

図5 国籍

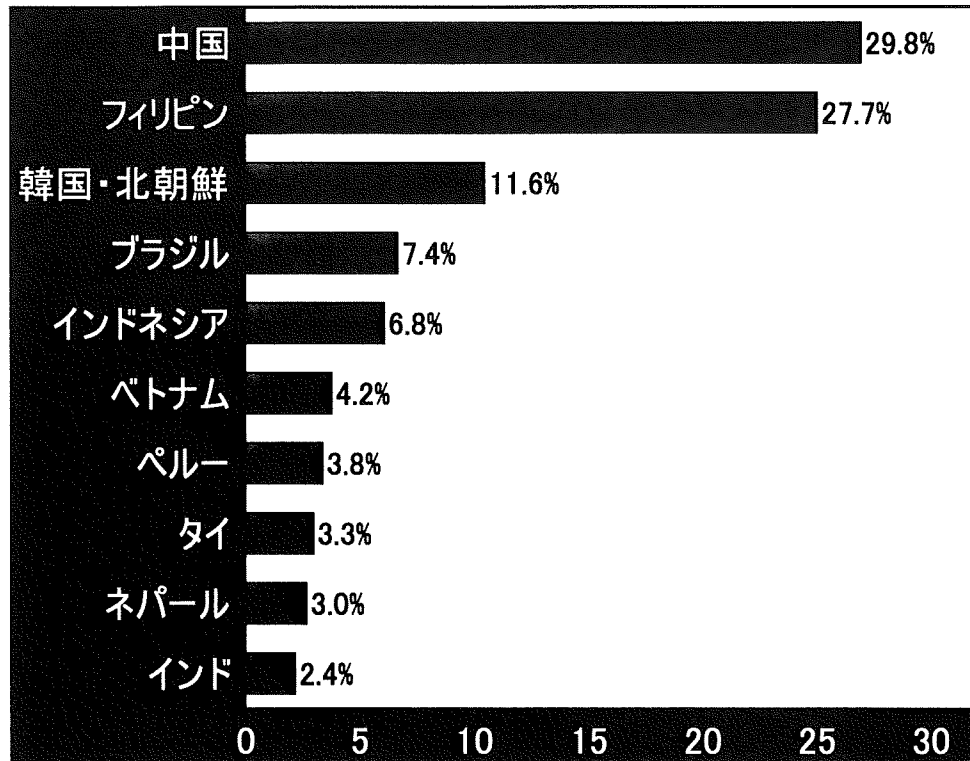


表9 来日年数

来日6ヶ月	12.5 %
来日6～12ヶ月	9.8
来日1～3年以内	23.6
来日3～5年以内	12.8

国籍では、中国が最も多く、次いでフィリピン、韓国・北朝鮮、ブラジル、インドネシアの順であった(図5)。入国1～3年の発症が多く(表9)、外国(母国)での結核感染が示唆された。東京都の外国人結核が最も多く、次いで神奈川県、愛知県であった(表11)。愛知県ではブラジル国籍の外国人が多い傾向を示した。

表10 都道府県

東京都	11.4 %
神奈川県	11.0
愛知県	9.2

常勤者(30.1%)、学生(12.6%)が多いのも特徴であった(表11)。

表11 職業

常勤者	30.1 %
臨時雇・日雇	17.8
学生	12.6
接客業	10.1
主婦	13.4
無職	13.2

表12 発見方法

医療機関受診	71.0 %
定期健診(学生)	5.1
定期健診(労働者)	11.8
日本語学校健診	1.6
外国人を対象の検診	0.7

しかし、定期健診や学校健診による発見は少なく、これを改善する必要があると示唆された(表12)。

表13 菌情報

塗抹陽性	53.0 %
培養陽性	55.4

表15 基礎疾患（合併症）

なし	74.7 %
糖尿病	4.4
HIV	1.7

表14 結核診断名

肺結核		79.8 %
肺外結核	胸膜炎	7.3
	リンパ節	10.8

細菌塗抹陽性が53.0%であり、培養陽性が55.4%であった（表13）。肺結核が79.8%であり、肺外結核として胸膜炎、リンパ節結核が報告された（表14）。合併症としては糖尿病合併結核が4.4%、HIV合併結核が1.7%であった（表15）。

表16 薬剤耐性

MDR-TB 3.4%（日本人1.9%）  
（INH耐性＋RFP耐性）

	外国人結核	日本人結核 （御手洗報告）
INH 耐性	8.4 %	5.9 %
SM 耐性	5.7	7.9
RFP 耐性	3.9	2.4
EB 耐性	3.9	2.4
PZA 耐性	2.5	
LVFX 耐性	0.5	
なし	48.6	
不明・未実施	39.4	

日本における外国人結核の結核菌の薬剤耐性について解析した（表16）。多剤耐性結核（MDR-TB）は3.4%と、明らかに日本人結核（1.9%）より高い頻度を示した。

また、外国人結核のINH単独耐性（8.4%）は日本人結核のINH単独耐性（5.9%）より高く、RFP単独耐性（3.9%）は日本人結核のRFP単独耐性結核（2.4%）より高い頻度を示した（表16）。

転帰としては治療途中の帰国が17%も存在し、大きな問題点であった（表17）。

具体的な問題点として、

①言語の問題が大きく、通訳対策の重要性が示された（表18）。

②翻訳パンフレットは外国人結核の多い韓国語、ブラジル人のポルトガル語、フィリピン人のタガログ語は少なく問題点であった（表19）。

治療上困難であった問題点を表20に示した。言葉の問題のみでなく、生活習慣の違いや宗教上の食事の問題が指摘された。

表18 言語障壁への対応  
通訳の有無

行政サービス	3.2 %
ボランティア	2.3
友人・知人	10.5
職場・学校など	17.2

表20

医療上困難であった問題点と対応
1. 言葉の問題
2. 生活習慣のちがいがい
3. 食事の問題(宗教上)
4. 不法滞在
5. 経済的な問題

表17 転帰

治療完了	74.3 %
継続中	5.4
帰国	16.6
治療中断・失敗	34.6
死亡	2.3

表19 翻訳パンフレット等の有無

英語	9.4 %
中国語	12.3
韓国語	1.8
タガログ語	2.4
ポルトガル語	1.4

図6

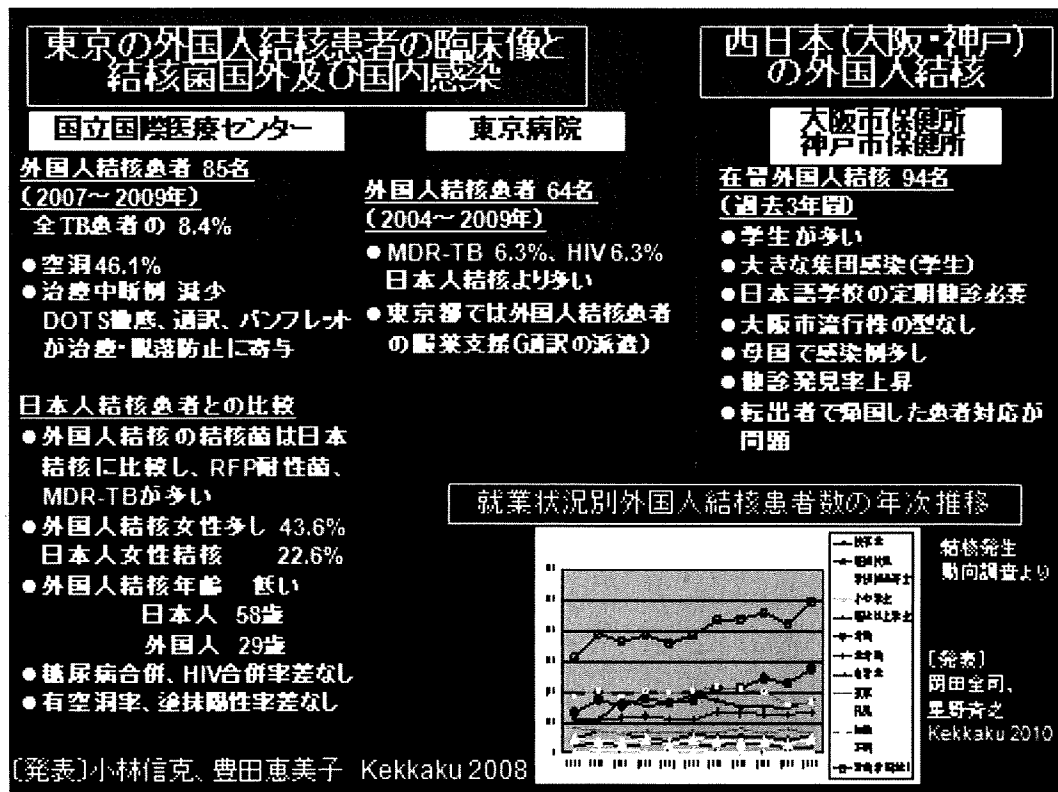


図7

## 東京の外国人結核菌の薬剤耐性・分子学的解析

外国人結核(東京の)は多剤耐性結核菌  
及びRFP耐性結核菌多し

### 結核菌の薬剤感受性

#### 国籍別の薬剤耐性

		薬剤耐性の割合(%)		性・年齢補正後 オッズ比 (95%信頼区間)
		日本人 (1590株)	外国人 (131株)	
薬剤耐性	INH	5.4	6.1	0.97(0.44-2.12)
	RFP	0.8	3.1	6.34(1.58-25.6)**
	SM	8.2	8.8	0.73(0.37-1.43)
	EB	0.8	1.5	3.47(0.6-20.1)
	LVFX	0.5	0.8	1.00(0.11-9.0)
多剤耐性		0.4	2.3	7.31(1.3-41.2)*

\*P<0.05 \*\*P<0.01

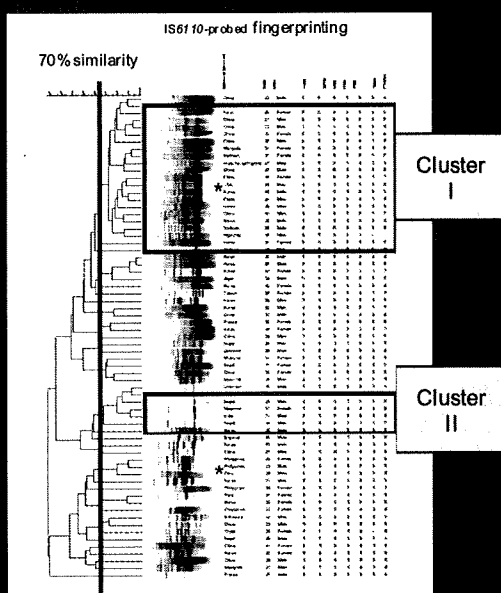
図8

#### 外国人結核の国内流行示唆

RFLP解析 70%以上のクラスター形成(2種のクラスター形成を発見)より  
特定の菌株蔓延示唆

#### 外国人結核の国外感染示唆

入国後発症1~3年より、母国で  
感染例も多し



(2) 調査期間中の外国人結核は85名であった。年齢は20～30歳代の若年層が多く（20代47.1%、30代27.1%）、性別は女性が43.6%を占めていた。国籍は以前の報告と同様に、中国・韓国・フィリピンといったアジア諸国が多いが、欧州出身の患者の増加が注目された。入国後1年以内の発症は22.5%であった。肺結核は68名で結核全体の82.3%を占め、そのうち排菌陽性は80.9%、塗抹陽性は55.9%、有空洞率は44.1%であった。肺外結核では頸部リンパ節結核と胸膜炎が多かった。日本人結核と比較した結果、外国人結核では年齢が有意に低く（ $p<0.001$ ）、女性が有意に多かった（ $p<0.001$ ）が、糖尿病、HIVの合併率、排菌陽性率、塗抹陽性率、有空洞率では両者の間に差はみられなかった（図6）。結核菌の薬剤感受性に関しては、最近6年間に得られた外国人由来株と日本人由来株について解析した結果、外国人由来株ではRFP耐性および多剤耐性が有意に高く、性・年齢で補正後のオッズ比は、RFP耐性で6.34、多剤耐性では7.31であった（図7）。治療中断例は以前と比べて少なくなっており、病院と保健所の連携、DOTSの徹底、通訳・パンフレットなどのツールの使用が外国人結核の治療脱落の防止に寄与したことが示唆される。しかし、発見できず、死亡してしまった症例（27歳男性、中国人、不法滞在）があり、上記対策からすり抜けてしまう例のあることが問題となった。MDR-TB症例の臨床像について外国人と日本人の比較を行った。例数は日本人6名、外国人5名（外国人は2003年以降）と少ないため検定はしていないが、外国人では若年で女性に多い傾向がみられた。初回MDRは外国人1名、日本人2名、HIV陽性は外国人で1名、日本人0名、塗抹陽性は外国人1名、日本人3名であった。2000年1月から2008年12月までに入院加療した外国人結核患者は150名（男性97名、女性52名、不明1名）であった。患者リストに従って菌株を移送し、疫学解析を開始した。これまでに87株の植菌が完了している。薬剤感受性試験の結果、74株は全ての第一選択薬に感受性であった。87株のうち、ゲノムを抽出することができたのは86株、RFLP解析が可能であったのは75株、さらに1患者1株としてクラスター解析できたのは67株であった。67株のうち、相同性70%以上の明確なクラスターは2つ形成された（図8）。クラスターIは20株から成り、クラスターIIは5株から成っていた。特定の菌株が蔓延している可能性が示唆され、引き続き解析を続ける。また、VNTR解析

も導入し解析を始める予定である。さらに、薬剤感受性試験と薬剤耐性遺伝子のシーケンス解析も実施し、特定の菌株が特定の集団に蔓延しているかどうかを明らかにしていく。

- (3) 国立病院機構東京病院では2009年の外国人結核は9人（全結核患者の2.4%）で、全国平均より少なかった。また2004～2009年の6年間に当院で結核治療を行った外国人結核患者数は64名であった（図6）。この間の全結核患者入院数は2411人の2.7%をしめており、2008年の全国新規登録外国人結核は468人で3.8%で全国平均よりも低い。男性31人、女性33人で、20代が41%であった。主な国籍は中国、フィリピン、韓国で肺結核52、肺外結核12例であった。HIV陽性者3例、多剤耐性4例あり、標準治療は52例（81.3%）うちPZAを含むA法は39人に60.9%に実施した。当院では高齢者結核に比較すれば臨床的困難性は低く、大体横ばいであり目立たぬ問題である（図6）。
- (4) 大阪市に新規登録された在留外国人結核患者数は、2006-2009年の4年間で、127名であった。登録患者数は年間平均30名程であり、徐々に増加してきている。患者の年齢層は20歳代にピークがあり、全体の50.4%、10-39歳で75.2%であった。職業別では、学生（33.1%）と常勤者（19.7%）の割合が高かった。臨時雇用者や接客業者、自営業者は少なかったが、無職（21.3%）も多く見られたが、多くは主婦や高齢者であった。出身国では中国と韓国が多く、両国で66.1%を占めた。それにフィリピン、その他の東南アジア等が続いた。アフリカ出身の結核患者は2名であった（図6）。結核患者の発病時期について、来日してから6カ月以内が12.6%、1年以内25.2%、2年以内42.5%、5年以内64.6%であった。患者の発見方法は、医療機関受診が66.9%、定期健診が26.8%であった。定期健診での発見割合は、大阪市全体の2倍近くであった。また定期健診発見のうち、70.6%は学生であった。また、健康保険に加入している者は85.8%と大半を占めていた。新規登録患者のうち、肺結核患者は83.5%（106名）であった。喀痰塗抹陽性者は46.2%、多量排菌と考えられる「2+以上」の者が18.9%であった。また、肺野に空洞なしが81.1%、「空洞なく」かつ「拡がり1」の早期病状が55.7%であり、「空洞あり」かつ「拡がり2以上」の進行病状は18.9%であった。肺結核患者の77.4%（82名）に薬剤感受性検査

を実施できた。多剤耐性結核を6.1% (5名) 認めた。INH耐性結核の割合は9.8%(8名)であった。

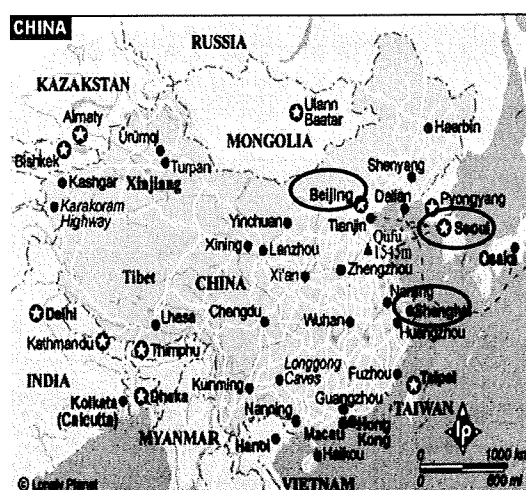
治療成績は、治癒29.0%、治療完了36.6%で、治療成功率は65.6%であるが、中断9.7%と転出20.4%が高かった。

JATA-VNTRによる12ヶ所のVNTR解析で市内解析株と完全に一致した在留外国人患者由来株は6株あった。韓国の1名を除いて、全て中国出身であり、6株全てが北京型結核菌であった。この6株にHV領域での比較解析を行ったところ、国内由来株データとの差異が、(1) 3箇所以上含んでいた2株と、(2) 1箇所のみ含んでいた3株と、(3) 1箇所のみ含んでおり、かつ「大規模拡散型結核菌」のVNTRと完全一致であった1株に分類できた。

今回の36株解析のうち、非北京型結核菌は11株(30.6%)であった。中国・韓国以外の外国人結核患者で、非北京型結核菌による感染は7名(77.8%)であった。これらの事例については、出身国での感染および入国後の日本国内発症が強く疑われた。

- (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(図6)。

## 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

1. 台湾における結核菌遺伝型の解析：東アジア諸国では、北京型結核菌の割合が70-90%と高いことが知られている(図9)。しかし、台湾では、北京型結核菌の割合が44.4%、次いでEast-African-Indian (EAI) が33.8%を占めており、他の国と大きく異なる。そのため、効率よく型別可能なVNTRのローサイは、他の国とは異なることが示唆された。台湾国内で分離された53株の北京型結核菌について、IS6110のNTF領域への送込の有無でAncient型とModern型に区分すると、37株(約70%)はModern型であった。
2. 香港における結核菌遺伝型の解析：香港では、Ancient型とModern型の区分等の結核菌遺伝型解析は行われていない状況だった(図9)。また、香港周辺はユーラシア東南部なので北京型結核菌の比率は低いのにに対して香港特別区では、なぜ結核菌の7割が北京型なのか、という疑問が残されている。今後の結核菌遺伝子型解析により解決可能であると考えられる。
3. 韓国国内で広まっているK-strainの型別：韓国では、特徴的なRFLPパターンを持つK-strainとその類似度が70%以上であるK-familyが、国内全結核のそれぞれ4%、19%を占めている。IS6110 RFLP分析では、類似度が高いため型別することが難しいが、JATA(12)-VNTR分析システムを利用することで、さらに小さなサブグループへと区分することが可能であった。このようにVNTR法による型別は、非常に有用であることが再確認できた(図10, 11)。

## 〔II〕アジア諸国との多剤耐性結核の分子疫学研究と宿主要因解析

### アジアでの感染伝播状況の解析

- 3カ国(中国、韓国、日本)の結核研究施設(結核研究所)が分子疫学共同研究
- 結核菌IS6110遺伝子とVNTR(Variable Number of Tandem Repeat)解析のMST(minimum spanning tree)解析により、
  - 日本・韓国の結核菌“祖先型(ancient型)”75~80%
  - 中国(上海、北京)、ロシアや欧米は“蔓延型(modern型)”90%で結核菌の遺伝的背景が国により異なることを発見

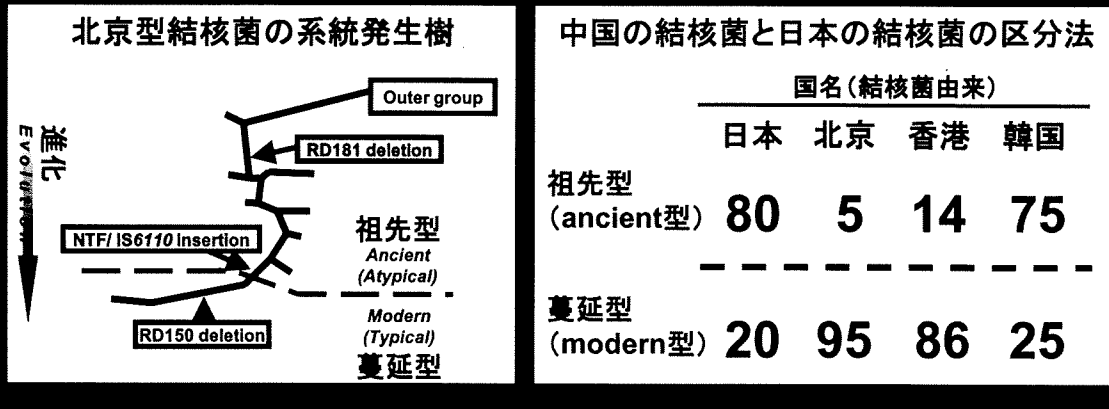


図10

## アジアでの感染伝播状況の解析

### 日本の結核菌と韓国の結核菌の区分法発見

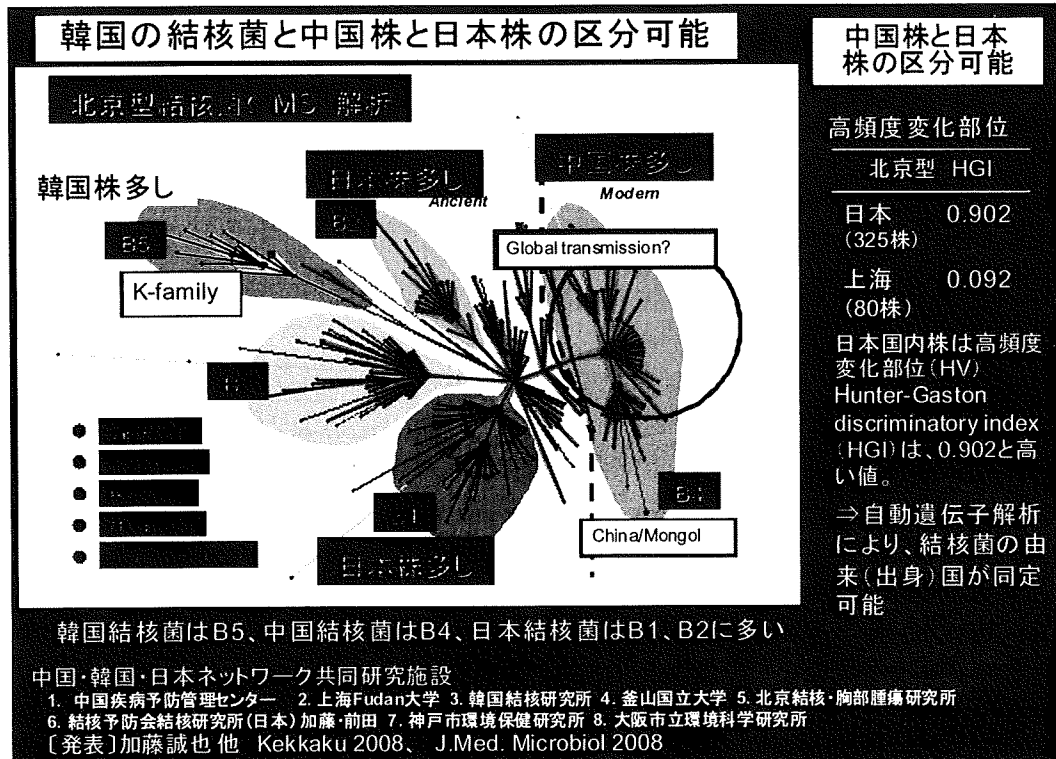
- 日本の結核菌と韓国の結核菌は遺伝子型で区分可能
- MST解析により韓国に特徴的なRD181陽性株(韓国の結核菌の6割)
- RD181陽性株はVNTRでB5グループに区分
- B5グループには韓国株に特徴的なk-strain株(RD181陽性株)が含まれる。
- 韓国に特徴的なK-strainと同じパターンの結核菌が日本国内でも0.3%。

#### 韓国に特徴的なRD181陽性株

#### Ancient型結核菌のRD181部位の有無

	祖先型 (Ancient型)	RD181	
		陽性	陰性
大阪	130	15 (12%)	115 (88%)
東京	87	17 (20%)	70 (80%)
韓国	46	29 (63%)	17 (37%)

図11



4. VNTR分析における精度管理の重要性：中国国内の上海の研究室からのVNTR型別データと北京の研究室から論文として報告されているデータを minimum spanning tree (MST)解析で比較したところ、全くそれぞれのデータが一致しないことが判明した。この結果は、上海と北京では全く異なる結核菌が広がっていることを意味する。しかし、ローカス毎のデータを精査すると上海のデータはコピー数への換算が、3箇所で誤っていることがわかった。このように、異なる研究室で出した型別結果を比較する際には、前もってデータの精度管理の必要があり、この点は非常に重要であることが確認された。

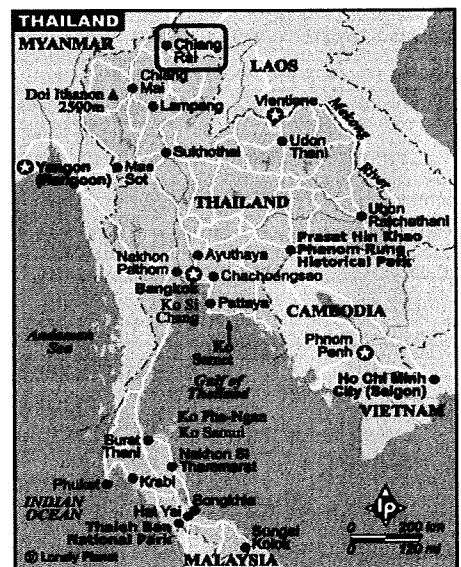
5. 共通VNTRシステムにおけるローサイの選択：VNTR分析では、ローカスの選択が非常に重要で、どのローカスを何箇所、解析するかで本型別法の分解能は大きく左右される。各国で現在利用しているローサイをまとめて共通なローサイを選択すれば、効率よく共有可能なVNTRシステムを構築することができる。

国(北京、上海)、香港、台湾、韓国、日本の6箇所の研究室すべてで、共通に利用しているローサイは、MIRU 10 (VNTR0960)とMIRU 26 (VNTR2996)の2箇所だけだった。そこで、6箇所の研究室の内、5箇所で採用している7箇所のローサイ [MIRU 31 (VNTR3192)、ETR A (VNTR2165)、QUB 26 (VNTR4052)、QUB 11b (VNTR2163b)、

Mtub 04 (VNTR0424)、Mtub 21 (VNTR1955)、VNTR4156 ]及び将来的なMST解析のために QUB15 (VNTR3155)を加えて、合計10ローサイを選択した。

結核研究所から各施設に結核菌DNAを送付し分析することによって、これらのローサイの精度管理を行うことにした。

(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) (図12)。



地図2. タイ



倫理委員会の承認にて実施されている患者の stage や治療を詳細に解析する前向きコホート研究で、PPD-tuberculin と結核死菌 (H37Ra) で Stimulation し培養した検体を活用して検討を進めた。現在までの解析した人数を示したが、正常タイ人 20 人、通常の非難治性の初回結核 23 例、難治性結核 47 例 (再発例 17 例、治療失敗例 26 例、慢性排菌例 4 例) が解析されている。結核患者 PBMC を H37Ra 刺激した In vitro 培養上清中グラニューライシン濃度を示した。正常タイ人コントロール (n=10) では中央値が 0.27、新規結核患者では 1.11 であったが、再発例 (n=17) で 0.87、治療失敗例 (n=26) で 0.80、慢性排菌例 (n=4) で 0.56 であり、グラニューライシン産生能が低下しているという知見が得られた。PPD-tuberculin で刺激した群でも同様であった。これは、岡田が日本において発見した、特に多剤耐性結核患者で CD8 陽性キラー T リンパ球内のグラニューライシンの低下等の知見と矛盾しない。

い。後ろ向きコホートの検体バンクでの測定では、岡田班で結核患者の血漿中グラニューライシン値は正常人よりも難治性結核で高値であった。尚、グラニューライシンのみならず、インターフェロニンにおいても同様な解析をしているが、すべての群で統計学的に有意な所見は得られていない。PPD-tuberculin の群を示した。難治性結核症における北京株の割合とタイ国の新規結核菌の全国レベルの 20.8% [Dhanida Rhienthong et al, 2005] に比したオッズ比を求めた。難治性結核患者の結核菌は北京株 (Beijing family) が 52.7% と高く、オッズ比は再発例 OR=5.5 (95% 信頼区間 2.5-13.1)、治療失敗例 OR=2.5 (95% 信頼区間 1.02-6.3) と有意に高かった。多剤耐性結核菌の北京株は更に高く 66.7% であった。バンコクでの結核性髄膜炎からの症例でも北京株が有意に比率が高いことから、タイにおいて北京株はより病原性が高い可能性がある。

図 1 2



- (8) ハルビン医科大学との共同研究  
結核菌の遺伝子解析  
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. microtti*, 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 600  
bp 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。(平成20年度報告書)さらに残りの結核菌  
であることが判明した株について薬剤感受性  
テストを行った。そこで得られた多剤耐性株  
MDR-TBの44株のDNAを抽出して、その起源  
をスポリゴタイピング法で解析した。  
スポリゴタイピング  
Kamerbeek の方法でスポリゴタイピングを行  
った DR 領域は以下のプライマーで増幅した。  
(DRa: GGTTTTGGGTCTGACGAC, DRb:  
CCGAGAGGGGACGAAAC) 得られた  
PCR産物はスパーサーの異なる 43 種類のプ  
ロープでハイブリダイズさせた。得られたバン  
ドについてはSpolDB4データベースにより  
SIT (Spoligotype International Type) 番号  
を決め、そのクレードは参考文献2により定めた。



地図3. ハルビン

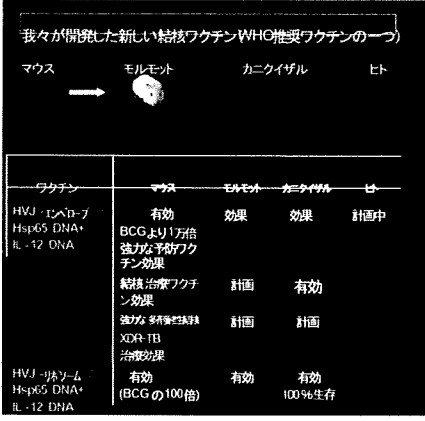
- ハルビン医科大学と、同地域の結核患者より得  
た結核菌の薬剤感受性を検討した。国内ではこ  
れほど多くの多剤耐性結核の症例を集めるこ  
とは困難である。疫学的な基礎資料となること  
が期待される。
- (9) OPNならびにgranulysin等の細胞障害性顆粒  
とHIV感染者とHIV合併結核を標的として臨  
床試料を用いた解析を行った。OPN、granu  
lysinともにHIV感染における結核発症の高い  
リスクと密接に関わっている可能性が示唆さ  
れた(図12)。
- (10) ホーチミン市のファムゴックタック病院は、結  
核菌耐性検査法の精度管理が確立しており、  
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、約5%と報告され、都市部の、結核既治  
療再排菌例に多いことが、我々独自の調査で  
も明らかである(未発表資料)。ファムゴック  
タック病院では、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  
治療を完遂しており、多剤耐性結核のベトナ  
ムにおける臨床共同研究の受け入れ機関とし  
て、最も適していた。  
本研究では、共同研究のプロトコール作成を  
行い、医療センター倫理委員会にて平成21年  
5月承認、ファムゴックタック病院倫理委員  
会にて平成21年8月承認、本年度の打ち合わ  
せ(ホーチミン市にて)は、平成21年8月延  
期(新型インフルエンザのため)、平成22年  
1月実施。リクルート開始は平成21年9月、リ  
クルート終了は平成22年1月。外来通院中の、  
多剤耐性結核患者60名から研究参加の同意を  
いただき、採血を終了し、サンプルの輸送を  
行なった。  
今回は、3年という研究期間の2年目であり、  
大規模なコホート研究は、本研究班の枠組み  
では困難なため、断面研究に近い、研究デザ  
インとならざるを得なかった。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(図12)。

図 1 3

### 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見(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-リポソーム/HSP65+IL-12 DNAは、サルで100%生存率の画期的な結核予防ワクチン効果。(BCG群は33%)

臨床応用に実績のプラスミドベクター(pVAX1)とHVJ-E封入製剤調製の品質管理基準・標準操作手順書・治験薬 GMPレベル。



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 結核治療ワクチン効果	効果	効果	計画中
		強力な多剤耐性結核 XDR-TB 治療効果	計画	計画
HVJ-リポソーム Hsp65 DNA+ IL-12 DNA	有効 (BCGの100倍)	有効	有効	100%生存

表 2 1

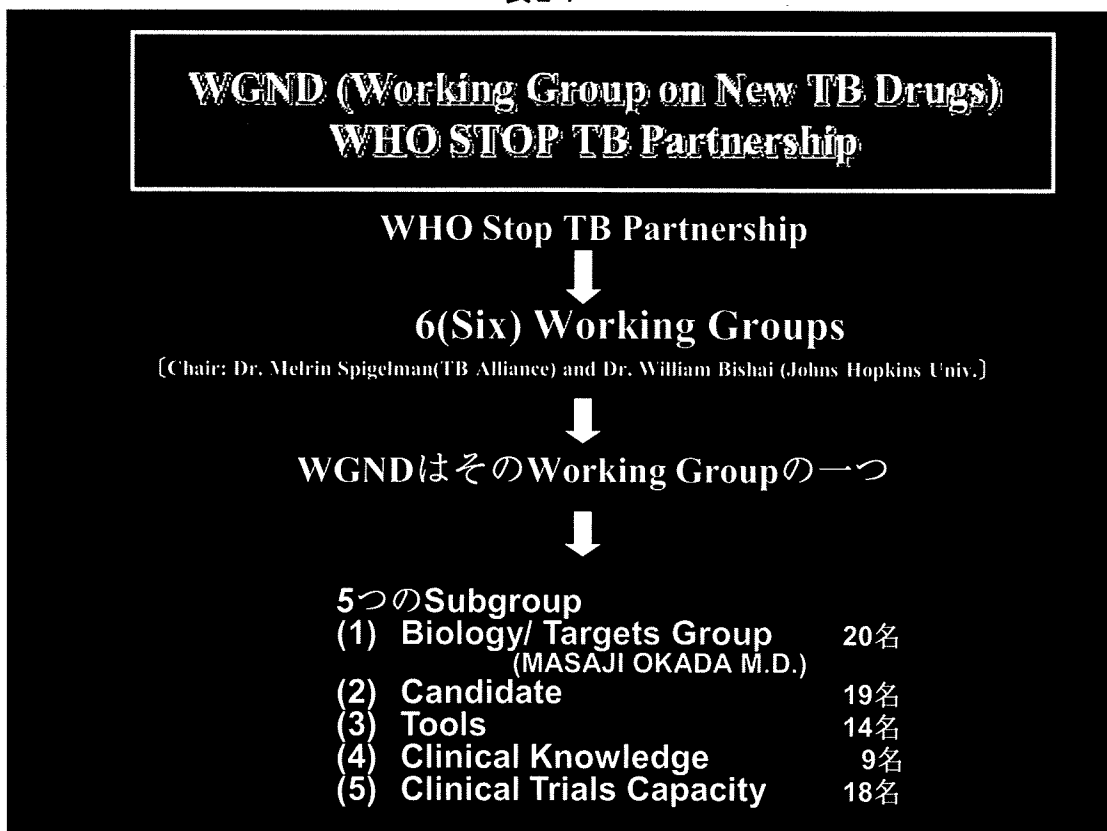


図14

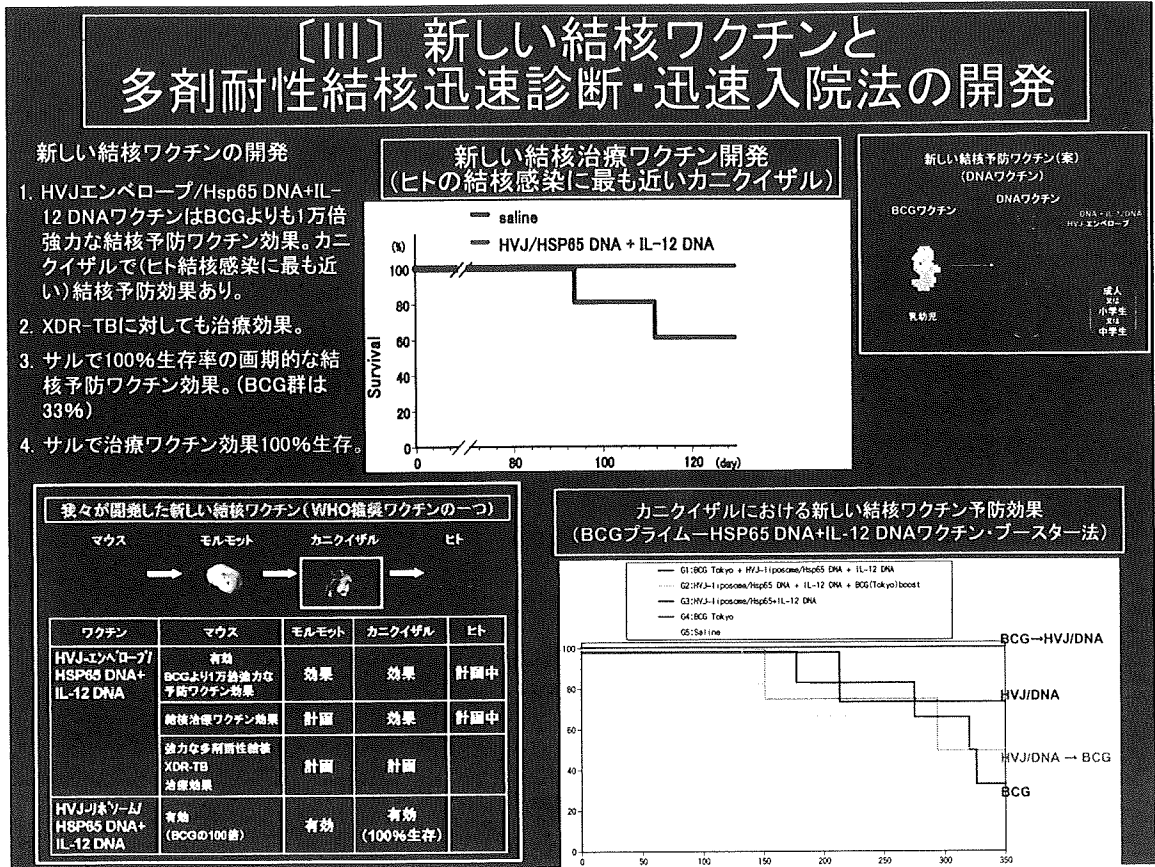
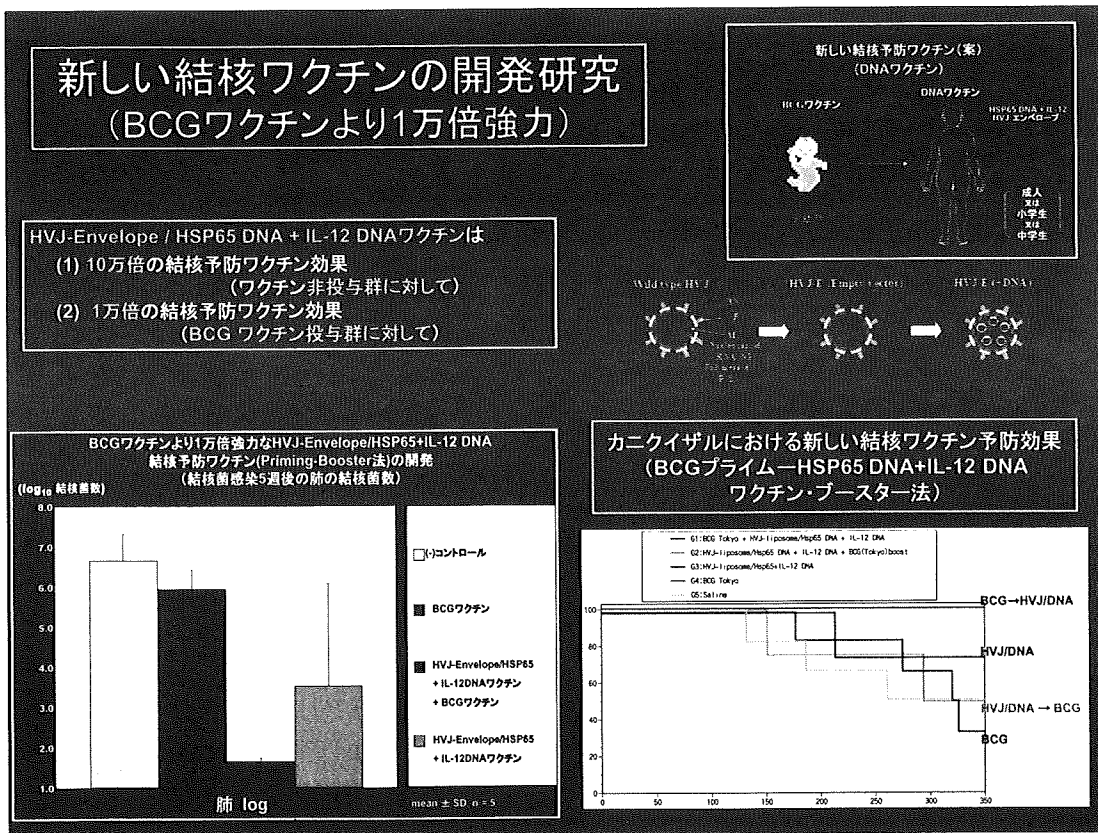


図15



### Ⅲ. 新規結核ワクチン・治療・診断

#### (11) 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。

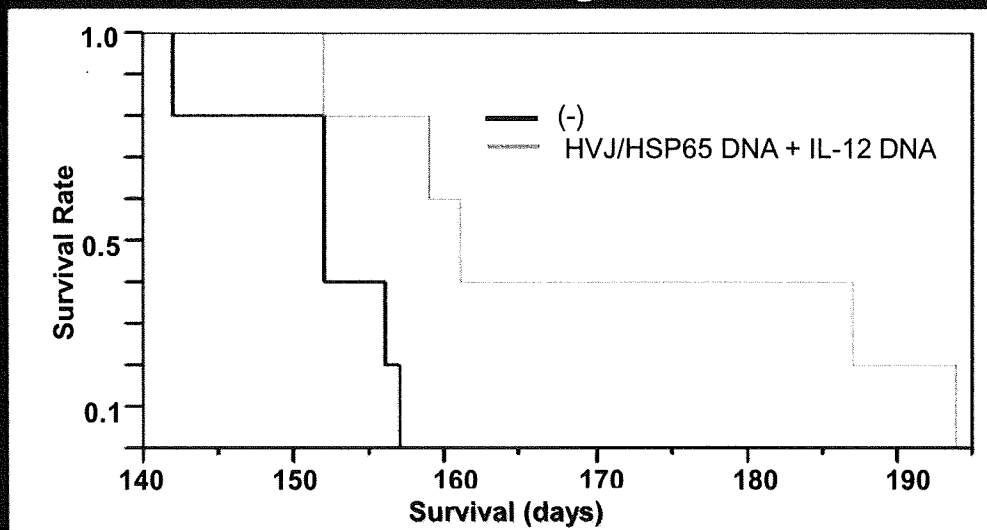
さらに、WHOより2004年2月からWHO STOP TB Partnershipに選出され、さらに、岡田は2004年WHO STOP TB Vaccine MeetingメンバーにWHOより選出され、発表し、世界の最先端かつ臨床応用すべき4つのワクチンの一つに選ばれる栄誉を得た。さらに、2009年よりWHOのWGNG Working Group of New Drugsのメンバーに選ばれた。(表21)

- 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 $5 \times 10^5$  *i.v.*チャレンジする系を用いた。BCG東京ワクチンでプライミングした後、HVJ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンをブースターした群では、BCGワクチン単独投与群に比較して1万倍以上強力な画期的結核ワクチン効果(結核菌数 $1 \times 10^6$ cfuを $1 \times 10^2$ cfu以下に減少)を示した。すなわち、肺や肝の結核数を非ワクチン群の10万分の1に減少させ、BCGワクチン群の1万分の1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- $\gamma$ 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。
- ③ 世界に先駆けて、結核治療ワクチンHVJ/HSP

65DNA+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、 $5 \times 10^5$  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 $5 \times 10^5$ 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) 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。

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

(12) カニクイザルを用いた結核予防ワクチン効果

<実験Ⅲ>

- 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-12DNAブースター (2回)
- G2群 HSP65+IL-12DNAプライム (2回)
- BCGブースト (1回)
- G3群 HSP65+IL-12DNAプライム (1回)
- HSP65+IL-12DNAブースター (2回)
- G4群 BCG東京プライム (1回)
- G5群 コントロール群 (生食)

その結果、G1群のBCG東京プライムでHSP65+IL-12DNAワクチンブースター群は1年後(360日)の生存率は4頭中4頭で100%と画期的な延命効果・生存率を示す結核予防ワクチン効果を示した。

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riming-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riming-booster法が強力な結核予防ワクチン効果を示した。

(図17、18)

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。

- 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>

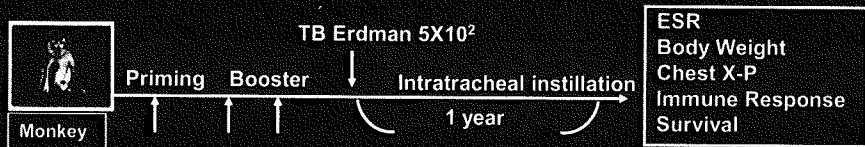
実験ⅣではHVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンを、実験ⅢのHVJ-liposome/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンの代わりに用いた。現在解析中であるが、BCGとこのDNAワクチンのプライム-ブースター法に効果が認められている。

**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



**Priming-Booster Method using  
HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA vaccine and  
BCG in Cynomolgus Monkey**

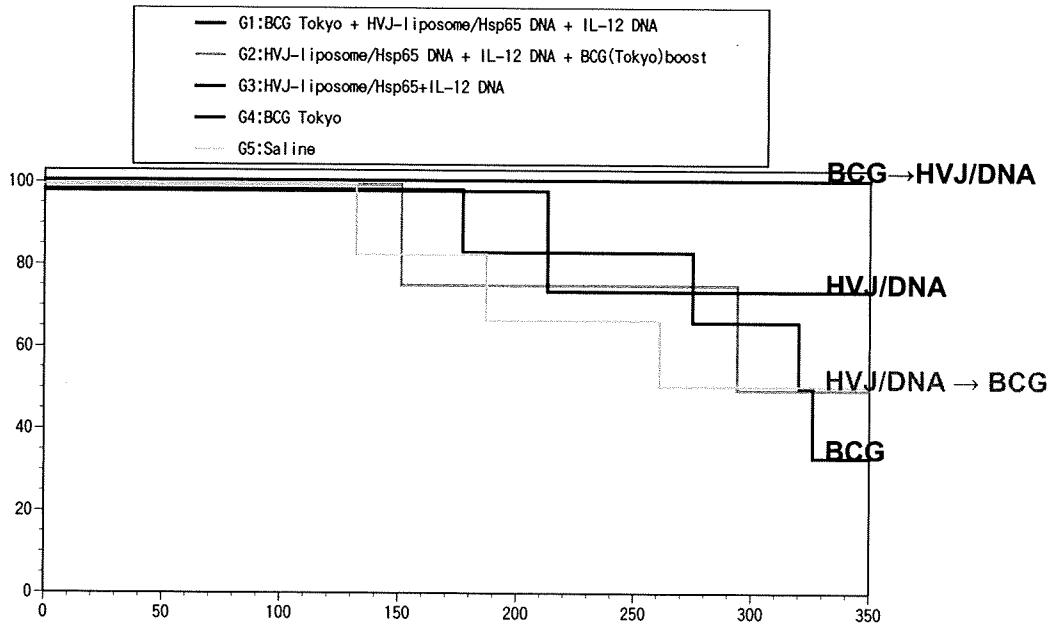


図19

### 臨床開発用DNAワクチンの構築

HSP-65とIL-12遺伝子は1つのプラスミドで発現される

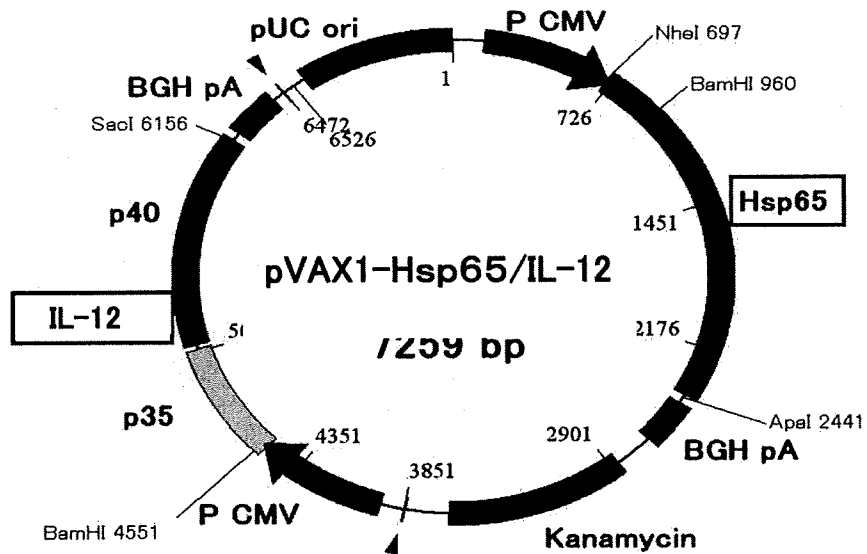


図20

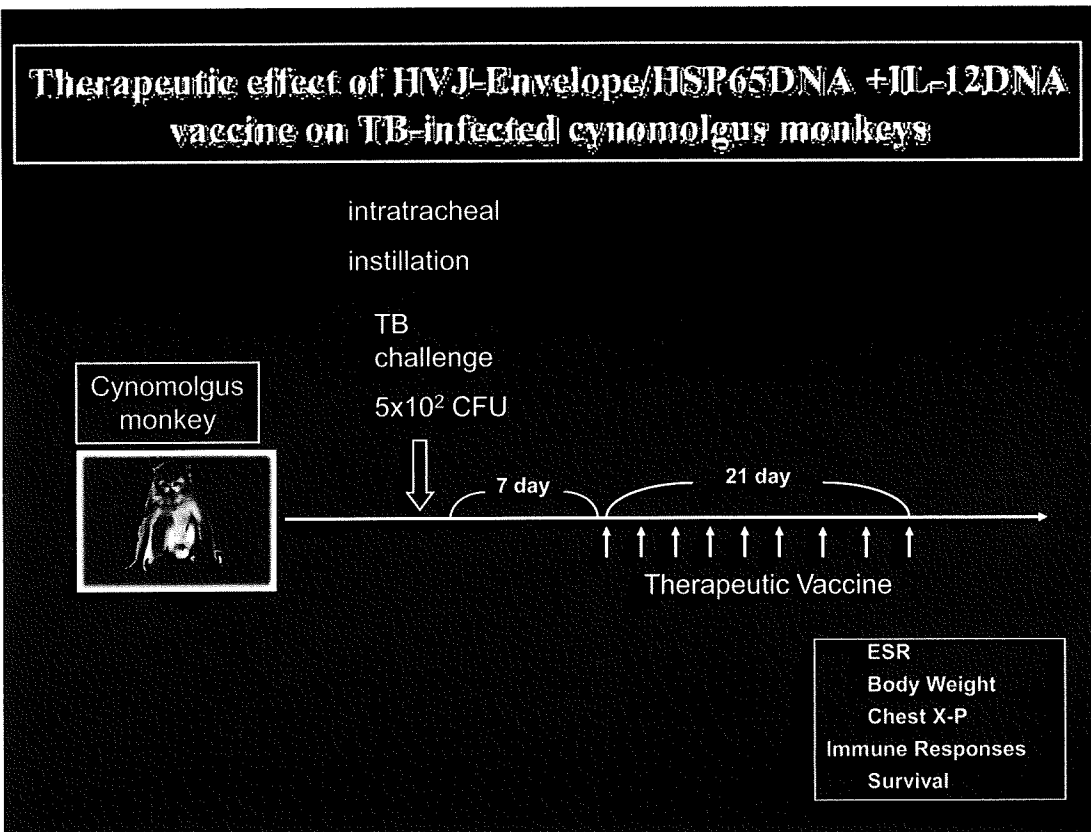




表 2 2

**Body weight of cynomologus moukey treated with HSP65DNA+IL-12DNA vaccine**

Increase in Body Weight			Survival
<b>G1</b> (DNA 9 times )	+	<b>4/5</b>	<b>5/5</b>
	+		
	+		
	+		
	0		
<b>G2</b> (control saline)	-	<b>1/5</b>	<b>3/5</b>
	+		
	0		
	-		
	-		

图 2 1

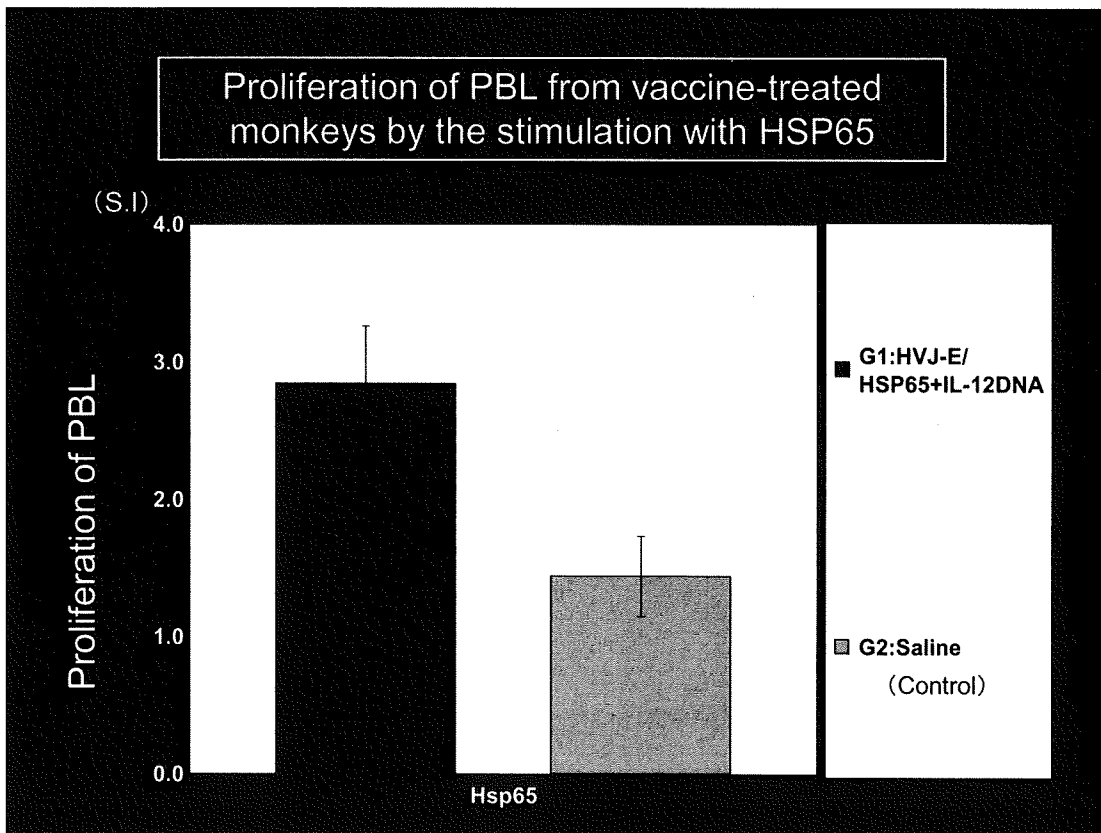
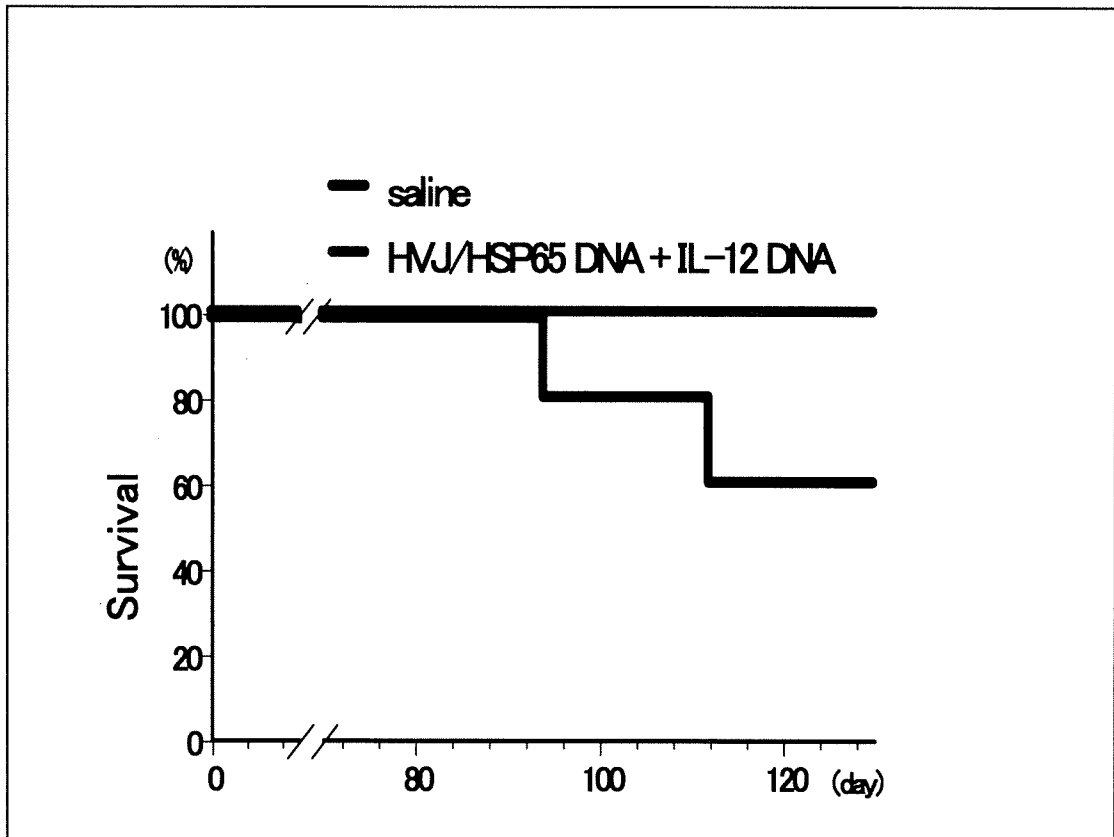


図 2 2



3. 治療ワクチン効果：カニクイザルを用いHVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12 DNAワクチンの結核治療ワクチン効果を研究した。

<実験V> (図19, 20)

G1群 結核菌をサルに気道内注入 $5 \times 10^2$ 個した後7日後より1週間に3回HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチン投与し、3週間で9回。その後1年間経過観察。(実験Ⅲ、Ⅳと同じ評価指標)

G2群 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22)(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22)(図22)。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( $^3\text{H}$ -サイミジンuptake)が増強した。(図21)

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慮してできる限り長い期間プライムとブースターの間期間をとった。本実験では4ヶ月の期間をあけた。(表23)

プライム 4ヶ月      ブースト (1ヶ月)      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。この実験においてもBCGプライムDNAワクチンブースターが最も予防ワクチン効果を発揮した。すなわち、G1群のBCGプライム-DNAワクチンブースター群はG4群のBCG単独ワクチン群に比較して、より居力な生存率の改善や延命効果の結核予防ワクチン効果を得た。また、G1群のBCGプライム-DNAブースター群はG5群の生食投与群よりも生存率の改善、延命効果の結核予防ワクチン効果を得た。さらにG1群は赤沈改善効果や体重増加、末梢血リンパ球増殖増強反応を認めた。特に、G1群では末梢血リンパ球のサルIFN- $\gamma$ 産生の著明な増強が認められた。以上の結果より

図 2 3

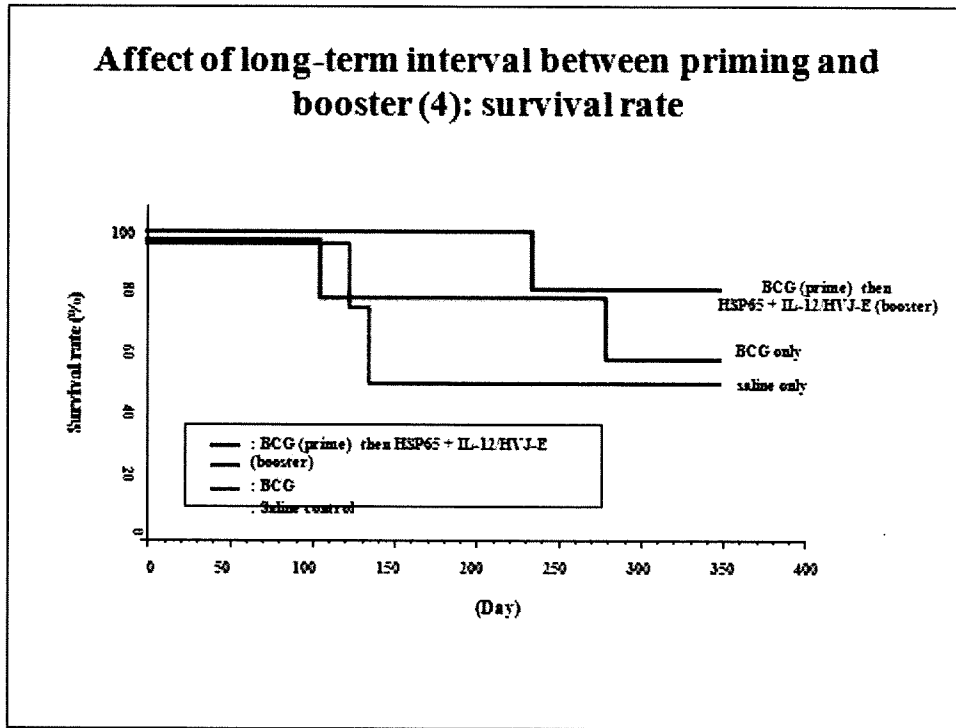


表 2 3

プライム - ブースト長期間間隔を用いた  
結核予防ワクチン効果(カニクイザルを用いた)

Prevention of TB using long-term interval between prime and boost, and then challenge TB by the intratracheal instillation into monkeys 4 weeks after last boost. (each group: 5 monkeys)

	prime	— 4 month —	boost	— 1 month —	boost
Group 1	BCG				HVJ-Envelope/ Hsp65DNA+IL-12DNA
Group 2					BCG
Group 3			HVJ-Envelope/ Hsp65DNA+IL-12DNA		HVJ-Envelope/ Hsp65DNA+IL-12DNA
Group 4			BCG		(-)
Group 5			(-)		(-)

5. より強力な治療ワクチンを開発するために HVJ-エンベロープ/HSP65DNA + IL-12DNA + Ag85BDNA + Ag85ADNA ワクチンを作製した。このワクチンで治療したカニクイザル群は生存率の上昇(結核菌チャレ

ンジから160日以内は100%の生存)、血沈の改善、体重増加改善、免疫応答(カニクイザル末梢血Tリンパ球の結核菌抗原に対する増殖反応)の増強がコントロール群(生食投与群)に比較して認められた。すなわち、

- HVJ-エンベロープ/HSP65DNA + IL-12DNA + Ag85BDNA + Ag85ADNA ワクチンは強力な治療ワクチンであることが明らかとなった。さらに、上記5.のワクチンに、MPT51DNAワクチンとgranulysin DNAワクチンを加えた、HVJ-エンベロープ/HSP65DNA + IL-12DNA + Ag85BDNA + Ag85ADNA + MPT51DNA + granulysin DNAワクチンを作製した。このワクチンの結核治療効果をカニクイザルを用いて解析中である。すなわち、ヒト結核菌Erdmant株 $5 \times 10^2$ を気道内注入して感染させ、4週間後より、上記ワクチン400 $\mu$ gをi.m (合計6回、2週間毎)投与して結核治療効果を解析した。
- (13) ヒト多剤耐性結核菌治療モデルを世界に先駆けて開発した。  
ヒト多剤耐性結核菌治療モデル IL-2R(-/+)SCID-PBL/huを初めて作製した。IL-2レセプター $\gamma$ 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  $\beta$  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。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。
- (14) 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M $\phi$ にとり込まれM $\phi$ 内の結核菌を殺す新しいpathwayを発見した。(図24、25)
  2. 15K granulysin Tgマウスを初めて作製し、生体内抗結核菌作用を示唆する結果を得た。
    - (1) 多剤耐性結核患者PBLのgranulysin mRNA、TRAIL mRNA、及びgranulysin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 $\phi$ 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プロテ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)
      - (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4 $\mu$ 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と比較して著明に減少した。
      - (c) リコンビナント15KGranulysinをin vitroのマウス・キラーT細胞誘導系に添