

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 9

Protocol

Novel vaccines for Tuberculosis Cynomolgus monkey

- | | |
|---|----------|
| Group 1. HVJ-liposome/Hsp65 DNA+IL-12 DNA | 4 animal |
| Group 2. BCG | 4 animal |
| Group 3. Saline control | 4 animal |

Total 12 animals
For more than 1 (one) year

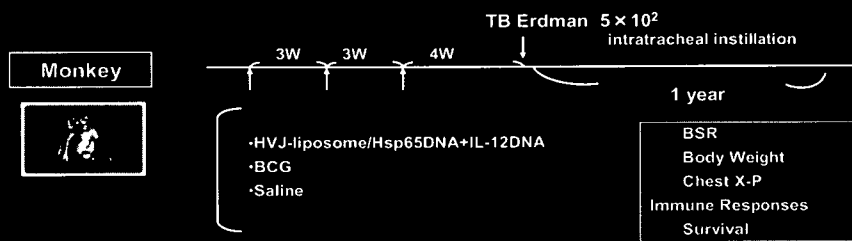


図 10

The Establishment of Priming- Booster Method: The Development of more effective vaccine against Tuberculosis using cynomolgus monkey

In Japan, BCG Tokyo vaccine (priming) is immunized in all infants.
Therefore, we need novel vaccines (booster vaccines) in adults

	<u>Priming Vaccine</u>	<u>Booster Vaccine</u>
Group 1.	BCG Tokyo	HVJ-liposome /HSP65 DNA+ IL-12 DNA
Group 2.	HVJ-liposome /HSP65 DNA+ IL-12 DNA	BCG Tokyo

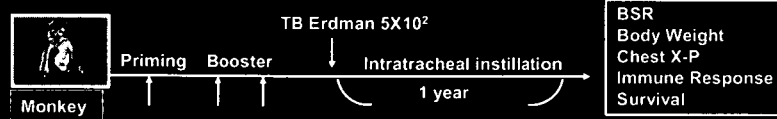


図 1 1

2. カニクイザルを用いた結核予防ワクチン効果<実験Ⅲ>

すでにこのワクチン3回投与でカニクイザルの系で効果を得た(図10)。したがって強力なプライムブースター法を用いた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11、図12)

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12)

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。

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

実験ⅣではHVJ-エンベロップ/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチンを、実験ⅢのHVJ-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。

4. 治療ワクチン効果: カニクイザルを用いHVJ-エンベロップ/Hsp65DNA+IL-12 DNAワクチンの結核治療ワクチン効果を研究した。<実験Ⅴ>

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) プースター

G3群 BCG東京ワクチンプライム (1回のみ)

G4群 生食投与群

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。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13)

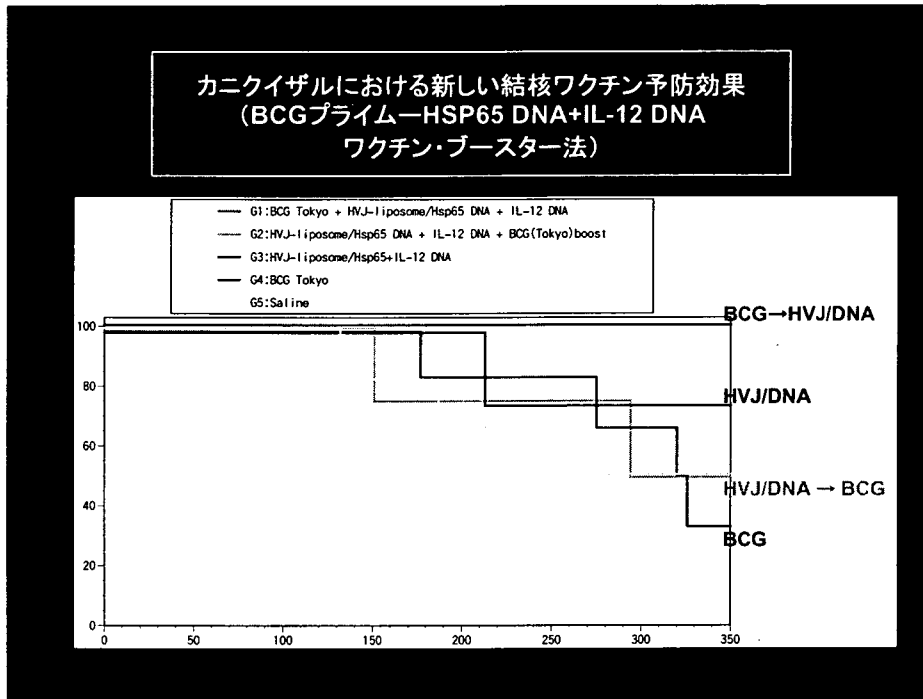


図12

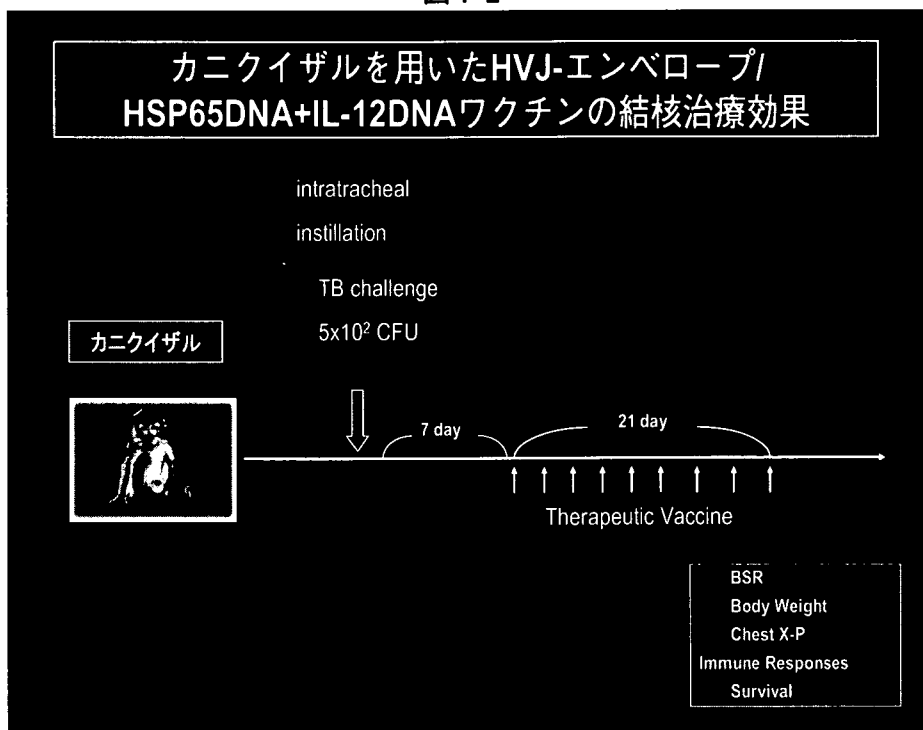


図13

[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

1. 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。
2. 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いた。[3H]uracilを用いて、BCGの細胞内での増殖を測定しても、ノックアウトマウス由来の細胞で、BCGの増殖能が増加していた。組換え体のLcn2を加えると、BCGの細胞内増殖を抑制した。また、Lcn2が細胞内にエンドサイトーシスにより取り込まれた。そこで、エンドサイトーシスのinhibitorを加えると、Lcn2によるBCGの細胞内増殖は阻害された。

〔Ⅸ〕 中国:Streptomycin(SM)耐性結核菌に対する遺伝学的研究及びXDR-TBの研究

- 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)。115株の遺伝子突然変異の有無を調べたところ、98株にrpsL, rrsの変異が見つかった。rpsL変異が、主で88株が該当した。98株のMICを求めたところ、変異型とSM耐性度との有意差は見られなかった。感受性株には、遺伝子突然変異は、認められなかった。DNAシーケンスのデータは、変性HPLCのデータと一致した。
- 中国東北部における多剤耐性結核菌の流布調査
患者属性：結核の治療歴について、有りと答えた患者は37% (90名) 無しは63% (152名)であった。
- 薬剤感受性試験結果
半数を超えるサンプルが何らかの薬剤耐性を持つことが示された。
- さらに薬剤耐性の詳細を明らかにするために、単剤耐性/多剤耐性の別を分析した。単剤にのみ耐性を示したものは、42サンプルで全体の17.4%であった。何らかの薬剤に耐性を示したものが137サンプルであったこととあわせて考えると、137サンプル中42サンプルのみが単剤耐性で、残りは複数の薬剤への耐性を持つことが明らかとなった。(図14)

超薬剤耐性結核菌 (XDR-TB) アジア地域での：中国と日本
分子疫学と早期診断マニュアル

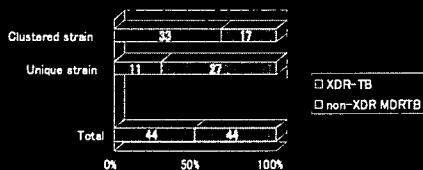
XDR-TB [Extensively (Extremely) Drug-resistant Tuberculosis]

XDR-TBの新たな定義 (1)少なくともRFPとINHに耐性(MDR-TB) (2)フルオロキノロン耐性 (3)注射可能な薬剤の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

	MDR-TB	XDR-TB (MDR-TB中)
中国(ハルビン) (服部)	15.1%	12.0%
タイ (野内)	3.25%	0.96%
日本	3.9%	50.0% (大阪)

XDR-TB と MDR-TB

(日本・国立病院機構近畿中央胸部疾患センター RFLP解析)



日本(大阪)XDR-TBはMDR-TBの50%

多剤耐性結核患者早期診断・入院マニュアル
(国立病院機構政策医療呼吸器ネットワークにおける)
ガフキー陽性患者の喀痰 (鈴木、坂谷)

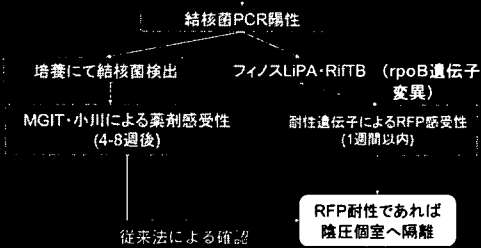


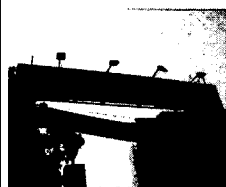
図 1 5

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



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



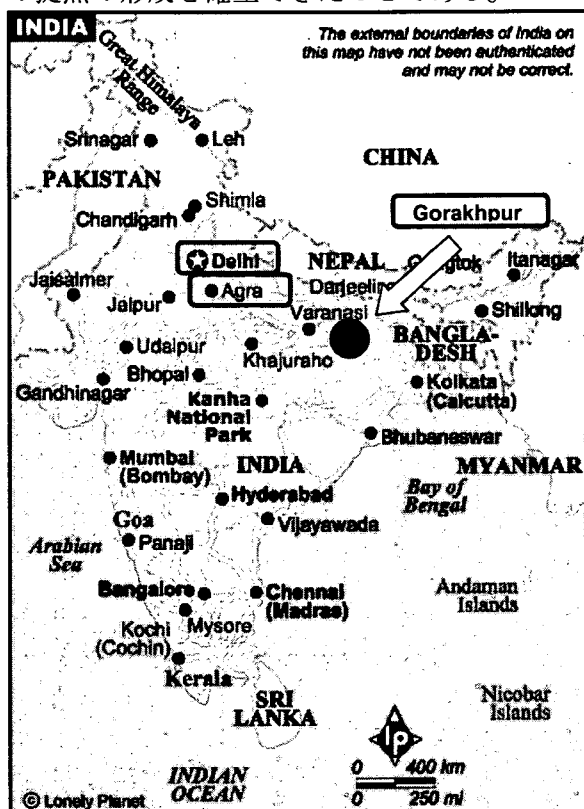
図 1 6

も他の検査室との共用使用であり、多数の菌株を取り扱い、菌検査の精度管理を行っていくことは困難な状況にあることが明らかとなった。現地で協議したところ医科大学校舎の完成に伴い微生物学教室の実験施設にPCR検査を行えるように器材が整えられる見通しとなった。現在はインドにおいては結核菌のルーチン検査として同定検査、感受性検査が行われておらず、MDR-TBと思われる一部の検体だけしか結核菌同定検査が行われていない状況にあり、現地の耐性菌株情報を得ても地域の流行状況を解釈が難しい状況にあると思われることから情報の提供をもとめることは行わなかった。

3) 日本、インド国の共同研究体制の確立

本年度は現地に検査器材、検査試薬を持っていき研究を実施する予定であったが、インド政府の許可がなかなか下りず研究年度内には研究目的とした結核菌の同定、感受性、分子型別分析を実際に行うことにはできず、当初の研究結果を得ることができなかった。しかし、平成18年度、平成19年度の現地での協議の結果、平成20年2月になりインド・デリーにおいて結核菌に関する共同研究を行うことについて政府の許可が得られる見通しになったとの報告が届いた。

本年度の研究の成果はインドと日本の両国で共同して結核菌について共同研究を行うための拠点の形成を確立できたことである。



地図4. インド

[X I] シンガポールにおけるINH耐性結果菌の研究:

1. 日本分離INH耐性結核菌の遺伝子解析

日本各地で分離された結核菌1,112をMGIT ASTと小川比率法でINHに対する感受性を調べた。96株はMGIT ASTで耐性、66株は小川比率法で耐性であった。2法の間で不一致株の結果であった30株はすべて、MGIT ASTで耐性・小川比率法0.2 μg/mlで感受性(低濃度-S)であった。両法で耐性を示した66株のうち、19株は低濃度-R・高濃度-Sであり、47株は高濃度-Rであった。低濃度-Sの43.3%は*inhA*のプロモーター領域に変異が認められた。しかし、*katG*遺伝子のコドン315に変異を持つ株はみられなかった。これに対し、高濃度-Rの51.1%は*katG* 315に変異を持っていた。*inhA*遺伝子のプロモーター領域の変異は4.3%のみであった。低濃度-R・高濃度-Sでは*inhA*のプロモーター領域と*katG* 315の両者に変異が認められた。これらの結果は、*inhA*プロモーター領域の変異は、INH低濃度耐性に、*katG* コドン315の変異はINH高濃度耐性に関与することを示唆している。

2. シンガポール総合病院との共同研究

BACTEC 460 TBによる検査でINH耐性を示したシンガポール分離株を小川比率法で再検査した。検査した48株中19株(39.6%)は小川比率法で感受性であり、シンガポールにもINH低レベル耐性菌が存在することが分かった。低レベル耐性菌の割合は日本分離株(31.3%)より高かった。これはシンガポール総合病院側でバイオセーフティを考慮し、いくつかの多剤耐性菌を除外したこと、BACTEC 460 TBとMGIT ASTシステムの違いからきていることが考えられる。BACTEC 460 TBの結果をさらに確認するためにMiddlebrook 7H10寒天培地を用いMICを測定中である。

[X II] 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

(図17, 18, 19)

1. DNAワクチン用製剤化技術の開発

本事業で開発を行っている結核用DNAワクチンは、アジア地域での使用を想定しているため冷凍保存や温度管理された状態での輸送が困難であると想定される。そこで、常温でも保存や輸送が出来る製剤の開発を試みた。

凍結乾燥技術による最終製剤化は、バイオ医薬の安定性を向上するために利用される技術であり、蛋白医薬などの安定性の向上に有用であるとされている。本事業で開発しているHVJ-Eベクターは、脂質二重膜、たん白質、糖たん白質、残存核酸から構成されているため、凍結乾燥製剤の開発には一般の蛋白医薬

と比較して、より高度な技術が必要である。

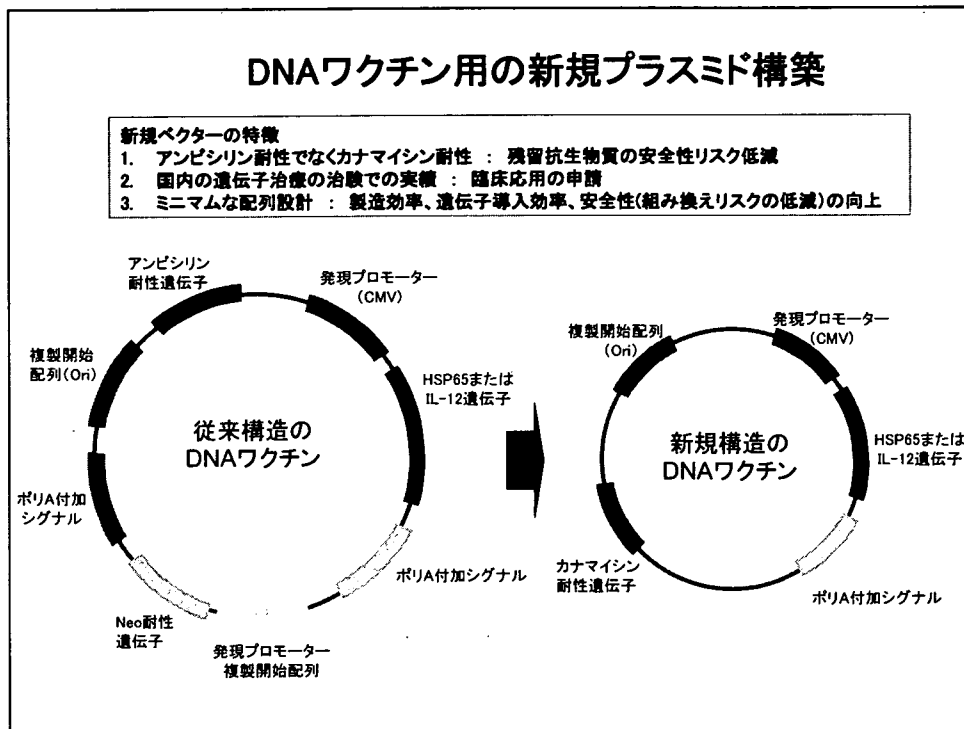


図 1 7

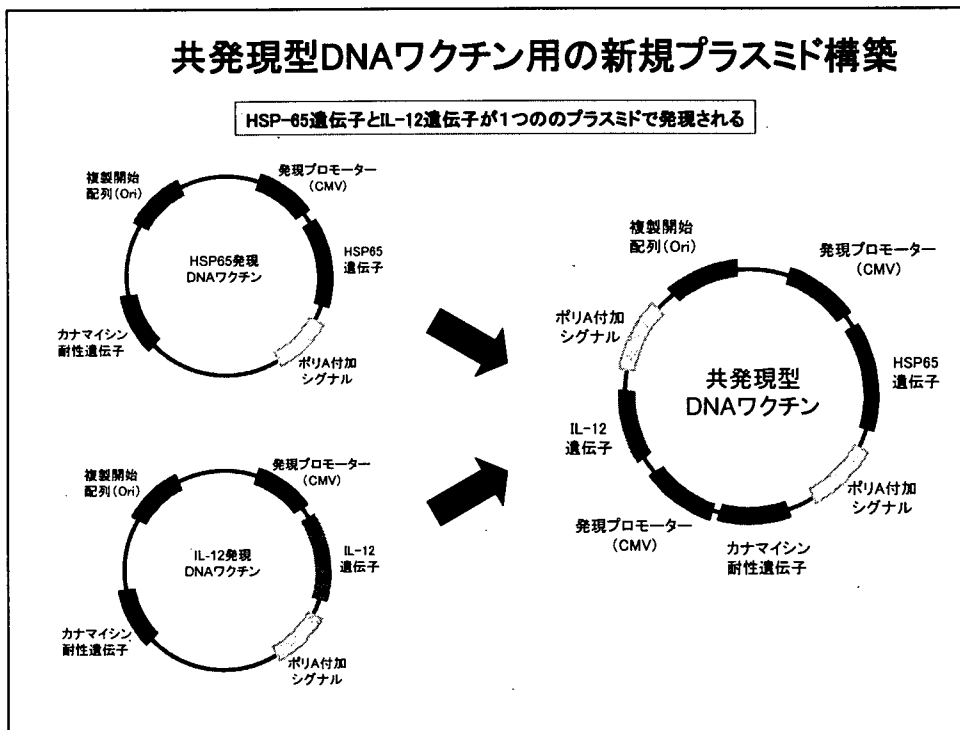


図 1 8

HVJ-Eベクターの治験薬GMP製造技術・製剤化技術

1. 生産工程はバイオリアクターシステムを利用した完全無血清・浮遊化培養
2. 精製工程は治験薬GMP製造対応の3段階のカラムクロマトグラフィーシステム
3. 製剤化工程は無菌充填と凍結乾燥システムを組み合わせたシステム
4. バイオ医薬としての無菌製造に適した密封工程の組み合わせて構築
5. GMP準拠のパイロットプラント内に機器を整備して実用化に対応

キット製剤化

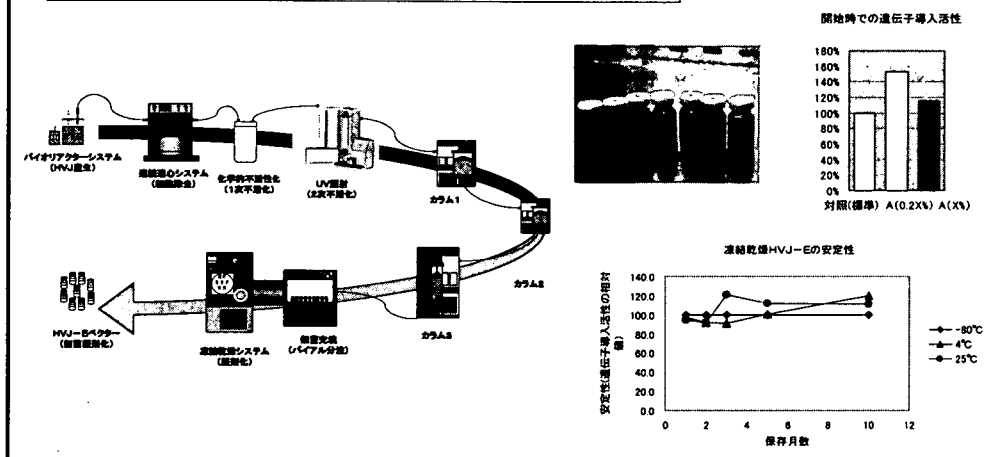


図19

そこで、凍結乾燥工程における保護・安定化のために添加する糖、塩類の種類や濃度について種々の検討を行うと共に、凍結乾燥工程における温度管理についても様々な検討を行った。その結果、凍結乾燥後の保存安定性が高くなるといわれているケーキ様の形状となる凍結乾燥条件の確立に成功した。

そこで、遺伝子導入活性を指標にして、凍結乾燥前後の活性変化と、常温での保存安定性を検討した結果、凍結乾燥前後で活性の低下が認められないこと、常温で保存した場合でも10ヶ月以上安定であることが明らかとなった。以上の検討により、凍結乾燥技術により、常温での輸送や保存に適した最終製剤候補を確立することが出来た。今後は、治験薬として使用するために必要な安定性試験をガイドラインに従って取得する必要がある。

2. 前臨床試験のための基礎研究

治療用の結核DNAワクチンの開発を成功させるためには、抗原蛋白遺伝子(HSP65)により免疫を活性化した上で、それを長期間持続させる必要がある。そこで、HVJ-Eを利用したDNAワクチンによる免疫活性化のメカニズム解析を行った。その結果、HVJ-Eは抗原蛋白遺伝子の導入効率を向上すると共に、アジュバントとして樹状細胞の活性化を誘導できることが明らかとなった。また、活性化された樹状

細胞は細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導と並行して、IL-6の産生を介して制御性T細胞(Treg)の機能を抑制することが明らかとなった。現在種々のDNAワクチンが開発されているが、アジュバントとして適切な物質がないために、十分な免疫の活性化を得ることが難しいといわれている。

HVJ-Eは、アジュバントとして結核の制御に重要なTh1タイプのヘルパーT細胞を介する免疫を高効率に活性化(CTLの誘導)できる上に、誘導された免疫を抑制することが示唆されているTregの機能をコントロールして、薬効を長期間維持できると期待される。また、この作用は、マウスとヒトの樹状細胞で共に認められることから、臨床においても同様の効果を期待することが出来る。今後は、臨床応用を実施するために詳細な解析を進める必要がある。

臨床応用を行うには、薬効・薬理試験データと共に、安全性に関するデータの取得も進める必要がある。そのため、HVJ-Eに関する安全性試験データの取得についても進めた。そのために、ガイドラインに従って毒性試験のマスタープランの作成を行って、GLP試験施設での用量設定試験データの取得を開始した。今後は、更に臨床応用の開始のための申請に必要となる試験データの取得を、GLP基準に準

拠してを進める予定である。

3. 治験薬 GMP 製造技術の開発

臨床応用を開始するためには、本事業で開発しているDNAワクチンを治験薬GMP基準に準拠して製造する必要がある。そのためには、製造工程、製造体制、製造施設について、それぞれガイドラインに従って確立する必要がある。そこで、上記のようにして確立した製剤化を含む製造工程の管理と品質管理に必要な暫定規格値の設定を行い、それに従って管理に必要なアッセイ（検定）法を確立した。また、工程、施設については、臨床に使用するDNAワクチンの製造時期に併せてバリデーション（妥当性確認作業）を進めるため、ガイドラインに従ってマスタープランの作成を開始している。

今後は、作成したプランに従ってバリデーションを進め、臨床に使用するDNAワクチンの製造に必要なデータの取得を進める予定である

[XIII] 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 I)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 Guide lines on Nonclinical Evaluation of Vaccines』と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行くことが予想された。

[XIV] 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- γ 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 γ 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。

[XV] 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- γ 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 1×10^{10} AAV particleで誘導されるワクチン効果と 1×10^{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- γ 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⁺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γ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。

[XVI] 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。従来の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。

[XVII] 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Mφ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。

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 ϕ 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 Secretory 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- γ 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 secretory 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 ϕ は結核菌を殺菌するが、GM-CSFで分化誘導したGM型M ϕ は結核菌の増殖を促す。M型M ϕ 及びGM型M ϕ 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 ϕ 及びGM型M ϕ のいずれのM ϕ 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 ϕ 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。

[XVIII] 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。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- γ 産生の系で解明された。

[XIX] 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康人の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。

[XX] ヒューマン・サイエンス振興財団研究事業 (平成19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5の如くタイ (チェンライ)、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。

平成19年度新興・再興感染症研究事業(財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団)
 外国の研究機関等への委託事業

- (1) 岡田全司
 「Preclinical trial of GMP-level Novel Vaccination (HVJ-Envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNA vaccine) in a single vector against Mycobacterium Tuberculosis using Monkeys」
 Leonard Wood Memorial 研究所
 Paul Saunderson 研究所長、Esterlina Virtudes Tan 博士
- (2) 野内英樹
 「タイ国健康人口(国民健康調査対象、全国新生児スクリーニング・プログラム)と結核患者(難治性、通常)の検体バンクによる難治化の遺伝学的研究」
 National Institute of Health, Department of Medical Sciences Ministry of Public Health, Thailand
 Dr. Pathom Sewanyapaert
- (3) 野内英樹
 「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研究」
 Mahidol University Faculty of Tropical Medicine, Department of Microbiology and Immunology
 Srisin Khusmith 教授

〔外国人研究者招へい事業〕

- (1) Pecharee Kantipong (パチュリー カンテポーン) タイ保健省チェンライ基幹病院内科部長
 「Feasibility Study on Research and Development for Tuberculosis」
 野内英樹博士
- (2) Saiyud Moolphats (サイユッド ムーンベツト) 結核研究所チェンライ拠点(エイズ結核研究NPO) Field Manager (現地責任者)
 「Feasibility Study on Research and Development for Tuberculosis」
 野内英樹博士

〔国内短期研修〕

Ms. Nada Pitabut (ナダ ベタブット) (櫻田紳策博士指導) マヒドン大学熱帯医学部
 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター(岡田全司)の研究室で多剤耐性結核患者リンパ球より産生される granulysin 及び多剤耐性結核患者血清中の granulysin のELISA測定系を研修し、技術を習得して帰国。
 この手法をタイ国の多剤耐性結核患者の granulysin 産生抑制機構解明に応用する。

表 5

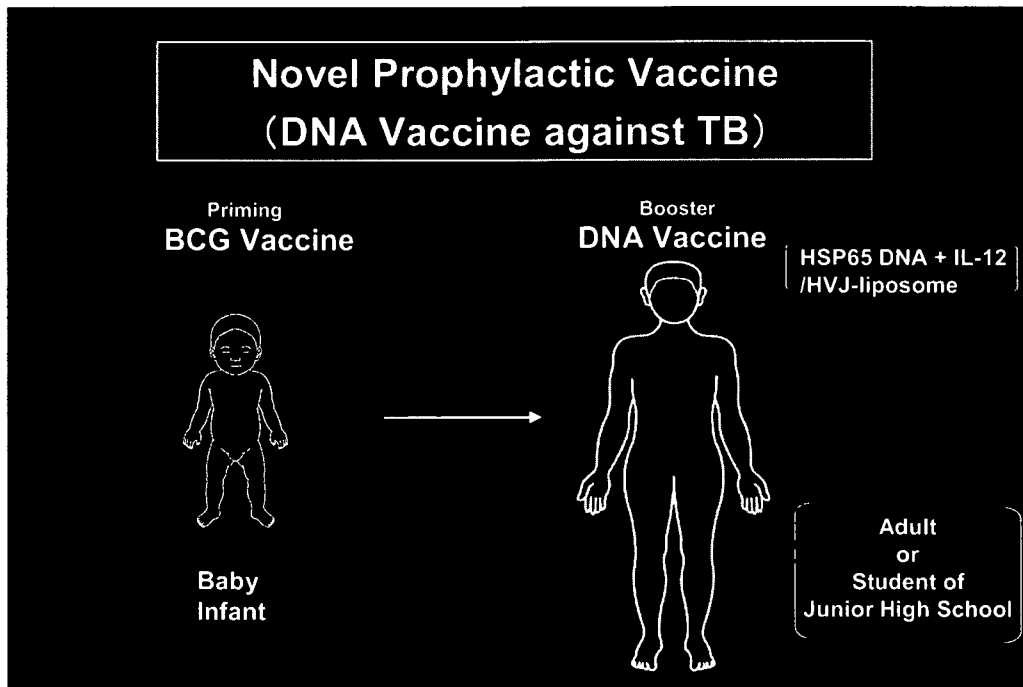


図 2 0

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

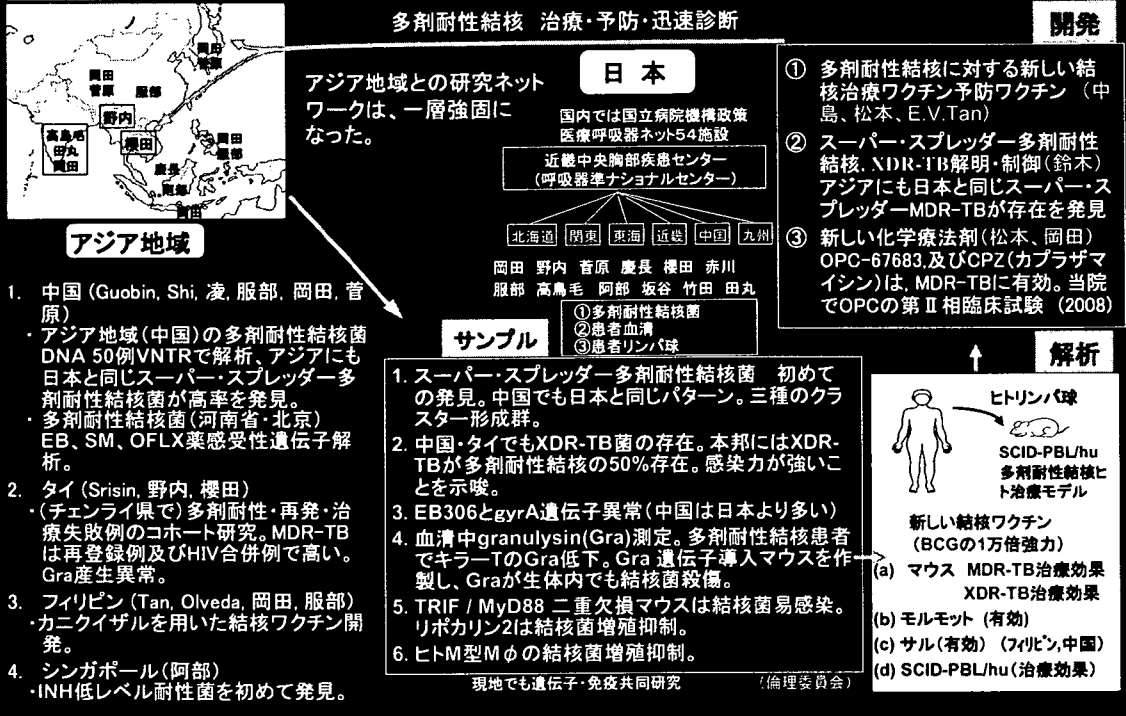


図 2 1

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ワーク及び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-

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20)
- (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
 - (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胞上皮細胞が、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21)

- 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-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る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VNTR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Fluoroquinolone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。

③MDR-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。

⑤Safdarjung 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。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療法を慎重にしなければいけない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 γ 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から、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。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の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初回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起ち上げた。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名の患者と対照健康者を登録され、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は通常多剤耐性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。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。（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）。
 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）（**図19**）pVAXにHSP65 DNAとIL-12DNAの二つの遺伝子を導入し、臨床応用を計画。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kannan-Hayashi Y, Okamura K, Hattori S, Kuwamura M, Higuchi E, Terayama H, Moriyama M, Mukamoto M, Okada M, Ohsugi Y, Nakamura Y.: Neuritogenic Effects of T Cell-Derived IL-3 on Mouse Splenic Sympathetic Neurons In Vivo. The Journal of Immunology, 2008, vol.180, p4227-p4234.
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, 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. 2007;25(16):2990-3
3. Mai HN, Hijikata M, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kimura K, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Nagai H, Kurashima A, Kajiki A, Oketani N, Hayakawa H, Tanaka G, Shojima J, Matsushita I, Sakurada S, Tokunaga K, Keicho N.: Pulmonary Mycobacterium avium complex infection associated with the IVS8-T5 allele of the CFTR gene. Int J Tuberc Lung Dis. 2007;11(7):808-13.
4. 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. 2007;25(16):3038-40.
5. 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. 2007;82(6):531-8.
6. Yoshida S, Suzuki K, Tsuyuguchi K, Iwamoto T, Okada M, Sakatani M.:Molecular epidemiological analysis of Mycobacterium kansasii isolates. Kekkaku. 2007;82(2):103-10.
7. 秋山一男, 手塚文明, 岡田全司, 石橋大海, 島津章, 堀部敬三, 是恒之宏, 村中光, 下田照文, 山本初美, 岡村純, 佐伯行彦, 福田信夫, 山内芳忠, 城ヶ崎倫久, 藤内智, 藤澤隆夫, 友保洋三, 谷山清己, 羽金和彦, 平成17年度国立病院機構共同臨床研究「国立病院機構における臨床研究部の活性化と適切な評価法に関する研究」班：施設長を対象とした臨床研究部・研究センターに関するアンケート調査. 医療 2007; 61(8):546-553.
8. 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: 新しい結核ワクチンの開発. 化学療法の領域 出版中 2007.
9. 岡田全司: 新しい結核ワクチン. 感染症 7: 14-18 2007.