

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

抗結核キラーTリンパ球とリコンビナント BCG - DNA - ワクチンの
開発による新しい予防・診断・治療法

主任研究者 岡田全司 国立療養所近畿中央病院 臨床研究部部長

研究要旨

[I] 新しい結核ワクチンの開発；

- (1) γ -IFN gene をアデノウィルスベクターに組み込み、これを結核感染マウス (i.v 投与にて H37RV ヒト型結核菌を感染) に i.p 投与すると 10 週後の肺、脾、肝の結核菌数の減少を認めた。すなわち、 γ IFN DNA ワクチンは有効であることを明らかにした。
- (2) IL-6 related gene (IL-6 gene + IL-6 レセプター gene + gp130gene) をアデノウィルスベクターに組み込み治療すると、結核感染マウスの肺、脾、肝の結核菌数の減少を認め、有効なワクチンであることを明らかにした。
- (3) リコンビナント BCG ワクチン：Antigen 85A gene, 85B gene, 85C gene, MPB51 gene を単独および組み合わせて BCG 東京株に導入し、種々のリコンビナント BCG を作成した。これらを結核感染マウスに投与し、抗結核ワクチン効果を検討した結果、85B gene リコンビナント BCG はコントロールの BCG 東京に比し有意な肺結核菌数の減少を認め有効なワクチンであることが示された。
- (4) plasmid DNA ワクチン：IL-12 gene, CD40L gene, Hsp65 gene をそれぞれ plasmid に導入することに成功し、現在結核感染マウスに注射し、ワクチン効果を解析中である。
- (5) サブユニット・ワクチンとして Mtb9.9A, 9.9B, 9.9C, 9.9D, 9.9E (Corixa 研究所 Steven Gillis Dr が gene cloning) を用い共同研究でその効果を解析中である。この gene cloning の方法は極めて短時間で結核菌の多種の gene を解析しうる、画期的なアッセイ法を開発した。リコンビナント IL-18 は結核感染マウス (IL-18 ノックアウトマウス) の肉芽腫形成の改善を示し有効であった。TDM は強力なアジュバント作用を示し、他のサブユニット・ワクチンと併用することによる新しいワクチン開発の方向性が示された。

[II] 新しい診断法：

ツベルクリン反応に代わる結核感染特異的診断法の開発に成功した。ツ反に用いられる PPD は多種の蛋白を含む。Dr Gillis はこれらのアミノ酸配列を解読し、結核

感染患者のみに skin test 陽性で BCG 接種者には反応しない蛋白のアミノ酸配列と DNA をクローニングした。

[III] 新しい予後診断法（キラーT細胞活性）：

多剤耐性結核患者及び糖尿病合併難治性結核患者 PBL では結核菌感染マクロファージに対するキラーT活性の分化・誘導低下が認められた。この一因としてこれらの患者のヘルパーTリンパ球からのキラーT細胞分化因子（IL-2,IL-6, γ -IFN）産生の低下が明らかとなった。さらに多剤耐性結核患者 PBL の granulysin mRNA 発現の著明な低下と TRAIL mRNA の極めて著明な低下が認められた。又、抗 granulysin 抗体を用いた FACS 解析より granulysin 蛋白のリンパ球上の発現が低下していることを初めて明らかにした。一方、抗 TRAIL 抗体を結核感染マウスに投与すると結核感染で死亡する時期が著明に早期になる発見をした。これらのことより多剤耐性結核患者では結核菌に対するキラー蛋白として granulysin と TRAIL が極めて重要であることを明らかにしたとともに、逆にこれを測定することにより結核患者の予後診断法が確立されることを示した。

[IV] BCG 接種による大人（成人）に対する結核予防効果の解析：

国立大学病院・国立病院・療養所のボランティア 321 名を対象にツ反を行った。ツ反陰性者を二群に分け BCG 接種群と非接種群に分け 5 年～ 20 年の経過観察で結核感染の予後調査を開始した。一方、BCG 接種者では γ -IFN 産生能の亢進が認められた。

分担研究者	坂谷光則 国立療養所近畿中央病院 副院長	菅原 勇 財団法人結核予防会結核研究所 科長
	矢野郁也 日本 BCG 研究所 中央研究所所長	谷山忠義 国立感染症研究所 室長
	螺良英郎 財団法人結核予防会大阪病院 病院長	井上義一 国立療養所近畿中央病院 室長
	土肥善胤 大阪大学医学部 保健学科長	細江重人 国立療養所近畿中央病院 室長
	奥村 康 順天堂大学医学部 教授	森 隆 国立療養所近畿中央病院 病院長

A. 研究目的

38年ぶりに結核罹患率の増加、集団感染が頻発、AIDSや糖尿病患者等の免疫不全疾患に高頻度に合併、薬剤耐性結核が増え、いわゆる難治性結核の対策が早急に望まれていることにより、我々の新しい予防・診断・治療の研究が必須である。

すなわち、① BCGよりも強力な新しいリコンビナント BCG ワクチンや DNA ワクチンの開発を行い、新しい予防・治療の臨床研究を目的とする。②キラーT細胞の結核免疫に対する重要性が最近急に示唆されはじめたが、そのメカニズムや本当の重要性に関する研究は不明である。したがって、キラーT細胞活性と結核発病を分子・遺伝子レベルで解明するとともに、③これらを用いた結核予後診断・難治性診断を行う。④ BCG 接種が大人の結核予防に有効か検討（厚生省と厚生省近畿地方医務局の指導のもとに当院の坂谷副院長が班長）。⑤ RFLP や遺伝子解析により西日本（もちろん全国）の排菌患者の結核菌 DNA 解析による疫学に関する研究。

B. 研究方法

(1) リコンビナント BCG ワクチンの作製：結核菌の主な分泌蛋白であり、しかも強力なT細胞免疫増強活性を示す Antigen 85A,85B,85C および最近新たに同定された相同性の高い MPB51 抗原の遺伝子を結核菌で発現するプラスミドに構築し、BCG 東京株に導入した。プラスミドには大腸菌抗酸菌シャトルベクター PNN2 を開発して用いた、これらの4種類の抗原すべてを発現するリコンビナント BCG も作製した。Ag85 の各コンポーネントをコードする遺伝子 (fbpA,fbpB,fbpC) と MPB51 をコードする遺伝子 (mpb51) は BCG 菌のものを用いた。プロモーターは *Mycobacterium avium* の Ag85B 遺伝子、*Mycobacterium*

kansasii の Ag85 B 遺伝子、BCG の MPB51 遺伝子のもを用いた。その結果、BCG/pBAC51 では Ag85A,85B,85C,MPB51 の分泌量の顕著な増加、BCG/pBAC51 では Ag85A,85B,MPB51 の分泌量の顕著な増加を認めた(山田)。これらを結核感染マウスに 1×10^5 i. v 投与し、2週間後に結核菌 H37RV 5×10^5 個を尾静脈より静注した。結核菌投与4週間後の脾・肝・肺の結核菌数と脾の免疫応答を解析した。(岡田、山田)

(2) DNA ワクチンの作製：IL-12 の p35 および p40 を CMV promoter 下流域に挿入した発現プラスミドを作製した。すでに、結核菌静注感染モデルマウスに筋注した。さらに、Hsp65 DNA ワクチンの作製に成功した。Hsp65 DNA ワクチンは、結核感染マウスの治療にも有効 (post-infection ワクチン) であることが Lowrie らにより、最近報告された (Nature1999)。Lowrie らは癩菌由来の Hsp65 gene を用いているのに比し、我々はヒト型結核菌 H37RV 由来の Hsp65 gene を用いた。したがって、より強力な効果が期待できる。(現在 Hsp65 DNA ワクチン投与中) (岡田、吉田)。又、T細胞性免疫を誘導する重要な dendritic cell を活性化する pathway として必須な CD40L DNA ワクチンの作製にも成功した(奥村、岡田)。

一方、IL-6 gene + IL-6 レセプター gene + gp130 gene をアデノウイルスベクターに組み込み、結核菌気道感染マウスを治療した。

(菅原、岡田)。DNA ワクチンの投与は結核菌 5×10^5 i. v の 3~7 日前と 3~7 日後の二日行い、予防と治療効果を幅広くスクリーニングした。また、 γ -IFN gene をアデノウイルスベクターに組み込み投与した(サイトカイン gene のアデノウイルスベクターへの導入は東大医科研齋藤泉助教授、札幌医大教授濱田博士との共同研究によ

る。EIA,EIB,E3 欠損、非増殖性アデノウイルスベクターを用いた。)現在 GM-CSF gene (ハーバード大学 Richard Mulligan 教授との共同研究)も治療として投与し、効果を解析中である。(岡田)

(3) サブユニットワクチン：組み換え IL-18 治療を結核菌気道感染マウスで行った。(菅原、岡田)

一方、HIV 感染等の免疫不全者に対しても使用可能である非生菌サブユニットワクチン開発も世界的に望まれている。BCG 培養ろ液 (CF) を crude antigen として各種 adjuvant を組み合わせることにより、低毒性免疫原の調整法について検討した。特に adjuvant として用いた結核菌 cord factor については、結核菌以外の低毒性のものについても抗原性を検討し、ウサギ、マウス、ヒトの抗体との反応性を検討した (矢野 1999 論分参)。in vitro assay においては FIA (Freund Incomplete Adjuvant) + TDM がより強力な免疫強化能を示した。また、ヒト型結核菌ろ液より、ワクチン抗原として、有望視されている ESAT-6 蛋白の精製を開始した。

一方、Gillis Dr と Reed Dr は全く新しい、強力な結核免疫を誘導する Mtb9.9A, 9.9B, 9.9C, 9.9D, 9.9E, Mtb8.4, MTB32A, MTB32B, Mtb39 蛋白抗原の遺伝子クローニングに成功し、蛋白抗原を単離した。しかも、これらの数種の蛋白の Fusion 蛋白は相乗的な抗結核予防効果を示した。これを用いても新しい予防法、治療法を開発する共同研究がスタートした。Gillis 博士 Read 博士らはこれらの結核免疫を誘導する結核蛋白抗原の迅速遺伝子クローニングの極めて画期的な方法を開発した (J.ExpMed2000)。すなわち H37RV 結核菌 DNA を約 3Kb に断片化し、これを順番に片端から大腸菌に導入し発現させる。これを異なる 96 マイクロウエルに入れた

dendritic cell に phagocyte させ、さらに PPD 陽性者末梢血リンパ球を加え 3 日間培養し、 γ -IFN 産生及び T 細胞増殖反応を検討し、T 細胞機能を増強する結核菌由来蛋白遺伝子をスクリーニングした。このアッセイ系の確立により極めて多数の結核免疫増殖蛋白の遺伝子クローニングが短時間に行えることとなった。

(4) 難治性結核患者及び、薬剤耐性結核患者、末梢血キラー T リンパ球機能の解析：多剤耐性結核患者 PBL および、糖尿病合併難治性結核患者 PBL を PPD 刺激やマイトゲン刺激した場合、結核菌感染マクロファージに対するキラー T 活性の誘導を測定した。granulysin 蛋白の 9Kd 蛋白 (活性が最も強い) の部分の primer を作製し、又 TRAIL mRNA に対する primer は奥村らが開発したものをを用いた。

RT-PCR 法を用い granulysin mRNA, TRAIL mRNA の著明な低下を示した。さらに、perforin, granzymeB, FasL mRNA を測定した。

結核感染 M ϕ 及びその貪食された結核菌の殺傷に TRAIL pathway と granulysin が重要であるか、解析した。

さらに、結核菌感染細胞の排除における、キラー細胞のエフェクター機構について解析することを目的として、次の実験を行いつつある。顆粒内因子、granulysin (グラニュライシン) に対する抗体を作成するため、granulysin 成熟体のアミノ酸配列を含むペプチドを合成し現在ウサギに免疫して抗 granulysin 抗体を作製中であり、この抗 granulysin 抗体を用いて、リンパ球及び血清中の granulysin 測定による、新しい結核予後診断法を開発する計画である。なお BML 研究所永田 Dr の作製した抗 granulysin 抗体を用いて多剤耐性結核患者 PBL を解析した。抗 granulysin 抗体を用いた FACS 解析を行った。一方、抗 TRAIL

抗体を結核感染マウスに投与し多剤耐性結核感染発生モデルを作製する試みを行った。他の免疫能として、Th1 活性、Mφ活性、種々のサイトカイン産生能を、PPD 又は結核死菌で、刺激し、キラーT活性と同様に解析した。

γ-IFN は ELISA アッセイで測定、IL-6 と IL-2 は ELISA と IL-6 dependent cell 及び IL-2 dependent cell で測定した。キラーT活性は in vitro で PBL を PPD 又は結核死菌で刺激し、5 日後の effector 細胞を用い PPD パルス標的細胞のキラー活性を測定した。

すなわち、Th1 細胞機能低下のみでなく、キラーT細胞分化因子活性低下 (IL-6, IL-2, γ-IFN は最も重要なキラーT細胞分化因子) によるキラーT細胞誘導を解析した。

(5) ツベルクリン反応に代わる結核感染特異的診断法の開発：米国 Corixa 研究所 S.Gillis Dr, S.Reed Dr と共同研究を行い、極めて結核感染に特異性の高い、ツ反に代わる新しい診断法の進展が認められた。ツ反に用いられる PPD は多種の蛋白を含む。Dr Gillis らはこれらの全ての蛋白のアミノ酸配列を解説し、結核感染患者のみに skin test 陽性で、BCG 接種者には反応しない蛋白のアミノ酸配列と DNA をクローニングすることに成功した。これは画期的な診断法となることが予測される。本年度はこれをさらに推進する。(S.Gillis, S.Reed, 岡田、坂谷)。γ-IFN 迅速アッセイ法としては、ヒト末梢血の全血 1 ml を 24 穴プレートにまきヒト型結核菌 PPD で刺激し 16 時間後の培養上清中の γ-IFN を ELISA で測定した。

又、成人 BCG 接種により、γ-IFN 産生増強等の免疫能増強と γ-IFN 迅速アッセイ法を確立した。

(6) Transgenic マウス、遺伝子ノックアウトマウスを用いた結核感染モデルの開発

：IL-18gene 欠損マウス【大阪大 審良教授作製】に結核菌を気道感染させ、抗結核効果を解析した。(菅原)すでに我々は γ-IFN transgenic (Tg) マウス、IL-6Tg マウス、IL-7Tg マウス、IL-18gene ノックアウト (-/-) マウス、IL-6 (-/-)、IL-12 (-/-) マウス、パーフォリン (-/-) マウス、FasL (-/-) マウスを飼育しており、gene の発現量が顕著なこれらのモデルマウスを用いることによりいかなる gene が結核治療に有効か解明できる。

さらに、最近審良教授はヒト型結核菌がマクロファージを刺激するレセプターの発見 (Toll レセプター 2、と Toll レセプター 4) をし、TollR-2 と TollR-4 ノックアウトマウスを作製した。さらにこれらのレセプターからのシグナル伝達物質 MyD88 の gene のノックアウトマウスも作製することに成功した。現在これらの極めて興味深いマウスでの抗結核免疫と易感染性を検討中である。(岡田、審良、菅原、熊沢)

(7) BCG 接種が大人の結核予防に有効か否かの解析：大阪大学病院、国立南和歌山病院、国立療養所近畿中央病院など近畿地区の 11 国立施設において新採用若年看護婦 132 名と付属看護学校新入生 189 名にツ反を行った。第 1 回目ツ反陰性率は前者で 17.4 %、後者 24.3 %。第 2 回目はそれぞれ 8.3 % と 8.5 % とほぼ同率となった。この陰性者 21 名を無作為に二分し 13 名に BCG 接種を行った。ツ反前に末梢血を採血し、迅速 γ-IFN 測定法で産生を ELISA で検討した。

(倫理面への配慮)

1. 当病院の倫理委員会は歴史が古くかつ厳格なことで定評がある。すなわち院外者 2 名関西学院大学総長、近畿大学法学部教授を含む各方面の医療従事者 (事務系の人も含む) により構成されており、毎月最低一回は長時間にわたり議論されている。

2. リコンビナント BCG ワクチンや DNA ワクチン治療を行うにあたり、末梢血リンパ球、組織の臨床研究等、研究対象者に対する人権擁護上の配慮を行う文書を作製している。もちろん研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と理解（インフォームドコンセント）に対する文面も記載されている。

3. 実験動物に対しても動物愛護上の配慮が十分なされている。

C. 研究結果

(1) リコンビナント BCG ワクチンの作製：結核菌の主な分泌蛋白であり、しかも強力な T 細胞免疫増強活性を示す Antigen 85A,85B,85C および最近新たに同定された相同性の高い MPB51 抗原の遺伝子を結核菌で発現するプラスミドに構築し、BCG 東京株に導入した。また、これらの 4 種類の抗原すべてを発現するリコンビナート BCG も作製した。その結果、BCG/pBAC51 では Ag85A,85B,85C,MPB51 の分泌量の顕著な増加を、BCG/pBAC51 では Ag85A,85B,MPB51 の分泌量の顕著な増加を認めた（山田）。これらを結核感染マウスに投与したところ preliminary であるが、リコンビナント 85B BCG、抗結核ワクチン効果が示唆された。（岡田、山田）

(2) DNA ワクチンの作製：IL-12 の p35 および p40 を CMV promotor 下流域に挿入した発現プラスミドを作製した。すでに、結核菌静注感染モデルマウスに筋注射し、結核菌数（肺、肝、脾）の減少効果が示唆された。さらに、Hsp65 DNA ワクチンの作製に成功した。Hsp65 DNA ワクチンは、結核感染マウスの治療にも有効 (post-infection ワクチン) であることが Lowrie らにより、最近報告された (Nature1999)。Lowrie らは癩菌由来の Hsp65 gene を用いているのに比し、我々はヒト型結核菌 H37RV 由来

の Hsp65 gene を用いた。したがって、より強力な効果が期待できる。（現在 Hsp65 DNA ワクチン投与中）（岡田、吉田）。又、T 細胞性免疫を誘導する重要な dendritic cell を活性化する pathway として必須な CD40L DNA ワクチンの作製にも成功した。

一方、IL-6 gene + IL-6 レセプター gene + gp130 gene をアデノウイルスベクターに組み込み治療すると結核菌気道感染マウスの肺病変軽減が認められた。（菅原、岡田）。さらに結核菌静注感染マウスにおいて肺、脾、肝における結核菌数の減少が認められた。（岡田）。また、 γ -IFN gene をアデノウイルスベクターに組み込み投与した群では PPD や結核菌抗原に対する T 細胞免疫応答の増強が認められた。 γ -IFN gene 投与 10 週後肺・肝・脾における結核菌数の著明な減少（約 1/50）を認め有効なワクチンであることが示された。現在 GM-CSF gene も治療として投与し、効果を解析中である。（岡田）

(3) サブユニットワクチン：組み換え IL-18 治療は結核内肉芽腫病変の有意な減少と肺組織の結核菌数を減少させ、IL-18 は免疫治療として有望であることが示された。一方、HIV 感染等の免疫不全者に対しても使用可能である非生菌サブユニットワクチン開発も世界的に望まれている。BCG 培養ろ液 (CF) を crude antigen として各種 adjuvant を組み合わせることにより、低毒性免疫原の調整法について検討した。特に adjuvant として用いた結核菌 cord factor については、結核菌以外の低毒性のものについても抗原性を検討し、ウサギ、マウス、ヒトの抗体との反応性を検討した（矢野 1999 論分参）。in vitro assay においては FIA (Freund Incomplete Adjuvant) + TDM がより強力な免疫強化能を示した。また、ヒト型結核菌ろ液より、ワクチン抗原として、

有望視されている ESAT-6 蛋白の精製を開始した。

一方、Gillis Dr と Reed Dr は全く新しい、強力な結核免疫を誘導する Mtb9.9A, 9.9B, 9.9C, 9.9D, 9.9E, Mtb8.4, MTB32A, MTB32B, Mtb39 蛋白抗原の遺伝子クローニングに成功し、蛋白抗原を単離した。しかも、これらの数種の蛋白の Fusion 蛋白は相乗的な抗結核予防効果を示した。これを用いても新しい予防法、治療法を開発する共同研究がスタートした。即ち短時間に多くの結核菌蛋白遺伝子をスクリーニングしうる画期的な方法を開発した。

(4) 難治性結核患者及び、薬剤耐性結核患者、末梢血キラーTリンパ球機能の解析：多剤耐性結核患者 PBL および、糖尿病合併難治性結核患者 PBL を PPD 刺激やマイトゲン刺激した場合、結核菌感染マクロファージに対するキラーT活性の誘導は極めて低いことを明らかにした。また、RT-PCR 法を用い granulysin mRNA, TRAIL mRNA の著明な低下を示した。さらに、perforin, granzymeB, FasL mRNA を測定した。

結核感染Mφ及びその貪食された結核菌の殺傷に TRAIL pathway と granulysin が重要である極めて興味深い結果が示された。

さらに、結核菌感染細胞の排除における、キラー細胞のエフェクター機構について解析することを目的として、次の実験を行いつつある。顆粒内因子、granulysin (グラニュライシン) に対する抗体を作成するため、granulysin 成熟体のアミノ酸配列を含むペプチドを合成し現在ウサギに免疫して抗 granulysin 抗体を作製中であり、この抗 granulysin 抗体を用いて、リンパ球及び血清中の granulysin 測定による、新しい結核予後診断法を開発する計画である。なお BML 研究所 永田 Dr の作製した抗 granulysin 抗体を用いて多剤耐性結核患者

PBL を解析した。抗 granulysin 抗体を用いた FACS 解析を行った。その結果、多剤耐性結核患者 PBL の非刺激状態及び PHA 刺激状態とも健常人に比し著明に granulysin 蛋白の実現低下が認められた。一方、抗 TRAIL 抗体を結核感染マウスに投与し多剤耐性結核感染発生モデルを作製する試みを行った。すでに抗 TRAIL 抗体を投与した。その結果、抗 TRAIL 抗体 i.p 投与マウスでは結核感染 (i.v) マウスで極めて早期に結核病炎で死亡した。すなわち TRAIL pathway が抗結核免疫に重要であることを初めて明らかにした。(奥村、岡田、土肥)。NK 細胞とT細胞は主として FasL およびパーフォリンを介した経路により標的細胞を破壊することが知られているが、奥村らはこれらの経路に依存しない標的細胞傷害機構の存在を明らかにした。すなわち TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-TRAIL レセプター pathway を明らかにした。さらに、TRAIL が IL-2 や IL-15 によって発現誘導されることを明らかにした。菅原らはすでに perforin ノックアウトマウスを用いて抗 TRAIL 抗体、抗 FasL 抗体を i-p し、結核気道感染マウスで現在観察中である。他の免疫能として、Th1 活性、Mφ活性、種々のサイトカイン産生能を、PPD 又は結核死菌で、刺激し、キラーT活性と同様に解析した。多剤耐性結核患者および糖尿病合併難治性患者では PBL からの極めて著明な γ IFN 産生低下、IL-2 産生低下、IL-6 産生低下が認められた。すなわち、Th1 細胞機能低下のみでなく、キラーT細胞分化因子活性低下 (IL-6, IL-2, γ -IFN は最も重要なキラーT細胞分化因子) によるキラーT細胞誘導低下が示唆された。

(5) ツベルクリン反応に代わる結核感染特異的診断法の開発：米国 Corixa 研究所 S.Gillis Dr, S.Reed Dr と共同研究を行い、

極めて結核感染に特異性の高い、ツ反に代わる新しい診断法の進展が認められた。ツ反に用いられる PPD は多種の蛋白を含む。Dr Gillis らはこれらの全ての蛋白のアミノ酸配列を解読し、結核感染患者のみに skin test 陽性で BCG 接種者には反応しない蛋白のアミノ酸配列と DNA をクローニングすることに成功した。これは画期的な診断法となることが予測される。来年度はこれをさらに推進する。(S.Gillis, S.Reed、岡田、坂谷) 又、成人 BCG 接種により、 γ -IFN 産生増強等の免疫能増強と γ -IFN 迅速アッセイ法を確立した。本年度はさらにより多くの成人対象者で BCG 接種効果を解析する。

(6) Transgenic マウス、遺伝子ノックアウトマウスを用いた結核感染モデルの開発：IL-18gene 欠損マウス【大阪大 審良教授作製】に結核菌を気道感染させる正常マウスより肉芽腫病変の増加が認められた【菅原】。すでに我々は γ -IFN transgenic (Tg) マウス、IL-6Tg マウス、IL-7Tg マウス、IL-18gene ノックアウト (-/-) マウス、IL-6(-/-)、IL-12(-/-) マウス、パーフォリン(-/-) マウス、FasL(-/-) マウスを飼育しており、gene の発現量が顕著なこれらのモデルマウスを用いることによりいかなる gene が結核治療に有効か解明できる。

さらに、最近審良教授はヒト型結核菌がマクロファージを刺激するレセプターの発見 (Toll レセプター 2、と Toll レセプター 4) をし、TollR-2 と TollR-4 ノックアウトマウスを作製した。さらにこれらのレセプターからのシグナル伝達物質 MyD88 の gene のノックアウトマウスも作製することに成功した。現在これらの極めて興味深いマウスでの抗結核免疫と易感染性を検討中である。(岡田、審良、菅原、熊沢)

(7) 抗結核免疫と毒力：IL-18 が IL-12

と共同で Th1 型ヘルパー細胞の分化と活性化に重要な働きを持ち、かつ Th1 ヘルパー T 細胞からの IFN γ 産生に必須の因子であることを明らかにした。また IL-18 は NK 細胞にも強く作用し、NK 細胞表面の Fas リガンドの発見を上昇させることやパーフォリン分子分泌を亢進させることを明らかにした。

また、IL-18 はマラリア原虫特異的なキラー T 細胞を誘導し抗マラリア免疫に重要であることを示した (柏村)。さらに自治医大の吉田 Dr. と IL-12DNA ワクチンはマラリア感染防御に有効でキラー T によりその効果が発揮させることを示し、この IL-12DNA を結核感染マウスに筋注し結核菌数の減少効果を解析中である。(岡田、吉田、柏村)。

一方、M ϕ から産生される殺菌物質、過酸化水素は結核菌が過酸化水素分解酵素を産生することにより、抵抗性であり、結核菌の食細胞内殺菌には、より強力な殺菌物質であるペルオキシ・ナイトライン (スーパーオキシドとナイトリック・オキシドから生成される活性窒素) が重要であると考えられ、これを測定した。活性窒素の産生には補体レセプターが必要で、結核菌を食菌させ産生する系を確立した (土肥)。さらにマクロファージ内で発現する結核菌プロモーター領域のクローニングとそのプロモーター領域に支配される遺伝子の機能についてその遺伝子を潰した結核菌の作製を開始した。結核菌の病原性に関与していると予想させる遺伝子 (2 個) の遺伝子欠失用ベクターの構築をした。

(8) BCG 接種が大人の結核予防に有効か否かの解析：大阪大学病院、国立南和歌山病院、国立療養所近畿中央病院など近畿地区の 11 国立施設において新採用若年看護婦 132 名と付属看護学校新入生 189 名にツ反を行った。第 1 回目ツ反陰性率は前者

で 17.4 %、後者 24.3 %。第 2 回目はそれぞれ 8.3 %と 8.5 %とほぼ同率となった。この陰性者 21 名を無作為に二分し 13 名に BCG 接種を行った。ツ反前に末梢血を採血し、迅速 γ -IFN 測定法で産生を ELISA で検討した。その結果ツ反と γ -IFN 濃度は相関した。さらに BCG 接種後 3 ヶ月の PBL の γ -IFN 産生は増強傾向を示したことにより BCG は少なくとも大人健常人に対し免疫増強能を有することが示唆された。BCG 接種による結核発症抑制効果判定のためには長期間の観察と母集団の増大を計画している。

D. 考察

① BCG よりも強力な新しいリコンビナント BCG ワクチンとして、Antugem 85B リコンビナント BCG がコントロール BCG 東京株よりも強力な抗結核効果（結核感染マウス）が得られた。したがって 85B リコンビナント BCG を中心に種々のリコンビナント BCG（85A,85C,MPB51 等）やサイトカイン gene 導入（ γ -IFN,IL-6,IL-12, IL-18）リコンビナント BCG を新たに作製し 85B リコンビナント BCG と組み合わせて、より強力なワクチン開発を行う計画である。

一方サブユニットワクチンは臨床応用が迅速にすすめられる可能性があり（DNA ワクチンや、リコンビナント BCG ワクチンは遺伝子治療の一つなので病院、大学、厚生省等の承認を頂くまでに時間がかかる可能性もある）、Dr.Gillis が発見し、臨床治験がすすめられている Mtb9.9A family 蛋白の臨床治験を本邦でも積極的に進展させる計画がスタートした。

DNA ワクチンは有効と考えられている Hsp 65 gene DNA も作製し、IL-12DNA, IL-18DNA 等を組み合わせて最も強力なワクチン開発動物実験が進行中である。これら

とリコンビナント BCG やサブユニットワクチンの組み合わせも重要となるであろう。

②一方、ツ反に代わる画期的な新しい診断法（結核感染特異的）の本邦での普及を目指したい。

③さらに、多剤耐性結核患者や糖尿病合併難治性 PBL の granulysin や TRAIL の発現低下か結核予後診断となりうることを明らかにした。従ってこの方法を全国の国立病院・療養所呼吸器ネットワーク（54 施設）を利用して、多剤耐性結核とキラー T 免疫の本質にせまる計画をたてている。

④ BCG の成人に対する結核予防効果において、BCG 接種は少なくとも γ -IFN 産生等を増強させることを明らかにしたが、長期予後 follow ともっと多くの母集団を対象とすることが統計解析上も必要であろう。

E. 結論

[I] 新しい結核ワクチンの開発：

(1) γ -IFN gene をアデノウィルスベクターに組み込み、これを結核感染マウス（i.v 投与にて H37RV ヒト型結核菌を感染）に i.p 投与すると 10 週後の肺、脾、肝の結核菌数の減少を認めた。すなわち、 γ IFN DNA ワクチンは有効であることを明らかにした。

(2) IL-6 related gene（IL-6 gene + IL-6 レセプター gene + gp130gene）をアデノウィルスベクターに組み込み治療すると、結核感染マウスの肺、脾、肝の結核菌数の減少を認め、有効なワクチンであることを明らかにした。

(3) リコンビナント BCG ワクチン Antigen 85A gene, 85B gene, 85C gene, MPB51 gene を単独および組み合わせて BCG 東京株に導入し、種々のリコンビナント BCG を作成した。これらを結核

感染マウスに投与し、抗結核ワクチン効果を検討した結果、85Bgene リコンビナント BCG はコントロールの BCG 東京に比し有意な肺結核菌数の減少を認め有効なワクチンであることが示された。

(4) plasmid DNA ワクチン：IL-12gene, IL-12gene, CD40Lgene, Hsp65gene をそれぞれ plasmid に導入することに成功し、現在結核感染マウスに注射し、ワクチン効果を解析中である。

(5) サブユニット・ワクチンとして Mtb.9.9A, 9.9B, 9.9C, 9.9D, 9.9E (Corixa 研究所 Steven Gillis Dr が gene cloning) を用い共同研究でその効果を解析中である。この gene cloning の方法は極めて短時間で結核菌の多種の gene を解析しうる、画期的なアッセイ法を開発した。リコンビナント IL-18 は結核感染マウス (IL-18 ノックアウトマウス) の肉芽腫形成の改善を示し有効であった。TDM は強力なアジュバント作用を示し、他のサブユニット・ワクチンと併用することによる新しいワクチン開発の方向性が示された。

[II] 新しい診断法：

ツベルクリン反応に代わる結核感染特異的診断法の開発に成功した。ツ反に用いられる PPD は多種の蛋白を含む。DrGillis はこれらのアミノ酸配列を解読し、結核感染患者のみに skin test 陽性で BCG 接種者には反応しない蛋白のアミノ酸配列と DNA をクローニングした。

[III] 新しい予後診断法 (キラー T 細胞活性)：

多剤耐性結核患者及び糖尿病合併難治性結核患者 PBL では結核菌感染マクロファージに対するキラー T 活性の分化・誘導低下が認められた。この一因としてこれらの患者のヘルパー T リンパ球からのキラー T 細

胞分化因子 (IL-2, IL-6, γ -IFN) 産生の低下が明らかとなった。さらに多剤耐性結核患者 PBL の granulysin mRNA 発現の著明な低下と TRAIL mRNA の極めて著明な低下が認められた。又、抗 granulysin 抗体を用いた FACS 解析より granulysin 蛋白のリンパ球上の発現が低下していることを初めて明らかにした。一方、抗 TRAIL 抗体を結核感染マウスに投与すると結核感染で死亡する時期が著明に早期になる発見をした。これらのことにより多剤耐性結核患者では結核菌に対するキラー蛋白として granulysin と TRAIL が極めて重要であることを明らかにしたとともに、逆にこれを測定することにより結核患者の予後診断法が確立されることを示した。

[IV] BCG 接種による大人 (成人) に対する結核予防効果の解析：

国立大学病院・国立病院・療養所のボランティア 321 名を対象にツ反を行った。ツ反陰性者を二群に分け BCG 接種群と非接種群に分け 5 年～ 20 年の経過観察で結核感染の予後調査を開始した。一方、BCG 接種者では γ -IFN 産生能の亢進が認められた。

F. 研究発表

1. 岡田全司：結核ワクチンの新しいストラテジー免疫 Immunology Frontier vol.10, No.4 in press 2000
2. 岡田全司：結核治療ワクチンと分子医学。現在医療社、出版中。2000
3. 岡田全司：抗結核キラー T 細胞とリコンビナント BCG・DNA ワクチンの開発による新しい予防・診断・治療法。「実験結核 40 年の歩み」、実験結核研究会編 P.119-128, 2000
4. 岡田全司：免疫低下と結核、臨床科学 35:344-351, 1999

5. 岡田全司、安部真佐子、秋吉毅、Richard C.Mulligan, Steven A. Rosengerg, Gary J. Nabel, Steven Gillis, Oliver Smithies, Bernd Gansbacher
サイトカイン遺伝子導入と遺伝子欠損モデルを用いたヒト癌・遺伝子治療の国際調査研究：International Study On Cytokine Gene Therapy of Human Cancer (Using Gene-Transfer and Gene-Deletion)。P.108-109。
「文部省国際学術研究・がん特別調査5年の歩み」文部省国際学術研究がん特別調査 総括班 研究代表者 富永裕民、大野良之
6. 岡田全司：高 IgD 症候群「リウマチ病セミナー IX」P.13-21、七川徹次 監修、永井書店、大阪、1999.
7. 岡田全司、岩崎輝夫、山中秀樹：キラーT細胞の発現補助機構の新しい概念。臨床免疫 1999 31:567-576
2. 学会発表
1. Okada M: Ueno K, Saito I, Kishimoto T, Sakatani M, Mori T, Synergistic anti-tumor effect of IL-6 gene + IL-6 receptor gene +gp130 receptor gene.The American Association of Immunologists Meeting Washington USA 1999
2. Okada M: Iwasaki T, Yamanaka H, Okura E, Matsumura A, Iuchi K, Sakatani M, Mori T, Nomura T, Saito I, Kishimoto T and Tsujimoto Y. Anti-human tumor effect of IL-6-related gene(s) and bcl-2 gene. The 5th Annual Meeting of Japanese Society of Gene Therapy, Tokyo, 1999
3. 岡田全司：岩崎輝夫、山中秀樹、大倉英司、松村晃秀 IL-6 遺伝子導入と bcl-2 遺伝子による相乗的抗腫瘍効果。第3回癌分子標的治療研究会、福岡、1999
4. 岡田全司：山中秀樹、岩崎輝夫、大倉英司、松村晃秀、井上敬二、濱口由香子、森隆、斎藤泉、寺山弘樹、河南有希子、太田光明、菅野 司、竹迫一任、糠谷斎衛、IL-6 関連遺伝子導入と癌拒絶抗原ペプチド投与によるヒト肺癌治療モデルの研究。第58回日本癌学会総会、広島、1999
5. 岡田全司：山中秀樹、岩崎輝夫、大倉英司、松村晃秀、井内敬二、井上義一、坂谷光則、森隆、斎藤泉、辻本賀英、サイトカイン遺伝子と bcl-2 遺伝子導入による相乗的キラーT細胞分化誘導と長期生存機構 第29回日本免疫学会、京都、1999
6. Y.Inoue, S.Yamamoto, M.Sakatani, H.Hara, M.Okada, E.Ueda: Expression of fibroblast growth factor receptors in the lungs with sarcoidosis.Sarcoidosis vasculitis and diffuse lung diseases 1999,16:26
7. 井上義一、片山友子、細江重人、四元正一、安光恵一、坂谷光則、森隆、岡田全司 γ -IFN 産生能及びキラーT細胞リンパ球機能による新しい結核診断法、結核 2000,75:286
8. 岡田全司、片山友子、井上義一、細江重人、四元正一、安光恵一、坂谷光則、森隆、多剤耐性結核、難治性結核のキラーT細胞免疫能、ヘルパーT細胞免疫能の解析、結核 2000,75:311
9. 片山友子、井上義一、細江重人、坂谷光則、森隆、岡田全司、山田毅、大原直也、吉田栄人 結核に対する新しいDNA ワクチン、リコンビナント BCG ワクチン開発の試み 結核 2000,75 :306
10. 岡田全司、片山友子、井上義一、四元正一、細江重人、安光恵一、坂谷光則、山中秀樹、松村晃秀、井内敬二、森隆、榎垣伸彦、八木田秀雄、奥村康：多剤

耐性結核・難治性結核患者におけるキラーT細胞機能の解析 第40回日本呼吸器学会総会

11. 山中秀樹、岩崎輝夫、桂浩、末岐博文、松村晃秀、井内敬二、森隆、岡田全司、坂谷光則：IL-6 関連遺伝子と癌拒絶抗原を用いたヒト肺癌免疫遺伝子治療モデルにおける抗腫瘍効果の解析、第40回日本肺癌学会総会
12. 井上義一、山本暁、岡田全司、岸潤、安光恵一、米田勉、針生寛之、吉田亮、延山誠一、石川秀雄、片山友子、細江重人、原英記、河原正明、坂谷光則：特発性間質肺炎、肺癌合併例におけるマスト細胞由来 Basic Growth Factor (bFGF) の役割について。第40回日本呼吸器学会総会
13. 岡田全司、井上義一、山中秀樹、大倉濱口由香子、津田紀子、高橋真由美、清未有希、坂谷光則、森隆： γ -IFN 産生能測定によるキラー T 細胞活性測定による結核に対する新しい診断法開発の試み、第54回日本呼吸器学会・第84回日本結核病学会近畿地方会
14. 岡田全司、片山友子、井上義一、坂谷光則、藤井隆、小瀬戸昌博、高田康徳、中村真胤、小西早苗、井上美佐：肺炎感染症にもかかわらず CRP 陰性の IL-6 産生欠損患者の T 細胞機能の検討、日本内科学会雑誌 89(219),2000

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

BCG 接種が大人（成人）の結核予防に有効か否かの解析

分担研究者 坂谷光則 国立療養所近畿中央病院 副院長

研究要旨

BCG 接種が成人の結核予防に有効か否かは不明であり議論の分かれるところである。したがって、近畿地区の 11 国立施設において新採用若年看護婦 132 名と付属看護学校新入生 189 名にツ反を行い、ツ反陰性者 13 名を二群に分け BCG 接種の有効性を解析する臨床研究を開始した。結果は 5～20 年後の結核感染率で判定する。BCG は少なくとも結核に対する免疫能増強作用を示すことを明らかにした。すなわち、BCG 接種群で末梢血リンパ球の γ IFN 産生能の増強が認められた。

A. 研究目的

結核に対するワクチンとしては、BCG が世界各国で用いられ、小児期における結核予防に関しては一定の成果を収めている。しかし、現行の BCG ワクチンでは、大人（成人）の結核予防に効果があるか否かは議論の分かれているところであり、確証がない。

したがって、BCG が真に大人の結核予防に有効であるか解明することを目的とする。

B. 研究方法

大阪大学病院、国立南和歌山病院、国立療養所近畿中央病院など近畿地区の 11 国立施設において新採用若年看護婦 132 名と付属看護学校新入生 189 名にツ反を行った。ツ反陰性者を無作為に二分し、一方の群に BCG を接種した。5 年～10 年後の結核発症予防効果で BCG 有効性を検定する。

一方、結核に対する BCG の免疫能の増強作用は末梢血リンパ球に (PBL) の γ -IFN

産生能で検討した。

（倫理面への配慮）

1. 当病院の倫理委員会は院外者 2 名、関西学院大学総長、近畿大学法学部教授を含む各方面の医療従事者(事務系の人も含む)により構成されており、毎月最低一回は長時間にわたり議論されている。
2. 本 BCG の効果研究をするにあたり、末梢血リンパ球等、研究対象者に対する人権擁護上の配慮を行う文書を作製している。もちろん研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と理解（インフォームドコンセント）に対する文面も記載されている

C. 研究結果

第 1 回ツ反陰性率は新採用若年看護婦 132 名のうち、17.4 %であった。一方、付属看護学校新入生は 189 名のうち 24.3 %であった。第 2 回目はそれぞれ 8.3 %と 8.5 %とほぼ同率となった。

この世代での結核既感染率は 10%以内とされているので、陽性者の大部分は過去

の BCG 接種による陽転者と推測される。上記の中で 2 施設は看護学生に対して 1 回法で検査しており、過去 3 年間の全検査実施者（新入生）250 名の中での陰性者は 95 名（33.5%）と高率であったが、この 3 名中 1～2 名は 2 回目の検査をすれば陽性になったであろうと思われる。上記陰性者（看護婦 11 名および看護学生 10 名）を無作為に 2 分し、片群の 13 名に日本 BCG 株式会社製の BCG ワクチンの接種を実施した。

次いで、上記検査の対象者の中で、近畿中央病院の看護婦 10 名と看護学生 36 名では、ツベルクリン反応の実施前に余血 1CD をヘパリン採血し、オーストラリア製 PPD および PHA 添加 18 時間培養の後に上清中のガンマ・インターフェロンの濃度を ELISA 法で測定した。

インターフェロン濃度はツベルクリン反応の陰性、陽性、強陽性の程度と相関する傾向をみとめた。その後 3 名の GCG 接種者中 2 名では 3 ヶ月分のインターフェロン産生能の上昇が認められ、対照者 4 名では上昇を認めず、この末梢血を使用したインターフェロン産生能の測定に、ツベルクリン反応に代る結核感染あるいは BCG 陽転の指標となり得ると考えられた。

BCG 菌との共通抗原性がなく、結核菌特異的な抗原物質が入手できれば、BCG 陽転と結核菌感染を分別できる検査となり得る可能性がある。

この陰性者は 21 名を無作為に二分し、13 名に BCG 接種を行った。ツ反前に末梢血を採血し、迅速 γ -IFN 測定法（Quantiferon 法）で γ -IFN 産生を ELISA で検討した。その結果ツ反の強さと γ -IFN 産生濃度は相関した。

さらに BCG 接種後 3 ヶ月の PBL の γ -IFN 産生は増強傾向を示した。このことにより BCG は少なくとも大人健常人に対

し免疫増強能を有することが示唆された。

D. 考察

成人で BCG 接種群では、 γ -IFN 産生の増強が認められ、免疫増強能が示された。BCG 接種による結核発症抑制効果判定のためには長期間の観察と母集団の増大で計画している。平成 12 年は九州地区の国立施設で母集団の増大がすでに計画済みである。（厚生省のサポートによる）

E. 結論

成人 321 名にツ反を行い、そのうちツ反陰性者 13 名を 2 群に分け、一方に BCG 接種を行った。結核発症予防効果を少なくとも 10 年間は経過観察中である。

一方、BCG 接種群では、結核に対する免疫能の増強を認めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Akira M. Hara H. Sakatani M. Interstitial lung disease in association with polymyositis dermatomyositis:long-term follow-up CT evaluation in seven patients. Radiology 1999 Feb;210 (2) :333-8

2. Akira M. Sakatani M. Hara H. Thin-section CT findings in rheumatoid arthritis-associated lung disease:CT patterns and their courses. J Comput Assist Tomogr 1999 Nov-Dec;23 (6) :941-8

3. Tomioka H, Sato K, Araki T, Kajitani H, Kawahara S. and Sakatani M Comparative In Vitro Antimicrobial Activities of the Newly Synthesized Quinolone HSR-903, Sitafloxacin (DU-6859a), Gatifloxacin (AM-1155), and Levofloxacin against Mycobacterium

- tuberculosis and Mycobacterium avium Complex
Antimicrobiaj. Agents and Chemotherapy
Dce, 1999, p, 3001-3004
4. 坂谷光則、非定型抗酸菌感染症の疫学と診断 感染と抗菌薬、2 (2) :182-187, 1999
 5. 坂谷光則、結核対策概論 最新医学、54 (9) :2105-2109,1999
 6. 坂谷光則、非定型抗酸菌症 —最近の話題— 臨床医学、35 (3) :313-317,1999
 7. 坂谷光則、非定型抗酸菌症 —疫学・日本と世界の現況— 化学療法の領域、15 (5) :19-22,1999
 8. 坂谷光則、肺結核 臨床外科、54 (11) :422-423,1999
 9. 坂谷光則、結核の管理・治療 医学のあゆみ、189 (11) :881-884,1999
 10. 坂谷光則、非定型抗酸菌症の疫学と臨床。結核、74 (4) :377-383,1999
 11. 坂谷光則、非定型抗酸菌症 in KEY WORD 1999-2000 呼吸器疾患 (編集: 山木戸道郎、日和田邦男、小倉剛)、pp156-157,1999 (先端医学社、東京)
 12. 坂谷光則、多剤耐性抗酸菌感染症 in 感染症症候群 (編集; 島田馨)、pp195-197,1999 (日本臨床社、東京)
 13. 坂谷光則、粟粒結核、臨床医、26 (1) :30-32.2000
 14. 坂谷光則、薬剤耐性結核への対応。診断と治療、87:1856-1860,1999
 15. 坂谷光則、結核伝染と院内感染予防、感染防止 9:8-11,1999
 16. Sakatani M: Nontuberculous mycobacteriosis; The present status of epidemiology and clinical studies The 73rd Annual Meeting Education Lecura, Kekkaku 1999 74:377-384
 2. 学会発表"
 1. 坂谷光則、日本結核病学会との共催教育講演 非結核性抗酸菌症の治療に関する見解-1998、第 40 回日本呼吸器学会総会、2000
 2. 岡田全司、片山友子、井上義一、四元正一、細江重人、安光恵一、坂谷光則、山中秀樹、松村晃秀、井内敬二、森隆、樞垣伸彦、八木田秀雄、奥村康、多剤耐性結核・難治性結核患者におけるキラー T 細胞機能の解析、第 40 回日本呼吸器学会総会、2000
 3. 原英記、坂谷光則、審良正則、山本暁、井内敬二、森隆、多剤耐性結核患者の経過と予後因子に関する検討、第 40 回日本呼吸器学会総会、2000
 4. 岡田全司、井上義一、山中秀樹、大倉英司、松村晃秀、井内敬二、細江重人、濱口由香子、津田紀子、高橋真由美、清末有希、坂谷光則、森 隆、 γ -IFN 産生能測定とキラー T 細胞活性測定による結核に対する新しい診断法開発の試み、第 54 回日本呼吸器学会・第 84 回日本結核病学会近畿地方会 1999
 5. 坂谷光則：看護学生におけるツ反・BCG 接種と血中インターフェロン γ 産生能の相関について、第 22 回結核・非定型抗酸菌症治療研究会 1999

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

結核菌糖脂質成分の抗原性と免疫増強活性、リコンビナントBCG作製 （結核菌糖脂質 Trehalose 6,6'-dimycolate の免疫応答に及ぼす作用）

分担研究者 矢野 郁也 日本BCG研究所中央研究所所長

研究要旨

結核菌の細胞壁構成成分である Trehalose 6,6'-dimycolate (TDM;コードファクター) の免疫賦活作用を調べた。TDM の単独投与では IFN- γ の産生や I-A^b の発現の上昇がみられ、免疫増強作用を示した。一方、TDM を BCG の培養上清タンパク質とともに w/o/w エマルジョンとして免疫すると、TDM のアジュバント効果は認められなかった。

A.研究目的

結核の再燃が世界的に問題となっており、特に北米での HIV 感染者の結核感染率が大きな社会問題となっている。日本では結核の予防に BCG (弱毒生ワクチン) が用いられているが、米国では BCG の予防接種は行われていない。HIV 感染者に BCG を接種すると発症する危険性があるため使用できない。そのため BCG の改良、または代替となる新しいワクチンの開発が行われている。その一つにコンポーネントワクチンがあるが、効果の点で問題があるのでアジュバントの使用が不可欠である。コンポーネントワクチンに利用できるアジュバントを検索するため、人型結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* Aoyama B 株 (強毒株) から単離した TDM に注目し、そのアジュバント効果を検討した。

B.研究方法

マウス：8 週齢の雌性 BALB/c と C57BL/6 マウス (日本 SLC、浜松) を用いた。

試料：TDM と CFP (Culture Filtrate Protein from *M.bovis* BCG) は日本 BCG 研究

所中央研究所より分与されたものを用いた。

試料の調製：TDM500 μ g を Freund 不完全アジュバント (IFA) に溶解し、同量の PBS を加えてホモジナイズし、次いで 0.2% Tween80-生理食塩水を加え、w/o/w 型ミセルを作製した。試料はマウス当たり 200 μ l ずつ腹腔内に投与した。アジュバント活性の測定には TDM25 μ g を IFA に溶解し、CFP を含む IFA に同量の PBS を加えてホモジナイズし、次いで 0.2% Tween80-生理食塩水を加え、十分にホモジナイズし、w/o/w 型ミセルを作製した。対照として TDM または CFP を含まない試料を同様に作製した。試料はマウス 1 回当たり 200 μ l ずつ背側皮下に免疫した。最初の免疫から 2 週間おきに 2 回目または 3 回目の免疫を行った。

細胞増殖反応：最終免疫後 2 週目のマウスの脾臓から細胞を採取し、10%FBS 完全 RPMI 培地に懸濁して細胞浮遊液 (1 \times 10⁶/ml) を作製した。この 200 μ l を 96 穴平底プレートに分注し、抗原として PPD または CFP を 10 μ g/ml になるように添加し

た。37℃、5%CO₂ インキュベーター内で72時間培養後、各穴に³H-thymidine (TdR, 37 kBq) を加え、さらに12時間培養した。細胞に取り込まれた³H量を測定した。

サイトカイン測定：IFN- γ の測定はFreudenberg らの方法に従い、抗 IFN- γ 精製抗体 (R4-6A2) とビオチン結合抗 IFN- γ 抗体 (AN-18) を用いたサンドイッチ ELISA で行った。

フローサイトメトリー (FCM) : FcR を介した非特異的結合を防ぐため抗 Fc γ R 抗体 (2.4G2) を用いた。FITC 標識 F4/80 抗体 (Serotec)、PE 標識抗 CD11b 抗体 (M1/70)、blotin 標識抗 I-A^b 抗体 (AF6-120.1) は Pharmingen から購入した。抗体を添加した後、4℃、暗所で30分間反応させた。blotin 標識抗体を用いた細胞は、APC 結合 streptavidin (Pharmingen) を4℃、暗所で30分間反応させた。抗体、APC 結合 streptavidin の染色及び細胞の洗浄には1%BSA、0.1%NaN₃ 含有 PBS を用いた。細胞は染色後、1%PFA 含有 PBS で固定した。測定は EPICS ELITE ESP で行った。

(倫理面での配慮)

実験動物に対し動物愛護上の配慮が十分なされている。

C. 研究結果

(1) TDM の IFN- γ 産生能

TDM500 μ g をマウスに投与し14日後までの血清中の IFN- γ 産生量を調べた。投与後2日目から有意な産生を認め、4日目にピークに達した (Fig.1)。

(2) TDM によるマクロファージの活性化

TDM を投与し肝臓単核細胞におけるマクロファージの活性化について FCM で解析した。活性化の指標である MHC クラス II を発現しているマクロファージの割合は、TDM 投与によりやや緩やかに上昇し、21日目にピークに達した (Fig.2)。

(3) TDM のアジュバント効果

TDM が IFN- γ 産生や MHC クラス II 分子発現といった生体応答を誘起することが分かったので、TDM をアジュバントとし、抗原に CFP を用いてマウスを1,2および3回免疫した。脾臓細胞を試験管内で PPD または CFP で刺激し、増殖性応答を³H-TdR の取り込みにより増殖性応答を調べた。反応性は IFA+CFP 群で強く上昇していた。それに比べ、TDM を加えて免疫した IFA+CFP+TDM 群の1回または2回免疫したときの脾臓細胞の両抗原に対する応答性は有意に低下していた。また、アジュバントのみの IFA+TDM 群では反応がみられなかった。

D. 考察

TDM を w/o/w エマルジョンとして投与すると IFN- γ 産生が誘導された。産生された IFN- γ によりマクロファージが活性化され、MHC クラス II の I-A^b 陽性マクロファージの割合が増加した。これらのことから TDM に免疫増強作用のあることが分かった。しかし、BCG の培養上清タンパク質である CFP を抗原として、TDM のアジュバントを細胞の増殖性応答を指標にして測定したところ、TDM を加えない方が応答性の高いことが分かった。これらの結果から、TDM は抗原特異的な応答において、抑制的に働くことが明らかとなった。今回使用した TDM は青山 B 株から分離したもので毒性をもつといわれている。また、TDM により抗原特異的 T 細胞が誘導されるという報告があるので、今後 TDM の脂肪酸の長さ、用量、免疫スケジュールなどを再検討する必要がある。

<参考文献>

- 1) Freudenberg MA., et al. *Infect. Immun.*, 59:3484-3491 (1991)
- 2) Tabata A., et al. *Microbiol. Immunol.*,

40:651-658 (1996)

E. 結論

結核菌の細胞壁構成成分である Trehalose 6,6'-dimycolate (TDM;コードファクター)の免疫賦活作用を調べた。TDMの単独投与ではIFN- γ の産生やI-A^bの発現の上昇がみられ、免疫増強作用を示した。一方、TDMをBCGの培養上清タンパク質とともにw/o/wエマルジョンとして免疫すると、TDMのアジュバント効果は認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) J.-W.Pan, N.Fujiwara, S.Oka, R. Maekura, T.Ogura, I.Yano Anti-cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) Ig G antibody in tuberculosis patients recognizes mycolic and subclasses *Microbiol. Immunol.*, 43 (9), 863-869, 1999
- (2) N.Fujiwara, J.-W. Pau, K.Enomoto, Y.terano, T.Honda, I.Yano Production and partial characterization of anticord factor (trehalose 6, 6'-dimycolate) Ig G antibody in rabbits recognizing mycolic and subclasses of *M. tuberculosis* or *M. avium* *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 24,141-149, 1999
- (3) N.Fujiwara, S.Oka, M. Ide, K.Kasima, T.Honda, I.Yano Production and partial characterization of antibody to cord factor (trehalose 6, 6'-dimycolate) in mice *Microbiol. Immunol.*, 43 (8), 785-793, 1999
- (4) K.Watanabe, R.Hasunuma, T.Horikoshi, H.Yamana, H.Maruya, N.Fujiwara, Y.Kumazawa, I.Yano Induction of hypersensitivity to endotoxin lethality in mice by treatment with trehalose 6, 6'-dimycolate but not with 2, 3, 6, 6'-tetraacyl trehalose 2'-sulfate *Journal of Endotoxin Res.* 5 (1/2) 23 ~ 30, 1999
- (5) L.Wang, S.Izumi, H.Ite, N.Fujiwara, N.Saita, I.Yano, K.Kobayashi, N.Tatsumi Serodiagnosis of Hansen's Disease / Leprosy by enzyme-linked immunosorbent assay using cord factor (trehalose 6, 6'-dimycolate) as antigen *Japanese J. Leprosy* 68, 165-174
- (6) K.Watanabe, R.Ryll, E.Hasumuna, M.Okada, Y.Kumazawa, I.Yano Mycobacterial trehalose 6, 6'-dimycolate, but not 2, 3, 6, 6'-tetraacyl trehalose 2'-sulfate, causes depletion of normal density CD4+NK1.1+TCR α /intermediate cells and upregulation of CD1d on murine macrophages. *BBRC* (submitted)

2. 学会発表

- (1) J.-W.Pan, N.Fujiwara, S.Oka, R. Maekura, T. Ogura, I.Yano Anti - cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) Ig G antibody in tuberculosis patients recognizes mycolic and subclasses 1999、日本細菌学会
- (2) N.Fujiwara, S.Oka, M. Ide, K.Kasima, T.Honda, I.Yano Production and partial characterization of antibody to cord factor (trehalose 6, 6'-dimycolate) in mice 1999、日本細菌学会
- (3) L.Wang, S.Izumi, H.Ite, N.Fujiwara, N.Saita, I.Yano, K.Kobayashi, N.Tatsumi Serodiagnosis of Hansen's Disease / Leprosy by enzyme-linked immunosorbent assay using cord factor (trehalose 6, 6'-dimycolate) as antigen 1999、日本瘰癧学会

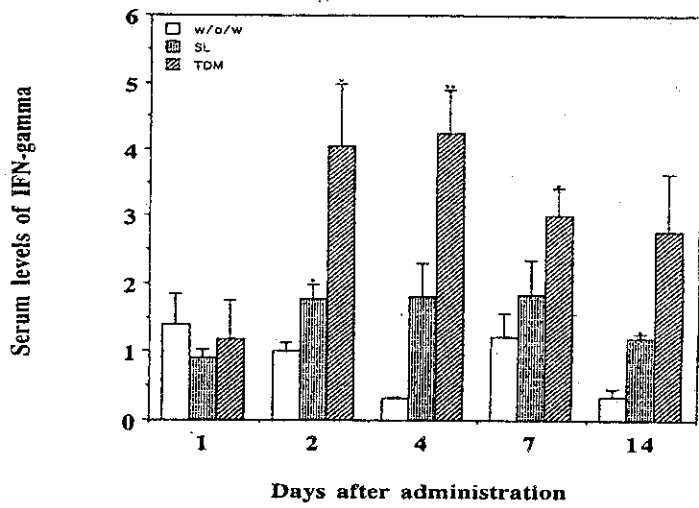


Fig.1 TDM 投与後の血清中 IFN- γ の変動

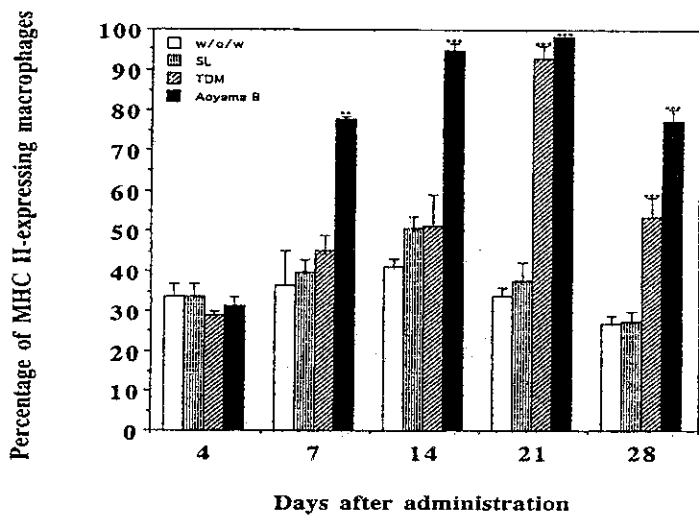


Fig.2 TDM 投与後の活性化マクロファージの変動

厚生省科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

(分担) 研究報告書

ツベルクリン反応に代わる結核菌感染特異的診断の開発

分担研究者 螺良英郎 財団法人結核予防会大阪病院 病院長

研究要旨

ツベルクリン反応に代わる結核菌感染特異的診断の開発に成功した。ツ反に用いられる PPD は多種の蛋白を含む。Dr Gillis はこれらのアミノ酸配列を解読し、結核感染患者のみに skin test 陽性で BCG 接種者には反応しない蛋白のアミノ酸配列と DNA をクローニングした。共同研究でこの画期的な新しい結核感染特異的診断法を本邦でも開発普及すべく計画中である。

A. 研究目的

38 年ぶりに結核罹患率の増加、集団感染が頻発、AIDS や糖尿病患者等の免疫不全疾患に高頻度に合併、薬剤耐性結核が増え、いわゆる難治性結核の対策が早急に望まれていることにより、我々の新しい予防・診断・治療の研究が必須である。

ツベルクリン反応(ツ反)は BCG 接種者で陽性に出る欠点があり、結核感染特異的診断には困難である。したがって結核感染特異的診断法が切望されている。

B. 研究方法

米国 Corixa 研究所 S.Gillis Dr, S.Reed Dr と共同研究を行い、極めて結核感染に特異性の高い、ツ反に代わる新しい診断法の進展が認められた。ツ反に用いられる PPD は多種の蛋白を含む。Dr Gillis らはこれらの全ての蛋白のアミノ酸配列を解読し、結核感染患者のみに skin test 陽性で BCG 接種者には反応しない蛋白のアミノ酸配列と DNA をクローニングすることに成功した。

C. 研究結果

米国 Corixa 研究所 S.Gillis Dr, S.Reed Dr と共同研究を行い、極めて結核感染に特異性の高い、ツ反に代わる新しい診断法の進展が認められた。結核感染患者のみに skin test 陽性で BCG 接種者には反応しない蛋白のアミノ酸配列と DNA をクローニングすることに成功した。これは画期的な診断法となることが予測される。来年度はこれをさらに推進する。(S.Gillis, S.Reed、岡田、坂谷)

D. 考察

ツ反に代わる画期的な新しい診断法(結核感染特異的)の本邦での普及を目指したい。

E. 結論

ツベルクリン反応に代わる結核感染特異的診断法の開発に成功した。ツ反に用いられる PPD は多種の蛋白を含む。Dr Gillis はこれらのアミノ酸配列を解読し、結核感