

健康危険情報

- 1) エイズ合併結核が着実に増加している。
- 2) HIV診療施設や関係者の結核感染を予防し、患者自身の重症化を予防するため、HIV感染者の診療のなかで結核発病に対する予防措置を強化する必要がある。
- 3) 結核患者におけるHIV感染を早期に発見するために結核施設は地域のHIV感染流行の水準に応じた病院としての検査実施基準を設定する必要がある。

知的財産権の出願・登録状況

なし。

研究発表

1 論文発表

- 1 Yoshuyama T, Yanai H, Mori T, et al Prevalence of drug-resistant tuberculosis in an HIV endemic area in northern Thailand. *Int J Tuberc Lung Dis* 5(1) 32-9, 2001
- 2 Hoshino Y, Nakata K, Hoshino S, et al Maximal HIV-1 replication in alveolar macrophages during tuberculosis requires both lymphocyte contact and cytokines. *J Exp Med* 195 495-505, 2002
- 3 Weiden M, Tanaka N, Nakata K, et al Differentiation of monocytes to macrophages switches the Mycobacterium tuberculosis effect on HIV-1 replication from stimulation to inhibition modulation of interferon response and CCAAT/enhancer binding protein beta expression. *J Immunol* 165 2028-2039, 2000
- 4) 中田光、慶長直人、本田芳宏、永井英明、蛇沢晶、藤田明 HIV感染と結核の病理 ウィルス先生の機構。結核77 687-692, 2002
- 5) 藤田明 HIV陽性者における結核。 *Modern Physician* 20 1157-1159, 2000
- 6) 永井英明 基礎疾患と感染予防の実際。 HIV。感染と抗菌薬4 258-261, 2001
- 7 永井英明、川辺芳子、長山直弘、他 結核患者における抗HIV抗体陽性率の検討。結核76 679-684, 2001
- 8) 永井英明 感染症治療の最前線 再興感染症としての結核。東京都医師会雑誌54 688-692
- 9) 中田光、本田芳広、田中直彦、他 AIDSに合併する結核。結核75 547-556, 2000
- 10) 中田光 エイズと結核。日本ハンセン病学会雑誌69 87-92, 2000
- 11) 中田光 細胞内寄生細菌に対する生体応答。 HIVと抗酸菌感染。日本ハンセン病学会雑誌69 25-26, 2000



AIDS結核における血漿及び肉芽腫内 Osteopontin 産生の解析

上江洲香織¹⁾、川上 和義¹⁾、高口 善信¹⁾、福島喜代康²⁾、仲本 敦³⁾、大湾 勤子³⁾、
久場 睦夫³⁾、新里 敬¹⁾、比嘉 大¹⁾、健山 正男¹⁾、昭屋 勝治⁴⁾、岡 慎一⁴⁾、
中田 光⁵⁾、今 重之⁶⁾、上出 利光⁶⁾、斎藤 厚¹⁾

1) 琉球大学第一内科

2) 長崎県立多良見病院

3) 国立沖縄病院

4) 国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター

5) 同呼吸器研究部 北海道大学遺伝子病制御研究所病因研究部門分子免疫分野

研究要旨

結核は、AIDSに合併する重要な感染症であり、AIDS指標疾患の中でもその頻度は高く約1割を占める。多剤耐性結核の出現に加え、AIDSなど高度に細胞性免疫が傷害された場合の結核感染では他の合併症も多く、健常人の結核と異なり更に重篤化し治療困難例も多い。そのため従来の抗菌化学療法に加え、免疫学的機序に基づいた新たな治療法の開発が望まれている。

細胞内寄生菌である結核の感染防御にはTh1反応による細胞性免疫が重要である。Osteopontin (OPN)は、そのTh1型反応を誘導するサイトカインとして注目を集めている。昨年度の本研究では結核患者において血漿OPN濃度が高値であることを示した。今回は症例数を増やすとともに、AIDS合併結核についても解析を行った。AIDS合併結核患者では、血漿OPN濃度に明らかな違いは認められなかった。しかし、AIDS結核患者において、血漿OPN濃度と末梢血CD4、CD8陽性リンパ球数との間に有意な正の相関を認め、更にHIV-RNA量との間には負の相関傾向が観察された。また免疫組織学的検討では、AIDS合併結核の肺病変では、HIV陰性結核に比較してOPN産生の低下している傾向がみられた。これらの結果から、AIDS結核では病期の進行とともにOPN産生が低下し、その発症病態に影響している可能性が示唆された。

研究の目的

結核は今なお、世界最大の感染症である。年間約200万人が死亡している。近年、医療の発展とともに易感染性宿主の増加とHIV感染患者の増加のため、immunocompromised host に合併する結核症例も増えてきている。これらの症例では非典型的な経過をたどる症例が多く、健常人に発症する結核とは異なる様相を呈している。

HIV感染患者においてはHAARTの導入と抗菌化学療法の発達により、合併する日和見感染症の頻度も変化してきている。多くの細菌、真菌感染症は減少してきているにもかかわらず、結核とカリニ肺炎はほぼ横這いか、わずかに増加傾向を示している¹⁾。今回はAIDSに合併した結核症例を健常人の結核症例と比較しつつ病態の解析を行い、その相違を明確にすることを目的に検討を行った。

結核感染症は細胞性免疫がその感染防御の主体であり、Th1反応を誘導することが有効な菌の排除へとつながる²⁾。Th1反応に必須なIL-12産生を誘導するサイトカインとして近年Osteopontin (OPN)が注目されている³⁾。OPNは、もともと骨基質に存在するリン酸化糖蛋白として同定され、その他乳汁、胎盤、尿、白血球、腎臓などの正常組織、およびいくつかの腫瘍組織にもその発現が見出されている⁴⁾。我々は、一昨年度の本研究において、東南アジア地域でエイズの日和見真菌として重要な*Penicillium marneffei*によるヒト末梢血単核球からのIL-12産生にOPNが必要であること

を明らかにした⁵⁾。昨年度は、肺結核患者において血漿中のOPNレベルが増加していることを報告した⁶⁾。今年度は、結核の症例数を増やして同様の検討を行った⁷⁾。さらに、AIDSに合併した結核症例についてもOPNの産生動態について解析を行った。

研究方法

1. 対象患者

琉球大学第一内科、国立療養所沖縄病院、長崎県立多良見病院においてインフォームドコンセントが得られた肺結核患者より得られた血漿を用いて検討を行った。健常コントロールが34例、免疫能に影響を及ぼすような基礎疾患のない肺結核が48例について検討した。患者群は糖尿病、腎不全、肝不全等の重症患者は含まず、ステロイド等の免疫抑制剤を使用している症例は対象外とした。また、インフォームドコンセントが得られたAIDS合併結核6症例からの血漿についても検討を行った。

2. 血漿OPN、IL-12、IFN- γ レベルの測定

血漿OPNの測定は免疫生物研究所(群馬)より供与されたELISAキットを用いた。IL-12、IFN- γ の測定はそれぞれBiosource社(米国)、Endogen社(米国)のELISAキットを用いた。

3 末梢血単核球 (PBMC) を用いた検討

PBMCはEDTA系採血した全血からFicoll-

分担研究者 斎藤 厚

研究協力者 川上和義、高口善信、上江州香織、福島喜代康、仲本 敦、大瀧勤子、久場睦夫、新里 敬、比嘉 太、健山正男、照屋勝治、岡 慎一、中田 光、今 重之、上出利光

Analysis of osteopontin production in plasma and granulomatous lesions of AIDS patients with tuberculosis

Kaori Uezu¹⁾ Kazuyoshi Kawakami¹⁾, Yoshinobu Koguchi¹⁾, Kiyoyasu Fukushima²⁾, Atsushi Nakamoto³⁾, Isoko Owan³⁾, Mutsuo Kuba³⁾, Takashi Shinzato¹⁾, Futoshi Higa¹⁾, Masao Tateyama¹⁾, Katsuji Teruya⁴⁾, Shinichi Oka⁴⁾, Koh Nakata⁵⁾, Shigeyuki Kon⁶⁾, Toshimitsu Uede⁶⁾ and Atsushi Saito¹⁾

¹⁾First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, ²⁾Nagasaki Prefecture Tarami Hospital, ³⁾National Okinawa Hospital ⁴⁾AIDS Clinical Center, International medical Center of Japan, ⁵⁾Department of Respiratory Disease Research Institute, International medical Center of Japan and ⁶⁾Division of Molecular Immunology, Research Section of Molecular Pathogenesis, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University

Paque (Pharmacia 社、スウェーデン)を用いた比重遠心法にて分離した。得られたPBMCを *M bovis* BCG (日本BCG社、東京)にて刺激し、経時的に産生されるOPN、IL-12、IFN- γ を測定した。

4 抗OPN中和抗体

中和抗体は免疫生物研究所より供与されたモノクローナル抗体を用いた。

5 OPNの免疫組織学的検討

HIV合併結核患者、非HIV結核患者の剖検例から得られた肺標本パラフィン包埋切片を用いた(それぞれ国立国際医療センター呼吸器疾患研究部 中田 光博士、東邦大学医学部病理 渋谷和俊博士より供与)。標本は脱パラフィン後、マイクロウェーブ照射にて抗原賦活化し、抗OPN抗体を反応させた。HRP結合ポリマー試薬(ニチレイ社、東京)にて処理し、DAB発色後、マイヤー ヘマトキシリンにて核染色を行った。

研究成果

1 結核患者及び健常人における血漿OPN濃度の比較

肺結核において、血漿OPNレベルが健常人に比へ有意に増加していた(図1)。

2 肺病変の広がり と OPNレベルの関係

昨年度と同様に、NTA分類に従い胸部X線所見に応じた肺病変の広がり と 血漿OPNレベルの関係について検討し、同様な結果が得られた。即ち、Minimal lesion、Moderately advanced lesion、Far advanced lesion と 肺病変が広範になるほど血漿OPNレベルは高値を示した(図2)。さらに、抗結核薬によって6ヶ月治療した後では血漿OPN濃度は有意に減少した。

3 血漿OPNレベルとIFN- γ 、IL-12との関係

血漿IL-12、IFN- γ 濃度いずれにおいても、OPNレベルと有意な正の相関を示した(図3)。

4 BCG刺激PBMCからのTh1サイトカイン産生におけるOPNの役割

PBMCをBCGで刺激し、経時的に産生されるサイトカインを測定したところ、OPN、IL-12、IFN- γ の順に産生が認められた(図4)。また、抗OPN中和抗体の添加によってBCG刺激PBMCからのIL-12、IFN- γ 産生のいずれも濃度依存的に有意に抑制された(図5)。

5 AIDS結核患者の血漿OPN濃度

エイズ合併結核患者では、血漿OPN濃度が非HIV結核症例に比へて有意差は認められなかった。しかしながら、症例数が6例と少ないものの、血

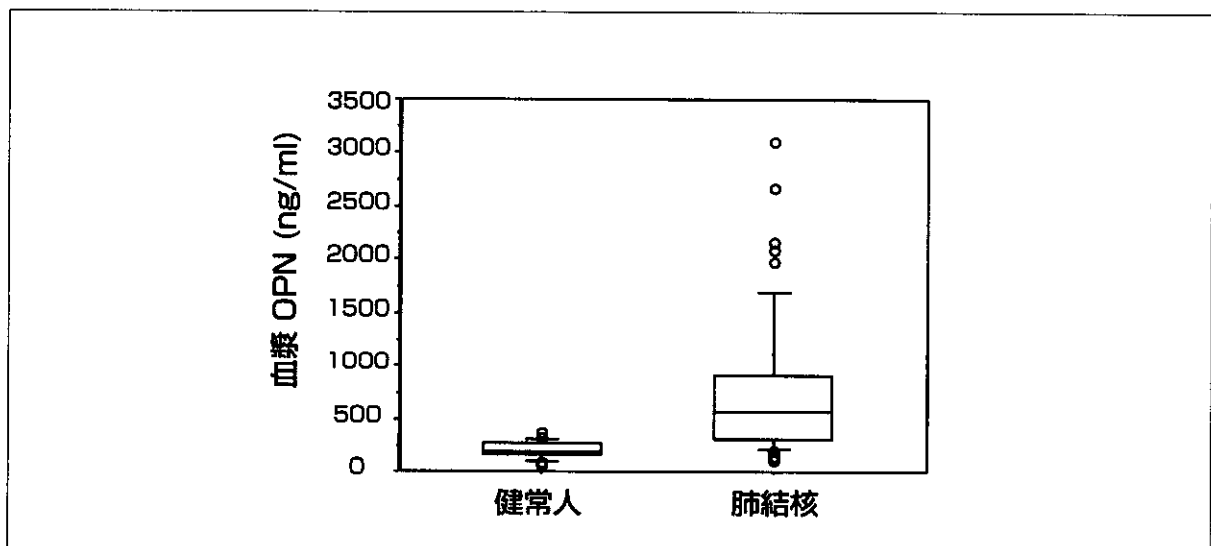


図1 肺結核患者と健常人における血漿OPN濃度の比較検討

漿OPN濃度と末梢血CD4、CD8陽性リンパ球数との間に有意な正の相関、そして血中ウイルス量との間に有意差はないが、負の相関の傾向がみられた(データ未発表)。

6. 肺病理組織におけるOPN産生の解析

非HIV結核症例では主に組織球を中心にOPNの陽性像が観察されたのに対して、AIDS合併結核の3症例ではOPNの発現は極めて乏しいものであった(データ未発表)。

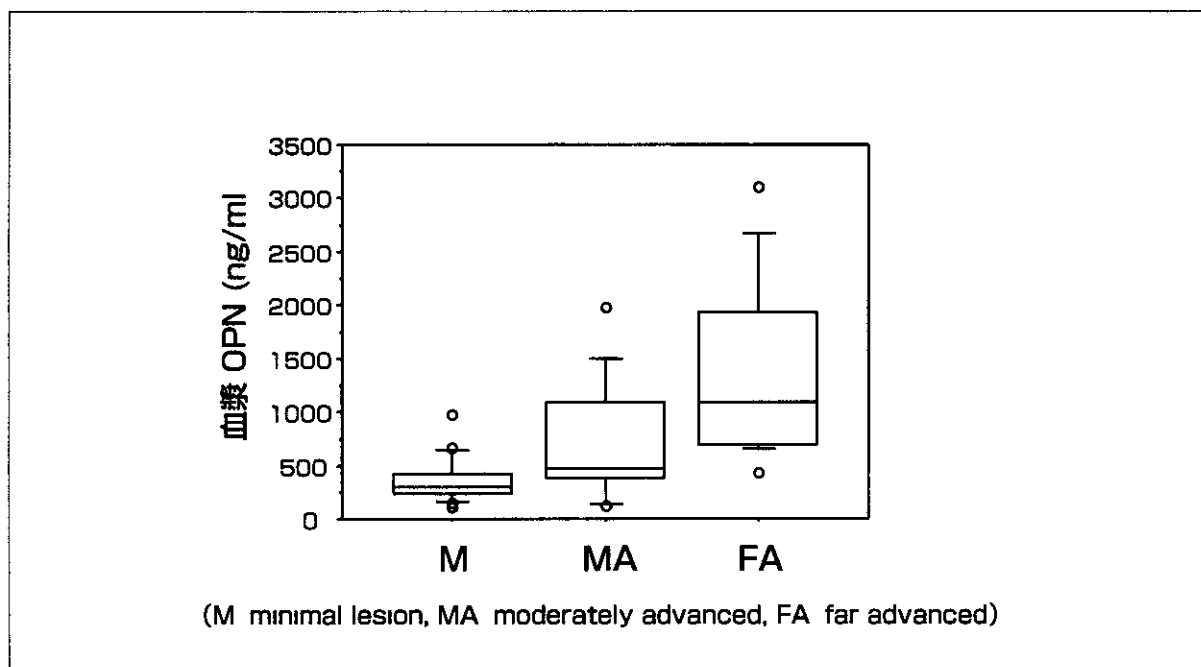


図2 肺病変の広がりやと血漿OPN濃度との相関

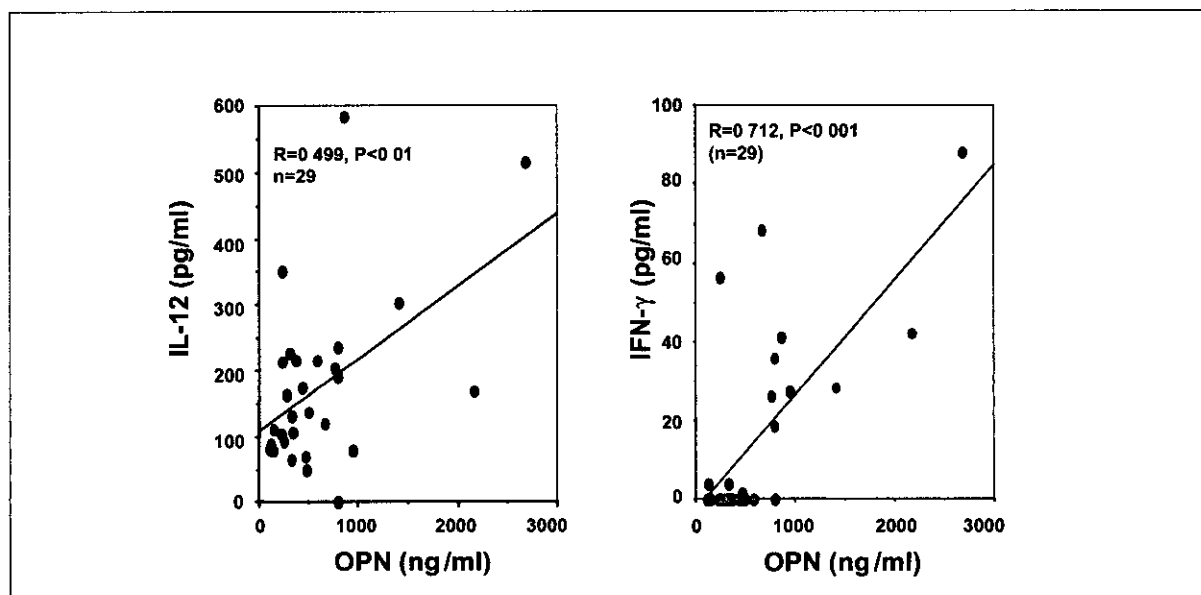


図3 肺結核患者における血漿OPNとIL-12 IFN-γとの相関

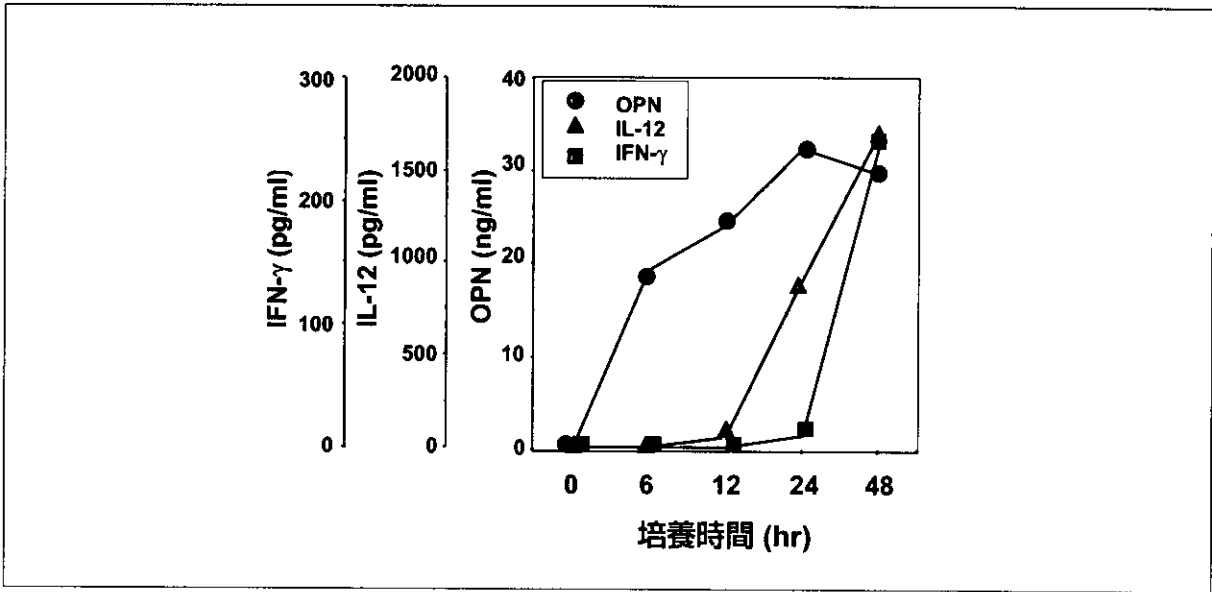


図4 BCG 刺激 PBMC による OPN, IL-12 の生産動態

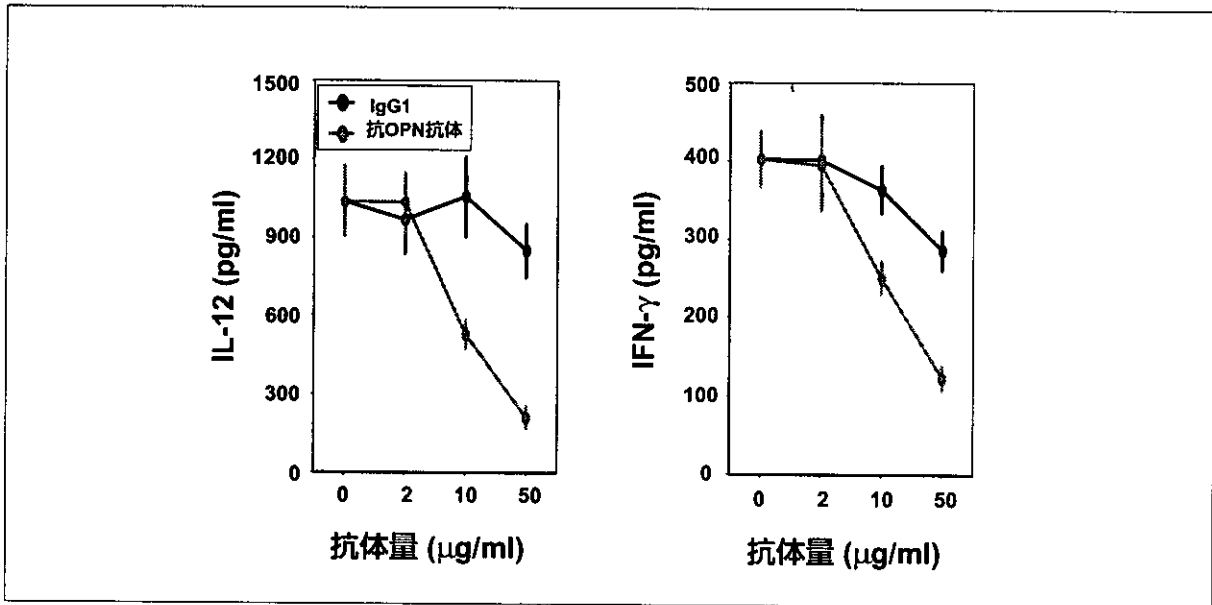


図5 BCG 刺激 PBMC による OPN, IL-12, IFN-γ への抗 OPN 抗体の影響

考察

1 結核感染における OPN の役割

結核患者において血漿 OPN 濃度はコントロール群に比べ有意に上昇し、さらに肺病変の広がりや治療経過と強い相関を示すことから、OPN が肺結核の病態形成に深く関わっている可能性が推察された。現在血漿 OPN 濃度の上昇が知られている

のは、頭頸部癌⁸⁾、乳癌⁹⁾、透析患者¹⁰⁾などであり、血漿 OPN 濃度の測定は結核診断の一助となることが期待できた。しかしながら別の研究では、肺結核ほどではないもののサルコイドーシスでも血漿 OPN 濃度の上昇がみられたため、他の呼吸器疾患でも検討してみる必要があると思われた。

一昨年度の本研究において、*P. marneffei* によるヒト末梢血単核球からの IL-12 産生に OPN が必要

であることを明らかにした。他の感染症においても OPN 遺伝子欠損マウスを用いた検討で OPN が Th1 反応に必要なサイトカインであることは既に示されている。ヘルペスウイルス感染では DTH 反応が減弱し、Th1 サイトカインが減少と Th2 サイトカインの増加が認められ、細胞内増殖菌である リステリア感染症、及び *M bovis* BCG 感染でも感染の増悪が報告されている³¹⁾。しかし、*M bovis* BCG 感染では、菌の排除が遅延するものの IFN- γ や、NO 産生においては差がないと報告されており、OPN の BCG 及び結核菌感染における役割については未だ不明な点が多い。したがって今回は、OPN と Th1 サイトカインの関係を臨床的に明らかにするべく、結核患者血漿中の各サイトカインの相関について検討した。血漿 IL-12、IFN- γ のいずれにおいても OPN レベルと有意な正の相関を示したことから、結核感染において OPN が Th1 反応の成立に関わっていると推察された。この仮説に一致して、*in vitro* でも、BCG 刺激 PBMC から OPN、IL-12、IFN- γ がこの順番に産生され、さらに抗 OPN 中和抗体の添加によってこれらのサイトカインの産生が濃度依存的に抑制された。これらの結果から、結核菌感染においても OPN が IL-12 の上流に位置し Th1 サイトカインの産生に必要であることが推測された。

2. AIDS 結核における OPN に関する検討

再興感染症として健常者間でも問題の結核感染症は、近年の HIV 感染患者の増加に伴い、免疫低下患者においてもその制御が重要となってきた。我々は日和見感染症としての結核感染症の病態のなかで OPN の関連を調べることで、免疫療法への応用の可能性を探るべく研究を行った。HIV 陰性結核患者に比べ、AIDS 結核患者では血漿 OPN 濃度において明らかな相違は認めなかった。しかし、肺病理組織における免疫組織学的検討では、AIDS 結核患者において OPN の発現は極めて乏しいものであった。このことから AIDS 結核では HIV 陰性結核に比較して病変局所における OPN 産生が低下している可能性が示唆された。また、血漿 OPN 濃度と末梢血 CD4、CD8 陽性リンパ球数との間に有意な正の相関、そして血中 HIV-RNA 量との間に有意差はないものの負の相関傾向がみられた

ことから、AIDS 合併結核では病期の進行とともに OPN 産生が低下し、その発症病態に影響している可能性が示唆された。一方 AIDS においては、OPN 産生細胞としての Tリンパ球総数の低下がその産生低下に関わっている可能性も考えられるが、血漿 OPN 濃度には差が認められなかったことから、感染局所において何らかの免疫反応の低下が病態の一因となっていることが予想された。

Nauらの抗酸菌感染患者の臨床的検討によると、IFN- γ RI 欠損患者や先天性免疫不全患者の所属リンパ節では OPN 発現が減弱しており、免疫能が正常な患者においては所属リンパ節の OPN 濃度が高値であったと報告されている¹²⁾。さらに彼らは、重症度と OPN 産生には逆相関が認められ、OPN が高値であるほど臨床的に良好な経過をたどる傾向にあり、OPN の測定は重症免疫不全患者の診断の一助になると述べている。IFN- γ 受容体異常を持つ患者で OPN 産生の低下がみられたことは、IFN- γ の OPN 産生に対するポジティブフィードバックが存在する可能性も示唆するものである。OPN 遺伝子のプロモータ部位には interferon regulator factor-1 結合部位が存在し、IFN- γ のシグナル伝達は OPN 産生を正に制御している可能性がある¹³⁾。このことは血漿中 IFN- γ と OPN 濃度が正の相関を示していたことと合致する。

今回の AIDS と結核における臨床的検討では症例数が少なく、結果についても明確に断定することが困難なため、今後更に症例数を増やしていく必要がある。しかし今回の研究から、AIDS 合併結核症例における肺病変の進展が OPN の産生低下に起因する可能性がでてきたことから、将来的には OPN の補充療法等も視野に入れた臨床応用を考慮しながら研究を進めていきたい。

参考文献

- 1) 安岡 彰、他 HIV にみられる日和見合併症の動向 日和見感染症の治療に対する研究 平成12年度報告書 18-22
- 2) Flynn JL, Chan J Immunology of tuberculosis Annu Rev Immunol 19 93-129, 2001
- 3) Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, et al Eta-1 (Osteopontin) an early component of type-1 (cell-mediated) immunity Science 287 860-4, 2000

- 4) Sodek J, Ganss B, McKee MD Osteopontin Crit Rev Oral Biol Med 11 279-303, 2000
- 5) Koguchi Y, Kawakami K, Kon S et al *Penicillium marneffei* causes osteopontin-mediated production of interleukin-12 by peripheral blood mononuclear cells Infect Immun 70 1042-8, 2002
- 6) 高口善信、他 結核の発症病態におけるオステオポンチンの役割に関する臨床的検討 日和見感染症の治療に対する研究 平成13年度報告書 131-6
- 7) Koguchi Y, Kawakami K, Uezu K, et al High plasma osteopontin level and its relationship with IL-12-mediated Th1 response in tuberculosis Am J Respir Crit Care Med in press, 2003
- 8) Le QT, Sutphin PD, Raychaudhuri S, et al Identification of osteopontin as a prognostic plasma marker for head and neck squamous cell carcinomas Clin Cancer Res 9 59-67, 2003
- 9) Singhal H, Vautista DS, Tonkin KS, et al Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival Clin Cancer Res 3 605-11, 2000
- 10) Nitta K, Ishizuka T, Horita S, et al Soluble osteopontin and vascular calcification in hemodialysis patients Nephron 89 455-8, 2001
- 11) Nau GJ, Liaw L, Chupp GL, et al Attenuated host resistance against *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice lacking osteopontin Infect Immun 67 4223-30, 1999
- 12) Nau GL, et al Osteopontin expression correlates with clinical outcome in patients with mycobacterial infection Am J Pathol 157 37-42, 2000
- 13) Hijiya N, Setoguchi M, Matsuura K, et al Cloning and characterization of the human osteopontin gene and its promoter Biochem J 303 255-62, 1994
- 3) 川上和義 クリプトコッカス感染防御とNKT細胞 -自然免疫から獲得免疫へ- 日本医真菌学会雑誌 43 137-41, 2002
- 4) Kawakami K Interleukin-18 and host defense against infectious diseases J Immunother 25 S12-9, 2002
- 5) Koguchi Y, Kawakami K Cryptococcal infection and Th1-Th2 cytokine balance Int Rev Immunol 21 423-38, 2002
- 6) Kawakami K, Koguchi Y, Qureshi MH, Zhang T, Kinjo Y, Yara S, Uezu K, Shibuya K, Naoe S and Saito A Anti-CD11b monoclonal antibody suppresses brain dissemination of *Cryptococcus neoformans* in mice Microbiol Immunol 46 181-186, 2002
- 7) Kinjo Y, Kawakami K, Uezu K, Yara S, Miyagi K, Koguchi Y, Hoshino T, Okamoto M, Kawase Y, Yokota K, Yoshino K, Takeda K, Akira S, Saito A Contribution of IL-18 to Th1 response and host defense against infection by *Mycobacterium tuberculosis* A comparative study with IL-12p40 J Immunol 169 323-9, 2002
- 8) Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Yara S, Miyagi K, Koguchi Y, Nakayama T, Taniguchi M, Saito A Minimal contribution of V α 14 natural killer T cells to Th1 response and host resistance against mycobacterial infection in mice Microbiol Immunol 46 207-10, 2002
- 9) Koguchi Y, Kawakami K, Kon S, Segawa T, Maeda M, Uede T, Saito A *Penicillium marneffei* causes osteopontin-mediated production of interleukin-12 by peripheral blood mononuclear cells Infect Immun 70 1042-8, 2002

2 学会発表

- 1) 宮城一也、川上和義、金城雄樹、上江洲香織、屋良さとみ、高口善信、齋藤 厚 結核感染防御とIL-18 トランスジェニックマウスを用いた解析 第77回日本結核病学会総会、東京、4月2002
- 2) 上江洲香織、川上和義、金城雄樹、屋良さとみ、宮城一也、高口善信、齋藤 厚 結核感染防御とIL-18 IL-12/IL-23との比較検討 第77回日本結核病学会総会、東京、4月2002
- 3) 川上和義 結核感染とTH1応答 基礎実験成績から臨床への展開 シンポジウム、第77回日本結核病学会総会、東京、4月2002
- 4) 金城雄樹、川上和義、上江洲香織、屋良さとみ、宮城一也、高口善信、齋藤 厚 クリプトコッカス感染防御におけるNKT細胞の役割 NK細胞との比較検討 第76回日本感染症学会総会、東京、4月2002
- 5) 上江洲香織、川上和義、金城雄樹、宮城一也、高口善信、齋藤 厚 クリプトコッカス感

健康危険情報

特になし

研究発表

1 論文発表

- 1) Koguchi Y, Kawakami K, Uezu K, Fukushima K, Kon S, Maeda M, Nakamoto A, Owan I, Kuba I, Kudaken N, Yara S, Shinzato T, Higa F, Tateyama M, Kadota J, Mukae H, Kohno S, Uede T, Saito A High plasma osteopontin level and its relationship with IL-12-mediated Th1 response in tuberculosis Am J Respir Crit Care Med in press 2003
- 2) Kawakami K Role of natural killer T cells in host defence against cryptococcal infection Revista Iberoamericana de Micologia 19 149-54, 2002

- 染による $\gamma\delta$ T細胞の肺内集積とその防御免疫における役割 第76回日本感染症学会総会、東京、4月2002
- 6) 高口善信、川上和義、健山正男、新里 敬、比嘉 大、仲本 敦、大冨勤子、久場睦夫、中田 光、齋藤 厚 ヒト結核感染防御におけるオステオホンチンの役割 第76回日本感染症学会総会、東京、4月2002
- 7) Kinjo Y, Kawakami K, Yamamoto N, Miyagi K, Kinjo T, Uezu K, Nakasone C, Nakayama T, Taniguchi M, Saito A The role for V α 14+ NKT cells in the early host defense against pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae* The second International Workshop on CD1 antigen presentation and NKT cells Boston, November 2002
- 8) Kawakami K Contrasting roles of natural killer T and antigen receptor $\gamma\delta$ -bearing T cells in the host immune response against cryptococcal infection Symposium, The second International Workshop on CD1 antigen presentation and NKT cells Boston, November 2002
- 9) 金城武士、川上和義、上江州香織、金城雄樹、宮城一也、齋藤 厚 クリプトコッカスによる宿主免疫反応の制御機構 NKT細胞活性化の抑制 第32回日本免疫学会総会、東京、12月2002

知的財産権の出願・登録状況

特になし



液体培地導入後の非結核性抗酸菌の 分離状況と薬剤感受性

米山 彰子¹⁾、日暮 芳己²⁾、奥住 捷子²⁾、森屋 恭爾²⁾、中原 一彦¹⁾、木村 哲²⁾

¹⁾ 東京大学医学部附属病院検査部

²⁾ 東京大学医学部感染制御部

研究要旨

2001年に当院において122症例から126株の非結核性抗酸菌が分離された。分離数の最も多い菌種は *M. avium* で58株、続いて *M. goodii* 19株、*M. fortuitum* 8株であった。群別ではIII群が64株と約半数を占め、続いてII群の46株、IV群は12株、I群は *M. kansasii* 1株のみが分離された。患者背景としては、高齢者が多く、外来患者からの分離が多いことが特徴的であった。基礎疾患としては慢性呼吸器疾患が33例と最も多く、悪性疾患、膠原病、血液疾患、糖尿病など続発性免疫不全状態を来す疾患も約30%に認められた。非結核性抗酸菌症と考えられた症例が19症例、その疑いとされたものが13症例であり、その起炎菌の半数強が *M. avium* であった。喀痰の肉眼的性状や固形培地上のコロニー数は起炎菌かどうかとは関連を認めなかった。*Mycobacterium avium* complex(MAC)はアミノグリコシド、RFP、CAM、LVFX、THには感受性であった。III群菌に比べ、II群菌は感受性良好、IV群は低感受性の傾向にあった。

分担研究者 米山彰子

研究協力者：三澤慶樹、奥住捷子、森屋恭爾、中原一彦、木村 哲

Species distribution and antibacterial susceptibility of nontuberculous mycobacteria isolates

Akiko Yoneyama¹⁾, Yoshiki Misawa²⁾, Katsuko Okuzumi²⁾, Kyoji Moriya²⁾, Kazuhiko Nakahara¹⁾ and Satoshi Kimura²⁾

¹⁾Laboratory Center, University of Tokyo Hospital and ²⁾Department of Infection Control and Prevention service University of Tokyo

研究目的

Mycobacterium avium complex(MAC)などの非結核性抗酸菌感染症はHIV感染をはじめとする免疫能低下時の日和見感染症として重要である。また、美容目的のシリコン等の注射に伴う非結核性抗酸菌感染症の多発の報告もある。近年、抗酸菌培養に液体培地が導入され、分離される非結核性抗酸菌の菌種別分離頻度が固形培地のみを用いていた時とは変化していることが示唆されている。そこで、液体培地導入後の非結核性抗酸菌の分離状況、感染症を起こしているかどうか、患者の臨床背景、薬剤感受性などの現状について把握することを目的とした。

研究方法

対象は2001年に当院で122症例から分離 同定された非結核性抗酸菌126株。同一症例から分離された同一菌種は1株のみを対象とした。非結核性抗酸菌の同定にはDDH マイコバクテリア ‘極東’を用いた。薬剤感受性試験は、Middle brook 7H9 broth (マイコビーズ® 極東製薬)によって前培養した菌を用い、プロスミンクNTM® (極東製薬)で行った。試験薬剤はStreptomycin (SM)、Ethambutol (EB)、Kanamycin (KM)、Isoniazid (INH)、Rifampin (RFP)、Levofloxacin (LVFX)、Clarithromycin (CAM)、Ethionamide (TH)、Amikacin (AMK)の9薬剤。また

患者の年齢、診療科、入院 外来別、基礎疾患、非結核性抗酸菌症の有無などを病歴から調査した。

研究結果

1 非結核性抗酸菌の菌種別分離頻度

非結核性抗酸菌の分類を表1に、2001年に同定された菌種別株数を表2に示す。分離数の最も多い菌種は *M avium* で58株、*M intracellulare* 3株をあわせて61株がMACであった。続いて *M gordonae* 19株、*M fortuitum* 8株であった (図1)。群別ではIII群が64株と約半数を占め、続いてII群の46株であった (図2)。IV群は12株、I群は *M kansasii* 1株のみが分離された。

2 非結核性抗酸菌が分離された患者の臨床背景

患者は高齢者が多く60歳以上が約70%を占めた (図3)。診療科としては呼吸器内科が最も多く64.8%を占め、他の内科系診療科を加えてほとんどが内科系であった (図4)。入院 外来別では77.6%が外来患者であった。

病歴によって基礎疾患を調査すると、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息、間質性肺炎などの呼吸器疾患が33例と最も多く、続いて悪性腫瘍15例、膠原病9例であった。糖尿病は6例、血液疾患が5例であった (表3)。

表1 非結核性抗酸菌の分類

slow growers	I群菌 光発色菌 (photochromogens)	<i>M kansasii</i> <i>M marinum</i> <i>M simiae</i>
	II群菌 暗発色菌 (scotochromogens)	<i>M scrofulaceum</i> <i>M szulgai</i> <i>M gordonae</i>
	III群菌 非光発色菌 (nonphotochromogens)	<i>M avium</i> <i>M intracellulare</i> <i>M xenopi</i> <i>M ulcerans</i> <i>M malmoense</i> <i>M gastri</i> <i>M nonchromogenicum</i> <i>M terrae</i> <i>M triviale</i>
rapid growers	IV群菌 迅速発育菌 (rapid growers)	<i>M fortuitum</i> <i>M chelonae</i> <i>M abscessus</i> Other group IV

表2 非結核性抗酸菌の分類頻度

	菌種	分離株数	
I群菌 光発色菌 (photochromogens)	<i>M kansasii</i>	1	1
II群菌 暗発色菌 (scotochromogens)	<i>M scrofulaceum</i>	2	46
	<i>M szulgai</i>	4	
	<i>M gordonae</i>	19	
	他のII群	21	
III群菌 非光発色菌 (nonphotochromogens)	<i>M avium</i>	58	64
	<i>M intracellulare</i>	3	
	他のIII群	3	
IV群菌 迅速発育菌 (rapid growers)	<i>M fortuitum</i>	8	12
	<i>M chelonae</i>	2	
	<i>M abscessus</i>	1	
	<i>M peregrinum</i>	1	
<i>Mycobacterium spp</i>		3	3

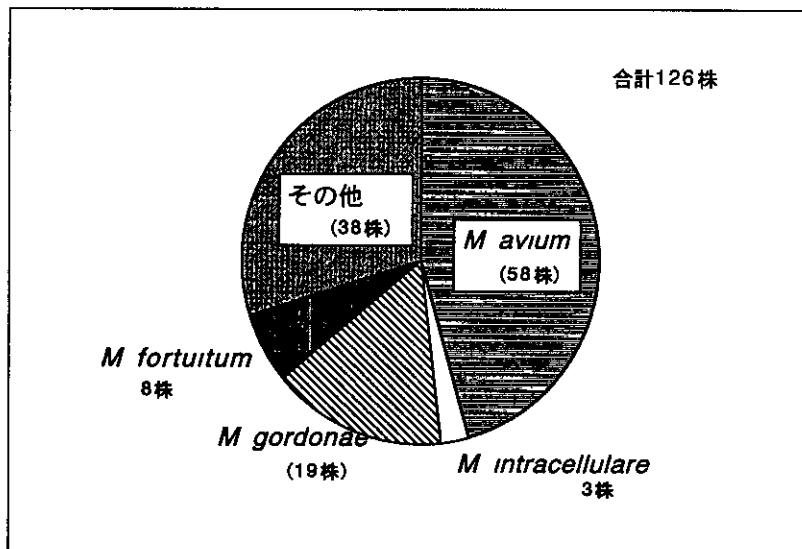


図1 非結核性抗酸菌 分類頻度の高い菌種

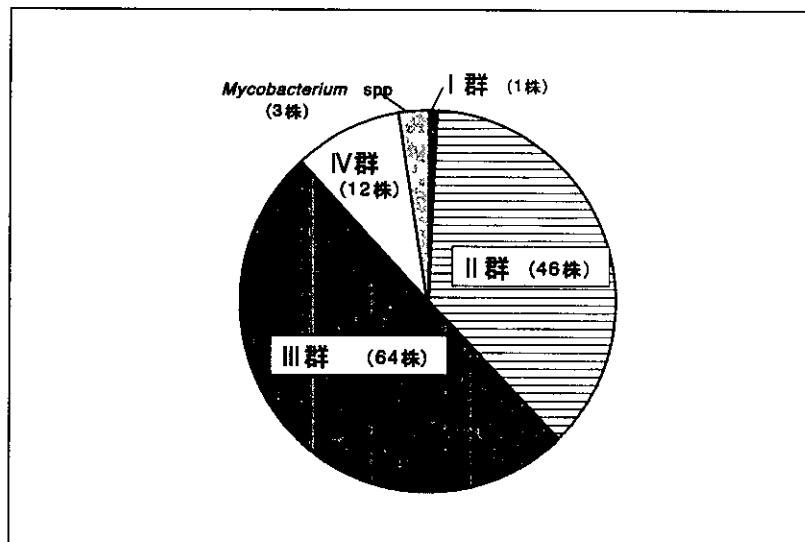


図2 非結核性抗酸菌 菌群別分離頻度

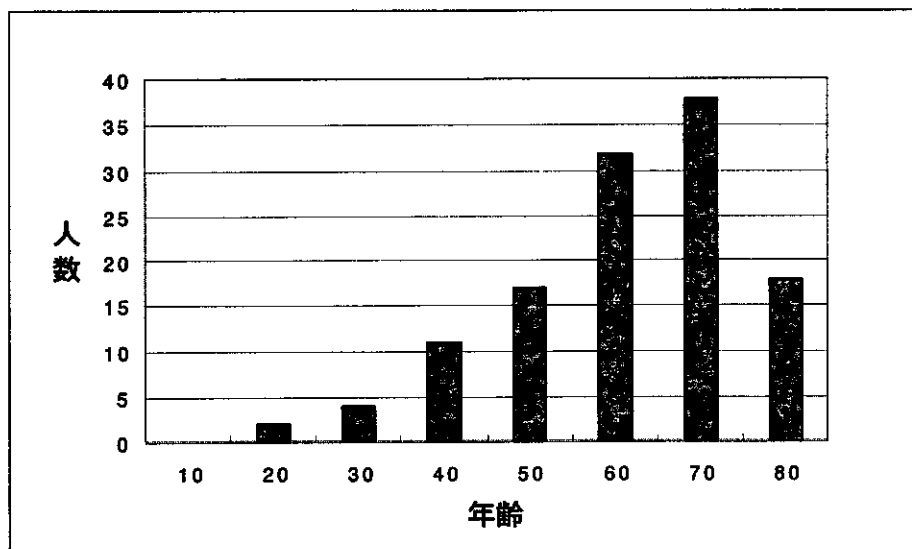


図3 非結核性抗酸菌が分離された患者の年齢分布

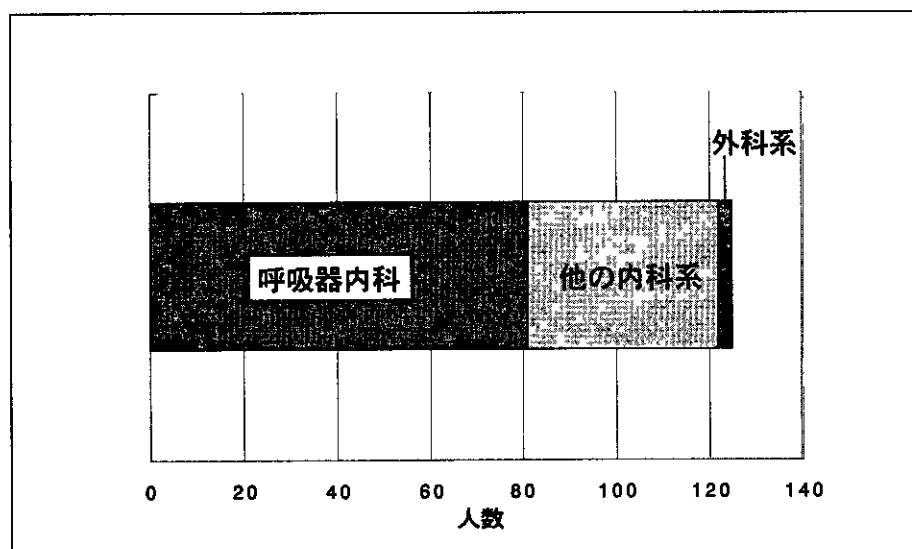


図4 非結核性抗酸菌が分離された患者の診療科・入院/外来別

表3 非結核性抗酸菌が分離された患者の基礎疾患

N=122	
疾患	症例数
呼吸器疾患 COPD、間質性肺炎、気管支拡張症 喘息 肺気腫 慢性気管支炎など	33例
悪性腫瘍 胃 肺 大腸 子宮 卵巣など	15例
膠原病 SLE RA	9例
糖尿病	6例
血液疾患 悪性リンパ腫 MDS	5例

3. 非結核性抗酸菌症と考えられた症例

病歴より、主治医が非結核性抗酸菌症あるいはその疑いと考えたかどうかを調査した。非結核性抗酸菌症と考えた症例が19症例、その疑いとされたものが13症例であった。非結核性抗酸菌症の診断は、診断基準を厳密に適用してではなく、臨床症状 所見、培養所見等をあわせて総合的に判断されていた。32症例の起炎菌を頻度順に示すと、*M. avium* 18例、*M. gordonae* 4例、*M. fortuitum* 3例で、他のII群3例、*M. scrofulaceum*、*M. szulgai*、*M. kansasii* がそれぞれ1例であった(図5)。

4 非結核性抗酸菌症と考えられた症例の検体および起炎菌の株の性状

非結核性抗酸菌症およびその疑いとされた症例の喀痰の肉眼的性状 (Miller & Jones 分類) を検討すると、膿性痰は約1/4に過ぎず、半数近くがM1の性状を示した(表4)。粘性性痰でも感染症が否定できないことが示唆された。

また、固形培地上のコロニー数と病原性の関連を検討した。非結核性抗酸菌症およびその疑いで固形培地上のコロニー数の記載がある8症例

中、コロニー数が100個以上であったのは1例のみであった。逆に、100コロニー以上が観察された8症例中、非結核性抗酸菌症であったのは1例のみであった。固形培地上のコロニー数と病原性も直接的な関係はないことが示唆された。

5 非結核性抗酸菌の薬剤感受性

非結核性抗酸菌の全菌種についての薬剤感受性を表5に示す。いずれの薬剤についてもMICは測定範囲全体に幅広く分布している。MACのMICを検討すると(表6)、抗結核薬の中ではEBおよびINHはピーク血中濃度より高いMICを示すか、RFPは有効と思われる。またLVFX、CAM、TH、KM、SM、AMKにも感受性であった。

表7には菌群別に各薬剤のMIC値の分布を示す。SM、KM、AMK、INH、RFP、CAMではII群はIII群より感受性が良好で、IV群はIII群より耐性の傾向が見られた。EBはII群とIII群でMIC80の差がなかった。LVFXのMIC80は、IV群がIII群より低値であった。THのMIC80はII群がIII群より高値であった。

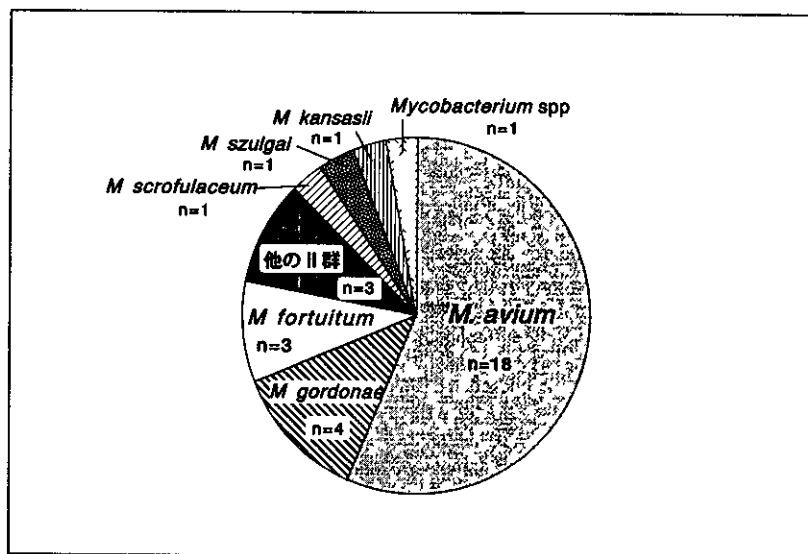


図5 非結核性抗酸菌症と考えられた(疑いを含む) 32例の起炎菌

表4 非結核性抗酸菌症(疑いを含む)の
喀痰の症状と病原性

喀痰の性状	症例数
M1	9例
M2	5例
P1	2例
P2	1例
P3	2例

表5 薬剤感受性(全菌種)

薬剤	MIC range (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)
SM	0.125~>128	8
EB	0.06~>128	16
KM	0.125~>64	16
INH	0.03~>16	16
RFP	0.03~>32	2
LVFX	0.03~32	4
CAM	0.03~>32	2
TH	<0.5~>16	16
AMK	<0.5~>16	16

表6 *M. avium complex*の薬剤感受性

MIC (µg/ml)

薬剤	MIC range	MIC ₉₀	ピーク血中濃度
SM	0.5~>16	8	25~50
EB	1~>16	8	2~6
KM	1~>32	16	14~29
INH	4~>16	16	3~5
RFP	0.03~>16	2	8~24
LVFX	0.125~8	4	5.7
CAM	0.06~>32	1	2~3
TH	1~16	4	20
AMK	1~16	16	38

表7-1 非結核性抗酸菌の郡別薬剤感受性

数字 株数
下線 MIC₈₀

	MIC(µg/ml)	0	125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
SM	I群								1					
	II群	2	1			6	6	4	1					
	III群				3	2	6	9	5	3		1		
	IV群								3	2			1	2
EB	I群								1					
	II群	1	1			5	4	2	2	2	3			
	III群					1	1		12	12	2		1	
	IV群								1	1	1	1	1	2
KM	I群								1					
	II群	1	1			3	7	4	4					
	III群					5	1	9	8	5	1			
	IV群							1	2	2	1	1	1	

表 7-2 非結核性抗酸菌の郡別薬剤感受性

数字 株数
下線 MIC80

	MIC(μ g/ml)	0	03	06	125	025	05	1	2	4	8	16	32	>32
INH	I群									1				
	II群	1						1	4	9	<u>2</u>	3		
	III群									9	8	<u>10</u>		2
	IV群									1	2	2		<u>3</u>
RFP	I群				1									
	II群	9			5	<u>2</u>	2	1	1					
	III群	4	6		3	1	3	3	3	<u>3</u>	1	1		1
	IV群				1	1		2			2			<u>2</u>
LVFX	I群							1						
	II群	1	1		2	7	<u>5</u>	3	1					
	III群				1	8	5	8	1	<u>4</u>	2			
	IV群				2		1	1	<u>3</u>				1	

表 7-3 非結核性抗酸菌の郡別薬剤感受性

数字 株数
下線 MIC80

	MIC(μ g/ml)	0	03	06	125	025	05	1	2	4	8	16	32	>32
CAM	I群				1									
	II群	3		2	7	<u>5</u>	1	2						
	III群			4	6	7	4	<u>4</u>	3					1
	IV群			1	1		1		1			2		<u>2</u>
TH	I群				1									
	II群			1	1	2	7	<u>8</u>	1					
	III群				1	12	<u>12</u>	2	2					
	IV群	1			1	2			2		<u>2</u>			
AMK	I群							1						
	II群	4		1	5	2	<u>6</u>	2						
	III群	1			4	2	5	10	<u>7</u>					
	IV群	2						3	1		<u>2</u>			

考 察

2001年1年間で122症例から126株の非結核性抗酸菌が分離された。菌種としては*M avium*が58株と最も多く、*M intracellulare*は3株のみであった。*M avium*は東日本に多く、*M intracellulare*は西日本に多いという報告と一致した結果であった。分離頻度第2番目は*M gordonae* 19株、3番目は*M fortuitum* 8株であった。群別にみると、III群が64株で最も多く、続いてII群が46株であった。非結核性抗酸菌症の起炎菌として重要な*M kansasii*は1株のみ分離された。

患者背景としては、高齢者が多く、外来患者からの分離が多いことが特徴的であった。基礎疾患としては慢性呼吸器疾患が33例と最も多かった。慢性の器質的変化のある肺に非結核性抗酸菌が定着しやすい可能性の他、頻回に喀痰検査が行われることも関連があると思われる。また、間質性肺炎等の呼吸器疾患に対し副腎皮質ステロイドが用いられている症例も目立ち、薬剤による易感染性も関与している可能性がある。悪性疾患、膠原病、血液疾患、糖尿病など統発性免疫不全状態を来す疾患も約30%に認められた。

122例中、非結核性抗酸菌症と考えた症例が19症例、その疑いとされたものが13症例であった。しかし、診断基準を厳密に適用したものは少なく、菌の検出状況、臨床所見等を総合して判断されており、実数はさらに少ない可能性がある。起炎菌として*M avium*以外が半数近くを占めたことも、非結核性抗酸菌症の診断が厳密ではないことと関連する可能性がある。

喀痰の性状、あるいは固形培地上の所見から感染症の有無を推測できるかどうか検討した。喀痰の肉眼所見は起炎菌かどうかと相関せず、一般細菌と異なり、肉眼的所見による喀痰の品質評価は困難であることが示唆された。また、診断基準に取り入れられている固形培地上のコロニー数も、今回の検討では起炎菌であるかどうかと相関しないことが示された。

薬剤感受性を検討するとMACはアミノグリコシド、RFP、CAM、LVFX、THには感受性であったが、CAMのMICが>32の耐性株も認めた。MACを主体とするIII群に比べ、II群は比較的感受性良

好で、IV群は耐性の傾向を認めたが、株によってばらつきは大きく、非結核性抗酸菌症の起炎菌では、薬剤感受性試験が治療上参考になると思われる。

結 論

非結核性抗酸菌は高齢者、呼吸器疾患患者、悪性腫瘍等の基礎疾患を持つ患者からの分離が多かった。菌種では*M avium*が126株中58株と最も多く、続いて*M gordonae* 19株、*M fortuitum* 8株であった。群別ではIII群に続いてII群が多かった。臨床的に非結核性抗酸菌症あるいはその疑いとされたものは約1/4であった。喀痰の肉眼的性状や固形培地上のコロニー数は起炎菌かどうかの推定には役立たないことが示唆された。MACはアミノグリコシド、RFP、CAM、LVFX、THには感受性であった。III群菌に比べ、II群菌は感受性良好、IV群は耐性の傾向にあった。

健康危険情報

特になし

研究発表

なし

知的財産権の出願・登録状況

なし



緑膿菌の増殖期別薬剤感受性

今村 圭文¹⁾、朝野 和典²⁾、金子 幸弘¹⁾、柳原 克紀¹⁾、宮崎 義継¹⁾、平潟 洋一³⁾、
田代 隆良⁴⁾、河野 茂¹⁾

- 1) 長崎大学医学部第二内科
- 2) 附属病院治験管理センター
- 3) 附属病院検査部
- 4) 医学部保健学科

研究要旨

緑膿菌感染症に対して、通常 *in vitro* における抗菌活性 (MIC) が優れている抗緑膿菌作用を有するセフェム系薬、カルハペネム系薬、フルオロキノロン系薬などの薬剤に、アミノ配糖体系抗菌薬の併用が選択されるが、慢性感染症においてはしばしばMICの値と臨床効果の乖離が認められる。慢性感染症における緑膿菌は様々な増殖相の菌が混在している。そこで増殖期が対数期および定常期の両相で各種抗菌薬の抗菌活性を比較した。その結果、 β -ラクタム系抗菌薬対数期では良好な抗菌活性を示すのにも関わらず、定常期では抗菌活性が認められなかった。これに対し、フルオロキノロン系およびアミノ配糖体系は定常期においても抗菌活性を発揮した。興味あることに、マクロライド系抗菌薬は、対数期で抗菌活性を示さないにも関わらず、定常期ではアミノ配糖体系に匹敵する抗菌活性を示した。そこで定常期で活性化される quorum sensing との相関を検討してみた。その結果、AZM は Las quorum sensing 依存性の殺菌機構を示した。この事実は、病原因子産生依存性の抗菌活性の発現であり、抗菌薬療法の新しいターゲットと考えられる。

分担研究者 中村哲也
研究協力者 高橋 孝、岩本愛吉

Gene polymorphism of an enzyme dihydrofolate reductase targeted by drugs in *Pneumocystis carinii* f sp *hominis*

Tetsuya Nakamura, Takashi Tajahashi and Aikichi Iwamoto

Division of Infectious Diseases & Applied Immunology, The Institute of Medical Science The University of Tokyo

研究目的

緑膿菌性肺炎は日和見感染症として起こる場合が多く、基礎に慢性の呼吸器疾患、悪性腫瘍などを有する患者や免疫不全患者に多く見られる。緑膿菌性肺炎に対しては通常抗緑膿菌作用を有するセフェム系薬、カルハペネム系薬、フルオロキノロン系薬などの薬剤に、アミノ配糖体系抗菌薬の併用が選択され、

これらはいずれも *in vitro* における抗菌活性(対数増殖期(exponential phase)のMIC)が優れている。しかしながら、抗菌薬による治療効果は急性感染症においてはMICと相関することが多いものの、器質的病変や感染防御能の低下した患者に発症する慢性感染症においては、しばしばMICの値と臨床効果の乖離が認められる。

慢性感染症における緑膿菌は様々な増殖相の菌が混在しているにも関わらず、exponential phaseでのMICのみが抗菌薬選択の指標となっており、このことが慢性感染症におけるMIC値と臨床効果の乖離が起こる一つの要因として考えられる。

そこで、緑膿菌 PAO1 株を用いて、exponential phase と stationary phase の両増殖相で各種抗菌薬の抗菌活性を比較検討した。またその結果得られた stationary phase におけるマクロライド系抗菌薬 azithromycin の殺菌的作用に対する、緑膿菌の quorum-sensing 機構の関与についても検討を行った。

研究方法

菌株には緑膿菌標準株 PAO1 とその quorum sensing 変異株である JP1 (*lasI* mutant)、JP2 (*lasI* and *rhII* double mutant)、PDO100 (*rhII* mutant) を用いた。

培養には Mueller-Hinton II 液体培地および PTSB (peptone trypticase soy broth) 培地を用いた。

抗菌薬には ciprofloxacin(CPFX)、tobramycin (TOB)、ceftazidime(CAZ)、azithromycin(AZM)を用いた。

殺菌能の評価には Killing assay を用いた。抗菌薬投与後に振盪培養 (37℃、250rpm) を行い8時間後に Mueller-Hinton 寒天培地に塗布し、37℃で一夜

培養後段階希釈を行い、コロニー数を計測した。

研究結果

1 抗菌薬の増殖相別抗緑膿菌活性

Mueller-HintonII 液体培地で発育させた exponential phase および stationary phase の緑膿菌にそれぞれ抗菌薬 (CPFX、TOB、CAZ、AZM) を投与し killing assay を行なった。抗菌薬投与後に菌の増殖を抑える最小濃度を MIC (minimum inhibitory concentration)、菌数を 99.9% 以下に現象させる濃度を MBC (minimum bactericidal concentration) とした。Exponential phase では CPFX、TOB、CAZ の MIC (μg/ml) はそれぞれ 0.25、0.5、1.0、MBC (μg/ml) は 0.5、1.0、4.0 と良好な抗菌活性を示した。AZM は MIC 256、MIB > 512 と全く抗菌活性を示さなかった(図 1)。次に Stationary phase において同様の実験を行なったところ CPFX、TOB の MBC はそれぞれ 0.5、0.8 と良好な抗菌活性を示したものの、CAZ では MBC > 32 とその抗菌活性が大きく低下していた(図 1)。また興味深いことに AZM の stationary phase における MBC は 16 と exponential phase と比較して大きく抗菌活性が増強していた(表 1)。

2 Azithromycin の stationary phase における緑膿菌殺菌作用

緑膿菌は stationary phase において quorum-sensing 機構を用いて外毒素蛋白の産生を活性化する。そこで azithromycin の stationary phase における殺菌作用と quorum-sensing 機構の関わりを明らかにするために quorum-sensing 遺伝子変異株を用いて実験を行なった。PTSB (peptone trypticase soy broth) で発育させた緑膿菌 PAO1 株の quorum-sensing 変異株に AZM を投与し killing assay を行なった。その結果 *Las* quorum-sensing 遺伝子変異を有する株では AZM に対する感受性が大きく低下したが(図 3)、*Rhl* quorum-sensing 遺伝子変異のみを有する株では AZM に対する感受性は低下しなかった(図 4)。

表1 Killing assay による増殖相列 MIC と MBC の比較

	Exponential phase		Stationary phase
	MIC	MBC	MBC
CPFX	0.25	0.5	0.5
TOB	0.5	1.0	8.0
CAZ	1.0	4.0	32<
AZM	256	512<	16

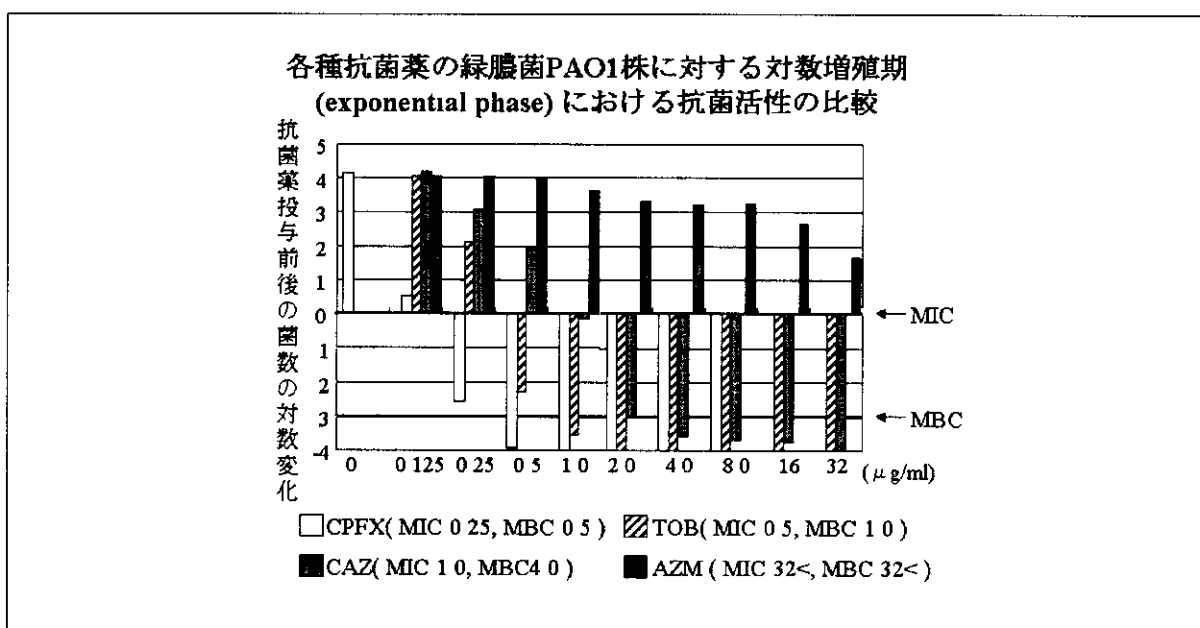


図2

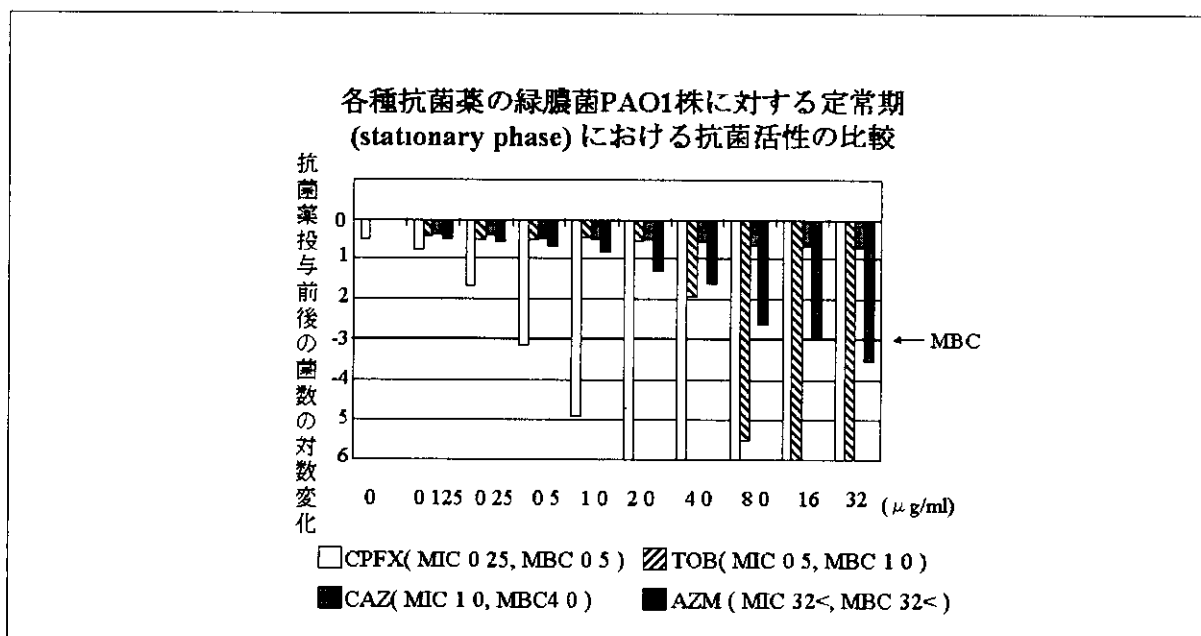


図3