

司 東南南アジア諸国における日本人
中・長期滞在者のHIV感染リスクに関する
研究 第19回日本エイズ学会学術集
(口頭演題047)、熊本、2005年12月

13. 糸山智, Quy T, Phi NC, Long HT,
Ha LD, Ban VV, 土方美奈子, 松下育美,
大橋順, 川名明彦, 野内英樹, 切替照雄,
倉辻忠俊, 笹月健彦, 慶長直人.

Angiotensin converting enzyme 1
(ACE1) の遺伝的多型とSevere acute
respiratory syndrome (SARS) の重症化.
第45回日本呼吸器学会総会, 4月14-16
日, 千葉, 2005.

14. 濱野栄美, 土方美奈子, Quy T, Phi NC,
Long HT, Ha LD, Ban VV, 糸山智,
松下育美, 野内英樹, 切替照雄, 倉辻忠俊,
笹川健彦, 慶長直人. 重症急性呼吸器症
候群 (SARS) と抗ウイルス蛋白MxA,
OAS1遺伝子多型の関連解析. 第45回日
本呼吸器学会総会, 4月14-16日, 千葉,
2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

タイ国の多剤耐性結核を含む難治性結核症例における宿主側要因の研究

分担研究者 慶長直人 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 部長

研究要旨

多剤耐性結核を含む難治性結核症例における遺伝子多型を中心とした宿主要因に関する研究を実施するため、すでに結核症例のコホート研究の実施体制の整備されている北タイのチェンライ県との共同研究体制を確立した。宿主側免疫応答に関連する遺伝子として、今年度は、NRAMP-1, VDR, MBL,に関する遺伝子タイピング系を確立した。

A. 研究目的

北タイ・チェンライ県における多剤耐性結核を含む難治性結核患者から得られるDNA検体を用いて、難治性結核の宿主側要因として自然免疫に関連する遺伝子多型の頻度を検討する。

結核症に関する遺伝要因の検索についての承認の得られているDNA検体を用いたパイロト的な解析を実施した。

（倫理面への配慮）

参加者（患者）からの検体収集は末梢血の採取であり、採取量も最大20mlである。従って、検体採取には特別な危険は伴わない。すべての小児例ならびに採血が臨床的に不適切と判断される場合（高度の貧血例や全身状態が採血に耐えられない例、採血が何らかの不利益を参加者にもたらす可能性が示唆された場合等）は研究対象から除外される。臨床研究コーディネーターから本研究について十分に説明を受けた参加者本人からインフォームドコンセント（文章）が得られた場合のみ研究対象者とする。得られた検体を用いた細胞生物学的、タンパク化学的ならびにゲノム疫学的解析をタイと日本の両サイドで実施するために、タイの保健省ならびに日本の国立国際医療センターにおける倫理委員会からの承認を得る。ヒトゲノム・遺

B. 研究方法

北タイ・チェンライ県では、分担研究者、野内らが、従来より、結核データベースを立ち上げ、コホート研究を実施してきた。そこで、今回、分担研究者である、野内、櫻田との共同研究体制を確立して、結核患者の登録台帳から再発例、再感染例、治療失敗例を洗い出し、細菌学的データと臨床データを含む患者資料の整備を行う。

次に、各々の患者群から末梢血を採取し、DNAを抽出し、各遺伝子多型を挟むプライマーセットでPCR増幅して、RFLP法、もしくは、マイクロサテライトタイピング法により、遺伝子タイピングを実施する。

本年度は、連結不可能匿名化され、以前に、

遺伝子解析研究に関する指針を遵守する。

C. 研究結果

NRAMP1遺伝子多型タイピングは、イントロン4の469+14 G/C、エクソン15のD543N、3'非翻訳領域のTGTGの挿入欠失、およびプロモーター領域のGT反復配列のアリルのタイピング系を確立した。さらにVDR遺伝子のエクソン2 (Fok I) とエクソン9 (Taq I) の制限酵素断片長多型についても同様にタイピング系を確立した。

さらにアジア人においては、MBLのプロモーター領域の-550G/C, -221T/Cと+4C/T (それぞれH/L, Y/X, P/Q variantsと呼ばれる)、エクソン1の230G/A (A/B, codon54) が主要なSNPsであり、ハプロタイプはHYPA, LYPA, LYQA, LXPA, LYPBの5種類に限定されて例外は非常に稀であることが既に知られている。LYPBを有する場合は正常なオリゴマーを形成できないために血中MBL濃度は著しく低くなり、また、LXPAは正常な分子構造のMBLを形成するものの、血中MBL濃度はHYPA, LYPA, LYQAと比較して低いことが知られている。そこで、Y/XとA/Bの2カ所のSNPsの遺伝子型を決定する系を確立した。

PCRプライマーを用いてY/XとA/Bの2カ所のSNPs位置を含む623bpをゲノムから増幅し、増幅産物を制限酵素Btg I で消化した後にアガロースゲル電気泳動を行うとYは540bpと83bpに切断されるのに対しXは切断されずに623bpのままであることを利用して、Y/Xの遺伝子型判定を行った。また同様に、PCR増幅産物を制限酵素Ban Iで消化すると、Aは切断されずに623bpのままであるのに対しBは536bpと87bpに切断されることを利用して、アガロースゲル電気泳動でA/Bの遺伝子型判定を行った。

患者資料の整備は、年度末にかけて準備を進めている。またタイ保健省倫理委員会からの研究承認に関しては、保健省指針を入手し、共同研究者とともに申請書の作成を行った。年度内申請が目標である。

D. 考察

結核症の発症は、感染者のおよそ10~15%に生じ、この発症規定因子として、宿主側の免疫能が大きな影響を与えていることが予想される。これは、低栄養、免疫抑制剤、AIDSなど、外的な要因に左右されるものの、宿主側の個体差にも依存することが、人種における発症頻度、双生児研究、動物モデルから明かである。

しかし、さらに多剤耐性結核の発生につながる、結核の難治化、再発、再感染に、宿主側の要因がどのように関わっているのかについては、ほとんど知見がなく、実情は不明である。今後、日本での予備的研究が今後のタイにおける研究に多くの示唆を与えてくれるものと予想している。

E. 結論

本年度は、結核の発症に関連することが過去に報告されている遺伝子の代表として、NRAMP-1, VDR, BMLの遺伝子多型の検出系を確立した。今後、難治性結核等疾患との関連するいくつかの候補遺伝子に着目して、分担研究者と共同で検索を進める必要がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

T-spot TBとTBGL抗体測定法の比較検討

分担研究者 服部俊夫 東北大学大学院感染症呼吸器病態学分野 教授

研究要旨

57人を対象にT-spotTBと抗TBGL抗体により結核感染の有無をテストし、検出精度を比較した。19人は結核、20人は結核以外の炎症性肺疾患、17人はいずれの症状も示さない健常対照群であった。結核群においてT-spotTBはTBGLよりも高い陽性率を示した。反対にその他肺疾患群においてはTBGLの陽性率の方が高かった。健常群においてT-spotTBの陽性率が高かったが、これは被験体が結核蔓延国由来であり潜伏感染しているためと解釈される。

A. 研究目的

結核は結核菌（Mycobacterium tuberculosis）ウシ型菌（M. bovis, M. africanum）によっておこる感染症である。産業革命による人間の集団生活を契機として蔓延するようになった。20世紀後半に減少傾向をみせたが、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染をはじめとする免疫不全の発生や、高齢化、麻薬常習者などの出現で、重要な再興感染症となっている。特に高罹患国においては多剤耐性結核（MDR結核）の罹患も多く、診断と治療には注意を要する。

結核では肺の病巣が最も多いがそれ以外に肺外結核として粟粒結核、結核性胸膜炎、リンパ節結核、脳・髄膜結核、腸結核・骨・関節結核・泌尿器系結核・喉頭結核などが存在する。

結核菌の特徴は増殖が極めて遅いことであるそのため目に見えるコロニーの形成に4～8週間を要することもある。これらの結核患者の結核菌感染を確認するためには習慣的にツベルクリン（PPD）反応が行われて

きた。しかしながらPPDはBCG菌由来であるので、BCG接種者においても高率に陽性になる。近年の遺伝子解析の進歩により結核菌には存在するRD1という領域がBCGには存在しないことが明らかになった。そこでこの領域に対する細胞性免疫応答を診断に利用する試みがなされた。

もう一つの結核菌の特徴は糖脂質に富んでいる点である。これらの糖脂質のtrehaloseを主な抗原とした、TBGLに対する抗体も診断用の測定キットになっている。

ここではこれらの細胞性免疫と液性免疫を用いた測定法を種々の結核菌感染者に対して応用した結果について報告する。

B. 方法と材料

ELISPOT Assay

Oxford Immunotech社から供与されたT-SPOT™を用いた。結核の疑いのある患者の末梢血よりリンパ球を分離し、 2.5×10^5 を各ウェルに加え、抗原とともに37℃で16～20時間培養した。培養後ウェルを

洗浄し、第 2 抗体を含む反応液を添加し、1 時間待ったのちに、プレートを洗浄し、BCIP/NBT を添加する。そして反応を顕微鏡下で観察する。陰性コントロールとしては抗原を全く添加しないものと、陽性コントロールとしては PHA を添加したものをを用いる。陽性とする判定基準は次のとおり。陰性コントロールが 0~4 個のスポットで、それより 5 個以上多いスポットがみられた場合。またスポットの数が 5 個以上ではその 2 倍以上のスポットがある場合。

TBGL抗体

患者の血清は-30℃に保存している。41

倍に希釈した患者血清をキットのウェルに加え、反応させた後に、洗浄しペロキシダーゼ標識抗ヒト IgG を加え発色させる。発色させて後に陽性コントロールと陰性コントロールとの比較でカットオフ値を決定する。2 以上を陽性とした。

対象

対象は表 1 に示した。活動性結核の患者は 19 名であった。また結核以外の呼吸器疾患の患者は 20 名であった。健常人は 17 名であった。出身地はアジアが多く、その他南アメリカ、あるいはアフリカの出身者が含まれていた。

表1. 検索対象内訳

	Active TB (n=19)	Other Diseases (n=20)	Normal Controls (n=17)
Age, yrs±SD	54.3±20.9	61.8±19	32.6±11.2
Gender,%			
Male	58	53	47
Female	42	47	53
Origin			
Asia	19	19	6
South Am.	0	0	10
Africa	0	1	1

なお、本研究のT-spotとTBGL抗体の測定に関しては東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得ている。

C. 結果

図1にTBGL抗体のカットオフ値の決定様式と T-spot の測定基準を示した。それらの基準をもとにそれぞれの検査を行った。結核発症者における T-spot 陽性率は 84%、TBGL は 63%であった。結核以外の呼吸器疾患においては、4 割が T-spot 陽性であった。

また TBGL の陽性率は 65%であった。この高率に TBGL 値が陽性になる理由は不明であった。健常者における T-spot 陽性者は 76%であったが、TBGL 抗体陽性者は 6%と非常に低かった(図 2)。また両方で陽性になる検体は結核患者において多く、非結核患者で 2 名、コントロールでは 0 名であった。

- **Anti TBGL-Ab:**
Positive=Value $\geq 2U/mL$
*Journal of Clinical Microbiology 2001; 3603-3608
- **ELISPOT**
Positive=#spots $\geq 5(C-)$
*Am J Resp Crit Care Med 2001; 163
The Lancet 2003; 361 (1168-1173)

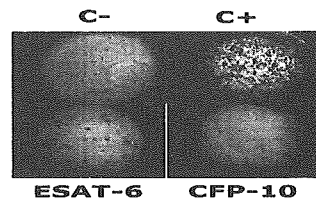
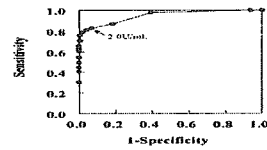


図1. TBGL と ELISPOT の陽性基準

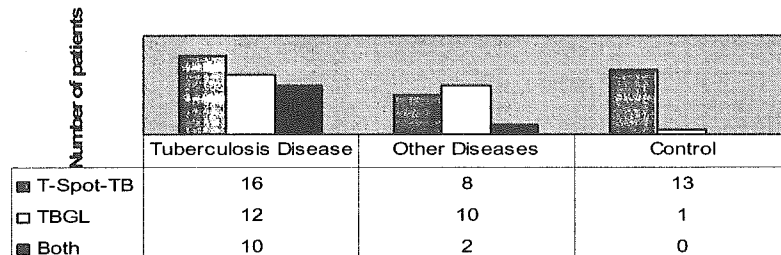


図2. 各グループの陽性率

T-spotにおける陽性スポット値をプロットした結果を示す(図3)

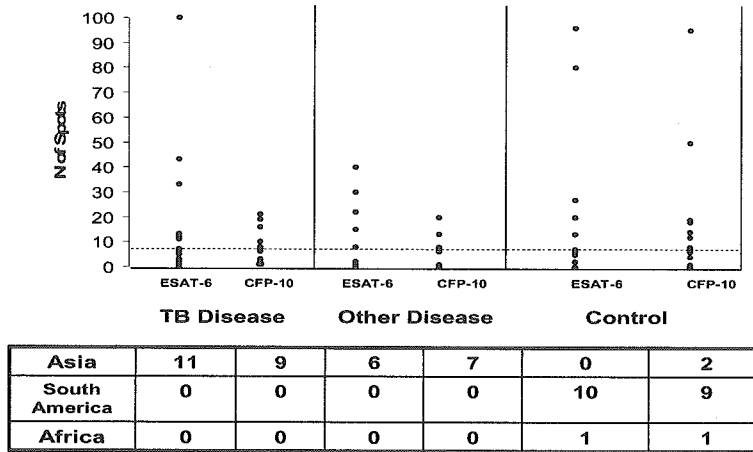


図3. 各グループにおけるElispot陽性数

結核発症者とその他の呼吸器疾患にはそのパターンに差がみられなかった。一方でコントロール群に極めて高い陽性者が存在したが、これらは、結核感染者との接触個体であり、これらの個体ではスポット数

が極めて高いことが観察された。また南アメリカ出身の健常人者は高率で陽性であった。これらのことから以前に感染した個体が極めて多いことが推測された。

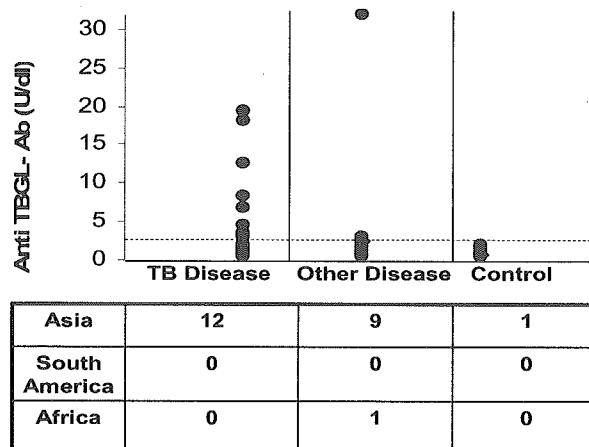


図4. 各グループにおけるTBGL値

TBGL値(図4)は陽性者の中でも結核発症者が非結核患者に比べて有意に高く、またコントロールでは1例のみがわずかに陽性であった。しかしながら非結核肺疾患においても半数が高いTBGL値を示した。

D. 考察

この研究ではT-spotとTBGL値を結核患者、非結核呼吸器疾患患者、健常人で検索した。結核患者におけるT-spot陽性率は84%と高い陽性率を示した。一方でTBGLの陽性率は低値であった。非結核呼吸器疾患でも両方において陽性者がかなり検出された。非結核呼吸器疾患に含まれている患者の種類は、極めて多様である。MAC感染症や古い結核患者の他にリュウマチ肺、肺線維症の患者などが含まれている。しかしながらTBGL値は陽性ギリギリであり、これらのデータの解釈に関しては注意が必要であると思われる。

興味深い点はT-spot陽性者の多くが、TBGL値が陰性である点であった。しかしながらこれらの点に関しては個々の症例が極めて多様な背景を有しているので注意深い解析が必要である。さらにコントロール群においてはT-spot陽性者は南アフリカ共和国、アメリカとアフリカ出身者であった。これらの症例は活動性結核の兆候を示さないのが潜伏感染であることが推測される。またこれらの中でTBGL値が陽性であった症例はない。

これらのことよりTBGL値は結核の発症と極めてよく相関する値ではないかと思われる。またコントロールで陽性であった症例もアジア出身であり、カットオフポイントの再検討も考慮する必要も考えられる。

E. 結論

BCGに存在しない結核菌に特異的な遺

伝子流域RD-1に存在するesat, cfp-10のペプチドを用いた細胞性免疫と液生免疫応答を中心にしたTBGLによる結核診断を比較検討した。これらの比較検討により結核及びその類縁疾患に新たな知見が見いだされることが期待される。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. J. Ashino, Y. Ashino, H. Guio, H. Saitoh, M. Mizusawa and T. Hattori Low antibody responses against tuberculous glycolipid (TBGL) in elderly gastrectomized tuberculosis patients. *The Int. J. Tb. Lung Dis.* 9:1052-3, 2005
2. K. Nishimaki, J. Nawata, S. Okada T. Hattori, I. Ohno. Neutrophil survival-enhancing activity in sputum from patients with diffuse panbronchiolitis. *Respir. Med.* 99:910-917, 2005
3. Komaki Y, Sugiura H, Koarai A, Tomaki M, Ogawa H, Akita T, Hattori T, Ichinose M Cytokine-mediated xanthine oxidase upregulation in chronic obstructive pulmonary disease's

airways. Pulm. Pharmacol. Ther.

18:297-302, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当無し

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

インドにおける結核対策と多剤耐性結核研究ネットワークの構築に関する研究

分担研究者 高鳥毛敏雄 大阪大学大学院医学系研究科公衆衛生学 助教授

研究要旨

世界の結核患者の約2割が発生しているインドにおける多剤耐性研究ネットワークの構築のために、B.R.D.Medical College とS.N.Medical Collegeを訪問し、両大学の学長に研究協力の要請を行い、今後の研究協力関係をつくることができた。また、現地において地域の結核対策を行っている結核クリニックを訪問して実情を把握した。多剤耐性結核の研究を行うには保健医療の検査器機や菌株保存器機の整備がなく、結核菌検査は塗抹検査にとどまっており、地域ベースでの結核菌株の研究を行うためには、その研究基盤をつくる必要があると思われた。現在、治療終了時の排菌患者については感受性検査を行わう体制を整えつつあることから、治療終了時の塗抹陽性患者の菌株については今後、地元の医科大学との協力体制をつくることにより研究をすすめていけると考えられた。

A. 研究目的

世界の結核患者の約2割はインドで発生している (Source:WHO Report 2004: Global Tuberculosis Control; Surveillance, Planning and Financing)。本年度は、インドにおける研究ネットワーク構築のために、インドの現地を訪問し、現地の2つの医科大学、および現地の地域を視察し、研究基盤をつくることを目的とした。

B. 研究方法

1. インド北東部のネパール国境に近いゴラクプル(Gorakhpur)を研究対象地域と定め、平成17年11月2日～11月5日の間に現地に滞在して、地域の結核の疫学状況、結核の保健医療資源、結核菌の検査体制について調査を行った。

2. 地域の調査にあたって、この地域の医療の拠点となっているB.R.D. Medical College & NEHRU Hosipital のPrincipal & DeanのProf.Saudan Singhの研究協力を得て、地域の結核の疫学状況、結核の保健医療体制について情報を収集を行った。
3. 地域の結核対策の拠点となっている結核クリニック (Tuberculosis Unit) を訪問し、患者発見から治療管理の現状について調査を行った。調査にあたっては、Dr. Jeetendra Pol (District Tuberculosis officer, Grakhpur, UP)の協力を得た。
4. インドにおける他地域における結核研究の可能性を図るためにインドの首都ニューデリー近郊のAgra (アグ

ラ)に存在するS.N.Medical CollegeのPrincipal,Dean & Chief of Hospitalであり、またインド公衆衛生協会理事長であるProf.Deonki Nandanを訪問し、研究協力の要請を行った。

C. 研究成果

1. インド国の結核の現状

2001年の新発症患者数は180万人、新発症塗抹陽性患者は795,000人、結核死亡者数は417,000人である(Source: ProvisionWHO estimates Sept 2003)

2. 訪問地の現状

訪問したGrakhpurはインドのUttar Pradesh州 (UP) のネパールとの交通の要所となっている地方都市である。UP州の首都はLucknow (ラクノー)、人口は1億6600万人であり、北インドの中心州である。ガンジス河とヤムナー河によって拓けた広々とした平野 (ヒンドゥスタン平原)によって開けた地域である。人口は密集している地帯である。街の中心部は人口が密集しているが、農業を主体とする、貧しい人々が多い農村地域であった。

3. 地域の結核対策の状況

1) 結核対策プログラムについて

結核対策は、世界銀行等の資金供与とWHOの技術指導のもとで、1993年に国レベルでDOTSを柱とした結核対策計画 (Revised National Tuberculosis Control Programme; RNTCP)が策定され、これに沿って結核対策が進められていた。UP州政府内にWHOからSTS (Senior Tuberculosis Supervisor) STLS (Senior Tuberculosis Laboratory Supervisor)の2人の指導者が派遣され、州政府のMOTC (Medical Officer of Tuberculosis

Control)とともに対策を推進していた。

2) 結核対策の現状について

地域の結核対策の内容は、顕微鏡検査により塗抹陽性患者として診断し、この患者に対してDOTSを行うというものであった。拠点組織となっていたのは結核臨床医師を配置している結核クリニックであった。この結核クリニックは州内に70か所あり、この結核クリニックの下に、菌塗抹検査とDOTSの両方を行う結核センター (Tuberculosis Unit: TU)が7か所、菌検査だけを行う顕微鏡検査センター (Microscopic Center)が25か所、DOTSセンターが519か所が配置されていた。今回は、1か所の地域の結核クリニックを訪問した。結核クリニックの医師であるDr.Jeetendra Pol (District Tuberculosis officer, Grakhpur, UP)に結核対策の現状について教えてもらった。このクリニックのスタッフは、患者登録事務を行っているData Operator、顕微鏡検査を行うLaboratoritian、胸部レントゲン写真を撮るX-ray Technitian、フィルムを現像するdarkroom assistantが、各1名ずつ配置されていた。また、DOTS事業のためにDOTSワーカー (ボランタリースタッフらしい) がいて患者の服薬支援を行っていた。この結核クリニックでDOTSを正式に始められたのはインドの中では遅い方であり、最近である。平成17年の実績は6月8日から9月30日までの間で399人であった。

4. 結核菌検査の実施状況について

1) 結核菌検査内容について

結核患者の菌検査の実施状況は、塗抹検査のみであり、培養検査はルーチンでは行われていなかった。また、菌の同定および感受性検査は治療当初には行われ

ていない。治療終了時の検査で排菌している者に対してのみ結核菌の感受性検査が行われていた。

2) 結核菌株の保管、保存について

結核クリニックにおいては電気はきいていたが、結核菌株を保管する冷蔵庫などの設備が整っていない。また、現在使用している検痰容器も検体を保存するのに適さない容器であった。菌株の保存、菌の培養検査は医科大学病院では行うことができるが設備が不十分と言うことであった。菌株の収集を行うためには、地域の結核クリニックや顕微鏡検査センターで採取した検体を保管、搬送する手段やシステムについても課題があった。

D. 考察

1. 研究の推進について

インドにおいては、塗抹陽性の結核患者の人数は多く、現状では塗抹陽性患者の発見と、治療体制を整えることを徹底することが課題である状況にあった。多剤耐性結核の制御には、現在進めている現在の結核対策はBCG接種とDOTSの徹底である状況であった。わが国では当たり前である結核検診、入院治療、結核菌培養、菌株の保管は、人的にも、財政的にも、無理な状況にあった。今回の訪問により現地の医科大学スタッフからは概ね研究協力の確約を得ることができたが、共同研究を行っていくためには、菌株保管や検査のための機器や器材の提供が必要であり、また研究者の技術供与も必要な状況にあり、複数の研究者の研究チームをつくる必要性がある。

2. 結核対策について

インドの現状は、国民の識字率が低く、医療保険制度が未発達であり、医師のいる医療機関も限られている。さらに、貧困者、その率も高い状況にある。このよ

うな状況の中で、結核問題を短期間に克服するには

BCG接種とDOTSだけでは困難であると考えられた。DOTSは患者の発生を直接克服する手段ではないからである。その意味では、このような地域の感染症の制御のためには、BCGよりも効力と予防効果の高いワクチンを開発し、投入ができれば短期間に結核問題を解決できる可能性があると考えられた。

3. 結核菌株研究について

地域では、塗抹検査のみで結核菌を培養していないし、保存もされていない。しかし、治療終了時に行う塗抹検査で陽性の者については薬剤感受性検査を行っている状況であることから、この菌株を収集して分析を行う計画であれば実現可能性があると考えられた。

E. 結論

インドは、世界の結核患者の約20%が存在し、世界の結核対策において重要な国である。現在WHOの指導のもとにDOTSを柱にした結核対策が進められていた。多剤耐性結核の研究を行うには保健医療の社会資源の整備が不十分であり、結核菌の検査についても塗抹検査にとどまっておき、菌株の保管や移送を含め地域ベースでの菌株の研究はこれからの状況であった。現在、治療終了時の排菌患者については感受性検査は行われつつあった。今後は、治療終了時の塗抹陽性患者の菌株を中心に地元の医科大学との協力体制のもとに研究をすすめていけるのではないかと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 高鳥毛敏雄:結核感染症の現状と今後の策.日本保険医学会誌,103(1), 2005.
2. 高鳥毛敏雄:英国、ロンドンで再興する結核とその対策.公衆衛生,69(3), 203-208,2005.
3. 高鳥毛敏雄、多田羅浩三,黒田研二,逢坂隆子:救急搬送要保護傷病入院患者の疾病構造と保健医療システムの現状の検討.社会医学研究,22,1-12,2005.
4. 逢坂隆子、黒田研二、高鳥毛敏雄、黒川渡、西森琢、安田誠一郎、下内昭、針原重義、的場梁次:ホームレス者の健康・生活実態より健康権を考えるーホームレス者の生活習慣病対策からみた考察ー.社会医学研究,22, 41-50,2005.
5. 黒川渡、黒田研二、逢坂隆子、高鳥毛敏雄、安田誠一郎、下内昭、西森琢、武田勝文:アウト・リーチ活動により認められた路上・公園・河川敷等野宿生活者の健康実態と医療・保健・福祉制度の課題.社会医学研究, 22,51-61, 2005.
6. 高鳥毛敏雄:ドイツにおける一般対策の及びにくい人々に対する保健所活動.公衆衛生,70(2),106-109,2006.
7. 高鳥毛敏雄:英国リーズスタディツアー報告 英国公衆衛生制度改革,複十字,308, 19-19,2006.

2. 学会発表

1. 高鳥毛敏雄、西森琢、逢坂隆子、山本繁、黒田研二:野宿生活者結核検診の実践経験から.第95回日本結核病学会近畿地方会. 2005.
2. 高鳥毛敏雄、西森琢、下内昭、田村嘉孝、藤川健弥、撫井賀代、逢坂隆子、山本繁、黒田研二:野宿者結核検診ー研究から行政事業への課題ー.第96回日本結核病学会近畿地方会演題. 2006.
3. 西森琢、高鳥毛敏雄、山本繁、逢坂隆子、黒田研二:野宿生活者に対するするNPOと研究チーム協働した結核検診.第80回日本結核病学会総会. 2005.
4. 高鳥毛敏雄:ロンドンと大阪の結核対策の比較研究.第80回日本結核病学会総会. 2005.
5. 西森琢、黒川渡、黒田研二、逢坂隆子、山本繁、高鳥毛敏雄:ホームレス者の健康支援(1)大阪市高齢者特別就労事業従事者の健康支援の取り組み.第46回日本社会医学会総会. 2005.
6. 黒田研二、逢坂隆子、高鳥毛敏雄、黒川渡、西森琢、山本繁:ホームレス者の健康支援(2)大阪市高齢者特別就労事業従事者の生活実態と検診結果.第46回日本社会医学会総会. 2005.
7. 山本繁、高鳥毛敏雄、西森琢、逢坂隆子、黒川渡、黒田研二:ホームレ

ス者の健康支援（3）野宿生活者に対する検診に基づく結核対策の実践的研究．第46回日本社会医学会総会．2005．

8. 高鳥毛敏雄、西森琢、逢坂隆子、黒田研二、下内昭：ホームレス者に対する検診実践に基づく結核対策戦略．第64回日本公衆衛生学会総会．2005．
 9. 高鳥毛敏雄、黒田研二、逢坂隆子、下内昭：野宿生活者に対する検診に基づく結核対策の実践的研究．第29回大阪府医師会医学会総会．2005．
 10. 逢坂隆子、黒田研二、黒川渡、高鳥毛敏雄：ホームレス者の健康支援～ホームレス者に対する継続的医療・健康相談が高血圧症改善に及ぼす効果～．第29回大阪府医師会医学会総会．2005．
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

アジア地域との研究ネットワークの活用による
多剤耐性結核の制御に関する研究

分担研究者 櫻田紳策 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部室長

研究要旨

多剤耐性結核を含む難治性結核症例におけるマクロファージの自然免疫を中心とした宿主免疫に関する研究を実施するため、すでに結核症例のコホート研究の実施体制の整備されている北タイのチェンライ県に免疫学的な研究のできる実験室を整備した。HIV結核合併例を含む結核患者からの検体収集とそれらの検体を用いた細胞生物学的、タンパク化学的ならびにゲノム疫学的解析をタイと日本の両サイドで行うために、タイの保健省ならびに日本の国立国際医療センターにおける倫理委員会からの承認を早急に得るべく準備を進めているところである。

A. 研究目的

北タイ・チェンライ県における多剤耐性結核を含む難治性結核患者から得られた末梢血単球由来マクロファージを用いて、難治性結核の宿主側要因としてマクロファージの自然免疫を主な対象とした研究を実施する。

B. 研究方法

北タイ・チェンライに免疫学的実験が可能な実験室をセットアップする。次に、結核患者の登録台帳からHIV合併症例、再発例、再感染例、治療失敗例を洗い出し、細菌学的データと臨床データを含む患者資料の整備を行う。

次に、各々の患者群から末梢血を採取し、そこから血漿、単球、リンパ球を分離する。血漿は血中サイトカイン（IL-4、IL-10、IL-12、IL-18、TNF- α ）量をELISAによる測定に、リンパ球は γ δ T細胞レセプ

ターを含む表面マーカーの検索に使用する。マグネットビーズ法（CD14によるpositive selection）により分離された単球はそれぞれGM-CSF、M-CSFの存在下に培養し、成熟した段階で、標的分子（osteopontine、NRAMP-1、cathepsinB、IL-10等）の発現解析をmRNAレベルではRT-PCR法、タンパクレベルではウエスタンブロット法にて日本で実施する。培養マクロファージの培養上清中のサイトカイン量（前述）をELISAにてタイにおいて測定する。また結核菌の感染実験をタイにて実施し、その際の標的分子の発現についても同様に解析する。全血の一部はそのDNAをゲノム解析のために抽出し、タイにおいて保存する。解析は日本にて実施する。

（倫理面への配慮）

参加者（患者）からの検体収集は末梢血の採取であり、採取量も最大20mlである。

従って、検体採取には特別な危険は伴わない。すべての小児例ならびに採血が臨床的に不適切と判断される場合（高度の貧血例や全身状態が採血に耐えられない例、採血が何らかの不利益を参加者にもたらす可能性が示唆された場合等）は研究対象から除外される。臨床研究コーディネーターから本研究について十分に説明を受けた参加者本人からインフォームドコンセント（文章）が得られた場合のみ研究対象者とする。得られた検体を用いた細胞生物学的、タンパク化学的ならびにゲノム疫学的解析をタイと日本の両サイドで実施するために、タイの保健省ならびに日本の国立国際医療センターにおける倫理委員会からの承認を得る。従って、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する指針（平成13年3月29日文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）は、個人情報保護を含めて遵守される。

C. 研究結果

平成17年9-11月にかけてチェンライ市内の施設において実験室の整備を完了した（図1）。

健常者（タイ側の共同研究者）の末梢血単球を分離し、GM-CSFならびにM-CSF存在下で分化誘導を試みた。結果、検体のうち何例かからは国内と同様に良好な分化したマクロファージが得られた。一方、大多数の単球が分化せずに細胞死と思われる変化を認めた例もあった。患者資料の整備は、年度末にかけて準備を進めている。またタイ保健省倫理委員会からの研究承認に関しては、保健省指針を入手し、共同研究者とともに申請書の作成を行った。年度内申請が目標である。

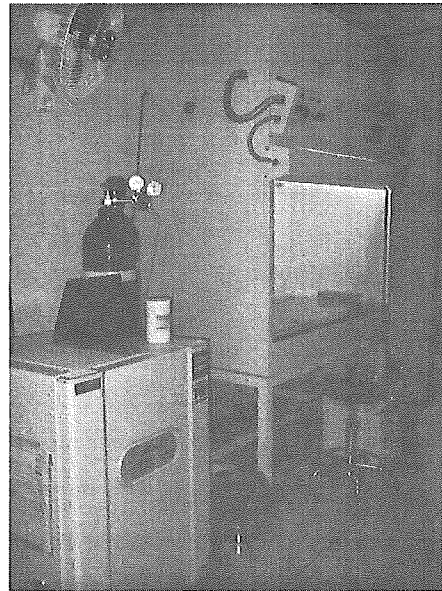


図1

D. 考察

健常者であっても単球からマクロファージへの分化には、形態学上の或いはサイトカインの産生における差異が存在する。一応、タイにおける分化実験は成功したが、日本国内で実施した予備実験の結果から、患者検体を使用した場合、さらに大きな差異が認められる可能性が予測される。国立国際医療センターではパイロット研究として活動性結核患者、気管支喘息患者、健常者から検体を得て、同様の実験を行う予定である（平成17年度に同センター倫理委員会からの承認取得済み、タイにおいて承認を得るためには日本国内の予備的研究は必須と考えられる）。日本での予備的研究が今後のタイでの研究に多くの示唆を与えてくれるものと予想している。

E. 結論

タイにおいても日本国内と同様に単球のマクロファージへの分化には形態学的

に個体差が認められた。今後、難治性結核等疾患との関連、いくつかの標的分子の発現に着目して検索を進める必要がある。

F. 健康危険情報

本研究ではHIV感染検体含む感染検体を使用する可能性が高い。従って、タイ国内の指針に合わせた実験操作が要求される。現時点では、オートクレーブを含む滅菌設備、バイオハザードタイプの安全キャビネットの使用、手袋の使用など感染検体の扱いは、共同研究施設の設備の使用を含めて問題がないと考える。結核菌に関しては、多剤耐性菌自体を実験に使用することはない。また、BCGならびに非耐性結核菌の感染実験は病院内の抗酸菌専用の施設（バイオハザードタイプの安全キャビネットが設置されている）を使用する予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

アジア地域との研究ネットワークの活用による
多剤耐性結核患者マクロファージ機能の解明

分担研究者 赤川清子 国立感染症研究所 免疫部 室長

研究要旨

ヒト単球由来M型M ϕ 及びGM型M ϕ の結核菌殺菌活性の違いに関して、MAPカインースの活性化の関与の影響、結核菌殺菌因子の産生能及び結核菌の増殖に関与することが知られているカタラーゼの発現の違いについて解析した。

A. 研究目的

多剤耐性結核の制御のためには、新薬の開発とともに、宿主の抗結核機構の増強が必要である。結核菌の主な増殖場所はマクロファージ（M ϕ ）内であるため、感染初期での生体内の結核菌の増減はM ϕ が要となる。本研究では、健常人単球由来M ϕ の結核菌の殺菌・増殖制御機構の解析及び殺菌機能活性化機構を検討するとともに、多剤耐性結核患者単球由来M ϕ 機能が健常者とどのように異なるのか比較検討を行い、多剤耐性結核患者のM ϕ の抗結核菌活性を増強する方法を見だし、治療への応用を検討する。

先に、健常人単球よりM-CSFで分化誘導したM型M ϕ は結核菌を殺菌するが、GM-CSFで分化誘導したGM型M ϕ （ヒト肺胞M ϕ に形質が似ている）は結核菌の増殖を促すこと、この時、MAPカインースの活性化がM型M ϕ でのみ認められることを明らかにした。一般的に結核菌は、マクロファージの産生するROIにたいし抵抗性を示す。それは、結核菌のvirulence geneとして知られているカタラーゼ遺伝子

（KatG）の作用により、M ϕ の産生するROIをスカベンジする事で、M ϕ 内での結核菌の生存及び増殖を可能にしているためである。結核菌のKatGが、virulence geneとして重要なことから、M ϕ の結核菌感染感受性の違いの理由として、M ϕ 側のカタラーゼ産生能の違いも考えられる。

そこで、本年度は下記の点について検討を行った。

1. MAPカインースの活性化が殺菌能に及ぼす影響。
2. M ϕ からの結核菌殺菌分子の産生能。
3. M型M ϕ 及びGM型M ϕ のカタラーゼ蛋白発現の違い。

B. 研究方法

リコンビナントヒト（rh）GM-CSFは、Shaeing Plau社より、rhM-CSFは、森永乳業よりそれぞれ供与された。ヒト単球の調整は、正常ボランティアの末梢血よりリンホブレップにて分離した単核球より、CD14ビーズ抗体とMACSによりCD14陽性の単球画分を分離精製した。これら単球をM-CSF

(100ng/ml) および GM-CSF (50 ng/ml) 存在下に 10%FCS を含む RPMI1640 培地で 1 週間培養し、M 型 M ϕ 及び GM 型 M ϕ を作製した。これらの M ϕ にヒト型結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv を moi 1—2 で感染させ、感染 6 日後に結核菌の CFU を測定して、菌の殺菌あるいは増殖を調べた。MAP カイネースの活性化が殺菌能に及ぼす影響を検討するため、P38MAPK の阻害剤 SB203580 及び ERK1/2 の上流にある MEK の阻害剤 PD98059 存在下に感染 M ϕ を培養後 CFU を測定した。結核菌感染あるいは非感染 M ϕ の 2 日後の培養上清を回収し、それらの結核菌、BCG、*M. avium* に対する増殖抑制活性を検討した。M 型 M ϕ 及び GM 型 M ϕ の cell lysates を 2 次元電気泳動で展開し、発現している蛋白を比較検討した。カタラーゼ及び Bcl-2 ファミリー遺伝子の発現は、ノーザンブロットまたは RT-PCR で、蛋白発現は、それぞれの分子に対する抗体を用いてウエスタンブロットにより検討した。カタラーゼの酵素活性は、スコポルチン法で測定した。

(倫理面への配慮)

正常ボランティアよりの血液及び肺胞 M ϕ の採取に関しては、インフォームドコンセントを得た。

C. 結果

1. MAP カイネースの活性化が殺菌能に及ぼす影響。

M 型 M ϕ では、結核菌感染により P38MAPK 及び ERK1/2 の活性化が誘導されたことより、P38MAPK の阻害剤 SB203580 及び ERK1/2 の上流にある MEK の阻害剤 PD98059 の結核菌増殖抑制活性

への影響を検討した。その結果、SB203580 添加群では対象群に比べ菌数が約 2 倍となったが、PD98059 添加群では対照群と差を認めなかった。GM 型 M ϕ での結核菌の増殖に対しては、これらの阻害剤は影響を与えなかった (Fig. 1)。

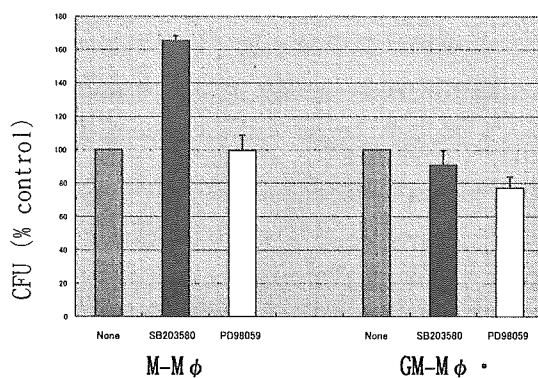


Fig. 1 Effects of SB203580 and PD98059 on the growth of *M. tuberculosis* H37Rv in human monocyte-derived macrophages.