

ら PGE2 の産生を誘導する作用を持つ事を明らかにし、本年度の Keystone Symposium (Colorado 州、米合衆国) で発表した。さらに IL-18 が結核菌と同じくマクロファージ中で増殖する寄生虫、Leishmania major の排除に重要な役割を持つ事を明らかにし、論文として Infection and Immunology 誌に発表した。また、DNA ワクチンに関してはマラリアの系で、この方法論が有効であることを自治医科大学の吉田らとともに明らかにし、Biochem Biophys Res Commun 誌に発表している。(柏村)

DNA ワクチン用のベクターを構築する目的で、Human IL-18、Mouse IL-18 および Mouse IFN- γ の coding sequence 遺伝子を単離、精製し長崎大学の大原らに供給した。Human IFN- γ coding sequence については現在ヒト末梢血からの遺伝子の単離をおこなっている。(柏村、岡田、大原、吉田)

家兎に対する cord factor の肉芽腫形成能と胸腺・脾臓のアポトーシスと萎縮を明らかにし、家兎を用いたワクチン動物モデルが期待された (Hamasakiet al.I&I. 2000 他)。(熊沢、矢野)

マウス (及びラット) に対する cord factor 肉芽腫形成と血管新生機構：

抗 VEGF 抗体の投与により肉芽腫形成は阻害された (Sakaguchi et.al.I&I. 2000 他)。

又これらの血管新生は、抗 TNF- α 、抗 IL-8、抗 VEGF の各抗体により顕著な阻害を受け、これらの cytokine が血管新生に重要な役割を果たしていることが判った (Saita et al. I&I. 2000 他)。(熊沢、矢野)

D. 考察

(1) サブユニットワクチン作製と抗結核ワクチン効果の発見・成果と活用・提供：
72f Fusion 蛋白のサブユニットワクチンがカニクイザル (cynomolgus monkey) のレ

ベルで BCG よりも有効であることを明らかにし、ヒトの系でも 72f を用いて免疫応答の解析が進められ、結核ワクチンで世界の最先端の研究で、しかもヒトへの臨床応用が最も近い、新しい結核ワクチンの開発に成功した。結核蛋白 Mtb39 と Mtb32 の fusion 蛋白 72f のサブユニットワクチンはマウスやモルモットの吸入感染のみでなくサルでも BCG よりも強力な予防ワクチン効果 (生存率、血沈、体重、肺の組織) を得た。Mtb72f は本格的な強力サブユニットワクチンとして今後、米国、ブラジルのみならず、本邦でもすぐに活用する計画である。これを本邦に普及するには我々の研究組織のみならず、企業、政府の協力体制で迅速な臨床治験申請を行いたい。特許の問題に接触しない限り全世界で Corixa 研究所より提供してもらいたい。Mtb71f fusion 蛋白もすぐれたサブユニットワクチンとなることが示唆されている。サブユニットワクチンは上記のリコンビナント BCG や DNA ワクチンが遺伝子を利用しているのに比較して、精製タンパクであり、臨床治験への申請や、倫理委員会や政府 (厚生省等) の承認を得やすく活用が最も迅速であると考えられる。平成 13 ~ 14 年度に Mtb72 ワクチン第 I 相試験計画中。

(2) DNA ワクチンの作製と抗結核ワクチン効果の発見・成果と活用・提供：

① HVJ-liposome をベクターに用いた場合 Hsp65DNA 単独 (HVJ-liposome/Hsp65) で BCG よりも有効であることをマウスの系 (H37RV i.v 投与) で明らかにした。② IL-12 DNA + Hsp65 DNA のワクチンは相乗効果を示し、gene gun 投与により BCG よりも強力な結核予防ワクチンであることを明らかにした。③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 gene + IL-6 レセプター gene + gp130 gene) で BCG よりも強力な治療ワクチン及び予防

ワクチン効果を示した。④アデノウイルスベクターに導入したγ-IFN DNA も BCG よりも強力な治療ワクチン及び予防ワクチン効果を示した。これらのすべては、DNA ワクチンとして世界に先駆けての発見である。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 療法を慎重にしないではいけな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。

(3) リコンビナント BCG ワクチンの作製と抗結核ワクチン効果の発見・成果と活用・提供：Ag85B リコンビナント BCG 単独及び 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マウスの結核感染(気道感染及び i.v 感染)の系で明らかにした。また、IL-2 rBCG、IL-6 rBCG、IL-18 rBCG の作製に成功し、γ-IFN rBCG、IL-12 rBCG、Hsp65 rBCG を作製中である。毒力 gene を欠失した BCG 菌の作製に成功した。これは、リコンビナント BCG を用いて、結核菌数の減少を認めた世界に先駆けての初めての発見である。この研究成果は約 40 年ぶりに罹患率の増加、集団感染が頻発している結核に対し、さらには糖尿病患者等の免疫不全疾患に高頻度に合併する結核(難治性結核)や薬剤耐性結核のいわゆる難治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。このリコンビナント BCG は本邦のみでなく、欧米、アジア、アフリカ等全世界に提供することができる。

(4) ツベルクリン反応に代わる新しい診断法の今後の活用・提供：
Dr Gillis らと共同で研究している、PPD に多種含まれるタンパクのうち唯一のタンパ

ク DPPD が BCG 接種者には反応せず結核感染患者のみに skin test 陽性である画期的な発見をした。これらを共同研究で大至急本邦で活用する計画をしている。本邦での集団感染結核発症や院内感染結核発症の迅速診断に積極的に提供したい。早急に本邦における臨床第 1 相試験が行えるよう、国立療養所近畿中央病院が中心となり計画である。

(5) 多剤耐性結核患者、難治性結核患者の新しい予後診断法(末梢血キラー T リンパ球機能 granulysin 蛋白発現、granulysin mRNA、TRAIL mRNA)の今後の活用・提供：多剤耐性結核患者、および糖尿病合併難治性結核患者 PBL で RT-PCR 法を用いて、granulysin mRNA、TRAIL mRNA の著明な低下を示し、これを測定することにより難治性の指標になることが示された。またキラー T や NK のパーフォリンも重要であることを明らかにした。さらに、BML 研究所永田 Dr らとの共同研究で抗 granulysin 抗体を用い、20 人以上の多剤耐性結核患者 PBL の granulysin 蛋白発現の著明な低下を得た。この抗 granulysin 抗体を用いた予後診断法、又 mRNA を用いた上記診断法を今後全国の 54 施設国立病院・療養所呼吸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。さらには一般の結核患者にも活用し、それぞれの結核患者の予後診断と予後の指標測定に応用する。

(6) 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、ESAT-6 蛋白の HLA-A2 に結合する 9 個のアミノ酸よりなるペプチドを合成し、これを SCID-PBL/hu

に免疫し、ESAT-6 に特異的でしかも HLA-A2 に拘束性を示す典型的なヒトキラー T 細胞の分化誘導を示す画期的な、結核菌に対する生体内ヒト T 細胞免疫解析モデルを開発した。このモデルは多剤耐性結核患者リンパ球とその患者さん自身の多剤耐性結核菌を用いることにより、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。

E. 結論

[1] 72f Fusion 蛋白のサブユニットワクチンがカニクイザル (cynomolgus monkey) のレベルで BCG よりも有効であることを明らかにし、ヒトの系でも 72f を用いて免疫応答の解析が進められ、結核ワクチンで世界の最先端の研究で、しかもヒトへの臨床応用が最も近い、新しい結核ワクチンの開発に成功した。結核蛋白 Mtb39 と Mtb32 の fusion 蛋白 72f のサブユニットワクチンはマウスやモルモットの吸入感染のみでなくサルでも BCG よりも強力な予防ワクチン効果 (生存率、血沈、体重、肺の組織) を得た。(S.Reed, S.Gillis) 又、T リンパ球機能増強活性を有する種々の結核蛋白 gene のクローニングに成功した。(J. I 2000, J. Exp. Med 2000, Inf and Immunity 2000, Mtb39, Mtb32, Mtb8.4, Mtb11, Mtb41, Mtb9.9, Mtb16, Mtb40,等)

[2] DNA ワクチン: ① HVJ-liposome をベクターに用いた場合 Hsp65DNA 単独 (HVJ-liposome/Hsp65) で BCG よりも有効であることをマウスの系 (H37RV i.v 投与) で明らかにした。② IL-12 DNA + Hsp65 DNA のワクチンは相乗効果を示し、gene gun 投与により BCG よりも強力な結核予防ワクチンであることを明らかにした。③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 gene + IL-6 レセプ

ター gene + gp130 gene) で BCG よりも強力な治療ワクチン及び予防ワクチン効果を示した。④アデノウイルスベクターに導入した γ -IFN DNA も BCG よりも強力な治療ワクチン及び予防ワクチン効果を示した。

[3] リコンビナント BCG ワクチン: Ag85B リコンビナント BCG 単独及び 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マウスの結核感染 (気道感染及び i.v 感染) の系で明らかにした。また、IL-2 rBCG, IL-6 rBCG, IL-18 rBCG の作製に成功し、 γ -IFN rBCG, IL-12 rBCG, Hsp65 rBCG を作製中である。毒力 gene を欠失した BCG 菌の作製に成功した。

[4] 上記の種々のサブユニットワクチン (72f, Mtb39, Mtb32, Mtb8.4, Mtb11, Mtb41, Mtb9.9, Mtb16, Mtb40, 31f, 71f) で刺激し、ヒトの多剤耐性結核患者 PBL や難治性結核 (糖尿病合併) PBL の T 細胞免疫能 (γ -IFN 産生能や T 細胞増殖能) が増強することを in vitro で明らかにした。

[5] 我々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、ESAT-6 蛋白の HLA-A2 に結合する 9 個のアミノ酸よりなるペプチドを合成し、これを SCID-PBL/hu に免疫し、ESAT-6 に特異的でしかも HLA-A2 に拘束性を示す典型的なヒトキラー T 細胞の分化誘導を示す画期的な、結核菌に対する生体内ヒト T 細胞免疫解析モデルを開発した。

[6] ツ反に用いられる PPD は多種の蛋白を含む。この中より、結核感染に極めて特異性の高い、ツ反に代わる蛋白 DPPD のアミノ酸配列及び遺伝子クローニングに成功した。リコンビナント DPPD 蛋白は結核感染に特異的で、BCG 接種群には反応しないことがモルモットで示された。ヒトで

も結核感染特異性を示すことを (in vitro) 明らかにした。

[7] ヒト型結核菌に存在し、BCG に存在しない Mtb11 蛋白 gene のクローニングに成功した。この蛋白は in vitro のヒト T 細胞を結核感染者のみ特異的に増強することを明らかにした。一方、結核患者血清中には Mtb11 と反応する抗体や 81kd の結核蛋白に結合する抗体が特異的に存在することを示した。さらに、ランダムファージディスプレイ法 (すでにこの方法で帯状疱疹と Herpes simplex の異なる抗原をはじめて発見) にて結核感染特異蛋白の検索システムを開発した。

[8] 多剤耐性結核患者 PBL 及び難治性結核患者 PBL において結核菌に対するキラー分化誘導の低下、granulysin mRNA、TRAIL mRNA、低下を明らかにした。さらに granulysin に対する抗体を作製し、これらの患者の PBL のキラー T、NK での granulysin 発現の著明な低下を明らかにした。すなわち新しい結核予後診断法を確立した。一方、パーフォリンノックアウトマウスに抗 TRAIL 抗体を投与し、TRAIL pathway は結核感染防御に重要であることを初めて明らかにした。

[9] BCG 接種による大人 (成人) に対する結核予防効果の解析：

現行の BCG ワクチン接種の有効性、特に成人における追加接種がその後の結核発病を抑制できるかどうか、を検討した。まず、近畿地区国立施設で参加意志を表明した 12 病院・療養所および 13 看護学校で開始した。ツベルクリン反応検査対象者数は看護婦 275 名、看護学生 552 名であった。陰性と判定された看護婦 21 名と学生 39 名を無作為に 2 分し、1 群のみ BCG 接種を接種し追跡調査を開始した。12 年末までの間に、両群からの結核発病者は認められていない。

F. 研究発表

I. 論文発表

1. R.Ryll, M.Hirai, M.Okada, N.Fujiwara, I.Tomiyasu, Y.Kumazawa and I.Yano: Inhibition of TDM-induced TNF- α release by sulfolipid : a potential new virulence mechanism of Mycobacterium tuberculosis. Microbiol. Pathogenesis (in press)
2. K.Watanabe, R.Ryll, N.Fujiwara, R.Hasunuma, Y.Kumazawa, M.Okada and I.Yano: Mycobacterial cord factor, but not sulfo lipid, causes depletion of NKT cells and upregulation of CD1d1 on murine macrophages. Microbiol. Pathogenesis (in press)
3. T.Iwasaki, Nakashima M., Watanabe T., Yamamoto S., Inoue Y., Yamanaka H., Matsumura A., Iuchi K., Mori T. and Okada M. : Expression and prognostic significance in lung cancer of human tumor-associated antigen RCAS1. Int. J.Cancer 89 : 488-493, 2000
4. Ryll R, Watanabe K., Fujiwara N., Hasunuma R., Kumazawa Y., Okada M. and Yano I.: Mycobacterial cord factor, but not sulfolipid causes depletion of NKT cells and upregulation of CD1d1 on murine macrophages. "M.bovis" 2000 , 2000
5. M.Okada, Y.Katayama, Y.Inoue, M.Yotsumoto, K.Yasumitsu, S.Hosoe, S.Yoshida, N.Ohara, T.Yamada, M.Sakatani and T.Mori : Analysis of CTL activity in the patients with multi-drug resistant tuberculosis and development of new vaccination by the induction of CTL using murine model. Faseb Journal A 1061, 2000
6. M.Okada, Tanaka T., Inoue Y., Katayama

- Y., Yoshida S., Ohara N., Yamada T., Kayagaki N., Yagita H., Okumura K., Sakatani M. and Mori T. : DNA and recombinant BCG vaccination against tuberculosis and cytotoxic activity in the patients with multi-drug resistant tuberculosis. Thirty-Fifth research conference on tuberculosis and leprosy p.197-201, 2000
7. 岡田全司, H. Yamanaka, Y. Katayama, A. Matsumura, K. Okura, T. Sunami, H. Iuchi, M. Sakatani, T. Takesako, T. Mori, In vivo induction of cytotoxic T lymphocytes specific for lung cancer in the SCID-PBL/hu mice by the IL-6 related gene therapy. The FASEB Journal A1009, 2000.
 8. 岡田全司, 田中高生 : 結核ワクチンの新しいストラテジー 免疫・Immunology Frontier 10 : 2000-2008, 2000
 9. 岡田全司 : 抗結核キラー T リンパ球とリコンビナント BCG-・DNA-ワクチンの開発による新しい予防・診断・治療法 (H-11-新興-2) 厚生科学研究費補助金実績報告書・研究報告書 P1-P81, 2000
 10. 岡田全司 : 結核治療ワクチンと分子医学 現代医療 32 : 83-88, 2000
 11. 岡田全司 : 抗結核キラー T リンパ球とリコンビナント BCG-・DNA-ワクチンの開発による新しい予防・診断・治療法 “実験結核研究会” P119-P128, 2000
- II. 学会発表
1. 井上義一, 山本暁, 岡田全司, 岸潤, 安光恵一, 米田勉, 針生寛之, 吉田亮, 延山誠一, 石川秀雄, 片山友子, 細江重人, 原英記, 河原正明, 坂谷光則 : 特発性間質性肺炎、肺癌合併例におけるマスト細胞由来 Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) の役割について 第 40 回日本呼吸器学会総会 広島 2000 年 03 月 22 日-24 日
 2. 岡田全司, 片山友子, 井上義一, 四元正一, 細江重人, 安光恵一, 坂谷光則, 山中秀樹, 松村晃秀, 井内敬二, 森隆, 榎垣伸彦, 八木田秀雄, 奥村康 : 多剤耐性結核・難治性結核患者におけるキラー T 細胞機能の解析 第 40 回日本呼吸器学会総会 広島 2000 年 03 月 22 日-24 日
 3. 井上義一, 片山友子, 細江重人, 四元正一, 安光恵一, 坂谷光則, 森隆, 岡田全司 : γ -IFN 産生能及びキラー T 細胞リンパ球機能による新しい結核診断法 第 75 回日本結核病学会総会 大阪 2000 年 04 月 18 日 19 日
 4. 片山友子, 井上義一, 細江重人, 坂谷光則, 森隆, 岡田全司 : 結核に対する新しい DNA ワクチン, リコンビナント BCG ワクチン開発の試み 第 75 回日本結核病学会総会 大阪 2000 年 04 月 18 日 19 日
 5. 岡田全司, 片山友子, 井上義一, 細江重人, 四元正一, 安光恵一, 坂谷光則, 森隆 : 多剤耐性結核、難治性結核のキラー T 細胞免疫能、ヘルパー T 細胞免疫能の解析 第 75 回日本結核病学会総会 大阪 2000 年 04 月 18 日 19 日
 6. 岡田全司, 山中秀樹, 大倉英司, 松村晃秀 : IL-6 関連遺伝子導入と癌拒絶抗原ペプチド・癌拒絶抗原遺伝子導入によるヒト肺癌治療モデルの研究 第 4 回がん分子標的治療 研究会総会 第 13 回日本臨床腫瘍研究会 名古屋 2000 年 06 月 15 日-17 日
 7. 武本優次, 安教哲, 河原正明, 小河原光正, 岡田全司, 坂谷光則, 細江重人, 山本暁, 森隆, 岡田達也 : 若年発生の AFP 産生肺癌の 1 例 第 161 回日本内科学会近畿地方会 和歌山 2000 年 06 月 10 日
 8. 坂谷光則, 鈴木克洋, 岡田全司 : 「多剤

- 耐性菌結核治療に関する一考察（アンケート結果の分析）」第27回 近畿地区国療胸部疾患研究会 大阪 2000年06月24日
9. 沖塩協一、岡田全司、坂谷光則、森隆：HOSPnet上に構築したクライアント・サーバー型CVS (Concurrent Version System) -政策医療呼吸器ネットワーク標準説明文書プロジェクト 国立病院療養所総合医学会 東京 2000年11月09日10日
 10. 井上義一、清水哲雄、松本博之、佐藤正男、齋藤泰晴、赤川志のぶ、田野正男、伊藤正巳、岡田全司、坂谷光則、森隆、竹山博泰、谷口清英、西村一孝、宮崎正之、島津和康：肺リンパ管平滑筋腫症をめぐる国立病院、療養所共同臨床研究(アンケート中間報告；ネットワーク利用の問題点も含めて) 国立病院療養所総合医学会 東京 2000年11月09日10日
 11. 岡田全司、田中高生、濱口由香子、喜多洋子、大城洋子、白谷純子、坂佳志子、井上義一、坂谷光則、森隆：結核患者におけるキラーTリンパ球機能の研究と新しい結核ワクチンの開発の試み 国立病院療養所総合医学会 東京 2000年11月09日10日
 12. 坂谷光則、岡田全司、岡本時重、竹田宗孝、森隆：呼吸器ネットワークの現状と将来 -高度専門医療施設として- 第55回国立病院療養所総合医学会 東京 2000.1.9-10
 13. 田中高生、井上義一、細江重人、坂谷光則、森隆、大原直也、山田毅、柏村信一郎、古田栄人、岡田全司：結核に対する新しいDNAワクチン、リコンビナントBCGワクチン開発の試み 第30回日本免疫学会総会・学術集会 仙台 2000年11月14日-16日
 14. 岡田全司、片山友子、井上義一、細江重人、四元正一、安光恵一、濱口由香子、坂佳志子、坂谷光則、森隆、奥村康、八木田秀雄、樫垣伸彦、山田毅、大原直也、古田栄人：結核患者におけるキラーTリンパ球機能の研究と新しい結核ワクチン開発の試み 第70回実験結核研究会 大阪 2000年04月17日
 15. Y. Inoue, S. Yamamoto, M.Okada, T.Iwasaki, K.Iuchi, M.Kawahara, M.Sakatani, T.Mori, E.Ueda. : Role of basic fibroblast growth factor bearing mast cells in pulmonary fibrosis and lung cancer. World Congress on Lung Health and 10th ERS Annual Congress Florence, 2000 Italy Internal Medicine 39 (7) : 579-582
 16. Y. Inoue, S. Yamamoto, K. Nakata, Y. Taguchi, K. Taneda, S. Kawabata, S. Kitada, Y. Katayama, H. Hara, M.Okada, M. Sakatani : COMPARISON OF KL-6 AND SURFACTANT PROTEIN-D IN PLASMA FROM PATIENTS WITH PULMONARY ALVEOLAR PROTEINOSIS 2000 International Conference (AST) Tronto, Canada 2000 Respiratory and Critical Care Medicine 161 (3) : A825
 17. M.Okada, T.Sunami, T.Tanaka, H.Yamanaka, M.Kawahara, S.Minamoto, E.Okura, A.Matsumura, K.Iuchi, M.Sakatani, T.Mori, I.Saito.: Synergistic Anti-Tumor Effect of The IL-6 Gene, IL-6 Receptor Gene and GP130 Gene Therapy on Murine and Human Cancer. AACR 2001
 18. Masaji Okada, Hideki Yamanaka, Toshihiko Sunami, Takao Tanaka, Seijiro Minamoto, Eiji Okuda, Akihide Matsumura, Keiji Iuchi, Yuko Kita, Mitsunori Sakatani, Takashi Mori, Izumu Saito, Tadimitsu

- Kishimoto, Ikuei Nukaya, Kazuto Takesako
: Anti-human tumor effect of IL-6-related
gene (s) and tumor rejection antigen gene.
The 6th Annual Meeting of the Japan
Society of Gene therapy, Tokyo, 2000.
- 19.T.Sunami, T.Tanaka, H. Yamanaka, M.
Kawahara, Y. Inoue, A. Matsumura, K.
Iuchi, M. Sakatani, T. Mori, M. Okada: The
anti-human tumor effect in SCID mice
given human peripheral blood lymphocytes
and lung cancer cells by the IL-6 related
genes using adenovirus vector AACR2001.

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

（分担）研究報告書

BCG 接種が大人（成人）の結核予防に有効か否かの解析

分担研究者 坂谷光則 国立療養所近畿中央病院 副院長

研究要旨

BCG 接種が成人の結核予防に有効か否かは不明であり議論の分かれるところである。したがって、まず、近畿地区国立施設で参加意志を表明した 12 病院・療養所および 13 看護学校で開始した。ツベルクリン反応検査対象者数は看護婦 275 名、看護学生 552 名である。検査は 2 回法で実施したが、1 回目の反応が陰性の比率は、看護婦 14.2 % 学生 22.3 %であったが、2 回目の陰性者は看護婦 7.6 %、学生 7.1 %となった。陰性と判定された看護婦 21 名と学生 39 名を無作為に二分し、1 群にのみを BCG を接種し追跡調査を開始した。12 年末までの間に、両群からの結核発病者は認められていない。

A. 研究目的

結核に対するワクチンとしては、BCG が世界各国で用いられ、小児期における結核予防に関しては一定の成果を収めている。しかし、現行の BCG ワクチンでは、大人（成人）の結核予防に効果があるか否かは議論の分かれているところであり、確証がない。

したがって、BCG が真に大人の結核予防に有効であるか解明することを目的とする。

B. 研究方法

大阪大学病院、国立南和歌山病院、国立療養所近畿中央病院など近畿地区の 12 国立施設において新採用若年看護婦 275 名と 13 の付属看護学校新生 552 名にツ反を行った。ツ反陰性者を無作為に二分し、一方の群に BCG を接種した。5 年～10 年後の結核発症予防効果で BCG 有効性を検定

する。

一方、結核に対する BCG の免疫能の増強率作用は末梢血リンパ球 (PBL) の γ -IFN 産生能で検討した。

（倫理面への配慮）

1. 当病院の倫理委員会は院外者 2 名、関西学院大学総長、大阪国際大学政経学部教授を含む各方面の医療従事者（事務系の人も含む）により構成されており、毎月最低一回は長時間にわたり議論されている。
2. BCG ワクチン有効性見当の際、健常人として国立病院・療養所の新採用看護婦および付設看護学校新生に説明会を開き、当プロジェクトを説明した上で、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と理解（インフォームドコンセント）に対する文面を記載して文書を配布している。日を空け、充分の考慮期間をおいた後、ボランティア

ア（承諾をいただいた人）のみ当研究に参加していただいている。なお、付設看護学校新生で未成年の学生には上記のことを保護者にも説明し、保護者（父母等）の署名と印鑑をもらった人のみ当研究に協力いただいている。

C. 研究結果

現行の BCG ワクチン接種の有効性、特に成人における追加接種がその後の結核発病を抑制できるかどうか、を検討した。国立病院・療養所の新採用看護婦および付設看護学校新生の集団ツベルクリン反応検査を実施し、陰性者を 2 分して 1 群のみに BCG 接種を行い、その後の長期間観察によって両群での結核発病率を比較検定した。対象者の属する施設は国立病院・療養所とするが、地方医務局単位（例：近畿地区、九州地区など）でグループを形成して作業した。まず、近畿地区国立施設で参加意思を表明した 12 病院・療養所および 13 看護学校で開始した。ツベルクリン反応検査対象者数は看護婦 275 名、看護学生 552 名である。検査は 2 回法で実施したが、1 回目の反応が陰性の比率は、看護婦 14.2 %、学生 22.3 %であったが、2 回目の陰性者は看護婦 7.6 %、学生 7.1 %となった。対象者の世代すなわち 10 才代後半から 20 才代前半でのツベルクリン反応陰性者の比率は 7 ~ 8%と推測される。この世代での結核既感染率は数%以下と推定されていることから、陽性者の殆どは、過去の BCG 接種によるツベルクリンアレルギーが持続していることによる反応陽性と判断される。陰性と判定された看護婦 21 名と学生 39 名を無作為に 2 分し、1 群にのみ BCG を接種し追跡調査を開始した。12 年末までの間に、両群からの結核発病者は認められていない。

前回報告した如く、この陰性者の 21 名

を無作為に 2 分し 13 名に BCG 接種を行った。ツ反前に末梢血を採血し、迅速 γ -IFN 測定法（Quantiferon 法）で γ -IFN 産生を ELISA で検討した。その結果ツ反の強さと γ -IFN 産生濃度は相関した。さらに BCG 接種後 3 ヶ月の PBL の γ -IFN 産生は増強傾向を示した。このことにより BCG は少なくとも大人健常人に対し免疫増強能を有することが示唆された。

D. 考察

この結果からは、看護職員での結核罹患率を 100/10 万人（一般市民の 2 ~ 3 倍）と仮定して、両群 1000 名程度の対象者が必要と推計される。従って、ツベルクリン反応検査対象者の組み入れは全国規模に拡大する必要がある。なお、ツベルクリン反応検査は施設間の技術差が著しく、1 回目陽性者が 2 回目に陰性と判定される場合も少なくない施設、もしくは計測平均値が減少する施設などもあり、末梢血リンパ球の、結核菌や BCG 菌特異抗原に対する試験管内での反応等を含め、より正確なツベルクリンアレルギー測定方法の開発が必要と考えられた。（坂谷、森、螺良、岡田）

E. 結論

近畿地区国立施設で参加意思を表明した 12 病院・療養所および 13 看護学校で開始した。ツベルクリン反応検査対象者数は看護婦 275 名、看護学生 552 名である。検査は 2 回法で実施したが、1 回目の反応が陰性の比率は、看護婦 14.2 %、学生 22.3 %であったが、2 回目の陰性者は看護婦 7.6 %、学生 7.1 %となった。陰性と判定された看護婦 21 名と学生 39 名を無作為に 2 分し、1 群にのみ BCG を接種し追跡調査を開始した。12 年末までの間に、両群からの結核発病者は認められていない。

F. 研究発表

1.論文発表

1. Akira M, Sakatani M and Ishikawa H.
Transient radiographic progression during initial treatment of pulmonary tuberculosis: CT findings. Journal of Computer Assisted Tomography 24 (3) :426-431, 2000
2. Akira M, Inoue Y, Yamamoto S and Sakatani M. Non-specific interstitial pneumonia: findings on sequential CT scans of nine patients. THORAX 55 (10) : 854-859, 2000
3. Inoue Y, Kawaguchi T, Yoshida A, Harada H, Hara H, Yamamoto S and Sakatani M. Paragonimiasis Miyazakii associated with bilateral pseudochoylothorax. Internal Medicine 39: 579-582, 2000
4. 坂谷光則 : 医療従事者のツベルクリン反応と BCG 接種 老年医学 38 (6) : 775-778, 2000
5. 坂谷光則 : 再興感染症としての結核 医学のあゆみ 195 (5) : 309-312, 2000
6. 坂谷光則 : 結核菌の再感染 日本医事新報 3971: 94-95, 2000
7. 坂谷光則 : 粟粒結核 臨床医 26 (1) : 30-32, 2000
8. 井上義一、坂谷光則 : 肺外結核 Medecal Practice 17 (6) : 969-973, 2000
9. 坂谷光則、森亨 : 肺の M.kansaii 症を合併したエイズ患者の 1 例 「HIV 感染症に関する臨床研究」平成 木村哲 11 年度研究報告書 227-229, 2000
10. 坂谷光則 : 非定型（非結核性）抗酸菌症の臨床 日本胸部臨床 59 (8) : 557-564, 2000
11. 鈴木克洋、坂谷光則 : 結核治療薬の分類と臨床薬理 今月の治療 8 (10) : 1167-1170, 2000
12. 坂谷光則 : 最近の結核問題とその背景 : 総論 モダンフィジシャン 20 (9) : 1069-1071, 2000
13. 井上義一、坂谷光則 : 間質性肺炎、肺線維症の ADL と QOL THE LUNG 8 (4) : 456-461, 2000
14. 坂谷光則 : 結核の院内感染 Pharma Medica 18 (10) : 55-59, 2000
15. 森亨, 岸不盡彌, 齊藤武文, 坂谷光則, 佐々木結花, 藤重えり子, 健山正夫, 豊田恵美子, 豊田丈夫, 中田光, 永井英明, 藤田明, 藤野忠彦, 吉山崇, 和田雅子 : 日本における HIV 感染抗酸菌症の実態. 「HIV 感染症に関する臨床研究」平成 11 年度研究報告書. 2000.3, 76-84
16. 坂谷光則 : 非定型抗酸菌症持続排菌例に対する治療. 日本医事新報 2001.1.13
17. 富田元久, 木下幸保, 新田忠善, 竹野華, 木村伸生, 入江章子, 山本暁, 鈴木克洋, 坂谷光則 : Tween80 の抗酸菌発育への影響. 医学と薬学 2001.1
18. Takayuki Kitamura, Kanji uchida, Naohiko Tanaka, Tomoko Tsuchiya, Junichi Watanabe, Yoshitsugu Yamada, Kazuo Hanaoka, John F.Seymour, Otto D.Schoch, Ian Doyle, Yoshikazu Inoue, Mitsunori Sakatani, Shoji Kudoh, Arata Azuma, Toshihiro Nukiwa, Shiro Kanegasaki, and Koh Nakata : Serological Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis. Am J Respir Crit Care Med. 2000, 162: 658-662
19. Y. Inoue, S. Yamamoto, M.Okada, T.Iwasaki, K.Iuchi, M.Kawahara, M.Sakatani, T.Mori, E.Ueda : Role of basic fibroblast growth factor bearing mast cells in pulmonary fibrosis and lung cancer. Internal Medicine. 2000, 39 (7) : 579-582
20. Y. Inoue, S.Yamamoto, K.Nakata, Y.Taguchi, K.Taneda, S.Kawabata, S.Kitada, Y.Katayama, H.Hara, M.Okada, M.Sakatani : comparison of

- kl-6 and surfactant protein-D in plasma from patients with pulmonary alveolar proteinosis. . Respiratory and Critical Care Medicine.2000, 161 (3) : A825
21. Koh Nakata, Kanji Uchida, Naohiko Tanaka, John F.Seymour, Otto D.Schoch, Ian Doyle, Yoshikazu Inoue, Mitsunori Sakatani, Shoji Kudoh, Arata Azuma, Toshihiro Nukiwa, Tomoyuki Tomita, Makato Katagiri, and Takayuki Kitamura : Serological Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis. Respiratory and Critical Care Medicine.2000, 161 (3) : A887
- 2.学会発表
1. 坂谷光則 : 結核院内感染の予防. 東大阪市結核指定医講習会. 大阪 : 2000年01月13日
 2. 坂谷光則 : 結核をめぐる諸問題. セミナー形式による研修会. 大阪 : 2000年02月05日-06日
 3. 馬上明子, 森隆, 坂谷光則, 原英記 : アンケートにみる在宅酸素病診連携のハードル. 第8回国立在宅ケア研究会. 千葉 : 2000年02月03日
 4. 坂谷光則 : 結核院内感染対策について. 第4回京都感染症フォーラム 京都 : 2000年02月19日
 5. 延山誠一, 光岡茂樹, 安光恵一, 米田勉, 吉田亮, 神谷敦, 川口知哉, 河原正明, 坂谷光則 : 気管支結核による気道狭窄に対してのバルーン拡張術の検討. 第66回日本気管支学会近畿支部会. 大阪 : 2000年03月10日
 6. 坂谷光則 : 日本結核病学会との共催教育講演「非結核性抗酸菌症の治療に関する見解-1998」. 第40回日本呼吸器学会総会. 広島 : 2000年03月22日-24日
 7. 井上義一, 山本暁, 岡田全司, 岸潤, 安光恵一, 米田勉, 針生寛之, 吉田亮, 延山誠一, 石川秀雄, 片山友子, 細江重人, 原英記, 河原正明, 坂谷光則 : 特発性間質性肺炎、肺癌合併例におけるマスト細胞由来 Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) の役割について. 第40回日本呼吸器学会総会. 広島 : 2000年03月22日-24日
 8. 岸潤, 井上義一, 吉田亮, 安光恵一, 米田勉, 針生寛之, 延山誠一, 石川秀雄, 片山友子, 原英記, 河原正明, 坂谷光則 : 間質性肺炎患者における血漿中 SP-D, KL-6 濃度の比較検討. 第40回日本呼吸器学会総会 広島 : 2000年03月22日-24日
 9. 岡田全司, 片山友子, 井上義一, 四元正一, 細江重人, 安光恵一, 坂谷光則, 山中秀樹, 松村晃秀, 井内敬二, 森隆, 榎垣伸彦, 八木田秀雄, 奥村康 : 多剤耐性結核・難治性結核患者におけるキラーT細胞機能の解析. 第40回日本呼吸器学会総会 広島 : 2000年03月22日-24日
 10. 原英記, 坂谷光則, 審良正則, 山本暁, 井内敬二, 森隆 : 多剤耐性結核患者の経過と予後因子に関する検討. 第40回日本呼吸器学会総会 広島 : 2000年03月22日-24日
 11. 石川秀雄, 吉田亮, 安光恵一, 米田勉, 針生寛之, 岸潤, 延山誠一, 神谷敦, 湯久浩, 井上義一, 原英記, 原田尚門, 坂谷光則 : 当院で経験した過敏性肺臓炎患者の実態及び現状についての検討. 第40回日本呼吸器学会総会 広島 : 2000年03月22日-24日
 12. 坂谷光則 : シンポジウム医療従事者の結核発病と予防対策の現状の問題点. 第75回日本結核病学会総会 大阪 : 2000年04月18日19日
 13. 井上義一, 片山友子, 細江重人, 四元正一, 安光恵一, 坂谷光則, 森隆, 岡田

- 全司 : γ -IFN 産生能及びキラー T 細胞リンパ球機能による新しい結核診断法. 第 75 回日本結核病学会総会 大阪 : 2000 年 04 月 18 日 19 日
14. 片山友子, 井上義一, 細江重人, 坂谷光則, 森隆, 岡田全司 : 結核に対する新しい DNA ワクチン, リコンビナント BCG ワクチン開発の試み. 第 75 回日本結核病学会総会 大阪 : 2000 年 04 月 18 日 19 日
15. 岡田全司, 片山友子, 井上義一, 細江重人, 四元正一, 安光恵一, 坂谷光則, 森隆 : 多剤耐性結核, 難治性結核のキラー T 細胞免疫能, ヘルパー T 細胞免疫能の解析. 第 75 回日本結核病学会総会 大阪 : 2000 年 04 月 18 日 19 日
16. 小河原光正, 延山誠一, 安宅信二, 坂谷光則 : 気管支結核後の気管支狭窄に対する気管支鏡下超音波検査の検討. 第 75 回日本結核病学会総会 大阪 : 2000 年 04 月 18 日 19 日
17. 坂谷光則 : 肺非定型抗酸菌症. 道後カンファレンス 松山 : 2000 年 05 月 20 日
18. 武本優次, 安教哲, 河原正明, 小河原光正, 岡田全司, 坂谷光則, 細江重人, 山本暁, 森隆, 岡田達也 : 若年発生の AFP 産生肺癌の 1 例. 第 161 回日本内科学会近畿地方会 和歌山 : 2000 年 06 月 10 日
19. 米田勉, 井上義一, 吉田亮, 坂谷光則, 黒田修, 川幡誠一, 萩平哲, 中田光 : 全麻下肺洗浄前後で各種血清マーカーにて経過を追えた特発性肺胞蛋白症の 1 例. 第 161 回日本内科学会近畿地方会 和歌山 : 2000 年 06 月 10 日
20. 岸潤, 井上義一, 吉田亮, 安光恵一, 針生寛之, 延山誠一, 石川秀雄, 神谷敦, 坂谷光則 : 間質性肺炎患者における血漿中 SP-D, KL-6 濃度の比較検討. 第 85 回日本結核病学会・第 55 回呼吸器病学会近畿地方会 奈良 : 2000 年 07 月 01 日
21. 石川秀雄, 四元正一, 原田尚門, 原英記, 井上義一, 湯久浩, 神谷敦, 延山誠一, 吉田亮, 須波敏彦, 針生寛之, 安光恵一, 米田勉, 岸潤, 坂谷光則 : 過敏性肺臓炎発症と気象条件の関与についての検討. 第 85 回日本結核病学会・第 55 回呼吸器病学会近畿地方会 奈良 : 2000 年 07 月 01 日
22. 延山誠一, 小河原光正, 岸潤, 安光恵一, 吉田亮, 河原正明, 坂谷光則 : 気管支結核の超音波内視鏡所見の検討. 第 85 回日本結核病学会・第 55 回呼吸器病学会近畿地方会 奈良 : 2000 年 07 月 01 日
23. 針生寛之, 石川秀雄, 神谷敦, 坂谷光則, 原田尚門, 湯久浩, 黒田修 : 喀血に対して超選択的気管支動脈塞栓術を施行した 29 症例の検討. 第 85 回日本結核病学会・第 55 回呼吸器病学会近畿地方会 奈良 : 2000 年 07 月 01 日
24. 延山誠一, 岸潤, 安光恵一, 吉田亮, 小河原光正, 河原正明, 坂谷光則 : 気管支結核による気道狭窄のバルーン拡張術, 電気焼却術の検討. 第 85 回日本結核病学会・第 55 回呼吸器病学会近畿地方会 奈良 : 2000 年 07 月 01 日
25. 坂谷光則, 鈴木克洋, 岡田全司 : 多剤耐性菌結核治療に関する一考察 (アンケート結果の分析). 第 27 回 近畿地区国療胸部疾患研究会 大阪 : 2000 年 06 月 24 日
26. 坂谷光則 : 結核問題の現状と対策. 第 7 回 南大阪呼吸器疾患勉強会 大阪 : 2000 年 09 月 30 日
27. 沖塩協一, 岡田全司, 坂谷光則, 森隆 : HOSPnet 上に構築したクライアント・サーバー型 CVS (Concurrent Version System) - 政策医療呼吸器ネットワーク標準説明文書プロジェクト. 国立病院療養所総合医学会 東京 : 2000 年 11 月

- 9-10日
- 28.川口知哉, 延山誠一, 光岡茂樹, 須波敏彦, 中宜敬, 沖塩協一, 安宅信二, 小河原光正, 細江重人, 河原正明, 坂谷光則: 多発性肺門部早期肺癌の一例. 第 67 回日本気管支学会近畿支部会 大阪: 2000年12月09日
- 29.坂谷光則: 結核院内感染対策. 結核院内感染対策シンポジウム 京都: 2000年11月11日
- 30.岸潤, 井上義一, 鈴木克洋, 坂谷光則, 山本暁: メチルプレドニゾロン, サイクロホスファミドのパルス療法が有効であった皮膚筋炎に合併した間質性肺炎の1例. 第 86 回日本結核病学会・第 56 回呼吸器病学会近畿地方会 京都: 2000年12月02日
- 31.高藤淳, 井上義一, 石川秀雄, 源誠二郎, 鈴木克洋, 坂谷光則, 審良正則, 山本暁: 血清中 KL-6, SP-D の測定が有用であった夏型過敏性肺臓炎の1例. 第 86 回日本結核病学会・第 56 回呼吸器病学会近畿地方会 京都: 2000年12月02日
- 32.眞木薫, 井上義一, 柏庸三, 井上幸治, 桑名みどり, 岸潤, 安光恵一, 吉田亮, 新井徹, 高藤淳, 源誠二郎, 鈴木克洋, 坂谷光則, 中田光: 血清学的検査が有用であった特発性肺胞蛋白症の1例. 第 86 回日本結核病学会・第 56 回呼吸器病学会近畿地方会 京都: 2000年12月02日
- 33.柏庸三, 針生寛之, 桑名みどり, 井上幸治, 岸潤, 眞木薫, 光岡茂樹, 安光恵一, 新井徹, 高藤淳, 延山誠一, 吉田亮, 鈴木克洋, 井上義一, 坂谷光則: 睡眠時呼吸障害を伴う亀背に対して NIPPV 導入を行った3症例. 第 86 回日本結核病学会・第 56 回呼吸器病学会近畿地方会 京都: 2000年12月02日
- 34.立花暉夫, 竹中雅彦, 河野修興, 坂谷光則: 胸部レ線像著明肺病変、呼吸器症状の著明改善と共に血清 KL-6 値、ACE 活性高値が著明改善した肺サルコイドーシス症例. 第 86 回日本結核病学会・第 56 回呼吸器病学会近畿地方会 京都: 2000年12月02日
- 35.立花暉夫, 竹中雅彦, 虎頭廉, 林清二, 坂谷光則, 山本暁, 由谷親夫: 合併症で死亡したサルコイドーシス剖検例の臨床的検討、大阪地区症例を中心に. 第 86 回日本結核病学会・第 56 回呼吸器病学会近畿地方会 京都: 2000年12月02日
- 36.光岡茂樹, 石川秀雄, 井上義一, 針生寛之, 源誠二郎, 鈴木克洋, 原田尚門, 坂谷光則, 審良正則: 若年女性に発症しびまん性の肺胞出血が疑われた特発性咯血の1例. 第 86 回日本結核病学会・第 56 回呼吸器病学会近畿地方会 京都: 2000年12月02日
- 37.坂谷光則: シンポジウム結核院内感染対策について. 第 48 回日本化学療法学会西日本支部会 京都: 2000年12月06日
- 38.坂谷光則: 結核症の臨床と診断. 第 27 回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会 大阪: 2000年12月01日
- 39.井上義一, 針生寛之, 吉田亮, 岸潤, 安光恵一, 源誠二郎, 鈴木克洋, 坂谷光則, 審良正則, 山本暁: 9年間の経過で cellular pattern から fibrosing pattern への移行が疑われた nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) の1例. 第 163 回日本内科学会近畿支部会 京都: 2000年12月16日
- 40.木下幸保, 富田元久, 入江章子, 吉田亮, 鈴木克洋, 坂谷光則: 咯痰の肉眼的品質分類による直接塗抹法と集菌塗抹法の比較. 第 24 回抗酸菌治療研究会 東京: 2000年12月02日
- 41.富田元久, 木下幸保, 入江章子, 吉田

- 亮, 鈴木克洋, 坂谷光則 抗酸菌検査用前処理 (CC-6) と液体培地 (KRD 培地) の検討. 第 24 回抗酸菌治療研究会 東京 : 2000 年 12 月 02 日
42. 針生寛之, 井上義一, 眞木薫, 岸潤, 光岡茂樹, 吉田亮, 源誠二郎, 鈴木克洋, 坂谷光則, 井内敬二, 審良正則, 山本暁 : 9 年間経過を追いたびまん性肺疾患の一例. 第 89 回びまん性肺疾患研究会 大阪 : 2000 年 06 月 03 日
43. 光岡茂樹, 井上義一, 眞木薫, 岸潤, 針生寛之, 吉田亮, 源誠二郎, 鈴木克洋, 坂谷光則, 井内敬二, 審良正則, 山本暁 : ステロイドが有効であったびまん性肺疾患の一例. 第 89 回びまん性肺疾患研究会 大阪 : 2000 年 06 月 03 日
44. 桑名みどり, 井上義一, 眞木薫, 岸潤, 針生寛之, 高藤淳, 新井徹, 延山誠一, 吉田亮, 源誠二郎, 鈴木克洋, 坂谷光則, 井内敬二, 審良正則, 山本暁 : 慢性関節リウマチ患者に認めたびまん性肺疾患の一例. 第 91 回びまん性肺疾患研究会 大阪 : 2000 年 11 月 25 日
45. 岸潤, 小河原光正, 井上義一, 坂谷光則, 山本暁 : 長期治療した DPB の 1 剖検例. 第 86 回日本結核病学会・第 56 回呼吸器病学会近畿地方会 京都 : 2000 年 12 月 02 日
46. 井上義一, 清水哲雄, 松本博之, 佐藤正男, 齋藤泰晴, 赤川志のぶ, 田野正男, 伊藤正巳, 岡田全司, 坂谷光則, 森隆, 竹山博泰, 谷口清英, 西村一孝, 宮崎正之, 島津和康 : 肺リンパ管平滑筋腫症をめぐる国立病院、療養所共同臨床研究(アンケート中間報告; ネットワーク利用の問題点も含めて). 国立病院療養所総合医学会 東京 : 2000 年 11 月 09 日 10 日
47. 岡田全司, 田中高生, 濱口由香子, 喜多洋子, 大城洋子, 白谷純子, 坂佳志子, 井上義一, 坂谷光則, 森隆 : 結核患者におけるキラー T リンパ球機能の研究と新しい結核ワクチンの開発の試み. 国立病院療養所総合医学会 東京 : 2000 年 11 月 09 日 10 日
48. 坂谷光則, 岡田全司, 岡本時重, 竹田宗孝, 森隆 : 呼吸器ネットワークの現状と将来—高度専門医療施設として—. 第 55 回国立病院療養所総合医学会 東京 : 2000.1.9-10
49. 沖塩協一, 岡田全司, 坂谷光則, 森隆 : HOSPnet 上に構築したクライアント・サーバー型 CVS (Concurrent Version System) -政策医療呼吸器ネットワーク標準説明文書プロジェクト. 第 55 回国立病院療養所総合医学会東京 : 2000.1.9-10
50. 田中高生, 井上義一, 細江重人, 坂谷光則, 森隆, 大原直也, 山田毅, 柏村信一郎, 吉田栄人, 岡田全司 : 結核に対する新しい DNA ワクチン、リコンビナント BCG ワクチン開発の試み. 第 30 回日本免疫学会総会・学術集会 仙台 : 2000 年 11 月 14 日—16 日
51. 岡田全司, 片山友子, 井上義一, 細江重人, 四元正一, 安光恵一, 濱口由香子, 坂佳志子, 坂谷光則, 森隆, 奥村康, 八木田秀雄, 梶垣伸彦, 山田毅, 大原直也, 吉田栄人 : 結核患者におけるキラー T リンパ球機能の研究と新しい結核ワクチン開発の試み. 第 70 回実験結核研究会 大阪 : 2000 年 04 月 17 日
52. 須波敏彦, 井上義一, 田中高生, 源誠二郎, 岡田全司, 河原正明, 坂谷光則, 山中秀樹, 大倉英司, 松村晃秀, 井内敬二, 森隆, 齋藤泉 : SCID-PBL/hu モデルにおけるヒト肺癌に対するアデノウイルスベクターを用いた IL-6 関連遺伝子導入による抗腫瘍効果. 第 73 回日本肺癌学会関西支部会 千里ライフサイエンスセンター 2001.1.27
53. 坂谷光則 : 「じん癌について—フィル

- ム読影と診断一」。平成12年度堺市医師会産業医部会基礎研修会 堺市医師会館：2001.2.17
54. 坂谷光則：じん肺について—フィルム読影と診断—。平成12年度堺市医師会産業医部会基礎研修会 堺市医師会館：2001.2.17
56. F.Ogushi, W.Ichikawa, K.Tani, K.Maniwa, K.Yoneda, Y.Nakamura, M.Sakatani, S.Sone : Immunoglobulin binding factor in sputum from patients with chronic airway diseases . World Congress on Lung Health and 10th ERS Annual Congress. Florence Italy : 2000年08月30日-09月03日
57. Koichi Nishimura, Koji Inoue, Yoshikazu Inoue, Mitsunori Sakatani, Katsuhiko Suzuki, Seiji Minamoto, Toru Arai, Akira Yoshida, Yozo Kashiwa, Masanori Akira, Satoru Yamamoto : An autopsy case of 50-year-old man who complained of chronic progressive dyspnea, whose chest radiograph showed diffuse bizarre interstitial. 第90回びまん性肺疾患研究会 記念特別例会 大阪：2000年08月26日
58. Y. Inoue, S. Yamamoto, M.Okada, T.Iwasaki, K.Iuchi, M.Kawahara, M.Sakatani, T.Mori, E.Ueda : Role of basic fibroblast growth factor bearing mast cells in pulmonary fibrosis and lung cancer . World Congress on Lung Health and 10th ERS Annual Congress. Florence,Italy : 2000年08月30日-09月03日
59. Y. Inoue, S.Yamamoto, K.Nakata, Y.Taguchi, K.Taneda, S.Kawabata, S.Kitada, Y.Katayama, H.Hara, M.Okada, M.Sakatani : comparison of kl-6 and surfactant protein-d in plasma-from patients with pulmonary alveolar proteinosis. International Conference (ast) . Tronto,Canada: 2000年05月05日-10日
60. Koh Nakata, Kanji Uchida, Naohiko Tanaka, John F.Seymour, Otto D.Schoch, Ian Doyle, Yoshikazu Inoue, Mitsunori Sakatani, Shoji Kudoh, Arata Azuma, Toshihiro Nukiwa, Tomoyuki Tomita, Makato Katagiri, and Takayuki Kitamura : Serological Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis. International Conference (AST) Tronto,Canada2000年05月05日-10日
61. M.Okada, T.Sunami, T.Tanaka, H.Yamanaka, M.Kawahara, S.Minamoto, E.Okura, A.Matsumura, K.Iuchi, M.Sakatani, T.Mori, I.Saito. : Synergistic Anti-Tumor Effect of The IL-6 Gene, IL-6 Receptor Gene and GP130 Gene Therapy on Murine and Human Cancer. AACR
62. Masaji Okada, Hideki Yamanaka, Toshihiko Sunami, Takao Tanaka, Seiji Minamoto, Eiji Okuda, Akihito Matsumura, Keiji Iuchi, Yuko Kita, Mitsunori Sakatani, Takashi Mori, Izumu Saito, Tadimitsu Kishimoto, Ikuei Nukaya, Kazuto Takesako : Anti-human tumor effect of IL-6-related gene (s) and tumor rejection antigen gene. The 6th Annual Meeting of the Japan Society of Gene therapy
63. M.Okada, T.Tanaka, Y.Inoue, Y.Katayama, S.Yoshida, N.Ohara, T.Yamada, N.Kayagaki, H.Yagita, K.Okumura, M.Sakatani, and T.Mori. : DNA and recombinant BCG vaccination against tuberculosis and cytotoxic activity in the patients with multi-drug resistant tuberculosis. 2000年アメリカ免疫学会
64. M.Okada, H.Yamanaka, Y.Katayama, A.Matsumura, K.Okura, T. Sunami, H. Iuchi, M. Sakatani, T.Takesako, T. Mori. :

- In vivo induction of cytotoxic T lymphocytes specific for lung cancer in the SCID-PBL/hu mice by the IL-6 related genes therapy. 2000年アメリカ免疫学会
- 65.M.Okada, Y.Katayama, Y.Inoue, M.Yotsumoto, K.Yasunitsu, S.Hosoe, S.Yoshida, N.Ohara, T.Yamada, M.Sakatani, T. Mori. : Analysis of CTL activity in the patients with multi-drug resistant tuberculosis and development of new vaccination by the induction of CTL using murine model. 2000年7月 US-JAPAN Tuberculosis-leprosy meeting (Yokohama)
- 66.T.SunamiTanaka,H.Yamanaka, M.Kawahara, Y.Inoue,A.Matsumura, K.Iuchi, M. Sakatani T.Mori, M.Okuda. The anti-human tumor effect in SCID mice given human peripheral blood lymphocytes and lung cancer cell by the IL-6 related genes using adenovirus vector. AACR 2001.

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

（分担）研究報告書

「サブユニットワクチンの蛋白精製、DNA ワクチン作製、結核菌糖脂質成分の抗原性と免疫増強活性」に関する研究

分担研究者 矢野 郁也 日本BCG研究所中央研究所 所長

研究要旨

結核サブユニットワクチンの新規開発を目標として、今年度は、結核菌及びその類縁菌 *Rhodococcus* 属より単離した細胞壁糖脂質 cord factor のアジュバント物質としての性質、即ち、毒性、肉芽腫形成能、血管新生機構を実験動物を用いて解析し、*Rhodococcus cord factor* にも顕著な活性があることを解明した。また、これらの低毒性 cord factor をアジュバントとして、BCG 菌培養上清蛋白と共にマウスに免疫することにより結核菌に対する感染防御能が上昇し、将来サブユニットワクチンの開発に有用であることも明らかとなった。

A.研究目的

近年、世界的な結核の再興に際して、新しい抗結核ワクチンの開発が要望されているが、結核の発病が複雑な細胞性免疫反応に基づくものであることと、動物モデルとしてマウスの系が必ずしもヒトの結核に対する免疫反応とは一致しないことから、その効力は勿論、副作用や持続性の点でも現在 BCG ワクチンに代わる強力なワクチンは実用化されていない。最近、結核菌の遺伝子構造が解明され、一方で細胞性免疫にかかわるサイトカイン遺伝子の解明も進歩したことより、DNA ワクチン始め、組み換え DNA ワクチン、栄養要求変異株ワクチン等が試みられつつあるが、抗結核ワクチンの中で最も安全で、かつ作用機構が明確なサブユニットワクチンの開発が期待される。我々は、岡田班班員として抗結核サブユニットワクチン開発のための基礎研究として、1) 抗原の選択、及び、2) アジュバ

ント糖脂質の免疫学的性質を明らかにすることを目的として検討した。

B.研究方法

1) 抗原の選択については、混合抗原として BCG 菌培養濾液濃縮蛋白抗原 (BCG-CFP) を、精製抗原として同じく BCG 菌培養濾液より精製して得られる MPB59 (85B) を感染防御抗原として用い、2) アジュバントについては、Freund の不完全アジュバント (FIA) にかわる低毒性ミコール酸含有糖脂質を *Rhodococcus* sp.4306 株より抽出単離して蛋白抗原と同時にマウスに投与することにより、結核菌 *M.tuberculosis* H37Rv のエロゾール感染に対する防御効果を検討した。糖脂質のアジュバント活性については、これまで報告されていない家兎に対する cord factor の肉芽腫形成能を形成させ、この際にみられ

腫形成能の検討と、ミコール酸含有糖脂質によるマウス肉芽腫形成に際してみられる血管新生機構について検討した。

(倫理面への配慮)

今年度の当該研究内容は、全て実験動物に対する投与実験であり、当該施設における「動物実験指針」に基づいて行われたもので、倫理面への配慮は特に必要ないものと考えている。

C.研究結果

1) 家兎に対する cord factor の肉芽腫形成能と胸腺・脾臓のアポトーシスと萎縮：
家兎はマウスに比べると結核菌に対する感受性が高く、免疫反応や感染による組織の変化もヒトに近い反応性を示す。けれども家兎に対する cord factor や結核菌細胞壁成分の肉芽腫形成能やアジュバント活性は充分解明されていなかった。我々は、NJ 系白色家兎耳静脈から cord factor を単回投与し(1～20mg/匹)、約7日目をピークに肺、肝及び脾臓に顕著な肉芽腫が誘導されること、又同時に胸腺皮質細胞のアポトーシスによる胸腺、脾臓の萎縮をきたすことを見出した。家兎を用いたワクチン動物モデルが期待される(Hamasaki et al. I&I. 2000 他)。

2) マウス(及びラット)に対する cord factor 肉芽腫形成と血管新生機構：
cord factor 肉芽腫の特徴は、投与初期にみられる proinflammatory cytokine の産生によるリンパ球やマクロファージの集積(recruitment)に始まり、血管透過性の増加、細胞接着因子の誘導を経てマクロファージやリンパ球の活性化に至る一連の慢性炎症反応を経ることであるが、細胞増殖を促進する要素の一つとして血管の新生がある。今回マウス皮下パウチ内に cord factor を投与する血管新生にどのような cytokine が関与し

ているかを調べた所、投与後1～3時間目をピークとする VEGF、IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 及び bFGF の産生が認められ、IL-1- β や TGF- β は 48 時間以上にわたって産生が持続した。血管新生はパウチ内肉芽腫に 3～7 日間にわたって認められ、抗 VEGF 抗体の投与により肉芽腫形成は阻害された(Sakaguchi et al. I&I. 2000 他)。ラットに対しては血管組織の未発達の角膜に TDM を投与し、1日より21日間観察したところ、投与2日目より9日目にかけて顕著な角膜内新生血管が認められ、これに先立ち、3時間～3日目にかけて TNF- α 、IL-8、IL-1- β 、VEGF の産生が認められた。又これらの血管新生は、抗 TNF- α 、抗 IL-8、抗 VEGF の各抗体により顕著な阻害を受け、これらの cytokine が血管新生に重要な役割を果たしていることが判った(Saita et al. I&I. 2000 他)。

3) BCG 培養濾液(BCG-CFP)及びこれより精製単離した MPB59 蛋白抗原と、結核菌 cord factor 及び CWS 画分、又は、低毒性 Rhodococcus の cord factor 及び CWS 画分をアジュバントとするサブユニットワクチンを構成し、マウスに皮下投与後、22日後に再投与して30日後に M.tuberculosis H37Rv 10² CFU をエロゾール接種した。30日後各臓器を摘出し、各 CFU を 28 日後に測定し、残存菌数を算定した所、MPB59 in oil 系が最も強力なワクチン効果を示し、ほぼ 10%にまで菌数を減少させることができた。注目すべきは BCG-CFP でも log10 protection で 0.73 の減少、Rhodococcus cord factor で log10 protection 0.51 の減少を示し、BCG 10⁶ s.q.による 1.45 の菌数減少には及ばなかったものの、将来のワクチン候補の可能性が示唆された。

D.考察

サブユニットワクチンの開発研究の最も

中心点は、抗原の選択とアジュバントの組み合わせにあるが、これ以外に投与形態や実験動物の選択が重要である。アジュバントについては従来の FIA に勝る低毒性かつ強力なアジュバント物質が望まれるが、未だ満足な物質は見出されていない。Rhodococcus 属は土壌細菌の一種でヒトには無害であるが結核菌と細胞壁構造も類似しており、cord factor を産生することから、これをアジュバントとするワクチンが開発される可能性がある。抗原としては結核菌感染防御抗原で人体にも最も適したものとして、MPB64、MPB59 (α 抗原)、ESAT-6、CFP-10、19KDa lipoprotein などが検討されているが、最近のデータでは単独抗原よりも複合抗原の方がより強力なワクチン効果を示すとされており、BCG-CFP にかなりの活性があることとよく一致する。今後、サブユニットワクチンの開発を進めるに当たり、アジュバント糖脂質の作用機序と抗原に対する感度を如何に高めるか、動物実験系を如何に正しく用いるかが主要点となる。

E. 結論

新しい結核サブユニットワクチンは、安全性の面からも最も期待されるワクチンであるが、その構成には感染防御抗原としての蛋白抗原の選定とアジュバントの免疫学的性質の解明が必要である。本年は、アジュバントとして結核菌及び Rhodococcus sp.4306 の cord factor を中心に、家兎の系での肉芽腫形成能、マウス系での血管新生能を検討し、毒性を比較した。結核菌 cord factor は家兎肉芽腫形成能、マウス肉芽腫血管新生能とも顕著であったが体重減少も著しかった。Rhodococcus cord factor は血管新生能も十分に認められ、これに関与するサイトカインの産生も十分認められたことから、今後 Rhodococcus sp.4306 の cord

factor を中心にアジュバント物質の開発を進めたい。また、マウスの系と比べて家兎の系は、アジュバントに対する感受性も良好な事から、今後マウスに変えて家兎の系を検討したい。感染防御抗原については、BCG 培養濾液での免疫強化活性が認められたことから、今後 BCG 濾液中の蛋白抗原についても検討したい。

F. 健康危険情報

本研究を進めるに当たって、特に健康危険情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) N.Hamasaki, E.Ishii, K.Tominaga, Y.Teizuka, T.Nagaoka, S.Kadota, T.Kuroki, and I.Yano : Highly selective antibacterial activity of novel alkyl quinolone alkaloids from a Chinese herbal medicine, Gosyuyu (Wu-Chu-Yu), against Helicobacter pylori in vitro. Microbiol Immunol., 44 (1) :9-16, 2000
- (2) I.Sakaguchi, N.Ikeda, M.Nakayama, Y.Kato, I.Yano, and K.Kaneda : Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) enhances neovascularization through vascular endothelial growth factor production by neutrophils and macrophages. Infect Immun., 68 (4) :2043-2052, 2000
- (3) T.Naka, N.Fujiwara, E.Yabuuchi, M.Doe, K.Kobayashi, Y.Kato, and I.Yano : A novel sphingoglycolipid containing galacturonic acid and 2-hydroxy fatty acid in cellular lipids of Sphingomonas yanoikuyae. J.Bacteriol., 182 (9) :2660-2663, 2000
- (4) N.Hamasaki, K.Isowa, K.Kamada, Y.Terano, T.Matsumoto, T.Arakawa, K.Kobayashi and I.Yano : In vivo administration of mycobacterial cord factor

- (Trehalose 6,6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits. *Infect Immun.*, 68 (6) :3704-3709, 2000
- (5) Y.Nishiuchi, T.Baba and I.Yano : Mycolic acids from *Rhodococcus*, *Gordonia*, and *Dietzia*. *J.Microbiol Methods*, 40 (1) :1-9, 2000
- (6) N.Saita, N.Fujiwara, I.Yano, K.Soejima and K.Kobayashi : Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces corneal angiogenesis in rats. *Infect Immun.*, 68 (10) :5991-5997, 2000
- (7) H.Yamagami, N.Fujiwara, K.Kamađa, T.Matsumoto, T.Arakawa, I.Yano, T.Kasama and K.Kobayashi : Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body and hypersensitivity granulomas in mice. *Infect Immun.*, 69 (2) :810-815, 2001
- (8) M.Iwata, H.Hotta, Y.Nishiuchi, N.Saita, K.Higuchi, T.Arakawa, I.Yano, and K.Kobayashi : Induction of thymic apoptosis by Shiga-toxin2 (Stx2) and lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* O157:H7 in vivo and in vitro. *Osaka City Medical J.*, 47 (1) , 2001
- (9) R.Ryll, M.Hirai, M.Okada, N.Fujiwara, I.Tomiyasu, Y.Kumazawa and I.Yano : Inhibition of TDM-induced TNF- α release by sulfolipid : a potential new virulence mechanism of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Pathogenesis* (submitted)
- (10) R.Ryll, K.Watanabe, N.Fujiwara, R.Hasunuma, Y.Kumazawa, M.Okuda and I.Yano : Mycobacterial cord factor, but not sulfo lipid, causes depletion of NKT cells and upregulation of CD1d1 on murine macrophages. *Microbes and Infection* (submitted)
- (11) 矢野郁也 : 感染症の病態、薬物治療 医療薬学Ⅲ (東京化学同人社刊) 265-294, 2000
- (12) 佐野浩一、矢野郁也 : 最近の結核感染について—高齢社会における感染の動向と結核の新しい検査の意義— 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 72 (3) :165-170, 2000
- (13) 矢野郁也 : 結核の血清学的診断 (老年者の結核 Topics) *Geriatric Medicine* 38 (6) :809-816, 2000
- (14) 矢野郁也 : 結核及び非定型抗酸菌症の血清学的診断 (結核・トピックス) *Medical Practice* 17 (6) :997-1000, 2000
- (15) 矢野郁也 : 総論 : 結核の再興を考える 生活衛生 44 (3) :93-100, 2000

2. 学会発表

H.知的財産権の出願・登録状況
特になし