

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。またユンビナント 72f BCGは強力な結核ワクチン効果を示した。したがって、

① r72f BCGワクチン ②HVJ /HSP65 DNA + IL-12DNAワクチン ③HVJ /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、HVJ /HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンは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-12 DNA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。

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: 図5) 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7)

結核予防効果の判定には最低数年以上かかる。

[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)

[IV] さらに、新しい抗結核化学療法剤OPC (大塚 松本博士らが開発) やCPZ (カプラザマイシン: 微生物科学研究所 三宅博士らが開発) と、このHVJ-エンベロープ / HSP65 DNA + IL-12 DNAを組み合わせて、結核治療の相乗効果及び治療期間の短縮を計画している。

表1

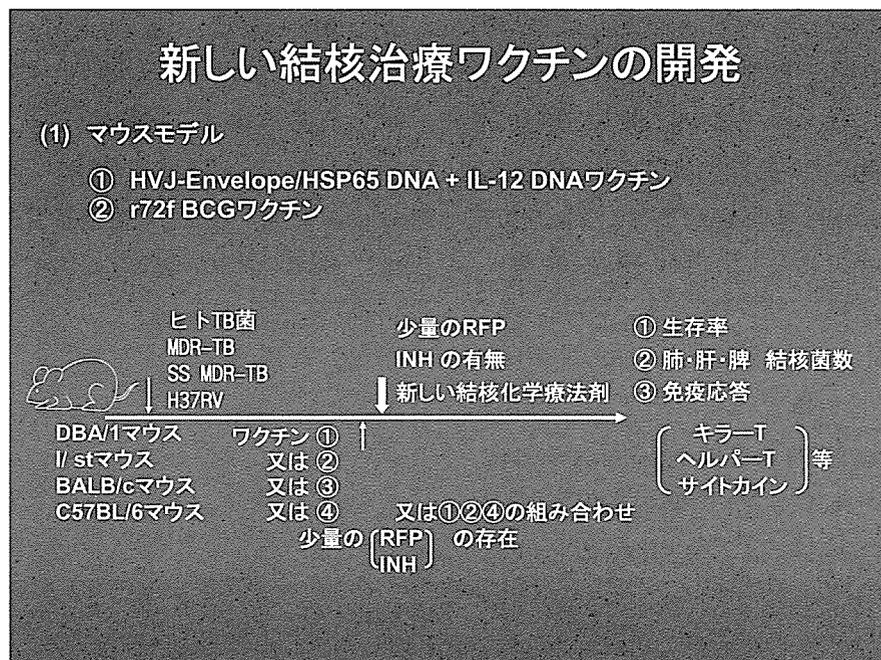


表2

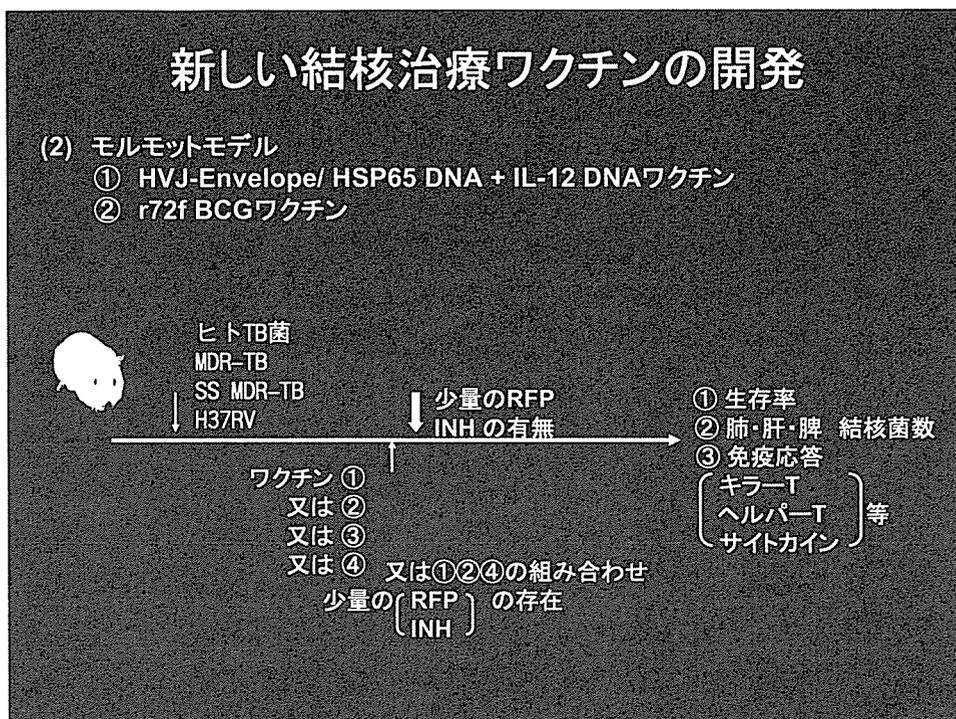


表3

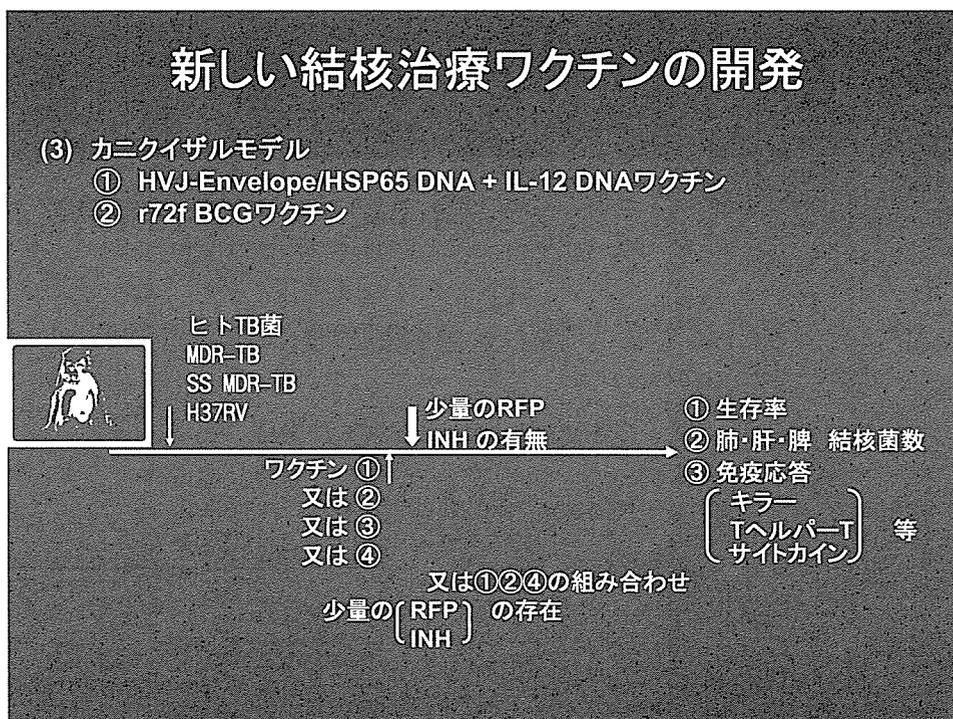


表4

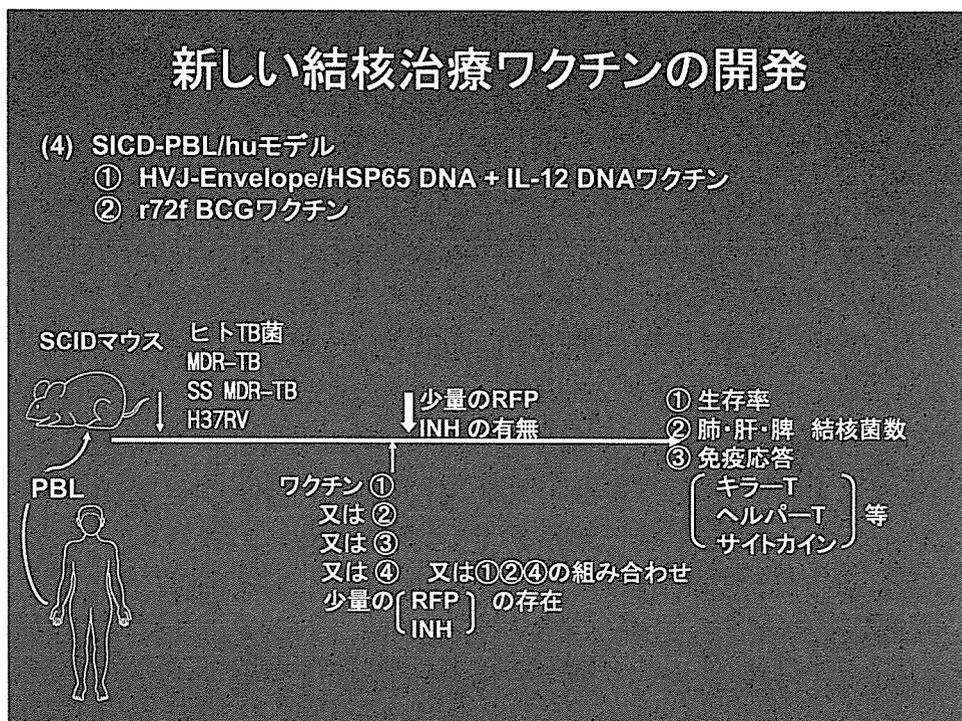


表5

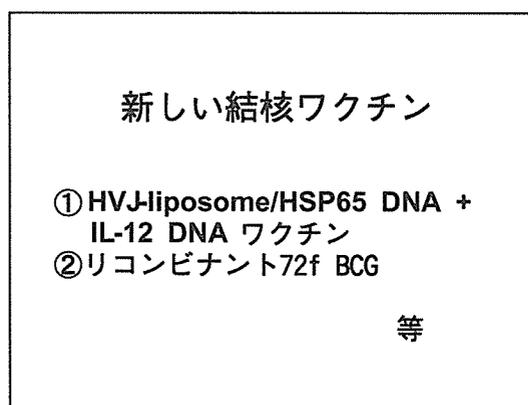


図5

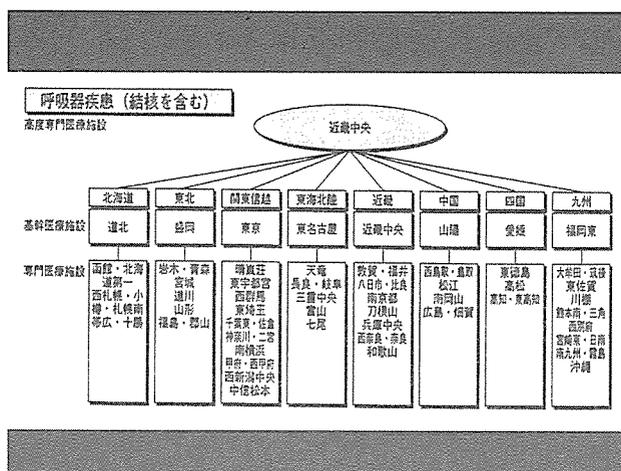


表6

新しい化学療法剤による 多剤耐性結核の制御

(1) OPC+HVJ/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチン

(2) CPZ+HVJ/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチン

表7

<p>結核予防ワクチンの 臨床応用として</p> <p>Phase I study 健常人で行う PPD皮内反応 副作用 PBL免疫反応</p> <p>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</p> <p>Phase III</p> <p>Phase</p>

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。

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。

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のみならずXDR-TBを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。したがって①HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNAワ

[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, Suzuki K, Tsuyuguchi K, Okada M, Sakatani M.: Molecular Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis-Comparision between Multidrug-Resistant Strains and Pan-Sensitive Strains. Kekkaku (in press)
2. 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, D 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)
3. 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)
4. 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.
5. 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; 581-596
6. Suzuki K, Yoshida S, Tuyuguchi K, Minamoto S, Inoue Y, Hayashi S, Okada M, Iuchi K, Sakatani M.: Chemotherapy for pulmonary M.kansasii disease.

- Kekkaku. 81:80-81, 2006
7. Tsuyuguchi K, Yoshida S, Suzuki K, Okada M, Sakatani M.: Exogenous re-infection by multidrug-resistant tuberculosis. Kekkaku. 81:41-43, 2006
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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, 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, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, R.M.Abalos, J.A.Burgos, R Gelber, Sakatani M.: Novel vaccination (HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNA) against Tuberculosis using cynomolgus monkey. Keystone 2007. Vancouver, Canada.
 2. 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.
 3. 藤山理世, 河上靖登, 青山博, 白井千香, 樋口純子, 片上祐子, 平岡恭典, 千原三枝子, 岩本朋忠, 園部俊明, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則: 神戸市において, 結核定期外健診時に施行した QFT-2G 検査について. 結核 81 巻 3 号 Page279, 2006.
 4. 鈴木克洋, 露口一成, 吉田志緒美, 林清二, 岡田全司, 坂谷光則: QuantiFERON-TB 第二世代による結核院内感染対策の試み. 結核 81 巻 3 号 Page276, 2006.
 5. 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.
6. 岡田全司、喜多洋子、金丸典子、橋元里実、西田泰子、綱井良恵、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、井上義一、吉田栄人、中島俊洋、坂谷光則: 結核に対する新しいワクチン (Hsp65+ IL-12 DNA) の開発とキラーT細胞分化誘導効果. 呼吸器病学会 2007.5. 東京
 7. 喜多洋子、金丸典子、橋元里実、西田泰子、綱井良恵、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、吉田栄人、中島俊洋、坂谷光則、金田安史、E. V. Tan, D.L.C. Dela Cruz, 岡田全司: ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた新しい結核ワクチン開発: HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン. 呼吸器病学会 2007.5. 東京
 8. 喜多洋子、井上義一、深水玲子、坂谷光則、岡田全司: 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: Hsp65DNA+ IL-12DNA ワクチン(5). 第82回結核病学会総会. 2007.6. 大阪
 9. 岡田全司、喜多洋子、深水玲子、井上義一、坂谷光則: 結核に対する新しいワクチン (HVJ-Envelope/Hsp65DNA+ IL-12 DNA) によるT細胞活性化機構. 第82回結核病学会総会. 2007.6. 大阪
 10. 浅木亮子、喜多洋子、深水玲子、坂谷光則、岡田全司: 気道内免疫ワクチン及びエアゾル結核感染モデルマウスを用いた新しい結核ワクチン評価法の確立. 第82回結核病学会総会. 2007.6. 大阪
 11. 井上義一、喜多洋子、深水玲子、坂谷光則、岡田全司: 結核に対する新しいワクチン (HVJ-Envelope/Hsp65DNA+ IL-12DNA) の開発とモルモット肺結核病理像改善作用. 第82回結核病学会総会. 2007.6. 大阪
 12. 深水玲子、喜多洋子、坂谷光則、岡田全司: HSP65 遺伝子導入マウス及び IL-12 遺伝子導入マウスを用いた結核感染防御機構の解析. 第82回結核病学会総会. 2007.6. 大阪
 13. 岡田全司、喜多洋子、金丸典子、橋元里実、深水玲子、中島俊洋、松本真、吉田栄人、井上義一、金田安史、坂谷光則: BCG ワクチンよりも強力な新しい結核ワクチン (HVJ-エンベロープ/Hsp65DNA+ IL-12DNA) 開発とキラーT細胞分化誘導作用. 日本免疫学会 2006.
 14. 藤山理世、田中賀子、中谷幸子、樋口順子、渋谷雄平、青山博、白井千香、伴貞彦、片上裕子、千原三枝子、栗木茂一、吉岡伸子、河上靖登、鈴木克洋、岡田全司、坂谷光則: 神戸市で結核定期外健康診断時に施行したQFT-2G検査と接触度について. 公衆衛生学会 2006.10. 富山
 15. 藤山理世、田中賀子、中谷幸子、河上靖登、大西理絵、大福春子、青山博、白井千香、片山裕子、岩本朋忠、園部俊明、田中忍、鈴木克洋、岡田全司、坂谷光則: 神戸市内で

- の小中学生にQFT-2Gを併用した定期外健康診断事例について. 第97回日本結核病学会近畿地方会. 2006.6. 奈良
16. 露口一成, 鈴木克洋, 坂谷光則: 肺結核患者の新退院基準 実際の運用と問題点について 国立病院機構退院基準の実際と運用上における問題点. 結核 81 巻 3 号 Page199(2006.03)
 17. 岡田全司, 喜多洋子, 田中高生, 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) によるキラーT細胞分化誘導作用. 第81回日本結核病学会総会 (2006. 4. 仙台)
 18. 井上義一, 田中高生, 喜多洋子, 坂谷光則, 岡田全司: 結核に対する新しいワクチン (HVJ-liposome/Hsp65+ IL-12 DNA) の開発と肺結核病理像改善作用. 第81回日本結核病学会総会 (2006. 4. 仙台)
 19. 喜多洋子, 田中高生, 井上義一, 坂谷光則, 岡田全司: 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 (4): HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン. 第81回日本結核病学会総会 (2006. 4. 仙台)
 20. 沖塩協一, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則, 鎌田有珠, 藤岡智, 大場泰良, 中野泰克, 駿田直俊, 阿部聖裕, 森健一: 政策医療呼吸器ネットワークシステムの分析による抗酸菌症入院症例菌種の検討. 第81回日本結核病学会総会(2006. 4. 仙台)
 21. 岡田全司, 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里実, 高井寛子, 福永有可里, 坂口弥生, 古川いづみ, 山田恭子, 和泉谷美和, 高谷直子, 田中高生, 井上義一, 橋本幸子, 吉田栄人, 中島俊洋, 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. 第46回日本呼吸器学会学術講演会 (2006. 6. 東京)
 22. 喜多洋子, 金丸典子, 橋本里実, 高井寛子, 福永由可里, 坂口弥生, 古川いづみ, 山田恭子, 和泉谷美和, 高谷直子, 田中高生, 井上義一, 橋本幸子, 吉田栄人, 中島俊洋, 坂谷光則, 金田安史, 大原直也, Tan E.V, DelaCruz E.C, Gelber R, 岡田全司: 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. 第46回日本呼吸器学会学術講演会 (2006. 6. 東京)
 23. 庄嶋淳子, 田中剛, 慶長直人, 松下育美, 桜田紳策, 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: 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 44 巻増刊 Page225(2006.06)

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

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」

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
研究協力者 露口一成 近畿中央胸部疾患センター 感染症研究所室長

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（フィロス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。

D. 考察

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。通常の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。

E. 結論

通常の薬剤感受性検査が実施できない場合、または結果を得るのに長期間要する場合、薬剤耐性遺伝子を用いる感受性検査で臨床的に有益な情報が得られる可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 鈴木克洋、吉田志緒美、露口一成、源誠二郎、井上義一、林清二、岡田全司、坂谷光則 肺カンサシ症の治療 結核81:41-43, 2006
2. 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81:475-479、2006
3. 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(8):934-939、2006
4. 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岩本朋忠、岡田全司、坂谷光則. Mycobacterium kansasii株における分子疫学的解析. 結核 印刷中
5. 鈴木克洋: 診療の秘訣「ツベルクリン反応の解釈」Modern Physician 26: 424, 2006
6. 鈴木克洋: 肺結核を見落とさないため

に 呼吸と循環 54:63-69, 2006

H. 知的財産権の出願状況・登録状況
なし

7. 鈴木克洋：肺非結核性抗酸菌症は増加している：臨床からみた病原性と宿主要因の考察 最新医学61：258-265、2006
8. 鈴木克洋：抗菌薬をつかいこなそう「結核」メディチーナ 43(4):664-665、2006
9. 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(11):1691-1695、2006
10. 鈴木克洋：非結核性抗酸菌症. Infectious Diseases Report 2006 37号、2006
11. 鈴木克洋：結核患者の新しい退院基準について. M.P. 23(11)：1992-1993、2006
12. 鈴木克洋：「結核」第4版、結核の感染と発病・結核菌検査・臨床検査：（福岡洋海編）、医学書院、東京、2006
13. 鈴木克洋：「結核・非結核性抗酸菌症」非結核性抗酸菌症、わが国における最近の動向、病態：（露口泉夫編）、最新医学社、大阪、2006

2. 学会発表

1. 鈴木克洋 非結核性抗酸菌症の変貌
合同教育プログラム 抗酸菌症の変貌
第46回日本呼吸器学会学術講演会
（2006 6.1 東京）

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

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

研究協力者 松本 真 大塚製薬株式会社微生物研究所 所長

研究要旨

独立行政法人国立病院機構近畿中央病院胸部疾患センター臨床研究センターで行われている「結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究：[抗結核キラーTリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン（サブユニット・DNA-・リコンビナントBCG-ワクチン）・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]」で見出された有望なワクチン候補の有用性を検討する目的で、予防効果並びに治療効が見られるかどうかについて、実験的マウス結核症モデルを用いて検討を行った。その結果、再現性が確認できず、その詳細を検討するため、再度新製剤またはアジュバントとしてLPSを添加し、効力の差異の確認を行った。その結果、ELISPOTアッセイにおいては、LPS混在下で結核菌由来ワクチン候補抗原であるHSP-65に、LPS非混在下でワクチネーションされた群より反応する細胞数が増えており、また新製剤によりLPSを混在させなくともより強力な効力が確認された。しかし、この結果がワクチンの効力に反映するかどうかについては、生菌数の結果を持って判断する必要があると考えられた。

A. 研究目的

独立行政法人国立病院機構近畿中央病院胸部疾患センター臨床研究センターで行われている「結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究：[抗結核キラーTリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン（サブユニット・DNA-・リコンビナントBCG-ワクチン）・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]」で見出された有望なワクチン候補の有用性を検討する目的で、予防効果並びに治療効が見られるかどうかについて、実験的マウス結核症モデルを用いて

検討した。その結果、再現性が確認できず、その詳細を検討するため、再度新製剤およびアジュバントを添加し、効力の確認を行った。

B. 研究方法

計画1（予防効果）：マウスにBCGとDNAワクチン（HSP-65/HVJ-E+IL-12/HVJ-E）をプライミング・ブースター法により、3週間おきに3回免疫し、その後結核菌を感染させ、感染後4週間後の肺内および脾臓内生菌数を確認することで、予防効果の確認を行った。

計画2（治療効果）：結核菌をマウスに感染させ、その後1、8、14日後にBCG並びに上記DNAワクチンを接種し、また、ワクチンと抗結核薬との併用の有無の条件下で、感染から4週間後の肺内並びに脾臓内生菌数を確認することで、治療効果の確認を行った。

計画3（予防効果）：マウスにBCGとDNAワクチン（HSP-65/HVJ-E+IL-12/HVJ-E）をプライミング・ブースター法により、3週間おきに3回免疫し、その後結核菌を感染させ、感染後4週間後の肺内および脾臓内生菌数を確認することで、予防効果の確認を行った。また、この際に新製剤のDANワクチン群、及びアジュバントとしてLPSを添加した群を設定し、予防効果の確認を行った。

C. 研究成果・考察

研究成果

1.（予防効果）感染防御効果については、ジェノメディアより供与いただいた2種類のベクター（1つのHVJ-Eの中に2つのプラスミドが封入されているもの、別々に封入されているもの）を使用し、BCGとの併用群及び非併用群を非ワクチン群及び現行のワクチンであるBCGワクチン群との比較を行うことで、検討を行った。その結果、非ワクチン群に対しては、BCG併用のワクチン接種群全てにおいて、有意に菌数が減少し、感染防御効果が確認されたが、BCG接種群との比較においては、変化がなく、DNAワクチンを併用した効果が確認できなかった。また、同試験と平行して、ELISOPOTアッセイを実施した結果、DNAワクチンで免疫したHSP-65に対する特異免疫活性が、

DANワクチンを接種した群、BCGを摂取した群に有意に上昇していることが確認でき、免疫応答は成立していることは確認できた。

2.（治療効果）治療効果の確認を行った試験についても同様で、DNAワクチン単独接種群、BCG併用群、リファンピシンまたはイソニアジド併用群のいずれにおいても、DNAワクチンの効果は確認できなかった。

3.（予防効果）現在解剖が終了し、生菌数の判定待ちであるが、平行して行っていたELISPOTアッセイの結果は、前回の結果を再現しており、またアジュバントを加えた群、更には新製剤の群がより、HSP-65に対し、より高い反応性を示した。

D. 考察

年頭に実施した計画1&2のワクチン接種評価実験において、岡田班で得られていたような実験結果を得ることができなかった。その理由として、マウスブリーダーの違い、使用したDANワクチンに混入していたわずかなエンドトキシンなどの量が異なっていることがわかっており、現在、その影響も含めて確認試験を行っている。

E. 結論

現在、得られているELISPOTのデータにおいては、より強力なワクチンとなっていることが確認されているが、最終的な判断は生菌数の結果を持って判断する必要があると考えている。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究報告

1. 論文発表

1. Makoto Matsumoto, Hiroyuki Hashizume, Tatsuo Tomishige, Masanori Kawasaki, Hidetsugu Tsubouchi, Hirofumi Sasaki, Yoshihiko Shimokawa, and Makoto Komatsu. : OPC-67683, A Promising Drug Candidate to Combat Unmet Needs in TB Chemotherapy in in vitro and in Mice. PLoS Medicine. in printing (2006)
2. Aya Yoshida, Makoto Matsumoto, Hiroyuki Hashizume, Yoshiro Oba, Tatsuo Tomishige, Hiroyuki Inagawa, Chie Kohchi, Mami Hino, Fuminori Ito, Kimiko Makino, Hiroshi Terada, Hitoshi Hori, Gen-Ichiro Soma. : Selective delivery of rifampicin in incorporated into poly(DL-lactic-co-glycolic) acid microspheres after phagocytotic uptake by alveolar macrophages, and the killing effect against intracellular Mycobacterium bovis Calmette-Guérin. Microbes and Infection. 8:2484-2491(2006)
3. Makoto Matsumoto, Hiroyuki Hashizume, Hidetsugu Tsubouchi, Hirofumi Sasaki, Motohiro Itotani, Hideaki Kuroda, Tatsuo Tomishige, Masanori Kawasaki and Makoto Komatsu.: Screening for Novel Antituberculosis Agent

that are Effective Against Multidrug Resistant Tuberculosis. Current Topics in Medicinal Chemistry. In printing (2007)

4. Hirofumi Sasaki, Yoshikazu Haraguchi, Motohiro Itotani, Hideaki Kuroda, Hiroyuki Hashizume, Tatsuo Tomishige, Masanori Kawasaki, Makoto Matsumoto, Makoto Komatsu, and Hidetsugu Tsubouchi.: Synthesis and Antituberculosis Activity of a Novel Series of Optically Active 6-Nitro-2,3-dihydroimidazo[2,1-b]oxazoles Journal of Medicinal Chemistry (2006)

5. 松本 真 : 新たな抗結核薬開発の必要性と世界の現状 化学療法の領域. VOL.22 No.11,2006 (1715-1722) なし。

2. 学会発表

1. M. Matsumoto.: OPC-67683: A Novel Anti-TB Drug Candidate with Potential to Shorten Treatment Duration, The Clinical Frontier, 2006.
2. M. Matsumoto.: OPC-67683: A Novel Class Antituberculosis Drug Candidate, TBTC 19th Semi-Annual Group Meeting, 2006.

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

研究協力者 中島 俊洋 ジェノメディア株式会社 取締役・最高技術責任者

研究要旨

AIDSに伴う結核の拡大や多剤耐性結核の出現など、アジア地域で問題となっている結核感染症の制御を目的として、新規DNAワクチンの開発に関する研究を行った。具体的には、BCGと相乗効果がある結核DNAワクチン・治療薬を開発するために、DNAワクチン用プラスミドの構築改変、凍結乾燥による製剤化、臨床応用に適した製造技術の3項目について研究・開発を進めた。その結果、構築を改変したDNAワクチンにおいても薬効に必要な免疫の活性化が認められる事、凍結乾燥による製剤化でDNAワクチンとしての比活性が向上する事、治験薬製造を想定した技術により製造したDNAワクチンで免疫活性化が認められる事などが明らかとなった。現在並行して実験動物の疾患モデルによる薬効評価も進めており、それらの有効性データをもとに今後も臨床応用に必要なデータ取得を進める予定である。

A. 研究目的

アジア地域においては、AIDSの蔓延に伴って結核患者数が増加している。特に重要な課題は、多剤耐性結核（MDR-TB：Multidrug-Resistant TB）の制御で、WHOの調査によれば2004年の全世界のMDR-TB患者の推定合計は424,203人であるが、このうち62%にあたる261,362人が、中国、インドなどのアジア地域とロシア連邦に集中していることが明らかになっている。また、WHOと米国疾病予防管理センターの共同調査によれば、MDR-TBの中で特に耐性の高い超多剤耐性結核（XDR-TB：Extensive or Extreme Drug-Resistant TB）は、世界中で症例が見られるが、やはりアジア地域と旧ソ連邦の被害がもっとも深刻であることが明らか

かになっている。これらのAIDSや結核感染症に加えて、近年アジア地域においては鳥インフルエンザやSARSなどのウイルス性の新興感染症が発生しており、それらを含めた種々の感染症の予防と治療を行うための医薬品開発が切望されている。

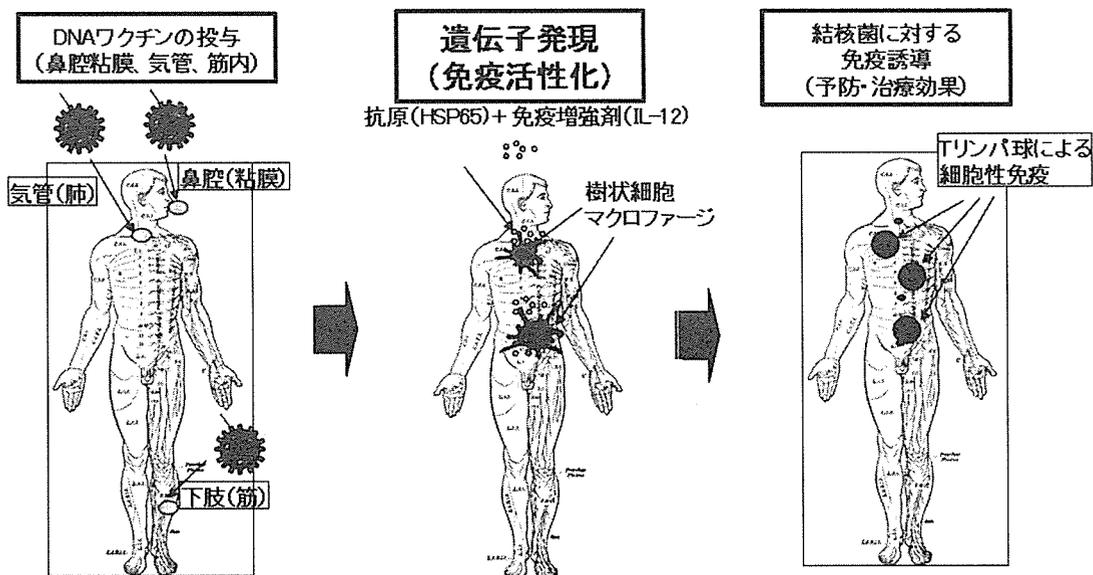
細菌感染症の制御には、従来抗生物質を中心とする治療が行なわれてきたが、超多剤耐性結核菌の出現で明らかのように、抗生物質のみの治療による制御は困難である。また、ウイルス感染症についてもHIVやインフルエンザ治療薬で認められているように薬剤耐性ウイルスが出現することから、単剤での治療は困難であり、癌で実施されているようにメカニズムの異なる医薬品を組み合わせる治療を行なう必要がある。

結核やウイルス感染症 (AIDS) の治療にはTh1タイプのT細胞を介する細胞性免疫を活性化する事が有効であり、国内外でそのような活性を持つ医薬品の開発が行なわれているが、現在のところ有効性の高い治療薬は開発されていない。また、感染症に対する新規ワクチンとしてDNAワクチンの開発も進められているが、現在までに実用化された製品はない状況である。特に、DNAワクチンの開発で課題となっている

のは、高効率のデリバリー技術と高活性のアジュバントを開発する事である。そこで、本研究開発ではDNAワクチンに適したデリバリーシステムで、かつ高いアジュバント活性を持つHVJ-Eベクターを利用して、多剤耐性結核感染症に対する新規ワクチンを開発する事を目的に研究を行った(図1)。

図1. 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)



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 α 、 β)の誘導
 - b. IFN- γ 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

B. 研究方法

1. DNAワクチン用プラスミドの構築改変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