

防御能力の差は、結局のところ、BALB においては M.tb 感染時に B6 にみられるほどの Th1 細胞の誘導と、それら細胞から産生されるサイトカインによる M.tb 特異的な細胞性免疫の強力な活性化が得られなかったためと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Haga T, Shimizu Y, Okoba M, Yamazaki N, Goto Y, Miura T, Hayami M. Construction And "in Vitro" Properties Of Chimeric Simian and Human Immunodeficiency Viruses Having Human Tnf-alpha And Rantes Genes. The International Congress of Virology San Francisco, 2005 July

秦優子、芳賀猛、後藤義孝 結核菌に対する免疫誘導にみられるマウス系統差. 日本獣医学会 鹿児島 2005年9月

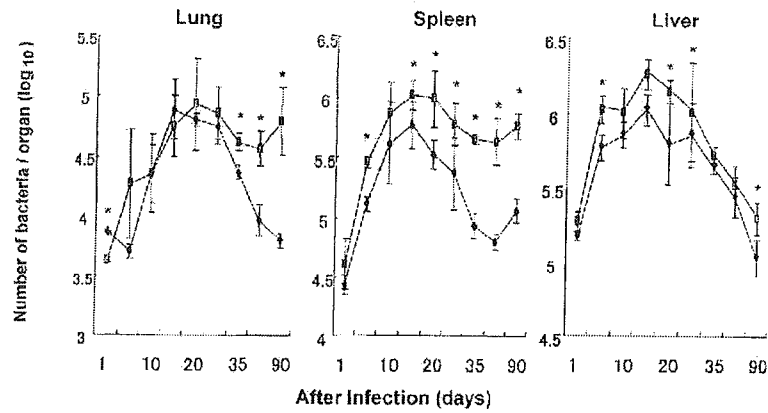


Fig.1. Kinetics of *M.tb* (H37Ra) in the lungs, spleen and liver of C57BL/6 (○) and BALB/c (●) mice. Both strains of mice were infected with 2×10^8 bacteria intravenously. The number of bacteria in the organs were determined at indicated times shown in this figure. Results were expressed as means \pm standard deviations of 3 or 4 mice. An asterisk indicates a significant difference by the Student *t* test, * $p < 0.05$.

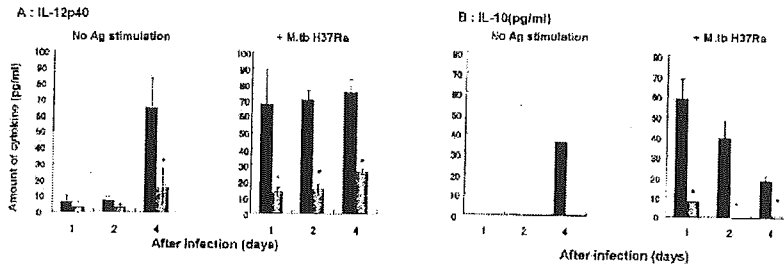


Fig.2. IL-12p40(A) and IL-10(B) production by BM-MΦ. BM-MΦ from normal C57BL/6 (■) and BALB/c (□) mice were stimulated with or without *M.tb* (H37Ra) for 1d, 2d, 4d at 37°C. The amount of these cytokines was determined by ELISA. Results were expressed as means \pm standard deviations of triplicate. Data were representative of two separate experiments. An asterisk indicates a significant difference between the C57BL/6 and BALB/c mice by the Student *t* test, * $p < 0.05$.

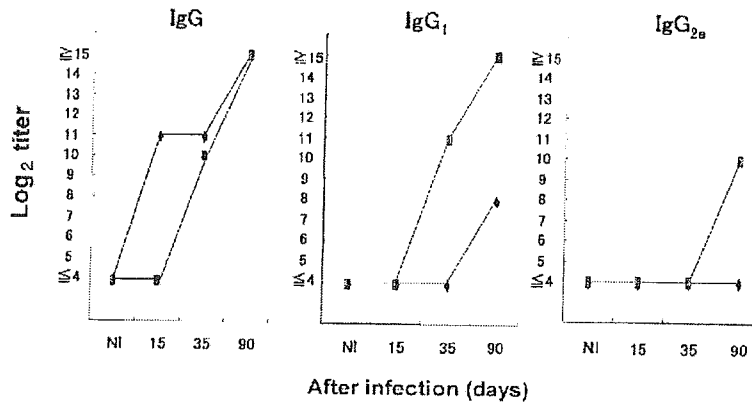


Fig.3. Levels of anti-*M.tb* antibody titers in the sera of C57BL/6 (○) and BALB/c (●) mice. Both strains of mice were infected with 2×10^8 *M.tb* (H37Ra) intravenously and sera were collected at indicated time shown in this figure. Both Ig class and IgG subclass were determined by ELISA. These results were typical of three independent experiments. NI: no infection.

厚生労働科学研究費補助金（国際医学研究事業）
分担研究報告書

Mycobacterium bovis BCG 亜株間の一酸化窒素（NO）感受性、及び細胞内増殖能力に関する研究

分担研究者 小野 菊夫 名古屋市立大学教授

研究要旨

結核症に対する唯一のワクチンである BCG には亜株が存在している。粟粒結核などの小児結核に対する有効性は認められるものの成人肺結核に対する有効性は 50%程であると推定され、ワクチン効果の持続性が問題となっている。推定の根拠となった野外調査の研究には菌株や接種方法が統一されていない等の問題点が指摘されており、結果を同一視できないとの評価もある。BCG ワクチンの再評価が必要であることを WHO も認めており、各国に検討を促している。本研究では、12種の BCG 亜株について宿主細胞から放出される殺菌分子の1つである一酸化窒素（NO）に対する感受性の検討と、ヒト肺胞上皮細胞株 A549 を用いた宿主細胞内での生存能について検討した。さらに、各亜株の生化学的な特徴（硝酸塩還元能試験、ナイアシン試験、ウレアーゼ試験、カタラーゼ試験等）の違いについても検討をおこなった。BCG 亜株には 1 mM の亜硝酸ナトリウムを含む培地では増殖が 10~15%にまで抑制される NO 感受性株と 40~80%にとどまる NO 耐性株が存在していた。硝酸塩還元能は Phipps 株だけ陽性となり、NO 感受性との関連は認められなかった。また、カタラーゼ活性については BCG 株は総て低かった。ナイアシンテストは微陽性となる株（Australia, Connaught, Phipps, Russia, Sweden, Tokyo）があった。ウレアーゼ試験は総て陽性であった。感染 16 時間目と 3 日目の A549 細胞内の菌数を比較したところ、3 日目でも菌数が減らない株と、3 日目に大きく菌数が減少する株が存在した。興味深いことに、*in vitro* での NO 感受性と宿主細胞内での生存能に相関が見られなかったことから、宿主細胞内での生存能は NO による殺菌機構からのエスケープによるものではないことが示唆された。現在、誘導型 NO 産生酵素の阻害剤を用いて宿主細胞内の菌数減少に及ぼす NO の役割を検討中である。生化学的な特徴と宿主細胞内での生存能についても相関性が認められないことから、菌-宿主間の生物学的な因子が感染の維持に重要であることが強く示唆された。本研究の成果は BCG ワクチンの再評価における基礎的な知見を与えるものである。

A. 研究目的

結核は、いまだに世界中で猛威を振るっている世界最大の感染症の一つである。エイズの世界的蔓延によって、ヒト免疫不全ウイルス（human immunodeficiency virus : HIV）感染者が増加する中で、現在、結核との重感染者の重症化が注目されている。世界保健機関（world health organization : WHO）の 2003 年度の統計によると、世界で 1 年間に新たに結核を発症する患者の 6 割はアジアであり、インド・中国のみで 38%を占め、両国は HIV 感染者数でもアジアの 1、2 位である。HIV 患者は結核に感染・発病しやすく、重感染者の 2 割は死に至ると言われている。日本では、結核感染患者の 8 割以上が 65 歳以上であり、高齢発症者から若年層への隔世代感染や小・中学校での集団感染が問題となっている。こうしたことから、結核は「再興感染症」として再び注目すべき疾患となっている。

BCG (bacillus Calmette-Guerin) はフランスの

医師 Calmette と獣医 Guerin が *Mycobacterium bovis* (ウシ型結核菌) を 13 年間 231 代にわたって継代培養し、1921 年に完成された弱毒化生ワクチンである。これがパスツール研究所から世界各国に広まり継代されていく間に、やや異なる性質が固定されていったと推定される。BCG は変異を起こしやすく、Calmette と Guerin が継代培養を開始してわずか 15 代目には変異株が得られ、その株は仔ウシやモルモットに対する病原性は低下していたと言われている。このため現在は菌体の凍結乾燥によるシードロット制が取り入れられ、継代による菌の変異をできるだけ少なくし、常に一定の性質を持った「BCG ワクチン」を提供できるシステムとなっている。現在世界では日本の Tokyo-172 の他、Glaxo, Copenhagen, Pasteur が主なシードとしてワクチン製造に使われているが、それらの細菌学的・免疫学的性質は異なることが知られている。近年の分子生物学の進歩によって、これら BCG 亜株間の差異が遺伝子レベルで明らかとなってきた。1999 年には、DNA マイクロアレイ法によって、親株の *M.*

bovis には見られる 5 つの領域が、大半の BCG では欠失していることが確認された。免疫誘導能にも BCG 亜株間で違いが見られ、BCG-Tokyo 株はマウスに対する防御免疫誘導能が低く、BCG-Tokyo 株で免疫したマウスにリコンビナント BCG を感染させたところ、これを排除できなかったと報告されている。しかし、モルモットでの免疫誘導効果を少量の結核菌経気道感染で調べたところ、その有効性について BCG-Copenhagen 株と有意差はないとの報告もあり、動物種の違いによるものなのか、結論を出すに至っていない。BCG の結核予防効果に対する野外調査でも、高いものは 80 % の予防効果から、低いものは 0 % までの相反する結果が報告されている。これらの野外調査では、使用された株や投与方法も統一されておらず、その結果の信頼性に問題があるとの評価もある。

BCG は結核に対するワクチンとしてこれからも継続して投与されていくことが予想されるため、より効果的に BCG ワクチンを利用するためには、各国の BCG 亜株を同一条件で再評価することが必要である。BCG 亜株間の比較をするに当たり、マウスやモルモットにおける *in vivo* の感染実験では、同一条件で何種類もの亜株を比較することは困難である。一方、一度に大量のサンプルを比較検討できる *in vitro* における実験が適していると考えられる。そこで本研究では、現在ワクチンとして使用されている亜株の *in vitro* での宿主免疫応答の再検討、及び各亜株間での生化学的な差異について検討することを目的とし、_BCG 亜株間の生化学的差異、_BCG 亜株間の NO 感受性の差異、_肺胞上皮細胞株 A549 を用いた BCG 亜株間の宿主細胞内での生存能力の差異について検討を行った。

B. 研究方法

菌株

Mycobacterium bovis BCG 亜株 (Australia ATCC 35739、Connaught ATCC 35745、Danish ATCC 35733、Glaxo ATCC 35741、Mexico ATCC 35738、Moatral ATCC 35735、Pasteur ATCC 35734、Phipps ATCC 35744、Russia ATCC 35740、Tice ATCC 35743)、Australia vaccine seed、Sweden 株は国立感染症研究所の山本三郎博士より供与された。*Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 25618、*Mycobacterium avium* 724S、*M. avium* SmO は Colorado State University より供与された。*Mycobacterium bovis*、*M. bovis* BCG Brazil、*Mycobacterium smegmatis* は結核研究所より供与

された。各菌株は Middlebrook 7H9 Broth/0.25 % Tween 80/10% ADC 培地にて培養した。

NO 感受性試験

- 1) 4週間程度培養した BCG の前培養液を亜硝酸ナトリウム(0, 0.5, 1 mM)を含む Middlebrook 7H9 Broth/0.25 % Tween80/10 % ADC 溶液 (pH 6.0) 培養液で O.D.₅₃₀=0.1 となるように希釈した。
- 2) 培養液各 5 ml を試験管に分注し、1) を 500 μl ずつ加えて 37C で培養した。
- 3) 培養後 3 日毎に 21 日目までそれぞれの培養液の O.D.₅₃₀ を、比色計 (Mini Photo 518R、TAITEC) を用いて測定した。

ナイアシン試験

ナイアシン試験紙 (極東製薬工業) を使用し、添付の使用書に従って行った。

硝酸塩還元試験

<基質液>

リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウムより、M/45 リン酸緩衝液 (pH 7.0) を 100 ml 作成し、これに硝酸ナトリウム 0.085 g を溶解し、オートクレーブした。

① 2 倍希釈塩酸溶液

超純水 5 ml に HCl 5 ml を注意深く加えた。

② 0.2 % スルファニルアミド水溶液

超純水 100 ml にスルファニルアミド 0.2 g を溶解した。

③ 0.1 % N-ナフチルエチレンジアミン水溶液

超純水 100 ml に N-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩 0.1 g を溶解した。

操作は以下のように行った。

- 1) スクリューキャップ付き小試験管 (マルエム、NW-18) に滅菌水 0.2 ml を分注し、これに 1 白金耳の菌を浮遊させた。
- 2) 1) に基質液 2 ml を加えてキャップを締め、軽く振とうして 37 C の温浴中に 2 時間保った。
- 3) 温浴から取り出し、①を 0.1 ml、②を 0.2 ml、③を 0.2 ml 加え、軽く振とうした。

カタラーゼ試験

<試薬>

滅菌水 90 ml に Tween80 10 ml を加え、オートクレーブした。使用時にこの 10 % Tween 80 水溶液と 30 % 過酸化水素水を等量混和した。

操作は以下のように行った。

- 1) BCG 菌液 0.1 ml を 2 % 小川変法培地に接種

し、4週間培養した。

2) 菌苔表面に試薬 1 ml を加え、5 分後の泡沫の高さを計測した。

耐熱性 (68 C) カタラーゼ試験

<試薬>

M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0)

リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウムより、M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) を作成した。

10 % Tween 80 水溶液

超純水 90 ml に Tween 80 10 ml を加え、オートクレーブした。

操作は以下のように行った。

- 1) スクリューキャップ付き小試験管 (マルエム、NW-18) に M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) を 0.5 ml 入れ、これに数白金耳の培養菌を分散させた
- 2) 1) を 68C の湯浴に 20 分保った。
- 3) 水冷後、Tween 80 と 30 % 過酸化水素水を等量混合した溶液を 0.5 ml 加えた。泡沫の出たものを陽性とした。

ウレアーゼ試験

<基質液>

リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウムより、M/100 リン酸緩衝液 (pH 6.8) 100 ml を作成し、オートクレーブした。これに尿素 3.0 g、0.1 % フェノールレッド水溶液 1 ml を加えた。

操作は以下のように行った。

小川培地培養菌の 1 白金耳を基質液に浮遊させ、37C、3 日間保った。ピンク色～赤色になったものを陽性とした。

細胞内増殖試験

- 1) 培養しておいた A549 細胞を EDTA 溶液とトリプシン・EDTA 溶液を用いて剥がし、1000 rpm で 5 分遠心した。
- 2) 遠心により生じた細胞のペレットに DMEM/10 % FBS を加え、 2.0×10^5 cells/ml となるように調整し、細胞懸濁液を作成した。
- 3) 2) を 96 穴プレート (FALCON No.3075) に 100 μ l ずつまき、37C、24 時間培養した。
- 4) あらかじめ菌数を測定しておいた菌液を 2.0×10^7 bacteria/ml となるように DMEM/10 % FBS で希釈し、3) に各穴 100 μ l ずつ加え、37C、16 時間培養した。
- 5) 培地を除いて EDTA 溶液で洗い、50 mg/ml gentamycin/DMEM/10 % FBS を 200 μ l 加え、

37 C、1.5 時間培養した。

- 6) 培地を除いて EDTA 溶液で洗い、滅菌水で細胞を低浸透破碎し、細胞内の菌を回収した。
- 7) 回収した菌の 10 倍希釈系列を作成した。
- 8) 7) を 10 % の OADC を含む BCG コロニーアッセイ用寒天培地を加えたペトリディッシュ (FALCON No.3075) に各希釈倍数毎に 100 μ l ずつまき、37C で培養した。
- 9) 5) からさらに 56 時間培養し、6) 7) 8) と同様にした。
- 10) 2 週間後、寒天培地上に現れた *M. bovis* BCG のコロニー数を計測し、菌数を、cfu (colony forming unit) /ml で表した。

C. 研究結果

1. BCG 亜株間の NO 感受性の差異

各 BCG 亜株の NO 感受性について調べるために、酸性条件下 0~1.0 mM NaNO_2 を液体培地に添加し、21 日間培養した。pH 5.5 の培地では BCG12 株共に増殖が認められなかったため (data not shown)、培養条件を検討し、pH 6.0 の培地を用いた。37 C、21 日間培養後、増殖抑制と生存率を評価するため、比色計 (Mini Photo 518R、TAITEC) を用いて O. D. (optical density) を測定した。NO の存在しないコントロール培地では増殖抑制は認められなかった。一方 NO 存在条件下では全ての株で増殖抑制が認められたが、その程度は株間で大きく異なっていた。Brazil、Glaxo、Russia 株は、1.0 mM NaNO_2 含有培地で 10~15 % まで増殖が抑制されたのに対し、Australia、Connaught、Danish、Mexico、Montrial、Pasteur、Phipps、Tokyo 株では増殖率は 40~80 % にとどまり、0.5 mM NaNO_2 と 1.0 mM NaNO_2 処理でほとんど差は見られなかった。

2. BCG 亜株間の生化学的差異

14 種類の BCG 亜株について、硝酸塩還元試験、ナイアシン試験、カタラーゼ試験、耐熱カタラーゼ試験、ウレアーゼ試験を行った。いずれもコントロールとして、*M. tuberculosis*、*M. bovis*、*M. avium* 724S、*M. avium* SmO、*M. smegmatis* を用いた。硝酸塩還元試験では、BCG Phipps 株が陽性であり、コントロール群では *M. tuberculosis*、*M. avium* 724S、*M. smegmatis* が陽性であった。ナイアシン試験では BCG Australia、Sweden 株が陽性であり、コントロール群では *M. tuberculosis* が陽性であった。カタラーゼ試験では、コントロ

ール群の *M. avium* 724S、*M. avium* SmO、が陽性であった。耐熱カタラーゼ試験では、コントロール群の *M. avium* SmO、のみが陽性であった。ウレアーゼ試験では、コントロール群の *M. avium* 724S、*M. avium* SmO を除いて全て陽性であった。

3. BCG 亜株間の細胞内増殖能力の差異

各 BCG 亜株の細胞内での増殖能力を比較するために、ヒト肺胞上皮細胞 A549 に 12 種類の BCG 亜株をそれぞれ感染させ、16 時間後に gentamicin によって細胞外の菌を殺菌してから細胞内の菌を回収した。さらに 56 時間後（感染 3 日後）に同様に細胞内の菌を回収し、16 時間後と 3 日後の細胞内生存菌数をコロニーアッセイ法により測定した。Danish、Glaxo、Phipps、Russia 株は細胞内での生存率が高く、増殖傾向が見られた。一方他の株では減少傾向が見られ、特に Australia、Mexico、Tice 株では減少が著しかった。また Montreal 株は、他の株と比較して細胞内へ取り込まれる割合が高い傾向にあった。

D. 考察

1. BCG 亜株間の NO 感受性の差異

現在世界各国で使用されている BCG には、継代過程での特異的な遺伝子欠損がいくつか見つかっている。それらの遺伝子がどのような機能を持つのかについて詳細には明らかにされていないが、NO 耐性を与える遺伝子である可能性も考えられる。*M. tuberculosis* において、RNI (reactive nitrogen intermediates) 耐性を持つ遺伝子として *noxR1*、*noxR3*、peroxiredoxin gene *Ahpc* (alkyl hydroperoxide reductase subunit C) が既に報告されている。

M. tuberculosis 感染マクロファージは、iNOS を誘導し NO を産生する。NO 産生試薬は、ほとんどの抗結核薬よりも *M. tuberculosis* を殺す効果が高いことが報告されている。マイコバクテリアにおけるこの抗結核効果の程度は、菌種によって様々である (*in vitro*) が、guinea pigs においては NO 耐性株ほど毒性が高いという報告もある。しかし、このような NO の防御効果にもかかわらず、一般にマイコバクテリアは、感染宿主細胞内で増殖することができる。

そこで各 BCG 亜株の NO 感受性について検討した。弱酸性条件下、 NaNO_2 を培地中に添加することにより、活性化マクロファージ内の nitrosative、oxidative 環境を実験的に再現できる

ことが報告されている。また他の報告では、pH 4.5 付近で IFN- γ 活性化マクロファージのファゴソームと同様の環境が得られるとされ、pH 5.5、0.5 mM NaNO_2 は 3×10^5 の活性化マクロファージが 24 時間で産生する量と同じレベルの NO 量であるとの報告もある。さらに、菌を殺すためには NO 用量依存性があるが、その活性は経時的に減衰していくため、mM レベルの量の NaNO_2 添加で実験を行うことが適当だと考えられた。本研究では、酸性 (pH 6.0) 条件下、0、0.5、1.0 mM NaNO_2 を液体培地に添加し、各培地で 21 日間培養した。この結果、NO による増殖抑制率は亜株によって異なっていた。この結果を 1.0 mM NaNO_2 含有培地での増殖抑制率が高いもの (10~15%) と低いもの (40~80%) と大きく 2 つに分類し、それぞれを NO 感受性株、NO 耐性株とした。NO 感受性株である Brazil 株、Russia 株は、遺伝子系統図では共に初期分与株であるが、遺伝的には全くの相同というわけではなく、また同じく NO 感受性である Glaxo 株は、分与時期や遺伝子的には Danish 株と最も近縁であるが、Danish 株は NO 耐性株であった。このように、BCG 亜株の NO 感受性は RD の欠失のみに依存するものではなく、他の何らかの因子が関与しているものと推察された。NO 耐性株を新たな組み換え体 BCG ワクチンの親株として選択することで、より長期間持続するワクチンの開発が期待できることから、NO 感受性の機構はさらに研究を進める必要がある。

2. BCG 亜株間の生化学的性質の差異

前述のように BCG は、世界各国に広まる過程で何らかの変異が起こっている。その変異が、BCG の生化学的な性質にどのような変化をもたらしているのかを検討した。対照には、BCG の親株である *M. bovis* の他、*M. tuberculosis*、*M. avium* 724S、*M. avium* SmO、*M. smegmatis* を用いた。

硝酸塩還元試験は、結核菌 (陽性)、ウシ菌 (陰性)、*M. avium* complex (陰性)、*M. nonchromogenicum* complex (陽性)、*M. fortuitum* グループ (陽性)、*M. chelonae* グループ (陰性) の鑑別に使われている方法である。この試験では、Phipps 株が陽性であった。これは他の亜株では見られず、また親株である *M. bovis* も陰性であったことから、Phipps 株が独自に獲得した形質であることが推察される。

抗酸菌は全てナイアシンを産生するが、*M. tuberculosis*、*M. simiae* などは産生されたナイアシ

ンをナイアシン・リボヌクレオチド (niacin ribonucleotide) に転換することができないため、多量のナイアシンが菌体外に蓄積される。ナイアシン試験は、この培地内に蓄積されたナイアシンを検出するものである。ナイアシン試験ではヒト型結核菌のほとんど全てが陽性になるが、ウシ型やトリ型などの他の抗酸菌ではナイアシンを代謝分解してしまうため、ほぼ全てが陰性となる。この現象を利用したのがナイアシンテストであり、ヒト型結核菌の鑑別によく用いられている。この試験では、Australia、Sweden 株が陽性であった。

カタラーゼ試験では水平小川培地に繁殖した菌苔表面に試薬 (10 % Tween 80 水溶液と 30 % 過酸化水素水を等量混和したもの) を加え、5 分後の泡沫の高さを計測し、45 mm 以上の泡沫産生菌を高カタラーゼ菌、45 mm 以下の泡沫産生菌を低カタラーゼ菌とした。結核菌群は低カタラーゼ菌に属しており、特にイソニアジド (INH) 高度耐性結核菌および *M. bovis*、*M. gastri* はカタラーゼ活性を欠くことが知られている。結核菌の INH 耐性は *KatG* と呼ばれる遺伝子に欠損が入るために起こる。*KatG* のカタラーゼ-ペルオキシダーゼ活性により INH は菌にとって有害な物質にかえられる。よって *KatG* が欠損するとその菌に対して INH は効力を発揮できなくなるのである。この試験では、BCG 亜株は全て低カタラーゼ菌群であった。

耐熱性 (68 C) カタラーゼ試験は高温時のカタラーゼ活性を検出するものである。M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.5 ml 中に数白金耳の小川培地培養菌を分散させ、68 C の湯浴に 20 分間保った。水冷後、試薬 (10 % Tween 80 水溶液と 30 % 過酸化水素水を等量混和したもの) を 0.5 ml 加え、発泡があるものを陽性とした。この試験も、いずれの BCG 亜株も陰性であった。

結核菌はウレアーゼによってアンモニアを産生し、自己の周囲の環境をアルカリ化することができる。これはマクロファージ等に貪食された後、ファゴソーム内の pH が下がることを阻害して、生体の免疫機構から脱出するときに利用されると考えられる。ウレアーゼ試験では、各 BCG 亜株のウレアーゼ活性について調査した。オートクレーブした M/100 リン酸緩衝液 (pH 6.8) 100 ml に尿素 3.0 g、0.1 % フェノールレッド水溶液 1 ml を加え、スクリュウキャップ付き試験管に 2 ml ずつ分注した。これに 1 白金耳の小川培地培養菌を浮遊させ、37_c で 3 日保った。3 日後に試験管の溶液が桃色～赤色を呈したものを

を陽性とした。その結果、全 BCG 亜株および *M. tuberculosis*、*M. bovis*、*M. smegmatis* が陽性であった。これにより、BCG はウレアーゼ活性において親株の形質を受け継いでいることが示唆された。

3. ヒト肺胞上皮細胞株 A549 内での BCG 亜株間の生存能力の差異

BCG による結核予防効果の持続期間は 10～15 年であると言われている。これは、BCG が *M. tuberculosis* ほど生体内増殖力に優れておらず、長期間生体の殺菌機構を回避できないためであると推察できる。しかし先述の結果の通り、BCG の性質は一定でなく、様々な差異があることがわかっているため、BCG は細胞内での増殖能力にも違いがあるのではないかと推察した。

そこで、各 BCG 亜株の細胞内増殖能について検討した。ヒト肺胞上皮細胞株 A549 を 96 穴プレートに 2×10^4 cells/well まき、それに 2×10^6 organisms/well の 12 種の BCG 亜株をそれぞれ感染させた。感染から 16 時間後、上清を除いて EDTA 溶液で細胞を洗い、50 μ g/ml gentamicin 入りの培地に交換し、1.5 時間 37C で放置し、細胞外の BCG を殺菌した。その後培地を除いて滅菌超純水で細胞を破砕し、細胞内の BCG を回収して 10 倍希釈系列を作成し、ペトリディッシュにまき、37_c で放置した。さらに 56 時間後に同様に細胞内の BCG を回収し、同様にペトリディッシュにまいた。2 週間後、現れたコロニーをカウントし、16 時間後と 3 日後の細胞内 BCG 生菌数を比較した。

その結果、Danish、Glaxo、Phipps、Russia 株は、3 日後でも細胞内での増殖が確認された。Australia、Mexico、Tice 株では、3 日後には細胞内生菌数は著しく減少していた。他の株でも、その生菌数の減少が見られた。また、Montreal 株では他の株と比べて多数の菌が細胞内に取り込まれていた。

3 日後に細胞内での増殖が確認された Glaxo、Russia 株は共に *in vitro* の結果では NO 感受性株であり、一方、Australia、Mexico、Tice は耐性にもかかわらず、3 日目には菌数が減少していた。理由は不明であるが、この菌数の減少が NO によるものか NO 合成酵素の阻害剤を用いて現在検討中である。また、同数の BCG を細胞に感染させたにも関わらず、その取り込まれ方の効率は様々であり、これには菌の大きさが関係しているのか、その他の要因が関連しているのか興味深く、検討の余地がある。

E. 結論

本研究により、以下のことが明らかとなった。

① *M. bovis* BCG 亜株には、継代された地域・分与時期によって遺伝的な差異、生化学的な差異がある。② *M. bovis* BCG 亜株を酸性条件下 (pH 6.0)、1.0 mM NaNO₂ 入りの培地で培養したところ、その生存率は 10~80 % と様々であり、BCG 亜株には NO 感受性株と NO 耐性株があることが示唆された。③ *M. bovis* BCG 亜株を A549 細胞に感染させて細胞内生存率を調べたところ、*in vitro* での生化学的な形質と宿主細胞内での生存能との間に強い相関は見られなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 発表論文

Takemasa Takii, Sonomi Hamasaki, Kazue Hirano, Chiyoji Abe, and Kikuo Onozaki
Pyrazinamic acid susceptibility test of *Mycobacterium tuberculosis* by simple fibroblast assay.
Antimicrob. Agents Chemother. 49(2): 804-807, 2005..

Nobumichi Ohoka, Satoshi Yoshii, Takayuki Hattori, Kikuo Onozaki, and Hidetoshi Hayashi
TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death.
EMBO J. 26(4): 1243-1255., 2005

Daichi Katagiri, Hidetoshi Hayashi, Ann Florence B. Victoriano, Takashi Okamoto, and Kikuo Onozaki

Estrogen Stimulates Transcription of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)
Int Immunopharmacol. 6(2): 170-181, 2006.

林秀敏、小野寄菊夫

Interleukin1(IL-1)alpha, beta, IL-1 receptor IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)
日本臨床 63 Suppl 8:60-64, 2005

2. 学会発表

1) 林 大介, 瀧井猛将, 飯塚成志, 岡田全司, 大岡静衣, 野本明男, 吉田栄人, 小野寄菊夫
ポリオウイルスベクターを用いた結核菌抗原発現に関する研究
第 17 回微生物シンポジウム・微生物科学の発展

と感染症対策. 2005 年 9 月 3 日 (東京); 21.

2) 荒川友博, 瀧井猛将, 林 秀敏, 向井 徹, 前田百美, John T. Belisle, Patrick J. Brennan, 小野寄菊夫

結核菌生菌の宿主細胞傷害活性機構の解析
第 17 回微生物シンポジウム・微生物科学の発展と感染症対策. 2005 年 9 月 3 日 (東京); 22.

3) 藤原綾希子, 金井啓太, 瀧井猛将, 千葉 拓, 山本三郎, 矢野郁也, 小野寄菊夫

M.bovis BCG 亜株間の NO 感受性と NO 産生誘導能の差異に関する研究
第 17 回微生物シンポジウム・微生物科学の発展と感染症対策. 2005 年 9 月 3 日 (東京); 23.

4) Takemasa Takii, David R. Sherman, John T. Belisle, Patrick J. Brennan, and Kikuo Onozaki

Role of RD1 region of *Mycobacterium tuberculosis* to confer cytotoxicity to human lung fibroblast cell.
第 3 4 回日本免疫学会総会. 2005 年 12 月 14 日 (横浜); 2-D-W24-7-P.

5) 林 大介, 瀧井猛将, 岡田全司, 小野寄菊夫

ポリオウイルスベクターを用いた BCG 抗原 Hsp65 発現に関する研究
第 3 4 回日本免疫学会総会. 2005 年 12 月 14 日 (横浜); 3-B-W38-21-P.

6) 小野寄菊夫, 林 大介, 伊藤 司, 瀧井猛将, 野本明男

ポリオウイルスベクターを用いた新たな結核菌ワクチンの研究
日本薬学会第 126 年会. 2006 年 3 月 28 日 (仙台); P28[S]am-501.

7) 瀧井猛将, 金井啓太, 藤原綾希子, 千葉 拓, 小野寄菊夫

Mycobacterium bovis BCG 亜株間の一酸化窒素 (NO) 感受性と NO 産生誘導能、宿主細胞内生存能の違いについて
日本薬学会第 126 年会. 2006 年 3 月 28 日 (仙台); P28[S]am-502.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

結核菌の同定、耐性検査へのマイクロアレイの応用に関する研究
－DNAマイクロアレイを用いた結核菌の分子疫学的解析法の構築－

分担研究者 鈴木 定彦 北海道大学教授

研究要旨

DNAデータベースの検索と臨床分離株よりのPCR産物の塩基配列決定により、直列反復配列領域のスペーサー配列と *IS6110* 挿入位置に関するデータを蓄積し、これらのデータを基にしてDNAマイクロアレイを作成した。このDNAマイクロアレイを用いて臨床分離株の型別を試みた結果、従来のスポリゴタイプ法では別けることが不可能であった菌株のうちの一部を型別することが可能となった。しかしながら、検出されるスポットの濃さの不均一性が問題点として見られ、今後の改良の余地を残していた。

A. 研究目的

古典的な結核疫学は、対ヒトとの接触関係や患者の既往歴などの情報を基礎とした解析であったが、その後、ファージ型別、薬剤耐性等の表現型が疫学的解析に用いられるようになった。更に、遺伝子技術の発展に伴い、結核菌ゲノム中に存在する特定の遺伝子配列の変化を知ることにより亜分類が可能となった。現在では、遺伝子を比較解析するための世界標準である制限酵素断片長多型（RFLP）法、直列反復配列（Direct Repeat）領域のスペーサー配列を解析するスポリゴタイピング法、新しい解析方法である Variable Numbers of Tandem Repeats（VNTR）法が主流となっている。結核菌の分子疫学的性状を掌握しておくことにより、感染源・感染ルートや蔓延状況の迅速把握が可能となるが、現在のRFLP法、VNTR法は操作が煩雑であるという短所を有している。一方、スポリゴタイピング法は、操作は簡便であるが、その型別能に難点がある。特に日本を含むアジア地域に数多く見られる北京ファミリーと呼

ばれる一連の結核菌の型別はこの方法では難しい。

操作が簡便で型別能の良い、新たな結核菌の分子疫学的解析法の構築を本研究の目的とした。

B. 研究方法

1. 遺伝子型別のランドマークとなる配列の検索

a) Direct Repeat 領域のスペーサー配列

Direct Repeat 配列をプローブとして、DNAデータベースを検索することにより Direct Repeat を含むDNAデータを抽出し、そこから Direct Repeat 間に存在するスペーサー配列を探索した。得られたスペーサー配列間でのホモロジー検索によりスペーサー配列を分類した。

b) 挿入配列 *IS6110* 挿入位置

挿入配列 *IS6110* をプローブとして、DNAデータベースを検索することにより、挿入配列 *IS6110* の挿入されている位置に関するデータを蓄積した。さらに、表 1 に示すプライマーTB IS6110-IRO を用いて

挿入配列 *IS6110* の周辺をPCR法により増幅させた後、増幅DNA断片の塩基配列を決定し、挿入配列 *IS6110* の挿入されている位置に関するデータを蓄積した。得られたデータ間でのホモロジー検索により挿入位置を分類した。

2. 遺伝子型別のためのDNAマイクロアレイの作成

Direct Repeat 領域に存在するスペーサー配列の探索データを基にしてキャプチャーオリゴヌクレオチドをデザインし、これらを配置したDNAマイクロアレイを作成した。一方、挿入配列 *IS6110* の挿入されている位置に関するデータを基にして挿入配列 *IS6110* 挿入位置を標的としたキャプチャーオリゴヌクレオチドをデザインし、これらを配置したDNAマイクロアレイを作成した。

3. PCRによるプローブの合成

Direct Repeat 上にプライマーDRa およびDRb (表1) を設定し、これを用いてスペーサー配列を増幅させプローブとした。一方、挿入配列 *IS6110* のインバーティッドリピート領域に外向きのプライマーTB *IS6110*-IRO5'B (表1) を設定し、*IS6110* 間の配列を増幅させプローブとした。

表1. 本研究に使用したPCR用プライマー

プライマー名	プライマー配列	修飾
TB <i>IS6110</i> -IRO	GAGTCTCCGGACWYRCCGGGG	
TB <i>IS6110</i> -IRO5'B	GAGTCTCCGGACWYRCCGGGG	5'-biotin
DRa	GGTTTGGGCTGACGAC	5'-biotin
DRb	CCGAGAGGGGACGGAAC	

4. ハイブリダイゼーションと検出

上記3で得られたプローブをDNAマイクロアレイに対してハイブリダイズさせた。ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させた後、TMBメンブ

レンサブストレイトにて検出を行なった。得られた結果はコンピュータに接続したOA用スキャナーにてコンピュータに取り込み解析した。

C. 研究結果

1. SPoligoArray96 の作成

DNAデータベースを検索することにより直列反復配列 (Direct Repeat) 領域に存在するスペーサー配列の探索を行なった結果、97種類のスペーサー配列が見いだされた。これらのうち43種のスペーサー配列は現在用いられているスポリゴタイピング法で用いられているものと同一であったが、残る54種のスペーサー配列は新しいものであった。そこでこれらを配置したDNAマイクロアレイを作成し、SPoligoArray97と命名した。既存のスポリゴタイピング法では43種のスペーサー配列が配置してあるが、SPoligoArray97ではその2倍以上のスペーサー配列が配置してあることになる。

2. SPoligoArray97 を用いた臨床分離結核菌の型別

臨床分離結核菌より直列反復配列領域のDNAの増幅を行ない、SPoligoArray97に対してハイブリダイゼーションを行い、スポットの検出を行った。その結果、図1Aに示す様なスポットが検出された。

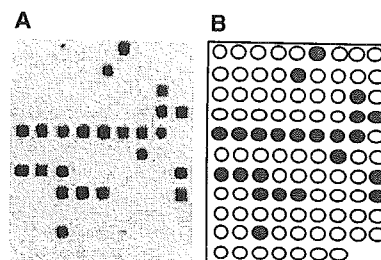


図1. SPoligoArray97による結核菌の型別
A. ハイブリダイゼーションにより得られたデータ。B. ハイブリダイゼーションにより得られたデータの解釈。

これを解釈すると、図 1B となる。また、SPoligoArray97 により、従来のスポリゴタイプ法では型別不可能であった北京ファミリーに属する結核菌株菌株を 4 つの亜型に型別することが可能となった (図 2)。図 2 中の A、B、C、D ともに北京ファミリーと考えられる結核菌株を対象として SPoligoArray97 による型別を実施した結果得られたパターンである。A、B 間では矢印で示した 6 つのスポットに差異が見られた。同様に A、C 間では 2 つ、A、D 間では 7 つ、B、C 間では 4 つ、B、D 間では 2 つ、B、D 間では 5 つのスポットに差異が見られた。それぞれの亜型間には 2 スポット以上の差異が見られ、明確な差であると考えられた。

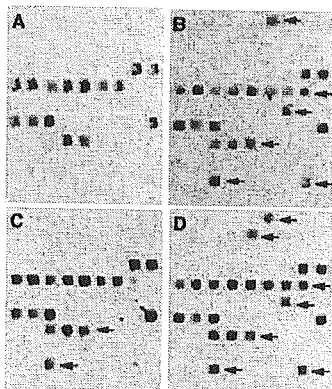


図 2. SPoligoArray97 による北京ファミリーの亜型別

A、B、C、D ともに北京ファミリーと考えられる結核菌株。A と他の異なる点を矢印で示した。

臨床分離結核菌 75 株を対象として SPoligoArray97 を用いた型別を実施したところ、41 種に型別ができた。北京ファミリーに属する結核菌 21 株は A : 2、

B : 3、C : 10、D : 6 株に亜型分類された。

表 2. SPoligoArray97 による結核菌株菌株の型別

検体数	型	北京ファミリー				
		A	B	C	D	計
75	41	2	3	10	6	21

3. ISoligoArray55 の作成

DNA データベースの検索により挿入配列 *IS6110* 挿入位置に関するデータを蓄積した。また、プライマー TB *IS6110*-IRO を用いて挿入配列 *IS6110* 間に存在する配列を増幅させた。増幅産物をアガロースゲル電気泳動にて分析したところクリアなバンドが見られた (図 3)。

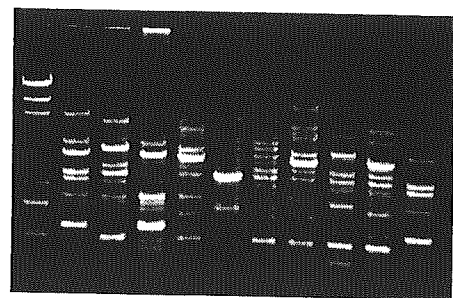


図 3. PCR による *IS6110* 間の DNA 断片の増幅

プライマー TB *IS6110*-IRO を用いて挿入配列 *IS6110* 間に存在する配列を増幅させた。

それぞれの DNA 断片の塩基配列を決定により、挿入配列 *IS6110* の挿入されてい

る位置に関するデータを探索した結果、挿入配列 *IS6110* の挿入位置と出現頻度に関するデータが得られた。そこで、挿入配列 *IS6110* 挿入位置の周辺の配列から一定のパラメーター（アニーリング温度、2次構造）を考慮してデザインしたキャプチャーオリゴヌクレオチドを配置したDNAマイクロアレイを作成し、ISoligoArray55と命名した。

b) ISoligoArray55 を用いた臨床分離結核菌の型別

臨床分離結核菌より挿入配列 *IS6110* の周辺を増幅させることのできるPCR法により増幅されたDNA断片をISoligoArray55 に対してハイブリダイゼーションを行い、スポットの検出を行った。その結果、ISoligoArray55 により結核菌の型別が可能であることが示された。試験した26株の結核菌株は25種の型に分類された。

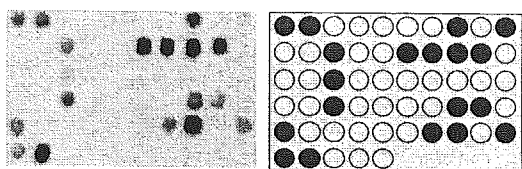


図4. ISoligoArray55 による結核菌の型別

A. ハイブリダイゼーションにより得られたデータ。B. ハイブリダイゼーションにより得られたデータの解釈。

D. 考察

本研究により、Direct Repeat 領域に存在する97種類のスペーサー配列が見いだされた。これらのうち43種のスペーサー配列は現在用いられているスポリゴタイピング法で用いられているものと同じであったが、残る54種のスペーサー配列は新しいものであった。これらの配列を配

置することにより作成したDNAマイクロアレイSPoligoArray97を用いた結核菌の型別試験により得られたデータはSPoligoArray97の性能が十分であることを示すものであった。特に従来のスポリゴタイピングでは型別が難しかった北京ファミリーに属する結核菌株が4種の亜型に方別できると言う事実は、SPoligoArray97が優れていることを示すものであった。

一方、挿入配列 *IS6110* の挿入位置と出現頻度に関するデータからデザインされたオリゴヌクレオチドを配置したDNAマイクロアレイISoligoArray55により結核菌の型別が可能であることが示された。

しかしながら、検出された各スポットの濃度は不均一であり、SPoligoArray97およびISoligoArray55客観的な判定のためには検出されるスポットの濃さを均一化するための改良が必要であると考えられた。

E. 結論

本研究で開発されたSPoligoArray96により、従来のスポリゴタイピング法では型別できなかった北京ファミリーに属する結核菌株が更に4種の亜型に型別できた。また、本研究で新たに開発されたISoligoArray55により、結核菌の型別が可能であることが示された。しかしながら、問題点として検出されるスポットの濃さの不均一性が見られた。本研究で開発されたSPoligoArray96、ISoligoArray55共に今後の改良が必要なものと考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

Suzuki Y. Development and introduction of new diagnostic tool for drug resistant *M.*

tuberculosis. Tenth International Conference
on Emerging Infectious Diseases in the
Pacific Rim, Hanoi, Vietnam

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

新規結核ワクチンの開発と応用：HVJ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチン

分担研究者 岡田全司 NHO近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター長

研究者名 岡田全司¹⁾、喜多洋子¹⁾、金丸典子¹⁾、橋元里実¹⁾、田中高生¹⁾、高井寛子¹⁾、福永有可里¹⁾、古川いづみ¹⁾、中島美穂子¹⁾、和泉谷美和¹⁾、高谷直子¹⁾、西田泰子¹⁾、寺元静江¹⁾、浪江由美¹⁾、綱井良恵¹⁾、井上義一¹⁾、坂谷光則¹⁾、吉田栄人²⁾、金田安史³⁾、中島俊洋⁴⁾、大原直也⁵⁾、松本 真⁶⁾、Babie Tan⁷⁾、Eiuardo de la Cruz⁷⁾、Robert Gelber⁷⁾、David McMurray⁸⁾

所属 ¹⁾国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター ²⁾自治医科大学医動物学 ³⁾大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療 ⁴⁾ジェノメディア研究所 ⁵⁾長崎大学歯学部口腔細菌学 ⁶⁾大塚製薬研究所 ⁷⁾Leonard Wood Memorial研究所 ⁸⁾Texas A&M大学

研究要旨

- (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、の強力なワクチンを開発した。

新しい 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、はサル系の系で延命効果、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。さらにリンパ球増殖反応の増強や、IL-2、IL-6、IFN- γ の産生増強が示された。

(2) カニクイザルの系でHVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンのコントロールとしてHVJ-liposome / GFP DNAをコントロールとした新たな確認実験で、このHSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンで著明な延命効果（100%）が認められた。

(3) マウスの系でこのワクチン効果はHSP65に対するキラーT細胞活性によって発揮されることが示唆された。さらにIFN- γ 及びIL-2産生の著明な相乗効果が認められた。

(4) HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンはモルモットの系でも強力な結核予防ワクチン効果を示すことを明らかにした。IL-2の産生増強や結核病巣改善効果を示した。

(5) 新しい治療ワクチンの開発：このHSP65 DNA + IL-12 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が示唆された。

A. 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ワクチンやリコンビナントBCG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。

B. 研究方法

- (1) IL-12 gene及びヒト結核菌由来H37Rv Hsp (heat shock protein) 65 DNAをHVJ-liposomeベクターに導入した。これらをBALB/Cマ

ウス(H-2^d)に3回免疫した後、ヒト結核菌H37Rv 5×10^5 /mouseをi.v投与した。結核菌に対するキラー活性は⁵¹Cr release法を用いた。J774.1 M ϕ cell line (H-2^d)に結核死菌(H37Ra死菌)貪食させた標準細胞、及びHsp65DNAをP815肥満細胞腫(H-2^d)に導入し、Hsp65発現標的細胞を⁵¹Crラベルとして用いた。

- (2) 結核菌に対する肺結核病理像はホルマリン固定した肺、肝及び脾臓の組織切片をH・E染色し、肺結核病理像を解析した。結核病変インデックスは長径×短径を面積で表示して計算した(Vaccine 2005)
- (3) カニクイザルにこのワクチンを3回生体内投与し、最終免疫4週後にヒト結核菌Erdman株を経気道投与した。ワクチン投与前、中、感染後約3週毎に体重、体温、血沈、胸部X線、ツ反及び生存率を解析し1年以上経過観察した。今回はコントロール群として

HVJ-liposome/GFP DNAを用いた。

C. 研究結果

- (1)①DNA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。
- ② このワクチン効果と脾リンパ球の結核菌に対するキラーT活性が相関した。さらに、Hsp65に対するキラー活性が誘導された。このキラー活性はin vivoで最終抗原刺激より8週後にも約10%認められた。さらに、IFN- γ 及びIL-2産生においてHsp65 DNAワクチンとIL-12 DNAワクチンの相乗効果が認められた。
- ③ このワクチン効果と肺結核病理組織改善効果は相関した。HVJ-liposome/Hsp65+IL-12 DNAワクチンでは有意差(P<0.05)をもって、非ワクチン投与群、コントロールベクター投与群やBCGワクチン投与群と比較して結核病変index(granuloma index)の改善が認められた。肝結核病理組織でもこのワクチンで改善効果が認められた。
- (2) 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。
- (3) 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。
- (4) リコンビナント72fワクチン
r72fBCG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。
- (5) 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

で免疫をし、priming-boosterしたサルは生存率が100%と最も生存率がよいことが示された。

- (6) 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、種々の結核蛋白で免疫し、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 γ 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。
- (7) 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。この菌はin vivoでの増殖力が通常のMDR-TB菌よりも強くsuper spreader 多剤耐性結核菌SS 0308-0783株投与マウスは通常のMDR-TB菌投与マウスより有意差をもって早く死亡した。

(倫理面での配慮)

- (1) 当院は呼吸器疾患 (結核を含む) 準ナショナルセンターとして、国立病院機構政策医療呼吸器ネットワーク54施設を束ねている。したがって、倫理委員会は院外委員5名 (関西学院大学総長、大阪国際大学政経学教授等) 及び各方面の医療従事者 (事務系の人も含む) の院内委員5名により構成し、倫理面には十分な配慮をしている。
- (2) DNAワクチン、新しい化学療法、新しい診断法等、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除やインフォームドコンセントに関する文面も記載されている。
- (3) DNAワクチンの臨床応用は、各国の倫理委員会や組換えDNA安全委員会の承認を得てから施行する。
- (4) 治験届の提出とGCPに基づき実施する。
- (5) 実験動物に対しても動物愛護上の配慮が十分なされている。

D. 考察

- (1)新しいDNAワクチンの開発
①HSP65 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このワクチン効果はキラーT細胞を分化誘

導させ、かつ長期間キラーT活性を持続させることによって発揮されることが示唆された。

- ③肺及び肝結核病理組織改善効果より、HVJ-liposome/Hsp65+IL-12 DNA ワクチンはBCG東京ワクチンよりも、切れ味のよい結核予防ワクチンであることが示された。
- ④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。
- (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。

E. 結論

- (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、の強力なワクチンを開発した。
新しい 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、はサルの系で延命効果、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。さらにリンパ球増殖反応の増強や、IL-2、IL-6、IFN- γ の産生増強が示された。
- (2) カニクイザルの系でHVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンのコントロールとしてHVJ-liposome / GFP DNAをコントロールとした新たな確認実験で、このHSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンで著明な延命効果 (100%) が認められた。

- (3) マウスの系でこのワクチン効果はHSP65に対するキラーT活性によって発抑させることが示唆された。さらにIFN- γ 及びIL-2産生の著明な相乗効果が認められた。
- (4) さらに、HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンはモルモットの系でも強力な結核予防ワクチン効果を示すことを明らかにした。IL-2の産生増強や結核病巣改善効果を示した。
- (5) 新しい治療ワクチンの開発： このHSP65 DNA + IL-12 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が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okada M. : Novel vaccines in Asia against Mycobacterium Tuberculosis and SARS. Drug and Future (in press) 2006
2. Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Kanamaru N, Muraki Y, Hashimoto S, Inoue Y, Sakatani M, Kobayashi E, Kaneda Y, Okada M. : DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against Mycobacterium tuberculosis by T cell activation. Vaccine. 2006,24:1191-204
3. Nakano H, Nagata T, Suda T, Tanaka T, Aoshi T, Uchijima M, Kuwayama S, Kanamaru N, Chida K, Nakamura H, Okada M., Koide Y. : Immunization with dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity specific to an epitope on antigen 85A. Vaccine (in press)
4. Okada M., Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, Peiris M, DeMello D, Chen P.J, Yamamoto Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. : Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. In "Xth International Nidovirus Symposium: Toward Control of SARS and Other Nidovirus Diseases" (Edit.) K. Holmes and S. Perlman, Springer Press (in press)
5. Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, Ohara N, Kaneda Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Inoue Y, Takemoto Y, Naito M, Yamada T, Matsumoto M, McMurray DN, Cruz EC, Tan EV, Abalos RM, Burgos JA, Gelber R, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M, Okada M. : Novel

- recombinant BCG- and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine* 2005; 23: 2132-5.
6. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, Demello D.E., Peiris JSM, Chen P.J., Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. : The Development of vaccines against SARS Corona Virus in Mice and SCID-PBL/hu Mice. *Vaccine* 2005; 23:2269-72.
 7. Okada M and Shirakawa T. : Frontier of Mycobacterium Research – Host Vs Mycobacterium. “the 80th Annual Meeting Symposium” *Kekkaku* 80:613-629, 2005.
 8. Okada M, Tanaka T, Yoshida S, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Kaneda Y, Nakajima T, Ohara N, Takai H, Fukunaga Y, Inoue Y, Matsumoto M, Gelber R, Tan E.V, DelaCruz E.C, Abalos R.M, Young L.J, Burgos J.A, McMurray D, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M.: Novel vaccination (HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA and recombinant 72f BCG) against tuberculosis using cynomolgus monkey. 40th Tuberculosis and Leprosy Research Conference US-JAPAN Cooperative Medical Science Program. 2005; 46-50.
 9. 岡田全司: 結核ワクチンの開発 (抗酸菌感染症医療の進歩). 呼吸 出版中 2006.
 10. 岡田全司: 結核ワクチン. 結核 第4版 (編集 泉孝英, 富岡洋海) 医学書院 2006; (in press) .
 11. 岡田全司: 結核: 自然・獲得免疫と疾患「免疫と疾患」. 最新医学 60:678-696, 2005.
 12. 岡田全司, 田中高生, 喜多洋子, 桑山さち子, 金丸典子, 村木裕美子, 橋元里実, 岡田知佳, 福永有可里, 高井寛子, 坂口弥生, 古川いつみ, 山田恭子, 和泉谷美和: 結核ワクチン. 呼吸器科 7:63-70, 2005.
2. 学会発表
1. Okada M(Symposist) : Novel vaccination (HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12DNA) against tuberculosis. 4th International Symposium for Gene Therapy : Development of Preventive and Therapeutic Gene Treatment against Infectious Diseases and Neuron Diseases. Feb.3, 2006. OSAKA, JAPAN.
 2. Okada M (Invited Speaker) : Japanese/Asian efforts on new TB vaccine development. 10th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. (US-Japan Cooperative Science Program) 16-17 November, 2005. Hanoi, Vietnam.
 3. Okada M(Special Lecture): DNA and recombinant Vaccines: Novel vaccination (HVJ – liposome /HSP65 DNA + IL-12 DNA and recombinant 72f BCG) against tuberculosis and DNA vaccines against SARS corona virus. 13th Annual Congress of the ESGT. (European Society of Gene Therapy). October 29- November 1, 2005. Prague, Czech Republic.
 4. Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Tanaka T, Takai H, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Yoshida S, Nakajima T, Tan E.V, McMurray D, Sakatani M, Okada M(Symposist). : Novel vaccination (Hsp65 DNA+IL-12 DNA vaccine) against Tuberculosis using cynomolgus monkey. The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 5-8 September, 2005. Awaji Island, Japan.
 5. Okada M(Symposist) : Novel vaccination (HVJ-liposome / Hsp65 DNA+ IL-12 DNA and recombinant 72f BCG) against tuberculosis using cynomolgus monkey. 2005 US-Japan tuberculosis 28-30-July 2005. Seattle, USA.
 6. Okada M(Symposist) : Novel vaccination (HVJ-liposome / Hsp65 DNA + IL-12 DNA and recombinant 72f BCG) against tuberculosis using cynomolgus monkey. 2005 US-Japan Immunology and Tuberculosis Joint Meeting 27 July 2005. Seattle, USA.
 7. Okada M(Symposist), Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y,
 8. Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, Peiris M, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. : The development of DNA vaccines and passive immunotherapy against SARS coronavirus using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. Global Vaccinology International Forum (7th) Disease Immunization and Immunotherapy. 2005. Dubai, United Arab Emirates.
 9. 岡田全司: 新しい結核ワクチンの研究(シンポジスト). 第88回日本細菌学会関東支部総会 2005年10月20日 浜松
 10. 岡田全司: 新しい結核ワクチン. (特別講演) 第9回 日本ワクチン学会、2005年10月15日 (大阪)
 11. Okada M, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Tanaka T, Takai H, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Yoshida S, Nakajima T, Kaneda Y, Matsumoto M, Tan E.V, Gelber R, Dela Cruz E.C, Reed S, Ohara N, McMurray D, Sakatani M. : Novel vaccines (HSP65 DNA+ IL-12 DNA Vaccine) Against Tuberculosis using cynomolgus monkey. Keystone Symposia (Pathogen-Host Stand off : Persistent and Latent Infection) Jan 5-10, 2006.
 12. Okada M, Tanaka T, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Muraki Y, Kuwayama S, Izumiya M, Matsumoto M, Sakatani M. : In Vivo Efficacy of Novel Antituberculous Candidate OPC-67683 against Multidrug-Resistant M.tuberculosis (MDR-TB) using SCID Mice and SCID-PBL/hu Mice.

- F-1463, 45th ICAAC 17-21 Dec. 2005, Washington D.C.
13. Okada M, Yoshida S, Tanaka T, Kuwayama S, Kita Y, Kanamaru N, Muraki Y, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M, Inoue Y, Kaneda Y, Sakatani M.: The Development of Strong HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccination against tuberculosis. FASEB Meeting AAI 2005, San Diego.
 14. 岡田全司、田中高生、喜多洋子、井上義一、坂谷光則：結核に対する新しいワクチン(HVJ-liposome Hsp65+IL-12 DNA)の開発とT細胞免疫増強効果. 結核 80 : 270, 2005.
 15. 喜多洋子、田中高生、井上義一、岡田全司、坂谷光則：ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しいDNAワクチン開発 HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン(3). 結核 80 : 269, 2005.
 16. 田中高生、喜多洋子、井上義一、坂谷光則、岡田全司：モルモット吸入感染モデルを用いた新しい抗結核DNAワクチン(HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA)の開発. 結核 80 : 265, 2005.
 17. 岡田全司：生体の抗酸菌症感受性と結核ワクチン研究. 結核 80 : 212, 2005.
 18. 田中高生、喜多洋子、桑山さち子、村木裕美子、金丸典子、橋元里実、高井寛子、岡田知佳、福永有可里、坂口弥生、古川いづみ、山田恭子、和泉谷美和、武本優次、井上義一、坂谷光則、永田年、小出幸夫、岡田全司：新しい抗結核弱毒化リステリアワクチンの開発. 日本呼吸器学会雑誌43巻増刊 Page280(2005)
 19. 岡田全司、田中高生、喜多洋子、桑山さち子、金丸典子、橋元里実、村木裕美子、高井寛子、岡田知佳、福永有可里、坂口弥生、古川いづみ、山田恭子、和泉谷美和、橋本幸子、武本優次、井上義一、金田安史、吉田栄人、坂谷光則：BCGワクチンより100倍以上強力な新しい結核ワクチン(HSP 65 DNA+IL-12DNAワクチン)開発. 日本呼吸器学会雑誌43巻増刊 Page280(2005)
 20. 庄嶋淳子、田中剛、慶長直人、松下育美、土方美奈子、井上義一、鈴木克洋、坂谷光則、岡田全司、木村謙太郎、小林信之、豊田恵美子、工藤宏一郎、永井英明、倉島篤行、加治木章、楠谷典弘、早川哲史、白川太郎、玉利真由美、中田光、岡晃、安藤寛、田宮元、笹月健彦、猪子英俊：呼吸器疾患と遺伝子多型 肺非結核性抗酸菌症感受性領域の全ゲノム高解像度マッピング. 日本呼吸器学会雑誌43巻増刊 Page54(2005)
 21. 桑山さち子、喜多洋子、金丸典子、田中高生、村木裕美子、橋元里実、高井寛子、岡田知佳、福永有可里、坂口弥生、古川いづみ、山田恭子、和泉谷美和、橋本幸子、井上義一、武本優次、坂谷光則、金田安史、吉田栄人、岡田全司：免疫不全と肺感染症 ヒト結核感染に最も近いモデル動物カニクイザルを用いた結核に対する新しいDNAワクチン開発:HSP65 DNA+IL-12DNAワクチン. 日本呼吸器学会雑誌43巻増刊 Page47(2005)
 22. 岡田全司：ワクチンをめぐる話題 結核ワクチンの現状と課題. 日本化学療法学会雑誌 53 37-38, 2005.
 23. 岡田全司：ワクチンをめぐる話題 結核ワクチンの現状と課題. 感染症学雑誌79 39, 2005.
 24. 岡田全司、田中高生、吉田栄人、井上義一、武本優次、大原直也、内藤真理子、山田毅、金田安史、坂谷光則：ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しいワクチン開発と結核免疫誘導 (II). 第35回日本免疫学会総会・学術集会 (2005. 12. 横浜)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

結核菌の主要防御抗原 MPT51 を発現する第三世代レトロウイルスの経気道免疫による肺ホーミング性特異的 T 細胞の誘導に関する研究

分担研究者 小出 幸夫 浜松医科大学教授

研究内容要旨

第三世代レンチウイルス・ベクターに結核菌由来の MPT51 遺伝子を挿入した。これを経気道接種したところ、CD11c 陽性の肺胞マクロファージ、縦隔リンパ節細胞に抗原が発現しており、主に縦隔リンパ節で T 細胞が感作されるものと推察された。縦隔リンパ節には MPT51 特異的 CD8⁺T 細胞がワクチン接種後 3 週をピークとして出現することがテトラマー法で観察された。6 週間には記憶 T 細胞のみを残した。一方、脾臓には MPT51 特異的 CD8T 細胞を観察出来なかった。このワクチンを接種後、2 ヶ月に BCG を経気道的に感染させたところ、5 日後の肺に多数の MPT51 特異的 CD8T 細胞が検出された。この CD8⁺T 細胞は MPT51 特異的キラー活性を示した。以上より、第三世代レンチウイルスによる抗結核ワクチンの経気道接種は肺結核の予防、治療に有効と考えられる。

A. 研究目的

結核に対するワクチンとして用いられている BCG は乳幼児の結核、特に粟粒結核には有効とされているが、成人の肺結核の有効性に関しては疑問視されている。我々は結核の新規防御遺伝子として MPT51 を見出し、その T 細胞エピトープをマウスとヒトにおいて同定した。本研究では、遺伝子導入効率が良く、安全な第三世代レンチウイルスをベクターとして MPT51 を発現するウイルスワクチンを作製

した。これを経気道接種することで、肺指向性抗結核 T 細胞を誘導することを目的とする。

B. 研究方法

1. ワクチンの作製：SIN (self-inactivating) プラスミドに MPT51 遺伝子を導入し、他の 2 つのパッケージング・プラスミドと共に 293T 細胞に遺伝子導入し、培養上清中ウイルスを得た。これを超遠心で 1,000 倍に濃縮し、GFP を指標として力価を測定する。2. ワクチンの接種：BALB/c マウスに 5×10^6 IU の MPT51 レンチウイ

ルスを経気道接種した。3.ワクチン効果の判定：(1)テトラマー法：H2-D^d/エピトープからなるテトラマーを用いて特異的 CD8⁺T 細胞数を定量した。縦隔リンパ節、肺および脾臓のリンパ球を対象として測定した。(2)キラーT細胞活性：免疫マウスのリンパ球を用いて、ペプチドをパルスした P815 細胞を標的細胞として ⁵¹Cr 遊離法で測定した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は浜松医科大学動物実験指針に従って行った。

C. 研究結果

1. 抗原提示細胞の動態：ワクチン経気道接種後の肺胞洗浄液 (BALF) 細胞における GFP を観察したところ、接種後 1 週から発現し、2 週でピークとなった(図 1)。この GFP を発現している細胞は全て CD11c 陽性であり、一部は MHC クラス II(I-A^d)を発現している成熟樹状細胞であった(図 2)。また、この GFP 陽性細胞は縦隔リンパ節に移行することが観察された。

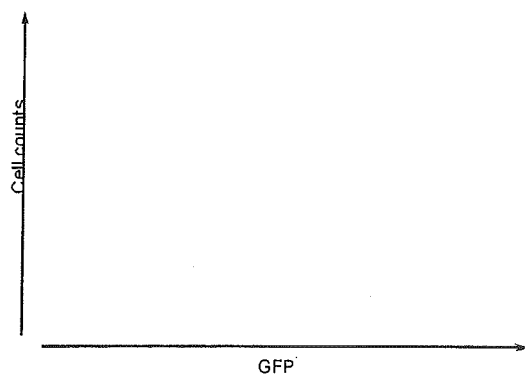


図 1.免疫後の肺胞洗浄液中の GFP 陽性細胞

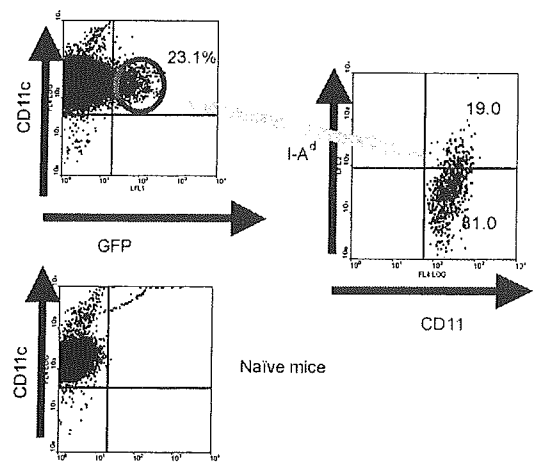


図 2.免疫マウスの肺胞洗浄液中細胞。

免疫 2 週後の肺胞洗浄液中の細胞の GFP,CD11c,MHC クラス II の発現を測定した。

2. MPT51 特異的 T 細胞の誘導：テトラマー法により、特異的 CD8⁺T 細胞を縦隔リンパ節と脾臓で測定した。縦隔リンパ節ではワクチン接種 2 週後から特異的 CD8⁺T 細胞が出現し、3 週後にピークとなり、その後、終息した(図 3)。脾臓では特異的 CD8⁺T 細胞は検出出来なかつた。

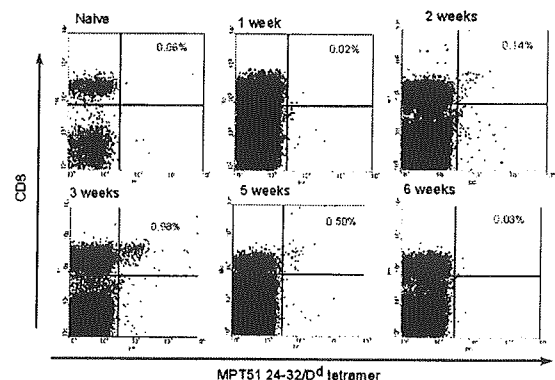


図 3.免疫マウスの縦隔リンパ節における MPT51p24-32 特異的 CD8⁺T 細胞のテトラマー法による経時的検出。