

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。人の *in vitro* における DPPD に対する末梢血 T リンパ球の IL-2 産生能や γ -IFN、IL-6 産生能や増殖反応において特異性が示唆された。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研究中である。

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。さらに、結核患者末梢血 T リンパ球を使つての *in vitro* のサイトカイン産生能や増殖反応を解析した。この研究は国立療養所近畿中央病院で、共同研究で行なった。

(倫理面での配慮)

DPPD の *in vitro* でのヒト T リンパ球の反応性を見ることにあたり末梢血リンパ球の臨床研究等、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。

C. 研究結果

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きわめて特異性の高い、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。(S.Gillis, S.Reed, 岡田、細江、坂谷、螺良) 来年度はこれをさらに推進する。(S.Gillis, S.Reed, 岡田、細江、坂谷、螺良)

ヒト型結核菌に存在し、BCG に存在しない Mtbll 蛋白 gene 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。(S.Gillis, S.Reed, 岡田)

一方、結核患者血清中には Mtbll 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。(S.Reed, 岡田、螺良)

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 10^8 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) にて結核感染得意蛋白の検索システムを開発した。(岡田、松本、坂谷、井上)

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得意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。さらに、我々の研究により、ヒトの in vitro における DPPD に対する末梢血 T リンパ球の IL-2 産生能や増殖反応において特異性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 樋口武史、丸井洋二、螺良英郎 : 結核菌検査新指針の概要と考察 臨床検査から見た今日の医療 19:54-61,2000.
- 螺良英郎 : 最近の抗酸菌症の動向と問題点 兵庫県医師会医学雑誌 42:23-28,2000.

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

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

分担研究者 土肥義胤 大阪大学医学部 教授

研究要旨

結核菌の増殖の場である単球中の BCG 菌の増殖を指標として、外的刺激 (IFN- γ など) による増殖抑制を調べた結果、結核患者の単球は抑制されず、増殖を許すことが明らかになった。

A. 研究目的

活動性肺結核患者の単球やマクロファージ内では、何故、結核菌に対する抵抗性が減弱し結核菌の増殖を許すかについて追究し、結核症発症の原因除去及び抗結核ワクチン開発に資する知見を得ることを目的とした。

B. 研究方法

結核菌に類縁の BCG 菌量は、培養によるコロニー数ではなく、alarBlue 蛍光発光により定量した。健康人及び活動性肺結核患者の末梢血から、Ficoll-Paque 密度勾配遠心法により単核球層を分画し、磁気ビーズ法により単球以外の細胞を除き、単球を精製した。単球に BCG 菌を食菌させ、食菌された BCG 菌の増殖を測定した。食菌している単球を 0.3% saponin で細胞を破壊し、残存する BCG 生菌を alamarBlue により測定した。食菌単球の培養時、ヒト IFN- γ 、抗 Fc γ R 抗体、LPS 等を単独又は組み合わせて添加し、各試薬の BCG 菌増殖に対する影響を調べた。

(倫理面への配慮)

末梢血採取に際し使用目的を分かりやすく説明し、血液は使用後全て廃棄した。

C. 研究結果

1. alamarBlue による BCG 生菌量の測定に関して、生菌量に対する蛍光強度値が直線的に増加する $10^6 \sim 3 \times 10^7$ cfu を測定できること、更に、0.3% saponin 処理 5 分は、単球やマクロファージ細胞を完全に破壊し、蛍光強度値を極小にするが、BCG 生菌には殆ど影響を与えないことが明らかになった。

2. 単球内での BCG 菌増殖性を測定した。末梢血単球に BCG 菌を混合し、24 時間後、培地に kanamycin を添加し食菌されなかった菌を殺菌した。培養 6 日目に於ける単球内 BCG 生菌量は、健康人由来単球の場合、平均 27 倍以上に増加していた。培養液中に IFN- γ 、LPS を添加した場合、顕著な増殖抑制が見られた。抗 Fc γ R 抗体を添加した場合は少々の抑制がみられ、

IFN- γ と一緒に添加した場合、それぞれ単独より更に強い抑制があった。一方、活動性肺結核患者由来の場合は、平均 30 倍以上に増加していたが、健康人由来の場合と異なり、IFN- γ 、LPS、抗 Fc γ R 抗体の添加は、BCG 菌増殖に殆ど影響を与えなかった。これらの事実から、活動性肺結核患者の単球が、外的刺激に不応答性になり、その結果結核菌の増殖を許す可能性が示唆された。

E. 結論

単球内に於ける BCG 菌の増殖を指標として外部刺激の影響を調べたところ、活動性肺結核患者由来の単球は、健康人由来のそれとは異なり、IFN- γ 、LPS、抗 Fc γ R 抗体などの影響を殆ど受けなかった。この事実は、活動性肺結核患者に於いて結核菌の増殖を許す原因を示唆していた。

F. 研究発表

1. 論文

Fumie Shirai, Makiko Kawaguchi, Etsuko Nishida, Ping Zou, Shigekazu Ohara, and Yoshitane Dohi, Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in peripheral blood polymorphonuclear leukocytes of elderly persons. J. Clin. Microbiol. in press.

2. 白井文恵、川口真紀子、土肥義胤、田中春美:母乳の保存温度が母乳中に混入した細菌の生残に与える影響 母性衛生 42 (1)、in press.

3. 白井文恵、土肥義胤:手指表皮上の常在菌に対する消毒剤「ハイエスト」の効果 新薬と臨床 49 (10) 1062-1066 (2000)

2. 学会発表

1. Shirai F, and Yoshitane Dohi., Peripheral polymorphonuclear leukocytes at ovulatory period are in an activated state. The 5th

Korea-Japan International Symposium on Microbiology p65,2000.

2. Fumie Shirai, Shuei Doi, Makiko Kawaguchi, Asuka Murakami, Akane Sogi and Yoshitane Dohi., Regulation of enterococcal infection to non-professional phagocyte. Benzon symposium No.46: Molecular Mechanisms of innate immunity 46:13 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

結核の免疫治療に関する基礎的研究

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

マウスを結核菌でエアロゾル感染させた直後、その1週間おきにの計三回、1) 組み換えマウス IFN-gamma 腹腔内注射、2) ネブライザによる IFN-gamma の吸入、3) IFN-gamma が封入された浸透圧ポンプの皮下埋め込み、の三つの方法で結核治療を行った。いずれの方法でも、肺肉芽腫病変の有意な縮小が認められた。投与量の増加、回数を変えることにより、治療法を改善できる可能性がある。

A. 研究目的

マウス組み換え IFN-gamma を用いたマウス結核に対する免疫治療の可能性。異なった治療法による治療効果の比較。

B. 研究方法

マウスを結核菌で、エアロゾル感染させた。感染実験終了直後、IFN-gamma を、1) 腹腔注射、2) ネブライザ(オムロン社)による吸入、3) 浸透圧ポンプ背部皮下埋め込み、により投与した。それから一週おきに二回、合計三回投与した。

感染7週後、マウスを解剖し肺の組織像、肺内結核菌数(CFUで表す)、TNF-alpha、IFN-gamma、iNOS mRNAの肺組織における発現をRT-PCRにより調べた。

C. 研究結果

異なった3つの方法で治療された結核菌感染マウス肺肉芽腫性病変のサイズは、未治療感染マウスに比較して、有意に減少した。しかし、完全に肺病変は消失しなかった。肺内結核菌数は未治療感染マウスに比較して50%減少した。IFN-gamma

治療感染マウス由来肺組織におけるIFN-gamma、TNF-alpha、iNOS mRNA発現は、未治療感染マウスに比べて有意に低かった。感染の程度が、治療群で軽いことが示唆された。

D. 考察

私は、マウス結核において3つの異なった治療法を用いてもIFN-gammaが治療に有効であることを示した。今までの私の研究から実験的結核の免疫療法としてIL-18、G-CSFが有望である。ただし、進行性結核にはほとんど効果がないのでできるだけ早期に結核と診断することが必須である。感度のよい結核診断法の開発が望まれる。結核菌の標的細胞は肺胞マクロファージであり、このマクロファージはIFN-gammaにより活性化される。従って、IFN-gammaを含んだエアロゾルの吸入療法は、理にかなっていて有望な免疫治療と考えられる。

今回、予算上の制約から、量、回数を制限したが、量、回数を増やせば、もっと効果的に結核を治療できると思われる。

E. 結論

結核早期に IFN-gamma による免疫療法は有用である。腹腔、エアロゾール、浸透圧ポンプの皮下埋め込みのいずれでも治療効果が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. I. Sugawara, S. Mizuno, H. Yamada, M. Matsumoto and S. Akira:
Disruption of nuclear factor-IL6, a transcription factor, results in severe mycobacterial infection. *Am. J. Pathol.*, 158:361-366, 2001.
2. 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.*, 80:759-767, 2000.
3. I. Sugawara: IL-18 and infectious diseases, with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens. *Microbes Infect.*, 2:1257-1263, 2000.
4. I. Sugawara, H. Yamada, S. Mizuno and Y. Iwakura: IL-4 is required for defense against mycobacterial infection. *Microbiol. Immunol.*, 44:971-979, 2000.
5. K. Otomo, S. Wang, A. Masunaga, A. Iwamoto and I. Sugawara: Secondary infection of AIDS autopsy cases in Japan with special emphasis on *Mycobacterium avium-intracellulare* complex infection. *Tohoku J. Exp. med.*, 192:99-109, 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

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結核菌遺伝子は生体防御機構に対抗する結核菌の重要な手段であると考えられる。本研究はマクロファージ細胞内で発現する結核菌遺伝子を同定し、それら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。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、同定された Vir S, Smp B, および Fab D 遺伝子の欠失結核菌を作製に成功した。また、BCG には無い結核菌の Mpt 64 抗原を発現するリコンビナント BCG も作製出来た。現在その防御効果について検討中である。

A. 研究目的

日本では、依然として結核が、死亡者数第一位の感染症である。現在、BCG ワクチンがほぼ全国民に投与されているにもかかわらず、過去数年前より、結核罹患率は減少するどころか、むしろ増加傾向に転じた。そのため、抗結核ワクチンとしての BCG の有効性の再判定を含め、より有効な抗結核ワクチンの開発が望まれる。そこで、本研究では、我々は、2つのアプローチにより、BCG を超える有効な抗結核ワクチンの開発を目指している。第一は、現在使用されている BCG ワクチンは、牛型結核菌を長期間の試験管培養により病原性の減弱した株として作られたが、我々は、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を行うことである。第二は、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す。

B. 研究方法

マクロファージ細胞内での生存が結核菌の病原性に深く関わっているため、GFP レポーター遺伝子の発現をマーカーにして、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

ト BCG をあらかじめマウスに投与し、続いて、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。

C. 研究結果

結核菌のマクロファージ細胞内での生存関与する遺伝子を同定するため、結核菌のマクロファージ細胞内で発現する遺伝子のプロモーターのクローニングを行ない、SmpB、FabD および VirS 遺伝子など約 10-15 種類の結核菌遺伝子がマクロファージ細胞内でのみ発現していることを見出した。そこで、これらのうち、Smpb、FabD および VirS 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み、homologous recombination により SmpB、FabD および VirS 遺伝子欠失結核菌の作成に成功した。現在、これらの改変結核菌の病原性およびワクチンとしての有用性について検討中である。また、BCG を改良するため、およそ 100 種類の脱落している遺伝子のうち、特に T 細胞に対する反応性が強い Mpt 64 抗原をコードする遺伝子が脱落しているため、これらの抗原を大量に発現するリコンビナント BCG を作成した。すなわち、結核菌の Mpt64 のクローニングを行い、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 の HSP60 遺伝子または結核菌自身の HSP65 遺伝子の強力なプロモーターの下流に Mpt64 遺伝子を組み込みだりコンビナント BCG を作成に成功した。現在、Mpt64 を組み込んだりコンビナント BCG のワクチンとしての有用性について検討中である。

D. 考察

昨年度に引き続き、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

など 10 数種の結核菌の遺伝子が発現していることを明らかになった。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。来年度には、これら改変結果飢饉の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、Mpt 64 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。

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 の作成に成功した。現在、これらの株の性質について検討中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Narita, T., Amano, F., Yoshizaki, K., Nishimoto, N., Nishimura, T., Tajima, T., Namiki, H., Taniyama, T.: Assignment of the SH3KBP1 to human chromosome band Xp21.3-p22.1 by in situ hybridization. Cytogenet. Cell Genet. in press (2001)

2. 学会発表

1. 草野浩二、榎原真二、西村忠洋、橘公一、佐藤進、谷山忠義 : G-CSF 様作用を示す低分子化合物の探索、第 30 回日本免疫学会総会、11 月、仙台、2000
2. 成田雅、西村忠洋、西本憲弘、吉崎和幸、天野富美夫、唐橋久恵、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 は TNF 誘導アポトーシス促進する、第 30 回日本免疫学会総会、11 月、仙台、2000
3. 田島貴司、谷山忠義 : GFP 発現を指標としたマクロファージ内で発現する結核菌遺伝子の同定、第 76 回日本結核病学会総会、4 月、沖縄、2001
4. 谷山忠義、菅原勇 : 遺伝子機能を欠失

させた結核菌の作成とワクチンへの応用、第76回日本結核病学会総会、4月、沖縄、2001

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

リコンビナントBCGワクチン（rBCG）開発の研究

分担研究者 山田 毅 長崎大学名誉教授

研究要旨

現行のBCGワクチンに遺伝子操作を行ない、新規の著効なワクチンの開発を目指し、研究を行なった。結核菌の蛋白質の中で防御抗原である α 抗原群を複数過剰発現するrBCGを作成し、このrBCGを前投与することにより、マウス足蹠内に接種した*Mycobacterium leprae*の顕著な増殖抑制効果が確認できた。この効果は現行のBCGワクチンを大きくこえていた。これとは別の観点から、感染防御に働くサイトカインを産生するrBCGの作成を行ない、IL-2、IL-6、IL-18等のサイトカインをBCGから産生させることができた。rBCGは現行のBCGワクチンに代わりうる可能性を持っていることが示唆された。

A. 研究目的

現行のBCG菌を遺伝子操作で改変し、結核を始めとする抗酸菌の感染症に対して著効な recombinant BCG ワクチン（rBCG）を作成することを目的とする。

B. 研究方法

α 抗原群のうち85A、85B、MPB51をコードする遺伝子を単離する。次にBCG菌体に導入した際に発現量が上昇するように85Aのプロモーターを*M. kansasii* 85Bのプロモーターに、85Bのプロモーターを*M. avium* 85Bのプロモーターに変換する。そして、作成した85A、85B、MPB51のそれぞれの発現カセットをタンデムに抗酸菌-大腸菌シャトルベクターに挿入し、このプラスミドでBCG菌を形質転換することによって複数の α 抗原群を過剰発現するrBCG（rBCG/BA51）を作成する。サイトカイン産生rBCGの作成にはマウスおよ

びヒトのサイトカイン遺伝子を用いる（主任研究者等から供与）。具体的には、IL-2、IL-6、IL-12、IL-18、IFN- γ を対象とする。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、*M. kansasii* 菌 α 抗原遺伝子の途中に挿入し、 α 抗原-サイトカイン発現カセットを作成する。作成したカセットを抗酸菌-大腸菌シャトルベクターに挿入し、このプラスミドでBCG菌を形質転換することによってサイトカイン産生rBCGを作成する。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する。抗酸菌に対する感染防御実験はマウスを用いて行なう。1つにはらい菌に対するワクチン効果を調べる。rBCG/BA51でマウス（C57BL/6、BALB/c）を免疫し、1カ月後らい菌を足蹠に感染させ、さらに5カ月足蹠中の抗酸菌数を数える。結核菌に対す

るワクチン効果については主任研究者の研究室で行う。

なお、動物実験は当該実験施設の基準に沿って行うため、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

rBCG/BA51 は親株である BCG Tokyo 株に比し、85A、85B、MPB51 のそれぞれの抗原を少なくとも 5 倍過剰発現していた。rBCG/BA51 のワクチン効果をマウス足蹠中でのらい菌の増殖抑制効果で判定したところ、C57BL/6、BALB/c のいずれのマウスにおいても著明な効果が見られた。その効果は BCG Tokyo 株を上回っていた。特に BALB/c マウスにおいては 6 匹中 5 匹においては足蹠中の抗酸菌数が検出限界以下であった。

サイトカイン産生 rBCG については IL-2 (マウス、ヒト)、IL-6 (ヒト)、IL-12 (マウス)、IL-18 (マウス、ヒト)、IFN- γ (マウス) のそれぞれのサイトカイン産生 rBCG の作成を行なった。このうち、ヘテロダイマーを形成する IL-12 は p35、p40 のそれぞれの鎖を単独のタンパク質として、IL-12 以外は α 抗原との融合蛋白質として発現するように設計した。IL-2 (マウス、ヒト)、IL-6 (ヒト)、IL-18 (マウス、ヒト) のそれぞれのサイトカイン産生 rBCG は目的のサイトカインを発現、分泌していた。これらの rBCG は現在主任研究者によりそのワクチン効果を検定中である。IL-12 (マウス)、IFN- γ (マウス) 産生 rBCG については現在サイトカインの産生も含めて菌の性状を解析中である。

D. 考察

これまでに現行の BCG ワクチンに代わるワクチンとして、サブユニットワクチン、DNA ワクチン等の新しいワクチン作成の試みが多くなされてきた。しかし、これま

で現行の BCG ワクチンの効果を上回るものは報告されていない。今回 rBCG/BA51 がマウス足蹠中でのらい菌の増殖抑制実験において現行の BCG を超えるワクチン効果を示したことはたいへん意味深いことである。今回の結果は、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できることが強く示唆している。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。

ところで、結核菌の感染防御においては全身および局所で産生されるサイトカインのバランスが重要な役割を演じている。感染防御に働くサイトカインを BCG ワクチンから積極的に発現、分泌させることで、現行の BCG ワクチンを上回る効果を引き出させることが期待できる。今回 rBCG からのサイトカインの産生を確認できたことで、目的に一步近付くことができた。

E. 結論

現行の BCG ワクチンを遺伝子操作によって改変する rBCG は、新しいワクチンとしての可能性を十分持っていることが示された。組み入れる抗原の選択が重要である。

F. 健康危険情報

一般の組み換え DNA 実験に準ずる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Naito, M., Fukuda, T., Sekiguchi, K., Yamada, T. The domains of human fibronectin mediating the binding of antigen, the most immunopotential antigen of mycobacteria that induces protective

- immunity against mycobacterial infection. *Biochem. J.* 347 (2000) 725-731.
2. Matsumoto, S., Yukitake, H., Kanbara, K., Yamada, T. Long-lasting immunity against rodent malaria parasite infection at the blood stage by recombinant BCG secreting merozoite surface protein-1. *Vaccine* 18 (2000) 832-834.
 3. Naito, M., Matsuoka, M., Ohara, N., Nomaguchi, H., Yamada, T. The antigen 85 complex vaccine against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice. *Vaccine* 18 (2000) 795-798.
 4. Adachi, N., Matsumoto, S., Tokuhisa, M., Kobayashi, K., Yamada, T. Antibodies against mycobacterial antigens in the synovial fluid of patients with temporomandibular disorders. *J. Dent. Res.* 79 (2000) 1752-1757.
 5. Yamada, H., Matsumoto, S., Matsumoto, T., Yamada, T., Yamashita, U. Murine IL-2 secreting recombinant *Bacillus Calmette-Gu_rin* augments macrophage-mediated cytotoxicity against murine bladder cancer MBT-2. *J. Urol.* 164 (2000) 526-531.
 6. Matsumoto, S., Furugen, M., Yukitake, H., Yamada, T. The gene encoding mycobacterial DNA-binding protein I (MDPI) transformed rapidly growing bacteria to slowly growing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 182 (2000) 297-301.
 7. Ohara, N., Matsuoka, M., Nomaguchi, H., Naito, M., Yamada, T. Inhibition of multiplication of *Mycobacterium leprae* in mouse foot pads by recombinant *Bacillus Calmette-Gu_rin* (BCG). *Vaccine* 18 (2000) 1294-1297.
 8. Tabira, Y., Ohara, N., Yamada, T. Identification and characterization of the ribosome-associated protein, HrpA, of *Bacillus Calmette Gu_rin*. *Microb. Pathog.* 29 (2000) 213-222.
 9. Kitaura, H., Ohara, N., Naito, M., Kobayashi, K., Yamada, T. Fibronectin-binding proteins secreted by *Mycobacterium avium*. *APMIS* 108 (2000) 558-564.
 10. Ohara, N., Tabira, Y., Ohara, N., Yamada, T. (2000) Learning from bacteria: molecular chaperones in ribosomes and thermophilic adaptation. In: Kosaka, M., Sugawara, T., Schmidt, K.L., Simon, E. eds. *Thermotherapy in practice: Applications in Neoplasia, Inflammation, and Pain.*, Springer-Verlag Tokyo, Tokyo, Japan. pp 346-354.
 11. Ohara, N., Matsuoka, M., Nomaguchi, H., Naito, M., Yamada, T. Protective responses against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice induced by recombinant *Bacillus Calmette-Gu_rin* over-producing three putative protective antigen candidates. *Vaccine*, in press.
 12. Furugen, M., Matsumoto, S., Matsuo, M., Matsumoto, M., Yamada, T. Identification of the region of MDPI (mycobacterial DNA-binding protein I), which suppresses transcription in vitro. *Microb. Pathog.*, in press.
 13. Ohara, N., Yamada, T. Recombinant BCG vaccines. *Vaccine*, submitted.
 14. 山田 毅：組換えBCGワクチンの研究。結核 75 (2000) 717-520.
 15. 山田 毅：抗酸菌に対する予防ワクチン。Jpn. J. Leprosy 69 (2000) 71-75.
2. 学会発表
1. Yamada, T., Ohara, N., Naito, M., Nomaguchi, H., Matsuoka, M. The 85 complex vaccine against experimental

- Mycobacterium leprae infection in mice, Fifth International Conference Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim (Chennai, India), 2000.
2. Hatta, M., Ohara, N., Yamada, T. r-BCG vaccine in human: preliminary clinical trial, Fifth International Conference Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim (Chennai, India), 2000.
 3. Ohara, N., Matsuoka, M., Nomaguchi, H., Naito, M., Yamada, T. Inhibition of multiplication of Mycobacterium leprae in mouse foot pads by recombinant BCG vaccination, Thirty-fifth Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis. The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (Yokohama), 2000.
 4. Okada, M., Tanaka, T., Inoue, Y., Katayama, Y., Yoshida, S., Ohara, N., Yamada, T., Kayagaki, N., Yagita, H., Okumura, K., Sakatani, M., Mori, T. DNA and recombinant BCG vaccination against tuberculosis and cytotoxic activity in the patients with multi-drug resistant tuberculosis, Thirty-fifth Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis. The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (Yokohama), 2000.
 5. Naito, M., Fukuda, T., Sekiguchi, K., Yamada, T. The domains of human fibronectin mediating the binding of antigen, the most immunopotent antigen of mycobacteria that induces protective immunity against mycobacterial infection. The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (Yokohama), 2000.
 6. 岡田全司, 片山友子, 井上義一, 細江重人, 四元正一, 安光恵一, 浜口由香子, 坂佳志子, 坂谷光則, 森隆, 奥村康, 八木田秀雄, 榎垣伸彦, 山田毅, 大原直也, 吉田栄人: 結核患者におけるキラーTリンパ球機能の研究と新しい結核ワクチン開発の試み, 第70回実験結核研究会(大阪), 2000, 抄録集 pp.5-6, 2000.
 7. 野島康弘, 梅森清子, 山本十糸子, 大原直也, 佐藤由紀夫, 山田毅, 山本三郎: ミコバクテリア感染防御抗原遺伝子を用いた抗結核DNAワクチンの作製, 第70回実験結核研究会(大阪), 2000, 抄録集 p34, 2000.
 8. 山田毅, 大原直也, 松岡正典, 野間口博子, 内藤真理子: 組換えBCGワクチンによるMycobacterium lepraeの増殖抑制, 第73回日本細菌学会総会(札幌), 2000, 日本細菌学雑誌 55, 177, 2000.
 9. 野島康弘, 梅森清子, 山本十糸子, 大原直也, 山田毅, 山本三郎: ミコバクテリア感染防御抗原遺伝子を用いた抗結核DNAワクチンの作製(第1報), 第73回日本細菌学会総会(札幌), 2000, 日本細菌学雑誌 55, 178, 2000.
 10. 北浦英樹, 大原直也, 山田毅: 抗酸菌の重感染によるHIV-1複製亢進とサイトカインについて, 第73回日本細菌学会総会(札幌), 2000, 日本細菌学雑誌 55, 211, 2000.
 11. 松尾長光, 大原直也, 内藤真理子, 山田毅: BCG感染マクロファージの細胞質蛋白質の解析, 第73回日本細菌学会総会(札幌), 2000, 日本細菌学雑誌 55, 280, 2000.
 12. 大原直也, 大原直子, 山田毅: BCG菌感染により発現が変化する骨芽細胞の遺伝子の解析, 第73回日本細菌学会総会(札幌), 2000, 日本細菌学雑誌 55, 382, 2000.
 13. 出平泰広, 大原直也, 山田毅: BCG菌低分子ストレス蛋白質HrpAの生化学的解析, 第53回日本細菌学会九州支部総会,

第 37 回日本ウイルス学会九州支部総会
(長崎), 2000, 抄録集 p52, 2000.

14.大原直也, 山田毅:細胞内寄生菌感染骨
芽細胞の遺伝子の解析, 第 42 回歯科基
礎医学会学術大会(大阪), 2000, 歯科
基礎医学会雑誌 42, 450, 2000.

15.梅森清子, 野島康弘, 山本十糸子, 山田
毅, 山本三郎:細菌 DNA による免疫活
性を増強するミコバクテリア由来 DNA
結合蛋白質, 第 30 回日本免疫学会総会
・学術集会(仙台), 2000, 抄録集 p283,
2000.

16.田中高生, 井上義一, 細江重人, 坂谷光
則, 森隆, 大原直也, 山田毅, 柏村信一郎,
吉田栄人, 岡田全司:結核に対する新し
い DNA ワクチン開発の試み, 第 30 回日
本免疫学会総会・学術集会(仙台),
2000, 抄録集 p296, 2000.

17.野島康弘, 梅森清子, 山本十糸子, 大原直
也, 山田毅, 山本三郎:ミコバクテリア
抗原遺伝子を用いた DNA ワクチン及び
リコンビナント BCG ワクチンの抗結核
効果,第 30 回日本免疫学会総会・学術集
会(仙台), 2000, 抄録集 p297, 2000.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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 吉田 栄人 自治医科大学医動物学 講師

研究要旨

マウス実験系において、遺伝子銃による結核 DNA ワクチン 1 回接種で BCG を上回る感染防御効果を得ることができた。この感染防御には IFN- γ を誘導する Th1 タイプの免疫応答が重要な役割を演じていると考えられる。

A. 研究目的

BCG に代わる強力で安全な新規結核ワクチンの開発の一端として、結核 DNA ワクチンの開発を目指す。

B. 研究方法

結核 DNA ワクチンを遺伝子銃を用いてマウスに免疫してその感染防御効果を検討する。さらに IL-12 遺伝子との同時接種により Th-1 タイプの免疫応答が誘導され、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する。

（倫理面への配慮）

実験動物はすべて麻酔下で処置した。

C. 研究結果

Hsp65 DNA ワクチンと IL-12 発現ベクター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、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かった。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。一方、*in vitro* 解析により T 細胞の増殖能と IFN- γ の産生も確認された。

D. 考察

結核 DNA ワクチンの開発は世界で多くの研究グループがしのぎを削っているが、ヒトへの応用には一歩及んでいないの現状である。今回の実験結果は結核 DNA ワクチンの大きな可能性を示し、実用化に向けての大規模実験を視野に入れた研究開発へと発展すると期待される。

E. 結論

遺伝子銃による 1 回免疫で BCG を上回る感染防御効果を得たことは非常に意義のある成果である。引き続き新規結核ワクチンを開発することを最終ゴールとして研究を推進していく。特に DNA ワクチンの開発を主体として結核菌の新規抗原遺伝子をクローニングし、その遺伝子の DNA ワク

チンとしての有効性を検討する。同時に結核に対する免疫として T 細胞がどのように関与しているのか明らかにし、予防や治療の新たな方法の開発の足がかりとする。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 107-115, 2000.
2. *Infect. Immun.* 68: 3186-3192, 2000.
3. *Med. Entomol. Zool.* 51: 13-20, 2000.
4. *Mol. Biochem. Parasitol.* (in press)

2. 学会発表

1. Oxford 2000 -New challenges in tropical medicine and parasitology. Oxford, UK. Sept.18-22, 2000
2. 第 41 回日本熱帯医学会研究奨励賞受賞講演、東京、2000. 11. 10-11.

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

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

分担研究者 熊沢義雄 北里大学理学部 教授

研究要旨

新しい結核ワクチンの開発のために、抗結核免疫を誘導できる菌体有効成分を用いてコンポーネントワクチンを再構築するために必要な条件について検討した。結核菌のアジュバント活性に及ぼす影響について、まず、コードファクター (trehalose 6,6'-dimycolate, TDM) の生体に及ぼす作用を調べた。TDM を w/o/w としてマウス腹腔内に投与すると Th1 を主体とした免疫応答を誘導することがわかった。ミコール酸を含有しない sulfolipid (SL) は免疫賦活作用が認められず、TDM に対しアンタゴニスト作用のあることがわかった。次に、精製ツベルクリン (PPD) あるいは卵白アルブミン (OVA) を抗原として各糖脂質のアジュバント活性を調べた。結核菌青山 B 株由来の TDM を標準試料として、Rhodococcus 由来の糖脂質とを比較したところ、結核菌 TDM のアジュバント活性は用量依存的であり Rhodococcus 由来の糖脂質を投与した群では結核菌 TDM と比べて活性は弱いことがわかった。ワクチン接種時における、これら糖脂質の肉芽腫形成能と毒性を検討し、BCG 菌の細胞壁骨格 (CWS, Tokyo 172 株と Connaught 株)、Rhodococcus の CWS、BCG 菌の TDM および Rhodococcus の TDM を w/o/w として静脈内に投与後、体重減少および臓器インデックスを指標にして観察したところ、CWS の体重減少作用は弱かったが、特定臓器に対して毒性のあることが明らかになった。さらに、結核菌由来の低分子量の抗原 ESAT-6 をベクターに組み込み真核生物で発現させること、結核菌の培養液に見いだされる 19 kDa のリポタンパク、CFP10 (culture filtrate protein 10) の分離・精製についても検討している。

A. 研究目的

結核感染に対する免疫が誘導でき、生菌ワクチンより安全で副作用がないコンポーネントワクチンの開発が望まれているが、まだ満足できるものは完成していない。抗結核免疫が誘導できる有効成分を用いて、コンポーネントワクチンを再構築する際には、持続的な抗原刺激により強い抗結核免疫が誘導できるアジュバントの開発が必須

である。結核菌のアジュバント活性物質に関する研究は細胞壁骨格 (CWS) やコードファクターについて行われてきた。コードファクターはトレハロースの 6,6' 位の水酸基にミコール酸が結合した構造を有し、ミコール酸は菌種によって化学構造や炭素数が異なる。Mycobacterium tuberculosis 青山 B 株由来の TDM は、ミコール酸の炭素数 C76 で Rhodococcus sp. 4306 由来の

TDM は、ミコール酸の炭素数 C36 である。また、ミコール酸 1 分子が結合した trehalose monomycolate (TMM) やグルコースやマンノースにミコール酸が結合した glucose monomycolate (GMM) や mannose monomycolate (MMM) といった糖脂質の存在も報告されている。そこで、炭素数の違いがこれら糖脂質のアジュバント活性にどのような影響を与えるかについて検討した。

B. 研究方法

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

試料：人型結核菌 *M. tuberculosis* 青山 B 株から単離した TDM (mTDM) は日本 BCG 研究所中央研究所より、*Rhodococcus* sp. 4306 由来の糖脂質、rTDM、rTMM、rGMM、rMMM はクラブコスメチック（株）より分与されたものを用いた。

試料の調製：糖脂質（10, 30, 100 mg/mouse）を Freund's 不完全アジュバント（IFA）に溶解し、卵白アルブミン（OVA、50 mg/mouse）PBS 溶液を同量加えホモジナイズし、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 エマルジョンを作製した。試料はマウス当たり 200 μ l ずつ背側皮下に投与した。

細胞培養：免疫後 3 週目のマウスの脾臓から細胞を採取し、10%FCS 添加 RPMI1640 培地に浮遊して細胞懸濁液（ 8×10^6 /ml）を作製した。この 100 μ l を 96 穴平底プレートに分注し、抗原として OVA を 50 mg/ml になるように添加した。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ インキュベーター内で 72 時間培養し、培養上清を 1,500 rpm で 3 分遠心した後、上清を回収した。

ELISA：IFN- γ の測定は抗 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 で行なった。抗体価測定は HRP-Goat 抗マウス IgG 抗体を用いた。

C. 研究結果

1. TDM のアジュバント作用の解析

TDM 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 産生を認めた。肝臓の単核細胞のフェノタイプをフローサイトメトリーで解析したところ、TDM 投与により NK 細胞数が著しく増加した。一方、NK1.1 + CD4 + T 細胞は TDM 投与により消失した。MHC クラス II 抗原や CD1d の発現も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ことがわかった。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た。

2. 他の糖脂質のアジュバント作用の比較

抗原として PPD を用いて、結核菌青山 B 株由来の TDM を標準試料として、*Rhodococcus* 由来の糖脂質、rTDM、rTMM、rGMM、rMMM を 400 あるいは 100 mg ずつ投与し、3 週間後に所属リンパ節を採取し、試験管内で抗原刺激を行ない、産生される IFN- γ 量を指標にしてアジュバント活性を調べた。その結果、400 mg では rTMM と rMMM が、100 mg では rGMM に高い活性を認めた。この違いを確認するため、OVA を抗原として実験を行なった。OVA とともに各種糖脂質をマウスに免疫し、3 週間後に血清を採取した。血清の抗 OVA 価を測定したところ、mTDM のアジュバント活性は用量依存的であり、100 mg として投与した群の抗体価が最も高かった。*Rhodococcus* 由来の糖脂質を投与したときもアジュバント活性を認めたが、

mTDM と比べると活性は弱かった。

3.糖脂質の肉芽腫形成能と毒性

ワクチン接種時の肉芽腫形成能と毒性について検討するため、BCG 菌の CWS (Tokyo 172 株と Connaught 株)、Rhodococcus の CWS、BCG の TDM および Rhodococcus の TDM を w/o/w として静脈内に投与し、体重減少および投与7日後の肺、脾臓、肝臓の臓器インデックスを指標にして評価した。BCG-TDM に遅延型体重減少を認めた。Rhodococcus-CWS と rTDM による体重減少は一過性であった。脾臓重量はいずれの試料を投与したときにも認められたが、CWS の作用は著しかった。従って、CWS の体重減少作用は弱かったが、特定臓器に毒性を示した(学会発表予定)。

4.防御抗原の作製

低分子量の抗原である ESAT-6 は真核生物で発現できるように pVax1 というベクターに組み込む実験を行なっている。また、結核菌の早期培養液に見いだされる 19 kDa や CFP10 (culture filtrate protein 10) を作製するため、結核菌以外の Mycobacterium kansasii から分離・精製する準備をしている。

D.考察

糖脂質を w/o/w エマルジョンで投与したときのアジュバント活性を抗体産生増強作用および Th1 誘導作用で検討したところ、mTDM が最も高い活性を示した。肉芽腫形成能も高かった。rTDM や rGMM は mTDM と比べ、アジュバント活性はやや弱い、肉芽腫形成能が弱いなどの毒性も低いことから低毒性の効果的なアジュバントとして期待される。

E.健康危険情報

糖脂質のアジュバント活性の検討におい

て、抗体産生増強作用および Th1 誘導作用で最も高い活性を示した mTDM はミコール酸鎖長が長いことから、毒性が強いのでワクチンのアジュバントとして適当ではないと考えられる。

G.研究発表

1.論文発表

- 1.Ryll R., Watanabe K., Fujiwara N., Hasunuma R., Kumazawa Y., Okada M. and Yano I
Mycobacterial cord factor, but not sulfolipid, causes depletion of NKT cells upregulation of CD1d1 on murine macrophages. submitted.
2. Ryll R., Hirai M., Okada M., Fujiwara N., Tomiyasu I., Kumazawa Y. and Ynano I.
Inhibition of TDM-induced TNF-alpha release by sulfolipid: a potential new virulence mechanism of Mycobacterium tuberculosis. submitted.

2.学会発表

1. "M. bovis 2000" (August 14-16, 2000; Cabrigde, St. John's College)
Ryll RR, Watanabe K, Fujiwara N, Hasunuma R, Kumazawa Y., Okada M, and Yano I.
Mycobacterial cord factor, but not sulfolipid causes depletion of NKT cells and upregulation of CD1d on murine macrophages.
- 2.日本細菌学会 (5月29-31日、2000年札幌市札幌京王プラザホテル)
Ryll R., Watanabe K., Hasunuma R., Kumazawa Y. and Yano I.
"Cord factor induces depletion of liver NKT cells and CD1d-upregulation on macrophages."
- 3.日本免疫学会 (11月14-16日、2000年

仙台市仙台国際センター)

Ryll R., Hirai M., Fujiwara N., Kano H.,

Kumazawa Y. and Yano I.

Antagonistic effect of sulfolipid on TNFalpha
release induced by trehalose dimycolate.