

## ベトナム多剤耐性結核の宿主要因に関する研究

研究分担者 慶長 直人 国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部長  
研究協力者 土方美奈子 同ウイルス性呼吸器疾患研究室長

### 研究要旨

ホーチミン市のファムゴックタック病院は、ベトナム南部の結核拠点病院である。多剤耐性結核についての共同研究として、多剤耐性結核の発生に関わる宿主側の要因を検討すべく、研究プロトコルを作成し、断面研究を実施した。58 名の多剤耐性結核患者について、抗結核剤代謝に関連する宿主側遺伝子 *NAT2* の検討を行った。*NAT2* 遺伝子型は、他の東南アジア集団における報告と同様、イソニアジド迅速代謝型 (F) と代謝遅延型 (S) の割合は、ほぼ 1 : 1 であり、日本韓国など東アジア集団よりは、遅延型 (S) が多く、ヨーロッパ集団よりは遅延型 (S) が少なかった。多剤耐性結核で遅延型 (S) がより少ない傾向を示す結果が得られたが、対照集団の遺伝子型分布の偏位、検出力の問題が残り、今回の結果は、今後、より大規模な研究で確認する必要がある。

### A. 研究目的

わが国では、居住している外国人のうち、アジア人が全体の 70%以上を占めるため、アジア人の結核対策が外国人結核対策に重要である。日本人の結核発症者の中で、多剤耐性結核の頻度は低いものの、外国人では数%以上の頻度で多剤耐性結核が認められる。したがって、外国人結核対策が、今後、わが国の多剤耐性結核対策の重要な部分を占める可能性が懸念されている。増加するアジア人の多剤耐性結核の発症素因を明らかにすることは、わが国を含むアジア全体の、多剤耐性結核対策に貢献するものと期待される。

これまで我々は東南アジア諸国において、結核に関する国際共同研究をおこなってきた。多剤耐性結核の発生は、不適切な治療により、結核菌ゲノムの中の薬剤効果に関連する遺伝子に変異が生じ、増殖することが最も重要なメカニズムとして知られており、結核医療に関わる人為的要因や制度上の問題が一義的であるが、その背景となる宿主側の免疫応答、薬剤代謝能なども関与しているものと推測される。そこで、本研究では、ベトナム人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ことを目的としている。

### B. 研究方法

ベトナム南部のホーチミン市にあるファムゴックタック病院は、ベトナム国内南北 2 カ所の薬剤感受性検査を実施する結核レファランスセンターのうち、ベトナム南部の結核対策の責任病院であり、本研究班において初めて我が国から共同研究を申し入れ、受諾された。研究プロトコルを作成し、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ことを目的として、研究を実施した。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。外来通院中の多剤耐性結核患者 58 名から研究参加の同意を得て、血液サンプルを収集し、DNA を抽出した。

本年度は、*NAT2* 遺伝子タイピングを実施した。

#### (倫理面への配慮)

実際の患者検体を用いたゲノム解析は、両国の指針 (我が国では、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針) に準拠して、事前にプロトコルは、両国の倫理委員会の承認を得た上で実施した。

### C. 研究結果

大規模なコホート研究は、本研究班の3年間の枠組みでは困難なため、断面研究に近い小規模な研究デザインとならざるを得なかった。本年度は、特に抗結核剤の代謝と深く関係する *NAT2* 遺伝子についてその特徴的な遺伝子変異と遺伝子頻度の解析を試みた。

*NAT2* 遺伝子は多型性に富み、20以上の対立遺伝子型を有するが、その中で特にイソニアジドを迅速に代謝する迅速代謝型 (F) と代謝遅延型 (S) は、主に3つの非同義置換 341T>C (rs1801280)、590G>A (rs1799930)、857G>A (rs1799931)によって決定されている。

これらの SNP の遺伝子タイピングの結果、ベトナム人の *NAT2* 遺伝子型は、他の東南アジア集団における報告と同様、イソニアジド迅速代謝型 (F) と代謝遅延型 (S) の割合は、ほぼ 1:1 であり、日本韓国など東アジア集団よりは、遅延型 (S) が多く、ヨーロッパ集団よりは遅延型 (S) が少なかった。

多剤耐性結核では、表1に示すように、対照集団より、遅延型 (S) がより少ない傾向を示す結果が得られたが、対照集団の遺伝子型分布の偏位、検出力の問題が未解決で残っており、今後、より大規模な研究で、この結果を確認する必要がある。

### D. 考察

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、初めてアプローチを実施している。本年度検討した *NAT2* 遺伝子の遺伝子型は、これまでイソニアジドによる肝障害が遅延代謝型 (S) に多いことが報告されてきたが、薬剤動態研究の結果により、迅速代謝型 (F) では不十分な治療により、イソニアジドの濃度が十分に上がらない可能性が強く疑われる。しかし、これまで知る限り、多剤耐性結核と *NAT2* 遺伝子型との関連解析については、十分な報告が無いため、今後、さらに検討を進め、この問題を明らかにする必要がある。

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、迅速に研究を実施することができたことは、

表1 ベトナムにおける多剤耐性結核の *NAT2* 遺伝子型から推測されるイソニアジド迅速代謝型 (F) と代謝遅延型 (S) の分布

### *NAT2* fast/slow alleles in MDR-TB in Viet Nam

Genotype	Activity	MDR-TB (n=58)		HC (n=111)		P-value	Fisher
		Count	Percentage	Count	Percentage		
Fast	Fast	12	20.7%	31	27.9%	0.025	2x3
Inter-mediate	Inter-mediate	35	60.3%	43*	38.7%		
Slow	Slow	11	19.0%	37	33.3%		
Allele	Fast	59	0.509	105	0.473	0.567	2x2
	Slow	57	0.491	117	0.527		

\* HC did not follow Hardy-Weinberg Equilibrium

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である。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期待される

### E. 結論

わが国の外国人登録者数は、アジア人が全体の70%以上を占め、今後、日本人の結核罹患率の低下に伴い、相対的にアジア人の結核対策が重要である。アジア人集団の多剤耐性結核発症に関する臨床疫学情報、宿主側の発症素因をとらえ、アジア全体の結核対策へ反映させるよう提言し、多剤耐性結核対策に貢献すべく研究を進めたい。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 書籍
- 2) 雑誌

1. Hang NT, Lien LT, Kobayashi N, Shimbo T, Sakurada S, Thuong PH, Hong LT, Tam DB, Hijikata M, Matsushita I, Hung NV, Higuchi K, Harada N, Keicho N. Analysis of factors lowering sensitivity of interferon-gamma release assay for

- tuberculosis. PLoS One 6 (8): e23806, 2011.
2. Kobayashi K, Yuliwulandari R, Yanai H, Lien LT, Hang NT, Hijikata M, Keicho N, Tokunaga K. Association of CD209 polymorphisms with tuberculosis in an Indonesian population. Hum Immunol 72 (9): 741-5, 2011.
3. Pitabut N, Mahasirimongkol S, Yanai H, Ridruechai C, Sakurada S, Dhepakson P, Kantipong P, Piyaworawong S, Moolphate S, Hansudewechakul C, Yamada N, Keicho N, Okada M, Khusmith S. Decreased granulysin and increased interferon-gamma levels in plasma of patients with newly diagnosed and relapse tuberculosis. Microbiol Immunol 55 (8): 565-73, 2011.
4. Ridruechai C, Sakurada S, Yanai H, Yamada N, Kantipong P, Piyaworawong S, Dhepakson P, Khusmith S, Keicho N. Association between circulating full-length osteopontin and IFN-gamma with disease status of tuberculosis and response to successful treatment. Southeast Asian J Trop Med Public Health 42 (4): 876-889, 2011.
5. Tanaka T, Sakurada S, Kano K, Takahashi E, Yasuda K, Hirano H, Kaburagi Y, Kobayashi N, Hang N, Lien L, Matsushita I, Hijikata M, Uchida T, Keicho N. Identification of tuberculosis-associated proteins in whole blood supernatant. BMC Infect Dis.;11 (1): 71, 2011.
6. Hijikata M, Shojima J, Matsushita I, Tokunaga K, Ohashi J, Hang NTL, Horie T, Sakurada S, Hoang NP, Thuong PH, Lien LT, Keicho N. Association of IFNGR2 gene polymorphisms with pulmonary tuberculosis among the Vietnamese. Hum Genet, in press.

# HIV 合併結核の病態に関する研究

研究分担者 櫻田紳策 国立国際医療研究センター

呼吸器疾患研究部細菌性呼吸器疾患研究室 室長

## 研究要旨

①ベトナムのハノイ肺病院と血液学・輸血研究所との連携研究を立ち上げ、ベトナムにおける HIV 合併結核の病態とグラニューリシンの関連についての臨床研究開始に向けて準備を行った。平成 24 年 3 月 17 日にハノイ市において倫理審査があり、一部条件付きで承認された。②HIV 合併結核患者病理組織標本を用いた研究では、国立病院機構東京病院永井英明医師、蛇澤晶医師との共同研究を立ち上げた。双方の施設で倫理承認を得た。③国立国際医療研究センター・エイズ治療開発センターにおける HIV 合併結核患者血漿・血清検体を用いて、グラニューリシン濃度の測定の準備を行った。倫理申請中。④HIV 感染が活性型ビタミン D によるマクロファージの活性化機構に与える影響を検討することを試みた。共同研究相手のタイ NIH が昨年 10 月以降洪水の影響を受けたため中断された。

## A. 研究目的

HIV 感染症と結核はともに世界主要感染症であり、合併症はアジア・アフリカ地域において公衆衛生上深刻な問題となっている。グラニューリシンは、NK 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、キラーT 細胞等の細胞溶解性顆粒に含まれるエフェクター分子で、強力な抗菌活性を持つと同時に細胞死を誘導し、組織障害にも関わっていると考えられる。

結核においては、進行例では有意に血漿グラニューリシン濃度が低下することが報告されている。本研究では、HIV 合併結核患者病理組織標本を用いた免疫組織染色による組織レベルのグラニューリシン発現の検討を行うとともに、ベトナム人患者血液検体（血液細胞、血漿、血清）を用いて、HIV 合併結核の病態とグラニューリシンとの関連について明らかにすることを計画し、研究実施に向けて準備・調整を行う。同時にタイにおける先行研究において HIV 合併結核例が 6 例と僅少であったことから、確認のためわが国における HIV 合併結核例を集め、血漿ないしは血清中のグラニューリシン濃度を測定する。

HIV 合併結核の劇症さや重篤さに関しては、単球・マクロファージ系細胞の機能障害も関与しているのではないかという観点から、HIV 感染が活性型ビタミン D (25OHD<sub>3</sub>)によるマクロ

ファージの活性化機構に与える影響を検討するため、タイ NIH との共同研究を開始する。

## B. 研究方法

①本研究では、ベトナムのハノイ肺病院と血液学・輸血研究所との連携研究を立ち上げ、ベトナム人血液検体を用いたフローサイトメトリーによる末梢血における細胞内グラニューリシンの発現分布の検討と血漿（血清）中グラニューリシン濃度の ELISA による測定を行う。研究対象は、HIV 合併結核（ART 無し）、HIV 陰性結核、HIV 感染者 ART 無し、及び有り、健常ドナーについて、各群 20～30 例を対象として、HIV 合併結核では結核発症時（結核治療直前）、ART 導入時、結核治療終了時の三点で採血を実施し、HIV 合併結核の病態とグラニューリシンとの関連について検討する。

②HIV 合併結核患者病理組織標本を用いた研究では、国立病院機構東京病院永井英明医師、蛇澤晶医師との共同研究により、標本としては、正常肺組織（陰性対照）1～2 例、NK 細胞悪性リンパ腫または扁桃（陽性対照）1～2 例 肺結核及び肺外結核（リンパ節結核、肺粟粒結核、結核性胸膜炎及び髄膜結核）病変組織 HIV 合併結核 13 例、HIV 陰性結核 15 例、何れもホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、抗グラ

ニュリシン抗体と細胞表面マーカーに対する抗体を用いた多重染色を含む免疫組織染色を行う。

③国立国際医療研究センター・エイズ治療開発センターと呼吸器内科からの検体提供を受ける。HIV 陰性結核、HIV 合併結核、HIV(クオオンティフェロンテスト陰性)、健常ドナー各々20~25例の血漿ならびに血清中のグラニュリシン濃度をELISAにて測定する。倫理委員会からの承認を得た後、臨床疫学的情報をエイズ治療開発センターと呼吸器内科から得て、解析を実施する。

④タイ NIH の Panadda 上級研究員との共同研究で、同施設のBSL2ならびにBSL3実験室において、HIV 感染が25OHD<sub>3</sub>によるマクロファージの活性化機構に与える影響を検討する。健常者の末梢血から単球を分離し、M-CSFおよびGM-CSF存在下にそれぞれ分化したマクロファージを得る。濃度を振った25OHD<sub>3</sub>を培養上清に加えてBCG(MOI=3-5)を感染させ、6時間後と12時間後に全RNAを抽出する。Real-time PCRにてCYP27B1、IL-15、vitamin D receptor (VDR)、cathelicidinの遺伝子発現を検出する。さらに同様の系で、HIV-1を感染させたM-CSF分化マクロファージ(M-M $\phi$ ) (HIV感受性)を用いて同じ遺伝子の発現を検出し、比較検討する。

### C. 研究結果

①本研究実施のためのベトナム側施設に対する技術移転を行い、大部分終了した。倫理申請に関しては、国立国際医療研究センターの倫理委員会にて審査を終了し、平成23年11月9日一部修正によって承認された。ベトナムでは、平成24年3月17日一部文言の訂正を条件に承認された。平成24年度からは、患者登録が開始できる見込みである。

②HIV合併結核患者病理組織標本を用いた研究では、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、抗グラニュリシン抗体と細胞表面マーカーに対する抗体を用いた多重染色を含む免疫組織染色を行う計画である。この染色のための抗グラニュリシン抗体をすでに入手した。また、連結不可匿名化した剖検所見を含む標本の情報を東京病院から入手した。倫理に関しては、国立国際医療研究センター及び国立病院機構東京病院において倫理審査を行いそれぞれ平成23

年11月と平成24年1月に承認された。承認後、剖検時採血による13例の血清中のグラニュリシン濃度も測定したが、いずれも高値であった(mean 4.51 ng/ml (1.70-5.99))。

③国立国際医療研究センター・エイズ治療開発センターの青木孝弘医師等と同センター呼吸器科小林信之医長の協力を得て、HIV 陰性結核19例、HIV 合併結核20例、HIV(クオオンティフェロンテスト陰性)21例、健常ドナー26例の血漿(一部は血清)検体をすでに入手し、グラニュリシン濃度をELISA法により測定する予定である。倫理申請はすでに行っており、平成24年5月中に審査を受けることになる。

④M-M $\phi$ における25OHD<sub>3</sub>による活性化機構に対するHIV感染の影響を検討する研究を計画した。平成23年10月タイ NIHでHIVに感受性のあるM-M $\phi$ の培養に関する予備実験を行ったが、NIH近辺に洪水の被害が及んだため中断を余儀なくされた。本実験の継続を平成24年度に予定している。

### D. 考察

①タイにおける先行研究はパイロット研究であったため、フローサイトメトリーにおいても末梢血単核球の表面マーカーの解析はされたが、細胞内グラニュリシンの分布や発現レベルの検討はなされなかった。このため、HIV合併結核において、血漿グラニュリシン濃度の上昇に関与している細胞がいかなる種類の細胞であるか、明らかにはならなかった。また、結核およびHIVに対する化学療法によってグラニュリシン濃度がどのように変化するかに関しても十分なデータを得られなかった。ベトナムにおける研究において、これらの点を明らかにできると思われる。

②上述のような末梢血中を用いた研究では、結核病変組織における変化を直接見ることはできない。compartmentalizationが起きている場合、末梢血の所見が病変部の変化を正確に反映していることにはならない。末梢血を用いた研究を補足するため、組織レベルの研究が必要となる。今回の研究では、国立病院機構東京病院との共同研究で、HIV合併結核ホルマリン固定・パラフィン包埋組織標本における細胞内グラニュリシン発現の検討によって、結核病変組織からの情報を得られると考えている。但し、HE染色

において、多くの組織で高度且つ広範な壊死が観察されていることから、免疫組織染色自体が正常に行われえない可能性もある。

③タイにおける先行研究のサンプルサイズの少なさと対象者が100%タイ族であったことのエスニシティの偏りから、日本人検体における確認を行う必要性があった。

④先行するタイの研究から HIV 合併結核では、患者末梢血に比較的多くの CD8+ T 細胞が存在する例があること、血漿中 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-12 (p40)、IL-18、IP-10、オステオポンチン、CRP レベルが、HIV 陰性結核や HIV 感染に比較して、著明に上昇していることが明らかとなった。これらの結果から、HIV 合併結核では強い炎症が引き起こされ免疫系は活性化した状態にあることが示唆された。しかし、多くの剖検病理所見からは、結核病変組織内の結核菌の増殖・負荷は非常に大きく、結核菌が宿主免疫機構によって効率的に殺菌されてないことは明らかである。また結核病変組織における肉芽組織の形成は乏しく、しばしば高度で広範な壊死が見られる。こう言った HIV 合併結核の特徴の一部が HIV 感染によるマクロファージ活性化の障害に由来するという仮説に基づいて、本研究は開始された。25OHD<sub>3</sub> が十分な濃度に達していなくても、M-M $\phi$  は BCG を殺菌し、その際 CYP27B1 遺伝子が高発現し、一方 VDR と cathelicidin 遺伝子はほとんど発現しないことがすでに確認されている。今年度は、25OHD<sub>3</sub> の濃度の上昇によって各遺伝子の発現レベルがどのように変化するか、また HIV-1 を感染させた M-M $\phi$  では同様の条件で各遺伝子の発現が影響されるかどうか明らかにする予定である。

## E. 結論

HIV 合併結核は、炎症性サイトカイン、Th1 系サイトカイン、ケモカイン、グラニューロシンが大量に産生され、全身的に循環している状態と思われる。しかし、最も必要な結核菌殺菌はまったく行われていないか、非常に低いレベルでしか行われていない可能性が高い。その原因はいまだ明らかとなっていないが、HIV 感染に起因するものであると予想される。また、肉芽組織による結核菌の物理的封じ込めが十分になされず、逆に本来肉芽組織を形成するはずの免

疫細胞が大量に壊死に陥ることも原因の一つであると考えられる。

## F. 健康危険情報

割愛

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ridruechai C, Sakurada S, Yanai H, Yamada N, Katipong P, Piyaworawong S, Dhepakson P, Khusmith S, Keicho N. Association between circulating full-length osteopontin and IFN- $\gamma$  with disease status of tuberculosis and response to successful treatment. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 42: 876-889, 2011.
2. 「新たな結核バイオマーカーへのアプローチバイオマーカー研究の現状と展開」櫻田紳策、田中崇裕、慶長直人、化学療法の領域、27: 1479-1487, 2011

### 2. 学会発表

1. Pitabut N, Sakurada S, Keicho N, Okada M, Khusmith S, Cytolytic granule-associated protein in tuberculosis patients with or without HIV-co-infection in Northern Thailand, US-Japan Cooperative Medical Science Program, 44st Tuberculosis and Leprosy Research Conference.
2. 「結核及び HIV 合併結核患者末梢血単球由来マクロファージにおける活性型ビタミンD<sub>3</sub>遺伝子の発現についての検討」櫻田紳策、赤川清子、慶長直人:第 86 回日本結核病学会、東京、2011.
3. Differential regulation of osteopontin expression in human monocyte-derived macrophages induced by exogenous M-CSF and GM-CSF in vitro, Ridruechai C, Sakurada S, Tanaka T, Hijikata M, Akagawa K, Yamazaki T,

Keicho N. 第 10 回オステオポンチン研究会、札幌、2011.

4. Differential regulation of osteopontin expression in human monocyte-derived macrophages induced by exogenous M-CSF and GM-CSF in vitro. Shinsaku Sakurada, Chutharut Ridruechai, Kiyoko Akagawa Takahiro Tanaka, Minako Hijikata, Toshio Yamazaki, Srisin Khusmith and Naoto Keicho 第 40 回日本免疫学会、幕張メッセ (千葉)、2011.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当事項無し

##### 2. 実用新案登録

該当事項無し

# アジア諸国・日本の外国人多剤耐性結核患者 TLR・リポカリン2の反応性と治療ワクチン開発の研究

研究分担者 竹田 潔 大阪大学大学院医学系研究科 免疫制御学 教授

## 研究要旨

結核菌の病原性因子 ESAT-6 がマクロファージの機能におよぼす影響を解析した。ESAT-6 が会合する宿主分子を GST 融合タンパク質を用いたプルダウン法により解析した。その結果、従来から ESAT-6 と相互作用することが報告されている Toll-like receptor 2, MHC class I 分子とともに、貪食胞の成熟に関与する LAMP-1 が GST 融合 ESAT-6 と会合することが明らかになった。細胞内での両分子の会合を解析するとため、動物細胞様発現ベクターに LAMP-1, ESAT-6 遺伝子をそれぞれ組み込み、細胞に導入し、免疫沈降法により解析を行った。その結果、ESAT-6 を発現した細胞では、LAMP-1 の発現が著明に減弱することが明らかになった。以上の結果から、ESAT-6 がマクロファージ内で、貪食胞の機能に関わる分子 LAMP-1 と会合し、何らかの分子機構で LAMP-1 を分解し、貪食胞の成熟をブロックしていることが示唆された。

## A. 研究目的

自然免疫系は、病原体の宿主内への侵入を最初に察知し、種々の炎症・免疫応答を誘導する重要な免疫系である。最近、Toll-like receptor (TLR)ファミリーの機能解析により、自然免疫系の活性化機構が明らかになり、TLR を介した自然免疫系の活性化の生体防御における重要性が明らかになった。結核菌に対する生体防御においても、自然免疫系が結核菌の認識が重要な役割を果たす可能性が考えられる。これまでに、マウスを用いた我々の解析から、リポカリン2や SLPI などの分子群が、結核感染における自然免疫応答で重要な役割を担っていることが明らかになっている。本研究では、自然免疫系による結核感染防御機構を明らかにし、多剤耐性結核菌に対する、自然免疫系の活性化を利用した新規治療ワクチンの開発への基盤を提供することを目的とする。

## B. 研究方法

結核菌がマクロファージに侵入後、貪食胞の成熟を抑制し、増殖をするが、貪食胞の成熟を抑制するメカニズムには不明な点が多い。結核菌の病原性因子として分泌たんぱく質である ESAT-6 が知られていて、これらの遺伝子はワクチン株としてももちいられる M. bovis BCG

株で欠損していることが知られている。ESAT-6は、T細胞に対する強い抗原性を有していることが知られているが、マクロファージの機能に及ぼす影響は明らかになっていない。そこで、マクロファージ内の貪食胞で分泌される ESAT-6 が宿主細胞とどのように相互作用するかを解析した。GST融合ESAT-6タンパク質を作製し、これをマクロファージ細胞株 RAW264.7細胞の溶解液と混合し、その後GST pull downを行うことにより、ESAT-6に会合する宿主分子の同定を試みた。

## 倫理面への配慮

本研究は実験動物を用いたものを含むが、実験は大阪大学動物実験指針に基づき行った。実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に1回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、苦痛の軽減を行うよう配慮している。

## C. 研究結果

GST 融合 ESAT-6 タンパク質を用いた GST pull down 解析で、ESAT-6 に会合する宿主分子を探索した。その結果、従来 ESAT-6 に相互作用することが報告されている、



TLR2, MHC class I 分子が同定された。このことから、この解析系は、ESAT-6 の会合分子を解析するのに適した実験系であることが示唆された。そこで、さらにプルダウンされてきたタンパク質のシークエンスを行った結果、これら分子以外に LAMP-1 を同定した。次に、LAMP-1 と ESAT-6 遺伝子をそれぞれ動物細胞様発現ベクターに組み込み、HEK293 細胞に導入し、免疫沈降法により両分子の会合を解析した。その結果、ESAT-6 を発現した細胞では、LAMP-1 の発現が抑制されることが明らかになった。また、ESAT-6 の種々の deletion mutant を発現させた解析から、ESAT-6 の N 末端から 30-60 塩基の領域が、LAMP-1 の発現抑制に関与することが明らかになった。

#### D. 考察

結核菌の病原性因子として知られている ESAT-6 に会合する分子として、LAMP-1 を同定した。ESAT-6 を哺乳類細胞に発現させると、LAMP-1 の発現が抑制されることから、結核菌がマクロファージに侵入後、貪食胞内で分泌された ESAT-6 が、貪食胞の成熟に関与する LAMP-1 と会合することにより、LAMP-1 タンパク質を何らかの分子機構で分解し、その結果、貪食胞の成熟を抑制していることが示唆された。今後、ESAT-6 がどのような機構で LAMP-1 の発現を抑制するかを解析していく。

#### E. 結論

結核菌の病原性因子 ESAT-6 が宿主マクロファージ内での貪食胞の成熟に関与する LAMP-1 を会合することを見出した。ESAT-6 を発現させると LAMP-1 の発現が抑制されることを見出した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Saiga, H., Shimada, Y. and Takeda, K.: Innate immune effectors in mycobacterial infection. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, 347594 (2011).

##### 2. 学会発表

1. Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, Regulatory Mechanisms of Immune Responses to Intestinal Bacteria. Keystone Symposium. Mar 4-8, 2012. Keystone, USA
2. Kiyoshi Takeda, Regulation of gut homeostasis by microbiota and innate immunity. The 4<sup>th</sup> Symposium of Immunological Self. Jan 27-28, 2012, Kyoto, Japan
3. Kiyoshi Takeda. Innate immune responses to mycoacterial infection. The 46<sup>th</sup> US-Japan Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Dec 7-9, 2011, Saitama, Japan
4. Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, A unique subset of intestinal myeloid cells suppress T cell-dependent intestinal inflammation. 第40回日本免疫学会学術集会（国際シンポジウム）2011年11月27-29日、千葉
5. Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama. Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. 日本食品免疫学会第7回学術大会、2011年10月18-19日、東京
6. Kiyoshi Takeda. Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. The New Zealand Australian Society for Immunology Branch Meeting 2011, June 30-July1, 2011. Wellington, New Zealand
7. 竹田 潔, 自然免疫と炎症性疾患. 第48回日本眼感染症学会、2011年7月8-10日、京都
8. 竹田 潔, 自然免疫による腸管免疫の制御.

第 28 回日本医学会総会、2011 年 4 月  
8-10 日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

# 国立国際医療研究センターにおける HIV 合併結核症例の解析

研究分担者 青木孝弘 独立行政法人国立国際医療研究センター  
エイズ治療・研究開発センター 医師

## 研究要旨

当センターにおける HIV 合併結核患者について、その臨床像(喀痰塗抹検査、抗結核療法の有害事象、免疫再構築症候群など)を診療録や画像などより後視的に検討した。対象は、平成 8 年 1 月から平成 22 年 8 月末までの抗結核療法を導入された 129 例の HIV 合併結核患者とした。

当院通院中に発見された例が 26.5%で、67.4%は結核発症を機に HIV 感染が判明していた。発症時平均 CD4 数は  $165.3 \pm 158.3/\mu\text{l}$ 、平均 HIV-RNA は  $5.53 \pm 5.98 \log \text{copies/ml}(\pm \text{SD})$ であった。当センターの平成 21 年度の初診患者 225 例を対照として比較すると、性別、年齢、及び HIV-RNA 量は有意差を認めないが、CD4 数は結核群で有意に低値であった。

喀痰塗抹陽性は 129 例中 41.9%で、喀痰培養は 118 例中 67.8%で陽性であった。治療開始 12 週の時点で、20%が依然塗抹陽性であった。肺結核のみの症例が 40.1%であった。肺外病変としては、結核性リンパ節炎が 31.6%、腸結核が 6.7%、中枢神経結核(結核性髄膜炎と脳内結核腫)が 6.0%、結核性腹膜炎が 4.5%、結核性脊椎炎が 3.8%であった。

129 例の症例の中、結核発症時に抗 HIV 療法を施行していなかった症例が 105 例中で、抗結核治療導入後に抗 HIV 療法の導入を確認できた症例が 74 例であった。74 例のうち、免疫再構築症候群を生じた症例は 5 例であった。5 例中 2 例では抗 HIV 療法の中断を余儀なくされた。4 例でステロイドの使用を認めた。5 例とも HIV・結核の経過は良好であった。

治療に難渋する症例を認めるが、当センターでは結核での死亡例は認めなかった。世界と本邦では、HIV 合併結核症例の結核による死亡率は大きな隔たりを認めた。

## A. 研究目的

世界的には新規 HIV 患者数は減少傾向であるが、本邦ではいまだ増加傾向である。AIDS 発症者の割合は新規 HIV 感染者の急増により相対的に減少傾向であり、結核合併 HIV 感染患者の絶対数は少ないが、今後本邦での結核患者の中に占める割合も増加することが予測される。HIV 感染者が結核菌に暴露した場合、その発症の確率は年に 5 から 10%と推定されており、HIV 非感染者が生涯で 5 から 10%の発症率であることと比べると非常に高い。また、HIV 感染者の結核による死亡率は、HIV 非感染症例の約 2 倍と高値であり、HIV 患者において結核は重要な合併感染症である。結核発症率が有意に高い HIV 感染者における結核の実態を把握することで、結核の蔓延の予防につながると考えられる。

本研究の目的は、HIV 合併結核患者の患者

背景、HIV 感染の状態、HIV および結核の治療経過を後視的に検討することで、HIV 合併結核患者の実態を把握することにある。森らの報告によると、本邦の HIV 合併結核患者は、平成 13 年 1 月末で 148 例と報告されている。国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センターでは、平成 8 年以後に約 130 症例の結核合併 HIV 感染の症例を経験しており、当センターでの症例を調査することで、本邦の HIV 合併結核に重要な知見となると考える。

## B. 研究方法

当センターにおける HIV 合併結核患者について、その臨床像(喀痰塗抹検査、抗結核療法の有害事象、免疫再構築症候群など)を診療録や画像などより後視的に検討した。対象は、平成 8 年 1 月から平成 22 年 8 月末までの抗

結核療法を導入された 129 例の HIV 合併結核患者とした。

免疫再構築症候群を以下の通り定義する。

抗 HIV 療法を導入前に結核と診断し、抗結核療法を開始し有効であった症例の中で、ART 開始後 3 ヶ月以内に、結核の他覚的所見の悪化（浸潤影悪化など）、または結核の臨床症状の悪化（発熱、咳嗽など）を認めた症例とする。なお、結核治療失敗例は除外する。

#### （倫理面への配慮）

HIV 合併結核患者の実態把握に関する研究は、独立行政法人国立国際医療研究センター倫理委員会にて承認（課題名：HIV による T 細胞免疫不全解析及び HIV に合併する結核研究と対策、承認番号 1015、平成 23 年 6 月 2 日承認）を受けている。本研究は後視的研究であり、本研究の施行で患者に有害事象が生じる可能性はない。また、当センター外来のモニターにて、本研究を施行することについて掲示を行うことで、患者への周知を行った。

#### C. 研究結果

HIV 合併結核症例 129 例は、男性 117 例 (90.6%)、平均発症年齢  $39.3 \pm 11.3$  歳で、31 例 (24.0%) は外国籍であった。当院通院中に発見された例が 35 例 (26.5%) で、89 例 (67.4%) は結核発症を機に HIV 感染が判明していた。発症時平均 CD4 数は  $165.3 \pm 158.3/\mu\text{l}$ 、平均 HIV-RNA は  $5.53 \pm 5.98 \log \text{copies/ml} (\pm \text{SD})$  であった。当センターの平成 21 年度の初診患者 225 例を対照として比較すると、性別、年齢、及び HIV-RNA 量は有意差を認めないが、CD4 数は結核群で有意に低値であった。

喀痰塗抹陽性は 129 例中 54 例 (41.9%) で、喀痰培養は 118 例中 80 例 (67.8%) で陽性であった。治療開始 12 週の時点で、20% が依然塗抹陽性であった。肺結核のみの症例が 54 例 (40.1%) であった。肺外病変としては、結核性リンパ節炎が 42 例 (31.6%)、腸結核が 9 例 (6.7%)、中枢神経結核（結核性髄膜炎と脳内結核腫）が 8 例 (6.0%)、結核性腹膜炎が 6 例 (4.5%)、結核性脊椎炎が 5 例 (3.8%) であった (病変の重複を含む)。

薬剤耐性試験が施行された 102 例のうち 12 例 (11.8%) に、薬剤耐性 (INH 5 例、RFP 3 例、その他 6 例) を認めた。多剤耐性 (INH と RFP) は 2 例 (2.0%) のみであった。

抗結核薬で有害事象を生じた症例は、128 例中 70 例 (54.6%) であった。その内訳は、INH 13.4%、RFP 26.1%、RBT 17.6%、EB 14.3%、PZA 18.1%、キノロン 21.2% (重複有) と、RFP が最も多かった。年齢、性別、国籍、体重、CD4 値、HIV-RNA 量と抗結核薬の有害事象について検討したところ有害事象発生群では、有意に体重が軽く、CD4 値  $< 100$  の症例が多いことが判明した。

結核症自体の経過はおおむね良好であり、結核を直接の原因とする死亡の症例はなかった。経過中に死亡した 7 例はいずれも、結核以外のエイズ関連疾患での死亡であった。

129 例の症例の中、結核発症時に抗 HIV 療法を施行していなかった症例が 105 例中で、抗結核治療導入後に抗 HIV 療法の導入を確認できた症例が 74 例であった。74 例のうち、免疫再構築症候群を生じた症例は 5 例であった。5 例中 2 例では抗 HIV 療法の中断を余儀なくされた。4 例でステロイドの使用を認めた。5 例とも HIV・結核の経過は良好であった。

#### D. 考察

海外での HIV 合併結核患者の死亡率は 20-30% 程度と高率であるのに対し、当センターでの HIV 合併結核患者の予後は良好で、結核による死亡例は存在しなかった。これは、本邦における医療機関へのアクセシビリティの良さやテイラーメイドな医療によると考えられる。喀痰好酸菌塗抹陽性例は、12 週間の治療後も 20% の症例で塗抹陽性で、HIV 合併症例では排菌陰転化に時間を要することが判明した。抗結核薬による有害事象は半数以上の症例で認められ、CD4 が  $100/\mu\text{L}$  未満の症例で優位に多かった。免疫再構築症候群を生じた症例と生じなかった症例を比較検討すると、生じた症例群で、有意に CD4 数が低く、HIV-RNA 量が高いことが判明したが、症例数が少なく更なる症例の集積を要すると考える。

## E. 結論

治療に難渋する症例を認めるが、当センターでは結核での死亡例は認めなかった。世界と本邦では、HIV 合併結核症例の結核による死亡率は大きな隔たりを認めた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# 外国人結核・帰国者結核の実態把握と対策

研究協力者 豊田恵美子 独立行政法人国立病院機構東京病院呼吸器疾患センター  
呼吸器科医長

## 研究要旨

対象は39例（男性11・女性28）で、32例（82%）が50才未満であった。出身国はフィリピン、中国、韓国、ネパール、タイ、ベトナム等のアジア地域が36例、アフリカ2例、東欧1例であった。発病の時期は入国前4例、5年以内20例、5～10年未満8例、10年以上7例であったが、20才代では入国前2例、5年以内8例で、5年以内の発症は72.3%であった。20才代11例に限ると、すでに入国前に発症し、入国後間もなく診断・入院となったもの2例、1年以内4例で半数以上は1年以内に発見されていた。

病型は肺結核34例（有空洞15例、気管支結核合併1例）、粟粒結核2例、胸膜炎1例、頸部リンパ節炎2例で、喀痰塗抹陽性31例、何らかの検体から培養陽性37例中主要薬剤耐性8例（INH4例、SM3例、INH・RFP・SM・EB耐性1例）及び多剤耐性1例を認めた。合併症は、11例（HIV2例、DM3例、肝障害3例、SLE1例、腎障害1例、気管支喘息1例）に認めた。初回治療35例、治療歴のあるもの4例であった。

結核で入院治療する外国人は、診断・治療・服薬管理に日本人と大きな差はない。HIVや耐性は日本人よりもやや高率と思われるが、対象が少ないため比較は困難である。将来的なことを考慮して、20才代や若年層の外国人結核を対象として、焦点を絞った検討と対策が必要と思われる。

## A. 研究目的

低蔓延の欧米先進諸国では結核患者の半数以上を外国出身者が占めている。これは国際交流がすすみ、人の行き来や交流のなかで起こってくる事態である。自国の高齢者が結核の半数以上を占めている日本でも、20代の結核患者では外国籍の患者が28.2%を占めており、83.4%が5年以内の発病であるという<sup>1)</sup>。高蔓延の母国で感染し、他国でのストレス等の要因で発病という一連の病態は納得しやすい説明である。実際には結核で入院治療する外国人患者は種々の状況で発病、診断され、治療されることは日本人の場合と変わらないが、言葉の問題や服薬支援ではより力を注ぐ必要がある。また結核の2大問題であるHIVと多剤耐性に注目し実態に迫りたい。

## B. 研究方法

当院結核病棟で2010年～2011年に入院治療した外国籍の活動性結核患者39例についてカルテ記載に基づいてレトロスペクティブに検討した。検討項目は年齢、性別、国籍、

入国から発病までの期間、病型、排菌状況、薬剤耐性、合併症、言葉の問題の有無、結核治療成績である。

## （倫理面への配慮）

当研究は、個人情報の保護に留意してデータ収集、解析、発表について配慮し作成した研究計画書が、当院倫理委員会にて承認された。レトロスペクティブスタディーであり観察研究であるため、研究計画や研究内容を公表揭示している。

## C. 研究結果

対象は39例（男性11・女性28）で、32例（82%）が50才未満であった（図1）。出身国はフィリピン、中国、韓国、ネパール、タイ、ベトナム等のアジア地域が36例、アフリカ2例、東欧1例であった（図2）。発病の時期は入国前4例、5年以内20例、5～10年未満8例、10年以上7例であったが、20才代では入国前2例、5年以内8例で、5年以内の発症は72.3%であった。20才代11

例に限ると、すでに入国前に発症し、入国後間もなく診断・入院となったもの2例、1年以内4例で半数以上は1年以内に発見されていた(図3)。日本滞在の事由は1) 留学、就学、職業研修 10例、2) 仕事 7例、3) 日本人と結婚 17例、4) 中国残留孤児として帰国 2例、5) 家族を訪問中 3例 6) その他 1例であった。日本人と結婚している女性が最も多かった(図4)。

病型は肺結核34例(有空洞15例、気管支結核合併1例)、粟粒結核2例、胸膜炎1例、頸部リンパ節炎2例で、喀痰塗抹陽性31例、何らかの検体から培養陽性37例中主要薬剤耐性8例(INH4例、SM3例、INH・RFP・SM・EB耐性1例)及び多剤耐性1例を認めた。合併症は、11例(HIV2例、DM3例、肝

障害3例、SLE1例、腎障害1例、気管支喘息1例)に認めた。初回治療35例、治療歴のあるもの4例であった。

レジメンは、HREZ(L)27例、HRE9例、REZL1例、HRLZ1例で、肝障害、皮疹、発熱等の副作用は5例に認め一時中断、一部薬剤変更された。治療歴のある60才代症例では、HRES耐性が判明KM、TH、CS、PAS、MFLXに変更治療した。

治療成績は、現時点で完了16例、退院後帰国2例、転出15例、中断・脱落1例、治療中5例である。

言葉の問題が指摘されているのは20才代4人、30才代1人、50才代2人、60才代1人、70才代3人で、計11人であった(図5)。

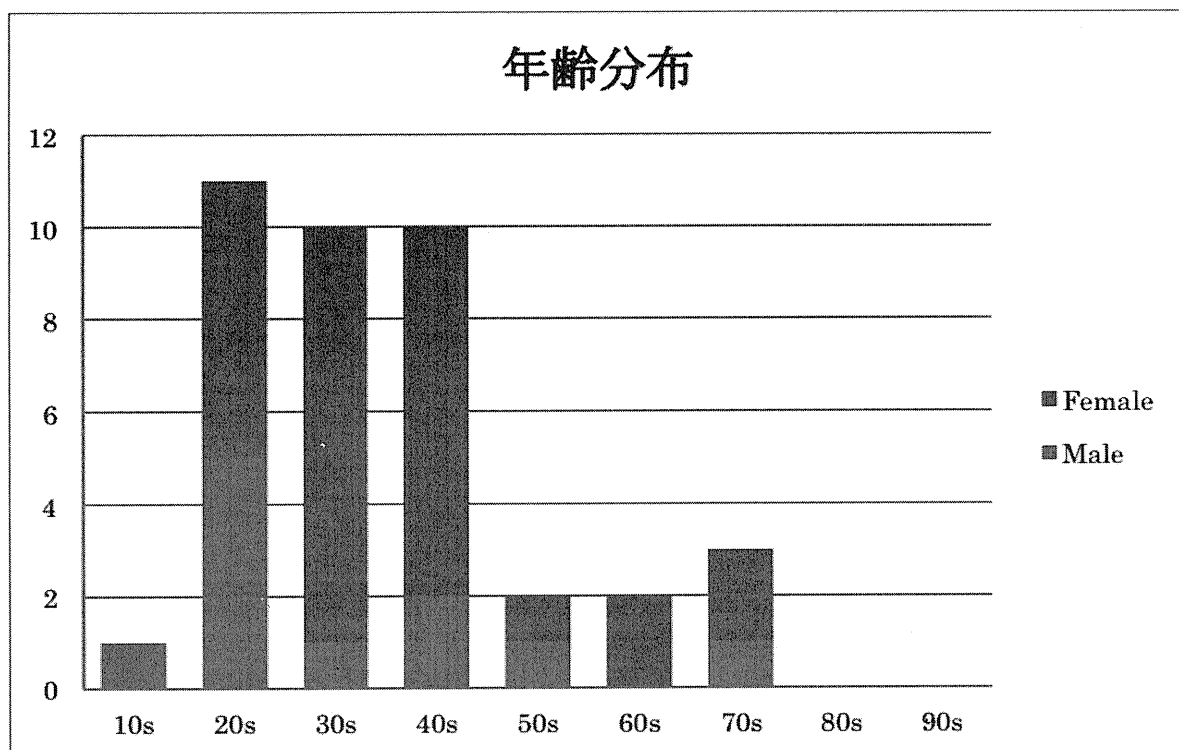


図1 外国陣結核患者の年齢分布

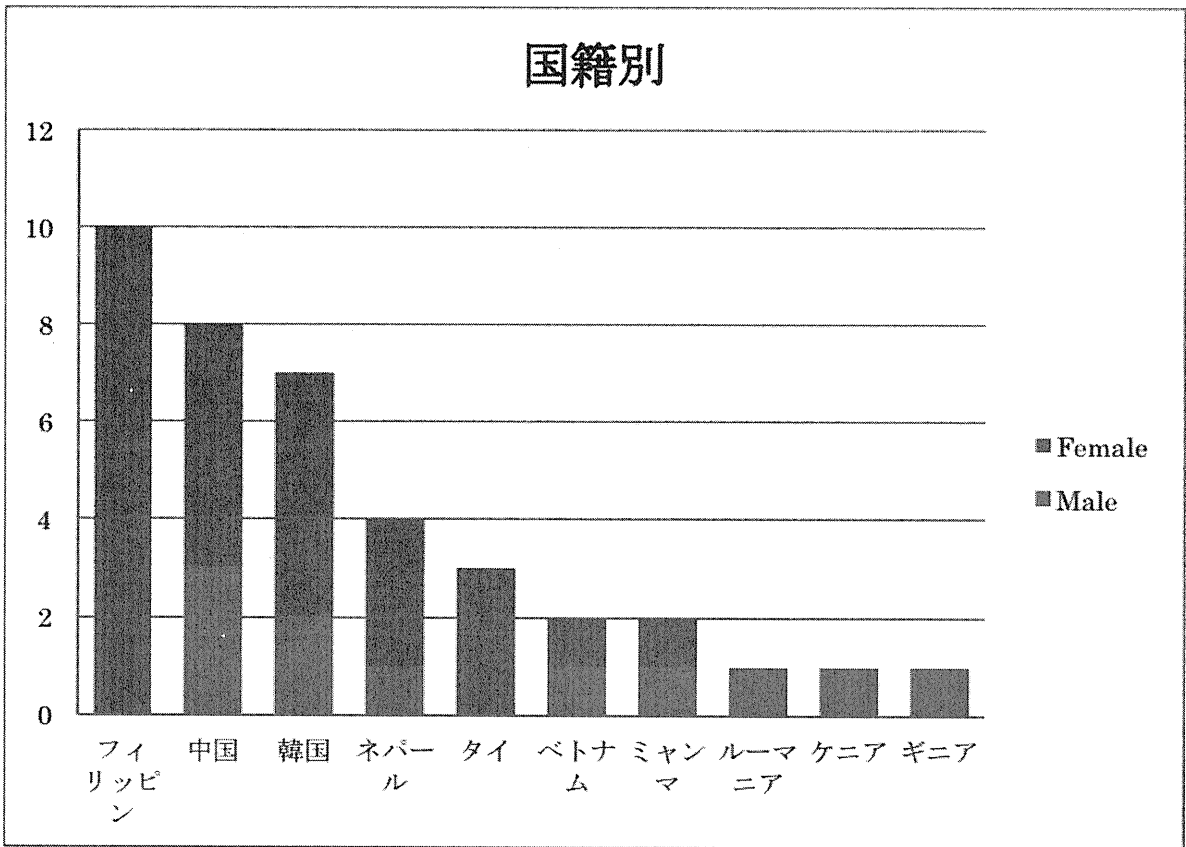


図2 国籍

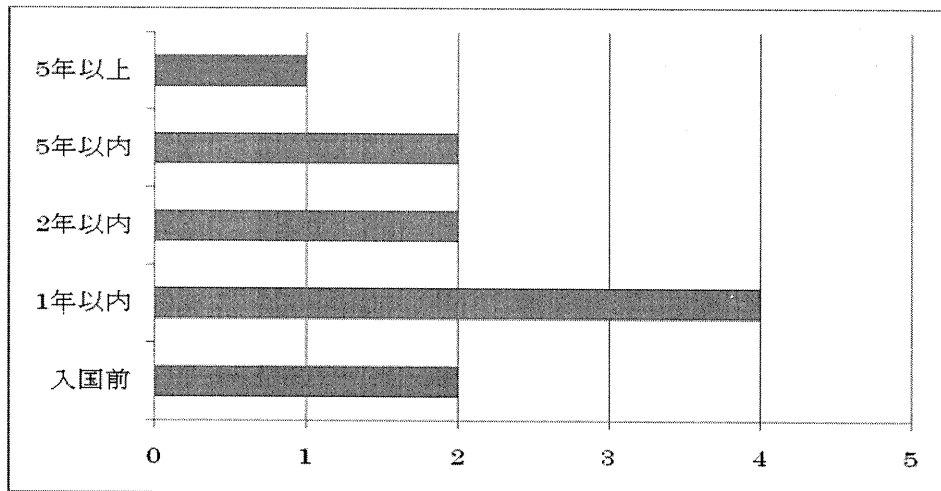


図3 20才代外国人の結核発症の時期



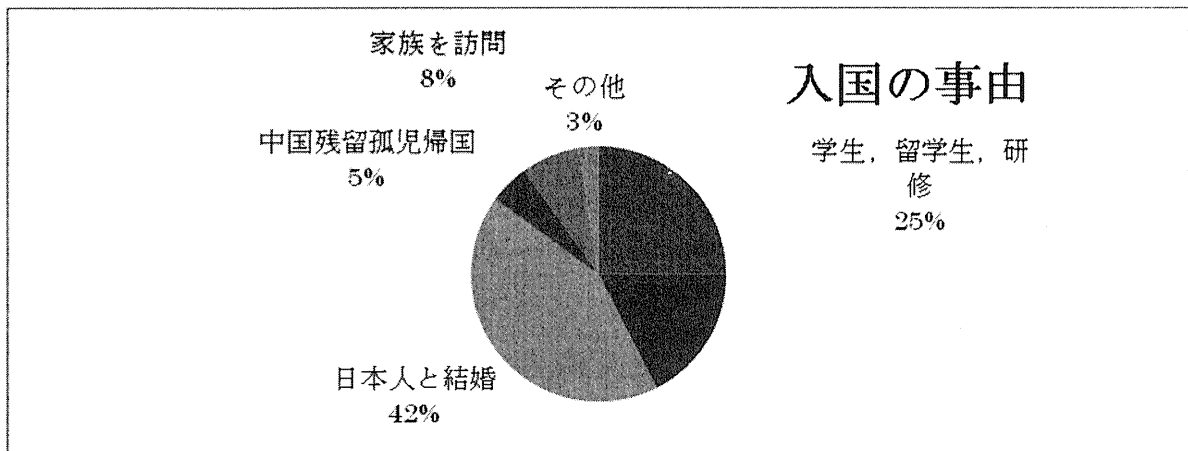


図4 入国の事由

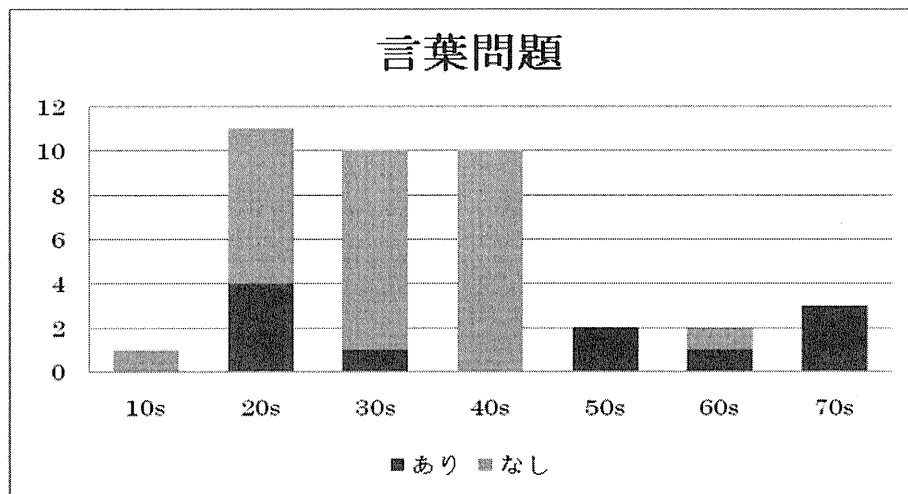


図5 言葉の問題の有無

#### D. 考察

2010年日本の活動性結核新登録患者数は23261人で人口10万対18.2%と報告されている。そのうち外国人結核患者数は952人(4.2%)で、20才代が438人と最多で、同年代の結核患者数1536人の28.5%をしめており、実数が増加しているわけではないが日本人の結核が減少するに相まって年々この割合は上昇している。欧米諸先進国の状況を見ても、国際交流と諸外国の結核状況のギャップの流れのなかで、外国人結核は日本の結核

において無視できないものとなってくる。若年者結核の多くが外来患者であるように、入院を要する外国人結核患者はむしろ少数である。一方で日本の結核患者の半数以上が高齢者で殆どが日本人であるが、外国人高齢者の結核も散見されるようになった。今回の対象のうちでは、中国残留孤児で帰国した人や子育て支援に観光ビザで入国した人などが含まれている。学校検診や会社検診を除く、一般外国人の健診制度はなく、欧米諸先進低蔓延国においても有効なシステムは見当たらない

い<sup>2)</sup>。日本人と結婚している女性の結核が目立っている。20～40才代の主婦層は結核の発見が遅れやすいグループと思われる。外国人に限らず受診しやすい環境が望まれる。

病型や排菌状況については他の日本人の結核と殆ど差はなかった。HIVは30代、40代の女性で今回判明した(5.1%)。これは日本全国の0.9%と比較すると高値であるが、一方糖尿病の合併は3例(7.7%)で全国の19.0%と比較して低い。当院の2010年～2011年の新規活動性結核入院患者数821例中、HIV5例(0.6%)、糖尿病150例(18.2%)となっており、一つには年齢層の偏り、HIVでは出身国の状況を反映しているものと思われる。耐性菌については、821例中いずれか主要薬剤耐性68例(INH19例、SM25例、EB3例、RFP1例、SH12例、HE3例、SE2例、SHE3例)および多剤耐性3例であった。8.4%vs20.6%、0.4%vs2.7%で外国人結核の耐性率はやはり高いのではないかと思われる。多剤耐性やH耐性を除き殆どの症例は標準治療を実施し、帰国や転出が半数を占めるが、当院で治療中のもの22例中1例が脱落となっている。

言葉の問題は若年者では滞在期間が短いこと、高齢者では外国語になかなかできない状況と思われるが、家族や友人、雇用者、日本語学校の職員、東京都から派遣される通訳の協力を得て、退院後も保健所との連携で安心して治療を継続できるよう支援することが重要である。

## E. 結論

結核で入院治療する外国人は、診断・治療・服薬管理に日本人と大きな差はない。HIVや耐性は日本人よりもやや高率と思われるが、対象が少ないため比較は困難である。将来的なことを考慮して、20才代や若年層の外国人結核を対象として、焦点を絞った検討と対策が必要と思われる。

## 文 献

1. 厚生労働省健康局結核感染症課監修：結核の統計2011. 結核予防会. 東京. 2011.
2. 豊田恵美子, 伊藤邦彦：外国人結核対策

# 多剤耐性結核の治療と予防に有効な新規 DNA ワクチンの開発に関する研究

研究協力者 中島俊洋 ジェノメディア株式会社

## 研究要旨

東アジア地域で蔓延しつつある多剤耐性結核に対して有効な新規ワクチンの開発を目的として、次世代のワクチン技術として注目されている DNA ワクチンの開発を行った。DNA ワクチンの開発を成功させるためには、より少ない用量で有効性を高める必要があるため、ワクチン効果を高める新規アジュバントとして注目されている HVJ-E を用いた免疫増強や安全性評価を行った。その結果、HVJ-E は、自然免疫や細胞性免疫の活性化に参与する RIG-I を介した新規メカニズム有する事、結核感染に対する防御に重要な細胞性免疫側に免疫反応をシフトできる事などが明らかとなった。

## A. 研究目的

東アジア地域（日本、韓国、台湾、中国）においては、結核に対して抗生物質による治療が実施されている。しかし、抗生物質による治療の失敗により多剤耐性結核（MDR-TB）が発生する事が問題になりつつある。今後の経済発展に伴って、日本と韓国、台湾、中国などの東アジア地域では人口の移動が増加すると予測されるため、それらの地域からの輸入感染症として多剤耐性結核が国内でも流行するリスクが年々高まっている。

成人の多剤耐性結核に対しては、複数の抗生物質の組合せによる治療法しか確立されていない事、抗生物質が効かない超多剤耐性結核（XDR-TB）も発生している事から、今後東アジア地域で多剤耐性結核を適切に制御するには、流行の詳細なモニタリングに加え、抗生物質とは異なる新規の治療法確立が必要であると考えられる。そこで本研究では、多剤耐性結核の予防と治療に有効な新規治療用ワクチンの臨床応用を目的として研究を実施した。

## B. 研究方法

### 1) HVJ-Eの安全性評価

本事業で開発を行っているDNAワクチンのデリバリーシステム兼アジュバントであるHVJ-Eの安全性試験については、小動物としてはラット、中動物としてはカニクイザルを用いて評価を実施した。予備試験については信頼性

基準に適合する試験として実施し、予備試験で取得したデータを根拠として本試験をGLP試験として実施した。それらの試験で取得したデータは、ガイドラインに従って臨床応用の際に申請用のデータとして使用できるレベルのデータである。安全性試験については、予備試験、本試験共に基本的にGLP適合試験施設で実施した。また、サイトカイン産生の基礎検討については、カニクイザルを用いた試験で調製したサンプルを使用し、臨床検査を実施している試験施設で測定試験を実施する事でデータの品質を確保した。

臨床での安全性評価は、大阪大学医学部附属病院が実施している。臨床試験は学内の倫理委員会の承認後に実施され、進行性悪性黒色腫（腫瘍内投与、皮内投与）、去勢抵抗性前立腺癌（腫瘍内投与、皮下投与）のそれぞれを対象疾患とした、第I/IIa相試験が実施されている。

### 2)HVJ-Eによる免疫活性化機序の解明

HVJ-Eの作用機序に関する基礎研究は大阪大学医学系研究科遺伝子治療学講座で実施された。HVJ-Eによる細胞性免疫活性化の活性化についてはマウスを用いた試験で評価した。抗原蛋白をデリバリーシステム兼アジュバントであるHVJ-Eの存在下、或いは非存在下でマウスに投与し、免疫の活性化について脾細胞を用いたアッセイで評価した。

### (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行政法人 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、微生物実験、動物取り扱いに関する指針などに従い、産業技術総合研究所で開催される各委員会にて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、独立行政法人 産業技術総合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、またはe-ラーニングでの研修を実施し、別途健康診断も受診して実験従事者の健康管理も確保した。

### C. 研究結果

本事業で開発しているDNAワクチンの構成物質（アジュバント兼デリバリーシステム）であるHVJ-Eに関して、ガイドライン上、国内の治験届やFDAのIND(investigational new drug)申請に必要な動物試験による安全性データを取得した。本年度は、免疫毒性の評価を中心に試験を実施し、安全性の確認を進めた。その結果、HVJ-Eを投与すると、投与開始から1週間後には認められないが、2週間後以降では抗体産生が認められる事が明らかとなった。また、炎症性サイトカイン（IL-6、IFN $\gamma$ ）の産生について検討を行った結果、HVJ-E投与後の血清中のサイトカインレベルは、健常動物で認められる変動の範囲内であり、毒性学的に意義のあるレベルの異常産生は認められない事が明らかとなった。

また、HVJ-Eのアジュバント効果の新規メカニズムとしてRIG-Iを介するシグナル伝達系により免疫系の活性化が認められる事が明らかとなった。この作用は、樹状細胞の活性化を介して、自然免疫（NK細胞の活性化）や細胞性免疫の活性化（CTLの活性化）を誘導する事が明らかとなった。更に、がん細胞に特異的なアポトーシスを誘導できる事が明らかとなった。このアポトーシスの誘導は、正常細胞では認められず、アポトーシス関連遺伝子の発現制御メカニズムが関与する事が示唆されている。

たん白を抗原とするワクチンをHVJ-E存在下

と非存在下で投与すると、HVJ-E存在下では本来液性免疫を誘導する特性を有する抗原でも、細胞性免疫を誘導するようシフトすることが明らかとなった。

更に、DNAワクチンやたん白ワクチンについては、投与経路を最適化することにより有効性を10倍程度増強出来る（用量を10分の1に低減できる）可能性が示唆された。従来はDNAワクチンで採用されている筋肉と比較して皮内への投与で活性が10倍程度増強される事を示唆されている。

結核のように罹患数が多い感染症は、流行拡大の制御に多量のワクチンを必要とする。そのため、投与経路の最適化で用量を10分の1に軽減できる可能性が示唆された事は重要な成果である。

一方、HVJ-Eの臨床応用については、大阪大学医学部附属病院が、進行性悪性黒色腫を対象とする臨床研究に加え、去勢抵抗性前立腺癌を対象とした臨床試験を開始した。これまでに進行性悪性黒色腫については皮内またはリンパ節の腫瘍内投与時のHVJ-Eの安全性と免疫活性化の評価が実施されていたが、去勢抵抗性前立腺癌を対象とした臨床試験においては前立腺内の投与に加えて皮下投与も実施されており、従来の皮内投与、リンパ節内投与に加えて、HVJ-Eの皮下投与による安全性と免疫活性化の評価が開始された。

### D. 考察

1) DNA ワクチンの構成物質である HVJ-E に関して安全性の評価を行なった結果、特に重篤な有害事象は認められず、安全性が高い事が示唆された。抗体産生についてはHVJ-E の投与開始後 1 週間では産生が認められず、2 週間以降に産生誘導が認められた。しかし、それに伴う重篤な有害事象は認められておらず、安全性の面では特に問題がならない事が示唆されている。また、HVJ-E 投与によるサイトカイン産生についても、血清中に産生される炎症性サイトカインレベルは健常動物（カニクイザル）で認められる変動の範囲内であり、実際にサイトカインの異常産生によると考えられ