

表6

研究の目的、必要性

[研究の目的]

近年輸入感染症としての多剤耐性結核が問題となっている。
したがって、

- ① アジア諸国の結核対策研究ネットワークの確立。
- ② 日本における外国人結核の発生と治療実態把握及び対策・制御。
- ③ アジア諸国の結核菌の分子疫学研究と宿主要因解析対策への応用。
- ④ 新診断法。
- ⑤ 新結核ワクチン(多剤耐性結核治療ワクチン)・化学療法。
- ⑥ 先進諸国における移民結核対策。

に関する結核輸入感染症対策・制御研究を行うことを目的。

表7

研究の目的、必要性

[必要性]

- ① 日本国内への流入・蔓延防止。
- ② 日本の外国人結核は年々増加。
- ③ 多剤耐性結核は a莫大な費用 b治療困難。新結核ワクチン、新治療薬必要。

図3

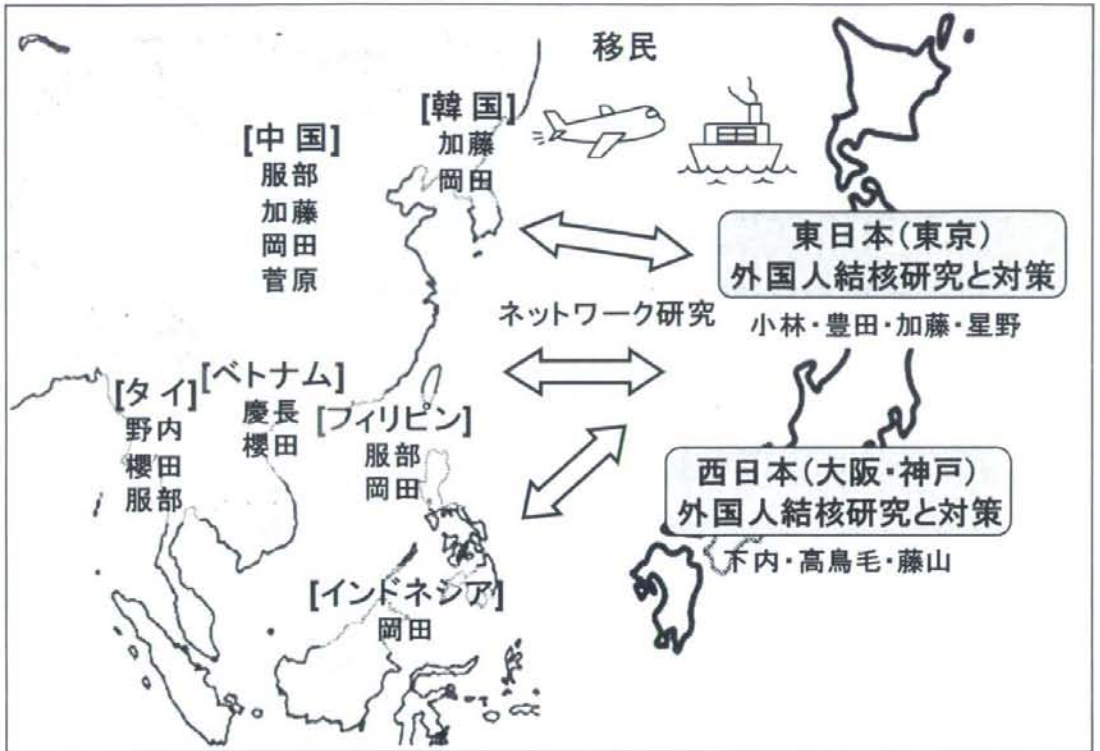
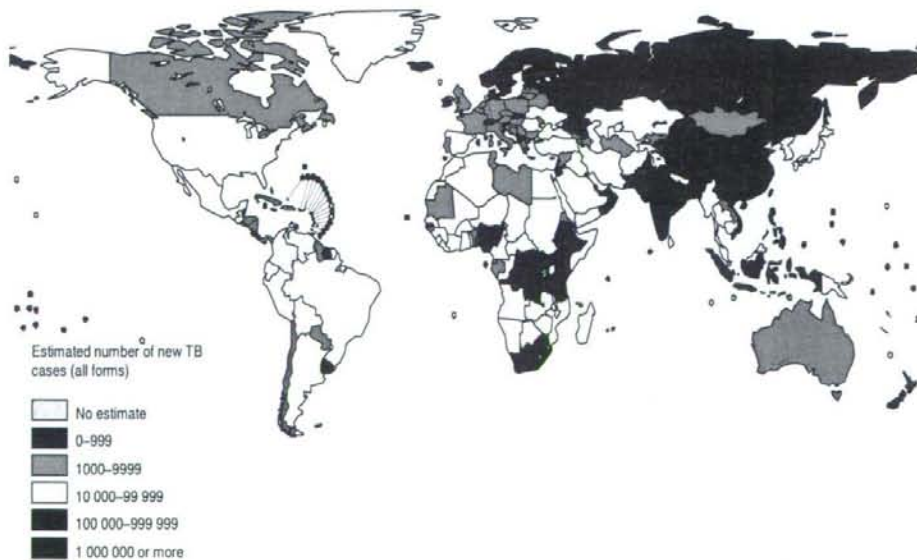


図4

Estimated numbers of new cases, 2006



The boundaries and names shown and the designations used 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 frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2006. All rights reserved.



B. 研究方法 (図2)

1. 日本における外国人結核

- (1) 2000年1月から2007年4月までに当センターにて入院加療を行った外国人結核患者を対象に、その国籍、性・年齢、職業、入国から発症までの期間、合併症、薬剤感受性・耐性率、治療および治療完遂率などについて検討し、過去の研究報告と比較する。また、外国人のMDR-TB症例について、その臨床背景を検討し、結核対策上の問題点を明らかにする。菌の解析には、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 解析、VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)解析、薬剤感受性試験、薬剤耐性遺伝子のシーケンス解析、クラスター解析といった分子疫学的及び分子生物学的手法を用いる。
わが国全体における外国人結核の実態調査を行うにあたり、研究班全体で調査票を作成する。新宿区保健所に依頼して調査票に記入してもらい、その結果を解析する。
- (2) 自施設の過去5年間に入院治療した外国人結核症例をサマライズし、問題点を抽出して、関係行政機関(保健所)との連携会議で情報提示し、研究目的・方法を示した上で、実施についての意見を求める計画である。(アンケート調査を予定している) ; 2009年3月6日(金)
(倫理面への配慮)
症例は氏名ではなく、整理番号で登録し、調査票のみでは個人の識別ができないよう配慮して、照会番号を介して入力等行う。
- (3) 2007-2008年に登録された結核患者について、国籍欄の確認、あるいは中国人、韓国人らしき氏名およびカタカナの氏名について、患者登録票を調査した。そのうち、日本国外で出生した者を対象として、患者票に記載されている項目について調査した。
- (4) 平成20年の神戸市における結核新登録患者のうち、外国生まれ・外国籍の者、日本生まれ・外国籍の者、外国生まれ・日本国籍の者、日本に居住・海外1年以上滞在後の帰国の日本国籍の者、日本に居住・海外1年以上滞在後の入国の外国国籍の者について患者面接時に得られた情報を収集した。
- (5) 在日外国人結核患者数の推移について、結核発動動向調査と出入国管理統計、在留外国人統計、不法残留者推計を用いて背景を検討する。

2. アジア諸国の結核分子疫学研究と宿主要因解析(ネットワーク研究)

- (6) 1. 日中韓分子疫学研究
平成21年1月20日から22日結核予防会結核研究所において研究会議を開催し、各国における結核の状況や対策および型別に関する研究状況について発表してもらい、今後進める共同研究について議論した。
(資料1~8参照)
10株程度の分析による予備実験から、日本、中国、韓国で広まっている結核菌は、進化の段階つまり遺伝的背景が異なることが示唆された。そのため、各国で利用できる共通のコアとなるVNTRシステムを共同で構築することにした。さらに、必要ならそれぞれの国で独自にlociを追加することにより、人口ベースの分子疫学調査に応用できるシステムに発展させることも可能となる。
2. 台湾CDCとの共同研究
平成21年2月21日台湾疾病予防センター抗酸菌部部長のDr. Ruwen Jouらと研究会議を持ち、情報交換を行った(加藤資料9)。
- (7) HIV合併結核発症のリスクを自然免疫から適応免疫まで広く検討するため、タイ・チェンライの結核とHIV感染者とHIV合併結核の患者群から得られた試料を用いて、単球から分化したマクロファージにおけるosteopontinの産生レベルと血漿中のosteopontinのレベルを比較検討した。さらに、患者血漿中のgranulysin等の細胞障害性顆粒のレベルを測定し、NK細胞およびリンパ球サブセットについてフローサイトメトリーにて解析を行い、細胞障害性顆粒のレベルと細胞数の相関を統計的に検討した。現在、結核データベースにアクセスして個々のケースに付き臨床情報と分離菌の薬剤耐性試験結果について解析を行っている。
- (8) ベトナム国内南北2カ所の薬剤感受性検査が可能な結核レファランスセンターのうち、ベトナム南部の拠点病院であるホーチミン市のファムゴックタック病院に共同研究を申し入れた。研究プロトコルを作成し、薬剤代謝酵素(NAT2など)、免疫応答関連遺伝子(Th1系サイトカイン系、エフェクター分子など)等を、耐性結核の宿主要因の候補遺伝子として、その特徴的な遺伝子変異、アジア人の遺伝子分

布の特徴を明らかにするための遺伝子タイピング法を確立し、末梢血全血を用いた遺伝子発現解析のためのリアルタイム逆転写PCR法による測定系の開発を行った。

- (9) MICプレートを用いて、MICを求めて、KM, AMK耐性が否かを調べた。次に、これらの株からDNAを抽出し、rrs, rpsL突然変異の有無をDNAシーケンサで解析した。

3. 新結核ワクチン・診療・治療

- (10) 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両遺伝子を健康人のPBMCよりクローニングした。DNAワクチン用ベクターとしてIL-12p40 p35融合タンパクを発現するプラスミドベクターを構築した。構築したIL-12p40 p35DNAワクチンとHSP65 DNAワクチンはHVJ-liposomeに包埋し、カニクイザルに接種した。(岡田、吉田、金田、Reed, Gillis) 米国NIH branchでWHOの支援研究機関であるLeonard Wood Memorial研究所(フィリピン、セブ)で行った。Leonard Wood Memorial研究所は世界で唯一多数のカニクイザルをP3レベルで結核研究できる施設である。この研究室からNatureに1996年、カニクイザルが最もヒト結核に近いモデルである有名な研究が発表された。

Dr.Babie Tan, Dr.Cruz(Leonard Wood)との共同研究で行った。

各ワクチンを3週間隔で3回予防ワクチン 5×10^6 cfu皮内投与(0.1mlの生食に浮遊)した。HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNAはi.m.投与した。最終ワクチン投与4週後に強毒ヒト結核菌クロノ株を気道内投与した。

カニクイザルを用いて、以下の結核予防ワクチン効果を解析した。

<実験OKADA V>

- (1)治療ワクチン効果の解析
 (2) HVJ-エンベロープ・パウダー-pVAXベクターを用いた解析(図4)
 (3) pVAXベクター-HSP65DNA+IL-12DNAを二つ同じ遺伝子上に導入
 G1 HVJ-エンベロープ・パウダー-pVAX HSP65DNA+IL-12DNA
 1週間に3回
 連続3週間合計9回 i.m
 G2 BCG東京(priming 1回)+ HVJ-エンベ

ロープ・パウダー-pVAX HSP65DNA+IL-12DNA(booster 8回)

G3 BCG東京(priming 1回のみ)

G4 生食投与(コントロール) 各5匹

ヒト型結核菌を気道内注入後、1週間後に治療ワクチンを開始。2~3日毎に3週間連続、合計9回ワクチンをi.m投与治療ワクチン効果は、生存率、胸部X線、血沈、体重、体温、PPD皮内反応ならびにワクチン投与ザルの末梢血Tリンパ球の増殖増強反応で解析した。末梢血T細胞をリコンビナントHSP65 10 μ g/ml、リコンビナント72f 10 μ g/ml、PPD 10 μ g/ml、PHA-P 0.2%で刺激し、3H-サイミジンuptakeの方法で三日後に増殖活性を測定した。上記の検査は、①ワクチン投与前、②ワクチン1回目投与後3週後、③2回目投与後3週後、④3回目投与後3週後、⑤TB菌投与4週後、⑥TB菌投与8週後行った。

<実験OKADA VI>

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

Prime	Boost
G1 BCG	HVJ-エンベロープ / HSP65+IL-12DNA
G2 HVJ-エンベロープ / HSP65DNA+IL-12DNA	BCG
G3 HVJ-エンベロープ HSP65+IL-12DNA	HVJ-エンベロープ HSP65+IL-12DNA
G4 BCG	(-)
G5 (-)	(-)

各5匹

3回ワクチン投与後、最終免疫より4週間後にヒト型結核菌Erdman株を 5×10^6 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。

- (11) 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 5×10^6 をi.v.投与した後1日後、8日後、及び15日後に①HVJ/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチン

②BCGワクチン

③HVJ /Hsp65DNA+IL-12DNA及びBCGとの同時投与

④ (HVJ /Hsp65DNA+IL-12DNA) ワクチンとBCGワクチンのpriming-boosterワクチンを投与する方法を用いて強力なる予防効果を示したことより、この方法でも治療効果を解析した。

多剤耐性結核菌投与30日後、すなわち3回目の治療ワクチン投与2週間後にDBA/1マウスをsacrifyした。肺臓・肝臓・脾臓をホモジナイズし、結核菌数を7H11寒天培地で2週間培養し、CFUで測定した。

免疫応答は脾細胞のサイトカイン産生及びリンパ球のBrdU増殖反応で解析した。

(12) Priming-Boosterワクチンの開発 (カニクイザルの系で)

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。

(13) ① 動物試験データの取得

臨床試験を行うためには、ガイドラインに従って前臨床試験データの取得を進める必要がある。その種類としては、主に薬効試験、薬効メカニズムの解析、安全性試験などがある。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、薬効メカニズム解析と、安全性試験をそれぞれ立案し、規制当局のガイドラインに示された品質レベル (信頼性基準準拠、GLP準拠など) の試験を実施してデータを取得した (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)。

具体的には、これまでにGLP試験施設で取得した予備試験のデータ等を参考にして試験をデザインし、GLP試験データの取得を行った。動物種は、安全性試験においてはラットとカニクイザルを選択し、これまでと臨床での投与経路である筋肉内投与の代替経路として皮下投与を選択して、各動物 (ラット及びサル) に投与を行って、試験データの取得を行なった。試験項目としては、一般毒性 (単回投与、反復投与)、トキシコキネティクス (TK)、抗体産生、局所刺激、安全性薬理試験 (コアパツテリイ試験)、薬物動態 (試験法検討のみ) を選択し、それぞれについてGLP施設で試験を実施した。

② 治験薬製造用データの取得

臨床応用の申請に必要な治験薬GMP製造のデータを取得した。まず、設定したHVJ-E原薬について暫定規格を設定した上で、複数バッチの製造を行って暫定規格の修正を実施した。また、凍結乾燥HVJ-Eについても暫定規格などの設定を行い、予測される実製造スケールでの基礎データを取得する。

更に、長期安定性試験を実施のために、加速、及び苛酷条件の保存条件を設定し、安定性予備試験を行って基礎データを取得した。

(14) 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 (secretory leukocyte protease inhibitor: SLPI) 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、SLPIによる結核菌増殖抑制機構を解析するため、走査電子顕微鏡による結核菌の形態変化、さらに1-N-phenylpiperazine (NPN) を用いた細胞膜透過性亢進試験を行った。また、SLPIタンパク質の結核菌増殖抑制に必須の部位を種々の変異タンパク質を作製し解析した。最後に、SLPI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。これらの解析によりSLPIの結核感染防御における役割を検討した。

(15) 当院保存中の多剤耐性結核菌株と全剤感受性結核菌に対して、各種分子疫学的方法を駆使し、

集団感染の有無と感染様式の比較を行う。RFP耐性遺伝子である $rpoB$ の変異の有無を迅速に判定する事で、MDR-TBの迅速スクリーニングを行い、速やかに隔離処置をとる。

- (16) 対象は、平成19年11月から平成20年11月までの間に、当院で喀痰検体に対してPCR検査を行い結核菌群陽性と判定された331例である。これらを対象に、ジェノスカラー-Rif-TBによる $rpoB$ 遺伝子検査を行い、培養菌に対するMGIT法・小川比率法による従来の感受性検査との比較検討を行った。

4. 先進国の外国人結核対策

- (17) 英国を訪問した期間は平成20年10月11日から17日である。前半は首都ロンドン、後半は北部イングランドのブラッドフォードとリーズを訪問した。ロンドンでは、ロンドン北部のコリンデルに存在するHPA(Health Protection Agency)の感染症センター(Centre for Infections)を訪問し、英国及びロンドンの結核対策の概略について視察および聞き取り調査を行った。ロンドンの諸組織や専門職の人に対する聞き取り調査はHPAのInternational Office, Executive OfficerであるKenny Yap氏の協力を得て行った。医師、刑務所担当看護師、ホームレス者担当看護師、保健師と面接を行った。後半は、West Yorkshire Health ProtectionのConsultant in Communicable Disease Controlの医師のMartin Schweiger氏の協力を得て調査を行った。訪問した施設はNHSのBradford and Airedale Teaching Primary Care Trust、Leeds Teaching Hospital Chest Clinic、West Yorkshire Health Protection Unitであり、訪問施設において視察及び聞き取り調査を行った。

C. 研究成果

I. 日本における外国人結核

- (1) 2000年からの7年間に入院した外国人結核患者は117名(男性76名、女性41名)であり、年次推移をみると、年間15名程度であるが入院患者全体が減少しているため、外国人の占める割合は2004年以降、3.8%、4.9%、5.2%、7.2%、9.0%と増加傾向である(表8)。年齢別では20代が49.6%と最も多く、次いで30代(30.8%)が多かった。国籍別では、中国34名、韓国31名と2カ国が多く、その次がミャンマー13名で、以下、ネパール、フィリピン、タイ、インド、インド

ネシア、パキスタンが3名以上で続いていた(図5)。職業別では学生と社会人が各々35%であり、無職、主婦がそれぞれ15%であった。入国から発症までの期間については、1年から3年までが最も多く、次いで5年から10年までが多く、入国1年未満は10%程度であった。HIV陽性は、最近3年間の52例中3例にみられた。薬剤耐性は9.9%にみられ、INH耐性が最も多く(7.7%)、MDR-TBは3例(2.6%)であった。治療経過・転帰に関しては、治癒/治療完遂が80%、帰国が11%、転院が3%、中断が5%、死亡が1%であり、治療完遂者は以前の報告と比べて増加していた。治療完遂率の向上はDOTSの推進、医療費や言語の問題への対応など、結核対策の整備が寄与していると考えられる。

MDR-TBの症例1は30歳の女性で中国出身、3年前に入国したが不法滞在者である。多量排菌者であるが、コミュニケーション不足があり1週間で脱走した。症例2は37歳の男性でミャンマー出身、7年前に来日、歌舞伎町でバイト生活。結核治療歴、入院からの逃亡歴あり。HIV陽性であり、菌陰性化後に自国へ強制送還。症例3は25歳の女性で中国出身、3年前に来日した美術学校の学生。初回MDRであるが、治療により菌陰性化が得られた。薬剤耐性の獲得は、感染を受けた国・地域、過去の治療歴などが影響し、外国からの多剤耐性菌の国内への持ち込みはわが国の結核医療において重要な問題である。在日外国人結核の診療では、早期発見とDOTSによる治療完遂がとくに重要であり、その実現のために有効な対策を構築する必要がある。入院加療した外国人結核患者リストに従って、順次、菌株移送・培養を開始しており、これまでに73株の植菌を完了した。73株のほとんどはアジア系外国人に由来していた(一部国籍調査中)。薬剤感受性試験の結果、63株は全ての第一選択薬に感受性だった。

新宿区保健所における外国国籍の結核新登録患者(2007年および2008年)を対象に、今回作成した調査票の記入を依頼した。潜在性結核を含む新登録者数は全体で2007年が145例、2008年が169例(概数)であった。2年間の外国人結核患者は48名(15.3%)であり、潜在性結核8名、未調査4名を除く36名について解析した。対象患者の約半数は当センターにて登録した患者であったため、臨床的特徴は上記結果とほぼ同様であった。全体の89%が肺結核であり、塗抹陽性は42%であった。発見方法は医療機関

受診が60%、日本語学校検診が20%であった。職業では学生（45%）が最も多く（図6）、定期健診は約半数に施行されていた（図7）。通訳

は17%の患者で利用され、翻訳パンフレットは25%の患者で使用されていた。

表8 国立国際医療センターにおける結核入院患者数

年	入院患者数	外国人 (%)
2004	396	15 (3.8%)
2005	389	19 (4.9%)
2006*	229	12 (5.2%)
2007*	208	15 (7.2%)
2008*	144	13 (9.0%)

*2006年より結核病床数は半減

図5 国立国際医療センターに入院した外国人結核患者
国籍 n=115 (2000年～2007年)

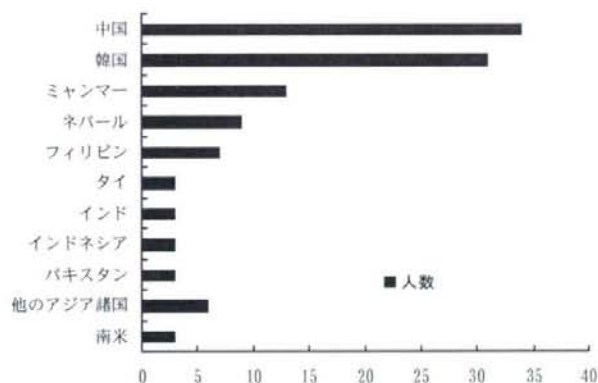


図6 外国国籍の結核新登録患者
(新宿区保健所：2007、2008)
職業 n=36

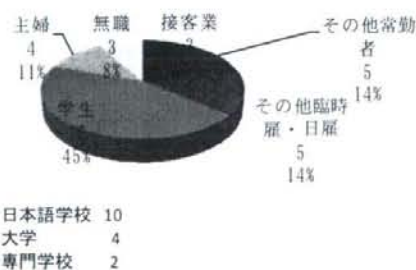
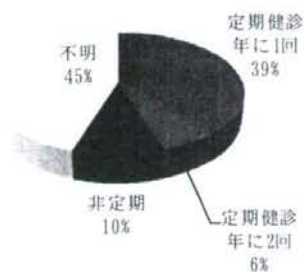


図7 外国国籍の結核新登録患者
(新宿区保健所：2007、2008)
健康診断の有無



(2) 2004-2008年の過去5年間に国立病院機構東京病院に入院治療した外国人結核患者は55名で、同期間の全結核入院患者2091人中の2.6%を占めていた。年齢は20代22、30代20、40代8で50才以上は5人のみで、80%が20-30代であった。国籍は中国、フィリピン、韓国が主体で、ネパール、タイ、モンゴル、ミャンマ、ナイジェリア等となっており、男女比28:27とほぼ同等であった。病型は肺結核47に対し、肺外結核9

(胸膜炎3、リンパ節炎2、粟粒結核1、喉頭結核1、心膜炎1、腹膜炎1※重複あり)と日本人の平均より高いが同年の日本人との比較は行っていない。合併症はHIV3例の他は重大な合併症はあまりチェックされていなかった。薬剤耐性はMDR3例、HS耐性1例、S耐性1例でとくに耐性が非常に多いわけではない。治療はHREZ32例、HRE12例、その他5例、不明6であった。(表9、10、11) (図8、9)

表9

東京病院の外国人結核 2004-2008年	
5年間	55人 / 2041 (2.7%)
2004:	11人 / 444
2005:	17人 / 432
2006:	7人 / 373
2007:	7人 / 374
2008:	13人 / 418 (3.1%)

図8

年齢分布(20~30代が80%)

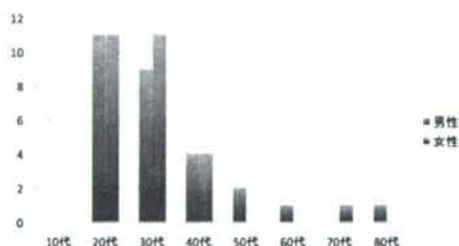


図9

国籍

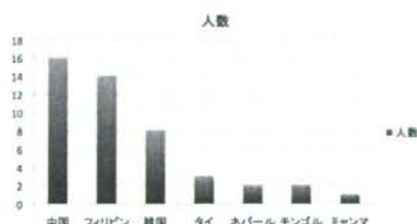


表10

その他の特徴(55人中)	
病型:	肺結核(47)・肺外結核(8) 胸膜炎(5)・リンパ節炎(2)・粟粒結核(1)・喉頭結核(1)・ 心膜炎(1)・腹膜炎(1)
合併症:	HIV 3例
耐性:	MDR 3例、S 2例、HS耐性 1例
治療:	HREZ (32)・HRE (12)・その他(5)・不明(6)

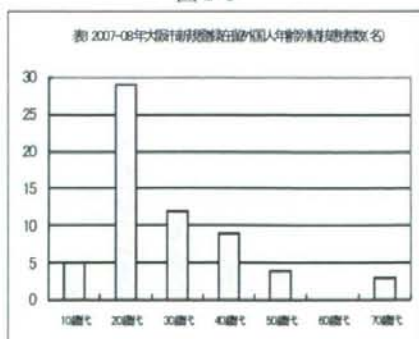
表11

外国国籍者の状況2007年

- ・新登録結核患者中の外国国籍者は842人(3.3%)
- ・割合の推移(02年2.5%、04年3.1%、06年3.5%)
- ・最も多い年齢20? 29才390人(20.3%)
- ・割合は年々拡大
(02年12.0%、04年15.9%、06年19.8%)
: 結核の統計2008

- 東京都では
- ・新登録結核患者中の外国国籍者は179人(5.3%)
 - ・割合は横ばい(02年5.7%、04年5.9%、06年5.3)

図10



- (3) 2007-2008年に登録された在留外国人結核患者は64名(2.1%)であり、年齢別では20代が実数(30名)でも全体に占める割合(18.7%)でも最も高かった。(図10)国籍は中国、韓国が最も多く両国で54.7%を占める。(図11)職業は学生(高校、大学、専門学校、日本語学校)が最も多く(26.6%)、続いて常勤者(25.0%)であった。保険は大半が国保一般・家族、被用者保険本人・家族15に加入していた。日本語会話能力は滞在年数が経つに連れて、高まるが、最初の6ヶ月はほとんどの者が理解できない。来日後5年以内発病割合は72.1%で、全国の53.4%より高い。2年以内発病が50.8%であり、さらにその内訳は、6ヶ月未満12.5%、6ヶ月以上1年未満10.9%と、来日直後に発病する者が多い。(図12)発見方法は医療機関受診67.2%が最も多く、次に定期健診・個別健診29.7%であった。感受性検査では42名中、多剤耐性(DR耐性)2名(4.8%)であり、国籍は中国と韓国であった。2007年登録患者の治療結果は治癒4名(21.1%)、治療完了(36.%)、死亡(結核外)1名、5.3%、中断2名(10.5%)、転出5名(26.3%)であった。結核菌の疫学遺伝子分析として、11例のVNTR分析で、大阪市の他の患者との一致例はなかった。(考察)来日後すぐに発病する者が多いため、学校、職場での健診を強化する必要がある。また、患者に対する健康教育を強化して、日本で治療を完了させるか、帰国する場合に母国の医療機関との連携を強化する必要がある。

図11

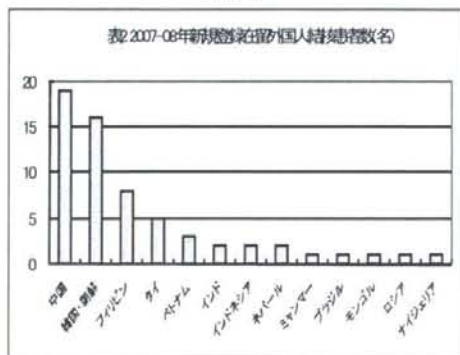
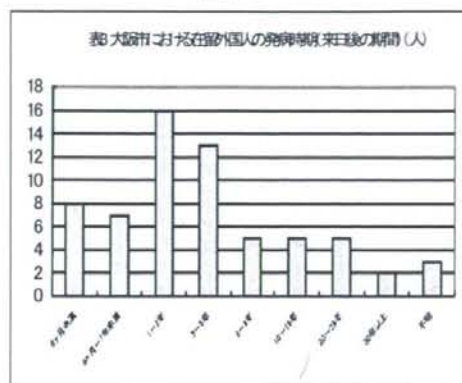


図12



- (4) 神戸市の外国人結核として対象となったのは、男性4名・女性5名の計9名であった。年齢分布は20代6名(男性3名・女性4名)、30代1名(女性)、60代1名(男性)、70代1名(女性)で、20代の結核患者においては外国人の割合が高かった。職業は留学生2名、常勤の会社員1名、主婦2名、無職4名であった。国籍は中国籍5名、韓国籍1名、日本国籍5名で、日本国籍のうち、中国出身2名、フィリピン出身1名、インド出身1名であった。入国してから、発病までの期間については、6ヶ月未満3名、6~12ヶ月1名、3~5年2名、6~9年1名、10年以上2名であった。保険については、社会保険3名、国民保険3名、無保険2名、障害年金1名であった。発見動機は、留学生が学校健診で、他の者は有症状受診であった。病名は、肺結核6名、結核性胸膜炎2名、膿胸1名で、塗抹陽性で入院した者は2名、うち1名は培養は検出されず、培養陽性は3名であった。再治療の者が1名いたが、耐性菌はなく、全員標準治療が可能であった。
- (5) 結核発生動向調査より星野・岡田はまとめた。外国人結核患者数は739名(1998年)から毎年増加し、931名(2004年)でピークを迎え、その後漸減し2007年は842名だった。就業状況別の患者数では、1998年と2004年の比較で、増加数が多い就業は、常雇(91名増加)、学生(66名増加)、無職(33名増加)、臨時・日雇い(28名増加)であった。2004年と2007年の比較では、減少数が多い就業は、無職(59名減少)、学生(23名減少)であり、その間に増加した就業は、家事(11名増加)、常雇(4名増加)であった。

II. アジア諸国の結核菌分子疫学研究と宿主要因解析 (ネットワーク研究)



地図1. 中国 北京・上海、韓国 ソウル

(6) 研究協力者

韓国

韓国結核研究所
分子疫学部門長 Dr. Park Young-Kil
分子疫学部門 Hee-yoon Kang

中国

中国疾病予防センター(CDC)
結核研究部長 Dr. Zhao Yan-Lin
上海市疾病予防センター(CDC)
結核部門長 Dr. Mei Jian
上海Fudan大学医学部
微生物教室 教授 Dr. Gao Qian

台湾

台湾疾病予防センター(CDC)
抗酸菌リファレンス検査室長
Dr. Ruwen Jou

日本

大阪市立環境科学研究所
和田崇之
神戸市環境保健研究所
岩本朋忠
結核予防会結核研究所

抗酸菌リファレンス部
前田伸司、村瀬良朗、菅原勇

VNTR分析では、ローカスの選択が非常に重要で、どのlocusを何箇所、解析するかで本型別法の分解能は大きく左右される。米国疾病予防

管理センターでは、Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU)の12箇所、ヨーロッパ諸国ではフランスパスツール研究所のSupplyらが報告したSupply (15)あるいはSupply(24)-VNTRシステムが、新しい結核菌の型別法として採用されている。ヨーロッパ諸国では、このSupply(15)-VNTRを用いて結核菌の型別情報のデータベース化が進められている。しかし、東アジア諸国では、米国、ヨーロッパ諸国と広まっている結核菌の遺伝子型が異なり、北京型結核菌が結核全体の7~8割を占めている。日本国内の結核菌をMIRU(12)およびSupply(15)-VNTRで分析すると大きなクラスターが形成し、これらのVNTR分析システムでは、北京型結核菌に対する分解能が低いことが判明している。そのため、北京型結核菌を効率良く型別できるVNTRシステムを構築する必要がある。

このような分析システムのひとつの候補として日本全国から集めた結核菌を分析して結核研究所が報告したJATA(12)-VNTR法がある。この方法が直接適応できるか、まずは中国、韓国、日本で広がっている結核菌の遺伝子型を比較した。(加藤)

日本株と韓国株との比較：北京型結核菌は、NTF領域にIS6110が挿入されている“Modern型”と挿入されていない“Ancient型”の2つに大きく区分される。中国(北京)、香港、ベトナム、ロシアおよびヨーロッパ諸国ではModern型が75-95%を占めているのに対して、日本では75-80%がAncient型であり、日本の結核菌は諸外国で広がっている北京型株と異なることが判明している。一方、韓国国内で分離された80株を使ってAncient型とModern型の割合を調べたところ、日本の結核菌と同様に72%がAncient型であった(表12)。また、NTF領域にIS6110が挿入される前に生じるRD181領域欠損という事象が生じていないRD181領域陽性株は、東京都内で分離された株では87株のAncient株中17株(20%)であるのに対して韓国国内で分離された株では46株のAncient株中29株(63%)とその割合が高いことが判明した(表13)。

日本株と中国(上海)株との比較：VNTR 4120は、日本国内株の分析では高頻度変化部位(HV)で北京型結核菌に対するHunter-Gaston discriminatory index (HGI)は、0.902と高い値であった。しかし、上海で分離された株のH

GIは、0.092と非常に低かった。このように、同じ北京型結核菌であってもコピー数の変化頻度は、日本と上海では大きく異なることが明らかになった。

台湾における分子疫学研究：台湾CDCは全国で分離される結核菌の約50%の菌株を収集しており、収集した全菌株に対してRFLP及びVNTR (12-MIRU+3ETR)を実施して、データベース化されている。

これらの菌の中で北京株は44.4%と日本、韓国、中国本土よりも低い割合であるが、北部、東部では北京型が多く、過去数十年間に優勢になっており、起こっている感染の原因となっていると考えられる。これらデータを用いてMST解析も可能であり、解析ソフトを入手して実施することになった。

今後の研究計画：次年度は、それぞれの国で広まっている結核菌の遺伝的背景を解析し、違いを明らかにするために以下の内容で解析を進める。

- (1) 結核研究所は必要な試薬等を送付し、また技術援助を行う。
- (2) 分析に利用する結核菌の選択は、ある地域内で一定期間内に分離したすべての株を分析し、株の選択の時点でバイアスがかからないようにする。
- (3) VNTR解析の精度管理：コピー数の定義は、日本で使っている共通なものを利用し、お互いに結核菌DNAを送り同じ結果が得られるようにする（但し、中国からのDNA検体の輸出は政府の許可が必要で難しい）。
- (4) 役割分担をはっきりさせ、期日を設定してそれまでにそれぞれの施設毎にデータを出す。
- (5) 各国のデータに基づきminimum spanning tree (MST)解析を行い各国で広まっている結核菌株の違い等を明らかにし、共同で学術論文を作成する。

また、台湾CDCも次年度より本研究に参加することで基本的に合意した。

表12 大阪、東京、韓国で分離された北京型結核菌

	Total numbers	Number of isolates	
		Ancient	Modern
Osaka	175	130 (75%)	45 (25%)
Tokyo	113	87 (77%)	26 (23%)
Korea	64	46 (72%)	18 (28%) ⁹⁾

表13 Ancient型結核菌のRD181部位の有無

	No. of Ancient isolates	RD181	
		Positive	Negative
Osaka	130	15 (12%)	115 (88%)
Tokyo	87	17 (20%)	70 (80%)
Korea	46	29 (63%)	17 (37%)

- (7) タイとの共同研究で、結核菌の分析をRFLP等のDNA指紋分析標準タイピングを活用しておこなった(野内)。



地図2. タイ

RFLPパターンは、北京株 (Beijing family) が52.7%、ノンタブリ株 (Nonthaburi group) が8.8%、この2つに属さないが6バンド以上の多型群 (Heterogeneous group) が13.2%、2-5バンド群が13.2%、1バンド群が12.1%であり、HI-V陰性例についての詳細な42例の経時的検討が終了し、40例(95%)がRFLPパターンが一致し、同じ菌による再燃、2例(5%)が、RFLPが異なり違う菌による再感染と考えられた。多剤耐性結核菌では北京株が66.7%であった。タイ国の新規結核菌の全国レベルの20.8%、北タイにおける分布の17.7%。多剤耐性結核菌の北京株は更に高く66.7%であった。

- (8) ハルビン医科大学との共同研究：ヒトに結核性の病変を生ずる疾患にはM. tuberculosis, M. bovis, M. bovis BCG, M. africanum, M. microti, と M. canettii, などが挙げられる。しかし非結核性の抗酸菌 (nontubercular myc

obacterium (NTM)は呼吸器疾患を生ずるが臨床的に区別しにくい場合もある。ここでは結核症として診断された症例由来のDNAを解析し、NTMの存在を確かめた。異なる4種のプライマーを用いて16S rRNA, Rv0577, RD12及びRD9領域を増幅し、それぞれ543bp, 786bp, 400bp, 及び600bpのバンドを確認することにより結核菌はNTMであるかの区別がついた。そして2例がNTM (*M. intracellulare*)であることが判明した。(表14)



地図3. ハルビン

ハルビン医科大学と、同地域の結核患者より得た結核菌の薬剤感受性を検討した。国内ではこれほど多くの多剤耐性結核の症例を集めることは困難である。疫学的な基礎資料となることが期待される。

表14
The differentiation of mycobacterial isolates

PCR primers	Target fragment (bp)	No of strains	Positive (No)	Negative (No)	Remarks if positive
16S rRNA	543	99	99	0	<i>Mycobacteria</i>
Rv0577	786	317	315	2	MTBC
RD12	400	317	315	2	MTB/ <i>M. canettii</i>
RD9	600	317	ND	ND	MTB/ <i>M. africanum</i> / <i>microti</i>

The two strains which were negative for both Rv0577 and RD12 were further identified by PCR-RFLP and showed the same pattern with of *M. intracellulare*. Sequencing is being undertaken.

- (9) OPNならびにgranulysin等の細胞障害性顆粒とHIV感染者とHIV合併結核を標的として臨床試料を用いた解析を行った。OPN, granulysinともにHIV感染における結核発症の高いリスクと密接に関わっている可能性が示唆された。
- (10) ホーチミン市のファムゴックタック病院は、結核菌耐性検査法の精度管理が確立しており、ベトナム国内随一の規模で、耐性結核患者の治療にあたっている。ベトナムの多剤耐性率は、2006年現在、約5%と報告され、都市部の、結核既治療再排菌例に多いため、この発生頻度を抑制することが求められる。同病院では、2008年に、1662名の新規活動性結核患者、71例の再治療例を治療している。そのうち、8例が多剤耐性結核であった。2006年に多剤耐性結核外来を開設して以来、360例の多剤耐性結核患者がすでに治療を受けており、そのうち57例が治療を完遂した。再治療例の耐性獲得には、社会的な要因、細菌学的要因のみならず、宿主側要因が疑われるため、これらを明らかにするための、共同研究のプロトコール作成を行った。すなわち、一回培養陰性の時点で、登録を行い、後ろ向きに背景となる臨床疫学情報を、前向きに予後を検討し、薬剤代謝酵素、免疫応答関連遺伝子についてその特徴的な遺伝子変異と遺伝子頻度、遺伝子発現を検出する。
- (11) 北京の74のSM耐性株のうち15例がKM, AMK耐性を示した。いずれも、MICは、100Mg/ml以上であり高度耐性を示した。15株、いずれも、rrs突然変異が見つかり、そのうち2株は、rrs,rpsL突然変異が認められた。
- (12) 検査した50株のうち1株は着色菌が混在していたことから除外した。BACTEC 460 TBでINH耐性菌の中で23株(46.9%)は小川比率法による検査で感受性、26株は耐性であった。2検査法で不一致を示した株のMICは0.8µg/ml未満であり、シンガポールにも低レベルINH耐性菌が存在することが分かった。低レベルINH耐性菌について他の薬剤に対する感受性を調べたところ、ストレプトマイシン(SM)耐性が3株、エタンブトール(EB)耐性が1株、エチオナミド(ETH)耐性が14株みられ、リファンピシン(RFP)、カナマイシン(KM)、エンビオマイシン(EVM)、パラアミノサリチル酸(PAS)、サイクロセリン(CS)、フルオロキノロン(FQ)耐性菌はみられなかった。低レベルINH耐性菌23株の中で16株はINH耐性

に關する *katG* 遺伝子または *inhA* 遺伝子に変異をもつことが分かり、BACTEC 460 TBの信頼性が確認できた。遺伝子変異のみられた16株の中で9株は低レベル耐性に関与することが知られている *inhA* のプロモーター部分に変異がみられた。一方高レベル耐性に関与することが報告されている *katG* 遺伝子のコドン315の変異が6株に認められた。このことは、シンガポール分離株の *katG* コドン315の変異は必ずしも高レベル耐性に関与していないことを示している。

III. 新規結核ワクチン・治療・診断

(13) 新しい結核予防ワクチンの開発 (図13)

(a)HVJ-liposome/Hsp65 DNA+IL-12 DNAワクチン、(b)リコンビナント72f BCG (r72f BCG) ワクチン、の世界で最先端のワクチン2種を開発した。

さらに、WHOより2004年2月からWHO STOP TB Partnershipに選出され、さらに、岡田は2004年WHO STOP TB Vaccine MeetingメンバーにWHOより選出され、発表し、世界の最先端かつ臨床応用すべき4つのワクチンの一つに選ばれる光栄を得た。さらに、2009年よりWHOのWGNG Working Group of New Drugsのメンバーに選ばれた。(表15)

- 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14) 結核菌由来のHeat Shock Protein (Hsp65) DNAを用いた。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東京ワクチンでブラッキングした後、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 新規HVJ-エンベロープ・パウダーを用いた、より強力な結核ワクチンの開発
HVJ-エンベロープ・ベクターをさらに改良してHVJ-エンベロープ・パウダーベクターを開

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

- ③ 世界に先駆けて、結核治療ワクチンHVJ/Hsp65 DNA+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の減少をコントロール群、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。

- ④ 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。
- ⑤ 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。(図15, 16, 17) 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。さらに、結核菌H37Rvエアゾル感染吸入系を用いて、結核菌を感染させた後HSP65DNA+IL-12DNAワクチン治療投与を行った結果、マウスの肺・肝・脾の結核菌数の減少効果を得た。すなわち、結核菌エアゾル感染でもこのワクチンは治療効果を示した。

(14) カニクイザルを用いた結核予防ワクチン効果<実験III>

1. すでにこのワクチン3回投与でカニクイザルの系で効果を得た。したがって強力なプライムブースター法を用いたBCGプライム-HVJ-liposome/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチン法を用いた、カニクイザルにおける新しい結核ワクチン予防効果:

G1群 BCG東京プライム Hsp65+IL-12 DNAブースター (2回)

G2群 Hsp65+IL-12DNAプライム (2回) BCGブースター (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。

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18, 19)

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。

2. 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。

3. 治療ワクチン効果: カニクイザルを用いた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。<実験V> (図20, 21)

G1群 結核菌をサルに気道内注入 5×10^8 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週間に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 生食投与群

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。

(表16) (図22, 23) すなわちG1群(ワクチン投与群)はコントロール群(G2)に比較して体重増加の頭数が多く、生存率も120日(結核菌経気道感染後)以内では全例5頭中5頭(100%)生存した。一方コントロール群(G2)は生存率は5頭中3頭(60%)であった。

すなわち、このワクチン治療により生存率の改善が認められた。(表16) (図23) また、ワクチン投与群ではカニクイザル末梢血リンパ球のHSP65抗原に対する増殖反応(H- サイミジンuptake)が増強した。(図22) 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。

4. 長期間のプライムブースター期間を入れて、ワクチン予防投与したカニクイザルの実験<実験VI>:

ヒトにおいては乳幼児(プライム)から成人(ブースター)・中学生(ブースター)までの期間が10~15年と仮定すると、長期のプライムブースター期間となる。したがってカニクイザルの系においてもヒトの臨床応用を考えてできる限り長い期間プライムとブースターの間の期間をとった。本実験では4ヶ月の期間をあげた。(表19)

プライム 4ヶ月 ブースト(1か月) ブースト)

G1群 BCG	HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNA (DNAワクチン)
---------	--

G2群 DNAワクチン	BCG
-------------	-----

G3群 DNAワクチン	DNAワクチン
-------------	---------

G4群 BCG	(-)
---------	-----

G5群 (-)	(-)
---------	-----

各群5頭の実験を行った。実験途中である

がこの実験においてもBCGプライムDNAワクチンが良さそうである。

- (15) 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。(図15)
- 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。(表18, 19) 国立病院機構政策医療呼吸器ネットワークを活用して治療ワクチンの臨床応用を計画している。(表20)
- (16) 新しい多剤耐性・難治性結核予後診断法の開発及び15K Granulysinを用いた新結核ワクチン
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から分泌される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。(図24, 25)
 2. 15K granulysin Ig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発現の著明な低下を明らかにした。
 - (2) 抗結核キラーT細胞から産出されるgranulysin [15kdのgranulysin (15K Gra)] がM ϕ 内結核菌殺傷に極めて重要な役割を果たしている発見をした。
 - (3) 15K Gra DNAワクチンは結核予防効果を示した。
 - (4) 多剤耐性結核患者キラーT細胞のGra蛋白発現の著明な低下を認めた。すなわち新しい結核予後診断法を確立した。

- (5) 15K Gra transgenicマウス、9K Gra transgenicマウスを初めて作製し、世界に先駆けて15K Graの生体内抗結核作用を明らかにした。すなわち15K Granulysin DNA, 9K Granulysin DNA及び分泌シグナルDNAを9K Granulysin DNAに付加して作製した。分泌型9K granulysin DNAをCAGプロ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。
- (8) 15K GranulysinのキラーT細胞分化作用と結核治療ワクチン効果(図26, 27, 28)
 - (a) DBA/1マウスまたはBALB/cマウスにヒト型結核菌H37Rvをエアゾル感染(1000CFU/マウス)させたあと、リコンビナント15K Granulysinタンパク μ g/マウスを6回投与して治療効果を解析した。その結果、コントロール群と有意差(p<0.05)をもって、肺臓、肝臓、脾臓の結核菌数(CFU)をリコンビナント15K Granulysinタンパクの治療群は減少させた。すなわち、15K Granulysinタンパクは結核治療効果を発揮することを初めて明らかにした。
 - (b) C57BL/6マウスにH37Rv結核菌を投与した後、15K Granulysin DNAを投与した群においては、Granulysinに対する強力な抗体産生が血清中に認められることを明らかにした。さらにGranulysin DNAで治療後4~8週後のマウスにおいて、肺臓・肝臓・脾臓中の結核菌数が非投与群に比較して著明に減少した。
 - (c) リコンビナント15K Granulysinをin vitroのマウス・キラーT細胞誘導系に添加し、15K GranulysinタンパクはキラーT細胞の分化を誘導することを明らかにした。さらに、in vitroのヒト・キラーT前駆細胞からエフェクター・キラーT細胞への分化にも15K GranulysinタンパクはキラーT分化因子とした作用することを明らかにした。また、15K GranulysinはIL-6やIL-2と相乗効果的にキラーT細胞の分化を誘導した。すなわち、Granulysinは結核菌を直接殺傷する効果以外に、キラーTの分化誘導を介して抗結核作用を発揮することが示された。
- (17) ① 実験動物による前臨床試験データ取得前臨床試験として一般毒性試験データの取得を

中心に研究開発を行った。動物種としては、げっ歯類(ラット)と非げっ歯類(カンクイザル)を選択して、安全性に関するデータを取得した。先ず、GLP試験施設で、単回投与、2週間反復(間歇)投与の予備試験を実施し、本試験用の用量設定根拠となる試験データを取得した。このデータに従って、GLP施設での本試験を実施した。それらの試験には、サテライト群としてTK試験、抗体産生試験、小核試験、安全性薬理試験(FOB)などの試験の組み込みも行って、平行して関連する安全性試験のデータ取得を行った。その結果、単回投与試験においては動物の死亡は認められず、概略致死量は、予測される臨床投与量に対して乖離幅があることが明らかとなった。また、薬効メカニズムについては、自然免疫、獲得免疫、制御性T細胞の機能抑制など、複合的な薬効メカニズムが明らかとなった。

② 治験薬GMP製造技術の確立

ワクチン製造技術の確立として、臨床応用の申請に必要な治験薬GMP製造のデータを取得するために、HVJ-E原薬に関して暫定規格を設定した。そして、予測される製造スケールで、HVJ-E原薬を10バッチ以上製造して、規格設定のための製造基礎データを取得した。その結果、初期の段階で設定した暫定規格の数値をより精度の高い数値へ修正する事ができた。また、凍結乾燥後のHVJ-Eについても暫定規格の設定を行った上で製造を行った。現在、凍結乾燥後の暫定規格についても製造データの取得を進めており、今後取得したデータを参考に必要があれば、より精度の高い暫定規格の数値を設定する予定である。

また、品質管理試験については、現段階で必要な検定法について試験バリデーションを実施して、操作手順書の整備を行った。更に、製造用機器、品質管理試験用の機器に関しても、治験薬GMP製造に向けた標準操作手順書の整備を進めた。

これらの取得したデータに基づいて、安定性試験のデータ取得も開始した。凍結乾燥HVJ-Eに対して、加速条件、苛酷条件の保存条件を設定し、保存安定性の傾向に関する基礎データを取得するために、短期間の安定性予備試験をデザインしてデータの取得を行い、保存安定性に関する傾向を明らかにした。

- (18) 結核菌の経気道的感染により肺で誘導される遺伝子として、secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)を同定した。SLPIは、結核感

染により肺でmRNAの発現が2日目をピークに上昇した。気道上皮では、通常時でもSLPIタンパク質が検出され、結核感染により気道腔内に分泌された。Recombinant SLPIタンパク質は、*in vitro*での結核菌の増殖を容量依存性に抑制した。増殖抑制の分子機構を次に解析した。蛍光ラベルしたSLPIは結核菌と会合した。また、走査型電子顕微鏡を用いた解析により、SLPIとともに3時間培養したBCGの細胞膜には、多数の瘤が観察され、12時間培養すると、ほとんどの結核菌の細胞膜は破壊されていた。NP Nを用いた細胞膜透過性の測定により、SLPIが結核菌の細胞膜の透過性を亢進させることが明らかになった。このように、SLPIは結核菌の細胞膜の透過性を亢進させることにより殺菌効果を示すことが明らかになった。次に、SLPIのどの領域が結核菌細胞膜の透過性亢進に必要な種々の変異タンパク質を用いて解析した。SLPIは2つのwhey acidic protein (WAP)ドメインを有している。N末側、C末側の各WAPドメインがそれぞれ、結核菌の細胞膜透過性を亢進させた。さらに、WAPドメインのどの部位が重要かを解析した結果、WAPドメインに陽性電荷を有するアミノ酸が必須であることが明らかになった。さらに、SLPIの個体レベルでの結核感染防御における役割を、SLPIノックアウトマウスを用いて解析した。SLPIノックアウトマウスが結核菌の気道感染によりすべてが2ヶ月以内に死亡したことから、SLPIが個体レベルでも結核感染防御に重要であることが明らかになった。

- (19) われわれは二つの結核療養所を舞台とした、MDRTBの院内集団感染事例を報告した。特に全剤感受性結核治療中にMDRTBが重感染した2症例の報告はわが国結核行政にも大きな影響を与えた。分子疫学的検討で、MDRTBの感染様式が、感受性結核菌と同等である事を発見した。以上の結果から、MDRTBの中に感染力の強い菌株が存在する事、MDRTBの院内感染対策が重要であると判明した。そこで喀痰塗抹陽性の結核患者のRFP感受性をrpoBの変異から迅速に判定する方法を実行した。3ヶ月間で107検体に応用し、7件でrpoBの変異を発見。速やかに患者の隔離に成功。7件中6件は後に薬剤感受性検査で多剤耐性が確定した。病院内で多剤耐性結核が感染しない体制の構築が可能となった。

- (20) 331例中、ジェノスカラーRifTBにてRFP感受

性パターンと判定されたのが316例であり、うち培養陽性で従来法による感受性検査を行えたのが308例であった。うち1例はMGIT法でRFP感受性、小川比率法でRFP耐性と判定されたが、他の307例はRFP感受性と判定された。また、ジェノスカラー-RifTBでRFP耐性パターンと判定されたのが15例であり、すべて培養陽性であり、1例は従来法でRFP感受性であったが他の14例はすべてRFP耐性であった。この14例中11例はイソニアジド (INH) にも耐性であり多剤耐性結核と判定された。従来法によるRFP耐性をgold standardとすると、ジェノスカラー-RifTBの感度は93.3%、特異度は99.7%であった。

- (21) ヒトマクロファージ (Mφ) のHIV感受性を抵抗性に変換することで、HIV増殖を抑制するエリスロマイシン誘導体EM201, EM703は、ヒトMφの結核菌感受性を抵抗性に変換できず、結核菌の増殖を抑制できなかった。

IV. 先進国の外国人結核

- (22) ロンドンにおいては外国人の患者が75%を占めていた。また、年齢構成では15-44歳の割合は1998年50%から2006年には62%に増加していた。ロンドンの患者数は最近10年間に倍増していた。ロンドンは多様な文化的、人種的な

人々で構成されており、使われている言語は300以上である。ロンドンの人口は720万人であるが、住民の52%は過密な住環境の中で生活している。ロンドンの人口の3分の1はマイノリティの人種で占められている。ロンドンは、31のBoroughと2つのCity、あわせて33の基礎的自治体から構成されている。しかし、現在保健医療サービスは国のシステムによって提供されている。結核患者に対する医療サービスは結核診療所(TB Clinic)によって提供されている。ロンドンはNorth Central (NC), North East (NE), North West (NW), South East (SE), South West (SW)の5つの地域に分けて結核対策が進められていた。地域により結核患者の抱えている問題がことなるが、前線の看護職の専門性を高めることで対応していた。

北部イングランドの結核対策：ブラッドフォード、リーズの周辺にはイングランドの中でインド系、バングラディッシュ系の移民が多く分布している。結核患者の多くもこれらの人々から発生してきている。これらに対応する保健医療職員はPCTに所属し、その感染症の制御はHPAに配置されている感染症専門医が担当していた。この地域でも結核患者には専門看護師が中心となって対策を行っていた。

図13

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発表(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発見した。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-リボソーム/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。

図13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	治療	治療	計画中
結核治療ワクチン効果	有効	計画	有効	
多剤耐性結核(XDR-TB)治療効果	有効	計画	計画	
HVJ-リボソーム/Hsp65 DNA+IL-12 DNA	有効 (BCGの100倍)	有効	有効 100%生存	

表15

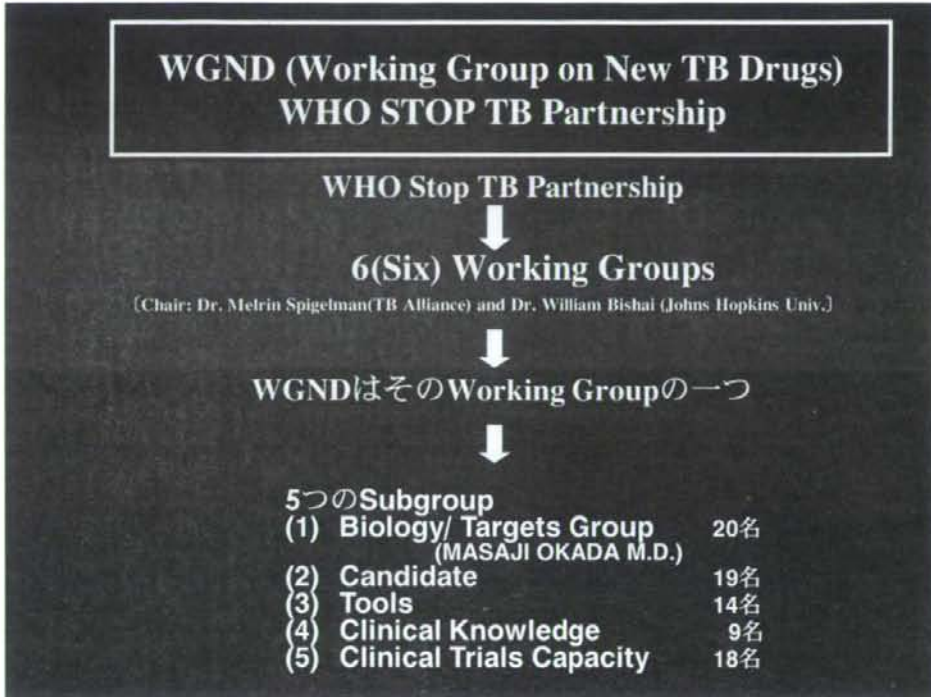


図14

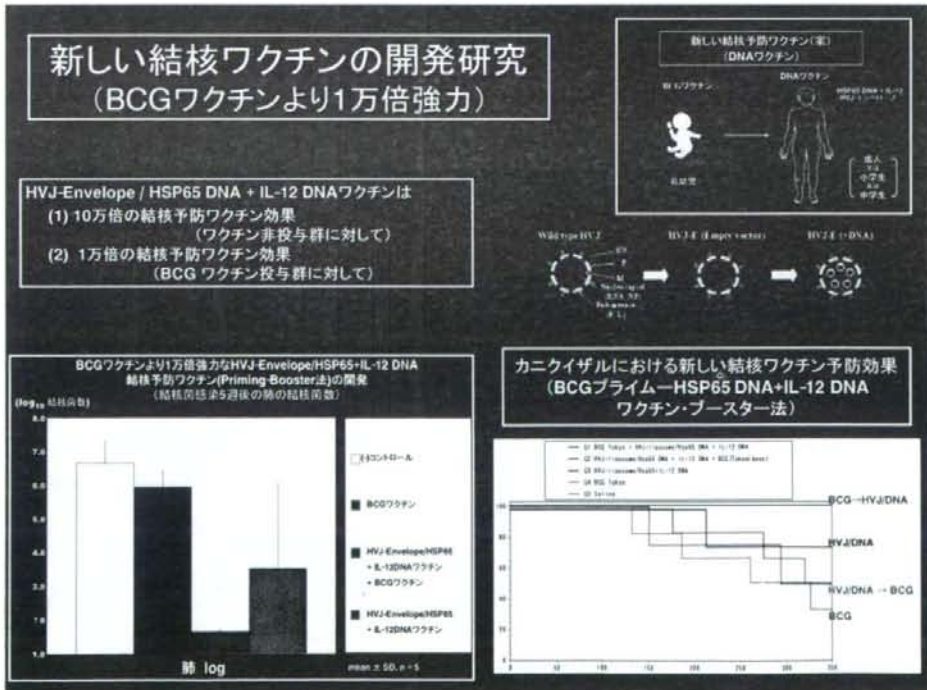


図15

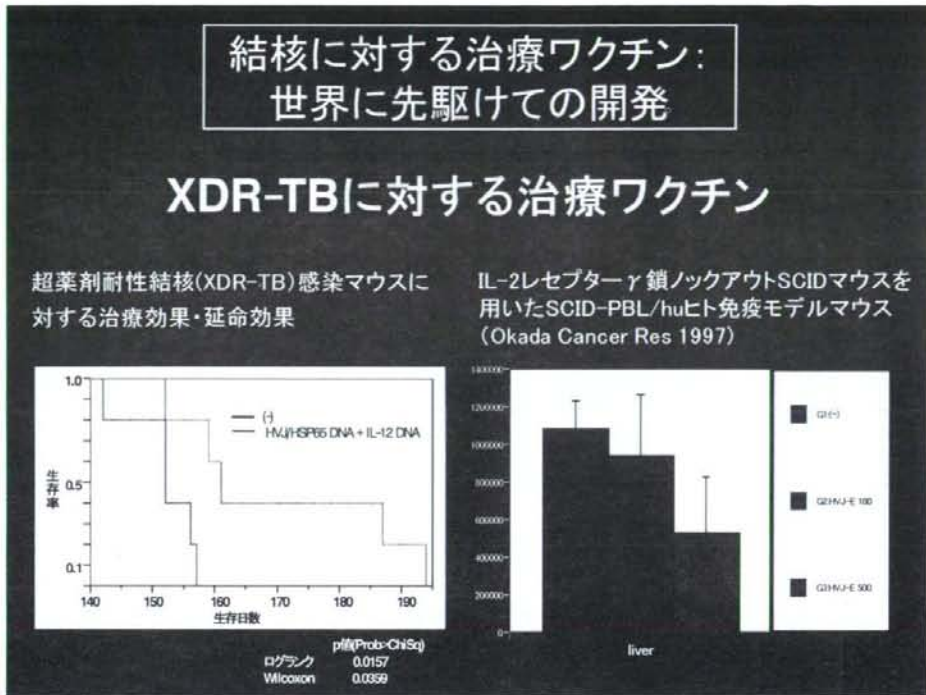


図16

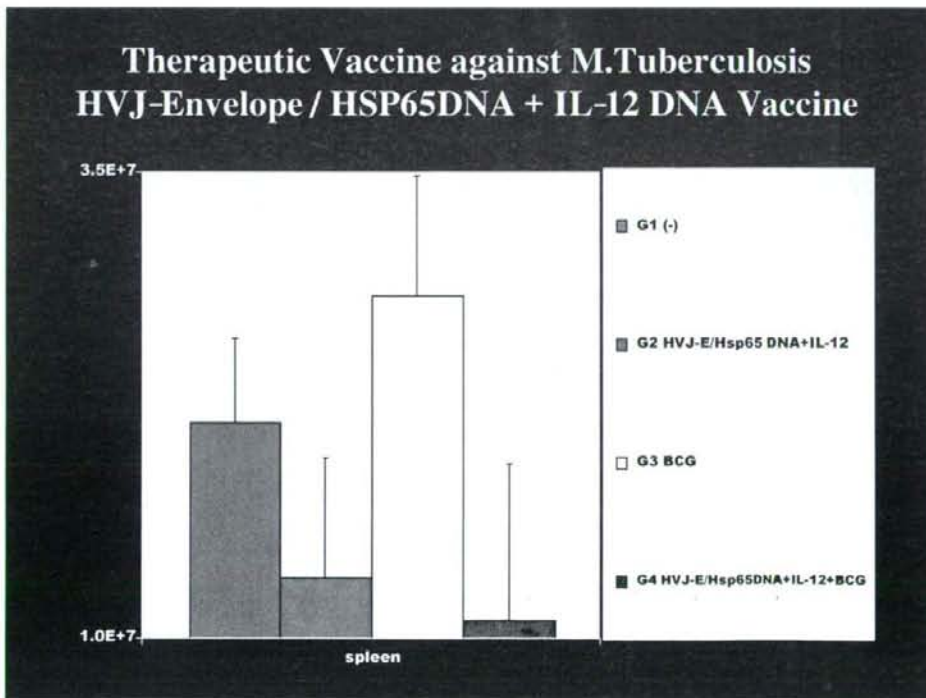
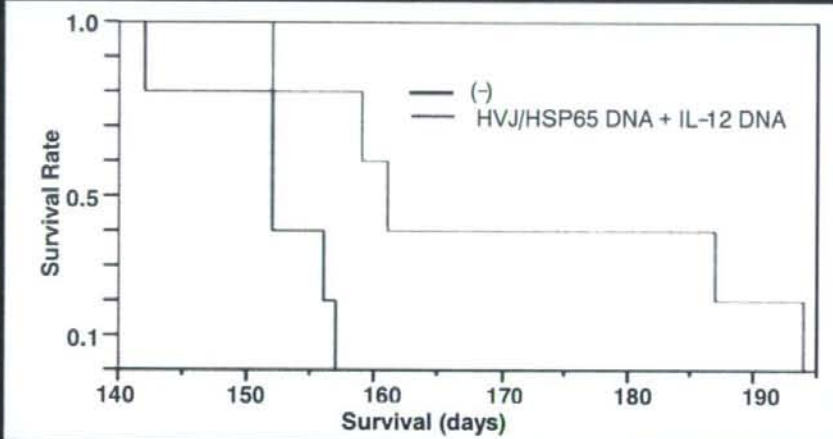


図 17

Therapeutic Effect of HVJ-Envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNA vaccine on Extremely Drug Resistant Tuberculosis (XDR-TB) -infected mice (Prolongation of Survival)



Log Rank 0.0157
Wilcoxon 0.0359

図 18

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

In Japan, BCG Tokyo vaccine (priming) is immunized in all infants.

Therefore, we need novel vaccines (booster vaccines) in adults

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

