

## 厚生労働科学研究費補助金

### 新興・再興感染症研究事業

結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究： [抗結核キラーTリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン（サブユニット・DNA－リコンビナントBCG－ワクチン）・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡田 全司

平成15（2003）年3月

## 目 次

I	総括研究報告書 (別添4)	
	結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究	1
	岡田全司	
II	分担研究報告 (別添5)	
1	BCG接種が大人(成人)の結核予防に有効か否かの解析	18
	坂谷光則	
2	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	23
	開発による新しい予防・診断・治療法	
	矢野郁也	
3	ツベルクリン反応に代わる結核菌感染特異的診断の開発	29
	螺良英郎	
4	改良型抗結核ワクチンの開発 サブユニット抗原を発現する	32
	リコンビナントBCGワクチンの作成	
	内藤真理子	
5	新規結核DNAワクチンの開発に関する研究	35
	吉田栄人	
6	国立病院・療養所の呼吸器ネットワークを用いた、多剤耐性	37
	結核患者のリンパ球、血清における新しい結核ワクチン抗原	
	・結核診断抗原に対するT細胞免疫応答の解析	
	倉島篤行	
7	活動性結核症患者の末梢血単球はIFN- $\gamma$ に対して低応答性である	40
	土肥義胤	
8	TB DNA vaccineに関する基礎的研究	42
	菅原 勇	
9	結核菌症の病態解明とDCを用いた細胞遺伝子治療の開発に関する研究	44
	原 寿郎	
10	結核に対する recombinant BCG -72f, -31f, -BA51投与マウスの	51
	病理形態学的検討	
	井上義一	
11	研究協力者研究報告	61
III	研究成果の刊行に関する一覧表 (別添6)	79

厚生労働科学研究費補助金（新興 再興感染症研究事業）

総括研究報告書

結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究  
[抗結核キラー T リンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核  
ワクチン（サブユニット・DNA - リコンビナント BCG - ワクチン）  
・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]

主任研究者 岡田全司 国立療養所近畿中央病院 臨床研究センター結核研究部長

研究要旨

- (1) 新しい結核サブユニットワクチンの開発 ① Mtb72f fusion(融合)蛋白ワクチンはカニクイサル（最もヒト結核感染に近いモデル Nature Med 1996）で BCG よりも強力な抗結核予防効果を示し、世界の最先端のワクチンであり、ヒト多剤耐性結核患者 T 細胞の結核免疫を増強した。さらに、BCG で priming し、後に 72f 融合蛋白ワクチン（booster ワクチン）を行うと、カニクイサルで極めて強力な予防効果が得られた。日本における成人での 72f 融合蛋白の booster ワクチンが有効であることが強く示唆された。② Phase I study を計画。
- (2) 新しい DNA ワクチンの開発 ① HSP65DNA + IL-12DNA ワクチンは、サル（カニクイサル）でも有効であることを明らかにした。（マウスの系で BCG よりも 100 倍以上強力なワクチン効果を示した）IL-12 DNA + Hsp65 DNA を HVJ-liposome ヘクターを用いて、サルで r72fBCG ワクチン群と 72f fusion 蛋白ワクチンで、強力なワクチンの検討を同時に行った。それぞれのワクチンで BCG ワクチン群に比し胸部 X 線所見（結核病巣）で強い改善傾向がみられた。② 1000 倍発現効率が高い画期的な AAV ヘクター(Hsp65 DNA)の開発に成功した。キラー T に極めて強く認識されるユビキチン DNA と結合した Hsp65DNA ワクチンを作製した。経口 attenuated リステリア結核ワクチン（Ag85B）を開発した。
- (3) 新しいリコンビナント BCG ワクチンの開発 ① リコンビナン 72fBCG (r72f BCG) を作製し、r72f BCG はマウス、モルモット、サルで BCG よりも強い結核予防ワクチン効果を明らかにした。② r72f-85b<sup>-</sup>, 31f<sup>-</sup>, r59f<sup>-</sup>, r88f<sup>-</sup>, r71f-BCG を作製することに成功した。
- (4) 新しい治療ワクチンの開発 IL-6 関連遺伝子ワクチンは初めて結核治療ワクチンとしても有効であることを示した。
- (5) IL-2 レセプター  $\gamma$  鎖ノックアウト NOD-SCID-PBL/hu のモデルでヒト多剤耐性結核治療モデルを世界に先駆けて開発した。
- (6) 結核菌症の病態解明 ① Granulysin による結核の病態解明 ④抗結核キラー T 細

胞から産出される granulysin [15kd の granulysin(15KGra)] が結核殺傷に極めて重要な役割を果たしている発見をした。15KGra は M Φ 内結核菌を殺すこと、血清中には 15K Gra が流れていることを初めて明らかにした。⑥ 15K GraDNA ワクチンは結核予防効果を示した。⑦ 多剤耐性結核患者キラー T 細胞の Gra 蛋白発現の著明な低下を認めた。すなわち新しい結核予後診断法を確立した。⑧ 結核患者キラー T 細胞から分泌される killer secretory protein (Ksp37) が血清中で低下していることを初めて明らかにした。⑨  $\gamma$ -IFN レセプター欠損患者を多数発見し、結核菌に対する易感染性を明らかにし、 $\gamma$ -IFN の結核免疫における重要性を明らかにした。⑩ 種々の TLR(-/-) マウスと多剤耐性結核菌を用い、解析が進展した。⑪ IRF-1 (-/-) マウス、STAT4(-/-)、NKT cell(-/-)を用い、これらは結核免疫に重要であることを明らかにした。

- (7) ツベルクリン反応に代わる新しい結核特異的診断法 DPPD skin test 及び in vitro ESAT-6 + CFP10 刺激  $\gamma$ -IFN 産生 test を開発した。
- (8) BCG 接種者より結核患者が発症し、成人における BCG ワクチンの有効性が疑問となることを示した。

分担研究者	坂谷光則 国立療養所近畿中央病院 病院長	倉島篤行 国立療養所東京病院 臨床研究部長
	矢野郁也 日本 BCG 研究所 中央研究所所長	土肥義胤 大阪大学医学部 保健学科長
	螺良英郎 財団法人大阪結核研究会 理事長	菅原 勇 財団法人結核予防会結核研究所 科長
	内藤真理子 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔病原微生物学 助手	原 寿郎 九州大学大学院 医学研究院成長発達医学 教授
	吉田栄人 自治医科大学 医動物学 講師	井上義一 国立療養所近畿中央病院 臨床研究センター呼吸不全研究部長

- A. 研究目的
- AIDS や糖尿病患者等の免疫不全疾患に高頻度に合併、薬剤耐性結核が増え、いわゆる結核罹患率の横這い、集団感染が頻発、

る難治性結核の対策が早急に望まれていることより、我々の新しい治療 予防 診断の研究が必須である。

したがって、BCG よりもより強力な新しい結核治療ワクチン 結核予防ワクチン〔サブユニットワクチン、DNA ワクチンおよびリコンビナント BCG ワクチン (rBCG)〕の開発の臨床研究を行うことを目的とする ② さらに、最近キラー T 細胞ならびに *granulysin* の結核免疫に対する重要性が示唆されつつあるか、このキラー T 細胞活性と結核発症を分子 遺伝子レベルで解明し、結核菌症の病態を解明するとともに ③ これらを用いた新しい治療法及び新しい結核予後診断 難治性診断法の開発を行う。 ④ Toll like レセプター (TLR) とキラー細胞からの結核菌症 (特に多剤耐性結核菌) の免疫監視エスケープ機構を解明し、新しい治療薬 (新しい化学療法剤等) を開発する。 ⑤ BCG 接種が真に大人の結核に有効であるか、検討する (厚生労働省と厚生労働省近畿厚生局等の指導のもとに)。多剤耐性結核の新しいワクチン 治療法を開発する。 ⑥ ノヘルクリン反応に代わる新しい結核感染特異的診断法の開発 ⑦ 当院 (結核 呼吸器準ナショナルセンター) を中心として、日本の 43 % の結核患者の治療を行っている、国立病院 療養所呼吸器ネットワーク (54 施設) を利用して臨床応用を行う。

## B 研究方法

### (1) サブユニットワクチン

結核菌に対する免疫応答において、多くの T 細胞エピトープを持つ抗原蛋白の方がペプチドよりも有効なワクチンとなる。又、一つのリコンビナントの抗原蛋白よりも *multiple antigens (poly-protein)* の方がより有効であることか考えられる。したがって、遺伝子工学的手法を用いて種々の

*fusion* 蛋白を作製し、これらの予防ワクチン効果を、マウス、モルモット、カニクイサルで検討した。Mtb39 と Mtb32 をタンテム (Mtb72f と呼ぶ) に発現する遺伝子を構築した。最もヒトの結核感染に類似したモデルのカニクイサルを用いて予防効果を解析した。3 回 Mtb72f で免疫し、最終免疫より 4 週間後に毒力株、ヒト型結核菌 Erdman 株を  $10^3$  気道内チャレンシした。致死率、体重減少、血沈、肺の X - P 所見で予防ワクチン効果を判定した。(岡田、井上、坂谷、Reed、Gillis)

### (2) DNA ワクチンの作製とカニクイサルへのワクチン免疫方法

カニクイザルの免疫実験のため、ヒト IL-12p40, p35 両遺伝子を健常人の PBMC よりクローニングした。DNA ワクチン用ヘクターとして IL-12p40 p35 融合タンパクを発現するプラスミドヘクターを構築した。構築した IL-12p40 p35DNA ワクチンと Hsp65 DNA ワクチンは HVJ-liposome に包埋し、カニクイサルに接種した。現在、結核菌によるチャレンシ実験が終了し、その経過を観察中である。(岡田、吉田、金田、Reed、Gillis)

米国 NIH branch で WHO の支援研究機関である Leonard Wood Memorial 研究所 (フィリピン、セブ) で行った。Leonard Wood Memorial 研究所は世界で唯一多数のカニクイサルを P3 レベルで結核研究できる施設である。この研究室から Nature に 1996 年、カニクイサルが最もヒト結核に近いモデルである有名な研究が発表された。

Dr Babie Tan, Dr Cruz (Leonard Wood), Dr Reed (Corixa) との共同研究でワクチンの投与群を 5 群に分け、各群 4 匹で行った。

1 群 r72fBCG 投与群

2 群 HVJ-liposome/HSP65DNA+

#### IL-12DNA 投与群

3 群 72f fusion 蛋白+BCG 東京投与群

4 群 BCG 東京投与群

5 群 生理食塩水

各ワクチンを3週間隔で3回予防ワクチン  $5 \times 10^6$  cfu 皮内投与 (0.1ml の生食に浮遊) した。HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA は i.m 投与した。72f fusion 蛋白は BCG 東京浮遊液に同時に入れ、注射も同部位で行った。72f fusion 蛋白+BCG 東京群の意味は、72f fusion 蛋白予防ワクチンはカニクイザルで BCG 接種後 4 ヶ月して投与した場合著明なワクチン効果を示したことにより、BCG をアジュバントとして 72f fusion 蛋白と同時に注射すると極めて強力なワクチン効果が得られる可能性があることより、このプロトコルを作製した。最終ワクチン投与 4 週後に強毒ヒト結核菌クロノ株を気道内投与した。予防ワクチン効果は、生存率、胸部 X 線、血沈、体重、体温、PPD 皮内反応ならびにワクチン投与ザルの末梢血 T リンパ球の増殖増強反応で解析した。末梢血 T 細胞をリコンビナント HSP65  $10 \mu$  g/ml、リコンビナント 72f  $10 \mu$  g/ml、PPD  $10 \mu$  g/ml、PHA-P 0.2% で刺激し、<sup>3</sup>H-サイミジン uptake の方法で三日後に増殖活性を測定した。

上記の検査は、①ワクチン投与前、②ワクチン1回目投与後3週後、③2回目投与3週後、④3回目投与後3週後、⑤TB菌投与4週後、⑥TB菌投与8週後行った。

結核菌由来の Ag85B 遺伝子、MPB51 遺伝子、HSP65、およびトキソプラズマ原虫由来の SAG-1 遺伝子等とユビキチン遺伝子との融合遺伝子を構築した。

(3) リコンビナント BCG ワクチンの作製

#### Mtb72f DNA 導入リコンビナント BCG

$1 \times 10^6$  あるいは BA51(Ag85B + Ag85A + MPB51)リコンビナント BCG を BALB/c マウスに皮下投与3回 (2週間隔) し、結核感染 ( $H37Rv5 \times 10^5$  i.v) した後、4週後と10週後の肺・肝・脾臓の結核菌数を測定した。モルモットの実験系における r72f BCG ワクチン効果はモルモット (ハートレイ系) に r72f BCG を  $1 \times 10^3$  CFU 1回皮内投与し、8週後に  $1 \times 10^3$  CFU の結核菌を気道内投与し、結核菌感染後7週後に脾、肝、肺の結核菌数と脾細胞の免疫応答を解析した。

(4) Attenuated リステリア菌を用いた新しい経口結核ワクチンの開発

リステリア (*Listeria monocytogenes*) は生体内でマクロファージ、樹状細胞などの抗原提示細胞の食胞に取り込まれ、その後 listeriolysin O (LLO) を分泌することにより、食胞膜を破壊し細胞質に移行する。そこで、弱毒リステリア株に DNA ワクチン (プラスミド) を導入し、感染させた。結核菌抗原である Ag85A、Ag85B および MPB(MPT)51 をコードする遺伝子を発現プラスミド p3L118R に組み込み、弱毒リステリア Delta2 株 (ActA 欠損株) に electroporation で導入した。発現プラスミド p3L118R は ActS プロモーターにドライブされるファージ由来のリステリア溶菌素 lysin118 遺伝子を持つため、この発現ベクターを持つリステリアは宿主細胞の食胞から細胞質に移行するとリステリアは溶菌し、DNA ワクチン (発現ベクター) を放出する。これらの組み換えリステリア DNA ワクチンを C57BL/6 マウスまたは BALB/c マウスに2週間隔で2回腹腔免疫した。

(5) 種々の DNA ワクチンとリコンビナント BCG ワクチン及びサブユニットワクチンのワクチン効果の同時比較

班研究の成果として見出されてきたワクチン候補を同時評価することにより、ベストな物質のスクリーニングを行った。

a 実験に使用している BCG Control 群 (rBCG pNN2、rBCG pSO246、BCG 東京株 + DNA)、BCG 東京株 + DNA / RAS)、b DNA ワクチン (IL 12+Hsp65、HSP65、IL 12)、c Component ワクチン (MDP1+DNA/RAS、AG85B/RAS)、d 治療 ワクチン (DNA ワクチンとして AdexIL-6+IL-6R+gp130、AdexIFN- $\gamma$ 、MDP1+DNA) についてワクチン効果の検討を BALB/c マウスおよび結核菌 Kurono 株を用いて行った。効果の判定は肺内および脾臓内生菌数と肺および脾臓インデックスで行った。

(6) ノヘルクリン反応に代わる結核感染特異的診断法の開発

PPD 蛋白の中より、結核感染に極めて特異性の高い、ノ反に代わる蛋白 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かモルモットで示された。ヒトで結核感染特異性を示すか否かを skin test で施行した。(Gillis、Reed、岡田、坂谷、蝶良)

ESAT-6 抗原、CFP-10 抗原 (結核菌に存在し、BCG 菌に存在しない) を用いた新しい結核特異的診断法の確立。結核患者と健常人末梢血を分離せずに全血 24well プレートに 1ml 培養し、ESAT 6 又は CFP-10 で抗原刺激した。16 ~ 20 時間後に培養上清を集め  $\gamma$ -IFN を ELISA で測定した。

(7) 結核菌症の病態解明

Toll like receptor と結核菌症の病態解明には、in vitro の種々の TLR ノックアウトマウス由来の M $\phi$  を用い、UV 処理し

て殺菌したこれらの多剤耐性結核菌に対する M $\phi$  活性化機構の差異を通常の結核菌や非定型抗酸菌と比較検討した。

(8) 難治性結核患者及び薬剤耐性結核患者末梢血キラー T リンパ球機能の解析

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 15K 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 発現を検討した。(岡田、井上、坂谷)

(9) 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

我々は IL-2R  $\gamma$  鎖ノックアウト NOD-SCID を作製した。IL-2R  $\gamma$  鎖は IL 4、IL-7、IL-15、IL-21 の  $\gamma$  鎖と共通である。したかつて、IL-2R  $\gamma$  鎖をノックアウトすると、ほとんどの T 細胞、NK 細胞活性シグナルがフロノクされる。したかつて、この IL-2R  $\gamma$  (-/-) NOD-SCID を用いて SCID-PBL/hu を作製した。

(10) BCG 接種か大人の結核予防に有効か否かの解析

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か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入生の集団ノヘ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 接種を行ない、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、各フロノクの厚生局単位 (例 近畿地区、九川地区など) でグループを形成して作業した。全国 54 施設の国立病院 療養所呼吸器ネットワーク (政策医療

呼吸器ネットワーク)を用いて研究を行った。

(倫理面への配慮)

- (1) 当病院の倫理委員会は歴史が古くかつ厳格なことで定評がある。すなわち院外者関西学院大学総長、大阪国際大学法学部教授等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) サブユニットワクチンや新しい結核診断蛋白の *in vitro* (試験管内)での結核患者末梢血リンパ球の T 細胞免疫増強活性を検討する研究は、上記の倫理委員会に実験計画書を提出し、審査を得て実施する。すなわち、研究対象者の人権擁護を第一に考え、個人が特定されるような情報は公表しない等、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究対象者に対する不利益や危険性の排除を十分に配慮して実施する。また、サブユニットワクチンや新しい結核診断蛋白の *phase I* 試験においては、研究対象者に対する不利益や危険性の排除、および個人が特定されるような情報は公表しない等を十分に配慮した実験計画書を、倫理委員会のみならず、院内に設置されている治験審査委員会に治験計画書を提出し、審査を経て実施する。
- (3) 国立療養所近畿中央病院で動物実験を行う場合、院内に設置されている動物実験委員会に事前に実験計画書を提出し審査を経て実施する。国立療養所近畿中央病院動物実験取扱規程等に則って、動物実験用施設において安楽死等動物愛護上の配慮を十分に行い実施する。DNA ワクチンや

リコンビナント BCG ワクチンを用いた結核予防および治療のための動物実験を行う場合は、事前に動物実験委員会のみならず、院内に設置されている組換え DNA 実験安全委員会に実験計画書を提出して、審査を経て承認されてから実施する。安全性、倫理面、動物愛護上の配慮等の面から審査を受ける。また国立療養所近畿中央病院組換え DNA 実験安全管理規程に則って、感染あるいは環境汚染のおそれがないように十分に配慮して行うとともに、実験に使用した器具は全てオートクレーブ消毒してから洗浄する。

- (4) また、人のみならず動物を用いた研究を行う際には、事前に院内に設置されている倫理委員会等に研究計画書を提出して、倫理面からの審査・承認を受ける。当院は厚生省より結核疾患・呼吸器疾患の準ナショナルセンター(高度専門医療施設)に選ばれたことにより、倫理面への配慮を十分おこない臨床応用を目指したい。
- (5) BCG ワクチン有効性検討の際、健康人として国立病院・療養所の新採用看護婦および付設看護学校新入生に説明会を開き、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。日をあげ、充分の考慮期間をおいた後、ボランティア(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、付設看護学校新入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たいている。

## C 研究結果

### (1) サブユニットワクチン

- ① Mtb72f fusion 蛋白（結核蛋白 Mtb39 と Mtb32 の fusion 蛋白）のサブユニットワクチンかカニクイサル（最もヒト肺結核に近いモデル動物 Nature Med 1996）のレベルで BCG よりもはるかに有効であることを明らかにし、さらに、BCG ワクチンで priming し、後に 72f 融合蛋白ワクチン（booster ワクチン）を行うと、カニクイサルで BCG 単独よりも強力な予防効果が得られた。（③に詳細）このことより日本における成人での 72f 融合蛋白の booster ワクチンが有効であることが強く示唆された。（岡田、Reed、Gillis）
- ② カニクイサルで（IL-12+Hsp65）DNA ワクチン投与を国産でしかも発現効率が良い HVJ liposome（金田）を用いて行った。同時にカニクイサルで r72f BCG ワクチン群と 72f fusion 蛋白ワクチン+BCG ワクチン群で現在最も強いワクチンの検討を行った。（現在経過観察中）。それぞれのワクチンで Hsp65 や 72f 蛋白に特異的な T 細胞増殖反応が増強した。さらに、コントロール群の BCG ワクチン単独群に比し胸部 X 線所見（結核病巣）が軽度で予防ワクチン効果が示された。（岡田、吉田、大原、金田、Reed、Gillis）
- ③ カニクイサルに BCG をあらかじめ皮内投与し、4 ヶ月後にリコン

ビナント 72f 融合蛋白をサブユニットワクチンとして 1m 投与し、その後ヒト型結核菌を気道感染させた。BCG 単独投与群に比し、極めて強力な結核予防ワクチン効果を得た。（ワクチン効果は生存率、胸部 X-P、血沈、体重、サル末梢血 T 細胞増殖反応で解析した）

- ④ サブユニットワクチン 72f-85b fusion 蛋白及び 72f fusion 蛋白をカニクイサルに投与し、比較検討を計画。

### (2) DNA ワクチン

- ① 平成 14 年度は HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンはさらに、サルでも進展した。カニクイサルの免疫実験のため、ヒト IL-12p40、p35 両遺伝子を健常人の PBMC よりクローニングした。DNA ワクチン用ヘクターとして IL 12p40p35 融合タンパクを発現するプラスミドヘクターを構築した。構築した IL-12p40p35DNA ワクチンと Hsp65DNA ワクチンは HVJ liposome に包埋し、カニクイサルに接種した。（岡田、吉田、柏村、金田、Reed、Gills）  
米国 NIH branch で WHO の支援研究機関である Leonard Wood Memorial 研究所（フィリピン、セブ）で行った。  
HSP65DNA+IL 12DNA 投与群では血沈の改善も認められた。胸部 X 線の改善も認められた。
- ② 特に世界の遺伝子治療の第一人者 Mulligan と共同研究で現有の Adeno Associated Virus (AAV) ヘクターよりも 1000 倍以上発現

率の良い type5AAV ベクターの作製に成功した。現在これを用い HSP65DNA 及び Antigen85B DNA ワクチンを構築した。(Mulligan、Jeng-Shin Lee、岡田)一方、発現効率が良いアデノウイルスベクターや Sendai virus ベクターを用い、ユビキチン・プロテアソーム DNA にこれらの DNA を融合させた DNA や T bet DNA を導入中である。

(Mulligan、岡田、姫野、原)

- ③ バキュロウイルス粒子は新規ワクチンベクターとなりうる事が明らかとなり、結核への展開を図る計画である。(吉田、岡田、井上)

### (3) リコンビナント BCG ワクチン

- ① 種々のリコンビナント fusion 蛋白 BCG ワクチンの作成

すでに r72f BCG のみならず r72f-85b BCG、r31f BCG、r59f BCG、r88f BCG、r71f BCG を作製することに成功した。r72f BCG はマウスの系で強力な  $\gamma$ -IFN 産生 T 細胞活性化を示し、モルモットでは BCG よりも結核病巣に対しより強力な病理所見改善を得た。(岡田、内藤、大原、井上、坂谷)

- 1)r72f BCG ワクチンを BALB/c マウスに投与した後、H37Rv ヒト型結核菌を投与した。ワクチン効果をまず KS-Elispot 自動計測機器 (カールツァイス社) を用い Elispot を客観的に測定した。その結果 72f 蛋白に特異的な  $\gamma$ -IFN 産生 T 細胞数は r72f BCG ワクチン投与群で増強した。又、PPD や結核死菌に対し反応して  $\gamma$ -IFN を産生する T 細胞も r72f BCG 群

では強力な BA51 BCG ワクチン投与群と同程度かやや強く認められた。このように r72f BCG はマウスで有効であった。PPD に対する T 細胞増殖反応は r72f BCG 投与モルモットの脾細胞で増強した。コントロールの BCG 東京ワクチン投与モルモットよりも r72f BCG ワクチン投与モルモットの方が強力な T 細胞増殖増強反応を示した。

さらに、興味深いことに、r72f BCG ワクチン投与モルモットの肺の病理組織において、著明な結核病巣の改善効果が認められた。この結果は、コントロール群の BCG 東京ワクチン投与よりも強力であった。すなわち、モルモットの系では、r72f BCG ワクチンは著明な結核予防ワクチン効果を示した。

- 2) r31f BCG ワクチンは結核感染 20 週後の長期の結核感染の系で強力な予防ワクチン効果 (結核菌数の減少) を示した。(内藤、大原、岡田)

- ② Priming-Booster 法による極めて強力な結核ワクチンの開発  
rHSP65 BCG ワクチンで priming し、HVJ-liposome/HSP65 DNA ワクチンで booster する priming-booster 法が強力な結核予防ワクチン方法となること、すなわち、新しい投与方法を開発した。(岡田、吉田、大原、坂谷)

### (4) その他の方法による新しい結核ワクチン開発

- ① Attenuated リステリア菌を用いた新しい経口結核ワクチンの開発  
病原性を欠失させ M  $\phi$  内に入ると

完全に消失するリステリア菌（すでに作製）を増強させる DNA (Ag85B, 85A, MPB51) を導入したワクチン作製に成功し予防ワクチン効果をマウスの TB 感染の系で示した。

ワクチンは BALB/c マウスに 1  $\mu$ g 投与し、ヒト型結核菌 H37Rv 5  $\times 10^5$  CFU を 1  $\mu$ g 投与した。その結果 MPB51 DNA を導入した attenuated リステリアワクチンか遺伝子を導入しないコントロール attenuated リステリアワクチンよりも有意な結核予防ワクチン効果を示した。(小出、岡田)

#### ②ペプチドワクチン

ヒトの場合、単一タンパク抗原に対する宿主側の抗原提示機構に HLA 型を始めとする遺伝的な個人差があるために、最近では、複数タンパク抗原を組み込んだ fused protein antigens (融合タンパク抗原) が工夫されている。本年は、結核菌 ESAT-6 タンパクの 51 ~ 70 番ペプチド (ESAT-6 epitope と考えられる) か  $\gamma$ -IFN の産生を増強し、感染防御にかかわる結果を得た。(矢野、岡田)

(5) 種々の DNA ワクチンとリコンビナント BCG ワクチン及びサブユニットワクチンのワクチン効果の同時比較 (松本真、岡田、吉田、松本荘吉、山田、内藤、大原、螺良)

平成 14 年度はサルの実験やヒトの臨床応用に移る前に、平成 11 年度から平成 14 年度に我々が開発して有効であった DNA ワクチンと rBCG ワクチンを同時に同一条件で比較検討した。その結果、① HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン② IL-6

関連遺伝子ワクチン③ rBA51 BCG が特に効果が強力であることを明らかにした。したかつて、少なくともこの三つはサル ヒトへの応用を行う。

DNA ワクチンとしては、IL-12+Hsp65 が肺内生菌数において減少傾向を示し、脾臓内で有意に菌数を減少させた。Component ワクチンとしては、MDP1+DNA/RAS に有意に肺内および脾臓内生菌数を減少させる効果が再確認された。

治療ワクチンとしては、Adex IL-6 IL6R+gp130 ワクチン群で有意に肺内生菌数を減少させた。

(6) ノヘルクリン反応に代わる新しい結核特異的診断法の開発

① DPPD の皮内反応を 200 例以上のヒトで行った。その結果 DPPD 陽性群と陰性群の二峰性のピークが鋭敏に認められた。一方、PPD 皮内反応では二峰性のピークは認められなかった。このことより、DPPD は結核感染に特異的な新しい診断法となることか示された。

(岡田、Reed)

② ESAT 6 抗原、CFP 10 抗原を用いた新しい結核特異的診断法の確立。BCG 菌にはコートする遺伝子が欠失して、ヒト型結核菌に存在する ESAT-6 及び CFP 10 抗原を用いた。結核患者と健常人末梢血を ESAT-6 又は CFP-10 で抗原刺激した。16 ~ 20 時間後に培養上清を集め  $\gamma$  IFN を ELISA で測定した。その結果、結核感染に特異度の高い、しかも BCG 接種した健常人リンパ球には反応しない、新しい結核感染特異的診断法を開発した。(岡田、坂谷、鈴木、

井上)

(7) 結核菌症の病態解明と IFN- $\gamma$  レセプター欠損患者

- ① 細胞内寄生性細菌である BCG 接種により全身播種を来した日本人症例を現在までに 14 例集積し、本邦で初めて 4 症例 (うち 2 例は父子例) の常染色体優性遺伝形式をとる IFN- $\gamma$  レセプター 1 欠損症を報告した(J.Infect.Dis.2002)。播種性 BCG 感染症例、難治性非定型抗酸菌感染症例について現在も集積を続けている。これらの症例での BCG 刺激による IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$  産生能や IFN- $\gamma$  R 1 以外にも IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$  R2, IL-12, IL-12R  $\alpha$ , IL-12R  $\beta$ , STAT1 の遺伝子解析を行った。  
(原)

- ② 種々の Toll like レセプターノックアウトや MyD88 (-/-) を用い、これらに本邦で最も多剤耐性結核株を保有している当院の種々の多剤耐性結核菌を投与しての解析がスタートした。(岡田、竹田、審良、井上、鈴木)

(8) 新しい結核予後診断法の開発  
(キラー T 細胞とキラー分子 granulysin、Ksp37)

- ① Killer Secretory Protein 37 (Ksp37)

Ksp37 はキラー T 細胞、NK 細胞から主として産生される。我々はこの蛋白がヒト血清中に検出されることを明らかにした。当国立療養所近畿中央病院結核患者 40 例と、健常人 40 例の血清中の Ksp37 濃度を抗 Ksp37 抗体を用い有意差 (< 0.05) をもって結核患者血清中の Ksp37 値

が低下していることを明らかにした。すなわち、結核の病態と、Ksp37 が密接な関連があることを初めて明らかにした。

- ② リコンビナント 15K granulysin の作製  
Cos 細胞に① Flag-15K granulysin DNA 及び② SR  $\alpha$ -15K granulysin を用い transfection した。
- ③ M  $\phi$  にヒト型結核菌を貪食させ、その後これに 15K granulysin を添加して、4 時間後に M  $\phi$  内の結核菌数を 7H11 寒天培地で測定した。その結果、15K granulysin はマクロファージ内の結核菌を殺すことを初めて明らかにした。この M  $\phi$  内結核殺菌作用の詳細な機構を解析中である。
- ④ 多剤耐性結核患者の外科手術の病理組織を抗 15K Granulysin 抗体を用いて染色した。その結果、肺結核病巣に浸潤している M  $\phi$  が染色された。
- ⑤ Granulysin DNA ワクチン:15K Granulysin DNA を BALB/c マウスに注射し、予防ワクチン投与し、結核予防ワクチン効果を示した。  
(岡田、井上、鈴木、倉島、坂谷、螺良、服部、土肥)

(9) 遺伝子ノックアウトマウス、遺伝子導入マウスを用いた新しい結核治療法の解明

IRF-1 (-/-) マウス、STAT4(-/-)、NKT(-/-)を用い、これらは結核免疫の重要であることを明らかにした。すなわち、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IL-12 や NKT 細胞は結核感染抵抗性に重要であることが示唆された (菅原)。

(10) BCG 接種が真に大人の結核予防に有効であるかの検討

これまで1～3年の間、観察を継続している48名（BCG ワクチン接種者23名、非接種者25名）の中の1名が平成14年に結核を発病した。当人は平成11年度のBCG ワクチン接種者であり、経過観察中の3年目に発病しており、対照となるBCG ワクチン非接種者群からは未だ発病者を認めていない。

今年度初めて発生した結核発病者は、BCG ワクチン接種直前のノヘルクリン皮内反応は陰性であり、病型カリンパ節結核であることを含め、ワクチン接種後に感染し、初感染発病したものと判断される。ワクチン接種群と非接種群の対象者が少ないため、推計学的な有意差は認められないか、成人に対するBCG ワクチン追加接種の結核発病予防効果に疑問を投げ掛けるに十分な結果であると考えられる。（坂谷、岡田、倉島、螺良）

(11) ヒト多剤耐性結核患者治療モデル SCID-PBL/hu の作製

平成14年度はIL2レセプター $\gamma$ 鎖ノックアウトNOD-SCIDマウスを作製し、ヒトT細胞の生着率が従来のSCIDより10倍以上よく、すべてのリンパ組織及び末梢血にも結核菌に対するヒトT細胞活性が発現する画期的なIL2R(-)NOD-SCID PBL/huを開発した。これに、PPD抗原や結核菌を投与すると、PPDや結核菌に特異的なヒトCD8陽性キラーT細胞やヒトヘルパーT細胞が生体内で誘導される発見をした。（岡田、坂谷、螺良、井上）

したかつて、このIL2R(-)NOD SCID-PBL/huモデルマウスに、我々が開発した種々のサブユニットワクチン、DNAワクチン、rBCGワクチンと多剤耐性結核患者末梢血Tリンパ球、及び、

多剤耐性結核菌を投与し、多剤耐性結核に対する新しいワクチン 新しい治療開発モデルとなることか示された。（岡田、大原、吉田、坂谷、螺良、井上、松本）

(12) 臨床応用に向けての対策  
（新しい結核ワクチン 診断法の臨床応用へのネットワーク組織作製）

現在、国立病院療養所のネットワークであるHOSP net内に全国の呼吸器基幹8施設を中心とした政策医療呼吸器ネットワーク支援システム（K-net）を構築中であり、肺結核に関しては国立療養所東京病院にサーバーを設置、リアルタイムオンラインでの結核症例登録システムを準備中である。（岡田、坂谷）

種々のリコンビナント結核蛋白を用いて、多剤耐性結核患者と通常の結核患者及び健常人のPBLの反応性を検討予定である。（倉島、岡田）

国立病院 療養所 呼吸器ネットワークか厚生労働省より正式に支援されることとなった。（坂谷、岡田、井上、鈴木）

## D 考察

我々は臨床応用に極めて間近な新しい結核ワクチン、診断法を開発しつつある。当院は呼吸器疾患（結核を含む）準ナショナルセンターとなった。日本の結核患者数の43%の診断治療を行っている、国立病院療養所54施設を統括 指導する高度専門医療施設であり、国立病院 療養所呼吸器ネットワークを用い、これらは多くの国民に活用 提供しうるものである。

(1)サブユニットワクチン研究の成果と今後の活用 提供

Mtb72f Fusion 蛋白 精製タンパクであり、臨床治療への申請や、政府（厚生労働省等）の承認を得やすく活用か最も迅速

である。BCG に代わる新しい成人結核予防ワクチンとして日本国民を対象として、厚生労働省の指揮下に予防ワクチンを行う計画。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。

(2)DNA ワクチン研究の成果と今後の活用・提供

HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンは極めて強力な予防ワクチンとなることが考えられる。早急な臨床応用を計画中。一方、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) で強力な治療ワクチン効果を示した。この研究成果は通常の結核のみでなく難治性結核や多剤耐性結核に対する新しい予防・治療に活用することができる。特に高度の免疫不全を伴う AIDS 合併結核患者におけるリコンビナント BCG 療法を慎重にしなければいけない時に強力な活用ワクチンとなる。これらの DNA ワクチンは本邦のみでなく全世界に提供する用意がある。

(3)リコンビナント BCG ワクチン研究の成果と今後の活用・提供

HIV ワクチンで rBCG が有効より類推し、r72fBCG ワクチンは結核の重要なワクチンとなる。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)Granulysin、Ksp37 による予後診断法は簡便・迅速であり、結核患者の治療効果を予測する新しい診断法となり、入院期間の短縮や最良の治療方針の決定において、治療経済面でも行政施策にとり極めて有用な診断法となる。今後全国の 54 施設国立病院・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。

(5)ツベルクリン反応に代わる新しい診断法 (DPPD skin test) の行政施策への貢献： 現在大きな社会問題・医療問題となっている結核集団感染、結核院内感染の早期発見における画期的な行政施策となる。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 I 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中である。

(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：我々が開発した IL-2 レセプター $\gamma$ 鎖(-/-)SCID-PBL/hu モデルは多剤耐性結核の新しいワクチン治療開発のみでなく、新しい化学療法剤開発の良いモデルとなる。

## E. 結論

(1)新しい結核サブユニットワクチンの開発：

① Mtb72f fusion 蛋白ワクチンはカニクイザル (最もヒト結核感染に近いモデル Nature Med 1996) で BCG よりも強力な抗結核予防効果を示し、世界の最先端のワクチンであり、ヒト多剤耐性結核患者 T 細胞の結核免疫を増強した。さらに、BCG で priming し、後に 72f 融合蛋白ワクチン (booster ワクチン) を行うと、カニクイザルで極めて強力な予防効果が得られた。日本における成人での 72f 融合蛋白の booster ワクチンが有効であることが強く示唆された。

② Phase I study を計画。

(2)新しい DNA ワクチンの開発： ① HSP65DNA + IL-12DNA ワクチンは、

サル（カニクイサル）でも有効であることを明らかにした。（マウスの系で BCG よりも 100 倍以上強力なワクチン効果を示した）IL-12 DNA + Hsp65 DNA を HVJ-liposome ヘクターを用いて、サルで r72fBCG ワクチン群と 72f fusion 蛋白ワクチンで、強力なワクチンの検討を同時に行った。それぞれのワクチンで BCG ワクチン群に比し胸部 X 線所見（結核病巣）で強い改善傾向がみられた。② 1000 倍発現効率が高い画期的な AAV ヘクター (Hsp65 DNA) の開発に成功した。キラー T に極めて強く認識されるユビキチン DNA と結合した Hsp65DNA ワクチンを作製した。経口 attenuated リステリア結核ワクチン (Ag85B) を開発した。

- (3) 新しいリコンビナント BCG ワクチンの開発 ① リコンビナン 72f BCG (r72f BCG) を作製し、r72f BCG はマウス、モルモト、サルで BCG よりも強い結核予防ワクチン効果を明らかにした。② r72f-85b-, 31f-, r59f-, r88f-, r71f-BCG を作製することに成功した。

- (4) 新しい治療ワクチンの開発 IL-6 関連遺伝子ワクチンは初めて結核治療ワクチンとしても有効であることを示した。

- (5) IL-2 レセプター  $\gamma$  鎖ノックアウト NOD-SCID-PBL/hu のモデルでヒト多剤耐性結核治療モデルを世界に先駆けて開発した。

- (6) 結核菌症の病態解明 ① Granulysin による結核の病態解明 ②抗結核キラー T 細胞から産出される granulysin [15kd の granulysin(15KGra)] が結核殺傷に極めて重要な役割を果たしている発見をした。15KGra は M  $\Phi$  内結核菌を殺すこと、血清中には 15K Gra が流れていることを初めて明らかにした。

③ 15K GraDNA ワクチンは結核予防効果を示した。④多剤耐性結核患者キラー T 細胞の Gra 蛋白発現の著明な低下を認めた。すなわち新しい結核予後診断法を確立した。⑤結核患者キラー T 細胞から分泌される killer secretory protein (Ksp37) が血清中で低下していることを初めて明らかにした。⑥  $\gamma$ -IFN レセプター欠損患者を多数発見し、結核菌に対する易感染性を明らかにし、 $\gamma$ -IFN の結核免疫における重要性を明らかにした。⑦種々の TLR(-/-)マウスと多剤耐性結核菌を用い、解析が進展した。⑧ IRF-1 (-/-)マウス、STAT4 (-/-)、NKT cell(-/-)を用い、これらは結核免疫に重要であることを明らかにした。

- (7) ノヘルクリン反応に代わる新しい結核特異的診断法 DPPD skin test 及び in vitro ESAT-6 + CFP10 刺激  $\gamma$ -IFN 産生 test を開発した。
- (8) BCG 接種者より結核患者が発症し、成人における BCG ワクチンの有効性が疑問となることを示した。

## F 研究発表

### 1 論文発表

- 1 Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Matsumoto K, Kita Y, Kimura K, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, Matsumoto S, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M Novel (recombinant BCG and DNA-) vaccination against tuberculosis Thirty Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference 2002, p171 175
- 2 Okada M, Yoshida S, Ohara N, Yamada T, Kaneda Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Inanaga

- Y, Kanamaru N, Inoue Y, Matsumoto M, Kimura K, Sakatani M, Mori T Novel DNA and Recombinant BCG Vaccination against Tuberculosis by the Augmentation of Cytotoxic Activity *Faseb J* 2002 A308 A309
- 3 Wang T, Fan L, Watanabe Y, McNeill P, Moulton G G, Bangur C, Fanger GR, Okada M, Inoue Y, Persing DH, Reed SG L523s, a RNA binding protein as a potential therapeutic target for lung cancer *British J Cancer* 2003, 88(6) 887-94
- 4 Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Matsumoto K, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y Matsumoto M, Matsumoto S, Skeiky Y, Reed S and Sakatani M Novel (recombinant BCG and DNA) vaccination against tuberculosis 2002, The Awaji International Forum on Infection and Immunity p 091
- 5 R Ryll, M Hiraï, M Okada N Fujiwara, I Tomiyasu, Y Kumazawa and I Yano Inhibition of TDM-induced TNF- $\alpha$  release by sulfolipid a potential new virulence mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* *Microbiol Pathogenesis* (in press)
- 6 S Yoshida, Tanaka M, Inoue Y Sakatani M, Mori T and Okada M Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccine encoding Hsp65 and IL 12 genes by single gene gun vaccination (submitted)
- 7 T Tanaka, Takamori Y, Nagata K, Inoue Y, Sakatani M, Mori T and Okada M Suppression of granulysin expression in the cytotoxic cells from the patients with multi-drug resistant tuberculosis (submitted)
- 8 M Okada Development of new vaccines (DNA vaccine, recombinant BCG vaccine and subunit vaccine) against *Mycobacterium Tuberculosis* *Kekkaku* 2002
- 9 Gillis S, Reed S, Skeiky Y and Okada M New Therapy with DNA vaccination and recombinant BCG vaccination against *Mycobacterium Tuberculosis* using Monkeys 平成13年度新興 再興感染症研究推進事業研究報告集 2002 (財) ヒューマンサイエンス振興財団 東京 p 330 341, 2002
- 10 Gillis S, Reed S, Okada M New therapy, Diagnosis and Protection using recombinant BCG, DNA vaccination and cytotoxic T lymphocytes against *Mycobacterium tuberculosis* New Vaccine and new diagnosis 平成13年度新興 再興感染症研究推進事業研究報告集 2002 (財) ヒューマンサイエンス振興財団 東京 p 501 512, 2002
- 11 岡田全司 一週一話「新たな抗結核ワクチン」 *日本医事新報* 2003 出版中
- 12 岡田全司 新しい結核ワクチン 最新医学 2002、57 1942 1952
- 13 岡田全司、田中高生 結核に対する遺伝子ワクチン 遺伝子医学 2002 6 251 258
- 14 岡田全司、田中高生 結核に対するワクチンの開発「肺抗酸菌症をめぐる研究の動向」*分子呼吸器病* 2002、6 210 219
- 15 岡田全司、田中高生、喜多川了 結核感染症の分子機構 宿主と病原体の分子の攻防」*Molecular Medicine*、2002、



- 39 144-154
- 16 岡田全司、田中高生 結核治療用 DNA ワクチン Molecular Technology 2002、30 388-389
- 17 岡田全司、田中高生、螺良英郎 結核ワクチン「感染症における免疫とワクチン」臨床と微生物 2002、29 127-132
- 18 岡田全司 喫煙によるヒト肺がんモデル作製と新しい癌ワクチン 遺伝子治療の開発 平成13年度喫煙科学研究財団研究年報 2002、p 87-92
- 19 鈴木康代、吉河康二、前田豊樹、岡田全司、鈴木友和 アスヘルキルスによる頭蓋内動脈炎の1剖検例(原著論文/症例報告) 大分県医学会雑誌 2002、20(1) 32-35
- 20 岡田全司 呼吸器疾患(結核 肺がん)に対する臨床研究(新しい結核ワクチン、肺がんワクチンおよび新しい診断法 予防法の開発)と評価 医療 2003、57(1) 51-3
- 2 学会発表
- 1 M Okada, S Yoshida, N Ohara, T Yamada, Y Kaneda, T Tanaka, Y Kita, S Kuwayama, Y Muraki, Y Inanaga, N Kanamaru, Y Inoue, M Matsumoto K Kimura, M Sakatani, T Mori NOVEL DNA AND RECOMBINANT BCG VACCINATIONS AGAINST TUBERCULOSIS BY THE AUGMENTATION OF CYTOTOXIC ACTIVITY 4th world congress on tuberculosis 2002
- 2 Okada M, Kuwayama S, Yamanaka H, Tanaka T, Kita Y, Sunami T, Inoue Y, Matsumura A, Iuchi K, Kimura K, Sakatani M, Mori T, Kawahara M In vivo induction of tumor-specific CTL against peptide of MAGE-3 expressed on human lung cancer by using IL-6 gene, IL-6 receptor gene and GP130 gene therapy Proceedings of the American Association for Cancer Research 2002, 43 609
- 3 Y Inoue, M Akira, T Arai, S Yamamoto, A Yoshida, K Inoue, Y Kashiwa, E Fujita, S Yotsumoto, S Minamoto, K Suzuki, M Okada, K Kimura, M Sakatani Clinical course of nonspecific interstitial pneumonia sequential HRCT finding EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL September 2002, Stockholm
- 4 M Okada, T Fujii, M Inoue, Y Inoue, M Sakatani, M Koseto T cell function in a patient with Interleukin-6 (IL-6) production deficiency showing negative C-Reactive Protein (CRP) in spite of recurrent pneumonia 26<sup>th</sup> International Congress of Internal Medicine 2002
- 5 田中高生、喜多洋子、井上義一、坂谷光則、岡田全司 新しい結核ワクチンの開発と ELISPOT assay (自動解析)を用いた T 細胞活性化によるワクチン効果の解析 結核 2003、78(3) 160
- 6 喜多洋子、田中高生、井上義一、坂谷光則、岡田全司 ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイサルを用いた結核に対する新しい DNA ワクチン開発 Hsp65 DNA + IL 12 DNA ワクチン 結核 2003、78(3) 161
- 7 井上義一、田中高生、喜多洋子、坂谷光則、岡田全司 結核に対するリコンビナント BCG ワクチン投与マウスの病理形態学的検討 結核 2003、78(3) 162
- 8 田中高生、井上義一、喜多洋子、桑山さち子、村木裕美子、稲永由紀子、金丸典

- 子、橋元里美、松本久美、坂谷光則、吉田栄人、大原直也、山田毅、岡田全司: Elispot assay (自動解析) を用いた新しい結核ワクチンによるT細胞活性化機構の鋭敏な解析法 第43回日本呼吸器学会総会 2003、41: 87
9. 桑山さち子、田中高生、河原正明、松村晃秀、井内敬二、細江重人、川口知哉、小河原光正、井上義一、喜多洋子、村木裕美子、稲永由紀子、金丸典子、橋元里美、松本久美、坂谷光則、岡田全司: 新しい肺がんワクチン開発のための生体内ヒト抗腫瘍免疫解析モデル (SCID-PBL/hu) の確立 第43回日本呼吸器学会総会 2003、41: 82
10. 岡田全司、田中高生、井上義一、喜多洋子、桑山さち子、村木裕美子、稲永由紀子、金丸典子、橋元里美、松本久美、坂谷光則: 新しい結核ワクチンと生体内ヒト抗結核T細胞免疫解析モデルの開発 第43回日本呼吸器学会総会 2003、41: 82
11. 岡田全司、田中高生、井上義一、喜多洋子、松本久美、吉田栄人、大原直也、山田毅、金田安史、松本真、松本荘吉、坂谷光則: 結核に対する新しいワクチン開発と抗原特異的キラーT細胞の分化・誘導 日本免疫学会総会 2002、32:129
12. 岡田全司: 新しい抗結核ワクチン開発の現状 シンポジウム「結核免疫学の動向と課題」第77回日本結核病学会総会、2002、p200
13. 田中高生、井上義一、喜多洋子、桑山さち子、村木裕美子、稲永由紀子、金丸典子、森珠里、橋元里美、松本久美、岡美穂、木村謙太郎、坂谷光則、岡田全司: 新しい抗結核リコンビナント BCG ワクチン開発 医療、2002、56 (2):242
14. 井上義一、西村一孝、川城丈夫、伊東政敏、岡田全司、木村謙太郎、坂谷光則: 国立病院,国立療養所呼吸器疾患専門施設におけるびまん性肺疾患診断の現状と問題点(共同研究)、医療 2002、56(1):50 第57回国立病院療養所総合医学会 福岡 2002年10月
15. 岡田全司: 国立医療における臨床研究の意義 先進医療を推進する臨床研究とは 医療 2002、56:109
16. 井上義一 新井徹、西山明秀、馬渡秀徳、南正剛、林清二、松本久美、岡美穂、田中高生、岡田全司、山本暁、坂谷光則: 肉芽腫性肺疾患肺組織におけるマスト細胞の増加とその役割 サルコイドーシス/肉芽腫性疾患、22(2):38 第22回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会 岡山 2002年11月
17. 鈴木克洋、湊良彰、村井隆太、井上康、吉田亮、新井徹、安藤守秀、藤田悦生、露口一成、源誠二郎、井上義一、林清二、岡田全司、木村謙太郎、坂谷光則: 多剤耐性結核の臨床的検討 結核 2002、77(10):700 第89回日本結核病学会・第59回日本呼吸器学会近畿地方会 大阪 2002年6月29日
18. 露口一成、鈴木克洋、湊良彰、村井隆太、井上康、吉田亮、新井徹、安藤守秀、藤田悦生、源誠二郎、井上義一、林清二、岡田全司、木村謙太郎、坂谷光則: 喀痰から M.szulgai が検出された症例の検討 結核 2002、77(10):699
19. 岡田全司、中島学、渡辺武、岩崎輝夫、田中高生、井上義一、山本暁、松村晃秀、井内敬二、河原正明: 肺がんにおけるヒト腫瘍関連抗原 RCAS1 の発現と予後因子 日本癌学会 2002、61:124
20. 井上義一、岡田全司、田中高生、岡美穂、河原正明、細江重人、小河原光正、新井徹、松村晃秀、井内敬二、他: 肺の線維化と肺癌 肺癌予後因子としての線維化

,basic fibroblast growth factor(bFGF)とそのレセプター発現 日本呼吸器学会雑誌 2002、40 157 第 42 回日本呼吸器学会総会 仙台 2002 年 4 月

- 21 井上義一, 西村一孝, 川城丈夫, 伊東政敏, 新井徹, 岡田全司, 木村謙太郎, 坂谷光則, 森隆 国立病院, 国立療養所におけるひまん性肺疾患診断の現状と問題 日本呼吸器学会雑誌 2002、48 148 第 42 回日本呼吸器学会総会 仙台 2002 年 4 月
- 22 岡田全司, 田中高生, 井上義一, 喜多洋子, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 金丸典子, 細江重人, 坂谷光則, 他 新しい抗結核 DNA ワクチンの開発 日本呼吸器学会雑誌 2002、40 92
- 23 井上義一, 田中高生, 岡田全司, 木村謙太郎, 坂谷光則, 森隆, 吉田栄人, 金田安史, 岡美穂, 金丸典子 結核に対する各種リコンビナント BCG ,DNA-ワクチン投与マウスの病理学的検討 結核 2002, 77(3) 279
- 24 田中高生, 井上義一, 細江重人, 木村謙太郎, 坂谷光則, 森隆, 岡田全司, 松本真, 喜多洋子, 桑山さち子 新しい抗結核リコンビナント BCG ワクチンの開発 結核 2002, 77(3) 278
- 25 岡田全司, 田中高生, 井上義一, 細江重人, 木村謙太郎, 坂谷光則, 森隆, 喜多洋子, 桑山さち子, 村木裕美子 結核に対する新しい DNA ワクチン開発 Hsp65 DNA+IL 12 DNA ワクチン 結核 2002, 77(3) 278
- 26 岡田全司, 吉田栄人, 山田毅, 大原直也, 金田安史, 齊藤泉 結核免疫学の動向と課題 新しい抗結核ワクチン開発の現状 結核 2002, 77(3) 2002

G 知的財産権の出願 登録状況 (予定を含む。)

1 特許取得 (出願中)

整理番号 PBM67 特願

2002-045865

感染症治療剤

- ① 15K グラニューライシンを有効成分とする、感染症治療剤。
- ② 15K グラニューライシンか組換え蛋白質である、請求項 1 記載の感染症治療剤。
- ③ 15K グラニューライシンをコートする遺伝子か組み込まれた、15K グラニューライシンの体内発現ヘクターを有効成分とする、感染症治療剤。

厚生労働科学研究費補助金（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 病院長

研究要旨

1999年（平成11年）から2001年（平成13年）までの新採用看護婦 591名に、2段階法でツベルクリン反応検査を実施した（近畿厚生局管内）。陰性者は48名（8.0%）であったが、無作為抽出により23名にBCGを接種した。非接種者（ツ反陰性）は25名である。これら48名の対象者を平成14年末まで観察したが、BCG接種群に所属する1名にリンパ節結核の発病をみた。検出菌のRFLP検査結果からの判定では、感染源は業務上で接触のあった排菌患者であり、BCG接種以後の感染発病である。両群での発病率に有意差は認めないが、若年のツ反陰性者に対しての医療機関就職時のBCG追加接種は、その後の結核感染発病の予防策として有用であるとは考え難いと思われる。

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納めている。しかし、現行のBCGワクチンの追加接種が、大人（成人）の結核発病予防に効果があるか否かについては、議論の分かれるところであり、確証がないのが現状である。

従って、本研究は、大人に対するBCG追加接種が、その後の結核予防に有用であるか否かを解明することを目的とする。

B. 研究方法

国立療養所近畿中央病院、国立南和歌山病院など、近畿厚生局管内の12国立施設において、毎年度初めの新採用看護師に対し2段階法によるツベルクリン反応検査を実施した。上記検査結果が陰性の者（対象者）を無作為に2分し、一方の群にBCG

を接種した。5年間の観察を継続し、両群での結核発病者の有無でBCG追加接種の有用性を検定する。

一方、BCG接種による抗結核菌免疫能増強効果を、今回の対象者の末梢血リンパ球（PBL）の $\gamma$ -IFN産生能で検討した。（倫理面での配慮）

1. 当院の倫理委員会は、大阪国際大学政経学部教授と関西学院大学学院長を含む多職種の委員により構成され、毎月1回以上開催しており、本研究は、この委員会での承認を得ている。
2. 各施設では新採用看護師に対する就職オリエンテーションの折に本研究に対する説明会を開き、文書を配布してインフォームドコンセントを取得し、承諾を得たボランティアのみ本研究に参加してもらっている。2段階法によるツベルクリン反応検査を実施した。上記検査結果が陰性の者（対象者）を無