

横田 (恒次) 恭子. 麻疹ウイルス偽型化 HIV-1 抑制性 shRNA 発現レンチウイルスベクターのヒト化マウスにおける in vivo 評価. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、12 月、東京、2011

- 5) 石毛真行、寺原和孝、渋谷謙太郎、光木裕也、池野翔太、小林和夫、岡田誠治、横田 (恒次) 恭子. R5 および X4 HIV-1 同時感染ヒト化マウスモデルによる感染早期のウイルス優位性の解析. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、12 月、東京、2011
- 6) Takayama, I., Shimada, S., Nakauchi, M., Minegishi, T., Tashiro, M., Kageyama, T.: A quantitative definition of the 275H and 275Y proportion in neuraminidase of the pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by real-time duplex RT-PCR assay. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011
- 7) Takayama, I., Takashita, E., Ejima, M., Nakauchi, M., Fujisaki, S., Kim, N., Kishida, N., Hong Xu, Sugawara, H., Itoh, R., Doi, T., Kageyama, T., Odagiri, T. and Tashiro, M.: Improved surveillance system to detect anti-viral-resistant influenza A/H1N1pdm09 viruses in Japan. Influenza Antivirals: Efficacy and Resistance, Rio de Janeiro, November, 2011
- 8) Takashita, E., Ejima, M., Takayama, I., Nakauchi, M., Fujisaki, S., Kim, N., Kishida, N., Hong Xu, Sugawara, H., Itoh, R., Doi, T., Kageyama, T., Tashiro, M. and Odagiri, T.: Detection of antiviral-resistant pandemic influenza A(H1N1)2009 (A/H1N1pdm09) Viruses by a combination of chemiluminescent and fluorescent neuraminidase inhibitor susceptibility assays in JAPAN. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

3. その他
特記なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

H5 亜型インフルエンザウイルスを特異的に認識するモノクローナル抗体

出願番号：特願 2011-22774

2. 実用新案登録
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
研究期間 平成22年4月～平成24年3月

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 |
| (7) 凸版印刷(株) | 加藤洋行 |

A. 研究目的

世界規模で感染症が深刻化しているなか、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、小児の結核には有効であるが、成人肺結核に対する効果は十分でないとされる。このため、新興・再興感染症、特に効果的な結核・エイズ対策を構築する一環として、プライムブーストワクチンの開発を目指す。プライムワクチンとしての BCG の多様性を分子レベル・遺伝子レベルで再評価し、その特性の検討およびその効果を高める組換え BCG ベクター(rBCG)の開発研究を行う。また、ブースターとして、侵襲性の低いマイクロニードル(MN)による独創的な経皮接種ワクチン等を、BCG プライム免疫によって産生されたメモリーT細胞を回復し結核特異的免疫を増強するためのブースターワクチンとして開発する。さらにその有効性・安全性を評価するためのシステムを構築する。

B. 研究方法

1) 菌株については、主に日本ビーシージー製造(株)中央研究所山本三郎博士より供与された。各菌株はミドルブルック 7H9, 7H10 および 7H11 培地にて培養した。

BCG Tokyo 株シードロットとコマーシャルロットとして以下のものを使用した。

旧シードロット Tokyo172 1961 年製造、現シードロット Tokyo172-1 1982 年製造、Tokyo172 より製造されたコマーシャルロット 1 種類、Tokyo172-1 より製造されたコマーシャルロット 2 種類、台湾における現行のコマーシャルロット 1 種類、タイ王国における現行のコマーシャルロット 1 種類の計 7 種類である。また Tokyo172-1 から分離された Tokyo 株 I 型と Tokyo 株 II 型も用いた。

2) マウス樹状細胞を抗原提示細胞とし、T 細胞との共培養を行い、各国 BCG 亜株添加で産生されるサイトカインを ELISA キットで測定した。

3) モルモットを用いた遅延型過敏反応および結核菌噴霧感染による抗結核免疫誘導能の比較を BCG 製品として、以下のものを用いて、行った。
Tokyo 172-1 由来ワクチンとして日本 BCG 研究所製品、台湾 CDC 製造の製品、タイ赤十字製造の製品を用いた。パスツール株 BCG としてアルゼンチン CLPH 製造の製品、エクアドル(国立衛生研究所)製造の製品、ベトナム(国立ワクチン研究所)製造の製品、インドネシアのワクチンメーカー(BioFarma)製造の製品を用いた。ロシア株としてブルガリア国立感染症寄生虫研究センター製造の製品を用いた。デンマーク株として国立血清研究所製造の製品を用いた。

4) 遺伝子領域 RD16 の異なる日本株 BCG Tokyo 172-1 株のサブポピュレーション I 型および II 型について光学および電子顕微鏡での形態観察を行った。またその総脂質画分を抽出し、薄層クロマトグラフィ、ガスクロマトグラフィ/マススペクトロメリー及び MALDI-TOF MS により脂質等菌体成分の分析・同定を行った。さらにそれぞれの *ppsA* 遺伝子のクローニングと形質転換株の作製を行った。

5) BCG 糖脂質分子の宿主応答の比較するため、培養した Tokyo 172 株 I 型および II 型の死菌体から総脂質画分を抽出し、PGL 及びミコール酸糖脂質を精製し、マウス骨髄性マクロファージを刺激し、サイトカインの産生または遺伝子発現から細胞の活性化を評価した。

6) 遺伝子発現レベルの差異を生じるメカニズムの解析のため、BCG のゲノム DNA の調製および BCG3475c タンパク質の作製し、ゲルシフトアッセイにより結合性を調べた。

7) BCG の構成成分の免疫活性を、細胞壁骨格 BCG-CWS についてラットを用い解析した。さらに BCG-CWS または BCG-MA リポソーム製剤の *in vivo* 免疫活性評価試験としてマウス LPS hypersensitivity 法を検討した。

8) BCG の投与方法を比較検討するため、ハートレイ系モルモットに気管挿管、経鼻、噴霧または皮内投与をした後、遅延型過敏反応および結核菌噴霧感染を行い、免疫誘導能を比較した。

9) BCG の効果の持続性について、加齢、菌の排除等の影響を、マウスを用いてメモリー細胞誘導能、カナマイシン耐性 BCG に対する免疫誘導能等で検討した。

10) 結核菌が増殖期と休眠期に発現する主要な蛋白質の組み換え体を作成し、未発症感染者における免疫応答を解析した。

11) BCG における *thyA*, *thyX* 遺伝子二重欠損株の作製を、 Δ ThyX のゲノム上の *thyA* に、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薬剤耐性遺伝子による選択を用いない BCG ベクター系の構築を試みた。

12) MHC ペンタマーアッセイ法での rBCG による CTL 誘導能の評価システムの構築を試み、HIV-Gag 高発現型 rBCG のマウスにおける細胞性免疫誘導能を解析した。さらに Th1 免疫をより強く誘導するための宿主遺伝子(SOCS1dn 等)導入等を行った。

13) BCG においてマウス SOCS1dn を発現させ、マウスへ投与したのち、IFN- γ 、TNF- α および RANTES 等サイトカイン産生誘導能の解析を ELISPOT 法および ELISA 法で行った。さらに組換え BCG 免疫マウスにおける強毒結核菌感染防御能の評価を噴霧感染後の臓器内生菌数測定で行った。ついで、コドン最適化 SIV gag および SOCS1dn 共発現型組換え BCG の構築をおこない、ウエスタンブロット法で SOCS1dn および SIV Gag の発現を調べた。

14) 難治性抗酸菌症モデルによる治療法の開発のため感染マウスにおける抗 TNF- α ならびに抗菌薬の菌増殖に及ぼす影響、病理組織所見および脾臓細胞からのサイトカイン産生を調べた。

15) 溶解性マイクロニードル(dMN)の皮膚穿刺性、溶解性および抗原送達率の検討を行い、さらに Ag85A 等結核菌抗原を含有する dMN を作製し、マウスの抗原特異的抗体応答について ELISA 法を用いて調べた。さらに中空型 MN を作製し、スキンスラットおよびブタ皮膚への穿刺性試験等を行った。

16) rBCG を用いた細胞性免疫誘導型ワクチンの開発とモルモットにおける評価系の確立のため、モルモット組換え IFN- γ の精製とモルモット IFN- γ に対するペプチド抗体の作成を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験、病原体取扱い実験、DNA 組換え実験について各所属機関の規程に従い、申請し、審査後

許可を受け、指定された実験室および区域において行った。ヒト血清試料については、大阪市立大学大学院医学研究科倫理委員会、国立病院機構刀根山病院倫理委員会の承認を得たのち、対象者のインフォームド Consent のもと実施した。

C. 研究結果

1) BCG の多様性について

本研究の成果は生後まもなく接種するプライムワクチンとしての BCG について、現在、使用されている亜株の中でより有用な株を評価するための科学的な情報を得た研究である。

i) BCG 亜株間の獲得免疫誘導能の違いに関し、マウスで検討したところ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、メモリー細胞の誘導能が高いことが示された。一方モルモットを用いた場合、検討した BCG ワクチン株の間には結核菌感染防御効果に差は検出されなかった。

ii) 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。

iii) 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。

(a) 菌体の長さの相異 (I 型 > II 型)

(b) 2-O-メチルラムノースの含有量 (I 型 > II 型)

(c) 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。

また、BCG Tokyo 172 株 I, II 型菌の脂質免疫学的な観点から、宿主応答機序の一部を解明した。

(a) 総脂質画分は TLR2 依存的に宿主認識されること。また、その反応性は I 型菌に比べ II 型菌由来が優位であること。

(b) PGL は (a) の宿主応答を抑制的に制御すること。

(c) TDM は mincle 分子、GMM は TLR2 分子をレセプターとして限定的に宿主認識されること。

さらに、現行の BCG ワクチンではシードロットからコマーシャルロットが作製される段階でサブポピュレーション I 型の比率が高くなることが示唆された。また BCG3475c 遺伝子産物は特定の遺伝子の転写調節領域と結合した。これらのことは、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。

2) 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。

BCG 細胞壁ミコール酸含有脂質成分 (BCG-CWS 及び BCG MA) の R8 MEND 化により、マウス LPS hypersensitivity 法において Th-1 免疫応答の指標として IFN- γ 、IL-12 及び TNF- α 値の上昇が製剤のスクリーニングに有用である。MA-MEND は CWS-MEND と比べて高い IFN- γ 値を示したのに対して CWS-MEND の TNF- α 値は MA-MEND と比べて高かった。

マウスにおける OVA 抗原に対するアジュバント活性を比較した結果、MA O/W は IFA と同等又はそれ以上の高い抗体価の上昇を示した。

3) 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。

4) 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。

5) 未発症結核菌感染者における抗体応答および結核菌蛋白質発現

潜在期において結核菌は、Antigen 85 と MDP1 を発現していることを明らかにした。また、Antigen 85 と MDP1 に対する抗体産生が顕著であった。Antigen 85 と MDP1 は、主要な宿主免疫の標的抗原であると推定された。

6) 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。

7) CTL 誘導能評価システムの確立

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。

8) BCG ベクターの免疫原性増強法の開発とワクチンへの応用

SOCS1 アンタゴニストを分泌発現させるという手法により、BCG ベクターのポテンシャルを増強することが可能であり、親株と比較して、強毒結核菌 H37Rv 株の噴霧感染系において、マウス脾臓での菌数を有意に低下させられることがわかった。エイズワクチンへの応用が期待される。

9) 難治性抗酸菌症モデルによる治療法

難治性 *M. avium* 感染症のマウスモデル系を用いて、肉芽腫形成が菌増殖に及ぼす影響と薬剤治療の効果に及ぼす影響について調べ以下の結論を得た。(1)細胞性免疫を誘導しやすい B6 のほうが体液性免疫を誘導しやすい BALB/c よりも肉芽腫の形成が著しく、抵抗性の DBA/2 マウスでは肉芽腫形成がほとんどみられない。(2)またこれら感染マウスに三種類 (RFP, LVFX) の抗菌剤を投与した場合、肉芽腫の形成が著しい B6 で治療効果が最も悪く、逆に肉芽腫形成がほとんどみられない DBA で最も優れた治療効果が認められる。(3)感染 B6 マウスにおける抗 TNF- α 抗体と抗菌薬の併用は、抗菌薬による治療効果を高める。ただし臓器によりその効果は異なる。

10) マイクロニードルを使用した新規経皮免疫法の検討

i) 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。

ii) 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。

iii) 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。

11) 皮内投与デバイスとしてのマイクロニードルの開発と評価

中実針型マイクロニードルの検討においては、マイクロニードルの形状により皮膚への穿刺性能が異なっていた。また、穿刺性能の優れている形状のマイクロニードルほど、皮膚穿刺の過程でマイクロニードルが破損しやすい傾向が認められた。以上のことから、穿刺性能と堅牢性のバランスを考慮してマイクロニードルを設計することが必要と考えられた。

中空針型マイクロニードルの検討においては、マイクロニードルが皮膚を穿刺しているにもかかわらず、排出した色素液の大部分が皮膚表面に漏れてしまった。中空針型マイクロニードルを用いて薬液を皮内に注入するためには、マイクロニードルの皮内への穿刺深度を安定して制御・維持するための方法・器具が必要となるかもしれない。

12) モルモットにおける細胞性免疫誘導の評価系の確立

2%CHPS により可溶化されたバキュロウイルスモルモット組換え IFN- γ は、濃縮過程で混入する DNA の除去により、Ni ビーズへの結合性が求められ、精製が可能となった。また、中和活性部位を予測して作成したペプチドに対する抗体は、モルモット組換え IFN- γ に結合することが認められた。

D. 考察

各 BCG 亜株において抗原提示能など獲得免疫の差異まで明らかにし、さらに日本株 I 型、II 型について、形態学的、脂質生化学的な相違点を解明した。II 型での遺伝子変異、それにより欠失している脂質分子 PGL の生合成経路を解明し、遺伝子型と表現型を結びつける事ができた。また、脂質免疫学的な観点から、宿主応答機序の一部を解明した。

BCG ベクターに関しては、結核および HIV ワクチン候補を構築し、高発現化および免疫原性増強法の開発を行い、その成果が得られた。さらに CTL 評価系の確立、薬剤耐性遺伝子を含まない BCG ベクターの構築で当初の目的は達成できた。また成人肺結核ワクチン開発に必要な情報である BCG の持続性に加え、BCG 成分のアジュバント効果、マイクロニードルによる新規経皮免疫法の検討においても動物実験での有効性が確認され、さらに新たに作製した中空針型のデバイスについても穿刺性等確認でき、一定の成果を達成できたと考えられる。

日本株 BCG は WHO の国際参照株であり、各国亜株との比較とともに I 型、II 型の性質の一部を解明した意義は大きく、世界の BCG ワクチンの品質管理・標準化に貢献すると考えられる。自然免疫と獲得免疫へ移行における *in vitro* での活性化において、株間比較の成果を論文として公表したが、WHO の

meeting report に引用された。
(http://www.who.int/biologicals/publications/meetings/areas/vaccines/bcg/BCG_meeting_report_2009v7_FOR_WEB_10JUNE.pdf)。すなわち、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。BCG の持続性等の諸性質の解明に加え、BCG ベクター系および新規経皮免疫法の開発研究は、社会的要請の高い成人肺結核・HIV ワクチン開発に重要な要素であり、その開発は、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られる。これら研究成果を行政、企業、大学の研究者が共有できたことは、今後のワクチン開発やワクチン行政に役立つものとして期待される。

日本株 BCG の、亜株間との差異、I 型および II 型の差異が遺伝子型と表現型との相関が明らかになりつつあるが、免疫誘導能の差異が遺伝子のどの部位のどのような変異に由来し、どう表現型として現れるかを明らかにしたい。それらの知見からより安全で有効な株、新規シードロット、ベクターとしてより適切な株の選定を行う。またプライムワクチンである BCG ベクターによる組換えワクチンの改良を進め、これまで有効性の評価を行ってきた。今後は、安全性の検討も視野に入れる必要がある。さらに経皮免疫用 MN 等のデバイスの開発および成人肺結核用ワクチン抗原の選定を進めたい。このように新興・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・臨床試験を目指す。

以上のように本研究はワクチン行政、ワクチン開発において、今後の展開に重要な研究である。得られた知見を産官学で共有し、新たな技術、製品開発、使用につながる基礎的研究を効率よく推進したいと考える。

F. 結論

1) 各 BCG 亜株において、前期分与株(日本株等)とそれ以降の後期分与株(Pasteur 株等)とで抗原提示能等をマウスで比較したところ、本邦の現行 BCG ワクチン株を含む前期分与株の抗原提示能およびメモリー細胞の誘導能が高いことが示された。一方モルモットを用いた場合、検討した BCG ワクチン株の間には結核菌感染防御効果に差は検出されなかった。

2) I 型、II 型の相違については、II 型 *ppsA* 遺伝子での 1 塩基挿入と 2 塩基置換、菌体の長さ、2-O-メチルラムノースの含有量および II 型での PGL および PDIM の欠失等の差異が見いだされた。さらに I 型のみで発現する PGL および PDIM を同定した。総脂質画分は TLR2 依存的にマクロファージを活性化したが、PGL にはその活性はなかった。これら形態変化や糖脂質はワクチン効果に影響する因子であることが考えられる。

3) リポソームに搭載した BCG-CWS は、ラットの膀胱癌モデルで治療効果が認められた。

4) 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。

5) BCG のワクチン効果の持続性は、加齢・菌の排除等によるものではなく、BCG 接種後の時間経過に依存することが示された。

6) 未発症結核菌感染者群で最も高い抗体価を示した抗原は、DorS、Ag85A、MDP1 の 3 種であった。これらは、潜伏感染結核菌が産生し、宿主免疫誘導能があることから、成人肺結核の発症予防抗原候補であると期待される。

7) 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て用いない方法のひとつが見出された。

8) MHC ペンタマーアッセイ法を適用することにより、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 rBCG の評価を進める上で有用である。さらに免疫原性増強法としての SOCS1dn 発現型 BCG では、マウスでのサイトカイン産生増強効果が明らかとなった。

9) 難治性抗酸菌症モデルである感染 B6 マウスにおける抗 TNF- α 抗体と抗菌薬の併用は、抗菌薬による治療効果を高める。

10) dMN は、経皮免疫用デバイスとして、簡便性、確実性、低侵襲性の点から有用である事がわかり、さらに結核抗原含有 dMN によりマウスに有意な抗体応答が誘導された。また、中空型 MN を試作開発し、ブタ皮膚への皮内注入が可能であることを実証した。

11) モルモットにおける細胞性免疫誘導の評価系のためのモルモット組換え IFN- γ およびモルモット IFN- γ に対するペプチド抗体が得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 山本三郎: CpG モチーフと結核免疫. 結核 85(6) 515-521, 2010.

2) Jackson M and Yamamoto S (2011) Historical background of *Mycobacterium bovis* BCG, p3-12. In: Takii T, Maeyama, J, Yamamoto S (eds) BCG---Vaccine and Adjuvant. Japan Anti-Tuberculosis Association, Tokyo.

3) Yamamoto S and Yamamoto T (2011) Protective efficacy of vaccine candidates against guinea pig pulmonary tuberculosis, p107-111. In: Takii T, Maeyama J, Yamamoto S (eds), BCG---Vaccine and Adjuvant. Japan Anti-Tuberculosis Association, Tokyo.

4) Yamamoto S and Yamamoto T (2011) BCG as an adjuvant substance: Brief history of BCG-DNA as an adjuvant substance, p153-156. In: Takii T, Maeyama J, Yamamoto S (eds), BCG---Vaccine and Adjuvant. Japan Anti-Tuberculosis Association, Tokyo.

5) Matsuo K & Ami Y. BCG as a vector for HIV/AIDS vaccine, p.124-141, In BCG Vaccine and

Adjuvant, Takii T, Maeyama J and Yamamoto S (eds), Japan Anti-Tuberculosis Association, Tokyo, 2011.

6) Naka T, Maeda S, Ohara N, Yamamoto S, Yano I, Maeyama J, Ogura H, Kobayashi K and Fujiwara N (2011) Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *M. bovis* BCG Tokyo 172. J Biol Chem 286, 44153-44161.

7) Seki M, Udagawa T, Sugawara I, Iwama K, Honda I, Fujita I, Hashimoto A, Yano I and Yamamoto S (2011) The effect of passages during Japanese BCG vaccine production on genetic stability and protective efficacy. Vaccine 30, 1460-1464.

8) Ozeki M, Hirayama Y, Takii T, Yamamoto S, Kobayashi K and Matsumoto S (2011) Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG. Vaccine 29, 6881-6887.

9) Ohara N. 2012. Current progress in tuberculosis and recombinant BCG vaccines. J Oral Biosci 54: (in press).

2. 学会発表

1) 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. 形態の異なる BCG Tokyo 172 亜種間の脂質生化学的比較. 第 85 回日本結核病学会総会 京都 2010 年 5 月.

2) Naka, T., Maeda S., Yamamoto R., Niki M., Ohara N, Yano I, Yamamoto S, Maeyama J, Ogura H., and Fujiwara N. Comparative phenotypes in two subpopulations of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo 172 strain. International Unions of Microbiological Societies 2011 Congress. Sep. 2011 Sapporo.

3) Maeyama J, Iho S, Osada-Oka M, Matsumoto S, Isaka M, Yamamoto S: Immune responses in guinea pig administered with anti-tuberculosis booster vaccine candidate consisting of recombinant proteins of *Mycobacterium tuberculosis* and adjuvants. International Unions of Microbiological Societies 2011 Congress. Sep. 2011 Sapporo.

4) Ohara N, Fujiwara N, Okabe M, Yamamoto S, Takii T, Maeyama J, Nakayama M, and Kobayashi K. Analysis of RD16 locus in the BCG Tokyo 172 genome. Forty-fifth Tuberculosis and Leprosy Research Conference US-JAPAN Cooperative Medical Science Program. July 13-16, 2010: Massachusetts USA.

5) Maeyama J, Iho S, Osada-Oka M, Matsumoto S, Isaka M, Yamamoto S: Effects of adjuvants on guinea pig and mouse administration with recombinant proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. Keystone Symposia, Tuberculosis: Immunology, Cell Biology and Novel Vaccination Strategies. Jan. 2011, Vancouver, Canada.

6) Hayashi D, Takii T, Fujiwara N, Fujita Y, Yano I, Yamamoto S, Horita Y, Taniguchi K, Chiba T, Onozaki K: Comparative studies of immunostimulating activity and intracellular

survivability *in vitro* among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) substrains. Keystone Symposia, Tuberculosis: Immunology, Cell Biology and Novel Vaccination Strategies. Jan. 2011, Vancouver, Canada.

7) Matsumoto S. Host factors having an impact on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. International Union Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.

8) Nishiuchi Y, Matsumoto S, Tateishi Y, Yamaguchi N, Nasu M. Biofilm formation of *Mycobacterium avium* isolated from living environment. International Union Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.

9) Maeyama J, Iho S, Osada-Oka M, Matsumoto S, Isaka M, Yamamoto S. Immune responses in guinea pig administered with anti-tuberculosis booster vaccine candidate consisting of recombinant proteins of *Mycobacterium tuberculosis* and adjuvants. International Union Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.

10) Ozeki Y, Kobayashi K, Matsumoto S. The efficacy of BCG may be a time-dependent after the vaccination and age-independent in mice. International Union Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.

11) 山本三郎: BCGの歴史、結核免疫、新規結核ワクチン開発の状況。第5回ストップ結核パートナーシップ ジャパン 総会特別講演、2011年11月、東京。

12) 山本三郎: BCGワクチンの多様性。第4回BCG注入療法研究会 教育講演、2011年11月、東京。

13) 前山順一、伊保澄子、井坂雅徳、山本三郎: 粘膜アジュバントとしての新規 A 型 CpG-DNA の作用機序: 形質細胞様樹状細胞の関与。第85回日本細菌学会総会、2012年3月、長崎市。

14) 尾関百合子、平山幸雄、岡真優子、立石善隆、瀧井猛将、山本三郎、小林和夫、松本壮吉: マウスモデルにおける BCG ワクチン効果の減衰に関する研究。第85回日本細菌学会総会、2012年3月、長崎市。

15) 谷口恵一、瀧井猛将、林大介、伊藤佐生智、矢野郁也、山本三郎、丸山光生、小野崎菊夫: BCG ワクチン接種自然加齢マウスにおけるメモリー細胞と Th1応答。第132回日本薬学会年会、2012年3月、札幌。

G. 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

2) 新規な組換え BCG ワクチン: 特願 2011-199422、松尾和造、水野 悟、川原 守、保富康宏、渡邊健太。

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、プライムワクチン検討の一環として BCG 亜株では前期及び後期分与株の相違、Tokyo172 株 I 及び II 型の脂質免疫学的な宿主応答機序の一部を解明した。

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 |
| (7) 凸版印刷(株) | 加藤洋行 |

A. 研究目的

新興・再興感染症が世界的に深刻化している。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 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はいない。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 亜株間でのメモリー細胞誘導能の差異について検討を行った。また、各国で使われている BCG 製品の抗結核免疫誘導能を結核菌噴霧感染実験により評価した。

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。昨年度、phenolglycolipid (PGL) および phthiocerol dimycocerosate (PDIM) の偏在性を見出し、PGL, PDIM が II 型菌で欠損しており、生合成遺伝子 *ppsA* 遺伝子の 1 塩基挿入、2 塩基置換による機能低下に起因していることを明らかにした。この糖脂質分子に着目し、宿主応答の比較から I 型菌にのみ発現している PGL 分子について、その機能を評価した。

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。細胞壁骨格 (CWS) をリポソームで製剤化した R8 リポソーム化 BCG-CWS が膀胱癌モデルで強力な抗腫瘍効果を有することを示してきたが、CWS の免疫活性中心がミコール酸 (MA) と考えられることから、本年度は、マウス LPS hypersensitivity において R8 リポソーム ミコール酸 (MA) が Th1 型免疫応答を誘導し抗腫瘍効果が期待されるばかりでなくリポソーム製剤の免疫活性スクリーニングにも適していることを明らかにした。

さらに未発症結核菌感染者における抗体応答を解析した。また、免疫組織染色により、未発症結核菌感染者における結核菌蛋白質の発現を解析した。

一方、ブースターワクチンに関しては、皮内投与デバイスとしての中実針型および中空針型マイクロノードルの開発と皮膚への穿刺性能等の評価を行った。

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)、旧シードロット Tokyo172 1961 年製造、現シードロット Tokyo172-1 1982 年製造、Tokyo172 より製造されたコマーシャルロット 1 種類、Tokyo172-1 より製造されたコマーシャルロット 2 種類、台湾における現行のコマーシャルロット 1 種類、タイ王国における現行のコマーシャルロット 1 種類等を用いた。。また Tokyo172-1 から分離された Tokyo 株 I 型と Tokyo 株 II 型も用いた。菌株については、主に日本ビーシージー製造 (株) 中央研究所山本三郎博士より供与された。

各菌株は Middlebrook 7H9 Broth/10% ADC/0.25 % Tween 80 培地 (7H9-ADC-Tween80) または

7H11/10% OADC/0.5% グリセリン/寒天培地で 37°C、2 週間培養した。

2) マウスを用いた各国亜株のメモリー細胞誘導能の比較

マウス骨髄細胞由来樹状細胞 (DC) を作成し、これと Concanavalin A (Con A) で刺激した脾細胞を 2 日間共培養し、抗原提示された T リンパ球活性化の指標として IFN- γ と IL-2 を ELISA で測定した。

3) モルモットを用いた遅延型過敏反応および抗結核免疫誘導能の比較

BCG 製品として、以下のものを用いた。Tokyo 172-1 由来ワクチンとして日本 BCG 研究所製品、台湾 CDC 製造の製品、タイ赤十字製造の製品を用いた。パスツール株 BCG としてアルゼンチン CLPH 製造の製品、エクアドル (国立衛生研究所) 製造の製品、ベトナム (国立ワクチン研究所) 製造の製品、インドネシアのワクチンメーカー (BioFarma) 製造の製品を用いた。ロシア株としてブルガリア国立感染症寄生虫研究センター製造の製品を用いた。デンマーク株として国立血清研究所製造の製品を用いた。

ハートレイ系モルモットを BCG で免疫し 8 週間後、精製ツベルクリン (PPD) の 0.2, 0.1, 0.05 μ g, を皮内注射し、24 時間後の硬結を遅延型過敏反応として測定した。さらに免疫 8 週間後にマジソン型噴霧装置を用い *M. tuberculosis* H37Rv 株を噴霧感染した。肺・脾臓から得られた結核菌のコロニー数よりワクチンの免疫効果を判定した。

4) BCG 糖脂質分子の宿主応答の比較

培養した Tokyo 172 株 I 型および II 型の死菌体から総脂質画分を抽出し、PGL 及びミコール酸糖脂質の検出と精製を行った。

4-1) マウス骨髄性マクロファージの刺激

6 週齢の wild type (C57BL/6), TLR2, 4-KO マウスの骨髄から採取分化させた骨髄性マクロファージ (Bone marrow macrophage, BMM) をを用い、適宜希釈した各サンプルを添加して 24 時間培養した。TLR2, 4 に対する陽性コントロールとして Pam3CSK, LPS を使用した。

4-2) 細胞の活性化評価

BMM の活性化は抗原刺激によって産生される炎症性サイトカイン TNF- α を市販の ELISA キットで定量して評価した。また total RNA を回収し、リアルタイム PCR で TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 の発現量をコントロール遺伝子 GAPDH と比較検討した。

4-3) BMM の感染実験

C57BL/6 と mincle-KO マウスの BMM に MOI 10 で BCG Tokyo 172 株 I 型菌を感染させた。感染 4 時間後にリン酸緩衝液で非感染菌を洗浄除去し、ゲンタマイシン加 DMEM 培地に変更して経時的な感染生存菌数を測定した。

5) 遺伝子発現レベルの差異を生じるメカニズムの解析

5-1) ゲノム DNA の調整

BCG のゲノム DNA の調整は Belisle と Sonnenberg の方法を改良して行なった。また、全 RNA 抽出のためにまず超音波破砕機を用いて菌体を破砕後、TRIzol 試薬を用いて全 RNA の抽出を行なった。得られた RNA に含まれる DNA を DNaseI で消化後、さらに RNeasy により精製した。cDNA の作製は市販のキットを用いて行なった。

5-2) BCG3475c タンパク質の作製

BCG3475c 遺伝子全長は Tokyo 株 II 型のゲノム DNA を鋳型として PCR 法により増幅し、pET21b(+) に挿入した。大腸菌 BL21 に形質転換し、IPTG で誘導することにより BCG3475c-(His)₆ タンパク質を得た。菌体を破碎後ニッケルカラムを用いて BCG3475c-(His)₆ タンパク質の精製を行なった。

5-3) ゲルシフトアッセイ

BCG3476、*ppsA*、*sigB*、*groES* の各遺伝子の開始コドンから上流 500 塩基対を PCR 法により増幅し、精製後実験に供した。100 ug の DNA と 25 uM の BCG3475c-(His)₆ タンパク質を 37°C 2 時間反応させ、1.5% アガロースゲル電気泳動に供した。

5-4) BCG3475c の誘導発現

BCG3475c 遺伝子を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- BCG3475c)。このカセットを pAL5000 の複製起点を含む pNN2 シヤトルベクターに挿入後、I 型に形質転換し、カナマイシン含有 7H10-ADC 寒天培地上に播種した。3 週間後に得られた集落を 7H9-ADC-Tween80 培地に継代し、アセトアミドを 0.2% 濃度で添加することにより、プラスミドからの BCG3475c の発現を誘導した。BCG シードロットとコマーシャルロットのゲノム配列解析は Illumina Genome Analyzer IIx を用いて行なった。

II. BCG 細胞壁成分のアジュバント活性

BCG-CWS または BCG-MA リポソーム製剤の *in vivo* 免疫活性評価試験としてマウス LPS hypersensitivity 法を検討し、これを製剤の評価法として確立した。即ち ICR マウスに R8 BCG-CWS 又は -MA

MEND を 0-300 mg i.v. し、2 週間後 LPS を 5 mg i.v. したのち 6 時間後のマウス血清 IFN- γ 、IL-12 及び TNF- α 値をサイトカイン ELISA 法にて測定し、用量依存性を調べて Th-1 免疫誘導の指標とした。

III. 未発症結核菌感染者における抗体応答および結核菌蛋白質発現

DosR レギュロンなど休眠結核菌が産生する 19 種類の蛋白質組換え体と増殖期結核菌が産生する 4 種類の蛋白質の組換え体 (ESAT-6, CFP-10, Antigen85A, Antigen85B) を作成し、ELISA により国内の健常者 (healthy control; HC) (n=17)、活動性結核患者 (active TB) (n=15) および潜在性結核菌感染者 (old TB) (n=17) の血清中の抗体価を測定した。次いで特異抗体を用いて Antigen85 と MDPI のヒト潜在性結核における発現を検討した。

IV. BCG ベクターの免疫原性増強法の開発とワクチンへの応用

1) BCG におけるマウス SOCS1dn の発現

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、pSO246 に組み込んだ SOCS1dn 発現ベクターの構造を、図1に示す。このプラスミドを導入した組換え BCG (rBCG-SOCS1dn) を、7H9-ADC 液体培地 (カナマイシン 50 mg/ml 含

有) で 2 週間振とう培養した後の菌体を sonication し、菌体抽出液を調製する。その一部をウエスタンブロット解析に供し、抗 SOCS1 モノクローナル抗体との反応性を調べた。

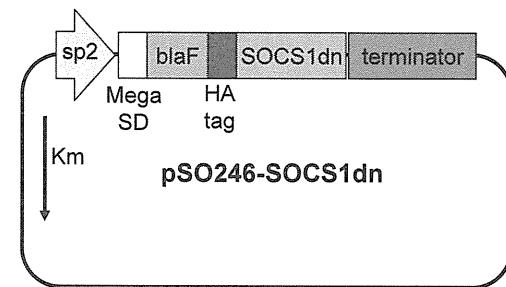


図1 SOCS1dn の発現ベクターの構造

2) マウス SOCS1dn 発現型組換え BCG のサイトカイン産生誘導能の解析

6-8 週齢の Balb/c マウスに、rBCG-SOCS1dn, 0.5 mg を皮下接種し、4 週後の脾細胞を用いて、Antigen (Ag) 85B 蛋白質、Ag85B 発現組換えワクシニアウイルスまたは PPD で刺激後のインターフェロン (IFN)- γ 産生細胞を ELISPOT 法で測定し、BCG 親株免疫マウスと比較した。同様の脾細胞を刺激後に一定期間培養し、その上清中の TNF- α および RANTES を ELISA 法で測定した。

3) 組換え BCG 免疫マウスにおける強毒結核菌感染防御能評価

5 週齢の Balb/c および C57BL/6 マウスに、BCG 親株および rBCG-SOCS1dn をそれぞれ 0.5 mg ずつ皮下接種し、4 週後に強毒結核菌 H37Rv 株 6.5×10^6 cfu を Glas-Col 社製噴霧感染装置 (model 099C A4212) を用いて噴霧感染させた (47 cfu/animal)。感染後 4 週および 8 週で脾臓および肺を採取し、重量を測定後、一部をグラインダーですり潰し、還元培養法により臓器内生菌数測定を行なった。

4) コドン至適化 SIV gag および SOCS1dn 共発現型組換え BCG の構築

上記 pSO246-SOCS1dn プラスミドの terminator の下流にある KpnI site に、コドン至適化 SIV gag 遺伝子発現カセット (*hsp60* promoter) を挿入し、SOCS1dn と SIV Gag 共発現ベクターを構築した。この発現プラスミドを、BCG 東京株およびウレアーゼ欠損型東京株 (国立感染研・ハンセン病研究センター 向井徹先生より分与) に導入し、(1)と同様にウエスタンブロット法で SOCS1dn および SIV Gag の発現を調べた。

V. 難治性抗酸菌症モデルによる治療法

1) 感染マウスにおける抗 TNF α ならびに抗菌薬の菌増殖に及ぼす影響

実験① 6 週齢の B6 マウスに 1×10^6 cfu の *M. avium* MINO 株を尾静脈より感染させた。抗 TNF- α 抗体は、感染後 0~3 週目に週 2 回の割合で 0.25mg/匹を腹腔内接種した。抗菌薬; RFP, CAM, LVFX の投与は感染後 2 週目より開始し、連日経口的に投与した。実験②: 同様に感染させた B6 マウスに、感染 2 週目より週 2 回の割合で抗 TNF- α 抗体を同様に投与した。抗菌薬 RFP, CAM, LVFX の投与時期および

期間は実験①と同じとした。実験①、②ともに感染直後ならびに感染後 2、4、6 週目に、肝臓・脾臓・肺内の生菌数を還元培養法により調べた。

2) 病理組織学的検査による肉芽腫の評価

実験①では、肝と肺より組織標本を作成し、H&E 染色を施して病理組織学的検査を行なった。肝臓では免疫組織染色により、形成された肉芽腫数と肉芽腫を構成する細胞の評価を行った。1 次抗体として、抗 CD3 抗体を使用した。

3) 脾細胞からのサイトカイン産生量測定

実験①ではマウスの脾臓細胞 1×10^7 /well を 24 穴マイクロプレートで 10%FBS を含む RPMI1640 にて培養した。半数のウェルに細胞:菌の比率が 1:1 となるように生菌を加えることで抗原刺激を行った。残り半数のウェルは、抗原非刺激の対照とした。24 時間後、上清を回収した。上清中のサイトカイン量 (IL-12p70、IL-10) は、それぞれ市販のマウス用 ELISA キットを用いて測定した。

VI. マイクロニードルを使用した新規経皮免疫法の検討

1) 中実針型マイクロニードルの皮膚穿刺性能の検討

角錐形状をベースとして同じ長さで形状の異なる 6 種類のシリコン製中実針型マイクロニードルを 5X5 (計 25 本) の正方形に配列したマイクロニードルアレイについて、以下の検討を行った。マウス (BALB/c、メス、10 週齢) の背部皮膚を剃毛した後に切除して、湿らせたろ紙を敷いたプラスチックディッシュ内に伸展させた。切除したマウス皮膚の表面にマイクロニードルアレイを載せて一定の荷重をかけた後に取り除いた。続いて皮膚表面に色素液 (1%エバンスブルー液) を塗布し、直後に 70%アルコール綿でふき取った。以上の操作により、マイクロニードルが穿孔した部分には色素液が吸収されて色素斑が形成され、マイクロニードルによる穿孔孔が可視化された。以上の方法で 6 種類の形状のマイクロニードルアレイの皮膚穿刺性能を検討した。

2) 中空針型マイクロニードルの皮膚穿刺性能と薬液注入性能の検討

中実針型マイクロニードルでの結果も加味して作製した、角錐および角柱形状をベースとした 8 種類の形状のシリコン製中空針型マイクロニードルについて、皮膚穿刺性能と薬液注入性能を検討した。皮膚穿刺性能については、麻酔下のヘアレスラット (HWY、オス、12 週齢) の背部皮膚にマイクロニードルを一定の荷重で押し付けた後に取り除き、色素液を塗布して穿孔孔を可視化することにより評価した。薬液注入性能については、同様にヘアレスラットの背部皮膚または摘出した豚皮膚にマイクロニードルを一定の荷重で穿孔した後、荷重をかけながらマイクロニードルにつなげたシリンジ中の色素液 (1%エバンスブルー/生理食塩液) を排出した。

VII. モルモットにおける細胞性免疫誘導の評価系の確立

1) モルモット組換え IFN- γ の精製

モルモット組換え His Tag/IFN- γ を可溶化した培養液あるいは細胞融解液を、Ni チャージしたビーズ (Millipore) で精製する目的で条件の検討を行っ

た。限外ろ過濃縮液では、ビーズに結合しないことが、昨年度わかったので、限外ろ過濃縮液の粘稠性がバキュロウイルス由来の核酸にあるものと考えられたため、DnaseI 処理をした後、12,000rpm10min 遠心上清で検討を行った。各分画についてウエスタンブロッティングを行い、anti-His tag 抗体で検出を行った。

2) モルモット IFN- γ に対するペプチド抗体の作成

検出系の作成には不可欠である抗モルモット IFN- γ 抗体の作成の手段として、既知のモルモット IFN- γ のアミノ酸配列から、中和活性を有する部位のペプチドを作成し、ウサギポリクローナル抗体の作成を行った。ヒト IFN- γ では、中和活性部位のアミノ酸配列 (20aa) が報告されている (J. immunol 129:2357)。この報告を参考にして、

²⁴ QSRFTNEIRILKNYFNADNSDVGDNGLTFV₆₁ の合成ペプチドに Acp を付加、MBS 法により KLH をキャリアー蛋白として結合させたものを免疫原として、ウサギ抗体の作成を行った。抗体の反応性については、可溶化した組換えモルモット IFN- γ を抗原として、ウエスタンブロッティング法で検出を行った。

3) モルモット組換え IFN- γ の哺乳類細胞での発現

モルモット IFN- γ 遺伝子を pCA10 プラスミドに挿入し、A549 細胞を用いて発現を試みた。組換えタンパクの発現は、細胞抽出液のウエスタンブロッティング解析で行った。

(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。組換え実験については、各施設の組換え DNA 委員会等で承認を受け実験を行った。

ヒト試料については、大阪市立大学大学院医学研究科倫理委員会、国立病院機構刀根山病院倫理委員会の承認を得たのち、対象者のインフォームドコンセントのもと実施した。

C. 研究結果

I. BCG の多様性について

1) マウスを用いた各国重株のメモリー細胞誘導能の比較

マウスを前期分与株の Japan 株と後期分与株の Connaught 株で免疫し、その脾細胞 (T 細胞) と APC として naïve DC に BCG と結核の共通抗原である PPD を提示させた細胞と共培養後の T 細胞からの IFN- γ 、IL-2 産生を測定した。前期分与株で免役した T 細胞からのこれらのサイトカイン産生が高かったことから、前期分与株はメモリー細胞の誘導能が高いことが示された。

2) モルモットを用いた遅延型過敏反応および抗結核免疫誘導能の比較

各国 BCG 製品の皮内投与により免疫したいずれのモルモットも PPD に対し良好な遅延型皮膚反応を示した。また、いずれの BCG ワクチンによって免疫したモルモットの臓器からの残存結核菌数は、生理食塩水のみ投与した陰性コントロールのモルモットからの残存菌数に比べ有意に低い値であることが判明

した。一方、各国 BCG ワクチンで免疫したモルモットにおける臓器の残存結核菌数の間には、脾臓においても肺においても有意な差異は認められなかった。一方、日本株 BCG をシードとする台湾製及びタイ製の BCG ワクチンで免疫したモルモットにおいても同様にワクチン間に結核免疫誘導能に差異は認められなかった。免疫群と非免疫群間の検出菌数には、肺、脾臓共に $P < 0.01$ で有意な差が検出された。BCG の投与方法の違いによる免疫群間内では肺、脾臓共に ANOVA による解析で有意な差は検出されなかった。

3) BCG 糖脂質分子の宿主応答の比較

3-1) 脂質画分によるマウス骨髓性マクロファージの刺激

クロロホルム-酢酸エチルで 2 回展開することにより PGL を高純度で精製した。クロロホルム-メタノール-アセトン-酢酸で精製したミコール酸糖脂質 TDM 等も含め、純度は TLC で確認した。

BCG Tokyo I, II 型菌より精製した総脂質画分でマウス BMM を刺激したところ、wild type の C57BL/6 由来 BMM は濃度依存的に TNF- α を産生した。その産生量は I 型菌より II 型菌由来の方が顕著であった。また、PGL 刺激ではマウス BMM からの TNF- α 産生は検出されなかった。さらに、TLR2, 4-KO マウス由来 BMM については、TLR4-KO マウス由来は wild type 由来と同様であったが、TLR2-KO マウス由来は総脂質画分刺激においても TNF- α は検出されず、総脂質画分は TLR2 依存的に BMM に宿主認識されることがわかった。

3-2) ミコール酸糖脂質の宿主認識におけるレセプター分子の検索

抗酸菌に特徴的な糖脂質 TDM が mincle 分子をレセプターとして宿主認識されることが明らかとなったが、一連のミコール酸糖脂質とレセプターの構造活性相関をリアルタイム PCR で検討した。Wild type, mincle, TLR2, 4-KO 由来 BMM を *M. smegmatis* から精製純化した各種ミコール酸糖脂質 TDM, GMM (glucose-monomycolate) で刺激した。TDM は mincle-KO マウスで TNF- α 産生を抑制したが TLR2, 4-KO マウスでは wild type と同様であった。GMM は TLR2-KO マウスで TNF- α 産生が抑制されており、GMM 認識に TLR2 の関与が示唆された。

単独糖脂質分子の宿主応答への関与が明らかになったが、mincle-KO マウス由来 BMM に BCG Tokyo 172 株 I 型菌を感染させた際の生存菌数の変化は wild type 由来 BMM と同様で、mincle 分子による TDM 認識機構の菌排除への影響は少ないと考えられた。

4) 遺伝子発現レベルの差異を生じるメカニズムの解析

I 型および II 型の遺伝子を pET21b(+) に挿入し、大腸菌での発現を試みた。サブタイプ II 型の BCG3475c タンパク質は可溶性タンパク質として発現されたが、サブタイプ I 型の BCG3475c タンパク質は不溶性画分に回収された。そのため以下の実験はサブタイプ II 型の BCG3475c タンパク質を用いて行なった。

BCG3475c タンパク質の添加により BCG3476、*ppsA*、*sigB* の遺伝子上流に相当する DNA 断片の泳動が遅延した。このことから BCG3475c タンパク質は

これらの DNA と結合していることが考えられた。

BCG3475c を過剰発現させた場合の Rv3406、*ppsA*、*sigB* の mRNA 量の変化を調べた。BCG3475c を Ace 転写調節領域に結合させた (Ace-BCG3475c) カセットをプラスミド上に持つ BCG にアセトアミドを添加したところ BCG3475c mRNA 量は顕著に増加した。しかし、Rv3406、*ppsA*、*sigB* の mRNA 量はいずれも変化がみられなかった。

II. BCG 細胞壁成分のアジュバント活性

BCG-MA MEND はマウス LPS hyper-sensitivity test において BCG-CWS MEND と比べて TLR-2 活性能を示さないにも拘らず同等又はより高い IFN- γ 、IL-12 値の上昇を認めた。

BCG-MA は、oil in water emulsion によりアジュバント活性を有しており、単独かつ低用量の投与では、IFA と同等又はそれ以上のアジュバント活性を有していた。

MA 含有脂質で priming 後、2 週後に TLR2 および 4-ligand で boost することにより、高レベルの Th-1 サイトカインが産生された。

III. 未発症結核菌感染者における抗体応答および結核菌蛋白質発現

23 種の休眠期および増殖期抗原に対する抗体レベルにおいて、未発症結核菌感染者 (old TB) 群で最も高い値を示したのは、Antigen85A、MDP1 の 2 種であった。

次に、特異抗体を用いて Antigen85 と MDP1 のヒト潜在性結核における発現を検討した。肺がん疑いで肺腫瘍を摘出したが、その後の検査で、腫瘍より結核菌が検出され、結核腫と診断された患者由来の肺組織切片の免疫染色を行った。その結果、結核腫 (肉芽腫) 中央部に、抗酸性染色陽性、すなわち結核菌の存在が確認された。抗 MDP1 は顕著に、抗 Antigen85 抗体はマイルドであるが確実に結核腫中央部を染色した。このことから、実際の潜在結核菌が MDP1 と Antigen85 を産生していることが示された。

この 2 種類の抗原は、宿主免疫誘導能があり共に防御抗原であることから、内因性再燃を防止し、成人の肺結核の発症を予防するワクチン候補分子であると期待される。

IV. BCG ベクターの免疫原性増強法の開発とワクチンへの応用

1) BCG におけるマウス SOCS1dn の発現

菌体 lysate および培養上清の両方で、SOCS1 抗体と特異的に反応する蛋白質が検出され分泌発現が確認された。

2) マウス SOCS1dn 発現型組換え BCG のサイトカイン産生誘導能の解析

rBCG-SOCS1dn をマウスに免疫し、その脾細胞での Antigen 85B 刺激による IFN- γ 、TNF- α および RANTES 産生を、BCG 親株と比較して調べた。その結果、rBCG-SOCS1dn 免疫マウスでは、Ag85B および Ag85B 発現組換えワクシニアウイルスで刺激親株と比較してこれらのサイトカインおよびケモカイン産生を有意に増強することが明らかになった。

3) 組換え BCG 免疫マウスにおける強毒結核菌感染

防御能評価

この rBCG-SOCS1dn の結核菌感染防御能をマウス (Balb/c および C57BL/6) で評価したところ、肺での効果は顕著ではなかったが、Balb/c マウスの脾臓で結核菌数を BCG 親株に比べて有意に減少させ、感染防御効果を増強することが示された

4) コドン至適化 SIV gag および SOCS1dn 共発現型組換え BCG の構築

SOCS1dn のサイトカイン産生増強効果が、SIV Gag 特異的免疫応答にどのような影響を与えるかを調べるため、SOCS1dn と SIV Gag (コドン至適化) を共発現する rBCG を、東京株およびウレアーゼ欠損東京株の両方について構築し、発現を確認した。しかしながら、液体培養をするとベクターの deletion が著しく、安定な共発現株は得られなかった。

V. 難治性抗酸菌症モデルによる治療法

1) 感染マウスにおける抗 TNF- α ならびに抗菌薬の菌増殖に及ぼす影響

実験①: 感染後 2 週目では、いずれの臓器も抗体投与の有無による有意差は見られなかった。感染後 4 週目の肝臓および脾臓では、抗体投与の有無に関わらず 2 週目からの治療によって、菌数が有意に減少した。特に同時期の抗体投与と治療を行った群は、抗体非投与で治療した対照群より菌数が有意にすくなく、抗体投与が治療効果を増加させた。肺での治療効果は感染後 4 週目の抗体投与群において最も顕著であった。

実験②: 抗菌剤のみを投与した群の肝臓・脾臓では抗菌剤投与後菌数の減少が見られた (感染 4 週と 6 週)。また、肺でも 6 週目に菌数の減少が見られた。他の群では菌数の減少は見られなかったが、抗 TNF- α 抗体と抗菌剤を投与した群では、コントロール群および抗 TNF 抗体投与群よりも菌数の増殖は抑えられ、その効果は肺で最も顕著であった。

2) 病理組織所見と脾臓細胞からのサイトカイン産生

抗体を投与することにより肉芽腫形成もまた抑制されたが、投与を中止すると菌増殖抑制効果が低下し、再び肉芽腫が形成された。抗体を投与しなかった群では中心にマクロファージや類上皮細胞が集簇しその周りに CD3 陽性リンパ球の浸潤が見られるのに対し、抗体投与群ではマクロファージや類上皮細胞の集簇が非常に悪く CD3 陽性細胞を主体とした小集簇から成り立っていた。抗体は感染初期における脾臓細胞からの IL-10、IFN-g、TNF-a 産生量をいずれも減少させた。一方、抗体と薬剤投与を行った群では、IL-12 の増加と IL-10 の減少がみられた

VI. 皮内投与デバイスとしてのマイクロニードルの開発と評価

1) 中空針型マイクロニードルの皮膚穿刺性能の検討

6 種類の形状のマイクロニードルアレイの皮膚穿刺性能を検討した結果、いずれの形状のマイクロニードルもマウスの皮膚を穿孔したが、形状により皮膚を穿孔したマイクロニードルの本数に違いがみられた。25 本のマイクロニードルのほとんどが皮膚を穿孔した皮膚穿刺性能が「良好なもの」、半分以上のマイクロニードルが皮膚を穿孔した「中等度のもの」、皮膚を穿孔したマイクロニードルの本数の方が穿孔しな

かったマイクロニードルの本数よりも少なかった「不良なもの」に大別された。皮膚穿刺後に取り除いたマイクロニードルアレイを実体顕微鏡で観察したところ、一部の形状のマイクロニードルについて破損している所見が認められた。マイクロニードルの破損しやすさと皮膚穿刺性能の間には正の相関傾向が認められた。

2) 中空針型マイクロニードルの皮膚穿刺性能と薬液注入性能の検討

接着剤またはスリーブを用いてホルダーに固定した中空型 MN を用いた。8 種類の形状のいずれのマイクロニードルにおいても良好な穿刺性能をしめしたが、すべてのマイクロニードルにおいて色素液が皮膚外に漏出し、皮内に色素液が注入されたマイクロニードルはごく一部に限られた。

また、MN のホルダーへの固定方式を接着剤からスリーブに変更することにより、MN のホルダーからの剥離が発生しなくなり、安定した注入実験が可能となった。

また、注入実験方法を手作業からジグを用いる方式に変更することにより、実験条件の精密な制御が可能になった。これにより、約 100ul の皮内注入が可能となる条件を見出すことができた。

しかしながら、皮内注入ができた場合でも、ブタ皮膚表面への液漏れを完全に抑制することはできなかった。ジグを用いた注入実験の結果、MN をブタ皮膚から剥離する時に発生する液漏れについては、ピストンを若干引きながら MN を剥離することで大幅に抑制可能であることが分かった。すなわち皮内注入のためには注入時の穿刺荷重の抑制が重要であることが判明した。

また、生体適合性を有するポリエステル系樹脂を用いた中空型 MN の作成に成功した。シリコン製の原版からの転写により当該樹脂を高さ 1mm の MN 形状に成形した後、UV エキシマレーザーを用いて中空孔加工を試行した。MN 先端面内に中空孔が形成された、9 本からなる樹脂製の中空型 MN アレイが作製できた。レーザー加工において懸念されたドロース等の付着は確認されなかった。一方、9 本の MN アレイについて、形成された中空孔の先端面に対する相対位置にばらつきが見られた。

VII. モルモットにおける細胞性免疫誘導の評価系の確立

1) モルモット組換え IFN- γ の精製

組換えバキュロウイルス AcgpIFN γ -His を用いて発現させ、限外濾過で濃縮した rGPIFN- γ は、2% CHAPS, 500mMNaCl を含む pH8.0 の緩衝液中で可溶化されたが、Ni ビーズへの結合は認められなかった。しかしながらこれを DNaseI により処理し、ウエスタンブロッティング法で解析したところ、目的の分子量 20K 付近にバンドが確認された。

2) モルモット IFN- γ に対するペプチド抗体の作成

中和活性を有する抗原部位を予測して作成した、合成ペプチドに体するウサギポリクローナル抗体は、抗 His-Tag 抗体で認識される蛋白にも同様の反応性を示した。

3) モルモット組換え IFN- γ の哺乳類細胞での発現

モルモット γ IFN 遺伝子を pCA10 プラスミドに挿入し、A549 細胞を用いて発現を試みた。発現細胞

のウエスタンブローディングでの解析を行った結果、抗 His-Tag 抗体で、mock 細胞には認められない 20K よりわずかに低い分子量のバンドが認められた。抗 ペプチド抗体でも同様の位置に認められた。

D. 考察

I. BCG の多様性について

BCG ワクチンはパスツール研究所から世界各国に分与されている。各国に分与された亜株間で遺伝学的・免疫学的性状が異なることが示されてきており、BCG のワクチンとしての効果が疫学調査間で異なる理由のひとつとされている。最近になり日本の亜株すなわち BCG Tokyo 株の中にも集落性状、遺伝子のタイプから少なくとも2種類のサブポピュレーションが存在することが明らかになっている。Yamamoto らは RD16 領域中の遺伝子 BCG3475c に 22 塩基対の欠損を持ちスムーズ型の集落を形成するサブポピュレーション I 型と、完全長の BCG3475c を持ちラフ型の集落を形成するサブポピュレーション II 型を報告している。

パスツール研究所からの分与時期の早い初期分与株 (Japan, Sweden) は *mma3* の遺伝子変異が入った以降の後期分与株 (Connaught, Pasteur) と比べて、naïve DC からの抗原提示のされやすさ、また、抗原提示を受けた T 細胞の活性が強く誘導することから、獲得免疫能をよく誘導できることが示唆された。実際、初期分与株 (Japan) と後期分与株 (Connaught) で免疫したマウスでの獲得免疫応答は初期株の方が高かった。これらの結果は、初期分与株は後期分与株に比べてワクチン能に優れていることを示唆している。

一方、モルモットにそれぞれ8種類の海外ワクチンメーカー製造の BCG または国産の BCG を接種し、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 10^3 CFU は通常のワクチン接種量の百分の一から千分の一であり、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 ワクチンの間にはモルモットにおいて免疫学的差異はないといえる。

BCG を含む抗酸菌の表現型はユニークな脂質群を菌体成分として多量に含有することが特徴である。本研究では、結核ワクチンである BCG Tokyo 172 株の I, 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、その脂質分子の宿主応答機序をレセプター/リガンドを含め解析した。

BCG 菌体からクロロホルム-メタノール抽出により得られた総脂質画分はマウス BMM を濃度依存的に活性化することから、この脂質画分には抗原性を有する脂質分子が含まれることがわかった。さらに、TLR2, 4-KO マウス由来 BMM の反応性から TLR2 を介した宿主応答であることが明らかとなった。II 型菌に欠損している PGL が直接宿主認識されることを期待したが、今回の検討では BMM への反応性は認められなかった。リアルタイム PCR の結果からも、炎症性サイトカイン、TNF- α 、IL-1 β に加え、IL-6、10 も全く発現していなかった。BMM への直接的な応答はないものと考えられる。総脂質画分の BMM 刺激の結果を見ると、PGL が欠損した II 型菌由来の方が TNF- α 産生量が I 型菌に比べ上昇しており、PGL 欠損の

関与を想定した。実際、脂質画分と PGL の共刺激で PGL の濃度依存的に TNF- α 産生量が減少していることから、抑制的な機能が明らかになった。原因としては TLR2 レセプターを PGL がマスクすることにより、競合的な反応で TLR2 リガンドの反応性が減少した、或いは TLR2 リガンド自体を PGL がマスクした可能性を考えられる。今後の検討で TLR2 依存性脂質分子の解明も含め検討したい。結核ワクチン株 BCG Tokyo 172 株はワクチンの有効性の観点から PGL が欠損していない I 型菌が有意なサブポピュレーションであることはワクチン株が宿主からの攻撃を回避して長期に生体内で免疫原として生存できる点で望ましいことかもしれない。

さらにサブポピュレーション I 型と II 型での遺伝子発現の差異の機構について検討した。ロット中の II 型の存在比率がシードロット Tokyo172 と Tokyo172-1 でそれぞれ 67.8%と 26.1%であるのに対して、コマーシャルロットではいずれも 6.5%以下であり、I 型の比率が急速に増加していることがこれまでの研究で明らかになっている。BCG の培養に通常用いられる 7H9-ADC-Tween80 培地あるいは 7H10-OADC 寒天培地における増殖速度にはそれぞれのサブポピュレーションで差が認められなかった。

我々が以前に行なった I 型と II 型の遺伝子発現パターンを比較した研究では、RD16 領域 (BCG3475c-BCG3478 領域)、細胞壁の構成成分であり免疫活性の高い分子 phthiocerol dimycocerosate (PDIM) および Phenol glycolipid (PGL) の合成に関与する酵素の遺伝子 *ppsA-E* (phenolphthiocerol chains synthase) および輸送に関わる分子をコードしている *ddr* オペロンが、I 型では発現が確認できたが、II 型では認められなかった。これらの遺伝子の中で BCG3475c は機能が不明であるもののその配列から転写因子として機能している可能性が示唆されているため、今回この遺伝子に着目し検討を加えた。全長を有する BCG3475c タンパク質を大腸菌で発現させ精製し、I 型と II 型において BCG3475c と同じ遺伝子発現パターンを示した Rv3406、*ppsA*、*sigB* の上流領域との結合を調べた。その結果、BCG3475c タンパク質はこれらの DNA 領域に結合することが示された。しかし、BCG において BCG3475c の発現量を増加させてもこれら遺伝子の発現量は増加しなかった。すなわち、BCG3475c が転写因子として機能していることは明らかにできなかった。BCG3475c タンパク質が転写因子としては機能していない可能性もあるが、今回用いた全長の BCG3475c を持つサブポピュレーション II 型では BCG3475c がわずかに発現しているのみで、一部欠損型の I 型では発現していることを考えると、この欠損型になることで機能している可能性も考えられる。

II. BCG 細胞壁成分のアジュバント活性

宿主に BCG を投与した時、抗酸菌に特徴的な MA を含む細胞壁脂質成分は強力な Th-1 型免疫応答を誘導するがこれが抗腫瘍活性に寄与している可能性が示唆された。製剤に MA が含まれているために、MA の免疫活性化機構を解明し、さらに製剤のスクリーニングを目的とした迅速かつ簡便な生物活性評価法を構築する必要があると考えられ

る。

III. 未発症結核菌感染者における抗体応答および結核菌蛋白質発現

結核菌感染未発症者において産生されている抗体が反応する主要な抗原を同定した。これらの抗原は、感染防御能を有することが判明しているため、感染成立後の内因性再燃を抑止する新しいワクチン開発に資する有意義な情報と考えられる。

IV. BCG ベクターの免疫原性増強法の開発とワクチンへの応用

SOCS1 アンタゴニスト発現型 BCG 株は、INF- γ , TNF- α , RANTES などの種々のサイトカインおよびケモカインの産生を、親株の BCG 東京株と比較して増強し、強毒結核菌 H37Rv 株の噴霧感染系において、脾臓での bacterial load を有意に低下させることができることがわかった。このような手法で自然免疫を活性化することにより、抗結核特異免疫が増強され、結果として結核菌の脾臓での増殖を抑制できたことは、HIV (SIV) 特異的な免疫応答における同様の効果を期待させるものである。

V. 難治性抗酸菌症モデルによる治療法

結核に代表される抗酸菌症において形成される肉芽腫は、活性化マクロファージが感染部位に集積することによりその構造を維持しているが、マクロファージ系細胞の局所への誘導や活性化に関わるサイトカイン、とりわけ TNF- α が肉芽腫の形成に非常に重要な働きをしている。TNF- α は抗酸菌感染にあつては、菌体成分やサイトカインによる刺激を受けたマクロファージから産生され、同細胞の活性化と感染部位への集積による肉芽腫の構築と肉芽腫構造を維持することにより感染を局所に抑え込んでいくように思われる。抗 TNF- α 抗体投与は対照群(抗体非投与)に比べ、感染2週目以降のマウスの肝臓、脾臓、肺における菌増殖抑制効果をほとんど阻害した。この結果は、TNF- α ノックアウトマウスでは抗酸菌感染をほとんど防御できないとするこれまでの報告とよく一致し、TNF- α がマウスの *M. avium* 感染に対する防御機構において重要な働きをしていることを示している。一方、抗 TNF- α 抗体投与と抗菌薬治療を組み合わせた群では、薬剤治療のみを行なった群に比べて、肝臓および肺内の生菌数やそれら臓器に形成される肉芽腫が著しく減少したことから、より効果的な治療効果が期待できることが分かった。すなわち抗体と抗菌薬の併用により、細胞性免疫が優位に働き、その結果菌を効率的に排除することができたのではないかと考えられる。このような感染動物の免疫をきめ細かく制御する方法の開発が、抗酸菌症のような難治性感染症の予防・治療対策として重要となる。

本研究は抗酸菌感染症が難治性となる機序のひとつを明らかにしたが、実際に実用可能な治療モデルを完成させるためには、それ以外の機序についても究明する必要がある。特に免疫系の適正な制御をどのように行うかという大きな課題が残されている。今後、幾つかのマウスの病態モデルを用いて免疫制御による肉芽腫病変の改善の可能性について研究を進めるとともに治療法を開発を行いたいと考えて

いる。

VI. 皮内投与デバイスとしてのマイクロニードルの開発と評価

中実針型マイクロニードルの検討においては、マイクロニードルの形状により皮膚への穿刺性能が異なっていた。また、穿刺性能の優れている形状のマイクロニードルほど、皮膚穿刺の過程でマイクロニードルが破損しやすい傾向が認められた。以上のことから、穿刺性能と堅牢性のバランスを考慮してマイクロニードルを設計することが必要と考えられた。

中空針型マイクロニードルの検討においては、マイクロニードルが皮膚を穿刺しているにもかかわらず、排出した色素液の大部分が皮膚表面に漏れてしまった。この原因としては、マイクロニードルが角質層は穿孔しているものの穿刺深度が表皮層にとどまり真皮層にまで達していないために、皮膚側の色素液注入スペースが十分でなかった可能性、一旦はマイクロニードルが必要な深度まで皮膚を穿刺したものの注入の過程で抜けてしまった可能性、などが考えられる。中空針型マイクロニードルを用いて薬液を皮内に注入するためには、マイクロニードルの皮内への穿刺深度を安定して制御・維持するための方法・器具が必要となるかもしれない。

VII. モルモットにおける細胞性免疫誘導の評価系の確立

組換えバキュロウイルス AcgpIFN γ -His は、His Tag を含む組換えモルモット IFN- γ を産生する。この蛋白は、感染細胞培養液中に産生されるものの、培養液中では、凝集あるいは結晶構造を形成し、可溶化していないことが認められている。精製用の可溶化溶液は、Ni ビーズにはそのまま結合することがないため、混入する核酸を除くために、DNaseI 処理を行った。

この処理により、明らかに溶液の粘稠性が消失し、非特異的結合により、60K 付近に検出されていたものが、予想蛋白分子量付近に移動したことは、これまで Ni ビーズへの結合を阻害していたものが除かれたと予想される。現在、その結合性を検討中である。

組換えモルモット IFN- γ の精製が、きわめて困難であるため、組換えタンパクの発現、及びそれに対する抗体作成に対して、異なる戦略を考える必要があると考えられた。そのために、哺乳類細胞を用いた発現を検討するとともに、報告のあるヒト IFN- γ の報告を参考にして、ペプチド抗体の作成を試みた。哺乳類細胞での発現は、認められたものの、その産生量がきわめて少ないことが認められた。また、作成されたウサギポリクローナル抗体は、予想通りに組換えモルモット IFN- γ に反応し、モルモット IFN- γ 検出系の作成に有用であると考えられた。中和活性の有無については、今後検討することが必要と考えられる。

E. 結論

I. BCG の多様性について

本研究の成果は生後まもなく接種するプライムワクチンとしての BCG について、現在、使用されている亜株の中でより有用な株を評価するための科学的な

情報を得た研究である。

マウスで検討したところ前期分与株はメモリー細胞の誘導能が高いことが示された。一方モルモットを用いた場合、検討した BCG ワクチン株の間には結核菌感染防御効果に差は検出されなかった。

また、BCG Tokyo 172 株 I, II 型菌の脂質免疫学的な観点から、宿主応答機序の一部を解明した。

(i) 総脂質画分は TLR2 依存的に宿主認識されること。また、その反応性は I 型菌に比べ II 型菌由来が優位であること。

(ii) PGL は(i)の宿主応答を抑制的に制御すること。

(iii) TDM は mincle 分子、GMM は TLR2 分子をレセプターとして限定的に宿主認識されること。

また、脂質免疫学的な観点から、宿主応答機序の一部を解明した。

(i) 総脂質画分は TLR2 依存的に宿主認識されること。また、その反応性は I 型菌に比べ II 型菌由来が優位であること。

(ii) PGL は(i)の宿主応答を抑制的に制御すること。

(iii) TDM は mincle 分子、GMM は TLR2 分子をレセプターとして限定的に宿主認識されること。

以上、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。

さらに、現行の BCG ワクチンではシードロットからコマmercialロットが作製される段階でサブポピュレーション I 型の比率が高くなることが示唆された。また BCG3475c 遺伝子産物は特定の遺伝子の転写調節領域と結合した。これらのことは、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 細胞壁ミコール酸含有脂質成分 (BCG-CWS 及び BCG MA) の R8 MEND 化により、マウス LPS hypersensitivity 法において Th-1 免疫応答の指標として IFN- γ 、IL-12 及び TNF- α 値の上昇が製剤のスクリーニングに有用である。MA-MEND は CWS-MEND と比べて高い IFN- γ 値を示したのに対して CWS-MEND の TNF- α 値は MA-MEND と比べて高かった。

マウスにおける OVA 抗原に対するアジュバント活性を比較した結果、MA O/W は IFA と同等又はそれ以上の高い抗体価の上昇を示した。

III. 未発症結核菌感染者における抗体応答および結核菌蛋白質発現

潜在期において結核菌は、Antigen 85 と MDP1 を発現していることを明らかにした。また、Antigen 85 と MDP1 に対する抗体産生が顕著であった。Antigen 85 と MDP1 は、主要な宿主免疫の標的抗原であると推定された。

IV. BCG ベクターの免疫原性増強法の開発とワクチンへの応用

SOCS1 アンタゴニストを分泌発現させるという手法により、BCG ベクターのポテンシャルを増強することが可能であり、親株と比較して、強毒結核菌 H37Rv 株の噴霧感染系において、マウス脾臓での菌数を有意に低下させられることがわかった。エイズワクチンへの応用が期待される。

V. 難治性抗酸菌症モデルによる治療法

難治性 *M. avium* 感染症のマウスモデル系を用いて、肉芽腫形成が菌増殖に及ぼす影響と薬剤治療の効果に及ぼす影響について調べ以下の結論を得た。

(1)細胞性免疫を誘導しやすい B6 のほうが体液性免疫を誘導しやすい BALB/c よりも肉芽腫の形成が著しく、抵抗性の DBA/2 マウスでは肉芽腫形成がほとんどみられない。(2)またこれら感染マウスに三種類 (RFP, LVFX) の抗菌剤を投与した場合、肉芽腫の形成が著しい B6 で治療効果が最も悪く、逆に肉芽腫形成がほとんどみられない DBA で最も優れた治療効果が認められる。(3)感染 B6 マウスにおける抗 TNF- α 抗体と抗菌薬の併用は、抗菌薬による治療効果を高める。ただし臓器によりその効果は異なる。

VI. 皮内投与デバイスとしてのマイクロニードルの開発と評価

中実針型マイクロニードルの検討においては、マイクロニードルの形状により皮膚への穿刺性能が異なっていた。また、穿刺性能の優れている形状のマイクロニードルほど、皮膚穿刺の過程でマイクロニードルが破損しやすい傾向が認められた。以上のことから、穿刺性能と堅牢性のバランスを考慮してマイクロニードルを設計することが必要と考えられた。

中空針型マイクロニードルの検討においては、マイクロニードルが皮膚を穿刺しているにもかかわらず、排出した色素液の大部分が皮膚表面に漏れてしまった。中空針型マイクロニードルを用いて薬液を皮内に注入するためには、マイクロニードルの皮内への穿刺深度を安定して制御・維持するための方法・器具が必要となるかもしれない。

VII. モルモットにおける細胞性免疫誘導の評価系の確立

2%CHPS により可溶化されたバキュロウイルスモルモット組換え IFN- γ は、濃縮過程で混入する DNA の除去により、Niビーズへの結合性が求められ、精製が可能となった。また、中和活性部位を予測して作成したペプチドに対する抗体は、モルモット組換え IFN- γ に結合することが認められた。

F. 健康危険情報

本年度は特に健康危険情報として報告すべきものはなかった

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 山本三郎: CpG モチーフと結核免疫. 結核 85(6) 515-521, 2010.
- 2) Jackson M and Yamamoto S (2011) Historical background of *Mycobacterium bovis* BCG, p3-12. In: Takii T, Maeyama, J, Yamamoto S (eds) BCG---Vaccine and Adjuvant. Japan Anti-Tuberculosis Association, Tokyo.
- 3) Yamamoto S and Yamamoto T (2011) Protective efficacy of vaccine candidates against guinea pig pulmonary tuberculosis, p107-111. In: Takii T, Maeyama, J, Yamamoto S (eds), BCG---Vaccine and Adjuvant. Japan Anti-Tuberculosis Association, Tokyo.

- 4) Yamamoto S and Yamamoto T (2011) BCG as an adjuvant substance: Brief history of BCG-DNA as an adjuvant substance, p153-156. In: Takii T, Maeyama J, Yamamoto S (eds), BCG---Vaccine and Adjuvant. Japan Anti-Tuberculosis Association, Tokyo.
- 5) Matsuo K & Ami Y. BCG as a vector for HIV/AIDS vaccine, p.124-141, In BCG Vaccine and Adjuvant, Takii T, Maeyama J and Yamamoto S(eds), Japan Anti-Tuberculosis Association, Tokyo, 2011.
- 6) Naka T, Maeda S, Ohara N, Yamamoto S, Yano I, Maeyama J, Ogura H, Kobayashi K and Fujiwara N (2011) Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *M. bovis* BCG Tokyo 172. J Biol Chem 286, 44153-44161.
- 7) Seki M, Udagawa T, Sugawara I, Iwama K, Honda I, Fujita I, Hashimoto A, Yano I and Yamamoto S (2011) The effect of passages during Japanese BCG vaccine production on genetic stability and protective efficacy. Vaccine 30, 1460-1464.
- 8) Ozeki M, Hirayama Y, Takii T, Yamamoto S, Kobayashi K and Matsumoto S (2011) Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG. Vaccine 29, 6881-6887.
- 9) Ohara N. 2012. Current progress in tuberculosis and recombinant BCG vaccines. J Oral Biosci 54: (in press).

2. 学会発表

- 1) Naka, T., Maeda S., Yamamoto R., Niki M., Ohara N., Yano I., Yamamoto S., Maeyama J., Ogura H., and Fujiwara N. Comparative phenotypes in two subpopulations of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo 172 substrain. International Unions of Microbiological Societies 2011 Congress. Sep. 2011 Sapporo.
- 2) Maeyama J., Iho S, Osada-Oka M, Matsumoto S, Isaka M, Yamamoto S: Immune responses in guinea pig administered with anti-tuberculosis booster vaccine candidate consisting of recombinant proteins of *Mycobacterium tuberculosis* and adjuvants. International Unions of Microbiological Societies 2011 Congress. Sep. 2011 Sapporo.
- 3) Maeyama J., Iho S, Osada-Oka M, Matsumoto S, Isaka M, Yamamoto S: Effects of adjuvants on guinea pig and mouse administration with recombinant proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. Keystone Symposia, Tuberculosis: Immunology, Cell Biology and Novel Vaccination Strategies. Jan. 2011, Vancouver, Canada.
- 4) Hayashi D, Takii T, Fujiwara N, Fujita Y, Yano I, Yamamoto S, Horita Y, Taniguchi K, Chiba T, Onozaki K: Comparative studies of immunostimulating activity and intracellular survivability *in vitro* among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) substrains. Keystone Symposia, Tuberculosis: Immunology, Cell Biology and Novel Vaccination Strategies. Jan. 2011,

Vancouver, Canada.

- 5) Matsumoto S. Host factors having an impact on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. International Union Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 6) Nishiuchi Y, Matsumoto S, Tateishi Y, Yamaguchi N, Nasu M. Biofilm formation of *Mycobacterium avium* isolated from living environment. International Union Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 7) Maeyama J. Iho S, Osada-Oka M, Matsumoto S, Isaka M, Yamamoto S. Immune responses in guinea pig administered with anti-tuberculosis booster vaccine candidate International Union Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 8) Ozeki Y, Kobayashi K, Matsumoto S. The efficacy of BCG may be a time-dependent after the vaccination and age-independent in mice. International Union Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 9) 山本三郎: BCGの歴史、結核免疫、新規結核ワクチン開発の状況。第5回ストップ結核パートナーシップ ジャパン 総会特別講演、2011年11月、東京。
- 10) 山本三郎: BCGワクチンの多様性。第4回BCG注入療法研究会 教育講演、2011年11月、東京。
- 11) 前山順一、伊保澄子、井坂雅徳、山本三郎: 粘膜アジュバントとしての新規 A 型 CpG-DNA の作用機序: 形質細胞様樹状細胞の関与。第85回日本細菌学会総会、2012年3月、長崎市。
- 12) 尾関百合子、平山幸雄、岡真優子、立石善隆、瀧井猛将、山本三郎、小林和夫、松本壮吉: マウスモデルにおける BCG ワクチン効果の減衰に関する研究。第85回日本細菌学会総会、2012年3月、長崎市。
- 13) 谷口恵一、瀧井猛将、林大介、伊藤佐生智、矢野郁也、山本三郎、丸山光生、小野崎菊夫: BCG ワクチン接種自然加齢マウスにおけるメモリー細胞と Th1 応答。第132回日本薬学会年会、2012年3月、札幌。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

- 1) 新規な組換え BCG ワクチン: 特願 2011-199422、松尾和浩、水野 悟、川原 守、保富康宏、渡邊健太。

小豆郡における帯状疱疹発症の大規模疫学研究

所 属 独立行政法人 医薬基盤研究所
研究代表者 山西 弘一

研究要旨 帯状疱疹の発症頻度、発症者の痛みの程度と持続時間、水痘帯状疱疹ウイルス(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帯状疱疹の相関についての疫学研究調査を行い、帯状疱疹の推定年間発症率は1.04%であること、加齢に伴いVZVに対する細胞性免疫応答が低下することを明らかにした。また、帯状疱疹発症時にVZV特異的な細胞性免疫応答が増強していた。

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

帯状疱疹は、水痘帯状疱疹ウイルス(以下VZV)が再活性化した病態であり、高齢者ほど発症しやすいと言われている。少子高齢化が進む日本では、今後発症者が増加すると予測され、高齢者医療費の増大が懸念されている。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.)が行われ、その結果を基に同ワクチンが帯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歳以上の人への帯状疱疹ワクチン接種を推奨している。一方国内では、帯状疱疹ワクチンは承認されておらず、発症者の疾病負担及び医療費負担の軽減のために帯状疱疹ワクチンの開発が期待されている。

そこで我々は、将来の帯状疱疹ワクチンの開発のための基礎的な検討を行うため、「帯状疱疹ワクチン開発のための疫学研究(平成20年度政策創薬総合研究事業)」を実施した。

世界初となる特定地域での帯状疱疹の大規模疫学研究によって、これまでに、発症率が米国の先行研究と同等であることや、高齢者や免疫

の程度が低い者ほど帯状疱疹を発症しやすいことなど、帯状疱疹の疫学が次第に明らかになりつつある。

今後、予定の3年間の前方視的疫学調査を完遂し、データを集積することにより、帯状疱疹の発症率、VZVに対する免疫の程度と発症の相関、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などを明らかにする。

B. 研究方法

香川県小豆郡における50歳以上12,522人の登録者に対して、「帯状疱疹ワクチン開発のための疫学研究」から継続して研究を実施した。

1. 本疫学研究のテーマ別登録者数と調査期間
研究登録者12,522人を対象とする。調査期間は登録から3年間とする。テーマ別の人数は、以下の通りである。

テーマA:12,522人

テーマB:5,685人

テーマC:365人

2. 研究テーマと調査内容について

1)テーマA

電話による聞き取り調査

2)テーマB

水痘皮内反応による細胞性免疫の測定

3)テーマC

(1)水痘皮内反応による細胞性免疫の測定(登録時、1年後、2年後、3年後に測定)

(2) gp-ELISA 価測定法、IAHA 価測定法、中和抗体価測定法による VZV に対する液性免疫の測定(登録時、1 年後、2 年後、3 年後に測定)

4) 発症者の調査

(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(発症時に実施)

(4) gp-ELISA 価測定法、IAHA 価測定法、中和抗体価測定法による 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) 皮疹の重症度と細胞性免疫ならびに液性免疫との相関についての検討: 带状疱疹発症者について、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を基に皮疹の重症度をスコア化した。この重症度スコアと細胞性免疫(水痘皮内反応)及び液性免疫(VZV 特異的抗体価)との関係を検討した。

7) 疼痛の重症度と細胞性免疫ならびに液性免疫との相関についての検討: 带状疱疹発症者について、疼痛の程度を経時的にグラフ化し、このグラフに基づいて疼痛スコア(AUC: area under curve)を求めた。この疼痛スコアと細胞性免疫(水痘皮内反応)及び液性免疫(VZV 特異的抗体価)との関係について検討した。

8) 带状疱疹後神経痛と免疫との関係: 発症から 3 ヶ月以上に渡って疼痛が持続している PHN 患者について、細胞性免疫(水痘皮内反応)との関係について検討した。

9) 細胞性免疫と液性免疫の関係及び免疫持続期間の調査

10) 带状疱疹の発症頻度及び生活習慣や社会心理的要因と带状疱疹発症との相関について(横断研究): 対象者は健康に関するアンケートに回答し、かつ水痘皮内反応を実施した 50 歳から 99 歳までの男性 2,573 人、女性 3,110 人、計 5,683 人とした。

水痘皮内反応の結果は先行研究の判定方法に基づき、紅斑長径 5mm 未満を陰性、5mm 以上

10mm 未満を擬陽性、10mm 以上を陽性とし、10mm 以上陽性を目的変数とした。また、浮腫についてはその長径に寄らず浮腫の有無を目的変数とした。

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、生活習慣および社会心理的因子、全 41 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。

この際、紅斑、浮腫共に年齢、性別、過去带状疱疹罹患歴を交絡因子として調整した。また、男女別解析も行った。

(縦断研究): 対象者は健康に関するアンケートに回答した 50 歳から 103 歳までの男性 5,509 人、女性 6,850 人、計 12,359 人とした。

健康に関するアンケート調査および皮内反応検査時をベースラインとして、その後 2 年間における带状疱疹発症を追跡調査した。2 年間における带状疱疹発症の有無(PCR 試験により VZV 検出例 246 人を带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、生活習慣および社会心理的因子、全 41 因子との関係を前向きに検討し、带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て、健康に関する 41 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。この際、年齢、性別、過去带状疱疹罹患歴を交絡因子として調整した。

(研究倫理面への配慮)

本研究は、(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。また、テーマC登録者の調査項目の追加に伴い、それぞれの倫理委員会【(独)医薬基盤研究所(H23 年 11 月 21 日)、(財)阪大微生物病研究会(H23 年 9 月 22 日)、奈良県立医科大学(H24 年 2 月 15 日)及び大阪大学(H24 年 1 月 31 日)】で承認を得た。

C. 研究結果

1. 調査期間と脱落者数(2011 年 12 月 31 日時点)

現時点で調査継続中の登録者の平均調査期間は876.5日(最長1,108日、最短782日)であり、調査期間中の脱落者数は605人であった。

2. 発症者調査

带状疱疹の発症疑い 565 例に対し、医療機関にて発症時の調査を実施した。そのうち、「带状疱疹」または「带状疱疹疑い」と診断された数は433例であった。これら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、429例中313例からVZV 特異的なDNA が検出された。なお4例は生体試料を採取していない。上記PCR 試験に基づく带状疱疹の年間発症率は1.04%であった。

性別及び年齢階層別(50代、60代、70代、80代以上に分類)に発症率を比較すると、性別では男性(年間0.78%)より女性(年間1.25%)のほうが発症率が高く、年齢階層別では高齢になるほど発症率が高くなる傾向が見られた。この結果は、前年度の報告と同じ傾向であった。

性別・年齢階層別の带状疱疹発症者数及び年間発症率を表1に示す。

带状疱疹発症の季節性を検討したところ、発症は冬に最も少なく、春から徐々に増加し、夏にピークを迎え、冬に向けて徐々に減少する傾向が見られた。これは、冬から春に流行のピークを迎える水痘と相反するものであり、前年度の報告と同じ傾向であった。四半期別带状疱疹の発症率及び小豆郡における水痘発生数を図1に示す。

3. 水痘皮内反応を用いた発症リスクの検討

登録時に実施した水痘皮内反応の結果によって、テーマBの登録者を陽性、陰性の2群に分類し、性、年齢、带状疱疹の過去罹患歴を調整して、登録から2年間の带状疱疹の発症リスクを比較した。なお、これ以降の検討から、紅斑、浮腫の判定不能者を除外した。紅斑長径5mm以上を陽性、5mm未満を陰性にしたとき、陽性群のハザード比(以下HR)は0.25(95%信頼区間:0.17-0.38)であった。

また、紅斑長径10mm以上を陽性、5mm未満を陰性にしたとき、陽性群のHRは0.19(95%信頼区間:0.12-0.30)であった。

同様に、浮腫長径5mm以上を陽性、5mm未満を陰性にしたとき、陽性群のHRは0.23(95%信頼区間:0.15-0.35)、浮腫長径10mm以上を陽性、5mm未満を陰性としたとき、陽性群のHR

は0.12(95%信頼区間:0.06-0.22)であった。紅斑長径、浮腫長径による発症リスクを表2、3に示す。

上記について、対象期間を登録から1年間に短縮し、検討したところ、2年間でのデータと比較して陰性群と陽性群との発症リスクの差がより顕著に確認された。

また、水痘皮内反応の判読時には、紅斑と浮腫の大きさの測定の他に、紅斑の赤みの程度を「僅か」、「明らか」の2段階で評価しており、上記と同様に性、年齢、带状疱疹の過去罹患歴及び紅斑長径を調整し、発症リスクを検討したところ、「僅か」と「明らか」のHRは0.55(95%信頼区間:0.30-1.03)であった。紅斑の赤みの程度による発症リスクを表4に示す。

4. 紅斑と浮腫の相関

テーマBの登録者のうち、紅斑の判定不能者を除いた5,527人の水痘皮内反応において、紅斑長径と浮腫長径の間に強い相関($r=0.81$)が認められた。紅斑長径と浮腫長径との相関を図2に示す。

5. 発症者と未発症者の水痘皮内反応の結果

テーマBの登録者における現時点での発症者は140人、未発症者は5,545人であった。登録時の紅斑長径の平均値は、発症者が8.20mm、未発症者が14.39mmであった。発症者は未発症者と比較して紅斑長径が小さかった。

また、浮腫長径の平均値に関しても、発症者が3.49mm、未発症者が7.70mmであり、発症者の浮腫長径が小さかった。

発症の有無別での紅斑長径及び浮腫長径の比較を図3に示す。

6. 登録から2年後の水痘皮内反応及び各種抗体価の結果

テーマCの登録者のうち326人に対して、登録から2年後に水痘皮内反応を、325人に対して各種抗体価を測定した。登録から2年間で带状疱疹を発症せず、水痘患者との接触がなかった308人のうち、紅斑の判定不能者を除いた301人における、水痘皮内反応の紅斑長径の平均値は17.62mm、標準偏差は11.85mmであった。紅斑長径が5mm以上の者は267人、5mm未満の者は34人であった。

紅斑長径、浮腫長径を検査時の年齢階層別に比較すると、高齢の群ほど小さい傾向があり、登録時や、1年後検査時の結果と同じ傾向であ

った。

水痘皮内反応の結果について、性別・年齢階層別での登録者数及び紅斑・浮腫の長径・短径を表5に示す。また、年齢階層別での紅斑長径の平均値及び標準偏差の比較を図4に示す。同様に浮腫の比較を図5に示す。

各種抗体価については、gp-ELISA 価(Log_{10})の平均値は 3.76、標準偏差は 0.34 (n=307)、IAHA 価(Log_2)の平均値は 5.28、標準偏差は 1.40 (n=304)、中和抗体価(Log_2)の平均値は 6.10、標準偏差は 1.34 であった(n=218)。なお、現在も試験実施途中であるため、試験法ごとに n 数が異なる。

各試験法とも性別間では抗体価の差はなく、年齢階層別では高齢者群で抗体価が高く、前年度と同様の傾向であった。

gp-ELISA 価、IAHA 価及び中和抗体価の性別の平均値及び標準偏差の比較を図6に、同様に年齢階層別での比較を図7に示す。

また、皮内反応の紅斑長径と各種抗体価との間に相関は見られなかった。

7. 皮膚症状重症度と免疫との関係について: 登録時に水痘皮内テストを実施した登録者のうち、帯状疱疹発症者は 108 人であった。この 108 人について皮疹の重症度スコアと登録時の細胞性免疫(水痘皮内反応)との関係を検討した結果、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。一方、液性免疫と皮疹重症度との間には有意な相関はみられなかった。

8. 疼痛重症度と免疫との関係について: 水痘皮内テストを実施した帯状疱疹発症者 97 人について、疼痛の重症度スコアと登録時の細胞性免疫(水痘皮内反応)との関係を検討した。その結果、細胞性免疫の程度が弱いグループほど、疼痛重症度スコアが高いことが判明した。一方、液性免疫と疼痛重症度との間には有意な相関はみられなかった。

9. PHN と細胞性免疫との相関についての検討: 帯状疱疹発症者 258 人のうち PHN を発症したものは 28 人で、そのうち皮内テストを実施した 15 人について、細胞性免疫(水痘皮内反応)との関係を検討した。その結果、判定不能を 1 人を除いた 14 人中 13 人が皮内反応陰性(<5mm)であったことから、細胞性免疫が弱いものが、PHN に移行しやすいことが示唆された。

10. 1)加齢によるVZV特異的細胞性免疫応答の変化: 本研究の一年目と二年目の IFN- γ ELISPOT テストのデータから、加齢と共に IFN- γ ELISPOT テストの値が低下することが示唆されていた。三年目の IFN- γ ELISPOT テストのデータを用いて解析した結果、一年目、二年目と同様に加齢に伴い測定値が低下する傾向にあることにした(図8)。

2) 健常人におけるVZV特異的細胞性免疫応答の増強: 我々は、3 年間測定した健常人 324 人のデータを解析した結果、一年目の平均値と比べ、二年目と三年目の平均値が有意に上昇していた(図9)。

3) 発症者における発症時のVZV特異的細胞性免疫応答の増強: 本研究を行った三年間で、帯状疱疹発症者 233 人から発症時及び回復時の血液検体が集まった。それらの検体を用いて IFN- γ ELISPOT テストを実施した結果、発症時に有意に IFN- γ ELISPOT テストの値が上昇していた(図10)。

4) 帯状疱疹を発症した参加者でのVZV特異的細胞性免疫応答の検討: 初年度に細胞性免疫応答測定試験に参加した 365 人のボランティアのうち、10 人が帯状疱疹を発症した。それらの方から集めた検体(内、1 人については、回復時の検体が得られなかった)を解析し、発症前後のVZV特異的細胞性免疫応答の変化をあきらかにした(図11)。発症前に 9 人中の 5 人で IFN- γ ELISPOT テストの値が低値であった。発症時に上昇を認めたのは 5 人であった。回復時の上昇が見られたのは 2 人であった。

11. 横断研究: 水痘皮内反応の結果と有意に関連する因子として、11 因子が挙げられた。結果一覧を表6と7に示す。

1) 健康状態: 健康状態について、「とてもよい」、「まあよい」、「あまりよくない・よくない」と回答した 3 群に分類し比較したところ、「とてもよい」と回答した群は「あまりよくない・よくない」と回答した群に比べ、紅斑、浮腫共に陽性率が有意に高かった。男女別解析によると男性にのみ有意であり、紅斑浮腫共に「とてもよい」と回答した群だけでなく、「まあよい」と回答した群も「あまりよくない・よくない」と回答した群に比べ有意に陽性率が高かった。

2) 喫煙: 喫煙について、現在喫煙群、過去喫煙群、もともと吸わない群の 3 群に分類し比較した