

200926005B (1/2)

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17年度～19年度 総合研究報告書

vol. 1

主任研究者 岡田 全司

平成20（2008）年3月

目 次

I. 総合研究報告

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

〔I〕 中国オフロキサシン耐性結核の現状に関する研究	菅原 勇	——	50
〔II〕 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	——	53
〔III〕 中国東北部における結核菌の薬剤感受性に関する解析 南アフリカ由来植物の抗結核菌活性	服部俊夫	——	58
〔IV〕 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	——	63
〔V〕 北タイ・チェンライにおけるHIV結核発症の宿主側要因と多剤耐性結核に関する臨床免疫学的研究	櫻田紳策 慶長直人	——	67
〔VI〕 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	——	69
〔VII〕 多剤耐性結核の薬剤耐性遺伝子の解析	阿部千代治	——	77
〔VIII〕 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	——	81

III. 研究協力者研究報告		——	92
----------------	--	----	----

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表		——	130
--------------------	--	----	-----

V. 研究成果の刊行物・別刷		——	151
----------------	--	----	-----

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総合研究報告書

アジア地域との研究ネットワークの活用による多剤耐性結核の制御に関する研究

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。チェンライ県では、結核菌喀痰塗抹陽性肺結核患者は、年間 950 人、再登録患者は約 100 人。1987 年から現在まで延べ人数で、1081 人の再登録、再発例 442 人、治療失敗による再登録例 205 人、治療脱落による再登録例 319 人、430 人の死亡。再登録に対応した、疫学的危険因子を検討。（a）難治性結核患者（多剤耐性・再発・治療失敗例）のコホート研究を立ち上げた。（b）10 年間近く菌体を保存している世界でも類をみないサンプルを用い再発例中の多剤耐性結核菌出現を解析。多剤耐性結核症例及び治療失敗となる率は、再登録例で高い。（c）慶長らは野内が保存した多剤耐性結核患者 PBMC を用い、SNP 解析プロトコール作製。（d）櫻田らはチェンライに実験室を整備し、多剤耐性結核宿主側要因（リンパ球、M ϕ ）の研究がスタート。ヒト PBMC からマグネットビーズ法で M ϕ を分離し分化させるシステム構築に成功した。オステオポンチン、granulysin や M ϕ 、リンパ球（キラーT、M ϕ 、NKT、 γ δ T）の解析を行いつつある。（e）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。（f）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 名の患者と対照健康常者が登録され、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

通常が多剤耐性結核菌より毒力が強力を証明。

- (b)多剤耐性結核菌（河南省・北京と瀋陽）300例を解析。OFLX耐性（gyrA変異）が多い発見。瀋陽はMDR-TB中12%でXDR-TBの可能性。（菅原、服部、Ling）
- (c) 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。
5. 国際的評価を得た。pacific-rimTB 国際会議（日米結核会議：アジアの多剤耐性結核対策）に岡田、野内、松本発表（ハノイ：平17）APSR（平18 京都）、国際ワクチン学会シンポジスト（岡田 平18 トロント）。
- [2] HVJ-エンベロープ/Hsp65 DNA+IL-12 DNA ワクチンはBCG ワクチンよりも1万倍強力な結核予防ワクチン効果。結核菌数の減少効果のみでなくマウスで初めてワクチンによる延命効果を発見（マウス）。結核菌由来 HSP65 蛋白に対するキラーT細胞やINF- 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。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。中国ではXDR-TB12%。タイではXDR-TB0.96%。
- [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）。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

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

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

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

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

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

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

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

坂谷光則
国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
院長

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発病予防の困難性 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菌側の要因一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 一病室の陰圧・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。

中国東北部：ハルビン医科大学 リン・ホン教授とともに、中国東北部における多剤耐性結核の状況を明らかにするための研究を開始した。患者より結核菌サンプルを収集し、242検体の薬剤感受性試験を実施した。これらの研究を進めるために、ヒューマンサイエンス振興財団の外国人招へい事業としてリン教授を招へいし、中国で得た結核菌サンプルの、薬剤耐性遺伝子を同定するための研究計画の検討を行った。その結果、中国で結核菌DNAを抽出して、日本に運搬する方法がもっとも効率的であると判断した。

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、Ethambutol, ofloxacin, 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、結核研究所に送ってもらった結核菌株から、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。

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>分担研究者 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>竹田 潔 阿部千代治 坂谷光則</p>	<p>アジア</p> <p>中国 タイ タイ 中国・フイピン インド タイ</p> <p>アジア シンガポール</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>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>(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1

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。

表2

[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。

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、比較の対象としたい。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關しての種々の要因検討、(3)と結核症群(1-2)の比較にて、結核自体の発症に關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た。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おり、検討事項とした。結核研究所はエイズに關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關しては1987年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推定にて1,310,000人で、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法のプロトコールにて、タイNIHの協力を得て測定した。

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。

患者サンプルは末梢血から血漿、単球、単球以外の単核球にそれぞれ分離し、単球以外は各々の条件で保存する。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。末梢血単球由来マクロファージを用いて、多剤耐性結核の宿主側要因としてマクロファージの自然免疫を中心とした検索を行う。単球は上記方法でマクロファージに分化させ、LPS、BCGなどの刺激前後での標的分子の発現の検出を試みる。標的分子はプロテオームに關する手法を用いて、絞り込まれている。血漿は保存後、サイトカインの測定に、単核球に關してはフローサイトメトリーT細胞のサブセット (V_{γ}/V_{δ} 中心)の検索に使用する。

北タイ・チェンライに免疫学的実験が可能な実験室をセットアップする。次に、結核患者の登録台帳からHIV合併症例(HAART有無の2群)と非HIV感染結核例(同じくHAART有無の2群)を洗い出し、細菌学的データと臨床データを含む患者資料の整備を行う。対照群としてHIV感染非結核例と健常例の2群が同様に研究対象になる。

次に、各々の患者群ならびに健常者群から末梢血を採取し、そこから血漿、単球、リンパ球を分離する。血漿は血中サイトカイン(IFN- γ 、IL-18)量をELISAによる測定に、リンパ球は $\gamma 9\delta 2$ T細胞レセプター、NK細胞、NKT細胞等の特異的表面マーカーの検索に使用する。マグネットビーズ法(CD14によるpositive selection)により分離された単球はそれぞれGM-CSF、M-CSFの存在下に培養し、分化した段階で、BCGによる感染実験を行い標的分子(osteopontin、VDR、cathelicidins等)の発現解析をmRNAレベルではRT-PCR法、タンパクレベルではスライド上にて培養された細胞を用いた免疫染色法にて行う。また培養マクロファージの培養上清中のサイトカイン量(前述)をELISA法にて測定する。患者検体

(全血)の一部は結核菌死菌とともに培養後、血漿分離してgranulysin等をELISA法にて測定する。基本的に細胞培養やBCG、結核菌死菌による刺激培養実験ならびにフローサイトメトリーによる細胞集団の解析はチェンライにおいて検体採取後速やかに行われる。凍結血漿、凍結培養上清、凍結細胞溶解液などはバンコックに凍結状態のまま移送されタイNIHにおいてELISA、RT-PCR、HPLCによる測定等に使用される。

[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回投与した。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。

全82頭の多数の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 II>

HVJ-リポソーム/HSP65DNA+IL-12DNAワクチン効果の再現性実験(図4)

- | | |
|-------------------------|------|
| G1. HVJ-リポソーム | 3回投与 |
| /HSP65DNA+IL-12DNA | |
| ワクチン群 | |
| G2. HVJ-リポソーム/GFP DNA | 3回投与 |
| ワクチン群 | |
| G3 リコンビナント72f BCG | 3回投与 |
| ワクチン群 | |
| G4 BCG東京+Mtb72f protein | 3回投与 |

- | | |
|---------------------------------|------|
| ワクチン群 | |
| G5 BCG東京ワクチン群 | 3回投与 |
| G6 BCG東京ワクチン群 | 1回投与 |
| G7 リコンビナント72f BCG | 1回投与 |
| ワクチン群 | |
| G8 BCG東京(priming)+ | |
| 72f蛋白/AS2(booster3回) | |
| G9 リコンビナント72f BCGワクチン (priming) | |
| +72f蛋白/AS2 | |
| (booster 3回) | |
| G10 生食投与群 | |

<実験OKADA III> Priming-Booster法の解析

- | | |
|-------------------------------------|--|
| G1 BCG東京(priming)+ HVJ-リポソーム | |
| /HSP65DNA+IL-12DNA | |
| (booster 2回) | |
| G2 HVJ-リポソーム/HSP65DNA+IL- | |
| 12DNA(priming)+ BCG東京 | |
| (booster 2回) | |
| G3 リコンビナント72f BCG (priming) + HVJ-リ | |
| ポソーム/HSP65DNA+IL-12DNA | |
| (booster 2回) | |
| コントロールは実験IIの | |
| G6 | |
| G7 | |
| G10 | |
| G1 | |

<実験OKADA IV>

HVJ-エンベロープを用いたPriming-Booster法の解析

- | | |
|--------------------------------|--|
| G1 生食投与群 (コントロール) | |
| G2 BCG東京(priming)のみ | |
| G3 BCG東京(priming)+ HVJ-エンベロープ | |
| /HSP65DNA+IL-12DNA(booster 2回) | |
| G4 HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL- | |
| 12DNA | |
| (priming 1回とbooster 2回) | |
| G5 HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL- | |
| 12DNA | |
| (primingとbooster) + BCG東京 | |
| (2回目のbooster) | |
| G6 BCG東京(priming) + HVJ-エンベロープ | |
| (booster 2回) | |

<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

(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

予防ワクチン効果は、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-エンハローフ/ HSP65DNA+IL-12DNA
G2 HVJ-エンハローフ/ HSP65DNA+IL-12DNA	BCG
G3 HVJ-エンハローフ HSP65DNA+IL-12DNA	HVJ-エンハローフ 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 \times 10²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] 中国で多剤耐性結核が多いのは、周知の事実である。中国北京市結核肺腫瘍研究所李伝友博士と共同研究を行い、オフロキサシン耐性結核の状況を明らかにした。同時に、日本のオフロキサシン耐性の実態を明らかにして中国と比較検討した。中国でオフロキサシン耐性と判定された(比例法を用いた)87の結核菌株と22のオフロキサシン感受性株を用いた。定法により、DNAを抽出後、PCRを行い、DHPLC法によりオフロキサシン耐性の標的遺伝子であるgyr遺伝子突然変異を検出した。オフロキサシン感受性結核菌のデータと比較検討した。複十字病院でオフロキサシン耐性結核菌がないかも同時に調べた。

中国の結核はハルピン市胸部疾患病院で診断された結核患者の基礎的なデータ：年齢、性別、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)薬剤耐性試験は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)を用いて行った。

[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 \times 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 sacrifice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：

1) 平成17年度

インドにおける共同研究者を確保し、現地の状況を視察し、研究協力体制を確立することを計画した。インド北東部のウッタラプラデーシュ州ゴラクプル(Gorakhpur)にあるB R D Medical College のPrincipal & DeanであるSaudan Singh教授の研究を得てGorakhpurにおける結核の疫学状況、結核の保健医療資源、結核菌の検査体制について調査を行なった。

2) 平成18年度

平成18年度に調査を行ったゴラクプルでは研究を行うためには多くの設備投資と研究体制の整備が必要であり即研究を行うことは困難であることがわかったために、ニューデリーのVardhman Mahavir Medical Collegeはインド最大の病床数を有するSafdarjung Hospitalを母胎にしてつくられた医科大学であり、この病院に地域の結核センターが併設されており、また結核菌検査も行う地域の感染症病理検査センターを併設しており、本研究を行うには拠点となりうる可能性があると判断し、訪印して病院、大学関係者と協議して結果、共同研究について合意を得ることができた。しかし、インドから結核菌株を日本に移送するにはインド政府の許可が必要であるとされ、さらに現地において日本人の研究者が結核菌の分析を行うにもインド政府の許可が必要であることが明らかとなった。結核菌検査を行うためにはインド科学技術省の許可が必要であり、そのために訪印して協議を行った。その結果、日印の双方の政府に新たな研究を申請を行い、承認を得るしか選択肢がないことが明らかとなった。

3) 平成19年度

訪印直前に現地の研究協力者からまだインド政府との交渉中の状況であり、ここで許可なく研究を行うと研究申請が承認されなくなる可能性があるとの状況が示された。平成19年度はインドの結核菌株の分析を行うことは断念し、LAMP検査試薬500検体分を日本から持ち込み、日本からの結核菌

標準株を使い結核菌DNAのLAMP法の検査について、現地の検査センターに対する検査技術移転し、現地で結核菌を分析してもらえようようにすることを目標として訪印した。しかしインド政府の許可がなければ検査のデモンストレーションも行うことができないとのことであり、技術移転を行うことも出来なかった。

世界の新規結核症例の4分の1の約200万人がインドで発生している。新規登録患者由来株の1.0%から3.3%が耐性菌(MDR-TB)であると報告されている。本研究では、インドにおける地域ベースの治療失敗例由来結核菌株の分子生物学的特徴を把握し、わが国の結核菌株との相違を明らかとすることを目的とした。本年度は、①研究協力してもらえ共同研究施設を確保する、②日印の研究施設において結核菌の分子生物学的研究を実施するため共同研究体制を構築する、③日印で結核菌の共同研究を行うための研究施設の倫理審査や研究許可の手続きを行う、などの3点を行うことを計画した。インド国ニューデリー都に存在するVardhman Mahavir Medical CollegeのProf. Saudan Singhの協力を得て、同大学地域医療学講座、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）に対し、本研究の研究協力をしてもらう交渉のために、2回訪印し、施設の状況、研究者の状況を確認した。共同研究をすすめるための関係者の理解を深め、研究の役割分担について確認を得ることができた。インドにおける結核株の遺伝子型別を日本の床分離株と比較分析するためにVNT Rを用いて対象locus分析を行った。

【Ⅶ】シンガポールとのネットワーク共同研究：WHO/IUATLDで薬剤感受性検査の外部精度評価に使用している菌株を用いMGIT ASTを評価した。また全国各地で分離された結核菌を用いMGIT ASTと日本で標準法としている小川比率法の結果を比較した。2法で不一致の結果を示した株について、Middlebrook 7H10寒天培地を用いMICを測定した。INH耐性に関与することが知られている遺伝子、*katG*および*inhA*の変異を調べた。シンガポール総合病院との共同でシンガポールにおける薬剤耐性結核の状況を調べる。アジア諸国で分離株の薬剤感受性検査を行っている国はわずかである。シンガポールは結核中蔓延国であり、十数年前から分離培養と薬剤感受性検査に液体培地を取り入れている。アジア諸国で分離株の薬剤感受性検査を行っている国はわずかである。シンガポールは結核中蔓延国であり、十数年前から分離培養と薬剤感受性検査に液体培地を取り入れている。したがって、シンガポールとの共同研究を計画した。

1. 使用菌株

全国各地から分離された結核菌でMGIT ASTと小川比率法の間で不一致の結果を示した30株の結核菌を研究に用いた。また低レベルINH 耐性菌がアジア諸国にも存在するかどうか調べるためにSingapore General Hospital(SGH)で分離された50株のINH耐性菌を研究に用いた。

2. INH耐性に関与する遺伝子の変異

INH耐性に関与することが知られている遺伝子*katG*、*inhA*、*ahpC*の変異を調べた。プライマー

は、*katG*遺伝子でコドン315を含む1,073 bpフラグメント、*inhA*遺伝子のプロモーターを含む217 bpおよび*inhA*の構造遺伝子(ORF) 460 bpフラグメント、*ahpC*遺伝子のプロモーターを含む264 bpフラグメントを増幅するように設計した。小川培地増殖結核菌をTris-EDTA bufferに懸濁し、水浴を用い60℃で30分保温後にボルテックス、その後95℃で10分間加熱処理し、遺伝子変異分析に用いた。塩基配列分析反応にはBig Dye Terminator Cycle Sequencing kitを用いた。増幅産物をApplied Biosystems 3137x1 Genetic Analyzerで分析した。

3. シンガポールとの共同研究

SGHのCentral Tuberculosis Laboratory (CTBL)で分離された結核菌を研究に用いた。BACTEC 460TBによる感受性検査でINH耐性結核菌を-80℃に保存した。検査時にレーベンシユタイン・イエンセン卵培地で培養した菌から接種菌を作製した。薬剤感受性検査のために薬剤感受性検査用ウエルパック培地Sを日本からシンガポールに送付し、検査に供した。感受性検査用培地に菌接種、37℃で4週間培養後に結果を判定した。

【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】モルモットを用いた結核菌吸入感染系における新しい結核ワクチンの予防効果のアッセイ
モルモットを用いた結核研究の世界の第一人者Texas A&M大学教授David N. McMurray博士と共同研究を行った。(McMurray博士は結核エアゾル感染させたモルモットを用いて、米国FDAやNIHより委託された新しい結核ワクチンの効果判定を行っており、名実ともにモルモットを用いた結核研究の大御所である。)

結核DNAワクチン群を

① HVJ/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチン

② BCG東京ワクチン

③ HVJ/emptyベクター群

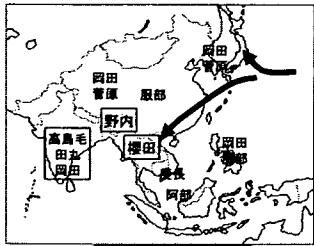
をそれぞれ組み合わせる3回予防ワクチン免疫した。各群各々11匹のモルモットに免疫した。うち、各々8匹は結核菌数の制御効果解析に用いる。

各々3匹は免疫応答増強機構解析に用いる。

各々のワクチンをモルモットに3回免疫した後、最終免疫より6週後にヒト結核菌H37Rvを吸入感染

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



アジア地域

特にWHO発表(2005年)結核高負担と韓国と日本の研究ネットワーク。

- ①多剤耐性結核患者(XDR-TBも)
- ②スーパー・スプレッダー多剤耐性結核患者
- ③HIV感染+多剤耐性結核患者
- ④日本への結核流入・蔓延防止

- (1)中国 (Guobin, Shi, 凌, 服部, 岡田, 菅原)
 - ・アジア地域(中国)の多剤耐性結核菌DNA 50例VNTRで解析、アジアにも日本と同じスーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌が高率に発見。
 - ・多剤耐性結核菌(河南省・北京)300例のEB, SM, OFLX薬感受性遺伝子解析。迅速遺伝子診断法。
- (2)タイ (Srisin, 野内, 櫻田)
 - ・(チェンライ県)難治性結核患者(多剤耐性・再発・治療失敗例)のコホート研究。MDR-TBは再登録例及びHIV合併例で高い。RFLP解析。チェンライに実験室を整備。慢性TBでGra産生異常。
- (3)フィリピン (Tan, Olveda, 岡田, 服部)
 - ・カニクイザルを用いた結核ワクチン開発研究が進展。多剤耐性結核菌DNA50例を入手。
- (4)インド (Singh, 高島毛, 岡田)
 - ・インド最大の結核病院サフダジュン病院 (Singh教授)と分子遺伝的解析契約 (VNTR等)。
- (5)ベトナム (Long, 慶長)
 - ・INH低レベル耐性菌を初めて発見。アジアの分布解明がスタート。
- (6)シンガポール (阿部)
 - ・INH低レベル耐性菌を初めて発見。アジアの分布解明がスタート。
- (7)韓国 (Cho, 岡田)及び JICA, WHO Partnership, (WHO本部 Uli Fruth博士等)

多剤耐性結核 治療・予防・迅速診断

・アジア地域との研究ネットワーク (野内, 櫻田, 岡田, 菅原, 服部, 慶長, 高島毛, 阿部, WHO等)は、一層強固になった。

日本

国内では国立病院機構政策医療呼吸器ネット54施設

近畿中央胸部疾患センター (呼吸器標準ナショナルセンター)

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

サンプル

- ①多剤耐性結核菌
- ②患者血清
- ③患者リンパ球

1. 薬剤耐性遺伝子解析、VNTR解析 100例
2. スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌 初めての発見。中国でも日本と同じパターン。三種のクラスター形成群。
3. 中国でもXDR-TB菌の存在(160例中5例)。本邦にはXDR-TBが多剤耐性結核の50%以上存在。三つのクラスター形成群に分けられ感染力が強いことを示唆。
4. EB306異常とgyrA遺伝子異常(中国は日本より多い) 中国MDR-TB菌のEB, OFLX耐性, SM耐性遺伝子解析。
5. 血清中granulysin(Gra)測定。多剤耐性結核患者でキラーTのGra低下。Gra 遺伝子導入マウスを作製し、Graが生体内でも結核菌殺菌に関与を証明。
6. TRIF / MyD88 二重欠損マウスは結核菌易感染。リポカリン2は結核菌増殖抑制。
7. 患者リンパ球、Mφ機能。ヒトM型Mφの結核菌増殖抑制とカタラーゼ産生解明。
8. リンパ球→SNP解析解明(宿主要因)

現地でも遺伝子・免疫共同研究

(倫理委員会)

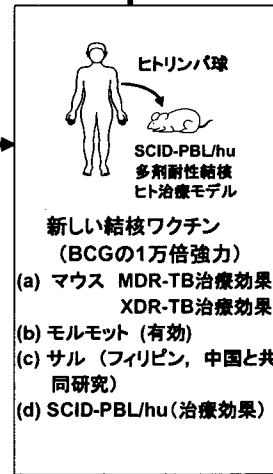
国際的評価。10回pacific-rim TB国際会議に岡田、野内、松本が発表 (ハノイ:平成17年11月)

(倫理委員会)

開発

- ① 多剤耐性結核に対する新しい結核治療ワクチン 予防ワクチン (中島, 松本, E.V.Tan)
- ② スーパー・スプレッダー多剤耐性結核-XDR-TB解明・制御 (鈴木)
 アジアにも日本と同じスーパー・スプレッダーMDR-TBが、またXDR-TBが本邦に存在することも発見
- ③ 新しい化学療法剤 (松本, 岡田)
 OPC-67683及びCPZは、MDR-TBに有効、当院でOPCの第Ⅲ相臨床試験(2008)
 マウスの生体内投与、AIDSモデルマウスで、多剤耐性結核菌(XDR-TBも)感染にも有効。

解析



新しい結核治療ワクチンの開発

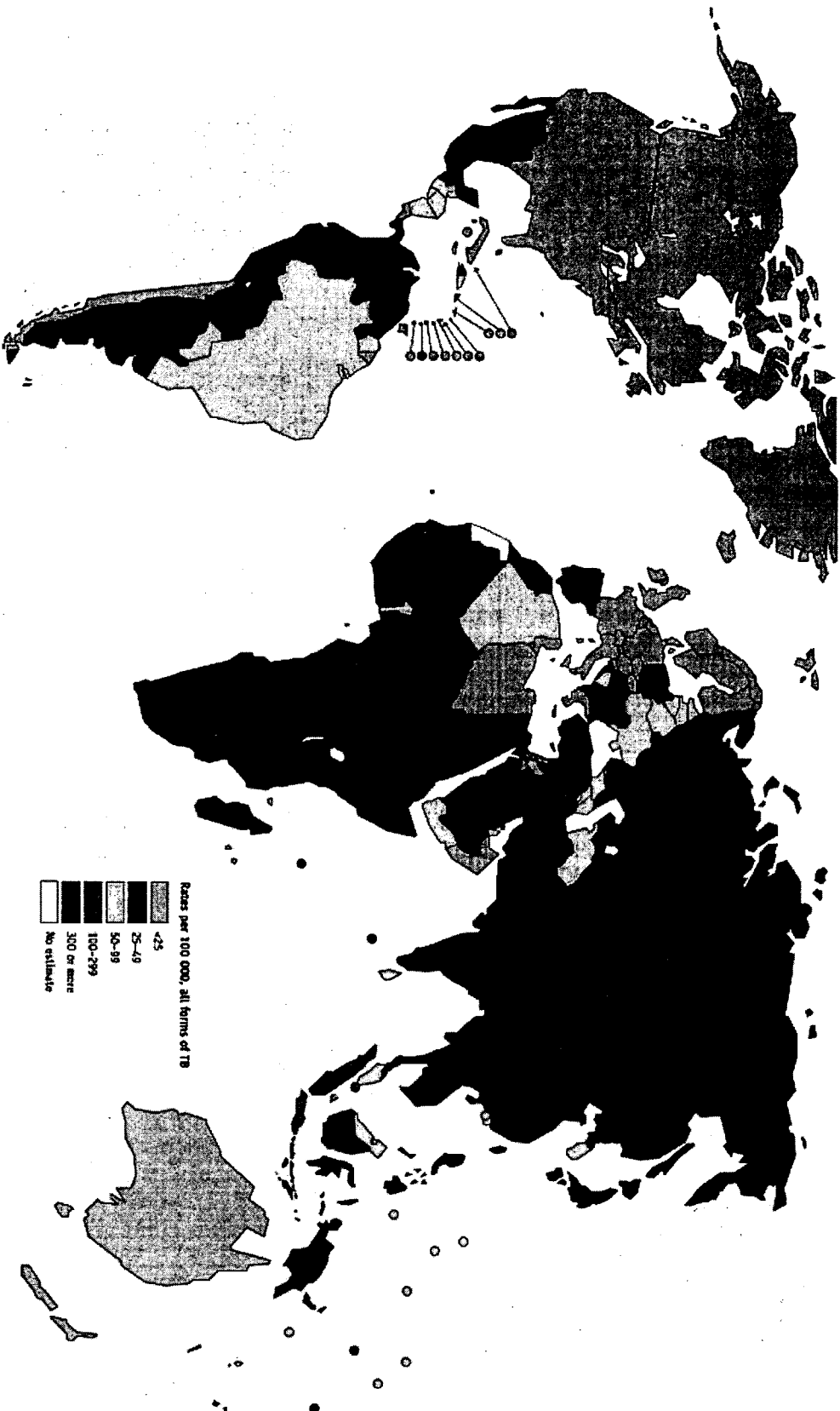
- (1) HVJエンベロープ/Hsp65 DNA+IL-12 DNA ワクチンはBCGよりも1万倍強力な結核予防ワクチン効果。初めてワクチンによる延命効果を見出し(マウス)。モルモット(McMurray 教授)及びカニクイザル(レオナルド研究所; ヒト結核感染に最も近い)にワクチン投与し、結核予防効果あり。CD8 キラーTが重要。
- (2) 多剤耐性結核に対する世界で初めての治療ワクチンを見出した。超薬剤耐性結核菌(XDR-TB)に対してもHVJエンベロープ/Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチンは治療効果。サルで実験中(治療効果示唆)。
- (3) 200倍強力な新規HVJ-Eベクターを開発した。
- (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

1. Estimated TB incidence rates, 2002



The calculations 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 authorities, or concerning the delimitation of its borders or boundaries. Dotted lines represent approximate borders lines for which there may not yet be 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

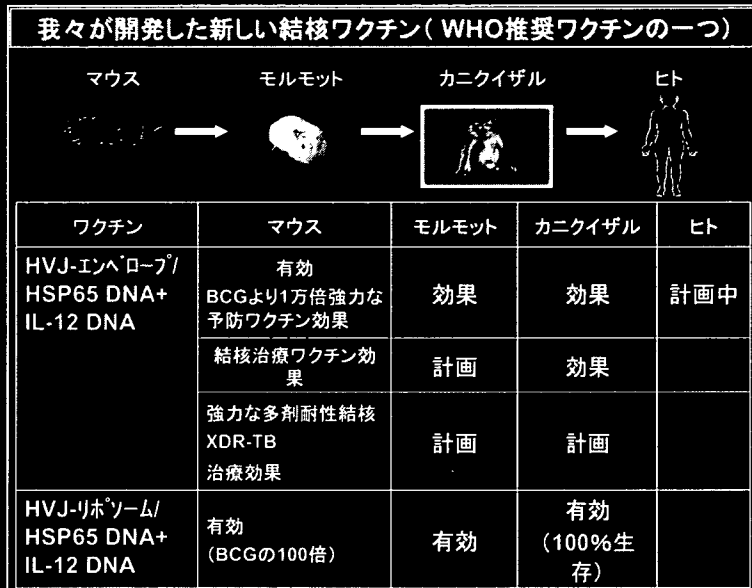


図 3

させた。結核菌吸入感染後5週後にモルモットをsacrifyし血液を採取し、肺臓、肝臓、脾臓の病理組織の解析と肺臓、肝臓の結核菌数を7H11寒天培地で解析した。又、脾リンパ球の免疫機能(サイトカイン産生、IFN- γ 等)を解析した。

一方、結核菌を吸入感染させる直前の結核ワクチン投与モルモットの免疫反応をIFN- γ 、TNF α 、IL-12p40等のRT-PCRを用いてサイトカイン活性を測定した。

[X] 結核に対する新規DNAワクチンの製造・製剤化技術の開発に関する研究

1. DNAワクチン用プラスミドの構築改変と遺伝子発現の確認

本研究においては、臨床応用を目的として研究を実施するため、臨床応用に適したプラスミドの構築を行なう必要がある。従来の発現プラスミドは、基礎検討用のバックボーンであったので、臨床実績のあるプラスミドベクターへの組み換えを行なった。

まず、従来のpcDNA3.1ベクターから、IL-12(マウス、ヒト、モルモットの3種類)とHSP65のそれぞれの遺伝子断片を制限酵素により切り出し、新規プラスミドの適切な部位への組み込みを行なった。次に、1つのプラスミド上にIL-12とHSP65のそれぞれの遺伝子の発現ユニットを組み込むために、上記のようにして構築した新規プラスミドよ

りIL-12遺伝子の発現ユニットの断片を制限酵素により切り出し、HSP65遺伝子の発現プラスミドに組み込みを行なった。この際に、正方向と逆方向の組み込みが発生したため、それぞれについて発現レベルを確認して、薬効検討に用いるプラスミドの構築を選定した。

各プラスミドの構築を確認した後に、培養細胞(BHK21細胞、ヒトHEK293細胞)に導入を行なって遺伝子の発現レベルを検討した。検討用の細胞としては、ハムスター腎細胞株(BHK21細胞)と、ヒト胎児性腎細胞株(HEK293細胞)を使用した。それぞれの遺伝子に関する発現レベルの確認は、産生される蛋白質の量を指標に行なった。IL-12遺伝子については、遺伝子導入後に培養上清を回収し、培地中に含まれるIL-12蛋白質濃度をELISA法により測定することで定量した。一方、HSP65蛋白質については、遺伝子をBHK21細胞に導入後に細胞溶解物を調製し、20 μ Lの細胞溶解物に含まれるHSP65蛋白質量をウェスタンブロット法により比較検討した。

結核感染症に対する有効性については、動物モデルとして小動物(マウス、モルモット)と、中動物(サル)の3種類の評価系を用いて有効性の評価を行なった。適切な投与間隔でHVJ-Eで製剤化したDNAワクチンを筋内に連続投与し、結核菌を感染させて評価を行なった。

2. DNAワクチンの製剤化技術の開発

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薬効と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。DNAワクチンの薬効と安定性の向上を目的として、新規製剤の検討を行なった。

従来の製剤の調製は、以下のように行なった。まず、氷上で冷却したHVJ-Eベクター溶液に界面活性剤を添加して、ベクターを構成する膜成分の透過性を一過性に増加させた。そして、DNAワクチン溶液を添加して氷上で静置する事でHVJ-Eベクター粒子中への封入を行なった。封入後は、バッファーを添加して界面活性剤を希釈した後に、遠心操作を行ってDNAワクチンを封入したHVJ-Eベクターを回収した。遠心により回収したHVJ-Eベクターは、生理食塩水で適切な濃度に調整した後に、有効性試験に使用した。また、新規製剤については、凍結乾燥処理したHVJ-Eベクターに対して、適切な量のDNAワクチン溶液を直接添加することで調製を行い、有効性検討に使用した。新規製剤の開発については、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を中心に検討を行なった。そのために、凍結乾燥工程において、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なった。それぞれの条件の評価は、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。

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、臨床での実用化を目的としているため、薬効検討や安全性検討に使用するサンプルについては、治験薬GMPレベルの製造が可能なパイロットプラントでの製造を行なった。製造施設としては、産業技術総合研究所・関西センターに整備したパイロットプラントで実施し、それぞれの製造に際しては、製造記録（バッチレコード）を作成し、記録として保存した。また、製造機器についても、GMP製造に対応した機器を使用して製造を行なった。

更にHVJ-Eベクターの製造法についても、GMPグレードでのスケールアップが可能な工程を検討した。

また、本事業において開発を行っているHVJ-Eベクターは、臨床試験の実施を目標として開発を行っているため、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なった。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なった。

4. 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。

[XI] 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。

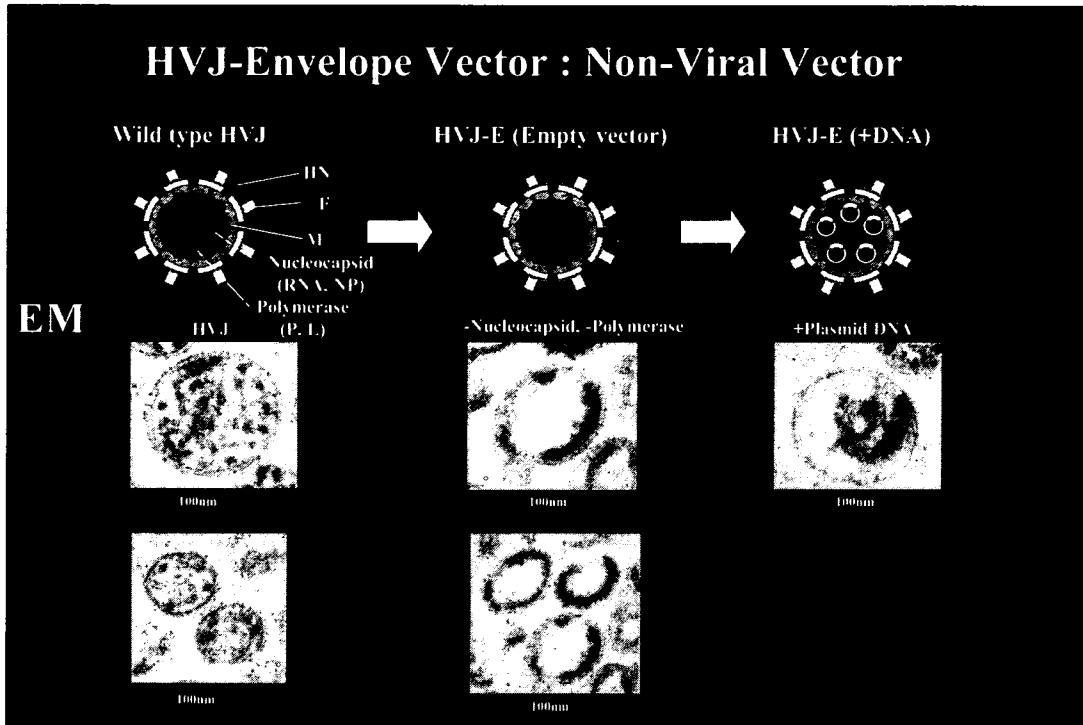


図 4

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] 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。

[XIII] 多剤耐性結核におけるTLRを介した免疫応答の解析:

1. これまで、TLRを介した自然免疫系の活性化機構の解析から、TLRを介したシグナル伝達経路では、TIRドメインを有するアダプター MyD88とTRIFが重要な役割を担っていて、TRIF/MyD88二重欠損マウスでは、TLRシグナルが完全に消失することを明らかにしている。そこで、TLRを介した自然免疫系の活性化の結核感染防御における役割を、TRIF/MyD88二重欠損マウスを作製し解析した。正常マウス、TRIF欠損マウス、MyD88欠損マウス、およびTRIF/MyD88二重欠損マウスにワクチン株であるBCGを感染させ、肺病変を解析し、また感染後の生存率を測定した。また結核菌 MtbH37Ra株を経気道的に感染させ、肺内の菌数を測定し、また生存率を測定した。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。

[XIV] 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) (図8)

[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厳密に管理し、参加研究者以外のものが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、検体等の日泰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な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実験安全委員会に実験計画書を提出して、審査を経て承認されてから実施する。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）

初年度は、本岡田班のテーマを鑑みながら、チェンライ県における結核疫学状況を見返した。チェンライ県では、年間1500人前後の新規結核患者が発生している。結核菌喀痰塗抹陽性肺結核患者は、年間950人程度であり、再登録患者は年間約100人である。2003年と2004年はそれぞれ、再発（relapse）例が38人と47人、治療失敗による再登録例が23人と34人、2ヶ月以上の治療脱落による再登録例が17人と22人、慢性排菌例が5人と11人であった。現在までに延べ人数として、1081人の再登録をした人数を同定しており、再発（relapse）例が442人、治療失敗による再登録例が205人、2ヶ月以上の治療脱落による再登録例が319人、慢性排菌例が76人であるが、チェンライ県での死亡データベースで430人の死亡は発見されている。これらの症例（1081人）を注意深く今回までのチェンライ県での登録回数を調べたところ、慢性排菌例がもちろん一番再登録回数が多かったが、再発例も3回以上が47例あった。この様な再登録に対応した、疫学的危険子を検討した。年齢は再発例や慢性例が初発と比べて有意に高かった。また、治療脱落後再発例で有意に女性が少なかった。HIV陽性者は治療失敗例で30%、治療脱落後再発例で23%、慢性排菌例で17%と少なかったが、再発例では37%と初発の35%より高いくらいであった。Ethnicityでは、タイ国籍でない人が山岳民族でないタイ国籍人と比較して有意に再発、治療失敗、慢性排菌、

脱落後再発が多かった。長期のフォローアップによる予後として、1997年から2000年に治療完了した1,267人の塗抹陽性の新規肺結核患者に関して、2年間の再発を検討した所、43人(3.4%)の喀痰塗抹陽性再排菌患者が発見された。また、26人(2.0%)が喀痰塗抹は陰性であったが、結核の悪化による治療がされた。死亡は123人(9.7%)であった。この基礎情報を基に、タイ保健省にコホート研究の研究計画書提出した。

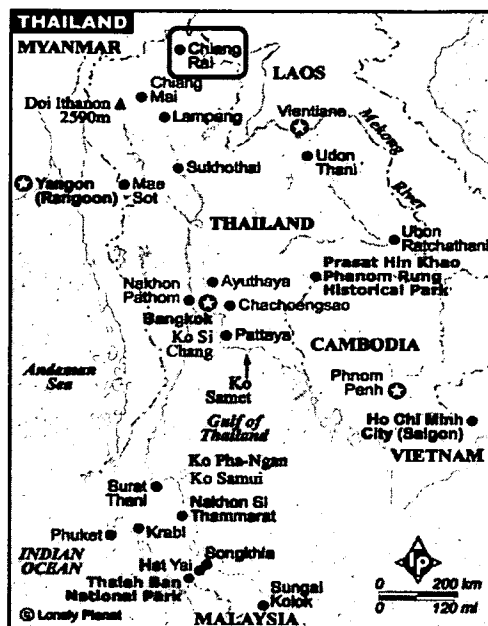
次年度は、上記計画書が倫理委員会で承認されるのを進めたと共に、待っている間、チェンライ県で結核研究の検体バンクのプロトコールにてコホートとしてフォローアップが認められている患者群について、対象となる患者群を同定した。初発例が440名、再発例11名、治療失敗例25名、慢性排菌例9例、治療脱落後再排菌例が34例、合計520例のPBMC、血漿、菌体が保存してある検体バンクを活用した。この中で、多剤耐性結核症例は、初発例で8例(1.8%)、再発例で1名(9.1%)、治療失敗例で4名(16.0%)、慢性排菌例1例(11.1%)、治療脱落後再排菌例で4例(11.8%)含まれていて、再登録例で初発例と比較し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%)、治療脱落後再排菌例で4例(13.8%)とこれも、再登録例で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。

3年目の今年度は、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。(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。



地図2. タイ

- (1) 末梢血単球ならびに末梢血単球由来マクロファージにおけるosteopontin発現解析は健常者血液サンプルを用いて、すでに基礎検討を終えた。Osteopontinは単球からマクロファージの分化過程で発現し、二つの表現型M型とGM型マクロファージの間に発現レベルで差がなかった。また、BCGのCFUアッセイを実施したところM型がBCGを効率的に殺菌するのに対してGM型は有意に殺菌効率が低かった。
- (2) チェンライ県における臨床免疫学研究を実施する実験室の移転と整備を完了した。
- (3) タイにおける一連の研究遂行のために、研究者個人レベルの連携だけではなく、所属組織レベルの連携体制を確立した。平成18年11月に、国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部、結核予防会結核研究所、タイNIH、タイマヒドン大学熱帯医学部、四者における連携(consortium)に向けての話し合いが持たれた。平成19年3月、国立国際医療センター総長とタイ公衆衛生省の部局との間にMinutes of Understandingが締結された。
- (4) 患者登録はH19年6月より開始し、平成20年2月25日現在74名が登録され、採取された試料を用いて以下の検討を行った。i)末梢血単球由来マクロファージの分化パターンの検討。ii)末梢血単球由来マクロファージにおけるosteopontinの発現解析。iii)末梢血結核菌抗原刺激(PPD)により血漿中に遊離されるgranulysin, perforin, granzyme BとTh1サイトカインINF- γ 、IL-18レベルの検討とフローサイトメトリーによるNK細胞、NKT細胞、g9Vd2T細胞、CD8+CTLのpopulation study。iv)血漿中の25OHDの測定と末梢血単球由来マクロファージにおけるvitamin D receptor, cathelicidinの発現解析。iv) 以外のすべての検討が現在進行中であるが、対照群と比較して結核患者では有意にマクロファージは活性化しているのに対してHIV感染者では結核を発症していてもマクロファージの

活性化のレベルが低かった。また、結核患者ではリンパ球中の γ 9V δ 2TCRT細胞の増加が見られ、一

方HIV感染者では減少が見られた。

PCR-Primer Using in VNTR

ETR-A-R	aaatcgggtcccatcaccttcttat	MIRU16-F	tgggtgatcgggtccagtcgaagta
ETR-A-L	cgaagcctggggtgccgcgattt	MIRU16-R	Cccgtcgtgcagccctgggtac
ETR-B-R	gcgaacaccaggacagcatcatg	MIRU20-F	Cggagagatgcccttcgagt
ETR-B-L	ggcatgccgggtgatcgagtgg	MIRU20-R	Cactaacgggtggcgggtatg
ETR-C-R	gtgagtcgctgcagaacctgcag	MIRU23-F	cagcgaaacgaactgtgctatcac
ETR-C-L	ggcgtcttgacctccacgagtg	MIRU23-R	cgtgtccgagcagaaaaagggtat
ETR-D*)		MIRU24-F	gctccgtgcacagcgaacc
ETR-E**)		MIRU24-R	tgggcgagttgagctcacagaac
		MIRU26-F	actgcctcgcggaatagg
ETR-F-R	ctcgggtgatggtccggccgggtcac	MIRU26-R	ggataggtctaccgtcgaatctg
ETR-F-L	ggaagtgtctgcagaacgcatgcc	MIRU27-F	cgacggggcatcttcgattg
		MIRU27-R	gttcaccgggcaacgcatag
MIRU2-F	tggacttgacgaatggaccaact	MIRU31-F	actgattggcttcatacggcttta
MIRU2-R	Tactcggacgccggctcaaat	MIRU31-R	gtgccgacgtggtcttgat
MIRU4-F	Gcgcgagagcccgaactgc	MIRU39-F	cgcatcgacaaactggagcgaac
MIRU4-R	Gcgcagcagaacgtcagc	MIRU39-R	cggaaactgtctacgccccacacat
MIRU10-F	gttcttgaccaactgcagtcgtcc	MIRU40-F	gggttgctggatgacaacgtgt
MIRU10-R	gccaccttgggtgatcagctacct	MIRU40-R	gggtgatctcggcgaaatcagata

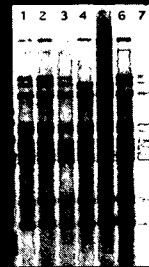
表 4

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

Lane 1,2	患者E
Lane 3	患者B
Lane 4	患者C
Lane 5	患者F
Lane 6	患者A
Lane 7	患者D

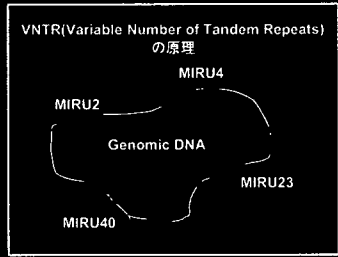
クラスターを形成する多剤耐性結核菌株

	クラスターサイズ	spoligoyping
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。藩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い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。



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	M7	M10	M15	M20	M23	M24	M25	M27	M33	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
1878	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
1879	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
1874	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
1874	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
2015	4	2	4	3	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
大阪府立野塚・アレルギークリニックセンター																
H135	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
近畿中央病院内科センター株																
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

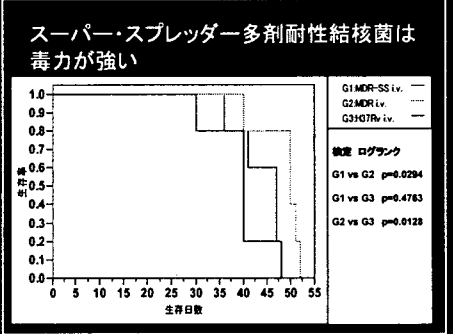


図 6

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)

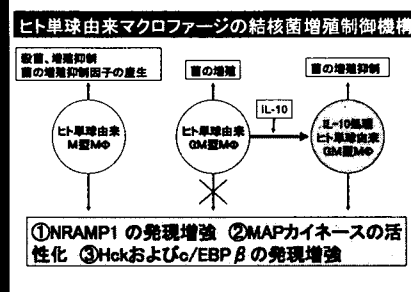
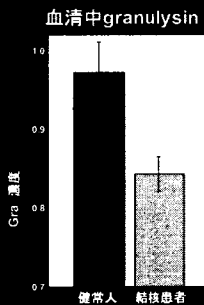
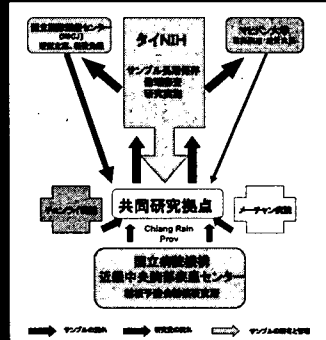


図 7

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

@HVJ-liposome/Hsp65 DNA+IL-12 DNAワクチン、
@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)