

をクローニングした。さらに、我々の研究により、ヒトのin vitroにおけるDPPDに対する末梢血Tリンパ球のIL-2産生能や増殖反応において特異性が示唆された(DPPDはヒトのskin testでPPD以外の蛋白では唯一反応をおこす蛋白であり、他に報告はない)。上記のDPPD大量産生法の開発及びskin testの極めて鋭敏なアッセイ法の開発によりDPPD skin testのヒトでの第I相臨床試験が可能となる。

F. 研究発表

(1) 論文発表

Marugame T, Sobue T, Nakayama T, Suzuki T, Kuniyoshi H, Sunagawa K, Genka K, Nishizawa N, Natsukawa S, Kuwahara O, Tsubura E.: Filter cigarette smoking and lung cancer risk: a hospital-based case-control study in Japan. Br J Cancer. 2004;90(3):646-51.

表1

目的

BCG接種歴のある被験者での結核感染の有無を検査するNC001(QF-2G)の臨床上(体外診断薬)の有用性を評価する

- a) 結核菌暴露のリスク要因が確認されないBCG接種歴のある被験者群におけるQuantIFERON-2Gの特異度の評価。
- b) 培養法で確認された結核患者群におけるQuantIFERON-2Gの感度の評価。
- c) ツ反応強陽性小児群におけるQuantIFERON-2Gの陽性率の評価。
- d) QuantIFERON-2G、QuantIFERON-TB及びツ反応検査の性能比較。

表2

2群被験者
n=44

	女性 n=17		男性 n=27	
	ESAT-6	CFP-10	ESAT-6	CFP-10
平均	6.416	2.329	3.042	2.714
標準偏差	8.093	4.896	4.882	4.483

Age (years)	No. IFN- γ tested	No. IFN- γ positive	% IFN- γ positive	No. Mantoux tested	No. Mantoux positive >5	% Mantoux positive	>10	%
21-30	2			1	1	100.0	1	100.0
31-40	8			8	8	100.0	8	100.0
41-50	7			6	6	100.0	6	100.0
51-60	7			7	7	100.0	7	100.0
61-70	10			10	10	100.0	8	80.0
71-80	7			6	6	100.0	5	83.3
>80	3			3	3	100.0	2	66.7

表3

1群被験者
n=63

	女性 n=59		男性 n=4	
	ESAT-6	CFP-10	ESAT-6	CFP-10
平均	0.0013	0.0003	-0.0337	-0.036
標準偏差	0.061	0.105	0.019	0.015

Age (years)	No. IFN- γ tested	No. IFN- γ positive	% IFN- γ positive	No. Mantoux tested	No. Mantoux positive	% Mantoux positive
18 - 20	48			48	47	97.9
21 - 31	14			14	13	92.9

G1 No. Mantoux+: >5 =

表4

Cutoff

Cut off (IFN- γ IU/mL)	ESAT-6		CFP-10		ESAT-6 and/or CFP-10	
	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Sensitivity (%)
0.05	90.5	79.6	90.5	72.7	84.1	90.9
0.10	95.2	75.0	92.1	63.6	88.9	84.1
0.15	96.8	72.7	95.2	56.8	93.7	81.8
0.20	98.4	68.2	95.2	56.8	95.2	79.6
0.25	98.4	68.2	95.2	52.3	95.2	79.6
0.30	98.4	68.2	96.8	52.3	96.8	79.6
0.35	100.0	68.2	98.4	52.3	98.4	79.6
0.40	100.0	68.2	98.4	50.0	98.4	79.6
0.45	100.0	68.2	98.4	47.7	98.4	77.3
0.50	100.0	65.9	100.0	47.7	100.0	77.3

図1

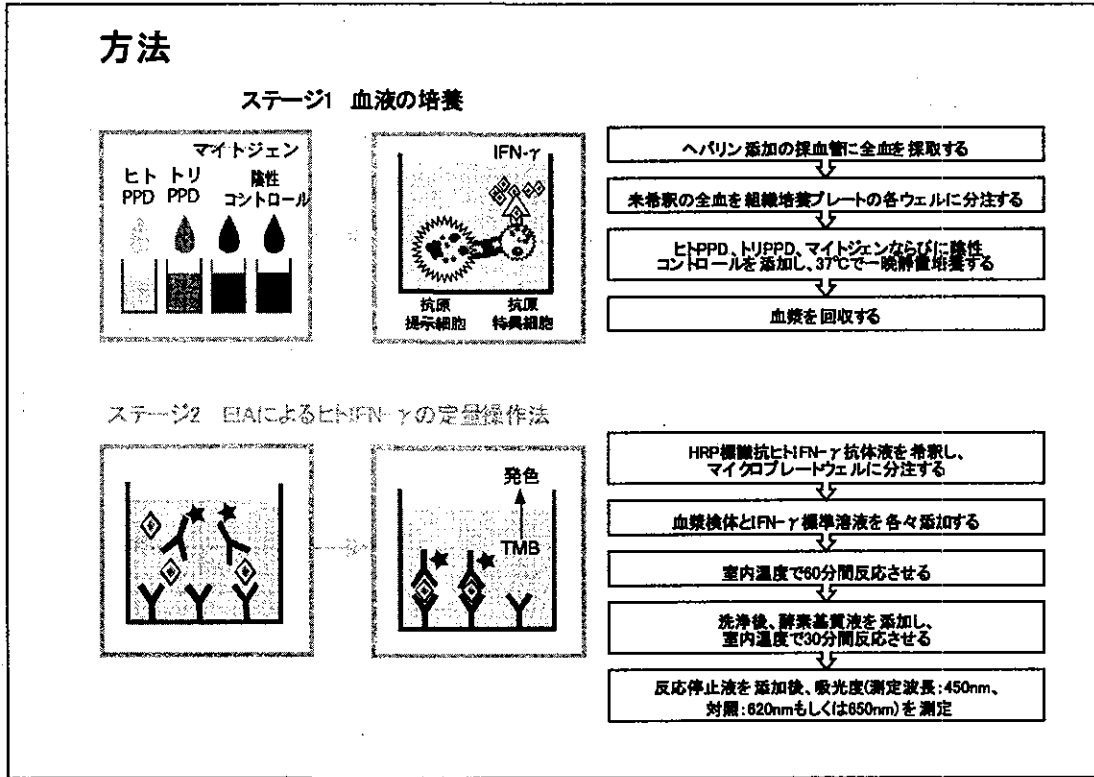
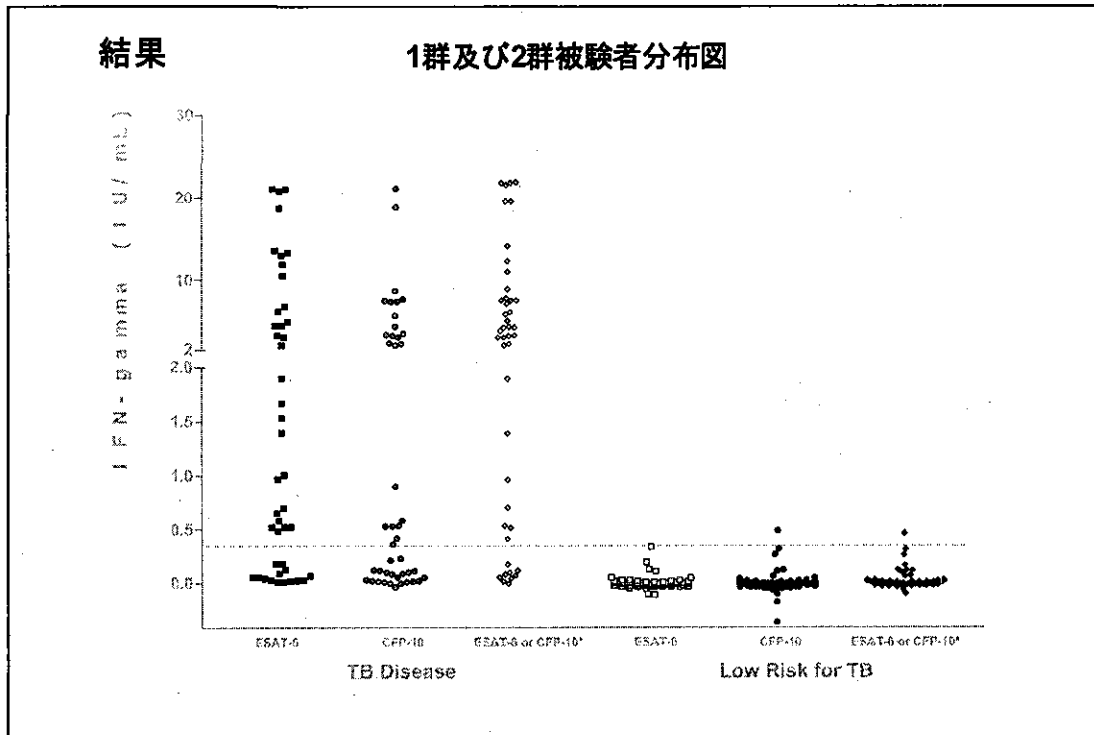


図2



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・開発の研究に関する研究

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 助教授

研究要旨

結核菌の感染防御免疫で主要な役割を演じているIL-12を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rBCGはIL-12を可溶性の蛋白質として産生していた。

また、チミン要求性を指標とした、薬剤耐性遺伝子をマーカーとして使用しないBCG宿主—ベクター系構築のため、BCG thyA欠損株の作成をおこない、thyA欠損株の候補株を得た。

A. 研究目的

結核菌の感染防御においては細胞性免疫が重要であるが、IL-12は細胞性免疫を正に制御する中心的なサイトカインである。主任研究者岡田博士と分担研究者吉田博士によるこれまでの研究の結果、IL-12 DNAワクチンが結核菌の感染防御に著効であることが示されている。宿主の中でBCGからIL-12を産生させることができれば、単独使用あるいはIL-12 DNAワクチンとの併用でさらに著効な結核ワクチンとなることが期待できる。

ところで、これまでにrBCGのベクターの保持の指標にカナマイシン耐性遺伝子を用いてきたが、実用化を考えた場合に、薬剤耐性遺伝子を用いないことが望ましい。このためチミン要求性を選択マーカーとしたBCG宿主—ベクター系を構築する。

B. 研究方法

IL-12サブユニットp35とp40のcDNAをin frameでタンデムにつないだ融合遺伝子を、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抗IL-12抗体によるウエスタンブロットにより評価を行う。

チミン要求性を指標とした新規BCG宿主—ベクター系を構築するため、チミジン合成に関与する酵素thymidylate synthaseの遺伝子thyA欠損株を作成する。ターゲットベクターとして、遺伝子内部を欠損したthyAとスクロース感受性遺伝子sacB及びカナマイシン耐性遺伝子aphIIを乗せた自殺ベクターを構築する。このプラスミドをBCGに導入し、カナマイシン耐性を指標として、相同組み換えによりゲノム上のthyA隣接領域にプラスミドDNA（thyA、sacB、aphII）が挿入された株を得る。次に得られた株をチミン含有、スクロース含有、カナマイシン不含有培地で継代するこ

とにより、再度相同組み換えを起こし、変異型thyAのみを有する株、すなわちthyA欠損株を得る。

C. 研究結果

マウスIL-12サブユニットp35とp40の融合遺伝子が組み込まれたプラスミドでBCG Tokyo株を形質転換することにより、IL-12遺伝子保有rBCGが得られた (IL-12/rBCG)。このrBCGを継代培養した後、菌体を超音波破碎し、遠心後の上清を電気泳動後、抗IL-12抗体 (抗p70抗体) と反応させたところ、IL-12/rBCGに特異的なバンドが検出された。分子量もIL-12の分子量と一致しており、この蛋白質がIL-12と推定された。ヒトIL-12についても同様に構築したプラスミドを用いてrBCGの作成をおこない、複数のクローンを得た。しかし、野生株に比し発育が遅く、現在解析のための継代培養をおこなっているところである。

thyA欠損株の作成については、まず、Tokyo株ゲノムよりthyA領域約5 kbpのDNA断片を大腸菌のプラスミドにクローニングした。次にthyA ORF部分を削除し (変異型thyA)、thyA領域DNA断片に隣接してsacB及びaphIIを挿入した。次にBCG Tokyo株をこのプラスミド (自殺ベクター) で形質転換し、カナマイシン含有培地で生育させた。その結果得られた32株を調べたところ、ゲノムのthyA領域に正しく組み込まれた2株を得た。両株はカナマイシン及びシュークロース含有培地上では発育することができず、カナマイシン耐性シュークロース感受性の性状を示した。次にこれらの株をカナマイシン非含有シュークロース含有培地で発育させたところ、多数の集落を得た。PCR法で確認したところ、そのほとんどは2回目の相同組み換えを起こさずにシュークロース耐性となった

株、及び野生型へ戻った株であった。他に相同組み換えを起こし、変異型thyAに入れ替わったと推測される株を3株得た。現在確認作業をおこなっている。これと並行し、プラスミドの作成のためにMycobacterium smegmatisのthyA遺伝子をクローニングした。クローニングしたthyA遺伝子が機能的であることを大腸菌チミジン要求株で確認した後、大腸菌—抗酸菌シャトルベクターの構築をおこなった。

D. 考察

これまでにIL-12産生rBCGの作成をおこなってきた。従来は2つのサブユニットp35とp40をそれぞれ単独の蛋白質として発現するように構築をおこない、いずれもIL-12遺伝子を保有するBCGの作成をおこなうことができた。しかし、検出できる量のIL-12を産生する株は得られなかった。今回p35とp40を融合蛋白質とすることによりIL-12を発現させることができた。通常蛋白質の分子量が大きくなるほど異種の蛋白質の発現は悪くなることから、今回のIL-12の産生はp35とp40の融合蛋白質が構造的に安定していることによることが一因ではないかと推測された。

thyA欠損株の作成については今回得られた株の最終的な確認がまだ出来ておらず、早急な解析が必要である。

E. 結論

マウスIL-12を効率よく産生するrBCGを作成した。今後主任研究者らによって動物実験に供される予定である。また、thyA欠損株候補株が得られた。

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. Kamijo K, Ohara N, Abe M, Uchimura T, Hosoya H, Lee J-S, Miki T. Dissecting the role of Rho-mediated signaling in contractile ring formation. submitted.
2. Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, Ohara N, Kaneda Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Inoue Y, Takemoto Y, Naito M, Yamada T, Matsumoto M, McMurray DN, Dela Cruz EC, Tan EV, Abalos RM, Burgos JA, Gelber R, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M, Okada M. (2005) Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine*. in press.
3. Sato K, Sakai E, Veith PD, Shoji M, Kikuchi Y, Yuki take H, Ohara N, Naito M, Okamoto K, Reynolds EC, Nakayama K. Identification of a new membrane-associated protein which influences transport/maturation of gingipains and adhesions of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.* in press.
4. Kikuchi Y, Ohara N, Sato K, Yoshimura M, Yuki take H, Sakai E, Shoji M, Naito M, Nakayama K. (2005) The novel stationary-phase-upregulated protein of *Porphyromonas gingivalis* influences the production of superoxide dismutase, thiol peroxidase and thioredoxin. *Microbiology*. 151: 841-853.
5. Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim YH, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M, Koide Y. (2004) Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and MPB/MPT51. *Infect. Immun.* 72: 2014-2021.
6. Shoji M, Naito M, Yuki take H, Sato K, Sakai E, Ohara N, Nakayama K. (2004) The major structural components of two cell surface filaments of *Porphyromonas gingivalis* are matured through lipoprotein precursors. *Mol. Microbiol.* 52: 1513-1525.
7. Saito K, Ohara N, Hotokezaka H, Fukumoto S, Yuasa K, Naito M, Fujiwara T, Nakayama K. (2004) 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.* 279: 13555-13563.

(2) 学会発表

1. Ohara N, Saito K, Yoshimura M, Hotokezaka H, Ohara N, Nakayama K. (2004) Effect of mycobacterial infection to osteoblast in vitro osteoclastogenesis. Fortieth Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program. (Kyoto) Program & Abstracts p.130.
2. Okada M, Tanaka T, Kuwayama S, Yoshida S, Kita Y, Kanamaru N, Muraki Y, Hashimoto S, Kaneda Y, Ohara N, Yamada T, Inoue Y, Matsumoto M, Gelber R, Tan VE, Dela Cruz EC, Abalos RM, Young LJ, Burgos JA, McMurray, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M. (2004) Novel vaccination (HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA and recombinant 72f BCG) against tuberculosis using cynomolgus monkey and plan for clinical trial. Fortieth Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program. (Kyoto) Program & Abstracts p.142.
3. Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, Ohara N, Kaneda Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Inoue Y, Takemoto Y, Naito M, Yamada T, Matsumoto M, Dela Cruz EC, Tan EV, Abalos RM, Young LJ, Burgos JA, Gelber R, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M, Okada M. (2004) Novel (recombinant BCG-and DNA-) vaccination against tuberculosis using cynomolgus monkey. Fourth World Congress on Vaccines and Immunisation. (Tokyo)
4. Kamijo K, Ohara N, Niiya F, Lee J-S, Miki T. (2004) Essential roles of a Kinesin-RhoGAP-RhoGEF complex in cleavage furrow formation and ingression in mammalian cells. 2004 Summer Meeting on Cytokinesis, American Society for Cell Biology. (Burlington, VT)
5. 大原直也, 菊池有一郎, 庄子幹郎, 佐藤啓子, 吉村満美子, 内藤真理子, 中山浩次: 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の *sod* は *OxyR* に支配される, 第 77 回日本細菌学会総会, 大阪, 4 月 {日本細菌学雑誌, 59, 164, 2004}
6. 菊池有一郎, 大原直也, 雪竹英治, 吉村満美子, 庄子幹郎, 内藤真理子, 中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* の新規低分子蛋白 (*SipA*) と酸化ストレス応答蛋白との関係について, 第 77 回日本細菌学会総会, 大阪, 4 月 {日本細菌学雑誌, 59, 164, 2004}
7. 庄子幹郎, 内藤真理子, 雪竹英治, 佐藤啓子, 大原直也, 中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* の主要線毛蛋白のリポ蛋白中間体の発現, 第 77 回日本細菌学会総会, 大阪, 4 月 {日本細菌学雑誌, 59, 168, 2004}
8. 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 77 回日本細菌学会総会, 大阪, 4 月 {日本細菌学雑誌, 59, 191, 2004}

9. 青枝大貴, 鈴木美奈, 永田年, 大原直也, 小出幸夫: peptide library と retroviral library による結核菌由来 MPT51 分子の T 細胞エピトープの同定, 第 77 回日本細菌学会総会, 大阪, 4月 {日本細菌学雑誌, 59, 307, 2004}
10. 吉村満美子, 大原直也, 中山浩次: Porphyromonas gingivalis 感染による末梢血単球の分化への影響, 第 46 回歯科基礎医学会学術大会, 広島, 9 月 {Journal of Oral Biosciences, 46, 481, 2004}
11. 佐藤啓子, 坂井詠子, 庄子幹郎, 菊池有一郎, 大原直也, 内藤真理子, 中山浩次: porT mutant of Porphyromonas gingivalis, 第 46 回歯科基礎医学会学術大会, 広島, 9 月 {Journal of Oral Biosciences, 46, 487, 2004}
12. 松尾謙一郎, 内藤真理子, 佛坂齊社, 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: PLC 阻害剤はアムホテリシン B による TLR2 依存性 NF- γ B 活性化を抑制する, 第 46 回歯科基礎医学会学術大会, 広島, 9 月 {Journal of Oral Biosciences, 46, 489, 2004}
13. 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及びモルモット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 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 福岡, 12 月 {第 33 回日本免疫学会総会・学術集会記録 34, 303, 2004}
14. 大原直也: Antigen protein from bacillus Calmette-Guerin and novel

vaccine candidates against tuberculosis. シンポジウム「熱帯病制圧にむけた製品開発」第 29 回日本熱帯医学会九州支部大会, 長崎, 2005。

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 感染免疫 講師

研究要旨

HVJエンベロープ結核DNAワクチン（Hsp65+IL-12/HVJ）で免疫したカニクイザルは、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、長期生存を続けており、Hsp65+IL-12/HVJワクチンの有効性を明確に示している。GMPレベルでの生産方法が確立しているHVJエンベロープを用いた結核DNAワクチン

（Hsp65+IL-12/Env）の評価試験を開始した。特筆すべき結果として、マウス動物実験においてBCGで初回免疫をした後、Hsp65+IL-12/Envで追加免疫を行うとBCG単独と比較して1万倍もの強力なワクチン効果を示すことが明らかとなった。このように結核DNAワクチンは臨床試験に向けて確実に前進している。新規ワクチンベクターとしてバキュロウイルス粒子を用いた結核ワクチン（TB-AcNPV）の開発にも着手した。TB-AcNPVはマウスマクロファージRAW264.7細胞に作用し、NOの発現を強力に誘導することを見出し、結核ワクチンとして新しい感染防御メカニズムを賦与する可能性を示した。

A. 研究目的

結核感染率を激減させ、また多剤耐性結核等の難治性結核を治療しうる画期的な次世代ワクチンを開発することを最終ゴールとする。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. 研究計画

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（Hsp65+IL-12/HVJ）、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、プロトタイプ改良および臨床試験申請のためのデ

ータをまとめる。一方、GMPレベルでの生産方法が確立しているHVJエンベロープと従来のHVJリポソームとのワクチン効果の比較・検討を行い、臨床試験のための基礎データを得る。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。さらに結核菌感染後のワクチン接種を想定し、Hsp65+IL-12/HVJの結核予防ワクチンとしての効果を検討する。

C. 研究結果・考察

現在までにマウス、モルモット、ヒトよりIL-12遺伝子をクローニングし、独自に開発したDNAワクチン用高発現ベクターを作製した。これにより、実験動物として、マウス、モルモット、カニクイザルを用いてHVJリポソームDNAワクチンを評価

することが可能となった。現在、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、長期生存を続けている。

GMPレベルで生産したHVJエンベロープは、本年度より本格的にマウスモデルの実験を開始した。BCGで初回ワクチンをした後、Hsp65+IL-12/Envで追加ワクチンを行うと、BCG単独と比較して1万倍もの強力なワクチン効果を示すことが明らかとなった。並行して、治療用ワクチンとしての効果も検討中である。

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。昨年度作製した(i) Hsp65タンパクをウイルス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の二種類の組換えバキュロウイルスは、マウスマクロファージRAW264.7細胞に作用し、NOの発現を強力に誘導することを見出した。結核菌は、マクロファージの細胞内殺菌をエスケープして増殖する。活性化マクロファージでは結核菌に対する殺菌活性が亢進するが、その重要な役割を果たしているのがNOであると考えられている。バキュロウイルスワクチンによりこの抗菌エフェクター分子であるNOが誘導されたことは、ワクチン開発に大きな期待がもたれる。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。

D. 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。さらにジェノメディア株式会社との共同開発によりGMPレベルで製造したHsp65+IL-12/Envワクチン

がマウスモデルでBCGをはるかに凌ぐ効果を得た。今後のカニクイザル実験に向けて着実に前進している。また結核DNAワクチンの成果と合わせて、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。

E. 研究発表

(1) 論文発表

1. Lee LF, Bacon LD, Yoshida S, Yanagida N, Zhang HM, Witter RL.: The efficacy of recombinant fowlpox vaccine protection against Marek's disease: its dependence on chicken line and B haplotype. Avian Dis. 48:129-37, 2004.
2. Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, Ohara N, Kaneda Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Inoue Y, Takemoto Y, Naito M, Yamada T, Matsumoto M, McMurray DN, Cruz ECD, Tan EV, Abalos RM, Young LJ, Burgos JA, Gelber R, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M, Okada M.: Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. Vaccine 2005, in press.
3. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T,

deMello DE, Peiris JSM, Chen P-J, Yamamoto N, Yoshinaga Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. Vaccine 2005, in press.

4. Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Kanamaru N, Muraki Y, Hashimoto S, McFarland C, Sedberry Allen S, Inoue Y, Sakatani Y, Kobayashi E, Kaneda Y, McMurray DN, Okada M.: DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against Mycobacterium tuberculosis by T cell activation. in submission

(2) 学会発表

1. Masaji Okada, Shigeto Yoshida, Takao Tanaka, Sachiko Kuwayama, Yoko Kita, Noriko Kanamaru, Yumiko Muraki, Satomi Hashimoto, Hiroko Takai, Chika Okada, Yukari Fukunaga, Yayoi Sakaguchi, Izumi Furukawa, Kyoko Yamada, Miwa Izumiya, Yoshikazu Inoue, Yasufumi Kaneda, Mitsunori Sakatani.: The Development of novel strong HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccination against tuberculosis. Fourth World Congress on Vaccines and Immunization (2004年10月筑波)

2. Yoko Kita, Takao Tanaka, Shigeto Yoshida, Naoya Ohara, Yasufumi Kaneda, Sachiko Kuwayama, Yumiko Muraki, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Hiroko Takai, Chika Okada, Yukari Fukunaga, Yayoi Sakaguchi, Izumi Furukawa, Kyoko Yamada, Yoshikazu Inoue, Yuji Takemoto, Mariko Naito, Takeshi Yamada, Makoto Matsumoto, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Robert Gelber, Yasir Skeiky, Steven Reed, Mitsunori Sakatani, Masaji Okada.: NOVEL (RECOMBINANT BCG-AND DNA-) VACCINATION AGAINST TUBERCULOSIS using cynomologus monkey. Fourth World Congress on Vaccines and Immunization (2004年10月筑波)
3. Shigeto Yoshida, Daisuke Kondoh, Flaminia Catteruccia, Tony Nolan, Hiroyuki Matsuoka, Robert E. Sinden, Andrea Crisanti : Establishment of genetically engineered mosquitoes expressing anti-malaria antibody: Effect on susceptibility of Plasmodium. 第39回日米医学協力・寄生虫疾患専門部会合同会議(京都)2004.12.7-9.
4. 渡辺裕之・松岡裕之・羅恩傑・吉田栄人: ハマダラカ唾液腺タンパク GE-rich protein をコードした遺伝子 (AnSG-1) のクローニング。第45回日本衛生動物学会大会(福井). 2004.4.4-6.
5. 近藤大介・松岡裕之・Nolan, T・Catteruccia, F・吉田栄人: 抗マalaria遺伝子を導入したトランスジェニックハマダラ

カによるマラリア原虫伝播阻止。第 45 回
日本衛生動物学会大会(福井)。
2004.4.4-6.

6. Shigeto Yoshida, Daisuke Kondoh,
Flaminia Catteruccia, Tony Nolan,
Hiroyuki Matsuoka, Robert E.
Sinden, Andrea Crisanti.:
Establishment of genetically
engineered mosquitoes expressing
anti-malaria antibody: Effect on
susceptibility of Plasmodium. 第 39
回日米医学協力・寄生虫疾患専門部会合
同会議(京都)2004. 12.7-9.
7. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y,
Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T,
Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y,
Kanamaru N, Takai H, Okada C,
Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K,
Yoshida S, Matsumoto M, Kase T,
Daphne E. deMello, JSM Peiris, Pei-
Jer Chen, Yamamoto N, Yoshinaka Y,
Nomura T, Ishida I, Morikawa S,
Tashiro M, Sakatani M.: The
Development of vaccines against
SARS corona virus in mice and
SCID-PBL/hu mice. 第 33 回日本免疫
学会総会 2004

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

ヒトマクロファージの結核菌殺菌機構における NRAMP1 及び MAP 系シグナル
伝達機構の役割と GM 型マクロファージにおける結核菌殺菌能誘導機構の開発
に関する研究

分担研究者 赤川清子 国立感染症研究所 免疫部 第4室 室長

研究要旨

ヒト単球より M-CSF で誘導した M 型 M ϕ は結核菌(H37Rv)を殺菌するが、GM-CSF に
より誘導した GM 型 M ϕ （ヒト肺胞 M ϕ に形質が似ている）は、結核菌の増殖を促す。
IFN- γ 処理 GM 型 M ϕ は結核菌の増殖抑制を誘導できなかったが、IL-10 処理 GM 型 M ϕ
は結核菌の増殖を抑制した。これらの結果は、マウス M ϕ と異なり、ヒト M ϕ では、IFN- γ
でなく IL-10 により結核菌の増殖抑制活性の活性化が誘導されること、また、ヒト M ϕ
の結核菌の殺菌および増殖抑制活性には、NRAMP1 の発現および MAP カイネース の活
性化が重要なことを強く示唆する。

A. 研究目的

結核菌の主な増殖場所はマクロファージ
(M ϕ) 内であるため、感染初期での生体
内の結核菌の増減は M ϕ が要となる。特に、
ヒトの結核を考えたとき、肺胞 M ϕ におけ
る結核菌の増殖と殺菌を制御する機構を解
明し、殺菌作用を増強する方法を見つける
ことは、結核の治療への応用に有用である。

昨年までに、ヒト単球より M-CSF で誘
導した M 型 M ϕ は結核菌(H37Rv)を殺菌す
ること、しかし、GM-CSF により誘導し
た GM 型 M ϕ （ヒト肺胞 M ϕ に形質が似て
いる）は、逆に結核菌の増殖を促すこと、
M 型 M ϕ では結核菌感染により自然抵抗性
遺伝子 NRAMP1 の発現及び ERK1/2 や
P38MAPK などの MAP カイネースの活性化
が認められるが、GM 型 M ϕ ではそれらの
発現や活性化がいずれも認められないこと
を明らかにした。

マウス M ϕ では IFN- γ で M ϕ を活性化す

ると結核菌の殺菌あるいは増殖抑制を誘導
できる。一方、IL-10 は、M ϕ の活性化を
抑制する事が知られている。そこで、本
年度は、IFN- γ や IL-10 のヒト単球由来
GM 型 M ϕ の結核菌の殺菌あるいは増殖抑
制活性に対する影響を検討し、また、M ϕ
における結核菌の殺菌や増殖抑制活性の違
いが NRAMP1 の発現や MAP カイネースの
活性化の違いと関連するの否かを検討し
た。

B. 研究方法

リコンビナントヒト (rh) GM-CSF は、
Shaeing Plau 社より、rhM-CSF は、
森永乳業よりそれぞれ供与された。

rhIFN- γ および rhIL-10 は、Genzyme
社より購入した。ヒト単球の調整は、正常
ボランティアの末梢血よりリンホブレップ
にて分離した単核球より、CD14 ビーズ
抗体と MACS により CD14 陽性の単球画

分を分離精製した。これら単球を M-CSF (100ng/ml) および GM-CSF (50 ng/ml) 存在下に 10%FCS を含む RPMI1640 培地で 1 週間培養し、M 型 M ϕ 及び GM 型 M ϕ を作製した。これらの M ϕ にヒト型結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv を moi 1—2 で感染させ、感染 6 日後に結核菌の CFU を測定して、菌の殺菌あるいは増殖を調べた。IFN- γ (100-1000U/ml) および IL-10(50 - 100ng/ml) は、結核菌感染時に M ϕ に添加した。また、結核菌を感染させた M ϕ を SDS サンプルバッファーで溶解し、Western blot により NRAMP1 の発現及び MAP キナーゼの活性化を調べた。NRAMP1 の発現は、ヒト NRAMP1 に対する抗体を用いて、また活性化 MAP キナーゼは、抗リン酸化 p38 MAP キナーゼ、抗リン酸化 p42/44 MAP キナーゼ、抗リン酸化 JNK キナーゼ 抗体を用いて検出した。

(倫理面への配慮)

正常ボランティアよりの血液の採取に関しては、インフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

IFN- γ 及び IL-10 の GM 型 M ϕ の結核菌の増殖、NRAMP1 蛋白の発現及び ERK1/2 や P38MAPK などの MAP カイネースの活性化に対する影響を検討した結果、IFN- γ 処理では、結核菌の増殖抑制を誘導できなかったが、IL-10 処理により結核菌の増殖を著明に抑制できた (図 1)。

一方、結核菌を殺菌する M 型 M ϕ とことなり、GM 型 M ϕ では、結核菌感染により自然抵抗性遺伝子 NRAMP1 の発現 (図 2) 及び ERK1/2 や P38MAPK などの MAP カイネースのリン酸化 (図 3) を認

めない。しかし、結核菌の増殖を抑制した IL-10 処理 GM 型 M ϕ では、M 型 M ϕ 同様、NRAMP1 蛋白の発現 (図 2) や P38MAPK、ERK1/2 そして JNK の強い活性化の誘導が認められた (図 3)。

D. 考察

今回の実験結果より、マウス M ϕ と異なり、ヒト GM 型 M ϕ は、IFN- γ でなく IL-10 により結核菌の増殖抑制活性の活性化が誘導されることが明らかになった。この結果は、必ずしもヒト M ϕ の結核菌殺菌機構はマウス M ϕ のそれと同じでないことを示しており、ヒト M ϕ を用いたより詳細な結核菌の増殖制御機構の解析の必要性が示唆された。

また、結核菌の殺菌活性を有する M 型 M ϕ は、結核菌の増殖を促す GM 型 M ϕ とことなり、結核菌感染により NRAMP1 の発現および MAP カイネースの活性化が誘導される。今回、結核菌の増殖抑制活性を認めた IL-10 処理 GM 型 M ϕ も NRAMP1 の発現および MAP カイネースの活性化が誘導されたことより、ヒト M ϕ の結核菌の殺菌および増殖抑制活性には、NRAMP1 の発現および MAP カイネースの活性化が重要なことが強く示唆された。

一般的に IL-10 は、IFN- γ や LPS による M ϕ の活性化を抑制することから、抑制性サイトカインとして知られてきた。しかし、IL-10 は必ずしも M ϕ の機能に対して抑制的に作用するわけではない。既に我々が報告しているように、IL-10 は、M-CSF による単球からの M ϕ の分化、Fc レセプターの発現、活性酸素産生能などの増強を誘導する。またナチュラルキラー (NK) 細胞の活性増強作用も有することが知られている。今回、我々は、IL-10 はヒト GM 型 M ϕ の結核菌増殖抑制活性の活性化作用も有することを明らかにした。これらのことより、

IL-10は、むしろinnate immunity におけるM ϕ やNK細胞の活性化に実は重要な役割を果たしていると思われる。

E. 結論

マウスM ϕ と異なり、ヒトGM型M ϕ では、IFN- γ でなくIL-10に結核菌の増殖抑制活性の活性化作用があることが知られた。また、IL-10処理GM型M ϕ は、結核菌の殺菌活性を示すM型M ϕ 同様、結核菌感染により、NRAMP1 の発現および MAPカインース の活性化が誘導されたことより、ヒトM ϕ の結核菌の殺菌および増殖抑制活性には、NRAMP1 の発現および MAPカインース の活性化が重要なことが強く示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Akagawa k. S., Kanazawa H., Yamazaki T., Kishi F. and Haga S.: M-CSF-induced-human monocyte-derived macrophages and IL-10-treated GM-CSF-induced- human monocyte-derived macrophages inhibit bacterial growth and induce the activation of MAP kinase and the expression of NRAMP1 protein after infection with M.tuberculosis H37Rv. (in preparation)

(2) 学会発表

1. Akagawa KS, Hiroko Kanazawa, Toshio Yamazaki, Shinji Haga, Fumio Kishi: Mechanisms of antibacterial activity of human monocyte-derived macrophages against Mycobacterium tuberculosis. 4th International Peroxidase Meeting, October 28, 2004, Kyoto, Japan
 2. Akagawa K.S.: Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte derived macrophages. The International symposium of New Aspects in Pulmonary surfactant biology and Diseases. November 12, Osaka, Japan
 3. 赤川清子、金沢裕子、岸 文雄：ヒトマクロファージの結核菌の増殖制御機構- IL-10 による結核菌増殖抑制活性の活性化、 第34回日本免疫学会総会・学術集会、平成16年12月3日、札幌市
 4. 赤川清子、山崎利雄、芳賀伸治：結核菌感染ヒトマクロファージにおけるNRAMP1 の発現と MAP カインースの活性化について 第79回日本結核病学会総会、平成16年4月21日、名古屋
- #### H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

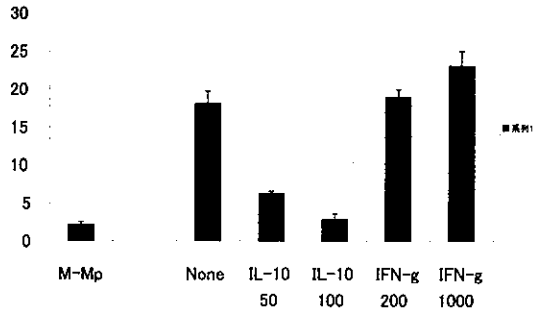


图 1. Effects of IL-10 and IFN- γ on the growth of *M. tuberculosis* in human monocyte-derived GM-M)

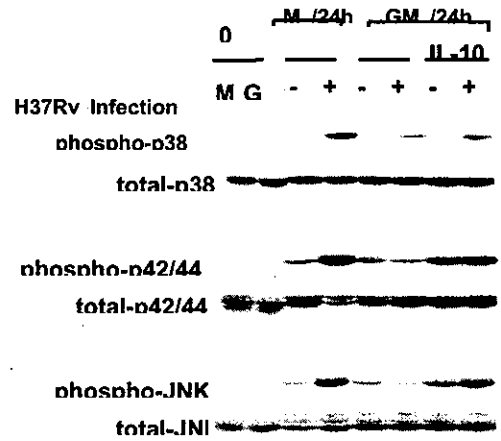


图 3. Effects of IL-10 on the the activation of MAPKs in human monocyte-derived GM- GM-M)

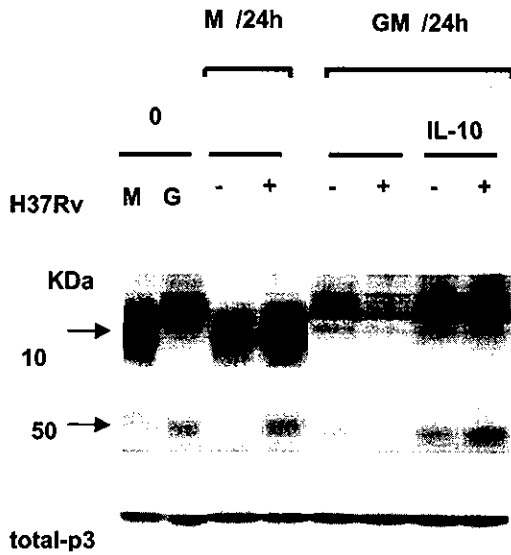


图 2. Effects of IL-10 on the the expression of NRAMP-1 in human monocyte-derived GM- GM-M ϕ

国立病院機構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および多剤耐性結核 自己活性化T細胞輸注療法の検討に関する研究

分担研究者 倉島篤行 国立病院機構東京病院臨床研究部 部長

研究要旨

国立病院機構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。

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、NK細胞増殖をきたすLAK療法と異なりT細胞のみの増殖であり副作用が少ない。多剤耐性結核では結核菌に対する宿主免疫応答が低下しており、本法の適応疾患となる可能性が考えられる。排菌持続陽性の多剤耐性結核で、過去3ヶ月間に治療薬剤の変更がない患者を対象に、活性化T細胞輸注療法の有効性について調べるとともに安全性も確認する。

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。多剤耐性結核の治療成績は極めて悪く、現在の如何なる治療にもかかわらず、少なくとも約4割以上の患者が治療できない現状にある。多剤耐性結核の新たな治療の試みの一つとして、IFN- γ 吸入療法が行われているが、菌陰性化の達成は困難である。我々は以下の研究を通し、多剤耐性結核の新たな治療法の解明をめざす予定である。岡田などによりBCGよりも強力な新しい結核ワクチン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。これらの研究から生まれた種々の免疫マ-

カーで多剤耐性結核の病態解析を行い診断、治療に資する。

活性化自己T細胞輸注法は、自己血中のT細胞を固相化抗CD3抗体とインターロイキン2(IL-2)の存在下で培養し、約1000倍程度に増殖させた後、体内に戻すもので、現在までに、700症例以上の患者に対し投与が行われ、ホジキン病、肝細胞癌、卵巣腫瘍など様々な腫瘍で縮小効果を認めるとともに、特に治療がきわめて困難な慢性活動性エプスタインバールウイルス(EBV)感染症、免疫不全症に合併した化学療法抵抗性のサイトメガロウイルス(CMV)感染症、カリニ肺炎などに効果が認められた。LAK療法と異なりNK細胞は増殖しないので副作用は少なく、強い反応が起きた場合もステロイド剤などでコントロールすることが可能であり、その安全性は東京医科歯科大学にお

いても再確認された。このようにT細胞機能不全がある症例でT細胞を生体外で活性化、増殖させ、生体内に戻すことによりT細胞機能を高めることが可能であることが明らかになってきている。結核感染症に対する生体側の防御機構はT細胞を中心とする細胞性免疫がなっている。多剤耐性結核患者では細胞性免疫機能の低下が指摘されており、治療のない多剤耐性結核患者に活性化自己T細胞輸注法の効果が期待出来る。

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病院機構・病院から多剤耐性結核で

- (1) 血液 10ml (ヘパリン採血) を収集。
- (2) 多剤耐性結核患者のリンパ球のキラーT細胞活性
新しい結核ワクチン抗原
HSP65
Antigen 85B、85A、MPB51
fusion蛋白 72f
その他種々の結核ワクチン抗原に対するキラーT活性誘導、増殖反応、キラーT細胞分化因子(サイトカイン)を解析する。(国立病院機構近畿中央胸部疾患センターの岡田に送り、そこで Assay)
- (3) 結核感染により特異性の高い、従来のツベルクリン反応に代わる新しい診断法(DPPD)やESAT-6ペプチドの開発をヒトのin vitro系で行う。
- (4) これらリンパ球を我々が開発したSCID-PBL/huの系で解析する。
- (5) 患者の病態、排菌、薬剤感受性等の情報をファイルし、臨床情報と併せて解析する。

菌陽性(塗抹、培養問わず)が持続する多剤

耐性結核で、過去6ヶ月に治療薬剤の変更がない患者を対象に、多剤耐性結核患者を対象に、活性化T細胞輸注療法の有効性について調べるとともに安全性も確認する。平成14年春に東京病院、東京医科歯科大学。国際医療センターからなるプロジェクトチームが結成され、免疫不全症に対する活性化T細胞輸注療法を参考にしつつ、多剤耐性結核患者に対する活性化T細胞輸注療法プロトコルを平成14年10月に東京病院倫理委員会に申請・承認を得た。その概要は、以下のとおりである。

1. フェーズ: 院内臨床試験〔単施設〕
2. 目的: 多剤耐性結核患者を対象に、活性化T細胞輸注療法の安全性と有効性について調べる。
3. 対象: 過去3ヶ月持続排菌している多剤耐性結核患者で、過去6ヶ月間治療レジメンの変更がない者。
4. 用法, 用量
試験投与: 本治療の前に1/10量の活性化T細胞を点滴静注し、有害事象の発現を調べる。
副作用がなければ、本投与を開始する。
本投与:
プロトコル1: 10⁹個の自己活性化Tリンパ球を2週間おきに計6回輸注。
プロトコル2: 10⁹個の自己活性化Tリンパ球を4日おきに計3回輸注。2週間あけて同様の輸注を行う。
5. プライマリ・エンドポイントおよび観察項目
リンパ球輸注開始後3ヵ月間、培養検査で喀痰中の菌陰性状態が持続するものを有効とする。
治療後の有害事象の観察、およびCRP、血沈、ツベルクリン反応、末梢血early secreted antigenic target 6 kda protein(ESAT-6)刺激下インターフェロン γ 産生能(Quanti FERON -TB

test)の変化をみる。

C. 研究結果

4例の多剤耐性結核患者をプロトコール1に従った活性化自己T細胞輸注療法にて治療した。

4例ともに輸注中。輸注後に特記すべき有害事象は見られなかった。

排菌量の変化であるが、症例1では治療前に喀痰培養持続陽性であったのが、治療後3ヶ月間、喀痰培養陰性となり、その後再度培養陽性となった。

症例2では、喀痰塗抹培養陽性であったが、治療後喀痰塗抹・培養ともに陰性が治療後5ヵ月間持続し、その後培養陽性となった。

症例3に関しては、全く効果なく、排菌量に変化がなかった。

症例2については、プロトコール2による再治療を行った。治療後2ヶ月間培養陰性となったが、再度陽性となっている。

症例4では、喀痰塗抹、培養陽性であったが、治療後一時塗抹、培養陰性化した。培養陽性が出現、その後塗抹、培養陽性となった。

4例において自己活性化T細胞輸注中のESAT-6刺激インターフェロン γ 産生能の増強が見られた。

D. 考察

活性化自己T細胞輸注療法は、多剤耐性結核例において輸注期間中の培養での菌陰性を達成した。今日まで試みられた新しい免疫治療法としては国際的にIFN- γ 吸入療法があるが、多剤耐性結核において喀痰塗抹の陰性化は得られてきたが、培養結果の陰性化は得られていない。その点で本法はより有効性が高いと言えるが、今までの試みと同様、効果は投与中の一過性のものにとどまった。

今後、投与量、投与回数、投与間隔の新たな検討を行う予定である。

E. 結論

治療法の無い多剤耐性結核に活性化自己T細胞輸注療法は一定の可能性が認められた。

F. 健康危険情報

これらの検討において重篤な副作用は認めなかった。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. 中田 光, 濱野栄美, 川辺芳子, 益田公彦, 永井英明, 有賀晴之, 倉島篤行, 森尾友宏, 清水則夫: 多剤耐性結核患者に対する活性化T細胞輸注療法の試み. 結核 79:57-60, 2004.
2. 倉島篤行, 町田和子, 永井英明, 川辺芳子, 赤川志のぶ, 長山直弘, 馬場基男, 鈴木純子, 益田公彦, 田村厚久, 小松彦太郎, 四元秀毅: 等温キメラプライマー核酸増幅(ICAN)法を用いた結核菌群検出キットの従来法との比較検討. 結核 78:533-539, 2003.
3. 倉島篤行: BCG接種の考え方. 臨床医 26:1857-1859, 2003.
4. 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
5. 長山直弘, 益田公彦, 馬場基男, 田村厚久, 永井英明, 赤川志のぶ, 川辺芳子, 町田和子, 倉島篤行, 四元秀毅: INH, RFPを含む結核化学療法における薬剤性肝炎出現率の経年上昇. 結核 78:339-346, 2003.