

200500628A

**厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業**

**アジア地域との研究ネットワークの活用
による多剤耐性結核の制御に関する研究**

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡田 全司

平成18（2006）年3月

目 次

| | | | |
|---|-------|-------|-----|
| I. 総括研究報告 | | | |
| アジア地域との研究ネットワークの活用による多剤耐性結核の制御に関する研究 | 岡田全司 | ----- | 1 |
| II. 分担研究報告 | | | |
| 1. 中国河南省におけるエタンブトール耐性結核の研究 | 菅原 勇 | ----- | 47 |
| 2. タイ国の多剤耐性結核を含む難治性結核症例における宿主側要因の研究 | 野内英樹 | ----- | 50 |
| 3. タイ国の多剤耐性結核を含む難治性結核症例における宿主側要因の研究 | 慶長直人 | ----- | 60 |
| 4. T-spot TBとTBGL抗体測定法の比較検討 | 服部俊夫 | ----- | 63 |
| 5. インドにおける結核対策と多剤耐性結核研究ネットワークの構築に関する研究 | 高鳥毛敏雄 | ----- | 69 |
| 6. アジア地域との研究ネットワークの活用による多剤耐性結核の制御に関する研究 | 櫻田紳策 | ----- | 74 |
| 7. アジア地域との研究ネットワークの活用による多剤耐性結核患者マクロファージ機能の解明 | 赤川清子 | ----- | 77 |
| 8. 多剤耐性結核の薬剤耐性遺伝子の解析 | 阿部千代治 | ----- | 82 |
| 9. 〔1〕新しい結核ワクチン、特に結核治療ワクチンによる臨床応用（国立病院機構政策医療呼吸器ネットワークを利用した）計画に関する研究 | 坂谷光則 | ----- | 88 |
| 10. 研究協力者研究報告書 | | ----- | 98 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | | ----- | 140 |

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

アジア地域との研究ネットワークの活用による多剤耐性結核の制御に関する研究

主任研究者

岡田全司¹ 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター・臨床研究センター長

研究要旨

〔1〕 アジア地域との研究ネットワーク（野内、櫻田、JICA、岡田、菅原、服部、慶長、高鳥毛、WHO等）はすでに確立されており、一層強固になった。

① タイ：（チェンライ県で野内と櫻田）多剤耐性結核の分子・疫学コホート対策について検討。チェンライ県では、結核菌喀痰塗抹陽性肺結核患者は、年間 950 人、再登録患者は約 100 人。1987 年から現在まで延べ人数で、1081 人の再登録、再発例 442 人、治療失敗による再登録例 205 人、治療脱落による再登録例 319 人、430 人の死亡。再登録に対応した、疫学的危険因子を検討。

（a）難治性結核患者（多剤耐性・再発・治療失敗例）のコホート研究を立ち上げた。（b）10 年間近く菌体を保存している世界でも類をみないサンプルを用い再発例中の多剤耐性結核菌出現を解析。（c）慶長らは野内が保存した多剤耐性結核患者 PBMC を用い、SNP 解析プロトコール作製。宿主側免疫応答に関連する遺伝子として、今年度は、NRAMP-1, VDR, MBL, に関する遺伝子タイピング系を確立した。（d）櫻田らはチェンライに実験室を整備し、多剤耐性結核宿主側要因（リンパ球、Mφ）の研究がスタート。ヒト PBMC からマグネットビーズ法で Mφ を分離し分化させるシステム構築に成功した。タイにおいても日本国内と同様に単球のマクロファージへの分化には形態学的に個体差が認められた。

② 中国、フィリピン：多剤耐性結核菌 DNA 約 100 例入手。VNTR 等で DNA をすでに解析した。

（a）アジア地域（中国）の多剤耐性結核菌 DNA 50 例を VNTR [Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)：瀋陽の多剤耐性結核菌 50 例中 6 例（12%）で日本のスーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌と全く同じ VNTR (MIRU) 配列を示した。] で解析し、アジアにも日本と同じスーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌が高率に存在することを初めて発見した（岡田、服部）。スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌は通常多剤耐性結核菌より毒力が強力であることをマウス生体内で証明した。

（b）多剤耐性結核菌（河南省と瀋陽）300 例の EB、RFP 等の薬剤感受性遺伝子変異を解析。arabinosyl transferase 遺伝子 emB306 番目の変異を 45% に認めた。（菅原）

③ インド：（高鳥毛）インドの大学（Singh 学長）と我々の新しい結核ワクチン臨床応用の共同研究が可能となった。（a）インドの結核対策の実情を調査し、現地との研究協力体制を確立：インドのゴラプールに行き、B. R. D 医科大学学長 Singh 博士、結核センター及びアグラ S. N. 医科大学学長（インド公衆衛生学会理事長）と研究協力。（b）地域の結核センターで結核菌株収集の協力を確約。

④ シンガポール：（阿部）INH 低レベル耐性菌を初めて発見。シンガポールの INH 低レベル耐性菌の存在、アジアでの分布解明共同研究。迅速・臨床に有用な薬剤感受性検査（結核菌遺伝子）法を解明。

⑤ 国際的評価を得た。第 10 回 pacific-rim TB 国際会議（日米結核会議：アジアの多剤耐性結核対策）に岡田（Japanese/Asian efforts on new TB vaccine development）、野内、松本が発表（\ノイ：平成 17 年 11 月）。

〔2〕 HVJ-エンベロープ/Hsp65 DNA+IL-12 DNA ワクチンは BCG よりも 1 万倍強力な結核予防ワクチン効果。結核菌数の減少効果のみでなくマウスで初めてワクチンによる延命効果を発見（マウス）。さらにモルモット（テキサス大 McMurray 教授）及びカニクイザル（レオナルド・ウッド研究所：ヒト結核感染に最も近いモデル。Nature Med. 1996）にワクチン免疫を行った。この群は体重増加。

現在、抗結核効果解析中。

- [3] 多剤耐性結核に対する世界で初めての治療ワクチン効果を明らかにした。当院の多剤耐性結核菌をマウスに投与した後 HVJ-エンベロープ/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチン治療を行い、多剤耐性結核菌の著明な減少を示した。すなわち多剤耐性結核に対する強力な治療ワクチンであることを発見した。
- [4] 多剤耐性結核菌のみでなく薬剤感受性結核菌に対しても、マウスでこのワクチンは強力な治療効果を示した。CD8 キラーT が結核ワクチン効果に必要。
- [5] HVJ-リポソーム/Hsp65+IL-12 DNA は、サルで 100%生存率の画期的な結核予防ワクチン効果。カニクイザルの系で HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンのコントロールとして HVJ-liposome / GFP DNA をコントロールとした新たな確認実験で、この HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンで著明な延命効果 (100%) が認められた。
- [6] 新しい化学療法剤 (二種 OPC-67683 及び CPZ) が多剤耐性結核に有効を発見。OPC は RFP や INH より切れ味が 10 倍強い (我々が初めて作製した多剤耐性結核ヒト治療モデル SCID-PBL/hu で)。
- [7] Toll-like receptor を介した自然免疫活性化が完全に消失する TRIF/MyD88 二重欠損マウスを作製し解析した。このマウスは、結核菌感染に対して、感受性が極めて高いことを初めて示した。
- [8] 結核菌殺傷タンパクである Granulysin (Gra) 遺伝子導入マウス作製に初めて成功し、Gra が生体内でも結核菌殺傷に関与することを初めて証明。抗 Gra モノクローナル抗体を作製し、血清中 Gra 測定系確立。多剤耐性結核患者でキラーT 細胞産生 Gra 低下。
- [9] 結核菌殺菌ヒト M 型 Mφ は結核菌増殖抑制因子産生。結核菌増殖カタラーゼ産生も異なる発見。
- [10] 臨床応用に実績のあるプラスミドベクター (pVAX1) へ目的遺伝子 (Hsp65 DNA と IL-12 DNA) の組換えを行い、マウス、モルモット、サルにワクチンとして投与した。遺伝子を HVJ-エンベロープに封入した製剤を調製し、品質レベル (品質管理基準) を確認した。(標準操作手順書と治験薬 GMP レベル) (図 1)

分担研究者

菅原 勇

財団法人結核予防会結核研究所
抗酸菌レファレンスセンター
センター長

野内英樹

財団法人結核予防会結核研究所
エイズ結核プロジェクト
リーダー

慶長直人

国立国際医療センター研究所
呼吸器疾患研究部
部長

服部俊夫

東北大学大学院医学研究科
内科病態学感染症内科
教授

高鳥毛敏雄

大阪大学大学院医学系研究科
社会環境医学講座 (公衆衛生)
助教授

櫻田紳策

国立国際医療センター
研究所・呼吸器疾患研究部
細菌性呼吸器感染症研究室
室長

赤川清子

国立感染研究所
免疫部
室長

阿部千代治

ベクトン・ディッキンソン研究所
学術情報部

指導研究員

坂谷光則

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
病院長

A. 研究目的

1. 結核発症の再興、HIV感染の結核高頻度合併、多剤耐性結核の多数発症が日本のみでなく世界中（特にアジア地域）で大きな問題となっている。（図2）一方、HIVの流行、多剤耐性結核の増加はDOTS戦略に変更をもたらしつつある。すなわち、DOTSプラス多剤耐性結核治療、新しい結核ワクチン、新しい治療薬の開発が必要である。多剤耐性結核は ①莫大な費用（一般の結核患者に比べ） ②治療困難 ③発症予防の困難性等の問題がある。
2. したがって、アジア地域との研究ネットワークを活用して、 ①多剤耐性結核疫学調査に基づく制御 ②強力な新しい結核予防ワクチンで発症予防 ③新しい結核治療ワクチン ④新しい結核化学療法剤 ⑤新しい早期結核特異的診断法と多剤耐性結核予後診断法 ⑥多剤耐性結核患者の宿主要因 ⑦菌側の要因—迅速な薬剤感受性遺伝子変異診断、TLR認識 ⑧スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌の対応—病室の陰圧・個別化 ⑨新しいT細胞免疫療法の普及 ⑩DOTSの普及 ⑪HIV感染症制御 ⑫セカンドライン抗結核薬、外科療法 による多剤耐性結核の制御を目的とする。特に①②③④⑥⑦⑧を目指す。

B. 研究方法

[I] 中国、フィリピン：多剤耐性結核菌DNA約100例入手。VNTR等でDNAをすでに解析した。アジア地域（中国）の多剤耐性結核菌DNA 50例を

VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) で解析した。

[II] タイ：（チェンライ県で野内と櫻田）多剤耐性結核の分子・疫学コホート対策について検討。チェンライ県では、結核菌喀痰塗抹陽性肺結核患者は、年間950人、再登録患者は約100人。現在まで1987年から延べ人数で、1081人の再登録、再発例442人、治療失敗による再登録例205人、治療脱落による再登録例319人、430人の死亡。再登録に対応した、疫学的危険因子を検討。

すなわち、結核研究所はエイズに関連する結核症のフィールド研究を指向し、1995年よりタイ保健省との覚え書きの基に、結核研究所職員と関係者をタイ国チェンライ県に駐在させ、TB/HIV Research Projectという国際共同研究プロジェクトを実施している。1996年にチェンライ県全県の喀痰塗抹陽性結核患者を対象として開始した薬剤耐性サーベイランスの開始以来、臨床分離結核菌株はタイ保健省結核課に保存されている。結核菌のDNA指紋法を活用して結核菌の感染ルート解明も追究している。また早期より、自発的HIV検査とカウンセリングを強化し実施している。結核登録を活用したサーベイランスに関しては1987までに遡って入力をして、結核疫学上の動きを見ると共に、薬剤耐性サーベイランスの治療歴の確認等に活用している。WHO方式のコホート治療結果評価を1995年登録の患者より実施している。更に、チェンライ県衛生局と協力して死亡統計や結核とエイズのサーベイランスデータを統合・電算化し、長期的予後の検索が可能なフィールドに確立している。出稼ぎもなく人口は安定している。チェンライ県の病院には、エイズや結核等の感染症診療では住民の最終診断・治療の場所となっている。チェンライ県は、住民登録での人口は1,273,349人（推定にて1,310,000人）のタイの中でも大きな県である。チェンライ県には、県病院としてのチェンライ病院(Chiang Rai Regional Hospital)と、各郡に1つ存在する16の郡病院(District Hospital)がネットワークを形成している。国民皆保険制度にて、基礎的な患者フォローアップ

もされている。

今回、上記の研究基盤を活用して、①難治性結核患者（多剤耐性・再発・治療失敗例）のコホート研究を立ち上げる。①の群に関しては、菌側のRFLP等の標準タイピングを活用して、厳格に内因性の再燃と外来性再感染を区別する。②結核治療に反応が良く再発をしなかった群、結核に罹患していない群③正常タイ人のコントロール群を設定し、比較の対象としたい。取り込み時にケース・コントロール研究の形態にて、①と②の比較にて結核症の難治に関する種々の要因検討、③と結核症群（②、①）の比較にて、結核自体の発症に関連する様々な臨床疫学、遺伝疫学、免疫学的な種々の宿主因子の検討を進めたい。

患者サンプルは末梢血から血漿、単球、単球以外の単核球にそれぞれ分離し、単球以外は各々の条件で保存する。本体研究と共同して、臨床免疫学的な研究を行う。分担研究者の櫻田、赤川と協力して、末梢血単球由来マクロファージを用いて、多剤耐性結核の宿主側要因としてマクロファージの自然免疫を中心とした検索を行う。単球は上記方法でマクロファージに分化させ、LPS、BCGなどの刺激前後での標的分子の発現の検出を試みる。標的分子はプロテームに関する手法を用いて、絞り込み中である。血漿は保存後、サイトカインの測定に、単核球に関してはフローサイトメトリーT細胞のサブセット（V・V・中心）の検索に使用する。班長の岡田とは、血清中granulysin測定（患者リンパ球内の培養土壌中も）、サイトカイン（ヒトIFN γ 、IL-2、IL-6）測定を考えている。また、キラーT細胞活性Assayの可能性も検討する。慶長野内、櫻田との共同研究体制を確立して、結核患者の登録台帳から再発例、再感染例、治療失敗例を洗い出し、細菌学的データと臨床データを含む患者資料の整備を行う。

次に、各々の患者群から末梢血を採取し、

DNAを抽出し、各遺伝子多型を挟むプライマーセットでPCR増幅して、RFLP法、もしくは、マイクロサテライトタイピング法により、遺伝子タイピングを実施する。

本年度は、連結不可能匿名化され、以前に、結核症に関する遺伝要因の検索についての承認の得られているDNA検体を用いたパイロット的な解析を実施した。

患者群から末梢血を採取し、そこから血漿、単球、リンパ球を分離する。血漿は血中サイトカイン（IL-4、IL-10、IL-12、IL-18、TNF- α ）量をELISAによる測定に、リンパ球はM Φ T細胞レセプターを含む表面マーカーの検索に使用する。マグネットビーズ法（CD14によるpositive selection）により分離された単球はそれぞれGM-CSF、M-CSFの存在下に培養し、成熟した段階で、標的分子（osteopontin、NRAMP-1、cathepsinB、IL-10等）の発現解析をmRNAレベルではRT-PCR法、タンパクレベルではウエスタンブロット法にて日本で実施する。培養マクロファージの培養上清中のサイトカイン量（前述）をELISAにてタイにおいて測定する。

[III] DNAワクチンの作製とカニクイザルへのワクチン免疫方法

カニクイザルの免疫実験のため、ヒトIL-12p40、p35両遺伝子を健常人のPBMCよりクローニングした。DNAワクチン用ベクターとしてIL-12p40 p35融合タンパクを発現するプラスミドベクターを構築した。構築したIL-12p40 p35DNAワクチンとHSP65 DNAワクチンはHVJ-liposomeに包埋し、カニクイザルに接種した。（岡田、吉田、金田、Reed, Gillis）

米国NIH branchでWHOの支援研究機関であるLeonard Wood Memorial研究所（フィリピン、セブ）で行った。Leonard Wood Memorial研究所は世界で唯一多数のカニクイザルをP3レベルで結核研究できる施設である。この研究室からNatureに1996年、カニクイザルが最もヒト結核に近いモデルである有名な研究が発表された。

Dr. Babie Tan, Dr. Cruz (Leonard Wood) との共同研究で行った。

各ワクチンを3週間隔で3回予防ワクチ

ン 5×10^6 cfu皮内投与 (0.1mlの生食に浮遊) した。HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNAはi. m. 投与した。最終ワクチン投与4週後に強毒ヒト結核菌クロノ株を気道内投与した。

全62頭の多数のカニクイザルを用いて、以下の結核予防ワクチン効果を解析した。(図3)

<実験OKADA II>

HVJ-リポソーム/HSP65DNA+IL-12 DNAワクチン効果の再現性実験

- | | |
|---|------|
| G1. HVJ-リポソーム /HSP65DNA+IL-12DNA ワクチン群 | 3回投与 |
| G2. HVJ-リポソーム/GFP DNA ワクチン群 | 3回投与 |
| G3 リコンビナント72f BCG ワクチン群 | 3回投与 |
| G4 BCG東京+Mtb72f protein ワクチン群 | 3回投与 |
| G5 BCG東京ワクチン群 | 3回投与 |
| G6 BCG東京ワクチン群 | 1回投与 |
| G7 リコンビナント72f BCG ワクチン群 | 1回投与 |
| G8 BCG東京(priming)+ 72f蛋白/AS2 (booster3回) | |
| G9 リコンビナント72f BCGワクチン (priming) +72f蛋白/AS2 (booster 3回) | |
| G10 生食投与群 | |

<実験OKADA III> Priming-Booster法の解析

- | | |
|---|--|
| G1 BCG東京(priming)+HVJ-リポソーム /HSP65DNA+IL-12DNA (booster 2回) | |
| G2 HVJ-リポソーム/HSP65DNA+IL- 12DNA (priming)+BCG東京 (booster 2回) | |
| G3 リコンビナント72f BCG (priming) +HVJ-リポソーム/HSP65DNA+IL-12DNA (booster 2回) | |

コントロールは実験IIの

G6

G7

G10

G1

予防ワクチン効果は、生存率、胸部X線、血沈、体重、体温、PPD皮内反応ならびにワクチン投与ザルの末梢血Tリンパ球の増殖増強反応で解析した。末梢血T細胞をリコンビナントHSP65 10 μ g/ml、リコンビナント72f 10 μ g/ml、PPD 10 μ g/ml、PHA-P 0.2%で刺激し、³H-サイミジンuptakeの方法で三日後に増殖活性を測定した。

上記の検査は、①ワクチン投与前、②ワクチン1回目投与後3週後、③2回目投与後3週後、④3回目投与後3週後、⑤TB菌投与4週後、⑥TB菌投与8週後行った。

[IV] 中国河南省における多剤耐性結核の研究

: 中国河南省30の県から集められた171例の結核菌を用いた。このうち、133例がエタンブトール耐性で、38例が、エタンブトール感受性であった。平均年齢は、43.7歳であり、男女比は、2.2対1であり、農民が多かった。エタンブトール耐性は、比率法で、固形培地上で2 μ g/ml以上と定義した。エタンブトールの標的遺伝子は、arabinosyl transferase 遺伝子で、そのうち*embB*が主である。*embB*のコードン306が重要と考えられているので、この領域を含む260bpの遺伝子増幅産物を解析した。精製した260bp産物を用いて、DNA sequencer (ABI PRISM Model 377) で塩基配列を決定した。

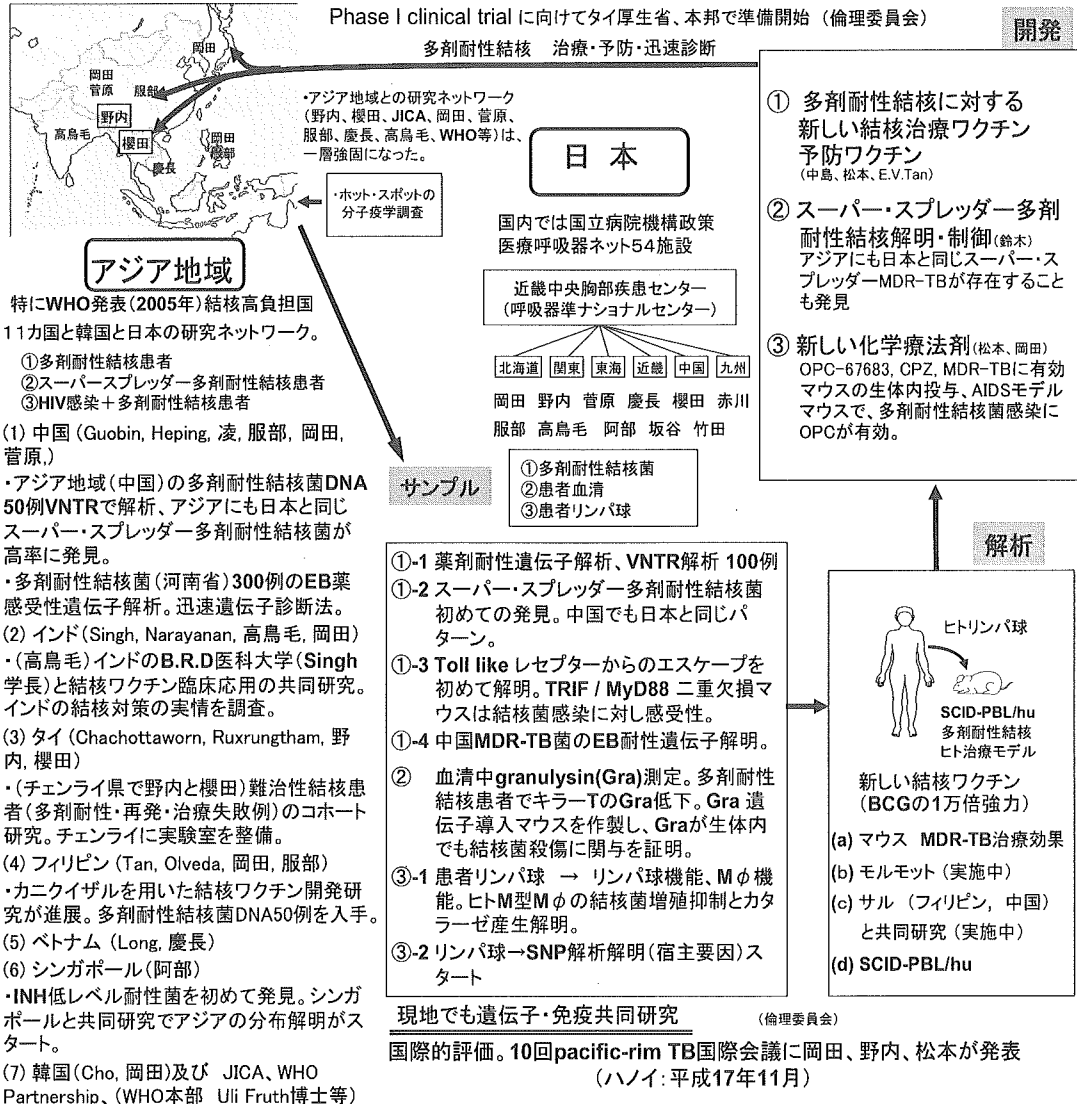
[V] 多剤耐性結核菌に対する初めての治療ワクチン開発

: 結核に対する有効な治療ワクチンの報告は全くなされていない。したがって、我々はHVJ/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチンを用いて、治療ワクチン効果を解析した。DBA/1マウスに多剤耐性結核菌H37Rv 5×10^5 をi. v. 投与した後1日後、8日後、及び15日後に

図 1

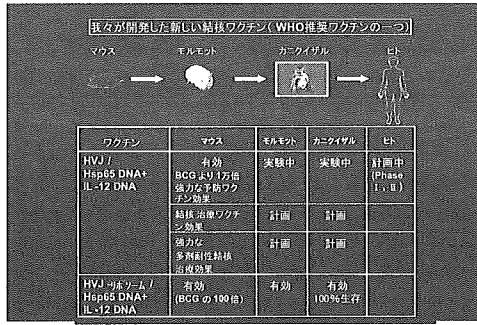
Ⅶ. Ⅲ. の1年間の研究成果の概要図等

アジア地域との研究ネットワークの活用による多剤耐性結核の制御に関する研究



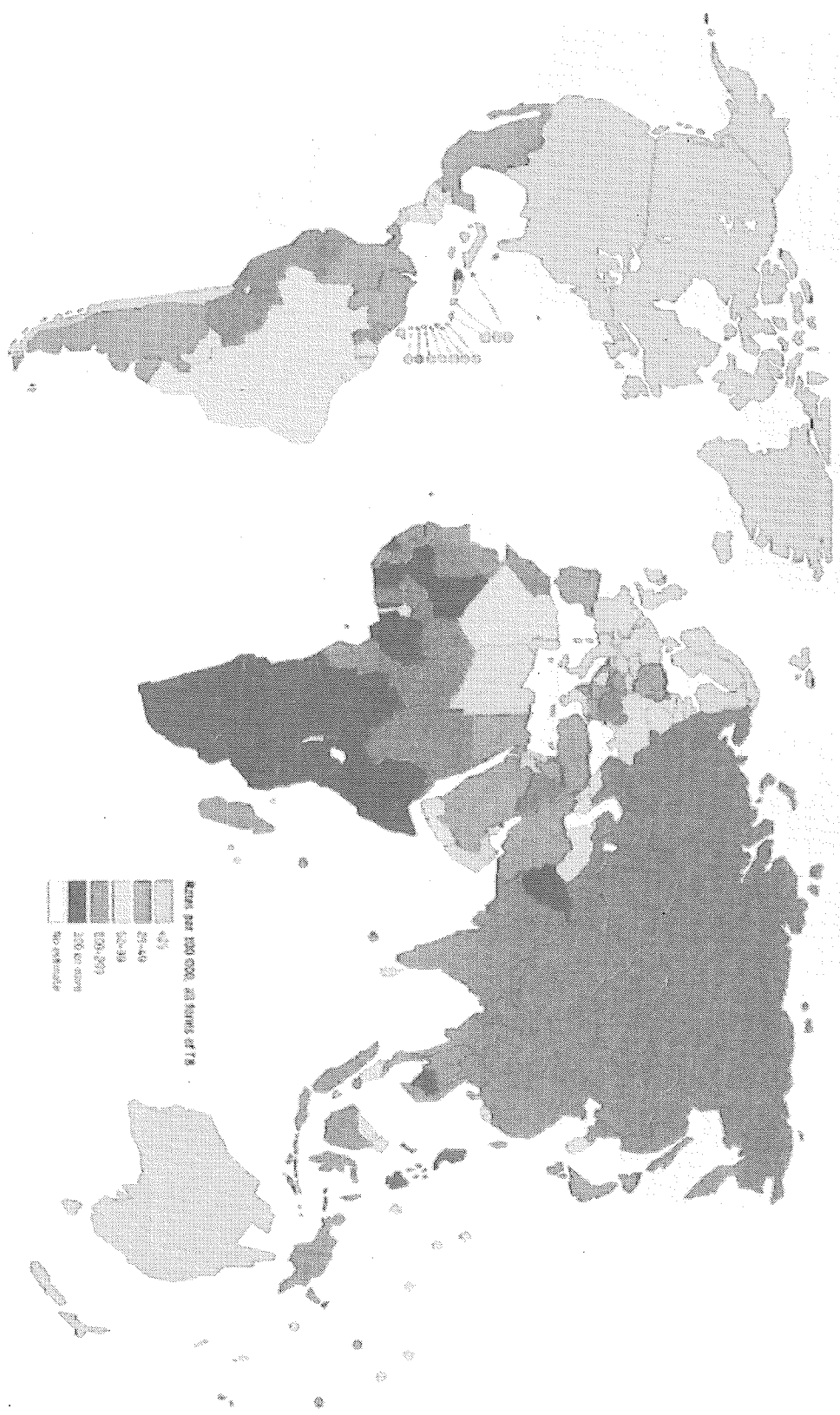
新しい結核治療ワクチンの開発

- HVJエンベロープ/Hsp65 DNA+IL-12 DNA ワクチンはBCGよりも1万倍強力な結核予防ワクチン効果。初めてワクチンによる延命効果を発見(マウス)。モルモット(McMurray 教授)及びカニクイザル(レオナルド研究所;ヒト結核感染に最も近い)にワクチン免疫。この群は体重増加。抗結核効果解析中。
- 多剤耐性結核に対する世界で初めての治療ワクチンを発見した。当院の多剤耐性結核菌をマウスに投与後、HVJエンベロープ/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチンは治療効果。
- 薬剤感受性結核菌に対しても、このワクチンは治療効果。
- HVJ-リボソーム/Hsp65+IL-12 DNA は、サルで100%生存率の画期的な結核予防ワクチン効果。
- 臨床応用に実績のプラスミドベクター(pVAX1)とHVJ-E封入製剤調製の品質管理基準・標準操作手順書・治験薬GMPレベル。



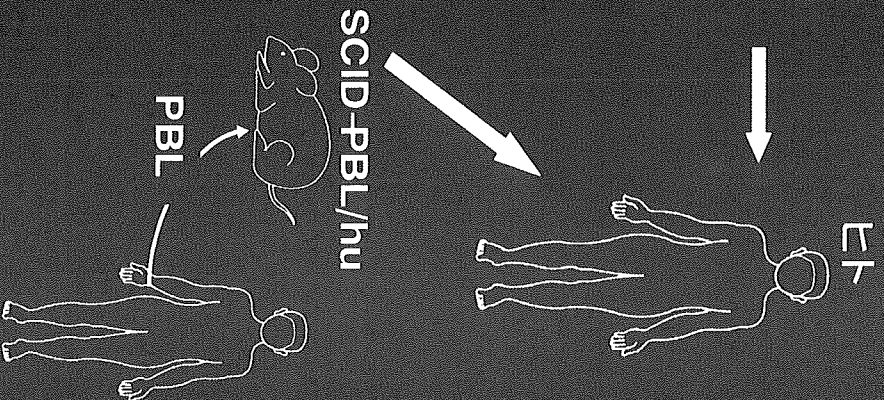
2

1. Estimated TB incidence rates, 2002



The distribution of TB incidence rates in 2002 is based on the most recent available data. The incidence rates are based on the most recent available data. The incidence rates are based on the most recent available data. The incidence rates are based on the most recent available data.

我々が開発した新しい結核ワクチン(WHO推奨ワクチンの一つ)



| ワクチン | ラウス | モルモット | カニクイザル | ヒト |
|--------------------------------------|-------------------------------|---------------|--------|----------------------|
| HVJ Hsp65 DNA+ IL-12 DNA | 有効 BCGより1万倍 強力な予防ワクチン効果 | 実験中 | 実験中 | 計画中 (Phase I, II) |
| HVJ+ホソーム/ Hsp65 DNA+ IL-12 DNA | 有効 (BCGの100倍) | 結核治療ワクチン効果 | 計画 | 計画 |
| | | 強力な多剤耐性結核治療効果 | 計画 | 計画 |
| | | 有効 | 有効 | |

- ①HVJ/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチン
- ②BCGワクチン
- ③HVJ /Hsp65DNA+IL-12DNA及びBCGとの同時投与
- ④ (HVJ /Hsp65DNA+IL-12DNA) ワクチンとBCGワクチンのpriming-boosterワクチンを投与する方法を用いて治療効果を解析した。

多剤耐性結核菌投与30日後、すなわち3回目の治療ワクチン投与2週間後にDBA/1マウスをsacrifyした。肺臓・肝臓・脾臓をホモジナイズし、結核菌数を7H11寒天培地で2週間培養し、CFUで測定した。免疫応答は脾細胞のサイトカイン産生及びリンパ球のBrdu増殖反応で解析した。

[VI] インドとのネットワーク共同研究：

1. インド北東部のネパール国境に近いゴラクプル (Gorakhpur) を研究対象地域と定め、平成17年11月2日～11月5日の間に現地に滞在して、地域の結核の疫学状況、結核の保健医療資源、結核菌の検査体制について調査を行った。
2. 地域の調査にあたって、この地域の医療の拠点となっているB. R. D. Medical college & NEHRU HosipitalのPrincipal & DeanのProf. Saudan Singhの研究協力を得て、地域の結核の疫学状況、結核の保健医療体制について情報収集を行った。
3. 地域の結核対策の拠点となっている結核クリニック (Tuberculosis Unit) を訪問し、患者発見から治療管理の現状について調査を行った。調査にあたっては、Dr. Jeetendra Pol (District Tuberculosis officer, Grakhpur, UP) の協力を得た。
4. インドにおける他地域における結核研究の可能性を図るためにインドの首都ニューデリー近郊のAgra (アグラ) に存在するS. N. Medical CollegeのPrincipal, Dean & Chief of Hospitalであり、またインド公衆衛生協会理事長であるProf. Deonki Nandanを訪問し、研究協力の要請を行った。

[VII] シンガポールとのネットワーク共同研究：
アジア諸国で分離株の薬剤感受性検査を行っている国はわずかである。シンガポールは結核中蔓延国であり、十数年前

から分離培養と薬剤感受性検査に液体培地を取り入れている。アジア諸国で分離株の薬剤感受性検査を行っている国はわずかである。シンガポールは結核中蔓延国であり、十数年前から分離培養と薬剤感受性検査に液体培地を取り入れている。したがって、シンガポールとの共同研究を計画した。

[VIII] Priming-Boosterワクチンの開発
(マウスの系で)

本邦では6ヶ月までにBCGワクチン接種が行われることより、成人（小学生、又は中学生も含む）ワクチンにおける有効なboosterワクチンの開発が切望されている。

したがって、HSP65DNA+IL-12DNAワクチンとBCG東京ワクチンのpriming-booster結核予防ワクチン効果を解析した。

PrimingとしてHSP65DNA+IL-12DNAワクチン、boosterワクチンとしてBCG東京を用いる系で解析した。

さらに、BCGワクチンをprimingワクチンとし、DNAワクチンをboosterワクチンとする方法を比較検討した。

Primingを1回行い、3週間隔でboosterワクチンを投与した。3回免疫後、4週後にH37Rvを感染させ、結核菌に対する予防ワクチン効果を解析した。

[IX] モルモットを用いた結核菌吸入感染系における新しい結核ワクチンの予防効果のアーッセイ

モルモットを用いた結核研究の世界の第一人者Texas A&M大学教授David N. McMurray博士と共同研究を行った。(McMurray博士は結核エアゾル感染させたモルモットを用いて、米国FDAやNIHより委託された新しい結核ワクチンの効果判定を行っており、名実ともにモルモットを用いた結核研究の大御所である。)

結核DNAワクチン群を

- ① HVJ /Hsp65DNA+IL-12DNAワクチン
 - ② BCG東京ワクチン
 - ③ HVJ/emptyベクター群
- をそれぞれ組み合わせる3回予防ワクチン免疫した (表1)

(表1)

| Day 0 (1 ^o) | | | |
|-------------------------|----------------------------|-----------|----------------------|
| Group # | Treatment | # of Inj. | details |
| 1 | — | — | Placebo Control |
| 2 | — | — | DNA Alone |
| 3 | BCG Tokyo | 11 | DNA Booster |
| 4 | BCG Tokyo | 11 | Empty Vector Control |
| 5 | BCG Tokyo | 11 | BCG alone |
| 6 | HVJ(N)/HSP65 DNA+IL-12 DNA | 11 | DNA prime/BCG Boost |
| 7 | HVJ(N)/HSP65 DNA+IL-12 DNA | 11 | Priming Control |

DNA vaccines will be given IM, 200 µl/inj.

BCG will be given SC.

Placebo control animals will receive sham injections of saline, IM.

| Day 21 (2 ^o) | | | |
|--------------------------|----------------------------|-----------|----------------------|
| Group # | Treatment | # of Inj. | details |
| 1 | — | — | Placebo Control |
| 2 | HVJ(N)/HSP65 DNA+IL-12 DNA | 11 | DNA Alone |
| 3 | HVJ(N)/HSP65 DNA+IL-12 DNA | 11 | DNA Booster |
| 4 | HVJ (E) | 11 | Empty Vector Control |
| 5 | — | — | BCG alone |
| 6 | HVJ(N)/HSP65 DNA+IL-12 DNA | 11 | DNA prime/BCG Boost |
| 7 | HVJ(N)/HSP65 DNA+IL-12 DNA | 11 | Priming Control |

EXP A: 56 animals (8/trt.grp.) will be challenged, via the aerosol route, 6 weeks

following third immunization, with *M. tuberculosis* H37Rv.

最終免疫から6週後に結核菌チャレンジ
結核菌チャレンジ後5週後に解剖

| Day 42 (3 ^o) | | | |
|--------------------------|----------------------------|-----------|----------------------|
| Group # | Treatment | # of Inj. | details |
| 1 | — | — | Placebo Control |
| 2 | HVJ(N)/HSP65 DNA+IL-12 DNA | 11 | DNA Alone |
| 3 | HVJ(N)/HSP65 DNA+IL-12 DNA | 11 | DNA Booster |
| 4 | HVJ (E) | 11 | Empty Vector Control |
| 5 | — | — | BCG alone |
| 6 | BCG Tokyo | 11 | DNA prime/BCG Boost |
| 7 | — | — | Priming Control |

EXP B: 21 animals (3/trt.grp.) will be euthanized 6 weeks following third immunization,

for cytokine assays. Cytokine

levels of IL-2, IFN-γ, IL-6, and IL-12 will be analyzed from stimulated spleen and lung cell supernatants.

最終免疫から6日後に免疫応答解析

各群各々11匹のモルモットに免疫した。うち、各々8匹は結核菌数の制御効果解析に用いる。

各々3匹は免疫応答増強機構解析に用いる。

各々のワクチンをモルモットに3回免疫した後、最終免疫より6週後にヒト結核菌H37Rvを吸入感染させた。結核菌吸入感染後5週後にモルモットをsacrifyし血液を採取し、肺臓、肝臓、脾臓の病理組織の解析と肺臓、肝臓の結核菌数を7H11寒天培地で解析した。又、脾リンパ球の免疫機能（サイトカイン産生、IFN-γ等）を解析した。

一方、結核菌を吸入感染させる直前の結核ワクチン投与モルモットの免疫反応をIFN-γ、TNFα、IL-12p40等のRT-PCRを用いてサイトカイン活性を測定した。

[X] 結核に対する新規DNAワクチンの製造・製剤化技術の開発に関する研究

(1) DNAワクチンの有効性評価用プラスミドの調製

従来研究用として使用していたp c DNA 3. 1プラスミドから、DNAワクチン用に開発されたプラスミドベクターであるp VAX 1へ目的遺伝子（IL-12、HSP 65）の組換えを行った。そのために、ヒトIL-12とHSP 65についてはNhe I/Not I断片を、モルモットIL-12についてはPme I断片を、マウスIL-12についてはNhe I/Apa I断片をそれぞれ調製して、p VAX 1のNhe I/Not I部位、Pme I部位、またはNhe I/Apa Iにそれぞれ組み込みを行った。評価のために疾患モデルとして使用する小動物（マウス、モルモット）と、中動物（サル）の3種類それぞれのアッセイ系に必要なプラスミドDNAを上記のように構築した後、試験に使用できる品質レベルのDNAを大量に製造した。製造

したプラスミドDNAは、品質検査試験後にデリバリーシステム兼アジュバントであるHVJ-E に封入し、品質レベルを確認した後に結核ワクチンとしての有効性検討に使用した。

(2) DNAワクチン開発のためのアッセイ構築

DNAワクチンの開発に必要なアッセイ系として、培養細胞で免疫の活性化を測定するアッセイ系と、プラスミドDNAにより発現される蛋白質定量アッセイ系をそれぞれ構築した。HVJ-Eのアジュバント効果である免疫活性化については、NF κ Bの活性化を測定する系の構築を行った。培養細胞にNF κ Bの結合部位をプロモーター領域に持つレポーター遺伝子(SEAP)を導入した後にクローニングを行い、反応性の高いクローンを選択してアッセイ用細胞として使用した。また、プラスミドDNAにより発現される蛋白質定量アッセイ系として、IL-12蛋白質についてはELISA法によるアッセイ系を、HSP65蛋白質に対してはウェスタンブロット法によるアッセイ系を構築した。アッセイにはBHK細胞を用い、対象となるプラスミドDNAを導入した後に、培養上清(IL-12蛋白質)または細胞溶解物(HSP65蛋白質)を回収して、目的の遺伝子の発現を確認するための測定に使用した。

(3) DNAワクチンの製造技術(封入、製剤)

HVJ-Eベクターに封入したDNAワクチン製剤の臨床応用のために、プラスミドDNAとHVJ-E製剤に関して製造技術を開発した。プラスミドDNAに関しては、遺伝子治療用医薬品のガイドラインに従って品質管理項目を設定して、ワクチンとしての有効性評価に使用するDNAについては、実際に品質管理基準に合致したプラスミドの製造を行った。一方、HVJ-Eベクターへの封入法についても封入工程の見直しを行い、実製造に適した簡便な封入法を開発した。

[XI] 将来の臨床試験を開始するための前臨床試験としてどのような試験が必要かの調査:

岡田班により見出されたワクチン候補物質であるHVJ-envelope/HSP65+IL-12、

HVJ-envelope/HSP65+IL-12+BCGについての有用性については過去何年間に渡り、検討が行われ、良好な結果が得られている。また、サルを用いた評価試験も現在進行中であり、その結果が待たれるところである。そこで、本ワクチン候補のヒトでの安全性評価を実施するためには、どのような試験が前臨床で必要であるかについて調査を行い、その準備を行うことを計画した。方法としては、近況のワクチン開発された事例の調査、公的機関が作成しているガイドラインの調査を行うことを計画した。また、臨床試験に向け、企画についても勘案した。

[XII] AAV(アデノ随伴ウイルスベクター)及びアデノウイルスベクターを用いた発現効率の良い結核ワクチンの開発
今まで通常AAVベクターとして使用されていたAAV(2/1)ベクターに代わり、1000倍発現効率が良い AAV(2/5)ベクターにHSP65 DNA及びAg85B DNAを挿入して、AAV/HSP65 DNAワクチン及びAAV/Ag85B DNAワクチンを作製した。さらに、E1a、E1b、E3欠損アデノウイルスベクターにこれらの遺伝子を導入した。Adenovirus vector/Ag85B DNAワクチン及びAdenovirus vector/HSP65 DNAワクチンを作製した。

Adenovirus vector/HSP65 DNAの高力価(MOI)を得るために293細胞への感染条件と培養条件を変えて解析した。

[XIII] 多剤耐性結核におけるTLRを介した免疫応答の解析:

(1) 多剤耐性結核に対するTLRを介した自然免疫:

これまで、TLRを介した自然免疫系の活性化機構の解析から、TLRを介したシグナル伝達経路では、TIRドメインを有するアダプターMyD88とTRIFが重要な役割を担っていて、TRIF/MyD88二重欠損マウスでは、TLRシグナルが完全に消失することを明らかにしている。そこで、TLRを介した自然免疫系の活性化の結核感染防御における役割を、TRIF/MyD88二重欠損マウスを作製し解析した。正常マウス、TRIF欠損マウス、MyD88欠損マウス、およびTRIF/MyD88二重欠損マウスにワクチン株であるBCGを感染させ、肺病変を解析し、また感染後の生存率を測定した。

また結核菌MtbH37Ra株を経気道的に感染させ、肺内の菌数を測定し、また生存率を測定した。

(2) TLRを介した獲得免疫応答の解析:

Toll like receptorと結核菌症の病態解明には、in vitroの種々のTLRノックアウトマウス由来のMφを用い、UV処理して殺菌したこれらの多剤耐性結核菌に対するMφ活性化機構の差異を通常の結核菌や非定型抗酸菌と比較検討した。さらにTLR2 (-/-) マウス、TLR4 (-/-) マウス、MyD88 (-/-) マウス、TRIF (-/-) マウス及びMyD88 (-/-) × TRIF (-/-) マウスにヒト型結核菌H37Rv及び種々の多剤耐性結核菌(スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌も含む)をi. v. 投与又はi. p. 投与してTLR2とTLR4の結核菌、多剤耐性結核菌に対するin vivo抗結核効果及びキラーT細胞分化誘導効果、サイトカイン(IFN- γ 、IL-2)産生誘導効果、T細胞増殖効果を解析した。

[XIV] 難治性結核患者及び薬剤耐性結核患者末梢血キラーTリンパ球機能の解析

多剤耐性結核患者PBL及び難治性結核患者PBLにおいて結核菌に対するキラーT分化誘導の低下、granulysin mRNA、TRAIL mRNA、低下を明らかにした。さらに15K granulysin に対する抗体を作製し、これらの患者のPBLのキラーT、NKでのgranulysin発現を検討した。(岡田、井上、坂谷) (図4)

[XV] 世界に先駆けてのヒト生体内抗結核感染免疫モデルの作製

我々はIL-2R γ 鎖ノックアウトNOD-SCIDを作製した。IL-2R γ 鎖はIL-4、IL-7、IL-15、IL-21の γ 鎖と共通である。したがって、IL-2R γ 鎖をノックアウトすると、ほとんどのT細胞、NK細胞活性シグナルがブロックされる。したがって、このIL-2R γ (-/-) NOD-SCIDを用いてSCID-PBL/huを作製した。

(倫理面への配慮)

1. 当病院の倫理委員会は歴史が古くかつ厳格なことで定評がある。すなわち院外者関西学院大学総長、大阪国際大学法学部教授等を含む各方面の医療従事者(事務系の人も含む)により構成されており毎月最低一回は長時間にわたり議論されて

いる。

2. ワクチンや結核蛋白のin vitro(試験管内)での結核患者末梢血リンパ球のT細胞免疫増強活性を検討する研究は、上記の倫理委員会に実験計画書を提出し、審査を得て実施する。すなわち、研究対象者の人権擁護を第一に考え、個人が特定されるような情報は公表しない等、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究対象者に対する不利益や危険性の排除を十分に配慮して実施する。また、ワクチンのphase I試験においては、研究対象者の人権擁護を第一に考え、研究対象者に対する不利益や危険性の排除、および個人が特定されるような情報は公表しない等を十分に配慮した実験計画書を、倫理委員会のみならず、院内に設置されている治験審査委員会に治験計画書を提出し、審査を経て実施する。
3. 国立病院機構近畿中央胸部疾患センターで動物実験を行う場合、院内に設置されている動物実験委員会に事前に実験計画書を提出し審査を経て実施する。国立病院機構近畿中央胸部疾患センター動物実験取扱規程等に則って、動物実験用施設において安楽死等動物愛護上の配慮を十分に行い実施する。DNAワクチンやリコンビナントBCGワクチンを用いた結核予防および治療のための動物実験を行う場合は、事前に動物実験委員会のみならず、院内に設置されている組換えDNA実験安全委員会に実験計画書を提出して、審査を経て承認されてから実施する。安全性、倫理面、動物愛護上の配慮等の面から審査を受ける。また国立病院機構近畿中央胸部疾患センター組換えDNA実験安全管理規程に則って、感染あるいは環境汚染のおそれがないように十分に配慮して行うとともに、実験に使用した器具は全てオートクレーブ消毒してから洗浄する。
4. また、人のみならず動物を用いた研究を行う際には、事前に院内に設置されている倫理委員会等に研究計画書を提出して、倫理面からの審査・承認を受ける。当院は厚生省より結核疾患・呼吸器疾患の準ナショナルセンター(高度専門医療施設)に選ばれたことにより、倫理面への配慮を十分おこない臨床応用を目指したい。

C. 研究結果

[I] 中国・フィリピンとのネットワーク研究を活用したアジアにおける多剤耐性結核菌のDNA解析：

中国、フィリピン：

多剤耐性結核菌DNA約100例を入手。VNTR等でDNAをすでに解析した(表2、表3)。アジア地域(中国)の多剤耐性結核菌DNA 50例をVNTR [Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)：瀋陽の多剤耐性結核菌50例中6例(12%)で日本のスーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌と全く同じVNTR

(MIRU)配列を示した。]で解析し、アジアにも日本と同じスーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌が高率に存在することを初めて発見した(岡田、服部)(表4、表5、表6、表7)。

スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌は通常が多剤耐性結核菌より毒力が強力であることをマウス生体内で証明した。



地図1. ハルビン

[II] タイとのネットワーク研究を活用した多剤耐性結核の制御に関する研究：

タイ：

チェンライ県では、年間1500人前後の新規結核患者が発生している(2002年と2003年の新規結核患者数はそれぞれ、1,433人と1,566人) 結核菌喀痰塗抹陽性肺結核患者は、年間950人程度で

あり、再登録患者は年間約100人である。2003年と2004年はそれぞれ、再発(relapse)例が38人と47人、治療失敗による再登録例が23人と34人、2ヶ月以上の治療脱落による再登録例が17人と22人、慢性排菌例が5人と11人であった。コホート研究を立ち上げた場合、これらの症例数が期待できる。現在までに延べ人数として、1081人の再登録をした人数を同定しており、再発(relapse)例が442人、治療失敗による再登録例が205人、2ヶ月以上の治療脱落による再登録例が319人、慢性排菌例が76人であるが、チェンライ県での死亡データベースで430人の死亡は発見されている。これらの症例(1081人)を注意深く今回までのチェンライ県での登録回数を調べた。慢性排菌例がもちろん一番再登録回数が多かったが、再発例も3回以上が47例あった。このような再登録に対応した、疫学的危険子を検討した。年齢は再発例や慢性例が初発と比べて有意に高かった。また、治療脱落后再発例で有意に女性が少なかった。HIV陽性者は治療失敗例で30%、治療脱落后再発例で23%、慢性排菌例で17%と少なかったが、再発例では37%と初発の35%より高いくらいであった。Ethnicityでは、タイ国籍でない人が山岳民族でないタイ国籍人と比較して有意に再発、治療失敗、慢性排菌、脱落后再発で多かった。

また、長期のフォローアップによる予後として、1997年から2000年に治療完了した1,267人の塗抹陽性の新規肺結核患者に関して、2年間の再発を検討した所、43人(3.4%)の喀痰塗抹陽性再排菌患者が発見された。また、26人(2.0%)が喀痰塗抹は陰性であったが、結核の悪化による治療がされた。死亡は123人(9.7%)であった。

NRAMP1遺伝子多型タイピングは、イントロン4の469+14 G/C、エクソン15のD543N、31非翻訳領域のTGTCGの挿入欠失、およびプロモータ領域のGT反復配列のアリルのタイピング系を確立した。さらにVDR遺伝子のエクソン2 (Fok I) とエクソン9 (Taq I) の制限酵素断片長多型についても同様に

タイピング系を確立した。
 さらにアジア人においては、MBLの
 プロモーター領域の-550G/C, -
 221T/C と+4C/T (それぞれ H/L,
 Y/X, P/Q variants と呼ばれる)、エ
 クソン1の230G/A (A/B, codon54)

が主要な SNPs であり、ハプロタイ
 プはHYPA, LYPA, LYQA, LXPA,
 LYPB の5種類に限定されて例外は非
 常に稀であることが既に知られている。
 LYPB を有する場合は正常なオリゴマ
 ーを形成できないために血中 MBL

表 2

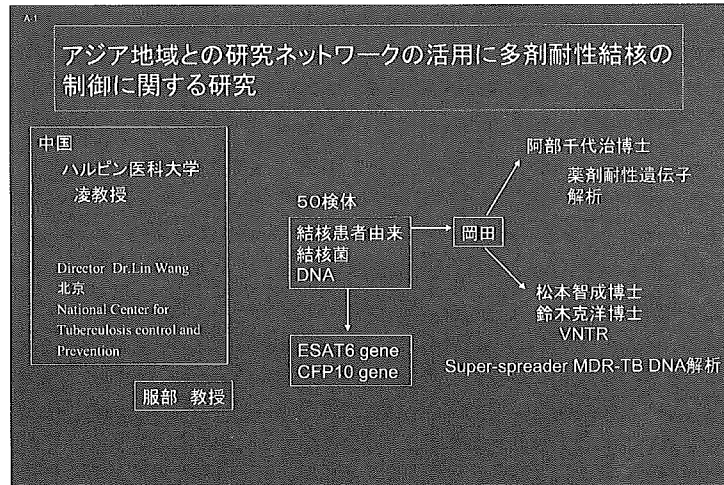


表 3

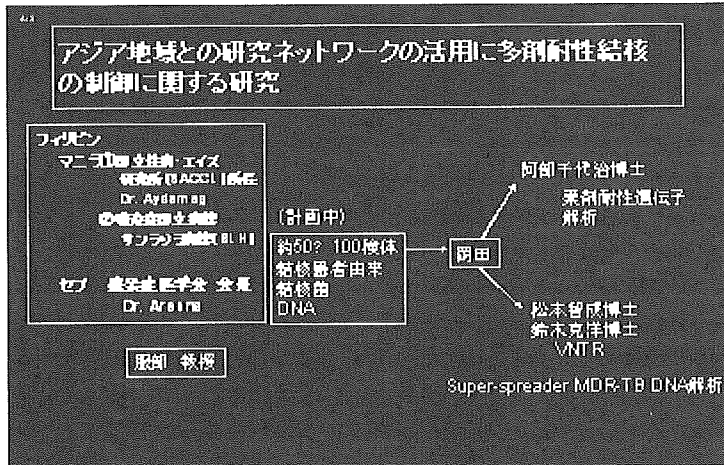


表 4

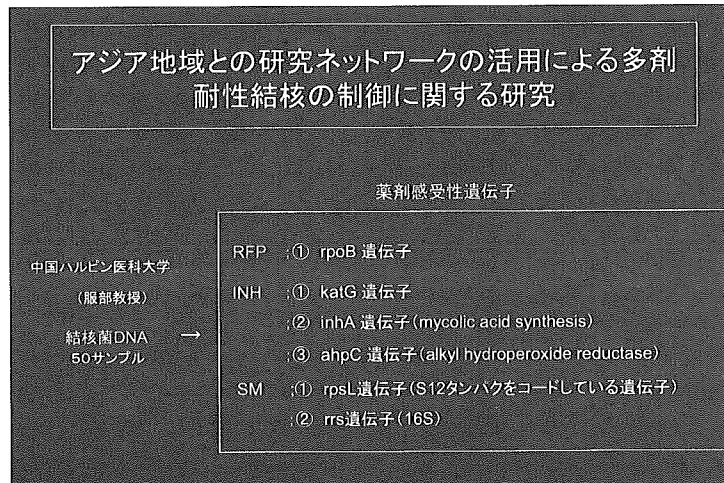


表 5

アジア地域との研究ネットワークの活用による多剤耐性結核の制御に関する研究

結核菌群と非結核性抗酸菌の鑑別

中国ハルビン医科大学
(服部教授)

結核菌DNA
50サンプル

→

① RFLP分析に用いているIS6110

② キャピリアTBに用いているMPB64タンパクをコードしているmpb64遺伝子

- ・この2つの遺伝子は結核菌群に特異的
- ・非結核性抗酸菌には存在しない

表 6

PCR-Primer Using in VNTR

| | |
|---|--|
| <p>ETR-A-R aaatcgggtccatcacctcttatt ETR-A-L cgaagcctgggtgcccgattt ETR-B-R gcgaacaccaggacagcatcatg ETR-B-L ggcattgccggtgatcgagttg ETR-C-R gtgagtcgctgcagaacctgcag ETR-C-L ggcgtctgacctccacgagtg ETR-D*)</p> <p>ETR-E**)</p> <p>ETR-F-R ctcgggtgatggtccggcgggtcac ETR-F-L ggaagtgcctcgacaacgccatgcc</p> <p>MIRU2-F tggacttgcagcaatggaccaact MIRU2-R Tactcggagccggctcaaat MIRU4-F Gcgcgagagccgaactgc MIRU4-R Gcgcagcagaacgtcagc MIRU10-F gtcttgaccaactgcagctgcc MIRU10-R gccacottggatgacgactacct</p> | <p>MIRU16-F tcggtgatcgggtccagtcceaagta MIRU16-R Ccgcctgctgcagcccttggtac MIRU20-F Cggagagatgcccttcgagt MIRU20-R Cactaacgggtggcgggtatg MIRU23-F cagcgaacgaaactgtgetatcac MIRU23-R cgtgtccgagcagaaaagggtat MIRU24-F gctcctgtcacagccaaacc MIRU24-R tggcggagttgagctcacagaac MIRU26-F actgcctcgcggaatagg MIRU26-R ggataggtctaccgtcgaaactcg MIRU27-F cgacggggcatcttcgattg MIRU27-R gttcacgggcaacgcatag MIRU31-F actgattggcttcatacggcttta MIRU31-R gtgcccagctggtcttctgat MIRU39-F cgcctcagacaactggagccaaac MIRU39-R cggaaactgtctacgcccacacat MIRU40-F ggggtgctggatgacaactgtg MIRU40-R ggggatctcggcgaactcagata</p> |
|---|--|

表 7

VNTR of *Mycobacterium tuberculosis* in China

| ID | E-A | E-B | E-C | E-D | E-E | E-F | M12 | M19 | M16 | M18 | M13 | M14 | M15 | M17 | M19 |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1787 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 2 | 5 | 1 | 7 | 3 | 3 | 3 |
| 1808 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 1 | 7 | 3 | 3 |
| 1870 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 1 | 7 | 3 | 3 |
| 1873 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 1 | 7 | 3 | 3 |
| 1876 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 1 | 7 | 3 | 3 |
| 1932 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 1 | 7 | 3 | 3 |
| 1933 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 1 | 7 | 3 | 3 |
| 1934 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 1 | 7 | 3 | 3 |
| 1921 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 1 | 7 | 3 | 3 |
| 1954 | 4 | 0 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 1955 | 4 | 0 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 1957 | 4 | 0 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 1958 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 1962 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 1 | 7 | 3 | 3 |
| 1963 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 1965 | 4 | 0 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 1966 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 1967 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 1971 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 1982 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 1988 | 3 | 0 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 1996 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 1998 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 2003 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 2015 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 1 | 7 | 3 | 3 |
| 2018 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 2021 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 2026 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 2029 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 2043 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 2076 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 2088 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 2088 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 2143 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 2189 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |
| 2209 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 7 | 3 | 3 |

度は著しく低くなり、また、LXPAは正常な分子構造のMBLを形成するものの、血中MBL濃度はHYPA, LYPA, LYQAと比較して低いことが知られている。そこで、Y/XとA/Bの2カ所のSNPsの遺伝子型を決定する系を確立した。

平成17年9-11月にかけてチェンライ市内の施設において実験室の整備を完了した。健常者（タイ側の共同研究者）の末梢血単球を分離し、GM-CSFならびにM-CSF存在下で分化誘導を試みた。結果、検体のうち何例かからは国内と同様に良好な分化したマクロファージが得られた。一方、大多数の単球が分化せずに細胞死と思われる変化を認めた例もあった。患者資料の整備は、年度末にかけて準備を進めた。またタイ保健省倫理委員会からの研究承認に関しては、保健省指針を入手し、共同研究者とともに申請書の作成を行った。

まとめると（チェンライ県で野内と櫻田）多剤耐性結核の分子・疫学コホート対策について検討。チェンライ県では、結核菌喀痰塗抹陽性肺結核患者は、年間950人、再登録患者は約100人。現在まで1987年から延べ人数で、1081人の再登録、再発例442人、治療失敗による再登録例205人、治療脱落による再登録例319人、430人の死亡。再登録に対応した、疫学的危険因子を検討。

(a) 難治性結核患者（多剤耐性・再発・治療失敗例）のコホート研究を立ち上げた。(b) 10年間近く菌体を保存している世界でも類をみないサンプルを用い再発例中の多剤耐性結核菌出現を解析。(c) 慶長らは野内が保存した多剤耐性結核患者PBMCを用い、SNP解析プロトコル作製。(d) 櫻田らはチェンライに実験室を整備し、多剤耐性結核宿主側要因（リンパ球、Mφ）の研究がスタート。ヒトPBMCからマグネットビーズ法でMφを分離し分化させるシステム構築に成功した。



地図2. タイ

【Ⅲ】新しい結核ワクチンの開発

1. 新しい結核予防ワクチンの開発

①HVJ-liposome/Hsp65 DNA+IL-12 DNA ワクチン、②リコンビナント72f BCG (r72f BCG) ワクチン、の世界で最先端のワクチン2種を開発した。

さらに、WHOより2004年2月からWHO STOP TB Partnershipに選出され、さらに、岡田は2004年WHO STOP TB Vaccine MeetingメンバーにWHOより選出され、発表し、世界の最先端かつ臨床応用すべき4つのワクチンの一つに選ばれる光栄を得た。

(1) 世界で最も切れ味のよい、BCG ワクチンより1万倍強力な結核予防ワクチンHVJ/Hsp65+IL-12 DNA ワクチンを開発した。

結核菌由来のHeat Shock Protein (Hsp65) DNAを用いた。

① HVJ/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチンをBalb/c マウスに3週毎に3回 i. m. 投与し、最終免疫から4週後にヒト型結核菌 H37Rv を 5×10^5 i. v. チャレンジする系を用いた。BCG 東京ワクチンでプライミングした後、HVJ/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチンをブースターした群では、BCG ワクチン単独投与群に比較して1万倍以上強力な画期的結核ワクチン効果（結核菌数 1×10^6 cfu を 1×10^2 cfu 以下に減少）を示した。

すなわち、肺や肝の結果菌数を非ワクチン群の10万分の一に減少させ、BCGワクチン群の1万分の一に結核菌数を減少させた。脾臓の結核菌数でも同様の結果を得た。

- ② 逆に、HVJ/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチン群でプライミングした後、BCG ワクチンでブースターを行っても BCG ワクチン単独に比較して、1 万倍以上強力な結核ワクチン効果を示した。

日本人は乳幼児に BCG をほぼ全員

- ④ 他の研究室より報告されている結核ワクチンよりも 1000 倍強力な画期的な結核予防ワクチン効果を示した。

- ⑤ HVJ ワクチンは GMP レベルのワクチンであり迅速な臨床応用につながる。

- ⑥ なお、今までの HVJ-liposome/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンの結果をまとめると、

1) HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンは相乗効果を示し、BCG よりも強力 (100 倍強力) な結核予防ワクチンであることをマウスの系で明らかにした (図 5、図 6、図 7)。

2) HSP65 タンパク抗原に対する T 細胞の増強反応性をこのワクチンは極めて強く、相乗的に増強した (図 8)。

3) さらに、ELISPOT アッセイ (カール・ツァイス社の自動計測システム) を用い (図 9)、HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは強力に IFN- γ 産生細胞の分化を誘導し、また IFN- γ 産生細胞数を増加させ

- ⑧ Hsp65 DNA ワクチンと IL-12 DNA ワクチンの相乗効果が認められた。

投与することより、本邦では BCG を priming ワクチンとし、成人、中学生、小学生で HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンの booster ワクチンが有効である可能性が示された。

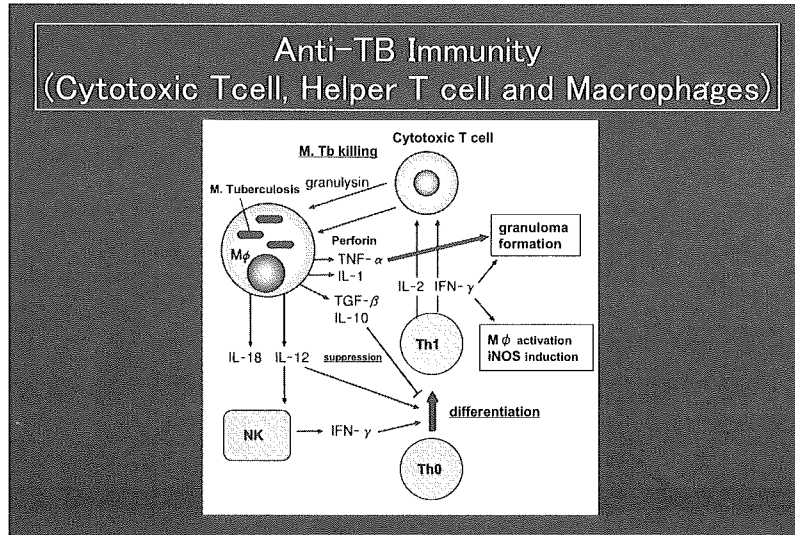
結核菌成分に対する IFN- γ 産生細胞数 (Elispot Assay で測定) や、IFN- γ 産生 (ELISA) 及び、IL-2 産生はワクチン効果と相関した。

- ③ ワクチン非投与群の 10 万倍強力な結核予防ワクチン効果を示した。

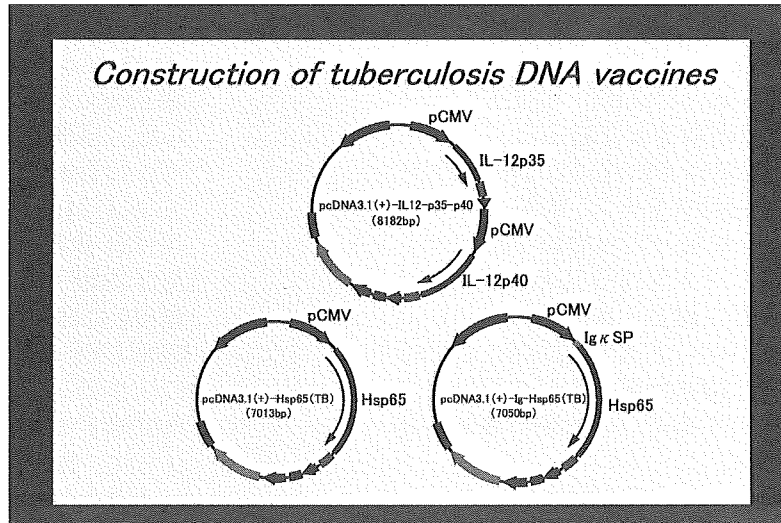
た (図 10)。

- ⑦ これらのワクチン効果とキラー T 細胞活性は相関した。キラー T の分化誘導を介して、ワクチン効果が発揮された。(heat shock protein) 65 DNA を HVJ-liposome ベクターに導入した。これらを BALB/C マウス (H-2^d) に 3 回免疫した後、ヒト結核菌 H37Rv 5×10^5 /mouse を i.v 投与した。結核菌に対するキラー活性は ⁵¹Cr release 法を用いた。J774.1 M ϕ cell line (H-2^d) に結核死菌 (H37Ra 死菌) 食させた標準細胞、及び Hsp65DNA を P815 肥満細胞腫 (H-2^d) に導入し、Hsp65 発現標的細胞を ⁵¹Cr ラベルとして用いた。このワクチン効果と脾リンパ球の結核菌に対するキラー T 活性が相関した。さらに、Hsp65 に対するキラー活性が誘導された。このキラー活性は in vivo で最終抗原刺激より 8 週間後にも約 10%認められた。さらに、IFN- γ 及び IL-2 産生において Hsp65 DNA ワクチンと IL-12 DNA ワクチンの相乗効果が認められた。(図 11)

☒ 4



☒ 5



☒ 6

