

**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18年度 総括・分担研究報告書**

**主任研究者 岡田 全司**

**平成19（2007）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. 中国オフロキサシン耐性結核の現状に関する基礎研究	菅原 勇	-----	63
2. タイ国における多剤耐性等の難治性結核患者の検体バンクとコホート研究	野内英樹	-----	65
3. 中国東北部における結核菌の薬剤感受性に関する解析 南アフリカ由来植物の抗結核菌活性	服部俊夫	-----	74
4. インドにおける多剤耐性結核菌に関する分子生物学的研究	高鳥毛敏雄	-----	79
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	櫻田紳策	-----	83
6. 自然免疫系による結核感染防御機構に関する研究	竹田 潔	-----	88
7. 多剤耐性結核の薬剤耐性遺伝子の解析	阿部千代治	-----	94
8. 新しい結核ワクチン、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	-----	98
9. 研究協力者研究報告書		-----	110
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		-----	147

平成18年度  
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 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、高鳥毛、田丸、岡田、菅原、服部、慶長、JICA、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・慶長・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。多剤耐性結核症例及び治療失敗となる率は、再登録例で高い。（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、M $\phi$ ）の研究がスタート。ヒト PBMC からマグネットビーズ法で M $\phi$  を分離し分化させるシステム構築に成功した。オステオポンチン、grnulysin や M $\phi$ 、リンパ球（キラーT、M $\phi$ 、NKT、 $\gamma$   $\delta$  T）の解析を行いつつある。（e）HIV 合併結核研究はタイ公衆衛生省倫理委員会に申請書提出。
  - ② 中国、フィリピン：多剤耐性結核菌 DNA 入手。VNTR 等で DNA をすでに解析した。
    - (a) アジア地域（中国瀋陽）の多剤耐性結核菌 DNA 50 例中 VNTR 6 例（12%）で日本のスーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌 S・S MDR-TB と全く同じ VNTR（MIRU）配列を示した。アジアにも日本と同じ S・S MDR-TB が高率に存在することを初めて発見した（岡田、服部）。S・S MDR-TB は通常が多剤耐性結核菌より毒力が強力を証明。
    - (b) 多剤耐性結核菌（河南省・北京と瀋陽）300 例を解析。OFLX 耐性（gyrA 変異）が多い発見。瀋陽は 160 例中 5 例で XDR-TB の可能性。（菅原、服部、Ling）
  - ③ インド：（高鳥毛、岡田）インドと結核ワクチン臨床応用と結核菌 DNA 解析の共同研究。（a）結核対策の実情調査。（b）ニューデリー・シン教授とインド最大の結核病院より多剤耐性結核菌株の提供と DNA 解析。
  - ④ シンガポール：（阿部）INH 低レベル耐性菌を初めて発見。アジアでの分布解析し、共同研究。
  - ⑤ 国際的評価を得た。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、野内、松本発表（ハノイ：平 17）APSR（平 18 京都）、国際ワクチン学会シンポジスト（岡田 平 18 トロント）。
- [2] HVJ-エンベロープ/Hsp65 DNA+IL-12 DNA ワクチンは BCG ワクチンよりも 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）。結核菌由来 HSP65 蛋白に対するキラーT 細胞や INF- $\gamma$  産生 T 細胞の分化を強力に誘導した。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）でワクチン免疫を行い、結核予防効果を解析した。モルモットで効果あり。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）で HVJ/HSP65+IL-12DNA ワクチン投与群は 100% 生存率（BCG ワクチン群は 33% の生存率）の画期的な結核予防ワクチン効果を示した。
- [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。超薬剤耐性結核菌（XDR-TB）に対しても治療効果。多剤耐性結核（XDR-TB）に対する強力な治療ワクチンを発見。

- [4] XDR-TB は本邦では多剤耐性結核菌の 50%以上に認められることを明らかにした。
- [5] 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。特に CPZ は XDR-TB にも効果。OPC は RFP や INH より 10 倍強力（初めて開発した結核ヒト治療モデル SCID-PBL/hu で）。
- [6] Toll-like receptor を介した自然免疫が消失 TRIF/MyD88 二重欠損マウスを作製し、結核菌易感染性を初めて示した。TLR 活性化により肺胞上皮細胞産生リポカリンが結核菌の増殖抑制を初めて示した。
- [7] 結核菌殺傷タンパクである 15K 及び 9K Granulysin (Gra) 遺伝子導入マウス作製に成功し、15K Gra が生体内でも結核菌殺傷を初めて証明。多剤耐性結核患者でキラーT 産生 Gra 有意に低下を発見。
- [8] 殺結核菌ヒト M 型 M $\phi$  は結核菌増殖抑制因子産生。GM-M $\phi$  は HIV・TB 感受性のヒト肺胞 M $\phi$  と同じ。
- [9] 高活性の新規 HVJ-E ベクター製剤（HVJ-エンベロープ・パウダーベクター：純国産技術で今までの HVJ-E より 200 倍強い発現効率を示す新ベクター）を開発。HVJ-エンベロープ封入製剤を調製し、品質レベル（品質管理基準）を確認。（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

長崎大学熱帯医学研究所

国際連携戦略本部

教授

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

竹田 潔

九州大学生体防御医学研究所

ゲノム機能防御研究分野・発生工学分野免疫学

教授

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

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発病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。(表1、表2)

## 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。結核研究所が主体となり、タイNIH、長崎大学等とコンソーシアムを組んで運営しているタイ国チェンライ県の結核研究フィールドを活用して、(1)難治性結核患者(多剤耐性・再発・治療失敗例)の検体バンクとコホート研究を立ち上げた。(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している。(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(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(1-2)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ている。岡田班長は、多剤耐性結核患者でキラーTリンパ球の分化因子やキラーT蛋白やToll like receptorで免疫応答が悪化している事を発表しているが、重要な検討事項と考えられる。また、チェンライ県における薬剤耐性結核患者の頻度の推移を分析し、研究班の主題である多剤耐性結核の制御に関して背景因子を同定した。

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。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。出稼ぎも少なく人口は安定している。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。チェンライ病院、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。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。

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分担研究者の櫻田、赤川と協力しておこなう。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。標的分子はプロテオームに関する手法を用いて、絞り込まれている。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 ( $V_{\gamma}/V_{\delta}$  中心)の検索に使用する。

北タイ・チェンライに免疫学的実験が可能な実験室をセットアップする。次に、結核患者の登録台帳からHIV合併症例 (HAART 有無の2群) と非HIV感染結核例 (同じくHAART有無の2群) 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。対照群としてHIV感染非結核例と健常例の2群が同様に研究対象になる。

次に、各々の患者群ならびに健常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 (IFN- $\gamma$ 、IL-18) 量をELISA による測定に、リンパ球は $\gamma 9 \delta 2T$ 細胞レセプター、NK細胞、NKT細胞等の特異的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、分化した段階で、BCGによる感染実験を行い標的分子 (osteopontine、VDR、cathelicidins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スライド上にて培養された細胞を用いた免疫染色法にて行う。また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法にて測定する。患者検

体 (全血) の一部は結核菌死菌とともに培養後、血漿分離してgranulysin等をELISA法にて測定する。

基本的に細胞培養やBCG、結核菌死菌による刺激培養実験ならびにフローサイトメトリーによる細胞集団の解析はチェンライにおいて検体採取後速やかに行われる。凍結血漿、凍結培養上清、凍結細胞溶解液などはバンコックに凍結状態のまま移送されタイNIHにおいてELISA、RT-PCR、HPLCによる測定等に使用される。

### [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 $5 \times 10^6$ 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82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

表 1

研究組織			
主任研究者 岡田全司	アジア:	結核ワクチン・化学療法による多剤耐性結核(スーパー・スプレッダー多剤耐性結核及びXDR-TBを含む)の制御研究の統括。	
分担研究者 菅原 勇 野内英樹	中国:	多剤耐性結核菌の分子機構	(財)結核研究所
	タイ:	多剤耐性結核コホート研究。 HIV感染合併結核	長崎大学
慶長直人 服部俊夫	タイ・ベトナム:	SNIP解析	国立国際医療センター
	中国・フィリピン・タイ:	スーパー・スプレッダー 多剤耐性結核制御	東北大学
高鳥毛敏雄 桜田紳策	インド:	多剤耐性結核の制御とDNA解析	大阪大学
	タイ:	多剤耐性結核患者キラーT <sub>H</sub> granulysin, Mφの解析	国立国際医療センター
竹田 潔 阿部千代治 坂谷光則	アジア:	TLRと結核感染	九州大学
	シンガポール:	薬剤耐性遺伝子解析	日本ペクティン・ディキンソン
	国立病院機構呼吸器ネットワークを活用		国立病院機構近畿中央 胸部疾患センター
研究協力者			
赤川清子	MDR-TBとMφ	金田安史	HVJ-ベクター
鈴木克洋	スーパー・スプレッダー MDR-TB, XDR TB	田丸亜貴	インド
中島俊洋	HJV-エンベロープベクター ワクチン	倉島篤行	政策医療呼吸器ネットワーク
松本 真	臨床応用(新しい結核ワクチン)	E.V.Tan	ヒトに最も近いサルを用いた結核ワクチン

表 2

研究目的
1. アジア地域との研究ネットワーク(すでに確立)を一層強固にし、多剤耐性結核制御。
2. 新しい結核予防ワクチン(BCGより1万倍強力なHsp65+IL-12DNAワクチン)で多剤耐性結核制御。
3. 結核治療ワクチンの開発。アジアに蔓延の多剤耐性結核、XDR-TBの強力な制御。
4. 新しい結核化学療法剤を開発し、多剤耐性結核の制御を目的。
5. 多剤耐性結核の宿主要因、granulysin (Gra)・TLRレベル及びマクロファージ・キラーTレベルで解明。
6. スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌(S・S-MDR TB)及びXDR-TBの対策を目的。
7. アジア地域の多剤耐性結核患者のコホート研究。HIV合併多剤耐性結核の免疫強化療法開発。

- /HSP65DNA+IL-12DNA  
ワクチン群
- G2. HVJ-リポソーム/GFP DNA 3回投与  
ワクチン群
- G3 リコンビナント72f BCG 3回投与  
ワクチン群
- G4 BCG東京+Mtb72f protein 3回投与  
ワクチン群
- 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 1回投与  
ワクチン群
- 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

<実験OKADA Ⅳ>

HVJ-エンベロープを用いた

Priming-Booster法の解析

- G1 生食投与群 (コントロール)

- G2 BCG東京(priming)のみ
- G3 BCG東京(priming)+ HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNA(booster 2回)
- G4 HVJ-エンベロープ  
/HSP65DNA+IL-12DNA  
(priming 1回とbooster 2回)
- G5 HVJ-エンベロープ  
/HSP65DNA+IL-12DNA  
(primingとbooster) + BCG東京  
(2回目のbooster)
- G6 BCG東京(priming) + HVJ-エンベロープ  
(booster 2回)

<実験OKADA V>

- (1)治療ワクチン効果の解析
- (2) HVJ-エンベロープ・パウダー/pVAXベクターを用いた解析

- (3) pVAXベクター-HSP65DNA+IL-12DNAを二つ同じ遺伝子上に導入

- G1 HVJ-エンベロープ・パウダー/pVAX  
HSP65DNA+IL-12DNA  
1週間に3回  
連続3週間  
合計9回 i.m
- G2 BCG東京(priming 1回)+ HVJ-エンベロープ・パウダー/pVAX  
HSP65DNA+IL-12DNA(booster 8回)
- G3 BCG東京(priming 1回のみ)
- G4 生食投与 (コントロール)

各5匹

ヒト型結核菌を気道内注入後、1週間後に治療ワクチンを開始。2~3日毎に3週間連続、合計9回ワクチンをi.m投与  
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  $\mu$  g/ml、リコンビナント72f 10  $\mu$  g/ml、PPD 10  $\mu$  g/ml、PHA-P 0.2%で刺激し、<sup>3</sup>H-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] 中国で多剤耐性結核が多いのは、周知の事実である。(図2) 中国北京市結核肺腫瘍研究所李伝友博士と共同研究を行い、オフロキサシン耐性結核の状況を明らかにした。同時に、日本のオフロキサシン耐性の実態を明らかにして中国と比較検討した。中国でオフロキサシン耐性と判定された(比例法を用いた)87の結核菌株と22のオフロキサシン感受性株を用いた。定法により、DNAを抽出後、PCRを行い、DHPLC法によりオフロキサシン耐性の標的遺伝子である *gyr* 遺伝子突然変異を検出した。オフロキサシン感受性結核菌のデータと比較検討した。複十字病院でオフロキサシン耐性結核菌がないかも同時に調べた。

中国の結核はハルピン市胸部疾患病院で診断された結核患者の基礎的なデータ：年齢、性別、現在の結核の病状、喀痰検査、結核の病歴と治療歴、リスク・コンタクト、BCG接種歴、PPD検査の結果、自覚症状(咳、息切れ、体重減少、発熱、消耗など) 薬剤耐性試験は4種類の薬剤、ストレプトマイシン(S) イソニアジッド(H) リファンピシン(R) エタンブトール(E)を用いて行った。

[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  $5 \times 10^5$ をi.v.投与した後1日後、8日後、及び15日後に

- 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。

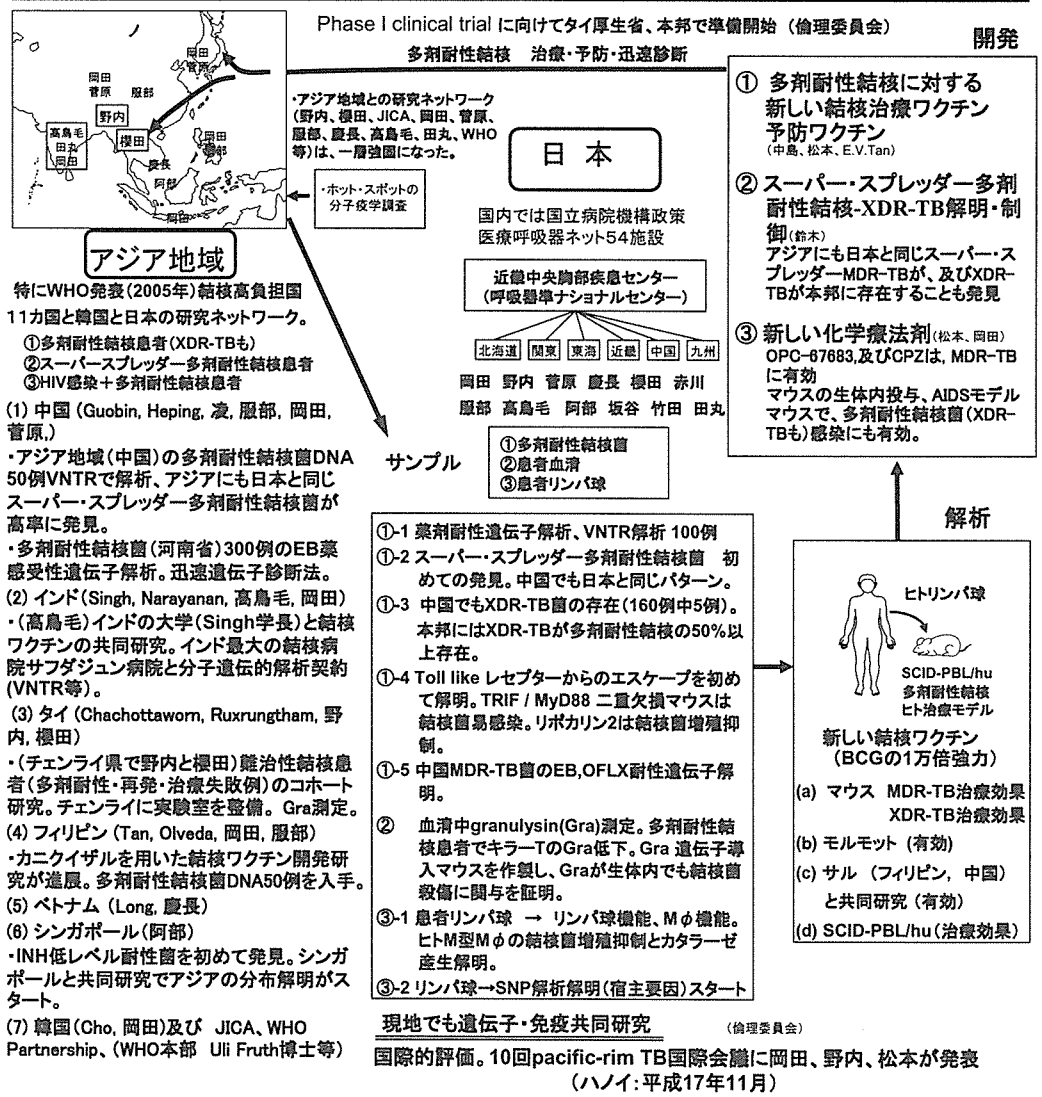
[VI] インドとのネットワーク共同研究：

世界の新規結核症例の4分の1の約200万人がインドで発生している。新規登録患者由来株の1.0%から3.3%が耐性菌(MDR-TB)であると報告されている。本研究では、インドにおける地域ベースの治療失敗例由来結核菌株の分子生物学的特徴を把握し、わが国の結核菌株との相違を明らかとすることを目的とした。本年度は、①研究協力してもらえる共同研究施設を確保する、②日印の研究施設において結核菌の分子生物学的研究を実施するため共同研究体制を構築する、③日印で結核菌の共同研究を行うための研究施設の倫理審査や研究許可の手続きを行う、などの3点を行うことを計画した。インド国ニューデリー都に存在するVardhman Mahavir Medical CollegeのProf. Saudan Singhの協力を得て、同大学地域医療学講座、Safdarjung Hospital併設結核センター、同病院感染症病理検査センターの細菌検査室(以下、研究協力施設)に対し、本研究の研究協力をしてもらおう交渉のために、2回訪印し、施設の状況、研究者の状況を確認した。共同研究をすすめるための関係者の理解を深め、研究の役割分担について確認を得ることができた。インドにおける結核株の遺伝子型別を日本の床分離株と比較分析する

ためにVNTRを用いて対象locus分析を行った。

7. 3. の2年間の研究成果の概要図等 (ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。)

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

- (1) 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)にワクチン投与し、結核予防効果あり。CD8 キラーTが重要。
- (2) 多剤耐性結核に対する世界で初めての治療ワクチンを見つけた。超薬剤耐性結核菌(XDR-TB)に対しても HVJ エンベロープ/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチンは治療効果。
- (3) 200倍強力な新規HVJ-Eベクターを開発した。
- (4) 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。(BCG群は33%)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。

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)

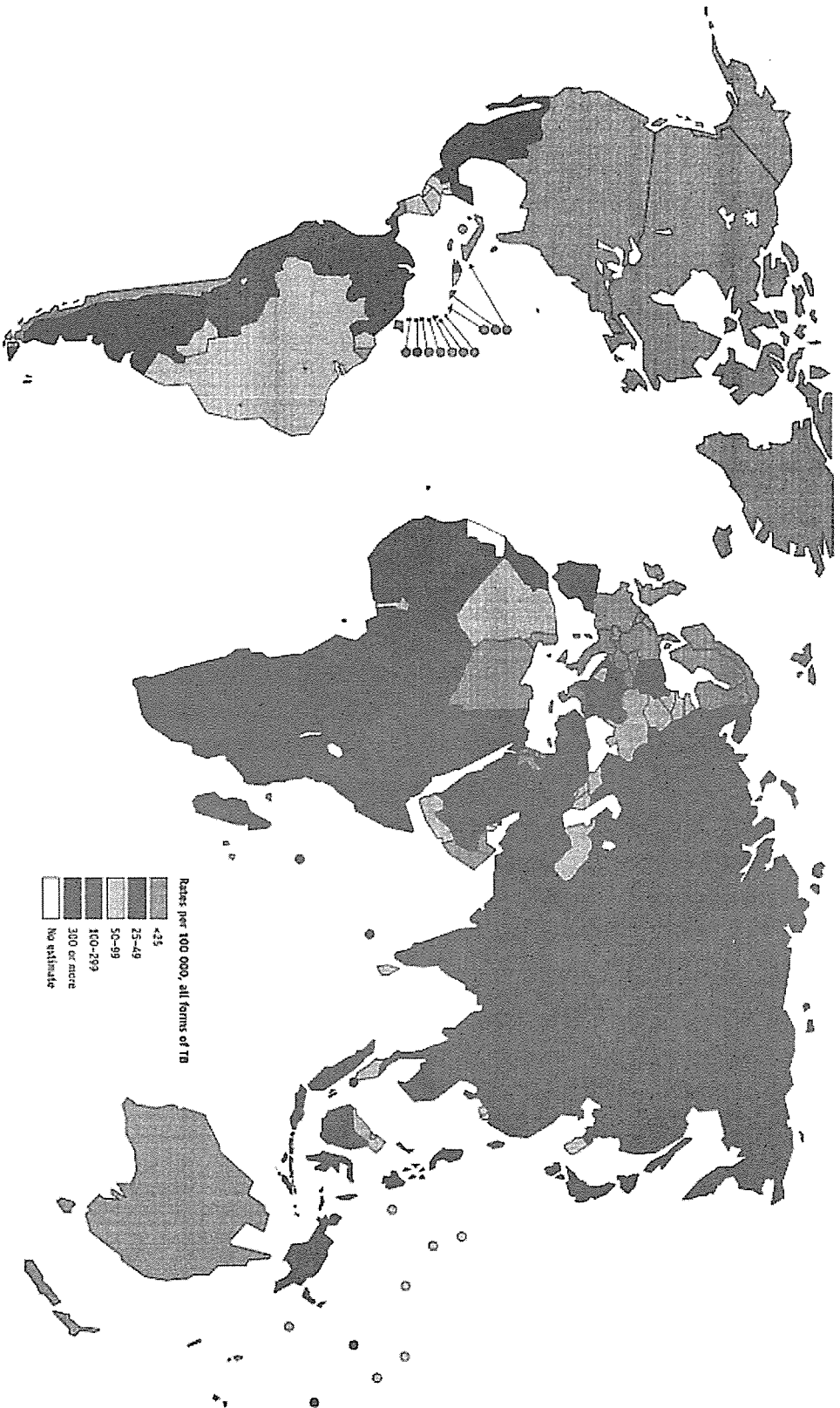
マウス → モルモット → カニクイザル → ヒト

ワクチン	マウス	モルモット	カニクイザル	ヒト
HVJ-エンベロープ / Hsp65 DNA+ IL-12 DNA	有効 BCGより1万倍強力な予防ワクチン効果	効果	効果	計画中 (Phase I, II)
結核治療ワクチン効果		計画	実施中	
強力な多剤耐性結核 XDR-TB 治療効果		計画	計画	
HVJ-リボソーム / Hsp65 DNA+ IL-12 DNA	有効 (BCGの100倍)	有効	有効	100%生存

図 1

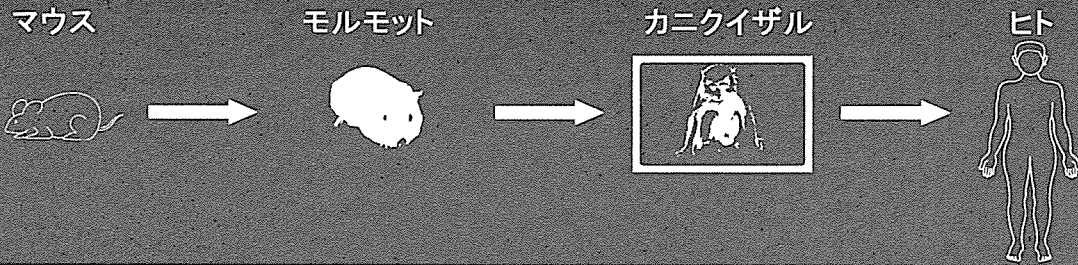
## 2

### 1. Estimated TB incidence rates, 2002



The designations employed and the presentation of material on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

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	マウス	モルモット	カニクイザル	ヒト
HVJ -エンペロープ / Hsp65 DNA+ IL -12 DNA	有効 BCG より 1万倍 強力な予防ワクチン効果	効果	効果	計画中 (Phase I, II)
	結核 治療ワクチン効果	計画	実験中	
	強力な多剤耐性結核 XDR-TB 治療効果	計画	計画	
HVJ -リポソーム / Hsp65 DNA+ IL -12 DNA	有効 (BCG の 100倍)	有効	有効 100%生存	

図 3

[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。

#### 1. 使用菌株

全国各地から分離された結核菌でMGIT ASTと小川比率法の間で不一致の結果を示した30株の結核菌を研究に用いた。また低レベルINH 耐性菌がアジア諸国にも存在するかどうか調べるためにSingapore General Hospital (SGH)で分離された50株のINH耐性菌を研究に用いた。

#### 2. INH耐性に関与する遺伝子の変異

INH耐性に関与することが知られている遺伝子*katG*、*inhA*、*ahpC*の変異を調べた。プライマーは、*katG*遺伝子でコドン315を含む1,073 bpフラグメント、*inhA*遺伝子のプロモーターを含む217 bpおよび*inhA*の構造遺伝子(ORF) 460 bpフラグメント、*ahpC*遺伝子のプロモーターを含む264 bpフラグメントを増幅するように設計した。小川培地増殖結核菌をTris-EDTA bufferに懸濁し、水浴を用い60℃で30分保温後にボルテックス、その後95℃で10分間加熱処理し、遺伝子変異分析に用いた。塩基配列分析反応にはBig Dye Terminator Cycle Sequencing kitを用いた。増幅産物をApplied Biosystems 3137xl Genetic Analyzerで分析した。

#### 3. シンガポールとの共同研究

SGHのCentral Tuberculosis Laboratory (CTBL)で分離された結核菌を研究に用いた。BACTEC 460TBによる感受性検査でINH耐性結核菌を-80℃に保存した。検査時にレーベンシュタイン・イエンセン卵培地で培養した菌から接種菌を作製した。薬剤感

受性検査のために薬剤感受性検査用ウエルパック培地Sを日本からシンガポールに送付し、検査に供した。感受性検査用培地に菌接種、37℃で4週間培養後に結果を判定した。

#### [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3)

表 3

Day 0 (1°)			
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°)			
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°)			
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、TNF α、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ワクチン用プラスミドの構築  
変異と遺伝子発現の確認

本研究においては、臨床応用を目的として研究を実施するため、臨床応用に適したプラスミドの構築を行なう必要がある。従来の発現プラスミドは、基礎検討用のバックボーンであったので、臨床実績のあるプラスミドベクターへの組み換えを行なった。

まず、従来のpcDNA3.1ベクターから、IL-12（マウス、ヒト、モルモットの3種類）とHSP65のそれぞれの遺伝子断片を制限酵素により切り出し、新規プラスミドの適切な部位への組み込みを行なった。次に、1つのプラスミド上にIL-12とHSP65のそれぞれの遺伝子の発現ユニットを組み込むために、上記のようにして構築した新規プラスミドよりIL-12遺伝子の発現ユニットの断片を制限酵素により切り出し、HSP65遺伝子の発現プラスミドに組み込みを行なった。この際に、正方向と逆方向の組み込みが

発生したため、それぞれについて発現レベルを確認して、薬効検討に用いるプラスミドの構築を選定した。

各プラスミドの構築を確認した後に、培養細胞（BHK21細胞、ヒトHEK293細胞）に導入を行なって遺伝子の発現レベルを検討した。検討用の細胞としては、ハムスター腎細胞株（BHK21細胞）と、ヒト胎児性腎細胞株（HEK293細胞）を使用した。それぞれの遺伝子に関する発現レベルの確認は、産生される蛋白質の量を指標にして行った。IL-12遺伝子については、遺伝子導入後に培養上清を回収し、培地中に含まれるIL-12蛋白質濃度をELISA法により測定することで定量した。一方、HSP65蛋白質については、遺伝子をBHK21細胞に導入後に細胞溶解物を調製し、20 $\mu$ Lの細胞溶解物に含まれるHSP65蛋白量をウェスタンブロット法により比較検討した。

結核感染症に対する有効性については、動物モデルとして小動物（マウス、モルモット）と、中動物（サル）の3種類の評価系を用いて有効性の評価を行った。適切な投与間隔でHVJ-Eで製剤化したDNAワクチンを筋内に連続投与し、結核菌を感染させて評価を行なった。

## 2. DNAワクチンの有効性を向上するための研究

DNAワクチンの薬効向上のために、新規製剤の検討を行なった。従来の製剤の調製は、以下のようにして行った。まず、氷上で冷却したHVJ-Eベクター溶液に界面活性剤を添加して、ベクターを構成する膜成分の透過性を一過性に増加させた。そして、DNAワクチン溶液を添加して氷上で静置する事でHVJ-Eベクター粒子中への封入を行った。封入後は、バッファーを添加して界面活性剤を希釈した後に、遠心操作を行ってDNAワクチンを封入したHVJ-Eベクターを回収した。遠心により回収したHVJ-Eベクターは、生理食塩水で適切な濃度に調整した後に、有効性試験に使用した。新規製剤については、凍結乾燥処理したHVJ-Eベクターに対して、適切な量のDNAワクチン溶液を直接添加することで調製を行い、有効性検討に使用した。

(図4、表4)

## 3. DNAワクチンの製造技術の検討

本研究において開発を行っているHVJ-Eベクターは、臨床での実用化を目的としているため、

薬効検討に使用するサンプルについては、治験薬GMPレベルの製造が可能なパイロットプラントでの製造を行った。製造施設としては、産業技術総合研究所・関西センターに整備したパイロットプラントで実施し、それぞれの製造に際しては、製造記録（バッチレコード）を作製した。また、製造機器についても、GMP製造に対応した機器を使用して製造を行った。HVJ-Eベクターの製造法についても、GMPグレードでのスケールアップが可能な工程を選択して製造を実施した。

[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。



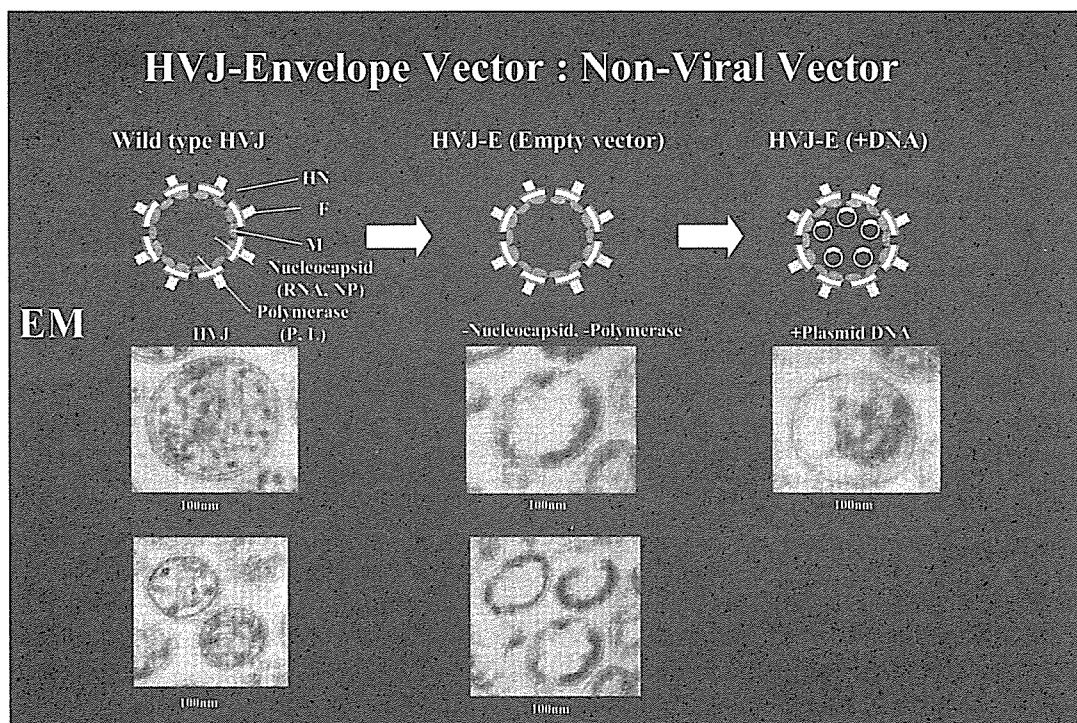


図 4

表 4

## 新しい結核ワクチンの開発研究

**HVJ-Envelope / HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンは**

- (1) 10万倍の結核予防ワクチン効果  
(ワクチン非投与群に対して)
- (2) 1万倍の結核予防ワクチン効果  
(BCG ワクチン投与群に対して)

Priming-boosterワクチン法を用いて

Priming		booster
① BCG	→	HVJ-Envelope / HSP65 + IL-12 DNA
② HVJ-Envelope / HSP65 + IL-12 DNA	→	BCG

[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:

自然免疫系の結核感染防御への関与について、これまでTLRを介したシグナルの消失するMyD88/TRIF欠損マウスを用いて解析し、自然免疫系の活性化の重要性を明らかにしてきた。これまでの解析は、マクロファージ、樹状細胞を標的としてきたが、自然免疫応答はこれら貪食細胞に限らず、最初に結核菌に出会う上皮細胞も深く関与している。そこで、結核菌の気道感染により上皮細胞で誘導される遺伝子を検索した。さらに、この遺伝子(Lcn2)を発現ベクターに組み込み、組み換え分子を作製し、結核菌やワクチン株BCGの試験管内で増殖に及ぼす影響を解析した。次に、Lcn2遺伝子のノックアウトマウスを用いて、結核菌の気道感染を行い、感染感受性を解析した。また、正常マウスおよびノックアウトマウスよりII型肺胞上皮細胞を単離し、試験管内で結核感染への感受性を解析した。通常マウスからは肺胞上皮細胞株の単離は困難なため、IFN- $\gamma$ で誘導されるClass II遺伝子のプロモーター下に33度でタンパクが発現するSV40遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを用い、肺組織から肺胞上皮細胞を精製し、種々の成長因子とともにIFN- $\gamma$ 存在下で33度で約1ヶ月培養することにより、surfactant protein C陽性の肺胞上皮細胞株を作製した。これらの、解析により肺胞上皮細胞から産生されるLcn2の結核感染防御における役割を検討した。

(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、invitroの種々のTLRノックアウトマウス由来のM $\phi$ 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M $\phi$ 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- $\gamma$ 、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8)

[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 $\gamma$ 鎖ノックアウトNOD-SCIDを作製した。IL-2R $\gamma$ 鎖はIL-4、IL-7、IL-15、IL-21の $\gamma$ 鎖と共通である。したがって、IL-2R $\gamma$ 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 $\gamma$ (-/-)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たから実施する。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5、図5、図6)。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5、図5、図6)。

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. ハルピン

- [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：(野内、慶長、櫻田)  
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。この様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数が少なかった。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、脱落后再発が多かった。

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%)の喀痰塗抹陽性再拝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、3'非翻訳領域のTGTGの挿入欠失、およびプロモーター領域の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 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。

表 5

PCR-Primer Using in VNTR	
ETR-A-R	aaatcgggtcccacacctcttat
ETR-A-L	cgaagcctgggggccccgcgattt
ETR-B-R	gcgaacaccaggacagcatcatg
ETR-B-L	ggcatgcccgggtgatcgagttg
ETR-C-R	gtgagtcgctgcagaacctgcag
ETR-C-L	ggcgtcttgacctccacgagtg
ETR-D <sup>*</sup>	
ETR-E <sup>*</sup>	
ETR-F-R	ctcgggtgatggtccggccggtcac
ETR-F-L	ggaagtgcctgacacagccatgcc
MIRU2-F	tggacttcagcaatggaccaact
MIRU2-R	Tactcggacgcccggcfaaaat
MIRU4-F	Gcgcgagagcccgaactgc
MIRU4-R	Gcgcgacgaaaaagtcagc
MIRU10-F	gttcttgaccaactgcagctctcc
MIRU10-R	gccaccttggatcagctactac
MIRU16-F	tcgggtgatcgggcccagtcacaagta
MIRU16-R	Cccgtcgtgcagcccctggctac
MIRU20-F	Gggagagatgcccttcgagt
MIRU20-R	Cactaacgggtggcggggtatg
MIRU23-F	cagcgaacgaactgtgctatcac
MIRU23-R	cggtccgagcagaaaagggtat
MIRU24-F	gctccgtgcacagccaaacc
MIRU24-R	tgggaggttgagctcacagaac
MIRU26-F	actgctcgcggaaatagg
MIRU26-R	ggataggctaccgctgaaatctg
MIRU27-F	cgacggggcatcttcgattg
MIRU27-R	gttcaccgggcaacgcatag
MIRU31-F	actgattggcttcatacggcitta
MIRU31-R	gtgcccagctgggtctctgat
MIRU39-F	ggcatcgacaaaactggagccaaac
MIRU39-R	cggaaacgtctacgcccacacat
MIRU40-F	gggtgctggatgacaacggtt
MIRU40-R	gggtgatctcggcgaatcagata