

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究： [抗結核キラーTリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン（サブユニット・DNA-リコンビナントBCG-ワクチン）
・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡田 全司

平成16（2004）年3月

目 次

I. 総括研究報告 (別添4)		
結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究： [抗結核キラーTリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン (サブユニット・DNA-・リコンビナントBCG-ワクチン)・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]	岡田全司	1
II. 分担研究報告 (別添5)		
1. 新しい結核ワクチンによる臨床応用 (国立病院療養所政策医療呼吸器ネットワークを利用した) 計画	坂谷光則	23
2. 結核サブユニットワクチンの開発 (モルモットにおけるBCG Tokyo細胞壁画分(CCW)の結核感染防御効果の検討)	矢野郁也	34
3. 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	螺良英郎	37
4. 組み換えBCGワクチン改良・開発の研究	大原直也	40
5. 新規結核DNAワクチンおよびバキュロウィルスベリオンワクチンの開発に関する研究	吉田栄人	46
6. 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	倉島篤行	49
7. 結核症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究	土肥義胤	53
8. TB DNA vaccineに関する基礎的研究	菅原 勇	55
9. 結核菌症の病態解明とDCを用いた細胞遺伝子治療の開発に関する研究	原 寿郎	57
10. Toll-like receptorによる結核菌 (病原体) 認識のシグナル伝達機構	竹田 潔	63
11. 新しい結核ワクチン (①HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン、②リコンビナント72f BCGワクチン、③72f融合タンパク+BCG東京ワクチン) 三種のワクチン接種マウス、モルモット、カニクイザルの病理形態学的検討	井上義一	69
12. 研究協力者研究報告		77
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添6)		106

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究
[抗結核キラー T リンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核
ワクチン(サブユニット・DNA - リコンビナント BCG - ワクチン)
・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]

主任研究者 岡田全司 国立療養所近畿中央病院 臨床研究センター結核研究部長

研究要旨

- [1] 新しい結核予防ワクチンの開発 ① HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン、②リコンビナント 72f BCG (r72f BCG) ワクチン、③ 72f fusion 蛋白ワクチンの世界の最先端のワクチンを開発した。
新しい DNA ワクチンの ① HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは、カニクイザル（最もヒト結核感染に近いモデル Nature Med. 1996）で強力な結核予防効果を示した。（マウスの系で BCG よりも 100 倍以上強力なワクチン効果を示した）HSP65 DNA+ IL-12 DNA ワクチン、②リコンビナント 72f BCG ワクチン、③ 72f fusion 蛋白ワクチンはサルで同等の延命効果、胸部 X 線所見（結核病巣）、血沈、体重で強い改善傾向がみられた。さらに、HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンはモルモットの系でも BCG より強力な画期的な結核予防ワクチンであることを明らかにした。72f 融合蛋白は Phase I study を開始した。④ 1000 倍発現効率が高い画期的な AAV ベクター(HSP65 DNA)の開発に成功した。経口リステリア結核ワクチン(Ag85B)を開発した。キラー T を強めるアデノ-HSP65 DNA、ユビキチン-HSP65 DNA ワクチン、T bet DNA-Sendai ウイルスベクター DNA も開発した。
- [2] 新しい治療ワクチンの開発： IL-6 関連遺伝子ワクチンは初めて結核治療ワクチンとしても有効であることを示した。
- [3] 良い治療法がないヒト多剤耐性結核患者 3 例に T 細胞（キラー T 細胞）輸注療法を行い、胸部 CT 像の改善及び結核菌の陰性化を認める、世界に先駆けて画期的な治療法を開発した。
- [4] IL-2 レセプター γ 鎖ノックアウト SCID-PBL/hu のモデルでヒト多剤耐性結核治療モデルを世界に先駆けて開発した。スーパースプレッダー多剤耐性結核菌を発見し、このモデルで治療ワクチン・治療薬を解析中。
- [5] 結核菌症の病態解明： ① Granulysin による結核の病態解明 ②抗結核キラー T 細胞から産出される granulysin [15kd の granulysin(15K Gra)] が M ϕ 内結核菌

殺傷に極めて重要な役割を果たしている発見をした。⑥ 15K Gra DNA ワクチンは結核予防効果を示した。⑦ 15K Gra Transgenic (Tg)-、9K Gra Tg-マウスを初めて作製し、世界に先駆けて 15K Gra の生体内抗結核作用を明らかにした。

- [6] 種々の TLR(-/-)マウス、MyD88(-/-)マウスを作製し、これらと種々の多剤耐性結核菌を用い、我々が発見したスーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌は TLR4 レセプター及び TLR2 レセプターの免疫認識機構からエスケープすることを世界に先駆けて明らかにした。現在このアゴニスト（治療薬）を解析中。
- [7] ツベルクリン反応に代わる新しい結核特異的診断法 DPPD skin test 及び in vitro ESAT-6 + CFP10 刺激 IFN- γ 産生 test を開発した。
- [8] ワクチン開発研究が評価され、World Health Organization (WHO)の STOP TB Partnership 及び WHO の STOP TB Vaccine Working Group メンバーに選出された。

分担研究者	坂谷光則 国立療養所近畿中央病院 病院長	土肥義胤 大阪大学大学院医学系研究科 保健学専攻微生物学 教授
	矢野郁也 日本 BCG 研究所 中央研究所 所長	菅原 勇 財団法人結核予防会結核研究所 抗酸菌レファレンスセンター センター長
	螺良英郎 財団法人大阪結核研究会 理事長	原 寿郎 九州大学大学院 医学研究院成長発達医学 教授
	大原直也 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔病原微生物学 助教授	竹田 潔 九州大学生体防御医学研究所 ゲノム機能制御学研究分野 発生工学分野 教授
	吉田栄人 自治医科大学 医動物学 講師	井上義一 国立療養所近畿中央病院 臨床研究センター呼吸不全研究部長

倉島篤行
国立療養所東京病院
臨床研究部長

A. 研究目的

結核罹患率の横這い、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より、我々の新しい治療・予防・診断の研究が必須である。

したがって、BCG よりもより強力な新しい結核治療ワクチン・結核予防ワクチン〔サブユニットワクチン、DNA ワクチンおよびリコンビナント BCG ワクチン (rBCG)〕の開発の臨床研究を行うことを目的とする ② さらに、最近キラー T 細胞ならびに granulysin の結核免疫に対する重要性が示唆されつつあるが、このキラー T 細胞活性と結核発症を分子・遺伝子レベルで解明し、結核菌症の病態を解明するとともに ③ これらを用いた新しい治療法及び新しい結核予後診断・難治性診断法の開発を行う。④ Toll like レセプター (TLR) とキラー細胞からの結核菌症 (特に多剤耐性結核菌) の免疫監視エスケープ機構を解明し、新しい治療薬 (新しい化学療法剤等) を開発する。多剤耐性結核の新しいワクチン・治療法を開発する。

⑤ 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 ⑥ 当院 (結核・呼吸器準ナショナルセンター) を中心として、日本の 43 % の結核患者の治療を行っている、国立病院・療養所呼吸器ネットワーク (54 施設) を利用して臨床応用を行う。

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。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。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 週間後に強毒株、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 X-P 所見で予防ワクチン効果を判定した。(岡田、井上、坂谷、Reed、Gillis)

(2) DNA ワクチンの作製とカニクイザルへのワクチン免疫方法

カニクイザ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 ワクチン用ベクターとして IL-12p40 p35 融合タンパクを発現するプラスミドベクターを構築した。構築した IL-12p40 p35DNA ワクチンと HSP65 DNA ワクチンは HVJ-liposome に包埋し、カニクイザルに接種した。(岡田、吉田、金田、Reed、Gillis)

米国 NIH branch で WHO の支援研究機関である Leonard Wood Memorial 研究所 (フィリピン、セブ) で行った。Leonard Wood Memorial 研究所は世界で唯一多数のカニクイザルを P3 レベルで結核研究で

きる施設である。この研究室から Nature に 1996 年、カニクイザルが最もヒト結核に近いモデルである有名な研究が発表された。

Dr.Babie Tan, Dr.Cruz(Leonard Wood), Dr.Reed(Corixa)との共同研究でワクチンの投与群を 5 群に分け、各群 4 匹で行った。

- 1 群 r72fBCG 投与群
- 2 群 HVJ-liposome/HSP65DNA+IL-12DNA 投与群
- 3 群 72f fusion 蛋白+BCG 東京投与群
- 4 群 BCG 東京投与群
- 5 群 生理食塩水投与群

各ワクチンを 3 週間隔で 3 回予防ワクチン 5×10^6 cfu 皮内投与 (0.1ml の生食に浮遊) した。HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA は i.m 投与した。72f fusion 蛋白は BCG 東京浮遊液に同時に入れ、注射も同部位で行った。72f fusion 蛋白+BCG 東京群の意味は、72f fusion 蛋白予防ワクチンはカニクイザルで BCG 接種後 4 ヶ月して投与した場合著明なワクチン効果を示したことにより、BCG をアジュバントとして 72f fusion 蛋白と同時に注射すると極めて強力なワクチン効果が得られる可能性があることより、このプロトコールを作製した。最終ワクチン投与 4 週後に強毒ヒト結核菌クロノ株を気道内投与した。

予防ワクチン効果は、生存率、胸部 X 線、血沈、体重、体温、PPD 皮内反応ならびにワクチン投与ザルの末梢血 T リンパ球の増殖増強反応で解析した。末梢血 T 細胞をリコンビナント HSP65 10μ g/ml、リコンビナント 72f 10μ g/ml、PPD 10μ g/ml、PHA-P 0.2% で刺激し、 3 H-サイミジン uptake の方法で三日後に増殖活性を測定した。

上記の検査は、①ワクチン投与前、②ワクチン 1 回目投与後 3 週後、③ 2 回目投与 3 週後、④ 3 回目投与後 3 週後、⑤ TB 菌投与 4 週後、⑥ TB 菌投与 8 週後に行った。

結核菌由来の Ag85B 遺伝子、MPB51 遺伝子、HSP65 遺伝子、およびトキソプラズマ原虫由来の SAG-1 遺伝子等とユビキチン遺伝子との融合遺伝子を構築した。

(3) リコンビナント BCG ワクチンの作製

Mtb72f DNA 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 BALB/c マウスに皮下投与 3 回 (2 週間隔) し、結核感染 (H37Rv 5×10^5 i.v) した後、4 週後と 10 週後の肺・肝・脾臓の結核菌数を測定した。モルモットの実験系における r72f BCG ワクチン効果はモルモット (ハートレイ系) に r72f BCG を 1×10^3 CFU 1 回皮内投与し、8 週後に 1×10 CFU の結核菌を気道内投与し、結核菌感染後 7 週後に脾、肝、肺の結核菌数と脾細胞の免疫応答を解析した。

(4) モルモットを用いた結核菌吸入感染系における新しい結核ワクチンの予防効果のアッセイ

モルモットを用いた結核研究の世界の第一人者 Texas A&M 大学教授 David N. McMurray 博士と共同研究を行った。(McMurray 博士は結核エアゾル感染させたモルモットを用いて、米国 FDA や NIH より委託された新しい結核ワクチンの効果判定を行っており、名実ともにモルモットを用いた結核研究の大御所である。)

結核 DNA ワクチン群を第 1 群 BCG (1×10^3) ワクチン、第 2 群 Empty ベクター ワクチン、第 3 群

HVJ-liposome / HSP65 DNA ワクチン、第 4 群 HVJ-liposome / モルモット IL-12 DNA ワクチン、第 5 群 HVJ-liposome / HSP65 DNA + モルモット IL-12DNA ワクチンの 5 群、各群 7 匹のモルモットを用いた。

各々のワクチンをモルモットに 3 回免疫した後、最終免疫より 6 週後にヒト結核菌 H37RV を吸入感染させた。結核菌吸入感染後 5 週後にモルモットを sacrifice し血液を採取し、肺臓、肝臓、脾臓の病理組織の解析と肺臓、脾臓の結核菌数を 7H11 寒天培地で解析した。又、脾リンパ球の免疫機能（サイトカイン産生、IFN- γ 等）を解析した。

一方、結核菌を吸入感染させる直前の結核ワクチン投与モルモットの免疫反応を IFN- γ 、TNF α 、IL-12p40 等の RT-PCR を用いてサイトカイン活性を測定した。

(5) AAV (アデノ随伴ウイルスベクター) 及びアデノウイルスベクターを用いた発現効率の良い結核ワクチンの開発

今まで通常 AAV ベクターとして使用されていた AAV(2/1)ベクターに代わり、1000 倍発現効率が良い AAV(2/5)ベクターに HSP65 DNA 及び Ag85B DNA を挿入して、AAV/HSP65 DNA ワクチン及び AAV/Ag85B DNA ワクチンを作製した。さらに、E1a、E1b、E3 欠損アデノウイルスベクターにこれらの遺伝子を導入した。Adenovirus vector/ Ag85B DNA ワクチン及び Adenovirus vector/HSP65 DNA ワクチンを作製した。

(6) Attenuated リステリア菌を用いた新しい経口結核ワクチンの開発

リステリア (*Listeria monocytogenes*) は生体内でマクロファージ、樹状細胞などの抗原提示細胞の食胞に取り込まれ、その後 listeriolysin O (LLO) を分泌すること

により、食胞膜を破壊し細胞質に移行する。そこで、弱毒リステリア株に DNA ワクチン (プラスミド) を導入し、感染させた。

結核菌抗原である Ag85A、Ag85B および MPB(MPT)51 をコードする遺伝子を発現プラスミド p3L118R に組み込み、弱毒リステリア Delta2 株 (ActA 欠損株) に electroporation で導入した。発現プラスミド p3L118R は ActS プロモーターにドライブされるファージ由来のリステリア溶菌素 lysin118 遺伝子を持つため、この発現ベクターを持つリステリアは宿主細胞の食胞から細胞質に移行すると溶菌し、DNA ワクチン (発現ベクター) を放出する。これらの組み換えリステリア DNA ワクチンを C57BL/6 マウスまたは BALB/c マウスに 2 週間隔で 2 回腹腔免疫した。

(7) 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

PPD 蛋白の中より、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。ヒトで結核感染特異性を示すか否かを skin test で施行した。(Gillis、Reed、岡田、坂谷、螺良)

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 IFN- γ を ELISA で測定した。

(8) 結核菌症の病態解明

Toll like receptor と結核菌症の病態解明には、in vitro の種々の TLR ノックアウトマウス由来の M ϕ を用い、UV 処理し

て殺菌したこれらの多剤耐性結核菌に対するM ϕ 活性化機構の差異を通常の結核菌や非定型抗酸菌と比較検討した。さらにTLR2(-/-)マウス、TLR4(-/-)マウス及びMyD88(-/-)マウスにヒト型結核菌 H37RV 及び種々の多剤耐性結核菌（スーパー・スプレッター多剤耐性結核菌も含む）を i.v 投与又は i.p 投与して TLR2 と TLR4 の結核菌、多剤耐性結核菌に対する in vivo 抗結核効果及びキラー T 細胞分化誘導効果、サイトカイン（IFN- γ 、IL-2 産生誘導効果）、T 細胞増殖効果を解析した。

（9）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 15K 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 発現を検討した。（岡田、井上、坂谷）

（10）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

我々は IL-2R γ 鎖ノックアウト NOD-SCID を作製した。IL-2R γ 鎖は IL-4、IL-7、IL-15、IL-21 の γ 鎖と共通である。したがって、IL-2R γ 鎖をノックアウトすると、ほとんどの T 細胞、NK 細胞活性シグナルがブロックされる。したがって、この IL-2R γ (-/-)NOD-SCID を用いて SCID-PBL/hu を作製した。

（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。すなわち院外者関西学院大学総長、大阪国際大学法学部教授等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行い実施する。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。

C. 研究結果

[I] 新しい結核ワクチンの開発

新しい結核予防ワクチンの開発

① HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン、②リコンビナント 72f BCG(r72f BCG)ワクチン、③ 72f fusion 蛋白ワクチンの世界の最先端のワクチンを開発した。

これらの研究は、第一回国際結核ワクチン学会（2003年9月、モントリオール）でシンポジストとして発表を行い、高い評価を得た。さらに、ワクチン開発研究が評価され、World Health Organization (WHO)のSTOP TB Partnership 及びWHOのSTOP TB Vaccine Working Group メンバーに選出され、極めて高い評価を得た。

[結果]

米国 NIH branch で WHO の支援研究機関である Leonard Wood Memorial

研究所で行った。Leonard Wood Memorial 研究所は世界で唯一多数のカニクイザルを P3 レベルで結核研究できる施設である。この研究室から Nature Med.に1996年、カニクイザルが最もヒト結核に近いモデルである有名な研究が発表された。

Dr.Babie Tan (Leonard Wood)、Dr.Reed との共同研究でワクチンの投与群を5群に分け、各群、4匹で行った。(結核菌を投与後14ヶ月間経過観察と予防効果解析)

1群 r72f BCG ワクチン

2群 HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン

3群 72f fusion 蛋白 + BCG 東京 ワクチン

4群 BCG 東京 ワクチン

5群 生理食塩液投与群

各ワクチンを3週間隔で3回予防ワクチン投与した。r72f BCG は 5×10^6 cfu 皮内投与 (0.1ml の生食に suspend) した。

HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA は、i.m 投与した。72f fusion 蛋白は BCG 東京 suspend 液に同時に入れ、注射も同部位に行った。最終ワクチン投与4週後に強毒ヒト結核菌クロノ株を気道内投与した。

予防ワクチン効果は、生存率、胸部 X 線、血沈、体重、体温、PPD 皮内反応ならびにワクチン投与ザルの末梢血 T リンパ球の増殖増強反応で解析した。

HSP65 蛋白に特異的な T リンパ球増殖増強反応が HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン投与群で認められた。さらに、この HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン群では、BCG 東京ワクチンや生食投与群に比し、PPD、72f 融合タンパク、結核死菌に対しても著明な増殖増

強効果を示した。また、サイトカイン産生 (IL-6 等) 増強が認められた。一方 72f 蛋白に特異的な増殖反応増強が r72f BCG ワクチン投与群で認められた。72f fusion 蛋白+BCG 東京ワクチン投与群では極めて強い T 細胞増殖反応が 72f 蛋白特異的に誘導された。

r72f BCG 投与群、HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA 投与群や 72f 蛋白投与群では血沈の改善、胸部 X 線所見の改善及び体重減少の改善が認められた。

14 ヶ月後の生存率は HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンでは 4 匹中 2 匹生存し、r72f BCG ワクチンでは 4 匹中 3 匹生存し、(72f fusion 蛋白+BCG 東京) ワクチンでは 4 匹中 4 匹生存した。一方生食コントロール群は全例死亡した。すなわち三つのワクチンは結核感染カニクイザルにおいて生存率の改善効果を示すことを明らかにした。

このように、この 3 つのワクチン投与群はサルレベルでも予防ワクチン効果を示した。

- すなわち① HVJ-liposome / HSP65 DNA+IL-12DNA ワクチン
② r72f BCG ワクチン
③ (72f fusion 蛋白+ BCG 東京) ワクチン

は有効であることがカニクイザルのレベルで示された。(岡田、吉田、大原、金田、Reed、Gillis)

さらに、モルモットを用い、HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンの結核予防ワクチン効果を初めて明らかにした。

- ① HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは BCG 東京ワクチンよりも強力な結核予防効果を発揮することを我々は明らかにした。

すなわち、HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン、HVJ-liposome / HSP65 DNA ワクチン、HVJ-liposome / IL-12 DNA ワクチン、HVJ-liposome control ベクター群、BCG 東京ワクチンを各々各群 7 匹のモルモットに 3 回免疫し、最終免疫から 6 週後にヒト結核菌を吸入感染させた。

肺臓、脾臓の結核菌数は HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンで BCG ワクチン群より著明な減少が認められた。

さらに HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンを投与したモルモットの肺臓及び脾臓の病理学的解析を行い結核 granuloma に対し、このワクチンによる有効な改善効果が認められた。granuloma index で HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンはモルモットの系で BCG よりも有意差をもって有効な結核予防ワクチンであることが示された。すなわち HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは結核菌吸入感染モルモットの系でも極めて強力な結核予防ワクチンであることが明らかとなった。

- ② 免疫反応においても HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン投与群では IFN- γ や IL-2 の産生の増強が認められた。

マウスの系においても HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは BCG 東京より 100 倍有効な結核予防ワクチン効果の再現性が得られた。この結果は画期的なことである。

さらに、結核菌の PPD や HSP65 蛋白に対するキラー T 細胞や IFN- γ 産生にお

いても HVJ-liposome/ HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは相乗効果が認められ、BCG 東京ワクチンよりもはるかに強力なキラー T 分化誘導能と Th1 細胞活性化能を示した。すなわち、HVJ-liposome / HSP65 DNA ワクチン単独および HVJ-liposome / マウス IL-12 DNA ワクチン単独に比し HVJ-liposome / HSP65 DNA + マウス IL-12 DNA ワクチンは極めて強力なキラー T 及びヘルパー T 分化誘導能を示し、しかも BCG 東京ワクチン接種群よりもはるかに強力であった。

今までの結果をまとめると

[1] DNA ワクチン: HSP65 DNA+ IL-12 DNA ワクチンは相乗効果を示し、BCG よりも強力 (100 倍強力) な結核予防ワクチンであることをマウスの系で明らかにした。

HVJ-liposome/ HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは、カニクイザル (最もヒト結核感染に近いモデル Nature Med. 1996) で強力な抗結核予防効果を示した。延命効果、胸部 X 線所見 (結核病巣)、血沈、体重で強い改善傾向がみられた。さらに、HSP65 DNA+ IL-12 DNA ワクチンはモルモットの系でも BCG より強力な画期的な結核予防ワクチンであることを明らかにした。

[2] リコンビナント 72f ワクチン

r72f BCG はマウス、モルモット、サルで BCG よりも強い結核予防ワクチン効果を発揮することを明らかにした。

これらの① HVJ-liposome/ HSP65 DNA+ IL-12 DNA ワクチン、②リコンビナント 72f BCG ワクチン ③ 72f fusion 蛋白ワクチンを免疫したカニクイザルの生存率と免疫増強効果、

血沈、体重の改善効果は相関した。

[3] 72f Fusion 蛋白ワクチン (結核蛋白 Mtb39 と Mtb32 の fusion 蛋白ワクチン) 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た。

新しい 72f fusion 蛋白ワクチンはヒト多剤耐性結核患者 T 細胞の結核免疫を増強した。BCG で priming し、後に 72f 融合蛋白ワクチン (booster ワクチン) を行うと、カニクイザルで極めて強力な予防効果を示した。日本における成人での 72f 融合蛋白の booster ワクチンが有効である可能性を示唆。Phase I study を計画。

[4] Priming-Booster 法で最も強力な新しい結核ワクチンを作製しつつある。本邦では乳幼児に BCG 接種を行う。したがって成人における booster ワクチンとして上記のワクチン① HSP65DNA+ IL-12DNA ワクチン、② r72f BCG ワクチン、③ 72f fusion 蛋白ワクチンを用いたモデルを 66 頭のサルの系で行いつつある。Priming は BCG 東京ワクチンを用い、すでに免疫をした。4 ヶ月後から booster ワクチンを投与。

Priming-Booster 法は 2003 年第一回国際結核ワクチン学会で結核ワクチン効果を得る極めて良い方法であるとのコンセンサスが得られた。

[5] 新しい治療ワクチンの開発: IL-6 関連遺伝子ワクチン (Adeno ウイルスベクター/ IL-6 DNA+ IL-6 レセプター DNA+ gp130 DNA ワクチン) は初めて結核治療ワクチンとしても有効であることを示した。

我々は 72f fusion 蛋白ワクチンがマ

ウスのみならずカニクイザルでも治療ワクチン効果を示す予備実験結果を得た。したがって、① IL-6 関連遺伝子ワクチン+ 72f 蛋白ワクチン、又は、② IL-6 関連遺伝子ワクチン+ リコンビナント 72f BCG ワクチンの組み合わせで強力な治療ワクチンを開発する。

- [6] ① 1000 倍発現効率が高い画期的な AAV ベクターワクチンを開発した。AAV(2/5) 型ベクターに組み込んだ HSP65 DNA ワクチンすなわち AAV(2/5)/ HSP65 ワクチンは、今までの AAV(2/1)/ HSP65 DNA ワクチンに比し HSP65 蛋白抗原に対する T 細胞免疫反応を極めて強く増強した。

さらに、AAV(2/5)/Ag85B DNA ワクチンも Ag85B 蛋白に対する T 細胞反応を増強した (ハーバード大学医学部 R.C.Mulligan 教授との共同研究)。すなわち、これらのワクチンを BALB/c マウス又は C57BL/6 マウスに投与すると、極めて強力な結核菌特異的キラー T 細胞の分化やヘルパー T 細胞増殖増強効果が認められた。又 IFN- γ 産生の強い増強が認められた。特に AAV(2/5) / HSP65 DNA ワクチンは 1×10^{10} particle だと全く同等のこれらの T 細胞活性化が認められた。このことより、有力な結核ワクチンとなることが示唆された。

- ② Adenovirus ベクター/ HSP65 DNA 及び Adenovirus ベクター/Ag85B DNA ワクチンも作製した。これらのワクチンも強力な T 細胞免疫誘導効果を示した (Mulligan 教授との共同研究)。

- ③ 弱毒化したリステリア菌 (act gene を欠損させた) に Ag85A, Ag85B, MPB51 DNA を導入し免疫したマウスは結核感染予防効果を示した。我々が世界に先駆けての報告となった。

- ④ ユビキチン DNA- HSP65 DNA ワクチン及びユビキチン DNA- Ag85B DNA ワクチンもそれぞれ抗原特異的に結核免疫を増強した。

さらに、Sendai ウイルスベクターを用いて T bet DNA ワクチンも開発した。

これらの、①②③④を組み合わせ、さらに BCG 東京ワクチンと priming-booster 法を用い、最も強力なワクチンを作製する。

一方、マウスに結核菌抗原感作 (TB 2 ペプチド刺激) 樹状細胞を投与することで脾臓の菌量が減少していた。この実験系を用いて、今後、センダイウイルスベクターを用いて T-bet 遺伝子を樹状細胞に導入し、結核菌感染に対する感染防御能の解析を行うことを検討している。

- [7] リコンビナント BCG ワクチン: 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明らかにした。種々のリコンビナント BCG ワクチンを作製した。

- [8] 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、結核蛋白 ESAT-6 ペプチドで免疫し、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。さらに、IL-2 レセプター γ 鎖ノックアウト SCID-PBL/hu のモデルでヒト多剤耐性結核治療モデルを世界

に先駆けて開発した。

- [9] 一方、我々は世界に先駆けて多くのヒトに感染する Super Spreader 多剤耐性結核菌 SS 0308-0783 株（一人の Super Spreader 患者から多数のヒトに感染）を発見した。IL-2R(-)/SCID PBL/hu モデルで治療ワクチン・治療薬を解析中。

[II] 新しい診断法の開発

- [1] 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を明らかにした。すなわち、ツベルクリン反応に代わる新しい結核特異的診断法 DPPD skin test を開発した。

（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をモルモットですでに示した）

- [2] さらに結核感染に特異的な ESAT-6+ CFP10 test (in vitro) を開発した。多剤耐性結核を含む 106 例の末梢血単核球の ESAT-6、CFP10 刺激による IFN- γ 産生能の検討では活動性結核では塗抹陰性結核や非結核性疾患に比べ有意に上昇を認めた。また CFP10 刺激 IFN- γ 値は多剤耐性結核は感受性結核に比べ有意に低下していた。

- [III] キラー T と結核菌殺傷蛋白による結核症の病態解明：15K granulysin による新しい pathway と予後診断法を発見した。又 15K granulysin がキ

ラー T から分泌され M ϕ にとり込まれ M ϕ 内の結核菌を殺す新しい pathway を発見した。

Granulysin Transgenic マウスを製作した。

- [1] 多剤耐性結核患者 PBL の granulysin mRNA, TRAIL mRNA、及び 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。
- [2] 抗結核キラー T 細胞から産出される granulysin [15kd の granulysin (15K Gra)] が M ϕ 内結核殺傷に極めて重要な役割を果たしている発見をした。
- [3] 15K Gra DNA ワクチンは結核予防効果を示した。
(a) CAG 15K Granulysin DNA ワクチン (b) CAG 9K Granulysin DNA ワクチン (c) CAG 分泌型 9K granulysin DNA ワクチン (d) Adenovirus ベクター / 15K Granulysin ワクチンをすでに作製した。
- [4] 多剤耐性結核患者キラー T 細胞の Gra 蛋白発現及び Killer Secretory Protein (KSP37) の著明な低下を認めた。すなわち新しい結核予後診断法を確立した。
- [5] 15K Gra Transgenic マウス、9K Gra Transgenic マウスを初めて作製し、世界に先駆けて 15K Gra の生体内抗結核作用を明らかにした。さらに 15K granulysin transgenic マウスは生体内の抗結核菌殺傷作用のみでなく、結核に対するキラー T 細胞の分化誘導を増強した。また、結核菌に対する T 細胞増殖能増強作用と IFN- γ 産生増強効果を示した。一方、9K granulysin transgenic マ

ウスも 15K granulysin と同様の効果を生体内で示した。

- [6] 多剤耐性結核患者キラー T 細胞、NK 細胞から産生され、血清中に流れている killer secretory protein37 (KSP37)の著明な低下を認めた。
- [7] KSP37 transgenic マウスを作製した。
- [8] 結核菌殺傷とマクロファージ：
1. 抗酸菌易感染性症例 40 例において IL-12 ファミリーの IL-23, IL-27 遺伝子解析を行っているが異常は見出されていない。
 2. CD14 陽性単球由来の GM-M ϕ または M-M ϕ について遺伝子発現の相違をマイクロアレイで検索したところ、GM-M ϕ において 2 倍以上の発現上昇がみられた遺伝子が 20、M-M ϕ において 2.5 倍以上の発現上昇がみられた遺伝子が 10 認められた。さらに GM-M ϕ または M-M ϕ に live BCG を加えた際の変化の差異を検討中である。
 3. live BCG-GM-M ϕ 、あるいは IFN- γ -GM-M ϕ と GM-M ϕ の相違をマイクロアレイ法を用いて解析
GM-M ϕ は IFN- γ 、BCG 生菌で刺激すると結核菌に対して抵抗性を持つようになるが、これらの遺伝子発現をコントロールの GM-M ϕ のものと比較すると、5 遺伝子において 6 倍以上の発現上昇が認められた。これらの遺伝子の発現の定量を行い、kinetics などさらに解析を進めている。
- [IV] 種々の TLR(-/-)関連マウスと多剤耐性結核菌を用い、初めて多剤耐性結核菌の TLR からのエスケープ機構が示唆された。

(1) Super Spreader MDR-TB 菌 (SS 0308-0783 株) や他の通常の MDR-TB 菌又は薬剤感受性 TB 菌を種々の TLR(-/-)や MyD88(-/-)マウス等に投与して解析したところ、ある種の MDR-TB は Toll like 関連レセプターの認識機構をエスケープする可能性が示された。すなわち通常のヒト結核菌 H37Rv は TLR2 と TLR4 の認識を受けるが、Super Spreader MDR-TB 菌 (SS0308-0783 株) は TLR2 と TLR4 の認識機構からエスケープした。これは結核菌数、キラー T 細胞分化、T 細胞増殖、IFN- γ 産生の系で説明された。

(2) TLR ファミリーの中で結核菌の構成成分の認識に TLR2 と TLR4 が重要な役割を果たすことが明らかになってきている。そのほかにも結核菌の認識に重要な役割を果たすメンバーを明らかにすることを目的とする。

TLR を介したシグナル伝達の分子機構を、TIR ドメインを持つアダプターに標的を絞って解析した。昨年度までに、MyD88 が全ての TLR を介した炎症性サイトカインの産生誘導に必須であることを明らかにしている。さらに、第 2 の TIR ドメインを持つアダプター TIRAP が TLR2, TLR4 による MyD88 を介したシグナルに特異的に関与していることを明らかにした。今年度はさらに第 3 のアダプター TRIF を同定し、その生理機能を、ノックアウトマウスを作製することにより解析した。TRIF ノックアウトマウスは、TLR3 刺激に対する応答性が顕著に阻害されていた。さらに TLR4 刺

激による IRF-3 の活性化および IFN 誘導性遺伝子の発現も顕著に阻害されていた。しかし、TLR4 刺激による MyD88 依存性のシグナルの活性化は障害されていなかった。そこで、TRIF と MyD88 の両遺伝子をともになくしたダブルノックアウトマウスを作製したところ、TLR4 刺激によるシグナル伝達の活性化はすべて消失し、さらに IFN 誘導性遺伝子の発現も全く認められなくなった。以上の結果から、TRIF が MyD88 非依存性のシグナル伝達活性化に必須のアダプターであることが明らかになった。また、TLR4 刺激による炎症性サイトカイン産生は、MyD88 ノックアウトマウスでも、TRIF ノックアウトマウスでも認められなくなる。各 TLR 刺激による炎症性サイトカインの産生は、MyD88 を介したシグナルが必須であるが、TLR4 刺激では、TRIF を介した(MyD88 を介さない)シグナルの活性化も必要であることが示唆される。

〔V〕多剤耐性結核に対する新しい治療法の開発

国立療養所東京病院倉島らは治療のない多剤耐性結核 3 例に対し活性化自己 T 細胞 (キラー T 細胞) 輸注療法を東京医科歯科大学難治疾患研究所および国立国際医療センターとの共同研究で世界で初めての治験を行い、3 例中 2 例で投与期間中の菌陰性化を達成した。1 例では胸部 CT の結核異常陰影の著明な改善を認めた。またこの経過でツベルクリン反応の増大と IFN- γ 産生能の上昇を認めた。さらに、多剤耐性結核に対する新しい

化学療法剤の開発も進展した。この新しい化学療法剤と我々が開発した新しい結核ワクチンの組み合わせにより画期的な治療法が開発されることが示唆された (松本、岡田)。

〔VI〕臨床応用に向けての対策

- ① (新しい結核ワクチン・診断法の臨床応用へのネットワーク組織作製)
現在、国立病院療養所のネットワークである HOSPnet 内に全国の呼吸器基幹 8 施設を中心とした政策医療呼吸器ネットワーク支援システム (K-net) を構築中であり、肺結核に関しては国立療養所東京病院にサーバーを設置、リアルタイムオンラインでの結核症例登録システムを準備中である。(岡田、坂谷) 種々のリコンビナント結核蛋白を用いて、多剤耐性結核患者と通常の結核患者及び健常人の PBL の反応性を検討予定である。(倉島、岡田)
国立病院療養所 政策医療呼吸器ネットワークが厚生労働省より正式に発足した。
- ② 新しい結核ワクチンの GMP に準拠した製造や
- ③ 臨床応用に向けた GMP レベルの HVJ-liposome/ HSP65 DNA+ IL-12 DNA ワクチンの開発 (HVJ-Envelope ベクター) が進行中である。
- ④ 72f fusion 蛋白ワクチンによる phase I trial が開始した。

D. 考察

我々は臨床応用に極めて間近な新しい結核ワクチン、診断法を開発しつつある。当院は呼吸器疾患 (結核を含む) 準ナショナルセンターとなった。日本の結核患者数の

43 %の診断治療を行っている、国立病院・療養所 54 施設を統括・指導する高度専門医療施設であり、国立病院・療養所呼吸器ネットワークを用い、これらは多くの国民に活用・提供しうるものである。

(1)DNA ワクチン研究の成果と今後の活用・提供

HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは極めて強力な予防ワクチンとなることが考えられる。早急な臨床応用を計画中。一方、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) で強力な治療ワクチン効果を示した。この研究成果は通常の結核のみでなく難治性結核や多剤耐性結核に対する新しい予防・治療に活用することができる。特に高度の免疫不全を伴う AIDS 合併結核患者におけるリコンビナント BCG 療法を慎重にしなくてはならない時に強力な活用ワクチンとなる。これらの DNA ワクチンは本邦のみでなく全世界に提供する用意がある。

(2) サブユニットワクチン研究の成果と今後の活用・提供

Mtb72f Fusion 蛋白：精製タンパクであり、臨床治験への申請や、政府（厚生労働省等）の承認を得やすく活用が最も迅速である。BCG に代わる新しい成人結核予防ワクチンとして日本国民を対象として、厚生労働省の指揮下に予防ワクチンを行う計画。Mtb72f は本格的な強力サブユニットワクチンとして今後、米国、ブラジルのみならず、本邦でもすぐに活用する計画である。これを本邦に普及するには我々の研究組織のみならず、企業、政府の協力体制で迅速な臨床治験申請を行いたい。

(3) リコンビナント BCG ワクチン研究の成果と今後の活用・提供

HIV ワクチンで rBCG が有効より類推

し、r72fBCG ワクチンは結核の重要なワクチンとなる。このリコンビナント BCG は本邦のみでなく、欧米、アジア、アフリカ等全世界に提供することができる。

(4) Granulysin、KSP37 による予後診断法は簡便・迅速であり、結核患者の治療効果を予測する新しい診断法となり、入院期間の短縮や最良の治療方針の決定において、治療経済面でも行政施策にとり極めて有用な診断法となる。今後全国の 54 施設国立病院・療養所呼吸器ネットワークで多剤耐性結核患者・難治性結核患者に迅速に普及させ、活用する。もちろんこの新しい予後診断方法及びアッセイ系の提供の用意は積極的に行いたい。

(5) ツベルクリン反応に代わる新しい診断法 (DPPD skin test) の行政施策への貢献： 現在大きな社会問題・医療問題となっている結核集団感染、結核院内感染の早期発見における画期的な行政施策となる。これらを共同研究で大至急本邦で活用する計画をしている。本邦での集団感染結核発症や院内感染結核発症の迅速診断に積極的に提供したい。早急に本邦における臨床第 I 相試験が行えるよう、国立療養所近畿中央病院が中心となり計画中である。

(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：我々が開発した IL-2 レセプター γ 鎖(γ)SCID-PBL/hu モデルは多剤耐性結核の新しいワクチン治療開発のみでなく、新しい化学療法剤開発の良いモデルとなる。

(7) ワクチン開発研究が評価され、World Health Organization (WHO) の STOP TB Partnership 及び WHO の STOP TB Vaccine Working Group メンバーに選出さ、極めて高い評価を受けた。すなわち、世界の現在の最先端のワクチン 4 つのうちの 1 つに HVJ-liposome/ HSP65 DNA+ IL-12 DNA が選ばれ、WHO の会議で公

に認められた。特に、HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNA ワクチンはマウスの系で BCG 東京よりも 100 倍強力なワクチンで、モルモットで BCG 東京よりも強力なことより、Mtb72f Fusion 蛋白よりも強力であることが示唆される。さらに Peter Andersen 博士の ESAT-6-Ag85B fusion ワクチンや Horowitz らのリコンビナント Ag85B BCG ワクチンよりもこの HVJ-liposome/ HSP65 DNA+ IL-12 DNA ワクチンははるかに強力である。さらに、この HVJ-liposome/ HSP65 DNA+ IL-12 DNA ワクチンはカニクイザルでも有効であり、ヒトへの臨床応用を考えている。WHO の STOP TB ワクチン・ミーティングにより米国 FDA の Dr, 米国 CDC の Dr やスイスジュネーブ WHO 本部の Dr 多数及び南アフリカ、ウガンダ、インド、韓国、イギリス等世界各国のトップの結核研究者・行政者とネットワークができたことより、このワクチンを全世界に提供する計画である。

E. 結論

- [1] 新しい DNA ワクチンの開発： ① HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは、モルモットで BCG ワクチンより有効で、サル（カニクイザル）でも有効であり、世界の最先端のワクチンであることが示された。 ② 経口 attenuated リステリア結核ワクチン (Ag85B) を開発した。
- [2] 新しいリコンビナント BCG ワクチンの開発： r72f BCG は、サルで BCG よりも強い結核予防ワクチン効果を明らかにした。
- [3] 新しい結核サブユニットワクチンの開発： Mtb72f fusion 蛋白 + BCG 東京ワクチンはカニクイザルで BCG よりも強力な抗結核予防効果を示した。

[4] 多剤耐性結核患者 T 細胞（キラー T 細胞）輸注療法を行い、胸部 CT 像の改善及び結核菌の陰性化を認める、世界に先駆けて画期的な治療法を開発した。

[5] 新しい治療ワクチンの開発： IL-6 関連遺伝子ワクチンは初めて結核治療ワクチンとしても有効であることを示した。

[6] IL-2 レセプター γ 鎖ノックアウト NOD-SCID-PBL/hu のモデルでヒト多剤耐性結核治療モデルを世界に先駆けて開発した。

[7] 結核菌症の病態解明： ① Granulysin による結核の病態解明 ② 抗結核キラー T 細胞から産出される granulysin [15kd の granulysin(15K Gra)] が M ϕ 内結核殺傷に極めて重要な役割を果たしている発見をした。 ③ 15K Gra DNA ワクチンは結核予防効果を示した。 ④ 15K Gra Transgenic (Tg)-、9K Gra Tg-マウスを初めて作製し、世界に先駆けて 15K Gra の生体内抗結核作用を明らかにした。

さらに MyD88/TRIF 二重欠損マウスでは、全ての TLR シグナルが障害されることから、このマウスでの、結核菌に対する免疫応答を解析し、TLR を介したシグナルの結核感染に対する役割を明らかにする。

本研究は TLR およびそのシグナル伝達に関与する分子のノックアウトマウスを用いた解析であり、この解析は全てのノックアウトマウスを有しているわれわれ以外にはできない研究である。また、ワクチンを含めた結核治療法の考案においては、これまでの T 細胞を主流とした獲得免疫系の解析だけでは限界があったが、TLR による自然免疫活性化機構の解析から結核治療の新たな方策の創出も期待される。

[8] スーパー・スプレッダー多剤耐性結核

菌は TLR4 レセプター及び TLR2 レセプターの免疫認識機構からエスケープすることを世界に先駆けて明らかにした。

[9] ツ反に代わる新しい結核特異的診断法 DPPD、及び ESAT-6 + CFP10 test を開発した。

[10] ワクチン開発研究が評価され、World Health Organization (WHO) の STOP TB Partnership 及び WHO の STOP TB Vaccine Working Group メンバーに選出され、極めて高い評価を得た。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M, Koide Y.: Induction of protective cellular immunity against Mycobacterium tuberculosis by recombinant attenuated self-destructing Listeria monocytogenes strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 complex and MPB/MPT51, *Infection and Immunity* 2004 72(4):2014-2021.
2. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Okada M, Shigeto E, Harada N, Mitarai S, Suzuki K, Inoue Y, Tsuyuguchi K, Sasaki Y, GH Mazurek, Tsuyuguchi I.: Specific Detection of Tuberculosis Infection an Interferon-gamma Based Assay using New Antigens. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine* 2004 (in press)
3. Koide Y, Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M.: Induction of protective cellular immunity against Mycobacterium tuberculosis by recombinant attenuated self-destructing Listeria monocytogenes strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 complex and MPB/MPT51. *Keystone Symposia: Rational Design of Vaccine and Immunotherapeutics*, 2004, p.67.
4. Koide Y, Miki K, Nagata T, Suzuki M, Aoshi T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Okada M.: Induction of protective cellular immunity against Mycobacterium tuberculosis using a DNA vaccine encoding MPB51 antigen carried by attenuated suicide Listeria monocytogenes and identification of T-cell epitopes of the antigen.: Thirty-eighth Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, US-Japan Cooperative Medical Science Program 2003, p.32-38.
5. Mitsuyama M, Akagawa K, Kobayashi K, Sugawara I, Kawakami K, Yamamoto S, Okada M.: Up-to-date understanding of tuberculosis immunity. *Kekkaku*. 78(1): 51-5.,2003
6. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Matsumoto K, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.dela Cruz, E.V. Tan, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M.: Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis *Keystone* 2003, P93, 335.
7. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N,

- Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M.: Novel (Recombinant BCG- and DNA-)Vaccination against Tuberculosis FASEB 2003 17(7) C25, 32.9.
8. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M.: Novel (Recombinant BCG- and DNA-)Vaccination against Tuberculosis. Thirty-Eighth Tuberculosis and Leprosy Research Conference 2003, P191.
 9. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.V.Tan, E.C.Dela Cruz, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M.: Novel (Recombinant BCG- and DNA-)Vaccination against Tuberculosis . The Awaji International Forum Infection Immunity. 2003, P126.
 10. Wang T, Fan L, Watanabe Y, McNeill PD, Moulton GG, Bangur C, Fanger GR, Okada M, Inoue Y, Persing DH, Reed SG.: L523S, an RNA-binding protein as a potential therapeutic target for lung cancer. Br J Cancer. 2003 88(6):887-94.
 11. Yoshida S, Kondoh D, Arai E, Matsuoka H, Seki C, Tanaka T, Okada M, Ishii A.: Baculovirus virions displaying Plasmodium berghei circumsporozoite protein protect mice against malaria sporozoite infection. Virology 2003, 316(1): 161-70.
 12. 岡田全司: 結核感染 (サイトカインの病態への関与—感染症) “医学の歩み : サイトカイン-state of arts” 宮坂信之、宮島篤編 医歯薬出版 東京 2004 (in press)
 13. 岡田全司: 肺結核 (感染症: 細菌・ウイルスなどによる感染症/呼吸器) 「家庭医学大全科」編集 倉田毅, 総合監修 高久史磨、猿田享男、北村惣一郎、福井次年 法研 東京 2004 (in press)
 14. 岡田全司: 肺癌 (感染症: 細菌・ウイルスなどによる感染症/呼吸器) 「家庭医学大全科」編集 倉田毅, 総合監修 高久史磨、猿田享男、北村惣一郎、福井次年 法研 東京 2004 (in press)
 15. 岡田全司: 肺腫瘍 (感染症: 細菌・ウイルスなどによる感染症/呼吸器) 「家庭医学大全科」編集 倉田毅, 総合監修 高久史磨、猿田享男、北村惣一郎、福井次年 法研 東京 2004 (in press)
 16. 岡田全司: 膿胸 (感染症: 細菌・ウイルスなどによる感染症/呼吸器) 「家庭医学大全科」編集 倉田毅, 総合監修 高久史磨、猿田享男、北村惣一郎、福井次年 法研 東京 2004 (in press)
 17. 岡田全司: 結核性髄膜炎 (感染症: 細菌・ウイルスなどによる感染症/脳) 「家庭医学大全科」編集 倉田毅, 総合監修 高久史磨、猿田享男、北村惣一郎、福井次年 法研 東京 2004 (in press)
 18. 岡田全司: 新しい抗結核ワクチン開発の現状 “結核病学会シンポジウム” 結

- 核 (出版中) 2004
19. 岡田全司: 新たな結核ワクチン開発 “特集Ⅱ: 感染免疫における新知見” 臨床免疫 (出版中) 2004
 20. 岡田全司: 結核ワクチン “結核 第4版” 編集 泉孝英, 網谷良一 医学書院 東京 (出版中) 2004
 21. 岡田全司: 結核 “分子予防環境医学 (生命科学研究所の予防・環境医学への統合) 分子予防環境医学研究会編 pp150-161, 2003, 本の泉社, 東京
 22. 岡田全司: 1週1話 新たな抗結核ワクチン. 日本醫事新報 No.4121 Page89 2003.4.
 23. 岡田全司: 抗結核キラー T とリコンビナント BCG-DNA ワクチン・及びサブユニットワクチンの開発による新しい予防・診断・治療法 (マウス、モルモット、カニクイザルを用いた) 平成14年度日米医学協力計画 結核・ハンセン病専門部会年次報告書 Page185-192 Annual report 2002 U.S. Japan cooperative medical science program tuberculosis and leprosy panel 2003.4
 24. 岡田全司: 国立病院・療養所における臨床研究と評価 呼吸器疾患(結核・肺がん)に対する臨床研究(新しい結核ワクチン, 肺がんワクチン及び新しい診断法・予防法の開発)と評価. 医療 57巻1号 Page51-53 2003
 25. 大西保行、日置恭司、臼居敏仁、玉置憲一、岡田全司、新井敏郎、西銘千代子、富沢政史、鬼頭千佳、末水洋志: 各種遺伝子操作動物を用いた発ガン予防とがん進展抑制の評価システムの確立. 平成12年度～平成14年度文部科学省科学研究費補助金 基盤研究 (B) Page1-9, 85-87 2003.4
 26. 井上義一, 松本久美, 岡美穂, 黒川恵理, 山本暁, 新井徹, 林清二, 岡田全司, 坂谷光則: Idiopathic Pulmonary Fibrosis におけるマスト細胞増加の意義: 免疫組織学的検討. 厚生労働省特定疾患「びまん性疾患調査研究班平成14年度研究報告」Page43-45 2003
2. 学会発表
 1. Koide Y, Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M: Induction of protective cellular immunity against Mycobacterium tuberculosis by recombinant attenuated self-destructing Listeria monocytogenes strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 complex and MPB/MPT51. Keystone Symposia: Rational Design of Vaccine and Immunotherapeutics, (Keystone, Colorado, USA) Jan. 6-11, 2004
 2. Masaji Okada, Takao Tanaka, Yoshikazu Inoue, Yuji Takemoto, Shigeto Yoshida, Naoya Ohara, Mariko Naito, Takeshi Yamada, Yasufumi Kaneda, Makoto Matsumoto, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, 7Yasir Skeiky, Steven Reed, Mitsunori Sakatani: Novel (Recombinant BCG- and DNA-) Vaccination against Tuberculosis. The First International Conference on TB vaccines for the world-TBV 2003
 3. Okada M, Iwasaki T, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Inanaga Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Watanabe Y, Mori J, Ishizaki K, Yamamoto S,