

作為に2分し、一方の群にBCGを接種した。5年間の観察を継続し、両群での結核発病者の有無でBCG追加接種の有用性を検定する。

### C 研究結果

1999年(平成11年)は226名、2000年(平成12年)は189名、2001年(平成13年)は176名の新採用看護師にノ反検査を実施した。それぞれの年での陰性者数は19名(84%)、15名(79%)、14名(80%)である。それぞれ9名、7名、7名の合計23名にBCGを接種した。従って非接種者は25名で、対象者の合計は48名である。

平成14年秋に、対象者の1名が頸部リンパ節結核を発病した。この看護師は平成11年にBCGを接種した群に属し、接種後3年半を経過しての発病であった。切除リンパ節組織から培養で結核菌が証明され、その薬剤耐性パターンより、平成13年に勤務で接触のあった某患者が感染源と推定され、両者の培養菌株のRFLP検査結果で同一株と判定された。すなわちこの感染は、BCG接種後に生じ、約1年後に発病したものである。

なお、ノ反検査実施者の一部では、検査前に末梢血を採取し、迅速 $\gamma$ -IFN測定(Quantiferon法)法で $\gamma$ -IFN産生能を検討した。その結果とノ反検査結果を比較したところ、ノ反検査結果の強さと $\gamma$ -IFN産生能は相関した。さらに、BCG接種者では、接種後3カ月目の $\gamma$ -IFN産生能は接種前に比較して増強しており、少なくとも大人の健常人に対するBCG接種か、在る種の免疫能増強をもたらすことが示唆された。

### D 考察

48名の対象者を1年半～3年半経過観察

し、BCG接種群23名から1名の結核発病者をみた。対象者数が少ないため、推計学上では有意差を認めないか、医療従事者に対するBCG追加接種がその後の結核感染防止に有用であるとは思われない現象である。ただし、発病者での病態か、通常見られる肺結核ではなくリンパ節結核であったことから、BCG接種によって発病は防止できなかったか、その速度や病態に影響を及ぼしたことは充分考えられる。また、菌のRFLP検査結果から、この対象者はBCGのRFLP検査結果から、この対象者はBCG接種後に感染を受け発病したものであり、BCG接種前に感染を受けていた菌による発病ではないことが明白であり、発病のみならず感染をも防止し得ないことも明らかとなったと言える。

### E 結論

1999年(平成11年)から2001年(平成13年)までのノヘルクリン反応検査実施者数は591名である。2段階法による陰性者比率は約8%(48名)であった。うち23名にBCGを接種し、非接種者の25名とともに経過観察を続けている。平成14年秋にBCG接種群に属する1名がリンパ節結核を発病し、検出された菌株のRFLP分析から、BCG接種後の感染と発病と判断された。

ノヘルクリン反応検査の強弱と、その者の末梢血リンパ球の $\gamma$ -IFN産生能の高低はほぼ相関し、BCG接種はその産生能を増強する。

### F 研究発表

#### 1 論文発表

- 1 Inoue K, Inoue Y, Arai T, Nawa Y, Kashiwa Y, Yamamoto S, Sakatani M Chronic eosinophilic pneumonia due to visceral larva migrans Intern Med 2002, 41(6) 478-82

2. Suzuki K, Tomita M, Kinoshita Y, Yoshida A, Yoshida S, Tsuyuguchi K, Irie A, Yamamoto A, Sakatani M.: Present trends of drug-resistant tuberculosis and how to manage it by mycobacterial laboratories. Rinsho Byori. 2002;50(9):847-52
3. Sakatani M, Kishi F: The estimation of therapeutic guidelines against non-tuberculous Mycobacteriosis. The 76th Annual Meeting Symposium. Kekkaku 2002, 77(2):45-48
4. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Matsumoto K, Kita Y, Kimura K, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, Matsumoto S, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M: Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis. Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference 2002, p171-175
5. 鈴木克洋, 富田元久, 木下幸保, 吉田亮, 吉田志緒美, 露口一成, 入江章子, 山本暁, 坂谷光則: 薬剤耐性菌感染症の現状と検査室の対応 結核菌感染症(解説) 臨床病理 2002, 50(9):847-852
6. 坂谷光則: 呼吸器内科患者の最近の実態 国立療養所近畿中央病院の場合 日本胸部臨床 2002, 61(9):766-773
7. 井上義一, 岸潤, 新井徹, 審良正則, 坂谷光則: 肺間質性病変 KL-6, SP-A, SP-D 肺の画像から見て 日本胸部臨床 2002, 61(2):125-133
2. 学会発表
  1. 坂谷光則: 結核診断の最前線 医療従事者の結核 問題点と対策 日本呼吸器学会雑誌 2002、40:61
  2. 井上義一、岸潤、新井徹、審良正則、坂谷光則: 肺間質性病変と KL-6, SP-A, SP-D。肺の画像から見て日本胸部臨床 2002、61(2):128-133
  3. 吉田亮, 新井徹, 藤田悦生, 井上義一, 鈴木克洋, 坂谷光則: 当院における最近の肺 M.kansasii 症について 医療 2002, 56(2): 242
  4. 田中高生, 井上義一, 喜多洋子, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 金丸典子, 森珠里, 橋元里実, 松本久美, 岡美穂, 木村謙太郎, 坂谷光則, 岡田全司: 新しい抗結核リコンビナント BCG ワクチン開発 医療 2002, 56(2):242
  5. 井上義一, 西村一孝, 川城丈夫, 伊東政敏, 岡田全司, 木村謙太郎, 坂谷光則: 国立病院,国立療養所呼吸器疾患専門施設におけるびまん性肺疾患診断の現状と問題点(共同研究) 医療 2002, 56(1):50
  6. 立花暉美, 大森文夫, 中谷敏, 石田良雄, 由谷親夫, 滝原啓子, 井上義一, 坂谷光則, 上田英之助: 心サルコイドーシスの経過に関する臨床的研究 サルコイドーシス/肉芽腫性疾患 2002, 22(2):40
  7. 井上義一, 新井徹, 西山明秀, 馬渡秀徳, 南正剛, 林清二, 松本久美, 岡美穂, 田中高生, 岡田全司, 山本暁, 坂谷光則: 肉芽腫性肺疾患肺組織におけるマスト細胞の増加とその役割 サルコイドーシス/肉芽腫性疾患 2002, 22(2):38
  8. 鈴木克洋, 湊良彰, 村井隆太, 井上康, 吉田亮, 新井徹, 安藤守秀, 藤田悦生, 露口一成, 源誠二郎, 井上義一, 林清二, 岡田全司, 木村謙太郎, 坂谷光則: 多剤耐性結核の臨床的検討 結核 2002, 77(10):700
  9. 露口一成, 鈴木克洋, 湊良彰, 村井隆太, 井上康, 吉田亮, 新井徹, 安藤守秀, 藤田悦生, 源誠二郎, 井上義一, 林清二, 岡田全司, 木村謙太郎, 坂谷光則: 喀痰

- から M szulgai が検出された症例の検討 結核 2002, 77(10) 699
- 10 森永謙二, 東原専郎, 大西一男, 前田均, 坂谷光則, 審良正則, 岸本卓巳, 名部誠, 中村之信, 多田慎也, 有澤淳 歯科技工士の粉じん曝露と健康障害 日本職業 災害医学会会誌 2002, 50 141
  - 11 石川秀雄, 柏庸三, 田中壽一, 上杉浩世, 吉田亮, 井上義一, 坂谷光則 一側肺動脈閉塞試験に合併した肺血栓の溶解に引き続いてショックをきたした一例 日本呼吸器学会雑誌 2002, 40 231
  - 12 桑山さち子, 田中高生, 須波敏彦, 喜多洋子, 細江重人, 沖塩協一, 中宣敬, 安宅信二, 小河原光正, 坂谷光則, 岡田全司 ヒト肺がん細胞, 肺がん拒絶抗原と SCID-PBL/hu を用いた生体内抗ヒト肺がん効果解析モデル 日本呼吸器学会雑誌 2002, 40 139
  - 13 井上義一, 西村一孝, 川城丈夫, 伊東政敏, 新井徹, 岡田全司, 木村謙太郎, 坂谷光則, 森隆 国立病院, 国立療養所におけるひまん性肺疾患診断の現状と問題点 日本呼吸器学会雑誌 40 148
  - 14 井上幸治, 井上義一, 新井徹, 審良正則, 柏庸三, 山本暁, 坂谷光則 当院における鉄肺症(siderosis) 10 例の臨床像, 画像ならびに病理後の検討 日本呼吸器学会雑誌 2002, 40 196
  - 15 立花暉夫, 竹中雅彦, 林清二, 坂谷光則, 五十嵐敢 心病変を有するサルコイドーノス症例の臨床的検討 日本呼吸器学会雑誌 2002, 40 255
  - 16 湊義彰, 新井徹, 井上義一, 小河原光正, 吉田亮, 鈴木克洋, 審良正則, 山本暁, 木村謙太郎, 坂谷光則 ひまん性汎細気管支炎剖検 11 例の臨床病理学的検討 日本呼吸器学会雑誌 2002, 40 83
  - 17 新井徹, 井上義一, 井上幸治, 桑名みとり, 吉田亮, 藤田悦生, 源誠二郎, 鈴木克洋, 山本暁, 木村謙太郎, 坂谷光則 Follicular bronchiolitis の疾患活動性マーカーとしての血清 CA125 の有用性 日本呼吸器学会雑誌 2002, 40 83
  - 18 坂谷光則 結核診療の最前線 医療従事者の結核 問題点と対策 日本呼吸器学会雑誌 2002, 40 61
  - 19 岡田全司, 田中高生, 井上義一, 喜多洋子, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 金丸典子, 細江重人, 坂谷光則, 他 新しい抗結核 DNA ワクチンの開発 日本呼吸器学会雑誌 2002, 40 92
  - 20 田中高生, 井上義一, 喜多洋子, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 金丸典子, 細江重人, 坂谷光則, 森隆, 他 新しい抗結核リコンビナント BCG ワクチン 日本呼吸器学会雑誌 2002, 40 92
  - 21 田中高生, 井上義一, 喜多洋子, 桑山さち子, 稲永由紀子, 村木裕美子, 金丸典子, 森珠里, 細江重人, 坂谷光則, 他 結核に対する新しいリコンビナント BCG ワクチンの開発 結核 2002, (4) 384
  - 22 小林和夫, 坂谷光則 結核の諸問題 現状と対策 感染症学雑誌 2002, 76 (2) 131-132
  - 23 坂谷光則 医療従事者の結核 国立病院 療養所看護職員におけるノヘルクリン反応検査と BCG 追加接種 結核 2002, 77(1) 42-43,44
  - 24 吉田亮, 安光恵一, 新井徹, 井上義一, 鈴木克洋, 坂谷光則 当院における初回治療例の結核菌薬剤感受性検査の推移について 結核 2002, 77(3) 317
  - 25 片田圭宣, 平田陽彦, 石井優, 坂谷光則, 田中敏郎, 佐伯行彦 筋逸脱酵素上昇の多発性動脈炎診断における有用性について アレルキー 2002, 51(2,3) 290
  - 26 井上義一, 田中高生, 岡田全司, 木村謙

- 太郎, 坂谷光則, 森隆, 吉田栄人, 金田安史, 岡美穂, 金丸典子: 結核に対する各種リコンビナント BCG-,DNA-ワクチン投与マウスの病理学的検討 結核 2002, 77(3):279
27. 田中高生, 井上義一, 細江重人, 木村謙太郎, 坂谷光則, 森隆, 岡田全司, 松本真, 喜多洋子, 桑山さち子: 新しい抗結核リコンビナント BCG ワクチンの開発 結核 2002, 77(3):278
28. 岡田全司, 田中高生, 井上義一, 細江重人, 木村謙太郎, 坂谷光則, 森隆, 喜多洋子, 桑山さち子, 村木裕美子: 結核に対する新しい DNA ワクチン開発 Hsp65 DNA+IL-12 DNA ワクチン 結核 2002, 77(3):278
29. 木下幸保, 富田元久, 鈴木克洋, 坂谷光則: 蛋白膨潤作用を有する抗酸菌前処理液(CCE 液)の評価 MGIT と 2%小川培地における NALC-NaOH 液との比較 結核 2002, 77(3):259
30. 木下幸保, 富田元久, 鈴木克洋, 坂谷光則: 抗酸菌の喀痰均質化集菌塗抹法の有用性 結核 2002, 77(3):258
31. 小河原光正, 吉田亮, 坂谷光則: 気管支結核後の気管支狭窄に対するマルチスライス CT を用いた Virtual Bronchoscopy の有用性の検討 結核 2002, 77(3):297

# 厚生労働科学研究費補助金（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

分担研究者 矢野 郁也 日本BCG研究所中央研究所 所長

#### 研究要旨

本年度は、1) 結核菌培養上清低分子タンパクの遺伝子組み換え体 (r-ESAT-6 及び r-CFP-10)、2) TDM、TMM、LAM、PIM 等脂質アジュバントの肉芽腫形成能と TNF 誘導活性、3) これら脂質の抗原提示細胞 (マクロファーン、DC 細胞) の TLR 発現誘導、の 3 点について検討した。

その結果、TDM、LAM、PIM 投与によりマウスの肺に肉芽腫が形成された。さらに、PIM、LAM は肺胞マクロファーンからの TNF  $\alpha$  を産生誘導するのみならず、TLR2 を介して、NF-KB の活性化を誘導した。

#### A 研究目的

BCG ワクチンに代わる次世代結核ワクチンの中で、ヒトに対する安全性、感染防御能の点で最も期待されているのは subunit vaccine (component vaccine) で、海外先進国では既にタンパク抗原が多数候補にのぼっている。ひとつの問題点は、ヒトの場合、単一タンパク抗原に対する宿主側の免疫応答が遺伝的制御を受けているために、抗原提示分子のクラス異なる HLA 型等により、反応性が著しく異なる点であり、これを克服するために fusion タンパク (fused protein antigen) が合成されて複数タンパク抗原による免疫効果が期待されつつある。我々は、昨年及び一昨年度の研究で、マウスの感染防御モデルにおいて、BCG 菌培養濾液 (多種類の粗タンパク抗原を含む) (BCG-CFP) か、結核菌分泌精製タンパク抗原 (MPB51) に近い感染防御活性を示したことから、結核菌や BCG

菌培養濾液から有用な抗原をみいたすことを目的として実験を進めた。既に中間報告において、結核菌培養上清に産生される低分子 T-cell タンパク抗原として知られる ESAT-6 の エピトープペプチド (ESAT-651-70、20mers からなる) と glycolipid adjuvant を組み合わせてマウスに投与することにより、強力な IFN- $\gamma$  産生が認められることを報告したか、今回の報告では、2 種類の培養上清タンパクで、強力な T-cell エピトープを持つ CFP-10 と ESAT-6 について、*Bacillus brevis* の発現ベクターを利用して r-ESAT-6 及び r-CFP-10 を産生させることを検討し、一方アジュバント脂質として有用な TDM (trehalose 6, 6'-dimycolate)、LAM (lipoarabinomannan) 及び PIM (phosphatidylinositol mannoside) の 3 者について、Th-1 誘導性の発現肉芽腫形成能 (肺、肝、脾) と、抗原提示細胞 (マクロファーン) における TLR のについ

て検討した。

## B 研究方法

ESAT-6 及び CFP-10 の組み換えタンパク抗原は、*B. brevis* の形質転換体を用いて培養上清中に r-ESAT-6 及び r-CFP-10 を産生させた。TDM、LAM 及び PIM の肺肉芽腫形成能は、C57BL/10ScSn マウスに各々脂質を 10  $\mu$ g、w/o/w エマルジョンとして投与 (iv) 後、7 日後の肺組織を HE 染色。TNF  $\alpha$  及び TLR2 + CD14 発現を介する NF- $\kappa$ B 活性化をリンフェラーゼ活性により測定した。

## C 研究結果

### 1 リコンビナント FSAT6 および CFP-10 の調製

常法により *M. tuberculosis* H37Rv 株の DNA から以下のプライマーを用い PCR を行った。

#### ESAT-6

sense GCG GAT CCG CCG CCA TGA

CAG AGC AGC AGT GGA A

antisense GCG AAT TCT ATG CGA

ACA TCC CAG TGA

#### CFP-10

sense GCG GAT CCA TGG CAG AGA  
TGA AGA C

antisense GCG AAT TCT CAG AAG  
CCC ATT TGC G

得られた PCR 産物を *Bam*HI および *Eco*RI で切断し、pBluescript II K/S + にクローニングした。クローニングした ESAT-6 および CFP-10 の塩基配列を DNA ノークエンサーで確認し、テーターヘースと完全に一致していることを確認した。*B. brevis* の発現ベクターである pNCH3 に組換え、塩基配列の確認し、*B. brevis* の形質転換体を作製した。*B. brevis* の培養上清を限外ろ過膜で濃縮後、プレノフセルを用いて精製した。精製した ESAT-6 および CFP-10 を SDS-PAGE およびウエスタンブロットにて確認した (Fig 1)

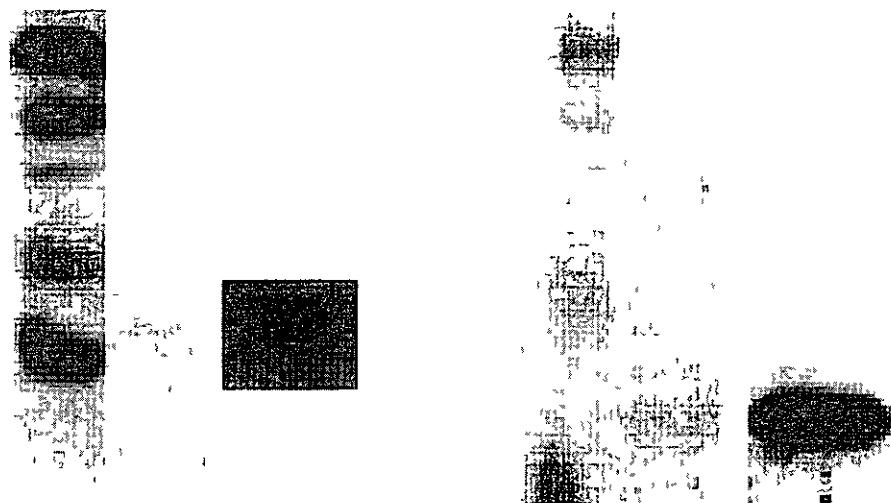


Fig 1 ESAT-6 および CFP10 の発現と精製

A ESAT-6      B CFP-10

## 2 肉芽腫形成能

C57BL/10ScSn マウスに 10  $\mu$ g の TDM、LAM および PIM を w/o/w エマルジョンとし尾静脈から投与すると、肺に肉芽腫が形

成された。TDM 投与により強い炎症反応が認められ、典型的な肉芽腫が形成された (Fig 2)。

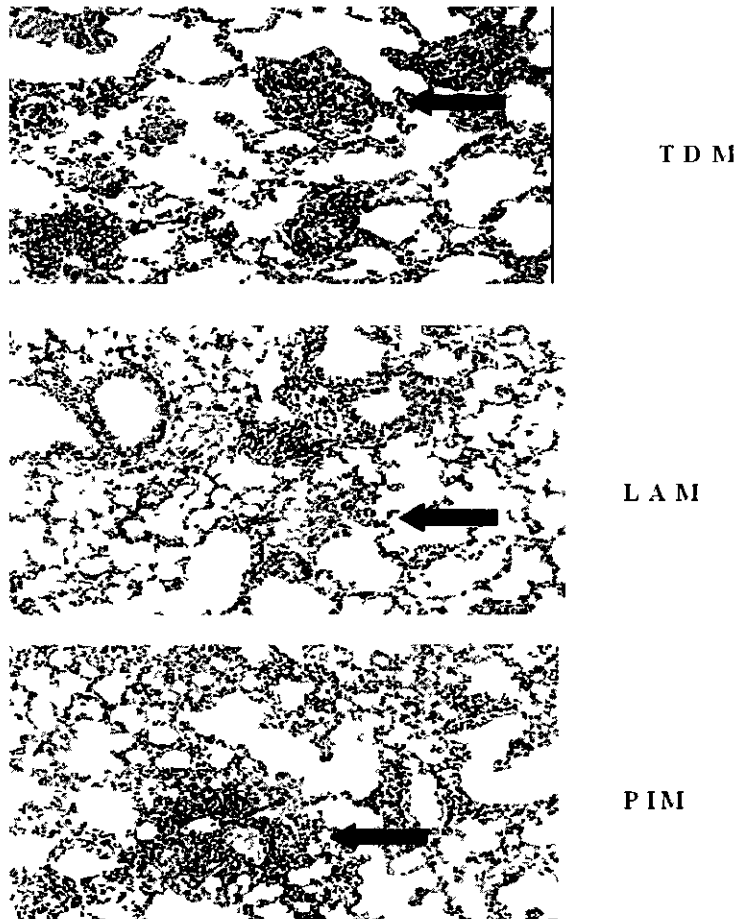


Fig 2 結核菌糖脂質による肺肉芽腫形成の組織学的観察  
B10Sn マウスに 10  $\mu$ g の LAM または PIM を  
静脈内投与し、7 日後の肺を HE 染色した。

3 PIM および LAM の TNF- $\alpha$  誘発活性  
糖脂質による肺肉芽腫形成が TNF- $\alpha$  に  
よって誘導されるという報告があるので  
PIM および LAM で肺胞マクロファージを

刺激したときに産生される TNF- $\alpha$  量を  
L929 細胞を用いてハイオアノセイで測定  
した。容量依存的に TNF- $\alpha$  誘発活性のあ  
ることか分かった (Fig 3)。

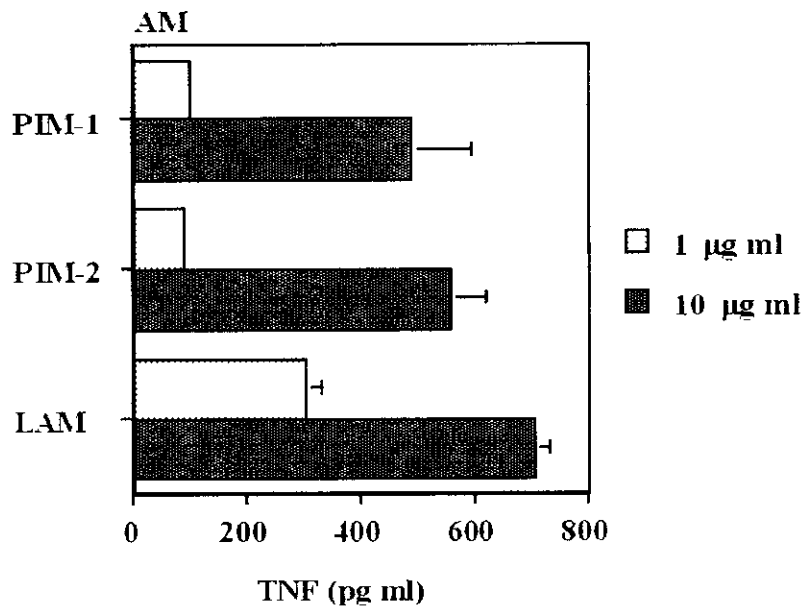


Fig 3 PIMおよびLAMのTNF- $\alpha$ 誘発活性  
 肺胞マクロファーンを1または10  $\mu$ gのPIM-1、PIM-2またはLAMで2時間刺激したときの培養上清中にTNF- $\alpha$ 量をハイオアナノセイで調べた

#### 4 PIMおよびLAMはTLR2を介してマクロファーンを活性化する

プラスミドは mouseTLR2 遺伝子をそれぞれ哺乳動物用発現ベクターである pcDNA3 (Invitrogen (o)) に組換えたものを使用した。

各遺伝子は、HEK293 細胞に Fugene6 Transfection Reagent (ROCHE) を用いてトランスフェクション効率を調製した。プラスミドは TLR2 25 ng/ml、pNF- $\kappa$ B-Luc

plasmid (Stratagene)、pRL-TK vector (Promega) 50 ng/ml で使用した。

トランスフェクションした HEK 293 細胞を 10  $\mu$ g/ml の LPS で 20 時間刺激し、蛍光強度の測定は Dual-luciferase TM Reporter Assay System (Promega) を用いて測定した。

その結果、PIM および LAM は Rho-TMM と同様に TLR2 を介して NF- $\kappa$ B の活性化を誘導した。



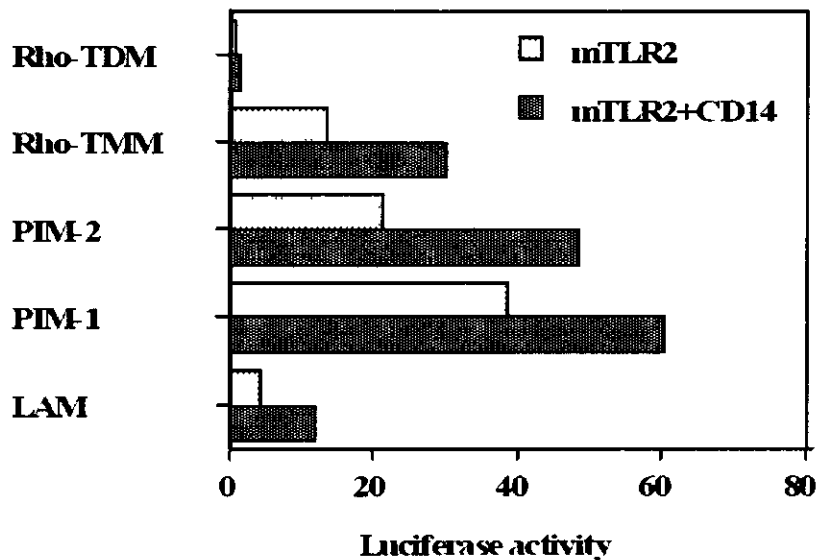


Fig 4 TMM、PIM および LAM は TLR2 を介してマクロファージにより認識され、NF-kB を活性化する (ルシフェラーゼアノセイ)

#### D 考察

ESAT-6 及び CFP-10 は、結核菌培養濾液中に産生されるタンパク抗原の中で最も低分子量の“ESAT-6 family”に属し、Th-1 免疫誘導性の T-cell epitope を有する。多重抗原 subunit vaccine 抗原として、1) 培養濾液そのものを用いる方法、2) r-ESAT-6 や r-CFP-10 を組み合わせて用いる方法、3) 合成 epitope peptide を組み合わせて用いる方法が考えられ、これらのタンパク抗原と、TDM や TMM、LAM や PIM との組み合わせにより実験動物 (マウス、モルモット) モデルによる感染防御実験を行い、ヒトへの応用に近づきたい。

#### E 結論

本年度は、1) 結核菌培養上清低分子タンパクの遺伝子組み換え体 (r-ESAT-6 及び r-CFP-10)、2) TDM、TMM、LAM、PIM 等脂質アンジュハントの肉芽腫形成能と

TNF 誘導活性、3) これら脂質の抗原提示細胞 (マクロファージ、DC 細胞) の TLR 発現誘導、の 3 点について検討した。

#### F 健康危険情報

以上の研究は、実験動物レベルで行っているため、特別留意していない。

#### G 研究発表

##### 1 論文発表

- Seigo Kitada, Ryoji Maekura, Naomi Toyoshima, Nagatoshi Fujiwara, Ikuya Yano, Takeshi Ogura, Masami Ito, and Kazuo Kobayashi Serodiagnosis of Pulmonary Disease Due to *Mycobacterium avium* Complex with an Enzyme Immunoassay that Uses a Mixture of Glycopeptidolipid Antigens Clinical Infectious Diseases 2002 35 1328-35

- 2 Miki Minamino, Ikuyo Sakaguchi,  
Takashi Naka, Norikazu Ikeda, Yoshiko  
Kato Ikuko Tomiyasu, Ikuya Yano and  
Kazuo Kobayashi Bacterial Ceramides  
and Sphingophospholipids Induce  
Apoptosis of Human Leukemic Cells  
Microbiology 2003 ( accepted for  
publication)

# 厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

## (分担) 研究報告書

### ツヘ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)大阪結核研究会 理事長

#### 研究要旨

ノヘ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。(1) ESAT-6 抗原、CFP-10 抗原(結核菌に存在し、BCG 菌に存在しない)を用いた新しい結核特異的診断法を確立した。結核患者と健常人末梢血を ESAT-6 又は CFP-10 で抗原刺激し、産生される  $\gamma$ -IFN を ELISA で測定した。その結果、結核感染に特異度の高い、しかも BCG 接種した健常人リンパ球には反応しない、新しい結核感染特異的診断法を開発した。(2) ノ反に用いられる 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。共同研究で人の *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  $\gamma$ -IFN、IL-6 産生能や増殖反応において特異性が示唆された。又、DPPD のヒト成人の skin test において、結核感染特異性を証明した。すなわち、BCG 接種者では、PPD (通常のノヘルクリン反応) に対する反応は陽性であったのに対し、DPPD に対する skin test は陰性であった。結核患者では PPD 及び DPPD とも両者皮内反応陽性を示した。さらに、DPPD 皮内反応をした成人健常人では陰性群と陽性群にきれいに分かれた。これに対し、PPD 皮内反応では大多数が陽性であった。

#### A 研究目的

ノヘルクリン反応(ノ反)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

BCG 菌にはコードする遺伝子が欠失して、ヒト型結核菌に存在する ESAT-6 及び CFP-10 抗原を用いた。結核患者と健常人末梢血を分離せずに全血 24well プレートに 1ml 培養し、ESAT-6 又は CFP-10 で抗原刺激した。16 ~ 20 時間後に培養上清を集め  $\gamma$ -IFN を ELISA で測定した。

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、ノ反に代わる新しい診断法の進展が認められた。ノ反に用いられる 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 リンパ球を用いた *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、共同研究を行なった。さらにフラシルの健常者を対象として skin

test を行った。

(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

(1) ESAT-6 抗原、CFP-10 抗原(結核菌に存在し、BCG 菌に存在しない)を用いた新しい結核特異的診断法の確立。結核患者と健常人末梢血を ESAT-6 又は CFP-10 で抗原刺激した。16 ~ 20 時間後に培養上清を集め  $\gamma$ -IFN を ELISA で測定した。その結果、結核感染に特異度の高い、しかも BCG 接種した健常人リンパ球には反応しない、新しい結核感染特異的診断法を開発した。(岡田、坂谷、鈴木、井上)

(2) 新しい結核特異診断法(DPPD)

① DPPD のヒト成人の skin test において、結核感染特異性を証明した。すなわち、BCG 接種者では、PPD(通常ツベルクリン反応)に対する反応は陽性であったのに対し、DPPD に対する skin test は陰性であった。結核患者では PPD 及び DPPD と両者皮内反応陽性を示した。一方、従来 PPD 陰性で結核感染が完全に否定されていた医療従事者が最近結核感染が強く疑われ、1 年以内に PPD 陽性となった人においては DPPD 陽性であった。(S.Gillis、S.Reed、岡田、坂谷、螺良)

② さらに、数百名の成人健常者に行った skin test 研究においては、DPPD 皮内反応は陰性群と陽性群にきれいに分かれた。一方、PPD skin test では大多数が陽性であった。すなわち DPPD 陰性群は BCG を接種

した人でも結核非感染者を選別する画期的な方法となることが示された。

### 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) DPPD skin test 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特異的診断法の開発に成功した。ESAT-6 抗原、CFP-10 抗原(結核菌に存在し、BCG 菌に存在しない)を用いた新しい結核特異的診断法を確立した。結核感染に特異度の高い、しかも BCG 接種した健常人リンパ球には反応しない、新しい結核感染特異的診断法を開発した(岡田、坂谷、鈴木、井上)。

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(DPPD はヒトの skin test で PPD 以外の蛋白では唯一反応をおこす蛋白であり、他に報告はない)。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. 岡田全司、田中高生、螺良英郎：結核ワクチン「感染症における免疫とワクチン」臨床と微生物 2002, 29(2) 127-132
2. 水谷哲、小牟田清、平田一人、成田亘啓、三木文雄、小倉剛、螺良英郎：重症院内肺炎における compromised host と原因病原体の現状 アンケート結果による分析 呼吸 2002, 21

- (3) 278-284
- 3 長岡滋、瀧島任、長野準、川上義和、北村諭、川上雅彦、野口英世、近藤有好、下方薫、螺良英郎、小倉剛、佐々木孝夫 慢性呼吸器疾患患者を対象とした SS320A の第Ⅲ相一般臨床試験 臨床医菓 2002, 18(1) 181-208
  - 4 長岡滋、瀧島任、長野準、川上義和、北村諭、川上雅彦、野口英世、近藤有好、下方薫、螺良英郎、小倉剛、佐々木孝夫、小川暢也 SS320A の慢性呼吸器疾患患者に対する第Ⅲ相一般臨床試験 長期投与試験 臨床医菓 2002, 18(1) 141-180
  - 5 螺良英郎 医療と倫理 また若い後輩たちへ 50年余の医師生活からのメッセージ 徳島大学教授時代の航跡(一般) The LUNG-perspective 2002, 10(4) 484-486
  - 6 螺良英郎 医療と倫理 また若い後輩たちへ 50年余の医師生活からのメッセージ 医師としてのスタート、生態学の魅力に惹かれる(解説) The LUNG-perspective 2002, 10(3) 361-363
  - 7 長岡滋、瀧島任、長野準、川上義和、北村諭、川上雅彦、野口英世、近藤有好、下方薫、螺良英郎、小倉剛、佐々木孝夫、小川暢也 SS320A の第Ⅲ相二重盲検群間比較臨床試験成績 臨床医菓 2002, 18(1) 109-140
  - 8 長岡滋、瀧島任、長野準、川上義和、北村諭、川上雅彦、野口英世、近藤有好、下方薫、螺良英郎、小倉剛、佐々木孝夫、小川暢也 SS320A の後期第Ⅱ相(容量設定)臨床試験成績 臨床医菓 2002, 18(1) 81-107
- 2 学会発表
    - 1 奥田みゆき、奥田恭久、榊野富彌、小倉剛、螺良英郎 集菌蛍光塗抹法と MGIT 培養法による培養陰性化期間の検討 日本呼吸器学会雑誌 2002, 40 268

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

(分担) 研究報告書

改良型抗結核ワクチンの開発：サブユニット抗原を  
発現するリコンビナント BCG ワクチンの作成

分担研究者 内藤真理子 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科  
口腔病原微生物学 助手

研究要旨

実用化されたもっとも安全な抗結核ワクチンである BCG をもとに、さらに抗結核免疫効果が期待されるサブユニット型抗原を発現する改良型リコンビナント BCG 菌 (rBCG) の作製を計画した。結核患者の T 細胞免疫を増強する融合蛋白質、(Mtb8.4+Mtb9.9+Mtb9.8+Mtb41) と抗結核感染効果が認められた融合蛋白質 (Mtb32-C+Mtb39+Mtb32) の 2 種をもとに組み合わせを変えた 5 種類融合蛋白質を発現する rBCG 菌株の作製を計画した。本年度の研究により、5 種の rBCG 菌株のすべての作製に成功し菌株を得た。特に 1 種類、rBCG 72f-85B では計画したとおりの融合蛋白質の発現が顕著に認められた。

A. 研究目的

我々はこれまでに結核防御抗原として注目を集める Ag 85 complex を用いた改良型結核ワクチンを作成し、その免疫効果を検討してきた。本年度の研究はさらなる抗結核免疫効果の改良をめざして、あらたなサブユニット抗原を発現するリコンビナント BCG 菌の作製をめざす。使用したサブユニット抗原は、結核患者の T 細胞免疫を増強する融合蛋白質、(Mtb8.4+Mtb9.9+Mtb9.8+Mtb41) と抗結核感染効果が認められた融合蛋白質 (Mtb32-C+Mtb39+Mtb32) の 2 種とこれらをもとに組み合わせを変えた 3 種を構築する (table)。また Mtb32-C+Mtb39+Mtb32 と抗結核免疫効果の認められる Ag 85 complex と融合させた蛋白質を発現するリコンビナント BCG 菌 (rBCG 72f-85B) の作製も行う。この研究は従来

の BCG を上回るより効果的な抗結核ワクチンの開発に役立つと考える。

table	plane of the sub-unit protein fusion	
rBCG	Promoter	Mature fusion protein and signal peptide
rBCG 72f	Ag 85B of M. kansasii	Mtb 32-C+Mtb39+Mtb32-N
rBCG 71f	Ag 85B of M. kansasii	Mtb8.4+Mtb9.9+Mtb41
rBCG 31f	Ag 85 of M. kansasii	Mtb8.4+Mtb9.9+Mtb9.8

rBCG 59f	Ag 85B of M kansasii	Mtb39+Mtb32-N
rBCG 88f	Ag 85B of M kansasii	14kDa Ag+ Mtb8 4+ Mtb9 9+Mtb41
rBCG 72f-85B	Ag 85B of M kansasii	Mtb32-C+Mtb39+ Mtb32-N+Ag85B (BCG)

## B 研究方法

### 1 Ag 85B promoter-signal peptide 利用発現ヘクターの作成

*Mycobacterium kansasii* Ag 85B 遺伝子の ORF を含む DNA 断片 (HincII 断片 2 kbp) を鋳型に PCR 法にて C 末端に SseI site を付加した DNA 断片を作成する (fragment-N)。また同様に *Mycobacterium kansasii* Ag 85B 遺伝子の ORF の終止コトノの直前からターミネーター配列までの DNA 断片を作成する。後者の断片には N 末端に SseI site を付加しておく (fragment-C)。fragment-N と fragment-C を順方向に大腸菌-抗酸菌シャトルヘクターに組み込み Ag 85B promoter-signal peptide 利用発現ヘクターを作成した。このヘクターは SseI site に目的の抗原の遺伝子断片を組み込むことにより、Ag 85B promoter-signal peptide を利用しての BCG 菌での発現かはかられるものである。サブユニット、融合蛋白質遺伝子断片の調整 88f (14kDa Ag+ Mtb8 4+Mtb9 9+Mtb41), 71f (Mtb8 4+Mtb9 9+Mtb41), 72f (Mtb32-C+Mtb39+Mtb32-N) の遺伝子断片をもとに PCR 法にて table に示した各 DNA 断片を両端に SseI site を付加した形で調整した。また BCG Ag 85 B 抗原の mature protein に相当する遺伝子断片も同様に調整した。

## 2 rBCG の作製

各遺伝子断片を SseI site を利用して Ag 85B promoter-signal peptide 利用発現ヘクターに組み込み、それぞれを BCG に電気穿孔法にて導入した。各 3 ~ 4 個の得られた形質転換菌、rBCG を Sauton 培地にて培養し、菌体と培養上清を調整した。各サブユニット、融合蛋白質の発現をサブユニット蛋白質室に対する抗体を用いた western blotting 法にて確認した。

## C 研究結果

作成した各々の rBCG の菌体と培養上清蛋白質を western blotting 法にて確認したところ、rBCG 72f-85B は培養上清中、菌体のどちらにも 100kDa をこえる大きさの融合蛋白質が検出された。また rBCG 72f, rBCG 31f, rBCG 88f は融合蛋白質の大きさにわすかに反応するバンドが検出された。これらはいずれも親株の BCG には認められないバンドであった。残りの rBCG 59f, rBCG 71f では元の BCG には認められないバンドは検出されなかった。

## D 考察

本年度に作成した rBCG のうち rBCG72f-85B が計画したとおりの大きさの融合蛋白質を発現したことから、ワクチン効果か最も期待されると考えられた。が、これまでに開発した rBCG において目的の融合蛋白質の発現量が必ずしもワクチン効果に相関するとも限らないので、今後今回作成した全ての株を使って、各々の rBCG の抗結核免疫効果を検討する必要があると考えられた。

## E 結論

これまで我々の研究では *Mycobacterium kansasii* の Ag 85B 遺伝子のプロモータ領域とシグナルペプチドを用いると、

BCGAg 85B 大量発現型（約7倍）の rBCG（rBCG/KB  $\alpha$ ）を作成できることをあらかじめ示してきた。他の研究者の rBCG のシステムとは違い、我々のシステムは上記のプロモータ領域を用いた点が独創的である。本研究では新たにサブユニット型の抗原を組み合わせた5種類の rBCG 菌の作製を行い、100 kDa を超える大きさの融合蛋白質の発現に成功した。これまでの rBCG 菌において発現が認められたものの中で最大の大きさであった。この結果は今後、我々の rBCG システムにおいて他の目的蛋白質を組み込む際に大いに役立つと考える。

2. 実用新案  
該当なし
3. その他  
該当なし

F. 健康危険情報  
該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表  
該当なし

2. 学会発表

1. Okada masaji, Tanaka Takao, Inoue yoshizaki, Matsumoto Kumi, Yosida Shigeto, Ohara Naoya, Naito Mariko, Yamada Takeshi, Kaneda Yasufumi, Matsumoto Makoto, Matsumoto Sohkiichi, Yasir Skeiky, Seven Reed, Sakatani Mitsunori · Novel (recombinant BCG-AND DNA) vaccination against tuberculosis · The Awaji International Forum on Infection and Immunity · P-091 · 2002

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得  
該当なし



# 厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

## (分担) 研究報告書

### 新規結核 DNA ワクチンの開発に関する研究

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

Hsp65 DNA ワクチンをヒト IL-12p40p35 発現プラスミドヘクターとともに HVJ リポソームに包埋したヒト用新規結核 DNA ワクチンを構築した。この DNA ワクチンをカンクイサルに接種し、ワクチン効果を調べたところ抗原特異的 T リンパ球の顕著な活性化を認め、また胸部 X-P 等の結核予防ワクチン効果を得た。

#### A 研究目的

結核感染率を激減させ、また多剤耐性結核等の難治性結核を治療しうる画期的な次世代ワクチンを開発することを最終ゴールとする。その中でも特に結核 DNA ワクチンの開発を目指す。

Hsp65 DNA ワクチンは HVJ リポソームに包埋し、カンクイサルに接種した。その後結核菌によるチャレンシを行った結果、ワクチン接種サルの抗原特異的 T リンパ球の顕著な活性化を認め、また胸部 X-P 等の結核予防ワクチン効果を得た。

#### B 研究方法

IL-12 遺伝子を” DNA アンジュハント” とした Hsp65 結核 DNA ワクチンを HVJ リポソームに包埋し、これをカンクイサルに接種する。結核菌のエアノル感染を行い、ワクチン効果を解析する。これらの動物実験結果をもとに、プロトタイプの改良および臨床試験申請のためのデータをまとめる。

#### D 考察

世界で唯一の大規模 P3 レベルのサル結核感染実験施設で実験を行い、有望な成果を上げたことは今後の臨床試験申請へ向けて大きな前進であった。さらに詳細な免疫学的解析を行い、最も効果のあるワクチンへと改良を加える。

#### C 研究結果

カンクイサルの免疫実験のため、ヒト IL-12p40, p35 両遺伝子を健常人の PBMC よりクローニングした。DNA ワクチン用ヘクターとして IL12p40p35 融合タンパクを発現するプラスミドヘクターを構築した。構築した IL-12p40p35DNA ワクチンと

#### E 結論

結核 DNA ワクチンの開発は世界で多くの研究グループかしのきを削っているか、ヒトへの応用に至っていない。今回のカンクイサルでの研究成果は世界に先駆けた結核 DNA ワクチンの臨床応用に一歩近づいたといえる。

F 研究発表

1 論文発表

- 1 Yoshida S, Kobayashi T, Matsuoka H, Seki C, Gosnell WL, Chang SP, Ishii A. T cell activation and cytokine production via a bispecific single-chain antibody fragment targeted to blood-stage malaria parasites. *Blood* 2003, 101: 2300-6
- 2 Matsuoka H, Maki N, Yoshida S, Arai M, Wang J, Oikawa Y, Ikeda T, Hirota N, Nakagawa N, Ishii A. A mouse model of the atopic eczema/dermatitis syndrome by repeated application of a crude extract of house-dust mite *Dermatophagoides farinace*. *Allergy* 2003, 58: 139-45
- 3 Wang J, Hirai M, Yoshida S, Arai M, Ishii A, Matsuoka H. Comparison of malaria parasite gametocyte activating factor in the salivary glands of five species of mosquito (Diptera: Culicidae). *Med Entomol Zool* 2002 51: 13-20

# 厚生労働科学研究費補助金(新興 再興感染症研究事業)

## (分担) 研究報告書

### 国立病院・療養所の呼吸器ネットワークを用いた、 多剤耐性結核患者のリンパ球、血清における新しい 結核ワクチン抗原・結核診断抗原に対するT細胞免疫応答の解析

分担研究者 倉島篤行 国立療養所東京病院 臨床研究部 部長

#### 研究要旨

多剤耐性結核は、今日においても約4割以上の患者において治療法が無く、21世紀の健康に対する脅威の最大の一つとなる可能性が指摘されている。我々は、国立病院 療養所の呼吸器ネットワークを用い多剤耐性結核患者のリンパ球、血清における新しい結核ワクチン抗原・結核診断抗原に対するT細胞免疫応答の解析を行い、多剤耐性結核の診断、治療、予防において新しい方法の検討を行った。

#### A 研究目的

今日、多剤耐性結核は21世紀の健康に対する脅威の最大の一つとなる可能性が指摘されている。1994年から1997年にかけて行われたWHOによる耐性結核のGlobal surveillanceによれば、約1/3の国々で耐性結核の頻度は2%から14%に達し、一部の国では初回耐性が36.9%に見られている。近年の交通の発達、これら耐性結核が容易に国境を越えて蔓延する事を見せている。

わが国では5年毎に結核療法研究協議会が全国的な耐性菌の調査を行っており1997年の報告では、いずれかの薬剤に初回耐性は10.3%、獲得耐性は42.4%、全体で15.5%であり、1992年報告に比しいずれの指標をみても増加し、世界的規模のWHO surveillanceのほぼ中央値よりやや高い状態にあり、推計では耐性結核は1997年で毎年約2900例が発生すると考えられる。

多剤耐性結核の治療成績は極めて悪く、

現在の如何なる治療にもかかわらず、少なくとも約4割以上の患者が治療できない現状にある。多剤耐性結核の新たな治療の試みの一つとして、IFN- $\gamma$ 吸入療法が行われているか、菌陰性化の達成は困難である。我々は以下の研究を通し、多剤耐性結核の新たな治療法の解明をめざす予定である。

BCGよりも強力な新しい結核ワクチン〔HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン (BCGより100倍強力)、IL-6 関連 gene、 $\gamma$ -IFN DNA および rBA51 BCG ワクチン これらはキラーTの活性化を介してワクチン効果〕の開発がマウスで進展した。

また、新たに合成した72f fusion 蛋白ワクチンはカニクイサル(最もヒトの結核感染に類似したモデル)のレヘルでBCGよりも強力な抗結核予防効果を示した世界の最先端ワクチンの一つである。

岡田はキラーT細胞分化因子の先駆的な発見者であり、T細胞活性化を介する遺伝子治療研究を行ってきた(岡田、Mulligan)。

また、結核患者でのキラー T 細胞の誘導低下とキラー T 細胞分化因子の低下を明らかにしてきた。

さらに、結核感染により特異性の高い、従来のツベルクリン反に代わる新しい診断法 (DPPD) や ESAT-6 の開発を行ってきた。

## B. 研究方法

呼吸器ネット 8 基幹呼吸器施設及び結核患者数が多い国立療養所・病院から多剤耐性結核で

- (1) 血液 10ml (ヘパリン採血) を収集
- (2) 多剤耐性結核患者のリンパ球のキラー T 細胞活性  
新しい結核ワクチン抗原 HSP65  
Antigen 85B、85A、MPB51  
fusion 蛋白 72f  
その他種々の結核ワクチン抗原に対するキラー T 活性誘導、増殖反応、キラー T 細胞分化因子 (サイトカイン) を解析する。(国立療養所近畿中央病院の岡田に送り、そこで Assay)
- (3) 結核感染により特異性の高い、従来のツベルクリン反応に代わる新しい診断法 (DPPD) や ESAT-6 ペプチドの開発をヒトの *in vitro* 系で行う。
- (4) これらリンパ球を我々が開発した SCID-PBL/hu の系で解析する。
- (5) 患者の病態、排菌、薬剤感受性等の情報をファイルし、臨床情報と併せて解析する。
- (6) 上記が進展した段階で、治療が極めて困難な非定型抗酸菌症の病態解析も予定に入れる。

## C. 研究結果

国立病院、療養所は、現在全国で 8 基幹医療施設、44 専門医療施設、計 52 施設で呼吸器疾患政策医療ネットワーク (K-NET) を形

成しており、今年度、全国の 4 個所に症例登録サーバーを設置、現在スタートアップ中である。

結核では、多剤耐性結核を中心にオンライン症例登録データベースを構築中であるが、実際の運用は、「個人情報保護法」および「臨床研究に関する倫理指針」確定後となるため、本研究の前提となる政策医療ネットワークを通じた多剤耐性結核検体の収集、症例の解析は未だ稼働していない現状である。

ここでは分担研究者所属施設における多剤耐性結核の後方視的実態と治療成績の検討について述べる。

1991 年から 1997 年までの菌陽性新規入院結核患者は 2331 例であり、このうち INH、RFP を含む 2 剤以上の多剤耐性結核は 108 例、4.6%であった。108 例中、6 例は肺切除などの外科的治療により治癒を見ており、内科治療 102 例中、早期死亡、治療中断、転院などで経過追跡不能例が 23 例あり 79 例を解析対象とした。

全 79 例の累積菌陰性化率は 3 ヶ月で 17%、20 ヶ月で 68%であり、全感受性菌結核の PZA を含む初回治療 3 ヶ月の 98.8%に比べると著しく低値であった。

79 例中 NQ を全く含まない化療は 22 例であり、累積菌陰性化率は 3 ヶ月で 22.7%、20 ヶ月で 59.1%であった。

79 例中 NQ を含む化療は 57 例であり 3 ヶ月で 14%であったが 20 ヶ月では 71.9%であった。

NQ を含む化療中、同時併用新規薬剤が 1 剤以下群 19 例では 3 ヶ月で 0%、20 ヶ月で 27.8%であったのに対し、同時併用新規薬剤が 2 剤以上群 39 例では 3 ヶ月が 20.5%、20 ヶ月が 92.3%であった。

## D. 考察

INH、RFP2 剤を含む多剤耐性肺結核症治