

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

分担研究者 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
分担研究者 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

研究要旨

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。

A. 研究目的

タイにおけるHIV/結核の患者のCD4陽性T細胞数以外の宿主側リスク要因の解析を行うこと。

B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

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。研究協力病院のメーチャン病院には倫理委員会は存在しない。

C. 研究結果

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。患者登録と末梢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ータ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-

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常人に比較して γ 9V δ 2TCRT細胞が増加し、HIV感染者では健常人より減少していた。

D. 考察

本研究では、granulysinの測定が重要なポイントであるが、細胞レベルの検索と併せてgranulysinのレベルの高低がHIV結核ならびにHIV非感染結核発症のリスク要因たるか注目される。今後、HIV結核患者を含めて、これらエフェクター分子の発現レベルの検討をさらに進めていく。

一方、菌側の情報としては、全例が塗末検査陽性培養陽性の患者のみ対象としているため、薬剤耐性に関する情報を結核データベースから確実に得ることできる。

以上、多剤耐性結核とgranulysin、osteopontinといったエフェクター分子ならびにTh1サイトカインについてHIV結核と非HIV結核の双方において有用な知見が得られると想定される。

E. 結論

タイNIH、マヒドン大学熱帯医学部、チェンライ病院、メーチャン病院との共同研究体制を構築し、HIV結核に関する臨床免疫学的研究を開始した。患者登録と臨床試料の採取を行った。試料の解析は現在進行中であり、最終的な結果を得るのは次年度になる。

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし

2. 学会発表

1. 「ヒト末梢血単球由来マクロファージにおけるオステオポンチン産生に対するBCG感染とコロナー刺激因子の作用」櫻田紳策、松下育美、土方

美奈子、赤川清子、山崎利雄、慶長直人、第47回
日本呼吸器学会、東京、2007

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

自然免疫系による結核感染防御機構に関する研究

分担研究者 竹田 潔 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

結核菌感染において生体防御の最前線を担う自然免疫系の役割を解析した。特に、結核感染により、肺胞上皮細胞および肺胞マクロファージから産生されるlipocalin 2の抗結核作用の機序を解析した。Lipocalin 2は、鉄イオンと会合したsiderophoreと結合し、細菌による鉄イオン取り込みを抑えることが知られている。結核菌、BCGの試験管内の培養液中にlipocalin 2を加えると、増殖を濃度依存性に抑制した。過剰の鉄イオンあるいは、鉄イオンの取り込みを司るmycobactinを加えると、lipocalin 2による結核菌の増殖抑制が解除されることから、lipocalin 2による結核菌の増殖抑制は鉄イオンのmycobactinを介した取り込みを抑制することによるものであることが示唆された。次に、lipocalin 2ノックアウトマウスに正常マウスがほとんど死なない数の結核菌を感染させると、大半が50日以内に死亡した。また、肺や肝臓で、結核菌数が有意に上昇していた。このように、lipocalin 2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た。さらに、組織解析から、lipocalin 2ノックアウトマウスでは、肺胞上皮層に結核菌の存在が明らかに認められた。正常マウスでは、肺胞上皮層に結核菌はほとんど認められず、また肺胞マクロファージにBCGを感染させても、正常マウスとノックアウトマウス間で有意な差はみとめられないことから、Lipocalin 2欠損により、肺胞上皮内で抗結核感染防御機構が障害されていることが考えられた。そこでII型肺胞上皮細胞を単離し、BCG感染させると、lipocalin 2ノックアウトマウス由来のII型肺胞上皮細胞は、BCG感染後の菌数が増加していた。Lipocalin 2を加えると、細胞内に取り込まれ、BCGの細胞内の増殖を抑制した。これらの結果から、結核感染により、ごく初期に肺胞に分泌されるlipocalin 2が、肺胞上皮層において結核感染の第一戦の防御機構を担っていることが明らかになった。

A. 研究目的

自然免疫系は、病原体の宿主内への侵入を最初に察知し、種々の炎症・免疫応答を誘導する重要な免疫系である。しかしながら、B, T細胞が主役を演じる獲得免疫系の分子機構が詳細に解析されてきているのに対し、自然免疫系の作動メカニズムはほとんど理解されていない。最近、Toll-like receptor (TLR)ファミリーが、病原体の構成成分の認識に関与していることが明らかになってきた。結核菌に対する生体防御においても、TLRファミリーによる結核菌の認識が重要な役割を果たす可能性が考えられる。本研究では、自然免疫系による結核などの病原体の生体内への侵入を察知するメカニズムをToll-like receptor (TLR)を中心とした受容体の解析から明らかにし、結核感染における免疫系作動の分子機構を解明することを目的とする。

B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整ったSPF環境化で週に1回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

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。また、過剰の mycobactin を加えても、Lcn2 による増殖抑制は解除された。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。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。また、肺組織をチールネルゼン法により染色したところ、正常マウスでも Lcn2 ノッ

クアウトマウスでも、granuloma 様の変化を起こした組織や、マクロファージ様の形態の細胞では、赤染する抗酸菌の数が、ほぼ同じ密度で観察された。一方、肺胞上皮層内には、正常マウスではチールネルゼン法で結核菌を認めることはなかったが、Lcn2 ノックアウトマウスでは、肺胞上皮層に有意に結核菌を認めた。また、肺胞マクロファージを単離し、BCG を感染させても、正常マウスとノックアウトマウス間で有意な差は認められなかった。これらの結果から、Lcn2 ノックアウトマウスで結核感染に対する感受性が高くなるのは、肺胞上皮での結核感染防御機構が、主に障害されているためであることが示唆された。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。組み換え体の 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。

D. 考察

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。さらに Lcn2 が、肺胞上皮細胞に取り込まれ、肺胞上皮内で侵入した結核菌の増殖を抑制することにより、結核感染防御の最初の砦を築いていることも明らかになった。このように、Lcn2 の結核感染防御機構の解析から、肺胞上皮の重要性が明らかになった。

E. 結論

結核菌の感染において、肺胞上皮細胞から分泌される Lcn2 が、鉄イオンの取り込みをブロックすることにより増殖を抑え、感染の最前線において自然免疫防御機構の一端を担っていることが明らかになった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto, M., Uematsu, S., Okamoto, T., Matsuura, Y., Sato, S., Kumar, H., Satoh, T.,

Saitoh, T., Takeda, K., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Kawai, T., and Akira, S.: Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J. Exp. Med.* 204, 2233-2239 (2007).

2. Sakamori, R., Takehara, T., Ohnishi, C., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Takeda, K., Akira, S., Hayashi, N.: STAT3 signaling within hepatocytes attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice. *Hepatology* 46, 1564-1573 (2007).
3. Nemoto, Y., Kanai, T., Makita, S., Okamoto, R., Totsuka, T., Takeda, K., and Watanabe, M.: Bone marrow retaining colitogenic CD4⁺ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology* 132, 176-189 (2007).

2. 学会発表

1. Kiyoshi Takeda, Regulation of inflammatory responses by nuclear I κ B proteins. 8th International Society of Exercise and Immunology Symposium, 2007.10.25, Sendai, Japan
2. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. The 9th International Colloquium on Paratuberculosis, 2007. 10.29, Tsukuba, Japan
3. 竹田 潔, 自然免疫系による結核感染防御機構, 第60回日本細菌学会九州支部総会, 2007.10.12, 長崎
4. Kiyoshi Takeda, Lipocalin 2 mediates host defense against Mycobacteria infection. 42th US-Japan Conference on Tuberculosis and leprosy, 2007.9.11-14, Henan, China
5. 竹田 潔, 自然免疫シグナルの制御機構第28回日本炎症・再生医学会, 2007.8.2, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

多剤耐性結核菌の薬剤耐性遺伝子解析

分担研究者 阿部千代治 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社 技術顧問

研究要旨

これまでの研究でBACTEC MGIT 960で感受性・小川比率法で耐性の結果を示すイソニアジド低レベル耐性菌が存在することを明らかにした。低レベル耐性菌の43.3%はinhA遺伝子のプロモーター部分に変異を示した。一方、小川比率法の高濃度に耐性を示した株の51.1%はkatG遺伝子のコドン315に変異を示した。これらのことは、inhAのプロモーター領域の変異は低レベル耐性、katG 315の変異は高濃度耐性に関与することを示唆している。シンガポール分離株を検査したところ、シンガポールにもイソニアジド低レベル耐性菌が存在することが分かった。その割合は日本分離株より少し多かった。

A. 研究目的

適切な患者管理と治療のために薬剤耐性菌を早急に同定することが必須である。わが国では薬剤感受性検査を小川比率法で行っているが、結果の報告までに4週間を要している。近年、液体培地を用いるBACTEC MGIT 960 AST (MGIT AST)が開発された。MGIT ASTを評価中に小川比率法との間でイソニアジド (INH)に対する検査で不一致の結果を示す株がみられた。不一致を示した分離株はすべてMGIT ASTで耐性、しかし小川比率法で感受性の結果であった。Middlebrook 7H10寒天培地でMIC測定の結果、それらの93%はMIC 0.4 µg/mlと0.8 µg/mlを示し、低レベル耐性菌であることが分かった。この研究で、さらに確認するためにINH耐性に関与する遺伝子の変異を調べる。この種の耐性菌がアジア諸国にも存在するかどうかを調べる。

B. 研究方法

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0.2 µg/ml濃度の検査で感受性 (低濃度-S)、0.2 µg/mlで耐性しかし1.0 µg/mlで感受性 (低濃度-R・高濃度-S)、1.0 µg/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。

C. 研究結果・D. 考察

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 (表 1)。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。

表 1. katG 315またはinhAプロモーター領域の変異とINH耐性レベルとの関連

小川比率法によるINH感受性検査	分離株数	次の遺伝子に変異を示した株数 (%)	
		katG 315	inhAプロモーター
低濃度-S	30	0	13 (43.3)
低濃度-R・高濃度-S	19	3 (15.8)	10 (52.6)
高濃度-R	47	24 (51.1)	2 (4.3)

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。

E. 結論

1. INHの耐性に関与する遺伝子の変異を調べた。
2. 低レベル耐性にinhA遺伝子のプロモーター領域の変異が関与する。
3. 高レベル耐性にkatG 315の変異が関与する。
4. 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。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Maeda R, Mukai T, Kai M, Fukutomi Y, Nomaguchi H, Abe C, Kobayashi K, Kitada S, Maekura R, Yano I, Ishi M, Mori T, and Makino M: Evaluation of major membrane protein-II as a tool for serodiagnosis of leprosy. FEMS Microbiol Lett 2007; 272: 202-205.
2. Chiba T, Takii T, Nishimura K, Yamamoto Y, Morikawa H, Abe C, and Onozaki K: Synthesis of new sugar derivatives from Stachys sieboldi Miq and antibacterial evaluation against Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium, and Staphylococcus aureus. Bioorg Med Chem Lett 2007; 17: 2487-2391.
3. 御手洗聡, 小林郁夫, 阿部千代治, 和田雅子, 鈴木克洋, 高嶋哲也, 川辺芳子, 町田和子, 田野正夫, 瀧川修一, 鎌田有珠, 重藤えり子, 藤井俊司, 森 健一, 須山尚史, 矢野修一, 川城丈夫, 尾形秀雄: バクテックMGIT 960結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ (MGIT AST)および小川標準法によるイソニアジド低濃度薬剤感受性検査の判定不一致に関する検討. 結核 2007; 82: 449-454.
4. 阿部千代治: 結核菌のバイオハザード対策. Med Technol 2008; 36: 136-141.
5. 阿部千代治: 今回の結核菌検査指針改訂のポイント. 結核 2008; 83: 46-47.

2. 学会発表

1. Abe C, Kobayashi I, Mitarai S, Wada M, Ogata H, and Sng Li-Hwei: Characterization of Mycobacterium tuberculosis isolates with

low-level resistance to isoniazid. 107th General Meeting of the American Society for Microbiology. May 20-25, 2007, Toronto.

2. Abe C, Kobayashi I, Mitarai S, Wada M, Ogata H, and Sng Li-Hwei: Molecular characteristics of isoniazid resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Japan. 28th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology. July 1-4, 2007, Athens.
3. 阿部千代治, 小林郁夫, 御手洗聡, 和田雅子, 川辺芳子, 高嶋哲也, 鈴木克洋, 尾形秀雄: BACTEC MGIT 960 ASTでイソニアジド耐性・小川比率法で感受性結核菌の性状. 第82回日本結核病学会総会, June 5-6, 2007, 大阪市.
4. 御手洗聡, 小林郁夫, 阿部千代治, 和田雅子, 鈴木克洋, 高嶋哲也, 川辺芳子, 尾形秀雄: バクテックMGIT 960結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ (MGIT AST)および小川標準法によるイソニアジド低濃度薬剤感受性検査の判定不一致に関する検討. 第82回日本結核病学会総会, June 5-6, 2007, 大阪市.
5. 小林郁夫, 阿部千代治, 御手洗聡, 青野昭男: バクテックMGIT 960 ASTによる二次抗結核薬に対する結核菌の感受性検査. 第82回日本結核病学会総会, June 5-6, 2007, 大阪.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

分担研究者 坂谷光則 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 病院長
研究協力者 螺良英郎 (財)大阪結核研究会 理事長

研究要旨

- [I] 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ワクチンもマウスの系で強い治療ワクチン効果を示した。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、を中心に治療ワクチンの開発計画を立案した。
さらに、
- [II] 多剤耐性結核菌に対する治療ワクチン
多剤耐性結核菌を感染させたマウスにおいて、HVJ-エンベロープ/HSP65DNA + IL-12 DNAワクチンは、強力な結核治療効果（結核治療ワクチン）を示した。
さらに、(HVJ-エンベロープ/HSP65DNA + IL-12 DNA)ワクチン+BCGワクチンも強力な結核治療効果を示した。更に、超薬剤耐性結核（XDR-TB）に対しても、治療ワクチン効果を示す画期的な成果を得た。
- [III] カニクイザルを用いた、結核治療ワクチン効果：このHVJ-エンベロープ/Hsp65 DNA + IL-12 DNAワクチンを臨床応用に適したpVAXベクターに二つのこれらの遺伝子を導入したワクチンを作製した。これをあらかじめ結核菌感染させてカニクイザルに治療ワクチンとして投与した。その結果、生存率の改善及び体重増加、免疫反応の増強等治療効果が示された。
- [IV] 新規化学療法剤との併用療法計画。
新規化学療法カプラザマイシン（CPZEN-45）とOPCの二種類を共同研究で開発した。
これらの新規化学療法剤と上記のワクチンの併用療法を計画中である。

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 TNFR(-/-)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。またユニバシット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-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。(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。

[III] カニクイザルを用いた、結核治療ワクチン効果：このHVJ-エンベロープ/Hsp65 DNA + IL-12 DNAワクチンを臨床応用に適したpVAXベクターに二つのこれらの遺伝子を導入したワクチンを作製した。これをあらかじめ結核菌感染させてカニクイザルに治療ワクチンとして投与した。その結果、生存率の改善及び体重増加、免疫反応の増強等治療効果が示された。

[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 (カブラザマイシン：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/HSP65DNA+IL-12DNA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6)

表1

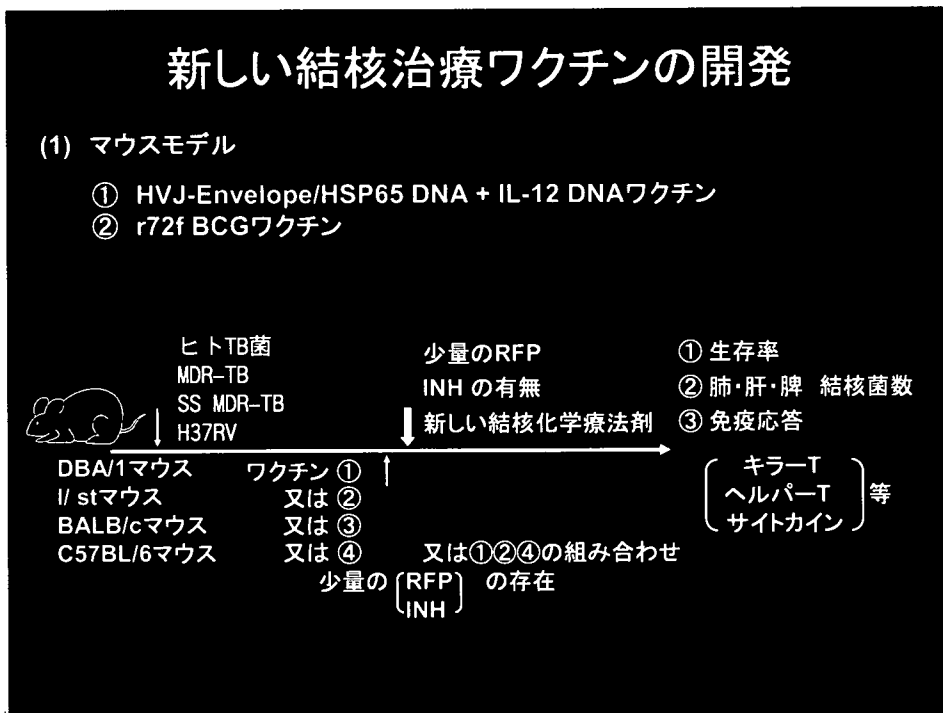


表2

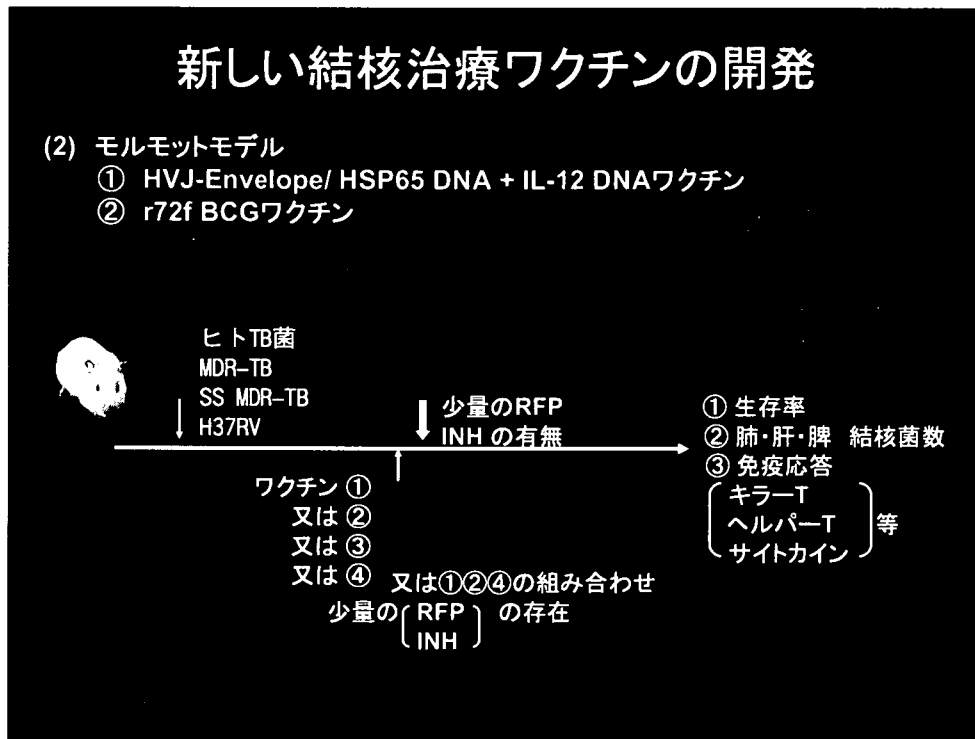


表3

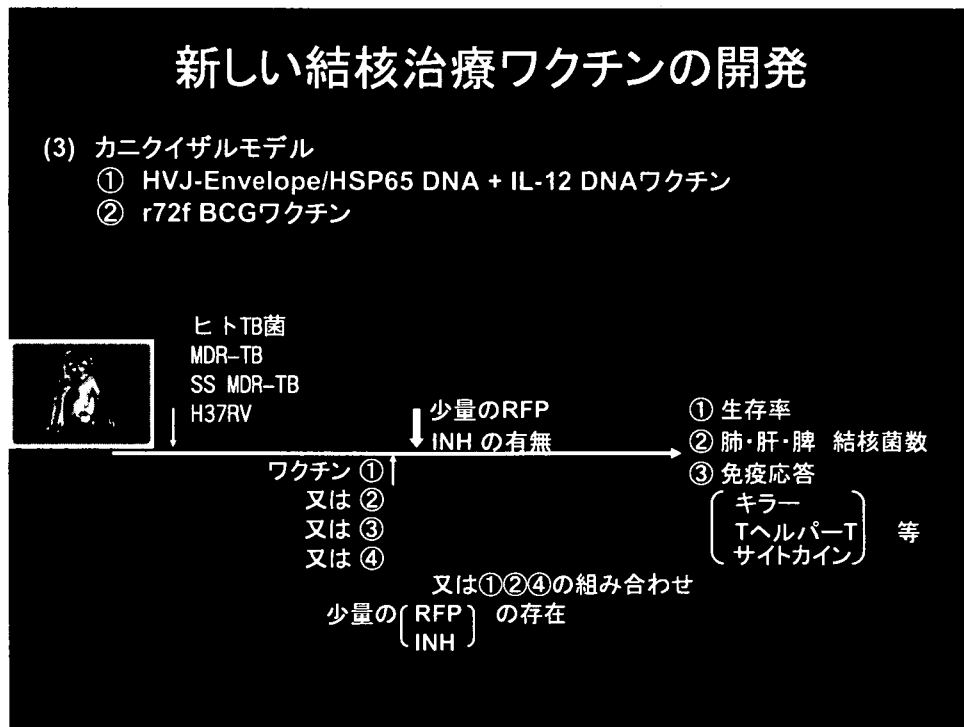


表 4

新しい結核治療ワクチンの開発

(4) SCID-PBL/huモデル

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

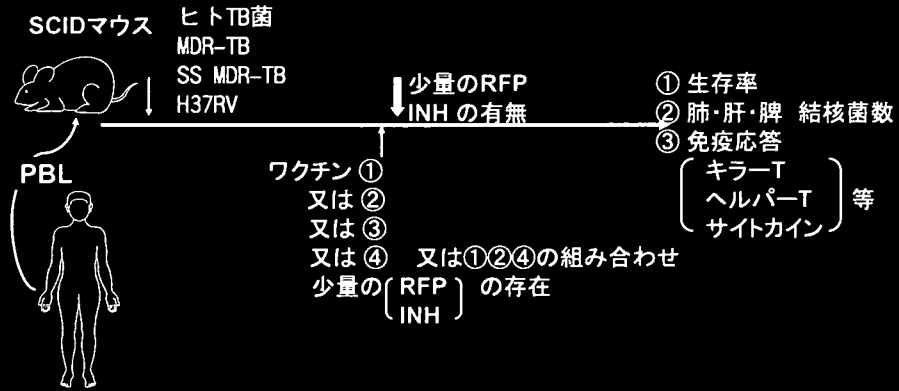


表 5

新しい結核ワクチン

- ① HVJliposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン
- ② リコンビナント72f BCG

等

- DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine*. 2007;25(16):2990-3
- 2 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.
 - 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*. 2007;25(16):3038-40.
 - 4 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*. 2007;82(6):531-8.
 - 5 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.
 - 6 M. Okada, Y. Kita, N. Kanamaru, S. Hashimoto, T Nagasawa, Y. Kaneda, Y. Nishida, H. Nakatani, K. Takao, R. Asai, R. Suhara, E.C. Dela Cruz, E.V. Tan, R.M. Abalos, R. Gellber, P. Saunderson, S. Yoshida, M. Matsumoto, D. McMurray, M. Sakatani: Novel Vaccination (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) Against Tuberculosis Using Cynomolgus Monkey. "13th International Congress of Immunology" Edit Jorge Kalil, Edecio Cunha-Neto, Luiz Viente Rizzo, MEDIMOU Intern p.119-122,2007
 - 1 喜多洋子、金丸典子、深水玲子、浅木亮子、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：HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン (4) 結核 82：409, 2007
 - 2 金丸典子、喜多洋子、深水玲子、浅木亮子、井上義一、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T細胞分化誘導作用 結核 82：408, 2007
 - 3 井上義一、喜多洋子、深水玲子、浅木亮子、坂谷光則、岡田全司 プライム・ブースター法を用いた新しいワクチン (HVJ-liposome / HSP65 + IL-12 DNA) による肺結核病理像作用 結核 82：408, 2007
 - 4 深水玲子、喜多洋子、金丸典子、浅木亮子、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モデルの開発 結核 82：405, 2007
 - 5 浅木亮子、喜多洋子、金丸典子、深水玲子、井上義一、坂谷光則、岡田全司 気道内投与・鼻腔内投与による新規結核ワクチン効果解析(エアゾル吸入感染系を用いた) 結核 82：409, 2007
 - 6 町田和子、四元秀毅、岡田全司、坂谷光則 国立病院機構 (NHO) 呼吸器ネットにおける2004年結核死亡調査と死亡推移の検討 結核 82:390, 2007
 - 7 藤山理世、田中賀子、樋口紀子、河上靖登、白井千香、片上祐子、平岡恭典、青山博、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 神戸市で結核定期外健康診断時に実施したQFT-2G検査の有用性と接触度について 結核 82巻4号：p.358, 2007
 - 8 藤山理世、田中賀子、中谷幸子、榎林成之、樋口純子、渋谷雄平、青山博、白井千香、片上祐子、千原三枝子、吉岡伸子、伴貞彦、河上靖登、鈴木克洋、岡田全司、坂谷光則 神戸市で結核接触者健康診断時に実施したQFT-2G検査と接触度について 第66回 日本公衆衛生学会総会抄録集 p.588, 2007
 - 9 久保昭仁、伊佐俊一、楠洋子、高田實、青野奈々、田村太郎、辻野和之、村上真理、湯峯克也、上平和孝、沖塩協一、川口知哉、安宅信二、田中壽一、松村晃秀、北市正則、河原正明、岡田全司、坂谷光則 胸部悪性腫瘍症例を対象とした包括的多種類検体保存システムの構築 肺癌 47巻5号：p.607, 2007
 - 10 露口一成、吉田志緒美、源誠二郎、鈴木克洋、岡田全司、洪泰浩、林清二、坂谷光則 INHの予防内服
2. 学会発表
- 1 喜多洋子、金丸典子、深水玲子、浅木亮子、井上義

- によりINH耐性が誘導されたと考えられた結核の1症例 結核 82 10:p.801, 2007
- 11 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 富田元久, 坂谷光則 Line Probe Assayを用いた抗酸菌同定キットの有用性の検討 結核 82 10:p.801, 2007
 - 12 白井千香, 藤山理世, 田中賀子, 河上靖登, 岩本朋忠, 園部俊明, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則 神戸市でのVNTR法による結核菌の遺伝子型別データベースが有用であり、QFTも併用した接触者健康診断事例について 結核 82 10:p.801, 2007
 - 13 武本優次, 深水玲子, 井上義一, 岡田全司, 坂谷光則, 影山圭吾, 前田光一, 神野正敏, 藤本眞一, 中村忍 高齢者薬剤性肺炎の1例 日本老年医学会雑誌 44巻4号:p.528, 2007
 - 14 露口一成, 吉田志緒美, 鈴木克洋, 源誠二郎, 井上義一, 岡田全司, 北市正則, 新井徹, 林清二, 坂谷光則 肺結核治療中に閉塞性細気管支炎を生じたその後肺M.avium complex症を生じた1例 結核 82巻6号:p.553, 2007
 - 15 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 富田元久, 坂谷光則 薬剤感受性試験でRFP感受性、耐性遺伝子検査でRFP耐性となる結核菌の検討 結核 82巻6号:p.551, 2007
 - 16 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 坂谷光則 結核菌の分子疫学的解析 多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌との比較 結核 82巻6号:p.531-538, 2007
 - 17 大家晃子, 井上義一, 審良正則, 田中勲, 深水玲子, 新井徹, 橘和延, 岡田全司, 林清二, 坂谷光則 リンパ脈管筋腫症におけるvolumetric CTと重症度との関係 日本呼吸器学会雑誌 45巻増:p. 276, 2007
 - 18 橋元里実, 武本優次, 喜多洋子, 金丸典子, 西田泰子, 綱井良恵, 井上ルリ子, 深水玲子, 仲谷均, 山田順子, 高尾京子, 浅井律子, 浅木亮子, 浪江由美, 奥野良信, 加瀬哲男, 吉田栄人, 坂谷光則, 岡田全司 SCID-PBL/huモデルマウスを用いたSARSウイルスM蛋白に対するヒト中和抗体誘導DNAワクチンの開発 日本呼吸器学会雑誌 45巻増:p. 264, 2007
 - 19 新井徹, 井上義一, 橘和延, 高藤淳, 深水玲子, 田村太朗, 大塚淳司, 源誠二郎, 露口一成, 鈴木克洋, 林清二, 岡田全司, 坂谷光則 間質性肺炎加療に伴うサイトメガロウイルス抗原血症 日本呼吸器学会雑誌 45巻増:p. 234, 2007
 - 20 深水玲子, 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, 浅木亮子, 仲谷均, 山田順子, 高尾京子, 浅井律子, 浪江由美, 坂谷光則, 岡田全司 HSP 65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明 日本呼吸器学会雑誌 45巻増:p. 200, 2007
 - 21 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(Hsp 65+ IL-12 DNA)の開発とキラーT細胞分化誘導効果 日本呼吸器学会雑誌 45巻増:p. 200, 2007
 - 22 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, Tan E.V., DelaCruz D.L.C., 岡田全司 肺感染症の病態と診療の研究における進歩 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 HSP 65 DNA+ IL-12 DNAワクチン 日本呼吸器学会雑誌 45巻増:p. 122, 2007
 - 23 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 坂谷光則, 岩本朋忠 M.kansasii症における多クローン性感染の検討 結核 82巻4号:p.447, 2007
 - 24 露口一成, 吉田志緒美, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則 血液透析を必要とする腎不全に合併した結核患者の臨床的検討 結核 82巻4号:p.442, 2007
 - 25 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 富田元久, 坂谷光則, 末竹寿紀 プラジナミド耐性遺伝子検出キットの有用性の検討 結核 82巻4号:p.416, 2007
 - 26 Masaji Okada, Yoko Kita, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Tetsuji Nagasawa, Yasufumi Kaneda, Yasuko Nishida, Reiko Fukamizu, Yoshie Tsunai, Ruriko Inoue, Hitoshi Nakatani, Yumi Namie, Junko Yamada, Kyoko Takao, Ritsuko Asai, Ryoko Asaki, E.V. Tan, Mitsunori Sakatani Novel vaccination (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA against Tuberculosis) The American Association of Immunology Meeting, 2007
 - 27 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.

- 28 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-12DNA) 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

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

多剤耐性結核の院内感染対策

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

研究要旨

従来多剤耐性結核は感染性がないとの認識がわが国では一般的で、感染対策は全く行われていなかった。しかし多剤耐性結核の院内感染、それも通常の結核治療中の患者への重感染が我々によって報告され、院内感染対策の重要性が周知されるに至った。しかし結核は不採算部門であり、衛生工学的対策には多額の費用が必要なため、いまだ充分に対策がなされているとは言えない。

A. 研究目的

我が国において結核の院内感染対策が論じられるようになったのは、1990年代の後半からである。今や感染対策の象徴的存在であるN-95微粒子マスクが臨床現場に導入されたのも90年代後半以降であり、それまでの結核病棟ではガーゼマスクを使用するのが普通であった。結核対策といえば、患者をとにかく結核病棟（多くは近隣の国立療養所）に移送することであり、結核病棟での感染対策は全く考慮されていなかったと言っても過言ではない。特に多剤耐性結核（MDRTB）は感染しないとの根強いドグマのもと、通常の結核患者をMDRTB患者と長期間同室させることになんら痛痒を感じなかったのが我が国の実態であった。

B. 研究方法

結核の院内感染対策は、1) マニュアルの作成、職員の教育や健康診断、患者への外科マスクの装着や優先診察などの制度的対策、2) 空気管理を中心とした衛生工学的対策、3) 微粒子マスクの装着、BCG接種、化学予防などの職員の個人的対策の3層構造から成立しており、先に述べた事項がより基礎的かつ重要である。結核の最大の特徴は、飛沫核（空気）感染でヒトからヒトへと伝播する事である。基本的に治癒可能であるにもかかわらず、現在も結核が社会的に重要視されている所以である。喀痰塗抹（ガフキー）陽性の結核患者が咳をしたときなどに生じる飛沫は短期間で床に沈下するが、一部の飛沫は床に達するまでに表面の水分が蒸発して裸の飛沫核となる。一般に結核菌を2-3個含んで空气中を長期間浮遊しているこの飛沫核を直接肺胞内に吸い込むことが結核感染の必要条件である。従って室内から飛沫核を大気中に拡散除去するのが基本的対策となる。

1990年代よりHIV感染に合併したMDRTBの高い致死率と医療従事者への感染の実態が欧米から報告されるようになり、我が国でも結核院内感染対策の重要性が認識されるようになった。さらにRFLP法による結核の分子疫学的手法が確立することで、健常者での結核再感染の事実が複数報告されるようになった。

C. 研究結果 と D. 考察

二つの結核療養所を舞台に、一人のMDRTB患者から二人の感受性結核治療中の患者と二人の医療従事者と一人の家族に集団感染を生じた事例である。これら6名の患者中5名が当センターに同時に入院となったことをきっかけとして集団感染が発見された。5名の薬剤感受性結果が同じ（EVMとCS以外の全ての薬剤に耐性）であり、またお互いに顔見知りであったことより、他の一名の菌株も取り寄せてRFLPをしたところ同一のパターンを示した。この6人は全員HIV陰性である。この事例は、「MDRTBは感染力が弱い」、「結核の再感染はない」という二つのドグマを同時に否定している点が大きな特徴である。結核の再感染はないという考えを捨ててシンプルに考えると、感受性結核治療中の患者は二重の意味でMDRTBの再（重）感染を受け発病しやすいことが理解できる：1)もともと結核の感染・発病を生じやすい理由がある（だから結核になっている、本事例では両者とも糖尿病があった）、2)標準化学療法を受けているのでそれらに耐性のあるMDRTBの増殖にはむしろ有利に働く。

1994年に発表されたCDCのガイドラインでも、薬剤感受性パターンが同一であると判明し有効な化学療法が行われている場合以外は、複数の排菌陽性結核患者を同じ部屋に収容してはならないと記載されている。つまり全てのガフキー陽性結核患者は薬剤感受性結果が判明するまで個室に収容しなければならないことになる。しかし我が国の結核病棟の現状ではとうてい無理な要求である。MDRTBとはっきりしている患者だけは空気管理のできた個室に収容し、感受性結核患者との接触を避けることが、現状で精一杯の対策である。

保存結核菌株に対する分子疫学的分析から見えてくるもの2001年から2004年までに当センターで分離したMDRTB115株に対してRFLP分析を施行し、2株以上に同一パターンを持つ株（クラスター株）の割合（クラスター率）を検討するとともに、スポリゴタイピング法により世界的に毒力が強く集団感染を起こしやすいと言われているBeijing strainの割合を計算した。同

じ分析を2003年に分離した全剤感受性結核菌株にも行いMDRTBと比較した。MDRTB48株が10群のクラスターを形成し（クラスター率44%）、最大のクラスターは12株からなり、11株からなるクラスターと7株からなるクラスターが続いた。12株と11株からなるクラスターはBeijing strainと判明したが、7株からなるクラスターはBeijing strainではなかった。MDRTB株全体では76.1%がBeijing strainであった。一方全剤感受性結核では、94株が19種類のクラスターを形成し（クラスター率41%）、Beijing strainの割合は79.8%であった。以上クラスター率、Beijing strainの割合ともにMDRTBと全在感受性菌で有意差がなく、両者の感染様式に大きな違いはない可能性が示唆された。

E. 結論

分子疫学的手法を始めとする技術革新が結核における長年のドグマを打破した。結核の再感染はある。MDRTBはむしろ感染しやすく、特に結核治療中の患者への院内感染には十分注意する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, Tomita M, Fujiyama R, Tanaka N, Kawakami Y, Ito M.: Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on Mycobacterium tuberculosis strains predominated by the Beijing family. FEMS Microbiol Lett. 270(1):67-74.2007.
2. 御手洗聡、小林郁夫、阿部千代治、和田雅子、鈴木克洋、高島哲也、川辺芳子、町田和子、田野正夫、瀧川修一、鎌田有珠、重藤えり子、藤井俊司、森健一、須山尚史、矢野修一、川城丈夫、尾形英雄。バクテックMGIT960結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ (MGIT AST) および小川標準法によるイソニアジド低濃度薬剤感受性検査の判定不一致に関する検討。結核82(5):449-454、2007
3. 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岡田全司、坂谷光則：結核菌の分子疫学的解析—多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌の比較— 結核 82:531-550、2007
4. 鈴木克洋：わが国における結核の現状とクオンチフェロン検査。Schneller 62：20-25、2007
5. 鈴木克洋：結核患者院内発生時の対応— QuantiFERONの可能性も含めて。感染症37(3)：105-108、2007

6. 審良正則、鈴木克洋、喜久山綾乃：肺結核の典型像、非典型像。日本医事新報 4358：53-56、2007
 7. 鈴木克洋、審良正則、喜久山綾乃：肺非結核性抗酸菌症の画像所見。日本医事新報 4362:53-56、2007
 8. 鈴木克洋：非結核性抗酸菌症、小児科診療 71(1):83-88、2008
2. 学会発表
1. 鈴木克洋：肺カンサシ症の病態と治療 「ワークショップ 非結核性抗酸菌症の病態と治療」第47回日本呼吸器学会学術講演会 (2007 5.12 東京)
 2. 鈴木克洋：そこが知りたい結核の臨床 「呼吸器学会・結核病学会合同プログラム 未来に繋がる結核対策」第47回日本呼吸器学会学術講演会 (2007 5.11 東京)
 3. 鈴木克洋：非結核性抗酸菌症の診断と治療 教育講演 第81回日本感染症学会 (2007 4.10 京都)
 4. 鈴木克洋：多剤耐性結核 教育講演 第82回日本結核病学会学術講演会 (2007、6.6 大阪)
 5. 鈴木克洋：難治抗酸菌感染症の治療 「合同シンポジウム感染症成立機構と化学療法—難治感染症の克服」第50日本感染症学会中日本地方会・第55回日本化学療法学会西日本支部総会 (2007.10.30. 神戸)
 6. 鈴木克洋：肺真菌症の診断と治療—新しい抗真菌薬を中心に—教育セミナー 第70回日本呼吸器学会近畿地方会・第100回日本結核病学会近畿地方会 (2007.12.8、京都)

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 代表取締役社長・最高技術責任者

研究要旨

AIDSの蔓延に伴う結核の拡大や、多剤耐性結核菌の出現など、特にアジア地域での制御が緊急の課題となっている結核感染症の治療薬の開発を目的として、新規に開発した治療用DNAワクチンの臨床応用に必要な前臨床研究を行った。そのために、治療用DNAワクチンの凍結乾燥による製剤化技術の開発、それを使用した前臨床試験の実施、治験薬GMP製造に向けた準備を進めた。その結果、常温でも安定性の高い製剤開発に成功した。また、メカニズム解析の結果ワクチンの薬効維持に重要な制御性Tリンパ球のコントロールが出来ることが明らかになり、より有効性の高いワクチン開発が期待できることが明らかとなった。更に、国内の製造拠点での製造体制についても整備が進み、臨床応用に向けた安定供給に目処をつけた。

本研究で開発中の治療用DNAワクチンは、既存薬で国内においては幼児期に摂取が行われているBCGと相乗効果があり、従来の医薬品との組み合わせによりアジア地域での感染制御に貢献できると期待される。また、結核以外の感染症ワクチンに対しても応用可能な技術であり、今後の新興・再興感染症の制御への適用拡大も期待できる。

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)や、MDR-TBの中でも特に耐性の高い超多剤耐性結核(XDR-TB: Extensive or Extreme Drug-Resistant TB)の制御で、WHOや米国疾病予防管理センターの調査によれば、アジア地域を中心とした被害が最も深刻であることが明らかになっている。結核の制御については、従来抗生物質を中心とした治療薬の開発が行われている。しかし、上記のように耐性菌の出現の問題があることから、感染の制御を成功させるためには異なる作用メカニズムを持つ治療薬の開発を並行して進める必要がある。

本事業で開発を行っている治療用ワクチンは、国内で幼児期の投与が行われているBCGと相乗効果を持つDNAワクチンであり、成人の結核感染を制御する上で重要な予防薬・治療薬になる可能性がある。そこで、その臨床応用に必要となる医薬品として安定な製剤の開発、前臨床研究(動物試験)、治験薬GMP製造技術の開発を目的として研究を実施した。

B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

本研究を実施するにあたり、ジェノメディア株式会社は、池田ラボラトリーの所在地である独立行政法人産業技術総合研究所の規定に従い、国で定められている、組換えDNA実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業技術総合研究所で開催される各委員会での実験

許可を受けてから実験を行った。

C. 研究結果とD. 考察

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、たんぱく質、糖たんぱく質、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。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な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

E. 結論

本年度の研究により、常温での輸送・保存に適した凍結乾燥製剤化技術を確立し、実際に長期保存に益していることを明らかにした。また、開発したDNAワクチンによる免疫の活性化メカニズムの解析から、樹状細胞を介して効率的で長期持続性の治療効果が期待できることを明らかにした。更に、臨床応用に必要な安全性試験についても試験データの取得を進めることが出来た。今後は、作成したプランに従って臨床応用に必要となる試験データ (動物試験データ、安定性試験データ、GMP製造に必要なバリデーションデータ) の取得を更に進める必要がある。

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, McMurray DN, Dela Cruz EC, Tan EV, Abalos RM, Burgos JA,

Gelber R, 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 Apr 20;25(16):2990-2993.

2. 中島俊洋、長澤鉄二、和田 博、「第2章 遺伝子治療用医薬品等の品質・安全性確保、第6節 非ウイルスベクター」、バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保(監修:早川 堯夫)、2007、pp631-651、株式会社エル・アイ・シー

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし