

いう単純な方策を想定したが、実際にはそれよりも丁寧な方策（例、前回のツベルクリン反応成績を加味するとか、曝露の程度を勘案するとか）で、対象を絞り込むことも行われる。それによつては過剰な化学予防は減らすことができるであろうが、同時に感度を下げのおそれもある。また化学予防には規則的な服薬の継続が大きな課題であるが、QFTの使用により診断により確信が持てれば、対象者に対してより強力な指導がしうるという効果も期待できる。

以上を総括すると、接触者健診においてツベルクリン反応検査でスクリーニングされた者に対して QFT を追加することは、とくに感染が非常に大量に起こっていない場合には苦痛の軽減および医療経済的に有用であり、後者の観点から QFT 単価が 5,000 円～10,000 円であればほぼつねに有利な方策である。

文献

- 1) 森 亨(監修)：保健所における結核対策強化の手引き。結核予防会 2003
- 2) Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K et al. Specific Detection of Tuberculosis Infection with an Interferon-gamma Based Assay Using New Antigens. *Am J Respir Crit Care Med.* 170: 59-64, 2004
- 3) 原田登之・森 亨・宍戸眞司・樋口一恵・関谷幸恵：集団感染事例における新しい結核感染診断法 QuantiFERON(r)TB-2G の有効性の検討。結核 79(11): 637-643, 2004
- 4) 船山和志・辻本愛子・森正明ほか：大学での結核集団感染における QuantiFERON-TB 第二世代(r)の有用性の検討。投稿中
- 5) Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, et al. : Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med.*2004;170: 65-69.
- 6) ニチレイ
- 7) 厚生省保健医療局疾病対策課結核・感染症対策室長通知：初感染結核に対する INH の投与について。平成元年 2 月 28 日健医感発第 20 号
- 8) 森 亨：新たな結核対策の技術と展望。結核 79(10): 587-604, 2004
- 9) Jasmer RM, Snyder DC, Saukkonen JJ, et al: Short-course rifampin and pyrazinamide compared with isoniazid for latent tuberculosis infection: A cost-effectiveness analysis based on a multicenter clinical trial. *CID* 38: 363-369, 2004
- 10) Snider DE, Caras GJ, Koplan JP: Preventive therapy with isoniazid: Cost-effectiveness of different durations of therapy. *JAMA* 255: 1579-1583, 1986
- 11) Rose DN, Schlechter CB, Silver AL: The age threshold for isoniazid chemoprophylaxis. *JAMA* 256(19): 2709-2713, 1986
- 12) Salpeter SR, Sanders GD, Salpeter EE, et al: Monitored Isoniazid Prophylaxis for Low-Risk Tuberculin Reactors Older Than 35 Years of Age. A Risk-Benefit and Cost-Effectiveness

Analysis. Ann Intern Med 127: 1051-1061, 1997

- 13) 森 亨：結核対策における意志決定. 結核 68(10): 33-42, 1993.
- 14) 吉山崇：結核の接触者検診によって発見された感染疑いの者に対するヒドラジド予防内服の費用効果分析. 結核 75: 629-642, 2000
- 15) 森 亨：ツベルクリン反応検査. 35 頁, 結核予防会, 1999
- 16) 森 亨：学校での患者発生時のツベルクリン反応検査の成績. 結核の統計 1984. 11 頁, 結核予防会, 1984
- 17) 豊田誠・森岡茂治：高知市中学校における結核集団感染. 感染要因と化学予防の効果に関する検討. 結核 76: 625-634, 2001
- 18) 森 亨：結核. 呼吸器科 6(1): 16-21, 2004
- 19) 千葉保之・所沢政夫：結核初感染の臨床的研究. 保健同人社. 1948
- 20) Ferebee SH: Controlled chemoprophylaxis trials in tuberculosis. A general review. Adv Tuberc Res 17: 28-106, 1970

厚生労働科学研究補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

薬剤耐性結核の迅速診断法の開発に関する研究

分担研究者 切替 照雄 国立国際医療センター研究所 感染症制御研究部長

研究要旨

結核の薬剤耐性機構は比較的限定したゲノム上の遺伝子内変異に基づくことが知られており、これらの変異の有無を同定することで耐性菌の診断可能である。本研究では、以下の抗結核薬の耐性に関与する遺伝子、*rpoB* (リファンピシン)、*katG* と *inhA* (イソニアジド)、*pncA* (ピラジナミド)、*embB* (エタンブトール)、*rpsL* と *rrs* (アミノグリコシド)、及び *gyrA* (フルオロキノロン) の耐性に関与する領域すべてを一回の操作で PCR 増幅しその塩基配列を決定するダイレクトシーケンス法を開発し、本年度は、その有効性を、臨床分離株 145 株を用いて検討した。また、上記ダイレクトシーケンス法で用いた耐性遺伝子 PCR 増幅法とその知見に基づいて、ピラジナミド耐性遺伝子検出のための簡便法(ラインプローブ法)をニプロ株式会社と共同で開発した。本年度は試作品が完成した。

A. 研究目的

多剤耐性結核菌の出現は、結核医療の中でも最も深刻な問題の一つである。多剤耐性結核は患者の治療を遅延させるばかりでなく、院内感染の原因ともなり、迅速な診断法の開発と新たな作用機序を持つ抗結核薬の開発が急務となっている。本研究では、多剤耐性結核の診断法の開発を行なう。幸い結核菌は全ゲノム配列が明らかにされており、またその薬剤耐性機構は比較的限定した遺伝子の変異であることが知られている。従って、多剤耐性遺伝子の迅速診断法の開発は大変有望な方法であると期待される。当センター病院とも共同で臨床応用を進め、本診断法の有用性を実証する。具体的には、ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性結核の迅速診断法の開発を中心に研究を推進した。また、上記ダイレクトシーケンス法で用いた耐性遺伝子 PCR 増幅法とその知見に基づいて、ピラジナミド耐性遺伝子検出のための簡便法(ラインプローブ法)をニプロ株式会社と共同で開発を

推進した。本年度は試作品が完成した。

B. 研究方法

国立国際医療センターなど医療施設から分離された結核菌または患者喀痰を前処理し DNA 抽出した。菌体由来 DNA の抽出には CTAB 法を喀痰由来には Chelex™ 100 resin を使用した。

(1)PCR : 8 本の PCR チューブを用いて、抽出した結核菌ゲノム DNA を鋳型とし、PCR による薬剤耐性遺伝子を増幅した。組成は以下の通りである。鋳型 DNA 1.0 μ l、Z-Taq ポリメラーゼ 1.25U (宝バイオ)、dNTP 200 μ l (宝バイオ)、耐性遺伝子に特異な 8 組のプライマーペアをそれぞれ 200nM ずつ、さらに 10 \times Z Taq Buffer 5 μ l (宝バイオ)を加え、滅菌蒸留水にて全量を 50 μ l とした。これらを geneAmp PCR SYSTEM 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、全て同じコンディションで増幅した。用いたプライマーは、Rifampicin 耐性遺伝子(*rpoB*)、Isoniazide 耐性遺伝子(*katG*)

及び *mab-inhA*)、Ethambutol 耐性遺伝子 (*embB*)、Pyrazinamide 耐性遺伝子 (*pncA*)、Kanamycin 耐性遺伝子 (*rpsL*)、Streptomycin 耐性遺伝子 (*rrs*)、Fluoroquinolones 耐性遺伝子 (*gyrA*) を増幅するように設計した。PCR 産物はそれぞれ MicroSpin™ Columns (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて精製した。

(2)塩基配列の決定：シーケンス反応は、BigDye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を用いたダイターミネーター法にて行った。組成は以下の通りである。プレミックス[5× Sequencing Buffer 4 μl、dNTP mix 1 μl、DyeDeoxy Terminators 0.5 μl、AmpliTaq,FS 4 μl；合計 9.5 μl (Applied Biosystems)]、それぞれ 1 μl の PCR 産物、塩基配列決定用に設計したプライマー 3.2 pmol を加え、滅菌蒸留水にて全量を 20 μl とした。

増幅反応後、未反応 Dye 及び過剰プライマーの除去には、Centri-sep spin columns (Applied Biosystems) を用いた。次いで、これらを遠心・乾燥させ、さらに loading buffer 15 μl を加え、95°C で 2 分加熱後、急冷し、96 ウェルプレートに入れ、16 本キャピラリー式 ABI 3100 オートシーケンサーを用いて泳動した。

(3)塩基配列の解析：塩基配列の解析及び編集は ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer software を用い、これらを既知の薬剤感受性 *M.tuberculosis* H37Rv 株の塩基配列と比較することにより、変異の有無を解析した。

(倫理面への配慮)

研究対象は患者情報と完全に切り離された臨床分離株を使用する。

C. 研究結果

主要抗結核剤 4 剤を含む 7 剤の耐性遺伝子に特異的なプライマーを用いて特定領域を PCR 増幅し、シーケンサーで塩基配列を決定し、変異の有無を解析した (図 1)。その結果を表 1 に示す。同時に従来薬剤

感受性試験も実施した。*pncA* 遺伝子内変異保有株については、ピラジナミダーゼ活性の有無を検査した。調べた臨床分離株 145 株中 73 株は全ての薬剤に感受性であったが、これらの株の中にもアミノ酸置換を伴う変異を有する株が存在したが、その変異の多くが、既知の多型であった。INH 耐性株 34 株中 32 株 (94.1%)、RFP 耐性 24 株中 24 株 (100%)、PZA 耐性株 19 株中全て (100%)、EB 耐性株 18 株中 16 株 (88.9%)、SM 耐性株 21 中 18 株 (85.7%)、LVFX 耐性株 11 株中全てに耐性遺伝子に変異が認められた。また、*pncA* 遺伝子内変異保有株全てが、ピラジナミダーゼ活性を消失していた。なお、RFP 耐性株で 2 つの、INH 耐性株で 8 つの、PZA 耐性株で 6 つの、SM 耐性株で 2 つのこれまでに報告のない変異を同定した。薬剤耐性との詳細な関連を決定すべく、変異を含む遺伝子のクローニングを行った。

D. 考察

本研究では、以下の抗結核薬の耐性に関与する遺伝子、*rpoB* (リファンピシン)、*katG* と *inhA* (イソニアジド)、*pncA* (ピラジナミド)、*embB* (エタンブトール)、*rpsL* と *rrs* (アミノグリコシド)、及び *gyrA* (フルオロキノロン) の耐性に関与する領域すべてを一回の操作で PCR 増幅しその塩基配列を決定するダイレクトシーケンス法を開発し、臨床分離株 145 株を用いた検討をした。その結果、一回の操作で主要抗結核剤 4 剤を含む 7 剤の耐性遺伝子全てを PCR 増幅することが可能となり、しかも 6.5 時間で広範な耐性関連領域の塩基配列を速やかに増幅し、解析することが出来るようになった。患者喀痰からの直接診断も可能とであった。しかし、本方法の短所として、必要なシーケンサーが高価であり、検査室への導入が難しいことがあげられる。そこで、本技術の最も重要な発見である耐性遺伝子 PCR 増幅法と、ハイブリダイゼーション (ラインプローブ法) と組み合わせたピラジナミ

ド耐性に関する迅速診断法を開発した (図2)。開発製品の実施例のいくつかを示した。(図3及び4)臨床試験を実施しゆきたい。RFP 耐性株で2つの、INH 耐性株で8つの、PZA 耐性株で6つの、SM 耐性株で2つのこれまで報告のない新規の変異を同定した。pncA 内に新規の変異を保有する株全てがピラジナミダーゼを活性消失していることから、これら新規変異がPZA 耐性に関与することが明らかになった。また、最も臨床上、重宝されている抗結核剤であるイソニアジド耐性に関連する遺伝子katGをクローニングし、katG-deficient E.coli 内で発現させ、KatG 蛋白の酵素学的特徴を比較した結果、いくつかの KatG 変異体のカララーゼ機能が著しく低下していることが明らかになった。この特徴は、INH 耐性菌に認められる現象であることが明らかになっており、新規の遺伝子内変異と薬剤耐性との関連があきらかになった。本法が新たな変異を同定する上でも有効であり、今後、さらに薬剤耐性に関与する変異の同定なされるものと考ええる。

E. 結論

本研究では、ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性結核の迅速診断法の開発を推進した。これらの結果を進展させ、ピラジナミド耐性遺伝子検出のための簡便法(ラインプローブ法)をニプロ株式会社と共同で開発を推進した。本年度は試作品が完成した。

F. 健康危惧情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Otsuka, Y., Fujino, T., Mori, N., Sekiguchi, J., Toyota, E., Saruta, K., Kikuchi, Y., Sasaki, Y., Ajisawa, A., Otsuka, Y., Nagai, H., Takahara, M., Saka, H., Shirasaka, T.,

Yamashita, Y., Kiyosuke, M., Koga, H., Oka, S., Kimura, S., Mori, T., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Survey of Human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive patients with mycobacterial infection in Japan. *J. Infect.*, in press.

- 2) Toyota, E., Sekiguchi, J., Shimizu, H., Fujino, T., Otsuka, Y., Yoshikura, H., Kuratsuji, T., Kirikae, T., Kudo, K.: Further acquisition of drug-resistance in multidrug-resistant tuberculosis during chemotherapy. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57:292-294, 2004.
- 3) Otsuka, Y., Hanaki, K., Zhao, J., Ohtsuki, R., Toyooka, K., Yoshikura, H., Kuratsuji, T., Yamamoto, K., Kirikae T.: Detection of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin with quantum dot immuno-conjugates. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57:183-184, 2004.
- 4) Otsuka, Y., Parniewski, P., Zwolska, Z., Kai, M., Fujino, T., Kirikae, F., Toyota, E., Kudo, K., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Characterization of a trinucleotide repeat sequence (CGG)₅ and its potential use in restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis*: *J. Clin. Microbiol.*, 42:3538-3548, 2004.
- 5) Sekiguchi, J., Toyota, E., Ohtsuki, R., Kirikae, F., Otsuka, Y., Fujino, T., Kobayashi, I., Zwolska, Z., Kudo, K., Kuratsuji, T., and Kirikae, T.: Rapid Genotypic Detection of Multi-Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Sequencing. (*J. Clin. Microbiol.*, submitted)
- 6) 切替照雄: 肺結核の pharmacogenomics. *The lung perspectives*, 12: 274-277.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「ピラジナミド耐性菌検出用プローブセッ

ト」 出願人：国立国際医療センター総長
及びニプロ株式会社、発明者：切替照雄（国
立国際医療センター）、関口純一郎（国立国
際医療センター）、中村 友彦（ニプロ株式
会社）、末竹 寿紀（ニプロ株式会社）。特
願 2004-376314, 出願日：2004 年 12 月 27 日。

「新規変異を含む pncA 遺伝子」 出願人：
国立国際医療センター総長及びニプロ株式
会社、発明者：切替照雄（国立国際医療セ
ンター）、関口純一郎（国立国際医療センタ
ー）、中村 友彦（ニプロ株式会社）、末竹
寿紀（ニプロ株式会社）。特願 2004-376669,
出願日：2004 年 12 月 27 日。

2. 実用新案登録 なし

表 1. ダイレクトシーケンスによる薬剤耐性遺伝子診断の結果

Results of drug susceptibility testing ^a		A mutation(s) within genes associated with drug-resistance			Sensitivity ^b (%)	Specificity ^c (%)	PPV ^d (%)	NPV ^e (%)
		Presence	Absence	(Target genes)				
RFP	R	24	0	<i>rpoB</i>	100	100	100	100
	S	0	121					
INH	R	32	2	<i>katG^f</i> or <i>mabA-inhA</i>	94.1	96.4	88.9	98.2
	S	4	107					
EB	R	16	2	<i>embB^g</i>	88.9	99.2	94.1	98.5
	S	1	126					
PZA	R	19	0	<i>pncA</i>	100	100	100	100
	S	0	107					
SM	R	18	3	<i>rpsL</i> or <i>rrs</i>	85.7	100	100	97.6
	S	0	124					
OFLX	R	11	0	<i>gyrA^h</i>	100	100	100	100
	S	0	113					

^a Drug susceptibility for anti-tuberculosis agnts except for PZA was determined by the agar proportion method according to NCCLS' guideline, and that for PZA was detrmned by Pzase activity.

^b The sensitivity: No. of drug-resistant isolates with mutations / (No. of drug-resistant isolates with mutations + No. of drug-resistant isolates without mutations).

^c The specificity: No. of drug-sensitive isolates without mutations / (No. of drug-sensitive isolates with mutations + No. of drug-sensitive isolates without mutations).

^d PPV, Positive prdictive value: No. of drug-resistant isolates with mutations / (No. of drug-resistant isolates with mutations + No. of drug-sensitive isolates with mutations).

^e NPV, Negative prdictive value: No. of drug-sensitive isolates without mutations / (No. of drug-resistant isolates without mutations + No. of drug-sensitive isolates without mutations).

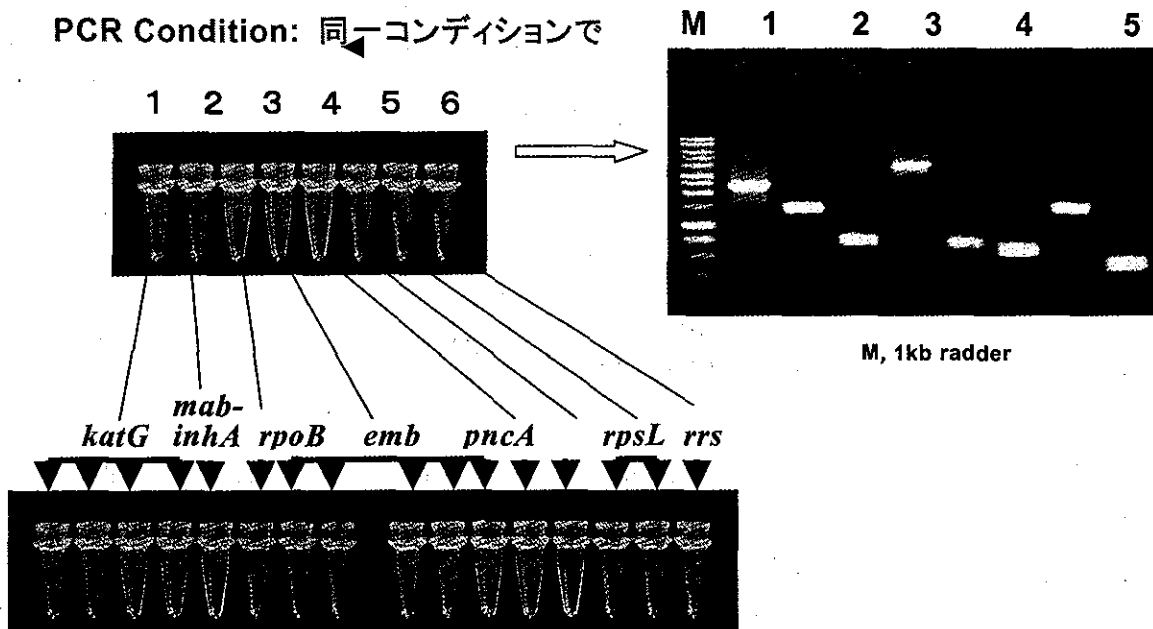
^f Isolates with a mutation at 378A were categorized into those without a mutation, because these isolates are known not to be associated phenotypically with EMB resistance.

^g Isolates with a mutation at 463L were categorized into those without a mutation, because these isolates are known not to be associated phenotypically with INH resistance.

^h Isolates with a mutation at E21Q and S95T were categorized into those without a mutation, because these isolates are known not to be associated phenotypically with FQs resistance.

PCR ターゲット遺伝子の増幅:

PCR Condition: 同一コンディションで



Cycle sequencing with ABI 3100 sequencer:

図 1. ダイレクトシーケンス法による結菌薬剤耐性遺伝子変異の検出

結核の薬剤耐性に関与する遺伝子の領域すべてを一回の操作で PCR 増幅しその塩基配列を決定する方法を開発した。具体的には、主要抗結核剤 4 剤を含む 7 剤の耐性遺伝子に特異的なプライマーを用いて特定領域を PCR 増幅し、シーケンサーで塩基配列を決定し、変異の有無を解析した。{「結核菌に含まれる薬剤耐性遺伝子を検出する方法、PCR 用プライマーセット、塩基配列決定用プライマーセット、及び薬剤耐性結核の診断用試薬キット」切替照雄、関口純一朗、大槻隆司。出願番号：Y2003-005370。出願日：2003 年 1 月 14 日。

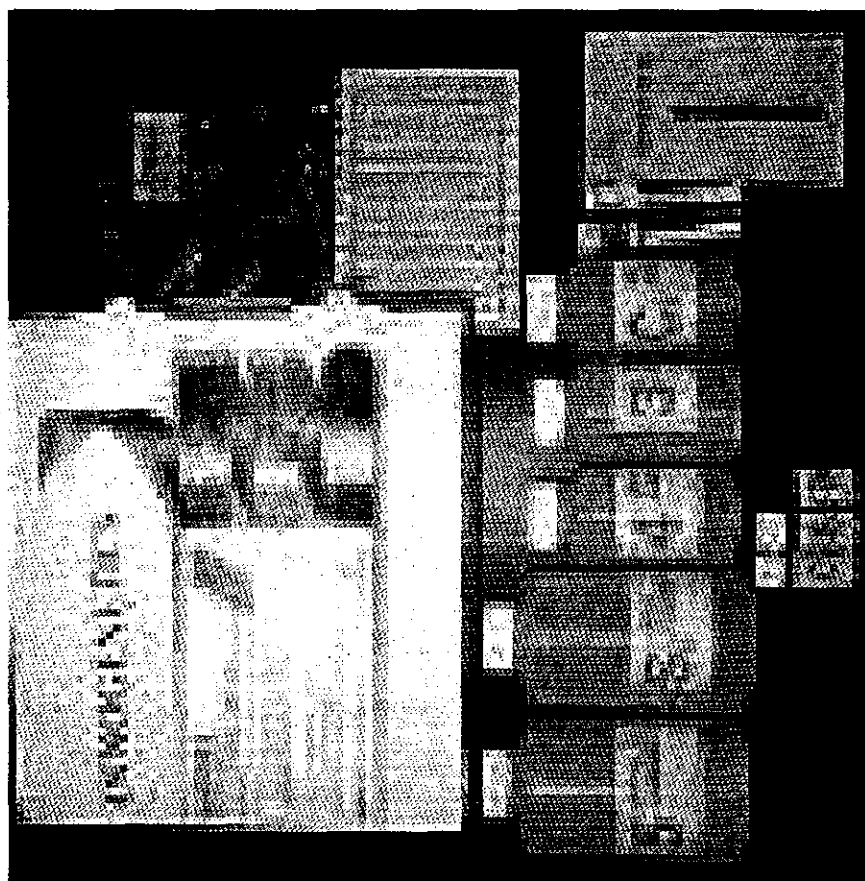


図 2. 結核菌の薬剤耐性関連変異迅速検出キット(NIPRO 社との共同開発製品)

本キットは数種類のプローブを固相化したストリップに、結核菌より抽出・PCR増幅されたビオチン化DNAをハイブリダイズさせ、*pncA*遺伝子内の変異を検出するキットである。酵素反応により検体が結合したプローブが発色する。{「ピラジナミド耐性菌検出用プローブセット」 出願人：国立国際医療センター総長及びニプロ株式会社、発明者：切替照雄（国立国際医療センター）、関口純一朗（国立国際医療センター）、中村 友彦（ニプロ株式会社）、末竹 寿紀（ニプロ株式会社）。特願2004-376314, 出願日：2004年12月27日}及び{「新規変異を含む*pncA*遺伝子」 出願人：国立国際医療センター総長及びニプロ株式会社、発明者：切替照雄（国立国際医療センター）、関口純一朗（国立国際医療センター）、中村 友彦（ニプロ株式会社）、末竹 寿紀（ニプロ株式会社）。特願2004-376669, 出願日：2004年12月27日。}

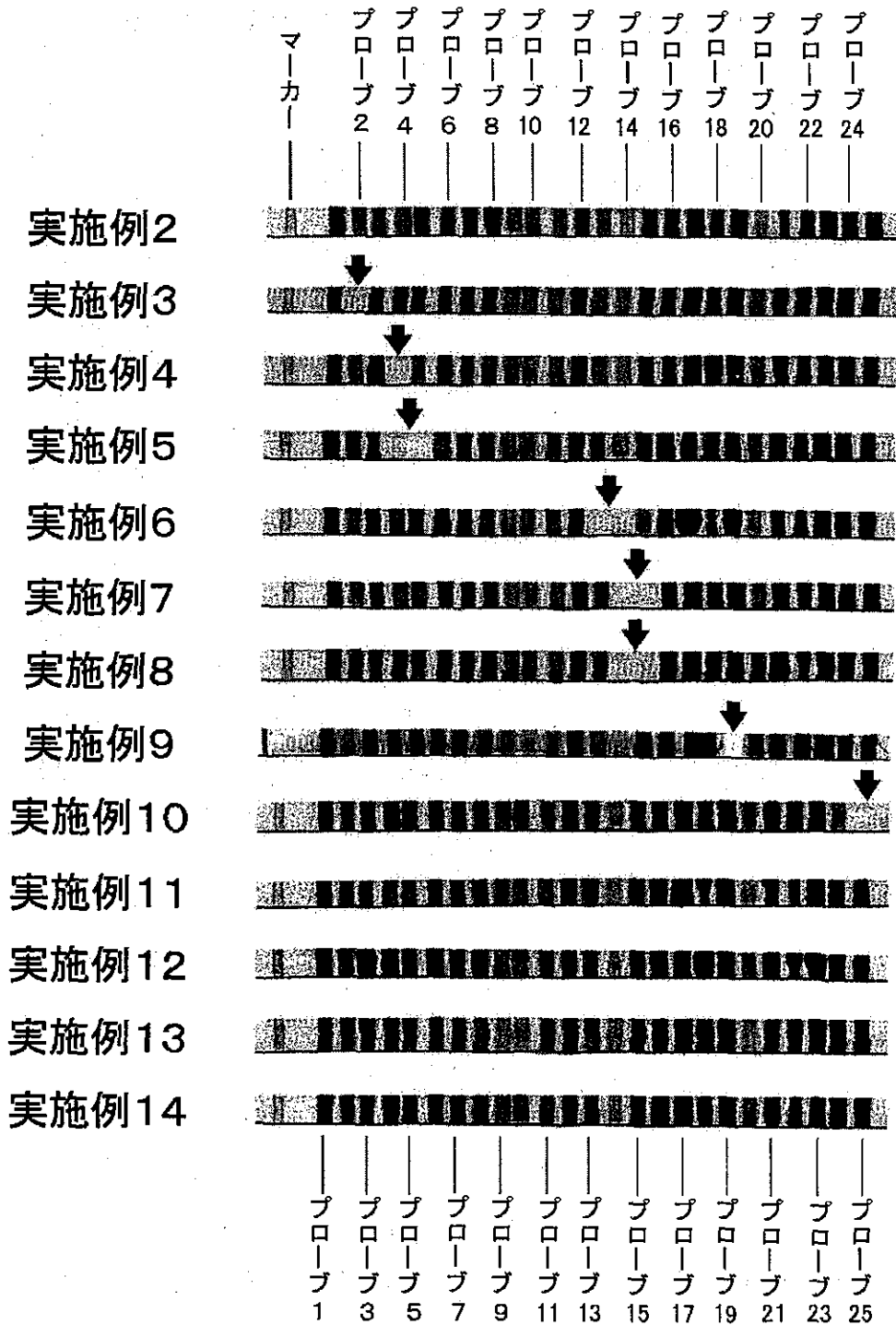


図3. 結核菌の薬剤耐性関連変異迅速検出キット(NIPRO社との共同開発製品)の実
 施例1。PZA耐性菌の *pncA* 遺伝子の変異部位に相当するプローブは発色しない。

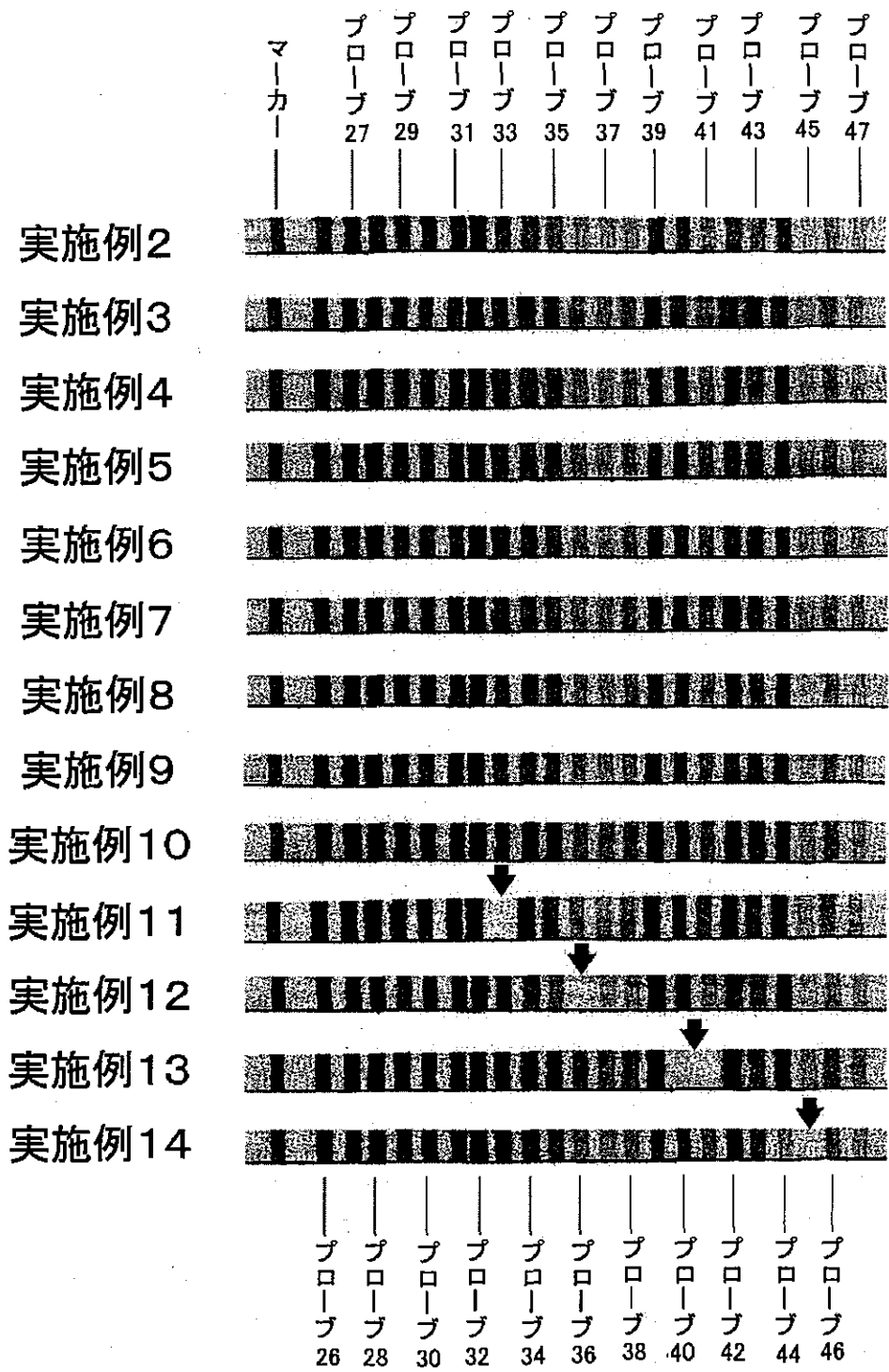


図 4. 結核菌の薬剤耐性関連変異迅速検出キット(NIPRO 社との共同開発製品) の実施例 1。PZA 耐性菌の *pncA* 遺伝子の変異部位に相当するプローブは発色しない。

厚生労働科学研究補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

多剤耐性結核に対する新たな治療方式の開発に関する研究

分担研究者 坂谷 光則 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 院長

研究要旨

多剤耐性結核患者(国立病院機構政策医療呼吸器ネットワークを利用した)リンパ球を用いた新しい技術 SNPs 解析法による多剤耐性結核の診断法を開発するとともに、新しい治療法を開発するプロジェクトを理化学研究所と共同研究ですでに開始した。(すでに非定型抗酸菌症の project で実績あり)すでに7共同研究施設で各々の病院で倫理委員会の許可を受けた後、多剤耐性結核患者の血清 48 例を集めた。目標症例 多剤耐性結核患者 100 例~200 例、薬剤感受性結核患者 100 例~200 例。

理化学研究所(京大教授)白川太郎博士との共同研究で多剤耐性結核患者 末梢血 48 例を解析した。健常人対照者 270 例と薬剤感受性結核患者 270 例と □候補遺伝子解析及び □薬剤遺伝子解析を行った。まず、細胞内寄生性病原体への選択的易感染性に関与する“Mendelian susceptibility to mycobacterial disease(MSMD)”遺伝子群の候補遺伝子解析を行った。その結果、□多剤耐性結核(MDR-TB)患者では NRAMP1 の SNPs パターン(Asn 543 Asp)に違いが認められ、MDR-TB 患者では菌の細胞内処理の違いが関係する可能性が示唆された。 □全ゲノムにおける薬剤感受性については 2000 個の薬剤遺伝子の中のチトクローム P450 系の遺伝子 700 個について解析した。CPY1A1 遺伝子で可能性が得られた。ただサンプル数が種々の統計解析できうるには、もっとたくさんのサンプルが必要である。

(政策医療呼吸器ネットワークを利用した)多剤耐性結核と T 細胞免疫機能解析(結核菌殺傷蛋白等)による新しい多剤耐性結核予防法及び治療法の開発。すでに、結核菌殺傷タンパク granulysin の定量的アッセイの系を確立した。さらにキラーT 細胞から産生される killer secretory37 (KSP37)タンパクの定量アッセイの系も作製中である。Transgenic マウスも作製した。これを用い結核菌に対するキラー活性が示唆された。

政策医療呼吸器ネットワークを利用した、種々の多剤耐性結核菌によるマクロファージ機能調節機構(SR や TLR 等の発現調節)の解明とこの作用機序解明による新しい診断法、治療法の開発→多剤耐性結核菌を岡田に送付 すでに多剤耐性結核菌では TLR 4 の認識からエスケープする可能性を初めて明らかにした。

MDR-TB 菌の RFLP 解析により、多剤耐性結核菌を多くの人に感染させるスーパープレッダー多剤耐性結核患者の存在を発見した。さらに同様の事例が見出された。すなわち MDR-TB 菌の RFLP、spoligotyping より初発患者から感染・発病した可能性が示された。

Toll-like レセプター(TLR)の免疫監視機構からスーパープレッダーMDR-TB 菌がエスケープする免疫機構が示唆された。一方、MDR-TB の新しい迅速診断法として、結核菌内の 16 多型配列部位を用いた VNTR を用いた迅速 genotyping を開発し、大阪における結核菌解析に必要な十分なクラスター抽出能を持つことを明らかにした。さらに我々の今回の

VNTR の研究により大阪府内において同一の SM・INH 同時耐性菌の複数感染が起こっており、しかもその中の3名が治療の失敗により多剤耐性化していることが判明した。また、16VNTR 解析にて感染力の強い、三種類の系統的に近い菌株のクラスター形成が示された。さらに、約 1600 の結核菌株の RFLP、スポリゴタイピング、VNTR を行い、クラスター形成率が同等である事より MDR-TB 菌が接触者へ感染し、発症する可能性があることを初めて示した。また spoligotyping の解析により、従来感染力が強いといわれている Beijing family の占有率は多剤耐性結核と全剤感受性と大きく変わらないことが示されたことより多剤耐性結核の感染性が示唆された。治療法の無い多剤耐性結核に活性化自己 T 細胞輸注療法は一定の可能性が認められた。九州地区の平成 10～16 年の多剤耐性結核 50 症例においては、糖尿病・肺炎合併が多く認められ、治療法としては ①手術症例、②空洞のない症例に対する抗結核剤の 4 剤治療であることを解明した。

A. 研究目的

多剤耐性結核の新治療方式の開発：これまで明確な成果の上がない免疫療法や姑息的化学療法に一大進歩を印する可能性がある。すなわち、結核や抗酸菌症分野では分担研究者が理研などとの共同でこれまで明確な成果の上がない免疫療法に一大進歩を印する可能性がある。また分担研究者の病院は呼吸器疾患の国療ネットワークの全国中核病院として、全国規模で症例にアクセスできる立場にある。したがって、①多剤耐性結核患者（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）リンパ球を用いた新しい技術 SNPs 解析法による多剤耐性結核の診断法を開発するとともに、新しい治療法を開発する。理化学研究所との共同研究で行う（すでに非定型抗酸菌症の project で実績あり）。②（政策医療呼吸器ネットワークを利用した）糖尿病合併に伴う多剤耐性結核患者の血糖調節ホルモン・サイトカインの測定と T 細胞免疫機能解析（結核菌殺傷蛋白等）による新しい多剤耐性結核予防法及び治療法の開発、③政策医療呼吸器ネットワークを利用した、種々の多剤耐性結核菌によるマクロファージ機能調節機構（SR や TLR 等の発現調節）の解明とこの作用機序解明による新しい診断法、治療法の開発、④政策医療呼吸器ネットワークを利用した多剤耐性結核治療における新しい治療薬（IFN- γ 吸入療

法や新規化学療法剤）。⑤政策医療呼吸器ネットワークを利用した多種の多剤耐性結核菌の RFLP 解析等による多剤耐性結核菌院内感染・集団感染の予防・診断法の開発の解明を目的とした。

〔研究背景〕

Common disease あるいは多因性疾患と呼ばれる糖尿病、虚血性心疾患、高血圧といった疾患の病態形成においては遺伝要因が重要であることが広く認識されている。結核などの感染症も例外ではなく、その発症には宿主側の環境衛生・生活栄養状態といった要因に加え、免疫反応に影響をもたらす遺伝要因が深く関わるのがこれまでに強く示されてきた。特筆すべきは、近年、非定型抗酸菌や BCG による致死性の重症感染をきたした家系や小児患者群から、インターロイキン-12 (IL-12) およびインターフェロン- γ (IFN- γ) といった TH1 免疫反応の中心を担うサイトカイン関連遺伝子の欠損・変異が相次いで見出された点である。これら一連の報告により、著しい TH1 活性の低下が抗酸菌症をはじめとした細胞内寄生性病原体への選択的易感染性をきたすことが明らかとなり、“Mendelian susceptibility to mycobacterial disease” (MSMD; MIM 209950) という新たな疾患概念が確立されるに至った (Casanova and Abel. Annu Rev Immunol, 2002)。これらの知見をふまえ、

我々は独自の多型解析の結果、IL-12受容体β1鎖(IL12RB1)に3カ所のミスセンス多型があることを見出し、そのリスクアレルがIL-12(およびIL-23)の受容体に対する反応性を低下させ、最終的にIFN-γを介したTH1免疫反応が減弱することで結核感染への感受性に寄与していることを報告した(Akahoshi et al. Hum Genet, 2003)。また、その後の我々の行った関連解析では、他のTH1反応に関連した候補遺伝子については結核感染との相関は認められなかった(Akahoshi et al. Hum Genet, 2004)。

一方で、ヒトやマウスのゲノム情報の整備に伴い、これまで様々な遺伝解析手法を駆使して抗酸菌感染症の感受性遺伝子(座)の同定が試みられてきた。代表的に用いられてきたのは、3つの手法、すなわち(1)動物モデルを使った解析、(2)候補遺伝子アプローチ、(3)全ゲノム連鎖解析、である。マウスの解析から同定された例としては、*Nramp1*がよく知られており、その後の患者対照研究でも、ヒトにおける*NRAMP1*の遺伝子多型と結核との強い相関が確認されている。ノックアウトマウスの解析からも宿主の感染防御に関わる遺伝要因の研究が進められており、例えばIL-12欠損マウスはBCGや結核感染により感受性が高いことが知られている。関連解析を用いた研究からは*NRAMP1*以外の有力な候補遺伝子として、MHC class II、vitamin D receptor (VDR)、mannose binding lectin (MBL)、IL1RA/IL1B、IL12RB1などが報告されている(表3)。また全ゲノム連鎖解析によって、主として2q35(*NRAMP1*領域)、15q11-13、Xq27の3領域が結核と連鎖のある遺伝子座として同定されている(Bellamy et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2000; Greenwood et al. Am J Hum Genet, 2000; Alessandra et al. Hum Mol Genet, 2002)。しかし、これまでに見出されたこれらの候補遺伝子は結核感染における宿主側の全遺伝要因の一部を説明しているにすぎず今後さらなる結核感受性遺伝子同定へ向

けての幅広い研究が必要である。

以上のような状況を踏まえて、結核患者において薬剤耐性現象が生じる理由として、①結核菌に対する感受性あるいは耐性が異なると考える、あるいは②結核菌への感受性は同じであるが、単に薬剤への感受性が異なる。

以上の2つが考えられる。この2つの仮説のどちらが正しいかを解決するには、①これまでの感受性遺伝子群について解析を行なう、あるいは②薬剤感受性については、全ゲノムで解析を行なう

以上2つの作業を行なうことで解決が可能であると考えられる。

B. 研究方法

1. 多剤耐性結核性菌症で、既存の肺病変の有無は問わない。原則、説明と同意の可能な症例を対象とするが、本人に説明と同意が不十分であると客観的に判断される場合、本人とともに代諾者(保護者、家族)の同意を得る。呼吸器ネットワーク関連施設等で試料提供施設を追加していくことにより、最終的に100例~200例の集積を目標とした。説明文書、同意文書を用いて、インフォームド・コンセントを取得し、EDTA採血にて7ml採取し、理化学研究所にて7mlを1本送りDNA、血漿、必要に応じリンパ球を保存した。保存されたDNAで遺伝子解析を行い、血漿で蛋白等の発現を確認する。理化学研究所での遺伝子解析は主として、肺の感染防御、免疫応答に関係する遺伝子群について、その遺伝子配列の個人差(遺伝子多型)を明らかにして、患者集団と健常集団とで比較検討し、それら遺伝子多型が疾患発症や疾患の難治性に関わる度合いを明らかにする(候補遺伝子アプローチ)。100例の症例の集積が達成された場合、候補遺伝子アプローチに加え、全ゲノム上に分布するSNPないし多型性を有するマイクロサテライトを遺伝マーカーとして(3万マイクロサテライトマーカー)、統

計学的に疾患群に関係の深い遺伝子領域を全染色体上から網羅的かつ段階的に絞り込む、全ゲノムアプローチを展開し、最終的に疾患と関連する遺伝子の多型を見いだす。本研究の遺伝子解析の対照となる健常人については、理化学研究所にてすでに同意のもとに得られた血液試料から得られ、連結不可能匿名化された検体の DNA を用いる。新たに対照を追加する場合は、文書による同意を得た後、血液試料を集積した。

2. 理化学研究所及び京都大学に保存されている、正常対照者(n=270)、結核患者で非薬剤耐性群(n=270)、及び薬剤耐性結核患者(n=48)について、解析を行なった。正常対照は、日赤和歌山医療センターの検診により、結核感染を否定された症例を用いた。結核患者サンプルは、和歌山市内にある結核専門病院である神田病院より、初発の結核患者サンプルを用いて行った。喀痰検査で陽性と診断され、3-4剤投与で薬剤耐性の見られなかった患者を対照とした。薬剤結核耐性の患者サンプルは国立病院機構近畿中央病院よりのサンプルを用いた。

- ① 候補遺伝子解析では、結核患者群と薬剤耐性群の比較を行った
- ② 薬剤耐性遺伝子解析では、正常対照群と薬剤耐性群との比較を行い、関連の見られた遺伝子については結核患者群と比較することとした。

統計解析は、SPSS 統計ソフトを用いて行った。

3. granulysin の測定は抗 granulysin 抗体(ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体)を用いて行った。Ksp37 測定も Ksp37 抗体を用いて解析した。

4. TLR2(-/-)マウス、TLR4(-/-)マウス及び MyD88(-/-)、SR (-/-)マウス、Lox(-/-)マウス等を多剤耐性結核菌を用いて解析した。

5. 1991年から1997年までの結核患者2331例中多剤耐性結核患者108例及び、これらの多剤耐性結核菌を用いて薬剤感受性を解析した。

6. 多剤耐性結核に対する活性化自己T細胞を 1×10^{10} 個、6回投与して治療を試みた。

7. 多剤耐性結核菌において IS6110 RFLP にてクラスター形成している菌ならびに、感受性菌においてクラスター形成をしている菌を中心に VNTR 解析を行った。VNTR は、ETR プライマーならびに MIRU プライマーの計 16 プライマーを用いて PCR 反応を行った。PCR 生成物は 2%アガロースゲルにて電気泳動を行い検出したバンド長から反復配列を決定した。大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターでは 2001 年から多剤耐性結核菌株約 140 株を含む培養陽性 1300 株以上の結核菌株の RFLP タイピングを行った。

8. 再感染を含む多剤耐性結核の院内集団感染事例の多剤耐性結核菌の RFLP 解析を行った。

C. 研究成果

分担研究テーマは「多剤耐性結核に対する新しい治療方式の開発に関する研究：国立病院・療養所呼吸器ネットワークを利用した患者宿主要因の SNPs 解析、T 細胞免疫機能解析、マクロファージ機能解析とこれを利用した治療戦略の開発」であり

1. 多剤耐性結核患者(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)リンパ球を用いた新しい技術 SNPs 解析法による多剤耐性結核の診断法を開発するとともに、新しい治療法を開発するプロジェクトを理化学研究所と共同研究ですでに開始した。(すでに非定型抗酸菌症の project で実績あり)すでに国立病院機構東京病院 四元秀毅院長、大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 露口泉夫院長、国立病院機構福岡東病院 原信之院長、国立病院機構愛媛病院 西村一孝副院長、国立病院機構山陽病院 中田大志院長、国立病院機構東埼玉病院 川城丈夫院長研究協力者とした呼吸器ネットワークを作製した(表1)。

さらに、これらの拠点施設を中心に全国 54 政策医療呼吸器ネットワーク、特に国立病院機構兵庫中央病院（黒須功医師）国立病院機構奈良病院（田村猛夏副院長）国立病院機構和歌山病院（駿田直俊医師）国立病院機構南京都病院（佐藤敦夫医師）につなげた（図 1）。共同研究で当院が作製した倫理委員会に提出した審査申請書を雛型として各々の病院で倫理委員会の許可を受けた（別添 1）。その後多剤耐性結核患者の血清の送付（岡田を通じて白川太郎教授に送付）を開始した（表 2）。目標症例 多剤耐性結核患者 100 例～200 例。すでに前述の 8 病院の研究施設で倫理委員会に提出中であり、当国立病院機構近畿中央病院及び国立病院機構愛媛病院倫理委員会で承認された。リンパ球検体（多剤耐性結核患者末梢血 7ml）約 48 例の検体を白川教授に送付した。

2. 京都大学大学院医学研究科：健康増進行動学、白川太郎教授、理化学研究所遺伝子多型センター、赤星光輝博士との共同研究。

- ① 候補遺伝子解析：結核感受性遺伝子群では、IL-10(1), IL-1RA(2), NRAMP1(4), IL-8(1), IL-12(1), IL-12RB1(2), MBL(2), SP(1), VDR(2), IFNG(1), P2X7(1), 11 遺伝子における 18 SNPs について解析を行なった。（ ）内は調査した SNPs の数を示す。NRAMP1 の Asn543Asp の変異パターンに違いが見られた(odds ratio 1.32, CI 1.02-4.32, p=0.03)。その他の遺伝子における SNP 頻度の差異を認めていない。（表 4）
- ② 薬剤遺伝子解析：2000 個に及ぶ登録された薬剤遺伝子データベースから、チトクローム P450 系の遺伝子 700 個について解析を行なっており、そのうち 286 個について解析を終了した。その結果、CPY1A1 遺伝子で可能性があるものが見出されている(最小 p 値 p=0.01)が、サンプル数が少ないため、multiple な p 値

補正に耐えうる evidence を得るにいたっていない。

3. すでに、結核菌殺傷タンパク granulysin の定量的アッセイの系を確立した。さらにキラー T 細胞から産生される killer serectory37 (KSP37)タンパクの定量アッセイの系も確立した。（表 5）

その結果、多剤耐性結核患者では granulysin 蛋白発現の低下が示唆された。さらにこれらの Tg マウスを作製した。その結果生体内結核菌数の低下が認められた。

4. 政策医療呼吸器ネットワークを利用した、種々の多剤耐性結核菌によるマクロファージ機能調節機構 [Scavenger Receptor (SR)や TLR 等の発現調節] の解明とこの作用機序解明による新しい診断法、治療法の開発 → 多剤耐性結核菌を岡田に送付すでに多剤耐性結核菌では TLR の認識からエスケープする可能性を初めて明らかにした。（表 6）

SR については SR(-/-)マウス、LOX (-/-)マウスとヒト多剤耐性結核菌を用いて解析中である。

5. MDR-TB 菌の RFLP 解析により、多剤耐性結核菌を多くの人に感染させるスーパープレッダー多剤耐性結核患者の存在を発見した。まず当院で経験した再感染を含む多剤耐性結核の院内集団感染事例の概要を述べる。初発患者は 56 歳男性の初回多剤耐性肺結核で、INH と RFP 以外に多くの薬剤に耐性を示している。巨大空洞があり、咳も強いため多量排菌が続いていた。この患者から 2 つの病院で、患者家族 1 名、担当した看護師 2 名、接触のあった全剤感受性結核で治療中であった入院患者 2 名に後に多剤耐性結核が発症した。全員から検出した結核菌の薬剤感受性パターンと RFLP パターンが一致し、初発患者から感染・発病した可能性が高いと考えられる。従来の予想に反して多剤耐性結核の一部に感染性

の高い株があることが予想されたので、当院に保存している多剤耐性結核菌 109 株の RFLP による分析を実施した。109 株中 42 株が 12 のクラスターを形成した。クラスターの最大のもは 10 株が所属しており、全体のクラスター形成率は 38.5%であった。一方全剤感受性結核菌 226 株に同様の検討を実施したところ、クラスター形成率は 37.2%であった。Spoligotyping において感染力が強いと言われている Beijing family の占有率は、多剤耐性で 76.1%、全剤感受性で 79.6%でとなった。今回の検討から多剤耐性結核菌の感染様式が全剤感受性菌と大きく変わらない可能性が示唆された。従来多剤耐性結核菌は感受性結核菌に比べて感染力が弱いと漠然と考えられてきたが、今回の結果はそのドグマが必ずしも正しくないことを示唆しており、今後の結核院内感染対策を考える上で重要な結果である。このスーパープレッダーMDR-TB 菌を用いて種々の TLR ノックアウトマウスに感染させた。TLR とスーパープレッダーMDR-TB 菌の免疫機構を解よりエスケープする可能性が示唆された。

一方、MDR-TB の新しい迅速診断法として、結核菌内の 16 多型配列部位を用いた VNTR を用いた迅速 genotyping を開発し、大阪における結核菌解析に必要十分なクラスター抽出能を持つことを明らかにした。既存の ETR-VNTR および MIRU-VNTR は、結核低蔓延地域では識別能は IS6110 RFLP と比較して充分かもしれないが結核中等度蔓延地域である大阪での解像度は IS6110 RFLP と比較してかなり低かった。16 個の多型反復部位を用いると解像度にて IS6110 RFLP にやや劣るもののほぼ同等であることが明らかになった。さらに上記結核菌タイプング法にて明らかになった事は、現在蔓延中の多剤耐性結核菌株群の存在である。今回の 16VNTR 解析にて、3 種類の系統的に近い菌株のおのおの 10 人以上のクラスター形成が確認出来た。これは、感染力の

強い多剤耐性菌の存在ならびにその蔓延を示している。

6. 自己活性化 T 細胞輸注療法：3 例の多剤耐性結核患者をプロトコールに従って治療した。3 例ともに輸注中・輸注後に特記すべき有害事象は見られなかった。排菌量の変化であるが、症例 1 では治療前に喀痰培養持続陽性であったのが、治療後 3 ヶ月間、喀痰培養陰性となり、その後再度培養陽性となった。症例 2 では、喀痰塗抹培養陽性であったが、治療後喀痰塗抹・培養ともに陰性が治療後 5 ヶ月間持続し、その後培養陽性となった。症例 3 に関しては、全く効果なく、排菌量に変化がなかった。症例 2 については、プロトコール 2 による再治療を行った。治療後 2 ヶ月間培養陰性となったが、再度陽性となっている。症例 4 では、喀痰塗抹、培養陽性であったが、治療後一時塗抹、培養陰性化した。培養陽性が出現、その後塗抹、培養陽性となった。4 例において自己活性化 T 細胞輸注中の ESAT-6 刺激インターフェロン γ 産生能の増強が見られた。活性化自己 T 細胞輸注療法は、多剤耐性結核例において輸注期間中の培養での菌陰性を達成し、今日まで試みられた新しい治療法としての IFN- γ 吸入療法より優れた治療法の可能性が確認できた。

7. 「結核緊急事態宣言」の中で多剤耐性結核対策の充実が重点的課題の一つに取り上げられている事により、九州地区において結核病棟を有する国立病院機構 11 施設において平成 10 年より 15 年末までに治療を開始した多剤耐性結核 50 症例の症例検討を行ってきた。平成 16 年は、登録症例は 9 例であった。対象症例は男性 5 例、女性 4 例、30 歳代から 80 歳代までみられた。合併症も糖尿病、肝炎など抵抗減弱因子を有する例がみられた。耐性症例の病態の 9 例全例が肺結核であり、結核病学会分類の I および II 型の空洞例が 7 例で、喀痰塗抹陽性は

9例全例であった。INH・RFPのみに耐性がみられたのは1例のみで、多数の耐性を獲得していた。短期的に排菌の停止が得られたのは手術症例および空洞のない4剤治療例であった。

D. 考察

1. 多剤耐性結核患者のSNPs解析において、前述の8病院の研究施設で倫理委員会に提出し、すでに理化学研究所 白川教授に血液検体が送付されプロジェクトが開始された。

2. 理化学研究所(京大教授)白川太郎博士との共同研究で多剤耐性結核患者末梢血48例を解析した。健常人対照者270例と薬剤感受性結核患者270例と①候補遺伝子解析及び②薬剤遺伝子解析を行った。まず、細胞内寄生性病原体への選択的易感染性に関与する”Mendelian susceptibility to mycobacterial disease(MSMD)”遺伝子群の候補遺伝子解析を行った。その結果、①多剤耐性結核(MDR-TB)患者ではNRAMP1のSNPsパターン(Asn 543 Asp)に違いが認められ、MDR-TB患者では菌の細胞内処理の違いが関係する可能性が示唆された。②全ゲノムにおける薬剤感受性については2000個の薬剤遺伝子の中のチトクロームP450系の遺伝子700個について解析した。CPY1A1遺伝子で可能性が得られた。ただサンプル数が種々の統計解析できうるには、もっとたくさんのサンプルが必要である。

3. すでに、結核菌殺傷タンパクgranulysinの定量的アッセイの系を確立した。さらにキラーT細胞から産生されるkiller serectory37 (KSP37)タンパクの定量アッセイの系も確立した。その結果、多剤耐性結核患者ではgranulysin蛋白発現の低下が示唆された。さらにこれらのTgマウスを作製した。その結果生体内結核菌数の低下が認められた。

3. MDR-TB患者のTBリンパ球の結核菌殺傷蛋白granulysinの発現測定については、我々がgranulysinに対する種々のモノクローナル抗体をすでに作製し、FACS解析で鋭敏に客観的に測定する方法を開発した。その結果多剤耐性結核患者CD8⁺Tリンパ球のgranulysin発現の著明な低下が認められた。したがってこのアッセイ系を用いた、新しい多剤耐性結核発症の宿主側の促進要因が解明される可能性がある。

4. RFLP解析やVNTR解析の最新の診断法を用いスーパースプレッダーMDR-TB菌の発現や迅速genotyping測定の方法を確立した。このことより迅速な多剤耐性結核患者の同定と治療開始が可能となることが示唆された。

5. ①SNPs解析、及び②T細胞免疫機能解析(特にgranulysin);良い治療法がないMDR-TBに対し明確な成果が上がっていない免疫療法や新しい治療法の開発に画期的な進歩・貢献を寄与する。すなわち行政施策への活用・貢献が大である。これらの情報や測定法・治療法は本邦のみでなく世界に提供する用意がある。

6. MDR-TBのスーパースプレッダー(super-spreader)の発見は多剤耐性結核患者の個室化等の行政施策に貢献している。VNTR解析は極めて迅速な診断法となり早急にMDR-TB患者を識別できる方法となる。これらの成果も行政施策への活用・貢献が大である。したがって、これらも本邦のみでなく全世界に提供する用意がある。

7. 活性化自己T細胞輸注療法は、多剤耐性結核例において輸注期間中の培養での菌陰性を達成した。今日まで試みられた新しい免疫治療法としては国際的にIFN- γ 吸入療法が試みられてきたが、多剤耐性結核において喀痰塗抹の陰性化は得られてきたが、

培養結果の陰性化は得られていない。その点で本法はより有効性が高いと言えるが、今までの試みと同様、効果は投与中の一過性のものにとどまった今後、投与量、投与回数、投与間隔の新たな検討を行う予定である。

8. 既存の ETR-VNTR および MIRU-VNTR は、結核低蔓延地域では識別能は IS6110 RFLP と比較して充分かもしれないが結核中等度蔓延地域である大阪での解像度は IS6110 RFLP と比較してかなり低かった。16 個の多型反復部位を用いると解像度にて IS6110 RFLP にやや劣るもののほぼ同等であることが明らかになった。さらに上記結核菌タイピング法にて明らかになった事は、現在蔓延中の多剤耐性結核菌株群の存在である。今回の 16VNTR 解析にて、3 種類の系統的に近い菌株のおおの 10 人以上のクラスター形成が確認出来た。これは、感染力の強い多剤耐性菌の存在ならびにその蔓延を示している。

迅速タイピングが出来る全国規模の多剤耐性結核菌 VNTR データベースを構築し感染様式を系統的に解析把握し、感染源の検出、感染源となっている客観的な根拠を明らかにする事により、その隔離が容易になり多剤耐性結核のさらなる感染拡大を防ぐ事ができる。

E. 結論

1. 多剤耐性結核患者（国立病院機構政策医療呼吸器ネットワークを利用した）リンパ球を用いた新しい技術 SNPs 解析法による多剤耐性結核の診断法を開発するとともに、新しい治療法を開発するプロジェクトを理化学研究所と共同研究ですでに開始した。（すでに非定型抗酸菌症の project で実績あり）すでに国立病院機構東京病院 四元秀毅院長、大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 露口泉夫院長、国立病院機構福岡東医療センター 原信之院長、国立

病院機構愛媛病院 西村一孝副院長、国立病院機構山陽病院 中田大志院長、国立病院機構東埼玉病院 川城丈夫院長・国立病院機構兵庫中央病院 黒須功博士と共同研究で各々の病院で倫理委員会の許可を受けた後、多剤耐性結核患者の血清 48 例を集めた。目標症例 多剤耐性結核患者 100 例～200 例 薬剤感受性結核患者 100 例～200 例。

2. 理化学研究所（京大教授）白川太郎博士との共同研究で多剤耐性結核患者 末梢血 48 例を解析した。健常人対照者 270 例と薬剤感受性結核患者 270 例と ①候補遺伝子解析及び ②薬剤遺伝子解析を行った。まず、細胞内寄生性病原体への選択的易感染性に関与する“Mendelian susceptibility to mycobacterial disease(MSMD)”遺伝子群の候補遺伝子解析を行った。その結果、多剤耐性結核(MDR-TB)患者では NRAMP1 の SNPs パターン(Asn 543 Asp)に違いが認められ、MDR-TB 患者では菌の細胞内処理の違いが関係する可能性が示唆された。②全ゲノムにおける薬剤感受性については 2000 個の薬剤遺伝子の中のチトクローム P450 系の遺伝子 700 個について解析した。CPY1A1 遺伝子で可能性が得られた。ただサンプル数が種々の統計解析できうるには、もっとたくさんのサンプルが必要である。

3. (政策医療呼吸器ネットワークを利用した)多剤耐性結核と T 細胞免疫機能解析(結核菌殺傷蛋白等)による新しい多剤耐性結核予防法及び治療法の開発。すでに、結核菌殺傷タンパク granulysin の定量的アッセイの系を確立した。さらにキラー T 細胞から産生される killer secretory37 (KSP37)タンパクの定量アッセイの系も作製中である。Transgenic マウスも作製した。これを用い結核菌に対するキラー活性が示唆された。

4. 政策医療呼吸器ネットワークを利用した、種々の多剤耐性結核菌によるマクロフ

アージ機能調節機構 (SR や TLR 等の発現調節) の解明とこの作用機序解明による新しい診断法、治療法の開発 → 多剤耐性結核菌を岡田に送付 → すでに多剤耐性結核菌では TLR 4 の認識からエスケープする可能性を初めて明らかにした。

5. MDR-TB 菌の RFLP 解析により、多剤耐性結核菌を多くの人に感染させるスーパープレッダー多剤耐性結核患者の存在を発見した。さらに同様の事例が見出された。すなわち MDR-TB 菌の RFLP、spoligotyping より初発患者から感染・発病した可能性が示された。

Toll-like レセプター (TLR) の免疫監視機構からスーパープレッダー MDR-TB 菌がエスケープする免疫機構が示唆された。一方、MDR-TB の新しい迅速診断法として、結核菌内の 16 多型配列部位を用いた VNTR を用いた迅速 genotyping を開発し、大阪における結核菌解析に必要なクラスター抽出能を持つことを明らかにした。さらに我々の今回の VNTR の研究により大阪府内において同一の SM・INH 同時耐性菌の複数感染が起こっており、しかもその中の 3 名が治療の失敗により多剤耐性化していることが判明した。また、16VNTR 解析にて感染力の強い、三種類の系統的に近い菌株のクラスター形成が示された。さらに、約 1600 の結核菌株の RFLP、スポリゴタイピング、VNTR を行い、クラスター形成率が同等である事より MDR-TB 菌が接触者へ感染し、発症する可能性があることを初めて示した。また spoligotyping の解析により、従来感染力が強いといわれている Beijing family の占有率は多剤耐性結核と全剤感受性と大きく変わらないことが示されたことより多剤耐性結核の感染性が示唆された。治療法の無い多剤耐性結核に活性化自己 T 細胞輸注療法は一定の可能性が認められた。九州地区の平成 10~16 年の多剤耐性結核 50 症例においては、糖尿病・肺炎合併が多く認められ、

治療法としては ①手術症例、②空洞のない症例に対する抗結核剤の 4 剤治療であることを解明した。

F. 健康危機情報

とくになし。

G. 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, Cruz EC Dela, Tan EV, Abalos M, Young LJ, Burgos JA, Gelber R, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M, Okada M.: Novel (Recombinant BCG- and DNA) Vaccination against Tuberculosis using Cynomolgus Monkey. Immunology 2004.MEDIMOND International Proceedings 2004; 403-406
- 2) Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K, Shigeto E, Harada N, Mitarai S, Okada M, Suzuki K, Inoue Y, Tsuyuguchi K, Sasaki Y, Mazurek GH, Tsuyuguchi I.: Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. Am J Respir Crit Care Med. 2004;70(1):59-64
- 3) Akira M, Kozuka T, Inoue Y, Sakatani M: Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Kanamaru N, Muraki Y, Hashimoto S, McFarland C, Allen SS, Inoue Y, Sakatani M, Kobayashi E, Kaneda Y, McMurray DN, Okada M: DNA vaccine combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12-encapsulated in hemagglutinating virus of pan-liposome induces CD8+ CTL and confers protection