

Treatment result	Drug susceptibility testing	IS6110-RFLP	Group of isolates
Success	SSSS/RRSS/RSSS	identical	Beijing
Default	SSRS/RRSR/RRRS	identical	Beijing
Default	SRSR/RRRR/NA	identical	Beijing
Failure	RRRS/RRRR	identical	Beijing
Failure	RRSR/RRSR/SRRR	identical	Beijing
Failure	RSSS/RRSR	identical	Heterogenous
Failure	RRSS/NA	identical	2-5 bands
Failure	RRRS/RRSS	non-identical	
Failure	RRSS/RRSS	identical	2-5 bands
Failure	RSRR/RRRR/NA	identical	Beijing

図3 HIV陰性再登録結核患者の治療経過、薬剤感受性、IS6110RFLPパターンの変化

- 1998 May** - New Pulmonary TB case, sputum AFB 2+, Start 2HRZE/4HR
All sensitive to INH, RFP, SM, EB
- 1998 July** - Sputum smear negative, HR
- 1998 Oct** - Sputum AFB negative, improved CXR considered "CURE"
- 1999 Mar** - Relapse, sputum AFB 2+, Start 2HRZES/HRZE/5HR
- 1999 Apr** - Sputum AFB negative
- 1999 Aug** - Stopped TB drug 1 month due to vomiting, headache, seizure
Dx. Toxoplasmosis, TB meningitis
- 1999 Sep** - Dead



図4 24歳HIV陽性結核再発例の結核菌RFLPパターンの変遷事例

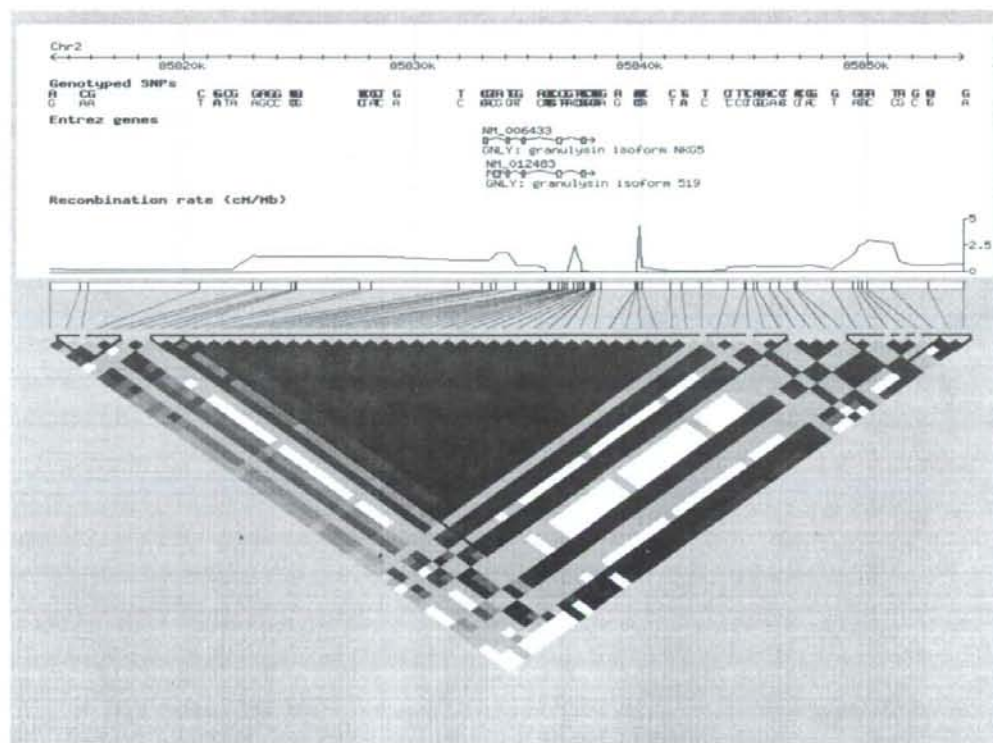


図5 人グランニューライシン遺伝子のマーカーになる一塩基多型 (tagSNP) 選定

表1 血漿中グランニューライシンとインターフェロン γ レベルの測定
(The optical density (OD) of granulysin and interferon γ among different groups.)

Group	No. of patient	Optical density of Granulysin 450/550nm				Optical density of IFN- γ 450/550nm			
		Mean	SD	Range	median	Mean	SD	Range	median
Normal	30	0.972	0.039	0.211 -1.868	1.099	0.003	0.002	0.000 -0.018	0.000
New	30	0.843	0.022	0.089 -3.718	0.587	0.346	0.027	0.005 -4.548	0.050
Relapse	30	1.529	0.048	0.198 -4.273	0.932	0.098	0.007	0.000 -0.435	0.074
Failure	29	1.623	0.071	0.411 -8.400	0.944	0.089	0.012	0.000 -2.035	0.041
Chronic	15	1.961	0.164	0.346 -11.10	1.108	0.030	0.178	0.000 -2.035	0.034
Total	134	1.386	0.069	0.251 -5.872	0.934	0.143	0.016	0.001 -1.490	0.040

D. 考察

結核菌の RFLP-IS6110 パターンは北京株 (Beijing family) が 52.7% と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% [Dhanida Rhienthong et al, 2005] に比して有意に高かった。多剤耐性結核菌の北京株は更に高く 66.7% であった。北京株はより病原性が高いという報告がされている点と関連して興味深いので、今後はチェンライにおける RFLP6110 パターンデータベースより新規結核患者の情報を得て、臨床情報を基に詳細な解析を進める。

日本の輸入感染症としての結核対策の為、これらの菌の薬剤耐性・DNA 指紋分析パターンの日本での結核例、特にタイ人を含む外国人発症事例との比較検討を日本のデータベースに取り込む事で可能である事が本年度判ったので、来年度以降実施する。タイで認められる耐性結核、難治性結核の菌が日本に伝播しているかどうか、その伝播の理由とルーツが検討される。タイで感染した後の内因性再燃であるのか、また日本で感染発病したのか、どこで耐性化が起きたのかを検討する。逆に少数であっても、日本人のタイからの輸入例がないか上記の過程で同定する。研究会議では、事例であっても同一の菌が日タイで見つかる (特にタイで特与とされているノンタブリ株) と重要でとのコメントが出された。

耐性結核の制御の為に、前向きのコホートが設定され、詳細な臨床経過の解析と共に岡田班長と協調した免疫制御システムの検討に進む。

岡田班長は CD8 陽性キラー T で *in vitro* で発見した現象 (TB 患者や MDR-TB 患者ではキラー T リンパ球内のグラニューライシンや *in vitro* 培養上清中 (Gra) が低下) と矛盾しない、慎重な考察が必要である。可能性の 1 つは 15k granulysin と 9k granulysin の分泌量の差とも思われる。結核の活動性が高い時は血漿中グラニューライシンが低下し、治療や薬剤投与で上昇等、TB の stage や薬剤投与の影響について報告がある。患者の stage や治療を詳細に解析する前向きコホート研究が重要現在、前向きコホートでは PPD-tuberculin と 結核死菌で Stimulation して培養した検体を保存しているが、それを活用して検討を進める。

岡田班長の志向する「免疫賦活療法」の研究開発には、研究開発のボランティアの対象となる難治性結核患者で、指標となる免疫マーカーが変化しているかどうか突き止めて、次に免疫賦活療法がそれを指標として活用できるか検討するステップが必要と指摘された。今後は、今回測定した免疫マーカーがその様な意義に活用できるか検討を進めたい。

検体は保存されており、現在進行しているグラニューライシンとインターフェロン γ の遺伝子多型と分泌量の相関研究をサンプル数を増加させて実施すると共に、より免疫学的な機能解析 (Functional Genetics) な研究が期待される。将来は、菌体と人検体の同時保存により、2 者の相互作用 (Host-pathogen interaction) を研究できる検体バ

ンクに進化させたい。

本岡田班は、前回と継続してアジア地域との研究ネットワーク活用による研究開発を志向しており、現地での研究基盤が欠かせない。タイ国では、BCG は東京株を使用しており、また BCG レコンビナントにて HIV ワクチンを開発してきた事より、結核ワクチンの開発に関して興味を持っている。岡田班長はアジアにおける数少ない結核ワクチンの開発者であり、共同研究の意義は深い。

E. 結論

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、コホート研究を継続している。今回、輸入感染症としての側面を検討するため、結核菌側の DNA 解析を進めた。今後、日本の結核菌の DNA 解析データベースとの比較検討を進めたい。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし

2. 学会発表

1. 野内英樹、慶長直人、山田紀男、石川信克 海外フィールドでの結核の遺伝疫学研究 第 83 回日本結核病学会総会(要演課題 発病に関係する宿主、菌の要因)、東京、2008 年 4 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
該当なし

結核菌に対するアネルギーの制御 T 細胞の関与 ハルビンにおける非結核性抗酸菌症の同定

分担研究者 服部俊夫 東北大学大学院感染症呼吸器病態学分野 教授

研究要旨

PPD-でありながら結核菌特異的高原に対して陽性反応を示すアネルギーに、CD4+CD25+ T 細胞がサイトカインの産生を制御することで関与していることを示した。ハルビン医科大学との共同研究を継続し、結核症と診断された患者の中に非定形抗酸菌に感染している患者が存在することを、4種類のプライマーを用いたPCRにより明らかにした。

A. 研究目的

世界の三分の一のヒトが結核菌感染者といわれる。そしてその診断には PPD がいまでも汎用されている。しかし、結核患者や結核菌感染者にも PPD に陰性反応を示す場合がある。結核患者の 15% はアネルギーであるともいわれる。アネルギーの免疫学的特徴は抗原特異的な T 細胞の IL-2 産生不全である。そこでムンプスや、カンジダなどの抗原をコントロールとして用いる方法が以前から使われた。しかし技術的な困難な点より現在ではこのような方法はとられていない。CD4+CD25+ T 細胞は制御 T 細胞としてしられ、CD4 細胞の 10% を占め、免疫系の統御に重要な役割をしている。ここでは、結核菌特異的な抗原を用いて、ヒト末梢血リンパを刺激してサイトカイン産生を測定することより、このようなアネルギー状態に CD4+CD25+ 制御 T 細胞 (Treg) が関与しているかを検索した。

またわが国と人的物的交流の盛んな中国における多剤耐性結核の流行状況は十分に明らかになっていない。中国東北部における多剤耐性結核の薬剤耐性遺伝子同定を行うことで、これらの結核がわが国に侵入してきた際の迅速な対応に資する。

B. 研究方法

1) 結核菌由来の、early secretory protein-6(ESAT-6)と culture filtrate protein 10(CFP-10)は H37RV 遺伝子の RD-1 領域に存在し、BCG や殆どの非結核性抗酸菌感染者は保有していない。これらの抗原は、結核菌に特異的な免疫応答の指標として期待できる。抗結核免疫応答を、結核菌に暴露されている医療関係者で PPD 陰性者と陽性者で比較検討した。健康な医療従事者で以前に BCG を受けている PPD 陽性者 (PPD+, 27 才男性)と PPD 陰性者 (PPD-, 42 歳 男性)を検索した。それぞれ 20ml の EDTA 採血全血より Ficoll-Paque により PBMC を分離した。Phosphate Buffered Saline (PBS) で洗浄後 10%FCS 含有 RPMI1640 メヂウムで、浮遊させた。

細胞はその後 MACS 分離バッファーに浮遊させた

のちに、100 ul FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec) を添加し、15 分間 反応させたのちに、CD25-Biotin 抗体を添加し、15 分後にさらにバッファーで洗浄した。さらに抗ビオチン抗体ビーズを加え MACS-assisted cell sorting で CD25 抗原陽性細胞を deplete させた。処理した細胞のマーカーは streptavidin-allophycocyanin と anti-CD4 FITC 抗体で二重染色を行った。

CD4+CD25+ 細胞を除去した群と非除去群のそれぞれを purified protein derivative (PPD), phytohemagglutinin (PHA) (Sigma, USA), recombinant CFP-10 (Proteix, Czech republic) 及び recombinant ESAT-6 protein (Proteix, Czech) と培養し、培養上清の IFN-gamma を human IFN-gamma Opt ELISA Set (BD Bioscience) で測定した。

C. 結果

FACS 解析

FACSCalibur (Becton Dickinson)を用いて解析した。それから推測すると PPD 陰性者の CD4+CD25+ 細胞の 80% 及び、PPD 陽性者の CD4+CD25+ 細胞の 91% が除去された。(図 1)

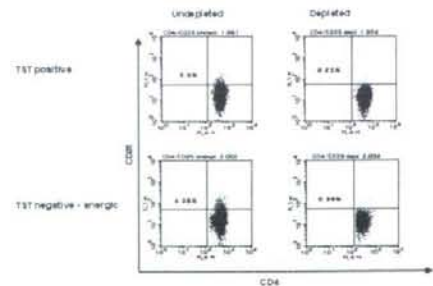


Figure 1: CD4+CD25+ depletion

未刺激状態

CD4+CD25+ T 細胞除去が及ぼす自発的 IFN-gamma 産生能刺激なしでは、非除去群では IFN-gamma の値は PPD+, PPD-ともにほとんど検出されなかった。しか PPD+ の CD4+CD25+ T 細胞除去群では IFN-gamma 産生は $95,506 \pm 47,622$ pg/ml (37 倍)そして PPD-では 410 倍に上昇した。(図 2)

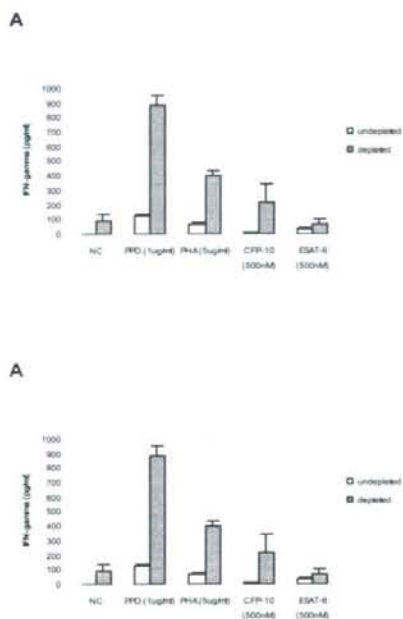


Figure 2: IFN-gamma production by (A) TST positive and (B) TST negative person.

PPD 刺激

CD4+CD25+ T 細胞非除去群では PPD+ では PPD 刺激による IFN-gamma 産生は $121,424 \pm 21,248$ pg/mlであったが PPD-では $14,598 \pm 1,962$ しか誘導されなかった。除去群では PPD+, - 両方ともに IFN-gamma 産生がみられた。しかしその倍率は PPD+ で 7.4 倍であったが PPD- では 39 倍ほどの上昇がみられた。

PHA 刺激

PHA 刺激では PPD+, -ともに非除去群では産生がみられた。除去群の上昇率は PPD+ で 5 倍、PPD-で 1.3 倍であった。

CFP-10 刺激

CFP-10 刺激では PPD+ では IFN-gamma 値は $7,023 \pm 0,689$ pg/ml で PPD-では $16,168 \pm 2,983$ pg/mlであった。PPD+ の CD4+CD25+ T 細胞除去では IFN-gamma 産生は 30.4 倍に、PPD-では 40.6 倍に上昇した。

ESAT-6 刺激

ESAT-6 刺激では PPD+ の IFN-gamma 産生は $38,07 \pm 12,413$ pg/ml. PPD-では $228,843 \pm 17,303$ pg/mlであった。CD4+CD25+ T 細胞除去の上昇率は PPD+ では 1.8 倍であったが、PPD-では 2.6 倍であった。

D. 考察

症例数は少ないがその末梢血リンパ球を解析することにより見掛け上 PPD 陰性者にも結核菌特異的抗原にたいしては陽性者がいることを明らかにした。この個体は医療従事者であり、結核患者の診療にあたった経験があるのにもかかわらず、PPD は以前より陰性であった。この PPD-の末梢血リンパ球の CD4+CD25+ T 細胞を除去するとサイトカイン産生が PPD+ の末梢血より増加した。これらのことは CD4+CD25+ T 細胞が見掛け上のアレルギーの原因となっていることを示唆している。しかしながらこの末梢血は CD4+CD25+ を除去しなくても esat-6 による IFN-gamma の産生を生じている。確かに当該細胞を除去すると産生はより高まるが、このことは PPD 陰性とは矛盾しているので、anergy が結核菌特異的抗原ではおこりにくいことを意味しているかもしれない。

E. 結論

結核菌に対するアレルギーに CD4+CD25+ T 細胞が関与していることを実験的に示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Min Zhuang, Hong Jiang, Yasuhiro Suzuki, Xiaoguang Li, Peng Xiao, Takashi Tanaka, Hong Ling, Baofeng Yang, Hiroki Saitoh, Lianfeng Zhang, Chuan Qin, Kazuo Sugamura, Toshio Hattori, Procyanidins and butanol extract of Cinnamomi Cortex inhibit SARS-CoV infection. Antiviral Research, in press.
- Theo, A. Masebe, Y. Suzuki, H. Kikuchi, S. Wada, C. L. Obi, P. O. Bessong, M. Usuzawa, Y. Oshima, T. Hattori, *Peltophorum africanum*, a

- traditional South African medicinal plant that contains an anti HIV-1 constituent, betulinic acid, The Tohoku Journal of Experimental Medicine, In press.
3. Jing Zhang; Osamu Yamada; Kenji Kawagishi; Hiromasa Araki; Shoji Yamaoka; Toshio Hattori; Kunitada Shimotohno. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax modulates interferon-alpha signal transduction through competitive usage of the coactivator CBP/p300. *Virology*, 379(2), 306-313, 2008.
 4. Peng Xiao, Osamu Usami, Yasuhiro Suzuki, Hong Ling, Nobuaki Shimizu, Hiroo Hoshino, Min Zhuang, Yugo Ashino, Hongxi Gu and Toshio Hattori. Characterization of a CD4-independent clinical HIV-1 that can efficiently infect human hepatocytes through CXCR4. *AIDS*, 22, 1749-1757, 2008.
 5. Masako Mizusawa, Mizuho Kawamura, Mikio Takamori, Tetsuya Kashiyama, Akira Fujita, Motoki Usuzawa, Hiroki Saitoh, Yugo Ashino, Ikuya Yano and Toshio Hattori. Increased synthesis of anti-TBGL IgG and IgA with cavity formation in pulmonary tuberculosis. *Clinical Vaccine and Immunology*, 15(3), 544-8, 2008.
 6. M. Usuzawa, Haorile Chagan Y, J. Imamura, J. Pyanoot, P. Warunya, P. Medina, C. S. Demetria, M. E. Miranda, Y. Suzuki, H. Oshitani, T. Hattori. Anti rabies antibodies in Japanese volunteers immunized with imported vaccine. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 39(suppl1), 68-71, 2008.
2. 学会発表
1. Y Ashino, Chagan H-Y, T. Hattori. A case report of HIV and HBV coinfection administered entecavir without ART(antiretroviral therapy), 7th Japan-China International Conference of Virology, 2008.6.2, Tokyo.
 2. Haorile Y Chagan, 齋藤弘樹, 芦野有悟, Shenwei Li, 有川智博, 平島光臣, 白澤基紀, 服部俊夫. HIV感染者の治療と血漿中のOPNの変動の関連 第8回オステオポンチン研究会, 2008.9.27. 札幌.
- その他経過報告
 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 mycobacterium (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。(文末表1)
 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1 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.

研究要旨

外国生まれの結核患者の割合が高く、高まん延国からの人々による輸入感染症としての結核問題が大きな課題となっている英国における結核対策の現状を調査し、わが国の結核対策に必要な内容を明らかとすることを目的とした。英国の首都ロンドン、北部イングランドのブラッドフォード、リーズにおいて、輸入感染症としての結核対策として行われている対策について調査を行った。英国では2003年から感染症対策の新しい全国組織Health Protection Agencyがつくられていた。近年、入国前、入国時に移民に対し健診に力を入れてきていたが費用が高く、健診のカバー率が低いなどの問題がありこの戦略は見直しされている途中であった。今後の対策として、一つは入国後の移民の人々に対するプライマリーケアの中の結核問題の対応力を高めることが最も重要と考えていた。次いで高まん延国の結核対策を支援し、結核罹患率を低下させることが根本的な結核対策であると考えた戦略へ移行しようとしていた。わが国も低まん延国に仲間入りしつつあるが今後同様の課題に対応していく必要がある。

A. 研究目的

欧米の低まん延国においては外国生まれの結核患者の割合が近年増加してきている。わが国の外国人の結核患者の割合は1998年から2006年の間に2.1%から3.8%に増加してきている。しかし、年代別には20歳代の患者の20%以上を占めている。外国人労働者数は1998年の19万人から2006年の39万人へと増加している。わが国は少子化のために将来は外国人労働者に依存しなければならぬと考えられている。このことから、欧米の低まん延国が直面している輸入感染症としての結核対策の内容はわが国の対策の参考となるものと思われる。英国は、世界で最も外国人の結核患者の問題の対応に直面している国であることから、今回訪問し調査することとした。その調査に基づきわが国の結核対策について検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

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

1. 欧米諸国の外国人の結核患者割合

各国の結核患者に占める外国人の割合は、アメリカ57%、オランダ63%、イギリス64%、スウェーデン72%、オーストラリア85% (2006年) である。

2. 英国の公衆衛生制度

英国の保健医療サービスは一般財源 (税金) を使って提供されている。人頭報酬制度で提供されている。国民の保健医療サービスは全国で約300あるプライマリーケア・トラスト(PCTs)によって提供されている。

感染症対策の強化のために2003年4月に新しく全国組織の専門組織であるHealth Protection Agency(HPA)がつくられ、結核対策は地域においてはHPAの地方組織であるHealth Protection Unit(HPU)、NHSのPrimary Care Trust(PCT)、地方自治体(Local Authority)が連携して対策を行っていた。

3. 英国における結核対策組織

英国においては、専門的公衆衛生師Consultant of Communicable Disease Control(CCDC)を配置した専門組織としてHealth Protection Agency(HPA)が設立され結核対策の技術的な専門行政の中心となっていた。患者に対する保健医療サービスはNational Health Service(NHS)に属するPCTに属する保健医療職種が担っている。PCTの中に結核診療に対応する呼吸器疾患診療所が整備され、呼吸器専門医が配置され、結核患者に対する専門サービスを行う看護職Tuberculosis Special Nurseが配置されている。外国人が主に入国してくる玄関となっているロンドンのヒースロー国際空港において胸部レントゲン検査装置を設置し、結核健診を行うなどの水際対策が進められてきた。現在この方策の有効性評価が行われていた。この方策だけで輸入感染症としての

結核患者の侵入を防止することはできないとの結論となってきた。今後力を入れていかなければならない対策は入国した外国人をプライマリーケアの場において適切に管理できる保健医療体制の充実強化であるとの考えとなってきた。当然の対策であるが、どうするかは難しい課題であると思われる。

4. ロンドンの結核対策

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。

5. 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、パ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。

D. 考察

英国では結核患者の診断・治療は結核診療所(TB Clinic)で行われている。この診療所と連携して結核専門看護師(TB Specialist Nurse)が患者の支援を担っている。この地域活動を行っている専門看護師が英国における結核対策の特徴である。移民に対する保健サービスの要となっていた。英国の結核に係る保健医療システムが近年新しい専門組織であるHPAがつくって行われていることが特徴である。英国、およびロンドンの結核は増加傾向にあり、これに対するために英国政府は保健省(DOH)の首席医務監(Chief Medical Officer)に新たな結核対策の行動計画「Stopping Tuberculosis in England: An Action Plan」を作成させた。2004年10月に出されている。英国の結核対策はこの行動計画に沿って進められている。その結核戦略は10の重点行動計画から成り立っている。それは、「結核の積極的な啓発」、「行政当局の強い政策意志の確立」、「高水準で、質の

高いサーベイランスシステムの構築」、「最善の治療体制の整備」、「患者を中心にしたサービスの組織的な連携体制の確立」、「最高水準の検査体制の整備」、「地域レベルにおける効果的な結核対策の推進」、「専門職の確保」、「周辺領域の研究の推進」、「結核対策のための国際的な連携体制の構築」というものである。患者発見を含めた結核対策全体の強化が必要であると考えられているが、最後の英国の結核問題の解決の根本は国際的な連携の下で世界の結核問題を解決することとしている点はわが国も同様な課題を有していると考えられる。

E. 結論

英国の結核対策は移民の結核問題の解決を行うことなくしては解決できない状況となっていた。ロンドンの結核への対応は結核専門看護師をキーパーソンとし、人(看護職)が人(移民)に対してサービスを行うことを基本として対策がすすめられていた。移民の結核対策として入国時の結核健診を導入して進めてきたが、費用やカバー率に課題があり、これまでの戦略の見直しと立て直しをはじめられていた。入国後の移民に対するプライマリーケアの場で適切に対応できるようにすることが最も必要な対策であると認識されてきた。新しい感染診断、迅速診断技術の開発投資と世界の結核対策への投資が最も重要であると認識されていた。低蔓延状況となるとわが国の結核対策に対する関心が低下していくものと懸念される。英国における移民に対する結核対策をみると、わが国の保健所は次第に健診や診療の機能が低下しているが、英国でみられる移民に対応していくためには言語問題への対応、生活支援、健診の提供、医療機関受診の支援、治療支援を行っていくことが大切である。保健所には十分な設備やマンパワーが配置されているとは言えないことから、外国人労働者が増加していくことに対応していくには、保健所体制の立て直しと、結核患者に対する保健医療サービスの提供体制の整備が必要となる。英国のこの間の移民の結核問題に対応するために試行錯誤してきている経験は参考になることが多いと考えられた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 高島毛敏雄: 低まん延国における結核対策の保健医療組織—米国、英国、ドイツ。結核, 84(2), 94-96, 2009.
2. 高島毛敏雄: 英国における公衆衛生人現任教育の現状—Faculty of Public Healthプログラム, 公衆衛生, 73(3), 200-205, 2009

2. 学会発表

1. 財団法人結核予防会 第13回国際結核セミナー「ドイツにおける保健所を中心とした結核対策」
平成20年3月6日
2. 第83回日本結核病学会総会（東京） 「シンポジウムⅠ 低まん延に向けた結核対策のあり方」低まん延国における結核対策の保健医療組織 平成20年4月24日
3. 第101回日本結核病学会近畿地方会、第71回日本呼吸器学会近畿地方会教育講演「結核医療の展望」
平成20年7月5日
4. 第67回日本公衆衛生学会総会 一般演題示説
公衆衛生専門職の教育制度－英国の現状－
平成20年11月7日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許修得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

ベトナム多剤耐性結核の宿主要因に関する研究

分担研究者 慶長直人 国立国際医療センター研究所 部長

研究要旨

ベトナム南部随一の結核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との共同研究を計画し、多剤耐性結核の宿主要因を免疫遺伝学的手法により明らかにするための研究プロトコルを作成した。また、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）、耐性結核の宿主要因の候補遺伝子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、患者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。

A. 研究目的

我が国の外国人登録者数は、アジア人が全体の70%以上を占め、アジア人の結核対策が重要である。特に増加しているアジア人の多剤耐性結核の発症要因を明らかにすることは、アジアにおける結核対策への我が国の貢献および国内のアジア系就労者を介しての多剤耐性結核対策の両面に貢献するものと期待される。

我々は、これまでベトナム、タイにおいて、結核研究の拠点を形成してきた。多剤耐性結核に関しては、人為的要因や制度上の問題のみならず、その背景となる宿主側の免疫応答、薬剤代謝能などが関与していると推測される。そこで、ベトナム人多剤耐性結核の宿主要因を免疫遺伝学的手法により明らかにする。

B. 研究方法

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。

（倫理面への配慮）

実際の患者検体を用いたゲノム解析は、両国の指針（我が国では、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針）に準拠して、事前にプロトコルは、両国の倫理委員会の承認を得た上で実施する。

C. 研究成果

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。

D. 考察

ベトナムにおける薬剤耐性結核は、リファンピシンに対して、イソニアジドの耐性が多いことが特徴であり、これは、ベトナムで採用している結核治療方式が、維持期に、リファンピシンを含まない治療薬剤を組み合わせることに起因するものと考えられている（2SHRZ/6HE）。今回、ベトナム人多剤耐性結核について、カウンターパートとなるホーチミン市の病院が決まり、多剤耐性結核症例について、具体的な研究プロトコルを協議し、詳細にわたり検討することができた。多剤耐性菌に関しては、ベトナムでもその増加が懸念されており、深刻な問題としてとらえられており、このような研究に、積極的に取り組む姿勢のカウンターパートを得て、速やかに上記プロトコルを完成させ、倫理委員会の承認を得て、来年度、実施する予定である。

E. 結論

特に我が国の外国人登録者数は、アジア人が146万4,360人と全体の74.2%を占め、アジア人の結核対策が重要である。アジア人集団の多剤耐性結核発症に関する臨床疫学的情報、宿主側の発症要因をとらえ、アジアにおける結核対策へ反映させるよう提言するとともに、および国内のアジア系就労者を介しての多剤耐性結核対策に貢献したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mahasirimongkol S, Yanai H, Nishida N, Ridruechai C, Matsushita I, Ohashi J, Summanapan S, Yamada N, Moolphate S, Chuchotaworn C, Chaiprasert A, Manosuthi W, Kantipong P, Kanitwittaya S, Sura T, Khusmith S, Tokunaga K, Sawanpanyalert P, Keicho N. Genome-wide SNP-based linkage analysis of tuberculosis in Thais. *Genes Immun* 10 (1): 77-83, 2009.
2. Hoa BK, Hang NTL, Kashiwase K, Ohashi J, Lien LT, Horie T, Shojima J, Hijikata M, Sakurada S, Satake M, Tokunaga K, Sasazuki T, Keicho N. HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 alleles and haplotypes in the Kinh population in Vietnam. *Tissue Antigens* 71 (2): 127-34, 2008.
3. Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Kajiki A, Nagai H, Kurashima A, Oketani N, Hayakawa H, Takemura T, Nakata K, Ito H, Morita T, Matsushita I, Hijikata M, Sakurada S, Sasazuki T, Inoko H. Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection. *J Infect Dis*, in press.
4. Vollstedt S, Yuliwulandari R, Okamoto K, Lien LT, Keicho N, Rochani JT, Wikaningrum R, Tokunaga K. No evidence for association between the interferon regulatory factor 1 (IRF1) gene and clinical tuberculosis. *Tuberculosis* 89 (1): 71-6, 2009

輸入感染症としての多剤耐性結核の対策・制御に関する研究

分担研究者 櫻田紳策 国立国際医療センター研究所・呼吸器疾患研究部
細菌性呼吸器感染症研究室 室長

研究要旨

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学的に検討した。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。

A. 研究目的

HIV合併結核において、多剤耐性結核が、一般の結核に比較して高頻度に出現するかどうかについては議論が分かれている。HIV合併結核においては、様々な免疫機構の障害・異常が報告されているが、本研究は、感染マクロファージにおけるosteopontin(OPN)を中心としたTh1型免疫応答の誘導障害ならびにNK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞およびCD8陽性細胞と自然免疫から適応免疫に至るまで広範にエフェクター分子として機能している細胞障害性顆粒であるgranulysin, perforin, granzyme Bの産生・遊離について、タイ・チェンライで得られた患者末梢血試料を用いた解析を行い、同時に同一患者からの分離菌における薬剤耐性との関連性を検討することを目的としている。

B. 研究方法

平成19年度に先行研究にて採取された臨床試料を用いる。患者群は、①健常者、②結核患者、③HIV感染者HAART無し、④HIV感染者HAART有り、⑤HIV合併結核患者(HAART無し)の5郡とし、サンプル数として、血漿中のOPNならびに各種細胞障害性顆粒の測定は、それぞれ①26名、②24名、③11名、④18名、⑤6名で行った。また、in vitroで単球より分化したマクロファージによるOPNの測定に関しては、①11名、②10名、③8名、④12名、⑤3名で行った。血漿中および培養上清中のOPNおよび各種細胞障害性顆粒の濃度はELISAによって決定した。リンパ球サブセットを含む患者末梢単核球の表面マーカーの検索はフローサイトメーターによって行った。また、結核患者喀痰からの結核菌の培養は、卵培地とMiddlebrook 7H9 brothを含む液体培地を併用した。(倫理面への配慮)

ヒト臨床検体を用いた研究であるため各臨床検体の採取にあたって、インフォームド・コンセントを取得した。その他の倫理的配慮は、タイ公衆衛生保健省の定める指針に準拠した。本研究に関する試料採集に関しては、先行研究において平成18年12月に国立国際医療センター倫理委

員会にて、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ている。

C. 研究結果

1-1. 血漿中OPNレベルは、結核とHIV合併結核において有意(各 $P<0,001$)に上昇していた。HIV合併結核における最低値は健常者ならびにHIV感染者における最高値をいずれも上回っており、さらに結核の最高値に近い値であった。

1-2. 単球より、M-CSFおよびGM-CSFにより分化させたマクロファージ、M型マクロファージとGM型マクロファージにBCGを感染させて、培養上清中のOPNを測定した。血漿中のOPNレベルと異なり、HIV合併結核患者由来のM型およびGM型マクロファージにおけるOPNは健常者ならびにHAART有りのHIV感染者由来マクロファージにおけるOPNと比較して有意に低値であった($P<0,05$)。また、HIVに感染していない結核患者由来のマクロファージにおいても健常者と比較してOPNの産生は亢進しておらず($P>0,05$)、血漿中OPN値との乖離が観察された。

1-3. 健常者同様、結核患者、HIV感染者、HIV合併結核においてもM型マクロファージにおけるOPN産生はM-CSFに依存しており、何れの場合もBCG単独の場合よりもM-CSF存在下でBSGを感染させた場合のOPNレベルが高かった。

2-1. 細胞障害性顆粒に関しては、granulysin, perforin, granzyme Bの血漿中レベルを測定した。しかし、granzyme BはELISA kitに不具合があり、信頼性のあるデータを得ることが出来なかった。

2-2. 血漿中 granulysinレベルとNK細胞とT細胞サブセット数の相関を検討した。その結果、HIV感染者HAART有りの群でのみCD3陽性細胞数($P=0,028$, $r=0,517$)、iNKT細胞数($P=0,006$, $r=0,619$)、CD8陽性細胞数($P=0,002$, $r=0,675$)が血漿中granulysinレベルと正に相関した。一方、HIV感染者HAART無しの群では、負に相関していた($P=0,011$, $r=-0,727$)。

2-3. 血漿中perforinレベルは、HIV合併結核においてのみiNKT細胞数と正に相関していた ($P=0.011$, $r=0.912$)。またさらにHIV感染者HAART無し群では、CD8陽性細胞数と血漿中perforinレベルが正に相関していた ($P=0.05$, $r=0.600$)。

D. 考察

OPNは多様な細胞から産生されるリン酸化糖タンパクで、マクロファージは主要な産生細胞の一つである。OPNの機能は多様であるが、integrinやCD44と結合する性質を持ち、感染・炎症等に伴って比較的少量に細胞外に分泌される。OPNの機能として、食細胞の運動、食食に関係する。マクロファージにおいては、IL-10産生についてCD44を介して抑制していると考えられており、IL-23とIL-10を産生するM型マクロファージにおいては、Th1応答の誘導に関与している可能性が指摘できる。従って、HIV合併結核患者の単球から分化したマクロファージにおいて、OPN産生が低下していたことは、HIV結核において肉芽腫の形成に乏しく、播種性結核になる傾向が高いという病理ならびに臨床像を説明できる。血漿中OPN値との乖離については、OPNは上皮細胞や活性化Tリンパ球からも産生されることから、マクロファージ以外の細胞からの分泌増加が寄与している可能性が考えられる。HIV非感染結核患者においてすら、マクロファージ由来のOPNが有意に高値を示さなかったことは、感染初期に結核菌を封じ込める能力にOPNが関与している可能性を示唆していると思われる。

血漿中granulysinとperforinについては、さらに詳細な統計解析を必要としており、現段階では多くのことを言うことは出来ない。しかし、今までの解析結果から、granulysinに関しては、CD8陽性細胞が主要な産生細胞と考えられた。さらに、健常者およびHIV非感染結核患者では、CD8陽性細胞数との間に有意な相関は認められなかったのに対して、HIV感染者HAART有りの群において有意な正の相関が認められた。このことは、HAARTの効果の可能性があり、immuno-reconstitution syndromeにおけるgranulysinの役割について示唆される。一方、血漿中granulysinレベルは、CD4陽性細胞数と負の相関関係が認められた。このことはHIV感染において相対的にCD8陽性細胞が増加し、かつ活性化を受けている可能性を示唆しているものと思われる。perforinに関しては、HIV感染者HAART無しの群においてCD8陽性細胞数と正の相関が認められたが、その免疫学的意義については考察中である。また、granulysin、perforin双方に関してiNKT細胞数との間に比較的強い正の相関が認められたが、非常に少ない細胞集団であり、免疫系全体における役割がどの程度のものであるか今のところ判然としない。しかし、iNKT細胞はTh1応答誘導において舵取り的な機能を果たしているという報告があり、興味を持たれる。今回、iNKT細胞中のさらに下位のサブセットについては解析していない。現在、統計的解析を中心に、さらに解析を進め

ているが、今後分離結核菌の薬剤耐性情報、臨床経過や結核病変の広がり等の臨床情報にアクセスし、一例ずつ詳細な検討を行っていく必要があると思われる。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

試料採取からその処理、試料を使った各種測定、試料の保存等、本研究にけるすべてのステップがタイ国内において実施された。従って、HIV陽性者の血液試料に関しては、BSL1が適応される。結核菌の分離は、病院内のBSL2の施設にて実施された。薬剤耐性試験はバンコックのreference labにて実施された。

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし (論文執筆中)
2. 学会発表
 1. 「ヒト末梢血由来マクロファージにおけるosteopontin産生に対するBCG感染とcolony-stimulating factorの作用」 櫻田紳策、赤川清子、山崎利雄、慶長直人、第83回日本結核病学会総会(東京)、2008年
 2. 「ヒト単球由来マクロファージの分化とBCGならびに結核菌感染におけるosteopontin産生」 櫻田紳策、Chutharut Ridruechai、田中崇裕、赤川清子、山崎利雄、慶長直人、第19回日本生体防御学会総会(札幌)、2008年

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し
3. その他
該当無し

研究要旨

結核菌の感染により肺で遺伝子発現が誘導されるsecretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)の機能を解析した。マウスに結核菌の感染を感染させると、気道上皮細胞から気道腔内、肺胞腔内にSLPIが2日目をピークに分泌される。Recombinant 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作用を示し、in vitroでの結核菌の増殖を抑制した。SLPIは2つのwhey acidic protein (WAP)ドメインを有しているが、各WAPドメインが結核菌の増殖を抑制した。さらに、WAPドメイン内の陽性電荷を有するアミノ酸が増殖抑制に必須であることが明らかになった。SLPI欠損マウスは、結核菌の気道感染に対する感受性が高いことから、SLPIが生理的にも結核感染防御に関与していることが明らかになった。今後、SLPIを用いた多剤耐性結核菌などへの新規治療法の開発が期待される。

A. 研究目的

自然免疫系は、病原体の宿主内への侵入を最初に察知し、種々の炎症・免疫応答を誘導する重要な免疫系である。最近、Toll-like receptor (TLR)ファミリーの機能解析により、自然免疫系の活性化機構が明らかになり、TLRを介した自然免疫系の活性化の生体防御における重要性が明らかになった。結核菌に対する生体防御においても、自然免疫系が結核菌の認識が重要な役割を果たす可能性が考えられる。本研究では、自然免疫系による結核感染防御機構を明らかにし、多剤耐性結核菌に対する、自然免疫系の活性化を利用した新規治療法の開発への基盤を提供することを目的とする。

B. 研究方法

自然免疫系の結核感染防御への関与について、これまでTLRを介したシグナルの消失するMyD88/TRIF欠損マウスを用いて解析し、自然免疫系の活性化の重要性を明らかにしてきた。これまでの解析は、マクロファージ、樹状細胞を標的としてきたが、自然免疫応答はこれら貪食細胞に限らず、最初に結核菌に出会う上皮細胞も深く関与している。そこで、結核菌の気道感染により上皮細胞で誘導される遺伝子を検索した。さらに、この遺伝子(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-phenyl-naphthylamine (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。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

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。NPN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かを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なかを解析した結果、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。

D. 考察

結核感染に際し、いわゆる免疫細胞ではなく、感染防御の最前線となる上皮系細胞から分泌されるSLPIが結核菌の殺菌作用を有していることが明らかになった。今後、SLPIを用いた抗結核薬の開発などが期待される。

E. 結論

結核菌の感染において、上皮系細胞から分泌されるSLPIが、抗結核作用を担っていることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Saiga, H., Nishimura, J., Kuwata, H., Okuyama, M., Matsumoto, S., Sato, S., Matsumoto, M., Akira, S., Yoshikai, Y., Honda, K., Yamamoto, M. and Takeda, K.: Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium. *J. Immunol.* 181, 8521-8527 (2008).
2. Nakamura, K., Miyazato, A., Koguchi, Y., Adachi, Y., Ohno, N., Saijo, S., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., Fujita, J., Ishii, K., Kaku, M., and Kawakami, K.: Toll-like receptor (TLR) 2 and dectin-1 contribute to the production of IL-12p40 by bone marrow-derived dendritic cells infected with *Penicillium marneffei*. *Microbes Infect.* 10, 1223-1227 (2008).
3. Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H., Ishii, N., Evans, R., Honda, K., and Takeda, K.: ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. *Nature* 455, 808-812 (2008).
4. Nakamura, J., Fujimoto, M., Yasuda, K., Takeda, K., Akira, S., Hatayama, T., Takagi, Y., Nozaki, K., Hosokawa, N., and Nagata, K.: Targeted disruption of Hsp110/105 gene protects against ischemic stress. *Stroke* 9, 853-2859 (2008).
5. Saito, F., Kuwata, H., Oike, E., Koike, M., Uchiyama, Y., Honda, K., and Takeda, K.: Inefficient phagosome maturation in infant macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 113-118 (2008).
6. Herrmann, J., Imura, T., Song, B., Ao, Y., Qi, J., Nguyen, T., Korsak, R., Takeda, K., Akira, S., and Sofroniew, M.: STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 28, 7231-7243 (2008).
7. Gong, L., Yao, F., Hockman, K., Heng, H. H., Morton, G. J., Takeda, K., Akira, S., Low, M. J., Rubinstein, M., and Mackenzie, R. G.: Stat3 is required in hypothalamic AgRP/Npy neurons for normal energy homeostasis. *Endocrinology* 149, 3346-3354 (2008).
8. Ueta, M., Hamuro, J., Ueda, E., Katoh, N., Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., and Kinoshita, S.: Stat6-independent tissue inflammation occurs selectively on the ocular surface and perioral skin of *Ikbz*^{-/-} mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3387-3394 (2008).
9. Kayama, H., Rairez-Carrozzi, V. R., Yamamoto, M., Mizutani, T., Kuwata, H., Iba, H., Matsumoto, M., Honda, K., Smale, S. T., and Takeda, K.: Class-specific regulation of pro-inflammatory genes by MyD88 pathways and *Ikbz*. *J. Biol. Chem.* 283, 12468-12477 (2008).
10. Nakamura, K., Miyazato, A., Gang, X., Hatta, M., Inden, K., Aoyagi, T., Takeda, K., Akira, S., Saijo, S., Iwakura, Y., Adachi, Y., Ohno, N., Suzuki, K., Fujita, J., Kaku, M., and Kawakami, K.: Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *J. Immunol.* 180, 4067-4074 (2008).
11. Nishimura, J., Saiga, H., Sato, S., Okuyama, M., Kayama, H., Kuwata, H., Matsumoto, S., Nishida, T., Sawa, Y., Akira, S., Yoshikai, Y., Yamamoto, M., and Takeda, K.: Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *J. Immunol.* 180, 4032-4039 (2008).
12. Hisaeda, H., Tetsutani, K., Imai, T., Moriya,

C., Tu, L., Hamano, S., Duan, X., Chou, B., Ishida, H., Aramaki, A., Shen, J., Ishii, K., J., Coban, C., Akira, S. Takeda, K., Yasutomo, K., Torii, M., and Himeno, K.: Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. *J. Immunol.* 180, 2496-2503 (2008).

13. Owaki, T., Asakawa, M., Morishima, N., Mizoguchi, I., Fukai, F., Takeda, K., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T.: STAT3 is indispensable to IL-27-mediated cell proliferation but not IL-27-induced Th1 differentiation and suppression of proinflammatory cytokine production. *J. Immunol.* 180, 2903-2911 (2008).
14. Yamamoto, M., and Takeda, K.: Role of nuclear I κ B proteins in the regulation of host immune responses. *J. Infect. Chemother.* 14, 265-269 (2008).
15. Takeda, K., Yamamoto, M., Honda, K.: Assessing the response of cells to TLR stimulation. *Signaling by Toll-like receptors*, 1-21 (2008).

2. 学会発表

1. Kiyoshi Takeda, Koji Atarashi, Kenya Honda: A mechanism for development of intestinal Th17 cells causing intestinal inflammation. The 7th Sino-Japan Joint Conference for Cancer Research, 2008.12.7-10, Guangzhou, China
2. Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, Masahiro Yamamoto: NFAT is responsible for TLR-independent innate immune responses to a protozoan parasite. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008.12.9-12, 神戸
3. Kiyoshi Takeda, Koji Atarashi, Kenya Honda: Commensal bacteria-derived ATP mediates Th17 cell development in the intestinal lamina propria (Symposium) 第37回日本免疫学会学術集会, 2008.12.1-3, 京都
4. 竹田 潔: 自然免疫系と炎症性腸疾患. 第29回日本炎症・再生医学会, 2008.7.9, 東京
5. 竹田 潔: 腸内フローラと炎症性腸疾患. 第12回腸内細菌学会 2008.6.13, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

新しい結核治療ワクチンによる臨床応用
計画に関する研究及び新規化学療法剤との併用療法計画

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

研究要旨

- [I] 結核治療ワクチン: HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンはマウスの系で治療効果を示した。さらにAg85B DNA + Ag85A DNAワクチンは強力な予防ワクチン効果を示した。したがって①HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン ②HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNA + Ag85B DNA + Ag85A DNAワクチン、を中心に治療ワクチンの開発計画を立案した。
- さらに、
- [II] 多剤耐性結核菌に対する治療ワクチン
多剤耐性結核菌を感染させたマウスにおいて、HVJ-エンベロープ/HSP65DNA + IL-12 DNAワクチンは、強力な結核治療効果(結核治療ワクチン)を示した。
更に、超薬剤耐性結核(XDR-TB)に対しても、治療ワクチン効果を示す画期的な成果を得た。
- [III] カニクイザルを用いた、結核治療ワクチン効果: このHVJ-エンベロープ/Hsp65 DNA + IL-12 DNAワクチンを臨床応用に適したpVAXベクターに二つのこれらの遺伝子を導入したワクチンを作製した。これをあらかじめ結核菌感染させてカニクイザルに治療ワクチンとして投与した。その結果、生存率の改善及び体重増加、免疫反応の増強等治療効果が示された。
- [IV] 新規化学療法剤との併用療法計画。
新規化学療法剤カプラザマイシン(CPZEN-45)とOPCの二種類を共同研究で開発した。
これらの新規化学療法剤と上記のワクチンの併用療法を計画中である。

A. 研究目的

結核に対するワクチンとしては、BCGが世界各国で用いられ、小児期における結核予防に関しては一定の成果を納めている。しかし、現行のBCGワクチンの追加接種が、大人(成人)の結核発病予防に効果がない見解がWHOよりなされた。

従って、BCGよりも切れ味の鋭い新しい結核ワクチンの開発が必須である。しかしながら、未だ臨床応用に有効な新しい結核ワクチンは開発されていない。我々は結核予防ワクチンとしてカニクイザルのレベルで有効な新しい結核ワクチンを開発したことより、臨床応用への計画を立案した。

さらに、治療ワクチンについては、結核治療phaseに有効なワクチンは我々以外全く開発されていない。したがって結核治療ワクチンについても将来的な臨床結核ワクチンについての動物モデルでの実験を行った。

B. 研究方法

結核治療ワクチン効果を判定するモデル動物として、DBA/1マウス TNF R(-/-)DBA/1マウス、IL-6(-/-)DBA/1マウス、BALB/cマウス、を用いた。結核菌はH37Rvヒト結核菌やErdmanヒト結核菌を使用した。また政策医療呼吸器ネットワークを用いた計画も立案した。

(倫理面での配慮)

当院の倫理委員会は、大阪国際大学政経学部教授と関西学院大学学院長を含む多職種の委員により構成され、毎月1回以上開催しており、本研究は、この委員会での承認を得ている。

C. 研究結果

[I] 結核治療ワクチン

結核治療ワクチンの開発が世界的に急速に熱気を帯びてきている。すなわち、HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンはマウスの系で治療効果を示した。またAg85B DNA + Ag85A DNAワクチンは強力な結核ワクチン効果を示した。したがって、① Ag85B DNA + Ag85A DNAワクチン ②HVJ/HSP65 DNA + IL-12DNAワクチンを単独又は組み合わせ、治療ワクチンの開発計画を立案した。具体的には、HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンはマウスの系で治療ワクチン効果を得た。したがって、これらのワクチンを組み合わせ、priming-booster法を用いより強力なワクチンの開発をスタートした。(表1)

用いる系は

- (1) マウス
- (2) モルモット (表2)
- (3) カニクイザル (表3)

(4) ヒト免疫応答を解析できるSCID-PBL/huモデルである。(表4)

[II] 多剤耐性結核菌に対する治療ワクチン

(1) さらに多剤耐性結核菌を 5×10^8 i.v. 投与したマウスに対しても HVJ/HSP65 DNA+IL-12DNAワクチンを3回投与することにより結核治療ワクチン効果を得た。(2) RFP、INHと結核治療ワクチンを併用することにより、RFP、INH低濃度でも結核治療効果、特に多剤耐性結核に対してもRFP、INH等が有効となる可能性が大である。

[III] カニクイザルを用いた、結核治療ワクチン効果：

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

[IV] さらに、新しい抗結核化学療法剤OPC (大塚 松本博士らが開発) やCPZ (カブラザマイシン；微生物科学研究所 三宅博士らが開発) と、このHVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNAを組み合わせて、結核治療の相乗効果及び治療期間の短縮を計画している。(表5)

表1

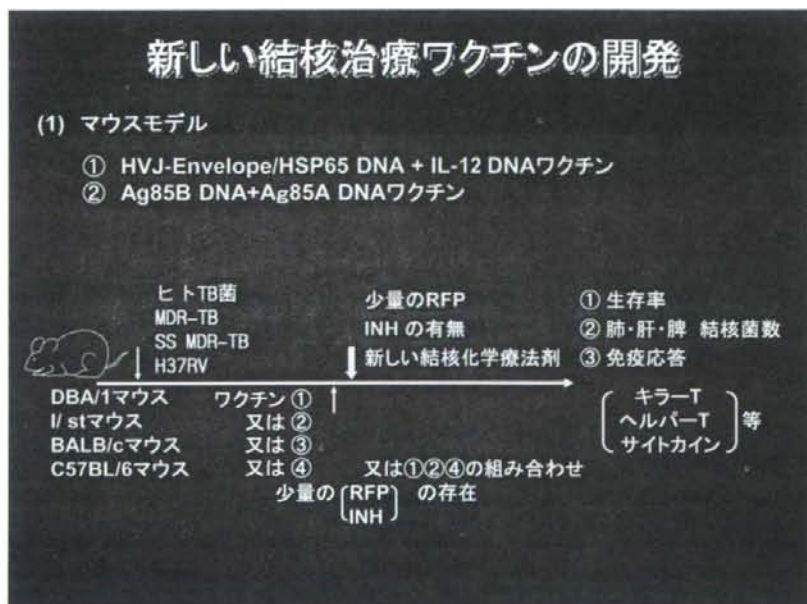


表2

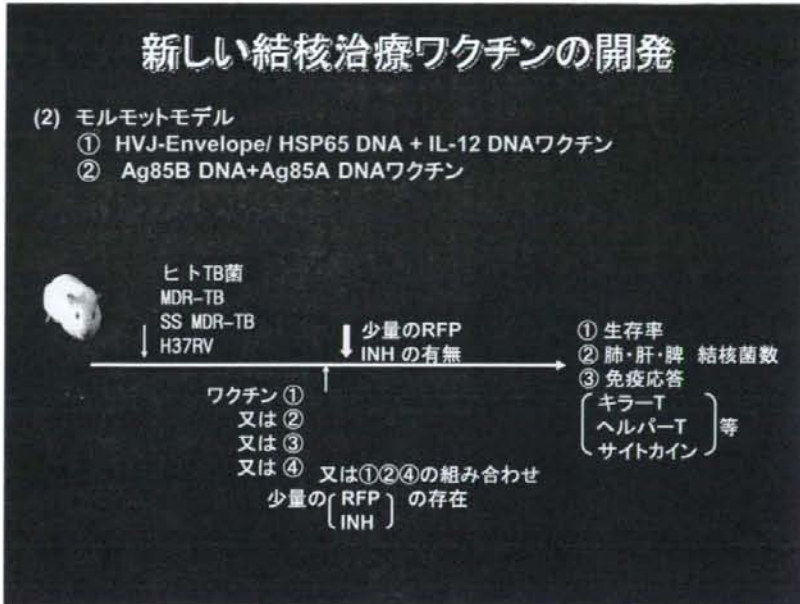


表3

