

D. 考察

[I] ~ [II] 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う予定である。

E. 結論

[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 [I] ~ [IV] 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う予定である。

(図1)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Inoue Y, Matsumoto M, McMurray D.N, Dela Cruz E.C, Tan E.V, Abalos R.M, Burgos J.A, Saunderson P, Sakatani M. :Novel prophylactic and therapeutic vaccine against Tuberculosis. Vaccine. (in press)
2. Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Sakatani

M. Okada M. :The study of Novel Vaccination using Granulysin transgenic mice. Vaccine. (in press)

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. Yoshida S, Suzuki K, Tsuyuguchi K, Tomita M, Okada M, Sakatani M.: Evaluation of the discrepant Mycobacterium tuberculosis strains between any ordinary susceptibility testing and rpoB gene analysis by the line probe assay. Kekkaku. 83:577-583.2008
5. Minamoto S, Tsuyuguchi K, Suzuki K, Okada M, Sakatani M.: An adolescent case of pulmonary MAC infection, found 3 years later from bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome. Kekkaku. 2008;83(8):585-90.
6. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岩本朋忠, 富田元久, 岡田全司, 坂谷光則: 遺伝子を用いた抗酸菌鑑別同定試薬 INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 の有用性の検討. 結核. 84(1):15-21.2009
7. Seigo Kitada, Kazuo Kobayashi, Satoshi Ichiyama, Shunji Takakura, Mitsunori Sakatani, Katsuhiko Suzuki, Tetsuya Takashima, Takayuki Nagai, Ikunosuke Sakurabayashi, Masami Ito, and Ryoji Maekura for the MAC Serodiagnosis Study Group. Serodiagnosis of Mycobacterium avium-Complex Pulmonary Disease Using an Enzyme Immunoassay Kit. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2008; 177: 793-797.
8. 富田元久, 竹野華, 吉田志緒美, 鈴木克洋, 坂谷光則: MGIT の前処理液 BBL マイコプレップと 2% NaOH 処理との比較. 結核 83 (6): 471-473, 2008
9. 露口一成, 鈴木克洋, 坂谷光則: 非結核性抗酸症. Mebio 25(1):68-77, 2008
10. 鈴木克洋, 露口一成, 吉田志緒美, 坂谷光則: ク

オンティフェロン TB-2G 検査の意義. 臨床検査 52 (10):1139-1143, 2008

2. 学会発表

1. 藤山理世, 田中賀子, 榎林成之, 樋口純子, 渋谷雄平, 青山博, 白井千香, 片上祐子, 千原三枝子, 吉岡伸子, 伴貞彦, 河上靖登, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則: 接触度を用いた, 結核接触者健康診断時に行った QFT-2G 検査の有用性の検討(会議録). 日本公衆衛生学会総会抄録 67 回. 582.2008
2. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 富田元久, 坂谷光則: 院内服薬用飲料水汚染に起因する Mycobacterium chelonae 感染の疑似アウトブレイク(会議録). 結核. 83(9):658. 2008
3. 竹原由紀子, 三室由紀子, 西尾郁子, 宅見久子, 山形久美子, 伴貞彦, 田中賀子, 藤山理世, 河上靖登, 岩本朋忠, 園部俊明, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則: 若年多国籍集団における, QFT 検査を併用した, 接触者健康診断の 1 事例(会議録). 結核. 83(9): 65. 2008
4. 田中賀子, 藤山理世, 樋口純子, 河上靖登, 岩本朋忠, 園部俊明, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則: 結核菌の遺伝子型別解析を行い, QFT 検査も併用した教育機関での接触者健康診断の 1 事例(会議録). 結核. 83(9): 65. 2008
5. 藤山理世, 田中賀子, 樋口純子, 河上靖登, 白井千香, 千原美枝子, 青山博, 片上祐子, 岩本朋忠, 園部俊明, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則: 神戸市で QFT 検査を併用した結核患者家族の接触者健康診断事例について(会議録). 結核. 83(9): 658. 2008
6. 露口一成, 吉田志緒美, 鈴木克洋, 岡田全司, 井上康, 林清二, 坂谷光則: 透析を要する腎不全に合併した多剤耐性結核症例の検討(会議録). 結核. 83(9): 657. 2008
7. 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里実, 西田泰子, 仲谷均, 高尾京子, 栖原里佳, 岸上知恵, 吉田栄人, 中島俊洋, 坂谷光則, 金田安史, Tan E.V., DeraCruz D.L.C., 岡田全司: ヒト結核感染モデルに最も近いカンクイザルを用いた新しい結核ワクチン開発 HSP 65 DNA+ IL-12 DNA ワクチン(会議録). 日本呼吸器学会雑誌. 46: 239. 2008
8. 藤山理世, 田中賀子, 河上靖登, 白井千香, 青山博, 岩本朋忠, 園部俊明, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則: 神戸市での QFT を併用した特別養護老人ホームでの結核接触者健康診断 3 事例について(会議録). 結核. 83(4): 401-402. 2008
9. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 富田元久, 坂谷光則, 岩本朋忠: Line Probe Assay を用いた抗酸菌同定キットの有用性の検討(2)(会議録). 結核. 83(4): 401. 2008
10. 岡田全司, 喜多洋子, 金丸典子, 井上義一, 坂谷光則. 新しい結核治療ワクチン (HVJ-エンペロープ/Hsp65+IL-12 DNA) の開発. 日本結核病学会. 4月24・25日
11. 喜多洋子・金丸典子・井上義一・坂谷光則・岡田全司. ヒト結核感染モデルに最も近いカンクイザルを用いた結核に対する新しい治療ワクチン開発: HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン. 日本結核病学会. 4月24・25日
12. 岡田全司, 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里実, 西田泰子, 仲谷均, 高尾京子, 栖原里佳, 岸上知恵, 井上義一, 吉田栄人, 中島俊洋, 坂谷光則. 結核に対する新しいワクチン (Hsp65+IL-12 DNA) の効果と CD8 陽性 T 細胞の重要性. 日本呼吸器学会. 6月15~17日
13. 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里実, 西田泰子, 仲谷均, 高尾京子, 栖原里佳, 岸上知恵, 吉田栄人, 中島俊洋, 坂谷光則, 金田安史, E. V. Tan, D.L.C. DelaCruz, 岡田全司. ヒト結核感染モデルに最も近いカンクイザルを用いた新しい結核ワクチン開発: HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン. 日本呼吸器学会. 6月15~17日
14. Masaji Okada, Yoko Kita, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Yasuko Nishida, Hitoshi Nakatani, Kyoko Takao, Ritsuko Asai, Rika Suhara, Chie Kishigami, Yoshikazu Inoue, Toshihiro Nakajima, Tetsuji Nagasawa, Yasuhumi Kaneda, Shigeto Yoshida, Makoto Matsumoto, Robert Gelber, Esterlina V. Tan, E.C. Dela Cruz, David McMurray, Mitsunori Sakatani: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. TBV (TB vaccines for the world, TBV 2008) . 4/19~21 (Atlanta, USA)
15. Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Sakatani M, Okada M. The study of Novel Vaccination using Granulysin transgenic mice. ICWO. 9/23~25. 6th ICWO (Italia, Milan)

16. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Inoue Y, Matsumoto M, McMurray D.N, Dela Cruz E.C, Tan E.V, Abalos R.M, Burgos J.A, Saunderson P, Sakatani M.: A novel PROPHYLATIC AND THERAPEUTIC vaccine (HVJ - envelope/HSP65 DNA+ IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model. ICWO. 9/23 ~ 25. 6th ICWO (Italia, Milan)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 (出願中)
2. 実用新案登録
3. その他

在日外国人結核患者数の推移とその背景に関する研究

研究協力者 星野齊之 財団法人結核予防会結核研究所 企画・医学科長

研究要旨

在日外国人結核患者数の推移について、結核発生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した。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。外国人結核患者数の変動は、正規労働者、就学生、不法在留者の人数が影響すると考えられた。

A. 研究目的

外国人の結核は、西欧や米国では大きな問題になっている。日本に於ける在日外国人結核の状況を把握することにより、今後の対策を展望することを目的とする。

B. 研究方法

在日外国人結核患者数の推移について、結核発生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。

C. 研究結果

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。

D. 考察

学生の結核では、在留する外国人就学生数が、30691名（1998年）から、50583名（2003年）でピークを取り、その後28147名（2005年）に急減し、その後漸増している（在留外国人統計）。学生の結核患者数の増減は、就学生数が影響すると思われる。労働者の結核については、正規の推定外国人労働者数は40万人（1998年）から75.5万人（2006年）に増加しており（厚生労働省推計）、常雇の結核患者数は正規の外国人労働者数に影響されると思われる。無職の結核については、不法残留者数が27万人（1998年）から21万人（2004年）まで漸減し、その後15万人（2007年）に急減しており（不法残留者推計）、無職の結核患者数は183名（1998年）から216名（2004年）まで変動しつつ増加したが、その後157名（2007年）に急減した。無職の結核患者数は、不法残留者数に影響される可能性がある。なお、外国人入国者数は1998-2004

年の間に、405万人増加（367万人から772万人）したが、その98.2%（398万人）は短期滞在目的であり、その他の増加分は7万人（26万人から33万人）にすぎず（出入国管理統計）、入国者数増加の影響は小さいと思われる。

E. 結論

外国人結核患者数の変動は、正規労働者、就学生、不法在留者の人数が影響すると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
雑誌「結核」に投稿予定
2. 学会発表
第84回結核病学会に発表予定

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

神戸市の外国人結核の現状

研究協力者 藤山理世 神戸市保健所

研究要旨

結核の罹患率は低下してきているが、先進諸国の例から、今後日本でも外国人の結核が増加する可能性が考えられる。神戸市での外国人結核の現状を調査し、問題点を把握し、今後の結核感染予防対策の示唆を得ることを目的とし、外国人の結核患者さんの実態を調査した。

平成20年結核新登録患者419名(概数)のうち、外国人は9名で、20代が6名であった。神戸市ではまだ外国人結核の割合は全体としては少ないが、若い世代では割合が高い傾向にあり、その実態を調査しておくことは重要であると考えられる。

A. 研究目的

結核の罹患率は低下してきているが、先進諸国の例から、今後日本でも外国人の結核が増加する可能性が考えられる。神戸市での外国人結核の現状を調査し、問題点を把握し、今後の結核感染予防対策の示唆を得ることを目的とする。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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ヵ月未満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。

D. 考察

神戸市では平成20年結核新登録患者419名(概数)のうち、外国人または海外居住歴のある者は9名であった。健診で発見された者が2名おり、比較的軽症である者が多かった。20代、入国6ヶ月未満の留学生・就労者が多く、入

国前の健診があってもよいのではないかと考えられた。また20代は健診の機会が少ないが、留学生・就労者とも集団生活となることもあり、健診が必要と考えられた。

E. 結論

神戸市ではまだ外国人結核の割合は全体としては少ないが、若い世代では割合が高い傾向にあり、その実態を調査しておくことは重要である。

F. 研究発表

なし

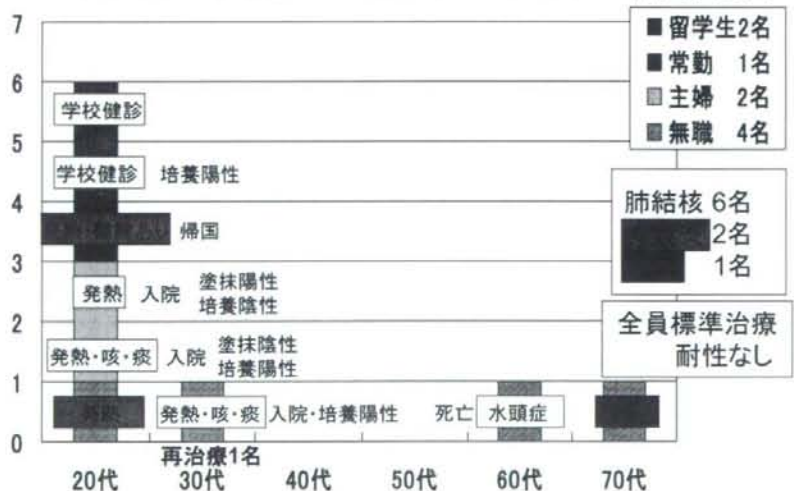
出身国と在日期間

2008年
外国人9人



病名と菌検査結果と転帰

2008年
外国人9人



HVJ-Eを利用した多剤耐性結核ワクチン（予防・治療）に関する研究

研究協力者 中島 俊洋 ジェノメディア㈱ 代表取締役社長

研究要旨

AIDSの蔓延に伴う結核の拡大や、多剤耐性結核菌の出現など、特にアジア地域での制御が緊急の課題となっている結核感染症の治療薬の開発を目的として、新規に開発した治療用DNAワクチンの臨床応用に必要な前臨床研究を行った。

そのために、実験動物（ラット、カンクイザル）による安全性試験を行い、予測される臨床試験での投与用量に対して乖離幅を確保できる事を示唆するデータを取得した。

また、治験薬GMP製造に関しては、原薬や凍結乾燥HVJ-Eに対する暫定規格の設定を行った上、原薬については10バッチ以上の製造を行って製造データの蓄積を進めた。また、保存安定性の検討のために、加速及び苛酷条件での短期安定性試験データの取得を行った。今後は、長期保存安定性試験を進める必要がある。

A. 研究目的

これまでの研究により、HVJ-Eを利用した新規結核DNAワクチンが、多剤耐性結核を含む結核の予防と治療に有用であることが動物の薬効評価系（マウス、モルモット、サル）を用いた評価試験で明らかにされている。今後、実際に臨床応用を進めるためには、規制当局によって定められたガイドラインに従い臨床応用申請のための前臨床試験データ（動物試験データなど）を取得する必要がある。

そこで、臨床試験開始に必要な安全性試験（一般毒性試験）データや薬物動態試験（クリアランス）データの取得を更に進める事を研究の目的とした。また、治験薬GMP製造についても、原薬設定、原薬及び製剤の暫定規格の設定と、そのための製造データの取得、安定性試験データの取得、製造に必要なバリデーションデータなど、臨床応用に必要な製造関連の試験データの取得を進めることを目的に研究開発を行った。

B. 研究方法

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事が必要である。その種類としては、主に薬効試験、薬効メカニズムの解析、安全性試験などがある。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ンクイザルを選択し、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（コアバッテリー試験）、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。

（倫理面への配慮）

本研究を実施するにあたり、ジェノメディア株式会社は、池田ラボラトリーの所在地である独立法人 産業技術総合研究所の規定に従い、国で定められている、組換えDNA実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業技術総合研究所で開催される各委員会で実験許可を受けてから実験を行った。また、実験に従事するものの安全確保についても、産業総合技術研究所の規定に従い、年に1回行われる実験の安全講習に参加し、健康診断も受けて実験従事者の健康管理も確保した。

C. 研究結果

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（カニクイザル）を選択して、安全性に関するデータを取得した。まず、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。

D. 考察

① 実験動物による前臨床試験データ取得

現在までに実施した一般毒性試験を中心とする安全性試験のデータは、HVJ-Eの毒性プロファイルや、想定される臨床用量に対して乖離幅を確保できる事を示唆している。これらの結果を基に、今後臨床用量・用法の設定を実施する必要がある。

現在までに、類似の研究としては、センダイウイルス（野生型、組換え型）、ミズルスウイルス、ニューキャッスル病ウイルス（NDV）を利用した臨床試験がある。組換え千台ウイルス以外は、がんを中心に研究開発が進められている。本研究で利用している、HVJ-Eの原料は、上記のセンダイウイルスと同様であるが、不活性化を行ってベクター

として使用している点で、上記の類似例とは全く異なるシステムとなっている。

ただし、上記の類似例の臨床試験では、初回投与時に発熱が認められる事が明らかになっている。この減少は、炎症性サイトカイン（TNF- α ）やインターフェロンの産生誘導によると推測されている。HVJ-Eについても、サイトカインを誘導する活性があることから、サイトカイン産生プロファイルで類似する点があれば、類似例の臨床試験での毒性プロファイルを参考にして、より安全性を確保できる臨床デザインを進める必要があると考えられる。

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製造のデータ取得を進めた。治験薬の場合には、製造バッチ数が少ない事や、製造工程の変更がありうる事から規格設定については暫定規格とする場合が多く、今回の規格設定においても暫定規格として設定している。開発段階が進み、上市品目と同様の製造スケール、バッチ数になった時点で蓄積された製造データを基にして規格設定を行う。今回の原薬製造については、10バッチ以上の製造データを参照して設定している事から、今後製造工程の変更がなければ最終的な規格設定値に近い数値となる可能性もある。

安定性試験については、今回進めた予備安定性試験データ（加速、苛酷）を参考に、長期安定性試験を実施することになる。予備安定性試験は月単位であるが、長期安定性試験は年単位にする事が予測されるため、予備安定性試験データを詳細に解析して、傾向を正確に判断した上で、慎重に試験デザインを進める必要がある。整備した自社施設での実施を予定しており、臨床試験に向けて少なくとも6ヶ月程度のデータまで取得を進める事を想定している。

E. 結論

① 実験動物による前臨床試験データ取得

前臨床試験データについては、予定していた通りGLPグレードの試験データの取得を進め、臨床試験の開始に必要なデータを取得すると共に、毒性用量と想定される臨床投与量の間に乖離幅を確保できる見込みである事が明らかとなった。今後、最終報告書のデータと類似例の前臨床データ、及び臨床試験データを基にして、更なる解析・考察を進め、臨床試験デザインを設定していく。

② 治験薬GMP製造技術の確立

臨床試験に必要なGMP製造用データの取得を進めた。特に安定性に関する傾向を把握する上で重要な加速試験、苛酷試験で短期間の安定性データ取得を進めた。今後、年単位の長期安定性データを進め、6ヶ月程度の安定性が確保できる保存条件を見出した上で、臨床試験での有効期限設定を行う。

F. 健康危険情報

分担研究者のため記入なし

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Masaji Okada, Yoko Kita, Toshihiro Nakajima,
Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Tetsuji
Nagasawa, Yasufumi Kaneda, Shigeto Yoshida,
Yasuko Nishida, Hitoshi Nakatani, Kyoko Takao,
Chie Kishigami, Yoshikazu Inoue, Makoto
Matsumoto, David N. McMurray, E.C.Dela Cruz,
E.V. Tan, R.M. Abalos, J.A. Burgos, Paul
Saunderson, Mitsunori Sakatani, Novel
prophylactic and therapeutic vaccine against
Tuberculosis., Vaccine, 2009 Feb 5 (in press)

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

多剤耐性結核菌の感染対策に関する研究

研究協力者 鈴木克洋 NHO近畿中央胸部疾患センター 感染症研究部長

研究要旨

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検体に適用し、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。

A. 研究目的

分子疫学的手法と分子生物学的手法を駆使し、多剤耐性結核 (MDRTB) の感染性と感染様式を探索する。その結果を元に、結核病棟ならびに市中における感染対策を構築する。

B. 研究方法

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、MDRTBの迅速スクリーニングを行い、速やかに隔離処置をとる。

C. 研究結果

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検体に適用し、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。

D. 考察

多剤耐性結核菌は感染しない、結核の再感染はない、以上二つのドグマがわが国における結核の感染対策を遅らせた事は間違いない。現在は両者ともに否定されている。むしろ薬剤が無効でいつまでも排菌の続くMDRTBの感染力は強いと考えねばならない。今後は結核病棟に陰圧個室を増加し、MDRTBが否定されるまで、個室隔離する体制の構築が急務である。我々の経験を活かし、全国的に院

内感染対策を普及させたい。

E. 結論

多剤耐性結核は感染する。特に結核病棟での感受性結核患者への重感染は深刻な問題で、各種感染対策を駆使して防止せねばならない。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Seigo Kitada, Kazuo Kobayashi, Satoshi Ichiyama, Shunji Takakura, Mitsunori Sakatani, Katsuhiko Suzuki, Tetsuya Takashima, Takayuki Nagai, Ikunosuke Sakurabayashi, Masami Ito, and Ryoji Maekura for the MAC Serodiagnosis Study Group. Serodiagnosis of Mycobacterium avium-Complex Pulmonary Disease Using an Enzyme Immunoassay Kit. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008; 177: 793-797.
2. 富田元久、竹野華、吉田志緒美、鈴木克洋、坂谷光則：MGITの前処理液BBLマイコプレップと2%NaOH処理との比較。結核83(6)：471-473、2008
3. Tomotada Iwamoto, Shiomi Yoshida, Katsuhiko Suzuki, Takayuki Wada: Population structure analysis of the Mycobacterium tuberculosis Beijing family indicates an association between certain sublineages and multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Oct;52(10):3805-9. Epub 2008 Aug 11.
4. Chiyoji Abe, Ikuo Kobayashi, Satoshi Mitarai, Masako Wada, Yoshiko Kawabe, Tetsuya Takashima, Katsuhiko Suzuki, Li-Hwei Sng, Suxing Wang, Hla Hla Htay, and Hideo Ogata: Biological and Molecular Characteristics of

Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates with Low-level Resistance to Isoniazid in Japan
J. Clin. Microbiol. 46:2263-2268, 2008

5. 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、富田元久、岡田全司、坂谷光則:薬剤感受性検査でRFP感受性、line probe assayでRFP耐性となる結核菌の検討. 結核 83:577-583, 2008
6. 源誠二郎、露口一成、鈴木克洋、岡田全司、坂谷光則:骨髄異型性症候群で骨髄移植後に3年をへて発症した若年者肺MAC症の1例. 結核83:585-590, 2008
7. 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岩本朋忠、富田元久、岡田全司、坂谷光則:遺伝子を用いた抗酸菌鑑別同定試薬INNO-LiPA MYCOBACTERIAの有用性の検討. 結核84:15-21, 2009
8. 鈴木克洋:非結核性抗酸菌症. 小児科診療 71(1):83-88, 2008
9. 露口一成、鈴木克洋、坂谷光則:非結核性抗酸菌症. Mebio 25(1):68-77, 2008
10. 審良正則、鈴木克洋、喜久山綾乃:肺炎の画像所見. 日本医事新報 4367:69-72, 2008
11. 鈴木克洋:多剤耐性結核. 結核83(1):39-42, 2008
12. 鈴木克洋:非結核性抗酸菌症. Medical Technology. 36(2):165-169, 2008
13. 鈴木克洋、審良正則、喜久山綾乃:肺真菌症の画像所見. 日本医事新報 4371:53-56, 2008
14. 審良正則、鈴木克洋、喜久山綾乃:肺癌の画像所見. 日本医事新報 4375:53-56, 2008
15. 審良正則、鈴木克洋、喜久山綾乃:その他の画像診断. 日本医事新報4380:53-56, 2008
16. 鈴木克洋:非結核性抗酸菌症と化学療法. 呼吸器科 13(1):62-67, 2008
17. 日本結核病学会非結核性抗酸菌症対策委員会、日本呼吸器学会感染症・結核学術部会:肺非結核性抗酸菌症診断に関する指針—2008. 結核83:525-526, 2008
18. 日本結核病学会非結核性抗酸菌症対策委員会:肺非結核性抗酸菌症に対する外科治療の指針. 結核 83:527-528, 2008
19. 鈴木克洋、露口一成、吉田志緒美、坂谷光則:クオインティフェロンTB-2G検査の意義. 臨床検査52 (10):1139-1143, 2008
20. 鈴木克洋:変貌する感染症—人類の備えは十分か? 結核予防法から新感染症法へ. 総合臨床57 (11):2621-2624, 2008
21. 鈴木克洋:肺MAC症の診断と治療. MEDICAMENT NEWS 1969号4, 2009
22. 鈴木克洋:質疑応答「多剤耐性結核の定義・現状と対策」日本医事新報4424:96-97, 2009
23. 鈴木克洋:喉頭・気管・気管支結核、「気管支鏡」(日本呼吸器内視鏡学会編) pp183-185, 医学書院、東京、2008
24. 鈴木克洋:第3版「分かりやすい内科学」かぜ症候群とインフルエンザ・肺炎. (井村裕夫編集主幹) pp7-16 文光堂 東京、2008
25. 鈴木克洋:「ガイドライン外来診療2008」非結核性抗酸菌症(泉孝英編集主幹) pp366-368, 日経メディカル開発 東京、2008
26. 鈴木克洋:「肺炎の画像診断と最新の治療」非結核性抗酸菌症の画像診断(藤田次郎編集) pp273-280, 医薬ジャーナル社 大阪、2008
27. 鈴木克洋:「KEY WORD 感染症、第2版」非定型抗酸菌症(非結核性抗酸菌症)(山口恵三、戸塚恭一編) pp118-119, 先端医学社 東京、2008

2. 学会発表

1. 鈴木克洋:結核治療の実際「結核の最新事情」第48回日本呼吸器学会学術講演会(2008.6.17、神戸)

多剤耐性結核の迅速診断及び迅速入院法の確立

研究協力者 露口一成 近畿中央胸部疾患センター 感染症診断・治療研究室室長

研究要旨

多剤耐性結核の感染防止のためには多剤耐性の迅速な診断が必要である。今回我々は、リファンピシン (RFP) の耐性遺伝子である *rpoB* の変異を検出することによる RFP 耐性迅速診断法と従来の薬剤感受性検査結果の比較検討を行った。耐性遺伝子による診断法は、従来法を gold standard とした場合、感度 93.3%、特異度 99.7% と優れた結果であった。本法は一日で結果が得られ、耐性結核の迅速な診断において有用であると考えられた。

A. 研究目的

結核菌に対する薬剤感受性検査には、従来1ヶ月以上を要していた。結核患者は、入院時には薬剤感受性が不明であることがほとんどであり、そのために、結果判明までの期間、耐性結核患者と感受性結核患者が同室に収容される可能性がある。近年多剤耐性結核による再感染事例が報告され、多剤耐性結核患者の迅速な診断・隔離の必要性が強調されている。今回我々は、リファンピシン (RFP) の耐性遺伝子である *rpoB* の変異を検出することにより RFP 耐性を迅速に診断し、ひいては多剤耐性を迅速に診断する試みにつき検討した。

B. 研究方法

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-RifTB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。

(倫理面への配慮)

検体は通常の検査にて採取した患者検体の一部及び発育した菌を用いており、新たに患者に負担をかけることはなく、危険性はない。

C. 研究結果

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。

D. 考察

ジェノスカラー-RifTBは、従来法による RFP 感受性結果ときわめて高い一致率を示した。また、本法により RFP 耐性と判定された15例中11例 (73.3%) は多剤耐性結核例であり、本法は多剤耐性結核のスクリーニング法としても有用であることが示唆された。本法は臨床検体採取してから1日以内に結果を得ることが可能であり、多剤耐性結核の迅速な診断、隔離を行う上で有用である。

E. 結論

ジェノスカラー-RifTBによる RFP 耐性遺伝子検査は、多剤耐性結核の迅速な診断のためにきわめて有用である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、富田元久、岡田全司、坂谷光則：薬剤感受性検査で RFP 感受性、line probe assay で RFP 耐性となる結核菌の検討。結核 2008; 83(8): 577-583
- 源誠二郎、露口一成、鈴木克洋、岡田全司、坂谷光則：骨髄異形成症候群で骨髄移植後に3年をへて発症した肺 MAC 症の1例。結核 2008; 83(8): 585-590
- 豊田恵美子、川辺芳子、四元秀毅、坂谷光則、露口一成、前倉亮治、藤川健弥、高嶋哲也、小川賢二、吉山崇、杉江琢美：多剤および超多剤耐性結核の全国調査 (2006年)。結核 2008; 83(12): 773-777

2. 学会発表

- 露口一成、吉田志緒美、鈴木克洋、大塚淳司、坂谷光則：当院における QFT 検査の臨床的検討。第82回日本感染症学会総会、松江、2008年4月18日
- 露口一成、吉田志緒美、鈴木克洋、井上義一、岡田全司、林清二、坂谷光則：潜在性結核感染の治療後に発

症した結核症例の検討. 第83回日本結核病学会総会、東京、2008年4月24日

3. 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岡田全司、岩本朋忠、和田崇之、坂谷光則：入院期間中に薬剤感受性が変化した肺結核症の1症例における分子遺伝学的検討. 第83回日本結核病学会総会、東京、2008年4月24日
4. 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岡田全司、岩本朋忠、齊藤肇、富田元久、坂谷光則：Line Probe Assay を用いた抗酸菌同定キットの有用性の検討. 第83回日本結核病学会総会、東京、2008年4月25日
5. 露口一成、吉田志緒美、鈴木克洋、岡田全司、井上康、林清二、坂谷光則：透析を要する腎不全に合併した多剤耐性結核症例の検討. 第101回日本結核病学会近畿地方会、神戸、2008年7月5日
6. 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岡田全司、富田元久、坂谷光則：院内服薬用飲料水汚染に起因する *Mycobacterium chelonae* 感染の疑似アウトブレイク. 第101回日本結核病学会近畿地方会、神戸、2008年7月5日
7. 佐々木由美子、林清二、坂谷光則、露口一成、吉田志緒美、鈴木克洋、富田元久：食道癌術後に発症した *M. szulgai* 症の一例. 第101回日本結核病学会近畿地方会、神戸、2008年7月5日
8. 新井徹、西山明秀、杉本親寿、鈴木克洋、林清二、坂谷光則、井上義一、露口一成、審良正則、北市正則：肺アスペルギルス症の進行とともに自己免疫性肺胞蛋白症が発症した一例. 第71回日本呼吸器学会近畿地方会、神戸、2008年7月5日
9. 露口一成、吉田志緒美、富田元久、鈴木克洋、岡田全司、坂谷光則：ジェノスカラーによる結核菌のRFP耐性迅速診断法の検討. 第102回日本結核病学会近畿地方会、大阪、2008年12月13日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

SM耐性結核菌のKM、AMK交差耐性に関する研究

研究協力者 菅原 勇 (財)結核予防会結核研究所

研究要旨

74のSM耐性結核菌株のうちKM,AMK耐性の有無を調べた。15株が、KM, SM, AMK耐性であった。15株ともrrs突然変異が見つかり、2株は、rrs,rpsL突然変異を有していた。この15株は、SM高度耐性株であり、rrs変異と有意な相関が認められた。

A. 研究目的

中国で見つけられたSM耐性結核菌株がKM,AMKと交差耐性を示すかどうかを、調べた。

B. 研究方法

まず、この15株を培養して、MICプレートを用いて、MICを求めて、KM, AMK耐性か否かを調べた。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。

(倫理面への配慮)

結核患者名を用いず、検体番号を用い、患者のプライバシーに配慮した。

C. 研究結果

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。

D. 考察

以前に、東村らは、SM耐性結核菌株はKM, AMKに感受性であると報告している。これらは、いずれも低レベルのSM耐性を問題にしている。我々は、SM高度耐性株であるなら、KM, AMKにも耐性を示すのではないかと考えて実験を行った。

中国で得られたSM耐性株は、高度耐性でMICが100 μ g/ml以上であった。従って、SM耐性を考える場合、低レベル、高レベルの2つを考える必要がある。低レベルでは、rpsL変異が見つかり、KM, AMKに感受性を示すが、高レベルでは、KM, AMKに耐性を示すことが多い。これからの、結核治療で考慮すべき点だと考えられる。

日本でも、少数ながら見つかっており、外国の結核問題だとは考えられない。

E. 結論

Sm, KM, AMKの3者に耐性を示す結核菌株を15株見つけ、詳細に検討したところ全株にrrs突然変異を見つけた。このrrs変異が、KM, AMK耐性に関係することを見いだした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. I. Sugawara, L. Sun, S. Mizuno, T. Taniyama. Protective efficacy of rBCG Tokyo[Ag85A] in rhesus monkeys infected intratracheally with H37Rv M. tuberculosis. *Tuberculosis*, 89:62-67, 2009.
2. I. Sugawara, S. Mizuno. Higher susceptibility of type 1 diabetic rats to Mycobacterium tuberculosis infection. *Tohoku J. Exp. Med.*, 216: 363-370, 2008.
3. Y. Li, H. Takizawa, A. Azuma, T. Kohyama, Y. Yamauchi, S. Takahashi, M. Yamamoto, T. Kawada, S. Kudoh, I. Sugawara. Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to airway inflammatory responses induced by low-dose diesel exhaust particles in mice. *Clin. Immunol.*, 128: 366-373, 2008.
4. Y. Murase, S. Mitarai, I. Sugawara, S. kato, S. Maeda. Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family Mycobacterium tuberculosis. *J. Med. Microbiol.*, 57: 873-880, 2008.
5. M. Nagano, S. Ichimura, N. Ito, T. Tomii, Y. Kazumi, K. Takei, C. Abe, I. Sugawara. Identification of 23 mycobacterial species by invader assay with targeting 16S rRNA gene and ITS-1 region-comparison with DDH method in clinical isolates. *Kekkaku*, 83:487-496, 2008.

H. 知的財産権に関する情報

なし

多剤耐性結核菌の薬剤耐性遺伝子

研究協力者 阿部千代治 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

研究要旨

シンガポールで分離されたイソニアジド (INH) 耐性菌のMICを調べたところ、シンガポールにもINH低レベル耐性菌が存在することが分かった。遺伝子解析の結果、INH低レベル耐性菌23株中16株(69.6%)のkatGまたはinhA遺伝子に変異がみられ、BACTEC 460 TBの信頼性が確認された。

A. 研究目的

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

B. 研究計画

シンガポール総合病院で分離された結核菌の中BACTEC 460 TBによる検査でINH耐性を示した50株の結核菌について小川比率法を用い感受性を調べる。またMiddlebrook 7H10寒天培地でMICを測定する。さらに、耐性に関与する遺伝子を調べる。

C. 研究成果・考察

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0.8 µg/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、エタンプトール(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耐性に関与する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。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Chiba T, Takii T, Nishimura K, Yamamoto Y, Morikawa H, Abe C, and Onozaki K: Synthesis of new sugar derivatives from *Stachys sieboldi* Miq and antibacterial evaluation against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, and *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*. 17: 2487-2491, 2007.
2. Maeda Y, Mukai T, Kai M, Fukutomi Y, Nomaguchi H, Abe C, Kobayashi K, Kitada S, Maekura R, Yano I, Ishii N, Mori T, and Makino M: Evaluation of major membrane protein-II as a tool for serodiagnosis of leprosy. *FEMS Microbiol Lett*. 272: 202-205, 2007.
3. Abe C, Kobayashi I, Mitarai S, Wada M, Kawabe Y, Takashima T, Suzuki K, Sng L-H, Wang S, Htay HH, and Ogata H: Biological and molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with low-level resistance to isoniazid in Japan. *J Clin Microbiol*. 46: 2263-2268, 2008.
4. 御手洗聡, 小林郁夫, 阿部千代治, 和田雅子, 鈴木克洋, 高嶋哲也, 川辺芳子, 町田和子, 田野正夫, 瀧川修一, 鎌田有珠, 重藤えり子, 藤井俊司, 森健一, 須山尚史, 矢野修一, 川城丈夫, 尾形英雄: バクテック MGIT 960結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ(MGIT AST)および小川標準法によるイソニアジド低濃度薬剤感受性検査の判定不一致に関する検討. *結核*. 82: 449-454, 2007.

5. 阿部千代治：今回の結核菌検査指針改訂のポイント．結核．83：46-47，2008．
6. 阿部千代治：結核菌のバイオハザード対策．Medical Technology．36：137-141，2008．
7. 長野誠，市村禎宏，伊藤伸子，富井貴之，鹿住祐子，武井勝明，阿部千代治，菅原勇：16S rRNA遺伝子およびITS-1領域をターゲットとしたInvader法による23菌種の抗酸菌の同定．結核．83：487-496，2008．
8. 阿部千代治：世界の薬剤耐性結核の現状と迅速結核菌検査．モダンメディア．54：223-232，2008．
7. 小林郁夫，阿部千代治，御手洗聡，青野昭男：バクテックMGIT 960 ASTによる二次抗結核薬に対する結核菌の感受性検査．第82回日本結核病学会，June 5-6，2007，大阪．
8. 阿部千代治，小林郁夫，御手洗聡，和田雅子，川辺芳子，高嶋哲也，鈴木克洋，尾形英雄：イソニアジド耐性結核菌の体制に関与する遺伝子の変異．日本結核病学会総会，April 24-25，2008，東京．

E. 知的財産権の取得

なし

2. 学会発表

1. Abe C, Kobayashi I, Mitarai S, Wada M, Ogata H, and Sng Li-Hwei: Characterization of Mycobacterium tuberculosis isolates with low-level resistance to isoniazid. 107th General Meeting of the American Society for Microbiology. May 20-25, 2007, Toronto.
2. Abe C, Kobayashi I, Mitarai S, Wada M, Ogata H, and Sng Li-Hwei: Molecular characteristics of isoniazid resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Japan. 28th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology. July 1-4, 2007, Athens.
3. Abe C, Kobayashi I, Mitarai S, Wada M, and Ogata H: Mutations in the gene of Mycobacterium tuberculosis isolates with resistance to ethionamide. 29th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, July 6-9, 2008, Plovdiv.
4. 阿部千代治：シンポジウムⅡ-2. 今回の結核菌検査指針改訂のポイント．第82回日本結核病学会，June 5-6，2007，大阪．
5. 阿部千代治，小林郁夫，御手洗聡，和田雅子，川辺芳子，高嶋哲也，鈴木克洋，尾形英雄：BACTEC MGIT 960 ASTでイソニアジド耐性・小川比率法で感受性結核菌の性状．第82回日本結核病学会，June 5-6，2007，大阪．
6. 御手洗聡，小林郁夫，阿部千代治，和田雅子，鈴木克洋，高嶋哲也，川辺芳子，尾形英雄：バクテックMGIT 960結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ(MGIT AST)および小川標準法によるイソニアジド低濃度薬剤感受性検査の判定不一致に関する検討．第82回日本結核病学会，June 5-6，2007，大阪．

多剤耐性結核に対する新たな薬剤の開発

研究協力者 赤川清子 北里大学北里生命科学研究所 客員教授

研究要旨

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

A. 研究目的

多剤耐性結核患者は世界的に増加しており、これらの結核に効く新規薬剤の早急な開発は世界的ニーズとなっている。しかし、抗菌剤の場合、常に耐性菌出現という問題が伴う。そのため、結核菌を直接殺菌する抗生物質としての抗結核剤の開発だけでなく、宿主の抗結核防御機構を増強することで結核菌を殺菌する薬剤の開発も重要である。結核菌の主たる増殖、生存の場所はマクロファージ (M ϕ) であることより、マクロファージの抗結核菌活性を増強する薬剤の開発は重要である。エリスロマイシン誘導体 EM201, EM703は、M ϕ の HIV感受性を抵抗性に交換し、ウイルスの増殖抑制活性を有する。本研究では、これらの誘導体がM ϕ の結核菌感受性も抵抗性に交換し、菌の増殖を抑制するか否か検討した。

B. 研究方法

ヒト単球の調整は、正常ボランティアの末梢血よりリンホブレップにて分離した単核球より、CD14ビーズ抗体とMACSによりCD14陽性の単球画分を分離精製した。これら単球をGM-CSF存在下に10%FCSを含むRPMI1640培地で1週間培養することで、GM型M ϕ を作製した。これらのM ϕ にヒト型結核菌Mycobacterium tuberculosis H37Rvをmoi 1-2で感染させ、エリスロマイシン誘導体 (EM201, EM703, EM202)の存在および非存在下に6日間培養後、菌のCFUを測定して、菌の殺菌あるいは増殖を調べた。

(倫理面への配慮)

正常ボランティアよりの血液の採取に関しては、インフォームドコンセントを得た。

C. 結果

EM201, EM202, EM703は、抗菌活性を全く有しない (EM703) かほとんど有しない (EM201, EM202) エリスロマイシン (EMA) の生体内代謝産物 (EM201, EM202)あるいはその誘導体 (EM703) である。これらエリスロマイシン誘導体が、結核菌感受性ヒト単球由来GM型M ϕ を結核菌抵抗性M ϕ に変換して、結核菌の増殖を抑制できるか否か検討した。

ヒト単球由来GM型M ϕ を種々の濃度 (3-30 μ M) のEM201, EM202, EM703で処理しても結核菌増殖は抑

制されず、対照群と同様に菌は増殖した。この結果より、これらのマクロライド誘導体はGM型M ϕ の結核菌感受性を結核菌抵抗性に交換する作用は有しないことが明らかになった。

D. 考察

EM201とEM703は、ヒトM ϕ のHIV感受性をHIV抵抗性に交換し、M ϕ におけるHIV増殖を抑制する薬剤として非常に有効であることを見いだした (PNAS 105(34): 12509-14, 2008)。EM201とEM703によるHIV感受性M ϕ のHIV抵抗性M ϕ への変換は、MAPカインースの活性化の抑制、Hckの発現抑制、C/EBP β のinhibitory small isoformの発現誘導による。一方、ヒトM ϕ の結核菌の殺菌・増殖抑制活性はHIV増殖抑制活性と異なり、MAPカインースの活性化、HckおよびC/EBP β の発現増強と正に相関するため、EM201とEM703はそれらの活性や発現を誘導できず、結核菌抵抗性M ϕ への変換を誘導できなかったと考えられる。ヒトM ϕ の結核菌殺菌活性の増強薬剤としては、EM201やEM703と異なり、ヒトM ϕ のMAPカインースを活性化して、HckおよびC/EBP β の発現増強を誘導するような薬剤の探索が必要と考えられた。

E. 結論

ヒトM ϕ の HIV感受性を抵抗性に交換することで、HIV増殖を抑制するエリスロマイシン誘導体 EM201, EM703は、ヒトM ϕ の結核菌感受性を抵抗性に交換できず、結核菌の増殖を抑制できなかった。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Komuro, I., Sunazuka, T., Akagawa K.S., Yokota Y., Iwamoto, I., and Omura S.: Erythromycin-derivatives EM201 and EM703 inhibit HIV-1 replication in macrophages through modulation of MAPK activity to

induce small isoform of C/EBP β . Proc Natl Acad Sci USA 105(34):12509-14, 2008

2. Kamata, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Chinen, H., Kobayashi, T., Sato, T., Sakuraba, A., Kitazume, M., Sugita, A., Koganei, K., Akagawa, K.S., and Hibi, H.: Unique CD14-positive intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn's disease via IL-23/IFN- γ axis. J. Clin. Invest. 118: 2269-2280, 2008
3. 赤川清子: 肺胞マクロファージの分化とGM-CSF--PPAR- γ の発現と抗炎症作用、医学のあゆみ224: 857-860, 2008

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

3. その他

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
鈴木克洋	喉頭・気管・気管支結核	日本呼吸器内視鏡学会編	気管支鏡	医学書院	東京	2008	183-185
鈴木克洋	第3版「分かりやすい内科学」	井村裕夫編集主幹	かぜ症候群とインフルエンザ・肺炎	文光堂	東京	2008	7-16
鈴木克洋	ガイドライン外来診療2008	泉孝英編集主幹	非結核性抗酸菌症	日経メディカル開発	東京	2008	366-368
鈴木克洋	肺炎の画像診断と最新の治療	藤田次郎編集	非結核性抗酸菌症の画像診断	医薬ジャーナル社	大阪	2008	273-280
鈴木克洋	KEY WORD 感染症、第2版	山口恵三、戸塚恭一編	非定型抗酸菌症(非結核性抗酸菌症)	先端医学社	東京	2008	118-119

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
岡田全司	Novel prophylactic and therapeutic vaccine against Tuberculosis.		Vaccine			in press
岡田全司	The study of Novel Vaccination using Granulysin transgenic mice.		Vaccine			in press
岡田全司	Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary Mycobacterium avium complex infection.		J.Infect. Dis.			in press
岡田全司	Research and Development of vaccines against Tuberculosis.		Kekkaku	83	635-640	2008
岡田全司	Neuritogenic Effects of T Cell-Derived IL-3 on Mouse Splenic Sympathetic Neurons In Vivo.		The Journal of Immunology	180	4227-4234	2008
岡田全司	The Journal of Gene Medicine Japanese Society of Gene Therapy Young Investigator Award 2008.		J Gene Med	10 (12)	1343	2008
岡田全司	Evaluation of the discrepant Mycobacterium tuberculosis strains between any ordinary susceptibility testing and rpoB gene analysis by the line probe assay.		Kekkaku	83	577-583	2008
岡田全司	An adolescent case of pulmonary MAC infection, found 3 years later from bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome.		Kekkaku	83(8)	585-590	2008

岡田全司	遺伝子を用いた抗酸菌鑑別同定試薬 INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2の有 用性の検討	結核	84(1)	15-21	2009
岡田全司	感染症に対するワクチン開発とその免疫理 論	臨床免疫・アレ ルギー科	50(5)	533-542	2008
岡田全司	特異抗原をターゲットとした Immunotherapy	日本臨床免疫 学会会誌	31(5)	356-368	2008
岡田全司	BCGと新たな結核ワクチン	呼吸器科	13	99-106	2008
岡田全司	新しい結核ワクチンの開発	呼吸と循環	56(7)	685-695	2008
加藤誠也	Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family Mycobacterium tuberculosis.	J Med Microbiol	57	873-880	2008
加藤誠也	国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復 配列多型(VNTR)分析システム -JATA (12)-VNTR分析法の実際-	結核	83	673-678	2008
小林信之	当センターにおける外国人結核症患者の臨 床的特徴の変遷 8年前との比較ならびに 今後の対策に向けて	結核	83	661-666	2008
服部俊夫	Procyanidins and butanol extract of Cinnamomi Cortex inhibit SARS-CoV infection.	Antiviral Research			in press
服部俊夫	Peltophorum africanum, a traditional South African medicinal plant that contains an anti HIV-1 constituent, betulinic acid.	The Tohoku Journal of Experimental Medicine	217 (2)	93-99	2009
服部俊夫	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
服部俊夫	Characterization of a CD4- independent clinical HIV-1 that can efficiently infect human hepatocytes through CXCR4.	AIDS	22	1749-1757	2008
服部俊夫	Increased synthesis of anti-TBGL IgG and IgA with cavity formation in pulmonary tuberculosis.	Clinical Vaccine and Immunology	15(3)	544-548	2008
服部俊夫	Anti rabies antibodies in Japanese volunteers immunized with imported vaccine.	Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health	39 (1)	68-71	2008
高鳥毛敏雄	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
高鳥毛敏雄	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
慶長直人	Genome-wide SNP-based linkage analysis of tuberculosis in Thais	Genes Immun	10(1)	77-83	2009