

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17 転帰

治療完了	75.0 %
継続中	6.5
帰国	15.8

表18 言語障壁への対応
通訳の有無

行政サービス	8.2 %
ボランティア	5.9
友人・知人	22.7
職場・学校など	42.2

表19 翻訳パンフレット等の有無

英語	23.7 %
中国語	34.7
韓国語	6.3
タガログ語	6.4
ポルトガル語	2.8

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

(2) 2007年1月から2010年10月の間に診療した外国人結核患者は113名であった。年齢は20~30歳代の若年層が多く(20代48.6%、30代28.3%)、性別は女性が44.2%を占めていた(図6)。国籍は以前の報告と同様に中国が23.0%と最も多く、以下、韓国(18.6%)、フィリピン(14.2%)、ネパール(8.8%)、ミャンマー(8.0%)の順に多く、アジア諸国が91%を占め、フィリピンではとくに女性が多かった(図2)。職業については就業者51名(45.1%)、学生33名(29.2%)、主婦20名(17.7%)の順に多く、中国では学生が、フィリピンでは主婦が、ネパール、ミャンマーでは就業者が多かった。発見動機については、健診による発見が学生では51.5%であるのに対し、就業者では17.6%と低値であった。結核診断時の入国年数は1年以内が31%を占めていた。治療については、治療完遂または治療中が69.9%、途中帰国が16.8%、脱落が4.4%、死亡は0.9%(1名:不法滞在)であった。脱落者5名のうち、4名は日雇、1名は学生であった。

平成21年末現在における外国人登録者数は2,186,121人であり、国籍別では中国が最も多く31.1%を占め、以下、韓国・朝鮮、ブラジル、フィリピン、ペルー、米国と続いている。これに対して、「結核統計2008」によると、外国人の結核患者数は、中国、フィリピン、韓国、インドネシア、ブラジル、ベトナム、タイの順に多かった。わが国における結核発病率を国別に計算すると、母国の発病率に比べて比較的高い国はネパール、モンゴルであり、比較的低い国は韓国、ブラジル、ペルーということがわかった。

外国人結核では多剤耐性結核が多いことを示した(図7)。

分子疫学解析は、2000年1月以降に診療した外国人結核患者のうち91株について完了した。薬剤感受性試験の結果は86株がINHとRFPに感受性、INH耐性2株、RFP耐性1株、多剤耐性2株であり、外国人結核患者由来結核菌における薬剤耐性化の集積はみられなかった。分子疫学解析については、IS6110-probed RFLP解析から、91株のうち26株(28.6%)が相同性70%以上のクラスターIを形成することが判明した(図8)。MIRU-VNTR解析、スポリゴタイプングの結果、クラスターIを形成する菌株は全て北京型結核菌であり、新興株(モダンタイプ)であることが示された。また、クラスターIを形成する菌株が分離された患者の国籍は23%が韓国籍、37%が中国籍であった。一方でクラスターIIを形成する菌株は非北京型結核菌だった。以上の結果から、解析対象では薬剤耐性が集積していることはなかったが、分子疫学解析から、特定の菌株が蔓延している可能性が示唆された。

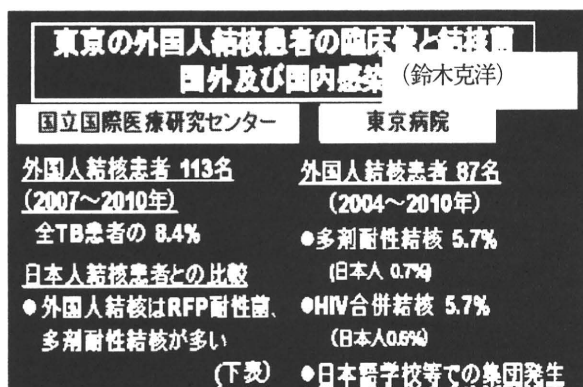


図6

- (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2004~2010年の7年間に当院で結核治療を行った外国人結核患者数は87名であった。この間の全結核患者入院数は2900人の3.0%で、2009年の全国平均の割合よりも低かった。男性41人、女性46人で、20代が32%、30代が33%で、主な国籍は中国、フィリピン、韓国で肺結核75例、肺外結核のみ12例であった。HIV陽性者5例、多剤耐性6例あり、標準治療は67例(77.0%)うちPZAを含むA法は56人に実施した。当院では外国人結核治療は高齢者結核に比較すれば臨床的な困難性は低く、頻度も大体

- 横ばいであまりインパクトは大きくはない。しかし退院後の治療継続や治療成績については十分に追跡されておらず、さらに保健所や転院先との連携が必要と思われる。(図6)
- (4) 25校の学生総数は2872名で、一校あたりの学生数の中央値は67名(18~420名)であった。不明であった3校を除く22校の国籍別学生の割合は、中国70%、台湾9.4%、韓国8.8%であった。(図9)学生の在籍期間は、最長2年間の学校が22校(88%)と最も多く、一年半4%、1年間8%であった。健診を実施しているのは21校(84%)、実施していなかったのは4校(16%)であった。不明の1校を除く20校の健診時期は、入学後1か月以内が60%、1か月以降に実施していたのは40%であった。在籍期間が2年を含む22校のうち、2年次の健診を行っている学校は59%であった。健診において要精密検査の者が発見された場合の対応について尋ねたところ、当該学生に医療機関受診を勧奨している学校は36%、精密検査結果を把握している学校は64%であった。発病者が在籍したことのある18校では、発病者を帰国させ治療を受けさせる学校は28%みられた。健診が実施されていなかった4校を除く21校について健診の状況を検討した。2007年から2009年の3年間に健診を受診した者は7,134名おり、うち発病者は4名(0.056%)であった。2009年の発病者はみとめなかったが、要精密検査となつた1名は翌年に結核発病が確認された。

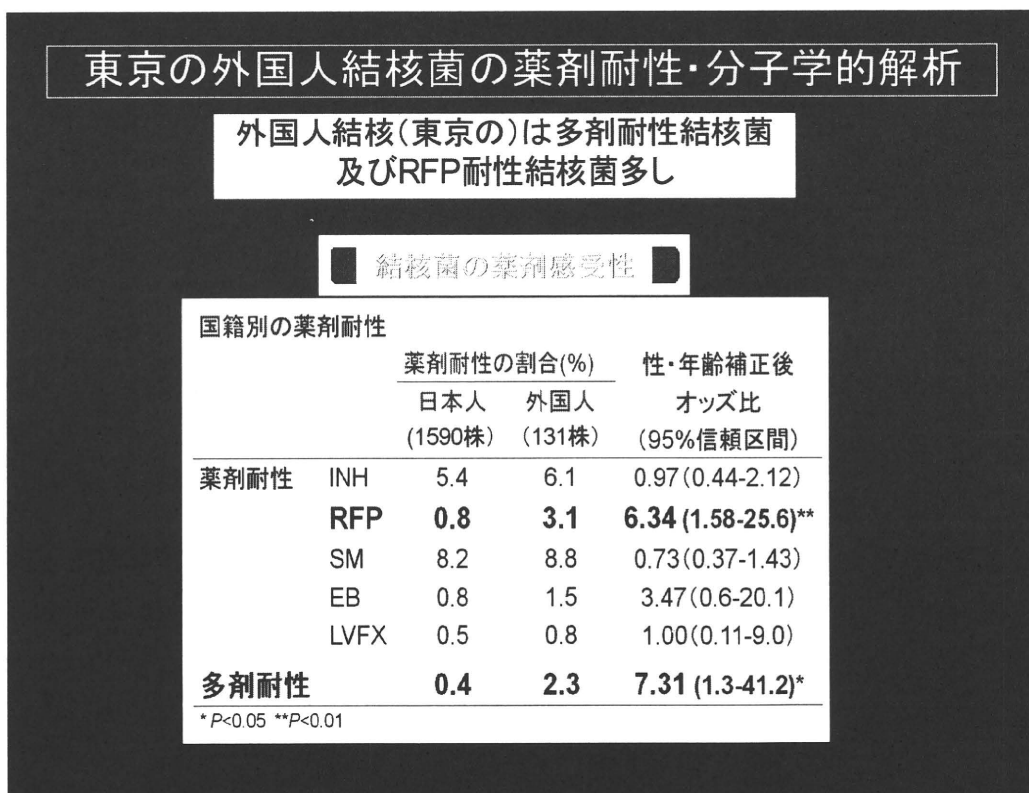


図7

東京の外国人結核菌の分子疫学解析

外国人結核の国内流行示唆

- ① 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
- ② VNTR解析でクラスター I は北京型蔓延型(modern型)で形成。クラスター I は91 株中26株(28.6%)
- ③ クラスター II は非北京型結核菌

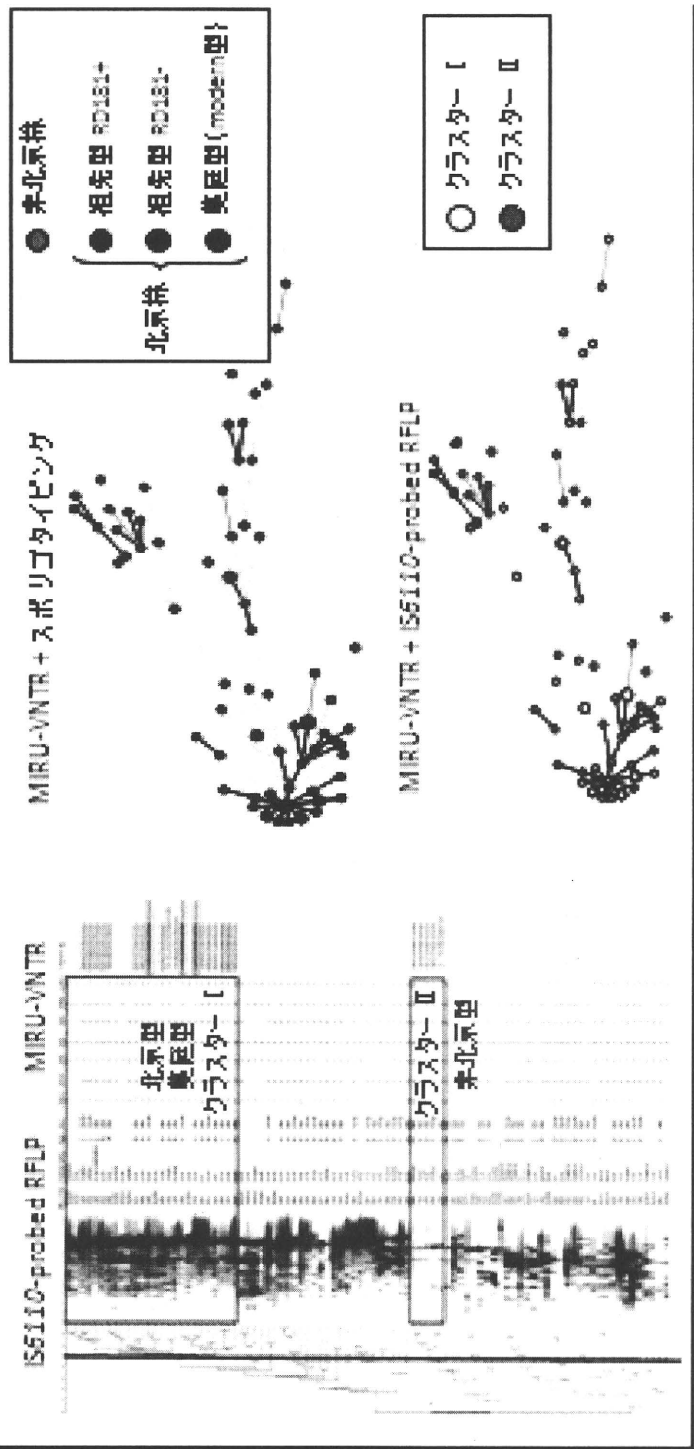


図8

(5) 1998年以降の労働者と学生の患者数は増加傾向を示し、要因として母数としての労働者と学生の増加が示唆された。家事従事者の患者数に一定の傾向はなく、永住者数は増加傾向だったが、配偶者等の数は横ばいであり、永住者数の影響は小さいと考えられた。罹患率の推移は、

労働者は不変で、学生と家事従事者は低下傾向にあり、罹患率の変化が患者数増加の要因ではなかった。なお、罹患率低下の要因として、長期在留者の増加や出身国の罹患率の低下が示唆された。(図10)

西日本(大阪・神戸)の外国人結核

大阪市保健所
神戸市保健所

在留外国人結核 131名
(過去3年間)

- 大きな集団感染(学生)
- 日本語学校の定期健診必要
- 学生・韓国籍・INH耐性が多い
- 大阪市流行株の型なし
- 母国で感染例多し
- 健診で、発見率上昇
- 転出者で帰国した患者対応が問題(脱落・転出多し)

図9

外国人結核対策マニュアルの作成

大阪市における外国人結核対策マニュアル(要点)

- 定期健診の徹底
 - 外国人では入国後早期健診重要。外国人雇用企業、学校(大学、日本語学校など)に対し定期健診の徹底勧奨。
- 患者面接時の注意点
 - 日本語によるコミュニケーションが困難な場合、家族・友人の同席やボランティア通訳を依頼。
- 国内での治療・接触者健診の完了を目指して

大阪市外国人結核対策マニュアル

大阪市保健所
感染症対策担当
2011年

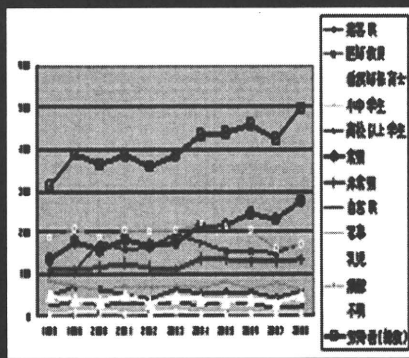
厚生労働科研
輸入感染症としての
結核対策
(岡田研)

東京都における外国人結核診療マニュアル
(医療者向け)(要点)

- 外国人結核の最近の傾向
 - 増加傾向(全体の4%が外国人)。
- 外国人結核の診療上の問題点
 - 高い薬剤耐性率(多剤耐性結核の輸入)。
- 結核高蔓延国からの移住者に対する感染者と発症者の早期発見
 - 入国時の健診(胸部レントゲン)の励行。入国時、接触者健診におけるクオアテンフェロン(QFT)検査の実施。
- 外国人結核に対する適切な治療体制の確立
 - 母国語で書かれた結核診療ハンドブック、在日外国人結核相談室。

図11

就業状況別外国人結核患者数の年次推移

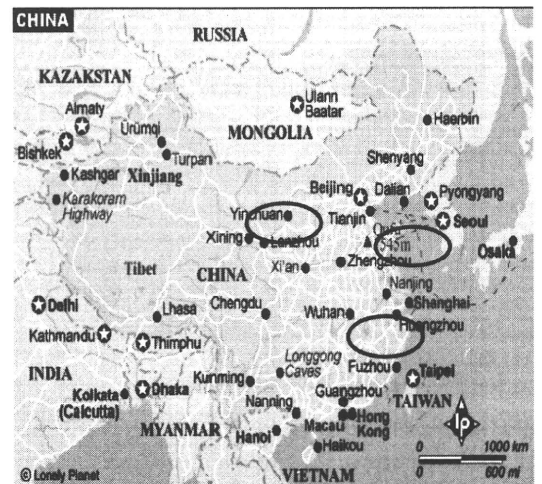


結核発生
傾向調査より

(発表)
岡田全司、
星野齊之
Kekkaku
2010

図10

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) 外国人結核対策マニュアルの作成
(a)大阪市における外国人結核対策マニュアル(要点)を下内分担研究者を中心に大阪市保健所の支援で作製した(2011年)。(図11)
①定期健診の徹底、②患者面接時の注意点、③国内での治療・接触者健診の完了を目指して、が目標。
(b)東京都における外国人結核診療マニュアル(医療者向け)(要点)を小林分担研究者を中心に作製した。
結核高蔓延国からの移住者に対する感染者と発症者の早期発見を重点化する。(図11)

- (7) 加藤分担研究者と日・中・韓・台研究ネットワーク(図12、13、14)

1. 10-locus VNTR分析によるMST解析:最初に精度管理用DNAを送付して、10-locus VNTR (MIRU-10、MIRU-26、MIRU-31、ETR-A、VNTRs-0424、1955、2163b、3155、4052、4156)のコピー数の定義の違いを確認した後、VNTR分析結果の比較を進めた。日本、韓国、中国(上海)で一定期間に分離された結核菌(30-100株)について10-locus VNTR

分析し、MST解析を行った。その結果、それぞれの国で広まっている主要な結核菌型は異なり、大きく3つのグループに分けることが出来た。つまり、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。しかし、遺伝子型が各国で異なり、中国ではModern型が95%、韓国ではRD181陽性のAncient型が65-70%、日本ではRD181陰性のAncient型が80%を占めている。これら3つの結核菌型は、本研究で選択した10-locus VNTRで区分出来ることが確認できた。しかしながら、各国では広まっている主要な型以外に頻度は低いが、ある程度の割合で他国において主要な結核菌型が含まれる。そのため、分離された菌型を調べることで菌の由来を推定することができるが、感染国の断定は難しいと考えられる。しかし、構築したVNTRシステムは、10箇所だけ分析するVNTRであるが、中国、韓国、日本でそれぞれ広まっているModern型、RD181陽性Ancient型、RD181陰性Ancient型をグループ分けすることが可能であった。

2. SNPsを用いた結核菌系統解析：本VNTRによる型別だけでなく、SNPs（一塩基多型）分析による結核菌の系統情報も加えると、さらに細かいサブグループに分けられると考えられる。そこで、結核菌を系統別に分けることができるSNPs部位のローカスについて検討を行った。7箇所SNPs（台湾が提案した非北京型結核菌の分類）、10箇所SNPs（日本が提案したAncientタイプ北京型結核菌の分類）及び3箇所SNPs（上海が提案したModernタイプ北京型結核菌の分類）の合計20箇所のSNPs部位を候補とした。

これらの分析により、SNPs分析法で結核菌の系統さらにVNTRで系統内での亜型分析という2つの方法を組み合わせることで、東アジア諸国で利用可能な結核菌の型別システムが樹立可能となる。分離結核菌の遺伝系統を明らかにすることができれば、国際的に感染が伝播している可能性が高いのか、それぞれの国内だけで感染が広がっているか推定することができる。

図12

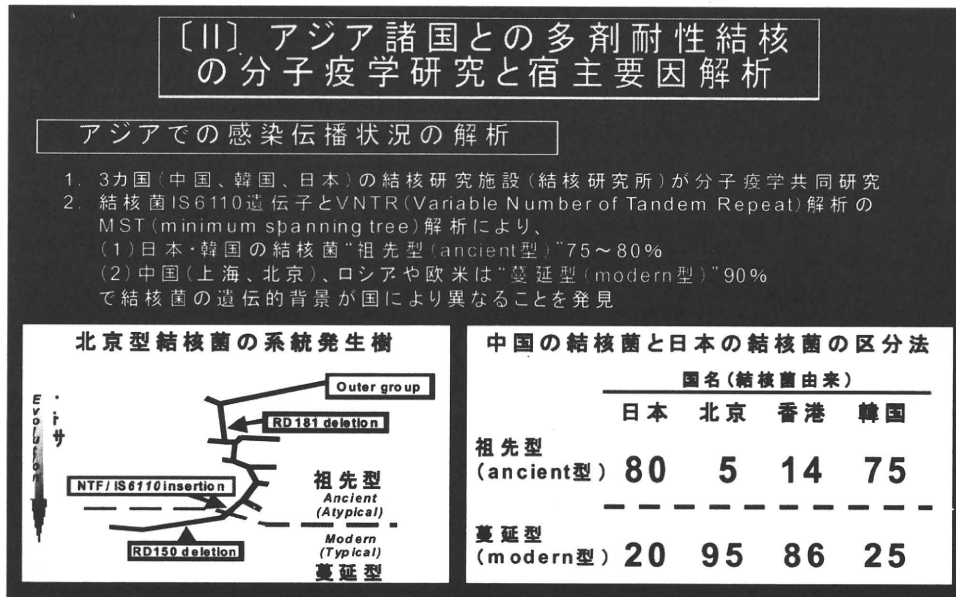
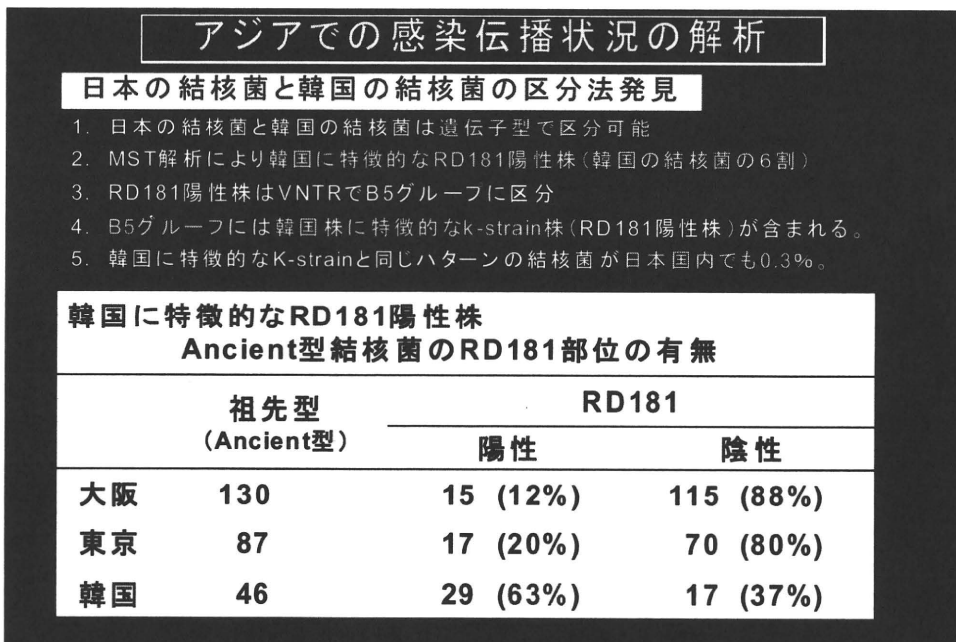


図13



韓国の結核菌と中国株と台湾株と日本株の区分可能

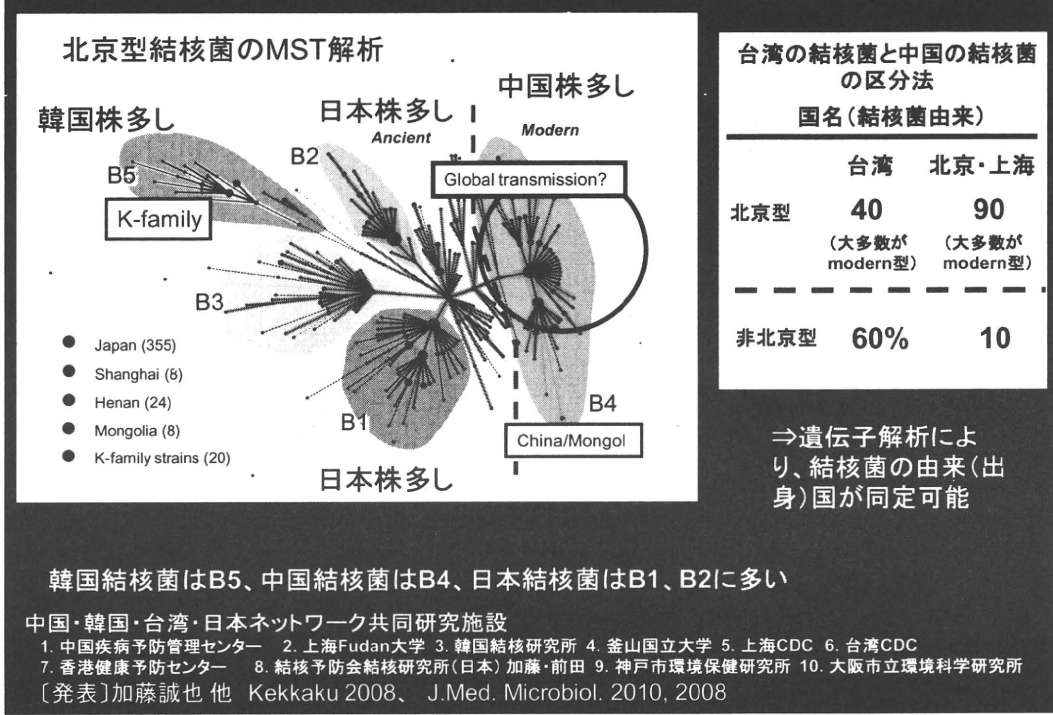


図14

- (8) 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15A)。



地図2. タイ

今年度は、臨床疫学因子を再発の関与因子に絞って再解析をしたところ、危険因子が同定されたので、論文作成している(Nampaisan O, et al. Analysis of risk factors for Tuberculosis recurrence using a population-based TB/HIV integrated surveillance system in Chiang Rai, Thailand.)

図2に示す様に、1000人年当りの再発率で、HIV陰性結核患者の5.1(4.3-6.2)と比較してHIV陽性結核患者は9.7(95%信頼区間7.8-11.9)と顕著に高かった。HIV陰性、陽性共に再発率が有意に初年度が一番高く、次年度以降漸減していた。危険因子同定は表1に単回帰解析の表2に多変量解析の詳細を示す。図2にも示す様に、HIV陰性結核では再発の関与因子としては、山岳民族が顕著で、タイ族と比して調節オッズ比2.63(95%信頼区間1.65-4.19)であった。また、図3にも示す様に、監獄歴のある場合が調節オッズ比3.38(1.39-8.21)と有意であった。他の関与因子としては、HIV陽性結核では、男性である事が調節オッズ比1.7(1.08-2.71)であった。結核の部位が肺外結核である場合、HIV陰性、HIV陽性ともにそれぞれ調節オッズ比0.15(0.04-0.64)、0.34(0.20-0.59)と肺結核例よりも再発率が低かった。直接監視下投薬(DOT)の実施の有無は再発に関与していなかった。核の治療後のフォローアップの結果を昨年度までの結果に追加して論文投稿した。(Pitabut N, et al., Decreased granulysin and increased IFN-levels in plasma of patients with newly diagnosed and relapse tuberculosis)

- (9) ハルビン医科大学との共同研究
結核菌の遺伝子解析 (図15A)

黒竜江省の結核菌の北京型の疫学 BACTEC 960 Automated System を用いて収集した200株のうち、初期(2007年5月から11月)に収集した44株について、スポリゴタイピングとRD105欠損の2法での北京型の同定を行った。前法で

は41株がSpolDB4 database で解析され(表1)39株は 35-43スパーサーをもつ最もよく見られる北京型であった。もう一つの株はSIT190に属し、最後の株はデータベースには存在しない型であった。残りの3株は新しいタイプであった。44株のうち40株がRD105を欠損していた。スポリゴタイピングとRD105 欠損のカッパ値は0.8451と高かった。他の156株については179株(89.5%)を北京型とし、10.5%を非北京型とした。

MIRU-VNTR適正座数の検討 北京型が大多数であったので、MIRU-VNTR遺伝子解析が最も適当と思われる。最初に適正座数を決定するために、19MIRU-VNTR 座で解析した。最初の44株のアリル多様性率は19座では(QUB11b, QUB26) 0.6となりよく分離された。7座 (MIRU4, MIRU16, MIRU26, MIRU31, MIRU40, Mtub21 and Mtub4) の多様性度は低いが(0.3≤h≤0.6), ETR C (h=0.068)とETR B (h=0.066) は特に多様性度は低かった。MIRU23 (h=0)座には多様性はなかった。そこで ETR C, ETR BとMIRU23座はMIRU-VNTR 解析から除いた。これらの結果に基づき残りの株を16 MIRU-VNTR座で解析した。その結果を見ると、全ての16座が19座解析と似通った多様性を示した。200株のうち最も高い多様性はQUB11b(h=0.730)で低い物はMtub29 (h=0.138)であった。16座を使用した時のHGDI値は0.9977だが、16座より低い座数での解析の可能性を求めた。10座数解析ではHGDIは0.9950で15座数あるいは16座数と同じであった。

VNTRによる遺伝子型 VNTR解析では200株は180の遺伝子型に分類され、170株

がユニークな型で残りの30株が10のクラスターを示した。16座を使用した系統樹解析を行った。これらの株は4種類の大きなグループに分けることができ、それぞれ21,13, 21,145株が存在した。179の北京株のうち144株(99.3%)がグループIVで、他の35株はグループIIIに属していた(P<0.0001)。そしてクラスター化した株は全てがグループIV(P=0.0018)に属した。これらのことは北京型とクラスターは別個であることを示した。

クラスター株の特性 北京型の30株が10のクラスターを形成しその比率は10.0%であった。非北京型の殆どがクラスターを形成していなかった。殆どのクラスターは小さく4株 (A6), 3株(A5,A10)以下は2株であった。結核菌収集時期の前期, 2007年5月から2008年5月(106株)と後期2008年6月から2008年10月(94株)はそれぞれ 6.4% と12.8%であった (OR, 0.3240; 95% CI, 0.1161-0.8265; P=0.0088)。またクラスターの場合を見るとA2とA7は黒竜江省の郊外でA3-A6, A9, A10はハルビン市であった。黒竜江省の結核菌の薬剤耐性 ストレプトマイシン、イソニアジッド、リファンピシンとエタンブトールに対する感受性のうち77株(38.5%)は4種類全てに感受性であった。また123株(61.5%)は少なくとも1種類に抵抗性で51株(41.5%)がMDR-MTBであった。51株のMDR-MTB株のうち48株が北京型であった。これから北京型の26.8%(48/179)がMDRで非北京型の14.3%(3/21)がMDRであった。この2群に有意差はなかった。(OR, 0.4564; 95% CI, 0.0824-1.6670; P=0.2127)。

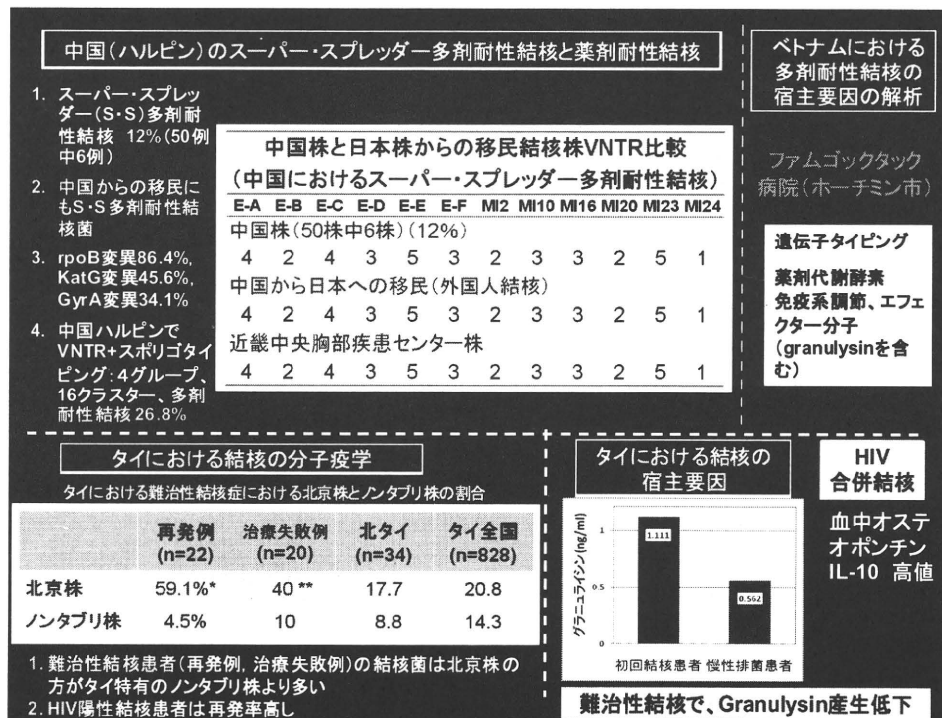


図1 5A



地図3. ハルビン

(10) 1. 血漿25(OH)vitamin D₃
 血漿25(OH) vitamin D₃ レベルにおいて、結核とHIV合併結核群においては他群よりdeficiencyが多い傾向が見られたが、サンプル数が少なく健常者との有意差は得られなかった。また、血漿1,25 (OH) vitamin D₃は結核2名、それ以外の患者グループで各1名の合計5名が正常下限(39pmol/L)以下であった。

2. Vitamin D関連遺伝子の発現

① CYP27B1: GM-CSFによって文化したGM-Mφにおいては、未刺激であってもどのグループであってもCYP27B1の発現が一定レベルで認められると同時に、BCG感染による発現増幅が認められた。また、GM-CSF単独では増幅作用が認められなかったが、BCG感染時にGM-CSFが存在した場合、発現は増強される傾向が認められた。一方、M-CSFによって分化したM-Mφにおいては、未刺激ではCYP27B1の発現は、極めて低く検出限界以下であったが、BCG感染によって発現が増強した。さらに、結核群、HIV結核群、健常者群に比較して、非結核HIV群ではBCG刺激によってもCYP27B1の発現レベルが低くなる傾向が認められた。M-CSF存在下では、M-MφにおけるCYP27B1の発現はむしろ抑制された。GM-MφとM-MφにおけるGAPDHとの発現比を比較するとGM-MφにおいてCYP27B1の発現が高い傾向にあった。

② VDR: GM-Mφにおいては、VDRの発現は、GM-CSFの存在によって増幅されるが、BCG感染によつてはされない。M-Mφにおいては、M-CSFの存在下ではVDR発現は増幅されずに、むしろ抑制的な効果が認められた。一方、BCG感染による増幅が認められた。GAPDHとの発現比では、GM-Mφ、M-Mφいずれの場合も発現レベルは0.6以下であった。

③ Cathelicidin: GM-Mφにおいては、GM-CSFおよびBCG感染のいずれの刺激でも明らかなcathelicidin遺伝子の発現増強は認められなかった。M-Mφにおいても、未刺激と比較してもM-CSFおよびBCG感染において、cathelicidin遺伝

子は検出限界以下のレベルであった。GAPDH遺伝子との発現比では、GM-Mφにおいてははいずれも0.2以下、M-Mφにおいては、0,007以下であった。各遺伝子とGAPDH発現レベルとの比の平均値を棒グラフで表した。

(11) 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月承認を得た。エントリー基準は、薬剤感受性試験で多剤耐性結核(INH, RFP耐性)と診断された、16歳以上70歳までの患者で、18か月の治療、観察期間を完遂できる見通しがあり、書面同意を得たものとして、HIV陽性、悪性腫瘍、免疫抑制剤の使用者を除外した。新型インフルエンザのアウトブレイクのために中断を余儀なくされたが、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得て、平成21年9月に患者リクルートを開始し、平成22年3月にリクルートを終了した。今年度、サンプルの輸送を行ない、解析を実施することができた。大規模なコホート研究は、本研究班の3年間の枠組みでは困難なため、断面研究に近い小規模な研究デザインとならざるを得なかった。本年度は、特に結核の殺菌能と深く関係するとされているgranulysin遺伝子についてその特徴的な遺伝子変異と遺伝子頻度、遺伝子発現の検出を試みた。granulysin遺伝子には、rs11127として公共のデータベースに登録されているSNPがよく知られており、これは、アミノ酸の非同義置換Thr119Ileを生じる。アレル頻度を決定(Cアレル=40%, Tアレル=60%)し、全血中の発現量との関連をみたが、ベトナム人検体で、遺伝子発現量と遺伝子型には、統計的に有意な関連は認められなかった(図15B)。今後、さらに、治療反応性との関連を明らかにする予定である。

GNLV marker SNP rs11127 and whole blood gene expression

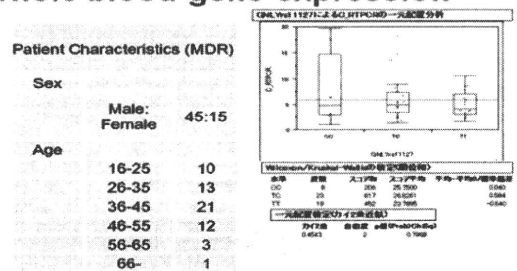


図15B

患者の年齢分布とGranulysinの遺伝子型別発現量

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。

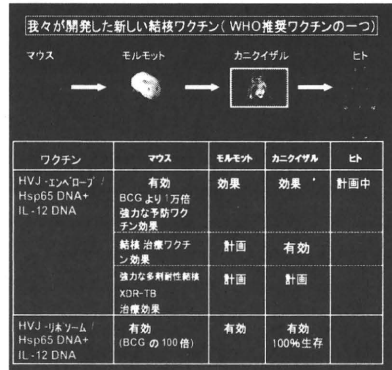


図 1 6

表 2 1

WGND (Working Group on New TB Drugs) WHO STOP TB Partnership

WHO Stop TB Partnership

↓
6(Six) Working Groups

[Chair: Dr. Melrin Spigelman(TB Alliance) and Dr. William Bishai (Johns Hopkins Univ.)]

↓
WGNDはそのWorking Groupの一つ

↓
5つのSubgroup

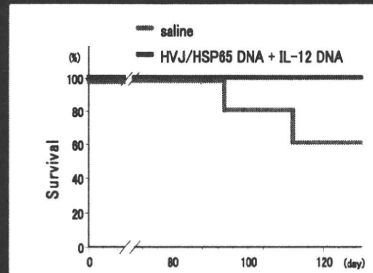
- | | |
|---------------------------------------------------|-----|
| (1) Biology/ Targets Group
(MASAJI OKADA M.D.) | 20名 |
| (2) Candidate | 19名 |
| (3) Tools | 14名 |
| (4) Clinical Knowledge | 9名 |
| (5) Clinical Trials Capacity | 18名 |

【III】新しい結核ワクチン

新しい結核ワクチンの開発

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。カニクイザルで(ヒト結核感染に最も近い)結核予防効果あり。
2. 超薬剤耐性結核に対しても治療効果。
3. 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%)
4. サルで治療ワクチン効果100%生存。

新しい結核治療ワクチン開発 (ヒトの結核感染に最も近いカニクイザル)



我々が開発した新しい結核ワクチン (WHO推奨ワクチンの一つ)

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 強力な多剤耐性結核超薬剤耐性治療効果	効果 計画	効果 計画	計画中 計画中
HVJ-リボソーム/HSP65 DNA+IL-12 DNA	有効 (BCGの100倍)	有効	有効 (100%生存)	

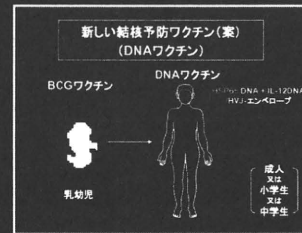
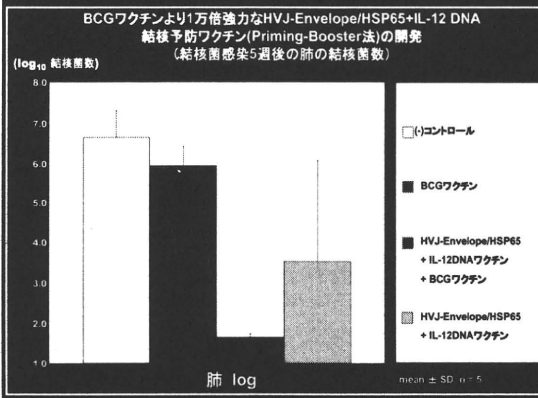
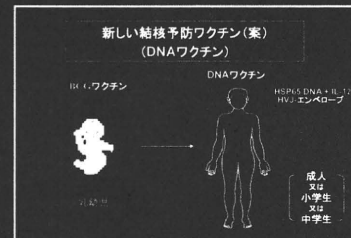


図17

新しい結核ワクチンの開発研究 (BCGワクチンより1万倍強力)

- HVJ-Envelope / HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンは
- (1) 10万倍の結核予防ワクチン効果 (ワクチン非投与群に対して)
 - (2) 1万倍の結核予防ワクチン効果 (BCG ワクチン投与群に対して)



カニクイザルにおける新しい結核ワクチン予防効果 (BCGプライム-HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン・ブースター法)

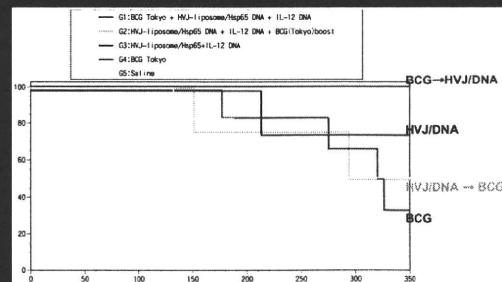
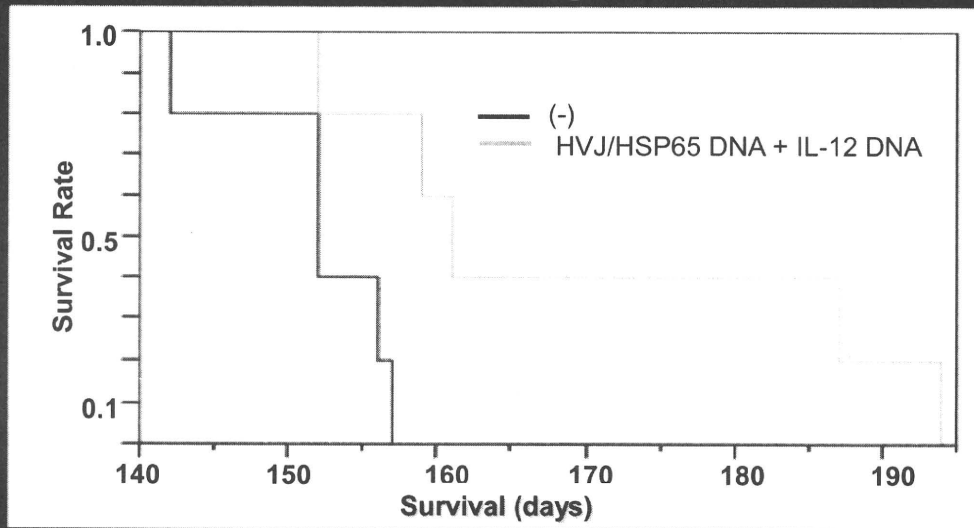


図18

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19

Ⅲ. 新規結核ワクチン・治療・診断

(12) 新しい結核予防ワクチンの開発 (図16)

(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17)・(図18)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東京ワクチンでプライミングした後、HVJ/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチンをブースターした群では、BCGワクチン単独投与群に比較して1万倍以上強力な画期的結核ワクチン効果(結核菌数 1×10^6 cfuを 1×10^2 cfu以下に減少)を示した。

すなわち、肺や肝の結果菌数を非ワクチン群の10万分の一に減少させ、BCGワクチン群の

1万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。

③ 世界に先駆けて、結核治療ワクチンHVJ/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチンを開発した。このワクチンを結核菌H37Rvをi.v.投与したマウスに3回i.m.注射することによりBCGワクチン投与群に比較して、有意差($p < 0.05$)をもって治療効果を示した。ワクチン非投与群と比較しても、有意にこのワクチンは結核菌減少効果を示した。すなわち、 5×10^5 H37Rvをi.v.した日を0日目とすると、その1日後に1回目のDNAワクチンを投与、8日目に2回目、15日目に3回目のDNAワクチンを投与した。H37Rv投与30日後に肺臓、肝臓、脾臓の結核菌CFUの減少をコントロール群、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17、19）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。

(13) 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-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20、21）

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22、23）

G1群 結核菌をサルに気道内注入 5×10^2 個した後7日後より1週間に3回HVJ-エンベロープ/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチン投与し、3週間で9回。その後1年間経過観察。（実験Ⅲ、Ⅳと同じ評価指標）

G2群 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24、25）。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25）。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（ ^3H -サイミジン uptake）が増強した。（図24）

また赤沈の改善効果や免疫反応増強効果を示

した。ワクチン投与群サルの末梢血Tリンパ球からのIL-2産生増強効果が認められた。このIL-2産生増強効果は生存率と相関した。

これも将来的にはCPZ+OPCと併用して治療相乗効果を解析する予定。

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	

図 2 0

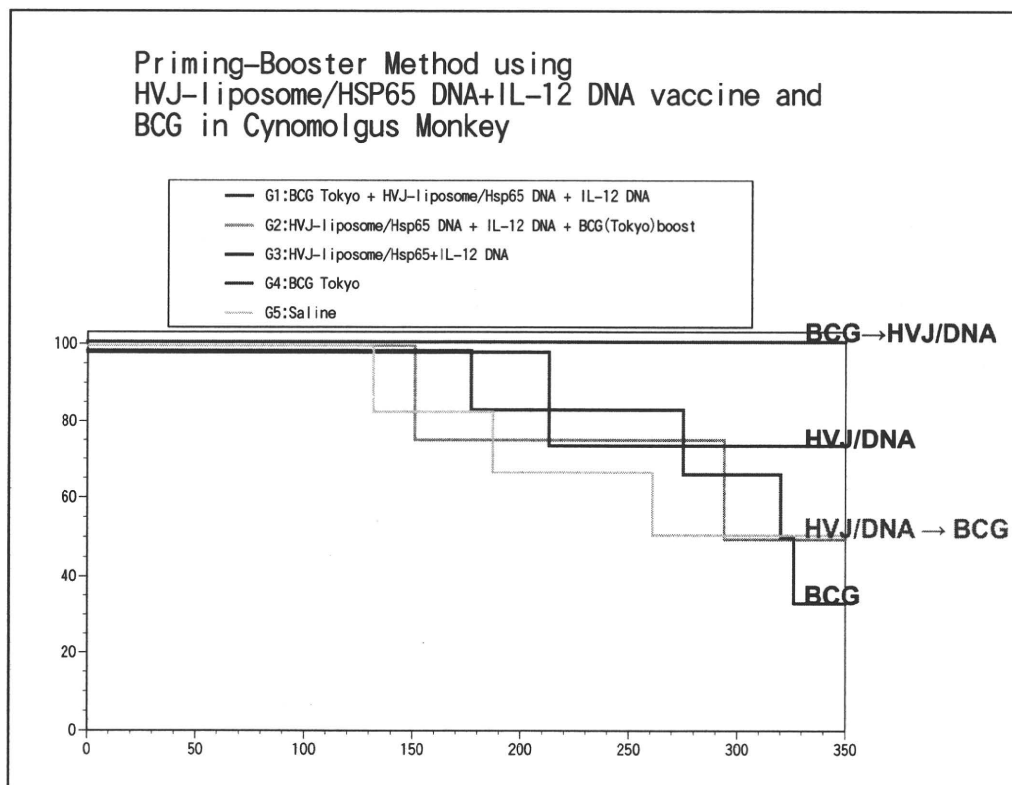


図 2 1

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

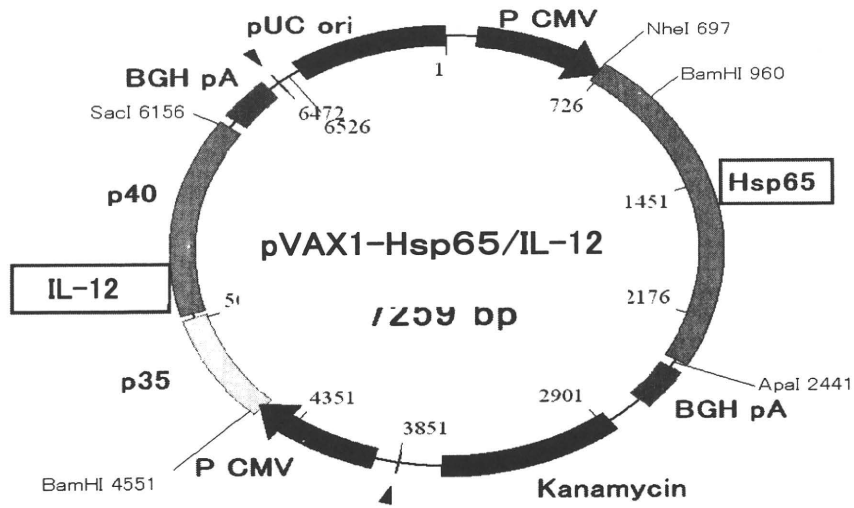


図 2 2

Therapeutic effect of HIVJ-Envelope/HSP65DNA +IL-12DNA vaccine on TB-infected cynomolgus monkeys

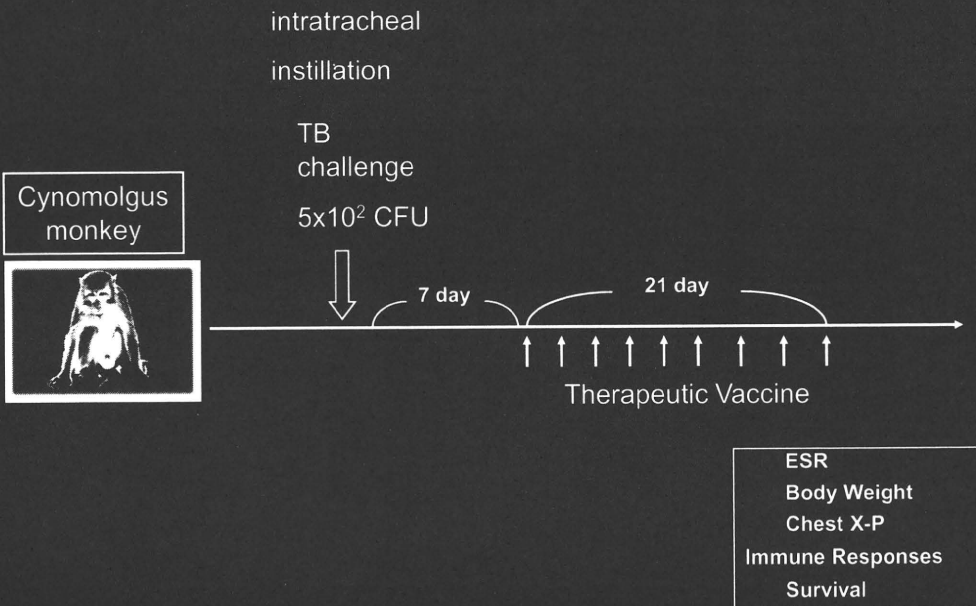


図 2 3

表 2 2

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

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

Proliferation of PBL from vaccine-treated monkeys by the stimulation with HSP65

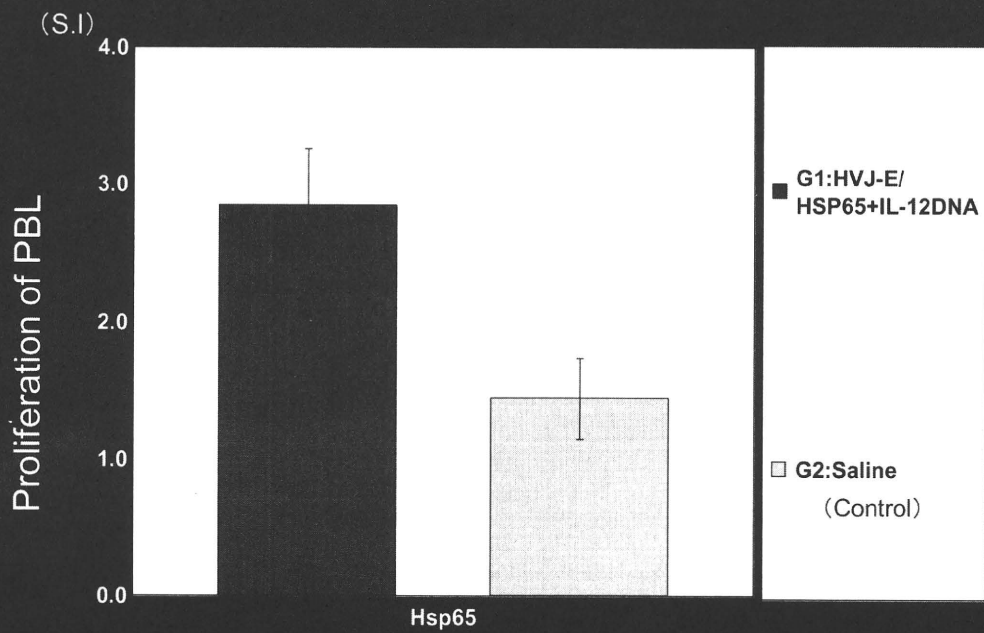


图 2 4

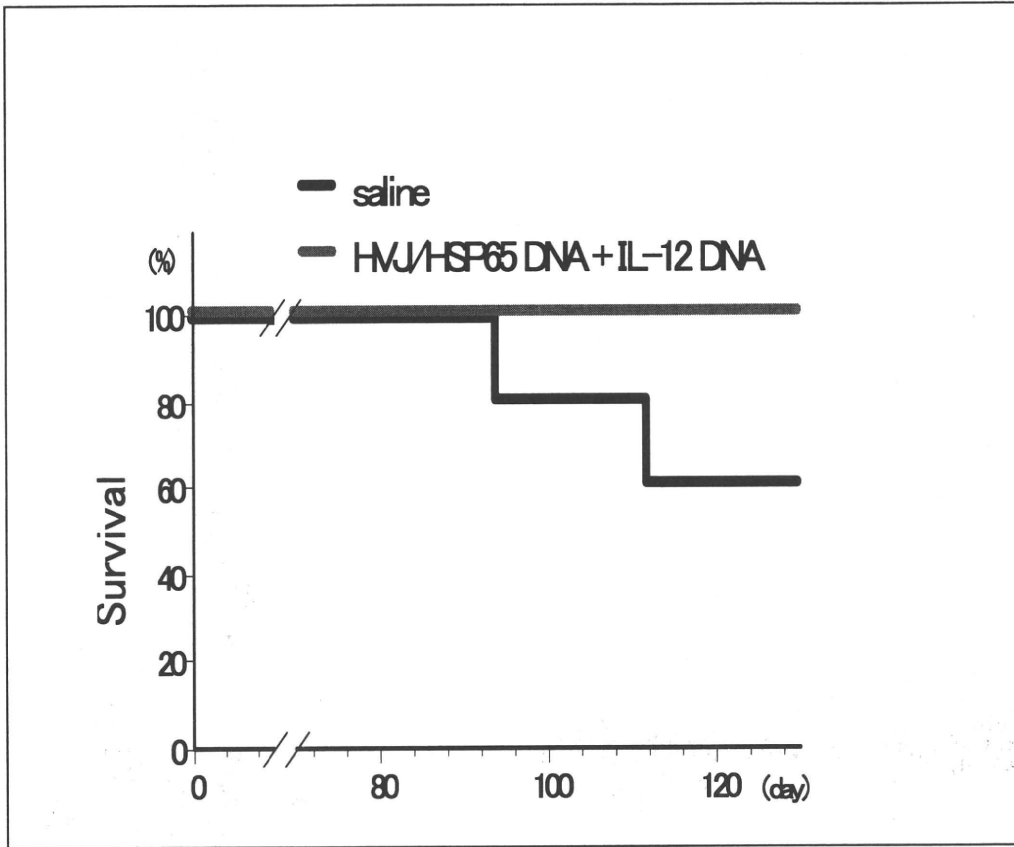


図 2 5

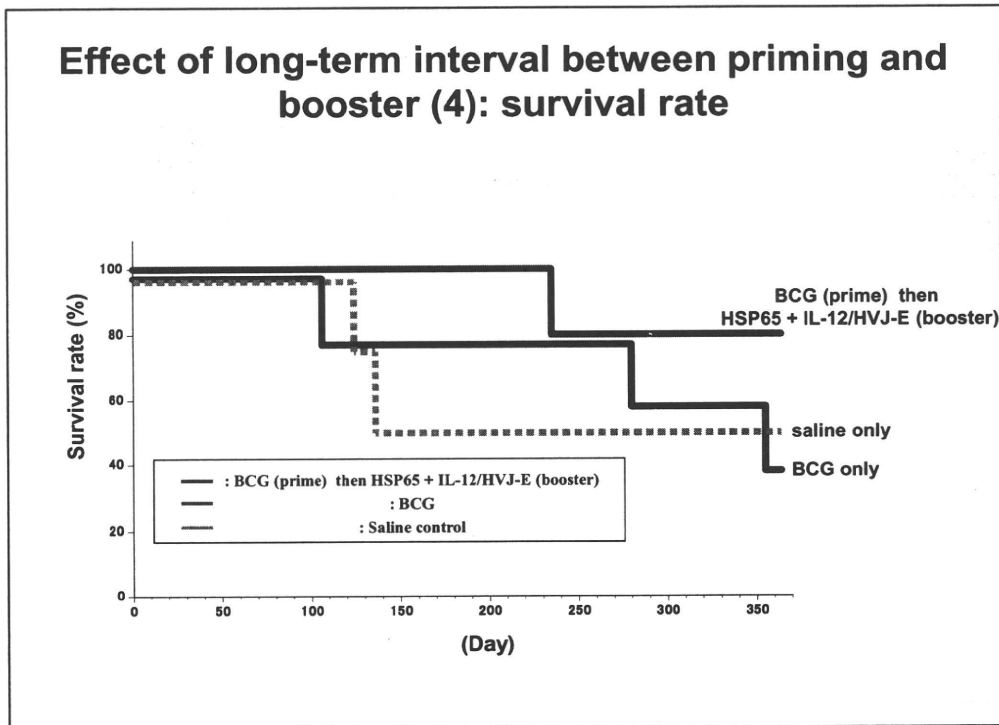


図 2 6

表23

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

Therapeutic effects of the polyvalent DNA vaccine (4):
survival rate

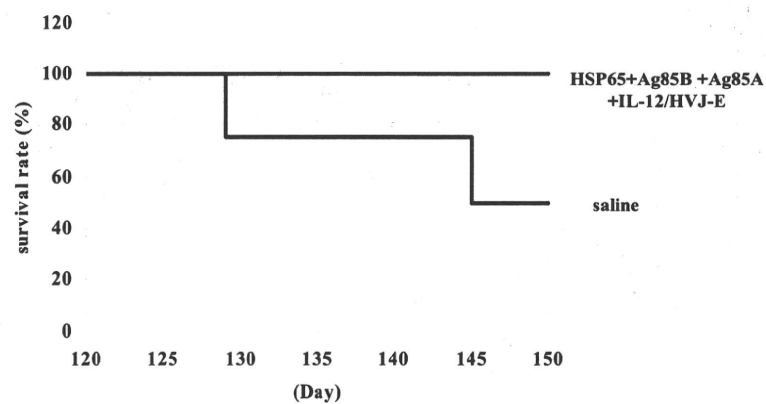


図27

Therapeutic effect of HVJ-Envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNA+Ag85B DNA+Ag85A DNA+MPT51 DNA vaccine + HVJ-Envelope/15K granulysin DNA vaccine on TB-infected cynomolgus monkeys

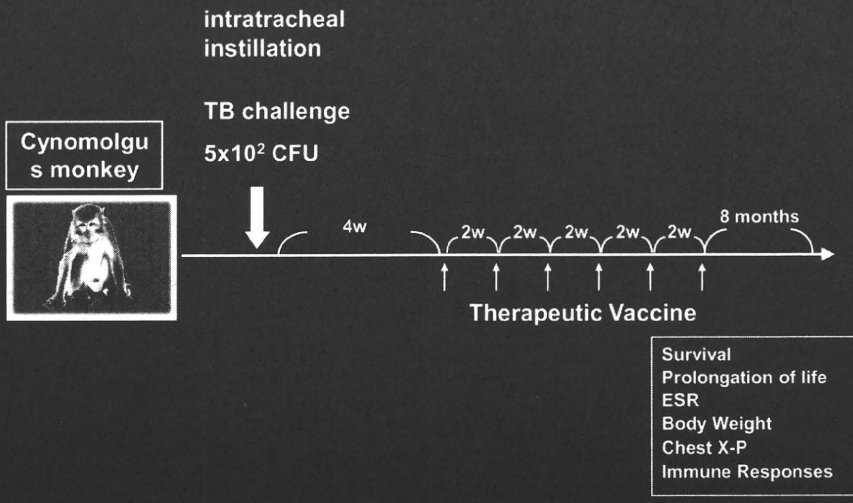


図 2 8

カニクザルにおける、HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNA + Ag85A DNA + Ag85B DNA + MPT51 DNA ワクチンとHVJ-エンベロープ/Granulysin DNAワクチンの結核治療効果

- G1 HVJ-E/15K Gra DNA
- G2 HVJ-E/(HSP65 + IL-12 + Ag85B + Ag85A + MPT51) DNA
- G3 HVJ-E/15K Gra DNA + HVJ-E/(HSP65 + IL-12 + Ag85B + Ag85A + MPT51) DNA
- G4 Saline

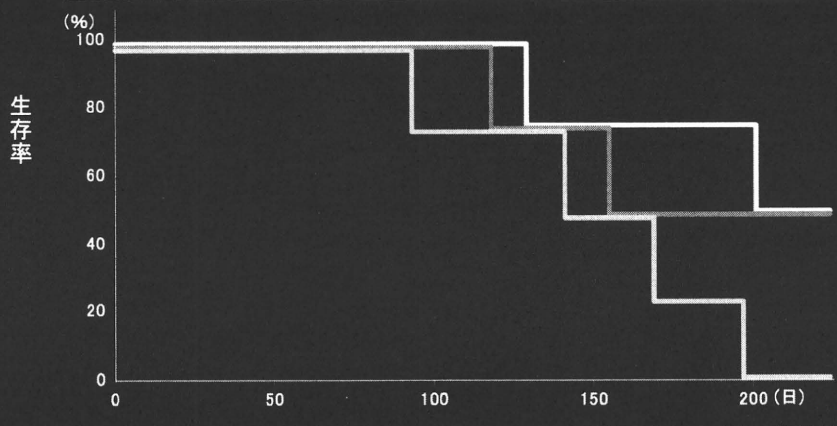


図 2 9

Induction of Cytotoxic T Cells and Killing Mechanism

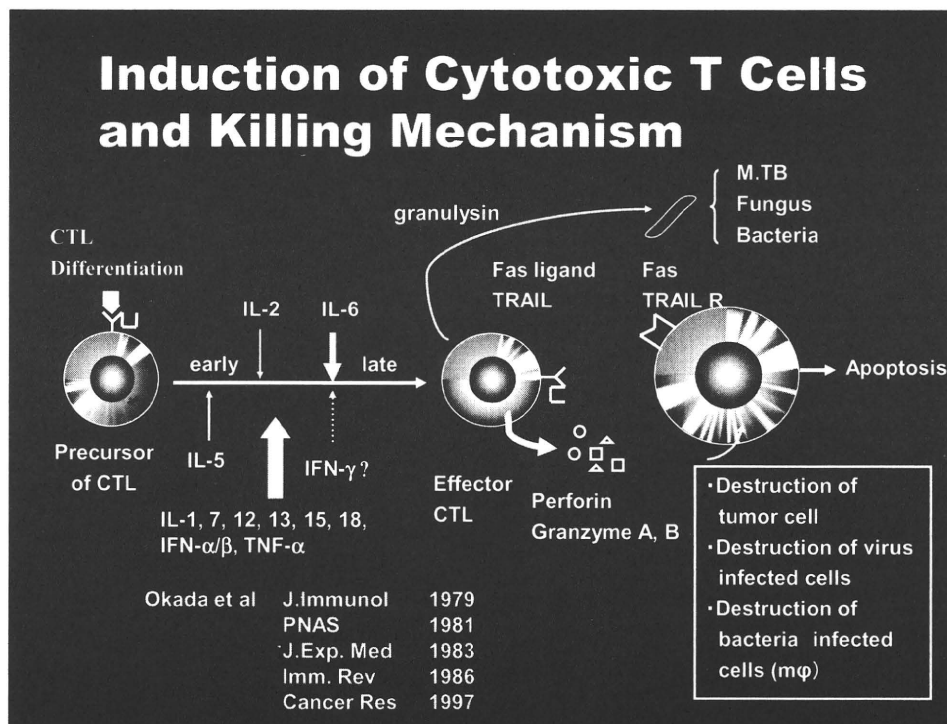


図30

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ンクイザルの実験<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。したがってカン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を期間をとった。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- γ 産生の著明な増強が認められた。(図26)

以上の結果より、このワクチンのカンクイザルにおける予防効果は再現性もあり、間違いのないものとなった。

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ン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(カンクイザル末梢血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。(図27)

6. 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ンクイザルを用いて解析中である。すなわち、ヒト結核菌Erdman株 5×10^2 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 μ 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。(図28、29)

- G1群: HVJ-E/granulysin DNA ワクチン
- G2群: HVJ-E(Hsp65+IL-12+Ag85B+Ag85A+MPT51)DNA ワクチン
- G3群: HVJ-E/granulysin DNA + (Hsp65+IL-12+Ag85B+Ag85A+MPT51)DNA ワクチン

G4群：コントロール（生食投与群）である。G2群の(Hsp65+IL-12+Ag85B+Ag85A+MPT51)DNA投与群は結核菌チャレンジ200日後で4頭中2頭の生存（50%の生存率であった）。一方、G4群コントロール群は全例死亡（生存率0%）であった。すなわち、Hsp65+IL-12+Ag85B+Ag85A+MPT51 DNAワクチンは強い治療効果を示した。さらに、360日後においてG3群のGranulysin DNAを加えた群では生存率50%（4頭中2頭）を示した。G1群のGra DNAワクチンも360日後には4頭中1頭（25%）の生存率を示した。すなわち、Gra DNAワクチンの追加は長期生存（長期治療効果）に有効であることが強く示唆された、初めての発見である。

(14) ヒト多剤耐性結核菌治療モデルを世界に先駆けて開発した。

ヒト多剤耐性結核菌治療モデル
IL-2R(-/-)SCID-PBL/huを初めて作製した。IL-2レセプター γ 鎖ノックアウトマウスNOD SCID [IL-2R(-/-)SCID] マウスを作製し、これにヒトPBLを投与して 極めてヒトT細胞の生着がよく、生体内ヒト抗結核菌免疫を解明できることを明らかにした。この、IL-2R(-/-)SCIDマウスはIL-2レセプターを欠損したNOD-SCIDマウスであり、T細胞、B細胞が全く存在しないのみでなく、NK細胞の分化が抑制されたSCIDマウスである。したがって、ヒト・リンパ球の生着が通常のSCIDマウスに比較して約100倍良い。しかも、このIL-2R(-/-)SCID-PBL/huはヒト癌細胞に対する生体内ヒト・キラーT細胞の誘導の系において、通常のNOD-SCID-PBL/huや

CB17-SCID-PBL/huに比較して、約50~200倍強力な抗原特異的ヒト・キラーT細胞を生体内脾リンパ球、PEC(peritoneal exudate cell)、腸間膜リンパ節や末梢血リンパ球で誘導する。

NK細胞を強く抑制する抗体、IL-2 Receptor β 鎖に対するモノクローナル抗体を投与したNOD-SCIDマウスでもこれに近いヒトのリンパ球が生着するマウスを作製できる。しかしながら、IL-2R(-/-)SCID-PBL/huの方が、やはり5~10倍ヒトT細胞生着率及びヒト・キラーT細胞誘導が強力である。

さらに、このIL-2R(-/-)SCID-PBL/huは、多剤耐性結核菌治療モデルとなることを初めて明らかにした。このモデルにH37Rvを投与した後、HVJ/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチンで治療することにより結核菌数の減少を認める画期的な結果を得た。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。

(15) 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 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30、31)

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 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

(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