

号)に基づき、各省庁および当該施設の動物委員会承認された方法で行った。当該実験動物管理施設の指針に従い、適切な麻酔剤及び鎮痛剤を用いて動物の苦痛の軽減に努めるとともに、実験計画を綿密に練ることにより、不要な動物実験を避け必要最低限の頭数で目的を達成するよう努めた。

## C. 研究結果

### C-1. 小口径血管

血管の脱細胞化と組織学的評価：界面活性剤であるTritonX-100/SDCによる脱細胞化血管においては、管腔構造が維持されず、エラスチン線維の断裂とコラーゲン脱落が観察された。一方、超高压法による脱細胞化血管においては、37℃処理ではコラーゲン脱落とエラスチン線維配向の乱れが認められ、血管の管腔構造維持は見られなかったのに対し、4℃処理では管腔構造を維持し、コラーゲンとエラスチン配向の乱れが最も軽微だった(図1)。

残存DNA・コラーゲン定量：全ての脱細胞化手法で残存DNA量が減少した。37℃超高压処理のみ、未処理血管との間に有意差が見られた。また、界面活性剤および37℃超高压処理では、未処理血管と比較してコラーゲン量が50%以下に減少した。一方、4℃超高压処理では、約65%のコラーゲンが残存した。

力学特性評価：破裂圧試験では、未処理、37℃超高压処理、および4℃超高压処理とも測定限界の1750mmHgでも破裂しなかった。suture retention testでは、全ての試料で有意差は見られなかった。

血管内皮細胞播種：超高压処理では、内皮細胞が単層で血管内腔表面を覆っており、増殖も確認された。

ラット頸動脈移植実験：37℃超高压処理においては、移植3日および1週間後では開存が確認されたが、2週間後では、3例全例で血栓形成により閉塞していた。一方、4℃超高压処理においては、移植2週間後でも3例全例の開存が確認された。グラフト内にはほとんど血栓形成は認められなかった。移植血管の中膜と外膜への少量の細胞浸潤と単層の内皮化が示された(図2)。

### C-2. 角膜

術後6ヶ月では、材料上には角膜上皮細胞様細胞が、材料内には線維芽細胞様細胞が浸潤しており、正常角膜類似構造の再構築がなされていた。

材料上への細胞浸潤については、術後早期より活発に行われ、上皮2mm欠損では9週、上皮4mm欠損では13週後に浸潤した上皮細胞様細胞に覆われた。術後6カ月では、欠損部に浸潤した細胞は材料上で上皮組織様構造物を形成し、ダウングロスや材料内部への浸潤は認められなかった。上皮細胞様細胞は正常な角膜上皮組織類似の構造であった(図3)。

材料内への細胞浸潤については、術後6カ月では、上皮2mm欠損および4mm欠損とも欠損部直下の材料内には線維芽細胞様細胞の浸潤が認められた(図4)。材料内での著しい線維芽細胞様細胞の増殖は認められず、きわめて正常角膜実質組織に類似した構造が認められた。

### C-3. 神経

脱細胞化処理：超高压処理直後(洗浄無)は正常組織と同様の組織像で、細胞核の除去は認められなかったが、洗浄後は効率よく細胞成分が取り除けていた。また、GFAP免疫染色の結果、シュワン細胞も効率よく除去できることが判った。残存しているECMは、その構造を保持していた(図5)。

動物実験：移植1か月後では、コントロール群および脱細胞神経移植群とも多くの細胞が浸潤していた。しかしながら、その細胞腫は両者で大きく異なっており、脱細胞神経移植群では多くのマクロファージが浸潤していた一方、コントロール群では、マクロファージはわずかし確認できなかった。移植110日後には、両群ともに多くの細胞が浸潤していた。神経が長軸方向に並んでいる様子が見られたが、神経束様の構造はほとんど認められなかった。一方、158日後には、多くの繊維状構造が見られ、特にコントロール群で顕著であった(図6)。

次に、電気生理学的に神経機能の再生を評価するために、筋電位を測定した。コントロール群では移植初期でも筋電位が観測されたが、脱細胞神経移植群では全く筋電位は認められなかった。しかし、さらに長期間(6か月)の観察の結果、3例中2例で筋電位が認められるようになった(図7)。

### C-4. 骨格筋

培養骨格筋：コラーゲンゲルは培養に伴って収縮し、シリコンシートから剥離して人工腱を覆うような形態を示した。この培養骨格筋は鑷子で容易に扱いが可能であり、等尺性収縮力測定装置に取り付けが可能であった(図8)。周波数を0.5Hz、パルス幅2msに設定し、電圧を0.5vp-pから50vp-pまで変化させたところ、入

力電圧が高くなるにつれて収縮力は大きくなった。より強力な培養筋を得るため、培養骨格筋を2本束ねたところ、1本のときより大きな収縮力を得ることができた。ピン間距離24mm、滴下量200 $\mu$ lのものが最も強い収縮力を示した(図9)。

**温熱ストレスを加えた培養**：39 $^{\circ}$ Cで培養を行ったところ、培養に伴い筋管細胞が多くなる傾向は見られたが、37 $^{\circ}$ C培養での培養骨格筋と比較すると非常に筋管細胞数は少なかった。また未分化と思われる細胞は培養にともなって多くなる傾向が見られた(図10)。

#### C-5. 安全性評価

**電気インピーダンス測定**：自作した測定システムを図11に示した。酵素処理時間に伴い血管組織の電気インピーダンスは低下し、24時間以上から平衡状態に達する傾向が見られた(図12)。Cole-Cole plotから生体組織の等価回路パラメータを算出したところ、酵素処理時間に伴い細胞内抵抗および細胞外抵抗共に低下し、24時間以上から平衡状態に達する傾向が見られた。酵素処理時間に伴う細胞膜容量の顕著な変化は見られなかった。

**組織評価**：酵素処理時間に伴い血管組織のDNA含有量は低下し、36時間以上から平衡状態に達する傾向が見られた。また、電気インピーダンスとDNA量との間に強い正の相関が見られた(図13)。

### D. 考察

#### D-1. 小口径血管

まず、界面活性剤法と大動脈用洗浄操作を用いた超高压法により、ブタ頸動脈脱細胞化を試みた。両処理とも細胞除去が可能であったが、血管組織構造の破壊が観察された。界面活性剤法では、エラスチン線維の損傷が著しく、脱細胞化血管の力学的強度が低下した。小口径人工血管は移植時のサイズ調整などの必要性から、10cm以上の長さが理想とされ、残存界面活性剤除去が困難であると考えられる。

一方、超高压印加後に4 $^{\circ}$ C静置洗浄した脱細胞化頸動脈では、界面活性剤と同等の細胞除去がなされ、細胞外マトリクスの損傷抑制が可能であった。動脈の主たる構成物のコラーゲンとエラスチンは超高压後の洗浄過程を4 $^{\circ}$ C静置条件にすることで構造維持されることが示された。構造変化を最小にすることが可能であり、生体血管に近い構造、力学的特性を有した脱細胞化血管を得ることが可能であった。

脱細胞化ラット頸動脈の移植実験において、

4 $^{\circ}$ C脱細胞化血管は、移植2週間後の開存が認められた。中膜と外膜の一部に細胞浸潤が認められ、血管内腔に細胞が単層接着していた。基底膜、細胞外マトリクス構造が維持され、生体に類似した力学的強度と早期内皮化による血栓形成回避が可能になったと考えられる。

以上より、超高压処理による脱細胞化頸動脈の小口径血管としての応用可能性が示された。

#### D-2. 角膜

ウサギ角膜内に本材料を移植した後、6カ月後には材料上へ角膜上皮細胞様細胞、材料内部へ線維芽細胞様細胞が浸潤し、組織を構築していた。材料上へ浸潤した角膜上皮細胞様細胞からなる上皮組織様構造物は、過形成を呈していた。しかしながら、材料内部への角膜上皮細胞様細胞の浸潤は認められなかった。材料上に構築された上皮細胞様構造物は、正常角膜上皮と同様に抗ケラチン抗体に対して陽性反応を示す重層上皮様構造をとっていたことから、角膜上皮組織として機能していたことがうかがえる。

材料内へ浸潤した線維芽細胞様細胞は、材料内での細胞密度や局在が、正常の角膜実質層と比べて類似していた。材料内に浸潤した線維芽細胞様細胞はレシピエントの角膜実質細胞由来の細胞が含まれている可能性が高く、角膜実質として機能しているように思われた。

本材料は処理後の力学強度および超微細レベルでも組織構造が維持されており、角膜実質組織としてレシピエントが認識した結果、それぞれの細胞の浸潤による角膜類似組織の再生につながったものと考えられる。本材料上への角膜上皮細胞の浸潤や、内部への角膜実質細胞の浸潤は、高静水圧印加処理による脱細胞化角膜の利点が十分に生かされた結果だと考えられる。

#### D-3. 神経

移植110日後には、コントロールならびに脱細胞化組織移植群ともに多くの細胞が浸潤していることがHE染色より判った。この時点では神経束様の構造はほとんど認められなかったが、158日後には多くの繊維状構造が見られ、特にコントロール群で顕著であった。コントロール群においても110日後にこのような構造が認められなかったことから、この期間に構造の組織再構築が起こっていることを示唆する。また、脱細胞神経には全くなかったGFAP陽性細胞が多く認められたことから、脱細胞組織はシュワン細胞の浸潤に適していることが示唆される。

電気生理学的に神経機能の再生を評価したと

ころ、長期間の観察の結果、3例中2例で筋電位が認められるようになったことは、今回作成した脱細胞神経が、周囲細胞の活発な浸潤を通して神経組織を再生させる優れたポテンシャルを有していることを示唆している。

#### D-4. 骨格筋

培養筋の長さを2倍にしても、収縮力にあまり変化がなかった。一方、2本を束ねた場合、1本に比べておよそ2倍の収縮力を得ることができた。これは束ねる本数が増えると、それにもなると収縮力が大きくなることを示している。束ねるといふ点においては、生体筋における筋繊維束に類似した構造といえる。生体筋も筋繊維が密になることで強い収縮力を発揮しており、強い収縮力を持つ培養筋作製には、培養筋を束ねることが効果的であると考えられた。

Yamaguchiらの2次元培養におけるC2C12細胞に与える温熱ストレスのプロトコルは、DMEMを増殖培地として使用し、37℃で培養後、70-80% confluentに達した時点で分化培地に交換するとともに37℃、39℃、あるいは41℃の温度環境下で最長72時間培養を行っている。その結果、筋管の直径は37℃培養と比べると39℃培養の方が増大し、筋管の融合指数も増大したと報告している。今回の3次元培養の結果では、39℃培養の方が細胞数が少なかった。これは、培養期間は最短でも1週間と長いこと、コラーゲンゲル内の筋芽細胞の分化が阻害されたか、あるいは長期的な熱によって筋管細胞が死滅した可能性がある。

#### D-5. 安全性評価

血管組織の大部分は中膜であり、平滑筋細胞と細胞外基質であるコラーゲン線維およびエラスチン線維が占める。酵素処理時間に伴い動脈組織の電気インピーダンスは低下し、24時間以上で平衡状態に達したのは弾性線維の分解に伴う動脈組織の膨潤によるものであると考えられる。一般的に、生体組織においては組織内の水分量が高くなるにつれて電気インピーダンスが低くなると報告されている。構造の変化に伴う含水率の上昇によって、キャリアイオンの総数の増加が電気インピーダンスの低下に寄与していると推察される。組織染色の結果より、酵素処理により動脈組織中のエラスチン線維は分解され、それに伴うコラーゲン線維間の間隙が広がった事が確認された。本研究で得られた動脈組織の電気インピーダンスの変化は組織構造の過疎化とそれに伴う水分状態の変化によるものであると考えられる。

循環器系における電気インピーダンス法の利

用例としてはインピーダンス・プレチモスグラフィがある。この技術は血流に伴う体肢体積の微小変化を検出する事で、心拍出量、体肢血流量、体肢体液量の無襲侵計測が可能である。また、降矢らは電気インピーダンス法を用いて非襲侵的に血管内の栓子検出を試みている。これらの研究は体外からの測定であり、直接血管組織の情報を推定する報告はほとんどない。本研究において電気インピーダンスとDNA含有量との間に強い正の相関が示された。これは組織構造の変化に伴う細胞数の変化を電気インピーダンスが間接的に示していると考えられる。従って、電気インピーダンス法を用いて動脈組織の脱細胞度を推定可能である事が示された。

#### 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。本研究における脱細胞化組織は、化学処理法よりも優れた細胞浸潤性や安全性を有しており、先行技術に対して高い競争力をもっていると考えられる。本研究終了後の早い時点での臨床応用および商品化を目指している。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Miskon A, Ehashi T, Mahara A, Uyama H, Yamaoka T. Beating behavior of primary neonatal cardiomyocytes and cardiac-differentiated P19CL6 cells on different extramatrix components. *J Artif Organs*. 2009; 12: 111-7.
- 2) Yamasaki K, Hayashi H, Nishiyama K, Kobayashi H, Uto S, Kondo H, Hashimoto S, Fujisato T. Control of myotube contraction by electrical pulse stimulation for bio-actuator. *J Artif Organs*. 2009; 12 (2): 131-7.
- 3) 藤里俊哉. Tissue Engineeringによる心臓弁. *Circulation Up-to-Date*. 2009; 4 (4): 470-8.
- 4) 藤里俊哉. バイオメカニクス. *人工臓器*. 2009; 38 (3): 162-4.
- 5) 赤土和也, 山崎健一, 中尾 誠, 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. *生体医工学*. 2009; 47 (2): 231-6.
- 6) 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. 培養骨格筋のバイオアクチュエータへの応用. *生体医工学*. 2009; 47 (6): 560-5.
- 7) Funamoto S, Nam K, Kimura T, Murakoshi A,

- Hashimoto Y, Niwaya K, Kitamura S, Fujisato T, Kishida A. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials*. 2010; 31: 3590-5.
- 8) Hashimoto Y, Funamoto S, Sasaki S, Honda T, Hattori S, Nam K, Kimura T, Mochizuki M, Fujisato T, Kobayashi H, Kishida A. Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. *Biomaterials*. 2010; 31: 3941-8.
  - 9) Sasaki S, Funamoto S, Hashimoto Y, Kimura T, Honda T, Hattori S, Kobayashi H, Kishida A, Mochizuki M. In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas. *Mol Vision*. 2009; 15: 2022-8.
  - 10) Nam K, Kimura T, Funamoto S, Kishida A. Preparation of a collagen/polymer hybrid gel designed for tissue membranes. Part I: Controlling the polymer-collagen cross-linking process using an ethanol/water co-solvent. *Acta Biomater*. 2010; 6: 403-8.
  - 11) Nam K, Kimura T, Funamoto S, Kishida A. Preparation of a collagen/polymer hybrid gel for tissue membranes. Part II: In vitro and in vivo biological properties of the collagen gels. *Acta Biomater*. 2010; 6: 409-17.
  - 12) Ishii D, Hui-Ying T, Mahara A, Murakami S, Yamaoka T, Lee W, Iwata T. In Vivo Tissue Response and Degradation Behavior of PLLA and Stereocomplexed PLA Nanofibers. *Biomacromol*. 2009; 10 (2): 237-42.
  - 13) Kakinoki S, Uchida S, Ehashi T, Murakami A, Yamaoka T. Modification of PLA Scaffolds Using Bioactive Peptide-Oligo (Lactic Acid) Conjugates. *Jpn Peptide Soc*. 2009; 449-50.
  - 14) Miskon A, Mahara A, Uyama H, Yamaoka T. A suspension induction for myocardial differentiation of rat mesenchymal stem cells on various ECM proteins. *Tissue Engineering*. in press.
  - 15) Ehashi T, Nishigaito A, Fujisato T, Moritan T, Yamaoka T. Peripheral nerve regeneration and electrophysiological recovery with CIP-treated allogeneic acellular nerve. *J Biomat Sci Polym Ed*. in press.
  - 16) Kakinoki S, Yamaoka T. Stable modification of poly(lactic acid) surface with neurite outgrowth-promoting peptides via hydrophobic collagen-like sequence. *Acta Biomater*. in press.
- ## 2. 学会発表
- 1) 江橋 具、西垣戸麻美、森反俊幸、藤里俊哉、山岡 哲二. 脱細胞化神経を用いた損傷神経の再生. 第48回日本生体医工学会、東京、2009年4月23～25日
  - 2) 山崎健一、林 宏行、中村友浩、寺田堂彦、藤里俊哉. 培養骨格筋の収縮および生化学的特性. 第48回日本生体医工学会、東京、2009年4月23～25日
  - 3) 井上智晴、川北悠介、山崎健一、藤里俊哉、宇戸禎仁. 電気刺激によるC2C12細胞の膜電位変化. 第48回日本生体医工学会、東京、2009年4月23～25日
  - 4) 小橋良丞、川北悠介、藤里俊哉、宇戸禎仁. 電気刺激による筋管細胞の収縮運動の定量的評価. 第48回日本生体医工学会、東京、2009年4月23～25日
  - 5) 江橋 具、佐合 満、森反俊幸、湊谷健司、岸田晶夫、藤里俊哉、山岡哲二、北村惣一郎. 石灰化軽減を目指した脱細胞化血管作製法の改良. 第48回日本生体医工学会、東京、2009年4月23～25日
  - 6) 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. 骨格筋の培養とアクチュエータ応用. 第48回日本生体医工学会、東京、2009年4月23～25日
  - 7) 根岸 淳、船本誠一、木村 剛、藤里俊哉、樋上哲哉、岸田晶夫. 脱細胞化技術を用いた小口径血管グラフトの模索. 第48回日本生体医工学会、東京、2009年4月23～25日
  - 8) 近藤英雄、寺田堂彦、山崎健一、藤里俊哉. 電気インピーダンス法を利用した動脈組織の脱細胞度推定の試み. 第48回日本生体医工学会、東京、2009年4月23～25日
  - 9) Sasaki S, Funamoto S, Hashimoto Y, Kimura T, Honda T, Hattori S, Kobayashi H, Kishida A, Mochizuki M. Novel Scaffold for Artificial Cornea Prepared by Decellularization of Cornea Using Ultra-high Hydrostatic Pressurization Treatment. ARVO 2009 Annual Meeting, Fort Lauderdale, FL, USA, May 3- 7, 2009
  - 10) Nam K, Kimura T, Funamoto S, Kishida A. Construction of a Collagen Matrix Designed for Regeneration of Physical and Biological Property of Native ECM. 8th international Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers, Mishima, Japan, May 20-23, 2009
  - 11) Ehashi T, Yamaoka T. Analysis of Host Response against Different Surface Materials for Tissue Regeneration. Immune Regulation: Present and Future, Osaka, Japan, May 25-27, 2009
  - 12) Okuda S, Hashimoto S, Ono K, Okada M, Mochizuki

- S, Fujisato T, Nakaoka H, Yoshiura M. Effect of Culture Medium Flow on Orientation of Muscle Cells. The 13th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics, Orlando, FL, USA, Jul 10-13, 2009
- 13) Kida K, Hashimoto S, Yamada E, Okada M, Mochizuki S, Fujisato T, Sahara T, Ohsuga M. Simultaneous Measurement System for Local Medium pH and Movement of Contracting Myotubes in Vitro. The 13th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics, Orlando, FL, USA, Jul 10-13, 2009
- 14) Hashimoto S, Okada M, Mochizuki S, Fujisato T, Yoshiura M, Nishimura K, Otani H. Orientation of Cultured Myotubes in Vortex Flow of Medium with Swinging Plate. The 13th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics, Orlando, FL, USA, Jul 10-13, 2009
- 15) Yoriki J, Hashimoto S, Tachibana K, Okada M, Mochizuki S, Fujisato T, Otani H. Effect of Magnetic Field on Adhesion of Muscle Cells to Culture Plate. The 13th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics, Orlando, FL, USA, Jul 10-13, 2009
- 16) Hashimoto S, Nakagawa A, Nakamura K, Okada M, Mochizuki S, Fujisato T, Uto S, Tonami H, Yamaoka T. Effect of Electric Field Direction on Contractile Movement of Longitudinally Oriented Myotubes Cultured in Vitro. The 13th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics, Orlando, FL, USA, Jul 10-13, 2009
- 17) 南広祐, 木村 剛, 船本誠一, 岸田晶夫. 生体組織類似構造を有するコラーゲン構造体の作製と物理的及び生物学的特性検討. 第38回医用高分子シンポジウム, 東京, 2009年7月27~28日
- 18) 服部晋也, 本田貴子, 船本誠一, 橋本良秀, 木村 剛, 岸田晶夫, 佐々木秀次, 望月 学, 藤里俊哉, 小林尚俊. 高圧印加処理を用いて作成した脱細胞化角膜の有用性. 第38回医用高分子シンポジウム, 東京, 2009年7月27~28日
- 19) 木村 剛, 今野北斗, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 高圧凝縮pDNAの特性と細胞内発現解析. 第38回医用高分子シンポジウム, 東京, 2009年7月27~28日
- 20) Kobayashi H, Hattori S, Funamoto S, Hashimoto Y, Kimura T, Sasaki S, Mochizuki M, Fujisato T, Honda T, Kishida A. Novel Approach for Artificial Cornea Using Decellularized Cornea Prepared by Ultra High Hydrostatic Pressure. 2nd Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress, Seoul, Republic of Korea, Aug 31-Sep 3, 2009
- 21) Negishi J, Funamoto S, Kimura T, Fujisato T, Higami T, Kishida A. Preparation and Evaluation of Acellular Small-Diameter Vessel from Porcine Carotid Decellularized by Ultra High Pressure Method. 2nd Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress, Seoul, Republic of Korea, Aug 31-Sep 3, 2009
- 22) Fujisato T, Yamasaki K, Kondo H, Hayashi H, Terada D, Hashimoto S. Tissue-Engineered Skeletal Muscle Having Native-Like Contractile Properties. 2nd Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress, Seoul, Republic of Korea, Aug 31-Sep 3, 2009
- 23) Ago Y, Funamoto S, Kimura T, Nam K, Kishida A. Capillary Network Tissue Engineering Using Decellularized Rat Liver Bioscaffold. 2nd Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress, Seoul, Republic of Korea, Aug 31-Sep 3, 2009
- 24) Nam K, Kimura T, Funamoto S, Kishida A. Engineering Collagen Matrix to Regenerate Similar Physical and Biological Property of Native ECM. 2nd Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress, Seoul, Republic of Korea, Aug 31-Sep 3, 2009
- 25) Ehashi T, Yamaoka T. Different Host Responses To Hydrophobic or Hydrophilic Scaffolds For Tissue Engineering. 2nd Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress, Seoul, Republic of Korea, Aug 31-Sep 3, 2009
- 26) Nam K, Kimura T, Kishida A. Preparation and Characterization of Collagen/Phospholipid Polymer Hybrid Gel Designed for Artificial Cornea. 22nd European Conference on Biomaterials, Lausanne, Switzerland, Sep 7-11, 2009
- 27) 服部晋也, 船本誠一, 橋本良秀, 木村 剛, 佐々木秀次, 望月 学, 本田貴子, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 小林尚俊. 高圧印加処理を用いて作成した脱細胞化角膜の臨床応用に向けた試み. 第58回高分子討論会, 熊本, 2009年9月16~18日
- 28) 木村 剛, 橋本良秀, 船本誠一, 南広祐, 藤里俊哉, 小林尚俊, 岸田晶夫. 種々の超高圧脱細胞化組織上での細胞培養と細胞機能解析. 第58回高分子討論会, 熊本, 2009年9月16~18日
- 29) 南広祐, 船本誠一, 木村 剛, 岸田晶夫. 生体組織の特性を有するコラーゲンマトリクスの創製. 第58回高分子討論会, 熊本, 2009年9月16~18日

- 日
- 30) 小林尚俊、服部晋也、本田貴子、船本誠一、佐々木秀次、橋本良秀、藤里俊哉、寺田堂彦、木村 剛、望月 学、岸田晶夫。高分子ナノファイバーを基盤とした角膜実質再生用足場材料。第58回高分子討論会、熊本、2009年9月16～18日
  - 31) 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。骨格筋の培養とバイオアクチュエータ応用。生体医工学シンポジウム2009、千葉、2009年9月18～19日
  - 32) Kakinoki S, Uchida S, Ehashi T, Murakami A, Yamaoka T. Peripheral nerve regeneration using PLA nanofiber conduit modified with neurite outgrowth promoting peptide-oligo (lactic acid) conjugates in the rat. 第46回ペプチド討論会、北九州、2009年11月4～6日
  - 33) 岸田晶夫。脱細胞化組織等の生態由来人工臓器の基礎と現状について。第47回日本人工臓器学会大会、新潟、2009年11月12～14日
  - 34) 湊谷謙司、藤里俊哉、岸田晶夫、山岡哲二。界面活性剤フリーの脱細胞弁・血管の臨床化に向けて。第47回日本人工臓器学会大会、新潟、2009年11月12～14日
  - 35) 根岸 淳、船本誠一、木村 剛、藤里俊哉、樋上哲哉、岸田晶夫。脱細胞化口径人工血管の調製。第47回日本人工臓器学会大会、新潟、2009年11月12～14日
  - 36) 江橋 具、白井 航、多嶋佑介、神村共住、山岡哲二。パターン化された有孔材料に対する生体応答の解析。第47回日本人工臓器学会大会、新潟、2009年11月12～14日
  - 37) 木村 剛、今野北斗、佐野麻美、藤里俊哉、岸田晶夫。高静水圧処理を施した核酸の構造特性と細胞内機能解析。第31回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2009年11月16～17日
  - 38) 田中聖也、柿木佐知朗、藤里俊哉、山岡哲二。β-シート形成性インジェクタブルハイドロゲルの諸条件下でのゲル化挙動。第31回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2009年11月16～17日
  - 39) 橋本良秀、船本誠一、佐々木秀次、望月 学、南広祐、服部晋也、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫。脱細胞化角膜実質を用いた再生型人工角膜の開発と機能評価。第31回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2009年11月16～17日
  - 40) 鈴木彩香、山口春加、江橋 具、森反俊幸、岸田晶夫、藤里俊哉、山岡哲二。血管組織の脱細胞操作における不要タンパク成分の除去。第31回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2009年11月16～17日
  - 41) 根岸 淳、木村 剛、南広祐、藤里俊哉、岸田晶夫。ヘパリン含有PVA人工血管の創製。第31回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2009年11月16～17日
  - 42) 江橋 具、竹村太郎、箕輪貴司、花方信孝、小林尚俊、山岡哲二。スキュフォールド材料に対する生体応答の遺伝子網羅的解析。第31回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2009年11月16～17日
  - 43) 山口晴加、鈴木彩香、佐合 満、朝本康太、江橋具、森反俊幸、藤里俊哉、山岡哲二。脱細胞大動脈に対する石灰化反応の経時的低侵襲評価。第31回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2009年11月16～17日
  - 44) Fujisato T. Tissue-Engineered Skeletal Muscle. 4th Conference on Artificial Muscle. Toyonaka, Japan, Nov 25-27, 2009
  - 45) 笠松研佑、掃部貴文、林 宏行、山崎健一、近藤英雄、藤里俊哉。筋芽細胞を用いた3次元筋組織の構築。第22回バイオエンジニアリング講演会、岡山、2010年1月9～10日
  - 46) 藤里俊哉。クラウン系ミニブタを用いた血管・心臓弁再生の試み。鹿児島大学発 先進医用ミニブタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクト 第1回公開シンポジウム、鹿児島、2010年2月23日
  - 47) 根岸 淳、船本誠一、木村 剛、樋上哲哉、岸田晶夫。小口径脱細胞化血管の作製とin vitro/vivo評価。第9回日本再生医療学会総会、広島、2010年3月18～19日
  - 48) 山岡哲二、湊谷謙司、田中裕史、山口晴加、黒川理世、森反俊幸、中谷武嗣、藤里俊哉。脱細胞化血管に対する石灰化評価とその抑制法。第9回日本再生医療学会総会、広島、2010年3月18～19日
  - 49) 橋本良秀、佐々木秀次、船本誠一、望月 学、本田貴子、南広祐、服部晋也、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫。脱細胞化角膜実質移植による角膜再生の試み。第9回日本再生医療学会総会、広島、2010年3月18～19日
  - 50) 吉澤玲子、藤里俊哉。培養骨格筋組織の作製を目的とした脱細胞化スキュフォールド。第9回日本再生医療学会総会、広島、2010年3月18～19日
  - 51) 掃部貴文、笠松研佑、岡田慎也、寺田堂彦、中村友浩、藤里俊哉。カラーゲンスポンジを用いた培養骨格筋の作製。第9回日本再生医療学会総会、広島、2010年3月18～19日
  - 52) 笠松研佑、掃部貴文、岡田慎也、中村友浩、藤里俊哉。温度変化による3次元培養骨格筋の特性比較。第9回日本再生医療学会総会、広島、2010年3月18～19日
  - 53) 岡田慎也、掃部貴文、笠松研佑、藤里俊哉、中村友浩。中空糸パイオリアクターを用いた三次元骨格筋培養。第9回日本再生医療学会総会、広島、2010年3月18～19日
  - 54) 中尾 誠、掃部貴文、藤里俊哉、筒井博司。培養骨格筋のバイオアクチュエータへの応用。第9回日本再生医療学会総会、広島、2010年3月18～19日

日

- 55) 黒川理世、寺田堂彦、山岡哲二、藤里俊哉. 脱細胞血管のin vitroでの内皮化. 第9回日本再生医療学会総会、広島、2010年3月18~19日
- 56) 船本誠一、西岡 宏、吉田謙一、菊池正博、小林泰彦、藤里俊哉、山岡哲二、岸田晶夫.  $\gamma$ 線を用いた生体由来組織の脱細胞化処理と移植評価. 第13回日本異種移植研究会、東京、2010年3月14日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



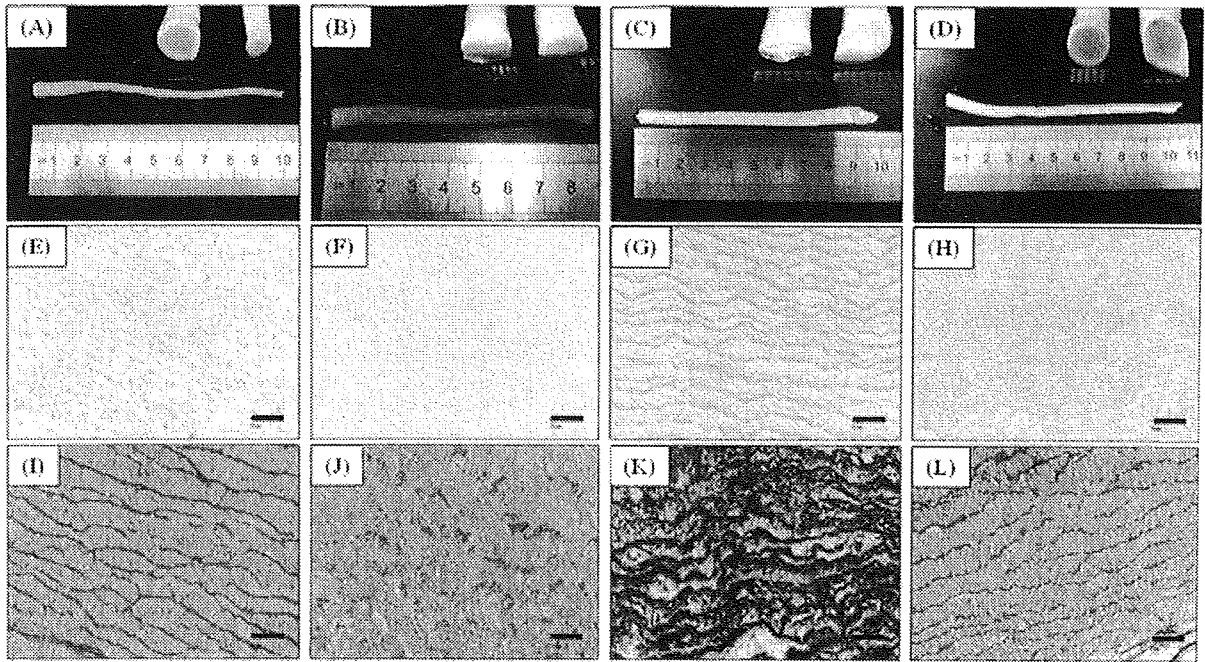


図1. 脱細胞化処理後のブタ小口径血管  
 (AEI) 未処理、(BFJ) 界面活性剤Triton/SDC処理、(CGK) 37℃超高压処理、(DHL) 4℃超高压処理  
 (E-H) HE染色、(I-L) EVG染色、スケールバー：50 $\mu$ m

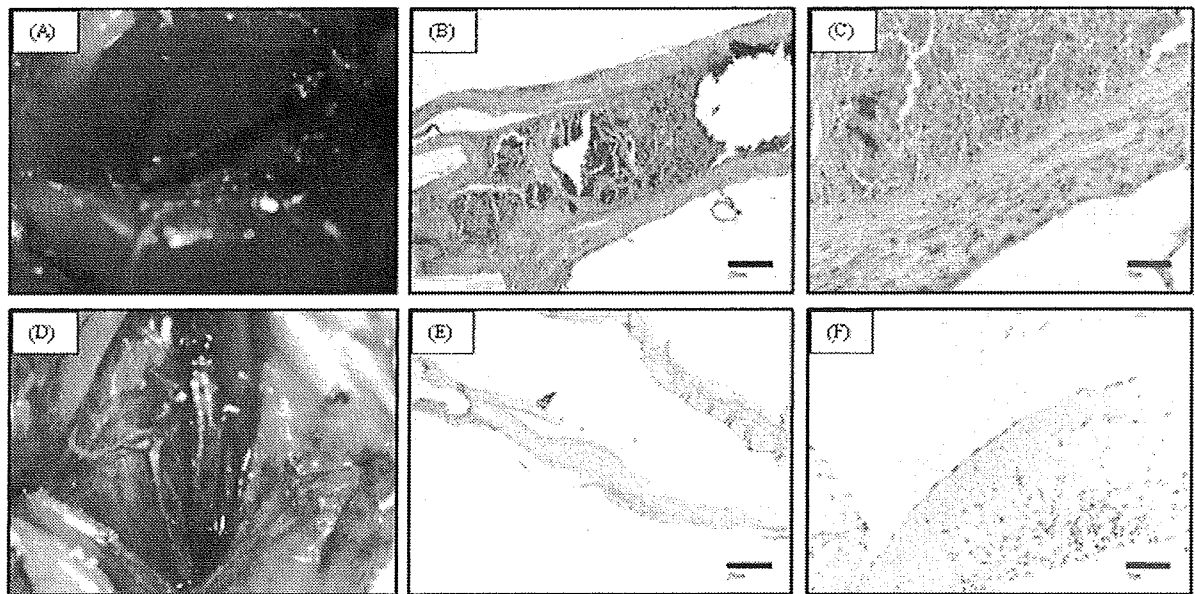


図2. 脱細胞化小口径血管の移植2週間後の組織像  
 (A-C) 37℃超高压処理、(D-F) 4℃超高压処理、スケールバー黒：250 $\mu$ m、赤50 $\mu$ m



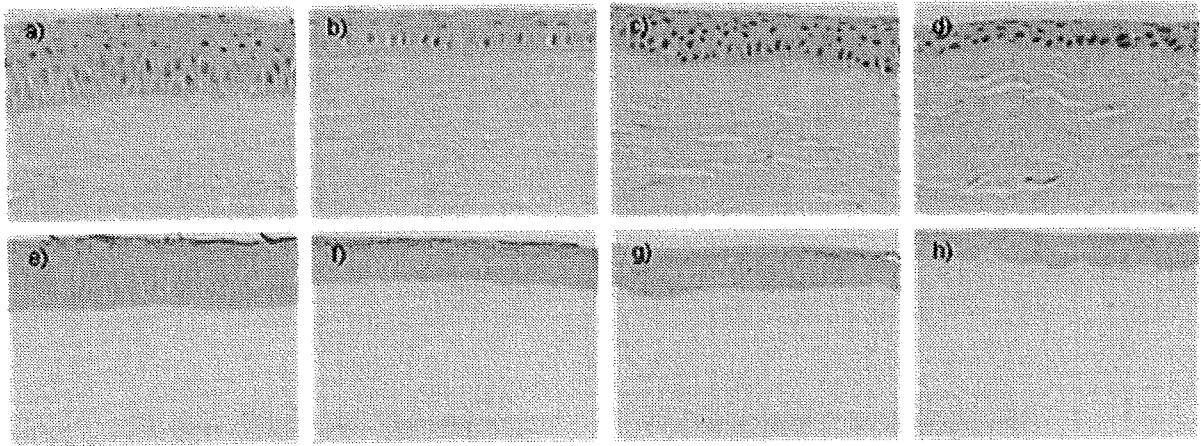


図3. 欠損部および正常部での上皮層

a) 上皮2mm欠損、欠損部、HE染色。b) 上皮2mm欠損、正常部、HE染色。c) 上皮4mm欠損、欠損部、HE染色。d) 上皮4mm欠損、正常部、HE染色。e) 上皮2mm、欠損部、抗ケラチン抗体染色。f) 上皮2mm欠損、正常部、抗ケラチン抗体染色。g) 上皮4mm欠損、欠損部、抗ケラチン抗体染色。h) 上皮4mm欠損、正常部、抗ケラチン抗体染色

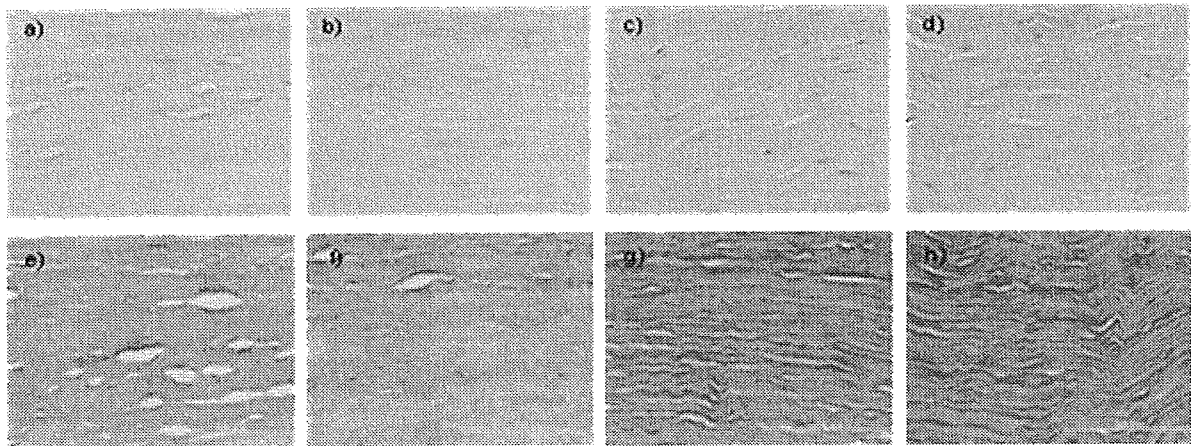


図4. 欠損部および正常部での角膜実質層

a) 上皮2mm欠損、欠損部、HE染色。b) 上皮2mm欠損、正常部、HE染色。c) 上皮4mm欠損、欠損部、HE染色。d) 上皮4mm欠損、正常部、HE染色。e) 上皮2mm、欠損部、MT染色。f) 上皮2mm欠損、正常部、MT染色。g) 上皮4mm欠損、欠損部、MT染色。h) 上皮4mm欠損、正常部、MT染色。

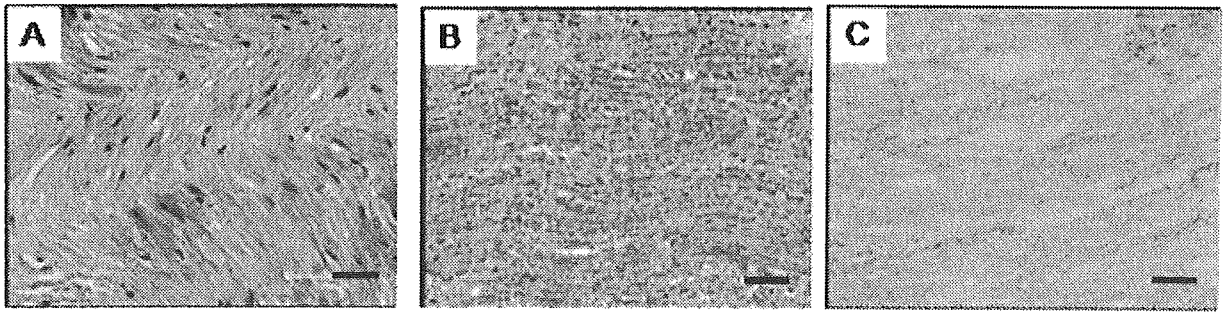


図5. 脱細胞化神経 (A : 未処理、B : 超高压処理 (洗淨無) 後、C : 超高压処理 (洗淨有) 後)

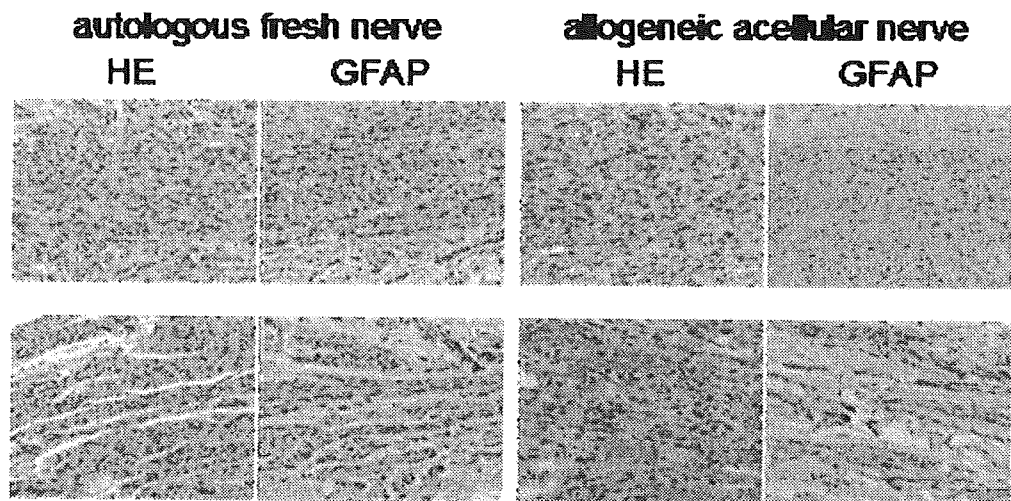


図6. 移植110日および158日後の組織像

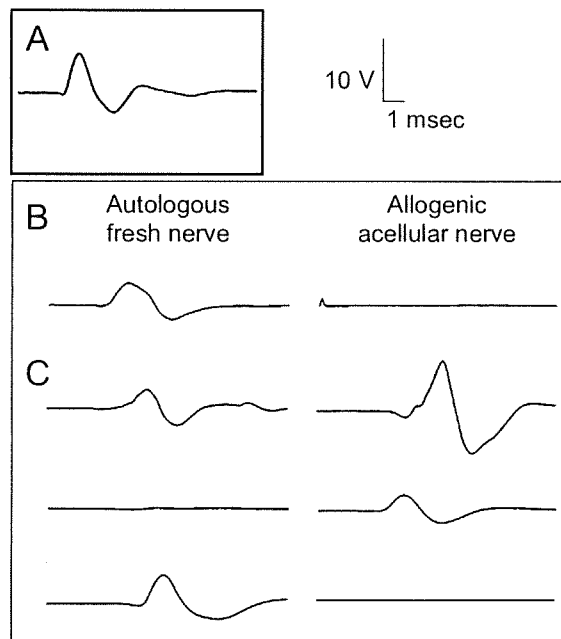


図7. 電気生理学的評価 (A : 正常、B : 短期移植後、C : 長期移植後)

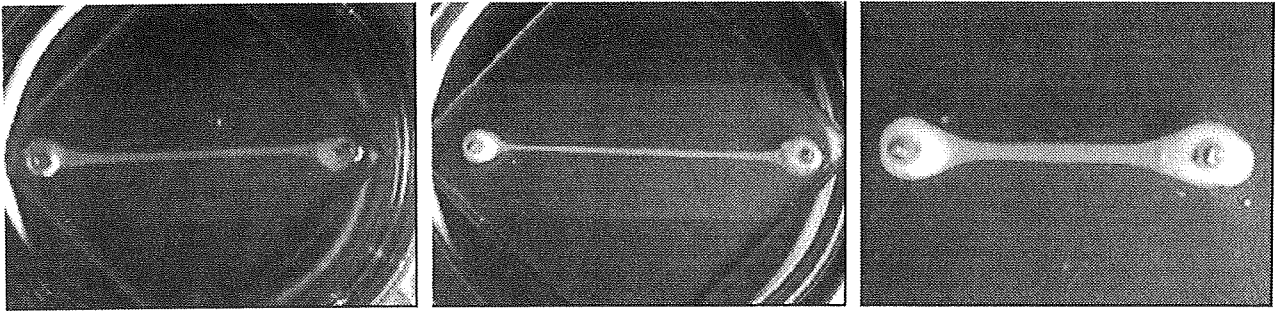


図8. 作製した培養骨格筋  
 (左: 12mm-100 $\mu$ l、中: 24mm-100 $\mu$ l、右: 24mm-200 $\mu$ l)

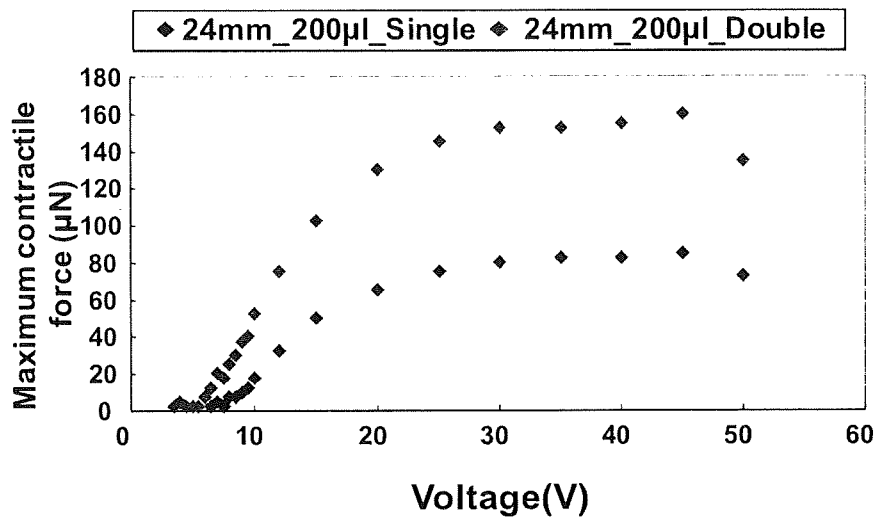


図9. 培養骨格筋の収縮特性 (2本、24mm-200 $\mu$ l)

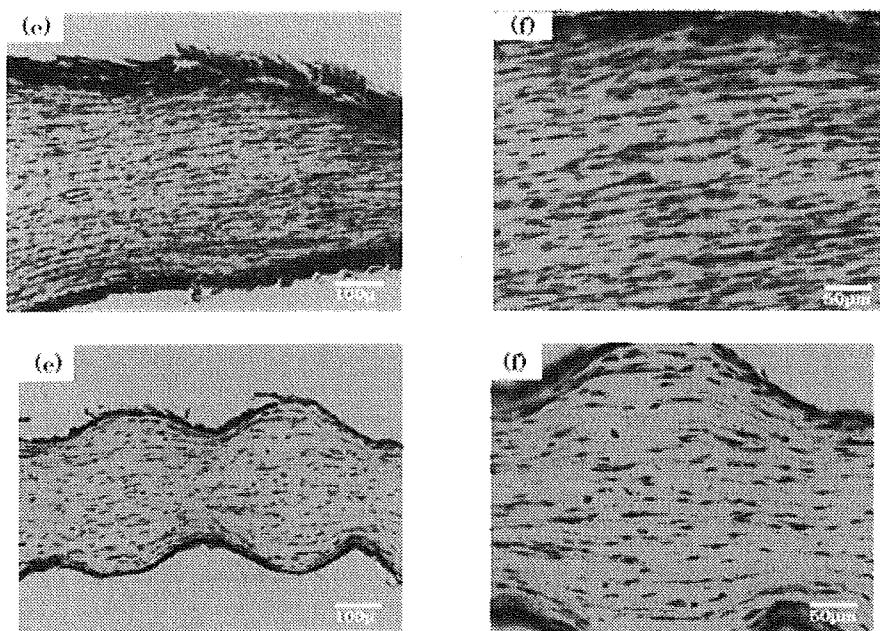


図10. 培養3週間後の培養骨格筋のHE染色像 (上ef: 37 $^{\circ}$ C培養、下ef: 39 $^{\circ}$ C培養)

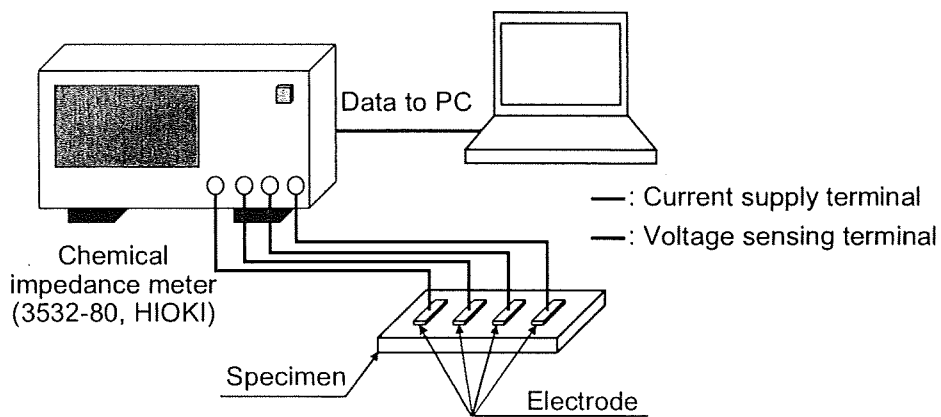


図11. 電気インピーダンス測定システム

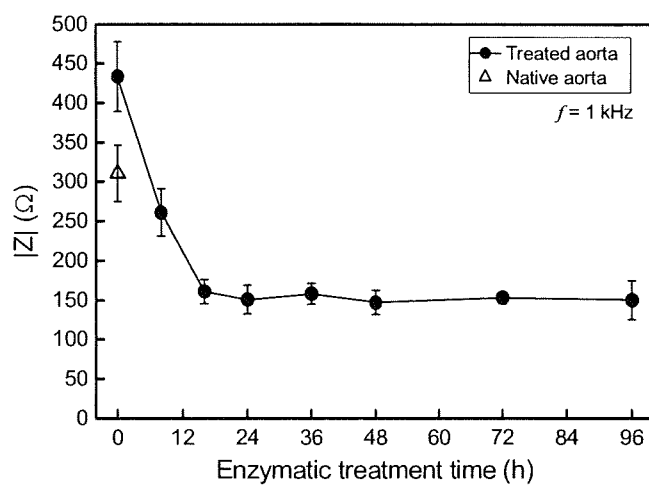


図12. 酵素処理時間に伴う電気インピーダンスの変化

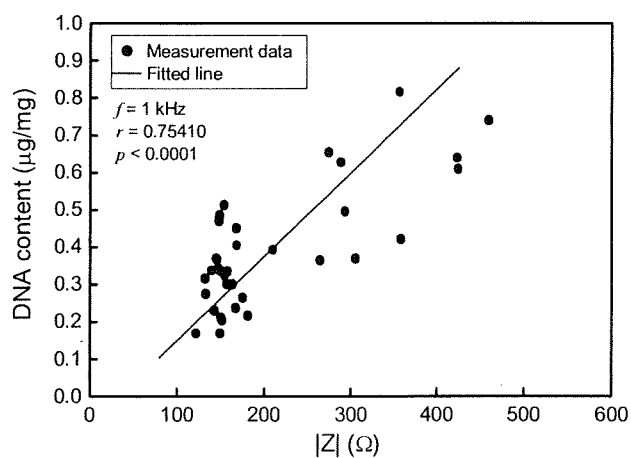


図13. 電気インピーダンスとDNA含有量との関係

## 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  
研究期間 平成19年4月～平成22年3月

研究要旨 新興・再興感染症対策、特に結核対策を構築する一環として、BCG ベクターや粘膜アジュバントの開発研究を進めると共に、BCG 亜株の性質を分子レベル・遺伝子レベルで比較し、多くの差違を見出し、遺伝子、構成成分および免疫活性の相関を明らかにした。

### 研究分担者

- |                    |                |
|--------------------|----------------|
| (1) 国立感染症研究所       | 網康至、小林和夫       |
| (2) 名古屋市立大学        | 井坂雅徳、瀧井猛将      |
| (3) 福井大学           | 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         | 藤原永年           |
| (6) 岡山大学           | 大原直也           |
| (7) 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

世界規模で感染症が深刻化している。なかでも世界人口の約三分の一が感染している結核は、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。BCG は結核の唯一の予防ワクチンであり、小児の結核性髄膜炎や粟粒結核にはきわめて有効であるが、成人の肺結核に対する効果は十分でないといわれる。このため、新興・再興感染症対策、特に効果的な結核対策を構築する一環として、BCG ベクターや粘膜ワクチンアジュバントの開発研究と共に、各国に分与され、長年継代された BCG 亜株について細菌学的、遺伝学的、免疫学的、生化学的諸性質を比較し再評価し、より有効な株やベクターに適した株の選定などの BCG のさらなる活用法を模索する。

### B. 研究方法

- 1) 結核菌または HIV の抗原遺伝子をプラスミドベクターに組み込み、BCG に導入して、外来抗原を発現する組換え BCG ワクチンの構築を試み、有効性、安全性、安定性を検討した。
- 2) 新規 A 型 CpG-DNA である G9.1 の粘膜アジュバント作用を、マウスを用いてジフテリアトキ

ソイド (DT) とともに経鼻投与して免疫し、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。

3) ウイルス感染に対する CpG の効果: 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 法及びビ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。さらに RSV 感染 Hep2 培養液に大量に存在する炎症性サイトカインが IFN- $\alpha$  産生抑制に関与しているかどうかを検討した。

4) BCG 亜株について、BCG の脂質、細胞壁成分ミコール酸のサブクラス・構成比・MALDI-TOF による質量分析、サイトカイン産生能、硝酸塩還元試験、ナイアシン試験等細菌学的試験等での差異を検討した。特に日本株 BCG の遺伝子領域 RD16 が異なるサブポピュレーション I 型 (BCG-I) と II 型 (BCG-II) については、マウスまたはモルモットを用いて抗原特異的遅延型過敏反応 (DTH) 誘導能や採取した脾臓細胞からのサイトカイン産生や遺伝子発現等を比較する一方、菌体の構成脂質やマイクロアレイでの菌の遺伝子発現を比較検討した。

5) BCG の細胞壁骨格 (CWS) について免疫活性をラットで解析した。

6) 再興感染症の一つである劇症型連鎖球菌症について、菌由来タンパク質のマウスの好中球

浸潤やマクロファージの食菌作用に対する作用を調べ、病原因子を特定し、粘膜アジュバントとして組換えコレラ毒素 B サブユニット (rCTB) を用いてワクチン抗原としての可能性を検討し、粘膜ワクチン化を試みた。

#### (倫理面への配慮)

本研究遂行にあたり、動物実験、病原体、DNA 組換えについて各所属機関の規程に従い許可を受け、指定された実験室において扱う。

ワクチン開発の研究は、現在、世界中で進行中であるが、研究方法として実験動物にワクチンとアジュバントを投与して評価する必要がある。動物に苦痛を与えないために、特に経鼻投与については軽麻酔下で行う。また、投与検体は刺激もなく、連続投与しても苦痛を与えないものとする。苦痛を与える可能性のある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。

### C. 研究結果

1) 種々の HIV あるいは結核菌の抗原遺伝子をプラスミドベクターに組み込み、BCG に導入して外来抗原を発現する組換え BCG ワクチンを構築し、モルモットおよびサルでの有効性、安全性、製剤の安定性を確認し、その評価法をも検討した。さらに外来抗原発現増強のためにコドン最適化を行ったが、プラスミドが不安定で脱落を起こしやすかったため、それ以外の方法でそれに匹敵する HIV Gag 高発現株を得るため、高コピー変異型プラスミドを構築したところ、発現レベルが約 10 倍に上昇し、かつ組換えプラスミドが安定的に保持された。さらに BCG ベクターのポテンシャルを向上させるため、抗原提示細胞の機能を増強する効果がある GM-CSF を発現する BCG 株を構築した。また、BCG のチミジル酸合成酵素 ThyX の NADPH 酸化活性を利用した新規 BCG 宿主 - ベクターシステムを構築した。

2) 新規 A 型 CpG-DNA である G91 は、ジフテリアトキソイド (DT) 特異的血清 IgG, IgA 抗体、粘膜分泌型 IgA 抗体、および血清毒素中和抗体の産生を増強した。

RSV-A2 株に感染した形質細胞様樹状細胞では IRF-7 活性化のプロセスが阻害されるため、G91 を添加しても IFN- $\alpha$  が産生されないことがわかった。

3) 14 株の BCG 亜株について生化学試験を行った。硝酸塩還元試験では Birkhaug 株が陽性、Tice、Australia、Pasteur 株が陰性であり、他の株はすべて微陽性であった。ナイアシン試験の結果では、Russia、Moreau、Japan、Sweden、Birkhaug、Montreal、Phipps 株で陽性であり、

他の株はすべて陰性であった。Tween80 水解試験では、Moreau、Sweden、Danish、Connaught、Montreal、Phipps、Australia、Pasteur 株が微陽性であり、他は陰性であった。ウレアーゼはすべての株で陽性であり、ピラジナミダーゼ、パス分解試験はすべて陰性であった。TCH 耐性試験では TCH の濃度  $1 \mu\text{g/ml}$  ではすべて陽性、 $10 \mu\text{g/ml}$  ではすべて陰性であった。カタラーゼ試験の結果では、BCG 亜株すべて低カタラーゼ群に分類されるが、泡沫高が 10mm を超える株が Japan 株と Birkhaug であった。耐熱カタラーゼ試験はすべて、陰性であった。BCG 亜株の生育至適 pH について検討したところ亜株間で違いが見られ分与時期に近い株同士で同じ傾向が見られた。*In vitro* での一酸化窒素ストレス、及び酸化ストレスに対する感受性試験を行った結果、Japan、Danish、Glaxo、Pasteur 株が一酸化窒素に対して比較的耐性であり、Russia、Japan、Birkhaug、Connaught 株が過酸化ストレスに対して比較的耐性を示した。すなわち、各亜株間においては、抗酸菌同定に使用されている生化学試験、および NO または酸化ストレス感受性に関する試験を行ったところ、Pasteur 研究所からの分与時期の近縁の株間で形質がよく似ていることが明らかとなった。これらは、宿主免疫応答、ワクチン効果、副反応の差異と関連している可能性が考えられる。

4) BCG-I は、低用量で BCG-II と比べ、モルモットおよびマウスにおいて強い DTH を示した。また、採取した脾臓細胞からのサイトカイン産生や遺伝子発現も同様の結果が得られた。さらに BCG 菌体の構成脂質、発現遺伝子にも違いが見られ、I、II 型間で網羅的脂質分子を比較した結果、II 型は脂質抗原 PDIM, PGL が欠損していた。

5) BCG の主要成分である細胞壁骨格をオクタアルギニン添加カチオン性リポソーム化によって製剤化し、ラット膀胱腫瘍に対して投与したところ、抑制効果が認められた。アジュバント活性のみならず、抗ガン免疫療法剤としての可能性が示唆された。

6) 連鎖球菌症においては、劇症型に伴う Nga 等の毒性因子が PMN 浸潤および食菌抵抗性に関与していることが示された。これによりまず Nga をワクチン抗原候補としてトキソイド化を試み、rCTB とともにマウスに経鼻投与したところ、血清中に有意な中和活性が得られた。

### D. 考察

BCG ベクターに関しては、結核または HIV ワクチン候補を構築し、その評価を行った。さらに高発現化の改良を行い、HIVgag 高発現株を得ることができたので、実用化上有用なツールとなると考えられる。また株選択法についても改良



を行い、チミジル酸合成酵素 ThyX の NADPH 酸化活性を利用した新規 BCG 宿主-ベクターシステムを構築した。このシステムは安定であり、薬剤耐性非依存的に組換え BCG を選択可能であり、したがって、汎用性が期待される。

BCG 亜株の細菌学的・免疫学的・生化学的特徴の基礎的知見の集積ができた。さらに日本株 BCG I 型 および II 型について免疫活性・遺伝子発現の差異を明らかにできた。また、構成脂質についても差異が認められ、原因として生合成遺伝子 *ppsA* の 1 塩基挿入によるフレームシフトが考えられた。また脂質画分には TLR2 アゴニストが含まれ、宿主応答、ワクチン効果への関与が示唆された。しかしながら結核菌・BCG のゲノムは解読されているものの未知の遺伝子がいまだ多数あり、情報が不足していること、BCG は元来増殖が遅く、ひとつの遺伝子操作に約 6 カ月かかることなどの問題もあるが、今後 RD16 の差異が免疫活性に本質的か否かを解明する段階となった。

また、CpG-DNA である G91 には、粘膜アジュバント効果があり、液性免疫および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、汎用性を考え、BCG などを抗原として用い細胞性免疫および CTL への影響等を調べる必要がある。さらに、IFN- $\alpha$  産生抑制作用をもつ微生物の感染に対して G91 は、感染由来物質が形質細胞様樹状細胞へ作用することを防ぐ技術を組み合わせることにより、防御免疫を誘導することが可能になると考えられる。

BCG CWS の効果を検討した。BCG ワクチンの膀胱内投与は、これまで癌免疫療法の中で化学療法に替わる最も強力な治療法として注目されているが、これが生菌であるため副作用を避けられなかった。BCG CWS のオクタアルギニン添加カチオン性リポソーム化によって副作用の少ない高薬効免疫療法剤としての製剤化が可能と考えられ、これは、これまでのどの CWS 製剤にもまさる製剤として尿路上皮癌の治療に有用な免疫療法剤となることが期待される。

劇症型 A 群連鎖球菌症ワクチン抗原候補を選択し、粘膜ワクチン開発を試みた。NADase は従来の A 群連鎖球菌では産生されず、劇症型に変化した際に産生、発現して来たタンパク質である。このタンパク質は、細胞中の NAD を消費して細胞毒性を示す。劇症型と称する現象に由来する原因物質として考えられている。今回このタンパク質をトキシノイド化し、経鼻粘膜免疫する事によって血清中に中和抗体が産生される事

を示した。この NADase トキシノイドの粘膜免疫で、劇症型発症の抑制効果につながるものと期待出来る。

粘膜アジュバントや BCG ベクター系の開発研究は、社会的要請の高い粘膜ワクチンや結核・HIV ワクチン開発に重要な要素であり、その改良・開発は、我が国のみならず国際的にも医療・福祉分野で社会的貢献度が高いと考えている。

BCG は、各国独自に継代される間にゲノムに変異が起こったことが明らかとなっている。しかし遺伝的変化が細菌学的・免疫学的にどのように影響するかについての詳細ははっきりと解明されていなかった。本研究は、BCG 亜株間の差異を研究した数少ない研究報告の 1 つである。BCG の有効性には接種方法や株間の性状の違いにあるとの見方もあり、本研究の成果は今後の BCG ワクチン利用について重要な知見であり学術的・社会的意義は大きいと考えられる。

亜株間の差異が、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が、さらにこれまで見いだされた性質の分子レベル・遺伝子レベルでの解析を行う必要があるが、それらの知見より、より有効な株の選定、ベクターとしてより適切な株の選定等を行いたい。

また BCG ベクターによる組換えワクチンの評価をし、さらなる粘膜アジュバントやベクター系の改良を続け、新興・再興感染症の病原因子を用いたワクチン候補を創製し、前臨床試験・臨床試験を目指したい。

## E. 結論

新規予防・治療法の開発のために、BCG ベクターについて組換え結核ワクチンおよびエイズワクチンを構築し、その安定性、及びモルモット、サルでの有効性、安全性を確認してきたが、本研究で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。さらに CpG-DNA の粘膜アジュバント効果、BCG 細胞壁骨格の抗腫瘍効果を確認し、劇症型 A 群連鎖球菌症ワクチン抗原候補の選定、粘膜ワクチン化においても基礎的な検討を進めた。また、BCG 亜株間の細菌学的、免疫学的、生化学的な差異の基礎的な知見を積み重ねてきており、遺伝的背景、構成成分および免疫活性の相関が明らかになってきた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Maeyama J, Komiya T, Takahashi M, Isaka M, Goto N, Yamamoto S. The mucosal adjuvanticity of the oligodeoxynucleotides containing a non-



methylated CpG motif on BCG and diphtheria toxoid. *Vaccine*, 2009, 27, 1166-1173.

2) 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. *Microbiol Immunol*. 2008, 52(2):55-63.

3) 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* 2009, 27: 1710-1716.

4) 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, Onozaki K. Comparable Studies of Immunostimulating Activities In Vitro among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) Sub-strains *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2009, 56(2):116-128.

5) 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

6) 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.

7) 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.

8) Yamamoto S and Yamamoto T: Historical review of BCG vaccine in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis*. 60: 331-336 (2007).

9) Yamamoto T, Lasco TM, Uchida K, Goto Y, Jeevan A, McFarland C, Ly L, Yamamoto S and McMurray DN.: *Mycobacterium bovis* BCG vaccination modulates TNF-alpha production after pulmonary challenge with virulent *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pigs. *Tuberculosis (Edinb)*. 87:155-65 (2007).

10) Sugawara I, Li Z, Sun L, Udagawa T, Taniyama T. Recombinant BCG Tokyo (Ag85A) protects

*cynomolgus* monkeys (*Macaca fascicularis*) infected with H37Rv *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 87: 518-525, 2007.

11) Naito S, Maeyama J, Mizukami T, Takahashi M, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Transcutaneous immunization by merely prolonging the duration of antigen presence on the skin of mice induces a potent antigen-specific antibody response even in the absence of an adjuvant. *Vaccine*, 25, 8762-8770, 2007

## 2. 学会発表

1) Takii, T., Hayashi, D., Fujiwara, N., Yano, I., Yamamoto, S., Chiba, T., Onozaki, K.: Comparable studies *in vitro* among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) sub-strains. Forty-four Research Conference, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, July 29-31, 2009. Fukuoka, Japan.

2) Maeyama J, Isaka M, Yamamoto S, Mucosal immune adjuvants for intranasal administration of BCG. the Keystone Symposia. Tuberculosis: Biology, Pathology and Therapy Part of the Keystone Symposia Global Health Series. Jan., 2009, Keystone

1) 前山順一、井坂雅徳、伊保澄子、山本三郎、経鼻投与による新規 A 型 CpG-DNA である G9.1 の粘膜分泌型 IgA 産生増強作用、第 82 回日本細菌学会総会、2009 年 3 月

2) 安田恵美, 林大介, 瀧井猛将, 矢野郁也, 山本三郎、BCG ワクチン亜株の生化学的、免疫学的な性状の比較検討、第 84 回日本結核病学会総会。2009 年 7 月

## F. 知的財産権の出願・登録状況

### (1) 特許取得

1) 米国特許. Kitagawa, H., Iho, S., Yamamoto, S., Matsuki, T. Immunostimulatory oligonucleotide that induces interferon alpha.

2009/10/6(登録許可)

国際公開番号 W02005/083076A1(USA).

2) 特許第 3976742 号「インターフェロンを誘導する免疫刺激オリゴヌクレオチド」平成 19 年 6 月 29 日 北川治和、伊保澄子、松木孝澄、山本三郎

### 3) 特許取得：瀧井猛将

1. 特許「抗結核化合物、及びその利用」

出願番号：特願 2009-037185

2. 特許「抗結核薬及びその用途」

出願番号：特願 2009-021026

3. 特許「抗結核化合物、及びその利用」

出願番号：特願 2008-059903

## 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見出され、遺伝子、構成成分および免疫活性の相関が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、サルでの評価法を検討した。CpG-DNA の適用法の検討、病原因子の粘膜ワクチン化の試みを行った。

### 分担研究者

(1) 国立感染症研究所 網康至、小林和夫  
(2) 名古屋市立大学 井坂雅徳、瀧井猛将  
(3) 福井大学 伊保澄子  
(4) 大阪市立大学 藤原永年  
(5) 岡山大学 大原直也  
(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

結核は結核菌の感染が原因で起こる伝染性疾患で、世界人口の 1/3 にあたる 20 億人以上が感染し、年間発病者は 800 万人、結核死者数は 300 万人を記録するなど、単一の病原体による感染症としては最悪の疾患である。患者の 95% はアジア・アフリカ・中南米等の開発途上国に存在する。BCG はウシ型結核菌の弱毒変異株で、世界中で使われる唯一の結核ワクチンとなっている。BCG は、世界各国に分与され、それぞれの分与先で継代培養されている間に多くの亜株が派生し今日に至っている。最近、それぞれの亜株の遺伝的性状も異なっていることが判ってきた。1998 年に Cole らによってヒト型結核菌 *M. tuberculosis* H37Rv の全塩基配列が解明されたことを利用して、Behr らは結核菌遺伝子と BCG 遺伝子との比較を microarray 法で行い、欠損領域について PCR に基づく塩基配列分析で確認した。このように BCG の分子生物学的解析も始まり、2009 年に日本で用いられている Tokyo172 株について、Seki らによって全塩基配列が解明された。

BCG ワクチンは世界でもっとも広く利用されているワクチンであるが、接種方法や有効性に関して各国で意見が異なっている。少なくとも BCG は、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、効果が十分ではないといわれる場合が多い。その効果にばらつきがみられる理由のひとつとして、BCG 株の違いが大きな要因になっていると考えられる。一方、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とともに、現行 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。中でも日本株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組換え 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組換えワクチンは、HIV に対する効果ばかりでなく、結核免疫を誘導し、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

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。一方、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再評価し、これを達成するのは本研究の目的の一つである。さらに、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、特徴的な脂質分子(糖脂質、リン脂質等)について網羅的に解析し、特に日本株 BCG である BCG Tokyo 172 株の I 型、II 型間に発現している脂質分子の違い、生合成機序とその宿主免疫応答を解析し、脂質生化学的不均一性とワクチン効果および遺伝子学的差異との関連を検討した。更に BCG と宿主との相互作用を推定するものとして、各 BCG 亜株の NO ストレス、酸化ストレスに対する感受性について調べた。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、サルによる評価系の検討をした。さらに粘膜アジュバントとしての CpG-DNA のウイルス感染との相互作用、BCG 細胞壁成分の生物活性の解析、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粘膜ワクチン化の検討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, Moatral 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、Tokyo 172 株、その I 型および II 型を用いた。  
2) 脂質生化学的比較解析とワクチン効果への影響

主に American Type Culture Collection (ATCC) から入手した 14 種類の BCG 亜株を 7H11 培地で培養した。死菌体を超音波破碎後、chloroform/methanol (4:1, 3:1, 2:1, by vol) と H<sub>2</sub>O で二層分配して総脂質画分を抽出した。総脂質画分は二次元 TLC で展開し、発色試薬 (リン脂質, Dittmer 試薬; アミノ基, Ninhydrin 試薬; 糖脂質, 20 % 硫酸) によりスポットを検定した。総脂質画分を TLC で分画し、ヒト TLR2, 4 遺伝子を導入した HEK293 細胞 (HEK-Blue2, 4, Invivogen) を刺激し、24 時間後の NF- $\kappa$ B 活性化を比較した。同様に C57BL/6, TLR2, TLR4 ノックアウトマウスから分離した骨髄性マクロファージを各脂質画分で刺激し、24 時間後の培養上清に産生された TNF- $\alpha$  を ELISA 法で定量し、骨髄性マクロファージの活性化を比較した。以上から各脂質画分に対する宿主応答を検討した。

3) NO ストレス、酸化ストレス、pH 感受性試験

各 BCG 亜株の NO ストレス下における感受性について調べるために、pH 6.6、6.0、5.5 に調製した液体培地に亜硝酸ナトリウム (0.5, 1, 2 mM) ま

たは S-Nitroso glutathione (GSNO) (0.5, 1, 2 mM) を添加し、24 時間培養した。培養後、MTT 法により吸光度を測定し、生菌数を調べた。また、上記 pH, NaNO<sub>2</sub> 条件下で液体培地で 3 日間培養し、次に Middlebrook 7H11 10%OADC 寒天培地にまいてコロニーアッセイを行った。また、酸化ストレスについては過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.5, 1.0 mM) を含んだ培地で同様の実験を行った。

4) BCG-I 型と BCG-II 型の遺伝子発現の差異

I 型と II 型は凍結乾燥品を 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 DNase I で消化、市販の RNA 抽出キットで精製した。精製した RNA は SuperScript III 逆転写酵素を用いて逆転写を行ない、cDNA を合成した。cDNA を鋳型とした PCR は各遺伝子特異的プライマーを用いて行ない、解析した。

5) BCG 亜株の免疫学的性状の比較検討

特に以下の BCG 亜株について検討した: BCG 日本株 (日本製品、台湾製品、タイ製品)、BCG パスツール株 (ベトナム製品、インドネシア製品、エクアドル製品、アルゼンチン製品)、BCG ロシア株 (ブルガリア製品)、BCG デンマーク株、BCG コンノート株。

5-1) 遅延型過敏反応: モルモットを各 BCG の 10<sup>4</sup>CFU で免疫し 6 週後、精製ツベルクリン (PPD) の 0.2、0.1 および 0.05  $\mu$ g を皮内注射し、24 時間後の硬結をキャリーパスで測定し遅延型過敏反応を PPD 皮膚反応として測定した。

5-2) 抗結核免疫誘導能の比較: 1 群 5 匹のハートレー系雌モルモットに各 BCG の 10<sup>4</sup> CFU を皮内接種して免疫した。8 週後に強毒ヒト型結核菌 H37Rv をモルモットあたり 5~10CFU となるようマジソン型噴霧感染装置内で経気道的に感染させた。感染後 5 週目に動物を安楽死させ、肺・脾臓を無菌的に摘出した。臓器をホモジナイザーで乳化し、Middlebrook 7H10 寒天培地上に 37°C で培養し、3 週後に生育した結核菌のコロニー数を算定してワクチンの免疫効果を判定した。

### 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

1-1) 高コピー変異型プラスミドベクターの構築  
*Mycobacterium fortuitum* 由来プラスミド pAL5000 のレプリコンを含む抗酸菌一大腸菌シャトルプラスミド pS0246 から 1.4 kbp *BgIII-XbaI* 断片を切り出し、pUC 系プラスミドにサブクローニングする。このプラスミドの *DraIII-NcoI* 小断片を除いたベクターに、*RepA* 遺伝子中の 3 塩基 (1 アミノ酸) の欠失変異を導入した合成 *DraIII-NcoI* DNA 断片 (88 bp) を連結する。そのプラスミドから 1.4 kbp *BgIII-XbaI* 断片を切り出し、元の pS0246 に戻すことにより、変異型 pS0246R プラスミドを得た

1-2) HIV-1 Gag 抗原の発現ベクター構築

*Mycobacterium kansasii* 由来 antigen 85B のプロモーターと分泌シグナル、あるいは *Mycobacterium smegmatis* 由来 SP2 プロモーター

と *blaF* 分泌シグナルに HIV-1 *gag* 遺伝子 (pNL4-3 由来の野生型または VRC3900 由来のコドン至適型) を繋いだ発現カセットを、pS0246 及び pS0246R にそれぞれ組み込み、種々の発現ベクターを得た。

#### 1-3) BCG への遺伝子導入と Gag 抗原発現の解析

上記の pS0246 及び変異型の pS0246R をベースとした Gag 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。

菌体 lysate 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・分泌量を定量した。

#### 1-4) 組換えプラスミドの抽出と安定性評価

形質転換菌のコロニーを滅菌したガラス棒でピックアップ後、新しい 7H10-OADC 寒天培地に植えつけて一定期間、37°C で培養する。菌体を 7H9-ADC 培地 (50 mg/ml カナマイシン含有) で 2-3 週間振とう培養した。増殖した菌体を遠心分離で集菌後、Tris-EDTA-Glucose 溶液 50 ml に懸濁し、20 mg/ml のリゾチーム溶液 50 ml を加えて、37°C で 3 時間インキュベート後、アルカリ SDS 法によりプラスミドを抽出した。各プラスミドは 1% アガロースゲル電気泳動で分析した。

#### 1-5) マウス GM-CSF 合成遺伝子発現ベクターの構築と BCG での分泌発現

すべてのコドンに置き換えて合成したマウス GM-CSF 遺伝子を、上記 *M. smegmatis* 由来 SP2 プロモーターと *blaF* 分泌シグナルの下流に繋いだ分泌発現カセットを、シャトルベクター pS0246 に組み込んで GM-CSF 分泌ベクターを構築し、BCG での分泌発現を解析した。

#### 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。

BCG Tokyo 株を親株とした *thyA* の遺伝子欠損株  $\Delta$ ThyA と *thyX* の遺伝子欠損株  $\Delta$ ThyX はショ糖感受性遺伝子 (*sacB*) を利用した 2 段階の相同組み換えによって行なった。遺伝子相補株  $\Delta$ ThyA: *thyA*/pNN および  $\Delta$ ThyX: *thyX*/pNN はそれぞれ  $\Delta$ ThyA をプラスミド pNN-*thyA* で、 $\Delta$ ThyX をプラスミド pNN-*thyX* で形質転換することにより作製した。BCG Tokyo 株および変異株は完全合成培地である Sauton 培地で 2 週間表面培養を行なった。

BCG *thyA*、*thyX* 二重遺伝子欠損株の作製は  $\Delta$ ThyX のゲノム上の *thyA* を大腸菌ファージに由来する部位特異的組換え酵素とその標的配列の組み合わせである Cre-loxP システムを応用することで行なった。

#### 3) BCG ベクターによる SIV ウイルス血症抑制効果の評価系の検討

初回免疫後 30 週に追加免疫を行う方法で A 群. rBCG/opt-SIVgag 0.1mg/ rDIs-SIVgag  $10^7$  PFU 3 頭、B 群. rBCG/opt-SIVgag 0.01mg/ rDIs-SIVgag  $10^7$  PFU 3 頭、C 群. rBCG/mac-SIVgag 0.1mg/ rDIs-SIVgag  $10^7$  PFU 3 頭 のカニクイザルを免疫し、その後 3 年後に D 群. 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 群、C 群の個体については、接種後 6 週で、その他の群については 12 週で安楽殺・解剖を行った。この間、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。また、接種 3 週後の SIVgag に対する免疫応答を、SIV p27 蛋白刺激による末梢血リンパ球の CD8 (+) 細胞中の IFN $\gamma$ 、IL-2、TNF $\alpha$  産生細胞の比率により評価を行った。

### 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

G91: 5' -GGGGGGGGGACGATCGTCG-3'

2) 形質細胞様樹状細胞の調製とウイルス感染: 形質細胞様樹状細胞は、健康成人末梢血から BDCA4 陽性細胞、または CD14-/CD3-/CD19-/CD56-/CD16-/CD11c-細胞として分離した。ウイルスには、IFN- $\alpha$  産生能の低いウイルスとして RSV-A2 株 (RSV-A2)、その陽性対照として RSV-A2 より IFN- $\alpha$  産生能の高い RSV-Long 株 (RSV-long) を用いた。形質細胞様樹状細胞の RSV 感染には、RSV 感染 Hep2 細胞の培養液そのものを用いた。実験は P2 レベルで行った。

### IV. BCG 細胞壁骨格 (BCG-CWS) の抗腫瘍性免疫活性

BCG 菌体の調整は常法に従い 37°C Sauton 培地に表面培養 8 日の菌体を 121°C 15 分滅菌して用いた。BCG-CWS は GLP 基準に従って製造された SMP-105 を用いた。オクタアルギニン (R8) リポソーム化 BCG-CWS の治療効果は、F344 ラットに BBN [N-methyl-N-(4-hydroxy butyl) nitrosamine] を発癌剤として飲水摂取させ、Na ascorbate を発癌 promoter として添加して発癌時期を短縮するとともに Harashima らの方法に従い R8 リポソーム化 BCG-CWS を調整し、これを 0.1~2.0 mg, 1 週 1 回, 10 週に亘り膀胱内に直接投与又は静脈内に投与し、発癌抑制効果を検証した。

マウスには MBT-2 膀胱癌細胞を R8 リポソーム化 BCG-CWS と同時に皮下に摂取して、初回投与による移植癌発癌抑制効果を腫瘍サイズの測定及び腫瘍死を指標として効果判定を行った他、4 週間後 R8-CWS を含む MBT-2 細胞を再皮下接種して 8 週後に治療終了、ラット及びマウスとも解剖所見より抗腫瘍効果を判定した

### V. 劇症型連鎖球菌の病原因子の粘膜ワクチン化の検討

劇症型 A 群連鎖球菌由来の劇症型発症因子と推測される NADase と、感染防御因子として推測される M タンパクを組換えコレラ毒素 B サブユニットと共に経鼻投与し、劇症型の発症または感染の防御因子候補として検討した。

#### 1) NADase と M タンパクの精製

pGEX ベクターのマルチクローニングサイトに nga

または emm1 を組込んだ大腸菌を作製した。各大腸菌をアンピシリン (f. c100  $\mu$ g/ml) 加 LB 培地で培養し、IPTG (f. c1mM) で融合タンパク質を誘導した。遠心分離操作で大腸菌を分離後、0.1% Triton X100 添加と凍結融解法で大腸菌を溶解させた。また超音波破碎 (200w, 4 $^{\circ}$ C) もあわせて行い、完全に可溶化させた。可溶化上清をグルタチオンアフィニティーカラムに吸着処理、洗浄処理を行い、トロンビン添加でタンパク融合部位を切断し、目的産物を回収した。限外ろ過膜法で目的タンパクを濃縮し最終精製品とした。精製確認は、SDS-PAGE と CBB 染色法で確認した。

## 2) タンパク質のトキシド化

精製 NADase、M タンパクの毒性を低下させ、一定の抗原性を出させる為にホルムアルデヒドを用いたトキシド化を実施した。ホルムアルデヒド溶液は、パラホルムアルデヒドより加水分解法で 1%ホルムアルデヒドリン酸緩衝液をホルムアルデヒド原液として作製した。各精製タンパクへ終濃度が 0.01~0.2%になる様にホルムアルデヒド原液を添加した。反応停止は、24 時間後に限外ろ過膜法によりホルムアルデヒドを除去し停止させた。吸光度測定 (280nm) と色素法によりタンパク濃度を測定して、トキシド化タンパクとして経鼻免疫に使用した。

## 3) NADase 活性測定

精製 NADase とトキシド化 NADase の酵素活性を測定した。NADase は NAD を基質として加水分解する。NAD はアルカリ存在下 340nm で吸収があるため、定量的に測定できる。

精製またはトキシド化 NADase に一定量の NAD を添加し 37 $^{\circ}$ C 一時間加水分解後に 5N NaOH で反応を停止させ、吸光度 (340nm) を測定した。NAD を標準物質として、一時間辺りの NAD 加水分解量で活性量を算出した。

## 4) NADase 中和抗体測定

NADase トキシド免疫マウス血清と NADase 一定量を 1 時間、37 $^{\circ}$ C で反応させ、NADase の活性中和を行った。このサンプルに NAD を添加し、中和され残存した NADase 活性を、上記 NADase 測定法に準じて算出し、NADase を中和する抗体希釈倍率を算出した。

## 5) マウスへの各抗原の経鼻投与方法

NADase および M タンパクまたは各トキシド 10  $\mu$ g を rCTB10  $\mu$ g と共に BALB/c, C57BL/6, ICR マウス (3 週齢、♀) ヘーテル麻酔下、経鼻投与した。経鼻投与回数は 0、2、3 週目の 3 回実施した。免疫状況は、初回免疫から 13、20 日目に採血し、ELISA 法により確認した。NADase については、更に 28 日目に動物より血液、肺洗浄液を採取し、NADase 中和抗体価、ELISA 抗体価、劇症型 A 群連鎖球菌攻撃に対する防御効果を測定した。

### (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。各所属機関の規程に従い、実験を実施した。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十分配慮する。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。BCG は、ワクチンに由来する株であり、ATCC より購入した株、およびワクチンとして販売されている株を用いている。

## C. 研究結果

### I. BCG の多様性について

#### 1) 脂質生化学的比較解析とワクチン効果への影響

特徴的な脂質分子 (糖脂質、リン脂質等) について網羅的に解析し、日本で結核ワクチン株として使用されている BCG Tokyo 172 株の I, II 型間に発現している脂質分子の違い、生合成機序とその宿主免疫応答を解析した。

#### 1-1) 糖脂質、リン脂質

主要な糖脂質、リン脂質の分布を二次元 TLC で検定したところ、I 型のみが発現している糖脂質のスポットを検出した。TLC での移動度、20% 硫酸噴霧、加熱後の呈色反応はフェノール糖脂質 (PGL) の挙動を示した。質量分析の結果、 $[M+Na]^+$ として m/z 1530 を中心とした疑似分子イオンを検出した。これらの結果は BCG 菌における mycoside B に相当する PGL であると同定した。PGL の脂質部分であるフチオセラン酸ジマイコセロセート (phthiocerol dimycocerosate, PDIM) の有無を TLC で確認したところ PGL 同様、II 型で欠損していた。

他の BCG 亜株 14 株についても PGL, PDIM の発現を検討したところ、4 株 (Moreau, Glaxo, Tice, Australian) が II 型と同様に欠損し、10 株 (Russian, Japanese, Birkhaug, Danish, Connaught, Phipps, Pasteur, Montreal, Mexican, Sweden) が発現していた。

#### 1-2) *ppsA-E* 遺伝子のシーケンス

クローニングした II 型 *ppsA-E* 遺伝子のシーケンスを実施し、I 型と比較した。*PpsA* 遺伝子は約 5.6 kb からなり、II 型において 1 塩基の挿入が確認された。フレームシフトによる *ppsA* 遺伝子の機能低下が示唆された。*ppsA* 遺伝子のアミノ酸配列は I 型と Pasteur 株で完全一致し、結核菌とは 7 アミノ酸が異なっていた。

#### 1-3) II 型菌への *ppsA* 遺伝子挿入

pVV16 ベクターに I, II 型からそれぞれクローニングした *ppsA* 遺伝子を挿入したプラスミドをエレクトロポレーション法で I, II 型菌に挿入した形質転換株を作製した。各株の PGL 発現は TLC を用いて解析した。I 型菌に I, II 型 *ppsA* 遺伝子を挿入すると、親株よりも PGL のスポットが極端に小さくなった。一方、II 型菌に I 型 *ppsA* 遺伝子を挿入すると PGL の産生が回復した。しかし、その発現量は I 型菌に比べ低かった。II 型菌は *ppsA-E* の発現が I 型菌に比べて低いことも DNA アレイの結果から示されている。以上より、II 型菌は *ppsA* 遺伝子の変異、発現量低下あるいは機能低下により PGL が産生されていないことが明らかとなった。

#### 1-4) 脂質画分の TLR を介した宿主免疫応答