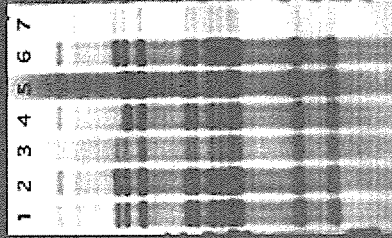


スーパー・スプレッダー 多剤耐性結核菌の発見

研究成果

1. 多剤耐性結核菌による6名の院内集団感染事例。うち2名は、感受性結核治療中に再感染を受けて発病したと考えられた。6名全員HIV陰性であった。
2. 従来、「結核の再感染発病はまれである」「多剤耐性菌の感染力は弱い」と思われてきたが、そのドグマをうち破る事例。
3. 今後、多剤耐性結核菌はすべて空気感染対策を施した個室とする必要がある。
4. スーパー・スプレッダーMDR TBはクラスタを形成する3種類存在を発見。

スーパー・スプレッダー MDR-TB



6名からの株のRFLP分析結果

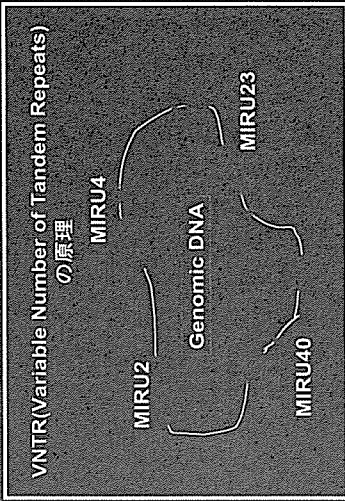
Lane1 患者E
Lane2 患者B
Lane4 患者C
Lane5 患者F
Lane6 患者A
Lane7 患者D

クラスタを形成する多剤耐性結核菌株

	クラスタ	サイズ	spoligotyping
a	13	Beijing	
b	12	Beijing	
c	8	non-Beijing	
d	3	Beijing	
e	3	Beijing	
f	3	Beijing	
g	3	non-Beijing	
h	2	Beijing	
i	2	Beijing	
j	2	Beijing	
k	2	Beijing	
l	2	non-Beijing	
m	2	non-Beijing	

アジア地域における スーパー・スプレッダー 多剤耐性結核菌

- (1) 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)。
- (2) スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌は通常の多剤耐性結核菌より毒力が強いことをマウス生体内で証明した。



中国株と日本株の結核菌DNA VNTR 比較 (中国におけるスーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌)

ID	E-A	E-B	E-C	E-D	E-E	E-F	M2	M10	M16	M20	M23	M24	M26	M27	M39	M40
中国株																
1868	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
1873	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
1876	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
1934	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
1924	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
2015	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
大阪府立呼吸器・アレルギー医科センター																
H135	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
H137	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
H138	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
H139	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
H140	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
H141	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
H142	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
H143	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
H144	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
H145	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
H146	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
江陵中央肺病部疾患センター株																
K7	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
K10	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
K25	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3

スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌は毒力が強い

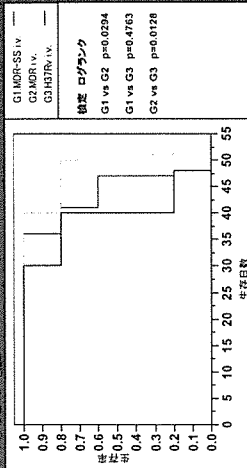


図 6

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。

チェンライ県で結核研究の検体バンクのプロトコールにてコホートとしてフォローアップが認められている患者群について、対象となる患者群を同定した図7に示すように、初発例が440名、再発例11名、治療失敗例25名、慢性排菌例9例、治療脱落后再排菌例が34例、合計520例のPBMC、血漿、菌体が保存してある。この中で、多剤耐性結核症例は、初発例で8例(1.8%)、再発例で1名(9.1%)、治療失敗例で4名(16.0%)、慢性排菌例1例(11.1%)、治療脱落后再排菌例で4例(11.8%)含まれていて、再登録例で初発例と比較して頻度が非常に高い。また、WHO式のコホート治療成績の分析で治療失敗となる率(治療途中を除いて)が、初発例で16例(4.5%)、再発例で1名(11.1%)、治療失敗例で4名(16.7%)、慢性排菌例4例(50.0%)、治療脱落后再排菌例で4例(13.8%)とこれも、再登録例で初発例と比較して非常に高い。よって、再登録結核症例を初発例と比較しながら、難治性結核のメカニズムを検討する事の有用性が示唆された。現在、主任研究者の岡田先生、分担研究者の櫻田先生に協力を願い、この保存検体の血漿を使用して、血漿中のインターフェロングammaとGranulysinのELISAで測定する事を、タイ国立マヒドン大学のSrisin副学長とタイNIHの協力を得て、実施試験を行っている。また、前向きのコホートでも、刺激を入れながら、サイトカイン測定を進める。いくつかのサイトカイン測定に関してはタイ側のサポートが得られる。

図7に示す様に、この検体バンクの菌株より、再発例に関して、以前の菌が得られる例

が77例同定されて、結核菌指紋分析と症例検討を進めている。また、再発(Relapse)例のみならず、治療失敗例、慢性排菌(図7)例についても同様に検討を進めている。

背景となるチェンライ県における薬剤耐性結核患者の頻度の推移であるが、表3に示す様に、全登録患者中の多剤耐性結核の頻度は1996年の16.8%(481株中81株)、97年の13.9%(813株中113株)、98年に12.9%(746株中96株)、99年に5.2%(716株中37株)、2000年に4.8%(667株中32株)、01年に4.6%(817株中38株)、02年に3.9%(735株中29株)と脱落率の低下に伴い、低下してきていた。しかし、03年に6.8%、04年に9.2%、05年に7.7%と問題となっている。03-05年の初回例の多剤耐性結核は、0.87%、1.8%、0.98%と低率のままなので、治療脱落が再度生じたりした為その他で、本研究の焦点である再登録例での薬剤耐性結核が増した事によると考えられる。

現在、以前からの菌株で多剤耐性に加えて二次抗結核薬に含まれる6つの区分(アミノグリコシド系、ポリペプチド系、フルオロキノロン系、チオアミド系、サイクロセリン、パラアミノサリチル酸)のうち、3つ以上に耐性を持っている結核菌と定義されるXDR-TB(Extensively Drug Resistant Tuberculosis)がどこまで存在するか菌株を上記の様に多く同定された暦年の多剤耐性菌の中から検索する。特に、1996-1999年は図7に示す様に、HIV感染者の多剤耐性結核患者において顕著に高い死亡率が記録されているので、XDR-TBの定義の契機となった南アフリカでの事例の様に、致死率が高いXDR-TB菌がHIV感染者で蔓延していたのではと考えられる。

長崎大学は世界保健ニーズに応える医薬品研究開発ディプロマコースを熱帯医学研究所でタイ国チュラロンコン大学、タマサート大学と共同して開催されている機会にて、結核に関する研究開発の課題を検討した。結核の多剤耐性結核の制圧には、再登録例にも活用できる薬剤の開発が国策として医薬品分野の製品開発を志向しており、倫理委員会を整えているタイでは関心が高かった。ワクチン開発に関しては、再登録例での免疫能低下とそれに対応した効力のあるワクチンと

いう整合性が期待されている。つまり、岡田班長の志向する「免疫賦活療法」の研究開発には、研究開発のボランティアの対象となる難治性結核患者で、指標となる免疫マーカーが低下しているかどうか先ず突き止めて、次に免疫賦活療法がそれを指標として活用できるか検討するステップが必要と指摘された。単純な共同研究では、前述の様にタイ側若手研究者の研究能力の向上が強調される。しかし、Product Developmentの様な研究開発の過程においては、タイ側のオーナーシップが重要で、組織的対応が必要とのコメントであった。

(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

一昨年、チェンライ市内の施設において整備された実験室は、現地事情から平成18年12月に移転・再整備された。健常者（タイ側の共同研究者と分担研究者櫻田）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。また、単球を採取した後の残りの末梢血単核球を用いてフローサイトメトリーによるCD4陽性T細胞その他

の解析も併せて行った。同じチェンライ県内で分離直後の細胞をフローサイトメトリーにより定量的に解析できる道筋が見つかった。

国立国際医療センターではタイで実施する臨床研究の基礎的検討として分化した二種類の異なった表現型のマクロファージ（M型とGM型）を使用して抗結核免疫、とくに細胞の運動、菌の貪食、細胞内殺菌等に関与していると考えられているosteopontinの発現についてmRNAレベルとタンパクレベルで検討した。

その結果、単球ではRT-PCR法とELISA法双方にて検出限界以下であったosteopontinはM型とGM型の双方のマクロファージにおいて分化にともなって発現レベルが上昇し、7～8日間の培養でプラトーに達した。BCG感染によって、さらにそのレベルは著明に増強されるが、mRNAレベルでは感染後3日間でM型マクロファージにおいて発現レベルの著明な増強が観察された。一方、GM型マクロファージはBCG感染前から発現レベルは高く、感染による発現レベルの増強は観察されたが、M型と比較して増強の程度は弱かった。

これに対して、タンパクレベルでは培養後3日目ないしは6日目においても培養上清中に分泌された、或いは細胞内に存在するosteopontinのタンパク量はむしろGM型マクロファージにおいて高かった。

BCGの殺菌に関しては、この実験と同時にCFUアッセイを行い、培養上清中ならびにマクロファージ内のBCG生菌数を感染後1日、2日、3日、6日と数えた。赤川等がすでに発表しているように、M型において有意に効率的に殺菌されたが、GM型においては菌数の減少は緩やかであった。

双方のマクロファージの細胞溶解液と培養上清を用いて、osteopontinに対するWestern blottingを行ったが、M型とGM型の間にosteopontinの分子量の違いはなく、また培養上清中に分泌されたものと細胞内のものを比較した場合もM型とGM型の間にパターンの違いは認められなかった。

倫理申請については、平成18年12月27日にタイ公衆衛生省倫理委員会に対して当研究の申請を行った。平成19年2月28日現在、部分修正にて本年3月中の承認の見通しが立っている。また同申請を平成18年12月国立国際医療センター倫理委員会に対して行い、平成19年2月15日研究計画書の部分修正とタイ側の最終版説明書と同意書の日本語訳文章の提出を条件に承認された。(e)服部らはバンコク子ども病院Warunee博士とプロトコルの検討を行い、委託研究誓約を結んだ。平成19年1月からサンプルの収集。

タイにおける多剤耐性結核・難治性結核のコホート研究

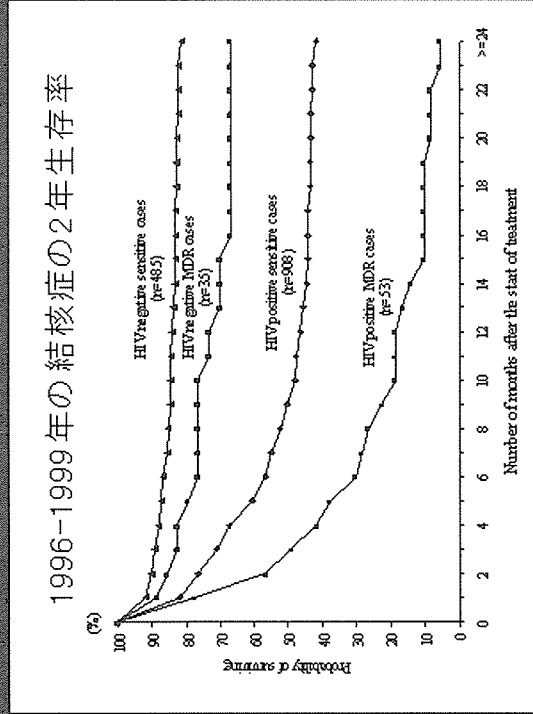
野内・慶長 Srisinタイ国立マヒン大学副学長

[成果]

(1) 再登録例で初発例と比較して、多剤耐性結核が多い。

タイ・チェンライ県(年間1500人の新規結核患者。うち結核菌喀痰塗抹陽性950人)結核研究検体バンク
多剤耐性結核の危険因子

結核患者	例数	多剤耐性結核(率%)
初発例	443例	8例(1.8%)
再発例	11例	1例(9.0%)
治療失敗例	27例	4例(14.8%)
慢性排菌例	9例	1例(11.1%)
治療脱落後再排菌例	34例	4例(11.8%)
合計	524例	18例(3.4%)



タイにおける多剤耐性結核の危険因子:HIVとの関係

HIV	結核患者数	多剤耐性結核	%	オッズ比
(-)	2892 例	104	3.6	1
不明	515 例	19	3.7	1.03
(+)	1537 例	88	5.7	1.59

図7

[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。(図 3、表 6)

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。(図 3、表 6)

日本人は乳幼児に BCG をほぼ全員投与することより、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。

④ 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。

⑤ なお、今までの HVJ-liposome/HSP65 DNA +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 8、図 9、図 10)。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。

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 11)、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た (図 12)。

⑥ 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) 貪食させた標準細胞、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 13)

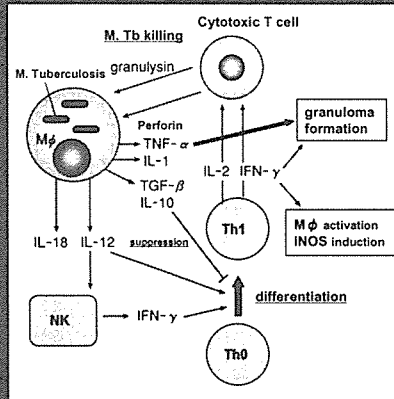
表 6

研究成果

新しい結核ワクチンの開発

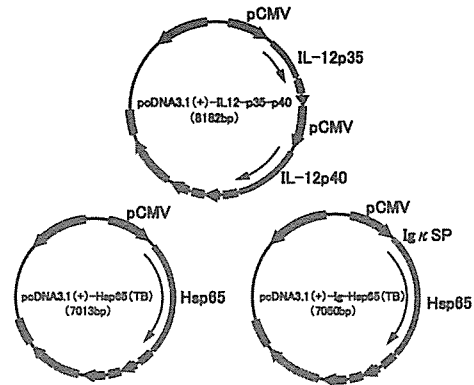
1. HVJエンベロープ/Hsp65 DNA+IL-12 DNAワクチンはBCGよりも1万倍強力な結核予防ワクチン効果。カニクイザル(ヒト結核感染に最も近い)結核予防効果あり。
2. 多剤耐性結核に対する世界で初めての治療ワクチンを発見した。超薬剤耐性結核菌(XDR-TB)に対しても治療効果。
3. サルで100%生存率の画期的な結核予防ワクチン効果。(BCG群は33%)
4. さらに、これよりも273倍強力な新規HVJ-E・パウダーベクターを開発

Anti-TB Immunity (Cytotoxic T cell, Helper T cell and Macrophages)



☒ 8

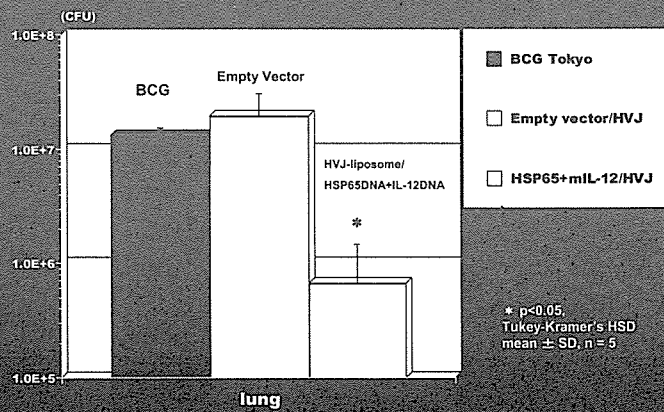
Construction of tuberculosis DNA vaccines



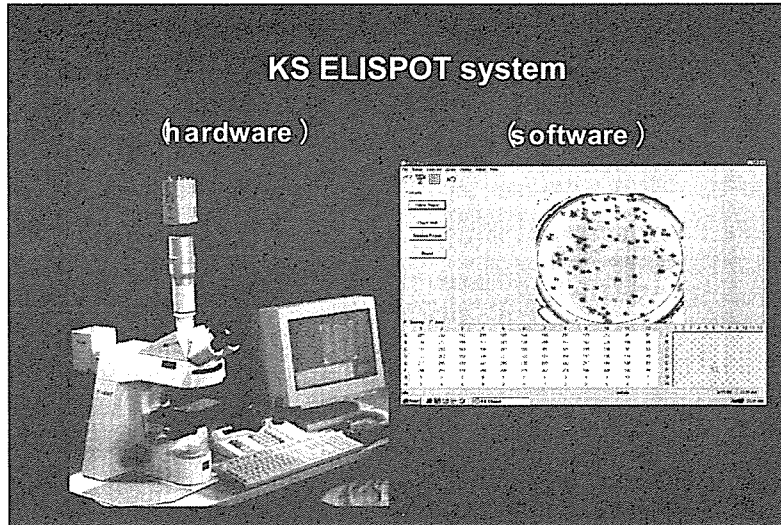
☒ 9

Prophylactic efficacy of HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA vaccine on TB-infected mice (5 weeks after TB infection)

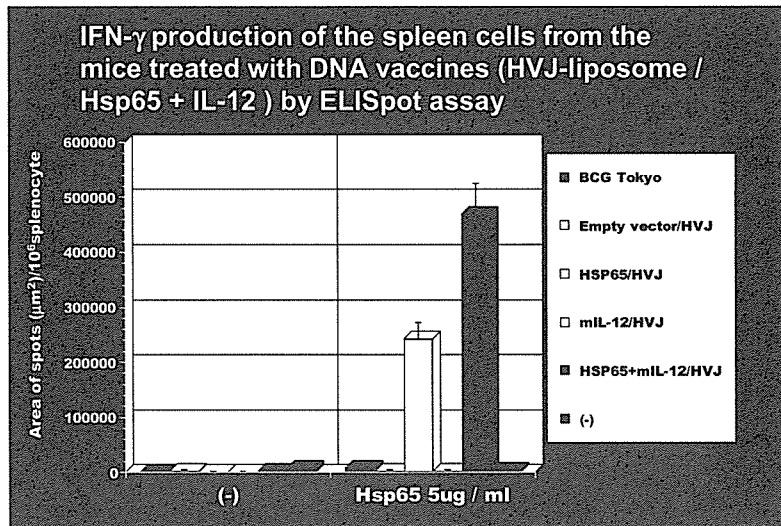
Number of M. tuberculosis



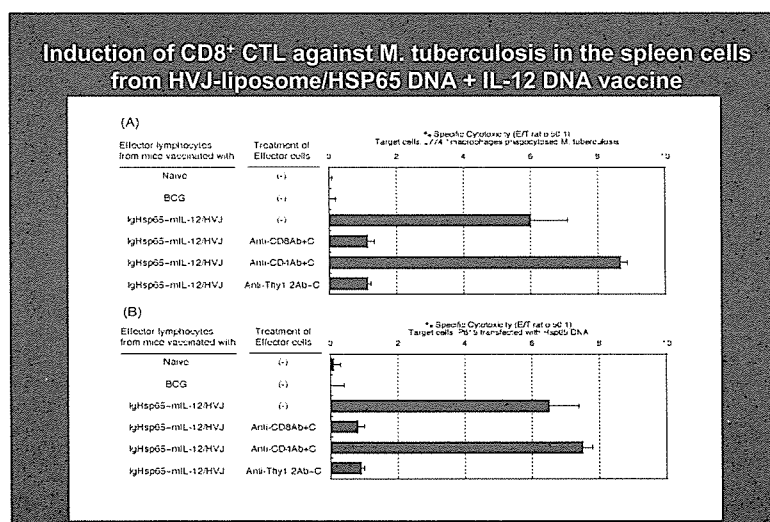
☒ 10



☒ 11



☒ 12



☒ 13

⑦ 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。

(2) 結核菌吸入感染系 (エアロゾル・チャンバー) を用いた結核感染に対する結核予防ワクチン効果の解析：

約35年前、Texas A & M 大学教授 David McMurray 博士が考案・作成し、世界の有名な研究所で使用されている Madison エアロゾル・チャンバー (Version up 版) を用いた。BALB/C マウスに結核菌 H37RV 2×10^6 /ml 15ml を5分間曝露吸入させ、肺内感染させた。1週間後、肺 1×10^3 個～ 1×10^4 個の結核菌 CFU が認められ、3週間後には肺で $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ CFU となった。脾臓では肺より1週間遅れて H37RV CFU が認められた。この系を用いて、HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンの結核予防効果を解析中である。下記に述べる pVAX ベクターを用いた HVJ-エンベロープ /HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンや新規 HVJ-エンベロープ・パウダーベクターを用いた HSP65DNA+IL12DNA ワクチンを用いてもこのエアロゾル感染系で従来の DNA ワクチンと予防効果比較研究である。

(3) ヒトの臨床応用に有用な pVAX ベクターを用いた HSP-65DNA+IL-12DNA ワクチンの結核予防ワクチン効果：
pcDNA3.1(+)ベクターを用い強力な結核予防ワクチンを開発したが、pcDNA3.1(+)はアンピシリン(ペニシリン)セレクションである。ヒトの臨床

応用を考えるとときにカナマイシン・セレクションの方が望ましい。したがってカナマイシン・セレクションの pVAX/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンを開発した。BCG ワクチンでプライムし、pVAX/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンを2回ブースターした群は統計的有意差をもって BCG ワクチン単独群に比較して肺・肝・脾の結核菌数の減少が認められた。すなわち、pVAX/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンの結核予防ワクチン効果が明らかとなり、この pVAX ベクターを用いて HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンの臨床応用が可能となることが示された。

(4) ワクチン投与方法の解析 (気道内投与)

(a) 経鼻・経気道投与ワクチンの開発

経鼻ワクチンはいくつかのワクチンで有用である報告がなされている。したがって、経鼻から経気道へワクチンが投与しうる方法を用いて新しいワクチン投与方法を用いて結核予防ワクチン効果を解析した。具体的には HVJ-エンベロープ / Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチン $50 \mu\text{l}$ を麻酔下で BALB/C マウスに鼻腔より徐々に注入し、気道内へ確かにワクチンが投与される方法を用いた。この系を用いて、HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンの結核予防効果を解析中である。下記に述べる pVAX ベクターを用いた HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンや新規 HVJ-エンベロープ・パウダーベクターを用いた HSP65DNA+IL12DNA ワクチンを用いて、この経鼻・経気道投与ワクチンで従来の筋肉注射投与ワクチンと結核予防効果比較研究である。

(b) 気管挿入チューブを用いた経気道投与ワクチンの開発

結核感染は肺の気道感染吸入より始まることが多い。すなわち、肺の免疫機能を増強することが、結核感染予防につながることを考えられる。したがって、気管挿入チューブを用い、気管分岐部上部より HVJ-エンベロープ /HSP65DNA+IL-12DNA ワクチン $50 \mu\text{l}$ を麻酔下で BALB/C マウスに除

々に投与し、肺野末梢にワクチンが投与される方法を用いた。

この系を用いて、HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンの結核予防効果を解析中である。

下記に述べる pVAX ベクターを用いた HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンや新規 HVJ-エンベロープ・パウダーベクターを用いた HSP65DNA+IL12DNA ワクチンを用いて、この経鼻・経気道投与ワクチンで従来の筋肉注射投与ワクチンと結核予防効果比較研究中である。この気管内挿入法を用い従来の筋肉注射 DNA ワクチンと結核予防効果を比較研究中である。

- (5) 新規 HVJ-エンベロープ・パウダーを用いた、より強力な結核ワクチンの開発 HVJ-エンベロープ・ベクターをさらに改良して HVJ-エンベロープ・パウダーベクターを開発した。従来の HVJ-エンベロープ・ベクターより 200 倍~300 倍発現効率が *in vivo* でも良いことを確認した(後述)。これを用いて HVJ-エンベロープ・パウダー/Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチンを開発した。これを用いてワクチン投与することにより、Elispot で極めて強力な IFN- γ 産生誘導が見られた。すなわちこのベクターは臨床応用を目指す上でも強力なベクターとなることが示唆された。松本(大塚)らも研究室でこの HVJ-エンベロープ/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチンや HVJ-エンベロープ・パウダー/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチンを用いてマウスの系で結核予防ワクチン効果を解析中である。Elispot アッセイの結果ではこれらのワクチンは Hsp65 に対し強力な IFN- γ 産生細胞へ分化させることを示した。
- (6) 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、 5×10^5 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。

- (7) 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。
- (8) 超薬剤耐性結核(XDR-TB)に対する治療ワクチン HVJ-エンベロープ/Hsp65 DNA+IL-12DNA ワクチンの開発：
当院の XDR-TB 患者より確立した XDR-TB 菌をマウスに 5×10^5 投与した後、このワクチンを投与(3 回) 1w 毎に 3 回投与し(1, 8, 15 日後)、30 日後に肺・脾・肝の XDR-TB 菌 CFU を計測した。その結果、このワクチンは上記臓器の CFU を減少させ、XDR-TB にも治療ワクチン効果を発揮した。将来的には新しい抗結核剤 *opc* や CPZ と併用して多剤耐性結核菌に対する相乗効果のみでなく治療期間短縮効果を目指したい(図 1 4)。

新しい結核治療ワクチンの開発

(1) マウスモデル

- ① HVJ-Envelope/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン
- ② r72f BCGワクチン



図 1 4

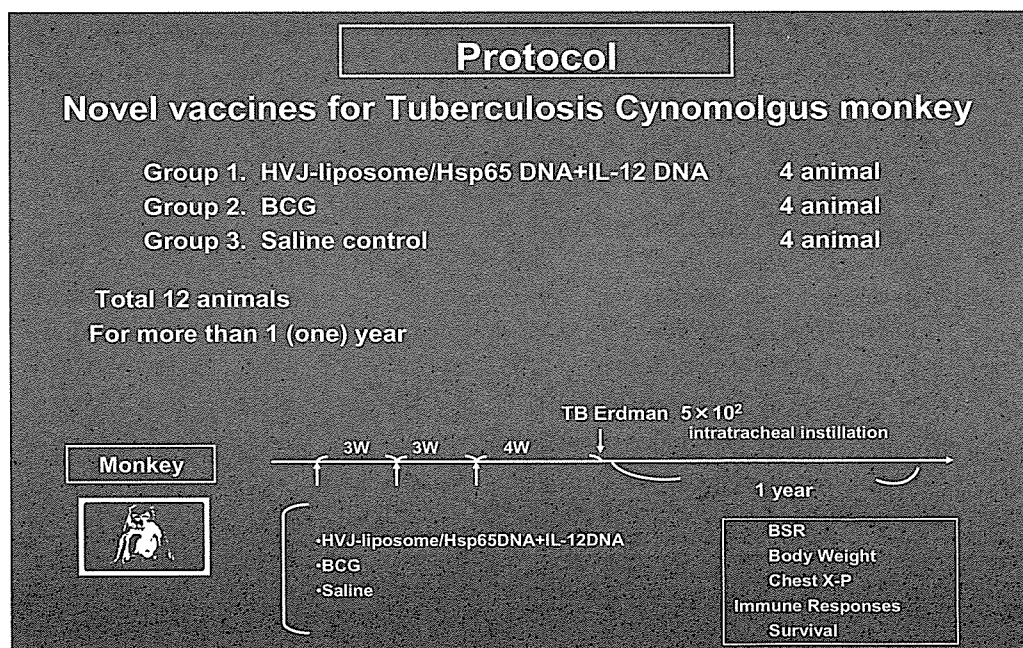
(9) 我々は世界の最先端の二種のワクチン①②を開発した。

- 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 3、図 1 5、図 1 6、図 1 7）
- 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。（図 3）

- 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- γ 、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 1 5



2. カニクイザルを用いた結核予防ワクチン効果<実験Ⅲ>

BCG プライム-HVJ-liposome/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチン法を用いた、カニクイザルにおける新しい結核ワクチン予防効果:

- G1 群 BCG 東京プライム
Hsp65+IL-12DNA ブースター (2 回)
- G2 群 Hsp65+IL-12DNA プライム (2 回)
BCG ブースト (1 回)
- G3 群 Hsp65+IL-12DNA プライム (1 回)
Hsp65+IL-12DNA ブースター (2 回)
- G4 群 BCG 東京プライム (1 回)
- G5 群 コントロール群 (生食)

その結果、G1 群の BCG 東京プライムで Hsp65+IL-12DNA ワクチンブースター群は 1 年後 (360 日) の生存率は 4 頭中 4 頭で 100% と画期的な延命効果・生存率を示す結核予防ワクチン効果を示した。

(図 16、図 17)

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 17) すなわち BCG プライム-この DNA ワクチンブースターは極めて強力な結核予防ワクチン効果を示した。日本や多くの発展途上国では乳幼児に BCG ワクチン接種を行う。BCG ワクチンは成人に対しては無効である (WHO の見解) ことより、成人に有効な新しい結核予防ワクチンが切望されている。したがって我々が開発した HVJ-エンベロップ/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチンは成人に対するブースターワクチンとして有効であり、極めて強力な武器を提供することが示された。

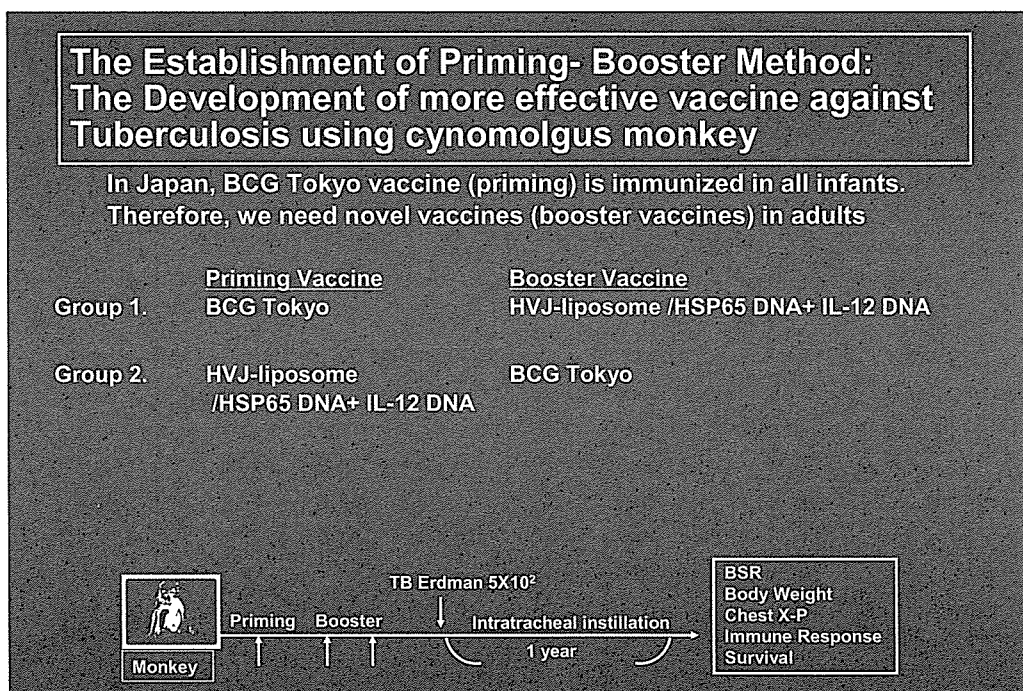


図 16

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。

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。

4. カニクイザルを用いたHVJ-エンベロープ/Hsp65DNA+IL-12DNA 結核予防ワクチン効果<実験Ⅳ>

実験ⅣではHVJ-エンベロープ/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチンを、実験ⅢのVJ-liposome/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチンの代わりに用いた。現在解析中であるが、BCGとこのDNAワクチンのプライム-ブースター法に効果が認められている。

5. 治療ワクチン効果：カニクイザルを用いHVJ-エンベロープ/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチンの結核治療ワクチン効果を研究した。

G1群 結核菌をサルに気道内注入 5×10^2 個した後7日後より1週間に3回HVJ-エンベロープ/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチン投与し、3週間で9回。その後1年間経過観察。(実験Ⅲ、Ⅳと同じ評価指標)

G2群 BCG東京ワクチンプライム(1回) DNAワクチン(8回) ブースター

G3群 BCG東京ワクチンプライム(1回のみ)

G4群 生食投与群

で現在治療効果観察中である。これも将来的にはCPZ+opcと併用して治療相乗効果を解析する予定。(図18)

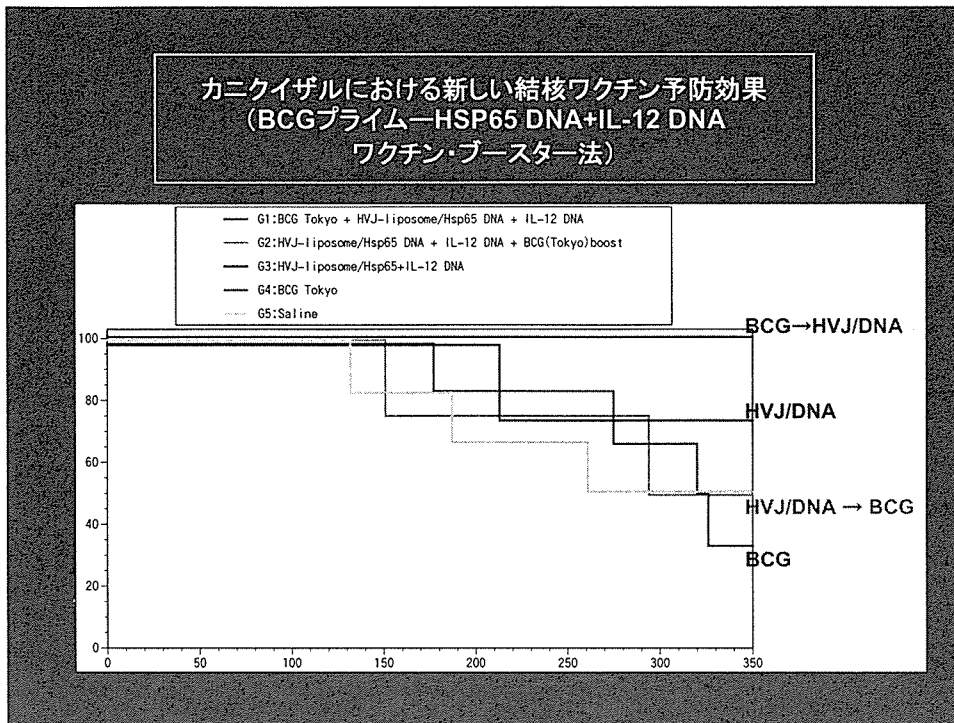


図 1 7

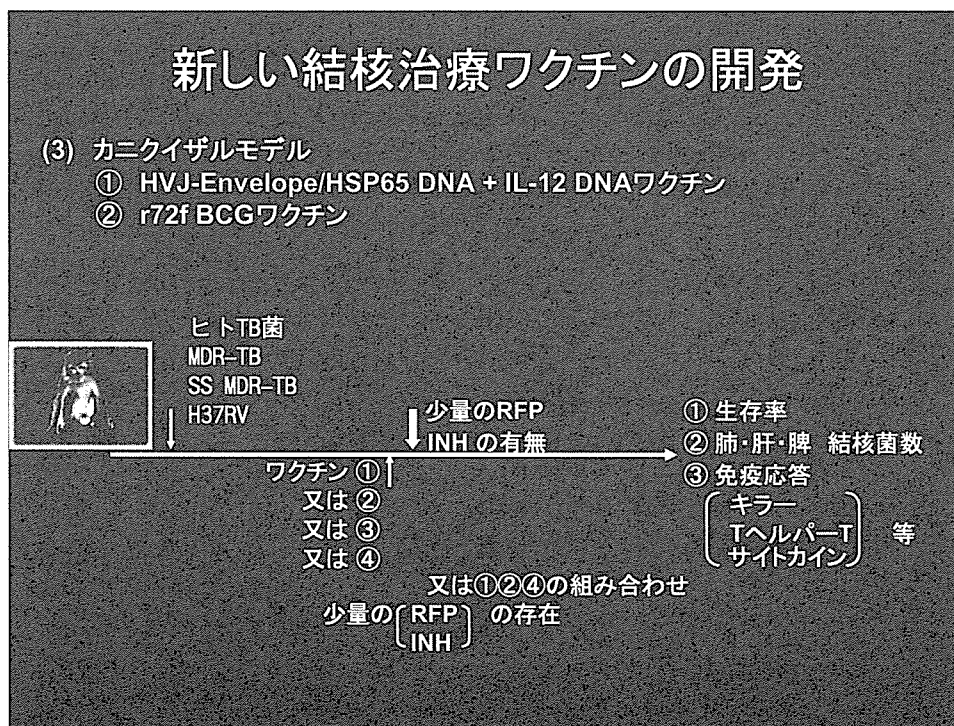


図 1 8

6. 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 効果を解析した。その結果 HVJ-エンベロープ/Hsp65 DNA+IL-12DNA ワクチンは弱いながら結核菌の現象が認める効果を得た。

[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 γ 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 β 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

- 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M ϕ にとり込まれM ϕ 内の結核菌を殺す新しい pathway を発見した。
- 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M ϕ 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人は明らかな再感染発病であり、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、スポリゴタイピングも耐性パターンと一致。スポリゴタイピングで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とlipocalin2を介した免疫応答の解析：BCGの気道感染によりマウスの肺で、lipocalin 2 (Lcn2)のmRNAが感染2日

目をピークに誘導された。さらに、肺のどの細胞がLcn2を発現するかを、BCG気道感染2日目の肺組織を抗Lcn2抗体で免疫染色したところ、分泌能を有するII型肺胞上皮細胞で強く染色された。次に、Lcn2が結核感染により肺胞腔内に分泌されているかを解析するため、気道感染0, 1, 2, 3日後に気管支肺胞洗浄液(BALF)を回収し、その液をwestern blot法によりLcn2の発現を解析したところ、感染2日目をピークにBALF中にLcn2が含まれていることが明らかになった。このように、Lcn2は結核菌の気道感染により、II型肺胞上皮細胞から産生され肺胞腔へ分泌されていることが明らかになった。自然免疫担当細胞として、肺胞マクロファージが肺胞腔に少数存在しているが、結核感染によりその数が著明に増加した。この肺胞マクロファージでもLcn2 mRNAの発現が著明に亢進していた。結核菌などの細菌は、増殖などのために鉄イオンを必要とし、それを宿主から取り込む。そのため、種々の細菌は鉄イオンと会合するsiderophoreを産生し、鉄イオンを取り込む。大腸菌もその増殖には鉄イオンが必要でenterobactinと呼ばれるsiderophoreを産生する。一方Lcn2は、鉄-siderophore複合体に会合し、大腸菌による鉄取り込みをブロックしていることが報告されている。結核菌も、鉄を取り込むためにmycobactinと呼ばれるsiderophoreを産生することから、結核感染により肺胞マクロファージや肺胞上皮細胞から産生されるLcn2が鉄の取り込みを抑制することにより、結核菌の感染を抑制しているかどうかを解析した。結核菌(M. tuberculosis H37Ra株)あるいはBCG東京株を7H9液体培地で試験管内で20日間培養し、そこに種々の濃度のLcn2を加えた。そうすると、

MtbH37Ra, BCGの増殖が濃度依存性に抑制された。そこに鉄イオン (FeCl₃) を加えると、濃度依存性にLcn2による増殖抑制が解除された。MtbH37Ra, BCGともに鉄イオンのキレーターを加えると増殖が抑制されることから、Lcn2は、結核菌の増殖を鉄イオンの取り込みをブロックすることにより抑制していることが示唆された。

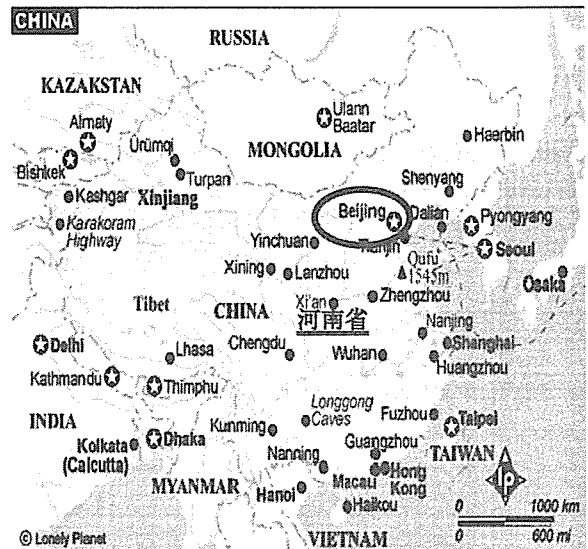
次に個体レベルでのLcn2の結核感染における役割を解析するため、Lcn2ノックアウトマウスに結核菌 MtbH37Raを気道感染させた。野生型マウスがほとんど死なない数の感染により大半のLcn2ノックアウトマウスは感染後50日以内に死亡した。また、感染2週後に肺と肝臓の結核菌数を測定したところ、Lcn2ノックアウトマウスで菌数が増加していた。感染1週後の肺組織を解析すると、Lcn2ノックアウトマウスで炎症細胞の浸潤を伴うgranuloma様な変化が数多くまた大きく誘導されていた。また、肺組織をチールネルゼン法により染色したところ、Lcn2ノックアウトマウスで、赤染する抗酸菌の数が増加していた。これらの結果から、Lcn2ノックアウトマウスは結核感染に対する感受性が高くなっていることが示された。マクロファージが結核感染防御に重要であることはよく知られているが、最初の生体内への侵入経路でもある肺胞上皮細胞が抗結核応答にどのように関与しているかは不明な点が多い。そこで、実際にII型肺胞上皮細胞を単離し、上皮細胞のBCG感染に対する感受性を解析した。Lcn2ノックアウトマウス由来の肺胞樹皮細胞では、正常マウス由来の細胞に比べて有意にBCG感染後の菌数が増加しており、肺胞上皮細胞から分泌されるLcn2の重要性が明らかになった。

[IX] 中国: オフロキサシン耐性結核の現状に関する基礎研究及びXDR-TBの研究

(a) 109の臨床株全部で、*gyrA*コドン95のACC突然変異が見つけられた。これは、オフロキサシン耐性と関係がなかった。87のオフロキサシン耐性結核菌株のうち49株(56%)で*gyrA*の突然変異が見つかった。49株のうち10株は、Ala⁷⁴Serの変異で、以前報告されていないものであった。*gyrB*で突然変異は見られなかった。

(図19)

昨年、複十字病院で分離された結核菌350株のうち、MICとDHPLCにより7株(2%)でオフロキサシン耐性株が見つけられた。この7人の結核患者が、どのようにオフロキサシン耐性を獲得したかを調べるために、カルテを精査したが、明白な原因は不明であった。



地図3. 中国 北京

(b) ハルビン医科大学及び服部・Hong Lingは4種の薬剤すべてに対して耐性を示した患者が5例検出された。これらがXDR-TBか詳細な解析を行っている。5例のうち3例は喀痰検査(スメアー)また5例ともに結核病歴を有していた。七年間あるいは二年間断続的な咳があった例があった。一方で血痰を認めた症例はなかった。呼吸困難を認めた例が2例で発熱を認めた例も2例であった(表7参照)。

表 7

症例	性別	年齢	診断	喀痰検査	結核病歴	リスク コンタクト	BCG 接種	FP D	咳嗽	咯 血	息 切れ	体 重 減 少	その 他
2390	男	73	肺結核四型、慢性気管支炎、慢性閉塞性肺気腫、慢性肺原性心臓病	陰性	2年前肺結核	無	無	無	断続的咳嗽咳痰2年余	有	有	有	近十日高熱
2511	男	48	肺結核三型、肺内臓統感染、慢性気管支炎、閉塞性肺気腫	陽性1	肺結核歴12年、喫煙歴20年以上	無	無	無	咳嗽咳痰一周間	有	有	有	発熱1週間
2442	男	38	肺結核三型、肺内臓統感染、間質性肺炎	陰性	7年前肺結核	無	無	無	半月	有	半月	有	有
2450	男	48	肺結核四型、肺内臓統感染、自覚性気胸、肺原性心臓病	陰性	9年前肺結核	無	無	無	七年	有	10日	有	有
2526	男	43	肺結核三型、肺内臓統感染、右側液気胸、糖尿病二型	陽性1	4年前肺結核	無	無	無	半月前より増悪	有	有	有	有

表：ハルピン医科大学サンプルにみられる薬剤耐性結核の病態

160サンプルのうち、ストレプトマイシン、イソニアジッド、リファンピシン、エタンブトールすべてに耐性を示した5例。

[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：

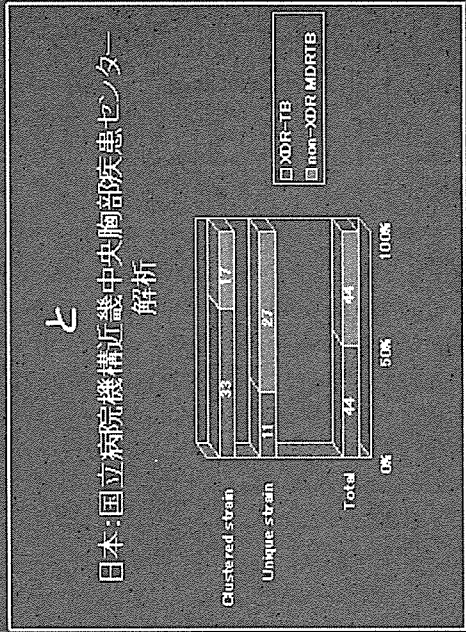
1. インド国の結核の現状
2001年の新発生患者数は180万人、新発生塗抹陽性患者は795,000人、結核死亡者数は417,000人である (Source: Provision WHO estimates Sept 2003)
2. 研究協力施設から、結核菌株の提供および共同研究に対する合意を得ることができた。実際に結核菌株の提供をしてもらうためには政府に申請して許可を得る必要があり、日本に菌株を搬送してもらうのは、許可取得後となる。訪印し結核菌検査を行う研究者と十分な協議を行い、共同研究を行う検査施設を視察し、そこで行われている検査内容を確認した。共同研究を行うためには、日本の方から培

地・試薬等の資材の提供は必要であるが、基本的な共同研究を行う設備は整えられてきている。役割分担として、1) 結核菌遺伝子型のpopulation based studyの実施に向けて、研究協力施設における塗抹陽性喀痰の処理済み沈査をすべて収集保管し提供してもらう、2) 2006年度分離のMDR-TB菌株の加熱死菌の提供してもらう、3) 提供検体については、日本で研究分担者・協力者（高鳥毛、田丸）による結核菌同定、耐性遺伝子検出、遺伝子型別分析を実施する、4) LAPM法による結核菌同定とVNTR法による遺伝子型別法をSafdarjung Hospital細菌検査室において実施できるように技術提供を行うこと、を取り決めた。上記に関しては、インド政府の許可が下り次第実施する予定である。(図20)

超薬剤耐性結核菌 (XDR-TB) アジア地域での：中国と日本

XDR-TBの新たな定義 (1) 少なくとも RFPと INHに耐性(MDR-TB) (2) フルオキノロン耐性 (3) 注釈可能な薬剤の1種以上耐性 アミカシン、カナマイシン、カプレオマイシン

中国 ハルピンの多剤耐性結核
 (ハルピン医科大学 教授と) 標本(結核菌)中 例 強力な薬剤耐性
 リファンピリン(イソニアジド) ストレプトマイシン(エタンブトール) 耐性



中国におけるオフロキサシン耐性結核菌の研究(gyrA遺伝子)

成果

- (1) 中国(北京)ではgyrA遺伝子においてdouble point mutations 率 高率。
- (2) 中国(北京)では87例中56%の高率で変異
- (3) 日本、清瀬市複十字病院350例中7例(2%)(コルオキサロン耐性)
- (4) 中国ではニューキノロン系薬剤が一般感染症に極めて多く投与されるためオフロキサシン耐性結核菌高率

オフロキサシン耐性結核菌のgyrA遺伝子変異

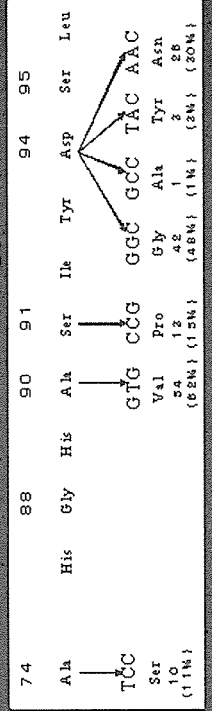


図 1 9