

BCG菌へ組み入れるためのプラスミドの改良を行なうにあたり、プロモーターとして α 抗原群（BCG菌、鳥型結核菌、カンサシー菌）、60 kDa ストレス蛋白質、低分子ストレス蛋白質それぞれのプロモーターを、ターミネーターとしては種々の α 抗原群のターミネーターについてそれぞれを用いた際の蛋白質発現効率について比較検討した。その評価はマラリア抗原 SERA をリポーターとしてその産生量で検討した。

抗酸菌に対する感染防御実験はマウスを用いてらい菌に対するワクチン効果を調べた。方法として、rBCG/BA51 でマウス（C57BL/6、BALB/c）を免疫し、1 カ月後らい菌を足蹠に感染させ、さらに5 カ月足蹠中の抗酸菌数を数えた。

なお、動物実験は当該実験施設の基準に沿って行うため、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

プロモーターを非結核性抗酸菌の α 抗原群遺伝子のものに変換することにより組み換えBCGからの85A、85B、MPB51のそれぞれの抗原産生量はTokyo株に比し、少なくとも5倍以上となった。この組み換えBCG（rBCG/BA51）のワクチン効果をマウス足蹠中におけるらい菌の増殖抑制効果で判定したところ、C57BL/6、

BALB/cのいずれのマウスにおいてもBCGTokyo株に比し著明な効果が見られた。特にBALB/cマウスにおいては6匹中5匹においては足蹠中の抗酸菌数が検出限界以下であった。

結核菌に対する感染防御効果は現在検討中である。

プラスミドの改良を試みた結果、SERA抗原の場合には低分子ストレス蛋白質プロモーターがもっとも有効であった。これに対し、 α 抗原群、60 kDa ストレス蛋白質のプロモーターを使用した場合にはSERA抗原の産生は確認できなかった。しかし、目的とする抗原遺伝子によってプロモーターの有効性は大きく異なり、それぞれに最も適したプロモーターを選択する必要があることも示唆された。

考察

これまでに現行のBCGワクチンに代わるワクチンとして、サブユニットワクチン、DNA ワクチン等の新しいワクチン作成の試みが多くなされてきた。今回rBCG/BA51がマウス足蹠中でのらい菌の増殖抑制実験において現行のBCGを超えるワクチン効果を示したことはたいへん意味深いことである。今回の結果は、BCG菌体に本来存在する感染防御抗原の複数を同時に過剰発現させることで、現行のBCGワクチンよりも有効なワクチンを作成できること

が強く示唆している。さらに有効なワクチンとするためには、標的として有望な抗原を見出すことが成功の鍵となりうると考えられる。

ところで、低分子ストレス蛋白質は宿主細胞内での菌の生存に大きく寄与していることが示されてきた。また、宿主細胞内においてはこれらの蛋白質が多量に産生されることがわかっている。このことから、そのプロモーターは宿主内で目的の遺伝子を発現させるためには有効であると考えられる。SERA を指標にした今回の結果ではその発現量が多く、また rBCG/SERA 接種マウスでは抗 SERA 抗体の産生が認められたことから有望なプロモーターであることが示唆された。今後他のプロモーターの検討も含め、さらなる解析が必要である。

E. 結論

現行の BCG ワクチンを遺伝子操作によって改変することにより、rBCG 作成のベースとなる BCG の改良を行える可能性が十分にある。そのためには組み入れる抗原の選択、発現カセットの構築が重要である。

F. 健康危険情報

一般の組み換え DNA 実験に準ずる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohara N, Matsuoka M, Nomaguchi H,

Naito M, Yamada T. (2001) Protective responses against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice induced by recombinant *Bacillus Calmette-Guérin* over-producing three putative protective antigen candidates. *Vaccine* 19: 1906-1910.

Furugen M, Matsumoto S, Matsuo T, Matsumoto M, Yamada T. (2001) Identification of the mycobacterial DNA-binding protein 1 region which suppresses transcription in vitro. *Microb Pathog.* 30: 129-38.

山田毅 (2001) 多剤耐性結核菌。日本臨床 59: 719-23.

Ohara N, Yamada T. (2001) Recombinant BCG vaccines. *Vaccine.* 19:4089-98.

Kitaura H, Ohara N, Kobayashi H, Yamada T. (2001) TNF- α -mediated multiplication of human immunodeficiency virus in chronically infected monocytoïd cells by mycobacterial infection. *APMIS* 109: 533-540.

Kitaura H, Ohara N, Kobayashi K, Yamada T. (2001) TNF-alpha-mediated activation of HIV-1 LTR in monocytoïd cells by mycobacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 31: 97-103.

Ohara N, Ohara N, Yanagiguchi K, Yamada S, Vilorio IL, Hayashi Y. (2002) Expression of alkaline phosphatase induces rapid and artificial mineralization in specific transformed *Escherichia coli*. *New Microbiol.* 25:107-110.

Kitaura H, Ohara N, Nakao N, Yoshida N, Yamada T. (2002) Changed Activation of HIV-1 LTR in monocytoïd cells by mycobacteria with temporal progression

of infection. *New Microbiol.*: 25:357-361.

Yamada H, Kuroda E, Matsumoto S, Matsumoto T, Yamada T, Yamashita U. (2002) Prostaglandin E2 down-regulates viable Bacille Calmette-Guerin-induced macrophage cytotoxicity against murine bladder cancer cell MBT-2 in vitro. *Clin Exp Immunol.* 128:52-8.

Kawahara M, Matsuo K, Nakasone T, Hiroi T, Kiyono H, Matsumoto S, Yamada T, Yamamoto N, Honda M. (2002) Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen. *Vaccine* 21: 158-66.

Yamamoto S, Yamamoto T, Nojima Y, Umemori K, Phalen S, McMurray DN, Kuramoto E, Iho S, Takanji R, Sato Y, Yamada T, Ohara N, Matsumoto S, Goto Y, Matsuo K, Tokunaga T. (2002) Discovery of immunostimulatory CpG-DNA and its application to tuberculosis vaccine development. *Jpn. J. Infect. Dis.* 55: 37-44.

Kitaura H, Nakao N, Yoshida N, Yamada T. (2003) Induced sensitization to nickel in guinea pigs immunized with mycobacteria by injection of purified protein derivative with nickel. *New Microbiol.* 26:101-8.

Lee J-S, Ohara N, Kamijo K, Kitamura T, Miki T. (2004) MgcRacGAP regulates membrane blebbing through RhoA during cytokinesis. *Exp. Cell. Res.* In press.

Saito SI, Liu X-F, Kamijo K, Razziudin R, Tatsumoto T, Okamoto I, Chen X, Lee

C-C, Lorenzi MV, Ohara N, Miki T. (2004) Dereglulation and mislocalization of the cytokinesis regulator ECT2 activate the Rho signaling pathways leading to malignant transformation. *J. Biol. Chem.* In press.

2. 学会発表

Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Yoshida S, Ohara N, Yamada T, Matsumoto M, Sakatani M, Mori T. (2001) New (DNA-, recombinant BCG- and subunit-) vaccination against tuberculosis and cytotoxic activity, Thirty-sixth Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (New Orleans), Program pp.127-133.

Yamamoto S, Yamamoto T, Nojima Y, Umemori K, Matsuo K, Nomaguchi K, Sato Y, Yamada T, Ohara N, Matsumoto M, Phalen S, McMurray DN. (2001) Protective efficacy of vaccine candidates against guinea pig pulmonary tuberculosis, Thirty-sixth Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (New Orleans). Program pp.139-143.

Ohara N, Tabira Y, Yamada T. (2001) Study on the second small heat shock protein from BCG, Thirty-sixth Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (New Orleans). Program pp.201-205.

Okada M, Yoshida S, Ohara N, Yamada T, Kaneda Y, Tanaka T, Inoue Y, Matsumoto M, Sakatani M, Mori T. (2001) New DNA and recombinant BCG vaccination against tuberculosis by the augmentation of cytotoxic activity, The Awaji International Forum on Infection and Immunity. (Awaji island).

Okada M, Yoshida S, Ohara N, Yamada T, Kaneda Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Inanaga Y, Kanamatsu N, Inoue Y, Matsumoto M, Kimura K, Sakatani M, Mori T. (2002) Novel DNA and recombinant BCG vaccination against tuberculosis by the augmentation of cytotoxic activity, Fourth World Congress on Tuberculosis. (Washington, DC). Program p.82.

Yamamoto S, Yamamoto T, Nojima Y, Umermori K, Matsuo K, Nomaguchi K, Sato Y, Yamada T, Ohara N, Matsumoto M, Goto Y, Phalen S, McMurray DN. (2002) Protective efficacy of vaccine candidates against guinea pig pulmonary tuberculosis, Fourth World Congress on Tuberculosis. (Washington, DC). Program supplement.

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. (2002) Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis, Thirty-seventh Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (Kyoto).

Yamamoto S, Yamamoto T, Nojima Y, Umermori K, Goto N, Maeyama J, Yamada T, Ohara N, Toida I, Iho S, Takauji R, Takatsuka H, Goto Y, McMurray DN. (2002) Protective efficacy of BCG and rBCG on guinea pig pulmonary tuberculosis and its modification with unmethylated CpG-DNA, Thirty-seventh Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (Kyoto).

Nagata T., Miki K., Kim Y-H., Uchijima M., Ohara N. and Koide Y. (2002) Induction of specific immunity against mycobacteria by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 family molecules, Thirty-seventh Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (Kyoto).

Koide Y, Miki K, Nagata T, Suzuki M, Aoshi T, Tanaka T, Kim Y-H., Uchijima M., Ohara N. and Okada M. (2003) 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. (Newark).

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. (2003) 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. (Newark).

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. (2003) 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. (Newark).

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. (2003) Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis, TBV2003 (Montreal, Canada)

大原直也, 大原直子, 山田毅: 酸素ストレスにより誘導される *Porphyromonas gingivalis* 新規低分子蛋白質, 第 74 回日本細菌学会総会(岡山), 2001, 日本細菌学雑誌 56, 234, 2001.

山本三郎, 野島康弘, 梅森清子, 野間口博子, 大原直也, 山田毅, 山本十糸子: 抗酸菌抗原 DNA ワクチンと rBCG のモルモット免疫応答及び結核防御効果, 第 74 回日本細菌学会総会(岡山), 2001, 日本細菌学雑誌 56, 315, 2001.

雪竹英治, 大原直也, 神原廣二, 山田毅: ヒトマラリアの防御抗原を発現する組換え BCG ワクチンの作製, 第 74 回日本細菌学会総会(岡山), 2001, 日本細菌学雑誌 56, 316, 2001.

大原直也, 菊池有一郎, 庄子幹郎, 上島潤一, 中山浩次: 歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* における酸化ストレスレギュレータ OxyR 支配性の検討, 第 54 回日本細菌学会九州

支部総会, 第 38 回日本ウイルス学会九州支部総会(北九州), 2001, 抄録集 p41, 2001.

大原直也, 菊池有一郎, 庄子幹郎, 上島潤一, 中山浩次: 歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* 酸化ストレス応答蛋白質 OxyR 支配性の解析, 第 43 回歯科基礎医学会学術大会(埼玉), 2001, 歯科基礎医学会雑誌 43, 531, 2001.

菊池有一郎, 大原直也, 庄子幹郎, 上島潤一, 中山浩次: 2次元電気泳動法による *Porphyromonas gingivalis* 酸化ストレス応答機構解明の試み, 第 43 回歯科基礎医学会学術大会(埼玉), 2001, 歯科基礎医学会雑誌 43, 602, 2001.

岡田全司, 田中高生, 井上義一, 細江重人, 吉田栄人, 大原直也, 山田毅, 金田安史, 坂谷光則, 森隆: 結核に対する新しい DNA ワクチンおよびリコンビナント BCG ワクチン開発とキラー活性, 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会(大阪), 2001.

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.

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.

齋藤幹、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.

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.

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.

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.

齋藤幹、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.

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.

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.

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.

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.

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.

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
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,
258, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）

分担研究報告書

HIV Gag ワクチンの構築に関する研究

分担研究者 小島 朝人 国立感染症研究所感染病理部・室長

研究要旨：(1) HIV-1 Gag 蛋白がウイルス排除に有効な免疫抗原である事に着目して、組換えワクシニアウイルスワクチン、DNA ワクチン、組換えバキュロウイルス由来精製 Gag 蛋白ワクチンを作成した。これらを用いて、プライムに 10 μ g 以上の DNA ワクチン電気パルス免疫と、ブーストに 10⁷PFU 組換えワクシニアワクチン接種の組み合わせが、最も高い Gag 免疫応答を誘導する事を示した。(2) ブーストに最も有効な組換えワクシニアウイルスベクターの安全性・有効性検討のため、WHO の痘瘡ワクチン Lister 株、これから樹立され最高の安全性評価を持つ我国痘瘡ワクチン LC16m8 株、及び樹立中間体 LC16mO 株の全ゲノム塩基配列とマウス免疫原性を解析した。その結果、Lister 由来株のゲノム構造は極めて類似している事、B5R 外被遺伝子の欠損が LC16m8 株の安全性に重要で、マウス親和性・皮膚増殖性と相関する事、他方、ベクターの免疫原性には影響しない事等を示した。

A. 研究目的

エイズワクチン開発は、HIV の組換え蛋白コンポーネントワクチン・ウイルスベクター生ワクチン・DNA ワクチン・合成ペプチドワクチン等多種多様な方策が世界各国で試みられてきたが、それぞれの試作ワクチン単独では十分な免疫が誘導されていない。そこで、これらの長所を組合せたコンビネーションワクチンの実現が1つの課題となっている。

本研究ではまず、(1)HIV Gag 蛋白が HIV の排除に有効な免疫抗原の1つであることに着目して、種々の Gag 抗原発現システムを開発し、最も高い Gag 免疫応答を誘導する1次免疫と2次免疫のコンビネーションを明らかにする事を第一の目的とした。その結果、DNA ワクチンのプライム/組換えワクシニアワクチン接種のブーストが、最も有効

である事が示された。そこで、(2)組換えワクシニアワクチンに最も大きな影響を与えるワクシニアウイルスの、ベクターとしての安全性・有効性を検討することを第二の目的とした。

B. 研究方法

Gag ワクチンシステム : Gag 遺伝子の組換えワクシニアウイルス、DNA ワクチン用 plasmid、組換えバキュロウイルスは既に報告した方法で構築した。組換えバキュロウイルス由来 Gag 抗原は、感染 High-5 昆虫細胞培養上清から超遠心で精製した。Gag 蛋白の抗原性 : 各ワクチンシステムで細胞内に産生された、あるいは培養上清中に放出された Gag 蛋白は、抗-Gag モノクローナル抗体あるいは HIV-1 感染者血清を用いたウェスタンブロット法、ELISA 法で解析した。ワクシニアウイルス株 : WHO

／日本／英国で採用され痘瘡根絶の実績を持つ Lister 原株(LO 株)、LO 株から樹立された我国の第 2 世代痘瘡ワクチン LC16m8 株 (m8 株)、樹立中間体の LC16mO 株(mO 株)は橋爪博士より分与を受けた。これらワクチン株及び強毒 WR 株は RK13 細胞で増殖させて用いた。全ゲノム塩基配列解析：各株のピリオンは、Joklik の方法に従って超遠心法で精製した。精製ウイルスから Rice らの方法に準じて、proteinase K 消化・phenol/chloroform 抽出を行なってウイルス DNA を調整した。塩基配列の決定はショットガン法で行い、確認をプライマーウオーキング法で行なった。免疫原性試験：免疫動物には BALB/c マウス (6 週齢、雌)を用いた。上記の Gag ワクチンを種々の組合わせで免疫したマウスの抗-Gag 抗体は、大腸菌の精製組換え GST-p24 Gag 蛋白を用いた ELISA で測定した。抗-ワクシニア抗体は可溶化ワクシニアウイルス蛋白を用いた ELISA

で測定した。感染防御実験は、WR 株の経鼻攻撃感染で判定した。

(倫理面への配慮)

動物実験ガイドラインに従って、保定器の使用、麻酔下での処置等、実験動物の苦痛を軽減できる方法で実施し、実験終了後は安楽死の処置を行なった。

C. 研究結果

(1)プライム・ブースト法の検討：1 次免疫単独では DNA ワクチン<精製 Gag 抗原ワクチン≒組換えワクシニアワクチンの順に効率がよく、同一ワクチンの 1 次・2 次繰返し免疫でも免疫効率は同様の順位であった。しかし、効率の悪い DNA ワクチンでプライムし、精製 Gag 蛋白ワクチン或いは組換えワクシニアワクチンをブーストするコンビネーションは、最も効率の高い組換えワクシニアワクチン 2 回免疫より約 5 倍高い抗体価が誘導された。この逆順に、プライムを組換えワクシニアワク

チン・ブーストを DNA ワクチンにする
と抗体価は約 1/20 に低下した。この結
果は、DNA ワクチン/組換えワクシニア
ワクチンのコンビネーションレジメが
最良であることを示唆している。

そこで、DNA 投与方法・投与量と組換
えワクシニアワクチンのブースト量を
検討した。その結果、多くの報告に見
られる筋肉注射法では DNA100 μ g 以上
を要したが、電気パルス法は DNA10 μ g
で同等のプライム効果を示した。次に、
組換えワクシニアワクチンのブースト
量を変動させて検討したところ、10⁷PFU
以上の組換えワクシニアウイルス量で
最大効果に達することが明らかになっ
た。

(2)ワクシニアベクターの検討：ブー
スト用の組換えワクシニアウイルスは国
際的コンセンサス株に由来する必要があ
る。そこで、LO 株→mO 株→m8 株のワ
クチン株樹立経緯を全ゲノム塩基配列か
ら比較した。その結果、LO 株は 50 塩基

に 1 箇所の頻度で多型が観察され、多様
なウイルスクローン混合株であることが
示された。弱毒 mO 株は、少なくとも 8
種類以上の LO 遺伝子型の 1 つから派生
した可能性が示唆された。一方、mO 株
と m8 株は極めて相同性が高く、ほぼ同
一の塩基配列であった。唯一、大きな遺
伝子欠失変異が B5R エンベロープ遺伝子
部位にマップされた（崎山博士・吉田博
士との共同実験）。

上記のように、我国ワクチン m8 株は
中和抗体誘導抗原遺伝子の 1 つの B5R 遺
伝子に欠失を生じている事から、ベクタ
ー自体としての免疫原性を検討する必要
が生じた。LO、mO、m8 各株の一回接種
では、抗-ワクシニア抗体も、抗-B5R 抗
体もほとんど検出されなかった。しかし、
各株の免疫マウス群は強毒・向神経性 WR
株の攻撃感染に対して完全な感染抵抗性
を示し、免疫ワクチン株による差異は認
められなかった（森川博士との共同実
験）。

D. 考察

近年の報告では、組換えワクシニアウイルス、バキュロウイルス由来の精製 HIV 抗原ワクチン、DNA ワクチン等、それぞれ単独では有効な HIV ワクチンになり得ていない。しかし、SIV 感染系では、DNA ワクチン 1 次免疫/組換えカナリアボックス 2 次免疫のコンビネーションで一定程度の感染防御が示され、マラリアでも DNA ワクチン/組換えワクシニアの組合わせで感染防御効果が報告されている。従って、HIV ワクチンでの最適なコンビネーションの解明は 1 つの焦点になっている。本研究では、Gag 抗原をモデルに 3 種のワクチン系を組合せて、効果的な免疫のコンビネーションを示した。この結果は、上記 SIV 及びマラリア感染系の結果とほぼ一致していたことから、HIV 感染が成立しないマウスでの本研究のアプローチでも、有効な HIV ワクチン評価

系として活用できるものと考えられる。

一方、ブーストに有効であった組換えワクシニアウイルスの多くは強毒・向神経性の WR 株で構築されていた。しかし、ヒトへの接種には国際的コンセンサス株をベクターにする事が求められている。それ故、アンカラ株、コペンハーゲン株、NYBH 株等各国で使用された痘瘡ワクチン株から構築された組換えワクシニアウイルスが、より安全性の高い組換えワクチンとして各国で開発が進められている。我国ワクチンの m8 株は最も高い安全性の評価を受けているが、B5R 防御抗原遺伝子の欠失も報告されている。しかし、全ゲノム塩基配列の比較では B5R 以外有効性に影響する欠損は見出されなかった。実際、m8 株は LO 株と同等の感染防御効果を示した。組換えワクシニアの第特相・第鑑相試験では、種痘歴のある成人での有効性が際立って低いことが知られている。むしろ、B5R⁺

の LO 株種痘を受けた世代には残存する抗-B5R 免疫の影響を受けない組換え m8 ワクチンのブーストの方が有効である可能性も考えられる。

E. 結論

(1) HIV Gag 組換えワクシニアウイルスワクチン、DNA ワクチン、組換えバキュロウイルス由来精製 Gag 抗原ワクチンを作成した。これらを用いて、初回プライムに DNA ワクチン、ブーストに組換えワクシニアワクチンの組み合わせが、最も高い Gag 免疫応答を誘導する事を示した。

(2) ワクシニアウイルスベクターの安全性・有効性評価のため、WHO の痘瘡ワクチン LO 株、LO 株由来の我国ワクチン m8 株、その中間 mO 株の全ゲノム塩基配列と免疫原性を検索した。その結果、極めて類似した 3 株のゲノム構造、B5R エンベロープ遺伝子の安全性への関与とマウス親和性・皮膚増殖性との

相関、m8 と LO の同等な免疫原性、及び B5R 欠失と感染防御の非相関性等を示した。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hachiya, A., Aizawa-matsuoka, S., Tanaka, M., Takahashi, Y., Ida, S., Gatanaga, H., Hirabayashi, Y., Kojima, A., Tatsumi, M., and Oka, S.: Rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 by using CCR5-expressing HeLa/CD4 cell clone 1-10 (MAGIC-5). *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 495-501, 2001.

Ohba, H., Soga, T., Tomozawa, T., Nishikawa, Y., Yasuda, A., Kojima, A., Kurata, T. and Chiba, J.: An immunodominant neutralization epitope on the 'thumb' subdomain of HIV-1 reverse transcriptase revealed by phage display antibodies. *J. Gen. Virol.* 82, 813-820, 2001.

Harada, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Koyanagi, Y., Sata, T., Kurata, T., and Kojima, A.: Role of nucleotide sequences in the V3 region in efficient replication of CCR5-utilizing human immunodeficiency virus type 1 in macrophages. *Virology* 299, 192-203, 2002.

Hasegawa, H., Tatsumi, M., Ogawa-Goto, K., Takahashi, H., Kojima, A.,

Iwasaki, T., Kurata, T., Sata, T., Takeuchi, T., Sheehy, N., Sawa, H., Nagashima, K., and Hall, W. W.: Processing of the HTLV-II envelope precursor glycoprotein gp63 by furin is essential for cell fusion activity. *AIDS Res. Human Retroviruses* 18, 1253-1260, 2002.

Kojima, A., Yasuda, A., Asanuma, H., Ishikawa, T., Takamizawa, A., Yasui, K. and Kurata, T.: Stable high-producer cell clone expressing virus-like particles of the Japanese encephalitis virus E protein for a second-generation subunit vaccine. *J. Virol.* 77, 8745-8755, 2003.

Yokomaku, Y., Miura, H., Tomiyama, H., Kawana-Tachikawa, A., Takiguchi, M., Kojima, A., Nagai, Y., Iwamoto, A., Matsuda, Z. and Ariyoshi, K.: Impaired processing and presentation of cytotoxic T-lymphocyte (CTL) epitopes are major escape mechanisms from CTL immune pressure in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* (in press).

2. 学会発表

三浦秀佳、横幕能行、建石幸子、後藤美江子、立川愛、岩本愛吉、小島朝人、有吉紅也：HIV 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL)による臨床株 Gag タンパクの認識効率に関する研究。第 49 回日本ウイルス学会学術集会、2001 年 11 月、大阪。

北川善紀、原田貴之、千葉文、佐多徹太郎、倉田毅、小島朝人：HIV-1 Gag-VLP 抗原発現系を組み合わせた最適なプライ

ム・ブースト免疫法の検討。第 49 回日本ウイルス学会学術集会、2001 年 11 月、大阪。

原田貴之、横田恭子、小柳義夫、佐多徹太郎、倉田毅、小島朝人：HIV-1 R5 ウイルスの M-トロピズムにおける V3 ヌクレオチド配列の役割。第 50 回日本ウイルス学会学術集会、2002 年 10 月、札幌。

原田貴之、佐多徹太郎、倉田毅、小島朝人：HIV 侵入の無細胞解析系におけるウイルス感染特異性。第 16 回日本エイズ学会学術集会、2002 年 11 月、名古屋。

武藤栄次、田中恵子、石川豊数、高見沢昭久、佐多徹太郎、倉田毅、小島朝人：持続細胞株が大量に産生する日本脳炎ウイルス E 蛋白中和抗原粒子の精製と抗原性・免疫原性の解析。第 6 回日本ワクチン学会学術集会、2002 年 11-12 月、千葉。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項なし。

リコンビナント BCG ワクチンの大量生産法

分担研究者 戸井田 一郎（BCG 研究所 名誉顧問）

研究要旨

これまでの組換え BCG ワクチンの製造法に関する検討をもとにして HIV-1 CRF01_AE Gag 蛋白を発現した組換え BCG ワクチンを GLP グレードで製造した。その臨床試行での使用について考察した。

協力研究者

橋本朗（BCG 研究所）

A. 研究目的

本 HIV ワクチン開発プロジェクトで全 Gag 遺伝子を組み込んだ組換え BCG ワクチンを作製し、ブースター抗原としてワクシニア DIs 抗原を用いて免疫を行うと防御免疫誘導能につながる事が明らかになった。さらにコードンの至適化により外来抗原の発現が増強することで組換え BCG ワクチンの有用性がさらに明らかになった。これらの成果を踏まえて組換え BCG-HIV ワクチンの効果的なパイロットプロダクションさらには安全性等に関する実用化研究、大量製造に関する研究を行う。

B. 研究方法

これまで日本 BCG 研究所で開発された BCG Tokyo 株の製造法を参考にして rBCG ワクチンの製造法を作成する。さらに、その評価方法と、挿入された外来抗原の発現評価法を開発する。BCG を製造する際の「BCG 製

造・製剤基準」に従い、GMP のラボで作製し、GLP の基準で製造する。

今回、製造する組換え BCG HIV-1 CRF01_AE Gag ワクチンはこれまでの成果から 0.1mg 皮内接種により初回免疫を行う。さらに、組換えワクシニア DIs HIV-1 CRF01_AE Gag ワクチンを 10^7 pfu で皮内接種しブースター免疫として組換え DIs ワクチンを 2 回投与する。標的グループとして、成年男子合計 200 人を予定し、最終的には新生児（感染母親から生まれた）を臨床試行の標的にすることを予定している。

（倫理面への配慮）

所内に設置された委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果、考察

今回組換えワクチンの製造実施に際して以下のような具体的投与方法及び保存法を用いることが望ましいと考えられた。

1. 投与方法

GLP レベルの凍結乾燥品を決められた量の

滅菌生食水で溶解する。両方のワクチンは同じ滅菌生食水を用いて溶解する、それぞれの vial の表面には組換え BCG ワクチンあるいは組換え DIs ワクチンの名前と量を記載されたものとする。投与量は人臨床試行のプロトコルにそって決められたものとする。1つの vial には1つのワクチンを使用し、再使用はしない。

2. 投与ルート

組換え BCG 及び組換えワクシニア DIs ワクチンの投与ルートは皮内接種で行う。

3. 候補ワクチンの接種に関する注意事項

成年男子を最初の標的集団として登録し、まず PPD を 0.05 µg / 0.1 ml 皮内接種を行い、48～72 時間後にツベルクリン反応を判定する。ワクチンの標的集団としてはツベルクリン反応の硬結が 5mm 以下を示す人を使用する。コッホ現象を強く訴える人に対しては Rifampicin 軟膏を局所に塗布する。

4. 候補ワクチンの保存及び安全性に関する事項

組換え BCG HIV-1 CRF01_AE Gag ワクチンは 0.5mg 凍結乾燥品として vial で供給する。添付した 1cc の生食水で溶解し 100 µg / 0.1 ml の量で皮内接種する。

組換えワクシニア DIs HIV-1 CRF01_AE Gag ワクチンは 10⁸ pfu の凍結乾燥品として vial で供給する。さらに、添付した 1cc の生食水で溶解し 10⁷ pfu / 0.1 ml の量で皮内接種する。

上記の3種の製剤は保存剤を含まない。従って接種時の調整は用時調整とする。これらの vial は 4～10℃で保存する。凍結乾燥

のツベルクリンは 4～10℃で保存し、3 年間で期限とする。組換え BCG、組換え DIs ワクチンは 4～10℃で保存し、2 年間で期限とする。これらの製剤は生食水で溶かした後直ちに接種し、再使用はしない。

これらをガイドラインとしてヒトでの臨床試行時に添付し使用する。

D. 結論

BCG をベースに用いた HIV ワクチンの実用化研究を行いタイ国で伝搬している HIV-1 CRF01_AE 野生株のコンセンサスに最も近いと同等されたウイルス株より得られたフルレングスの Gag 遺伝子を外来性抗原遺伝子として用い rBCG ワクチンを作製した。そのシードを用いて前臨床レベルでのワクチンの実用化研究を完成させるためにパイロットプロダクションの方法を確立した。この方法を用いると BCG を始めとした種々の BCG リコンビナントワクチンを実用化させることが可能となる。従って rBCG ワクチンの実用化の目処がついたと判断できる。

今後の計画としては以下のことが課題となる、

1) 本年度までの班研究において組換え BCG ワクチンが HIV ワクチンとして使用される眼界と可能性について検討した。その結果、組換え BCG としての挿入する外来遺伝子は従来言われていた分子量の小さいもののみでなく、全 Gag 遺伝子や、全 env 遺伝子等の大きな HIV 構想遺伝子を発現させることが可能であることが明らかにされた。さらにこの組換え BCG-

HIV ワクチンは GLP レベルで大量生産が可能となった。また、組込んだ外来性遺伝子に対する免疫能の持続はこれまでの DNA やその他の種々の組換えワクチンと比較して単回皮内投与で長期間免疫力が持続する特徴を持つ。しかし、免疫誘導能がそれのみでは病原性ウイルスに対する感染防御を誘導できない。従って組換え BCG ワクチンの他の疾患に対するワクチンへの期待にもかかわらず BCG ワクチンの持つ有用性を生かすことができない状態である。その対策として組込んだ外来性遺伝子の発現を増強させることが検討すべき最も重要な課題である。前実験で外来性抗原遺伝子のコドンマイコバクテリアのコドンに変えて組込むことにより発現が *in vitro* のレベルで上昇することを明らかにしつつある。従ってコドンの至適化による発現の増強が防御免疫の誘導に結びつくかどうかを最優先のテーマとして検討する。

- 2) 至適化した HIV 遺伝子と従来の天然型の HIV 遺伝子を組込んだ組換えワクチンの免疫誘導能の差を細胞性免疫及び液性免疫さらに生来免疫の立場から明らかにする。
- 3) 至適化組換え BCG ワクチンの大量生産法とその検定法について検討する。

E. 健康危険情報

特記すべき事無し。

F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

無し。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し。

2. 実用新案登録

無し。

3. その他

無し。

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
（分担）研究報告書

研究課題名：rBCG-V3J1 を用いた HIV ワクチンの粘膜免疫能の解析

分担研究者：廣井隆親（助手）、清野 宏（教授）東京大学医科学研究所炎症免疫学分野

研究要旨

rBCG-V3J1 はマウスへの全身免疫によって全身系の抗原（V3 ループ）に対する細胞傷害活性を効果的に誘導することが認められている。同システムをエイズ粘膜ワクチンへの応用性を検討するために rBCG-V3J1 をワクチン抗原として経鼻免疫をした。その結果、HIV に対する中和能を持つ抗体の誘導が長期間血清中に認められた。しかしながら、HIV の初期感染経路として最も重要であると考えらる生殖器粘膜面を含めた粘膜分泌液においては抗原特異的抗体産生の誘導は認められなかった。一方興味深いことに、rBCG-V3J1 を経鼻免疫するこのシステムは HIV に対する中和能を持つ抗体の長期誘導が野生型マウスのみならず IFN- γ (Th1 型)欠損マウスや IL-4(Th2 型)欠損マウスでも誘導された。HIV の感染に伴い CD4⁺T 細胞統御系に破綻が生じた状態においても、この免疫法は有効であることが示唆された。これらの結果は、経鼻免疫型 rBCG-V3J1 は効果的に長期抗原特異的免疫誘導能があり、さらにエイズ予防だけでなく治療ワクチンとしても応用できる可能性を示している。

A. 研究目的

粘膜免疫システムの特徴として特定の IgA 誘導組織を感作するだけで生殖器に代表とされる遠隔の粘膜面と全身系の血清中に抗原特異的免疫応答を誘導できることが挙げられる。本研究計画では、粘膜免疫のコンセプトを基本とした経粘膜 HIV ワクチンの可能性について検討する。例えば、これまで日本で結核菌のワクチンとして広く使用されてきた BCG(東京株)を用いて粘膜標的型抗原デリバリー法の開発に向けての基礎的研

究を行い、将来に向けた実用性のある経粘膜 HIV ワクチンの開発を研究目的とする。

B. 研究方法および結果

HIV の中和活性部位である V3 ループを BCG の α 抗原プロモーターで発現するベクターに挿入し BCG 東京株に組み込んだ(rBCG-V3J1)。生 BCG を培養液中にて培養し対数増殖期の菌体を回収して生理食塩水に懸濁し菌体濃度を測定後した。この rBCG-V3J1 をマウス (C57BL/6) に経鼻 (1 μ g、

10 μ g)、経口(10 μ g、100 μ g)ならびに全身免疫法(1 μ g、10 μ g)で投与し経粘膜投与方法による有用性を確認した。この場合、ワクチン効果がどのくらいの期間持続するか検討するために少なくとも1年間において定期的に抗原特異的抗体産生モニタリングを行った。さらにこれらの免疫法で誘導されてくる抗原特異的な免疫抗体反応を全身系ならびに粘膜系各組織(唾液腺、膣、腸管)について検討した。また誘導された抗体が HIV に対して中和活性能を有しているかを HIV-MN 株(HIV 標準株)ならびに HIV-MNp 株(臨床分離株)を用いた *in vitro* p24 リリースアッセイにて検討した。また予防用ワクチンだけではなく rBCG の治療用ワクチンへの応用性を考慮に入れ HIV 感染に即した免疫不全状態での抗体誘導応答の検討を行うために Th1 型不全の IFN- γ 欠損マウス(C57BL/6)と Th2 型不全の IL-4 欠損マウス(C57BL/6)を用いて同様の研究を行った。

(倫理面への配慮)

当該研究はマウスを用いた動物実験を中心に行っており、ヒトに対する倫理面に関しては特に問題ない。またマウスを用いた動物実験における動物愛護上には十分に配慮し国立大学実験動物施設協議会指針に基づいた研究を遂行している。さらに BCG 東京株の生菌を使用しておりヒトへの感染に対するバイオハザードには十分に注意をしている。

C. 研究成果

rBCG-V3J1 を経鼻・経口ならびに免疫(注射)を行い血清中の抗原に対する抗体価を測定したところ、経

鼻投与方法は投与菌体量(10 μ g 菌体重量/マウス)が少ないにも関わらず抗体誘導が効果的で注射投与と同等の粘膜応答が確認された。また経口免疫においては 100 μ g 菌体重量以上投与することによって経鼻免疫ならびに全身免疫と同等の抗原特異的抗体価の誘導が認められた。これらの3種類の投与方法の中で経鼻免疫法が効果的であると判断し、以後の実験を経鼻免疫投与方法で行うこととした。rBCG-V3J1 を経鼻免疫することで V3 抗原特異的な血清 IgG は誘導されたが、膣洗浄液、鼻腔洗浄液、糞便といった粘膜面ならびに血清中に抗原特異的 IgA 抗体は誘導されなかった。また脾臓組織より分離した単核球中に V3 特異的 IgG 抗体を産生する細胞が ELISPOT 法にて確認されたが、ELISA の結果と同様に IgA 抗体は検出されなかった。興味深いことにこれらの抗体産生維持は 1 週間ごと 3 回の経鼻免疫で少なくとも実験期間の 1 年間は維持することが明らかとなった。抗原特異的な抗体の誘導を助けるサイトカインの産生パターンを検討したところ、各種臓器(脾臓、パイエル板、腸間膜リンパ節、鼻咽頭関連リンパ組織)において V3 特異的な IFN- γ を中心とする Th1 型のサイトカイン産生が CD4⁺ T 細胞に認められ、Th2 型のサイトカイン(IL-4, IL-5, IL-6 と IL-10)の産生はほとんど認められなかった。誘導された血清中の IgG は *in vitro* の p24 リリース試験で HIV 臨床分離株 HIV-MNp や標準株 HIV-MN に対する中和能が濃度依存的に認められた。これらの結果に加え、ヒトにおいて HIV の感染による Th1 型/Th2 型のアンバランスな免疫不全状態を引き起こすこと

から、IFN- γ 欠損マウスや IL-4 欠損マウスを用いて HIV 感染後のヘルパー T 細胞の機能をアンバランスにした状態を想定して同様の実験を行ったところ、野生型マウスと同様に全身系のみ HIV に対する中和能を持つ IgG 抗体が約 1 年間である長期間誘導された。

D. 考察

本実験で rBCG-V3J1 の経鼻免疫により抗原特異的な Th1 型サイトカインの産生を促して HIV に対して中和抗体が血清中に誘導可能なことが確認された。さらに rBCG-V3J1 の経鼻免疫は長期（抗体価測定期間の 1 年間）に渡って中和抗体の誘導維持が示された。本研究計画により rBCG-V3J1 は有効な経鼻ワクチンキャリアーであることが明らかとなった。また HIV 感染により引き起こされる Th1 型、Th2 型免疫不全状態における rBCG-V3J1 経鼻免疫システムの有効性について IFN- γ 欠損マウスや IL-4 欠損マウスを用いて野生型マウスと同様の実験を行った。両遺伝子欠損マウス群では全身系のみ HIV に対する中和能を持つ抗体が誘導され、長期に渡って抗体産生が維持されていた。これらの結果は、HIV 感染に対する予防用粘膜ワクチンの開発のみならず、治療ワクチンの可能性も示唆している。また rBCG-V3J1 経鼻免疫システムでは、抗原特異的ヘルパー T 細胞の活性は IFN- γ を中心とする Th1 型が誘導されていたことを考えると、Th2 型の影響を強く受ける粘膜面における抗原特異的分泌型 IgA の誘導は抑制されたのかもしれない。今後は実用化に向けてサル-SHIV の系を用いてより臨床応用を見据えた詳細

な検討を加えていくと同時に粘膜面での抗原特異的な抗体価の誘導に何が必要であるかを検討する。さらに、この結果をもとに投与方法が簡単で被験者に負担の少ない経口免疫の有用性についても詳細な検討をしていく必要がある。その実験系の立ち上げを進めている。

E. 結論

エイズ対策用ワクチンとしての rBCG-V3J1 経鼻ワクチンは HIV に対して中和能を有する血清 IgG を誘導するが粘液分泌物中には抗原特異的な IgA は認められなかった。今後は抗原特異性 IgA 誘導能を惹起する為に粘膜アジュバントとして開発された無毒化変異毒素(mCT)かキメラ型(mCTA/LTB)の遺伝子と V3J1 または pSO-gagE 併用発現 rBCG の開発を考慮する必要がある。さらに樹状細胞増殖効果のある Flt3-L の粘膜免疫増強効果が確認されており、その併用も興味ある。この rBCG-V3J1 の全身系投与は以前の報告で HIV 特異的な CTL 活性を誘導することより、今回の中和能を有する抗体の誘導と合わせて考えると将来の経粘膜 HIV ワクチンとして期待されるものである。

F.健康危険情報
特になし。

G.研究発表

1.論文発表

- 1.Hiroi, T., Goto, H., Someya, K., Yanagita, M., Honda, M., Yamanaka, N. and Kiyono H. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with