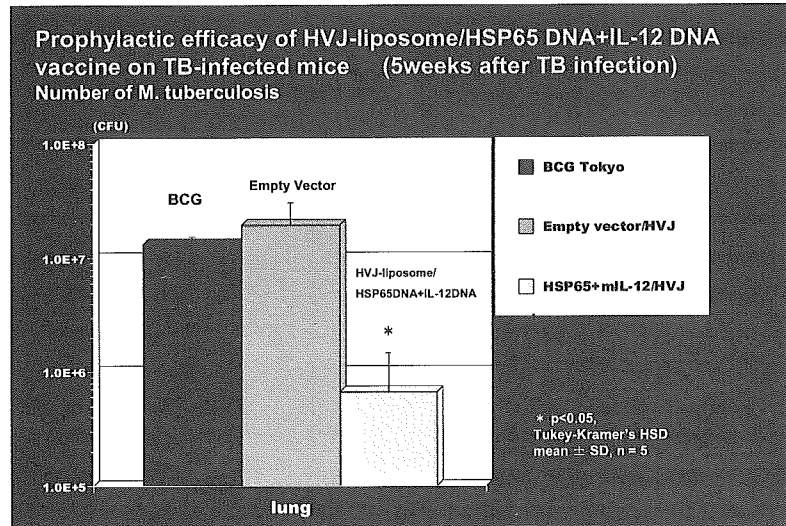
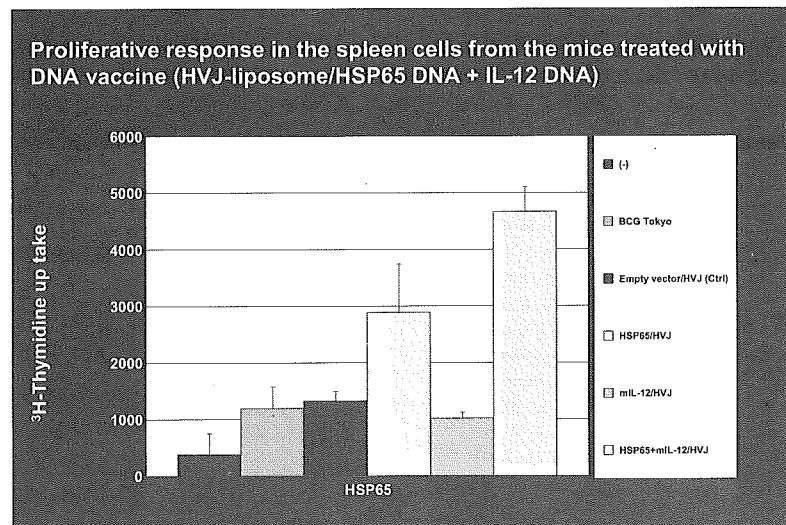


☒ 7



☒ 8



☒ 9

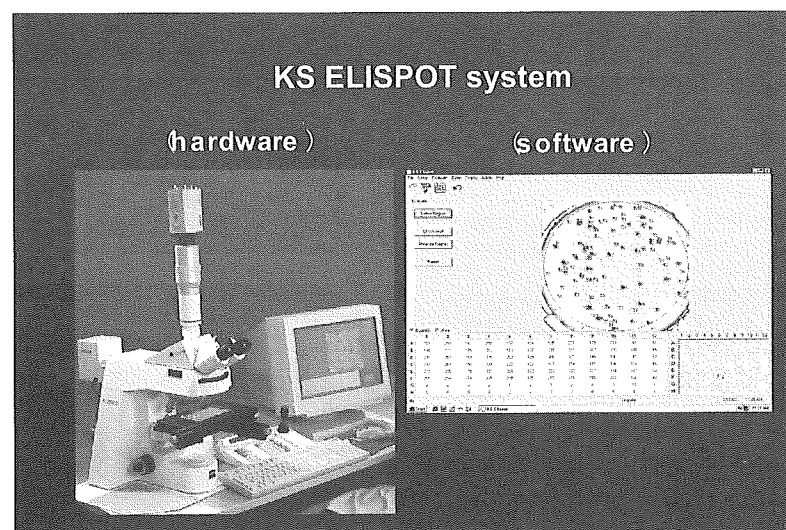


図 1 0

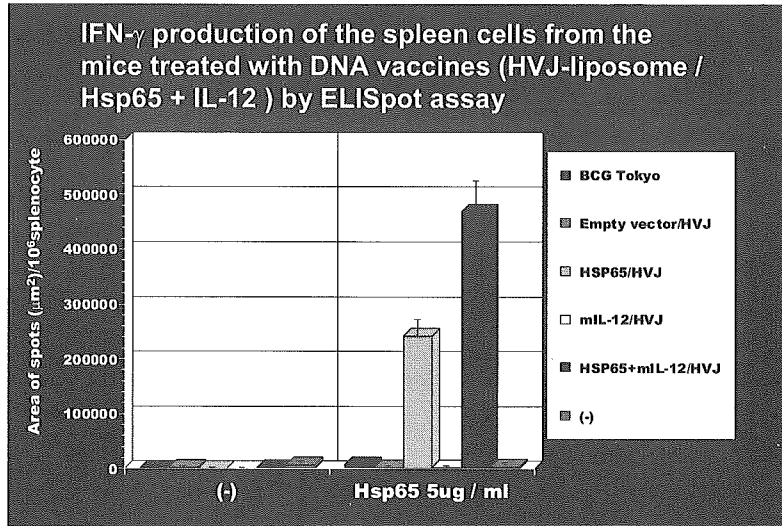
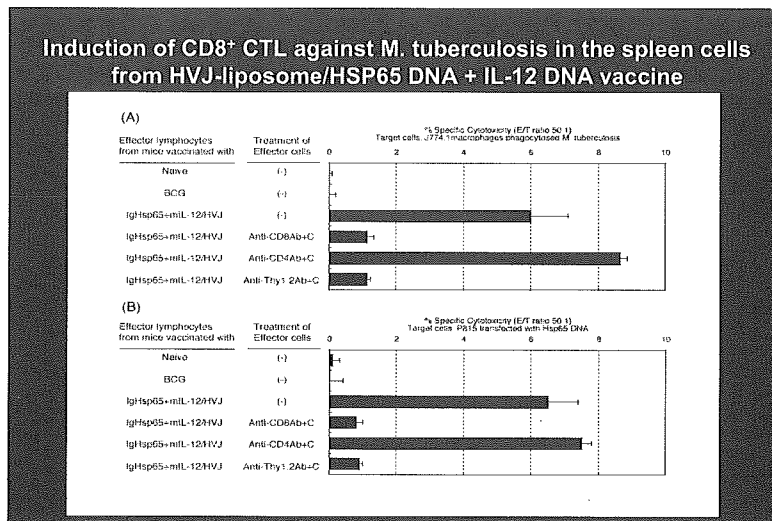


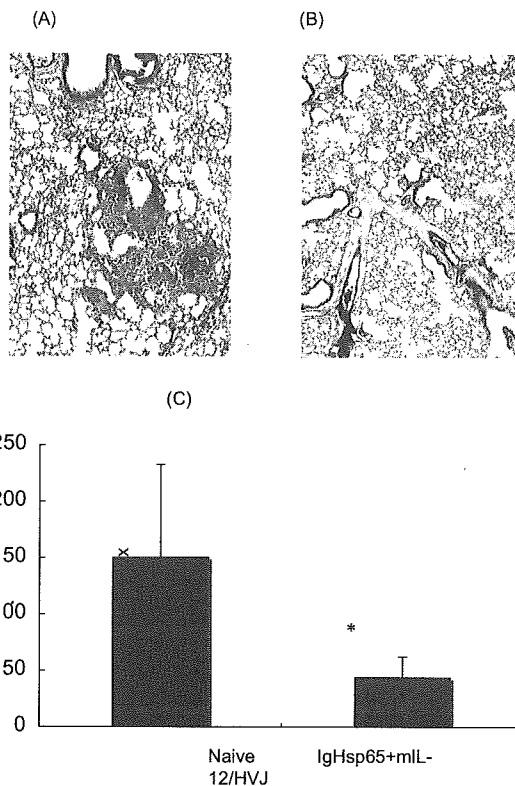
図 1 1



⑨ 肺結核病理像の改善：結核菌に対する肺結核病理像はホルマリン固定した肺、肝及び脾臓の組織切片をH・E染色し、肺結核病理像を解析した。結核病変インデックスは長径×短径を面積で表示して計算した (Vaccine 2005)。このワクチン効果と肺結核病理組織改善効果は相関した。HVJ-liposome/Hsp65+IL-12 DNA ワクチンでは有意差 ( $P <$

0.05) をもって、非ワクチン投与群、コントロールベクター投与群や BCG ワクチン投与群に比較して結核病変 index (granuloma index) の改善が認められた。肝結核病理組織でもこのワクチンで改善効果が認められた。(図 12)

図 1 2



(2) 世界に先駆けて、結核治療ワクチン HVJ/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチンを開発した。このワクチンを結核菌 H37Rv を i. v. 投与したマウスに 3 回 i. m. 注射することにより BCG ワクチン投与群に比較して、有意差 ( $p < 0.05$ ) をもって治療効果を示した。ワクチン非投与群と比較しても、有意にこのワクチンは結核菌減少効果を示した。すなわち、 $5 \times 10^5$  H37Rv を i. v. した日を 0 日目とすると、その 1 日後に 1 回目の DNA ワクチンを投与、8 日目に

2 回目、15 日目に 3 回目の DNA ワクチンを投与した。H37Rv 投与 30 日後に肺臓、肝臓、脾臓の結核菌 CFU の減少をコントロール群、BCG 単独投与群に比較して有意差をもって認められた。

結核治療ワクチン効果を示すワクチンの報告はいまだなく、この Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチンが初めての結核治療ワクチンであることを明らかにした。この Hsp65DNA +IL-12DNA ワクチンの治療ワクチン効

果は結核菌感受性 strain のマウス及び結核菌抵抗性 strain のマウス、両方で認められた。すなわち、このワクチンの将来的な臨床応用を考える一つの目標が得られた。

(3) さらに、多剤耐性結核菌を投与した後に、この HVJ /Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチンで治療すると、治療ワクチン効果（肺臓、肝臓、脾臓の結核菌減少）を得た。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。

(4) 我々は世界の最先端の二種のワクチン①②を開発した。

① HVJ-liposome / Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチン： カニクイザル（最もヒトの結核感染に類似したモデル Babie Tan et al.

Nature Medicine 1996) を用い、（我々が唯一、世界に先駆けてこのサルを用いた極めて重要な研究を行っている）結核予防効果を示した。（図 13）

② リコンビナント72f BCGワクチンはカニクイザルでBCGよりも強力な抗結核予防効果を示した。結核菌由来のタンパクで結核菌に対するT細胞免疫を強く誘導するMtb39とMtb32の融合タンパクMtb72fタンパクをコードするDNAをBCG菌に導入しリコンビナント72f BCGワクチンを作製した。

①②の結核予防ワクチン効果は、延命効果、胸部 X 線所見の改善、血沈の改善、体重減少の改善、サル PBL の増強反応、IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-6 の産生増強等の T 細胞免疫増強作用が認められた。

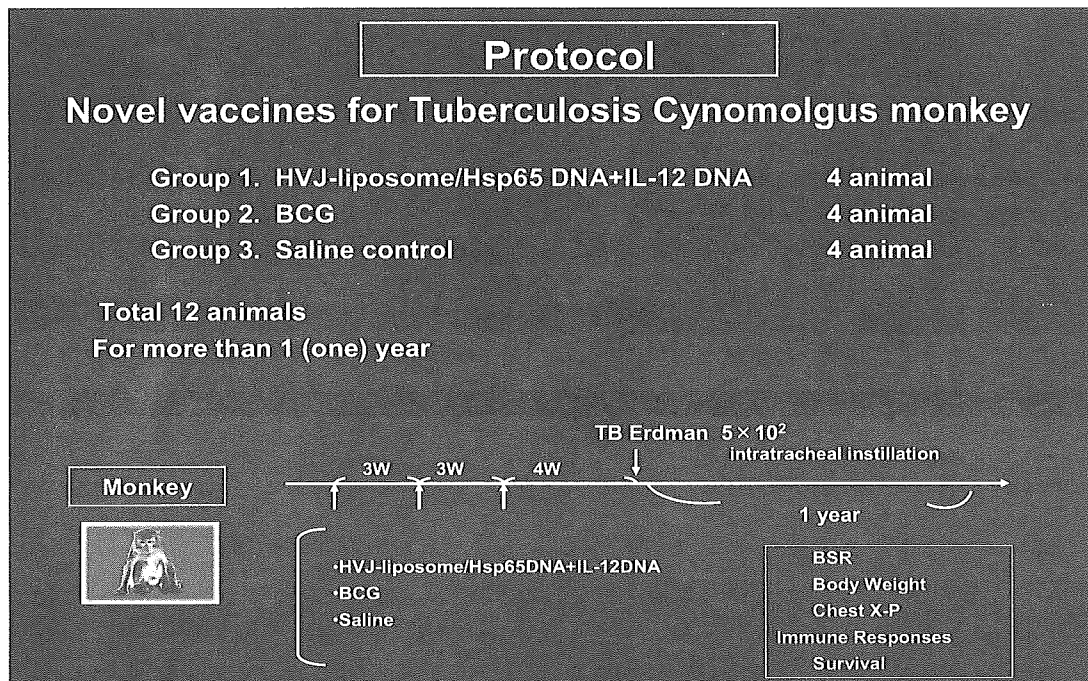


図 13

2. カニクイザルを用いた結核予防ワクチン効果<実験Ⅲ>

priming-booster ワクチン効果カニクイザルを用いた<実験Ⅲ>では HVJ-liposome/ HSP65 DNA + IL-12 DNA ワク

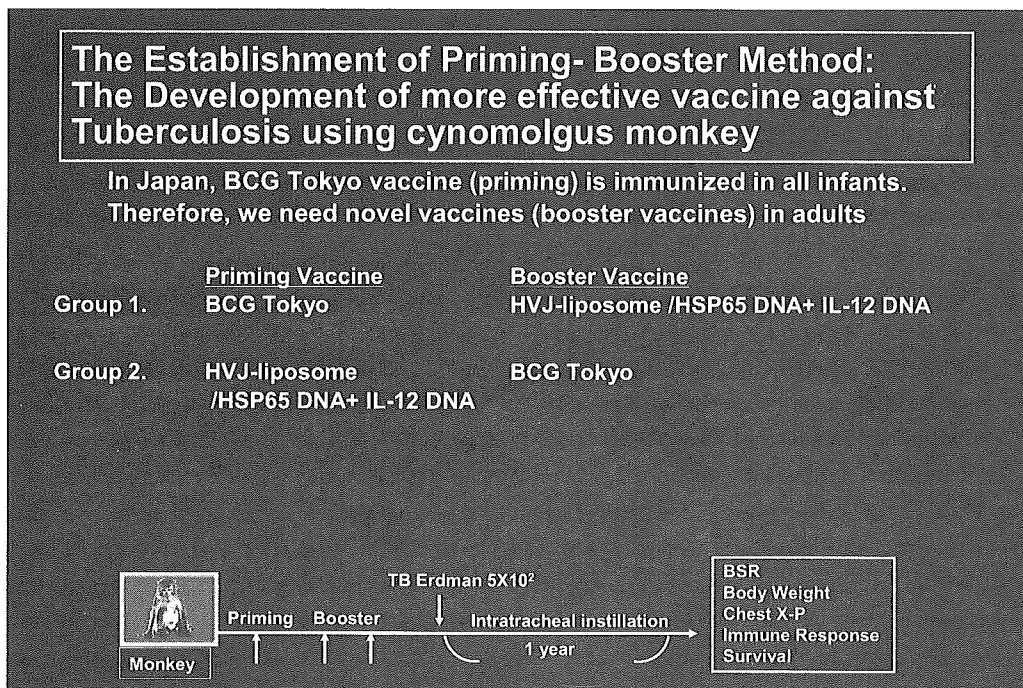
チンの priming-booster ワクチン効果を検討した。

現在、結核菌投与後 1 年観察した結果、生存数は BCG priming + HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン投与群では 4 匹中 4

匹生存（生存率は100%）した。一方生食投与群では6匹中3匹（生存率50%）死亡した。BCG Tokyo 単独投与群では6匹中2匹生存（生存率33%）であった。HVJ-liposome/Hsp65DNA+IL-12DNA 3回投与群では4匹中3匹（75%の生存率）で

あった。  
このことよりカニクイザルにおいてもHSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンのpriming-booster法が強力な結核予防ワクチン効果を示した。（図14）

図14



3. カニクイザルを用いた結核予防ワクチン効果<実験Ⅱ>  
カニクイザルにこのワクチンを3回生体内投与し、最終免疫4週後にヒト結核菌 Erdman 株を経気道投与した。ワクチン投与前、中、感染後約3週毎に体重、体温、血沈、胸部X線、ツ反及び生存率を解析し1年以上経過観察した。今回はコントロール群としてHVJ-liposome/GFP DNAを用いた。コントロールのHVJ-liposome/GFP DNAワクチンは4匹中2匹生存〔生存率50%〕であり、生食投与のコントロール群の生存率50%（6匹中3匹）と同じであった。（図15）  
一方HVJ-liposome/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチン投与群は4匹中3匹生存（生存率75%）であり、このワクチ

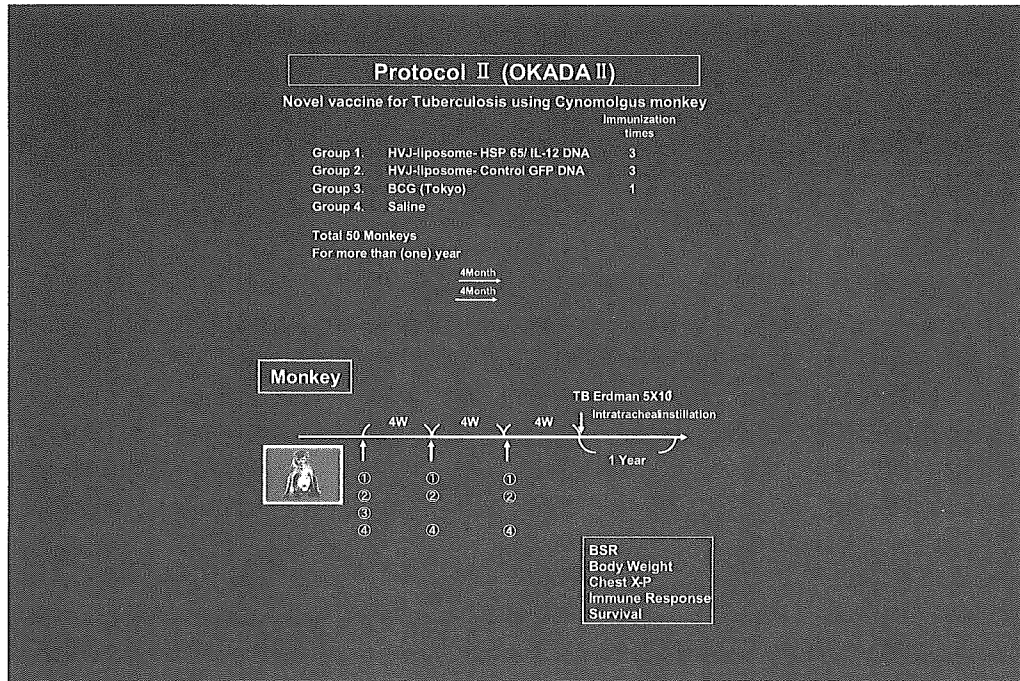
ンが間違いなくコントロール群より有効な結核予防ワクチンであることを再確認した。

カニクイザルを用いた<実験Ⅱ>では、HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン投与群が最も強い増殖反応をHSP65抗原や結核死菌抗原に対して示した。この結果はカニクイザルを用いた実験Ⅰで2003年に報告した結果と同様の結果を示した。

このワクチン投与カニクイザル群は血沈の改善効果の再現性、体重減少抑制効果の再現性を示した。生食投与群は38℃前後の発熱を結核菌気道感染後示した。これに対しHSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン投与群では発熱の抑制効果も示された。



図 1 5



4. モルモットのエアゾール結核菌吸入系においてもワクチン①の HVJ-liposome/Hsp65 DNA +IL-12 DNA ワクチン ②のリコンビナント 72f BCG は BCG より強力な結核予防ワクチン効果を示した (モルモットを用いた結核研究の世界の第一人者 McMurray との共同研究)。さらに、表 1 の如く、このモルモットの系で Dr. McMurray の研究室で HVJ-/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチンと BCG 東京ワクチンの priming-booster 効果を解析中である。
- [IV] ヒト多剤耐性結核菌治療モデルを世界に先駆けて開発した。  
ヒト多剤耐性結核菌治療モデル IL-2R (-/-) SCID-PBL/hu を初めて作製した。IL-2レセプター $\gamma$ 鎖ノックアウトマウス NOD SCID [IL-2R (-/-) SCID] マウスを作製し、これにヒト PBL を投与して極めてヒト T 細胞の生着がよく、生体内ヒト抗結核菌免疫を解明できることを明らかにした。この、IL-2R (-/-) SCID マウスは IL-2レセプターを欠損した NOD-SCID マウスであり、T 細胞、B 細胞が全く存在しないのみでなく、NK 細胞の分化が抑制された SCID マウスで

ある。したがって、ヒト・リンパ球の生着が通常の SCID マウスに比較して約 100 倍良い。しかも、この IL-2R (-/-) SCID-PBL/hu はヒト癌細胞に対する生体内ヒト・キラー T 細胞の誘導の系において、通常の NOD-SCID-PBL/hu や CB17-SCID-PBL/hu に比較して、約 50~200 倍強力な抗原特異的ヒト・キラー T 細胞を生体内脾リンパ球、PEC (peritoneal exudate cell)、腸間膜リンパ節や末梢血リンパ球で誘導する。

NK 細胞を強く抑制する抗体、IL-2 Receptor  $\beta$  鎖に対するモノクローナル抗体を投与した NOD-SCID マウスでもこれに近いヒトのリンパ球が生着するマウスを作製できる。しかしながら、IL-2R (-/-) SCID-PBL/hu の方が、やはり 5~10 倍ヒト T 細胞生着率及びヒト・キラー T 細胞誘導が強力である。

さらに、この IL-2R (-/-) SCID-PBL/hu は、多剤耐性結核菌治療モデルとなることを初めて明らかにした。このモデルに H37Rv を投与した後、HVJ/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチンで治療することにより結核菌数の減少を認める画期的な結果を得た。

[V] 多くのヒトに感染する Super Spreader多剤耐性結核菌SS 0308-0783株 (一人のSuper Spreader患者から多数のヒトに感染) を用いた。IL-2R (-/-) SCID PBL/huモデルで治療ワクチン・治療薬を解析中。この菌はin vivoでの増殖力が通常のMDR-TB菌よりも強くsuper spreader 多剤耐性結核菌SS 0308-0783株投与マウスは通常のMDR-TB菌投与マウスより有意差をもって早く死亡した。スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌はTLRの認識機構をエスケープする結果を世界に先駆けて明らかにした。

種々のTLR (-/-) マウスを用い、スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌はTLR4レセプターとTLR2レセプターの認識機構をエスケープすることを明らかにした。

[VI] 新しい多剤耐性・難治性結核予後診断法の開発

1. 15K granulysin による新しい結核予後診断法を発見した。又 15K granulysin がキラーT から分泌されMφにとり込まれMφ内の結核菌を殺す新しい pathway を発見した。
2. 15K granulysin Tg マウスを初めて作製し、生体内抗結核菌作用を示唆する結果を得た。
  - (1) 多剤耐性結核患者PBLのgranulysin mRNA、TRAIL mRNA、及び granulysin (Gra) 発現の著明な低下を明らかにした。
  - (2) 抗結核キラーT細胞から産出される granulysin [15kdのgranulysin (15K Gra)] がMφ内結核菌殺傷に極めて重要な役割を果たしている発見をした。
  - (3) 15K Gra DNAワクチンは結核予防効果を示した。
  - (4) 多剤耐性結核患者キラーT細胞のGra 蛋白発現の著明な低下を認めた。すなわち新しい結核予後診断法を確立した。
  - (5) 15K Gra transgenicマウス、9K Gra transgenicマウスを初めて作製し、世界に先駆けて15K Gra の生体内抗結核作用を明らかにした。すなわち 15K Granulysin DNA, 9K

Granulysin DNA及び分泌シグナルDNAを9K Granulysin DNAに付加して作製した。分泌型9K granulysin DNAをCAGプロテクターを用いて構築した。これらのプラスミドDNAを用い、①15K Granulysin Transgenicマウス2種及び②9K Granulysin transgenicマウス3種及び③分泌型9K granulysin transgenicマウス4種の作製に成功した。

これらのマウスを用い、granulysinの生体内結核菌殺傷効果を世界に先駆けて明らかにした。15K Gra Tgマウスも9K Gra Tgマウスも結核菌に対しキラーT分化誘導作用を示した。

- (6) キラーT細胞、NK細胞から産生され、血清中に流れているKiller Secretory Protein of 37kd (KSP37) が結核患者で著明に低下していることを初めて明らかにした。
- (7) KSP37 transgenicマウスを初めて作製した。

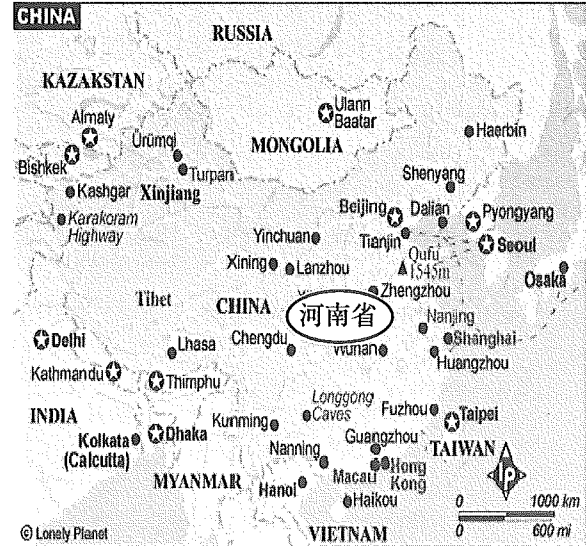
[VII] スーパー・スプレッダー多剤耐性結核を世界に先駆けて発見した。

3つの結核病院が関与したMDR-TB院内感染事例発病者5人のうち2人は明らかに再感染発病であり、感染を受け発病した看護師2人はともに肺切除術を受けている。菌のRFLP、スポリゴタイプリングも耐性パターンと一致。スポリゴタイプリングでBeijing株とも異なる新しい多剤耐性株であることを明らかにした。スーパー・スプレッダー MDR-TB菌 (SS 0308-0783株) や他の通常のMDR-TB菌はToll likeレセプター4の認識機構をエスケープしスーパー・スプレッダーはTLR4とTLR2の認識機構をエスケープすることが示された。

[VIII] 多剤耐性結核菌におけるTLRを介した免疫応答の解析：マウスにワクチン株であるBCGを感染させたところ、正常マウス、TRIF欠損マウス、MyD88欠損マウスでは肺組織に著明な変化は認められないが、TRIF/MyD88二重欠損マウスでは感染2週間以内に壊

死を伴った病理変化が観察された。抗酸菌染色を行ったところ、TRIF/MyD88二重欠損マウスの肺では、多数の抗酸菌が観察された。生存率を測定しても、他のマウスと異なり、TRIF/MyD88二重欠損マウスは約半数が死亡した。また、結核菌MtbH37Ra株を感染させたところ、MyD88欠損マウスは正常マウスよりやや感受性が高いが、TRIF/MyD88二重欠損マウスはさらに感受性が高くなっており、肺内の結核菌数も多くなり、生存率も低下していた。これらのことから、TRIF/MyD88二重欠損マウスは結核感染に高感受性を示すことが明らかになった。この結果は、自然免疫系の活性化シグナルが、結核菌感染防御に重要な役割を担っていることを示している。BCG感染によるTh1応答を、CD4陽性T細胞からのIFN- $\gamma$ 産生を指標に解析したところ、MyD88欠損マウスでは正常に比べて1/3程度に低下していたが、TRIF/MyD88二重欠損マウスでもMyD88欠損マウスと同程度の低下しか認めず、有意にTh1応答が観察された。このことは、結核感染においてはTLR非依存性にTh1細胞の分化が誘導されることを示している。

[IX] 中国とのネットワーク研究を活用した多剤耐性結核菌のDNA解析：エタンブトール耐性結核菌と判定された133例のうち、60例で*embB*の点突然変異が見いだされた。主要な点突然変異は、ATG-GTGで43例、ATG-ATA、ATG-ATT、ATG-CTGATG-ATC変異は、それぞれ7、5、3、2であった。38例のエタンブトール感受性菌のうち3例で、*embB*変異が見つかった。次に多剤耐性の程度と*embB*の変異との関係を調べたところ、エタンブトールモノ耐性菌より、INH、SM、RFP耐性結核菌の方に、*embB*変異が多く見られた。



地図3. 中国 河南省

[IX] インドとのネットワーク研究を活用した多剤耐性結核の制御 研究：

1. インド国の結核の現状

2001年の新発生患者数は180万人、新発生塗抹陽性患者は795,000人、結核死亡者数は417,000人である (Source: Provision WHO estimates Sept 2003)

2. 訪問地の現状

訪問したGrakhpurはインドのUttar Pradesh州 (UP) のネパールとの交通の要所となっている地方都市である。UP州の首都はLucknow (ラクノー)、人口は1億6600万人であり、北インドの中心州である。ガンジス河とヤムナー河によって拓けた広々とした平野 (ヒンドゥスタン平原) によって開けた地域である。人口は密集している地帯である。街の中心部は人口が密集しているが、農業を主体とする、貧しい人々が多い農村地域であった。

3. 地域の結核対策の状況

1) 結核対策プログラムについて

結核対策は、世界銀行等の資金供与とWHOの技術指導のもとで、1993年に国レベルでDOTSを柱とした結核対策計画 (Revised National Tuberculosis Control Programme; RNTCP) が策定され、これに沿って結核対策が進められていた。UP州政府内にWHOからSTS (Senior Tuberculosis Supervisor)、STLS (Senior Tuberculosis Laboratory)



Supervisor)の2人の指導者が派遣され、州政府のMOTC (Medical Officer of Tuberculosis Control) とともに対策を推進していた。

## 2) 結核対策の現状について

地域の結核対策の内容は、顕微鏡検査により塗抹陽性患者として診断し、この患者に対してDOTSを行うというものであった。拠点組織となっていたのは結核臨床医師を配置している結核クリニックであった。この結核クリニックは州内に70か所あり、この結核クリニックの下に、菌塗抹検査とDOTSの両方を行う結核センター (Tuberculosis Unit: TU) が7か所、菌検査だけを行う顕微鏡検査センター (Microscopic Center) が25か所、DOTSセンターが519か所が配置されていた。今回は、1か所の地域の結核クリニックを訪問した。結核クリニックの医師である Dr. Jeetendra Pol (District Tuberculosis officer, Grakhpur, UP) に結核対策の現状について教えてもらった。このクリニックのスタッフは、患者登録事務を行っている Data Operator、顕微鏡検査を行う Laboratoritian、胸部レントゲン写真を撮る X-ray Technician、フィルムを現像する darkroom assistant が、各1名ずつ配置されていた。また、DOTS事業のためにDOTSワーカー (ボランティアスタッフらしい) がいて患者の服薬支援を行っていた。この結核クリニックでDOTSを正式に始められたのはインドの中では遅い方であり、最近である。平成17年の実績は6月8日から9月30日までの間で399人であった。

## 4. 結核菌検査の実施状況について

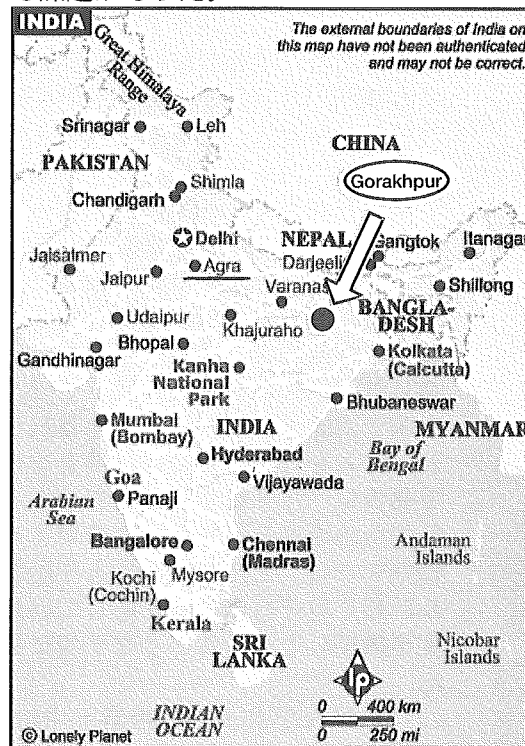
### 1) 結核菌検査内容について

結核患者の菌検査の実施状況は、塗抹検査のみであり、培養検査はルーチンでは行われていなかった。また、菌の同定および感受性検査は治療当初には行われていない。治療終了時の検査で排菌している者に対してのみ結核菌の感受性検査が行われていた。

### 2) 結核菌株の保管、保存について

結核クリニックにおいては電気はきていたが、結核菌株を保管する冷蔵庫な

どの設備が整っていない。また、現在使用している検痰容器も検体を保存するのに適さない容器であった。菌株の保存、菌の培養検査は医科大学病院では行うことができるが設備が不十分と言うことであった。菌株の収集を行うためには、地域の結核クリニックや顕微鏡検査センターで採取した検体を保管、搬送する手段やシステムについても課題があった。



地図4. インド

## [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

従来の研究では、基礎研究用として広範に使用されている p c DNA 3. 1 ベクターを用いて目的の遺伝子 (IL-12 および HSP 65) の発現を行ない、結核ワクチンとして優れた有効性を示すデータを取得した。p c DNA 3. 1 は遺伝子の発現効率の高いベクターであるが、それをベースとするプラスミド DNA の製造にはアンピシリンを使用するため、残留する抗生物質によりアレルギーを誘発する可能性がある。そのため、臨床応用を考慮する場合にはアンピシリン

耐性遺伝子以外のマーカー遺伝子を持つプラスミドベクターを使用する事が望ましい。

そこで、臨床応用を行なうためのプラスミドベクターとしてカナマイシン耐性遺伝子をマーカー遺伝子として持つ発現ベクター (pVAX1) を選択し、DNAワクチン開発用のベクターの構築を行った。pVAX1はDNAワクチン用に開発されたベクターで、発現ユニットはpcDNA3.1ベクターと共通であるため、同様に広範な組織で高発現を期待する事ができる。そこで、目的の遺伝子 (ヒト、マウス、モルモットのIL-12遺伝子、HSP65遺伝子) を新規プラスミドベクターへ組換えを行って、目的の発現プラスミドを得た。制限酵素マップや配列確認により構築の確認を行なった後に、有効性試験に使用するプラスミドDNAの大量調製を行った。大量調製したプラスミドDNAは、デリバリーシステム兼アジュバントであるHVJ-Eへ封入を行なった後に、検査を行なって品質レベルを確認し、結核ワクチン評価のため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) のそれぞれの目的に応じて容量や濃度を調整した後に各アッセイ用に供与した。

## (2) DNAワクチンの用量・用法を設定するための研究

有効性評価や臨床応用のために使用するDNAワクチンは、バイオ医薬の範疇に分類されると考えられる。そのため、制限酵素マップや配列確認等の検査に加えて、特性 (力価) に関する検査を行なう必要がある。また、力価測定の結果と有効性評価のデータをもとにして用法用量設定を進める必要がある。そこで、力価検定のためのアッセイ系を構築し、実際に使用するプラスミドDNAを用いて測定を行った。

力価検定法としては、HVJ-Eベクターがアジュバントとして免疫を賦活化する活性を測定するアッセイと、薬効成分である遺伝子発現プラスミドによる目的蛋白質の発現量を測定するアッセイを選択した。免疫の賦活化については、サイトカイン遺伝子の発現を増強するNF-

$\kappa$ B活性化を指標とするアッセイ系を構築して測定を行った。その結果、再現性の高いデータを取得する事が出来たので品質管理試験として適切である事が明らかとなった。また、発現プラスミドの力価検定として、培養細胞に導入後に発現される蛋白質を定量するアッセイを選択し、IL-12についてはELISA法を、HSP65についてはウェスタンブロット法を構築して測定を行った。その結果、構築した発現プラスミドをBHK細胞に導入する事で、目的の蛋白質が発現する事が確認された。

今後、標準操作手順書 (SOP) の整備やバリデーションを実施することでアッセイのレベルを臨床応用レベル (治験薬GMPレベル) としていく予定である。

## (3) DNAワクチンの製造技術の検討

本研究で開発するDNAワクチン製剤を使用して臨床応用を開始するためには、治験薬としての品質レベルをもつ製剤を開発する必要がある。開発を行っているDNAワクチンは薬効成分であるプラスミドDNAと、アジュバント兼デリバリーシステムであるHVJ-Eから構成されており、それぞれについて品質を管理し、最終製剤化を行なう必要がある。そこで、本年の研究では薬効成分であるプラスミドDNAに関しては遺伝子治療薬のガイドラインに従った品質管理項目を設定して大量製造を行い、HVJ-Eベクターに関しては上記のような力価検定を品質管理項目として追加して検討を行った。

薬効成分であるプラスミドDNAの品質管理項目としては、現段階で必要とされる品質グレードとしては動物試験での薬効評価に使用できる品質レベルであるので、表2に示す管理項目を設定して製造を行った。数バッチの製造を行ったプラスミドDNAについて検討を行った結果、現在の製造プロトコルで、いずれの項目についても目的とするレベル以上の品質グレードを確保できる事が明らかとなった。

一方、HVJ-Eベクターの品質管理については、図16、図17に示すプロトコルで工程管理を行いながら製造を行い、プラスミドDNA封入前の原末の

段階で品質管理を行っていた。本年度の研究では、従来実施していたベクター原末の試験項目に加えて、上記のようにDNAワクチン製剤としての力価検定に必要な項目を追加して検討を行った。

製剤化検討については、従来法ではスケールアップが困難であったため、実製造に適した簡便な封入法を開発した。今

後、力価検定や有効性評価で同等性を確認する予定である。また、製造技術・製剤技術の開発に加えて、治験薬GMPグレードの製造施設に関しても、施設移転に伴う整備を進めた。

表2.製造したプラスミドDNAの品質管理項目

試験項目	指針上の試験項目	試験方法
無菌性	生菌数限度試験	
エンドトキシン	LAL	比色法(≦0.5EU/ug DNA)
同定	plasmid size, restriction map	制限酵素切断、Agarose gel 電気泳動
純度	UV absorbance	A260/A280≧1.8, スペクトル、ピーク
	agarose gel electrophoresis	予期した断片以外は検出されない
濃度	UV absorbance	(OD260)1= 50ug/mL
力価/遺伝子発現	動物細胞にTFして、発現を確認。	ELISA
厳格な純度	<i>E. coli</i> protein	ELISA
厳格な同定	full plasmid DNA sequence determination	発現ユニットのみを確認 Promoter~PolyA
外観		目視
液量		重量
小分け	適切な用量を含む	融解が容易に可能

図16. HVJ-Eベクター原料の生産工程  
(バイオリアクターシステムによる製造)

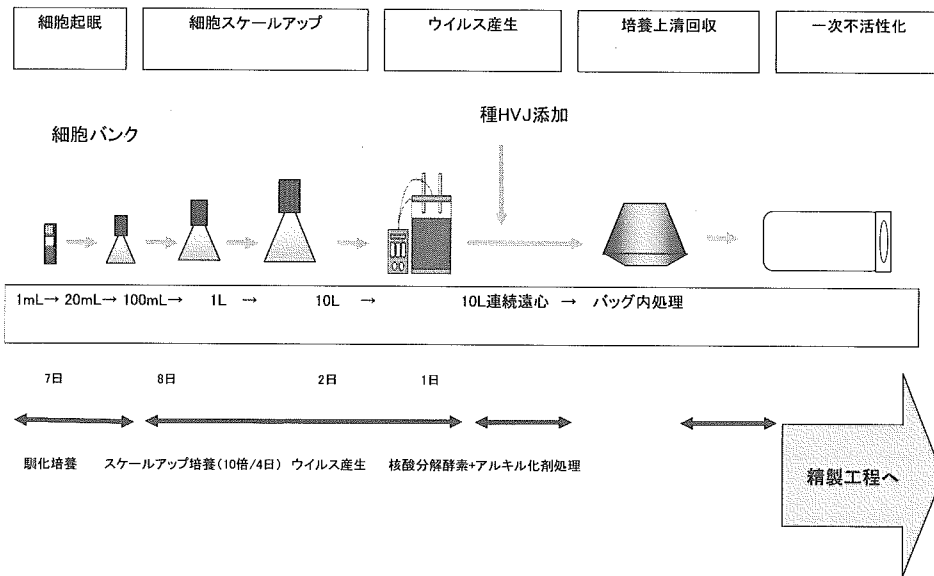
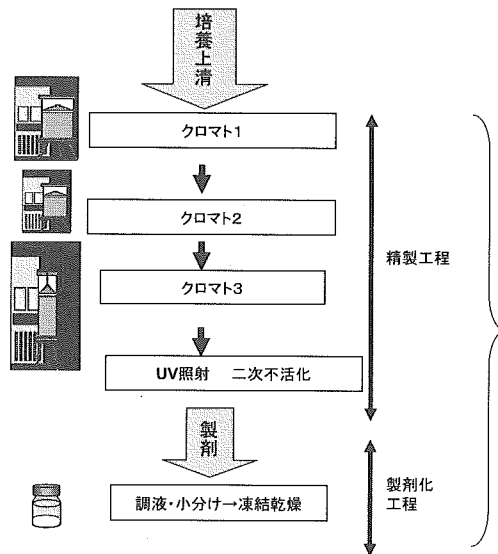


図17. HVJ-Eベクターの精製行程  
(カラムクロマトシステムによる精製)



[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：  
通常健常成人での第一相臨床試験 (Phase I) へと移行する場合、安全性を担保するだ

けの十分な根拠（毒性，ADMEなどの非臨床試験成績）及び有効性を示唆する根拠（薬理試験などの非臨床試験成績，さらに医薬品（この場合，DNAワクチンあるいはベクター）の品質・規格に関するデータを

準備する必要がある。医薬品製造販売承認申請に用いることを前提に、毒性試験に関してはGLP基準、臨床試験ではGCP基準、品質・規格では関連する標準規格基準（合成品の場合、日局など）を遵守して実施されなければならない。

臨床第1相試験へ移行するために最も重要な前臨床試験である安全性評価試験について、関連すると思われるガイドラインとして、バイオ医薬品の非臨床安全性評価の実施に関する注意事項（ICHガイドラインS6）が、医薬審第326号、平成12年2月22日付で通知されているが、記載事項をみると『本ガイドラインはウイルスワクチン、DNAワクチンに適用されない』という記載がある。したがって、日本にはワクチンの毒性評価するためのガイドラインがなく、現在検討段階であることが判明した。但し、欧州においては『Preclinical Pharmacological and Toxicological Testing of Vaccines』と題したガイドラインが、また『WHO Guidelines on Nonclinical Evaluation of Vaccines』題したガイドラインがWHOより発表されている。

現行ワクチンは、2つのプラスミドが別々のベクターに封入されており、現状のままでは、配合比率の問題など様々な問題が派生してくることが予想された。

#### [XII] 国立病院機構政策医療(54施設)呼吸器ネットワーク

当国立病院機構近畿中央胸部疾患センターは呼吸器疾患（結核を含む）準ナショナルセンターとなった。日本の結核患者数の43%の診断・治療を行っている、国立病院機構54施設を統括し、国立病院機構政策医療呼吸器ネットワークを用いて結核の新しい予防・治療法の確立を全国規模で行う。

坂谷光則を中心に

- (1) 結核予防ワクチン：すでに、マウス、モルモットの結核感染モデル動物実験のみならずヒトの結核感染に最も近いと折り紙つきのカニクイザル (Nature Medicine 1996) のレベルで新しい結核ワクチン①HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン ②リコンビナント72f BCG等が結核予防ワクチンとして有効である事が示された。したがって、結核予防ワクチンの臨床応用としてPhase I study（健常人で行う PPD皮内反応 副作用

PBL免疫反応) Phase II study [日本

(当国立病院機構近畿中央胸部疾患センターを中心として政策医療呼吸器ネットワーク) フィリピン ブラジル インド 南アフリカ等結核発生率の低下]、Phase III、Phase IVを行う計画をたてた。結核予防効果の判定には最低数年以上かかる。

- (2) 結核治療ワクチン：HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンはマウスの系で治療効果を示した。さらにHSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン+BCGワクチンはこれより強い治療ワクチン効果を示した。またAdex (IL-6 + IL-6R + gp130) DNA ワクチンは治療効果を示すことをすでに報告した。したがって①HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン ②HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNA+BCG ワクチン ③Adex (IL-6 + IL-6R + gp130) DNA ワクチン ④リコンビナント72f ワクチンを単独又は組み合わせ、治療ワクチンの開発計画を立案した。さらに、

- (3) 多剤耐性結核菌に対する治療ワクチン
- (4) PPD (ツ反) DPPD皮内反応、及び Quantiferon (ESAT-6 + CFP-10) テストによる結核特異的診断法の開発。これらの(1)～(4)の臨床応用を国立病院機構政策医療呼吸器ネットワークを利用して行う予定である。

#### [XIII] 多剤耐性結核の薬剤耐性遺伝子の解析

- (1) SRLN の外部精度管理用株を用いた MGIT AST システムの評価  
WHO/IUATLD の SRLN で精度管理に使用している 50 株の臨床分離結核菌および結核菌標準株 H37Rv を用い MGIT AST の検査精度を評価した。同時に 7H10 比率法で検査を行い比較した。INH と RFP の感受性検査について、MGIT AST の成績は SRLN の結果と完全に一致した。感度、特異性、一致率、PV-R、PV-S はすべて 100%であった。7H10 比率法の結果も MGIT AST とまったく同様であり、いずれも 100%であった。SM に対する感受性検査で SRLN の結果と不一致となった菌株は MGIT AST と 7H10 比率法でそれぞれ 1 株ずつ認められた。それらのうち 1 株は SRLN の結果が耐性を MGIT AST で感受性として、別の株は SRLN で耐性と判定

した株を 7H10 比率法で感受性と判定していた。SM 検査における MGIT AST および 7H10 比率法の SRLN の結果との一致率は 97.9%であった。EB に対する感受性検査で SRLN の成績と不一致の結果を示した菌株は MGIT AST で 4 株、7H10 比率法で 2 株認められた。MGIT AST で不一致であった 4 株いずれも SRLN で耐性と判定したものを感受性と判定していた。一方 7H10 比率法で不一致の結果を示した 2 株とも SRLN で感受性と判定した菌株であり、7H10 比率法で耐性と判定していた。MGIT AST の SRLN の結果との一致率は 91.7%、7H10 比率法の一致率は 95.8%であった。

(2) MGIT AST 検査用チューブに菌接種後結果が得られるまでに要した日数は 6 日から 11 日の範囲であり、中央値は 7 日であった。一方 7H10 比率法の所要日数は 3 週間であった。MGIT AST と小川比率法による INH 感受性検査の比較臨床分離株を用いた MGIT AST の評価中に INH 感受性検査で小川比率法の結果と不一致の結果を示す株の存在が認められた。それらは MGIT AST で耐性のものを小川比率法で感受性と判定していた。この種の菌が全国各地に広がっているのかどうかを調べるために北海道から九州までの 12 施設で分離された結核菌 1,122 株を調べた。治療歴別の成績を表 2 に示した。分与された株のうち 10 株は培地汚染または発育がみられなかったため除かれ、1,112 株を調べた。

MGIT AST で 96 株 (8.6%)、小川比率法で 66 株 (5.9%) が INH 耐性と判定された。すなわち MGIT AST で INH 耐性と判定された 96 株のうち 30 株 (31.3%) は小川比率法で INH 感受性と判定されたことが分かった。不一致を示した分離株の割合は初回治療例で 48.1% (25/52)、既治療例で 11.4% (5/44) であり、初回治療例で約 4 倍高かった。不一致の結果は全国各地で分離された株にみられ、分離頻度に大きな差はみられなかった。次に不一致の結果を示した 30 株について MGIT 960 と 7H10 寒天培地で MIC を調べた。MGIT 960 での測定で 6 株は 0.4  $\mu\text{g/ml}$ 、残りの 24 株は 0.2  $\mu\text{g/ml}$  の MIC 値を示し、感受性検査に用いている濃度の近くに MIC を持

つ菌株であることが分かった。7H10 寒天培地による検査で 18 株は 0.8  $\mu\text{g/ml}$ 、10 株は 0.4  $\mu\text{g/ml}$ 、2 株は 0.2  $\mu\text{g/ml}$  の MIC を示し、2 株を除き 28 株は INH 耐性の表現型を示した。

### (3) アジアの研究所との研究協力

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。INH 低レベル耐性菌がシンガポールにも存在するかどうかを調べることを目的とし、シンガポール総合病院と共同で研究することが決まった。研究は同意書にサイン後次年度よりスタートする。

### 〔XIV〕新しい結核ワクチンの開発

今までの結果をまとめると

(1) DNA ワクチン：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。

HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは、カニクイザル (最もヒト結核感染に近いモデル Nature Med. 1996) で強力な抗結核予防効果を示した。延命効果、胸部 X 線所見 (結核病巣)、血沈、体重で強い改善傾向がみられた。さらに、HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンはモルモットの系でも BCG より強力な画期的な結核予防ワクチンであることを明らかにした。病理形態学的解析も進展した。すなわち、新しい結核ワクチン (① HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン、② リコンビナント 72f BCG ワクチン、③ 72f 融合タンパク + BCG 東京ワクチン) による結核病巣形成予防効果について、マウスモデル、モルモットモデル及びヒトの結核感染に最も近いカニクイザルのモデルを用い、病理形態学的に解析した。

BALB/c マウス、モルモット、カニクイザル (cynomolgus monkey) に上記の三種の新しい結核ワクチンを 3 回投与しヒト型結核菌強毒株を感染させた。マウスでは 5 ~ 10 週後、モルモットでは 6 週後、カニクイザルでは 6 ヶ月から 12 ヶ月後の結核病巣形成 (肉芽腫 (granuloma) 形成および単核球浸潤) をコントロールと比較し



た。HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNAではマウス、モルモットで著明なgranuloma形成抑制効果、肺結核病理像の改善効果がBCG東京ワクチンよりも有意に強く認められた。リコンビナント72f BCGワクチン投与モルモットでも肺結核病理所見の改善がBCG東京ワクチンよりも強く認められた。

(2) リコンビナント72fBCGワクチン

r72f BCGはマウス、モルモット、サルでBCGよりも強い結核予防ワクチン効果を発揮することを明らかにした。

これらの①HVJ-liposome/ HSP65 DNA+ IL-12 DNAワクチン、②リコンビナント72f BCGワクチン ③72f fusion蛋白ワクチンを免疫したカニクイザルの生存率と免疫増強効果、血沈、体重の改善効果は相関した。

(3) Priming-Booster法で最も強力な新しい結核ワクチンを作製しつつある。本邦では乳幼児にBCG接種を行う。したがって成人におけるboosterワクチンとして上記のワクチン①HSP65DNA+ IL-12DNAワクチン、②r72f BCGワクチン、③72f fusion蛋白ワクチンを用いたモデルを62頭のサルの系で行った。PrimingはBCG東京ワクチンを用い、すでに免疫をした。4ヶ月後からboosterワクチンを投与。

Priming-Booster法は2003年第一回国際結核ワクチン学会で結核ワクチン効果を得る極めて良い方法であるとのコンセンサスが得られた。

(4) 新しい治療ワクチンの開発：

IL-6関連遺伝子ワクチン(Adenoウイルスベクター/ IL-6 DNA+ IL-6レセプターDNA+ gp130 DNAワクチン)は初めて結核治療ワクチンとしても有効であることを示した。

(5) ① 1000倍発現効率が非常に高い画期的なAAVベクターワクチンを開発した。

AAV (2/5) 型ベクターに組み込んだHSP65 DNAワクチン すなわちAAV (2/5) / HSP65ワクチンは、今までのAAV (2/1) / HSP65 DNAワクチンに比しHSP65蛋白抗原に対するT細胞免疫反応を極めて強く増強した。さらに、AAV (2/5) / Ag85B DNAワクチンもAg85B蛋白に対するT細胞反応を増強した (ハーバード大学医学部R. C. Mulligan教授との共同研究)。

すなわち、これらのワクチンをBALB/cマウス又はC57BL/6マウスに投与すると、極めて強力な結核菌特異的キラーT細胞の分化やヘルパーT細胞増殖増強効果が認められた。又IFN- $\gamma$ 産生の強い増強が認められた。特にAAV (2/5) / HSP65 DNAワクチンは $1 \times 10^{10}$  AAV particleで誘導されるワクチン効果と $1 \times 10^{11}$  AAV particleで誘導されるワクチン効果と同等であった。これらのワクチンによりT細胞活性化が認められた。このことより、有力な結核ワクチンとなることが示唆された。

② Adenovirusベクター/ HSP65 DNA及びAdenovirusベクター/Ag85B DNAワクチンも作製した。これらのワクチンも強力なT細胞免疫誘導効果を示した (Mulligan教授との共同研究)。

③ 弱毒化したリステリア菌 (act geneを欠損させた) にAg85A, Ag85B, MPB51 DNAを導入し免疫したマウスは結核感染予防効果を示した。我々が世界に先駆けての報告となった。

④ バキュロウィルスはヒトに感染しない安全性の高いウイルスベクターである。現在までにマウス、モルモット、ヒトよりIL-12遺伝子をクローニングし、DNAワクチン用高発現ベクターを独自に開発した。これにより、実験動物として、マウス、モルモット、カニクイザルを用いてHVJリポソームDNAワクチンを評価することが可能となった。現在、DNAワクチンを接種したカニクイザルでは、致死量の結核菌を接種されてもレントゲン検査で結核病巣の陰影を見ることもなく、長期生存を続けている。GMPレベルで生産したHVJエンベロープは、本年度より本格的にマウスモデルの実験を開始した。BCGで初回ワクチンをした後、Hsp65+IL-12/Envで追加ワクチンを行うと、BCG単独と比較して1万倍もの強力なワクチン効果を示すことが明らかとなった。並行して、治療用ワクチンとしての効果も検討中である。

バキュロウィルスはヒトに感染しない安全性の高いウイルスベクターである。昨年度作製した (i) Hsp65タンパクをウィルスビリオン上に提示した組換えバキュロウィルス (ii) Hsp65遺伝子

をCMVプロモーター下流に挿入した組換えバキュロウィルスの二種類の組換えバキュロウィルスは、マウスマクロファージRAW264.7細胞に作用し、NOの発現を強力に誘導することを見出した。結核菌は、マクロファージの細胞内殺菌をエスケープして増殖する。活性化マクロファージでは結核菌に対する殺菌活性が亢進するが、その重要な役割を果たしているのがNOであると考えられている。バキュロウィルスワクチンによりこの抗菌エフェクター分子であるNOが誘導されたことは、ワクチン開発に大きな期待がもたれる。今後、上記の確立した動物実験系を用いて解析を行っていく予定である。

⑤ 感作と追加免疫を異なったベクターで行う所謂「ヘテロ免疫法」は強力な免疫能を誘導することが知られている。日本人はBCGで感作を受けている。そこで、我々は結核に対する追加免疫に有効なワクチンの研究を行った。1) 第三世代レンチウイルスベクター：MPT51またはHsp65を発現する安全なレンチウイルスベクターを作製した。このワクチンの経気管接種により、縦隔リンパ節に特異的T細胞を誘導できた。

- 1) 抗原提示細胞の動態：ワクチン経気道接種後の肺胞洗浄液 (BALF) 細胞におけるGFPを観察したところ、接種後1週から発現し、2週でピークとなった。このGFPを発現している細胞は全てCD1c陽性であり、一部はMHCクラスII (I-A<sup>b</sup>)を発現している成熟樹状細胞であった。また、このGFP陽性細胞は縦隔リンパ節に移行することが観察された。
- 2) MPT51特異的T細胞の誘導：テトラマー法により、特異的CD8<sup>+</sup>T細胞を縦隔リンパ節と脾臓で測定した。縦隔リンパ節ではワクチン接種2週後から特異的CD8<sup>+</sup>T細胞が出現し、3週後にピークとなり、その後、終息した。脾臓では特異的CD8<sup>+</sup>T細胞は検出出来なかった。
- 3) IFN- $\gamma$ 産生：MPT51ペプチド刺激によるIFN- $\gamma$ 産生で、特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の存在を検討したところ、縦隔リンパ節で大量に、脾臓でも少量産生がみられた。脾臓

にも若干特異的T細胞が存在すると考えられた。

- 4) 再刺激によるT細胞の誘導：ワクチン接種2ヶ月後にBCGを経気道的に感染させたところ、5日後に肺に特異的CD8<sup>+</sup>T細胞が出現し、記憶T細胞が誘導されていることを確認した。興味あることに、この際に縦隔リンパ節に特異的CD8<sup>+</sup>T細胞は認められず、チャレンジ2ヶ月後に再発現した。このことは、記憶CD8<sup>+</sup>T細胞がBCG感染に伴って、縦隔リンパ節から動員されることを意味する。
- 5) ヘテロ免疫とキラー活性：レンチベクターで感作し、BCGで追加免疫することで、縦隔リンパ節に強いキラー細胞を誘導できた。このことは、このヘテロ免疫の感染防御における有用性を示唆する。

(6) リコンビナントBCGワクチン：チミン要求性を指標とした、薬剤耐性遺伝子をマーカーとして使用しないBCG宿主-ベクター系構築のため、BCG thyA欠損株の作成をおこない、thyA欠損株の候補株を得た。

- (7) 我々が世界に先駆けて開発したSCID-PBL/huの系で結核患者リンパ球をSCIDマウスに生着させ、結核蛋白ESAT-6ペプチドで免疫し、画期的な結核菌に対する生体内ヒトT細胞免疫解析モデルを開発した。さらに、IL-2レセプター $\gamma$ 鎖ノックアウトSCID-PBL/huのモデルでヒト多剤耐性結核治療モデルを世界に先駆けて開発した。
- (8) 一方、我々は世界に先駆けて多くのヒトに感染するSuper Spreader多剤耐性結核菌SS 0308-0783株 (一人のSuper Spreader患者から多数のヒトに感染) を発見した。IL-2R (-/-) SCID PBL/huモデルで治療ワクチン・治療薬を解析中。

[XV] スーパースプレッダー多剤耐性結核

(1) まず当院で経験した再感染を含む多剤耐性結核の院内集団感染事例の概要を述べる。初発患者は56歳男性の初回多剤耐性肺結核で、INHとRFP以外に多くの薬剤に耐性を示している。巨大空洞があり、咳も強いため多量排菌が続いていた。この患者から2つの病院で、患者家族1名、担当した看護師2名、接触のあった全剤感受性結核で治療中であった入院患者2名に後に多剤耐性結核が発症した。全員から検出した結核菌の薬剤感受性パターン、RFLPパターン、spoligotyping patternが一致

し、初発患者から感染・発病した可能性が高いと考えられている。従来予想に反して多剤耐性結核の一部に感染性の高い株があることが予想されたので、当院に保存している多剤耐性結核菌109株のRFLPによる分析を実施した。109株中42株が12のクラスターを形成した。クラスターの最大のもは10株が所属しており、全体のクラスター形成率は38.5%であった。一方全剤感受性結核菌226株に同様の検討を実施したところ、クラスター形成率は37.2%であった。Spoligotypingにおいて感染力が強いと言われているBeijing familyの占有率は、多剤耐性で76.1%、全剤感受性で79.6%となった。今回の検討から多剤耐性結核菌の感染様式が全剤感受性菌と大きく変わらない可能性が示唆された。

(2) 結核菌培養陰性例・非結核性抗酸菌混在例における耐性遺伝子を利用した薬剤感受性検査の検討。

臨床的に結核再発が強く疑われ、塗抹とPCR-TBが陽性ながら卵培地・液体培地ともに陽性にならない2症例と、培養は陽性ながらPNB培地上での発育も見られNTMの混在が明らかな3症例に耐性遺伝子検査を実施した。培養陰性の一例はINH・SM耐性、もう一例はRFP・SM耐性と判定された。通常の薬剤感受性検査が出来ないため、結果の妥当性は判定不能である。しかし薬剤感受性に従った治療で両者とも順調に改善しており、臨床的には有用と判断している。一方NTM混在例は、SM耐性2例、EB耐性1例で、純培養後の通常の薬剤感受性とほとんど一致しており、臨床的にも有用であった。

[XVI] キラーTと結核菌殺傷蛋白による結核症の病態解明：15K granulysinによる新しいpathwayと予後診断法を発見した。又15K granulysinがキラーTから分泌されMφにとり込まれMφ内の結核菌を殺す新しいpathwayを発見した。

Granulysin Transgenicマウスを作製した。

1. 多剤耐性結核患者PBLのgranulysin mRNA, TRAIL mRNA, 及びgranulysin発現の著明な低下を明らかにした。すなわち新しい結核予後診断法を確立した。
2. 抗結核キラーT細胞から産出される granulysin (15kdのgranulysin (15K Gra)) がMφ内結核殺傷に極めて重要な役

割を果たしている発見をした。

3. 15K Gra DNAワクチンは結核予防効果を示した。
  - (a) CAG 15K Granulysin DNAワクチン
  - (b) CAG 9K Granulysin DNAワクチン
  - (c) CAG分泌型9K Granulysin DNAワクチン
  - (d) Adenovirusベクター/ 15K Granulysin ワクチン
 をすでに作製した。
4. 多剤耐性結核患者キラーT細胞のGra蛋白発現及びKiller Secretory Protein (KSP37)の著明な低下を認めた。すなわち新しい結核予後診断法を確立した。
5. 15K Gra Transgenicマウス、9K Gra Transgenicマウスを初めて作製し、世界に先駆けて15K Graの生体内抗結核作用を明らかにした。さらに15K granulysin transgenicマウスは生体内の抗結核菌殺傷作用のみでなく、結核に対するキラーT細胞の分化誘導を増強した。また、結核菌に対するT細胞増殖能増強作用とIFN- $\gamma$ 産生増強効果を示した。一方、9K granulysin transgenicマウスも15K granulysinと同様の効果を生体内で示した。
6. 多剤耐性結核患者キラーT細胞、NK細胞から産生され、血清中に流れているkiller secretory protein37 (KSP37)の著明な低下を認めた。
7. KSP37 transgenicマウスを作製した。
8. 結核菌殺傷とマクロファージ：
  - (1) MAPカインースの活性化が殺菌能に及ぼす影響。

M型Mφでは、結核菌感染によりP38MAPK 及びERK1/2の活性化が誘導されたことより、P38MAPKの阻害剤SB203580及びERK1/2の上流にあるMEKの阻害剤PD98059の結核菌増殖抑制活性への影響を検討した。その結果、SB203580添加群では対象群に比べ菌数が約2倍となったが、PD98059添加群では対照群と差を認めなかった。GM型Mφでの結核菌の増殖に対しては、これらの阻害剤は影響を与えなかった

(2) Mφからの結核菌殺菌分子の産生能。

結核菌感染M型Mφの培養上清は、結核菌H37Rvの増殖を抑制した  
しかし、結核菌非感染M型Mφの培養上清や結核菌感染及び非感染GM型Mφの培養上清にはそのような抑制作用は認められなかった。

結核菌感染M型Mφの培養上清は、BCG菌やM. avium菌の増殖も抑制した。

(3) M型Mφ及びGM型Mφのカタラーゼ産生の違い。

M型Mφ及びGM型Mφのカタラーゼ産生能について検討した結果、M型Mφではコロニー刺激因子(CSF)依存性であるが、GM型MφではCSF非依存性であり、その産生量も多いことが知られた。このカタラーゼはM型MφではBCL-2の発現を、GM型MφではBCL-X<sub>L</sub>の発現を誘導しMφの生存に関与していることが知られた。ヒトの肺胞Mφのカタラーゼ産生能、及びカタラーゼによるBCL-2ファミリー遺伝子発現は、GM型Mφと同じであった

[XVII] 種々のTLR(-/-)関連マウスと多剤耐性結核菌を用い、初めて多剤耐性結核菌のTLRからのエスケープ機構が示唆された。

1. Super Spreader MDR-TB菌(SS 0308-0783株)や他の通常のMDR-TB菌又は薬剤感受性TB菌を種々のTLR(-/-)やMyD88(-/-)マウス等に投与して解析したところ、ある種のMDR-TBはToll like関連レセプターの認識機構をエスケープする可能性が示された。すなわち通常のヒト結核菌H37RvはTLR2とTLR4の認識を受けるが、Super Spreader MDR-TB菌(SS0308-0783株)はTLR2とTLR4の認識機構からエスケープした。これは結核菌数、キラーT細胞分化、T細胞増殖、IFN-γ産生の系で解明された。

[XVIII] 多剤耐性結核に対する新しい治療法の開発

国立病院機構東京病院倉島らは治療法のない多剤耐性結核4例に対し活性化自己T細胞(キラーT細胞)輸注療法を東京医科歯科大学難治疾患研究所および国立国際医療センターとの共同研究で世界で初めての治験を行い、4例中3例で投与期間中の菌陰性化を達成した。1例では胸部CTの結核異常陰影の著明な改善を認めた。またこの経過でツベルクリン反応の増大とIFN-γ産生能の上昇を認めた。

さらに、多剤耐性結核に対する新しい化学療法剤の開発も進展した。この新しい化学療法剤と我々が開発した新しい結核ワクチンの組み合わせにより画期的な治療法が開発されることが示唆された(松本、岡田)。極めて難治な感染症治療として自

己活性化T細胞輸注が注目され、NK細胞増殖をきたすLAK療法と異なりT細胞のみの増殖であり副作用が少ない。多剤耐性結核では結核菌に対する宿主免疫応答が低下しており、本邦の適応疾患となる可能性が考えられる。排菌持続陽性の多剤耐性結核で、過去3ヶ月間に治療薬剤の変更がない患者を対象に、活性化T細胞輸注療法の有効性について調べるとともに安全性も確認する。

[XIX] 臨床応用に向けての対策

1. (新しい結核ワクチン・診断法の臨床応用へのネットワーク組織作製)  
現在、国立病院機構のネットワークであるHOSPnet内に全国の呼吸器基幹8施設を中心とした政策医療呼吸器ネットワーク支援システム(K-net)を構築中であり、肺結核に関しては国立病院機構東京病院にサーバーを設置、リアルタイムオンラインでの結核症例登録システムを準備中である。(岡田、坂谷)種々のリコンビナント結核蛋白を用いて、多剤耐性結核患者と通常の結核患者及び健常人のPBLの反応性を検討予定である。(倉島、岡田)  
国立病院機構 政策医療呼吸器ネットワークが厚生労働省より正式に発足した。
2. 新しい結核ワクチンのGMPに準拠した製造。
3. 臨床応用に向けたGMPレベルのHVJ-liposome/ HSP65 DNA+ IL-12 DNAワクチンの開発(HVJ-Envelopeベクター)が進行中である。

D. 考察

[将来計画]

1. 開発した結核ワクチン(Hsp65+IL-12 DNA ワクチン)を流行地(アジア地域等)で臨床応用し、結核予防ならびに結核治療を行う。平成18~19年はこのワクチンの第I相臨床試験。
2. 開発した結核ワクチンならびに化学療法剤(opc)を流行地で活用し、多剤耐性結核治療。
3. 開発したワクチン・診断法を呼吸器ネット及びWHO ネットワークを用い、全国・全世界に普及。
4. granulysin とTLR認識をさらに解明し、薬剤耐性を生じない新しい機序の結核治療剤を開発。
5. BCGに代わる1万倍強力な結核ワクチン(Hsp65+IL-12DNA ワクチン)・化学療法剤

・granulysin 予後診断法は日本、世界の結核対策に貢献し、日本国内行政・国際協力施策に極めて重要。

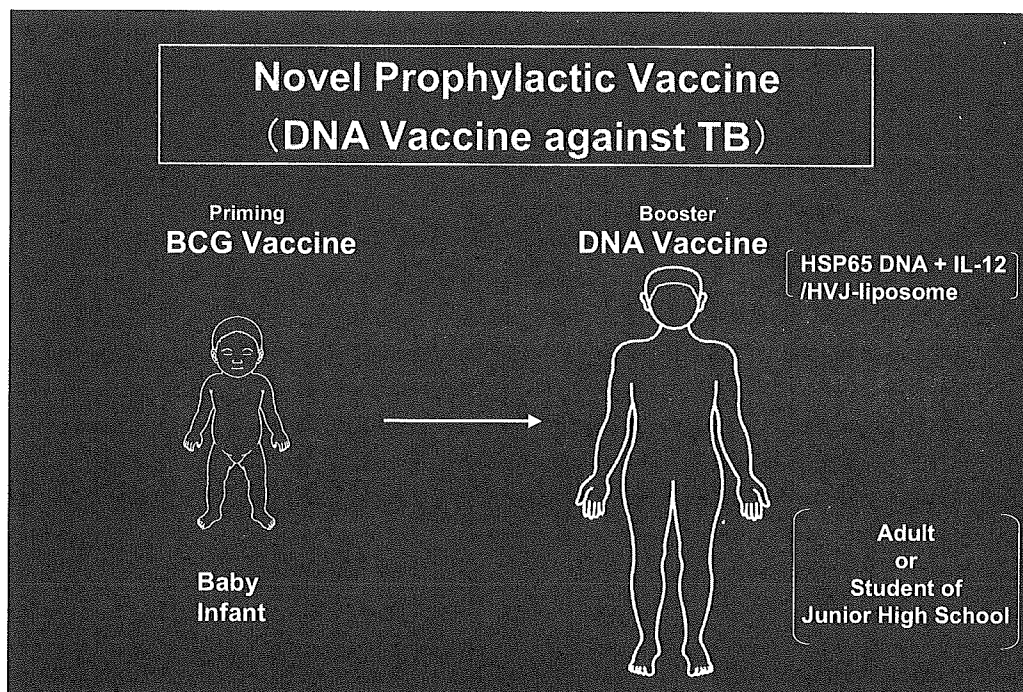
6. 国立病院機構政策医療呼吸器ネットワーク 54 施設を活用し、多くの国民に実施できる行政施策。
7. スーパー・スプレッダー多剤耐性結核の発見・研究は結核病室の個室化等の重要な行政施策。
8. 新しい結核予防ワクチン・結核治療ワクチン (HVJ/Hsp65+IL-12DNA ワクチン) の臨床応用

- (1) 開発した結核ワクチン (HVJ/Hsp65+IL-12DNA ワクチン: BCG ワクチンより1万倍強力) がマウスのみでなくモルモットの系でも HVJ-リポソーム/Hsp65+IL-12 DNA 及びBCGと比較してはるかに強力な予防ワクチン効果を示すことを解明する。
- (2) 開発したこの結核ワクチン (Hsp65+IL-12 DNA) を流行地 (日本、アジア地域、アフリカ、南アメリカ等) で臨

床応用し、結核予防ならびに結核治療を行う。

- (3) このワクチン効果はBCGでプライムし開発したワクチンでブースターする方法が最も強く、本邦において乳幼児 (BCG・プライム) -成人 (開発したワクチン・ブースター) で結核予防を行う。日本では乳幼児にBCGを接種しており、Hsp65+IL-12DNA ワクチンは成人ワクチンとして極めて強力なワクチンとなることを証明する。(図18)
- (4) 開発した結核ワクチンを流行地 (日本、インド、中国、アジア地域) で活用し多剤耐性結核治療を行う。
- (5) 開発した結核ワクチン・新しい診断法を本邦の国立病院機構政策医療呼吸器ネットワーク (54施設より組織化され、本邦の50%の結核患者診療) を用い、全国に普及させる。当院は呼吸器疾患 (結核を含む) 準ナショナルセンターであり54施設を活用し、統括しうる。

図18



- (6) 開発したワクチン・診断法をWHO STOP TB Partnership (岡田がメンバー) のネットワークを用い、アジア・世界で臨床応用する。

- (7) HVJはすでにGMP (Good Manufacturing Practice) レベルであり、純国産のベクターで、基本特許を有することより、世界に普及させる。

- (8) このワクチンを多剤耐性結核患者に治療ワクチンとして用い、多剤耐性結核の制御と撲滅を目指す。
- (9) このHsp65+IL-12 DNAワクチンを第一候補ワクチンとして焦点を絞って研究を進展させる。すでにタイ国に臨床試験の共同研究者がいる。
- (10) BCGより1万倍強力な、我々が開発した結核予防ワクチンは他の研究室の結核ワクチンに比し1000倍強力な結核予防効果を示した。平成18～19年はこのワクチンの第Ⅰ相臨床試験を行う。さらに、これに基づき第Ⅱ相臨床試験を行う。第Ⅲ相臨床試験の後、厚生労働省の認可を得て臨床応用を目指す。
9. 新しい結核ワクチン組み合わせによる結核撲滅戦略  
HVJ/Hsp65+IL-12DNAワクチンとリコンビナント72f BCGワクチンを組み合わせ、更により強力なワクチンを創製する。
10. 新しい多剤耐性結核化学療法剤の臨床応用  
開発した結核ワクチンならびに化学療法剤(opc)を流行地(日本、インド、中国、アジア地域、アフリカ)で活用し多剤耐性結核治療を行う。
11. 多剤耐性結核・難治性結核の予後診断法の開発  
開発した新しい難治性結核予後診断法(granulysin、KSP37の測定による予後診断法)を流行地、特に日本、アジア地域で活用し知見の収集。
12. 結核菌殺傷蛋白(granulysin)の臨床応用  
granulysin機能解明とTLR認識をさらに解明し、(開発した多剤耐性結核治療モデルを用い)薬剤耐性を生じない新しい機序の結核治療剤を開発する。
13. スーパー・スプレッダー結核に対する制御とTLRアゴニストによる治療剤の開発
- (1) スーパー・スプレッダー多剤耐性結核のTLR認識エスケープと感染性を解明。この方法論を用い、流行地での多剤耐性結核の制御研究を行う。
  - (2) スーパー・スプレッダー多剤耐性結核の発見・研究結果を踏まえ、本邦の全ての結核病室の個室化等による多剤耐性結核制御を行う。

[アジアとのネットワーク研究を活用した多

剤耐性結核の制御]

(1) タイ:

本研究は非常にユニークな研究である。元々疫学上のコホート研究のために整備されたフィールドを臨床免疫学的研究に利用する学際的な研究である。本岡田班は、アジア地域との研究ネットワーク活用による研究開発であり、現地での研究基盤が欠かせない。この様な研究にはタイ国のチェンライ県の様に、地域ベースで20年近い地域結核登録データベースを持ち、しかも菌体保存を10年近くしている地域は非常に稀である。特に本研究の場合、結核菌のタイピングをして、前と同じ菌による再燃(reactivation)か、前と違う菌により再感染(reinfection)発病したものかにより、大きく解釈が異なるので、チェンライ県のフィールドは貴重である。これまで、システムの結核の再発と治療失敗の原因要因について、薬剤耐性菌出現の問題からの検討は一度、研究発表している(Development of acquired drug resistance in recurrent tuberculosis patients with various previous treatment outcomes. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 2004; 8(1):31-38)。症例の蓄積、PBMCの一部保存は進めているが、様々の要因、特に宿主側の要因検索は進んでいない。

コホートの取り込みはパイロット的に進めているが、来年度は取り込みをする病院を増やし、症例数を増加させて、内部比較も出来る様に進める。免疫応答の継時的な変化を見ながら、免疫マーカーの低下の状況と臨床的予後を明らかにする事を進めたい。分担研究者の慶長らと遺伝学的素因を調べるには、サンプル数が必要なので、Retrospectiveの取り込みを考慮する。Retrospectiveな取り込みが出来た場合、その過程で、この様な結核患者の長期予後の分析が出来ると思われる。免疫マーカーがこれらの群で低下している事実を突き止めた場合、それを指標として、何らかの免疫賦活療法が適応となるかどうか検討する研究をタイ側と協議し、当班長の目指している研究開発の基盤としたい。また、タイ保健省NIHやマヒドン大学の様な有力なタ