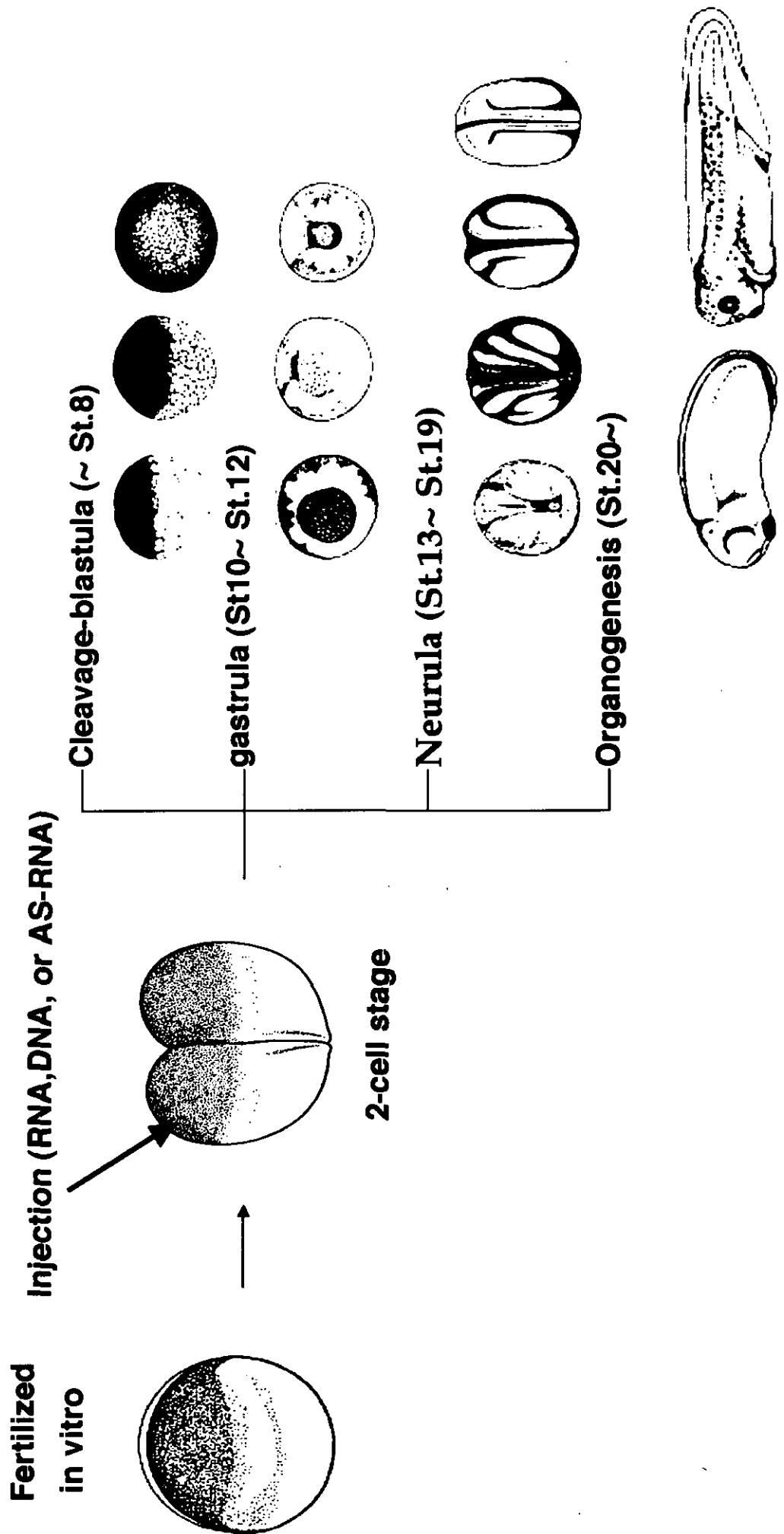
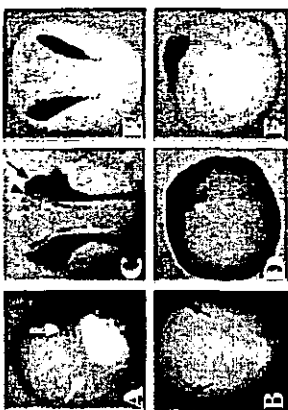
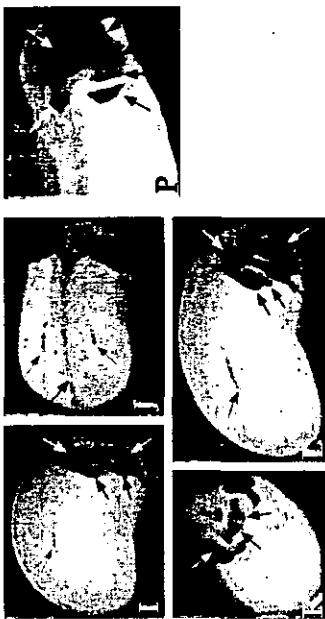


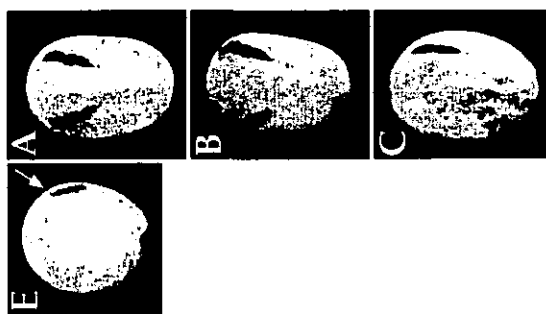
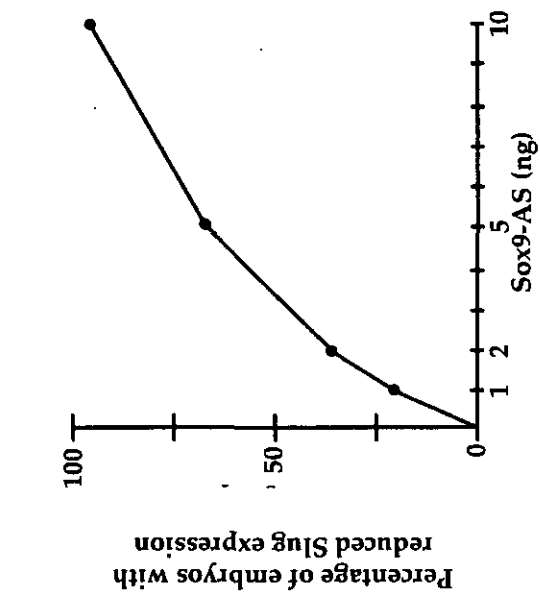
**Analysis of phenotype at each stages  
(in situ hybridization, histology etc.)**



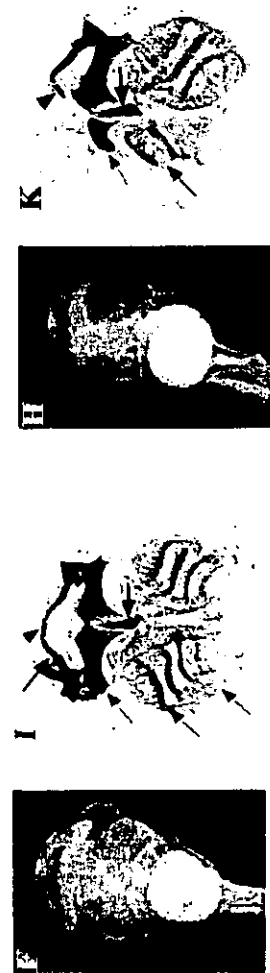
**Fig.3**



(1)

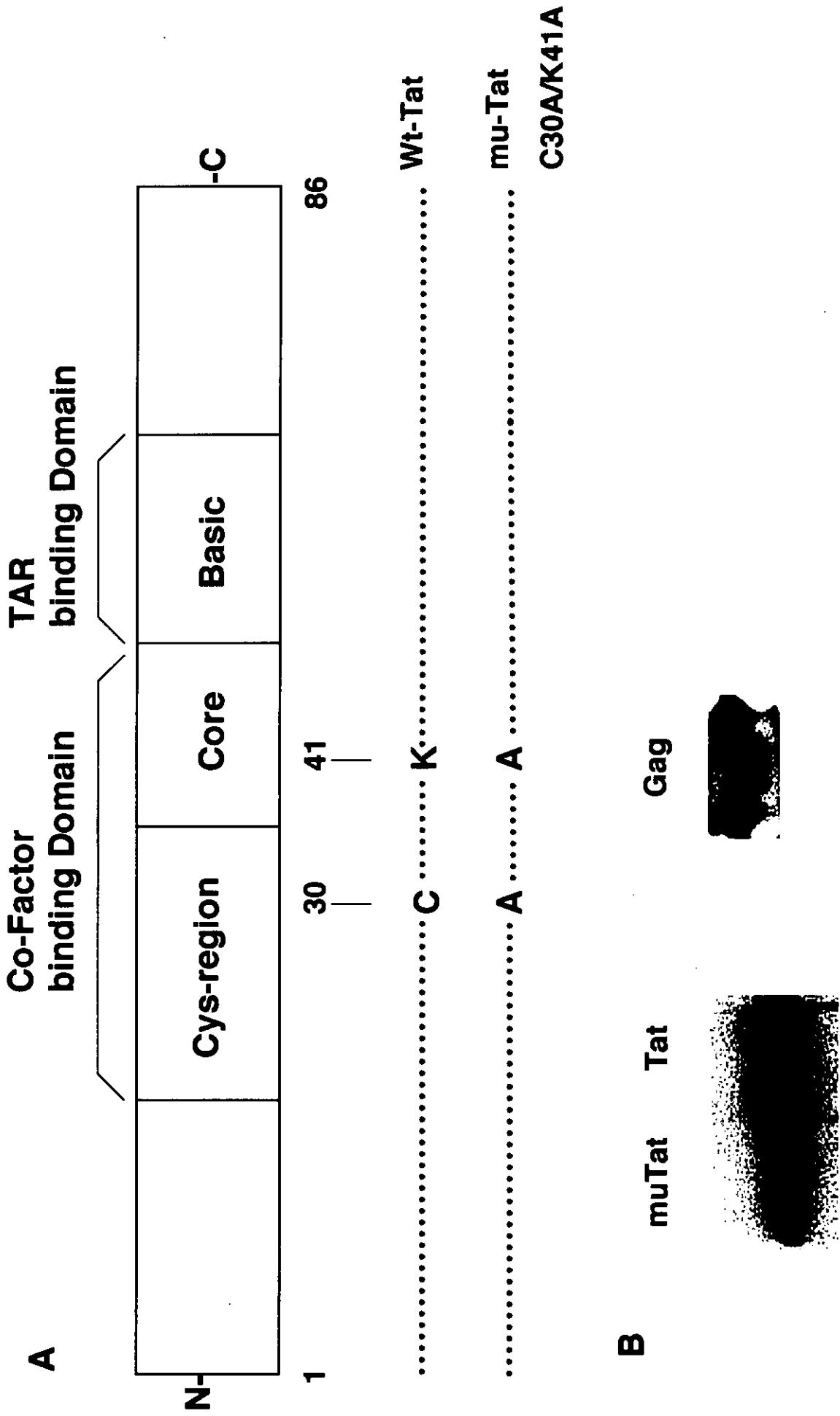


(2)



(3)

Fig. 4



**Fig.5**

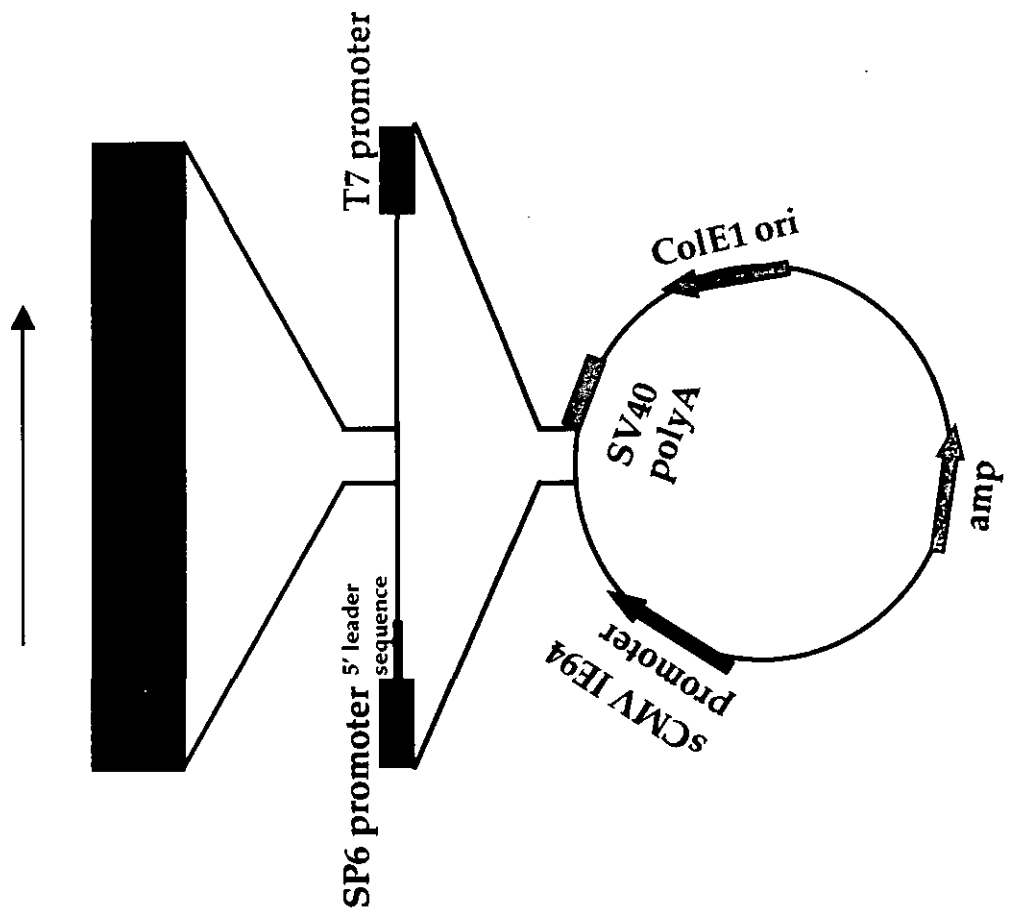


Fig. 6

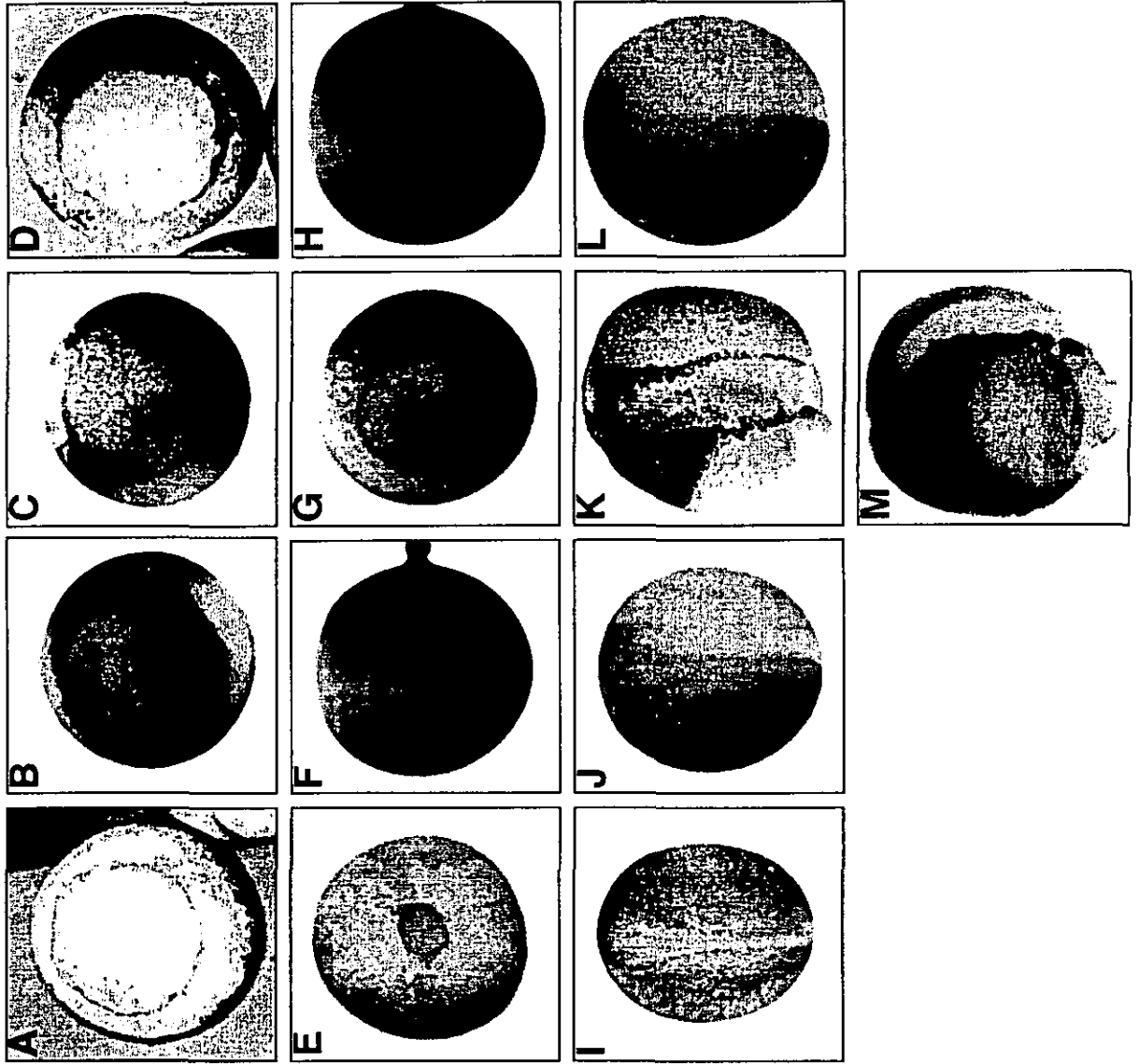


Fig.7

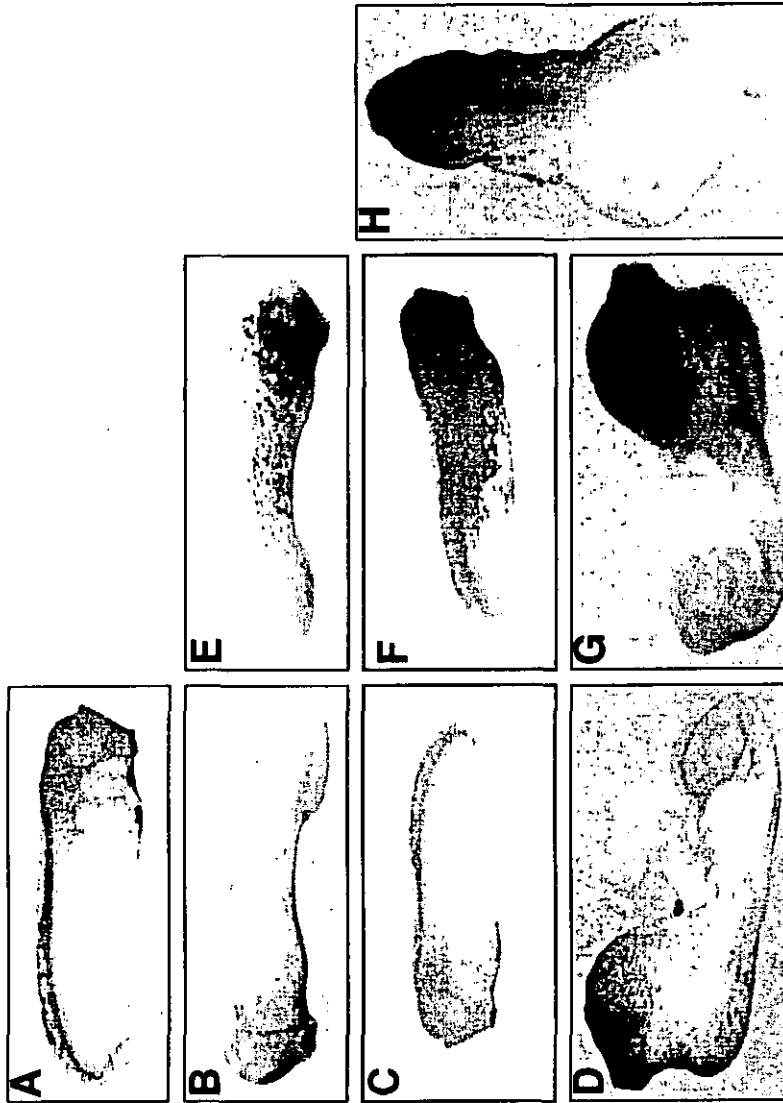


Fig.8

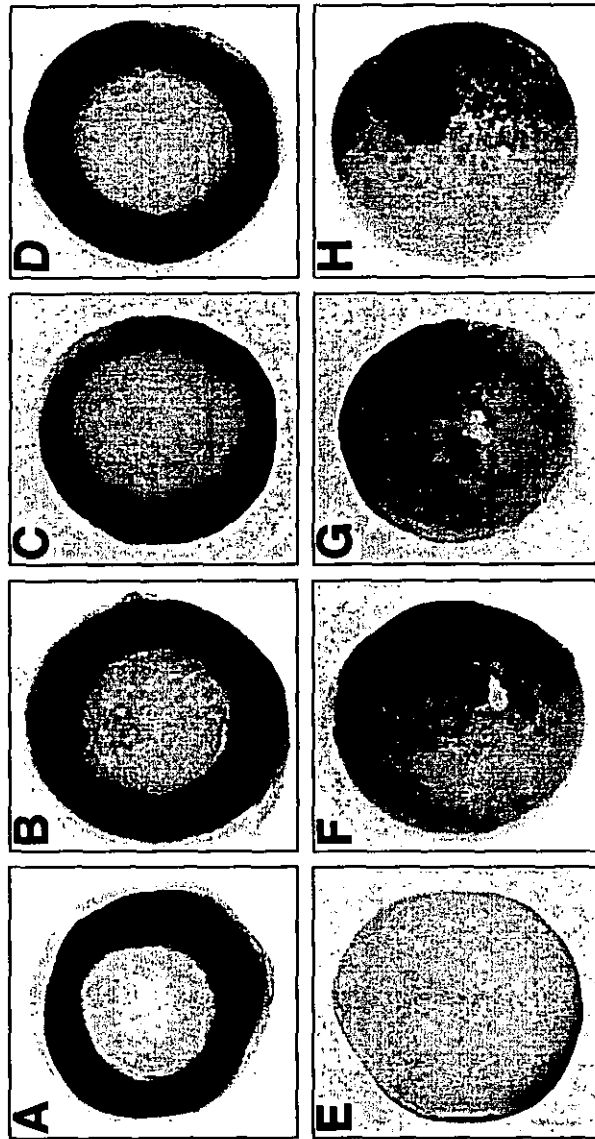
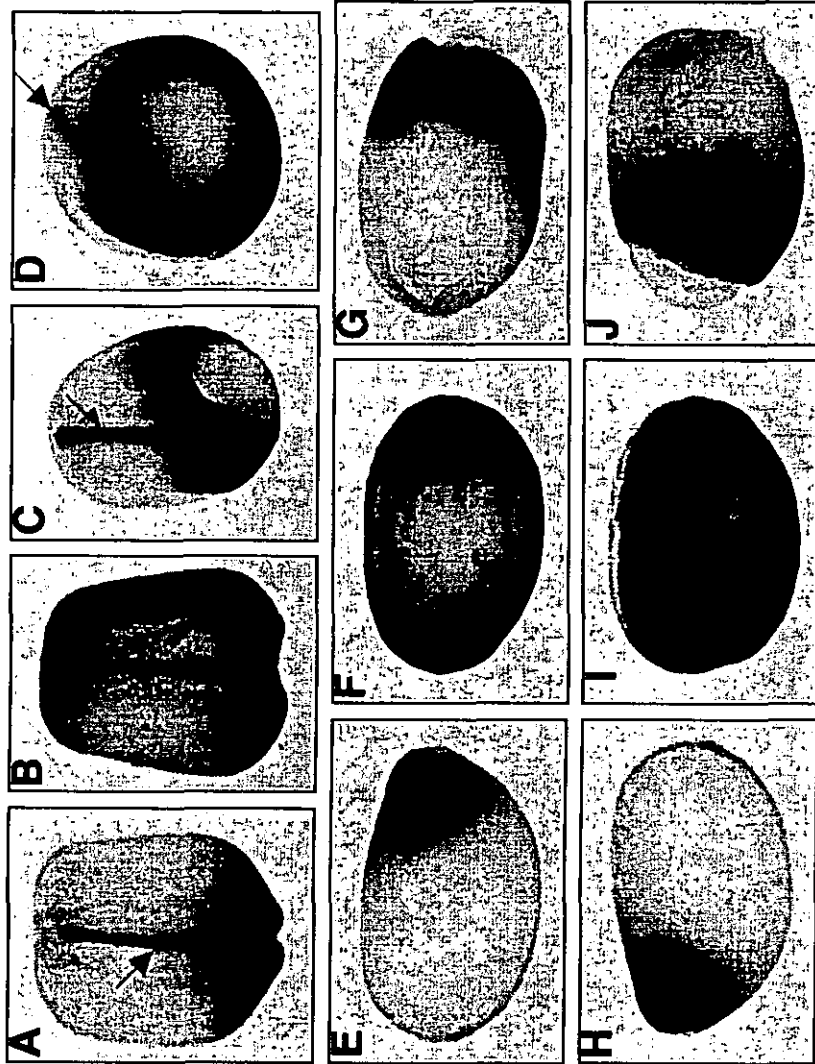
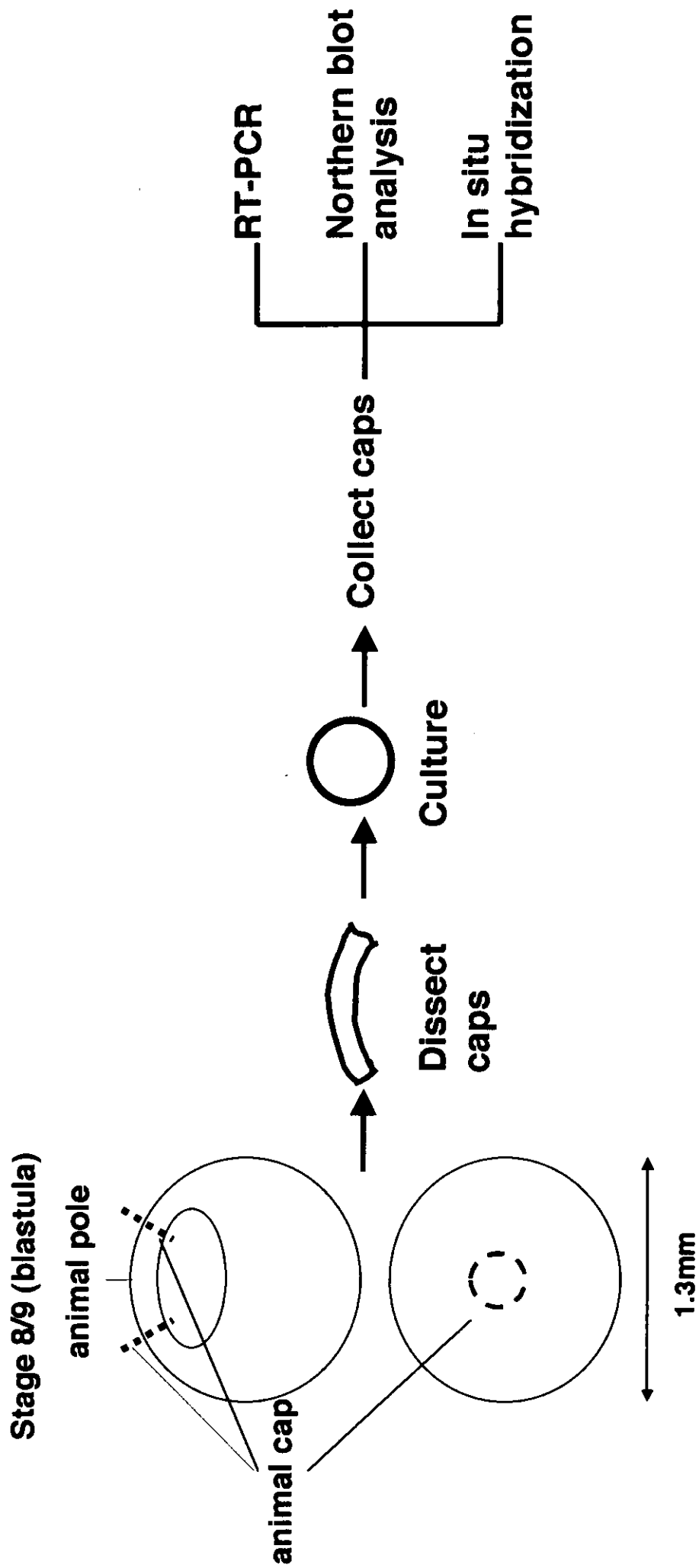


Fig.9







**Fig.11**



## ベクターを基盤とした HIV ワクチンの問題点とその実用化に関する研究

分担研究者 山本直樹 国立感染症研究所・エイズ研究センター

研究要旨:HIV/AIDS の薬剤療法や種々の予防治療法の開発及び応用により HIV/AIDS の治療が可能になってきたが従来の感染症における薬剤療法とは異なり HIV/AIDS の感染をコントロールするには新規の予防治療法の開発が必須となっている。とりわけ、効果的なワクチンの開発は HIV の感染者の増加をコントロールするのに寄与するのに明らかであるが、その実用化についてはまだめどがたたない状態である。例えばタイ国、アメリカ、カナダ、オランダで行われた臨床第 III 相の試験では残念ながら HIV Env 蛋白 gp120 ワクチンの効果が認められなかった。さらに、そのワクチンで用いられる組換え gp120 と ALVAC のプライムブーストワクチンではその免疫効果が単独ワクチン使用時と比較して疑問視され、欧米では中止されタイでもその方向性で検討され始めている。したがって動物モデルのみでなくヒト試行によっても免疫誘導能が明らかな候補ワクチンの開発は第 III 相の臨床試行を行うのに重要なポイントとなることが示唆されている。（Science 2004, Lancet 2004）従って本研究プロジェクトではそれらの視点を視野に入れた有効性と安全性が期待できるワクチン開発をめざす。

### 協力研究者

本多三男、仲宗根正、松尾和浩、浜野隆一、染谷健二、川原守、滝澤万里、泉泰之、原敬志、吉野直人、堀端重男、兼清優、浜武牧子（国立感染症研究所・エイズ研究センター）

### A. 研究目的

本年度の米国レトロウイルス会議でも明らかのように第一世代ワクチンとしての組換え Env 蛋白を抗原に用いたワクチンは臨床第

III 相試行によりワクチン効果が期待できないことが明らかにされた。このことは、HIV ワクチンの開発では従来の比較的新しい概念として確立された組換え Env 蛋白を用いたコンポーネントワクチンは機能しないことを明らかにしたものであり、HIV 感染予防ワクチンの開発の困難さを示しているといえる。さらに、プライムブーストワクチンの概念を用いた組換え蛋白+組換えベクターワクチンの免疫においてもヒトにおけるワクチン接種の免疫能の解析から第 III 相試行を行うに足る科

学的根拠としてそれまでの臨床 I, II 相の研究成果における特異免疫誘導能の結果が極めて不十分だと思われる。即ち、臨床の第 III 相におけるワクチン効果の判定を行うには臨床試行 I, II 相の十分な免疫誘導能の解析が必須条件になる。これらの点を満たすことができるワクチン開発として現在日本で行われているワクチンプロジェクトは研究を進めるのに十分価値があるかどうかという観点からすべてのワクチンプロジェクトを根本的に見直すべき時期になっている。その視点でこのプロジェクトを検証する。

## B. 研究方法

rBCG-HIV ワクチンの候補として以下の点について検討した。

1. 免疫不全動物における候補ワクチンの病原性の主な検討(例えばヌードマウス、種々の SCID マウス等の免疫機能不全動物を用いた候補ワクチンの接種による病原性の解析)
2. 通常の小動物モデルを用いた毒性の検討
3. サル(成人サル及び新生児サル)を用いた大量投与によるワクチン抗原の安全性、安定性、毒性、環境汚染、免疫誘導の解析
4. HIV/AIDS サルモデル及びマウスモデルを用いた防御免疫能の誘導とその評価
  - ① SHIV キメラウイルスを用いた HIV/AIDS 感染系によるワクチン効果の判定
  - ② ヒト組織を移植した Scid マウスを用い

## たワクチン免疫誘導能の検討

(倫理面への配慮)

所内に設置された動物実験委員会の承認を得て行われた。

## C. 研究結果と考察

HIV ワクチンの実用化には上記のワクチン効果を期待できることが重要な条件となるがそれに劣らず候補ワクチンの安全性は HIV 感染症が免疫不全を来すことから極めて重要な課題であり言い換えれば安全性の保証されないワクチンは実用化研究を行うに値しない。つまり、そのような候補ワクチンはワクチン効果を誘導する動物モデルでのポジティブコントロールとして機能することが位置づけられる。そのような観点からまず、本研究プロジェクトで標的とするプライムブーストワクチン即ち、BCG 東京株をベクターに用いた組換え BCG ワクチンとワクシニア DIs 株をベクターに用いた組換え DIs ワクチンの安全性を研究した。その結果以下のことが明らかとなった。

- 1) これまでの BCG の安全性評価法を参考にして組換え BCG 80mg (ヒト投与量の 800 ~1600 倍) の皮内接種、組換えワクシニア DIs  $5 \times 10^8$  pfu (ヒト投与量の 50 倍) の単独あるいはコンビネーションで接種し、コントロールを含めて 41 頭のサルで約半年から 1 年観察した。全ての動物はワクチン検定の様式に従って生化学的、細菌学的、ウイルス学的、分子生物学的、病理学的に解析されその安全性が使用した

ワクチン株である BCG 東京株と相違ないことを明らかにした。さらにベクターの局在や環境汚染に関する解析が行われ、それらのデータが蓄積された。そのデータと組換え BCG ワクチンの抗結核作用、組換え BCG 及び DIs ワクチンの免疫不全動物による副作用の解析結果から BCG 東京株及び DIs 株を用いた組換えワクチンは外来性遺伝子としての HIV Gag 抗原の組込みによっても親株として用いたワクチン株となら生物学的な変化を示さず、安全性に関して問題無いことを明らかにした。

ワクチン効果に関してはヒトでの臨床応用を考慮に入れてベクターのヒトでの安全性が明らかになっているヒト使用量で有効な免疫誘導能ができるかどうかを検討した。即ち組換え BCG-HIV Gag ワクチン 0.1mg 皮内接種で免疫し、組換え DIs-HIV Gag ワクチンでブースターを2度かけると ELISPOT で指標とする  $10^6$  あたり 400~600 個の抗原特異的 $\gamma$ インターフェロン産生作用の誘導が可能となった。これらのことから組換え HIV ワクチンの GLP レベルのワクチン抗原を用いてサルで感染防御が得られるレベルの免疫誘導が HIV 候補ワクチンでも誘導できることを明らかにした。

#### D. 結論

本年度の研究によって本研究プロジェクトの組換え BCG Gag + 組換え DIs-Gag によるプライムブーストワクチンのレジメンがサルレ

ベルで有効な免疫誘導能を示すのみならず、安全性においても優れていることが示唆された。

#### E. 健康危険情報

特になし。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamamoto N, Honda M. Fractionation of guinea pig leukocyte by flow cytometry using a novel MIL4/SSC parameter. *Cytometry Research*, 13(1):25-32, 2003
- 2) Izumi Y., Ami Y., Matsuo K., Someya K., Sata T., Yamamoto N., and Honda M. Intravenous inoculation of replication-deficient recombinant Vaccinia DIs expressing SIV Gag controls highly pathogenic SHIV in monkeys. *J. Virol.* 2003. 77(24):13248-13256.
- 3) Hamano, T, P. Sawanpanyalert, H. Yanai, S. Piyaworawong, T. Hara, S. Sapsutthipas, J. Phromjai, S. Yamazaki, N. Yamamoto, P. Warachit, M. Honda and K. Matsuo. Determination of HIV-1 CRF01\_AE gag p17 and env-V3 consensus sequences for HIV/AIDS vaccine design. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, in press, 2004
- 4) Matsuo K, Promkhatkaew D, Balachandra K, Hamano T, Sutthent R, Ruxrungtham R, Sittisombut N, Puthavathana P, Butraporn R,

Sriwanthana B, Boon-Long J, Nakasone T, Rugpoa S, Yamazaki S, Yamamoto N, Warachit P, and Honda M. Japan's Collaboration with Thailand in the Development of HIV/AIDS Vaccine. AIDS in ASIA, 2004. in press.

学会発表

- (1) Honda M, Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Ami Y, Someya K, Kanekiyo M, Hamano T, Horibata S, Yoshino N, Hara T, Takizawa M, Kawahara M, Kaizu M, Hamatake M, Sakai K, Shinohara K, Yamazaki S, Yamamoto N: Vaccine efficacy and safety of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) and replication-deficient vaccinia virus DIs- based HIV vaccine. 14th Joint Meeting of AIDS Panels, Japan-US CMSP, Mar.5-7, 2003, Okinawa, Japan.
- (2) Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Ami Y, Someya K, Kanekiyo M, Hamano T, Horibata S, Yoshino N, Hara T, Takizawa M, Kawahara M, Kaizu M, Hamatake M, Sakai K, Shinohara K, Yamazaki S, Yamamoto N, Honda M. Prime-boost vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin in and vaccinia strain DIs elicits protective immunity against pathogenic SHIV infection in macaques. Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program 14th Joint Meeting of AIDS Panel (March 5-7, 2003, Okinawa)

- (3) Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Ami Y, Someya K, Kanekiyo M, Hamano T, Horibata S, Yoshino N, Hara T, Takizawa M, Kawahara M, Kaizu M, Hamatake M, Sakai K, Shinohara K, Yamazaki S, Yamamoto N, Honda M. Prime-boost vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin in and vaccinia strain DIs elicits protective immunity against pathogenic SHIV infection in macaques. International Symposium on "Research and Development of Recombinant BCG and Vaccinia Virus-Based HIV Vaccine" (Feb 5-6, 2003, Tokyo)
- (4) Nakasone T, Yamamoto N, Izumi Y, Matsuo K, Ami Y, Yamazaki S, Honda M. Prime-boost vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin in and vaccinia strain DIs elicits protective immunity against pathogenic SHIV infection in macaques. 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Feb 10-14, 2003, Boston, USA)
- (5) 吉野直人、兼清優、染谷健二、松尾和浩、網康至、佐藤成大、山本直樹、本多三男  
リコンビナント DIs ワクチンの経粘膜接種への応用 第 17 回日本エイズ学会総会 (11/27-29, 2003, 神戸)
- (6) 浜野隆一、岡本尚、野内英樹、日比悠里名、高橋なを子、原敬志、山本直樹、山崎修道、本多三男、松尾和浩・Gag p17

遺伝子変異による HIV-1 CRF01\_AE 複製  
の制御 第 17 回日本エイズ学会総会  
(11/27-29, 2003, 神戸)

- (7) Someya K, Matsuo K, Sata T, Yamamoto N,  
Honda M. Abortive virus production of  
vaccinia DIs-Gag recombinant in mammalian  
cells results in efficient immune induction as a  
safe immunodeficiency virus vaccine candidate.  
15<sup>th</sup> Joint Scientific Meeting of the AIDS  
Panels, Nashville, TN, March 8-10, 2004.
- (8) Honda M, Tadashi Nakasone, Yasushi Ami,  
Yasuyuki Izumi, Kazuhiro Matsuo, Mamoru  
Kawahara, Kenji Someya, Mari Takizawa,  
Takashi Hara, Shigeo Horibata, Masaru  
Kanekiyo and Naoki Yamamoto A prime-boost  
vaccine with recombinant Mycobacterium  
bovis bacillus Calmette-Guérin and a non-  
replicating vaccinia virus recombinant:  
elicitation of long-lasting and positive  
immunity and safety study. 15<sup>th</sup> Joint Scientific  
Meeting of the AIDS Panels, Nashville, TN,  
March 8-10, 2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含  
む。）

- 1) 特許取得 無し
- 2) 実用新案登録 無し
- 3) その他 無し

## rBCG-GagE ワクチンの安全性評価に関する研究

分担研究者：佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

研究協力者：Sanya Sukpanichnant（マヒドン大学病理）

研究要旨：エイズワクチンの開発ではその有効性評価とともに安全性評価が重要である。今回 31 頭のサルを用いて、rBCG-GagE ワクチンの単独皮内投与ないし経口投与、さらにプライム・ブースト法による rDis-GagE の追加投与を行い、その接種局所および所属リンパ節、ほかの臓器組織について病変の有無を肉眼的および病理組織学的に検討した。その結果、皮内投与では対照群の BCG 東京株を投与したときに所属リンパ節の乾酪壊死病巣がみられたが、rBCG-GagE ワクチン皮内投与群では類上皮細胞肉芽腫が認められたが、乾酪壊死病変はなかった。rBCG/E-gag 接種では接種局所病変はないが所属リンパ節などに類上皮細胞肉芽腫が認められた。今回用いた全量を 10 回に分けて皮内接種を行えば、接種部位の重篤な副作用はおこらず、また全身の臓器においても類上皮細胞肉芽腫が認められることはあっても、重篤な副病変は起こらないと考えられた。剖検時にはワクチニアウイルス抗原も HIVP24 抗原も検出できず、また nested PCR 法で 1 例のリンパ節に gag 遺伝子が検出されたほかはすべて陰性であった。したがって、rBCG-GagE ワクチンは安全性において問題はないと考えられた。

### A. 研究目的

多くの努力にもかかわらず、HIV 感染者はわが国でもいまだに増加しており、さらに全世界では 4000 万人を越えた。HIV 感染者およびエイズ発症者に対し HAART が開始され、CD4 数の改善とともに免疫能が回復し、日和見感染症の発症阻止およびこれらの症状の劇的改善がもたらされ、エイズ患者の予後は著明に改善した。しかしコンプライアンスや治療のコスト、そして治療の継続性に大きな問題が残されている。一方、開発途上国での薬物治療は上記の点で大きな期待はできず、エイズの蔓延防止には感染予防に優る方法はない。HIV ワクチンは早くから開発が試みられ、すでに臨床治験も行われているものもあるが、いまだにその有効性は十分確認されていない。ワクチン開発にはその有効性のみならず、使用に当たって局所および全身における副作用がないことを確認する安全性評価は欠くことのできないものである。HIV ワクチン開発には、モデル動物としてマカク属サル

とウイルスとして HIV の代わりに SIV や SHIV を用いて、その有効性や安全性の評価に動物実験が行われており、前臨床試験としてのサル実験は重要な位置を占めている。

今回、rBCG-GagE およびワクチニア Dis 株を用いた候補ワクチンについて、カニクイサルを用いた安全性について検討することを目的とした。平成 14 年度報告書ではおもにリンパ節組織についてまとめが、今回は皮内接種群サル 24 頭および経口投与群 7 頭の計 31 頭についてリンパ節を含めた全身臓器組織の所見についてまとめて報告する。

### B. 研究方法

1) 実験動物：3-13 才のカニクイサルで、雄 10 頭、雌 21 頭の計 31 頭を用いた。

2) ワクチン候補：タイ型の Gag タンパクを発現するように組み換えた rBCG-GagE および対照として BCG 東京株、および rDis-GagE と対照として rDis-LacZ を使用した。



3) 実験スケジュール：二つの実験群に分けた。グループ1 (表1) は、rBCG-GagE および対照の BCG 東京株の一回投与群で、12 頭のサルからなっている。rBCG-GagE は 5 mg と 50 mg を各 3 頭、対照として BCG 東京株を 5 mg と 50 mg を各 2 頭のサルに右大腿に皮内接種した。ほか rBCG-GagE ワクチンを 800 mg を 2 頭のサルに経口投与した。グループ2 (表2) は、プライム・ブーストによる投与方法で 19 頭からなっている。対照として BCG 東京株と rDis-LacZ の組み合わせを、それぞれ 50 mg 皮内接種と 10<sup>8</sup>pfu 皮内接種し (計 2 頭)、また 800 mg 経口投与と rDis-LacZ を 10<sup>8</sup>pfu 皮内接種を行った (計 2 頭)。rBCG-GagE を 5 mg と 50 mg の皮内接種、および 800 mg の経口投与と rDis-GagE 10<sup>8</sup>pfu 皮内接種を組み合わせたもの各 3 頭計 9 頭、さらに rDis-GagE 10<sup>8</sup>pfu 皮内接種および rDis-LacZ 10<sup>8</sup>pfu 皮内接種のそれぞれ単独投与を各 3 頭計 6 頭に行った。グループ1 は 12 週後に、グループ2 は 12 週後と 18 週後にブースター投与を行い 24 週後に、それぞれのサルを剖検した。

表1 Group 1: Single dose

	Inoculum	Dose	Route	Monkey
Control	BCG-Tokyo	5 mg	I.D	2
	BCG-Tokyo	50 mg	I.D	2
Test	rBCG-GagE	5 mg	I.D	3
	rBCG-GagE	50 mg	I.D	3
	rBCG-GagE	800 mg	Oral	2

I.D: 接種部位に10回に分けて接種、12w(20w)後に剖検

表2 Group 2: Prime-Boost Regimen

	Inoculation	Monkeys
Control	BCG-Tokyo 50mg ID + rDis-LacZ 10 <sup>8</sup> pfu ID	2
	BCG-Tokyo 800mg Oral + rDis-LacZ 10 <sup>8</sup> pfu ID	2
Test	rBCG-GagE 5 mg ID + rDis-GagE 10 <sup>8</sup> pfu ID	3
	rBCG-GagE 50 mg ID + rDis-GagE 10 <sup>8</sup> pfu ID	3
	rBCG-GagE 800 mg Oral + rDis-GagE 10 <sup>8</sup> pfu ID	3
	rDis-GagE 10 <sup>8</sup> pfu ID, x3	3
	rDis-LacZ 10 <sup>8</sup> pfu ID, x3	3

I.D: 接種部位に10回に分けて接種、12w、18w後に追加、24wで剖検

4) 病理組織検索：麻酔薬の過剰投与と心臓からの全採血後に、それぞれのサルのワクチン接種部位、近傍の鼠径部リンパ節の状態、連続する腹腔内リンパ節、さらに腸間膜リンパ節の観察と写真撮影を行い、全身諸臓器の肉眼観察を行った。主要臓器重量を計測したのち、各臓器組織から PCR 用の凍結組織と OCT コンパウンドに包埋した凍結標本を採取し、残りをホルマリンで固定した。固定組織標本から適切な場所を切り出し、通常のごとくパラフィンに包埋した。4 ミクロンの組織切片を作製し、HE 染色と抗酸菌染色、そして BCG 抗体、必要に応じて抗ワクチニア抗体や HIVp24 抗体、およびリンパ節や脾臓では組織変化を評価する目的で、CD3, CD20(L26), HAM56(CD68) および Mac384(macrophage marker)抗体を用いて LASB 法で免疫染色を行った。組織標本は病理医二名で組織検索を行った。

5) PCR 法による検討：rBCG-gagE, 50 mg 皮内投与群のサルで、12 週および 24 週で剖検したもの計 6 頭について gagE を検出する nested PCR 法を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験委員会の許可を得ている。

### C. 研究結果

1 回投与方法と prime-boost 法による候補ワクチン投与方法では組織病変には大差がみられなかったため、各候補ワクチン接種による組織所見を下記のごとくまとめた。

1) rDis/LacZ ないし rDis/E-gag 皮内投与群 (各 3 頭、計 6 頭)

それぞれ 3 頭に皮内接種した。全身諸臓器組織には目立った組織変化は認められなかった。しかし、それぞれのサルにはいくつかの組織所見が認められた。両群ともにリンパ節の反応性変化および腎臓、肝臓、甲状腺にリンパ球の浸潤巣がみられたほか、rDis/LacZ 投与群では、脾臓の腫大が 1 例、異型子宮内膜組織病変が 1 例で、rDis/E-gag 投与群では、筋

肉内に好酸球の浸潤巣が1例に認められた(図1)。

図1.

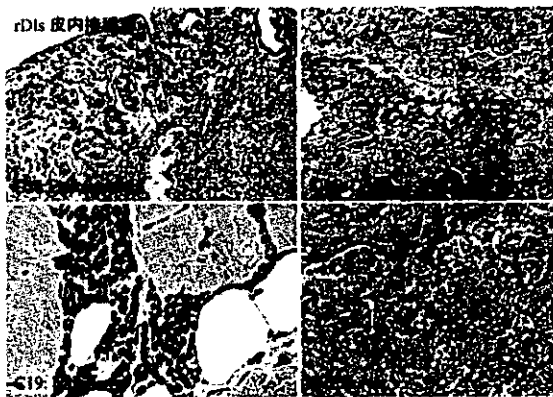


図2.

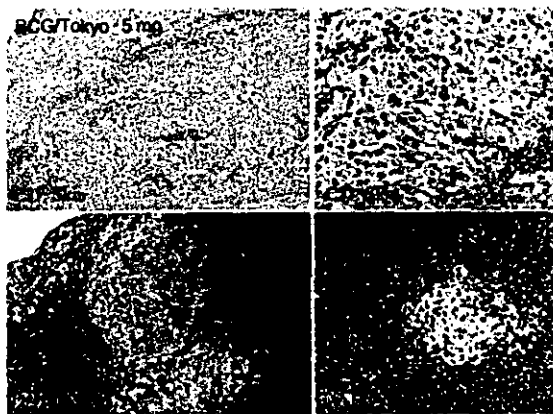


図3.

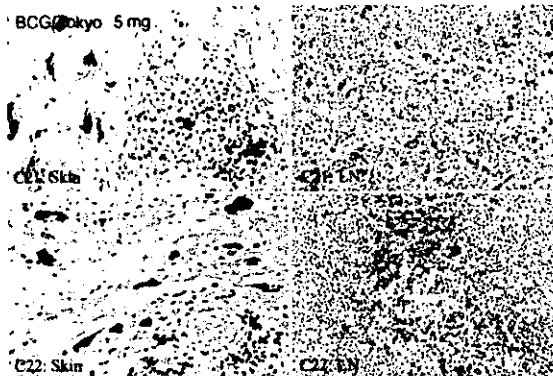


表3

rDis 皮内接種群

接種	主要所見	副所見
1) rDis/LacZ (C15, C16, C17)	特になし	リンパ節の混合型反応性変化 脾腫(C15)、リンパ球浸潤(C15、 C16: 肝臓、腎臓、甲状腺)、 子宮内膜高度異形成(C16)
2) rDis/E-gag (C18, C19, C20)	特になし	リンパ節の混合型反応性変化 筋内の好酸球浸潤(C19)、リン パ球浸潤(C20: 腎臓)

これらの副所見は投与された物質とは直接的な関連性はない偶発的な所見と考えられた。接種皮膚標本を抗ワクチニア抗体で免疫染色したが、抗原陽性所見はいずれのサルにおいても認められなかった。したがって rDis/LacZ および rDis/E-gag による組織変化はないと考えられた(表3)。

2) BCG/Tokyo 株皮内投与群(各2頭、計6頭)

a) BCG/Tokyo 株 5 mg 皮内投与群では接種皮膚に類上皮細胞肉芽腫が1頭にみられた。肉芽腫内には壊死はなく、BCG 抗体を用いた免疫染色でも陰性であった(図2)。リンパ節の辺縁洞に BCG 抗原陽性の組織球が、またリンパ濾胞内の胚中心に網目状の BCG 抗原反応が認められた。PPD 接種した眼瞼組織には BCG 抗原陽性の組織球が慢性炎症所見とともにみられた(図3)。他の臓器組織には肉芽腫はみられなかった。

b) BCG/Tokyo 株 50 mg 皮内投与群では、そけいリンパ節に乾酪壊死病変が2頭にみられ、また顎下リンパ節、皮膚、肝臓に類上皮細胞肉芽腫が認められた。BCG 抗原は眼瞼組織、リンパ節の辺縁洞の組織球に陽性であった(図4)。ほか、リンパ球浸潤巣が肝臓や腎臓にみられた。

c) BCG/Tokyo 株 50 mg 皮内投与に加えて rDis/LacZ を追加投与した群では、1頭のそけいリンパ節に乾酪壊死病変があり BCG 抗原も陽性となった。肝臓や腎臓にリンパ球浸潤巣がみられ、1頭の骨髄の過形成や肺に寄生虫感染が認められた。(図5)

対照として用いた BCG/Tokyo 株では接種部位の所属リンパ節に乾酪壊死を伴う類上皮細胞肉芽腫がみられ、量を増やすと顎下リンパ節や肝臓に肉芽腫が広がっていた。リンパ節では BCG 抗原が辺縁洞やリンパ濾胞内に認められた。PPD 接種した部位では組織球を中心として炎症性細胞浸潤とともに BCG 抗原陽性組織球が認められた。ほかの臓器における組織球やリンパ球浸潤は非特異的な所見と考えられた(表4)。

図 4.

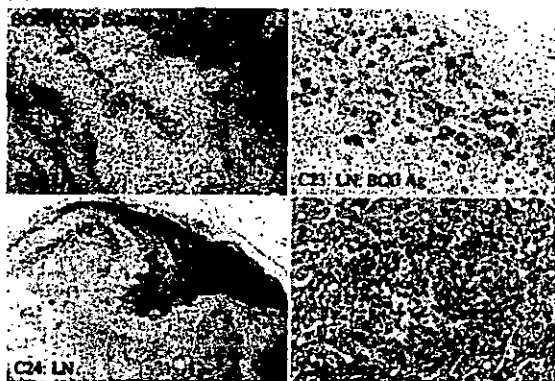


図 5.

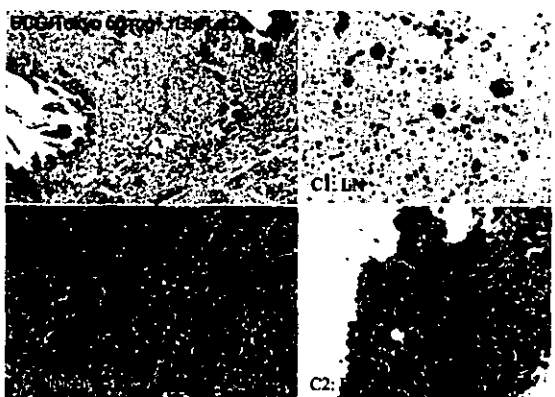


図 6.

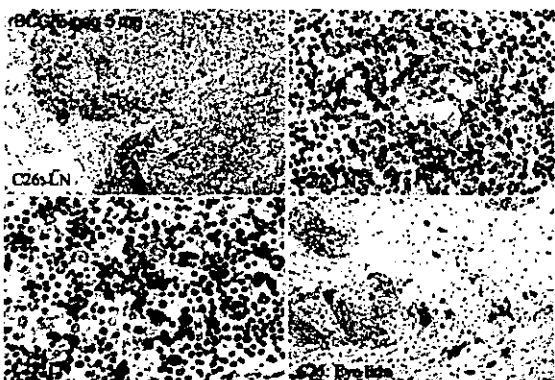


表4 BCG/Tokyo株皮内接種群:10箇所に分けて接種

接種	主要所見	副所見
1) BCG/Tokyo 5 mg (C21, C22)	腫上皮細胞肉芽腫 (リンパ節、皮膚; C21, C22) 皮膚病変なし	BCG抗原:リンパ節の辺縁洞 (C21, C22)と胚中心(C22) PPD接種陽性 リンパ球浸潤、膿瘍(腎臓、肝臓)、 扁桃のOC、子宮内膿瘍
2) BCG/Tokyo 50 mg (C23, C24)	乾酪壊死を伴う腫上皮細胞肉芽腫(リンパ節; C23, 24) 腫上皮細胞肉芽腫(皮下リンパ節; C21, C22, 肝臓; C24) 皮膚病変なし	BCG抗原:リンパ節の辺縁洞 (C23)、PPD接種陽性 リンパ球浸潤、膿瘍(肝臓、腎臓; C23, C24)、組織球浸潤(肺; C24)
3) BCG/Tokyo 50 mg + rDIs/LacZ (C1, C2)	乾酪壊死を伴う腫上皮細胞肉芽腫(リンパ節; C1) 皮膚病変なし	リンパ球浸潤、膿瘍(肝臓、腎臓、心臓、膀胱; C1, 2) 寄生虫感染(肺; C1) 組織球浸潤(脾臓; C2)

3) rBCG/E-gag 皮内投与群 (各 6 頭計 12 頭)

a) rBCG/E-gag を 5 mg 皮内投与した群 (6 頭) では、とくに類上皮細胞肉芽腫はみられなかった。しかし、リンパ節や眼瞼組織には BCG 抗原陽性の組織球がみられた。リンパ節では辺縁洞内の組織球の細胞質に抗原が陽性で、眼瞼組織では組織球に陽性となった (図 6)。また rDIs/E-gag を追加投与群 (3 頭) では同様にリンパ節の辺縁洞内に BCG 抗原陽性組織球があった。ほか膀胱ラ氏島の硝子化 (1 頭)、子宮内膜症 (1 頭)、延髄の血管周囲性リンパ球浸潤 (1 頭) がみられた。(表 5)。

表5 rBCG/E-gag, 5 mg, 皮下接種群

接種	主要所見	副所見
1) rBCG/E-gag 5 mg (C25, 26, 27)	それ以外のリンパ節に小肉芽腫 (C27)	BCG抗原:皮下リンパ節(C26, C27)、眼瞼 (C25, C26, C27) リンパ球浸潤、膿瘍(腎臓、甲状腺; C26) リンパ節T領域の反応性変化
2) rBCG/E-gag 5 mg + rDIs/E-gag (C29, 30, 31)	特になし	BCG抗原:リンパ節辺縁洞(C29) リンパ球浸潤、膿瘍(腎臓; C29、肝臓; C30) 脾臓の胚中心の拡大(C29, C30, C31) リンパ節のT領域および混合器反応性変化 膀胱ラ氏島の硝子化(C29)、子宮内膜症 (C29)、延髄の血管周囲性リンパ球浸潤、

b) rBCG/E-gag を 50 mg 皮内投与した群 (6 頭) では、接種部位の皮膚組織に類上皮細胞肉芽腫はないが炎症性肉芽組織変化があり、組織球に BCG 抗原が陽性であった。また所属リンパ節の濾胞内胚中心に網目状の BCG 抗原が検出できた (図 7)。リンパ節は反応性変化を示していた。肝臓や腎臓にリンパ球浸潤巣がみられた。また rDIs/E-gag を追加投与群 (3 頭) では、リンパ節の胚中心に BCG 抗原が網目状に陽性 (2 頭) みられ、リンパ節は反応性変化を示し、肝臓、腎臓、副腎、骨髄、耳下腺にリンパ濾胞を伴ったリンパ球浸潤が 2 頭に、腎臓尿細管の石灰化、肺の好酸球性肉芽腫 (寄生虫) が 1 頭に認められた (図 8)。(表 6)。

rBCG/E-gag を 5 mg ないし 50 mg 皮内投与した群および rDIs/E-gag を追加投与群においては、後者の影響は接種部位でのワクチニアウイルス抗原もみられず、前者による組織変化のみ認められた。

4) 経口投与群 (計 7 頭)

a) BCG-Tokyo 株 800 mg 経口投与群 (計2頭) では、肉芽腫性変化は認められず、肝臓や顎下リンパ節にちいさなリンパ球浸潤、気管支粘膜にリンパ濾胞を伴うリンパ装置の腫大、脾臓の白脾髄の腫大があり、1頭ではリンパ節の傍皮質(T細胞領域)域の腫大がみられた。

図7.



図8.

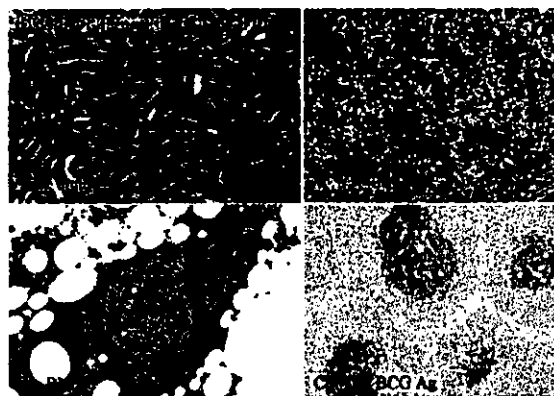


表6

rBCG/E-gag, 50 mg, 皮下接種群

接種	主要所見	副所見
1) rBCG/E-gag 50 mg (C5, 6, 28)	特になし	BCG抗原:リンパ節中心(ソケイリン) C6, C28)、皮下接種部位(肉芽腫: C5, Cリンパ球浸潤、腫大(腎臓、肝臓: C5, C6, C28)、リンパ節T領域の反応性変化、脾臓T中心の変化(硝子化、蓄積)
2) rBCG/E-gag 50 mg + rDis/E-gag (C7, 8, 9)	特になし	BCG抗原:リンパ節中心(C8, C9)リンパ球浸潤、腫大(耳下腺、腎臓)、リンパ濾胞形成(腎臓、耳下腺、骨髄: C8, 脾臓: C9)、尿細管の石灰化(腎臓: C7)、脾臓のT中心拡大(C8)、脾臓の好酸球性肉芽腫(C9、寄生虫?) 混合型リンパ節反応性変化

b) rBCG/E-gag, 800 mg 投与群 (計2頭) で

は、類上皮細胞肉芽腫が1頭の腭周囲リンパ節にみられたほか、BCGの免疫染色でリンパ濾胞や辺縁洞に抗原が検出できた(図9)。ほか、寄生虫による好酸球性肉芽腫、リンパ節の混合型ないしT細胞型反応病変、脾臓や大腸のリンパ装置に二次濾胞の腫大が認められた。

c) rBCG/E-gag, 800 mg 経口および rDis/E-gag 皮内投与群 (計3頭) では、とくに類上皮細胞肉芽腫は認められなかった。肝臓や腎臓に小リンパ球浸潤巣、混合型ないしB細胞型のリンパ節の反応性変化、脾臓の白脾髄の腫大、脾の脂肪浸潤が認められた。

対照とした BCG-Tokyo 株 800 mg 経口投与群では類上皮細胞肉芽腫は認められなかったが、rBCG/E-gag, 800 mg 投与群の1頭で腭周囲リンパ節に壊死のない類上皮細胞肉芽腫がみられたのみであった。一部のサルでは経口

図9.

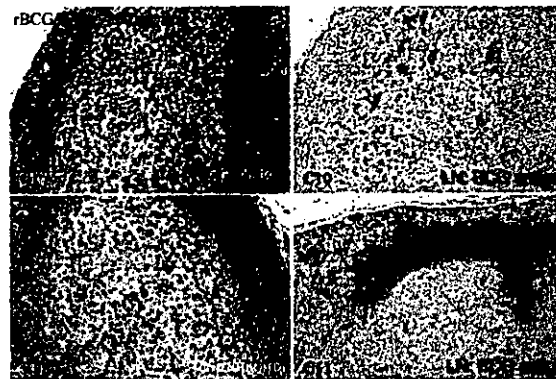


表7 経口投与群

接種	主要所見	副所見
1) BCG-Tokyo, 800 mg, (C3, C4)	特になし	肝、顎下腺のリンパ球浸潤、肺血管支脈のリンパ管腫大、白脾髄の腫大、リンパ節T領域拡大
2) rBCG/E-gag, 800 mg, (C10, C11)	類上皮細胞肉芽腫(腭周囲リンパ節)	リンパ節のBCG抗原陽性、脾の寄生虫性肉芽腫、リンパ節混合型変化、白脾髄と大腸リンパ装置の腫大
3) rBCG/E-gag, 800 mg + rDis/E-gag, i.d. (C12, C13, C14)	特になし	肝、腎のリンパ球浸潤、白脾髄の腫大、リンパ節B細胞領域の拡大、脾の脂肪浸潤

投与によりリンパ節へ病変を作るが、大部分では特異的所見はみられなかった。(表7)

5) HIVP24 抗原および PCR 法による gag の検出

HIVP24 抗原は gag 蛋白にコードされている