

- Kobayashi, K., M. Kai, M.-i. Gidoh, N. Nakata, M. Endoh, R.P. Singh, T. Kasama, and H. Saito. 1998. The possible role of interleukin (IL)-12 and interferon-gamma-inducing factor/IL-18 in protection against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 88: 226-231.
- Xu, D.L., Goto, Y., Endo, F., Amoako, K.K. and Shinjo, T. The effect of *Bcg* gene on antigen presentation of spleen adherent cells and peritoneal macrophages from *M. bovis* BCG-infected *Bcg^s* and *Bcg^r* mice. *Veterinary Microbiology* 59:67-78 (1997)
- Amoako, K.K., Goto, Y., Misawa, N., Xu, D.L. and Shinjo, T. The erythrocyte receptor for *Fusobacterium necrophorum* hemolysin: phosphatidylcholine as a possible candidate. *FEMS Microbiology Letters* 168:65-70 (1998)
- Nakanaga, K., Maeda, S., Myojin, Y., Xu, D.L. and Goto, Y. Sequence analysis and Expression of *Nramp-1* Gene in *Bcg^r* and *Bcg^s* Mice. *The Journal of Veterinary Medical Science* 61:(6) in press (1999)
- Hashimoto, S., Yamada, M. and Akagawa K.: IL-10 Modulates CSF-Induced Human Monocytes Differentiation into Macrophages. *Proceedings of Thirty-third U.S. -Japan Tuberculosis and Leprosy Research Conference*, p. 167-171, 1998.
- 橋本達一郎、山本三郎：ワクチン開発の現状と問題点 BCG ワクチン。治療学 32(12)、25-29(1998)
- 光山正雄、野村卓正：ツベルクン反応とBCG、臨床と研究 75(4)：751-757, 1998.
- 光山正雄：生体防御と感染、現代医療 30(5)：1157-1162, 1998.
- 河村伊久雄、光山正雄：特異的・非特異的感染防御因子、INFECTION CONTROL 7(9)：902-908, 1998.
- 光山正雄：抗酸菌に対する免疫病理学的反応とサイトカインネットワーク、分子呼吸器病 2(5)：14-20, 1998.
- 光山正雄：生体は感染をどう防御しているか？ Convention Insights on Chemotherapy 13(2)：10-11, 1998.
- 光山正雄：結核防御免疫の誘導と発現、結核 73(11)：639-644, 1998.
- 光山正雄：細胞内寄生菌研究の動向、学術月報 52(2)：142-146, 1999.
- 小林和夫. 1998. 抗酸菌感染症制圧における生体防御増強戦略. *BioDefence* シリーズ 3. 異物反応と生体反応 -新しい視点を求めて-(日本生体防御学会、岡田秀親編). 東京：菜根出版. 227-241.
- 進士ひとみ、小林和夫. 1998. マクロファージ活性化と病態形成. 細菌感染症. 臨

床免疫 30: 207-213.

斎藤 肇、D. Dawson、甲斐雅規、小林和夫。1998. Mycobacterium avium complex の自然環境における地理的分布並びに AIDS・非 AIDS 患者株の血清型。結核 73: 379-383.

樋口一恵、原田登之、内山隆司、藤原 寛、上田千里、露口泉夫、中村玲子、小林和夫、青木正和。1998. マクロファージの IL-12 産生を高値に誘導する結核菌体成分の解析。結核 73: 531-543.

2. 学会発表

S Yamamoto, E Shigeto, T Yamamoto, S Haga, N Tasaka.: Cellular immune responses to MPB64 antigen of tuberculosis patients and of mice immunized with BCG. The 29th World Conference of IUATLD/UICTMR. Global Congress on Lung Health. Bangkok, Thailand 23-26 November 1998.

Saburo Yamamoto, Toshiko Yamamoto, Ryo Takagi, Masayoshi Inoue, Yoshiharu Takahashi, Maiko Kamachi and Hiroto Hara: Immunostimulatory activity of oligodeoxyribonucleotides. The 33rd Research Conference on Tuberculosis and Leprosy. US-Japan Cooperative Medical Science Program July 1998, Osaka.

Saburo Yamamoto: DNA as Immunostimulatory Agents. Symposium on

Immunology of Tuberculosis Pathogenesis and Vaccine Development. US-Japan Cooperative Medical Science Program July 1998, Osaka.

Honda M., Joint development of BCG carrier of HIV genes-Japanese NIH and Thai NIH HIV Vaccine Trials in Thailand Current Progress 1998 (1998.02.11-13 Bangkok Thailand)

Mitsuo Honda Current Progress of BCG-vectored HIV candidate vaccine UNAIDS 98.10.28-30 Tokyo

Honda M., Nakasone T., Yoshino N., Kaizu M., Ami Y., Shinohara K., Takizawa M., Matsuo K., Someya K., Yamamoto H., Sasaki Y., Sakai K., Andou S., Takahashi E., Naganawa S., Hamano T., Kawahara M., Osu T., Hara T., Horibata S., Nagai Y., and Yamazaki S., Study of HIV/AIDS candidate vaccine to obtain good protective immunity France-Japan AIDS Conference 1998.12.4-5 Tokyo)

Mitsuo Honda Recombinant BCG-based HIV-1 vaccine are possible for baby use? HIV Vaccines for Developing Countries: Vaccinating Against the Leading Infectious Killers of Children (December 6-9, 1998 Dakar, Senegal)

Kazuhiro Matsuo, Takeaki Ohsu, and Mitsuo Honda Improvement of

Antigenicity and Stability for V3 Epitope-Secreting rBCG Candidate Vaccine Japan - U.S.A AIDS (Toyama 3.17-19 1999)

Simon Beddows, Mitsuo Honda, Saladin Osmanov, Eva-Maria Feny · Susan Zolla-Pazner and Jonathan Weber. Neutralization of Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates by Sera Generated in Three Cynomologous Monkeys Following Immunization with a Recombinant BCG/V3 Construct. 1999. J.Virol.

Yoshitomo Chujoh, Kazuhiro Matsuo, Hitomi Yoshizaki, Tetsuya Nakasatomi, Kenji Someya, Yukari Okamoto, Satoshi Naganawa, Shinji Haga, Hiroshi Yoshikura, Akihiro Yamazaki, Shudo Yamazaki, and Mitsuo Honda. Cross-Clade Neutralizing Antibody Production against Human Immunodeficiency Virus Type 1 Clade B and E Strains by Recombinant Mycobacterium bovis BCG-Based Candidate Vaccine. 1999

Someya K., Ami Y., Shinohara K., Yoshino N., Yamamoto H., Yoshizaki H., Nakasatomi T., Okamoto Y., Naganawa S., Nakasone T., Asano T., Haga S., Lu Yichen, Matsuo K., Yoshikura H., Yamazaki s., and Honda M. A single-shot recombinant BCG vaccine for HIV-1 induce protective immunity in cynomolgus monkeys against challenge

by SHIV. (submitted) 1998

M.Mitsuyama: Cytokine response of the host against virulence factor of *Listeria monocytogenes* and its implication in protective immunity. The 10th Takeda Science Foundation Symposium on Molecular Basis of Microbial Pathogenesis. 1999.

Xu, De Long. Goto, Y. Amoako, K.K. Shinjo, T.. The effect of Bcg gene on antigen presentation of spleen adherent cells and peritoneal macrophages from *M.bovis* BCG-infected Bcg^s and Bcg^r mice. The 4th Japan-Korea International Symposium on Microbiology. 1998. p62 (Tokushima, Japan)

Goto, Y. Xu, De Long, Nakanaga, K. Effect of corticosteroid on the expression of *Nramp-1* in *M.avium* infected Bcg^s and Bcg^r mice. Thirty-Third U.S.-JAPAN Tuberculosis and Leprosy Research Conference 1998. (Osaka, Japan) pg88-92

Hashimoto, S., Yamada, M. and Akagawa K.: IL-10 Modulates CSF-Induced Human Monocytes Differentiation into Macrophages. Thirty-third U.S. -Japan Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 1998 July, Osaka.

KN. Mochida, KS. Akagawa, EA. Rich. Interleukin-10 mediated suppression of interferon-g induced by monocyte

cultured with macrophage colony-stimulating factor but not granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. The VIIth International Symposium on the Molecular Cell Biology of Macrophages '98. June 18, 19, Yamagata-city, Japan.

山本十糸子、種市麻衣子、蒲地一成、徳永徹、山本三郎：細菌由来 DNA および合成 DNA に応答してインターフェロン α を産生する細胞に関する研究。第 71 回日本細菌学会総会 1998 年 4 月、松本市。

山本三郎、山本十糸子、種市麻衣子、蒲地一成、徳永徹：細菌 DNA および合成 DNA の NK 細胞活性と抗腫瘍活性。第 71 回日本細菌学会総会 1998 年 4 月、松本市。

山本三郎、山本十糸子、種市麻衣子、芳賀伸治、重藤えり子、田坂博信：結核患者におけるツベルクリン蛋白質抗原 MPB64 に対する細胞性免疫応答。第 73 回日本結核病学会総会 1998 年 4 月、新潟市。

山本十糸子、梅森清子、山本三郎：細菌由来 DNA および 5'-ACGA-3'オリゴ DNA 刺激による免疫増強反応。第 80 回日本細菌学会関東支部総会 1998 年 11 月、東京都。

山本三郎、山本十糸子：免疫増強性オリゴ DNA の免疫アジュバント活性。1998 年 12 月、神戸市。

山本十糸子、伊保澄子、徳永徹、山本三郎：直接的かつ宿主介在性抗 HIV 作用を兼ね備

えた非アンチセンスオリゴヌクレオチド抗エイズ薬の開発研究。第 28 回日本免疫学会・学術集会 1998 年 12 月、神戸市。

伊保澄子、山本十糸子、山本三郎：ヒト NK 及び T 細胞に対し IFN $\cdot\gamma$ 産生誘導活性を示す細菌 DNA の塩基配列。第 28 回日本免疫学会・学術集会 1998 年 12 月、神戸市。

山本三郎、山本十糸子、梅森清子：ツベルクリンタンパク質抗原の細胞性免疫誘導に及ぼす細菌 DNA および合成 DNA のアジュバント効果。第 72 回日本細菌学会総会 1999 年 3 月、東京都。

本多三男 エイズのワクチン開発—BCG ベクターからサルエイズモデルまで—東京理科大学 基礎工学研究科生物工学専攻免疫工学特論・講義 98.11.20 東京理科大・生命科学研究所

松尾和浩、大洲竹晃、長縄聡、浜野隆一、海津雅彦、滝沢万里、芳賀伸治、山田毅、山崎修道、本多三男 V3 エピトープ分泌型組換え BCG ワクチンの開発：抗原性とベクター安定性の向上 第 12 回日本エイズ学会 (1998.12/1,2 東京)

芳賀伸治、網 康至、須崎百合子、本多三男：カニクイザルの結核実験動物としての有用性の検討、第 68 回実験結核研究会総会、1998 年 3 月、新潟。

芳賀伸治、山崎利雄、倉 文明：肺結核症動物モデル開発のための安全なエアロゾル感染の検討 第 69 回実験結核研究会総

会, 1999年4月, 宇都宮.

山崎利雄、芳賀伸治、赤川清子、山本三郎、PCR法による結核菌群からBCGの鑑別同定法の検討、第135回日本結核病学会関東支部会、1999年5月、東京

河村伊久雄、光山正雄：食細胞による殺菌機構と菌のエスケープ、第71回日本細菌学会総会、1998.

望月博史、野村卓正、大矢聡、河村伊久雄、光山正雄：サルコドローシスと*Propionibacterium acnes*：菌株差によるサイトカイン誘発能の差異とその解析、第71回日本細菌学会総会、1998.

藤田雅、光山正雄、仲川洋治：多剤耐性のセラチアの遺伝子発現について、第71回日本細菌学会総会、1998.

野村卓正、田邊嘉也、光山正雄：リステリア感染で誘導されるCTLの標的細胞における食胞内pHの意義、第71回日本細菌学会総会、1998.

牧野真人、藤田雅、光山正雄：活性化Mφ内での*Listeria monocytogenes*病原因子遺伝子発現の解析、第71回日本細菌学会総会、1998、松本.

河村伊久雄、光山正雄：結核菌の細胞侵入因子によるマクロファージ活性酸素産生の抑制、第71回日本細菌学会総会、1998.

橋敏明、松山東平、光山正雄：菌の温度感

受性と宿主細胞性免疫は*Sporothrix schenckii*感染の予後に関与する、第71回日本細菌学会総会、1998.

筒井奈々子、野村卓正、河村伊久雄、光山正雄：劇症型溶連菌感染症由来菌の病原性：マウス足蹠感染モデルによる解析、第71回日本細菌学会総会、1998.

江部佑輔、内藤真、長谷川剛、光山正雄：マクロファージ除去マウスにおける*Listeria*感染機序、第38回日本リンパ網内系学会総会、1998.

河村伊久雄、野村卓正、光山正雄：抗結核防御免疫へのリステリアヘモリシンの応用、第9回日本生体防御学会学術総会、1998.

望月博史、野村卓正、河村伊久雄、光山正雄：*Propionibacterium acnes*とサルコドローシス：菌株によるサイトカイン誘発能の差異、第28回日本免疫学会総会、1998.

河村伊久雄、幸田力、野村卓正、光山正雄：サイトカイン産生誘導能を有するlisteriolysin Oの抗結核防御免疫発現への応用、第28回日本免疫学会総会、1998.

筒井奈々子、野村卓正、河村伊久雄、光山正雄：劇症型溶連菌感染症由来菌に対するマウスでのサイトカイン応答、第28回日本免疫学会総会、1998.

光山正雄：リステリア感染防御の発現と誘導におけるNK細胞由来IFN-gの中心的役割、第22回阿蘇シンポジウム、1998.

筒井奈々子、野村卓正、河村伊久雄、光山正雄：劇症型溶連菌感染症由来菌の貪食細胞への影響：J774 細胞における解析、第 7 2 回日本細菌学会総会、1999.

望月博史、野村卓正、河村伊久雄、光山正雄：*Propionibacterium acens* とサルコイドーシス：菌株によるサイトカイン誘発能の差異、第 7 2 回日本細菌学会総会、1999.

牧野真人、藤田雅、光山正雄：マクロファージ内での *Listeria monocytogenes* 病原因子の遺伝子発現についての解析、第 7 2 回日本細菌学会総会、1999.

河村伊久雄、幸田力、野村卓正、光山正雄：結核防御免疫誘導へのアジュバントとしてのリステリオリシン O の応用、第 7 2 回日本細菌学会総会、1999.

野村卓正、幸田力、河村伊久雄、光山正雄：リステリオリシン O 刺激による IFN-g 産生に關与するサイトカインネットワークの解析、第 7 2 回日本細菌学会総会、1999.

幸田力、野村卓正、河村伊久雄、光山正雄：リステリオリシン O のサイトカイン誘導能と細胞傷害活性の解離とサイトカイン産生誘導活性最小単位の特定制、第 7 2 回日本細菌学会総会、1999.

小林和夫、吉田 彪 1998. 肉芽腫炎症制御におけるサイトカインネットワーク（要望課題）. 結核、73：236、1998. 第 73 回日本結核病学会総会（新潟、4 月）

樋口一恵、原田登之、内山隆司、藤原 寛、上田千里、中村玲子、小林和夫 1998. マクロファージにおいて IL-12 産生を高値に誘導する結核菌体成分の解析. 結核、73：244、1998. 第 73 回日本結核病学会総会（新潟、4 月）

佐藤直樹、山崎利雄、芳賀伸治、小林和夫、柏原嘉子、林 公子、田村俊秀、山下研也、豊田耕一、岡沢 豊、丹野和信 1998. 生物発光を用いた結核菌の薬剤感受性試験法（その 2）. アデノシン三リン酸（ATP）測定法の結核菌標準株による基礎的検討. 結核、73：250、1998. 第 73 回日本結核病学会総会（新潟、4 月）

山崎利雄、佐藤直樹、芳賀伸治、小林和夫、柏原嘉子、林 公子、田村俊秀、山下研也、豊田耕一、岡沢 豊、丹野和信 1998. 生物発光を用いた結核菌の薬剤感受性試験法（その 2）. ATP 測定法の薬剤感受性試験への応用. 結核、73：251、1998. 第 73 回日本結核病学会総会（新潟、4 月）

小林和夫、儀同政一、甲斐雅規、齋藤肇. 1998. *Mycobacterium leprae* 感染マウスにおける免疫療法の理論と応用. 日本ハンセン病誌、67：44、1998. 第 71 回日本ハンセン病学会総会（平良、6 月）

福富康夫、木村博昭、虎谷 聡、松木玄二、小林和夫、松岡正典. 1998. らい菌貪食マクロファージにおいて誘導される TNF、IL-10 産生に対する IFN-g の相反する影響. 日本免疫学会・学術集会記録、28：325、

1998. 第 28 回日本免疫学会総会・学術総会（神戸、12 月）

樋口一恵、原田登之、中村玲子、小林和夫。
1998. マクロファージの IL-12 産生を高値に誘導する結核菌体成分の解析。日本免疫学会・学術集会記録、28：331、1998. 第 28 回日本免疫学会総会・学術総会（神戸、12 月）

許徳龍、後藤義孝、江島美穂、高橋由紀子、新城敏晴 Nrap-1(Bcg)遺伝子が人型結核により誘導される調節性サイトカインに及ぼす影響。126 回日本獣医学会 1998 年 8 月、江別。

中永和枝、江島美穂、後藤義孝 Bcg^s マウス由来細胞株における *Nramp1* 遺伝子発現の試み。126 回日本獣医学会、1998 年 8 月、江別。

許徳龍、後藤義孝、新城敏晴 NRAMP-1 遺伝子が *M. avium* 感染により産生されるサイトカインに及ぼす影響。日本細菌学会、1999 年 3 月 東京、細菌学雑誌 54 (1)

岩切章、長友亜樹子、前淵恭子、許徳龍、後藤義孝、新城敏晴 豚抗酸菌（野外例）における免疫応答。第 127 回日本獣医学会、1999 年 4 月、東京。

赤川清子、山崎利雄：ヒト単球よりのマクロファージ形成への *Mycobacterium avium* 感染の影響、第 135 回日本結核病学会関東支部会、1999 年 5 月、東京

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

分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

新しいタイプの抗結核ワクチンの構築とその発現に関する研究

分担研究者 本多三男

国立感染症研究所・エイズ研究センター・第一研究グループ長

研究組織：本多三男、仲宗根正、吉野直人、松尾和浩、長縄聡、大洲竹晃、
浜野隆一、海津雅彦、滝澤万里、川原守、原敬志

研究要旨

- ① α 抗原特に α -K 抗原をモルモットに投与すると細胞性免疫及び、液性免疫が著名に誘導されることを明らかにした。
- ② α 抗原を BCG にトランスフェクションすると α -K 遺伝子を使うことが最も有効に発現されることが判った。
- ③ 新しいタイプの抗結核候補ワクチンとして α 抗原蛋白、rBCG α 、pcDNA- α 、リコンビナントワクシニア α を作成した。

A. 研究目的

結核による新規感染は平成 9 年度の統計では 43,000 人に達し、死亡者数は約 3,000 人と報告されている。これらの結果から、新しいタイプの抗結核ワクチンの開発が緊急の課題の一つになっている。我々のグループでは、これまで抗酸菌の分泌する生理活性能を持った蛋白を分子生物学的に明らかにしてきた。これらの成果をもとにして、以下の点について検討をする。

- ① 現在用いられている BCG ワクチンを遺伝子学的に補強し、新しいタイプのリコンビナント BCG 結核ワクチンを作成する。
- ② BCG が分泌する分泌型蛋白を抗原に用い、コンポーネント結核ワクチンあるいは DNA ワクチンとして使用し、抗結核効果を解析する。

③ 抗結核効果を最大限に得るために①、②のコンビネーションの可能性と投与ルートの解析を行う。

B. 研究方法

① リコンビナント BCG 結核ワクチンの作成

標的遺伝子として結核菌の有する分泌型の α 抗原蛋白及び類似の蛋白に着目し、その遺伝子を BCG 東京株に発現させる。さらに培養液中に遊離する蛋白を Western Blot 法で確認し、リコンビナント BCG を作成した。

② DNA- α 抗原ワクチンの作成

α 抗原をベクター (pcDNA3) のサイトメガロウイルス・プロモーター直下に組み込んで作製した。さらにその発現は M 細胞

にベクターをトランスフェクトし、抗原の発現をフローサイトメーターで確認した。

③ α 抗原をモルモットに投与し、免疫誘導能を解析した。

C. 研究成果

①モルモットにおけるリンパ球増殖法の開発

モルモットの全血を使って PHA 及び ConA で刺激すると 1.4×10^5 細胞あるいは全血 15ml を使った時ステミレーションインデックス (SI) が 20~60 得られることがわかった。さらにモルモットの脾臓細胞を PHA 及び ConA で刺激すると 1×10^5 の細胞濃度の時に SI が 100 前後上昇することが明らかになった。これらの条件を用いて α 抗原を特異抗原としてモルモットにコンプリートアジュバンドと免疫すると、免疫 1 週間目で有意に増殖反応が認められ、約 1 カ月後ピークに達する。約 40 日後、インコンプリートアジュバンドでブースターをかけると SI は 10 倍前後から 50~100 倍に上昇する。(Fig.参照)

② α 抗原に対する抗体産生能を解析すると抗原刺激後 1 週間で抗体価の上昇が認められ、3 週間でピークに達する。40 日目にコンプリートアジュバンドでブースターをかけると抗体価は著名に上昇し、1:250 万に達する。実験に用いて 70 日前後でも 1:150 万の高い抗体価を持続していた。

③ α -K 抗原遺伝子を DNA ワクチン作成用ベクターである pcDNA3.1 に挿入し、pcDNA α -K DNA ワクチンを作成した。その発現を確認するために M3.5.1 細胞にトランスフェクションし、細胞を薬剤耐性下

で培養し、さらに細胞をクローニングした。 α 抗原の発現をフローサイトメーターで確認すると No.1, No.2 のいずれのクローンも細胞表面に α 抗原を著名に発現していることが確認された。

④ α 抗原遺伝子とシャトルベクター pSO 及び pIS の 2 種類のベクターに挿入し、BCG 東京株にトランスフェクションし、培養液中の遊離される α -K 蛋白を Western Blot 法で確認した。この発現は rBCG をモルモットに投与し α -K 蛋白で DTH を誘導することにより確認した。さらに α -K 特異的抗体の産生能でも確認することができた。

D. 考察

抗結核ワクチンの方向性として我々がクローニングした α 抗原及び α 抗原類似の遺伝子はその研究に用いられつつある。我々は約 10 年前から α 抗原の DTH 誘導能及び結核菌からの多量分泌能に着目し、種々のリコンビナント BCG を作成してきた。今回 10 年度の研究ではまず、挿入した α 抗原の安定性を強化するために小型のシャトルベクターである pSO タイプのベクターを用い rBCG を作成することができた。さらに抗結核能を増幅するためにいくつかの方向から検討した。まず、 α 抗原がワクチン抗原として有用であるかどうかを精製した α -K 抗原を用いて検討すると α 抗原特異的なリンパ球増殖能が著名に上昇することがわかった。さらに、 α 抗原特異的な液性免疫の上昇が認められる α 抗原がワクチン抗原として有用であることが明らかにされた。この蛋白抗原の免疫反応の増幅は BCG 投与による免疫反応とは異なっており、ブースター効果が投与方法により極めて有効に長期

間作用することが判った。

そこで、 α -K 抗原を用いて DNA ワクチンを作成した。この α 抗原を組み込んだ DNA ワクチンの発現を細胞にプラズミッドトランスフェクションして確認することができた。今後、この DNA ワクチンを in vivo 投与し、その発現を免疫誘導能について確認する予定である。さらに、細胞性免疫能、特に α 抗原特異的な CTL の誘導を確認するために α 抗原を用いたリコンビナントワクシニアを作成中である。このリコンビナントワクシニアは弱毒化されているのでワクチン抗原としても使用可能である。今後、これらの系を in vivo でその発現を確認した後、結核に対する防御免疫能の誘導とその増幅について検討する予定である。

E. 研究発表

- 1) Honda M., Joint development of BCG carrier of HIV genes-Japanese NIH and Thai NIH HIV Vaccine Trials in Thailand Current Progress 1998 (1998.02.11-13 Bangkok Thailand)
- 2) Mitsuo Honda Current Progress of BCG-vectored HIV candidate vaccine UNAIDS 98.10.28-30 Tokyo
- 3) 本多三男 エイズのワクチン開発ー BCG ベクターからサルのエイズモデルまでー 東京理科大学 基礎工学研究科生物工学専攻免疫工学特論・講義 98.11.20 東京理科大・生命科学研究所
- 4) 松尾和浩、大洲竹晃、長縄聡、浜野隆一、海津雅彦、滝沢万里、芳賀伸治、山田毅、山崎修道、本多三男 V3 エピトープ分泌型組換え BCG ワクチンの開発:抗原性とベク

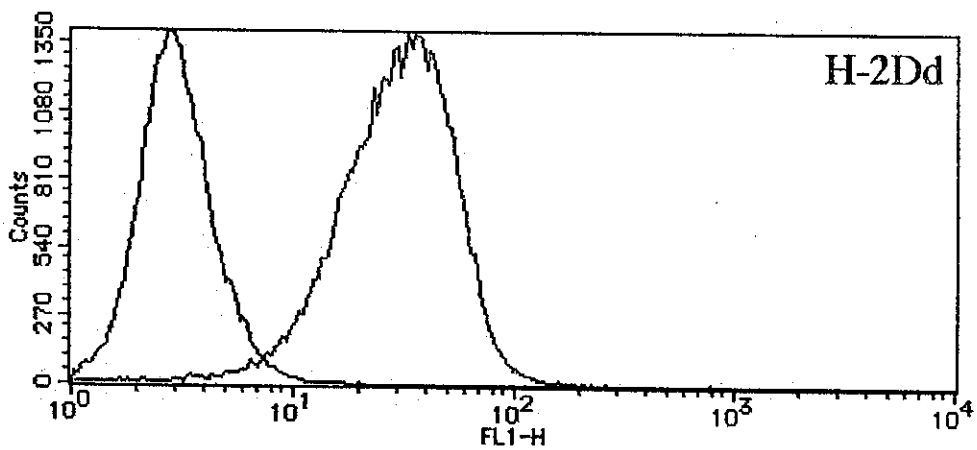
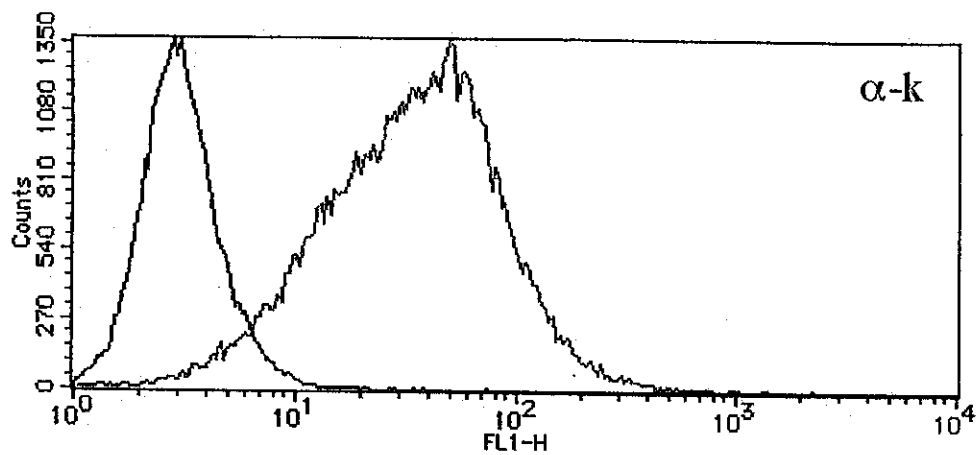
ター安定性の向上 第 12 回日本エイズ学会 (1998.12/1,2 東京)

- 5) Honda M., Nakasone T., Yoshino N., Kaizu M., Ami Y., Shinohara K., Takizawa M., Matsuo K., Someya K., Yamamoto H., Sasaki Y., Sakai K., Andou S., Takahashi E., Naganawa S., Hamano T., Kawahara M., Osu T., Hara T., Horibata S., Nagai Y., and Yamazaki S., Study of HIV/AIDS candidate vaccine to obtain good protective immunity France-Japan AIDS Conference (1998.12.4-5 Tokyo)
- 6) Mitsuo Honda Recombinant BCG-based HIV-1 vaccine are possible for baby use? HIV Vaccines for Developing Countries: Vaccinating Against the Leading Infectious Killers of Children (December 6-9, 1998 Dakar, Senegal)
- 7) Kazuhiro Matsuo, Takeaki Ohsu, and Mitsuo Honda Improvement of Antigenicity and Stability for V3 Epitope-Secreting rBCG Candidate Vaccine Japan - U.S.A AIDS (Toyama 3.17-19 1999)
- 8) Simon Beddows, Mitsuo Honda, Saladin Osmanov, Eva-Maria Feny · Susan Zolla-Pazner and Jonathan Weber. Neutralization of Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates by Sera Generated in Three Cynomologous Monkeys Following Immunization with a Recombinant BCG/V3 Construct. 1999. J.Virol.
- 9) Yoshitomo Chujoh, Kazuhiro Matsuo, Hitomi Yoshizaki, Tetsuya Nakasatomi,

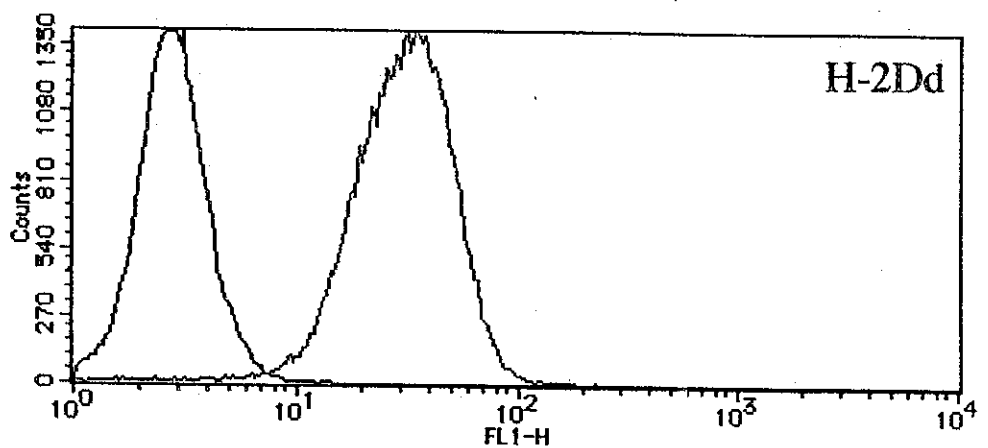
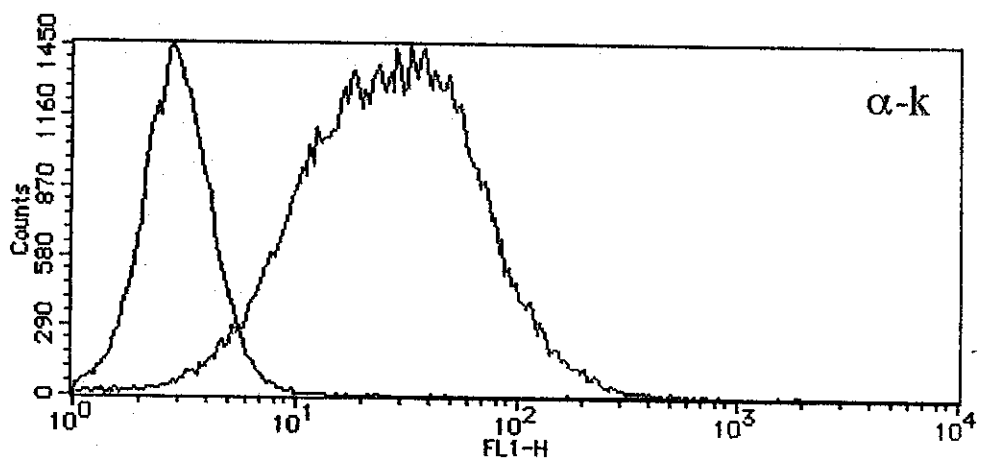
Kenji Someya, Yukari Okamoto, Satoshi Naganawa, Shinji Haga, Hiroshi Yoshikura, Akihiro Yamazaki, Shudo Yamazaki, and Mitsuo Honda. Cross-Clade Neutralizing Antibody Production against Human Immunodeficiency Virus Type 1 Clade B and E Strains by Recombinant Mycobacterium bovis BCG-Based Candidate Vaccine. 1999

10) Someya K., Ami Y., Shinohara K., Yoshino N., Yamamoto H., Yoshizaki H., Nakasatomi T., Okamoto Y., Naganawa S., Nakasone T., Asano T., Haga S., Lu Yichen, Matsuo K., Yoshikura H., Yamazaki s., and Honda M., A single-shot recombinant BCG vaccine for HIV-1 induce protective immunity in cynomolgus monkeys against challenge by SHIV. (submitted) 1998

#1



#2



Lymphocyte Proliferation

- Priming : 0.2 mg/ml of α -K antigen emulsified with FCA intravenously (1ml i.v.)
- Priming : 0.2 mg/ml of α -K antigen emulsified with FIA intravenously (1ml i.v.)
- Booster : 0.2 mg/ml of α -K antigen emulsified with FIA intravenously (0.5ml i.v.)

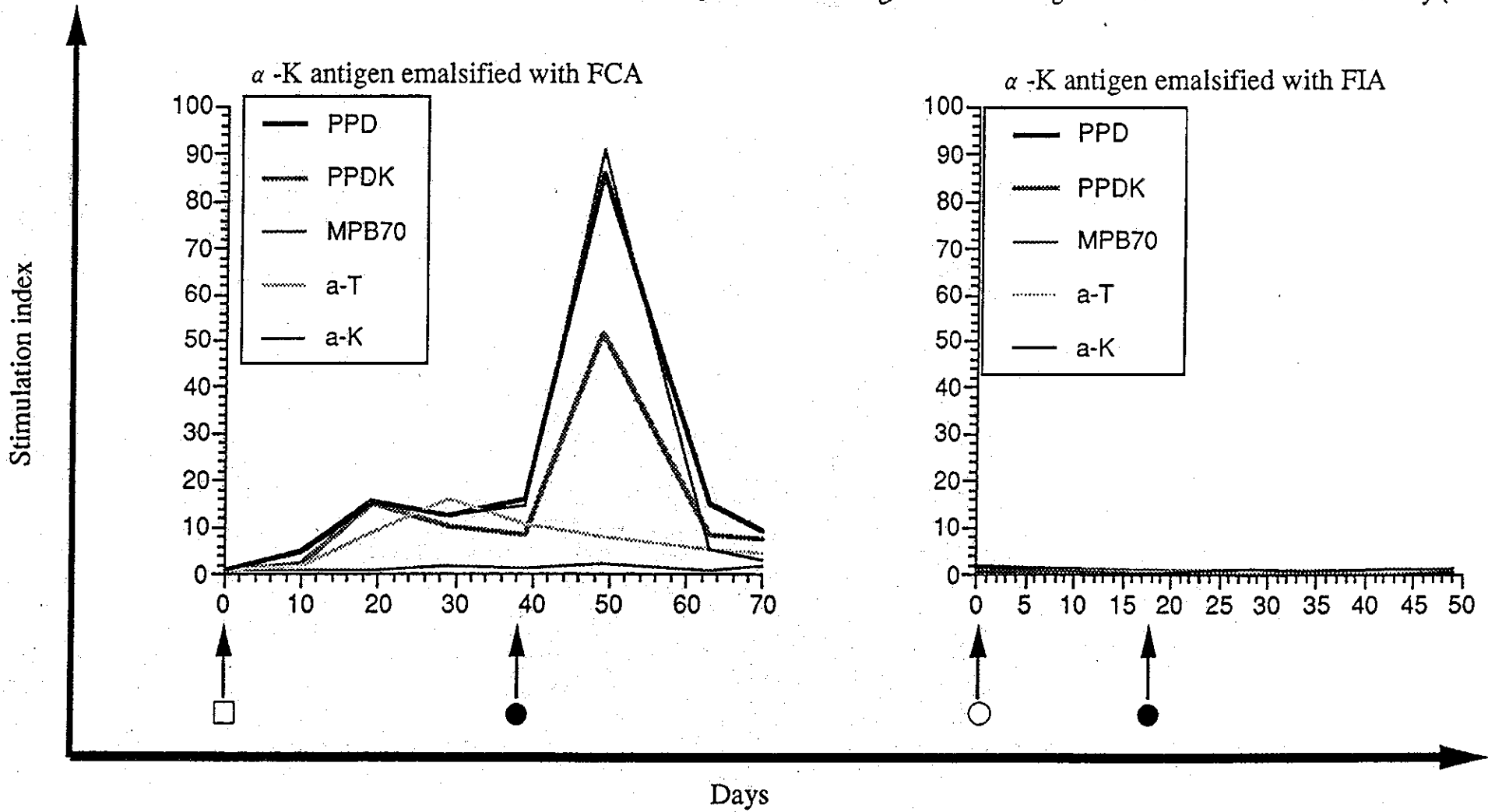


Fig.

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

結核の新ワクチン評価の為に肺結核症動物モデル開発及び、感染、発病、防御の
代理マーカーの検討

分担研究者 芳賀伸治 国立感染症研究所 細菌部 主任研究官

研究要旨

モルモットを用いた結核感染実験は、ツベルクリン反応や、より特異的なMPT64による皮膚反応と感染局所との関係を詳しく観察出来る。そこで、経気道感染実験動物にモルモットを用いることを企てた。米国Glas-Col社のエアロゾル噴霧感染装置を導入し、実験の安全性テストを繰り返した結果、決められた手順を遵守して実験する限りに於いては、安全性には問題の無いことがはっきりした。又この他結核症の研究に猿を用いることは有用と考えられた。将来の有望なワクチン候補開発とその評価に向けてこれらの動物実験から得られた成績を利用することは極めて有用と考えられる。

A. 研究目的

結核のニューワクチンの開発、特に成人の肺結核症発病の防御を目的とした方策が強く望まれている。現在実験動物としてマウスを用いた結核症に対するDNAワクチン等の開発の報告が多くなされている。われわれは、マウスよりも人に近い反応を示すモルモットを実験動物に用いたワクチン効果の評価法の開発を進めている。モルモットを用いる事で皮膚DTH反応、とりわけツベルクリン反応やより特異的なMPT64による皮膚反応と感染局所との関係を詳しく観察出来る。又動物が比較的大きいので、感染動物の剖検所見のデータが多くとれる等の利点がある。モルモットを用いた経気道感染は、わが国では少なく、外国では米国では1～2施設程度の報告がある。又、将来の有望なワクチン候補開発とその評価に向けて、猿の成績を人へ対応させることが可能か否かも含めた実験を進めている。

B. 研究方法

米国Glas-Col社のエアロゾル噴霧感染装置を導入し、実験の安全性（実験従事者への感染の可能性及び環境への暴露）のテストを繰り返している。モルモットへ

M.smegmatis F21株を感染後、毛の部分を持って小川培地に塗布した。噴霧菌量はF21株を0.05%Tween80水中に6000万CFU/mlが含まれる菌液2ml全部を30分間かけてエアロゾル化し噴霧した。装置内別々の部分10数カ所についても菌の残存を同様に検討した。

モルモットに結核菌H37Rvを5500CFU静注感染、又は18万CFUを皮下感染し経時的に結核菌分泌蛋白MPT64による皮膚DTH反応やこの蛋白に対する血中抗体価と脾臓内の結核菌還元培養の成績とを比較した。

モルモットにBCG 0.5mgを皮下免疫し経時的にBCG分泌蛋白MPB64による皮膚DTH反応やこの蛋白に対する血中抗体価と脾臓内のBCG還元培養の成績とを比較した。

カニクイザルにBCG 0.05mg（人への接種と同じ量）を免疫しPPDによる皮膚反応を経時的に観察後、反応局所を一部摘出し病理学的観察をおこなった。なお実験群は現在BCG接種後2年目を経過している。

C. 研究結果

エアロゾル感染の安全性を検討した結果、毛の部分についてはいずれも菌の検出は認められなかった。特にモルモットの腹

部は紫外線(噴霧感染後に動物と共に装置内
が照射される)が直接照射されないにもか
かわらず菌の検出はできなかつた。同様
に、エアロゾルが直接あたり紫外線照射
のない底部の板の裏側からも菌が検出
出来なかつた。チャンバー内の他の部
分からも菌の検出が認められなかつた
が、一カ所ガラスネブライザーとチャン
バーへつながるパイプの繋ぎの部分に
大量の菌が検出された。これは噴霧終
了後滅菌の為にネブライザーを取り去
ると同時に別の空のネブライザーを装
着し空運転することで対処した。なお
、この時モルモットの肺内のF21株の
還元培養では肺あたり3000CFUが分
離された。エアロゾルはいわゆる加湿
器で細かい水滴を発生させるものと異
なりガス状の気体のようなもので、噴
霧中でもチャンバー内はほとんど曇ら
ない。このようなエアロゾルの性質か
ら動物の毛やチャンバー内に多量の菌
が残らず肺内に吸い込まれた以外の菌
はすべて装置内のHEPAフィルターに
補足されてしまうか、UV照射で生成す
るオゾンで殺菌されてしまうのであ
ろう。(3.抄録参照)

MPT64やMPB64抗原の皮膚DTH反応や
抗体価測定値と菌の分離培養の成績が
よく平行した。

カニクイザルのツベルクリン反応は通
常は上眼瞼で行うが、モルモットと同
様に横腹の部分でも可能であった。こ
の方法により部位を変えての皮膚反応
の観察が可能となり、又反応部位局所
の摘出による病理学的観察が可能とな
った。BCG接種2年後でもツベルクリ
ン反応が観察され、その局所の免疫組
織検査では、マクロファージの高度の
集積及びT細胞、CD8陽性細胞の集積
が観察された。CD4陽性細胞は少数が
観察された。この他にNK細胞やケモ
カインレセプター(CCR-2, CCR-5, CXCR4)
の発現した細胞も多く集積していた。
なお単クローン抗体はT細胞に対する
ものを除き人と猿と交差するものを
をFACSにて検索し用いた。

D. 考察

モルモットを用いたエアロゾル噴霧感

染及び肺からの菌の還元培養成績と
MPB64やMPT64抗原による皮膚反
応や抗体価測定とを組み合わせること
により肺結核に対するワクチン効果
の有無を知ることが可能と考えられ
る。

E. 結論

感染研のバイオハザード対策が施さ
れたP3動物実験室で、決められた手
順を遵守して実験する限りに於いて
は、エアロゾル噴霧感染の安全性に
は問題の無いことがはっきりした。
感染研P3施設は「国立感染症研
究所病原体等安全管理規程」にもと
づき運営されており、事故時の対応
マニュアル等細かく規定されている。
動物実験を行う場合は合わせて「国
立感染症研究所実験動物管理運営
規程」に基づき実験を進めている。

モルモットを用いたエアロゾル噴霧
感染は肺結核の研究やワクチン効果
判定の研究に有用である。

結核症の研究に猿を用いることは
有用と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文

1. R. M. Nakamura, M. A. Velmonte, K. Kawajiri, C. F. Ang, R. A. Frias, M. T. Mendoza, J. C. Montoya, I. Honda, S. Haga, I. Toida. MPB64 mycobacterial antigen: a new skin-test reagent through patch method for rapid diagnosis of active tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 78, 541-546, 1998.

2. 学会

1. S Yamamoto, E Shigeto, T Yamamoto, S Haga, N Tasaka. Cellular immune responses to MPB64 antigen of tuberculosis patients and of mice immunized with BCG. 29th World Conference of IUATLD/UICTMR. Global Congress on Lung Health. Bangkok, Thailand 23-26 November 1998.

2. 芳賀伸治、網 康至、須崎百合子、本多三男
カニクイザルの結核実験動物としての有用性の検討、
第68回実験結核研究会総会、1998年3月、新潟。

3. 芳賀伸治、山崎利雄、倉 文明
肺結核症動物モデル開発のための安全なエアロゾル感
染の検討
第69回実験結核研究会総会、1999年4月、宇都宮。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

結核菌群からの*Mycobacterium bovis* BCGの鑑別同定法の確立に関する研究

分担研究者 山崎利雄 国立感染症研究所 ハンセン病研究センター
病原微生物部 主任研究官

研究要旨

結核菌群に特異的遺伝子の検索、プライマーの設計、遺伝子増幅、増幅産物の証明、プライマーの特異性について検討し、*M. tuberculosis*と*M. bovis*の鑑別が可能な方法を確認した。また、*M. africanum*は*M. tuberculosis*と同義語とすべきであることがわかった。

A. 研究目的

現行の抗酸菌鑑別同定キットでは、結核菌群(*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*)の菌種を同定することは難しい。そのため、BCG接種後に分離された抗酸菌の同定依頼が来る。それは、国立感染症研究所が、BCGワクチンの国家検定業務を持っているため、結核菌かBCGであるかを明確にする責任があるからである。ところが、結核菌群よりBCGを明確に鑑別同定する方法は無い。また、現行法では、*M. bovis*と同定するにもおよそ2ヶ月間を要する。迅速なBCGの鑑別同定により、患者の治療方針や、行政の予防対策方針を早期に決定することができる。さらに、*M. tuberculosis*とBCGの2種類の菌を用いた動物の感染実験をした時、還元培養菌が、*M. tuberculosis*かBCGであるかを明確に鑑別同定することは不可欠である。そのため、分子遺伝学的手法を用いて正確で、迅速な*M. bovis* BCGの鑑別同定法を確認する。

B. 研究方法

結核菌群に特異的遺伝子の検索を行い、*pab*、*mtp40*、*MPB64*、*pncA*といった遺伝子を選択した。著者報告プライマーを合成し、結核菌群の各参照株DNAを用いてPCRを行い追試をした。ダイレクトシーケンス法によりPCR増幅DNAの塩基配列を調べ、より適切なプライマーを設計し合成した。これらのプライマーを用いて、結核菌群の臨床分離株について鑑別同定可能かを調べた。

C. 研究結果

結核菌の*pab* 遺伝子をコードするプライマーMT-1, MT-2を用いたPCRでは、*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*の4菌種全て419bpのDNAが増幅された。*mtp40*遺伝子をコードするプライマーPT-1, PT-2を用いたPCRでは、*M. tuberculosis*は、319bpのDNAが増幅される。しかし、*M. tuberculosis* 46株中37株は増幅されたが、9株は増幅されなかった。*M. africanum* 5株は、全て増幅され396bpのバンドが確認された。また、*M. bovis* 14株と*M. microti* 1株は、全て増幅されなかった。*MPB64* 遺伝子をコードするプライマー

T-2, T-6 を用いた PCR では、*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* の4菌種全て241bpのDNAが増幅された。しかし、BCGの4株 (Copenhagen, Glaxo, Pasteur, Tice) のDNAは増幅されなかった。これらの4株は、サザンブロット法によりMPB64 遺伝子が欠損していることがわかった。

pncA 遺伝子をコードするプライマー *pncA*-7, *pncA*-8 を用いた PCR では、結核菌群の4菌種全て561bpのDNAが増幅された。しかし、ダイレクトシーケンス法により *pncA* 遺伝子内の169番目が、*M. tuberculosis* は Cytosine、*M. bovis* は Guanine になっていることを確認し、この違いを利用し、プライマー *pncA*-10 と *pncA*-11 を設計した。*pncA*-7, *pncA*-10 は、*M. tuberculosis* 検出用に、*pncA*-7, *pncA*-11 は、*M. bovis* 検出用に用いることが可能であることを確認した。

D. 考察

mp 40 遺伝子をコードするプライマー PT-1, PT-2 を用いた場合、396bp の PCR 増幅バンドが検出されると *M. tuberculosis* と言える。*M. africanum* はかつてアフリカの結核患者から分離された菌種で、生化学的方法では *M. tuberculosis* と *M. bovis* の中間であったために *M. africanum* という菌種名がつけられた。今回の検討では *M. africanum* 5株は全て増幅されたことから、*M. africanum* は *M. tuberculosis* と同義語としても良いと考える。

抗酸菌より結核菌群を迅速に同定する方法は、既に臨床検査で用いられている。しかし、結核菌群より *M. bovis* を鑑別したという報告はあるが、BCG を明確に鑑別する方法は無い。そこで、BCG の鑑別

同定を最終目標に研究を開始したが、今年度は、*M. tuberculosis* と *M. bovis* の鑑別までしかできなかった。わが国では、牛に接する機会が無い人から分離された抗酸菌が、*M. bovis* のパターンをとれば、BCG と断定して差し支えないと思われる。しかし、酪農家や、酪農国では BCG を明確に鑑別することが望まれている。最近、Coleらにより、結核菌 H37Rv 株の全塩基配列が報告されたので、文献的に報告されている遺伝子の再検討をおこない、*M. bovis* BCG 特異的な塩基配列を検索する必要があるだろう。

E. 結論

MT-1, -2、PT-1, -2、MPB64-T2, -T6、*pncA*-7, -10、*pncA*-7, -11 の5組のプライマーを用いて *M. tuberculosis* と *M. bovis* の鑑別が可能になった。また、*M. africanum* は *M. tuberculosis* と同義語とすべきであることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表
投稿準備中

2. 学会発表

1) 山崎利雄、芳賀伸治、赤川清子、山本三郎、PCR法による結核菌群からBCGの鑑別同定法の検討、第135回日本結核病学会関東支部会、1999年5月、東京

厚生科学研究費補助金 (新興・再興感染症 研究事業)

分担研究報告書

結核菌感染と免疫賦活に関する研究

分担研究者 光山正雄 京都大学医学研究科 教授

研究要旨 結核菌と同様に細胞内寄生性を示すリステリアの病原因子である LLO につき、その生物活性と宿主免疫応答の賦活への応用につき研究した。LLO の毒性（膜傷害活性）と宿主サイトカイン誘導活性は分離が可能であり、マクロファージの刺激による IL-12, IL-18 が NK 細胞に作用して IFN- γ の産生を誘導すること、このような LLO のサイトカイン誘導能が感染防御免疫の賦活誘導に応用できることなどが示された。

A. 研究目的

結核の原因となる結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は、感染宿主のマクロファージに貪食されてもその細胞内殺菌をエスケープして生存増殖し、慢性肉芽腫性の病変を形成する。エスケープのメカニズムとしては、貪食されたマクロファージ内での食胞とリソソーム顆粒との融合を阻害することが第一義的と考えられるが、その関与する遺伝子や分子については全く解明されていない。一方、細胞内寄生菌による感染では、宿主に強い免疫応答が誘導され、細胞内寄生菌が宿主免疫応答を強く刺激することも事実である。そこで細胞内寄生性細菌の病原性およびエスケープ機構を分子生物学的に明らかにし、これらに対する感染宿主の免疫応答と両者の相互関係を解析することにより、宿主免疫賦活による感染症への新たなアプローチを確立することを本分担研究の目的とした。なお、今回は初年度であり、従来我々が研究してきた細胞内寄生菌であるリステ

リアについての研究を主体としつつ、同時に翌年度以降に結核菌についてのアプローチを開始する実験系の作成にとりかかることも目的とした。

B. 研究方法

リステリアのエスケープ因子であり同時に主要病原因子でもあるリステリオリシン O (LLO) の各種リコンビナント標品を作成した。LLO をコードする遺伝子 hly のリーダーシーケンスを外した遺伝子、さらに C 末端側のペプチドをコードする遺伝子を順次欠失させた遺伝子を PCR 法にて作成し、その際に N 末端側に 6 x His の tag を標識した。作成したフルサイズおよび欠失変異遺伝子は大腸菌に電気穿孔法で導入し、遺伝子発現により産生される LLO 蛋白を、His-tag を利用してニッケルカラムで精製した。

精製した各種リコンビナント標品の毒素活性（膜傷害活性）とマウス脾細胞に対するサイトカイン誘導活性をしらべ、それぞれの責任部位の特定を試みた。ま

た両活性のコレステロール処理に対する感受性を比較した。サイトカイン誘導活性については、誘導されるサイトカインを RT-PCR 法や ELISA による定量法によりしらべ、特に重要な IFN- γ の誘導過程を解析した。また、フルサイズの LLO をリポソームに封入してマウスに投与し、単独では感染防御免疫誘導能を示さない死菌や LLO(-)菌株、BCG 死菌との併用による感染防御免疫誘導への応用を試みた。

C. 研究結果

i)上記の方法により、各種のリコンビナント標品を作成することが可能となった。

ii)フルサイズのリコンビナント LLO には、赤血球溶解（溶血）活性で検出可能な細胞膜傷害活性と、マウス脾細胞に対する強いサイトカイン誘導活性がみられた。前者はコレステロールによる前処理で完全に阻害されたが、サイトカイン誘導活性はコレステロール処理でも阻害されなかった。

iii) C 末端から順次一定サイズのペプチドを欠失させた変異 LLO では、C 末端約 40 アミノ酸の欠失で細胞膜傷害活性がみられなくなり、とくに ECTGLAWEWWR のウンデカペプチドの存在が必須と考えられた。一方サイトカイン誘導能はこれを欠失させても消失しなかった。さらに N 末端よりのアミノ酸を約 150 欠損させると、サイトカイン誘導能も消失した。サイトカイン誘導能は変異 LLO においてもコレステロール処理に抵抗性であった。

iv)LLO により各種の炎症性サイトカイン産生が誘導されるが、まずマクロファージを刺激して proinflammatory cytokine を産生させ、さらにこれらの作用により NK 細胞が活性化されて IFN- γ 産生が誘導されることが、in vitro での脾細胞刺激実験で示された。マクロファージ由来のサイトカインのうち、とくに IL-12 と IL-18 が NK 細胞刺激に主要な作用をしていることが、抗サイトカイン抗体による中和実験で明らかとなった。

v)リコンビナント LLO は単独では毒性を発揮するため、リポソームに封入してマウスへの投与が可能であった。単独では感染防御免疫の誘導 (TH1)がみられない、リステリアの死菌、LLO(-)株および *M.bovis* BCG の死菌による免疫と併用することにより、それぞれ抗原特異的な TH1 細胞の分化誘導がおり、攻撃感染に対する防御免疫を成立させることができた。

D. 考察

今回の実験で、細胞内寄生菌のひとつリステリアのエスケープ因子である LLO には、毒素蛋白としての膜傷害活性と、宿主免疫応答の誘導つまり抗原特異的 TH1 細胞の分化誘導を促す IFN- γ の産生誘発活性の、2つの活性があることが示された。さらに興味あることには、これらの活性は単一ポリペプチドに担われているにも関わらず、解離させることが可能であり、それぞれの責任部位が異なるらしいことが示された。マウスへの投与実験によって、単独では防御免疫誘導