

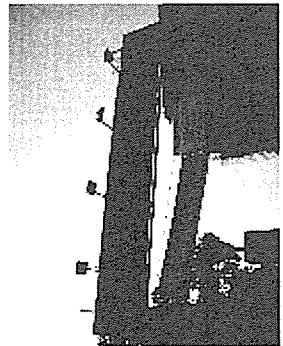
# インド(デリー)における薬剤耐性結核菌に 関する分子生物学的研究

## < 研究成果 >

1. インドにおける地域ベースの結核菌株研究を推進するために、研究機関・研究者との協力体制を確立  
Vardhman Mahavir Medical College (VMMC)
2. 地域ベースの結核菌株を収集し、分析するためのシステムを確立
3. インドの結核菌株を日本で分析を行うだけでなく、現地で分析できる共同研究体制が確立

中期的に研究協力の得られる施設の確保

Vardhman Mahavir medical College (VMMC)



インド、ニューデリー  
インド最大の病床数を有し、  
結核DOTSセンターも併設する  
Safdarjung Hospital(SH)  
に付属するMedical college

結核菌分子遺伝学的研究における  
日印の役割分担決定

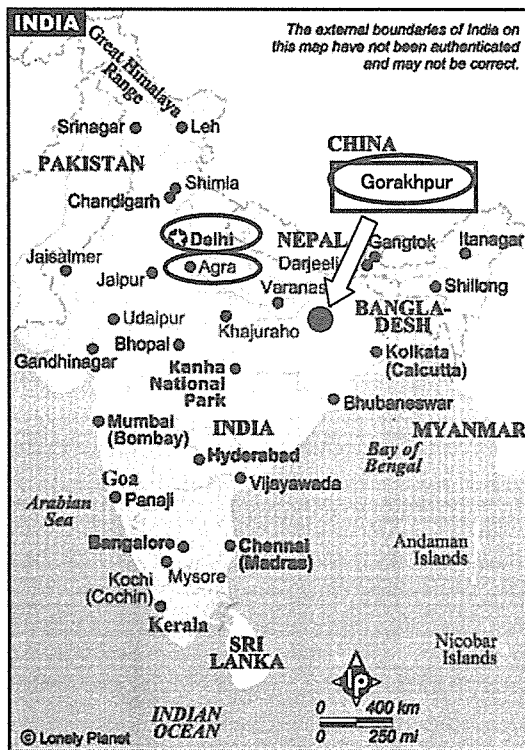
SH Microbiology Dep.

- ・2006年度分離のMDR-TB菌株の加熱死菌の分与
- ・SH院内結核センターにおける塗抹陽性検体の  
収集・処理済み沈査作製・-20℃での保管・提供

高島毛・田丸

- ・加熱死菌、塗抹陽性沈査からの菌種同定、薬剤耐性遺伝子  
検出・遺伝子型別の実施、結果報告
- ・LAM印法による結核菌同定法、VNTR型別による遺伝子  
型別法の技術提供

菌検査を実施に当たっての費用負担等も今後協議の上詳細を決定することになっている。VNTR型別についてはRFLP分析と同等以上の解析能を有する18loci-VNTR型別法を確立した。18loci-VNTR型別は遺伝的類似の高い大阪府内の結核分離株についてすでに実施しており、インド臨床分離株に対しても分析することは有用性である。



地図4. インド

[X] シンガポールにおけるINH耐性結果菌の研究：

1. INH低レベル耐性菌の性状

MGIT ASTで耐性・小川比率法で感受性の表現型を示した30株の結核菌の性状を調べた。2つの検査法で用いているINHの検査濃度が異なることからMiddlebrook 7H10寒天培地でMICを測定した。不一致の結果を示した30株のうち、9株は0.4 μg/ml、19株は0.8 μg/mlのMICを示した。この結果は、28株は低レベルINH耐性菌であることを示している。残りの2株は0.2 μg/mlのMICを示し感受性の表現型であった。INH高度耐性株はカタラーゼ活性を完全に失っているとする報告がある。

2検査法で不一致の結果を示した株のカタラーゼ活性を半定量カタラーゼ試験で調べた。産生量に差はみられたがすべての株がカタラーゼ活性を有していた。

さらに性状を確認するために、INH耐性に関与することが知られている*katG*、*inhA*、*ahpC*遺伝子の変異を調べた。INH低レベル耐性菌28株の中で15(53.5%)株の遺伝子に変異がみられた。残りの13株には調べた領域に変異を検出できなかった。変異を持つ株の中で2株は2つの遺伝子(*katG* + *ahpC*、*katG* + *inhA*)に、13株は単一の遺伝子に変異を示した。*katG*遺伝子のコドン315の変異がINH高度耐性に関与していることが知られている。3株は*katG*遺伝子に変異を示したがコドン315に変異を持つ株はみられなかった。INH低レベル耐性菌28株の中で13株(46.4%)は*inhA*遺伝子のプロモーター領域(-15)にC→Tの変異を持っていた。しかし、*inhA*遺伝子のORFに変異を持つ株はみられなかった。このことは、*inhA*遺伝子のプロモーター領域の変異がINH低レベル耐性に関与しているとする報告を支持している。

2. シンガポールとの共同研究

SGHはベッド数1,600のシンガポール最大の総合病院である。本研究のカウンターパートであるSGHのCTBLではシンガポールの抗酸菌検査の90%が行われている。培養にはBACTEC MGIT 960を、薬剤感受性検査にはBACTEC 460TBを用いている。シンガポールにもINH低レベル耐性菌が存在するかどうかCTBLと共同で研究した。2006年1月から7月までにCTBLで分離された結核菌でBACTEC 460TBによる感受性検査でINHに耐性を示した50株を研究に用いた。1株は黄色コロニーが含まれていたことから除外した。ウエルパック培地との一致率は59.1% (29/49)であった。20株(40.8%)は不一致の結果であり、それらはBACTEC 460TBで耐性しかし小川比率法で感受性であった。わが国で分離された結核菌について、BACTEC MGIT 960 ASTと小川比率法の結果の不一致率は31.2%であり、シンガポール分離株の一致率が幾分低い結果となった。これはCTBL側でバイオセーフティを考え一部の多剤耐性菌を除外していることから起きていると考えられる。これらの結果はシンガポールにもINH低レベル耐性菌が

存在することを示している。不一致株のMIC測定および遺伝子の検索は次年度に計画している。

[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ワクチンの構築改変と有効性評価  
結核感染症に対する新規のDNAワクチンを臨床応用するためには、臨床において実績のあるプラスミドを用いて構築を行う必要がある。そこで、従来のpcDNA3.1ベクターを骨格とする構築を、臨床実績のある骨格へ改変した(図21、表8、図22)。構築したプラスミドを使用して、マウスIL-12遺伝子とHSP遺伝子の発現効率を蛋白質レベルで検討したところ、HSP65遺伝子とIL-12遺伝子で従来の構築に対してそれぞれ50%と200%程度の発現レベルが認められた。この結果から、新規構築においても遺伝子の発現が確認されたため、それらを用いて疾患モデル動物による薬効試験で更に比較検討を行うことにした。その結果、マウスモデルでELISPOTアッセイのデータを指標とした比較検討で、従来型と新規構築で同レベルの免疫の活性化が認められた。この結果から、新規構築においても薬効に必要な免疫の活性化が誘導されることが明らかとなった。今後は、下記に示す新規構築も含めて実用化に必要な薬効や安全性の検討を更に進める予定である。

上記のようにして構築したDNAワクチンでは、IL-12とHSP65遺伝子は別々の構築上に存在しているため、開発時に2種類の成分の取り扱いになると予測される。そのため、有効性を検討するための前臨床試験を行う場合には、それぞれの配合比を検討して至適混合比を見出す必要がある。また、GMP製造を行う場合の品目数が増える上に、試験を行う場合に2成分となるため試験の群数の設定が複雑になる。そこで、構築を変更して1つのプラスミド上に2種類の遺伝子の発現ユニットを搭載することが出来るかを検討した。そのために、上記のようにして構築したプラスミドからマウス、ヒト、モルモットのIL-12遺伝子の発現ユニット(プロモーター+IL-12遺伝子+ポリA付加シグナル)を含むDNA断片をそれぞれ調製し、HSP65の発現プラスミドへ組み込みを行った(図23)。そして、構築した

DNAワクチンについて培養細胞を用いて遺伝子の発現を検討した。その結果、BHK21細胞においてはHSP65遺伝子とIL-12遺伝子の発現レベルは共発現を行わない場合の70%と20%程度のレベルまでそれぞれ減少することが明らかとなった。発現量低下の原因としては、共発現型のプラスミドではサイズが1.3倍~1.6倍程度に増加していることが原因と考えられる。今後、単独発現のプラスミドを2種類導入した場合と、共発現型プラスミドを導入した場合で、薬効を指標にした比較検討を実施し、臨床応用に使用する構築を選定する予定である。

また、臨床応用に必要な薬効薬理と安全性試験のために、新規構築での用量・用法設定についても検討を進める予定である。

## 2. DNAワクチンの有効性を向上するための研究

従来の製剤においても薬効(ワクチン効果、治療効果)が認められていたが、臨床応用と医薬品としての実用化を想定して、更に製剤面での開発を進めることにした。製剤開発の課題としては、薬効、保存安定性、取り扱いの簡便性のそれぞれの面での向上である。そこで、保存安定性の面で優れた凍結乾燥による製剤化条件について検討を行い、DNAワクチン(筋内投与、鼻腔内投与)に適した新規凍結乾燥製剤を開発した(図24)。そして、新規凍結乾燥製剤を用いて遺伝子の発現レベルをマウスへの筋内投与で行ったところ、レポーター遺伝子(LacZ遺伝子)の発現レベルを指標として、80倍以上の遺伝子発現増強が認められた。また、従来製剤はマイナス80度での凍結保存を必要としていたが、新規の凍結乾燥製剤については4度の冷蔵保存が可能となった。

以上のように、臨床応用や製品としての実用化に適した新規結核DNAワクチンの製剤化について検討を行い、従来の製剤よりも活性が高く、保存安定性に優れた製剤を開発することが出来た。新規製剤においては、DNAワクチンの単位重量あたりの遺伝子発現レベルについても増強が認められており、封入率の向上だけでなく、HVJ-EベクターとプラスミドDNAとの複合体形成のメカニズムも変化していることが示唆されている。現在、結核の動物疾患モデルに投与を行って遺伝子発現の増強によりDNAワクチ

ンとしての薬効が増強されるかについて検討を進めており、データを取得した後に最終製剤の剤型を選定する予定である。

### 3. DNA ワクチンの製造技術の検討

前臨床試験と臨床応用の実施を考慮して、実際に治験薬を製造する予定のパイロットプラントで製造したHVJ-Eベクターを使用して活性の評価を行った(図7)。製造後に品質試験により評価を行った結果、遺伝子導入活性など規格値として採用する予定の品質管理項目についての品質レベルが確認された。そこで、上記のようにして構築を行ったプラスミドDNAと技術を用いて製剤化を行い、疾患動物による薬効検

討試験用に供与を行った。その結果、薬効に必要なHSP65蛋白質に対する特異的免疫の誘導が認められることが明らかとなった。以上の結果から、治験薬製造を想定した製造施設と製造工程で製造を行ったDNAワクチンで、目的とする免疫の活性化が誘導できることが明らかとなった。

今後は、実験動物で有効性・安全性を確認する前臨床試験用のDNAワクチンの製造に向けて更に無菌製造工程の改良を行い、簡便でスケールアップに適した製造技術を開発する予定である。また、実用化に必要な臨床応用を目指して、製造工程と施設のバリデーションについて研究・開発を進める予定である。

## HVJ-Eベクターによる新規結核DNAワクチンの開発

1. プラスミドDNAにより抗原(HSP65)とIL-12の蛋白質を長期間発現(遺伝子導入)
2. HVJ-EベクターによるTh1活性化で細胞性免疫を効率的に誘導(アジュバント効果)

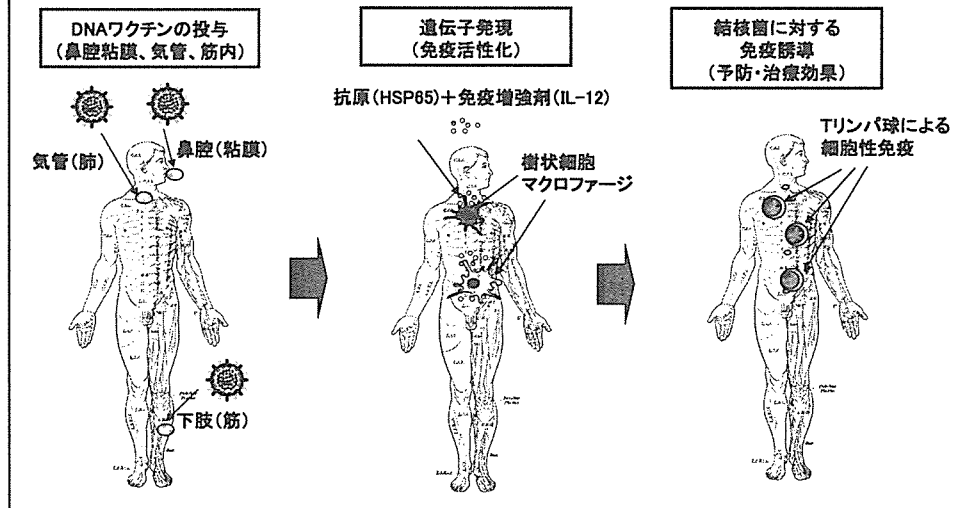


図 2 1

表 8

## HVJ-Eによるアジュバント効果

1. 投与部位への免疫細胞浸潤の誘導
  - a. 単球系の細胞の浸潤(抗原提示細胞)
  - b. Th1タイプのTリンパ球の浸潤
2. 投与部位でのサイトカインの産生誘導
  - a. I型IFN(IFN  $\alpha$ 、 $\beta$ )の誘導
  - b. IFN- $\gamma$ の誘導
  - c. IL-12の誘導(DNAワクチン)
3. 樹状細胞の分化・成熟の誘導

## DNAワクチン用の新規プラスミド構築

### 新規ベクターの特徴

1. アンピシリン耐性でなくカナマイシン耐性：残留抗生物質の安全性リスク低減
2. 国内の遺伝子治療の治験での実績：臨床応用の申請
3. ミニマムな配列設計：製造効率、遺伝子導入効率、安全性(組み換えリスクの低減)の向上

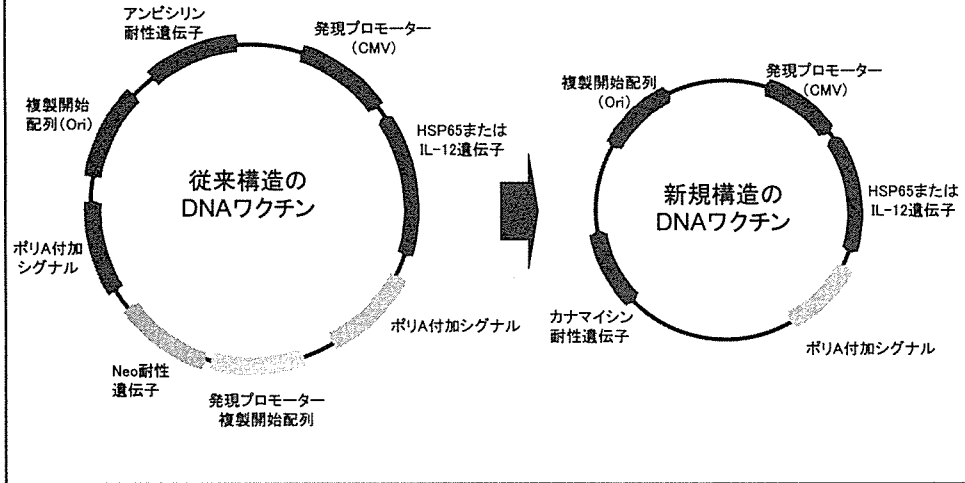


図 2 2

## 共発現型DNAワクチン用の新規プラスミド構築

HSP-85遺伝子とIL-12遺伝子が1つのプラスミドで発現される

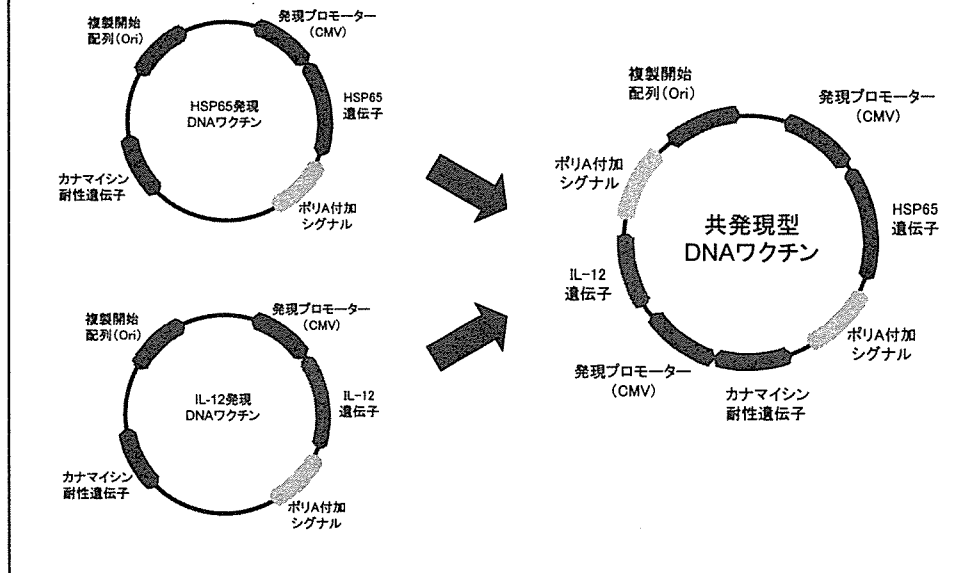


図 2 3

# HVJ-Eベクター製剤化工程の概要 (凍結乾燥工程のフロー)

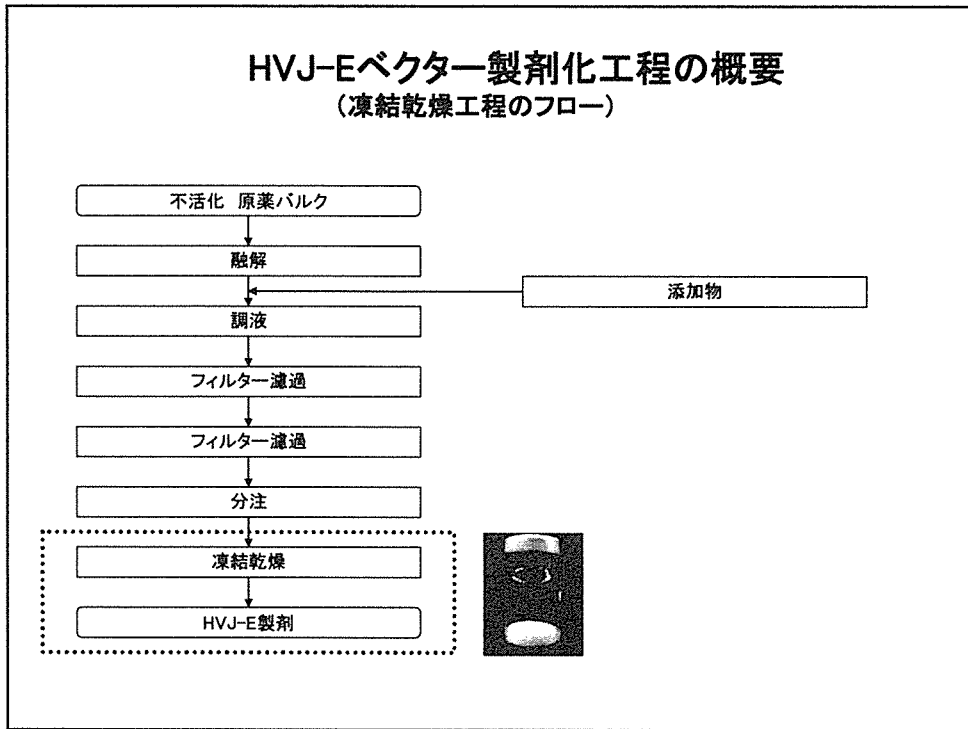


図 2 4

[X I] 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：

通常健康成人での第一相臨床試験(Phase 1)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。

[X II] 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(健康人で行う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て、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っている。例えば、近年導入された特異抗原刺激末梢血単核球遊離IFN- $\gamma$ 測定(QFT法)は臨床で広く使われつつあるが、複数回施行108例でIFT $\gamma$ 測定値上昇につき検討を行い、18例で上昇を認めたが、明かな治療失敗例はなかった。この方法は結核治療を正確に行い、アジアにおける多剤耐性結核の制御に有力な武器とな



る。

### [XIII] 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：HSP65DNA+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（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 バキュロウイ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。組換えバキュロウイルス (AcNPV-CMV-Hsp65) を免疫したマウスの脾臓細胞では、Hsp65タンパクに反応してIFN- $\gamma$  が産生されることが確認された。AcNPV-CMV-Hsp65ワクチンが感染防御効果を誘導する次世代の有望なワクチンとなりうることを示唆している。

④ 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。

我々が結核の防御抗原であることを証明したMPT51分子を発現する第三世代レンチウイルスベクターを経気道感染することにより、肺および脾臓に記憶CD8<sup>+</sup>T細胞を誘導することが出来た。しかし、縦隔リンパ節に記憶T細胞を検出できなかった。このことは、このワクチン法は肺結核の予防に有効であることのみならず、脾臓が特異的記憶T細胞のプールとなりうることを示唆している。

(6) リコンビナントBCGワクチン改良・開発の研究：これまで多種のリコンビナントBCG (rBCG) ワクチンが作製された。これらのrBCGを実用化するために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の研究を行った。チミン要求性を指標とするために、チミン合成経路の酵素thymidylate synthaseの遺伝子破壊株の作製実験をおこなった。BCGにおいてはthymidylate synthaseの遺伝子として、*thyA*および*thyX*の2つの遺伝子があるため、スクロース感受性遺伝子導入による、スクロースに対する感受性の変化を指標とした相同組換えにより、両遺伝子の2重欠損株

の作製を試みたが、チミン要求株を得ることができなかった。

(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。

[XIV] 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のは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。

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。

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。

[XV] 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M $\phi$ にとり込まれM $\phi$ 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M $\phi$ 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 Secretary 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 secretary 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：ヒト単球よりM-CSFで分化誘導したM型M $\phi$ は結核菌を殺菌するが、GM-CSFで分化誘導したGM型M $\phi$ は結核菌の増殖を促す。M型M $\phi$ 及びGM型M $\phi$ の結核菌殺菌活性の違いに関して、オステオポンチン産生能との関連を検討した。その結果、M型M $\phi$ 及びGM型M $\phi$ のいずれのM $\phi$ も、結核菌感染によりオステオポンチンを大量に産生することから、オステオポンチン産生能が、これら両M $\phi$ の結核菌の殺菌・増殖抑制能の違いと直接関連しないことが明らかになった。

[XVI] 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- $\gamma$ 産生の系で解明された。

[XVII] 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-エンベロープ/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。

[XVIII] ヒューマン・サイエンス振興財団研究事業(平成18年度新興・再興感染症)JHSF(ヒューマンサイエンス振興財団)の支援により表9の如くタイ(チェンライ)、中国(ハルビン)、フィリピン、タイ(バンコク)とのアジア地域における研究ネットワークを活用した多剤耐性結核の制御研究が飛躍的に進展した。さらに、モルモットの結核研究で世界で最も有名なTexas A&M大学マックマレー教授を招へいし、新しい結核ワクチン研究が飛躍的に進展した。

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25)
  - (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。
  - (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-エンベロープはすでに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。

表 9

(財) ヒューマン・サイエンス振興財団 研究事業 平成18年度新興・再興感染症	
1. 外国の研究機関等への委託事業 (野内)	Srisin Khusmith Mahidol大学教授 「タイ国チェンライ県における結核患者の難治性要因に関する臨床疫学・免疫学的研究」
2. 外国の研究機関等への委託事業 (岡田)	Esterlina Virtudes Tan部長 Leonard Wood Memorial 研究所 「カニクイザルを用いた新しい結核治療ワクチン(HVJ/Hsp65DNA+IL-12DNA)による新しい結核治療法の開発」
3. 外国人研究者招へい事業 (服部)	Ling Hong ハルビン医科大学教授 「HIV感染者の薬剤耐性結核に関する研究と結核早期診断の確立及び中国における多剤耐性結核の制御」
4. 外国人研究者招へい事業(岡田)	David Neil McMurray Texas A&M 大学教授 「The study of novel vaccine against Mycobacterium tuberculosis using Aerosol Exposure Chamber system in mice and guinea pig」

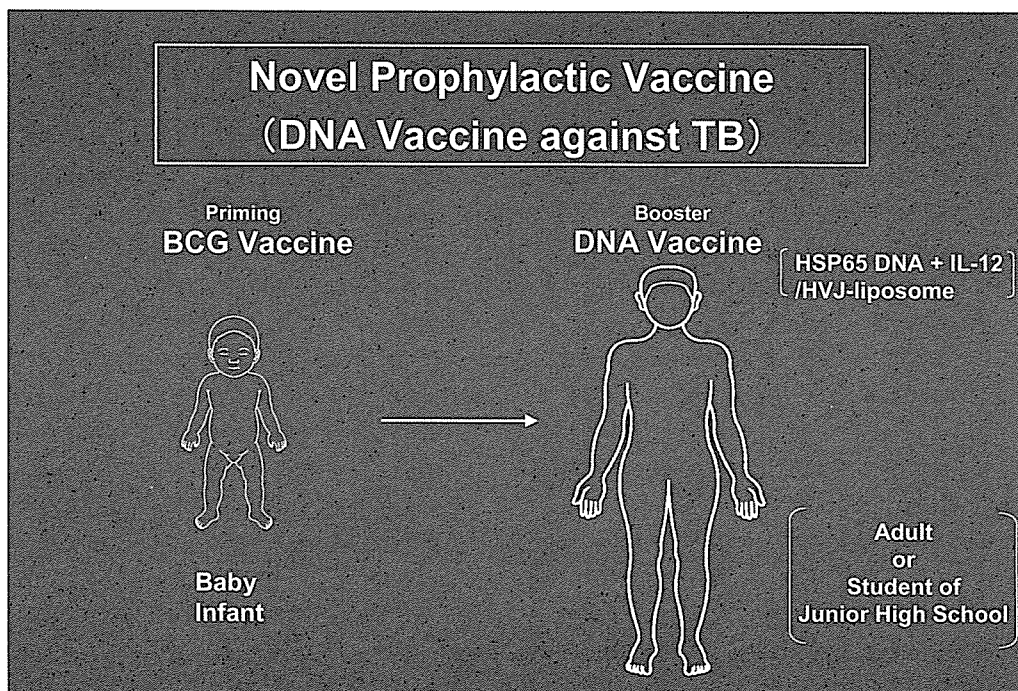
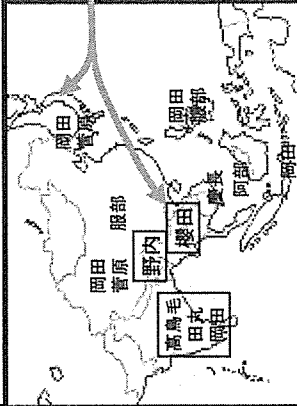


図 2 5



# 研究成果

## 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



### アジア地域

1. 中国 (Guobin, 凌, 服部, 岡田, 菅原) アジア地域 (中国) の多剤耐性結核菌 DNA 50 例 VNTR で解析、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発見。  
多剤耐性結核菌の EB, OFLX 薬感受性遺伝子解析。  
インド (Singh, 高島毛, 岡田) (高島毛) インドの大学 (Singh 学長) とインド最大の結核病院 サフダゲン 病院 と分子遺伝的解析契約 (VNTR 等)。  
タイ (Chachottaworn, Srisin, 野内, 櫻田) (チエンライ) 県で野内と櫻田) 多剤耐性・再発・治療失敗例のコホート研究。チエンライに実証を整備。  
フィリピン (Tan, Olveda, 岡田, 服部) カニクイガルを用いた結核ワクチン開発研究が進展。  
シンガポール (阿部) INH 低レベル耐性菌を初めて発見。

Phase I clinical trial に向けてタイ厚生省、本邦で準備開始 (倫理委員会)

### 開発

- ① 多剤耐性結核に対する新しい結核治療ワクチン・予防ワクチン (中島、松本、E.V.Tan)
- ② スーパー・スプレッダー多剤耐性結核-XDR-TB 制御 (鈴木) アジアにも日本と同じスーパー・スプレッダー-MDR-TB が存在を発見
- ③ 新しい化学療法剤 (松本、岡田) OPC-67683, 及び CPZI は, MDR-TB, S-S-MDR TB, XDR-TB にも有効。

### 日本

国内では国立病院機構政策医療呼吸器ネットワーク54施設  
近畿中央胸部疾患センター (呼吸器標準シヨナルセンター)

北海道 関東 近畿 中国 九州  
岡田 野内 菅原 慶長 櫻田 赤川  
服部 高島毛 阿部 坂谷 竹田 田丸

### サンプル

- ① 多剤耐性結核菌
- ② 患者血清
- ③ 患者リンパ球

1. スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌 初めでの発見。中国でも日本と同じパターン。中国でも XDR-TB 菌の存在 (106 例中 5 例)。本邦には XDR-TB が多剤耐性結核の 50% 以上存在。
2. TRIF / MyD88 二重欠損マウスは結核菌易感染。リポカルイン 2 は結核菌増殖抑制。
3. 血清中 granulysin (Gra) 測定。多剤耐性結核患者でキラート (Gra) 低下。Gra 遺伝子導入マウスを作製し、Gra が生体内でも結核菌殺傷。
4. 患者リンパ球 → リンパ球機能、Mφ 機能。ヒト M 型 Mφ の結核菌増殖抑制。

現地でも遺伝子・免疫共同研究 (倫理委員会)

### 解析

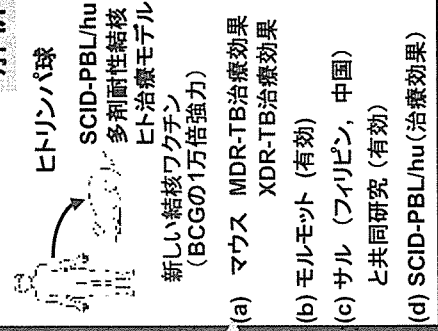


図 26

- (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) 平成19~20年はBCGより1万倍強力なワクチンの第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及びCPZ)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 自然免疫系に属するマクロファージや樹状細胞はT細胞を中心とした獲得免疫系との連携などにより、結核感染防御に深く関与している。しかし、今回の研究から、結核菌の呼吸器感染において、最初の侵入サイトとなる肺上皮細胞が、抗結核応答の最前線の応答場所としてLcn2を分泌することにより、極めて重要な役割を担っていることが明らかになった。Lcn2は、一度分泌されたあと、細胞内に受容体を介して取り込まれ、細胞のアポトーシスを抑制することが報告されている。そのため、結核感染の最前線でも上皮細胞内に侵入した結核菌を細胞内でその増殖を抑制している可能性もあるのではないかと考えている。
- 12 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。
- 13 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。
- 14 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] (図26)

(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。このような研究にはタイ国のチェンライ県のように、地域ベースで20年の地域結核登録データベースを持ち、しかも菌体保存を10年以上保存している地域は研究開発のフィールドとして重要である。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が、その比較が出来る。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研究発表している。しかし、症例の蓄積、血漿、PBMCの保存は検体バンクとして進めてきたが、宿主側の要因検索は進んでいなかったので、今回の研究を機会として進行させる。

コホートは倫理委員会の承認が得られたので、前向きな取り込みを増やし、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る。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、このよう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し、岡田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イ国研究機関との共同作業によるコホート研究の運営を通じて、今後の研究開発の組織化

についての検討を進めたい。

その研究開発での課題を明確に同定する為、長崎大学が中心メンバーであるアジア西太平洋地域の倫理審査委員会フォーラム

(FERCAP)主催の国際シンポジウムに参加して、より倫理的な側面から、本研究班の中心テーマである多剤耐性結核の制御に役立つ具体的な製品開発の具体的な方向性を検討したい。

長崎大学は海外拠点も活用した国際的な医薬品の製品開発の分野において、パイオニアの活動を展開しており、結核分野においても結核専門家と連携をしながら、多剤耐性結核の制御に役立つ製品開発のあり方を検討できる。

タイ国では、BCGは東京株を使用しており、またBCGレコンビナントにてHIVワクチンを開発してきた事より、結核ワクチンの開発に関して興味を持っている。岡田班長はアジアにおける数少ない結核ワクチンの開発者であり、共同研究の意義は深い。

健常者であっても単球からマクロファージへの分化には、形態学上の或いはサイトカイン等の産生における差異が存在する。一応、タイにおける分化実験は成功したが、日本国内で実施した予備実験の結果から、患者検体を使用した場合、さらに大きな差異が認められる可能性が予測される。

今後のタイ国内での研究を成功させる鍵はチェンライーバンコックの間の検体の移送システムにあると考えられるため、移送システムの整備を急いでいる。今のところ、現地共同研究者が定期的にバンコックに検体を移送する方法が考えられている。検体のすべてはタイNIHに保管され、実験の大半もそこで実施されることから、このシステムの運用が非常に重要であることは言うまでもない。

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において検討した。その結果、双方の型のマクロファージにおいて単球からマクロファージへの分化過程で遺伝子発現が起きること、BCG感染によって発現が著明に増強されるが、M型とGM型の間にはmRNAレベルとタンパクレベルの発現の間に乖離が観察された

ことは注目に値する。GM型に比較してM型がBCGを効率的に殺菌するにもかかわらず、osteopontinのタンパクレベルの発現量の多寡は、殺菌効率とパラレルにはなっていない。またWestern blottingから二つの異なるマクロファージのタイプが産生するosteopontinの分子量に違いがないことが分かっている。このことから、osteopontinは細胞の運動や菌の貪食に関わってはいても、殺菌には直接関わっていない可能性が示唆された。

## (2) 中国：

中国で160の結核菌株より5株の薬剤耐性株を得た、これらの臨床症状からすると5例全例が以前に結核を罹患したことのある患者であり、その治療の際の問題点があげられる。今後はVNT Rを用いてこの結核菌が昨年報告した Super Spreader MDRと近似のものであるかどうかを検討する準備を進めている。またこれらの菌株の第二選択薬に対する薬剤感受性試験を行いXDR-TB菌であるかの検証も大事である。中国からの菌株の受け入れは困難であるのでこれらの実験をハルビン医科大学で行えるべく共同研究体制を強化する必要がある。

中国で、すでにオフロキサシンを含むFluorquinolone耐性が存在することを示している。この原因を、早急に調べる必要がある。日本では、まだ耐性比率が低く、中国のデータとは、違いが大きい。中国、日本で、オフロキサシン耐性の広範な研究がないので、行う価値がある。中国では、オフロキサシン耐性結核の頻度が高いので、治療法の再検討が必要である。

## (3) インド：

① 今年度は分担研究者、研究協力者、主任研究者が訪印し、インドにおける結核菌検査担当者と直接協議を行った。今後、インド分離結核株の研究を具体的に進めていく道筋ができた。研究協力施設に隣接する地域の結核センターにおける塗抹陽性喀痰検体数は100程度、肺外結核由来株を入れても年間150程度確保できると推定され研究解析を行うには十分な数を得ることが可能である。

② インドにおいては治療失敗例のみが後方の結核菌検査センターに結核菌が回されることになっており、すべての塗抹陽性患者の菌検査を行う流れになっていないが、共同研究をすすめる中ですべての塗抹陽性患者の菌株を研究対象として実施できるようにしていくことが課題として残



されている。

- ③ MDR-TB以外の結核菌株については、結核菌のIncidence、薬剤感受性パターン等は現在のインドにおける検査体制では明らかにできる状況にはなかった。
  - ④ 国内における結核高蔓延地域における抗酸菌症起因菌の種類、MDR-TBを含む薬剤耐性菌の耐性遺伝子変異部位の調査についての結核菌の分子疫学研究をすすめ、インドにおける結核菌研究に応用していくことを計画している。
  - ⑤ Safdarjung Hospital細菌学研究室においてLAMPによる結核菌同定、VNTR法による遺伝子型別の検査の実施を望んでいた。現在建物を新築し結核菌検査設備は整備されてきており、来年度はインドにおいて基礎的な分子生物学的検査を実施し、そこでできない詳細な分子遺伝学的な研究を日本の研究施設で行っていくような研究分担をすすめていく。
- (4) シンガポール：  
シンガポールにもINH低レベル耐性菌が存在することを示している。不一致株のMIC測定および遺伝子の検索は次年度に計画している。
- (5) 日本：  
多剤耐性結核の克服にとって、正しい薬剤感受性検査が迅速に得られることは必須の項目である。今回の5症例は従来の培養法を用いる薬剤感受性結果が得られないか、正確な結果を得るのに長期間要し、臨床的には問題の例であった。今回市販の2キットを用いて、薬剤耐性遺伝子の変異の有無の検討を実施した。その結果は臨床的な薬剤選択判断に有益な情報をもたらした。培養不能例では結果の妥当性の判断は正確にはできない。しかし臨床経過は順調であり、結果が正しかったものと推定している。一方NTM混在例の結果は、後に結核菌を純培養して得られた薬剤感受性結果との比較が可能であった。一部若干の相違はあったものの臨床的に問題になるほどではなく、特にINH・RFPの結果は完全に一致していた。通常薬剤感受性検査が不能な例、また結果が変動したり臨床経過と合わない例では、耐性遺伝子を用いた薬剤感受性検査で臨床上有益な情報が得られる可能性が示唆された。

[ワクチンや診断法の活用・提供]

我々は臨床応用に極めて間近な新しい結核ワクチン、診断法を開発しつつある。当院は呼吸器疾患（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60%の診断治療を行っている、国立病院機構54施設を統括・指導する高度専門医療施設であり、国立病院機構呼吸器ネットワークを用い、これらは多くの国民に活用・提供しうるものである。

1. DNAワクチン研究の成果と今後の活用・提供  
HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンは極めて強力な予防ワクチンとなることが考えられる。早急な臨床応用を計画中。さらに、HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンは薬剤感受性結核のみでなく多剤耐性結核に対しても、マウスの系で強力な治療ワクチン効果を世界に先駆けて明らかにした。この研究成果は通常の結核のみでなく難治性結核や多剤耐性結核に対する新しい予防・治療に活用することができる。特に高度の免疫不全を伴うAIDS合併結核患者におけるリコンビナントBCG療法を慎重にしないではいけな時に強力な活用ワクチンとなる。これらのDNAワクチンは本邦のみでなく全世界に提供する用意がある。
2. Granulysin、KSP37による予後診断法は簡便・迅速であり、結核患者の治療効果を予測する新しい診断法となり、入院期間の短縮や最良の治療方針の決定において、治療経済面でも行政施策にとり極めて有用な診断法となる。今後全国の54施設国立病院機構呼吸器ネットワークで多剤耐性結核患者・難治性結核患者に迅速に普及させ、活用する。もちろんこの新しい予後診断方法及びアッセイ系の提供の用意は積極的に行いたい。
3. 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：我々が開発したIL-2レセプター $\gamma$ 鎖(-/-)SCID-PBL/huモデルは多剤耐性結核の新しいワクチン治療開発のみでなく、新しい化学療法剤開発の良いモデルとなる。
4. ワクチンの開発研究が評価され、World Health Organization(WHO)のSTOP TB Partnership及びWHOのSTOP TB Vaccine Working Groupのメンバーに選出され、極めて高い評価を受けた。すなわち、世界の現在の最先端のワクチン4つのうちの1つにHVJ-liposome /Hsp65DNA+IL-12DNAが選ばれ、WHOの会議で公に認められた。特にHVJ-エンベロープ/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチン

はマウスの系でBCG東京よりも1万倍強力なワクチンで、モルモットでBCG東京よりも強力なことより、Mtb72f Fusion蛋白よりも強力であることが示唆される。さらに、Peter Andersen博士のESAT-6 Ag85B fusionワクチンやHorowitzらのリコンビナントAg85B BCGワクチンよりもこのHVJ-liposome /Hsp65DNA+IL-12DNAワクチンははるかに強力である。さらに、このHVJ-liposome /Hsp65DNA+IL-12DNAワクチンはカニクイザルでも有効であり、ヒトへの臨床応用を考えている。WHOのSTOP TBワクチン・ミーティングにより米国FDAのDr, 米国CDCのDrやスイス、ジュネーブ、WHO本部のDr多数及び南アフリカ、ウガンダ、インド、韓国、イギリス等世界各国のトップの結核研究者・行政者とネットワークができたことより、このワクチンを全世界に提供する計画である。

#### E. 結論

[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-rimTB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)

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### (1) 論文発表

1. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Fukamizu R, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Matsumoto M, David N. McMurray, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, R.M.Abalos, J.A.Burgos, R Gelber, Sakatani M.: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12

DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. Vaccine (in press)

2. Okada M, Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, JSM Peiris, Pei-Jer Chen, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. Vaccine (in press)
3. Yoshida S, Suzuki K, Tsuyuguchi K, Okada M, Sakatani M.: Molecular Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis-Comparison between Multidrug-Resistant Strains and Pan-Sensitive Strains. Kekkaku (in press)
4. Okada M: Novel vaccines against tuberculosis. Kekkaku (in press) 2006
5. 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. 2006;24:1191-1204
6. Okada M: Novel vaccines in Asia against Tuberculosis and SARS. Drug and Future. (in press) 2006
7. Okada M, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Fukunaga Y, Furukawa I, Nakajima M, Teramoto S, Nishida Y, Namie Y, Tsunai Y, Inoue Y, Nakajima T, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Matsumoto M, R Gelber, E V Tan, E.C.Dela Cruz, D McMurray, Sakatani M.: Novel vaccination (HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA) against Tuberculosis using cynomolgus monkey. 41st Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 109-113. 2006.
8. Nakano H, Nagata T, Suda T, Tanaka T, Aoshi T, Uchijima M, Chida K, Nakamura H, Okada M, Koide Y.: Immunization with dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity

- specific to an epitope on antigen 85A. Vaccine. 2006 15;24(12):2110-9
9. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, Peiris M, DeMello D, Chen P.J, Yamamoto 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. Adv. Exp. Med. Biol. 2006; 581-566
  10. Suzuki K, Yoshida S, Tuyuguchi K, Minamoto S, Inoue G, Hayashi S, Okada M, Iuchi K, Sakatani M. : Chemotherapy for pulmonary M.kansasii disease. Kekkaku. 81:41-43, 2006
  11. Tuyuguchi K, Yoshida S, Suzuki K, Okada M, Sakatani M. : Exogenous re-infection by multidrug-resistant tuberculosis. Kekkaku. 81:80-81, 2006
  12. 岡田全司, 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里実, 西田泰子, 網井良恵, 井上ルリ子, 深水玲子, 浅木亮子, 仲谷均, 山田順子, 高尾京子, 浅井律子, 浪江由美: 新しい結核ワクチンの開発. 化学療法の領域 出版中 2007.
  13. 岡田全司: 新しい結核ワクチン. 感染症 出版中 2007.
  14. 岡田全司: 国際ワクチン学会“学会レポート”. 感染・炎症・免疫 出版中 2007.
  15. 岡田全司: 結核ワクチン開発の現況と展望 “呼吸器6 結核・非結核性抗酸菌症; 新しい診断と治療のABC 41”. 最新医学・別冊170:183,2006
  16. 鈴木克洋, 吉田志緒美, 露口一成, 岡田全司, 坂谷光則: 多剤耐性結核菌の院内感染の現状と対策. 化学療法の領域. 22 1691-1695, 2006.
  17. 岡田全司: 結核ワクチンの開発 (抗酸菌感染症医療の進歩). 呼吸 25(5):477-484 2006.
  18. 岡田全司: 結核ワクチン. “結核 第4版” p50-58 (編集 泉孝英, 富岡洋海) 医学書院 2006.
  19. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 岡田全司, 富田元久, 坂谷光則; 培養陰性, 非結核性抗酸菌混在時における結核菌薬剤耐性遺伝子検査キットの有用性. 臨床検査 50巻8号 Page934-939, 2006.
  20. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岩本朋忠, 富田元久, 岡田全司, 坂谷光則; リファンピシン耐性 Mycobacterium kansasii における rpoB 変異の解明. 結核 81巻7号 Page475-479, 2006.
- (2) 学会発表
1. Okada M(Symposist): Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. Fifth World Congress on Vaccines, Immunization and Immunotherapy (WCVII), November 6-9, 2006. Montreal, Canada.
  2. Okada M. (Symposist): Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. Fifth World Congress on Vaccines, Immunization and Immunotherapy (WCVII), November 6-9, 2006. Montreal, Canada.
  3. Okada M(Symposist), Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Fukamizu R, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Namie Y, Yamada J, Takao K, : Novel vaccination (HVJ-liposome/Hsp65DNA+ IL-12DNA) against tuberculosis using cynomolgus monkey. The 6th Awaji: International Forum on Infection and Immunity. 4-7 September 2006 Awaji Island, Japan.
  4. Okada M(Symposist) : Novel Vaccines Against Tuberculosis; Non-antibiotic Strategy for Pulmonary Infection. 46<sup>th</sup> JRS-International Symposium (Japanese Respiratory Society). June 1-3, 2006. Tokyo, JAPAN.
  5. Kanamaru N, Kita Y, 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, Ohara N, McMurray D, Sakatani M, Okada M. : Novel vaccination (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) against Tuberculosis using cynomolgus monkey. The Second International Conference on TB Vaccination for the World (TBV 2006), 19-21 April 2006, Vienna, Austria.
  6. Okada M(Symposist) : Novel vaccination ( HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12DNA )against tuberculosis. 4<sup>th</sup> International Symposium for Gene Therapy: Development of Preventive