

2. M ϕ からの結核菌殺菌分子の産生能。
結核菌感染M型M ϕ の培養上清は、結核菌H37Rvの増殖を抑制した (Fig. 2)。

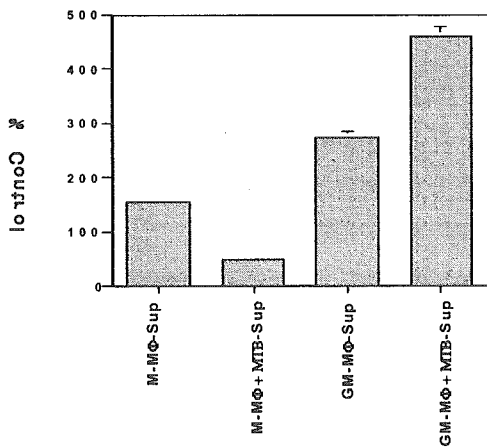


Fig. 2 Effects of culture supernatants of human monocyte-derived macrophages on the growth of *M. tuberculosis*.

しかし、結核菌非感染M型M ϕ の培養上清や結核菌感染及び非感染GM型M ϕ 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M ϕ の培養上清は、BCG菌や*M. avium*菌の増殖も抑制した。

3. M型M ϕ 及びGM型M ϕ のカタラーゼ産生の違い。

M型M ϕ 及びGM型M ϕ のカタラーゼ産生能について検討した結果、M型M ϕ ではコロニー刺激因子(CSF)依存性であるが、GM型M ϕ 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(Fig. 3)。このカタラーゼはM型M ϕ ではBCL-2の発現を、GM型M ϕ ではBCL-X_Lの発現を誘導しM ϕ の生存に関与していることが知られた (Fig. 4)。ヒトの肺胞M ϕ 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M ϕ と同じであった(Fig. 3、4)。

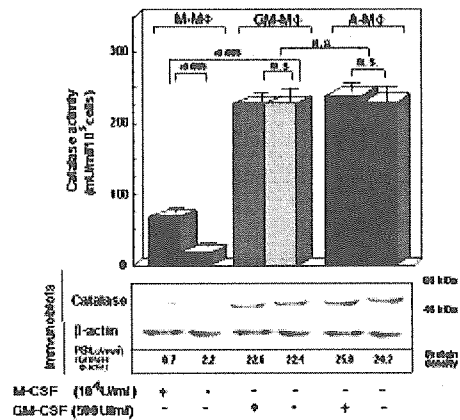


Fig. 3. Effects of CSFs on the production of catalase in human macrophages.

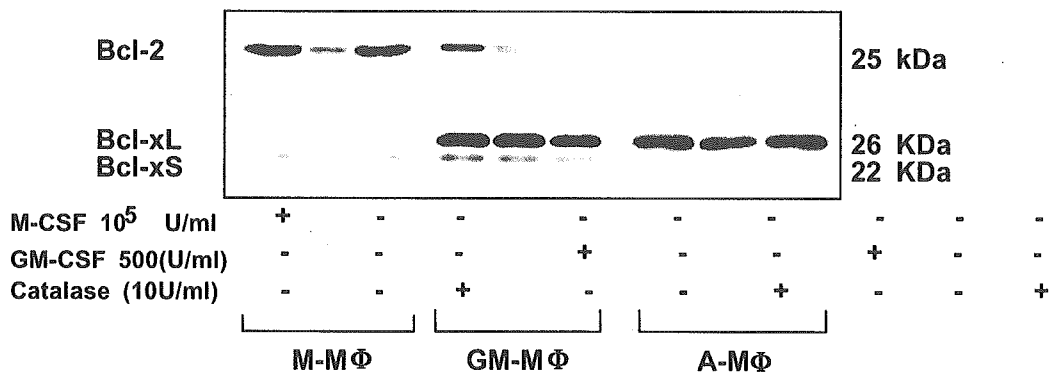


Fig. 4. Effects of CSFs and catalase on the expression of bcl-2 family proteins in human macrophages.

D. 考察

今回の結果より、M型M ϕ の結核菌殺菌活性には、ERK1/2よりP38MAPKの活性化が重要なことが示唆された。しかし、SB203580添加群の菌数は、GM型M ϕ に比べ遙かに少ないことより、P38MAPK以外のシグナル伝達分子がM ϕ の結核菌増殖抑制活性に重要なことが示唆された。今後、これらのシグナルの同定及びその活性化機構の解明が必要である。

結核菌感染M型M ϕ の培養上清は、結核菌、BCG、M.aviumのいずれの増殖も抑制する因子を産生していることが知られた。今後、この増殖抑制因子の本体を明らかにするとともに、薬剤耐性菌に対する増殖抑制活性の検討、またその産生増強法の検討が必要である。

M型M ϕ とGM型M ϕ では、カタラーゼ産生能が異なることが明らかになった。カタラーゼは、結核菌の増殖にポジティブに働くことより、このカタラーゼ産生能の違いもM型M ϕ とGM型M ϕ の結核菌感受性

の違いの理由の一つと考えられる。

E. 結論

1. M型M ϕ の結核菌殺菌活性には、ERK 1/2の活性化は関与せず、P38MAPKの活性化が一部関与するが、P38MAPK以外のシグナル伝達分子がM ϕ の結核菌増殖抑制活性に重要なことが示唆された。
2. 結核菌感染M型M ϕ は、結核菌、BCG、M.aviumの増殖抑制因子を産生することが知られた。
3. M型M ϕ とGM型M ϕ あるいはヒト肺胞M ϕ はカタラーゼ産生能が異なり、M型M ϕ ではコロニ刺激因子(CSF)依存性であるが、他の2つのM ϕ 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。
4. カタラーゼはM型M ϕ ではBCL-2の発現を、GM型M ϕ と肺胞M ϕ ではBCL-X ϕ の発現を誘導してM ϕ の生存に関

与していることが知られた。

5. カタラーゼは結核菌の KatG にみられるように、M ϕ の ROI に対し抵抗性を与え、結核菌の増殖にポジティブに働くことより、このカタラーゼ産生能の違いも M 型 M ϕ と GM 型 M ϕ の結核菌感受性の違いの理由の一つと考えられた。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 誌上発表

1. Akagawa, K.S., Komuro, I., Kanazawa, H., Yamazaki, T., Mochida, K. and Kishi, F.:
Functional Heterogeneity of Colony-Stimulating Factor-Induced Human Monocyte-Derived Macrophages. *Respirology* 11:S32-S36, 2006

2. Komuro, I., Yasuda, T., Iwamoto, A. and Akagawa, K.S.:
Catalase plays a critical role in the CSF-independent survival of human macrophages via regulation of the expression of Bcl-2 family genes. *J. Biol. Chem.* 280:41137-41145, 2005.

1. 学会発表

1. 赤川清子、金沢裕子、岸 文雄：結核菌感染ヒト単球由来マクロファージにおける Hck 及び C/EBP β の発現、第 35 回日本免疫学会総会・学術集会、平成 17 年 12 月 14 日、横浜市

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

多剤耐性結核の薬剤耐性遺伝子の解析

分担研究者 阿部千代治 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社・技術顧問
共同研究者 小林 郁夫 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社
尾形 英雄 結核予防会複十字病院
和田 雅子 結核予防会結核研究所
御手洗 聡 結核予防会結核研究所
川辺 芳子 国立病院機構東京病院
高嶋 哲也 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター
鈴木 克洋 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター

研究要旨

WHO/IUATLDのSRLNで薬剤感受性検査の外部精度管理菌を用いた評価でMGIT ASTはSRLNの掲げた精度目標を満足させる検査であることが明らかにされた。また検査に要する時間の中央値も7日であり、MGIT ASTの高い迅速性が再確認された。迅速な薬剤感受性検査の報告は患者管理と治療に役立つのはもとより、延いては入院期間の短縮にもつながる。INHの検査でMGIT ASTで耐性しかし小川比率法で感受性を示す臨床分離株がみられた。これらは検査濃度の近くにMICを持つINH低レベル耐性菌であり、全国各地に存在していた。耐性に関与する遺伝子やアジア諸国にこの種の菌が存在するかについては次年度に検討する。

A. 研究目的

世界保健機関（WHO）は国際結核肺疾患予防連合（IUATLD）と協力し、薬剤耐性結核の広がりを調べるプロジェクトを1994年に立ち上げた。これまでに調査に参加した国のすべてに薬剤耐性菌が出現していること、少なくともイソニアジド（INH）とリファンピシン（RFP）の両者に耐性を示す多剤耐性結核（MDR-TB）の頻度の高い地域があり、結核対策を困難にしていることが明らかになった。

適切な患者管理と治療のために耐性菌の迅速な同定は重要である。わが国では薬

剤感受性検査を小川培地による比率法（小川比率法）で行っており、結果の報告までに4週間を要している。欧米諸国で用いているBACTEC 460TBシステムは迅速な検査法であり、5～10日で薬剤感受性の結果を報告できるが、放射性物質を使用することからわが国では日常検査に導入不可能である。近年、非放射性迅速抗酸菌培養システムであるBCTEC MGIT 960 AST（MGIT AST）が開発された。日常検査に導入するためにMGIT ASTシステムを評価したところ、INH に対する感受性検査でMGIT ASTと小川比率法の間で不一致の

結果を示す株の存在が認められた。それらはMGIT ASTで耐性、しかし小川比率法で感受性の表現型を示すINH低レベル耐性菌であった。この研究では、この種の菌が全国各地に存在するか、INH耐性に関与する遺伝子に変異がみられるか調べる。またこの種の菌がアジア諸国に存在するかどうか調べる。

B. 研究材料および方法

1. 菌株

WHO/IUATLDのコーディネーターから分与された結核菌50株をMGIT ASTの評価に用いた。これらの結核菌はWHO/UATLDのSupranational Reference Laboratory Network (SRLN)で標準化された菌株である。INH低レベル耐性菌の広がりを調べるために全国12の施設で分離された1,122株の結核菌を用いた。菌株の使用にあたって、倫理面で細心の注意が払われた。

2. MGIT AST

添付文書に従い、結核菌薬剤感受性検査用MGITチューブに専用サプリメントと各薬剤を添加した。検査に用いた薬剤濃度はINH: $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、RFP: $1.0 \mu\text{g/ml}$ 、ストレプトマイシン (SM): $1.0 \mu\text{g/ml}$ 、エタンブトール (EB): $5.0 \mu\text{g/ml}$ であった。McFarland #0.5に調整した菌液を滅菌蒸留水で5倍希釈し、薬剤添加MGITチューブへの接種菌液とした。コントロール用MGITチューブへの接種には接種菌液を滅菌蒸留水でさらに100倍希釈したものをを用いた。菌液を各MGITチューブに0.5ml接種後直ちにBACTEC MGIT 960全自動抗酸菌培養装置 (MGIT 960) で培養を開始した。MGIT 960では培養開始から4日目より12日目までの間でコントロールMGITチューブの菌発育を示す蛍光強度が一定値を越えた時点で薬剤添加MGITチューブの蛍光

強度を測定して被検菌の感受性を判定するシステムである。

3. Middlebrook 7H10 寒天培地による比率法 (7H10 比率法)

検査に用いた薬剤の濃度はINH: $0.2 \mu\text{g/ml}$ 、RFP: $1.0 \mu\text{g/ml}$ 、SM: $2.0 \mu\text{g/ml}$ 、EB: $5.0 \mu\text{g/ml}$ であった。McFarland #0.5に調整した菌液を滅菌蒸留水で100倍希釈し、薬剤添加Middlebrook 7H10寒天培地への接種菌液とした。コントロール用Middlebrook 7H10 寒天培地への接種菌液としては、接種菌液を滅菌蒸留水でさらに100倍希釈したものをを用いた。菌液を各培地に塗布後、5%CO₂条件下で培養し、培養3週目に判定した。

4. 小川比率法

検査に用いたINHの濃度は $0.2 \mu\text{g/ml}$ であった。McFarland #0.5に調整した菌液を滅菌蒸留水で100倍希釈し、薬剤添加小川培地への接種菌液とした。コントロール小川培地への接種菌液としては、接種菌液を滅菌蒸留水でさらに100倍希釈したものをを用いた。菌液を培地に接種後37°Cで培養し、培養4週目に判定した。

5. 評価方法

MGIT ASTおよび7H10比率法の結果についてWHO/IUATLDのSRLNの結果をゴールドスタンダードとして感度、特異性、一致率、耐性的中率 (PV-R)、感受性的中率 (PV-S) を計算した。感度はSRLNの結果が耐性のものを正しく耐性と判定した割合、特異性はSRLNの結果が感受性のものを正しく感受性と判定した割合、一致率はSRLNの結果がそれぞれの薬剤について耐性、もしくは感受性と判定したものを同様に判定した割合である。PV-Rは耐性と判定したとき、その判定が正解である確率、PV-Sは感受性と判定したときの正解率である。

C. 研究結果

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 とまったく同様に、いずれも 100% であった(表1)。

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。

表1. WHO/IUATLD の SRLN の成績と MGIT AST および 7H10 比率法の結果との比較

	感度	特異性	全体の一致率	PV-R	PV-S
MGIT AST					
INH	100	100	100	100	100
RFP	100	100	100	100	100
SM	95.5	100	97.9	100	96.2
EB	78.9	100	91.5	100	87.5
7H10 比率法					
INH	100	100	100	100	100
RFP	100	100	100	100	100
SM	95.5	100	97.9	100	96.2
EB	100	92.9	95.7	90.5	100

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。

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。

2. 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。

表2.イソニアジドに対する感受性検査

症例	検査株数	耐性株数 (%)	
		MGIT AST	小川比率法
初回治療	955	52 (5.4)	27 (2.8)
既治療	157	44 (28.0)	39 (24.8)
合計	1,112	96 (8.6)	66 (5.9)

MGIT AST vs 小川比率法

初回治療例：p = 0.004

既治療例：p = 0.52

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 μ g/ml、残りの24株は0.2 μ 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 μ g/ml、10株は0.4 μ g/ml、2株は0.2 μ 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。

D. 考察

WHO/IUATLDはINHとRFPの感受性検査の感度と特異性を95%以上に保つこと、SMとEBを加えた主要抗結核薬4剤について全体の一致率を90%以上に保つことを目標に掲げている。WHO/IUATLDのSRLNの外部評価菌株を用いた実験で、INHとRFPについてMGIT ASTの結果は

SRLNの結果と完全に一致した。またSMの一致率は7.6%、EBの一致率は91.7%であり、4薬剤の一致率は90%以上であった。これらの成績は、MGIT ASTはWHO/IUATLDの掲げた検査精度の目標を満足させる検査であることを示している。

現在結核患者の入院期間の短縮が求められており、そのためには分離された結核菌の薬剤感受性検査は重要である。今回の実験で菌接種後測定が終了するまでの所要日数は6日から11日の範囲（中央値：7日）であり、MGIT ASTの高い迅速性が再確認された。迅速な薬剤感受性検査の報告は患者管理と治療に役立つのはもとより、延いては入院期間の短縮にもつながる。

INHは最も重要な抗結核薬であり、INH耐性菌で発病した患者の治療は容易でない。全国12病院で分離された結核菌のINHに対する感受性検査をMGIT ASTと小川比率法で行い、2つの検査法で得られた結果を比較した。初回治療例955株の中で52（5.4%）株はMGIT ASTで、27（2.8%）株は小川比率法でINH耐性の表現型を示した。一方既治療例157株中、MGIT ASTで耐性の表現型を示したのは44株、小川比率法では39株であった。両検査法で得られた感受性検査の結果の差は既治療例（ $P=0.52$ ）では有意でなかったが、初回治療例（ $P=0.004$ ）では統計学的に有意であった。この結果は、既治療例では治療中に比較的高レベルの耐性菌が選択されることを示している。

INH感受性検査に用いている試験濃度はMGIT ASTでは $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、小川比率法では $0.2 \mu\text{g/ml}$ であり、2つの検査法で異なる。この研究でみられた差は検査法の違いからきたのかどうか調べるためにMGIT960でMICを測定した。不一致を示した30株のうち24株（80%）は $0.2 \mu\text{g/ml}$ の濃度で感受性の表現型を示し、それらのMICは0.15

$\mu\text{g/ml}$ と $0.4 \mu\text{g/ml}$ の間にあることから、これらはINH低レベル耐性菌と考えられた。7H10寒天培地によるMIC測定の結果もこのことを支持している。

これらINH低レベル耐性菌の耐性に関与すると考えられている遺伝子に変異がみられるか、低レベル耐性菌で発病している患者の治療にINHは有効か、シンガポールにこの種の菌が存在するかなどの研究は次年度に行われる。

E. 結論

1. WHO/IUATLD の SRLN の外部評価菌株を用いた評価で MGIT AST は WHO/IUATLD の掲げた精度目標を満足させる検査であることが証明された。
2. MGIT 960 による培養検査の所要日数の中央値は 16 日、MGIT AST による薬剤感受性検査の所要日数の中央値は 7 日であった。これらの結果は、BACTEC MGIT システムは検体採取後薬剤感受性検査の結果を 30 日以内に担当医に報告することとする米国 CDC の勧告を十分達成できる検査法であることを示している。
3. INH 感受性検査における MGIT AST と小川比率法の比較で、MGIT AST で耐性しかし小川比率法で感受性を示す臨床分離株の存在が明らかになった。
4. 2 検査法で不一致の結果を示した株は検査濃度の近くに MIC 値を持つ低レベル耐性菌であることが分かった。
5. INH 低レベル耐性菌は全国各地に存在していた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 阿部千代治：結核菌の薬剤耐性に関する遺伝子. 結核. 80: 804-807、2005.
2. 小林郁夫、阿部千代治、御手洗智：結核菌薬剤感受性検査のための BACTEC MGIT 960 AST の評価：外部評価菌株を用いた研究。結核. 81: 57-62、2006.
3. Takii T、Hamasaki S、Hirano K、Abe C、and Onozaki K: Simple fibroblast-based assay to test the pyrazinamide susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 49: 804-807、2005.

2. 学会発表

1. 阿部千代治、平野和重：結核菌の薬剤耐性に関する遺伝子. 第80回日本結核病学会総会、さいたま市、2005。
2. 小林郁夫、阿部千代治、御手洗智：バクテックMGIT 960による結核菌の薬剤感受性検査の評価
—WHO/IUATLDのSRLの成績との比較—。第80回日本結核病学会総会、さいたま市、2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

〔I〕 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

分担研究者 坂谷光則 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 院長

研究要旨

- 〔I〕 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ワクチンマウスの系で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、を中心に治療ワクチンの開発計画を立案した。
- さらに、
- 〔II〕 多剤耐性結核菌に対する治療ワクチン
多剤耐性結核菌を感染（プール）させたマウスにおいて、HVJ/HSP65DNA + IL-12DNAワクチンは、強力な結核治療効果（結核治療ワクチン）を示した。
- さらに、(HVJ/HSP 65DNA + IL-12 DNA)ワクチン+BCGワクチンも強力な結核治療効果を示した。
- 〔III〕 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。

A. 研究目的

結核に対するワクチンとしては、BCGが世界各国で用いられ、小児期における結核予防に関しては一定の成果を納めている。しかし、現行のBCGワクチンの追加接種が、大人（成人）の結核発病予防に効果がある

か否かについては、議論の分かれるところであり、確証がないのが現状である。

従って、BCGよりも切れ味の鋭い新しい結核ワクチンの開発が必須である。しかしながら、未だ臨床応用に有効な新しい結核ワクチンは開発されていない。我々は結核

予防ワクチンとしてカニクイザルのレベルで有効な新しい結核ワクチンを開発したことより、臨床応用への計画を立案した。

さらに、治療ワクチンについては、結核治療phaseに有効なワクチンは我々以外全く開発されていない。したがって結核治療ワクチンについても将来的な臨床結核ワクチンについての動物モデルでの実験を行った。

B. 研究方法

結核治療ワクチン効果を判定するモデル動物として、DBA/1マウス TNF R (-/-) DBA/1マウス、IL-6 (-/-) DBA/1マウス、BALB/cマウス、を用いた。結核菌はH37Rvヒト結核菌やErdmanヒト結核菌を使用した。また政策医療呼吸器ネットワークを用いた計画も立案した。

(倫理面での配慮)

当院の倫理委員会は、大阪国際大学政経学部教授と関西学院大学学院長を含む多職種の委員により構成され、毎月1回以上開催しており、本研究は、この委員会での承認を得ている。

C. 研究結果

[I] 結核治療ワクチン

結核治療ワクチンの開発が世界的に急速に熱気を帯びてきている。

すなわち、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、

① r72f BCGワクチン

②Adex(IL-6+ IL-6R+ gp130)DNA

ワクチン ③HVJ /HSP65 DNA + IL-12DNAワクチン ④HVJ /HSP65 DNA + IL-12 DNA+ BCGワクチンを単独又は組み合わせて、治療ワクチンの開発計画を立案した。具体的には、すでに我々のAdex (IL-6+ IL-6R+ gp130) DNAワクチンは結核治療ワクチン効果をマウスの結核感染の系で示した。さらにHVJ /HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンもマウスの系で治療ワクチン効果を得た。したがって、これらのワクチンを組み合わせ、priming-booster法を用いより強力なワクチンの開発をスタートした。(表1)

用いる系は

(1) マウス

(2) モルモット (表2)

(3) カニクイザル (表3)

(4) ヒト免疫応答を解析できる

SCID-PBL/huモデルである。(表4)

[II] 多剤耐性結核菌に対する治療ワクチン

(1) さらに多剤耐性結核菌を 5×10^5 i.v. 投与したマウスに対してもHVJ/HSP65 DNA+IL-12DNAワクチンを3回投与することにより結核治療ワクチン効果を得た。(2) RFP、INHと結核治療ワクチンを併用することにより、RFP、INH低濃度でも結核治療効果、特に多剤耐性結核に対してもRFP、INH等が有効となる可能性が大である。

[III]

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-liposome / 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。(表5)

したがって、結核予防ワクチンの臨床応用としてPhase I study (健常人で行う検査項目として、PPD皮内反応 副作用 PBL免疫反応) Phase II study [日本 (当近畿

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を行う計画をたてた。(表6) 結核予防効果の判定には最低数年以上かかる。

表1

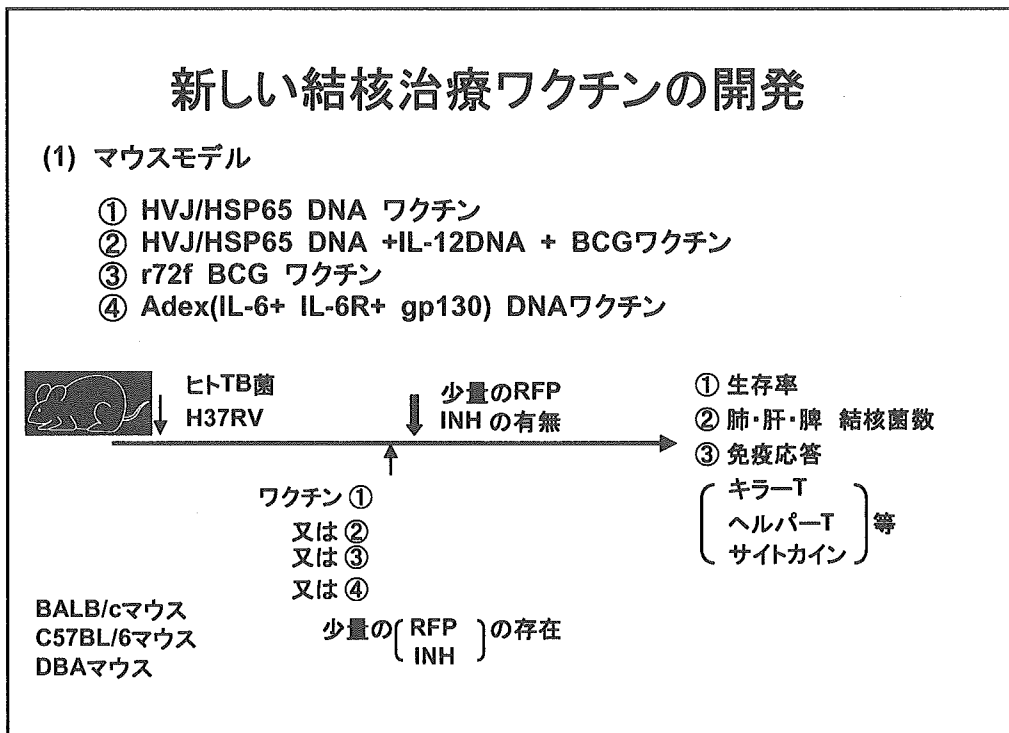


表 2

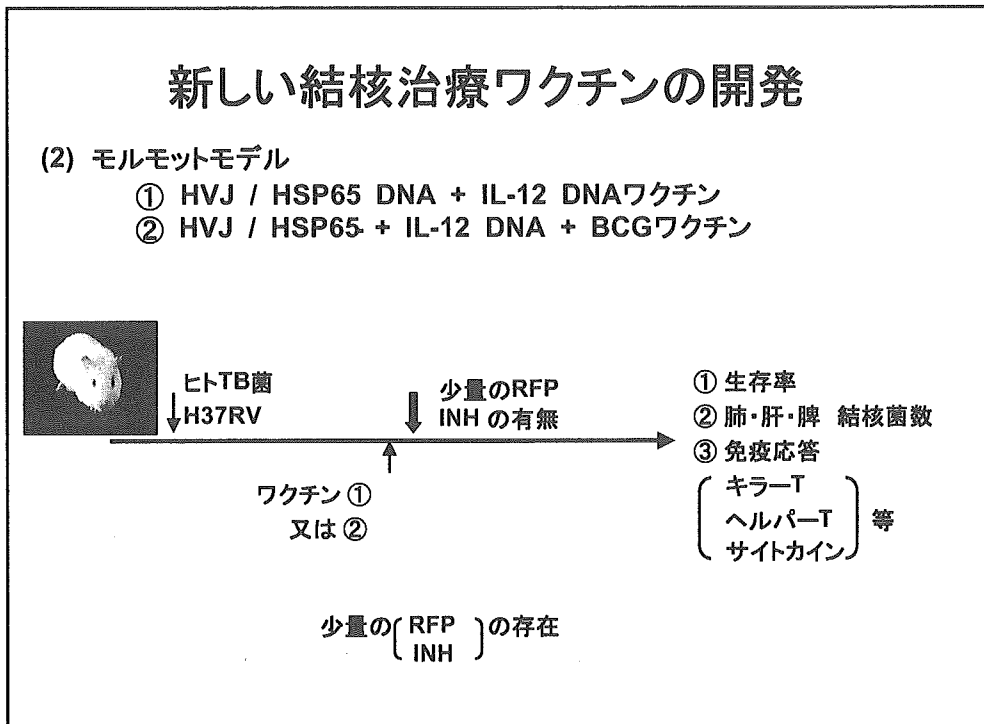


表 3

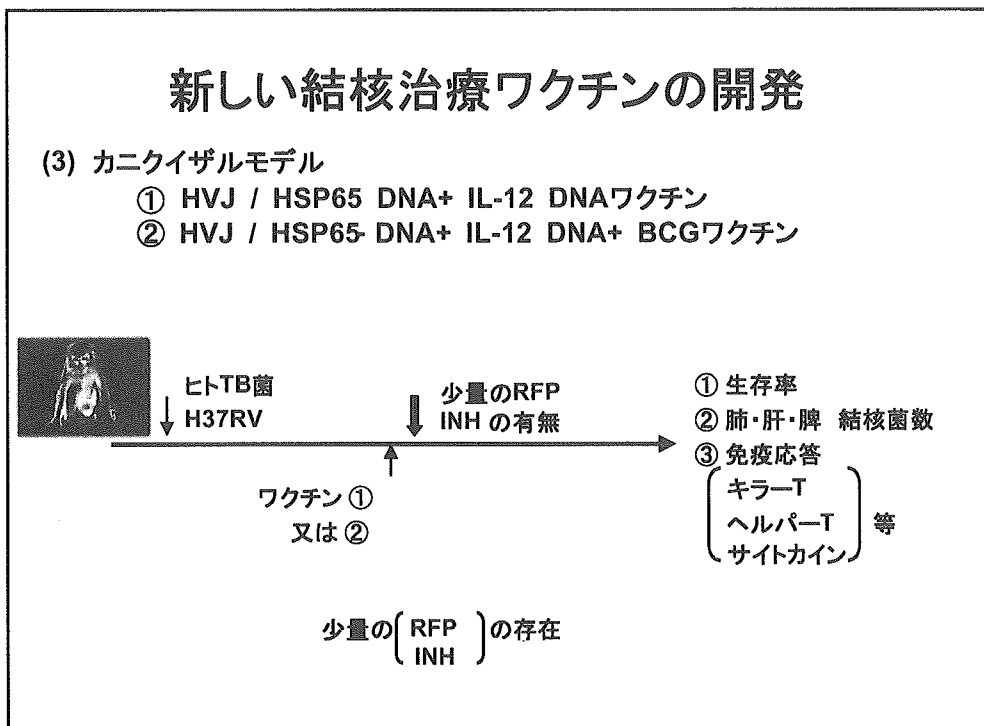


表 4

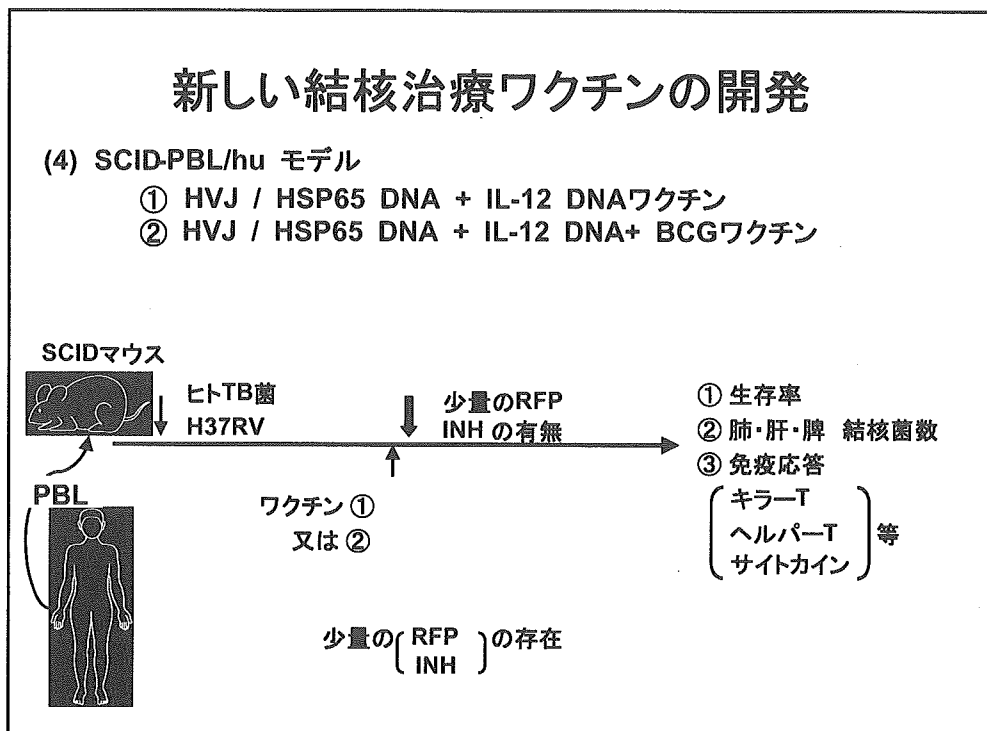


表 5

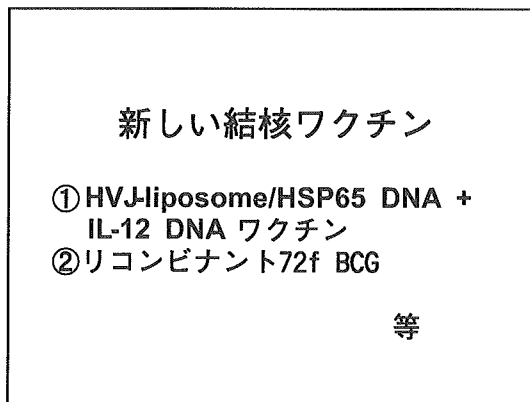


表 6

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}

日本
(当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

D. 考察

[I] ~ [II] 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。

E. 結論

[I] 多剤耐性結核治療ワクチン: 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。さらに多剤耐性結核菌を 5×10^5 i.v. 投与したマウスに対してもHVJ/HSP65 DNA+IL-12DNAワクチンを3回投与することにより結核治療ワクチン効果を得た。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 ワクチンを中心に、治療ワクチンの開発計画を立案した。

[II] 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。

これらの[I]~[II]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。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Kanamaru N, Muraki Y, Hashimoto S, Inoue Y, Sakatani M, Kobayashi E, Kaneda Y, Okada M. : DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against Mycobacterium tuberculosis by T cell activation. *Vaccine*. 2005 Sep 19; 2006 24:1191-1204
2. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kanamaru N, Takai H, Sakaguchi Y, Furukawa I, Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, Peiris JSM, deMello D.E, Chen P.J, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. : Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. In "Xth International Nidovirus Symposium: Toward Control of SARS and Other Nidovirus Diseases" (Edit.) K. Holmes and S. Perlman, Springer Press (in press)
3. Arai T, Inoue Y, Yamamoto S, Akira M, Uesugi H, Hayashi S, Sakatani M.: Incipient stage of pulmonary Langerhans-cell histiocytosis complicated with pulmonary tuberculosis was examined by high-resolution computed tomography. *Respir Med*. 2005 ;99(9):1188-90.
4. Sakatani M.: The non-tuberculous mycobacteriosis. *Kekkaku*. 2005. 80:25-30.
5. Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, Ohara N, Kaneda Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Inoue Y, Takemoto Y, Naito M, Yamada T, Matsumoto M, McMurray DN, Cruz EC, Tan E.V, Abalos R.M, Burgos J.A, Gelber R, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M, Okada M. : Novel recombinant BCG- and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine* 2005;23:2132-5.

6. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, Demello D.E, Peiris JSM, Chen P.J, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: The Development of vaccines against SARS Corona Virus in Mice and SCID-PBL/hu Mice. *Vaccine* 2005;23:2269-72.
7. Okada M, Tanaka T, Yoshida S, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Kaneda Y, Nakajima T, Ohara N, Takai H, Fukunaga Y, Inoue Y, Matsumoto M, Gelber R, Tan E.V, Dela Cruz E.C, Abalos R.M, Young L. J, Burgos J.A, McMurray D, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M. : Novel vaccination (HVJ-liposome/Hsp65 DNA+ IL-12 DNA and recombinant 72f BCG) against Tuberculosis using cynomolgus monkey. 40th Tuberculosis and Leprosy Research Conference 2005; 46-50.
2. 学会発表
1. Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Tanaka T, Takai H, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Yoshida S, Nakajima T, Tan E.V, McMurray D, Sakatani M., Okada M. : Novel vaccination (Hsp65 DNA+ IL-12 DNA vaccine) against Tuberculosis using cynomolgus monkey. The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 5-8 September, 2005. Awaji Island, Japan.
2. Okada M, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Tanaka T, Takai H, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Yoshida S, Nakajima T, Kaneda Y, Matsumoto M, Tan E.V, Gelber R, Dela Cruz E.C, Reed S, Ohara N, McMurray D, Sakatani M. : Novel vaccines (HSP65 DNA+ IL-12 DNA Vaccine) Against Tuberculosis using cynomolgus monkey. Keystone Symposia (Pathogen-Host Stand off : Persistent and Latent Infection) Jan 5-10, 2006.
3. Okada M, Tanaka T, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Muraki Y, Kuwayama S, Izumiya M, Matsumoto M, Sakatani M. : In Vivo Efficacy of Novel Antituberculous Candidate OPC-67683 against Multidrug-Resistant M.tuberculosis (MDR-TB) using SCID Mice and SCID-PBL/hu Mice. F-1463, 45th ICAAC Dec. 2005, Washington D.C.
4. Okada M, Yoshida S, Tanaka T, Kuwayama S, Kita Y, Kanamaru N, Muraki Y, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M, Inoue Y, Kaneda Y, Sakatani M. : The Development of Strong HVJ-liposome / HSP65 DNA +

- IL-12 DNA vaccination against tuberculosis. FASEB Meeting AAI 2005, San Diego.
5. Okada M, Tanaka T, Kuwayama S, Yoshida S, Kita Y, Kanamaru N, Muraki Y, Hashimoto S, Kaneda Y, Ohara N, Yamada T, Inoue Y, Matsumoto M, Gelber R, Tan E.V, Dela Cruz E.C, Abalos R.M, Young L.J, Burgos J.A, McMurray D, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M. : Novel vaccination (HVJ-liposome/ HSP65 DNA+ IL-12 DNA and recombinant 72f BCG) against Tuberculosis using cynomolgus monkey and plan for clinical trial. 2005 Keystone Symposia.
 6. 岡田全司、田中高生、吉田栄人、井上義一、武本優次、大原直也、内藤真理子、山田毅、金田安史、坂谷光則：ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しいワクチン開発と結核免疫誘導（Ⅱ）．第35回日本免疫学会総会（2005. 12. 横浜）
 7. 鈴木克洋、吉田志緒美、北原直人、露口一成、源誠二郎、井上義一、林清二、岡田全司、井内敬二、坂谷光則：肘関節炎を合併した肺M.kansasii症の1例．結核80巻8号 Page587(2005)
 8. 岡田全司、田中高生、喜多洋子、井上義一、坂谷光則：結核に対する新しいワクチン (HVJ-liposome Hsp65 + IL-12 DNA)の開発とT細胞免疫増強効果．結核80:270, 2005
 9. 喜多洋子、田中高生、井上義一、岡田全司、坂谷光則：ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しいDNAワクチン開発．HSP65 DNA+ IL-12 DNAワクチン (3)．結核80:269,2005
 10. 田中高生、喜多洋子、井上義一、坂谷光則、岡田全司：モルモット吸入感染モデルを用いた新しい抗結核DNAワクチン(HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNA)の開発．結核80:265, 2005
 11. 坂谷光則、中島由槻：非結核性抗酸菌症の治療一座長のことは．結核80:203, 2005
 12. 田中高生、喜多洋子、桑山さち子、村木裕美子、金丸典子、橋元里実、高井寛子、岡田知佳、福永有可里、坂口弥生、古川いづみ、山田恭子、和泉谷美和、武本優次、井上義一、坂谷光則、永田年、小出幸夫、岡田全司：新しい抗結核弱毒化リステリアワクチンの開発．日本呼吸器学会雑誌43巻増刊 Page280(2005)
 13. 岡田全司、田中高生、喜多洋子、桑山さち子、金丸典子、橋元里実、村木裕美子、高井寛子、岡田知佳、福永有可里、坂口弥生、古川いづみ、山田恭子、和泉谷美和、橋本幸子、武本優次、井上義一、金田安史、吉田栄人、坂谷光則：BCGワクチンより100倍以上強力な新しい結核ワクチン (HSP 65 DNA+ IL-12DNAワクチン)開発．日本呼吸器学会雑誌43巻増刊 Page280(2005)
 14. 露口一成、鈴木克洋、木村謙太郎、井

上康, 新井徹, 林清二, 坂谷光則, 田中壽一, 松村晃秀, 井内敬二: 肺結核の既往を有さない結核類似型肺 M.avium complex症の検討. 日本呼吸器学会雑誌43巻増刊 Page199(2005)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得 (出願中)
2. 実用新案登録
3. その他

15. 庄嶋淳子, 田中剛, 慶長直人, 松下育美, 土方美奈子, 井上義一, 鈴木克洋, 坂谷光則, 岡田全司, 木村謙太郎, 小林信之, 豊田恵美子, 工藤宏一郎, 永井英明, 倉島篤行, 加治木章, 桶谷典弘, 早川哲史, 白川太郎, 玉利真由美, 中田光, 岡晃, 安藤覚, 田宮元, 笹月健彦, 猪子英俊: 呼吸器疾患と遺伝子多型 肺非結核性抗酸菌症感受性領域の全ゲノム高解像度マッピング. 日本呼吸器学会雑誌43巻増刊 Page54(2005)

16. 桑山さち子, 喜多洋子, 金丸典子, 中高生, 村木裕美子, 橋元里実, 高井寛子, 岡田知佳, 福永有可里, 坂口弥生, 古川いづみ, 山田恭子, 和泉谷美和, 橋本幸子, 井上義一, 武本優次, 坂谷光則, 金田安史, 吉田栄人, 岡田全司: 免疫不全と肺感染症 ヒト結核感染に最も近いモデル動物カニクイザルを用いた結核に対する新しいDNAワクチン開発: HSP 65DNA+ IL-12DNAワクチン. 日本呼吸器学会雑誌43巻増刊 Page47(2005)

17. 露口一成, 鈴木克洋, 坂谷光則: 高齢者結核・非結核性抗酸菌症の現状と問題点 非結核性抗酸菌症の診断. 化学療法の領域21:218-223, 2005

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

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

研究協力者 鈴木克洋 近畿中央胸部疾患センター 感染症研究部長

研究要旨

結核が克服されたのは強力な化学療法による。薬剤耐性菌の出現はその状況を脅かす重要な課題である。従って薬剤感受性結果が正確・迅速に得られる事が結核治療の要となる。しかしながら塗抹陽性ながらどうしても培養が陽性にならない例、また非結核性抗酸菌（NTM）が混在しているため正確な結果を得るのに長期間要する例がある。我々はそのような例の検体から結核菌の遺伝子を増幅し既存の薬剤耐性遺伝子検査を実施し、その結果が臨床的に有用である事を見出した。

A. 研究目的

結核が克服されたのは強力な化学療法が発達したためで、薬剤耐性菌の存在はその状況を脅かす事態である。特に現在の短期化学療法の要であるINH とRFP 両剤耐性(多剤耐性結核)は現在でも難治であり、その対策は急務となっている。結核菌の薬剤感受性は薬剤含有培地上での培養状況により決定する方法が従来から用いられている。現在世界的に標準となっているのは、卵培地上でのコロニー数を比較する比率法である。他に液体培地を用い迅速に薬剤感受性を判定する方法もある。しかし培養法を用いる薬剤感受性検査を行うには、当然ながら結核菌が純培養されている必要がある。臨床的に活動性結核が疑われるがどうしても培養が陽性にならない例では感受性検査が実施できないし、NTMが混在している例では結核菌を純培養するのに長期間を要する事になる。そのような場合検体から結核菌の遺伝子を増幅し、既存の薬剤耐性

遺伝子検査キットを用いて、薬剤感受性を検討することが可能である。今回そのような場合の臨床的な有用性を検討した。

B. 研究方法

INH・RFP・EB・SM・KMの耐性遺伝子変異の検討はOligoArray-TB（日清紡）を用い、マニュアル通りに実施した。RFPに関しては市販のline probe assay キット（フィノスLipa Rif TB）を用いてさらに判定した。NTM混在例では、培地上から結核菌と思われるコロニーを取り出し、再度培地で増菌し結核菌の純培養である事を確認後培養を用いる薬剤感受性検査を実施し、遺伝子を用いた方法の結果と比較検討した。

C. 研究結果

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