

2009年3月5～6日

- 71) 中尾 誠、赤土和也、山崎健一、寺田堂彦、藤里俊哉、吉浦昌彦、筒井博司. 骨格筋培養のための機械刺激負荷に関する研究. 再生医療学会、東京、2009年3月5～6日
- 72) 根岸 淳、船本誠一、木村 剛、藤里俊哉、樋上哲哉、岸田晶夫. 超高压を利用した脱細胞化小口径血管グラフトの作製と評価. 再生医療学会、東京、2009年3月5～6日
- 73) 船本誠一、佐々木秀次、橋本良秀、服部晋也、本田貴子、藤里俊哉、望月 學、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫. 脱細胞化技術を用いた異種角膜組織からの移植・再生医療用角膜の開発. 第12回日本異種移植研究会、鹿児島、2009年3月7日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

脱細胞化生体組織の調製における緩衝液の選択法
(準備中)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

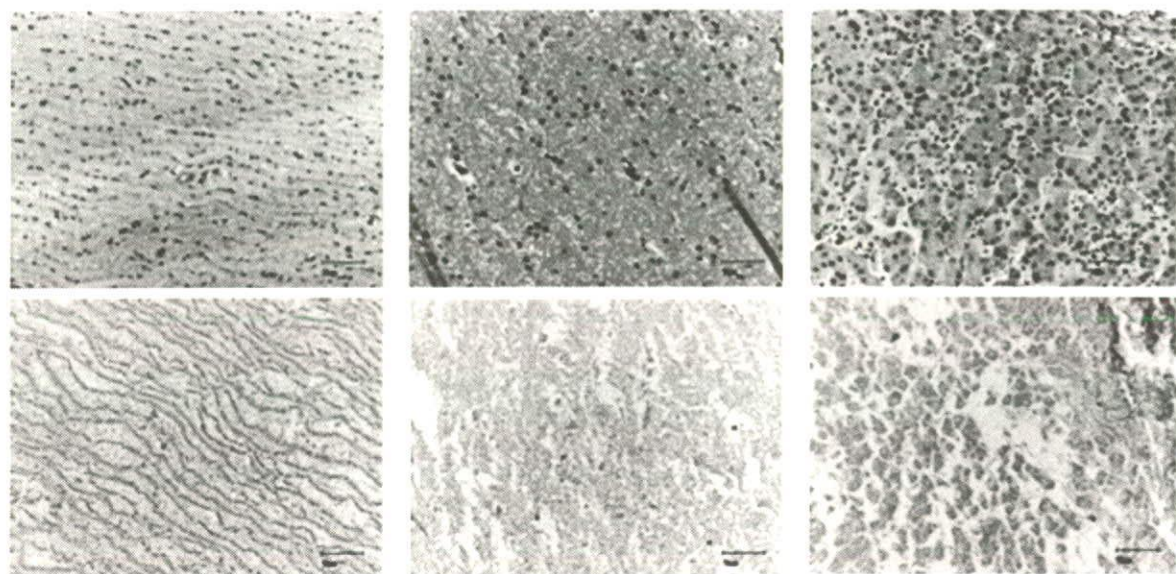


図1. 上：未処理組織 下：脱細胞化組織（左より、大動脈、脳、肝臓）（20×）

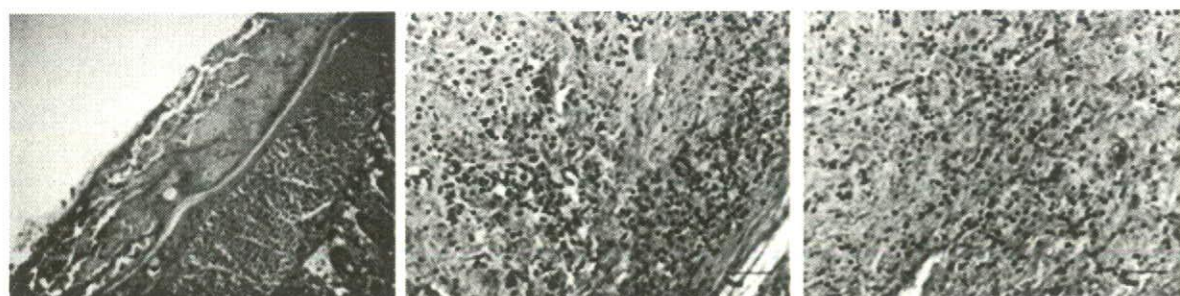


図2. 構造維持組織・脱細胞化脳

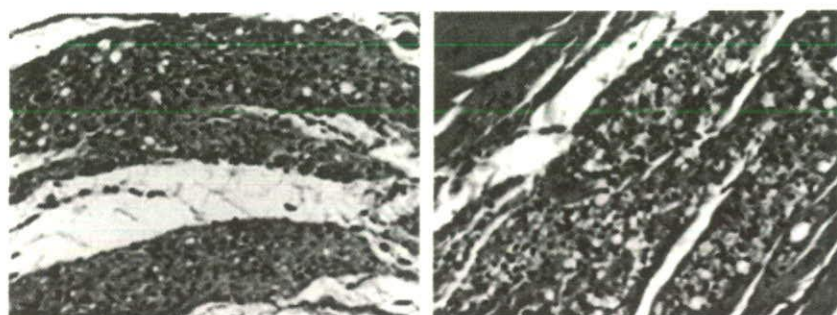


図3. 構造破壊組織群（左：脱細胞化脳 右：脱細胞化肝臓）

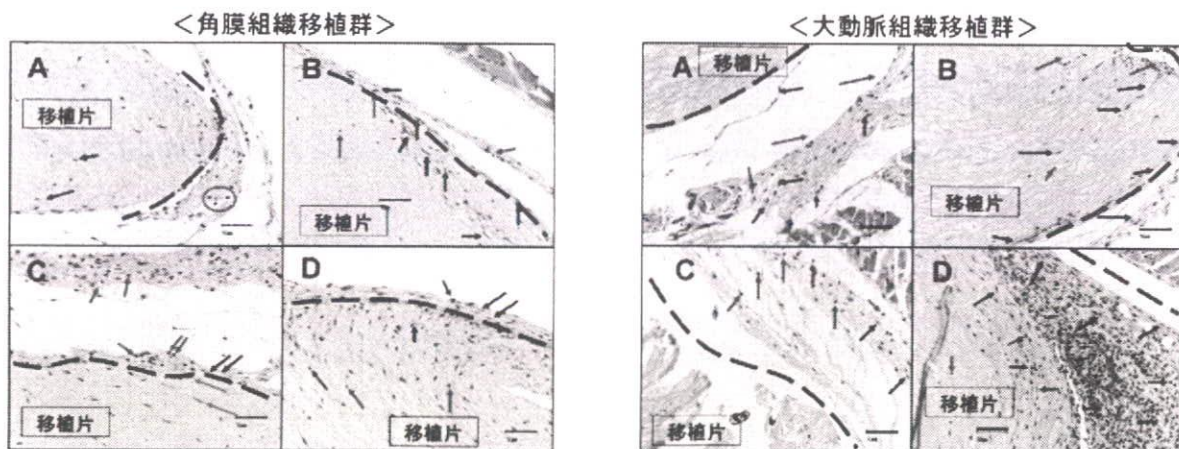


図4. HE染色像 (×200)

左：角膜移植群（脱細胞化 A：7日、B：14日 未処理 C：7日、D：14日）
 右：大動脈移植群（脱細胞化 A：3時間 B：7日、未処理 C：3時間 D：7日）
 リンパ球：→、好酸球：⇨、マクロファージ：⇩、線維芽細胞：⇨

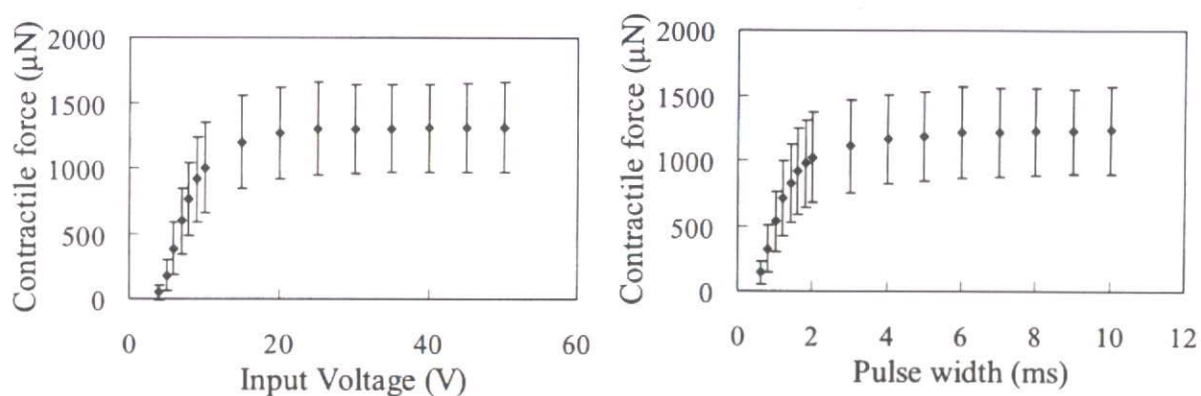


図5. 入力電圧およびパルス幅と等尺性収縮力との関係 a) 入力電圧 b) パルス幅

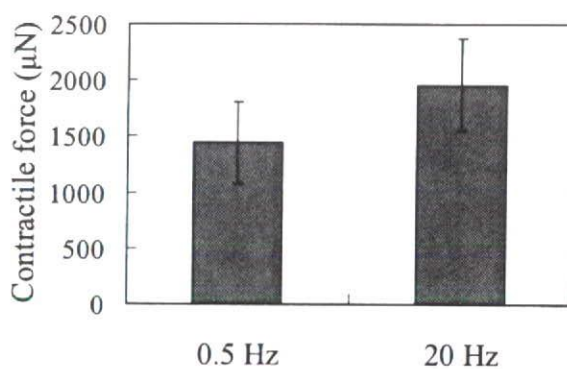


図6. 周波数と等尺性収縮力との関係

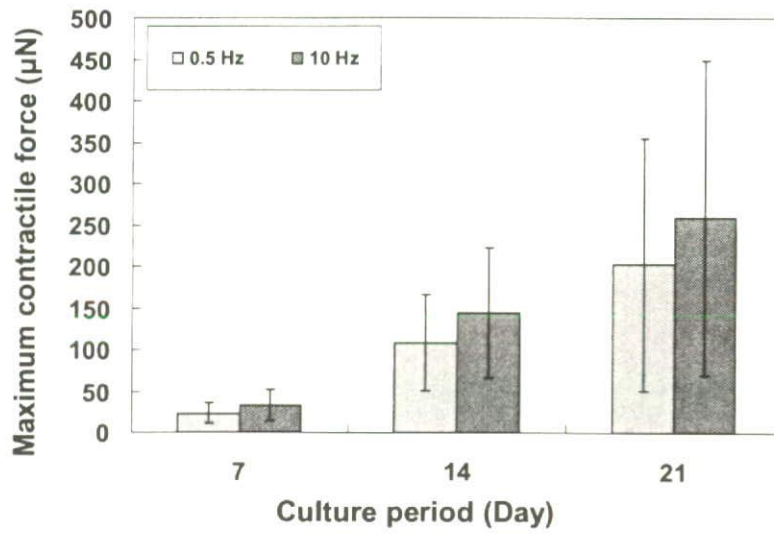


図7. 培養骨格筋の等尺性収縮力

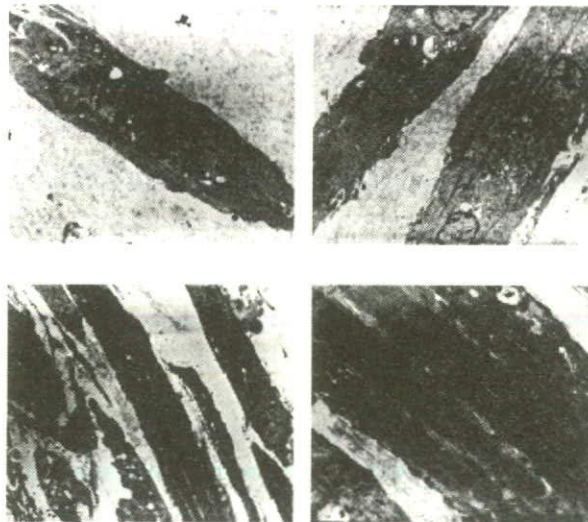


図8. 培養骨格筋のTEM像

(左上：培養7日、右上：培養14日、左下：培養21日、右下：培養21日強拡大)

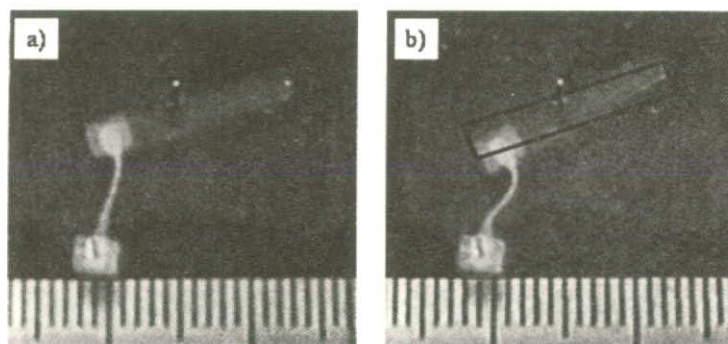


図9. 造形物の駆動

a) 電気刺激前 b) 電気刺激後 (周波数3 Hz) (四角は刺激前の造形物の位置を示す)

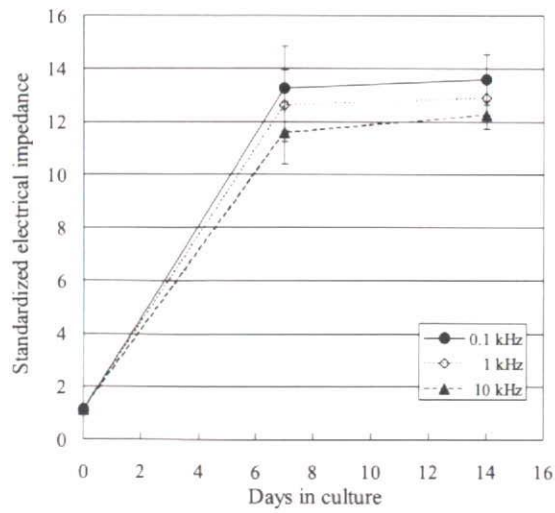


図10. 培養期間に伴う培養筋の標準化電気インピーダンスの変化

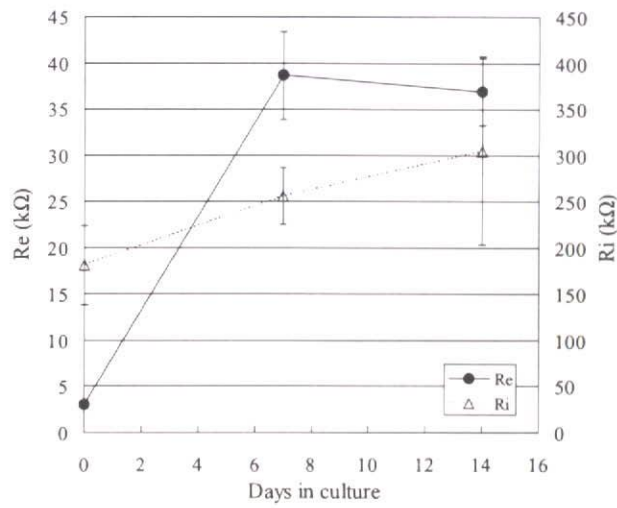


図11. 培養期間に伴う細胞内液抵抗および細胞外液抵抗の変化

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 亜株間の多くの差違が、遺伝子、構成成分および免疫活性の相関とともに明らかになってきた。BCG ベクターにより組換えワクチンを構築し、モルモット、サルでの有効性、安全性を確認した。CpG-DNA の粘膜アジュバント効果を確認した。

分担研究者

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

A. 研究目的

結核は、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、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り、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。しかしながら成人肺結核の発症予防効果については多くの疫学調査が行われてきたが、その結果は様々であり、BCG の効果が十分ではないといわれる場合が多い。このように BCG の効果にばらつきがみられる理由として、調査地域での結核流行の程度、環境中の抗酸菌量、流行結核菌株の違い、ヒトの遺伝的素因など様々な要因が挙げられる。中でもワクチンに使用している BCG 株の違いが大きな要因になっているのではないかと考えられる。各国に分与された後 BCG には現在までに多くの亜株が派生していることが知られている。現在までに BCG を凌駕する新ワクチンは実用化しておらず、ワクチン開発を推進する一方で、現行の BCG ワクチン亜株間の細菌学的、免疫学的な差異を分子レベル、遺伝子レベルで比較して解明することによって、BCG ワクチン亜株を再評価し、有用な亜株を選定することが急務であると考えられる。

その中で日本株 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。

また新興・再興感染症が深刻化している中で、特に新興感染症である 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 の重感染は、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。

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用いることができる。遺伝子工学的手法により、BCG 以外の抗原またはサイトカイン遺伝子を組み込んだリコンビナント BCG が開発されつつある。これは、比較的安価な上に、熱安定性で経口投与が可能であることから、世界的な蔓延が危惧される HIV に対するワクチンとして期待され、精力的に開発研究が行われている。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、結核と HIV の重感染を防ぐ効果が期待できる。本研究では、BCG をベクターとして用いて、結核菌および HIV の遺伝子を組み込んだ組換えワクチンを開発し、その有効性、安全性を検討する。

また、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が、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、感染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。しかしながらこれらのワクチンの研究は、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改良・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、cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) に着目し、BCG 亜株間におけるミコール酸の偏在性が宿主免疫応答に与える影響を比較検討した。更に培養細胞に対する炎症性メディエーター誘導能等の解析を行った。また日本(Japan)株 BCG である BCG Tokyo172 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) について脂質生化学的、分子生物学的検討を加え、構成脂質や遺伝子発現の差異を明らかにした。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、BCG ベクター系に関してさらに改良を加え、サルによる有効性・安全性等の検討をした。さらに粘膜アジュバントとしての CpG-DNA の作用、BCG 細胞壁成分である lipoarabinomannan (LAM) / lipomannan (LM) の生物活性の解析、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 ATCC 35739, Connaught ATCC 35745, Danish ATCC 35733, Glaxo ATCC 35741, Mexico ATCC 35738, Moatrial ATCC 35735, Pasteur ATCC 35734, Phipps ATCC 35744, Russia ATCC 35740, Tice ATCC 35743)、Sweden 株、Brazil 株 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 25618、*Mycobacterium tuberculosis* Aoyama B、*Mycobacterium bovis*-Ravenel 株を用いた。

2) Cord factor 投与によるマウス肺肉芽腫炎症病変の形成

集菌した死菌体を超音波破碎後、chloroform/methanol (4:1, 3:1, 2:1, vol/vol) と H₂O で二層分配して総脂質画分を抽出した。総脂質画分は展開溶媒系の異なる二次元薄層クロマトグラフィーで展開し発色試薬によりスポットを検定した。Cord factor は各種溶媒沈澱法と

カラム分画を組み合わせて単離精製した。Cord factor (300 µg) を water-oil-water (w/o/w) ミセルの形状で C57/BL6 マウス (7 週齢, 雌) の尾静脈より投与し、経時的な体重変化を観察した。マウスは投与後 4, 7, 14 日目に各 2-3 匹ずつ解剖し、肺を摘出した。組織を HE 染色して組織学的な変化を観察比較した。さらに、肺をホモジナイザーで破碎し、肺における TNF- α 、IL-1 β の産生量を比較した。

3) BCG 亜株のマウス及び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

一酸化窒素 (NO) の測定: ヒト肺胞上皮細胞株 A549、マウスマクロファージ細胞株 Raw264.7 細胞、マウス初代培養骨髄細胞に BCG を Multiplicity of infection (MOI)=10 で感染させた。もしくは TDM でコートした培養プレートに細胞をまくか、TDM でコートしたガラスビーズを細胞あたり 10 個加えた。48 時間後に培養上清を回収し、ろ過滅菌後 diaminonaphtalen を用いた蛍光法で測定した。

培養上清中のサイトカインタンパクの測定: 宿主細胞 (ヒト肺胞上皮細胞株 A549、ヒト単球系培養細胞株 THP-1、マウスマクロファージ系細胞株 RAW264.7、マウス初代培養骨髄細胞) を 1×10^5 cells/well で 24 Well プレートにまき、37 °C、24 時間培養後、MOI=10 相当の菌を含む DMEM を細胞に加え、37 °C で培養した。72 時間後の培養上清を回収し、ろ過滅菌を行ったのち IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-12、TNF- α 、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。

4) BCG-I と BCG-II の遺伝子発現の差異

BCG-I と BCG-II は凍結乾燥品を 1 % 小川培地で培養後、Sauton 培地で継代した。Sauton 培地を用いた表面培養または 7H9-ADC-Tween80 培地を用いた振とう培養を行った後 RNA 抽出に用いた。RNA 抽出は TRIzol 試薬を用い、混入する DNA を DNaseI で消化、市販の RNA 抽出キットで精製した。

DNA マイクロアレイは公開されている BCG Pasteur 株ゲノム配列をもとに設計した。タイリングアレイはプローブ長を 60 mer とし、12 bp 間隔で全ゲノムをカバーした。発現アレイは Pasteur 株でアノテーションされている 3,951 遺伝子を、プローブ長 60 mer、9 x 2 プローブ/遺伝子として設計した。7H9-ADC-Tween80 培地を用いた振とう培養を行なった菌体から得られた BCG の全 RNA はタイリングアレイと発現アレイの両方で、Sauton 培地表面培養を行なった菌体から得られた BCG の全 RNA は発現アレイで解析した。得られたデータは ArrayStar および NandemoAnalysis で処理し、株間の比較を行った。

5) BCG-I と BCG-II の遅延型過敏反応 (DTH) 誘導能による解析

マウス及びモルモットに対し、 10^3 から 10^6 CFU/匹の BCG-I または -II を皮内投与し、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) を測定した。さらにモルモットより脾臓細胞を採取し、*in vitro* で PPD 刺激した 48 時間後の細胞増殖反応をトリチウムチミジンの取り込みによって測定した。また PPD 存在下 24~48 時間培養した後上清を採取し、TNF- α 測定用に -80°C に保存した。TNF- α 産生量は、2 倍系列希釈したサンプルをアクチノマイシン D 存在下で L929 細胞と培養し、生存率から組換え TNF- α を指標にして求めた。また刺激した脾臓細胞から RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法によって IFN- γ の発現量を比較した。

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。

Env 抗原発現ベクターの構築: 米国 NIH ワクチン研究センターより分与を受けた、HIV-1 改変型 env 遺伝子を含むプラスミドを鋳型として、PCR により gp140DCFIDV1V2 (cleavage site, fusion peptide および gp41 部分にある 2 つの heptad repeat の間の領域を欠失させ、さらに gp120 の V1V2 ループを欠失させた)、gp140DCFIDV1V2-1AB (V3 loop が 6 アミノ酸短い変異体) および gp145DCFI をそれぞれ得た。それらを *Mycobacterium kansasii* 由来 antigen 85B のプロモーターとシグナル配列を有する pKAH240S と、blaF シグナルを有する pA717N にそれぞれ導入し、発現カセットを切り出して pS0246 シャトルベクターに繋ぎかえることにより、Env 発現ベクター pS0-gp140B, pS0-gp145B, pS0-blaF145B, および pS0-blaF140B を得た。

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: 上記の pS0246 をベースとした発現ベクターを電気穿孔法により BCG 東京株に導入し、カナマイシン (30 mg/ml) 含有 7H10-OADC 寒天培地で 3 週間培養することにより、形質転換体を選択した。コロニーをピックアップして 7H9-ADC 液体培地で 2 週間培養後に集菌し、菌体の超音波破砕により lysate を調製した。SDS-PAGE (4-20% グラディエントゲル) で分画後、PVDF 膜にブロットし、一次抗体として抗 Env C25 マウスモノクローナル抗体を、二次抗体としてアルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG を用いてウエスタンブロット解析を行った。

2) 多コピー変異プラスミドの構築

Bourn et al. (Tuberculosis, 2007) を参考に、pAL5000 レプリコン中の repA 遺伝子に変異を導入することにより、多コピー変異型 pS0246 を構築し

た。菌体 lysate (蛋白質量 10 μ g 分) あるいは培養上清の一部を用いて HIV-1 p24 ELISA キット (Zepto Metrix) により Gag 蛋白質の発現・分泌を定量した。

3) 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。

4) BCG ベクターの安定性について

HIV-V3 領域と *M. kansasii* α 抗原の融合タンパク質をコードしたプラスミドを導入した rBCG を使用し、その凍結乾燥品をモルモットハートレー (一群 4 匹使用) に接種後、*in vivo* における安定性と細胞性免疫の指標として PPD に対する DTH 反応を測定した。5x10⁵CFU の菌液 0.5ml を静脈注射し、1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 週後に DTH の測定と脾臓の摘出を行った。rBCG の分離培養はカナマイシン含有または非含有の 1% 小川培地で培養後にコロニー数を測定し、生じたコロニーを 7H10 寒天培地で培養後、boil 法で DNA を抽出した。HIV-V3 領域を PCR で検出しプラスミドの有無を調べた。

5) 組換え結核ワクチンのサルモデルによる有効性・安全性の検討

アカゲサル (PBS 接種群、BCG 接種群、組換え BCG ワクチン接種群の 3 群、各群 3 匹) に 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 線撮影を行い、生存率を調べた。また 6 ヶ月後に解剖を行い、肺組織、脾臓より結核菌数を求め、さらに各組織の病理検査を行い、臓器内肉芽腫の有無を調べた。

6) 組換え HIV ワクチン開発のためのサルエイズ (SIV) モデルによる有効性の検討

Gag 蛋白を標的とするプライム・ブースト型ワクチン開発を目的として、サルエイズモデルにおいてその有効性について評価を行った。初回免疫後 30 週に追加免疫を行う方法で A. rBCG/opt-SIVgag 0.1mg/ rDIs-SIVgag 10⁷PFU、B. rBCG/opt-SIVgag 0.01mg/ rDIs-SIVgag 10⁷PFU、C. rBCG/mac-SIVgag 0.1mg/ rDIs-SIVgag 10⁷PFU、各群 3 頭のカニクイザルを免疫し、その後 3 年後に D. naive 3 頭を加えて、SIVmac239(nef+) 2000TCID50 を直腸内接種により攻撃試験を行った。なお、各群 2 頭については、免疫開始以前 3 ヶ月前に、BCG Tokyo 株を 0.1mg 皮内接種を行った。B、C 群の個体については、接種後 6 週で、A、D 群については 12 週で安楽殺・解剖を行い、各臓器を解析した。また経時的に採血を行い、plasma 中のウイルス RNA コピー数を指標として感染動態の解析を行った。

III. TLR 制御を取り入れた新規 DNA アジュバントの開発

1) オリゴ DNA

palGACGA0901 (G9.1) :

5' -GGGGGGGGGACGATCGTCG-3'

BALB/c 及び C57BL/6 マウスを用いて G 9.1 をジフテリアトキソイド (DT) とともに麻酔下で経鼻投与した。初回免疫後、2 週、3 週及び 4 週目に追加免疫し、5 週目に採血、6 週目に肺洗浄液、鼻腔洗浄液、唾液、糞便を採取した。血清および粘膜サンプルについて ELISA 法により各抗体価を、また培養細胞法で血清中の抗毒素価を測定した。

IV. BCG Tokyo172 株の LAM/LM の生物活性

BCG Tokyo172 株菌体の調製は常法に従い Sauton 培地に表面培養 8 日の菌体を滅菌して用いた。LAM/LM の精製は、菌体をフレンチプレス破碎後、遠心分離した crude cell wall fraction を、18000 ×g 1h 超遠心にかけて、lipoglycan を含む上清を得た。90%phenol を添加し lipoglycan 含有水層を分離し、crude lipoglycan を Triton X-114 で 2 層分離した。得られた lipoglycan (LAM/LM) を Deoxycholate buffer を含む溶出液で Sephadex G75 カラムにかけ溶出した。Human PBMC 及び CD4 T cell の調製は、全血を volunteers (24~50 才) より採取し、倫理委員会の規定に従って実験に供した。精製 naive CD4 T cells (CD4⁺, CD45RA⁺) は、human naive CD4 T cell Isolation Kit と Auto MACS Sorter を用いて精製した。精製 DC を *in vitro* T cell 分化用培地に加え T cell の分化に供した。

In vitro T cell 分化用培養は anti-CD3 mAb、IL-2 存在下で刺激し、さらに IL-12、anti-IL-4 mAb 存在下 (Th-1 培養)、又は antiCD3 mAb で IL-2、及び IL-4 及び anti-IFN- γ mAb 存在下 (Th-2 培養) で培養した。IL-4 又は IFN- γ 産生細胞の染色は、培養 T cell を PMA・ionomycin・monensin で再刺激し、固定・permeabilize 化したのち anti-IFN- γ -FITC、IL-4-PE 等で染色し、FACS Calibur を実施し、結果は Cell Quest software program で解析した。

V. 劇症型連鎖球菌の病原因子の特定

1) 多形核白血球 (PMN) と菌体培養上清の調製 : ICR マウスからの牡蛎グリコーゲン刺激による腹腔 PMN 及び密度勾配遠心法による血中 PMN を使用した。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、各変異導入菌体 (病原因子 Mga、Nga、Emn、Sic) を、BHI 培地 37°C で前培養と本培養した。培養上清は一部フェノール/クロロホルム処理でタンパク除去した水相を糖成分として使用した

2) PMN 浸潤測定 : 腹腔および血中 PMN は、蛍光色素のカルセイン AM を用い、蛍光標識 PMN として使用した。フィルター付きカップ上部に PMN を、下部に各菌体培養上清、走化性ペプチド等を添加し、2 時間培養後に、蛍光プレートリーダーにより、フィルターを通過した標識細胞を測定して細

胞数を算出した。

3) PMN のセレクチンへの結合 : 組換え P, E セレクチンをコーティングした 96 穴プレートを作成し、蛍光標識 PMN を各連鎖球菌培養上清と 20 分間インキュベート後、添加した。2 時間後の接着細胞数を蛍光プレートリーダーで測定し算出した。

3) 細胞障害性について : PMN に各菌体を添加し 2 時間培養した後、培養上清を LDH 測定キットを用い、細胞障害活性を算出した。

(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動物福祉を充分配慮し、苦痛を与えないように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) Cord factor 投与によるマウス肺肉芽腫炎症病変の形成

14 種類の BCG 亜株のうち昨年度の結果からミコール酸サブクラスが特徴的パターンを示す代表株として Russia, Japan, Connaught 株を用いた。親株である B10 と Ravenel 株は、 α -, methoxy-, keto-ミコール酸の 3 つのサブクラスが存在した。BCG 亜株のうち Russia, Japan 株が親株の B10 株と同様のミコール酸サブクラス組成であったが、Connaught 株は methoxy-ミコール酸が欠失し、 α -, keto-ミコール酸のみであった。また、B10 株では methoxy-ミコール酸の含量が最も多く、Ravenel 株では α -ミコール酸の含量が多かった。BCG 亜株 3 株についてはすべて keto-ミコール酸の含量が最も多く、各菌株でサブクラスの組成及び含量の差異が明らかとなった。

各抗酸菌由来 cord factor を尾静脈より投与したマウスの肺肉芽腫炎症病変形成と炎症性サイトカインの発現について検討した。経静脈的に cord factor 含有 w/o/w ミセルを投与すると、肺の血管系にトラップされ肉芽腫形成を伴う炎症を誘発した。コントロールの w/o/w ミセルのみを投与したマウスでは、目立った変化は観察されず正常であった。最初に結核菌 AoyamaB 株と BCG 亜

株である BCG Japan 株由来 cord factor を投与したマウスについて比較検討した。どちらも経時的に肉芽腫炎症病変が観察されたが、AoyamaB 株の方が BCG Japan 株よりも顕著であった。肺における肉芽腫炎症病変形成は炎症性サイトカイン TNF- α および IL-1 β の発現量と関連し、AoyamaB 株に有意に多く発現していることがわかった。次に、BCG 亜株について比較検討した。Connaught 株は BCG 亜株の中で最も顕著な肉芽腫炎症病変形成が認められ、Russia 株と Japan 株は同程度であった。また、親株である B10 株と Ravenel 株は BCG 亜株より肉芽腫炎症病変形成が減弱化していることがわかった。

Cord factor 投与後マウスの体重にも変動がみられ、投与直後はすべてのマウスにおいて体重の減少を認め、w/o/w ミセルのみを投与したマウスは減少度合いが軽く、すぐに回復した。上述の肉芽腫炎症病変形成の程度によって回復に要する期間に差がみられ、B10 株と Ravenel 株では 7 日前後で回復するのに対し、Russia 株と Japan 株では 11 日前後、Connaught 株では 18 日前後を要した。

2) BCG 亜株のマウス及び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

自然免疫系の活性化の指標として、宿主細胞からの一酸化炭素 (NO) の産生と炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α) の産生を測定した。初期分与株 (Russia, Moreau, Japan, Sweden, Birkhaug) の方が後期分与株 (Danish, Glaxo, Mexico, Tice, Connaught, Montreal, Phipps, Australia, Pasteur) と比べて高い傾向が見られた。この結果は、*mma3* 変異とよく相関していた。初期分与株の代表として Japan 株、後期分与株の代表として Connaught 株から抽出した TDM を用いて NO と IL-12, TNF- α の産生誘導活性を検討した結果、誘導活性は全体的に弱いながら、菌体そのもので刺激した場合と同様の結果が得られた。IL-1 β の産生については、生菌と死菌で逆の結果が得られた。以上のように初期分与株の生菌が自然免疫系の優れた誘導活性があることが明らかとなった。

3) BCG-I と BCG-II の遺伝子発現の差異

BCG-I と BCG-II について、7H9-ADC-Tween 80 培地で培養した菌体 RNA をタイリングアレイで解析した場合、7H9-ADC-Tween 80 培地で培養した菌体 RNA を発現アレイで解析した場合、Sauton 培地表面培養を行なった菌体 RNA を発現アレイで解析した場合、それぞれ 1.5 倍以上差のある遺伝子を抽出した結果、抽出された遺伝数が大きく異なったことから、基礎的に発現量の異なる遺伝子として 3 条件すべてにおいて発現量が異なる遺伝子を抽出した。その結果、BCG-I で発現の高い遺伝子 24 遺伝子および BCG-II で発現の高い遺伝子 21 遺伝子を抽出した。その中で hypothetical protein は 7 遺伝子であり、機能が推定されているものが 14 遺伝子であった。BCG-II で発現の高

い遺伝子の中で hypothetical protein は 13 遺伝子であり、機能が推定されているものが 8 遺伝子であった。

BCG-I で発現量が最も高くなっている遺伝子は単独の遺伝子ではなく、遺伝子領域として 2 か所存在していた。最も高い遺伝子領域は、Pasteur 株のアノテーションで BCG 3475c - BCG 3478 で、最も低い値でも BCG-II に対して 5.03 倍であった。次に高い領域は BCG 2953 - BCG 2960 の領域であった。一方、BCG-II で発現量が最も高くなっている遺伝子は 21 遺伝子であったが、2 成分制御系 DevRS の遺伝子 *devRS* が顕著な差のないものの BCG-II で上昇している傾向にあったことから DevRS に支配される遺伝子に着目したところ、BCG-II で発現量が高くなっている遺伝子は 21 遺伝子中 14 遺伝子が DevRS の支配を受ける遺伝子であった。

4) BCG-I と BCG-II の発現脂質の比較

BCG-I、-II および Japan 株の総脂質画分について二次元 TLC で比較した。BCG-II に発現していない未知の脂質スポットを BCG-I, Japan 株で確認した。質量分析の結果、 $[M+Na]^+$ として m/z 1530 を中心とするクラスターイオンが検出された。質量数と展開 TLC での Rf 値から、本スポットはフェノール糖脂質 (PGL) の脂質部分に相当する phthiocerol dimycocerosate (PDIM) であることが予想された。現在、詳細な構造を解析中である。BCG 亜株 14 株について同様に二次元 TLC で本スポットの存在を検討したところ、PDIM のスポットは Moreau, Glaxo, Tice, Australia 株で BCG-II と同様に欠落していた。

5) BCG-I と BCG-II の遅延型過敏反応 (DTH) 誘導能による解析

モルモットの皮膚反応では、 10^3 CFU/匹で BCG-II 免疫モルモットと比べ BCG-I 免疫モルモットの方が有意に強い反応を示した。一方、マウスについては 10^3 CFU/匹で DTH を示さなかったが、 10^6 CFU/匹で BCG-I が有意に強い反応を示した。モルモットでの脾臓細胞では、PPD による細胞増殖反応、TNF- α 産生および IFN- γ 発現で BCG-I 免疫モルモットの方が有意に強い反応を示した。

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

Antigen 85B 遺伝子のプロモーターと分泌シグナルを用いた系 (rBCG-gp140B と rBCG-gp140B-1AB) では、菌体内での改変型 *env* 遺伝子発現は見られたが、発現した Env 抗原が不安定で菌体内での分解産物がメジャーであった。また分泌シグナルを付加したにもかかわらず、菌体外への分泌は見られなかった。そこで、抗酸菌由来の Tat 依存性分泌シグナルである *blaF* (β ラクタマーゼ遺伝子) のシグナルペプチドを SP2 プロモーターに繋いだベクターを構築し、これに改変型 *env* 遺伝子を導入して BCG での発現を検討した。その結果、gp140 遺伝子を用いた場合 (rBCG-*blaFgp140B*)、

BCG の菌体内で極めて高発現することがわかった。しかし、高レベルで発現しているにも関わらず、菌体外への分泌は認められなかった。

2) 多コピー変異型プラスミドの構築と応用

Antigen 85B のプロモーター、シグナルペプチドに HIV gag 遺伝子を繋いだコンストラクトを、pS0246 と多コピー型 pS0246R に繋いで *M. smegmatis* に導入し、Gag の発現を調べた結果を図 4 に示す。明らかに、多コピープラスミドに導入した方が、Gag の発現レベルが上昇していた。HIV-1 p24 ELISA キットで Gag を定量したところ、pS0246R のコンストラクトでは発現レベルは約 10 倍に増加していた。

3) 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

必須の代謝系と考えられるチミン誘導体合成経路の酵素のひとつチミジル酸合成酵素の欠損株の作製を行ってきたが現時点でチミン要求株の作製は困難との結論に達した。その途上 BCG の TS のひとつ ThyX がもつ NADPH oxidase 活性がこの菌にとって重要であることが明らかになってきた。

4) 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 HIV-V3 領域特異的な DTH 反応は、3 週から 6 週にかけて観察されたが、いずれも直径 10mm 以下と弱かった。また 8 週以降は観察されなくなった。一方、PPD 及び BCG のゲノム上にコードされる MPB70 などの抗原では 3 週以降 8 週目まで、直径 15mm 以上の強い DTH 反応が持続して観察された。カナマイシン含有培地の非含有培地に対するコロニー数の比は、1、2 週目に約 1/2、3 週目で 1/4、4 週目にはカナマイシン含有培地では 4 匹中 1 匹にしかコロニーが検出されなかった。一方、非含有培地では 4 匹すべてでコロニーが検出された。4 週目から生じたコロニーを解析した結果、プラスミドを保持したコロニーは平均 16% であった。一方、培地上で継代した rBCG では 95% 以上のプラスミドが保持されていた。

5) 組換え結核ワクチンの動物モデルによる有効性・安全性について

PBS 接種群のアカゲサルは、6 ヶ月前に結核によりすべて死亡した。ワクチン接種した 2 群は、生存した。病理検査では、PBS 接種群は、壊死を伴う肉芽腫が広範囲に認められ、胸部 x 線像は斑状に見えた。ワクチン接種 2 群では、肉芽腫がほとんど認められず、肺炎を呈していた。これは胸部 x 線像でも確かめられた。肺組織内の結核菌数は、BCG 接種群よりも組換え BCG ワクチン接種群で有意に減少していた ($p < 0.05$)。脾臓でも同様な結果が認められたが、統計的な有意差が認められなかった。old tuberculin test, 結核血清診断では、ワクチン接種 2 群で減弱しており、血沈の結果は、PBS 接種群で著明な亢進が見られた。

6) 組換え HIV ワクチン開発のための SIV モデルによる有効性の検討

接種後 2 週における SIV Gag 蛋白に対する免疫応答は、A 群のうち 2 頭で高い誘導を示したが、他の群ではわずかにしか認められなかった。血漿中のウイルスコピー数は、その peak を示す接種 2 週間後において、対象群 (D 群) に比べて A および B 群では 3 頭中 1 頭、C 群では 3 頭中 2 頭が対照群である D 群の平均値に比べて有意に低値を示した。A 群と D 群で接種 1 2 週間後で比較すると、有意に A 群で低値を示し、D 群に比べて約 1/100 の値を示した。また、接種後 1 3 週における、A 群と D 群の解剖時の末梢血単核球、下顎リンパ節、そ径リンパ節、脾臓における effector memory / naive memory CD4(+) T 細胞比は、A 群に比べて、体表リンパ節の下顎リンパ節、そ径リンパ節においては、D 群で明らかに低下していた。実験期間を通じて、接種したカニクイザルに臨床症状を認めることはなかった。

III. TLR 制御を取り入れた新規 DNA アジュバントの開発

抗 DT 血清 IgG、IgA、粘膜 IgA 抗体価、及び抗毒素価については、DT と CpG-DNA を同時経鼻投与したとき、DT のみで経鼻投与した場合に比べ、BALB/c 及び C57BL/6 マウスのいずれの系統においても有意な増強が認められた。

IV. BCGTokyo172 株の LAM/ LM の生物活性

LAM/LM を Th-1 又は Th-2 条件下で加えて IFN- γ ⁺細胞又は IL-4⁺細胞の分化に及ぼす影響を調べたところ、LAM/LM 100 μ g/ml 添加により、IFN- γ ⁺細胞の増加と、IL-4⁺細胞の減少が認められ、LAM/LM の添加は Th-1 又は Th-2 培養下のいずれの条件下でも強力な Th1 分化と Th2 抑制を示した。高度精製 naive CD4 T cell 及び enriched DC を用いて、LAM/LM 存在下に Th1/Th2 分化誘導培養を行った。その結果 LAM/LM は Th1 条件下では CD4 T cell に直接作用して IFN- γ ⁺細胞産生を促進すると共に Th-2 条件下では DC を介して間接的に CD4⁺cell に作用して IFN- γ ⁺細胞の産生を促進する一方で IL-4⁺細胞の産生を阻害することがわかった。

V. 劇症型連鎖球菌の病原因子の特定

1) PMN の劇症型 A 群連鎖球菌培養上清の浸潤抑制作用について

初代 SF370 株、第一世代 1529 株では PMN 浸潤に抑制は見られないが、第二世代株では PMN 浸潤に対して強い抑制効果をもたらす物質の存在を示した。

2) PMN のセレクトイン結合への影響

初代から第二世代迄の菌体培養上清と PMN を共培養し、P,E セレクトインプレートに添加して、PMN の結合を測定したところ、P セレクトインの場合、第二世代の GT01 株で結合阻害が認められた。また E セレクトインでは第一世代 1529 株、第二世代 GT01 株で結合阻害が認められた。初代 SF370 株で

は結合阻害が見られなかった。病原因子ノックアウト株の培養上清でセレクチン結合阻害を測定した結果、各毒素因子が無い場合でも阻害作用が認められた。腹腔 PMN では、GT01 の糖成分の結合阻害が強い事が示された。

3) 劇症型 A 群連鎖球菌の PMN の細胞障害性について

劇症型株培養上清では PMN より LDH がリリースされた。毒性因子については劇症型第一世代 1529 株では Nga をノックアウトすると LDH リリースを減少させた。第二世代の GT01 株では Nga ノックアウトでも LDH リリースは抑制されなかった。第二世代株では Nga 以外の因子が更に毒性を示している事を示唆している。

D. 考察

I. BCG の多様性について

BCG 亜株間の細菌学的、遺伝学的、分子生物学的な差異の基礎的な知見を積み重ね、さらに構成成分や免疫活性の相関とともに明らかになってきた。今後、免疫記憶や有効性について検討を重ねていくことで、よりよいワクチンの選択と接種の施行方法に関する、今後のワクチン行政に貢献できると考えられる。

1) Cord factor 投与によるマウス肺肉芽腫炎症病変の形成

BCG 亜株による肉芽腫炎症病変形成能の差異をミコール酸組成の観点から考察すると、keto-ミコール酸を多く含む Russia 株と Japan 株がそうでない B10 株と Ravenel 株に比べ肉芽腫炎症病変が強く形成され、 α -ミコール酸を多く含む Connaught 株がそうでない Russia 株と Japan 株に比べ肉芽腫炎症病変形成が強かった。これらの結果から、keto-ミコール酸や α -ミコール酸は methoxy-ミコール酸に比べ、より宿主細胞への抗原認識を容易にしていると考えられた。肺肉芽腫炎症病変の形成と炎症性サイトカインである TNF- α や IL-1 β の発現量についての経時的な比較を行った結果、肉芽腫形成の各段階における細胞の集積、浸潤する細胞の違いが反映されていると考えられた。ミコール酸含有糖脂質 cord factor がミコール酸組成の違いにより宿主免疫応答に差異を生じたことが明らかとなり、脂質分子を中心とした宿主免疫応答の解明に有用な知見であり、BCG 亜株におけるミコール酸組成の違いは宿主応答に影響を与えワクチン効果への連関が示唆された。

2) BCG 亜株のマウス及び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

本研究の結果、初期分与株 (Russia, Moreau, Japan, Sweden, Birkhaug) の方が後期分与株 (Danish, Glaxo, Mexico, Tice, Connaught, Montreal, Phipps, Australia, Pasteur) と比べて自然免疫系をよく活性化することが明らかとなった。この結果は、*mma3* 変異とよく相関していた。活性化の機構の一部にメトキシミコール酸の

関与が示唆された。今後、自然免疫を強く誘導する BCG がメモリー誘導活性や結核防御活性を持つか、否か、検討していく必要がある。

3) BCG-I と BCG-II の遺伝子発現の差異

I と II の遺伝子発現パターンの変化に着目して解析を行なった。その結果培養条件が異なっても発現量の異なる遺伝子の抽出を行うことができた。

BCG-I で発現量が最も高くなっている遺伝子領域は BCG 3475c - BCG 3478 であった。BCG 3475c と BCG 3476 - BCG 3478 は逆方向に転写される。BCG 3475c は転写調節因子としてアノテーションされているが、BCG-I と BCG-II の発見のきっかけとなった遺伝子で 22 bp 欠損している。しかし、DNA 結合領域と推測される領域は N 末端に存在しており、機能している可能性は十分にあり、BCG 3476 - BCG 3478 を正に転写調節している可能性がある。BCG 3476 - BCG 3478 の機能については BCG 3476 が dioxygenase とアノテーションされている以外には情報がない。これらの機能を明らかにするためにはそれぞれの遺伝子破壊株の作製と解析が必要である。次に高い領域は BCG 2953 - BCG 2960 の領域であった。これらは細胞壁糖脂質に関与する遺伝子群を含むことから I と II で細胞壁糖脂質の組成が異なることが推測される。

BCG-II で発現の高い遺伝子に *ahpCD* が含まれていた。AhpC は代表的な過酸化物の消去系酵素であり、酸化ストレス応答、あるいは酸化ストレスに対する抵抗性に差があることが推測される。また II では 2 成分制御系 DevRS (DosRS) に支配される遺伝子群の発現が高くなっていた。DevRS は低酸素状態で働くことが多く報告されており、そのため、結核菌が宿主内で休眠用菌になり長期に潜伏感染する際に働くことが示唆され、DevRS 系と病原性は強く関係すると考えられている。このことから、BCG は病原性を低下させた弱毒菌であるが、I と II ではワクチンとしての効果に差があることが考えられ、DevRS 系に支配されるタンパク質がその一端を担っている可能性がある。今後コロニー性状等の菌の表現系と結びつける必要がある。

4) BCG-I と BCG-II の発現脂質の比較

BCG-I には BCG-II にはない PDIM が発現していることを明らかにした。BCG-I の RD16 領域に 22 bp の欠落があり、この領域には PGL/PDIM の生合成に関与する *Rv4305c* 遺伝子が含まれるが、PDIM が RD16 領域が完全な BCG-II で消失していることからこの領域以外の生合成遺伝子群の影響が考えられ、*pks15/1*、*ppsA-E* 領域等に関与している可能性が示唆された。親株の B19 株に PGL/PDIM は存在していたが、BCG 亜株間においては不均一であった。PGL は病原因子として重要であり、今後、PGL/PDIM の詳細な構造解析とその発現に関与する遺伝子群を特定し、機能との関連について解明する。さらに PGL/PDIM の宿主応答、ワクチン効果への影響について検討したい。

5) BCG-I と BCG-II の DTH 誘導能による解析

モルモットとマウスでは BCG-I と BCG-II に対する感受性には差異があったが、どちらも同様に DTH 誘導能は、BCG-I が有意に強いことが示された。サイトカイン産生等細胞反応も同様であった。このように RD16 上の遺伝子特性と免疫学的性質に関連が見られたが、脂質生化学的性質やゲノムの差異も明らかになっており、免疫学的性質の違いが何に起因するのか、物質レベル、遺伝子レベルで特定するよう進めたい。

II. 組換え BCG ベクター系の開発と応用

BCG ベクターについて組換え BCG ワクチン、エイズワクチンを構築し、安定性、安全性、及びモルモット、サルでの有効性の向上を確認してきたが、さらに今回見いだされた点を改良し、前臨床試験・臨床試験を目指したい。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。従って安全性に関しては一層注意深く検証していく必要がある。

1) エイズワクチンの開発

Antigen 85B のプロモーター、分泌シグナルを用いる分泌発現系 (sec 系) は、既に多くのグループによって用いられており、特に IL-2, IL-18, GM-CSF などのサイトカインについては、BCG から分泌発現させられることが報告されている。しかし、本研究で用いた改変型 env 遺伝子については、分泌発現は認められず、遺伝子産物は不安定で、分解物として BCG 菌体内に認められた。一方、SP2 プロモーターと blaF 分泌シグナルを用いた Tat 系でも分泌は確認できなかったが、gp140 (V1V2 領域を欠失している) と gp145 (V1V2 領域を持つ) で発現レベルが大きく異なることから、blaF シグナルペプチドに繋ぐ env 遺伝子産物の構造が、BCG での安定性、高発現に大きく関与しているものと考えられる。その構造的要因を探ることにより、菌体外への分泌も含めた、さらなる発現系の改良が可能であると思われる。今回得られた改変型 Env 高発現株については、分泌は認められなかったものの、免疫原性の増強が期待されるので、今後小動物での評価を行う。

2) 多コピー変異型プラスミドの構築と応用

pS0246 プラスミドの repA 遺伝子に変異を導入することにより、多コピー型に変換することが可能であり、*M. smegmatis* での Gag の発現が増強されることがわかった。今後 BCG での Gag あるいは Env 発現を増強するために応用して行く。

3) 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

チミジル酸合成酵素 (TS) の欠損株の作製を行ってきたが、チミン要求株の作製は困難との結論に達した。その途上 BCG の TS のひとつ ThyX がもつ NADPH oxidase 活性がこの菌にとって重要であることが明らかになってきたため、その役割について現在解析を行なっている。また、本来の目的である薬剤耐性を指標としない新たな BCG ベク

ター系の開発についてはチミン要求性以外の方向で検討している。

5) 組換え結核ワクチンの動物モデルによる有効性・安全性について

組換え BCG ワクチンは、BCG Tokyo ワクチンよりも結核菌の有意な減少を示し、その点で優れていた。この組換えワクチンは、カニクイザル、アカゲザル両方に結核防御効果を示した。将来臨床研究を行うには、GMP 下で作る必要がある。ヒトに使用するには、初回に組み換えワクチンを用い、ブーストに成分ワクチンを使うプライム/ブーストワクチンが有効であろう。ブースターとして 72 f 成分ワクチンを検討している。

6) 組換え HIV ワクチン開発のためのサルエイズモデルによる有効性の検討

マカク属サル類への SIV 感染は、ヒトにおけるエイズの感染病態の非常に近いモデルとして、ワクチンの評価に用いられている。Gag 蛋白を標的とした細胞性免疫誘導型ワクチンでは、感染防御効果ではなく感染後のウイルス量を制御あるいは排除させることが期待されている。今回ウイルス量を低下させる効果は、接種量によっても変わらず、rBCG 接種量を少なくしてもそのプライム効果は変わらないと考えられ、副反応を低減できる可能性がある。またウイルス低減効果は他の候補ワクチンとほぼ同様の効果を示したと考えられる。また、ワクチン接種後 3 年という長期間であっても有効性を示したことは、実用性の点において優れていることを示している。

III. TLR 制御を取り入れた新規 DNA アジュバントの開発

CpG-DNA である G9.1 には、粘膜アジュバント効果があり、液性免疫、粘膜免疫を増強することがわかった。一般に CpG-DNA は、細胞性免疫を増強することが知られているが、可溶性タンパク質抗原を用いると液性免疫をも誘導した。抗原に依存して免疫反応が誘導された可能性があるが、今後 Th1/Th2 バランスの解析とともに、BCG などを抗原として用い細胞性免疫および CTL への影響を調べる必要がある。

IV. BCG Tokyo 172 株の LAM/LM の生物活性

ヒト末梢血 PBMC を用いた Th1/Th2 分化培養系において BCG 菌から得られる LAM/LM が 2 つの独立した系を介して Th1 免疫を増強することを初めて示したもので、LAM/LM は一つは naive T cell に直接作用して Th1 培養条件下で Th1 分化を増強すること、他の一つは Th-2 培養条件下で DC に作用して間接的に T cell を Th2 から Th1 へと分化させることを示したものである。LAM/LM は Th1 反応には極めて重要な成分であると考えられる。

V. 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に白血球浸潤が認められないことと毒素因子の関係

を解明すべく、PMN 浸潤及び結合への毒素因子の阻害反応、及び細胞障害反応を検討した結果、病原因子 Nga および他の細胞傷害因子により、感染組織部位への PMN 浸潤が阻害され、劇症型として表現化されている可能性が示された。これらの毒素がワクチンのための発症防御抗原の候補として考えられる。

E. 結論

I. BCG の多様性について

- 1) ミコール酸含有糖脂質である cord factor はマウスモデルにおいて結核類似の肺肉芽腫炎症病変を誘導し、その程度は菌種特異的なミコール酸組成を反映していた。代表的なミコール酸サブクラスを持つ BCG 亜株 Russia, Japan, Connaught を比較すると、methoxy-ミコール酸が欠損した Connaught 株が最も顕著な肉芽腫誘導能を示した。
- 2) 宿主細胞からの NO の産生と炎症性サイトカインの産生は初期分与株の方が後期分与株と比べて高い傾向が見られた。
- 3) BCG-I と BCG-II の遺伝子発現パターンの違いを明らかにした。BCG-I で発現の高い遺伝子 24 遺伝子を抽出した。また BCG-II で発現の高い遺伝子 21 遺伝子を抽出した。BCG-I で発現量が最も高くなっている遺伝子領域は、BCG 3475c - BCG 3478、細胞壁糖脂質 PDIM の合成に関与する遺伝子群 *ppsA-E* (BCG 2953 - BCG 2957) と *draA-C* (BCG 2958 - BCG 2960) であった。BCG-II で発現の高い遺伝子には *ahpCD* とともに DevRS に支配される遺伝子群が多く存在した。
- 4) BCG-I には BCG-II に無い PDIM が存在することを明らかにした。PDIM は BCG 亜株間において偏在性のある糖脂質分子であった。
- 5) モルモットおよびマウスにおいて BCG-II に比べ BCG-I が強い DTH 誘導能を示し、細胞増殖やサイトカイン産生などの細胞反応誘導も同様であった。

II. 組換え BCG ベクター系の開発と応用について

- 1) blaF シグナルに改変型 Env (gp140) 遺伝子を繋ぐことにより、BCG で Env 高発現株を取得できたが、菌体外への分泌は確認できなかった。従来用いている pS0246 の約 4 - 5 倍程度コピー数が増加した pS0246R を構築することができた。
- 2) 凍結乾燥した rBCG は、*in vivo* ではプラスミドが脱落しやすく、導入遺伝子に特異的な細胞性免疫の誘導も弱いことがわかった。
- 3) rBCG-SIVGag と rDis-SIVGag による細胞性免疫誘導を目的としたプライム-ブースト型 HIV ワクチンは、SIVmac239 による攻撃試験で対照群に比べて血漿中のウイルス量を有意に低減させ、かつ長期間に渡りその免疫を持続させることが可能であった。
- 4) 組換えワクチン BCG Tokyo[Ag85A] は、アカゲサル結核に対して、防御効果を示した。

III. TLR 制御を取り入れた新規 DNA アジュバントの開発

新規 A 型 CpG-DNA である G9.1 は、抗原特異的血清 IgG, IgA 抗体、粘膜分泌型 IgA 抗体、血清毒素中和抗体の産生を増強した。

IV. BCGTokyo172 株の LAM/ LM の生物活性

BCG 由来の LAM/LM は Th1 反応を誘導する。

V. 病原因子の特定

Nga 等の劇症型 A 群連鎖球菌由来の毒素が、PMN の浸潤を阻害し、免疫細胞の誘導を抑制していると考えられる。また Nga 以外の新たな毒性因子も存在し、糖成分の関与も示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maeyama, J., Komiya, T., Takahashi, M., Isaka, M., Goto, M., Yamamoto, S.: The mucosal adjuvanticity of the oligodeoxynucleotides containing a non-methylated CpG motif on BCG and diphtheria toxoid. *Vaccine* 27, 1166-1173, 2009.
- 2) Seki, M., Honda, I., Fujita, I., Yano, I., Yamamoto, S., Koyama, A.: Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo 172: a comparative study of BCG vaccine substrains. *Vaccine* 27, 1710-1716, 2009.
- 3) 山本三郎: 結核の動向 総合臨床 57: 2549-2550, 2008.
- 4) Naito M, Hirakawa H, Yamashita A, Ohara N, Shoji M, Yukitake H, Nakayama K, Toh H, Yoshimura F, Kuhara S, Hattori M, Hayashi T, Nakayama K: Determination of the genome sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in *P. gingivalis*, *DNA Res* 15: 215-225, 2008.
- 5) Yoshimura M, Ohara N, Kondo Y, Shoji M, Okano S, Nakano Y, Abiko Y Nakayama K: Proteome analysis of *Porphyromonas gingivalis* cells placed in a subcutaneous chamber of mice, *Oral Microbiol Immunol* 23: 413-418, 2008.
- 6) 大原直也, 小林和夫: 結核菌, バイオメディカルサイエンス研究会編. バイオセーフティの事典—病原微生物とバイオハザード対策の実際— 医学評論社 194-197, 2008.
- 7) 大原直也: ハンセン病, 渡邊信, 西村和子, 内山裕夫編. 微生物の事典 朝倉書店 470-471, 2008.
- 8) Sugawara I., Sun L., Mizuno I., Taniyama T., Protective efficacy of recombinant BCG Tokyo (Ag85A) in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) infected intratracheally with H37Rv *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 89,62-67,2009
- 9) Sugawara I., Mizuno I., Higher susceptibility of type I diabetic rats to *Mycobacterium tuberculosis*

infection. *Tohoku J. EXP. Med.*, 216, 363-370, 2008.

10) Murase Y., Mitarai S., Sugawara I., Kato S., Maeda S. Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Microbiol.*, 57, 873-880, 2008.

11) Hayashi D., Takii T., Fujiwara F., Fujita Y., Yano I., Yamamoto S., Kondo M., Yasuda E., Inagaki E., Kanai K., Fujiwara A., Kawarazaki A., Chiba T., Onozaki K.: Comparable studies of immunostimulating activities *in vitro* among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) sub-strains. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* In press (2009)

12) Tsugita K., Hirose M., Murata E., Iho S., General anaesthesia and TrkA mRNA in peripheral blood mononuclear cells. *European Journal of Anaesthesiology* 2008; 25:1032-1033.

13) Hosono N., Iho S., Kishi S., Urasaki Y., Yoshida A., Kurooka H., Yokota Y., Ueda T. Suppression of dexamethasone-induced apoptosis by glutathione S-transferase M1 in a lymphoblastic leukemia cell line, CCRF-CEM: a proposed novel mechanism of dexamethasone resistance. submitted.

14) Fujiwara N., Nakata N., Naka T., Yano I., Doe M., Chatterjee D., McNeil M., Brennan P. J., Kobayashi K., Makino M., Matsumoto S., Ogura H., and Maeda S. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.* 190,3613-3621, 2008.

15) Okazaki M., Ohkusu K., Hata H., Ohnishi H., Sugawara K., Kawamura C., Fujiwara N., Matsumoto S., Nishiuchi Y., Toyoda K., Saito H., Yonetani S., Fukugawa Y., Yamamoto M., Wada H., Sejimo A., Ebina A., Goto H., Ezaki T., and Watanabe T. *Mycobacterium kyorinense* sp. nov., a novel slowly growing *Mycobacterium* sp. related to *Mycobacterium celatum* isolated from human clinical specimens. *IJSEM*. (in press).

16) Hayashi D., Takii T., Fujiwara N., Fujita Y., Yano I., Yamamoto S., Kondo M., Yasuda E., Inagaki, E., Kanai K., Fujiwara A., Kawarazaki A., Chiba T., and Onozaki K. Comparable Studies of Immunostimulating Activities *In Vitro* among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) Sub-strains. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (in press).

17) Isaka M., Zhao Y., Nobusawa E., Nakajima S., Nakajima K., Yasuda Y., Matsui H., Hasegawa T., Maeyama J., Morokuma K., Ohkuma K., Tochikubo K. Protective effect of nasal immunization of influenza virus hemagglutinin with recombinant cholera toxin B subunit as a mucosal adjuvant in mice *Microbiology and Immunology* Feb;52(2):55-63, 2008.

18) Kutsuna T., Nakamura A., M.Kato., Morita H., Iwashima Y., Isaka M., Joh T. Systemic and mucosal immune responses in mice after intranasal

immunization with pneumococcal polysaccharide conjugate vaccines with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Nagoya Medical Journal*, 49,135-148, 2008.

19) Ito T, Hasegawa A, Hosokawa H, Yamashita M, Motohashi S, Naka T, Okamoto Y, Fujita Y, Ishii Y, Taniguchi M, Yano I., and Nakayama T. Human Th1 differentiation induced by lipoarabinomannan/lipomannan from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo-172. *International Immunology*. 20(7), 849-860, 2008.

20) Joraku A, Hombuan A, Kawai K, Yamamoto T, Miyazaki J, Kogure K, Yano I., Harasima H, and Akaza H. Immunoprotection against murine bladder carcinoma by octaarginine-modified liposomes incorporating cell wall of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *British Journal of Urology International*. 103,686-693, 2009.

21) Yoshino N, Kanekiyo M, Hagiwara Y, Okamura T, Someya K, Matsuo K., Ami Y., Sato S, Yamamoto N, Honda M. Mucosal Administration of Completely Non-Replicative Vaccinia Virus Recombinant Dairen I strain Elicits Effective Mucosal and Systemic Immunity. *Scand. J. Immunol.* 68: 476-83, 2008.

22) Mori H, Yamanaka K, Matsuo K., Kurokawa I, Yasutomi Y, Mizutani H. Administration of Ag85B showed therapeutic effects to Th2-type cytokine-mediated acute phase atopic dermatitis by inducing regulatory T cells. *Arch. Dermatol. Res.* 301: 151-157, 2009.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：瀧井猛将：

1) 特許出願中：抗結核化合物、及びその利用（特願 2008-059903）

2) 特許出願中：抗結核薬及びその用途（特願 2009-21026）

クロイツト・フェルト・ヤコブ病 (CJD) 特異的な、 簡便かつ迅速髄液検査法の開発

所 属 国立感染症研究所 感染病理部
研究者 飛梅 実

研究要旨 本研究では、CJD等のプリオン病の早期診断を目的として、疾患特異的な髄液中マーカー検出法の開発を目標とする。プリオン病の生前診断は、臨床所見から判断されるが、他の疾患との共通症状も多く、客観的診断材料を提供する検査法が存在しない。本研究では、プリオン病特異的に脳脊髄液中に放出される疾患マーカーを高精度に検出する系を開発し、プリオン病の早期診断及び他疾患との鑑別材料を臨床に提供することを目指す。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所感染病理部・佐多 徹太郎、高橋 秀宗
- (2) 北海道大学大学院医学研究科・大場 雄介
- (3) 熊本大学大学院医薬学研究科・森岡 弘志
- (4) 岸本医科学研究所・研究開発部・伊藤 禎司

A. 研究目的

本研究で申請者らは、CJDに代表されるヒトプリオン病を早期にかつ特異的に診断しうる検査法を開発する。

プリオン病の一つであるクロイツト・フェルト・ヤコブ病 (CJD) は、年間 100 万人に 1 人の発症率の疾患であり、治療法は存在しない致死性疾患である。本邦では毎年 120 人程度が報告されている。臨床症状は、他の神経症状等を伴う疾患と重複するものが多い。また、CJD の確定診断は脳組織からのプリオン蛋白質の検出により下されるため、生前の確定診断は困難である。CJD 発症の原因となるプリオン蛋白質は伝達性 (感染性) で、不活化が難しく手術機器等を介した水平伝播が懸念される。食人に起因する kuru 病、狂牛病 (BSE) に由来するバリエーション CJD (vCJD) や硬膜移植における医原性 CJD (iCJD) の解析からプリオン暴露後、臨床症状を呈するまで長期の潜伏期が存在することが報告されている。実際に海外では、狂牛病 (BSE) に由来するバリエーション CJD (vCJD) 罹患患者からの

輸血によりプリオン病が伝播した例が報告されている。臓器移植技術が飛躍的に向上した現在、本邦でもこのようなリスクは存在し、簡便、迅速かつ特異的なプリオン病の早期確定診断系の確立は急務である。

プリオン蛋白質は中枢神経系の神経細胞の変性・脱落を誘導することが知られている。この神経細胞崩壊に際し、患者髄液中に障害された神経細胞由来と考えられる 14-3-3 γ 蛋白質が検出される。申請者らは現在、国内の病院からの依頼に答え、髄液中の 14-3-3 γ 蛋白質濃度測定を行っており、結果は判断材料の一つとして用いられている。しかしながら、検出系は手技等が煩雑で濃度測定には不向きなウエスタンブロット法であり、検出できる施設は国内では限られている。本研究で申請者らは、髄液中の CJD 特異的な 14-3-3 蛋白質濃度を簡便、迅速かつ特異的に検出できる系の開発を行うと同時に、他疾患との鑑別マーカーの検索を行い、臨床への有効な判断材料を提供できる系の開発を行う。

B. 研究方法

① プリオン感染成立と共作用する生体側分子の検索

マウス神経芽細胞腫由来細胞株である N2a 細胞は、外来 PrPsc の感染成立および増幅が可能な細胞株として知られている。この N2a 細胞のサブク

ローンである N2a-1 および N2a-5 細胞は、PrPsc に対し非感受性または高感受性細胞株が樹立されており、本研究では、これらの細胞株を用いた比較検討から PrPsc の感染成立に関与する生体側分子を同定する。

解析には Fluorescence 2D Difference Gel Electrophoresis (2D DIGE) (ファルマシア社) system を用いた比較 2 次元電気泳動法を用い、N2a-1 および N2a-5 細胞株の解析から候補分子の検索を行った。さらに、LC/MS 解析により含まれるアミノ酸配列から分子の同定を行い、プリオン感染時における候補分子の動態を検討した。

② プリオン感染に伴い活性化される分子動態検出系構築のための基礎実験

プリオン感染成立と共作用する生体側分子の動態について解析するため、分子標的治療薬イマチニブが承認された疾患である、慢性骨髄性白血病 (Chronic myelocytic leukemia, CML) をモデルとして、患者腫瘍細胞に対するイマチニブの効果を評価する分子イメージングシステムを構築した。薬剤効果の判定には FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) の系を用いた。FRET モニター分子の発現ベクターは N 末から YFP の変異体 Venus、ヒト CrkL、ECFP の順にタンデムに並んだキメラタンパク質を発現するように、遺伝子工学的的手法を用いて作製した。

③ 新規 14-3-3 アイソフォーム特異的抗体の作成

エライザの感度・特異性向上のため、更なる 14-3-3 アイソフォーム特異的な抗体を作成する。14-3-3 タンパク質は分子量約 30kDa のサブユニットからなる二量体タンパク質で、そのサブユニットは、いずれのアイソフォームにおいても、9 個の α -ヘリックスとそれらを繋ぐ短いリンカーペプチドから構成されている。14-3-3 タンパク質の立体構造は報告されており、その N 末端側から 4 個の α -ヘリックス ($\alpha 1 \sim \alpha 4$) は、二量体形成に関与していることが知られている。14-3-3 タンパク質に対して選択的結合性を示し、さらには、 β および γ の 2 つのアイソフォームを識別する抗体を作製するために、14-3-3 タンパク質の立体構造情報を基に抗体作製に用いる抗原タンパク質 (または、ペプチド) の開発を計画した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験は動物愛護倫理規程に則り、申請・承認を受けた方法で実施した。即ち、

必要最小限のマウス数を使用し、採血時にはマウスに対して麻酔処置を施して負担を最大限軽減し、実験終了後は安楽死の処置を行った。

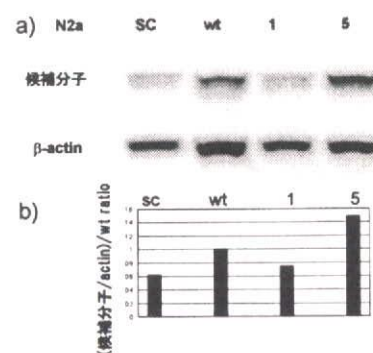
C. 研究結果

① プリオン感染成立と共作用する生体側分子の検索

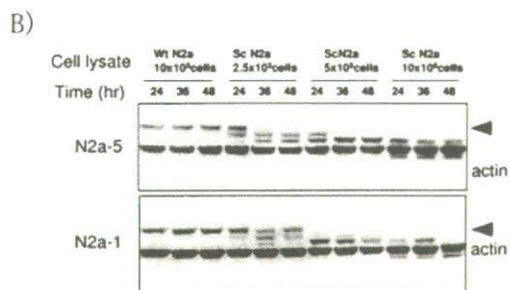
マウス神経芽細胞腫由来細胞株である N2a 細胞は、外来 PrPsc の感染成立および増幅が可能な細胞株として知られている。この N2a 細胞のサブクローンである N2a-1 および N2a-5 細胞は、PrPsc に対し非感受性または高感受性細胞株として分離樹立されている。本研究では、Fluorescence 2D Difference Gel Electrophoresis (2D DIGE) (ファルマシア社) system を用いたこれらの細胞株の比較検討から PrPsc の感染成立に関与すると考えられる生体側分子を同定した。

ウエスタンブロット法により上記 2) で同定された候補分子の発現について、各 N2a 細胞での発現量の確認を行った (下図 A)。候補分子の発現量は、プリオンに高感受性である N2a-5 細胞において優位に高かった。

A)



次に、各 N2a 細胞への外来 PrPsc 添加による細胞内候補分子の動態について検討した。添加する PrPsc として、PrPsc 持続感染細胞である scN2a 細胞の細胞溶解液を用い、コントロールとして非感染 N2a 細胞溶解液を用いた。添加する scN2a 細胞溶解液量および添加後の時間経過を変化させ、細胞内の候補分子の量的動態をウエスタンブロット法を用いて検討した (下図 B)。候補分子は、プリオン感染細胞溶解液を添加した場合においてのみ、細胞内での発現量が低下した。また、この低下は添加する細胞溶解液量依存的であった。



② プリオン感染に伴い活性化される分子動態検出系構築のための基礎実験

細胞内分子の動態について解析するために作成したプローブの模式図を示す(下図 A)。作成したプローブの FRET 効率の上昇は、BCR-ABL の発現量依存的であり、かつイムノブロットで解析した CrkL のリン酸化レベルに比例していた。

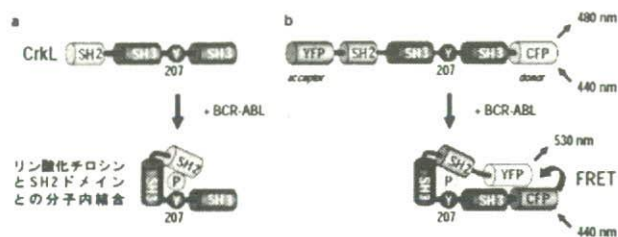
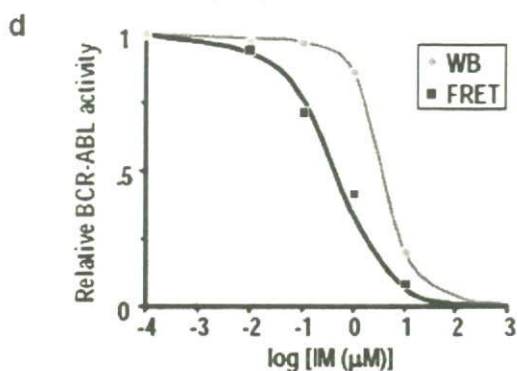
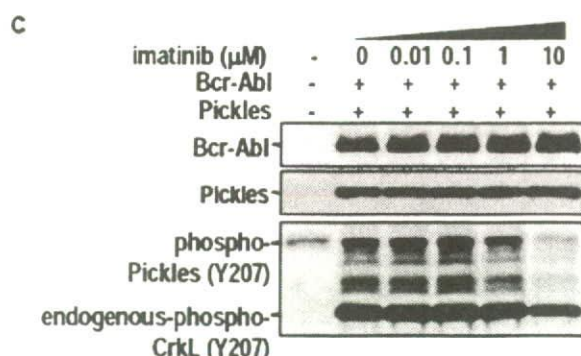
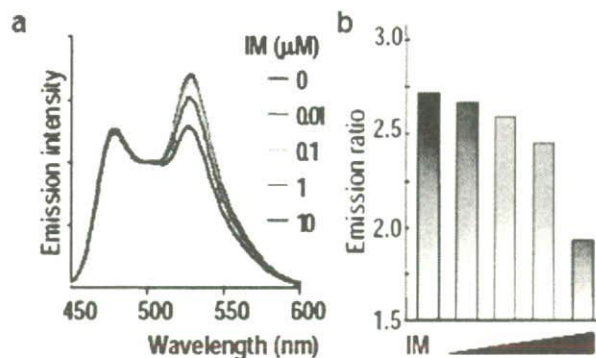


図1 CrkL と Pickles の模式図 (a) CrkL の模式図。N 末側より SH2, SH3, BCR-ABL リン酸化配列, SH3 ドメインからなる。207 番目のチロシンが BCR-ABL によりリン酸化されると、自身の SH2 ドメインが結合することにより、構造変化が生じる。(b) Pickles の模式図。CrkL の両端に FRET のアクセプターとドナーである YFP と CFP を付加した。BCR-ABL の活性により生じる CrkL の構造変化に伴って、FRET 効率が上昇することが予想される。

次に、イマチニブの効果を Pickles を用いて評価した。Pickles と BCR-ABL を発現する 293F 細胞に、様々な濃度のイマチニブ処理を行い、FRET 効率を評価したところ、予想通り、容量依存的に FRET 効率の減少が認められた。特にその減少は 0.01 μM で有意に減少していた (a, b)。一方、イムノブロット法で Pickles と内在性の CrkL のリン酸化状態を検討すると、有意な減少は少なくとも 1 μM 以上の濃度域でのみ認められた (c)。そこで、免疫ブロット法と FRET 分析における、Pickles のダイナミックレンジを計算して、比較ところ、FRET の方が、イムノブロット法に比べて、ダイナミックレンジが広いことが明らかとなった (d)。したがって、我々が今回開発した手法は、イマチニブの薬効評価に関して、より高い感度とより広い測定域を有する手法であることが明らかとなった。



(a) Pickles と BCR-ABL を発現する 293F 細胞に、図に示す濃度のイマチニブ(IM)を 24 時間処理した後の蛍光スペクトル。(b) (a)のスペクトル図から算出した、各イマチニブ濃度における蛍光強度比。(c) (a)と(b)で用いたサンプルを SDS-PAGE で展開し、左に示す抗体でイムノブロットを行った。(d) (b)および(c)の結果をイマチニブ濃度を横軸、BCR-ABL の活性相対値を縦軸にプロットした。

③ 新規 14-3-3 アイソフォーム特異的抗体の作成
免疫抗原として、熊本大学の森岡らにより調製された PCNA 蛋白のヒンジ部分に 14-3-3 蛋白の β および γ 特異的なペプチド配列を組み込んだリコンビナント抗原を使用し、マウスへ免疫した。

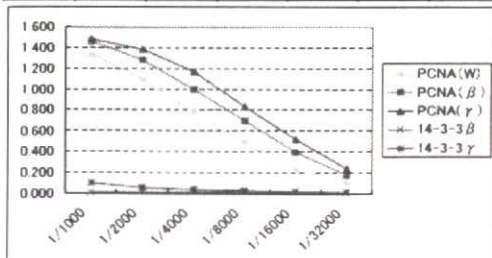


(上図) 14-3-3 を組み込んだ PCNA タンパク質

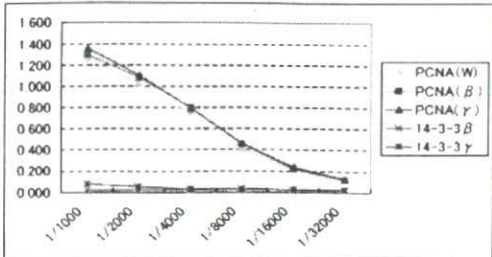
免疫は各抗原 100 μ g/回・匹を TiterMaxGold をアジュバンドとして用いて行い、各マウス 1 週間間隔で 4 回ずつ行った。抗体産生の確認は、リコンビナント野生型 PCNA、リコンビナント 14-3-3 β (67-77) 組み込み PCNA (免疫抗原)、リコンビナント 14-3-3 γ (67-78) 組み込み PCNA (免疫抗原)、そして国立感染症研究所にて調製されたホールのリコンビナント 14-3-3 β 、リコンビナント 14-3-3 γ を用いてエライサ法にて行った。結果を下図に示す。

免疫の結果

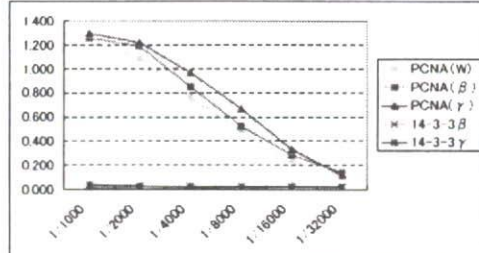
14-3-3 γ mouse#1		A450 630nm					
Day28 (最終免疫)	Dilution	PCNA(W)	PCNA(β)	PCNA(γ)	14-3-3 β	14-3-3 γ	
	1/1000	1.337	1.467	1.479	0.020	0.105	
	1/2000	1.103	1.283	1.384	0.023	0.052	
	1/4000	0.783	1.000	1.169	0.023	0.045	
	1/8000	0.495	0.701	0.835	0.025	0.034	
	1/16000	0.236	0.402	0.523	0.022	0.025	
	1/32000	0.114	0.186	0.244	0.023	0.022	



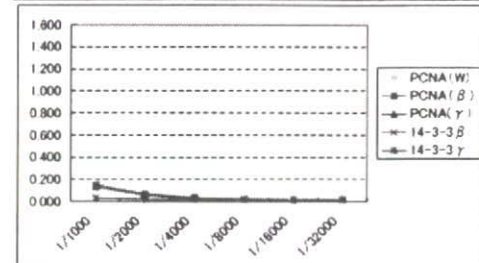
14-3-3 γ mouse#2		A450 630nm					
Day28 (最終免疫)	Dilution	PCNA(W)	PCNA(β)	PCNA(γ)	14-3-3 β	14-3-3 γ	
	1/1000	1.256	1.299	1.359	0.020	0.078	
	1/2000	1.022	1.089	1.106	0.022	0.052	
	1/4000	0.751	0.803	0.798	0.024	0.032	
	1/8000	0.411	0.456	0.463	0.025	0.034	
	1/16000	0.206	0.221	0.235	0.024	0.022	
	1/32000	0.114	0.116	0.124	0.023	0.024	



14-3-3 β mouse#3		A450 630nm					
Day28 (最終免疫)	Dilution	PCNA(W)	PCNA(β)	PCNA(γ)	14-3-3 β	14-3-3 γ	
	1/1000	1.254	1.263	1.296	0.020	0.041	
	1/2000	1.087	1.195	1.221	0.024	0.029	
	1/4000	0.759	0.854	0.967	0.021	0.026	
	1/8000	0.488	0.526	0.666	0.023	0.024	
	1/16000	0.236	0.287	0.332	0.024	0.025	
	1/32000	0.114	0.142	0.118	0.025	0.023	



14-3-3 β mouse#3		A450 630nm					
Day28 (最終免疫)	Dilution	PCNA(W)	PCNA(β)	PCNA(γ)	14-3-3 β	14-3-3 γ	
	1/1000	0.126	0.156	0.136	0.029	0.031	
	1/2000	0.057	0.075	0.062	0.026	0.022	
	1/4000	0.036	0.041	0.026	0.022	0.024	
	1/8000	0.022	0.023	0.023	0.023	0.025	
	1/16000	0.023	0.023	0.022	0.024	0.021	
	1/32000	0.022	0.024	0.024	0.023	0.021	



免疫したマウスから採取した血清による抗体価の測定では、免疫 4 週間後で 14-3-3 γ ペプチド組み込み PCNA を免疫したマウスにおいて免疫抗原に対する抗体の生成が確認されたが、14-3-3 β 組み込み PCNA 免疫マウスにおいては抗体価の上昇は確認できなかった。

14-3-3 γ ペプチド組み込み PCNA に対するマウス抗血清に関して、リコンビナント野生型 PCNA、リコンビナント 14-3-3 β (67-77) 組み込み PCNA、そしてホールのリコンビナント 14-3-3 β 、リコンビナント 14-3-3 γ に対するそれぞれの反応性を確認したところ、免疫原に最も強い反応性を示すものの野生型 PCNA および 14-3-3 β (67-77) 組み込み PCNA に対しても強い反応が認められた。この結果より、組み込み 14-3-3 γ ペプチドに対する抗体が含まれることが期待されたが、ホールのリコンビナント 14-3-3 γ に対しては僅か痕跡程度の反応性しか観察されなかった。(資料 1) 当初 PCNA ヒンジ部分は抗体に認識され易い部位として標的ペプチドの組み込み蛋白として設計されたが、免疫結果では特に組み込みペプチドに選択的な抗体の誘導は得られず、最終目的とするホールの 14-3-3 蛋白に反応する抗体の生成が明確でなかったため、免疫以降のモノクローナル抗体の調製は断念した。

D. 考察

CJD の確定診断は脳組織からのプリオン蛋白質の検出により下されるため、生前の確定診断は困難である。しかしながら、CJD 発症の原因となるプリオン蛋白質は伝達性（感染性）で、不活化が難しく手術機器等を介した水平伝播が懸念され、生前での早期診断法の確立が望まれている。

神経細胞中には細胞内シグナル伝達分子である 14-3-3 γ および β アイソフォームタンパク質が豊富に含まれており、プリオンが神経細胞に蓄積し、細胞の崩壊を誘導する際に髄液中へ放出されることが報告されている。本研究では、この 14-3-3 タンパク質を高感度かつ簡便に検出する方法の開発を目指しており、本年度の研究からも、エライザ系での検出が可能であることが明らかとなったが、さらなる好感度抗体の作成が必要とされる。また、14-3-3 に代わる新規のプリオン感染特異的に共作用する分子として新しい生体側因子を同定した。さらに解析を行い、診断系に用いることが可能であるか否かについて検討する。

E. 結論

- ① プリオン感染と共作用すると考えられる新規の生体側候補分子を同定した。
- ② 細胞内因子の動態を解析できる FRET を用いた検出系を構築した。
- ③ 14-3-3 特異的な新規抗体の作成には至らなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当事項なし。
2. 実用新案登録
該当事項なし。
3. その他
該当事項なし。