

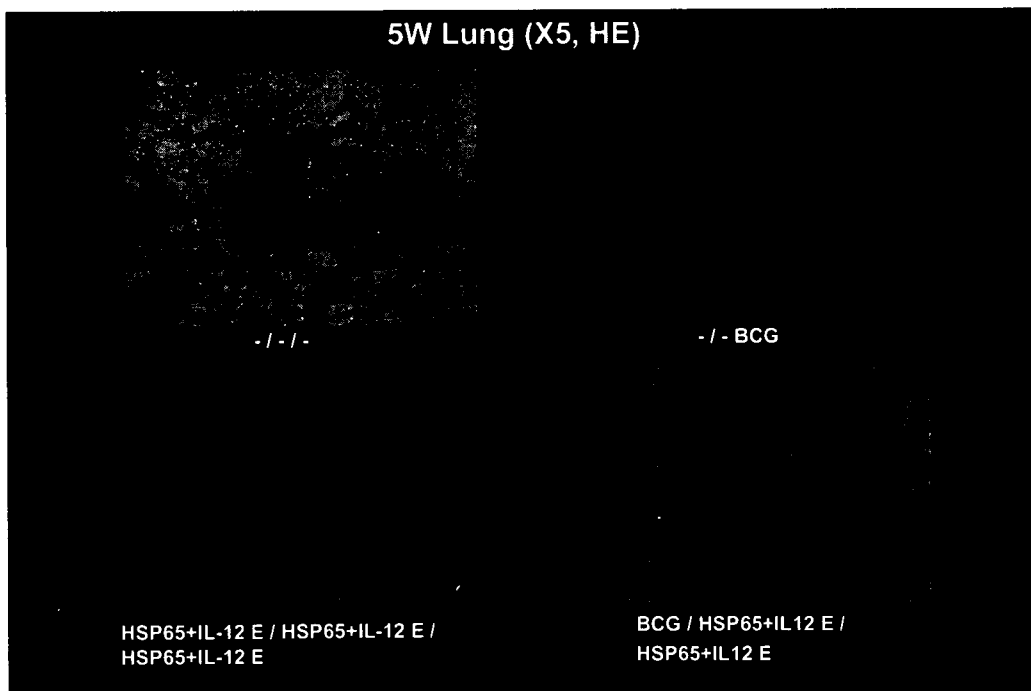
結核菌由来のHeat Shock Protein (Hsp65) DNAを用いた。

- ① HVJ/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチンをBalb/cマウスに3週毎に3回*i.m.*投与し、最終免疫から4週後にヒト型結核菌H37Rvを 5×10^5 *i.v.* チャレンジする系を用いた。BCG東京ワクチンでプライミングした後、HVJ/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチンをブースターした群では、BCGワクチン単独投与群に比較して1万倍以上強力な画期的結核ワクチン効果（結核菌数 1×10^6 cfuを 1×10^2 cfu以下に減少）を示した。すなわち、肺や肝の結果菌数を非ワクチン群の10万分の一に減少させ、BCGワクチン群の10万分の一に結核菌数を減少させた。脾臓の結核菌数でも同様の結果を得た。
- ② 逆に、HVJ/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチン群でプライミングした後、BCGワクチンでブースターを行ってもBCGワクチン単独に比較して、1万倍以上強力な結核ワクチン効果を示した。（図3）
日本人は乳幼児にBCGをほぼ全員投与することより、本邦ではBCGをprimingワクチンとし、成人、中学生、小学生でHSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンのboosterワクチンが有効である可能性が示された。
結核菌成分に対するIFN- γ 産生細胞数（Elispot Assayで測定）や、IFN- γ 産生（ELISA）及び、IL-2産生はワクチン効果と関連した。
- ③ ワクチン非投与群の10万倍強力な結核予防ワクチン効果を示した。
- ④ HVJワクチンはGMPレベルのワクチンであり迅速な臨床応用につながる。
- ⑤ なお、今までのHVJ-liposome/HSP65 DNA +IL-12DNA ワクチンの結果をまとめると、
1) HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンは相乗効果を示し、BCGよりも強力（100倍強力）な結核予防ワクチンであることをマウスの系で明らかにした。
2) HSP65タンパク抗原に対するT細胞の増強

反応性をこのワクチンは極めて強く、相乗的に増強した。

- 3) さらに、ELISPOTアッセイ（カール・ツァイス社の自動計測システム）を用いて測定すると、HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンは強力にIFN- γ 産生細胞の分化を誘導し、またIFN- γ 産生細胞数を増加させた。
- ⑥ これらのワクチン効果とキラーT細胞活性は関連した。キラーTの分化誘導を介して、ワクチン効果が発揮された。Hsp (heat shock protein) 65 DNAをHVJ-liposomeベクターに導入した。これらをBALB/Cマウス(H-2^d)に3回免疫した後、ヒト結核菌H37Rv 5×10^5 /mouseを*i.v.*投与した。結核菌に対するキラー活性は⁵¹Cr release法を用いた。J774.1 M ϕ cell line (H-2^d)に結核死菌(H37Ra死菌)貪食させた標準細胞、及びHsp65DNAをP815肥満細胞腫(H-2^d)に導入し、Hsp65発現標的細胞を⁵¹Crラベルとして用いた。このワクチン効果と脾リンパ球の結核菌に対するキラーT活性が関連した。さらに、Hsp65に対するキラー活性が誘導された。このキラー活性は*in vivo*で最終抗原刺激より8週後にも約10%認められた。さらに、IFN- γ 及びIL-2産生においてHsp65 DNAワクチンとIL-12 DNAワクチンの相乗効果が認められた。
- ⑦ 肺結核病理像の改善：結核菌に対する肺結核病理像はホルマリン固定した肺、肝及び脾臓の組織切片をH・E染色し、肺結核病理像を解析した。結核病変インデックスは長径×短径を面積で表示して計算した(Vaccine 2005)。このワクチン効果と肺結核病理組織改善効果は関連した。HVJ-liposome/Hsp65+IL-12 DNAワクチンでは有意差(P<0.05)をもって、非ワクチン投与群、コントロールベクター投与群やBCGワクチン投与群に比較して結核病変index(granuloma index)の改善が認められた。肝結核病理組織でもこのワクチンで改善効果が認められた。（図8）

図 8



(2) 結核菌吸入感染系 (エアロゾル・チャンバー) を用いた結核感染に対する結核予防ワクチン効果の解析:

約35年前、Texas A & M 大学教授David McMurray博士が考案・作成し、世界の有名な研究所で使用されているMadisonエアロゾル・チャンバー (Version up 版) を用いた。BALB/Cマウスに結核菌 H37RV 2×10^6 /ml 15mlを5分間曝露吸入させ、肺内感染させた。1週間後、肺 1×10^3 個 ~ 1×10^4 個の結核菌CFUが認められ、3週間後には肺で 1×10^5 ~ 1×10^6 CFUとなった。脾臓では肺より1週間遅れてH37RV CFUが認められた。この系を用いて、HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンの結核予防効果を解析中である。下記に述べるpVAXベクターを用いたHVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンや新規HVJ-エンベロープ・パウダーベクターを用いたHSP65DNA+IL12DNAワクチンを用いてもこのエアゾル感染系で従来のDNAワクチンと予防効果比較研究中である。

(3) ヒトの臨床応用に有用なpVAXベクターを用いたHSP-65DNA+IL-12DNAワクチンの結核予防ワクチン効果:

pcDNA3.1(+)ベクターを用い強力な結核予防ワクチンを開発したが、pcDNA3.1(+)はアンピシリン (ペニシリン) セレクションである。ヒトの臨床応用を考えるとときにカナマイシン・セレクションの方が望ましい。したがってカナマイシン・セレクションのpVAX/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンを開発した。BCGワクチンでプライムし、pVAX/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンを2回ブースターした群は統計的有意差をもってBCGワクチン単独群に比較して肺・肝・脾の結核菌数の減少が認められた。すなわち、pVAX/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンの結核予防ワクチン効果が明らかとなり、このpVAXベクターを用いてHSP65DNA+IL-12DNAワクチンの臨床応用が可能となることが示された。

(4) ワクチン投与方法の解析 (気道内投与)

①経鼻・経気道投与ワクチンの開発
経鼻ワクチンはいくつかのワクチンで有用である報告がなされている。したがって、経鼻から経気道へワクチンを投与しうる方法を用いて結核予防ワクチン効果を解析した。具体的にはHVJ-エンベロープ / Hsp65 DNA + IL-12 DNAワクチン $50 \mu\text{l}$ を麻酔下でBALB/Cマウスに鼻腔より除々に注入し、気道内へ確かにワクチンが投与される方法を用いた。この系を用いて、HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンの結核予防効果を解析中である。

下記に述べるpVAXベクターを用いたHVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンや新規HVJ-エンベロープ・パウダーベクターを用いたHSP65DNA+IL12DNAワクチンを用いて、この経鼻・経気道投与ワクチンで従来の筋肉注射投与ワクチンと結核予防効果比較研究中である。

②気管挿入チューブを用いた経気道投与ワクチンの開発

結核感染は肺の気道感染吸入より始まることが多い。すなわち、肺の免疫機能を増強することが、結核感染予防につながる事が考えられる。したがって、気管挿入チューブを用い、気管分

岐部上部よりHVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチン $50 \mu\text{l}$ を麻酔下でBALB/Cマウスに除々に投与し、肺野末梢にワクチンが投与される方法を用いた。

この系を用いて、HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンの結核予防効果を解析中である。

下記に述べるpVAXベクターを用いたHVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンや新規HVJ-エンベロープ・パウダーベクターを用いたHSP65DNA+IL12DNAワクチンを用いて、この経鼻・経気道投与ワクチンで従来の筋肉注射投与ワクチンと結核予防効果比較研究中である。この気管内挿入法を用い従来の筋肉注射DNAワクチンと結核予防効果を比較研究中である。

(5) 新規HVJ-エンベロープ・パウダーを用いた、より強力な結核ワクチンの開発

HVJ-エンベロープ・ベクターをさらに改良してHVJ-エンベロープ・パウダーベクターを開発した。従来のHVJ-エンベロープ・ベクターより200倍~300倍発現効率がin vivoでも良いことを確認した (後述)。これを用いてHVJ-エンベロープ・パウダー/Hsp65 DNA + IL-12 DNAワクチンを開発した。これを用いてワクチン投与することにより、Elispotで極めて強力なIFN- γ 産生誘導が見られた。すなわちこのベクターは臨床応用を目指す上でも強力なベクターとなることが示唆された。松本 (大塚) からも研究室でこのHVJ-エンベロープ/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチンやHVJ-エンベロープ・パウダー/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチンを用いてマウスの系で結核予防ワクチン効果を解析中である。Elispotアッセイの結果ではこれらのワクチンはHsp65に対し強力なIFN- γ 産生細胞へ分化させることを示した。

(6) 世界に先駆けて、結核治療ワクチンHVJ/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチンを開発した。このワクチンを結核菌H37Rvをi.v.投与したマウスに3回i.m.注射することによりBCGワクチン投与群に比較して、有意差 ($p < 0.05$) をもって治療効果を示した。ワクチン非投与群と比較しても、有意にこのワクチンは結核菌減少効果を示した。すなわち、 5×10^5 H37Rvをi.v.した日を0日目とすると、その1日後に1回目のDNAワクチンを投与、8日目に2回目、15日目に3回目のDNAワクチンを投与した。H37Rv投与30日後に肺臓、肝臓、脾臓の結核菌CFUの減少がコントロール群、BCG単独投与群に比較して有意差をもって認められた。

結核治療ワクチン効果を示すワクチンの報告はいまだなく、このHsp65DNA+IL-12DNAワクチンが初めての結核治療ワクチンであることを明らかにした。このHsp65DNA+IL-12DNAワクチンの治療ワクチン効果は結核菌感受性strainのマウス及び結核菌抵抗性strainのマウス、両方で認められた。すなわち、このワクチンの将来的な臨床応用を考える一つの目標が得られた。

(7) さらに、多剤耐性結核菌を投与した後に、このHVJ/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチンで治療すると、治療ワクチン効果 (肺臓、肝臓、脾臓の結核菌減少) を得た。

(8) 超薬剤耐性結核 (XDR-TB) に対する治療ワ

クチンHVJ-エンベロープ/Hsp65 DNA+IL-12DNA
ワクチンの開発：
当院のXDR-TB患者より確立したXDR-TB菌をマウスに 5×10^5 投与した後、このワクチンを投与（3回）1w毎に3回投与し（1, 8, 15日後）、30日後に肺・脾・肝のXDR-TB菌CFUを計測した。その結

果、このワクチンは上記臓器のCFUを減少させ、XDR-TBにも治療ワクチン効果を発揮した。将来的には新しい抗結核剤opcやCPZと併用して多剤耐性結核菌に対する相乗効果のみでなく治療期間短縮効果を目指したい（図9）。

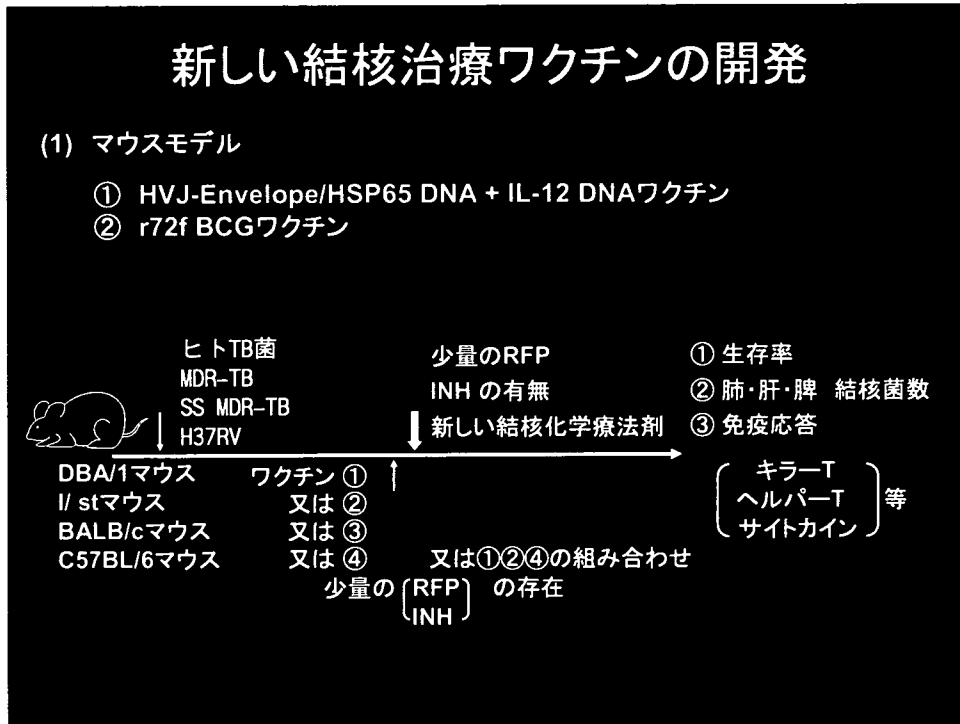


図 9

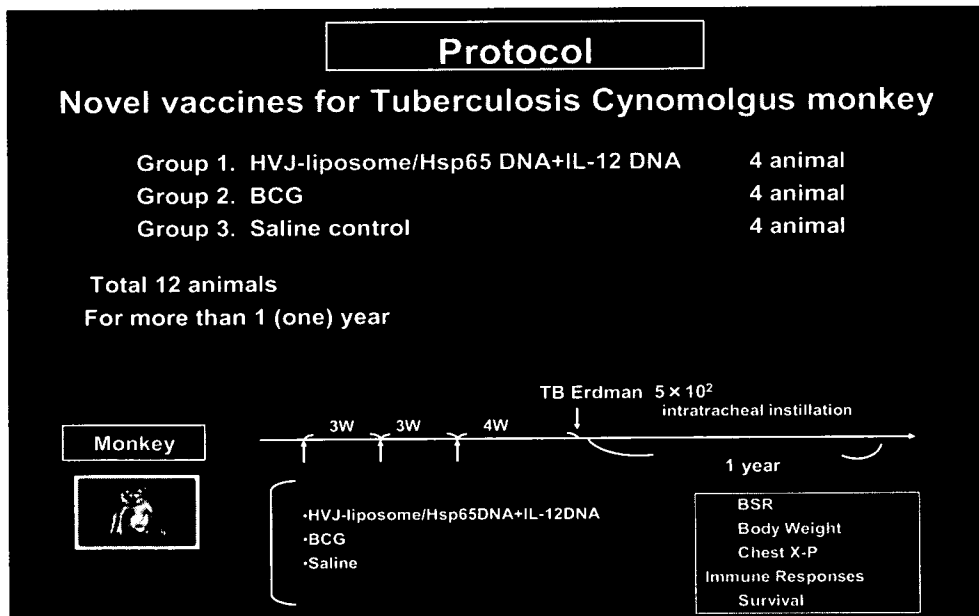


図 10

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

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

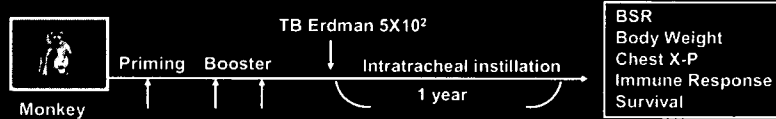


図 1 1

(9) 我々は世界の最先端の二種のワクチン①②を開発した。

① HVJ-liposome / Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチン： カニクイザル（最もヒトの結核感染に類似したモデル Babie Tan et al. Nature Medicine 1996）を用い、（我々が唯一、世界に先駆けてこのサルを用いた極めて重要な研究を行っている）結核予防効果を示した。（図 1 0）

② リコンビナント72f BCGワクチンはカニクイザルでBCGよりも強力な抗結核予防効果を示した。結核菌由来のタンパクで結核菌に対するT細胞免疫を強く誘導するMtb39とMtb32の融合タンパクMtb72fタンパクをコードするDNAをBCG菌に導入しリコンビナント72f BCGワクチンを作製した。

①②の結核予防ワクチン効果は、延命効果、胸部X線所見の改善、血沈の改善、体重減少の改善、サルPBLの増強反応、IL-2、IFN- γ 、IL-6の産生増強等のT細胞免疫増強作用が認められた。

2. カニクイザルを用いた結核予防ワクチン効果＜実験Ⅲ＞

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 1 1、図 1 2）

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 1 2）

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-エンベロープ/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結核予防ワクチン効果＜実験Ⅱ＞

カニクイザルにこのワクチンを3回生体内投与し、最終免疫4週後にヒト結核菌Erdman株を経気道投与した。ワクチン投与前、中、感染後約3週毎に体重、体温、血沈、胸部X線、ツ反及び

生存率を解析し1年以上経過観察した。今回はコントロール群としてHVJ-liposome/GFP DNAを用いた。コントロールのHVJ-liposome/GFP DNAワクチンは4匹中2匹生存〔生存率50%〕であり、生食投与のコントロール群の生存率50% (6匹中3匹)と同じであった。

一方HVJ-liposome/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチン投与群は4匹中3匹生存 (生存率75%) であり、このワクチンが間違いなくコントロール群より有効な結核予防ワクチンであることを再確認した。

カニクイザルを用いた<実験II>では、HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン投与群が最も強い増殖反応をHSP65抗原や結核死菌抗原に対して示した。この結果はカニクイザルを用いた実験Iで2003年に報告した結果と同様の結果を示した。このワクチン投与カニクイザル群は血沈の改善効果の再現性、体重減少抑制効果の再現性を示した。生食投与群は38℃前後の発熱を結核菌気道感染後示した。これに対しHSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン投与群では発熱の抑制効果も示された。

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

実験IVではHVJ-エンベロープ/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。

5. 治療ワクチン効果：カニクイザルを用いHVJ-エンベロープ/Hsp65DNA+IL-12 DNAワクチンの結核治療ワクチン効果を研究した。(図13)

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) ブースター

G3群 BCG東京ワクチンプライム (1回のみ)

G4群 生食投与群

生存率増強、体重増加、免疫反応増強の治療効果を示した。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。

6. モルモットのエアゾール結核菌吸入系においてもワクチン①のHVJ-liposome/Hsp65 DNA +IL-12 DNAワクチン ②のリコンビナント72f BCGはBCGより強力な結核予防ワクチン効果を示した (モルモットを用いた結核研究の世界の第一人者McMurrayとの共同研究)。さらに、このモルモットの系でDr. McMurrayの研究室でHVJ-/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチンとBCG東京ワクチンのpriming-booster効果を解析した。その結果HVJ-エンベロープ/Hsp65 DNA+IL-12DNAワクチンは弱いながら結核菌の増殖抑制現象が認められる効果を得た。

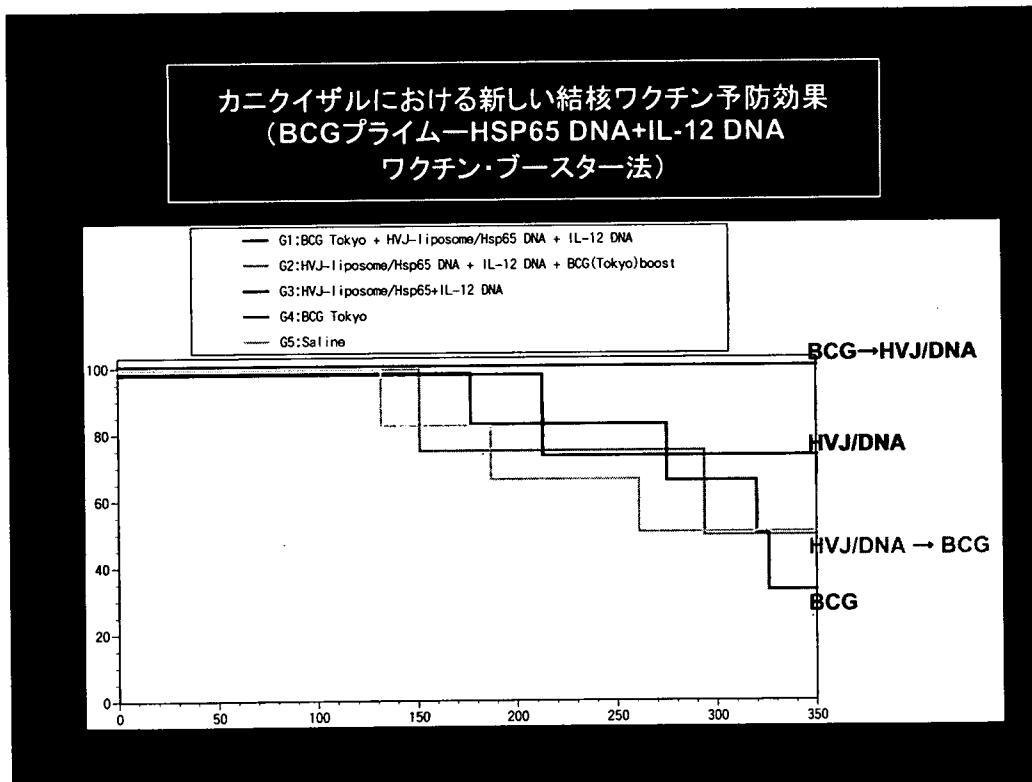


図12

カニクイザルを用いたHVJ-エンベロープ/ HSP65DNA+IL-12DNAワクチンの結核治療効果

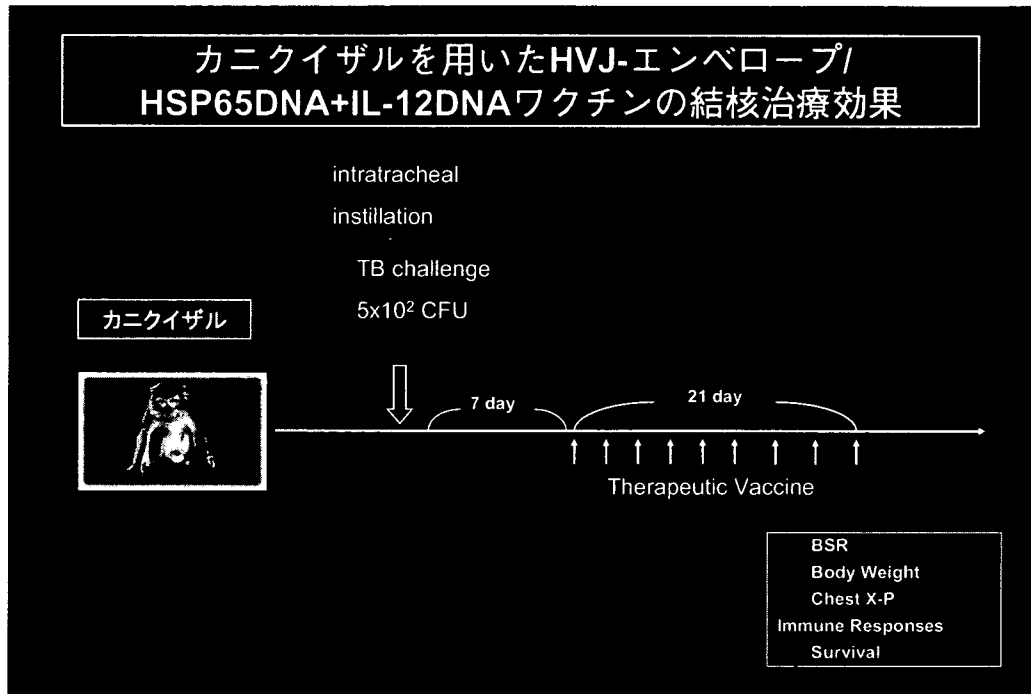


図 1 3

[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Mφにとり込まれMφ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Mφ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に付加しても作製した。分泌型9K Granulysin DNAをCAGプロモー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：

マウスにワクチン株であるBCGを感染させたところ、正常マウス、TRIF欠損マウス、MyD88欠損マウスでは肺組織に著明な変化は認められないが、TRIF/MyD88二重欠損マウスでは感染2週間以内に壊死を伴った病理変化が観察された。抗酸菌染色を行ったところTRIF/MyD88二重欠損マウスの肺では、多数の抗酸菌が観察された。生存率を測定しても、他のマウスと異なり、TRIF/MyD88二重欠損マウスは約半数が死亡した。また、結核菌MtbH37Ra株を感染させたところ、MyD88欠損マウスは正常マウスよりやや感受性が高いが、TRIF/MyD88二重欠損マウスはさらに感受性が高くなっており、肺内の結核菌数も多くなり、生存率も低下していた。これらのことから、TRIF/MyD88二重欠損マウスは結核感染に高感受性を示すことが明らかになった。この結果は、自然免疫系の活性化シグナルが、結核菌感染防御に重要な役割を担っていることを示している。BCG感染によるTh1応答を、CD4陽性T細胞からのIFN-gamma産生を指標に解析したところ、MyD88欠損マウスでは正常に比べて1/3程度に低下していたが、TRIF/MyD88二重欠損マウスでもMyD88欠損マウスと同程度の低下しか認めず、有意にTh1応答が観察された。このことは、結核感染においてはTLR非依存性にTh1細胞の分化が誘導されることを示している。

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。

[IX] 中国: オフロキサシン耐性結核の現状に関する基礎研究及びXDR-TBの研究



地図3. 中国 北京

1. Ethambutol耐性

中国で集められた171結核菌臨床株を使用した。比率法で133株がEthambutol耐性であった。標的遺伝子であるembBの突然変異を調べたところ、43株にATG---GTG変異が認められ、7例がATG---ATA変異であった。5例が、ATG---ATT変異であった。133株中、63株(47%)で突然変異が見つかった。興味深いことに、薬剤耐性度が高いほど、embB変異の程度も高かった。

Ofloxacin耐性

比率法で決定した870floxacin耐性株のうち、56%に標的遺伝子gyrAの突然変異が認められた。興味深いことに、結核治療前にOfloxacin耐性が存在した。

Streptomycin耐性(図14)

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。

2. ハルビン医科大学及び服部・Hong Lingは4種の薬剤すべてに対して耐性を示した患者が5例検出された。これらがXDR-TBか詳細な解析を行っている。5例のうち3例は喀痰検査(スミア)また5例ともに結核病歴を有していた。七年間あるいは2年間断続的な咳があった例があった。一方で血痰を認めた症例はなかった。呼吸困難を認めた例が2例で発熱を認めた例も2例であった。
3. 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、有りとなされた患者は37% (90名) 無しは63% (152名)であった。
4. 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。
5. 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。
6. 前述のとおり今回試験を行ったサンプルについては、7割が複数の薬剤に耐性を持つ結核菌であることが示された。そこで薬剤耐性のパターンを明らかにするために、どのような薬剤に耐性を持っているのか、その組み合わせを分析した。
7. 4種類全ての薬剤に耐性を持つサンプルの存在が明らかとなった。その割合は、今回のサンプルの10%をしめた。INHとRFPへ同時に耐性を持つサンプルは、20%以上であった。(図15)

[X] インドとのネットワーク研究を活用した多剤耐性結核の制御 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、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 が研究協力を得れる見通しとなった。そこで、現地を訪問し、Gorakhpurの医科大学およびその中の地域結核センターとの協力体制をつくるための交渉を行った。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った。その結果、地域の結核センターでは顕微鏡検査により塗抹陽性検査は行われていたが、培養検査を行う設備はなく、また検体を保存、搬送するためには冷蔵庫などの設備が必要であり、さらに検痰容器の供与、また検査技師の研修も必要であり、現地で結核菌株に関わる研究を行うためには多くの器材や検査設備の投資が必要な状況にあり、即研究を行うことはできない状況にあることが明らかになった。インドにおいて即研究を行える研究拠点を獲得するためにAgraのS.N. Medical CollegeのPrincipal, Dean & Chief of Hospitalで、インドの公衆衛生学会理事長のDeonki Nandan教授と会い交渉を行った。アグラ

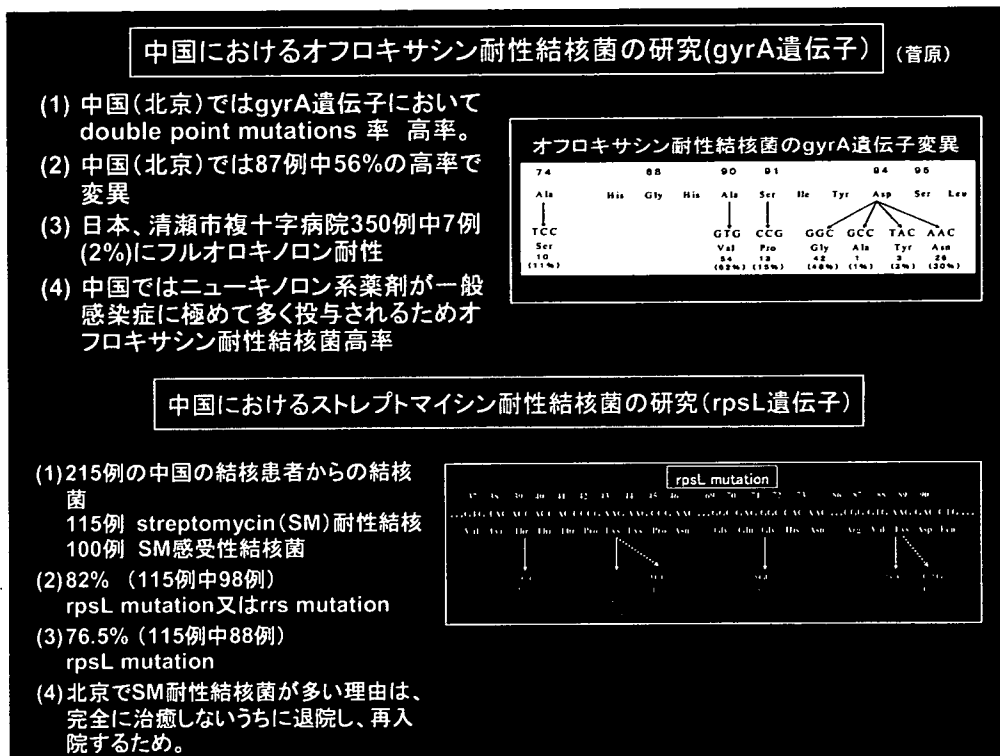


図 1 4

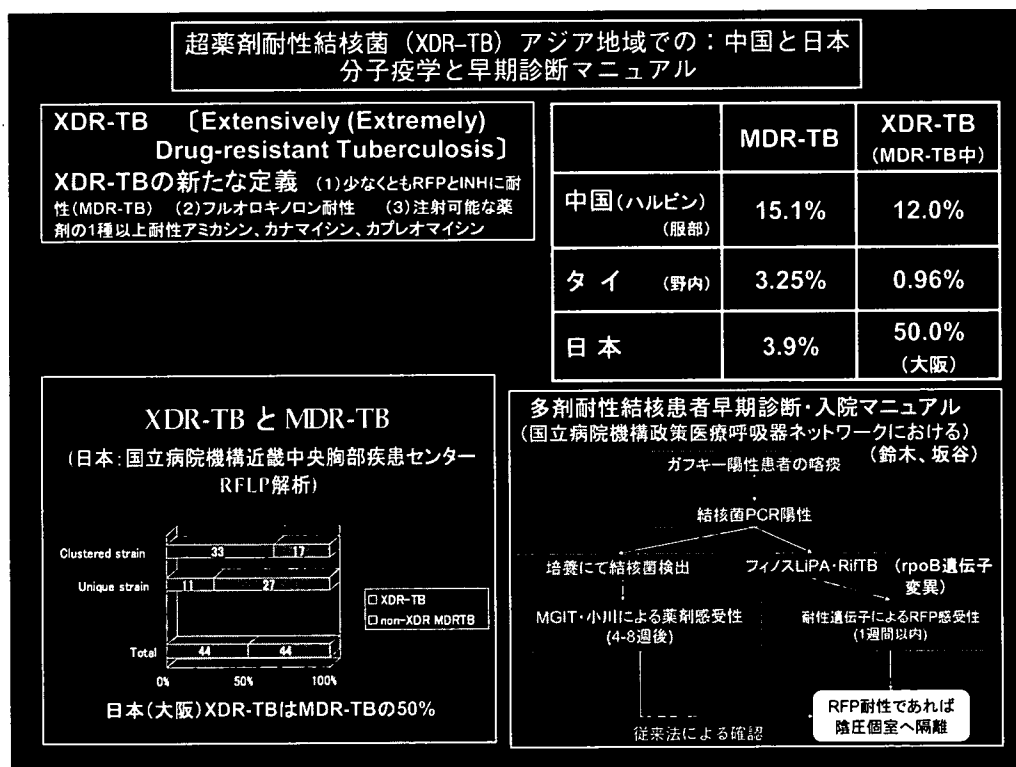


図 1 5

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

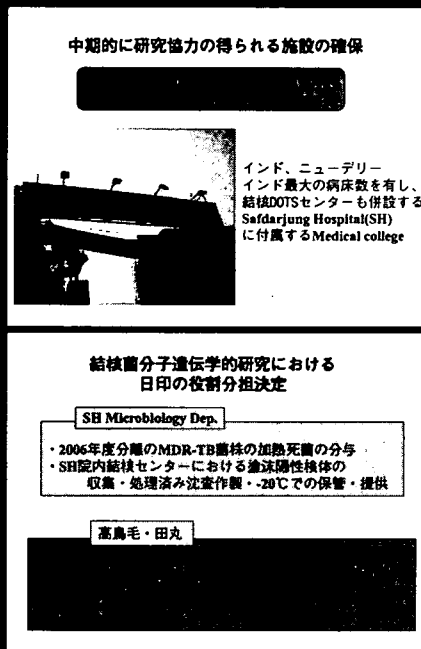
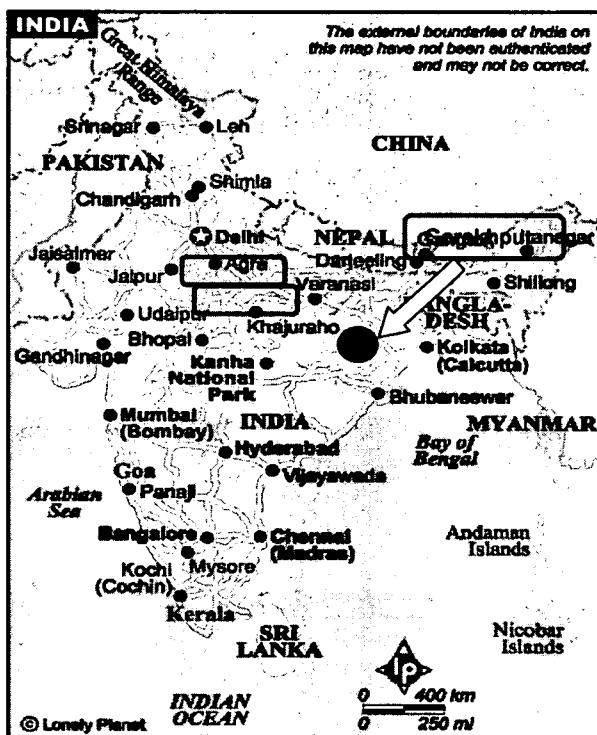


図 16

2. 平成18年度

インドの現実の経験を踏まえニューデリーで研究拠点を探すこととした。その結果、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、この病院の外来診療棟に地域の結核センターが併設されており、さらに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いることから本研究を行うには最適の研究拠点となりうると判断した。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り、また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現地で協議を進める中で明らかとなった。次に政府の許可を得るために再度訪印し、インド科学技術省で担当官と直接交渉することとした。インド科学技術省における協議の結果日本学術振興会が進める日印の共同研究事業としてインド、日本の両政府に研究申請することが適切との判断が示されたことから、新たな研究申請を行うことになった。一方で、現地の研究者と政府の許可が得られた後にただちに研究を推進していくために両国の研究者で役割分担を取り決めた。インドの結核センターにおいて塗抹陽性喀痰の処理済み沈査およびMDR-TB菌株の加熱死菌を収集、保管し、分析は日本で行うことから始める。インドにおいても結核菌検査技術の向上のために日本からインドの検査施設にLAMP法による結核菌同定とVNTR法による遺伝子型別法の技術提供を行い、基本的な結核菌の分析はインドにおいて行えるようにすることとした。(図16)



地図4. インド

3. 平成19年度

①インドにおける結核菌同定検査の実施について

平成19年度はLAMP法を研究協力施設で実施するべくLAMP検査試薬500検体分を購入して持参し、現地で日本から持っていった結核菌標準株のDNAによるLAMP法のデモンストレーションを実施し、現地の検査者に対する検査

技術を移転し、現地の検査施設で現地の検査者により結核菌の分析を行えるようにすることを計画した。しかし、インド政府の許可がなければ検査の技術移転を行うこともできなかった。

②共同研究協力施設の再調査

平成18年度から医科大学の新校舎の建設がはじまり新校舎の中に細菌学研究施設がつけられた。これまでの検査施設とあわせて、インドの研究協力施設の抗酸菌核酸検査室の検査設備について再調査を行った。しかし、核酸検査には旧型のサーマルサイクラーを使用しており、また電気泳動槽・恒温槽等の設備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現状では困難な状況にあることが明らかとなった。協議を進める中で医科大学において微生物学教室の実験施設についてPCR検査等の検査設備を整えてもらえる見通しが得ることができた。インドで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る。地域ベースの結核菌株を収集して結核菌の分析を行うためには日印の政府による研究費の投入が不可欠な状況にあったことが明らかとなった。

③インド政府からの研究許可について

平成19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ないためインドにおける結核菌の同定、感受性、分子型別分析を行うことができずに3年間の研究は終了した。しかし、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。過去3年間の訪印しての交渉により、結核菌について共同研究を行うための拠点の形成という最小限の目標は達成することができた。

[X I] シンガポールにおけるINH耐性結果菌の研究：

1. 外部精度管理株を用いたMGIT ASTの評価（平成17年度）

WHO/IUATLDのSupranational Reference Laboratory network (SRLN)で精度管理に使用している50株を用いてMGIT ASTの精度を評価した。INHとRFPの感受性検査について、MGIT ASTの成績はSRLNの結果と完全に一致した。感度、特異性、一致率、PV-R、PV-Sはすべて100%であった。SMに対する感受性検査で不一致となった菌株は1株認められ、それはSRLNで耐性と判定した株をMGIT ASTで感受性と判定していた。SRLNの結果との一致率は97.9%であった。EBに対する検査で不一致の結果を示した株は4株認められた。これらはいずれもSRLNで耐性と判定していたものを感受性と判定していた。SRLNとの一致率は91.7%であった。また、結果が得られるまでに要した日数は6日から11日の範囲であり、中央値は7日であった。これらの結果はMGIT ASTは正確に薬剤耐性菌を迅速に同定できることを示している。

2. MGIT ASTと小川比率法の結果の比較（平成17年度）

北海道から九州までの12施設で分離された結核菌1,112株を用い2法の結果を比較した。MGIT ASTで96株（8.6%）、小川比率法で66株（5.9%）がINH耐性と判定された。すなわち、MGIT ASTでINH耐性と判定された96株のうち30株

（31.3%）は小川比率法で感受性と判定されたことが分かった。不一致を示した株の割合は初回治療例で48.1%、既治療例で11.4%であり、初回治療例で4倍高かった。不一致の結果は全国各地でみられ、分離頻度に大きな差はみられなかった。

3. 不一致株のMIC測定（平成18年度）

不一致の結果を示した30株についてMiddlebrook 7H10寒天培地を用いMICを測定した。10株は0.4 μg/ml、18株は0.8 μg/mlのMIC値を示し、感受性検査に用いている検査濃度の近くにMICを持つ菌株であることが分かった。米国のClinical Laboratory Standard Institute (CLSI)はMiddlebrook 7H10を用いる比率法を標準法に指定している。MIC測定から、30株中28株（93.3%）はINH耐性と判定され、MGIT ASTの検査精度が確認された。2株は0.2 μg/mlのMICを示し、感受性の表現型であった。

4. 不一致株の*katG*と*inhA*遺伝子解析（平成18年度）

不一致株についてINHの耐性に関する*katG*と*inhA*遺伝子の変異を調べた。INH低レベル耐性菌28株の中で15株（53.5%）の遺伝子に変異が認められた。残りの13株には調べた領域に変異を検出できなかった。変異を持つ株の中で2株は2つの遺伝子に、13株は単一の遺伝子に変異を持っていた。*katG*遺伝子のコドン315の変異はINH高度耐性に関与することが知られている。3株は*katG*遺伝子に変異を示したが、コドン315に変異を持つ株はみられなかった。INH低レベル耐性菌28株の中で13株（46.4%）は*inhA*遺伝子のプロモーター領域（-15）にC→Tの変異を持っていた。しかし、*inhA*の構造遺伝子（ORF）に変異を持つ株はみられなかった。このことは、*inhA*のプロモーター領域の変異がINH低レベル耐性に関与しているとする報告を支持している。

5. MGIT ASTと小川比率法の両方で耐性を示した株の*katG*と*inhA*の解析（平成19年度）

2つの感受性検査法でINH耐性を示した66株について遺伝子を調べた。38株は*katG*遺伝子に変異を示した。*katG*コドン315の変異が最大であり、27株に認められた。他に、コドン198、217、285、337、344に変異が認められた。5株はPCR増幅が認められず、遺伝子の欠失が起こっていることを示している。*inhA*のプロモーター領域の変異が12株に認められた。また、*inhA*のORFの変異が3株にみられたが、3株いずれも*katG*または*inhA*のプロモーター領域の変異を伴っていた。MGIT ASTでINH耐性を示した96株を小川比率法の結果により次のように3グループに分けた；0.2 μg/ml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）。低濃度-Sの43.3%は*inhA*のプロモーター一部に変異を示したが、*katG*コドン315に変異

を持つ株は認められなかった。これに対し、高濃度-Rでは、51.1%の株は*katG*コドン315に変異を持っており、*inhA*のプロモーター部の変異は4.3%のみであった。低濃度-R・高濃度-S株では*katG*コドン315と*inhA*のプロモーター部の両者に変異を持っていた。これらの結果は、*inhA*のプロモーター領域の変異はINH低濃度耐性、*katG*コドン315の変異は高濃度耐性に関与することを示唆している。

6. シンガポールとの共同研究 (18, 19年度)
シンガポールにもINH低レベル耐性菌が存在するかどうかシンガポール総合病院と共同で研究した。シンガポール総合病院では薬剤感受性検査にBACTEC 460 TBを用いている。BACTEC 460 TBによる検査でINH耐性を示した49株を研究に用いた。1株は黄色コロニーが含まれていたことから結果の比較から除外した。日本から送付した小川比率法の簡便法であるウエルパック培地を用い検査し、その結果を比較した。両法の一致率は60.4% (29/48)、19株 (39.6%) は不一致の結果であり、シンガポールにも低レベル耐性菌が存在することが分かった。わが国で分離された結核菌について、MGIT ASTと小川比率法との不一致率は31.2%であり、シンガポール分離株の不一致株の割合が幾分高い結果であった。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。感受性を確かめるために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. 新規DNAワクチンの構築改変と有効性評価 (平成18年度)

結核感染症に対する新規のDNAワクチンを臨床応用するためには、臨床において実績のあるプラスミドを用いて構築を行う必要がある。そこで、従来のpcDNA3.1ベクターを骨格とする構築を、臨床実績のある骨格へ改変した。構築した

プラスミドを使用して、マウスIL-12遺伝子とHSP遺伝子の発現効率を蛋白質レベルで検討したところ、HSP65遺伝子とIL-12遺伝子で従来の構築に対してそれぞれ50%と200%程度の発現レベルが認められた。この結果から、新規構築においても遺伝子の発現が確認されたため、それらを用いて疾患モデル動物による薬効試験で更に比較検討を行うことにした。その結果、マウスモデルでELISPOTアッセイのデータを指標とした比較検討で、従来型と新規構築で同レベルの免疫の活性化が認められた。この結果から、新規構築においても薬効に必要な免疫の活性化が誘導されることが明らかとなった。今後は、下記に示す新規構築も含めて実用化に必要な薬効や安全性の検討を更に進める予定である。上記のようにして構築したDNAワクチンでは、IL-12とHSP65遺伝子は別々の構築上に存在しているため、開発時に2種類の成分の取り扱いになると予測される。そのため、有効性を検討するための前臨床試験を行う場合には、それぞれの配合比を検討して至適混合比を見出す必要がある。また、GMP製造を行う場合の品目数が増える上に、試験を行う場合に2成分となるため試験の群数の設定が複雑になる。そこで、構築を変更して1つのプラスミド上に2種類の遺伝子の発現ユニットを搭載することが出来るかを検討した。そのために、上記のようにして構築したプラスミドからマウス、ヒト、モルモットのIL-12遺伝子の発現ユニット (プロモーター+IL-12遺伝子+ポリA付加シグナル) を含むDNA断片をそれぞれ調製し、HSP65の発現プラスミドへ組み込みを行った。そして、構築したDNAワクチンについて培養細胞を用いて遺伝子の発現を検討した。その結果、BHK21細胞においてはHSP65遺伝子とIL-12遺伝子の発現レベルは共発現を行わない場合の70%と20%程度のレベルまでそれぞれ減少することが明らかとなった。また、臨床応用に必要な薬効薬理と安全性試験のために、新規構築での用量・用法設定についても検討を進める予定である。

DNAワクチン用の新規プラスミド構築

新規ベクターの特徴

1. アンピシリン耐性でなくカナマイシン耐性：残留抗生物質の安全性リスク低減
2. 国内の遺伝子治療の治験での実績：臨床応用の申請
3. ミニマムな配列設計：製造効率、遺伝子導入効率、安全性(組み換えリスクの低減)の向上

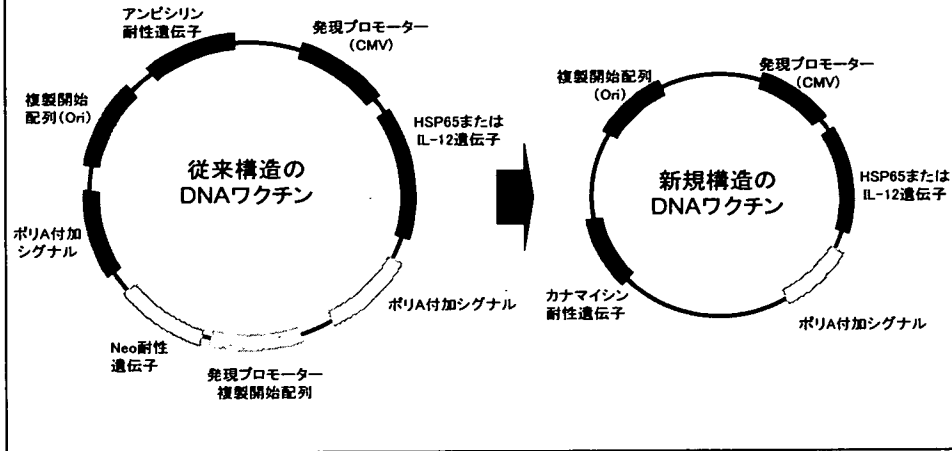


図17

共発現型DNAワクチン用の新規プラスミド構築

HSP-65遺伝子とIL-12遺伝子が1つのプラスミドで発現される

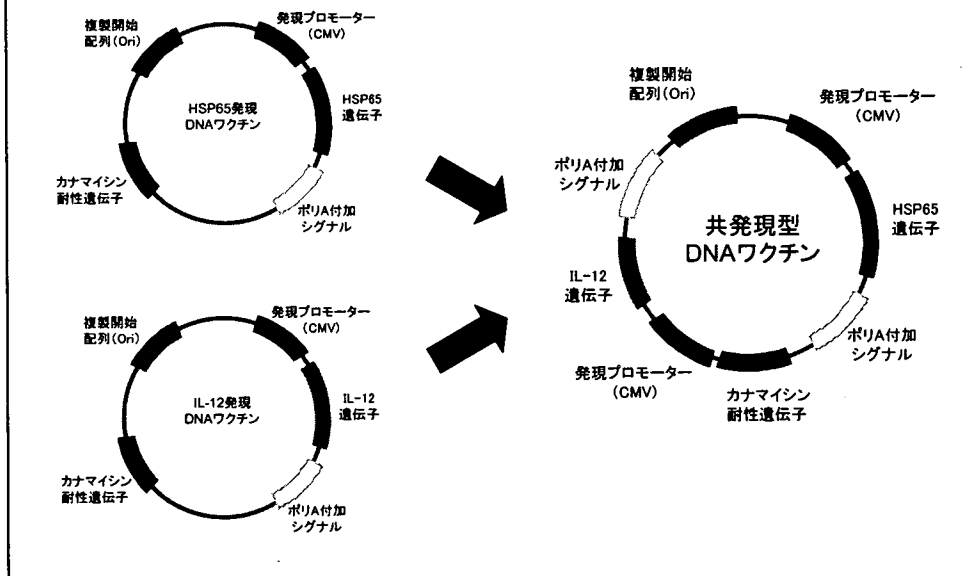


図18

HVJ-Eベクターの治験薬GMP製造技術・製剤化技術

1. 生産工程はバイオフィ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

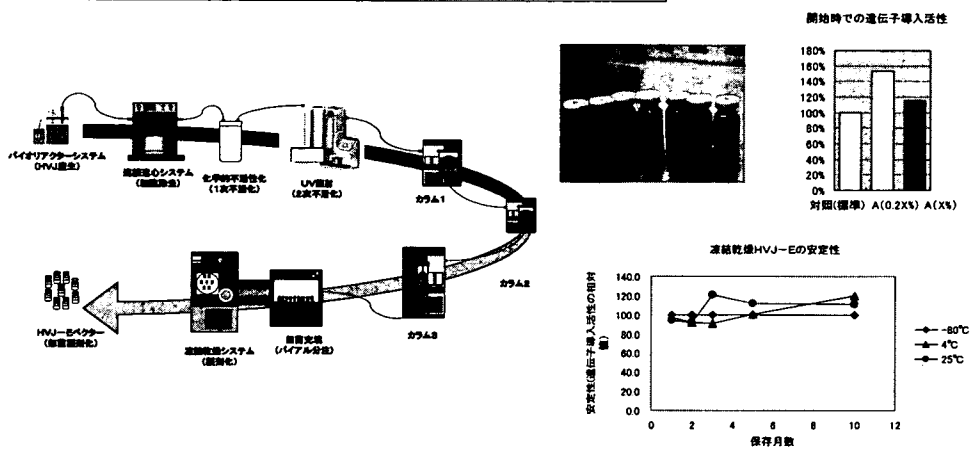


図19

2. DNAワクチンの有効性・安定性を向上するための製剤化技術開発（平成18年度、平成19年度）

従来の製剤においても薬効（ワクチン効果、治療効果）が認められていたが、臨床応用と医薬品としての実用化を想定して、更に製剤面での開発を進めることにした。製剤開発の課題としては、薬効、保存安定性、取り扱いの簡便性のそれぞれの面での向上である。そこで、保存安定性の面で優れた凍結乾燥による製剤化条件について検討を行い、DNAワクチン（筋内投与、鼻腔内投与）に適した新規凍結乾燥製剤を開発した。そして、新規凍結乾燥製剤を用いて遺伝子の発現レベルをマウスへの筋内投与で行ったところ、レポーター遺伝子（LacZ遺伝子）の発現レベルを指標として、80倍以上の遺伝子発現増強が認められた。以上のように、平成18年度までに臨床応用や製品としての実用化に適した新規結核DNAワクチンの製剤化について検討を行い、従来の製剤よりも活性が高い製剤を開発することが出来た。

そこで、平成19年度は安定性の向上を目的として、更に凍結乾燥技術の開発を進めた。特に、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。そのために、凍結乾燥工程において重要な添加剤である糖、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予定である。

3. DNAワクチンの製造技術の検討（平成18年度、平成19年度）

平成18年度は、前臨床試験と臨床応用の実施を考慮して、実際に治験薬を製造する予定のパイロットプラントで製造したHVJ-Eベクターを使用して活性の評価を行った。製造後に品質試験により評価を行った結果、遺伝子導入活性など規格値として採用する予定の品質管理項目についての品質レベルが確認された。そこで、上記のようにして構築を行ったプラスミドDNAと技術を用いて製剤化を行い、疾患動物による薬効検討試験用に供与を行った。その結果、薬効に必要なHSP65蛋白質に対する特異的免疫の誘導が認められることが明らかとなった。以上の結果から、治験薬製造を想定した製造施設と製造工程で製造を行ったDNAワクチンで、目的とする免疫の活性化が誘導できることが明らかとなった。

そこで、平成19年度は、実際に臨床応用を開始するために必要な製造工程、製造体制、製造施設について、それぞれ治験薬GMPガイドラインに従って確立する事を進めることにした。そのために、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た。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。

4. 前臨床試験のための基礎研究（平成19年度）

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。

また、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 Guidelines on Nonclinical Evaluation of Vaccines』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くることが予想された。

[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例で上昇を認めしたが、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：
：これまでに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違わ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。通常の薬剤感受性検査が出来ないため、結果の妥当性は判定不能である。しかし薬剤感受性に従った治療で両者とも順調に改善しており、臨床的には有用と判断している。一方NTM混在例は、SM耐性2例、EB耐性1例で、純培養後の通常の薬剤感受性とほとんど一致しており、臨床的にも有用であった。

[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。

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18年度新興・再興感染症) JHSF (ヒューマンサイエンス振興財団) の支援によりタイ (チェンライ)、中国 (ハルビン)、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。さらに、モルモットの結核研究で世界で最も有名なTexas A&M大学マックマレー教授を招へいし、新しい結核ワクチン研究が飛躍的に進展した。

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。

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及びWHOネットワークを用い、全国・全世界に普及。

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性の遺伝学的研究」
National Institute of Health, Department of Medical Sciences Ministry of Public Health, Thailand
Dr. Pathom Sawanyapalet
- (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
Srtain Khummith 教授

【外国人研究者招へい事業】

- (1) Pacharee Kantipong (パチュリー カンテポング) 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 Moolphate (サイユッド ムーンペット) 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) マヒドン大学兼帯医学部
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

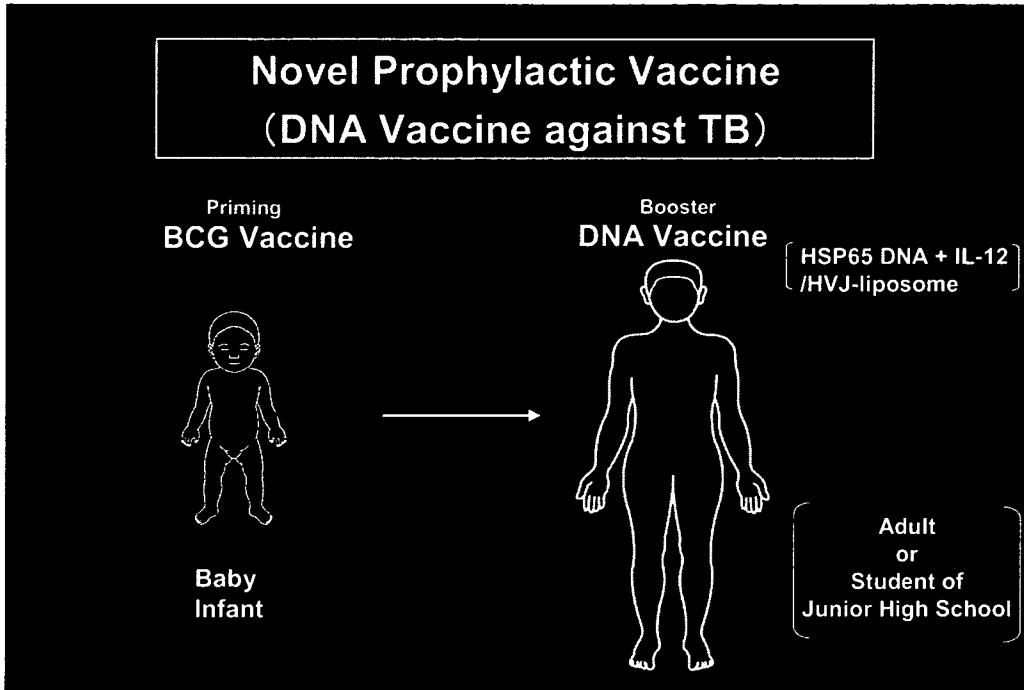
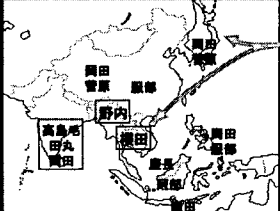


図 2 0

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



アジア地域

多剤耐性結核 治療・予防・迅速診断

日本

国内では国立病院機構政策
医療呼吸器ネットワーク54施設

近畿中央胸部疾患センター
(呼吸器学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

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・スプレッター多剤耐性結核、XDR-TB解明・制御 (鈴木) アジアにも日本と同じスーパー・スプレッターMDR-TBが存在を発見
- ③ 新しい化学療法剤 (松本、岡田) OPC-67683、及びCPZ (カブラザマイシン) は、MDR-TBに有効。当院でOPCの第II相臨床試験 (2008)

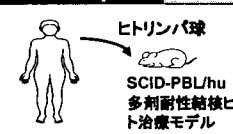
アジア地域との研究ネットワークは、一層強固になった。

サンプル

1. スーパー・スプレッター多剤耐性結核菌 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。
2. 中国・タイでもXDR-TB菌の存在。本邦にはXDR-TBが多剤耐性結核の50%存在。感染力が強いことを示唆。
3. EB306とgyrA遺伝子異常 (中国は日本より多い)
4. 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傷。
5. 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。
6. ヒトM型Mφの結核菌増殖抑制。

現地でも遺伝子・免疫共同研究 (倫理委員会)

解析



新しい結核ワクチン (BCGの1万倍強力)

- (a) マウス MDR-TB治療効果 XDR-TB治療効果
- (b) モルモット (有効)
- (c) サル (有効) (フィリピン、中国)
- (d) SCID-PBL/hu (治療効果)

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・スプレッター多剤耐性結核菌が高率を発見。
- ・多剤耐性結核菌 (河南省・北京) EB、SM、OFLX薬感受性遺伝子解析。

2. タイ (Srisin, 野内, 櫻田)

- ・(チェンライ県で) 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。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。

4. シンガポール (阿部)

- ・INH低レベル耐性菌を初めて発見。

図 2 1

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-リポソーム/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) を使い、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) のネットワークを使い、アジア・世界で臨床応用する。
 - (7) HVJ-エンベローブはすでに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使い、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。TRIF/MyD88二重欠損マウスを用いた結核感染実験から、TLRを介した自然免疫系の活性化が、結核感染防御に重要であることが明らかになった。さらに結核感染に対するTh1応答には、TLR非依存的なメカニズムが存在することも明らかになった。今後、TRIF/MyD88二重欠損マウスが結核感染に高感受性になる分子機構、Th1分化の誘導機構を解析する。また、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。
 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。この様な研究にはタイ国のチェンライ県の様に、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