

工染色体に転座させ、ES細胞を介してマウス個体に導入することが可能であり、ノックアウトマウスと組み合わせると当該遺伝子に関してゲノムレベルで「ヒト」化した新しいモデルマウスを作製できることが示された。この新しい実験系は、遺伝子の機能解析に非常に有用なモデル系となることが期待されるだけでなく、ヒト遺伝疾患の新規治療法や新薬の開発にも有用であることが期待される。

#### E. 結論

ポストゲノム時代における、新たなアプローチである全長 cDNA トランスフェクションによる機能的スクリーニングのシステムを構築した。自動分注装置などを使用したこのシステムにより、短時間で効率よく、更に低コストで網羅的なスクリーニングを行うことができることが明らかとなった。本年度は、骨形成に重要な転写因子 Runx2 の転写コファクターの探索、軟骨組織形成に重要な転写因子 Smad3 の転写コファクターの探索、網膜発生に重要な Sonic hedgehog (Shh)の上流因子の探索、アレルギー・癌の病態に関わる遺伝子の上流因子の探索の一次スクリーニングを行い、それぞれ約 100 程度の候補遺伝子を見出すことができた。今後の詳細な解析により、これらの遺伝子の機能を明らかとする。また、今後それぞれの探索において見出された遺伝子の機能解析においてマウスを使用した解析を行う予定であるが、モデルとしてヒトとマウスのジストロフィン遺伝子が入れ替わった新しいモデルマウスを作製し、より効率的かつ有用な解析法の構築につながる結果を得ることができた。

これらの研究による成果は、病態メカニズム解明および新規治療ターゲットの発見に有用なデータベースとして利用できるほか、幅広い疾患に対する創薬アプローチへの応用が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Watanabe S、 Kondo S and Hanaoka K :  
Functional analysis of homeodomain-  
containing transcription factor、 Lbx1、 in  
satellite cells of mouse skeletal muscles.  
J.Cell Sci、 120(23) 4178-4187、 2007

Sasaki N、 Okishio K、 Kumiko Ui-Tei et  
al. : Heparan sulfate regulates self-renewal  
and pluripotency of embryonic stem cells. J  
Biol.Chem. .283(6) 3594-3606、 2008

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 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

## 脱細胞化組織を用いた再生医療用生物由来素材の開発 と各種組織移植への展開

所 属 ニプロ株式会社総合研究所  
研究者 藤里 俊哉

研究要旨 生物由来素材の再生医療への応用を実現するため、高圧処理法によって脱細胞化した異種由来組織について検討した。その結果、従来の化学処理法に比べて、血管や角膜を含めた種々の組織の脱細胞化に非常に有効であることが示された。また、細胞播種した筋組織を電気刺激にて弛緩収縮させることができた。

### 分担研究者

- |                 |      |
|-----------------|------|
| (1) 東京医科歯科大学    | 岸田晶夫 |
| (2) 国立循環器病センター  | 山岡哲二 |
| (3) 物質材料研究機構    | 小林尚俊 |
| (4) ニプロ(株)総合研究所 | 白数昭雄 |
| (5) 大阪工業大学工学部   | 橋本成広 |

### A. 研究目的

絶対的なドナー不足である脳死臓器移植、再生医療に用いる足場材料、あるいは既存の人工臓器・医用材料の欠点を克服するため、新しい生体材料の必要性が高まっている。このうち、現在でも必要性の高い血管、気管、食道などの比較的単純な組織構成の臓器の再生のための足場材料は、主として生体内分解吸収性の合成材料が用いた研究が進められている。しかし、ポリ乳酸等の既存の材料は加工が困難で、物性が生体のものとは大きく異なる。また、新規の材料は、安全性に関する試験等に要する期間・費用や、臨床応用後の問題発生時の訴訟リスク等から、大企業でさえも容易に開発できるものではない。我々は、生物組織を脱細胞化処理することによって得られた生物由来素材の応用を進めている。これまでに、肺動脈弁及び大血管において研究を進め、臨床応用の手前まで到達している。本研究では、この基礎技術を、小口径血管や皮膚、角膜等へと応用する。

人工血管は、中大口径のものに限れば既に完成された技術であり、我が国では年間約5万本が使用され、約100億円の市場規模にある。しかし、移植後も異物のままであり、自己細胞の浸潤による自己組織化が達成されないため、移植後の成長性がなく、感染に対しても非常に弱

い。冠動脈や末梢血管等で小口径の場合では、自己血管を用いたバイパス術や同種血管の使用が第一選択肢となっている。欧米では組織バンクが商業ベースで行われており、年間数千件以上の提供組織が臨床使用されている。しかし、我が国では年間数十件に留まっており、圧倒的に提供数が不足している。また、我が国では年間2万人以上の患者が、角膜移植の対象疾患で移植治療を待っている。世界的には、角膜の障害による失明は少なくとも10万人以上は存在すると推定されている。移植用角膜の不足が主要因であり、失明患者の救済、失明患者のために費やす社会保障費用削減などの観点から角膜実質代替材料の開発が強く望まれている。前述の循環器組織と同様に、我が国では提供数が不足しているため、年間約千もの角膜組織が輸入されている現状にある。同様に、代用皮膚組織は熱傷や褥瘡の他、がん切除後の組織再建、さらには美容目的に使用され、輸入ヒト組織も使用されている。本研究では、このような同種組織の不足を補うべく、生物由来素材を改変した再生型組織移植技術を開発し、商品化を目指す。

### B. 研究方法

脱細胞化：クラウン系ミニブタ（株）ジャパンファーム）あるいは食用ブタから清潔下にて各種組織を採取した。化学処理による脱細胞化法として、トリプシン処理、TritonX-100 (TX) 処理、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 処理、デオキシコール酸ナトリウム (SD) 処理を行った。高圧処理による脱細胞化として、冷間等方加圧装置Dr. CHEF（株）神戸製鋼所）を用いて、10,000気圧下10分間の超高圧処理を行った。また、血

管組織からエラスチン線維を除去するため、凍結乾燥後、熱架橋処理を施し、続けてエラストーゼ溶液中でエラスチンを分解除去した。

**組織学的評価：**未処理および脱細胞化処理後の組織評価を光学顕微鏡観察、走査型電子顕微鏡（SEM）観察、および透過型顕微鏡（TEM）観察にて行った。組織標本は、通例に従って作成した。

**生化学的評価：**組織内のDNA量は、フェノール/クロロホルム法によりゲノムDNAの抽出し、エタノール沈殿後、紫外-可視分光光度計を用いて算出した。GAG量は、アルシアンブルー結合アッセイにてマイクロプレートリーダーを用いて600 nmの吸光度を測定することにより算出した。

**力学的評価：**ダンベル型に調製した大動脈サンプルを用いて、力学試験機にて単軸引張試験を行った。破断するまで1mm/秒の速度で引張を行った後、応力-歪曲線を作成し、初期、後期の微分係数をそれぞれエラスチン、コラーゲンの弾性率として算出した。

**電氣的評価：**ケミカルインピーダンスメータを使用し、試験片に刺入した電極に交流電流を与えて各周波数における電気インピーダンスを測定した。得られた測定データをPCに保存した後、データ解析を行った。

**石灰化評価：**脱細胞化組織を石灰化加速試験にて検討した。疑似体液（SBF）および血清（FBS）を調製し、3、10、15日間浸漬した後、Kossa染色にて石灰化を評価した。

**保存法の検討：**食用ブタ大動脈組織を、徐冷あるいは急冷した後、凍結乾燥を行った。乾燥後、肉眼にて亀裂などの損傷の有無と変形の程度を観察した。また、組織学的評価および力学的評価を行った。

**細胞化角膜：**食用ブタ眼球を採取し、脱細胞化処理した。組織学的評価、生化学的評価、および透明性評価を行った。透明性評価は、Merriamらの方法に従って、可視領域における角膜の光透過率測定を行った。

**脱細胞化筋：**細胞およびエラスチンを除去したクラウン系ミニブタの大動脈を使用した。スキャフォールド表面にマウス横紋筋由来株化細胞C2C12細胞懸濁液を播種し、分化誘導した。パルス電圧に対する培養筋の周波数応答性を調べるとともに、組織学的評価を行った。

## C. 研究結果

**組織学的評価：**化学処理による脱細胞化を行った大動脈のHE染色写真を図1に示した。トリ

プシン処理およびSDS処理では、光学顕微鏡観察において脱細胞化が確認された。しかし、トリプシン処理ではECMの損傷が激しく、線維の断裂が確認された。また、SDS処理では線維間が有意に拡大していた。

**生化学的評価：**残存DNAの定量結果を図2に示した。組織学評価において脱細胞化が確認された洗浄処理組織においても、DNA定量の結果ではDNA残渣の存在が示された。一方、超高压処理大動脈は、検出限界の残存DNA量であった。

**力学的評価：**各脱細胞化処理による力学特性を図3に示した。いずれの処理でもエラスチンの弾性率が大幅に高くなり、エラスチンは化学処理により硬化が生じることが示唆された。特に、SD処理において、コラーゲンの弾性率、最大破断応力が大きく上昇した。最大応力・最大歪率については、洗浄処理・超高压処理組織どちらも、未処理組織と大きな差がなかった。

**電氣的評価：**脱細胞化処理組織の1 kHz時の電気インピーダンスを図4に示した。未処理組織（Native）に比べて、高压処理による脱細胞化組織（Powergraft）および脱細胞エラスチン除去組織（48時間処理、Deelastin）に方が低い値を示し、脱細胞エラスチン除去組織がもっとも低かった。

**石灰化評価：**結果を図5に示した。未処理の組織では石灰化は観察されなかったが、コントロールとして用いたグルタルアルデヒド固定化組織では、端部において石灰化が確認された。超高压処理を用いた脱細胞化組織では、組織中心部に石灰化が観察されたが、洗浄溶液の成分を変えて行ったところ、は観察されなくなった。

**保存法の検討：**結果を図6に示した。初期弾性率と破断歪率に関しては、コントロールに対して処理による有意な差はみられなかった。しかし、後期弾性率に関しては、-80℃まで徐冷凍結後真空乾燥させた群以外の群でコントロールに対して有意な低下が見られた。

**脱細胞化角膜：**結果を図7に示した。TX処理およびSD処理では、ほとんどの細胞が除去されていなかった。SDS処理では、上皮層部は除去されていたが、実質層では細胞の残存し、コラーゲン繊維の配向も乱れていた。高压処理法は、細胞核の完全な除去が示され、コラーゲン繊維配向の大きな乱れは観察されなかった。また、処理後の透明性の回復について検討したところ、ほぼ透明になったことから、移植時における透明性回復が示唆された。

**脱細胞化筋：**電気パルス刺激による弛緩収縮挙動を図8に示した。印加電気パルスに応じたスキャフォールドの収縮弛緩が確認された。し

た。細胞は細長い形態を示しており、スキャフォールドの長軸と平行に配向している様子が見られたが、スキャフォールド内部への侵入は見られなかった。

なお、動物組織の採取においては、麻酔や鎮痛剤の使用、最小使用数となるような実験計画の立案など、規定に従って実験動物の愛護に配慮した。

#### D. 考察

血管組織の脱細胞化について、高圧処理法と従来の化学処理法とで比較したところ、高圧処理法は、化学処理法に比べて高い脱細胞化効率および組織構造の維持が示された。また、物理特性も生体組織特有の特性の維持が示された。角膜の脱細胞化でも、高圧処理法は非常に有効であった。再生医療用生物由来素材の臨床応用では、移植後の石灰化の検討が重要であるが、長期の動物実験は犠牲死を必要とする上、非効率である。疑似体液への浸漬によって石灰化を検討したところ、動物実験の結果を模擬できることが示された。また、脱細胞化血管への筋芽細胞の播種による筋組織の作成について検討したところ、電気刺激で弛緩収縮する筋組織を作成し得ることが示唆された。これら素材の広範な応用および臨床使用のためには、安全な保存法の確保が必要である。種々の行程による凍結乾燥法について組織学および力学的に検討したところ、徐冷凍結法にて生体組織の組織学的・力学的特性が維持されることが明らかとなった。

#### E. まとめ

欧米では化学処理法によって、既にいくつかのグループが再生型血管や心臓弁、皮膚の臨床応用を開始している。一部では、動物由来組織を用いた臨床応用も行われている。高圧処理法は化学処理法に比べて、種々の組織の脱細胞化に非常に有効であることが示され、特に角膜実質部の脱細胞化は高圧処理法のみが可能であった。本研究終了後の早い時点での臨床応用を実施するとともに、将来の商品化を想定している。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Fujisato T, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Reduction of Antigenicity and Risk of Infection in Regenerative Tissue Transplantation by Cold Isostatic Pressing. *High Press Biosci Biotech* 2007; 1 (1): 161-5.

- 2) Kimura T, Iwai S, Moritan T, Nam KW, Mutsuo S, Yoshizawa H, Okada M, Furuzono T, Fujisato T, Kishida A. Preparation of PVA/DNA hydrogels via hydrogen bonds by ultra high pressure treatment and controlled release of DNA from hydrogels for gene delivery. *J Artif Organs* 2007; 10: 104-8.
- 3) 澤田和也, 寺田堂彦, 藤里俊哉. 繊維と線維 (生体繊維の洗浄と再生医療への展開). *繊維と工業*, 2007; 63 (5): 120-4.
- 4) 藤里俊哉, 北村惣一郎. 心臓弁. 笹 義人監修, 再生医療工学の技術. シーエムシー出版, 2007; 142-7.
- 5) Nam KW, Kimura T, Kishida A. Physical and biological properties of collagen-phospholipid polymer hybrid gels. *Biomaterials* 2007; 28: 3153-62.
- 6) Kimura T, Funamoto S, Kishida A. Gene transfection on the tissue engineered bone decellularized by ultra high hydrostatic pressurization. *Cont Rel Soc Newsletter*, 2007; 24 (2): 10-1.
- 7) Nam KW, Kimura T, Kishida A. Controlling Coupling Reaction of EDC and NHS for Preparation of Collagen Gels Using Ethanol/Water Co-Solvents. *Macromol Biosci* 2008; 8: 32-7.
- 8) 木村 剛, 船本誠一, 橋本良秀, 佐々木秀次, 望月 學, 岸田晶夫, 小林尚俊. 脱細胞化角膜の特性と in vivo 生体適合性評価. 東京医科歯科大学生体材料工学研究年報 2008; 41: 15-7.

##### 2. 学会発表

- 1) Nam KW, Murakoshi A, Kimura T, Fujisato T, Kishida A. Cross-linking and polymer immobilization of decellularized blood vessel for bioscaffold application. The 2007 Annual meeting of The Society for Biomaterials, Chicago, USA, April 18-21, 2007.
- 2) Fujisato T, Funamoto S, Yoshida K, Yamaoka T, Kimura T, Kikuchi M, Kobayashi Y, Kishida A, Nakatani T. Regenerative Tissue Scaffolds Prepared by Gamma Ray Irradiation. The 2007 Annual meeting of The Society for Biomaterials, Chicago, USA, April 18-21, 2007.
- 3) 江橋 具, 永谷憲歳, 橋本成広, 藤里俊哉. 脱細胞化筋スキャフォールドを用いた骨髄由来間葉系幹細胞の筋分化誘導. 第46回日本生体医工学会, 仙台, 2007年4月25~27日.
- 4) 寺田堂彦, 澤田和也, 緒方裕之, 江橋 具, 平工香織, 鎌田和加子, 吉田謙一, 船本誠一, 永谷憲歳, 岸田晶夫, 藤里俊哉, 中谷武嗣. 生体内で自己組織化するバイオ人工血管の開発. 第46回日本生体医工

- 学会、仙台、2007年4月25～27日。
- 5) 寺田堂彦、澤田和也、江橋 具、平工香織、鎌田和加子、永谷憲歳、藤里俊哉、中谷武嗣、吉田謙一、船本誠一、岸田晶夫. 生体内で再細胞化する無細胞バイオ人工血管の開発. 第56回高分子学会年次大会、京都、2007年5月29-31日。
  - 6) Kobayashi H, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki Y, Mochizuki M, Nam KW, Fujisato T, Kishida A. Preparation of decellularized cornea by chemical and physical methods. TERMIS-NA 2007 Annual Conference & Exposition, Toronto, Canada, Jun 13-16, 2007.
  - 7) Terada D, Sawada K, Ogata H, Ehashi T, Hiraku K, Kamata W, Yoshida K, Funamoto S, Nagaya N, Kishida A, Fujisato T, Nakatani T. Development of the vascular graft having an in situ repopulation. TERMIS-NA 2007 Annual Conference & Exposition, Toronto, Canada, Jun 13-16, 2007.
  - 8) Ehashi T, Nagaya N, Hashimoto S, Fujisato T. Effect of stretch culture of mesenchymal stem cells on their differentiation into skeletal muscle cells. TERMIS-NA 2007 Annual Conference & Exposition, Toronto, Canada, Jun 13-16, 2007.
  - 9) Fujisato T, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Regenerative vascular graft for aortic root reconstruction in porcine model. The Society for Heart Valve Disease 4th Biennial Meeting, New York, USA, June 15-18, 2007.
  - 10) 寺田堂彦、藤里俊哉. 移植用生体弁の力学評価. 平成19年度繊維学会年次大会 第9回生命工学材料とバイオテクノロジーに関するシンポジウム、東京、2007年6月20～22日。
  - 11) 藤里俊哉、菊地正博、坂下哲哉、舟山知夫、小林泰彦、船本誠一、木村 剛、岸田晶夫、山岡哲二. 放射線照射による脱細胞バイオスキャフォールドの調製. 第2回高崎量子応用研究シンポジウム、高崎、2007年6月21～22日。
  - 12) Ito Y, Kimura T, Higami T, Fujisato T, Kato A, Masuzawa T, Kishida A. Cell Culture on Nano-Vibrating Surface for Controlling Cell Function. TERMIS-EU 2007 Annual Meeting, London, UK, Sep 4-7, 2007.
  - 13) Kimura T, Okada M, Furuzono T, Yoshizawa H, Fujisato T, Kishida A. Cellular Delivery of DNA-Polymer Complex Encapsulating Inorganic Nanoparticles Prepared by Ultra High Pressurization. TERMIS-EU 2007 Annual Meeting, London, UK, Sep 4-7, 2007.
  - 14) Terada D, Sawada K, Ogata H, Ehashi T, Hiraku K, Kamata W, Yoshida K, Funamoto S, Nagaya N, Kishida A, Fujisato T, Nakatani T. Development of the Regenerative Vascular Graft having in vivo Repopulation. TERMIS-EU 2007 Annual Meeting, London, UK, Sep 4-7, 2007.
  - 15) Murakoshi A, Kimura T, Funamoto S, Fujisato T, Nakatani T, Kitamura S, Kishida A. Effect of the Pressurizing Process on the Decellularized Aortic Tissue Using Ultra High Hydrostatic Pressurization. TERMIS-EU 2007 Annual Meeting, London, UK, Sep 4-7, 2007.
  - 16) Kobayashi H, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Fujisato T, Kishida A. Implantation of porcine cornea decellularized by ultra high pressurization to rabbit cornea. TERMIS-EU 2007 Annual Meeting, London, UK, Sep 4-7, 2007.
  - 17) Ehashi T, Somekawa S, Udagawa H, Fujisato T. Novel cell seeding method for the tissue-derived acellular scaffolds. TERMIS-EU 2007 Annual Meeting, London, UK, Sep 4-7, 2007.
  - 18) Miskon A, Terada D, Ehashi T, Fujisato T, Mahara A, Uyama H, Yamaoka T. Preliminary Study of In Vitro Niche Effect on Differentiation of Rat Bone Marrow Stem Cell to Cardiomyocytes-Like Cells. TERMIS-EU 2007 Annual Meeting, London, UK, Sep 4-7, 2007.
  - 19) Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Fujisato T, Kobayashi H, Kishida A. Preparation and characterization of cornea decellularized by ultra high pressurization. TERMIS-EU 2007 Annual Meeting, London, UK, Sep 4-7, 2007.
  - 20) 船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、南 広祐、望月學、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫. 超高圧処理技術を応用した人工角膜の作製と評価. 第15回生物関連高圧研究会20周年記念シンポジウム、横浜、2007年9月6～7日。
  - 21) 寺田堂彦、藤里俊哉、中谷武嗣、北村惣一郎. 再生型生体弁の特性評価. 日本機械学会2007年度年次大会、吹田、2007年9月9～12日。
  - 22) 大西優貴、川北悠介、山崎健一、藤里俊哉、宇戸禎仁. 筋芽細胞の分化と細胞膜電位の変化. 生体医学シンポジウム2007、札幌、2007年9月21～22日。
  - 23) 林 宏行、山崎健一、小林裕之、宇戸禎仁、江橋具、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 電気パルスによる骨格筋細胞収縮の制御. 第5回生活支援工学系学会連合大会、つくば、2007年10月1～3日。
  - 24) 山崎健一、林 宏行、小林裕之、宇戸禎仁、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 電気パルスを用いた筋管細胞の収縮制御. 第18回バイオフロンティア講演会、福岡、2007年10月6～7日。
  - 25) 近藤英雄、北 孝之、山崎健一、寺田堂彦、橋本成

- 広、藤里俊哉. 電気インピーダンス法を用いた骨格筋の評価. 第18回バイオフィロンディア講演会、福岡、2007年10月6～7日.
- 26) Fujisato T, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Tissue Regeneration by Acellular Scaffolds by Detergent-Free Treatment. Joint meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs and The 2nd International Federation for Artificial Organs, Osaka, October 28-31, 2007.
- 27) Yamasaki K, Hayashi H, Uto S, Ehashi T, Hashimoto S, Tsutsui H, Mochizuki S, Kondo H, Yoshiura M, Fujisato T. Control of skeletal muscle cell contraction by electrical pulse. Joint meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs and The 2nd International Federation for Artificial Organs, Osaka, October 28-31, 2007.
- 28) Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Nam KW, Fujisato T, Nakatani T, Kitamura S, Kobayashi H, Kishida A. Acellular porcine cornea via ultra-high pressurization as a scaffold for regeneration of cornea. Joint meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs and The 2nd International Federation for Artificial Organs, Osaka, October 28-31, 2007.
- 29) Ehashi T, Somekawa S, Udagawa H, Fujisato T. Novel Method for Interspersed Cell Inoculation into the Tissue-derived Scaffold. Joint meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs and The 2nd International Federation for Artificial Organs, Osaka, October 28-31, 2007.
- 30) 山崎健一、寺田堂彦、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 無細胞生体由来組織を用いた筋芽細胞の3次元培養. 第10回日本組織工学会、東京、2007年11月8～9日.
- 31) 船本誠一、橋本良秀、南 広祐、佐々木秀次、望月學、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫. 組織工学的的手法による人工角膜の開発.
- 32) 近藤英雄、北 孝之、寺田堂彦、山崎健一、橋本成広、藤里俊哉. 生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法の基礎的検討. 第29回日本バイオマテリアル学会大会、豊中、2007年11月26～27日.
- 33) 奈良雅尚、山崎健一、寺田堂彦、澤田和也、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. ポリプロピレン繊維を用いた筋芽細胞の三次元培養. 第29回日本バイオマテリアル学会大会、豊中、2007年11月26～27日.
- 34) 佐々木 愛、柿木佐知朗、馬原 淳、中谷武嗣、山岡哲二. 高親水性高分子を用いた人工血管用スキャフォールドの作製と評価. 第29回日本バイオマテリアル学会大会、豊中、2007年11月26～27日.
- 35) 吉川千晶、小林尚俊、南 広祐、木村 剛、岸田晶夫. 濃厚ポリマーブラシ表面のタンパク・細胞の接着特性. 第29回日本バイオマテリアル学会大会、豊中、2007年11月26～27日.
- 36) Fujisato T, Yoshida K, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Tissue-derived Scaffold for Aortic Root Reconstruction. TERMIS-AP Meeting 2007, Tokyo, Japan, Dec 3-5, 2007.
- 37) Kimura T, Horiuchi K, Kurata K, Ono T, Yoshizawa H, Furuzono T, Nam KW, Fujisato T, Kishida A. Preparation of Condensal Plasmid DNA Using High Pressure Technology for Gene Delivery. TERMIS-AP Meeting 2007, Tokyo, Japan, Dec 3-5, 2007.
- 38) Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Nam KW, Fujisato T, Nakatani T, Kitamura S, Kobayashi H, Kishida A. Characterization of acellular porcine cornea by ultra-high pressurization as artificial cornea. TERMIS-AP Meeting 2007, Tokyo, Japan, Dec 3-5, 2007.
- 39) Fujisato T, Terada D, Sawada K, Yoshida K, Kishida A, Miyamoto K, Niwaya K, Nakatani T, Kitamura S. Evaluation of Acellular Scaffolds for Heart Valve Regeneration. 1st Asian Biomaterials Congress, Tsukuba, Japan, Dec 6-8, 2007.
- 40) Saitoh Y, Katanoda M, Yamada H, Fujisato T, Kimura T, Kishida A, Takakuda K. Reconstruction of small diameter arteries using acellular vessel scaffold. 1st Asian Biomaterials Congress, Tsukuba, Japan, Dec 6-8, 2007.
- 41) Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Kimura T, Fujisato T, Kobayashi H, Kishida A. Development of Acellular Cornea as an Artificial Cornea. 1st Asian Biomaterials Congress, Tsukuba, Japan, Dec 6-8, 2007.
- 42) Ehashi T, Hashimoto S, Fujisato T. Acellular Skeletal Muscle Scaffold as an Inducer of Muscular Differentiation. 1st Asian Biomaterials Congress, Tsukuba, Japan, Dec 6-8, 2007.
- 43) Kimura T, Horiuchi K, Kurita K, Ono T, Yoshizawa H, Fujisato T, Kishida A. DNA condensation using hydrostatic pressurization for gene delivery. 1st Asian Biomaterials Congress, Tsukuba, Japan, Dec 6-8, 2007.
- 44) Yoshikawa C, Nam KW, Kimura T, Kishida A, Kobayashi H. Protein and Cell Adhesions on

- Well-Defined Concentrated Polymer Brushes Prepared by Surface-Initiated Living Radical Polymerization. 1st Asian Biomaterials Congress, Tsukuba, Japan, Dec 6-8, 2007.
- 45) 近藤英雄、北 孝之、山崎健一、寺田堂彦、橋本成広、藤里俊哉. 電気インピーダンス法による骨格筋損傷度の評価の試み.
- 46) 林 宏行、山崎健一、宇戸禎仁、小林裕之、江橋具、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 培養筋管細胞の収縮動態の定量評価. 第20回バイオエンジニアリング講演会、東京、2008年1月25~26日.
- 47) 山崎健一、寺田堂彦、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 無細胞生体由来組織を基材としたバイオアクチュエータの開発. 第20回バイオエンジニアリング講演会、東京、2008年1月25~26日.
- 48) Fujisato T, Terada D, Funamoto S, Minatoya K, Kishida A, Yamaoka T, Nakatani T, Kitamura S. Tissue Regeneration by Decellularized Biological Scaffold Prepared by Detergent-free Treatment. Biologic Scaffold for Regenerative Medicine, 5th Symposium, Phoenix, USA, Feb 14-18, 2008.
- 49) Kishida A, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Kobayashi H, Fujisato T. Preparation and Characterization of Decellularized Porcine Cornea for the Corneal Tissue Engineering. Biologic Scaffold for Regenerative Medicine, 5th Symposium, Phoenix, USA, Feb 14-18, 2008.
- 50) 藤里俊哉、寺田堂彦、湊谷謙司、山崎健一、林 宏行、江橋 具、小林尚俊、岸田晶夫、山岡哲二、中谷武嗣、北村惣一郎. 異種組織をテンプレートとする組織再生技術の開発. 第11回日本異種移植研究会、吹田、2008年2月23日.
- 51) 藤里俊哉、寺田堂彦、湊谷謙司、山崎健一、林 宏行、近藤英雄、江橋 具、小林尚俊、岸田晶夫、山岡哲二、中谷武嗣、北村惣一郎. 生体由来素材スキャフォールドを用いた臓組織再生. 第36回人工心臓と補助循環懇話会、湯沢、2008年3月7~8日.
- 52) 橋本良秀、船本誠一、佐々木秀次、望月 學、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫. 脱細胞化角膜の組織適合性評価. 第7回日本再生医療学会総会、名古屋、2008年3月13~14日.
- 53) 村越彩子、木村 剛、船本誠一、藤里俊哉、岸田晶夫. 力学特性の制御を目指した脱細胞化血管の調製. 第7回日本再生医療学会総会、名古屋、2008年3月13~14日.
- 54) 寺田堂彦、澤田和也、緒方裕之、平工香織、鎌田和加子、吉田謙一、船本誠一、藤里俊哉、岸田晶夫、山岡哲二、中谷武嗣. 脱エラスチン化血管組織をスキャフォールドとして用いた動脈組織再生. 第7回日本再生医療学会総会、名古屋、2008年3月13~14日.
- 55) 玉井克明、藤里俊哉、岸田晶夫、山岡哲二. 血管組織の新規脱細胞化処理法の検討. 第7回日本再生医療学会総会、名古屋、2008年3月13~14日.
- 56) 北 孝之、近藤英雄、寺田堂彦、山崎健一、橋本成広、藤里俊哉. 電気インピーダンス法を用いた培養筋成熟度の評価の試み. 第7回日本再生医療学会総会、名古屋、2008年3月13~14日.
- 57) 奈良雅尚、山崎健一、寺田堂彦、澤田和也、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. ポリプロピレン繊維-コラーゲン複合体を用いた筋芽細胞の三次元培養. 第7回日本再生医療学会総会、名古屋、2008年3月13~14日.
- 58) 山崎健一、寺田堂彦、奈良雅尚、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 脱エラスチン組織-コラーゲン複合体を足場としたC2C12細胞の3次元培養. 第7回日本再生医療学会総会、名古屋、2008年3月13~14日.
- 59) 赤土和也、山崎健一、出谷 耕、中尾 誠、吉浦昌彦、藤里俊哉、筒井博司. 骨格筋培養のための機械刺激負荷装置の開発. 第7回日本再生医療学会総会、名古屋、2008年3月13~14日.
- 60) 林 宏行、山崎健一、小林裕之、宇戸禎仁、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 電界に対する培養筋管細胞の異方性. 第7回日本再生医療学会総会、名古屋、2008年3月13~14日.
- 61) 西山慶子、川北悠介、林 宏行、山崎健一、宇戸禎仁、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 細胞への電気刺激を目的とした電位分布の測定. 第7回日本再生医療学会総会、名古屋、2008年3月13~14日.
- 62) 近藤英雄、北 孝之、寺田堂彦、山崎健一、橋本成広、藤里俊哉. 生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法の検討. 第7回日本再生医療学会総会、名古屋、2008年3月13~14日.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許
- 1) 岸田晶夫、藤里俊哉、木村 剛、船本誠一. 脱細胞処理液、脱細胞化組織の調製方法、移植片、及び培養部材. 特願2007-217099、2007年8月23日.
- 2) 岸田晶夫、木村 剛、南 広祐、藤里俊哉. 機能性DNAの製造方法、形質転換体及び疾患治療剤. 特願2007-263704、2007年10月9日.
- 3) 藤里俊哉、岸田晶夫、船本誠一、中谷武嗣、北村惣一郎. 超高静水圧印加による移植用生体組織の処理方法. 特許第4092397号、2008年3月14日.
2. 実用新案登録  
なし
3. その他
- 1) 他人の頭皮で毛再生、朝日新聞、2008年2月1日.

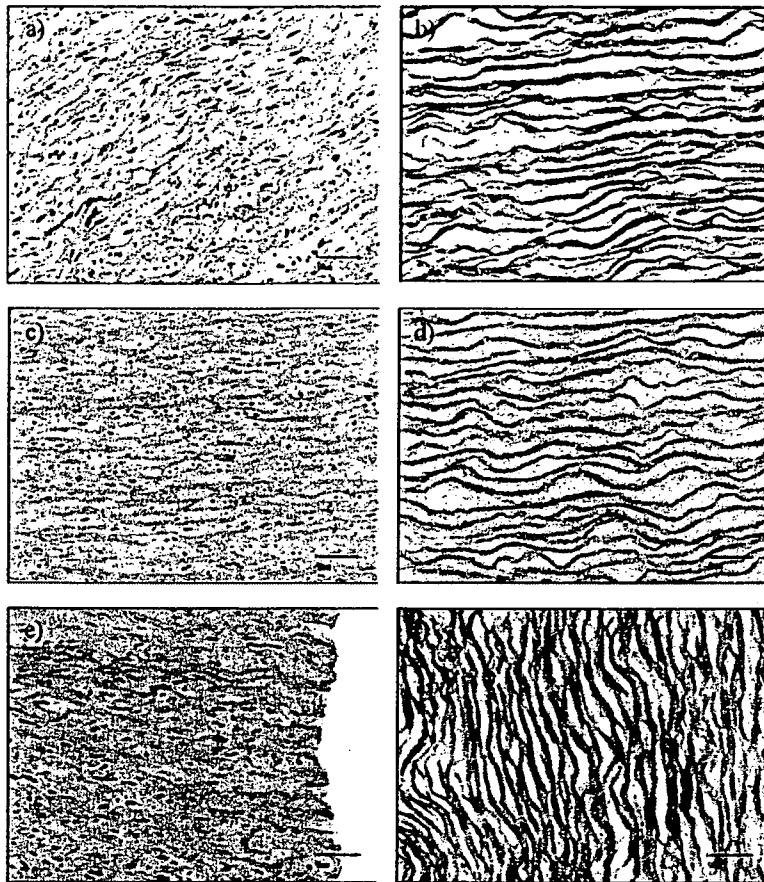


図1. 各脱細胞化処理組織のHE染色写真 (スケールバー: 50 $\mu$ m)  
 (a) 未処理, (b) 超高压処理, (c) TX処理, (d) SDS処理, (e) SD, (f) トリプシン処理

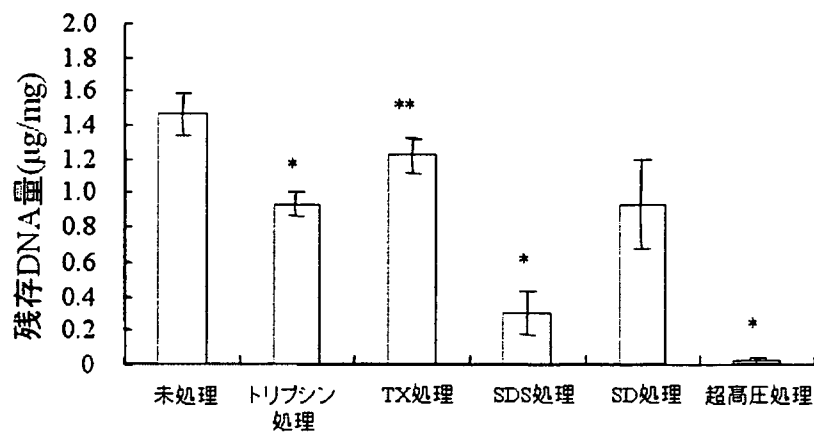


図2. 各脱細胞化処理組織における残存DNA濃度 (\* $P < 0.01$ , \*\* $0.01 < P < 0.05$ )



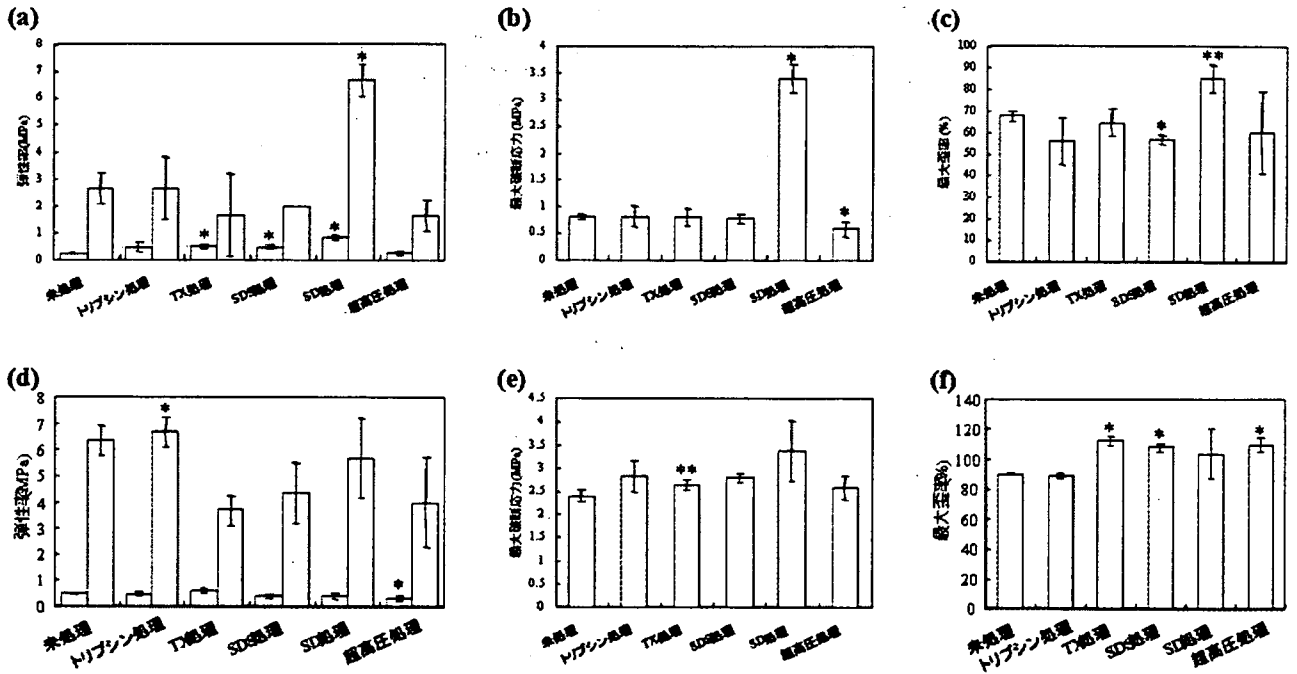


図3. 各脱細胞処理によるブタ大動脈の力学特性の変化  
 (a) エラスチン・コラーゲンの弾性率 (長軸)、(b) 最大破断応力 (長軸)、(c) 最大歪率 (長軸)

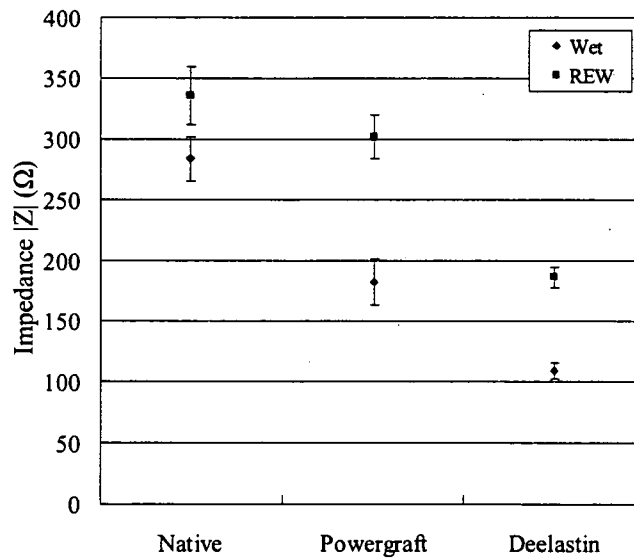


図4. 各組織の電気インピーダンス (Wet : 湿潤状態、REW : 風乾状態)

SBF

Treatment method	Decellularization	Ca deposit		
		3 days	10 days	15 days
Trypsin	○	not	not	not
Triton X-100	x	not	not	not
SDS	⊙	not	not	not
Sodium deoxycholate	x	not	not	not
UHP(5 °C/2-10-2)	⊙			
UHP(30 °C/15-10-15)	⊙			

FBS

Treatment method	Decellularization	Ca deposit		
		3 days	10 days	15 days
Trypsin	○	not	not	not
Triton X-100	x	not	not	not
SDS	⊙	not		
Sodium deoxycholate	x	.	not	
UHP(5 °C/2-10-2)	⊙			
UHP(30 °C/15-10-15)	⊙			

図5. 各脱細胞化処理組織を用いた石灰化加速試験

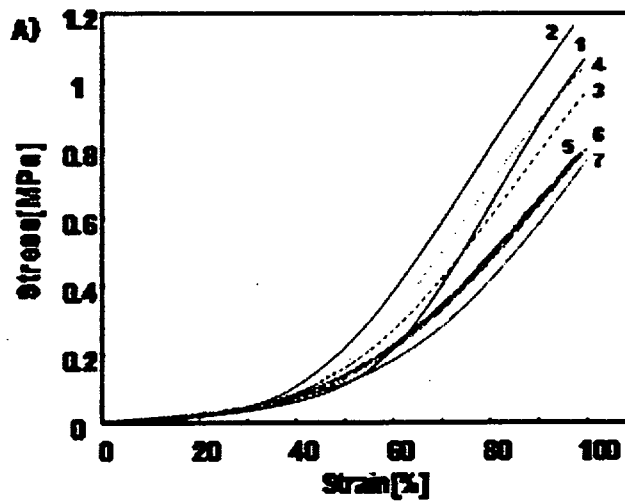


図6. 凍結乾燥処理した大動脈の力学特性

(1 : 未処理大動脈、2 : -80°C 徐冷後に凍結乾燥、3 : -20°C 徐冷後に凍結乾燥  
 4 : -196°C 急冷後に凍結乾燥、5 : -80°C 急冷後に凍結乾燥、6 : -20°C 急冷後に凍結乾燥  
 7 : シリカゲル室温乾燥)

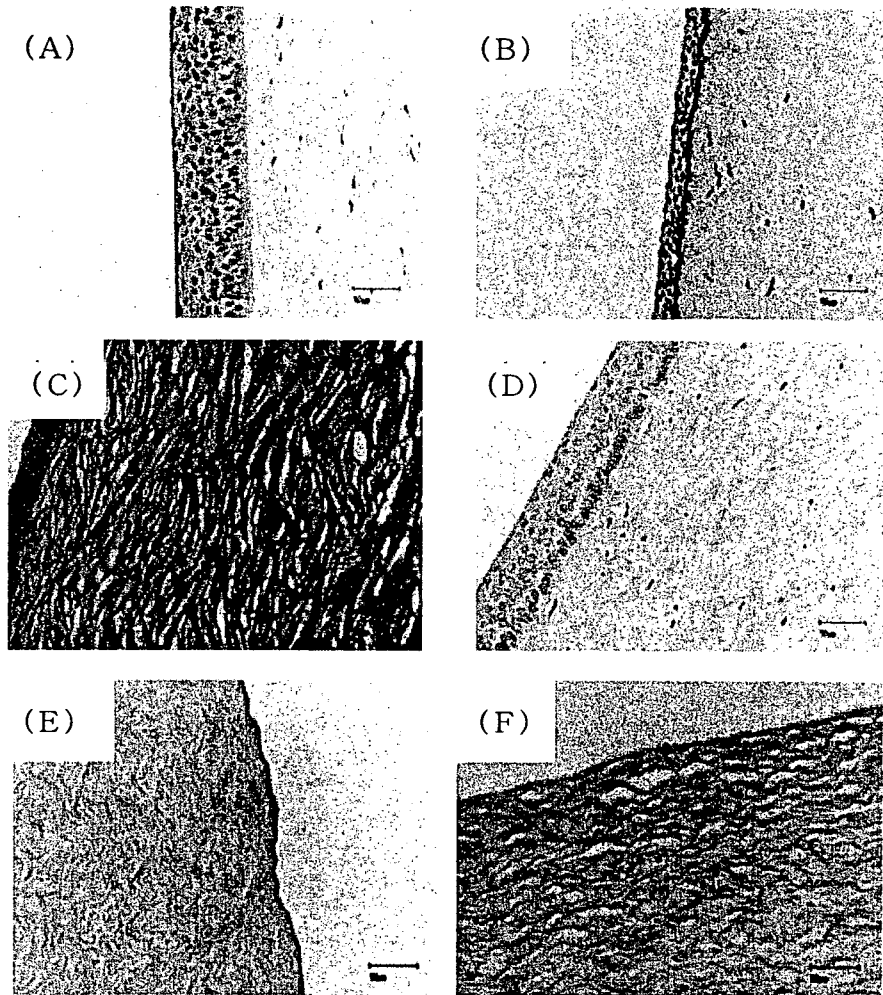


図7. 脱細胞化したブタ角膜のHE染色

(A: 未処理、B: Triton X-100、C: SDS、D: コール酸ナトリウム、E: 4000気圧、F: 10,000気圧)

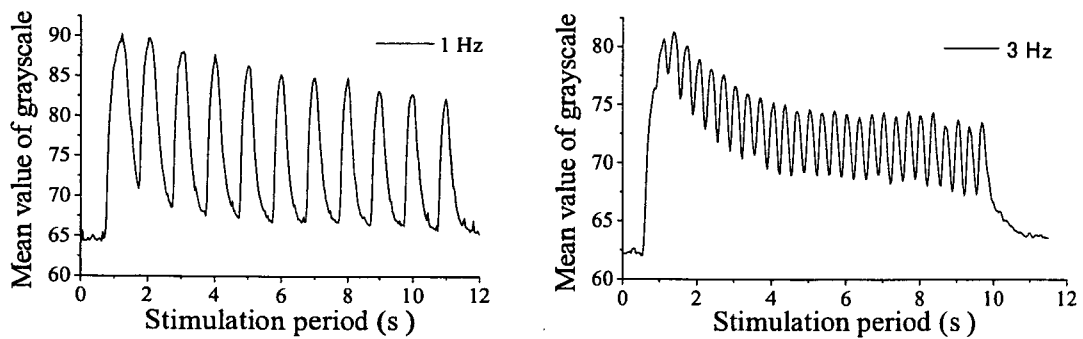


図8. 培養筋管細胞の電気刺激による弛緩収縮

## 細菌性ベクター及び粘膜アジュバントを用いた新興・再興感染症に対する新規予防・治療法の開発

所属 国立感染症研究所 血液・安全性研究部  
研究者 前山 順一

研究要旨 BCG亜株間に多くの差違が見出された。効果・副反応との関連解明のため、更に分子・遺伝子レベルで比較検討を行う必要がある。また新規予防・治療法開発のためにワクチン用ベクター・アジュバントの有効性・安全性、病原因子解析等の基礎的な検討を行った。

### 分担研究者

- |                     |      |
|---------------------|------|
| (1) 日本ビーシージー製造(株)   | 矢野郁也 |
| (2) (株)クマベ研究所       | 山本三郎 |
| (3) 国立感染症研究所        | 網康至  |
| (4) (財)結核予防会 結核研究所  | 菅原勇  |
| (5) 福井大学 医学部        | 伊保澄子 |
| (6) 名古屋市立大学大学院薬学研究科 | 瀧井猛将 |
| (7) 大阪市立大学大学院医学研究科  | 藤原永年 |
| (8) 名古屋市立大学大学院医学研究科 | 井坂雅徳 |

### A. 研究目的

世界規模で新興・再興感染症が深刻化している。中でも新興感染症である HIV 感染者数は世界的な規模で増加を続けており、新規感染者の90%以上は開発途上国に居住している。これらの国々は結核の高蔓延国でもあり、結核と HIV 感染のつながりは、結核蔓延の要因の一つと考えられる。結核と HIV の重感染は、免疫力の低下から結核重症化の可能性が増すと考えられる。近年、HIV 感染者の効果的な治療法が開発されてきたが、莫大なコストがかかるため、発展途上国の人々にとってその恩恵を享受するのは困難と考えられ、HIV を取り巻くさまざまな現状を考慮すると、安全かつ効果的なコストの安いワクチン開発が望まれている。

一方、全世界人口の約 3 分の 1 が感染し、毎年多くの新規患者と死亡が確認されている結核

は、エイズやマラリアと並び世界規模での対応が求められている主要な再興感染症である。BCG は結核に対する唯一の予防ワクチンであるが、分与後多くの亜株が派生している。また小児の結核性髄膜炎や粟粒結核には極めて有効であるが、成人の肺結核の発症予防効果は十分ではないといわれている。しかし現在までに BCG を凌駕する新ワクチンは実用化していないため、WHO はワクチン開発を推進する一方、BCG を再評価するため、亜株の性質を分子レベル、遺伝子レベルで明らかにするよう国際共同研究が行われようとしている。しかし日本株 BCG の多様性については世界的に行われておらず独自に解明する必要がある。BCG は結核ワクチンとして用いられるほか、組換えワクチンの有用なベクターとしての役割がある。BCG に HIV 遺伝子を組み込んだリコンビナントワクチンは、HIV に対する効果ばかりでなく、結核免疫の誘導にも効果がもたらされることが考えられる。

これまでワクチンは種々の感染症の予防に多大の貢献をしてきた。しかし従来の注射法によるワクチン投与では、感染の最初のバリアーとなるべき粘膜面での防御に関しては、十分に期待できない。粘膜ワクチンの開発には、病原因子を特定することによる有効な抗原の選定ばかりでなく、有効で安全なアジュバントの開発が必須である。経口投与が可能なベクター系の開

発応用とともに、これを目的とした TLR 系に作用する新規アジュバントの研究を更に進めたい。しかしながら結核ワクチンおよび粘膜投与型ワクチンの研究は、世界各国で活発に行われているが、いずれも開発段階であり、新ワクチンとして採用されるには長い年月が必要である。現在も増え続ける結核感染患者に対して迅速に効果を上げるためには現行 BCG ワクチンをいかに有効に用いるかということも一つの新規の手段である。BCG の多様性解析を通じてこれを達成するのは本研究の目的の一つである。これに加え、細菌ベクター系やアジュバントの開発を進め、新規予防・治療法の開発に至ることを目的とする。

今年度は、BCG 亜株において、細胞壁成分（ミコール酸等）、生化学的反応等の解析を行い、更に日本株 BCG である BCG Tokyo-172 の遺伝子領域 RD16 が異なっているサブポピュレーション I 型 (BCG-I) と II 型 (BCG-II) について検討を加えた。また、広く応用できるワクチン開発の基礎的な研究として、細菌ベクター系の開発、安全性等の検討、感染細胞への CpG-DNA の作用、食細胞を用いて再興感染症のひとつである劇症型連鎖球菌症の病原因子の解析を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### I. BCG の多様性について

1) 菌株 : *Mycobacterium bovis* BCG 亜株 (Australia, Connaught, Danish, Glaxo, Mexico, Moatral, Pasteur, Phipps, Russia, Tice)、Australia vaccine seed、Sweden 株は山本三郎博士より供与された。BCG Tokyo 株 BCG-I 及び BCG-II は日本 BCG 研究所より供与された。*Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv、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。*Mycobacterium tuberculosis* AoyamaB, *M. bovis* BCG Tokyo172, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. phlei*, *M. flavescens* は ATCC より購入した。

### 2) BCG 亜株のミコール酸の解析

集菌した死菌体を超音波破碎後、脂質画分を抽出した。菌体残渣を 1 M 水酸化テトラブチル

アンモニウム溶液でアルカリ加水分解し、中和後ヘキサン抽出によりミコール酸画分を分取した。薄層クロマトグラフィー (TLC) で展開し、その移動度から各種ミコール酸サブクラスを検出同定し、デンストメーターによりサブクラスの組成比を検討した。TLC 上の単一スポットを精製した各サブクラスミコール酸メチルエステルを MALDI/TOF/MS 分析し、質量数を測定した。TLC での移動度と質量数から各ミコール酸の分子種を同定した。

### 3) BCG 亜株のトレハロース付加ミコール酸 (TDM) の解析と生物活性

TDM は、加熱死菌体より溶媒を用いて脂質を抽出し、主として TLC によって TDM を精製した。TDM のミセルは FIA 存在下で Tween80 及び PBS を加え調整し、粒度分布計で測定した。マウスに対する毒性は、TDM300 $\mu$ g をエマルジョンで尾静脈より投与し、体重測定、1 週後の臓器の重量を測定し、肉芽腫形成能を調べた。組織学的検討をした。更に、胸腺皮質リンパ球について TUNNEL 法によりアポトーシス誘導を調べた。

### 4) BCG 亜株の生化学的試験における比較

ナイアシン試験 : 小川培地で培養し十分な菌量がある培地上に熱した超純水を注ぎ、ナイアシンの抽出を行った。抽出液を密栓可能な小試験管に移し、ナイアシン検出用試験紙を用い、陽性コントロール液と抽出液の色調とを比較した。更に硝酸塩還元試験および鉄イオン取り込み試験を行い株間の比較を行った。

### 5) BCG 亜株のヒト由来培養細胞に対する炎症性メデイエーター誘導能の比較

ヒト肺胞上皮細胞株 A549、ヒト単球系培養細胞株 U937 に BCG を MOI=10 で感染させ、一定時間後に培養上清を回収し、ろ過滅菌後、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IP-10 について市販のサイトカイン測定キット (BD Biosciences) で測定した。

### 6) BCG-I と BCG-II のゲノムの差異

サブプレッションサブトラクト法 (クロンテック社製) を用いて、濃縮された DNA 断片をクローニングベクターに挿入し、その配列を決定する。さらに確認のため、BCG-I と BCG-II それぞれのゲノム該当部位に対して PCR で領域の長さを確認するとともに、得られた断片をプローブ

としたサザン法で差異の確認を行なった。

#### 7) BCG-IとBCG-IIのDNA受容菌としてのキャラクター化

I型、II型株へのプラスミドDNAの導入を、常法により電気穿孔法でI型、II型株それぞれに導入し、カナマイシン含有7H10-OADC寒天培地上でのコロニー形成をさせた。更に増殖させ、抽出したプラスミドについて、RD16領域のPCRによるI型 (379 bp) とII型 (401 bp) のタイピングを行った。

#### 8) BCG-IとBCG-IIの遅延型過敏反応 (DTH) による解析

マウス及びモルモットに対し、 $10^3$ から $10^6$  CFU/匹のBCGを皮下投与し、6週後にPPD投与による足蹠反応 (マウス)、硬結など皮膚反応 (モルモット) を観察した。

### II. 組換え BCG ベクター系の開発と応用

#### 1) エイズワクチンの開発

HIV-1 92TH022株感染性分子クローンを鋳型として、Gag発現ベクター (pS0-Th22gag) 及びEnv発現ベクター (pS0-Th22env) を得た。さらにGagとEnvの両方の発現カセットを組み込んだpS0-EnvGagを構築した。ついでBCGへの遺伝子導入と組換えBCG株のウエスタンブロット解析を行った。

#### 2) 栄養要求性を指標とする新しい抗酸菌の宿主-ベクター系開発

カナマイシンなど薬剤耐性遺伝子をマーカーとして使用しない栄養要求性 (チミン要求性) を指標とした BCG 宿主-ベクター系の構築を行った。

#### 3) BCG ベクターの安全性と安定性について

カナマイシン含有または非含有の小川培地を用いた熱安定性の試験、生物学的製剤基準に基づく有毒結核菌否定試験 (モルモット) を行い、さらに凍結乾燥リコンビナント BCG ワクチン (日本ビーシージー製造) を静脈接種したヌードマウスから各臓器を経時的に採取し、12 週目まで生菌コロニー・プラスミドの検出を行った。

#### 4) BCG ベクターの品質管理について

モルモット (slc:Hartley) のサイトカイン遺伝子クローニングは、脾臓から分離した単核球を、PMA 及び Ionomycin で刺激し、常法に従ってその細胞より全 RNA を分離し、cDNA を合成、ゲノム

バンクから得た既知のシーケンスから作成したプライマーを用いて、PCR 法で行い、pGEM-T Easy vector への挿入により行った。

#### 5) 組換え BCG の動物モデルによる有効性・安全性について

今年度は、BCG による予備実験を行った。中国武漢大学実験動物センターで飼育された old tuberculin 反応陰性のアカゲサル (雄、8.5-9kg、6 頭) を 2 群に分け結核菌感染実験に使用した。第 1 群は、PBS を、第 2 群は、BCG Tokyo を 50 万 CFU 皮内に接種した。8 週後、3,000CFU の結核菌 H37Rv を気管内接種した。感染後 1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月後、それぞれ old tuberculin test、結核血清診断、血沈、胸部 X 線写真を行い、生存率を調べた。また 6 ヶ月後に解剖を行い、肺組織、脾組織より結核菌数を求め、さらに各組織の臓器内肉芽腫の有無を調べた。

### III. TLR 制御を取り入れた新規 DNA アジュバントの開発

#### 1) オリゴ DNA

palGACGA0901 (G9.1):

5'-GGGGGGGGGACGATCGTCG-3'

(開発したヒト型非修飾タイプで、pDC に IFN- $\alpha$  を強く誘導する。)

#### 2) ウイルス感染と CpG の評価

ヒト形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells, pDC) を末梢血より精製し、IFN- $\alpha$  産生能のあるウイルスとして A 型インフルエンザウイルス (IAV)、ニューカッスル病ウイルス (NDV)、IFN- $\alpha$  産生能のないウイルスとして RS ウイルス A2 株 (RSV) を試験管内で感染させ、培養上清中のサイトカインを Biosource 社の測定キットを用いて測定した。遺伝子発現の解析は、RT-PCR 法及びルシフェラーゼ法を用いたレポーターアッセイを用いた。

### IV. 劇症型連鎖球菌の病原因子の特定

#### 1) マクロファージ及び多形核白血球による食菌作用について

ICR マウスより、チオグリコレド培地により誘導した腹腔マクロファージ (M $\phi$ )、またはカキグリコーゲンにより誘導した多形核白血球 (PMN) を採取し、劇症型連鎖球菌の食菌作用観

察のために使用した。

A 群連鎖球菌;SF370 株、劇症型 A 群連鎖球菌：第一世代 1592 株、第二世代 GT01 株を、ブレインハートインフュージョン(BHI)培地で 37°Cで前培養と本培養した。本培養菌体は、RPMI1640 培地で遠心洗浄し食菌用細菌とした。培養上清は、細胞内ラジカル測定に使用した。

食細胞へ菌体を添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub> で 20 分間食菌させ、直ちにゲンタマイシン添加、遠心洗浄し、食菌されない菌体を除去した。各細胞は、滅菌蒸留水を添加し細胞を溶解後、BHI 寒天に塗布し培地上で食菌数を求めた。

### 3) 遺伝子欠損株に対する食菌作用について

A 群連鎖球菌で、既存の病原因子として公表されている Mga、Nga、Emn、Sic については、第二世代 GT01 株で各遺伝子の欠損株を作製し、Mφ、PMN での食菌作用を調べた。

### 4) PMN に対する細胞障害性について

PMN を各菌体とともに培養し、培養上清の乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)活性を測定した。これより PMN 細胞障害活性を算出した。

### 5) 殺菌作用に対する抵抗性測定について

劇症型連鎖球菌の食菌後、Mφ内でラジカルによる殺菌が行われているかを観察し、食菌された後の殺菌作用に対する抵抗性の有無を観察した。Mφと各菌体培養上清を混合培養後、食菌作用測定用のマイクロビーズを食菌させ、細胞内ラジカルによる化学発光をルミノメーターにより測定した。

### 6) 劇症型連鎖球菌の溶血反応測定

羊血液は市販品を、ヒト血液は分担研究者本人の自己血を使用し、菌体及び培養上清を 2 倍系列希釈した後混和し反応させた。ストレプトリジン O(SLO)の関与の有無、SLO 以外の因子の有無を比較検討するため、各菌体および菌体培養上清をジチオスレイトール(DTT)で還元し SLO を活性化した。また活性阻害剤のコレステロールを添加して SLO 以外の因子の関与を観察した。

### (倫理面への配慮)

本研究計画は実験動物を用いて行う部分が含まれる。国立感染症研究所においては動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、審査許可を受けた後、動物実験に関する実験指針に従い実

験を実施する。その他の機関でも所属機関の規程に従い、実験を実施する。すべての動物実験は麻酔下で行い、採材時には適当な方法で安楽殺に導き、動物福祉の上で充分配慮して、苦痛を与えないようにして実験を遂行している。

ヒト血液は、所属機関の規定に基づき、医学部倫理審査委員会の承認を得た上で、患者に文書および口頭にて研究の趣旨と使用方法およびプライバシーの保護について十分説明し、同意協力を得たうえで提供を願い使用する。その際、人権および利益の保護について充分配慮する。供血者の健康状態は予め学内臨床研究協力者がチェックし、感染症患者の血液は用いない。

病原体は所属機関の規程に従い、現有の P2 及び P3 実験室において扱う。

## C. 研究結果

### I. BCG の多様性について

#### 1) BCG 亜株のミコール酸の解析

14 種類の BCG 亜株と親株である B10 株および Ravenel 株のミコール酸サブクラスの分布を TLC で比較検討した。親株である B10 株は、 $\alpha$ -methoxy-, keto-ミコール酸の 3 つのサブクラスが存在した。BCG 亜株のミコール酸サブクラスを比較した結果、5 株 (Russian, Brazilian, Japanese, Swedish, Birkhaug 株) が親株の B10 株と同様のミコール酸サブクラスであったが、残りの 9 株 (Danish, Glaxo, Mexican, Tice, Montreal, Connaught, Phipps, Australian, Pasteur 株) は methoxy-ミコール酸が欠失し、 $\alpha$ -keto-ミコール酸のみであった。牛型結核菌の強毒株である Ravenel 株は B10 株や BCG 亜株とミコール酸サブクラスの組成比が異なり keto-ミコール酸の合成が減弱化しており、 $\alpha$ -methoxy-ミコール酸の比率が高くなっていた。これは非常に特異的で keto-ミコール酸の生合成経路、病原性の解明に有用であると考えられた。

次に、質量数を MALDI/TOF/MS で測定した。Matrix として chloroform/methanol (1:1, by vol.) に溶解した 10 mg/ml 2,5-dihydroxy benzoic acid (DHB) を用いることにより良好なスペクトルが得られた。methoxy-ミコール酸および keto-ミコール酸では BCG 亜株間で特筆すべき差は見られなかった。 $\alpha$ -ミコール酸では菌種により偏りが認められた。

サブクラスの組成比は、人型結核菌の強毒株 H37Rv, Erdman 株が  $\alpha$ >methoxy>>keto であるのに対し、牛型結核菌 B10, Ravenel 株が  $\alpha$

<methoxy>>keto、BCG 亜株は  $\alpha \approx$ methoxy<<keto あるいは  $\alpha$ <<keto となった。BCG 亜株は、人型結核菌、牛型結核菌と異なり、keto-ミコール酸の組成比が高くなっているのが特徴であった。

BCG Tokyo 172 株の I 型、II 型についても同様のミコール酸解析を実施したが、ATCC 由来株も含め、構成ミコール酸のサブクラス、組成比、分子種は同じであった。

## 2) BCG 亜株のトレハロース付加ミコール酸 (TDM) の解析と生物活性

TDM ミセルは、ヒト結核菌、Connaught 株での粒度が大きく、wax-ester mycolic acid を含む TDM は、一般に粒度が小さかった。ヒト結核菌 TDM は、強い肉芽腫形成能と体重減少を示したが、BCG 株は弱かった。ヒト結核菌、*M. kansasii* で顕著な胸腺萎縮とアポトーシスが認められた。

## 3) 生化学的試験における BCG 亜株間の相違

ナイアシン試験、硝酸塩還元試験および鉄イオン取り込み試験を行ったところ、ナイアシン試験では、Russia 株、Tokyo 株、Sweden 株、Birkhaug 株など比較的早い段階で分与された BCG 株が陽性になる傾向にあった。一方で、分与の遅い BCG 株すなわち RD2 が欠失している株では陰性となる傾向にあった。後期に分与された RD2 欠失株である Australia 株、Connaught 株は陽性を示した。硝酸塩還元試験においては、BCG-Phipps を除くすべての株で陰性であり、鉄イオン取り込み試験はすべての株は陰性であった。

## 4) BCG 亜株のヒト由来培養細胞に対する炎症性メディエーター誘導能の比較

A549 細胞においては IL-6、IP-10、および TNF- $\alpha$  の産生量は亜株間にあまり差が見られないのに対して、Danish 株、Pasteur 株、Russia 株感染細胞での IL-8 産生量は低く、一方で Connaught 株、Tokyo 株、および Moreau 株感染細胞では 3 倍程度の IL-8 産生がみられた。また、IL-1 $\beta$  産生量は Pasteur 株、Tokyo 株、および Moreau 株で産生量が高かった。BCG 感染 U937 細胞でもほぼ同様の結果が得られた。

## 5) BCG-I と BCG-II のゲノムの差異

ゲノムの差異を調べるためにサブプレッションサブトラクト法を用い、BCG-I と BCG-II ゲノム DNA を鋳型に PCR を行なったが、両 Type で増幅断片にサイズに差のあるものはなかった。

## 6) BCG-I と BCG-II の DNA 受容菌としてのキャラクタリゼーション

組換え BCG の作製に用いている東京株シードロットは、I 型、II 型の混合物であることが明らかになっているが、それらの株によって形質転換効率、導入されたプラスミド DNA の安定性、外来抗原発現能等が異なるかどうかを、HIV-1 Gag 及び Gag 変異体発現プラスミドを用いて調べた。野生型 Gag 発現プラスミドでは、コロニー数、プラスミドの安定性について I 型 II 型で大差がなかったが、Gag の N 末端の 2 アミノ酸を PheSer (野生型は GlyAla) に置換した変異体発現プラスミドでは、II 型で多数のコロニーを生成するものの、プラスミドを欠失した形質転換体が多く観察され、DNA の安定性に差がある可能性が示唆された。

## 7) BCG-I と BCG-II の遅延型過敏反応 (DTH) による解析

モルモットの皮膚反応では、 $10^3 \sim 10^5$ CFU/匹で BCG -I の方が強い反応を示した。一方、マウスについては  $10^3$  CFU/匹で DTH を示さず、また  $10^5$ CFU/匹でも明確な結果が得られなかった。

## II. 組換え BCG ベクター系の開発と応用

### 1) エイズワクチンの開発

Gag 発現ベクター pS0-Th22gag を導入した株のコロニー生育速度はほぼ正常であったが、Env 発現ベクター (pS0-Th22env または pS0-EnvGag) を導入した株の生育は極めて遅く、Env 遺伝子発現によって菌に何らかのストレスがかかっていることを示唆した。pS0-Th22gag 及び pS0-EnvGag による形質転換株を 7H9-ADC 液体培地で培養し、菌体抽出液のウエスタンブロット解析を行ったところ、前者では Gag 単独、後者では Gag と Env 抗原の両方の発現が認められ、BCG に Gag、Env の両方を同時に発現させることが可能であることがわかった。

### 2) 栄養要求性を指標とする新しい抗酸菌の宿主-ベクター系開発

BCG Tokyo 株をもとに *thyA* あるいは *thyX* 欠損型遺伝子のゲノム上への挿入と、その後のゲノム内における相同組換えにより *thyA* 欠損株および *thyX* 単独欠損株の作製を試みたところ、理論どおり、いずれの欠損株を得ることができた。チミジル酸合成酵素を選択マーカーとしたベクター構築のため、プラスミドの抗酸菌、大腸菌



それぞれに対する複製起点の最小領域について PCR を応用して調べたところ、抗酸菌での複製起点として pAL5000 最小領域 1.65 kb、大腸菌での複製起点として pUC19 の最小領域 1.1 kb を決定した。両断片、PaphII (PaphII プロモーター)-thyA、および PaphII-thyX からなるプラスミドを大腸菌チミン要求株に形質転換し、最小培地 M9 平板培地上でコロニーを得た。これらのクローンはプラスミドを保持していた。

### 3) BCG ベクターの安全性と安定性について

リコンビナント BCG のいずれの試料の場合も、カナマイシンの含有、非含有培地間で生菌コロニー数に有意差は認められなかった。有毒結核菌否定試験では進行性結核病変その他の異常は全く認められなかった。ヌードマウスに接種したとき、各臓器からの生菌コロニー数は一時的に 2 週目に増加した後、12 週目まで定常的に推移した。プラスミドは、接種後 12 週目まで認められ、脱落することなく安定に存在することが示唆された。

### 4) モルモットによる品質管理方法の検討

細胞性免疫の指標となるサイトカインを検出するための抗体作成を目的として、モルモットサイトカインの遺伝子のクローニングを行った。Th1 型リンパ球の産生する 3 種のサイトカイン (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2)、及び IFN- $\gamma$  の産生誘導能を有する IL-18 のクローニングを行った。クローニングしたサイトカインのアミノ産配列を報告されている配列と比較すると、クローニング産物では、IL-2 では aa141 に変異が認められた。

### 5) 組換え BCG の動物モデルにおける有効性・安全性について

今年度は BCG を用いて予備実験を行った。結核菌感染後 2 ヶ月を過ぎてから第 1 群のアカゲサルは、死亡し始めた。死亡個体は凍結保存した。結核血清診断の結果は、感染後 1 ヶ月で第 1、2 群とも陰性だったが、2 ヶ月では陽性で、第 2 群のほうが弱かった。old tuberculin の反応も同様であり、第 1 群で血沈は促進された。肺内の結核菌数は、第 2 群で第 1 群の 1/100 の  $10^6$  のオーダーであり、統計的に有意差が認められた。脾内の結核菌数は有意差は認められなかった。胸部 x 線写真は感染後 2 ヶ月で第 1 群に肺

炎像、小結節陰影が認められたが、第 2 群では肺炎像のみが見られた。第 1 群の肺、脾、肝に肉芽腫が見られ、中心性壊死が見られたが、第 2 群では少数の肉芽腫が見られたのみであった。

### III. TLR 制御を取り入れた新規 DNA アジュバントの開発

#### 1) 微生物感染 pDC の CpG DNA 反応性について

A 型インフルエンザウイルス (IAV) やニューカッスル病ウイルス (NDV) を添加して培養した pDC の培養上清には、CpG DNA 刺激 pDC をうわまわる量の IFN- $\alpha$  が検出された。しかし、RSV 感染 pDC の培養上清には IFN- $\alpha$  は検出されなかった。同上清中に m. o. i 数に比例して IL-8 が検出された。

RSV の IFN- $\alpha$  誘導欠如の機構を明らかにするために、IFN- $\alpha$  遺伝子の転写因子 Interferon regulatory factor (IRF)-7 の発現について検討した。その結果、RSV 添加 pDC では IRF-7 の mRNA および蛋白が誘導されていることが示された。RSV が IRF-7 活性化の経路を制御している可能性を考え、IRF-7 活性化の最終産物である IFN- $\alpha$  の産生量を測定することにより、RSV の IRF-7 活性化抑制作用を評価した。

pDC に RSV と CpG DNA を同時添加し、培養上清中の IFN- $\alpha$  を ELISA で検討したところ、RSV は CpG DNA による IFN- $\alpha$  産生を抑制することが示された。RSV を CpG DNA 添加後に加えても抑制が認められたことから、RSV には IRF-7 活性化のプロセスを抑制する作用があると考えられた。

次に、RSV による IFN- $\alpha$  産生の抑制に与る標的分子を同定するため、TLR9 と IRF-7 を強制発現させた HEK237T 細胞に RSV 遺伝子の NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2-1, M2-2 のそれぞれを導入して各蛋白質を発現させ、IFN- $\alpha$ 4 をレポーター遺伝子として CpG DNA による IRF-7 活性化に対する影響を評価した。その結果、NS1 に強い抑制活性があることが示された。IRF-7 に加えて、TLR9 シグナリングにかかわる遺伝子 MyD88 や TRAF6、およびその両方を発現させた場合でも、NS1 は IFN- $\alpha$ 4 遺伝子のプロモーター活性を抑制した。一方、MyD88、TRAF6、MyD88+TRAF6 を発現させた HEK293T 細胞で、NF- $\kappa$ B をレポーター遺伝子とした場合、そのプロモーター活性は NS1 蛋白を発現させても抑制されなかった。

#### IV. 劇症型連鎖球菌の病原因子の特定

##### 1) MφおよびPMNによる食菌作用について

食菌数は、第一世代 1529 株、第二世代 GT01 株と世代が進むに従い、極端に減少していた。遺伝子欠損株では、親株の GT01 株と比較し差異があまり見あたらず、著しい形態変化も観察されなかった。

殺菌に対しては、標準菌として使用した黄色ブドウ球菌に比べ食菌された後の殺菌抵抗性がどれも明確であったが、世代間で殺菌能抵抗性の差はあまり観察されなかった。遺伝子欠損株では、Mga, Nga, emm, Sic 欠損株において、食菌抵抗性の阻害と食菌後の細菌数減少が観察された。PMN においてもほぼ同様であり、遺伝子欠損株では、emm, sic, Mga 欠損株において、食菌数が親株に比して若干増加したが、Nga 欠損株では著しく食菌数が増加した。

各菌体培養上清とマクロファージと混合培養後の細胞内ラジカルの発生は、初代株 SF370、第一世代 1529 株、第二世代 GT01 株の順に減少した。また遺伝子欠損株では Mga, emm, Nga, Sic の順番でラジカル発生が増加した。細胞内殺菌抵抗性因子として Nga, Sic が重要な役割を果たしている事が推測される。

PMN に対する細胞障害性を LDH を指標として測定すると、PMN によって食菌された後、初代株から劇症型株にいたるに伴い細胞障害性が増加した。DTT 還元で、細菌培養上清では著しい細胞障害性をしめした。また非還元状態下でも劇症型連鎖球菌が好中球に取り込まれることによって細胞障害性が増加した事から、SLO 以外の障害性因子の存在が考えられた。

##### 2) 劇症型連鎖球菌による溶血反応について

羊血液を用いた溶血反応では、初代株 SF370、劇症型第一 (1529)、第二 (GT01) になるに伴い、DTT の還元の有無にかかわらず溶血反応が増大した。SLO の阻害剤のコレステロールの添加で、羊血液では溶血が阻害された。ヒト血液でも同様であった。

#### D. 考察

##### I. BCG の多様性について

##### 1) BCG 亜株のミコール酸の解析

抗酸菌に特徴的なミコール酸についてBCG亜株間での相違を詳細に検討した。ミコール酸の構成サブクラス、組成比、分子種においてBCG亜株間で不均一であり、宿主免疫応答やワクチン効果との関連が示唆された。親株の牛型結核菌B10やRavenel株は強毒株と考えられており、ミコール酸についてもその表現形は人型結核菌に近いものであった。BCG亜株は継代を重ねることによって弱毒化しているはずであり、ミコール酸の表現形も弱毒化に寄与したと考えられる。特にサブクラスの組成比は人型、牛型結核菌と大きく異なり、これらの要因が宿主免疫応答に影響する可能性がある。ミコール酸構造修飾がワクチン効果に重要な役割を果たしていることが示唆され、さらに詳細な構造修飾について検討する必要がある。今後、より効果的なBCGワクチンの開発へこれらの知見を応用したいと考える。

##### 2) BCG亜株のトレハロース付加ミコール酸(TDM)の解析と生物活性

TDMは、結核菌の毒性因子として知られているが、一方で強い免疫アジュバントとして知られている。Mycobacteriaの菌種やBCG亜株によって活性が異なり、ほとんど毒性を認めないにもかかわらず、強い肉芽腫形成能を有するものも存在したことから、TDMを適切に選択して有効活用することが必要がある。

##### 3) 生化学的試験、ヒト由来培養細胞に対する炎症性メディエーター誘導能の相違

炎症性メディエーターの誘導能、生化学的性質ともBCG亜株によって違いがみられることがわかった。誘導能の相違は、BCGの副作用と関連している可能性とともに、アジュバント活性の強さに関係していることが示唆される。ナイアシン試験において陽性株と陰性株とで性質の違いとの相関は不明であり、現段階では特定のBCG亜株が優れていると評価できないが、特に、RD2欠損、もしくはmma3変異が入る前の初期分与株(Russia株、Moreau株、Tokyo株)は、類似した性質を有することがわかった。今後、マウスなどの実験動物を用いて、初期分与株と後期分与株のin vivoでの性質(生着能、獲得免疫誘導能)や感染防御能を比較し、in vitro、in vivoでのBCG亜株間の特徴の違いについてさらに検討が必要である。

#### 4) BCG-I と BCG-II のゲノムの差異

サプレッションサブトラクト法では BCG-I と BCG-II のゲノムの差異を明らかにすることができなかつた。差異を明らかにできなかつた理由としては両者において同法で得られるほどの大きな欠損はなく、数 10 bp 程度、あるいは塩基置換程度の変異が存在することが考えられる。今後他の手法を用いて検討する予定である。

#### 6) BCG-I と BCG-II の DNA 受容菌としてのキャラクタリゼーション

I 型と II 型それぞれの分離株を用いると、pSO-GagFS の例外を除き、形質転換効率に有意差が認められなかつたことから、なぜシードロットを用いると II 型しか形質転換株が取れないのかという疑問に対する解答は得られなかつた。

プラスミドが持つ外来遺伝子の配列により、プラスミドの安定性に差が出てくる結果は興味深い。今回用いた pSO-GagB と pSO-GagFS では 4 塩基の違いしかなく、その違う配列を認識して DNA を排除しようとする、制限あるいは修飾酵素の存在が推測される。特に II 型で pSO-GagFS の保持率が低いことは、II 型株におけるそれら酵素活性が高いことを示しているのかもしれない。今後さらにサンプル数を増やしてプラスミドを解析する予定である。この一連の研究によって、組換え BCG ワクチン構築に適した株を純化したいと考えている。

#### 7) BCG-I と BCG-II の遅延型過敏反応 (DTH) による解析

モルモットでの BCG-I と BCG-II による DTH の差異、モルモットとマウスでの BCG-I と BCG-II に対する感受性の差異が示された。その機構解析のためにサイトカイン産生等検討する必要がある。

## II. 組換え BCG ベクター系の開発と応用

### 1) エイズワクチンの開発

HIV 特異的細胞性免疫に加え、中和抗体誘導をも可能にするワクチン開発を目指し、Gag 及び Env 抗原の BCG 菌体内での共発現を試み、発現株を得ることができたが、その株の生育速度は極めて遅く、今後の production を考慮すると、大きな問題が残る。Env 抗原を菌体内に蓄積させず、菌体外に分泌させるような発現系改良の試みが

必要である。

### 2) 栄養要求性を指標とする新しい抗酸菌の宿主-ベクター系開発

今回 *thyX* 破壊株を作製したところ、最小培地で発育し、チミン要求性を示さなかつたことから、これまでの報告とは異なり、*thyX* も BCG の発育に必須でないことが示された。従って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 *thyA* と *thyX* 両遺伝子二重欠損株を作製する必要性が示された。そのため *thyX* 欠損株をもとに *thyA* 領域の単純な相同組換えによる *thyA* 欠損 (二重欠損株) 作製を試みたが目的の株は得られなかつた。その理由としては、二重欠損株はチミン要求性となるため、発育速度が非常に遅く、選択できなかつたことが考えられる。次に試みる Cre-lox システムは組み換え効率が高いため、目的のクローンを得られる可能性が高い。

### 2) BCG ベクターの安全性と安定性について

これまでに多数の結核防御抗原候補が報告され、Antigen 85 Complex と 65kDa の熱ショック蛋白質がもっとも有力とされている。また新型ワクチンの特性として「耐熱性、経口投与、遅延型過敏性反応を惹起せず従ってツベルクリン反応を陽性にしない、Th1 型反応に向けるが、Th2 型反応に向かわせない、CD4<sup>+</sup>T 細胞のみならず CD8<sup>+</sup>T 細胞も誘導する、しかも生涯を通じて有効であること」などが挙げられている。今後行われる臨床試験はワクチン接種後の効果判定に相当期間がかかることが考えられる。したがって安全性に関しては一層注意深く見守っていく必要がある。

### 4) モルモットによる品質管理方法の検討

BCG ベクターを用いた麻疹ワクチンの試験的開発を通じて、モルモットにおける免疫学的解析手段を発展させ、実用化に備え、BCG ベクターにおける品質管理の質的向上を図ることを目的としている。モルモットは、そのほとんどが out-bred であり、その系統のひとつである Hartley は、クローズドコロニーの動物である。従って各国で用いられている Hartley は、遺伝的に差がありうると考えられる。

本年は、slc:Hartley を用いて、サイトカイン遺伝子のクローニングを行った。IL-2 遺伝子

におけるアミノ酸変異は、数個のクローンで同様の配列が認められたことから、slc:Hartley に固有の遺伝子多型かもしれない。次年度以降、これらの遺伝子を用いてサイトカイン測定系の開発を行う予定である。

5) 組換え BCG の動物モデルにおける有効性について

予備的な実験であったが、アカゲサルを用いた BCG Tokyo ワクチンの感染予防実験は、未だ無く貴重な経験と考える。以前我々は、カニクイサルを用いた結核菌予防実験を行い、有意に予防効果が見られたことを報告した。アカゲサルでも同様な予防効果が得られたことは、特記に値する。我々は、BCG Tokyo に Ag85A 遺伝子を挿入発現させた BCG Tokyo [Ag85A] 組み替えワクチンを開発した。今後このワクチンを用いて、感染防御実験を行いたい。

### III. TLR 制御を取り入れた新規 DNA アジュバントの開発

pDC は免疫担当細胞のなかでは僅少な細胞集団であるが、自然免疫や獲得免疫の形成に中枢的役割を果たしている。発現している TLR7 や TLR9 のリガンドは、Th1 免疫や IFN- $\alpha$  の誘導を必要とする疾患の治療に有用と期待されている。しかしながら、病原体に感染した pDC の動態についてはよくわかっていない。今回、RSV に感染した pDC について検討したところ、NS1 蛋白が IFN- $\alpha$  転写因子 IRF-7 の活性化プロセスを抑制し、IFN- $\alpha$  が産生されないことが示された。DNA アジュバントの開発には、pDC の様態に応じた創薬設計が必要であることが示され、RSV 感染 pDC に IFN- $\alpha$  を産生させるには IRF-7 活性化の工夫が必要であると思われた。次年度は RSV 感染 pDC を機能低下 pDC のモデルのひとつとして、その IFN- $\alpha$  産生抑制機構を詳細に解析し、機能賦活アジュバントの開発に取り組みたい。

### IV. 病原因子の特定

劇症型 A 群連鎖球菌感染症患者の炎症部位の白血球浸潤の抑制と劇症型に由来する毒素因子の関与を検索すべく、マウスマクロファージ、好中球への劇症型 A 群連鎖球菌の食菌抵抗性を検討した。マクロファージ、好中球による劇症

型 A 群連鎖球菌の食菌細菌数の測定、ラジカル発生測定、LDH 測定から、劇症型に伴う Nga 等の毒素因子が食菌抵抗性に関与している事が示された。溶血凝集反応の結果から、従来の実験方法では見落としている劇症型由来毒素因子の存在を明らかにした。これらの結果を踏まえて、Nga をワクチン候補とすると同時に、劇症型由来毒素因子の更なる検討を行う必要がある。

### E. 結論

#### I. BCG の多様性について

- 1) 人型結核菌、牛型結核菌、BCG 亜株のミコール酸を脂質生化学的に解析した結果、構成サブクラス、組成比、分子種に偏りがあり、宿主免疫応答に寄与している可能性が示唆された。
- 2) TDM の活性は Mycobacteria の菌種や BCG 亜株によって異なることから、免疫活性化機構を明らかにすることによって病原性やワクチンアジュバントとしての有用性が解明されうる。
- 3) サイトカイン誘導活性の強さ、ナイアシン試験の結果と BCG 亜株の遺伝背景との間に相関関係があることが示唆された。
- 4) サプレッションサブトラクト法では BCG-I と BCG-II のゲノムの差異を明らかにすることができなかった
- 5) BCG-I と BCG-II の DNA 受容菌としてのキャラクター化を行い、一例を除き形質転換効率には大差がないことがわかった。
- 6) モルモットにおいて BCG-I が強い DTH を示した。

#### II. 組換え BCG ベクター系の開発と応用について

- 1) HIV-1 Gag 及び Env 抗原を同時に BCG 菌体内で発現させられることがわかったが、Env の発現が菌の増殖を著しく阻害し、生育速度は極めて遅かったことから、Env 発現系の改良が必要と考えられた。
- 2) 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なった。BCG では TS として ThyA および ThyX の両者を持つ。既報とは異なり ThyX は BCG の発育に必須でないことが示された。
- 3) 凍結乾燥リコンビナント BCG は熱安定性があること、リコンビナント BCG はカナマイシン含