

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 医療分野研究成果展開事業 研究成果最適展開プログラム(A-STEP)
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer: Adaptable and Seamless Technology Transfer Program through Target-Driven Research and Development (AMED・A-STEP)
- 研究開発課題名： (日本語) 新規結核菌抗原と DNA アジュバントを用いた成人肺結核に対するブースターワクチンの開発
(英語) Development of booster vaccine against adult pulmonary tuberculosis by the combination of a novel mycobacterial antigen and DNA adjuvant
- 研究開発担当者 (日本語) 日本ビーシージー製造株式会社中央研究所所長 山本三郎
所属 役職 氏名： (英語) Japan BCG Laboratory, Central Research Laboratory, Director, Saburo Yamamoto
- 実施期間： 平成 27年 4月 1日 ～ 平成 28年 3月 31日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

新潟大学

組み換え大腸菌より、1リットルの培養液より 0.5 mg の効率により、トータル 6 mg のエンドトキシンフリーのワクチン抗原を精製した。また組み換え抗酸菌より、1リットルの培養液より 1 mg 以上の効率で、組み換えワクチン抗原を精製した。

ワクチン対象となる BCG 接種者の末梢血より CD4T 細胞および CD8T 細胞を採取し、CD14 陽性細胞を抗原提示細胞として、ワクチン抗原に対する免疫応答を検出した。

ワクチン効果の検討において、結核菌感染動物臓器の病理標本を作製し、病理組織学的検討を行った。

感染研

カニクイザルへのワクチン接種、レントゲン撮影、採血等の技術を習得した。また、モルモットで確立した BCG プライム - ブースターワクチンの系を基に、カニクイザルにおけるその効果検証の予備実験を行ったところ、無処置のサルと比較し、プライム - ブースター群において結核菌感染後の症状の改善が認められた。マウスでの実験では、免疫条件によって遅延型過敏反応と結核菌防御能に乖離が有り、免疫条件

確立を急ぐ必要がある。

福井大学

新規結核菌タンパク質抗原と形質細胞様樹状細胞(pDC)を活性化するオリゴDNAの組み合わせに対する免疫応答を、健康成人の末梢血単核球を用いて検討した。抗原とオリゴDNAは複合体を形成し、pDCと骨髄性樹状細胞に共刺激分子の発現を相乗した。これらの樹状細胞サブセットでは、オリゴDNAの取り込みが抗原との組み合わせにより亢進し、当該組み合わせは樹状細胞活性化を増強する特徴をもつことが示された。

日本 BCG

カニクイザル3頭を飼育し、そのうち2頭に BCG プライム免疫後、ブースターワクチン免疫を3回行った。残り1頭には生理的食塩水を接種した。3頭すべてに結核菌 H37Rv 株を気道内感染を行なった。結核菌感染の1ヶ月目、2ヶ月目、3ヶ月目に感染確認として、体温測定、胸部レントゲン撮影、血清採取を行い、感染3ヶ月目に剖検し、肺・脾臓・肝臓・リンパ節を採取し、肉眼的観察及び肺・脾臓については臓器を乳化後希釈培養して3~4週後のコロニー数から臓器の残存結核菌数を推定した。また各臓器はホルマリン固定後切片を作成し組織像を観察した。

その結果、非免疫サルでは肉眼的ならびに病理組織上の病変が認められ、免疫サル2頭の病変は非免疫サルに比べるとはるかに軽度であった。このことから、本ブースターワクチンは結核菌感染に対して有効な防御手段であることが示唆された。

Niigata University

We purified 6 mg of LPS-free vaccine antigen from recombinant *Escherichia coli* with efficiency of 0.5 mg from 1 L culture. We also established the purification protocol of LPS-free vaccine antigen from recombinant *Mycobacterium* with efficiency of 1 mg from 1 L culture.

We purified CD4 and CD8 positive T cells from healthy individuals vaccinated with BCG, who are target population of the booster vaccine and studied immune response to vaccine antigen by employing CD14 positive cells as antigen presenting cells.

In order to evaluate vaccine efficacy in animals, we prepared the pathology section of *M. tuberculosis*-infected animal organs, some of which are vaccinated with the booster vaccine, and analyzed histopathology.

National Institute of Infectious Diseases

We have mastered the technique of vaccination of cynomolgus monkeys, blood collection, and X-ray photography, and so on. Also based on the validation system of BCG prime - booster vaccine established in guinea - pigs, as a result of preliminary experiments on the validation of the booster vaccine in cynomolgus monkeys, improvement in symptoms after *Mycobacterium(M.) tuberculosis* infection in the prime-boost immunization group as compared to a naive monkey, was observed. In experiments with mice, there are differences between delayed type hypersensitivity reaction and defense ability against *M. tuberculosis* infection depending on the conditions of immunization, which is necessary to establish in future.

Fukui University

The immune response to an anti-tuberculosis booster vaccine candidate consisting of the new mycobacterium antigen and oligo DNA, which activates plasmacytoid dendritic cells (pDCs), was investigated using peripheral blood mononuclear cells of healthy adults. The antigen and oligo DNA formed a complex, and synergized the expression of co-stimulatory molecules in both pDCs and

myeloid dendritic cells. Uptake of oligo DNA in these DC subsets was enhanced by combining the antigen. This combination has the property of enhancing DC activation.

Japan BCG Laboratory

Three cynomolgus monkeys were divided into two groups. First group of two monkeys were inoculated with one BCG shot and three boosters. Second group of one monkey was injected with saline alone. All monkeys were infected with *M. tuberculosis* H37Rv via respiratory tract. One month, two months and three months after the infection, all monkeys were checked their chests by a X-ray technique. Three months later of infection, all monkeys were dissected under anesthesia and taken out their lungs, spleens, livers and lymph nodes. Their organs were observed carefully and the lungs and spleens were homogenized to incubate on agar plates. The numbers of colonies were counted and the protective abilities of the vaccines were estimated.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 0 件)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 鈴木史子、岩崎博道、前山順一、松本壮吉、山本三郎、伊保澄子：形質細胞様樹状細胞を標的とする TLR9 リガンドのアジュバントとしての作用メカニズム。第 20 回日本ワクチン学会学術集会、口頭、平成 28 年 10 月 22 日～23 日 (東京都新宿区)
2. 前山順一、山崎利雄、林大介、山本十糸子、尾関百合子、鈴木史子、山口雄大、松本壮吉、伊保澄子、山本三郎：遅延型過敏反応から検討した MDP1 および G9.1 からなる結核ブースターワクチン候補の免疫条件、第 90 回日本細菌学会総会、口頭、平成 29 年 3 月 19 日～21 日 (宮城県仙台市)
3. 松本 壮吉、シンポジウム (潜在性結核感染症の診断と治療)、抗酸菌の「長生き」のメカニズムと結核対策への応用、口頭、第 92 回日本結核病学会総会 (東京) 2017/ 03/23～24, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. Shkichi Matsumoto, Tuberculosis: Facts, Mechanisms, and Research to control it. Japan-Russia G-MedEx Project: International symposium of educational and scientific development-2016. Krasnoyarsk, 2016/09/08-9 (国外) .
2. 松本 壮吉、結核・抗酸菌症研究の重要性と面白さ、NOA-METS 新潟医療技術科学オープンアトリエ第 7 回講演会、2016/07/22, 国内.
3. 岩崎博道、忍び寄る病原体ー感染症から身を守るためにはー、第 91 回日本結核病学会総会石川県民のための公開セミナー、2016/5/27, 国内.

(4) 特許出願

なし