

## C. 研究結果

### I. 日本における外国人結核

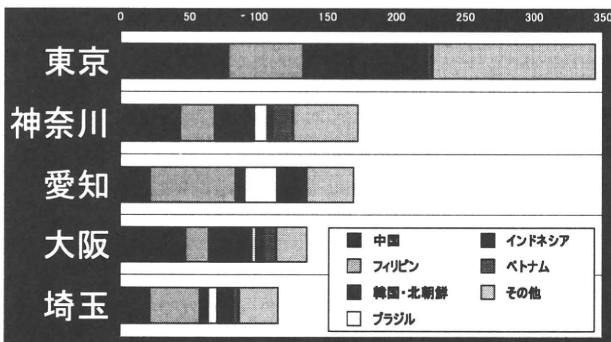
- (1) 当班であらたに外国人結核調査票を作成し、日本全国保健所と結核診療施設の合計800施設に送付し、多くの584施設(74%)より回答を得た(表7)。この約2700症例を解析した。20歳台が最も多く、次いで30歳台であった(表8)。男性も女性も同じ傾向であった。女性の方がやや多くを占めた(58%)。

表9 来日年数

来日1～3年以内	29.7	%
----------	------	---

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10)。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



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	29.1	%
学生	14.5	

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

表15 基礎疾患(合併症)

なし	76.1	%
糖尿病	3.5	
HIV	1.3	

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3.5%、HIV合併結核が1.3%であった(表15)。

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3.8%と、明らかに日本人結核(1.9%)より高い頻度を示した(表16)。また、外国人結核のINH単独耐性(10.0%)は日本人結核のINH単独耐性(5.9%)より高く、RFP単独耐性(3.7%)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16 薬剤耐性

MDR-TB 3.8% (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	10.0 %	5.9 %
SM 耐性	7.1	7.9
RFP 耐性	3.7	2.4
EB 耐性	4.4	2.4

表17 転帰

治療完了	75.0 %
継続中	6.5
帰国	15.8

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) 国立国際医療研究センター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(図6)。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。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。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

た。脱落者5名のうち、4名は日雇、1名は学生であった。外国人結核の特徴を明らかにするために、臨床的事項について日本人結核と比較した。2010年4月までの外国人結核患者102名のうち、肺結核は83名で結核全体の81.3%を占め、そのうち排菌陽性は81.9%、塗抹陽性は56.6%、有空洞率は45.8%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。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) 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。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。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。MIRU-VNTR解析、スポリゴタイピングの結果、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(図8)。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。

東京の外国人結核患者の臨床像と結核菌 国外及び国内感染	
国立国際医療研究センター	東京病院
外国人結核患者 113名 (2007~2010年)	外国人結核患者 87名 (2004~2010年)
全TB患者の 8.4%	●多剤耐性結核 5.7%
日本人結核患者との比較	(日本人 0.7%)
●外国人結核はRFP耐性菌、 多剤耐性結核が多い	●HIV合併結核 5.7% (日本人0.6%)
(下表)	●日本語学校等での集団発生

図6

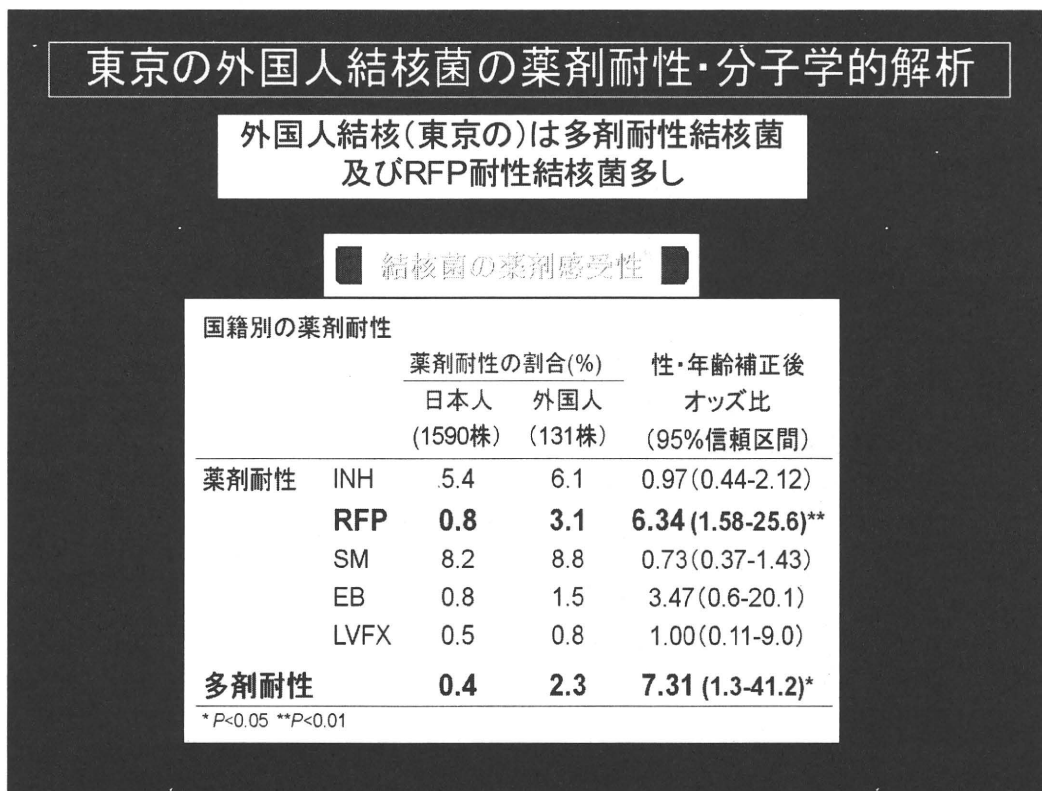


図7

# 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

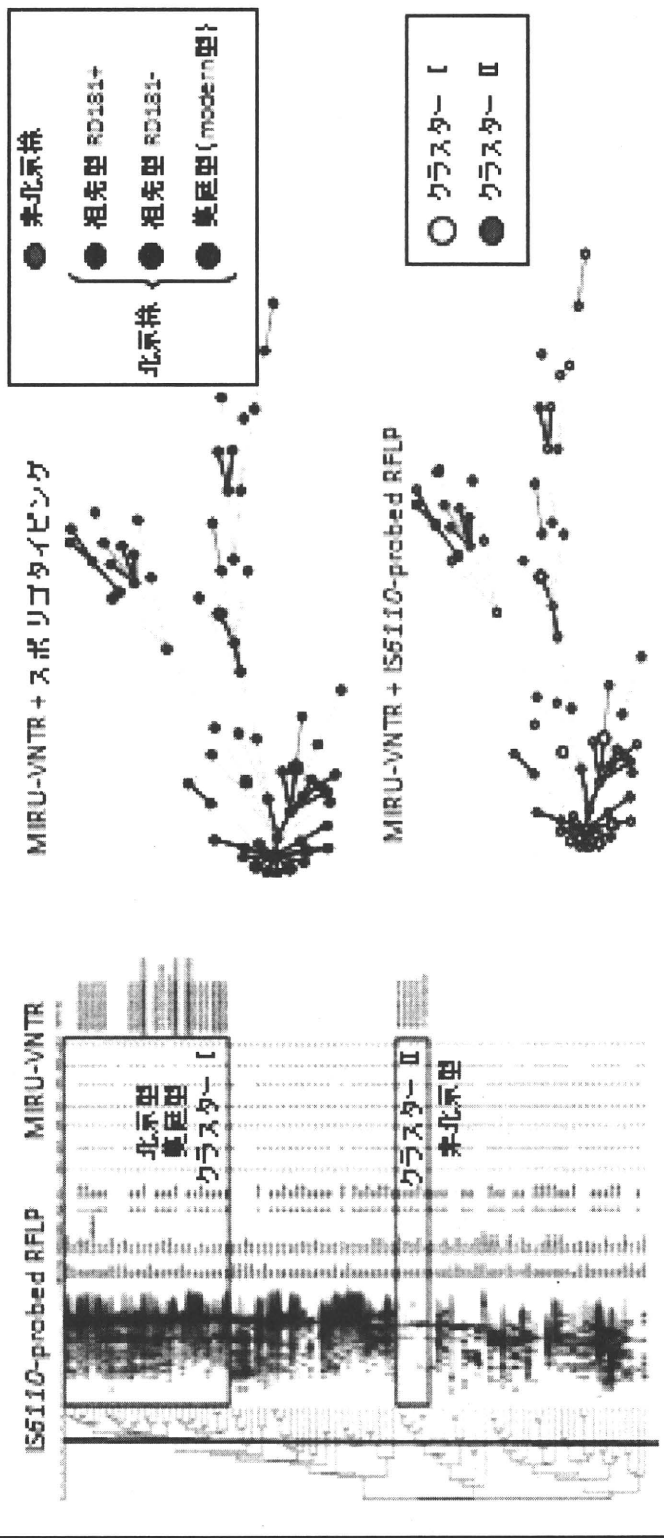


図 8

- (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) 大阪市の外国人結核患者は4年間で126名おり、男性59名、女性67名で男女比は0.9であった(表1)。全年齢における外国人患者数は29名(2006年)から34名(2009年)と増加傾向であった(図9)。

国では第三位であった。フィリピン籍は13名(10%)であり、全国では第二位であった。韓国・北朝鮮籍の者は全国と比べ大阪市で有意に多く、フィリピン籍の者は大阪市で有意に少なかった。薬剤感受性の状況を外国人と外国人を含む大阪市全体とで比較した。初回治療の群では、外国人のMDRは2.9%であり、大阪市全体では0.7%であった。一方再治療群では、外国人のMDRは30%で、大阪市全体では6.6%であった。年齢分布についてみると、外国人では20代が64名(51%)、30代が22名(17%)であった。一方大阪市全体では20代90名(7%)、30代(9%)であり、20～39歳群の占める割合は、外国人68%に対し、大阪市全体では16%であった。入国から発病までの期間を20～39歳の外国人について調べたところ、1年未満が23名(29%)、一年以上2年未満が19名(24%)、2年以上3年未満が14名(18%)であり、3年未満の者は合わせて70%を占めた。社会背景では、20～39歳の在留外国人のうち学生は36名(42%)であり、在留外国人以外の者と比較して有意に多かった。20～39歳の健康診断によって発見された者は、在留外国人29名(34%)に対し大阪市全体50名(27%)であり、有意差は認めなかった。X-P上空洞を認める者は、在留外国人10名(12%)に対し在留外国人以外33名(18%)であり、有意差は認めなかった。塗抹検査上陽性の者は、在留外国人29名(37%)に対し在留外国人以外64名(44%)であり、有意差は認めなかった。治療成績を比較検討した結果を表12に示した。20～39歳の脱落の者は、在留外国人12名(19%)、在留外国人以外6名(4%)と有意差を認めた。

- (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

外国人の割合は1.9%(2006年)から2.6%(2009年)と同様に増加傾向がみられた。20代に限ると、13%(2006年)から20%(2009年)へと増加していた。国籍別の患者割合を、大阪市と全国の外国人結核患者で比較した。大阪市では中国籍が48名(38%)と最も多かった。韓国・北朝鮮籍は36名(29%)と第二位を占めたが、全

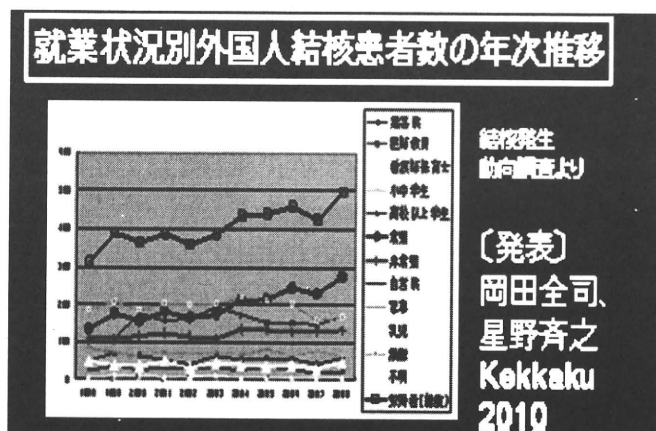


図10

- (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10)  
 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。(図11)  
 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。

- (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)

**VNTRシステムのコアとなるローサイ: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。米国疾病予防管理センターでは、Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU)の12箇所、ヨーロッパ諸国ではフランスパスツール研究所のSupplyらが報告したSupply(15)あるいはSupply(24)-VNTRシステムが、新しい結核菌の型別法として採用されている。ヨーロッパ諸国では、このSupply(15)-VNTRを用いて結核菌の型別情報のデータベース化が進められている。しかし、東アジア諸国では、米国、ヨーロッパ諸国と広まっている結核菌の遺伝子型が異なり、北京型結核菌が結核全体の7-8割を占めている。日本国内の結核菌をMIRU(12)およびSupply(15)-VNTRで分析すると大きなクラスターが形成し、これらのVNTR分析システムでは、北京型結核菌に対する分解能が低いことが判明している。そのため、北京型結核菌を効率良く型別できるVNTRシステムを構築する必要がある。同じ北京型結核菌でも、NTF領域にIS6110が挿入されている“Modern型”と挿入されていない“Ancient型”の2つに大きく区分される。中国(北京)、香港、ベトナム、ロシアおよびヨーロッパ諸国ではModern型が75-95%を占めているのに対して、日本や韓国では70-80%がAncient型であり、諸外国で広まっている北京型株と異なる型の結核菌が広まっていることが判明した。韓国国内で分離された80株分析したところ、進化の過程でNTF領域にIS6110が挿入される前に生じるRD181領域欠損という事象が生じていないRD181領域陽性株の割合が高いことが判明した。つまり、東京都内で分離された株では87株のAncient株中17株(20%)であるのに対して、韓国国内で分離された株では46株のAncient株中29株(63%)がRD181陽性株だった。このように結核菌の遺伝的背景が各国で異なることから、最適なVNTRシステムは各国で異なることが想定された。そこで、共通に利用できるコアとなるVNTRローサイを選択することにした。選択したローサイのVNTR結果を用いたMST解析:各国の施設で現在実際に分析しているローカスを調査して、共通な10箇所のローサイ(MIRU-10、MIRU-26、MIRU-31、ETR-A、VNTRs-0424、1955、2163b、3155、4052、4156)を選択した。また、最初に精度管理用DNAを送付して、各ローカスにおけるコピー数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。それぞれの国で広まっている主要な結核菌型は異なるが、本研究で選択した10-locus VNTRで3つに大きく区分することができることが確認できた。つまり、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型をそれぞれのグループに分けることが可能だった。  
**SNPsを用いた結核菌系統解析:**本VNTRシステム

## 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  
(岡田敏)

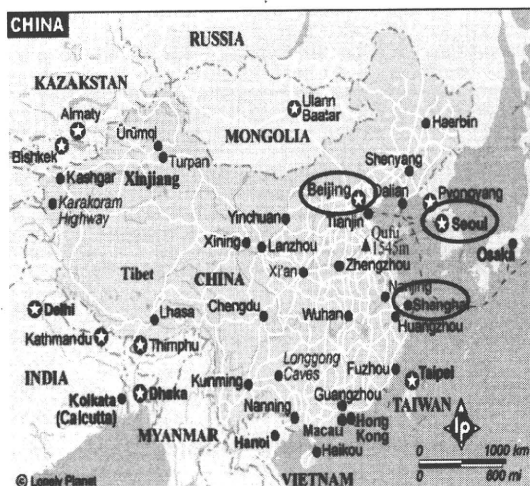
---

### 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(胸レントゲン)の厳行、入国時、接触者健診におけるクオンティフェロン(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
  - 専門医が受け持つ結核診療センター、在日外国人結核相談室。

図 1 1

## 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

は10箇所だけの分析なので、識別能はあまり高くないと考えられる。そのため、本VNTRシステムによる型別だけでなく、SNPs分析による遺伝系統情報も加えることで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、結核菌を遺伝系統別に分けることができるSNPs部位のどのローカスを使うか検討した。7箇所の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を候補とした。これらの分析により、SNPs分析で結核菌の遺伝系統さらに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た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できる。東アジアで共有できる型別システム構築により、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まっているか推定することが可能となる。

図12

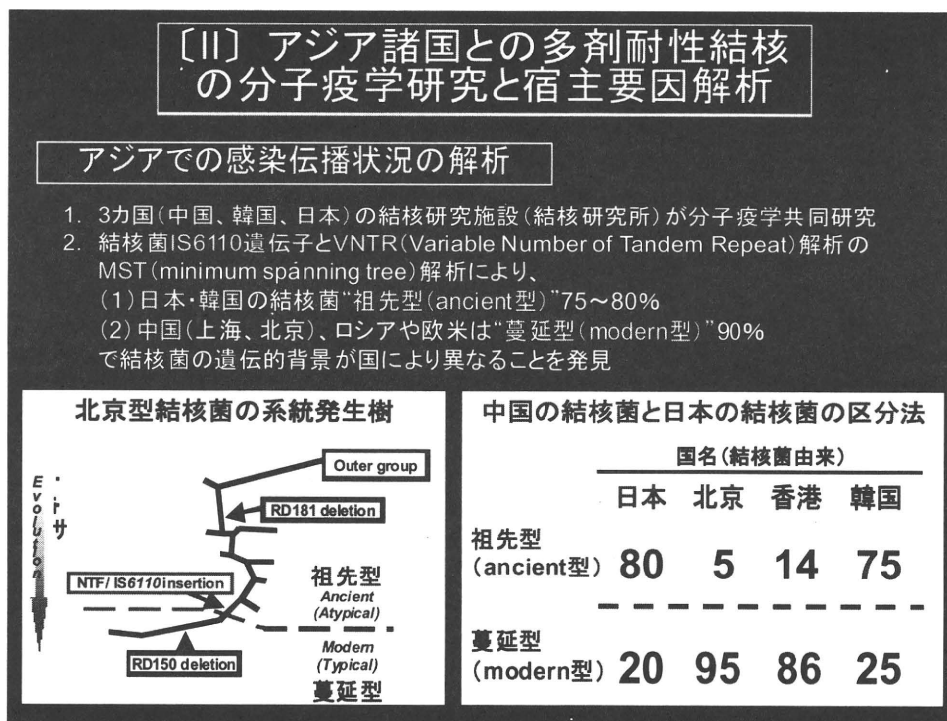
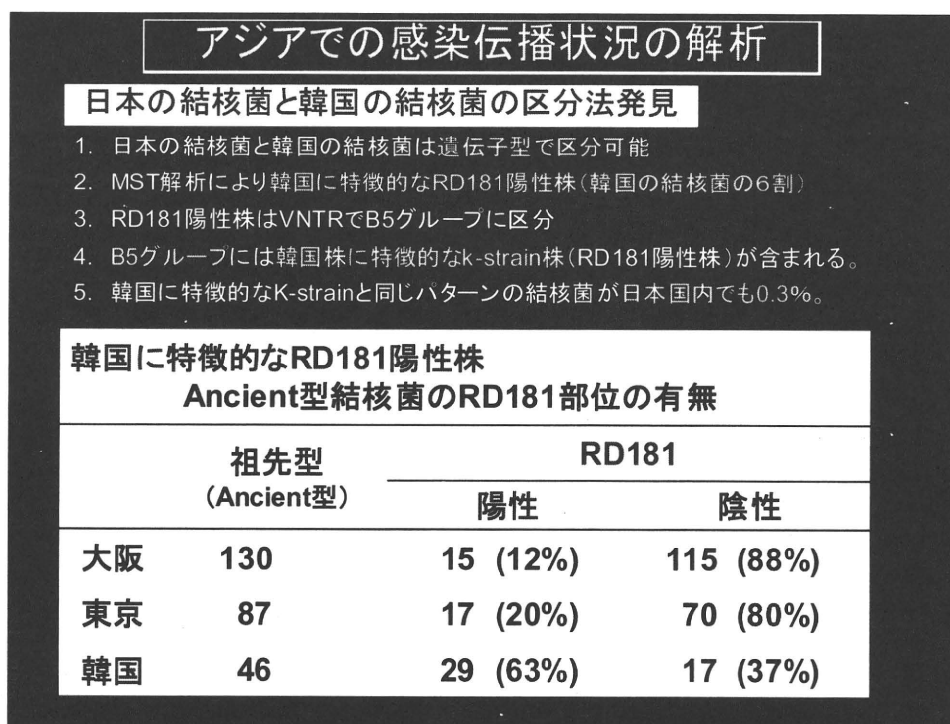


図13



## 韓国の結核菌と中国株と台湾株と日本株の区分可能

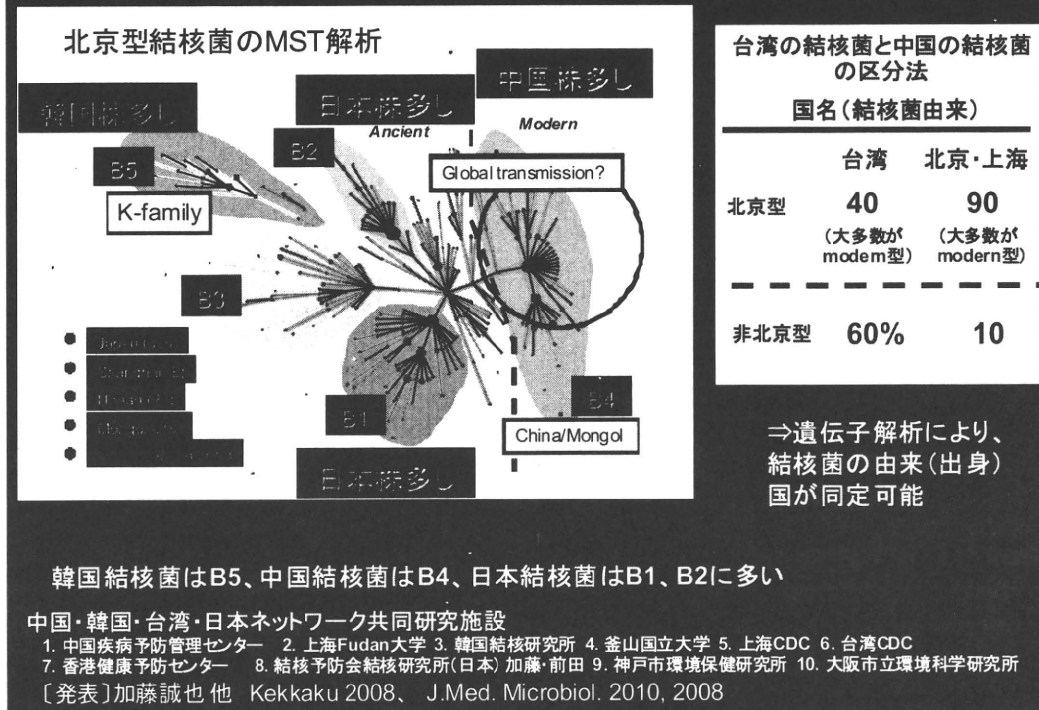
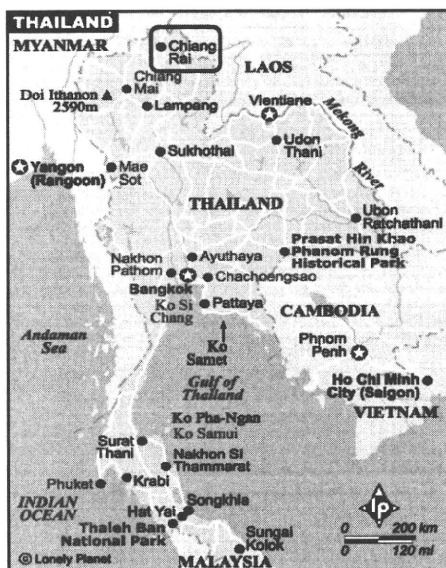


図14

- (3) 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15)。



臨床疫学因子を再発の関与因子に絞って再解析をし、危険因子が同定された。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。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、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。宿主免疫学的因子は、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。最終年度に得られた結核の治療後のフォローアップの結果を追加して図5-8に示した結果にて、論文投稿した。

菌体因子として、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たパターンを示す。HIV陰性例における詳細な42例の経時的検討が終了し、40例(95%)がRFLPパターンが一致し、同じ菌による再燃、2例(5%)が、RFLPが異なり違う菌による再感染と考えられた。表3に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]と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、再発例で52.7%、オッズ比OR=5.5(95%信頼区間2.5-13.1)、治療失敗例で40%OR=2.5(95%信頼区間1.02-6.3)と有意に高かった。



(9) ハルピン医科大学との共同研究

結核菌の遺伝子解析 (図15)

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、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欠損のカップ値は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た。最初に最も適正座数を決定するために、19 MIRU-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, Mtb21 and Mtb4) の多様性度は低いが(0.3<math>h</math>≤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 Mtb29 ( $h = 0.138$ ) 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

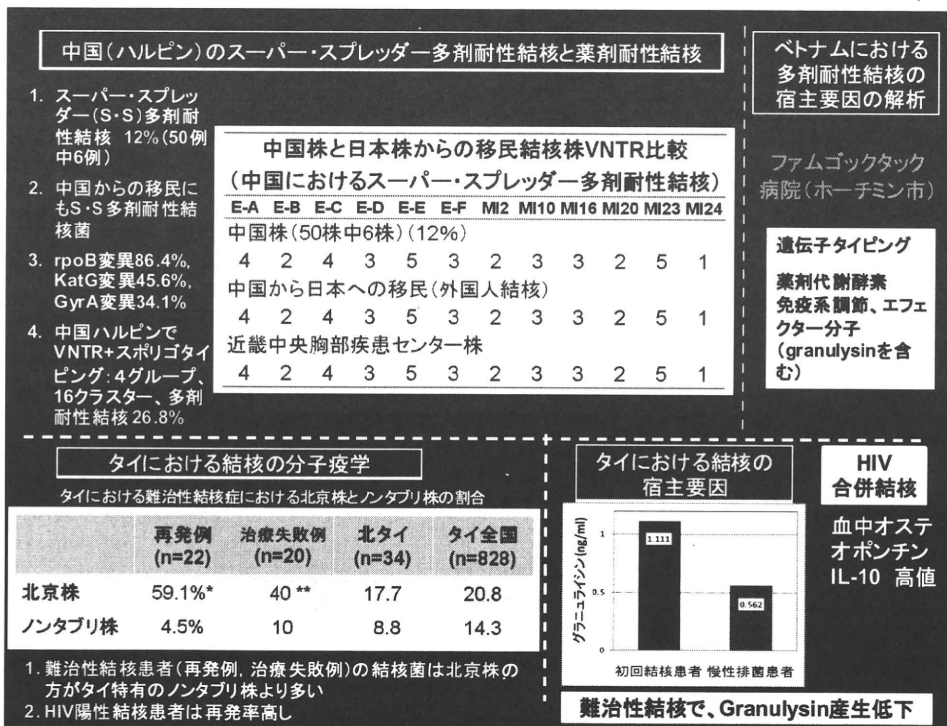
を求めた(表2)。10座数解析では HGDI は 0.9950 で15座数あるいは16座数と同じであった。

黒竜江省由来結核菌の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結果これらの株は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。非北京型のほとん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) で以下は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所を見るとA2 と A7 は黒竜江省の郊外で A3-A6, A9, A10 はハルピン市であった。

**黒竜江省の結核菌の薬剤耐性** Streptomycin, isoniazid, rifampin と ethambutol, 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;  $P = 0.2127$ )。





地図3. ハルビン

- (10) Osteopontin: 患者血漿におけるIFN- $\gamma$ 値は結核、HIV合併結核群において有意に上昇しており、他群との比較から、osteopontin、IL-18、IP-10の場合と同様のパターンを示すことが確認された。IL-12はHIVHAART(+)群で有意上昇していたため、osteopontinならびに上記サイトカインと異なったパターンを示したが、結核、HIV合併結核においても有意に上昇しており、osteopontinとTh1系サイトカインがHIV合併結核患者血漿で著明に上昇していた。2. Granulysin: 患者血漿におけるgranulysin値は、健常者からQuantiferon test陽性者を除外したことから、結果に違いが出た。結核患者では健常者およびHIVHAART(+)の患者と比較して有意にgranulysin値は減少していた。一方、補正後もHIV合併結核では他群に比較して有意に上昇しており、この点は変わらなかった。さらに、HIV合併結核で血漿中granulysinが著明に上昇していたことから、その分子量を明らかにするためイムノブロッティングを実施したところ、この方法によってもHIV合併結核患者血漿ではgranulysin量が著明に増加していることが分かった。また、分子量は15kDaと9kDaのものが確認され、9kDaのものが大半であった。3. 活性型ビタミンDと関連遺伝子: 血漿25(OH)D3値は結核群で欠乏している症例が多い傾向が認められたが、サンプル数が少なく統計学的に有意な結果を出すに至っていない。M-CSFにより分化した培養M-M $\phi$ においては、未刺激ではCYP27B1の発現は認められず、BCG感染刺激によってのみ発現誘導が認められた。また、M-CSFは、むしろCYP27B1の発現を抑制した。一方GM-CSFによって分化した培養GM-M $\phi$ においては、未刺激でも一定のレベルで発現しており、GM-CSFの添加およびBCG感染によってさらに発現が増強された。VDRは、培養M-M $\phi$ においてBCG感染刺激によってのみ発現が弱く誘導され、一方、培養GM-M $\phi$ においてはBCG感染ではなくGM-CSFによってVDR遺伝子の発現が増強された。cathelicidinは双方の培養マクロファージにおいて刺激時

にも誘導がかからず、とくに培養M-M $\phi$ では検出限界以下のレベルであった。患者群では、CYP27B1の遺伝子発現が、HIVHAART(-)とHIV合併結核で、抑制されている傾向が認められた。4. 薬剤耐性試験はバンコックの中央検査室で実施されたが、多剤耐性・超多剤耐性結核菌は全例から検出されなかった。また、薬剤別ではSMに対して14%が耐性、INHに対しては8%が耐性であった。それ以外の薬剤に対しては耐性菌は確認されていない。

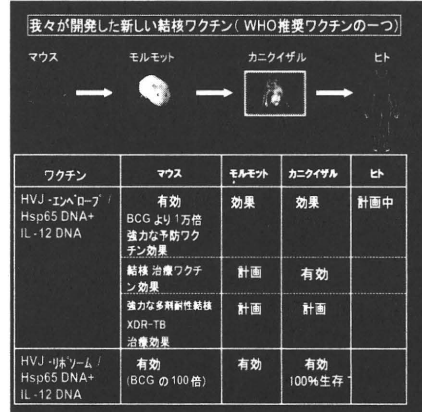
- (11) ベトナムの多剤耐性結核は、都市部の、結核既治療再排菌例に多いことが、我々独自の調査でも明らかである(未発表資料)。ファムゴックタック病院では、多剤耐性結核のベトナムにおける臨床共同研究の受け入れ機関として、最も適していた。本研究では、共同研究のプロトコール作成を行い、医療センター倫理委員会にて平成21年5月承認、ファムゴックタック病院倫理委員会にて平成21年8月承認を得た。エントリー基準は、薬剤感受性試験で多剤耐性結核(INH, RFP耐性)と診断された、16歳以上70歳までの患者で、18か月の治療、観察期間を完遂できる見通しがあり、書面同意を得たものとして、HIV陽性、悪性腫瘍、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。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。(図15)

### 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)

## 新しい結核治療ワクチンの開発

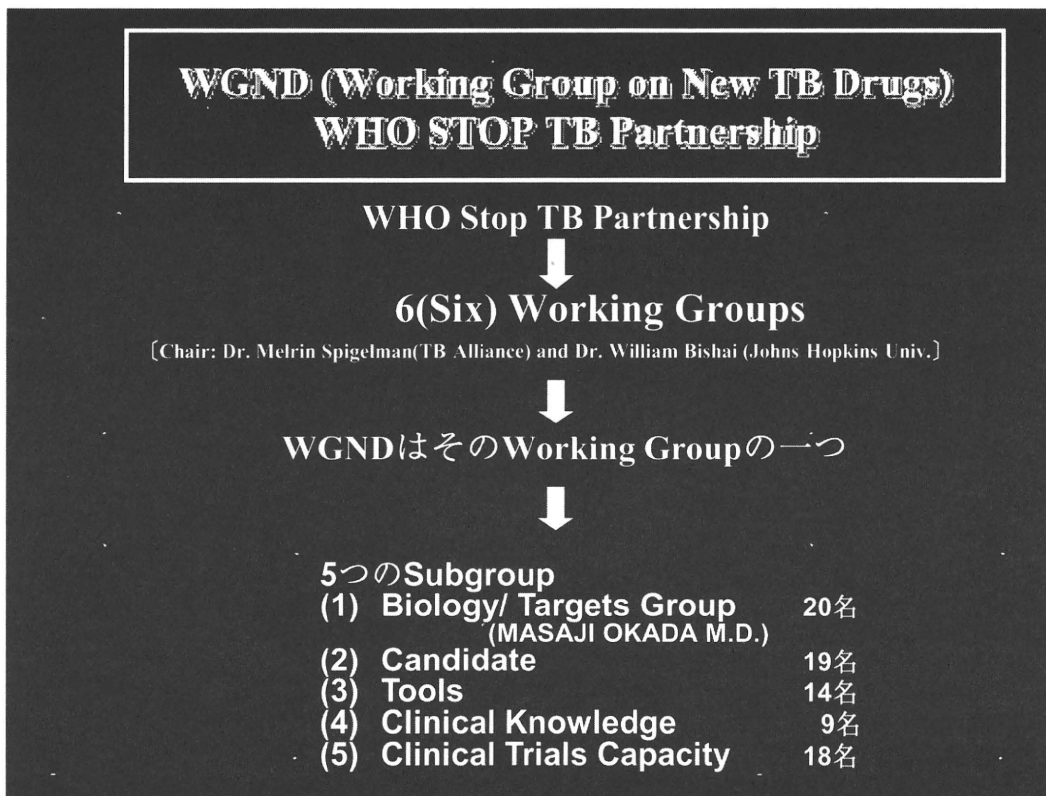
- (1) HVJエンベロープ/Hsp65 DNA+IL-12 DNAワクチンはBCGよりも1万倍強力な結核予防ワクチン効果。初めてワクチンによる延命効果を発見(マウス)。モルモット(McMurray教授)及びカニクイザル(レオナルド研究所;ヒト結核感染に最も近い)にワクチン投与し、結核予防効果あり。CD8キラーTが重要。
- (2) 多剤耐性結核に対する世界で初めての治療ワクチンを発見した。超薬剤耐性結核菌(XDR-TB)に対してもHVJエンベロープ/Hsp65DNA+IL-12DNAワクチンは治療効果。サルで実験中(治療効果示唆)。
- (3) 200倍強力な新規HVJ-Eベクターを開発した。
- (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。

図16

表21

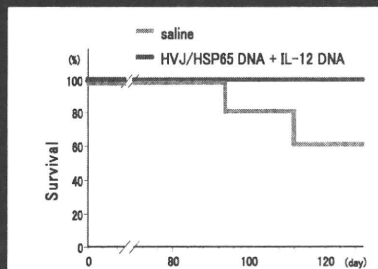


# 〔Ⅲ〕 新しい結核ワクチン

## 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	効果	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)	

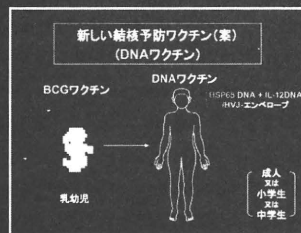
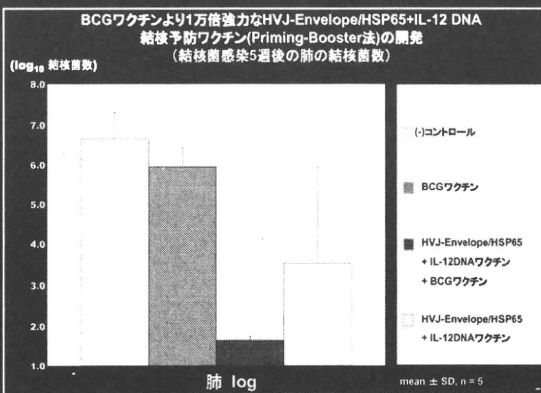
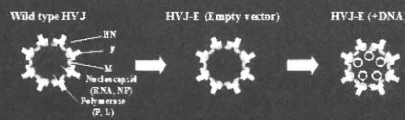
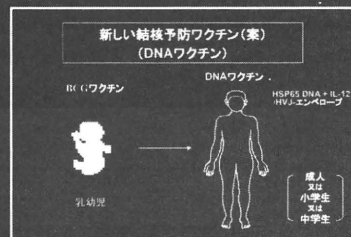


図 17

## 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)

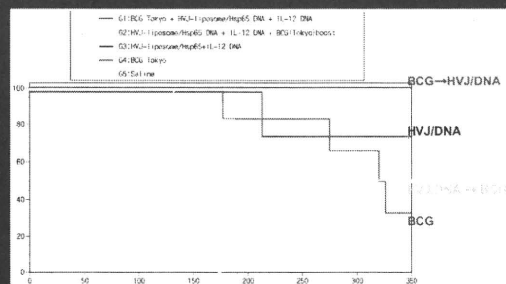
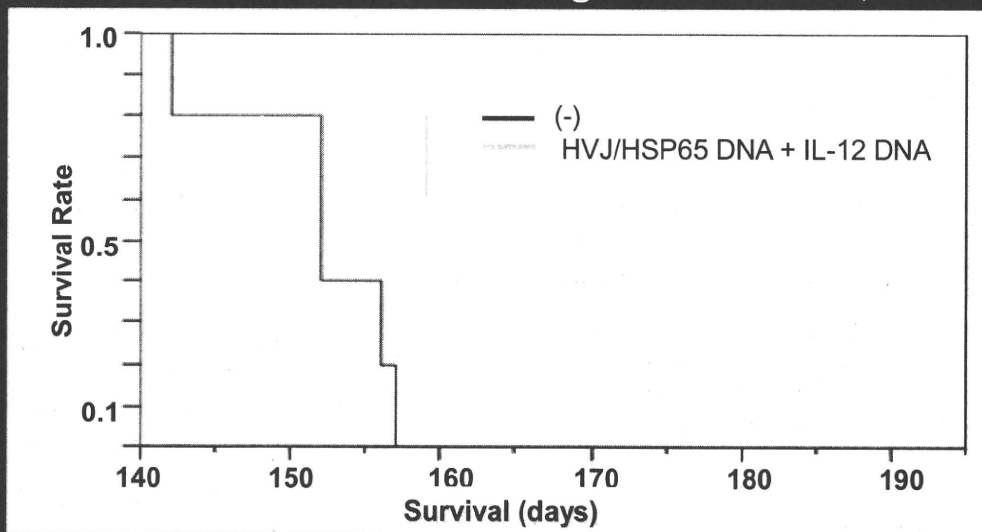


図 18

## 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

- 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、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 $5 \times 10^5$  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-エンベロップ・パウダーを用いた、より強力な結核ワクチンの開発  
HVJ-エンベロップ・ベクターをさらに改良してHVJ-エンベロップ・パウダーベクターを開発した。従来のHVJ-エンベロップ・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-エンベロップ・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/Hsp65 DNA+IL-12DNAワクチンを開発した。このワクチンを結核菌H37Rvをi.v.投与したマウスに3回 i.m.注射することによりBCGワクチン投与群に比較して、有意差( $p < 0.05$ )をもって治療効果を示した。ワクチン非投与群と比較しても、有意にこのワクチンは結核菌減少効果を示した。すなわち、 $5 \times 10^5$  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標にしたい。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-12 DNA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ブスター（2回）

G2群 Hsp65+IL-12DNAプライム（2回）BCGブスター（1回）

G3群 Hsp65+IL-12DNAプライム（1回）Hsp65+IL-12DNAブスター（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. 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-ブスター法に効果が認められている。

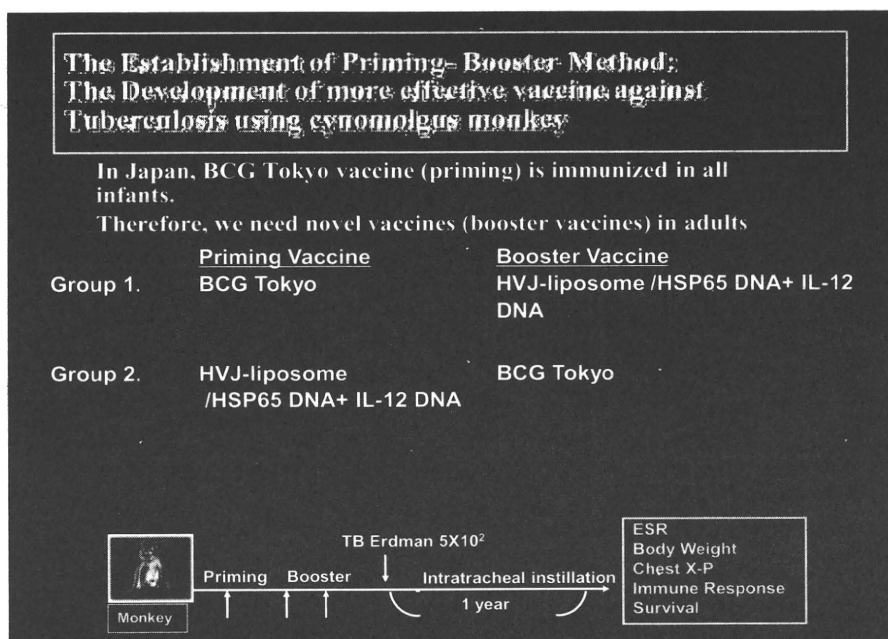


図 20

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

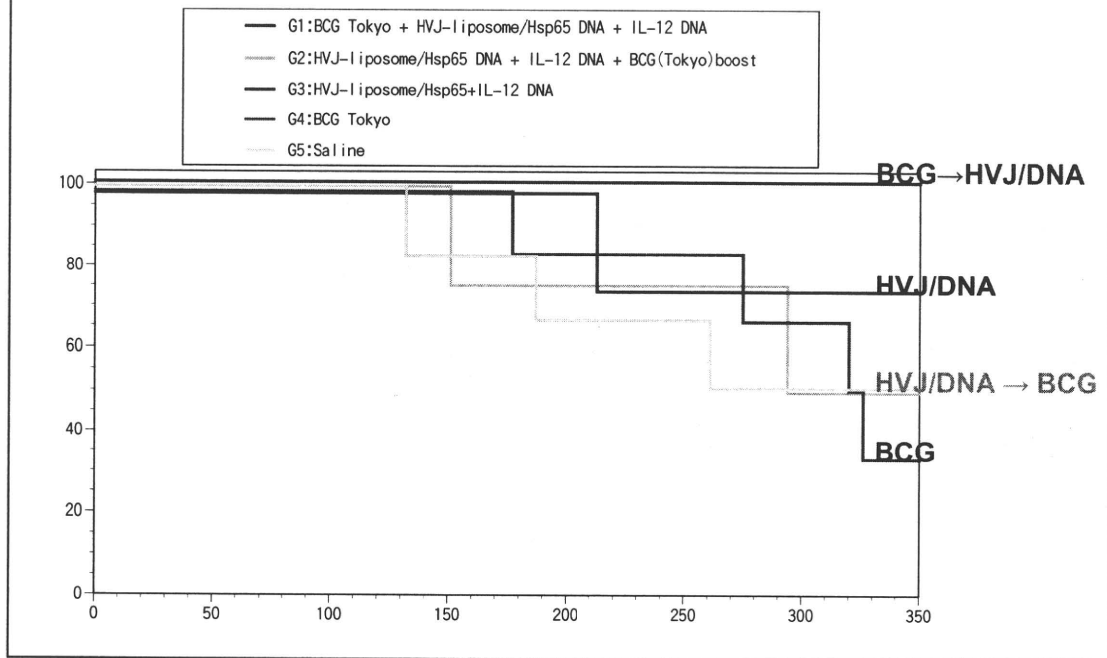


図 2 1

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

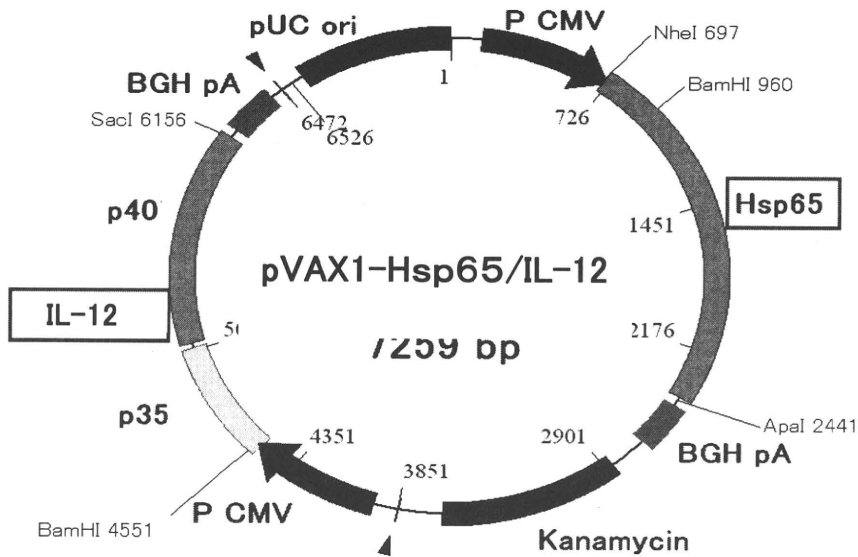


図 2 2

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

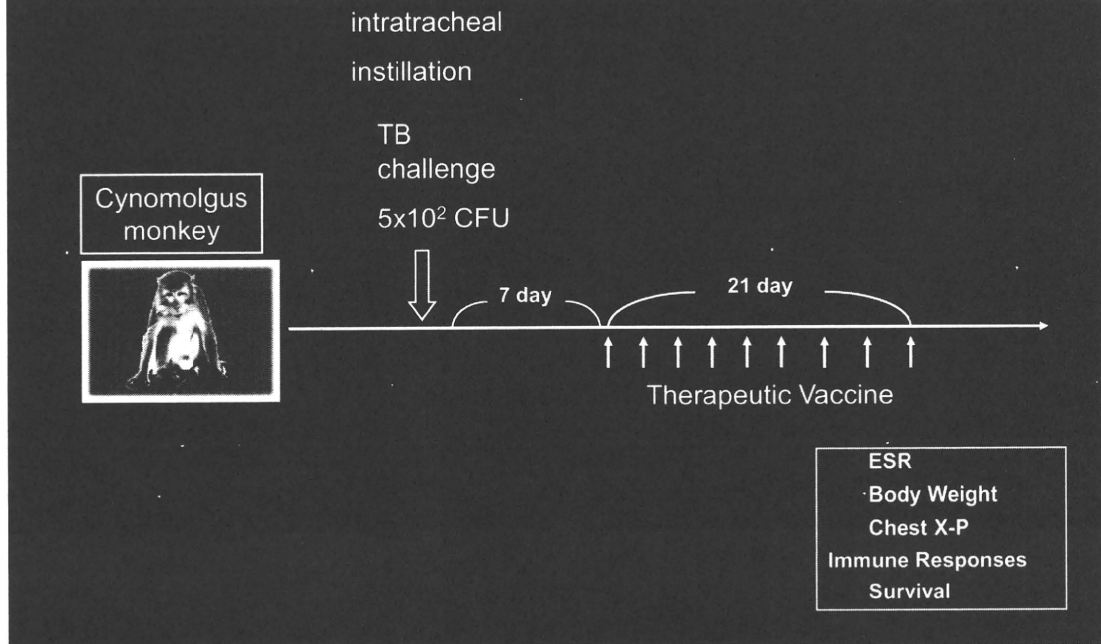


图 2 3

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		
	-		
	-		



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

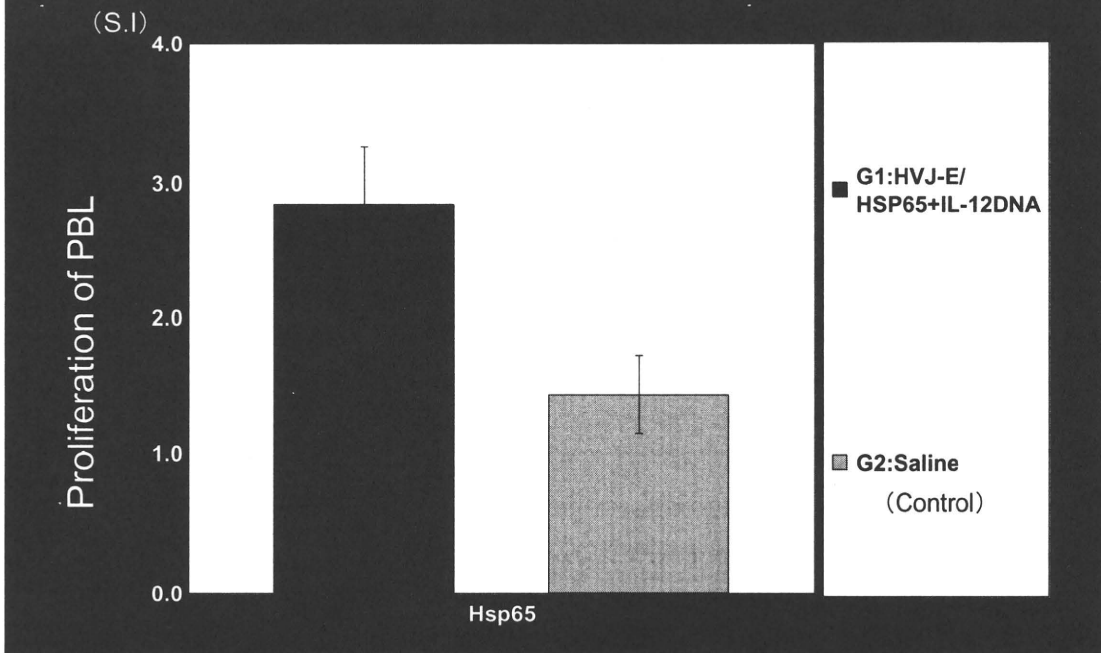


図 2 4

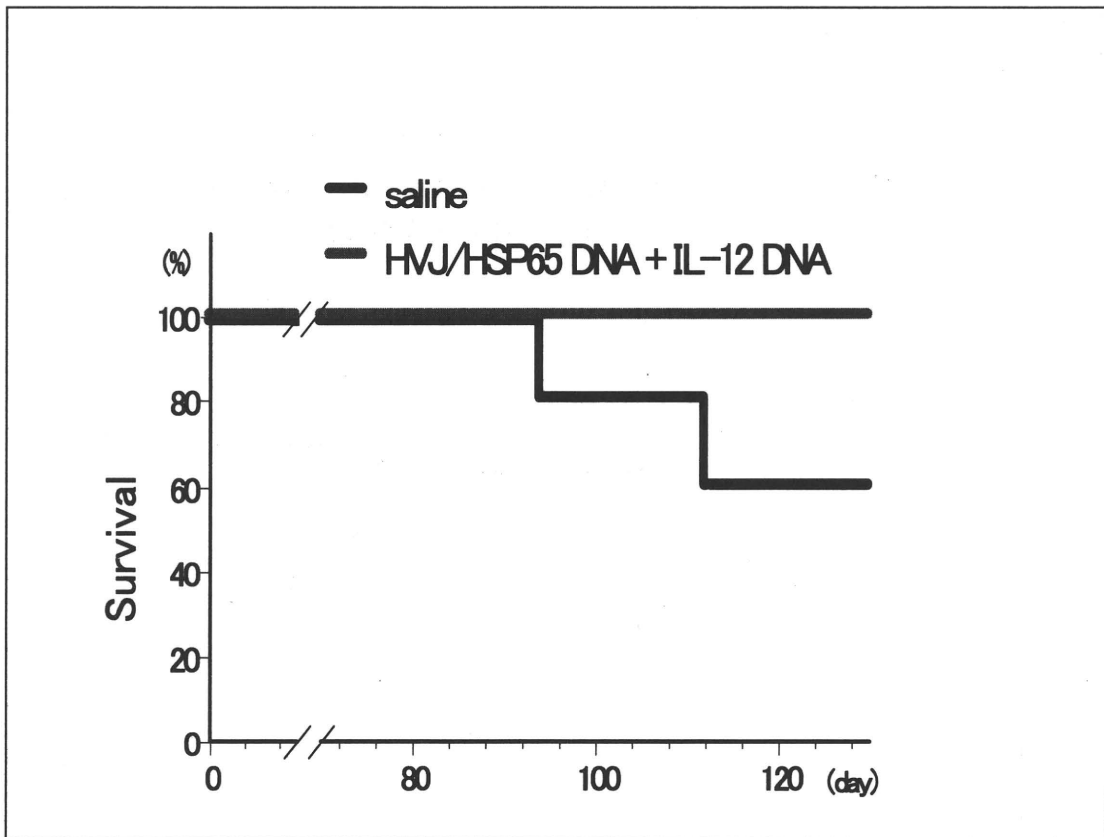


図 2 5

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 $5 \times 10^2$ 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( $^3\text{H}$ -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。
4. 長期間のプライム-ブースター期間を入れて、ワクチン予防投与したカニクイザルの実験〈実験Ⅵ〉：ヒトにおいては乳幼児(プライム)から成人(ブースター)・中学生(ブースター)までの期間が10~

15年と仮定すると、長期のプライム-ブースター期間となる。したがってカニクイザルの系においてもヒトの臨床応用を考えてできる限り長い期間プライムとブースターとの間の期間をとった。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。(図26)以上の結果より、このワクチンのカニ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になった。

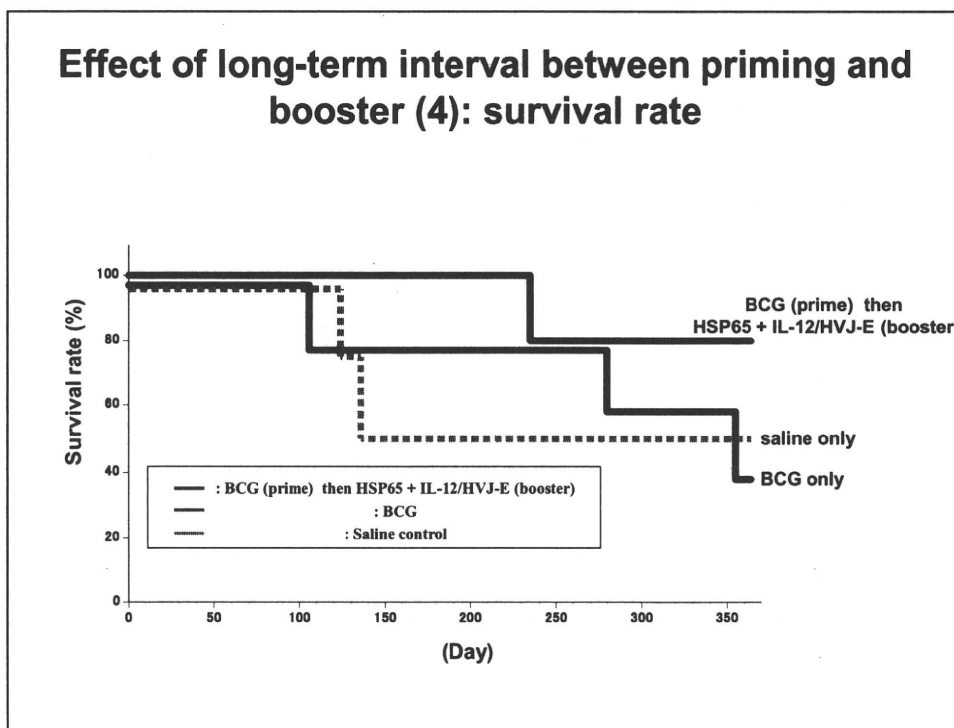


図26

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	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	(-)		(-)	

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。(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ニクイザルを用いて解析中である。すなわち、ひと結核菌 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  $400 \mu\text{g}$  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: HVJE(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  $\gamma$  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。

(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Mφにとり込まれMφ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Mφ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プロテク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32)

- (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µg/マウスを6回投与して治療効果を解析した。その結果、コントロール群と有意差(p<0.05)をもって、肺臓、肝臓、脾臓の結核菌数(CFU)をリコンビナント15K Granulysinタンパクの治療群は減少させた。すなわち、15K Granulysinタンパクは結核治療効果を発揮することを初めて明らかにした。
- (b) C57BL/6マウスにH37RV結核菌を投与した後、15K Granulysin DNAを投与した群においては、Granulysinに対する強力な抗体産生が血清中に認められることを明らかにした。さらにGranulysin DNAで治療後4~8週後のマウスにおいて、肺臓・肝臓・脾臓中の結核菌数が非投与群に比較して著明に減少した。
- (c) リコンビナント15K Granulysinをin vitroのマウス・キラーT細胞誘導系に添加し、15K GranulysinタンパクはキラーT細胞の分化を誘導することを明らかにした。さらに、in vitroのヒト・キラーT前駆細胞からエフェクター・キラーT細胞への分化にも15K GranulysinタンパクはキラーT分化因子とした作用することを明らかにした。また、15K GranulysinはIL-6やIL-2と相乗効果的にキラーT細胞の分化を誘導した。すなわち、Granulysinは結核菌を直接殺傷する効果以外に、キラーTの分化誘導を介して抗結核作用を発揮することが示された。

(16) ①動物の安全性試験(図33)

アジュバント兼DDSでワクチン成分であるHVJ-Eについて安全性試験を行った。国内の非臨床試験のガイドラインに従って、ラット(げっ歯類)、カンクイザル(非げっ歯類)の2種の動物を選択し、一般毒性試験(単回投与、2週間間歇投与)、安全性薬理試験(中枢神経系、呼吸器系、心血管系)、トキシコキネティクス(TK)試験、特殊毒性試験(免疫毒性、遺伝毒性など)を実施した。単回投与試験の結果、投与可能な最高用量においても死亡する動物は認められず、概略の致死量が投与可能な最高用量を上回る用量であることが明らかとなった。また、ラット(げっ歯類)とカンクイザル(非げっ歯類)の2種の動物いずれにおいても毒性学的に意義のある所見は認められなかった。また、反復投与毒性試験(間歇投与試験)の結果、ラット(げっ歯類)とカンクイザル(非げっ歯類)の2種の動物いずれにおいても、投与部位の軽度な炎症反応のみで重篤な毒性所見は認められなかった。更に、ラットの間歇投与試験にサテライト群として組み込んだトキシコキネティクス(TK)試験においては、被験物質の皮下投与後に血清移行は観察されない事(検出限界以下)が明らかとなった。