

200726005A

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡田 全司

平成20（2008）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. 中国におけるStreptomycin(SM)耐性結核菌に対する遺伝学的研究	菅原 勇	——	42
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	——	44
3. 中国東北部における多剤耐性結核菌の流布調査とタイにおける小児結核の病態解析	服部俊夫	——	50
4. インド・デリーの多剤耐性結核菌に関する研究拠点の確立に関する研究	高鳥毛敏雄	——	56
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 慶長直人	——	59
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	——	61
7. 多剤耐性結核菌の薬剤耐性遺伝子解析	阿部千代治	——	64
8. 新しい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) 計画に関する研究及び新規化学療法剤との併用療法計画	坂谷光則	——	66
9. 研究協力者研究報告		——	74
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		——	94
IV. 研究成果の刊行物・別刷		——	103

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。北タイ・チェンライ県において、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、結核症に対するフィールド研究開発を実施した。得られた疫学情報、臨床情報、細菌学的情報と共に、血液サンプルを活用して、難治化していない新規の結核患者、及び結核症を発症していない正常タイ人と比較する事により、多角的に難治化に関する因子の同定を進めた。チェンライ県で結核研究の検体バンクとコホートでの血漿より、再発例 30 名、治療失敗例 29 名、慢性排菌例 15 例の血漿を活用して、通常の新規結核(再発なしを確認) 30 例、結核症のない健康人 30 人と比較した。血漿中グラニューライシンの値は、結核症でない正常人と初回結核群では有意差がなかった。しかし、再発例、治療失敗例、慢性排菌例の難治性結核が通常の新規結核と比較して有意に高かった。同じ患者群について、血漿中インターフェロン・ガンマの測定を測定した。結核症でない正常人では、殆ど皆無であったが、結核患者では全ての群で有意に高く同定された。しかし、再発例、治療失敗例、慢性排菌例の難治性結核が通常の新規結核と比較して測定値が異なることはなかった。今後、治療の経過による変化が、ツベルクリンや結核死菌で刺激した前後でどうなるかを突き止め、これらの免疫マーカーを指標として、何らかの免疫賦活療法が適応となるかどうか検討したい。櫻田らは北タイ・チェンライ県における結核と HIV 結核患者における宿主側危険因子（granulysin と osteopontin）の同定のための臨床免疫学的研究プロジェクトを立ち上げた。平成 19 年 5 月にタイ公衆衛生省ならびに同年 6 月にチェンライ病院の倫理委員会から本研究は承認された。同月より患者登録を開始、平成 20 年 2 月 25 日時点で 74 名の患者と対照健常者を登録され、採血により試料を採取し現在解析を続けている。患者登録は最短でも本年度 3 月末日まで続けられる予定である。
 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 は通常の新規結核菌より毒力が強力を証明。
 - (b) 中国北京市結核・肺腫瘍研究所で得られた 215 の結核菌臨床株のうち、115 株が SM 耐性株で 100 株が感受性株であった（比率法による）。115 株の遺伝子突然変異の有無を調べたところ、98 株（85%）に rpsL 遺伝子、rrs 遺伝子の変異が見つかった。rpsL 変異が、主で 88 株が該当した。この割合は、すでに発表されているものより高い。（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。
- [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- γ 産生 T 細胞の分化を強力に誘導した。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。カニクイザルで 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 (マウスの系)。さらにカニクイザルの系でも HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンは生存率改善、体重増加、免疫反応増強の治療効果を得た。
- [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)。臨床第Ⅱ相試験を計画。
- [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 ϕ は結核菌増殖抑制因子産生。GM-M ϕ は HIV・TB 感受性のヒト肺胞 M ϕ 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)。pVAX に HSP65DNA と IL-12DNA の二つの遺伝子を導入し、臨床応用を計画。(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

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

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

竹田 潔

大阪大学医学系研究科

感染免疫医学講座免疫制御学

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

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

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

坂谷光則

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター

院長

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

教授

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発症予防の困難性 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。

薬剤感受性試験

サンプルの属性：ハルビン市胸部疾患病院で診断された結核患者から242名のサンプルを得た。平均年齢は45.9歳、男性は179名で女性は

63名。

問診：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）を検査と問診で得た。

塗末試験：Ziehl-Neelsen染色により行った。判定基準は以下のとおりである。

Negative (-):0 acid-fast bacilli /50 view fields

Positive (+):1~3 acid-fast bacilli /50 view fields

Positive (1+):10~99 acid-fast bacilli /50 view fields

Positive (2+):1~9 acid-fast bacilli / 50 view fields

Positive (3+):10~99acid-fast bacilli / 50 view fields

Positive (4+):≥100 acid-fast bacilli / 50 view fields

培養：固形培地による培養と液体培養を行った。固形培養では、3%のNaOH処理を施したLowenstein Jensen (LJ)培地を用いて最長8週間の培養を行った。24日後に以下の基準により判定を行った。

Positive (1+): コロニーが領域の1/4を占める

Positive (2+): コロニーが領域の1/2 を占める

Positive (3+): コロニーが領域の3/4を占める

Positive (4+): コロニーが領域の全てを占める

液体培養では、ベクトンディッキンソン社のBBL™MGIT™を用いた。42日後までにコロニーが観察されない場合にnegativeと判定した。

薬剤耐性試験：LJ培地に薬剤を添加して培養を行った。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）を用いた。被験者群の定義：患者を初診時の結核治療歴によって新規症例と治療経験群に分けた。新規症例は、結核の治療経験のない患者あるいは治療経験が4週間未満である患者、治療経験群は、抗結核薬の服用経験が4週間以上ある患者とした。

[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。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とPBMCに分離し、ツベルクリンや、結核死菌の刺激前後で血漿中のインターフェロンガンマ量とグラニューライシン量を、マヒドン大学学術担当副学長Srisin教授の基で、大学院博士課程を学んでいるNada氏を日本へ招聘し、岡田班長の実験室でアッセイを習得してもらった。同じELISA法のプロトコルにて、タイNIHの協力を得て測定した。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。

年度初頭にタイ公衆衛生省、チェンライ病院においてヒトサンプルを用いた臨床医学研究の倫理申請の承認を得る。次に、チェンライ病院ならびにメーチャン病院にて患者登録を開始して、末梢血サンプル採取を開始する。リンパ球、単球等の血液細胞の培養と単球からマクロファージへの分化の形態学的観察ならびにフローサイトメーターによるリンパ球の表面マーカーの解析を全例に行う。血漿中ならびに細胞培養上清中のgranulysin、IFN- γ 等結核免疫関連タンパク質のELISAによる定量とBCG感染後マクロファージからのmRNAの抽出を行い、活性型ビタミンD3関

連遺伝子を含む結核免疫関連分子の遺伝子発現をmRNAレベルで検討する。

表1

平成19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

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
(独)国立病院機構 近畿中央胸部疾患センター・臨床研究センター長

研究組織

<p>主任研究者 岡田全司</p>	<p>アジア</p>	<p>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。</p>
<p>分担研究者</p>		
<p>菅原 勇 野内英樹 慶長直人 服部俊夫 高島毛敏雄 櫻田紳策</p>	<p>中国 タイ タイ 中国・フィリピン インド タイ</p>	<p>多剤耐性結核菌の分子機構 多剤耐性結核コホート研究 HIV感染合併結核 スーパー・スプレッダー多剤耐性結核制御 多剤耐性結核の制御とDNA解析 多剤耐性結核患者キラーT、granulysin、Mφの解析 TLRと結核感染 薬剤耐性遺伝子解析 国立病院機構呼吸器ネットワークを活用</p>
<p>竹田 深 阿部千代治 坂谷光則</p>	<p>アジア シンガポール</p>	<p>(財)結核研究所 長崎大学 国立国際医療センター 東北大学 大阪大学 国立国際医療センター 大阪大学 日本ベクトン・ディキンソン 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター</p>

表2

研究目的

1. 多剤耐性結核の多数発症が日本・世界(特に結核最多のアジア地域)で大問題。有効な治療法がない。
2. 多剤耐性結核は ①莫大な費用(一般結核に比べ) ②治療困難 ③発病予防の困難 等の問題。
3. 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、多剤耐性結核制御の飛躍的成果。
4. アジア地域の多剤耐性結核の分子疫学・コホート研究。日本への結核流入・蔓延防止。
5. 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。
6. 結核治療ワクチン、新化学療法剤の開発。アジアに蔓延の多剤耐性結核、超薬剤耐性結核(XDR-TB)に対し制御成果。
7. 多剤耐性結核の宿主要因を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。
8. スーパー・スプレッダー多剤耐性結核(S・S MDR-TB)及びXDR-TBの対策。医療費節減。

[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 5×10^6 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。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 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(図4)
- (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
治療ワクチン効果は、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 μ g/ml、リコンビナント72f 10 μ g/ml、PPD 10 μ g/ml、PHA-P 0.2%で刺激し、³H-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。

<実験OKADA VI>

プライムブースト長期間隔を用いた結核予防ワクチン効果(カニクイザルを用いた)Prime-4ヶ月-boost-1ヶ月-boostの間隔で特にPrimeと1回目のboostの間隔を4ヶ月と長期あけた。

	Prime	Boost
G1	BCG	HVJ-エンベロープ/ HSP65DNA+IL-12DNA
G2	HVJ-エンベロープ/ HSP65DNA+IL-12DNA	BCG
G3	HVJ-エンベロープ/ HSP65DNA+IL-12DNA	HVJ-エンベロープ/ HSP65DNA+IL-12DNA
G4	BCG	(-)
G5	(-)	(-)

各5匹

3回ワクチン投与後、最終免疫より4週間後にヒト型結核菌Erdman株を 5×10^2 個気道内注入した。予防ワクチン効果は、1年以上にわたり、生存率、胸部X線、血沈、体重、体温、PPD皮内反応ならびに末梢血リンパ球の増殖増強反応で解析した。

[IV] 北京市結核肺腫瘍研究所で集められた臨床株のうち、比率法でSM耐性を決める。この研究は、中国で行う。培養して結核菌を死滅させた後送ってもらった菌株から、DNAを抽出する。この研究は、結核研究所で行う。一定のDNAと特異的プライマーを用いてPCRを施行しPCR産物を得る。その後、WAVEシステムを用いて変性HPLCを行う。突然変異があると、HPLCパターンが違うので、判別できる。この装置は、結核研究所にあるので、ここで実験を行う。

[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らない。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 5×10⁵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強力なる予防効果を示した(表3)ことより、この方法でも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：

インド国・ニューデリーのVardhman

Mahavir Medical CollegeのProf.Saudan

Singhの協力を得て、同大学公衆衛生学講座、

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）との研究協力の関係を構

築し、インド臨床分離結核株と日本における

臨床分離株について菌株の遺伝子型別分析を

行うために必要な、分子疫学に最適なVNTR

対象locusの研究を実施することを計画した。

研究の許可を得た後に、研究を直ちに行う

ためにインドの研究施設において結核菌遺伝

子型のpopulation based studyのため研究協

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、

2006年度分離のMDR-TB菌株の加熱死菌の

提供してもらう、上記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、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、の4点の取り

決めを行った。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、18loci-VNTR型別は遺伝的

類似の高い大阪府内の結核分離株も詳細に分

類する。

[VII]シンガポールとのネットワーク共同研究：

MGIT ASTによる検査でINH耐性を示した結

核菌について、INH耐性に関与することが知

られている*katG*と*inhA*遺伝子の変異を調べる。

得られた結果を耐性レベル別、すなわち小川

比率法の0.2μg/ml濃度の検査で感受性（低濃度-S）、0.2μg/mlで耐性しかし1.0μg/mlで感受性（低濃度-R・高濃度-S）、1.0μg/mlで耐性（高濃度-R）の3グループに分け比較する。シンガポール総合病院で分離された結核菌の中でBACTEC 460 TBによる検査でINH耐性を示した菌株について小川比率法を用い感受性を調べる。

[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] 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ワクチン用製剤化技術の開発

本事業で開発を進めている治療用DNAワク

チンを、医薬品として開発するためには安

定性の高い製剤を開発し、臨床試験や上市

後の製品として供給する必要がある。特に

アジア地域で普及させるためには、冷凍庫

が必要な凍結製剤ではなく、常温でも安

定性の高い製剤を開発する必要がある。そ

こで、バイオ医薬の製剤化技術として利用

されている凍結乾燥技術による製剤化を試

みた。そのために、添加する糖や塩の種類

と濃度、温度、処理時間を中心に条件の検

討を行った。評価は、遺伝子導入活性を指

標として、凍結前後の比較と、種々の温度

で一定期間保存後の活性で実施した。

2. 前臨床試験のための基礎研究

臨床応用を行うためには、ガイドラインに

準じた前臨床試験データの取得が必要であ

る。その種類としては、主に薬効試験、薬

効メカニズムの解析、安全性試験がある。

このうち薬効試験については、共同研究先

である近畿中央胸部疾患センターとの共同

実施（マウス、ラット、サル）となるため、

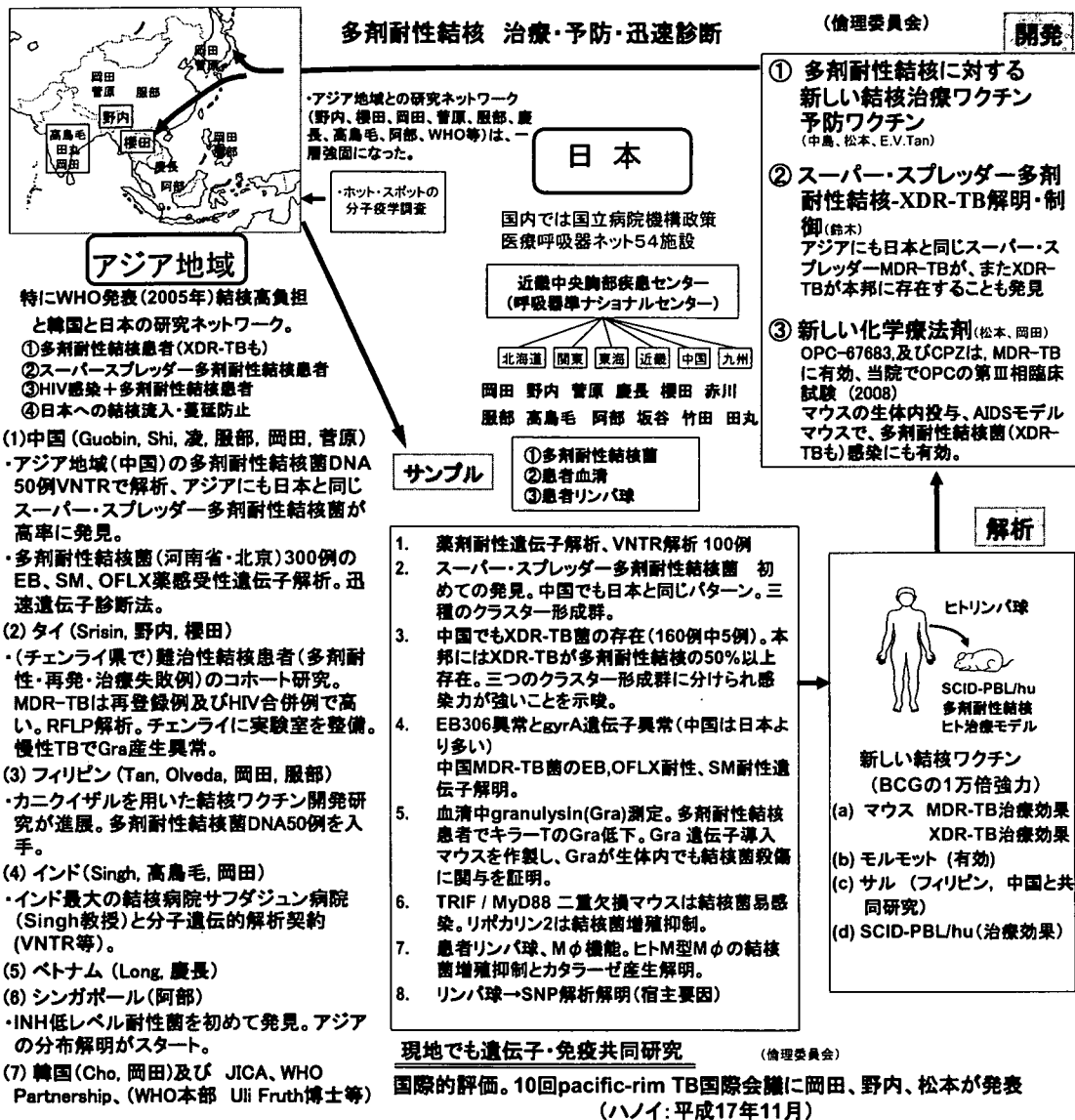
薬効メカニズムの解析と、安全性試験の立

案と実施について進めた。それらの試験デ

ータの取得については、規制当局のガイド

Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等

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見出し(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出した。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。サルで実験中(治療効果示唆)。
- (3) 200倍強力な新規HVJ-Eベクターを開発した。
- (4) HVJ-リポソーム/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)

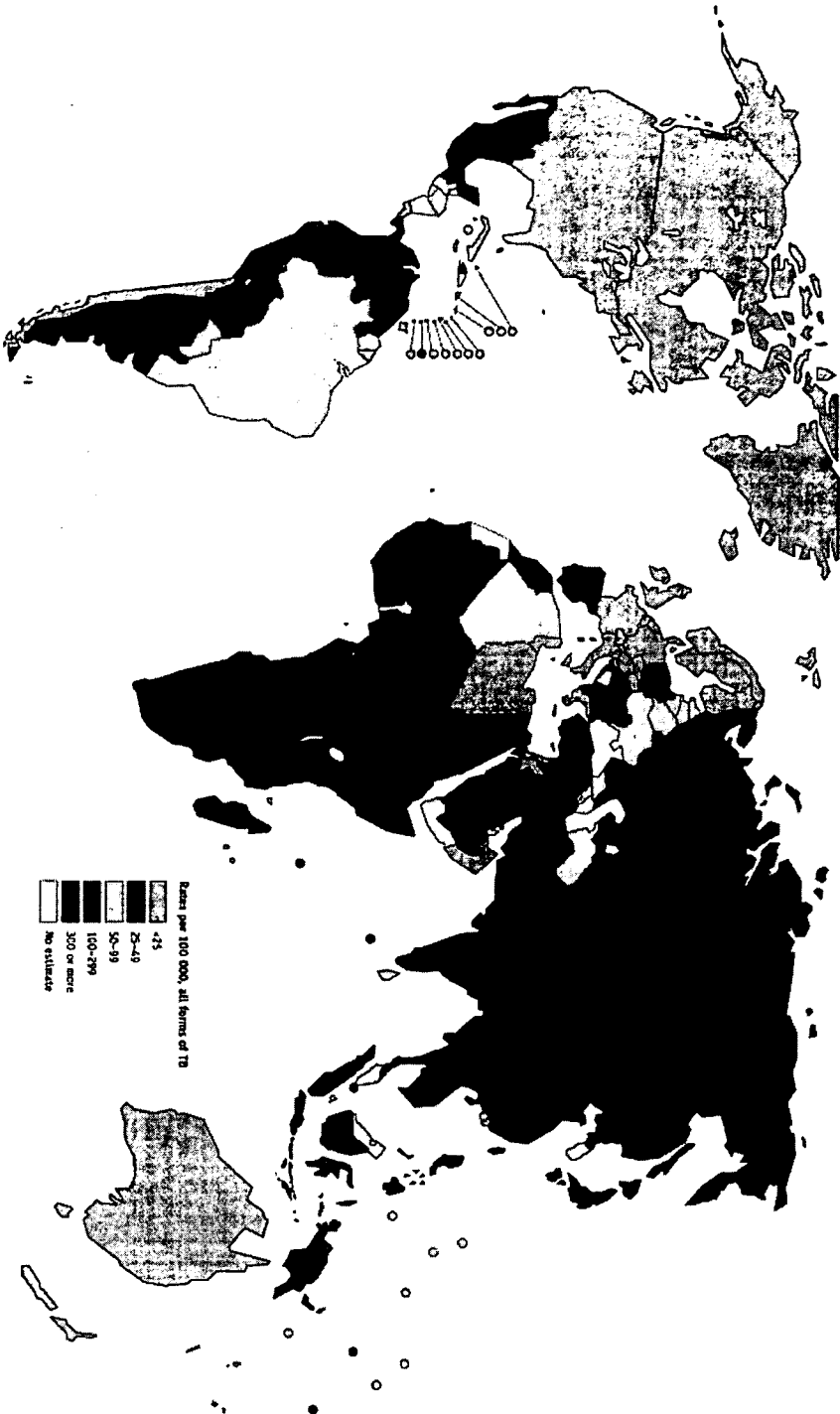
マウス → モルモット → カニクイザル → ヒト

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
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 frontiers, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. It should be noted that the appearance of some lines on this map may not be in full agreement.

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。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発見した。超薬剤耐性結核菌(XDR-TB)に対しても治療効果。サルで実験中(治療効果示唆)。
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

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
	結核治療ワクチン効果	計画	効果	
	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 3

ラインに従って実施し、例えば安全性試験についてはGLP基準に準拠した施設で実施した。

3. 治験薬GMP製造技術の開発

本事業において開発を行っているHVJ-Eベクターは、臨床応用の実施を目標として開発を行っている。そのため、治験薬GMP製造に対応した工程管理と品質管理が必要になる。そこで、暫定的な規格値の設定を進め、それに対応した検定技術の確立を行った。また、治験薬の製造を行うために必要なハードの部分である、パイロットプラントについても、治験薬製造性能に関する実証データが必要であるためのバリデーションが必要になるため、そのマスタープランの作成を行った。

[X] 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。

[XI] 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ワクチンを作製した。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。

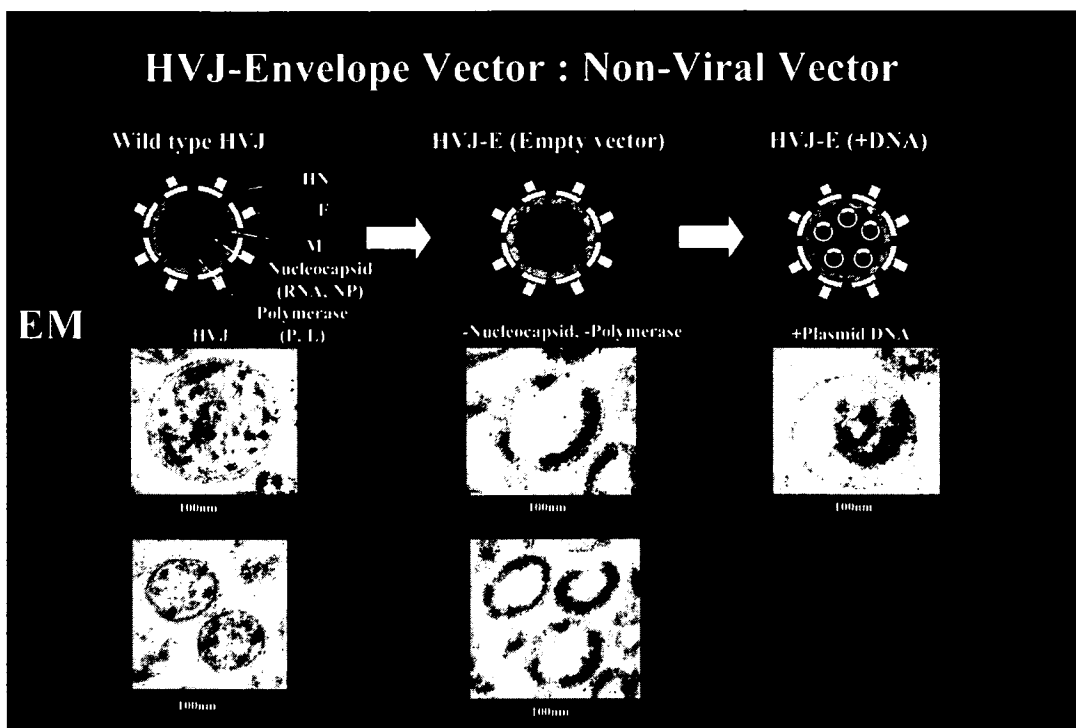


図 4

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

表 3

【XⅡ】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、in vitroの種々のTLRノックアウトマウス由来のM ϕ 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 ϕ 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- γ 、IL-2)産生誘導効果、T細胞増殖効果を解析した。

【XⅢ】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)

【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 γ 鎖ノックアウトNOD-SCIDを作製した。IL-2R γ 鎖はIL-4、IL-7、IL-15、IL-21の γ 鎖と共通である。したがって、IL-2R γ 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 γ (-/-)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. タイ国側については、タイ保健省倫理委員会の定める倫理規定に沿って研究を実施している。参加研究者全員の合意を得た研究プロトコルを作成し、タイ国保健省倫理委員会および関連研究施設の倫理委員会に提出し、今回のプロトコルも正式な研究として承認を得た。本研究に参加する患者については、担当医師による十分な説明の後、書面によるインフォームドコンセントを得た。研究を通して得られた個人情報には厳密に管理し、参加研究者以外のもので内容を知り得ることはない。現在までの日泰間の共同研究でこれらの基本原則を遵守し、更に、検体等の日タイ間の移動等に関しては文書でのMaterial Transfer Agreement等を結び、知的財産権(パテント)等の問題も含め国際共同研究に関連した倫理的問題に配慮してきた実績がある。コホートの参加者にはインフォームド・コンセントに基づく自発的な参加を実施し、参加者のフォローアップにも強制は加えなかった。なるべく、医療的な利益が参加者に得られる様に、タイ保健省の発行する国民健康保険への参加の支援等を行っている。タイ人若手研究者の育成の為、Nada氏を岡田班長の基でトレーニングしたのは意義深い。現在タイ国にて本研究を主体となり進めた。

3. 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。
4. 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実行し実施する。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実験安全管理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。
5. 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い臨床応用を目指したい。
6. 本研究は国立国際医療センター倫理委員会にて平成18年12月に承認された。また、平成19年5月にタイ公衆衛生省、6月にチェンライ病院の倫理委員会からそれぞれ承認を得た。

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。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4、図5、図6）。

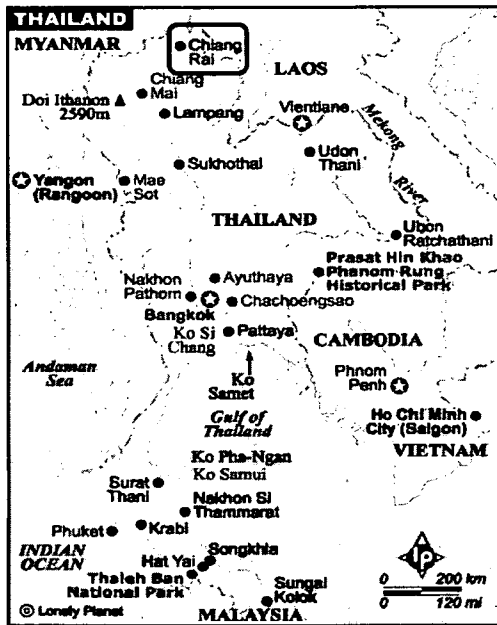
スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌は通常が多剤耐性結核菌より毒力が強力であることをマウス生体内で証明した。



地図1. ハルビン

[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）

昨年度まで、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。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検体バンクを活用した。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



地図 2. タイ

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。

今年度は、このチェンライ県で結核研究の検体バンクとコホートでの血漿より、再発例30名、治療失敗例29名、慢性排菌例15例の血漿を活用して、通常初発結核(再発なしを確認)30例、結核症のない健康人30人と比較した。血漿中グラニューライシンの値は、結核症でない正常人と初回結核群では有意差がなかった。しかし、再発例、治療失敗例、慢性排菌例の難治性結核が通常初回結核と比較して有意に高かった。同じ患者群について、血漿中インターフェロン・ガンマを測定した。結核症でない正常人では、殆ど皆無であったが、結核患者では全ての群で有意に高く同定された。しかし、再発例、治療失敗例、慢性排菌例の難治性結核が通常初回結核と比較して測定値が異なることはなかった。(図7)

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、慢性排菌例についても同様に検討を進めている。現在まで得られている39例では、再発例で、前と同じ菌による再燃(reactivation)と考えられる症例が80%、前と違う菌により再感染(reinfection)と考えられる症例が20%の比率であった。

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タイ人の研究者を長崎に招聘して検討した。結核の多剤耐性結核、再登録例にも活用できる薬剤の開発を国策として推進しているタイでは、倫理的な課題を論理的に整理して研究開発を進める可能性が示唆された。

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。

平成19年7月までにタイ公衆衛生省、チェンライ病院の倫理委員会からそれぞれ本研究に関する承認を得た。患者登録と抹消血サンプルの採取は11月30日現在、49名49検体となった。細胞培養とフローサイトメトリーによる解析は全例に、また血漿と培養上清中のosteopontin, granulysin, IFN-γといったエフェクター分子のタンパクレベルの定量は一部の例に実施した。これらの分子に関して、RT-PCR等のmRNAレベルの検討は、これからである。

今までの検討から、結核患者では単球-マクロファージがin vivoである程度活性化されている可能性が示唆され、従来からの報告にあるようにosteopontin等の産生レベルの上昇が観察された。さらにHIV非感染の結核患者では健康人に比較してγ9Vδ2TCRT細胞が増加し、HIV感染者では健康人より減少していた。

表 4

PCR-Primer Using in VNTR

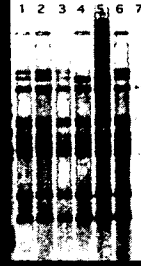
ETR-A-R	aaatcgggtcccatcacccttctat	MIRU16-F	tcgggtgatcgggtccagtcacaagla
ETR-A-L	cgaagcctgggtgcccgcgaltt	MIRU16-R	Cccgtcgtgcagccctgggtac
ETR-B-R	gcgaacaccaggacagcatcatg	MIRU20-F	Cggagagatgcccttcgagt
ETR-B-L	ggcatgccgggtgatcgagttgg	MIRU20-R	Cactaacgggtggcgggtatg
ETR-C-R	gtgagtcgctgcagaacctgcag	MIRU23-F	cagcgaacgaactgtgctatcac
ETR-C-L	ggcgcttgaacctcaccagagtg	MIRU23-R	cggtgccgagcagaaaagggtat
ETR-D ¹⁾		MIRU24-F	gctccctgcacagccaacc
ETR-E ¹⁾		MIRU24-R	tgggcgagttgagctcacagaac
ETR-F-R	ctcgggtgatgtccggccgggtcac	MIRU26-F	actgctccgcggaatagg
ETR-F-L	ggaaagtgcctgcacaacgccatgcc	MIRU26-R	ggataggtctacgctgaaatctg
MIRU2-F	tggacttgcagcaatggaccaact	MIRU27-F	cgacggggcatcttcgattg
MIRU2-R	Tactcggacgccgctcctcaaat	MIRU27-R	gttcaccgggcaacgcgatag
MIRU4-F	Gcgcgagagcccgaactgc	MIRU31-F	actgattggctcacaaggcttta
MIRU4-R	Gcgcagcagaaacgctcagc	MIRU31-R	gtgcccagctgggtcttgat
MIRU10-F	gttcttgaccaactgcagctgtcc	MIRU39-F	cgcatcgacaactggagccaac
MIRU10-R	gccaccttgggtatcagctacct	MIRU39-R	cggaaactgctacgcccacacat
		MIRU40-F	gggttctggatgacaactgtg
		MIRU40-R	gggtgatctcggcgaatcagata

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. 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。厚生行政、結核診療改善に寄与。
4. スーパー・スプレッダーMDR TBはクラスターを形成する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

- Lane1,2 患者E
- Lane3 患者B
- Lane4 患者C
- Lane5 患者F
- Lane6 患者A
- Lane7 患者D

クラスターを形成する多剤耐性結核菌株

クラスターサイズ	spoIIGyping
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

図5

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で解析した。瀋陽の多剤耐性結核菌と全く同じVNTR(MIRU)配列を示した。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。
- (3) 中国からの日本への移民の結核菌が全く同じVNTRパターンを示した。

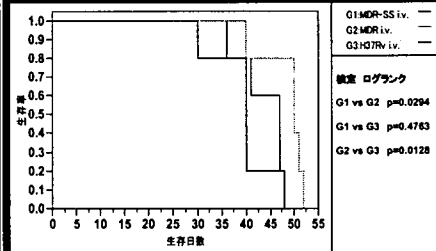
VNTR(Variable Number of Tandem Repeats)の原理



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	M12	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
1974	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
2019	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター																
H136	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
石川県立中央病院結核センター																
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



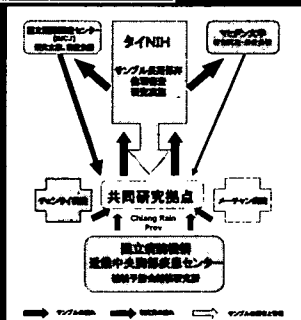
検査 ログランク
 G1 vs G2 p=0.0294
 G1 vs G3 p=0.4763
 G2 vs G3 p=0.0128

図6

タイにおける多剤耐性結核患者の 宿主側免疫応答の制御

研究成果 (櫻田、野内、赤川)

1. タイ結核患者血清中Granulysin、IFN- γ 低下を発見。
2. ヒトM ϕ のNRAMP1、MAPキナーゼ活性化及びHck/EBP β の発現増強による結核菌増殖抑制解明。
3. タイNIHならびにマヒドン大学熱帯医学部との連携体制の確立。
4. タイNIHならびにチェンライ病院における倫理審査委員会からの臨床免疫学研究の承認。
5. チェンライ研究拠点における実験室の整備。
6. 結核患者登録、サンプル保存 (①結核菌、②HIV陽性又は陰性多剤耐性結核患者リンパ球)



血清中granulysin

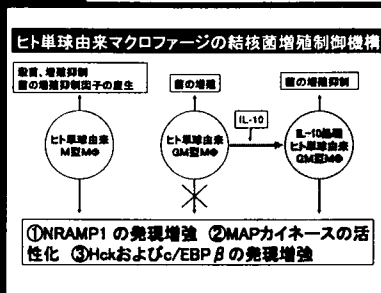
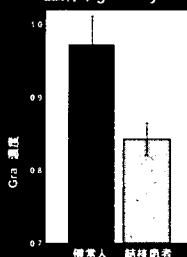


図 7

[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

(a)HVJ-liposome/Hsp65 DNA+IL-12 DNAワクチン、(b)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)

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)

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。
- 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。

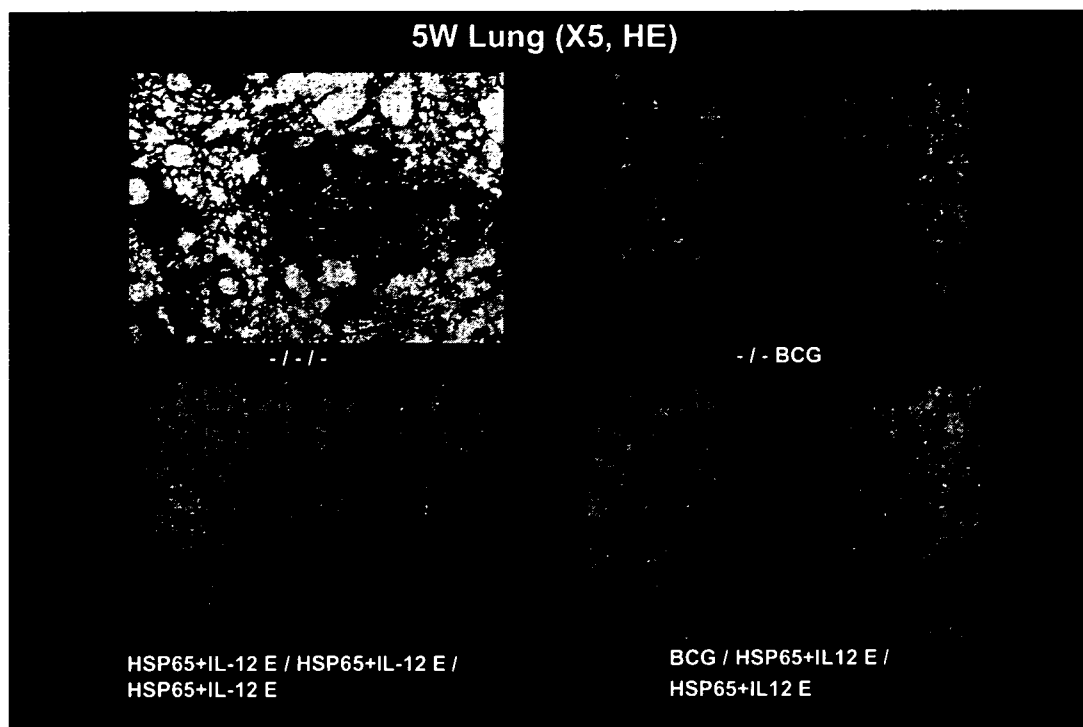


図 8

- 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、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。
- ⑥ 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。(図8)
- (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ゾル感染系で従来のDNAワクチンと予防効果比較研究中である。
- (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)

① 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 μ lを麻酔下でBALB/Cマウスに鼻腔より除々に注入し、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中である。

② 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ということが考えられる。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 μ 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ワクチン投与群と比較して、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 \times 10⁵ 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単独投与群と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 \times 10⁵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9)。