

試験が可能となる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 螺良英郎: 医療と倫理 まだ若い後輩
たちへ 50 年余の医師生活からのメ
ッセージ 座右銘と死生観. THE
LUNG-perspectives 11(2)
Page219-221
2003

2. 螺良英郎: 医療と倫理 まだ若い後輩
たちへ 50 年余の医師生活からのメ
ッセージ 医学研究について. THE
LUNG-perspectives 11(1) Page89-92
2003.

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

組み換え BCG ワクチン改良・開発の研究

分担研究者 大原直也 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
口腔病原微生物学分野 助教授

研究要旨

結核菌に対する感染防御抗原であることが示されている、結核菌由来タンパク質抗原を複数融合させたキメラタンパク質抗原を効率よく産生するリコンビナント BCG ワクチン（rBCG）を作成した。作成された5種類の rBCG はいずれも目的のキメラタンパク質抗原を産生していることが確認された。

A. 研究目的

これまでの研究で、本来結核菌の持つ感染防御抗原である α 抗原群を過剰発現するリコンビナント BCG（rBCG）が現行の BCG ワクチンよりも著効であることを動物実験で示した。このことは結核菌の持つ他の感染防御抗原を過剰発現する rBCG を作成すればその rBCG についても著効なワクチンとなる可能性が高いことを示している。今年度では昨年度に引続き、複数の感染防御抗原を過剰発現する rBCG を作成し、その評価をおこなう。具体的にはサブユニットワクチンとしてその有効性がサルで示された、結核菌 Mtb39、Mtb32、Mtb8.4、Mtb11、Mtb41、Mtb9.9 等のキメラタンパク質である 72f、88f シリーズを発現する rBCG の作成と評価をおこなう。

B. 研究方法

結核菌抗原キメラタンパク質として、88f (acr+Mtb4.9+Mtb9.9+Mtb9.8+MTCC2)、71f (Mtb4.9+Mtb9.9+Mtb9.8+

MTCC2)、31f (Mtb4.9+Mtb9.9+Mtb9.8)、72f-85B (Mtb32-C+Mtb39a+Mtb32-N+Ag85B)、72f (Mtb32-C+Mtb39a+Mtb32-N)、59f (Mtb39a+Mtb32-N) を選択し、それぞれのキメラ遺伝子を pKAH30X ベクター中の、Mycobacterium kansasii 由来 α 抗原遺伝子発現カセットプロモーター直下に挿入する。次に、 α 抗原遺伝子プロモーターおよびターミネーターを付与した形でこのカセットを切り出し、大腸菌—抗酸菌 pNN2 に組み入れる。そして BCG Tokyo 株を形質転換する。rBCG を培養後、プラスミドの回収とキメラタンパク質特異抗体によるウエスタンブロットにより評価を行う。

C. 研究結果

作成した 88f、71f、31f、72f-85B、72f、59f それぞれの rBCG についてプラスミドを確認したところ、いずれの rBCG 菌体においても導入されたプラスミドは組み換えを起こすことなく保持されていた。なお、今回用いた大腸菌—抗酸菌シャトルベクタ

一について BCG 菌内における保持性、組換えについて調べたところ、1 年間継代を続けた菌体においてもプラスミドを保持しており、変異も認められなかった。次にこれらの rBCG の菌体抽出物および培地中に分泌されたタンパク質についてウエスタンブロット法により、キメラタンパク質の産生を調べた。その結果、菌体抽出物を検体とした場合には、いずれの株についても期待される分子量のところに、それぞれの特異抗体に対する反応が認められた。しかし、その産生量は少なくクマシー染色では確認することが困難であった。いずれの株においてもキメラタンパク質の菌体外への分泌は確認されなかった。

D. 考察

結果の項で述べたように今回作成した rBCG は目的の抗原を発現していることが確認できた。そして、一部の rBCG は主任研究者による動物実験によってもその効果が確認されている。しかしながら、まだ改良の余地が残されている。まず、目的の抗原の産生量が少ない。今後産生量を増加させるためにプロモータ等の改良が、また、効率良く菌体外へ分泌させるための分泌装置等の改良が必要である。次に、これまで BCG 菌体における大腸菌—抗酸菌シャトルベクター保持の選択に、薬剤耐性マーカーを使用してきたが、実用化を考えると、理想的には選択マーカーとして薬剤耐性を使用しないことが望ましい。そのための一つの選択肢として、栄養要求性を選択マーカーとする宿主—ベクター系の利用が考えられる。これまでの我々の研究においてチミン合成に参与する BCG 菌からクローニングしており、これをもとにした栄養要求株の作成およびプラスミドの構築に取りかかっている。この宿主—ベクター系が開発されれば安定化した rBCG となり、また

rBCG 薬剤耐性株を使用することが無いため、臨床応用の観点からも非常に有用性が高いと考えられる。

E. 結論

結核菌に対する感染防御抗原を複数融合させたキメラタンパク質抗原を効率よく産生するリコンビナント BCG ワクチン (rBCG) を作成した。作成された 5 種類の rBCG はいずれも目的のキメラタンパク質抗原を産生していることが確認された。主任研究者らによる動物実験により、感染防御効果が認められているが、実用化するには今後さらに改良を行う必要がある。

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. 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 (in press).
2. Lee J-S, Ohara N, Kamijo K, Kitamura T, Miki T. MgcRacGAP regulates membrane blebbing through RhoA during cytokinesis. Exp. Cell. Res. 2004 (in press).
3. Saito SI, Liu X-F, Kamijo K, Razziudin R, Tatsumoto T, Okamoto

- I, Chen X, Lee C-C, Lorenzi MV, Ohara N, Miki T. Deregulation and mislocalization of the cytokinesis regulator ECT2 activate the Rho signaling pathways leading to malignant transformation. *J. Biol. Chem.* 279:7169-7179.(2004)
4. Saito K, Ohara N, Hotokezaka H, Fukumoto S, Yuasa K, Naito M, Fujiwara T, Nakayama K. Infection-induced up-regulation of the costimulatory molecule 4-1BB in osteoblastic cells and its inhibitory effect on M-CSF/RANKL-induced in vitro osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.* (2004)In press.
 5. Shoji M, Naito M, Yukitake H, Sato K, Sakai E, Ohara N, Nakayama K. The major structural components of two cell-surface filaments of *Porphyromonas gingivalis* are matured through lipoprotein precursors. *Mol. Microbiol.* (2004)In press.
 6. 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.
 7. Naito M, Shi Y, Ideguchi H, Shoji M, Ohara N, Yamamoto K, and Nakayama K. A novel mechanism of *Porphyromonas gingivalis*-induced platelet aggregation. Submitted.
 8. Ohara N, Kikuchi Y, Shoji M, Mariko Naito M, and Nakayama K. Superoxide dismutase-encoding gene of the obligate anaerobe *Porphyromonas gingivalis* is regulated by the redox-sensing transcription activator OxyR. Submitted.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
12. 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.
 13. 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.
 14. 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, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M.: Novel (Recombinant BCG- and DNA-)Vaccination against Tuberculosis. The First International Conference on TB vaccines for the world-TBV 2003.
 15. Yamamoto S, Haga S, Yamazaki T, Yamazaki T, Yamamoto T, Taneichi M, Kamachi K, Toida I, Hashimoto A, Yamada T, Ohara N and Honda M. Protective ability of anti-HIV recombinant BCG on guinea pig pulmonary tuberculosis, and safety and stability, Thirty-eighth Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. 2003, p180.
 16. 大原直也、山田毅分子遺伝学的性状、「非結核性（非定型）抗酸菌症の基礎と臨床」、斎藤肇、大泉耕太郎、阿部千代治監修、結核予防会、東京、印刷中 2003.
2. 学会発表
 1. Koide Y, Miki K, Nagata T, Suzuki M, Aoshi T, Tanaka T, Kim Y-H., Uchijima M., Ohara N. and 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 Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (2003)(Newark).
 2. Yamamoto S, Haga S, Yamazaki T, Yamazaki T, Yamamoto T, Taneichi M, Kamachi K, Toida I, Hashimoto A, Yamada T, Ohara N and Honda M. Protective ability of anti-HIV recombinant BCG on guinea pig pulmonary tuberculosis, and safety and stability, Thirty-eighth Joint

- Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (2003)(Newark).
3. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, Dela Cruz EC, Tan EV, Abalos RM, Young LJ, Burgos JA, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M. Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis, Thirty-eighth Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (2003)(Newark).
 4. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, Dela Cruz EC, Tan EV, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M. Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis, TBV2003 (2003)(Montreal, Canada)
 5. 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)(Keystone, Colorado, USA)
 6. 庄子幹郎、内藤真理子、雪竹英治、大原直也、吉村文信、中山浩次：Porphyromonas gingivalis における線毛構成蛋白の輸送機構の解析、第76回日本細菌学会総会（熊本）、2003、日本細菌学雑誌 58、174、2003.
 7. 鈴木美奈、永田年、青枝大貴、内嶋雅人、大原直也、小出幸夫：DNA ワクチンを用いた Mycobacteria 主要分泌タンパク MPB/MPT51 の T 細胞エピトープの同定、第76回日本細菌学会総会（熊本）、2003、日本細菌学雑誌 58、192、2003.
 8. 斎藤幹、大原直也、佛坂齊祉、藤原卓、中山浩次：感染骨芽細胞に発現する CD137 の破骨細胞分化へ与える影響、第76回日本細菌学会総会（熊本）、2003、日本細菌学雑誌 58、284、2003.
 9. 内藤真理子、庄子幹郎、大原直也、中山浩次：Porphyromonas gingivalis の血小板凝集活性の解析、第56回日本細菌学会九州支部総会、第40回日本ウイルス学会九州支部総会（宮崎）、2003、抄録集、19、2003.
 10. 松尾謙一郎、佛坂齊祉、岡田幸雄、坂井詠子、内藤真理子、大原直也、吉田教明、中山浩次：アムホテリシン B による炎症性サイトカインの誘導とそのシグナル伝達経路、第45回歯科基礎医学会学術大会（盛岡）、2003、歯科基礎医学会雑誌 45、334、2003.
 11. 庄子幹郎、内藤真理子、雪竹英治、大原直也、吉村文信、中山浩次：Porphyromonas gingivalis における線毛蛋白の輸送機構の解析、第45回歯科基礎医学会学術大会（盛岡）、2003、歯科基礎医学会雑誌 45、362、2003.
 12. 斎藤幹、大原直也、佛坂齊祉、福本敏、藤原卓、中山浩次：Porphyromonas gingivalis に感染骨

- 芽細胞から産生される 4-1BB の解析-
各種細菌に対する応答性の違いと標的
細胞の検討, 第 45 回歯科基礎医学会
学術大会 (盛岡), 2003, 歯科基礎医
学会雑誌 45, 365, 2003.
13. 菊池有一郎、大原直也、坂井詠子、
庄子幹郎、内藤真理子、吉村文信、中
山浩次: Porphyromonas gingivalis
の新規低分子蛋白 (SipA) と酸化ス
トレスとの関係について, 第 45 回歯科
基礎医学会学術大会 (盛岡)、2003、
歯科基礎医学会雑誌 45、368、2003.
 14. 永田年、田中高生、大原直也、内嶋
雅人、岡田全司、小出幸夫: 弱毒リス
テリアをキャリアとした Ag85 ファミ
リー分子 DNA ワクチンによる抗結核
菌細胞性免疫の誘導、第 33 回日本免
疫学会総会・学術集会 (福岡)、2003、
第 33 回日本免疫学会総会・学術集会
記録 33、88、2003.
 15. 鈴木美奈、青枝大貴、永田年、大原
直也、小出幸夫: 結核菌の新規感染防
御抗原である MPT51 の H-2 および
HLA-A 拘束性 T 細胞エピトープの同
定、第 33 回日本免疫学会総会・学術
集会 (福岡)、2003、第 33 回日本免
疫学会総会・学術集会記録 33、90、
2003.
 16. 岡田全司、田中高生、吉田栄人、井
上義一、武本優次、大原直也、内藤真
理子、山田毅、金田安史、坂谷光則:
ヒト結核感染に最も近いカニクイザル
を用いた結核に対する新しいワクチン
開発と結核免疫誘導、第 33 回日本免
疫学会総会・学術集会 (福岡)、2003、
第 33 回日本免疫学会総会・学術集会
記録 33、184、2003.
 17. 大原直也: 細菌感染により骨芽細胞
から産生される CD137 はリバースシ
グナルによって in vitro における破骨
細胞分化を抑制する、第 2 回感染症若
手研究者沖縄フォーラム (沖縄) 2003、
抄録集 p49.
 18. 大原直也: BCG 菌感染により産生さ
れる共刺激分子 CD137 の骨代謝への
影響 (シンポジウム), 第 76 回日本
細菌学会総会 (熊本), 2003, 日本細
菌学雑誌 58, 95, 2003.
 19. 大原直也: 結核菌の細胞傷害戦略と
骨代謝への影響 (シンポジウム), 第 4
5 回歯科基礎医学会学術大会 (盛岡),
2003, 歯科基礎医学会雑誌 45, 258,
2003.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
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 ワクチンおよびバキュロウイルススピリオンワクチンの 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

結核菌由来の Hsp65 DNA と IL-12p40p35 よりなる HVJ リポソーム DNA ワクチンは、マウス、モルモット、カニクイザルのいずれの動物に対しても結核菌感染防御免疫を誘導し、BCG 接種対照群と比較して、有意に高い感染防御効果を示した。この結果は、今後の臨床応用を強力にサポートするものである。またバキュロウイルススピリオンをベクターとする新規ワクチン研究では、Hsp65 抗原特異的な T リンパ球の顕著な活性化を誘導し、結核菌感染防御に必須の IFN- γ が高いレベルで産生されていることが明らかとなった。この結果は、新しい結核ワクチンベクターの可能性を示すものである。

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。特に新規結核 DNA ワクチンの開発を目指す。合わせて、バキュロウイルス粒子を用いた新しいアイデアのワクチン開発にも取り組む。

B. 研究方法

IL-12 遺伝子を "DNA アジュバンド" とした Hsp65 結核 DNA ワクチンを HVJ リポソームに包埋し、これを実験モデル動物（マウス、モルモット、カニクイザル）に接種する。結核菌のエアゾル感染を行い、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。結核菌由来の抗原あるいは遺伝子を導入し

た組換えバキュロウイルススピリオンを作製し、マウスで感染防御効果を検討する。

C. 研究結果

マウスに加え、ヒトおよびモルモットより IL-12p40、p35 遺伝子をクローニングし、DNA ワクチンを構築した。IL-12p40p35DNA と Hsp65DNA よりなる HVJ リポソーム DNA ワクチンを作製し、マウス、モルモット、カニクイザルにそれぞれ免疫し、その後結核菌によるチャレンジを行った結果、いずれの動物も BCG 接種対照群と比較して、肺、脾臓より分離される結核菌数は少なく、病理組織解析でも granuloma 形成は明らかに抑制されていた。さらに特筆すべき点は、DNA ワクチンを接種したカニクイザルでは、致死量の結核菌を接種されてもレントゲン検査で結核病巣の陰影を見ることもなく、長期生存を続けた。

次の二種類の組換えバキュロウイルスを構築した。(i) Hsp65 タンパクをウイルスピリオン上に提示した組換えバキュロウイルス(ii) Hsp65 遺伝子を CMV プロモーター下流に挿入した組換えバキュロウイルス。これらバキュロウイルスのピリオンを精製してマウスに免疫すると、Hsp65 抗原特異的な T リンパ球の活性化が誘導され、結核菌感染防御に必須の IFN- γ が高いレベルで産生されることを見出した。

D. 考察

本年度はマウス、サル動物実験評価系に新たにモルモットが加わった。

モルモット/結核研究の世界の第一人者であるマックマレー博士との共同研究で、モルモットを用いて DNA ワクチン効果の評価を行い、BCG を超える感染防御効果があることを示したことは大きな意義を持つ。今後、プロトタイプワクチンの改良を行っていく上で、マウス→モルモット→サルの実験系を利用して、ワクチン効果の評価を迅速に行うことが可能となった。

バキュロウイルスはヒトに感染しない安全性の高いウイルスベクターである。また TLR を介して自然免疫を誘導することも報告されており、今回得られた結果と合わせて全く新規な結核ワクチンの可能性が示された。今後、上記の確立した動物実験系を用いて解析を行っていく予定である。

E. 結論

平成 14 年度より開始しているカニクイザル実験は順調に成果を上げており、世界に先駆けた結核 DNA ワクチンの臨床応用に着実に前進している。また新しいタイプの結核ワクチンとしてバキュロウイルスベクターの可能性を見出したことは、研究の独創性を有し、今後の展開に大きな期待が寄せられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. Lee LE, Witter RL, Reddy SM, Wu P, Yanagida N, Yoshida S.: Protection and synergism by recombinant fowl pox vaccines expressing multiple genes from Marek's disease virus. *Avian Dis.* 2003 Jul-Sep;47(3):549-58.
3. Matsuoka H, Arai M, Yoshida S, Tantular IS, Pusarawati S, Kerong H, Kawamoto F.: Five different glucose-6-phosphate [correction phosphate]dehydrogenase (G6PD) variants found among 11 G6PD-deficient persons in Flores Island, Indonesia. *J Hum Genet.* 2003;48(10):541-4.
4. 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.
5. Matsuoka H, Maki N, Yoshida S, Arai M, Wang J, Oikawa Y, Ikeda T, Hirota N, Nakagawa H, Ishii A. : A mouse model of the atopic eczema/dermatitis syndrome by repeated application of a crude extract of house-dust mite

- Dermatophagoides farinae. Allergy. 2003 Feb;58(2):139-45.
6. Matsuoka H, Jichun W, Hirai M, Yoshida S, Arai M, Ishii A, Baral MP. : Two cases of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient Nepalese belonging to the G6PD Mediterranean-type, not India-Pakistan sub-type but Mediterranean-Middle East sub-type. J Hum Genet. 2003;48(5):275-7.
 7. Wang J, Murakami T, Yoshida S, Matsuoka H, Ishii A, Tanaka T, Tobita K, Ohtsuki M, Nakagawa H, Kusama M, Kobayashi E. : Predominant cell-mediated immunity in the oral mucosa: gene gun-based vaccination against infectious diseases. J Dermatol Sci. 2003, 3:203-10.
 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, 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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, Yasir Skeiky, S Reed, Sakatani M. : Novel (Recombinant BCG- and DNA-)Vaccination against Tuberculosis. The First International Conference on TB vaccines for the world-TBV 2003.
 13. 吉田栄人, 近藤大介, 矢口理恵, 関千里, 松岡裕之, 田中高生, 岡田全司 : 組換えバキュロウイルスのウイルスピリオン上にマラリア CS 抗原を提示した新規マラリアワクチンの感染防御効果 第 44 回日本熱帯医学会 2003 年 10 月

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う。

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。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でも増加し、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 割以上の患者が治癒できない現状にある。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、IFN- γ 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ザル（最もヒトの結核感染に類似したモデル）のレベルで 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。

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・病院の多剤耐性結核患者の血液を収集。

多剤耐性結核患者のリンパ球のキラー T 細胞活性および新しい結核ワクチン抗原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。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。

C. 研究結果

- 1) 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、昨年度、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。
- 2) 結核患者末梢血 T 細胞機能解析の一つとして、肺結核確定診断 83 例と健常人を含めた非結核 23 例、計 106 例に末梢血単核球の ESAT-6、CFP10 刺激による IFN- γ 産生能の検討を行った。陽性基準を 0.1 とすると特異度 93.3%、感度 83.9% の結果が得られた。
- 3) 多剤耐性結核への新しい治療法の試み近年、CMV 肺炎など極めて難治な感染症治療として自己活性化 T 細胞輸注が注目され、本法は NK 細胞増殖をきたす LAK 療法と異なり T 細胞のみの増殖により副作用が少ないことが知られている。多剤耐性結核は免疫応答が低下していることが知られており本法の適応疾患となる可能性が考えられる。

治療法のない多剤耐性結核 3 例に対し活性化自己 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。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。

D. 考察

多剤耐性結核症例の集積は K-net 結核 database 構築が途上のため十分ではないが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。

世界で初めて行われた多剤耐性結核に対する活性化自己 T 細胞輸注は、投与期間中の菌陰性化を達成し、この間ツベルクリン反応の増大や IFN- γ 値の上昇など免疫応答指標の増強が観察された。

E. 結論

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う。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagayama N, Masuda K, Baba M, Tamura A, Nagai H, Akagawa S, Kawabe Y, Machida K, Kurashima A, Yotsumoto H, Mohri M.: Secular increase in the incidence rate of drug-induced hepatitis due to anti-tuberculosis chemotherapy including isoniazid and rifampicin. *Kekkaku*. 2003, 78(4): 339-46.
2. Kurashima A, Machida K, Nagai H, Kawabe Y, Akagawa S, Nagayama N, Baba M, Suzuki J, Masuda K, Tamura A, Komatsu H, Yotsumoto H.: Comparative evaluation of the isothermal and chimeric primer-initiated amplification of nucleic acids (ICAN) and Roche

- Amplicor PCR and culture for detecting Mycobacterium tuberculosis complex in sputum samples. *Kekkaku*. 2003, 78(8): 533-9.
3. Saito W, Nagayama N, Miyamoto M, Hara H, Suzuki J, Masuda K, Baba M, Tamura A, Nagai H, Akagawa S, Kawabe Y, Machida K, Kurashima A, Yotsumoto H.: Characteristics and treatment outcomes of INH-resistant or RFP-resistant tuberculosis. *Kekkaku*. 2003, 78(10): 611-7.
 4. Shishido Y, Nagayama N, Masuda K, Baba M, Tamura A, Nagai H, Akagawa S, Kawabe Y, Machida K, Kurashima A, Komatsu H, Yotsumoto H.: Agranulocytosis due to anti-tuberculosis drugs including isoniazid (INH) and rifampicin (RFP)-a report of four cases and review of the literature. *Kekkaku*. 2003, 78(11): 683-9.
 5. 倉島篤行: BCG 接種の考え方。臨床医 26:1857-1859、2003
 6. 倉島篤行: サルコイドーシスと抗酸菌感染症。呼吸器科 3:45-48、2003
 7. 松永伸一、倉島篤行、永井英明、赤川志のぶ、町田和子、四本秀毅、毛利昌史: Mycobacterium abscessus の感染を合併した外因性リポイド肺炎の 1 例。日本呼吸器学会雑誌 41:14-18、2003
 8. 倉島篤行: 手術前、急速に肺野に浸潤影が進展した肺真菌症。日本医真菌学会雑誌 43:65、2003
 9. 倉島篤行: 非定型抗酸菌症治療におけるニューキノロン剤投与の現状と問題点について。結核 78: 226、2003
2. 学会発表
 1. 斎藤若奈、長山直弘、赤川志のぶ、宮本牧、原弘道、益田公彦、田村厚久、永井英明、川辺芳子、町田和子、倉島篤行、四元秀毅、相良勇三: びまん性微細粒状影を呈した M.avium 症の 1 例。結核 78(7): 502、2003
 2. 宍戸雄一郎、川辺芳子、宮本牧、鈴木純子、益田公彦、永井英明、田村厚久、赤川志のぶ、長山直弘、町田和子、倉島篤行、四元秀毅: ITP の治療中に足関節結核を発症した 1 例。結核 78(4): 373、2003
 3. 益田公彦、原弘道、宮本牧、斎藤若奈、長山直弘、赤川志のぶ、倉島篤行、蛇沢晶、四元秀毅: サルコイドーシスに非定型抗酸菌症を合併した 3 例の検討。日本呼吸器学会雑誌 41(増刊): 204、2003
 4. 赤川志のぶ、鈴木純子、宍戸雄一郎、田村厚久、永井英明、川辺芳子、長山直弘、町田和子、倉島篤行、四元秀毅: 気管支喘息を合併したサルコイドーシス症例の検討。日本呼吸器学会雑誌 41(増刊): 204、2003
 5. 田村厚久、原弘道、宮本牧、馬場基男、永井英明、赤川志のぶ、川辺芳子、長山直弘、町田和子、倉島篤行、米谷文雄、林孝二、相良勇三、四元秀毅、毛利昌史: 肺癌切除例にみる肺膿瘍の検討。日本呼吸器学会雑誌 41(増刊): 180、2003
 6. 馬場基男、蛇沢晶、赤川志のぶ、林孝二、相良勇三、倉島篤行: 糸状細菌による肺化膿症の臨床病理学的検討。日本呼吸器学会雑誌 41(増刊): 105、2003
 7. 永井英明、川辺芳子、倉島篤行、宍戸雄一郎、原弘道、鈴木純子、益田公彦、馬場基男、田村厚久、長山直弘、赤川志のぶ、町田和子、四元秀毅: 結核合

- 併 AIDS 症例における rifampicin 投与下 efavirenz の血中濃度の検討。日本呼吸器学会雑誌 41(増刊): 88、2003
8. 田村厚久、蛇沢晶、相良勇三、宍戸雄一郎、鈴木純子、益田公彦、馬場基男、永井英明、赤川志のぶ、川辺芳子、長山直弘、町田和子、倉島篤行、四元秀毅: 肺癌患者にみられる肺非定型抗酸菌症。結核 78(3): 324、2003
 9. 宮本牧、倉島篤行、川辺芳子、斎藤若菜、原弘道、鈴木純子、益田公彦、馬場基男、田村厚久、永井英明、長山直弘、赤川志のぶ、町田和子、四元秀毅: 微小病変肺 MAC 症の進展例と非進展例の検討。結核 78(3): 317、2003
 10. 川辺芳子、鈴木純子、田村厚久、永井英明、長山直弘、赤川志のぶ、町田和子、倉島篤行、四元秀毅: 検査室での結核菌の Cross-contamination の発生と臨床経過、結核 78(3): 287、2003
 11. 町田和子、川辺芳子、馬場基男、田村厚久、永井英明、長山直弘、赤川志のぶ、倉島篤行、四元秀毅: 結核患者治療支援事業 東京病院保健所結核連携システムについて。結核 78(3): 263、2003
 12. 相良勇三、倉島篤行、四元秀毅、毛利昌史: 肺非定型抗酸菌症の胸腔鏡手術の意義 病型及び再発形式をもとにした検討。結核 78(3): 246、2003
 13. 斎藤若菜、宍戸雄一郎、原弘道、鈴木純子、益田公彦、馬場基男、田村厚久、永井英明、長山直弘、赤川志のぶ、川辺芳子、町田和子、倉島篤行、四元秀毅: INH 又は RFP 耐性結核の治療成績。結核 78(3): 237、2003
 14. 町田和子、川辺芳子、鈴木純子、益田公彦、馬場基男、田村厚久、永井英明、長山直弘、赤川志のぶ、倉島篤行、四元秀毅: 肺結核における栄養学的な側面と初回短期化学療法について。結核 78(3): 235、2003
 15. 宍戸雄一郎、益田公彦、馬場基男、田村厚久、永井英明、長山直弘、赤川志のぶ、川辺芳子、町田和子、倉島篤行、四元秀毅: 抗結核薬による白血球減少症と無顆粒球症。結核 78(3): 234、2003
 16. 益田公彦、永井英明、川辺芳子、倉島篤行: 多剤耐性結核に対する活性化 T 細胞輸注療法の 3 例。第 79 回結核病学会総会演題提出中、2004
 17. 川辺芳子、鈴木純子、益田公彦、斎藤若菜、原弘道、宮本牧、土屋香代子、永井英明、長山直弘、赤川志のぶ、町田和子、四元秀毅、原田登之、樋口一恵、森亨: 新しい結核感染診断キット QuantiFERON-TB の臨床評価とくに判定基準の検討。第 79 回結核病学会総会演題提出中、2004

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

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

分担研究者 土肥義胤 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

結核症を発症している未治療の患者の末梢血単球を精製分画し、分化させた肺胞型マクロファージは、健康人由来のものに比して、IFN- γ 並びに LPS の刺激に対して著しく応答性を失い抗酸菌低殺菌性であることを明らかにした。

A. 研究目的

結核の発症は、マクロファージ内で結核菌が増殖するか否かで決定される。BCG 菌を食菌させ、IFN- γ 、IL-10、LPS などを添加して培養し、細胞内 BCG 菌の消長を調べ、結核患者のマクロファージ内で結核菌が増殖する原因を追究する。

B. 研究方法

単球並びにそれを GM-CSF で分化させたマクロファージを用いた。まず、BCG 菌食菌直後の生菌数を正確に測定する。IFN- γ 、IL-10、LPS などを添加して5日間培養し細胞内 BCG 生菌数を測定し、応答性を BCG 殺菌の有無から判断する。応答性の低下について、それぞれのリガンド・レセプターの発現を調べる。

（倫理面への配慮）

結核症の患者の採血に関し、各患者に研究目的及び患者氏名の非公開を説明し、また、病院倫理委員会から当研究の許可を得て行った。

C. 研究成果・考察

1. 単球に、補体処理した BCG 菌（5倍量）を混合した場合、単球の食菌量には、健康人でも患者でも大きな個人差（個人差）があった。また、マクロファージにも大きな個人差があった。単球に IL-10 を添加して1日培養すると、食菌量は約 1/4 に減少するが、マクロファージの場合は、食菌量は変化がないことが明らかになった。
2. 健康人の単球内では、BCG 菌は増殖するが、健康人のマクロファージ内では、BCG 生菌数は減少した。一方、結核患者のマクロファージ内では、BCG 生菌数に変化なし又は増殖であった。
3. 食菌した健康人の単球の培養では、IFN- γ を添加した場合、BCG 菌生菌数減少（殺菌）したが、IL-10 を添加した場合は、逆に、何も添加しなかった場合（2.）よりも更に増加した。
4. 結核患者のマクロファージは BCG 菌の細胞内増殖を許すが、IFN- γ 及び LPS の双方に対し応答性を欠如するもの、どちらか一方には応答性を保持しているが他方には応答性を欠如しているものがあること

が分かった。しかし、これは、単球から GM-CSF で分化培養中に、応答性の欠如が外れたためではないかと推察された。GM-CSF で共存下での 5 日培養中にも拘わらず、BCG 菌の殺菌ができない状態を保持していた事実は、結核患者の血液内単球はすでに、殺菌不能へのシグナルを得ていたことを示唆している。即ち単球が受けている IL-10 などの効果を除去することが、結核の治療には必要であることが推察され

5. 結核患者の単球から RNA を抽出し、IFN- γ レセプターの α 鎖、 β 鎖の mRNA を測定したところいずれも、健康人のものと同程度の発現が明らかになった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Takashima, F. Shirai, M. Sageshima, N. Ikeda, Y. Okamoto, Y. Dohi Distinctive bacteria-binding property of cloth materials. Am J Infect Control 2004; 32: 27-30

2. 学会発表

1. 白井文恵、池田七衣、土肥義胤、肺結核症患者のマクロファージの BCG 殺菌能低下、第 77 回日本細菌学会総会 (2004)、日本細菌学雑誌 59(1):289, 2004.
2. 下嶋真紀子、白井文恵、土肥義胤、活動性肺結核患者の末梢血単球の IFN- γ に対する応答性の低下、第 76 回日本細菌学会総会 (2003)、日本細菌学雑誌、58(1):301, 2003.
3. 白井文恵、土肥義胤、活動性肺結核症患者の末梢血単球の殺菌能が低下している原因、第 29 回日本看護研究学会学術集会 (2003)、日本看護研究学会

雑誌 26(3):139, 2003.

4. 白井文恵、池田七衣、土肥義胤、抗酸菌の末梢血単球内増殖に及ぼすサイトカインの影響 第 56 回日本細菌学会関西支部総会 (2004)

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

TB DNA vaccine に関する基礎的研究

分担研究者 菅原 勇 （財）結核予防会結核研究所 センター長

研究要旨

結核ワクチンの予防効果を評価する場合、短期間の感染実験結果で判定している。長期間の感染実験は必要ないのだろうか。長期間、感染経過を観察した場合、どのような効果が得られ、病像はどのように結核 DNA ワクチンで修飾されるのか、を調べるために実験を行った。結核 DNA ワクチンで効果が認められた群で1年間観察した群では、結核菌誘導肉芽腫は、有意に縮小し、膠原線維で取り囲まれていた。肉芽腫内に、結核菌がほとんど認められなかった。はじめ脾に肉芽腫があったのが、予防効果が増すにつれ、肉芽腫が縮小し、消失した症例もあった。このことから、結核ワクチンの予防効果を見るには、長期間の経過観察が必須である。

A. 研究目的

結核 DNA ワクチンの予防効果を評価する場合、短期間の感染実験で評価している。では、長期間、感染経過を観察した場合、どのような効果が得られ、病態像はどのように修飾されるのか。いまだ、優れた報告がないので、実験を行った。結核 Ag85A DNA ワクチンを、用いた。

B. 研究方法

結核 DNA ワクチンを 50 マイクログラム 3 週おきに二回、遺伝子銃で (Bio·Rad) モルモット皮内に投与した (第1群)。この実験条件に、Ag85A peptide を、ブスターとして 1 mg 皮下投与した (第2群)。BCG Tokyo (ヒトに用いられる量を、体重換算して、モルモットに投与した。) を皮下投与した群を陽性対照とした (第3群)。最終のワクチン接種が終わった 1 週間後に、結核菌毒力株 Kurono 株で、エアロ

ソール感染 (結核菌数 50 万 CFU) をさせた。エアロソール感染には、Inhalation Exposure System (IES) を使用した。感染後 1 年間、経過観察し、その後、モルモットを解剖し、病理組織像 (H&E 染色と Ziehl-Neelsen 染色を用いた)、肺内結核菌数を求めた。肺組織をホモゲナイズした後、段階希釈を行い、一定量を、1% 小川培地に接種した後、4 週間 37℃ で培養後、出現したコロニーを数えた。

C. 研究結果

陽性対照である BCG Tokyo を用いた第3群では、肉芽腫が縮小し、肉芽腫が膠原線維で囲まれていた。膠原線維を青く染める Azan 染色を用いると、肉芽腫は青く染め上げられた。第3群のワクチン予防効果に比べて、第1群でも、ほぼ同等の予防効果が見られた。やはり、肉芽腫は線維性であった。さらに、Ag85A peptide をブー

スターとして用いた第2群では、第3群よりやや良好な予防効果が見られた。ワクチンを打たないで、エアロソール感染させたモルモットは、感染後3ヶ月以内に全身播種性結核で死亡した。結核菌は、肉芽腫内で、ほとんど見られないか、あっても1ヶであった(1群から3群全部)。

D. 考察

DNA TB ワクチン単独よりも、DNA TB ワクチンと Ag85A peptide (ブースターとして) の組み合わせでワクチン感染予防増強効果が見られたので、この併用は大いに期待が持てる。これらモルモットを1年間観察したところ、感染予防効果の見られた群(第1群-3群)の肉芽腫は、縮小し、これら肉芽腫は、膠原線維で囲まれていた。肉芽腫内に結核菌は、ほとんど見られなかった。さらに興味のあることには、はじめ、脾に肉芽腫が存在したのが、予防効果がまずにつれ、肉芽腫が縮小し、消失した例もあった。このことから、結核ワクチンの結核菌感染予防効果を見るには、長期間の観察が必須である。長期間、結核菌感染予防効果を調べた論文は、調べた限りないので、本研究は、ワクチン研究の今後、に、有用な情報を与えるだろう。

E. 結論

1年間観察した群では、結核菌誘導肉芽腫は、有意に縮小し、膠原線維で被覆されていた。肉芽腫内に、結核菌がほとんど認められなかった。感染初期、脾に肉芽腫があったのが、感染予防効果が増強するにつれ、肉芽腫が縮小し、消失した症例もあった。このことより、結核ワクチンの結核菌感染予防効果を見るには、長期間の経過観察が必須である。

F. 健康危険情報

動物実験なので、健康危険情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. I. Sugawara, H. Yamada, T. Udagawa and K. Huygen: Vaccination of guinea pigs with DNA encoding Ag85A by gene gun bombardment. *Tuberculosis*, 83:331-337, 2003.
2. I. Sugawara, H. Yamada, S. Mizuno, K. Takeda and S. Akira: Mycobacterial infection in MyD88-deficient mice. *Microbiol. Immunol.*, 47:841-847, 2003.
3. O. C. Turner, R. G. Keefe, I. Sugawara, H. Yamada and I. M. Orme: SWR mice are highly susceptible to pulmonary infection with *M. tuberculosis*. *Infect. Immun.*, 71: 5266-5272, 2003.
4. I. Sugawara, H. Yamada, C. Li, S. Mizuno, O. Takeuchi and S. Akira: Mycobacterial infection in TLR2 and TLR6 knockout mice. *Microbiol. Immunol.*, 47: 327-336, 2003.
5. Mitsuyama M, Akagawa K, Kobayashi K, Sugawara I, Kawakami K, Yamamoto S, Okada M.: Up-to-date understanding of tuberculosis immunity. *Kekkaku*. 2003, 78(1): 51-5.
6. Sugawara I, Yamada H, Mizuno S.: Relative importance of STAT4 in murine tuberculosis. *J. Med Microbiol.* 2003, 52(1):29-34.

（分担）研究報告書

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

分担研究者 原 寿郎 九州大学大学院医学研究院 成長発達医学分野 教授

研究要旨

結核に対する細胞免疫療法の有用性を検討するため、マウス由来の樹状突起細胞（dendritic cell：DC）を結核菌抗原で感作し、これをマウスに投与した。その結果、抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞が誘導され、BCG を経気道感染させるとコントロールマウスと比較して脾臓において有意な菌数の減少が認められた。このことより、結核菌抗原感作 DC を用いた細胞免疫療法は抗酸菌易感染性患者あるいは多剤耐性結核菌患者など難治性結核患者に対するワクチン療法として利用できる可能性が示唆された。一方、強力な IFN- γ 産生の誘導を有する転写因子である T-bet 遺伝子についてセンダイウイルスベクターを用いてマウス DC への導入を試みたところ、マウスの骨髄細胞へ直接導入した場合の導入効率は 30～40%であった。培養時の T 細胞や異種蛋白の除去により 50～80%まで導入効率を上げることができると考えている。T-bet 遺伝子導入 DC による細胞遺伝子療法は技術的に十分可能であり、今後結核感染マウスモデルにおいてその有用性を検討する予定である。

A. 研究目的

我々はこれまで抗酸菌易感染性患者の病態について解析を行い、本邦で初めて 4 症例の常染色体優性遺伝形式をとる IFN- γ レセプター 1 欠損症を同定し報告した。このような抗酸菌易感染性患者あるいは多剤耐性結核菌患者など難治性結核患者に対する新たな治療戦略の開発が求められている。その一つとして強力かつ抗原特異的な Th1 の誘導を目的とした樹状突起細胞（dendritic cell：DC）を用いた細胞遺伝子治療の開発が重要かつ有用な治療と考えている。特に転写因子である T-bet は IFN- γ 産生を誘導し Th1 への分化を規定する最も重要な分子であることから、T-bet を

導入した樹状細胞は新たな細胞療法として有用な可能性が示唆される。

我々はマウスにおける細胞免疫療法モデルを作製し、新規ウイルスベクターであるセンダイウイルスを用いたマウス樹状細胞への T-bet 遺伝子導入方法の確立と T-bet 導入マウス樹状細胞の細胞内寄生性細菌に対する免疫学的効果の検討を目標に研究を行った。

B. 研究方法

1) マウスにおける細胞免疫療法モデルの作製

(a) 抗原感作 DC の作製：C57BL/6 マウスの大腿骨および脛骨から骨髄細胞を取

り出し、IL-4 および GM-CSF 添加液体培地で培養を行った。培養7日目に LPS を添加して一晚培養し、翌8日目に結核菌由来ペプチドである TB2 ペプチド (H2M3 拘束性)、MPT64 ペプチド (MHC クラス I Ab 拘束性) 添加し培養した。培養3時間後、遠心洗浄し結核菌抗原感作 DC を作製した。

(b) 細胞性免疫能の解析：上記作製した結核菌抗原感作 DC を C57BL/6 マウスに静脈内投与し、投与6日目に解析を行った。結核菌抗原感作 DC 投与マウスより脾臓を摘出し、脾臓細胞に結核菌抗原ペプチド (TB2 ペプチド、MPT64 ペプチド) およびコントロールペプチドであるリステリア抗原ペプチド (LLO ペプチド) を各々加え培養した。抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞における IFN- γ 産生についてフローサイトメトリー解析を行った。

(c) 抗酸菌に対する免疫能の解析：TB2 ペプチド単独で感作した TB2 感作 DC を作製し C57BL/6 マウスに静脈内投与した。投与後6日目に BCG (Tokyo 株) を 1.0×10^6 CFU 気道内感染させ、感染3日後、6日後に抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞における IFN- γ 産生能の解析および臓器内菌数の測定を行った。

2) センダイウイルスを用いたマウス樹状細胞への遺伝子導入法の検討

C57BL/6 マウスより骨髄細胞を取り出し、IL-4 および GM-CSF 添加液体培地で培養した。培養0日目、4日目、7日目に Sendai virus (SeV)-GFP を一定時間添加後、洗浄した。各培養8日目に、フローサイトメトリーによる GFP 陽性細胞率の検出と細胞数を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子解析研究「BCG 副反応例および抗酸菌感染症発症に関連する宿主

遺伝子要因の解明」として九州大学大学院医学研究院 遺伝子解析倫理審査委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1) マウスにおける細胞免疫療法モデルの作製

結核菌抗原感作 DC を投与して6日後のマウスより脾臓細胞を摘出した。脾臓細胞に結核菌由来抗原である TB2 ペプチド、MPT64 ペプチドをおのおの加え培養し、抗原特異的 CD8 T 細胞の誘導をフローサイトメトリーで調べたところ、TB2 ペプチドおよび MPT64 ペプチド刺激においては抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導が認められた。

またマウスに TB2 ペプチド感作 DC を投与後、BCG を経気道感染させ3日および6日目に抗原特異的 CD8 T 細胞の出現が認められた。TB2 感作 DC による免疫において、感染6日目の脾臓では有意な BCG の菌数の減少がみられた。一方、肺ではこの時期では有意な BCG の排除はみられなかった。

2) センダイウイルスを用いたマウス樹状細胞への遺伝子導入法の検討

SeV-GFP 添加後マウス樹状細胞 (CD11c 陽性細胞) への導入効率は 30 ~ 40%であった。培養0日に導入したものは CD11c 陽性細胞への分化が不良であった。

D. 考察

DC を用いた結核菌に対する細胞免疫療法について、結核菌抗原感作 DC をマウスに投与することにより抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞が誘導され、さらに菌の排除が認められたことからワクチンとしての効果が期待できた。しかし菌の排除の程度は弱いため、別の結核菌抗原との比較やさらに強力に抗原特異的 CD8 T 細胞を誘導する