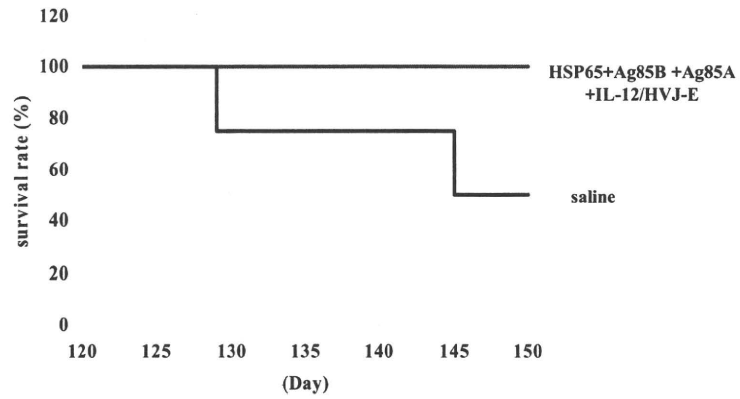
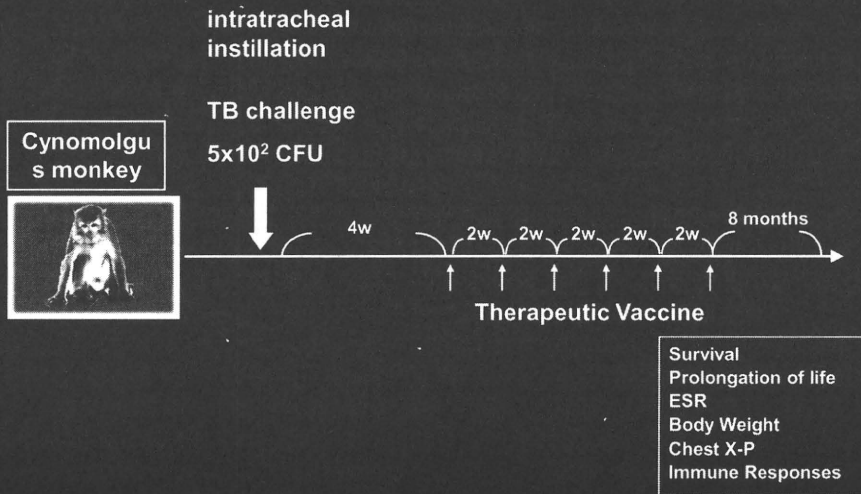


**Therapeutic effects of the polyvalent DNA vaccine (4):
survival rate**



☒ 2 7

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



☒ 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

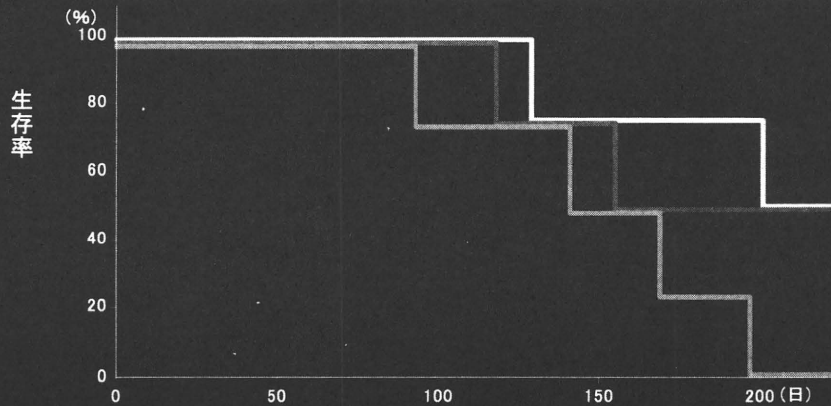


図 2 9

Induction of Cytotoxic T Cells and Killing Mechanism

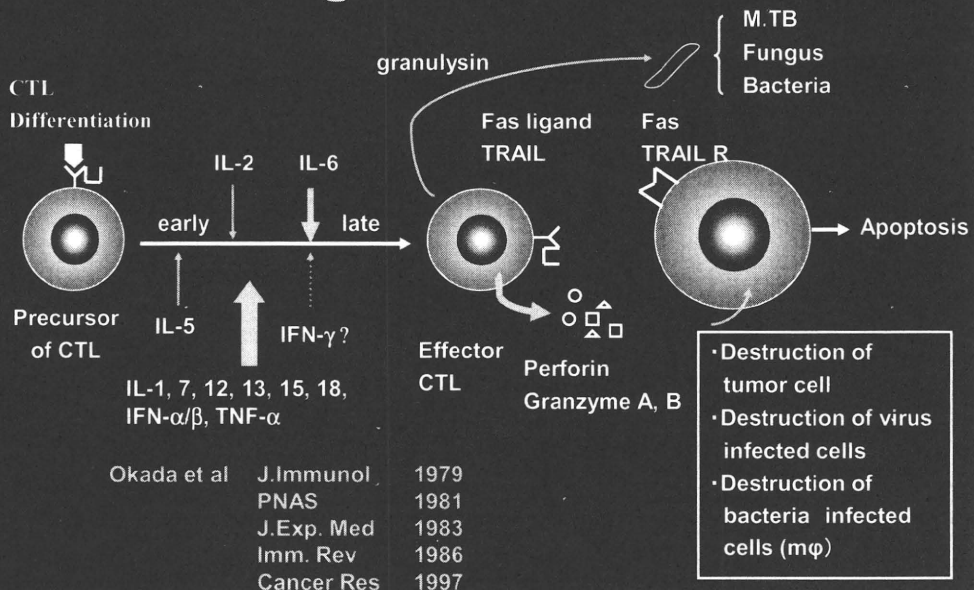


図 3 0

Anti-tuberculosis immunity by granulysin produced from cytotoxic T cells
(Hypothesis 2)

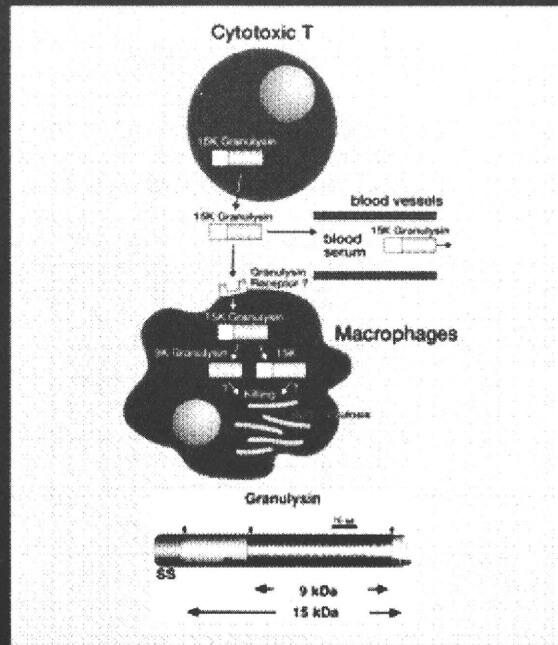


图 3 1

In vitro Induction of human Cytotoxic T cells
by the stimulation with recombinant 15K granulysin

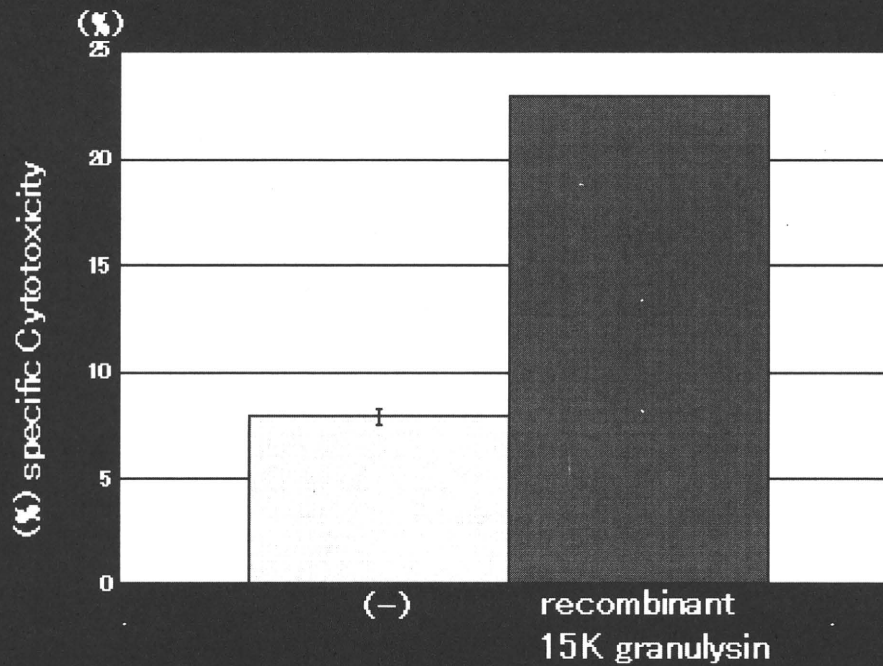
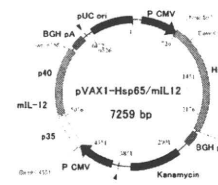


图 3 2

前臨床試験（安全性・毒性試験、GMPレベル製造）と臨床応用

HSP-65とIL-12遺伝子は1つのプラスミドで発現される

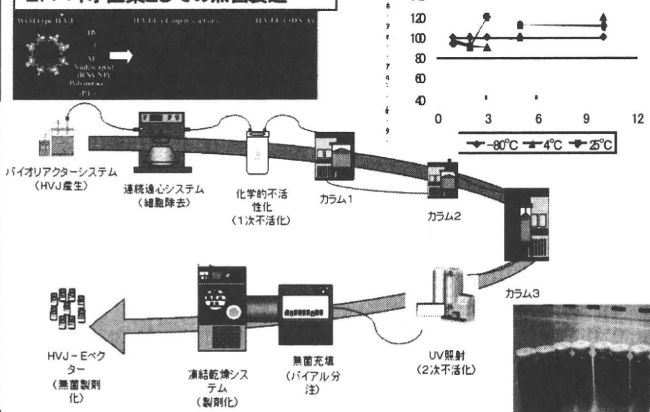


新規結核DNAワクチンの開発状況(まとめ) 岡田、中島

1. 前臨床開発(動物での有効性、安全性試験)
 - ① 有効性(マウス、モルモット、サル、SCID/hu)
 - ② 安全性(サル・ラット、GLP適合試験)実証
 - a. 一般毒性試験
 - b. 安全性薬理試験、TK試験
2. 製造関連(非臨床、臨床試験用製造)
 - ① 長期安定性
 - a. 加速試験、苛酷試験
 - b. 長期安定性試験

HVJ-Eベクターの治験薬GMP製造技術・製剤化技術

1. 精製工程は治験薬GMP製造対応
2. バイオ医薬としての無菌製造



- ② 臨床用のGMP製造実績
 - a. 臨床応用のためにGMPレベルの製造を実施
 - b. 実際に臨床研究用に供給

臨床応用の申請用データパッケージを整備

3. 臨床応用
 - ① フランス研究施設と臨床応用 HSP65DNA+IL-12DNAワクチン
 - ② WHO STOP TB Partnership会議で推奨された(2009年)
 - ③ 臨床研究(大阪大学病院) HVJ-Envelopeベクターは悪性黒色腫に対し第I/II相試験

図33

特殊毒性試験としては、ラットによるin vivo 遺伝毒性試験(ラット小核試験)を実施した。その結果、指標となるMNIE(%, 幼若赤血球2000個に対する小核を有する幼若赤血球の発現率)及びIE(%, 赤血球1000個に対する幼若赤血球の比率)のいずれについても遺伝毒性は認められなかった。安全性薬理試験については、ラットを用いた2種類の安全性薬理試験(中枢神経系、呼吸器系)を実施した結果、異常は認められなかった。また、カニクイザルを使用した心血管系に対する安全性薬理試験を実施した結果、HVJ-Eの投与による重篤な異常は特に認められなかった。

②薬効薬理試験

サル、マウス、モルモット、ヒト骨髄細胞を移植したマウス(SCID/hu)の結核感染モデルを用いた薬効試験を実施するために、GMPレベルのHVJ-Eを製造・供与した。その結果、新規DNAワクチンは、いずれの動物種を用いたモデルに対しても、予防効果・治療効果を示す事が明らかとなった。HVJ-Eの投与後の免疫活性化についてマウスを用いた評価系で検討を実施した。ラットの皮下に被験物質であるHVJ-Eを投与し、その作用により免疫システムを介した薬理作用が認められるかを検討したところ、免疫の活性化を示唆するデータを取得する事ができた。

③ 製造

新規DNAワクチンの成分であるHVJ-Eを凍結乾燥により安定化したものについて、医薬品として応

用した際に輸送・保存期間をどの程度保証できるかを検討するために、種々の安定性試験を実施した。まず、基礎データの取得を目的として数種類の温度条件(苛酷条件、加速条件、想定保存条件)で、短期間(1ヶ月~6ヶ月)の検討を実施した結果、設定した条件では安定を確保できる事が明らかとなった。そこで、それらのデータを基本として長期安定性試験を実施した。その結果、ICH(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: 日米欧医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議)で規定された基準に従って、18ヶ月の有効期限を設定できる事が明らかとなった。

また、今後の臨床応用の際に新規DNAワクチンの成分であるHVJ-EをGMPレベルで製造するため、バイオ医薬製造、及び治験薬製造のためのガイドラインに準拠した方法で研究開発を行った。基本的には治験薬GMP製造に関する通知書(厚労省医薬食品局長の薬食発第0709002号(平成20年7月9日付け通知)「治験薬の製造管理及び品質管理等に関する基準(治験薬GMP)について」)に準拠して、手順書、組織を整備し、それによって作成した計画書の通りにバリデーション(品質試験法)、クオリフィケーション(設備・機器)、ベリフィケーション(製造工程)を進めて、品質試験、設備・機器、製造工程のそれぞれについて適切な性能である事を実証した。臨床応用のため

のGMP製造（GCP下の製造）に必要となる治験薬GMP製造を想定した体制を確立した。更に、注射剤を想定した高度無菌化のために新規に凍結乾燥システムを開発し、その性能についても検証を実施した。最終的に、確立した製造体制や整備した手順で実際に再現性をもって製造を実施できる事を検証するため、実際に臨床用に使用できるレベルのGMP製造を実施し、臨床研究用の被験物質製造のための原料として出荷した。

- (16) これまで結核感染に際し、肺上皮細胞から分泌されるリポカリン2が、鉄イオンの取り込みを阻害することにより、結核菌増殖を抑制していることを見出した。さらに、結核感染に際し、肺で遺伝子発現が上昇するsecretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)の結核感染防御における役割を解析した。SLPIは、試験管内で結核菌の増殖を抑制した。さらにその増殖抑制機構を解析したところ、SLPIは結核菌の細胞膜の透過性を亢進させることにより細胞膜を破壊し、殺菌していることが明らかになった。SLPIは、Whey acidic protein (WAP) domainが二つ並んだ分子であるが、どちらのWAPドメインも細胞膜の透過性を亢進させた。WAPドメインのアミノ酸配列を解析すると、WAPドメインのN末側の陽性電荷を有するアミノ酸が、膜透過性亢進に必要であることが明らかになった。陽性電荷を有したアミノ酸が、陰性電荷の結核菌細胞膜に会合し、膜透過性を亢進させていることが考えられた。また、SLPIの個体レベルでの結核感染における役割を解析するため、SLPIノックアウトマウスに結核菌を感染させたところ、感染感受性が正常マウスに比べて極めて高くなっていることが明らかになった。このように、SLPIはリポカリン2とは異なる分子機構で、結核感染に対する自然免疫応答を担っていることが明らかになった。(図34)

さらに、SLPI、リポカリン2以外に結核感染で誘導される遺伝子を同定しており、現在その機能を解析している。

- マクロファージ細胞株RAW264.7にESAT-6、CFP-10遺伝子を導入したが、CFP-10恒常発現株は単離できたが、ESAT-6恒常発現株は単離することができなかった。CFP-10恒常発現マクロファージをもちいて、この細胞に非病原性のBCGを感染させたところ、CFP-10恒常発現細胞で、有意にBCGの菌数が増加した。CFP-10の哺乳類細胞発現ベクターには、Flag、MycタグおよびTEVプロテアーゼ切断部位が挿入されているので、CFP-10恒常発現マクロファージ細胞株から、細胞溶解液を作製し、これを抗Flag、Myc抗体およびTEVプロテアーゼで処理し、これらの処理により抽出されたタンパク溶解液を電気泳動し、抽出されたタンパク質を解析したところ、貪食胞に発現する分子がいくつか同定された。またGST融合ESAT-6タンパク質を持ちたpull down解析でも、ESAT-6に会合する宿主分子を探索した。その結果、従来ESAT-6に会合することが報告されている、TLR2、MHC class I分子が同定されるとともに、貪食胞に発現する分子がいくつか同定された。
- (17) 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検体に応用し、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。

(図34)

- (18) 3446例中、LiPA法でRFP感受性、RFP耐性と判定されたのはそれぞれ426例、20例であった。RFP感受性と判定された426例中、425例は従来の薬剤感受性検査でもRFP感受性と判定されたが、1例は耐性であった。また、RFP耐性と判定された20例中、19例は従来の薬剤感受性検査でもRFP耐性であったが、1例は感受性であった。さらにこの20例中、15例はイソニアジドにも耐性を示す多剤耐性結核であった。(図34)

IV. 先進国の外国人結核

米国ニューヨーク市は移民社会であり、貧富の格差も大きく、多様な人々が存在している困難な中で結核対策を進めてきている。結核の再興に対処するために1990年代には外来治療も行う総合的に結核対策を行う公的な拠点施設(Chest Center)を設け、すべての人々に対応できる結核対策システムをつくり対応している。2000年代に入り既存の公的医療機関ネットワークと公的結核センターと保健当局が組み合わさった体制に移行している。結核対策を専門的に進めるために人材や技術面ではCDCの大きな支援を得ていた。わが国も不安定就労者、医療保険未加入者、そして外国人の結核患者割合も増加傾向にあり、多様な人々に対応した結核対策を進めているニューヨークの結核対策システムの実践は参考となる点が多い。さらに、岡田はサンフランシスコにおける移民結核患者の実態調査と対策について、サンフランシスコ・general hospitalのpublic health長 Dr. Masae Kawamuraを訪問し情報交換と調査を行った。その結果、ツベルクリン反応診断をQFT診断に変えてから、サンフランシスコの移民結核が62%減少したとの画期的な移民結核対策の情報を得た。(図35)

D. 考察

I. 日本における外国人結核

- (1) 国立国際医療研究センターにおいて最近4年間で診療を行った外国人結核患者は、20~30歳代の若年者が多く、女性の割合が日本人結核患者と比較して多くみられたが、この傾向は以前の調査とほぼ同様の傾向であった。国籍については、全国調査と比べると韓国が2番目に多くなっているが、これは当センターの近くに新宿区の韓人居住地があるためと思われる。

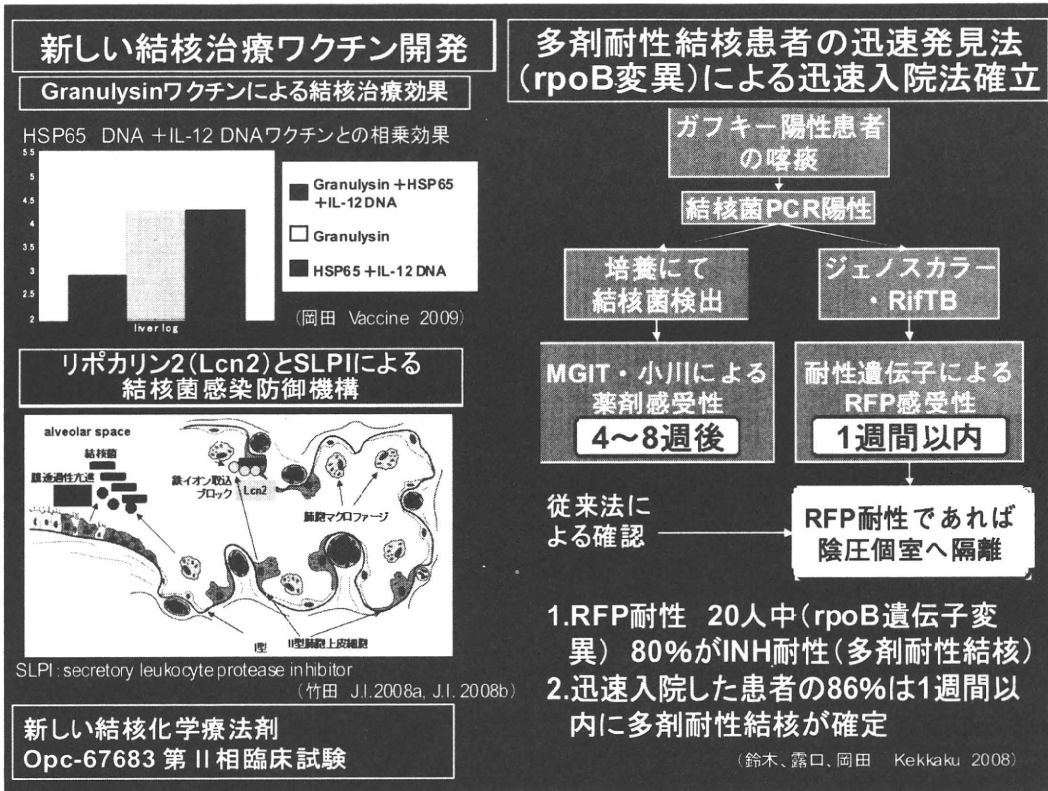


図34

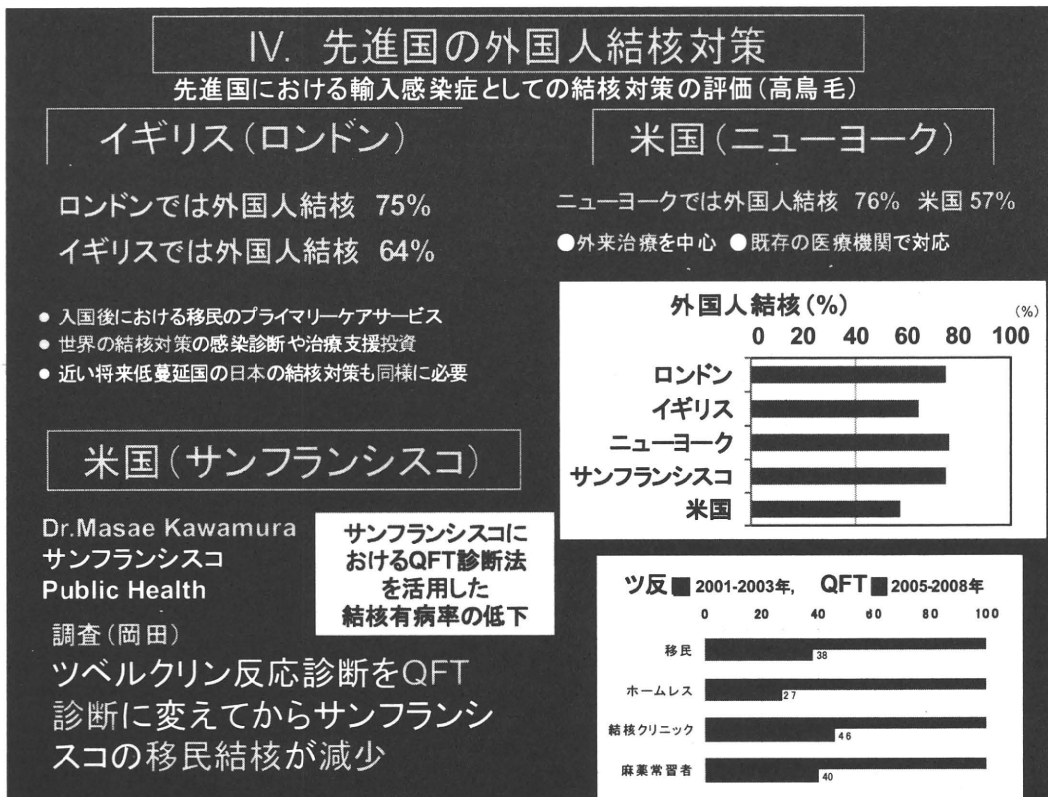


図35

職業に関しては、中国では学生が、フィリピンでは主婦が、ネパールやミャンマーでは就業者の割合が高く、国により特徴のあることが示唆された。発見動機については、学生の結核は約半数が健康診断で発見されているに対し、就業者では健診による発見が18%程度と低かった。以上のように外国人結核といっても、その臨床像は出身国による違いがあることは興味深く、その点をふまえた結核対策を立てる必要があると思われた。合併症については外国人でHIVが多く、糖尿病が少ないことが予想されたが、統計学的な解析結果としては日本人と差はみられなかった。排菌量についても両者に差はみられなかった。薬剤耐性に関しては最近6年間の菌株について検討した結果、外国人株では日本人株と比べてRFP耐性とMDRが有意に高率であることが明らかとなった。今回の研究結果は、今後のわが国における「輸入感染症」としてのMDR-TBの脅威について懸念されることである。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、発見が遅れて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。日本における外国人登録者数の多い国ほど、その国の結核患者数は多くなると予想されるが、日本における国別の結核発病率は明らかになっていない。法務省入国管理局による「外国人登録者数」は約220万人（2008年）であるが、国別の登録者数の順位と結核発病者数の順位は一致していない。これには母国の結核感染率の違いのほか、年齢や日本での居住年数も関連していると思われる。日本における韓国、ブラジル、ペルー出身者の結核発病率は、母国における発病率よりも低いことは興味深い。分子疫学解析から、外国人結核患者の中でモダンタイプの北京型結核菌が蔓延している可能性が示唆された。また、これら菌株が分離された患者の国籍は韓国籍・中国籍が過半数を占めた。引き続き全体像解明のため分子疫学解析を実施していく。また、今後の課題として、VNTR解析における標準法の確立が挙げられる。現在、米国疾病管理センターで採用されている方法と、日本独自のJATA (12)-VNTR法がある。本研究ではJATA (12)-VNTRを採用しており、解析結果を他国で実施されたものと直接比較することができない。プロトコール作成も含めて検討していく必要がある。

(2) 国立病院機構東京病院で過去7年間に入院散らうした外国人結核について検討した。年間の患者数、重症度、治療内容は同年代日本人結核患者と変わらず、もっとも大きな障害は言語であるが通訳の派遣などでどうにか切り分けられている。退院後の治療継続や治療完遂については少ない人数にも拘わらず十分追跡がされておらず、この点が当院の今後の対策の重要課題である。DOTSの見直しや評価を実施する必要があると思われた。外国籍結核は地域的に偏在しており、むしろ地域とリンクした問題とおもわれる。また20-30代に多く、

主な治療の場は外来であり、支援においても日本の結核の半数以上を占める高齢者結核とはある程度異なった対応が必要である。日本の結核は、低蔓延に向かっており、欧米諸先進国の歴史的結核事情を考えると、今後日本の結核における外国人の割合の上昇が予測され、より重大なターゲットとなるであろう。すでに低蔓延となり、50%以上が外国人である欧米先進国の現状と対策から、よりよい対策を模索すべきと考え文献やWeb siteから情報収集した。今回は入国時の結核健診についてであるが、欧米、オセアニアの低蔓延国では、高蔓延国からの難民受入や永住申請では殆どの国で実施されてしているが、他の入国者については、入学時健診、入職時健診以外は一様に行っても効果は少なく費用効果に見合わずむしろ人権問題になりかねない。一時的なスクリーニングではなく地域の対応に根ざした取り組みが必要である

(3) 外国人の増加に伴って外国人結核患者数が増加する現象は、米国や英国でもみられている。日本の外国人登録者数は、1998年の151.2万人から2008年末では221.7万人に増加した。大阪市においても結核患者における外国人の占める割合は増加傾向にあり、特に20代については20%を占め、全国の25%には及ばないものの、外国人結核は無視できない課題となりつつある。大阪市では外国人結核患者数に大きな変化はみられなかった。しかし大阪市全体に占める外国人結核患者の割合は増加傾向にあり、20代に限ると2009年には20%を占めており、今後大阪市においても外国人結核対策が重要な課題となることが示唆された。出身国では、全国の外国人と比べ、韓国・北朝鮮が多く、フィリピンが有意に少なかった。これは大阪市には韓国人のコミュニティーが多数みられ、その家族、親族が入国している可能性が考えられた。薬剤耐性率を外国人と大阪市全体と比較したところ、初回治療、再治療いずれにおいても多剤耐性結核の割合が外国人で高かった。主要3か国（中国、韓国、フィリピン）の多剤耐性結核患者の割合は、すべての新登録患者ではそれぞれ5.0%、2.7%、4.0%、再治療患者ではそれぞれ26%、14%、21%と報告されている。これらはいずれも本邦の薬剤耐性率より高く、大阪市の外国人結核患者の多剤耐性結核患者の割合に近似するものであった。外国人結核の増加に伴って多剤耐性結核患者も増加することが予想され、多剤耐性結核患者の早期発見・早期治療がさらに重要になっていくと考えられた。外国人結核患者の年齢分布は20-39歳の割合が68%を占め、大阪市全体と比べ若年者が多くみられた。入国後3年未満に発病する者の割合は70%であった。また社会背景をみると外国人では学生が有意に多かった。これらのことより、大阪市では学生として入国した若年外国人が発病する例が多くみられることが示唆された。日本語でのコミュニケーションに不安のある外国人は入国後早期に日本語学校に所属することが予想され、日本語学校を始め大学、各種学校における入学時健診の徹底が重要であると考えられた。一方、臨時雇用を含む労働者の割合は38%と二番

目に多かった。大阪市において外国人を多く雇用する企業数は不明であり、それらの企業を調査し結核健診の重要性を啓発していくことも課題の一つとして挙げられた。20~39歳の群では、健康診断で発見された者の割合に有意差は見られなかった。X-P上空洞ありの割合および塗抹陽性の割合に有意差はみられなかった。このことより、大阪市では日本人と同様外国人に対しても結核健診が実施され、早期に発見されている可能性が示唆された。しかし現状に満足することなく今後学校、企業等に対し健康診断をさらに徹底することが肝要である。2007年登録外国人のち喀痰塗抹陽性初回治療患者658名の検討では、脱落は10%、転出は11%と報告されている。この中には治療途中に母国に帰国する例が含まれ、治療中断が懸念されていた。我々の報告では、20~39歳の外国人では脱落者が有意に多く、うち5名は治療中に帰国していた。脱落した7名の内訳は、医師の指示による者が1名、副作用によるものが2名、拒否・行方不明の者が4名であった。その中には日本語によるコミュニケーションが困難なため中断した例があり、医療通訳を介した支援がさらに必要であると考えられた。帰国した5名の内訳をみると、配偶者が日本へ帰国して処方薬を持ち帰り治療を継続していた者が1名、薬剤を処方して帰国させた者が1名、紹介状を作成し帰国させた者が2名みられた。大阪市では治療中の帰国者に対し上記のような対応を行っていく限り治療中断を減らす努力を行っている。今後は本人の希望を考慮しつつ可能な限り国内で治療を完了できるよう配慮していく必要がある。

- (4) 在留外国人の罹患率は低下傾向にあるが、同じ就業状況の日本人の罹患率の数倍を示しており、患者の早期発見は重要な課題である。具体的には、学生、労働者（特に臨時・日雇い）、家事従事者に対する定期健診の普及や有症状時における医療機関受診の勧奨が挙げられる。また、出身国の結核蔓延状況の改善が、在留外国人の罹患率に影響する可能性があるため、周辺国への対策支援による日本国内の外国人の結核対策への寄与が期待される。

II. アジア諸国の結核分子疫学研究と宿主要因解析(ネットワーク研究)

- (5) ヨーロッパ諸国で広まっている株を対象に開発されたSupply (15) -VNTRシステムは、その識別能の低さから東アジアでは使われていない。東アジアの国で広がっている北京型結核菌は、それぞれの国で遺伝的背景が異なる株が広まっていることが判明した。中国（北京や上海）の株は、Modern型の割合が高く、日本のものと大きく異なることがわかった。また、韓国で広まっている結核菌は、日本の株と非常に似ていてAncient型が高い割合で検出された。しかし、同じAncient型でもRD181欠損が起こっていないRD181陽性株の割合が日本国内で分離された株より高いことが判明した。本研究で選択した10箇所VNTR分析結果を利用してMST解析を行うと、中国、韓国、日本でそれぞれ広まっている北京型結核菌である

Modern型、RD181陽性Ancient型、RD181陰性Ancient型を各グループに区分することが可能だった。10ローサイのVNTR解析であるが、東アジア諸国で広まっている結核菌を効率よく遺伝的背景ごとにグループ化できるVNTRシステムであることが分かった。また、SNPs解析による系統解析情報も含めて解析することで、台湾のように北京型結核菌の頻度が低い国でも利用可能な型別システムとすることができた。SNPs法は、特定場所の塩基多型を調べる方法なので、薬剤耐性菌の検出のために利用されているラインプロブアッセイ法の原理・手法を利用し分析することができる。この塩基多型検出系でSNPs解析ができれば、高価な分析機器が必要なDNAシーケンス分析やTaqMan法を利用せず、簡便・迅速に結核菌の遺伝系統情報を調べることができる。今後、このようなSNPs検出システムを構築して、キット化する予定である。遺伝系統情報とVNTR法による型別情報を組み合わせることで、注目している結核菌が海外で広まっている結核菌の可能性が高いかどうか等、正確・迅速に推定することが可能となる。

- (6) 難治化に及ぼす、臨床疫学的因子として、まずHIVの関与が大きい事が示唆された。それは、特に治療完了後に大きく、その後、少しずつ低下している。タイ国チェンライの場合は、山岳民族である事や、投獄歴である事等が危険因子として同定された。今後、再発を予防する対策を立てる上で役立てる必要がある。宿主免疫学的因子では、岡田班長がCD8陽性キラーTでin vitroで発見した現象（TB患者やMDR-TB患者ではキラーTリンパ球内のグラニューライシンやin vitro培養上清中グラニューライシンが低下）と矛盾しない結果が得られた。岡田班長の志向する「免疫賦活療法」の研究開発には、研究開発のボランティアの対象となる難治性結核患者で、指標となる免疫マーカーが変化しているかどうか突き止める必要がある。次に免疫賦活療法がそれを指標としての活用を検討する必要がある。菌体因子として、結核菌のRFLP-IS6110パターンは北京株(Beijing family)が、タイ国の新規結核菌の全国レベルの20.8%、北タイにおける分布の17.7%[Dhanida Rhienthong et al, 2005]に比して有意に高かった。多剤耐性結核菌の北京株は更に高く66.7%であった。北京株はより病原性が高いという報告がされており、本研究も関連してると考えられる。本岡田班は、前回と継続してアジア地域との研究ネットワーク活用による研究開発を志向しており、現地での研究基盤が欠かせない。タイ国では、タイ赤十字が製造しているBCGは東京株を使用しており、2009年に供給不足が予想された際は、最終的には回避できたが、いち早く日本BCG研究所に購入を申し込んでいる。またBCGレコンビナントにてHIVワクチンを開発してきた事より、結核ワクチンの開発に関して興味を持っている。岡田班長はアジアにおける数少ない結核ワクチンの開発者であり、共同研究の意義は深い。
- (7) ベトナム人における多剤耐性結核と宿主要因の関連について、本研究班で、初めてのアプローチ

を行った。本年度検討したgranulysin遺伝子の非同義置換と多剤耐性結核については、明らかな関連性を認めなかったが、今後、さらに候補遺伝子を加えて検討したい。

ベトナム人多剤耐性結核について、具体的な研究プロトコルを協議し、詳細にわたり検討し、倫理委員会承認後、迅速に研究を実施することができたことは、ベトナムとの7年来の共同研究における信頼関係にもとづくものと思われる。多剤耐性菌に関しては、ベトナムでも深刻な問題としてとらえられており、両国に裨益する研究成果が待たれる。

- (8) 結核におけるOsteopontinの産生の亢進は、以前から指摘されてきた。今回、HIV合併結核において血漿osteopontinが著明な高値を示した。HAARTを行っていないHIV症例であり、CD4+T細胞数も全群の中で最も減少していたが、IFN- γ 、IL-12p40、IL-18、IP-10といったTh1系のサイトカイン・ケモカインの有意な産生亢進を伴っていた。このことから、一般に慢性進行性のHIV感染症においては、HIV特異的な細胞性免疫は強く抑制され、また他の病原微生物に対する細胞性免疫も低下していると考えられているHIV感染症においても、結核を発症し、急速に増悪している時期には、Th1応答ないしはそれに類似した応答が誘導されている可能性が示唆された。しかし、これが抗原特異的な応答であるかは不明であり、むしろgranulysinの実験結果から想像されるように、結核特異的な免疫応答は抑制されているにもかかわらず、強い非特異的な免疫応答ないし炎症反応だけが誘導されている可能性も考えられる。また、osteopontinが、このような疾患において、今まで指摘されているようにTh1誘導に正に関与しているかどうか不明である。結核患者およびHIV結核患者血漿におけるgranulysin値については、結核では健常より減少、HIV合併結核では著明に上昇していたことは、granulysinの分子量を明らかにする必要性を迫るものであった。今回、われわれは、HIV合併結核における血漿granulysinの分子量が主として9kDaであるというイムノブロッティングの結果を得たが、サンプル採取、保存、実験中のdegradationによって9kDaの分子量のものが生じた可能性を排除仕切れていない。今後、検討する必要があると考えている。活性型ビタミンDは、マクロファージの活性化因子と考えられているが、VDRを介したcathelicidineの産生誘導によって、結核菌を殺菌すると考えられている。しかし、この活性系が異なる表現型のマクロファージにおいて、結核菌殺菌時にどのように働いているかは明らかになっていない。培養M-M ϕ は、結核菌(H37Rv)を10%FBS RPMI1640中で殺菌する。しかし、10%FBS中の25(OH)D₃の濃度は低く、cathelicidineを誘導するレベルではない。従って、M-M ϕ はVDR-cathelicidineとは異なるメカニズムで結核菌を殺菌していると考えられる。今後、25(OH)D₃の培地への添加によるcathelicidine 遺伝子の発現検討およびキリングアッセイを行って、M-M ϕ ならびにGM-M ϕ の活性化における活性型ビタミンDの関与を明らかにしていく必要が

ある。さらに、HIV感染群では、BCG感染時のCYP27B1の発現が抑制されている傾向が見られることから、HIV感染によって活性型ビタミンDによるマクロファージの活性化が阻害されている可能性も考え得る。

Ⅲ. 新結核ワクチン・治療・診断

(9) [将来計画]

1. 開発した結核ワクチン (Hsp65+IL-12 DNA ワクチン) を流行地 (アジア地域等) で臨床応用し、結核予防ならびに結核治療を行う。平成18~19年はこのワクチンの第I相臨床試験。
 2. 開発した結核ワクチンならびに化学療法剤 (opc) を流行地で活用し、多剤耐性結核治療。
 3. 開発したワクチン・診断法を呼吸器ネット及びWHOネットワークを用い、全国・全世界に普及。
 4. granulysinとTLR認識をさらに解明し、薬剤耐性を生じない新しい機序の結核治療剤を開発。
 5. BCGに代わる1万倍強力な結核ワクチン (Hsp65+IL-12DNA ワクチン)・化学療法剤・granulysin予後診断法は日本、世界の結核対策に貢献し、日本国内行政・国際協力施策に極めて重要。
 6. 国立病院機構政策医療呼吸器ネットワーク54施設を活用し、多くの国民に実施できる行政施策。
 7. スーパー・スプレッダー多剤耐性結核の発見・研究は結核病室の個室化等の重要な行政施策。
 8. 新しい結核予防ワクチン・結核治療ワクチン (HVJ/Hsp65+IL-12DNA ワクチン) の臨床応用
- (1) 開発した結核ワクチン (HVJ/Hsp65+IL-12DNA ワクチン: BCGワクチンより1万倍強力) がマウスのみでなくモルモットの系でもHVJ-リポソーム/Hsp65+IL-12 DNA及びBCGと比較してはるかに強力な予防ワクチン効果を示すことを解明する。
 - (2) 開発したこの結核ワクチン (Hsp65+IL-12 DNA) を流行地 (日本、アジア地域、アフリカ、南アメリカ等) で臨床応用し、結核予防ならびに結核治療を行う。
 - (3) このワクチン効果はBCGでプライムし開発したワクチンでブースターする方法が最も強く、本邦において乳幼児 (BCG・プライム) -成人 (開発したワクチン・ブースター) で結核予防を行う。日本では乳幼児にBCGを接種しており、Hsp65+IL-12DNA ワクチンは成人ワクチンとして極めて強力なワクチンとなることを証明する。
 - (4) 開発した結核ワクチンを流行地 (日本、インド、中国、アジア地域) で活用し多剤耐性結核治療を行う。
 - (5) 開発した結核ワクチン・新しい診断法を本邦の国立病院機構政策医療呼吸器ネットワーク (54施設より組織化され、本邦の50%の結核患者診療) を用い、全国に普及させる。当院は呼吸器疾患 (結核を含む) 準ナショナルセンターであり54施設を活用し、統括しうる。

- (6) 開発したワクチン・診断法をWHO STOP TB Partnership (岡田がメンバー) のネットワークを用い、アジア・世界で臨床応用する。
- (7) HVJ-エンベロープはすでにGMP (Good Manufacturing Practice) レベルであり、純国産のベクターで、基本特許を有することより、世界に普及させる
- (8) このワクチンを多剤耐性結核患者に治療ワクチンとして用い、多剤耐性結核の制御と撲滅を目指す。
- (9) このHsp65+IL-12 DNA ワクチンを第一候補ワクチンとして焦点を絞って研究を進展させる。すでにタイ国に臨床試験の共同研究者がいる。
- (10) 平成24~25年はBCGより1万倍強力なワクチンの第I相臨床試験を行う。さらに、これに基づき第II相臨床試験を行う。第III相臨床試験の後、厚生労働省の認可を得て臨床応用を目指す。
9. 新しい結核ワクチン組み合わせによる結核撲滅戦略
HVJ/Hsp65+IL-12DNA ワクチンとGranulysin ワクチンを組み合わせ、更により強力なワクチンを創製する。
10. 新しい多剤耐性結核化学療法剤の臨床応用
開発した結核ワクチンならびに化学療法剤 (opc及びCPZ)を流行地 (日本、インド、中国、アジア地域、アフリカ) で活用し多剤耐性結核治療を行う。
11. 自然免疫系に属するマクロファージや樹状細胞はT細胞を中心とした獲得免疫系との連携などにより、結核感染防御に深く関与している。しかし、今回の研究から、結核菌の呼吸器感染において、最初の侵入サイトとなる肺胞上皮細胞が、抗結核応答の最前線の応答場所としてLcn2を分泌することにより、極めて重要な役割を担っていることが明らかになった。Lcn2は、一度分泌されたあと、細胞内に受容体を介して取り込まれ、細胞のアポトーシスを抑制することが報告されている。そのため、結核感染の最前線でも上皮細胞内に侵入した結核菌を細胞内でその増殖を抑制している可能性もあるのではないかと考えている。
12. 多剤耐性結核・難治性結核の予後診断法の開発
開発した新しい難治性結核予後診断法 (granulysin, KSP37の測定による予後診断法)を流行地、特に日本、アジア地域で活用し知見の収集。
13. 結核菌殺傷蛋白 (granulysin) の臨床応用
granulysin機能解明とTLR認識をさらに解明し、(開発した多剤耐性結核治療モデルを用い) 薬剤耐性を生じない新しい機序の結核治療剤を開発する。
14. スーパー・スプレッダー結核に対する制御とTLRアゴニストによる治療剤の開発
(1) スーパー・スプレッダー多剤耐性結核のTLR認識エスケープと感染性を解明。この方

法論を用い、流行地での多剤耐性結核の制御研究を行う。

(2) スーパー・スプレッダー多剤耐性結核の発見・研究結果を踏まえ、本邦の全ての結核病室の個室化等による多剤耐性結核制御を行う。

[アジアとのネットワーク研究を活用した多剤耐性結核の制御]

- (10) 多剤耐性結核の克服にとって、正しい薬剤感受性検査が迅速に得られることは必須の項目である。今回の5症例は従来の培養法を用いる薬剤感受性結果が得られないか、正確な結果を得るのに長期間要し、臨床的には問題の例であった。今回市販の2キットを用いて、薬剤耐性遺伝子の変異の有無の検討を実施した。その結果は臨床的な薬剤選択判断に有益な情報をもたらした。培養不能例では結果の妥当性の判断は正確にはできない。しかし臨床経過は順調であり、結果が正しかったものと推定している。一方NTM混在例の結果は、後に結核菌を純培養して得られた薬剤感受性結果との比較が可能であった。一部若干の相違はあったものの臨床的に問題になるほどではなく、特にINH・RFPの結果は完全に一致していた。通常の薬剤感受性検査が不能な例、また結果が変動したり臨床経過と合わない例では、耐性遺伝子を用いた薬剤感受性検査で臨床に有益な情報が得られる可能性が示唆された。

(11) [ワクチンや診断法の活用・提供]

我々は臨床応用に極めて間近な新しい結核ワクチン、診断法を開発しつつある。当院は呼吸器疾患 (結核を含む) 準ナショナルセンターとなった。日本の結核患者数の60%の診断治療を行っている、国立病院機構の呼吸器疾患研究ネットワーク65施設を統括・指導するグループリーダー施設であり、岡田はその呼吸器疾患研究ネットワークグループリーダーである。したがって、このネットワークを用い、これらは多くの国民に活用・提供しうるものである。(図36) (表24、25、26)

- 1 DNAワクチン研究の成果と今後の活用・提供
HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンは極めて強力な予防ワクチンとなることが考えられる。早急な臨床応用を計画。さらに、HVJ/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンは薬剤感受性結核のみでなく多剤耐性結核に対しても、マウスの系で強力な治療ワクチン効果を世界に先駆けて明らかにした。さらに、サルでHSP65 DNA+IL-12DNA ワクチンは結核治療効果を発揮した。この研究成果は通常の結核のみでなく難治性結核や多剤耐性結核に対する新しい予防・治療に活用することができる。特に高度の免疫不全を伴うAIDS合併結核患者におけるリコンビナントBCG療法を慎重にしながらはいけない時に強力な活用ワクチンとなる。これらのDNAワクチンは本邦のみでなく全世界に提供する用意がある。

国立病院機構研究ネットワークグループ(呼吸器疾患)

呼吸器疾患(結核を含む)

グループリーダー施設

近畿中央胸部疾患センター

メンバー施設 4施設

茨城東

東京

相模原

福岡

研究協力施設 60施設

道北

札幌南

西新潟
中央

千葉東

天竜

東名古屋

南京都

奈良

和歌山

刀根山

岡山

南岡山

広島

松江

山口
宇部

愛媛

高知

福岡東

大牟田

西別府

熊本

南九州

他国立病院機構結核診療施設

合計 65施設

図36

表24

呼吸器疾患メンバーリスト

No.	氏名	所属	備考
1	岡田全司	近畿中央胸部疾患センター	●
2	鎌田有珠	西札幌病院	
3	荒谷義和	国府病院	
4	藤内 智	道北病院	
5	八掛 浩	帯広病院	
6	坂本桂樹	青森病院	
7	杉江厚典	盛岡病院	
8	菊池善博	仙台区保センター	
9	寺下京子	山形病院	
10	遠藤健夫	水戸区保センター	
11	齋藤寛文	茨城東病院	☒
12	岡田壮幸	宇都宮病院	
13	藤本 充	高崎総合区保センター	
14	藤辺 寛	西群馬病院	
15	中村利彦	西埼玉中央病院	
16	朝戸裕子	埼玉病院	
17	藤嶋昌英	東埼玉病院	
18	佐々木裕花	千葉東病院	
19	小山田吉孝	東京区保センター	
20	赤川志のぶ	東京病院	☒

表25

No.	氏名	所属	備考
21	谷口正実	相模原病院	◎
22	大平敬郎	西新井中央病院	
23	小山剛敏	まつもと医療センター	
24	北 俊之	金沢医療センター	
25	室下 隆	七尾病院	
26	加藤達雄	長良川医療センター	
27	三輪清一	天竜病院	
28	坂 英雄	名古屋医療センター	
29	小川賢二	名古屋病院	
30	高井清行	三島病院	
31	井澤英憲	三島中央医療センター	
32	佐々木良行	京都医療センター	
33	佐藤敦夫	南京都病院	
34	三木啓貴	刀根山病院	
35	上野清伸	大阪南医療センター	
36	昌月吉郎	姫路医療センター	
37	秋山裕由	南和歌山医療センター	
38	山本光博	鳥取医療センター	
39	小嶋昌智明	松子医療センター	
40	矢野修一	松江医療センター	
41	佐藤利雄	岡山医療センター	
42	多田敦彦	南岡山医療センター	
43	中野豊久夫	長門医療センター	

表26

No.	氏名	所属	備考
44	丸川麻臣	播山医療センター	
45	松本孝男	山口千部医療センター	
46	朝田元二	栗橋山病院	
47	山口真弘	高松医療センター	
48	阿部豊裕	愛媛病院	
49	筑原 勉	高知病院	
50	日高孝子	小倉医療センター	
51	一木昌朗	九州医療センター	
52	吉田 誠	福岡病院	◎
53	加治本章	大牟田病院	
54	高田昇平	福岡東医療センター	
55	植島佳文	福岡医療センター	
56	木下明敏	長崎医療センター	
57	川上禮司	長崎川崎医療センター	
58	柏原光介	熊本医療センター	
59	山中 徹	熊本南病院	
60	仲間 麻	大分医療センター	
61	澤部俊之	別府医療センター	
62	杉崎勝敏	西別府病院	
63	伊井敏彦	宮崎東病院	
64	川原政治	南九州病院	
65	久増聡夫	沖縄病院	

●：グループリーダー ◎：メンバー

- 2 Granulysin, KSP37による予後診断法は簡便・迅速であり、結核患者の治療効果を予測する新しい診断法となり、入院期間の短縮や最良の治療方針の決定において、治療経済面でも行政施策にとり極めて有用な診断法となる。今後全国の54施設国立病院機構呼吸器ネットワークで 多剤耐性結核患者・難治性結核患者に迅速に普及させ、活用する。もちろんこの新しい予後診断方法及びアッセイ系の提供の用意は積極的に行いたい。
- 3 世界に先駆けてのヒト生体内抗結核感染免疫モデルの作製：我々が開発したIL-2レセプターγ鎖(-)SCID-PBL/huモデルは多剤耐性結核の新しいワクチン治療開発のみでなく、新しい化学療法剤開発の良いモデルとなる。
- 4 ワクチンの開発研究が評価され、World Health Organization(WHO)のSTOP TB Partnership及びWHOのSTOP TB Vaccine Working Groupのメンバーに選出され、極めて高い評価を受けた。すなわち、世界の現在の最先端のワクチン4つのうちの1つにHVJ-liposome /Hsp65DNA+HL-12DNAが選ばれ、WHOの会議で公に認められた。特にHVJ-エンベロープ /Hsp65DNA+HL-12DNAワクチンはマウスの系でBCG東京よりも1万倍強力なワクチンで、モルモットでBCG東京よりも強力なことにより、Mtb72f Fusion蛋白よりも強力であることが示唆される。さらに、Peter Andersen博士のESAT-6 Ag85B fusionワクチンやHorowitzらのリコンビナントAg85B BCGワクチンよりもこのHVJ-liposome /Hsp65DNA+HL-12DNAワクチンははるかに強力である。さらに、このHVJ-liposome /Hsp65DNA+HL-12DNAワクチンはカニクイザルでも有効であり、ヒトへの臨床応用を考えている。WHOのSTOP TBワクチン・ミーティングにより米国FDAのDr、米国CDCのDrやスイス、ジュネーブ、WHO本部のDr多数及び南アフリカ、ウガンダ、インド、韓国、イギリス等世界各国のトップの結核研究者・行政者とネットワークができたことより、このワクチンを全世界に提供する計画である。
- (12) 安全性試験においては、ラット（げっ歯類）とカニクイザル（非げっ歯類）の2種の動物を選択して一般毒性試験（単回、反復）を実施したところ、被験物質であるHVJ-Eの投与による重篤な異常は認められなかった。また、HVJ-Eによる免疫の活性化には、細胞内に存在する核酸受容体であるRIG-Iの関与が示唆されており、HVJ-Eの成分の一種である残存核酸が細胞内に取り込まれると予測されるが、特に遺伝毒性は認められず安全である事が示唆された。また、カニクイザルにおいても重篤な毒性は認められず、げっ歯類と非げっ歯類で共に安全性が実証された。薬効薬理試験では、種々の動物の結核感染モデル（カニクイザル、マウス、モルモット、ヒト骨髓細胞を移植したマウス）で、新規DNAワクチンの予防効果、治療効果が実証された。特に、

- 既存のワクチンであるBCGとの併用により、増強効果が認められている。国内では、幼児期にBCGワクチンの接種が実施されるため、新規ワクチンの有効性が高まる事が期待される。また、マウスを用いた評価では、皮下投与での免疫の活性化が示唆された。これまでに、自然免疫を活性化する成分として核酸の一種であるCpGなどが報告されているが、それらの物質についても皮下投与での免疫活性化が示唆されている。ただし、CpGの受容体については細胞外に存在するTLR-9であるのに対して、新規DNAワクチンのアジュバントとして用いているHVJ-Eの成分（残存核酸）の受容体は細胞内に存在するRIG-Iを介する事が示唆されており、それぞれのシグナル伝達経路は異なると考えられる。そのため、今後、免疫活性化メカニズムについての詳細な解析結果により、他のアジュバントとの併用による有効性向上も検討する事も重要である。また、どのようなシグナル伝達経路を活性化する事が、結核の予防と治療に重要であるかについての詳細もを明らかにする必要がある。製造については、ガイドラインに従って実施した苛酷試験、加速試験、長期安定性試験の結果から、冷蔵の保存条件下で18ヶ月の有効期間設定が示唆された。通常臨床応用の初期段階では1年程度の安定性を保証する事が必要であるので、臨床試験の開始に必要な安定性については確保できるものと考えられる。今後、臨床応用の開発ステージに応じて、更に長期の安定性についても検討を進める予定である。
- (13) 結核感染に際し、いわゆる免疫細胞ではなく、感染防御の最前線となる上皮系細胞から分泌されるSLPIが結核菌の殺菌作用を有していることが明らかになった。今後、SLPIを用いた抗結核薬の開発などが期待される。ESAT-6は何度試みても、恒常発現マクロファージ株を単離することができなかった。ESAT-6はマクロファージに細胞死を誘導するのかもしれない。CFP-10を恒常的に発現させたマクロファージの解析から、CFP-10がマクロファージにおいて病原性を担っていることが示唆された。ESAT-6, CFP-10に会合する分子として、貪食胞に関連する分子をいくつか同定した。これら分子の中に、ESAT-6/CFP-10が相互作用し、その機能を抑制するなどして貪食胞の成熟を抑制するものが存在しているものと考えている。今後、これら分子候補の中で、ESAT-6/CFP-10が実際に会合する分子を同定し、さらにどのような分子機構で貪食胞の成熟が抑制されているのかを明らかにしていきたい。
- (14) 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MDR-TB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、MDR-TB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。(図34)

- (15) 従来の薬剤感受性検査をgold standardとすると、LiPA法の感度は95.0%、特異度は99.8%となり、極めて優れた相関が得られた。LiPA法は1日で

結果を得ることができるため、迅速診断法として有用である。また、LiPA法でRFP耐性と診断された例の75%は多剤耐性結核であり、本法は多剤耐性結核の迅速なスクリーニング法として優れていると考えられた。

行政施策への貢献

1. 日本の外国人結核の全国研究(実態把握・マニュアル作成)で早期予防、治療の厚生行政に寄与。
2. アジア各国共通利用のVNTRシステム構築。結核菌が由来した国の同定法を確立。(中国、韓国、日本、台湾の結核菌はそれぞれ区分できる発見)
3. アジア諸国の分子疫学研究は日本への結核流入・蔓延防止行政に寄与。
4. 多剤耐性結核患者迅速診断法・迅速入院(隔離)法の確立及びS-S多剤耐性結核の発見は結核病室の個室化等、重要な厚生行政施策にすでに寄与。
5. 結核ワクチンと新薬開発は多剤耐性結核や超薬剤耐性結核の医療費節減・行政施策に重要。国際貢献。
6. 日本の外国人結核患者の間で特定の結核菌株蔓延示唆。

今後考えられる新たな課題

1. 外国人結核の分子疫学解析。特定菌株が特定集団に蔓延を解明。
2. 結核高蔓延国からの移住者・日本語学校・外国人雇用事業所の早期診断(入国時・入国後QFT)。
3. 外国人結核の最多国、中国・韓国と10-locusのVNTR + 20 SNPs系統解析の分子疫学解析。
4. INHやPZA耐性結核の迅速診断迅速入院法の確立。新しい化学療法ワクチンの開発。
5. HIV合併結核・多剤耐性結核の実態把握と分子疫学研究。

図 3 7

IV. 先進国の外国人結核

ニューヨーク市は特別の自治体であることで、現実的に即した独自の結核対策がすすめることができていることを理解しておかなければならない。市の結核対策部門は、公衆衛生活動や結核対策に精通した多くの専門スタッフを要しており、地域において結核対策を進めているChest centerにおいても医師、アウトリーチワーカーなどの多様な結核患者に対応できるスタッフを配置されていた。ニューヨーク市の結核対策の調査から明らかになったことを4点に分けてまとめた。

1. 結核対策を進めようとする強い政策当局の意志
ニューヨーク市の1980年代に再興した結核を克服することができたのは、市当局が何としても結核問題を制御したいと強い政策意志を出発点となっている。市当局の依頼を受けてCDC(米国疾病管理予防センター)による専門家の人的支援と結核対策に対する財政支援を得て、社会の総力を結集して結核対策を進める体制を整えたことが今日の結核対策の基盤となっていた。
2. 結核対策の地域のケースマネジメント体制の確立
結核対策のためには公衆衛生と臨床上の機能面の協力が必要である。そのためChest centerを立て直し、DOT(Directly Observed Therapy)の拠点とするとともに、地域の開業医、病院関係者、公衆衛生、研究施設を代表した専門家からなる諮問会議を設

け、地域の保健医療関係者が一体となって結核対策を進める体制を整えていた。2006年の実績ではChest Centerは全結核患者の9%をここで診断し、結核患者のほぼ半数の外来医療が提供されていた。結核患者が1992年と比べ2007年には4分の1に減少したことから、結核患者に対する保健医療サービスを一般医療機関で提供する体制に移行してきていた。わが国においても、保健所、結核病院を中心とした対策から新たなシステムの転換が必要となっている。ニューヨーク市では市中の医療機関における結核患者管理や診療を支援するため地域の結核対策推進のため4つのField Officeを設け、地域の結核医療の市支援サービス(Field Service)の構築に力が注がれていた。

3. すべての人々に対する結核医療保障の存在
米国民の中には医療保険に未加入の者が2割存在している状況にある。この中で結核に関わる対策および医療費などは公費で支出され、移民であったとしても、結核対策がカバーされている状況にある。ニューヨーク市の公立病院グループ(The New York City Health and Hospitals Corporation (HHC))に属する15医療施設において、移民や貧困者であっても結核の検査と診療を低額または無料で受けることができるように医療機関の支援と結核医療提供体制の整備が行われていた。

4. 結核医療を担う医療関係者に対する研修と医療相談支援組織の確立

米国では2007年の結核患者数は13,299人、結核罹患率は4.4であり、結核の医療提供体制と医療現場への支援と質の維持は重要な課題となっている。米国では全国を4つの地域に分けて、医療関係者を支援するためにCDCが地元の大学や専門医療機関に対して人的・財政的に支援して地域の結核医療を担う人々に対する相談支援研修センターとしてRegional Training and Medical Consultation Center(RTMCC)を設けられている。わが国においても結核医療を担うのが地域医療を担う人々に負う部分が多くなるとともに、このような医療関係者の結核の診断治療を支援する施設の整備が必要と思われる。

5. サンフランシスコの移民結核対策でツ反からQFT診断に切り替えてから移民結核が著明に減少したことをふまえ、日本における外国人結核のQFT診断を積極的にやりたい。

V. 行政施策への貢献と今後考えられる新たな課題 (図37)

行政施策への貢献と今後考えられる新たな課題

- (1) 日本の外国人結核の全国研究 (実態把握・マニュアル作成) で早期予防、治療の厚生行政に寄与。
- (2) アジア各国共通利用のVNTRシステム構築。結核菌が由来した国の同定法を確立。(中国、韓国、日本、台湾の結核菌はそれぞれ区分できる発見)
- (3) アジア諸国の分子疫学研究は日本への結核流入・蔓延防止行政に寄与。
- (4) 多剤耐性結核患者迅速診断法・迅速入院 (隔離) 法の確立及びS・S 多剤耐性結核の発見は結核病室の個室化等、重要な厚生行政施策にすでに寄与。
- (5) 結核ワクチンと新薬開発は多剤耐性結核や超薬剤耐性結核の医療費節減・行政施策に重要。国際貢献。
- (6) 日本の外国人結核患者の間で特定の結核菌株蔓延示唆。

今後考えられる新たな課題

- (1) 外国人結核の分子疫学解析。特定菌株が特定集団に蔓延を解明。
- (2) 結核高蔓延国からの移住者・日本語学校・外国人雇用事業所の早期診断 (入国時・入国後QFT)。
- (3) 外国人結核の最多国、中国・韓国と10-locusのVNTR + 20 SNPs系統解析の分子疫学解析。
- (4) INHやPZA耐性結核の迅速診断迅速入院法の確立。新しい化学療法ワクチンの開発。
- (5) HIV合併結核・多剤耐性結核の実態把握と分子疫学研究。

E. 結論

I. 日本における外国人結核

1. 日本全国：調査票 (外国人結核) を作成し全保健所・結核病院 800 施設に送付。1000 例解析。20 代、中国、フィリピン、韓国多し。多剤耐性結核 4.7%、XDR-TB 存在。学生、常勤者多し。言語や治療途中の帰国が問題 (岡田)。結核発生動向調査分析 (星野 結核 2009)。

2. 東日本：(1)国際医療センター・東京病院外国人結核 135 名解析。結核全体の9%。(2)RFLPで特定菌株蔓延。HIV 6%、薬剤耐性獲得は母国 (小林、豊田 結核 2008)。
3. 西日本：大阪市・神戸市外国人結核 103 名、学生の集団感染。日本語学校の定期健診必要。VNTR 解析で母国感染 (下内、公衆衛生 2009)。

II. アジア諸国の結核菌分子疫学と宿主要因研究 (ネットワーク研究)

1. アジアでの感染伝播状況解析。3 カ国 (日、中、韓) の結核施設共同研究。(1)IS6110 遺伝子とVNTR MST 解析で、日本・韓国の結核菌は“祖先型”。中国、ロシアや欧米は“蔓延型”で、遺伝的背景は異なる発見 (加藤、結核 2008)。(2)韓国は RD181 陽性株で日本の結核菌と区別できる大発見。
2. 中国の結核 315 株。rpoB 変異 87%。
3. タイ特有な結核株発見。難治性結核で Gra 産生異常。

III. 新結核ワクチン・治療・診断

1. ヒト結核に酷似のサルを用い、HSP65+HL-12DNA ワクチンの世界初の治療効果 (岡田 Vaccine 2009)。XDR-TB にも効果。①前臨床試験 (毒性・安全性) ②GMP 製造。
 2. Gra ワクチンは結核治療効果 (岡田 Hum. Vac.出版中) 上記ワクチンと相乗効果。リポカリン 2 や SLPI の結核菌殺傷解明 (竹田 JI 2008)。
 3. 多剤耐性結核患者迅速発見法 (rpoB) で迅速入院システム構築 (鈴木・岡田 結核 2009)。
- IV. 先進国 英・米国の外国人結核75%。米国でツ反をQFT診断に変え外国人結核減少。(岡田)

・研究代表者 (岡田全司) (表 1, 2, 3, 4)

・研究代表者

- (1) 日本全国：下内、小林、豊田、星野、加藤と改訂を繰り返し、岡田が調査票 (外国人結核及び入国者結核) を当班で作成した。これを全国保健所527施設、国立病院機構施設54施設を含む結核病床を有する病院273施設、合計800施設に送付した。現在、集計中で2006年~2008年の1000例の対象者を解析。日本における外国人結核は20代、中国、フィリピン、韓国、インドネシア、ブラジル国籍の順、来日1~3年発症多し。多剤耐性結核は4.7%、XDR-TBも存在。学生13%、常勤者32%。糖尿病合併44%、HIV合併1.2%。患者管理上の問題として、言語の壁や治療途中の帰国割合が高いこと。(岡田)
- (2) 先進国、米国サンフランシスコの調査 (公衆衛生局Dr. Kawamuraと) で外国人移民結核 (特に中国から) が多く問題。ツ反からQFT診断に変えてから外国人結核減少。(岡田)
- (3) 日本全国：結核発生動向調査を分析。外国人労働者、学生、日本人配偶者、不法在留者の人数が外国人結核患者数に影響。脱落率と転出率の高さが課題。(星野、岡田)
- (4) 平20年神戸市内結核届出患者366名中外国人結核2.5%。(藤山、岡田)
- (5) 新結核治療ワクチン：ヒト結核感染に最も近いカ

ニクイザルを用い、HVJエンベロープ

(E)/HSP65+IL-12DNAワクチンが結核治療効果を発揮することを世界で初めて報告(岡田,Vaccine 2009)。XDR-TBに対しても治療効果。

- (6) このワクチンの動物実験による前臨床試験データ取得:一般毒性試験、安全性試験(中島、岡田)。
①前臨床試験:a.薬効薬理試験。マウス、カニクイザル、SCID-PBL/huで薬効確立(予防+治療) b.安全性確認 c.安定(凍結乾燥)②GMP製造で臨床応用可能。
- (7) 結核菌殺傷蛋白Granulysin(Gra)はキラーT細胞分化因子活性も有する発見。15キロダルトンGranulysin(特許取得)蛋白ワクチンは結核治療効果(Human Vaccine in press)。Graと上記DNAワクチンで結核治療相乗効果を得た。
- (8) 多剤耐性結核患者の迅速発見法(rpoB変異)を用い、多剤耐性結核患者迅速入院方法及び病院内で多剤耐性結核が感染しない体制を構築した(鈴木、岡田等、結核2008)。107人に応用し、rpoB変異を発見し、迅速入院したうちの86%は後に多剤耐性結核が確定。

・研究分担者(小林信之)

- (1) 日本における外国人結核:東日本:国立国際医療センターの外国人結核80名(うち入院38名)を解析(2007年1月~2009年5月)。結核患者全体の8.9%、20-30才、中国・韓国、入国後1年以内多し。欧州出身増加。空洞46%、喀痰塗抹陽性46%。薬剤耐性率9.6%で、以前に比し減少。治療中断例は、以前に比し少なく病院と保健所の連携、DOTSの徹底、通訳、パンフレット等の使用が治療脱落の防止に寄与示唆。

- (2) 外国人結核の結核菌RFLP解析。70%以上のクラスター形成より、特定の菌株が蔓延。

・研究分担者(豊田恵美子)

東日本:東京病院で診療55人(2004~2008年)の外国人結核解析。全結核の2.7%。高蔓延国から帰国の児童(外国生まれ)も多くQFT陽性(5.7%)も多し。QFT診断導入の方向。

・研究分担者(下内昭)

西日本:大阪市で在留外国人結核患者は過去3年間で94名。20代、中国、韓国籍、学生が多く大きな集団感染を引き起こした。日本語学校の定期健診必要。VNTR分析で一致例なし。ユーラシア大陸型で、大阪市流行株の型なし。母国で感染例が多い。

・研究分担者(加藤誠也)

アジアでの感染伝播状況の解析。3カ国(日本、中国、韓国)の結核研究施設が分子疫学共同研究会。(1)IS6110遺伝子とVNTRのMST解析で、日本、韓国の結核菌は“祖先型”(75%)。中国(上海、北京)、ロシアや欧米は“蔓延型”(90%)で、遺伝的背景は異なることを発見。(2)日本と韓国との比較:MST(minimum spanning tree)解析により韓国に特徴的なRD181陽性株(韓国の6割)はVNTRでB5グループに区分。B5には韓国株に特徴的なK-strain株が含まれる。日本の結核菌と区分可能。

・研究分担者(野内英樹) タイから日本への伝播の解析。RFLPでタイに特有な結核株(Nonthaburi株)発見。37%が北京株、11%がNonthaburi株。難治性結核でGra産生異常。

・研究分担者(櫻田紳策) タイのHIV陽性結核の宿主

要因:IL-10の上昇により抑制的制御。

・研究分担者(服部俊夫) 中国・ハルピンの薬剤耐性結核:結核315株解析。S・S多剤耐性結核(12%)、XDR-TB解析。rpoB変異86.4%、KatG変異45.6%、gyrA変異34.1%。

・研究分担者(慶長直人) ベトナムの多剤耐性結核調査と宿主要因。(1)ベトナムの多剤耐性結核約5%で、都市部、結核既治療再排菌例に多い。(2)ホーチミン市結核レファランスセンター50例の細胞性免疫関連遺伝子の遺伝子多型頻度解析。

・研究分担者(竹田潔) 多剤耐性結核に対する自然免疫治療法:(1)TLRを介し産生されるリポカリン2の鉄の取り込みの抑制による結核菌増殖抑制を発見。(2)secretory leukocyte protease inhibitor(SLPI)が細胞膜の透過性を亢進させる結核菌の感染防御を発見。(3)リポカリン2DNA、SLPI DNAワクチン構築し上記ワクチンとの相乗効果解析中(岡田、竹田)。

・研究分担者(高鳥毛敏雄) 先進諸国における移民結核対策:(1)ロンドン、ニューヨークでは外国人結核患者が増加し、結核患者の75%と大問題。結核対策の中核組織調査。(移民、ホームレス等の分野に分け専門職員設置。)(2)医療者の相談支援体制の整備。

・研究分担者(坂谷光則) 発現効率が高いHVJ-E封入製剤調整。安全性・毒性検査。OPC67683(新結核治療剤)の臨床応用。

[日本における外国人結核]

- (9) わが国の結核患者における外国人結核の割合は増加傾向にあり、結核蔓延国からの薬剤耐性菌とくに多剤耐性結核(MDR-TB)菌の国内への持ち込みが懸念されている。外国人結核の臨床的特徴、菌の薬剤感受性を知る目的で、国立国際医療センターで診療した外国人結核と日本人結核の臨床像および薬剤感受性について比較検討した。2007年以降に診療した85例の外国人結核の国籍は、以前の報告と同様に中国・韓国・フィリピンなどアジア諸国が多く、日本人結核と比較して年齢が低く、女性の割合が高いことが統計学的に示された。基礎疾患や肺結核の有空洞率、排菌量に関しては日本人結核と有意な差はみられなかった。薬剤耐性に関しては、外国人結核でRFP耐性およびMDRの率が有意に高いことが明らかとなり、今後わが国においてMDR対策を進めていく上で外国人結核対策は重要な課題であると考えられた。外国人結核由来菌株の分子疫学解析を開始し、RFLP解析の結果、高い相同性を持つ2つのクラスターが同定された。とくにクラスターIは20株から構成されており、中国人患者由来菌株と韓国人患者由来菌株が過半数を占めていた。特定の菌株が特定の集団に蔓延している可能性が示唆された。
- (10) 当院入院の過去7年間の外国籍結核患者の検討より、入院中の治療は日本人と同様におこなわれているが、通院に関してはDOTSの見直しや評価が必要で、今後の課題と考える。入国時の結核スクリーニングについては、難民、永住申請、入学、入職等を除いては、あまり推奨できない。
- (11) 大阪市における在留外国人の結核患者は、年々増加傾向にある。2006-2009年に新規登録された在留外国人結核患者に関して、患者票に記載されている項目から患者の特性、結核の病態、治療結果に

ついて調査した。患者の特性として若年者の学生や常勤者が多かった。定期健診によって早期発見ができ、軽症例を多く認めた。来日初期の発病が多いため、外国人が多く集まる学校や職場での、来日直後およびその後の定期的な健診を実施することが重要である。結核菌の耐性率が強く多剤耐性を6.1%に認め、早期の感受性検査が必要である。治療途中の中断・転出の症例が多いため、これらを防ぐためには、母国語の冊子の配布や通訳の依頼などにより、コミュニケーション問題を解決し、治療完了に導く患者教育を強化する必要がある。結核菌株のVNTR解析のデータ集積と解析の高精度化により、患者の出身国での感染を証明することや、日本国内で感染・発症した可能性のある症例を絞り込むことができるようになった。

- (12) 在留外国人の結核患者数は増加傾向にあり、罹患率は日本人より数倍高い。在留外国人は、日本の結核罹患状況におけるハイリスク集団の一つとして、今後も特別な対策を講じていく必要がある。

[アジア諸国の結核分子疫学研究と宿主要因解析（ネットワーク研究）]

- (13) 東アジアに位置する日本、中国、韓国、台湾では、近年ビジネスや観光で人々がそれぞれの国を訪れていることから、結核をはじめとした感染症も人の移動に伴い輸入・輸出されていると考えられる。これらの地域では、北京型結核菌の割合が高いという共通の特徴を持ち、さらに結核罹患率は先進諸国に比べて高く、罹患率を低下させるためには今後も精力的な対策が必要である。その対策のひとつとして、各国の分子疫学担当者と会議を持ち、型別データを共有できる反復配列多型（VNTR）システムの構築を進めている。今回は、各国で現在分析に利用しているVNTRローサイを中心に、共同で分析すべきローサイの選択を行った。今後は、このローサイ分析のための精度管理を行い、minimum spanning tree (MST)解析により各国の結核菌が持つ遺伝的背景や型別データの比較及び型別情報のデータベース化を図る予定である。共通の反復配列多型（VNTR）結核菌型別システムの構築を目指し、各国で広まっている結核菌の遺伝的背景の解析を行った。中国で広まっている北京型結核菌は、ヨーロッパや米国と同様に9割以上がModern型であった。しかし、日本および韓国の北京型株は、7割以上がAncient型であった。また、韓国の広まっている結核菌は日本のものと似ているが、RD181領域を持つ結核菌の割合が高い点が異なることが明らかになった。一方、台湾では北京下部株が44.4%で、北部、東部では北京株が数十年間流行株になっていると考えられた。このように、日本、中国、韓国では、共通して北京型結核菌の割合が高いことが知られているが、それぞれの国で広まっている北京型結核菌の遺伝的背景が異なることが明らかになった。

- (14) 北タイ・チェンライ県において、難治性結核患者（多剤耐性・再発・治療失敗例）の検体バンク、コホート研究を継続している。輸入感染症としての側面を検討するため、結核菌側のDNA解析を進めている。

- (15) 非結核性抗酸菌症患者の潜伏結核感染の頻度とその病態を非潜伏結核感染者と比較検討した。潜伏結核感染者の炎症反応が、非潜伏結核患者より高値で、臨床症状も強い事が明らかになった。またハルビン医科大学との共同研究を継続し、当大学で特性化した多剤耐性結核菌の由来でそのうち80%以上が北京株であることを明らかにした。

- (16) タイ・チェンライでOPNならびにgranulysin等の細胞障害性顆粒とHIV感染者とHIV合併結核を標的として臨床試料を用いた解析を行った。OPN、granulysinともにHIV感染における結核発症の高いリスクと密接に関わっている可能性が示唆された。HIV合併結核においては、血漿中のOPNや一部Th1 cytokineまたはIL-10のような抑制性cytokineのレベルが健常者のみならずHIV陰性結核患者と比較しても有意に上昇していた。

- (17) ベトナム南部随一の結核拠点病院であるホーチミン市のファムゴックタック病院との共同研究を実施した。多剤耐性結核の宿主要因を分子遺伝学的な手法により明らかにする研究プロトコールについて両国両施設の倫理委員会での承認を得た後、断面研究を実施し、60名の多剤耐性結核患者の研究参加を得て、血液検体を当センターに移送した。今後、薬剤代謝酵素NAT2など、耐性結核の宿主要因の候補遺伝子の特徴的な遺伝子変異、アジア人の遺伝子分布の特徴を明らかにするための遺伝子タイピングを行い、多剤耐性結核の遺伝要因に関する知見を得たい。

[新規結核ワクチン・治療・診断]

- (18) HVJ-エンベロープ/Hsp65 DNA+IL-12 DNAワクチンはBCGワクチンよりも1万倍強力な結核予防ワクチン効果。結核菌数の減少効果のみでなくマウスで初めてワクチンによる延命効果を発見（マウス）。結核菌由来 HSP65蛋白に対するキラーT細胞やINF- γ 産生T細胞の分化を強力に誘導した。カニクイザル（レオナルド・ウッド研究所：ヒト結核感染に最も近いモデル。Nature Med.1996）でワクチン免疫を行い、結核予防効果を解析した。カニクイザルでHVJ/HSP65+IL-12DNAワクチン投与群は100%生存率（BCGワクチン群は33%の生存率）の画期的な結核予防ワクチン効果を示した。多剤耐性結核に対する世界で初めての治療ワクチン効果を明らかにした。超薬剤耐性結核（XDR-TB）に対しても治療効果。多剤耐性結核（XDR-TB）に対する強力な治療ワクチンを発見（マウスの系）。さらに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。
- (19) 結核菌殺傷タンパクである15K及び9K Granulysin 遺伝子導入マウス作製に成功し、15K Graが生体内でも結核菌殺傷を初めて証明。多剤耐性結核患者でキラーT産生Gra有意に低下を発見。
- (20) 新規DNAワクチンの成分であるHVJ-Eについて、臨床応用を想定した安全性、薬効、安定性に関するデータを取得した。3年間に実施した安全性試験により、アジュバント兼DDSでワクチン成分であるHVJ-Eについて、臨床応用上特に問題となる重篤な

異常などは認められず、臨床試験の開始に必要な安全性が実証された。薬効薬理試験については、新規DNAワクチンの有用性と新しい作用メカニズムが示唆された。また、今後臨床応用を目指して開発を進める予定である。安定性試験については、臨床応用に必要なレベルの安定性（冷蔵条件、18ヶ月の有効期限）が明らかとなった。更に、製造に関するバリデーション（品質試験法）、クオリフィケーション（設備・機器）、ベリフィケーション（製造工程）により、製造体制・製造工程の適格性を実証し、臨床応用のための製造体制の整備を進める事ができた。

- (21) 結核感染に際し、最前線となる上皮系細胞から分泌されるSLPIやリポカリン2が結核菌の増殖抑制作用を異なる分子機構により発揮していることが明らかになった。今後、SLPI、リポカリン2以外にも、自然免疫系による結核感染防御機構を担う分子を同定していきたい。
- 結核菌由来の遺伝子CFP-10を、宿主マクロファージに直接発現させることにより、このマクロファージが非病原性のBCGに対する感受性が高まることを見出した。
- 異なるプロテオミクス法を用いたアプローチにより、ESAT-6、CFP-10に会合する宿主分子候補を同定した。今後、これら候補分子のESAT-6、CFP-10会合による貪食胞成熟に及ぼす影響を明らかにしていきたい。
- (22) われわれは二つの結核療養所を舞台とした、MDR-TB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MDR-TB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、MDR-TB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、MDR-TBの中に感染力の強い菌株が存在する事、MDR-TB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。
- (23) 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。
- (24) LiPAは多剤耐性結核のスクリーニング法として有用である。

[先進国の外国人結核対策]

- (24) 結核が低蔓延状況となるにつれ、結核対策のためだけの独自の制度と施設、例えば結核専門病院、保健所などの組織を維持することは困難となるが、結核患者は全国の何処で発生するかわからない。

しかも、外国人、ホームレス者、透析患者、高齢者などの患者の割合が増えていくものと考えられる。このような状況に対し、英国、米国においては、一般医療機関をも巻き込んだ新たなケースマネジメントシステムの構築を重要視した対策を進めている。一般医療機関の結核に関わる診療支援体制と、一般医療機関で行っている結核診療を適切なものとするように調整する機能の強化である。罹患率が低下し、患者数が減少している中で、専門性の高い、個別ニーズに対応した対策を進めていくことが必要となる。この点については結核対策のマネジメントを行う組織が必要である。英国、米国における結核対策は、それを支える公衆衛生体制の基盤が存在しているから成り立っているように思われる。わが国においても結核対策を支える公衆衛生体制のあり方もあわせて、輸入感染症としての結核に備えた体制づくりが求められていると思われる。

G. 研究発表

(1) 論文発表

- Hoshino H, Ohmori M, Okada M. Trends in tuberculosis infection among foreigners in Japan according to work status. *Kekkaku*. 85(9):697-702, 2010.
- Takahashi Y, Igarashi M, Ishikawa K, Komatsuki Y, Shotome H, Koyama Y, Miyake T, Nakagawa N, Hattori S, Inoue K, Doi N, Okada M, Matsumoto S, Tamaru A, Akamatsu Y: Synthesis and SAR of Caprazamycin derivatives CPZEN-45: as a promising drug candidate for treating XDR-TB. *ACS Medical Chemistry Letters*. (in press)
- Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Inoue Y, McMurray DN, Sakatani M.: Novel vaccine against tuberculosis using prime-boost method. *Clin. Develop Immunol*. (in press)
- Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Inoue Y, Matsumoto M, McMurray DN, E.C.Dela Cruz, E.V. Tan, R.M.Abalos, J.A.Burgos, Saunderson P, Sakatani M: Novel therapeutic vaccine: granulysin vaccine against tuberculosis. *Human Vaccine*. (in press)
- Kita Y, Okada M, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Takamori Y, McMurray DN, E.C.Dela Cruz, Tan EV, R.M.Abalos, J.A.Burgos, Saunderson P, Sakatani M.: Development of therapeutic and prophylactic vaccine against tuberculosis using monkey and granulysin transgenic mice models. *Human Vaccine*. (in press)
- Yoshida S, Suzuki K, Iwamoto T, Tsuyuguchi K,

- Tomita M, Okada M, Sakatani M. Comparison of rifabutin susceptibility and rpoB mutations in multi-drug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by DNA sequencing and the line probe assay. *J Infect Chemother.* 16(5):360-3, 2010.
7. Yoshida S, Suzuki K, Iwamoto T, Tsuyuguchi K, Tomita M, Okada M, Sakatani M. Detection of molecular epidemiology of Mycobacterium gordonae isolates. *Kekkaku.* 85(7):609-14, 2010.
 8. Okada M, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Inoue Y, Nakajima T, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Matsumoto M, P Saunderson, E V.Tan, Dela Cruz E.C., D McMurray, Sakatani M.: A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccine (HVJ-Envelope/Hsp65 DNA+IL-12 DNA) against Tuberculosis Using The Cynomolgus Monkey Models. *Procedia in Vaccinology.* Vol.2. Issue1:34-39, 2010.
 9. Okada M, Kita Y. Tuberculosis vaccine development: The development of novel (preclinical) DNA vaccine. *Human Vaccine.* 6(4):297-308, 2010.
 10. Okada M, Kita Y. Anti-tuberculosis immunity by cytotoxic T cells granulyisin and the development of novel vaccines (HSP-65 DNA+IL-12 DNA). *Kekkaku.* 2010;85(6):531-8.
 11. Okada M. Immunity against Mycobacterium tuberculosis (introduction). *Kekkaku.* 85(6):501-8, 2010.
 12. 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.* 27:3267-3270,2009.
 13. 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.* 199:1707-1715,2009.
 14. Yoshida S, Suzuki K, Tsuyuguchi K, Iwamoto T, Tomita M, Okada M, Sakatani M.: Evaluation of the INNO-LiPA Mycobacteria v2 for Mycobacterial identification, *Kekkaku* 84: 15-21, 2009
 15. Masaji Okada, Yoko Kita, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Yasuko Nishida, Hitoshi Nakatani, Kyoko Takao, Chie Kishigami, Shiho Nishimatsu, Yoshikazu Inoue, Toshihiro Nakajima, Tetsuji Nagasawa, Yasuhumi Kaneda, Shigeto Yoshida, Makoto Matsumoto, Paul Saunderson, Esterlina V.Tan, E.C.Dela Cruz, David McMurray, Mitsunori Sakatani
A novel therapeutic and prophylactic vaccine against tuberculosis. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 2009. 154-158.
 16. 岡田全司 わが国の結核対策の現状と課題 結核予防ワクチンの開発状況とその応用の可能性. *日本公衆衛生雑誌*56巻4号 (2009.04) Page266-270
 17. Kannan-Hayashi Y, Okamura K, Hattori S, Uwamura M, Higuchi E, Terayama H, Moriyama M, Mukamoto M, Okada M, Ohsugi Y and Nakamura Y.: Neuritogenic effects of T cell-derived IL-3 on mouse splenic sympathetic neurons. *J. Immunol.* 2008; 180(6): 4227-34.
 18. 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
 19. Kobayashi K, Sugawara I, Okada M, Hussey G, Andersen P, Sadoff J C. :Research and Development of vaccines against Tuberculosis. *Kekkaku.* 2008;83:635-640
 20. 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.
 21. 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, 岸上知恵: 【結核対策の現状を考える】 新しい結核ワクチンの開発. *呼吸と循環.* 56(7): 685-695. 2008
 22. 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: BCGと新たな結核ワクチン. *呼吸器科.* 13: 99-106, 2008
- (2) 学会発表
 1. A Novel Therapeutic Vaccine Against Tuberculosis Using the Cynomolgus Monkey Model. Okada M, Kita Y , Kanamaru N, Hashimoto S, Nakajima T, Kaneda Y, P. Saunderson , E.V.Tan. 41th IUATLD(The International Union Against Tuberculosis and Lung Disease), 11-15 Nov, 2010, Berlin, Germany.
 2. A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccine against Tuberculosis Using the Cynomolgus Monkey Model and Mouse Model. Okada M, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Inoue Y, Nakajima T, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Matsumoto M, P Saunderson, E. V.Tan, E.C.D. Cruz, D McMurray, Hayashi S. 4th Vaccine Global Congress, 3-5 Oct, 2010, Wien, Austria.
 3. A Novel Therapeutic Vaccine (HVJ-Envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNA) against Tuberculosis Using Monkey Models. in “Symposium: Host-Directed Therapies in Bacterial and Fungal Infections (Invited Speaker)” Okada M. 50th ICAAC (International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy), Sep 11-15,2010, Boston, USA.
 4. Novel therapeutic vaccines (granulyisin and novel DNA vaccine) against Tuberculosis. Okada M. 7th WCVII(WORLD CONGRESS ON VACCINE, IMMUNISATION AND IMMUNOTHERAPY) 2010

- May 26-28 Berlin, Germany.
5. Novel prophylactic and therapeutic vaccine against Tuberculosis using monkey and transgenic mice models. Kita Y, Okada M. 7th WCVII(WORLD CONGRESS ON VACCINE, IMMUNISATION AND IMMUNOTHERAPY), 26-28 May, 2010, Berlin, Germany.
 6. A novel prophylactic and therapeutic vaccines against tuberculosis in the tuberculosis-sensitive mice and SCID-PBL/hu mice. Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Inoue Y, Nakajima T, Kaneda Y, Yoshida S, D McMurray, Okada M. 14th International Congress of Immunology, 22-27 Aug, 2010, Kobe, Japan.
 7. A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccine (HVJ-Envelope/Hsp65 DNA + IL-12 DNA) against Tuberculosis Using The Cynomolgus Monkey Model. Okada M., Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Nakajima T, Kaneda Y, P Saunderson, E. V. Tan, D McMurray. 14th International Congress of Immunology, 22-27 Aug, 2010, Kobe, Japan.
 8. A NOVEL THERAPEUTIC VACCINE (HVJ-ENVELOPE/HSP65 DNA+IL-12 DNA) AGAINST TUBERCULOSIS USING THE MONKEY MODEL. Okada M., Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Nakajima T, Nagasawa T, Yasufumi Kaneda, Yoshida S, E. V. Tan, P Saunderson, E.C. Dela Cruz, D McMurray, Sakatani M. 45th US-JAPAN CONFERENCE ON TUBERCULOSIS AND LEPROSY, 13-16 Jul, 2010, Cambridge, USA
 9. 結核高感受性マウスを用いた新しい結核治療ワクチン(Hsp 65 DNA+IL-12 DNA)の開発. 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, 岸上知恵, 西松志保, 関根有紀, 井上義一, 吉田栄人, 中島俊洋, 金田安史, 坂谷光則. 第50回日本呼吸器学会学術講演会 2010年4月23日-25日 京都
日本呼吸器学会雑誌 48 巻増刊 Page296(2010.03)
 10. ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた新しい結核治療ワクチン開発. 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里実, 西田泰子, 仲谷均, 高尾京子, 岸上知恵, 西松志保, 関根有紀, 吉田栄人, 中島俊洋, 坂谷光則, 金田安史, Tan E.V., Saunderson Paul, 岡田全司. 第50回日本呼吸器学会学術講演会 2010年4月23日-25日 京都
日本呼吸器学会雑誌 48 巻増刊 Page295(2010.03)
 11. ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しい予防・治療ワクチン開発研究. 喜多洋子, 岡田全司, 金丸典子, 橋元里実, 西田泰子, 仲谷均, 高尾京子, 岸上知恵, 西松志保, 関根有紀, 林清二, 吉田栄人, 中島俊洋, 金田安史, E.V. Tan, E.L.C. Dela Cruz, Paul Saunderson
64 回国立病院総合医学会 2010年11月26日-27日 福岡
 12. 新しい結核治療ワクチン (HVJ-エンベロープ/Hsp65+IL-12 DNA) 及び granulysin ワクチンの開
 - 発. 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里実, 西田泰子, 仲谷均, 高尾京子, 岸上知恵, 西松志保, 関根有紀, 井上義一, 坂谷光則, 岡田全司. 第80回実験結核研究会総会 2010年5月19日 京都
 13. 新しい結核治療ワクチン(HVJ-エンベロープ/Hsp65+IL-12 DNA)の開発(SCID-PBL/hu マウスを用いた). 岡田全司, 喜多洋子, 金丸典子, 井上義一, 坂谷光則. 第85回結核病学会総会 2010年5月20日-21日 京都
結核 85 巻4号 Page383(2010.04)
 14. ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しい予防・治療ワクチン開発. 喜多洋子, 金丸典子, 井上義一, 坂谷光則, 岡田全司. 第85回結核病学会総会 2010年5月20日-21日 京都 結核 85 巻4号 Page383(2010.04)
 15. Masaji Okada, Yoko Kita, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Yasuko Nishida, Hitoshi Nakatani, Kyoko Takao, Chie Kishigami, Shiho Nishimatsu, Yoshikazu Inoue, Toshihiro Nakajima, Tetsuji Nagasawa, Yasuhumi Kaneda, Shigeto Yoshida, Makoto Matsumoto, Paul Saunderson, Esterlina V. Tan, E.C. Dela Cruz, David McMurray, Mitsunori Sakatani. A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccine (HVJ-Envelope/Hsp65 DNA+ IL-12 DNA) against Tuberculosis Using The Cynomolgus Monkey Model. 3rd World Vaccine Meeting Oct.4-7 Singapore
 16. M Okada, Y Kita, N Kanamaru, S Hashimoto, Y Nishida, H Nakatani, K Takao, C Kishigami, S Nishimatsu, Y Sekine, T Nakajima, Y Kaneda, P Saunderson, E V. Tan, D McMurray, M Sakatani. A novel therapeutic vaccine (HVJ-Envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNA) against Tuberculosis using the Cynomolgus monkey model. 49th ICCAC (Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy). Sep 12~15 San Francisco
 17. Masaji Okada, Yoko Kita, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Yasuko Nishida, Hitoshi Nakatani, Kyoko Takao, Chie Kishigami, Shiho Nishimatsu, Yuki Sekine, Toshihiro Nakajima. Activation of CD8 positive cytotoxic T-cells by a novel vaccine (HSP65 DNA+ IL-12 DNA) against tuberculosis in vivo. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009年12月4日(金)
 18. Masaji Okada, Yoko Kita, Toshihiro Nakajima, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Tetsuji Nagasawa, Yasufumi Kaneda, Shigeto Yoshida, Yasuko Nishida, Hitoshi Nakatani, Kyoko Takao, Chie Kishigami, Shiho Nishimatsu, Makoto Matsumoto, E.V. Tan, Paul Saunderson, Mitsunori Sakatani. Novel therapeutic and prophylactic vaccine (HVJ-Envelope/Hsp65DNA+IL-12DNA) against tuberculosis using cynomolgus monkey. 第15回遺伝子治療学会 2009.7.9 大阪
 19. 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-エンベロープ/Hsp65+IL-12 DNA) の開発. 第84回結核病学会総会 2009年7月2, 3日 北海道. 結核 (2009.05)84 巻5号 Page403
 20. 喜多洋子・金丸典子・井上義一・坂谷光則・岡田