

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

新しい結核ワクチン(①HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNAワクチン、②リコンビナント72f BCGワクチン、③72f融合タンパク+BCG東京ワクチン)三種のワクチン接種マウス、モルモット、カニクイザルの病理形態学的検討に関する研究

分担研究者 井上義一 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター
呼吸不全研究部 部長

研究要旨

新しい結核ワクチン(①HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNAワクチン、②リコンビナント72f BCGワクチン、③72f融合タンパク+BCG東京ワクチン)による結核病巣形成予防効果について、マウスモデル、モルモットモデル及びヒトの結核感染に最も近いカニクイザルのモデルを用い、病理形態学的に解析した。

BALB/cマウス、モルモット、カニクイザル(cynomolgus monkey)に上記の三種の新しい結核ワクチンを3回投与しヒト型結核菌強毒株を感染させた。マウスでは5～10週後、モルモットでは6週後、カニクイザルでは6ヶ月から12ヶ月後の結核病巣形成(肉芽腫(granuloma)形成および単核球浸潤)をコントロールと比較した。HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNAではマウス、モルモットで著明なgranuloma形成抑制効果、肺結核病理像の改善効果がBCG東京ワクチンよりも有意に強く認められた。リコンビナント72f BCGワクチン投与モルモットでも肺結核病理所見の改善がBCG東京ワクチンよりも強く認められた。

A. 研究目的

現行のBCGワクチンは成人に対して結核予防効果に問題点があるとされている。われわれはBCGワクチンより強力な新しい結核ワクチンの開発を行った。本年度は新しい結核ワクチン(①HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNAワクチン、②リコンビナント72f BCGワクチン、③72f融合タンパク+BCG東京ワクチン)による結核病巣形成予防効果について、マウスモデル、モルモットモデル及びヒトの結核感染に最も近いカニクイザルのモデルを用い、病理形態学的に解析した。

B. 研究方法

BALB/cマウスにHVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNAを3回 i.m 投与しその後M.tuberculosis H37Rv株 5×10^5 CFUを尾静脈投与した。前処置なし(Control)、empty ベクター群、BCG Tokyo 群を対照とし検討した。マウスはH37Rv株投与後、5週、12週で検討した。一群5匹。肺、肝臓、脾臓を湿重量測定後10%PBSホルマリンで固定。組織中の肉芽腫の量、単核球浸潤を以下の方法で顕微鏡下に半定量した。各臓器中結核菌のコロニー数とも比較検討し

た。

- (1) 肉芽腫半定量法: granuloma index: H&E染色標本を用い、 4×10 倍で1視野中の肉芽腫の長径×短径の合計(単位は $\times 10^{-2} \text{ mm}^2$)を計算した。無作為に3視野計算しその平均を granuloma indexとした。
- (2) 単核球浸潤半定量: mononuclear cell (MNC) infiltration index: H&E染色標本を用い、 4×10 倍で1視野中の単核球浸潤の程度を以下の基準でスコア化した。無作為に3視野計算し浸潤している部分の面積の%からスコアを求め、その平均をMNC infiltration indexとした。
 - 0; 病的浸潤なし、
 - 1; $0\% < \text{浸潤面積} \leq 10\%$
 - 2; $10\% < \text{浸潤面積} \leq 30\%$
 - 3; $30\% < \text{浸潤面積} \leq 70\%$
 - 4; $70\% < \text{浸潤面積} \leq 100\%$
- (3) 評価項目として組織の湿重量、組織のH&E stainを用いた granuloma index及び mononuclear cell infiltration index。また組織の結核菌コロニー数(CFU/total)を用いた。
- (4) モルモットではHVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNA 投与群、empty ベクター投与群、BCG投与群等を比較検討した。マウスと同様の granuloma indexを用いた。
- (5) カニクイザルでは granuloma 形成及び乾酪壊死の病理像を解析した。

C. 研究結果

(1) マウスモデル

HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNA ワクチン投与群はBCG東京投与群やempty ベクター投与群に比し granuloma indexの著明な改善が認められた。この効果は結核菌数(CFU)で解析したHSP65 DNA+ IL-12 DNAワクチンの抗結核効果と強く相関した。(図1)

(2) モルモットモデル

さらに、モルモットでも同様にHSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン投与群は結核病巣の著明な改善が認められた。(図2)

また、HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNAワクチン投与群はBCGワクチン投与群に比しモルモットの肺における granuloma indexの著明な改善をみた。(図3)

一方リコンビナント72f BCGワクチンもBCG東京ワクチン接種モルモットに比し肺の結核病巣の改善を示した。(図4)

(3) カニクイザルモデル

人の結核感染に最も近いモデルとして有名なカニクイザル(Nature Med. 1996)では、肺で、人の結核病理像と同じ granuloma 形成と乾酪壊死像が認められた。(図5)

D. 考察

マウス、モルモットでHSP65 DNA+ IL-12 DNAワクチン投与による granuloma indexと抗結核菌効果が相関したことにより我々の granuloma indexのアッセイ法は極めて有用である。

サルにおける granuloma 形成と乾酪壊死像についてワクチン投与カニクイザルの肺で解析中である。

E. 結論

新しい結核ワクチン(①HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン、②リコンビナント72f BCGワクチン、③72f融合タンパク+BCG東京ワクチン)による結核病巣形成予防効果について、マウスモデル、モルモットモデル及びヒトの結核感染に最も近いカニクイザルのモデルを用い、病理形態学的に解析した。

BALB/cマウス、モルモット、カニクイザル(cynomolgus monkey)に上記の三種の新しい結核ワクチンを3回投与しヒト型結核菌強毒株を感染させた。マウスでは5~10週後、モルモットでは6週後、カニクイザルでは6ヶ月から12ヶ月後の結核病巣形成(肉芽腫(granuloma)形成および単核球浸潤)をコントロールと比較した。HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNAではマウス、モルモットで著明なgranuloma形成抑制効果、肺結核病理像の改善効果がBCG東京ワクチンよりも有意に強く認められた。リコンビナント72f BCGワクチン投与モルモットでも肺結核病理所見の改善がBCG東京ワクチンよりも強く認められた。

本研究は、国立病院機構近畿中央胸部疾患センター岡田全司博士らとの共同研究による。

図1

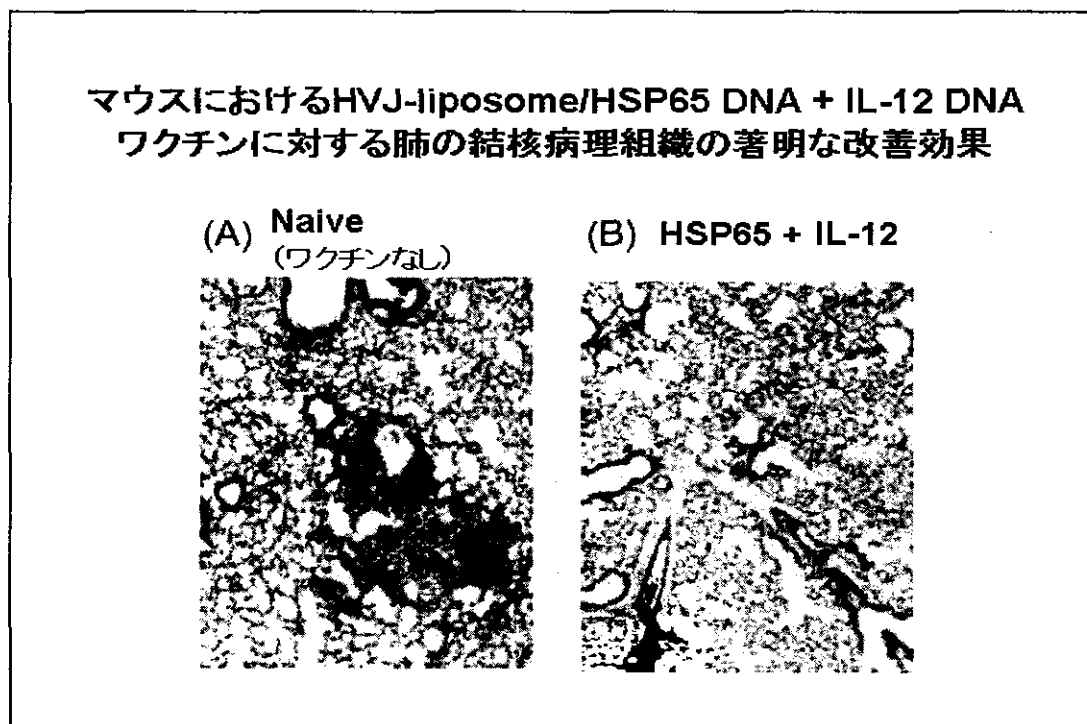


図2

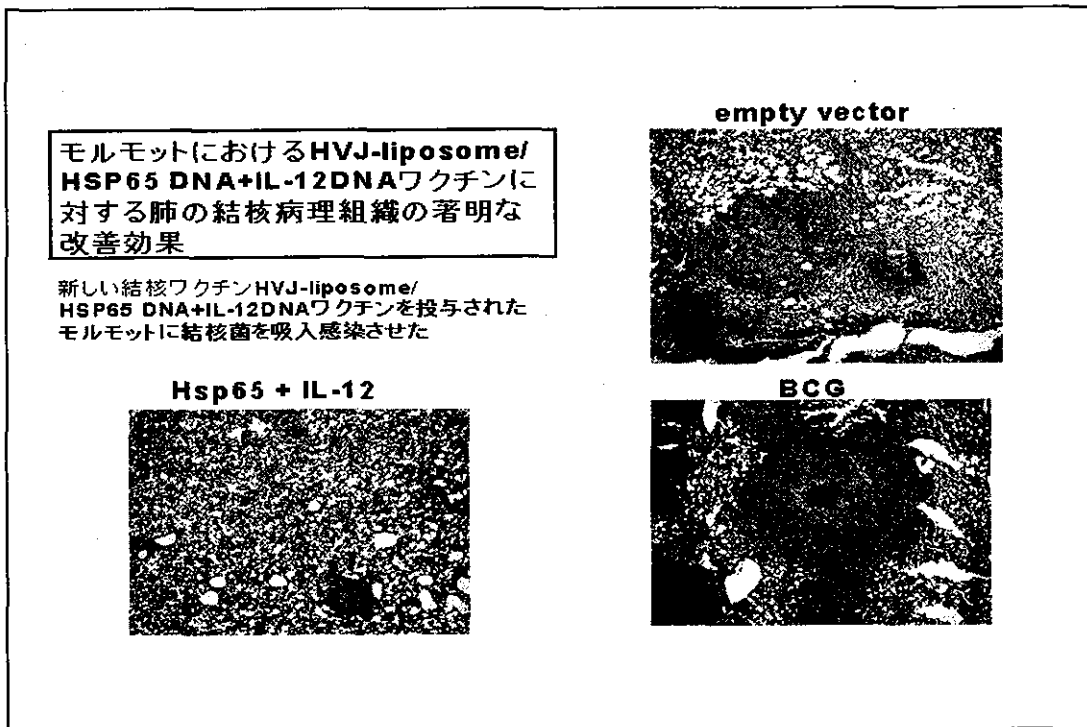


図3

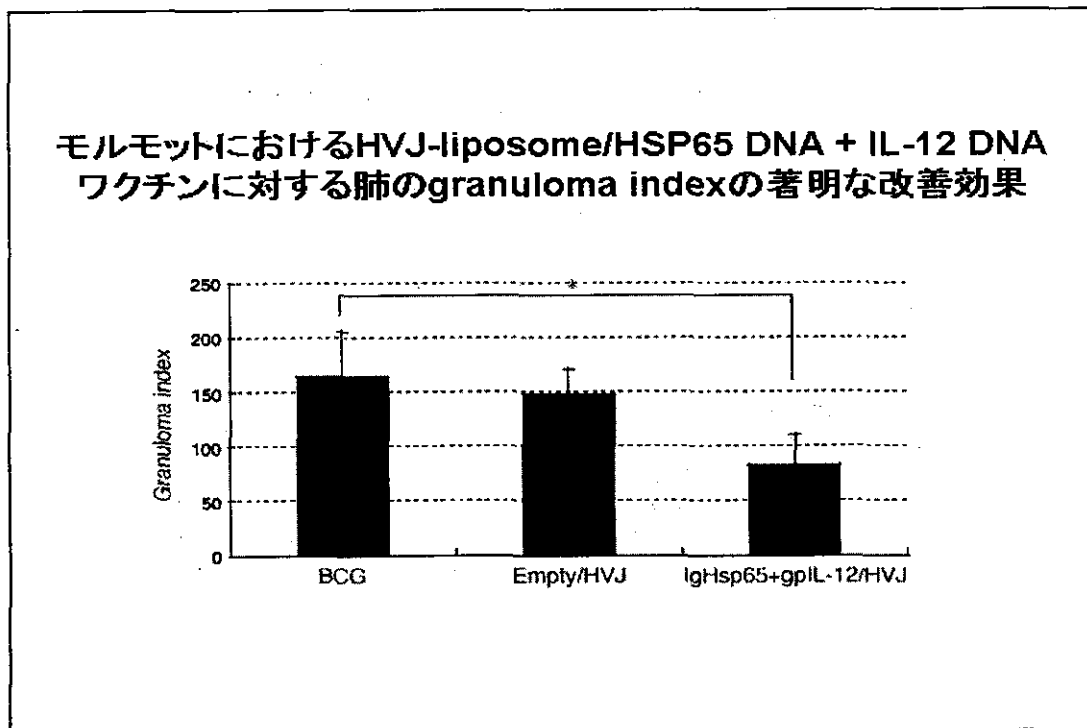


図4

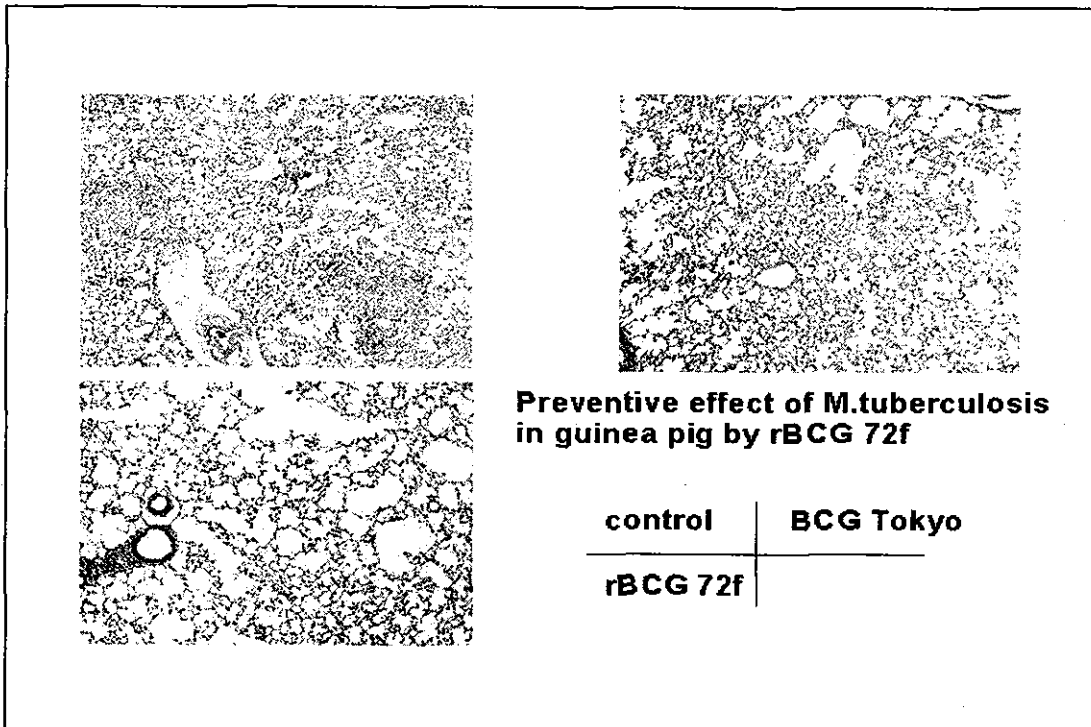
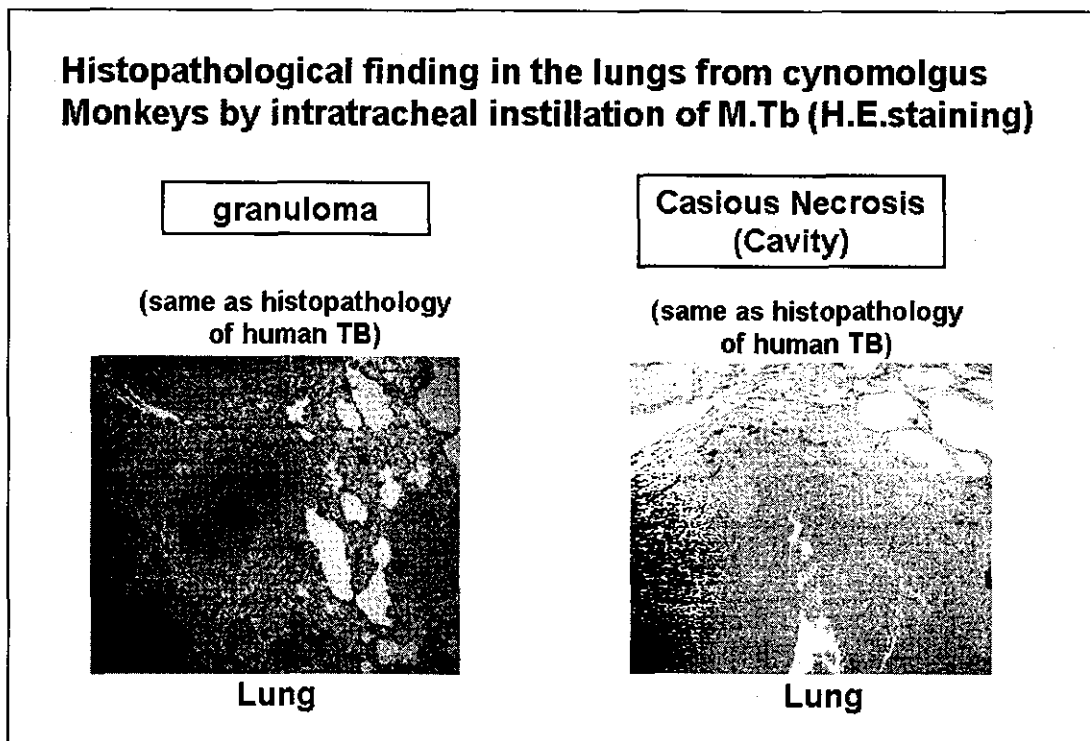


図5



G. 研究発表

(1) 論文発表

1. 井上義一、大家晃子、新井徹、林清二、木村謙太郎、坂谷光則、佐藤輝彦、瀬山邦明、久保恵嗣. 肺リンパ脈管筋腫症をめぐる問題点と今後の展望. P103-104.2004
 2. 南誠剛、鈴木克洋、露口一成、馬渡秀徳、鈴木真優美、新井徹、井上義一、林清二、坂谷光則. Mycobacterium kansasii による感染性肺嚢胞の1症例. 日本呼吸器学会雑誌 第42巻/第5号 P440-445. 2004
 3. 井上義一、大家晃子、新井徹、黒川理恵、橋本幸子、林清二、山本暁、木村謙太郎、坂谷光則、谷尾吉郎、伏見博彰. 肺リンパ脈管筋腫症におけるマスト細胞の役割. 厚生労働省難治性疾患 呼吸不全に関する調査研究 平成15年度研究報告書. 厚生労働省難治性疾患 呼吸不全研究班 P100-102P100-102. 2004.5.
 4. 井上義一. 海外におけるLAM事情 患者団体の活動支援状況. J-BREATH 第17号 P10-11. 日本呼吸器障害者情報センター. 2004
 5. 井上義一. 第44回日本呼吸器学会 ～新基準による特発性間質性肺炎の再評価～画像、病理だけでは不十分. Medical Tribune vol.37,NO.19 P19. 株式会社メディカル トビューン. 2004
 6. 井上義一その他. 作業の経過と委員会の構成. 特発性間質性肺炎 診断と治療の手引き. 日本呼吸器学会びまん性肺疾患 診断・治療ガイドライン作成委員会 2004
 7. Jeffrey J.Presneill, MB BS,PhD,FRACP,Koh Nakata,MD,PhD,Yoshikazu Inoue,MD,PhD,John F.Seymour,MB BS,FRACP. Pulmonary alveolar proteinosis. CLINICS IN CHEST MEDICINE Volume 25 Number 3,p593-613. ELSEVIER. 2004
 8. 大家晃子、井上義一、田中勲、小塚健倫、審良正則、前田優華、深水玲子、新井徹、林清二、木村謙太郎、坂谷光則. 肺リンパ脈管筋腫症の嚢胞性病変の評価 三次元 computed tomography による試み. 臨床放射線 Vol.50 No.1 2005 P104-107. 2005
 9. 井上義一、特発性間質性肺炎、ガイドライン外来診療 2005 P350-353、株式会社日経メディカル開発、2005
- (2) 学会発表
1. 南誠剛、井上義一、新井徹、馬渡秀徳、鈴木真優美、林清二、山本暁、坂谷光則. 肺多発性結節影を伴った multicentric Casrtleman' s disease の1症例. 2004.4
 2. Y Inoue, T.Arai, E.Hamano, K.Nakata, R.Tazawa, T.Nukiwa,K.Kudo, N.Keicho, N.Hizawa, E.Yamaguchi, R.Eda, K.Oishi, K.Uchida, M.Sakatani. Idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis in Japan(Epidemiological Study). American Thoracic Society; Orand,Florida. May 21-26.2004
 3. R.Tazawa, E.Hamano, H.Ohta, O.Ishimoto, T.Arai, K.Uchida,

- M.Watanabe, M.Ebina, Y Inoue, K.Nakata, T.Nukiwa. . Effects of Aerosolized GM-CSF Therapy on Alveolar Macrophages in Patients with Pulmonary Alveolar Proteinosis. American Thoracic Society; Orand,Florida. May 21-26.2004
4. E.Hamano, K.Nakata, K.Uchida, T.Tarakawa, M.Watanabe, A.Mikami, Y Inoue, R.Tazawa, K.Yamauchi, N.Keicho. Translocation of PU.1 into the Nuclei in Alveolar Macrophages Is Associated with Their Maturation in Patients with Idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis. American Thoracic Society; Orand,Florida. May 21-26.2004
5. G.H.Mazurek, T.Mori, M.Sakatani, F.Yamagishi, T.Takashima, Y.Kawabe, K.Suzuki, E.Shigeto, N.Harada, S.Mitarai, M.Okada, Y Inoue, K.Tsuyuguchi, Y.Sakatani, I.Tsuyuguchi. Accuracy of a Whole Blood Interferon-Gamma Release Assay Using ESAT-6 and CFP-10 for Detecting M. tuberculosis Infection in BCG Vaccinated People. American Thoracic Society; Orand,Florida. May 21-26.2004
6. Y Inoue, S.Yamamoto, A.Hebisawa, I.Yamadori, M.Akira, T.Arai, Y.Mochizuki, T.Sato, Y.Fujita, N.Nagata, S.Akagawa, Y.Saito, R.Eda, M.Abe, S.Kitada, K.Fukushima, Y.Yokosaki, Y.Kobashi, S.Hayashi, S.Nagai, M.Kitaichi, K.Nishimura, M.Sakatani, W.D.Travis. Prognostic Evaluation of Radio-Pathological Findings in Fibrotic Idiopathic Interstitial Pneumonias(Multicenter Study) . American Thoracic Society; Orand,Florida. May 21-26.2004
7. 馬渡秀徳、新井徹、林清二、坂谷光則、井上義一、源誠二郎、鈴木克洋、西山明秀. 再発性多発軟骨炎と考えられた 1 例. 日本内科学会近畿地方会 大阪国際会議場グランキューブ大阪. 2004.6.5
8. 露口一成、吉田志緒美、源誠二郎、鈴木克洋、井上義一、岡田全司、木村謙太郎、林清二、坂谷光則. 小川比率法・MGIT 法で RFP 感受性、Line Probe Assay で RFP 耐性パターンであった肺結核の 3 症例. 第 93 回日本結核病学会 第 63 回日本呼吸器学会 近畿地方会. グランキューブ大阪(大阪国際会議場). 平成 16 年 7 月 3 日
9. 馬渡秀徳、新井徹、高藤淳、林清二、坂谷光則、審良正則、山本暁、北市正則、井上義一、鈴木克洋. 羽毛布団使用により発症したと考えられた鳥飼病の一例. 第 93 回日本結核病学会 第 63 回日本呼吸器学会 近畿地方会. グランキューブ大阪(大阪国際会議場). 平成 16 年 7 月 3 日
10. 安藤性實、新井徹、田村光信、井上義一、林清二、河原正明、山本暁、北市正則、小塚健倫、審良正則、坂谷光則. FDG-PET が病巣の局在診断に有用であった IPF に合併した肺腺癌の一例. 第 93 回日本結核病学会 第 63 回日本呼吸器学会近畿地方会. グランキューブ大阪(大阪国際会議場)平成 16 年 7 月 3 日

11. 鈴木真優美、南誠剛、井上義一、林清二、坂谷光則、松村晃秀、山本暁、北市正則。5年間肺野病変の変化を観察しえた multicentric Castleman's disease の一症例。第 93 回日本結核病学会 第 63 回日本呼吸器学会 近畿地方会。グランキューブ大阪(大阪国際会議場)。平成 16 年 7 月 3 日
12. 石川秀雄、木村剛、大家晃子、林清二、坂谷光則、黒田修、井内敬二、井上義一、鈴木克洋、高橋由利子、木村謙太郎、小塚健倫、審良正則。IDC による気管支動脈塞栓術により治療し得た気管支動脈瘤の一例。第 93 回日本結核病学会 第 63 回日本呼吸器学会 近畿地方会。グランキューブ大阪(大阪国際会議場)。平成 16 年 7 月 3 日
13. 石川秀雄、木村剛、大家晃子、神谷敦、井上義一、鈴木克洋、審良正則、林清二、河原正明、岡田全司、木村謙太郎、井内敬二、坂谷光則。気管支動脈塞栓術における IDC (Interlocking Detachable Coil) 導入の有用性。日本呼吸器学会雑誌 第 42 巻/第 8 号[平成 16 年 8 月]別冊。p730-736
14. Yoshikazu Inoue Yukiko Hashimoto, Kumi Kobayashi, Eri Kurokawa, Masaji Okada, Toru Arai, Seiji Hayashi, Satoru Yamamoto, Kentaro Kimura, Mitsunori Sakatani.: Matrix metalloproteinase (MMP)-2 production by fibroblasts and mast cells: the role in pulmonary fibrosis. 14th ERS Annual Congress. Glasgow, UK. September 4-8, 2004
15. 井上義一。特別講演「特発性間質性肺炎をめぐる臨床と最近の話題」。第 8 回岩手びまん性肺疾患研究会。ホテルメロポリタン盛岡。平成 16 年 9 月 16 日
16. 安藤性實、新井徹、馬渡秀徳、木村卓、井上義一、林清二、坂谷光則、山本暁、北市正則、小塚健倫、審良正則。カレー製造業者に発症したびまん性肺疾患の一例。第 105 回びまん性肺疾患研究会。薬業年金会館 平成 16 年 5 月 29 日
17. 井上義一。「特発性間質性肺炎」治療と日常生活での注意点。泉州ブロック合同事業「特発性間質性肺炎」講演会。泉南府民センタービル 1 階 多目的ホール。平成 16 年 10 月 1 日
18. 井上義一。LAM 症例の健康関連 QOL 調査結果について。第 3 回 LAM 勉強会。順天堂大学 8 号館 A 1 階 大学院教室 (3 番教室)。平成 16 年 10 月 16 日
19. 井上義一。LAM 最近の動き。LAM 懇話会。大阪市中央公会堂 小集会室。2004 年 11 月 13 日
20. 井上義一。リンパ脈管筋腫症(LAM): サルコイドーシスとの鑑別点と最近の話題。日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会 日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会雑誌 第 24 回学会総会ミニシンポジウム Vol.24 サプリメント号 2004 p 22。京都市国際交流会館。平成 16 年 10 月 30 日・31 日
21. Y. Inoue, T Arai, R Tazawa, E Hamano, T Nikiwa, K Nakata, N Kicho, N Hizawa, E Ymaguchi, R Eda, K Oishi, M Sakatani, K Nakata. Clinical and serological features of idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis. THE international symposium 第 3 回 肺サーファクタント分子病態研究会。Ringa Royal NCB in

Osaka, Japan. November 12-13, 2004

22. 森田真也、川口知哉、林清二、河原正明、坂谷光則、北市正則、井上義一。咯血をきっかけに発見された気管支ポリープの一例。第76回日本呼吸器内視鏡学会近畿支部会。新阪急ビル 12 階スカイルーム(12号室)。2004年12月4日
23. 大塚淳司、井上義一、新井徹、審良正則、林清二、山本暁、北市正則、坂谷光則。姉妹に認められた若年発症間質性肺炎/肺線維症の一家系。第71回間質性肺疾患研究会。山之内製薬株式会社 本社2階ホール。平成16年11月19日
24. 源誠二郎、井上康、小河原光正、露口一成、新井徹、井上義一、鈴木克洋、林清二、北市正則、坂谷光則。肺結核症の治療中に出現した間質性肺炎、髄膜炎症状から後天性免疫不全症候群と診断された1症例。第64回日本呼吸器学会第94回日本結核病学会 近畿地方会。奈良県新公会堂。平成16年12月11日
25. 石川秀雄、大家晃子、木村剛、林清二、坂谷光則、黒田修、井内敬二、高橋由利子、井上義一、鈴木克洋、岡田全司、木村謙太郎。気管支動脈塞栓術用オリジナルカテーテル ISK の開発。第64回日本呼吸器学会 第94回日本結核病学会 近畿地方会。奈良県新公会堂。平成16年12月11日
26. 濱口直彦、井上義一、新井徹、深水玲子、林清二、審良正則、山本暁、大住壽俊、坂谷光則、馬渡秀徳。全肺洗浄前後で血清中 CYFRA、CEA の測定が有用であった特発性肺胞蛋白症の1例。第64回日本呼吸器学会 第94回日本結核病学会 近畿地方会。奈良県新公会堂。平成16年12月11日
27. 深水玲子、井上義一、新井徹、林清二、坂谷光則、審良正則、北市正則、玉舎学、岩垣明隆。吸入ステロイド療法により呼吸器症状の改善を認めた慢性過敏性肺臓炎の一例。第64回日本呼吸器学会第94回日本結核病学会 近畿地方会。奈良県新公会堂。平成16年12月11日
28. 森田真也、林清二、北市正則、濱口直彦、深水玲子、大塚淳司、高藤淳、新井徹、審良正則、露口一成、鈴木克洋、井上義一、坂谷光則。先天性多発関節拘縮症に合併し外科的肺生検にて usual interstitial pneumonia パターンを示した上肺野優位の間質性肺炎の一例。第64回日本呼吸器学会 第94回日本結核病学会 近畿地方会。奈良県新公会堂。平成16年12月11日
29. 立花暉夫、竹中雅彦、林清二、坂谷光則、井上義一、上田英之助。ウイルス性感染症合併サルコイドーシス症例の検討。第64回日本呼吸器学会 第94回日本結核病学会 近畿地方会。奈良県新公会堂。平成16年12月11日
30. 武本優次、安教哲、南誠剛、井上義一、岡田全司、坂谷光則、明田寛史、中村忍。長期経過観察にて、軽快したインターフェロンによる肺線維症の一例。第15回日本老年医学会近畿地方会。守口ロイヤルパインズホテル。平成16年11月6日
31. 露口一成、吉田志緒美、鈴木克洋、源誠二郎、井上義一、林清二、岡田全司、木村謙太郎、坂谷光則。再感染発病を証明し得た多剤耐性肺結核の一例。K-net 近畿地区研究会 一第36回研究会

プログラマー. 大阪薬業年金会館 4F
401号室. 平成17年1月29日

32. 井上義一. 特発性間質性肺炎の臨床とその周辺. 胸部レントゲン勉強会 学術講演会のご案内. ラグナガーデンホテル 2階「羽衣の間」. 平成17年1月28日

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
研究協力者研究報告書

結核に対して有効なヘテロ追加免疫法に関する研究に関する研究

研究協力者 小出 幸夫 浜松医科大学微生物学・教授

研究要旨

感作と追加免疫を異なったベクターで行う所謂「ヘテロ免疫法」は強力な免疫能を誘導することが知られている。日本人はBCGで感作を受けている。そこで、我々は結核に対する追加免疫に有効なワクチンの研究を行った。1) 第三世代レンチウイルスベクター：MPT51またはHsp65を発現する安全なレンチウイルスベクターを作製した。このワクチンの経気管接種により、縦隔リンパ節に特異的T細胞を誘導できた。しかし、脾臓には特異的T細胞を検出できなかった。2) ケモカイン融合ワクチン：未熟樹状細胞に発現しているケモカイン受容体のリガンドとMPT51またはHsp65を融合させたDNAワクチンを作製した。これはマウスに特異的T細胞を効率よく誘導できた。3) アルファ-ガラクトシルセラミド(α -GalCer)を用いた樹状細胞ワクチン：CD1dのリガンドであり、NKT細胞を活性化する α -GalCerとMPT51のCD8+T細胞エピトープを樹状細胞にパルスし、マウスに接種することで特異的T細胞の誘導が増強された。今後は、上記ワクチンをBCG免疫マウスの追加ワクチンとして用い、ヘテロ免疫の効果を判定する予定である。

A. 研究目的

HIVに対するワクチンの研究において、感作と追加免疫を異なるベクターで行う所謂「ヘテロ免疫法」の有効性が確かめられている。即ち、初回免疫をDNAワクチンで、追加免疫をワクシニアウイルス(MVA: recombinant modified vaccinia virus Ankara)ベクターで行うと強い防御免疫が得られるというものである。結核に対しても、このヘテロ免疫法が有効であると考えられる。実際に、ヒトに対してBCG初回免疫を行った後、Ag85Aを発現するMVAで追加免疫を行うことで強い抗結核免疫が誘導されることが報告されている(Nat Med 10:1240, 2004)。

本研究の目的は追加免疫用の上記MVAより更に強力なワクチンを開発することに

より、結核に対して最適なヘテロ免疫システムを構築することにある。本年度は、

1) 第三世代レンチウイルスベクター、2) ケモカイン融合ワクチン、3) アルファ-ガラクトシルセラミド(α -GalCer)を用いた樹状細胞ワクチンの検討を行った。

B. 研究方法

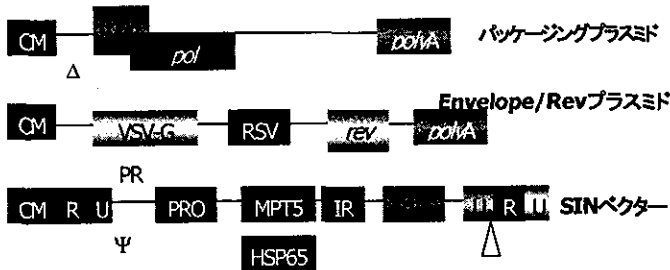
(1) 第三世代レンチウイルスベクター：SIN(self-inactivating)ベクターとレンチウイルスのtatなど修飾遺伝子を除いて完全に安全にし、更に、エンベロープにVSV-Gを用いて組織特異性を無くした第三世代レンチウイルスベクターにMPT51またはHsp65遺伝子を挿入した(図1)。これら3種のプラスミドを293T細胞に遺伝子導入し、

ウイルスを作製した。400ml の培養上清を超速心で 400 μ l に濃縮し、 1.2×10^8 IU/ml のウイルスを得た。

胞エpiteープであるMPT51 24-32ペプチドをパルスし、 1×10^5 個をマウスに静注免疫した。

(倫理面への配慮)

動物実験は計画書を作成し、浜松医科大学動物実験委員会の承認を受けている。



C. 研究結果

(1) 第三世代レンチウイルスベクター

A

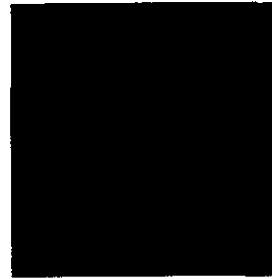


図1. 第三世代レンチウイルス・ベクター

50~100 μ lのウイルス液を麻酔したBALB/cマウスの気管内に投与した。

(2) ケモカイン融合ワクチン：未熟樹状細胞(DC)に発現しているケモカイン受容体CCR5のリガンドであるCCL3 (MIP-1 α)をMPT51またはHsp65の上流に14アミノ酸をリンカーとして融合させたDNAワクチンを作製した(図2)。また、大腸菌により、この融合蛋白も作製した (Dr. Arya; NIH)。

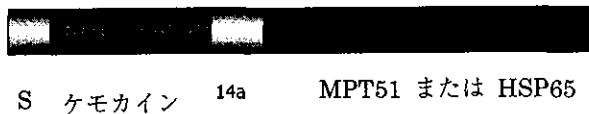


図2. ケモカイン融合蛋白

このDNAワクチンはBALB/cマウスの剃毛した腹部に遺伝子銃で2 μ gを1週間隔で3回接種した。

(3) α -GalCerを用いた樹状細胞ワクチン：マウス骨髄由来DCにCD1dのリガンドであり、NKT細胞を刺激する α -GalCerとMPT51のH2-D^d拘束性T細

B

GFP-positive cells in BAL of immune mice

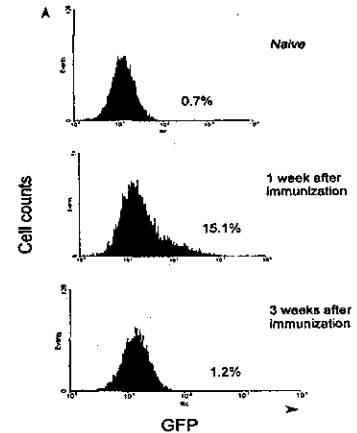


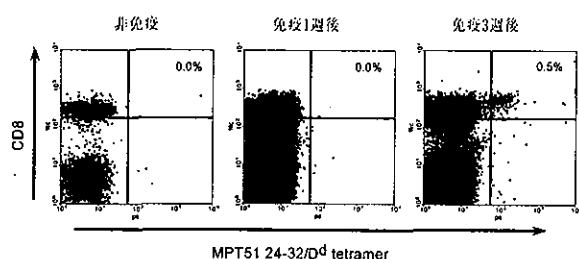
図3.Hsp65-GFP発現レンチウイルスの経気管投与

A：肺胞洗浄液中マクロファージのウイルス感染(GFP)

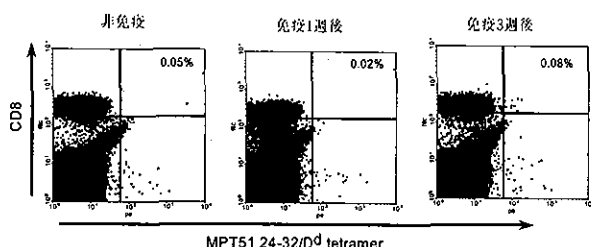
B：GFP陽性細胞の経時的変化

図3に見られるように、経気道的に接種したウイルスは肺胞マクロファージに感染し、接種1週後に15.1%と最も多く認めましたが、3週後には1.2%とほとんど認めなくなりました。次にMPT51を発現するウイルスを経気道的に接種し、縦隔リンパ節と脾臓におけるMPT51特異的CD8+ T細胞をテトラマー法で測定したところ、縦隔リンパ節で接種3週後に0.5%検出された(図4)。しかし、脾臓では特異的T細胞は検出されなかった。

A



B



(1) ケモカイン融合ワクチン

まず、未熟DCに発現しているCCR5のリガンドであるCCL3 (MIP-1 α)を用い、これと防御抗原との融合蛋白を発現するDNAワクチンを作製し、防御抗原をDCに取込ませることを計画し

た。即ち、CCL3/MPT51およびCCL3/Hsp65 DNAワクチンを1週おきに3回遺伝子銃で免疫したところ以下の結果を得た。i)テトラマー・アッセイでMPT51特異的CD8+ T細胞の誘導を検出した結果、MPT51 DNAワクチンではCD8+ T細胞の約0.13%がMPT51に特異的であったのに対し、CCL3/MPT51 DNAワクチンでは約3.0%と高頻度に特異的CD8+ T細胞を認めた。

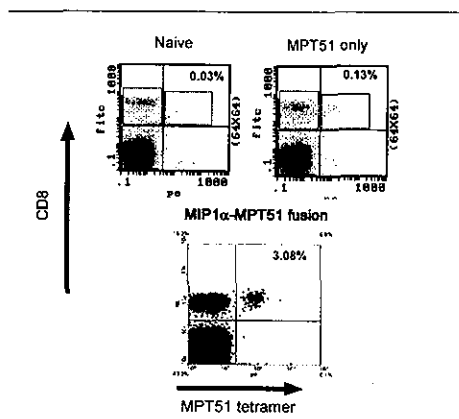


図5 .MPT51およびCCL3(MIP1 α)/MPT51 DNAワクチンによる特異的CD8+ T細胞のテトラマーによる検出

- (2) サイトカイン産生能： DNAワクチン接種後のTNF- α , IFN- γ , IL-5, IL-4, IL-2の産生をサイトカインビーズ・アレイで測定した(図6)。その結果、MPT51単独に比し、CCL3(MIP1 α)/MPT51 DNAワクチンは強くIFN- γ 産生を誘導した。興味あることに、CCL3とMPT51 DNAワクチンを混合接種した場合(mix)も融合ワクチンと同等のIFN- γ 産生を誘導した。
- (3) 特異的CTL活性： ペプチドをパルスしたP815細胞を標的細胞として、⁵¹Cr

遊離法でCTL活性を測定したところ、MPT51単独に比し、CCL3/MPT51 DNAワクチンは強いCTL活性を誘導した。また、サイトカイン産生でも見られたように、CCL3とMPT51の混合ワクチンも融合ワクチンには及ばないもののCTL活性の増強を認めた。

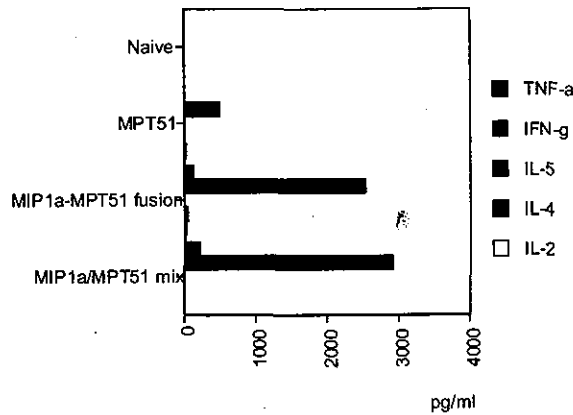


図6. サイトカインビーズ・アレイによる各種サイトカイン量の測定.

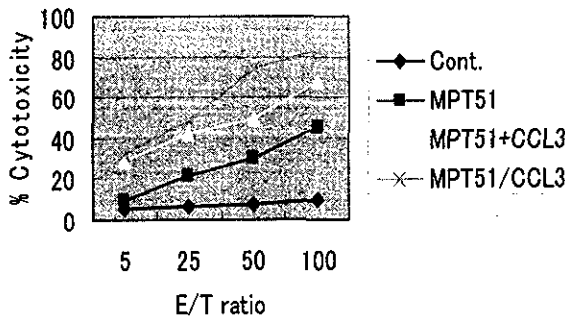


図7. ケモカイン融合ワクチンによるCTL活性の誘導.

MPT51 24-32ペプチドをパルスしたP815細胞を標的細胞として、⁵¹Cr遊離法でCTL活性を測定した。

(1) α -GalCer を用いた DC ワクチン (図8)

H2-D^d拘束性T細胞エピトープ・ペプチドを α -GalCerと共にDCにパルスし、マウスに静注しテトラマー法で特異的CD8+ T細胞を検出したところ、ペプチド単独免疫ではCD8+ T細胞の0.14%がMPT51に特異的であったのに対し、 α -GalCerを添加したものでは1.03%に増加した。このことはNKT細胞がヘルパーT細胞に代わってCD8+ T細胞の感作を増強することを示唆する。

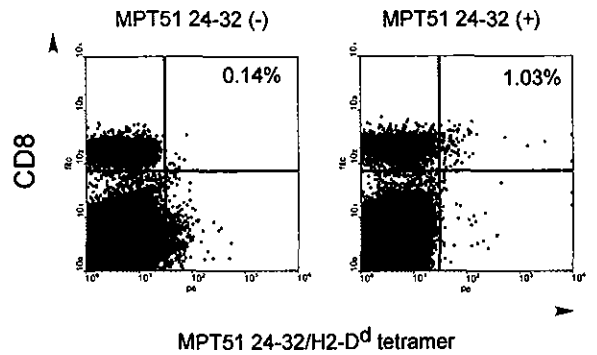


図8. α -GalCerのアジュバント効果. DCをMPT51 24-32ペプチドと α -GalCerでパルスし、BALB/cマウスに静注免疫した。

D. 考察

本年度は結核のヘテロ免疫における追加免疫に資するワクチンの探索を行った。検討したワクチンは以下の3種である。1) 第三世代レンチウイルスベクター、2) ケモカイン融合ワクチン、3) α -GalCerを用いた樹状細胞ワクチン これらは何れも強力な免疫を誘導できたが、3) はその性格上、多剤耐性結核などに対する治療用ワクチンに適していると考えられる。

第三世代レンチウイルスベクターの経気管投与は1回免疫のみで縦隔リンパ節に特異的T細胞を誘導できた。我々の用いた第三世代レンチウイルスベクターはSINベクターとtatなどの修飾遺伝子を全て除去した完全に安全なベクターである。今後、BCGで感作し、このウイルスで気管内追加免疫を行ったマウスの結核菌感染防御能を検討する予定である。

防御抗原を未熟DCにターゲティングするケモカイン融合蛋白発現DNAワクチンは、予想通り強力に特異的T細胞を誘導できた。興味あることに、ケモカインと防御抗原を発現するDNAワクチンを混合して免疫しても、免疫増強効果が認められた。このことは、抗原のターゲティング以外にケモカイン自身がアジュバント効果を示すことを示唆する。米国NIHのArya博士との共同研究で、融合蛋白を作製したので、これを用いた結核菌感染防御効果を検討する予定である。

α -GalCer はCD1dのリガンドであり、NKT細胞を活性化することが知られている。従って、 α -GalCer によるCD8+ T細胞免疫増強効果は、NKT細胞がヘルパーT細胞に代わってCD8+ T細胞の感作を増強する可能性を示唆する。現在、このメカニズムについて検討中である。また、アルファ-ガラクトシルセラミド+ペプチドを角質破壊皮膚に塗布し、直接、表皮ランゲルハンス細胞に取込ませ、抗原提示させるシステムを開発中である。

E. 結論

今回、1) 第三世代レンチウイルスベクター、2) ケモカイン融合ワクチン、3) α -GalCerを用いた樹状細胞ワクチン、の検討を行った。中でも1) は1回接種で強力に肺局所での免疫を誘導できたので、追加免疫用ワクチンとして有望である。

F. 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 immunity against Mycobacterium tuberculosis by recombinant attenuated self-destructing Listeria monocytogenes strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 complex and MPB/MPT51. *Infect Immun* 72(4):2014-2021, 2004.
2. Kageyama Y, Koide Y, Uchijima M, Nagata T, Yoshida A, Aoshi T, Miura T, Nagafusa T, Nagano A :Plasmid encoding interleukin-4 in the amelioration of murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 50:968-975, 2004.
3. Suzuki M, Aoshi T, Nagata T, Koide Y: Identification of H2-D^d- and H2-A^b-restricted T-cell epitopes on a novel protective antigen, MPT51, of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 72 (7):3829-3837, 2004.
4. Nagata T, Aoshi T, Uchijima M, Suzuki M, Koide Y: Cytotoxic T-lymphocyte-, and helper T-lymphocyte-oriented DNA Vaccine. *DNA and cell Biology*, 23: 93-106, 2004.
5. Nagata, T, Miki, K, Koide Y: Attenuated bacteria as transfer vehicles of DNA vaccines. *Recent Res Devel Biophys Biochem* 4: 189-207, 2004.

6. Miki K, Unno N, Nagata T, Uchijima M, Konno H, Koide Y, Nkamura S: Butyrate suppresses hypoxia-inducible factor-1 activity in intestinal epithelial cells under hypoxic conditions. *Shock* 22:446-452, 2004.
 7. Uchijima M, Nagata T, Aoshi T, Koide Y: Interferon- γ overcomes low responsiveness of myeloid dendritic cells to CpG-DNA. *Immunol Cell Biol* (in press)
 8. Aoshi T, Suzuki M, Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Expression mapping by retroviral vector for CD8⁺ T cell epitopes: definition of a Mycobacterium tuberculosis peptide presented by H2-D^d. *J Immunol Methods* (in press)
 9. Nagata T, Uchijima M, Uchiyama H, Yamada T, Aoshi T, Koide Y: Immunization with gene encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inserted with a single helper T-cell epitope of an intracellular bacterium induces a specific T-cell subset and protective immunity. *Vaccine* (in press)
 10. Nakano H, Nagata T, Suda T, Tanaka T, Aoshi T, Uchijima M, Chida K, Nakamura H, Okada M, Koide Y: Immunization with dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity specific to a dominant epitope on antigen 85A. (manuscript in preparation)
 11. 小出幸夫, 永田 年: Ag85分子DNAワクチンによる抗結核細胞性免疫の誘導 *Annual Review 免疫* 2004, 中外医学社, p. 233-243, 2004
 12. 小出幸夫: DNAワクチンによる感染防御. *今日の移植* 17 (5) : 625-636, 2004.
 13. 小出幸夫: マクロファージによる感染防御機構 *最新医学* (印刷中)
- (2) 学会発表
1. Nagata T, Uchijima M, Uchiyama H, Yamada T, Aoshi T, Koide Y: Immunization with gene encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inserted with a single helper T-cell epitope of an intracellular bacterium induces a specific T-cell subset and protective immunity. *DNA Vaccines* 2004. November 17-19, 2004 (Monte Carlo, Monaco).
 2. Suzuki M, Aoshi T, Nagata T, Koide Y: Identification of H2-D^d- and H2-A^b-restricted T-cell epitopes on a novel protective antigen, MPT51, of Mycobacterium tuberculosis. *Fortieth Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program*, Dec. 7-10, 2004 (Kyoto, Japan)
 3. Koide Y, Nakamura Y, Nakano H, Aoshi T, Suda T, Uchijima M, Nagata T: Induction of protective

- cell-mediated immunity against intracellular bacteria with dendritic cells transduced with bacterial genes. Keystone Symposia February 1-7, 2005 (Vancouver, Canada)
4. 内嶋雅人、青枝大貴、永田 年、鈴木美奈、小出幸夫：c-Junを介した免疫賦活性CpG-DNA配列によるiNOS遺伝子発現調節. 第77回日本細菌学会総会、平成16年4月1-3日 (大阪)
 5. 青枝大貴、永田 年、鈴木美奈、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、平成16年4月1-3日 (大阪) 第77回日本細菌学会総会、平成16年4月1-3日 (大阪)
 6. 永田 年、青枝大貴、内嶋雅人、柴田潔、小出幸夫：DNAワクチンにより誘導した抗リステリアヘルパーT細胞の機能的多様性. 第77回日本細菌学会総会、平成16年4月1-3日 (大阪)
 7. 榎本紀之、永田 年、青枝大貴、内嶋雅人、小出幸夫：細胞内寄生菌に対するalpha-ガラクトシルセラミドを用いた樹状細胞ワクチンの検討. 第87回日本細菌学会関東支部総会、平成16年11月5-6日 (東京)
 8. Aoshi T, Uchijima M, Nagata T, Shibata K, Koide Y: Expression mapping for CD8⁺ T cell epitopes by retroviral vector. 第34回 日本免疫学会、平成16年12月1-3日 (札幌) 平成16年12月1-3日 (札幌)
 9. 内嶋雅人、青枝大貴、永田 年、小出幸夫：c-Junを介した免疫賦活性CpG-DNA配列によるiNOS遺伝子発現調節. 第34回 日本免疫学会、平成16年12月1-3日 (札幌) 平成16年12月1-3日 (札幌)
 10. 永田 年、青枝大貴、内嶋雅人、柴田潔、小出幸夫：DNAワクチンを用いた細胞内寄生細菌感染制御におけるヘルパーT細胞の解析. 第34回 日本免疫学会、平成16年12月1-3日 (札幌) 平成16年12月1-3日 (札幌)

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
研究協力者研究報告書

多剤耐性結核に対する新しい治療法の開発に関する研究

研究協力者

鈴木克洋 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター、臨床研究センター感染症研究部長

研究要旨

従来感染力が弱いと言われてきた多剤耐性結核菌による院内集団感染事例を経験した。そこで当院保存結核菌株を用い、分子疫学の手法により、クラスター形成率と感染力が強い Beijing family の占有率を、多剤耐性菌と全剤感受性菌で比較した。クラスター形成率は両者約38%、Beijing family の占有率も両者約80%弱で、ほとんど差がなかった。今回の研究からは多剤耐性結核菌の感染様式が全剤感受性結核菌と大きく変わらない可能性が示唆された。

A. 研究目的

結核治療の要であるINHとRFPに耐性の多剤耐性結核は基本的に難治でありその治療と管理には難渋することが多いため、これ以上患者を増加させないことが重要である。そのためには患者の大部分を占める再治療例中に、新たに多剤耐性菌に再感染した事例がどの位含まれているかを検討する事が必要である。

従来再治療例は、治療の失敗により耐性菌が誘導された獲得耐性であると判断されてきた。しかし最近我々は結核治療中に多剤耐性菌が院内で再感染し発病した事例を経験した。再治療例の中に未使用薬まで耐性化している症例を少なからず経験しており、再感染により多剤耐性結核を発病している症例が想像以上に多い可能性がある。呼吸器ネットワークに所属し結核病棟を持つ各施設で多剤耐性結核菌株を保存しておき、当施設で集中的にRFLP法とspoligotyping法による分子疫学を実施する。従来獲得耐性と思われていた再治療例の中に、各地域

での流行株による再感染事例がどの程度存在するか判定する。

B. 研究方法

当院研究検査科に2000年以降保存されている結核菌株に対して、通常の方法で、RFLPとスポリゴタイピングを実施した。バンドの解析はmolecular analyst software (Bio-Rad 社)のダブルゲルアナリシス法を用いた。当該研究は保存菌株を用いるのみで、菌株由来患者の臨床データとの関連は一切検討しないので、特に倫理面で配慮する必要はない。

C. 研究結果と考察

まず当院で経験した再感染を含む多剤耐性結核の院内集団感染事例の概要を述べる。初発患者は56歳男性の初回多剤耐性肺結核で、INHとRFP以外に多くの薬剤に耐性を示している。巨大空洞があり、咳も強いいため多量排菌が続いていた。この患者から2つの病院で、患者家族1名、担当した看護

師2名、接触のあった全剤感受性結核で治療中であった入院患者2名に後に多剤耐性結核が発症した。全員から検出した結核菌の薬剤感受性パターン、RFLPパターン、spoligotyping patternが一致し、初発患者から感染・発病した可能性が高いと考えられている。

従来の子孫に反して多剤耐性結核の一部に感染性の高い株があることが予想されたので、当院に保存している多剤耐性結核菌109株のRFLPによる分析を実施した。109株中42株が12のクラスターを形成した。クラスターの最大のものは10株が所属しており、全体のクラスター形成率は38.5%であった。一方全剤感受性結核菌226株に同様の検討を実施したところ、クラスター形成率は37.2%であった。Spoligotypingにおいて感染力が強いと言われている Beijing familyの占有率は、多剤耐性で76.1%、全剤感受性で79.6%でとなった。今回の検討から多剤耐性結核菌の感染様式が全剤感受性菌と大きく変わらない可能性が示唆された。

D. 結論

保存株に分子疫学的手法を用いた今回の研究では、多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌の感染様式に大きな差がない可能性が示唆された。

E. 研究発表

(1) 論文発表

1. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K, Shigeto E, Harada N, Mitarai S, Okada M, Suzuki K, Inoue Y, Tsuyuguchi K, Sasaki Y, Mazurek GH, Tsuyuguchi I. Specific detection of tuberculosis infection:

an interferon-gamma-based assay using new antigens. Am J Respir Crit Care Med.170(1):59-64, 2004

2. 南 誠剛, 鈴木 克洋, 露口 一成, 馬渡 秀徳, 鈴木 真優美, 新井 徹, 井上義一, 林 清二, 坂谷 光則. Mycobacterium kansasiiによる感染性肺嚢胞の1症例. 日本呼吸器学会誌 42 (5) : 440-445, 2004
3. 南 誠剛, 鈴木 克洋, 露口 一成, 坂谷 光則. Mycobacterium xenopi 肺感染症の4症例 結核 79 (4) : 313-320, 2004
4. 石川秀雄, 木村剛, 大家晃子, 神谷敦, 井上義一, 鈴木克洋, 審良正則, 林清二, 河原正明, 岡田全司, 木村謙太郎, 井内敬二, 坂谷光則. 気管支動脈塞栓術におけるIDC (Interlocking Detachable Coil) 導入の有用性. 日本呼吸器学会雑誌 42 (8) 730-736, 2004
5. 鈴木克洋, 坂谷光則: 高齢者結核 特集「結核の現状と薬物療法」医薬ジャーナル 40 (2) : 754-759, 2004
6. 露口一成, 鈴木克洋, 坂谷光則: 非結核性抗酸菌症の疫学. 呼吸と循環152 (6) : 561-564, 2004
7. 鈴木克洋: 非結核性抗酸菌症の診断. 呼吸と循環152 (6) : 575-582, 2004
8. 鈴木克洋, 坂谷光則: 高齢者の結核. 日本医師会雑誌132 (1) : KM77-KM80, 2004
9. 鈴木克洋: 知っておきたい呼吸器感染症、非結核性抗酸菌症. 呼吸器科6 (1) : 22-28, 2004

10. 四元秀毅、米丸亮、鈴木克洋：若年者結核の種々相 呼吸23 (10) :788-795, 2004

11. 鈴木克洋：「呼吸器病学総合講座」肺抗酸菌感染症 総論（和田洋巳、三嶋理晃監修）pp228-229、メディカルレビュー社、大阪、2004

(2) 学会発表

1. 鈴木克洋. 核酸増幅法 <合同教育プログラム 肺結核の新しい診断法の臨床的評価> 第44回日本呼吸器学会学術講演会 (2004.4.1 東京)

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし