

作成し、これを用いることにより耐性の判定が可能であった。しかし、ピラジナミド（PZA）耐性結核菌の遺伝子変異に関するいくつかの報告によると耐性に関与する変異はピラジナミダーゼ遺伝子（*pncA*遺伝子）中に限局することなしに見い出されている。このことは今年度行ったPZA耐性結核菌の*pncA*遺

伝子の塩基配列の解析によっても確認された。このことはPZA耐性の判別のためのDNAチップを構築するためには莫大な数のオリゴヌクレオチドを固定する必要があることを意味しており、コスト等の面を考えた場合現実的ではないことが容易に想像できた。

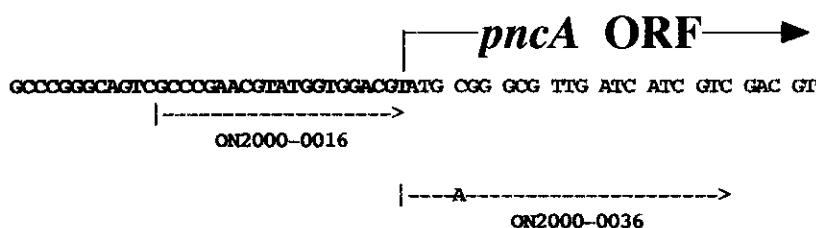


図7. 試験管内転写・翻訳系に用いたプライマー ON2000-0036は開始コドン直後の塩基をCからAに置換できる様にデザインしてある（コザックコンセンサス）。

そこで次の段階の研究としてPZA耐性結核菌の多くがピラジナミダーゼをコードしている遺伝子（*pncA*遺伝子）に変異を持ち、それと同時にピラジナミダーゼ活性を欠損していることに着目し、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を基盤とした試験管内転写・翻訳系を応用したピラジナミダーゼ活性測定系の構築とそのPZA耐性結核菌の迅速鑑別法への応用を試みた。すなわちPZA耐性結核菌、結核菌標準菌株H37Rv（ピラジナミダーゼ陽性）および*M. bovis* BCG（BCG菌；ピラジナミダーゼ陰性）より*pncA*遺伝子をT7ファージプロモーター配列が

結合する形で合成させた。これを試験管内蛋白質合成系に投入しピラジナミダーゼを合成させた。H37RvおよびBCG菌を用いた実験からはそれぞれピラジナミダーゼ陽性および陰性の形質が得られ、実際の発現型と一致していた。また、これらの2つを用いて試験管内ピラジナミダーゼ合成の条件検討を行い最適反応時間を見い出すことができた。得られた最適条件で臨床分離PZA耐性結核菌に対して試験管内転写・翻訳系を応用したピラジナミダーゼ活性の測定を行ったところ用いた40種類の臨床分離PZA耐性結核菌のうちの39株においてH37Rv

より得られたピラジナミダーゼ活性 よりも著しく低い値を示していた。

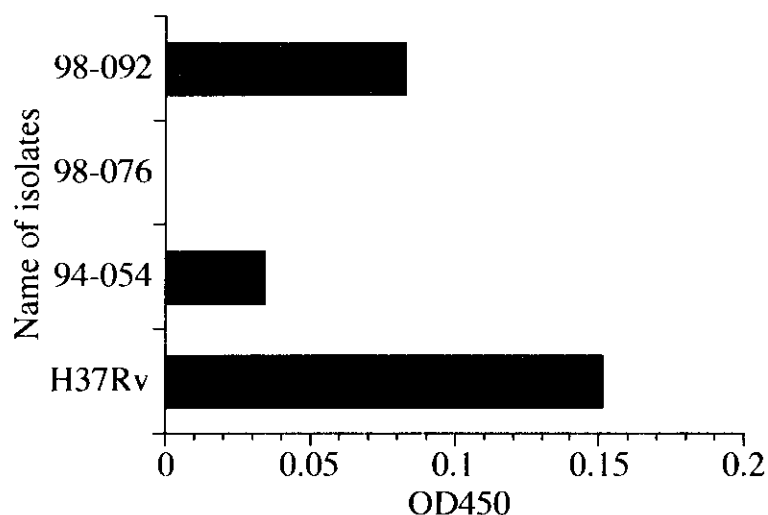


図8. プライマー ON2000-0016 と ON2000-0012 を用いた PCR 産物によるピラジナミダーゼの試験管内転写・翻訳 ON2000-0036 と ON2000-0012 を用いた試験管内ピラジナミダーゼ合成とピラジナミダーゼ試験により活性の低下の見られなかった PZA 耐性結核菌株に対して ON2000-0016 と ON2000-0012 をプライマーとして用いて PCR を行い得られた産物により試験管内ピラジナミダーゼ合成とピラジナミダーゼ試験を行った。

E. 結論

以上に述べた様に本年度の研究で構築した試験管内転写・翻訳系を応用したピラジナミダーゼ活性測定系により迅速にしかも簡便にピラジナミド耐性結核菌の検出が可能となるものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoda T, Terano Y, Shimada A, Suzuki Y, Yamazaki K, Sakon N, Oishi I, Utagawa ET, Okuno Y, Shibata T (2000)

Expression of recombinant Norwalk-like virus capsid proteins using a bacterial system and the development of its immunologic detection. J. Med Virol. 60:475-481

2. Kikkawa S, Shida K, Okamura H, Begum NA, Matsumoto M, Tsuji S, Nomura M, Suzuki Y, Toyoshima K, Seya T. (2000) A comparative analysis of the antigenic, structural, and functional properties of three

- different preparations of recombinant human interleukin-18. *J Interferon Cytokine Res* 2000 Feb;20(2):179-85
3. Sasaki K, Tsutsumi A, Wakamiya N, Ohtani K, Suzuki Y, Watanabe Y, Nakayama N, Koike T. (2000) Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection. *Scand J Gastroenterol.* 2000 Sep;35(9):960-5.
 4. Yoda, T., Terano, Y., Suzuki, Y., Yamazaki, K., Utagawa, E., Shimada, A., Matsuura, S., Nakajima, M., and Shibata, T. (2000) Characterization of monoclonal antibodies generated against Norwalk virus GII capsid protein expressed in *Escherichia coli*. *Micobiol. Immunol.*, 44, 905-914
 5. 若宮伸隆、鈴木定彦 (2000) 生体防御レクチンとしてのコレクチンファミリー. *蛋白質・核酸・酵素* 45:655-663
 6. 鈴木定彦、田丸亜貴、Amin Ruhul、勝川千尋 (2000) 結核菌の薬剤耐性獲得機序の解析と迅速診断への展開. *防菌防黴* 28, 561-573
 7. 鈴木定彦、田丸亜貴、鈴木文、勝川千尋 (2000) 結核菌の薬剤耐性と関与遺伝子. *ファルマメディカ* 18:47-53
 8. 鈴木定彦、市原竜生、田丸亜貴、Amin Ruhul、勝川千尋、牧野正直、阿部千代治 (2000) 結核菌の耐性診断 DNAチップ応用技術 pp159-170
 9. 鈴木定彦 (2000) 中高齢者の健康実態調査報告その4、コレクチンの生体防御における役割と年齢による推移. *エストレーラ* 79 : 35-39
 10. 芥子宏行、大谷克城、坂本隆志、岸雄一郎、荒木宏昌、鈴木定彦、若宮伸隆 (2000) 日本人におけるMBL (mannan-binding lectin) 遺伝子変異と血中濃度. *医学のあゆみ* 194:957-8
 11. 長谷川好規、阿部千代治、飯沼由嗣、鈴木定彦、高橋光良、水口康雄 (2000) 結核-分子遺伝学からのアプローチ. *結核* 75 : 725-728
 12. Ruhul, A., Suzuki, Y., Takatorige, T., Tatara, K., Shirakura, R. (2001)

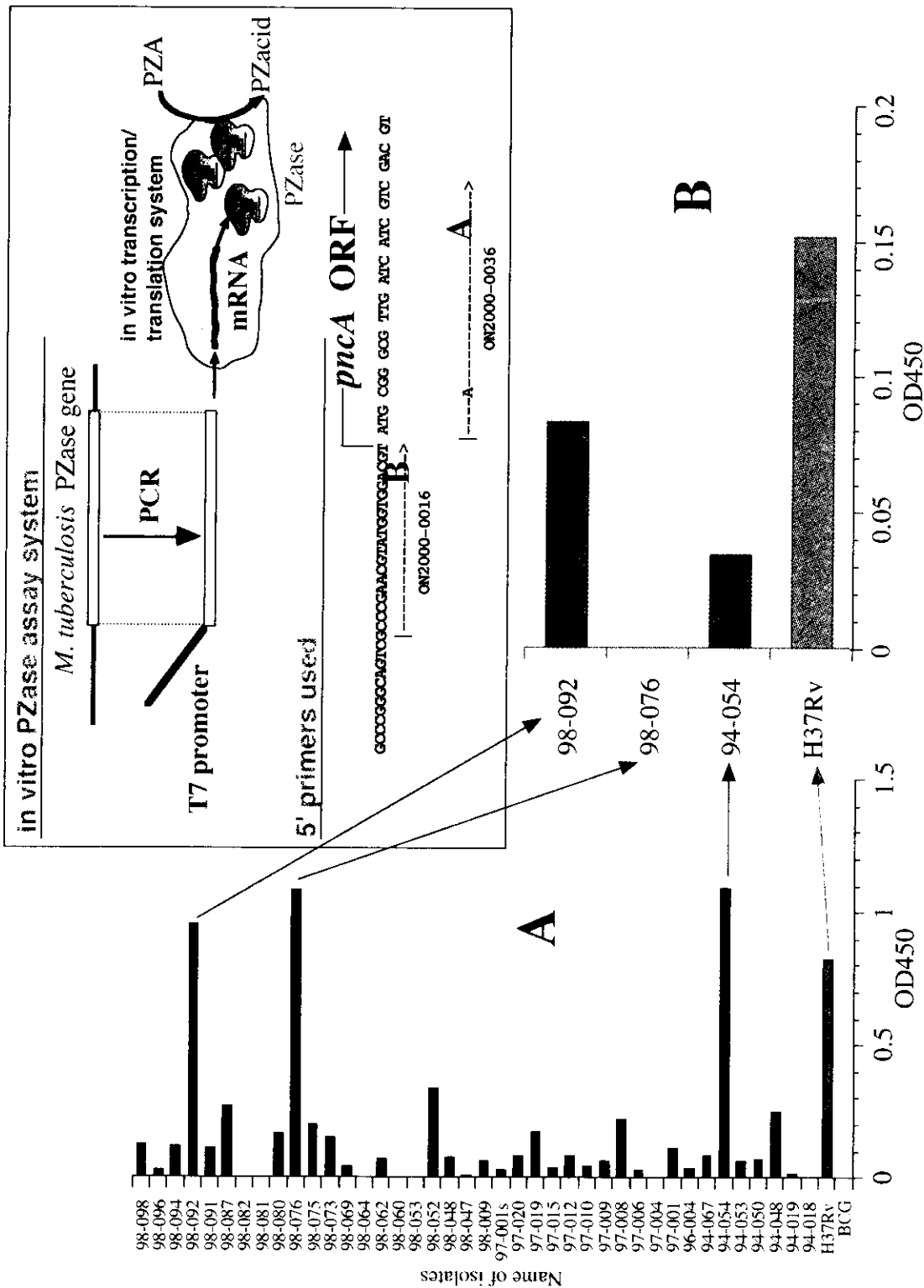
- Usefulness of self ligation mediated polymerase chain reaction: A rapid method for fingerprinting in molecular epidemiology of tuberculosis. *Kekkaku* 76: 9-18
13. Suzuki Y, Yoda T, Ruhul A, Sugiura W (2001) Molecular cloning and characterization of the gene coding for azoreductase from *Bacillus* sp. OY1-2 isolated from soil. *J. Biol. Chem.* In press
 14. 鈴木定彦、田丸亜貴、鈴木文、勝川千尋 (2001) 結核菌の化学療法剤と薬剤耐性. *臨床と微生物* 28:35-41
 15. 鈴木定彦、田丸亜貴、鈴木文、勝川千尋 (2001) 結核菌の薬剤耐性. *感染症* 印刷中
 16. 若宮伸隆、鈴木定彦 (2001) 膜型コレクチンは血管内皮に存在しスカベンジャーレセプター様の機能を持つ. *生化学* 印刷中
 17. Suzuki, Y., Tamaru, A., Katsukawa, C., Ichihara, T., Matsumoto, K., Nishida, M., and Abe, C. (2001) Rapid detection of drug resistant tuberculosis by low-density oligonucleotide array. Submitting
 18. Suzuki, Y., Suzuki, A., Tamaru, A., and Katsukawa, C. (2001) Rapid detection of pyrazinamide resistant *Mycobacterium tuberculosis* by PCR based in vitro system. Submitting
 19. Nakamura, T., Iwanari, H., and Suzuki, Y. (2001) Expression of glycosylated human interferon-beta in high levels in Chinese hamster ovary cells. Submitting
- ## 2. 学会発表
1. Suzuki, Y. (2000) Tuberculosis and its rapid diagnosis of drug resistance by microchip. The 5th Korea-Japan International Symposium on Microbiology (kyongju)
 2. 大谷克城、鈴木定彦、坂本隆志、芥子宏行、福応温、若宮伸隆 (2000) 膜型コレクチンCLP 1は血管内皮に発現しスカベンジャーレセプター様の機能を示す. 日本分子生物学会年会 (神戸)
 3. 鈴木定彦、田丸亜貴 (2001) DNAチップ技術を用いた結核菌の分子疫学的解析法の開発. 日

本結核病学会 （那覇）

4. 田丸亜貴、鈴木定彦（2001） I
S 1 2 4 5 を基盤とする R F L
P 用いた結核菌の分子疫学的解
析法の検討． 日本結核病学会
（那覇）

F. 知的財産権の取得状況
なし

ピラジナミダーゼの*in vitro*系での発現とPZA耐性結核菌迅速鑑別への応用



抗酸菌 virulence の *in vitro* における評価に関する研究

分担研究者	小野寄菊夫	名古屋市立大学薬学部教授
研究協力者	瀧井猛将、田村綾子	名古屋市立大学薬学部
P. J. Brennan		コロラド州立大学
阿部千代治		結核研究所

病原微生物の毒力評価系の研究は非常に重要な問題である。*M. tuberculosis* の毒力の判定は、齧歯類を用いた感染実験により行われている。*In vitro* による評価ではマウス培養マクロファージの感染実験により、宿主細胞内での菌の増殖を指標に行われている。これらの評価系には、短所・長所が存在し、ヒトの結核症を再現するより優れたモデル系が求められている。本研究では、簡便な抗酸菌毒力の *in vitro* 評価系について報告する。

強毒株の結核菌と動物細胞株を共培養すると、宿主細胞に細胞死が起こることが報告されている。本研究では、ヒト由来の培養細胞株(monocytic cell lines; U937, THP-1, myeloid cell line, HL-60, lung epithelial carcinoma cell line, A549, lung fibroblast cell line, MRC-5)を用いて、強毒株 *M. tuberculosis* H37Rv の細胞傷害性に対する感受性を調べたところ、MRC-5 細胞が高い感受性を示した。さらに、他の抗酸菌種 (*M. tuberculosis* (H37Rv, H37Ra), *M. avium* (724S, 2151 SmO), *M. bovis* BCG (Pasteur, Tokyo)) を用いて細胞障害活性を調べたところ、報告されている病原性に比例した結果が得られた。菌による細胞障害活性は炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 (IL-1)、または腫瘍壊死因子 (TNF- α)によって増強された。本現象の機構については、現在解析中である。本法で 50%の宿主細胞を殺す菌数を指標にして、臨床分離結核菌株の薬剤感受性株 (11 株)、多剤耐性を含む薬剤耐性株 (13 株) の毒力の評価を試みた。実験室株の H37Rv では 10.0 ± 5.9 であったのに対して、薬剤感受性・耐性の臨床株の値は、それぞれ 2.02 ± 1.89 、 1.31 ± 0.53 であった。薬剤感受性・耐性株は実験室株に対して、毒力が強いことが示唆された。また、薬剤耐性・感受性株間での差異は認められなかった。さらに、MAC 症の臨床分離株を用いたところ、その値が >100 であった。以上のように、本実験系は臨床結果を反映しており、簡便に *in vitro* で毒力の判定に利用できることが示された。さらに本法は、今後開発される、リコンビナント BCG ワクチンの安全性の試験にも用いることができると思われる。

A. 研究目的

BCG や結核菌の virulence を知ることは、ワクチン開発、結核患者の治療や感染予防上重要である。我々は、ヒト胎児由来 2 倍体肺線維芽細胞株

(MRC-5, 9) を virulence の異なるヒト型結核菌(H37Rv, H37Ra)、トリ型結核菌(724S, 2151SmO)、そして、ワクチン株である(BCG Pasteur, Tokyo)と

培養することにより、菌の virulence に比例して細胞毒性が見られることを見いだしている。従って、本実験系は、結核菌や BCG の *in vitro* における virulence の評価やワクチン開発に応用できると考えられた。以上の知見をふまえ、本法により臨床分離結核菌株、薬剤感受性株、多剤耐性を含む薬剤耐性株について調べた結果、感受性株、耐性株、いずれも H37Rv 株より強い細胞毒性が認められた。一方、同じ臨床分離株である MAC 患者分離菌では H37Rv と比較して、弱い細胞毒性しか認められなかった。これらの結果から、本実験系は臨床的な virulence を反映していると考え

られた。そこで、多剤耐性株を用いて、カタラーゼ活性陽性株と陰性株について比較したところ、同様の細胞毒性が認められた。以上の結果、本実験系では薬剤感受性、耐性結核菌も同等の virulence を持っていると考えられた。

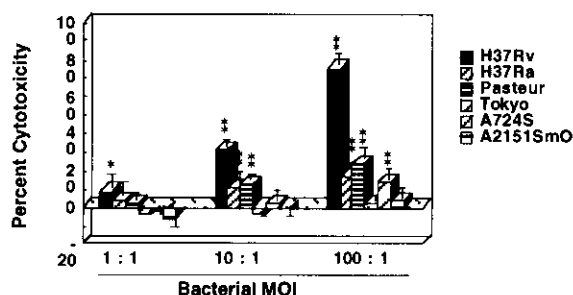
今回、マレーシアの臨床株（15 株）と日本の臨床株（15 株）を本法を用いて解析を行った。

B. 研究方法

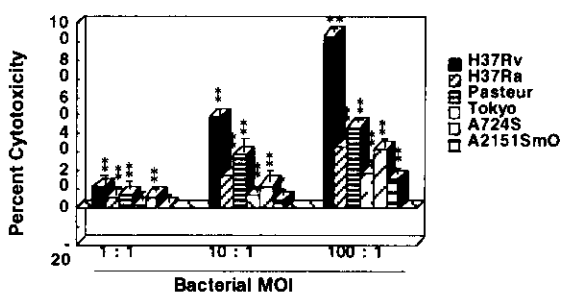
In vitro における菌の毒力の判定法

96 穴培養プレートに標的細胞をまき、細胞を付着させた後に菌を加え、16～18 時間培養した。次に、IL-1、又は、TNF- α を加え 2 日間培養したのち、細胞をクリスタルバイオレットで染色し、プレートリーダーで吸光度を測定した。菌株は、*M. tuberculosis* H37Rv、H37Ra 株、*M. avium* 724S、2151SmO、及び、*M. bovis* BCG の Pasteur、Tokyo 株の生菌、及びオートクレイブ死菌を用いた。また、臨床分離結核菌株、並びに *M. avium* complex(MAC) を用いた。結果のグラフの横軸は細胞当たりの菌数、縦軸は菌を加えず、かつ IL-1 や TNF- α を加えていない細胞の吸光度を 100% として示した。

a) No Cytokine



b) IL-1



c) TNF- α

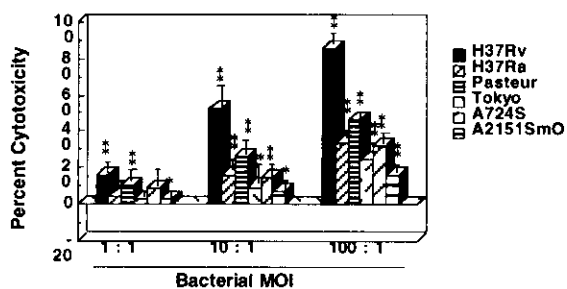


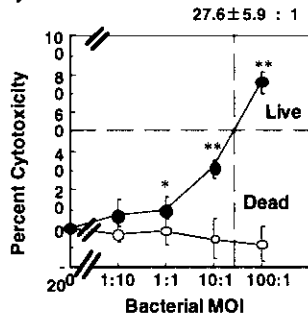
図 1 Virulence の異なる抗酸菌株による MRC-5 細胞に対する細胞毒性

C. 結果および考察

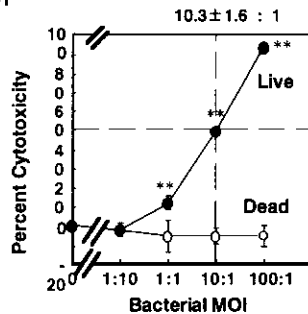
1. Virulence の異なる抗酸菌株によるヒト肺由来線維芽細胞株 MRC-5 に対する細胞毒性

ヒト線維芽細胞株 MRC-5 を毒力の異なる抗酸菌株 *M. tuberculosis* H37Rv, H37Ra, *M. avium* 724S, 2151SmO, *M. bovis* BCG Pasteur, Tokyo と培養し、MRC-5 細胞の細胞死誘導活性を測定した (図 1)。強毒株である H37Rv では強い細胞死誘導活性が認められ、菌の virulence が強いほど、強い細胞死が認められる。

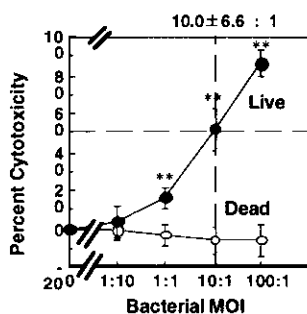
a) No Cytokine



b) IL-1



c) TNF-α



図には示していないが、H37Rv を感染させた MRC-5 細胞からの LDH(lactose dehydrogenase)の遊離を測定したところ、本法で行っているクリスタル・バイオレット染色による細胞死の測定結果と比例した結果を得た。また、アポトーシス阻害剤によってこの現象が阻害できなかったこと、アポトーシス誘導剤による核の形態変化と、H37Rv 感染時の核の形態は異なっていた。以上のことから、強毒株は MRC-5 細胞に対してアポトーシスではない細胞毒性を示すことが明らかとなった。

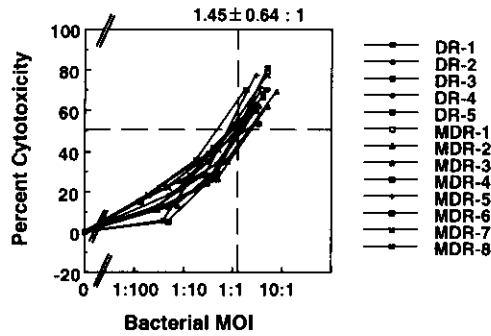
現在、解析中であるが、この細胞毒性は IL-1, TNF-αによって増強される (図 1)。また、昨年報告したように、本現象は強毒株の生菌で認められ、死菌では全く認められない。菌体成分を用いた場合も細胞死は誘導されない。宿主細胞の蛋白合成を阻害することによって、この現象が阻害されることから、感染細胞から細胞傷害性因子が産生されることが予想される。

2) 結核患者、MAC 感染症患者分離株による virulence の比較

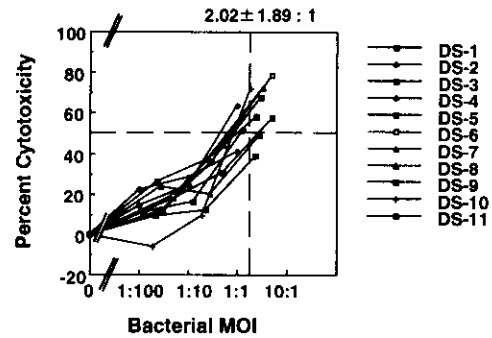
次に、本系を用いて臨床株の virulence の評価を検討した。Virulence の評価の基準として、50%細胞毒性を示すのに必要な菌数を用いた。図 2 に示したように、H37Rv はサイトカインを加えないときには 27.6 ± 5.9 である (図 2 a)。IL-1, TNF-αを加えたときには、それぞれ、 $10.3 \pm 1.6, 10.0 \pm 6.6$ である (図 2 b, c)。そこで、臨床分

図 2 IL-1、又は、TNF-αによる H37Rv 生菌による細胞障害活性の増強効果

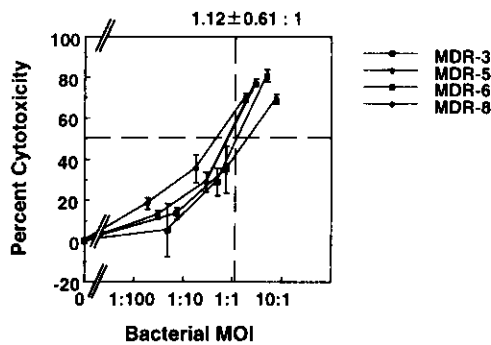
a) DR- and MDR-MTB



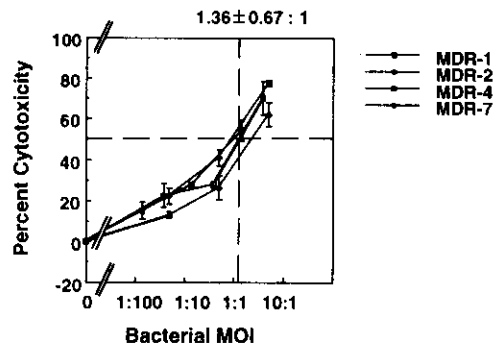
b) DS-MTB



c) Catalase Positive MDR-MTB



d) Catalase Negative MDR-MTB



e) MAC

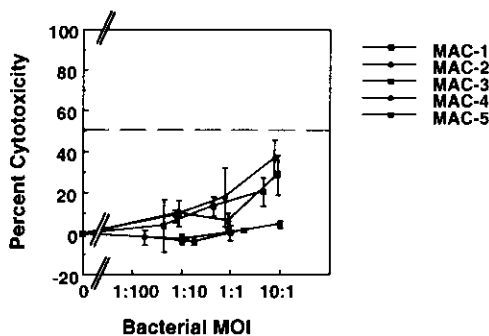


図3 *M. tuberculosis* 及び、*M. avium complex* (MAC)患者臨床分離株における virulence の比較

分離株を用いて、TNF- α 添加の条件で virulence の比較を行った。薬剤感受性菌株 (1 1 株) の平均は 2.02 ± 1.89 であり、薬剤耐性菌株 (1 3 株) のそれは 1.45 ± 0.64 であった (図 3 a, b)。臨床株は実験室株の H37Rv より強い活性を示した。また、耐性菌株

中のカタラーゼ活性陽性株、陰性株について比較したところ、 1.12 ± 0.61 と 1.36 ± 0.67 と両者は同等の値を示した (図 3 c, d)。また、MAC 患者由来のそれは >100 であり、弱い活性しか認められなかった。これらの結果は、本実験系が臨床的な virulence を反映していることを示している。

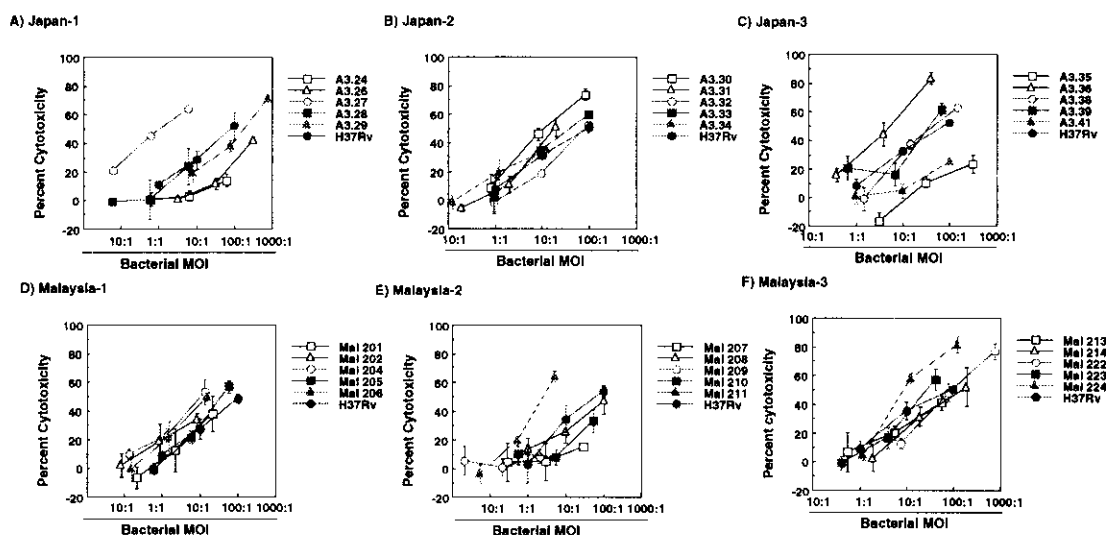


図4 日本株とマレーシア結核臨床分離株の virulence の比較

そこで、多剤耐性株を用いて、カタラーゼ活性陽性株と陰性株について比較したところ、同程度の細胞毒性が認められた。以上の結果、本実験系では薬剤感受性、耐性結核菌も同等の virulence を持っていると考えられた。

本実験において、個々の臨床分離株の中で、virulence の程度が違うものがあることが示された。この結果は、薬剤耐性と virulence の間には相関性が無く、virulence は個々の菌に存在する因子に依存していると考えられる。

そこで、今回、マレーシアの臨床株（15 株）と日本の臨床株（15 株）を本法を用いて解析を行った。図4に示したように、マレーシア、日本株間で virulence に有意な差は認められなかった。しかし、H37Rv と比較して、強い virulence を持つ株と弱い株が認められた。以上の結果は結核治療に有用な情報を提供できる

と考えられる。

D. 結論

本実験系では薬剤感受性菌・耐性菌間での virulence に有意な差は認められなかった。また、抗結核薬イソニアジドの耐性に関係している菌のカタラーゼ活性の有無について検討した結果、両者の間に差は認められなかった。一方、本実験系での細胞障害活性は菌の薬剤感受性に関係なく、個々の臨床分離株の性質によっていることが示唆された。日本、マレーシアの臨床分離株、各15株を検討した結果からも両者の間に有意な差は認められなかった。そして、それらの細胞障害活性は個々の株の性質に依存している結果となった。以上のことから、薬剤感受性と virulence の間には相関は認められず、治療の際に十分な注意が必要であると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 瀧井猛将、阿部千代治、小野寄菊夫. 結核菌・BCG virulence の *in vitro* 評価法の開発
BCG・BRM 療法研究会誌 21,31-36, 1997.
2. T. Matsumura, A. Ito, T. Takii, H. Hayashi, and K. Onozaki. Endotoxin and cytokine regulation of toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 gene expression in murine liver and hepatocytes.
J. Interferon and Cytokine Res. 20, 915-921, 2000.
3. T. Takii, C. Abe, A. Tamura, S. Ramayah, J. T. Belisle, P. J. Brennan, and K. Onozaki. Interleukin-1 or tumor necrosis factor- α augmented the cytotoxic effect of mycobacteria on human fibroblasts: application to evaluation of pathogenesis of clinical isolates on *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* complex.
J. Interferon and Cytokine Res. in press, 2001.

2. 学会発表

1. T. Takii, C. Abe, A. Tamura, S. Ramayah, K. Onozaki. An *in vitro* method for evaluation of virulence of mycobacteria.
U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Proc. Thirty-third research conference on tuberculosis and leprosy, July, 1998, Oosaka.
2. 田村綾子、瀧井猛将、小野寄菊夫、阿部千代治. 結核菌・BCG virulence の *in vitro* 評価法の開発
日本薬学会第 119 年会 1999 年 3 月、徳島.
3. T. Takii, C. Abe, A. Tamura, S.

- Ramayah, J. T. Belisle, P. J. Brennan, K. Onozaki. Cytotoxic effect of mycobacteria on human fibroblasts and its application to evaluation of virulence of clinical isolates of *M. tuberculosis* and *M. avium* complex.
U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Proc. Thirty-third research conference on tuberculosis and leprosy, July, 2000, Yokohama.
4. T. Takii, C. Abe, A. Tamura, S. Ramayah, J. T. Belisle, P. J. Brennan, K. Onozaki.
New evaluation method of mycobacterial virulence *in vitro*: application to clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* complex (MAC).
フォーラム 2000 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、2000 年 10 月、東京.
 5. T. Takii, J. T. Belisle, P. J. Brennan, K. Onozaki. Interleukin 1 and tumor necrosis factor α augment the mycobacteria induced host cell death.
Third joint meeting of the ICS and the ISICR, November, 2000, Amsterdam, the Netherlands.
 6. T. Takii, S. Ramayah, J. T. Belisle, P. J. Brennan, K. Onozaki. New evaluation method of mycobacteria virulence *in vitro*, based on cytotoxicity of mycobacteria to human cell lines.
日本免疫学会総会・学術集会、2000 年 11 月、仙台.
 7. T. Takii, Y. Yamamoto, J. T. Belisle, P. J. Brennan, K. Onozaki. New screening method for anti-mycobacterial drugs based on mycobacterial cytotoxicity on human lung fibroblast cell line.
International symposium on mycobacterial diseases: pathogenesis,

protection and control. January, 2001,
Calcutta, India.

8. 瀧井猛将、山本桂史、千葉 拓、
小野寄菊夫. ヒト由来細胞株に対
するミコバクテリアの細胞障害活
性を用いた抗結核薬の新しいスク
リーニング法.
日本薬学会第 121 年会、2001 年 3
月、札幌.

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

多剤耐性結核における長期生存例に関する研究

（分担）研究者 毛利昌史 国立療養所東京病院病院長
共同研究協力者 佐藤紘二 国立療養所熊本南病院副院長

研究要旨：

日本での結核の発病者が、今までの減少傾向から一転して増加傾向に転じたことから1999年7月には厚生省から結核対策非常事態宣言が出された。それに付随して公衆衛生審議会から日本には現在2000名前後の多剤耐性結核患者が存在していると報告された。これらの患者は持続排菌のため長期療養を余儀なくされているにもかかわらず全身状態は、それほど悪くはない。しかし、公衆衛生上は極めて重大なことであり、その対策の必要性が叫ばれているにもかかわらず有効薬の登場もなく手をこまねいているのが実状である。そこで、現在の化学療法ではいかんともし難い多剤耐性結核対策法を模索して、従来の視点とは逆に宿主側から検討することとした。即ち、同じ結核患者であるにもかかわらず治癒した患者とこれらの患者との宿主としての免疫応答の違いをサイトカインの面より検討し治療上に役立つものを考慮した。その結果、多剤耐性結核患者では、簡単に治癒傾向に向かっている患者や略治癒した患者に比し血清のIFN- γ 値は、有意（5%の危険率）に低く、TGF- β 1値は、逆に有意（5%の危険率）に高かった。これは、両群間に結核菌に対する応答に差があることを示唆している。Th1/Th2比には有意差はみられなかった。このことから多剤耐性結核患者では、Th1細胞の機能減弱が推測され、サイトカイン（IFN γ ）補充療法が有望視される。

A. 研究目的

多剤耐性結核患者が、蓄積しつつある現状を打破するため、その治療法を見つげだすことを最大の目的とする。多剤耐性結核に至った原因には、種々の原因が有るが、根本的には菌側要因と宿主側要因の両作用によって規定される。菌側要因には、明らかになっている事が多々あるが、宿主側要因については必ずしもそうではない。そこで多剤耐性結核患者と支障なく治癒に至った結核患者の間にどのような違いが有るか内因性のサイトカインを通して検討し、多剤耐性結核の治療法を模索することを目的とする。

B. 研究方法

多剤耐性結核患者と略治癒患者について、結核の発症と防御に関連する因子の内、今年度はTh1への誘導状態に関与するであろうIL10とNK細胞を刺激するIL18の両者に的をしぼって血清で測定し検討する。その上で昨年までの検討で分かった既知の状況をも勘案し多剤耐性結核の治療に役立つ要因や方策がないか検討する。

政策医療への反映方法：

現在のところ多剤耐性結核の治療に難渋しているのが現状である。その治療成績も芳しくない。新薬の登場もないままである。そのような中、IFN- γ による治療が外国では試験的になされているが、日本の医療の

現場ではこの方法が認可されていないので、その理論的根拠を少しでも明らかにすることが出来れば今後のために有用である。

多剤耐性結核患者の中には、急激な悪化を来たすこともないにもかかわらず、長年持続排菌を続けている患者群がある。このような患者と同じ程度の排菌者でありながら支障無く結核は治癒してしまう症例との間にどのような違いが有るのか、宿主の結核菌に対する応答に関与するサイトカインを通して光山のモデルから検討し、多剤耐性結核治療の一助とする。

倫理面への配慮：

対象患者には、血清検査の説明を行い同意をうる。当研究は血清検査のみで生体にとって異物となる投薬は行わない。血清量は3mlでサイトカインの測定以外には使用しない。

研究対象：

対象は、国立療養所熊本南病院と国立療養所東京病院に入院或いは外来通院したこのある患者の中で少なくともINHとRFPの二剤以上の耐性結核菌患者と対照症例として結核が治りつつある患者か簡単に略治癒した症例で同意の得られた者である。

C. 研究結果

1) 血清中のIL18

活動性の強いもの程高値を示す傾向が見られたが、飛び抜けた高値を示すはずれ値もあり、今回のデータでは、両者間に有意の差ははっきりしない。

2) 血清中のIFN- γ

持続排菌している多剤耐性結核患者群と軽快中か略治癒した患者群のIFN- γ の測定値は末尾のグラフの通りである。この両群の平均をt検定で比較すると5%の危険率で有意差が認められた。即ち、多剤耐性結核患者群の方が低値となっていた。

3) 血清中のTGF- β 1

この測定値について、同じく両群間の平均

の比較をt検定すると5%の危険率で有意差があり、多剤耐性結核患者群の方が高くなっていてIFN- γ とは逆の傾向を示した。

4) Th1/Th2比

IFN- γ 値に差があったため、Th1/Th2比にも差があるのではないかと思われたが、両群間の平均値に差は認められなかった。ここではサイトカイン産生パターンよりIFN- γ (+)でIL-4(-)をTh1細胞としIFN- γ (-)でIL-4(+)をTh2細胞としている。

5) 培養単球におけるBCG刺激による上清中IFN- γ の産生量

BCGは生菌のためか刺激を受けた単球は、かなり激しく反応してIFN- γ を産生している。しかし、個々の症例の産生量にばらつきが大きく、また両群間の平均値に差は認められなかった。

6) 培養単球におけるPPD刺激による上清中IFN- γ の産生量

BCG刺激の時の上清中IFN- γ の産生量と比較しようとの考えの下に同じ数の単球数に調整してPPD刺激をしたが、BCG程の刺激効果はなくIFN- γ 産生は低値で、しかも、両群間の平均値に差は認められなかった。

7) これらの結果は、末尾にグラフとして添付した。

D. 考察

光山が、動物実験で作り上げたモデルを参考として人への応用を行い、多剤耐性結核患者の治療法を模索した。

近年、CD4+T細胞はその産生するサイトカインのパターンから3つ

(Th0/Th1/Th2)の亜集団に分類されるようになってきている。結核防御免疫は、T細胞の中でもTh1が主体であるとされ、Th1,Th2サブセットの概念が一般に受け入れられている。そこでIFN- γ はTh1の分化に必須の役割をすることが分かっているので感染抵抗性Th1細胞(抗原特異的IFN- γ 産生性T細胞)の誘導機構として抗

原特異的T細胞を高いIFN- γ 産生性T細胞へ分化させることが必要になる。通常、生体内でTh1, Th2は相互に抑制し合うことによりバランスを保ち生体の恒常性を維持しているため、生体にとってこのバランスは重要な意味を有しているといえる。今回の検討では、多剤耐性結核症例においては、略治癒症例に比しIFN- γ 産生量は低く、TGF- β 産生量は高い結果が得られた。Th1/Th2比には、両者間に差がなかったことから推測すると、Th1細胞自身の機能減弱によるIFN- γ 誘導能の低下か、或いは高いTGF- β がTh0細胞から結核菌特異的Th1細胞への分化を抑制することによりIFN- γ の誘導が少なくなったとも考えられる。いずれにしろIFN- γ が通常の結核患者よりも低値であることは、エフェクター細胞の機能低下を意味する。多剤耐性結核の治療にサイトカイン (IFN- γ) の補充療法が考えられる所以でもある。

E. 結論

結核対策において、最後まで残るであろう多剤耐性結核の対処法を宿主側から検討した。

(1) 多剤耐性結核患者では、排菌が在っているにもかかわらず誘導されるIFN- γ は、軽快中の患者や略治癒した患者の値よりも有意差をもって低く、TGF- β 1は逆に有意差をもって高かった。このことは、結核菌の抗原刺激があるにもかかわらずマクロファージの活性化に必要な抗原特異的なIFN- γ 産生が少ないことを示している。即ち多剤耐性患者では、結核防御免疫の誘導と発現機構が弱体化している可能性がある。

(2) 従って将来的には、多剤耐性結核患者に対する抗原特異的なIFN- γ によるサイトカイン補充療法も考えられる。

(3) 日本の多剤耐性患者は、増加傾向を示しており、抜本的対策を考えねばならない。

F. 健康危険情報

療研により5年毎に実施されている日本全国の結核菌の耐性検査成績によると多剤耐性結核患者の頻度は近年増加しており、十分なる注意が必要である。

G. 研究発表

1. 多剤耐性結核に関する寄稿

- (1) 佐藤紘二：多剤耐性結核菌症. JIM 8 (6): 482-484, 1998
- (2) 曾根三郎、佐藤紘二他：高齢者の呼吸器感染症治療とQOLの管理. 日本内科学会雑誌 8 (2) : 97 - 118 , 1998 (この中の結核の領域を私が執筆した。)
- (3) 佐藤紘二：難治性肺結核の特徴. THE LUNG perspective 7(4) : 377-381, 1999
- (4) 佐藤紘二：薬剤耐性結核への対処と感染予防. 月刊ナーシング 19(10) : 62-70, 1999
- (5) 佐藤紘二、毛利昌史：近年における結核. BIO Clinica 14(13) : 1210-1214, 1999
- (6) 毛利昌史、佐藤紘二 他：呼吸器疾患--この1年の進歩. 内科 84(6): 1104-1110, 1999 (この中の結核領域を執筆した。)
- (7) 佐藤紘二、四元秀毅：最近の肺結核の傾向と一時結核・二次結核の割合. 日本医事新報 3927 : 142, 1999
- (8) 佐藤紘二：多剤耐性結核とは -- その頻度と治療 --. INFECTION CONTROL 9(3): 258 - 259, 2000
- (9) 佐藤紘二：老年者結核の治療. Geriatric Medicine 38(6): 763 - 767, 2000
- (10) 佐藤紘二：抗結核剤の使用量と副作用. 臨床医 26(1): 76 - 79, 2000
- (11) 佐藤紘二：細菌の薬剤耐性 1 結核菌. 治療学 34(3): 262 - 266, 2000
- (12) 森亨、佐藤紘二、中島由規：薬剤耐性

結核問題とその対応(座談会) . 治療学
34(3): 315 - 324, 2000 (薬剤耐性結核
の諸問題について結核研究所森亨所長らと
対談した記事)

(13) 佐藤紘二：耐性結核の治療. 今月の治
療 8(10) : 1094 -1099, 2000

(14) 佐藤紘二：結核の臨床(2) 結核の治療.
BIO Clinica 16(2) : 133 -137, 2001

2. 学会発表

1) 佐藤紘二、毛利昌史、他：多剤耐性結
核患者が辿った化学療法歴. 日本結核病学
会総会. 1999.

2) 佐藤紘二、毛利昌史、他：宿主応答か
らみた多剤耐性結核患者と治癒患者。日本
呼吸器学会総会. 2000.

(9) 佐藤紘二：医療経済的観点からみた多
剤耐性結核と初回治療結核. 日本結核病学
会総会. 札幌. 2000.3

G. 知的所有権の取得状況

無し。

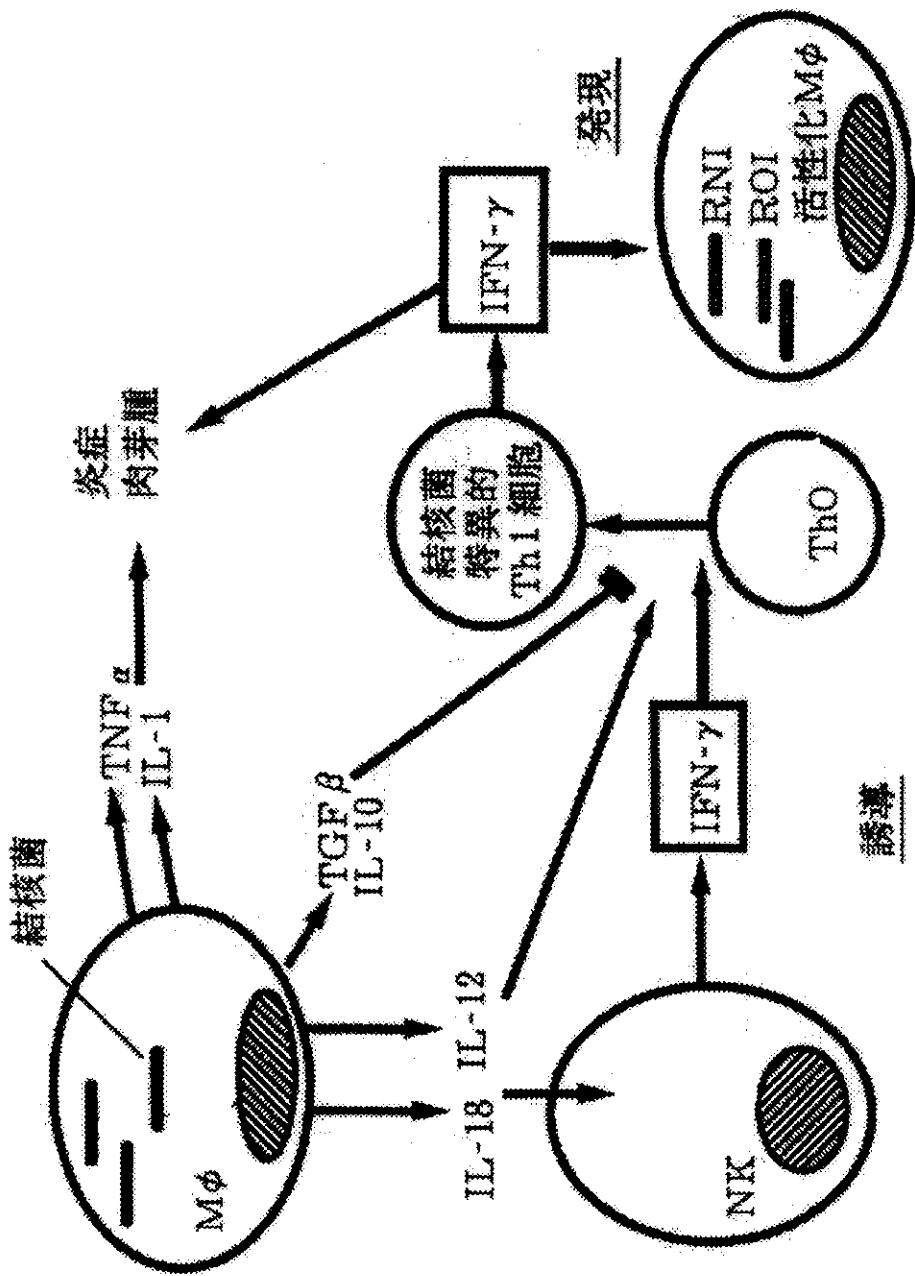
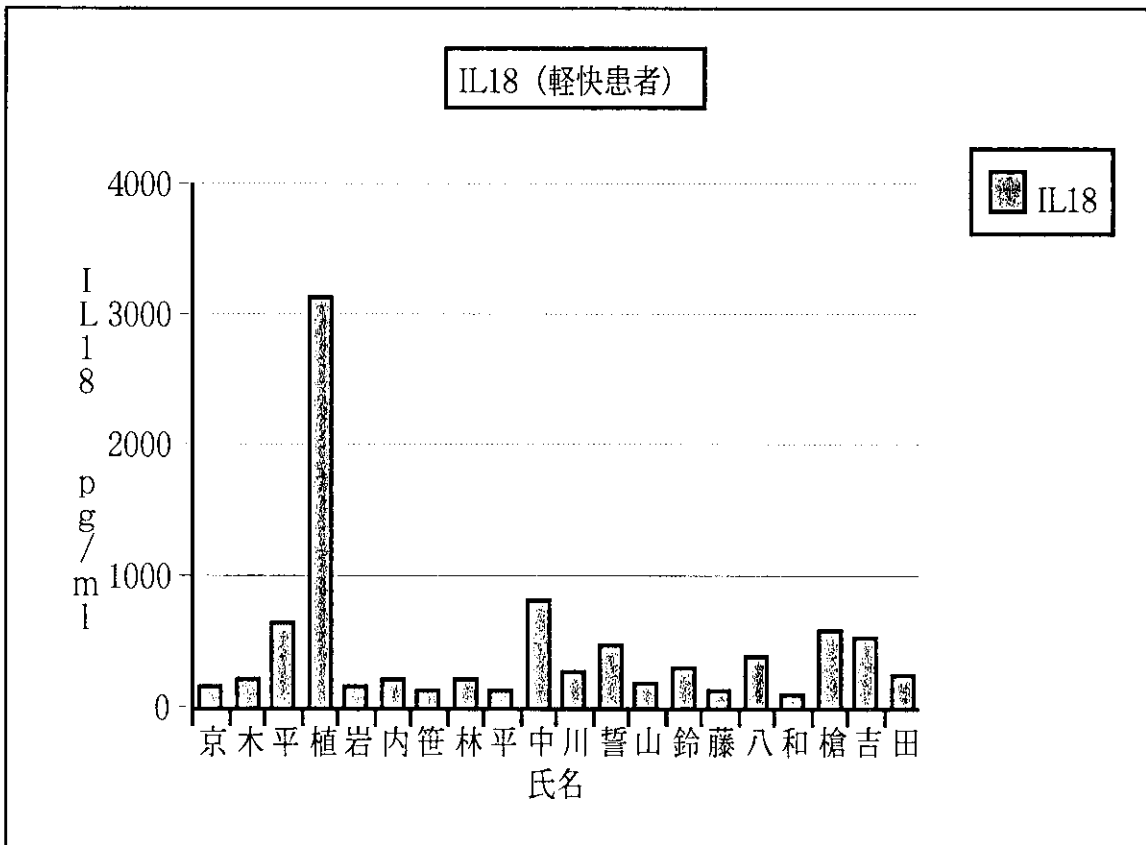
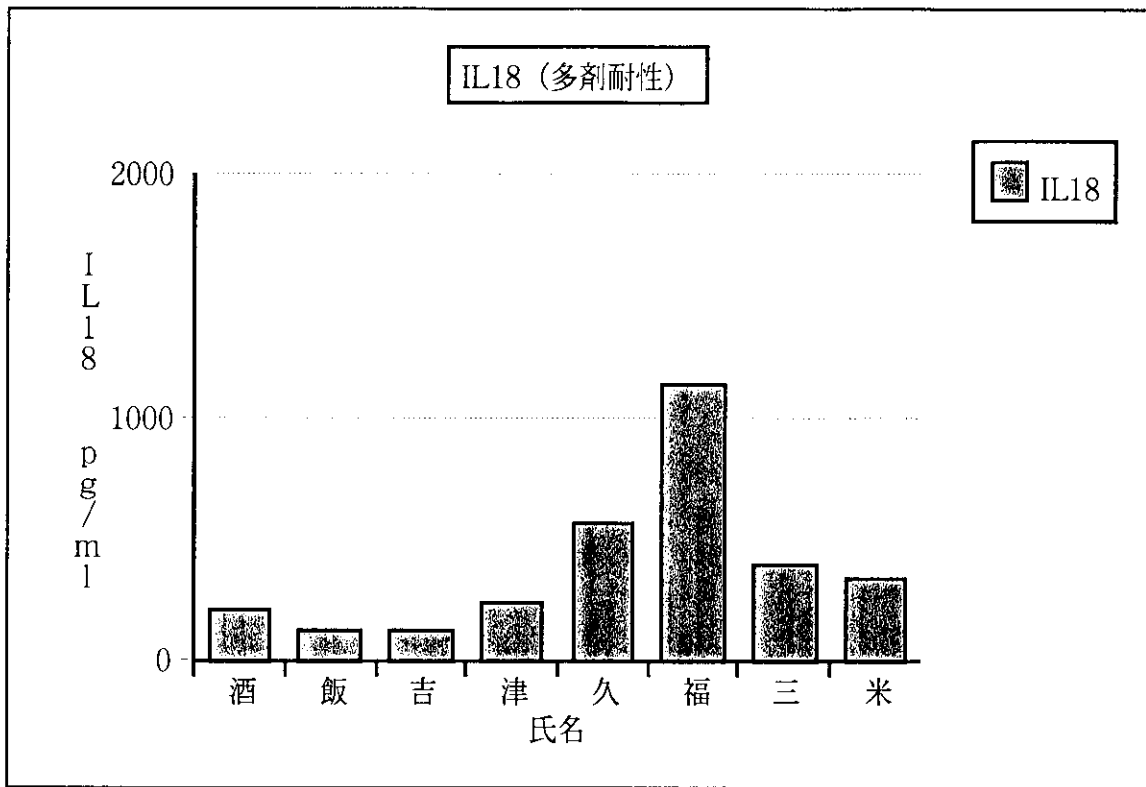
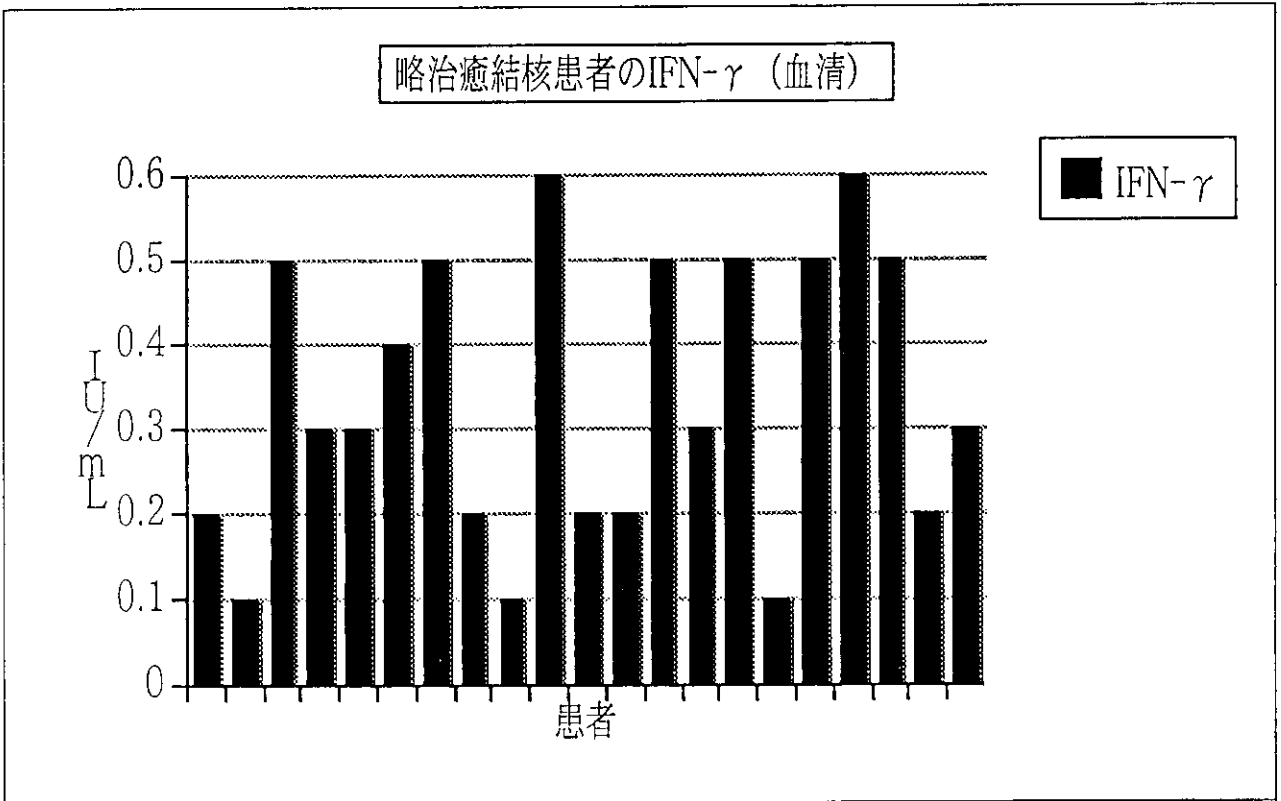
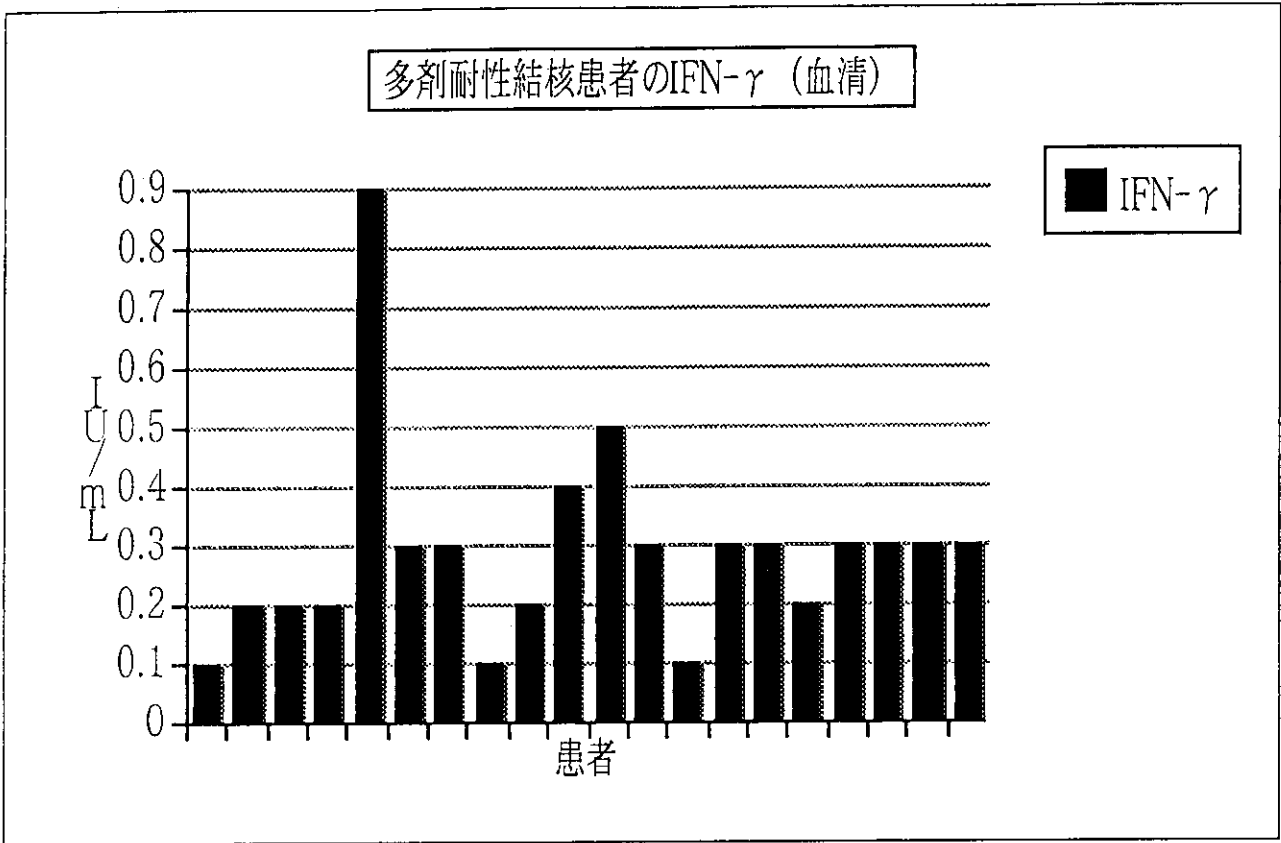


図8 結核防御免疫の誘導と発現に関わる主要サイトカイン

(光山による)



対応する一方のサンプル数少なく未検定。



多剤耐性結核患者と略治癒中の結核患者の血清中IFN- γ には、T検定において5%の危険率をもって有意差が認められた。