

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Abe C, Hirano K, Wada M, Tsubura E, Yamanaka M, Aoyagi T, Osumi M, Takeda M, Kurashima A, Yoneyama A, Okuzumi K.
: Comparison of the newly developed MB redox system with mycobacte growth indicator tube (MGIT) and 2% Ogawa egg media for recovery o mycobacteria Kekkaku 1999.74 (10) :707-13

螺良英郎：感染症をめぐる MDP 誘導体（ロムルチド）ノピアとの長い熱い闘いが続いている。“実験結核研究会編 104-108,1999

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

易感染宿主の免疫状態の解析

分担研究者 土肥義胤 大阪大学医学部 保健学科長 教授

研究要旨

結核菌の増殖場所であるマクロファージ(単球)の産生しうる殺菌物質ペルオキシ・ナイトライト量を測定した。活動性肺結核症の患者の末梢血単球による産生量は、健康成人のそれよりも、顕著に少ないことが明らかになった。

A. 研究目的

結核は、易感染状態のヒトに感染し発病しやすく、寛解状態の結核も宿主が易感染状態になると再燃する。結核菌による感染状態を解析し、感染の原因除去に役立つ知見を得ることを目的とする。特に、結核菌の増殖の場であるマクロファージ(単球)の殺菌能力を調べ、結核菌の増殖に対する抵抗性から、結核菌感染成立の可否を予想できる手段を工夫、発明し、リコンビナント BCG ワクチンの効能を測定する。

B. 研究方法

活動性肺結核症の患者(及び健康成人)の末梢血単球を Ficoll 密度勾配遠心法、更に、磁気ビーズ単球分画法により精製分離し、LPS と IFN- γ 、及び、各種リコンビナント BCG の添加により産生される強力な殺菌物質である peroxynitrite 量をルミノール依存性化学発光(NO 消去剤の非存在下、及び、存在下)により測定する。結核菌及び各種リコンビナント BCG の増殖を Alamar blue 蛍光測定法により測定する。

(倫理面での配慮)

採血した患者並びに健康成人には、採血

の目的をよく説明した。また、残った細胞は破壊し、廃棄処理した。また、主任研究者岡田部長との共同研究であり、岡田 Dr の報告書と同じ倫理面での配慮がなされている。

C. 研究結果

高齢者及び腎透析患者の好中球の機能を解析し、好中球の非刺激状態並びに食菌による活性化後に産生される殺菌物質 superoxide 及び過酸化水素が、易感染状態で非常に低いことを明らかにした。また、単球が、LPS と IFN- γ の添加により、ルミノール依存性化学発光量の大部分を占める殺菌物質 peroxynitrite を持続的に産生することを明らかにした。更に、活動性肺結核症の患者の単球が、健康成人のそれと比して、低い産生量であることも明らかにした。単球に BCG 生菌を加えると、LPS と IFN- γ の効果よりも多量の peroxynitrite を産生することも明らかにした。

D. 考察

精製単離された単球に十分な IFN- γ を添加して、単球の機能を測定することによって、単球の感染防御への能力を明らかに

することができると考えられる。

食細胞内で最も強力な殺菌物質である peroxynitrite が、健康成人の単球の中で、好中球よりも遥かに多量に、且つ、持続的に産生されることが明らかになり、この物質は、明らかに単球内で結核菌の殺菌に有効な物質であることが窺われた。また、症例数は未だ少ないが、活動性病巣をもつ結核症患者の単球の機能が低いことが明らかになったが、単球の機能を抑制しているメカニズムについては、何も明らかにされていない。

E. 結論

結核菌の増殖場所であるマクロファージ（単球）の産生しうる殺菌物質 peroxynitrite 量を測定した。活動性肺結核症の患者の末梢血単球による産生量は、健康成人のそれよりも、顕著に少ないことが明らかになった。

F. 研究発表

2. 学会発表 Shirai F, Dohi Y, et al (1999) Regulation on enterococcal infections to non-professional phagocytes. Bonzon Symposium No.46 Molecular mechanisms of innate immunity p13

G. 知的所有権の取得状況

なし

（分担）研究報告書

TRAIL を介した第 3 の標的細胞破壊機構についての解析

分担研究者 奥村 康 順天堂大学医学部 免疫 教授

研究要旨

本研究において、NK 細胞におけるマウス TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) 分子の発現誘導、および、その機能について明らかとなった。本研究において、我々は、マウス TRAIL に対するモノクローナル抗体 (N2B2) を新たに樹立し、N2B2 を用いて TRAIL の発現について解析した結果、T 細胞のみならず、NK 細胞上にも、IL-2 や IL-15 といったレセプターコンポーネントの一部を共有するサイトカイン刺激によって発現が誘導されることが判明した。

本研究において新たに樹立したマウス TRAIL 中和抗体をマウスに投与することにより *in vivo* モデルにおける結核菌排除機構のメカニズムについて解明されることが期待される。また、結核菌排除機構のメカニズムの詳細について明らかとなれば、より効果的なワクチン開発の一助となることが予想される。

A. 研究目的

細胞障害性 T リンパ球 (CTL) や NK 細胞等を介した標的細胞障害機構は細菌感染細胞や癌化細胞に対する免疫監視機構の一つとして重要であることが知られている。これまでに、キラー細胞が主として 2 つの経路、すなわち、パーフォリン放出経路と細胞死 (アポトーシス) 誘導分子である Fas レセプター / Fas リガンド (FasL) 依存性の経路を介して標的細胞を破壊することが明らかにされていた。最近、我々は、新規アポトシス誘導分子である TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) がヒト T 細胞上に発現し、標的細胞上に発現する TRAIL-レセプターを介して標的細胞破壊を誘導することから、TRAIL とそのレセプターが第 3 の標的細胞破壊経路を形成することを明らかにした。しかしながら、TRAIL の *in vivo* での発現および機能につ

いては、不明のままであった。マウスにおける TRAIL の発現および機能について解析することは、マウス結核菌感染モデルにおけるエフェクター機構を解明する一助となることが期待される。(これらの研究は八木田秀雄助教授と榎垣伸彦助手によってなされた)。

B. 研究方法

マウス TRAIL に対するモノクローナル抗体の作製に関しては、マウス TRAILcDNA をマウス B リンフォーマ 2PK-3 に導入した mTRAIL/2PK-3 細胞を免疫原として、mTRAIL/2PK-3 のヒト T リンフォーマ Jurkat に対する細胞障害活性の中和を指標にハイブリドーマの培養上清をスクリーニングした。

TRAIL 分子のアポトーシス誘導能については、TRAIL に対して感受性示すマウ

ス繊維芽細胞 L929 を用いた 51Cr 遊離試験にて行った。

(倫理面での配慮)

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

本研究において新たに樹立した抗マウス TRAIL 中和モノクローナル抗体 N2B2 を用いて C57BL/6 マウスリンパ球上の TRAIL の発現を解析した結果、未刺激では脾臓由来の T,B,NK および NKT 細胞のいずれにおいても TRAIL の発現は認められなかったが、IL-2 あるいは IL-15 存在下で6日間培養することにより NK 細胞上に TRAIL が発現することが判明した。これら NK 細胞は YAC-1,B16,P815 および L929 といった標的細胞を効率よく殺傷することが 51Cr release assay により認められたが、この時、TRAIL に抵抗性を示す YAC-1,P815 および B16 に対する lymphokine-activated killer (LAK) 活性はパーフォリン経路を阻害する薬剤である Concanamycin A (CMA) によりほぼ完全に阻害された。一方、TRAIL および FasL に感受性を示す L929 に対する LAK 活性を完全に阻害するには CMA のみならず抗マウス FasL モノクローナル抗体 (MFL2) および N2B2 の添加が必要であった。以上の結果は、TRAIL が NK 細胞による標的細胞障害に関与すること、および、TRAIL が IL-2 や IL-15 によって発現誘導されることを示す。

D. 考察

最近、ヒト臍帯血中の未熟な血球系幹細胞より、stem cell factor (SCF) および IL-2 を用いて誘導された NK 細胞のうち、一部の細胞群が TRAIL を介して標的細胞を破壊することが報告された。我々も、マウス

NK 細胞における TRAIL 分子の発現について解析したところ、未刺激時の脾臓由来 NK 細胞には TRAIL の発現は認められないが、IL-2 や IL-15 といったレセプターコンポーネントの一部 (IL-2R β / IL-15R β および IL-2R γ / IL-15R γ) を共有するサイトカインによって TRAIL の発現が誘導されることが明らかとなった。また、IL-2 や IL-15 によって活性化された NK 細胞が FasL やパーフォリン経路とともに TRAIL 経路を介して標的細胞を破壊することも確認された。これらの結果は、CTL のみならず NK 細胞も TRAIL 経路を介して標的細胞を破壊すること、および、NK 細胞においては TRAIL の発現が IL-2 や IL-15 によって制御されることを示す。最近、腫瘍細胞のみならずサイトメガロウイルスやワクシニアウイルス等の病原体感染に伴い正常細胞も TRAIL に対して感受性を示すようになることが報告されており、TRAIL を介した標的細胞破壊経路は癌細胞やウイルス感染細胞の除去に重要であると予想されるが、in vivo における TRAIL 分子の重要性については不明のままであり、今後の解析が待たれる。

E. 結論

マウスにおける TRAIL の発現、機能について解析した結果、CTL のみならず NK 細胞も TRAIL 経路を介して標的細胞を破壊すること、および、NK 細胞においては TRAIL の発現が IL-2 や IL-15 によって制御されることが明らかとなった。現在、結核菌排除における TRAIL、FasL、パーフォリン経路の重要性について中和抗体およびパーフォリン KO マウスを用いて解析中であり、結核菌排除におけるこれらエフェクター分子の役割について明らかとなれば、ワクチン等の開発に大いに役立つことが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Akiba, H., Oshima, K., Takeda, M., Atsuta, H., Nakano, A., Nakajima, C., Nohara, H., Yagita, H., and K. Okumura. CD28 independent costimulation of T cells by OX40 ligand and CD70 on activated B cells. *J Immunol* 1999. 162, no.12:7058-66.
2. Kawamura, T., M. Azuma, N. Kayagaki, S. Shimada, H. Yagita, and K. Okumura. Fas/Fas ligand-mediated elimination of antigen-bearing Langerhans cells in draining lymph nodes. *Br J Dermatol* 1999. 141, no.2:201-205.
3. Kayagaki, N., N. Yamaguchi, M. Nakayama, K. Takeda, H. Akiba, H. Tsutsui, H. Okamura, K. Nakanishi, K. Okumura, and H. Yagita. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol* 1999. 163, no.4:1906-13
4. Kayagaki, N., N. Yamaguchi, M. Nakayama, H. Eto, K. Okumura, and H. Yagita. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J Exp Med*, 1999. 189, no.9: 1451-60.
5. Kayagaki, N., N. Yamaguchi, M. Nakayama, A. Kawasaki, H. Akiba, K. Okumura, and H. Yagita. Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human CD4 + T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1999. 162, no.5:2639-47.
6. Kodama, T., K. Takeda, O. Shimozato, Y. Hayakawa, M. Atsuta, K. Kobayashi, M. Ito, H. Yagita, and K. Okumura. Perforin-dependent NK cell cytotoxicity insufficient for anti-metastatic effect of IL-12. *Eur J Immunol* 1999. 29, no.4:1390-6.
7. Liu, Z. J., Y. Tanaka, H. Fujimoto, S. Mine, A. Morinobu, H. Yagita, K. Okumura, I. Oishi, J. Udagawa, H. Yamamura, and Y. Minami. A novel role for H-Ras in the regulation of very late antigen-4 integrin and VCAM-1 via c-Myc-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 1999. 163, no.9:4901-8.
8. Nakano, H., S. Sakon, H. Koseki, T. Takemori, K. Tada, M. Matsumoto, E. Munechika, T. Sakai, T. Shirasawa, H. Akiba, T. Kobata, S. M. Santee, C. F. Ware, P. D. Rennert, M. Taniguchi, H. Yagita, and K. Okumura. Targeted disruption of Traf5 gene causes defects in CD40- and CD27-mediated lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999. 96, no.17:9803-8.
9. Seino, K., N. Kayagaki, N. Yamaguchi, Y. Takada, S. Uyama, T. Kiuchi, K. Tanaka, H. Yagita, K. Okumura, and K. Fukao. Soluble forms of CD95 and CD95 ligand after living related liver transplantation. *Transplantation* 1999. 67, no.4:634-6.
10. Shirakata, Y., K. Ishii, H. Yagita, K. Okumura, M. Taniguchi, and T. Takemori. Distinct subcellular localization and substrate specificity of extracellular signal-regulated kinase in B cells upon stimulation with IgM and CD40 [In Process Citation] *J Immunol*. 1999. 163, no.12:6589-97.
11. Tsukada, N., T. Kobata, Y. Aizawa, H. Yagita and K. Okumura. Graft-versus-leukemia effect and graft-versus-host disease can be differentiated by cytotoxic mechanisms in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1999. 93, no.8:2738-47.

2. 学会発表

1. Type I IFN による TRAIL 分子の発現
制御

榎垣伸彦、山口典子、中山勝文、八木
田秀雄、奥村康

第 29 回日本免疫学会・学術集会記録
p.63 (京都、1999 年 12 月 3 日)

2. マウス NK 細胞による TRAIL を介し
た標的細胞障害

中山勝文、榎垣伸彦、山口典子、八木
田秀雄、奥村康

第 29 回日本免疫学会・学術集会記録
p.63 (京都、1999 年 12 月 3 日)

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

IL-18 を用いたマウス結核に対する免疫療法

分担研究者 菅原 勇 (財) 結核研究所 分子病理学科科長

研究要旨

IL-18 欠損マウスを、経気道的に、結核菌 (H37Rv) で感染させた。感染翌日から1週おきに3回、組み替えマウス IL-18 を腹腔に注射した。7週後、マウスを解剖して肺病変を調べたところ肉芽腫病変は、有意に縮小した。同時に肺内の結核菌も、有意に減少した。結核のある局面では、免疫療法も有効である。

A. 研究目的

IFN-gamma 誘導因子である IL-18 の有用性を検討するために、IL-18 欠損マウスに結核菌を経気道的に感染させた。

(倫理面での配慮)

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。

B. 研究方法

IL-18 欠損マウスを、経気道的に、結核菌株 (H37Rv) 10^6 cfu で感染させた。IL-18 欠損マウスは大阪大学微生物研究所審良静男教授より恵与され当研究所で繁殖飼育させたマウスを使用した。感染暴露装置 (Glas-Co 社、米国) を利用した。

7週後、感染マウスを殺し、肺、脾、肝、腎組織標本を作製し、病変の程度を検索した。抗酸菌染色を施し、結核菌の有無も検討した。主要なサイトカインの変化を調べるために肺組織を瞬間凍結し RT-PCR を施行した。治療実験には組み替えマウス IL-18、(Pepro-Tech 社、英国) を用いた。感染暴露後翌日と1週おきに二回 5 μ g、腹腔に投与した。7週後、肺病変の程度を調べた。感染肺の重量を計り、すりつぶした組織を小川固形培地中で培養して、結核菌の cfu を求めた。対照として BALB/c 雌マウスを用いた。

C. 研究結果

これら欠損マウスには野生マウスと比較して大きな肉芽腫性病変が認められ、壊死病変は認められなかった。肉芽腫で多くの結核菌を認めた。ELISA では、IFN-gamma レベルは低かったがゼロではなかった。野生マウスと比較して10分の1だった。IL-12 レベルは少し増加していた。この傾向は、RT-PCR でも確認された。肺胞マクロファージの N 産生能は、野生マウスの肺胞マクロファージと比較して有意差はなく、正常に保たれていた。IL-18 欠損マウスにできた肉芽腫病変は、組み替えマウス IL-18 投与により、有意に縮小したが、完全に治癒しなかった。

D. 考察

IL-18 は、IFN-gamma 誘導因子であり、Th1 に作用して、IFN-gamma を分泌させる。このマウスでは、完全に IFN-gamma が欠損してはず、IL-12 が少し高いことから

IL-12がIL-18の代用をしている。

この状態で治療実験を行うと、マクロファージを活性化でき、病変が縮小した。少しでも、IFN-gammaが産生されている条件下では、IL-18は治療薬として有望である。しかしながら、完全治癒が望めなかったため、今後IFN-gammaと併用療法をやりたい。

E. 結論

IL-18はマウス実験的結核症の治療に有効である。

F. 研究発表

1. 論文発表

I. Sugawara, H. Yamada, H. Kaneko, S. Mizuno, K. Takeda and S. Akira:
Role of IL-18 in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. *infect. Immun.* 67, 2585-2589, 1999.

I. Sugawara:
IL-18 and infectious diseases, with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens. *Microbes and Infection*, 2000 (in press).

H. Yamada, S. Mizuno, R. Horai, Y. Iwakura, and I. Sugawara:
Protective role of IL-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. *Lab. Invest.*, 2000 (in press).

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

遺伝子欠失法を用いた結核菌の病原性の解析と 抗結核ワクチンの開発に関する研究

分担研究者 谷山忠義 国立感染症研究所 免疫制御室室長

研究要旨

マクロファージ細胞内で発現する遺伝子を欠失させた結核菌を作成し、マウスに感染させ、肺で増殖するかどうか検討し、結核菌の病原性を担う遺伝子を特定することを目指す。また、これら遺伝子欠失結核菌やリコンビナント BCG の抗結核ワクチンとしての有用性を調べ、BCG に代わる抗結核ワクチンの開発を目指す。現在、VirS,SmpB、および、FabD 遺伝子の欠失結核菌を作成中である。また、BCG に欠損した Mpt64 を発現するリコンビナント BCG を作成できたと考えられるので、その防御効果について検討を行なう予定である。

A. 研究目的

最近日本では、結核が、再興感染症として注目を集めており、依然として、死亡者数第一位の感染症である。しかしながら、現在、BCG が抗結核ワクチンとして使用されているが、その効果の再判定を含めて抗結核問題が重要な課題である。そこで、我々は、2つのアプローチにより、BCG を越える有効な抗結核ワクチンの開発を目指している。

B. 研究方法

本研究では、マクロファージ細胞内で発現する結核菌遺伝子を特定する。次に、特定した遺伝子を欠失させた結核菌を作成する。その後、マウスに感染させ、肺中の結核菌数を測定することにより結核菌の病原性の有無を決定する。抗結核防御効果は、病原性を無くした遺伝子欠失結核菌またはリコンビナント BCG をあらかじめマウスに投与し、その後、結核菌を感染させ、肺

中の結核菌数の測定により防御効果を判定する。

（倫理面への配慮）

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. 研究効果

マクロファージ内での生存が結核菌の病原性に関与するものと考えられるので、結核菌のマクロファージ内で発現する遺伝子のプロモーターの解析を行ない、SmpB,FabD および VirS 遺伝子が発現していた。そこで、この遺伝子のクローニングを行ない、結核菌遺伝子欠失用ベクターに組み込んだ。現在、SmpB,FabD および VirS 遺伝子欠失結核菌の作成を行なっている。また、BCG の改良による抗結核ワクチンについて、我々は、Mpt64 抗原に着目し、結核菌の Mpt64 をクローニングし、BCG 内で大量に発現させるため、Mpt64 遺伝子自身のプロモーターではなく、BCG HSP60

遺伝子の強力なプロモーターの下流に Mpt64 遺伝子を組み込んだ。続いて、BCG 株に遺伝子導入し、Mpt64 を大量に発現するトランスフォーマントを樹立できたと考えている。

D. 考察

本年度、我々は、マクロファージ細胞内で発現する結核菌の遺伝子を特定したところ、SmpB, FabD および VirS の遺伝子が発現した。そこで、これらの遺伝子を欠失した結核菌の作成に成功したと思われるので、来年度には、病原性の有無や抗結核ワクチンとしての効果を調べる予定である。また、Mpt64 抗原を発現するリコンビナント BCG の作成できたとと思われるので、抗結核防御効果も合わせて検討する予定である。

E. 結論

遺伝子欠失結核菌の作成およびリコンビナント BCG の作成にほぼ成功した。

F. 研究発表

2. 学会発表

成田 雅、西村忠洋、西本憲弘、吉崎和幸、谷山忠義：ヒト Hck チロシンキナーゼに特異的に結合する新規ヒト蛋白（HSB-1）のクローニング、第 29 回日本免疫学会総会・学術集会、1999 年、12 月

G. 知的所有権の取得状況

1. 知的取得

「ヒトチロシンキナーゼ Hck に結合するヒトタンパク質及びそれをコードする遺伝子」発明者：谷山忠義、成田 雅、平成 11 年 10 月 29 日出願

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

キラー T 細胞活性による多剤耐性結核・難治性結核の 予後診断法の確立

分担研究者 井上義一 国立療養所近畿中央病院 室長

研究要旨

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。

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。

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。

B. 研究方法

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（グラニューライシン）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。

(倫理面への配慮)

主任研究者岡田全司と同じ倫理委員会及び倫理面の配慮をしている。

C. 研究結果

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 (グラニューライシン) 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。

D. 考察

多剤耐性結核患者や糖尿病合併難治性 PBL の granulysin や TRAIL の発現低下が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。

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

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

ア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。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Takayuki Kitamura, Kanji Uchida, Naohiko Tanaka, Tomoko Tsuchiya, Junichi Watanabe, Yoshitsugu Yamada, Kazuo Hanaoka, John F Seymour, Otto D Schoch, Ian Doyle, Yoshikazu Inoue, Mitsunori Sakatani, Shiji Kudoh, Arata Azuma, Toshihiko Nukiwa, Tomoyuki Tomita, Masato Katagiri, Akira Fujita, Atsuyuki Kurashima, Shiro Kanegasaki, Koh Nakata: Serodiagnosis of idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med* (in press)

(2) Yoshikazu Inoue, Tomoya Kawaguchi, Akira Yoshida, Hisato Harada, Hideki Hara, Satoru Yamamoto, and Mitsunori Sakatani: Paragonimiasis miyazaki associated with bilateral pseudochyrothorax. *Internal Medicine* (in press)

(3) Hironobu Hamada, Val Vallyathan, Elizabeth Barker, Yoshikazu Inoue, and Lee S. Newman: Mast cell basic fibroblast growth factor in silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* (in press)

(4) Tomoya Kawaguchi, Akihito Matsumura, Keiji Iuchi, Satoru Yamamoto, Yoshikazu Inoue, Toshihiko Sunami, Kyoichi Okishio, Kiyonobu Ueno, Shinji Atagi, Mitsumasa Ogawara, Shigeto Hosoe, and Masaaki Kawahara: Solitary squamous papilloma of the bronchus associated with human papilloma virus type II. *Internal Medicine* 1999,38:817-819

2. 学会発表

(1) Y. Inoue, M. Sakatani, M. Nishioka, A. Yoshida, H. Tamiya, M. Kobayashi, H. Kimura, S. Nobuyama, H. Hamada, K. Ueno, H. Hara, S. Yamamoto, M. Aikira, and E. Ueda: Association of basic fibroblast growth factor with pulmonary inflammatory events in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999,159:A68

(2) K. Ueno, Y. Inoue, S. Hosoe, T. Kawaguchi, M. Kawahara: Basic fibroblast growth factor level in sera and clinical outcome in patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 1999,159:A202

(3) T. Kawaguchi, Y. Inoue, S. Hosoe, K. Ueno, T. Teramoto, S. Yamamoto, M. Kawahara. Immunohistochemical analysis of c-met expression in centrally-located early stage lung cancer treated with photodynamic therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 1999,159:A202.

(4) 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

(5) 井上義一、西岡真輔、吉田亮、田宮

弘之、小林雅子、延山誠一、木村裕美、上野清伸、原英記、審良正則、山本暁、坂谷光則、上田英之助：特発性間質性肺炎患者の血漿および気管支肺胞洗浄液中 bFGF,IL-1 β ,IL-8 の検討、日本呼吸器病学会雑誌 1999,37:245

(6) 井上義一、河野修興、山本暁、坂谷光則、上田英之助：各種間質性肺疾患における肺組織中 KL-6 発現について -Morphometric analysis-：日本呼吸器病学会雑誌 1999,37,107

(7) 上野清伸、井上義一、細江重人、川口知哉、中宣敬、沖塩協一、小河原光正、河原正明：原発性肺癌症例における血清 Basic Fibroblast Growth Factor の検討 日本呼吸器病学会雑誌 1999,37:-139

(8) 川口知哉、井上義一、上野清伸、須波敏彦、中宣敬、沖塩協一、安宅信二、小河原光正、細江重人、河原正明：肺門部早期肺癌における c-Met の発現に関する検討 日本呼吸器病学会雑誌 1999,37:268

(9) 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

(10) 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 2000,75:286

(11) 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

(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、清末有希、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

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

結核に対する新しいワクチン（遺伝子治療）の開発研究

分担研究者 細江重人 国立療養所近畿中央病院 臨床研究部病理研究室長

研究要旨

BCG よりもより強力な新しいリコンビナント BCG ワクチンや DNA ワクチンを作製した。リコンビナント BCG では Antigen 85A、85B、85C、MTB51 の gene を PNN2 抗酸菌一大腸菌シャトルベクターを用いて BCG 東京株に導入した。85B gene リコンビナント BCG は結核感染マウスにおける肺の結核菌数の減少効果を示した。一方、DNA ワクチンとして γ -IFN gene、IL-6 関連遺伝子（IL-6 遺伝子+IL-6 レセプター遺伝子+gp130 遺伝子）で結核感染マウスにおける肺・脾・肝の結核菌数の減少を示した。

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、新しい予防・診断・治療の研究が必須である。

すなわち、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。

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 遺伝子のものを用いた。

(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し、結核菌数（肺、肝、脾）の減少効果が示唆された。さらに、Hsp65DNA 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治療した。

C. 研究結果

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 H37RV5 $\times 10^5$ 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。投与したところ preliminary であるが、リコンビナント 85BBCG、抗結核ワクチン効果が示唆された。(岡田、山田)

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治療した。

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、札幌医科大学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。)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。

IL-6 関連遺伝子治療にて、結核感染マウスにおける肺、肝、脾の結核菌数の減少効果を示した。

D. 考察

Antigen 85B gene 導入リコンビナント BCG はコントロールの BCG 東京株より有意に結核感染マウス肺内結核菌数を減少したことより有望なワクチンと考えられる。さらに種々のリコンビナント BCG ワクチン(IL-6,IL-18, γ -IFN,IL-12 gene 等)を組み合わせて検討する予定である。一方 γ -IFN DNA, (IL-6 gene+IL-6 R gene+gp130 gene) DNA が有効であることから強力な条件を検討する。さらにリコンビナント BCG で免疫をかけておいて、DNA ワクチンでより強力な追加免疫をかける組み合わせも興味深い。

E. 結論

BCG よりもより強力な新しいリコンビナント BCG ワクチンや DNA ワクチンを作製した。リコンビナント BCG では Antigen 85A, 85B, 85C, MTB51 の gene を PNN2 抗酸菌一大腸菌シャトルベクターを用いて BCG 東京株に導入した。85B gene リコンビナント BCG は結核感染マウスにおける肺の結核菌数の減少効果を示した。一方、DNA ワクチンとして γ -IFN gene、IL-6 関連遺伝子(IL-6 遺伝子+IL-6 レセプター遺伝子+gp130 遺伝子)で結核感染マウスにおける肺・脾・肝の結核菌数の減少を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kawaguchi.T.,Hosoe S.,et al.,Solitary squamous papilloma of the bronchus associated with human papilloma virus type 11,Internal Medicine,38.817-819,1999

Kawaguchi.T.,Hosoe S.,et al., Immunohistochemical analysis of Bcl-2 protein in early squamous cell carcinoma of

the bronchus treated with photodynamic therapy, Brit. J. Cancer, 82:418-423, 2000

2. 学会発表

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

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

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

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

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

K.Ueno, Y.Inoue, S.Hosoe, T.Kawaguchi, M.Kawahara: Basic fibroblast growth factor level in

sera and clinical outcome in patients with lung cancer. Am J Respir Crit Care Med 1999, 159:A202

細江重人、河原正明他、切除不能Ⅲ期非小細胞肺癌に対する塩酸イリノテカンとシスプラチン併用療法後、塩酸イリノテカンと胸部放射線同時併用療法の第Ⅱ相試験、第37回日本癌治療学会.1999

細江重人、安宅真二他、経気管支鏡下針吸引生検 (TBNA) の有効性について、第39回日本呼吸器学会.1999

細江重人、川口知哉他、肺癌における Fas-ligand に対する decoy receptor (DcR3) 遺伝子のゲノム増幅の検討、第40回日本呼吸器学会.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

国立病院・療養所呼吸器ネットワークを利用した
多剤耐性結核の疫学調査と免疫学的解析

分担研究者 森 隆 国立療養所近畿中央病院 病院長

研究要旨

国立療養所近畿中央病院は呼吸器疾患（結核を含む）高度専門医療施設（準ナショナルセンター）として全国国立 54 施設の呼吸器専門病院を束ねて、結核の治療・研究を行っている。

特に多剤耐性結核に有効な治療法はなく医療上のみでなく社会的にも大問題となっている。したがって、国立病院・療養所呼吸器ネットワークを利用して全国の大半の多剤耐性結核の疫学調査を行った。さらに免疫学的解析も行った。

A. 研究目的

多剤耐性結核に有効な治療法はなく医療上のみでなく、社会的にも大問題となっている。

したがって、国立病院・療養所呼吸器ネットワークを利用して多剤耐性の疫学調査を行うことを目的とする。さらにこれを基に互いに共同研究として、多剤耐性結核菌の送付・多剤耐性結核患者リンパ球の送付を行い、免疫学的解析を行うことを目的とする。最終的には多剤耐性結核に有効な新しい治療法や新しいワクチンの開発を目指す。

B. 研究方法

全国の国立病院・療養所呼吸器ネットワークを利用して、多剤耐性結核菌患者についてのアンケート調査を行った。又、国立呼吸器専門施設より多剤耐性患者の結核菌及び、多剤耐性結核菌患者末梢血リンパ球を当国立療養所近畿中央病院に送付しても

らった。

結核菌は小川培地及び MGIT 液体培地で継代した。

PBL は末梢血を Ficoll 遠沈比重法で分離した。

（倫理面への配慮）

坂谷光則班員と同じ倫理委員会を通じて、同様に倫理面の配慮を行った。

C. 研究結果

多剤耐性結核患者リンパ球を反応性細胞とし PPD、PHA-P、又は ConA 刺激し、4～7日間培養し、キラー活性を測定した。キラー活性の一つとして PPD でパルスした自己標的細胞を用いた。

多剤耐性患者 PBL においては γ -IFN 産生の低下が認められ、キラー活性の低下が示唆された。糖尿病患者 PBL でもキラー活性の低下が認められた。

γ -IFN、IL-6、IL-2 の強力なキラー T 細

