

- Inoue Y, Matsumura A, Iuchi K, Sakatani M, Kawahara M: Expression and prognostic significance in lung cancer of human tumor-associated antigen RCAS1. American Association for Cancer Research 2003 Annual Meeting 2003.6
4. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Matsumoto K, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.dela Cruz, E.V. Tan, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M: Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis Keystone 2003
 5. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M: Novel (Recombinant BCG- and DNA-) Vaccination against Tuberculosis. Thirty-Eighth Tuberculosis and Leprosy Research Conference 2003.7.21-22
 6. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, Yasir Skeiky, S Reed, Sakatani M: Novel (Recombinant BCG- and DNA-) Vaccination against Tuberculosis. The First International Conference on TB vaccines for the world-TBV 2003.
 7. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.V.an, E.C.Dela Cruz, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M: Novel (Recombinant BCG- and DNA-) Vaccination against Tuberculosis . The Awaji International Forum Infection Immunity. 2003.8
 8. Okada M, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Inanaga Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Watanabe Y, Mori J, Ishizaki K, Matsumoto K, Inoue Y, Matsumoto M, Sakatani M: Novel DNA Vaccination against Tuberculosis by the Augmentation of in vivo Cytotoxic Activity. American Society for Microbiology 2003.5.18-22
 9. 岡田全司, 田中高生, 鈴木克洋, 井上義一, 露口一成, 喜多洋子, 木藤孝, RothelJim, 露口泉夫, 森享, 坂谷光則, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 金丸典子, 橋元里実, 高井寛子, 岡田知佳, 渡邊悠子, 森珠里, 石崎邦子, 松本久美, 岡美穂, 黒川恵理: QF2G(ESAT-6,CFP10)を用いた,新しい結核診断法の開発,及び ESAT-6 peptide 投与 SCID-PBL/hu による生体内免疫応答の解析. 第78回日本結核病学会総会 2003.4
 10. 岡田全司, 田中高生, 吉田栄人, 大原直也, 内藤真理子, 山田毅, 金田安史, 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, 橋元里実, 高井寛子, 岡田知佳, 福永有可里, 森珠里, 石崎邦子, 渡邊悠子, 岡美穂, 黒川恵理, 松本久美, 松本真, 坂谷光則: 新しい抗結核ワクチン (DNA ワクチン、リコンビナント BCG ワクチン、サブユニットワクチン) の開発. 実験

結核研究会 2003.4

11. 井上義一, 田中高生, 喜多洋子, 坂谷光則, 岡田全司, 吉田栄人, 岡美穂, 松本久美, 金丸典子, 稲永由紀子, 村木裕美子, 桑山さち子, 高井寛子, 石崎邦子, 森珠里, 黒川恵理, 岡田知佳, 渡邊悠子, 山田毅, 大原直也, 内藤真理子, Reed Steven, Skeiky Yasir, Gillis Steven: 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. 第 78 回日本結核病学会総会 2003.4
12. 田中高生, 喜多洋子, 井上義一, 坂谷光則, 岡田全司, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 金丸典子, 橋元里実, 高井寛子, 渡邊悠子, 岡田知佳, 森珠里, 石崎邦子, 松本久美, 岡美穂, 黒川恵理, 吉田栄人, 金田安史, 大原直也, 内藤真理子, 山田毅, 松本杜吉, Steven Reed, Yasir Skeiky, Steven Gillis: 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. 第 78 回日本結核病学会総会 2003.4
13. 喜多洋子, 田中高生, 井上義一, 坂谷光則, 岡田全司, 桑山, 村木, 稲永, 金丸, 橋元, 高井, 渡邊, 岡田, 森, 石崎, 松本, 岡, 黒川, 吉田栄人, 金田安史, 大原直也, 内藤真理子, 山田毅, Reed S., Skeiky Y., Gillis S., Tan E.V., Cruz E.C. Dela: ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しい DNA ワクチン開発 Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチン. 第 78 回日本結核病学会総会 2003.4
14. 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 2003.03
15. 井上義一, 審良正則, 田中勲, 新井徹, 中田光, 源誠二郎, 松本久美, 安藤守秀, 鈴木克洋, 林清二, 岡田全司, 木村謙太郎, 坂谷光則: 三次元 CT による特発性肺胞蛋白症肺内リポプロテイン様物質定量の試みとその意義. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.03
16. 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, 橋元里実, 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 2003.03
17. 桑山さち子, 須波敏彦, 喜多洋子, 田中高生, 細江重人, 沖塩協一, 中宣敬, 安宅信二, 小河原光正, 坂谷光則, 森隆, 木村謙太郎, 岡田全司, 河原正明: ヒト肺がん細胞, 肺がん拒絶抗原と SCID-PBL/hu を用いた生体内抗ヒト肺がん効果解析モデル. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.03
18. 松本久美, 井上義一, 岡田全司, 田中高生, 岡美穂, 木村謙太郎, 山本暁, 坂谷光則: マスト細胞と線維芽細胞からの Matrix Metalloproteinase(MMP)-2 産生 肺の線維化病変での役割. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.03
19. 岡田全司, 田中高生, 吉田栄人, 井上義一, 武本優次, 大原直也, 内藤真利子, 山田毅, 金田安史, 坂谷光則, Steven Reed, Yasir Skeiky, Babie Tan: ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しいワクチン開発と結核免疫誘導. 第 33 回日本免疫学会総会 2003.12

20. 田中高生, 喜多洋子, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 金丸典子, 橋元里実, 高井寛子, 岡田知佳, 福永有可里, 松本久美, 岡美穂, 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. 第 58 回国立病院療養所総合医学会 2003.10
21. 露口一成, 鈴木克洋, 馬渡秀徳, 南誠剛, 新井徹, 安藤守秀, 村井隆太, 林清二, 井上義一, 岡田全司, 木村謙太郎, 坂谷光則, 佐々木秀文, 後藤正志, 奥村明之進, 松村晃秀, 井内敬二. 当院での肺アスペルギルス症に対するミカファンギンナトリウムの治療成績 第 91 回日本結核病学会第 61 回日本呼吸器学会近畿地方会 2003.6
22. 岡田全司, 田中高生, 喜多洋子, 桑山さち子, 川口知哉, 松村晃秀, 井内敬二, 坂谷光則, 齊藤泉, 河南有希子, 森山光章, 中村洋一, 河原正明: 肺癌関連抗原遺伝子治療によるヒト肺癌治療モデルの研究 第 62 回日本癌学会総会 2003.9
23. 岡田全司: 新しい結核ワクチンの開発について K-net 近畿地区研究会 (第 33 回研究会) 2003.7
24. 田中高生, 井上義一, 岡田全司, 河原正明, 田村光信, 松村晃秀, 井内敬二, 山本暁: RCAS-1 抗原の発現とヒト肺癌の悪性度予後診断. 第 78 回日本肺癌学会関西支部会 2003.7
25. 武本優次, 安教哲, 横井良明, 中田真司, 森岡信行, 河原田修身, 中村忍, 岡田全司: 胸部不快感により、発見された右肺動脈内浮遊血栓症の一例. 第 14 回日本老年医学会近畿地方会 2003.11
26. 武本優次, 安教哲, 尾野光市, 飯田武, 岡澤崇, 中村忍, 岡田全司: 胃癌との鑑別が困難であった再発性難治性胃一二指腸潰瘍の一例. 第 171 回日本内科学会近畿地方会 2003.9
27. 石川秀雄, 木村剛, 安藤守秀, 井上義一, 鈴木克洋, 林清二, 岡田全司, 木村謙太郎, 井内敬二, 坂谷光則: 気管支動脈塞栓術の IDC(interlocking detachable coil)導入による成績向上について. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.03
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
- 岡田全司
1. 特許取得 (出願中)
 - 整理番号 PC 出願
 - 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が組換え蛋白質である、請求項 1 記載の感染症治療剤。
 - ① 15K グラニューライシンをコードする遺伝子が組み込まれた、15K グラニューライシンの体内発現ベクターを有効成分とする、感染症治療剤。
- 原 寿郎
2. 特許取得 (出願中)
 - T-bet 遺伝子多型と疾患との関連で
 - 特許申請中
- 小出幸夫
3. 特許取得
 - 「結核菌防御抗原 MPT51 の
 - HLA-A*0201 拘束性 T 細胞エピトープ」
 4. 特許取得
 - 「新規遺伝子解析法による細菌の迅

速同定法]

姫野國祐

5. 特許取得

特許出願番号 特願 2003-023507
発明者 姫野國祐、石井一成
発明の名称 細胞内寄生病原体に
対する遺伝子ワクチン
出願人 株式会社産学連携機構
九州
出願日 平成 15 年 1 月 31 日

6. 特許取得

特許出願番号 特願 2002-302810
発明者 姫野國祐、古江増隆、
前原喜彦
発明の名称 癌遺伝子ワクチン
出願人 株式会社産学連携機構
九州
出願日 平成 14 年 10 月 17 日

7. 特許取得

特許出願番号 特願 2000-229369
発明者 高橋幸則
発明の名称 動物・ヒト用免疫賦活
調整剤及び動物・ヒト
の感染症や皮膚病、癌
の予防・治療方法
出願人 岡本電機株式会社、
高橋幸則、姫野國祐
出願日 平成 12 年 7 月 28 日

8. 特許取得

特許出願番号 特願 1990-014000
発明者 大久保新也
発明の名称 抗癌剤
出願人 大久保新也、佐藤光伸、
姫野國祐
出願日 平成 2 年 6 月 27 日

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

新しい結核ワクチンによる臨床応用
（国立病院療養所政策医療呼吸器ネットワークを利用した）計画

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

〔Ⅰ〕結核予防ワクチン：すでに、マウス、モルモットの結核感染モデル動物実験のみならずヒトの結核感染に最も近いと折り紙つきのカニクイザル（Nature Medicine 1996）のレベルで新しい結核ワクチン① HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン、② 72f fusion 蛋白 + BCG 東京ワクチン ③リコンビナント 72f BCG 等が結核予防ワクチンとして有効である事が示された。したがって、結核予防ワクチンの臨床応用として Phase I study（健常人で行う PPD 皮内反応 副作用 PBL 免疫反応）Phase II study [日本（当国立療養所近畿中央病院を中心として政策医療呼吸器ネットワーク） フィリピン ブラジル インド 南アフリカ等結核発生率の低下]、Phase III、Phase IV を行う計画をたてた。結核予防効果の判定には最低数年以上かかる。

〔Ⅱ〕結核治療ワクチン：① r72f BCG ワクチン② Adex(IL-6 + IL-6R + gp130)DNA ワクチン③ 72f fusion 蛋白ワクチン ④ HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンを単独又は組み合わせて、治療ワクチンの開発計画を立案した。

さらに、〔Ⅲ〕多剤耐性結核菌に対する治療ワクチン〔Ⅳ〕PPD（ツ反）DPPD 皮内反応による結核特異診断法の開発。これらの〔Ⅰ〕～〔Ⅳ〕の臨床応用を国立病院療養所政策医療呼吸器ネットワークを利用して行う予定である。

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、BCG よりも切れ味の鋭い新しい結核ワクチンの開発が必須である。しか

しながら、未だ臨床応用に有効な新しい結核ワクチンは開発されていない。我々は結核予防ワクチンとしてカニクイザルのレベルで有効な三種の新しい結核ワクチンを開発したことより、臨床応用への計画を立案した。

一方、治療ワクチンについては、結核治療 phase に有効なワクチンは全く開発されていない。したがって結核治療ワクチンについても将来的な臨床結核ワクチンについての動物モデルでの実験を行った。

B. 研究方法

結核ワクチン効果を判定するモデル動物として、BALB/c マウス、モルモット（ハートレー）、カニクイザルを用いた。結核菌は H37Rv ヒト結核菌や Erdmann ヒト結核菌を使用した。また政策医療呼吸器ネットワークを用いた計画も立案した。

（倫理面での配慮）

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。

C. 研究結果

[I] すでに、マウス、モルモットの結核感染モデル動物実験のみならずヒトの結核感染に最も近いと折り紙つきのカニクイザル（Nature Medicine 1996）のレベルで新しい結核ワクチン① HVJ-liposome / HSP65 DNA +IL-12 DNA ワクチン ② 72f fusion 蛋白 + BCG 東京ワクチン ③ リコンビナント 72f BCG 等が結核予防ワクチンとして有効である事が示された。(表 1)

表 1

新しい結核ワクチン
① HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン
② 72f fusion 蛋白 + BCG 東京ワクチン
③ リコンビナント 72f BCG 等

したがって、結核予防ワクチンの臨床応用

として Phase I study (健常人で行う PPD 皮内反応 副作用 PBL 免疫反応) Phase II study [日本 (当国立療養所近畿中央病院を中心として政策医療呼吸器ネットワーク) フィリピン ブラジル インド 南アフリカ等結核発生率の低下] Phase III、Phase IVを行う計画をたてた。(表 2)

結核予防効果の判定には最低数年以上かかる。

[II] 結核治療ワクチン

一方、結核治療ワクチンの開発が世界的に急速に熱気を帯びてきている。

- ① r72f BCG ワクチン
- ② Adex(IL-6+IL-6R+gp130)DNA ワクチン
- ③ 72f fusion 蛋白 ワクチン
- ④ HVJ-liposome/

HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンを単独又は組み合わせ、治療ワクチンの開発計画を立案した。

事実すでに我々の Adex (IL-6+IL-6R+gp130)DNA ワクチンは結核治療ワクチン効果をマウスの結核感染の系で示した。さらに r72f fusion 蛋白 ワクチンもマウス、モルモットの系で治療ワクチン効果が示され、カニクイザルでも preliminary であるが治療ワクチン効果を得た。したがって、これらのワクチンを組み合わせ、特に recombinant 72f BCG ワクチンを用いて治療ワクチン効果の解析を Steven Reed との共同研究でスタートした。(表 3)

用いる系は

- (1) マウス
- (2) モルモット (表 4)
- (3) カニクイザル (表 5)
- (4) ヒト免疫応答を解析できる

SCID-PBL/hu モデルである。(表 6)

[III] 多剤耐性結核菌に対する治療ワクチン

RFP、INH と結核治療ワクチンを併用

することにより、RFP、INH 低濃度でも結核治療効果、特に多剤耐性結核に対しても RFP、INH 等が有効となる可能性が大である。

[IV] PPD (ツ反) DPPD 皮内反応による結核特異診断法の開発

D. 考察

[I] ~ [IV] の臨床応用を国立病院療養所政策医療呼吸器ネットワークを利用して行う予定である。

E. 結論

[I] 結核予防ワクチン：すでに、マウス、モルモットの結核感染モデル動物実験のみならずヒトの結核感染に最も近いと折り紙つきのカニクイザル (Nature Medicine 1996) のレベルで新しい結核ワクチン ① HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン ② 72f fusion 蛋白 + BCG 東京ワクチン ③リコンビナント 72f BCG 等が結核予防ワクチンとして

有効である事が示された。したがって、結核予防ワクチンの臨床応用として Phase I study (健常人で行う PPD 皮内反応 副作用 PBL免疫反応) Phase II study [日本 (当国立療養所近畿中央病院を中心として政策医療呼吸器ネットワーク) フィリピン ブラジル インド 南アフリカ等結核発生率の低下]、Phase III、Phase IVを行う計画をたてた。結核予防効果の判定には最低数年以上かかる。

[II] 結核治療ワクチン：① r72f BCG ワクチン ② Adex(IL-6+IL-6R+gp130)DNA ワクチン ③ 72f fusion 蛋白ワクチン ④ HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンを単独又は組み合わせて、治療ワクチンの開発計画を立案した。

さらに、[III] 多剤耐性結核菌に対する治療ワクチン [IV] PPD (ツ反) DPPD 皮内反応による結核特異診断法の開発。これらの [I] ~ [IV] の臨床応用を国立病院療養所政策医療呼吸器ネットワークを利用して行う予定である。

表 2

結核予防ワクチンの 臨床応用として	
Phase I study	健常人で行う PPD皮内反応 副作用 PBL免疫反応
Phase II	日本 (当国立療養所近畿中央病院を中心として政策医療呼吸器ネットワーク) フィリピン ブラジル インド 南アフリカ等 結核発生率の低下
Phase III	
Phase IV	

表 3

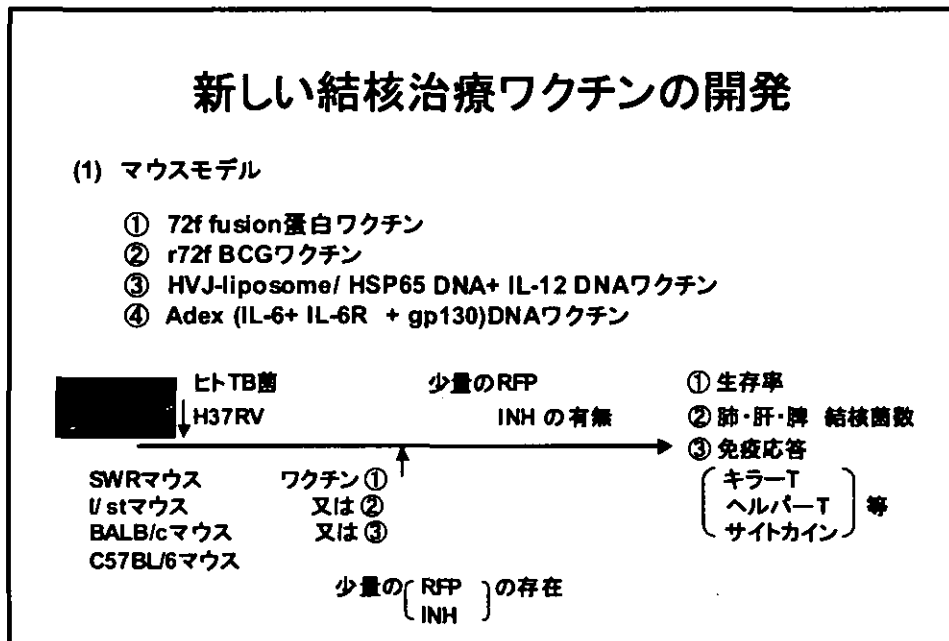


表 4

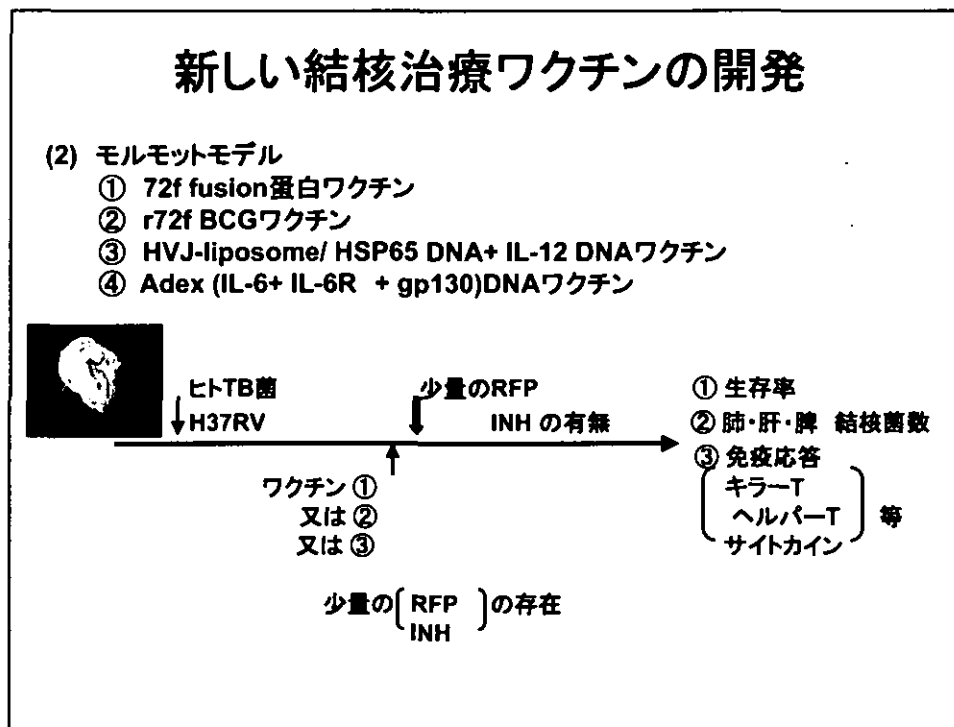


表 5

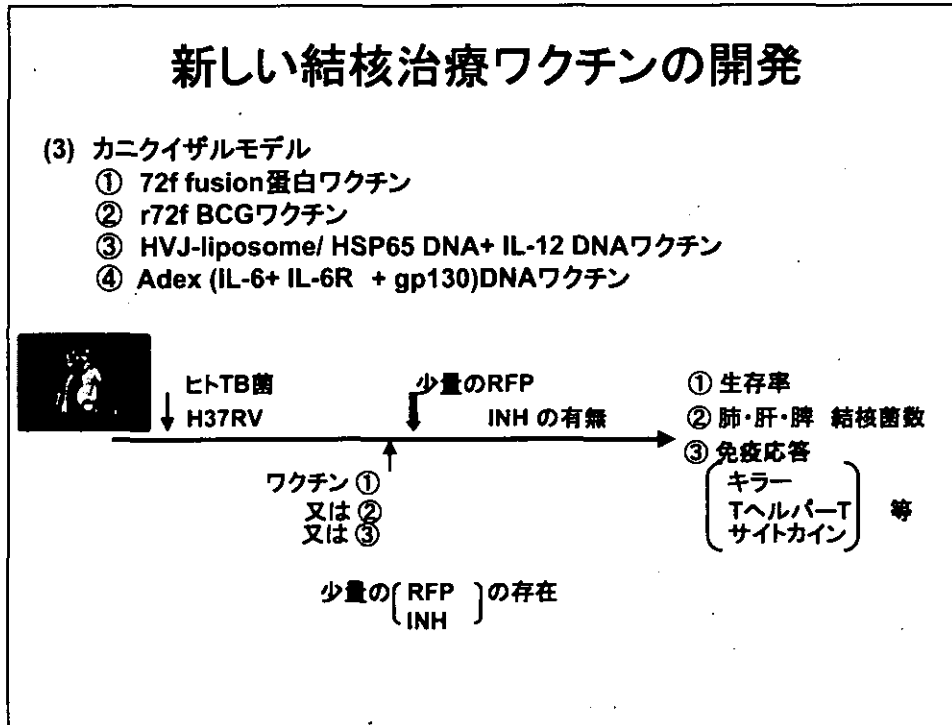
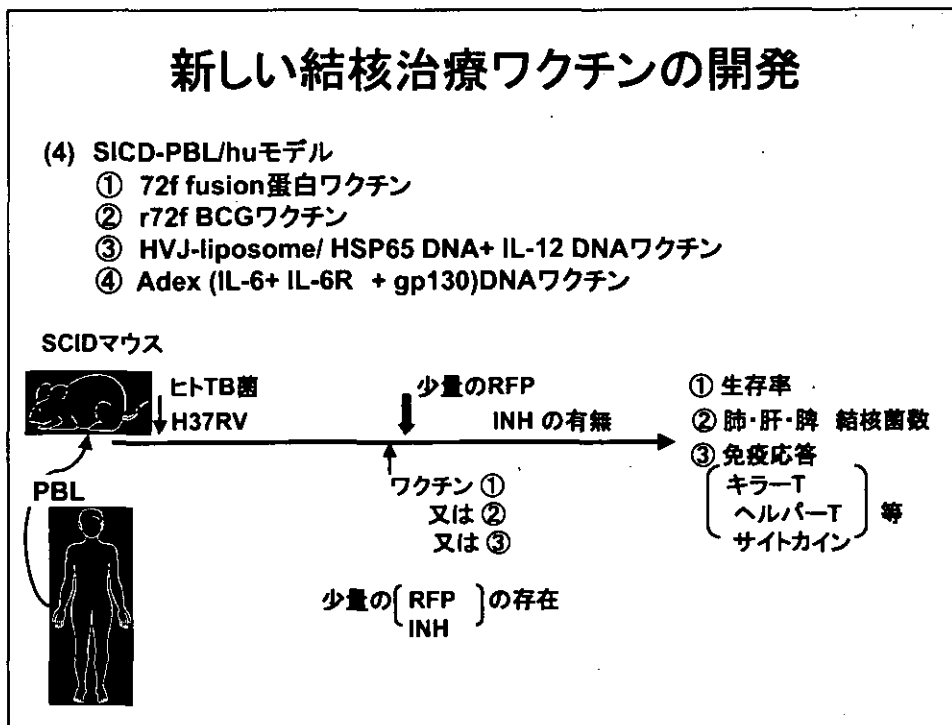


表 6



G. 研究発表

1. 論文発表
1. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Okada M, Shigeto E, Harada N, Mitarai S, Suzuki K, Inoue Y, Tsuyuguchi K, Sasaki Y, GH Mazurek, Tsuyuguchi I.: Simple and accurate detection of tuberculosis infection in BCG vaccinated individuals using a whole blood interferon- γ assay and the Mycobacterium tuberculosis specific proteins ESAT-6 and CFP-10. Am. J. Resp & Crit. Care Med. (in press) 2004
2. Yotsumoto H, Yonemaru M, Suzuki K, Kawabe Y, Sasaki Y, Toyoda E, Yamagishi F, Kudoh K, Kurasawa T, Ito M, Kawashiro T, Sakatani M, Mori M: A Clinical Study on tuberculosis among young adults in Japan: analysis on patients admitted to national hospitals in Kanto- and Kinki-areas in the year 2000. Kekkaku 2003;78(8) 525-31
3. Akira M, Yamamoto S, Inoue Y, Sakatani M.: High-Resolution CT of Asbestosis and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. AJR Am J Roentgenol. 2003 Jul;181(1):163-169.
4. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Matsumoto K, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.Dela Cruz, E.V. Tan, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M.: Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis Keystone 2003, P93, 335.
5. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M.: Novel (Recombinant BCG- and DNA-)Vaccination against Tuberculosis FASEB 2003 17(7) C25, 32.9.
6. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M.: Novel (Recombinant BCG- and DNA-)Vaccination against Tuberculosis. Thirty-Eighth Tuberculosis and Leprosy Research Conference 2003, P191.
7. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.V.Tan, E.C.Dela Cruz, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M.: Novel (Recombinant BCG- and DNA-)Vaccination against Tuberculosis . The Awaji International Forum Infection Immunity. 2003, P126.
8. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M Novel (Recombinant BCG- and DNA-)Vaccination against Tuberculosis. The First International Conference on TB vaccines for the world-TBV 2003

9. 露口一成, 鈴木克洋, 坂谷光則: びまん性肺陰影を読む 非結核性抗酸菌感染症. 総合臨床 52, Page1979-1984 2003
 10. 藤田悦生, 井上義一, 田中勲, 審良正則, 源誠二郎, 新井徹, 吉田亮, 井上康, 湊義彰, 坂谷光則: 慢性肺気腫患者における 3D-CT による気腫化(%LAA)と肺機能検査との比較. 臨床放射線 48 巻 1 号 Page133-136 2003
 11. 四元秀毅, 米丸亮, 鈴木克洋, 川辺芳子, 佐々木結花, 豊田恵美子, 山岸文雄, 工藤宏一郎, 倉澤卓也, 伊藤正己, 川城丈夫, 坂谷光則, 毛利昌史: 若年者結核の臨床的検討. 結核 Vol.78 No.8 Page525-53 2003
 12. 坂谷光則, 倉島篤行, 新井秀夫, 加治木章, 河原伸, 岸不盡彌, 佐藤滋樹, 鈴木克洋, 豊田恵美子, 長谷光雄, 前倉亮治 (日本結核病学会非定型抗酸菌症対策委員会): 肺非結核性抗酸菌症診断に関する見解— 2003 年 結核 Vol.78 Page569-572, 2003
 13. 井上義一, 松本久美, 岡美穂, 黒川恵理, 山本暁, 新井徹, 林清二, 岡田全司, 坂谷光則: Idiopathic Pulmonary Fibrosis におけるマスト細胞増加の意義: 免疫組織学的検討. 厚生労働省特定疾患「びまん性疾患調査研究班平成 14 年度研究報告」Page43-45 2003
2. 学会発表
1. Masaji Okada, Takao Tanaka, Yoshikazu Inoue, Yuji Takemoto, Shigeto Yoshida, Naoya Ohara, Mariko Naito, Takeshi Yamada, Yasufumi Kaneda, Makoto Matsumoto, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, Yasir Skeiky, Steven Reed, Mitsunori Sakatani: Novel (Recombinant BCG- and DNA-) Vaccination against Tuberculosis. The First International Conference on TB vaccines for the world-TBV 2003
 2. Okada M, Iwasaki T, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Inanaga Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Watanabe Y, Mori J, Ishizaki K, Yamamoto S, Inoue Y, Matsumura A, Iuchi K, Sakatani M, Kawahara M: Expression and prognostic significance in lung cancer of human tumor-associated antigen RCAS1. American Association for Cancer Research 2003 Annual Meeting 2003.6
 3. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Matsumoto K, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.dela Cruz, E.V. Tan, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M: Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis Keystone 2003
 4. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M: Novel (Recombinant BCG- and DNA-) Vaccination against Tuberculosis. Thirty-Eighth Tuberculosis and Leprosy Research Conferenc 2003.7.21-22
 5. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y,

- Matsumoto M, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, Yasir Skeiky, S Reed, Sakatani M: Novel (Recombinant BCG and DNA) Vaccination against Tuberculosis. The First International Conference on TB vaccines for the world-TBV 2003.
6. Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Takemoto Y, Yoshida S, Ohara N, Naito M, Yamada T, Kaneda Y, Matsumoto M, E.V.an, E.C.Dela Cruz, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M: Novel (Recombinant BCG and DNA) Vaccination against Tuberculosis . The Awaji International Forum Infection Immunity. 2003.8
 7. Okada M, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Inanaga Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Watanabe Y, Mori J, Ishizaki K, Matsumoto K, Inoue Y, Matsumoto M, Sakatani M: Novel DNA Vaccination against Tuberculosis by the Augmentation of in vivo Cytotoxic Activity. American Society for Microbiology 2003.5.18-22
 8. 岡田全司, 田中高生, 鈴木克洋, 井上義一, 露口一成, 喜多洋子, 木藤孝, RothelJim, 露口泉夫, 森亨, 坂谷光則, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 金丸典子, 橋元里実, 高井寛子, 岡田知佳, 渡邊悠子, 森珠里, 石崎邦子, 松本久美, 岡美穂, 黒川恵理: QF2G(ESAT-6,CFP10)を用いた,新しい結核診断法の開発,及び ESAT-6 peptide 投与 SCID-PBL/hu による生体内免疫応答の解析. 第 78 回日本結核病学会総会 2003.4
 9. 坂谷光則: じん肺と結核 じん肺結核と関連法令. 第 78 回日本結核病学会総会 2003.4
 10. 喜多洋子, 田中高生, 井上義一, 坂谷光則, 岡田全司, 桑山, 村木, 稲永, 金丸, 橋元, 高井, 渡邊, 岡田, 森, 石崎, 松本, 岡, 黒川, 吉田栄人, 金田安史, 大原直也, 内藤真理子, 山田毅, ReedS., SkeikyY., GillisS., TanE.V., Cruz E.C.Dela: ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しい DNA ワクチン開発 Hsp65DNA + IL-12DNA ワクチン. 第 78 回日本結核病学会総会 2003.4
 11. 井上義一, 田中高生, 喜多洋子, 坂谷光則, 岡田全司, 吉田栄人, 岡美穂, 松本久美, 金丸典子, 稲永由紀子, 村木裕美子, 桑山さち子, 高井寛子, 石崎邦子, 森珠里, 黒川恵理, 岡田知佳, 渡邊悠子, 山田毅, 大原直也, 内藤真理子, ReedSteven, SkeikyYasir, GillisSteven: 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 第 78 回日本結核病学会総会 2003.4
 12. 小河原光正, 鈴木克洋, 坂谷光則: 抗結核療法 5 ヶ月後に HAART を開始したところ免疫再構築により著しい症状増悪を認めた HIV 合併結核性心外膜炎の一症例. 第 78 回日本結核病学会総会 2003.4
 13. 田中高生, 喜多洋子, 井上義一, 坂谷光則, 岡田全司, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 金丸典子, 橋元里実, 高井寛子, 渡邊悠子, 岡田知佳, 森珠里, 石崎邦子, 松本久美, 岡美穂, 黒川恵理, 吉田栄人, 金田安史, 大原直也, 内藤真理子, 山田毅, 松本壮吉, ReedSteven, SkeikyYasir,

- GillisSteven: 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. 第 78 回日本結核病学会総会 2003.4
14. 田中壽一, 井内敬二, 松村晃秀, 奥村明之進, 田村光信, 後藤正志, 出口寛, 鈴木克洋, 坂谷光則: 当院における非結核性肺抗酸菌症に対する外科治療成績. 第 78 回日本結核病学会総会 2003.4
 15. 田村光信, 井内敬二, 松村晃秀, 奥村明之進, 田中壽一, 出口寛, 後藤正志, 鈴木克洋, 坂谷光則: 明らかな結核性病変が認められなかった気管支結核の 1 切除例. 第 78 回日本結核病学会総会 2003.4
 16. 岡田全司, 田中高生, 吉田栄人, 大原直也, 内藤真理子, 山田毅, 金田安史, 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, 橋元里実, 高井寛子, 岡田知佳, 福永有可里, 森珠里, 石崎邦子, 渡邊悠子, 岡美穂, 黒川恵理, 松本久美, 松本真, 坂谷光則: 新しい抗結核ワクチン (DNA ワクチン、リコンビナント BCG ワクチン、サブユニットワクチン) の開発 実験結核研究会 2003
 17. 桑山さち子, 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, 橋元里実, 松本久美, 坂谷光則: 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 2003.3
 18. 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, 橋元里実, 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 2003.03
 19. 松本久美, 井上義一, 岡田全司, 田中高生, 岡美穂, 木村謙太郎, 山本暁, 坂谷光則: マスト細胞と線維芽細胞からの Matrix Metalloproteinase(MMP)-2 産生肺の線維化病変での役割. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.03
 20. 石川秀雄, 木村剛, 安藤守秀, 井上義一, 鈴木克洋, 林清二, 岡田全司, 木村謙太郎, 井内敬二, 坂谷光則: 気管支動脈塞栓術の IDC(interlocking detachable coil)導入による成績向上について. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.03
 21. 井上義一, 審良正則, 田中勲, 新井徹, 中田光, 源誠二郎, 松本久美, 安藤守秀, 鈴木克洋, 林清二, 岡田全司, 木村謙太郎, 坂谷光則: 三次元 CT による特発性肺胞蛋白症肺内リポ蛋白質様物質定量の試みとその意義. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.03
 22. 鈴木克洋, 露口一成, 村井隆太, 井上康, 高藤淳, 新井徹, 安藤守秀, 源誠二郎, 井上義一, 林清二, 坂谷光則: 症状が乏しく入院時発熱と有意な炎症反応がないため他疾患が疑われた細菌性肺炎の 6 症例. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.03
 23. 林清二, 井上義一, 森雅秀, 山本暁, 坂谷光則: 肺組織中肝癌由来増殖因子発現細胞種の検討. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.03
 24. 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, 橋元里実, 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

2003.03

25. 新井徹, 井上義一, 田中勲, 源誠二郎, 林清二, 山本暁, 審良正則, 田澤立之, 中田光, 木村謙太郎, 坂谷光則: 肺胞蛋白症に対する GM-CSF 吸入療法の有用性 血清マーカー, 画像, 肺機能による病勢評価. 第 43 回日本呼吸器学会総会 2003.03
26. 田中高生, 喜多洋子, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 金丸典子, 橋元里実, 高井寛子, 岡田知佳, 福永有可里, 松本久美, 岡美穂, 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. 第 58 回国立病院療養所総合医学会 2003.10
27. 岡田全司, 田中高生, 吉田栄人, 井上義一, 武本優次, 大原直也, 内藤真利子, 山田毅, 金田安史, 坂谷光則, Steven Reed, Yasir Skeiky, Babie Tan: ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しいワクチン開発と結核免疫誘導. 第 33 回日本免疫学会総会 2003.12
28. 岡田全司, 田中高生, 喜多洋子, 桑山さち子, 川口知哉, 松村晃秀, 井内敬二, 坂谷光則, 齊藤泉, 河南有希子, 森山光章, 中村洋一, 河原正明: 肺癌関連抗原遺伝子治療によるヒト肺癌治療モデルの研究 第 62 回日本癌学会総会 2003.9
29. 石川秀雄, 木村剛, 安藤守秀, 林清二, 坂谷光則, 黒田修, 井内敬二, 井上義一, 鈴木克洋, 木村謙太郎: 気管支動脈塞栓術後の再喀血機序に関して示唆的であった気管支拡張症の一例. 第 91 回日本結核病学会第 61 回日本呼吸器学会近畿地方会 2003.6
30. 西山明秀, 井上義一, 新井徹, 石川秀雄, 林清二, 坂谷光則, 村井隆太, 井上康, 安藤守秀, 木村謙太郎, 山本暁, 審良正則, 黒田修: 心病変と肺病変を合併した HES (Hypereosinophilic syndrome) の一例. 第 91 回日本結核病学会第 61 回日本呼吸器学会近畿地方会 2003.6
31. 村井隆太, 井上康, 木村剛, 西山明秀, 高藤淳, 新井徹, 林清二, 坂谷光則, 露口一成, 井上義一, 鈴木克洋, 木村謙太郎: 人工呼吸管理を要した急性呼吸不全合併肺結核症の臨床的検討. 第 91 回日本結核病学会第 61 回日本呼吸器学会近畿地方会 2003.6
32. 露口一成, 鈴木克洋, 馬渡秀徳, 南誠剛, 新井徹, 安藤守秀, 村井隆太, 林清二, 井上義一, 岡田全司, 木村謙太郎, 坂谷光則, 佐々木秀文, 後藤正志, 奥村明之進, 松村晃秀, 井内敬二: 当院での肺アスペルギルス症に対するミカファンギンナトリウムの治療成績. 第 91 回日本結核病学会第 61 回日本呼吸器学会近畿地方会 2003.6
33. 新井徹, 山内勢津子, 安藤守秀, 林清二, 坂谷光則, 井上義一, 鈴木克洋, 木村謙太郎, 審良正則, 山本暁: 肺結核治療後に発症し, 早期の HRCT 像を検討し得た Pulmonary Langerhans'-cell histiocytosis の一例. 第 91 回日本結核病学会第 61 回日本呼吸器学会近畿地方会 2003.6
34. 南誠剛, 新井徹, 安藤守秀, 林清二, 井上義一, 坂谷光則: 肺病変を伴った multicentric Castleman 病の 1 症例. 第 91 回日本結核病学会第 61 回日本呼吸器学会近畿地方会 2003.6
35. 馬渡秀徳, 新井徹, 高藤淳, 安藤守秀, 林清二, 坂谷光則, 審良正則, 山本暁, 井上義一, 鈴木克洋: 急性腸炎が急性憎悪の原因と考えられた特発性

- 肺線維症の一例 第 170 回日本内科学
会近畿地方会 2003.6
36. 新井徹、安藤守秀、高藤淳、井上康、
馬渡秀徳、南誠剛、鈴木真優美、林清
二、坂谷光則、井上義一、鈴木克洋、
露口一成、木村謙太郎、審良正則、山
本暁、平田陽彦：無症状で多発性浸潤
陰影を示した女性の 1 例。第 102 回び
まん性肺疾患研究会 2003.08
37. 露口一成、鈴木克洋、坂谷光則、坪井知
正、佐藤敦夫、倉澤卓也、岡村英生、田
村猛夏：外来性再感染も含む多剤耐性
結核菌による院内集団感染事例。
K-net 近畿地区研究会（第 33 回研究
会） 2003.7

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

結核サブユニットワクチンの開発 （モルモットにおける BCG Tokyo 細胞壁画分(CCW)の 結核感染防御効果の検討）

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

CCW 投与モルモットでは強毒結核感染後の生菌数算定結果は、肺・脾臓共 BCG Tokyo 接種と比べて、ほぼ同程度の感染防御効果が得られた。無処置群と比べて 10^3 (Log CFU/tissue)の菌数の減少（肺では $10^6 \rightarrow 10^3$ 迄減少）が認められた。脾臓菌数の減少傾向もほぼ同様で、強力な感染防御効果が認められた。

A. 研究目的

ヒトにおける BCG ワクチンの結核発病予防効果に大きなバラツキがあることから、その原因の解明が新しい抗結核ワクチン開発に必須であると考えられているが、human trialにおけるこのようなバラツキの最も大きな原因は環境中の非定型抗酸菌、特に *M. avium* 菌の感作による接種 BCG 菌の生存抑制にあると考えられている(WHO 2003)。実験的にも MAC 菌に予め暴露したマウスでは、生菌免疫と比べて component vaccine を投与した場合の効果が高いことが報告されている。一方、HIV 感染者(抗体陽性者)の結核発病予防を目的とした BCG 接種(デンマーク株)による播種性感染症が報告されつつあり、感染免疫抑制者では、特に強毒 BCG ワクチン株の接種による副作用を十分考慮する必要がある。現在抗結核ワクチンの中で最も安全で確実な効果が期待できるのは component (subunit) vaccine であるが、この場合も免疫学的には単一抗原での防御効果が低

く、多重化抗原や複数タンパクを用いた fused antigen が工夫されつつあり、経費的にも問題が残る。このような背景の中で、菌からの調製が容易でコストも安く、安全かつ常に安定した防御免疫効果が得られる subunit vaccine として、我々は BCG 菌細胞壁画分(crude cell wall, CCW)を用いてモルモットの系における抗結核ワクチン効果を検討した。

B. 研究方法

BCG 細胞壁の調製： BCG Tokyo 172 (37 °C、8 日間表面培養)加熱死菌をフレンチプレス(大岳製作所製)を用いて破碎し(180 MPa)、6500×g 10 分間の遠心分離により未破碎菌体を除去した上清を 18000×g 60 分間遠心して沈殿を集め粗細胞壁画分(CCW)とした。その純度は、抗酸性染色、透過型電子顕微鏡像及び粒度分布測定により評価した。

モルモットの免疫実験： 雌性ハートレイ系モルモット(約 300 g)を用い、抗原とし

て BCG-CCW(タンパク及び脂質抗原を含む) 1 mg/匹を頸背部皮内に接種し、3週後に各群 3 匹ずつ解剖し、6 週目解剖群には 3 週目と同じ抗原で再度免疫した。CCW は等量の IFA 又は生食水と混合し、CCW を含まない PBS/IFA 群を control とした。モルモットにおける BCG-CCW の免疫効果判定： 免疫 3 週目または 6 週目にモルモットの臓器重量(肝、脾、肺、胸腺)を測定し、各々 HE 染色により病理学的観察を行い、同時に採取した脾細胞及びリンパ節細胞の増殖応答を CCW、PPD 刺激により行い、増殖応答は³H-チミジンの取り込みで測定した。

モルモットの皮内反応： 皮内反応は、3 週及び 6 週免疫モルモット腹部皮内に各抗原を接種(1 ~ 100 µg)し、6 ~ 48 時間後に局所の紅斑径及び硬結径を測定して皮内反応(skin test)の値とした。

感染防御実験： モルモットを 3 群に分け、A 群(CCW 1 mg)、B 群(BCG Tokyo 10 µg)、C 群(control 群、PBS/IFA)の各々皮下に接種(A 群は 3 週間隔 2 回)、最終皮下投与後 1 週目に M. tuberculosis H37 Rv 株をエアロゾル感染させ(5 ml, 10⁶ CFU H37 Rv 株) (IES, Gas-Col 製吸入装置使用)、4 週後、脾および肺の生菌数を測定するため臓器ホモジネートとして 7H10 agar plate に接種し、4 週後生菌数を算定した。

C. 研究結果及び考察

BCG-CCW の収率は、調整法により異なるが packed cell から 30 ~ 40% に及び、糖 20%、タンパク質 28%、脂質(抽出可能)20%以上を含む。粒度分布測定の結果からサイズは 200 ~ 300 nmφ を中心に 70 ~ 600 nm に及び、電顕像では、比較的均一な小型粒子として認められた。

³H-チミジンの取り込みによる T 細胞増殖応答では脾細胞及びリンパ節細胞とも CCW 免疫で、CCW による in vitro 刺激群に³Hの高い取り込み率が認められたが、特にリンパ節リンパ球の in vitro 刺激では ConA による非特異的な刺激と比べて CCW 刺激による³Hの著しく高い取り込みが認められた。ただ ConA の場合と比べて CCW 刺激による³Hの取り込みには個体差が大きく、モルモット自身の本来の個体差によるものか、不溶性の CCW による不均一なミセルによるものか今後検討が必要と考えられる。免疫群と対照群を比較した場合、免疫群で CCW に対照群の cpm と比べて強い促進効果が認められた。これは T 細胞がタンパク質や脂質抗原に特異的に反応しただけでなく、CCW が持つアジュバント作用による促進効果が大きいと考えられる。

CCW 投与モルモットの皮膚反応では、接種 3 週及び 6 週後共、CCW 1 ~ 100 µg 皮内接種後 24 ~ 48 時間の反応(紅斑及び硬結)が顕著に認められ、又特に感作 3 週後の臓器重量変化(肝、脾、肺の腫大と胸腺の萎縮)が著明であった。病理組織片の HE 染色では、CCW 投与モルモット肺で中心部に壊死を伴う典型的な異物性肉芽腫が認められた。

強毒結核感染後の生菌数算定結果は、肺・脾臓共 BCG Tokyo 接種と比べて、ほぼ同程度の感染防御効果が得られており、無処置群と比べて 10⁻³ (Log CFU/tissue)の菌数の減少(肺では 10⁶ → 10³迄減少)が認められた。脾臓菌数の減少傾向もほぼ同様で、強力な強力な感染防御効果が認められた。

以上の結果から、BCG 細胞壁画分(CCW)は、抗結核ワクチンとして BCG(生菌)と

比べて安全で使い易いワクチンとして期待されるものと推測されるが、CCWには細胞壁骨格(CWS)を始め多数の脂質分子が含まれ、CD1拘束性のinnate immunityを強化する一方、MHC拘束性タンパク質抗原の含量は低いと考えられることから、今後結核菌特異タンパク質抗原(又は各エピトープペプチド)を組み合わせるにより、更に強力なcell wall vaccineの開発研究を進めたいと考えている。

G. 研究報告

1. Ryll R, Hirai M, Okada M, Fujiwara N, Tomiyasu I, Kumazawa Y, Yano I.: Inhibition of TDM-induced TNF- α release by sulfo lipid: a potential new virulence mechanism of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Pathogenesis* (in press). 2004
2. Maekura, R., Kohno, H., Hirotani, A., Okura, Y., Ito, M., Ogura, T., and Yano, I.: Prospective Clinical Evaluation of the Serologic Tuberculous Glycolipid Tset in Combination with the Nucleic Acid Amplification Test. *J. Clin. Microbiol.*, 41 (3): 1322-1325, 2003.
3. Kawashima, T., Norose, Y., Watanabe, Y., Enomoto, Y., Narazaki, H., Watari, E., Tanaka, S., Takahashi, H., Yano, I., Brenner, M.B., and Sugita, M. Major CD8 T Cell Response to Live *Bacillus Calmette-Guerin* is Mediated by CD1 Molecules. *J. Immunol.*, 170: 5345-5348, 2003.
4. Minamino, M., Sakaguchi, I., Naka, T., Ikeda, N., Kato, Y., Tomiyasu, I., Yano, I., and Kobayashi, K. Bacterial Ceramides and Sphingophospholipids Induce Apoptosis of Human Leukaemic Cells. *Microbiology*, 149:2071-2081, 2003.
5. Naka, T., Fujiwara, N., Yano, I., Maeda, S., Doe, M., Minamino, M., Ikeda, N., Kato, Y., Watabe, K., Kumazawa, Y., Tomiyasu, I., and Kobayashi, K. Structural Analysis of Sphingophospholipids derived from *Sphingobacterium spiritivorum*, the Type Species of Genus *Sphingobacterium*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1635: 83-92, 2003
6. 藤田由希子、矢野郁也: 肺結核抗酸菌抗体 総合臨床 2003, 52 (1); 135-142.

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

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

分担研究者 螺良英郎 (財)大阪結核研究会 理事長

研究要旨

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に成功した。(1) 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を確立した。結核患者と健常人末梢血を ESAT-6 又は CFP-10 で抗原刺激し、産生される IFN- γ 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。さらに、ESAT-6 のペプチド及び CFP-10 のペプチドを用いより簡便で特異度の高い結核感染特異診断法を解析中である。(2) ツ反に用いられる PPD は多種の蛋白を含む。Dr. Gillis はこれらのアミノ酸配列を解読し、結核感染患者のみに skin test 陽性で BCG 接種者には反応しない蛋白のアミノ酸配列と DNA をクローニングした。さらに、DPPD のヒト成人の skin test において、結核感染特異性を証明した。すなわち、BCG 接種者では、PPD（通常のツベルクリン反応）に対する反応は陽性であったのに対し、DPPD に対する skin test は陰性であった。結核患者では PPD 及び DPPD とも両者皮内反応陽性を示した。

A. 研究目的

ツベルクリン反応（ツ反）は BCG 接種者で陽性に出る欠点があり、結核感染特異的診断は困難である。したがって結核感染特異的診断法が切望されている。

B. 研究方法

BCG 菌にはコード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 IFN- γ を ELISA で測定した。

また、ESAT-6 ペプチド及び CFP-10 ペプチドも抗原刺激に用いた。

米国 Corixa 研究所 Dr.S.Gillis Dr.S.Reed と共同研究を行い、極めて結核感染に特異性の高い、ツ反に代わる新しい診断法の進展が認められた。ツ反に用いられる PPD は多種の蛋白を含む。Dr.Gillis らはこれらの全ての蛋白のアミノ酸配列を解読し、結核感染患者のみに skin test 陽性で BCG 接種者には反応しない蛋白のアミノ酸配列と DNA をクローニングすることに成功した。さらに、結核患者末梢血 T リンパ球を使つての in vitro のサイトカイン産生能や増殖反応を解析した。この研究は国立療養所近畿中央病院で、共同研究を行なった。さらにブラジルの健常者を対象として skin test を行った。

(倫理面での配慮)

DPPD の *in vitro* でのヒト T リンパ球の反応性を見ることにあたり末梢血リンパ球の臨床研究等、研究対象者に対する人権擁護上の配慮を行う文書を作製している。もちろん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）に対する文面も記載されている。

C. 研究結果

(1) 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 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 IFN- γ 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)

さらに、ESAT-6 のペプチド及び CFP-10 のペプチドを用いより簡便で特異度の高い結核感染特異診断法を解析中である。

(2) 新しい結核特異診断法 (DPPD)

① DPPD のヒト成人の skin test において、結核感染特異性を証明した。すなわち、BCG 接種者では、PPD (通常ツベルクリン反応) に対する反応は陽性であったのに対し、DPPD に対する skin test は陰性であった。結核患者では PPD 及び DPPD とも両者皮内反応陽性を示した。一方、従来 PPD 陰性で結核感染が完全に否定されていた医療従事者が最近結核感染が強く疑われ、1 年以内に PPD 陽性となった人においては DPPD 陽性であった。(S.Gillis、S.Reed、岡田、坂谷、蝶良)

② さらに、数百名の成人健常者に行った skin test 研究においては、DPPD 皮内反

応は陰性群と陽性群にきれいに分かれた。一方、PPD skin test では大多数が陽性であった。すなわち DPPD 陰性群は BCG を接種した人でも結核非感染者を選別する画期的な方法となることが示された。

D. 考察

ツ反に代わる画期的な新しい診断法 (結核感染特異的) DPPD skin test の本邦での普及を目指したい。DPPD は、大腸菌に DPPD DNA を発現させた場合、大腸菌での発現が低い。したがってこの蛋白の大腸菌での大量発現、大量産生法を検討中である。さらに、DPPD の skin test の際により少量の蛋白を小微粒にコートし skin test を行う方法を開発しつつある。

E. 結論

ツベルクリン反応に代わる結核感染特異的診断法の開発に成功した。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を確立した。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)。

ツ反に用いられる PPD は多種の蛋白を含む。Dr.Gillis はこれらのアミノ酸配列を解読し、結核感染患者のみに skin test 陽性で BCG 接種者には反応しない蛋白のアミノ酸配列と DNA をクローニングした。さらに、我々の研究により、ヒトの *in vitro* における DPPD に対する末梢血 T リンパ球の IL-2 産生能や増殖反応において特異性が示唆された (DPPD はヒトの skin test で PPD 以外の蛋白では唯一反応をおこす蛋白であり、他に報告はない)。上記の DPPD 大量産生法の開発及び skin test の極めて鋭敏なアッセイ法の開発により DPPD skin test のヒトでの第 I 相臨床