

(Fetal Bovine Serum: FBS)を確保して用いることとなった。

D. 考察

1. 臍帯血 T 細胞活性化培養法の GMP に則った改良について

医薬品として認められていない RPMI-1640 培養液の代わりに、医薬品である生理食塩水 (1%アルブミン添加)を含む溶液を用いて細胞を希釈或いは洗浄する方法により良好な結果を得られたことにより、GMP 基準に 1 歩近づけたと考えている。

市販の無血清培養液のうち Alys505、SKY-2、KMB540 の 3 種で良好な細胞増殖が得られたが、Alys505 で培養した細胞では、CD3 陽性率が約 4%に止まったため、T 細胞の活性化培養には適さないと考えられた。SKY-2、KMB540 については、CD3 陽性細胞率が 90%以上となったため、利用が可能であることが示唆された。今後、実際に臍帯血バンクで保存された細胞を用いても同じ結果が得られるかどうか検証する必要がある。SKY-2、KMB540 はヒト血清アルブミン (医薬品グレード)、組み換え型ヒトインシュリン・IL-2 以外のタンパク質を含まない無血清培地であるが、詳しい培地組成は未公表である。今後これらの培地を臍帯血 DLI 用活性化 T リンパ球の調製に使用していくためには、必要であれば秘密保持契約等を結び、詳しい培地組成の開示を求め、培養液製造の GMP 化を求めていくことが必要と考えられる。

2. 臍帯血 Treg 細胞の体外増幅法の確立について

固相化抗 CD3/CD28 抗体および TGF- β を用いた基本的増幅系はすでに確立されているが、本年度は mTOR 阻害剤である Everolimus を添加することにより Treg マーカーである FOXP3 の安定的発現を実現することができたため、安定した品質の Treg 細胞を調整することが可能となった。また、Treg 細胞品質評価の指標として CD26 発現が有望であると考えられた。

3. EBV 感染モデルマウスに対する臍帯血 DLI の効果について

臍帯血 DLI に関しては、これまで探索的臨床研究により臍帯血移植後の日和見感染症や

混合キメラ状態に対する効果を示唆するデータが積み重ねられてきた。一方、臍帯血 DLI の作用メカニズムについては、ウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞の活性化が関与することを示唆する結果が以前の動物実験により得られているが、更に検証が必要である。今年度行われたヒト化 NOG マウスを用いた臍帯血 DLI の動物実験は、用いたマウス個体数が限られており、今後の追加実験が必要であるが、臍帯血 DLI により臍帯血移植後の日和見感染症の代表的存在である EBV 関連 LPD に対して延命効果があることを示唆する結果と考えられる。また、モデルマウスの主要臓器における EBV DNA 量も臍帯血 DLI により低下することが示唆された。さらに、CD4 陽性 T 細胞を選択して投与する場合より、T 細胞分画の全体を投与の方が効果が大きいことも示唆された。今後、この実験系を用いて追加の実験を行い以上の点を確認するとともに、臍帯血 DLI の作用メカニズム (エフェクター細胞の特定など) についても解析する計画である。

4. 第 I 相臨床試験のプロトコールの策定について

プロトコール案策定と平行して、FBS の検定が必要であり、今後培養や検定の中で最適のロットを選択して確保する予定である。一方 FBS を用いた場合には、異種タンパクが培養細胞に利用されることになり、反復投与が必要となった場合に、輸注関連有害事象が生じる可能性を否定できない。今回は単回投与の第 I 相試験であるが、第 II 相以降のプロトコール内容によっては変更等の配慮が必要となる。その点で、無血清化は重要かつ緊急性を要する課題であり、今後本研究の中でも開発と検証を進めていく予定である。プロトコールの完成後、第 I 相試験の開始に当たっては、専属細胞培養士及び細胞解析担当者の配属が必要であり、またその後の先進医療化や製剤化という観点からは、早期からの PMDA への戦略相談が必要である。

E. 結論

臍帯血 DLI に用いる活性化 T 細胞など、臍帯血リンパ球を主成分とする細胞治療製剤の医薬品化に向けて、GMP に則った培養法の確

立、Treg 細胞調製法の改良、臍帯血 DLI の前臨床試験、臍帯血 DLI 臨床第 I/II 相試験プロトコール策定を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsui N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Like Disease With Somatic KRAS Mutation. *Blood* [Nov 9, Epub ahead of print], 2010.

2) Seki M. Kimura H. Mori A. Shimada A. Yamada Y. Maruyama K. Hayashi Y. Agematsu K. Morio T. Yachie A. Kato M. Prominent eosinophilia but less eosinophil activation in a patient with Omenn syndrome. *Pediatr. Int.* 52:e196-9, 2010

3) Inoue H. Takada H. Kusuda T. Goto T. Ochiai M. Kinjo T. Muneuchi J. Takahata Y. Takahashi N. Morio T. Kosaki K. Hara T. Successful cord blood transplantation for a CHARGE syndrome with CHD7 mutation showing DiGeorge sequence including hypoparathyroidism. *Eur. J. Paediatr.* 169:839-44, 2010.

4) Okamoto K, Iwai Y, Ohhara M, Yamamoto M, Morio T, Aoki K, Ohya K, Jetten AM, Akira S, Muta T, Takayanagi H. I κ B α regulates TH17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature.* 464: 1381–1385, 2010.

5) Albert MH, Bittner TC, Nonoyama S, Notarangelo LD, Burns S, Imai K, Espanol T, Fasth A, Pellier I, Strauss G, Morio T, Gathmann B, Noordzij JG, Fillat C, Hoenig M, Nathrath M, Meindl A, Pagel P, Wintergerst U, Fischer A, Thrasher AJ, Belohradsky BH, Ochs HD. X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: Clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options. *Blood.* 115:3231-3238, 2010.

6) Yamanaka Y., Tagawa H., Takahashi N., Watanabe A., Guo Y-M., Iwamoto K., Yamashita J., Saitoh H., Kameoka Y., Shimizu N., Ichinohasama R., and Sawada K. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT

signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood.* 114(15): 3265 – 3275, 2010.

7) Miki Yuzawa , Tokiko Nagamura-Inoue, Ikuo Ishige , Kazuo Ogami, Tomoki Tamura, Atsuko Takahashi, Hideki Kodo, Satoru Yamaguchi, and Arinobu Tojo, Time from cord blood collection to processing and temperature influence the quality of mononuclear cell products isolated using a density-gradient protocol., *The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy.*(日本輸血・細胞治療学会誌), in press, 2010

8) Hishizawa M, Kanda J, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective study. *Blood.* 116,1369-76, 2010.

9) Isoyama K, Oda M, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, Kigasawa H, Kobayashi R, Mimaya J, Inoue M, Kikuchi A, Kato S; Japan Cord Blood Bank Network. Long-term outcome of cord blood transplantation from unrelated donors as an initial transplantation procedure for children with AML in Japan. *Bone Marrow Transplant.* 45:69-77,2010.

10) Arai A, Imadome K, Watanabe Y, Takahashi M, Kawaguchi T, Nakaseko C, Fujiwara S, Miura O. Clinical features of adult-onset chronic active Epstein-Barr virus infection: a retrospective analysis. *Int J Hematol*, in press.

11) Iwata S, Yano S, Ito Y, Ushijima Y, Gotoh K, Kawada J, Fujiwara S, Sugimoto K, Isobe Y, Nishiyama Y, Kimura H. Bortezomib Induces Apoptosis in T Lymphoma Cells and Natural Killer Lymphoma Cells Independent of Epstein-Barr Virus Infection. *Int J Cancer in press.*

2. 学会発表

(国際学会)

1) Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakagawa A, Kawano F, Ichikawa S, Nakamura H, Miura O, Shimizu N, Ito M, Yamamoto N, and Fujiwara S. A xenotransplant model of chronic active Epstein-Barr virus (EBV) infection by use of NOG mice. 14th Biennial Conference of the International Association for Research on EBV & Associated Diseases. Birmingham, UK. Sep. 4-7, 2010.

2) Ogawa M, S. Sugita S, Shimizu N, Morio T, Mochizuki M. Use of Human Herpes Virus (HHV) PCR Assays to Detect Viral DNA in Ocular Fluids of Patients with Herpetic Eye Diseases. ARVO 2010, Fort Lauderdale, Florida.

3) Morio T, Tomizawa D, Atsuta Y, Nagamura T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara S, and Kato S. Unrelated umbilical cord blood transplantation for patients with primary immunodeficiency in Japan. The 52nd ASH Annual Meeting. Orlando, Florida, USA. December 2010.

4) Morio T, Tomizawa D, Atsuta Y, Nagamura T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara S, and Kato S. Unrelated umbilical cord blood transplantation for patients with primary immunodeficiency in Japan. XIVth meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Isutanbul, Republic of Turkey. October 2010.

5) Morio T. Btk Controls ROS Production and Apoptosis in Human Neutrophils. XIVth meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Isutanbul, Republic of Turkey. October 2010.

6) Morio T. Immunomonitoring and T-cell immunotherapy in CBT. The Second Korea-Japan Cord Blood Transplantation Symposium. Yokohama in Japan. September 2010.

(国内学会)

1) 森尾友宏. 造血細胞移植後のウイルスモニタリングと感染制御. 第11回血液細胞療法フォーラム 2010年10月16日 大阪

2) 森尾友宏. 我が国における再生医療・細胞治療の現状と展望: 発展のために必要なこと. 第4回細胞再生療法シンポジウム・JSTイノベーションサテライト新潟育成研究成果報告会 2010年7月23日 新潟

3) 森尾友宏. 移植医療におけるウイルス感染症対策: 迅速検出法と治療戦略の現状と展望. 第35回群馬移植研究会 2010年5月26日 群馬.

4) 満生紀子、遠藤明史、青木由貴、小野敏明、高木正稔、梶原道子、長澤正之、峯岸志津子、落合 央、清水則夫、森尾友宏、水谷修紀: 当科で施行した造血幹細胞移植患者における網羅的 PCR 法による経時的ウイルス、第32回日本造血細胞移植学会総会、2010年2月、浜松市

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

インフルエンザウイルス型特異的および共通抗原に対する抗体の作成と迅速診断法の確立

所 属 国立感染症研究所 免疫部
研究代表者 横田 恭子

研究要旨

東洋紡社製小型発光自動分析装置 POCube®で使用する H5N1 の検出キットの最適化を検討し、キット用抗体が認識する H5HA の立体構造理解のための動物細胞発現系を一部作製した。更に、バイオインフォーマティクス的手法に基づき、表面露出 HA ペプチドに反応すると期待される多数のモノクローナル抗体を新たに得ると同時に、今後の抗体作製用エピトープセットの設定とその特異性・感度を *in silico* で評価するプロトコルの開発を開始した。

研究分担者

- (1) 国立感染症研究所
インフルエンザウイルス研究センター
影山 努
- (2) 国立感染症研究所 免疫部 大西和夫
- (3) 東洋紡 (株) 敦賀バイオ研究所
三澤 修平

(委託研究)

国立感染症研究所 免疫部 横田恭子

A. 研究目的

本研究は、東洋紡株式会社が開発した多孔性フィルター固相と化学発光免疫測定を組み合わせ開発されたインフルエンザウイルス抗原を簡便かつ安全に検出できる自動分析装置 POCube®に、国立感染症研究所が保有あるいは新たにバイオインフォーマティクス的手法を用いて作製する抗体を利用し、幅広くインフルエンザウイルスの型共通あるいは型特異的抗原エピトープを認識する、感度と特異性に優れたインフルエンザウイルス検出キットの開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

- 1) 様々な H5 亜型特異的な HA のアミノ酸配列およびエピトープの候補領域を網羅的にリストアップし、3 量体を形成した際に HA の表面に出ている事が予

測されるいくつかの領域のペプチドを選択してマウスを免疫した。

- 2) 型特異的ならびに共通エピトープ部分を *in silico* で予測して標的エピトープをデザインした。また、迅速診断系のためのエピトープセットとしての特異性・感度を *in silico* で評価する方法を検討した。

- 3) POCube®専用キットに用いる各試薬中の BSA 或いはカゼインの濃度、前処理液中の界面活性剤の種類、濃度、加熱処理による測定感度の違いを検討した。また、種々の組換え HA を用いて検出特異性を評価した。

- 4) インフルエンザウイルス HA 遺伝子を PCR で増幅して pIRES2-DsRed Express に組み込み、293T 細胞にトランスフェクトした。細胞を既に作製した抗 H5HA 抗体 4 種類、次いで FITC 標識抗マウス抗体で染色してフローサイトメーターで解析した。

(倫理面への配慮)

モノクローナル抗体作製等に必要動物実験に関しては実験動物委員会の承認を受ける。

C. 研究結果

- 1) いくつかのペプチドに反応する多数のモノクローナル抗体を得た。現在は、ウイルス粒子に対する反応性の確認を行っている。

- 2) インフルエンザウイルス・ゲノム配列データベースの解析、文献情報および各種データベースよりウイルス株間で保存された共通エピトープと型特異的エ

ピトープの候補配列を網羅的に列挙し、型共通エピトープとしては HA2 の N50-D90 領域によく集中する事が示唆された。また、エピトープセットの設定とその特異性・感度の *in silico* 評価プロトコルを確立するため、分子動力学計算を行う事によって互いの立体構造の干渉の度合い、分子フレキシビリティの抗原抗体結合親和性への影響などのシミュレーションを行った。

3) POCube®のキットには BSA を添加したほうがカゼインの数倍以上高感度で測定でき、TritonX-100 を増量したものが今回の比較検討では最も良好な反応性を示した。安定性試験では、4 度でも-80 度の凍結保存でも感度の低下は認められなかった。

4) HA を動物細胞表面に恒常的に発現させるため、まずクレードの異なる代表的 HA 遺伝子 4 つを組込んだ pIRES2-DsRed Express 発現クローンを作製して 293T 細胞に発現させ、4 種類の抗体の反応性の相違を FACS で解析する系を確立した。

D. 考察

既に作製した抗 H5N1 抗体を利用した自動分析装置 POCube®は既存のキットよりも既に感度は良いが、更に改良を重ねるための情報が蓄積できた。前処理については臨床検体に含まれる成分の影響がキット性能に大きな影響を与える恐れがあり、実用現場に近い疑似検体などを使用した評価が必要である。今後このキットに用いた抗体の HA 立体構造認識が明らかになれば、新たに作製する抗体の中からより優れた抗体を選択することが容易となることが期待される。また、動物細胞で発現させた HA に対する各抗体の反応は、エライザやウエスタンブロットとは異なる特徴を有していたことから、今更に細胞種による HA の発現様式の相違も考慮に入れて様々な HA 恒常的発現細胞を作製する。

本研究で新たに作製したのはペプチドに対する抗体であり、同じあるいは別の亜型のウイルス粒子に対する反応性を詳細に解析してその有用性を検討する必要がある。また、これまでの捕捉抗体・検出抗体の組み合わせでは反応が立体構造障害を受ける事が多かったことから、HA2 の膜近傍領域に対するモノクローナル抗体を効果的に作製するプロトコルの開発を進めたい。

E. 結論

東洋紡社製小型発光免疫自動分析装置 POCube®での H5N1 の検出キットの最適化および組換え HA に

対する反応性の検討を行い、十分な検出感度を有するキットの作製準備が整った。また、これらの抗体が認識する H5HA の立体構造解析のための発現系が一部作製できた。更に、3 量体を形成した際に HA の表面に出ている事が予測されるいくつかの領域のペプチドに反応する多数のモノクローナル抗体を新たに作製した。また、ウイルス株間で保存された共通エピトープや型特異的エピトープの候補配列を網羅的に列挙し、これらの情報をもとにエピトープセットの設定とその特異性・感度の *in silico* 評価プロトコルの開発を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

(総説) 横田(恒次) 恭子、影山努: プタ由来インフルエンザウイルス(A/H1N1pdm)、広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査—その数値をどう読むか—(第 7 版)、(日本臨床社)、日本臨床 68(6): 385-388, 2010

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

申請中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記なし

新興・再興感染症を標的としたプライムブーストワクチンの開発と有効性・安全性評価システムの構築

所属 国立感染症研究所 血液・安全性研究部
研究代表者 前山 順一

研究要旨 プライムブーストワクチン開発のための BCG、rBCG 及び経皮免疫に関する基礎的知見を集積した。プライムワクチン検討の一環として BCG 亜株では前期および後期分与株の相違、Tokyo172 株 I 及び II 型の表現型と遺伝子変異との相関を見いだした。

研究分担者

- | | |
|-------------------|----------------|
| (1) 国立感染症研究所 | 網康至、内藤誠之郎 |
| (2) 名古屋市立大学 | 瀧井猛将 |
| (3) 大阪市立大学 | 藤原永年、松本壮吉 |
| (4) 岡山大学 | 大原直也 |
| (5) 宮崎大学 | 後藤義孝 |
| (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

現在世界的に感染症が深刻化している。中でも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細菌性疾患である。

BCG は世界で唯一使用されている結核予防ワクチンである。BCG はウシ型結核菌の弱毒変異株で、1921 年この菌を確立した Calmette と Guerin にちなみ BCG と名づけられた。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。さらに細菌学的、免疫学的にも差異があることが我々の研究を含め報告されている。

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。これらにより RD1 から RD16 の領域で BCG 遺伝子に欠損が生じ、BCG の亜株間で差異がみられるのは、RD2、RD8、RD14、RD16 であることが明らかとなった。このように結核菌全遺伝子との比較および遺伝学的解析技術により進化の系統樹が作成された。それによると 20 年代に分与された日本株、ロシア株、ブラジル株などの前期分与株と、30 年代に分与されたグラクソー株、デンマーク株、パスツール株などの後期分与株に分けられることがわかった。

BCG は小児における粟粒結核や結核性髄膜炎に対して十分効果的で、発症率も低下させるが、その効果は 15 年程度で成人期までは続かないとされ、また WHO は成人肺結核への有効性は不定としている。しかし、この根拠はメタアナリシスによるものであり、実験科学的な検証を行っていない。使われた野外調査は対象年齢、経過観察期間、使用された株や接種方法も異なっているため、BCG 亜株の免疫効果については、条件を一定にした再評価が必要である。

しかしながら、BCG は長年世界中で使用されてきた実績があり、副作用の頻度・程度も十分に把握されている。また生菌ではあるものの乾燥に強く、運搬が容易で、生産コストもたいへん低く抑えられる。これらの性状を持つことから、BCG を遺伝学的に組み換え、効果を顕著に高めることができれば、BCG は理想的なプライムワクチンとなることが期待できる。これまでも多くの遺伝子組換え BCG ワクチン(rBCG)が実験的に作製され、その効果が動物実験を中心として検証されてきた。

一方、日本国内においては、20 歳前から結核の罹患率が徐々に上昇してくることが知られている。このような時期を前に抗結核免疫を増強するためのブースター免疫を行うことは有効であると考えられる。BCG プライム免疫によって産生されるメモリー T 細胞を回復し結核免疫の増強を図るために、侵襲性が低く結核菌抗原を添加した溶解性マイクロニードルによる独創的な経皮接種ワクチンや粘膜投与型ワクチンは肺粘膜や全身性の結核特異的免疫を増強するブースターとして有用と考えられる。

さらにこれらワクチン候補の有効性・安全性を評価するためのシステムを構築する必要がある。我々は成人期の抗結核免疫の低下した状態のモデルを構築するため、モルモットモデルで検討しているが、現在のマウスによる検討だけでなく、ブースターワクチン開発のために早急な確立が必要である。さらにモルモットは、ヒトと類似した結核病態を示し、細胞性免疫を測定するための有力な実験動物であるが、現状では免疫学的指標

を測定するシステムがほとんどない。そこでモルモットの各種免疫学的指標の測定システムを構築することができればワクチン開発ばかりでなくその品質管理にも有用であると考えられる。また、マウスでは様々な指標を測定するシステムが整っているため、系統と抗酸菌の組み合わせを検討することによって、結核等難治性抗酸菌感染モデルを作製しようと考えられる。

本年度は、プライムワクチンとしての BCG を再評価する一環として、その多様性解析をさらに進めた。まず各 BCG 亜株の前期分与株 (Japan, Sweden) と後期分与株 (Connaught, Pastuer) について、実験動物を用いた系での BCG 亜株間での抗原提示能の差異について検討を行った。

さらに、日本株 BCG Tokyo 172 のサブポピュレーション I 型、II 型の遺伝学的差異および表現型について検討した。特に菌体成分に着目し、発現する脂質の相異点を探索し、その表現型の違いと生合成遺伝子との関連を明らかにすることを目的とした検討を行った。

BCG を含む抗酸菌の細胞壁にはミコール酸含有糖脂質、リポマンナン (LM) やリポアラビノマンナン (LAM) 等のユニークな脂質成分が多く含まれ、これらは抗酸菌を特徴づける脂質表現型としてコロニー形態や宿主応答に影響することが想定される。さらにこれらに注目して膀胱癌を標的とした細胞壁骨格 (CWS) のアジュバント活性の解析も行った。

さらに BCG 投与方法の比較検討、効果の持続性等について検討した。プライムワクチンとしての BCG の効果を高めるために rBCG の作製を試みた。その方法として、薬剤耐性遺伝子をマーカーとしない作製法を検討した。また細胞性免疫誘導に関する迅速で簡便な評価システムの構築を行った。

一方、ブースターワクチンに関しては、本年度は、マウスを用いて新規経皮免疫法の有用性や投与条件等の基礎的検討を行い、さらに結核菌由来および組換えタンパク質の結核菌抗原投与を行い、抗体産生増強反応を解析した。

B. 研究方法

I. BCG の多様性について

1) 菌株: *Mycobacterium bovis* BCG 亜株 (Japan 株、Sweden 株、Connaught 株、Pastuer 株等)、BCG Tokyo 株の前シードロット 172 株、現行のシードロット 172-1 株、172-1 より作製された 172-2 株、172-1 株より作製されたコマーシャルロット、172-1 から分離された I 型および II 型株は日本 BCG 研究所山本三郎博士から恵与いただき、本研究に使用した。

各菌株は Middlebrook 7H9 Broth/10% ADC/0.25% Tween 80 培地 (7H9-ADC-Tween80) にて培養した。

2) 各国亜株の抗原提示能の評価

マウス骨髄細胞を GM-CSF で分化させた樹状細胞を抗原提示細胞とし、BCG 添加 (MOI 10) 24 時間後、conA で刺激した脾細胞との共培養を行った。BCG 添加 3 日後に抗原提示された T リンパ球活性化の指標としてインターフェロン (IFN- γ) と IL-12 を ELISA で測定した。

3) シードロット、コマーシャルロット中の I 型、II 型の比率の測定

シードロット、コマーシャルロット中の I 型、II 型の比率は Shibayama ら (Biologicals 35, 139-143) の方法に従い、定量的リアルタイム PCR 法により行なった。すなわち、16S rRNA 遺伝子の増幅量を対照として、BCG3405c 遺伝子の増幅量を比較した。

4) I 型と II 型の増殖速度

Sauton 培地で 3 週間培養した I 型と II 型の菌体を 300 ml 容量のバツフル付き三角フラスコ中の 7H9-ADC-Tween80 培地 50 ml に植菌した。対数増殖期 (OD0.3 - 0.7) に達したのち、OD0.1 になるように新鮮な 7H9-ADC-Tween80 培地 50 ml に継代した。対数増殖期に達したのち、再度新鮮な 7H9-ADC-Tween80 培地 50 ml に継代した。このとき OD0.05 になるように調整し、36°C で培養し、その後の吸光度を測定した。

5) BCG3405c - BCG3408 導入株の性状

I 型株の BCG3405c あるいは BCG3405c - BCG3408 をプラスミド pNN2 に挿入した。作製したプラスミドはエレクトロポレーション法により II 型株に導入し、カナマイシン含有 7H10-ADC 寒天培地上に播種した。得られた株における遺伝子の発現は半定量 RT-PCR 法により測定した。

6) Tokyo 172 株 I 型および II 型の培養および総脂質画分の抽出

Tokyo 172 株 I 型および II 型は、10% Middlebrook OADC Enrichment (Difco) と 0.5% グリセリンを加えた 7H11 寒天培地を用いて 37°C で 2 週間培養した。

総脂質画分の抽出は、死菌体を混合溶媒クロロホルム-メタノール (2:1, v/v) に懸濁し、超音波発生装置によって菌体を破碎後、蒸留水を加えて二層分配した。有機層を濃縮乾固することで各菌株の総脂質画分を得た。

7) 形態観察

コロニー形態の観察は、7H11 寒天培地での培養 2 週間後のコロニーを光学顕微鏡により観察した。さらに 7H9 液体培地で 2 週間培養した菌液をフィルター濾過 (5.0 μ m) し、塊状菌体を除いた菌液を Poly-L-lysine コートしたカバースリップに固定し、走査型電子顕微鏡 (S-4700, 日立製作所) により観察した。

8) 菌体成分 (ミコール酸、脂肪酸、糖) の分析

菌体ミコール酸は、メチルエステル誘導体とし、薄層クロマトグラフィー (TLC) によりミコール酸サブクラスを精製し、MALDI-TOF MS を用いて各分子種を決定した。

菌体脂肪酸は、ミコール酸と同様に脂肪酸メチルエステルとし、ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (Gas chromatography/mass spectrometry, GC/MS) 分析を行い I 型および II 型の脂肪酸組成を比較した。

菌体構成糖は、2 M トリフルオロ酢酸による菌体の加水分解 (120 °C, 1 時間) を行い、遊離糖はアルジトールアセテート誘導体として GC/MS 測定で各菌株の糖組成を比較した。

9) 2 次元 TLC による総脂質画分の解析

シリカゲル薄層クロマトプレートを用いて、総

脂質画分の2次元TLCを各種展開溶媒系で行った。TLCプレートを展開後、20%硫酸、Dittmer試薬、ニンヒドリン試薬を噴霧し、全脂質、リン脂質、アミノ基含有脂質をそれぞれ検出した。展開溶媒の1例を下記に示した。

(a) Phenolglycolipid (PGL) 検出用, 1st; クロロホルム-メタノール (96:4, by vols), 2nd; トルエン-アセトン (80:20, by vols.)

10) PGL および Phthiocerol dimycocerosate (PDIM) のGC/MS分析

PGLを部分メチル化アルジトールアセテート誘導体として、GC/MSにより構成糖を分析した。また、脂肪酸部分は弱アルカリ加水分解後に*n*-ヘキササンで抽出し、トリメチルシリル (TMS) 化してGC/MSで分析した。

11) *PpsA* 遺伝子のクローニングと形質転換株の作製

I型およびII型の各 *ppsA* 遺伝子のクローニングは、I型、II型からそれぞれゲノムDNAを抽出し、各ゲノムDNAを鋳型として、Forward: 5'-CATATGACGGGAAGCATCAGTGGTGAAG-3', Reverse: 5'-AAGCTTTACACCGACCTCTCGGCC TCAG-3' のプライマーでPCRを行った。II型の *ppsA* 遺伝子はシーケンズを行いI型 *ppsA* 遺伝子と比較した。さらに、pVV16ベクターにI型、II型からそれぞれクローニングした *ppsA* 遺伝子を組み込んだプラスミドをエレクトロポレーション法でI、II型に挿入し、形質転換株を作製した。

II. BCG細胞壁成分のアジュバント活性

F344ラットに8週間0.05 w/v% BBN [N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine] を発癌剤として飲水摂取させ、Na ascorbate を発癌プロモーターとして添加し、発癌時期を短縮して観察した。10週間後、ラット尿中に異型細胞の出現したことを確認し、リポソームに搭載したBCG-CWSまたはミコール酸各種製剤を8週間 (Day 73-128)、週1回、合計8回投与し、実験終了日 (Day 129) に剖検を実施した。リポソームに搭載するBCG-CWSは、0.03 mg, 0.1 mg 又は1.0 mgとした。ラット血清中IFN- γ 値をリポソーム製剤投与 (又は静注) 前、注入開始後8時間後及び24時間後に採血し、製剤投与4週目と8週目に測定した。ラットへの製剤投与中は、一般状態、体重測定、摂餌量、摂水量、尿検査、血液化学的検査を実施し、重量を測定した。

腫瘍性病変は、粘膜のdigital写真を用手法によりトレースし、2値化画像について腫瘍数を算定し、各腫瘍の長径、短径を測定しvolumeを算出した。その後、paraffin埋包後、切片をHE染色し、simple hyperplasia (S), papillary nodular hyperplasia (PN), papilloma 又は carcinoma に分類した。

III. BCG投与方法の比較検討

1) 動物: ハートレイ系モルモットに1群4匹で以下の4経路7群で免疫した。(1) 気管挿管投与 10^6 CFU (2) 経鼻投与 (A) 5×10^5 CFU (3) 経鼻投与 (B) 5×10^6 CFU (4) 噴霧投与 (A) 3×10^4 CFU (5) 噴霧投与 (B) 3×10^5 CFU (6) 皮内投与 10^4 CFU (7) 非免疫。

2) 遅延型過敏反応: モルモットをBCGで免疫し

6週間後、精製ツベルクリン (PPD) の0.2、0.1または $0.05 \mu\text{g}$ を皮内注射し、24時間後の硬結をキャリアパスで測定し遅延型過敏反応をPPD皮膚反応とした。

3) 結核菌感染: 免疫8週間後にグラスコール社の噴霧装置を用い1匹当たり10-20 CFUの *M. tuberculosis* Erdman を噴霧感染した。解剖: 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。右肺下葉および脾臓の2/3をホモジナイザーで乳化し、ミドルブルック7H10寒天培地上に37°Cで培養し、3週間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。

IV. BCGの免疫効果の持続性

雌性6-8週齢C57BL/6マウスに 10^4 CFUのBCG Tokyo ワクチン株をPBSに懸濁し、腹腔内投与を行った。経時的に肝臓、脾臓の菌数 (CFU) を測定した。また、Km R BCG (カナマイシン耐性BCG: ゲノムにKm耐性遺伝子を挿入した組み換えBCG) を気管内に投与し、4-5週間後に解剖した。肺はホモゲナイズした後、適宜希釈し、Km ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 含有7H11-OADC寒天培地に接種して37°Cで3週間培養後、CFUを算出した。コントロールとしてワクチン非接種群とCFUを比較した。リンパ節細胞をPPDと共に7日間培養し、上清中のサイトカイン産生量を測定した。45-55週齢の老齢マウスについても同様の実験を行い、若齢マウス (6-8週齢) と比較した。雌性6-8週齢STAT6ノックアウトマウス (STAT6 KO) とその同系BALB/cマウスについても同様の実験を行った。

V. 難治性抗酸菌症モデルの構築

C57BL/6 (B6) マウス (4週齢、雌) を感染実験に用いた。マウスあたり *Mycobacterium avium* Mino 株 2×10^5 cfu を尾静脈内に接種した。ステロイド剤は、感染マウスを4群に分け、2つの群には水溶性プレドニン (PD) を感染直後から毎週1回投与 ($2\text{mg}/\text{head}/\text{s.c.}$) した。抗菌薬剤による治療としてPD投与群と非投与群の各1群についてリファンピシン (RFP)、レボフロキサシン (LVFX) およびクラリスロマイシン (CAM) の3剤併用療法を試みた。治療は感染後2週目より開始し、RFPとLVFXについては $25\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ 、CAMは $16\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ の割合で連日経口的に投与した。臓器内生菌数の測定は、肝臓、脾臓及び肺についてIII. 3) と同様に行った。病理組織検索は、定法に従い固定・包埋後4mmの厚さの標本とし、HE染色し、臓器内に形成された肉芽腫数とその大きさ特徴などを光学顕微鏡下で観察した。

VI. 薬剤耐性遺伝子を含まない宿主ベクター系の構築

1) 染色体上の *thyA* への loxP 配列の挿入

BCGにおける *thyA*, *thyX* 二重遺伝子欠損株の作製を Δ 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計画した。 Δ ThyX ゲノム上の *thyA* 遺伝子の上流領域および下流領域それぞれに loxP 配列を相同組換えにより挿入し、*thyA* ORF が2つの loxP 配列で挟まれるように組み込まれた株を作製した (Δ ThyX loxP)。

2) Cre 発現大腸菌-抗酸菌シャトルベクターの構築

組換え酵素 Cre の遺伝子はアセトアミドによって正に誘導される *Mycobacterium smegmatis* 由来の Ace 転写調節領域に結合させた (Ace-Cre)。次に pAL5000 の全長を含む大腸菌-抗酸菌シャトルベクター pIS18 に Ace-Cre、ハイグロマイシン耐性遺伝子、*thyA* および *thyX* を挿入することで、Cre 発現用プラスミド pISCre-*thyX* を構築した。

3) 外来遺伝子発現用プラスミドの構築

pAL5000 の複製起点を含む 1.3 kb を PCR で増幅し、pUC19 にクローニングした。クローニング後、PCR により複製に影響しない 0.8 kb を消失させ pNN3 を作製した。pNN3 に Ace-Cre、ハイグロマイシン耐性遺伝子、*thyA* および *thyX* を挿入した。作製したプラスミド中に、大腸菌複製起点-アンピシリン耐性遺伝子-ハイグロマイシン耐性遺伝子-Ace-Cre を挟む位置 2 か所に loxP 配列を挿入し、プラスミド pNNCre を作製した。

4) pNNCre の BCG への形質転換

Δ ThyXloxP への pISCre-*thyX* の導入はエレクトロポレーション法により行ない、ハイグロマイシン耐性株を選択した。Cre の発現はアセトアミドで誘導することによって行なった。pISCre-*thyX* をハイグロマイシン含有 7H9-ADC-Tween80 培地で OD=0.6 まで培養後、アセトアミド溶液を最終濃度 0.2 % で添加し、さらに 24 時間培養した。その後 7H10-ADC 寒天培地に播種した。4 週間培養後、PCR 法により *thyA* 遺伝子が欠損している株を選択した。

VII. CTL 評価システムの確立と BCG ベクターの免疫原性増強法の開発

1) HIV-1 Gag および Env 特異的 MHC pentamer assay 法の確立

マウス MHC class I-H2d 拘束性の Env V3 epitope (IGPGRAFYA) および Gag p24 epitope (AMQMLKETI) の MHC pentamer (いずれも PE 標識) は、Proimmune 社より購入した。6-8 週齢の BALB/c マウスに Gag DNA ワクチン (pVRC3900) および Env gp140 DNA ワクチン (pVRC2824) を 2 週おきに 50 μ g ずつ 2-3 回、筋肉注射により接種し、最後の接種の 2 週後に末梢血を採取して、CD3 陽性、CD8 陽性、MHC pentamer 反応性の細胞をフローサイトメトリーで解析した。

2) Gag 高発現型組換え BCG のマウスにおける細胞性免疫誘導能の解析

6-8 週齢の BALB/c マウスまたは DBA/2 マウス (いずれも H2d) に、Gag 発現型組換え BCG, 0.5 mg を皮内接種し、2 週後の末梢血を用いて上記 (1) と同様に、Gag 特異的 MHC pentamer 反応性の細胞をフローサイトメトリーにより解析した。

3) リステリオライシン 0 (LLO) またはマウス SOCS (suppressor of cytokine signaling) 1 アンタゴニスト発現ベクターの構築と BCG での発現解析

BCG の Antigen 85B 遺伝子のプロモーターとシグナルペプチドの下流に、LLO 遺伝子 (京都大学・光山先生より分与) を in frame で導入したもの及び *Mycobacterium smegmatis* 由来 SP2 プロモーターと *blaF* 分泌シグナルにマウス SOCS1 ドミナントネガティブ (dn) 変異体遺伝子 (医薬基盤研究所よ

り分与) を繋いだ発現カセットを、それぞれ pS0246 に組み込み、発現ベクターを得た。これを BCG 東京株に電気穿孔法にて導入した。

VIII. マイクロニードルを使用した新規経皮免疫法の検討

マイクロニードルアレイ (MNA) を作製する基剤として水溶性・洩糸性ポリマーであるコンドロイチン硫酸を使用した。抗原をあらかじめコンドロイチン硫酸ゲルに練りこんで、マイクロニードルを成型・乾燥・硬化させることにより、抗原を含有する溶解性 MNA (dmNA) を得た。dmNA パッチは、皮膚に圧着するのみで、マイクロニードルが皮膚上層に挿入され、速やかに溶解して、含有する抗原を皮膚内に放出することが期待される。

1) dmNA の皮膚穿刺性と溶解性の確認

エバンスブルーを指標として含有させた dmNA を作製し、マウスの皮膚への色素の送達を観察して、dmNA の皮膚穿刺性と溶解性を確認した。

2) 卵白アルブミン (OVA) をモデル抗原として抗原含有 dmNA を作製し、抗原の皮膚内への送達効率の検討するとともに、血清中の抗原特異的抗体応答の用量反応性を、ELISA 法を用いて検討した。

3) 結核菌抗原である Ag85A および Ag85B を含有する dmNA を作製し、マウスの皮膚に投与して、血清中の抗原特異的抗体応答を、ELISA 法を用いて観察した。

(倫理面への配慮)

本研究での細菌を用いる実験は感染症法及び同等の規定に従い、各施設のバイオセーフティ委員会等の審査・承認のもとで実施した。実験動物の取り扱いについては、動物愛護の精神にのっとり、実験は、各施設の動物実験委員会等の審査・承認のもとに実施した。

C. 研究結果

I. BCG の多様性について

1) 各国亜株の抗原提示能の評価

自然免疫の誘導と獲得免疫の誘導との関連性を調べるため、樹状細胞の抗原提示能について検討を行った。前期分与株 (Japan, Sweden) と後期分与株 (Connaught, Pastuer) とで比較したところ、前期分与株は後期株と比べて、ナイーブマウス骨髄由来樹状細胞からの強い IL-12 産生およびナイーブマウス T リンパ球からの強い IFN- γ 産生を示すことから、前期分与株の方が獲得免疫を誘導する活性が高いことが示唆された。

2) シードロット、コマーシャルロット中の I 型、II 型の比率の検証

Shibayama らの方法によりシードロット、コマーシャルロット中の II 型の存在比率を検証した。シードロットの 172、172-1、172-2 では 67.8%、26.1% および 5.88% であった。コマーシャルロットは 4 ロット調べたが、それぞれ 4.22%、2.71%、6.51% および 4.24% であった。今回、日本から分与された台湾およびタイ国で使用されているコマーシャルロットも調べたが、II 型の比率はそれぞれ 61.6%、100% であった。

3) I 型と II 型の増殖速度

I 型、II 型ともに 6 日後に OD1.4 に達し、その

後微増を示した。I型とII型の間に増殖速度の差は認められなかった。

4) BCG3405c - BCG3408 導入株の性状

I型のBCG3405cあるいはBCG3405c - BCG3408をII型に導入し、遺伝子導入株における遺伝子発現の変化をRT-PCRにより調べた。BCG3405c、あるいはBCG3405c - BCG3408の発現の増加は観察された。また細胞壁糖脂質 phthiocerol dimycocerosate (PDIM)の合成酵素をコードしている遺伝子群 BCG 2953 - BCG 2957 (*ppsA-E*)、PDIMの輸送に関わるトランスポーターをコードしている遺伝子群 BCG 2958 - BCG 2960 (*drrA-C*)の遺伝子の発現も上昇する傾向にはあったが、差はわずかであり、I型における発現レベルと比し大きな差があった。

5) I型とII型の形態観察

光学顕微鏡によるコロニー形態観察を行った。植菌2週間後に7H11寒天表面に現れたI型のコロニーは表面が平滑なsmooth型、対照的にII型コロニーは表面が荒く凹凸のあるrough型であった。

走査型電子顕微鏡による観察では、I型とII型両菌株長に違いが認められた。I型の平均菌体長は $2.25 \pm 0.11 \mu\text{m}$ 、II型では $1.44 \pm 0.05 \mu\text{m}$ であり、I型菌体の長さはII型の約1.5倍あり有意差があった。

6) 菌体成分(ミコール酸、脂肪酸、糖)の比較

(6-1) ミコール酸サブクラス、脂肪酸組成の比較

I型とII型両株の菌体ミコール酸のサブクラスの構成、組成比、分子種、および脂肪酸組成について相異は認められなかった。

(6-2) 糖組成の比較

菌体および総脂質画分の構成糖について、GC/MS分析を行った。菌体の構成糖は両株ともにグルコース、アラビノース、ガラクトース、マンノースが主成分で組成に差異はなかった。微量成分として、2-O-メチルラムノースがII型では0.05%未満であるのに対し、I型ではその10倍以上(0.5%)含まれていた。さらに総脂質画分では2-O-メチルラムノースの組成比率がI型では11.2%であるのに対し、II型では0.4%と微量であり、2-O-メチルラムノースの含有量に有意な差が認められた。

7) 脂質表現型の比較

総脂質画分を極性脂質画分、中極性脂質画分および低極性脂質画分の3画分に分けて2次元TLCによる比較を行った。極性脂質画分には、I、II型の脂質発現の違いは見られなかったが、中極性脂質画分と低極性脂質画分にはI型にのみ発現する脂質が2種類存在することが判明した。

これらの脂質に関しては、TLC上の移動度から、中極性脂質画分の脂質はPGL、低極性脂質画分の脂質はPDIMであることが予想された。これらのI型にのみ発現する脂質をTLCで精製純化し、MALDI-TOF MS分析およびGC/MS分析による各脂質の同定を行った。I型の中極性脂質画分のみが発現していた脂質のMALDI-TOF MSのマスペクトルからは、分子関連イオン $[M+Na]^+$ が m/z 1531を中心とし14 Da間隔に出現する分子種のクラスターイオンが検出された。さらに m/z 1531のMS-MS

分析した結果、*mono*-メチルデオキシ糖、C26:0脂肪酸およびC29:0脂肪酸がそれぞれ脱落したフラグメントイオン m/z 1371、 m/z 1135、 m/z 1093、また両方の脂肪酸が脱落したフラグメントイオン m/z 696、さらには *mono*-メチルデオキシ糖、C26:0脂肪酸とC29:0脂肪酸のすべてが脱落し総炭素数35のphenolic phthiocerolに相当するフラグメントイオン m/z 535が検出された。

この脂質を加水分解し、その分解物として予想される成分(脂肪酸、糖)についてGC/MS分析を行った。脂肪酸のトリメチルシリル化誘導体のマスペクトルからは、 m/z 468に分子関連イオン $[M]^+$ 、 m/z 146、187、229にメチル分岐に由来するフラグメントイオンが検出されたことから、メチル分岐を少なくとも3つ以上持つ炭素鎖長23-29の脂肪酸が検出された。また糖のGC/MS分析の結果、得られたピークはラムノースの2位の炭素に-O-CH₃があることを示すフラグメントイオン m/z 104、117、164が検出されたことから、この脂質は2-O-メチルラムノースを構成成分とすることが明らかとなった。

以上の質量分析の結果から、I型にのみが発現するPGL、PDIMを同定した。

8) PpsA遺伝子のシーケンズ

RD16遺伝子領域に欠失があるI型にのみPGLが発現することから、II型のPGL発現はRD16遺伝子領域以外の生合成遺伝子に起因するものと仮定し、PGLおよびPDIM生合成の開始点である*ppsA*遺伝子をI型およびII型からクローニングし、塩基配列を決定した。II型の*ppsA*遺伝子において塩基配列351番目に1塩基(アデニン)の挿入があること、この挿入によりII型*ppsA*遺伝子の終止コドン(3556-3558番目)はI型(5630-5632番目)よりも手前に出現することが明らかになった。またII型の*ppsA*遺伝子には塩基配列275番目と2415番目の塩基がチミンからシトシンに置換していることも判明した。

9) PpsA遺伝子挿入形質転換株の脂質表現型

II型のPGL欠失がII型*ppsA*遺伝子の変異に起因するものかどうかを検証した。I型にII型*ppsA*遺伝子を挿入すると、親株であるI型よりもPGLの発現が減少した。一方、II型にI型*ppsA*遺伝子を挿入した形質転換株では、I型に比べ発現量は低いPGLの発現が認められた。

II. BCG細胞壁成分のアジュバント活性

1) 一般状態観察、尿および血液には、群間に有意な差は認められなかった。膀胱重量については、コントロールリポソーム群が最も高値を示し、有意な低値がBCG-CWS及びミコール酸投与群で認められた。静脈内投与群の膀胱重量(実重量及び相対重量)も同様であった。

2) 病理組織学的解析

肉眼的病変の体積は、膀胱内投与群では、無処置群及びコントロールリポソーム群と比較してリポソームに搭載したBCG-CWS及びミコール酸投与群で低値傾向が認められた。病理組織学的検査では、膀胱内投与群及び静脈内投与群に共通してsimple hyperplasia, papillary nodular hyperplasia及びpapillomaの発生が各群に認められた。膀胱内投与群の病変数の比較では、無

処置群と比較して有意な総病変数の低値が、BCG-CWS 及びミコール酸投与群で認められた。組織学的各病変毎の比較では、無処置群と比較して、simple hyperplasia の有意な低値が、BCG-CWS 及びミコール酸投与群で認められた。simple hyperplasia の有意な低値が、BCG-CWS 及びミコール酸投与群で認められた。特にミコール酸投与群では、papilloma を 100 % 阻止した。静脈内投与群の病変数の比較では、無処置群と比較して有意な総病変数の変動は認められなかったが、各病変毎の比較では、無処置群と比較して、simple hyperplasia の有意な低値が、BCG-CWS 及びミコール酸投与群で認められた。

III. BCG 投与法の比較検討

遅延型過敏反応 (DTH) 誘導能について BCG を気管挿管投与、経鼻投与、噴霧投与、皮内投与により免疫したところ、いずれの群のモルモットも PPD に対し良好な DTH 反応を示した。また、抗結核免疫誘導能については、免疫群と非免疫群間で、結核菌噴霧感染による肺及び脾臓からの検出菌数には、肺、脾臓共に $P < 0.01$ の有意な差が検出された。しかし投与方法の違いによる免疫群間内では肺、脾臓共に ANOVA による有意な差は検出されなかった。

IV. BCG の免疫効果の持続性

1) C57BL/6 マウスに投与したワクチン株は肝臓では速やかに排除されるのに対し、脾臓では菌数がほとんど見られなくなった後、再び菌数の増加が観察された。ワクチン接種20週後に Km R BCG を感染させた場合の肺の菌数はワクチン接種群が非接種群に比べて有意に少なく、ワクチン効果がみられたのに対し、40週後の感染実験ではワクチン接種群と非接種群で差がなく、ワクチン効果の消失が観察された。リンパ節細胞からの PPD 特異的な IFN- γ 産生量は20週後ではワクチン接種群で非接種群より有意に高かったが40週後では2群間での差異は見られず、産生量も低下した。IL-5 産生量は40週後のワクチン接種群で著しく高かった。

2) ワクチン接種5週後に若齢マウス (6-8週齢) および老齢マウス (45-55週齢) に Km R BCG 感染させた場合のワクチン効果はいずれのマウスでも顕著に認められ、リンパ節細胞からの PPD 特異的な IFN- γ 産生量にも差がなかった。STAT6KO および同系の BALB/c (WT) マウスにワクチン接種した。C57BL/6 マウスの場合と同様にワクチン株は肝臓からは速やかに排除されるのに対し、脾臓では少し減少するものの、観察期間中を通して存在した。しかし、C57BL/6 マウスの場合のように再燃する現象は見られなかった。ワクチン接種3週後、20週後に Km R BCG を感染させた場合はワクチン効果が見られたのに対して40週後ではワクチン効果が見られなくなった。PPD 特異的な CD4 T 細胞の増殖はワクチン接種20週後、40週後ともに顕著に見られ、STAT6KO で WT よりも有意に高かった。IFN- γ 産生量についても同様の結果であった。IL-4 産生量は逆に WT で有意に高かった。IL-5 についてはワクチン接種20週後で WT でのみ産生が確認され、40週後にはいずれのマウスからも産生が見られなかった。IL-10 産生量は20週後では WT、STAT6KO と

もに同等の産生量が確認され、40週後では STAT6KO で WT よりも有意に高かった。

V. 難治性抗酸菌症モデルの構築

PD 投与群では感染マウスの体重増加の抑制が認められた。肺・肝臓の菌数は PD 投与による大きな効果はなかった。脾臓では、PD 投与後の抗菌薬治療で、PD 非投与群と比べて治療効果が大きかった。病理組織所見としては、肝臓の肉芽腫数は PD 投与群と比べ非投与群のほうが有意に多い肉芽腫を形成していた。しかし薬剤治療せず PD 投与した群では直径が対照群の約2倍の肉芽腫が形成され、その周辺部や内部へのリンパ球系細胞浸潤が他の3群に比べて非常に少なかった。対照群の肺では肉芽腫を主体とした炎症像が広い範囲にわたって認められたが、PD 投与群および PD 投与後治療を施した群では肺の炎症像は極めて軽微で、小型の肉芽腫がわずかに認められた。

VI. 薬剤耐性遺伝子を含まない宿主-ベクター系の構築

1) Δ ThyX loxP の作製

Δ ThyX を中間体として *thyA* 遺伝子座に loxP-*thyA*-loxP 配列を持つ株の作製を行なった。

loxP-*thyA* 上流部分を持つプラスミドを構築し、1か所での相同組換えによりプラスミド全体が *thyA* 上流部分に挿入された株の作製を試みたところ目的の株を得ることができた。この株に *thyA* 上流部分-loxP を持つプラスミドを導入することにより、ゲノム上の *thyA* 遺伝子座に loxP-*thyA*-loxP 配列を持つ株 Δ ThyX loxP を作製した。*thyA* の上流、下流それぞれに loxP を導入する段階で Δ ThyX loxP にはカナマイシン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子が導入された。 Δ ThyX loxP の増殖速度は親株である BCG Tokyo 株の増殖速度と差が無く、またチミンおよびチミジンに対する栄養要求性は示さなかった。

2) チミン要求株の作製

Δ ThyX loxP に Cre 発現ベクター-pISCre-*thyX* を導入した。0.2 % アセトアミド含有 7H9-ADC-Tween 80 培地で 24 時間培養、続いて 7H10-ADC 寒天培地で継代することにより集落を形成させた。PCR 法によりゲノム上の *thyA* の存在を確認したところ、調べた 24 株すべてで *thyA* が欠損した Δ *thyX* Δ *thyA*: pISCre-*thyX* であることが確認された。

3) Δ ThyX loxP への pNNCre の導入

エレクトロポレーションにより pNNCre を Δ ThyX へ導入し、カナマイシンおよびハイグロマイシン含有培地で増殖させ、 Δ ThyX loxP:pNNCre 株を選択した。

次にゲノム上の *thyA* 遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、およびカナマイシン耐性遺伝子と、プラスミド上の大腸菌複製起点-アンピシリン耐性遺伝子-ハイグロマイシン耐性遺伝子-Ace-Cre を除去するため、それぞれの株を 0.2 % アセトアミド含有 7H9-ADC-Tween 80 培地で 24 時間培養、続いて 7H10-ADC 寒天培地で継代することにより集落を形成させた。PCR 法により確認したところ、ゲンタマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、およびハイグロマイシン耐性遺伝子は認められなかった。

VII. CTL評価システムの確立とBCGベクターの免疫原性増強法の開発

1) HIV-1 Gag 特異的 MHC pentamer assay 法の確立

BCG ベクターの免疫原性をさらに改良していくためには、特異的な CTL 応答を簡便に測定できる高感度アッセイ系が必要である。米国 NIH で構築された HIV-1 Gag 遺伝子を持つ DNA ワクチンを免疫原として BALB/c マウスに接種し、末梢血中の Gag 特異的 CD8 陽性の CTL を MHC pentamer assay で検出できるかどうかを検討した。DNA ワクチンを 3 回接種することにより、2%程度の CD8 陽性 T 細胞が pentamer 反応性の細胞として検出された。

2) Gag 高発現型組換え BCG のマウスにおける CTL 誘導能の解析

高コピー型変異プラスミドを用いると BCG での Gag 発現レベルが約 10 倍上昇し、コドン最適化による発現増強に匹敵するレベルであった。そこで、変異を持たない pSO246 プラスミドに antigen 85B のプロモーター、シグナル配列を介して pNL-43 由来の gag 遺伝子を導入した pSO-NLgag と、同じ発現カセットを高コピープラスミドに導入した pSOR-NLgag をそれぞれ導入した BCG を BALB/c および DBA/2 マウスに接種し、2 週後の Gag 特異的 CTL 誘導能を、上記 MHC pentamer assay により解析した。

BALB/c マウスでは有意な pentamer 反応性細胞の誘導は見られなかったが、DBA/2 マウスでは BCG/pSO-NLgag 接種群で 0.1-0.2%、BCG/pSOR-NLgag 接種群で 0.2-0.3%の CD8 陽性 T 細胞が pentamer 反応性細胞として検出された。

3) BCGベクターのポテンシャルを増強するための新たな試み

BCGの免疫原性増強を目的として、またLL0の発現カセットとHIV-1 Gag発現カセットを単一のプラスミド (pSO246) に載せ、LL0とGagの両方を発現するBCG株の構築に成功した。一方、免疫応答をサイトカイン発現レベルでコントロールすることを旨として、IFN- γ など種々のサイトカインシグナルを負にコントロールしているSOCS1のアンタゴニストを発現するBCG株を構築した。

VIII. マイクロニードルを使用した新規経皮免疫法の検討

1) dMNAの穿刺性および皮膚内での溶解性の確認

エバンスブルーを含有する dMNA をマウスの背部皮膚に圧着、穿刺したところ、3 分後にはマイクロニードルが原型をとどめずに溶解し、皮膚には、マイクロニードルが刺入された部位に一致して青色のスポットが観察された。

2) dMNA含有抗原の皮膚への送達率

皮膚に穿刺後の dMNA パッチを観察すると、皮膚に吸収されずに残留した薬剤が観察される。そこで、卵白アルブミン (OVA) を含有する dMNA を半分に分割し、一方をマウスの皮膚に穿刺し、処置後の半分と無処置の半分の OVA 含量を、それぞれ ELISA 法により定量し、その差から OVA の皮膚への送達量を見積もった。その結果、含有する OVA の 30~50%が、皮膚に送達されることが明らかとなった。

3) dMNAと皮内注射での抗体応答の用量反応性の

比較

モデル抗原として種々の量の OVA を含有する dMNA をマウスの背部皮膚に穿刺した。比較のために、同量の OVA 溶液をマウスの背部皮内に注射した。血清中の抗原特異的抗体産生の用量反応性を比較したところ、dMNA は、皮内注射とほぼ同等の抗体誘導能を示した。

4) Ag85AおよびAg85B含有dMNA投与に対するマウスの抗体応答

結核菌から抽出、精製した Ag85A または Ag85B (native Ag85A または native Ag85B) を、仕込み量換算で 0.05 μ g または 0.25 μ g 含有する dMNA を、それぞれ作製した。マウスの背部皮膚に投与し、血清中の抗原特異的 IgG 抗体量を測定した。初回免疫では、有意な抗体応答は観察されなかったが、同じ方法でブースター免疫することにより、Ag85A、Ag85B ともに、0.25 μ g 投与群において有意な抗体応答が観察された。

5) native Ag85Bとrecombinant Ag85Bの抗原性の比較

native Ag85B により免疫したマウスの血清中抗 Ag85B 抗体を ELISA 法により測定する際、免疫原と同じ native Ag85B、または recombinant Ag85B を ELISA プレートのコートに用い、両者での測定結果を比較した。その結果、マウス個体別の抗体量のパターンは、両測定間でよく一致していた。

D. 考察

I. BCGの多様性について

BCG 亜株の比較において、自然免疫の誘導能の高い株は獲得免疫誘導能が高いという仮説を支持する結果を得ることが出来た。獲得免疫の差異について、宿主条件を一定にして亜株間の比較をした学術的な重要性は高く、これまでの成果の集積は、今後の有効性・安全性評価に対して果たす意義は大きいと考えられる。

日本の現行のシードロット BCG Tokyo 172-1 株には RD16 中の遺伝子 BCG3405c の長さから 2 種類のタイプに分けられる。I 型を代表とする BCG3405c 遺伝子に 22 bp の欠損を有するタイプと、II 型を代表とする完全長の BCG3405c 遺伝子を持つタイプである。Shibayama らは以前使用されていたシードロット 172 株よりも現行のシードロット 172-1 株において、I 型の比率が増加していることを報告している。さらにコマーシャルロットではその比率がさらに増加していた。今回この比率の変化を検証し、Shibayama らが用いたロット以外のコマーシャルロットを用いても同じ傾向であることがわかった。この結果は、シードロットからコマーシャルロットを作製するまでの数世代の培養中において、I 型と II 型の比率が急激に変化することを示している。最も可能性の高い推測として、II 型に比し、I 型の増殖速度が速いことが考えられたが、定常期に達するまでの時間、定常期の菌数 (吸光度) は両型間において差が認められなかった。コマーシャルロットの製造法を考えると他の可能性として、乾燥状態の BCG を生理的食塩水で戻した際に生じる対数増殖期に入るまでの時間、すなわち準備期の長さにおいて両型間で差が生じていることが考えられ、現在検討

中である。

シードロット中には現在分離されている I 型と II 型以外の株が複数共存している可能性が示唆されている。他の株も存在しているのであれば、共存しているそれぞれの株の性状を明らかにする必要がある。そのためには分離培養を行なうことが一般的であり、本研究においても必要と考えられる。しかし、その前に各ロットにおける変異の全体像を把握しておくことは重要であると考えられる。この目的のため、シードロット、複数のコマーシャルロットの各ロットからゲノムを抽出し、次世代シーケンサーにより変異の検出およびその存在比率を明らかにすることを計画中である。

I 型と II 型の遺伝学的な差異について解析を進める目的で、I 型、II 型にそれぞれ相反する株の BCG3405c-BCG3408 遺伝子をプラスミド性に導入した株の解析を進めたが、現時点においては顕著な成果を得ることができていない。そのため、遺伝子破壊株を早期に完成させ、その解析を行なう予定である。

BCG を含む抗酸菌の表現型の特徴として、ミコール酸含有糖脂質や glycopeptidelipid (GPL) などユニークな脂質群を細胞壁構成成分として多量に含有することが挙げられる。これらの糖脂質は宿主に対する抗原性や薬剤標的として有用である。本年度は、細胞壁脂質分子がコロニー形態や宿主応答に影響を与えることに着目し、BCG ワクチン Tokyo 172 株の I 型、II 型の表現型の相異を脂質生化学的な観点から明らかにした。

走査型電子顕微鏡を用いて I 型、II 型の菌体の詳細構造を観察した。その平均菌体長は、I 型が II 型の約 1.5 倍長く、顕著な違いがあった。このような菌体の大きさの相異は増殖に伴うコロニー形成に大きく関与する可能性が高く、I 型と II 型のコロニー形状が異なる要因のひとつであると考えられた。抗酸菌の菌体長については、結核菌 *M. tuberculosis* H37Rv 株の LM/LAM 生合成に関連する *Rv3779* 遺伝子を欠失させた株において、親株よりも菌体の長さが短縮することが報告されている。本研究結果では、I 型、II 型菌体のマンノースおよびアラビノース比率に差異が認められなかったが、LM/LAM を構成するマンナンやアラビノマンナンの鎖長構造に I 型、II 型の相異がある可能性は否定できず、今後の検討課題である。

2次元 TLC を用いて I 型と II 型の総脂質画分を網羅的に比較した結果、II 型で欠失し I 型に発現する脂質 PGL と PDIM の存在が明らかになった。PDIM は長鎖多価アルコールの phthiocerol と 2 つの長鎖メチル分岐脂肪酸 mycocerosic acid からなる脂質である。PGL は PDIM を基本構造とする化合物であり、脂質抗原 Mycoside B として *M. bovis* に広く分布することが明らかにされている。抗酸菌の菌体脂質とコロニー形態については、*Mycobacterium avium* において、野生株は smooth 型であり GPL 欠失株は rough 型であることから GPL の発現とコロニー形態に強い関連性があることが指摘されている。この様に、GPL や PGL のような菌体表層成分である脂質の欠失がコロニー形態に影響を与える可能性が考えられる。

さらに、II 型で欠失していた PGL と PDIM の生合成に関与する遺伝子について検討を行った。Chen らは RD16 遺伝子領域にある *Rv3405c* 遺伝子が PGL の生合成に関与することを指摘しているが、今回は RD16 領域が完全である II 型で PGL と PDIM が発現せず、RD16 領域の一部を欠失した I 型で発現が確認されたことから、RD16 領域以外の生合成遺伝子群 *pks15/1* (polyketide synthase) や *ppsA-E* (phenolphthiocerol chains synthase) 領域の関与が考えられた。実際に II 型の *ppsA* 遺伝子の 1 塩基挿入によるフレームシフトによって *ppsA* 遺伝子が正常なタンパク質として合成されず、機能低下を引き起こしていることが示唆された。

本年度は、脂質生化学的な視点から I 型と II 型の表現型の相異について検討した。PGL および PDIM の存否を明確にし、その発現には生合成遺伝子 *ppsA* が関与することを明らかにしたことは、ワクチン効果や免疫原性の理解を深める一助になると考えられる。

II. BCG 細胞壁成分のアジュバント活性

BCG-CWS は 1970 年代より強力な免疫賦活成分として知られてきたが製剤化に成功していなかった。その原因は、構成成分の複雑さと強度の疎水性によると考えられる。CWS をカチオニックリポソーム化することにより、分散性が改善されることが明らかとなった。さらに安定なリポソーム粒子を調製するためにミコール酸 (MA) のリポソーム製剤も加えて膀胱癌治療効果を比較検討した。

BCG 菌 (Tokyo 172) MA はヒト型結核菌に類似し、脂質抗原として最近注目されている。今回、比較の目的で両者をラット BBN 発癌治療実験に供したところ、両者はほぼ同等の抗腫瘍効果を示し、MA 0.1 mg/rat × 8 回投与で papilloma をほぼ完全に阻止したこと、腫瘍免疫指標としての IFN- γ 誘導も 両者同様レベルで産生されたことから、ミコール酸自身もリポソーム化により、抗原として、又アジュバントとして免疫刺激反応に有用な製剤となる可能性が示された。

III. BCG 投与方法の比較検討

モルモットに対する気管挿管投与、経鼻投与、噴霧免疫、皮内投与の遅延型過敏反応誘導能と抗結核免疫誘導能を調べた。皮内投与 BCG の接種量 10^4 CFU は通常ワクチン接種量の百分の一以下であり、新型抗結核ワクチン候補の検定に用いられる量であるが、この方法で差異が認められなかったことから、これら BCG 投与方法の間には免疫学的差異はないといえる。

IV. BCG の免疫効果の持続性

BCG ワクチンが成人肺結核発症に対して効果がないという報告が相次いでいるので、その効果の持続性をマウスモデルで検討した。BCG に抵抗性であるとされる C57BL/6 マウスを用いた実験から BCG ワクチン効果の消失は特異的抗原に対する Th1 サイトカイン産生能の減弱および Th2 サイトカイン産生能の増強であるという結果が示唆された。Th2 サイトカインは転写因子 GATA3 の活性化により産生される。GATA3 ノックアウトマウスは致死的であるため、GATA3 の誘導に関わるシグ

ナル分子のひとつである STAT 6 に着目し、そのノックアウトマウス (STAT6KO) および同系の BALB/c マウス (WT) を用いた。STAT6KO は Th2 サイトカインの産生が減弱され、Th1 サイトカイン産生能が増強されると考えられたからである。しかし、C57BL/6 マウスでの実験と同様にワクチン接種後の時間が経過するとワクチン効果は消失した。若齢マウスでも老齢マウスでもワクチン効果が得られることから、ワクチン効果の消失は加齢による免疫機能の衰えではないことが示唆された。また、ワクチン株が体内に十分存在しているにも関わらず、ワクチン効果の消失は観察された。BCG ワクチン効果の消失はマウスの加齢、Th2 サイトカイン産生量の増加と Th1 サイトカイン産生能の低下、ワクチン株の体内からの排除、これらのいずれによるものでもなく、ワクチン接種後の時間経過に依存することが示された。

V. 難治性抗酸菌症モデルの構築

これまでに臓器重量の減少、臓器内菌数増加の抑制、肉芽腫の病理組織学的評価の改善という点において 3 剤併用療法による治療効果にはマウス系統差がみられ、BALB/c や DBA といった系統のほうが、細胞性免疫の誘導に優れた能力をもつ B6 よりも著効を示すことを見出している。B6 での抗菌剤治療では、いずれの臓器でも、対照群と比べ肉芽腫数の有意な減少は認められなかった。一方、ステロイド剤と三種類の抗菌剤の併用した場合は、肉芽腫形成に伴う臓器重量増加を軽減させ、治療効果が認められた。ステロイド剤投与は、感染初期には肉芽腫数を抑制し、極めて軽微な肺の炎症像を示した。ステロイド剤は免疫機構とりわけ T 細胞主体の細胞性免疫への影響が大きいため、感染防御能のうち肉芽腫形成に関わる部分のみを特異的に抑制する方法を考案すれば、B6 における治療効果をさらに向上できるのではないかとと思われる。

人の結核症や抗酸菌症がマウスモデルと必ずしも同一であるとは限らないが、本研究は動物種固有の防御機構解析から動物種差を超えた普遍的な防御機構を明らかにすることを目指しており、人の結核症をはじめとする抗酸菌症の治療のための有用なシステムとなり得るものと考えている。

VI. 薬剤耐性遺伝子を含まない宿主ベクター系の構築

rBCG ワクチンの基礎となる BCG 宿主 - ベクター系の作製について、多くの場合は目的の外來抗原の遺伝子を載せたベクターが組み込まれた菌の選択のために薬剤耐性遺伝子が挿入されている。しかし、臨床応用を考えると薬剤耐性遺伝子を含まないことが望ましい。その方法のひとつが、特定の分子を発育に必要とする栄養要求株の利用である。この場合、栄養要求株になった責任遺伝子を載せたプラスミドで形質転換することにより、通常の培地で発育可能となる。

本研究では栄養要求性としてチミン要求性を応用し、それに関わる具体的な酵素としてチミジル酸合成酵素 ThyA と ThyX を標的にした。すなわち Δ ThyX をもとに *thyA* を欠損させることで *thyA* と *thyX* の 2 重欠損株の作製を試みた。これまで

に報告されている抗酸菌における遺伝子欠損株の作製法を試したが、結果的に菌体内から *thyA* と *thyX* の両遺伝子を排除した株を得ることはできなかった。しかし、プラスミド上に *thyX* を保持させたうえでゲノム上の *thyA* を欠失させることは可能であった

本方法にはまだ改善の余地が多く残されているが、薬剤耐性遺伝子を含まない宿主ベクターシステムのひとつの方向性が示されたと考えられる。

VII. CTL 誘導能評価システムの確立と BCG ベクターの免疫原性増強法の開発

組換え BCG ワクチンのマウスでの CTL 誘導能を簡便に評価するため、HIV-1 Gag および Env 特異的 MHC pentamer assay 系を確立した。これを用いて、多コピー変異プラスミドを用いた Gag 高発現型 BCG 株の評価を行ったところ、BALB/c マウスと同じ MHC class I (H2d) を持つが、抗酸菌に対する自然抵抗性を持つ DBA/2 マウスで pentamer 陽性細胞が検出できた。DBA/2 マウスでは BALB/c マウスよりもマクロファージ中での菌の分解活性が強く感染早期に菌が分解されることによって、発現した抗原のプロセッシングおよび抗原提示が起こるために、免疫誘導を迅速に検出できた可能性が考えられる。これまでは、BCG ベクターのプライミング能を、ブースター後の細胞性免疫応答で評価していたため、実験に長期を要していたが、DBA/2 マウスを用いた pentamer assay を用いることにより、早期での評価が可能になる点で極めて有用と思われる。LLO や SOCS1 アンタゴニスト発現型 BCG 株を構築できたので、これらの免疫誘導能評価に応用する予定である。

VIII. マイクロニードルを使用した新規経皮免疫法の検討

エバンスブルーを含有する dMNA をマウスに投与する実験により、dMNA は、皮膚を穿刺するのに十分な鋭利性と強度を有すること、速やかに溶解して抗原を放出し得ることが確認された。

OVA をモデル抗原とする実験では、dMNA が抗原を皮膚内に送達する能力を有していることを実証している。マイクロニードルの溶解性を改善することにより送達率を向上させれば、さらに免疫の効率を上げることが可能と考えられる。

OVA に対する血清中の抗原特異的抗体産生の用量反応性は、dMNA と皮内注射で、ほぼ同等であった。投与の簡便性、低侵襲性などを考慮に入れると、dMNA による免疫法は、従来の注射法に替わり得る有用性を有していると考えられる。今後は、液性免疫のみではなく、細胞性免疫応答についても比較を進めるべきであろう。

Ag85A または Ag85B を含有する dMNA を用いてマウスを免疫することにより、血清中に有意な抗原特異的抗体応答が誘導された。検出用抗原として native Ag85B を用いた場合と recombinant Ag85B を用いた場合とで、マウス個体別の抗体価パターンが、極めてよく一致した。このことは、両者の抗原性に大きな違いがないことを示唆していると考えられる。

E. 結論

I. BCG の多様性について

1) BCG 亜株間の獲得免疫誘導能の違いに関し、自然免疫と同様に前期分与株が抗原提示に関連したサイトカインのより強い産生が示され、自然免疫と同様に前期分与株が高いことが示唆された。

2) BCG Tokyo 172 株 I 型、II 型の遺伝子レベルの相違については、今回 II 型 *ppsA* 遺伝子で 1 塩基挿入と 2 塩基置換が見いだされた。

3) I 型、II 型の表現型の相異点として、以下の 3 点を明らかにした。

(i) 菌体の長さの相異 (I 型 > II 型)

(ii) 2-O-メチルラムノースの含有量 (I 型 > II 型)

(iii) II 型での PGL および PDIM の欠失

さらに I 型のみで発現する PGL および PDIM を同定した。これらの II 型での生合成不全は、*ppsA* 遺伝子での変異によると考えられる。

II. BCG 細胞壁成分のアジュバント活性

リポソーム化ミコール酸製剤も BCG-CWS 製剤と同様に膀胱内局所投与または静脈内投与による膀胱腫瘍治療での有効性を示す結果が得られた。

III. BCG 投与法の比較検討

検討した BCG の免疫経路の間には結核菌感染防御効果に差は検出されなかった。

IV. BCG の免疫効果の持続性

BCG ワクチン効果の消失は、ワクチン接種後の時間経過に依存することが示された。

V. 難治性抗酸菌症モデルの構築

M. avium 感染 B6 マウスにおいてステロイド剤と抗菌剤の併用は肉芽腫形成を軽減させ、治療効果を増強させることが示唆された。

VI. 薬剤耐性遺伝子を含まない宿主-ベクター系の構築

rBCG ワクチン構築の基本となる新規の宿主-ベクター系の構築については薬剤耐性遺伝子をマーカーとしない系を作製できることが示された。

VII. CTL 誘導能評価システムの確立と BCG ベクターの免疫原性増強法の開発

MHC pentamer assay を適用することにより、マウスでの HIV-1 Gag および Env 特異的な CTL 誘導能評価システムを確立した。今後改良型 BCG ベクターの評価を進める上で有用である。

VIII. マイクロニードルを使用した新規経皮免疫法の検討

1) dmNA は、抗原を皮膚内に送達するデバイスとして、簡便性、確実性、低侵襲性の観点から有用であることが確認された。

2) Ag85A および Ag85B 含有 dmNA による経皮免疫により、マウスに有意な抗体応答が誘導された。

3) native Ag85B と recombinant Ag85B とでは、抗原構造に大きな違いはないことが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hayashi D, Takii T, Mukai T, Makino M, Yasuda E, Horita Y, Yamamoto R, Fujiwara A, Kanai K, Kondo M, Kawarazaki A, Yano I, Yamamoto S, Onozaki K. Comparable Study on Biochemical Characteristics among *Mycobacterium bovis* BCG Sub-strains *FEMS Microbiology Letters*, 306, 103-109 (2010)

2. 学会発表

1) J. Maeyama, S. Iho, M. Osada-Oka, S. Matsumoto, M. Isaka and S. Yamamoto. Effects of adjuvants on guinea pig and mouse administered with recombinant proteins derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *uberculosis: Immunology, Cell Biology, and Novel Vaccination Strategies*, Part of the Keystone Symposia Global Health Series. 2011. 1.

2) D. Hayashi, T. Takii, N. Fujiwara, Y. Fujita, I. Yano, S. Yamamoto, Y. Horita, K. Taniguchi, T. Chiba, and K. Onozaki. Comparable studies of immunostimulating activity and intracellular survivability in vitro among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette- Guérin (BCG) substrains. *Tuberculosis: Immunology, Cell Biology and Novel Vaccination Strategies*, Part of the Keystone Symposia Global Health Series. 2011. 1.

3) 大原直也、岡部真裕子、山本三郎、瀧井猛将、藤原永年、前山順一、佐藤法仁、井上哲圭、小林和夫. BCG Tokyo 172 株に存在するサブポピュレーション間の遺伝子発現の比較検討. 第 80 回実験結核研究会. 2010 年 5 月.

4) 藤原永年、前田伸司、吉村満美子、大原直也、前山順一、瀧井猛将、矢野郁也、山本三郎. BCG Tokyo 172 type I, II 間の脂質生化学的比較. 第 85 回日本結核病学会総会. 2010 年 5 月.

5) 大原直也、山本三郎、瀧井猛将、藤原永年、前山順一、小林和夫. DNA マイクロアレイを用いた BCG Tokyo 172-1 に存在するサブポピュレーションの遺伝子発現の比較検討. 第 85 回日本結核病学会総会. 2010 年 5 月.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1) 免疫刺激 G9.1 の抗結核ブースターワクチン創出への応用: 特願 2011-080646、平成 23 年 3 月 31 日、伊保澄子、前山順一、松本壮吉、山本三郎

带状疱疹ワクチン開発のための疫学研究

所 属 独立行政法人 医薬基盤研究所

研究代表者 山西 弘一

研究期間 平成20年4月～平成23年3月

研究要旨 带状疱疹の発症頻度、発症者の痛みの程度と持続時間、水痘带状疱疹ウイルス (VZV) に対する細胞生免疫と液性免疫の相関、生活習慣や社会的心理的要因と带状疱疹の相関についての疫学研究調査を行い、带状疱疹の発症率 1.04%や加齢による VZV 特異的な細胞性免疫応答の減少等が明らかになった。

研究分担者

- | | |
|-------------------|-------|
| (1) 大阪大学大学院医学系研究科 | 磯 博康 |
| (2) 独立行政法人医薬基盤研究所 | 森 康子 |
| (3) 奈良県立医科大学 | 浅田 秀夫 |
| (4) 財団法人阪大微生物病研究会 | 奥野 良信 |

A. 研究目的

带状疱疹について、米国では水痘ワクチンの力価を高めたワクチンを用いて、大規模臨床試験 (M. N. Oxman, et al.) が行なわれ、その結果を基に同ワクチンが带状疱疹ワクチンとして承認されている。また、ACIP (米国予防接種勧告委員会) も 60 歳以上の成人への带状疱疹ワクチン接種を推奨している。

一方国内では、带状疱疹発症の詳細な疫学研究は無く、水痘ワクチンを高齢者に接種すると水痘带状疱疹ウイルス (VZV) に対する細胞性免疫の増強効果が解明された (平成 12 年厚生科学研究費補助金带状疱疹神経痛の予防を目的とする成人高齢者への水痘ワクチン接種による免疫増強に関する研究)。しかし、細胞性免疫の程度と带状疱疹発症の相関や免疫持続期間については検証されていない。

本研究では、将来の带状疱疹ワクチン開発のための基礎的な検討を行うため、香川県小豆郡における 50 歳以上の住民 17,323 人 (平成 20 年 10 月 1 日時点) のうち本研究に登録した方を対象に、带状疱疹の発生頻度と発症者における痛みの程度と持続期間、生活習慣及び社会心理的要因と細胞性免疫の程度及び带状疱疹発症との関係、VZV に対する免疫の程度と带状疱疹発症の相関、細胞性免疫と液性免疫の各種抗体価の相関、及び免疫持続期間について、3 年間のプロスペクティブな疫学調査を行う。

B. 研究方法

本疫学研究の規模および研究テーマは、以下の通りである。

1. 本疫学研究の対象者と目標登録者数
本疫学研究対象者は、香川県小豆郡在住の 50 歳以上の男女 17,323 人 (平成 20 年 10 月 1 日時点) であり、対象者の 69.3% に当たる 12,000 人を目標登録者数とした。
2. 研究テーマの内容について
 - 1) テーマ A (目標登録者数 12,000 人以上)
電話による聞き取り調査。
 - 2) テーマ B (目標登録者数 5,000 人以上)
水痘皮内反応による細胞性免疫の測定
 - 3) テーマ C (目標登録者数 200~300 人)
 - (1) 水痘皮内反応及び ELISPOT 法による細胞性免疫の測定 (登録時、1 年後、2 年後に測定)
 - (2) gp-ELISA 価測定法、中和抗体価測定法、IAHA 価測定法による VZV に対する液性免疫の測定 (登録時、1 年後、2 年後に測定)
 - 4) 発症時の調査及び回復時の調査
 - (1) 臨床症状の調査 (発症時、回復時に実施)
 - (2) 患部写真撮影 (発症時、回復時に実施)
 - (3) 带状疱疹患部からの採材による PCR 試験及びウイルス分離によるウイルス同定試験 (発症時に実施)
 - (4) gp-ELISA 価測定法、中和抗体価測定法、IAHA 価測定法による VZV に対する液性免疫の測定 (発症時、回復時に測定)
 - (5) 痛みの調査 (発症時から痛み消失まで、最長 6 ヶ月間実施)

5) 細胞性免疫と液性免疫の関係及び免疫持続期間の調査

6) 帯状疱疹重症度評価と細胞性免疫の程度との相関の検討

発症時調査のPCR試験でVZV陽性であった帯状疱疹発症者について、臨床症状の調査票及び臨床写真情報に基づき、帯状疱疹重症度を評価した。さらに疼痛の程度を経時的に調査した。登録時の細胞性免疫の程度(水痘皮内反応)と皮疹の重症度・疼痛の程度との相関について検討

7) 帯状疱疹の発生頻度と発症者における痛みとの程度と持続時間の調査

8) 細胞性免疫と液性免疫の関係及び免疫持続時間の調査

9) 生活習慣・社会心理的要因・VZVに対する細胞性免疫の程度と帯状疱疹発症の関係に関する調査

(横断研究): 過去帯状疱疹罹患歴の有無を問診にて把握し、健康に関するアンケート調査によって得られた基礎疾患、喫煙、飲酒、家族歴、食生活、ストレスなどの身体的因子、生活習慣及び社会心理的因子、全31因子との関連を検討した。解析は帯状疱疹罹患歴を目的変数とし、上記31因子を説明変数として、ロジスティック回帰分析を行った。年齢と性別は交絡因子として調整した。また男女別に解析を行った。

(縦断研究): 健康に関するアンケート調査及び皮内反応検査時をベースラインとして、その後1年間における帯状疱疹発症の有無

(PCR試験によりVZV検出例187名を帯状疱疹発症と定義した。)とベースライン時における身体的因子、生活習慣集会及び社会心理的因子、全31因子との関連を前向きに検討し、帯状疱疹発症に関連する危険因子を検討した。解析は発症の有無を目的変数とし、健康に関する31因子を説明変数として、ロジスティック回帰分析を行った。年齢と性別は交絡因子として調整した。また、男女別に解析を行った。

【研究倫理面への配慮】

「帯状疱疹ワクチン開発のための疫学研究」は、

(独)医薬基盤研究所の倫理委員会(山西、森)(H20年11月11日)、(財)阪大微生物病研究会(奥野)の倫理委員会(H20年8月23日)、奈良県立医科大学の倫理委員会(浅田)(H20年12月12日)及び大阪大学の倫理委員会(磯)(H21年2月12日)で承認を得た。

C. 研究結果

(平成22年12月31日時点)

1. 登録対象者17,323人のうち、12,522人(72.3%)が登録を行った。テーマ別では、テーマA:12,522人、テーマB:5,685人、テーマC:365人であった。

調査の平均期間は525.5日、最長742日、最短427日であり、期間中の脱落者は251人であった。

2. 医療機関において、「帯状疱疹」または「帯状疱疹疑い」と診断された発症者の患部から生体試料を採取し、PCR試験を実施したところ、265例中187例からVZV特異的なDNAが検出された。PCR試験に基づく帯状疱疹の年間発症率は、1.04%であった。

また、性別及び年齢階層別に帯状疱疹の発症率を比較すると、性別では男性よりも女性が帯状疱疹の発症率が高く、年齢階層別では高齢になるほど、帯状疱疹の発症率が高くなる傾向が見られた。

3. 登録時に実施した水痘皮内反応の結果をもとに、5mmを基準に陽性群と陰性群の2群での発症リスクを比較したところ、陰性群の帯状疱疹発症リスクは陽性群よりも4.19倍高かった。

また、紅斑10mm以上の者を陽性、5mm未満の者を陰性とする、陰性群の発症リスクは陽性群よりも5.69倍高かった。

4. テーマCの登録者365人のうち338人対して、登録から1年後に水痘皮内反応を実施したところ、紅斑長径(mm)の平均値は、15.12、中央値は、15.02、標準偏差は11.40であった。紅斑長径が5mm以上の者は269人、5mm未満の者は69人であった。

紅斑、浮腫ともに、高齢の群ほど長径が小さい経口があった。

5. テーマCの登録者338人から、登録から1年後に採取した血液検体を用いて試験を行ったところ、

gp-ELISA抗体価 (Log₁₀) の平均値は3.80、標準偏差0.37であった。テーマC登録者のうち、311人のIAHA抗体価 (Log₂) の平均値は5.56、標準偏差は1.52であった。

gp-ELISA及びIAHAの値に、性別による差はなかった。また、gp-ELISA及びIAHAは、高齢の群ほど高い傾向を示した。

6. 重症度と細胞性免疫の相関についての検討：登録時に皮内テストを実施したテーマB、C登録者のうち、PCR試験でVZV陽性となった帯状疱疹発症者は85人であった。この85人について、臨床症状の調査票及び臨床写真より、①紅斑の神経分節における面積比、②水疱・びらんの数、③潰瘍の有無、④融合水疱の有無、⑤皮疹が出現した神経分節数に基づいてスコア化し、帯状疱疹の重症度を判定し、この重症度と登録時の細胞性免疫(水痘皮内反応)との相関を検討した。その結果、細胞性免疫の程度が弱いグループほど、重症度スコアが高いことが判明した。

7. 疼痛と細胞性免疫の相関についての検討：PCR試験でVZV陽性であった帯状疱疹発症者のうち疼痛調査が可能であった77例について、疼痛の程度の経時変化をグラフ表し、このグラフに基づいて疼痛スコア (AUC : area under curve) を求め、登録時の細胞性免疫 (水痘皮内反応) との相関した結果、細胞性免疫の程度が弱いグループほど、疼痛スコアが高いことが判明した。

8. 健常人ボランティアにおけるVZV特異的な細胞性免疫応答について、水痘抗原皮内テストおよびIFN- γ ELISPOTテストを行った。両者の測定値間の相関性をピアソンの相関係数の検定により行ったところ、相関係数が0.23と弱いながらも正の相関性を示した。

水痘皮内テスト、IFN- γ ELISPOT テスト双方において、加齢による測定値の低下の傾向が認められた。

帯状疱疹を発症した129名について、発症直後および発症3ヶ月後のVZV特異的な免疫応答について比較検討を行った。IFN- γ ELISPOTの測定値を指標とした細胞性免疫応答については、発症直後および発症3ヶ月後の各測定値の分布に大きな変化は見られなかったが、gpELISAの測定値を指標とした体液性免疫応答については、

発症直後よりも発症3ヶ月後の方が増強の方向にシフトしていた。

9. 帯状疱疹発症時での細胞性免疫応答の変化について調べたところ、全体としては、発症直後の細胞性免疫応答は健常人と比べて高い傾向を示すことを確認している。しかし、発症3ヶ月後の細胞性免疫応答は、発症直後の場合とほとんど変化がなかったことから、帯状疱疹発症時にはすでにVZV特異

的な細胞性免疫応答の増強がみられている可能性が考えられる。しかし、発症時の細胞性免疫応答については、ELISPOT数が10個以下と応答が極めて低い検体も存在する他、その数は発症直後と発症3ヶ月後であまり変化がない。この結果は、帯状疱疹発症によっても細胞性免疫応答の上昇を誘導しない検体が存在することを示すものであるが、その検体について何故細胞性免疫応答の上昇を誘導しないのかは不明であり、今後検討を行う必要がある。

10. 横断研究：帯状疱疹過去罹患歴と有意に関連する因子として、19因子が挙げられた。

1) 基礎疾患：高血圧、高脂血症、糖尿病、膠原病、癌、白血病の6因子中、高血圧、高脂血症、膠原病の3因子について帯状疱疹発症との関連性が示された。男女別解析によると、男性では高血圧、女性では高血圧、高脂血症に有意な結果が得られた。

2) 喫煙・禁煙：喫煙の1因子について、帯状疱疹発症との関連性が示された。男女別解析でも、男女共に喫煙に有意な結果が得られた。

3) 家族歴：父親帯状疱疹罹患歴、母親帯状疱疹罹患歴、兄弟帯状疱疹罹患歴の3因子について帯状疱疹発症との関連性が示された。男女別解析でも、男女共に家族の罹患歴に有意な結果が得られた。

4) うつ症状：「興味がない」、「希望がない」の2因子中、「興味がない」の1因子について、帯状疱疹発症との関連性が示された。男女別解析では、女性についてのみ「興味がない」に有意な結果が得られた。

5) ライフイベント：ライフイベント、仕事や生活環境の変化、人間関係の変化、金銭的問題の4因子中、人間関係の変化、金銭的問題の

2 因子について、帯状疱疹発症との関連性が示された。男女別解析では、男性についてのみ人間関係の変化、金銭的問題に有意な結果が得られた。

6) 食生活：野菜、果物、魚、大豆製品、乳製品の5因子について、帯状疱疹発症との関連性が示された。男女別解析では、男性では大豆製品と乳製品、女性では果物、魚、卵、乳製品に有意な結果が得られた。

7) 社会心理的ストレス：睡眠満足度、ストレス、楽観的思考、笑う頻度の4因子について、帯状疱疹発症との関連性が示された。男女別解析では、男性ではストレス、女性ではストレス、楽観的思考、笑う頻度に有意な結果が得られた。

1 1. 縦断研究：帯状疱疹発症に関連する危険因として以下の4因子が挙げられた。

1) 基礎疾患：高血圧、高脂血症、糖尿病、膠原病、癌、白血病の6因子中、癌の1因子について、帯状疱疹発症の危険因子であることが示唆された。男女別解析によると、女性についてのみ癌に有意な結果が得られた。

2) 喫煙・禁煙：喫煙の1因子について、帯状疱疹発症の危険因子であることが示唆された。男女別解析では、男性についてのみ喫煙に有意な結果が得られた。

3) 家族歴：父親帯状疱疹罹患歴、母親帯状疱疹罹患歴、兄弟帯状疱疹罹患歴の3因子について、いずれも有意な結果が得られなかった。

4) うつ症状：「興味がない」、「希望がない」の2因について、いずれも有意な結果が得られなかった。

5) ライフイベント：ライフイベント、仕事や生活環境の変化、人間関係の変化、金銭的問題の4因子について、いずれも有意な結果が得られなかった。

6) 食生活：野菜の1因子について、帯状疱疹発症の危険因子であることが示唆された。

7) 社会心理的ストレス：睡眠満足度の1因子について、帯状疱疹発症の危険因子であることが示唆された。男女別解析では、女性についてのみ睡眠満足度に有意な結果が得られた。

D. 考察

1. 当初の目標の12,000人を上回る12,522人の登録者数を確保したことにより、3年間の継続調査によって、統計学的に評価し得る十分な症例数が確保できると考える。

現時点のデータより、日本人における帯状疱疹の発症率は、年間で1.04%であることが示唆される。これは、前述の米国での大規模臨床試験での数値に非常に近い数値である。

しかしながら、性別での発症率を比較したところ、米国では認められなかった男女差が観察された。帯状疱疹発症の男女差については、文献によって、多様な結果が報告されているため、引き続き検討を重ねる必要がある。

テーマCの登録者338人に対して、登録から1年後に実施した各種免疫測定結果において、水痘皮内反応結果では、紅斑、浮腫の長径は、高齢の群ほど小さかったことから、細胞性免疫は加齢に伴い減少することが推察される。一方、gp-ELISA及びIAHAの結果では、高齢の群ほど高い値であったことから、液性免疫は加齢に伴い上昇することが推察される。

帯状疱疹の発症が高齢の群に多いことを考慮すると、帯状疱疹の発症には水痘皮内反応に関与する細胞性免疫が強く関係していることが推察される。このことから、水痘皮内反応の結果が、その後の帯状疱疹の発症の可能性を示す有用な代替指標になりうると考えられる。

2. 帯状疱疹発症者について、皮疹の重症度・疼痛度の程度と細胞性免疫（水痘皮内反応）との相関について検討した結果、細胞性免疫の程度が低下している者の方が、皮疹や疼痛の程度が重症化しやすい傾向が明らかとなった。現在のところ、帯状疱疹後神経痛や神経麻痺などの合併症と細胞性免疫との相関については、症例数が少ないため、明らかな結果が得られていない。

今後、さらなる症例の蓄積により、細胞性免疫と臨床症状との相関がより明確になっていくものと期待される。

3. 帯状疱疹の発症は小児期の水痘既往歴や年齢、細胞性免疫の低下が危険因子であるといわれてきたが、本研究にて生活習慣や社会心理的要因との関連に言及することが可能となった。

横断研究により、19 因子が危険因子候補として注目すべき因子が抽出された。

特に、家族に帯状疱疹罹患歴がある者は、本人の帯状疱疹罹患歴が有意に高いことが明らかとなった。また、縦断的検討においても、有意な差は確認できないものの、家族に帯状疱疹罹患歴がある者のほうが、本人も帯状疱疹発症リスクが高い傾向が見られた。これは、水痘帯状疱疹ウイルスに対する免疫は、水痘患者や帯状疱疹患者との接触により賦活され、帯状疱疹になりにくくなるという通説とは異なる結果である。なお、帯状疱疹の危険因子が家族の帯状疱疹既往歴であることを示した先行研究としては、Lindsey D. Hicks 等によるケースコントロールスタディがあり、家族の帯状疱疹既往歴のある群が対照群に比べ、本人の帯状疱疹既往歴のオッズ比が 4.50 倍有意に高いことが報告されている。本横断研究においても同様の結果が確認されたことで、帯状疱疹の遺伝的感受性の可能性について、更なる検討の必要性が示された。

また、縦断研究により、基礎疾患に癌を有する者は有意に帯状疱疹の発症リスクが高いことが分かった。これは免疫抑制剤等の治療の影響があることが示唆される。有意な差は確認できないものの、自己免疫性疾患である膠原病を基礎疾患に持つ者も、発症リスクが高い傾向がみられた。今後更なる帯状疱疹発症者のデータの蓄積により、免疫抑制者の発症リスクが明らかとなると考えられる。

最後に、喫煙と帯状疱疹発症に関連性が認められた。縦断研究の結果より現在喫煙している者の方が喫煙していない者より発症リスクは 0.48 と有意に低いことが分かった。これは喫煙の有無と皮内検査の紅斑長径(陽性基準 10mm)との関係性を検討すると、現在喫煙群の方が有意に紅斑長径が大きいことに起因している可能性が高く、その背景機序に関する更なる検討が必要と考える。

E. 結論

既に、1 年間以上のデータが蓄積されており、これらの結果から帯状疱疹の発症率や水痘皮内反応

陽性群と陰性群の発症リスク比、生活習慣及び社会心理的要因等の傾向が明らかとなっている。しかし、より信頼性の高い結論を得るためには、当初の目標である平均調査期間 3 年間、発症例数 300 例以上の調査が必要であると考えられる。

現在、水痘抗原は VZV に対する免疫の程度を測定する用途においてのみ使用されているが、本研究の成果により、帯状疱疹の発症リスクを示す新たな指標とできることが証明されれば、今後より効果的な発症予防策を講じることができると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表 3 件

(邦文総説)

- 1) 浅田秀夫: ウイルス感染と薬疹. J Environ Dermatol Cutaneous Allergol 4(2), 83-88, 2010
- 2) 浅田秀夫: 慢性腎臓病患者に対する抗ヘルペスウイルス薬治療 (最近のトピックス 2010). 臨床皮膚科 64(5), 141-145, 2010
- 3) 小川浩平、長島千佳、北村華奈、横井祥子、野口隆一、増谷剛、浅井英樹、川井廉之、小林信彦、浅田秀夫: 潰瘍性大腸炎に合併した致死的水痘の 1 例. 皮膚の科学 in press

2. 学会発表 4 件

- 1) 山西弘一: 小豆郡における帯状疱疹ヘルペス疫学. 国際ヘルペスウイルス学会. 米国ユタ州ソルトレークシティ 2010. 7. 28
- 2) 奥野良信: ワクチンフォーラム 2010-日本発のワクチン開発をめざしてIV-講演 新宿明治安田生命ホール 2010. 9. 14
- 3) 浅田秀夫: 帯状疱疹の疫学とワクチンによる予防. 第 51 回日本臨床ウイルス学会 教育講演 (高松) 2010. 06. 20
- 4) 浅田秀夫: ウイルス性皮膚疾患に関する最近のトピックス. 第 61 回日本皮膚科学会中部支部学術大会 Up-to-date 講演 3 (大阪) 2010. 09. 11

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし