

は低い可能性が示唆された。特に低年齢小児における結核感染判断においてはQFT結果のみならず感染源の状況や接触頻度、BCG歴、ツ反結果等を考慮に入れた総合的な判断が必要と考える。

D. 考察

小児における結核感染ハイリスク集団に対する効率的な健診実施方法が導き出されることを目的に小児結核発症例に関する後方視的検討、さらに小児結核診療におけるQFTの反応性について検討を行った。その結果より今後検討すべき課題として、①より効率的に感染者を見つけ出すことを目的とした健診対象小児の選定、②より精度の高い感染診断法の提唱、が挙げられた。小児を対象とした健診対象としては、これまでと同様に患者発生時の接触者健診例や学校健診要精検例に加え、近年の外国人結核患者数の増加を考慮し結核中～高蔓延地域からの転入時健診実施も考慮すべきであると考え。また、今回の小児結核発症例及び健診例におけるQFT反応性の検討結果より小児例における本検査法の有用性と限界が明らかとなった。今後はより精度の高い感染診断を目的に小児を対象とした検討例をさらに蓄積していくと共に、対象例の年齢を考慮に入れた感染判断基準の作成、低年齢小児における感染診断感度の向上を目的としたELISpot(末梢血単核球を用いたenzyme-linked immunospot assayによる感染診断)の試験的導入とその評価などの取り組みが必要と考える。

E. 結論

小児における結核感染ハイリスク集団に対する効率的な健診実施方法が導き出されることを目的に①当院で経験した小児活動性結核例の症例背景に関する後方視的検討、②結核感染診断に新たに導入されたQFTの小児症例におけるパフォーマンスに関する検討を行った。

小児結核対策における課題として、①BCG接種率の向上(早期接種の徹底)及びコッホ現象の把握と適切な事後処置、②精度の高い接触者健診及び慎重な経過観察の実施、③小児結核感染診断へのQFTの導入、④学校結核健診の効率的運用(結核中～高蔓延地域からの転入小児など特に精密な健診実施が望まれるハイリスク小児の絞り込み)などが明らかとなった。また、結核発症例におけるQFT結果の検討より小児においても発病を前提とする感染診断では本検査が非常に有用であることが明らかとなった。一方で小児を対象とした接触者健診例におけるQFT結果より潜在性結核診断におけるQFTの感度が乳児例では低い可能性が示唆された。特に低年齢小児における感染判断においてはQFT結果のみならず旧来の感染診断方法(=BCG歴や感染源との接触状況、ツ反結果に関する詳細な検討)も併用した総合的な判断が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 徳永修、濱谷舟、宮野前健、樋口一恵、原田登之：小児結核感染診断におけるQuantiFERON TB-2Gの有用性に関する検討。日本小児呼吸器疾患学会雑誌。18：127-136, 2007
2. 徳永修、宮野前健：症例に学ぶ—診断に苦慮する長引く発熱疾患 結核。小児内科。39：2022-2026, 2007

2. 学会発表

1. 徳永修、濱谷舟、宮野前健：学童・生徒に発症した塗沫陽性肺結核の3症例。第19回近畿小児科学会 2006.03 京都
2. 徳永修、濱谷舟、宮野前健：当院で診療した小児結核症例15例の検討—小児結核の予防、発症阻止、早期診断に向けて—。第38回日本小児感染症学会 2006.11 高知
3. 徳永修、濱谷舟、宮野前健、樋口一恵、原田登之：小児結核診療におけるQuantiFERON[®]TB-2G測定結果に関する検討。第39回日本小児呼吸器疾患学会 2006.11東京
4. 徳永修、濱谷舟、宮野前健、原田登之：小児結核感染診断におけるQuantiFERON[®]TB-2Gの有用性に関する検討。第20回近畿小児科学会 2007.3 和歌山
5. 徳永修、濱谷舟、宮野前健、樋口一恵、原田登之：小児結核感染診断におけるQuantiFERON TB-2Gの有用性に関する検討。第82回日本結核病学会 2007.6 大阪
6. 徳永修、濱谷舟、宮野前健、樋口一恵、原田登之：中学校での結核接触者健診におけるQuantiFERON TB-2Gの使用経験。第39回日本小児感染症学会 2007.11 横浜
7. 徳永修、濱谷舟、宮野前健、末永麻由美、宮川知士、錦戸知喜、吉田之範、亀田誠、高松勇、土居悟、樋口一恵、原田登之：小児期活動性結核症例におけるクオンティフェロン TB-2G反応性の検討。第40回日本小児呼吸器疾患学会 2007.11 大阪
8. 徳永修、濱谷舟、村田祐樹、宮野前健、樋口一恵、原田登之：小児に対する結核接触者健診におけるクオンティフェロン TB-2Gの有用性に関する検討。第40回日本小児呼吸器疾患学会 2007.11 大阪

G. 知的所有権の取得状況

なし

〔V〕体腔液QFTを用いた結核性漿膜炎の診断に関する研究

分担研究者 倉島篤行 有賀晴之 独立行政法人国立病院機構東京病院 臨床研究部長 医師

研究要旨

活動性結核性漿膜炎の細菌学的確定診断は、しばしば困難である。今回、我々は体腔液中の細胞を結核菌特異的抗原で刺激し、IFN- γ 産生応答を測定し、結核性漿膜炎を特異的に診断するこれまでにない方法を確立した。

A. 研究目的

胸膜炎や心膜炎、腹膜炎などの活動性結核性漿膜炎の確定診断は、体腔液または漿膜生検組織からの結核菌の同定によるが、その感度は低い。日本では体腔液上清中のadenosine deaminase (ADA) の測定が日常臨床上用いられているが、非結核の胸膜疾患でも上昇することがあり、不必要な抗結核治療が開始されてしまう可能性もある。よって、非侵襲的で簡便かつ迅速な診断法の開発が望まれる。活動性結核性胸膜炎は、胸腔内炎症局所において特異的細胞性獲得免疫応答が成立し、抗原特異的T細胞が集積している。この抗原特異的T細胞の炎症局所での証明が胸膜炎の特異的診断となる可能性がある。そこで、結核性漿膜炎患者の体腔液から得られた細胞を特異抗原により、in vitroで刺激した場合、末梢血と同等かそれ以上にIFN- γ 産生応答が増強すると予想され、新たな診断法を確立するのが本研究の目的である。

B. 研究方法

体腔穿刺または胸腔鏡を施行し、確定診断が得られた体腔液貯留患者75名を対象とした。結核菌が体腔液または漿膜組織から同定された活動性結核性漿膜炎、計28名、非結核性胸水計47名。体腔液中の細胞を、陰性、陽性コントロール、抗原とともに本人の体腔液上清を用いて18時間培養後、上清中のIFN- γ を測定した。

(倫理面への配慮)

対象患者に研究内容、目的、利害などについて説明し、文書にて同意を得た。個人情報には厳重に守秘した。

C. 研究結果

結果、陰性バックグラウンドに比べ、抗原刺激した場合のIFN- γ は、結核性胸膜炎群において統計学的に有意に上昇していたが、非結核性胸膜炎では有意な上昇は認めなかった。対象患者に対し全血QFT、ADAを同時に測定し、体腔液抗原応答（抗原刺激値－陰性バックグラウンド）とROC曲線のAUCを比較したところ、体腔液抗原応答が最も大きく、また診断能において最

も優れていた。陰性バックグラウンドと体腔液抗原応答の多変量解析による比較では、体腔液抗原応答が診断上有意であった（ $p < 0.005$ 、OR=1.21、95%CI=1.03-1.42）。

D. 考察

本法は、炎症局所の検体を用い、結核菌抗原特異的かつ非侵襲的、迅速に診断することが可能である。結核性漿膜炎が臨床的に疑われるが、細菌学的確証が得られない症例における補助的診断法として、日常実地臨床に有用であると考えられる。

E. 結論

活動性結核性漿膜炎の診断は臨床的に困難な場合が多く、本診断法により無駄な抗結核治療が減少すると考えられ、臨床的に有用な新しい診断法に成り得ると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Haruyuki Ariga, Yoshiko Kawabe, Hideaki Nagai, Atsuyuki Kurashima, Kimihiko Masuda, Hirotohi Matsui, Atsuhisa Tamura, Naohiro Nagayama, Shinobu Akagawa, Kazuko Machida, Akira Hebisawa, Yutsuki Nakajima, Hideki Yotsumoto, and Toru Mori: Diagnosis of Active Tuberculous Serositis by Antigen-Specific Interferon-gamma Response of Cavity Fluid Cells. 2007 45 1559-1567 Clinical Infectious Diseases.
2. Atsuyuki Kurashima: Novel diagnosis of active tuberculous pleuritis; Interferon- γ -based assay using M. tuberculosis specific antigen. 投稿中
3. Atsuyuki Kurashima: Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory

samples by transcription-reverse
transcription concerted reaction with an
automated system. J Clin Microbiol.
43:5435-5439,2005

4. 倉島篤行、有賀晴之: 高齢者の抗酸菌感染症 日本臨床 65:490-494, 2007.
5. 倉島篤行、有賀晴之: 非侵襲性肺アスペルギルス症治療の新たな展開, 結核 82:143-147, 2007.
6. 倉島篤行、有賀晴之: 肝硬変に合併した結核症例の検討, 結核 81(7):457-465 2006.
7. 倉島篤行、有賀晴之: 結核性抗酸菌症 Modern Physician 26(3):385-388, 2006.
8. 倉島篤行、有賀晴之: 肺癌と活動性肺抗酸菌症の混在する病態の検討。結核 80:413-419, 2005.
9. 倉島篤行、有賀晴之: 結核性抗酸菌症の診断と治療 JIM 15:398-402. 2005.
10. 倉島篤行、有賀晴之: 気密空間における感染性疾患 日本胸部臨床 64:325-332, 2005.

2. 学会発表

1. Haruyuki Ariga Diagnosis of Active Tuberculous pleuritis by Antigen-Specific Interferon-gamma Response of Cavity Fluid Cells The 11th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology 19-20 November 2006
2. 有賀晴之 他: 結核性胸膜炎の新しい診断法 Kekkaku 2006 vol 81 No.3
3. 有賀晴之 他: 体腔液QFTを用いた結核性漿膜炎の診断 Kekkaku 2007 vol 82 No.4

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

〔VI〕結核の感受性・重症度と遺伝子多型QuantiFERONの有用性 —原発性免疫不全症における経験—

分担研究者 原 寿郎 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 教授

研究要旨

(1) 結核菌症の病態解明

結核患者87名と正常対照265名を対象として、21の結核感受性候補遺伝子についてマーカー—塩基多型(SNPs)を用いた関連解析を行った。その結果、IL12RB1が結核に関連しており、日本人における結核感受性遺伝子の一つであることが示唆された。

(2) 樹状細胞を用いた結核菌症に対する細胞遺伝子治療の開発に関する研究

マウス骨髄由来樹状細胞を結核菌抗原とともに培養し、これをマウスに投与した。その結果、結核菌抗原特異的CD8陽性T細胞が肺、脾臓で誘導され、ヒト型結核菌を高濃度気道内感染させるとコントロールマウスと比較して肺で有意な菌数の減少が認められた。以上より、結核菌抗原感作樹状細胞を用いた免疫療法は、難治性結核患者に対するワクチン療法として利用できる可能性が示唆された。

(3) IFN- γ /IL-12経路障害による免疫不全症の全国調査

BCGや非結核性抗酸菌による播種性重症感染を呈しやすいことが知られているmendelian susceptibility to mycobacterial disease (MSMD)患者のわが国での臨床像と遺伝的背景を検討した。MSMD患者の半数が複数回の抗酸菌感染症に罹患しており、起炎菌はBCGが59%、BCG菌以外の非結核性抗酸菌感染症は34%だった。BCG感染症では、骨髄炎・関節炎が最も多く、以下、リンパ節炎、皮下膿瘍・皮膚炎であり、死亡例はなかった。また、4家系5名が常染色体優性interferon- γ R1部分欠損症であることが判明した。わが国のMSMD患者は、海外の報告と比較して、男性に多く、BCG接種1年以上経過した後の発症も多い反面、死亡例がなかったことが特徴的であった。

(4) 結核診断におけるQuanti FERON TB-2Gの有用性の検討

小児におけるQuanti FERON TB-2G(QFT)の有用性を検討するために、結核の接触者健診としてまたは臨床的に結核を疑われてツベルクリン反応(ツ反)およびQFTを施行された6歳から12歳の小児患者でのツ反およびQFT結果と最終診断を比較したところ、ツ反よりもQFTの方が鋭敏であった。また、6歳未満の初感染結核患者において、ツ反陰性者の中にQFT陽性となる例もあり、乳幼児に対してもQFTを行うべきと考えられた。さらに、播種性BCG感染症患者において、QFTが陰性であった点から、非結核性抗酸菌感染症との鑑別にQFTが有用であることが示唆された。

A. 研究の目的

- (1) 日本人の結核発症に関与する宿主側遺伝要因を明らかにし、結核治療のテイラーメイド化に役立てる。
- (2) 結核菌抗原感作樹状細胞投与マウスでの抗原特異的T細胞に関する解析を行い、抗酸菌感染症の治療・ワクチンとしての有用性評価を行う。
- (3) わが国のBCGを含む非結核性抗酸菌感染症患者の臨床像や遺伝的背景を検討する。
- (4) Quanti FERON TB-2Gの小児結核診断における有用性と非結核性抗酸菌感染症との鑑別での有用性について検討する。

B. 研究方法

- (1) 結核患者87名と正常対照265名を対象として、21の結核感受性候補遺伝子についてマーカー—塩基多型(SNPs)を用いた関連解析を行った。複数のマーカーSNPsで結核との関連がみられた候補遺伝子に

ついては、その近傍のcoding SNPs (cSNPs)を検索し、non-synonymous cSNPsと結核の関連解析を行った。

- (2) C57BL/6マウス由来の樹状(DC)細胞を、結核菌由来のTB2ペプチド (MHCクラス I b拘束性)、またはMPT64ペプチド (MHCクラス I a拘束性)で刺激して結核菌抗原感作DCを作製した。これらをC57BL/6マウスに静脈内投与し、肺、脾臓、PECにおけるIFN- γ 産生抗原特異的CD8陽性細胞数について細胞内染色を行いフローサイトメトリーで解析を行った。また、投与後6日目および60日目に結核菌(H37Rv株)を気道内感染(1.0×10^5 CFU)させ、感染7日後および28日後に臓器内菌数を測定した。

- (3) 国内の667の小児科を持つ総合病院に一次調査票を送り、過去5年間(1999年から2003年)に、①MSMDと診断された患者、②BCG骨髄炎やBCG関節炎患者、③播種性BCG感染症や播種性非結核性抗酸菌感染症患者、④再発性あるいは重症の抗酸菌・サ

ルモネラ・リステリア感染症患者、⑤再発性あるいは重症結核患者、⑥家族性の再発性抗酸菌感染症患者、の6項目のいずれかに該当する患者を診療したかどうかを調べ、二次調査票で臨床像や遺伝的背景を検討した。

(4) 結核の接触者健診としてまたは臨床的に結核を疑われて国立病院機構福岡病院小児科または国立病院機構福岡東医療センター小児科を受診し、ツベルクリン反応(ツ反)およびQFTを施行された0歳から12歳の小児患者を対象とし、ツ反およびQFT結果と最終診断を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子解析研究「BCG副反応例および抗酸菌感染症発症に関連する宿主遺伝子要因の解明」として九州大学大学院医学研究院 遺伝子解析倫理審査委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

- (1) 結核感受性候補遺伝子の一塩基多型(SNP)を用いた結核患者と健常者との比較および軽症者と重症者との比較で、IL12RB1とIL1Bが結核の発症および重症度と関連していることが判明した。
- (2) 結核菌由来のペプチドを感作させた樹状(DC)細胞を投与したマウスでは、その後の結核菌感染が有意に減少しており、DCワクチン療法の有効性が示唆された。
- (3) わが国の播種性BCGおよび非結核性抗酸菌感染症患者(32名)は、欧米と比較して、男性に多く、BCG接種1年以上経過した後の発症が多く、BCG感染症は致死的不是なことなどが判明した。また、4家系5名が常染色体優性IFN- γ receptor 1部分欠損症であった。
- (4) 6歳以上の小児において、QFTの結果を基にした治療適応決定が可能と考えられた。6歳未満の小児でもQFT陽性となり、結核診断に有用であることが示唆された。さらに、播種性BCG感染症患者において、QFTが陰性であった点から、非結核性抗酸菌感染症との鑑別にQFTが有用であることが証明された。

D. 考察

(1) 今回解析したcSNPと同じクラスターのSNPについては、赤星らは日本人において結核との関連を認め、ハプロタイプの違いがIL12レセプターの機能と関連することを報告している。多数の候補遺伝子のスクリーニングから得られた今回の結果は、この報告と併せ、IL12RB1が日本人における結核感受性遺伝子の一つであることを強く示唆している。一方、モロッコと韓国での検討ではこのクラスターと結核

との関連は認められず、また、モロッコでの検討で関連が認められたプロモーター領域のSNPは今回の解析では関連がみられなかった。IL12RB1の結核感受性への関与は民族間で異なる可能性が考えられる。(2) 結核菌ペプチドを用いたワクチン療法の効果について、本年度に数編の報告がなされているが、その効果は十分なものではないというものであった。使用する樹状細胞の作成方法や、ペプチドの種類により抗原特異的T細胞の誘導に差があることは既知であり、これらの結核菌ペプチドを用いたワクチン療法の報告は我々のモデルと比較しても不十分な点があり、そのために効果がでなかったと思われる。樹状細胞による免疫療法は、短時間で多量の抗原特異的T細胞を誘導できる方法であり、その抗原に対するmemory T細胞を誘導できることからワクチンとして効果があるのみならず、難治症例に対する新規治療方法としてもその効果が期待できると思われる。(3) 我が国のMSMD患者は播種性あるいは反復性BCG感染症が主体であった。海外からの報告では、MSMDの男女比は同じで、BCG接種1年以上経過した後の発症は6%と少ないこと、播種性BCG感染症の約半数が死亡することなどが特徴であったが、今回の解析で、我が国では男性に多いこと、BCG接種1年以上経過した後の発症は30%であること、BCG感染症は致死的不是なことなどが明らかになった。(4) 6歳以上の症例では、結核の診断にQFTは有用であるだけでなく、ツ反陽性であってもQFT陰性に基づいて予防内服なしでの経過観察が可能であると考えられた。また、6歳未満の症例でも、QFT陽性を示し結核の診断に有用な情報が得られることがわかった。しかし、ツ反陽性の乳幼児は、予防内服を行っており、最終的な判定は困難であった。また、非結核性抗酸菌感染症との鑑別にQFTが有用であることも示唆された。

E. 結論

- (1) IL12RB1が結核に関連しており、日本人における結核感受性遺伝子の一つであることが示唆された。
- (2) 結核菌抗原感作DC投与により結核菌抗原特異的細胞性免疫が誘導されワクチン療法として利用できる可能性が示唆された。
- (3) わが国の重症非結核性抗酸菌感染症患者の状況が明らかとなり、早期診断、感染予防、適切な治療・管理を検討することが可能となった。
- (4) QFTにより小児の結核接触者および非結核性抗酸菌感染症患者への治療開始決定がより可能となることが示唆された。また、乳幼児の結核診断の一助となり、結核集団感染発生阻止につながると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Khajooe V, Saito M, Takada H, Nomura A, Kusuhara K, Yoshida SI, Yoshikai Y, Hara T: Novel roles of osteopontin and CXC chemokine ligand 7 in the defence against mycobacterial infection. *Clin Exp Immunol* 143(2):260-8, 2006
2. Takada H, Yoshikawa H, Imaizumi M, Kitamura T, Takeyama J, Kumaki S, Nomura A, Hara T. Rapid screening method for IRAK4 deficiency by flow cytometer. *J Pediatr*.148(4):546-548,2006
3. Sakai Y, Khajooe Y, Ogawa Y, Kusuhara K, Katayama K, Hara T: A novel transfection method for mammalian cells using gas plasma. *J Biotechnol*.121(3):299-308,2006
4. Kusuhara K, Yamamoto K, Okada K, Mizuno Y, Hara T. Association of IL12RB1 polymorphisms with susceptibility to and severity of tuberculosis in Japanese: a gene-based association analysis of 21 candidate genes. *Int J Immunogenet*. 34(1): 35-44, 2007
5. Ku CL, von Bernuth H, Picard C, Zhang SY, Chang HH, Yang K, Chrabieh M, Issekutz AC, Cunningham CK, Gallin J, Holland SM, Roifman C, Ehl S, Smart J, Tang M, Barrat FJ, Levy O, McDonald D, Day-Good NK, Miller R, Takada H, Hara T, Al-Hajjar S, Al-Ghoniaim A, Speert D, Sanlaville D, Li X, Geissmann F, Vivier E, Marodi L, Garty BZ, Chapel H, Rodriguez-Gallego C, Bossuyt X, Abel L, Puel A, Casanova JL. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med*. 204(10): 2407-22, 2007
6. Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, Metin A, Karasuyama H. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature*. 448(7157): 1058-62, 2007
7. Doi T, Yamada H, Yajima T, Wajjwalku W, Hara T, Yoshikai Y. H2-M3-restricted CD8+ T cells induced by peptide-pulsed dendritic cells confer protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 178(6): 3806-13, 2007
8. 原 寿郎 STAT1欠損症による免疫不全の病態 *日本醫時新報*4222 : 108-110, 2005
9. 原 寿郎 免疫疾患、小児科学・新生児学テキスト 改訂第5版, 2006
10. 高田英俊、Vahid Khajooe、齋藤光正、原寿郎 抗酸菌抵抗性とマクロファージの種類 *臨床免疫・アレルギー科*, 46(1): 19-25, 2006
11. 石崎義人、吉良龍太郎、鳥巢浩幸、實藤雅文、岩山真理子、由芽直子、原寿郎 原発性免疫不全症の遺伝子とコモンディジーズ: UNC93B1と熱性痙攣 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業原発性免疫不全症候群に関する調査研究平成18年度総括・分担研究報告書 87-90, 2007
12. 楠原浩一 結核菌/非結核性抗酸菌に対する易感染性とIFN- γ /IL-12経路 *日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会雑誌* 27: 9-19, 2007
13. Hara T: Novel roles of osteopontin and CXC chemokine ligand 7 in the defense against mycobacterial infection. *Clin Exp Immunol* 143:260-268,2005.
14. Hara T: Association of IL12RB1 polymorphisms with tuberculosis in Japanese. a gene-based analysis. 2005.

2. 学会発表

1. Khajooe V, Saito M, Takada H, Nomura A, Kusuhara K, Yoshikai Y, Hara T: Gene expression profiles of M-/GM-colony-stimulating factor-induced macrophages in the presence or absence of mycobacteria by microarray analysis. *Experimental Biology* 2005, Annual Meeting of AAI, March 31-April 5, 2005, San Diego, CA.
2. Kusuhara K, Yamamoto K, Hara T: Genetic susceptibility to tuberculosis in Japanese: a gene-based analysis. 11th International Congress of Human Genetics. Brisbane, Australia, August 6-10, 2006.
3. Kusuhara K, Yamamoto K, Hara T: Genetic

susceptibility to tuberculosis in Japanese: a gene-based analysis. XIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Budapest, Hungary. October 4-7, 2006.

4. 楠原浩一、佐々木由佳、中尾太、岡田賢司、保科隆之、齋藤光正、原寿郎：IL12RB1遺伝子多型と結核菌感受性：マーカーSNPsを用いた候補遺伝子の関連解析 第37回日本小児感染症学会総会・学術集会 2005.11.11-12 津
5. 土居岳彦、矢島俊樹、原寿郎、吉開泰信：結核菌由来ペプチド／樹状細胞の全身免疫はマイコバクテリアの血行感染に有効だが、気道感染には無効である。第35回日本免疫学会総会・学術集会 2005.12.13-15 横浜
6. 楠原浩一、佐々木由佳、保科隆之、齋藤光正、原寿郎、岡田賢司、山本健、中尾太、水野勇司：IL12RB1遺伝子多型と結核感受性：マーカーSNPsを用いた候補遺伝子の関連解析。第80回日本感染症学会総会 東京 2006.4.20-21.
7. 高田英俊 Genetic bases and epidemiology of mendelian susceptibility to mycobacterial infection in Japan第39回日本小児科学会国際シンポジウム 金沢 2006. 4.21-23
8. 楠原浩一、保科隆之、齋藤光正、大賀正一、原寿郎 BCG接種後20年以上を経てBCGリンパ節炎を発症した慢性肉芽腫症の1例 第39回日本小児感染症学会 2007.11.10-11 横浜

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

〔Ⅶ〕 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関する研究

分担研究者 螺良英郎 (財)大阪結核研究会 理事長

研究協力者 岡田全司 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター長

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。

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。これの皮内反応を容易に解析する方法を解析中である。この方法は皮内反応 (in vivo反応) であることより、アジア・アフリカ・南アメリカ等の発展途上国における結核感染特異的診断法として強力な武器を提供する。

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

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リンパ球を使ってのin vitroのサイトカイン産生能や増殖反応を解析した。この研究は国立病院機構近畿中央胸部疾患センターで、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。さらに、particleにこのDPPDを結合させ、ジェット噴射で皮内に免疫する方法を検討した。(図1、図2)

(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) 新しい結核特異的診断法 (DPPD)

① 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。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、螺良)

② 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。

(図2、図3)

③ さらに、皮内にこのPPD蛋白を効率的に免疫する方法として、particleと結合したDPPD蛋白を高速のジェット噴射で導入する試みを行いつつある

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. 結論とD. 考察

(1) 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の臨床試験を目指している。

- (2) 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。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。これの皮内反応を容易に解析する方法を解析中である。この方法は皮内反応（in vivo反応）であることより、アジア・アフリカ・南アメリカ等の発展途上国における結核感染特異的診断法として強力な武器を提供する。

新しい結核診断法

I . DPPD

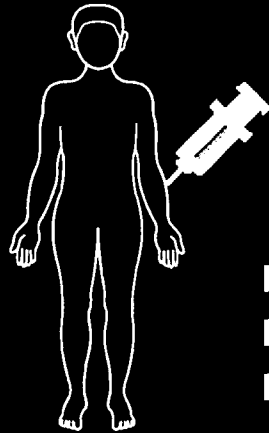
II . ESAT-6 + CFP-10

（結核菌に存在し、BCG菌に存在しない蛋白刺激による γ -IFN産生）

図1

[New Diagnosis]

Diagnosis using skin test with DPPD specific for TB (tuberculosis) infection



Skin Test (DPPD)

Patients with Tuberculosis
BCG vaccinated volunteer
BCG non-vaccinated volunteer

図 2

ツベルクリン反応に代わる 結核感染特異的診断法(DPPD)

	diagnosis	healthy BCG-vaccinated	Tb-infected
In vitro activation of human PBL T cells	DPPD	-	++
	PPD	+~++	++
In vivo skin test	DPPD	-	++
	PPD	++	++

[New Diagnosis]

Diagnosis using skin test with DPPD specific for TB (tuberculosis) infection



Skin Test (DPPD) → Induration Erythema

Patients with Tuberculosis
BCG vaccinated volunteer
BCG non-vaccinated volunteer

Skin test reaction sizes in persons sensitized with tuberculous bacilli

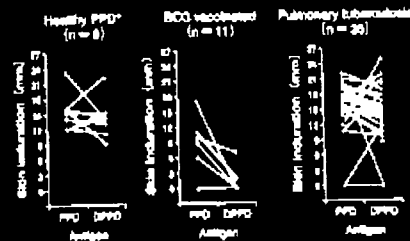


図 3

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
研究協力報告書

〔I〕結核ハイリスクグループ及びデインジャーグループに対する新しい結核診断法QFTの研究

研究協力者 藤山理世 神戸市保健所 予防衛生課 主幹

研究要旨

結核菌特異蛋白を用いたQFT-2G検査は、結核の感染の有無を、ツベルクリン反応単独で行うより正確に判定し、予防内服の必要な人を適切に選び、無用な予防内服や、レントゲン撮影を減らし、コストの削減ができ、効率のよい接触者健診を行うことができ、有用である。

A. 研究目的

結核菌特異蛋白を用いたQFT-2G検査は、結核の感染の有無を、ツベルクリン反応単独で行うより正確に判定し、潜在性結核感染症の治療の必要な人を適切に選び、無用な投薬や、レントゲン撮影を減らし、コストの削減ができる。また接触状況の指標として接触度を設定し、より効率のよい接触者健診を行うことを目標とし、QFTを実施した事例を蓄積して評価する。

B. 研究方法

BCG接種を行っている本邦では、ツベルクリン反応検査で結核感染の正確な診断はできず、結核菌特異蛋白を用いたQFT-2G検査で正確な診断ができることが期待される。日本における今後の有用な結核対策の基礎データとして、神戸市での、ハイリスクグループ・デインジャーグループでのQFT-2G陽性率がどの程度であるか、また、接触者健診でのQFT-2G検査の有用性をツベルクリン反応と比較し検討する。

結核の感染の有無を、ツベルクリン反応単独で行うより正確に判定し、予防内服の必要な人を適切に選び、無用な予防内服や、レントゲン撮影を減らし、コストの削減と有用で効率のよい接触者健診を進めるためのデータを蓄積する。

接触度は[対象者のcaseとの関係]×[caseの感染性(Gaffky号数)]×[暴露環境]×[暴露期間(M)]として、計算した。また、[caseとの関係]は同居のパートナー:3、同居者:2、同居ではない接触者:1、[caseの感染性]は喀痰塗抹集菌法 3+またはG6号以上:4、2+またはG3~5号:3、1+またはG2号:2、±またはG1号:1、喀痰塗抹陰性だが、肺結核:1、[暴露環境]は(4×室内でcaseの1m以内にいた時間/週)+(部屋の接触性×caseといた時間/週)+(部屋は異なるが同じ建物にcaseといた時間/週)+(0.25×戸外でcaseといた時間)として計算し、「部屋の接触性」は室内で1m以内の接触:4、車内・飛行機・船舶 等:3.5、病室・休憩室:3、一般住居の部屋:2.5、バー・レストラン・

喫茶店・学校・事務所 等:2工場・会議室・映画館・ガレージ等:1.5、部屋は異なるが同じ建物の中:1、戸外:0.25、さらに閉鎖循環式空調なら×2、換気設備が整っていれば×0.5と設定した。

C. 研究成果

平成17年度には1~4事例、18年度には5~15事例、19年度には16~25事例について実施した。ツベルクリン反応発赤径30mm以上の判定であれば、結核感染者は217名となるところ、QFTでの判定では感染者は77名であった。QFTの導入によりBCG陽転を除外でき、より正確に結核感染者を診断することが可能であった。

また接触度を設定してQFT陽性率を検討したところ、接触度の高い人に要請率の高い傾向があり、接触者健診の対象の選定の際に接触度を考慮に入れることにより、より効率のよい健診が実施できる可能性が示唆された。(表1)

D. 考察

QFT陽性者は結核に感染していると考えられた。ただし、治療歴のある者や、以前から陰影をいわれているものも存在し、過去の感染であると考えられた例もある。また、ツベルクリン反応発赤長径が30mm未満でもQFT陽性の例もあり、ツ反では感染者を実際より多く判断してしまう反面、QFTでは感染と判断できる者を見落としている可能性があり、QFT検査の方が、ツベルクリン反応検査より、正しく結核感染を診断出来ると考えられた。中学生以下を含む集団ではQFT陰性者でツ反発赤径の大きい者がみられ、QFTだけで判断してよいとは言い難く思われ、年齢や地域の罹患率、接触状況を考慮にいれた総合判断が必要であると考えられた。さらに対象者数を蓄積し、またQFT陰性者から発病がないことを確認する必要があると考えられた。また接触度を考慮に入れることは、より効率のよい健診の実施のため有用であると考えられた。

表1 神戸市におけるQFT実施接触者健診事例

事例	初発患者	検診対象者	人数	年齢		ツ反発赤長径		QFT 結果			
				分布	平均	30mm未満	30mm以上	陰性	判定保留	陽性	判定不可
1	G 2 x 2 M	特養従業員	56	21-62	35.8	40	16	51	1	3	1
2	G1x0.5M	塾講師・生徒	75	9-46	13.6	61	14	70 (1)	5	0	0
3	G 6 x 6 M	警備員	27	33-73	58.2	21(6)	6	15	3	9	0
4	G 5 x 1 M	特養従業員	22	20-30	25.3	17(1)	5	18 (3)	3	1	0
5	G 2 x 1 M	特養従業員	22	19-64	35.3	14	8	20	1	1	0
6	G 5 x 6 M	IT関係会社	37	23-39	29.1	29(1)	8	34	1	2	0
7	G 2 x 4 M	精肉関係会社	43	19-70	39.5	28(1)	15	30	7	6	0
8	G5x3.5M	港湾関係会社	55	22-67	42.1	34(6)	21	36	4	15	0
9	G9x1.5M	飲食店	6	23-34	26.3	3	3	5	0	1	0
10	G 5 x 3 M	飲食店	6	23-51	34.3	5(1)	1	2	2	2	0
11	G 6 x 3 M	大学同級生	22	20-21	20.5	18	4	21	0	1	0
12	G 5 x 1 M	塾生徒・講師	18	12-56	28.6	8	10	16	0	2	0
13	G 9 x 6 M	倉庫会社	47	21-63	37.3	40	7	41	5	1	0
14	G9x3M	簡易宿泊所 5名ツ反判定来ず	25	35-71	54.2	15(5)	5	14	2	9	0
15	G 9 x 2 M	事業所従業員等	56	19-73	29.2	27(1)	29	41	5	10	0
16	G5x5M	IT研修受講者	40	21-53	41.7	25	15(3)	35	2	3	0
17	G9x2.5M	バンド仲間	5	25-30	27.2	0	5(1)	3	1	1	0
18	G5x3M	塗装会社従業員	7	21-63	43.3	4	3	7	0	0	0
19	G5x1M	病院職員	16	23-48	34.9	9	7(1)	15	0	1	0
20	G5x1M	清掃作業員	7	31-45	38.3	5	2	6	1	0	0
21	G5x2M	生徒(1名QFTせず)	56	14-18		54(4)	2	42	9	4	0
22	G2x2M	大学同級生	40	21-36		23	17(1)	36	3	1	0
23	G10x12M	鍍金工場従業員	20	35-75		17	3	19	1	0	0
24	G6x5M	夜間高校 (3名ツ反せず)	35	16-73		26(1)	6(1)	31	2	2	0
25	G5x3M	遊び仲間	13	13-21		8(2)	5	11 (3)	0	2	0
計			756			536	217	619	58	77	1

E. 結論

QFT-2G検査は結核感染の有無を診断するのに有用な検査である。特に陽性であった場合に結核感染があることは確実である。但し、いつ感染したかはQFT-2G検査では判定できないため、臨床情報を組み合わせた総合判断が必要である。接触度が高いほど、QFT-2G検査結果が高値で結核感染の可能性も高いと考えられ、今後さらに症例を積み重ね検討する。(表2)

今後考えられる新たな課題

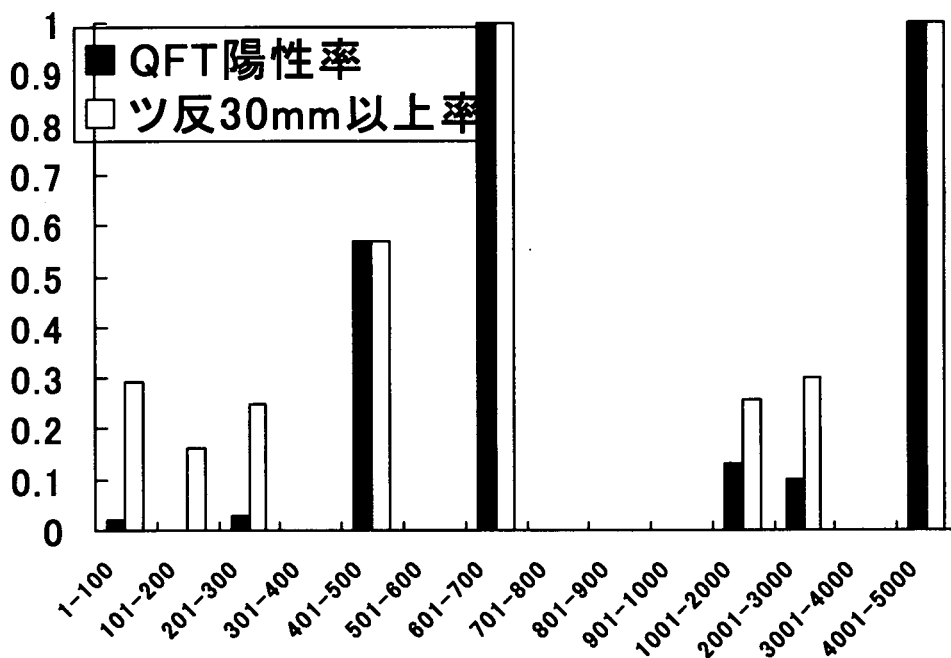
(1) QFT陽性者は結核に感染していることは疑いの余地はない。ただし、治療歴のある者や、以前から陰影をいわれているものも存在し、過去の感染である者がふくまれる。年齢や地域の罹患率、接触状況を考慮にいれた総合判断が必要であると考えられた。

- (2) 少数ながらツベルクリン反応検査の結果と矛盾がみられた例もあり、特に若年層に対し、QFT陰性の信頼性の評価が必要である。対象者数を蓄積して少なくとも2年間はQFT陰性者から発病がないことを確認する必要があると考えられた。
- (3) 接触度を考慮に入れて接触者をより適切に選定できれば、無用な検査を省くことが可能となり、コストの削減につながることから、既感染者は少ないと考えられる集団におい事例を蓄積することが必要であると考えられた。

行政施策への貢献の可能性

- (1) 各自治体で接触者健診としてQFT検査を実施する場合のモデルとなる。
- (2) 接触者健診において接触状況から健診の範囲を選定する際に接触度が指標となり、より効率のよい健診が可となる。

表2



F. 研究発表

1. 研究論文

なし

2. 学会発表

1. 藤山理世; 神戸市において、結核定期外健診時に施行したQFT-2G検査について 第81回日本結核病学会総会 2006.4.28. 仙台
2. 藤山理世; 神戸市での小中学生にQFT-2G検査を併用した定期外健康診断事例について 第97回日本結核病学会近畿地方会 2006.6.24. 奈良
3. 藤山理世; 神戸市で結核定期外健康診断時に施行したQFT-2G検査と接触度について 第3回神戸市公衆衛生研究会 2006.7.1. 神戸
4. 藤山理世; 神戸市で結核定期外健康診断時に施行したQFT-2G検査と接触度について 第65回日本公衆衛生学会総会 2006.10.25. 富山
5. 藤山理世; 神戸市で結核定期外健康診断時に実施したQFT-2G検査の有用性と接触度について 第82回日本結核病学会総会 2007.6.5. 大阪
6. 藤山理世; 神戸市で結核定期外健康診断時に施行したQFT-2G検査と接触度について 第66回日本公衆衛生学会総会 2007.10.25. 松山
7. 藤山理世; 神戸市でのQFTを併用した特別養護老人ホームでの結核接触者健康診断3事例について 第100回日本結核病学会近畿地方会 2007.12.8 京都

〔Ⅱ〕結核の感染と発病診断におけるQuantiferon TB第二世代の有用性の検討

研究協力者 鈴木克洋 NHO近畿中央胸部疾患センター 感染症研究部長

研究要旨

BCG接種が広範に普及している我が国で、ツベルクリン反応を用いて結核感染を正確に判定することは難しい。特に結核病棟をもつ病院職員では、ほとんど不可能と考えられる。近年結核菌特異的な抗原を用いてリンパ球を刺激し、インターフェロン γ 産生量からBCGの影響を受けずに結核感染を正確に判定できるQuantiferon TB第二世代(QFT2G)が開発され、その有用性が内外で報告されている。結核病棟を持つ当センター職員の結核感染対策への同法の応用の有用性が示唆された。また胸部レントゲン上肺結核が疑われる症例の発病診断における有用性も認められた。

A. 研究目的

国民のほとんどがBCG接種を受けているわが国で、結核の感染と発病診断におけるQFT2Gの有用性を検討する。

B. 研究方法

当院職員のボランティア(約250名)にツベルクリン反応とQFT2Gを同時に施行し、各種指標と比較する事で結核感染診断においてどちらの検査が有用化検討する。また胸部画像上結核を疑われた症例にQFT2Gを施行し、発病診断における有用性を検討する。

C. 研究結果

当院職員の94%はツベルクリン反応陽性であり、強反応者も半数を超える。一方QFT2G陽性者は12%であった。各種指標との比較検討では、ツベルクリン反応に対するQFT2Gの優越性が示された。結核発病診断におけるQFT2Gの感度は87%、特異度78%となり、臨床的な有用性が示された。

D. 考察

BCGが広範に接種されてきたわが国ではツベルクリン反応の臨床的な有用性はほとんどない。BCG免疫によらず結核免疫を正確に判定できるQFT2Gは、感染診断のみならず、発病診断においても大変有用である事が判明した。今後ツベルクリン反応に替わり、少なくとも成人では使用するべきである。

E. 結論

結核の感染と発病診断におけるQFT2Gの臨床的な有用性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shunji Takakura, Shigeo Tsuchiya, Yuichi Isawa, Kiyoshi Yasukawa, Toshinori Hayashi,

Motohisa Tomita, Katsuhiro Suzuki, Tatsuro Hasegawa, Takanori Tagami, Atsuyuki Kurashima, and Satoshi Ichiyama: Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory samples by transcription - reverse transcription concerted reaction with an automated system. J. Clin. Microbiol 43:5435-5439, 2005

2. 鈴木克洋, 吉田志緒美, 露口一成, 源誠二郎, 井上義一, 林清二, 岡田全司, 坂谷光則 肺カンサシ症の治療 結核81:41-43, 2006
3. 鈴木克洋: 「結核」第4版、結核の感染と発病・結核菌検査・臨床検査(富岡洋海編)医学書院、東京、2006
4. 鈴木克洋: 質疑応答、肺MAC症の診断・治療. 日本医事新報4225:90-91, 2005
5. 鈴木克洋: 病気と薬の説明ガイド2005 肺結核薬局 56(1):899-905, 2005
6. 鈴木克洋: 診療の秘訣「ツベルクリン反応の解釈」Modern Physician 26:424, 2006
7. 鈴木克洋: 私の処方「肺MAC症」Modern Physician 25:1596, 2005
8. 鈴木克洋: 肺結核を見落とさないために 呼吸と循環 54:63-69, 2006
9. 鈴木克洋: 肺非結核性抗酸菌症は増加している: 臨床からみた病原性と宿主要因の考察 最新医学 61:258-265, 2006
10. 鈴木克洋: 抗菌薬をつかいこなそう「結核」メディチーナ 43(4):664-665, 2006
11. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岩本朋忠, 富田元久, 岡田全司, 坂谷光則. リファンピシン耐

- 性Mycobacterium kansasiiにおけるrpoB変異の
 解明 結核81:475-479、2006
12. 吉田志緒美、鈴木克洋、岡田全司、富田元久、坂谷光則. 培養陰性、非結核性抗酸菌混在時における結核菌薬剤耐性遺伝子検査キットの有用性 臨床検査 50(8):934-939、2006、
 13. 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岩本朋忠、岡田全司、坂谷光則. Mycobacterium kansasii株における分子疫学的解析. 結核 82(2):103-110、2007
 14. 鈴木克洋、吉田志緒美、露口一成、岡田全司、坂谷光則: 多剤耐性結核菌の院内感染の現状と対策. 化学療法の領域 22(11):1691-1695、2006
 15. 鈴木克洋: 非結核性抗酸菌症. Infectious Diseases Report2006 37号、2006
 16. 鈴木克洋: 結核患者の新しい退院基準について. M.P. 23(11):1992-1993、2006
 17. 鈴木克洋: 「結核・非結核性抗酸菌症」 非結核性抗酸菌症、わが国における最近の動向、病態: (露口泉夫編)、最新医学社、大阪、2006
 18. 御手洗聡、小林郁夫、阿部千代治、和田雅子、鈴木克洋、高島哲也、川辺芳子、町田和子、田野正夫、瀧川修一、鎌田有珠、重藤えり子、藤井俊司、森健一、須山尚史、矢野修一、川城丈夫、尾形英雄. バクテックMGIT960結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ (MGIT AST) および小川標準法によるイソニアジド低濃度薬剤感受性検査の判定不一致に関する検討. 結核82(5):449-454、2007
 19. 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岡田全司、坂谷光則: 結核菌の分子疫学的解析—多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌の比較— 結核 82:531-550、2007
 20. Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, Tomita M, Fujiyama R, Tanaka N, Kawakami Y, Ito M.: Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on Mycobacterium tuberculosis strains predominated by the Beijing family. FEMS Microbiol Lett. 270(1):67-74. 2007
 21. 鈴木克洋: わが国における結核の現状とクオンチフェロン検査. Schneller 62:20-25、2007
 22. 鈴木克洋: 結核患者院内発生時の対応— QuantiFERONの可能性も含めて. 感染症37(3):105-108、2007
 23. 審良正則、鈴木克洋、喜久山綾乃: 肺結核の典型像、非典型像. 日本医事新報 4358:53-56、2007
 24. 鈴木克洋、審良正則、喜久山綾乃: 肺非結核性抗酸菌症の画像所見. 日本医事新報 4362:53-56、2007
 25. 鈴木克洋: 非結核性抗酸菌症、小児科診療 71(1):83-88、2008
2. 学会発表
 1. 鈴木克洋. 肺カンサシの治療 <シンポジウム非結核性抗酸菌症の治療>第80回日本結核病学会総会 (2005.5.12 埼玉)
 2. 鈴木克洋 非結核性抗酸菌症の変貌 合同教育プログラム 抗酸菌症の変貌 第46回日本呼吸器学会学術講演会 (2006 6.1 東京)
 3. 鈴木克洋: 肺カンサシ症の病態と治療 「ワークショップ 非結核性抗酸菌症の病態と治療」第47回日本呼吸器学会学術講演会 (2007 5.12 東京)
 4. 鈴木克洋: そこが知りたい結核の臨床 「呼吸器学会・結核病学会合同プログラム 未来に繋がる結核対策」第47回日本呼吸器学会学術講演会 (2007 5.11 東京)
 5. 鈴木克洋: 非結核性抗酸菌症の診断と治療 教育講演 第81回日本感染症学会 (2007 4.10 京都)
 6. 鈴木克洋: 多剤耐性結核 教育講演 第82回日本結核病学会学術講演会 (2007、6.6 大阪)
 7. 鈴木克洋: 難治抗酸菌感染症の治療 「合同シンポジウム感染症成立機構と化学療法—難治感染症の克服」第50日本感染症学会中日本地方会・第55回日本化学療法学会西日本支部総会 (2007.10.30. 神戸)
 8. 鈴木克洋: 肺真菌症の診断と治療—新しい抗真菌薬を中心に—教育セミナー 第70回日本呼吸器学会近畿地方会・第100回日本結核病学会近畿地方会 (2007.12.8、京都)
 - G. 知的所有権の取得状況
なし

〔Ⅲ〕費用対効果の高い新規結核ワクチンの開発研究

研究協力者 吉田 栄人 自治医科大学 講師

研究要旨

マウス、モルモット、ヒトよりIL-12遺伝子をクローニングし、独自に開発したDNAワクチン用高発現ベクターを作製した。これにより、実験動物として、マウス、モルモット、カニクザルを用いてHVJ-DNAワクチンを評価することが可能となった。

HVJエンベロープDNAワクチン (Hsp65+IL-12/Env) をGMPレベル製造した。マウスモデルにおいてBCGで初回ワクチンをした後、Hsp65+IL-12/Envで追加ワクチンを行うと、BCG単独と比較して1万倍もの強力なワクチン効果を示した。特筆すべき点は、ヒトへの臨床治験に向けて、Hsp65遺伝子とヒトIL12p40p35遺伝子の両遺伝子を一つのプラスミドに挿入した改良型DNAワクチンを構築し、このDNAワクチンをカニクザルに接種すると、致死量の結核菌を接種されてもレントゲン検査で結核病巣の陰影を見ることもなく、長期生存を続けた。

組換えバキュロウイルス(AcNPV-CMV-Hsp65) を免疫したマウスの脾臓細胞では、Hsp65タンパクに反応してIFN- γ が産生されることが確認された。しかしながらマウスモデルでは明確な感染防御効果を示さなかった。

A. 研究目的

ヒトへの臨床治験に向けて、安全でコストパフォーマンスに優れたBCGに代わる強力な新規結核ワクチンを開発する。

B. 研究方法

IL-12遺伝子を“DNAアジュバンド”としたHsp65結核DNAワクチンをHVJリポソームあるいはエンベロープに包埋し(Hsp65+IL-12/HVJ)、これを実験モデル動物(マウス、モルモット、カニクザル)に接種する。結核菌のエアゾル感染を行い、ワクチン効果を解析する。これらの動物実験結果をもとに、プロトタイプの改良および臨床試験申請のためのデータをまとめる。DNAワクチンプロジェクトとは別に結核菌由来の抗原あるいは遺伝子を導入した組換えバキュロウイルスベリオンを作製し、マウスで感染防御効果を検討する。さらに結核菌感染後のワクチン接種を想定し、Hsp65+IL-12/HVJの結核予防ワクチンとしての効果を検討する。

C. 研究結果

1. マウス、モルモット、ヒトよりIL-12遺伝子をクローニングし、DNAワクチン用高発現ベクターを独自に開発した。これにより、実験動物として、マウス、モルモット、カニクザルを用いてHVJエンベロープDNAワクチンを評価することが可能となった。
2. DNAワクチンを接種したカニクザルでは、致死量の結核菌を接種されてもレントゲン検査で結核病巣の陰影を見ることもなく、長期生存を続けた。
3. Hsp65遺伝子とIL12p40p35遺伝子の両遺伝子を一つのプラスミドに挿入した改良型DNAワクチ

ンを構築し、GMPレベルでHVJエンベロープワクチン (Hsp65+IL-12/Env) を製造し、動物実験に使用できる体制を整えた。

4. Hsp65+IL-12/Envで追加ワクチンを行うと、BCG単独と比較して1万倍もの強力なワクチン効果を示した。
5. 組換えバキュロウイルスワクチン (AcNPV-CMV-Hsp65) を免疫したマウスの脾臓細胞では、Hsp65タンパクに反応してIFN- γ が産生されることが確認された。
6. AcNPV-CMV-Hsp65はマウスモデルでは明確な感染防御効果を示さなかった。

D, 考察とE. 結論

1. 平成14年度より開始しているカニクザル実験は順調に成果を上げており、世界に先駆けた結核DNAワクチンの臨床応用に着実に前進している。また新しいタイプの結核ワクチンとしてバキュロウイルスベクターの可能性を見出したことは、研究の独創性を有し、今後の展開に大きな期待が寄せられる。
2. プロトタイプワクチンの改良を行っていく上で、マウス→モルモット→サルの実験系を利用して、ワクチン効果の評価を迅速に行うことが可能となった。この動物実験結果をもとに、臨床試験申請のためのデータをまとめる。並行して、治療用ワクチンとしての効果も検討中である。
3. DNAワクチンとは別に新規ワクチンベクターとしてバキュロウイルスベクターの改良を行う。バキュロウイルスはヒトに感染しない安全性の高いウイルスベクターである。またTLRを介して自然免疫を誘導することも報告されており、今回得

られた結果と合わせて全く新規な結核ワクチンの可能性が示された。今後、上記の確立した動物実験系を用いて解析を行っていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, Ohara N, Kaneda Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Inoue Y, Takemoto Y, Naito M, Yamada T, Matsumoto M, McMurray DN, Cruz ECD, Tan EV, Abalos RM, Young LJ, Burgos JA, Gelber R, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M, Okada M.: Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine* 23:2132-5, 2005.
2. Matsuoka H, Nguon C, Kanbe T, Jalloh A, Sato H, Yoshida S, Hirai M, Arai M, Socheat D, Kawamoto F.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Cambodia: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common variant in the Cambodian population. *J Hum Genet* 50: 468-72, 2005.
3. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, deMello DE, Peiris JSM, Chen P-J, Yamamoto N, Yoshinaga Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. *Vaccine* 23:2269-72, 2005.
4. Okada M, Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, Peiris JSM, Chen P-J, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS coronavirus using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. *Adv Exp Med Biol* 581:561-6, 2006.
5. Yoshida S & Watanabe H.: Robust salivary gland-specific transgene expression in *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Mol Biol* 15:403-10, 2006.
6. Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Kanamaru N, Muraki Y, Hashimoto S, Inoue Y, Sakatani Y, Kobayashi E, Kaneda Y, Okada M.: DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* by T cell activation. *Vaccine* 24:1191-204, 2006.
7. Yoshida S, Sudo T, Niimi M, Tao L, Sun B, Kambayashi J, Watanabe H, Enjou L, Matsuoka H.: Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline anti-platelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. *Blood* 111:2007-14, 2007.
8. Okada M, Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, Peiris JSM, Chen P-J, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. *Vaccine* 25:3038-40, 2007.
9. Yoshida S, Shimada Y, Kondoh D, Kouzuma Y, Ghosh AK, Jacobs-Lorena M, Sinden RE.: Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. *PLoS Pathog* (2007) in press.
10. Yoshida S, Shimada Y, Watanabe H.: Novel approach toward infectious diseases--combating malaria by using genetically engineered mosquitoes. *Nippon Rinsho* 5:1715-26, 2007.
11. 吉田栄人: マラリア防圧—遺伝子操作蚊からのアプローチ— (総説) . 治療 2007 in press.
12. 吉田栄人: マラリアコントロールへの新たな挑戦—遺伝子操作によるマラリア非媒介蚊作製— (総説) . *Medical Bio* 4:70-77, 2007.
13. 吉田栄人: 遺伝子操作によるマラリアを媒介しないハマダラカの創出—新規マラリアコントロールへの挑戦— 日本衛生動物学会誌 (総説) 57:249-254, 2006.

14. 吉田栄人: 遺伝子操作蚊を用いた蚊-マラリア原虫の寄生適応性解明-マラリアコントロールに向けての新規戦略-蚕糸・昆虫バイオティク(総説), 75:161-166, 2006.
2. 学会発表
 1. Yoshida S & Watanabe H: Establishment of robust salivary gland-specific transgene expression system in Anopheline mosquito. 54th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene (2005) USA.
 2. Yoshida S & Watanabe H: Robust salivary gland-specific expression in transgenic Anopheline mosquito. EMBO WORKSHOP 2005 "Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Diseases Vectors" (2005) Greece.
 3. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, Peiris J, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M: The development of DNA vaccines and antibody vaccine against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. The American Association of Immunologists Annual Meeting, "Immunology 2005" (2005) USA.
 4. Yoshida S: Generation of genetically engineered mosquitoes refractory to malaria parasites -Challenge for malaria control through the genetic manipulation of its vector-. International Congress of Insect Biotechnology & Industry (2007) Korea.
 5. Yoshida S, Sudo T, Watanabe H, Luo E, Matsuoka H, Ishii A: An inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline anti-platelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. EMBO WORKSHOP 2007 "Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Diseases Vectors" (2007) Greece.
 6. 吉田栄人: 遺伝子操作による病原体を媒介しない昆虫の創出 -ハマダラカのトランスジェニクス-. 第45回日本衛生動物学会東日本支部例会(2005) 東京.
 7. 吉田栄人: トランスジェニックカを用いたハマダラカ-マラリア原虫の生物学的適応性の解明. 第4回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム シンポジウム (2005) 東京.
 8. 渡辺裕之, 吉田栄人: ハマダラカ唾液腺に特異的な外来遺伝子の大量発現. 第46回日本熱帯医学会大会 (2005) 京都.
 9. 嶋田陽平, 近藤大介, 上妻由章, 吉田栄人: 海洋生物由来のレクチンを発現するトランスジェニックハマダラカのマラリア伝播阻止. 第46回日本熱帯医学会大会 (2005) 京都.
 10. 吉田栄人: トランスジェニックカによる蚊唾液腺-病原体の相互作用解明. 第57回衛生動物学会生理分子生物学談話会 (2005) 札幌.
 11. 吉田栄人, 渡辺裕之, 松岡裕之, 羅恩傑: ハマダラカ唾液に存在するカルシウム結合タンパクの分子生物学的解析. 第57回衛生動物学会 (2005) 札幌.
 12. 渡辺裕之, 吉田栄人: 唾液腺特異的に外来遺伝子を発現するトランスジェニックハマダラカの作製. 第57回衛生動物学会 (2005) 札幌.
 13. 吉田栄人, 渡辺裕之, 松岡裕之, 羅恩傑: 唾液腺特異的に外来異種タンパクを発現するトランスジェニックハマダラカの作製. 第74回日本寄生虫学会 (2005) 米子.
 14. 周藤俊樹, 吉田栄人, 松岡裕之, 嶋田陽平, 川崎昌則, 長村芳恵, 林秀樹, 間可和之, 山田能久: ハマダラカ唾液腺からの抗血小板因子AAPPの発見. 第29回日本血栓止血学会 (2006) 宇都宮.
 15. 吉田栄人: 遺伝子操作蚊を用いた病原体-蚊の寄生適応性解明 -マラリアコントロールに向けての新規戦略-: 独立行政法人 農業生物資源研究所主催公開シンポジウム「昆虫科学の未来 -昆虫を学ぶ、昆虫に学ぶ-」(2006) 東京.
 16. 吉田栄人, 嶋田陽平, 渡辺裕之: スポロゾイトの蚊唾液腺侵入メカニズム解明に向けてのアプローチ-唾液腺特異的に赤色蛍光タンパクを発現するトランスジェニックハマダラカ-. 第5回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム (2006) 東京.
 17. 嶋田陽平, 近藤大介, 上妻由章, 吉田栄人: 海洋生物由来のレクチンを発現するトランスジェニックハマダラカのマラリア伝播阻止効果. 第5回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム (2006) 東京.
 18. 嶋田陽平, 近藤大介, 上妻由章, 吉田栄人: 海洋

- 生物由来のレクチンCEL-IIIを発現するトランスジェニックハマダラカのマラリア伝播阻止効果。第58回日本衛生動物学会東日本支部大会(2006) 栃木。
19. 荒木一美、吉田栄人：ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) merozoite surface protein 1をウイルスベクター上に提示した組換えバキュロウイルスのワクチン効果。第47回日本熱帯医学会・第21回日本国際保健医療学会合同大会(2006) 長崎。
 20. 嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、吉田栄人：海洋生物由来のレクチンを発現する遺伝子操作蚊のマラリア伝播阻止効果。第47回日本熱帯医学会・第21回日本国際保健医療学会合同大会(2006) 長崎。
 21. 嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、吉田栄人：ナモコのレクチンCEL-IIIを導入した遺伝子操作蚊によるマラリア伝播阻止。第58回日本衛生動物学会(2006) 長崎。
 22. 吉田栄人：トランスジェニック蚊を用いたハマダラカマラリア原虫の寄生適応性の解明。基盤研究(C) (企画研究調査) 「感染現象のマトリックス的解明をめざす企画調査研究」シンポジウム 感染現象のマトリックス(2006) 東京。
 23. 吉田栄人：トランスジェニック蚊を用いたハマダラカマラリア原虫の寄生適応性の解明。第50回応用動物昆虫学会(2006) つくば。
 24. 吉田栄人：遺伝子操作蚊を用いたハマダラカマラリア原虫の寄生適応性の解明 -マラリアコントロールに向けての新規戦略-。第48回日本熱帯医学会特別講演(2007) 大分。
 25. 荒木一美、吉田栄人：ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii*) のmerozoite surface protein-1₁₉をウイルスベクター上に提示した組換えバキュロウイルスのワクチン効果。第48回日本熱帯医学会(2007) 大分。
 26. 嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、Eappen G.Abraham、Marcelo Jacobs-Lorena、Robert E.Sinden、吉田栄人：海洋生物由来のレクチンCEL-IIIを発現する遺伝子操作蚊のマラリア伝播阻止効果。第76回日本寄生虫学会(2007) 大阪。
 27. 吉田栄人、周藤俊樹、松岡裕之、嶋田陽平、川崎昌則、長村芳恵、林秀樹、問可和之、山田能久：ハマダラカ唾液に含まれる抗血小板凝集活性を有するAnopheles Anti-Platelet Aggregation Protein。第59回日本衛生動物学会(2007) 大阪。
 28. 吉田栄人：遺伝子操作蚊を用いたハマダラカマラリア原虫の寄生適応性の解明 -マラリアコントロールに向けての新規戦略-。第48回日本熱帯医学会特別講演(2007) 大分。
 29. 吉田栄人：遺伝子操作によるマラリアを媒介しないハマダラカの創出 -新規マラリアコントロールへの挑戦-(総説)。日本衛生動物学会誌 57: 249-54, 2006。
 30. 吉田栄人：遺伝子操作蚊を用いた蚊-マラリア原虫の寄生適応性解明 -マラリアコントロールに向けての新規戦略-(総説)。蚕糸・昆虫バイオティク75:161-6, 2006。
 31. 吉田栄人、嶋田陽平、渡辺裕之：感染症征服への新たな挑戦(総説)。日本臨床65:1715-26, 2007。
 32. 吉田栄人：マラリアコントロールへの新たな挑戦-遺伝子操作によるマラリア非媒介蚊作製-(総説)。Medical Bio 4:70-77, 2007。
 33. 吉田栄人：マラリア防圧-遺伝子操作蚊からのアプローチ-(総説)。治療 2008 in press。
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
 1. 特願2005-320817「血小板凝集阻害組成物」(2005年) 吉田栄人、周藤俊樹
 2. 特願2006-32863「新規ウイルスベクター」(2006年) 吉田栄人、大庭義郎、播口徳充、水越真巳、川崎昌則、松本真
 3. 国際特許PCT/JP2006/322417号「Anti-Platelet Aggregation Product」(2006年) Yoshida S, Sudo T.
 4. 国際特許PTC/JP2007/51295号「Novel vaccine vector」(2007年) Yoshida S, Ohba Y, Hariguchi T, Mizukoshi M, Kawasaki M, Matsumoto M.
 2. 実用新案登録

なし
 3. その他(新聞、雑誌報道)