

図3 SCID-PBL/huマウスを用いた結核菌ペプチドに特異的なヒトキラーT細胞のin vivoにおける誘導<sup>2)</sup>

インが必要であることをはじめに明らかにした。クラスII抗原を認識しキラーT細胞分化因子を産生するTh細胞はCD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>であり、クラスI抗原を認識しキラーT細胞分化因子を産生するTh細胞はCD8<sup>+</sup>である。また、モノクローナル抗IL-2抗体を用いて、IL-2はキラーT細胞誘導に必要な因子のひとつであることを示した<sup>15)</sup>(図2)。

さらに、IL-2とは異なるサイトカインもT細胞分化誘導に必要であることをキラーT細胞分化因子を産生するヒトT細胞ハイブリドーマ、およびIL-2依存性ヒトThクローンを世界に先駆けて確立し明らかにした。その解析の結果、IL-6、IFN- $\gamma$ がキラーT細胞分化因子として強力なキラーT分化を誘導することを明らかにした<sup>16)~18)</sup>。筆者らはIL-6がTc誘導の後期の分化段階に作用することを解明した<sup>18)</sup>(図2)。多剤耐性結核患者PBLにおいて、これらのキラーT細胞分化因子すなわちIL-2、 $\gamma$ -IFN、IL-6の著明な低下を認めた<sup>5)(6)(8)~10)</sup>(表1)。また、糖尿病合併難治性結核患者ではPPD特異的キラーTの分化誘導の著しい低下を明らかにした<sup>5)(6)(8)~10)</sup>。

### 3. サイトカインと結核免疫

抗結核免疫にIFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12が重要であることは解析されている(岡田結核文献<sup>2)</sup>参照)。

### 4. マクロファージ(M $\phi$ )

結核菌の増殖場所はM $\phi$ 内である。一方、M $\phi$ は異物貪食能と細胞内殺菌能および抗原提示能をもつ。したがって結核菌が優位に立つか、ヒ

ト(生体)が優位に立つかの戦争でもある(詳細は岡田結核文献<sup>2)</sup>と文献<sup>3)</sup>参照)。

### 5. Toll-like受容体とマクロファージ活性化

最近発見されたToll-like receptor (TLR)ファミリーがinnate immunityの重要な役割を果たしている<sup>19)</sup>。結核菌のcell wall (LAM, mAGP, total lipid)による応答はTLR2を介する。一方、結核生菌に対する反応にはTLR2とTLR4が必要である。病原株の*M. tuberculosis*由来のMan LAMはM $\phi$ を活性化しないが、非病原性の抗酸菌は異なるglycolipid Ara LAMよりなり、これはTLR2を介してM $\phi$ を活性化する。この差が発病の差となる可能性もある。結核菌体成分19kDaのlipoproteinがTLR2を介してM $\phi$ を活性化する<sup>20)</sup>。また、抗酸菌DNAから見出されたCpGモチーフ(パリンδροーム配列)は感染防御免疫能増強することが示されていたが、CpGレセプターに対するTLR9が審良によりクローニングされた。

### 6. Th1リンパ球, Th2リンパ球

CD4<sup>+</sup>T細胞が結核免疫に重要であることはMHCクラスII<sup>-/-</sup>マウスやCD4<sup>-/-</sup>マウス抗CD4抗体投与マウスで明らかとなっている<sup>21)</sup>(Th1細胞と結核免疫については岡田結核文献<sup>2)</sup>参照)。

### 新しい結核ワクチン

結核ワクチンは①サブユニットワクチン、②DNAワクチン、③リコンビナントBCGワクチン(弱毒化結核菌を含む)、そのほかに大別され

る(表1)。

DNAワクチンのベクターとしては、①gene gun  
②プラスミド③アデノウイルスベクター④HVJ  
リポソーム④改良型HVJエンベロープベクター  
を計画中である<sup>2-8)21)</sup>。α抗原(Ag85B), ESAT-  
6, 種々のサイトカイン, HSP65, 38kDa,  
Mtb32, Mtb39, MDP1などについて, サブユニッ  
トワクチン, DNAワクチン, リコンビナントBCG  
ワクチンの形で, 多くの報告が主にマウスの結  
核感染の系でなされている<sup>22)23)</sup>。

Reed博士らはT細胞結核免疫を誘導する蛋白  
質抗原遺伝子のクローニングを迅速かつ, 絨緞  
爆撃的に行える画期的な系を開発した<sup>24)</sup>。

マウスではBCGワクチンをはるかに凌駕する  
新しい結核ワクチンはきわめて少ない。われわ  
れはHSP65 DNA+IL-12 DNA予防ワクチンにて  
BCGワクチンの100倍強力なワクチンの開発に成  
功した<sup>6)7)9)</sup>(表2)。一方, 長崎大学山田博士, 大  
原博士らは, キラーT細胞誘導結核菌蛋白質抗  
原遺伝子やサイトカイン遺伝子をBCG菌に導入

表1 新しい結核ワクチン<sup>2)</sup>

1. サブユニットワクチン  
Mtb72f融合タンパク質  
85B-ESAT-6融合タンパク質  
α 抗原 (Ag85B), Ag85A, MPB51, ESAT-6, Hsp65  
リコンビナントサイトカイン (IFN $\gamma$ など) (吸入・注射)  
新しい結核菌タンパク質抗原 Mtb32, Mtb39  
その他
2. DNAワクチン  
Hsp65 DNA, IL-12遺伝子, Hsp70 DNA, ESAT-6DNA, IL-6遺伝子, IL-6遺伝子+IL-6R遺伝子+gp130遺伝子,  
IFN $\gamma$ 遺伝子, Mtb72f遺伝子, IL-15遺伝子, IL-18遺伝子, M-CSF遺伝子, 38kD DNA, キラー T細胞誘導結核  
菌タンパク質抗原遺伝子, CD40L遺伝子, MPT64 DNA, MPT63 DNA, Kat G DNA, 上記の新しい結核菌タ  
ンパク質抗原遺伝子
3. リコンビナントBCGワクチン  
Mtb72f遺伝子  
Ag85A遺伝子, Ag85B遺伝子, Ag85C遺伝子, MPB51遺伝子, MDP-1遺伝子, HSP65遺伝子  
IL-6遺伝子, IFN $\gamma$ 遺伝子, IL-2遺伝子, IL-12遺伝子, IL-18遺伝子  
キラー T細胞誘導結核菌タンパク質遺伝子
4. 弱毒化結核菌  
弱毒化サルモネラ菌に結核免疫増強DNA導入し, 経口ワクチン  
弱毒化リステリア菌に結核免疫増強DNA導入し, 経口ワクチン
5. キラー T細胞移入

表2 新しい結核ワクチンの開発

(1)DNAワクチン HVJ-liposome/HSP66 DNA+IL-12 DNA	BCGより有効 (マウス, モルモット, カニクイザル)
(2)リコンビナントBCGワクチン	BCGより有効
①リコンビナント72f BCG	(マウス, モルモット, カニクイザル)
②リコンビナント(Ag85A+85B+MPB51) BCG	BCGより有効(マウス)
(3)サブユニットワクチン Mtb 72f融合タンパク	BCGより有効(カニクイザル) 多剤耐性結核患者T細胞機能増強活性(+) Phase I Study
(4)治療ワクチン IL-6 related DNA(マウス)	
(5)Priming-Booster Method BCG(priming)+新しいワクチン(booster)(カニクイザル)	
(6)遺伝子ノックアウトattenuatedリステリアを用いた新しい結核ワクチン(経口)	
(7)新しいベクター AAVベクター(1000倍発現高率↑), Adenovirusベクター —WHO STOP TB Partnership及びWHO STOP TB Vaccines Working Groupに選出	

するPNN2シャトルベクター(大腸菌⇄好酸菌)を用いてリコンビナントBCGワクチンを作製した。この方法はBCG自身にアジュバント作用があり、BCGがベクターとしての働きもかねている。

#### 1. DNAワクチン

われわれは①HSP65 DNA+IL-12 DNAのワクチンが相乗効果を示し、gene gunを用いた遺伝子投与でBCGよりもきわめて強力な(約100倍)結核予防ワクチンであることを明らかにした(自治医科大学吉田博士との共同研究)(表2)。IL-12のp35およびp40をCMVプロモーター下流域に挿入した発現プラスミドを作製した。さらに、ヒト型結核菌H37RV由来HSP65 DNAワクチンの作製に成功した(図4)。

HVJリボソームをベクターに用いた場合、HSP65

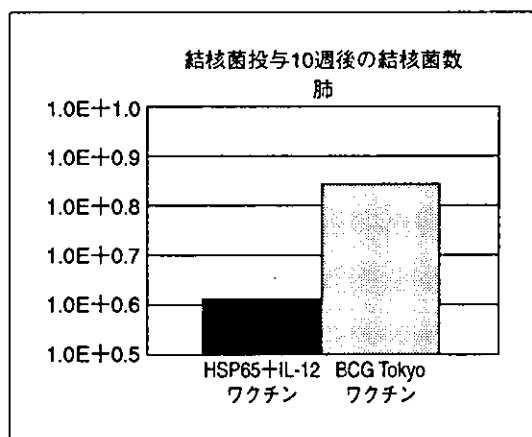


図4 HSP65DNA+IL-12 DNAワクチンによるBCGより100倍強力な抗結核ワクチン効果(マウス)<sup>2)</sup>

DNA単独(HVJリボソーム/HSP65)でBCGよりも有効であることをマウスの系で明らかにした(大阪大学医学部金田博士との共同研究)(表3)。また、後述のHSP65リコンビナントBCGで初回免疫しHVJリボソーム/HSP65 DNAで追加免疫をかけるpriming-booster法がより有効であることを明らかにした。

アデノウイルスベクター(E1a, E1b, E3領域を欠損させたヒト5型アデノウイルスベクターで、非増殖性・非感染性に優れたベクター)に導入したIL-6関連遺伝子(IL-6遺伝子+IL-6レセプター遺伝子+gp130遺伝子)ワクチンは、BCGよりも強力な治療ワクチン効果を示した(図5)。IL-6関連遺伝子ワクチンは、結核菌に対するキラーT細胞の分化・誘導およびTh1サイトカイン(IL-2およびIFN-γ)の産生誘導を介して抗結核効果を発揮した<sup>6)7)9)</sup>。

アデノウイルスベクターに導入したIFN-γ DNAもBCGよりも強力な治療・予防ワクチン効果を示した<sup>6)7)9)</sup>。

以上4つのワクチン効果は、キラーT細胞やTh1細胞の分化誘導を増強することによって発揮されることが示された<sup>6)7)9)</sup>。まとめると、結核死菌を食食させたJ774.1Mφを標的細胞とし、ワクチン投与後結核感染させたBALB/cマウスの脾細胞をPPDや結核菌で*in vitro*で再刺激し、エフェクター細胞として反応させ、IFN-γの産生でキラー活性を測定した。その結果、ワクチン効果とキラー活性は見事な相関が認められることを明らかにした。

表3 カニクイザルにおけるHVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン、リコンビナント72fBCGワクチンおよびMtb72f融合タンパクサブユニットワクチンによる抗結核効果

予防ワクチン	結核予防 ワクチン 効果	延命効果	血沈改善	体重増加	胸部X線 所見改善	免疫反応
						リンパ球 増殖反応 増強
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 ワクチン	++	++	+	±	++	++
④コントロール(生食)	-	-	-	-	-	-

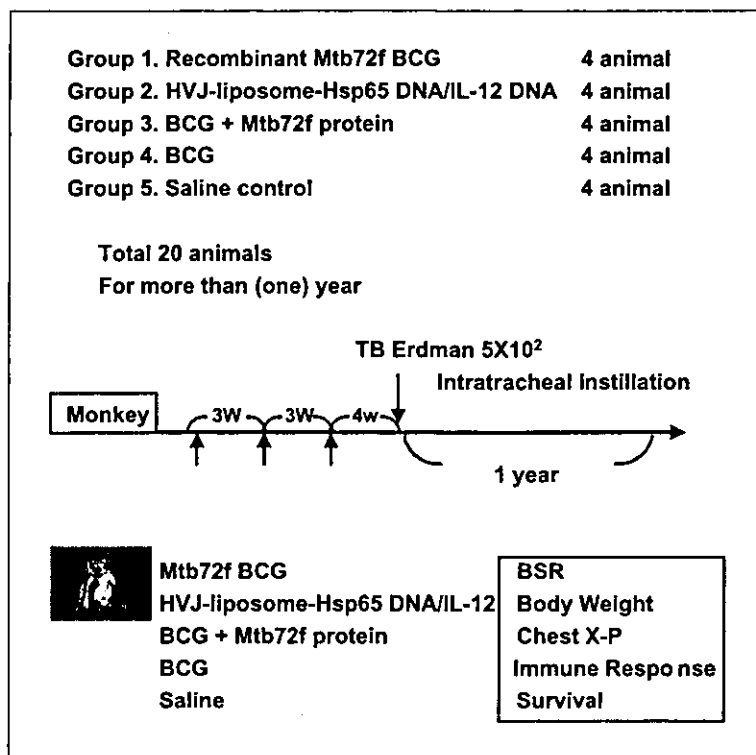


図5 カニクイザル(ヒトの結核感染にもっとも近いモデル: 文献<sup>28)</sup>)を用いた新しい結核ワクチン予防効果研究のプロトコール

一方, Huygenらは, Ag85AのDNAワクチンを用い, マウスで抗原特異的キラー T細胞(CTL)が誘導されることや, BCG免疫と同等の防御効果が得られることを明らかにした<sup>26)</sup>。

## 2. リコンビナントBCGワクチン

結核菌は300種以上の蛋白質を分泌するが,  $\alpha$  抗原Ag 85Bとそのファミリー(85A, Ag85C)DNAをリコンビナントBCGに使用した。Ag85Bは285アミノ酸からなり40アミノ酸のシグナルペプチドをもつ<sup>25)</sup>。

これらの遺伝子をPNN2シャトルベクター(大腸菌 $\leftrightarrow$ 好酸菌)に組み込みBCG東京菌に, 遺伝子を導入した。われわれはBA51(Ag85A+Ag85B+MPB51)リコンビナントBCGはBCGよりも強力なワクチンであることを静脈感染の系および気道感染の系で明らかにした。さらにAg85BリコンビナントBCGワクチン, Ag85AリコンビナントBCGワクチンやMDP1リコンビナントBCGワクチンでもBCG東京菌よりも強力なワクチン効果

を得た<sup>6)7)9)</sup>。また, 結核菌の増殖がきわめて遅いことを調節するDNA結合蛋白質MDP1(結核免疫抗原性もAg85Bより強い)をコードする遺伝子をBCGに組み込みrBCGを作製し, BCG東京菌よりも強力なワクチン効果を得た。さらに最近, サブユニットワクチンでサルでレベルで強力な予防効果が得られたMtb72f融合蛋白質のDNAを導入した72fリコンビナントBCGの作製に成功した。この72f rBCGはBA51 rBCGと同程度のきわめて強力な結核菌に特異的なIFN- $\gamma$ 産生 T細胞数の増強を誘導することをELISPOT(enzyme-linked immunospot) assayで明らかにした。

## 3. サブユニットワクチン

Mtb72f融合蛋白質(Mtb39とMtb32の融合蛋白質)のサブユニットワクチンはマウス, モルモットの系で結核予防ワクチン効果を示した<sup>25)</sup>。われわれはヒトの*in vitro*系でもMtb72f融合蛋白質を用いて免疫応答が増強することを示した(Reed博士らとの共同研究)。そのほかにも種々の結核菌

蛋白質抗原遺伝子のクローニングに成功し、サブユニットワクチン (Mtb72f, 39, 32, 8.4, 11, 41, 9.9, 16, 40, 31f, 71f) で *in vitro* 刺激したところ、多剤耐性結核患者の T 細胞免疫能が増強した<sup>6)</sup> (表 2)。

また、多剤耐性結核患者に IFN- $\gamma$  吸入療法を行い、投与期間中の多剤耐性結核菌の消失を認めている。しかしながら、IFN- $\gamma$  投与を中止すると再び多剤耐性結核菌が喀痰中に認められた。

一方、Anderson P らは 85B-ESAT51 の fusion 蛋白ワクチンがマウスとモルモットで BCG よりやや劣るが同程度に有効であることを報告している。

#### 4. 遺伝子ノックアウト attenuated (弱毒化) 菌体を用いた結核ワクチン

ある結核菌遺伝子を欠失させて弱毒化した結核菌をワクチンにする方法がある。われわれは (浜松医科大学小出教授と) さらに、akt 遺伝子を欠失させた無毒化リステリア菌に Ag85A-, 85BB-, MPB51-DNA を導入し新しい結核ワクチンを開発した<sup>27)</sup>。このワクチンは経口ワクチンとして応用できる利点がある。

これらの 1. ~ 4. の新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され WHO STOP TB Partnership および WHO STOP TB VACCINE GROUP MEETING に選出された。

#### 新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID-PBL/hu (ヒト結核ワクチン解析モデル) の作製

われわれが世界に先駆けて開発した SCID-PBL/hu の系で結核患者リンパ球を SCID マウスに生着させ、結核菌蛋白質に特異的なヒトキラー T 細胞誘導を示す画期的な、生体内ヒト免疫解析モデル (ヒト結核ワクチン効果解析モデル) を開発した<sup>6) 7) 9) 22)</sup> (図 4)。

#### 新しい結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル (*cynomolgus monkey*, もっともヒトの肺結核に近いモデル, 文献<sup>28)</sup> 参照) を用い BCG よりもはるかに強力な予防ワクチン効果 (生存率, 血沈, 体重, 肺の組織) を示すワクチン 3 種を開発した (図 5, 表 3)。すなわち、現在もっとも有力なものとして HVJ リポソーム/HSP65

DNA+IL-12 DNA ワクチン, r72f BCG ワクチンおよび Mtb72f fusion 融合蛋白質サブユニットワクチンがあげられる。(岡田, Reed 博士, Tan 博士ら, カニクイザルで共同研究)。事実、われわれはカニクイザルで結核感染後 1 年で、コントロール群 (生食投与群) では 4 匹中 4 匹死亡 (0% 生存) したが、HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン投与群は、4 匹中 2 匹生存 (50% 生存), r72f BCG ワクチンで 4 匹中 3 匹生存 (75% 生存), BCG Tokyo+72f fusion 蛋白で 4 匹中 4 匹生存 (100%) 生存を認め、これらのワクチン効果をサルレベルで認めた (2003 年第 1 回国際結核ワクチン学会) (表 3)。Ag85B-ESAT-6 融合蛋白質 (Anderson 博士ら) も報告されているが、モルモット、サルでは効果は不明である。一方 Huygen の Ag85A DNA ワクチンはマウス・モルモットで有効であったがサルの結核感染予防に対し有効でなかったという (2002 年第 4 回 World Congress on Tuberculosis) ワクシニアウイルスに 85A DNA を導入したワクチンや r85B BCG (Horowitz ら) も clinical trial が近い将来考えられている。もっとも切れ味のするどい臨床応用ワクチン候補の筆頭として HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンがあげられる。BCG+Mtb72f 融合蛋白質サブユニットワクチンは、第 I 相臨床試験が計画されている。さらに、われわれは HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンと 72f 融合蛋白ワクチンやリコンビナント 72f BCG ワクチンを組み合わせ、きわめて強力なワクチン開発を目指している<sup>5) ~ 7)</sup>。

#### おわりに

当国立療養所近畿中央病院は呼吸器疾患 (結核を含む) 準ナショナルセンターとなった。日本の結核患者数の 43% の診断・治療を行っている、国立病院・療養所 54 施設を統括し、国立病院・療養所政策医療呼吸器ネットワークを用い結核の新しい予防・治療法の確立が進展している。

サルにおいては 72f ワクチン HSP65 DNA+IL-12 DNA / HVJ-liposome ワクチンおよび r72f BCG ワクチン 72f 融合蛋白ワクチンが明らかに優れていることより、これらのワクチンが結核の発症予防や治療に役立つ日が来るであろう。

## 文 献

- 1) 螺良英郎, 山中正彰, 岡田全司. 結核菌の逆襲, 再興感染症としての結核症(解説). 感染・炎症・免疫 1998 ; 3 : 192.
- 2) 岡田全司, 田中高生, 喜多洋子. 結核感染・新しい結核ワクチンの開発「感染症発症の分子機構—宿主と病原体の分子の攻防」. Molecular Medicine 2002 ; 39 : 144.
- 3) Flynn JL, Chan J. Immunology of Tuberculosis. Annu Rev Immunol 2001 ; 19 : 93.
- 4) Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 1998 ; 157 : 679.
- 5) 岡田全司. 新しい結核ワクチン. 最新医学 2002 ; 57 : 1942.
- 6) 岡田全司. 抗結核キラー T リンパ球とリコンビナント BCG・DNA-ワクチンの開発による新しい予防・診断・治療法(H-11-新興-2). 厚生科学研究費補助金実績報告書・研究報告書. 2001. p. 1.
- 7) Okada M, Tanaka T, Inoue Y, et al. Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis. Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference[abstract] 2002 ; 171.
- 8) Gillis S, Okada M. New therapy, diagnosis and protection using recombinant BCG-, DNA- Vaccination and cytotoxic T lymphocytes against Mycobacterium Tuberculosis. New vaccine and new diagnosis. 平成12年度新興・再興感染症研究推進事業研究報告集, 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団. 2001. p. 355.
- 9) 岡田全司, 岸本忠三. リンホカインとモノカイン. In ; 山村雄一, 織田敏次, 黒岩義五郎, ほか・監. 新内科学体系 ; 年刊版 '84-C. 東京 : 中山書店 ; 1984. p. 221.
- 10) 岡田全司. サイトカインと腫瘍免疫. In ; 石井威望, 岡 博, ほか・編. 新医科学大系8B ; 免疫応答—生体の防御機構II. 東京 : 中山書店 ; 1996. p. 269.
- 11) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium Tuberculosis from the complete genome sequence. Nature 1998 ; 393 : 537.
- 12) Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, et al. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. Science 1997 ; 276 : 1684.
- 13) Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al. An Antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science 1998 ; 282 : 121.
- 14) Tanaka F, Abe M, Akiyoshi T, et al. The anti-human tumor effect and generation of human cytotoxic T cells in SCID mice given human peripheral blood lymphocytes by the *in vivo* transfer of the Interleukin-6 gene using adenovirus vector. Cancer Res 1997 ; 57 : 1335.
- 15) Okada M, Klimpel GR, Kuppers RC, et al. The differentiation of cytotoxic T cells in vitro. I. Amplifying factor(s) in the primary response is Lyt1 + cell dependent. J Immunol 1997 ; 122 : 2527.
- 16) Okada M, Yoshimura N, Kaieda T, et al. Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. Proc Natl Acad Sci USA 1981 ; 78 : 7718.
- 17) Okada M, Sakaguchi N, Yoshimura N, et al. B cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas. Two distinct kinds of B cell growth factor and their synergism in B cell proliferation. J Exp Med 1983 ; 157 : 583.
- 18) Okada M, Kitahara M, Kishimoto S, et al. IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the *in vitro* induction of cytotoxic T cells. J Immunol 1988 ; 141 : 1543.
- 19) Akira S. Toll-like receptor and innate immunity. Adv Immunol 2001 ; 78 : 1.
- 20) Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. Science 1999 ; 285 : 732.
- 21) Hess J, Schaible U, Raupach B, et al. Exploiting the immune system: toward new vaccines against intracellular bacteria. Adv Immunol 2000 ; 75 : 1.
- 22) Anderson P. TB vaccines. progress and problems. Trends Immunol 2001 ; 22 : 160.
- 23) Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. Nature 1999 ; 400 : 269.

- 24) Alderson MR, Bement T, Day CH, et al. Expression cloning of an immunodominant family of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using human CD4(+) T cell. *J Exp Med* 2000 ; 191 : 551.
- 25) Reed S, Alderson M, Campos-Neto A, et al. Development of a recombinant tuberculosis vaccine. Thirty-Fifth research conference on tuberculosis and leprosy ; 2000 Jun 18-20 ; Yokohama, Japan. 2000 ; 159.
- 26) Huygen K, Content J, Denis O, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med* 1996 ; 2 : 893.
- 27) Miki K, Nagata T, Tanaka T, et al. 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* 2004 ; 72 : 2014.
- 28) Walsh GP, Tan EV, dela Cruz EC, et al. The Philippine cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat Med* 1996 ; 2 : 430.

\* \* \*

平成 15 年度  
日米医学協力計画  
結核・ハンセン病専門部会  
年次報告書

**ANNUAL REPORT 2003**  
**U.S.-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM**  
**TUBERCULOSIS AND LEPROSY PANEL**

日米医学協力計画  
結核・ハンセン病専門部会  
**U.S.-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM**  
**TUBERCULOSIS AND LEPROSY PANEL**



## 研究実績報告書

「抗結核キラーT と DNA・ワクチン・リコンビナント BCG・及びサブユニットワクチンの開発による新しい予防・診断・治療法（ヒト結核感染に最も近いカンクイザルを用いた）」

研究者名 岡田全司<sup>1)</sup>、田中高生<sup>1)</sup>、喜多洋子<sup>1)</sup>、桑山さち子<sup>1)</sup>、村木裕美子<sup>1)</sup>、金丸典子<sup>1)</sup>、橋元里実<sup>1)</sup>、高井寛子<sup>1)</sup>、岡田知佳<sup>1)</sup>、福永有可里<sup>1)</sup>、坂口弥生<sup>1)</sup>、古川いづみ<sup>1)</sup>、山田恭子<sup>1)</sup>、武本優次<sup>1)</sup>、坂谷光則<sup>1)</sup>、井上義一<sup>1)</sup>、吉田栄人<sup>2)</sup>、金田安史<sup>3)</sup>、山田 毅<sup>4)</sup>、大原直也<sup>4)</sup>、内藤真理子<sup>4)</sup>、松本 真<sup>5)</sup>、永田年<sup>6)</sup>、小出幸夫<sup>6)</sup>、Steven Reed<sup>7)</sup>、Yasir Skeiky<sup>7)</sup>、Babie Tan<sup>8)</sup>、Eiuardo de la Cruz<sup>8)</sup>、Robert Gelber<sup>8)</sup>、David McMurray<sup>9)</sup>

所 属 <sup>1)</sup>国立療養所近畿中央病院臨床研究センター <sup>2)</sup>自治医科大学医動物学 <sup>3)</sup>大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療 <sup>4)</sup>長崎大学歯学部口腔細菌学 <sup>5)</sup>大塚製薬研究所 <sup>6)</sup>浜松医科大学 <sup>7)</sup>Corixa 研究所 <sup>8)</sup>Leonard Wood Memorial 研究所 <sup>9)</sup>Texas A&M 大学

### 【研究目的】

結核罹患率の増加、集団感染が頻発、AIDS や糖尿病患者の免疫不全疾患に高頻度に合併、薬剤耐性結核が増え、いわゆる難治性結核の対策が早急に望まれている。したがって、新しい予防・診断・治療の研究が必須である。

すなわち、①BCG よりも強力な新しい DNA ワクチン、リコンビナント BCG ワクチンやサブユニットワクチンの開発を行い、新しい予防・治療の臨床研究を目的とする。②キラーT 細胞の結核免疫に対するメカニズムや本当の重要性に関する研究は不明である。したがって、キラーT 細胞活性と結核発病を分子・遺伝子レベルで解明するとともに、③これらを用いた結核予後診断、難治性診断を行う。④ツ反に代わる、BCG 接種者に反応しない、結核感染患者に特異的な診断法の開発を行うことを目的とした。

### 【要旨】

[1] 新しい結核予防ワクチンの開発 ①HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン、②リコンビナント 72f BCG (r72f BCG) ワクチン、③72f fusion 蛋白

ワクチンの世界の最先端のワクチンを開発した。

新しい DNA ワクチンの ①HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは、カニクイザル(最もヒト結核感染に近いモデル Nature Med. 1996) で強力な結核予防効果を示した。(マウスの系で BCG よりも 100 倍以上強力なワクチン効果を示した) HSP65 DNA+ IL-12 DNA ワクチン、 ②リコンビナント 72f BCG ワクチン、 ③72f fusion 蛋白ワクチンはサルで同等の延命効果、胸部 X 線所見(結核病巣)、血沈、体重で強い改善傾向がみられた。(図 1)

- [2] さらに、HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンはモルモットの系でも BCG より強力な画期的な結核予防ワクチンであることを明らかにした。
- [3] 1000 倍発現効率が高い画期的な AAV ベクター(HSP65 DNA)の開発に成功した。経口リステリア結核ワクチン (Ag85Complex) を開発した。
- [4] 新しい治療ワクチンの開発: IL-6 関連遺伝子ワクチンは初めて結核治療ワクチンとしても有効であることを示した。
- [5] これらが評価され WHO STOP TB Partnership 及び WHO TB Vaccine Working Group に選出された。(表 1)

#### 【方法と結果】

- [1] ① DNA ワクチン (カニクイザル): HSP65 DNA+ IL-12 DNA ワクチンは相乗効果を示し、BCG よりも強力(100 倍強力)な結核予防ワクチンであることをマウスの系で明らかにした。

HVJ-liposome/ HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは、カニクイザル(最もヒト結核感染に近いモデル Nature Med. 1996) で強力な抗結核予防効果を示した。延命効果、胸部 X 線所見(結核病巣)、血沈、体重で強い改善傾向がみられた。(図 2)

- ② モルモット:

さらに、HSP65 DNA+ IL-12 DNA ワクチンはモルモットの系でも BCG より強力な画期的な結核予防ワクチンであることを明らかにした。モルモットを用いた結核研究の世界の第一人者 Texas A&M 大学教授 David N. McMurray 博士と共同研究を行った。(McMurray 博士は結核エアゾル感染させたモルモットを用いて、米国 FDA や NIH より委託された新しい結核ワクチンの効果判定を行っており、名実ともにモルモットを用いた結核研究の大御所である。)

結核 DNA ワクチン群を BCG (1×10<sup>3</sup>) ワクチン、Empty ベクターワクチン、HVJ-liposome / HSP65 DNA ワクチン、HVJ-liposome / モ

ルモット IL-12 DNA ワクチン、HVJ-liposome / HSP65 DNA+モルモット IL-12DNA ワクチンの 5 群のモルモットを用いた。

[2] リコンビナント 72f ワクチン

r72f BCG はマウス、モルモット、サルで BCG よりも強い結核予防ワクチン効果を発揮することを明らかにした。

これらの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 fusion 蛋白ワクチンを免疫したカニクイザルの生存率と免疫増強効果、血沈、体重の改善効果は相関した。

[3] 72f Fusion 蛋白ワクチン (結核蛋白 Mtb39 と Mtb32 の fusion 蛋白ワクチン) のサブユニットワクチンがカニクイザル (cynomolgus monkey) のレベルで BCG よりも有効であることを明らかにした。

新しい 72f fusion 蛋白ワクチンはヒト多剤耐性結核患者 T 細胞の結核免疫を増強した。BCG で priming し、後に 72f 融合蛋白ワクチン (booster ワクチン) を行うと、カニクイザルで極めて強力な予防効果を示した。

日本における成人での 72f 融合蛋白の booster ワクチンが有効である可能性を示唆。 Phase I study を計画。

[4] Priming-Booster 法で最も強力な新しい結核ワクチンを作製しつつある。本邦では乳幼児に BCG 接種を行う。したがって成人における booster ワクチンとして上記のワクチンをサルの系で行いつつある。Priming は BCG 東京ワクチンを用い、すでに免疫をした。

Priming-Booster 法は 2003 年第一回国際結核ワクチン学会で結核ワクチン効果を得る極めて良い方法であるとのコンセンサスが得られた。

[5] 新しい治療ワクチンの開発: IL-6 関連遺伝子ワクチン(Adeno ウイルスベクター/ IL-6 DNA+ IL-6 レセプターDNA+ gp130 DNA ワクチン)は初めて結核治療ワクチンとしても有効であることを示した。

[6] ① 1000 倍発現効率が高い画期的な AAV ベクターワクチンを開発した。

AAV(2/5) 型ベクターに組み込んだ HSP65 DNA ワクチン すなわち AAV(2/5)/ HSP65 ワクチンは、今までの AAV(2/1)/ HSP65 DNA ワクチンに比し HSP65 蛋白抗原に対する T 細胞免疫反応を極めて強く増強した。 さらに、AAV(2/5)/Ag85B DNA ワクチンも Ag85B 蛋白に対する T 細胞反応を増強した (ハーバード大学医学部 R.C.Mulligan 教授との共同研究)。このことより、有力な結核ワクチンとなることが示唆された。

② Adenovirus ベクター/ HSP65 DNA 及び Adenovirus ベクター/Ag85B DNA ワクチンも作製した。これらのワクチンも強力な T 細胞免疫誘導

効果を示した (Mulligan 教授との共同研究)。

- ③ 弱毒化したリステリア菌 (act gene を欠損させた) に Ag85A, Ag85B, MPB51 DNA を導入し免疫したマウスは結核感染予防効果を示した。これらの、①②③を組み合わせ、さらに BCG 東京ワクチンと priming-booster 法を用い、最も強力なワクチンを作製する。
- [7] リコンビナント BCG ワクチン: BA51(Ag85A+ Ag85B+ MPB51)リコンビナント BCG は BCG よりも強力なワクチンであることを明らかにした。種々のリコンビナント BCG ワクチンを作製した。
- [8] 我々が世界に先駆けて開発した SCID-PBL/hu の系で結核患者リンパ球を SCID マウスに生着させ、結核蛋白 ESAT-6 ペプチドで免疫し、画期的な結核菌に対する生体内ヒト T 細胞免疫解析モデルを開発した。さらに、IL-2 レセプター鎖ノックアウト SCID-PBL/hu のモデルでヒト多剤耐性結核治療モデルを世界に先駆けて開発した。
- [9] 一方、多くのヒトに感染する Super Spreader 多剤耐性結核菌 SS 0308-0783 株 (一人の Super Spreader 患者から多数のヒトに感染) を用いた。IL-2R(-/-)SCID PBL/hu モデルで治療ワクチン・治療薬を解析中。
- [10] リコンビナント DPPD 蛋白は結核感染に特異的で、BCG 接種群には反応しないことを明らかにした。すなわち、ツベルクリン反応に代わる新しい結核特異的診断法 DPPD skin test を開発した。  
(ツ反に用いられる PPD は多種の蛋白を含む。この中より、結核感染に極めて特異性の高い、ツ反に代わる蛋白 DPPD のアミノ酸配列及び遺伝子クローニングに成功した。リコンビナント DPPD 蛋白は結核感染に特異的で、BCG 接種群には反応しないことをモルモットですでに示した)
- [11] さらに結核感染に特異的な ESAT-6+ CFP10 test (in vitro)を開発した。

#### 【考察と結論】

- [1] ① 新しい DNA ワクチンの開発: ① HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは、モルモットで BCG ワクチンより有効で、サル (カニクイザル) でも有効であり、世界の最先端のワクチンであることが示された。
- ② 新しいリコンビナント BCG ワクチンの開発: r72f BCG は、サルで BCG よりも強い結核予防ワクチン効果を明らかにした。
- ③ 新しい結核サブユニットワクチンの開発: Mtb72f fusion 蛋白+BCG 東京ワクチンはカニクイザルで BCG よりも強力な抗結核予防効果を示した。
- [2] モルモットを用いた結核菌吸入感染系における新しい結核ワクチンの

予防効果のアッセイで HSP65DNA+IL-12 DNA ワクチンは BCG よりも有効であることを示した。

- [3] これらの新しい結核ワクチン①HSP65DNA+IL-12 DNA ワクチン、②リコンビナント BCG ワクチン、③72f 融合タンパク+BCG ワクチンは世界に先駆けてカニクイザルの系で BCG よりも有効な結核予防ワクチンであることを明らかにした。
- [4] これらのワクチンの臨床応用を計画している。
- [5] これらの研究等が極めて高く評価され WHO (World Health Organization : 世界保健機関) より Global Partnership to stop TB (WHO TB stop Partnership) に選出された。さらに WHO STOP TB Vaccine Meeting のメンバーに選出された。  
したがってこれらの新しい結核ワクチンを本邦のみでなく全世界に供給して国際貢献を行う用意がある。

#### 【平成 15 年度論文・学会発表等】

岡田全司

1. Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M, Koide Y.: Induction of protective cellular immunity against Mycobacterium tuberculosis by recombinant attenuated self-destructing Listeria monocytogenes strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 complex and MPB/MPT51, Infection and Immunity 2004 72(4):2014-2021.
2. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Okada M, Shigeto E, Harada N, Mitarai S, Suzuki K, Inoue Y, Tsuyuguchi K, Sasaki Y, GH Mazurek, Tsuyuguchi I.: Specific Detection of Tuberculosis Infection an Interferon-gamma Based Assay using New Antigens. American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine 2004 (in press)
3. Koide Y, Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M.: Induction of protective cellular immunity against Mycobacterium tuberculosis by recombinant attenuated self-destructing Listeria monocytogenes strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 complex and MPB/MPT51. Keystone Symposia: Rational Design of Vaccine and Immunotherapeutics, 2004,

p.67.

4. Koide Y, Miki K, Nagata T, Suzuki M, Aoshi T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Okada M.: Induction of protective cellular immunity against Mycobacterium tuberculosis using a DNA vaccine encoding MPB51 antigen carried by attenuated suicide Listeria monocytogenes and identification of T-cell epitopes of the antigen.: Thirty-eighth Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, US-Japan Cooperative Medical Science Program 2003, p.32-38.
5. R. Ryll, M. Hirai, M. Okada, N. Fujiwara, I. Tomiyasu, Y. Kumazawa and I. Yano.: Inhibition of TDM-induced TNF- $\alpha$  release by sulfo lipid: a potential new virulence mechanism of Mycobacterium tuberculosis. Microbiol. Pathogenesis (in press)
6. Mitsuyama M, Akagawa K, Kobayashi K, Sugawara I, Kawakami K, Yamamoto S, Okada M.: Up-to-date understanding of tuberculosis immunity. Kekkaku. 78(1): 51-5.,2003
7. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Matsumoto K, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.dela Cruz, E.V. Tan, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M.: Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis Keystone 2003, P93, 335.
8. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M.: Novel (Recombinant BCG- and DNA- )Vaccination against Tuberculosis FASEB 2003 17(7) C25, 32.9.
9. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M.: Novel (Recombinant BCG- and DNA- )Vaccination against Tuberculosis. Thirty-Eighth Tuberculosis and Leprosy Research Conference 2003, P191.
10. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.V.Tan, E.C.Dela Cruz, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M.: Novel (Recombinant BCG- and DNA- )Vaccination against Tuberculosis . The Awaji International Forum Infection Immunity. 2003, P126.

11. Yoshida S, Kondoh D, Arai E, Matsuoka H, Seki C, Tanaka T, Okada M, Ishii A.: Baculovirus virions displaying Plasmodium berghei circumsporozoite protein protect mice against malaria sporozoite infection. *Virology* 2003, 316(1): 161-70.
12. 岡田全司: 結核感染(サトウカシの病態への関与—感染症) “医学の歩み: サトウカシ・state of arts” 宮坂信之、宮島篤編 医歯薬出版 東京 2004 (in press)
13. 岡田全司: 肺結核(感染症: 細菌・ウイルスなどによる感染症/呼吸器) 「家庭医学大全科」編集 倉田毅, 総合監修 高久史麿、猿田享男、北村惣一郎、福井次年 法研 東京 2004 (in press)
14. 岡田全司: 膿胸(感染症: 細菌・ウイルスなどによる感染症/呼吸器) 「家庭医学大全科」編集 倉田毅, 総合監修 高久史麿、猿田享男、北村惣一郎、福井次年 法研 東京 2004 (in press)
15. 岡田全司: 結核性髄膜炎(感染症: 細菌・ウイルスなどによる感染症/脳) 「家庭医学大全科」編集 倉田毅, 総合監修 高久史麿、猿田享男、北村惣一郎、福井次年 法研 東京 2004 (in press)
16. 岡田全司: 新たな結核ワクチン開発 “特集Ⅱ: 感染免疫における新知見” 臨床免疫(出版中) 2004
17. 岡田全司: 結核ワクチン “結核 第4版” 編集 泉孝英, 網谷良一 医学書院 東京(出版中) 2004
18. 岡田全司: 結核 “分子予防環境医学(生命科学研究の予防・環境医学への統合)” 分子予防環境医学研究会編 pp150-161, 2003, 本の泉社, 東京
19. 岡田全司: 1週1話 新たな抗結核ワクチン. 日本醫事新報 No.4121 Page89 2003.4.
20. 岡田全司: 抗結核キラーTとリコンビナント BCG・DNA-ワクチン・及びサブユニットワクチンの開発による新しい予防・診断・治療法(マウス、モルモット、カニクイザルを用いた) 平成14年度日米医学協力計画 結核・ハンセン病専門部会年次報告書 Page185-192 Annual report 2002 U.S. Japan cooperative medical science program tuberculosis and leprosy panel 2003.4
21. 岡田全司: 国立病院・療養所における臨床研究と評価 呼吸器疾患(結核・肺がん)に対する臨床研究(新しい結核ワクチン, 肺がんワクチン及び新しい診断法・予防法の開発)と評価. 医療 57 巻 1 号 Page51-53 2003

表 1

## [ Summary ]

### 新しい結核ワクチンの開発

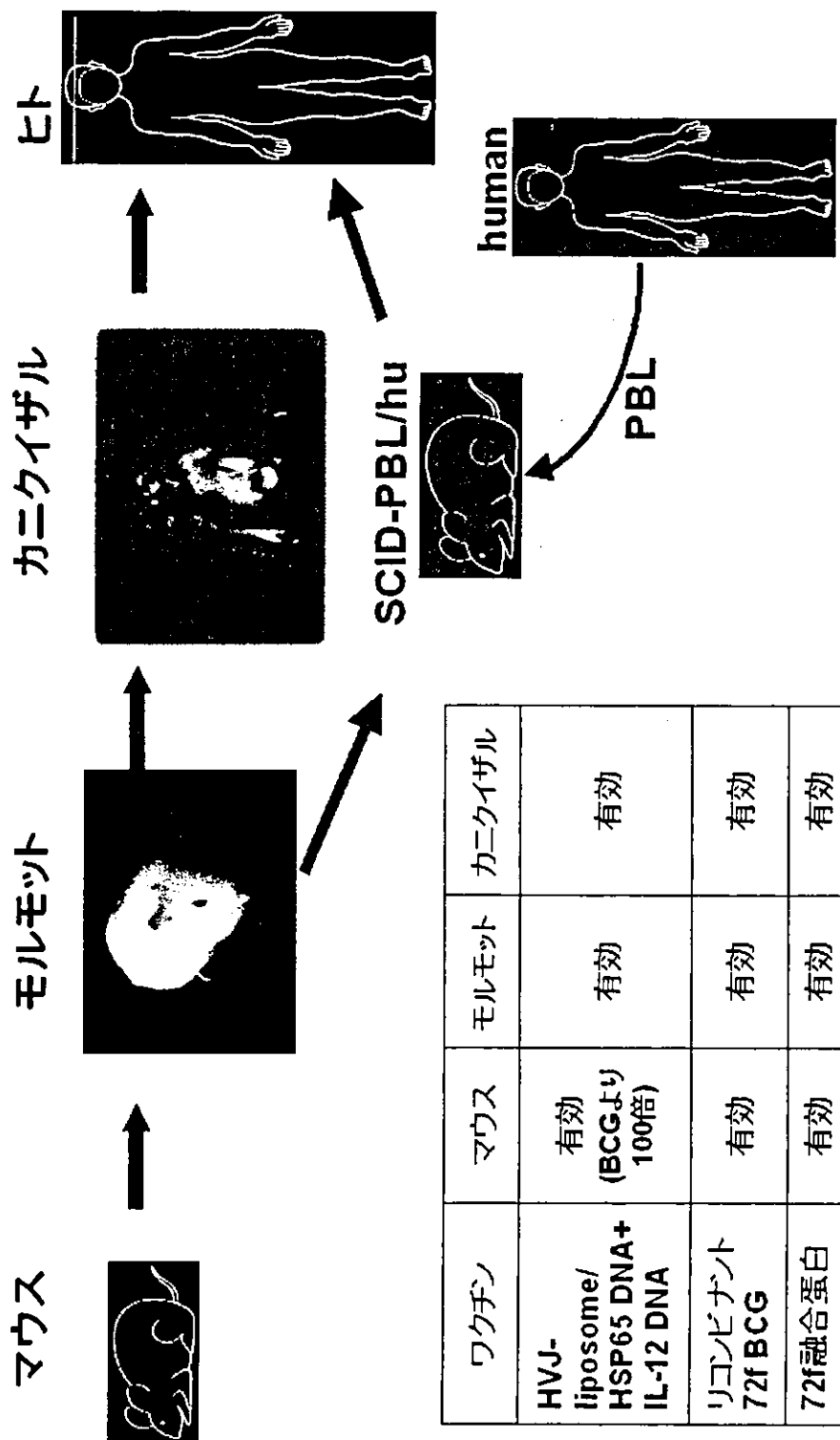
- |  |   |
|--|---|
| (1) DNAワクチン<br>HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA                      | BCGより有効<br>(マウス、モルモット、カニクイザル)                             |
| (2) リコンビナントBCGワクチン<br>① リコンビナント72f BCG<br>② リコンビナント(Ag85A+85B+MPB51) BCG | BCGより有効<br>(マウス、モルモット、カニクイザル)<br>BCGより有効 (マウス)            |
| (3) サブユニットワクチン<br>Mtb 72f 融合タンパク   | BCGより有効 (カニクイザル)<br>多剤耐性結核患者T細胞機能増強活性(+)<br>Phase I Study |
| (4) 治療ワクチン<br>IL-6 related DNA (マウス)                                     |   |
| (5) Priming-Booster Method<br>BCG (priming) + 新しいワクチン (booster) (カニクイザル) |   |
| (6) 遺伝子ノックアウトattenuatedリステリアを用いた新しい結核ワクチン(経口)                            |   |
| (7) 新しいベクター<br>AAVベクター(1000倍発現効率↑)、Adenovirusベクター                        |   |

→ WHO STOP TB Partnership及WHO STOP TB vaccine Working Groupに選出



図 1

# The Development of Novel Vaccines for M.tuberculosis using animal models

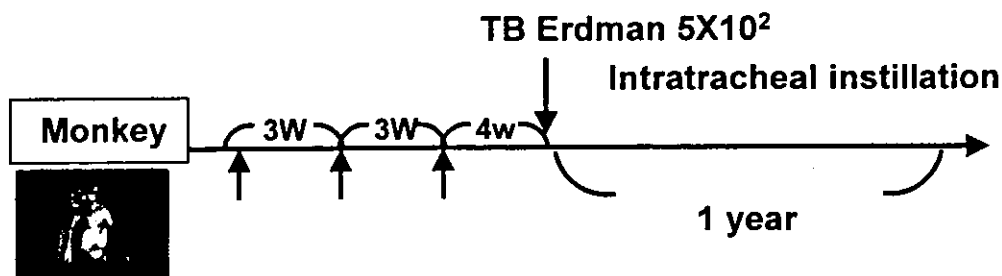


# Protocol

## Novel vaccine for Tuberculosis Cynomolgus monkey

Group 1. Recombinant Mtb72f BCG	4 animal
Group 2. HVJ-liposome-Hsp65 DNA/IL-12 DNA	4 animal
Group 3. BCG + Mtb72f protein	4 animal
Group 4. BCG	4 animal
Group 5. Saline control	4 animal

Total 20 animals  
For more than (one) year



Mtb72f BCG  
HVJ-liposome-Hsp65 DNA/IL-12  
BCG + Mtb72f protein  
BCG  
Saline

BSR  
Body Weight  
Chest X-P  
Immune Response  
Survival

平成 15 年度  
日米医学協力計画  
結核・ハンセン病専門部会  
年次報告書

**ANNUAL REPORT 2003**  
**U.S.-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM**  
**TUBERCULOSIS AND LEPROSY PANEL**

日米医学協力計画  
結核・ハンセン病専門部会  
**U.S.-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM**  
**TUBERCULOSIS AND LEPROSY PANEL**

## 外来性再感染も含む多剤耐性結核菌による院内集団感染事例

露口一成、鈴木克洋、吉田志緒美、岡田全司、木村謙太郎、坂谷光則

国立療養所近畿中央病院 内科、臨床研究センター

### はじめに

今回ここに述べる事例は近畿地区を中心に報道されたもので、56歳男性の多剤耐性肺結核患者が感染源となり、家族1人と看護師2人を含む5人に発病させた院内集団感染事例である。結核に携わる医療従事者にとってはショッキングな事例であった。それは、①従来病原性が弱いと漠然と考えられてきた多剤耐性結核菌による集団感染であったこと、②うち2名は、全剤感受性結核にて治療中に多剤耐性結核菌の重感染を受けて発病したと考えられること、による。今後の結核感染対策にも影響を及ぼす重要な事例であると思われるのでここに報告する。

### 事例

#### 患者 A (感染源)

初発患者 A は 56 歳の男性であり、湿性咳嗽を主訴として平成 12 年 3 月 27 日 X 病院を受診し、胸部 X 線異常及び喀痰抗酸菌塗抹陽性のため肺結核として同院入院となった。その際の喀痰培養で結核菌を認め、感受性検査にて INH、RFP を含む多くの抗結核薬に耐性であった。過去に抗結核治療の既往はなく、初回多剤耐性結核と考えられた。当初 INH、RFP、PZA、EB による化学療法が開始され、感受性判明後は CS、EVM、PAS、ニューキノロン剤等による治療が行われたが排菌は持続し改善を認めないため、外科的治療の適応検討のため平成 13 年 6 月 6 日 Y 病院転院となる。しかし、病巣が左右肺にわたって広く存在するため手術は困難と判断し、PZA、EVM、CPFX、MINO、CVA/AMPC 等による化学療法を継続されていた。平成 14 年 6 月、他患者とのトラブルがあり同院入院継続が困難となったため 6 月 12 日国立療養所近畿中央病院転院となる。転院後化学療法を継続していたが、大量排菌は持続し改善傾向は全くみられなかった。病巣は左右肺にわたってはいたが、空洞は右上葉のみであったため、空洞部分の菌量減少を目的に、平成 14 年 11 月 19 日空洞切開術を施行した。以後現在に至るまで、化学療法を継続しながら空洞部のガーゼ交換を行っており、平成 15 年 6 月からは、わずか