

及び腎臓（下）の2次濾胞の組織像を示す。免疫組織化学的解析により、腎臓の節外性リンパ組織は、TおよびBリンパ球よりなることが明らかである。表1には、今回解析したサル組織病変の有無、及び抗体産生異常を示した個体について、カテゴリー毎に示した。

表 1

群	組織病変	抗体産生	動物数
A	有り	低/無	n=2
B	有り	有り	n=2
C	なし	低/無	n=3
D	なし	有り	n=2

免疫系に影響を与える可能性のあるウイルスの選択

下記の1.と2.に述べた理由で、表1のA群2頭、B群2頭、C群3頭、D群2頭のカニクイザルについてSRV/DとサルEBウイルスの感染の有無を検討した。

1) Simian Retrovirus Type D (SRV/D) : SRV/Dは、1969年に米国でアカゲザルの乳癌組織より分離されたオンコウイルス亜科に属するMason Pfizer virus (SRV/D-3)をはじめ、現在までにサブタイプ1～5が血清学的に分類されており、そのうちSRV/D-1, -2, -3の全塩基配列が決定されている。SRV/D感染マカク属サルが発症すると、免疫不全、貧血、下痢、羸瘦等の症状を示す。SRV/D感染症による免疫不全は、レンチウイルス亜科のSIVによる免疫不全に類似している。

本ウイルス感染の特徴は、抗体の産生を伴わず無症候キャリアになる場合があることである。このため、抗体検査に加えて、検出感度の高いPCR法によるSRV/D感染サルの検出が必要である。我々は、TPC産の抗SRV抗体陽性カニクイザル2頭から新型SRV/D-T株の分離に成功し(1)、その全塩基配列を基にSRV/D-T株特異的PCR検出系を確立した。また、退役したTPCの繁殖親サルの疫学調査により、22.5%のサル(11/49)が本SRV/D-T株の感染を受けており、他のサブタイプのSRV/Dは検出できなかった(2)。

2) サルEBウイルス:カニクイザルのEBウイルス産生B細胞株(Ts-B6)は、当センターで1988年に偶然に分離された。筑波霊長類センターカニクイザルの疫学調査では、生後4～7ヶ月齢で26%、1～3歳52.5%、4～9歳69%、10歳以上の100%が抗体陽性である。ヒトに於いては、ほとんどが小児期から青年期にかけてEBウイルスの感染を受けるが、伝染性単核球症以外は、感冒症状を伴うか無症候性の感染を受け、例外なくBリンパ球に潜伏するが、通常はリンパ腫を形成しない。

しかし、エイズや臓器移植後などの免疫不全状態では、Bリンパ球増殖症や、節外性リンフォーマを形成することがある。当センターにおいても、エイズ発症アカゲザルにおいて、咽頭部にサルEBウイルスによる節外性リンフォーマを持つ症例を得た経験がある。

3) 筑波霊長類センターサル繁殖コロニーにおける現時点での微生物学的清浄状態:ヒトに危険なBウイルス陽性個体に関して、1998年に最後の1頭が繁殖コロニーから排除され、サルに致死的なSVV(Simian Varicella Virus; サル水痘ウイルス)については、1994年にSPF化された。しかしながら、SRV/DやサルEBウイルスについては、まだSPF化されていない。

筑波霊長類センターカニクイザルからSRV/D-Tukuba株の分離と遺伝子検出系の開発

分離されたSRV/D-Tukuba株の遺伝子配列を基にSRV/D-T株特異的超高感度PCR検出系を確立した(1, 2)(図2)。

サルEBウイルス感染の検出系の検討

サルの血清診断については、カニクイザル由来EBV産生細胞株Ts-B6より作成したEBV抗原(VCA)を用いた蛍光抗体法適用した。

免疫組織化学的検出についてを、サルTs-B6細胞株を抗原として市販の抗ヒトEBV検出用抗体およびRNA用プローブの反応性を検討した結果、抗LMP-1と抗ZEBRA単クローン抗体に反応性はみられず、抗EBNA2抗体(clone: PE2)のみに反応性がみられた(図3)。EBウイルス潜伏感染のいずれの状態(Latency I, II,

III) でも普遍的に発現している small RNA である EBER 用 プローブ (DAKO Y5203, ヒト用) は Ts-B6 株には反応しなかった。

組織病変とウイルス感染

表 2 に示したように、組織病変のみられた A 群の 2 頭と B 群の 2 頭のサルは、SRV/D とサル EB ウイルスに対する抗体が陽性であった。また、免疫組織化学的解析では、A 群と B 群すべてサルの唾液腺の腺組織に SRV/D 抗原 (gp20) が認められたので、既感染 SRV/D が再活性化して、免疫異常を引き起こしているものと推測される。一方、EBNA2 抗原は節外性リンパ組織、リンパ球の集簇部位、腺組織のいずれにも見られなかった。組織病変のみられなかった C 群と D 群のサルについては、抗体も陰性であり、免疫組織化学的解析で SRV/D が認められなかった。

以上の結果から、SRV を唾液腺から排出しており、免疫異常を引き起こしているものと考えられるサルにおいて、EB ウイルスの重感染個体においてのみ組織病変が認められた。免疫異常のみ認められなかった D 群の 2 頭については、いずれも抗 SRV/D 抗体陽性であったが、組織免疫化学的解析では陰性であったので、SRV/D 感染に関して潜伏感染 (不顕性感染) 状態にあると考えられる。図 4, 5 には A 群の 1 頭のサルにおける組織免疫化学的解析結果を、図 6 には唾液腺、腺導管部位に排出された SRV/D 粒子の電子顕微鏡写真を示す。

表 2

Summary of Serology and Imm-Histo Chem on SRV/D & EBV

Group	Lesion	Imm Response	Number
A	有	低/無	2
B	有	有	2
C	無	低/無	3
D	無	有	2

Group	SRV/D (gp20)		EBV (EBNA2)	
	W.B	Histo.Chem.	IFA(VCAg)	Histo.Chem.
A	Indeterminant	+	+	-
A	+	+	+	-
B	+	+	+	-
B	+	+	+	-
C	-	-	-	-
C	-	-	-	-
D	+	-	-	-
D	+	-	-	-

抗体産生低応答とウイルス感染

接種ワクチン株に対する抗体産生能が低レベルであった群は、A 群と C 群であるが、両群に共通のウイルス感染パターンは認められなかった。しかしながら、A 群では、表 2 に明らかなように、潜伏感染していた SRV/D が再活性化していることが免疫組織化学的解析により明らかである。従って、A 群に関する限り、SRV/D の再活性化に伴い抗体産生能が低下していた可能性が考えられる。データは示さないが、SRV/D の再活性化に伴い、抗 SRV/D 抗体価の低下したカニクイザル 3 例を経験している。一方、C 群に関しては、SRV/D の感染・再活性化はなく、サル EB ウイルス感染も認められないので、MHC を含めた遺伝的バックグラウンドによる可能性が考えられる。

D. 考 察

組織病変とウイルス感染

我々は以前に、SIV 感染によりエイズを発症したアカゲザルにおいて、咽頭部に EB ウイルスによる節外性リンパ腫を持つ症例を得た経験がある。ヒトに於いては、ほとんどの場合小児期から青年期にかけて EB ウイルスの感染を受けるが、伝染性単核球症以外は、感冒症状を伴うか無症候性の感染を受けるが、通常はリンパ腫を形成しない。従って、エイズなどの免疫不全状態でのみ、節外性リンパ腫が形成されると考えられている。

今回、節外性リンパ組織やリンパ球の集簇・過形成が見られた原因としては、おそらく、背景として、SRV/D 感染症による免疫の低下があり、これが直接的原因となって、EB ウイルスが潜伏感染していた B リンパ球が活性化した可能性が考えられる。また、ワクチン接種後 3 日目のサルの各種臓器にも組織病変が認められたケースがあるので (図 1)、弱毒化生ワクチンの接種以前にこれら組織病変が生じていた可能性が考えられるが、EB ウイルス感染サルが、SRV/D 感染症により死亡したケースすべてで、今回の組織病変がみられるわけではないので、現時点では、これら 2 種のウイルス以外の原因 (ワクチン接種やある種のウイルス

感染等) の関与も否定できない。

また、今回市販のヒト用 EB ウイルス検出用 EBER PNA プローブを用いたが、サルの上昇組織病変部には反応しなかった。この点に関して、核酸塩基配列の相同性が低いことも考えられるので、今後、カニクイザル由来 EBV 産生細胞株 Ts-B6 の配列に基づいて、より長いプローブ(700bp 以上)を作成し、サルの上昇組織病変部位から、EB ウイルスゲノムの検出を試みるつもりである。

抗体産生低応答とウイルス感染

表 1, 2 の A 群と C 群の計 5 頭のサルがワクチン接種後の抗体産生に関し低応答であった。A 群については、抗体検査、及び免疫組織学的に、SRV/D の感染とその再活性化が確認されたので、おそらくは、SRV/D-T 感染症の発症により、抗体産生能が低下していたものと解釈できる。しかし、C 群については、抗体検査、免疫組織学的解析のいずれの結果からも、SRV/D の感染は確認できないし、サル EB ウイルスの感染も確認できない。従って、これらウイルスが関与していない C 群については、MHC のハプロタイプの違いによる免疫不応答が考えられるが、この点に関しては、今後、MHC class II のハプロタイプとワクチン株に対する液性免疫応答との相関を検討しなければならない。

E. 結 論

1. SRV/D とサル EB ウイルスについて、抗体調査と免疫組織染色による解析結果から、EBV が潜伏感染したサルに、SRV/D 感染症が合併すると、リンパ系組織病変がみられる可能性が示唆された。
2. 一方、これら SRV/D とサル EB ウイルスが関与せず組織病変がない、C 群については、接種ワクチンに対する免疫応答に関し、MHC のハプロタイプの差による抗体産生低応答性が考えられるが、MHC class II のハプロタイプとの相関を今後検討しなければならない。
3. 実験モデル動物として、SHIV, SIV の感染実験に SRV/D や EB ウイルス感染サル

を用いることは望ましくないと考えられ、特に SRV/D の感染の診断には、抗体検査のみではなく、我々の開発した PCR 診断(2)を複数回行って、SRV/D 感染のない動物を選ぶべきである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hara, M., Sata, T., Kikuchi, T., Nakajima N., Uda A., Fujimoto, K., Baba, T., Mukai. R.: Isolation and characterization of a new simian retrovirus type D subtype from monkeys at TPC Japan. *Microbes and Infection*, in Press.
- 2) Hara, M., Kikuchi, T., Ono, F., Takano, J., Ageyama, N., Fujimoto, K., Terao, K., Baba, T., Mukai. R.: Survey of Captive Cynomolgus Macaque Colonies for SRV/D Infection by PCR, *Comparative Medicine*, in press.

2. 学会発表

- 1) 徳永恵一、中山大介、清永康平、三隅将吾、高宗暢暁、向井鎌三郎、橘 園臣、梅田 衛、柴田英昭、庄司省三：HIV-1 coreceptor に元づいたキメラ環状抗原免疫カニクイザル抗血清による種々 clade 由来の R5X4 HIV-1 への多様な感染阻害。第 18 回日本エイズ学会（静岡）2004 年 12 月
- 2) 中山大介、徳永恵一、清永康平、三隅将吾、高宗暢暁、向井鎌三郎、橘 園臣、梅田 衛、柴田英昭、庄司省三：CCR5-CXCR4 キメラ環状抗原により得られた種々の単クローン抗体の Cross-clade HIV-1 感染防御。第 52 回日本ウイルス学会（横浜）2004 年 11 月
- 3) 遠藤昌史、稲津麻子、橘 園臣、三隅将吾、向井鎌三郎、梅田 衛、柴田英昭、高宗暢暁、庄司省三：CXCR4 を標的とした新規ペプチド免疫戦略と cross-clade 抗 HIV-1 活性。第 52 回日本ウイルス学会（横浜）2004
- 4) 原正幸、小野文子、菊池俊彦、高野淳一郎、成田豊子、藤本浩二、馬場忠、寺尾恵治、

向井鏖三郎: 霊長類センターのカニクイザ
ルコロニーにおける SRV/D の疫学調査.
第 51 回日本実験動物学会 (長崎) 2004
年 5 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|-------|
| 1. 特許取得 | 申請準備中 |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

図1 カニクイザル唾液腺及び腎臓にみられた2次濾胞

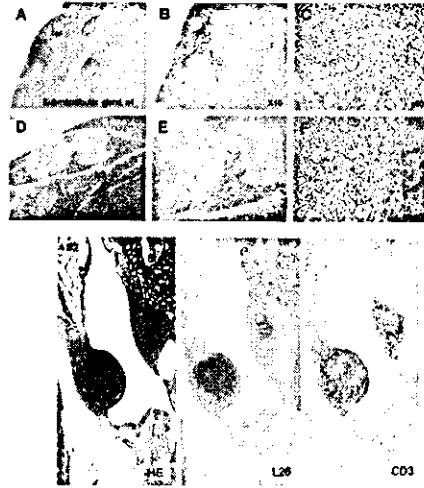
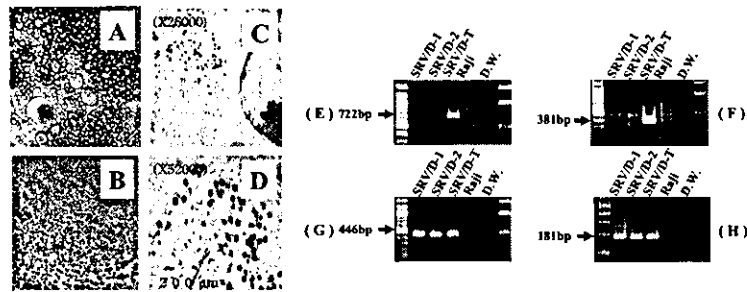


図2 SRV/D-Tukuba株の分離, A & D粒子, PCR検出法の確立

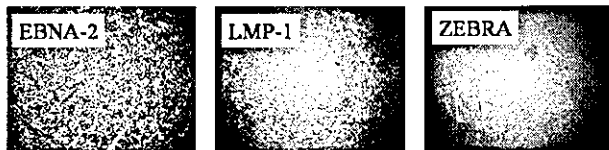


Raji cells infected with SRV/D isolate from monkey N27.

A: photographs of large syncytia 5 days after cocultivation (x100). C: Uninfected Raji cells (x100). B: Electron micrograph of the syncytium of Raji cells (x26,000). D: Higher magnification electron micrograph of cytoplasmic 90nm typeA retrovirus particles and extracellular mature type D retroviruses (1). E~H: PCR detection of SRV/D genome(2).

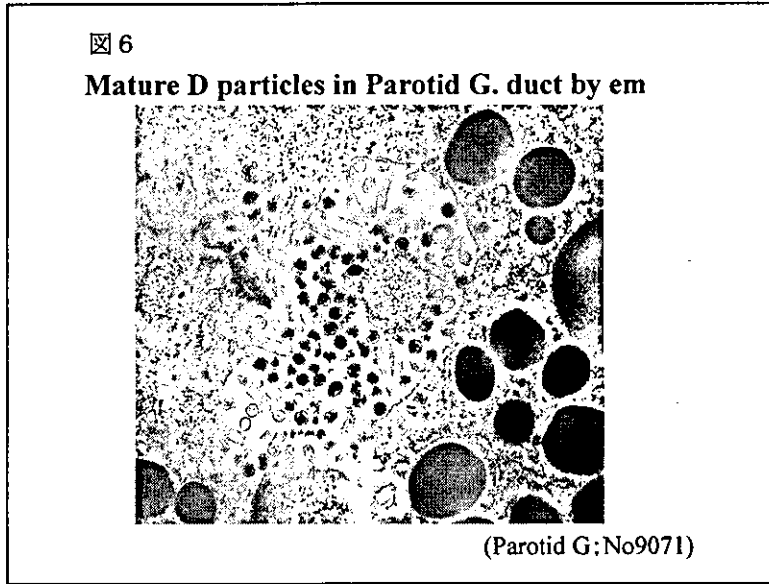
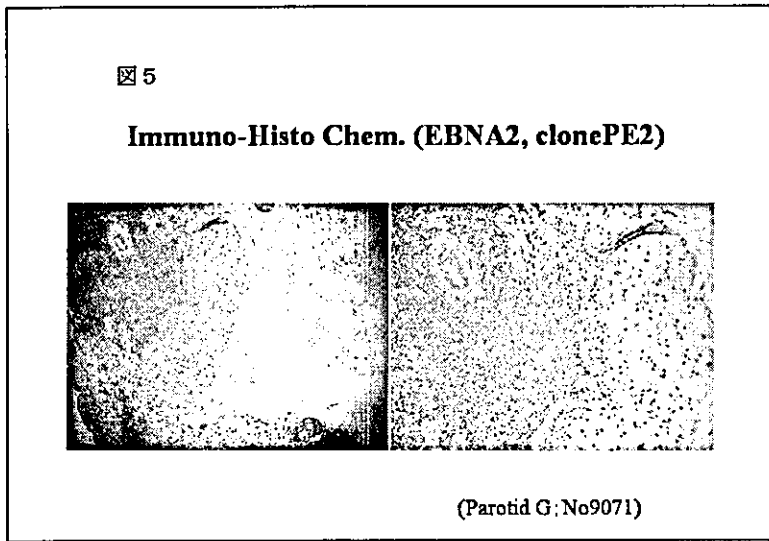
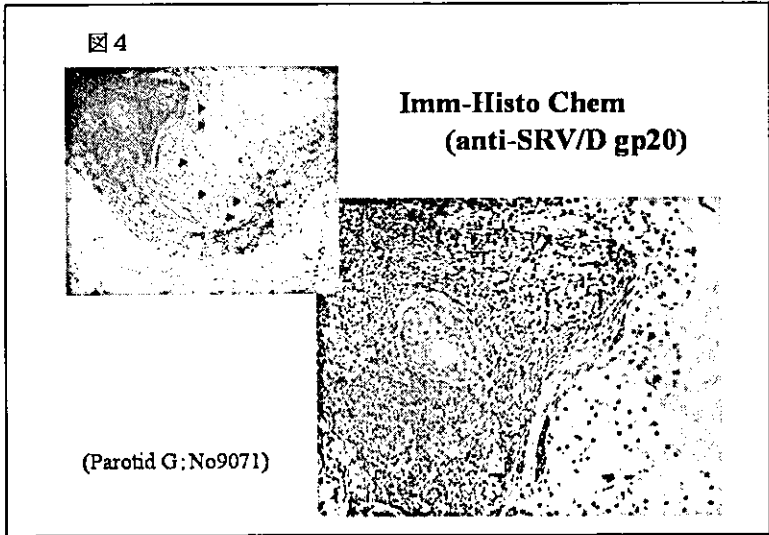
図3 カニクイザルEBウイルス検出用プローブ

Antibody probes for Imm-histo-Chemistry of EBV detection



Cell line (Tr-B6): Simian EBV producing cells from Cynomolgus monkey

- ZEBRA : Immediate Early
- BZLF-1 : Early
- EBNA-1 : Latency I (w/EBER 1,2)
- LMP-1,2 : Latency II (LMP-1, -2A, -2B)膜蛋白
- EBNA-1,2,3: Latency III (w/3LMPS, EBER1)



8. α 抗原を用いたワクチンの増強作用に関する研究

分担研究者 保富 康宏 三重大学医学部 助教授

研究要旨 エイズ感染症予防におけるワクチン開発では液性免疫のみならず細胞性免疫が重要であることは良く知られている。本研究では強い Th1 誘導能を持つ抗酸菌の分泌蛋白である α 抗原(Ag85B)を DNA ワクチンには DNA として、サブユニットワクチンにはリコンビナント蛋白として用い Th1 タイプの免疫反応誘導可能なアジュバントとの可能性を検討した。 α 抗原 DNA と HIVenvDNA ワクチンを混合して免疫したマウス群では DNA ワクチン単独免疫群に比べ高い細胞傷害性 T リンパ球 (CTL)活性が認められ、in vivo における HIVenv 組み込みリコンビナントワクシニアウイルスの排除においても α 抗原 DNA 混合接種群が有意に更新していた。HIVenv 特異的サイトカイン産生では α 抗原 DNA 混合接種群では著しい Th1 タイプのサイトカイン産生を認めた。これらすべての反応はマウスを BCG で感作することにより増強されていた。さらにこの α 抗原をリコンビナント蛋白として得るために酵母菌での作成を試みたところ染色体組み込み型の酵母菌の作成に成功した。この蛋白をアジュバントとしてインフルエンザウイルスワクチンと混合接種したところ Th1 タイプの抗体の産製が認められた。以上のことより α 抗原は新規アジュバントとして特に Th1 型免疫反応の誘導に極めて効果的であると考えられた。

A. 研究目的

エイズウイルスワクチンの開発は急務であるが、未だ実用されるワクチンは存在しない。既に試みられたワクチンでは免疫反応が誘導されるが微弱であるために実用に至らなかったものも多く存在する。ワクチンの増強効果を導くアジュバントの開発は世界中で行われているが、これも実用化されるものは少ない。しかしながらアジュバントは既存のワクチンに効果を付与するという利点から新規の開発は続けられている。本研究ではワクチン効果、特に細胞性免疫を増強するアジュバントとして抗酸菌由来の α 抗原を DNA ワクチンに対しては DNA として、また蛋白を用いたワクチンにはリコンビナント蛋白として、アジュバントの可能性を検討した。

B. 研究方法

1) α 抗原組み込みプラスミド: *Mycobacterium kansasii* 由来 α 抗原遺伝子を pcDNA3.1 に TPA leader sequence に続き挿入した (pcDNA α -k)。

2) 免疫: Balb/c x DBA2 F1(BDF1)マウス筋肉内に HIVenv DNA ワクチンと α 抗原 DNA 各 100 μ g を混合し 1 週間隔で 3 回接種した。接種部位には electroporation を行った。また免疫マウスは BCG 感作群と未感作群の 2 群作成した。

3) サイトカイン測定: 免疫マウスの脾細胞を HIVenv エピトープペプチドで 4 8 時間刺激培養した培養上清の IL-4 と IFN- γ を ELISA にて測定した。

4) Toll like receptor (TLR)の発現: α 抗原 DNA をマウス筋肉内に接種し、接種部位の組織から TLR2,3,4,9 の mRNA の発現を PCR にて測定した。

5) HIVenv 特異的 T 細胞の測定: CTL は免疫マウスの脾細胞から誘導し、⁵¹Cr 遊離法にて測定した。また、CD8⁺細胞は特異的 IFN- γ 産生細胞を ELISPOT にて測定した。

6) In vivo における抗ウイルス効果: in vivo における抗ウイルス効果は免疫マウスに HIVenv 遺伝子組み込みワクシニアウイルスをチャレンジし、5 日後の卵巣でのウイルス

複製を Real Time PCR の測定にて判定した。

7) 酵母菌には α 抗原遺伝子を 8 個組み込み、菌体内から α 抗原を精製し、その精製抗原 10 μ g とインフルエンザ HA ワクチン 1 μ g をインコンプリートアジュバント (IFA) でマウスに皮下接種し HA 特異的抗体をサブクラス別に比較した。

8) 倫理面への配慮：本研究はマウスのみを使用する基礎研究でヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

1) HIVenv 特異的 IL-4 と IFN- γ の測定：免疫マウスの脾細胞における HIVenv 特異的 IL-4 と IFN- γ を測定したところ α 抗原添加群では IL-4 産生が低下し、IFN- γ が増加を示した。またこのことは BCG の感作でより著名であった (Fig. 1)。

2) α 抗原接種による TLR の発現： α 抗原 DNA 接種後 3 日目で TLR2,3,4 の mRNA の発現増加が接種部位の組織で認められたが、TLR9 については発現がなかった。また対称としたコントロールベクターにおいてもこのような変化は認められなかった (Fig. 2)。

3) HIVenv 特異的 CTL の誘導：CTL の誘導は α 抗原を添加したもので明らかに高く、それは BCG により感作しているものでより著名であった。また誘導された CTL は CD8⁺、MHC 拘束性を示した (Fig. 3)。このことは CD8⁺細胞の IFN- γ を指標とした HIVenv 特異的 ELISPOT アッセイにおいても同様に確認された (Fig. 4)。

4) *in vivo* における抗ウイルス効果：免疫マウスに HIVenv 組み込みワクシニアウイルスを接種したところ、 α 抗原遺伝子添加、BCG 感作群で著名にウイルスをコントロールしていることが示され、その接種時の脾細胞は HIVenv 特異的に高い細胞傷害活性を示した (Fig. 5)。

5) リコンビナント α 抗原蛋白によるアジュバント効果：インフルエンザ HA ワクチンとリコンビナント α 抗原とを混合接種したところ、 α 抗原を加えない IFA に比べ高い抗体賛

成が認められ、特に IgG2a で著明であった (Fig.6)。

D. 考 察

HIV 感染は free のウイルスの感染によるもの以上に感染細胞による感染の拡大が見られることから感染予防、ウイルス制御には中和抗体を主とした液性免疫とともに CTL を中心とした細胞性免疫が重要であると考えられている。また感染直後のウイルスをコントロールすることで予後においても大きくかわってくることからエイズウイルス感染症に対するワクチンは初回ウイルス暴露時に強力な免疫反応、特に細胞性免疫を誘導する試みが数多く報告されている。今回用いた α 抗原は安全であり、強い免疫反応を誘導することが出来る。さらに BCG 等の抗酸菌で感作されているとその効果はより著明であること、加えて世界中の多くの国で結核ワクチンとして BCG が用いられ、多数のヒトが抗酸菌感作を受けていることから α 抗原のワクチン増強効果は現実的なアジュバントとして有望であると思われる。一方 DNA ワクチンは簡便であり、安全性やコストの面からも注目されているワクチンであることから、これを用いたワクチン開発における免疫増強効果のあるアジュバント開発はエイズワクチン開発に大きく寄与出来得る。また、今回作成したリコンビナント α 抗原蛋白は局所反応等が認められず高いアジュバント効果、特に Th1 タイプの免疫反応の誘導効果が認められることから、既存のコンポーネントワクチン、サブユニットワクチンにおけるアジュバントとして、Th1 タイプの免疫反応を維持して使用できるワクチンとして考えられる。現在 α 抗原を組み込んだベクターを種々作成中であり、これにより α 抗原のアジュバント活性を持つ新たなワクチンベクターが期待できる。

E. 結 論

抗酸菌 α 抗原がワクチンのアジュバントとして有効である可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takamura,S., Niikura,M., Li,T.C., Takeda,N., Kusagawa,S., Takebe,Y., Miyamura,T., and Yasutomi,Y. DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulates mucosal and systemic immune responses by oral administration. Gene Ther.2004;11:628-635.

2. 学会発表

- 1) Yasutomi Y: Oral administration of vaccine by using virus-like particle derived from orally transmissible virus. Fourth World Congress on Vaccine and Immunization. シンポジウム (つくば) 2004.10.
- 2) Yasutomi Y: Induction of effective cytotoxic T lymphocyte responses using helper T cell determinant peptide of α antigen from mycobacteria in peptide vaccine constructs. Fourth World Congress on Vaccine and Immunization. ワークショップ (つくば) 2004.10.
- 3) 保富康宏：経口感染ウイルスのウイルス様中空粒子 (VLP) を利用した経口エイズワクチンの開発. 第8回ワクチン学会学術集会、シンポジウム (札幌) 2004.10.
- 4) 河野光男、保富康宏、高村史記、垣内雅彦、駒田洋、鶴留雅人、伊藤守弘、西尾真知子、伊藤康彦：M 蛋白欠損パラインフルエンザ 2 型ウイルス (PIV2) およびマウス IL-4 を挿入した PIV2 の性状解析. 第52回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2004.11.
- 5) 高村史記、新倉昌浩、横田恭子、李天成、武田直和、宮村達男、保富康宏：DNA ワクチン封入キメラ VLP 経口投与による粘膜誘導ワクチンの試み. 第52回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2004.11.

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) α 抗原のワクチンにおけるアジュバント剤としての利用 (出願中、特開

2002-114708)

- 2) α 抗原のアレルギー性疾患治療剤としての利用 (出願中、PCT/JP/01459)

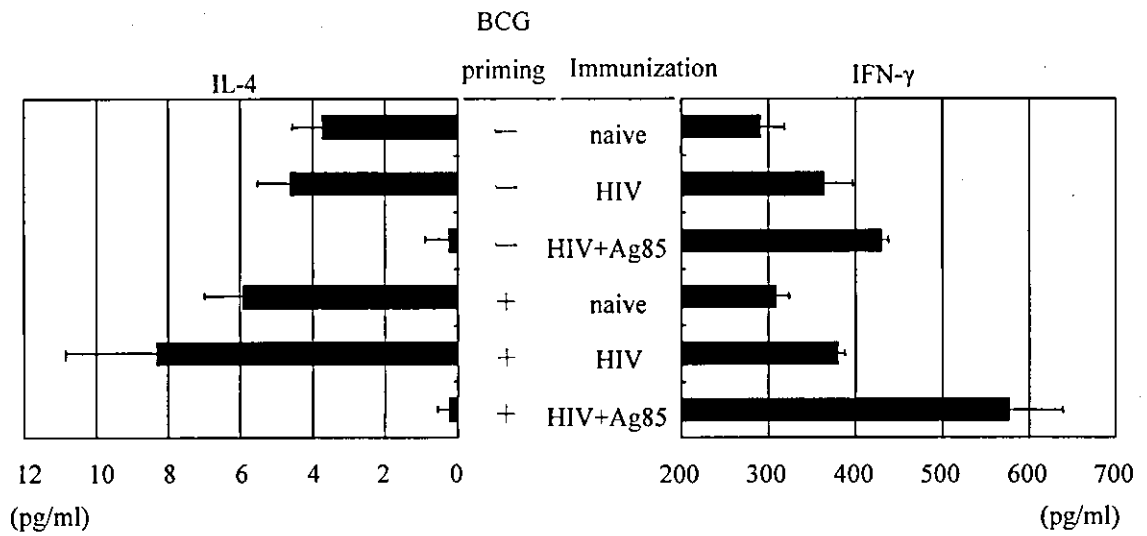


Fig. 1 HIVenv 特異的 IL-4 と IFN- γ の産生
 免疫マウスの脾細胞を HIVenv エピトープペプチドで刺激し、HIVenv 特異的 IL-4 と IFN- γ の産生を ELISA にて測定した。

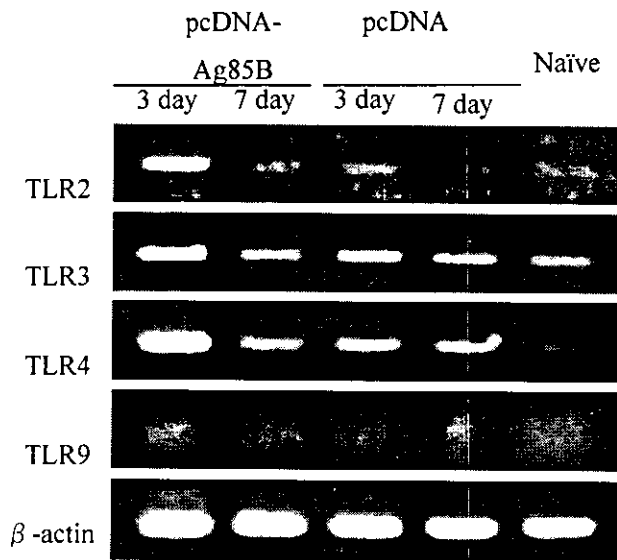


Fig. 2 α 抗原 DNA 接種部位における TLR の発現
 α 抗原 DNA 接種部位における TLR の mRNA の発現を PCR にて確認した。

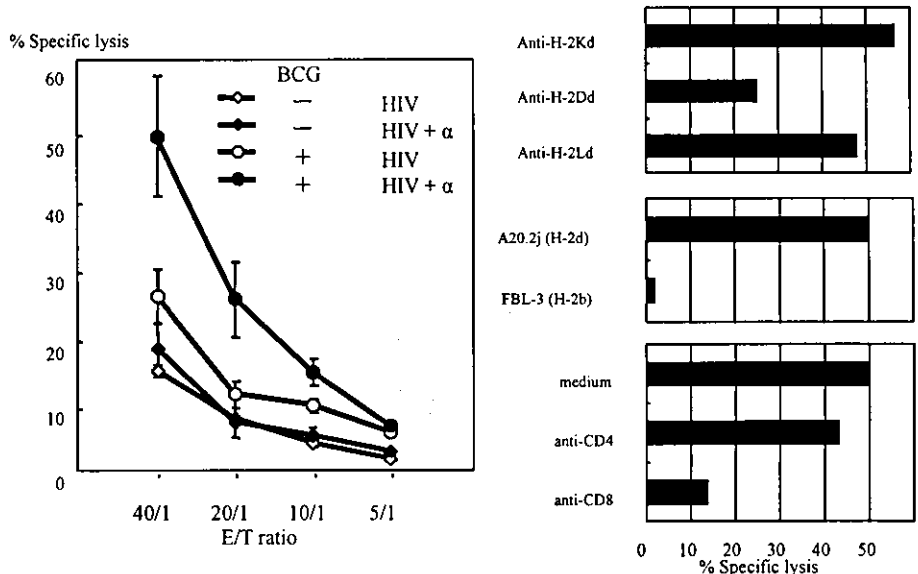


Fig. 3 HIVenv 特異的 CTL の誘導

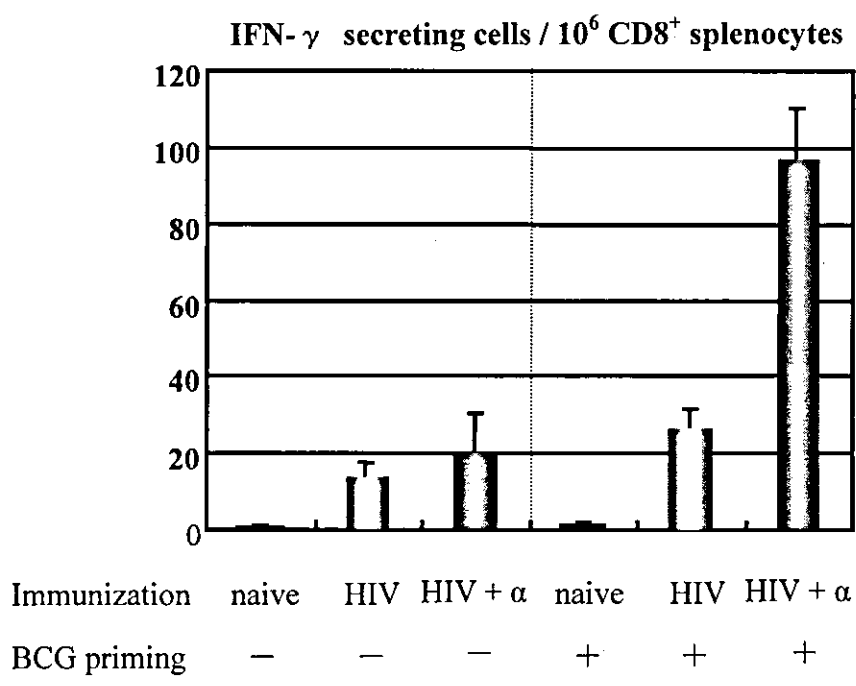


Fig. 4 HIVenv 特異的 ELISPOT assay

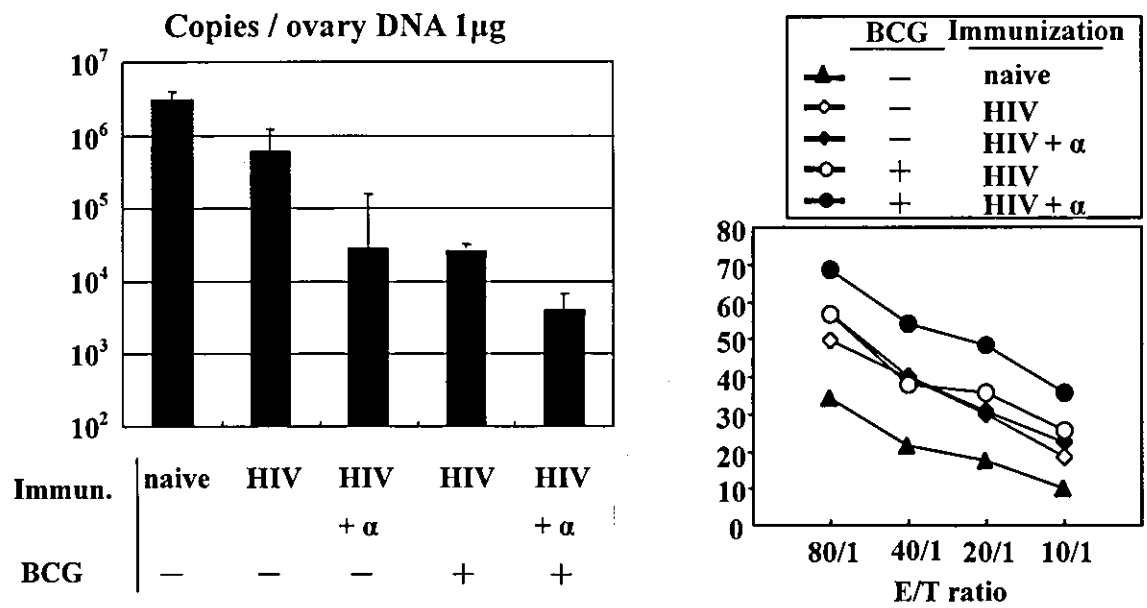


Fig. 5 in vivo における抗ウイルス効果と CTL の誘導

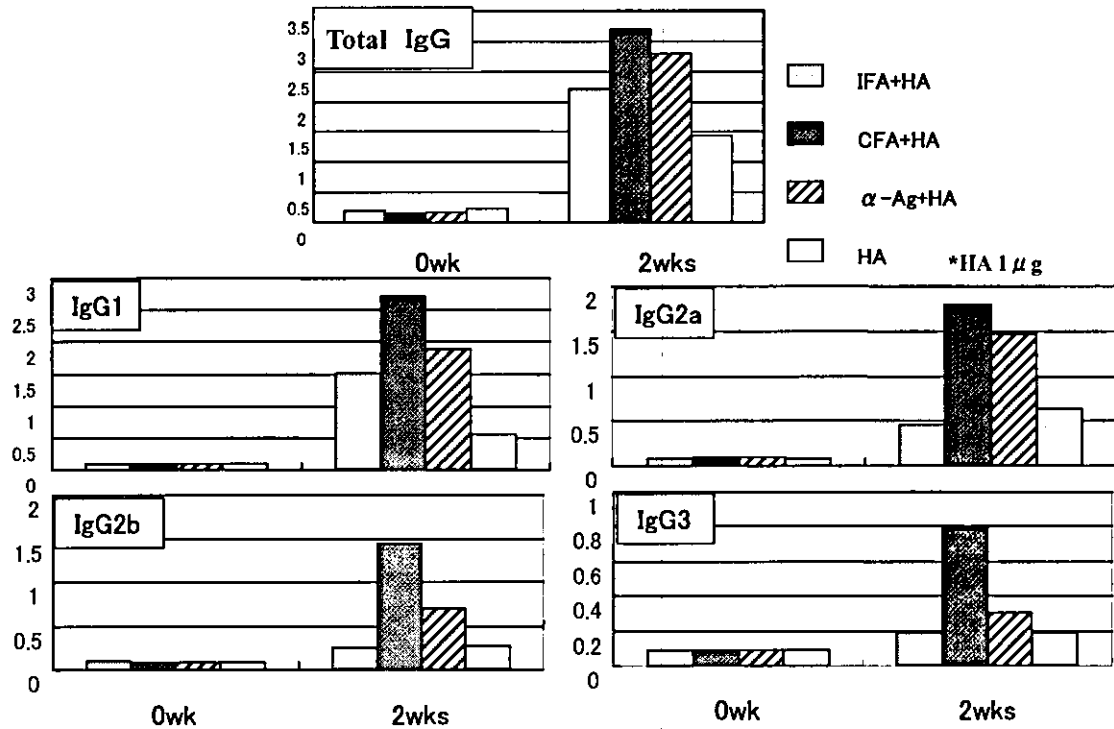


Fig. 6 リコンビナント α 抗原蛋白のサブユニットワクチンに対するアジュバント効果

9. T細胞機能分子を介する HIV-1 感染防御

分担研究者 神奈木 真理 東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 教授

研究要旨 無症候 HIV-1 キャリアの末梢血リンパ球は、試験管内で新たな HIV-1 感染に抵抗性となっている。また、弱毒化生ワクチンを接種したサルは新たな SIV 感染に抵抗性である。これらのウイルス抵抗性の機序は明らかではない。我々は、CD4 陽性 T 細胞の表面に存在する種々のレセプターの中に HIV-1 複製の抑制シグナルを伝える分子があると考え、可能性のある T 細胞上表面分子を検索し、これを介した HIV-1 抑制機序を解明することを目的とした。このような HIV-1 複製抑制シグナルを伝える機能分子は HIV-1 感染防止方法の開発に応用できる可能性がある。本研究では、CD28 ファミリー分子として知られている CD28, CTLA-4, ICOS, PD1 について解析を行った。昨年までに、ヒト CD28 と ICOS に対するモノクロナル抗体が R5 あるいは X4 HIV-1 株の複製を有意に抑制することが分かった。CD28 抗体は固層化した場合のみ、ICOS 抗体は固層化の有無に拘わらず抑制効果を示した。本年度は、これらの抗体による HIV-1 抑制ステップを pseudotype virus や逆転写産物の PCR により詳細に検討した。この結果、ICOS および CD28 抗体は、HIV-1 エンベロープを持つ pseudotype virus 発現を有意に抑制したが、VSV エンベロープを持つ pseudotype virus 発現は抑えなかった。また、感染後 14~24 時間後の HIV-1 逆転写産物量は抗体存在下で有意に減少していた。これらのことから、HIV-1 感染は侵入から逆転写までの過程で抑制されていると考えられる。CD4, CXCR4, CCR5 発現の減少は認められず、用いた実験系ではサイトカイン産生も微量であった。しかし、抑制活性は NFκB 阻害剤により消失することから、これらの抗体からのシグナルは NFκB を介すると考えられる。さらに、抗体の代わりに可溶型 ICOS リガンドを加えた場合にも HIV-1 複製は抑制されたのに対して、CD28 リガンドを加えた場合には HIV-1 複製はやや増加した。以上から、ICOS の自然あるいは人工リガンドは CD4 陽性細胞上の ICOS を介して HIV-1 感染の初期過程を抑制することが分かった。

A. 研究目的

我々は、遺伝素因に因らない HIV-1 感染抵抗性のヒト集団の存在や弱毒化生ワクチン接種サルが新たな SIV 感染抵抗性になる事実から、CD4 細胞上の何らかのレセプター分子から HIV-1 複製を抑制する negative signal が伝わるのではないかと仮定している。CD4 陽性 T 細胞の表面には、活性化あるいは抑制シグナルを伝える様々な分子が存在し、HIV-1 複製を制御すると考えられるがその詳細は不明である。このような HIV-1 複製抑制シグナルを伝える機能分子は HIV-1 感染予防方法の開発に応用できる可能性がある。本研究では、HIV-1 抑制

シグナルを伝える CD4 陽性 T 細胞上の表面分子を見つけ、これを介した HIV-1 抑制機序を解明することを目的として、CD28 ファミリー分子の HIV-1 複製に対する影響を調べた。

B. 研究方法

1) 健康人末梢血単核球 (PBMC)への野生型あるいは pseudotype HIV-1 感染

非感染健康人 PBMC を PHA 刺激し、IL-2 存在下に一週間培養したものから、磁気ビーズ (MACS) を用いて CD4 陽性 T 細胞分画を得た。これらの細胞に X4 HIV-1/NL4-3 あるいは R5 HIV-1/JR-CSF 株を 2 時間感染させ、洗浄後

様々な抗体とともに IL-2 添加培地で培養した。エンベロープ欠損 luciferase 発現 HIV-1 plasmid (pNL4-3 lucΔenv) と VSV-G エンベロープ発現 plasmid (pHCMVG) を 293T 細胞に共導入した上清を DNase 処理し、これを pseudotype virus として CD4 陽性 T 細胞に感染させた。

2) 抗体および可溶性リガンド

ヒト CD28 family 分子に対するマウスモノクロナル抗体 TN228 (CD28)、M1H8 (CTLA-4)、M1H4 (PD-1) は東京医科歯科大学の東博士から、SA12 (ICOS) は Japan Tobacco 社から精製抗体として供与された。対照としてマウス IgG1 を用いた。可溶性 ICOS リガンド (B7h) あるいは CD28 リガンド (CD80) は R&D 社より購入した。

3) HIV-1 産生抑制の検定

上記のように HIV-1 感染させた CD4+PBMC 培養の 4 日後上清中の HIV-1 p24 量を ELISA により調べた。Pseudotype virus の発現の検定には、感染 48 時間後の CD4+細胞抽出液中の luciferase 活性をルミノメーターで測定した。

4) PCR 法による逆転写産物の検出

CD4+PBMC に HIV-1 感染後、経時的に細胞から DNA を抽出し、HIV-1 LTR R 領域と Gag 領域に設定した primer set を用いて後期逆転写産物を増幅した。感染後産物のみを検出するコントロールとして熱処理ウイルスを、内部コントロールとして β グロビン特異的 primer を用いた。

C. 研究結果

1) CD28 と ICOS に対するモノクロナル抗体による HIV-1 複製

CD28 抗体は、培養中に直接添加した場合は度々 HIV-1 複製を増強したが、プレートに抗体を固層化した場合は著明に HIV-1 産生を抑制した。ICOS 抗体は、培養中に直接添加した場合にも固層化した場合にも安定して HIV-1 抑制効果を示した。固層化した抗体で細胞を感染前に抗体で処理すると抑制効果が増強された。

両抗体は、X4、R5 両 HIV-1 株に対して抑制効果を示し、CD4 と CXCR4 の発現量には影響を与えず、CCR5 の発現はむしろ増加した。また、ICOS および CD28 固層化抗体の細胞増殖への影響は軽微であった。(昨年度まで)

2) HIV-1 感染初期過程に対する影響

HIV-1 および VSV-G エンベロープを有する pseudotype HIV-1 を CD4 陽性細胞に感染させ両者を比較したところ、HIV-1 エンベロープを持つ pseudotype virus のみが CD28, ICOS 抗体で抑制された。これは VSV-G pseudotype virus を用いて昨年得ていた予備実験結果を、適切な対照と判定に耐える luciferase 活性がでる実験条件に改善し、再現性を確認したものである。細胞を感染前に抗体で処理すると、HIV-1 および VSV-G エンベロープの差はさらに明確になった。

3) 感染初期の HIV-1 逆転写産物の減少

次に、これらの抗体が HIV-1 感染のどのステップを抑制するか調べるため、CD4+細胞に HIV-1 感染後抗体処理し、経時的に HIV-1 逆転写産物を PCR で増幅した。この結果、感染 3 時間の時点では抗体の有無にかかわらず PCR 産物は認められなかった。感染 24 時間後、抗体処理していない細胞では PCR 産物が検出できたにもかかわらず、CD28, ICOS 抗体処理細胞では PCR 産物は有意に少なかった。また、別の実験では、感染 14 時間後の細胞について PCR を行ったが、やはり抗体処理群で有意に逆転写産物の減少が確認された。

4) ICOS リガンドの HIV-1 抑制効果

次に、CD28 と ICOS 抗体の HIV-1 抑制効果が、それぞれのナチュラルリガンドによって再現できるかどうか調べた。HIV-1 NL4-3 に感染させた CD4+PBMC にヒト Ig の Fc 部分と融合させた可溶性の CD28 リガンド (CD80) を加えたところ、HIV-1 p24 量はむしろ増加した。一方、可溶性の ICOS リガンド (B7h) を加えた場合は、ICOS 抗体と同様有意な HIV-1 抑制効果が認められた。

D. 考 察

CD28 抗体は固層化すると HIV-1 複製を抑制したが、固層化しない CD28 抗体は HIV-1 複製を増強した。従って、CD28 からの刺激は HIV-1 複製にとっては正負両方あり、CD28 リガンド (CD80) が HIV-1 複製を増強したことから考えて、生体内では HIV-1 複製を助長する可能性が強い。

一方、ICOS 抗体は、固層化の有無に拘わらず HIV-1 複製を抑制し、可溶型の ICOS リガンド (B7h) も HIV-1 複製を抑制した。従って、ICOS は生体内で HIV-1 複製にたいして負の制御を行っている可能性がある。

ICOS を CD3 と同時に刺激すると T 細胞が活性化され、種々のサイトカインを産生することが知られている。しかし、本研究で用いた実験系は、PHA 刺激から 1 週間後に ICOS だけを刺激している。このような条件では、調べたサイトカイン (IFN γ , TNF, IL-4, IL-5, IL-10, RANTES, MIP-1a) の産生量は微量であった。

PHA 刺激の直後に ICOS 抗体で刺激を加えた場合には、上記サイトカインの著明な産生が認められ、HIV-1 抑制効果も同様に認められた。従って、調べた種類のサイトカインの量と HIV-1 抑制には直接の関係は無いと思われる。

PCR を用いた解析では、抗体存在下で感染初期の HIV-1 逆転写産物が有意に減少していたことから、抑制は逆転写段階以前のステップでおこると考えられる。また、これらの抗体は、HIV-1 エンベロープを持つ pseudotype HIV-1 には抑制を示したの VSV-G pseudotype HIV-1 には影響しないことから、HIV-1 の侵入から脱核、逆転写までの段階を主に抑制すると推察される。しかし、これは、HIV-1 レセプター発現の減少によるものではない。

ICOS は一旦活性化した T 細胞に発現され、一方 ICOS リガンドはマクロファージや DC 等の抗原提示細胞のほか上皮細胞や活性化 T 細胞にも発現されている。本研究の結果から、ICOS のナチュラルリガンドあるいは人工的リガンド生体内で HIV 抑制効果をもたらす可能性が示唆された。また、HIV-1 持続感染のレゼルボアと考えられているメモリー T 細胞にお

ける HIV-1 複製調節機序の一つと考えられる。

ICOS 刺激による HIV-1 抑制については初めての報告であり、本年度までの結果は国内学会および国際学術誌 *Virology* に発表した。

E. 結 論

ICOS のナチュラルリガンドあるいは人工的リガンドは CD4+細胞における HIV-1 複製を抑制する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) X. Zhou, M. Kubo, H. Nishitsuji, K. Kurihara, T. Ikeda, T. Ohashi, M. Azuma, T. Masuda, and M. Kannagi. Inducible co-stimulator (ICOS)-mediated suppression of human immunodeficiency virus type 1-replication in CD4+ T lymphocytes. *Virology* 325: 252-263, 2004.
- 2) Y. Emori, T. Ikeda, T. Ohashi, T. Masuda, T. Kurimoto, M. Takei, and M. Kannagi. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by Z-100, an immunomodulator extracted from human type tubercle bacilli, in macrophages. *J. Gen. Virol.* 85: 2603-2613, 2004.
- 3) M. Kubo, H. Nishitsuji, H. Liu, K. Kurihara, T. Masuda, and M. Kannagi. Suppression of HIV-1 replication by HIV-1-irrelevant CD8+ cytotoxic T lymphocytes and their culture supernatants. XV International AIDS Conference, Medimond S.r.l., E710F1425: 15-19, 2004.
- 4) H. Nishitsuji, T. Ikeda, H. Miyoshi, T. Ohashi, M. Kannagi, and T. Masuda. Expression of small hairpin RNA by lentiviral-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells. *Microbes and Infection.* 6: 76-85, 2004T.
- 5) Ikeda, H. Nishitsuji, X. Zhou, N. Nara, T. Ohashi, M. Kannagi, and T. Masuda. Evaluation of the functional involvement of

Human immunodeficiency virus type 1 Integrase in nuclear import of viral cDNA during acute infection. J. Virol. 78: 11563-11573, 2004.

2. 学会発表

- 1) M. Kubo, H. Nishitsuji, H. Liu, K. Kurihara, T. Masuda, and M. Kannagi. Suppression of HIV-1 replication by HIV-1-irrelevant CD8+ cytotoxic T lymphocytes and their culture supernatants. XV International AIDS Conference. July 2004, Bangkok.
- 2) 周シン、久保誠、西辻裕紀、栗原清、池田たま子、大橋貴、東みゆき、増田貴夫、神奈木真理. ICOS リガンドによる HIV-1 複製調節. 第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月.
- 3) 久保誠、西辻裕紀、栗原清、増田貴夫、神奈木真理. HIV 抗原と無関係な特異性を持つ CTL 株とその培養上清による HIV-1 複製抑制効果. 第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月.
- 4) 増田貴夫、池田たま子、西辻裕紀、濱本誠

二、神奈木真理. HIV ゲノムの核内輸送におけるインテグラーゼ宿主因子の機能的関与. 第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月.

- 5) Zhou Xin、久保誠、西辻裕紀、栗原清、池田たま子、大橋貴、東みゆき、増田貴夫、神奈木真理. CD28 ファミリー分子による HIV-1 複製調節. 第 34 回日本免疫学会、札幌、2004 年 12 月.
- 6) 久保誠、西辻裕紀、栗原清、増田貴夫、神奈木真理. HIV 抑制因子を産生する健康人由来 CD8+CTL 株の樹立. 第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月.
- 7) 周シン、久保誠、西辻裕紀、栗原清、池田たま子、大橋貴、東みゆき、増田貴夫、神奈木真理. ICOS と CD28 を介する HIV-1 複製調節. 第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月.
- 8) 池田たま子、西辻裕紀、神奈木真理、増田貴夫. HIV ゲノム核内移行におけるインテグラーゼの機能的関与. 第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月.

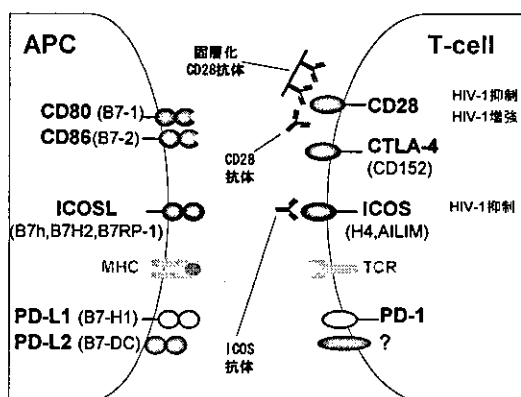


図 1. ICOS, CD28 抗体による HIV-1 複製抑制。CD28 ファミリー分子のうち、CD28 に対する抗体は固層化された時は HIV-1 複製を抑制するが、固層化しなければ時に増強も見られた。一方、ICOS に対する抗体は固層化の有無に拘わらず HIV-1 複製を抑制した。

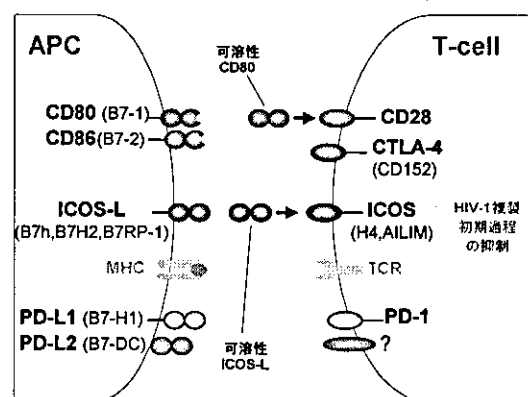


図 2. ICOS ligand による HIV-1 複製抑制。可溶性 ICOS ligand (B7h) は HIV-1 複製を抑制した。可溶性 CD80 (CD28 ligand) はかえって HIV-1 複製を増強した。

10. 樹状細胞の DC-SIGN と感染防御機構

分担研究者 牧野 正彦 国立感染症研究所病原微生物部 部長
協力研究者 向井 徹 国立感染症研究所病原微生物部 室長

研究要旨 HIV-1 と抗酸菌は、樹状細胞表面に発現する共通レセプターDC-SIGN 抗原を認識し、樹状細胞に感染することが知られている。HIV-1 と抗酸菌とりわけ非結核性抗酸菌が同一固体に重複感染すると両病変が著しく悪化し重篤かつ高い致死率を示す。DC-SIGN 抗原は、多くの病原体を認識するレセプター分子として作用し、樹状細胞の機能を抑制すると考えられているが、HIV-1 と非結核性抗酸菌の両者が感染した場合、それぞれに対する生体防御反応がどのように影響を受けるのか詳細は不明である。本研究では、環境菌である非結核性抗酸菌が DC-SIGN 抗原を認識して細胞性免疫反応の根幹を成す樹状細胞へ侵入する可能性を、DC-SIGN 抗原発現細胞株を用いて検索した。その結果、これまでの報告とは異なり、代表的非結核性抗酸菌 *Mycobacterium avium* も DC-SIGN 抗原を認識する病原体であることを明らかにした。

A. 研究目的

非結核性抗酸菌は環境菌であり、一旦感染しても多くの場合不顕性感染に留まり、多くの病原体は対外へ排除される。しかし、HIV-1 感染者に非結核性抗酸菌が重複感染すると重篤な病変が誘導され、多くの場合不幸な転帰をもたらす。HIV-1 と非結核性抗酸菌の重複感染により毎年数十万人が死亡しており、アフリカ・東南アジアなど発展途上国では、HIV-1 感染者のほとんどが抗酸菌に感染していると予想されている。HIV-1 と非結核性抗酸菌に対する生体防御反応は、樹状細胞を抗原提示細胞とする細胞性免疫によって営まれている。樹状細胞の活性化によって誘導される CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の活性化が、病原体感染細胞のアポトーシスおよび対外排除に極めて重要な役割を果たす。しかし、HIV-1 と非結核性抗酸菌の重複感染者において、病変が極めて強く重篤化する機構については明らかにされていない。近年、樹状細胞表面に発現する DC-SIGN 抗原が HIV-1 および抗酸菌を認識するレセプター抗原である可能性が示唆された。しかし、現在 100 種以上知られる抗酸菌の全てが一様に DC-SIGN 抗原を認識するわけではなく、菌種によって異なる親和性を示すと考えられている。非結核性抗

酸菌の DC-SIGN 抗原親和性については種々の報告がなされており、見解の統一は見られていない。ここでは、HIV-1 感染者の日和見感染症として重要な *M. avium* の DC-SIGN 抗原への結合性について検討を加えることを目的とした。

B. 研究方法

DC-SIGN 非発現細胞株 K562 へ、DC-SIGN 発現プラスミドを遺伝子導入し、G418 存在下、限界希釈法により、DC-SIGN 発現細胞株 3M-1 を得た。

GFP 遺伝子を抗酸菌-大腸菌シャトルベクターに組み込み、*M. smegmatis*, *M. avium* および *M. bovis* BCG へエレクトロポレーション法により遺伝子導入を行い、カナマイシン含有プレートにより、GFP 発現各種抗酸菌を得た。

各種抗酸菌の DC-SIGN 依存的細胞付着能を検討するため、各種 GFP 発現抗酸菌を親株 K562 および DC-SIGN 発現細胞株 3M-1 へ、MOI: 20 にて 18 時間共培養した後、Alexa Fluoro546 標識抗 DC-SIGN 抗体により染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡下で細胞を観察し、GFP の緑色、抗 DC-SIGN の赤の合成色黄色を DC-SIGN と抗酸菌が結合した菌とし、合成色数を計測した。

DC-SIGN による抗酸菌取り込み能を検討するため、細胞内侵入生存菌数の検討を行った。上記と同様に、MOI: 0.1 にて、*M. avium* もしくは *M. bovis* BCG を細胞株と共培養し、18 時間後、細胞外菌体を洗浄除去した後、カナマイシン含有 7H10 プレート接種した。*M. avium* は、10 日後、*M. bovis* BCG は、3 週後コロニー数を計測した。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解 (インフォームドコンセント) を得た。

C. 研究結果

DC-SIGN 依存的細胞付着能を検討した結果、DC-SIGN 発現細胞へ *M. smegmatis* は 2.5%、*M. avium* は 12.7%、*M. bovis* BCG では、23.2% の細胞に、菌の付着が観察された。DC-SIGN を発現しない親株 K562 では、菌の付着は認められなかった。また、Ca 阻害剤である EGTA 存在下では、DC-SIGN 発現細胞 3M-1 への上記抗酸菌の付着はほとんど認められなかった。DC-SIGN 抗原はカルシウム依存性にその機能を発揮することが知られるが、EGTA 存在下で抗酸菌の 3M-1 細胞への結合が抑制されたため、3M-1 細胞への菌の付着は DC-SIGN 依存的であると考えられた。

細胞内侵入検討では、*M. avium* は、K562 細胞へは 122 CFU の菌が侵入したのに対し、3M-1 細胞へは 220 CFU の抗酸菌が侵入した。同様に *M. bovis* BCG では、K562 細胞で 398 CFU、3M-1 細胞で 805 CFU の抗酸菌の侵入が観察された。両菌共に、DC-SIGN 発現細胞へは、非発現細胞に比べ約 2 倍細胞内侵入効率が上昇し、BCG は *M. avium* と比較し、約 4 倍効率よく細胞内へ侵入した。

D. 考察

抗酸菌は 100 種類以上知られ病原性菌と非病原性菌に大別される。病原性菌の中には、結核菌と結核以外の非結核性抗酸菌が存在す

る。これらの抗酸菌は、HIV-1 感染者に重複感染すると HIV と抗酸菌症の両者の病変が著しく悪化する。抗酸菌は、抗原提示細胞に対し親和性を有し、代表的な抗原提示細胞である樹状細胞へ感染することが、抗酸菌に対する生体防御反応を賦活する上で重要な役割を果たす。抗酸菌は樹状細胞上の種々のレセプター抗原に結合することで細胞内に取り込まれる。これらの中で、近年 DC-SIGN は抗酸菌表層に存在する Lipoarabinomannan (LAM) を認識することが明らかにされた。これまでの研究では、DC-SIGN をレセプターとして使用する抗酸菌は結核菌群のみであり、他の抗酸菌種は使用しないと報告されてきた。しかし、本実験の結果、結核菌群である *M. bovis* BCG よりも非効率的ではあるが、非結核性抗酸菌である *M. avium* も明らかに DC-SIGN をレセプターとして利用することが示された。つまり、結核菌群の Tri-もしくは Di-MAN LAM は、リガンドとして知られているが、*M. avium* の単一型 MAN-LAM も DC-SIGN への付着能を有することが示された。一方、非結核性抗酸菌である *M. smegmatis* は、病原性菌の Mannose 型 LAM とは異なる Phosphonoositolide 型 LAM を有し、DC-SIGN との相互作用を認めなかった。本研究により、DC-SIGN と相互作用しないことが確認された。DC-SIGN に結合する分子は、一般に樹状細胞の機能を抑制することが知られる。HIV-1 の gp120 も DC-SIGN に結合するが、T 細胞の活性化は誘導しない。昨年、抗酸菌由来のタンパク抗原 Major Membrane Protein-II は DC-SIGN に結合した後、Lysosome にまで運搬されることを明らかにした。DC-SIGN に結合し樹状細胞の機能を抑制する HIV-1 gp120 が、抗酸菌の有する樹状細胞の活性化誘導能にどのような影響をもたらすか、HIV-1 と非結核性抗酸菌および結核菌の重複感染の不幸な転帰を説明し得る分子機構の解明に繋がるか、今後の重要な課題と想定される。

E. 結論

HIV-1 の日和見感染として重要な位置を占

める非結核性抗酸菌も、免疫抑制誘導性細胞表面レセプターDC-SIGN 抗原に結合し、樹状細胞内に取り込まれることを初めて明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyamoto, Y., T. Mukai, F. Takeshita, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, and M. Makino. Aggregation of mycobacteria caused by disruption of fibronectin-attachment protein-encoding gene. *FEMS Microbiol. Letters*, 236:227-234, 2004.
- 2) Kimura, H., Y. Maeda, F. Takeshita, L. E. Takaoka, M. Matsuoka, and M. Makino. Upregulation of T-cell-stimulating activity of mycobacteria-infected macrophages. *Scand. J. Immunol.*, 60:278-286, 2004.
- 3) Yamashita, Y., Y. Maeda, F. Takeshita, P. J. Brennan, and M. Makino. Role of the polypeptide region of 33 kDa mycobacterial lipoprotein for efficient IL-12 production. *Cell. Immunol.*, 229:13-20, 2004.

2. 学会発表

- 1) Development of a new vaccine candidate against mycobacteria. Makino, M., M. Maeda, T. Mukai, and N. Ishii. 4th The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 30 August-2 September, 2004, Awaji Island, Hyogo, Japan.
- 2) Study of the interaction of *M. leprae* with Schwann cells. Maeda, Y., M. Endoh, K. Terao, and M. Makino. 4th The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 30 August-2 September, 2004, Awaji Island, Hyogo, Japan.
- 3) The genes involved in glycosylation steps of mycobacterial glycopeptidolipids. Miyamoto, Y., T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yana, and M. Makino. 4th The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 30 August-2 September, 2004,

Awaji Island, Hyogo, Japan.

- 4) Identification of anti-mycobacterial host defense-associated antigen and assessment of its immunological significance. Makino, M., Y. Maeda, and T. Mukai. Fortieth Anniversary US-Japan Cooperative Medical Science Program. 39th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, December 7-10, 2004.
- 5) Loop-mediated isothermal amplification of the *dnaA* sequence for rapid detection of *Mycobacterium leprae*. Mukai, T., Y. Miyamoto, M. Matsuoka, T. Yamazaki, and M. Makino. Fortieth Anniversary US-Japan Cooperative Medical Science Program. 39th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, December 7-10, 2004.
- 6) Regulation by clofazimine of cytokine production in *M. leprae*-infected macrophages. Fukutomi, Y., F. Takeshita, M. Matsuoka, and M. Makino. Fortieth Anniversary US-Japan Cooperative Medical Science Program. 39th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, December 7-10, 2004.
- 7) らい菌由来抗原 MMP-II 分泌型 BCG 株の作製とその免疫学的性状解析. 稲垣勝也, 前田百美, 牧野正彦. 日本農芸化学会 2004 年度(平成 16 年度)大会 2004 年 3 月 広島
- 8) らい菌ゲノム DNA の株間における多様性の検討. 中田 登, 松岡正典, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 9) らい菌由来抗原 MMP-II の分泌型および脂質付加型発現抗酸菌株の作製. 稲垣勝也, 前田百美, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 10) サルシュワン細胞のらい菌感受性の検討. 前田百美, 牧野正彦, 遠藤真澄, 寺尾恵治. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 11) 抗酸菌糖脂質 Glycopeptidolipids (GPLs) 糖酵素遺伝子の破壊株作製とその機能解析.

- 宮本友司, 向井 徹, 武下文彦, 中田 登, 甲斐雅規, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 12) らい菌由来 Major Membrane Protein-II による自然免疫および獲得免疫の活性化. 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹, 武下文彦, 山下康子, 稲垣勝也, 石井則久. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 13) らい菌由来リポ蛋白 LpK の IL-12 産生活性中心の解析. 山下康子, 前田百美, 武下文彦, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 14) DC-SIGN を介した抗酸菌感染の解析. 向井 徹, 宮本友司, 前田百美, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 15) *M. smegmatis katG* 変異株の機能. 福富康夫, 甲斐雅規, 中田 登, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 16) LAMP 法によるらい菌遺伝子の検出. 向井 徹, 宮本友司, 武下文彦, 牧野正彦. 第 77 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2004 年 5 月 大宮
- 17) らい菌ゲノム DNA の多様性についての検討. 中田 登, 松岡正典, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 牧野正彦. 第 77 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2004 年 5 月 大宮
- 18) クロファジミンによるマクロファージのサイトカイン産生調節. 福富康夫, 武下文彦, 松岡正典, 牧野正彦. 第 77 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2004 年 5 月 大宮
- 19) 抗酸菌感染マクロファージにおける菌の細菌内寄生と排除に関わる分子機構. 鈴木幸一, 武下文彦, 中田 登, 松岡正典, 牧野正彦. 第 45 回日本組織細胞化学学術集会 2004 年 10 月 鹿児島
- 20) 自然免疫および獲得免疫の活性化能を有する新たな抗酸菌抗原の同定. 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹, 山下康子, 石井則久. 第 34 回日本免疫学会総会 2004 年 12 月 札幌
- 21) ヒトマクロファージのらい菌貪食とサイトカイン産生. 福富康夫, 牧野正彦. 第 34 回日本免疫学会総会 2004 年 12 月 札幌
- 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