Yonemitsu Y, Nomura A, Okano S, Takeshita H, Hasegawa M, Sueishi K, Hara T: Recombinant Sendai virus provides a highly efficient gene transfer into human cord blood-derived hematopoietic stem cells. The 6th Annual ASGT meeting, June 4-8, 2003 Washington DC
9. 原 寿郎: 会頭講演 こどもと感染—生命誕生からゲノム時代を超えて— 第 106 回日本小児科学会 2003.4.25 福岡
10. 原 寿郎: 教育講演 神経感染症の免疫遺伝学的発症要因 第 45 回日本小児神経学会 2003.5.22-24 福岡
11. 楠原浩一、吉良龍太郎、原寿郎: SSPE における宿主側遺伝要因の解析. シンポジウム「亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) 現状と展望」. 第 8 回日本神経感染症学会. 2003.10.10 宇部.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

T-bet 遺伝子多型と疾患との関連で特許申請中

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

結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究：

Toll-like receptor による結核菌（病原体）認識のシグナル伝達機構

分担研究者 竹田 潔 九州大学生体防御医学研究所 教授

研究要旨

TLR を介したシグナル伝達の分子機構を、TIR ドメインを持つアダプターに標的を絞り解析した。昨年度までに、MyD88 が全ての TLR を介した炎症性サイトカインの産生誘導に必須であることを明らかにしている。さらに、第2の TIR ドメインを持つアダプター TIRAP が TLR2, TLR4 による MyD88 を介したシグナルに特異的に関与していることを明らかにした。今年度はさらに第3のアダプター TRIF を同定し、その生理機能を、ノックアウトマウスを作製することにより解析した。TRIF ノックアウトマウスは、TLR3 刺激に対する応答性が顕著に障害されていた。さらに TLR4 刺激による IRF-3 の活性化および IFN 誘導性遺伝子の発現も顕著に障害されていた。しかし、TLR4 刺激による MyD88 依存性のシグナルの活性化は障害されていなかった。そこで、TRIF と MyD88 の両遺伝子をとまもなくしたダブルノックアウトマウスを作製したところ、TLR4 刺激によるシグナル伝達の活性化はすべて消失し、さらに IFN 誘導性遺伝子の発現も全く認められなくなった。以上の結果から、TRIF が MyD88 非依存性のシグナル伝達活性化に必須のアダプターであることが明らかになった。この成果により、TLR を介したシグナルの消失したマウスを作製することができた。今後、この TRIF/MyD88 二重欠損マウスを用いて、結核菌感染における TLR シグナルの重要性を明らかにしていきたい。

A. 研究目的

自然免疫系は、病原体の宿主内への侵入を最初に察知し、種々の炎症・免疫応答を誘導する重要な免疫系である。しかしながら、B, T 細胞が主役を演じる獲得免疫系の分子機構が詳細に解析されてきているのに対し、自然免疫系の作動メカニズムはほとんど理解されていない。最近、Toll-like receptor (TLR) ファミリーが、病原体の構成成分の認識に関与していると明らかになってきた。結核菌に対する生体防御においても、TLR ファミリーによる結核菌

の認識が重要な役割を果たす可能性が考えられる。本研究では、自然免疫系による結核などの病原体の生体内への侵入を察知するメカニズムを Toll-like receptor (TLR) を中心とした受容体の解析から明らかにし、結核感染における免疫系作動の分子機構を解明することを目的とする。

B. 研究方法

TLR を介した細胞内シグナルでは、MyD88 がすべての TLR を介した炎症反応の誘導に必須であるが、MyD88 非依存

性のシグナルの存在も明らかになっている。昨年度 MyD88 と同じ TIR ドメインを有するアダプターとして TIRAP が、TLR2, TLR4 を介した MyD88 依存性のシグナルに特異的に関与していることを明らかにした。この結果は、TIR ドメインを有するアダプター群が TLR シグナルにおいて重要な役割を担っていて、他の TIR ドメインを有するアダプターが MyD88 非依存性のシグナルに関与している可能性を示唆していた。そこで、新たな TIR ドメインを有する分子をデータベースから同定し、その生理機能をノックアウトマウスの作製により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、SPF 環境化で週に 2 回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。

C. 研究結果

今年度はさらに第 3 のアダプター TRIF を同定し、その生理機能を、ノックアウトマウスを作製することにより解析した。TRIF ノックアウトマウスは、TLR3 刺激に対する応答性が顕著に障害されていた。さらに TLR4 刺激による IRF-3 の活性化および IFN 誘導性遺伝子の発現も顕著に障害されていた。しかし、TLR4 刺激による MyD88 依存性のシグナルの活性化は障害されていなかった。そこで、TRIF と MyD88 の両遺伝子をともになくしたダブルノックアウトマウスを作製したところ、TLR4 刺激によるシグナル伝達の活性化はすべて消失し、さらに IFN 誘導性遺伝子の発現も全く認められなくなった。また、TLR4 刺激による炎症性サイトカイン産生は、MyD88 ノックアウトマウスでも、TRIF

ノックアウトマウスでも認められなくなった。

さらに、データベース検索により第 4 の TIR ドメインを有するアダプター TRAM を同定し、その生理機能を、ノックアウトマウスを作製し解析した。TRAM ノックアウトマウスでは、TLR4 刺激による IRF-3 の活性化および IFN 誘導性遺伝子の発現が TRIF ノックアウトマウスと同様に顕著に障害されていた。さらに、TLR4 刺激による炎症性サイトカインの産生も顕著に障害されていた。しかしながら、TLR3 刺激による IRF-3 の活性化および IFN 誘導性遺伝子の発現はまったく正常であった。

D. 考察

以上の結果から、TRIF が MyD88 非依存性のシグナル伝達活性化に必須のアダプターであることが明らかになった。そして、TRAM が TLR4 を介した MyD88 非依存性のシグナルに特異的に関与していることが明らかになった。また、各 TLR 刺激による炎症性サイトカインの産生は、MyD88 を介したシグナルが必須であるが、TLR4 刺激では、TRIF を介した(MyD88 を介さない)シグナルの活性化も必要であることが示唆される。MyD88/TRIF 二重欠損では、TLR シグナルがすべて消失する。このマウスを用いることにより、結核感染防御における自然免疫シグナルの重要性を明らかにできるものと考えている。

E. 結論

TLR を介した細胞内シグナル伝達経路では、TIR ドメインを有するアダプター群が重要な役割を担っていることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuwata H, Watanabe Y, Miyoshi H, Yamamoto M, Kaisho T, Takeda K, Akira S.: IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF- γ production in macrophages. *Blood* 2004 102(12) 4123-9.
2. Ikushima, H., Nishida, T., Takeda, K., Ito, T., Yasuda, T., Yano, M., Akira, S., and Matsuda, H.: Expression of Toll-like receptors 2 and 4 is down-regulated after operation. *Surgery* 2004 135(4) 376-85.
3. Matsukawa, A., Takeda, K., Kudo, S., Maeda, T., Kagayama, M., and Akira, S.: Aberrant inflammation and lethality to septic peritonitis in mice lacking Stat3 in macrophages and neutrophils. *J. Immunol.* 2004 171(11) 6198-205.
4. Joosten, L. A. B., Koenders, M. I., Smeets, R. L., Heuvelmans-Jacobs, M., Helsen, M. M. A., Takeda, K., Akira, S., Lubberts, E., van de Loo, F. A. J., and van den Berg, W. B.: Toll-like receptor 2 pathway drives Streptococcal cell wall induced joint inflammation: Critical role of MyD88. *J. Immunol.* 2004 171(11) 6145-53.
5. Sanjo, H., Takeda, K., Tsujimura, T., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., and Akira, S.: TAB2 is essential for prevention of apoptosis in fetal liver but not for IL-1 signaling. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1231-1238 (2003).
6. Prinz, M., Heikenwaelder, M., Schwarz, P., Takeda, K., Akira, S., and Aguzzi, A.: Prion pathogenesis in the absence of Toll-like receptor signaling. *EMBO Rep.* 4, 195-199 (2003).
7. Hazeki, K., Masuda, N., Funami, K., Sukenobu, N., Matsumoto, M., Akira, S., Takeda, K., Seya, T., and Hazeki, O.: Toll-like receptor-mediated tyrosine phosphorylation of paxillin via MyD88-dependent and -independent pathways. *Eur. J. Immunol.* 33, 740-747 (2003).
8. Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K., and Akira, S.: The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-PKcs in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J. Immunol.* 170, 3059-3064 (2003).
9. Schultz, M., J., Knapp, S., Florquin, S., Pater, J., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T.: Interleukin-18 impairs the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 71, 1630-1634 (2003).
10. Wheeler, R. D., Boutin, H., Touzani, O., Luheshi, G. N., Takeda, K., and Rothwell, N. J.: No role for interleukin-18 in acute murine stroke-induced brain injury. *J. Cereb. Blood Flow and Metab.* 23, 531-535 (2003).
11. Kobayashi, M., Kweon, M., Kuwata, H., Kiyono, H., Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptor-dependent IL-12p40 production causes chronic enterocolitis in

- myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 111, 1297-1308 (2003).
12. Zwijnenburg, P. J. G., van der Poll, T., Florquin, S., Akira, S., Takeda, K., Roord, J. J., and van Furth, A. M.: Interleukin-18 gene-deficient mice show enhanced defense and reduced inflammation during pneumococcal meningitis. *J. Neuroimmunol.* 138, 31-37 (2003).
 13. Yasukawa, H., Ohishi, M., Mori, H., Murakami, M., Chinen, T., Aki, D., Hanada, T., Takeda, K., Akira, S., Hoshijima, M., Hirano, T., Chien, K. R., Yoshimura, A.: IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat. Immunol.* 4, 551-556 (2003).
 14. Yokozeki, H., Wu, M. H., Sumi, K., Igawa, K., Miyazaki, Y., Katayama, I., Takeda, K., Akira, S., and Nishioka, K.: Th2 cytokines, IgE and mast cells play a crucial role in the induction of para-phenylenediamine-induced contact hypersensitivity in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 132, 385-392 (2003).
 15. Elhage, R., Jawien, J., Rudling, M., Ljunggren, H. G., Takeda, K., Akira, S., Bayard, F., and Hansson, G. K.: Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc. Res.* 59, 234-240 (2003).
 16. Yazawa, N., Fujimoto, M., Sato, S., Miyake, K., Asano, N., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S., Tedder, T. F., Tamaki, K.: CD19 regulates innate immunity by the Toll-like receptor RP105 signaling in B lymphocytes. *Blood* 102, 1374-1380 (2003).
 17. Kojima, E., Takeuchi, A., Haneda, M., Yagi, F., Hasegawa, T., Yamaki, K., Takeda, K., Akira, S., Shimokata, K., and Isobe, K.: The function of GADD34 is a recovery from a shut-off of protein synthesis induced by ER stress; elucidation by GADD34-deficient mice. *FASEB J.* 17, 1573-1575 (2003).
 18. Zhang, J. H., He, H., Borzychowski, A. M., Takeda, K., Akira, S., and Croy, B. A.: Analysis of cytokine regulators inducing interferon production by mouse uterine natural killer cells. *Biol. Reprod.* 69, 404-411 (2003).
 19. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S.: Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643 (2003).
 20. Takagi, H., Kanai, T., Okazawa, A., Kishi, Y., Sato, T., Takaishi, H., Inoue, N., Ogata, H., Iwao, Y., Hoshino, K., Takeda, K., Akira, S., Watanabe, M., Ishii, H., and Hibi, T.: Contrasting action of IL-12 and IL-18 in the development of dextran sodium sulphate colitis in mice. *Scand. J. Gastroenterol.* 38, 837-844 (2003).
 21. Shibue, T., Takeda, K., Oda, E., Tanaka, H., Murasawa, H., Takaoka, A., Morishita, Y., Akira, S., Taniguchi, T., and Tanaka, N.:

- Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev.* 17, 2233-2238 (2003).
22. Chen, F., Wang H.-W., Cuenca, A., Wang, H., Huang, M., Ghansah, T., Brayer, J., Kerr, W. G., Takeda, K., Akira, S., Schoenberger, S., Yu, H., Jove, R., and Sotomayor, E. M.: A critical role for STAT3 signaling in immune tolerance. *Immunity* 19, 425-436 (2003).
 23. Weijer, S., Sewnath, M. E., de Vos, A. F., Florquin, S., van der Sluis, K., Gouma, D. J., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T.: Interleukin-18 facilitates the early antimicrobial host response to *Escherichia coli* peritonitis. *Infect. Immun.* 71, 5488-5497 (2003).
 24. Kariyone, A., Tamura, T., Kano, H., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., and Takatsu, K.: Immunogenicity of peptide-25 of Ag85B in Th1 development: role of IFN- γ . *Int. Immunol.* 15, 1183-1194 (2003).
 25. Haga, S., Terui, K., Zhang, H. Q., Enosawa, S., Ogawa, W., Inoue, H., Okuyama, T., Takeda, K., Akira, S., Ogino, T., Irani, K., and Ozaki, M.: Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J. Clin. Invest.* 112, 989-998 (2003).
 26. Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K., and Akira, S.: Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- γ (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF- κ B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 171, 4304-4310 (2003).
 27. Shi, S., Nathan, C., Schnappinger, D., Drenkow, J., Fuortes, M., Block, E., Ding, A., Gingeras, T. R., Schoolnik, G., Akira, S., Takeda, K., and Ehrt, S.: MyD88 primes macrophages for full-scale activation by interferon- γ yet mediates few responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* 198, 987-997 (2003).
 28. Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., Wagner, H., and Bauer, S.: The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur. J. Immunol.* 33, 2987-2997 (2003).
 29. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S.: TRAM is specifically involved in the TLR4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4, 1144-1150 (2003).
 30. Sugawara I, Yamada H, Mizuno S, Takeda K, Akira S.: Mycobacterial infection in MyD88-deficient mice. *Microbiol. Immunol* 2003, 47:841-847.
 31. Takeda K, Kaisho T, Akira S.: Toll-like Receptors. *Annu Rev*

- Immunol. 2003, 21:335-76.
32. 竹田潔、審良静男、感染症と Toll-like receptor、最新医学、58(5), 123-128, 2003
 33. 竹田潔、審良静男、TLR シグナルの制御、Molecular Medicine、40 (11), 1342-1348, 2003
 34. Okuda, Y., Takahashi, I., Kim, J. -K., Ohta, N., Iwatani, K., Iijima, H., Kai, Y., Tamagawa, H., Hiroi, T., Kweon, M. -N., Kawano, S., Takeda K., Akira, S., Sasaki, Y., Hori, S., and Kiyono, H.:
Development of colitis in STAT6-deficient TCR α -/- mice: a potential role of STAT6-independent IL-4 signaling for the generation of Th2-biased pathologic CD4 + $\beta\beta$ T cells. Am. J. Pathol. 2003, 162, 263-271.
2. 学会発表
 1. Kiyoshi Takeda, Hiroataka Kuwata, Shizuo Akira. Identification of an IL-10-inducible gene that prevents LPS responses in macrophages. Keystone Symposia (The regulation of mucosal inflammation) 2003. 4. 1-6, Keystone USA
 2. Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira. Toll-like receptors: their specificity and signaling. EMBO Workshop on Pattern recognition protein and receptors. 2003. 5. 14-18, Trest, Czech Republic
 3. Kiyoshi Takeda, Masahiro Yamamoto, Shizuo Akira. Roles of TIR domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling pathways. Korean Rheumatological Association Meeting. 2003.11.20, Seoul, Korea
 4. Kiyoshi Takeda, Masahiro Yamamoto, Shizuo Akira. Toll-like receptor signaling pathways. 2003 Meeting of the Korean Society for Immunology. 2003.11.21-22, Seoul, Korea
 5. 竹田潔、山本雅裕、審良静男、Toll-like receptor を介したウイルス認識のシグナル、第 68 回インターフェロン・サイトカイン学会、2003.7.23-24, 東京
 6. 竹田潔、山本雅裕、審良静男、TIR domain-containing adaptors regulate TLR signaling pathways、第 76 回日本生化学会 (シンポジウム) 2003.10.17, 横浜
 7. Kiyoshi Takeda, Masahiro Yamamoto, Shizuo Akira. TIR domain-containing adaptors mediate TLR signaling pathways. (シンポジウム) 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、福岡、2003. 12. 8-10
- 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（新興・再興感染症研究事業）

（分担）研究報告書

新しい結核ワクチン（① HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン、②リコンビナント 72f BCG ワクチン、③ 72f 融合タンパク + BCG 東京ワクチン）三種のワクチン接種マウス、モルモット、カニクイザルの病理形態学的検討

分担研究者 井上義一 国立療養所近畿中央病院 臨床研究センター
呼吸不全研究部 部長

研究要旨

新しい結核ワクチン（① HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン、②リコンビナント 72f BCG ワクチン、③ 72f 融合タンパク + BCG 東京ワクチン）による結核病巣形成予防効果について、マウスモデル、モルモットモデル及びヒトの結核感染に最も近いカニクイザルのモデルを用い、病理形態学的に解析した。

BALB/c マウス、モルモット、カニクイザル (cynomolgus monkey) に上記の三種の新しい結核ワクチンを3回投与しヒト型結核菌強毒株を感染させた。マウスでは5～10週後、モルモットでは6週後、カニクイザルでは6ヶ月から12ヶ月後の結核病巣形成（肉芽腫 (granuloma) 形成および単核球浸潤）をコントロールと比較した。HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA ではマウス、モルモットで著明な granuloma 形成抑制効果、肺結核病理像の改善効果が BCG 東京ワクチンよりも有意に強く認められた。リコンビナント 72f BCG ワクチン投与モルモットでも肺結核病理所見の改善が BCG 東京ワクチンよりも強く認められた。

A. 研究目的

現行の BCG ワクチンは成人に対して結核予防効果に問題点があるとされている。われわれは BCG ワクチンより強力な新しい結核ワクチンの開発を行った。本年度は新しい結核ワクチン（① HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン、②リコンビナント 72f BCG ワクチン、③ 72f 融合タンパク + BCG 東京ワクチン）による結核病巣形成予防効果について、マウスモデル、モルモットモデル及びヒトの結核感染に最も近いカニクイザルのモデルを用

い、病理形態学的に解析した。

B. 研究方法

BALB/c マウスに HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA を3回 i.m 投与しその後 M.tuberculosis H37Rv 株 5×10^5 CFU を尾静脈投与した。前処置なし (Control)、empty ベクター群、BCG Tokyo 群を対照とし検討した。マウスは H37Rv 株投与後、5週、12週で検討した。一群5匹。肺、肝臓、脾臓を湿重量測定後 10% PBS ホルマリンで固定。組織中の肉芽腫の量、単

核球浸潤を以下の方法で顕微鏡下に半定量した。各臓器中結核菌のコロニー数とも比較検討した。

(1)肉芽腫半定量法: granuloma index: H&E 染色標本を用い、4×10 倍で 1 視野中の肉芽腫の長径 x 短径の合計 (単位は ×10² mm²) を計算した。無作為に 3 視野計算しその平均を granuloma index とした。

(2)単核球浸潤半定量: mononuclear cell (MNC) infiltration index: H&E 染色標本を用い、4×10 倍で 1 視野中の単核球浸潤の程度を以下の基準でスコア化した。無作為に 3 視野計算し浸潤している部分の面積の%からスコアを求め、その平均を MNC infiltration index とした。

0; 病的浸潤なし、

1; 0% < 浸潤面積 ≤ 10%

2; 10% < 浸潤面積 ≤ 30%

3; 30% < 浸潤面積 ≤ 70%

4; 70% < 浸潤面積 ≤ 100%

(3)評価項目として組織の湿重量、組織の H&E stain を用いた granuloma index 及び mononuclear cell infiltration index。

また組織の結核菌コロニー数 (CFU/total) を用いた。

(4)モルモットでは HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA 投与群、empty ベクター投与群、BCG 投与群等を比較検討した。マウスと同様の granuloma index を用いた。

(5)カニクイザルでは granuloma 形成及び乾酪壊死の病理像を解析した。

C. 研究結果

(1)マウスモデル

HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン投与群は BCG 東京投与群や empty ベクター投与群に比し granuloma index の著明な改善が認められた。この効果は結核菌数(CFU)で解析した HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンの抗結核効果と強く相関した。

(2)モルモットモデル

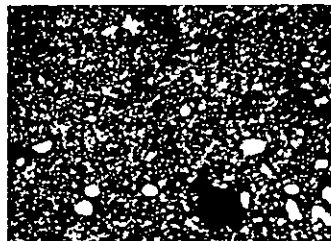
HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン投与群は BCG ワクチン投与群に比しモルモットの肺における granuloma index の著明な改善をみた。

(図 1)

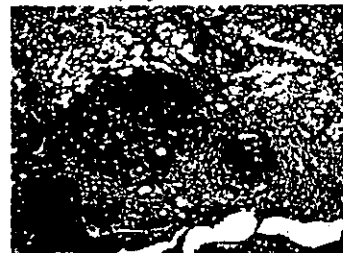
モルモットにおけるHVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12DNAワクチンに対する肺の結核病理組織の著明な改善効果

新しい結核ワクチンHVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12DNAワクチンを投与されたモルモットに結核菌を吸入感染させた

Hsp65 + IL-12



empty vector



BCG



図 1

一方リコンビナント 72f BCG ワクチンも BCG 東京ワクチン接種モルモットに比し肺の結核病巣の改善を示した。(図 2)



Preventive effect of *M.tuberculosis* in guinea pig by rBCG 72f

control	BCG Tokyo
rBCG 72f	

図 2

(3)カニクイザルモデル

人の結核感染に最も近いモデルとして有名なカニクイザル(Nature Med. 1996)では、肺で、人の結核病理像と同じ granuloma 形成と乾酪壊死像が認められた。

D. 考察

マウス、モルモットで HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン投与による granuloma index と抗結核菌効果が関連したことにより我々の granuloma index のアッセイ法は極めて有用である。

サルにおける granuloma 形成と乾酪壊死像についてワクチン投与カニクイザルの肺で解析中である。

E. 結論

新しい結核ワクチン (① HVJ-liposome/

HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン、②リコンビナント 72f BCG ワクチン、③ 72f 融合タンパク+ BCG 東京ワクチン) による結核病巣形成予防効果について、マウスモデル、モルモットモデル及びヒトの結核感染に最も近いカニクイザルのモデルを用い、病理形態学的に解析した。

BALB/c マウス、モルモット、カニクイザル (cynomolgus monkey) に上記の三種の新しい結核ワクチンを 3 回投与しヒト型結核菌強毒株を感染させた。マウスでは 5~10 週後、モルモットでは 6 週後、カニクイザルでは 6 ヶ月から 12 ヶ月後の結核病巣形成 (肉芽腫 (granuloma) 形成および単核球浸潤) をコントロールと比較した。HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA ではマウス、モルモットで著明な granuloma 形成抑制効果、肺結核病理像の改善効果が BCG 東京ワクチンよりも有

意に強く認められた。リコンビナント 72f BCG ワクチン投与モルモットでも肺結核病理所見の改善が BCG 東京ワクチンよりも強く認められた。

本研究は、国立療養所近畿中央病院岡田全司博士らとの共同研究による。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Okada M, Shigeto E, Harada N, Mitarai S, Suzuki K, Inoue Y, Tsuyuguchi K, Sasaki Y, GH Mazurek, Tsuyuguchi I.: Simple and accurate detection of tuberculosis infection in BCG vaccinated individuals using a whole blood interferon- γ assay and the Mycobacterium tuberculosis specific proteins ESAT-6 and CFP-10. *Am. J. Resp & Crit. Care Med.* (in press) 2004
2. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Matsumoto K, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.dela Cruz, E.V. Tan, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M.: Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis *Keystone* 2003, P93, 335.
3. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M.: Novel (Recombinant BCG- and DNA-) Vaccination against tuberculosis *FASEB* 2003 17(7) C25, 32.9.
4. Akira M, Yamamoto S, Inoue Y, Sakatani M.: High-Resolution CT of Asbestosis and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *AJR Am J Roentgenol.* 2003 Jul;181(1):163-169. 2003.7
5. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M.: Novel (Recombinant BCG- and DNA-) Vaccination against Tuberculosis. *Thirty-Eighth Tuberculosis and Leprosy Research Conference* 2003, P191.
6. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.V.Tan, E.C.Dela Cruz, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M.: Novel (Recombinant BCG- and DNA-) Vaccination against Tuberculosis. *The Awaji International Forum Infection Immunity.* 2003, P126.
7. Wang T, Fan L, Watanabe Y, McNeill PD, Moulton GG, Bangur C, Fanger GR, Okada M, Inoue Y, Persing DH, Reed SG.: L523S, an RNA-binding protein as a potential therapeutic target for lung cancer. *Br J Cancer.* 2003 88(6):887-94.
8. 井上義一, 松本久美, 岡美穂, 黒川恵理, 山本暁, 新井徹, 林清二, 岡田全司, 坂谷光則: Idiopathic Pulmonary

- Fibrosis におけるマスト細胞増加の意義: 免疫組織学的検討. 厚生労働省特定疾患「びまん性疾患調査研究班平成14年度研究報告」Page43-45 2003
9. 井上義一: 肺胞蛋白症 肺胞蛋白症の病勢,重症度と血清マーカー. 日本胸部臨床 62 卷 3 号 Page223-231 2003.03
 10. 井上義一: COPD INTERNATIONAL CONGRESS & WORKSHOP REPORTCOPD の全身への影響について COPD FRONTIER2 卷 2 号 Page151-154, 2003.05
 11. 井上義一: 間質性肺炎をめぐって 間質性肺炎の診断をどのように進めるか. MEDICO34 卷 7 号 Page240-243, 2003.07
 12. 藤田悦生, 井上義一, 田中勲, 審良正則, 源誠二郎, 新井徹, 吉田亮, 井上康, 湊義彰, 坂谷光則: 慢性肺気腫患者における 3D-CT による気腫化(%LAA)と肺機能検査との比較. 臨床放射線 48 卷 1 号 Page133-136, 2003.1
2. 学会発表
1. Masaji Okada, Takao Tanaka, Yoshikazu Inoue, Yuji Takemoto, Shigeto Yoshida, Naoya Ohara, Mariko Naito, Takeshi Yamada, Yasufumi Kaneda, Makoto Matsumoto, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, Yasir Skeiky, Steven Reed, Mitsunori Sakatani: Novel (Recombinant BCG- and DNA-)Vaccination against Tuberculosis. The First International Conference on TB vaccines for the world-TBV 2003
 2. Okada M, Iwasaki T, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Inanaga Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Watanabe Y, Mori J, Ishizaki K, Yamamoto S, Inoue Y, Matsumura A, Iuchi K, Sakatani M, Kawahara M: Expression and prognostic significance in lung cancer of human tumor-associated antigen RCAS1. American Association for Cancer Research 2003 Annual Meeting 2003.6
 3. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Matsumoto K, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.dela Cruz, E.V. Tan, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M: Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis Keystone 2003
 4. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M: Novel (Recombinant BCG- and DNA-)Vaccination against Tuberculosis. Thirty-Eighth Tuberculosis and Leprosy Research Conferenc 2003.7.21-22
 5. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, Yasir Skeiky, S Reed, Sakatani M.: Novel (Recombinant BCG- and DNA-)Vaccination against Tuberculosis. The First International Conference on TB vaccines for the world-TBV 2003.
 6. Okada M, Tanaka T, Inoue Y,

- Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.V.an, E.C.Dela Cruz, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M: Novel (Recombinant BCG- and DNA-) Vaccination against Tuberculosis . The Awaji International Forum Infection Immunity. 2003.8
7. Okada M, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Inanaga Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Watanabe Y, Mori J, Ishizaki K, Matsumoto K, Inoue Y, Matsumoto M, Sakatani M: Novel DNA Vaccination against Tuberculosis by the Augmentation of in vivo Cytotoxic Activity. American Society for Microbiology 2003.5.18-22
 8. 岡田全司, 田中高生, 鈴木克洋, 井上義二, 露口一成, 喜多洋子, 木藤孝, RothelJim, 露口泉夫, 森享, 坂谷光則, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 金丸典子, 橋元里実, 高井寛子, 岡田知佳, 渡邊悠子, 森珠里, 石崎邦子, 松本久美, 岡美穂, 黒川恵理: QF2G(ESAT-6,CFP10)を用いた,新しい結核診断法の開発,及び ESAT-6 peptide 投与 SCID-PBL/hu による生体内免疫応答の解析. 第78回日本結核病学会総会 2003.4
 9. 岡田全司, 田中高生, 吉田栄人, 大原直也, 内藤真理子, 山田毅, 金田安史, 井上義一, 喜多洋子, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 金丸典子, 橋元里実, 高井寛子, 岡田知佳, 福永有可里, 森珠里, 石崎邦子, 渡邊悠子, 岡美穂, 黒川恵理, 松本久美, 松本真, 坂谷光則: 新しい抗結核ワクチン (DNA ワクチン、リコンビナント BCG ワクチン、サブユニットワクチン) の開発. 実験結核研究会 2003.4
 10. 井上義一, 田中高生, 喜多洋子, 坂谷光則, 岡田全司, 吉田栄人, 岡美穂, 松本久美, 金丸典子, 稲永由紀子, 村木裕美子, 桑山さち子, 高井寛子, 石崎邦子, 森珠里, 黒川恵理, 岡田知佳, 渡邊悠子, 山田毅, 大原直也, 内藤真理子, ReedSteven, SkeikyYasir, GillisSteven: 結核に対するリコンビナント BCG ワクチン投与マウスの病理形態学的検討. 第78回日本結核病学会総会 2003.4
 11. 田中高生, 喜多洋子, 井上義一, 坂谷光則, 岡田全司, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 金丸典子, 橋元里実, 高井寛子, 渡邊悠子, 岡田知佳, 森珠里, 石崎邦子, 松本久美, 岡美穂, 黒川恵理, 吉田栄人, 金田安史, 大原直也, 内藤真理子, 山田毅, 松本杜吉, ReedSteven, SkeikyYasir, GillisSteven: 新しい結核ワクチンの開発と ELISPOT assay(自動解析)を用いた T 細胞活性化によるワクチン効果の解析. 第78回日本結核病学会総会 2003.4
 12. 喜多洋子, 田中高生, 井上義一, 坂谷光則, 岡田全司, 桑山, 村木, 稲永, 金丸, 橋元, 高井, 渡邊, 岡田, 森, 石崎, 松本, 岡, 黒川, 吉田栄人, 金田安史, 大原直也, 内藤真理子, 山田毅, ReedS., SkeikyY., GillisS., TanE.V., CruzE.C.Dela: ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しい DNA ワクチン開発 Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチン. 第78回日本結核病学会総会 2003.4
 13. 岡田全司, 田中高生, 井上義一, 喜多洋

- 子, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 金丸典子, 橋元里実, 松本久美, 坂谷光則: 新しい結核ワクチンと生体内ヒト抗結核 T 細胞免疫解析モデルの開発. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.03
14. 井上義一, 審良正則, 田中勲, 新井徹, 中田光, 源誠二郎, 松本久美, 安藤守秀, 鈴木克洋, 林清二, 岡田全司, 木村謙太郎, 坂谷光則: 三次元 CT による特発性肺胞蛋白症肺内リポ蛋白質様物質定量の試みとその意義. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.03
 15. 田中高生, 井上義一, 喜多洋子, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 金丸典子, 橋元里実, 松本久美, 坂谷光則, 吉田栄人, 大原直也, 山田毅, 岡田全司: ELISPOT assay(自動解析)を用いた新しい結核ワクチンによる T 細胞活性化機構の鋭敏な解析法. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.03
 16. 松本久美, 井上義一, 岡田全司, 田中高生, 岡美穂, 木村謙太郎, 山本暁, 坂谷光則: マスト細胞と線維芽細胞からの Matrix Metalloproteinase(MMP)-2 産生肺の線維化病変での役割. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.03
 17. 桑山さち子, 河原正明, 松村晃秀, 井内敬二, 細江重人, 川口知哉, 小河原光正, 井上義一, 喜多洋子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 金丸典子, 橋元里実, 松本久美, 坂谷光則: 新しい肺がんワクチン開発のための生体内ヒト抗腫瘍免疫解析モデル(SCID-PBL/hu)の確立. 第 43 回日本呼吸器学会総会
 18. 井上義一: NSIP の現状 -臨床と治療- 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003
 19. 石川秀雄, 木村剛, 安藤守秀, 井上義一, 鈴木克洋, 林清二, 岡田全司, 木村謙太郎, 井内敬二, 坂谷光則: 気管支動脈塞栓術の IDC(interlocking detachable coil)導入による成績向上について. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003
 20. 鈴木克洋, 露口一成, 村井隆太, 井上康, 高藤淳, 新井徹, 安藤守秀, 源誠二郎, 井上義一, 林清二, 坂谷光則: 症状が乏しく入院時発熱と有意な炎症反応がないため他疾患が疑われた細菌性肺炎の 6 症例. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003
 21. 林清二, 井上義一, 森雅秀, 山本暁, 坂谷光則: 肺組織中肝癌由来増殖因子発現細胞種の検討. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.
 22. 新井徹, 井上義一, 田中勲, 源誠二郎, 林清二, 山本暁, 審良正則, 田澤立之, 中田光, 木村謙太郎, 坂谷光則: 肺胞蛋白症に対する GM-CSF 吸入療法の有用性 血清マーカー, 画像, 肺機能による病勢評価. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.
 23. 岡田全司, 田中高生, 吉田栄人, 井上義一, 武本優次, 大原直也, 内藤真利子, 山田毅, 金田安史, 坂谷光則, Steven Reed, Yasir Skeiky, Babie Tan: ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しいワクチン開発と結核免疫誘導. 第 33 回日本免疫学会総会 2003.
 24. 田中高生, 喜多洋子, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 金丸典子, 橋元里実, 高井寛子, 岡田知佳, 福永有可里, 松本久美, 岡美穂, 井上義一, 坂谷光則, 岡田全司: 新しい結核ワクチンの開発と ELISPOT assay (自動解析)を用いた T 細胞活性化によるワクチン効果の解析. 第 58 回国立病院療養所総合医学会 2003.
 25. 露口一成, 鈴木克洋, 馬渡秀徳, 南

- 誠剛、新井徹、安藤守秀、村井隆太、林清二、井上義一、岡田全司、木村謙太郎、坂谷光則、佐々木秀文、後藤正志、奥村明之進、松村晃秀、井内敬二、当院での肺アスペルギルス症に対するミカファンギンナトリウムの治療成績 第 91 回日本結核病学会第 61 回日本呼吸器学会近畿地方会 2003.
26. 石川秀雄、木村剛、安藤守秀、林清二、坂谷光則、黒田修、井内敬二、井上義一、鈴木克洋、木村謙太郎：気管支動脈塞栓術後の再喀血機序に関して示唆的であった気管支拡張症の一例。第 91 回日本結核病学会第 61 回日本呼吸器学会近畿地方会 2003.
27. 西山明秀、井上義一、新井徹、石川秀雄、林清二、坂谷光則、村井隆太、井上康、安藤守秀、木村謙太郎、山本暁、審良正則、黒田修：心病変と肺病変を合併した HES (Hypereosinophilic syndrome) の一例。第 91 回日本結核病学会第 61 回日本呼吸器学会近畿地方会 2003.
28. 村井隆太、井上康、木村剛、西山明秀、高藤淳、新井徹、林清二、坂谷光則、露口一成、井上義一、鈴木克洋、木村謙太郎：人工呼吸管理を要した急性呼吸不全合併肺結核症の臨床的検討。第 91 回日本結核病学会第 61 回日本呼吸器学会近畿地方会。2003.
29. 新井徹、山内勢津子、安藤守秀、林清二、坂谷光則、井上義一、鈴木克洋、木村謙太郎、審良正則、山本暁：肺結核治療後に発症し、早期の HRCT 像を検討し得た Pulmonary Langerhans'-cell histiocytosis の一例。第 91 回日本結核病学会第 61 回日本呼吸器学会近畿地方会 2003.
30. 南誠剛、新井徹、安藤守秀、林清二、井上義一、坂谷光則：肺病変を伴った multicentric Castleman 病の 1 症例。第 91 回日本結核病学会第 61 回日本呼吸器学会近畿地方会 2003.
31. 田中高生、井上義一、岡田全司、河原正明、田村光信、松村晃秀、井内敬二、山本暁：RCAS-1 抗原の発現とヒト肺癌の悪性度予後診断。第 78 回日本肺癌学会関西支部会 2003.7
32. 新井徹、安藤守秀、高藤淳、井上康、馬渡秀徳、南誠剛、鈴木真優美、林清二、坂谷光則、井上義一、鈴木克洋、露口一成、木村謙太郎、審良正則、山本暁、平田陽彦：無症状で多発性浸潤陰影を示した女性の 1 例。第 102 回びまん性肺疾患研究会。2003.08
33. 井上義一：LAM オーバービューと問題点。肺リンパ脈管筋腫症勉強会 (2) 2003.10

平成 15 年度 厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業 岡田全司班
研究協力者

Steven Reed Corixa 研究所 副所長

「結核に対する新しいワクチンの開発及び動物を用いた安全性試験」

Steven Gillis Corixa 研究所 所長

「結核に対する新しいワクチンの開発及び動物を用いた安全性試験」

小出 幸夫 浜松医科大学 微生物学 教授

「結核に対する新規ワクチンと接種法に関する研究」

赤川 清子 国立感染症研究所 免疫部 第 4 室 室長

「結核菌感染ヒトマクロファージにおける NRAMP1 の発現及び
MAP カイネース活性化の解析に関する研究」

Richard C. Mulligan ハーバード大学医学部 遺伝子学 教授

「結核に対する新しい DNA ワクチン（遺伝子治療）法の確立。骨髄
stem cell plasticity による肺 stem cell の結核後遺症の新しい再生医療法の
開発」

鈴木 克洋 国立療養所近畿中央病院 臨床研究センター 薬剤耐性結核感染症研究部 部長

「結核・非定型抗酸菌症患者血液を用いた予後・治療効果の予測」

金田 安史 大阪大学大学院医学研究科 分子治療学 教授

「HVJ-liposome を用いた新しい DNA ワクチンの開発」

柏村信一郎 兵庫医科大学先端医学研究所 生体防御部門 講師

「IL-18 と感染免疫防御機構」

松本 真 大塚製薬 微生物研究所 所長

「結核に対する多種の新しいワクチンの比較効果試験。動物を用いた
安全性試験。多剤耐性結核に対する新しい化学療法の開発」

服部 俊夫 東北大学大学院医学系研究科 感染病態学分野 教授

「後天性免疫不全症候群(AIDS)患者の結核発症と
非結核性抗酸菌症患者の血清学的結核診断」

姫野 國祐 九州大学大学院医学研究院 教授

「ユビキチン DNA-結核タンパク DNA を用いた
新しい結核ワクチンの開発」

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

（研究協力者）研究報告書

結核に対する新規ワクチンと接種法に関する研究

研究協力者 小出幸夫 浜松医科大学微生物学 教授

研究要旨

我々は結核に対するワクチンを種々のベクターを用いて作製している。これは感作とブースターを異なったワクチンで行うとより有効であるという事実に基づいている。これまで、弱毒細胞内寄生菌（リステリア）をキャリアーとしたDNAワクチンの開発を行った。今回は強力な抗原提示細胞である樹状細胞にレトロウイルスベクターで結核菌防御抗原遺伝子を導入したワクチンを作製し、特異的T細胞を感作誘導できたので報告する。また、現在進行中であるケモカイン融合ワクチンおよびアデノキメラワクチンについても報告する。また、ワクチン接種法として、肺指向性T細胞を誘導するための組換えリステリアの経鼻免疫を行い、肺に特異的リンパ球を誘導できたので報告する。

A. 研究目的

本研究の目的は結核に対する新規ワクチン開発と接種法の検討にある。まず、ワクチン開発であるが、異なったベクターを用いたワクチンで感作—ブースターを行うと強力な感染防御免疫が得られることがHIVにおける研究で明らかとなっている。そこで、我々はまず種々のベクターをもちいて結核に対するワクチンを開発し、その後、その中で有効なワクチンを組み合わせた感作—ブースター法を確立することを目指している。これまで、弱毒細胞内寄生菌（リステリア）をキャリアーとしたDNAワクチンの開発を行い、一定の成果を挙げることができた。そこで、次にナイーブT細胞に対する強力な抗原提示細胞である樹状細胞(DC)にレトロウイルスベクターで結核菌防御抗原遺伝子を導入したDCワクチンを作製し、その効果を検討した。また、現在ケモカイン融合ワクチンおよびアデノ

キメラワクチンを作製している。

接種法としては、我々の作製したリステリアをキャリアーとしたDNAワクチンの経鼻免疫を行った。リステリアは粘膜面より侵入できるので経鼻免疫に適していると考えられる。

B. 研究方法

- 1) マウス：BALB/c マウスをSLCより購入し、浜松医科大学附属動物実験施設で系統維持したものをを用いた。
- 2) DCの調整：BALB/c 骨髄より単クローン抗体/磁気ビーズによりリンパ球、マクロファージを除去し、GM-CSFとIL-4の存在下で48時間培養し、DCをえた。
- 3) レトロウイルスの作製と感染：レトロウイルスベクター pMX の5'LTRと3'LTR間に結核菌の主要防御抗原であるAg85AまたはAg85Bをコードする