

表1. 製造したプラスミドDNAの品質管理項目

試験項目	指針上の試験項目	試験方法
無菌性	生菌数限度試験	
エンドトキシン	LAL	比色法( $\leq 0.5$ EU/ $\mu$ g DNA)
同定	plasmid size, restriction map	制限酵素切断、Agarose gel 電気泳動
純度	UV absorbance	A260/A280 $\geq 1.8$ , スペクトル、 ピーク
	agarose gel electrophoresis	予期した断片以外は検出されな い
濃度	UV absorbance	(OD260) $\times 1 = 50\mu$ g/mL
力価/遺伝子発現	動物細胞にTFして、 発現を確認。	ELISA
厳格な純度	<i>E. coli</i> protein	ELISA
厳格な同定	full plasmid DNA sequence determination	発現ユニットのみを確認 Promoter~PolyA
外観		目視
液量		重量
小分け	適切な用量を含む	融解が容易に可能

数バッチの製造を行ったプラスミドDNAについて検討を行った結果、現在の製造プロトコールで、いずれの項目についても目的とするレベル以上の品質グレードを確保できる事が明らかとなった。

一方、HVJ-Eベクターの品質管理については、図1、図2に示すプロトコールで工程管理を行いながら製造を行い、プラスミドDNA封入前の原末の段階で品質管理を行っていた。本年度の研究では、従来実施していたベクター原末の試験項目に加

えて、上記のようにDNAワクチン製剤としての力価検定に必要な項目を追加して検討を行った。

製剤化検討については、従来法ではスケールアップが困難であったため、実製造に適した簡便な封入法を開発した。今後、力価検定や有効性評価で同等性を確認する予定である。また、図3に示すように製造技術・製剤技術の開発に加えて、治験薬GMPグレードの製造施設に関しても、施設移転に伴う整備を進めた。

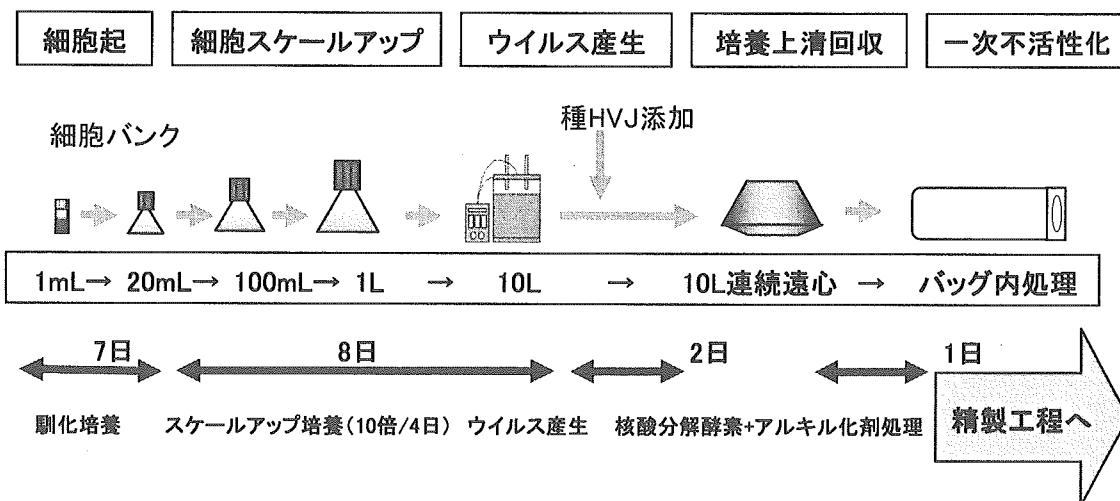


図1. HVJ-Eベクター原料の生産工程  
(バイオリアクターシステムによる製造)

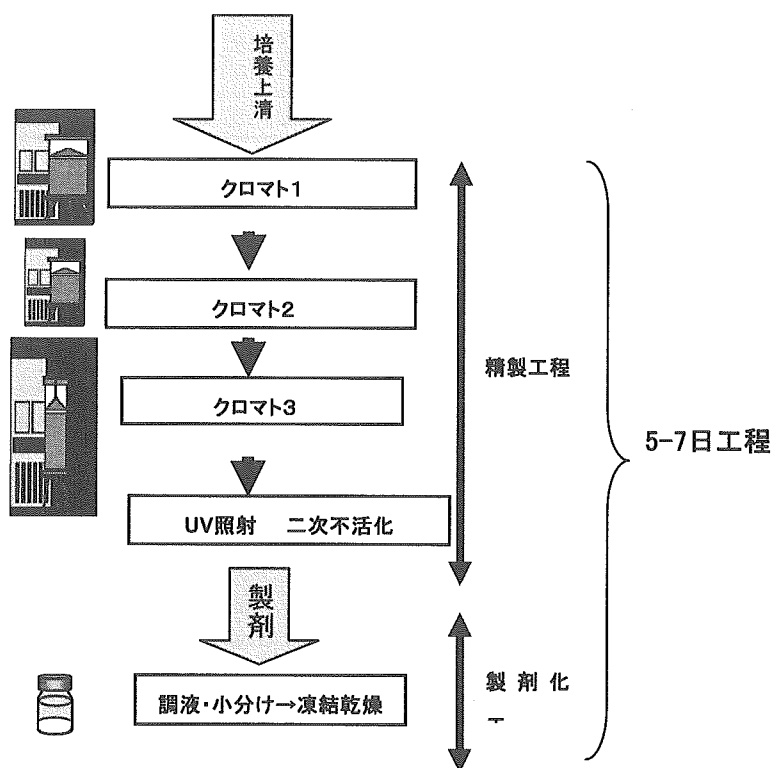
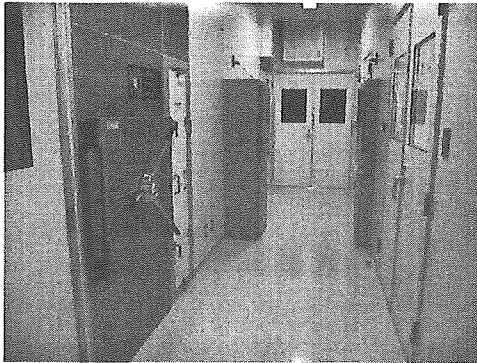
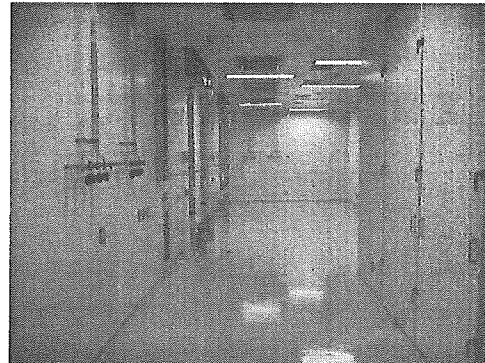


図2. HVJ-Eベクターの精製工程  
(カラムクロマトシステムによる精製)

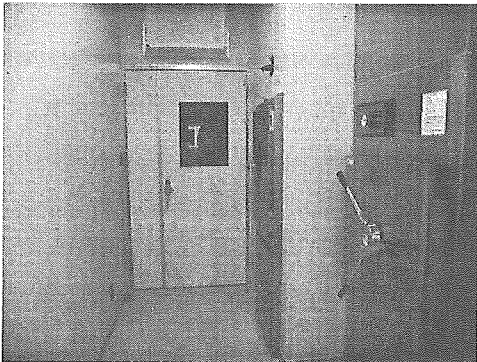
クリーンエリア廊下



HVJ-E製造室(滅菌水、スチーム)



クリーン脱衣室(ダーティーエリア)



HVJ-E製造室(クリーンベンチ)

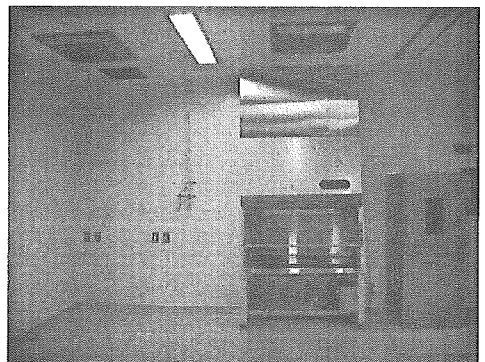


図3. HVJ-E製造用パイロットプラント  
(プラント内の製造ルーム)

#### D. 結論

本年の研究では、開発を行っている結核に対するDNAワクチンの臨床応用を目指して、薬効成分であるプラスミドDNAとアジュバント兼デリバリーシステムであるHVJ-Eベクターの製造・製剤化に関する研究を行なった。その結果、臨床応用に向けた基本的な品質管理項目の設定や、製造技術の開発を行う事が出来た。

今後は、最終製剤化部分についての検討を進めると共に、設定した項目について品質を管理された状況で製造されたDNAワクチン製剤を使用し、有効性・安全性に関するデータを取得して、臨床応用の開始に

必要なデータパッケージを整備する必要がある。

#### E. 健康危険情報

特になし。HVJを不活性化して作成したHVJ-Eベクターは十分に不活性化されており、感染性は検出されていない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表：

1. Development of HVJ envelope vector and its application to gene therapy. Adv Genet. 2005;53:307-332.

2. 学会発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(ア)特許取得：

- ① 特許番号：特願2005-280379、  
提出日：2005年9月27日、  
発明の名称：DNAワクチン組  
成物

(イ)実用新案登録：なし

(ウ)その他

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

組み換えBCGワクチン改良・開発の研究

研究協力者 大原直也 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 助教授

### 研究要旨

これまでに多種のリコンビナントBCG (rBCG) ワクチンが作製された。これらのrBCGを実用化するために薬剤耐性遺伝子をマーカーとして使用しないBCG宿主—ベクター系構築のための研究を行った。チミン要求性を指標とするために、チミン合成経路の酵素thymidylate synthaseの遺伝子破壊株を作製した。BCGにおいてはthymidylate synthaseの遺伝子として、thyAおよびthyXの2つの遺伝子を持つが、従来の報告と異なり、片方を欠損させても致死にはならないことが明らかになった。

#### A. 研究目的

これまでに数百を超える新規結核ワクチンの候補が作製されてきたが、リコンビナントBCG (rBCG) ワクチンは有力な候補として位置づけられる。rBCGは感染防御に有効な抗原の遺伝子をBCGに導入したものであるが、これまでのrBCGのほとんどは、導入された遺伝子の保持について、同時に導入した薬剤耐性マーカーを指標としている。rBCGの実用化を考えた場合に薬剤耐性に関わる遺伝子を除くことが望ましい。そのため、薬剤耐性遺伝子をマーカーとして使用しないBCG宿主—ベクター系の構築を考えた。本研究ではチミン要求性を指標としたBCG宿主—ベクター系を作製するための研究をおこなった。

#### B. 研究方法

BCGのチミジン合成に関与する酵素thymidylate synthaseの遺伝子thyAおよびthyXの遺伝子をそれぞれの遺伝子上流および下流の領域を含めてクローニング

した。これらのDNA断片からthyAおよびthyXの読み枠(ORF)を除き、隣接してカナマイシン耐性遺伝子(aphII)およびスクロース感受性遺伝子(sacB)を挿入した自殺プラスミドを作製した。このプラスミドをBCGに導入し、カナマイシン耐性を指標として、相同組み換えによりゲノム上のthyA隣接領域にプラスミドDNA(thyA(thyX)、sacB、aphII)が挿入された株を得た。得られた株をチミンおよびdTMP含有、スクロース含有、カナマイシン不含有培地で継代することにより、再度相同組み換えを起こし、変異型thyAあるいはthyXのみを有する株、すなわちthyA欠損株およびthyX欠損株を得た。

#### C. 研究結果

研究方法に述べた手順によりthyA欠損株およびthyX欠損株を得た。それぞれの株についてその性状を調べたところ、完全合成培地であり、チミンおよびチミジンを含まないSauton培地上においても発育した

ことから、両遺伝子それぞれの単独欠損株においては栄養要求性において野生株と同じであることが示された。なお、発育速度についても野生株との間で顕著な差は認められなかった。

#### D. 考察

多くの真性細菌ではthymidylate synthaseの遺伝子として、thyAあるいはthyXのいずれかを持つことが知られている。そしてthyAを持つ大腸菌等においてはthyAを欠損させることでチミン要求株になる。結核菌ではこれまでの報告でthyXは必須の遺伝子であり、欠損すると致死になることが示唆されていた。しかし、本実験の結果、thyXを欠損させても栄養要求株にならない、すなわち致死にならないことが明らかになった。またthyAに関しても栄養要求株にならないことが示された。すなわちチミン要求性を指標とした宿主-ベクター系を完成させるためには両遺伝子欠損株を作製する必要性が示された。そのため、現在両遺伝子の2重欠損株の作製をおこなっているところである。

#### E. 結論

チミン要求性を指標としたBCG宿主-ベクター系構築のための研究を行った。BCGではthyAあるいはthyXの遺伝子単独欠損株では栄養要求性にならないことが示された。そのためチミン要求性株作製には両遺伝子の2重欠損株の作製が必要であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

一般の組み換えDNA実験に準ずる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takahashi H, Sasaki K, Takahashi

M, Shigenori N, Honda S, Arimitsu H, Ochi S, Ohara N, Tsuji T. (2006) Mutant Escherichia coli enterotoxin as a mucosal adjuvant causes specific CD4+ and CD8+ T cells to produce IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  in response to nasal killed-bacillus Catmette-Guerin vaccine in mice. Vaccine in press.

2. Matsuo K, Hotokezaka H, Ohara N, Yoshimura A, Fujimura Y, Okada Y, Hara Y, Yoshida N, Nakayama, K. (2006) A phospholipase C inhibitor suppresses amphotericin B-induced production of proinflammatory cytokines. Microbiol. Immunol. in press.

3. Fujimura Y, Hotokezaka H, Ohara N, Naito M, Sakai E, Yoshimura M, Narita Y, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K. (2006) Hemoglobin receptor protein (HbR) of Porphyromonas gingivalis inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis from bone marrow macrophages. Infect. Immun. in press.

4. Ohara N, Kikuchi Y, Shoji M, Naito M, Nakayama K. Superoxide : dismutase-encoding gene of the obligate anaerobe Porphyromonas gingivalis is regulated by the redox-sensing transcription activator OxyR. (2006) Microbiology in press.

5. Kamijo K, Ohara N, Abe M, Uchiyama A, Hosoya H, Lee J-S,

- Miki T. (2006) Dissecting the role of Rho-mediated signaling in contractile ring formation. *Mol. Biol. Cell.* 17: 43-55
6. Naito M, Sakai E, Shi Y, Ideguchi H, Shoji M, Ohara N, Yamamoto K, Nakayama K. Porphyromonas gingivalis-induced platelet aggregation in plasma depends on Hgp44 adhesin but not Rgp proteinase. *Mol. Microbiol.* 59: 152-167.
  7. 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. (2005) : Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine.* 23:2132-2135.
  8. Sato K, Sakai E, Veith PD, Shoji M, Kikuchi Y, Yukitake H, Ohara N, Naito M, Okamoto K, Reynolds EC, Nakayama K. (2005) Identification of a new membrane-associated protein which influences transport/maturation of gingipains and adhesions of Porphyromonas gingivalis. *J. Biol. Chem.* 280: 8668-8677.
  9. Kikuchi Y, Ohara N, Sato K, Yoshimura M, Yukitake H, Sakai E, Shoji M, Naito M, Nakayama K. (2005) The novel stationary-phase-upregulated protein of Porphyromonas gingivalis influences the production of superoxide dismutase, thiol peroxidase and thioredoxin. *Microbiology.* 151: 841-853.
  10. 大原直也 (2005) BCGを用いた抗酸菌の抗原性および病原性に関する研究. *日本細菌学雑誌* 60:349-356.
2. 学会発表
    1. Kamijo K, Ohara N, Abe M, Uchimura T, Hosoya H, Lee J, Miki T. (2005) Dissecting the Role of Rho-mediated Signaling in Contractile Ring Formation. 45th Annual Meeting, The American Society for Cell Biology (San Francisco, U.S.A.)
    2. Yoshimura M, Ohara N, Shoji M, Nakayama K. (2005) Effect of Porphyromonas gingivalis infection on monocyte-to-macrophage differentiation. The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity: (Awaji island), Abstract p79.
    3. Ohara N, Yoshimura M, Saito K, Hotokezaka H, Nakayama K. (2005) Bacterial infection inhibits osteoclastogenesis in vitro. 11th International Congress of Bacteriology and Applied

- Microbiology Division, Joint Meeting of the 3 Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2005 (San Francisco, U.S.A.), Abstracts p6.
4. Ohara N, Ohara N, Yoshimura M, Ganno T, Yamada S, Nakayama K, Hayashi Y. (2005) Effects of water-soluble chitosan on invasion of *Porphyromonas gingivalis*. 11th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division, Joint Meeting of the 3 Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2005 (San Francisco, U.S.A.), Abstracts p6.
  5. 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 VE, Dela Cruz EC, Abalos RM, Young LJ, Burgos JA, McMurray, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M. (2005) Novel vaccination (HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA and recombinant 72f BCG) against tuberculosis using cynomolgus monkey. Fortieth Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (Seattle) Program & Abstracts p.46-50.
  6. Ohyama H, Ogata K, Takeuchi K, Uemura Y, Oyama M, Ohara N, Namisato M, Kogoe N, Yamada N, Terada N, Matsushita S. (2005) Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor b2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. Fortieth Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (Seattle) Program & Abstracts p.100-104.
  7. Ohara N, Yoshimura M, Shoji M, Nakayama K. (2005) Effect of BCG infection on in vitro osteoclastogenesis. Fortieth Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (Seattle) Program & Abstracts p.230.
  8. 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（2）、第35回日本免疫学会総会・学術集会、横浜、12月 {第35回日本免疫学会総会・学術集会記録35、174、2005}
  9. 大原直也：組み換え BCG ワクチンの作製とその応用。シンポジウム「ホストパラサイトインターフェイス研究—基礎から応用へ—」。第47回歯科基礎医学会学術大会、仙台、{Journal of Oral Biosciences, 47 Suppl, 73,



- 2005}
10. 大原直也, 吉村満美子, 庄子幹郎, 中山浩次: P. gingivalis および BCG 感染の破骨細胞分化への影響, 第 47 回歯科基礎医学会学術大会, 仙台, 9 {Journal of Oral Biosciences, 47 Suppl, 142, 2005}
  11. 吉村満美子, 大原直也, 庄子幹郎, 中山浩次: Porphyromonas gingivalis 感染による単球/マクロファージの分化の成熟への影響, 第 47 回歯科基礎医学会学術大会, 仙台, 9 月 {Journal of Oral Biosciences, 47 Suppl, 143, 2005}
  12. 中山浩次, 藤村裕治, 吉村満美子, 大原直也, 吉村満美子, 佛坂齊祉, 吉田教明: Porphyromonas gingivalis 感染による末梢血単球の分化への影響, 第 47 回歯科基礎医学会学術大会, 仙台, 9 月 {Journal of Oral Biosciences, 47 Suppl, 167, 2005}
  13. 内藤真理子, 庄子幹郎, 大原直也, 中山浩次: Porphyromonas gingivalis の血小板凝集活性における血清成分、抗体の役割, 第 78 回日本細菌学会総会, 東京, 4 月 {日本細菌学雑誌, 60, 80, 2005}
  14. 菊池有一郎, 大原直也, 佐藤啓子, 吉村満美子, 雪竹英治, 坂井詠子, 庄子幹郎, 内藤真理子, 中山浩次: Porphyromonas gingivalis の新規低分子蛋白 (UstA) と酸化ストレス応答蛋白との関係について, 第 78 回日本細菌学会総会, 東京, 4 月 {日本細菌学雑誌, 60, 137, 2005}
  15. 大原直也, 吉村満美子, 齋藤幹, 佛坂齊祉, 中山浩次: 骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系における BCG および P. gingivalis 感染の効果, 第 78 回日本細菌学会総会, 東京, 4 月 {日本細菌学雑誌, 60, 160, 2005}
  16. 大原直也, 吉村満美子, 中山浩次: Porphyromonas gingivalis のヒト単球/マクロファージの分化への影響, 第 78 回日本細菌学会総会, 東京, 4 {日本細菌学雑誌, 60, 161, 2005}
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

国立病院・療養所の呼吸器ネットワークを用いた、多剤耐性結核患者のリンパ球、血清における新しい結核ワクチン抗原・結核診断抗原に対するT細胞免疫応答の解析  
および多剤耐性結核自己活性化T細胞輸注療法の検討

研究協力者 倉島篤行 独立行政法人国立病院機構東京病院 臨床研究部長

### 研究要旨

国立病院・療養所の呼吸器ネットワークを用い多剤耐性結核患者のリンパ球、血清における新しい結核ワクチン抗原・結核診断抗原に対するT細胞免疫応答の解析を行い、多剤耐性結核の診断、治療、予防において新しい方法の検討を行なった。

また、多剤耐性結核における結核菌抗原に対するT細胞の免疫応答の測定を行った。

### A. 研究目的

今日、多剤耐性結核は21世紀の健康に対する脅威の最大の一つとなる可能性が指摘されている。多剤耐性結核の治療成績は極めて悪く、現在の如何なる治療にもかかわらず、少なくとも約4割以上の患者が治療できない現状にある。多剤耐性結核の新たな治療の試みの一つとして、IFN- $\gamma$  吸入療法が行われているが、菌陰性化の達成は困難である。我々は以下の研究を通し、多剤耐性結核の新たな治療法の解明をめざす予定である。岡田などによりBCGよりも強力な新しい結核ワクチンの開発がマウスで進展した。また、新たに合成した72f fusion蛋白ワクチンはカニクイザルのレベルでBCGよりも強力な抗結核予防効果を示した世界の最先端ワクチンの一つである。これらの研究から生まれた種々の免疫マーカーで多剤耐性結核の病態解析を行い診断、治療に資する。

活性化自己T細胞輸注法は、自己血中のT細胞を固相化抗CD3 抗体とインターロイ

キン2(IL-2)の存在下で培養し、約1000倍程度に増殖させた後、体内に戻すもので、現在までに、700症例以上の患者に対し投与が行われ、ホジキン病、肝細胞癌、卵巣腫瘍など様々な腫瘍で縮小効果を認めるとともに、特に治療がきわめて困難な慢性活動性エプスタインバルウイルス(EBV)感染症、免疫不全症に合併した化学療法抵抗性のサイトメガロウイルス(CMV)感染症、カリニ肺炎などに効果が認められた。

LAK療法と異なりNK細胞は増殖しないので副作用は少なく、強い反応が起きた場合もステロイド剤などでコントロールすることが可能であり、その安全性は東京医科歯科大学においても再確認された。このようにT細胞機能不全がある症例でT細胞を生体外で活性化、増殖させ、生体内に戻すことによりT細胞機能を高めることが可能であることが明らかになってきている。

結核感染症に対する生体側の防御機構はT細胞を中心とする細胞性免疫がになっ

ている。多剤耐性結核患者では細胞性免疫機能の低下が指摘されており、治療のない多剤耐性結核患者に活性化自己T細胞輸注法の効果が期待出来る。

## B. 研究計画

呼吸器ネット8基幹呼吸器施設及び結核患者数が多い国立療養所・病院から多剤耐性結核で

- (1) 血液 10ml (ヘパリン採血) を収集。
- (2) 多剤耐性結核患者のリンパ球のキラーT細胞活性  
新しい結核ワクチン抗原
  - HSP65
  - Antigen 85B、85A、MPB51
  - fusion蛋白 72f

その他種々の結核ワクチン抗原に対するキラーT細胞活性誘導、増殖反応、キラーT細胞分化因子(サイトカイン)を解析する。(国立療養所近畿中央病院の岡田に送り、そこでAssay)

- (3) 結核感染により特異性の高い、従来のツベルクリン反応に代わる新しい診断法(DPPD)やESAT-6ペプチドの開発をヒトのin vitro系で行う。
- (4) これらリンパ球を我々らが開発したSCID-PBL/huの系で解析する。
- (5) 患者の病態、排菌、薬剤感受性等の情報をファイルし、臨床情報と併せて解析する。

菌陽性(塗抹、培養問わず)が持続する多剤耐性結核で、過去6ヶ月に治療薬剤の変更がない患者を対象に、多剤耐性結核患者を対象に、活性化T細胞輸注療法の有効性について調べるとともに安全性も確認す

る。平成14年春に東京病院、東京医科歯科大学。国際医療センターからなるプロジェクトチームが結成され、免疫不全症に対する活性化T細胞輸注療法を参考にしつつ、多剤耐性結核患者に対する活性化T細胞輸注療法プロトコルを平成14年10月に東京病院倫理委員会に申請・承認を得た。その概要は、以下のとおりである。

1. フェーズ: 院内臨床試験〔単施設〕
2. 目的: 多剤耐性結核患者を対象に、活性化T細胞輸注療法の安全性と有効性について調べる。
3. 対象: 過去3ヶ月持続排菌している多剤耐性結核患者で、過去6ヶ月間治療レジメンの変更がない者。
4. 用法、用量  
試験投与: 本治療の前に1/10量の活性化T細胞を点滴静注し、有害事象の発現を調べる。  
副作用がなければ、本投与を開始する。

本投与:

プロトコル1: 10<sup>9</sup>個の自己活性化Tリンパ球を2週間おきに計6回輸注。  
プロトコル2: 10<sup>9</sup>個の自己活性化Tリンパ球を4日おきに計3回輸注。2週間あけて同様の輸注を行う。

## 5. プライマリ・エンドポイントおよび観察項目

リンパ球輸注開始後3ヵ月間、培養検査で喀痰中の菌陰性状態が持続するものを有効とする。

治療後の有害事象の観察、およびCRP、血沈、ツベルクリン反応、末梢血 early secreted antigenic target 6 kda protein (ESAT-6)刺激下インターフェロン $\gamma$ 産生能(Quanti FERON -TB test)の変化をみる。

### C. 研究成果

4例の多剤耐性結核患者をプロトコール1に従った活性化自己T細胞輸注療法にて治療した。

4例ともに輸注中。輸注後に特記すべき有害事象は見られなかった。

排菌量の変化であるが、症例1では治療前に喀痰培養持続陽性であったのが、治療後3ヶ月間、喀痰培養陰性となり、その後再度培養陽性となった。

症例2では、喀痰塗抹培養陽性であったが、治療後喀痰塗抹・培養ともに陰性が治療後5ヵ月間持続し、その後培養陽性となった。

症例3に関しては、全く効果なく、排菌量に変化がなかった。

症例2については、プロトコール2による再治療を行った。治療後2ヶ月間培養陰性となったが、再度陽性となっている。

症例4では、喀痰塗抹、培養陽性であったが、治療後一時塗抹、培養陰性化したのが、培養陽性が出現、その後塗抹、培養陽性となった。

活動性肺結核57例の初回平均刺激下IFN- $\gamma$ 値は1.8857に対し、多剤耐性結核36例における初回平均刺激下IFN- $\gamma$ 値は1.4074とやや低値であった。

自己活性化T細胞輸注多剤耐性結核4例においては経過中ESAT-6刺激インターフェロン $\gamma$ 産生能の増強が見られた。

### D. 考察

活性化自己T細胞輸注療法は、多剤耐性結核例において輸注期間中の培養での菌陰性を達成した。今日まで試みられた新しい免疫治療法としては国際的にIFN- $\gamma$ 吸入療法があるが、多剤耐性結核において喀痰塗抹の陰性化は得られてきたが、培養結果の陰性化は得られていない。その点で本法はより有効性が高いと言える。

経過の分析では、空洞病変が無い症例においては、概ねリンパ球輸注により特異抗原刺激下IFN- $\gamma$ 値が増強され、その時点で、塗抹、培養とも陰性転化が観察された。

しかしその効果持続は一過性であり、今後効果の持続に関しての方法の探索が必要と考えられた。

### E. 結果

治療法の無い多剤耐性結核に活性化自己T細胞輸注療法は一定の可能性が認められた。

### F. 健康危険情報

これらの検討において重篤な副作用は認めなかった。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Takakura S, Tsuchiya S, Isawa Y, Yasukawa K, Hayashi T, Tomita M, Suzuki K, Hasegawa T, Tagami T, Kurashima A, Ichiyama S.: Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory samples by transcription-reverse transcription concerted reaction with an automated system. J Clin Microbiol 43: 5435-39, 2005.

2. 田村厚久, 蛇沢晶, 相良勇三, 鈴木純子, 益田公彦, 永井英明, 赤川志のぶ, 長山直弘, 川辺芳子, 町田和子, 倉島篤行, 小松彦太郎, 四元秀毅: 肺癌と活動性肺抗酸菌症の混在する病態の検討. 結核 80: 413-419, 2005.

3. 倉島篤行: 非結核性抗酸菌症の診断と治療. JIM 15: 398-402. 2005.

4. 倉島篤行: 気密空間における感染性疾患. 日本胸部臨床 64: 325-332, 2005.

5. 倉島篤行: 非結核性抗酸菌症の発生と進展に関する臨床学的研究. 結核 79: 737-741, 2004.

6. 中田 光, 濱野栄美, 川辺芳子, 益田公彦, 永井英明, 有賀晴之, 倉島篤行, 森尾友宏, 清水則夫: 多剤耐性結核患者に対する活性化T細胞輸注療法の試み. 結核 79:57-60, 2004

## 2. 学会発表

1. 永井英明(国立病院機構東京病院 呼吸器科), 有賀晴之, 川辺芳子, 川島正裕, 鈴木純子, 益田公彦, 田村厚久, 長山直弘, 赤川志のぶ, 町田和子, 倉島篤行, 四元秀毅, 森亨: AIDS合併結核におけるQuanti FERON-TB 第2世代の有用性についての検討. 結核病学会 2005.03

2. 有賀晴之, 川辺芳子, 永井英明, 松井芳憲, 田代尚樹, 鈴木純子, 平間未知大, 大島信治, 益田公彦, 田村厚久, 長山直弘, 赤川志のぶ, 町田和子, 倉島篤行, 四元秀毅, 森亨: 活動性結核治療経過中におけるQuantiFERON-TB2 G testの検討.

## H. 知的財産の出願・登録状況

未定

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

感染免疫強化性BCG共生成分の網羅的解析とアジュバントの開発

研究協力者 矢野郁也 日本BCG中央研究所

研究要旨

代表的なmycobacteria（病原性・非病原性）11種からTMM及びTDMを単離し、各々の構造をMALDI/TOF Mass分析したところ、TMMでは1300~1700、TDMでは2600~3500daltonの質量領域に特徴的なマスイオンが検出され、ミコール酸のサブクラス及び炭素数、二重結合数のことなる多数の成分が同定された。TDMやTMMは、結核感染に際してvirulence factorとして病原性に寄与する一方、NKやNKT細胞を活性化してTh-1型免疫反応を増強する強力なアジュバントとなる

（平成17年度）

A. 研究目的

結核はヒト感染症の中で最も重要な伝染病で、アジアを初め世界に広く分布し絶滅への途は遠い。結核ワクチンとしてBCGは永年にわたり大きく貢献してきたが、その効果や安全性を改善するために次世代ワクチンが考案されている。結核感染免疫が解明されるにつれて、最近では自己免疫の役割が特異免疫と並んで重要視され、副作用の少ない強力アジュバントの開発が望まれている。我々は、BCG菌培養液抗原と細胞壁画分（CW）を組み合わせることにより、モルモットモデルにおける結核感染防御機能を高めることをみだし抗原とアジュバント成分の解析を行ってきたが、本年は毒性の低い免疫強化物質を解明するため、種々のmycobacteriaから単離したトレハロースミコール酸エステル（TDMおよびTMM）の構造を網羅的に解析した。

B. 研究計画

BCG東京172株を始め各種抗酸菌菌体より常法に従い溶媒抽出及びTLC分画によりTMM及びTDMを単離し、単一化確認後、MALDI/TOF・MASS分析を行った。（文献1、2）

C. 研究成果、考察

代表的なmycobacteria（病原性・非病原性）11種からTMM及びTDMを単離し、各々の構造をMALDI/TOF Mass分析したところ、TMMでは1300~1700、TDMでは2600~3500daltonの質量領域に特徴的なマスイオンが検出され、ミコール酸のサブクラス及び炭素数、二重結合数のことなる多数の成分が同定された。TDMやTMMは、結核感染に際してvirulence factorとして病原性に寄与する一方、NKやNKT細胞を活性化してTh-1型免疫反応を増強する強力なアジュバントとなることから、今後は低毒性TDM(TMM)をスクリーニングする

ことにより、サブユニットワクチンの構築に供する他、innate immunity の刺激物質として抗アトピー、抗腫瘍免疫活性物質として探索し、実用化への検討を行いたい。

G. 研究報告（別紙・関連英文論文のみ）

1. 論文発表

1. Enomoto Y, Sugita M, Matsunaga I, Naka T, Sato A, Kawashima T, Shimizu K, Takahashi H, Norose Y, Yano I: Temperature-dependent biosynthesis of glucose monomycolate and its recognition by CD1-restricted T cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Nov 18;337(2):452-6, Epub 2005 Sep 21.
2. Fujita Y, Naka T, McNeil MR, Yano I: Intact molecular characterization of cord factor (trehalose 6, 6'-dimycolate) from nine species of mycobacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Microbiology*. 2005 Oct;151(Pt 10):3403-16.
3. Maekura R, Okuda Y, Hirotsu A, Kitada S, Hiraga T, Yoshimura K, Yano I, Kobayashi K, Ito M.: Clinical and prognostic importance of serotyping *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex isolates in human immunodeficiency virus-negative patients. *J Clin Microbiol*, 2005 Jul; 43(7):3150-8
4. Fujita Y, Doi T, Sato K, Yano I: Diverse humoral immune responses and changes in IgG antibody levels against mycobacterial lipid antigens in active tuberculosis. *Microbiology*, 2005 Jun;151(Pt 6):2065-74
5. Fujita Y, Naka T, Doi T, Yano I: Direct molecular mass determination of trehalose monomycolate from 11 species of mycobacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Microbiology*, 2005 May;151(pt 5):1443-52
6. Seki M, Sato A, Honda I, Yamazaki T, Yano I, Koyama A, Toida I.: Modified multiplex PCR for identification of *Bacillus Calmette-Guérin* substrain Tokyo among clinical isolates. *Vaccine*. 2005 May 2;23(24):3099-102
7. Ikeda N, Honda I, Yano I, Koyama A, Toida I.: *Bacillus calmette-guérin* Tokyo172 substrain for superficial bladder cancer characterization and antitumor effect. *J Urol*. 2005 May;173(5):1507-12
8. Kano H, Doi T, Fujita Y, Takimoto H, Yano I, Kumazawa Y, : Serotype-specific modulation of human monocyte functions by glycopeptidolipid (GPL) isolated from *Mycobacterium avium* complex. *Biol Pharm Bull*, 2005 Feb;28(2):335-9

9. Kitada S, Maekura R, Toyoshima N,  
Naka T, Fujiwara N,  
Kobayashi M, Yano I, Ito M,  
Kobayashi K.:  
Use of glycopeptidolipid core  
antigen for serodiagnosis of  
mycobacterium avium complex  
pulmonary disease in  
immunocompetent patients.  
Clin Diagn Lab Immunol. 2005 Jan;  
12(1):44-51.

(平成18年度)

#### 研究目的

平成18年度は、BCG細胞壁構成成分の1つであるlipoarabinomannan及びlipomannanを中心に分子構造の解析及びTh-1免疫反応の増強効果を調べ、ワクチンアジェバントとしての有用性を明らかにする。

#### 研究計画

BCG菌フレンチプレス破碎菌より細胞壁画分を分画し、表面活性剤抽出分配法により両親媒性リポグリカンを抽出し、ゲル透過液体クロマトグラフィーによりBCG LAM及びLM画分を精製する。単離した標品は、糖及び脂質部分の同定を行い質量分析及びNMR分析により構造を決定する。

国内外の研究状況とこの研究の独創的な点

LAMやLMは、抗酸性細胞壁成分として極めて特徴的な構造を有し、免疫学的に興味ある成分であるが、水及び有機溶媒のいずれにも溶けにくく取り扱いが困難なため、免疫学的性質の解明が遅れていた。最近、この分野の研究成果が発達し、そのワクチンや抗アトピー剤、抗腫瘍剤としての利用が期待されている。



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

第三世代レンチ・ウイルスベクター及び接種法による多剤耐性結核に  
対するワクチン開発

研究協力者 小出幸夫 浜松医科大学 教授

### 研究要旨

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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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 $5 \times 10^6$  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<sup>d</sup>/エピトープ からなるテトラマーを用いて特異的CD8<sup>+</sup>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<sup>51</sup>Cr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。この GFP を発現している細胞は全て CD1c 陽性であり、一部は MHC クラス II(I-A<sup>d</sup>) を発現している成熟樹状細胞であった (図1)。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。

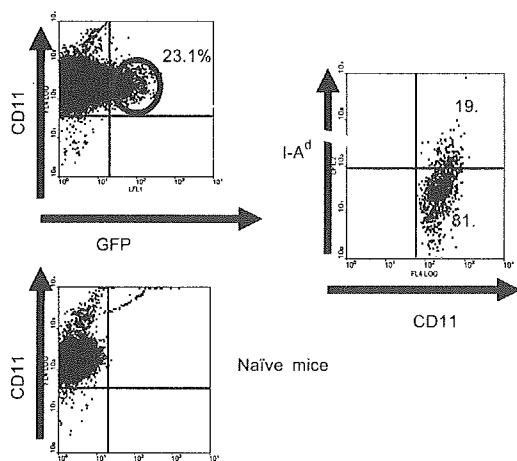


図1.免疫マウスの肺胞洗浄液中細胞。免疫2週後の肺胞洗浄液中の細胞のGFP, CD11c, MHCクラスIIの発現を測定した。

2. MPT51 特異的 T 細胞の誘導：テトラマー法により、特異的 CD8<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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2)。脾臓では特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞は検出出来なかった。

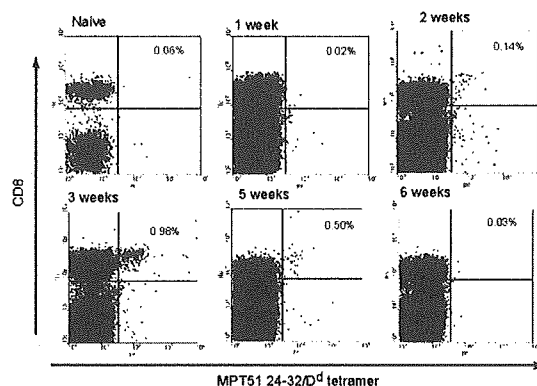


図2.免疫マウスの縦隔リンパ節におけるMPT51p24-32特異的CD8<sup>+</sup>T細胞のテトラマー法による経時的検出。

3. IFN- $\gamma$  産生：MPT51 ペプチド刺激による IFN- $\gamma$  産生で、特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の存在を検討したところ、縦隔リンパ節で大量に、脾臓でも少量産生がみられた。脾臓にも若干特異的 T 細胞が存在すると考えられた。

4. 再刺激による T 細胞の誘導：ワクチン接種2ヶ月後に BCG を経気道的に感染させたところ、5日後に肺に特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞が出現し、記憶 T 細胞が誘導されていることを確認した (図3)。

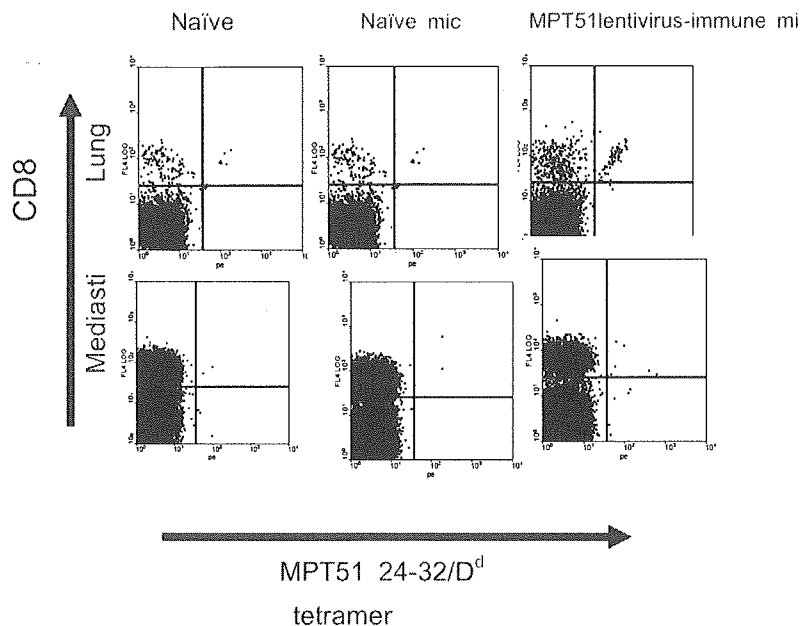


図3.BCG感染後の免疫マウスにおけるMPT51特異的T細胞。  
上段：肺、下段：縦隔リンパ節

興味あることに、この際に縦隔リンパ節に特異的CD8<sup>+</sup>T細胞は認められず、チャレンジ2ヶ月後に再発現した。このことは、記憶CD8<sup>+</sup>T細胞がBCG感染に伴って、縦隔リンパ節から動員されることを意味する。

- 5.ヘテロ免疫とキラー活性：レンチベクターで感作し、BCGで追加免疫することで、縦隔リンパ節に強いキラー細胞を誘導できた。このことは、このヘテロ免疫の感染防御における有用性を示唆する。

#### D. 考察

結核の防御抗原であるMPT51を発現する第三世代レンチウイルスベクターを経気道感染することにより、肺にホーミング

する特異的CD8<sup>+</sup>T細胞を誘導することが出来た。この特異的T細胞の誘導は、肺樹状細胞が縦隔リンパ節に移行し、ナイーブT細胞を感作することによって行われると考えられた。また、感作後の記憶CD8<sup>+</sup>T細胞は縦隔リンパ節に存在し、感染に伴い肺に動員されることが考えられる。BCGとのヘテロ免疫が有効であることが判明したので、今後、BCGで感作し、レンチベクターの経気道免疫で追加免疫して、肺ホーミング性T細胞を誘導する実験を計画している。

#### E. 結論

結核の防御抗原であるMPT51を発現する第三世代レンチウイルスベクターを経

気道感染することにより、肺にホーミングする特異的CD8<sup>+</sup>T細胞を誘導することが出来た。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Aoshi T, Suzuki M, Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Expression mapping by retroviral vector for CD8<sup>+</sup> T cell epitopes: definition of a Mycobacterium tuberculosis peptide presented by H2-D<sup>d</sup>. J Immunol Methods 298(1-2):21-34, 2005.

2. Nagata T, Uchijima M, Uchiyama H, Yamada T, Aoshi T, Koide Y: Immunization with gene encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inserted with a single helper T-cell epitope of an intracellular bacterium induces a specific T-cell subset and protective immunity. Vaccine (in press)

3. Nakano H, Nagata T, Suda T, Tanaka T, Aoshi T, Uchijima M, Chida K, Nkamura H, Okada M, Koide, Y: Immunization with dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity specific to a dominant epitope on Antigen 85A. Vaccine (in press)

##### 2. 学会発表

1. 永田 年、青枝大貴、内嶋雅人、小出

幸夫: DNAワクチンを用いた細胞内寄生細菌防御におけるヘルパーT細胞の解析. 第78回日本細菌学会総会、平成17年4月4-6日 (東京)

2. 内嶋雅人、永田 年、青枝大貴、小出幸夫: ケモカイン・抗原融合型抗結核菌DNAワクチンの検討. 第78回日本細菌学会総会、平成17年4月4-6日 (東京) .

3. 田中高生、喜多洋子、桑山さち子、村木裕美子、金丸典子、橋元里美、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. 第45回日本呼吸器学会学術講演会、東京、2005 (平成17年4月14~16日) .

4. Koide Y, Hashimoto D, Uchijima M, Suda T, Chida K, Miyoshi H, Nagata T: Intratracheal administration of third-generation lentivirus vectors encoding MPT 51 and HSP65 from M. tuberculosis induce specific T cell responses in the lung. US-Japan cooperative Medical Science Program. Fortieth Tuberculosis and Leprosy Research Conference. Seattle, Washington, July 28-30, 2005.

5. Enomoto N, Nagata T, Suda T, Uchijima M, Chida K, Nakamura H, Koide Y: Immunization with dendritic cells loaded with a CTL