

カラムを通し、マクロファージを除去すると IFN- γ 産生がほとんど認められなくなるが、この操作で IFN- γ の主要な産生細胞である NK 細胞の割合は変化しない。また、この IFN- γ 産生が抗 IL-12 および抗 IL-18 抗体により抑制されることから、脾細胞中に存在するマクロファージが IL-12 および IL-18 を産生し、NK 細胞からの IFN- γ 産生を誘導することがわかった。

近年、無脊椎動物の DNA が免疫系を活性化することが明らかにされ、その活性はメチル化されていない CpG モチーフと呼ばれる配列を有するオリゴヌクレオチド(ODN)によることが明らかにされている。BCG 由来の DNA-rich フラクションである MY-1 の免疫賦活作用もこの CpG モチーフを含むパリンドローム配列によることが徳永らによって明らかにされている。しかし、CpG モチーフを含む ODN による免疫担当細胞の活性化の機序については不明な点が多い。Stacey らは、マクロファージが細菌由来の DNA を取り込み、その DNA に存在する CpG モチーフが NF- κ B のシグナルカスケードを活性化することを報告している。また、Ballas らは、CpG モチーフを含む ODN は NK 細胞を直接活性化するのではなく、サイトカインを介して間接的にその細胞傷害性を高めていることを示している。我々が得た結果でも、NK 細胞による IFN- γ 産生誘導にはマクロファージが必要であることから、CpG モチーフを含む ODN による NK 細胞の活性化にはアクセサリ細胞としてマクロファージが必要で、この ODN によるマクロファージの活性化が引き金となって NK 細胞からの IFN- γ 産生が誘導されると考えられる。NK 細胞の活性化あるいは、正常脾細胞からの IFN- γ 産生誘導に必要なサイトカインについて Halpern らは、IL-12 と TNF- α の重要性を示している。一方、Ballas らは IL-12、IFN-

α/β および TNF- α を中和すると NK 細胞の細胞傷害性が抑制されることを報告しており、これらのサイトカインが NK 細胞の活性化に必要なことを示している。また、我々は NK 細胞からの IFN- γ 産生誘導には IL-12 および IL-18 が重要であることを示した。実験条件の違いにより NK 細胞の活性化に要求されるサイトカインが異なるが、IL-12 はいずれの系でも共通してその必要性が示されていることから、このサイトカインが NK 細胞の活性化に最も影響する因子であると考えられる。我々の実験系では MY-1 激後の上清中に IL-18 を検出することができなかった。しかし、IL-18 ノックアウトマウスの脾細胞の IFN- γ 産生がコントロールマウスのそれに比べて著しく低いことから、IL-18 は NK 細胞からの IFN- γ 産生に重要な因子であり、IFN- γ 産生を誘導するためには IL-12 と微量の IL-18 の存在が必要になるのであろうと考えている。

CpG モチーフを含む ODN は、細胞レベルでは B 細胞とマクロファージを直接活性化できる。また、scavenger receptor や Mac-1 が ODN の binding site であることが報告されており、これらの分子が ODN による細胞の活性化に関与する可能性が示されている。さらに現在、種々の DNA ワクチンの有効性が報告されているが、その効果の一部は CpG モチーフを含む ODN の免疫賦活作用によるものと考えられる。CpG モチーフを有する ODN による細胞の活性化のメカニズムは未だに明確ではないが、この点を明らかにし、積極的に応用することが可能になればより有効な DNA ワクチンの開発が可能になると考えられる。このような観点から、早急に CpG モチーフを含む ODN による免疫増強機序を解明しなければならないと考えている。

E. 結論

これまで抗酸菌の分泌する分泌型抗原蛋白遺伝子、 α 抗原蛋白遺伝子をモデルとして選び、リコンビナント BCG α の作製を検討し、その免疫誘導能を明らかにした。今回 MPB74 蛋白遺伝子さらに ESAT6 遺伝子を個々の BCG に発現することができた。リコンビナント BCG α をモルモットに接種すると α 抗原特異的な DTH の誘導が可能となった。これらの発現したリコンビナント BCG に免疫誘導能を解析し、さらにコンビネーションで免疫誘導能が上昇するかどうかを検討する。その結果としてワクチンの構築の改良が必要であるかどうか検討した後 BCG 菌あるいは結核菌をチャレンジとして使った感染防御実験を行えるようにシステムを準備中である。上記の実験観察からモルモット肺内や脾臓内での菌の増殖淘汰の基礎的な成績が多数得られた。これらの成績をもとに、エアロゾル噴霧感染法により結核に対抗するリコンビナント BCG ワクチンの評価ができるようになった。しかし、一部基礎データが不足しているので感染条件や BCG ワクチンの免疫ルート等をさらに検討している。

Strain 2 又は Strain 13 モルモットはリコンビナント BCG の抗結核免疫評価のために有用である。

結核菌群に特異的なプライマー MT-1, MT-2, PT-1, PT-2, MPB64-T2, MPB64-T6, pncA-7, pncA-10, pncA-7, pncA-11C の 5 組のプライマーを用いて PCR を行い、増幅バンドの出現パターンにより *M. tuberculosis* と *M. bovis* の鑑別が可能になった。

抗酸菌感染に対する細胞性免疫応答が宿主防御に貢献しているが、細胞性免疫は病変形成にも関与、すなわち、組織障害を招来し、諸刃の剣である。抗菌化学療法薬である rifampicin は抗菌活性のみならず、宿主のステロイド受容体に結合し、抗炎症作用を発揮する。従って、抗菌化学療法と免疫増強療法による間欠併用

療法は「最大の防御と最小の病変形成」を誘導することができ、難治性抗酸菌感染症の制圧に有望な戦略である。

IL-4 は結核菌感染の進展に何らかの抑制作用をしていることが示唆された。しかしその抑制の程度は、IFN- γ , TNF- α より、ずっと軽かった。

ヒト単球由来 GM-M ϕ は、患者由来 *M. avium* の増殖の場として作用すること、しかし M-M ϕ は増殖抑制活性が強いことが知られた。BCG はその毒力が弱いことと一致して GM-M ϕ でもあまり増殖が認めなかった。GM-M ϕ は、ヒトの肺胞マクロファージに似た形質を示すことより、このマクロファージで、患者由来 *M. avium* の増殖が強いことは、非定型抗酸菌や結核菌がヒトの肺で良く増殖することと関連する可能性が示唆された。HIV の増殖は M-M ϕ で強く GM-M ϕ では抑制されることを既に報告したが、今回の結果より、抗酸菌と HIV のマクロファージでの増殖パターンは逆であることが知られた。

ラット肺胞 M ϕ -NR8383 は、ヒトの肺結核研究の *in vitro* 実験系として適していることが明らかにされた。有毒結核菌が宿主細胞内で生存できることと宿主細胞ファゴソーム膜蛋白質 Rab5 の消失との関連性が示唆された。

結核菌がマクロファージに感染すると抑制性の転写因子 C/EBP β が誘導され HIV の転写が抑制されるが、この反応はインターフェロンのシグナル伝達経路を介し、ISFG-3 の形成と核への移行によると考えられる。単球ではこの反応が起こらず、従って HIV 産生が亢進してしまう可能性が高い。

F. 研究発表

I. 論文発表

1. Tokunaga, T., Yamamoto, T. and

- Yamamoto, S.: How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn. J. Infect. Dis.* 52: 1-11, 1999.
2. Yamamoto, T., Takagi, R., Hattori, E., Takahashi, Y., Inoue, M., Taneichi, M., Kamachi, K., Tokunaga, T. and Yamamoto, S.: CD3- CD64- CD4dim Cells Are Potent Producers of IFN- α in Response to Bacterial DNA and Synthetic Oligodeoxyribonucleotide Having a 5'-ACGT-3' Motif. (submitted to *J. Immunol.*).
 3. Iho, S., Yamamoto, T., Takahashi, T. and Yamamoto, S.: Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequence with internal 5'-CG-3' directly act on human natural killer and activated T cells to induce IFN- γ production in vitro. *J. Immunol.* 163: 3642-3652, 1999.
 4. Fujieda, S., Iho, S., Kimura, Y., Sunaga, H., Ikara, H., Sugimoto, C., Yamamoto, S. and Saito, H.: DNA from *Mycobacterium bovis* BCG (MY-1) inhibits the synthesis of immunoglobulin E by interleukin-4-stimulated human lymphocytes. *Am. J. Respiratory & Crit. Care Med.* 160: 2056-2061, 1999.
 5. Yamamoto, S., Yamamoto, T. and Tokunaga, T.: Oligodeoxyribonucleotides with 5'-ACGT-3' or 5'-TCGA-3' sequence induce production of interferons. *Current Topics Microbiol. Immunol. Immunobiology of Bacterial CpG-DNA* 247:23-39, 1999.
 6. Yamamoto, S., Umemori, K., Nojima, Y., Atsumi, S., Ohishi, K., Takahashi, Y., Inoue, M., Iguchi, Y., Toyoo, S. and Yamamoto, T.: Immunoadjuvant effect of oligodeoxy-nucleotides. *Proc. 34th Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, US-Japan Cooperative Medical Science Program*, 34: 282, 1999.
 7. 藤枝重治、斎藤等、伊保澄子、山本三郎 結菌 DNA および合成短鎖 DNA による IgE 産生抑制の試み. *日鼻誌* 38 : 84-90, 1999.
 8. Yamamoto, S., Yamamoto, T. and Tokunaga, T.: The discovery of immunostimulatory DNA sequence. *Springer Seminors in Immunopathology : Immunostimulatory DNA Sequences* (in press).
 9. Yamamoto, S., Yamamoto, T., Iho, S. and Tokunaga, T.: Activation of NK cell (human and mouse) by immunostimulatory DNA sequence. *Springer Seminors in Immunopathology : Immunostimulatory DNA Sequences* (in press).
 10. 山本十糸子、Phalen, S., 内田和幸、梅森清子、野島康弘、堀内善信、後藤義孝、McMurray, D.N., 山本三郎: BCG Tokyo 172 株の抗結核効果: 結核菌噴霧感染によるモルモット肺結核実験モデルを用いた防御効果の検討. *結核* 75: 2000 (in press)

11. Kasama, T., J. Yamazaki, R. Hanaoka, Y. Miwa, Y. Hatano, K. Kobayashi, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 1999. Biphasic regulation of the development of murine type II collagen-induced arthritis by interleukin-12. Possible involvement of endogenous interleukin-10 and tumor necrosis factor α . *Arthritis Rheum.* 42: 100-109.
12. Iwabuchi, H., T. Kasama, R. Hanaoka, Y. Miwa, Y. Hatano, K. Kobayashi, Y. Mori, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 1999. Downregulation of intercellular adhesion molecule-1 expression on human synovial fibroblasts by endothelin-1. *J. Rheumatol.* 26: 522-531.
13. Takizawa, H., T. Ohtoshi, S. Kawasaki, T. Kohyama, M. Desaki, T. Kasama, K. Kobayashi, K. Nakahara, K. Yamamoto, K. Matsushima, and S. Kudoh. 1999. Diesel exhaust particles induce NF- κ B activation in human bronchial epithelial cells in vitro. Importance in cytokine transcription. *J. Immunol.* 162: 4705-4711.
14. Hatano, Y., T. Kasama, H. Iwabuchi, R. Hanaoka, H.T. Takeuchi, L. Jing, Y. Mori, K. Kobayashi, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 1999. Macrophage inflammation protein 1 alpha expression by synovial fluid neutrophils in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 58: 297-302.
15. Kai, M., M. Matsuoka, N. Nakata, S. Maeda, M.-i. Gidoh, Y. Maeda, K. Hashimoto, K. Kobayashi, and Y. Kashiwabara. 1999. Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 177: 231-235.
16. 斎藤 肇、村上和保、小林和夫、儀同政一、日高隆義、權 赫們. 1999. 実験的 *Mycobacterium avium* complex 感染に対する化学的予防. *結核* 74: 677-681.
17. Wang, L., S. Izumi, H. He, N. Fujiwara, N. Saita, I. Yano, K. Kobayashi, and N. Tatsumi. 1999. Serodiagnosis of Hansen's disease/leprosy by enzyme-linked immunosorbent assay using cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) as an antigen. *Jpn. J. Lepr.* 68: 165-174.
18. 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.
19. I. Sugawara: IL-18 and infectious diseases, with Special emphasis on diseases induced By intracellular pathogens. *Microbes and Infection*, 2000 (in press).
20. G. 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).

21. Koh Nakata, Michael Weiden, Timothy Harkin, David Ho, and William N. Rom. Low copy number and limited variability of proviral DNA in alveolar macrophages from HIV-1 infected patients: *Molecular Medicine*, 1(7),744-757, 1995.
 22. Koh Nakata, William N. Rom, Yoshihiro Honda, Rany Condos, Shiro Kanegasaki, Yunchen Cao, and Michael Weiden. Mycobacterium tuberculosis enhances human immunodeficiency virus-1 replication in the lung; *Am J Respir Crit Care Med* 155:996-1003, 1997.
 23. Yoshihiro Honda, Linda Rogers, Koh Nakata, Ben-Yang Zhao, Richard Pine, William N. Rom, and Michael Weiden. Type 1 interferon induces inhibitory 16-kD CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP)b, Repressing the HIV-1 long terminal repeat in macrophages: Pulmonary tuberculosis alters C/EBP expression, enhancing HIV-1 replication. *J. Exp. Med.*, vol.188, 1255-1265, 1998.
 24. Nakanaga K., Maeda S., Myojin Y., Xu D. L. and Goto Y. Sequence analysis and expression of Nramp-1 gene in Bcgr and Bcgs mice. *J.Vet.Med.Sci.* 61(6):717 - 720, 1999.
 25. Izu K., Yoshida S., Miyamoto H., Chang B., Ogawa M., Yamamoto H., Goto Y. and Taniguchi H. Grouping of 20 reference strains of *Legionella* species by the growth ability within mouse and guinea pig macrophages. *FEMS Immunol.Microbiol.* 26: 61-68, 1999.
 26. 岩切章、瀬戸山定三、斎藤宏、年増美保、後藤義孝、新城敏晴 南九州における豚抗酸菌症の原因菌。 *日本獣医師会雑誌*, 52 : 663-666, 1999.
 27. Yang,J., & Mitsuyama, M. An essential role for endogenous interferon- γ in the generation of protective T cells against Mycobacterium bovis BCG in mice. *Immunology*, 91:529-535, 1997.
 28. Yang, J., Kawamura,I.,& Mitsuyama, M. Requirement of the initial production of gamma interferon in the generation of protective immunity of mice against *Listeria monocytogenes*. *Infect.Immun.*, 65:72-77, 1997.
 29. Nishibori, T., Xiong, H., Kawamura, I., Arakawa, M., & Mitsuyama, M. Induction of cytokine gene expression by listeriolysin O and roles of macrophages and NK cells. *Infect.Immun.* 64:3188-3195, 1996.
- II. 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総会、1999 年 5 月、東京都。
 2. 山本三郎、山本十糸子、梅森清子 : 抗 HIV

- リコンビナント BCG ワクチンの安全性・安定性。第 74 回日本結核病学会総会、1999 年 3 月、宇都宮市。
3. Yamamoto, S., Umemori K., Nojima, Y., Atsumi, S., Ohishi, K., Takahashi, Y., Inoue, M., Iguchi, Y., Toyoo, S. and Yamamoto, T.: Immunoadjuvant effect of oligodeoxynucleotides. Thirty-fourth Tuberculosis-Leprosy Research Conferenc of U.S.-Japan Cooperative Medical Science, June 1999, San Francisco
 4. 山本三郎: 免疫増強性 DNA。第 8 回臨床免疫学生物学研究会、1999 年 7 月、神戸市。
 5. Saburo Yamamoto: Immunostimulatory DNA from BCG augments host defense mechanisms via induction of interferons. 1st International Workshop on Immunobiology of Bacterial CpG-DNA, September 1999, Schloss Elmau, Germany
 6. 山本三郎、山本十糸子、David N. McMurray: モルモットに対する結核菌噴霧感染に及ぼす BCG ワクチンの効果。第 3 回日本ワクチン学会、1999 年 11 月、名古屋市
 7. 山本十糸子、梅森清子、野島康弘、佐藤由紀夫、松尾和浩、野間口博子、山本三郎: 免疫増強性オリゴ DNA 配列の結核菌噴霧感染モデル系でのワクチン効果。第 29 回日本免疫学会学術集会、1999 年 12 月、京都市
 8. 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- γ 産生誘導活性を示す細菌 DNA の塩基配列 (2)。第 29 回日本免疫学会学術集会、1999 年 12 月、京都市
 9. Saburo Yamamoto: Safety issue of rBCG. International Workshop on Research and Development of Recombinant BCG-Based HIV Vaccine. November 1999, Tokyo, Japan
 10. 小林和夫、笠原慶太、吉田 彪. 1999. In vitro 肉芽腫炎症モデルの開発とその制御機序 (要望課題) 結核、74: 264、1999. 第 74 回日本結核病学会総会 (宇都宮、4 月) .
 11. 笠原慶太、足立 満、小林和夫. 1999. 好中球の結核菌体成分刺激によるケモカイン産生 (要望課題) 結核、74: 264、1999. 第 74 回日本結核病学会総会 (宇都宮、4 月) .
 12. 樋口一恵、原田登之、関谷幸江、中村玲子、小林和夫. 1999. 結核菌体蛋白のマウス肺胞マクロファ-ジに対するサイトカイン産生誘導の解析. 結核、74: 292、1999. 第 74 回日本結核病学会総会 (宇都宮、4 月) .
 13. 原田登之、樋口一恵、関谷幸江、中村玲子、小林和夫. 1999. マウス肺胞マクロファ-ジに対してサイトカイン産生誘導を行う結核菌体蛋白の解析. 結核、74: 293、1999. 第 74 回日本結核病学会総会 (宇都宮、4 月) .

14. 松岡正典、前田伸司、甲斐雅規、中田 登、小林和夫、柏原嘉子、和泉眞藏、Gue-Tae Chae、Thomas P. Gillis. 1999. らい菌 rpoT 遺伝子の多型性とその地理的分布. 日本ハンセン病誌、68 : 51、1999. 第 72 回日本ハンセン病学会総会（東京、4 月）.
15. 笠間 毅、井出宏嗣、小林和夫. 1999. Interleukin-12 によるマウスコラ-ゲン誘導関節炎の制御：免疫応答およびサイトカイン動態の解析を中心として（ワ-クショ-ップ）. 日本炎症学会プログラム予稿集 89、1999. 第 20 回日本炎症学会総会（仙台、7 月）.
16. 樋口一恵、原田登之、小林和夫. 1999. マクロファ-ジの IL-12 産生を高値に誘導する結核菌体成分の解析 II. 日本免疫学会・学術集会記録、29 : 243、1999. 第 29 回日本免疫学会総会・学術総会（京都、12 月）.
17. 木村博昭、虎谷 聡、松岡正典、小林和夫、福富康夫. 1999. マクロファ-ジにおける抗らい菌活性発現に関わる分子の解析. 日本免疫学会・学術集会記録、29 : 244、1999. 第 29 回日本免疫学会総会・学術総会（京都、12 月）.
18. Koh Nakata, Michael Weiden, Timoty Harkin, David Ho, and William N. Rom. Striking synergy in HIV replication with tuberculosis co-infection, poster discussion, International conference of Americal Thoracic Society, Seatle Am. Rev. Resp. Dis. 152,:A796,1995.
19. Koh Nakata, Michael Weiden, Timoty Harkin, David Ho, and William N. Rom. Low copy number and limited variability of proviral DNA in alveolar macrophages from HIV-1 infected patients:, poster presentation, Keystone Meeting, Colorado, 1995.
20. Koh Nakata, Michael Weiden, Yoshihiro Honda, and William N. Rom. M. tuberculosis co-infection augments the production of T lymphocyte tropic HIV-1 but suppresses production of macrophage tropic HIV-1 in peripheral blood mononuclear cells. International conference of American Thoracic Society, San Francisco, Am. Rev. Resp. Dis. 155, :A22,1997.
21. Yoshihiro Honda, Koh Nakata, Michael Weiden, and William N. Rom. Tuberculosis and promoter regulation of HIV-1 long terminal repeat by NF-IL6 in vitro and vivo, poster presentation International conference of American Thoracic Society, San Francisco, Am. Rev. Resp. Dis. 155, :A337,1997
22. Koh Nakata, William N. Rom, Yoshihiro Honda, Rany Condos, Shiro Kanegasaki, and Michael Weiden. Mycobacterium tuberculosis enhances human immunodeficiency virus-1 replication in the lung. Thirty -second U.S.-Japan cooperative medical science program :Tuberculosis-leprosy research conference, Cleveland, Ohio, July 21-23, 1997.

23. Koh Nakata, Yoshihiro Honda, William N. Rom, and Michael Weiden. Transcriptional Regulation of HIV-1 in Macrophages coinfecting with M.tuberculosis. Thirty-third U.S.-Japan cooperative medical science program :Tuberculosis-leprosy research conference, Osaka, July 8-10, 1998.
24. Koh Nakata, Yoshihiro Honda, William N. Rom, and Michael Weiden. Transcriptional Regulation of HIV-1 in Macrophages coinfecting with M.tuberculosis. Thirty-fourth U.S.-Japan cooperative medical science program :Tuberculosis-leprosy research conference, San Francisco, June 27-30, 1999.
25. Koh Nakata. Molecular mechanisms in mycobacteria-HIV interaction in macrophages. 5th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Chennai, India, January 7-9, 2000.
26. 許徳龍、後藤義孝、新城敏晴 Nrap-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。第 72 回日本細菌学会総会、平成 11 年 3 月、東京。
27. 前淵恭子、岩切章、後藤義孝、新城敏晴 豚の Mycobacterium avium 感染症に対する Nrap-1 遺伝子の影響。第 72 回日本細菌学会総会、平成 11 年 3 月、東京。
28. 岩切章、長友亜樹子、前淵恭子、許徳龍、後藤義孝、新城敏晴 豚抗酸菌症(野外例)における免疫応答。第 127 回日本獣医学会、平成 11 年 4 月、相模原市、神奈川。
29. 岩切章、玉得良信、後藤義孝、新城敏晴 南九州地区における豚から分離される抗酸菌。平成 11 年度日本獣医公衆衛生学会、平成 12 年 2 月、静岡。
30. 後藤義孝 抗酸菌に対する宿主の感受性『細胞内寄生細菌に対する生体応答』。第 73 回日本ハンセン病学会総会、平成 12 年 3 月 9~11 日、鹿屋市、鹿児島。
31. Goto Y. and Xu D.L. Cytokine profiles of resistant and susceptible mice infected with avian or mammalian type of mycobacteria. In "International Workshop on the potential application of recombinant cytokine and DNA vaccines for the control of infectious diseases of domestic animals." International veterinary cytokine and vaccine conference. March 16th-17th, 2000, Tsukuba, Ibaraki.
32. Akagawa K.S.: Functional heterogeneity of human monocyte-derived macrophages. VIIIth International Symposium on the Molecular Cell Biology of Macrophages '99, Tokyo, 1999, June
33. 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 74 回日本結核病学会、1999 年 4 月、宇都宮市

34. 赤川清子、山崎利雄、芳賀伸治：ヒト単球由来マクロファージの BCG 及び *Mycobacterium avium* 感染感受性、第 75 回日本結核病学会(発表予定、2000 年 4 月)
35. 芳賀伸治、山崎剛、山崎利雄：結核感作近交系モルモット Strain 2 又は Strain 13 における分泌蛋白 MPB64、MPB70 の皮膚 DTH 反応。第 75 回日本結核病学会総会、2000 年 4 月、大阪。
36. 本多三男、松尾和浩、仲宗根正、吉野直人、海津雅彦、大洲竹晃、浜野隆一、長縄聰、滝沢万里、川原守、原敬志、芳賀伸治、山本三郎、山崎修道 「リコンビナント BCG のワクチン開発の試み」第 69 回実験結核研究会 99.04.14 宇都宮市 栃木県総合文化センター

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）
分担研究報告書

結核症及び非結核性抗酸菌症における生体防御機構の解明とその予防・診断・治療への応用

山本三郎 国立感染症研究所細菌血液製剤部細菌製剤第一室長

研究要旨

結核菌噴霧感染によるモルモット肺結核実験モデルを用いて BCG Tokyo 172 株の結核菌感染に対する防御効果を検討した。モルモット 1 匹当たり 10^3 CFU の凍結乾燥あるいは冷凍 Tokyo 172 株を皮内接種し、8 週後に噴霧装置内でモルモットに平均 10CFU の人型結核菌 H37Rv 株を気道感染させた。対照亜株として凍結乾燥 Copenhagen 1331 株を用いた。感染 5 週後に、すべての動物を安楽死させ結核菌回収ならびに組織所見観察のために脾、肺および肝を摘出した。冷凍 Tokyo 172 株、凍結乾燥 Tokyo 172 株、凍結乾燥 Copenhagen 1331 株および偽薬を接種されたモルモットの右肺下葉からはそれぞれ \log_{10} 4.72、4.23、4.35、および 5.76CFU の結核菌が回収された。脾からはそれぞれ 2.11、1.51、1.37 および 5.90CFU であった。肺および脾から回収された菌数は BCG 免疫群と非免疫群との間で有意な差が認められたが BCG ワクチン接種群の間で有意差は認められなかった。BCG 免疫群モルモットの肺は小型の肉芽腫結節を形成していたが、脾では肉芽腫結節形成は認められなかった。非免疫群モルモットの肺ならびに脾は中心性の凝固壊死を伴う大型の肉芽腫結節を形成していた。これらの病理組織所見は臓器内結核菌数とよく一致した結果を示した。すなわち、BCG Tokyo 172 株は、BCG Copenhagen 1331 株と同等の人型結核菌に対する防御能を誘導することが結核菌の噴霧感染によるモルモット肺結核実験系により示された。またこれらの成績から今回使用したモルモット肺結核実験系は肺結核ワクチンの有効性を評価するために非常に信頼できる実験系であることが確認された。

A. 研究目的

現在世界の結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）感染者の総数は 20 億人を超え、結核発病者は年間 800 万人、死亡者は 300 万人で、感染症のなかで結核は最大の死亡原因となっている。また近年増加している HIV 感染者の結核感染は直ちに結核発病につながる率が非常に高く「エイズと結核の共感染」は重大な脅威となっている。更に最近不適切な化学療法に由る多剤耐性結核菌の出現が治療を困難にしている。このような事態に対し、WHO は 1993 年に緊急事態宣言を発した。この世界的

規模の非常事態を克服するために、結核に対する唯一のワクチンとして用いられてきた生菌ワクチン BCG（Bacille Calmette - Guérin）に加え、より安全で効果的なワクチン—BCG の改良、弱毒人型結核菌ワクチン、栄養要求変異株ワクチン、死菌ワクチン、サブユニットワクチン、DNA ワクチン等—の開発が期待されている。

BCG は 1921 年から液体生菌ワクチンとして用いられはじめ、1950 年頃から凍結乾燥菌ワクチンとして用いられている。我国は、1924 年に Calmette から分与された BCG 菌株を原

法に従って忠実に継代し、1961年にワクチン株としてBCG Tokyo 172株をシードロットに採用した。BCGのシードロットとしては他にLondon 1077株（Glaxo株、最近ではPasteur-Merieux株と呼称されている）、Copenhagen 1331株、Pasteur 1173P2株等がある。BCGワクチンは最も安全性の高いワクチンのひとつと考えられているが、これらの中でも、Tokyo 172株は新生児化膿性リンパ節炎等の副作用が少なく、更に我国では経皮法で接種されるので局所の潰瘍、膿瘍等の副作用の頻度は著しく低い。BCGワクチンの結核予防効果に関しては極めて有効から無効まで幅広い報告があるが現在はColditzらの「結核性髄膜炎や粟粒結核などの重症結核には高い有効性を認め、肺結核は50%発病率が低くなる」という結論が世界のBCG評価のコンセンサスとなっている。

BCGワクチンの結核予防効果の差異の原因のひとつとして、BCGワクチン亜株の有効性の違いが考えられた。ヒト野外実験でのワクチン株の種類と防御効果に関する直接的なデータはないので、ケースコントロール実験の結果を再解析し、その相関関係を評価しようとする試みがなされたが、明確な結果は得られなかった⁴⁾。しかしながらBCG Tokyo 172株はより弱毒化されており⁵⁾またComstock¹¹⁾により限定的ながらBCG Tokyo 172株は、Pasteur 1173P2株やCopenhagen 1331株よりも有効であることが示唆され国内のみならず海外でも多く使用されている。動物実験による評価も様々に試みられたが、それぞれの動物実験の方法（使用動物、ワクチネーションスケジュール、感染菌株、感染菌量、感染経路、防御効果判定法等）が異り、相互に正確な比較をすることが困難であった⁴⁾。

近年Lagranderieらにより、5種類のBCG亜株をマウスに免疫し、その後の残存BCG菌数、

チャレンジした組み換え型BCG（rBCG）の定着阻止能、遅延型アレルギー反応（DTH）、サイトカイン産生能、細胞傷害性T細胞（CTL）活性および抗体産生能を比較しTokyo 172株は免疫原性が低いという成績が報告された。その後この成績に対する評価は行われていないにもかかわらず、この成績から直ちにTokyo 172株のヒトに対する結核予防効果が低いのような誤解を生じている場合もあるので、今回著者らはモルモットにワクチン接種後、低菌量の強毒結核菌を噴霧感染させ、惹起された肺結核の程度でワクチンの有効性を評価する実験系を用いてBCG Tokyo 172株の抗結核防御効果を検討したので報告する。

B. 研究方法

動物：SPFのハートレイ系モルモット（200～250g、雌雄は問わず）はCharles River Laboratories Inc. (Wilmington, MA, U.S.A.)より購入した。モルモットは随時市販のモルモット用飼料（Ralston Purina Inc., St. Louis, MO）と水を摂取できるポリカーボネイト製飼育箱に1匹ずつ入れて、気温、湿度および明暗を一定に保持し、空気濾過のできる動物飼育室で飼育した。免疫：BCG Tokyo 172株は凍結乾燥標品（日本ビーシージー製造、東京）及び培養直後に-80℃で保存した冷凍標品を用いた。対照のBCG亜株としてテキサスA&M大学の結核ワクチン前臨床試験の標準株であるCopenhagen 1331株（凍結乾燥品、Statens SerumInstitut, Copenhagen, Denmark）を用いた。いずれのBCGも使用直前に生理的食塩水で希釈して生菌数を 10^4 CFU/mlに調整した。モルモットを無作為に振り分け5匹を1群とし、BCG懸濁液0.1mlを皮内接種した。対照群には生理的食塩水0.1mlを皮内注射した。ツベルクリン反応：BCG免疫8週後にモルモット腹部の毛を除去し、ツベルクリン

PPD (Connaught Laboratories, Toronto, Canada) 250 TU を皮内注射した。24 時間後に硬結をキャリパスを用いて測定した。結核菌噴霧感染: *M. tuberculosis* H37R v (ATCC27294) 株は、0.05% Tween80 を含む Dubos broth (Difco, Detroit, MI, U.S.A.) で 8 ~ 10 日間培養増殖後集菌し、single cell suspension とした後 1ml づつ分注し、-80℃ で保存した。噴霧感染直前に冷凍菌液を融解し使用した。*M. tuberculosis* H37R v 株の生菌数は Middlebrook 7H10 寒天平板 (Hardy Diagnostics, Santa Monica, CA) で培養することにより確認した。ツベルクリン反応測定の翌日、噴霧装置内でモルモットに *M. tuberculosis* H37R v を噴霧し肺胞内に 5 ~ 10CFU を感染させた。噴霧は生物学的封じ込めレベル(BSL)3 の動物実験室で行い、感染後のモルモットは、随時飼料と水を摂取できるステンレス製飼育箱に 1 匹づつ入れ感染防止カバーで覆い BSL3 動物飼育室で飼育した。

臓器摘出: 感染 5 週後にモルモットに 100mg/kg の sodium pentobarbital を腹腔注射し安楽死させ脾臓と右肺下葉を無菌的に摘出して *M. tuberculosis* H37R v の臓器内生菌数測定に使用した。脾臓の一部分、左肺下葉ならびに肝臓は摘出後ホルマリン固定し病理組織学的観察に付した。*M. tuberculosis* H37R v の臓器内生菌数測定: 無菌的に摘出した右肺下葉および脾臓を 4.5ml の無菌生理的食塩水中に浸し、ホモジナイザーで均質化した後生理的食塩水で希釈し、各々 0.1ml を Middlebrook 7H10 寒天平板に接種した。寒天平板を培養缶に入れ 37℃ で培養し 3 週後にコロニー数を計測した。統計解析: ツベルクリン反応による硬結、ならびに結核菌感染後の体重変化の計測値は分散分析法により解析した。肺および脾臓の結核菌生菌数計測値は、対数変換した後、分散分析法により解析した。また脾

臓の生菌数については、必要に応じ下側 1.65 での打ち切り標本として分散および平均値を最尤法により推定した。結果の有意性判定は危険率 5% の水準で行った。病理組織学的検索: 10%ホルマリン液で固定した肺、肝、および脾臓は、肉眼的に結核結節の有無を観察した後、定法に従い各々パラフィン包埋し、2μm 切片とした。切片にヘマトキシリン・エオジン染色、チール・ネルゼン染色を施し、病理組織学的に検索した。

C. 研究結果

ツベルクリン反応: BCG Copenhagen 1331 株、BCG Tokyo 172 株 (凍結乾燥標品および冷凍標品) で免疫したモルモットは、ツベルクリン PPD によりほぼ同程度に陽性の遅延型アレルギー反応 (DTH) を示した。対照群は DTH 陰性であった。

M. tuberculosis H37R v 感染後の体重変化: 各 BCG 免疫群ならびに対照群のモルモットの *M. tuberculosis* 感染後の体重の変化は、いずれの群でも体重増加がみられ、ワクチン群間にも、またワクチン群と対照群の間にも有意な差は認められなかった。

M. tuberculosis H37R v 臓器内生菌数測定: 右肺下葉ならびに脾臓から回収された菌数と統計学的評価の結果、肺内生菌数はいずれのワクチン群でも非免疫対照群に比べ有意な減少が見られた。また脾臓の生菌数についてはワクチンの効果は著明で、対照群に比べて概ね 10^4 の減少が見られた。統計学的な評価の結果、肺、脾臓いずれも免疫群と対照群の間には有意な違いが認められたが、用いたワクチン間に有意な効果の違いは認められなかった。

病理学的検索結果: 固定後の肺、肝、脾の肉眼所見および病理組織学的検索の結果、肉眼的に肺の白色結節病変が観察された。一方、対照群の全例において脾に明瞭な結節病変が観察

されたのに対し、BCG 免疫群では、脾に肉眼的異常がみられるものは極めて希であった。病理組織学的結果は、それぞれの病変をスコア化して評価した。すなわち、組織球系細胞（肺胞マクロファージ、脾洞の組織球系細胞、肝のクッパー星細胞等）の増数はあるが肉芽腫形成の認められないもの(−)、小型の肉芽腫を少数認めるもの(+)、大小の肉芽腫を多数認めるもの(++)、および大小の肉芽腫を多数みとめ肉芽腫中心部に凝固壊死（乾酪壊死）を伴うもの(+++)に分類して記載した。対照群と BCG 免疫群の相違は脾で極めて顕著であった。対照群のモルモット全例で、脾に中心性の凝固壊死部を有する大型肉芽腫結節が多数形成されていたのに対し、BCG 免疫群では、脾に肉芽腫結節が形成されている例は極めて希であった。肺については、全群・全症例で種々の程度で肉芽腫結節の形成が確認されたが、対照群において、特に大型で凝固壊死を伴った肉芽腫結節が形成される傾向が明らかであった。なお、BCG Tokyo 172 株の凍結乾燥標品および冷凍標品、BCG Copenhagen 1331 株で免疫されたモルモットでは、各群の肺、肝、脾の病変はほぼ同程度であり、病理組織学的相違を明確にすることは困難であった。

D. 考察

ヒト肺結核の実験モデル動物としては現在モルモット、マウス、ウサギ等が用いられている。モルモットは *M. tuberculosis* に感受性で特に炎症性刺激に対する肺の反応はヒトに非常に類似しており、加えて急性ならびに慢性の炎症メディエーターに対する皮膚反応もヒトに非常に類似している。Calmette と Guérin による BCG の前臨床試験はモルモットを用いて行われ、また Koch の結核菌感染モルモットに結核菌を皮内注射することにより惹起される DTH (Koch 現象) の観察はツベルクリンの力

価試験にモルモットが使用される基礎となった。

マウスは本来低菌量結核菌感染に対して低感受性で *M. tuberculosis* に対する抵抗性がヒトと異なり、ヒト肺結核の動物モデルとして適当ではない。しかし安価に入手できバイオハザードの点も含めて取扱いが容易である。更に現在では多種類の近交系マウスならびに特定遺伝子が欠落した近交系マウスが存在し、多種類のサイトカインならびにそれらに対する抗体、細胞表面抗原マーカーに対する抗体が市販され容易に入手できる。そのため、近年マウスを用いて結核の感染防御機構が精力的に研究されている。

それに対し、モルモットのサイトカインならびにそれに対する抗体、細胞表面抗原マーカーに対する抗体等が非常に少く入手困難であることが、モルモットを用いる感染防御機構の研究を困難にしている。更に近交系モルモットが非常に少数で、入手が容易でないことが、結核に対する免疫学的・遺伝学的な研究に支障をきたしている。

ウサギは *M. bovis* には感受性が非常に高いが *M. tuberculosis* に対する感受性は低い。しかしながら、*M. tuberculosis* の感染病巣に空洞を形成するので病理組織学的研究には有用である。研究の目的により使用する動物種を選択することが必要である。

M. tuberculosis の実験的感染経路として静脈内、腹腔内、気道等がある。気道感染は定量的感染技術とバイオハザード阻止の点で困難さがあるが、1950 年代に入りヒトの結核菌感染経路に近似の噴霧感染系を作成する試みがなされた。Smith の研究グループは長年にわたる基礎的な研究により低菌量 (5~10CFU) の結核菌をモルモットに噴霧感染し肺結核を惹起する実験系を確立し、その実験系を用いて、結核菌感染初期の病像の研究、BCG 等のワク

チン効果の研究等を推進した。

抗結核ワクチン効果を正確に評価するためには、動物実験に際しヒトに使用される予防接種の条件およびヒトの結核感染条件に近似の条件を用いることが必要である。Wiegshauss と Smith²¹⁾ はワクチン効果評価のための動物実験では 1.ワクチン量は防御効果を期待できる最低量であること、2.非特異的な抵抗性を排除するためにワクチン投与後 6 週以降に有毒結核菌でチャレンジすること、3.チャレンジは気道感染によること、4.チャレンジ量は動物に感染惹起可能な最低菌量(マウスおよびモルモット 1 匹あたり 5~10 CFU が妥当である)で行うこと、5.予備試験によりチャレンジ後ワクチン効果が最大に示される期間を求めておき、その期間内の早期に動物を安楽死させてワクチン効果を評価する等が必須であると報告した。その条件下で Smith らは 10 種類の BCG 亜株をヒトに投与する 1/600 量でモルモットを免疫しその抗結核効果を評価した。その結果、試作段階の 1 株以外の 9 株は効果に若干の差異はあるが、有効な抗結核効果を示した。使用 BCG 亜株はすべて匿名で記載されているが、論文の内容から有効な 9 株の中には Tokyo 172 株と Copenhagen 1331 株が入っていると推定される。今回我々は彼等とほぼ同様な方法で Tokyo 172 株の抗結核効果を検討し、Tokyo 172 株は凍結乾燥標品も冷凍標品も Copenhagen 1331 株と同等の防御効果を示す結果を得た。

Lagranderie らは BALB/c マウスを用いて BCG Pasteur 1173P2 株、Glaxo 1077 株、Russian 株、Prague 株および Tokyo 172 株の免疫原性を 1.BCG 各株(10^6 CFU)を静脈注射し脾臓内での増殖、2.BCG 各株(10^6 CFU)を静脈投与で免疫後、rBCG(10^6 CFU)を静脈注射でチャレンジし、rBCG に対する防御能、3.BCG 各株(10^9 CFU)を皮下投与で免疫後リンパ節細胞

を採取し PPD で刺激してその細胞の BCG 感染肺胞マクロファージに対する CTL 活性、4.BCG 各株を静脈投与 (2×10^7 CFU, 2 回)あるいは経口投与(5×10^9 CFU)で免疫した後の抗 PPD 抗体産生能、5.BCG 各株(10^9 CFU)を皮下投与で免疫後リンパ節細胞の PPD 刺激による増殖能、6.BCG 各株(10^9 CFU)を皮下投与で免疫後、リンパ節細胞の PPD あるいは ConA 刺激による IFN- γ と IL-2 産生能、7.BCG 各株を静脈投与(10^7 CFU)、皮下投与(10^9 CFU)および経口投与 (5×10^9 CFU)で免疫した後、PPD 特異的 DTH 等を比較検討した。その結果 BCG5 株の間で免疫原性に差があることを報告した。その中でも Tokyo 172 株はいくつかの点(上記 1,2,3,4&7)で低い成績を示した。Pasteur 1173P2 株は静脈注射により投与された後脾臓で増殖し、その後も脾臓中によく残存しているが、Tokyo 172 株は増殖することなく漸次減少している。12 週後の残存菌数は、Pasteur 1173P2 株 10^6 CFU に対し Tokyo 172 株は 10^3 CFU であった。BCG は生菌ワクチンであり、投与後も残存することがワクチン効果に必須であるが効果を発揮するためにはどの位の菌数が必要であるかについては、明確でない。Lagranderie らが 10^2 CFU と 10^5 CFU の Pasteur 1173P2 株をモルモットに皮内投与で免疫し 5~7CFU の *M. tuberculosis* H37Rv でチャレンジした結果では 10^2 CFU 投与も 10^5 CFU 投与もほぼ同等のワクチン効果を示している。

Teulieres らはヒト 1 才未満児に Pasteur 1173P2 株を皮内投与した際に、0.05mg (2.5×10^5 CFU 相当)群では 5.5%に、その半量の 0.025mg (1.2×10^5 CFU 相当)では 0.7%に化膿性リンパ節炎を認め、またツベルクリン反応で評価する限り両者のワクチン効果に差はなかったと報告している。これらの報告は、BCG 菌量が多ければワクチン効果が大きくなる訳

ではなく、かえって副作用を惹起することを明示している。Lagranderie らにより示された Pasteur 1173P2 株等が投与後 8~80 倍増殖することがワクチン効果と副作用の両面にいかに作用するのか興味深い。マウスに 10^6 CFU 以上の BCG を投与する実験系で得られた結果が、ヒトに対するワクチン効果評価の基礎データになり得るかは疑問の残るところである。近年 BCG に勝る抗結核ワクチン開発をめざして、多くの rBCG、栄養要求変異結核菌株ワクチン、弱毒人型結核菌株ワクチン、死菌ワクチン、コンポーネントワクチン、DNA ワクチン等が作製され動物実験での評価が報告されている^{4,24-29)}。ワクチン投与法は皮内注射、皮下注射の他に筋肉注射、粘膜免疫等が工夫され、ワクチン効果を *in vitro* 系で予備的に評価する試みもなされている。

今回採用したモルモットにワクチン投与後低菌量の強毒結核菌を噴霧感染させ、惹起された肺結核症の程度で評価する実験系は現時点で実施可能なヒト肺結核に対するワクチン評価系として最も信頼されている。本研究でも病理組織所見は臓器内菌数をよく反映し、またこれらの結果はヒトの結核に対する BCG の「肺結核は 50% 発病率が低くなり血行性の結核性髄膜炎や粟粒結核などの重症結核には高い有効性を認める」という評価とよく一致し実験系の信頼性が確認された。しかしながら実験者自身が安全に強毒結核菌を動物に噴霧感染させ、感染した動物を飼育するためにはかなり大規模な BSL3 の動物実験室ならびに動物飼育室が必須である。今回の噴霧感染実験は設備の整った米国 Texas A&M 大学で行ったが、我国でもすでに結核予防会結核研究所はその施設を有し、国立感染症研究所等も徐々に整備されているので、将来的には国内で実施可能である。ヒト結核感染経路に近似の噴霧感染系を用いて多くの新たな抗結核ワクチン候補の評価が

国内で実施され、現在の BCG よりも有効なワクチンが開発されることを願う。

E. 結論

結核菌噴霧感染によるモルモット肺結核実験モデルを用いて BCG の結核菌感染に対する防御効果を検討した。モルモット 1 匹当たり 10^3 CFU の Tokyo 172 株を皮内接種し、8 週後に噴霧装置内でモルモットに平均 10CFU の人型結核菌 H37Rv 株を気道感染させた。対照亜株として凍結乾燥 Copenhagen 1331 株を用いた。感染 5 週後に、すべての動物を安楽死させ結核菌回収ならびに組織所見観察のために脾、肺および肝を摘出した。肺および脾から回収された菌数は BCG 免疫群と非免疫群との間で有意な差が認められたが BCG ワクチン接種群の間で有意差は認められなかった。BCG 免疫群モルモットの肺は小型の肉芽腫結節を形成していたが、脾では肉芽腫結節形成は認められなかった。非免疫群モルモットの肺ならびに脾は中心性の凝固壊死を伴う大型の肉芽腫結節を形成していた。これらの病理組織所見は臓器内結核菌数とよく一致した結果を示した。今回使用したモルモット肺結核実験系は肺結核ワクチンの有効性を評価するために非常に信頼できる実験系であることが確認された。

F. 研究発表

I. 論文発表

1. Tokunaga, T., Yamamoto, T. and Yamamoto, S.: How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn. J. Infect. Dis.* 52: 1-11, 1999.
2. Yamamoto, T., Takagi, R., Hattori, E., Takahashi, Y., Inoue, M., Taneichi, M., Kamachi, K., Tokunaga, T. and

- Yamamoto, S.: CD3- CD64- CD4dim Cells Are Potent Producers of IFN- α in Response to Bacterial DNA and Synthetic Oligodeoxyribonucleotide Having a 5'-ACGT-3' Motif. (submitted to J. Immunol.).
3. Iho, S., Yamamoto, T., Takahashi, T. and Yamamoto, S.: Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequence with internal 5'-CG-3' directly act on human natural killer and activated T cells to induce IFN- γ production in vitro. J. Immunol. 163: 3642-3652, 1999.
 4. Fujieda, S., Iho, S., Kimura, Y., Sunaga, H., Ikara, H., Sugimoto, C., Yamamoto, S. and Saito, H.: DNA from Mycobacterium bovis BCG (MY-1) inhibits the synthesis of immunoglobulin E by interleukin-4-stimulated human lymphocytes. Am. J. Respiratory & Crit. Care Med. 160: 2056-2061, 1999.
 5. Yamamoto, S., Yamamoto, T. and Tokunaga, T.: Oligodeoxyribonucleotides with 5'-ACGT-3' or 5'-TCGA-3' sequence induce production of interferons. Current Topics Microbiol. Immunol. Immunobiology of Bacterial CpG-DNA 247:23-39, 1999.
 6. Yamamoto, S., Umemori, K., Nojima, Y., Atsumi, S., Ohishi, K., Takahashi, Y., Inoue, M., Iguchi, Y., Toyoo, S. and Yamamoto, T.: Immunoadjuvant effect of oligodeoxy-nucleotides. Proc. 34th Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, US-Japan Cooperative Medical Science Program, 34: 282, 1999.
 7. 藤枝重治、斎藤等、伊保澄子、山本三郎 結菌 DNA および合成短鎖 DNA による IgE 産生抑制の試み. 日鼻誌 38 : 84-90, 1999.
 8. Yamamoto, S., Yamamoto, T. and Tokunaga, T.: The discovery of immunostimulatory DNA sequence. Springer Seminors in Immunopathology : Immunostimulatory DNA Sequences (in press).
 9. Yamamoto, S., Yamamoto, T., Iho, S. and Tokunaga, T.: Activation of NK cell (human and mouse) by immunostimulatory DNA sequence. Springer Seminors in Immunopathology : Immunostimulatory DNA Sequences (in press).
 10. 山本十糸子、Phalen, S., 内田和幸、梅森清子、野島康弘、堀内善信、後藤義孝、McMurray, D.N., 山本三郎: BCG Tokyo 172 株の抗結核効果: 結核菌噴霧感染によるモルモット肺結核実験モデルを用いた防御効果の検討. 結核 75: 2000 (in press)
- ## II. 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総会、1999 年 5 月、東京都。

2. 山本三郎、山本十糸子、梅森清子：抗 HIV リコンビナント BCG ワクチンの安全性・安定性。第 74 回日本結核病学会総会、1999 年 3 月、宇都宮市。
3. Yamamoto, S., Umemori K., Nojima, Y., Atsumi, S., Ohishi, K., Takahashi, Y., Inoue, M., Iguchi, Y., Toyoo, S. and Yamamoto, T.: Immunoadjuvant effect of oligodeoxynucleotides. Thirty-fourth Tuberculosis-Leprosy Research Conferenc of U.S.-Japan Cooperative Medical Science, June 1999, San Francisco
4. 山本三郎：免疫増強性 DNA。第 8 回臨床免疫学生物学研究会、1999 年 7 月、神戸市。
5. Saburo Yamamoto: Immunostimulatory DNA from BCG augments host defense mechanisms via induction of interferons. 1st International Workshop on Immunobiology of Bacterial CpG-DNA, September 1999, Schloss Elmau, Germany
6. 山本三郎、山本十糸子、David N. McMurray: モルモットに対する結核菌噴霧感染に及ぼす BCG ワクチンの効果。第 3 回日本ワクチン学会、1999 年 11 月、名古屋市
7. 山本十糸子、梅森清子、野島康弘、佐藤由紀夫、松尾和浩、野間口博子、山本三郎：免疫増強性オリゴ DNA 配列の結核菌噴霧感染モデル系でのワクチン効果。第 29 回日本免疫学会学術集会、1999 年 12 月、京都市
8. 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- γ 産生誘導活性を示す細菌 DNA の塩基配列 (2)。第 29 回日本免疫学会学術集会、1999 年 12 月、京都市
9. Saburo Yamamoto: Safety issue of rBCG. International Workshop on Research and Development of Recombinant BCG-Based HIV Vaccine. November 1999, Tokyo, Japan

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

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 グループ長

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。

②BCG 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 of 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結核防御免疫誘導を目的とした抗酸菌由来分泌型遺伝子の選択

これまで α 抗原蛋白遺伝子を標的としたリコンビナント BCG ワクチンを作製した。今回さらに MPB74 蛋白遺伝子及び ESAT6 蛋白遺伝子を増幅し、シャトルベクターに挿入した後、BCG 東京株にトランスフェクションした。さらに培養液中に遊離する蛋白を特異抗体によって Western Blot 法で検出した。

③各々の遺伝子の発現蛋白を準備した。

C. 研究成果

①分泌型抗原遺伝子発現リコンビナント結核ワクチンの作製

α 抗原及び MPB74 分泌蛋白遺伝子の発現はリコンビナント BCG 培養濾液を用い、その中に分泌された蛋白抗原を各々の特異抗体で結合性を見ることにより、Western Blot 法で確認することができた。

②ESAT6 遺伝子をベクターに組み込み分泌蛋白として BCG 菌から遊離できるかどうかを現在確認中である。この ESAT6 の BCG はさらに α 抗原遺伝子が発現できるようになっており、両方の蛋白遺伝子の発

現を検討中である。

③ α 抗原及び MPB74 遺伝子発現リコンビナント BCG をモルモットに接種し経時的に蛋白特異的な DTH の発現を見ると抗原特異的に強い遅延型皮膚反応が誘導された。

D. 考察

結核ワクチンの重要性は本年度になって結核症が再興感染症の一つとして我が国で宣言されたことから明らかであり、結核菌に対する有効なコントロール方法の研究開発が社会的にも求められている。このことはこれまでの結核ワクチンとしての BCG が一定の評価を得ているにもかかわらず、改良すべき余地が残されていることを示唆している。その原因の一つとして耐性結核菌感染者の増加があげられ、その診断と菌にたいする対策が具体的に重要であると考えられる。さらに、結核症は HIV 感染者の増加にともなって世界的にも急増しており、結核を効果的にコントロールするにはより有効なワクチンの改良、開発が望まれていることは明らかである。これまで BCG ワクチンの他に結核蛋白に対するコンポーネントワクチンあるいは DNA ワクチンが試作されているが、これまでの結果から推測すると抗結核作用は充分ではなく、BCG の抗結核作用を超えられるようなワクチン効果を誘導できるものはまだ示されていないといっても過言ではないと思われる。したがって、現時点でより有効な抗結核作用を誘導する方法としてこれまで開発されている BCG 菌を用いて免疫力を効果的に付加するリコンビナント BCG 結核ワクチンの方向性が最も効果的ではないかと推測される。我々のグループは DTH を誘

導できる能力を持つ抗酸菌の分泌できる遺伝子をクローニングし、その性質を明らかにしてきた。本研究ではさらに g インターフェロンの誘導能に優れた ESAT6 ペプチドに着目し、それらの3つの遺伝子を個々にあるいはさらにコンビネーションに発現させ BCG の抗結核免疫誘導能を強化することを目的とした。その方法が本プロジェクトの終了までに目処がつけられるようにプロジェクトとして検討する予定としている。

E. まとめ

これまで抗酸菌の分泌する分泌型抗原蛋白遺伝子、 α 抗原蛋白遺伝子をモデルとして選び、リコンビナント BCG α の作製を検討し、その免疫誘導能を明らかにした。

①今回 MPB74 蛋白遺伝子さらに ESAT6 遺伝子を個々の BCG に発現することができた。

②リコンビナント BCG α をモルモットに接種すると α 抗原特異的な DTH の誘導が可能となった。

これらの発現したリコンビナント BCG に免疫誘導能を解析し、さらにコンビネーションで免疫誘導能が上昇するかどうかを検討する。その結果としてワクチンの構築の改良が必要であるかどうか検討した後 BCG 菌あるいは結核菌をチャレンジとして使った感染防御実験を行えるようにシステムを準備中である。

F. 研究発表

本多三男、松尾和浩、仲宗根正、吉野直人、海津雅彦、大洲竹晃、浜野隆一、長縄聡、滝沢万里、川原守、原敬志、芳賀