

では1910年頃であり、「女工哀史」[(製糸工業)を中心とした産業革命]では人口10万対763にもなった。このため「亡国病」としての1935年から第二次世界大戦終戦時まで死亡順位の一位であった。

その後生活水準の向上や栄養改善による宿主免疫力増強、さらには、抗結核剤ストレプトマイシンの発見や結核予防法(患者の発見, 集団検診, 隔離・治療)により減少の一途をたどった。SMにつづき, INH(イソニアジド)さらには最も切れ味の鋭いRFP(リファンピシン)の出現により結核患者は減少した。

しかし, 1980年以降, 高齢化やHIV感染に伴う結核合併症が増加, 又, 糖尿病合併に伴う結核症も増加してきている。

BCGは結核予防ワクチンとして, 本邦では2003年3月まで小児, 小, 中学生の予防ワクチンとして使用されてきた。しかし, 小児結核(特に結核性髄膜炎)には有効であるが成人に対してのワクチン効果は, ばらつきが大きく賛否両論であり, 本邦でもBCG接種は小児のみと法改正がなされた。

したがって成人にも有効な新しい結核ワクチンの開発が切望されている。

2. 結核菌の分子疫学

結核菌のゲノム中にランダムに存在する挿入配列(insertion sequence: IS)6110(IS6110は大腸菌のIS3ファミリーに属する転位因子で全長は1,355bpである。)が発見され, このIS6110をプローブにしたrestriction fragment length polymorphism (RFLP)analysis[制限酵素断片長多型分析]

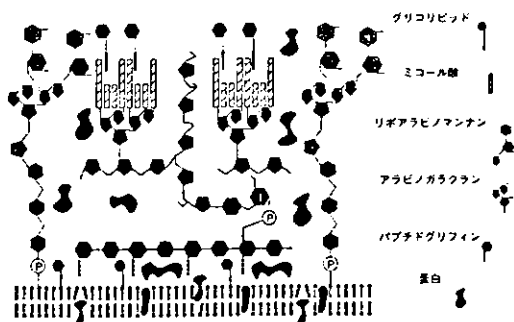


図3 結核菌の細胞壁モデル(P Brennanら)

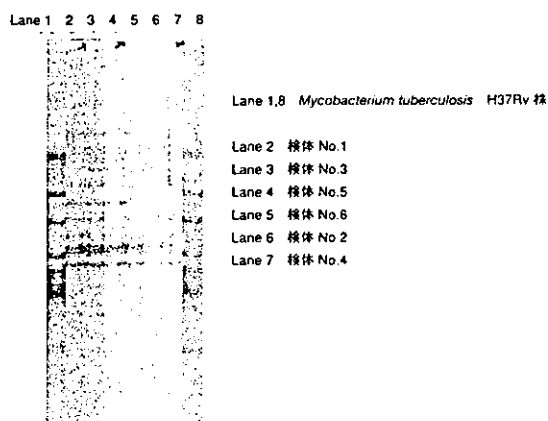


図2 院内感染の結核菌のRFLP解析
6検体中No.1, No.3, No.5とNo.6はRFLPパターンが一致。したがってNo.1, No.3, No.5, No.6の患者は同一結核菌による院内感染である。

が可能となり, この手法が感染源の特定の定石となっている¹²⁾。

すなわち, その同一性により感染源追跡, 再燃と再感染の区別, 感染様式, 院内感染, 薬剤耐性菌の感染経路等の解明に大きく寄与している。さらにIS1081, DR(direct repeat) PGRS(polymorphism GC-rich sequence), スポリゴタイピング(spoligotyping)法, パルスフィールド電気泳動を用いても詳細に検討できる。これらの分析法を分子疫学と呼ばれている(図2)。

3. 抗酸菌感染症

抗酸菌の伝染性感染疾患として, 結核(tuberculosis)とハンセン病(leprosy)がある。結核はM. tuberculosisが病原菌で, 後者はM. lepraeが病原菌である。結核とよく似た肺病変をきたすものとして非定型抗酸菌症があり, 本邦での抗酸菌感染症で入院している患者の約1/5が非定型抗酸菌症である[これは非伝染性, 主としてMAC症(M. aviumとM. intracellulare)やM. Kansaiiが非定型抗酸菌症の大部分を占める]。これらは, AIDSに合併してよく発症するが, AIDS初期には結核, 後期には非定型抗酸菌症が合併しやすい。

2. 結核菌の特性

結核菌(Mycobacterium tuberculosis)は, マイ

コバクテリウム属 (Genus *Mycobacterium*) に属する桿菌で好気性桿菌である。グラム染色では染色され難く、抗酸性染色によってのみ染色され、抗酸菌 (acid-fast bacillus) と呼ばれる¹³⁾。

これは細胞壁に多量の脂質が含まれ、ワックス様の疎水性の強い成分 (主としてミコール酸 mycolic acid) よりなることによる (図3)。したがって種々の物質の細胞壁透過性を低下させ、乾燥、消毒剤、酸、アルカリに抵抗性を示す。さらにきびしい物理化学的環境でも生き延び体外や体内 (宿主: ヒト体内) で生き延びる persister となる。

Mycobacterium 属、感染症の共通の特徴は結核菌表層のミコール酸含有脂質等 (ケトミコール酸やメトキシミコール酸が強毒結核菌に関与するともいわれている) による宿主に対する細胞性免疫誘導に基づく乾酪性肉芽腫病変である。一方、cell wall skeleton (CWS) の N Acetyl - muramyl L Ala Glu がキラー T を強力に誘導する。(岡田ら)

1. 結核菌の形態学的特徴

結核菌は小桿菌 (大きさ $0.2 \sim 0.5 \mu\text{m} \times 2 \sim 4 \mu\text{m}$) でチール・ネールゼン (Ziehl-Neelsen) 染色法で濃紅色に染色される。

2. 結核菌の培養

他の細菌と異なり、小川培地、7H11培地、MGIT培地ではじめて分裂・増殖・コロニーを形成する。分裂は15~24時間に1回分裂し発育速度が極めて遅い。したがって、コロニー形成には小川培地で3週間(21日)~4週間(28日)を要する。一方、近年開発されたMGITでは培養期間を14日ですませる。したがって、本邦の呼吸器疾患(結核を含む)の準ナショナルセンターとなった国立療養所近畿中央病院を中心に国立病院・療養所呼吸器疾患基幹・専門施設(54施設)(政策医療呼吸器ネットワーク)で、結核診断法を小川培地からMGIT培地に切り変えつつある。

3. 結核菌の感染機序・ライフサイクルと新しい結核診断法

1. 結核菌の感染機序とライフサイクル

結核は結核菌による慢性の感染症である。結核

菌の感染があっても発病(一次結核)に至るのは、5%に過ぎない。一方、感染した結核菌は冬眠状態(dormancy)で体内に生存し続ける¹⁴⁾。その5%は「内因性再燃」を起こす(図1)。大部分の成人の結核(二次結核)はこの形で発病し、肺に結節、空洞等の結核に特徴的な病像を作る。空洞は遅延型アレルギー反応の過剰免疫反応で、結核死菌で空洞形成がなされることが山村雄一(元阪大総長)らにより最初に報告された。

空気感染(飛沫核感染)により結核菌が気道から肺に侵入し、胸膜の直下に定着する。肺胞マクロファージ内に感染し増殖を繰り返しマクロファージを殺し、滲出性病巣を作る(初期感染原発巣)。一方、活性化マクロファージは類上皮細胞やラングハンス巨細胞へと分化し、結節の形成が始まる。結節形成の初期免疫により、結核菌を結節内に閉じ込め、菌の増殖を防ぐ。

この初期の結節が形成される頃までには、宿主体内では結核菌の菌体タンパク抗原特異的な結核免疫が成立し、殺菌がもたらされる。結節内では、周囲は線維化し、中心部では乾酪化がみられる。一部リンパ行性に所属の肺門リンパ節に移行し初期変化群を作る。一部の菌は肺尖部に達しパーシスター(persister)として生存し続ける。血行性に粟粒結核(早期蔓延)や結核性髄膜炎へと進むこともある。この時期までに発病する結核を一次結核と呼ぶ(図1)。

感染後発症しなかった人が加齢とともに免疫機能低下がおこり発症すると考えられる成人型の二次結核は、パーシスターが冬眠状態(dormancy)から目覚めて増殖を始め(内因性再燃)発症する。この冬眠状態から目覚めさせて結核菌を増殖させる bacterial cytokine である RPF (resuscitation promoting factor) を結核菌が作る(遺伝子も報告)説もある。

2. 新しい結核診断法

ツベルクリン反応は、日本ではBCG接種が全員に施行されるため、結核非感染者でも陽性に出る大きな問題点を抱えている。我々は、これを break through する結核感染特異診断法 DPPD を開発しつつある。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がモルモットとヒトでin vitro及びskin testの系で我々は明らかにした²⁹⁾。また、結核菌に存在し、BCGに存在しないESAT-6とCFP-10蛋白を抗原としてin vitroでヒトPBLの γ -IFN産生能を測定するアッセイ系が結核感染特異診断法となることを示した。

4. 結核感染と免疫

結核感染に対する免疫力はM ϕ , CD4 + T細胞, NK細胞, γ/δ T細胞, キラーT細胞(CD8 + TとCD8 - T)および肉芽腫形成の総合的な抵抗力である(図4)。また、1998年Natureに結核菌H37Rvゲノム全塩基が掲載され、遺伝子レベルで結核免疫を解析しうることになった³⁰⁾。

1. キラーT細胞(CD8 + T細胞)

CD8あるいは $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子やTAP遺伝子ノックアウトマウスでは抗結核免疫が十分でなく、動物は死亡する。すなわち、結核におけるCD8 + T細胞はマウスで抗結核免疫に重要である。

キラーTの一つの役割として γ -IFNを分泌して抗結核免疫に寄与するが、次に述べる結核感染M

ϕ を殺して、結核菌の増殖の場をなくし結核菌を殺す役割の方が重要である。最近、CD8 + T細胞が結核菌で感染したM ϕ をFas-independent, granule-dependentの機構で溶かし、最終的には結核菌を殺すことが報告されている^{15,16)}。このT細胞はCD1-restrictedでミコール酸, LAM, phosphatidyl inositol mannoside, glucose monomycolate, isoprenoid glycolipid(Cd1cと結合)等の結核菌lipidとlipoglycanを認識する³¹⁾。CD1の抗原結合グループは深くhydrophobicである。CD1dノックアウトマウスは結核感染に影響しないことや、CD1b分子には細菌のN-formylatedペプチドが結合し結核免疫を誘導することが示唆されている³²⁾。このキラーTの顆粒内の蛋白であるgranulysinは直接細胞外の結核菌を殺す。この機序は結核菌細胞膜を不完全な状態にすることによる。granulysinは病原細菌、真菌、寄生虫の生存を減少させる。さらにパーフォリンとの共存下でM ϕ 内の結核菌も殺すと考えられている。これはパーフォリンよりM ϕ に穴が開き、M ϕ 内の結核菌に直接granulysinが作用するためと思われる。我々は結核患者、特に多剤耐性結核患者ではキラーTリンパ球のmRNAの発現及び蛋白の発現が低下していることを明らかにした³³⁾。すなわち、我々はキラーT細胞のgranulysin(分子量9000)産生低下が多剤耐性結核発症と大きな関連があるのではないかと考えている。一方、キラーTのTRAILとパーフォリンが抗結核免疫に重要である興味深い結果を得た。

一方、MHCクラスI拘束性の結核菌の38kDa蛋白、Hsp65蛋白を認識するマウスCD8 + キラーTや19kDa蛋白、Ag85, CFP10(Mtb11)を認識するヒトCD8 + キラーTが報告されている³⁴⁾。結核菌の方が結核死菌よりもphagosome poreを形成しやすく抗原提示がすばやく行われる。ESAT-6抗原に対するキラーTでHLA-A2とは82~90位の9個のアミノ酸AMASTEAGNV、が結合してキラーT細胞がこれらを認識する。我々は世界に先駆けて確立した、ヒト生体内結核免疫応答解析モデルSCID-PBL/huに、このESAT-6ペプチドを投与し、これに特異的でHLA-A2拘束性を示すヒトキラーTを生体内で誘導することに初めて成功した^{27,28)}(図5)。

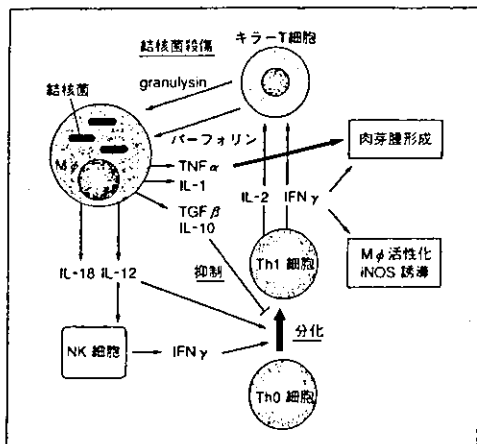


図4 抗結核免疫とマクロファージ、ヘルパーT細胞、キラーT細胞活性化

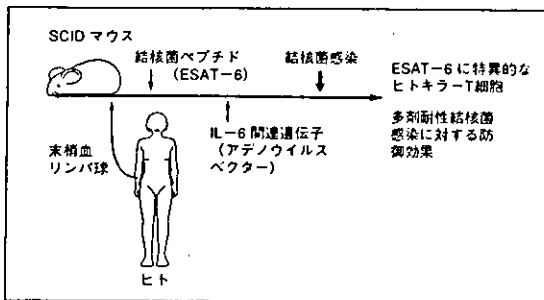


図5 SCID-PBL/huマウスを用いた結核菌ペプチドに特異なヒトキラーT細胞の *in vivo*における誘導

S.Reed, MR. AldersonらはPPD陽性のヒトより結核菌に感染した dendritic cellに反応するCD8キラーTクローンを確立したが、HLA-A, B, C, DR, DQ, CD1に拘束性を示さない nonclassically restrictedキラーTと classically restrictedなキラーTクローンの二種を確立した。またI-E領域に拘束性の結核特異的キラーTも報告された。これらのT細胞が結核免疫にいかなる作用を発揮するかが興味深い大きな問題として残されている。

2. キラーT細胞分化とサイトカイン(キラーT細胞分化因子)

筆者らはCD8+キラーT細胞(Tc)の誘導にはヘルパーT細胞(Th細胞)から産生されるサイトカインが必要であることを始めて明らかにした。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+CD8-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+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細胞誘導に必須な因子の一つであることを示した¹⁸⁾(図6)。

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- γ 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^{19,20,21)}。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²¹⁾(図6)。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、 γ -IFN、IL-6の著明な低下を認め^{5,6,8,9,10)}(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^{5,6,8,9,10)}。

3. サイトカインと結核免疫

抗結核免疫にIFN- γ が重要であることはマウスの系で詳細に解析されている²²⁾。ヒトにおいても、IFN- γ 受容体遺伝子に変異がみられた先天性IFN- γ レセプター欠損児に、BCGワクチン注射にて重症全身性感染が認められたりM.avium感染症を来した。マウスにもIFN- γ geneノックアウトマウスやIFN- γ レセプター遺伝子ノックアウトマウスでは結核易感染性である。

LAMにTNF α の強い誘導活性が認められ、コードファクター(trehalose dimycolate, TDM)も

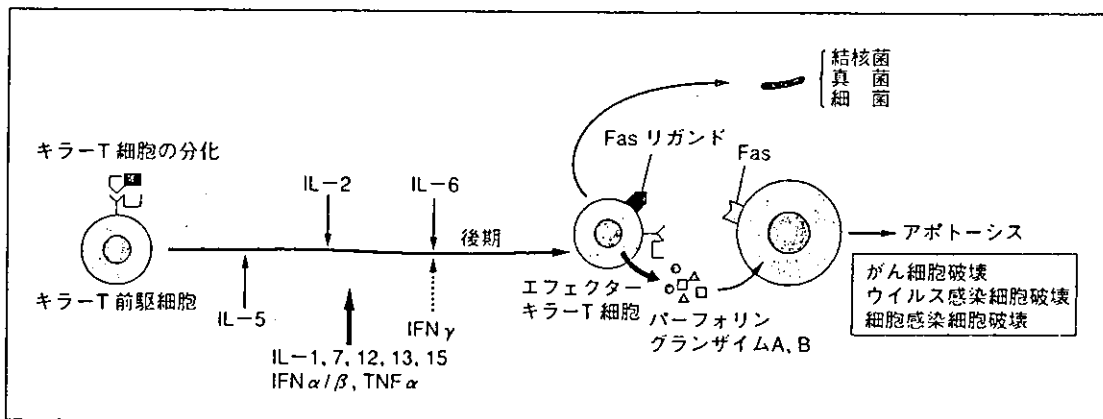


図6 キラーT細胞活性化と細胞傷害機構

表1 抗結核薬(化学療法剤)

	抗結核薬		抗結核薬の標的	耐性遺伝子
	一般名	略号		
標準治療薬 (First line drugs)	イソニアシド	INH	ミコール酸合成	KatG, inhA, ahpC rpoB
	リファンピシン	RFP	RNA polymerase	
	ピラジナミド	PZA	ピラジナミダーゼ	rrs, rps2 embB
	ストレプトマイシン	SM	リボソームタンパク	
	エタンブトール	EB	細胞壁多糖体	
Second line drugs	カナマイシン	KM	リボソームタンパク	rrs
	カプレオマイシン	CPM	リボソームタンパク	rrs
	エチオナミド	TH	ミコール酸合成	
	エンビオマイシン	EVM	リボソームタンパク	
	パラアミノサリチル酸	PAS	葉酸合成	
	サイクロセリン	CS	細胞壁合成	
	アミカシン	AMK	リボソームタンパク	
その他	ニューキノロン系薬			
	レボフロキサシン	LVFX		
	スパフロキサシン	SPFX		
	シプロフロキサシン	CPFX		
	オフロキサシン	OFLX	DNA gyrase	gyrA

ラジカルである活性酸素が融合(P-L fusion)し、アズール顆粒に貯蔵されている各種殺菌蛋白(岡田結核文献(2)参))が放出され、又ROIやNO等のRNIも産生され、結核菌の殺傷に関与する。最近発見された結核菌のTACO (tryptophan-aspartate-containing coat protein)がP-L

強くTNF α をし、マウスM ϕ 上のCD1d1の発現を誘導した²²⁾。TNF α は肉芽腫形成のみでなく慢性の長期感染結核に重要であり、抗TNF α 抗体投与マウスや、TNFレセプター(TNF-Rp55)欠失マウスでは結核菌感染の死亡率が著増し、肉芽腫形成も損なわれた重症の肺結核病理像を示した。慢性関節リウマチ患者の治療に最近抗TNF α 抗体を使用するが、致死的な重症結核感染症をひきおこした。さらにIL-6遺伝子ノックアウトマウスでも結核感染の増悪を来したり、 γ IFNの産生誘導の欠損がみられ、IL-6も非特異的防御とくにM ϕ の活性化やキラーT細胞分化を介して特異的な結核免疫に関与している可能性もある²³⁾。

IL-12レセプター欠損マウスやIL-12欠損患者では結核菌感染・増殖を抑制できなかった。すなわちIL-12も抗結核免疫に重要なサイトカインであることが示された。また、リコンビナントIL-12の投与にてBALB/cマウスの結核菌抵抗性が増し、IL-12の生体内中和にて感染増悪を来す²³⁾。

4. マクロファージ(M ϕ)

結核菌の増殖場所はM ϕ 内である。一方、M ϕ は異物貪食能と細胞内殺菌能及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。食細胞(M ϕ および好中球)が細菌を貪食すると、まず殺菌性

fusionを阻止し、殺菌を免れる。Nramp(natural resistance associated macrophage protein)は2価金属(Fe²⁺ + Zn²⁺)イオンのトランスポーターで結核菌の増殖に必要な2価金属イオンをファゴゾームからくみ出し、枯渇させることで殺菌に関与していると考えられる。ヒトでNramp1遺伝子の多型性が示され結核易感染性との相関が示唆されている²⁴⁾。

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。²⁵⁾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 ϕ 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 ϕ 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 ϕ を活性化する²⁶⁾。また、抗酸菌DNAから見いだされたCpGモチーフ(パリンドローム配列)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が審良らによりクローニングされた。

6. Th1リンパ球, Th2リンパ球

CD4 + T細胞が結核免疫に重要であることは MHC class II-/-マウスや CD4-/-マウス抗CD4抗体投与マウスで明らかとなっている²⁰⁾.

急性結核感染では γ IFN 産生の低下のため死亡する。一方, chronic persistent 結核モデルでは γ IFN 産生, iNOS は正常で CD4 dependent, IFN- γ 非依存性 iNOS 非依存性の pathway が示唆されている。Th1 は IFN- γ を産生し, 結核菌等の細胞内感染病原体に対する増殖抑制を發揮する。(Th1細胞と結核免疫については岡田総説²⁾ 参)。

5. 治療

1. 標準化学療法

本邦の結核治療における標準化学療法は, イソニアシド (INH), リファンブシン (RFP), エタンブトール (EB) [又はストレプトマイシン (SM) にピラジナミド (PZA) の4剤治療を最初の2ヶ月行い, 次の4ヶ月を INH と RFP の2剤で治療する。この間 EB を加えても良いとされている (INH, RFP が感受性であれば EB を加える必要はない) [2HRZS (又は E) /4HR (または + E)], 80才以上の高齢者や肝機能障害で PZA が使用できない場合, 最初の6ヶ月は INH, RFP を使う [6HES (又は E) /3HR]。各抗結核薬の標的分子を表1に示した。

結核治療の基本は, 病巣に存在する大量の菌を早急に殺菌し, 耐性菌の発現を抑制することである。自然耐性獲得頻度は, INH 10^{-6} , RFP 10^{-8} , PZA 10^{-6} , EB 10^{-5} , SM 10^{-7} である。肺結核の空洞内には109の結核菌が存在すると推測されている。したがって, 2剤併用 INH × RFP では $10^6 \times 10^8 \times 10^7 = 10^{21}$ に1個となり, 実際耐性菌が出現する可能性は0となる。

これが多剤併用法を原則とする理由である。

2. 多剤耐性結核菌

結核菌の薬剤耐性獲得には, 一般細菌でよくみられるプラスミドの関与はなく, 自然に発する遺伝子内のランダムな突然変異である。耐性遺伝子は RFP 耐性の95%が rpo 遺伝子変異, PZA 耐性

の95%が pncA 遺伝子変異による (表1)。耐性菌の感染様式には二つの型がある。第1は初回耐性 (未治療耐性, 一次耐性) で耐性菌による初感染である。第2のタイプは獲得耐性 (二次耐性) で, 不完全な治療歴のある患者に耐性菌が残り, 増殖したタイプである。大多数は患者の服用遵守 (コンプライアンス) の欠損により, これが多剤耐性結核菌出現の重要な原因となる。

多剤耐性結核では, 表1の標準化学療法 (First line drug) も耐性化されていることが多い。したがって WHO (1996) は TH, OFLX, EB, PZA およびアミノ酸配糖体を初期最底3ヶ月使い (菌陰性化まで持続), 維持期として EB, OFLX, 他1剤を菌陰性化後少なくとも18ヶ月使う治療法を推奨している。ただし, ニューキノロン系 (OFLX 等) は本邦では抗結核薬としてはまだ認可されていない。AIDS 合併結核でも上記の3薬以上併用標準化学療法が有効である。

3. DOTS (Directly Observed Treatment Short-course: 直接監視下短期化学療法)

専門のスタッフ (public health advisor, 看護師等) が患者の服薬を目前で確認する方法であり, この方法により結核罹患率の著しい改善が認められる。この方法を WHO, 及び日本の厚生労働省が強く推奨している。発展途上国での重要な治療戦略の一つとなっている。

4. Super spreader 多剤耐性結核耐性結核菌

一般的に多剤耐性結核 (MDR-TB) は毒力や感染率が低いといわれているが, 実際は感染力の強いものや, 一人の MDR-TB 患者から多数の患者が感染する (Super spreader) 可能性も示唆されている。

5. 外科的治療

内科的治療に限界を認めた時に, 専門の呼吸器専門病院で外科的治療を行う。空洞 (+), 化学療法4ヶ月無効剤, 等

6. 新しい抗結核薬

1966年に開発された RFP 後, 新薬は開発されていない。しかし, 最近新しい化学療法剤の開発

が進展しつつある。リファマイシン誘導体のリファブチン(RBT)、リファベンチン(RPT)が欧米で認可されており、リファラジル(KRM-1648)の臨床治験も行われている。8-methoxy-fluoroquinolone 剤, Ketolide 化合物, nitroimidazopyran (PA-824: 結核菌の蛋白合成阻害や細胞壁脂質ミコール酸の合成阻害), N-octansulfonylacetamide 等である。

多剤耐性結核薬として γ -IFN 吸入療法の治験が開始されている。排菌の陰性化が認められたが、投与中止後に再び塗株陽性となった。

なお、新しい結核ワクチンで治療効果を示すワクチン(therapeutic vaccine)の開発も進展しつつある(後述)。

6. 予防

(1)我が国では結核予防法(1951年)による定期健康診断や接触者検診により患者発見のシステムがとられている。しかし、最近では約80%が症状受診医療機関から発見されている。

(2)BCG接種

結核予防法(2003年)の改正により、BCG接種は乳幼児のみとなった。小児の結核発病、特に結核性髄膜炎や粟粒結核に対しBCGは予防効果があることが確認されている。しかし、成人の結核感染に対する予防効果は賛否両論あり、WHOはBCGの両接種は認めていない。我が国でも2003年より、このWHOの方針に従う結核予防法改正となった。

(3)INH予防

我が国では、最近結核に感染したことが強く疑われる29歳までの人にINHの予防投与が実施されている。

(4)患者の登録管理

発生届けを、結核と診断した医師は2日以内に保健所長に届けを提出しなければならない。

(5)予防マスク

N-95マスク等極めて高い効率で結核感染を予

防するマスクが開発されており、結核専門病院等ではルーチンに使用されている。

(6)結核病棟の個室化・陰圧化

本邦でも欧米に遅れていたが、やっと多剤耐性病棟の入院部屋の陰圧化が進みつつある。さらに多剤耐性結核が通常の結核患者にも感染する事例が発生したことより、当国立療養所近畿中央病院の示唆を踏まえ、厚生労働省が多剤耐性結核病室の個室化の方針を確立しつつある。

(7)なお、著しい進展を示しつつある新しい予防ワクチン(prophylactic vaccine)については次章で述べる。

7. 新しい結核ワクチンによる予防・治療

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)、その他に大別される(表2)。

DNAワクチンのベクターとしては、①gene gun②プラスミド③アデノウイルスベクター④HVJリボソーム⑤改良型HVJエンベロープベクターがある。5-8,26-30)。 α 抗原(Ag85B)、ESAT-6、種々のサイトカイン、HSP65、38kDa、Mtb32、Mtb39、MDP1等について、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²⁰⁾。

Reed博士らはT細胞結核免疫を誘導するタンパク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²¹⁾。この系を用い、強力な結核免疫を誘導するMtb9.9Aファミリー等、多種のタンパク質抗原遺伝子のクローニングに成功し、新しい結核ワクチン開発が飛躍的に進んでいる。

しかしながら、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極めて少ない。われわれはHSP65DNA+IL-12DNA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⁵⁻⁷⁾(表3)。

表2 新しい結核ワクチン

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, EST6, Hsp65
リコンビナントサイトカイン(IFN γ 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-6 DNA, IL-6遺伝子,
IL-6遺伝子+gp130遺伝子, IFN γ 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 γ 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

8. サブユニットワクチン

Reed博士らはMtb72f融合タンパク質(Mtb39とMtb32の融合タンパク質)のサブユニットワクチンがカニクイザル(cynomolgus monkey, 最もヒトの肺結核に近いモデル, Nature Medicine 2, 430, 1996参照)で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)を示すことを明らかにした^{8,29)}(表4)。われわれはヒトのin vitro系でもMtb72f融合タンパク質を用いて免疫応答が増強することを示し, ヒトへの臨床応用が最も近い結核ワクチンの開発に成功した(Reed博士らとの共同研究)。その他にも種々の結核菌タンパク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⁵⁻⁷⁾(表3)。

9. DNA ワクチン

われわれは①IL-12 DNA + Hsp65 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よりも極めて強力な(約100倍)結核予防ワクチンであることを明らかにした(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。

HVJリボソームをベクターに用いた場合, Hsp65DNA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(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。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・誘導及び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⁵⁻⁷⁾。

以上のワクチン効果は, 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⁵⁻⁷⁾。

表3 新しい結核ワクチン・治療モデルの開発 (岡田ら)

新しいワクチン	
1. サブユニットワクチン Mtb72f	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(+)
2. DNA ワクチン Hsp65 DNA + IL-12DNA HVJリボソーム/Hsp65 DNA IL-6関連遺伝子ワクチン (IL-6 DNA + IL-6R DNA + gp130) IFN γ 遺伝子ワクチン	BCGより有効(マウス) <u>100倍強力</u> BCGより有効(マウス) キラーT細胞活性増強 予防ワクチン・治療ワクチン
3. リコンビナントBCGワクチン (AG85A + AG85B + MPB51)リコンビナント Ag85B リコンビナント, Ag85A リコンビナント MDP1 リコンビナント	BCGより有効(マウス) キラーT細胞活性増強 BCGより有効(マウス) BCGより有効(マウス)
4. ヒト生体内結核ワクチン解析モデル SCID-PBL/huにESAT-6抗原を注射	ESAT-6に対するヒトキラーT細胞 $\uparrow\uparrow$

表4 カニクイザルにおけるMtb72f融合タンパク質
サブユニットワクチンによる抗結核効果

予防ワクチン	結核感染生存率 (カニクイザル生存匹数/総数)
BCGワクチン	0% (0/3)
Mtb72f融合タンパク質ワクチン	100% (3/3)
Mtb8.4タンパク質ワクチン	0% (0/3)

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³⁰⁾.

10. リコンビナントBCGワクチン (rBCGワクチン)

結核菌は300種以上のタンパク質を分泌するが, α 抗原Ag 85Bとそのファミリー(85A, 85C, MPB51)が有名である. 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.

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及び気道感染の系で明らかにした. さらにrAg85BBCG,

rAg85ABCG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⁵⁻⁷⁾. また, 結核菌の増殖が極めて遅いことを調節するDNA結合タンパク質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, ワクチン効果を得た. さらに, サルのレベルで強力な予防効果が得られたMtb72f融合タンパク質の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IFN- γ 産生T細胞数の増強を誘導することをElispot Assayで明らかにした. またモルモットの結核感染の肺結核病巣の改善を得た.

11. 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, 結核菌タンパク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^{5-7,17)}(図5).

12. 新しい結核ワクチンの臨床応用

現在最も有力なものとして Mtb72f fusion 融合タンパク質サブユニットワクチン, HVJリボソーム/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン及び r72f BCG 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, 我々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のレベルで認め(2003年第一回国際結核ワクチン学会)。Ag85B-ESAT-6融合タンパク質(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)一方, 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。臨床応用ワクチン候補の筆頭としては BCG + Mtb72f 融合タンパク質サブユニットワクチンがあげられ, 第 I 相臨床試験が計画されている。さらに, われわれは Mtb72f ワクチンと HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンを組み合わせ, 極めて強力なワクチン開発を目指している⁵⁻⁷⁾。

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。

2002年6月ワシントンD.C.で開催された第4回 World Congress on Tuberculosis で NIAID 研究所長 A. Fauci は最も臨床応用が期待される二つ

の結核ワクチンを示した。1つは我々の72f fusion 蛋白サブユニットワクチン, もう1つは Horowitz 等の r85B BCG ワクチンである。サルにおいては72f ワクチン HSP65 DNA + IL-12 DNA/HVJ-liposome ワクチン及び r72f BCG ワクチンが明らかにすぐれていることより, 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。

References

1. 蝶良英郎, 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. 感染・炎症・免疫 28: 38, 1998
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, 39:144-154
3. Flynn J.L and Chan J. Immunology of Tuberculosis. Annu.Rev. Immunol. 19:93-129, 2001
4. Schluger NW, Rom WN: The host immune response to tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 157: 679-691, 1998.
5. 岡田全司: 新しい結核ワクチン 最新医学 2002, 57: 1942-1952
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 p1-140, 2001.
7. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Matsumoto K, Kita Y, Kimura K, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, Matsumoto S, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M: Novel (recombinant BCG-DNA-) vaccination against tuberculosis. Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference 2002, 0171-175
8. Steven Gillis, Masaji Okada. 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)" p355-359, 2001
9. 岡田全司, 岸本忠三: リンホカインとモノカイン. 「新内科学体系; 年刊版'84-C」山村雄一ほか監, 中山書店, 東京, 1984, p. 221
10. 岡田全司: サイトカインと腫瘍免疫. 「新医学大系 8B: 免疫応答-生体の防御機構II」石井威望ほか編, 中山書店, 東京, 1996, p. 269
11. Cole ST, Brosch R, Parkhill J et al: Deciphering the biology of Mycobacterium Tuberculosis from the complete genome sequence. Nature 393:537-544, 1998
12. 高橋光良 結核菌の分子疫学 「結核」p.88-96, 光山正雄 編 医薬ジャーナル, 大阪, 2001
13. 矢野郁也 結核菌の構造と特性 「結核」p.32-56, 光山正雄 編 医薬ジャーナル, 大阪, 2001
14. 露口泉夫 結核の感染と発症 「結核」p.136-148, 光山

- 正雄 編 医薬ジャーナル, 大阪, 2001
15. Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, Cho S, Barnes PF et al: Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science* 276:1684 - 1687, 1997
 16. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR et al: An Antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282:121-125, 1998
 17. 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* 57:1335-1343, 1997
 18. 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* 122 : 2527-2535, 1979
 19. Okada M, Yoshimura N, Kaieda T et al: Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7718-7721, 1981
 20. 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* 157:583 - 590, 1983
 21. 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* 141:1543-1549, 1988
 22. R. Ryll, K. Watanabe, N. Fujiwara, R. Hasunuma, Y. Kumazawa, M. Okada and I. Yano: Mycobacterial cord factor, but not sulfo lipid, causes depletion of NKT cells and upregulation of CD1d1 on murine macrophages. *Microbes Infect* 2001, 3: 611-619
 23. Akira S. Toll-like receptor and innate immunity. *Adv in Immunol.* 78:1-56, 2001
 24. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik et al: Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285:732-736, 1999
 25. Hess J, Schaible U, Raupach B and Kaufmann, S.H.E. Exploiting the immune system: toward new vaccines against intracellular bacteria. *Adv. in Immunol.* 75:1-88, 2000
 26. Anderson P : TB vaccines: progress and problems. *Trends in Immunology* 22:160-168, 2001
 27. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato V et al : Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 400 : 269 - 271, 1999
 28. 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* 191 : 551-560, 2000
 29. Reed S, Alderson M, Campos-Neto A, Dalemans W, Orme I, Tan B, de La Cruz E. C. and Skeiky Y. Development of a recombinant tuberculosis vaccine. Thirty-Fifth research conference on tuberculosis and leprosy. P159-164, 2000
 30. Huygen K, Content J, Denis O et al: Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nature Med* 2:893-898, 1996

(2) 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、肺がんワクチンおよび 新しい診断法・予防法の開発）と評価

岡 田 全 司

CLINICAL RESEARCH (NOVEL VACCINE AGAINST TUBERCULOSIS AND
LUNG CANCER, AND NOVEL DIAGNOSIS AND PREVENTION) AND
EVALUATION FOR THE RESPIRATORY DISEASE (TUBERCULOSIS AND LUNG CANCER)

Masaji OKADA

国立病院・療養所の臨床研究は一般的に大学の研究室に劣ると考えがちである。しかし、この考えは間違いであることを強調したい。われわれの臨床研究は、大学の研究室などに比し、勝るとも劣らない研究であると自負している。むしろ患者に直接還元できる新しい治療法、新しい診断法の開発においては、より秀でている。そのキーワードは、(1) 結核、肺がん患者が極めて多い、(2) 世界の一流の研究室との共同研究、(3) 厚生労働省および文部科学省の強力なサポート（厚生科学研究費）、(4) アイデアなどである¹⁾(表1)。

(1) 当院は、日本で最も結核患者数が多い病院の一つである。さらに国立病院・療養所呼吸器ネットワーク54施設が診療している結核患者数は本邦の43%を占める。毎年約350名の肺がん入院患者数を示し、国立療養所の中では、抜きんでて最多である。(2) 世界の一流の研究室の共同研究においては、世界の遺伝子治療の第一人者ハー

バード大学医学部教授マリガン博士、サイトカイン研究の大御所 Corixa 社長 Gillis 博士、結核ワクチンの世界の第一人者 Reed 副所長、長崎大山田博士・大阪大岸本総長・金田博士・辻本博士、東大斎藤博士・松島博士、実中研野村所長、中外研究所大杉社長、大塚研究所、JT, BML, 九州大学、その他多数の大学・研究所²⁾。(3) 厚生科学研究費補助金3件、①新興・再興感染症研究事業「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」(岡田全司班)、②がん克服戦略研究事業「国立病院療養所・呼吸器ネットワークを利用した、肺癌に対する新しい治療法（癌ワクチンを加えた）の開発」、③(森亨班)「国立病院・療養所呼吸器ネットワークを利用した多剤耐性結核に対する標準治療の作製」、(4)各研究者のアイデア(独創的)がまず基盤にあってはじめて上記(2)、(3)が得られる。一流の研究指導者や一流の研究所でトレーニングを受けて初めて、真の独創性が育つ。(たとえば、山村雄一元阪大総長→岸本忠三阪大総長→門下生)³⁾。したがって、臨床研究を行う人は一時期は一流の研究環境でトレーニングを受けることが望ましい。これらの条件を満たせば(1)症例数が圧倒的に多いことより、国立病院・療養所の臨床研究は鬼に金棒である。

一方、説得力のある評価方法を作成することは重要である。3つの評価方法としては(1) impact factor⁴⁾(2) 和文論文(3) 学会発表に比重をつける。これに加え

表1 大学の研究室よりも秀でた臨床研究

キーワード
(1) 症例患者数が多い (例) 結核、肺がん、肺線維症等
(2) 世界の一流研究室との共同研究
(3) 厚生労働省や文部科学省の強力なサポート (厚生労働科学研究費、科学研究費(文部科学省)等)
(4) アイデア(独創性)

国立療養所近畿中央病院 National Kinki-Chuo Hospital for Chest Diseases 臨床研究センター

Address for reprints: Masaji Okada, Clinical Research Center, National Kinki-Chuo Hospital for Chest Diseases, 1180, Nagasone-machi, Sakai, Osaka 591-8555 JAPAN

Received August 9, 2002

Accepted September 20, 2002

て研究費の獲得額、獲得件数が重要である。治験の活動度、獲得額も参考になる。さらに、最重要点として、いかに患者の病気を治すことに貢献したか、またはそれをしうる研究か、いかに早期かつ特異的にその病気を診断しうる研究かが、研究の本質的な価値として問われることを忘れてはならない(表2)。

つぎに、呼吸器疾患患者へ還元できる我々の臨床研究について述べてみる⁹⁾。[I] 新しい結核ワクチンを開発した。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(表3)。[II] ツベルクリン反応に代わる新しい結核診断法 DPPD を開発した。[III] 新しい結核予後診断法を開発した(表3)。[IV] 新しい肺がんワクチン、遺伝子治療モデルを開発した。[V] 新しい肺がん発症予防モデルマウスを作製した(表4)。これらの研究は、文部科学省・科学研究費(当院は国立病院・療養所臨床研究部において最初の文部科学省認定研究施設)にも3つ(①結核、②肺がん、③びまん性肺疾患)最近採択され、国立病院・療養所の臨床研究の存在意義が高く評価されている。苦しんでいる患者にその研究が還元されることが、最も臨床研究として重要であり、国民からも、必ず高い評価が得られるであろう。

表2 臨床研究の重要性

患者に還元できる研究
1. いかに患者の病気を治すことに貢献したか
2. 患者の病気を治しうる研究になるか (病因の解明→治療に結びつくことが必要)
3. いかに早期かつ特異的に病気を診断しうる研究となるか
4. 病気予防に役立つ研究か

表3 新しい結核ワクチンおよび結核特異診断法の開発

[I] 新しい結核ワクチンの開発	
(1) サブユニットワクチン	
① Mtb72f	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(+)
(2) DNA ワクチン	BCGより有効(マウス) BCGより有効(マウス)・キラーT細胞活性増強 予防ワクチン・治療ワクチン
① Hsp65DNA+IL-12DNA	
② HVJ-liposome/Hsp65DNA	
③ IL-6 related gene ワクチン	
④ γ -IFN gene ワクチン	
(3) リコンビナントBCG ワクチン	BCGより有効(マウス)・キラーT活性増強
① リコンビナント (Ag85A+85B+MPB51) BCG	BCGより有効(マウス)
② リコンビナント85B BCG	
[II] 新しい診断法(DPPD)	
(1) ツベルクリン反応に代わる結核特異的診断 DPPD 蛋白の遺伝子クローニングに成功 モルモット-結核感染特異的	ヒト(in vitro)・ヒト(skin test)
[III] 新しい予後診断法(キラーT細胞活性) ・多剤耐性結核患者CD8 ⁺ キラーT細胞、 NK細胞 ・(perforin+TRAIL)発現が重要	granulysin 蛋白発現 ↓
[IV] ヒト生体内結核ワクチン解析モデルの 開発に成功 SCID-PBL/hu にESAT-6抗原を注射	ESAT-6対するヒト・キラーT細胞 ↑↓

表 4 新しい肺がんワクチン、遺伝子治療法・予防法の開発と新しい早期肺癌診断法・予後診断法の開発

- I. 国立病院・療養所呼吸器ネットワーク (54施設) [呼吸器ネットワーク] を利用した、新しいヒト肺癌拒絶抗原を用いた新しい治療法
- ① 新しい13種のヒト肺癌拒絶抗原
 - ② 呼吸器ネットワーク54施設で肺がんワクチンの臨床応用のプロジェクト
- II. 呼吸器ネットワークを利用した、RCAS1 抗原及び抗体 (Nature Med) を用いた新しい治療法の開発
- ① ヒト肺癌の悪性度および喫煙と肺癌細胞上のRCAS-1発現と相関
 - ② 予後診断法
 - ③ 喫煙者の肺癌はRCAS-1発現が強い
- III. 呼吸器ネットワークを用い切除不能局所進行型非小細胞肺癌に対する導入化学療法+胸部放射線療法同時併用後の追加科学療法の臨床第 I 相試験
- IV. 呼吸器ネットワーク8 基幹医療施設による遺伝子治療の開発
- ① 我々が発見したIL-6関連遺伝子 (IL-6 gene+IL-6R gene+gp130 gene) を導入したアデノウイルス・ベクターを肺癌患者 T リンパ球とヒト肺癌が生着した SCID-PBL/hu ヒト癌治療モデルマウスに生体内投与し強力な生体内抗ヒト肺がん効果を得た (Cancer Res)
 - ② 肺癌拒絶抗原 MAGE-3 ペプチドおよび CEA-gene をこの系に用い、強い抗腫瘍効果を得た
- V. 我々が開発した画期的な、肺癌発症マウス
- ① IL6 関連遺伝子治療を行い、肺がんの予防効果および治療効果
 - ② キラー T 細胞免疫を増強

文 献

1) Okada M, Yoshimura N, Kaieda T et al: Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting Immunoregulatory molecules. Proc. Natl Acad Sci 78 : 7717-7722, 1981

2) 岡田全司, 阿部真佐子, 秋吉 毅ほか: サイトカイン遺伝子導入と遺伝子欠損モデルを用いたヒト癌・遺伝子治療の国際調査研究: International Study on Cytokine Gene Therapy of Human Cancer (Using Gene-Transfer and Gene-Deletion). In: 「文部省国際学術研究・がん特別調査5年の歩み」文部省国際学術研究がん特別調査 総括班 研究代表者 富永裕民, 大野良之編, 文部省, 東京,

pp.108-109, 2000

3) 岡田全司, 岸本忠三: リンホカインとモノカイン In: 「新内科学体系; 年間版 '84-C」山村雄一ほか監, 中山書店, 東京, p. 221, 1984

4) 棚橋佳子: ISI・ハイ・インパクト論文ランキング (国内) In: 「大学ランキング2002」清水建宇ほか編, 朝日新聞社, 東京, p56-61, 2002

5) 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” Mol Med 39 : 144-154, 2002

(平成14年8月9日受付)

(平成14年9月20日受理)

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究
[抗結核キラーTリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン(サブユニット・DNA-リコンビナントBCG-ワクチン)・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]
に関する研究

平成14年度～16年度 総合研究報告書

vol. 2

主任研究者 岡田 全司

平成17 (2005) 年3月

US-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM

**THIRTY-SEVENTH TUBERCULOSIS AND LEPROSY
RESEARCH CONFERENCE**

**KYOTO UNIVERSITY HALL
(Kyodai-Kaikan)**

**KYOTO, JAPAN
AUGUST 21-23, 2002**

**Organized by
Masao MITSUYAMA
(Kyoto University, Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan)**

IMPORTANT NOTICE

**This information should not be released to other persons, quoted
or extracted for publication without permission from the authors.**

NOVEL (RECOMBINANT BCG-AND DNA-) VACCINATION AGAINST TUBERCULOSIS

¹Masaji Okada, ¹Takao Tanaka, ¹Yoshikazu Inoue, ¹Kumi Matsumoto, ¹Yoko Kita, ¹Kentaro Kimura, ²Shigeto Yoshida, ³Naoya Ohara, ³Mariko Naito, ³Takeshi Yamada, ⁴Yasufumi Kaneda, ⁵Makoto Matsumoto, ⁶Sohkichi Matsumoto, ⁷Yasir Skeiky, ⁷Steven Reed, ¹Mitsunori Sakatani

¹Clinical Research Center, National Kinki-Chuo Hospital for Chest Disease., ²Dep. Med. Zoology, Jichi-Med. Sch, ³Nagasaki Univ. Grad. Sch. Biomed. Sci. Div. of Microbiol. Oral Infect., ⁴Div. of Gene Ther. Sci. Grad. Sch. of Med. Osaka, ⁵Otsuka Pharmaceut. (Co)Inst., ⁶Dept. Hostdefense, Osaka City Univ. Grad. Sch. Med., ⁷Corixa Corp.

Abstract. The development of novel vaccines against tuberculosis was studied by using murine systems and cynomolgus monkey system. Four distinct methods; DNA vaccination (①plasmid ②adenovirus vector), ③recombinant BCG, and ④subunit (recombinant protein) were used for the development of novel vaccines.

Genes (HSP65 gene, IL-12 gene, Ag 85A-, 85B-, MPB51-gene as well as MDP1 gene were administered into the Balb/c mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*) (i.v. or intra-tracheal injection). Elimination of *M.tuberculosis* in lungs, liver, and spleen in these mice and survival were studied in these models. HSP65 gene + IL-12 gene vaccination, or recombinant BCG (BA51: Antigen 85B.+Antigen 85A.+MPB51-gene recombinant BCG) were more efficient than parental BCG Tokyo vaccination. Cytotoxic T cells (CTL) activity against *M. tuberculosis* in the spleen cells from mice treated with recombinant BA51 BCG vaccination were augmented.

The recombinant(r) Mtb72f BCG vaccine, which was recently established, showed stronger anti-tuberculosis immunity than BCG Tokyo. rMtb72f BCG augmented the frequency of T cells producing γ -IFN specific against the PPD and *M. tuberculosis*.

Furthermore, NOD-SCID-PBL/hu mice treated with anti-IL-2 receptor β -chain antibody provide an useful tool for analyzing in vivo human T cell immunity against tuberculosis.

By using these new vaccine (rMtb 72f BCG, and HVJ-liposome/HSP65+IL-12) and the monkey models which are very similar to human tuberculosis, the prophylactic effect of vaccines are now being studied.

Introduction

The development of new vaccine against tuberculosis(TB) is essential to protect many people from the infection of M.tuberculosis in the world. New vaccine is also necessary to cure the patients with MDR-TB. Therefore, the development of new vaccines was studied using four distinct methods ; DNA vaccination (①plasmid, ② adenovirus vector) ③rBCG and ④subunit vaccination.

In our previous report, γ -IFN gene and IL-6 related genes (IL-6gene+IL-6R gene+gp130gene) using adenovirus vector exerted significant preventive efficacy against TB(1,2). Cytotoxic T lymphocyte(CTL) is also suggested to play an important role in the anti-tuberculosis immunity in mice vaccinated related genes as well as tumor immunity (1-5). In the present paper, to develop the novel rBCG vaccine and HVJ-liposome vaccine, DNA encoding immunogenic protein from M.tb, such as HSP65, MDP1, Antigene-85B, -85A, MPB51 were constructed into these vectors.

Recently, it has been reported that 72f fusion protein is a good candidate for clinical trial to the patients with tuberculosis. Therefore, r72f BCG was constructed. r72fBCG vaccine induced very strong immune responses against M.tb.

Materials and Methods

DNA vaccination using plasmid and HVJ-liposome

Female BALB/c mice aged 6~8 weeks were infected by intravenous injection with M.tb H37Rv. DNA vaccination using gene gun (HSP65 DNA + IL-12 DNA) was initiated 14 days before the i.v. injection of M.tb. IL-12 gene or heat shock protein (HSP65) gene derived from M.tb was constructed as DNA vaccine into plasmid using CMV promoter by Yoshida (6). HSP65 gene was also constructed with HVJ-liposome by Kaneda of Osaka University, and initiated 14 days i.m. before the i.v. injection of M.tb. (7)

Recombinant BCG vaccination

rBCG vaccination was s.c. initiated 14~30 days before the i.v. injection of M.tb. Mice were sacrificed 4~10 weeks later and bacteria(M.tb) were counted as colony forming units on Ogawa medium.

Proliferation of lymphocyte.

Proliferation of lymphocyte in spleen cells were detected by culturing 1×10^5 spleen cells in microwell (flat-bottomed) for 48hr using BrdU method.

Recombinant BCG vaccine.

rBCG secreting antigen 85A, antigen 85B and/or MPB51 antigen(s) were constructed as described previously(8).

Induction of cytotoxic T cells in the spleen cells from the mice vaccinated with vaccines.

Activity of CTL was assessed by the detection of γ -IFN activity in the culture supernatant of 20 hr. culture consisting effector spleen cells from vaccine(s)-treated mice 6 days after the stimulation of PPD, or killed M.tb in the presence of J774.1 macrophage cells pulsed with M.tb.

Results and Discussion

DNA vaccine using gene gun

An infection initiated by intravenous injection of virulent M.tb H37RV was allowed to develop for 8 weeks, the duration time of which the number of bacteria in the internal organs such as lung, liver, spleen increased. 10 weeks after challenge, mice immunized with Hsp65 DNA vaccines and IL-12 expression vector had significantly reduced numbers of CFU in the all three organs (lungs, liver, spleen) as compared with mice immunized with BCG vaccine.

Recombinant BCG vaccination

1×10^6 rBCG secreting MPB51 antigen or BA51 (that is Antigen 85A + Antigen 85B + MPB51) antigens were pre-treated s.c. 2 weeks and 4 weeks before the injection of H37RV i.v. The number of live bacteria in liver from the mice treated with these rBCG was less than that of the mice treated with parental BCG. CTL activity (γ -IFN production) in the spleen cells from the TB-challenged mice vaccinated with rBA51 BCG or r85B BCG correlated with the efficacy of vaccination.

MDP1 protein in M.tb is considered to induce the very slow division of M.tuberculosis. rMDP1 BCG also exerted the significant efficacy of vaccination.

The rMtb72f BCG vaccine, which was recently established, showed stronger anti-tuberculosis immunity than parental BCG. rMtb72f BCG augmented the frequency of T cells producing γ -IFN specific against the PPD and M.tb. (Fig 1)

The new experimental models using SCID-PBL/hu mice and PBL from the patients with tuberculosis capable of analyzing the *in vivo* human CTL against tuberculosis.

Peptide from ESAT-6 was injected into SCID-PBL/hu mice. Human cytotoxic T cells specific for ESAT-6 peptide were induced in vivo in the SCID-PBL/hu model.(5) Human CTL were generated more strongly in this model using NOD-SCID mice treated with anti-IL-2R β -chain antibody. Therefore, the experimental models using NOD SCID-PBL/hu mice and PBL from MDR-TB might provide new strategies capable of developing new vaccines against MDR-TB.

Thus, the development of new vaccines using DNA vaccination and recombinant BCG employing several kinds of genes (Mtb72f gene, IL-12 gene, Antigen 85B family genes as well as HSP 65 gene) might provide a useful tool for the protection against the infection of tuberculosis and for the treatment against TB. By using these new vaccine (recombinant Mtb 72f BCG, and HVJ-liposome/HSP65+IL-12) and the monkey (cynomolgus) models which are very similar to human TB, the prophylactic effect of vaccines are now being studied.

Acknowledgement. The present study was supported by the grant of "Research on emerging and re-emerging infectious disease" by Japanese Ministry of Health Welfare and Labor.

References

1. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Yoshida S, Ohara N, Yamada T, Matsumoto M, Sakatani M, and Mori T: New(DNA – Recombinant BCG-and Subunit-) Vaccination against tuberculosis and cytotoxic activity. Thirty-Sixth Tuberculosis and Leprosy Research Conference. P. 127-133,2001
2. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Katayama Y, Yoshida S, Ohara N, Yamada T, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, Sakatani M, and Mori T, :DNA and recombinant BCG vaccination against tuberculosis and cytotoxic activity in the patients with multi-drug resistant tuberculosis . Thirty-Fifth research conference on tuberculosis and leprosy p. 197-201, 2000
3. Okada, M., Klimpel, G.K., Kuppers, R.C., and Henny, C.S. The differentiations of cytotoxic T cells in vitro. I. Amplifying factor(s) in the primary response is Lyt1 cell-dependent. *J. Immunol.*, 122: 2527-2533, 1979.
4. Okada, M., Yoshimura, N., Kaieda, T., Yamamura, Y., and Kishimoto, T. Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA.*, 78:7717-7721, 1981.
5. Tanaka, F., Abe, M., Akiyoshi, T., Nomura, T., Sugimachi, K., Kishimoto, T., Suzuki, T., Okada, M. 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 Research.*, 57: 1335-1343, 1997.