

各プラスミドの構築を確認した後に、培養細胞（BHK21細胞、ヒトHEK293細胞）に導入を行なって遺伝子の発現レベルを検討した。検討用の細胞としては、ハムスター腎細胞株（BHK21細胞）と、ヒト胎児性腎細胞株（HEK293細胞）を使用した。それぞれの遺伝子に関する発現レベルの確認は、産生される蛋白質の量を指標にして行った。IL-12遺伝子については、遺伝子導入後に培養上清を回収し、培地中に含まれるIL-12蛋白質濃度をELISA法により測定することで定量した。一方、HSP65蛋白質については、遺伝子をBHK21細胞に導入後に細胞溶解物を調製し、20uLの細胞溶解物に含まれるHSP65蛋白質量をウェスタンブロット法により比較検討した。

結核感染症に対する有効性については、動物モデルとして小動物（マウス、モルモット）と、中動物（サル）の3種類の評価系を用いて有効性の評価を行った。適切な投与間隔でHVJ-Eで製剤化したDNAワクチンを筋肉内に連続投与し、結核菌を感染させて評価を行った。

2. DNAワクチンの製剤化技術の開発

本事業で開発を進めている治療用DNAワクチンを、医薬品として開発するためには薬効と安定性の高い製剤を開発し、臨床試験や上市後の製品として供給する必要がある。特にアジア地域で普及させるためには、冷凍庫が必要な凍結製剤ではなく、常温でも安定性の高い製剤を開発する必要がある。DNAワクチンの薬効と安定性の向上を目的として、新規製剤の検討を行った。

従来の製剤の調製は、以下のようにして行った。まず、氷上で冷却したHVJ-Eベクター溶液に界面活性剤を添加して、ベクターを構成する膜成分の透過性を一過性に増加させた。そして、DNAワクチン溶液を添加して氷上で静置する事でHVJ-Eベクター粒子中への封入を行った。封入後は、バッファーを添加して界面活性剤を希釈した後に、遠心操作を行ってDNAワクチンを封入したHVJ-Eベクターを回収した。遠心により回収したHVJ-Eベクターは、生理食塩水で適切な濃度に調整した後に、有効性試験に使用した。また、新規製剤については、凍結乾燥処理したHVJ-Eベクターに対して、適切な量のDNAワクチン溶液を直接添加することで調製を行い、有効性検討に使用した。

新規製剤の開発については、バイオ医薬の製剤化技術として利用されている凍結乾燥技術を中心に検討を行った。そのために、凍結乾燥工程において、添加する糖や塩の種類と濃度、温度、処理時間を中心に条件の検討を行った。それぞれの条件の評価は、遺伝子導入活性を指標として、凍結前後の比較と、種々の温度で一定期間保存後の活性で実施した。

3. 治験薬GMP製造技術の開発

本事業において開発を行っているHVJ-Eベクターは、臨床での実用化を目的としているため、薬効検討や安全性検討に使用するサンプルについては、治験薬GMPレベルの製造が可能なパイロットプラントでの製造を行った。製造施設としては、産業技術総合研究所・関西センターに整備したパイロットプラントで実施し、それぞれの製造に際しては、製造記録（バッチレコード）を作成し、記録として保存した。また、製造機器についても、GMP製造に対応した機器を使用して製造を行った。更にHVJ-Eベクターの製造法についても、GMPグレードでのスケールアップが可能な工程を検討した。

また、本事業において開発を行っているHVJ-Eベクターは、臨床試験の実施を目標として開発を行っているため、治験薬GMP製造に対応した工程管理と品質管理が必要になる。そこで、暫定的な規格値の設定を進め、それに対応した検定技術の確立を行った。また、治験薬の製造を行うために必要なハードの部分である、パイロットプラントについても、治験薬製造性能に関する実証データが必要であるためのバリデーションが必要になるため、そのマスタープランの作成を行った。

4. 前臨床試験のための基礎研究

臨床応用を行うためには、ガイドラインに準じた前臨床試験データの取得が必要である。その種類としては、主に薬効試験、薬効メカニズムの解析、安全性試験がある。このうち薬効試験については、共同研究先である近畿中央胸部疾患センターとの共同実施（マウス、ラット、サル）となるため、薬効メカニズムの解析と、安全性試験の立案と実施について進めた。それらの試験データの取得については、規制当局のガイドラインに従って実施し、例えば安全性試験についてはGLP基準に準拠した施設で実施した。

5. (倫理面への配慮)

本研究を実施するにあたり、ジェノメディア株式会社は、池田ラボラトリーの所在地である独立法人産業技術総合研究所の規定に従い、国で定められている、組換えDNA実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業技術総合研究所で開催される各委員会で実験許可を受けてから実験を行った。

C. 研究結果

1. 新規DNAワクチンの構築改変と有効性評価（平成18年度）

結核感染症に対する新規のDNAワクチンを臨床応用するためには、臨床において実績のあるプラスミドを用いて構築を行う必要がある。そこで、従来

のpcDNA3.1ベクターを骨格とする構築を、臨床実績のある骨格へ改変した。構築したプラスミドを使用して、マウスIL-12遺伝子とHSP遺伝子の発現効率を蛋白質レベルで検討したところ、HSP65遺伝子とIL-12遺伝子で従来の構築に対してそれぞれ50%と200%程度の発現レベルが認められた。この結果から、新規構築においても遺伝子の発現が確認されたため、それらを用いて疾患モデル動物による薬効試験で更に比較検討を行うことにした。その結果、マウスモデルでELISPOTアッセイのデータを指標とした比較検討で、従来型と新規構築で同レベルの免疫の活性化が認められた。この結果から、新規構築においても薬効に必要な免疫の活性化が誘導されることが明らかとなった。今後は、下記に示す新規構築も含めて実用化に必要な薬効や安全性の検討を更に進める予定である。

上記のようにして構築したDNAワクチンでは、IL-12とHSP65遺伝子は別々の構築上に存在しているため、開発時に2種類の成分の取り扱いになると予測される。そのため、有効性を検討するための前臨床試験を行う場合には、それぞれの配合比を検討して至適混合比を見出す必要がある。また、GMP製造を行う場合の品目数が増える上に、試験を行う場合に2成分となるため試験の群数の設定が複雑になる。そこで、構築を変更して1つのプラスミド上に2種類の遺伝子の発現ユニットを搭載することが出来るかを検討した。そのために、上記のようにして構築したプラスミドからマウス、ヒト、モルモットのIL-12遺伝子の発現ユニット（プロモーター＋IL-12遺伝子＋ポリA付加シグナル）を含むDNA断片をそれぞれ調製し、HSP65の発現プラスミドへ組み込みを行った。そして、構築したDNAワクチンについて培養細胞を用いて遺伝子の発現を検討した。その結果、BHK21細胞においてはHSP65遺伝子とIL-12遺伝子の発現レベルは共発現を行わない場合の70%と20%程度のレベルまでそれぞれ減少することが明らかとなった。

また、臨床応用に必要な薬効薬理と安全性試験のために、新規構築での用量・用法設定についても検討を進める予定である。

2. DNAワクチンの有効性・安定性を向上するための製剤化技術開発（平成18年度、平成19年度）

従来の製剤においても薬効（ワクチン効果、治療効果）が認められていたが、臨床応用と医薬品としての実用化を想定して、更に製剤面での開発を進めることにした。製剤開発の課題としては、薬効、保存安定性、取り扱いの簡便性のそれぞれの面での向

上である。そこで、保存安定性の面で優れた凍結乾燥による製剤化条件について検討を行い、DNAワクチン（筋内投与、鼻腔内投与）に適した新規凍結乾燥製剤を開発した。そして、新規凍結乾燥製剤を用いて遺伝子の発現レベルをマウスへの筋内投与で行ったところ、レポーター遺伝子（LacZ遺伝子）の発現レベルを指標として、80倍以上の遺伝子発現増強が認められた。以上のように、平成18年度までに臨床応用や製品としての実用化に適した新規結核DNAワクチンの製剤化について検討を行い、従来の製剤よりも活性が高い製剤を開発することが出来た。

そこで、平成19年度は安定性の向上を目的として、更に凍結乾燥技術の開発を進めた。特に、本事業で開発を行っている結核用DNAワクチンは、アジア地域での使用を想定しているため冷凍保存や温度管理された状態での輸送が困難であると想定される。そこで、常温でも保存や輸送が出来る製剤の開発を試みた。そのために、凍結乾燥工程において重要な添加剤である糖、塩類の種類や濃度について種々の検討を行うと共に、凍結乾燥工程における温度管理についても様々な検討を行った。その結果、凍結乾燥後の保存安定性が高くなるといわれているケーキ様の形状となる凍結乾燥条件の確立に成功した。そこで、遺伝子導入活性を指標にして、凍結乾燥前後の活性変化と、常温での保存安定性を検討した結果、凍結乾燥前後で活性の低下が認められないこと、常温で保存した場合でも10ヶ月以上安定であることが明らかとなった。以上の検討により、凍結乾燥技術により、常温での輸送や保存に適した最終製剤候補を確立することが出来た。今後は、治験薬として使用するために必要な安定性試験をガイドラインに従って取得する予定である。

3. DNAワクチンの製造技術の検討（平成18年度、平成19年度）

平成18年度は、前臨床試験と臨床応用の実施を考慮して、実際に治験薬を製造する予定のパilotプラントで製造したHVJ-Eベクターを使用して活性の評価を行った。製造後に品質試験により評価を行った結果、遺伝子導入活性など規格値として採用する予定の品質管理項目についての品質レベルが確認された。そこで、上記のようにして構築を行ったプラスミドDNAと技術を用いて製剤化を行い、疾患動物による薬効検討試験用に供与を行った。その結果、薬効に必要なHSP65蛋白質に対する特異的免疫の誘導が認められることが明らかとなった。以上の結果から、治験薬製造を想定した製造施設と製造工程で製造を行ったDNAワクチンで、目的と

する免疫の活性化が誘導できることが明らかとなった。

そこで、平成19年度は、実際に臨床応用を開始するために必要な製造工程、製造体制、製造施設について、それぞれ治験薬GMPガイドラインに従って確立する事を進めることにした。そのために、上記のようにして確立した製剤化を含む製造工程の管理と品質管理に必要な暫定規格値の設定を行い、それに従って管理に必要なアッセイ

(検定)法を確立した。また、工程、施設については、臨床に使用するDNAワクチンの製造時期に併せてバリデーション(妥当性確認作業)を進めるため、ガイドラインに従ってマスタープランの作成を開始した。今後は、作成したプランに従ってバリデーションを進め、臨床に使用するDNAワクチンの製造に必要なデータの取得を進める予定である。

4. 前臨床試験のための基礎研究(平成19年度)

治療用の結核DNAワクチンの開発を成功させるためには、抗原蛋白遺伝子(HSP65)により免疫を活性化した上で、それを長期間持続させる必要がある。そこで、HVJ-Eを利用したDNAワクチンによる免疫活性化のメカニズム解析を行った。その結果、HVJ-Eは抗原蛋白遺伝子の導入効率を向上すると共に、アジュバントとして樹状細胞の活性化を誘導できることが明らかとなった。また、活性化された樹状細胞は細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導と並行して、IL-6の産生を介して制御性T細胞(Treg)の機能を抑制することが明らかとなった。現在種々のDNAワクチンが開発されているが、アジュバントとして適切な物質がないために、十分な免疫の活性化を得ることが難しいといわれている。

HVJ-Eは、アジュバントとして結核の制御に重要なTh1タイプのヘルパーT細胞を介する免疫を高効率に活性化(CTLの誘導)できる上に、誘導された免疫を抑制することが示唆されているTregの機能をコントロールして、薬効を長期間維持できると期待される。また、この作用は、マウスとヒトの樹状細胞で共に認められることから、臨床においても同様の効果を期待することが出来る。今後は、臨床応用を実施するために詳細な解析を進める必要がある。

また、臨床応用を行うには、薬効・薬理試験データと共に、安全性に関するデータの取得も進める必要がある。そのため、HVJ-Eに関する安全性試験データの取得についても進めた。そのために、ガイドラインに従って毒性試験のマスタープランの作成を行って、GLP試験施設での用量設定試験データ

の取得を開始した。今後は、更に臨床応用の開始のための申請に必要な試験データの取得を、GLP基準に準拠して進める予定である。

D. 考察

臨床応用に適したDNAの構築については、pcDNA3.1ベクターを骨格とする構築をpVAX1へと変更を行った。これによる著しい発現低下は認められず、薬効的にも維持されることが明らかとなった。この結果から、プラスミドの骨格変更に伴う薬効の低減はないと考えられた。また、2つの遺伝子を何時のプラスミドベクターから発現させるための構築変更については、IL-12とHSP65遺伝子のそれぞれについて発現の低下が認められた。この原因としては、共発現型のプラスミドではサイズが1.3倍~1.6倍程度に増加していることから、遺伝子の導入効率が低下したことが原因と考えられる。そのため、新構築に適した用法用量設定を行うことが重要だと考えられる。

新規製剤開発については、凍結乾燥製剤の開発を中心に進め、それによりDNAワクチンの単位重量あたりの遺伝子発現レベルに増強が認められた。これは、封入率の向上だけでなく、HVJ-EベクターとプラスミドDNAとの複合体形成のメカニズムも変化していることが示唆されている。また、結核の動物疾患モデルに投与を行って遺伝子発現の増強によりDNAワクチンとしての薬効を検討した結果、目的の免疫活性化が認められており、新規製剤がDNAワクチンとしての活性を保持していることが示唆された。さらに、安定性を向上するために凍結乾燥条件を種々検討した結果、常温においても安定性の高い製剤を開発することが出来た。これにより、本事業の目的であるアジア地域での普及を促進することが出来ると考えられる。

薬効検討と並行して薬効メカニズムの解析についても検討を行った結果、DNAワクチンのデリバリーシステム兼アジュバントとして利用しているHVJ-Eが、樹状細胞の活性化を介して細胞傷害性T細胞の誘導と、制御性T細胞の機能抑制をすることが明らかとなった。これらの活性は、DNAワクチンによる免疫の効率的な活性化とその長期持続性に重要であると考えられる。特に、長期間薬効が期待できる事は、投与回数の低減に繋がる事から、アジア地域での普及に重要である。

以上のように、本事業で開発した治療用結核DNAワクチンは、有用性が高いことが期待できる。これまでの研究により既存のワクチンであるBCGとは、相乗効果があることが明らかとなっているが、今後は抗生物質などとの組み合わせによる有効性の増強についても検討を行う必要があると考えられる。また、DNAワクチンに私用する遺伝子についてもポリ馬連とにするこ

とで有効性の向上が期待できるため、HSP65遺伝子以外の遺伝子についても検討を進める必要があると考えられる。

E. 結論

本事業の研究開発により、結核に対する新規ワクチン開発を進めることが出来た。特に、種々の動物を用いた感染モデルにおいて、予防効果に加えて治療効果が認められた事は、治療薬として開発する上で重要な成果である。また、既存のワクチンであるBCGとの併用で薬効の増強が認められた事は、治療方針を検討する上で重要な知見である。更に、臨床応用のための前臨床試験データ（薬効薬理、安全性、安定性）の取得についても開始しており、臨床試験の開始申請に向けた実用化開発も進めている。更に、治験薬GMP製造のガイドラインに従って、臨床試験ように提供するDNAワクチン製造技術、製造施設、製造体制の整備についても、バリデーションマスタープランの作成を行って着実に進めている状況である。今後は、臨床試験の開始申請に必要なデータを取得できた時点で、試験デザインの作成を含めた臨床応用の検討を行う必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Fukamizu R, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Matsumoto M, McMurray DN, Dela Cruz EC, Tan EV, Abalos RM, Burgos JA, Gelber R, Sakatani M. Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. Vaccine. 2007 Apr 20;25(16):2990-2993.
2. Kaneda Y, Yamamoto S, Nakajima T. Development of HVJ Envelope Vector and Its Application to Gene Therapy. Adv Genet. 2005;53PA:307-332.
3. Kaneda Y, Yamamoto S, Nakajima T. Development of HVJ envelope vector and its application to gene therapy. Adv Genet. 2005;53:307-32.
4. Kotani H, Nakajima T, Lai S, Morishita R, Kaneda Y. The HVJ-envelope as an innovative vector system for cardiovascular disease. Curr Gene Ther. 2004 Jun;4(2):183-194.
5. 中島俊洋、長澤鉄二、和田 博、「第2章 遺伝子治療用医薬品等の品質・安全性確保、第6節 非

ウイルスベクター」、バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保（監修：早川 堯夫）、2007、pp631-651、株式会社エル・アイ・シー

2. 学会発表

1. Masaji Okada, et. al., Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB., 第5回 国際ワクチン学会
2. 岡田全司等、「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：HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン」第10回 日本ワクチン学会 学術集会

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特許名称：「DNAワクチン組成物」、
出願日：平成18年9月27日PCT出願、
出願番号：PCT/JP2006/310162

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

〔IV〕 自然免疫系による結核感染防御機構に関する研究

研究協力者 小出 幸夫 浜松医科大学感染症学生体防御分野・教授

研究要旨

第三世代レンチウイルスベクターの経気道接種による肺ホーミング性抗結核ワクチンは、1回の接種で肺における結核菌感染防御能を誘導できた。また、DCを標的とした抗結核ワクチンの開発では、幾つかの候補の中でMIP-1 α をキャリアーとした結核菌防御抗原との融合蛋白ワクチンが最も効率良くT細胞を感作できた。

A. 研究目的

結核はいまだ新規発症数が2005年で880万人、死亡数が170万人と推定される世界レベルでは死因となる主要な感染症である。また、AIDSに伴う結核及び多剤耐性結核菌の出現が社会問題となっている。結核に対するワクチンとして使用されているBCGワクチンは小児期には有効であるが、10代を過ぎるとその有効性が失われるとされている。このため、BCGに代わるより有効なワクチンの開発が求められている。

B. 研究方法

- 1) 遺伝子導入効率が良く、安全性の高い第三世代レンチウイルスをワクチンベクターとして用い、経気道免疫を行うことにより、肺ホーミング性結核菌特異的T細胞を誘導した。
- 2) ナイーヴT細胞を強力に感作する樹状細胞(DC)を標的として、DCに効率よく結核菌の防御抗原を取り込ませる新規ワクチンを開発した。この目的のため、DCに発現しているCCR5のリガンドであるMIP-1 \cdot 、CD91のリガンドであるHSP70及びTSP-1と防御抗原(MPT51)の融合蛋白ワクチンを作製した。
- 3) 免疫の効果は、MPT51エピトープ刺激によるT細胞からのインターフェロン \cdot の産生、テトラマー法、細胞傷害活性で検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験計画は3Rを考慮に入れて作成し、浜松医科大学動物実験委員会の承認を得て施行した。

C. 研究結果

- 1) 第三世代レンチウイルスベクターの経気道感染による肺ホーミング性抗結核ワクチンの作製：
 - (1) 結核菌由来主要分泌蛋白MPT51を遺伝子導入したレンチウイルスベクターの気道内投与は、縦隔リンパ節に特異的CD8陽性T細胞を誘導することをテトラマー法で確認した。(2) MPT51特異的記憶T細胞は肺と脾臓に認められたが、縦隔リンパ節には認められなかった。(3) レンチウイルスベクターの単回の気道投与によ

- り、肺における結核菌感染防御能を誘導できた。
- 2) DCを標的とした抗結核ワクチンの開発：未熟DCに発現しているCCR5を標的として、これに対するリガンドであるMIP1 \cdot を我々が発見した結核の防御抗原であるMPT51と融合したDNAワクチンを作製した。その結果：(1) MIP1 \cdot /MPT51融合タンパクはDCに結合し、速やかに取り込まれた。(2) MIP1 \cdot /MPT51 DNAワクチンをマウスに遺伝子銃で3回接種し、その後MPT51特異的T細胞を検討した結果、免疫マウスの脾臓にCD4+ およびCD8+ T細胞の両者が検出された。これらはMPT51単独で免疫したマウスで検出される特異的T細胞よりも遙かに多かった。

HSP70/MPT51及びTSP-1/MPT51融合蛋白ワクチンもアジュバント効果を示したが、MIP1 \cdot /MPT51融合タンパクには及ばなかった。

D. 考察

第三世代レンチウイルスベクターの経気道接種による肺ホーミング性抗結核ワクチンは、1回の接種で肺における結核菌感染防御能を誘導できた。今後、安全性も含め臨床応用の可能性を探る必要がある。

DCを標的とした抗結核ワクチンの開発では、幾つかの候補の中でMIP-1 \cdot をキャリアーとした結核菌防御抗原との融合蛋白ワクチンが最も効率良くT細胞を感作できた。今後、この融合蛋白ワクチンの結核菌感染防御能を検討する予定である。

E. 結論

第三世代レンチウイルスベクターの経気道接種、及びMIP1 \cdot /MPT51融合蛋白ワクチンは効率よく、結核に対するT細胞を感作できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Aoshi T, Nagata T, Suzuki M, Hashimoto D, Refiei A, Suda T, Chida K, Koide Y: Identification of HLA-A*0201-restricted

- T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from Mycobacterium tuberculosis, using combination of MPT51 overlapping peptide library and computer algorithms. *Infect Immun* (in press).
2. Hashimoto D, Nagata T, Uchijima M, Seto S, Suda T, Chida K, Miyoshi H, Nakamura H, Koide Y: Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from Mycobacterium tuberculosis induces specific CD8⁺ T-cell responses in the lung. *Vaccine* (in press)
 3. Ikehara Y, Shiuchi N, Kabata-Ikehara S, Nakanishi H, Yokoyama N, Takagi H, Nagata T, Koide Y, Kuzushima K, Takahashi T, Tsujimura K, Kojima N: Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal phagocytic cells. *Cancer Letters* (in press)
 4. Nagata T, Aoshi T, Uchijima M, Koide Y: In vivo hierarchy of individual T-cell epitope-specific helper T-cell subset against an intracellular bacterium. *Vaccine* (in press).
 5. Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Chemokine receptor-mediated delivery of mycobacterial MPT51 protein efficiently induces antigen-specific T-cell responses. *Vaccine* (in press).
 6. Cervantes J, Nagata T, Uchijima M, Shibata K, Koide Y: Intracytosolic Listeria monocytogenes induces cell death through caspase-1 activation in murine macrophages. *Cell Microbiol* (in press).
 7. Nagata T and Koide Y: Anti-infective vaccine strategies In: Liu D ed. *Handbook of Listeria monocytogenes*. (in press)
 8. Enomoto N, Nagata T, Suda T, Uchijima M, Nakamura Y, Kingo C, Nakamura H, Koide Y: Immunization with dendritic cells loaded with β -galactosylceramide at priming phase, but not at boosting phase, enhances cytotoxic T-lymphocyte activity against infection of intracellular bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51:350-362, 2007.
 9. Kgeyama Y, Takahashi M, Torikai E, Suzuki M, Ichikawa T, Nagafusa T, Koide Y, Nagano A: Treatment with anti-TNF- α antibody infliximab reduces serum IL-15 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 26 (4): 505-509, 2007.
 10. Koide Y: Curcumin for maintenance therapy in ulcerative colitis (Letter). *Clin Gastroenterol Hepatol* 5:642, 2007.
 11. 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. *Vaccine* 24 (21): 4548-4553. 2006.
 12. Nakano H, Nagata T, Suda T, Tanaka T, Aoshi T, Uchijima M, Chida K, Nakamura H, Okada M, Koide Y: Immunization with dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity specific to a dominant epitope on Antigen 85A. *Vaccine* 24: 2110-2119, 2006.
 13. Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Maruyama Y, Andoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Mitsuyama K, Sata M, Yamada M, Iwaoka Y, Kanke K, Hiraishi H, Hirayama K, Arai H, Yoshii S, Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Curcumin Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis: Multicenter, Double-Blind, Randomized Clinical Trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4:1502-1506, 2006.
 14. 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.
 15. 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.
 16. Matsuda H, Suda T, Sato J, Nagata T, Koide Y, Chida K, Nakamura H: β -Galactosylceramide, a Ligand of Natural Killer T Cells, Inhibits

- Allergic Airway Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 33(1):22-31, 2005.
17. 小出幸夫：私達の研究 (56)「細胞内寄生細菌感染症をめぐって－ワクチン研究およびイメージング解析による感染機構の解明－」. *化学療法の領域* 23(11): 101-112, 2007.
 2. 学会発表
 1. 永田 年、青枝大貴、内嶋雅人、小出幸夫：DNA ワクチンを用いた細胞内寄生細菌防御におけるヘルパーT細胞の解析. 第78回 日本細菌学会総会、平成17年4月4-6日 (東京) .
 2. 内嶋雅人、永田 年、青枝大貴、小出幸夫：ケモカイン・抗原融合型抗結核菌DNAワクチンの検討. 第78回 日本細菌学会総会、平成17年4月4-6日 (東京) .
 3. Cervantes J, Aoshi T, Nagata T, Uchijima M, Koide Y: Real time imaging study on the CTL response against *Listeria monocytogenes* infected cells. 第78回 日本細菌学会総会、平成17年4月4-6日 (東京) .
 4. 田中高生、喜多洋子、桑山さち子、村木裕美子、金丸典子、橋元里美、高井寛子、岡田知佳、福永有可里、坂口弥生、古川いづみ、山田恭子、和泉谷美和、武本優次、井上義一、坂谷光則、永田 年、小出幸夫、岡田全司：新しい抗結核弱毒化リステリアワクチンの開発. 第45回日本呼吸器学会学術講演会、東京、2005 (平成17年4月14～16日) .
 5. Koide Y, Hashimoto D, Uchijima M, Suda T, Chida K, Miyoshi H, Nagata T: Intratracheal administration of third-generation lentivirus vectors encoding MPT51 and HSP65 from *M. tuberculosis* induce specific T cell responses in the lung. US-Japan cooperative Medical Science Program. Fortieth Tuberculosis and Leprosy Research Conference. Seattle, Washington, July 28-30, 2005.
 6. Enomoto N, Nagata T, Suda T, Uchijima M, Chida K, Nakamura H, Koide Y: Immunization with dendritic cells loaded with a CTL-epitope peptide and α -galactocylceramide induces strong protective immunity against intracellular bacteria infection. Vaccine Congress Berlin 2005; New Approaches to Vaccine Development From the Bench to the Field. Berlin, Germany, September 8-10, 2005.
 7. Koide Y, Hashimoto D, Uchijima M, Suda T, Chida K, Miyoshi H, Nagata T: Intratracheal administration of third-generation lentivirus vectors encoding MPT51 and Hsp65 from *M. tuberculosis* induces specific T cell responses in the lung. Vaccine Congress Berlin 2005; New Approaches to Vaccine Development From the Bench to the Field. Berlin, Germany, September 8-10, 2005.
 8. Koide Y, Nagata T, Uchijima M, Aoshi T, Shibata K: Intratracheal administration of a third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *Mycobacterium tuberculosis* induces specific T cell responses in the lung. 第35回日本免疫学会総会・学術集会. 横浜、2005 (平成17年12月13～15日) .
 9. 永田 年、青枝大貴、鈴木美奈、内嶋雅人、柴田清、小出幸夫: DNAワクチンを用いた結核菌分泌タンパクMPT51内HLA-A*0201拘束性CTLエピトープの同定. 第35回日本免疫学会総会・学術集会. 横浜、2005 (平成17年12月13～15日) .
 10. 内嶋雅人、永田 年、青枝大貴、柴田清、小出幸夫：結核菌に対するケモカイン・抗原結合型DNAワクチンの検討 第35回日本免疫学会総会・学術集会. 横浜、2005 (平成17年12月13～15日)
 11. Hashimoto D, Uchijima M, Suda T, Chida K, Miyoshi H, Nagata T, Koide Y Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *M. tuberculosis* induces lung-homing specific T cells; Determinants of Host Resistance, Susceptibility or Immunopathology to Pathogens: Integrating Knowledge from Experimental Models to Human Disease, Keystone Symposia, Keystone, CO, USA, January 6 - 11, 2006
 12. Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Maruyama Y, Andoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Mitsuyama K, Sata M, Yamada M, Iwaoka Y, Kanke K, Hiraishi H, Hirayama K, Arai H, Yoshii S, Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Curcumin Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis: Multicenter, Double-Blind, Randomized Clinical Trial. Broad Medical Research Program, Los Angeles, USA, March 23-24, 2006.
 13. 永田 年、内嶋雅人、小出幸夫：DNAワクチンを

- 用いた結核菌分泌蛋白MPT51内HLA-A*0201拘束性CTLエピトープの同定. 第79回日本細菌学会総会、金沢、平成18年3月29-31日
14. 内嶋雅人、永田 年、小出幸夫：ケモカインレセプターを標的とした抗結核菌DNAワクチンの解析、第79回日本細菌学会総会、金沢、平成18年3月29-31日
 15. Koide Y, Hashimoto D, Uchijima M, Suda Y, Chida K, Nagata T: Intratracheal administration of third-generation lentivirus vectors encoding MPT51 from *M. tuberculosis* induces lung-homing specific T cells. 12th International Society for Infectious Diseases. Lisbon, Portugal, June 15-18, 2006.
 16. Enomoto N, Nagata T, Suda T, Uchijima M, Chida K, Nakamura H, Koide Y: Immunization with dendritic cells pulsed with α -galactocylceramide and a dominant CTL epitope elicits effective protective immunity against intracellular bacteria infection. 12th International Society for Infectious Diseases. Lisbon, Portugal, June 15-18, 2006.
 17. Koide Y, Hashimoto D, Uchijima M, Suda T, Chida K, Miyoshi H, Nagata T: Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *M. tuberculosis* induces lung-homing specific T cells. Australasian Society for Immunology Conference 2006, Auckland, NZ, Dec. 3-7, 2006.
 18. Uchijima M, Nagata T, Shibata K, Koide Y: Chemokine receptor-mediated delivery of mycobacterial MPT51 efficiently induces antigen specific T-cell responses. 第36回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、平成18年12月11日～13日
 19. Wang L-X, Nagata T, Koide Y: Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein of *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51 overlapping peptide library. 第36回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、平成18年12月11日～13日
 20. Cervantes J, Nagata T, Uchijima M, Koide Y: Necrosis-like cell death of *Listeria monocytogenes*-infected macrophages involves caspase-1 activation. 第36回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、平成18年12月11日～13日
 21. Ikehara Y, Shiuchi N, Kabata-Ikehara S, Yokoyama N, Nagata T, Koide Y, Kuzushima K, Takahashi T, Kojima N, Tsujimura K: Cancer vaccine delivery system using oligomannose coated liposomes. 第36回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、平成18年12月11日～13日
 22. Seto S, Koide Y: Mycobacterium tuberculosis blocks phagosome-lysosome fusion by dissociation of late endosome protein, Rab7 from phagosome. Keystone Symposia: Imaging Immune responses, Feb. 25- March 1, 2007. (Keystone, Colorado, USA)
 23. 畑 敏道、高水波、杉山紫乃、内嶋雅人、永田 年、小出幸夫、中原大一郎：・2-mおよびperforin KOマウスにおける自発的活動量とコカイン誘発性活動量の増加. 第34回 日本脳科学会、平成19年6月8-9日 (島根)
 24. Hashimoto D, Nagata T, Suda T, Chida K, Koide Y: Intracellular administration of third-generation lentivirus vectors encoding MPT51 from *Mycobacterium tuberculosis* induces specific T-cell responses in the lung. American thoracic society, May 18-23, 2007. (San Francisco, USA).
 25. Nagata T, Aoshi T, Uchijima M, Koide Y: In vivo heterogeneity of individual T-cell epitope-specific helper T cells against an intracellular bacterium. DNA Vaccine 2007, May 23-25, 2007 (Malaga, Spain).
 26. Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Chemokine receptor-mediated delivery of mycobacterial MPT51 efficiently induces antigen specific T-cell responses. DNA Vaccine 2007, May 23-25, 2007 (Malaga, Spain).
 27. Koide Y, Hashimoto, D, Uchijima, M, Suda, T, Chida, K, Nagata, T: Intratracheal administration of an alternative genetic vaccine, third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *Mycobacterium tuberculosis*, induces lung-homing specific T cells. DNA Vaccine 2007, May 23-25, 2007 (Malaga, Spain).
 28. Seto S, Koide Y: Live *Mycobacterium tuberculosis* blocks phagosome-lysosome

fusion by dissociation of late endosomal protein, Rab7, from phagosome in macrophages. The 42th US-Japan conference of tuberculosis and leprosy, Sept. 11-14, 2007, (Zhengzhou, Henan, China).

29. 瀬戸真太郎、小出幸夫：結核菌感染マクロファージにおける膜小胞輸送機構のイメージ解析。
第90回 日本細菌学会関東支部総会、平成19年10月12, 13日（東京）
30. Cervantes J, Nagata T, Uchijima M, Koide Y: Nuclear changes associated with cell death of *Listeria monocytogenes*-infected macrophages. 第37回日本免疫学会総会・学術集会、平成19年11月20日～22日、（東京）
31. Uchijima M, Nagata T, Shibata K, Koide Y: Genetic fusion of MIP-1 \cdot to a mycobacterial MPT51 antigen enhances the antigen-specific CD8 $+$ T- and CD4 $+$ T-cell responses.
第37回日本免疫学会総会・学術集会、平成19年11月20日～22日、（東京）
32. Wang L-M, Nagata T, Koide Y: Characterization of human HLA-DR4-restricted CD4 $+$ T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis*.
第37回日本免疫学会総会・学術集会、平成19年11月20日～22日、（東京）
33. Koide Y: Imaging analysis of intracellular bacteria with host cells.
Kyunpook-Hamamatsu Joint Medical Symposium, Dec.7, 2007 (Korea).

G. 知的所有権の取得状況
無し

〔V〕新規結核DNAワクチンおよびバキュロウイルスビリオンワクチンの開発に関する研究

研究協力者 吉田 栄人 自治医科大学 講師

研究要旨

マウス、モルモット、ヒトよりIL-12遺伝子をクローニングし、独自に開発したDNAワクチン用高発現ベクターを作製した。これにより、実験動物として、マウス、モルモット、カニクザルを用いてHVJ-DNAワクチンを評価することが可能となった。HVJエンベロープDNAワクチン(Hsp65+IL-12/Env)をGMPレベル製造した。マウスモデルにおいてBCGで初回ワクチンをした後、Hsp65+IL-12/Envで追加ワクチンを行うと、BCG単独と比較して1万倍もの強力なワクチン効果を示した。特筆すべき点は、ヒトへの臨床治験に向けて、Hsp65遺伝子とヒトIL12p40p35遺伝子の両遺伝子を一つのプラスミドに挿入した改良型DNAワクチンを構築し、このDNAワクチンをカニクザルに接種すると、致死量の結核菌を接種されてもレントゲン検査で結核病巣の陰影を見ることもなく、長期生存を続けた。

組換えバキュロウイルス(AcNPV-CMV-Hsp65)を免疫したマウスの脾臓細胞では、Hsp65タンパクに反応してIFN-gが産生されることが確認された。しかしながらマウスモデルでは明確な感染防御効果を示さなかった。

A. 研究目的

結核感染率を激減させ、また多剤耐性結核等の難治性結核を治療する画期的な次世代ワクチンを開発することを最終ゴールとする。特に新規結核DNAワクチンの開発を目指す。合わせて、バキュロウイルス粒子を用いた新しいアイデアのワクチン開発にも取り組む。

B. 研究方法

IL-12遺伝子を”DNAアジュバンド”としたHsp65結核DNAワクチンをHVJリポソームあるいはエンベロープに包埋し(Hsp65+IL-12/HVJ)、これを実験モデル動物(マウス、モルモット、カニクザル)に接種する。結核菌のエアゾル感染を行い、ワクチン効果を解析する。これらの動物実験結果をもとに、プロトタイプの改良および臨床試験申請のためのデータをまとめる。DNAワクチンプロジェクトとは別に結核菌由来の抗原あるいは遺伝子を導入した組換えバキュロウイルスビリオンを作製し、マウスで感染防御効果を検討する。さらに結核菌感染後のワクチン接種を想定し、Hsp65+IL-12/HVJの結核予防ワクチンとしての効果を検討する。

C. 研究結果

1. マウス、モルモット、ヒトよりIL-12遺伝子をクローニングし、DNAワクチン用高発現ベクターを独自に開発した。これにより、実験動物として、マウス、モルモット、カニクザルを用いてHVJエンベロープDNAワクチンを評価することが可能となった。
2. DNAワクチンを接種したカニクザルでは、致死量の結核菌を接種されてもレントゲン検査で結

核病巣の陰影を見ることもなく、長期生存を続けた。

3. Hsp65遺伝子とIL12p40p35遺伝子の両遺伝子を一つのプラスミドに挿入した改良型DNAワクチンを構築し、GMPレベルでHVJエンベロープワクチン(Hsp65+IL-12/Env)を製造し、動物実験に使用できる体制を整えた。
4. Hsp65+IL-12/Envで追加ワクチンを行うと、BCG単独と比較して1万倍もの強力なワクチン効果を示した。
5. 組換えバキュロウイルスワクチン(AcNPV-CMV-Hsp65)を免疫したマウスの脾臓細胞では、Hsp65タンパクに反応してIFN-gが産生されることが確認された。
6. AcNPV-CMV-Hsp65はマウスモデルでは明確な感染防御効果を示さなかった。

D, 考察 と E. 結論

1. 平成14年度より開始しているカニクザル実験は順調に成果を上げており、世界に先駆けた結核DNAワクチンの臨床応用に着実に前進している。また新しいタイプの結核ワクチンとしてバキュロウイルスベクターの可能性を見出したことは、研究の独創性を有し、今後の展開に大きな期待が寄せられる。
2. プロトタイプワクチンの改良を行っていく上で、マウス→モルモット→サルの実験系を利用して、ワクチン効果の評価を迅速に行うことが可能となった。この動物実験結果をもとに、臨床試験申請のためのデータをまとめる。並行して、治療用ワクチンとしての効果も検討中である。

3. DNAワクチンとは別に新規ワクチンベクターとしてバキュロウイルスベクターの改良を行う。バキュロウイルスはヒトに感染しない安全性の高いウイルスベクターである。またTLRを介して自然免疫を誘導することも報告されており、今回得られた結果と合わせて全く新規な結核ワクチンの可能性が示された。今後、上記の確立した動物実験系を用いて解析を行っていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, Ohara N, Kaneda Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Inoue Y, Takemoto Y, Naito M, Yamada T, Matsumoto M, McMurray DN, Cruz ECD, Tan EV, Abalos RM, Young LJ, Burgos JA, Gelber R, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M, Okada M.: Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine* 23:2132-5, 2005.
2. Matsuoka H, Nguon C, Kanbe T, Jalloh A, Sato H, Yoshida S, Hirai M, Arai M, Socheat D, Kawamoto F.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Cambodia: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common variant in the Cambodian population. *J Hum Genet* 50: 468-72, 2005.
3. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, deMello DE, Peiris JSM, Chen P-J, Yamamoto N, Yoshinaga Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. *Vaccine* 23:2269-72, 2005.
4. Okada M, Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, Peiris JSM, Chen P-J, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS coronavirus using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. *Adv Exp Med Biol* 581:561-6, 2006.
5. Yoshida S & Watanabe H.: Robust salivary gland-specific transgene expression in *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Mol Biol* 15:403-10, 2006.
6. Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Kanamaru N, Muraki Y, Hashimoto S, Inoue Y, Sakatani Y, Kobayashi E, Kaneda Y, Okada M.: DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* by T cell activation. *Vaccine* 24:1191-204, 2006.
7. Yoshida S, Sudo T, Niimi M, Tao L, Sun B, Kambayashi J, Watanabe H, Enjou L, Matsuoka H.: Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline anti-platelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. *Blood* 111:2007-14, 2007.
8. Okada M, Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, Peiris JSM, Chen P-J, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. *Vaccine* 25:3038-40, 2007.
9. Yoshida S, Shimada Y, Kondoh D, Kouzuma Y, Ghosh AK, Jacobs-Lorena M, Sinden RE.: Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. *PLoS Pathog* (2007) in press.
10. Yoshida S, Shimada Y, Watanabe H.: Novel approach toward infectious diseases--combating malaria by using genetically engineered mosquitoes. *Nippon Rinsho* 5:1715-26, 2007.
11. 吉田栄人: マラリア防圧—遺伝子操作蚊からのアプローチ— (総説). *治療* 2007 in press.
12. 吉田栄人: マラリアコントロールへの新たな挑戦—遺伝子操作によるマラリア非媒介蚊作製— (総

説) . Medical Bio 4:70-77, 2007.

2. 学会発表

1. Yoshida S & Watanabe H.: Establishment of robust salivary gland-specific transgene expression system in Anopheline mosquito. 54th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene (2005) USA.
2. Yoshida S & Watanabe H.: Robust salivary gland-specific expression in transgenic Anopheline mosquito. EMBO WORKSHOP 2005 "Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Diseases Vectors" (2005) Greece.
3. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, Peiris J, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M: The development of DNA vaccines and antibody vaccine against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. The American Association of Immunologists Annual Meeting, "Immunology 2005" (2005) USA.
4. Yoshida S.: Generation of genetically engineered mosquitoes refractory to malaria parasites -Challenge for malaria control through the genetic manipulation of its vector-. International Congress of Insect Biotechnology & Industry (2007) Korea.
5. Yoshida S, Sudo T, Watanabe H, Luo E, Matsuoka H, Ishii A.: An inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline anti-platelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. EMBO WORKSHOP 2007 "Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Diseases Vectors" (2007) Greece.
6. 吉田栄人: 遺伝子操作による病原体を媒介しない昆虫の創出 -ハマダラカのトランスジェニクス-. 第45回日本衛生動物学会東日本支部例会 (2005) 東京.
7. 吉田栄人: トランスジェニックカを用いたハマダラカマラリア原虫の生物学的適応性の解明. 第4回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム シンポジウム (2005) 東京.
8. 渡辺裕之, 吉田栄人: ハマダラカ唾液腺に特異的な外来遺伝子の大量発現. 第46回日本熱帯医学会大会 (2005) 京都.
9. 嶋田陽平, 近藤大介, 上妻由章, 吉田栄人: 海洋生物由来のレクチンを発現するトランスジェニックハマダラカのマラリア伝播阻止. 第46回日本熱帯医学会大会 (2005) 京都.
10. 吉田栄人: トランスジェニックカによる蚊唾液腺-病原体の相互作用解明. 第57回衛生動物学会生理分子生物学談話会 (2005) 札幌.
11. 吉田栄人, 渡辺裕之, 松岡裕之, 羅恩傑: ハマダラカ唾液に存在するカルシウム結合タンパクの分子生物学的解析. 第57回衛生動物学会 (2005) 札幌.
12. 渡辺裕之, 吉田栄人: 唾液腺特異的に外来遺伝子を発現するトランスジェニックハマダラカの作製. 第57回衛生動物学会 (2005) 札幌.
13. 吉田栄人, 渡辺裕之, 松岡裕之, 羅恩傑: 唾液腺特異的に外来異種タンパクを発現するトランスジェニックハマダラカの作製. 第74回日本寄生虫学会 (2005) 米子.
14. 周藤俊樹, 吉田栄人, 松岡裕之, 嶋田陽平, 川崎昌則, 長村芳恵, 林秀樹, 間可和之, 山田能久: ハマダラカ唾液腺からの抗血小板因子AAPPの発見. 第29回日本血栓止血学会 (2006) 宇都宮.
15. 吉田栄人: 遺伝子操作蚊を用いた病原体-蚊の寄生適応性解明 -マラリアコントロールに向けての新規戦略-: 独立行政法人 農業生物資源研究所主催公開シンポジウム「昆虫科学研究の未来 -昆虫を学ぶ、昆虫に学ぶ-」 (2006) 東京.
16. 吉田栄人, 嶋田陽平, 渡辺裕之: スポロゾイトの蚊唾液腺侵入メカニズム解明に向けてのアプローチ-唾液腺特異的に赤色蛍光タンパクを発現するトランスジェニックハマダラカ-. 第5回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム (2006) 東京.
17. 嶋田陽平, 近藤大介, 上妻由章, 吉田栄人: 海洋生物由来のレクチンを発現するトランスジェニックハマダラカのマラリア伝播阻止効果. 第5回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム (2006) 東京.
18. 嶋田陽平, 近藤大介, 上妻由章, 吉田栄人: 海洋生物由来のレクチンCEL-IIIを発現するトランスジェニックハマダラカのマラリア伝播阻止効果. 第58回日本衛生動物学会東日本支部大会 (2006) 栃木.

19. 荒木一美、吉田栄人：ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) merozoite surface protein 1をウイルスピリオン上に提示した組換えバキュロウイルスのワクチン効果。第47回日本熱帯医学会・第21回日本国際保健医療学会合同大会 (2006) 長崎。
20. 嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、吉田栄人：海洋生物由来のレクチンを発現する遺伝子操作蚊のマラリア伝播阻止効果。第47回日本熱帯医学会・第21回日本国際保健医療学会合同大会 (2006) 長崎。
21. 嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、吉田栄人：ナマコのレクチンCEL-IIIを導入した遺伝子操作蚊によるマラリア伝播阻止。第58回日本衛生動物学会 (2006) 長崎。
22. 吉田栄人：トランスジェニック蚊を用いたハマダラカマラリア原虫の寄生適応性の解明。基盤研究(C) (企画研究調査) 「感染現象のマトリックス的解明をめざす企画調査研究」シンポジウム 感染現象のマトリックス (2006) 東京。
23. 吉田栄人：トランスジェニック蚊を用いたハマダラカマラリア原虫の寄生適応性の解明。第50回応用動物昆虫学会 (2006) つくば。
24. 吉田栄人：遺伝子操作蚊を用いたハマダラカマラリア原虫の寄生適応性の解明 -マラリアコントロールに向けての新規戦略-。第48回日本熱帯医学学会特別講演 (2007) 大分。
25. 荒木一美、吉田栄人：ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii*) のmerozoite surface protein-1₁₉をウイルスピリオン上に提示した組換えバキュロウイルスのワクチン効果。第48回日本熱帯医学学会 (2007) 大分。
26. 嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、Eappen G.Abraham、Marcelo Jacobs-Lorena、Robert E.Sinden、吉田栄人：海洋生物由来のレクチンCEL-IIIを発現する遺伝子操作蚊のマラリア伝播阻止効果。第76回日本寄生虫学会 (2007) 大阪。
27. 吉田栄人、周藤俊樹、松岡裕之、嶋田陽平、川崎昌則、長村芳恵、林秀樹、問可和之、山田能久：ハマダラカ唾液に含まれる抗血小板凝集活性を有するAnopheles Anti-Platelet Aggregation Protein。第59回日本衛生動物学会 (2007) 大阪。
28. 吉田栄人：遺伝子操作蚊を用いたハマダラカマラリア原虫の寄生適応性の解明 -マラリアコン

トロールに向けての新規戦略-。第48回日本熱帯医学学会特別講演 (2007) 大分。

総説

1. 吉田栄人：遺伝子操作によるマラリアを媒介しないハマダラカの創出 -新規マラリアコントロールへの挑戦-(総説)。日本衛生動物学会誌 57: 249-54, 2006。
 2. 吉田栄人：遺伝子操作蚊を用いた蚊-マラリア原虫の寄生適応性解明 -マラリアコントロールに向けての新規戦略-(総説)。蚕糸・昆虫バイオテク75:161-6, 2006。
 3. 吉田栄人、嶋田陽平、渡辺裕之：感染症征服への新たな挑戦 (総説)。日本臨床65:1715-26, 2007。
 4. 吉田栄人：マラリアコントロールへの新たな挑戦 -遺伝子操作によるマラリア非媒介蚊作製-(総説)。Medical Bio 4:70-77, 2007。
 5. 吉田栄人：マラリア防圧-遺伝子操作蚊からのアプローチ (総説)。治療 2008 in press。
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
 1. 特願2005-320817「血小板凝集阻害組成物」(2005年) 吉田栄人、周藤俊樹
 2. 特願2006-32863「新規ウイルスベクター」(2006年) 吉田栄人、大庭義郎、播口徳充、水越真巳、川崎昌則、松本真
 3. 国際特許PCT/JP2006/322417号「Anti-Platelet Aggregation Product」(2006年) Yoshida S, Sudo T。
 4. 国際特許PTC/JP2007/51295号「Novel vaccine vector」(2007年) Yoshida S, Ohba Y, Hariguchi T, Mizukoshi M, Kawasaki M, Matsumoto M。
 2. 実用新案登録なし
 3. その他 (新聞、雑誌報道)
 1. 吉田栄人「遺伝子操作蚊によるマラリアコントロールへの挑戦」メディカルレビューン 2005年12月8日
 2. 吉田栄人「マラリア防ぐ蚊、遺伝子操作で開発」日経新聞 2005年10月14日

3. 吉田栄人「21世紀の気鋭」日経新聞 2006年12月21日
4. 吉田栄人「蚊の遺伝子改変、マラリア防ぐ」日経新聞 2006年11月27日
5. 岡田全司、吉田栄人「BCGより1千倍効く結核新ワクチン 学会で発表」朝日新聞電子版 2006年5月31日
6. 岡田全司、吉田栄人「BCGを超える結核ワクチン開発、高齢者に期待」朝日新聞電子版 2006年5月30日
7. 岡田全司、吉田栄人「新しい結核DNAワクチンマウスでBCGより100倍の“切れ味”」メディアカルトレビュー 2006年4月20日
8. Yoshida S “Glowing mosquito helps conquer malaria” The Nikkei Weekly海外版 2006.2.20.
9. 吉田栄人「リーシュマニア症 抗原持つ蚊作製」日経産業新聞 2006年3月9日
10. 吉田栄人「体内で抗原作る蚊、刺されるだけで免疫」日経産業新聞 2006年2月28日
11. 吉田栄人「みらい技術がやってきた！ 光るハマダラカ」日経産業新聞 2006年1月13日
12. 吉田栄人「トランスジェニック蚊を駆使して人類の敵マラリア撲滅に挑む」Techno Innovation (社団法人 農林水産先端技術産業振興センター) 66:52-3, 2007.
13. Yoshida S “Sea Cucumber Protein Used To Inhibit Development Of Malaria Parasites” Science Daily (UK) 2007.12.7.
14. 吉田栄人「抗血栓薬 蚊の唾液から」日経新聞 2008年1月28日

〔VI〕 組み換えBCGワクチン改良・開発の研究

研究協力者 大原直也 国立感染症研究所 免疫部 室長

研究要旨

これまでに多種のリコンビナントBCG (rBCG) ワクチンが作製された。これらのrBCGを実用化するために薬剤耐性遺伝子をマーカーとして使用しない、栄養要求性を指標としたBCG宿主—ベクター系構築のための研究を行った。このためBCGチミン要求株とチミン合成遺伝子をマーカーとして保持しているプラスミドを作製した。その途上、これまで示唆されていることとは異なり、チミン合成経路の酵素thymidylate synthaseの遺伝子欠損株は必須ではないことが明らかになった。

A. 研究目的

これまでに数多くの新規結核ワクチンの候補が作製されてきたが、その中で遺伝子組み換えによるリコンビナントBCG (rBCG) ワクチンは有力な候補として位置づけられている。rBCGは感染防御に有効な抗原あるいはサイトカイン等の遺伝子をBCGに導入したものであるが、これまでのrBCGのほとんどは、導入された遺伝子を乗せたベクターの保持の選択を、同時に導入した薬剤耐性マーカーを指標としている。特に結核の治療薬であるカナマイシン耐性遺伝子が多用されているのが現状である。rBCGの実用化を考えると薬剤耐性に関わる遺伝子を除くことが望ましい。そのため、薬剤耐性遺伝子をマーカーとして使用しない、栄養要求性を指標としたBCG宿主—ベクター系の構築を考えた。

B. 研究方法

BCGのチミジン合成に関与する酵素thymidylate synthase (TS) の遺伝子thyAおよびthyXの遺伝子をそれぞれの遺伝子上流および下流の領域を含めてクローニングする。これらのDNA断片からthyAおよびthyXの読み枠 (ORF) を除き、隣接してカナマイシン耐性遺伝子 (aphII) およびスクロース感受性遺伝子 (sacB) を挿入した自殺プラスミドを作製する。このプラスミドをBCGに導入し、カナマイシン耐性を指標として、相同組み換えによりゲノム上のthyAあるいはthyX隣接領域にプラスミドDNA (thyA あるいはthyX, sacB, aphII) が挿入された株を得る。得られた株をスクロース含有、カナマイシン不含有培地で継代することにより、再度相同組み換えを起こし、変異型thyAあるいはthyXのみを有する株、すなわちthyA欠損株およびthyX欠損株を得る。次にクローニングしたthyA領域のthyA ORFに隣接した位置にカナマイシン耐性遺伝子 (aphII) に置換し、さらにthyA ORFとカナマイシン耐性遺伝子 (aphII) を挟む形でその前後に大腸菌λファージ組み換え酵素Creの認識配列であるlox配列を挿入したプラスミドを構築する。このプラスミドから

thyA領域全体を切り出し、BCG thyX欠損株に導入する。カナマイシン耐性を指標として、ゲノム上のthyA領域が導入したDNAに置換された株を選択する。次にアセトアミドで誘導されるスメグマ菌アセトアミダーゼ転写調節領域にCre遺伝子ORFをつなぎ、このcre発現カセットを抗酸菌—大腸菌シャトルベクターに挿入する。lox配列挿入株に導入をこのプラスミドで形質転換後、培地へのアセトアミド添加によりCre組換え酵素を発現させ、lox配列に挟まれたthyA領域をゲノムから取り除く。その後継代することによりCre発現用プラスミドを脱落させ、薬剤耐性遺伝子を含有しないチミン要求性株を作製する。

チミン合成遺伝子を乗せたプラスミドは大腸菌および抗酸菌で機能するプロモーターにthyAおよびthyXを結合させた発現カセット、大腸菌での複製起点および抗酸菌での複製起点より構成されるプラスミドを作製する。このプラスミドは大腸菌チミン要求株を用いることにより、薬剤耐性マーカーを含めずに構築する。

C. 研究結果

研究方法に述べた方法によりthyA欠損株およびthyX欠損株を得た。それぞれの株についてその性状を調べたところ、完全合成培地であり、チミンおよびチミジンを含まないSauton培地上においても発育したことから、両遺伝子それぞれの単独欠損株においては栄養要求性において野生株と同じであることが示された。なお、7H10寒天培地、Sauton培地上における発育速度についても野生株との間で顕著な差は認められなかった。また、集落の性状も差異が認められなかった。以上のことからチミン要求株を作製するためには、thyA欠損株とthyX欠損株の二重欠損株を作製する必要があることが示唆された。そのため、thyX欠損株をもとにthyA欠損株の作製を試みた。まずthyAあるいはthyXの単独欠損株を作製したと同様の方法で二重欠損株の作製を試み400個以上のクローンをスクリーニングしたが、目的の株を得ることはできなかった。次に、厳

密に部位特異的組換えを起こすことが可能な大腸菌入ファージのCre-loxシステムを応用した。研究方法に述べた方法で、ゲノム上にlox配列を挿入後、Cre発現プラスミドの導入を行なった。アセトアミドの添加によりCre組み換え酵素の発現が確認された。

thyXを選択マーカーとしたベクターは抗酸菌での複製起点としてpAL5000の最小領域、大腸菌での複製起点としてpBlueScriptIIの最小領域を用いて作製し、大腸菌チミン要求株でこのプラスミド保持の選択が確認された。

D. 考察

多くの真性細菌ではthymidylate synthaseの遺伝子として、thyAあるいはthyXのいずれかを持つことが知られている。そしてthyAを持つ大腸菌等においてはthyAを欠損させることでチミン要求株になる。結核菌ではこれまでの報告でthyXは必須の遺伝子であり、欠損すると致死になることが示唆されていた。しかし、本実験の結果、thyXを欠損させても栄養要求株にならない、すなわち致死にならないことが明らかになった。またthyAに関しても栄養要求株にならないことが示された。すなわちチミン要求性を指標とした宿主ベクター系を完成させるためには両遺伝子欠損株を作製する必要性が示された。しかしthyX欠損株の単純な相同組換えによるthyA欠損（二重欠損株）作製を試みたが目的の株は得られなかった。その理由としては、2重欠損株はチミン要求性であるので、発育速度が非常に遅く、選択できなかったことが考えられる。次に試みたCre-loxシステムは組み換え効率が高いため、目的のクローンを得られる可能性が高い。現時点で最終のスクリーニングをおこなっているところであり、近日中に作業を終える予定である。

E. 結論

チミン要求性を指標としたBCG宿主ベクター系構築のための研究を行った。BCGではTSとしてthyAおよびthyXの両者を持つ。遺伝子欠損株による栄養要求株作製には両遺伝子欠損二重欠損株の作製が必要であったが、そのための組み換え法としては部位特異的高効率の組み換えシステムが必要であった。なお、大腸菌栄養要求株を用いたモデル実験でチミン要求性を指標とした宿主ベクター系が成立することが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kikuchi Y, Ohara N, Sato K, Yoshimura M, Yukitake H, Sakai E, Shoji M, Naito M, Nakayama K. The novel stationary-phase-upregulated protein of Porphyromonas gingivalis influences the production of

superoxide dismutase, thiol peroxidase and thioredoxin. Microbiology 151:841-853, 2005

2. Sato K, Sakai E, Veith PD, Shoji M, Kikuchi Y, Yukitake H, Ohara N, Naito M, Okamoto K, Reynolds EC, Nakayama K. Identification of a new membrane-associated protein which influences transport/maturation of gingipains and adhesins of Porphyromonas gingivalis. J Biol Chem 280:8668-8677, 2005
3. Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, Ohara N, Kaneda Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Inoue Y, Takemoto Y, Naito M, Yamada T, Matsumoto M, McMurray DN, Cruz EC, Tan EV, Abalos RM, Burgos JA, Gelber R, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M, Okada M. Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. Vaccine 23:2132-2135, 2005
4. Naito M, Sakai E, Shi Y, Ideguchi H, Shoji M, Ohara N, Yamamoto K, Nakayama K. Porphyromonas gingivalis-induced platelet aggregation in plasma depends on Hgp44 adhesin but not Rgp proteinase. Mol Microbiol 59:152-167, 2006
5. Kamijo K, Ohara N, Abe M, Uchiyama A, Hosoya H, Lee J-S, Miki T. Dissecting the role of Rho-mediated signaling in contractile ring formation. Mol Biol Cell 17:43-55, 2006
6. Ohara N, Kikuchi Y, Shoji M, Naito M, Nakayama K. Superoxide dismutase-encoding gene of the obligate anaerobe Porphyromonas gingivalis is regulated by the redox-sensing transcription activator OxyR. Microbiology 152:955-966, 2006
7. Takahashi H, Sasaki K, Takahashi M, Shigenori N, Honda S, Arimitsu H, Ochi S, Ohara N, Tsuji T. Mutant Escherichia coli enterotoxin as a mucosal adjuvant causes specific CD4+ and CD8+ T cells to produce IFN-gamma and TNF-alpha in response to nasal killed-bacillus Calmette-Guerin vaccine in mice. Vaccine 24:3591-3598, 2006
8. Matsuo K, Hotokezaka H, Ohara N, Fujimura Y, Yoshimura A, Okada Y, Hara Y, Yoshida N,

- Nakayama K. Analysis of amphotericin B-induced cell signaling with chemical inhibitors of signaling molecules. *Microbiol Immunol* 50:337-348, 2006
9. Fujimura Y, Hotokezaka H, Ohara N, Naito M, Sakai E, Yoshimura Y, Narita Y, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K. The hemoglobin receptor protein of *Porphyromonas gingivalis* inhibits receptor activator NF- κ B ligand-induced osteoclastogenesis from bone marrow macrophages. *Infect Immun* 74:2544-2551, 2006
 10. Hotokezaka H, Sakai E, Ohara N, Hotokezaka Y, Gonzales C, Matsuo K, Fujimura Y, Yoshida N, Nakayama K: TNF- α , lipopolysaccharide, and peptidoglycan induce cell fusion independently of RANKL at the latest step of differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells, *J Cell Biochem* 101: 122-134, 2007
 11. Fukusaki T, Ohara N, Hara Y, Yoshimura A, Yoshiura K: Evidence for association between a Toll-like receptor 4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population, *J Periodont Res* 42: 541-545, 2007
 12. Tang C, Yamada H, Shibata K, Maeda N, Yoshida S, Wajjwalku W, Ohara N, Yamada T, Kinoshita T, Yoshikai Y: Efficacy of Recombinant BCG Vaccine Secreting IL-15/Ag85B fusion protein on Protection against *Mycobacterium tuberculosis*, *J Infect Dis*, in press.
 13. 大原直也. BCGを用いた抗酸菌の抗原性および病原性に関する研究. *日本細菌学雑誌* 60: 349-356, 2005.
 14. 岡部真裕子、大原直也、小林和夫. 結核, 保健の科学 49:691-697,2007
2. 学会発表
 1. Kamijo K, Ohara N, Abe M, Uchimura T, Hosoya H, Lee J, Miki T. (2005) Dissecting the Role of Rho-mediated Signaling in Contractile Ring Formation. 45th Annual Meeting, The American Society for Cell Biology (San Francisco, U.S.A.)
 2. Yoshimura M, Ohara N, Shoji M, Nakayama K. (2005) Effect of *Porphyromonas gingivalis* infection on monocyte-to-macrophage differentiation. The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity: (Awaji island), Abstract p79.
 3. Ohara N, Yoshimura M, Saito K, Hotokezaka H, Nakayama K. (2005) Bacterial infection inhibits osteoclastogenesis in vitro. 11th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division, Joint Meeting of the 3 Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2005 (San Francisco, U.S.A.), Abstracts p6.
 4. Ohara N, Ohara N, Yoshimura M, Ganno T, Yamada S, Nakayama K, Hayashi Y. (2005) Effects of water-soluble chitosan on invasion of *Porphyromonas gingivalis*. 11th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division, Joint Meeting of the 3 Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2005 (San Francisco, U.S.A.), Abstracts p6.
 5. Okada M, Tanaka T, Yoshida S, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Kaneda Y, Nakajima T, Ohara N, Takai H, Fukunaga Y, Inoue Y, Matsumoto M, Gelber R, Tan VE, Dela Cruz EC, Abalos RM, Young LJ, Burgos JA, McMurray, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M. (2005) Novel vaccination (HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA and recombinant 72f BCG) against tuberculosis using cynomolgus monkey. Fortieth Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (Seattle) Program & Abstracts p.46-50.
 6. Ohyama H, Ogata K, Takeuchi K, Uemura Y, Oyama M, Ohara N, Namisato M, Kogoe N, Yamada N, Terada N, Matsushita S. (2005) Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor b2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. Fortieth Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (Seattle) Program & Abstracts p.100-104.
 7. Ohara N, Yoshimura M, Shoji M, Nakayama K.

- (2005) Effect of BCG infection on in vitro osteoclastogenesis. Fortieth Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (Seattle) Program & Abstracts p.230.
8. 岡田全司、田中高生、吉田栄人、井上義一、武本優次、大原直也、内藤真理子、山田毅、金田安史、坂谷光則：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（2）、第35回日本免疫学会総会・学術集会、横浜、12月 {第35回日本免疫学会総会・学術集会記録35、174、2005}
 9. 大原直也：組み換えBCGワクチンの作製とその応用。シンポジウム「ホストパラサイトインターフェイス研究—基礎から応用へ—」。第47回歯科基礎医学会学術大会、仙台、 {Journal of Oral Biosciences, 47 Suppl, 73, 2005}
 10. 大原直也、吉村満美子、庄子幹郎、中山浩次：P. gingivalisおよびBCG感染の破骨細胞分化への影響、第47回歯科基礎医学会学術大会、仙台、9月 {Journal of Oral Biosciences, 47 Suppl, 142, 2005}
 11. 吉村満美子、大原直也、庄子幹郎、中山浩次：Porphyromonas gingivalis感染による単球/マクロファージの分化の成熟への影響、第47回歯科基礎医学会学術大会、仙台、9月 {Journal of Oral Biosciences, 47 Suppl, 143, 2005}
 12. 中山浩次、藤村裕治、吉村満美子、大原直也、吉村満美子、佛坂斉社、吉田教明：Porphyromonas gingivalis感染による末梢血単球の分化への影響、第47回歯科基礎医学会学術大会、仙台、9月 {Journal of Oral Biosciences, 47 Suppl, 167, 2005}
 13. 内藤真理子、庄子幹郎、大原直也、中山浩次：Porphyromonas gingivalisの血小板凝集活性における血清成分、抗体の役割、第78回日本細菌学会総会、東京、4月 {日本細菌学雑誌, 60, 80, 2005}
 14. 菊池有一郎、大原直也、佐藤啓子、吉村満美子、雪竹英治、坂井詠子、庄子幹郎、内藤真理子、中山浩次：Porphyromonas gingivalisの新規低分子蛋白（UstA）と酸化ストレス応答蛋白との関係について、第78回日本細菌学会総会、東京、4月 {日本細菌学雑誌, 60, 137, 2005}
 15. 大原直也、吉村満美子、齋藤幹、佛坂斉社、中山浩次：骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系におけるBCGおよびP. gingivalis感染の効果、第78回日本細菌学会総会、東京、4月 {日本細菌学雑誌, 60, 160, 2005}
 16. 大原直也、吉村満美子、中山浩次：Porphyromonas gingivalisのヒト単球/マクロファージの分化への影響、第78回日本細菌学会総会、東京、4月 {日本細菌学雑誌, 60, 161, 2005}
 17. Kamijo K, Ohara N, Abe M, Uchimura T, Hosoya H, Lee J, N Usuda, Miki T: Positioning of the cleavage plane by Rho signaling. The Cell Cycle, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A. 2006 {Abstracts, 2006}
 18. Kamijo K, Ohara N, Abe M, Uchimura T, Hosoya H, Lee J, N Usuda, Miki T: Accumulation of Rho at the equatorial cell cortex for contractile ring formation. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan 2006 {CD-ROM, 2006}
 19. Ohyama H, Kogoe N, Takeuchi K, Nishimura F, Uemura Y, Matsushita S, Ohara N, Okano S, Abiko Y, Yamanegi K, Yamada N, Nakasho K, Terada N: The effect of 5' flanking region gene polymorphism of IL12RB2 on NK cell activity. Forty-first Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program, Kagoshima, Japan 2006 {Abstracts, 41-45, 2006}
 20. Ohara N, Yoshimura M, Shoji M, Kondo Y, Nakayama K: Diverse effects of BCG infection on various stages of RANKL-induced osteoclast differentiation. Forty-first Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program, Kagoshima, Japan 2006 {Abstracts, 156-158, 2006}
 21. 藤村裕治、大原直也、吉村満美子、佛坂斉社、内藤真理子、中山浩次：Porphyromonas gingivalisのhomoglobin結合タンパクによる破骨細胞形成抑制作用について、第79回日本細菌学会総会、金沢、3月 {日本細菌学雑誌, 61, p123, 2006}
 22. 大原直也、吉村満美子、庄子幹郎、近藤好夫、中山浩次：細菌感染症による破骨細胞形成の制御におけるMyD88の役割、第79回日本細菌学会総会、

- 3月{日本細菌学雑誌, 61, p149, 2006}
23. 内藤真理子, 庄子幹郎, 大原直也, 中山浩次 : Porphyromonas gingivalisの血小板凝集活性に必須なIgGの特異性の解析、第79回日本細菌学会総会, 3月{日本細菌学雑誌, 61, p154, 2006}
 24. 大原直也, 藤村裕治, 吉村満美子, 庄子幹郎, 佛坂齊社, 坂井詠子, 近藤好夫, 内藤真理子, 中山浩次 : 細菌および菌体成分による破骨細胞形成抑制作用、第59回日本細菌学会九州支部総会, 第43回日本ウイルス学会九州支部総会, 9月{プログラムおよび抄録, p37, 2006}
 25. 大原直也, 吉村満美子, 庄子幹郎, 近藤好夫, 中山浩次 : 細菌感染によってもたらされる破骨細胞前駆細胞の分化の方向性、第48回歯科基礎医学学会学術大会ならびに総会, 9月{Journal of Oral Biosciences, 48, Suppl., p167, 2006}
 26. 菊池有一郎, 大原直也, 上田青海, 平井要, 柴田幸永, 中山浩次, 藤村節夫 : Porphyromonas gingivalisの新規低分子蛋白(UstA)と環境ストレスとの関係、第48回歯科基礎医学学会学術大会ならびに総会, 9月{Journal of Oral Biosciences, 48, Suppl., p202, 2006}
 27. Kondo Y, Yoshimura M, Ohara N, Shoji M, Yukitake H, Naito M, Fujiwara T, Koji Nakayama K: One of the bacterial tetratricopeptide repeat-containing proteins is involved in virulence of the periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science, Feb 2007. Sendai, Japan.
 28. Ohara N, Yoshimura M, Okabe M, Nakayama K, Kobayashi K: Construction and characterization of the thymidylate synthase mutants derived from BCG. China-Japan-US Tuberculosis Seminar and Forty-second Tuberculosis and Leprosy Research Conference: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. Sep 2007. Zhengzhou, China.
 29. Tang C, Yamada H, Shibata K, Maeda N, Yoshida S, Wajjwalku W, Ohara N, Yamada T, Yoshikai Y: Efficacy of recombinant BCG vaccine secreting IL-15/Ag85B fusion protein on protection against Mycobacterium tuberculosis. China-Japan-US Tuberculosis Seminar and Forty-second Tuberculosis and Leprosy Research Conference: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. Sep 2007. Zhengzhou, China.
 30. Ohara N: Recombinant BCG vaccines: current status. 2nd Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases. Nov 2007. Nagasaki, Japan.
 31. 内藤真理子, 平川英樹, 山下敦士, 大原直也, 庄子幹郎, 中山恵介, 吉村文信, 久原哲, 服部正平, 林哲也, 中山浩次: Porphyromonas gingivalis ATCC33277株の全ゲノム塩基配列決定、第1回日本ゲノム微生物学会, 2007年3月
 32. 大原直也: 細菌による破骨細胞分化の制御. ワークショップ骨と感染症研究の新展開、第80回日本細菌学会総会, 2007年3月
 33. 内藤真理子, 大原直也, 庄子幹郎, 中山恵介, 吉村文信, 林哲也, 中山浩次: Porphyromonas gingivalis ATCC33277株の全ゲノム塩基配列決定、第80回日本細菌学会総会, 2007年3月
 34. 近藤好夫, 吉村満美子, 大原直也, 庄子幹郎, 雪竹英治, 内藤真理子, 藤原卓, 中山浩次 : Porphyromonas gingivalis のTPRドメイン蛋白質欠損株の解析、第80回日本細菌学会総会, 2007年3月
 35. 北里海雄, 布施隆行, 大原直也, 渡辺健, 小林信之 : MIP-T3と微小管との結合機構の解析、平成19年度日本生化学会九州支部例会, 2007年5月
 36. 菊池有一郎, 大原直也, 上田青海, 平井要, 柴田幸永, 中山浩次, 藤村節夫 : Porphyromonas gingivalis ECFシグマ因子群の遺伝子挿入変異株の作製、第49回歯科基礎医学学会学術大会ならびに総会, 2007年8月
 37. 内藤真理子, 大原直也, 庄子幹郎, 吉村文信, 中山浩次: Porphyromonas gingivalis ATCC33277株の全ゲノム塩基配列決定、第49回歯科基礎医学学会学術大会ならびに総会, 2007年8月
 38. Yoshimura A, Yamaguchi R, Kaneko T, Ohara N : 日本人におけるTLR4 遺伝子多型と中等度および重度歯周炎との関連/Association between a TLR4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 2007年11月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし