

治験薬GMP製造のためのガイドラインに準拠して手順書・組織の整備を進めた上で、バリデーション（施設・機器についてはクオリフィケーション、工程についてはペリフィケーションとも表現する）を進めた。また、今後の臨床応用の際に必要な治験薬GMP製造体制の確立、製造工程の再現性確認、注射剤を想定した高度無菌化などについても並行して実施した。更に、確立した技術に基づいて実際に臨床応用（臨床研究）のためのGMP製造を実施した。

（倫理面への配慮）

本研究を実施するにあたり、ジェノメディア株式会社は、池田ラボラトリーの所在地である独立法人 産業技術総合研究所の規定に従い、国で定められている、組換えDNA実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業技術総合研究所で開催される各委員会でも実験許可を受けてから実験を行った。

また、実験に従事するものの安全確保についても、独立法人 産業総合技術研究所の規定に従い、年に1回行われる実験の安全講習に参加し、健康診断も受けて実験従事者の健康管理も確保した。

C. 研究結果

①動物の安全性試験

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。

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、カン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レベルで製造する必要があるため、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、それに従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）、ペリフィケーション（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）に必要な治験薬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実証するため、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。

D. 考察

安全性試験においては、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、カン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、ヒト骨髄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をも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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Novel Prophylactic Vaccine Using a Prime-Boost Method and Hemagglutinating Virus of Japan-Envelope against Tuberculosis., 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., Clin Dev Immunol. 2011;2011.

2. Development of therapeutic and prophylactic vaccine against Tuberculosis using monkey and transgenic mice models., Kita Y, Okada M, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Takamori Y, McMurray DN, Cruz EC, Tan EV, Abalos RM, Burgos JA, Saunderson P, Sakatani M., Hum Vaccin. 2011 Jan 1;7, pp108-114.
3. Novel prophylactic and therapeutic vaccine against tuberculosis., 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 DN, Dela Cruz EC, Tan EV, Abalos RM, Burgos JA, Saunderson P, Sakatani M., Vaccine. 2009 May 26;27(25-26):3267-3270.

2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。）

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

[IV] ジェノスカラーによる結核菌 RFP 耐性迅速診断法の検討に関する研究

研究協力者 露口 一成 近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター部長

研究要旨

多剤耐性結核の有効な治療、感染対策のためには迅速に多剤耐性結核と診断することが必要である。今回我々は、多剤耐性結核の迅速スクリーニング法として、リファンピシン (RFP) 耐性遺伝子による迅速 RFP 感受性測定法の評価を行い、本法が有用であることを示した。

A. 研究目的

多剤耐性結核は治療が極めて困難であり適切な治療開始の遅れは致命的となる可能性がある。また、近年多剤耐性結核の院内感染事例の報告も散見され、多剤耐性結核を迅速に発見して隔離することが求められている。RFP 耐性結核菌の大部分は多剤耐性結核菌であり、RFP 耐性を迅速に診断することによって多剤耐性結核を早期に発見することが期待される。我々は RFP 耐性遺伝子変異をラインプローブアッセイ (LiPA) 法により検出するキットを用いて、多剤耐性結核の迅速スクリーニング法としての有用性を検討した。

B. 研究方法

NHO 近畿中央胸部疾患センターにおいて平成 19 年 11 月より平成 21 年 3 月までの期間に、喀痰等の臨床検体に対してアンプリコア PCR 検査を行って結核菌群陽性と判定され、かつ抗酸菌培養検査で陽性で薬剤感受性検査を行い得た 446 例を検討の対象とした。当院では抗酸菌塗抹陽性で PCR 検査で結核菌群陽性と判定された検体に対して LiPA 法を行っている。LiPA 法は、検体から抽出した DNA に対して RFP 耐性遺伝子である *rpoB* 領域の一部を PCR で増幅し、ストリップ上に固相化された野生株配列、耐性株配列とハイブリダイズさせ、変異の有無を検出する方法である。この結果を、検体に対して抗酸菌培養を行って発育した結核菌を用いて行った通常の薬剤感受性検査結果と比較検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、当院での通常行う細菌学的検査の範疇で得られた結果を後ろ向きに検討したものであり、大きな倫理的問題はないものと考えられるが、個人情報取り扱いには細心の注意を払って行った。

C. 研究結果

446 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。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

- 論文発表
 - 露口一成：第 84 回総会シンポジウム V. 日本における多剤耐性結核 1. 多剤耐性結核の疫学、診断 結核. 2010; 85(2): 126-128
 - 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. 2010; 16(5): 360-363
 - 吉田志緒美、鈴木克洋、岩本朋忠、露口一成、富田元久、岡田全司、坂谷光則：当センターにおける *Mycobacterium gordonae* の分子疫学的解析. 結核 2010; 85(7): 609-614
- 学会発表
 - 露口一成：結核の診療 - 結核専門病院からの要望を含めて - 日本結核病学会との共同企画 一般病院において「結核対策」はどうするか? 第 50 回日本呼吸器学会、京都、2010 年 4 月 25 日
 - 露口一成：結核退院基準について - 事例を元に今後の望ましい基準のあり方を考える - 第 85 回日本結核病学会総会ミニシンポジウム IV. 結核退院基準について. 京都、2010 年 5 月 21 日
 - 露口一成：多剤耐性結核 第 53 回日本感染症学会中日本地方会シンポジウム「Emerging Infectious Diseases」京都、2010 年 11 月 13 日

G. 知的所有権の取得状況

- 特許取得 なし
- 実用新案登録 なし
- その他 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
高鳥毛敏雄	わが国の貧困と医療の課題－英国との比較から－		貧困研究	明石書店		2009	2 (51-58)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
岡田全司	Synthesis and SAR of Caprazamycin derivatives CPZEN-45: as a promising drug candidate for treating XDR-TB.	ACS Medical Chemistry Letters			in press
岡田全司	Novel vaccine against tuberculosis using prime-boost method.	Clin. Develop Immunol			in press
岡田全司	Novel therapeutic vaccine: granulysin vaccine against tuberculosis.	Human Vaccine			in press
岡田全司	Development of therapeutic and prophylactic vaccine against tuberculosis using monkey and granulysin transgenic mice models.	Human Vaccine			in press
岡田全司	Trends in tuberculosis infection among foreigners in Japan according to work status.	Kekkaku	85(9)	697-702	2010
岡田全司	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)	360-363	2010
岡田全司	Detection of molecular epidemiology of Mycobacterium gordonae isolates.	Kekkaku	85(7)	609-614	2010

岡田全司	A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccine HVJ-Envelope/Hsp65 DNA+ IL-12 DNA) against Tuberculosis Using The Cynomolgus Monkey Models.	Procedia in Vaccinology	2	34-39	2010
岡田全司	The development of novel (preclinical) DNA vaccine.	Human Vaccine	6(4)	297-308	2010
岡田全司	Anti-tuberculosis immunity by cytotoxic T cells granulysin and the development of novel vaccines (HSP-65 DNA+ IL-12 DNA).	Kekkaku	85(6)	531-538	2010
岡田全司	Immunity against Mycobacterium tuberculosis (introduction).	Kekkaku	85(6)	501-508	2010
岡田全司	Novel prophylactic and therapeutic vaccine against Tuberculosis.	Vaccine	27	3267-3270	2009
岡田全司	Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary Mycobacterium avium complex infection.	J.Infect. Dis	199	1707-1715	2009
岡田全司	Evaluation of the INNO-LiPA Mycobacteria v2 for Mycobacterial Identification.	Kekkaku	84	15-21	2009
岡田全司	A novel therapeutic and prophylactic vaccine against tuberculosis.	44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference		154-158	2009
岡田全司	Neuritogenic effects of T cell-derived IL-3 on mouse splenic sympathetic neurons.	J. Immunol.	180(6)	4227-4234	2008
岡田全司	Evaluation of the discrepant Mycobacterium tuberculosis strains between any ordinary susceptibility testing and rpoB gene analysis by the line probe assay.	Kekkaku	83	577-583	2008
岡田全司	Research and Development of vaccines against Tuberculosis.	Kekkaku	83	635-640	2008
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(4)	266-270	2009
岡田全司	特異抗原をターゲットとした Immunotherapy.	日本臨床免疫学会誌	31(5)	356-368	2008
岡田全司	【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
岡田全司	BCG と新たな結核ワクチン	呼吸器科	13	99-106	2008

加藤誠也	Phylogeographical particularity of the Mycobacterium tuberculosis Beijing Family in South Korea based on International comparison with surrounding countries.	J Med Microbiol.	59	1191-1197	2010
加藤誠也	Transmission of specific genotype Streptomycin resistant strains of Mycobacterium tuberculosis in the Tokyo Metropolitan Area in Japan.	BMC Infect Dis.	9	138	2009
加藤誠也	Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family Mycobacterium tuberculosis.	J Med Microbiol.	57	873-880	2008
加藤誠也	国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型(VNTR)分析システム -JATA(12)-VNTR 分析法の実際-	結核	83	673-678	2008
豊田恵美子	外国人結核対策への取り組み-結核低蔓延国における外国人に対する健診実施状況-	結核			投稿中
野内英樹	Decreased granulysin and increased IFN- γ levels in plasma of patients with newly diagnosed and relapse tuberculosis.	Submitted			
服部俊夫	Genotypes and characteristics of Clustering and drug-susceptibility of Mycobacterium tuberculosis isolates in Heilongjiang Province, China.	J Clin Microbiol			in press
服部俊夫	Antibody to tubercular glycolipid antigen; TBGL-IgG and TBGL-IgA responses in pulmonary tuberculosis patients and healthy individuals from Thailand.	a TB-endemic country			投稿中
服部俊夫	Identification of CD44 as a downstream target of noncanonical NF- κ B pathway activated by Human T-cell leukemia virus type 1-encoded.	Tax protein			投稿中
服部俊夫	Evaluation of the antibacterial and anticancer activities of some South African medicinal Plants.	BMC Complementray and Alternative Medicine	11	14	2011
服部俊夫	Transactivation of human osteopontin promoter by human T cell leukemia virus type 1-encoded Tax protein.	Leuk Res	34	763-768	2010
服部俊夫	A sensitive HIV-1 envelope induced fusion Assay identifies fusion enhancement of thrombin.	Biochem Biophys Res Commun.	39	1780-1784	2010

服部俊夫	The increase of plasma galectin-9 in a patient with insulin allergy: a case report.	Clin Mol Allergy	8	12	2010
服部俊夫	High numbers of Interferon- γ -Producing T Cells and Low Titers of Anti-Tuberculous Glycolipid Antibody in Individuals with Latent Tuberculosis.	Tohoku J Exp Med	220	21-25	2010
服部俊夫	Rev-derived peptides inhibit HIV-1 replication by antagonism of Rev and a co-receptor, CXCR4.	Int J Biochem Cell Biol.	42(9)	1482-1488	2010
服部俊夫	Procyanidin B1 purified from Cinnamon cortex suppresses hepatitis C virus replication.	Antivir Chem Chemother.	20(6)	239-248	2010
高鳥毛敏雄	Tuberculosis infection among homeless persons and caregivers in a high-tuberculosis-prevalence area in Japan: a cross-sectional study.	BMC Infectious Diseases			2011
高鳥毛敏雄	救急医療現場における薬物中毒者の実態	大阪保険医雑誌	38 (519)	26-30	2010
高鳥毛敏雄	米国、イギリス、ドイツにおける結核医療の提供体制	結核	85(2)	98-101	2010
高鳥毛敏雄	わが国の結核対策の現状と課題 結核対策の及ばない人々に対する対策	日本公衛誌	56(6)	418-421	2009
高鳥毛敏雄	英国における公衆衛生人現任教育の現状	公衆衛生	73(3)	200-205	2009
高鳥毛敏雄	低まん延国における結核対策の保健医療組織－米国、英国、ドイツ－	結核	84(2)	94-96	2009
慶長直人	Identification of tuberculosis-associated proteins in whole blood supernatant.	BMC Infect Dis	11(1)	71	2011
慶長直人	Genetic predisposition to diffuse Panbronchiolitis.	Respirology			2011 in press
慶長直人	Molecular cloning of two novel mucin-like genes in the disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis.	Hum Genet	129(2)	117-128	2011
慶長直人	Biomarkers to assess different aspects of Tuberculosis-from development to relapse.	Kekkaku	85(11)	823-828	2010
慶長直人	Association analysis of susceptibility Candidate region on chromosome 5q31 for tuberculosis.	Genes Immun	11(5)	416-422	2009

慶長直人	Prevalence and risk factors for tuberculosis infection among hospital workers in Hanoi, Viet Nam.	PLoS One.	4(8)	e6798	2009
慶長直人	Quality assessment of an interferon-gamma release assay for tuberculosis infection in a resource-limited setting.	BMC Infect Dis	9	66	2009
慶長直人	Association of human leukocyte antigen class II alleles with severe acute respiratory syndrome in the Vietnamese population.	Hum Immunol	70(7)	527-531	2009
慶長直人	Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary Mycobacterium avium complex infection.	J Infect Dis	199 (11)	1707-1715	2009
櫻田紳策	Plasma and cellular granulysin levels relates inversely to IFN- γ in patients with newly diagnosed and relapse pulmonary tuberculosis.				投稿中
櫻田紳策	Circulating full-length osteopontin, IFN- γ and hsCRP levels correlates with tuberculosis disease activity and response to successful treatment.				投稿中
竹田 潔	Prophylactic and therapeutic implications of Toll-like receptor ligands.	Med. Res. Rev.			in press
竹田 潔	Commensal microbiota induce LPS hyporesponsiveness in colonic macrophages via the production of IL-10.	Int. Immunol.	22	953-962	2010
竹田 潔	Activation of myeloid dendritic cells by deoxynucleic acids from Cordyceps sinensis via a Toll-like receptor 9-dependent pathway.	Cell Immunol.	263	241-250	2010
竹田 潔	Current views of Toll-like receptor signaling pathways.	Gastroenterol Res Pract.			2010
竹田 潔	A novel inducible dendritic cell ablation model in mice.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	397	559-563	2010
竹田 潔	The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection.	Microbes Infect.	12	511-517	2010
竹田 潔	Therapeutic activation of STAT3 by Interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction.	Circulation	121	684-691	2010

竹田 潔	A single polymorphic amino acid on <i>Toxoplasma gondii</i> kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3.	J. Exp.Med.	206	2747-2760	2009
竹田 潔	Induction of Intestinal Th17 cells Bysegmented filamentous bacteria.	Cell	139	485-498	2009
竹田 潔	Increased atherosclerotic lesions and Th17 in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice fed high-fat diet.	Mol Immunol.	47	37-45	2009
竹田 潔	Toll-like receptor 9-dependent activation Of myeloid dendritic cells by deoxynucleic acids from <i>Candida albicans</i> .	Infect. Immun.	77	3056-3064	2009
竹田 潔	NFATc1 mediates Toll-like receptor-independent innate immune responses during <i>Trypanosoma cruzi</i> infection.	PLoS Pathogens 5		e1000514	2009
竹田 潔	C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus.	Malassezia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	106	1897-1902	2009
竹田 潔	Fra-1 negatively regulates lipopolysaccharide-mediated inflammatory responses.	Int. Immunol.	21	457-465	2009
竹田 潔	The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation.	Hepatology	49	204-214	2009
竹田 潔	Lipocalin 2-dependent inhibition of Mycobacterial growth in alveolar epithelium.	J. Immunol.	181	8521-8527	2008
竹田 潔	Toll-like receptor (TLR) 2 and dectin-1 contribute to the production of IL-12p40 by bone marrow-derived dendritic cells infected with <i>Penicillium marneffei</i> .	Microbes Infect.	10	1223-1227	2008
竹田 潔	ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation.	Nature	455	808-812	2008
竹田 潔	Targeted disruption of Hsp110/105 gene Protects against ischemic stress.	Stroke	9	2853-2859	2008
竹田 潔	Inefficient phagosome maturation in infant macrophages.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	375	113-118	2008

竹田 潔	STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinalcord injury.	J. Neurosci.	28	7231-7243	2008
竹田 潔	Stat3 is required in hypothalamic Agrp/Npy neurons for normal energy homeostasis.	Endocrinology	149	3346-3354	2008
竹田 潔	Stat6-independent tissue inflammation Occurs selectively on the ocular surface and perioral skin of Ikbz ^{-/-} mice.	Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.	49	3387-3394	2008
竹田 潔	Class-specific regulation of pro-inflammatory genes by MyD88 pathways and Ikbz.	J. Biol. Chem.	283	12468-12477	2008
竹田 潔	Deoxynucleic acids from Cryptococcus Neoformans activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway.	J. Immunol.	180	4067-4074	2008
竹田 潔	Potent antimycobacterial activity of mouse Secretory leukocyte protease inhibitor.	J. Immunol.	180	4032-4039	2008
竹田 潔	Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells.	J. Immunol.	180	2496-2503	2008
竹田 潔	STAT3 is indispensable to IL-27-mediated cell proliferation but not to IL-27-induced Th1 differentiation and suppression of proinflammatory cytokine production.	J. Immunol.	180	2903-2911	2008
竹田 潔	Role of nuclear Ikb proteins in the regulation of host immune responses.	J. Infect. Chemother.	14	265-269	2008
竹田 潔	Assessing the response of cells to TLR stimulation.	Signaling by Toll-like Receptors.		1-21	2008
星野齊之	就業状況別の在留外国人結核の推移とその背景	結核	85(9)	697-702	2010
中島俊洋	Novel Prophylactic Vaccine Using a Prime-Boost Method and Hemagglutinating Virus of Japan-Envelope Against Tuberculosis.	Clin Dev Immunol.			2011
中島俊洋	Development of therapeutic and prophylactic vaccine against Tuberculosis using monkey and transgenic mice models.	Hum Vaccin.	7	108-114	2011
中島俊洋	Novel prophylactic and therapeutic vaccine against tuberculosis.	Vaccine.	27 (25-26)	3267-3270	2009

露口一成	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)	360-363	2010
露口一成	第 84 回総会シンポジウム V.日本における多剤耐性結核 1.多剤耐性結核の疫学、診断	結核	85(2)	126-128	2010
露口一成	当センターにおける Mycobacterium gordonae の分子疫学的解析	結核	85(7)	609-614	2010

添付資料

特集：特異抗原をターゲットとした Immunotherapy

総 説

新しい結核ワクチンの開発

岡田 全司

The development of novel vaccines against Tuberculosis

Masaji OKADA

Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center

(Received August 4, 2008)

summary

We have developed a novel tuberculosis (TB) vaccine; a combination of the DNA vaccines expressing mycobacterial heat shock protein 65 (HSP65) and interleukin 12 (IL-12) delivered by the hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome or-envelope (HSP65 + IL-12/HVJ). This vaccine provided remarkable protective efficacy in mouse and guinea pig models compared to the BCG vaccine, on the basis of an induction of the CD8 positive CTL activity against TB antigens and improvement of the histopathological tuberculosis lesions, respectively. The Elispot assay showed that HSP65 + IL-12 DNA/ HVJ vaccine induced a greater number of IFN- γ producing T cells than BCG in the mouse model. Furthermore, we extended our studies to a cynomolgus monkey model, which is currently the best animal model of human tuberculosis. This novel vaccine provided a higher level of the protective efficacy than BCG based upon the assessment of mortality, the ESR, body weight, chest X-ray findings and immune responses (IFN- γ , IL-2, IL-6 production, and lymphocyte proliferation of cynomolgus monkey). The combination of HSP65 + IL-12/HVJ and BCG by the priming-booster method showed a synergistic effect in the TB-infected cynomolgus monkey (100% survival). In contrast, 33% of monkeys from BCG Tokyo alone group were alive (33% survival). These data indicate that our novel DNA vaccine might be useful against Mycobacterium tuberculosis for human clinical trials.

Key words—Mycobacterium Tuberculosis; HSP65 DNA + IL-12 DNA; Cytotoxic T-cell; Cynomolgus monkey; DNA vaccine and recombinant BCG

抄 録

1998年、米国CDC及びACETは新世代の結核ワクチン開発の必要性を発表した。しかしながら、BCGワクチンに代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。我々はBCGを凌駕する強力な結核予防ワクチン(HVJ-エンベロープ(又はリポソーム)/HSP65+IL-12 DNA ワクチン)を開発した。結核免疫を強く誘導するヒト結核菌由来のHSP65蛋白をコードするDNAを用いた。プライム・ブースター法を用い、HSP65 DNA+IL-12 DNA(HVJ-エンベロープベクター)のワクチンはBCGよりも1万倍強力な結核予防ワクチンであり、CD8陽性キラーT細胞の分化、IFN- γ 産生T細胞の分化を増強した。肺の結核病理像を改善した。このワクチンは多剤耐性結核菌に対しても治療ワクチン効果を示した。さらに、ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザル(Nature Med. 1996)を用い、このワクチンの強力な有効性を得た。カニクイザルにワクチン接種後ヒト結核菌を経気道投与し、1年以上経過観察した。免疫反応増強及び胸部X線所見・血沈、体重の改善効果が認められた。また、生存率改善・延命効果も認められた。

BCGワクチン・プライム-DNAワクチン・ブースター法を用いた群は100%の生存率を示した。一方、BCGワクチン単独群は33%の生存率であった。このワクチンが強力な成人ワクチンとなることが示唆された。

I. はじめに

いまだに世界の1/3の20億人が結核菌に感染し

ており、その中から毎年880万人の結核患者が発症し、200万人が毎年結核で死亡している、最大の感染症の一つである(WHOレポート2007年(図1))¹⁻⁴⁾。本邦でも1998年から結核罹患率の増加・横ばいが認められ、1999年“結核緊急事態宣言”が厚生省より出された。結核症に対する宿主の免疫

Estimated TB incidence rates, 2005

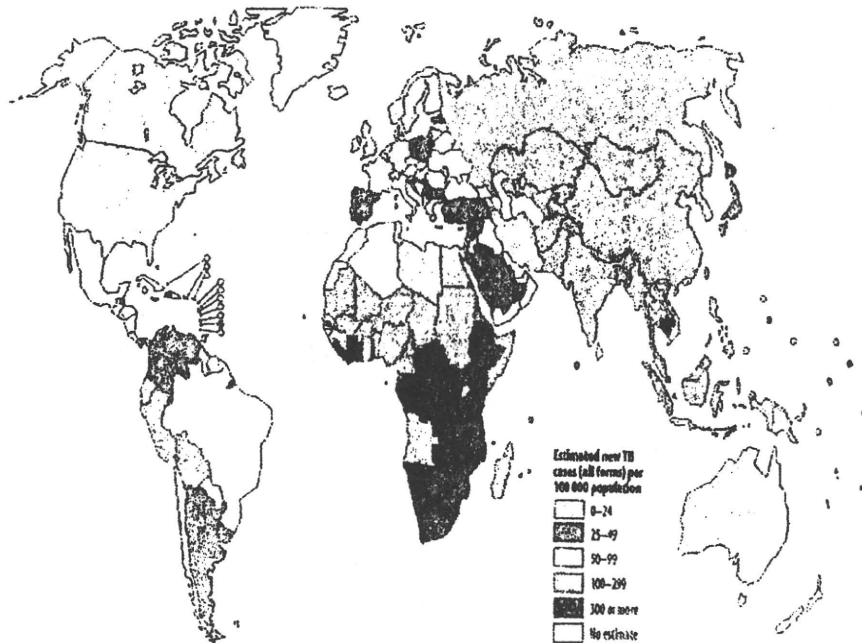


図 1

抵抗性は T 細胞性免疫といって過言ではない。特に獲得免疫（キラー T 細胞と Th1 ヘルパー T 細胞）が重要であり、最近では自然免疫の結核への関与が再び重要視されている。1998 年、米国 CDC は結核に対し、政府・学術機関・企業が一体となって新世代の結核ワクチン開発の必要性を強く主張する発表をした。又、ACET は国民の健康に対する大敵である結核撲滅のためには、BCG に代わる有効なワクチンが必要であることを示した。しかしながら、BCG に代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。我々は BCG よりもはるかに強力な DNA ワクチンやリコンビナント BCG ワクチンの開発に成功した。（表 1、図 2）⁵⁻⁸⁾新しい抗結核ワクチン開発と結核感染免疫におけるキラー T の機能解明についても述べる^{9,10)}。

II. 結核と免疫

1. 自然免疫と結核

1) マクロファージ (Mφ)

結核菌の増殖場所は Mφ 内である。一方、Mφ は異物貪食能と細胞内殺菌能及び抗原提示能をもつ。したがって結核菌が優位に立つか、ヒト（生体）が優位に立つかの戦争でもある。（詳細は岡田結核文献^{1,2)}参照）

2) Toll-like Receptor 及び Pathogen Recognition Receptor とマクロファージ・樹状細胞活性化

最近発見された Toll-like receptor (TLR) ファミリーが innate immunity の重要な役割を果たしている¹¹⁾。

TLR (TLR1~TLR10) はそのリガンドによって大きく 3 つに分類される。

このうち菌体膜由来の糖脂質を認識する TLR としては、TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR9 である。

結核菌の cell wall (LAM, mAGP, total lipid) による応答は TLR2 を介する。一方、結核生菌に対する反応には TLR2 と TLR4 が必要である。病原株の *M. tuberculosis* 由来の Man LAM は Mφ を活性化しないが、非病原性の抗酸菌は異なる glycolipid Ara LAM よりなり、これは TLR2 を介して Mφ を活性化する。この差が発病の差となる可能性もある。結核菌体成分 19kDa の lipoprotein が TLR2 を介して Mφ を活性化する。また、抗酸菌 DNA から見いだされた CpG モチーフ（パリンドローム配列）は感染防御免疫能増強することが示されていたが、CpG レセプターに対する TLR9 が審良らによりクローニングされた。

TLR2 の場合、細胞内領域の 2 つの変異 (Arg753Gln と Arg677Trp) が認められ、Arg753Gln

表1 新しい結核ワクチンの開発

(1) DNA ワクチン HV J-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA	BCG より有効 (マウス, モルモット, カニクイザル)
(2) DNA ワクチン HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNA	BCG よりはるかに有効 (マウス)
(3) リコンビナント BCG ワクチン ①リコンビナント 72f BCG ②リコンビナント (Ag85A+85B+MPB51) BCG	BCG より有効 (マウス, モルモット, カニクイザル) BCG より有効 (マウス)
(4) 治療ワクチン IL-6 related DNA (マウス)	
(5) Priming-Booster Method BCG (priming) + 新しいワクチン (booster) (カニクイザル)	
(6) 遺伝子ノックアウト attenuated リステリアを用いた新しい結核ワクチン (経口)	
(7) 新しいベクター AAV ベクター (1000 倍発現効率↑), Adenovirus ベクター	

→WHO STOP TB Partnership 及び WHO STOP TB Vaccines Working Group に選出

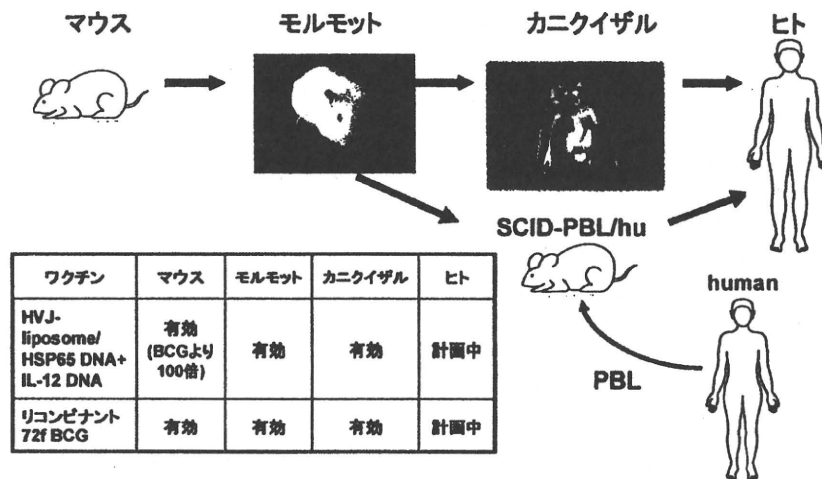


図2 新しい結核ワクチンの開発

は敗血症にかかりやすく, Arg677Trp はアジア人において *M. leprae* による結節性ハンセン症と関連している。

TLR はそれぞれ病原微生物由来の構成成分を認識する。TLR シグナルを介するシグナル伝達経路には MyD88 を介する MyD88 依存的経路と MyD88 を介さない MyD88 非依存的経路の 2 つが存在する。主に前者は全ての TLR を介した炎症性サイトカインの産生を, 後者は主に TLR3・TLR4 を介したインターフェロン (IFN) および IFN 誘導性遺伝子群の産生を担う。

この MyD88 非依存的経路を担うアダプター分子が TRIF である。TRIF が TLR3 と TLR4 の MyD88 非依存的経路に共有されているのに対し, TRAM は MyD88 非依存的 (TRIF 依存的) 経路を

TLR4 シグナルに特異的にだけ与えるアダプター分子である。また, TIRAP はすべての TLR に共有された MyD88 依存的経路を, TLR1/2/6 と TLR4 シグナル特異的に与える役割をもつ。竹田らは TRIF(-/-) × MyD88(-/-) ダブルノックアウトマウスを用い, 結核菌に対する易感染性を解析しつつある。

TLR 以外にも PRR (pathogen recognition receptor) として DC-SIGN, NOD ファミリー, マンノース受容体, スカベンジャー受容体, dectin-1 があげられる。HIV や *M. tuberculosis* は DC-SIGN に結合して樹状細胞に入り込むが, その際, その TLR による自然免疫機構の活性化を抑制し, これらの病原体の生存を有利にする機構が働いていることが示された。NOD1, NOD2 を中心とする CARD ファ

ミリーの分子は、膜貫通領域をもたず、細胞質蛋白として存在する。NOD2は、古くより菌体由来の免疫調整物質として知られていたPGNの構成成分であるムラミルジペプチド(MDP)を認識することが示された。

III. キラーT細胞と結核免疫

1. キラーT細胞(CD8⁺T細胞)

CD8あるいはβ₂ミクログロブリン遺伝子やTAP遺伝子ノックアウトマウスでは抗結核免疫が十分でなく、動物は死亡する。すなわち、結核におけるCD8⁺T細胞はマウスで抗結核免疫に重要である(図3)^{3,12-17)}。

キラーTの一つの役割としてIFN-γを分泌して抗結核免疫に寄与するが、次に述べる結核感染Mφを殺して、結核菌の増殖の場をなくし結核菌を殺す役割の方が重要である。CD8⁺T細胞が結核菌で感染したMφをFas-independent, granule-dependentの機構で溶かし、最終的には結核菌を殺すことが報告されている。このT細胞はCD1-restrictedでミコール酸, LAM, phosphatidyl inositol mannoside, glucose monomycolate, isoprenoid glycolipid (Cd1cと結合)等の結核菌lipidとlipoglycanを認識する。このキラーTの顆粒内の蛋白であるgranulysinは直接細胞外の結核菌を殺す。この機序は結核菌細胞膜を不完全な状態にすることによる。granulysinは

病原細菌, 真菌, 寄生虫の生存を減少させる。さらにパーフォリンとの共存下でMφ内の結核菌も殺すと考えられている。これはパーフォリンよりMφに穴が開き, Mφ内の結核菌に直接granulysinが作用するためと思われる。我々は結核患者, 特に多剤耐性結核患者ではキラーTリンパ球のmRNAの発現及び蛋白の発現が低下していることを明らかにした^{5,7)}。すなわち, 我々はキラーT細胞のgranulysin(分子量9000)産生低下が多剤耐性結核発症と大きな関連があるのではないかと考えている。一方, キラーTのTRAILとパーフォリンが抗結核免疫に重要である興味深い結果を得た(図3)。

一方, MHCクラスI拘束性の結核菌の38kDa蛋白, HSP65蛋白を認識するマウスCD8⁺キラーTや19kDa蛋白, Ag85, CFP10(Mtb11)を認識するヒトCD8⁺キラーTが報告されている。ESAT-6抗原に対するキラーTでHLA-A2とは82~90位の9個のアミノ酸AMASTEAGNV, が結合してキラーT細胞がこれらを認識する。我々は世界に先駆けて確立した, ヒト生体内結核免疫応答解析モデルSCID-PBL/huに, このESAT-6ペプチドを投与し, これに特異的でHLA-A2拘束性を示すヒトキラーTを生体内で誘導することに初めて成功した。

2. キラーT細胞分化とサイトカイン(キラーT細胞分化因子)

筆者らはCD8⁺キラーT細胞(Tc)の誘導にはヘルパーT細胞(Th細胞)から産生されるサイトカインが必要であることをはじめて明らかにした。クラスII抗原を認識しキラーT細胞分化因子を産生するTh細胞はCD4⁺CD8⁻であり, クラスI抗原を認識しキラーT細胞分化因子を産生するTh細胞はCD8⁺である。また, モノクローナル抗IL-2抗体を用いて, IL-2はキラーT細胞誘導に必須な因子の一つであることを示した¹⁴⁾(図4)。

さらに, IL-2とは異なるサイトカインもT細胞分化誘導に必要であることをキラーT細胞分化因子を産生するヒトT細胞ハイブリドーマ, およびIL-2依存性ヒトThクローンを世界に先駆けて確立し明らかにした。その解析の結果, IL-6, IFN-γがキラーT細胞分化因子として強力なキラーT分化を誘導することを明らかにした^{16,17)}。筆者らはIL-6がTc誘導の後期の分化段階に作用することを解明した¹⁷⁾(図4)。多剤耐性結核患者PBLにおい

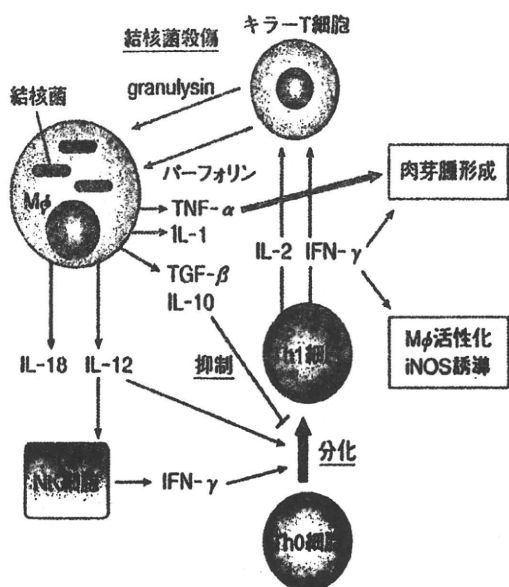


図3 抗結核免疫とマクロファージ, ヘルパーT, キラーT細胞活性化

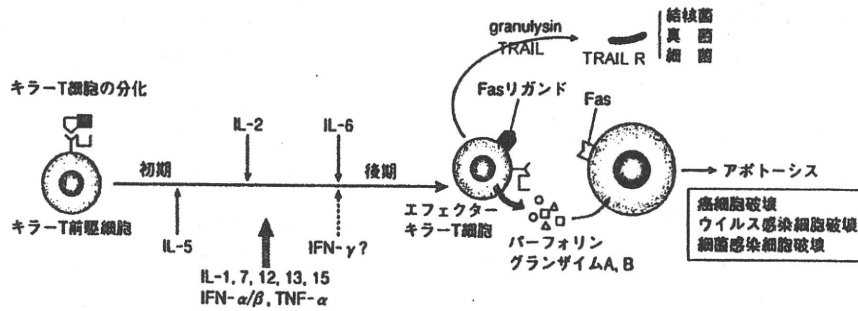


図4 キラー T 細胞活性化と細胞傷害機構

表2 新しい結核ワクチン

1. サブユニットワクチン
 - Mtb 72f fusion 蛋白
 - 8.5B-ESAT6 fusion 蛋白
 - α 抗原 (Antigen 85B), Ag 85A, MPB51, ESAT-6, Hsp65
 - 19Kd lipoprotein
 - リコンビナントサイトカイン (吸入・注射) (γ -IFN, など)
 - 新しい結核蛋白抗原等 Mtb8.8, Mtb9.9, Mtb32, Mtb39, Mtb11
2. DNA ワクチン
 - Hsp65 DNA, IL-12 遺伝子, Hsp70 DNA, ESAT-6 DNA, IL-6 遺伝子, IL-6 遺伝子+IL-6 レセプター遺伝子+gp130 遺伝子, γ -IFN 遺伝子, Mtb72f 遺伝子, IL-15 遺伝子, IL-18 遺伝子, M-CSF 遺伝子, 38kd DNA, キラー T 誘導蛋白遺伝子, CD40L, 遺伝子, MPT64 DNA, MPT63 DNA, Kat G DNA, 上記の新しい結核蛋白抗原遺伝子
3. リコンビナント BCG ワクチン
 - ① Mtb 72f 遺伝子
 - ② Antigen 85A-, 85B-, 85C-, MPB51-遺伝子, MDP-1 遺伝子, ESAT-6 遺伝子, HSP65 遺伝子
 - ③ IL-6 遺伝子, γ -IFN 遺伝子, IL-2 遺伝子, IL-12 遺伝子, IL-18 遺伝子
 - ④ キラー T 誘導結核蛋白遺伝子
4. attenuated 結核菌
 - attenuated サルモネラ菌に結核免疫増強 DNA 導入
 - attenuated リステリア菌に結核免疫増強 DNA 導入
5. キラー T 細胞移入

て、これらのキラー T 細胞分化因子すなわち IL-2, IFN- γ , IL-6 の著明な低下を認めた^{5,6,8-10}。また、糖尿病合併難治性結核患者では PPD 特異的キラー T の分化誘導の著しい低下を明らかにした^{5,6,8-10}。

3. サイトカインと結核免疫

抗結核免疫に IFN- γ , TNF α , IL-6, IL-12 が重要であることは解析されている(岡田結核文献⁹参照)。

IV. BCG ワクチン

1. 生菌ワクチン菌株としての BCG

1) BCG の発見

Pasteur 研究所の Calmette と Guerin は、Pasteur の弱毒生菌免疫論を背景に、胆汁によって結核菌を処理すると弱毒化するという知見から、13年間 230

代継代培養し、1921年、動物に病原性のない菌株 BCG (Bacille de Calmette et Guerin: BCG): *Mycobacterium bovis* strain BCG を得た。現在世界で年間約 1 億人に BCG が接種されている²⁾。

2) わが国における BCG の導入と経過

志賀潔は、大正 14 年 (1925)、パスツール研究所から BCG 株を持ち帰った。その後、特に今村ら (大阪大学) によって BCG の動物実験、人体接種が熱心に行われた。

1942 年から集団接種が行われ、現在、Tokyo172 株 (BCG Japan) (1960 年にそれまで胆汁加馬鈴薯培地で継代されていた第 172 代の株) を凍結乾燥させ、primary seed lot (種菌株) としてのものをワクチンとして用いている。

3) BCGの種類と遺伝子変異

BCGの原株はパスツール研究所由来であるが、世界各国に広まり継代されていく間に少し異なる性質となった。世界各国で固有の名称がつけられた代表的なBCG株につき、主にIS6110とmpt64をマーカーにして検べた結果、日本株やロシア株は2コピーのIS6110とmpt64を有する点でBCG原株に近く、Denmark (Copenhagen) 株やGlaxo株などは1コピーのIS6110, mpt64(-)で原株とは異なる。すでに報告された*M. tuberculosis* H37Rv株ゲノムの全配列を基準に、*M. bovis*やBCGの違いをDNAマイクロアレイで調べた最近の報告によれば、少なくとも11の領域(RD: Deletion Regions)が*M. bovis*にはみられず、さらに*M. bovis*にはみられる5つの領域が大半のBCGでは欠失している。

最近(2004年)これらの種々のBCG菌株を同一基準で比較検討し、再評価する方向性を示す会議及び新しい結核ワクチンの開発研究、臨床応用への方向性の会議がWHOによりなされた(WHO U. Fruth, 近畿中央胸部疾患センター 岡田全司, Staten 研究所 P. Andersen, 米国FDA M. Brennan, 米国CDC M. F. Iademarcoら)。

4) BCGの有効性

BCGワクチンの評価は困難である。結核が地球規模での脅威であり、他に何ら予防法も治療法も確立されていなかった70年以上も前から広範に用いられ、多くの先進国ではその導入と結核の減少に平行関係がみられたこと、安全なワクチンであることより、感染予防効果に厳密な疫学的証拠があるか否かが明確でないままに、長年用いられてきたことがその理由である。

1940年代後半からBCGの結核予防効果に関する野外調査の報告がみられる(表3)¹⁰⁾。特に10万人を超す南インド農民を対象として実施された大規模なcontrolled trial (Chingleput study)では、全く有効性が否定される結果となった。この結果を元にWHOはBCGワクチンは成人の結核に無効であると世界中に勧告した。日本もWHOの勧告に従った。高緯度地域に比べ低緯度地域では一般的にBCGの効果が低い傾向が1950年代から指摘されており、高温帯に多い非結核性抗酸菌による自然感作が関係するのではないかといった推測や、用いたBCG中の生菌の割合の違いによる効果の低さなどが推定されている。一方、小児における結核性髄膜炎や粟粒結核など播種性のものには十分な予防効果がある。動物実験では、少なくとも静脈内接種感染(血行播種モデル)に対して極めて高い菌数増殖抑制効果が得られる。

V. 新しい結核ワクチン開発

1. BCGワクチンより1万倍強力な結核予防ワクチン

BCGワクチンより1万倍強力な結核予防ワクチンを開発:我々国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センターが、画期的な結核の新しいワクチンを開発した。マウスの実験で現行のBCGワクチンを超える極めて強力な有効性(1万倍の効果)を確認した。マウスの結核感染系ではBCGワクチンをはるかに凌駕する新しい結核ワクチンは極めて少ない。我々はHSP65 DNA + IL-12 DNA (HVJ-エンペローブベクター)のワクチンはBCGワクチンよりも1万倍強力な結核予防ワクチンであること

表3 BCG接種の結核防御効果に関する主要野外調査成績

調査地域	調査年	対象例数		結核発症者数		防御率 %
		対象群	BCG群	対象群	BCG群	
カナダ	1949	303	306	29	6	80
北アメリカ	1958	1,451	1,541	372	108	75
南アフリカ	1968	17,135	20,623	74	48	37
米国	1969	2,341	2,398	3	5	0
インド (Madanapalle)	1973	5,808	5,069	46	28	31
ハイチ	1973	629	2,545	15	25	80
プエルトリコ	1974	27,338	50,634	141	186	31
米国	1976	17,854	16,913	32	26	14
米国	1977	12,867	13,958	93	56	77
インド (Chingleput)	1980	79,398	272,455	93	192	0

(文献10)より引用)

を世界に先駆けて明らかにした。このワクチンでマウスを免疫して結核菌を投与すると、マウス肺の結核菌数が BCG ワクチン投与の 1 万分の 1 以下となった。これを 1 万倍強力という。これらの研究が国内外より極めて高く評価され当臨床研究センターは WHO (世界保健機関) より WHO STOP TB Partnership に選ばれた (表 1)。また、大阪大学大学院 (医学系研究科)・連携大学院にも選ばれた。

2. 新しい結核ワクチン

結核ワクチンは①サブユニットワクチン、② DNA ワクチン、③リコンビナント BCG ワクチン (弱毒化結核菌を含む)、その他に大別される (表 2)。

マウスでは BCG ワクチンをはるかに凌駕する新しい結核ワクチンは極めて少ない。われわれは HSP65 DNA + IL-12 DNA 予防ワクチンにて BCG ワクチンの 100 倍強力なワクチンの開発に成功した (表 1, 図 2)^{6,7,9,18)}。

1) DNA ワクチン

われわれは IL-12 DNA + HSP65 DNA のワクチンが相乗効果を示し、gene gun を用いた遺伝子投与で BCG よりも極めて強力な (約 100 倍) 結核予防ワクチンであることを明らかにした (自治医科大学吉田博士との共同研究)。IL-12 の p35 および p40 を CMV プロモーター下流域に挿入した発現プラスミドを作製した。さらに、ヒト型結核菌 H37RV 由来 HSP65 DNA ワクチンの作製に成功した (表 1)¹⁸⁾。

HVJ リポソームをベクターに用いた場合、HSP65 DNA 単独 (HVJ リポソーム/HSP65) で BCG よりも有効であることをマウスの系で明らかにした (大阪大学医学部金田博士との共同研究) (図 2, 図 5)。

さらに、HSP65 DNA と IL-12 DNA 両者の DNA ワクチンを投与した、HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンマウスでは、BCG 東京ワクチンマウスの肺、肝、脾の結核菌数の 100 倍以上の減少が認められた。すなわち、HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは BCG に比較して 100 倍以上強力な結核予防ワクチン効果を示した (図 5)。さらに、この HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは HSP65 タンパク抗原に対する脾リンパ球増殖反応を著明に増幅した (BCG ワクチンよりはるかに強い増殖反応)。また、KS-Elispot Assay 自動計測器 (ELISA Assay の 200 倍以上の感度) を用いて、HSP65 DNA + IL-

12 DNA ワクチンは脾臓の IFN- γ 産生細胞数の増強と IFN- γ 産生細胞の著しい分化増強を誘導することを明らかにした¹⁸⁾。

さらに、結核菌に対する CD8 陽性キラー T 細胞の分化誘導を増強した。また、結核菌抗原の主要な抗原タンパクである HSP65 タンパク抗原に対する CD8 陽性キラー T 細胞の分化誘導を著明に増強した。一方、BCG ワクチンは結核菌に対するキラー T 細胞や HSP65 タンパクに対するキラー T 細胞誘導活性はほとんど認められなかった (図 5)¹⁸⁾。

このように、HVJ-リポソーム/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは結核菌に対するキラー T 細胞分化誘導、IFN- γ 産生細胞分化誘導、T 細胞増殖反応増強を介して、BCG ワクチンより 100 倍以上強力な結核予防ワクチン効果を発揮することが示された^{6,7,9)}。

アデノウイルスベクターに導入した IL-6 関連遺伝子 (IL-6 遺伝子 + IL-6 レセプター遺伝子 + gp130 遺伝子) ワクチンは、BCG よりも強力な治療ワクチン効果を示した。

以上のワクチン効果は、キラー T 細胞や Th1 細胞の分化誘導を増強することによって発揮されることが示された (図 6)。

新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され、WHO STOP TB VACCINE GROUP MEETING に選出された。

一方、Huygen らは、Ag85A の DNA ワクチンを用い、マウスで抗原特異的キラー T 細胞 (CTL) が誘導されることや、BCG 免疫と同等の防御効果が得られることを明らかにした。

2) リコンビナント BCG ワクチン

結核菌は 300 種以上のタンパク質を分泌するが、 α 抗原 Ag 85B とそのファミリー (85A, Ag85C) DNA をリコンビナント BCG に使用した^{2,5)}。

これらの遺伝子を PNN2 ショットルベクター (大腸菌⇔好酸菌) に組み込み BCG 東京菌に、遺伝子を導入した。われわれは BA51 (Ag85A + Ag85B + MPB51) リコンビナント BCG は BCG よりも強力なワクチンであることを静脈感染の系及び気道感染の系で明らかにした^{6,7,9)}。さらに最近、サブユニットワクチンの Mtb72f 融合タンパク質の¹⁹⁾ DNA を導入した 72f リコンビナント BCG の作製に成功した。この 72f rBCG は BA51 rBCG と同程度の極めて強力な結核菌に特異的な IFN- γ 産生 T 細胞数の増強を誘導することを Elispot Assay で明らかにし

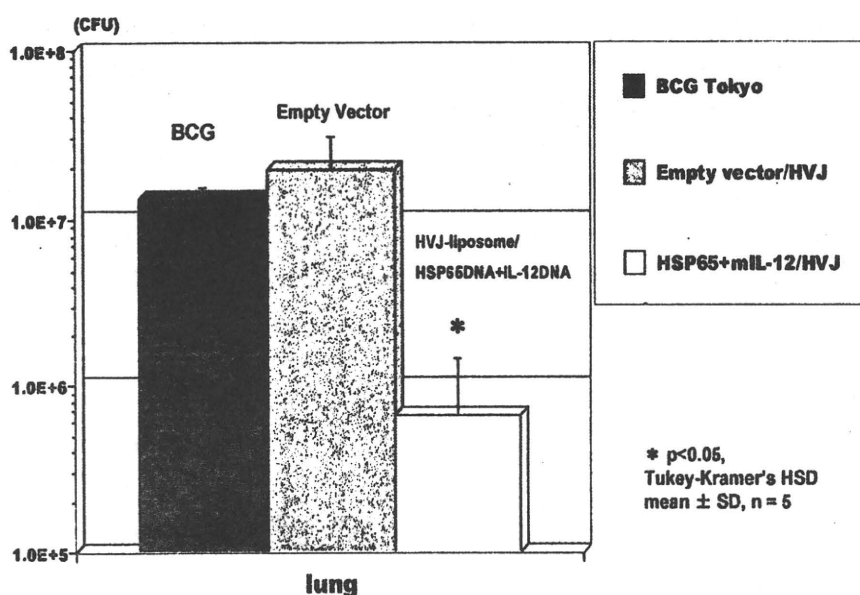


図5 Prophylactic efficacy of HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine in TB-infected mice (5weeks after TB infection) Number of *M. tuberculosis*

た。

3) 遺伝子ノックアウト attenuated (弱毒化) 菌体を用いた結核ワクチン

ある結核菌遺伝子を欠失させて弱毒化した結核菌をワクチンにする方法がある。我々は(浜松医大 小出教授と)さらに, akt 遺伝子を欠失させた無毒化リステリア菌に Ag85A-, 85BB-, MPB51-DNA を導入し新しい結核ワクチンを開発した。このワクチンは経口ワクチンとして応用できる利点がある⁹⁾。

4) 我々が開発した, 新しい結核ワクチン

新ワクチンは, 前述の如く, 結核菌の HSP65 というたんぱく質と免疫力を高める働きのあるインターロイキン-12 を作る遺伝子 (DNA) を注射する DNA ワクチンと呼ばれるものである。HVJ ウイルスの殻を利用して DNA を体内の細胞内に送り込んでこれらのたんぱく質を作らせ, 強い免疫反応の誘導を狙った。この新しいワクチンは結核免疫に最も重要と考えられている (結核菌に対する) CD8 陽性キラー T 細胞の分化を増強した。さらに IFN- γ 産生 T 細胞の分化を増強した。

マウスの実験系: マウスに新ワクチンを接種した後, 結核菌を感染させ, 5週間後の結核菌の数を調べた。すると, 新ワクチンを接種したマウスの菌数は BCG 接種のマウスの約 1 千分の 1 で発症を抑えられる程度だった。さらに, あらかじめ BCG を接種してから新ワクチンを打つと, 菌数は約 1 万分の 1 まで抑えられていた。

3. 新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID-PBL/hu

われわれが世界に先駆けて開発した SCID-PBL/hu の系で結核患者リンパ球を SCID マウスに生着させ, 結核菌タンパク質に特異的なヒトキラー T 細胞誘導を示す画期的な, 生体内ヒト免疫解析モデル (ヒト結核ワクチン効果解析モデル) を開発した^{6,7,9)}。

VI. 結核ワクチンの展望

1. 新しい結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル (cynomolgus monkey, 最もヒトの肺結核に近いモデル, Nature Medicine 2, 430, 1996 参照) を使い BCG よりもはるかに強力な予防ワクチン効果 (生存率, 血沈, 体重, 肺の組織) を示すワクチン二種を開発した⁸⁾。すなわち, 現在最も有力なものとして HVJ リポソーム/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン及び, r72f BCG ワクチンがあげられる (図 2)。すなわち, カニクイザルに 3 回ワクチン投与を 3 週間隔で行った。最終免疫より, 4 週間後にヒト結核菌エルドマン株 5×10^2 CFU を気道内注入した。事実, カニクイザルで結核感染後 1 年で, コントロール群 (生食投与群) では 4 匹中 4 匹死亡 (0% 生存)。HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン投与群は, 4 匹中 2 匹生存 (50% 生存), r72f BCG ワクチンで 4 匹中 3 匹生存 (75% 生存), 生存を認め, これらのワクチン効果をサルレベル