

33. 滝澤万里、芳賀伸治、千葉丈、浅野敏彦、山崎剛、本多三男 「フローサイトメトリーを用いモルモットの白血球 subset の解析の確立と BCG 免疫の解析」(第 70 回実験結核研究会 4/17-19 大阪)
34. Kazuhiro Matsuo, T. Ohsu, T. Hamano, M. Kanekiyo, K. Ishii, K. Kato, Z. Matsuura, T. Miyamura, M. Minamitani, M. Hamatake, Y. Nagai, S. Yamazaki, and M. Honda. (松尾和浩、大洲竹晃、浜野隆一、兼清優、浜武牧子、永井美之、山崎修道、本多三男) Highly immunogenic live recombinant BCG and vaccinia virus DIs strain both of which express whole Gag antigen of HIV-1. The 13th International AIDS Conference (9-14 July 2000 Durban South Africa)
35. 滝澤万里、芳賀伸治、千葉丈、浅野敏彦、本多三男 「モルモットの BCG 免疫における活性化 T 細胞の検出とその生物学的意義」(第 10 回日本サイトメトリー学会 2000. 8. 5-6 東京)
36. 滝澤万里、芳賀伸治、千葉丈、浅野敏彦、本多三男 「BCG 免疫における DTH 反応と組織の活性化 T 細胞との相関」(第 30 回日本免疫学会総会 2000. 11/14-16 仙台)
37. 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、大阪市、2000 年 4 月。
38. Akagawa, K.S., Komuro, I., Yamazaki, T. and Haga, S.: M-CSF- but not GM-CSF-induced human monocyte-derived macrophages inhibit growth of M. tuverulosis. US-Japan cooperative medical science program 35th Tuberculosis and Leprosy Reserch Conference. Yokoham, July 2000.
39. 赤川清子：リンパ網内系細胞の多様性と生体防御 - ヒト単球由来マクロファージの多様性を中心に、第 40 回日本リンパ網内系学会総会シンポジウム “リンパ網内系と生体防御” 浜松市、2000 年 8 月
40. 赤川清子、小室巖、岸 文雄：ヒト単球由来マクロファージの結核菌の増殖及び増殖抑制機構の解明、第 30 回日本免疫学会総会、仙台市、2000 年 11 月
41. 川野英治、小室巖、赤川清子：ヒト単球由来マクロファージにおける NO 産生能について、第 30 回日本免疫学会総会、仙台市、2000 年 11 月
42. 芳賀伸治・山崎剛・山崎利雄・赤川清子：結核感染近交系モルモット Strain 2、Strain 13 又は Hartley における脾臓、肺臓、リンパ節の還元培養菌数及び皮膚反応など遅延型過敏反応の差異について。第 76 回日本結核病学会総会、2001 年 4 月、沖縄。
43. 山崎剛・山崎利雄・赤川清子・浅野敏

- 彦・本多三男・芳賀伸治：近交系モルモット Strain2, Strain13, Hartley における結核菌感染に対する応答性の差異。第71回実験結核研究会総会、2001年4月、沖縄。
44. 芳賀伸治・山崎剛・山崎利雄・山本三郎・赤川清子・本多三男：BCG-Tokyo株免疫モルモットの結核菌経気道噴霧感染法による結核防御効果の評価。第71回実験結核研究会総会、2001年4月、沖縄。
45. 山崎剛・山崎利雄・山本三郎・芳賀伸治：結核菌濃厚感染に対するBCGワクチンの防御効果。第76回日本結核病学会総会、2001年4月、沖縄。
46. 山崎剛・山崎利雄・赤川清子・芳賀伸治：BCGの皮下及び経気道接種による結核菌噴霧感染への防御効果。第74回日本細菌学会総会、2001年4月、岡山。
47. 山崎利雄、山崎 剛、芳賀伸治、赤川清子、山本三郎、結核菌とBCGの鑑別同定法の検討、第83回日本細菌学会関東支部総会、2000年11月、東京。
48. 山田毅、大原直也、松岡正典、野間口博子、内藤真理子：組み換え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、平成12年5月30日（札幌）。
49. N. Ohara, M. Matsuoka, H. Nomaguchi, M. Naito and T.

Yamada: Inhibition of multiplication of *Mycobacterium leprae* in mouse foot pads by recombinant BCG vaccination. US-Japan cooperative medical science program, Thirty-Fifth Tuberculosis and Leprosy Research Conference. Yokohama, July 21, 2000.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

II. 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

抗結核ワクチンの開発と評価に関する研究

主任研究者 山本 三郎 国立感染症研究所室長

研究要旨

BCG 由来 α 抗原遺伝子ファミリーを組み込んだリコンビナント BCG(rBCG)でモルモットを免疫し、有毒結核菌噴霧感染に対する結核菌感染防御能を検討した。その結果、いずれの rBCG も親株 BCG と同等以上の防御効果をもたらした。とくに 3 種類の抗原遺伝子 (Ag85A+Ag85B+MPB51) を同時発現させた BA51-rBCG による感染防御能は他に比べて有意に高く、かつ親株 BCG より優れた感染防御能を示した。また抗原遺伝子 (Ag85A、Ag85B、Ag85C、MPB51、MPB51+Ag85A、HSP65、MPB64、MDP1) を発現する DNA ワクチンを構築し感染防御能を検討した。さらに結核免疫の解析に有用でありながら、これまでヒト・マウスと異なり解析が遅れていたモルモットサイトカインのうちインターフェロン測定系を樹立した。

A. 研究目的

結核は、世界人口の 3 分の一が感染者といわれ、単一の病原体に基づく疾患としては人類にもっとも多くの死をもたらしている。BCG ワクチンは、80 年近い経験から十分に安全かつ安価であることなどから世界中の子供たちに接種されているが、子供の重篤な結核に対してはきわめて有効とされるものの、成人の肺結核に対する有効性は平均 50%程度とされている。BCG の効果を改善する必要性はこの数年言われつづけてきたが、微生物学、遺伝学、バイオテクノロジー分野での著しい進歩は結核ワクチンの改良についてもいろいろな手段を利用可能としている。一方、モルモットは人類と結核との闘いにおいてもっとも貢献してきた実験動物と言える。モルモットが結核モデルとして優れているのは、(i) ごく少

数の菌で気道ルートから再現性よく感染させることができる、(ii) 感染から発症にいたる経過がヒトに良く似ている、(iii) 結核菌による遅延型過敏反応や肉芽腫反応はヒトと類似の反応である、(iv) BCG 接種による防御効果を評価するのに優れている点である。そこで、ミコバクテリア抗原遺伝子を用いた rBCG 及び DNA ワクチンのヒト肺結核モデルとしてモルモットを用いた噴霧感染系で有毒結核菌感染防御能を検討することを第一の目的とした。一方、モルモットはヒトの結核モデルとして研究するうえで有用であるが、ヒトやマウスに比べ、モルモットに関する免疫学がほとんど進んでいないこと、したがって免疫細胞の表面抗原やサイトカイン、あるいはそれらの抗体が入手不能ないし人手困難なため、免疫学的な解析がほとんど不可能に近い欠

点がある。サイトカインの中でインターフェロン(IFN)とくに IFN- γ は結核菌に対する宿主応答でもっとも重要なサイトカインであり、モルモットによるヒト結核のモデル研究において、信頼性が高くかつ迅速な測定法が要請されてきたことから、モルモットインターフェロンの測定系の樹立を第二の目的とした。

B. 研究方法

BCG 由来 α 抗原ファミリー (Ag85A, 85B, 85C, MPB51) 遺伝子、らい菌由来 HSP65 遺伝子、BCG 由来 MPB64 遺伝子及びミコバクテリア由来核酸結合性タンパク質 (MDP1) 遺伝子を用いた。rBCG は長崎大学の山田・大原らによって作出され遺伝子を過剰発現する 85A-rBCG、85B-rBCG、85C-rBCG、MPB51-rBCG 及び Ag85A、Ag85B、MPB51 の 3 遺伝子を組み込んだ BA51-rBCG を用いた。免疫増強性オリゴ DNA 配列である 5'-AACGTT-3' を含む pACB ベクターおよび pcDNA3.1 ベクターは CMV プロモーター/エンハンサーを持ち、ウシ成長ホルモン (BGH) 由来の pA 及びアンピシリン耐性遺伝子 (AmpR) を組み込んだプラスミド DNA であり、外来遺伝子を挿入するためのマルチクローニングサイト (MCS) を有する。pACB に抗原遺伝子を組み込んだ 85A-pACB、85B-pACB、85C-pACB、MPB51-pACB、Ag85A と MPB51 遺伝子を組み込んだ 51A-pACB、HSP65-pACB、MPB64-pACB および BCG または結核菌 MDP1 遺伝子を含む TB-MDP1/pcDNA、BCG-MDP1/pcDNA

を用いた。構造は制限酵素を用いた分析で確認し、タンパク質発現はプラスミドを導入した COS-7 細胞 lysate のウエスタン・ブロットで確認した。免疫はそれぞれ 1 群 5 匹のモルモットに rBCG は 10^3 cfu を単回皮内に、DNA ワクチンは $200 \mu\text{g}$ ずつ 3 週間隔で 3 回、筋肉中に投与した。陽性コントロールとして BCG-Tokyo 株、陰性コントロールとして生理的食塩水を投与した。BCG または rBCG の投与 8 週間後あるいは DNA ワクチンは 3 回目投与の 6 週後に *M.tuberculosis* H37Rv ($5-10$ CFU) を噴霧感染装置内で気道感染させた。ツベルクリン反応: ツベルクリン反応: BCG 接種 8 週間後または DNA ワクチン 3 回目接種の 6 週間後、モルモット背部皮下に PPD2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を 0.1ml 皮内接種し、24 時間後に局所の硬結を測定した。噴霧感染及びその後の飼育はすべて生物学的封じ込めレベル 3 (BSL3) の動物実験室及び動物飼育室で行った。5 週間後に剖検して肺・脾を摘出した。臓器内生菌数測定は、肺及び脾をホモジナイザーで均質化後、それらの一部を Middlebrook 7H10 寒天平板に接種し、3 週間後のコロニー数を計測して行った。モルモットインターフェロン (IFN): モルモットに BCG (Tokyo-172) を 10^3 CFU 皮内接種して免疫した。免疫 8 週間後、モルモットから脾臓を摘出、メッシュを通して浮遊細胞した。脾細胞 ($1 \times 10^7/\text{ml}$) と免疫増強性オリゴ DNA MY-1 ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) または特異抗原のツベルクリンタンパク質 PPD ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) を 5% 炭酸ガスフラン器中で 37°C 24 時間混合培養した上清をモルモット IFN とした。細胞株: モルモット細胞株 3 株 (GPC-16、

104C1, JH4)、ヒト細胞株2株(A549, FL)、マウス細胞株1株(L929)を用いた。

ウイルス株：EMCV、VSV、SBVを用いた。

モルモット IFN 検出法：あらかじめそれぞれの細胞株を96穴平底培養プレートに2-5 x 10⁴/ウエルずつ播き、96穴Uプレート上でモルモット IFN 試料の培養上清の2段階希釈系列をつくり、平底プレートの各穴へ加え、一晚培養した後、適当な指示ウイルスを添加した。24-40時間培養後、試料のCPE抑制効果を細胞染色によって判定した。ヒト IFN- α の国内標準品を標準とした。

細胞染色：反応終了後、各穴から培養液を除き、細胞を10%ホルマリン液で10分間固定したのち、ナフトール・ブルー液(0.06% Naphthol Blue, 0.1% 酢酸ナトリウム、9% 酢酸)で染色、流水で洗浄後乾燥した。各穴に100 μ lの0.1N水酸化ナトリウム液を加えプレート・リーダーで655 nmの吸光度を測定した。

生細胞測定：WST-1と1-メトキシPMSを1:1に混合してその10 μ lを各穴に添加し、2時間培養したのち、25 μ lの1N硫酸を添加して反応を停止させ、450nmと655nmの吸光度をプレート・リーダーで測定した。

C. 研究結果

ツベルクリン反応：rBCGで免疫したモルモットのツベルクリン皮内反応は、親株のBCGで免疫したモルモットより強い反応を示した。皮内反応に関しては抗原遺伝子

数の違いはほとんどなかった。抗原遺伝子Ag85A、Ag85B、Ag85C、MPB64、HSP65、MDP1のDNAワクチンで免疫したモルモットのツベルクリン皮内反応は弱かった。結核菌感染防御能：rBCGで免疫したモルモットの結核菌感染防御能を検討したところ、いずれのrBCGも親株BCGと同等ないしはそれ以上の防御効果をもたらした。とくに3種類の抗原遺伝子(Ag85A+Ag85B+MPB51)を同時過剰発現させたBA51-rBCGによる感染防御能は他に比べて有意に高く、かつ親株BCGより優れた感染防御能を示した。一方、抗原遺伝子(Ag85A、Ag85B、Ag85C、MPB51、(MPB51+Ag85A)、HSP65、MPB64を発現するDNAワクチンのモルモットの結核菌噴霧感染に対する防御免疫能は、有意な結核防御効果をモルモットにもたらしたが、BCGの防御効果を越えることはなかった。BCGまたは結核菌MDP1遺伝子を発現するDNAワクチンは結核菌噴霧感染による防御能は認められなかった。

モルモット IFN の CPE 抑制効果：まず市販の IFN 測定キットがモルモット IFN 測定に使用可能かどうか調べるためヒト IFN- γ 測定用 ELISA キットを検討したが、いずれのキットもモルモット IFN 測定は不能であった。次にバイオアッセイ法を検討するため、すでに述べたモルモット細胞株、マウス細胞株、ヒト細胞株とウイルスの組み合わせでモルモット IFN の検出を試みた。その結果、モルモット IFN はモルモット細胞株に対してのみ抗ウイルス効果を発揮すること、ヒト細胞株やマウス細胞株はモルモット IFN では防御されることが明らかとなった。逆に、ヒト IFN- γ 、

マウス IFN- γ 、ブタ IFN- γ 、イヌ IFN- γ は、いずれもモルモット細胞株の CPE を防御しなかった。一方、ヒト IFN- α は、モルモット細胞株の CPE に抑制活性を示した。これらの結果は IFN- γ の抗ウイルス活性が IFN- α より高度な種特異性を持つことを示している。また、用いた3種のモルモット細胞株のうち、104C1細胞は維持が容易で EMCV による CPE が他の細胞株とウイルスの組み合わせに比べて明確であることがわかった。

ウイルス濃度：モルモット細胞株 104C1 の EMCV に対する CPE とモルモット IFN による CPE 抑制効果を検討した。96 穴平底プレートに細胞 3×10^4 /ウエル をまき、一晚培養後、モルモット IFN 試料の2段階希釈を加えて、さらに一晚培養した。翌日、EMCV の各濃度を添加、ウイルスチャレンジから 24 時間後、生細胞を WST-1/1-メトキシ PMS で検出した。その結果、MOI が 0.00033 と 0.001 では EMCV による CPE はまったく認められなかった。また MOI 1 と 0.3 では CPE 抑制効果が明瞭に得られなかった。MOI 0.01 と 0.1 の間ではウイルスによる CPE とモルモット IFN 試料による CPE 抑制効果が明瞭に観察された。モルモット細胞株 104C1 と EMCV によるヒト IFN- α の CPE 抑制効果も同じ MOI で認められた。

BCG 免疫モルモット IFN：BCG で免疫したモルモットの脾細胞を MY-1 または PPD と混合培養した培養上清中のモルモット IFN 活性をバイオアッセイ法で測定した。一晚培養した 104C1 細胞に脾細胞上清の2倍希釈液を添加し、18時間後 EMCV を MOI 0.03 で添加した。24時間後のモル

モット IFN による CPE 抑制効果を色素取込法または WST-1 変法で生細胞数を算定した。生細胞測定法による OD 値は色素取込法によるよりも広い範囲にわたったが、いずれの方法によっても 50% CPE 抑制を示す IFN 力価はほぼ同じ値であった。すなわち、色素とり込み法によるモルモット IFN の力価は、ヒト IFN- α の力価換算で、MY-1 刺激で 107U、PPD 刺激では 18U であった。また生細胞測定法では、同様に、MY-1 刺激で 93U、PPD 刺激で 16U であった。モルモット IFN 試料を抗ヒト IFN- γ 抗体、抗ヒト白血球 IFN 抗体、抗ヒト IFN- α で 30 分間処理したところ、CPE 抑制効果にはほとんど影響を与えなかった。これらの結果は、用いた抗体のいずれによってもモルモット IFN は中和されなかったことを示している。一般に IFN- γ は pH2 処理で失活するが、IFN- α は影響を受けないことが知られている。この方法によって BCG 免疫モルモット脾細胞と PPD の培養上清中のモルモット IFN には pH2 に感受性の IFN- γ と pH2 処理に抵抗性の IFN- α/β が含まれる可能性が示唆された。アッセイの信頼性：BCG 免疫モルモット脾細胞と MY-1 または PPD との混合培養中の IFN 力価について 10 回のばらつきを算定したところ、MY-1 刺激での IFN 力価は 70.9 ± 13.5 U、PPD 刺激での IFN 力価は 14.9 ± 2.4 U であった。これらからモルモット IFN 力価を測定するこのバイオアッセイが十分な信頼性を有することが示された。

D. 考察

結核に対する新規ワクチンを考えるとき、どのようなワクチンタイプがもっとも高い防御能が期待できるかについて多くの議論が行われてきた。すなわち、結核菌から「なにか」を除去して高い防御能を有する弱毒結核菌ワクチンを作成すること、あるいは安全な現行の BCG ワクチンに「なにか」を足して、防御能を高めることについてさまざまな試みが行われている。一方、成分ワクチンとして従来からのタンパク質ワクチンは適当なアジュバントの選択が重要である。また生菌ワクチンと成分ワクチンの中間には DNA プラスミドワクチンがある。弱毒結核菌ワクチンは、その安全性に対する疑問が実用化における大きな障害となっている。ここでは、安全が保証されている BCG に抗原を過剰発現させる rBCG と、同じく結核菌のたんぱく質を生産できる DNA ワクチンの作成と防御能を検討した。考慮されるべき次に重要な点は、どの防御抗原を選択するかにある。結核の感染防御に有効な細胞性免疫は主に分泌タンパク質によって誘導されることが知られ、熱ショックタンパク HSP65、HSP70、Ag85、38KD-Ag、ESAT-6、MPT70 などをコードする遺伝子が使われる。HSP65 タンパク質および Ag85 タンパク質はともに特異的な細胞性免疫をマウスに誘導することができ、結核菌の腹腔または経気道感染に対して BCG と同等の感染抵抗性を付与できたと報告されている。Ag85 ファミリー複合体は Ag85A、Ag85B、Ag85C からなるが、Ag85A および Ag85B は、Th1 細胞と CTL の細胞性免疫を誘導し、結核菌に対する感

染抵抗性を誘導できるのに対し、Ag85C にはこれらの免疫誘導能はないとされる。

Th1/Th2 バランスを変化させることも結核の治療に寄与すると考えられる。マウスに結核菌を注射すると、初期には IFN γ を産生する Th1 細胞の反応が見られるが、感染の成立したのちには、IL-4 産生を伴う Th2 細胞の反応が見られる。同様に、結核患者の末梢血単核球を結核抗原で刺激すると、健常者のそれに比べ Th1 タイプの反応が抑制されていることが知られている。このように結核症においては防御免疫である Th1 細胞が抑制されている可能性がある。そこで結核感染マウスに IL-12 を発現するプラスミドを注射し、Th1 細胞を優位にすると、HSP65 とほぼ同等の治療効果が期待できる。

DNA ワクチンは、ワクチンが実現していないがんやマラリア、ヘルペス、エイズ、C 型肝炎等の感染症やアレルギー疾患の予防、治療を目的に研究が進められており、一部では臨床試験の段階に進んでいるものもある。遺伝子ワクチン、核酸ワクチン、プラスミドワクチンと多彩に命名され、投与方法も当初は筋肉投与が中心に行われてきたが、現在では、遺伝子銃による経皮投与も行われている。その作用機序は、不明の点が多いが、細胞に取り込まれたプラスミド DNA が核に移り、組み込まれた遺伝子を発現して細胞に病原体の抗原たんぱく質を作らせるというメカニズムが考えられている。

一般に、抗原たんぱく質が細胞外で分泌された場合は、体液性免疫反応から B 細胞活性化、抗体産生がもたらされるが、一方、抗原たんぱく質が細胞内で分解・処理され

抗原提示された場合は、細胞性免疫の誘導が起こり、キラー細胞の活性化が引き起こされる。

結核免疫では、生菌ワクチンは有効であるが、死菌ワクチンはアレルギー誘導だけで、防御免疫は誘導できないとの至適があり、BCG 生菌によるワクチン接種の理論付けとして考えられてきた。DNA ワクチンによる免疫誘導は、細胞内で生産される抗原タンパク質が断片化して抗原提示されるため、あたかも生菌が細胞内で抗原タンパク質を産生すると同様に、MHC クラス I を介した CD8 キラーT 細胞の誘導が行われるとされている。また、細胞外に分泌された抗原タンパク質は、MHC クラス II を介して CD4 のヘルパー細胞の活性化をもたらすことも可能とされている。

このように、長所としては体液性免疫と細胞性免疫を誘導できること、感染性がなくワクチンデザインが容易であること、大量生産が可能、品質の安定性は従来型ワクチン以上であること、製造・輸送コストが安いことなどがあげられている。一方、短所としてはメカニズムが不明、DNA の持続性や体内でのプラスミドの安定性などに難点が挙げられている。

モルモット IFN はこれまで α 、 β 、 γ のいずれの型も精製品もリコンビナントも知られていない。ここで述べたバイオアッセイ法からリコンビナントのモルモット IFN あるいはそれから得られる抗モルモット IFN 抗体の力価に生物学的な保証を与えるばかりでなく、簡単にモルモット IFN を測定できる系が見出されたことで、モルモットを使つての結核免疫の研究分野でさらなる発展が期待できる。

E. 結論

BCG 由来 α 抗原遺伝子ファミリーを組み込んだリコンビナント BCG(rBCG)でモルモットを免疫し、有毒結核菌噴霧感染に対する結核菌感染防御能を検討した。その結果、いずれの rBCG も親株 BCG と同等以上の防御効果をもたらした。とくに3種類の抗原遺伝子 (Ag85A + Ag85B + MPB51)を同時発現させた BA51-rBCG による感染防御能は他に比べて有意に高く、かつ親株 BCG より優れた感染防御能を示した。抗原遺伝子 (Ag85A、Ag85B、Ag85C、MPB51、MPB51 + Ag85A、HSP65、MPB64、MDP1) を発現する DNA ワクチンを構築した。モルモットインターフェロン測定系を樹立した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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, 2000.

Yamamoto, S., Yamamoto, T. and Tokunaga, T.: The discovery of immunostimulatory DNA sequence. Springer Seminars in Immunopathology 22: 11-19, 2000.

Yamamoto, S., Yamamoto, T., Iho, S. and Tokunaga, T.: Activation of NK cell (human and mouse) by immunostimulatory DNA sequence. Springer Seminars in Immunopathology 22: 35-43, 2000.

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: 379-388, 2000.

山本三郎: 結核 DNA ワクチン. ワールド・フォーカス (バイオメディカルサイエンス研究会) 14: 1-2, 2000.

山本三郎: 結核菌感染後の発症予防. 日本薬学会ホームページ ホットニュース, www.pharm.or.jp/hot-news/

伊保澄子, 山本三郎: 非メチル化 CpG-DNA による NK 細胞の活性化. Annual Review 免疫 2001, 137 - 146, 2000.

2. 学会発表

梅森清子, 野島康弘, 松本壮吉, 山田毅,

山本十糸子, 山本三郎: ミコバクテリア DNA 結合性タンパク質(MDP1)による細菌 DNA の免疫活性の調節および抗結核 DNA ワクチンへの応用. 第 70 回実験結核研究会 平成 12 年 4 月、大阪。

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 平成 12 年 4 月、大阪。

山本十糸子, 梅森清子, 野島康弘, 堀内善信, 山本三郎, 内田和幸, Susan Phalen, David N. McMurray. BCG 東京 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モデルを用いた防御効果の検討. 第 75 回日本結核病学会総会 平成 12 年 4 月、大阪。

山本十糸子, 梅森清子, 野島康弘, 山本三郎: インターフェロン γ によるモルモット結核免疫の解析. 第 73 回日本細菌学会総会 平成 12 年 5 月、札幌。

梅森清子, 野島康弘, 山本十糸子, 山田毅, 山本三郎: CpG モチーフによる免疫活性を増強するミコバクテリア由来タンパク質. 第 73 回日本細菌学会総会 平成 12 年 5 月、札幌。

野島康弘, 梅森清子, 山本十糸子, 大原直也, 山田毅, 山本三郎: 第 73 回日本細菌学会総会 平成 12 年 5 月、札幌。

Yamamoto, T., Phalen, S., Uchida, K.,

Umemori, K., Nojima, Y., Horiuchi, Y., Goto, Y., McMurray, N.D. and Yamamoto, S.: Protective efficacy of Tokyo 172 and Copenhagen 1331 BCG vaccines in the guinea pig against pulmonary tuberculosis. Thirty-fifth Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, Yokohama, July 2000.

山崎剛、山崎利雄、山本三郎、芳賀伸治：結核菌濃厚感染に対する BCG ワクチンの防御効果。第 83 回日本細菌学会関東支部総会 平成 12 年 11 月、東京。

山崎利雄、山崎剛、芳賀伸治、赤川清子、山本三郎：結核菌と BCG の鑑別同定法。第 83 回日本細菌学会関東支部総会 平成 12 年 11 月、東京。

山本三郎、山本十糸子、梅森清子、野島康弘、大原直也、山田毅、McMurray, D.N.：リコンビナント BCG 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。第 4 回日本ワクチン学会学術集会 平成 12 年 11 月、横浜。

山本三郎：結核予防に関する世界現況抗結核 DNA ワクチンの開発。第 4 回日本ワクチン学会学術集会教育講演 平成 12 年 11 月、横浜。

山本三郎：DNA ワクチンの可能性と問題点。（シンポジウム結核）第 21 回衛生微生物技術協議会研究会 平成 12 年 7 月、郡山。

山本十糸子、梅森清子、野島康弘、山本三郎：モルモットインターフェロン測定法の確立と結核免疫の解析。第 30 回日本免疫学会学術集会 平成 12 年 11 月、仙台。

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プラズマ由来 DNA 結合タンパク質。第 30 回日本免疫学会学術集会 平成 12 年 11 月、仙台。

野島康弘、梅森清子、山本十糸子、大原直也、山田毅、山本三郎：ミコプラズマ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 回日本免疫学会学術集会 平成 12 年 11 月、仙台。

伊保澄子、高橋隆幸、山本三郎：非メチル化 CpG-DNA のヒト免疫調節機構に関する研究：CpG-DNA の作用は標的細胞に依存して発現される。第 30 回日本免疫学会学術集会 平成 12 年 11 月、仙台。

高氏留美子、伊保澄子、山本十糸子、松木孝澄、山本三郎：CpG モチーフを有するオリゴ DNA の免疫調節機構の検討。ヒトサイトカインの誘導。第 30 回日本免疫学会学術集会 平成 12 年 11 月、仙台。

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

結核菌由来 trehalose dimycolate (TDM) に対する多彩な宿主応答：
TDM は異物性および過敏性肉芽腫を誘導する

分担研究者 小林 和夫 大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学 教授

研究要旨

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。しかし、細胞性免疫応答発現機序は不明である。本研究では、抗酸菌成分、特に、細胞壁由来糖脂質に注目し、炎症および免疫惹起性を解析した。結核菌やその他の抗酸菌由来糖脂質、trehalose dimycolate が血管新生、肉芽腫炎症および細胞性免疫を惹起することが判明した。抗酸菌感染において、血管新生、肉芽腫炎症および細胞性免疫の発現は宿主防御に必須の構成要素である。従って、抗酸菌由来糖脂質は防御抗原であり、難治性抗酸菌感染症に対する免疫介入療法（ワクチンを含む）の開発に有望な戦略になる可能を示している。

A. 研究目的

結核菌細胞壁は脂質を豊富に含有し、特に、trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) は結核菌表層に特徴的な糖脂質成分である。結核菌感染による病変形成として、肉芽腫炎症が特徴的であるが、病原因子-宿主関係による病変形成機序では未解明の部分が多い。本研究では、結核菌細胞壁由来 TDM に対する宿主免疫および炎症応答における分子機序を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

BALB/c や BALB/c 由来無胸腺ヌードマウスを用い、結核菌死菌を含む完全 Freund アジュバントで免疫後、細胞性免疫発現の指標として、遅延型足蹠腫脹反応を評価した。また、TDM を静脈内投与し、肺肉芽腫炎症を病理形態学的に、さらに、病変部におけるサイトカインの蛋白発現を酵素抗体法により、評価した。

C. 研究結果

TDM は遅延型足蹠腫脹反応を惹起し、かつ、免疫群において非免疫群に比し、有意に増強していた。ヌードマウスにおける足

蹠腫脹反応は免疫群と非免疫群間で有意差を認めなかった。BALB/c マウスにおいて TDM 静脈内投与は肉芽腫炎症を誘導したが、免疫群は非免疫群に比し、顕著であった。他方、ヌードマウスでは免疫による肉芽腫炎症の増強は認めなかった。病変構成細胞として、免疫群で CD4 陽性細胞が有意に増加していた。病変部サイトカイン解析では早期に単球走化性ケモカイン（マクロファージ炎症性蛋白-1 α や単球走化性蛋白-1）および炎症惹起性サイトカイン（インターロイキン 1：IL-1 や腫瘍壊死因子- α ：TNF- α ）、その後、細胞性免疫誘導性サイトカイン（IL-12 やインターフェロン- γ ：IFN- γ ）の蛋白発現を認めたが、何れのサイトカインも免疫群は非免疫群に比し、高値を示した。

D. 考察

結核菌由来 TDM は非特異的異物性炎症応答のみならず、特異性および記憶を特徴とする細胞性免疫応答も惹起すること、さらに、T 細胞依存性抗原であることが判明した。すなわち、結核性肉芽腫炎症は異物性および過敏性機序の関与した混合性病変

である。TDM は、肉芽腫炎症に加えて、血管新生やアポトーシスも誘導し、結核の病原体-宿主関係における多機能分子である。

TDM が抗結核免疫の効果機能分子である IL-12 や IFN- γ を誘導したことは、TDM が防御抗原であり、従って、ワクチンなど免疫介入療法の開発に寄与するであろう。すなわち、TDM は結核菌由来糖脂質であり、化学的にも安定、かつ、生菌ワクチンと異なり、安全なワクチン候補になる可能性を示している。

E. 結論

抗酸菌由来糖脂質 (TDM) は宿主防御抗原であり、従って、本研究の成果は難治性抗酸菌感染症に対する免疫介入療法 (ワクチンを含む) の開発に有望な基盤を提供した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Desaki, M., H. Takizawa, T. Ohtoshi, T. Kasama, K. Kobayashi, T. Sunazuka, S. Omura, K. Yamamoto, and K. Ito. 2000. Erythromycin suppresses nuclear factor- κ B and activator protein-1 activation in human bronchial epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267: 124-128.

Desaki, M., H. Takizawa, T. Kasama, K. Kobayashi, Y. Morita, and K. Yamamoto. 2000. Nuclear factor- κ B activation in silica-induced interleukin 8 production by human bronchial epithelial cells. *Cytokine* 12: 1257-1260.

Nishiuchi, Y., M. Doe, H. Hotta, and K. Kobayashi. 2000. Structure and properties of O-specific polysaccharide from *Citrobacter freundii* possessing

cross-reactivity with *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 28: 163-171.

Naka, T., N. Fujiwara, E. Yabuuchi, M. Doe, K. Kobayashi, K. Kato, and I. Yano. 2000. A novel sphingolipid containing galacturonic acid and 2-hydroxy fatty acid in cellular lipids of *Sphingomonas yanoikuyae*. *J. Bacteriol.* 182: 2660-2663.

Hamasaki, N., K. Isowa, K. Kamada, Y. Terano, T. Matsumoto, T. Arakawa, K. Kobayashi, and I. Yano. 2000. In vivo administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits. *Infect. Immun.* 68: 3704-3709.

Saita, N., N. Fujiwara, I. Yano, K. Soejima, and K. Kobayashi. 2000. Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces corneal angiogenesis in rats. *Infect. Immun.* 68: 5991-5997.

Kasama, T., K. Kobayashi, N. Yajima, F. Shiozawa, Y. Yoda, H.T. Takeuchi, Y. Mori, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 2000. Expression of vascular endothelial growth factor by synovial fluid neutrophils in rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.* 121: 533-538.

Lu, J., T. Kasama, K. Kobayashi, Y. Yoda, F. Shiozawa, M. Hanyuda, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 2000. Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* 164: 5922-5927.

Matsuoka, M., S. Maeda, M. Kai, N. Nakata, G.-T. Chae, T.P. Gillis, K. Kobayashi, S. Izumi, and Y. Kashiwabara. 2000. *Mycobacterium leprae* typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. 68: 121-128.

Yamagami, H., T. Matsumoto, N. Fujiwara, T. Arakawa, K. Kaneda, I. Yano, and K. Kobayashi. 2001. Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body- and hypersensitivity-type granulomas in mice. Infect. Immun. 69: 810-815.

Ueda, S., N. Fujiwara, T. Naka, I. Sakaguchi, Y. Ozeki, I. Yano, T. Kasama, and K. Kobayashi. 2001. Structure-activity relationship of mycoloyl glycolipids derived from *Rhodococcus* sp. 4306. Microb. Pathog. 30: 91-99.

2. 学会発表

原田登之、樋口一恵、小林和夫、関谷幸江、森下加奈. 2000. 結核菌死菌のマウスに対する免疫効果. 結核、75 : 306、2000. 第 75 回日本結核病学会総会（大阪、4 月）.

佐藤明正、藤原永年、小林和夫、矢野郁也. 2000. *Mycobacterium avium-intracellulare* complex 症患者分離株の血清型地域特異性. 結核、75 : 320、2000. 第 75 回日本結核病学会総会（大阪、4 月）.

中 崇、藤原永年、小林和夫、藪内英子、加藤敬香、矢野郁也. 2000. *Sphingomonas yanoikuyae* から分離された新規スフィンゴ糖脂質. 日本細菌学会

雑誌、55 : 342、2000. 第 73 回日本細菌学会総会（札幌、5 月）.

小林和夫、有田 齊. 2000. 炎症疾患と肉芽腫（ワークショップ）. 炎症、20 : 400、2000. 第 21 回日本炎症学会総会（東京、7 月）.

藤原永年、山上博一、濱崎尚子、斎田典夫、矢野郁也、小林和夫. 2000. 抗酸菌性肉芽腫炎症の分子制御機構. 炎症疾患と肉芽腫（ワークショップ）. 炎症、20 : 401、2000. 第 21 回日本炎症学会総会（東京、7 月）.

山上博一、藤原永年、矢野郁也、小林和夫. 2000. 結核菌由来 cord factor/trehalose 6,6'-dimycolate による肉芽腫炎症と分子機構. 炎症、20 : 494、2000. 第 21 回日本炎症学会総会（東京、7 月）.

木村博昭、虎谷 聡、松岡正典、小林和夫、福富康夫. 2000. マクロファー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、30 : 288、2000. 第 30 回日本免疫学会総会・学術総会（仙台、11 月）.

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（平成12年度）

BCG 生菌と死菌刺激における Th1 型サイトカイン誘導能の違いと
その産生誘導機序の解析

分担研究者：光山正雄（京都大学大学院医学研究科微生物感染症学教授）

研究要旨

Mycobacterium bovis BCG 菌体刺激に対するマウス腹腔浸出細胞のサイトカイン応答を、生菌と死菌の違いについて解析した。生菌刺激で認められる脾細胞からの IFN- γ 産生は死菌刺激では低く、その違いはマクロファージレベルでの IL-12, IL-18 に規定されていると思われた。これらのサイトカイン応答には、マクロファージの CD14 や LPS シグナル応答系の関与は低いことが示唆された。

A. 研究目的

結核菌や BCG に対する感染防御においては抗原特異的 T 細胞が中心的な役割を果たしており、その産生する IFN- γ によるマクロファージの活性化が抗結核防御の主要なメカニズムである。この感染防御を担う T 細胞の誘導には感染初期に産生される IFN- γ が重要で、死菌にはこの IFN- γ 誘導能が欠如しているため防御免疫を誘導することができないことを我々は明らかにしている。しかし、この生菌刺激で見られる IFN- γ 産生に生菌のどのような因子が関与しているのかは明らかではない。そこでマウス腹腔細胞(PEC)を *in vitro* で BCG 刺激する系を用いて、そのメカニズムについて解析を行った。

B. 研究方法

雌性 C3H/HeN に 3% チオグリコレートを腹腔内注射し、3 日後の腹腔細胞を回収した。PEC あるいは PEC を組織培養用プレートで一夜培養して得たマクロファージを BCG 生菌あるいは死菌で刺激し、24 時間後の培養上清を回収した。上清中の IFN- γ 、IL-12 (p40) あるいは IL-18 は EIA で測定した。また、BCG で細胞を刺激する際に、抗 CD14 抗体、LPS のアンタゴニストである E5531 あるいは各種サイトカインに対する抗体を加えて、IFN- γ 産生への影響を調べた。

C. 研究結果

PEC を BCG 生菌で刺激した場合には IFN- γ 産生が認められたが、死菌刺激した群では IFN- γ 産生はほとんど認められなかった。また、マク

ロファージからの IL-12 (p40) および IL-18 産生が IFN- γ 産生と同様に BCG 生菌刺激で認められ、これらのサイトカインに対する抗体を加えることにより IFN- γ 産生が抑制されることがわかった。さらに、BCG 生菌刺激で誘導される IFN- γ 、IL-12 (p40) および IL-18 産生は、抗 CD14 抗体や E5531 を培養系に加えても影響を受けなかった。

D. 考察

PEC を BCG 生菌で刺激すると IFN- γ 産生が認められたが、抗 IL-12 および抗 IL-18 抗体により抑制されたことから、BCG 生菌がマクロファージからの IL-12 および IL-18 産生を誘導し、IFN- γ はそれらに反応した NK 細胞あるいは $\gamma\delta$ T 細胞や CD8 陽性 T 細胞などが産生したものと考えられる。また、BCG 生菌で誘導されるサイトカイン産生は抗 CD14 抗体や E5531 で抑制されなかったことから、BCG 生菌は Toll-like receptor (TLR)2 や TLR4 を介さない、別な経路でマクロファージのサイトカイン産生を刺激することが示唆された。今後 BCG 生菌による Th1 型サイトカイン産生誘導のメカニズムを明らかにするため、それらのサイトカイン産生誘導に関与する生菌因子について解析していくことが必要である。

E. 結論

BCG 生菌による宿主サイトカイン刺激には、マクロファージレベルで

の IL-12、IL-18 の発現誘導が重要であるが、その経路には Toll-like receptor を介さない機序の関与が示唆された。

F. 健康危険情報

とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kayama, S., Mitsuyama, M., Sato, N. & Hatakeyama, K. : Overgrowth and translocation of *Escherichia coli* from intestine during prolonged external feeding in rats. *J. Gastroenterol.* 35:15-19, 2000.

Ishiguro, T., Naito, M., Yamamoto, T., Hasegawa, G., Gejo, F. & Mitsuyama, M., Suzuki, H., & Kodama, T. : Role of macrophage scavenger receptors in response to *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Amer J Pathol*, 158:179-188, 2001

Baba, H., Kawamura, I., Kohda, C., Nomura, T., Kimoto, T., Ito, M., Watanabe, I. & Mitsuyama, M.: Essential role of domain 4 of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* in cytolytic activity as determined by truncated proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 281: 37-44, 2001.

Tachibana, T., Matsuyama, T., Ito, M. & Mitsuyama, M. *Sporothrix schenckii* thermo-tolerant mutants losing fatal

visceral infectivity but remaining high cutaneous infectivity. *Med. Mycol.*, 39 : in press, 2001.

Makino, M., Fujita, M., Gejo, F., Kawamura, I. & Mitsuyama, M. : Involvement of oxygen radicals in the enhanced expression of virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* inside activated macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.*, in submission 2/22, 2001.

Ito M., Kawamura I, Kohda C, Baba H, Nomura T, Kimoto T, Watanabe I, Nomura, T. & Mitsuyama M. Difference in cholesterol-binding and cytolytic activities between listeriolysin O and seeligeriolysin O : a possible role of Ala residue of Trp-rich undecapeptide. *Infect. Immun.* in submission, 2001.

2. 学会発表

光山正雄：細胞内寄生菌に対する防御免疫、第73回日本ハンセン病学会総会シンポジウム。

光山正雄：抗酸菌のエスケープ機構と宿主免疫応答、第75回日本結核病学会総会シンポジウム。

光山正雄：細胞内寄生菌のエスケープ機構と bacterial modulin、第74回日本感染症学会総会特別講演。

光山正雄：グラム陽性菌の溶血タン

パク毒素に対するマクロファージのサイトカイン応答と感染防御、第40回日本リンパ網内系学会総会シンポジウム。

光山正雄：リステリアのエスケープ因子の菌側、宿主側にとっての異なる役割、第53回日本細菌学会九州支部総会シンポジウム。

Masao Mitsuyama : Essential role of hemolysin (LLO) of *Listeria monocytogenes* in the generation of protective immunity of the host . French - Japanese Workshop on Molecular Aspects of Bacterial Infections (Paris, France, May , 2000.)

Kawamura, I and Mitsuyama M: Characterization of bacterial toxin as an immunomodulator : Effect of listeriolysin O on host defense and analysis of its cytokine-inducing activity. 35th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy (Yokohama, Japan, July , 2000.)

Masao Mitsuyama : Thiol-activated cytolysins from gram-positive bacteria as a possible new bacterial modulin : Implication in the immune response. 5th Korea-Japan International Symposium on Microbiology (Kyongju, Korea, October, 2000.)

H. 知的財産権の出願・登録
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

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・グループ長

研究要旨 新しいタイプの抗結核ワクチンの構築を試みた。標的遺伝子として非定型抗酸菌 MPB64、MPB70、 α 抗原の三つの蛋白遺伝子を BCG 東京株に発現させ、各々の rBCG を作成した。さらに結核菌遺伝子のサブトラクションにより、誘導される結核菌遺伝子の中から γ インターフェロンの誘導能に富む ESAT6 及び 10kD 蛋白遺伝子に着目し、それらの遺伝子を組込んだ rBCG 結核ワクチンを作成し、発現されることができた。

A. 研究目的

結核症のワクチンとして BCG が広く使われているが、最近発展途上国のみでなく多くの国で結核菌感染のアウトブレイクが検出され、その対応が大きな健康上の課題になっている。その対策の一つとして新しいタイプの抗結核ワクチンの開発が研究課題にあげられる。本研究では BCG が結核菌感染を動物実験レベルで防御できることに着目し、これまでの BCG に防御能を増幅させる方向性で新しいタイプの抗結核ワクチンの開発を試みる。

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 を作成する。

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 ESAT6 蛋白及び 10kD 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。

C. 研究結果

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

すでに α 抗原及び MPB64、MPB70 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。

2) ESAT6 遺伝子をベクターに組み込んで Western Blot 法で確認することができた。

3) 10kD 蛋白遺伝子を挿入して分泌蛋白として BCG 菌から遊離できるかどうかを現在確認中である。

4) ESAT6 をマウスに接種してその発現をペ

ブチドに対して誘導されるかどうかを検討し、マウスの strain に特異的なヘルパーエピトープを同定した。

D. 考察

従来の BCG ワクチンの抗結核菌作用を増幅する必要性については現在の結核菌感染の拡大と結核症が発展途上国で感染症死の 50%以上を占めることから明らかである。そのための方法としてはまず第一に従来の BCG ワクチンを用いてその投与方法、量、回数等を再検討することにより免疫誘導の最適化を計ることが考えられる。二番目に新しいタイプの結核ワクチンとしてこれまでの BCG に関する研究成果をもとにした rBCG 結核ワクチンの開発が考えられる。三番目に結核菌防御遺伝子の同定を計るとともに最近開発されてきた技術を用いてコンポーネントワクチン、DNA ワクチン、あるいは他のリコンビナントベクター由来ワクチンが考えられる。

本研究グループではこれまでの rBCG の技術を用いて BCG ワクチンに免疫誘導能の増幅を計るために BCG には無くて結核菌に存在する γ インターフェロン誘導能に富む遺伝子に着目し、その遺伝子を従来の結核ワクチンとして使用されている最も安全な BCG ワクチンとして知られている BCG 東京株に組み込み発現を試みた。幸い MPB64、MPB70、 α 抗原遺伝子についてはその発現を明らかにすることができた。さらに ESAT6 及び 10kD 蛋白遺伝子の発現を検討中である。これらの rBCG を単独あるいは組合せして用いることにより抗原特異的ヘルパー機能の誘導と γ インターフェロンの産生の誘導をマーカーにして *in vivo* における rBCG 蛋白の発現を確認中である。今後、*in vivo* でそれらの発現系の最適化を計った後、芳賀先生のところで噴霧感染における結核菌感染の防御能について解析する予定である。

E. 結論

新しいタイプの抗結核ワクチンの構築を以下のように試みた。標的遺伝子として非定型抗酸菌 MPB64、MPB70、 α 抗原の三つの蛋白遺伝子を BCG 東京株に発現させ、各々の rBCG を作成した。さらに結核菌遺伝子のサブトラクションにより、誘導される結核菌遺伝子の中から γ インターフェロンの誘導能に富む ESAT6 及び 10kD 蛋白遺伝子に着目し、それらの遺伝子を組込んだ rBCG 結核ワクチンを作成し、発現されることができた。今後、これらの rBCG 結核ワクチンを用いて防御免疫誘導能について解析する予定である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

2. 学会発表

- 1) 滝澤万里、芳賀伸治、千葉丈、浅野敏彦、山崎剛、本多三男 「フローサイトメトリーを用いたモルモットの白血球 subset の解析の確立と BCG 免疫の解析」(第 70 回実験結核研究会 4/17-19 大阪)
- 2) Kazuhiro Matsuo, T. Ohsu, T. Hamano, M. Kanekiyo, K. Ishii, K. Kato, Z. Matsuura, T. Miyamura, M. Minamitani, M. Hamatake, Y. Nagai, S. Yamazaki, and M. Honda. (松尾和浩、大洲竹晃、浜野隆一、兼清優、浜武牧子、永井美之、山崎修道、本多三男) Highly immunogenic live recombinant BCG and vaccinia virus D1s strain both of which express whole Gag antigen of HIV-1. The 13th International AIDS Conference (9-14 July 2000 Durban South Africa)
- 3) 滝澤万里、芳賀伸治、千葉丈、浅野敏彦、本多三男 「モルモットの BCG 免疫におけ

る活性化 T 細胞の検出とその生物学的意義」(第 10 回日本サイトメトリー学会 2000. 8. 5-6 東京)

4) 滝澤万里、芳賀伸治、千葉丈、浅野敏彦、

本多三男 「BCG 免疫における DTH 反応と組織の活性化 T 細胞との相関」(第 30 回日本免疫学会総会 2000. 11/14-16 仙台)