

# 微生物学

## 1 構成員

	平成18年3月31日現在
教授	1人
助教授	1人
講師（うち病院籍）	0人（0人）
助手（うち病院籍）	2人（0人）
医員	0人
研修医	0人
特別研究員	1人
大学院学生（うち他講座から）	4人（3人）
研究生	0人
外国人客員研究員	0人
技術職員（教務職員を含む）	0人
その他（技術補佐員等）	1人
合 計	10人

## 2 教員の異動状況

- 小出 幸夫（教授）（H8.4.1～現職）  
 永田 年（助教授）（H9.9.1～H18.3.31）  
 内嶋 雅人（助手）（H5.4.1～現職）  
 青枝 大貴（助手）（H12.7.1～H18.3.31）

## 3 研究業績

数字は小数2位まで。

	平成17年度
(1) 原著論文数（うち邦文のもの）	6編（0編）
そのインパクトファクターの合計	28.85
(2) 論文形式のプロシーディングズ数	1編
(3) 総説数（うち邦文のもの）	1編（1編）
そのインパクトファクターの合計	2.01
(4) 著書数（うち邦文のもの）	0編（0編）
(5) 症例報告数（うち邦文のもの）	0編（0編）
そのインパクトファクターの合計	0

### (1) 原著論文（当該教室所属の者に下線）

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. Uchijima M, Nagata T, Aoshi T, Koide Y: Interferon- $\gamma$ overcomes low responsiveness of

myeloid dendritic cells to CpG-DNA. Immunol Cell Biol 83: 92-95, 2005.

2. Aoshi T, Suzuki M, Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Expression mapping by retroviral vector for CD8<sup>+</sup> T cell epitopes: definition of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide presented by H2-D<sup>d</sup>. J Immunol Methods 298(1-2): 21-34, 2005.
3. 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: 4548-4553. 2006.

インパクトファクターの小計 [7.89]

B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの（学内の共同研究）

1. Matsuda H, Suda T, Sato J, Nagata T, Koide Y, Chida K, Nakamura H:  $\alpha$ -Galactosylceramide, a Ligand of Natural Killer T Cells, Inhibits Allergic Airway Inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol. 33(1): 22-31, 2005.
2. 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.

インパクトファクターの小計 [17.11]

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

1. Nagatsu M, Terashita F, Nonaka H, Xu Lei, Nagata T, Koide Y: Effect of oxygen radicals in low-pressure surface-wave plasma on sterilization. Appl. Phys. Lett. 86(21): 211502-1-211502-3, 2005.

インパクトファクターの小計 [3.85]

## (2) 論文形式のプロシーディングズ

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. Koide Y, 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. p56-61, 2005.

## (3) 総 説

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. 小出幸夫: マクロファージによる感染防御機構. 最新医学60: 529-543, 2005.

インパクトファクターの小計 [2.01]

#### 4 特許等の出願状況

	平成16年度
特許取得数（出願中含む）	0件

#### 5 医学研究費取得状況

	平成17年度
(1) 文部科学省科学研究費	3件 (1,120万円)
(2) 厚生科学研究費	2件 (107万円)
(3) 他政府機関による研究助成	1件 (20万円)
(4) 財団助成金	2件 (1,840万円)
(5) 受託研究または共同研究	1件 (425万円)
(6) 奨学寄附金その他（民間より）	2件 (100万円)

##### (1) 文部科学省科学研究費

小出幸夫（代表者）基盤研究（B）結核菌の新規防御抗原MPT51による免疫応答能の解析とヘテロワクチンの開発 650万円（新規）

小出幸夫（代表者）萌芽研究 2フォトン顕微鏡を用いたT細胞による細胞内寄生菌排除の生体内イメージング解析 170万円（新規）

永田 年（代表者）基盤研究（B）結核菌由来T細胞エピトープの同定とマルチエピトープDNAワクチンの開発 300万円（新規）

##### (2) 厚生科学研究費

小出幸夫（分担者）厚生科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業 75万円（継続）

代表者 独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター センター長 岡田全司

小出幸夫（分担者）厚生労働省 厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

「抗酸菌感染の国際的対応への貢献を目指した基盤に関する研究」日米医学協力研究会結核ハンセン病専門部会 32万円（継続）

代表者 京都大学大学院医学研究科微生物感染症学 光山正雄

##### (4) 財団助成金

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

小出幸夫（代表者）中部乳酸菌研究会 30万円

##### (5) 受託研究または共同研究

小出幸夫（分担） 経済産業省 地域新生コンソーシアム研究開発事業 有毒物質を用いない医療用非加熱滅菌機の開発 425万円 管理法人 ジーマ株式会社

## 7 学会活動

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

### (1) 国際学会等開催・参加

#### 5) 一般発表

##### 口頭発表

1. 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.

##### ポスター発表

1. 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.
2. 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 -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.
3. 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.
4. 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

(2) 国内学会の開催・参加

1) 主催した学会名

第88回日本細菌学会関東支部総会，浜松，平成17年10月20日～21日

2) 学会における特別講演・招待講演

Aoshi, T, Koide, Y, Unaue, E, Miller, MJ: Two-photon imaging of the immune response to *Listeria monocytogenes* infection in mice. 第88回日本細菌学会関東支部総会，浜松，平成17年10月20日～21日

3) シンポジウム発表

1. 永田 年，小出幸夫：「ワクチン開発の新戦略」細胞内寄生菌に対するCD8<sup>+</sup>T細胞誘導型ワクチン開発の戦略 第88回日本細菌学会関東支部総会，浜松，平成17年10月20日～21日
2. 小出幸夫：ワクチンの現状と展望（ワクチン研究の展望），第79回日本細菌学会総会，金沢，平成18年3月29～31日

4) 座長をした学会名

日本細菌学会総会

(3) 役職についている国際・国内学会名とその役割

小出幸夫 日本細菌学会（評議員）

小出幸夫 日本細菌学会関東支部会（評議員，学術集会委員会委員長）

小出幸夫 日本免疫学会（評議員）

小出幸夫 日本組織適合学会（評議員）

小出幸夫 東海遺伝子・再生医療研究会（評議員）

小出幸夫 中部乳酸菌研究会（幹事）

## 8 学術雑誌の編集への貢献

	国内	外国
学術雑誌編集数（レフリース数は除く）	0件	0件

(3) 国内外の英文雑誌のレフリース

小出幸夫 8回 J Immunol（米国）1回

Gastroenterology（米国）1回

FEMS Immunol & Medical Microbiol（英国）1回

Biochem Biophys Res Commun.（英国）1回

Vaccine（Elsevier，オランダ）3回

Microbiol Immunol（日本）1回

永田 年 2回 Applied Microbiology and Biotechnology（ドイツ）1回

Nucleic Acids Research（英国）1回

## 9 共同研究の実施状況

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

### (1) 国際共同研究

- 1) 「DNA vaccines against Cancer and TB」, Arya Biragyn , Ph.D., National Cancer Institute / National Institutes of Health (米国), Feb., 2003～, 研究材料の交換
- 2) 「Two-photon imaging of T-lymphocytes in vivo」, Mark Miller Ph.D., Washington University (米国), Feb, 2004～, 資料の交換, 研究者の派遣

### (2) 国内共同研究

- 1) 岡田全司 (独立行政法人国立病院機構 近畿中央胸部疾患センター) 「レンチウイルスベクターを用いた結核に対するワクチンの開発」
- 2) 永津雅章 (静岡大学工学部 電気・電子工学科) 「マイクロ波放電を用いた低温プラズマ滅菌のメカニズム解明とその医療応用」

### (3) 学内共同研究

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

## 10 産学共同研究

	平成16年度
産学共同研究	2件

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

## 12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

### 1. 結核に対する樹状細胞ワクチンの開発

〔目的〕 樹状細胞 (Dendritic Cells; DC) は生体で最も抗原提示能の高い細胞であることが知られている。そこで細胞内寄生菌に対する感染防御にとって必須である強力な細胞性免疫を誘導するため、感染防御抗原遺伝子をレトロウイルスベクター系を用いて導入したautologous DCを調製

しそれをマウスに免疫し、その免疫効果を検討する。感染防御抗原として結核菌の主要感染防御抗原であるAg85Aを用いる。

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

〔目的の達成度〕Ag85A遺伝子導入DCワクチン免疫により結核菌特異的細胞性免疫が誘導されること、感染防御能が賦与されるという結果が得られ、それを論文として発表した。

(中野秀樹, 永田 年, 青枝大貴, 内嶋雅人, 小出幸夫)

## 2. 第三世代レンチウイルスベクターを用いた抗結核ワクチンの研究

〔目的〕遺伝子導入効率が良く、安全な第三世代レンチウイルスをベクターとして、我々が発見した結核菌の防御抗原 (MPT51) を発現するウイルスワクチンを作製する。これを経気道接種することで、肺指向性抗結核T細胞を誘導する。

〔概要〕 1. ワクチンの作製：SIN (self-inactivating) プラスミドにMPT51遺伝子を導入し、他の2つのパッケージング・プラスミドと共に293T細胞に遺伝子導入し、培養上清中ウイルスを得た。これを超遠心で1,000倍に濃縮し、GFPを指標として力価を測定する。 2. ワクチンの接種：BALB/cマウスに $5 \times 10^6$  IUのMPT51レンチウイルス経気道接種した。 3. ワクチン効果の判定：(1) テトラマー法：H2-D<sup>d</sup>/エピトープからなるテトラマーを用いて特異的CD8<sup>+</sup>T細胞数を定量した。縦隔リンパ節、肺および脾臓のリンパ球を対象として測定した。(2) キラーT細胞活性：免疫マウスのリンパ球を用いて、ペプチドをパルスしたP815細胞を標的細胞として<sup>51</sup>Cr遊離法で測定した。

〔目的の達成度〕

- 1) 抗原提示細胞の動態：ワクチン接種後の気道樹状細胞 (CD11c<sup>+</sup>) を、GFPを指標として追跡すると、肺から縦隔リンパ節に移行することが判明した。これによりT細胞は縦隔リンパ節で感作されることが示唆された。
- 2) MPT51特異的T細胞の誘導：テトラマー法により、特異的CD8<sup>+</sup>T細胞を縦隔リンパ節と脾臓で検出した。縦隔リンパ節ではワクチン接種2週後から特異的CD8<sup>+</sup>T細胞が出現し、3週後にピークとなり、その後、終息した。脾臓では特異的CD8<sup>+</sup>T細胞は検出出来なかった。
- 3) IFN- $\gamma$ 産生：MPT51ペプチド刺激によるIFN- $\gamma$ 産生で、特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の存在を検討したところ、縦隔リンパ節で大量に、脾臓でも少量産生がみられた。脾臓にも若干特異的T細胞が存在すると考えられた。
- 4) 再刺激によるT細胞の誘導：ワクチン接種2ヶ月後にBCGを経気道的に感染させたところ、5日後に肺に特異的CD8<sup>+</sup>T細胞が出現し、記憶T細胞が誘導されていることを確認した。興味あることに、この際に縦隔リンパ節に特異的CD8<sup>+</sup>T細胞は認められず、チャレンジ2ヶ月後に再発現した。このことは、記憶CD8<sup>+</sup>T細胞がBCG感染に伴って、縦隔リンパ節から動員されることを意味する。
- 5) ヘテロ免疫とキラー活性：レンチベクターで感作し、BCGで追加免疫することで、縦隔リンパ節に強いキラー細胞を誘導できた。このことは、このヘテロ免疫の感染防御における有用

性を示唆する。

(橋本 大, 永田 年, 内嶋雅人, 小出幸夫)

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

[目的] 樹状細胞ワクチン投与による抗原特異的CTL (細胞傷害性T細胞) の誘導における $\alpha$ -GalCerのアジュバンド効果について検討する。

[概要] リステリア菌の主要CTLエピトープであるリステリオリジンO (LLO) 91-99ペプチド (LLO p91-99) を骨髄由来DCにパルスしたDCワクチンに, CD1d分子のリガンドでありNKT細胞を誘導できる $\alpha$ -GalCerを同時にパルスし, それをマウスに免疫した。免疫マウスにおける特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の誘導, リステリアに対する感染防御効果について検討した。

[目的の達成度] (1) LLO p91-99ペプチドパルスDC細胞を2週おき2回マウスに静脈注射することにより, 強いLLO p91-99特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の誘導を観察した。(2) 1回目の免疫時 (プライム) に $\alpha$ -GalCerとLLO p91-99の同時パルスDCワクチン免疫, 2回目の免疫時 (ブースト) にLLO p91-99ペプチドパルスDCワクチン免疫すると, 強力なCTLの誘導を観察した。しかし1回目の免疫時 (プライム) と2回目の免疫時 (ブースト) の両方とも同時パルスDCワクチン免疫をするとCTLの誘導は減弱した。(3) 2回目の同時パルスDCワクチン免疫後のマウスに抗IFN- $\gamma$ 抗体処理をするとCTLの誘導の増強を認めたことから2回目免疫時の過剰なIFN- $\gamma$ 産生がCTLの誘導を阻害していることが明らかとなった。

(榎本紀之, 永田 年, 内嶋雅人, 小出幸夫)

### 4. 結核菌由来感染防御抗原分子, MPT51のヒトT細胞エピトープの同定

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

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

[目的の達成度] (1) MPT51 DNAワクチン免疫HLA-A\*0201トランスジェニックマウス脾細胞は, MPT51 p51-70ペプチドに応答してIFN- $\gamma$ を産生した。さらにMPT51 p51-70ペプチド内の, p53-62 (TLAGKGISVV) の10merペプチドがT細胞エピトープであることが明らかとなった。(2) 実際にツベルクリン皮内テスト陽性健常者の末梢血を用いて検討したところ, このペプチド刺激に対してIFN- $\gamma$ の産生を認めた。

(青枝大貴, 永田 年, 橋本 大, 小出幸夫)

### 5. ケモカインによる分子標的型坑結核菌ワクチンの開発と作用機構の解析

ケモカインは炎症時における白血球浸潤を誘導する因子として研究されてきたが, 近年リンパ球や樹状細胞を主な標的細胞とするケモカインが数多く同定され, 免疫系の維持・制御にこれらが重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。ケモカインのDNAワクチンへの応用を



目的として、MIP-1 $\alpha$ と結核菌のMPT51遺伝子を連結したケモカイン・抗原融合型DNAワクチンを作製した。これを遺伝子銃を用いてBALB/cマウスに接種し、その効果を解析した。MPT51のみのDNAワクチンに比べ、ケモカイン融合型にすることでMPT51抗原特異的CD8<sup>+</sup>T細胞が増加した。抗原特異的IFN- $\gamma$ のmRNAおよびタンパク質発現量も、ケモカイン融合型で増加した。また、C57/BL6マウスにも同様に免疫した結果、抗原特異的IFN- $\gamma$ の産生誘導能が融合型DNAワクチンで増強し、MHCクラスIIの経路においても有効である可能性が認められた。

一方、大腸菌発現系で作製したMIP-1 $\alpha$ -MPT51融合タンパクで免疫した場合も、BALB/cマウスにおいて抗原特異的IFN- $\gamma$ の産生が強く誘導された。MIP-1 $\alpha$ に変異を加えたもので免疫した場合は、IFN- $\gamma$ 産生は全く誘導されなかった。これらのことから、MIP-1 $\alpha$ と抗原を融合させることで、細胞性防御免疫誘導におけるワクチンの効果が増強されることが明らかになった。

さらにMIP-1 $\alpha$ -GFP融合タンパクを作製し、マクロファージおよび樹状細胞に作用させた。共焦点顕微鏡を用いた解析により、MIP-1 $\alpha$ のレセプターであるCCR5を介した抗原の結合、取り込みが認められた。ケモカイン本来の効果のみならず、抗原提示細胞への効率のよい抗原の取り込みにより細胞性防御免疫が強く誘導されることが示唆された。

(内嶋雅人, 永田 年, Arya Biragyn, 青枝大貴, 小出幸夫)

#### 6. HLA-A2402トランスジェニックマウスの作出

結核菌抗原のヒトHLAエピトープを同定するために、HLA-A2402遺伝子を $\beta$ 2mノックアウトマウスに導入したトランスジェニックマウスをこれまでに作出した。しかし、この系統は繁殖能が極めて低く、維持が困難であることから、C57/BL6マウスと交配してHLA-A2402遺伝子の移入を試みた。継代の結果、HLA-A2402遺伝子同型接合性C57/BL6マウスを作出した。今後解析をすすめる予定である。

(内嶋雅人, 永田 年, 小出幸夫)

#### 7. 結核菌由来タンパク質に対する宿主遺伝子発現の解析

結核菌由来タンパク質により発現誘導される宿主の遺伝子を解析するための材料として用いるために、結核菌のMPT51, GroES, ESAT6, CFP10の遺伝子を大腸菌に導入し、タンパク質発現の条件設定をおこなった。MPT51については、小麦胚を用いた試験管内タンパク質合成もおこなった。予備的な結果として、試験管内合成した粗製のMPT51タンパク質で刺激したマクロファージ細胞株で、TLR2などの遺伝子発現が対照と比べて増加していた。タンパク質の精製および他の細胞を用いた解析をすすめている。

(内嶋雅人, 永田 年, 小出幸夫)

#### 8. 2フォトン顕微鏡を用いたT細胞による細胞内寄生菌排除の生体内イメージング解析

[目的] 脾臓は病原体の全身感染において、重要な防御機構を担っている。本研究の目的は、細胞内寄生菌（リステリア）の脾臓における防御機構を2フォトン顕微鏡を用いて生体内でイメージング解析することにある。具体的には 1) リステリアの辺縁帯マクロファージ及び樹状細胞による捕捉, 2) これらの細胞の脾臓内移動, 3) リステリア特異的T細胞の感作, をイメージング解析

する。本年度に得られた結果を以下に記す。

〔概要及び目的の達成度〕

- (1) リステリア静脈内感染2時間後：CFSE標識したリステリアは辺縁帯に存在するが、この時点で辺縁帯マクロファージおよび樹状細胞に変化を認めなかった。
- (2) リステリア感染6～12時間後：ほとんど全てのリステリアは辺縁帯および赤脾髄のマクロファージによって、捕捉された。
- (3) リステリア感染24時間後：興味あることにCFSE標識したリステリアは白脾髄および小動脈周囲リンパ鞘（PALS）のT細胞領域にのみ認められた。この間に、リステリアを捕捉した辺縁帯マクロファージおよびCD11c陽性樹状細胞がT細胞領域に移動することが観察された。特に、CD11c陽性樹状細胞は急速にPALS周囲に蓄積されることが判明した。これらの実験において、樹状細胞を検出するために、CD11c-eYFPトランスジェニック（Tg）マウスを、また、マクロファージをCD11b-GFP Tgマウスを用いた。
- (4) 特異的T細胞の感作（今後の予定）：本年度の結果から、辺縁帯でリステリアを捕捉した樹状細胞がPALSに移動して、T細胞を感作する可能性が考えられた。そこで、これを証明するため、OVA発現リステリア、OVA特異的CD8+T細胞受容体Tgマウス（OT-I）およびOVA特異的CD4+T細胞受容体Tgマウス（OT-II）を用いて生体内イメージング解析を行う予定である。（青枝大貴，Mark Miller，小出幸夫）

#### 9. リステリア感染マクロファージの細胞死のイメージング解析

〔目的〕細胞内寄生菌であるリステリアは宿主細胞内で増殖すると共に、宿主細胞に細胞死を誘導する。この細胞死は宿主における感染防御機構の1つと考えられる。そこで、そのメカニズムを主にリアルタイム・イメージング解析を用いて行った。

〔概要〕リステリアをCFSEで染色し、マクロファージ細胞株に感染させた。カスパーゼ1の活性は蛍光基質で細胞死はPIで染色した。

〔目的の達成度〕リステリアはマクロファージに感染し、食胞から細胞質にエスケープする段階で、カスパーゼ1を活性化することにより、細胞死を誘導することが判明した。この細胞死はアポトーシスとは明らかに異なっていた。食胞からエスケープ出来ない変異リステリアにはこのような細胞死を誘導できなかった。

（セルバンテス・ホルヘ，内嶋雅人，永田 年，小出幸夫）

#### 10. クルクミンによる潰瘍性大腸炎の治療

〔目的〕我々は既にマウスのTNBS腸炎で、クルクミンがNF- $\kappa$ Bを抑制することにより腸炎を抑制することを見出した。本研究では、クルクミンが実際にヒト潰瘍性大腸炎の緩解維持に有効かどうかを多施設、double blind、偽薬コントロール法で検討した。

〔概要〕11施設89名の緩解期大腸炎患者を5-ASA/SASP+クルクミン（2g/day）又は5-ASA/SASP+偽薬群に分け、6ヶ月間これらを投与した。効果判定にはClinical Activity Index（CAI）とEndoscopic Index（EI）を用いた。

〔目的の達成度〕偽薬投与群44名中8名に再燃が認められたが、クルクミン投与群では45名中2名

のみに再燃が認められた ( $p=0.049$ )。CAIも偽薬群では1.0から2.2へと悪化したのに対し、クルクミン群では1.3から1.0へと改善された。また、EIも同様に偽薬群では1.3から1.6に悪化したのに対し、クルクミン群では1.3から0.8へと顕著に改善された。現在、この論文は米国一流誌に受理されている。

(花井洋行, 小出幸夫, 内嶋雅人, 永田 年)

### 13 この期間中の特筆すべき業績, 新技術の開発

1. DCワクチン1回目投与時 (プライム) に $\alpha$ -GalCerを用いることにより, より強力なCTL誘導能を認めたが, 2回目投与時 (ブースト) の $\alpha$ -GalCer処理は, CTL誘導を抑制した。この結果は, 細胞内寄生細菌に対する有効な細胞性免疫の誘導のメカニズムの解明に重要な知見である。またMPT51分子のHLA-A\*0201拘束性のCTLエピトープが明らかとなった。これは今後の結核サブユニットワクチンの開発において重要な知見であると考えられる。
2. 安全な第三世代レンチウイルスベクターを用いて, 我々が発見した結核菌の防御抗原であるMPT51を発現するワクチンを作製した。これを経気道接種することにより, 1回の免疫で肺にホーミングする特異的T細胞を感作できた。これはBCG接種後の追加免疫として極めて有効なワクチンと考えられる。
  1. 自然免疫に関与するTLRが注目されているが, 我々はIFN- $\gamma$ 存在下では通常TLR9が発現が低いmyeloid DCもTLR9を発現し, ISSに応答するようになることを発見した。すなわちDC亜集団は環境に応じて異なった役割を果たすことを明らかにした。
3. クルクミンが潰瘍性大腸炎の緩解維持に有効であることを証明した。

### 14 研究の独創性, 国際性, 継続性, 応用性

1. 当教室は, これまで遺伝子銃および弱毒細菌をキャリアとしたDNAワクチンにより細胞内寄生細菌に対する細胞性免疫の誘導について研究してきた。平成17年度は, 樹状細胞ワクチン, レンチウイルスベクターを用いた粘膜ワクチン等に研究を広げ, より有効な細胞性免疫の誘導を試みている。これらの結果は, 将来のワクチン開発に有用であるのみならず, 細胞内寄生細菌に対する細胞性免疫誘導の基礎的解明に有用な知見を与えるものである。
2. 前述のように細胞内寄生菌の感染にたいしてはCTLが重要な役割を果たすが, どのようにしてCTLが菌を排除するのかは明らかでない。近年, 多光子励起顕微鏡を用いて生きたマウスの臓器内の蛍光標識された細菌, リンパ球の挙動を観察できるようになった。そこで, この分野の第一人者であるワシントン大学のMark Miller博士と生体内の菌とリンパ球の相互作用の観察に関する共同研究を開始した。
3. クルクミンが臨床的に潰瘍性大腸炎の緩解維持に有効であることを世界で初めて証明した。