

厚生科学研究費補助金総括研究報告書
厚生科学研究費補助金分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

研究課題名（課題番号）： 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
(H-11-新興-2)

研究期間（西暦） ： 1999 - 2001

研究年度（西暦） ： 2000

主任研究者名（所属施設名・職）： 岡 田 全 司
(国立療養所近畿中央病院・臨床研究部長)

目 次

別添 1.	厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版	1
別紙 2.	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	岡田 全司 4
	（分担）研究報告書	坂谷 光則 26
		矢野 郁也 35
		螺良 英郎 39
		土肥 善胤 41
		菅原 勇 43
		谷山 忠義 45
		山田 毅 48
		吉田 栄人 53
		熊沢 義雄 55
		井上 義一 59
		森 隆 66

別添 1

厚生科学研究費補助金総括研究報告書

- (1) 研究費の名称 = 厚生科学研究費補助金
- (2) 研究事業名 = 新興・再興感染症研究事業
- (3) 研究課題名 = 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・治療法に関する研究（総括研究報告書）
- (4) 国庫補助金精算所要額（円） = 36,000,000
- (5) 研究期間（西暦） = 1999 - 2001
- (6) 研究年度（西暦） = 2000
- (7) 主任研究者名（所属施設名） = 岡田全司（国立療養所近畿中央病院）
- (8) 分担研究者名 = 坂谷光則（国立療養所近畿中央病院）、矢野郁也（日本 BCG 研究所）、蝶良英郎（財団法人結核予防会大阪病院）、土肥善胤（大阪大学医学部）、菅原勇（財団法人結核予防会結核研究所）、谷山忠義（国立感染症研究所）、山田毅（長崎大学歯学部）、吉田栄人（自治医科大学医動物学）、熊沢義雄（北里大学理学部）、井上義一（国立療養所近畿中央病院）、森 隆（国立療養所近畿中央病院）
- (9) 研究目的 = 結核罹患率の増加、集団感染 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、難治性結核の対策が早急に望まれており、結核に対する新しい予防・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②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③これらを用いた結核予後診断・難治性診断④ BCG 接種の成人結核予防効果の研究を目的とする。
- (10) 研究方法 = [1]サブユニットワクチン：Mtb72f fusion 蛋白（Mtb39 と Mtb32 を遺伝子工学的に fusion させて作製）等をカニクイザルに筋注し、ヒト型結核菌を経気道エアロゾル感染させ、予防ワクチン効果（生存率、血沈、体重、肺の病理）を解析した。種々（約 10 種類）のサブユニットワクチン（Mtb72f、Mtb71f 等）ワクチンで *in vitro* でヒトの多剤耐性結核患者 PBL を刺激し、T 細胞免疫（ γ -IFN、IL-2 産生能や T 細胞増殖能）増強効果を解析した。[2]DNA ワクチンの作製：Hsp65 DNA 及び IL-12 DNA 等を挿入し

た発現プラスミッドを作製した。さらに、HVJ-liposome に Hsp65 DNA を組み込み、世界に先駆けてこのベクターを用いてワクチン効果を解析した。一方、アデノウイルスベクターに組み込み、H37RV 5×10^5 i.v 感染 Balb/c マウスに予防・治療投与した。[3] リコンビナント BCG ワクチンの作製：Antigen 85A, 85B, 85C, MPB51 等を PNN2 シャトルベクターに挿入し、BCG 東京株に導入した。[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 granulyisin 発現の解析：抗 granulyisin 抗体を用いた FACS 解析を行った。[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 DPPD 蛋白を用いた解析を行った。

(11) 結果と考察 = [1] 72f Fusion 蛋白のサブユニットワクチンがカニクイザル (cynomolgus monkey) のレベルで BCG よりも有効であることを明らかにし、ヒトの系でも 72f を用いて免疫応答の解析が進められ、結核ワクチンで世界の最先端の研究で、しかもヒトへの臨床応用が最も近い、新しい結核ワクチンの開発に成功した。結核蛋白 Mtb39 と Mtb32 の fusion 蛋白 72f のサブユニットワクチンはマウスやモルモットの吸入感染のみでなくサルでも BCG よりも強力な予防ワクチン効果 (生存率、血沈、体重、肺の組織) を得た。(S.Reed, S.Gillis) 又、T リンパ球機能増強活性を有する種々の結核蛋白 gene のクローニングに成功した。(J. I 2000, J. Exp. Med 2000, Inf and Immunity 2000, Mtb39, Mtb32, Mtb8.4, Mtb11, Mtb41, Mtb9.9, Mtb16, Mtb40,等) [2] DNA ワクチン：① HVJ-liposome をベクターに用いた場合 Hsp65DNA 単独 (HVJ-liposome/Hsp65) で BCG よりも有効であることをマウスの系 (H37RV 投与) で明らかにした。② IL-12 DNA + Hsp65 DNA のワクチンは相乗効果を示し、gene gun 投与により BCG よりも強力な結核予防ワクチンであることを明らかにした。③アデノウイルスベクターに導入した IL-6 関連遺伝子 (IL-6 gene + IL-6 レセプター gene + gp130 gene) で BCG よりも強力な治療ワクチン及び予防ワクチン効果を示した。④アデノウイルスベクターに導入した γ -IFN DNA も BCG よりも強力な治療ワクチン及び予防ワクチン効果を示した。[3] リコンビナント BCG ワクチン：Ag85B リコンビナント BCG 単独及び BA51 (Ag85A + Ag85B + MPB51) リコンビナント BCG は等のワクチンをマウスの結核感染 (気道感染及び i.v 感染) の系で解析した。[4] 上記の種々のサブユニットワクチンで刺激し、ヒトの多剤耐性結核患者 PBL や難治性結核 (糖尿病合併) PBL の T 細胞免疫能 (γ -IFN 産生能や T 細胞増殖能) が増強することを in vitro で明らかにした。[5] 我々が世界に先駆けて開発した SCID-PBL/hu の系で結核患者リンパ球を SCID マウスに生着させ、ESAT-6 蛋白の HLA-A2 に結合する 9 個のアミノ酸よりなるペプチドを合成し、これを SCID-PBL/hu に免疫し、ESAT-6 に特異的でしかも HLA-A2 に拘束性を示す典型的なヒトキラー T 細胞の分化誘導を示す画期的な、結核菌に対する生体内ヒト T 細胞免疫解析モデルを開発した。[6] ツ反に用いられる PPD は多種の蛋白を含む。この中より、結核感染に極めて特異性の高い、ツ反に代わる蛋白 DPPD のアミノ酸配列及び遺伝子クローニングに成功した。リコンビナント DPPD 蛋白は結核感染に特異的で、BCG 接種群には反応しないことがモルモットで示された。ヒトでも結核感染特異性を示すことを (in vitro) 明らかにした。

[7] 多剤耐性結核患者 PBL のキラー T、NK での granulysin 発現の著明な低下を明らかにした。すなわち新しい結核予後診断法を確立した。一方、パーフォリンノックアウトマウスに抗 TRAIL 抗体を投与し、TRAIL pathway は結核感染防御に重要であることを初めて明らかにした。[8] BCG 接種が大人の結核予防に有効か否かの解析：近畿中央病院など近畿地区の 1 国立施設において新採用若年看護婦 275 名と付属看護学校新入生 552 名にツ反を行った。陰性者 60 名を無作為に二分し 30 名に BCG 接種を行った。

(12) 結論 = [1] 72f Fusion 蛋白のサブユニットワクチンがカニクイザル (cynomolgus monkey) のレベルで BCG よりも有効であることを明らかにし、ヒトの系でも 72f を用いて免疫応答の解析が進められ、結核ワクチンで世界の最先端の研究で、しかもヒトへの臨床応用が最も近い、新しい結核ワクチンの開発に成功した。[2] DNA ワクチン：① HVJ-liposome をベクターに用いた場合 Hsp65DNA 単独 (HVJ-liposome/Hsp65) で BCG よりも有効であることをマウスの系 (H37RV i.v 投与) で明らかにした。② IL-12 DNA + Hsp65 DNA のワクチンは相乗効果を示し、gene gun 投与により BCG よりも強力な結核予防ワクチンであることを明らかにした。③ アデノウイルスベクターに導入した IL-6 関連遺伝子 (IL-6 gene + IL-6 レセプター gene + gp130 gene) で BCG よりも強力な治療ワクチン及び予防ワクチン効果を示した。④ アデノウイルスベクターに導入した γ -IFN DNA も BCG よりも強力な治療ワクチン及び予防ワクチン効果を示した。[3] リコンビナント BCG ワクチン：Ag85B リコンビナント BCG 単独及び BA51 (Ag85A + Ag85B + MPB51) リコンビナント BCG は BCG よりも強力なワクチンであることをマウスの結核感染 (気道感染及び i.v 感染) の系で明らかにした。また、IL-2 rBCG, IL-6 rBCG, IL-18 rBCG, γ -IFN rBCG, IL-12 rBCG, Hsp65 rBCG, MDP1rBCG の作製に成功した。毒力 gene を欠失した BCG 菌の作製に成功した。[4] 上記の種々のサブユニットワクチン (72f, Mtb39, Mtb32, Mtb8.4, Mtb11, Mtb41, Mtb9.9, Mtb16, Mtb40, 31f, 71f) で刺激し、ヒトの多剤耐性結核患者 PBL や T 細胞免疫能 (γ -IFN 産生能や T 細胞増殖能) が増強することを in vitro で明らかにした。[5] 我々が世界に先駆けて開発した SCID-PBL/hu の系で結核患者リンパ球を SCID マウスに生着させ、ESAT-6 に特異的なヒトキラー T 細胞の分化誘導を示す画期的な、結核菌に対する生体内ヒト T 細胞免疫解析モデルを開発した。[6] 結核感染に極めて特異性の高い、ツ反に代わる蛋白 DPPD のアミノ酸配列及び遺伝子クローニングに成功した。リコンビナント DPPD 蛋白は結核感染に特異的で、BCG 接種群には反応しないことがモルモット及びヒト (in vitro) 明らかにした。[7] 耐性結核患者 PBL のキラー T、NK での granulysin 発現の著明な低下を明らかにした。すなわち新しい結核予後診断法を確立した。

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 臨床研究部部长

研究要旨

- [1] 72f Fusion 蛋白のサブユニットワクチンがカニクイザル (cynomolgus monkey) のレベルで BCG よりも有効であることを明らかにし、ヒトの系でも 72f を用いて免疫応答の解析が進められ、結核ワクチンで世界の最先端の研究で、しかもヒトへの臨床応用が最も近い、新しい結核ワクチンの開発に成功した。結核蛋白 Mtb39 と Mtb32 の fusion 蛋白 72f のサブユニットワクチンはマウスやモルモットの吸入感染のみでなくサルでも BCG よりも強力な予防ワクチン効果（生存率、血沈、体重、肺の組織）を得た。(S.Reed, S.Gillis) 又、T リンパ球機能増強活性を有する種々の結核蛋白 gene のクローニングに成功した。(J. I 2000, J. Exp. Med 2000, Inf and Immunity 2000, Mtb39, Mtb32, Mtb8.4, Mtb11, Mtb41, Mtb9.9, Mtb16, Mtb40,等)
- [2] DNA ワクチン：① HVJ-liposome をベクターに用いた場合 Hsp65DNA 単独 (HVJ-liposome/Hsp65) で BCG よりも有効であることをマウスの系 (H37RV i・v 投与) で明らかにした。② IL-12 DNA + Hsp65 DNA のワクチンは相乗効果を示し、gene gun 投与により BCG よりも強力な結核予防ワクチンであることを明らかにした。③ アデノウイルスベクターに導入した IL-6 関連遺伝子 (IL-6 gene + IL-6 レセプター gene + gp130 gene) で BCG よりも強力な治療ワクチン及び予防ワクチン効果を示した。④ アデノウイルスベクターに導入した γ -IFN DNA も BCG よりも強力な治療ワクチン及び予防ワクチン効果を示した。
- [3] リコンビナント BCG ワクチン：Ag85B リコンビナント BCG 単独及び BA51 (Ag85A + Ag85B + MPB51) リコンビナント BCG は BCG よりも強力なワクチンであることをマウスの結核感染 (気道感染及び i・v 感染) の系で明らかにした。また、IL-2 rBCG, IL-6 rBCG, IL-18 rBCG の作製に成功し、 γ -IFN rBCG, IL-12 rBCG, Hsp65 rBCG を作製中である。毒力 gene を欠失した BCG 菌の作製に成功した。
- [4] 上記の種々のサブユニットワクチン (72f, Mtb39, Mtb32, Mtb8.4, Mtb11, Mtb41, Mtb9.9, Mtb16, Mtb40, 31f, 71f) で刺激し、ヒトの多剤耐性結核患者 PBL や難治性結核 (糖尿病合併) PBL の T 細胞免疫能 (γ -IFN 産生能や T 細胞増殖能) が増強することを in vitro で明らかにした。
- [5] 我々が世界に先駆けて開発した SCID-PBL/hu の系で結核患者リンパ球を SCID マウス

に生着させ、ESAT-6 蛋白の HLA-A2 に結合する 9 個のアミノ酸よりなるペプチドを合成し、これを SCID-PBL/hu に免疫し、ESAT-6 に特異的でしかも HLA-A2 に拘束性を示す典型的なヒトキラー T 細胞の分化誘導を示す画期的な、結核菌に対する生体内ヒト T 細胞免疫解析モデルを開発した。

[6] ツ反に用いられる PPD は多種の蛋白を含む。この中より、結核感染に極めて特異性の高い、ツ反に代わる蛋白 DPPD のアミノ酸配列及び遺伝子クローニングに成功した。リコンビナント DPPD 蛋白は結核感染に特異的で、BCG 接種群には反応しないことがモルモットで示された。ヒトでも結核感染特異性を示すことを (in vitro) 明らかにした。

[7] ヒト型結核菌に存在し、BCG に存在しない Mtb11 蛋白 gene のクローニングに成功した。この蛋白は in vitro のヒト T 細胞を結核感染者のみ特異的に増強することを明らかにした。一方、結核患者血清中には Mtb11 と反応する抗体や 81kd の結核蛋白に結合する抗体が特異的に存在することを示した。さらに、ランダムファージディスプレイ法 (すでにこの方法で帯状疱疹と Herpes simplex の異なる抗原をはじめて発見) にて結核感染特異蛋白の検索システムを開発した。

[8] 多剤耐性結核患者 PBL 及び難治性結核患者 PBL において結核菌に対するキラー分化誘導の低下、granulysin mRNA、TRAIL mRNA、低下を明らかにした。さらに granulysin に対する抗体を作製し、これらの患者の PBL のキラー T、NK での granulysin 発現の著明な低下を明らかにした。すなわち新しい結核予後診断法を確立した。一方、パーフォリンノックアウトマウスに抗 TRAIL 抗体を投与し、TRAIL pathway は結核感染防御に重要であることを初めて明らかにした。

[9] BCG 接種による大人 (成人) に対する結核予防効果の解析：

現行の BCG ワクチン接種の有効性、特に成人における追加接種がその後の結核発病を抑制できるかどうか、を検討した。まず、近畿地区国立施設で参加意志を表明した 12 病院・療養所および 13 看護学校で開始した。ツベルクリン反応検査対象者数は看護婦 275 名、看護学生 552 名であった。陰性と判定された看護婦 21 名と学生 39 名を無作為に 2 分し、1 群のみ BCG 接種を接種し追跡調査を開始した。12 年末までの間に、両群からの結核発病者は認められていない。

分担研究者	坂谷光則 国立療養所近畿中央病院 副院長	谷山忠義 国立感染症研究所 室長
	矢野郁也 日本 BCG 研究所 中央研究所所長	山田 毅 長崎大学歯学部 名誉教授
	螺良英郎 財団法人結核予防会大阪病院 病院長	吉田栄人 自治医科大学 講師

土肥善胤
大阪大学医学部
保健学科長

熊沢義雄
北里大学理学部
教授

菅原 勇
財団法人結核予防会結核研究所
科長

井上義一
国立療養所近畿中央病院
室長

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、①BCGよりも強力な新しいサブユニットワクチン、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。④BCG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）。⑤RFLP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。⑥ツベルクリン反応に代わる新しい結核特異的診断法の開発

B. 研究方法

(1) サブユニットワクチン

結核菌に対する免疫応答において、多くのT細胞エピトープを持つ抗原蛋白の方がペプチドよりも有効なワクチンとなる。又、一つのリコンビナントの抗原蛋白よりもmultiple antigens (poly-protein)の方がより有効であることが考えられる。したがって、遺伝子工学的手法を用いて種々のfusion蛋白を作製し、これらの予防ワクチン効果を、マウス、モルモット、カニクイザルで検討した。C57BL/6マウスにおける結核菌のエアゾル吸入気道感染実験系で、Mtb8.4 DNA, Mtb32 DNA, Mtb39 DNAは感染予防効果を示し、なかでもMtb32 DNA + Mtb39 DNAはより強力な予防効果を示した。したがってMtb39とMtb32のfusion蛋白(poly-protein)にまず焦点をしばった。又、poly-protein (fusion蛋白)ワクチンの方が経済的にも安くつく。Mtb39とMtb32をタンデム(Mtb72fと呼ぶ)に発現する遺伝子を構築した。このfusion蛋白Mtb72f(略して72f)をC57BL/6マウスにアジュバントとともに3回筋注し、最後の筋注から4週間後にヒト型結核菌をエアゾル吸入感染させた。3週間後に結核菌数を判定した。その結果脾臓中で2～2.5logの結核菌数の減少を認めた。さらに結核菌エアゾル感染モルモットに対しMtb72fは致死率及び体重減少において著明な予防効果を示した。

さらに、最もヒトの結核感染に類似したモデルのカニクイザルを用いて予防効果を解析した。3回 Mtb72f で免疫し、最終免疫より4週間後に毒力株、ヒト型結核菌 Erdman 株を 10^3 気道内チャレンジした。致死率、体重減少、血沈、肺の病理で予防ワクチン効果を判定した。感染後32週間まで72f ワクチン群は体重減少や死亡を認めなかった。一方、BCG ワクチン群は20週以降死亡例が認められた。このように、カニクイザルのレベルで72f fusion 蛋白はBCG ワクチンよりも強力な予防ワクチンであることが示された。又、Tリンパ球機能増強活性を有する種々の結核蛋白 gene のクローニングに成功した。(JI 2000, J. Exp. Med 2000, Inf and Immunity 2000, Mtb39, Mtb32, Mtb8.4, Mtb11, Mtb41, Mtb9.9, Mtb16, Mtb40,等)(Gillis, 岡田, Reed, 井上) これらの種々のサブユニットワクチン(72f, Mtb39, Mtb32, Mtb8.4, Mtb11, Mtb41, Mtb9.9, Mtb16, Mtb40, 31f, 71f) で刺激し、ヒトの多剤耐性結核患者 PBL や難治性結核(糖尿病合併) PBL のT細胞免疫能(γ -IFN 産生能やT細胞増殖能)が増強することを *in vitro* で明らかにした。(岡田, 井上, 坂谷, 森, 細江, Reed, Gillis) また、サブユニットワクチン開発研究の重要点は、抗原の選択とアジュバントの組み合わせにある。矢野らは抗原の選択については、混合抗原としてBCG 菌培養濾液濃縮蛋白抗原(BCG-CFP)を、精製抗原として同じくBCG 菌培養濾液より精製して得られるMPB59(Ag85B)を感染防御抗原として用い、アジュバントについては、Freund の不完全アジュバント(FIA)にかわる低毒性ミコール酸含有糖脂質を *Rhodo coccus* sp.4306 株より抽出単離して蛋白抗原と同時にマウスに投与することにより、結核菌 *M.tuberculosis* H37Rv のエロゾール感染に対する防御効果を検討した。

Ag85B in oil 系が最も強力なワクチン効果を示し、ほぼ10%にまで菌数を減少させることができた。TDM (trehalose6,6'-dimycolate) を w/o/w としてマウス腹腔内に投与すると有意な血清 IFN- γ 産生を認め、NK 細胞数が著しく増加した。MHC クラスII 抗原やCD1d の発現が高まることも明らかとなり、Th1 を主体とした免疫応答を誘導するアジュバントであることを明らかにした。しかし、ミコール酸を含有しない sulfolipid (SL) は免疫賦活作用を認めなかった。また、SL は TDM にアンタゴニスト作用のあることを明らかにし、rTMM、rGMM、rMMM もアジュバント活性を示した。

(2) DNA ワクチンの作製

結核菌 H37Rv 株より Hsp65 遺伝子をクローニングし、DNA ワクチン用プラスミドベクターを構築した。マウス IL-12 遺伝子はすでにマラリア DNA ワクチン(マウスモデル)として実績があるプラスミドベクターを使用した。遺伝子銃を用いた1回接種の後、結核菌 H37Rv 株でチャレンジを行い、4,10週後の肺、脾臓、肝臓の各臓器より結核菌の分離を行なった。対照群であるBCG 接種群と比較し、分離菌数の減少率を検定し、評価した。並行して結核感染防御に重要であるといわれているキラー T 細胞の増殖能と IFN- γ 産生を調べ、DNA ワクチンによる免疫応答と感染防御との関係を検討した。DNA ワクチンを遺伝子銃を用いてマウス腹部に免疫した。2週後にチャレンジし、その10週後の肺、脾臓、肝臓より分離された結核菌数を調べた。Hsp65 と IL-12 遺伝子の混合物で免疫した群ではBCG 接種群と比較して明らかに分離菌数は少ない。この結果は遺伝子銃によるシングルワクチネーションでBCGを上回る効果を示した初めての報告となる。我々の独創性の第一はDNA ワクチンの接種方法に

ある。現在 DNA ワクチンの接種方法として筋肉注射、遺伝子銃が主流となっているが、次世代の接種方法として HVJ リポソーム法を試みた。HVJ リポソームは本研究班の研究協力者である大阪大学金田教授が開発した方法で、肝硬変の動物モデルへ HGF 遺伝子を導入し、大きな改善をもたらした遺伝子治療の国産版である。DNA ワクチンへの応用は例がなく、新規な試みとなる。

(3) リコンビナント BCG ワクチンの作製

Ag85B 導入リコンビナント BCG 1 × 10⁹ あるいは BA51 (Ag85B + Ag85A + MPB51) リコンビナント BCG をそれぞれ 28 日前と 14 日前に 2 回皮下投与し、結核感染 (H37Rv5 × 10⁶ i.v.) した後、4 週後と 8 週後の肺・肝・脾臓の結核菌数を測定した。その結果コントロールの BCG 東京株をワクチンとした群よりも強力なワクチン効果 (結核菌数の減少) を得た。これらのワクチン効果は結核菌に対するキラー T 細胞の分化・誘導を増強することにより発揮された。(岡田、山田) さらに、よりヒトの結核感染に近い気道感染モデルを用いた。まず、BA51 リコンビナント BCG あるいは Ag85B リコンビナント BCG をマウス気道内に注入し、1~2 週後にヒト型結核菌を気道感染させた。その結果、コントロールの BCG 東京株よりも有効な予防ワクチン効果が得られた。これらのワクチン効果は γ -IFN 産生の誘導増強により発揮された。(岡田、山田) 結核菌の感染においては産生されるサイトカインの種類および量がその後の病態の形成を左右する。本年度は感染防御に有効なサイトカインを産生するリコンビナント BCG を作成し、その効果を検定することを目的とした。また、昨年度に作成した抗酸菌由来感染防御抗原 α 抗原群 Ag85B, Ag85A, Ag85C,

MPB51 を複数産生するリコンビナント BCG について、その効果を動物モデルで検討した。リコンビナント BCG に組み入れられるサイトカインとして具体的には、IL-2、IL-6、IL-12、IL-18、IFN- γ を対象とした。まず、クローン化したこれらサイトカインの cDNA に制限サイトを付与し、Mycobacterium kansasii 菌 α 抗原遺伝子の途中に挿入した。作成された融合遺伝子を大腸菌-抗酸菌シャトルプラスミドに組み入れ、BCG 菌をこのプラスミドで形質転換した。形質転換菌を培養し、菌体内および培地中に産生されたタンパク質を回収し、目的のサイトカイン- α 抗原融合タンパク質を解析した。 α 抗原群を複数産生するリコンビナント BCG (rBCG/BA51) についてはマウスを用いて、同じ抗酸菌であるらい菌に対する感染実験でそのワクチン効果を調べた。結核菌に対するワクチン効果については岡田の研究室で行った。(山田、大原、岡田)

(4) 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

この中より、結核感染に極めて特異性の高い、ツベルクリンに代わる蛋白 DPPD のアミノ酸配列及び遺伝子クローニングに成功した。リコンビナント DPPD 蛋白は結核感染に特異的で、BCG 接種群には反応しないことがモルモットで示された。ヒトでも結核感染特異性を示すことを (in vitro) 明らかにした。(Gillis, Reed, 岡田, 細江, 坂谷, 螺良)

ヒト型結核菌 H 37Rv 2 × 10⁴ 個 i.v 投与して感染させたモルモットに、4 週後に、リコンビナント DPPD 蛋白、又は PPD で皮内反応を施行した。その結果 12 匹中 12 匹で DPPD 2 μ g でも 10 μ g でも皮内反応 (DTH) 陽性 (24 時間後に判定) であった。一方、M. bovis (BCG) で免疫したモルモットに、リコンビナント DPPD 蛋白 2 μ

g で皮内反応 (skin test) した群では陽性は 8 匹中 0 匹 (陽性: 発赤および硬結を示すもの) であった。10 μ g で皮内反応すると 8 匹中 2 匹のみに skin test 陽性であった。一方、PPD による皮内反応では 2 μ g でも 10 μ g でも全例陽性であった。同様のことが *M.bovis* BCG の代わりに、*M.kansasii*, *M.avium*, *M.scrofulaceum*, *M.fortuitum*, *M.chelonae*, *M.goroniae*, *M.terrae*, *M.smegmatis*, *M.vacciae* で免疫したモルモットに対しても DPPD は 2 μ g でも 10 μ g でも skin test 陰性、であったが PPD は 2 μ g でも 10 μ g でも 100% skin test 陽性反応を誘起した。このように DPPD は結核感染に特異的な皮内反応ストとして極めて有用であることが示された。

(5) 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 及び難治性結核患者 PBL において結核菌に対するキラー分化誘導の低下、granulysin mRNA、TRAIL mRNA、低下を明らかにした。さらに granulysin に対する抗体を作製し、これらの患者の PBL のキラー T、NK での granulysin 発現の著明な低下を明らかにした。すなわち新しい結核予後診断法を確立した。(岡田、井上、BML 研究所高森、永田、森) すなわち、それぞれ約 20 名の多剤耐性結核患者、通常の結核患者、および健康人の PBL を抗 granulysin 抗体を用い FACS 解析した。

(6) 世界に先駆けてのヒト生体内抗結核感染免疫モデルの作製
我々が世界に先駆けて開発した SCID-PBL/hu の系で結核患者リンパ球を SCID マウスに生着させ、ESAT-6 蛋白の HLA-A2 に結合する 9 個のアミノ酸よりなるペプチドを合成し、これを SCID-PBL/hu に免疫し、ESAT-6 に特異的でしかも HLA-A2 に拘束性を示す典型的なヒトキラー

ー T 細胞の分化誘導を示す画期的な、結核菌に対する生体内ヒト T 細胞免疫解析モデルを開発した。(岡田、井上、森)

(7) 遺伝子ノックアウトマウスを結核感染モデルの作製

パーフォリンノックアウトマウスに抗 TRAIL 抗体を投与し、TRAIL pathway は結核感染防御に重要であることを初めて明らかにした。(岡田、井上、坂谷、森) TRAIL はキラー T 細胞に発現し結核菌抑制効果に極めて重要な役割をすることを明らかにした。すなわち、TRAIL の生理学的意義を我々は初めて明らかにした。結核感染 BALB/c マウスに抗 TRAIL 抗体を投与することにより結核の病状悪化と早期死亡が認められた。さらにパーフォリンノックアウトマウス (C57BL/6) に抗 TRAIL 抗体を投与すると肺・脾・肝臓の結核菌数が著明に増加した。

(8) BCG 接種が大人の結核予防に有効か否かの解析

現行の BCG ワクチン接種の有効性、特に成人における追加接種がその後の結核発病を抑制できるかどうか、を検討した。国立病院・療養所の新採用看護婦および付設看護学校新入生の集団ツベルクリン反応検査を実施し、陰性者を 2 分して 1 群のみに BCG 接種を行ない、その後の長期間観察によって両群での結核発病率を比較検定した。対象者の属する施設は国立病院・療養所とするが、地方医務局単位 (例: 近畿地区、九州地区など) でグループを形成して作業した。まず、近畿地区国立施設で参加意思を表明した 12 病院・療養所および 13 看護学校で開始した。ツベルクリン反応検査対象者数は看護婦 275 名、看護学生 552 名である。検査は 2 回法で実施したが、1 回目の反応が陰性の比率は、看護婦 14.2%、学生 22.3%であったが、2 回目の陰性者は看護婦 7.6%、学生 7.1%となった。

対象者の世代すなわち 10 才代後半から 20 才代前半でのツベルクリン反応陰性者の比率は 7 ~ 8 % と推測される。この世代での結核既感染率は数%以下と推定されていることから、陽性者の殆どは、過去の BCG 接種によるツベルクリンアレルギーが持続していることによる反応陽性と判断される。陰性と判定された看護婦 21 名と学生 39 名を無作為に 2 分し、1 群にのみ BCG を接種し追跡調査を開始した。

(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、大阪国際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. サブユニットワクチンや新しい結核診断蛋白の *in vitro* (試験管内) での結核患者末梢血リンパ球の T 細胞免疫増強活性を検討する研究は、上記の倫理委員会に実験計画書を提出し、審査を得て実施する。すなわち、研究対象者の人権擁護を第一に考え、個人が特定されるような情報は公表しない等、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究対象者に対する不利益や危険性の排除を十分に配慮して実施する。また、サブユニットワクチンや新しい結核診断蛋白の *phase I* 試験においては、研究対象者の人権擁護を第一に考え、研究対象者に対する不利益や危険性の排除、および個人が特定されるような情報は公表しない等を十分に配慮した実験計画書を、倫理委員会のみならず、院内に設置されている治験審査委員会に治験計画書を提出し、審査を経て実施する。
3. 国立療養所近畿中央病院で動物実験を行う場合、院内に設置されている動物実験委員会に事前に実験計画書を提出し審査を経て実施する。国立療養所近畿中央病院動

物実験取扱規程等に則って、動物実験用施設において安楽死等動物愛護上の配慮を十分に実行実施する。DNA ワクチンやリコンビナント BCG ワクチンを用いた結核予防および治療のための動物実験を行う場合は、事前に動物実験委員会のみならず、院内に設置されている組換え DNA 実験安全委員会に実験計画書を提出して、審査を経て承認されてから実施する。安全性、倫理面、動物愛護上の配慮等の面から審査を受ける。また国立療養所近畿中央病院組換え DNA 実験安全管理規程に則って、感染あるいは環境汚染のおそれがないように十分に配慮して行うとともに、実験に使用した器具は全てオートクレーブ消毒してから洗浄する。

4. また、人のみならず動物を用いた研究を行う際には、事前に院内に設置されている倫理委員会等に研究計画書を提出して、倫理面からの審査・承認を受ける。当院は厚生省より結核疾患・呼吸器疾患の準ナショナルセンター（高度専門医療施設）に選ばれたことにより、倫理面への配慮を十分おこない臨床応用を目指したい。

5. BCG ワクチン有効性検討の際、健常人として国立病院・療養所の新採用看護婦および付設看護学校新入生に説明会を開き、当プロジェクトを説明した上で、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）に対する文面を記載して文書を配布している。日をあげ、充分の考慮期間をおいた後、ボランティア（承諾をいただいた人）のみ当研究に参加していただいている。なお、付設看護学校新入生で未成年の学生には上記のことを保護者にも説明し、保護者（父母等）の署名と印鑑をもらった人のみ当研究に協力いただいている。

C. 研究結果

(1) サブユニットワクチン

72f Fusion 蛋白のサブユニットワクチンがカニクイザル (*cynomolgus monkey*) のレベルで BCG よりも有効であることを明らかにし、ヒトの系でも 72f を用いて免疫応答の解析が進められ、結核ワクチンで世界の最先端の研究で、しかもヒトへの臨床応用が最も近い、新しい結核ワクチンの開発に成功した。結核蛋白 Mtb39 と Mtb32 の fusion 蛋白 72f のサブユニットワクチンはマウスやモルモットの吸入感染のみでなくサルでも BCG よりも強力な予防ワクチン効果 (生存率、血沈、体重、肺の組織) を得た。(S.Reed, S.Gillis)

結核菌に対する免疫応答において、多くの T 細胞エピトープを持つ抗原蛋白の方がペプチドよりも有効なワクチンとなる。又、一つのリコンビナントの抗原蛋白よりも multiple antigens (poly-protein) の方がより有効であることが考えられる。したがって、遺伝子工学的手法を用いて種々の fusion 蛋白を作製し、これらの予防ワクチン効果を、マウス、モルモット、カニクイザルで検討した。C57BL/6 マウスにおける結核菌のエアゾル吸入気道感染実験系で、Mtb8.4 DNA, Mtb32 DNA, Mtb39 DNA は感染予防効果を示し、なかでも Mtb32 DNA + Mtb39 DNA はより強力な予防効果を示した。したがって Mtb39 と Mtb32 の fusion 蛋白 (poly-protein) にまず焦点を絞った。又、poly-protein (fusion 蛋白) ワクチンの方が経済的にも安くつく。Mtb39 と Mtb32 をタンデム (Mtb72f と呼ぶ) に発現する遺伝子を構築した。この fusion 蛋白 Mtb72f (略して 72f) を C57BL/6 マウスにアジュバントとともに 3 回筋注し、最後の筋注から 4 週間後にヒト型結核菌をエアゾル吸入感染させた。3 週間後に結核菌数を判定した。その結果脾臓中で 2 ~ 2.5log の結核菌数の

減少を認めた。さらに結核菌エアゾル感染モルモットに対し Mtb72f は致死率及び体重減少において著明な予防効果を示した。

さらに、最もヒトの結核感染に類似したモデルのカニクイザルを用いて予防効果を解析した。3 回 Mtb72f で免疫し、最終免疫より 4 週間後に毒力株、ヒト型結核菌 Erdman 株を 10^3 気道内チャレンジした。致死率、体重減少、血沈、肺の病理で予防ワクチン効果を判定した。感染後 32 週間まで 72f ワクチン群は体重減少や死亡を認めなかった。一方、BCG ワクチン群は 20 週以降死亡例が認められた。このように、カニクイザルのレベルで 72f fusion 蛋白は BCG ワクチンよりも強力な予防ワクチンであることが示された。

又、T リンパ球機能増強活性を有する種々の結核蛋白 gene のクローニングに成功した。(J.I 2000, J. Exp. Med 2000, Inf and Immunity 2000, Mtb39, Mtb32, Mtb8.4, Mtb11, Mtb41, Mtb9.9, Mtb16, Mtb40,等) (Gillis, 岡田, Reed, 井上) これらの種々のサブユニットワクチン (72f, Mtb39, Mtb32, Mtb8.4, Mtb11, Mtb41, Mtb9.9, Mtb16, Mtb40, 31f, 71f) で刺激し、ヒトの多剤耐性結核患者 PBL や難治性結核 (糖尿病合併) PBL の T 細胞免疫能 (γ -IFN 産生能や T 細胞増殖能) が増強することを *in vitro* で明らかにした。(岡田, 井上, 坂谷, 森, 細江, Reed, Gillis)

また、サブユニットワクチン開発研究の重要点は、抗原の選択とアジュバントの組み合わせにある。矢野らは抗原の選択については、混合抗原として BCG 菌培養濾液濃縮蛋白抗原 (BCG-CFP) を、精製抗原として同じく BCG 菌培養濾液より精製して得られる MPB59 (Ag85B) を感染防御抗原として用い、アジュバントについては、Freund の不完全アジュバント (FIA) にかわる低毒性ミコール酸含有糖脂質を

Rhodococcus sp.4306 株より抽出単離して蛋白抗原と同時にマウスに投与することにより、結核菌 *M.tuberculosis* H37Rv のエロゾール感染に対する防御効果を検討した。糖脂質のアジュバント活性については、これまで報告されていない家兎に対する cord factor の肉芽腫形成能の検討と、ミコール酸含有糖脂質によるマウス肉芽腫形成に際してみられる血管新生機構について検討した。 γ -IFN の吸入、BCG 培養濾液 (BCG-CFP) 及びこれより精製単離した Ag85B 蛋白抗原と、結核菌 cord factor 及び CWS 画分、又は、低毒性 *Rhodococcus* の cord factor 及び CWS 画分をアジュバントとするサブユニットワクチンを構成し、マウスに 2 回皮下投与後、30 日後に *M.tuberculosis* H37Rv 10^2 CFU をエロゾール接種した。30 日後各臓器を摘出した。Ag85B in oil 系が最も強力なワクチン効果を示し、ほぼ 10%にまで菌数を減少させることができた。注目すべきは、*Rhodococcus* cord factor で log10 protection0.51 の減少を示し、BCG10 6 s.c. による 1.45 の菌数減少には及ばなかったものの、ヒトには無害であるが結核菌と細胞壁構造も似ており、将来のワクチンアジュバント候補の可能性が示唆された。(矢野、熊沢、岡田、菅原)

TDM (trehalose6,6'-dimycolate) を w/o/w としてマウス腹腔内に投与すると有意な血清 IFN- γ 産生を認め、NK 細胞数が著しく増加した。MHC クラス II 抗原や CD1d の発現が高まることも明らかとなり、Th1 を主体とした免疫応答を誘導するアジュバントであることを明らかにした。しかし、ミコール酸を含有しない sulfolipid (SL) は免疫賦活作用を認めなかった。また、SL は TDM にアンタゴニスト作用のあることを明らかにし、rTMM、rGMM、rMMM もアジュバント活性を示した。(熊沢、岡田、

矢野)

(2) DNA ワクチン

DNA ワクチン：① HVJ-liposome をベクターに用いた場合 Hsp65DNA 単独 (HVJ-liposome/Hsp65) で BCG よりも有効であることをマウスの系 (H37RV i.v 投与) で明らかにした。② IL-12DNA+Hsp65 DNA のワクチンは相乗効果を示し、gene gun 投与により BCG よりも強力な結核予防ワクチンであることを明らかにした。③アデノウイルスベクターに導入した IL-6 関連遺伝子 (IL-6gene + IL-6 レセプター gene + gp130gene) で BCG よりも強力な治療ワクチン及び予防ワクチン効果を示した。④アデノウイルスベクターに導入した γ -IFN DNA も BCG よりも強力な治療ワクチン及び予防ワクチン効果を示した。

結核菌 H37Rv 株より Hsp65 遺伝子をクローニングし、DNA ワクチン用プラスミドベクターを構築した。マウス IL-12 遺伝子はすでにマラリア DNA ワクチン (マウスモデル) として実績があるプラスミドベクターを使用した。遺伝子銃を用いた 1 回接種の後、結核菌 H37Rv 株でチャレンジを行い、4,10 週後の肺、脾臓、肝臓の各臓器より結核菌の分離を行なった。対照群である BCG 接種群と比較し、分離菌数の減少率を検定し、評価した。並行して結核感染防御に重要であるといわれているキラー T 細胞の増殖能と IFN- γ 産生を調べ、DNA ワクチンによる免疫応答と感染防御との関係を検討した。DNA ワクチンを遺伝子銃を用いてマウス腹部に免疫した。2 週後にチャレンジし、その 10 週後の肺、脾臓、肝臓より分離された結核菌数を調べた。Hsp65 と IL-12 遺伝子の混合物で免疫した群では BCG 接種群と比較して明らかに分離菌数は少ない。この結果は遺伝子銃によるシングルワクチネーションで BCG を上

回る効果を示した初めての報告となる。(吉田、岡田)

一方、*in vitro* 解析による T 細胞の増殖能と IFN- γ の産生に関しては BCG 接種群が最も高い。(岡田、吉田) つまり DNA ワクチンが BCG と同レベルに T 細胞を活性化することができたら、さらに感染防御効果が高まると期待される。これを実現するために Hsp65 遺伝子に加え、新たな結核菌抗原遺伝子を DNA ワクチンとして検討する。また DNA ワクチンの投与方法として、遺伝子銃のほかに HVJ リポソーム等の遺伝子治療で効果が上がっている方法を試みた。(吉田、岡田、金田) すなわち結核に対する新しい DNA ワクチンとして世界に先駆けて HVJ-liposome をベクターに用い、これに Hsp65gene を導入した。HVJ-liposome/Hsp65 では、単独でも BCG 東京株よりも強力な予防効果を示す画期的なワクチンであることを明らかにした。これら (HVJ-liposome/Hsp65 や Hsp65DNA + IL-12DNA) のワクチン効果はキラー T 細胞や Th1 細胞の分化誘導を介して発揮されることを明らかにした。さらに、Ag85A、Ag85B、Ag85C、MBP51 DNA ワクチン用プラスミドベクターを作製した。現在これらの DNA ワクチンを組み合わせてワクチン効果を解析中である。

さらに、結核菌殺傷蛋白である granulysin の DNA を哺乳動物細胞で発現させるベクターに構築することに成功した。この granulysin DNA ワクチンを結核感染マウスに投与し、根治的ワクチン開発を計画している。(岡田、BML 高森、永田)

広義の DNA ワクチンの安全性に関して、染色体へのインテグレーション、抗 DNA 抗体誘導は今まで報告されておらず、新規で有効なワクチンとして有望視されている。実用化に向けて、たとえばマラリア DNA ワクチンは、アフリカ各地で Phase

II の臨床試験が進行中である。このように感染症に対するワクチン開発に新風をもたらした DNA ワクチンを新規結核ワクチン開発へと展開する。

結核 DNA ワクチンは、すでに多くの研究グループがその有効性を示している。しかし、明らかに BCG を超える成果というのはまだ得られておらず、動物レベルの実験結果に留まりヒトへの応用には一步及んでいないのが現状である。我々の独創性の第一は DNA ワクチンの接種方法にある。現在 DNA ワクチンの接種方法として筋肉注射、遺伝子銃が主流となっているが、次世代の接種方法として HVJ リポソーム法を試みた。HVJ リポソームは本研究班の研究協力者である大阪大学金田教授が開発した方法で、肝硬変の動物モデルへ HGF 遺伝子を導入し、大きな改善をもたらした遺伝子治療の国産版である。DNA ワクチンへの応用は例がなく、新規な試みとなる。(岡田、吉田、金田) 第二は DNA ワクチンで 1 回目の接種を行なった後、追加免疫として組換え BCG を接種する方法である。DNA ワクチンで priming し、同じ遺伝子を有する組換え BCG で追加免疫を行なうことにより、特異的でしかも非常に高いレベルの免疫が誘導することが期待される。この方法は最近脚光を浴びている方法で priming-booster strategy と呼ばれている。通常は、DNA ワクチンと組換えワクチニアウィルスの組み合わせであるが、我々は、HVJ リポソーム DNA ワクチンと組換え BCG の全く新規な組み合わせにより BCG を越える効果のある新規結核ワクチンの開発を目指す。(岡田、吉田、山田)

さらに、新たに結核抗原遺伝子として Ag85A、Ag85B、Ag85C をクローニングし、DNA ワクチン用のプラスミドベクターを構築した。岡田、松本は結核免疫において生体内防御機構に重要な役割はたしている

サイトカイン、インターフェロンガンマ、およびインターロイキン6 関連遺伝子（インターロイキン6、インターロイキンレセプター遺伝子、gp130 遺伝子）をベクターとしてアデノウイルスを使用し、ワクチン候補物質とした。IL-6gene + IL-6 レセプター gene + gp130gene をアデノウイルスベクターに組み込み Balb/c マウスに結核菌投与7日前と投与後2日目の2回（ 5×10^8 moi）投与し、 5×10^6 個の H37Rv を i.v 後4週間後と10週間後の肺臓、脾臓、肝臓中の結核菌数を小川培地で培養し、コロニー数で測定した。その結果コントロールベクターの Adex・sw に比し有意な結核菌数の減少が認められた。すなわち、有望な予防・治療ワクチンとなることが示された。さらに、 γ -IFN gene をアデノウイルスベクターに組み込み同様の実験を行なった。その結果 γ -IFN DNA も有効な予防・治療ワクチンとなることが明らかとなった。これらのワクチンは結核菌に対するキラー T 細胞の分化・誘導及び Th1 サイトカイン（IL-2 及び γ -IFN）の産生誘導を介して抗結核効果が発揮された。

さらに、これらをワクチンしたマウス（BCG 感受性マウス：BALB/c、BCG 抵抗性マウス：C3H/He）に結核菌（病原株）を感染させ、2週目、6週目に肺内生菌数を算出することでワクチン効果の比較を行った。また、同じに臓器インデックスを算出し、病態解析も行った。（岡田、松本）

Adex ベクターに IFN- γ gene 及び IL-6-related gene をのせ、ワクチンした群については、ワクチンタイミングが重要であることが分かった。即ち、結核菌感染28日前および2日前にワクチン接種した群においては、肺内生菌数の変化は観察されなかったが、7日前および2日前にワクチン接種した群においては、肺内生菌数減少傾向が確認され、その効果は IL-6related gene

ワクチン群において有意な差として確認された。また有意な差は BALB/c マウスおよび C3H/He マウス両系統において確認できた。また、同時比較として、BCG 東京株に IFN- γ gene、または IL-6 related gene を併用してワクチン接種した群について、東京株をワクチン接種した場合との効果について比較を行った。各 Adex ベクターの投与は、各遺伝子を導入したベクターのみをワクチン接種（結核菌感染28日目および2日前）した結果、効力が確認できなかったスケジュールのみで検討を行った。この条件で検討を行った結果、東京株と比較し、IL-6 related gene ワクチンをオンした群では、C3H/He の系統において有意な肺内生菌数の減少が確認できた。この結果から、BCG 東京株ワクチン接種した結果として、獲得される結核菌感染防御免疫になんらかの影響を及ぼしていることが示唆された。（岡田、松本）しかしながら、BALB/c の系統における同様の実験結果では逆に BCG 東京株の効果を減弱させる結果が得られた。両マウスにおける大きな相違は、BCG gene の存在の有無である。ヒトにおいても BCG gene に相当する遺伝子として、natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP) gene が確認されている。この遺伝子の機能解析については現在多くの研究者の間で検討されているが、その遺伝子の有無が BCG のみでなく、結核菌の killing にも重要な役割を演じていることも考えられる。

さらに、結核免疫で重要な肺胞マクロファージを特異的に分化・活性化させる M-CSF gene をアデノウイルスベクターに組み込むことに成功した。これを用いてすでにワクチンの効果の解析を行なっている。また dendritic cell を介した結核免疫を強力に増強する CD40L DNA のプラスミドの構築に成功し、動物実験を開始した。

今回得られた結果から、少なくとも現在使われている BCG 東京株よりも優れた感染防御効果を得るための現実的な手法を考える手がかりが得られた。(岡田、松本)

(3) リコンビナント BCG ワクチン

リコンビナント BCG ワクチン: Ag85B リコンビナント BCG 単独及び BA51 (Ag85A + Ag85B + MPB51) リコンビナント BCG は BCG よりも強力なワクチンであることをマウスの結核感染(気道感染及び i.v 感染)の系で明らかにした。また、IL-2 rBCG, IL-6 rBCG, IL-18 rBCG の作製に成功し、 γ -IFN rBCG, IL-12 rBCG, Hsp65 rBCG を作製中である。毒力 gene を欠失した BCG 菌の作製に成功した。(岡田、山田、谷山)

Ag85B 導入リコンビナント BCG 1×10^6 あるいは BA51 (Ag85B + Ag85A + MPB51) リコンビナント BCG をそれぞれ 28 日前と 14 日前に 2 回皮下投与し、結核感染 ($H37Rv5 \times 10^5$ i.v) した後、4 週後と 8 週後の肺・肝・脾臓の結核菌数を測定した。その結果コントロールの BCG 東京をワクチンとした群よりも強力なワクチン効果(結核菌数の減少)を得た。これらのワクチン効果は結核菌に対するキラー T 細胞の分化・誘導を増強することにより発揮された。(岡田、山田)

さらに、よりヒトの結核感染に近い気道感染モデルを用いた。まず、BA51 リコンビナント BCG あるいは Ag85B リコンビナント BCG をマウス気道内に注入し、1~2 週後にヒト型結核菌を気道感染させた。その結果、コントロールの BCG 東京株よりも有効な予防ワクチン効果が得られた。これらのワクチン効果は γ -IFN 産生の誘導増強により発揮された。(岡田、山田)

結核菌の感染においては産生されるサイトカインの種類および量がその後の病態の

形成を左右する。本年度は感染防御に有効なサイトカインを産生するリコンビナント BCG を作成し、その効果を検定することを目的とした。また、昨年度に作成した抗酸菌由来感染防御抗原 α 抗原群 Ag85B, Ag85A, Ag85C, MPB51 を複数産生するリコンビナント BCG について、その効果を動物モデルで検討した。リコンビナント BCG に組み入れるサイトカインとして具体的には、IL-2, IL-6, IL-12, IL-18, IFN- γ を対象とした。まず、クローン化したこれらサイトカインの cDNA に制限サイトを付与し、*Mycobacterium kansasii* 菌 α 抗原遺伝子の途中に挿入した。作成された融合遺伝子を大腸菌-抗酸菌シャトルプラスミドに組み入れ、BCG 菌をこのプラスミドで形質転換した。形質転換菌を培養し、菌体内および培地中に産生されたタンパク質を回収し、目的のサイトカイン- α 抗原融合タンパク質を解析した。

α 抗原群を複数産生するリコンビナント BCG (rBCG/BA51) についてはマウスを用いて、同じ抗酸菌であるらい菌に対する感染実験でそのワクチン効果を調べた。結核菌に対するワクチン効果については岡田の研究室で行った。(山田、大原、岡田)

サイトカイン産生リコンビナント BCG マウス及びヒト IL-2, ヒト IL-6, マウス IL-12, マウス及びヒト IL-18, マウス IFN- γ についてリコンビナント BCG を作成した。いずれも当初の計画通り α 抗原との融合タンパク質として BCG 菌から発現、分泌させた。マウス及びヒト IL-2, ヒト IL-6, マウス及びヒト IL-18 産生リコンビナント BCG についてはタンパク質の解析まで終わっている。マウス及びヒト IL-2 産生リコンビナント BCG は十分量の目的タンパク質を分泌しており、そのタンパク質はサイトカインとしての活性を有していることが確認できた。ヒト IL-6, マウス及びヒト

IL-18 産生リコンビナント BCG は IL-2 に比し少量ではあるが、いずれも目的タンパク質を発現、分泌していることが確認された。結核菌の感染防御において重要であるこれらのサイトカインを発現、分泌させることができたことで、これらのリコンビナント BCG は現行の BCG ワクチンより効果が上回ることが期待できる。これらのリコンビナント BCG のワクチン効果については岡田の研究室において検定中である。マウス IL-12、マウス IFN- γ 産生リコンビナント BCG については現在解析の準備中である。(山田、大原、岡田)

α 抗原群を複数産生するリコンビナント BCG (rBCG/BA51) のワクチン効果複数の系統のマウスを用いてらい菌感染に対する rBCG/BA51 のワクチン効果を検定した。その結果いずれの系統のマウスにおいても顕著なワクチン効果が認められた。その効果は昨年度に実験をおこなった、 α 抗原群のタンパク質を単独過剰発現するリコンビナント BCG を上回っていた。感染防御に携わる宿主側の分子としては IFN- γ 及び NO が重要であることが示唆された。今回の結果から、BCG 菌体に本来存在する感染防御抗原の複数を同時に過剰発現させることで、現行の BCG ワクチンよりも有効なワクチンを作成させることが強く示唆された。さらに有効なワクチンとするためには、標的として有望な抗原を見出すことが成功の鍵となりうると考えられる。(山田、岡田)

一方、結核菌を遺伝子工学的に改変し、病原性を欠失させた結核菌を作成し、ワクチンとして使用できるか検討した。また、BCG は、結核菌と比較して約 100 種類の遺伝子が欠失していることが、遺伝子配列の解析からあきらかになっているので、我々は、このなかから重要と思われる遺伝子を大量に発現させたりコンビナント BCG

を作成して、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した。その結果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 など 10 数種の結核菌の遺伝子が発現していることが明らかになった。そこで、これら 3 種 (SmpB、FabD、および VirS) の遺伝子を欠失した結核菌の作成に成功した。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 抗原や MTSA10 抗原を発現するリコンビナント BCG も作成出来たのでこれらリコンビナント BCG の抗結核防御効果も合わせて検討する予定である。(谷山、岡田)

(4) ツベルクリン反応に代わる新しい結核感染特異的診断法の開発

ツ反に用いられる PPD は多種の蛋白を含む。この中より、結核感染に極めて特異性の高い、ツ反に代わる蛋白 DPPD のアミノ酸配列及び遺伝子クローニングに成功した。リコンビナント DPPD 蛋白は結核感染に特異的で、BCG 接種群には反応しないことがモルモットで示された。ヒトでも結核感染特異性を示すことを (in vitro) 明らかにした。(Gillis、Reed、岡田、細江、坂谷、蝶良)

ヒト型結核菌 H 37Rv 2×10^4 個 i.v 投与して感染させたモルモットに、4 週後に、リコンビナント DPPD 蛋白、又は PPD で皮内反応を施行した。その結果 12 匹中 12 匹で DPPD $2 \mu\text{g}$ でも $10 \mu\text{g}$ でも皮内反応 (DTH) 陽性 (24 時間後に判定) であった。一方、M. bovis (BCG) で免疫したモルモットに、リコンビナント DPPD 蛋白 $2 \mu\text{g}$ で皮内反応 (skin test) した群では陽性は 8 匹中 0 匹 (陽性：発赤および硬結を示すもの) であった。 $10 \mu\text{g}$ で皮内反応すると 8 匹中 2 匹のみに skin test 陽性であ

った。一方、PPD による皮内反応では 2 μ g でも 10 μ g でも全例陽性であった。同様のことが *M.bovis* BCG の代わりに、*M.kansasii*, *M.avium*, *M.scrofulaceum*, *M.fortuitum*, *M.chelonae*, *M.goroniae*, *M.terrae*, *M.smegmatis*, *M.vaccae* で免疫したモルモットに対しても DPPD は 2 μ g でも 10 μ g でも skin test 陰性、であったが PPD は 2 μ g でも 10 μ g でも 100% skin test 陽性反応を誘起した。このように DPPD は結核感染に特異的な皮内反応テストとして極めて有用であることが示された。

ヒト型結核菌に存在し、BCG に存在しない *Mtb11* 蛋白 gene のクローニングに成功した。この蛋白は *in vitro* のヒト T 細胞を結核感染者のみ特異的に増強することを明らかにした。(Gillis, Reed, 岡田)

一方、結核患者血清中には *Mtb11* と反応する抗体や 81kd の結核蛋白に結合する抗体が特異的に存在することを示した。

(Reed, 岡田, 蝶良)

さらに、ランダムファージディスプレイ法(ほとんどすべての組み合わせのアミノ酸配列を遺伝子操作でき、結核患者に特異的に反応するペプチドをほとんどすべて発見できる、新しい画期的な方法；p8 蛋白質ディスプレイファージを用い 10⁸ 個種類のランダムペプチドファージディスプレイ・ファージライブラリーと結核患者血清を反応させる；すでにこの方法で帯状疱疹と Herpes simplex の異なる抗原をはじめて発見)にて結核感染特異蛋白の検索システムを開発した。(岡田, 松本, 坂谷, 井上)

(5) 多剤耐性結核患者 PBL におけるキラー T 細胞中の結核菌殺傷蛋白 *granulysin* 発現低下。および抗 *granulysin* 抗体を用いた新しい予後診断法の確立。

多剤耐性結核患者 PBL 及び難治性結核患者 PBL において結核菌に対するキラー

分化誘導の低下、*granulysin* mRNA、TRAIL mRNA、低下を明らかにした。さらに *granulysin* に対する抗体を作製し、これらの患者の PBL のキラー T、NK での *granulysin* 発現の著明な低下を明らかにした。すなわち新しい結核予後診断法を確立した。(岡田, 井上, BML 研究所高森, 永田, 森) すなわち、それぞれ約 20 名の多剤耐性結核患者、通常の結核患者、および健康人の PBL を抗 *granulysin* 抗体を用い FACS 解析した。その結果、多剤耐性結核患者では、CD3 + CD8 + キラー T 細胞の *granulysin* 蛋白発現の著明な低下、及び CD3 - NK 細胞の *granulysin* 蛋白発現の著明な低下を明らかにした。また、キラー T 細胞の *perforin* 蛋白の発現低下も認められた。

(6) 世界に先駆けてのヒト生体内抗結核感染免疫モデルの作製：

我々が世界に先駆けて開発した SCID-PBL/hu の系で結核患者リンパ球を SCID マウスに生着させ、ESAT-6 蛋白の HLA-A2 に結合する 9 個のアミノ酸よりなるペプチドを合成し、これを SCID-PBL/hu に免疫し、ESAT-6 に特異的でしかも HLA-A2 に拘束性を示す典型的なヒトキラー T 細胞の分化誘導を示す画期的な、結核菌に対する生体内ヒト T 細胞免疫解析モデルを開発した。(岡田, 井上, 森)

(7) TRAIL は抗結核免疫に極めて重要な役割を果たしていることを初めて明らかにした。及び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

パーフォリンノックアウトマウスに抗 TRAIL 抗体を投与し、TRAIL pathway は結核感染防御に重要であることを初めて明らかにした。(岡田, 井上, 坂谷, 森) TRAIL はキラー T 細胞に発現し結核菌抑制効果に極めて重要な役割をすることを明らかに

した。すなわち、TRAIL の生理学的意義を我々は初めて明らかにした。結核感染 BALB/c マウスに抗 TRAIL 抗体を投与することにより結核の病状悪化と早期死亡が認められた。さらにパーフォリンノックアウトマウス (C57BL/6) に抗 TRAIL 抗体を投与すると肺・脾・肝臓の結核菌数が著明に増加した。

(8) BCG 接種が大人の結核予防に有効か否かの解析：

現行の BCG ワクチン接種の有効性、特に成人における追加接種がその後の結核発病を抑制できるかどうか、を検討した。国立病院・療養所の新採用看護婦および付設看護学校新入生の集団ツベルクリン反応検査を実施し、陰性者を 2 分して 1 群のみに BCG 接種を行ない、その後の長期間観察によって両群での結核発病率を比較検定した。対象者の属する施設は国立病院・療養所とするが、地方医務局単位 (例：近畿地区、九州地区など) でグループを形成して作業した。まず、近畿地区国立施設で参加意思を表明した 12 病院・療養所および 13 看護学校で開始した。ツベルクリン反応検査対象者数は看護婦 275 名、看護学生 552 名である。検査は 2 回法で実施したが、1 回目の反応が陰性の比率は、看護婦 14.2%、学生 22.3%であったが、2 回目の陰性者は看護婦 7.6%、学生 7.1%となった。対象者の世代すなわち 10 才代後半から 20 才代前半でのツベルクリン反応陰性者の比率は 7~8%と推測される。この世代での結核既感染率は数%以下と推定されていることから、陽性者の殆どは、過去の BCG 接種によるツベルクリンアレルギーが持続していることによる反応陽性と判断される。陰性と判定された看護婦 21 名と学生 39 名を無作為に 2 分し、1 群にのみ BCG を接種し追跡調査を開始した。12 年末ま

での間に、両群からの結核発病者は認められていない。この結果からは、看護職員での結核罹患率を 100/10 万人 (一般市民の 2~3 倍) と仮定して、両群 1000 名程度の対象者が必要と推計される。従って、ツベルクリン反応検査対象者の組み入れは全国規模に拡大する必要がある。なお、ツベルクリン反応検査は施設間の技術差が著しく、1 回目陽性者が 2 回目に陰性と判定される場合も少なくない施設、もしくは計測平均値が減少する施設などもあり、末梢血リンパ球の、結核菌や BCG 菌特異抗原に対する試験管内での反応等を含め、より正確なツベルクリンアレルギー測定方法の開発が必要と考えられた。(坂谷、森、螺良)

(9) 抗結核免疫

結核菌の増殖の場である単球及びマクロファージの結核菌殺菌能力、結核菌等 (BCG 菌) の増殖性を指標として、健康人と活動性結核症患者を比較し、結核菌等の細胞内増殖可・不可を決定している因子を解析した。

5%Tween80 で処理することにより、BCG 菌を生かした状態で単球を溶解することが明らかになり、 $10^6 \sim 3 \times 10^7$ cfu の細胞内 BCG 菌を数時間内に定量することが可能となった。活動性結核症患者の末梢血単球に於ける BCG 菌の増殖は、健康人の単球内より早いことが分かった。また、この事実として一致して、活動性結核症患者の末梢血単球の LPS 及び IFN- γ 刺激により産生される peroxynitrite 量は、健康人のものよりはるかに少ないことも分かった。即ち、活動性結核症患者の末梢血単球内に於ける結核菌の増殖し易さは、単球/マクロファージの中での結核菌殺菌抵抗性の減弱に原因することが強く示唆された。(上肥、岡田)

IL-18 が単独で腹腔内マクロファージか