

PULMONARY DISEASE DUE TO NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA IN JAPAN.

Katsuhiko Suzuki, Akira Yoshida, Kazunari Tsuyuguchi, and
Mitsunori Sakatani

Department of Internal Medicine, National Kinki-Chuo Hospital for Chest Diseases, Osaka

Abstract. Based on the clinical data collected by the Mycobacteriosis Research Group of the Japanese National Chest Hospitals from 1977 to 1997, epidemiology of pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria (NTM) in Japan were briefly reviewed. Annual incidence rate of the pulmonary NTM disease has been increasing gradually from 0.4 to 2.64 / 100,000, while those of tuberculosis has been decreasing from 69.5 to 31.7/100,000. The most common etiologic species was *Mycobacterium avium* complex (about 70%), and the second one was *M. kansasii* (about 20%). The local distribution of *M. avium* complex disease has been rather even in Japan through the study period. In contrast, *M. kansasii* disease was restricted in Tokyo area in 1970s and gradually spread to the western part of Japan, Osaka area in particular, in 1980s. In 1990s, *M. kansasii* disease began to spread to the northern part of Japan (Tohoku and Hokkaido area) and it could be found almost all the country at present time.

Introduction

The incidence of *Mycobacterium avium* complex (MAC) pulmonary disease is reported to be steadily increasing in some developed countries [1-4]. But accurate annual incidence rate of the NTM pulmonary disease and its temporal trend in one country have been reported rarely, because the NTM is not contagious and the disease doesn't have to be reported in many countries. The Mycobacteriosis Research Group of the Japanese National Chest Hospitals (MRG) was founded in 1968 and consisted of about 14 to 16 national hospitals for chest diseases distributed all over Japan (Figure 1). The group has collected cases of tuberculosis and NTM with their etiologic species from each hospital annually since 1971, and published some reports regarding epidemiology of pulmonary disease due to NTN in Japan periodically up to 1988 [5-7]. The present study briefly reported the change of incidence, the characteristic of etiologic species, and the feature of local distribution of NTM pulmonary disease in Japan from 1977 to 1997.

Materials and Methods

The ratio of pulmonary NTM disease to bacteria-proven pulmonary tuberculosis (R) was calculated each year from the data collected by MRG. The diagnosis criteria of pulmonary NTM disease employed were as follows: in the absence of new lesion 1) three or more isolations of the same mycobacterial species by monthly sputum examination during 3- to 6-month period 2) one or more of these isolates yielding more than 100 colonies, in the presence of new lesion 1) only two or more sputum isolates of the same mycobacteria within 3-month period [7]. Annual incidence rate of the bacteria-proven pulmonary tuberculosis in Japan (T) was cited from the statistics of the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan [8]. Thus we calculated the annual incidence of NTM pulmonary disease in Japan (N) by the following equation: $N = T \times R$.

Results and Discussion

Incidence of pulmonary NTM disease, pulmonary tuberculosis, and bacteria-proven pulmonary tuberculosis in Japan from 1977 to 1997 was depicted in Figure 2. The steep rise of the incidence of NTM disease around 1986 was, in part, due to the partial change of the participating hospitals. Incidence of active pulmonary tuberculosis had steadily decreased up to 1997 (from 69.5 to 31.7 /100,000/year), although incidence of bacteria-positive tuberculosis had remained rather constant (from 16.1 to 15.2/10,000/year). In contrast, incidence of pulmonary NTM disease had increased over six times during the study period (from 0.40 to 2.64/10,000/year). Temporal change of the local distribution of pulmonary *M. kansasii* disease was shown in Figure 3. In 1977, six cases of *M. kansasii* disease were seen only in Tokyo area. In 1984, however, it appeared not only in Tokyo area, but also in all over west Japan, Osaka area in particular. In 1997, it also spread to the northern part of the country (Tohoku and Hokkaido area), and it appeared in almost all over Japan. In 1997, NTM/TB ratio (R) reached 0.17 and calculated incidence of pulmonary NTM disease was 2.64 /10,000/year. Etiologic species of the disease consisted of MAC (71.3%), *M. kansasii* (16.3%), and others (12.4%) including *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. nonchronogenicum*, and *M. xenopi* (Figure 4).

References

1. Kennedy TP, Werner DJ. Nontuberculous mycobacteria- An underappreciated cause of geriatric lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 1654-1658.
2. Prince DS, Peterson DD, Steiner RM, Gottlieb JE, Scott R, Israei HL, Figueora WG, Fish JE. Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions. *N Engl J Med* 1989; 321: 863-868.
3. Tanaka E, Amitani R, Niimi A, Suzuki K, Murayama T, Kuze F. Yield of computed tomography and bronchoscopy for the diagnosis of *M. avium* complex pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 2041-2046.
4. Fujita J, Ohtsuki Y, Suemitsu I, Shigeto E, Yamadori I, Obayashi Y, Miyawaki H, Dobashi N, Matsushima T, Takahara J. Pathological and radiological changes in resected lung specimens in *Mycobacterium avium* intracellulare complex disease. *Eur Respir J* 1999; 13: 535-540.
5. Tsukamura M, Shimoide H, Kita N, Kawakami K, Ito T, Nakajima N, Kondo H, Yamamoto Y, Matsuda N, Tomura M, Yoshimoto K, Shirota N, and Kuze A: Epidemiologic studies of lung disease due to mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *Reviews of Infectious Diseases* 3:997-1007, 1981.
6. The Mycobacteriosis Research Group of the Japanese National Chest Hospitals : Rapid increase of the incidence of lung disease due to *Mycobacterium kansasii* in Japan. *Chest* 83:890-892, 1983
7. Tsukamura M, Kita N, Shimoide H, Arakawa H, and Kuze A: Studies on the epidemiology of nontuberculous mycobacteriosis in Japan. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137:1280-1284, 1988.
8. Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan: Statistics of TB 2001. Tokyo, Japan Anti-tuberculosis Association, 2001.



Figure 1. Location of Participating Hospitals

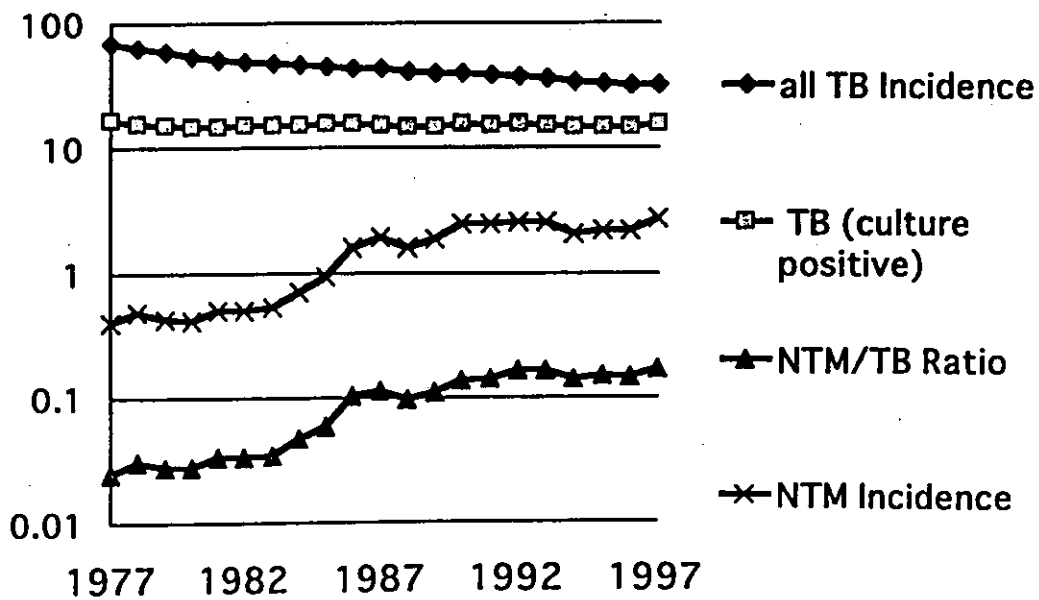


Figure 2 . Temporal Changes of Incidence of Tuberculosis and NTM Diseases in Japan

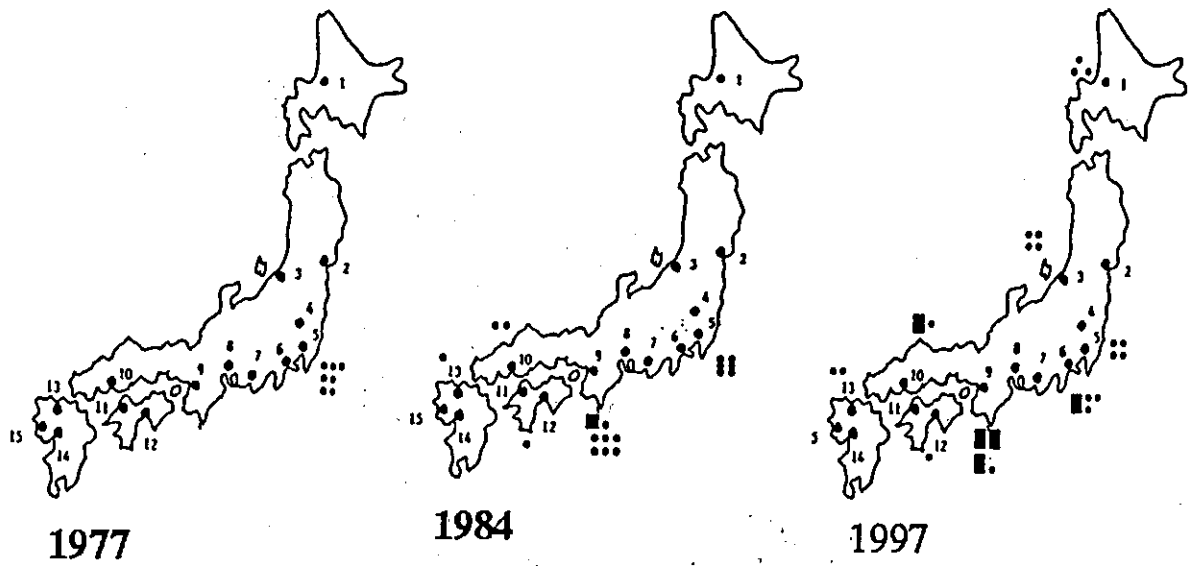


Figure3. Spread of *M. kansasii* disease from Tokyo area to western, and then northern part of Japan

- = one pulmonary *M. kansasii* disease patient
- = ten pulmonary *M. kansasii* disease patients

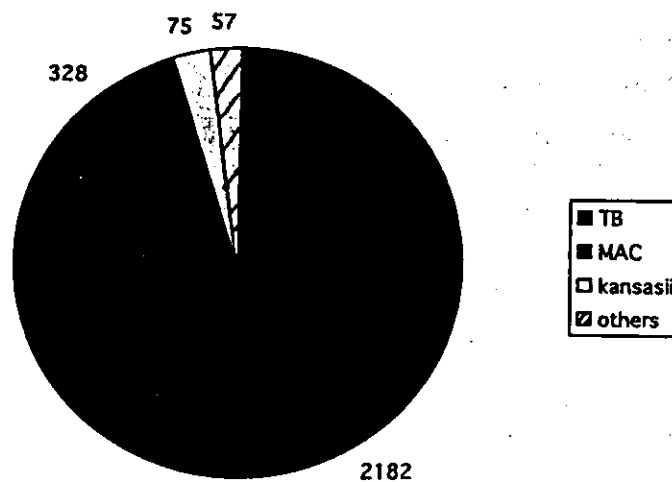


Figure 4. Etiologic species of mycobacterial diseases in 1997

結核感染

新しい結核ワクチンの開発

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

岡田全司, 田中高生, 喜多洋子

結核は世界最大の感染症であり、BCGよりも効果的なワクチンの開発が切望されている。結核におけるキラーT細胞の機能や役割については、重要であることは類推されているが、不明な点が多い。われわれは、このキラーT細胞の役割を解明する糸口をgranulysinという分子でつかみつつある。また、BCGワクチンよりもはるかに切れ味のよい新しい結核ワクチン（DNAワクチン、サブユニットワクチン、リコンビナントBCGワクチン）を開発した。特にHsp65 DNA+IL-12 DNAワクチンはきわめて強力な結核予防ワクチン効果を示した。これらのワクチン効果は、キラーT細胞の分化誘導を介して発揮されることを示し、ヒト結核においてgranulysin分泌キラーT細胞がきわめて重要な働きをしていることを明らかにした。また、ヒト生体内結核免疫解析モデルSCID-PBL/huを世界に先駆けて確立した。

Key word

tuberculosis vaccine, DNA vaccine, subunit vaccine, recombinant BCG vaccine, cytotoxic T cell, SCID-PBL/hu model, clinical trial

はじめに

結核は、いまだに世界の人口の1/3が結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の感染を受け、そのなかから毎年800万人の患者が発生し200万人が死亡している、世界最大の感染症の一つである¹⁻⁴⁾。本邦でも4年前から結核罹患率の増加が認められ、

1999年「結核緊急事態宣言」が厚生省（当時）から出された。1998年、米国疾病管理センター（CDC）は、政府・学術機関・企業が一体となって新世代の結核ワクチンを開発する必要性を強く主張する発表を出した。また、結核撲滅対策委員会（ACET）は国民の健康に対する大敵である結核撲滅のためには、BCGに代わる有効なワクチンが必要であることを示した。1998年にはNatureに結核菌H37Rvゲノム全塩基配列が報告され、遺伝子レベルで抗結核免疫を解析しうることになった⁵⁾。

しかしながら、BCGに代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。われわれはBCGよりもはるかに強力な新しいサブユニットワクチン、DNAワクチンやリコンビナントBCGワクチンの開発に成功した⁶⁻¹¹⁾。本稿ではわれわれの研究成果を中心に、新しい結核ワクチン開発の現状について検討する。またわれわれは、サイトカイン、キラーT細胞、遺伝子治療を長年研究しており、これらを基礎にして、まだ不明な点が多い抗結核免疫におけるキラーT細胞の機能解明について述べる¹²⁻¹⁷⁾

Tuberculosis infection : Development of new vaccine against tuberculosis

Masaji Okada Takao Tanaka Yoko Kita

国立療養所近畿中央病院臨床研究センター

おかだ・まさじ 1977年大阪大学大学院医学研究科博士課程（第三内科学）修了。78年米国University of Washington, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Basic Immunology Program, Research Fellow, 83年大阪大学医学部第三内科助手, 93年九州大学生体防御医学研究所臨床遺伝学助教授, 98年（財）結核予防会大阪病院副院長, 国立療養所近畿中央病院臨床研究部長を経て、2001年同近畿中央病院臨床研究センター結核研究部長。専門は結核免疫、遺伝子治療、免疫学。現在の研究テーマは、結核に対する新しいワクチン開発とキラーT細胞関連分子による新しい結核・予防・診断・治療法の開発。

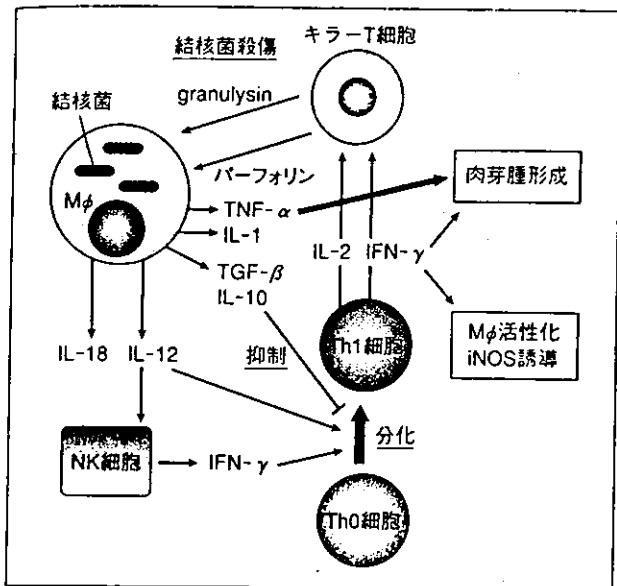


図1 抗結核免疫とマクロファージ, ヘルパーT, キラーT細胞活性化

結核感染と免疫

結核感染に対する免疫力は、マクロファージ(Mφ), CD4⁺T細胞, ナチュラルキラー(NK)細胞, γ/δ T細胞, キラーT細胞(CD8⁺T細胞とCD8⁻T細胞)および肉芽腫形成による総合的な抵抗力である(図1)。

1. キラーT細胞(CD8⁺T細胞)

CD8遺伝子あるいは $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子やTAP(transporter associated with antigen processing)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、マウスは死亡する。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。また、CD4⁺T細胞と同様にCD8⁺T細胞は肺へ遊走するが、結核患者の気管支肺胞洗浄液(BAL)中のCD8⁺T細胞が多いことと病気の回復との関連が報告されている。活動性結核ではCD8⁺T細胞が増加し、IFN- γ mRNAとIL-12 mRNAを強く発現している細胞がBAL中に増加する。キラーT細胞の一つの役割としてIFN- γ 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Mφ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(図2, 3)。

最近、CD8⁺T細胞が結核菌感染したMφをFas非依存性、granule依存性の機構で溶かし、最終的には結核菌を殺すことが報告されている^{18, 19)}。このT細胞はCD1拘束性でミコール酸, lipoarabinomannan(LAM), phosphatidyl inositol mannoside, glucose monomycolate, isoprenoid glycolipid(CD1cと結合)等の結核菌脂質とlipoglycanを認識する³⁾。CD1の抗原結合グループは深く疎水性である。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分子には細菌のホルミル化ペプチドが結合し抗結核免疫を誘導することが示唆されている³⁾。

このキラーT細胞の顆粒内のタンパク質である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Mφ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によりMφ細胞膜に穴が開き、Mφ内の結核菌に直接granulysinが作用するためと考えられる。このように、granulysinは細胞内病原体に対する免疫に直接関与することが明らかとなった。

われわれは結核患者、特に多剤耐性結核患者末梢血リンパ球(PBL)ではキラーT細胞のgranulysin mRNAの発現が低下していることを明らかにした⁶⁾(表1)。このことからわれわれは、キラーT細胞のgranulysin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⁶⁾。granulysin(分子量9,000)はキラーT細胞やNK細胞に存在するタンパク質で、saposin-like protein(SAPLIP)ファミリーのメンバーでありNK-lysinに43%のホモロジーを示す。

キラーT細胞はさらにTIA-1等の細胞質内小分子タンパク質を分泌しアポトーシスを誘導することもいわれている。最近、順天堂大学榎垣博士、八木田博士、奥村博士らと共同研究を行い、キラーT細胞の腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド(TRAIL)とパーフォリンが抗結核免疫に重要であることを示す興味深い結果を得た⁶⁾(表3参照)。

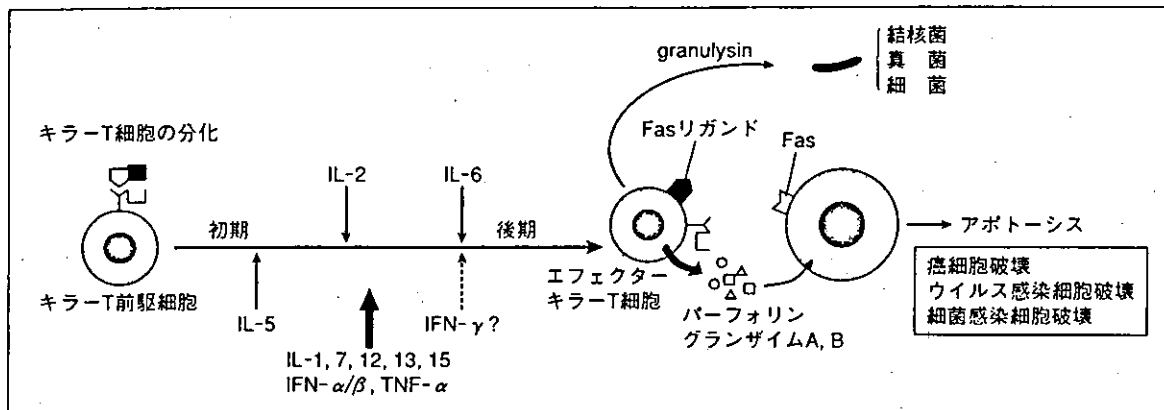


図2 キラーT細胞活性化と細胞傷害機構

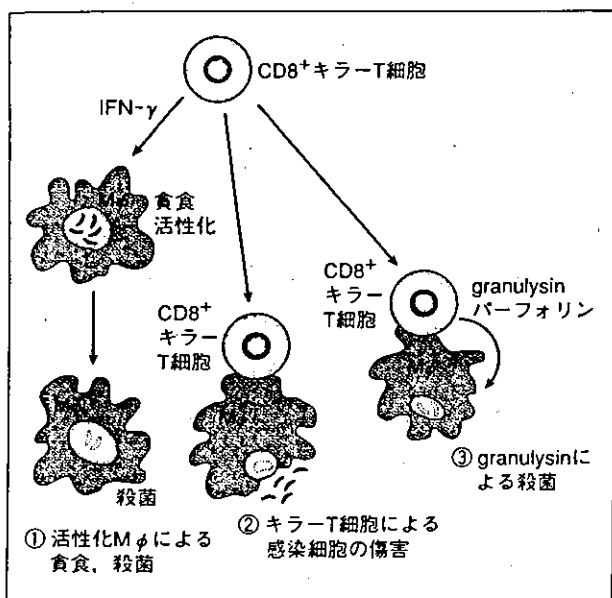


図3 キラーT細胞によるマクロファージ内結核菌殺菌機構

CD8⁺キラーT細胞は結核感染マクロファージ (Mφ) や殺菌能の低下したMφを破壊し、新たな非感染Mφに結核菌を貪食させる。キラーT細胞顆粒内に含まれるパーフォリンとgranulysinを分泌してMφ内の菌を直接殺す。またキラーT細胞から産生されるIFN-γはキラーT細胞を活性化する。

一方、MHCクラスI拘束性の結核菌の38 kDaタンパク質、Hsp65タンパク質を認識するマウスCD8⁺キラーT細胞や19 kDaタンパク質、antigen (Ag) 85, CFP10 (Mtb11) を認識するヒトCD8⁺キラーT細胞が報告されている³⁾。結核菌の方が結核死菌よりも食胞孔 (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

表1 多剤耐性結核患者末梢血リンパ球 (PBL) における各因子の発現

granulysin mRNA	↓↓
TRAIL mRNA	↓↓
キラーT細胞分化因子産生	↓↓
IL-2産生	↓
IFN-γ産生	↓
IL-6産生	↓

TRAIL: 腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド

対するキラーT細胞で、HLA-A2とは82~90位の9個のアミノ酸AMASTE₉GV, HLA-B52とは69~76位のLQNLARTIが結合してキラーT細胞がこれらを認識する。われわれ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細胞を生体内で誘導することにはじめて成功した²⁰⁻²³⁾ (図4)。一方、Corixa研究所 (米国Corixa社) Reed博士、Alderson博士らはPPD陽性のヒトから結核菌に感染した樹状細胞に反応するCD8⁺キラーT細胞クローンを確立したが、HLA-A, B, C, DR, DQ, CD1に拘束性を示さなかった。さらにIFN-γ Elispot assayで、PPD陽性健常人のclassically restricted (典型的な拘束性) CD8⁺T細胞の頻度を解析した。その結果、1人は結核菌反応性CD8⁺T細胞クローンの4%、もう1人は26%がclassically restrictedであった。残りはnonclassically restrictedであったが、CD1拘束性ではなかった²⁴⁾。このように、nonclas-

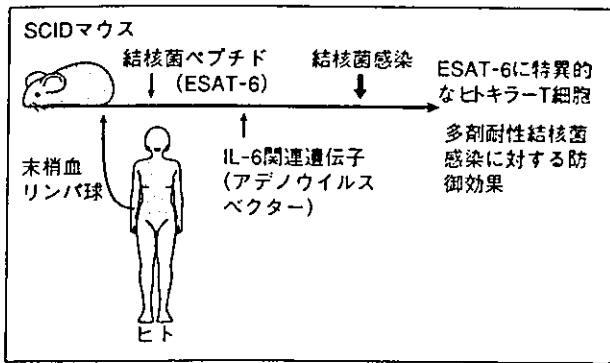


図4 SCID-PBL/hu マウスを用いた結核菌ペプチドに特異的なヒトキラーT細胞の *in vivo* における誘導

sically restricted CD8⁺T細胞の抗原結合分子と、このT細胞が抗結核免疫にいかなる作用を發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)

われわれはCD8⁺キラーT細胞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はじめに明らかにした。MHC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、MHC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^{25,26)} (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細胞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細胞分化を誘導することを明らかにした^{15,27,28)}。われわれはIL-6がキラーT細胞誘導の後期の分化段階に作用することを解明した²⁹⁾ (図2)。多剤耐性結核患者末梢血リンパ球 (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、IFN- γ 、IL-6の著明な低下を認めた^{6,7,9-11)} (表1)。また、PPDに特異的なヒトキラーT細胞の誘導系を確立した。糖尿病合併難治性結核患者ではPPD特異的キラーT細胞

の分化誘導の著しい低下を明らかにした^{6,7,9-11)}。

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²⁾。ヒトにおいても、IFN- γ レセプター遺伝子に変異がみられる先天的IFN- γ レセプター欠損児では、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。マウスにてもIFN- γ 遺伝子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) も強くTNF- α を誘導し、マウスM ϕ 上のCD1d1の発現を誘導した³⁰⁾。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- α レセプター (TNF-Rp55) 欠損マウスでは結核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。最近、慢性関節リウマチ患者の治療に抗TNF- α 抗体を使用するが、致死的な重症結核感染症を引き起こした。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、IFN- γ の産生誘導の欠損がみられ、IL-6も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²⁻⁴⁾。

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²⁻⁴⁾。

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および抗原提示能をもつ。したがってM ϕ 内が結核菌が優位に立つか、ヒト (生体) 免疫能が優位に立つかの戦争の場でもある。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タンパク質 (文献2) 参照) が放出され、また

ROI (reactive oxygen intermediate) やNO等のRNI (reactive nitrogen intermediate) 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 fusionを阻止し、結核菌は殺菌を免れる。Nramp (natural resistance associated macrophage protein) は2価金属イオン (Fe^{2+} や Zn^{2+}) 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ソームから汲み出し、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³¹⁾。

5. Toll-like レセプターとマクロファージ活性化

最近発見されたToll-like receptor (TLR) ファミリーが自然免疫 (innate immunity) に重要な役割を果たしている^{22, 31)}。結核菌の細胞壁 (LAM, mAGP, total lipid) に対する応答はTLR2を介する。一方、結核菌に対する反応にはTLR2とTLR4が必要である。病原性の結核菌由来のMan LAM (マンシル化LAM) はMφを活性化しないが、非病原性の抗酸菌は異なる糖脂質Ara LAM (アラビノフラシル化LAM) よりなり、これはTLR2を介してMφ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19 kDaのリポタンパク質がTLR2を介してMφを活性化する³²⁾。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が審良らによりクローニングされた³¹⁾。

6. Th1細胞, Th2細胞

CD4⁺T細胞が結核免疫に重要であることは、MHCクラス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。これらのマウスは、急性結核感染ではIFN- γ 産生低下のため死亡する。一方、chronic persistent結核モデルでは、IFN- γ 産生は誘導型NO合成酵素 (iNOS) は正常でCD4依存性、IFN- γ 非依存性、iNOS非依存性の経路が示唆されている。Th1細胞は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

を発揮する。*in vitro*での結核菌抗原刺激に対して、健常人PBLはTh1優位 (IFN- γ 産生) であり、これに対し肺結核患者PBLはTh2優位 (IL-4産生) であった。これはTh2優位だと結核に対する抵抗が低下するためかもしれない。また、結核菌の活動部位ではTh1反応が強く誘発されていることが示された (Th1細胞と結核免疫については文献2)参照)。

7. 結核感染特異的遅延型反応

—新しい診断法の開発

本邦ではBCG接種が幼児、小学生、中学生全員に施行されるため、結核非感染者でもツベルクリン反応が陽性に出るという大きな問題点を抱えている。われわれは、これを解決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は多種のタンパク質を含む。このなかから、結核感染にきわめて特異性の高い、ツ反に代わるタンパク質DPPD (N末端のアミノ酸配列がDPPDで始まる) のアミノ酸配列および遺伝子クローニングに成功した。リコンビナントDPPDタンパク質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で示された。ヒトでも結核感染特異性を示すことを*in vitro*およびskin test (皮内反応) の系で明らかにした^{8, 33-35)}。

結核ワクチンの種類

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 gun、②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を計画中である^{6-9, 20, 22, 36, 37)}。 α 抗原 (Ag85B)、ESAT-6、種々のサイトカイン、Hsp65、38kDa、19kDaリポタンパク質、Mtb8.8、Mtb9.9、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³⁸⁾。

またさらに最近、Alderson博士、Gillis博士、

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, ESAT-6, Hsp65
19kDaリボタンパク質
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 Mtb8.8, Mtb9.9, Mtb32, Mtb39, Mtb11
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+IL-6R 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, 38kDa 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, ESAT-6 遺伝子, HSP65 遺伝子
IL-6 遺伝子, IFN-γ 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抗原遺伝子
④ attenuated 結核菌
attenuated サルモネラ菌に結核免疫増強DNA 導入し, 経口ワクチン
attenuated 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

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、絨緞爆撃的に進める画期的な系を開発した³⁹⁾。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^{6, 7, 9)} (表3)。一方、長崎大学山田博士、大原博士らは、キラーT細胞誘導結核菌タンパク質抗原遺伝子やサイトカイン遺伝子をBCG菌に導入する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ワクチンを作製している。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。

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^{6, 8, 40)} (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⁶⁾ (表3)。

また、多剤耐性結核患者にIFN-γ 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-γ 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。

DNA ワクチン

われわれは、① IL-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3)。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、Hsp65 DNA ワクチンの作製に成功した。Lowrie らは癩菌由来のHsp65 遺伝子を用いているが、われわれはヒト型結核菌H37Rv由来のHsp65 遺伝子を用い、マウスIL-

表3 新しい結核ワクチン・診断法・治療モデルの開発

新しい結核ワクチン	
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-12 DNA HVJ リポソーム/Hsp65 DNA IL-6 関連遺伝子ワクチン (IL-6 DNA + IL-6R DNA + gp130 DNA) 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)

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 タンパク質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 (<i>in vitro</i>) ヒト (skin test)

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細胞のgranulysin mRNA 発現↓ (パーフォリン+TRAIL) 発現が重要	

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 ↑↑

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

BCG ワクチン	0% (0/4)
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)

12 遺伝子にはすでにマラリア DNA ワクチン (マウスモデル) として実績があるプラスミドベクターを使用した。

HVJ リポソームをベクターに用いた場合, Hsp65 DNA 単独 (HVJ リポソーム/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 リポソーム/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・予防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^{6,7,9)} (図6)。

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^{6,7,9)}。

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^{6,7,9)}。まとめると, 結核死菌を貪食

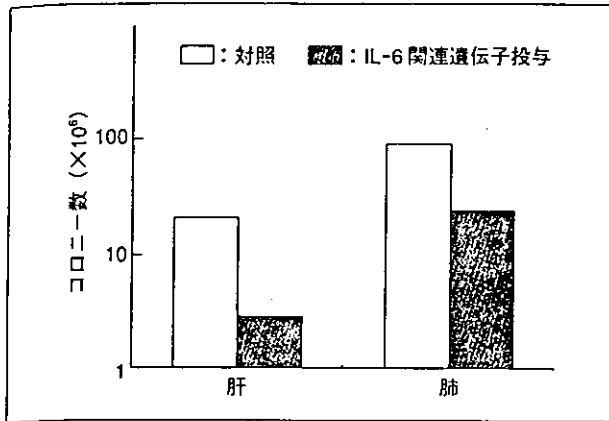


図5 IL-6 関連遺伝子 (DNA) による結核ワクチン効果
ヒト型結核菌 (H37RV) 5×10^5 個を静脈投与した BALB/c マウス (結核感染マウス) に、IL-6 関連遺伝子 (IL-6 遺伝子+IL-6 レセプター遺伝子+gp130 遺伝子) をアデノウイルスベクターに挿入した DNA ワクチンを腹腔内投与した。結核菌感染後 4 週後の肺および肝の結核菌数を小川培地に培養してコロニー数で測定した。

させた J774.1M ϕ 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。

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⁴¹⁾。われわれはさらに、Ag85A, Ag85B, Ag85C, MPB51 DNA ワクチン用プラスミドベクターを作製した。これらの DNA ワクチンを組み合わせてワクチン効果を解析中である。

リコンビナント BCG ワクチン

結核菌は 300 種以上のタンパク質を分泌するが、特にわれわれの共同研究者長崎大学山田博士らがクローニングした α 抗原 Ag85B とそのファミリー (Ag85A, Ag85C) 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²⁰⁾。ほかに MPB (mycobacterial protein from BCG) 51 (fibronectin binding protein C1 と同じ) や MPB64 と相同性をもつ。Ag85A, Ag85B, Ag85C はフィブ

細胞	投与	IFN- γ (pg/ml)				
		0	1	2	3	4 ($\times 10^3$)
IL-6 関連遺伝子導入群	PPD (20 μ g)	[Bar]				
	M. tu (20 μ g)	[Bar]				
	M. tu (100 μ g)	[Bar]				
	Con A (5 μ g)	[Bar]				
	PHA-P (0.2%)	[Bar]				
対照群	PPD (20 μ g)	[Bar]				
	M. tu (20 μ g)	[Bar]				
	M. tu (100 μ g)	[Bar]				
	Con A (5 μ g)	[Bar]				
	PHA-P (0.2%)	[Bar]				

図6 IL-6 関連遺伝子を導入した結核感染マウス脾細胞におけるキラー T 細胞の活性 (IFN- γ の産生)

ConA: コンカナバリン A, PHA-P: フィトヘマグルチニン-P

ロネクチンとの結合活性や mycolyl transferase 活性をもつ。

Ag85 の各コンポーネントをコードする遺伝子 (fbpA, fbpB, fbpC) と MPB51 をコードする遺伝子 (mpb51) は BCG 菌のものを用いた。プロモーターは *M. avium* の Ag85B 遺伝子, *M. kansasii* の Ag85B 遺伝子, BCG の MPB51 遺伝子のものを用いた。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^{6, 7, 9)}。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、BCG 東京菌よりも強力なワクチン効果を得た。IL-2 リコンビナント BCG, IL-6 リコンビナント BCG, IFN- γ リコンビナント BCG, HSP65 リコンビナント BCG の作製に成功した。さらに最近、サブユニットワクチンでサル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 Mtb72f DNA リコンビナント BCG の作製に成功した。

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^{6,7,9,23}(図4)。

臨床応用に向けての新しい結核ワクチン

現在最も有力なワクチンとして、Mtb72f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 (岡田ら、カニクイザルで解析計画)、Ag85B-ESAT-6融合タンパク質 (Anderson博士ら)があげられる。臨床応用ワクチン候補の筆頭としてはMtb72f融合タンパク質サブユニットワクチンがあげられ、1年以内に第I相臨床試験が計画されている。さらにわれわれは、Mtb72f DNAをBCGまたはHVJリボソームに組み込み、きわめて強力なワクチン開発をめざしている^{6,7,9}。

おわりに

結核におけるキラーT細胞の機能や役割については、重要であることは類推されているが、不明な点がいまだ多い。われわれはこのキラーT細胞の役割を解明する糸口をgranulysinという分子でつかみつつある。また、BCGワクチンよりもはるかに切れ味の鋭い新しい結核ワクチン(DNAワクチン、サブユニットワクチン)を開発した。臨床応用も近いと考える。

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。本邦の結核患者数の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・治療法の確立を全国規模で行う計画である。自治医大吉田博士、長崎大山田博士、大原博士、大阪大金田博士、大塚研究所松本博士、東大医科研究藤博士、BML総合研究所高森博士、永田博士、Corixa研究所Reed博士、Gillis博士らとの共同研究として、厚生科学研究費新興・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」(岡田班)の大型プロジェクトの支援を得た。共同研究者の当臨床研究センター井上義一博士、研究員の方々(桑山さち子、村木裕美子、稲永由紀子、森珠里、金丸典子、岡美穂、松本久美各氏)に深謝します。

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. 感染・炎症・免疫 28, 38 (1998)
- 2) 岡田全司. 免疫低下と結核. 臨床科学 35, 344 (1999)
- 3) Flynn JL & Chan J. Immunology of Tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19, 93 (2001)
- 4) Schluger NW & Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 157, 679 (1998)
- 5) Cole ST, Brosch R, Parkhill J et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537 (1998)
- 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 (2001)
- 7) Okada M, Tanaka T, Inoue Y et al. New (DNA-recombinant BCG- and subunit-) vaccination against tuberculosis and cytotoxic activity. The 36th Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, p127 (2001)
- 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, p.355 (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団, 2001)

- 9) Okada M, Tanaka T, Inoue Y et al. DNA and recombinant BCG vaccination against tuberculosis and cytotoxic activity in the patients with multi-drug resistant tuberculosis. The 35th Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, p197 (2000)
- 10) Okada M, Yoshida S, Ohara N et al. Novel DNA and recombinant BCG vaccinations against tuberculosis by the augmentation of cytotoxic activity. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, P-049 (2001)
- 11) Okada M, Yoshida S, Ohara N et al. DNA and recombinant BCG vaccination against tuberculosis by the augmentation of cytotoxic activity. *FASEB J*, A1008 (2001)
- 12) 岡田全司, 岸本忠三. リンホカインとモノカイン: 山村雄一他監. 新内科学体系 年刊版 '84-C, p221 (中山書店, 東京, 1984)
- 13) 岡田全司. サイトカインと腫瘍免疫: 石井威望他編. 新医科学体系8B 免疫応答—生体の防御機構II, p269 (中山書店, 東京, 1996)
- 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* 57, 1335 (1997)
- 15) 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 (1981)
- 16) 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 (1983)
- 17) 杉村和久, 岡田全司. 細胞性免疫の調節機構: 山村雄一, ロバート・A・グッド, 石坂公成編. 岩波講座免疫科学5, p113 (岩波書店, 東京, 1984)
- 18) Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K et al. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science* 276, 1684 (1997)
- 19) Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282, 121 (1998)
- 20) 岡田全司. 結核治療ワクチンと分子医学. 現代医療 32, 83 (2000)
- 21) 岡田全司. 抗結核キラーT細胞とリコンビナントBCG・DNAワクチンの開発による新しい予防・診断・治療法: 実験結核研究会編. 実験結核40年の歩み, p119 (2000)
- 22) 岡田全司. 新しい抗結核ワクチンの開発の現状: 第77回日本結核病学会総会シンポジウム「結核免疫学の動向と課題」(2002)
- 23) 岡田全司, 田中高生. 結核ワクチンの新しいストラテジー. 免疫・Immunology Frontier 10, 2000 (2000)
- 24) Lewinsohn DM, Zhu L, Madison VJ et al. Classically restricted human CD8⁺T lymphocytes derived from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cells: Definition of antigenic specificity. *J Immunol* 166, 439 (2001)
- 25) Okada M, Klimpel GR, Kupperts 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 (1979)
- 26) Okada M & Henney CS. The differentiation of cytotoxic T cells *in vitro*. II. Amplifying factor(s) produced in primary mixed lymphocyte cultures against K/D stimuli require the presence of Lyt2⁺ cells but not Lyt1⁺ cells. *J Immunol* 125, 300 (1980)
- 27) Kaieda T, Okada M, Yoshimura N et al. A human helper T cell clone secreting both killer helper factor(s) and T cell-replacing factor(s). *J Immunol* 129, 46 (1982)
- 28) Okada M, Yoshimura N, Ichimori Y et al. Immunologic and molecular characterizations of T cell-derived T cell activating factor. *J Immunol* 136, 1288 (1986)

- 29) 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 (1988)
- 30) Ryll R, Watanabe K, Fujiwara N et al. Mycobacterial cord factor, but not sulfo lipid, causes depletion of NKT cells and upregulation of CD1d1 on murine macrophages. *Microbes Infect* **3**, 611 (2001)
- 31) Akira S. Toll-like receptor and innate immunity. *Adv Immunol* **78**, 1 (2001)
- 32) Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* **285**, 732 (1999)
- 33) Campos-Neto A, Rodrigues-Junior V, Pedral-Sampaio DB et al. Improvement of the Mantoux test with a single and defined recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein. *Tubercle*, in press
- 34) Campos-Neto A, Rodrigues-Junior V, Pedral-Sampaio DB et al. Improvement of the Mantoux test with a single recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein. The 36th Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, p196 (2001)
- 35) Coler RN, Skeiky YA, Ovendale PJ et al. Cloning of a *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding a purified protein derivative protein that elicits strong tuberculosis-specific delayed-type hypersensitivity. *J Infect Dis* **182**, 224 (2000)
- 36) Hess J, Schaible U, Raupach B & Kaufmann SHE. Exploiting the immune system : Toward new vaccines against intracellular bacteria. *Adv Immunol* **75**, 1 (2000)
- 37) Anderson P. TB vaccines : Progress and problems. *Trends Immunol* **22**, 160 (2001)
- 38) Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* **400**, 269 (1999)
- 39) 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 (2000)
- 40) Reed S, Alderson M, Campos-Neto A et al. Development of a recombinant tuberculosis vaccine. The 35th Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, p159 (2000)
- 41) Huygen K, Content J, Denis O et al. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med* **2**, 893 (1996)

臨床と微生物
Vol.29 No.2 別刷
2002年3月25日
株式会社近代出版

【開発・改良が切望されるワクチン】

結核ワクチン

OKADA MASAJI/TANAKA KOUSEI/TSUBURA EIROU

岡田全司*1/田中高生*1/螺良英郎*2

*1◎国立療養所近畿中央病院臨床研究センター結核研究部 *2◎財団法人結核予防会大阪府支部

結核は、いまだに世界の人口の1/3が結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の感染を受け、そのなかから毎年800万人の患者が発生し200万人が死亡している、世界最大の感染症の一つである¹⁻³⁾。本邦でも4年前から結核罹患率の増加が認められ、1999年「結核緊急事態宣言」が厚生省(当時)から出された。1998年、米国疾病管理センター(CDC)は、政府・学術機関・企業が一体となって新世代の結核ワクチンを開発する必要性を強く主張する発表を出した。また、結核撲滅対策委員会(ACET)は国民の健康に対する大敵である結核予防のためには、BCGに代わる有効なワクチンが必要であることを示した。1998年にはNatureに結核菌H37Rvゲノム全塩基配列が報告され、遺伝子レベルで抗結核免疫を解析しうることになった。

しかしながら、BCGに代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。われわれはBCGよりもはるかに強力な新しいサブユニットワクチン、DNAワクチンやリコンビナントBCGワクチンの開発した⁴⁻¹⁰⁾。本稿ではわれわれの研究成果を中心に、新しい抗結核ワクチン開発の現状と、その結核免疫機能について述べる。

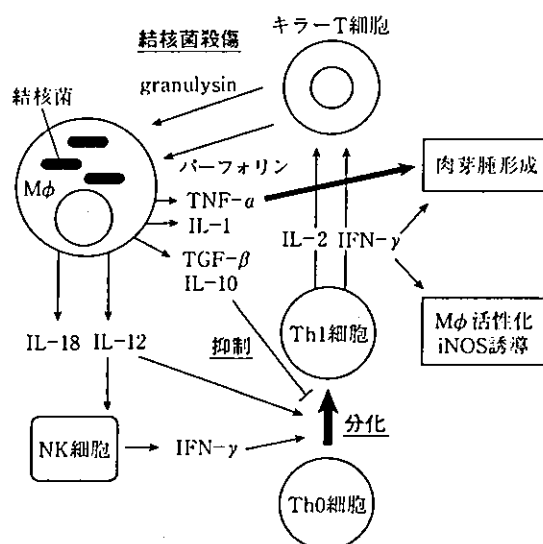


図1 抗結核免疫とマクロファージ、ヘルパーT、キラーT細胞活性化

■結核感染と免疫

結核感染に対する免疫力は、マクロファージ(Mφ)、CD4⁺T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、 γ/δ T細胞、キラーT細胞(CD8⁺T細胞とCD8⁻T細胞)および肉芽腫形成による総合的な抵抗力である(図1)。マクロファージ(Mφ)、Toll-likeレセプターとMφ、およびTh1細胞については、総説[岡田ら: Mol Med(in press)]を参照されたい。

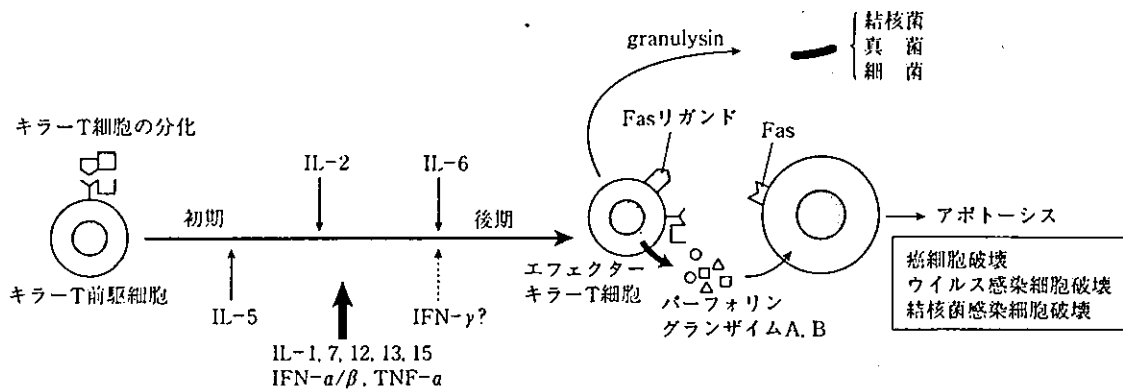


図2 キラー T 細胞活性化と細胞傷害機構

キラー T 細胞分化とサイトカイン

われわれは CD8⁺キラー T 細胞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明らかにした。また、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 細胞クローンを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 細胞分化を誘導することを明らかにした^{13, 19)}。われわれは IL-6 がキラー T 細胞誘導の後期の分化段階に作用することを解明した²⁰⁾ (図2)。多剤耐性結核患者末梢血リンパ球 (PBL) において、こちらのキラー T 細胞分化因子すなわち IL-2、IFN- γ 、IL-6 の著明な低下を認めた^{4, 5, 7-9)}。また、糖尿病合併難治性結核患者では PPD 特異的キラー T 細胞の分化誘導の著しい低下を明らかにした^{4, 5, 7-9)}。

キラー T 細胞 (CD8⁺ T 細胞)

最近、CD8⁺キラー T 細胞が結核菌感染した M ϕ を Fas 非依存性、granule 依存性の機構で溶かし、最終的には結核菌を殺すことが報告されている。

このキラー T 細胞の顆粒内の蛋白質である granulysin は直接細胞外の結核菌を殺す。この機序は結核菌細胞壁を不完全な状態にすることによる。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により M ϕ 細胞膜に穴が開き、M ϕ 内の結核菌に直接 granulysin が作用するためと考えられる。

われわれは結核患者、特に多剤耐性結核患者末梢血ではキラー T 細胞の granulysin mRNA の発現が低下していることを明らかにした⁴⁾。このことからわれわれは、キラー T 細胞の granulysin 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⁴⁾。

一方、MHC クラス I 拘束性の結核菌の 38kDa 蛋白質、Hsp65 蛋白質を認識するマウス CD8⁺キラー T 細胞などが報告されている³⁾。われわれは、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 EAST-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 細胞を生体内で誘導した¹⁵⁻¹⁷⁾。

■結核ワクチンの種類

結核ワクチンは、①サブユニットワクチン、②DNA ワクチン、③rBCG 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