



表 3

## 様々な集団における結核と候補遺伝子の関連解析の報告のまとめ

候補遺伝子	染色体	対立遺伝子/多型	集団	サンプル (患者/健常者)	オッズ比 (95% CI) /P値	文献
IL10	1q31-q32	-1082A→C	Gambian	358/106	1.8 (1.2-2.9)	[1]
IL1RA/IL1B	2q14-14.2	IL1RA A2-/IL1B (+3953) A1+	Gujarati Asian	54/65	0.028	[2]
IL1RA	2q14-14.2	allele2	Gambian	>400/400	0.03	[3]
NRAMP1	2q35	INT4 C+3'UTR del	Gambian	410/417	4.1 (1.9-9.1)	[4]
NRAMP1	2q35	3'UTR	Korean	192/192	1.8 (1.1-3)	[5]
NRAMP1	2q35	5'(GT) <sub>n</sub> , Asn543Asp	Japanese	267/202	1.9 (1.3-2.6)	[6]
NRAMP1	2q35	INT4 C	Guinea-Conaky	44 家系	<0.04	[7]
IL8	4q13-q21	-251T→A	White/African American	167/180	3.5 (1.5-8.1)	[8]
IL12B	5q31.1-q33.1	(ATT) <sub>8</sub>	Hong Kong Chinese	516/514	2.1 (1.5-3.2)	[9]
HLA class I	6p21.3	A1, Cw6, Cw7	Indian	235/289	<0.001	[10]
HLA-DRB1	6p21.3	DRB1*1501	North Indian	20/46	4.8 (1-23.3)	[11]
HLA-DRB1	6p21.3	DRB1*1501	South Indian	126/87	2.7 (1.3-5.9)	[12]
HLA-DRB1	6p21.3	DRB1*1501	Mexican	50/95	7.9 (2.7-23.1)	[13]
HLA-DQB1	6p21.3	DQB1*0503	Cambodian	78/49	0.005	[14]
MBL	10q11.2-21	R52C, G54D, G57Q	Indian	202/109	0.008	[15]
MBL	10q11.2-21	G54D	South African	91 (64) /79	<0.017 (<0.002)	[16]
SP	10q22-q23	1A <sup>3</sup>	Mexican	107/101	9.3 (1.6-53.4)	[17]
VDR	12q12-14	codon352 (tt)	Gambian	408/414	0.01	[18]
VDR	12q12-14	Fok I ff or undetectable VD	Gujarati Asian	71/42	5.1 (1.4-18.4)	[19]
IFNG	12q14	874A→T	South African	313/235	0.0055	[20]
P2X7	12q24	-762T→C	Gambian	323/347	0.55 (0.32-0.93)	[21]
IL12RB1	19p13.1	R214-T365-R378	Japanese	98/197	2.5 (1.2-5.0)	[22]
IL12RB1	19p13.1	-2C→T	Moroccan	101 家系	2.7 (1.2-6.1)	[23]

IL1RA, IL-1 receptor antagonist; NRAMP1, natural resistance-associated macrophage protein 1 (SLC11A1); MBL, mannose binding lectin; SP, surfactant protein; VDR, vitamin D receptor; IFNG, IFN- $\gamma$ ; P2X7, P2X7 purinergic receptor; IL12RB1, IL-12 receptor  $\beta$ 1

- [1] Delgado et al. J Infect Dis, 2002  
 [2] Wilkinson et al. J Exp Med, 1999  
 [3] Bellamy et al. Tuber Lung Dis, 1998  
 [4] Bellamy et al. N Eng J Med, 1998  
 [5] Ryu et al. Int J Tuberc Lung Dis, 2000  
 [6] Gao et al. Clin Genet, 2000  
 [7] Cervino et al. Ann Hum Genet, 2000  
 [8] Ma et al. J Infect Dis, 2003  
 [9] Tso et al. J Infect Dis, 2004  
 [10] Balamurugan et al. J Infect Dis, 2004  
 [11] Mehra et al. Int J Lepr Other Mycobact Dis, 1995  
 [12] Ravikumar et al. Tuber Lung Dis, 1999  
 [13] Teran-Escandon et al. Chest, 1999  
 [14] Goldfeld et al. JAMA, 1998  
 [15] Selvaraj et al. Tuber Lung Dis, 1999  
 [16] Hoal-Van Helden et al. Pediatr Res, 1999  
 [17] Floros J et al. J Infect Dis, 2000  
 [18] Bellamy et al. J Infect Dis, 1999  
 [19] Wilkinson et al. Lancet, 2000  
 [20] Rossouw M et al. Lancet, 2003  
 [21] Li et al. J Infect Dis, 2002  
 [22] Akahoshi et al. Hum Genet, 2003  
 [23] Remus et al. J Infect Dis, 2004

表 4

	調査数	Asn543Asp genotype frequency		
		G/G	G/A	A/A
正常対照	270	89.9	9.8	0.3
結核患者群	269	83.8	16.2	0.0
薬剤耐性群	47	93.2	6.8	0.0

表 5

(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

群	血清中 血糖調節ホルモン (サイトカイン)	血清中 及び Tリンパ球培養上清中
①糖尿病 + 多剤耐性結核 ②多剤耐性結核 ③糖尿病 ④結核 ⑤健常人	レプチン アディポネクチン	結核殺傷タンパク T細胞機能

表 6

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

群	SRレセプター, TLRレセプター解析
①多剤耐性結核菌	マウスとヒト
②結核菌	免疫反応

#### 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 48 例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。健康人対照者 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 secretory37 (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。
- (4) 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。

#### 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。健康人対照者 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. (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(結核菌殺傷タンパク等)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。

## 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 EC, Tan EV, Abalos RM, 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* 2005;23(17-18): 2132-5.
- 2) 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
- 3) 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
- 4) Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim YH, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M, Koide Y: Induction of protective cellular immunity against Mycobacterium tuberculosis by recombinant attenuated self-destructing Listeria monocytogenes strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and MPB/MPT51. Infect Immun. 2004;72(4):2014-21.
  - 5) 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 Japan-liposome induces CD8+ CTL and confers protection against Mycobacterium tuberculosis both in mouse and guinea pig model. 2005(submitted)
  - 6) Nakano H, Nagata T, Suda T, Tanaka T, Kuwayama S, Kanamaru N, Aoshi T, Uchijima M, Chida K, Nakamura H, Okada M, Koide Y: Immunization with dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity specific to a dominant epitope on antigen 85A. Vaccine 2005 (submitted).
  - 7) Mitsuyama T, Kobayashi K, Matsumoto S, Kawakami K, Kawamura I, Okada M: Establishment and evaluation of novel vaccine against tuberculosis: cutting edge of basic study on tuberculosis. Kekkaku 2004;79(8):27-41.
  - 8) 岡田全司: 編集 倉田毅, 総合監修高久史麿, 猿田享男, 北村惣一郎, 福井次年: 肺結核 (感染症: 細菌・ウイルスなどによる感染症/呼吸器) 家庭医学大全科 (法研出版) 2004;p2659-62.
  - 9) 岡田全司(編集 泉孝英, 網谷良一): 結核ワクチン. 結核 第4版 (医学書院) 編集 泉孝英, 富岡洋海. 2005 (in press)
  - 10) 岡田全司: 宮坂信之, 宮島篤編: サイトカインの病態への関与 感染症 結核感染とサイトカイン 新しい結核ワクチン 医学のあゆみ別冊サイトカイン-state of arts 2004;209-213
  - 11) 岡田全司, 田中高生, 喜多洋子, 桑山さち子, 金丸典子, 村木裕美子, 橋元里実, 岡田知佳, 福永有可里, 高井寛子: 結核ワクチン. 呼吸器科 2005;7(1):63-70.
  - 12) 岡田全司, 田中高生, 喜多洋子, 桑山さち子, 金丸典子, 村木裕美子, 橋元里実, 岡田知佳, 福永有可里, 高井寛子: 感染免疫における新知見. 新たな結核ワクチン開発. 臨床免疫 2004;42(1):61-69.
  - 13) 岡田全司: 新しい抗結核ワクチン開発の現状“結核病学会シンポジウム”. 結核 2004;78(8): 487-501
  - 14) 岡田全司: 結核基礎研究の最前線 新たな抗結核ワクチンの作製と評価. 結核 2004;79(8):497-499

- 15) 岡田全司: 自然免疫と獲得免疫の基礎. 最新医学 2005
- 16) 木村謙太郎, 岡田全司, 鈴木克洋, 南城悟, 井上義一: 2003年度 国立療養所近畿中央病院 臨床研究センター 業績集. 2003年度 国立療養所近畿中央病院 臨床研究センター 業績集 2004;1-580・2004
- 17) 岡田全司: 抗結核キラーTとDNA-ワクチン・リコンビナントBCG-及びサブユニットワクチンの開発による新しい予防・診断・治療法 (ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用いた). 平成15年度日米医学協力計画 結核・ハンセン病専門部会年次報告書 Annual report 2003 U.S. Japan cooperative medical science program tuberculosis and leprosy panel. 2004;167-187.
- 18) 岡田全司, 坂谷光則, 矢野郁也, 螺良英郎, 大原直也, 吉田栄人, 倉島篤行, 土肥義胤, 菅原勇, 原寿郎, 竹田潔, 井上義一: 結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究: [抗結核キラーTリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン (サブユニット・DNA・リコンビナントBCG-ワクチン)・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]. 厚生労働省研究費補助金 新興・再興感染症研究事業 平成15年度 総括・分担研究報告書 2004;1-128

## 2. 学会発表

- 1) Okada M, Tanaka T, Kuwayama S, Yoshida S, Kita Y, Kanamaru N, Muraki Y, Hashimoto S, Kaneda Y, Ohara N, Yamada T, Inoue Y, Matsumoto M, Gelber R, E.V.Tan, E.C. Dela Cruz, R.M.Abalos, L.J.Young, J.A.Burgos, D McMurray, Y Skeiky, S Reed, Sakatani M: Novel Vaccination (HVJ-liposome/ HSP65 DNA+ IL-12 DNA and Recombinant 72f BCG) Against Tuberculosis Using Cynomolgus Monkey and Plan for Clinical Trial 40th Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 2004;142. Kyoto, Japan
- 2) Koide Y, Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M: Induction of protective cellular immunity against Mycobacterium tuberculosis by recombinant attenuated self-destructing Listeria monocytogenes strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 complex and MPB/MPT51.: Keystone Symposia: Rational Design of Vaccine and Immunotherapeutics, p67. Keystone, Colorado, USA) 2004.01
- 3) Okada M, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Ishizaki K, Yamamoto S, Matsumura A, Iuchi K, Kwahara M, Sakatani M.: In vivo induction of tumor-specific CTL against CEA-antigens and MAGE-3 antigens expressed on human lung adenocarcinoma by using CEA gene therapy and adenovirus vector. American Association for Cancer Research. Orland, U.S.A., 2004.04

- 4) Okada M, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Saito I, Matsumoto M, Sakatani M.: Novel Therapeutic DNA Vaccination using adenovirus vector / IL-6 DNA + IL-6R DNA + gp130 against Tuberculosis by the Augmentation of in vivo Cytokine Activity. American Association for Immunology. Washington, U.S.A 2004.04
- 5) Okada M.: Novel HVJ-liposome /Hsp65DNA+IL-12DNA vaccination and recombinant 72f BCG vaccination in a cynomolgus monkey model. WHO (World Health Organization ) STOP TB Vaccine Meeting. Manila, Philippines. 2004.04
- 6) Mazurek GH, Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Suzuki K, Shigeto E, Harada N, Mitarai S, Okada M, Inoue Y, Tsuyuguchi K, Sakatani Y, Tsuyuguchi I.: Accuracy of a Whole Blood Interferon-Gamma Release Assay Using ESAT-6 and CFP-10 for Detecting M. tuberculosis Infection in BCG Vaccinated People. 2004 International Conference, American Thoracic Society. Orlando, U.S.A. 2004.05
- 7) 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, 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 using cynomolgus monkey. 12th International Congress of Immunology. Canada, Montreal. 2004.07
- 8) Tanaka T, Kuwayama S, Kita Y, Kanamaru N, Muraki Y, Takai H, Yoshida S, Ohara N, Yamada T, Inoue Y, Gelber R, Tan E, McMurray D, Sakatani M, Okada M.: Novel Vaccine (HSP65 DNA + IL-12 DNA Vaccine and Recombinant 72f BCG Vaccine) Against Tuberculosis.: The Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan. 2004.08
- 9) 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, E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, Abalos RM, 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. 4th World Congress of vaccine and Immunisation. Tsukuba Japan. 2004.09
- 10) 岡田全司: 結核基礎研究の最前線 新たな抗結核ワクチンの作製と評価. 第79回日本結核病学会総会. 名古屋2004.04
- 11) 岡田全司, 田中高生, 喜多洋子, 井上義一, 坂谷光則: 結核に対する新しいワクチン (AAVベクターDNA-,rBCG-ワクチン)の開発. 第79回日本結核病学会総会. 名古屋

2004.04

- 12) 岡田全司, 田中高生, 喜多洋子, 桑山さち子, 村木裕美子, 金丸典子, 橋元里実, 福永有可里, 岡田知佳, 稲永由紀子, 坂口弥生, 古川いづみ, 山田恭子, 武本優次, 井上義一, 坂谷光則, 松本真, 吉田栄人: 新しい抗結核治療DNAワクチンの開発. 第44回日本呼吸器学会 東京2004.04
- 13) 喜多洋子, 田中高生, 井上義一, 坂谷光則, 岡田全司: ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しいDNAワクチン開発  
HSP65DNA+IL-12DNAワクチン(2) 第79回日本結核病学会総会. 名古屋 2004.04
- 14) 田中高生, 喜多洋子, 井上義一, 坂谷光則, 岡田全司: 結核に対する新しい弱毒化リステリアワクチンの開発. 第79回日本結核病学会総会 名古屋 2004.04
- 15) 露口一成, 鈴木克洋, 井上義一, 岡田全司, 木村謙太郎, 小河原光正, 坂谷光則: 結核患者の退院基準について. 第79回日本結核病学会総会. 名古屋 2004.04
- 16) 田中高生, 喜多洋子, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 金丸典子, 橋元里実, 高井寛子, 岡田知佳, 福永有可里, 古川いづみ, 山田恭子, 坂口弥生, 武本優次, 井上義一, 坂谷光則, 松本真, 大原直也, 山田毅, 岡田全司: 新しい抗結核リコンビナントBCG経気道ワクチンの開発. 第44回日本呼吸器学会. 東京 2004.04
- 17) 河南有希子, 服部静香, 桑村充, 岡田全司, 田中高生, 森山光章, 中村洋一: 脾臓の交感神経支配におけるリンパ球およびサイトカインの役割について: 免疫不全マウスを用いた検討. 第81回生理学会大会. 札幌2004.06
- 18) 岡村健作, 服部静香, 河南有希子, 森山光章, 桑村充, 田中高生, 岡田全司, 中村洋一: Tリンパ球により促進される交感神経の軸索伸展—免疫不全マウスを用いた検討. 第138回日本獣医学会学術集会. 北海道2004.09
- 19) 岡田全司, 田中高生, 喜多洋子, 桑山さち子, 井内敬二, 坂谷光則, 斉藤泉, 河南有希子, 森山光章, 中村洋一, 河原正明, 日置恭司, 野村達次: IL-2レセプター $\gamma$ 鎖欠損 SCID-PBL/huと肺癌関連抗原によるヒト肺癌治療モデル. 第63回日本癌学会学術.

2004.12

- 20) 岡田全司, 田中高生, 吉田栄人, 井上義一, 武本優次, 大原直也, 内藤真利子, 山田毅, 金田安史, 坂谷光則: ヒト結核感染に最も近いカニクイザル及びモルモットを用いた結核に対する新しいワクチン開発と結核免疫誘導. 日本免疫学会総会・学術集会 2004.12
- 21) 露口一成, 吉田志緒美, 源誠二郎, 鈴木克洋, 井上義一, 岡田全司, 木村謙太郎, 林清二, 坂谷光則: 小川比率法・MGIT法でRFP感受性、Line Probe AssayでRFP耐性パターンであった肺結核の3症例. 第93回日本結核病学会第63回日本呼吸器学会近畿地方会. 大阪2004.07
- 22) 岡田全司: 結核ワクチンの現状と課題. 第53回日本感染症学会東日本地方会総会第51回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会2004
- 23) 岡田全司, 田中高生, 喜多洋子, 桑山さち子, 村木裕美子, 金丸典子, 橋元里実, 高井寛子, 岡田知佳, 福永有可里, 坂口弥生, 古川いづみ, 山田恭子, 井上義一, 坂谷光則, 吉

田栄人, 金田安史, 大原直也, 内藤真理子, 山田毅, McMurray D, Mulligan RC, Lee J-S, Zhang HL, Re: ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用いた新たな抗結核ワクチン開発. 第74回実験結核研究会2004.04

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

- 1) 岡田全司、高森靖、小川一行、永田欽也。「感染症治療剤 15K granulysin」
- 2) WO 03/070268 A1, 2002年
- 3) 岡田全司、吉田栄人、金田安史、松本真。「結核ワクチン HVJ-liposome/Hsp65 DNA+IL-12 DNA」, 2005年
- 4) 岡田全司、吉田栄人、松本真。「抗酸菌症ワクチン baculo virus/Hsp65DNA」, 2005年

2. 実用新案登録

なし

3. その他

分担研究課題 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

資料 6. 肉芽腫組織に存在する結核菌の薬剤耐性メカニズムに関する研究

研究協力者 中田太志 国立病院機構山陽病院 院長  
福永 肇 国立病院機構山陽病院 臨床検査科

<研究要旨>

多剤耐性結核菌は、水平感染だけではなく内因性に起因したメカニズムによって発生する可能性を試験管モデルで検証した。抗結核薬の希釈系列を MGIT 試験管で作成し、結核菌の MIC を経時的に観察した。

その結果、INH では長期の培養で耐性を誘導することに成功した。また、REP では薬剤濃度を段階的に上昇させることにより耐性誘導が可能であることが判明した。これらのことより多剤耐性結核菌は抗結核薬の投与により人為的に作り出されることが示唆された。A. 研究目的

再興感染症としての結核は、多剤耐性結核菌の蔓延や院内感染としての発生などの要因で注目されている。なかでも多剤耐性菌である場合には、適切な治療法がなく早期に隔離することが必要である。しかし、多剤耐性結核菌の発生にはいくつかの不明な点が存在している。一つには、水平感染するような多剤耐性結核菌排菌患者が周囲に存在しないにも関わらず、ある日突然、多剤耐性菌に変化すること。二つ目は、糖尿病などの基礎疾患に結核を併発した患者から検出されることが多く認められることである。このことは、多剤耐性結核菌は、水平感染だけではなく内因性に起因したメカニズムによって発生する可能性を有しているものと考えられる。我々は、肉芽腫中に閉じ込められた結核菌が MIC 以下の抗結核薬に接することにより耐性化するという仮説をもとに、試験管モデルを作成し耐性の誘導を試みた。

B. 研究方法

MGIT 培地 (ベクトン) に抗結核薬 (SM,INH,REP,EB) の希釈系列を作成した。濃度はそれぞれの薬剤の耐性判定基準値の 10000 希釈、1000 倍希釈、100 倍希釈、10 倍希釈と耐性判定基準値濃度の 5 濃度とした。また、試験菌として結核菌基準株 H37RV と臨床分離菌 5 株を用いた。接種菌量は最終濃度が  $10^5$  個 /ml とした。

発育の観察は BACTEC 970 の装置で行い、発育値は毎日定時に出力し、データ収集は 8 週間行った。もう一つの実験として薬剤濃度を段階的に増加させ、耐性誘導を行った。最初は耐性判定基準濃度の 10000 希釈した MGIT 試験管に結核菌を摂取 (最終濃度  $10^5$  個 /ml) し、発育が認められたら 1000 倍希釈の MGIT 試験管に継代していった。以下同様に

10 倍濃度の薬剤に順次接触させていった。ただし、10 倍濃度で発育が抑制された場合には薬剤濃度の増加を適宜減少させて継代をおこなった。耐性判定基準値を超えて発育してきた結核菌はプロスミック（極東製薬）を用いて MIC 測定を実施した。

（倫理面への配慮）

研究対象として結核菌の基準株である H37RV と分離培養菌であるため、直接的な倫理面の問題は生じてこないと思われる。しかし、患者情報の守秘義務の励行に努めた。

### C. 研究結果

INH 含有 MGIT 培地に結核菌を長期間（3 週間）培養した結果、耐性に誘導させることができた。INH の耐性判定基準値 0.1 $\mu$ g/ml の濃度に接触させ発育してきた結核菌の MIC は 64 $\mu$ g/ml 以上になり接触濃度以上の MIC を示す耐性菌を誘導することができた。他の抗結核薬については耐性基準値を超える発育は 8 週間を経過しても観察することはできなかった。一方、薬剤濃度を段階的に上昇させた実験において、REP の耐性基準値の 1/10 の MIC を示す結核菌を誘導することができた。

### D. 考察

肉芽腫組織から抗結核薬の耐性遺伝子が検出される現象の説明を試験管モデルで実験をおこなった。試験管モデルとして採用した MGIT 培地は密閉された試験管であるが結核菌の発育をモニタリングすることができ、尚且つ液体培地であるため薬剤濃度を自由に設定できるため仮説で想定している肉芽腫に閉じ込められた結核菌と薬剤の関係を観察する方法としてすぐれているモデルと考え採用した。このモデルを用いて行った長期に渡る薬剤との接触で結核菌は INH 耐性を獲得することが判明した。臨床分離株においてもほとんどすべての菌株において認められるため普遍的な現象と考えることができる。INH はミコール酸合成阻害による細胞壁合成阻害剤といわれている薬剤であるが、一般の抗生物質の細胞壁合成阻害剤であるペニシリン系薬剤やセフェム系薬剤でも、発育を阻止していた状態から再度発育を認める現象が報告されている。これは薬剤の分解による力化の低下が原因と言われているが、抗結核薬では、この現象は報告されていない。耐性誘導に成功した MGIT 培地の液体成分を 0.22 $\mu$ m のろ過フィルターで結核菌を除去した後、ろ過液に再度、感受性結核菌を接種させると結核菌の発育を阻止することからも分解による再増殖でないと考えられる。INH 耐性化の説明は結核菌遺伝子の突然変異により 10 の 8 乗個に 1 個の頻度で耐性菌を生じるといわれている耐性化と考えられる。また、REP の耐性化も同様に突然変異と考えられるが、治療中に突然、多剤耐性菌となるためには薬剤濃度を徐々に上げて行かなくてはならないなど現象の説明としては無理があると思われる。今回は遺伝子変異について解析していないためデータとしては不完全である。今後遺伝子解析も実施する予定であるため、合わせてデータを公表できるものと考えている。

**分担課題 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**

**資料 7. 肺結核及び結核病等の問題点に関する研究**

研究協力者 西村 一孝 国立病院機構愛媛病院 副院長  
阿部 聖裕 国立病院機構愛媛病院 呼吸器科医長

**<研究要旨>**

肺結核、および結核病棟の問題点を明らかにするために、四国呼吸器ネットワーク会議を通じて、四国の国立病院・療養所の4施設の現状を検討した。結核病床の占拠率は約56—78%と施設によりばらつきがあった。入院患者中、多剤耐性結核患者はおよそ6%で、昨年の5%とほぼ同様であった。入院患者の在院日数は各施設とも3ヵ月を下回っており在院日数の短縮化を認めている。診断・治療に関しては入院管理により適切に行われていたと考えられた。70歳異常の高齢者は約80%であり、入院中ももとより、退院時期の決定においても、高齢者問題が重要であった。

**A. 研究目的**

再興感染症として肺結核が近年注目されているが、患者の高齢化、集団感染、多剤耐性結核の治療、入院期間の短縮化、病床運営の悩みなど問題点は多い。今回私達は、前回と同様に呼吸器ネットワークを利用して、四国の国立病院、療養所4施設の現状、問題点を明らかにした。

**B. 研究方法**

第4回四国呼吸器ネットワーク会議を通じて、四国呼吸器ネットワークに属する国立高知病院、国立療養所東徳島病院、国立療養所高松病院、および国立療養所愛媛病院の4施設の現状、問題点をまとめた。平成16年10月現在の入院状況、多剤耐性結核患者数、病床の高齢者結核患者数・その問題、利用状況、各施設での入院短縮化の取り組み、DOTSの実施状況などを検討した。

**C. 研究結果**

平成16年10月の状況で、活動性肺結核病床数は192床であった。その中で活動性肺結核の病床に入院していた患者は135例で病床占拠率は70%で平成15年の67%、平成14年の70%とほぼ同様であった。全体で多剤耐性結核患者数は8例で前年と変化はなかった。

また年間入院患者 448 例のうち非結核性抗酸菌症が 25%であった。平均在院日数は全ての施設で 3 ヶ月以内を達成できていたが、いくつかの問題点が挙げられた。入院期間短縮を阻む問題点として、やはり高齢者の問題が挙げられた。4施設で 70 歳以上の高齢者は 78%で 50%が 80 歳以上であった。入院中の寝たきりの状態、痴呆、さらに結核は良くなっているが退院後の受け入れ先がみつからないことに各施設とも苦勞していた。また長期入院患者の患者管理上の問題点として、高齢者では、面会が少なく家族から見放された状況が見受けられ、若年者では喫煙の問題が取り上げられた。病院・結核病棟の取り組みとして、クリニカルパスの使用、様々な院内行事（結核教室など）の開催や、院外医療機関などへの啓蒙など工夫が見られている。

#### D. 考察

結核の緊急事態宣言がだされ、患者数減少の頭打ちが指摘されているが、四国 4 施設に入院していた活動性結核患者は増加傾向なく、むしろ各施設で減少傾向が指摘されている。これは東京や大阪など大都市との違いであり、多剤耐性結核患者数もこの数年ほぼ横ばいである。また、病床占拠率は昨年と同時期とほぼ同様の 70%であり高いものではなかった。このことは最近の各施設の入院期間短縮のための努力がなされたことも大きな要因と考えられた。重要な問題点ひとつは高齢者結核患者の入院中そして退院後の対応であり今後さらにこの問題は地域の病診連携も含めて考えていかなければならない。

#### E. 結論

第 4 回四国呼吸器ネットワーク会議を通して、私達は結核患者の診断・治療・管理・病棟運営などの現状や問題点に対して、共通の認識とより新しい対応の必要性が求められていることを認識させられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 佐藤千賀、阿部聖裕、市木拓、山本利枝、城戸知子、西村一孝：当院における肺外結核の検討。第 79 回日本結核病学会 名古屋。
- 2) 西田加久美、山本岩枝、篠藤ゆみ、新田タエ子、阿部聖裕、西村一孝：当院における高齢者結核の現状。第 79 回日本結核病学会 名古屋。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

**分担課題 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**

**資料 8. 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  
しい治療薬やクラリスロマイシン、ニューキノロン薬の併用の治療効果の解析**

研究協力者 原 信之 国立病院機構福岡東医療センター 院長

研究参加施設および共同研究者：NHO 福岡東医療センター 田尾義昭、二宮清、岩永知秋、  
宮崎正之、高田昇平、岡林寛、NHO 大牟田病院 北原義也、永田忍彦、加治木 章 NHO  
福岡病院 古藤 洋、NHO 東佐賀病院 小江俊行、NHO 長崎神経医療センター 川上健  
司、NHO 熊本南病院 東賢次、NHO 再春荘病院 本田 泉、NHO 西別府病院 大津達也、  
NHO 宮崎東病院 伊井敏彦、NHO 宮崎病院 上徳亮輔、NHO 南九州病院 川畑政治、NHO  
沖縄病院 宮城 茂

**A. 研究目的**

本邦における結核の統計において、これまで減少していた新規結核登録患者数および罹  
患率が増加に転じたなかで、高齢者や免疫低下患者に伴う結核の発病、集団感染や院内感  
染の増加など、緊急的に対応をはからなければならない課題が出現し、厚生省は平成 11 年  
6 月「結核緊急事態宣言」を宣言することに至った。

宣言の中で重点的課題の一つに多剤耐性結核対策の充実が掲げられており、これに基づき  
九州管内の国立療養所での共同研究により多剤耐性結核の疫学や予後および治療法を平成  
10 年から平成 15 年にわたって検討してきた。今回は、平成 16 年の多剤耐性結核症例の臨  
床的検討を行った。

**B. 研究方法**

1. 平成 16 年に多剤耐性例として入院治療を開始した結核患者の中で、再発例について前  
治療薬の結核剤の投与期間、服薬コンプライアンス、当時の薬剤感受性検査、合併症の有  
無と今回の入院時での薬剤感受性の変化について調べる。

2. 平成 16 年に治療を開始した多剤耐性例の治療経過と予後について調べる。

3. 通常の抗結核剤に薬剤耐性を示す排菌症例については、分離菌株のニューキノロン剤  
を含む抗結核剤(INH, RFP, EB, SM, KM, EVM, PZA, TH, PAS, CS, (LVFX, CFPX, SPFX))  
に対する薬剤感受性濃度の測定を行い治療に反映させる。

(倫理面への配慮)

診療録に基づく調査であり、患者本人が一般に特定されないように調査票には、性別と生  
年および施設内認識番号しか表示しないように配慮した。

### C. 研究結果

平成16年、各施設で治療を開始された新規の多剤耐性結核症例を以下の表に表す。

施設名	平成16年
NHO福岡東医療センター	0
NHO大牟田病院	0
NHO福岡病院	0
NHO東佐賀病院	0
NHO長崎神経医療センター	3
NHO熊本南病院	1
NHO再春荘病院	0
NHO西別府病院	1
NHO宮崎東病院	3
NHO宮崎病院	0
NHO南九州病院	0
NHO沖縄病院	1
計	9

対象症例の性別は、男性5例、女性4例であった。生年は大正生まれが2名、昭和生まれが7名（1～9年生が1名、10～19年生が2名、20～29年生が3名、40～49年生が1名）であった。

対象症例の病態は9例全例が肺結核であった。

肺結核の病型は全例両側性で、I型1例、II型6例、III型2例であった。広がりには1が1例、2が4例、3が4例であった。排菌量はガフキー2号1例、ガフキー3号2例、ガフキー4号2例、ガフキー7号2例、ガフキー8号が2例、ガフキー9号1例であった。合併症は合併症なしが6例、合併症ありが3例で、2例が糖尿病合併例で、1例が慢性C型肝炎であった。

これらの症例の多剤耐性化の原因として、発病時からINHとRFP耐性は3例あった。その他不完全な断続的治療でINHとRFP耐性となった例は5例あり、不明は1例であった。

症例から分離された結核菌の感受性検査においてINH・RFPの2剤のみ耐性を示したのは1例のみで、INH・RFP・EBの3剤耐性2例、INH・RFP・EB・SMの4剤耐性1例、INH・RFP・EB・SM・KMの5剤耐性1例、INH・RFP・SM・KM・PAS・LVFXの6剤耐性1例、INH・RFP・EB・SM・KM・PAS・LVFXの7剤耐性1例、液体培地を使用したINH・RFP・EB・KM・TH・PAS・LVFX・CPFX・SPFXの9剤耐性が1例あった。液体培地によるニューキノロン剤に対する薬剤感受性試験は3症例にのみ施行されていた。

治療内容では、手術例が1例。使用薬剤は、3剤使用が2例、4剤使用は4例、5剤使用は2例、6剤使用は1例であり、経過中ニューキノロン剤は9例中6例に使用されていた、CAMは1例に併用されていた。これらの中にはすでに耐性となっている薬剤も含まれているので、耐性化している薬剤を除くと、感受性薬剤で1剤のみ感受性有りの治療となっているのは、2ヶ月という短期間で耐性化したコロニーが検出されたが、胸部X線上は改善の見られるPZA1例と薬剤耐性および副作用で薬剤制限された1例で、CAMを併用していた。3剤治療はTH+CS+LVFX、PZA+SM+CSの2例、4剤治療はPZA+TH+CS+GTFX、PZA+KM+TH+SPFXの2例、5剤治療はPZA+TH+CS+PAS+GTFX、PZA+SM+CS+PAS+LVFX、PZA+SM+EB+TH+LVFXの3例であった。

最低3ヵ月以上治療された症例6例での治療効果を調べた。排菌停止例は左肺全摘除術を受けた1例を含めた2例にみられた。不変が4例であった。

1例は治療3ヶ月目に自己退院した。

#### D. 考察

九州管内の国立病院機構（旧国立療養所）で平成16年に治療開始された多剤耐性例を調査したが、今回症例は男性5例、女性4例で、30歳代から80歳代までにわたってみられた。再発例を含め過去に結核の治療歴を有す例が9例中6例あることは多剤耐性結核の成立に、過去の治療が結果的に不適切であった事が密接に関連していると推測された。また3例において易感染をきたす合併症である糖尿病や肝炎を有しており、耐性の成立に合併症の関与が推測された。

症例から分離された菌の感受性結果は2剤耐性1例、3剤耐性2例、4剤耐性1例、5剤耐性1例、6剤耐性1例、7剤耐性2例、8剤耐性1例あり多剤耐性の治療の難渋さが推測された。短期間の排菌の停止が得られているのは手術症例および空洞のない4剤治療例であった。

治療内容の問題点として第1は感受性検査の結果、既に耐性と判明している薬剤が併用療法に組み込まれている症例があった、問題点の第2は単剤治療が1例あり、数少ない感受性薬の耐性化が懸念された。第3点は、ニューキノロン薬の感受性検査が本年の症例提出施設では1施設のみの採用で、ニューキノロン薬の適性使用を確率するためにも、すべての施設で行えるようにすることが今後必要である。

#### E. 結論

「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療養所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、喀痰塗沫陽性は 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。

F. 健康危惧情報

とくになし。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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

薬剤耐性結核の治療成績とそれに影響する要因の研究

分担研究者 川城丈夫 独立行政法人国立病院機構東埼玉病院 院長

研究要旨

結核菌の薬剤耐性サーベイランスを目的に、2002年6月より11月末までの期間に全国より抗酸菌株を収集し、INH、RFP、SMおよびEBについて薬剤感受性試験を実施した。結果として3,122株の結核菌について感受性試験を実施し、各薬剤への耐性率は初回あるいは治療4週以内の患者で、INH 2.8%、RFP 1.0%、SM 7.0%、EB 1.2%となった。また、既治療患者群では同様にINH 18.9%、RFP 11.0%、SM 14.4%、EB 10.1%となった。初回治療および既治療での耐性率は統計的に有意な差を認めた ( $p < 0.0001$ )。さらに多剤耐性菌は60株認められ、初回治療 0.7%、既治療 9.8%となった。この結果は1997年の調査結果と比較して耐性率の低下を示しているが、青壮年層での既治療耐性や多剤耐性率は依然として高く、継続したサーベイランスと対策の強化が必要と考えられる結果であった。

本研究は結核療法研究協議会参加施設、各委員および結核研究所の協力の下に実施された。

A. 研究目的

全世界では年間およそ800万人が新たに結核に罹患し、200万人が死亡している。世界保健機関および国際結核肺疾患予防連合は世界規模の結核薬剤感受性調査を行い、幾つかの国での急速な薬剤耐性結核の増加が報告されている。

日本では結核療法研究協議会が1957年から1997年までに2~5年ごとに過去12回入院時薬剤耐性菌に関する研究を行い、各年度の耐性菌の頻度と30年にわたる日本での薬剤耐性の頻度の推移を報告している。国立、公立、私立を問わず全国で50以上の施設が参加しており、日本の代表的な薬剤感受性成績として認識されている。

前回の調査から5年が経過しており、この間日本の結核患者の増加や耐性菌の頻度が高くなったことが報告されており、全国的に結核への関心が高まっている。また少

数であるがホームレス等を対象とした Directory Observed Treatment with Short course chemotherapy (DOTS)の試みがなされており、薬剤耐性菌の頻度に変化が生じたかどうか興味のあるところである。さらにこの間に液体培地が導入され、薬剤感受性検査法が比率法へ変化し、技術的にも過渡期にあると考えられ、検査室の精度管理的意味合いもあると思われる。

B. 研究方法

【目的】日本における結核菌の薬剤感受性について総合的な情報を全国レベルで収集し、以て結核対策の一助とする。

【方法】

期間および対象

2002年6月1日から11月30日までの期間に入院した抗酸菌症(非結核性抗酸菌症も含む)患者中、抗酸菌培養陽性(喀痰以