

ス誘導機構の詳細を解明することが今後必要である。

#### E. 結論

クロファジミンにより誘導されるマクロファージの細胞死は caspase 3 等の活性化や PARP 不活性化、BAX 発現増強を伴ったアポトーシスであることが判明した。マクロファージは炎症性サイトカインを産生する細胞でもあることから、クロファジミンによるマクロファージのアポトーシス誘導はその抗炎症作用と深い関係があると思われた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Masahiko Makino, Yumi Maeda, Yasuo Fukutomi, Tetsu Mukai: Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. *Microbes and Infection*. *Microbes and infection* 9:70-77, 2007.

Yumi Maeda, Tetsu Mukai, Masanori Kai, Yasuo Fukutomi, Hiroko Nomaguchi, Chiyoji Abe, Kazuo Kobayashi, Seigo Kitada, Ryoji Maekura, Ikuya Yano, Norihisa Ishii, Toru Mori and Masahiko Makino: Evaluation of Major Membrane Protein-II as a Tool for Serodiagnosis of Leprosy. *FEMS Microbiol Lett*. Jul;272(2):202-5, 2007.

##### 2. 学会発表

福富康夫・前田百美・牧野正彦：ハンセン病におけるマクロファージのサイトカイン産生調節機構、第80回日本細菌学会総会、大阪、2007年3月

前田百美、田村敏生、福富康夫、牧野正彦、らい菌由来リポ蛋白の抗らい菌生体防御反応に及ぼす影響、第80回日本細菌学会総会 2007年3月、大阪

福富康夫・前田百美・牧野正彦クロファジミンによるマクロファージの細胞死と caspase活性化、第80回日本ハンセン病学会総会、横浜、2007年5月

Yasuo Fukutomi, Yumi Maeda and Masahiko Makino: Clofazimine-induced cell death in human and mouse macrophages. 42th Tuberculosis and Leprosy Research Conference organized by US-Japan Cooperative Medical Science Program. Zhengzhou, China, Sept. 2007.

Yasuo Fukutomi and Masahiko Makino: Induction of anti-*M.leprae* response in human macrophages. 第37回日本免疫学会総会・学術大会、2007年11月。

Yasuo Fukutomi, Yumi Maeda and Masahiko Makino: Clofazimine-induced cell death in macrophages. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, Jan 30- Feb 4, 2008.

Masanori Kai, Yumi Maeda, Yasuo Fukutomi and Masahiko Makino: Search for *Mycobacterium leprae* antigens for sero-diagnosis. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, Jan

30- Feb 4, 2008.

4, 2008.

Masanori Kai, Nguyen Phuc Nhu Ha, Yasuo Fukutomi, Yuji Miyamoto, Yumi Maeda, Tetsu Mukai, Nguyen Thanh Tan and Masahiko Makino: Application of new serological test for leprosy in Vietnam. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, Jan 30- Feb

Maeda Y, Tamura T, Fukutomi Y, Kai M, Makino M, Lipopeptide (LipoK) of *Mycobacterium leprae* activates antigen presenting cells and type I T cells. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, Jan 30- Feb 4, 2008.

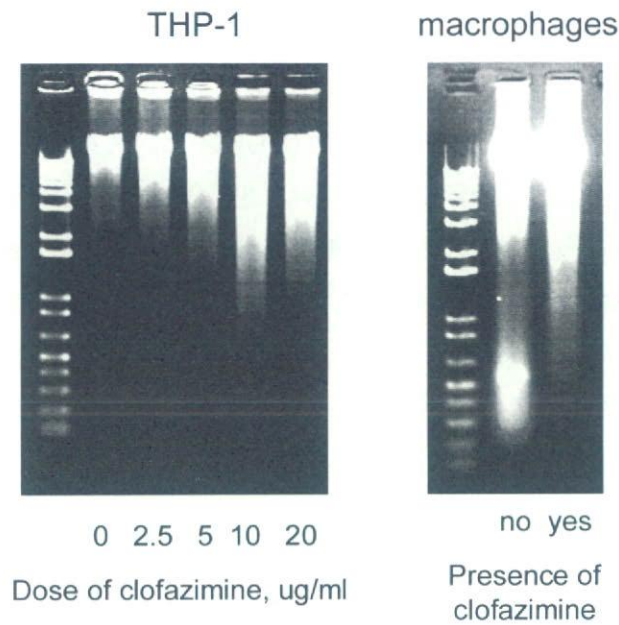


Fig.1. DNA ladder formation in THP-1 cells and human macrophages incubated in the presence of clofazimine for 4 hr and 16 hr, respectively.



Fig.2. Western blot analysis of lysates from THP-1 cells incubated in the presence of clofazimine.

16S rRNA 遺伝子による環境中の

抗酸菌の分布調査

分担研究者 谷口 初美 産業医科大学教授

研究要旨

我々は、これまで土壌微生物叢の網羅的な遺伝子工学的解析手法を構築してきた。今回は、これまでに得られた土壌試料の細菌叢解析結果を基に抗酸菌の分布状況の調査を行った。また、幾つかの土壌については培養法による検出も試みた。汚染土壌（不法投棄現場や廃棄物処分場土壌）137 サンプル、山畑土壌 66 サンプル、合計 203 の土壌サンプルにおいて、抗酸菌は約 20%の土壌から検出された。また検出された 16S rRNA 遺伝子の系統樹解析から、土壌の種類により検出される菌種が異なること、および多くは既知菌種と異なる系統であることが明らかになった。培養法により検出された抗酸菌の約 70%は同定不能であった。細菌叢解析および培養法による両解析結果から、土壌試料中には未知の抗酸菌が広く分布していることが強く示唆された。

A. 研究目的

土壌汚染対策法（2003 年）の制定により、跡地利用のための土壌評価が求められている。特に、病院跡地の場合、病原菌の生息状況の調査が問題となる。抗酸菌は、広く環境に生息すると言われているが、その培養、同定は困難である。とくに、遅発育菌の場合、多種の菌が生息する環境サンプルからの検出は困難を極める。

これまでの抗酸菌分布調査は培養法に基づいたものであり、難培養、培養不能な菌種を網羅した調査は行われていない。我々は環境試料中の微生物叢の動態を可能な限り正確に且つ簡便に把握するための遺伝子工学的手法を構築し、様々な環境試料における細菌叢解析結果を蓄積してきた。その検査結果を基に抗酸菌の検出頻度や系統解

析を行い、土壌試料に於ける分布状況を明らかにすることを目的とした。また、従来用いられてきた培養法による抗酸菌の検出も行った。

B. 研究方法

土壌サンプル

汚染土壌として廃棄物処分場及び不法投棄現場の土壌 137 サンプル、および対照として山や畑の土壌 66 サンプルを採取した。サンプルは密閉容器に入れ、実験に用いるまで 4℃で保存した。

溶菌及び DNA 抽出法；

土壌 0.3 g をマイクロチューブに取り、DNA extraction buffer, lysozyme, と SDS solution で溶菌。上清を phenol-chloroform- isoamylalcohol

(25:24:1, vol/ vol)で処理後、DNA を抽出し、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN 社)を用いて精製した。

菌体破壊率；

DNA 抽出前後の土壌サンプル中の菌数を上記の蛍光染色法で計測し、以下の計算式で菌体破壊率を求めた。[100-(DNA 抽出操作後の菌数/ DNA 抽出操作前の菌数×100)] %

16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定；

16S rRNA 遺伝子の universal primer セット (E341F, E907R) を用いて部分断片約 580bp を増幅して、TOPO TA Cloning Kit (pCR2.1 vector) [Invitrogen] を用いてクローニングを行った。各サンプルにつき 100 から 500 クローンをランダムに選択し、挿入断片の塩基配列を BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 及び Applied Biosystems 3130xl (ABI) を使用して決定した。

16S rRNA 遺伝子塩基配列の系統樹作製；

Ribosomal Database Project II に登録されている抗酸菌基準株 104 種の 16S rRNA 遺伝子塩基配列の 510bp を用いて CLASTALW による系統樹を作製した。

細菌叢解析

細菌の基準株の 16S rRNA 遺伝子 (4,386 件) データベースに対する相同性検索 (BLAST) を行った。

投入した塩基配列に対して BLAST 検索で最も高い相同性を示した生物種の階層分類表 (門、綱、目、科、属、種) を作成した。

抗酸菌の培養；

土壌約 50 g を滅菌水 100ml に懸濁した後、4 週間静置 (28°C、36°C) した。上清 1ml を酸処理後、小川培地に塗布した。1 ヶ月後に形成されたコロニーについて Ziehl-Neelsen 染色、生化学性状テスト (10 項目)、遺伝子検査 (16SrRNA, *hsp65*, *rpo B*) による分類を行った。

## C. 研究結果

1) 土壌細菌叢解析結果における抗酸菌の検出：細菌叢解析結果から処分場土壌及び不法投棄現場土壌 137 サンプルの内、抗酸菌は 6 の土壌サンプルから検出された。山畑土壌 66 サンプルについては抗酸菌が 15 サンプルから検出され、その頻度はそれぞれ 4% および 23% であった。検出されたクローン数は汚染土壌から 14、山畑土壌から 19 クローン、合計 33 クローンが検出された。

2) 抗酸菌基準株 16S rRNA 遺伝子の系統樹：RDPII に登録されている抗酸菌基準株 (104 種) 16S rRNA 遺伝子の部分断片 (510bp) の系統樹を作製した。遅発育菌である結核菌群、I 群、II 群、III 群は極めて近接したクラスターを形成した。迅速発育菌群 (IV 群) は多様であり、幾つかの明瞭なクラスターを形成していることが明らかになった。

3) BLAST 解析：得られた 33 クローンの BLAST による相同性検索の結果、*M. chlorophenicum* (4 クローン)、*M. nonchromogenicum* (2 クローン)、*M. septicum* (10 クローン)、*M. elephantis* (2 クローン)、*M. goodii* (1 クローン)、*M. holsaticum* (1 クローン)、*M. lacus* (3 クローン)、*M. peregrinum* (3 クローン)、*Mycobacterium* sp. (1 クローン)、*M. thermoresistibile* (6 クローン) 10 菌種との類似性が認められた。*M. nonchromogenicum* および *M. lacus* は遅発育菌であり、それ以外の 8 菌種は全て迅速発育菌に属する菌種であった。汚染土壌からは 3 菌種

(*M. chlorophenicum*、*M. nonchromogenicum*、*M. septicum*)、山畑土壌から 8 菌種 (上記以外) が検出され、両土壌から共通して検出された菌種は *M. septicum* だけであった。

4) 検出されたクローンの系統解析：抗酸菌基準株 (104 種) と検出された抗酸菌

33 クローンによる系統樹を作製したところ、検出された抗酸菌は迅速発育菌種のクラスターに広く分布しており、その分布は汚染土壌と山畑土壌では異なった。

5) 培養法による抗酸菌の検出: 11 の土壌サンプルから 19 株の迅速発育抗酸菌が分離できた。処分場と不法投棄現場の表層から 1.5m の深さで、pH 8.3 以下の土壌から分離された。生化学性状および遺伝子解析の結果、同定可能な 6 株は *M. vanbaalenii*、*M. austroafricanum* / *M. vanbaalenii*、*M. chubuense* / *chlorophenicum*、*M. mageritense*、*M. frederiksbergense* であった。このうち *M. mageritense* 以外の 4 菌種は環境汚染物質の PAH (多環芳香族炭化水素) 分解菌として報告されている。13 株は同定不能であった。

#### D. 考察

203 の土壌サンプルの細菌叢解析結果から、抗酸菌は土壌の種類による偏在性が強く、山畑により広く分布していることが示唆された。抗酸菌の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく解析で抗酸菌を分類することは不可能と考えられている。しかし、抗酸菌基準種 (104 種) の 16S rRNA 遺伝子の部分断片 (510 b p) の系統樹解析結果から、厳密な種レベルの分類は不可能であるが、いくつかのグループにタイプングすることが可能であることが明らかになった。BLAST および系統樹解析の結果、土壌には迅速発育型抗酸菌種が多く存在しており、それらは病原性が報告されている抗酸菌種に類似した菌種であることが明らかになった。また、汚染土壌と山畑土壌ではその種類が異なっており、山畑土壌の方が多様な抗酸菌が生息していることが示唆された。培養法では、pH8.3 以下の土壌からのみ抗酸菌が検出されたが、16SrRNA 遺伝子による菌叢解析では pH10.6、pH10.3 の

1.5m の深層部からも検出された。検出された菌種は、培養法でも、菌叢解析でも、迅速発育菌が多かったが、菌叢解析では III 群に属する遅発育菌も検出された。このことから、土壌中には培養法で検出が困難な遅発育菌種も存在しているが、その検出には遺伝子を用いた解析が有用であることが示唆された。培養法では 11 サンプルから 19 株検出され、検出頻度は菌叢解析より高かった。これは全菌数に占める割合が少数でも (1%以下) 検出可能であるためと考えられた。培養に依存しない細菌叢解析でも、土壌における抗酸菌の生息状況の把握は可能であると考えられた。本手法は約 1 週間で優占的に生息する菌の種別および菌数の割合を半定性的・半定量的に知ることが可能であり、また、培養困難な菌をも網羅した解析結果を得ることが可能であることから、土壌評価に有用であると考えられた。しかし、少数 (全菌数の 1%未満) の菌の検出には限界があり、少数でも有意な病原性を発揮する菌については別の検出方法を併用する必要がある。

#### E. 結論

土壌中には環境に適応した特有の抗酸菌が偏在しており、その多くは未知の菌種であることが細菌叢解析および培養法により明らかになった。

#### F. 健康危険情報

主任研究者が記入

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Wang Y, Ogawa M, Fukuda K, Miyamoto H, Taniguchi H: Isolation and identification of mycobacteria from soils at an illegal dumping site and

landfills in Japan. *Microbiol Immunol*  
50(7):513-524, 2006

福田和正, 市原剛志, 上田直子, 郡山一明,  
小川みどり, 谷口初美: 北九州市洞海湾の  
底泥の細菌叢調査. *J. UOEH* 29: 51-62,  
2007

福田和正, 市原剛志, 郡山一明, 谷口初  
美: 産業医大病院地下ピット工事に伴う細  
菌感染症予防のための汚泥の細菌叢検査.  
*J. UOEH* 29: 39-49, 2007

## 2. 学会発表

福田和正, 小川みどり, 宮本比呂志, 谷  
口初美: 16S rDNA 塩基配列に基づく細菌叢  
解析手法の検証. 第80回日本細菌学  
会総会, 大阪, 2007

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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<sup>1)</sup>、喜多洋子<sup>1)</sup>、金丸典子<sup>1)</sup>、橋元里実<sup>1)</sup>、西田泰子<sup>1)</sup>、仲谷 均<sup>1)</sup>、高尾京子<sup>1)</sup>、岸上知恵<sup>1)</sup>、井上義一<sup>1)</sup>、坂谷光則<sup>1)</sup>、吉田栄人<sup>2)</sup>、金田安史<sup>3)</sup>、中島俊洋<sup>4)</sup>、松本 真<sup>5)</sup>、Babie Tan<sup>6)</sup>、Eiuardo de la Cruz<sup>6)</sup>、Paul Saunderson<sup>6)</sup>、David McMurray<sup>7)</sup>

所 属 <sup>1)</sup>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 <sup>2)</sup>自治医科大学医動物学 <sup>3)</sup>大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療 <sup>4)</sup>ジェノメディア研究所 <sup>5)</sup>大塚製薬研究所 <sup>6)</sup>Leonard Wood Memorial 研究所 <sup>7)</sup>Texas A&M 大学

研究要旨

(1) 新しい結核予防ワクチンの開発 HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンの強力なワクチンを開発した。

新しい 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）で強力な結核予防効果を示した。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- $\gamma$  の産生増強が示された。

(2) HVJ-エンベロープ / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンを用い、BCG の priming-booster 法で BCG 単独より 1 万強力な結核予防ワクチンを得た。

(3) HVJ-エンベロープ / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンでは、BCG とのプライム-ブースター法を用い、肺の結核病理像の著明な改善が認められた。

(4) カニクイザルの系で HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは BCG プライミング、この HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンブースターで著明な延命効果（100%）が認められた。一方、BCG 単独群は 33% の生存率であった。

(5) 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- $\gamma$  及び IL-2 産生の著明な相乗効果が認められた。

(6) 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<sup>d</sup>) に 3 回免疫した後、ヒト結核菌 H37Rv  $5 \times 10^5$ /mouse を i.v 投与した。
- (2) 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。

(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。国立病院機構近畿中央胸部疾患センター動物実験委規程の規則に従って、3R (Refinement, Replacement, Reduction) の原則に基づき動物実験委員会で承認された実験を行っている。

### C. 研究結果

- (1) ①マウスの実験系：マウスに新ワクチンを接種した後、結核菌を感染させ、5週間後の結核菌の数を調べた。すると、新ワクチンを接種したマウスの菌数はBCG接種のマウスの約1千分の1で発症を抑えられる程度だった。さらに、あらかじめBCGを接種してから新ワクチンを打つと、菌数は約1万分の1まで抑えられていた。
- 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週間後にも約10%認められた。さらに、IFN- $\gamma$ 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。
- (2) BCGワクチン・プライミング-HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン・ブースター群では、肺の病理組織像において、結核肉芽腫像の著明な改善が認められた。肺のgranulomaの大きさ（面積の計算）はChristopher Dasherの方法を用いて行なった (Granuloma Index)。すなわち、BCGプライム-DNAワクチン予防投与群及びDNAワクチン・プライム-BCGブース

ター予防投与群は、コントロール群（予防ワクチン非投与群、あるいはBCGワクチン投与群）に対して有意差 ( $p < 0.01$ ) をもって、granuloma indexの減少（肺結核病理像の改善）が認められた。これは結核投与5週間後でも10週間後でも同様に有意差をもってgranuloma indexの改善がこのDNAワクチン投与群で認められた。

- (3) 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。
- (4) Priming-Booster法で最も強力な新しい結核ワクチンを作製しつつある。本邦では乳幼児にBCG接種を行う。したがって成人におけるboosterワクチンとして上記のワクチンをサル系で行った。PrimingはBCG東京ワクチンを用いた。さらにBCGワクチンと新ワクチンのプライミング-ブースター法で100%の生存を示した。一方BCGワクチン単独群の生存率は33%であった。このように、ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルを用いた実験系で、強力な新しい結核ワクチンを我々は世界に先駆けて開発した。すなわち、本邦では乳幼児にBCG接種が義務づけられていることにより、プライミングワクチンとしてBCGワクチンを用い、成人ワクチン（小学生、中学生、成人、老人）として切れ味のするどい我々が開発したHVJ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンをブースターワクチンとして用いることにより強力な新しい結核ワクチンの臨床応用が可能となる案を計画中である。
- (5) 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 $\gamma$ 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。
- (6) 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。

- (7) さらに途中経過であるが、カニクイザルを用い、このHVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン生存率の改善及び体重増加が免疫反応の増強の治療効果を得た。

#### 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。

(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) 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。HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン、の強力なワクチンを開発した。新しい 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) で強力な結核予防効果を示した。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- $\gamma$ の産生増強が示された。

- (2) HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンを用い、BCGのpriming-booster法でBCG単独より1万強力な結核予防ワクチンを得た。

(3) HVJ-エンベロープ / HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンでは、BCGとのプライムブースター法を用い、肺の結核病理像の著明な改善が認められた。

(4) カニクイザルの系でHVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンはBCGプライミング、このHSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンブースターで著明な延命効果(100%)が認められた。一方、BCG単独群は33%の生存率であった。

(5) 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- $\gamma$ 及びIL-2産生の著明な相乗効果が認められた。

(6) 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された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Fukamizu R, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Matsumoto M, David N. McMurray, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, R.M.Abalos, J.A.Burgos, R Gelber, Sakatani M.: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. Vaccine. 2007;25(16):2990-3
2. Mai HN, Hijikata M, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kimura K, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Nagai H, Kurashima A, Kajiki A, Oketani N, Hayakawa H, Tanaka G, Shojima J, Matsushita I, Sakurada S, Tokunaga K, Keicho N.: Pulmonary Mycobacterium avium complex infection associated with the IVS8-T5 allele of the CFTR gene. Int J Tuberc Lung Dis. 2007;11(7):808-13.

3. Okada M, Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, JSM Peiris, Pei-Jer Chen, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. *Vaccine*. 2007;25(16):3038-40.
  4. Yoshida S, Suzuki K, Tsuyuguchi K, Okada M, Sakatani M.: Molecular Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis-Comparision between Multidrug-Resistant Strains and Pan-Sensitive Strains. *Kekkaku*. 2007;82(6):531-8.
  5. Yoshida S, Suzuki K, Tsuyuguchi K, Iwamoto T, Okada M, Sakatani M.:Molecular epidemiological analysis of Mycobacterium kansasii isolates. *Kekkaku*. 2007;82(2):103-10.
  6. 秋山一男, 手塚文明, 岡田全司, 石橋大海, 島津章, 堀部敬三, 是恒之宏, 村中光, 下田照文, 山本初美, 岡村純, 佐伯行彦, 福田信夫, 山内芳忠, 城ヶ崎倫久, 藤内智, 藤澤隆夫, 友保洋三, 谷山清己, 羽金和彦, 平成17年度国立病院機構共同臨床研究「国立病院機構における臨床研究部の活性化と適切な評価法に関する研究」班:施設長を対象とした臨床研究部・研究センターに関するアンケート調査. *医療*2007; 61(8):546-553.
  7. 岡田全司, 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里実, 西田泰子, 綱井良恵, 井上ルリ子, 深水玲子, 浅木亮子, 仲谷均, 山田順子, 高尾京子, 浅井律子, 浪江由美: 新しい結核ワクチンの開発. *化学療法の領域* 23(3) 447-453 2007.
  8. 岡田全司: 新しい結核ワクチン. *感染症* 7: 14-18 2007.
  9. 岡田全司: 国際ワクチン学会“学会レポート”.*Fifth World Congress on Vaccines, Immunization and Immunotherapy* 感染・炎症・免疫 37: 66-67, 2007
  10. 岡田全司: 新しい結核ワクチンの新展開. *最新医学* 62(11) 2007:125-130
  11. 岡田全司: 新しい結核ワクチンの開発. 呼吸と循環. (in press)
  12. 岡田全司: BCGと新たな結核ワクチン. *呼吸器科*. 13(1) 99-106 2008
  13. M. Okada, Y. Kita, N. Kanamaru, S. Hashimoto, T Nagasawa, Y. Kaneda, Y. Nishida, H. Nakatani, K. Takao, R. Asai, R. Suhara, E.C. Dela Cruz, E.V. Tan, R.M. Abalos, R. Gellber, P. Saunderson, S. Yoshida, M. Matsumoto, D. McMurray, M. Sakatani: Novel Vaccination (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) Against Tuberculosis Using Cynomolgus Monkey. "13<sup>th</sup> International Congress of Immunology" Edit Jorge Kalil, Edecio Cunha-Neto, Luiz Viente Rizzo, *MEDIMOND Intern* p.119-122,2007
  14. David Neil McMurray, 岡田全司 The study of vaccine against Mycobacterium tuberculosis using Aerosol Exposure Chamber system in mice and guinea pig 平成18年度 新興・再興感染症研究推進事業研究報告集 p.5-13, 2007
  15. 岡田全司 カニクイザルを用いた、新しい結核治療ワクチン (HVJ / HSP65 DNA + IL-12 DNA) による新しい結核治療法の開発 平成18年度 新興・再興感染症研究推進事業研究報告書 p.146-159, 2007
  16. Masaji Okada, Yoko Kita, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Yasuko Nishida, Hitoshi Nakatani, Junko Yamada, Kyoko Takao, Ritsuko Asai,, Ryoko Asaki, Rika Suhara, Reiko Fukamizu, Yoshikazu Inoue, Toshihiro Nakajima, Tetsuji Nagasawa, Yasuhumi Kaneda, Shigeto Yoshida, Makoto Matsumoto, Robert Gelber, Esterlina V. Tan, E.C.Dela Cruz, David McMurray, Mitsunori Sakatani Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB Forth-Second Tuberculosis and Leprosy Research Conference U.S-JAPAN Cooperative Medical Science Program: p66-69, 2007
  17. Yukiko Kannan-Hayashi, Kensaku Okamura, Shizuka Hattori, Mitsuru Kawamura, Etsuko Higuchi, Hiroki Terayama, Mitsuaki Moriyama, Masamumi Mukamoto, Masaji Okada, Yoshiyuki Osugi, Youichi Nakamura Neuritogenic effect of T cell-derived IL-3 on mouse splenic sympathetic neurons in vivo *J. Immunol.* (in press)
  18. 岡田全司 新しい結核ワクチンの新展開 *結核* 82 10 : p.794-797, 2007
  19. 岡田全司 結核の抗体と細胞性免疫 *日本医事新報* 4351号 : p.95-97, 2007
  20. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 坂谷光則 結核菌の分子疫学的解析 多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌との比較 *結核* 82巻6号 : p.531-538, 2007
  21. 岡田全司 新しい結核ワクチン *感染症* 7 巻1号 : p.14-18, 2007
2. 学会発表
    1. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru

- N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Fukamizu R, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, R.M.Abalos, J.A.Burgos, R Gelber, Sakatani M.: Treatment of Multi-drug resistant Tuberculosis(XDR-TB, super-spreader MDR-TB) by Novel vaccination (HVJ-envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNA). 13<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Rio de Janeiro. Brazil. 2007.8.
2. Okada M.: Novel vaccination (HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA) against Tuberculosis using cynomologas monkey. Educational seminar for infectious diseases: Tohoku University Medical School (Japan) and Benza University (South Africa) collaborative study. (Aug 21, 2006. Sendai, Japan)
  3. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Fukamizu R, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, R.M.Abalos, J.A.Burgos, R Gelber, Sakatani M.: Novel vaccination (HVJ-liposome/ HSP65 DNA+ IL-12 DNA) against Tuberculosis using cynomolgus monkey. Keystone 2007. Vancouver, Canada.
  4. 岡田全司、喜多洋子、深水玲子、井上義一、坂谷光則: 結核に対する新しいワクチン (HVJ-Envelope/Hsp65DNA+ IL-12DNA) による T 細胞活性化機構。第 82 回結核病学会総会。(2007.6.大阪)
  5. 岡田全司、小林和夫 抗酸菌研究の最前線 “第 82 回 日本結核病学会総会” 結核 82 : 330, 2007
  6. 岡田全司 新しいワクチン開発 “第 82 回 日本結核病学会総会” 結核 82 : 335, 2007
  7. 喜多洋子、金丸典子、深水玲子、浅木亮子、井上義一、坂谷光則、岡田全司 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 (4) 結核 82 : 409, 2007
  8. 金丸典子、喜多洋子、深水玲子、浅木亮子、井上義一、坂谷光則、岡田全司 結核に対する新しいワクチン (HVJ-liposome / HSP65 + IL-12 DNA) の開発と T 細胞分化誘導作用 結核 82 : 408, 2007
  9. 井上義一、喜多洋子、深水玲子、浅木亮子、坂谷光則、岡田全司 プライム・ブースター法を用いた新しいワクチン (HVJ-liposome / HSP65 + IL-12 DNA) による肺結核病理像作用 結核 82 : 408, 2007
  10. 深水玲子、喜多洋子、金丸典子、浅木亮子、坂谷光則、岡田全司 HSP65 遺伝子導入マウス及び IL-12 遺伝子導入マウスを用いた結核感染防御機構の解析モデルの開発 結核 82 : 405, 2007
  11. 浅木亮子、喜多洋子、金丸典子、深水玲子、井上義一、坂谷光則、岡田全司 気道内投与・鼻腔内投与による新規結核ワクチン効果解析 (エアゾル吸入感染系を用いた) 結核 82 : 409, 2007
  12. 町田和子、四元秀毅、岡田全司、坂谷光則 国立病院機構 (NHO) 呼吸器ネットにおける 2004 年結核死亡調査と死亡推移の検討 結核 82 : 390, 2007
  13. 藤山理世、田中賀子、樋口紀子、河上靖登、白井千香、片上祐子、平岡恭典、青山博、千原三枝子、岩本朋忠、園部俊明、鈴木克洋、岡田全司、坂谷光則 神戸市で結核定期外健康診断時に実施した QFT-2G 検査の有用性と接触度について 結核 82 巻 4 号:p.358, 2007
  14. Masaji Okada, Yoko Kita, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Yoichi Nakamura, Yukiko Kannan, Tatsuji Nomura Induction of CTL by using granulysin, IL-6 related genes and IL-2 Receptor d isrupted SCID mouse Proceedings 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association: 245, 2007
  15. Okada Masaji, Kita Yoko, Kanamaru Noriko, Hashimoto Satomi, Nishida Yasuko, Nakatani Hitoshi, Yamada Junko, Takao Kyoko, Asai Ritsuko, Suhara Rika, Fukamizu Reiko, Inoue Yoshikazu, Nakajima Toshihiro Immunological enhancement of a novel vaccine (HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB 日本免疫学会総会・学術集会記録 250, 2007
  16. 藤山理世、田中賀子、中谷幸子、楢林成之、樋口純子、渋谷雄平、青山博、白井千香、片上祐子、千原三枝子、吉岡伸子、伴貞彦、河上靖登、鈴木克洋、岡田全司、坂谷光則 神戸市で結核接触者健康診断時に実施した QFT-2G 検査と接触度について 第 66 回 日本公衆衛生学会総会抄録集 p.588, 2007
  17. 露口一成、吉田志緒美、源誠二郎、鈴木克洋、岡田全司、洪泰浩、林清二、坂谷光則 INH の予防内服により INH 耐性が誘導されたと考えられた結核の 1 症例 結核 82 10 : p.801, 2007
  18. 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岡田全司、富田元久、坂谷光則 Line Probe Assay を用いた抗酸菌同定キットの有用性の検討 結核 82 10 : p.801, 2007
  19. 白井千香、藤山理世、田中賀子、河上靖登、

- 岩本朋忠, 園部俊明, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則 神戸市での VNTR 法による結核菌の遺伝子型別データベースが有用であり、QFT も併用した接触者健康診断事例について 結核 82 10 : p.801, 2007
20. 岡田全司 抗酸菌研究の最前線 新しい結核ワクチン開発 結核 82 10 : p.794-797, 2007
21. 岡田全司 特異抗原をターゲットとした Immunotherapy 新しい結核ワクチンの開発 日本臨床免疫学会誌 30 巻 4 号 : p.265, 2007
22. 武本優次, 深水玲子, 井上義一, 岡田全司, 坂谷光則, 影山圭吾, 前田光一, 神野正敏, 藤本眞一, 中村忍 高齢者薬剤性肺炎の 1 例 日本老年医学会雑誌 44 巻 4 号 : p.528, 2007
23. 橋元里美, 武本優次, 喜多洋子, 金丸典子, 西田泰子, 綱井良恵, 井上ルリ子, 深水玲子, 仲谷均, 山田順子, 高尾京子, 浅井律子, 浅木亮子, 浪江由美, 奥野良信, 加瀬哲男, 吉田栄人, 坂谷光則, 岡田全司 SCID-PBL/hu モデルマウスを用いた SARS ウイルス M 蛋白に対するヒト中和抗体誘導 DNA ワクチンの開発 日本呼吸器学会雑誌 45 巻増 : p. 264, 2007
24. 深水玲子, 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里美, 西田泰子, 綱井良恵, 井上ルリ子, 浅木亮子, 仲谷均, 山田順子, 高尾京子, 浅井律子, 浪江由美, 坂谷光則, 岡田全司 HSP 65 遺伝子導入マウス及び IL-12 遺伝子導入マウスを用いた結核感染防御機構の解明 日本呼吸器学会雑誌 45 巻増 : p. 200, 2007
25. 岡田全司, 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里美, 西田泰子, 綱井良恵, 井上ルリ子, 深水玲子, 浅木亮子, 仲谷均, 山田順子, 高尾京子, 浅井律子, 浪江由美, 井上義一, 吉田栄人, 中島俊洋, 坂谷光則 結核に対する新しいワクチン(Hsp 65+IL-12 DNA)の開発とキラーT細胞分化誘導効果 日本呼吸器学会雑誌 45 巻増 : p. 200, 2007
26. 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里美, 西田泰子, 綱井良恵, 井上ルリ子, 深水玲子, 浅木亮子, 仲谷均, 山田順子, 高尾京子, 浅井律子, 吉田栄人, 中島俊洋, 坂谷光則, 金田安史, TanE.V., DelaCruzD.L.C., 岡田全司 肺感染症の病態と診療の研究における進歩 ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた新しい結核ワクチン開発 HSP 65 DNA+IL-12 DNA ワクチン 日本呼吸器学会雑誌 45 巻増 : p. 122, 2007
27. 岡田全司 未来に繋がる結核対策 新しい抗結核ワクチン開発 日本呼吸器学会雑誌 45 巻増 : p. 46, 2007
28. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 坂谷光則, 岩本朋忠 M.kansasii 症における多クローン性感染の検討 結核 82 巻 4 号 : p.447, 2007
29. 露口一成, 吉田志緒美, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則 血液透析を必要とする腎不全に合併した結核患者の臨床的検討 結核 82 巻 4 号 : p.442, 2007
30. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 富田元久, 坂谷光則, 末竹寿紀 ビラジナミド耐性遺伝子検出キットの有用性の検討 結核 82 巻 4 号 : p.416, 2007
31. 露口一成, 吉田志緒美, 鈴木克洋, 源誠二郎, 井上義一, 岡田全司, 北市正則, 新井徹, 林清二, 坂谷光則 肺結核治療中に閉塞性細気管支炎を生じその後肺 M.avium complex 症を生じた 1 例 結核 82 巻 6 号 : p.553, 2007
32. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 富田元久, 坂谷光則 薬剤感受性試験で RFP 感受性、耐性遺伝子検査で RFP 耐性となる結核菌の検討 結核 82 巻 6 号 : p.551, 2007
33. Masaji Okada, Yoko Kita, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Tetsuji Nagasawa, Yasufumi Kaneda, Yasuko Nishida, Reiko Fukamizu, Yoshie Tsunai, Ruriko Inoue, Hitoshi Nakatani, Yumi Namie, Junko Yamada, Kyoko Takao, Ritsuko Asai, Ryoko Asaki, E.V. Tan, Mitsunori Sakatani Novel vaccination (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA against Tuberculosis) The American Association of Immunology Meeting, 2007
34. Masaji Okada Novel Vaccination (HVJ-Liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) Against Tuberculosis Using Cynomolgus Monkey Leonard Wood Memorial International Meeting 2007: Oct 23, 24, 2007
35. 岡田全司 最新の結核ワクチン・SARS ワクチン及び肺癌ワクチンについて 箕面医師会特別講演 : 2007 年 6 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

岡田全司、高森靖、小川一行、永田欽也

「感染症治療剤 15K granulysin」

WO 03/070268 A1

2002 年

岡田全司、吉田栄人、中島俊洋

DNA ワクチン組成物 (結核ワクチン HVJ-liposome/Hsp65 DNA+IL-12 DNA)

提出日：平成 17 年 9 月 27 日

整理番号：MED-AO504 受付番号：

50501768464

出願番号通知：特願 2005-280379

2005 年

岡田全司、吉田栄人、松本真

「抗酸菌症ワクチン baculo  
virus/Hsp65DNA」

2005 年

岡田全司、大杉義征、三原昌彦

「キラーT細胞の誘導抑制剤」

特許申請中

岡田全司、大杉義征、三原昌彦

「心臓移植における拒絶反応抑制剤」

特許申請中

2. 実用新案登録

3. その他

分担研究者 小出 幸夫 浜松医科大学感染症学主任教授

#### 研究要旨

本研究において結核菌によるファゴリソソーム形成阻害機構の解明をめざし、結核菌感染マクロファージにおける膜小胞輸送機構を解析した。GFP を融合した各種のエンドソーム、リソソームマーカータンパク質を発現する Raw マクロファージ細胞に結核菌を感染させて共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。その結果、食後直後の結核菌ファゴソームは後期エンドソームやリソソームと融合するが、その後、後期エンドソームタンパク質が結核菌ファゴソームから分離するため、持続的なファゴリソソーム形成が阻害されることが示唆された。

#### A. 研究目的

結核菌は細胞内寄生性細菌で、この増殖能はファゴリソソーム形成を阻害することによって獲得している。このことは、結核菌は感染したマクロファージの膜小胞輸送を変調させていることを示唆する。本研究において結核菌感染マクロファージにおける膜小胞輸送機構のイメージ解析を行うことによってファゴリソソーム形成阻害機構を解明し、今後のワクチン開発に有効な情報を得る。

#### B. 研究方法

1. GFP 融合エンドソーム、リソソームマーカータンパク質発現マクロファージ：pEGFP-C1 もしくは pEGFP-N1 に各種エンドソーム、リソソームマーカー遺伝子をクローニングしたプラスミドを作成した。これらのプラスミドをもちいて、Raw264.7 マクロファージ細胞に電気穿孔法によって遺伝子導入した。3. 結核菌感染マクロファージの顕微鏡観察：遺伝子導入を行ったマクロファージ細胞に結核菌を感染させた。結核菌感染マクロファージを 1% パラフォル

ムアルデヒドを含む PBS で固定して、PBS で洗浄後に顕微鏡観察を行った。顕微鏡観察は LS-1 共焦点レーザー顕微鏡システム（横河電機）を用いて行った。2. 免疫染色：結核菌感染マクロファージを 3% パラフォルムアルデヒドを含む PBS で固定して、PBS で洗浄した後、LAMP-2 およびカテプシン D 抗体を用いて免疫染色を行った。その後、顕微鏡観察を行った。

#### C. 研究結果

1. 後期エンドソームマーカータンパク質である Rab7 はこれまで結核菌ファゴソームには局在しないといわれていた。しかし、本研究の結果、感染 30 分後の 80%以上の結核菌ファゴソームに Rab7 が局在することが明らかになった。その後、Rab7 は結核菌ファゴソームから分離して、感染 6 時間後には、Rab7 陽性結核菌ファゴソームは 30%まで減少した。

2. ファゴリソソーム形成を促進する RILP タンパク質は感染 30 分後には 30%の結核菌ファゴソームに局在していたが、その後、増加しなかった。

3. リソソームマーカータンパク質である CD63 は結核菌ファゴソームには局在しないといわれていた。しかし、CD63 は結核菌ファゴソームに感染 6 時間後において局在していた。

4. 他のリソソームマーカータンパク質である LAMP-2 も感染 30 分後に結核菌ファゴソームに局在したが、その後減少した。

5. リソソーム局在タンパク質分解酵素であるカテプシン D は感染 30 分後の結核菌ファゴソームに局在したが、感染 6 時間後にはまったく局在しなかった。

#### D. 考察

これまで、結核菌ファゴソームには初期エンドソームタンパク質は局在するが、後期エンドソームタンパク質やリソソームタンパク質は局在せずに、ファゴソーム熟成が阻害されていると考えられていた。しかし本研究において、感染直後において結核菌ファゴソームに後期エンドソームタンパク質やリソソームタンパク質が局在することが明らかになった。その後、後期エンドソームタンパク質が結核菌ファゴソームから分離することによって、持続的なファゴリソソーム形成が阻害されることが示唆された。

#### E. 結論

本研究の結果は、結核菌は感染マクロファージの膜小胞輸送機構を変調させることによって、持続的なファゴリソソーム形成を阻害して、マクロファージ内で増殖を行うことを示唆する。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Aoshi T, Nagata T, Suzuki M, Hashimoto D, Refiei A, Suda T, Chida K, Koide Y: Identification of HLA-A\*0201-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis*, using combination of MPT51 overlapping peptide library and computer algorithms. *Infect Immun* (in press).
- (2) Hashimoto D, Nagata T, Uchijima M, Seto S, Suda T, Chida K, Miyoshi H, Nakamura H, Koide Y: Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *Mycobacterium tuberculosis* induces specific CD8+ T-cell responses in the lung. *Vaccine* (in press)
- (3) Ikehara Y, Shiuchi N, Kabata-Ikehara S, Nakanishi H, Yokoyama N, Takagi H, Nagata T, Koide Y, Kuzushima K, Takahashi T, Tsujimura K, Kojima N: Effective induction of anti-tumor immune responses with oligo-mannose-coated liposome targeting to intraperitoneal phagocytic cells. *Cancer Letters* (in press)

- (4) Nagata T, Aoshi T, Uchijima M, Koide Y: In vivo hierarchy of individual T-cell epitope-specific helper T-cell subset against an intracellular bacterium. *Vaccine* (in press).
- (5) Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Chemokine receptor-mediated delivery of mycobacterial MPT51 protein efficiently induces antigen-specific T-cell responses. *Vaccine* (in press).
- (6) Cervantes J, Nagata T, Uchijima M, Shibata K, Koide Y: Intracytosolic *Listeria monocytogenes* induces cell death through caspase-1 activation in murine macrophages. *Cell Microbiol* (in press).
- (7) Nagata T and Koide Y: Anti-infective vaccine strategies In: Liu D ed. *Handbook of Listeria monocytogenes*. (in press)
- (8) Enomoto N, Nagata T, Suda T, Uchijima M, Nakamura Y, Kingo C, Nakamura H, Koide Y: Immunization with dendritic cells loaded with  $\alpha$ -galactosylceramide at priming phase, but not at boosting phase, enhances cytotoxic T-lymphocyte activity against infection of intracellular bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51:350-362, 2007.
- (9) Kgeyama Y, Takahashi M, Torikai E, Suzuki M, Ichikawa T, Nagafusa T, Koide Y, Nagano A: Treatment with anti-TNF- $\alpha$  antibody infliximab reduces serum IL-15 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 26 (4): 505-509, 2007.
- (10) Koide Y: Curcumin for maintenance therapy in ulcerative colitis (Letter). *Clin Gastroenterol Hepatol* 5:642, 2007.
- (11) 小出幸夫: 私達の研究 (56) 「細胞内寄生細菌感染症をめぐってーワクチン研究およびイメージング解析による感染機構の解明ー」. *化学療法の領域* 23(11): 101-112, 2007.

## 2. 学会発表

### 国際学会発表

1. Hashimoto D, Nagata T, Suda T, Chida K, Koide Y: Intracellular administration of third-generation lentivirus vectors encoding MPT51 from *Mycobacterium tuberculosis* induces specific T-cell responses in the lung. American thoracic society, May 18-23, 2007. (San Francisco, USA).
2. Nagata T, Aoshi T, Uchijima M, Koide Y: In vivo heterogeneity of



- individual T-cell epitope-specific helper T cells against an intracellular bacterium. DNA Vaccine 2007, May 23-25, 2007 (Malaga, Spain).
3. Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Chemokine receptor-mediated delivery of mycobacterial MPT51 efficiently induces antigen specific T-cell responses. DNA Vaccine 2007, May 23-25, 2007 (Malaga, Spain).
  4. Koide, Y, Hashimoto, D, Uchijima, M, Suda, T, Chida, K, Nagata, T: Intratracheal administration of an alternative genetic vaccine, third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *Mycobacterium tuberculosis*, induces lung-homing specific T cells. DNA Vaccine 2007, May 23-25, 2007 (Malaga, Spain).
  5. Seto S, Koide Y: Live *Mycobacterium tuberculosis* blocks phagosome-lysosome fusion by dissociation of late endosomal protein, Rab7, from phagosome in macrophages. The 42th US-Japan conference of tuberculosis and leprosy, Sept. 11-14, 2007, (Zhengzhou, Henan, China).

#### 国内学会発表

1. 瀬戸真太郎、小出幸夫：結核菌感染マクロファージにおける膜小胞輸送機構のイメージ解析。第90回 日本細菌学会関東支部総会、平成19年10月12, 13日 (東京)
2. Cervantes J, Nagata T, Uchijima M, Koide Y: Nuclear changes associated with cell death of *Listeria monocytogenes*-infected macrophages. 第37回日本免疫学会総会・学術集会、平成19年11月20日～22日、(東京)
3. Uchijima M, Nagata T, Shibata K, Koide Y: Genetic fusion of MIP-1a to a mycobacterial MPT51 antigen enhances the antigen-specific CD8+ T- and CD4+ T-cell responses. 第37回日本免疫学会総会・学術集会、平成19年11月20日～22日、(東京)
4. Wang L-M, Nagata T, Koide Y: Characterization of human HLA-DR4-restricted CD4+ T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis*. 第37回日本免疫学会総会・学術集会、平成1

9年11月20日～22日、(東京)

H. 知的財産権の出願・登録情報  
無し。

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  
-結核菌群の詳細な鑑別能を有するマルチプレックスPCR法の開発とこれを用いたバング  
ラデシュにおけるヒトおよびウシ由来結核菌群のサーベイランス-

分担研究者 鈴木定彦 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター教授  
研究協力者 中島千絵 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター  
研究協力者 福島由華里 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター

研究要旨 結核菌群の人獣共通感染症起因性を追求するためには、結核菌群を更に結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、ウシ型結核菌 (*M. bovis*)、アフリカ菌 (*Mycobacterium africanum*)、ネズミ型結核菌 (*M. microtii*) に鑑別する必要がある。本研究では、結核菌群の間でその存在において差異の見られる遺伝子領域に焦点を合わせて、マルチプレックスPCR法を構築した。更に、この方法を用いて、バングラデシュの首都ダッカおよびその周辺地域の結核患者および牛より分離された結核菌群の型別を実施した。その結果、鑑別した全ての結核菌群が *M. tuberculosis* であることが判明した。興味深い事には、ウシより分離された2株の結核菌群が *M. bovis* ではなく *M. tuberculosis* であった。この結果は、*M. tuberculosis* のヒト-ウシ間の伝播を示唆するものであり、ウシ由来菌の数を増やして分析する必要があるものと考えられた。

#### A. 研究目的

結核菌群は人獣共通感染症起因菌として重要なものと考えられている。そのため、結核菌群のサーベイランスは重要な課題と考えられている。しかしながら、結核菌群はお互いに非常に類似した性状を示すため、これらを鑑別する事は容易ではない。そのため、現在は、結核菌群である事までは鑑別するものの、更なる鑑別は為されていない。しかしながら、結核菌群の人獣共通感染症起因性を追求するためには、結核菌群を更に結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、ウシ型結核菌 (*M. bovis*)、アフリカ菌 (*Mycobacterium africanum*)、ネズミ型結核菌 (*M. microtii*) に鑑別する必要がある。また、*M. bovis*の多くはWHOが推奨するDOTSに用いられている主要抗結核

剤4剤のうちの一つであるピラジナミドに対して感受性を示さない事から、結核菌群の詳細な鑑別は、結核菌群による感染症の治療方針の決定にも大きな意味を持つ。

そこで、本研究では、結核菌群の間でその存在において差異の見られる遺伝子領域に焦点を合わせて、マルチプレックスPCR法を構築した。更に、この方法を用いて、バングラデシュの首都ダッカ周辺の結核患者および牛より分離された結核菌群の型別を実施した。

#### B. 研究方法

結核菌群株DNA： バングラデシュの首都ダッカとその周辺の結核患者及びウシから分離された結核菌群よりフェノール-クロロフォルム法を用いてDNAを抽出してこれを用いた (表1)

表1 本研究に用いたバングラデシュの首都ダッカ及びその周辺地域から得られた検体

Source of samples	Number of samples
human sputum	330
jaw lymph nodes	22
cattle lung lesion	2
total	354

マルチプレックスPCR：結核菌群菌を詳細に鑑別するためには、結核菌群菌が分化する過程で喪失した染色体上の領域が最適と考えられたため、標的染色体上の領域としてRD (Region of Difference) を選定した。結核菌群菌の祖先から結核菌 (*M. tuberculosis*) とアフリカ結核菌 (*M. africanum*)、ネズミ型結核菌 (*M. microtii*)、ウシ型結核菌 (*M. bovis*) が分化する過程でRD 9およびRD 12が失われたと考えられている (図1)。この事を応用してPCRを構築すると、結核菌は、RD 9 (+)、RD 12 (+) となる。一方、アフリカ結核菌およびネズミ型結核菌はRD 9 (-)、RD

12 (+)、ウシ型結核菌はRD 9 (-)、RD 12 (-) となる。

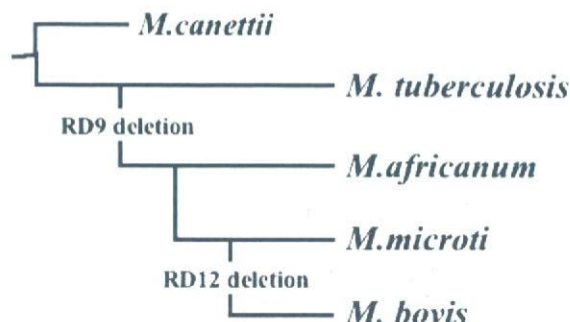


図1 結核菌群菌の分化とRD欠失

結核菌群菌の祖先から結核菌 (*M. tuberculosis*) とアフリカ結核菌 (*M. africanum*)、ネズミ型結核菌 (*M. microtii*)、ウシ型結核菌 (*M. bovis*) が分化する過程でRD 9が失われ、更に、アフリカ結核菌からネズミ型結核菌とウシ型結核菌が分化する過程でRD 12が失われたと考えられている。

プライマーとしては、RD 9およびRD 12の内部領域を増幅できるものと、結核菌群菌が共通に持つc f p 32遺伝子断片を増幅できるものを混合して用いた (表2)。

表2 本研究に用いたプライマー

Target region	Name of primer	Sequence of primers	size of product
c f p 32	Rv0577F	atgcccaagagaagcgaatacaggcaa	786 bp
	Rv0577R	ctattgctgcgggtgcgggcttcaa	
RD9	Rv2073cF	tcgccgctgccagatgagtc	600 bp
	Rv2073cR	tttgggacgcgcccgggtgatga	
RD12	Rv3120F	gtcggcgatagaccatgagtcctccat	404 bp
	Rv3120R	gcgaaaactgggaggatgccagaatagt	

### C. 研究結果

結核菌群の詳細な鑑別能を有するマルチプレックスPCR法の開発：c f p 32、RD 9、RD 12増幅用のプライマーを様々な濃度で混ぜ合わせ、これを用いてPCRを実施した結果、プライマーの混合比率をc f p 32 : RD 9 : RD 12 = 2 : 0.75 : 0.75とした場合に、三本のバン

ドの濃さが均一になる事を見出した。この条件を用いて、結核菌、アフリカ結核菌、ウシ型結核菌、カネッティ菌 (*M. canettii*) より抽出したDNAを対象としてマルチプレックスPCRを実施したところ、結核菌は、c f p 32 (+)、RD 9 (+)、RD 12 (+)、アフリカ結核菌はc f p 32 (+)、RD 9 (-)、RD 12 (+)、また、ウシ型結