

分担研究課題 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
資料 (1)

結核患者収容のための施設の基準に関する検討

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

図1

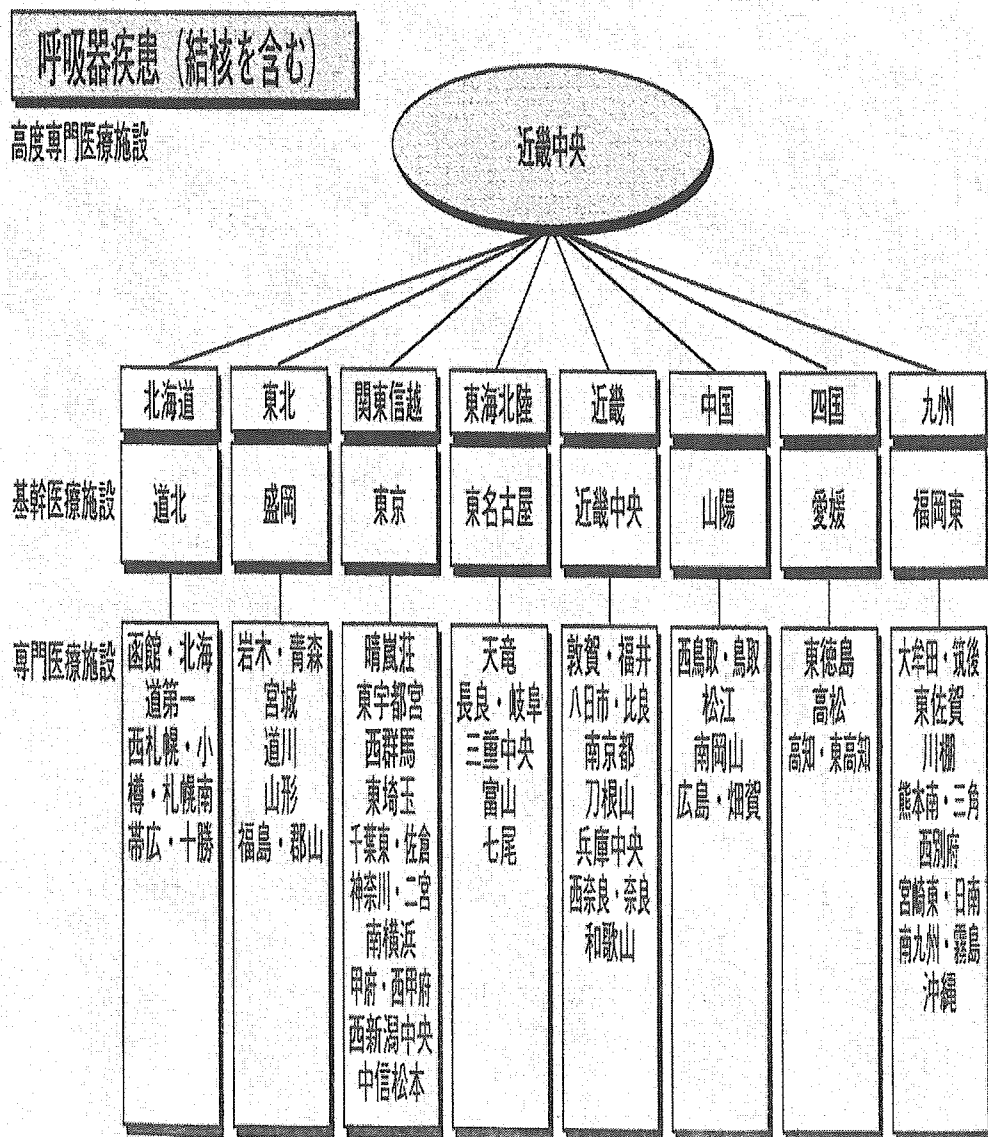
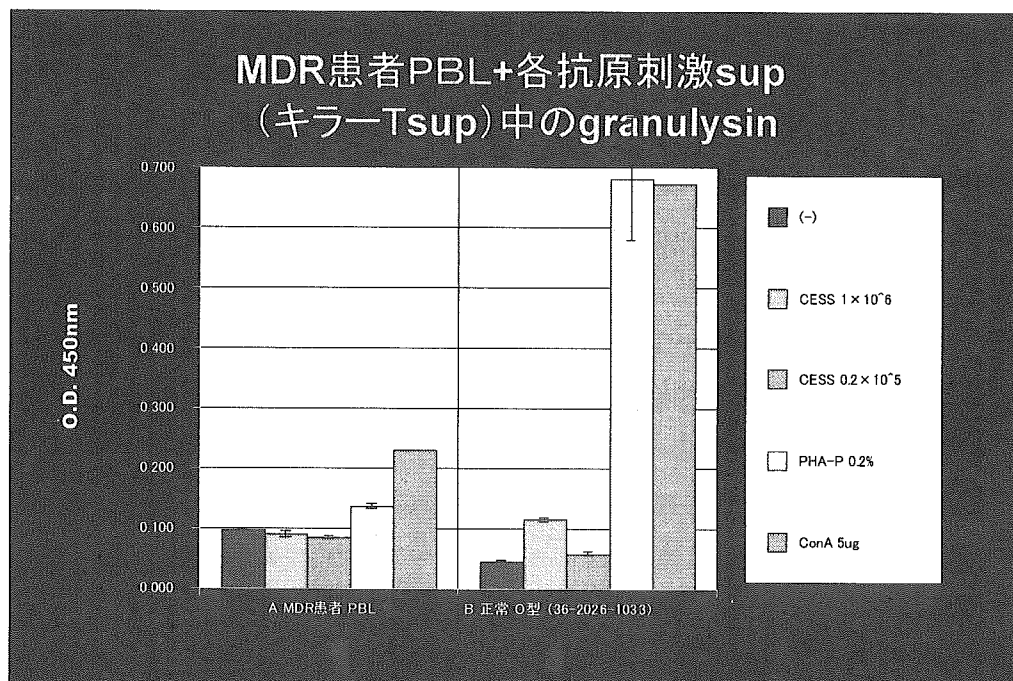


表 3.

<h2>候補遺伝子解析</h2>	
(1) NRAMP1	
Asn 543 Aspの差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	
(2) その他の遺伝子には差異を認めていない。	

図2.



分担研究課題 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 資料(2)

多剤耐性非結核性抗酸菌 *M. avium* における Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) 分析

研究協力者 川城丈夫 国立病院機構東埼玉病院 院長

米丸 亮 国立病院機構東埼玉病院 呼吸器科

研究要旨

Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)分析により自然多剤耐性抗酸菌である *M. avium* の VNTR パターンを分析した。*M. avium* の VNTR パターンは大多数の症例で異なっていた。同一症例で複数の分離菌を分析すると、高率に異なる VNTR パターンが検出された。家族内発生した症例で VNTR パターンは同一であり、他の 1 例でも同一のパターンを認めた。*M. avium* 症は多様な菌株パターンを示す多クローン性感染であり、一方でクラスターも形成する可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、結核菌遺伝子内の Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)の検出による簡便な菌株同定法が可能となった。さらに、適切なプライマーを設定することにより *M. avium* に対しても VNTR 法は適応可能である。本研究では、当院の *M. avium* の VNTR 分析を実施し、菌株パターンの特徴を分析することを目的とした。

B. 研究方法

国院機構東埼玉病院を受診した *M. avium* 症患者を対象とした。*M. avium* の DNA を DNA Zol(Quiagen) kit を用い抽出し、VNTR 当該部位計 16 ヶ所に対する PCR を HotStarTaq DNA Polymerase (Quiagen)を用い、既報告に準拠したサーマルサイクルプロトコールにて PCR を実施した。PCR 産物を電気泳動し目視的に産物の大きさを判定し、それらより tandem repeats の反復回数を求めた。反復回数をレーダーチャート上にプロットし、菌株パターンとした。

(倫理面への配慮)

本研究は既に当院の倫理審査委員会にて承認を得た。本研究によって得られる遺伝情報は人由来のものではなく、抗酸菌 *M. avium* のそれであるが、本研究結果と診療録情報を突合する場合に、倫理的配慮が必要である。本研究において必要最小限の診療録情報のみを使用する予定である。

C. 研究結果

分析した *M. avium* 症 27 症例うち 3 症例で同一パターンを示す *M. avium* 株が検出された（そのうち 2 症例は家族内夫婦発生例であった）。類似パターンを示す菌株を少数認めたが、大多数の症例で菌株パターンは異なっていた。また、同一症例から複数の菌を分析すると、過半数の症例で異なる菌株パターンを検出した。*M. avium* 症家族内発生の 2 例では、同時期に菌陽性となった当初同一 VNTR パターンを示した。夫の菌 5 株では VNTR パターンは同一もしくは類似していた。妻の菌 7 株では明らかに異なるパターンを示す菌が確認された。

D. 考察

各症例間で菌株パターンが大多数の症例で異なるという結果から、*M. avium* の多様性が示唆された。同一時期に発症した夫婦症例で同一パターンを示す菌株の感染から始まっており、共通の感染源がある可能性が考えられた。夫婦例と同一菌株パターンを示す症例を認めたことより、ヒトに感染しやすい菌が存在し得ると考えられた。RFLP 分析法で *M. avium* の多クローン性感染が報告されているが、VNTR 法による成績も *M. avium* 症における多クローン性感染を示唆した。

E. 結論

M. avium 症は多様な菌株パターンを示す多クローン性感染であるが、クラスターも形成する可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- (1) 米丸 亮・白井 哲・諸井文子・芳賀孝之・堀場昌英・高橋博人・青山克彦・川城丈夫（国立病院機構東埼玉病院呼吸器科 *研究検査科 **呼吸器外科）同時期に菌陽性となった *M. avium* 症家族内発生例の VNTR 分析. 平成 18 年 4 月, 第 81 回日本結核病学会総会, 於仙台.
- (2) 米丸 亮, 野澤 誠, 白井 哲, 諸井文子, 脇 泰裕, 堀場昌英, 高杉知明, 高橋博人, 青山克彦, 川城丈夫. *Mycobacterium avium* の variable numbers of tandem repeats (VNTR) による菌株分析. 第 4XX 回日本呼吸器学会学術講演会, 平成 18 年 6 月, 於 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

分担研究課題 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 資料 (3)

国立病院機構呼吸器ネットワークを用いた多剤耐性結核自己活性化 T 細胞輸注療法の検討

研究協力者 四元秀毅 (独立行政法人国立病院機構東京病院 院長)
倉島篤行 (同上 臨床研究部長)

研究要旨

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。

A. 研究目的

細胞機能不全がある症例で T 細胞を生体外で活性化、増殖させ、生体内に戻すことにより T 細胞機能を高めることが可能であることが明らかになってきている。結核感染症に対する生体側の防御機構は T 細胞を中心とする細胞性免疫がになっている。多剤耐性結核患者では細胞性免疫機能の低下が指摘されており、治療法のない多剤耐性結核患者に活性化自己 T 細胞輸注法の効果が期待出来る。

B. 研究計画

菌陽性（塗抹、培養問わず）が持続する多剤耐性結核で、過去6ヶ月に治療薬剤の変更がない患者を対象に、多剤耐性結核患者を対象に、活性化T細胞輸注療法の有効性について調べるとともに安全性も確認する。平成14年春に東京病院、東京医科歯科大学、国際医療センターからなるプロジェクトチームが結成され、免疫不全症に対する活性化T細胞輸注療法を参考にしつつ、多剤耐性結核患者に対する活性T細胞輸注療法プロトコルを平成14年10月に東京病院倫理委員会に申請・承認を得た。

C. 研究成果

4例の多剤耐性結核患者をプロトコル1に従った活性化自己T細胞輸注療法にて治療した。4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：症例1では治療前に喀痰培養持続陽性だったが、治療後3ヶ月間は喀痰培養陰性、その後再度培養陽性化した。症例2は喀痰塗抹培養陽性、治療後喀痰塗抹・培養ともに陰性が5ヶ月間持続し、その後培養陽性化。症例2については、プロトコル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。その後塗抹・培養陽性となった。

D. 考察

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 吸入療法があるが、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。

しかしその効果持続は一過性であり、今後効果の持続に関しての方法の探索が必要と考えられた。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 中田 光, 濱野栄美, 川辺芳子, 益田公彦, 永井英明, 有賀晴之, 倉島篤行, 森尾友宏, 清水則夫: 多剤耐性結核患者に対する活性化 T 細胞輸注療法の試み. 結核 79:57-60, 2004.
- (2) 永井英明: 輸入感染症としての多剤耐性結核. クリニカルプラクティス 23:1067-1070, 2004.

2. 学会発表

- (1) 川辺芳子, 有賀晴之, 永井英明, 八戸敏史, 岡田徹, 田代尚樹, 川島正裕, 松井芳憲, 下之内康雄, 八木理充, 大島信治, 鈴木純子, 平間未知大, 益田公彦, 田村厚久, 長山直弘, 赤川志のぶ, 町田和子, 四元秀毅, 森亨: 活動性結核における QuantiFERON-TB 第2世代陰性例の検討. 日本結核病学会 2006年4月 (予定)
- (2) 有賀晴之, 川辺芳子, 永井英明, 松井芳憲, 田代尚樹, 鈴木純子, 平間未知大, 大島信治, 益田公彦, 田村厚久, 長山直弘, 赤川志のぶ, 町田和子, 倉島篤行, 四元秀毅, 森亨: 活動性結核治療経過中における QuantiFERON-TB2G test の検討. 日本結核病学会 2006年4月 (予定)

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

分担研究課題 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 資料 (4)

大阪における多剤耐性結核の分子疫学解析
- 全国規模の多剤耐性結核菌データベース構築に関する研究 -

研究協力者 松本智成 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター
結核内科診療主任

A. 研究目的

IS6110 RFLP が発表されて以来、結核菌の分子疫学解析は感染経路解明のための接触者検診、疫学解析に多大な貢献をしてきた。現在、IS6110 RFLP から PCR を利用した解析法である MIRU-VNTR、スポリゴタイピングが中心となりつつある。VNTR は、結核菌遺伝子に存在する多型反復配列を利用した解析法である。現在、ETR 領域と MIRU 領域を利用した解析法が行われているが、最近 QUB 領域が発表された。QUB 領域を付加することにより ETR 領域と MIRU 領域をあわせた 16VNTR の解像度が上がるか否か、実際の接触者同士の関係を反映するか否かを検討し結核菌データベース構築に有用か否か検討した。

B. 研究方法

ETR, MIRU 領域からなる 16VNTR は西森等が発表した条件で行った [動物衛生研究所報告書、109, pp25-32, 2003]。QUB 領域の VNTR は、Roring 等の方法に従った [JCM, vol. 40, No. 6, pp2126-2133, 2002]。尚、全菌株の保管並びに解析の同意は文章にて得ているし、提供者の個人情報 は院外に出してはいない。

C. 研究結果

QUB 領域を付加する事により 16VNTR よりも VNTR の解像度は上昇した。しかしながら感染経路が明らかな株同士や、家族内感染の場合でも QUB 領域により一致しなくなる組があった。さらに QUB 領域は Roring 等の条件では、PCR で単一のバンドが得られない場合があり PCR 産物長の解読が困難な場合があった。

D. 考察

QUB による解像度の上昇は、QUB 領域の反復配列の増減が、他の ETR 領域ならびに MIRU 領域よりも早い事、ならびにおのおのの反復配列の 1 単位が他の領域に比べ短い上に繰り返

返し数が多い為に測定誤差も含まれると考察される。このため再現性が低くなる可能性が考えられ、現時点では多施設間の広域結核菌データベース構築には QUB 領域は不向きであると判断する。

E. 結論

QUB 付加により解像度が上昇しても実際の感染経路を反映しない場合があること、および PCR 産物長の解読の難しさから付随する再現性の低さより結核菌データベース構築には現時点では ETR および MIRU からなる *16VNTR* が有用である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Tomoshige Matsumoto, Hiromi Ano, Takayuki Nagai, Katsura Danno, Tetsuya Takashima, Izuo Tsuyuguchi: IS6110 DNA fingerprinting analysis of individually separated colony, Tuberculosis 2005; 85:207-212.
- (2) 松本智成:【呼吸器感染症の最新診断法の評価】結核, 呼吸器科 7: 23-26, 2005

2. 学会発表

- (1) 松本智成, 永井崇之: 当院における結核の分子疫学解析. 感染症学会(2005.09)
- (2) 松本智成, 永井崇之: 非結核性抗酸菌症(*Mycobacterium avium* 症)の治療における分子疫学解析. 感染症学会(2005.09)
- (3) 阿野裕美, 松本智成, 永井崇之, 團野桂, 河原邦光, 高嶋哲也, 露口泉夫: DNA マクロアレイを用いた抗結核薬 Isoniazide (INH) 耐性遺伝子の検出結果. 日本結核病学会近畿地方会(2005.08)
- (4) 永井崇之, 田村嘉孝, 團野桂, 松本智成, 韓由紀, 高嶋哲也, 露口泉夫: ブロスミック MTB-1 法による INH 判定保留域肺結核症例の検討. 日本結核病学会近畿地方会(2005.08)
- (5) 松本智成, 阿野裕美, 永井崇之, 團野桂, 韓由紀, 石原英樹, 河原邦光, 高嶋哲也, 露口泉夫: 救命救急センターから搬送された人工呼吸管理を要した高度多剤耐性結核患者の 1 例. 日本結核病学会近畿地方会(2005.08)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

該当なし

分担研究課題 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 資料 (5)

培養法による RFP の薬剤感受性検査では感受性、しかし薬剤耐性遺伝子検出キットでは耐性であった症例の検討

分担研究者 鈴木克洋 近畿中央胸部疾患センター 感染症研究部長

研究要旨

RFP は結核短期化学療法の要となる薬剤であり、結核菌が RFP に感受性か否かは治療法や予後に大きな影響を及ぼす。今回我々は通常の薬剤感受性検査では RFP が感受性であるが、臨床経過から RFP 耐性が疑われ、RFP の耐性遺伝子変異を認めた 5 症例を経験した。また RFP の薬剤感受性検査に変動があり、臨床的にも RFP 耐性が疑われ、遺伝子変異から RFP 耐性が確定できた 3 症例も経験した。全 9 例中 8 例は INH も耐性で、耐性遺伝子変異の検出により多剤耐性結核と判定された。培養法を用いた薬剤感受性検査では過大評価や過小評価が避けられない。RFP の感受性検査結果と臨床経過に齟齬がある場合、積極的に薬剤耐性変異の検討を行い、RFP 耐性の有無を確定すべきである。

A. 研究目的

結核が克服されたのは強力な化学療法が発達したため、薬剤耐性菌の存在はその状況を脅かす事態である。特に現在の短期化学療法の要である INH と RFP 両剤耐性（多剤耐性結核）は現在でも難治であり、その対策は急務となっている。結核菌の薬剤感受性は薬剤含有培地上での培養状況により決定する方法が従来から用いられている。現在世界的に標準となっているのは、卵培地上でのコロニー数を比較する比率法である。他に液体培地を用い迅速に薬剤感受性を判定する方法もある。しかし培養法を用いる薬剤感受性検査は生物学的アッセイ系であるため、過大評価（本当は感受性なのに耐性と判定する）と過小評価（本当は耐性なのに感受性と判定する）が避けられない。我々は小川比率法（ウエルパック）と液体培地法（MGIT960）では RFP 感受性であるが、臨床経過から RFP 耐性が疑われた症例、ウエルパックや MGIT960 の結果が動揺する例の RFP 感受性を確定するため、RFP 耐性遺伝子（*rpoB*）の変異の有無を検討した。

B. 研究方法

ウエルパックと MGIT960 による薬剤感受性検査は、説明書に従い通常の方法で実施し判

定した。RpoB 変異は、市販の line probe assay キット（フィノス Lipa Rif TB）を用いて判定した。その概略は以下の通り：rpoB の変異が集中しているホットスポットに重なり合う 5 個の野生型のプローブ（S1-S5）と代表的な耐性パターンの 4 プローブ（R2-R5）を設定する。結核菌 DNA を PCR で増幅し、先述したプローブとの結合の有無を発色反応で検出するものである。全ての S プローブが発色し、R プローブが一切発色しない場合が RFP 感受性と、それ以外の場合（S の欠損または R の存在）が RFP 耐性と判定される。

C. 研究結果

発端となった 3 症例はほぼ同時期に当院に入院となった結核症例で全員が男性で大阪南部の同一市の居住者であった。INH を含む複数薬剤に耐性を示したが、RFP を含む複数の薬剤に感受性があり、入院 DOTS 下に有効薬による多剤併用療法を実施したにも関わらず、排菌が続き画像上の改善もないため RFP 耐性が疑われた。RFP 感受性はウエルパック、MGIT 両法で複数回確認した。フィノス Lipa Rif TB では、全例 S4 欠損パターンで RFP 耐性が証明された。住所が同じ市であったため、IS6110 による RFLP を実施したところ同一パターンを示し同一菌株であった。その後 RFP 感受性でありながら排菌が停止しない 2 症例で、やはり rpoB の変異を認めた（一例は S1 欠損、一例は S2 欠損）。これら 2 症例由来結核菌の RFLP は前 3 症例ともまた互いにも異なるものであった。次いでウエルパックと MGIT による薬剤感受性結果に変動がある 3 症例の異なる時期にとられた複数菌株に対してフィノス Lipa Rif TB を実施したところ、全菌株で RFP 耐性が証明された（それぞれ S1、S3、S4 欠損）。

D. 考察

多剤耐性結核の克服にとって、正しい薬剤感受性検査が迅速に得られることは必須の項目である。今回の症例は従来の培養法を用いる薬剤感受性結果に重大な疑義を投じるものであった。しかし今回のような例が多い訳ではなく、ほとんどの症例で従来の薬剤感受性結果と臨床経過はよく相関している。培養法による薬剤感受性検査は、どのような方法論を用いるにせよ、生物学的アッセイであるため、過大評価と過小評価が避けられない。その点薬剤耐性遺伝子の変異の有無の検討は遺伝子工学的的方法論により比較的安定した結果が得られるものと考えられる。実際今回の検討でも、臨床経過とよく相関する結果が全例で得られている。しかしなが耐性遺伝子が 1 個の RFP と異なり、耐性遺伝子が複数存在している INH などでは、耐性遺伝子変異を検討するキットの開発が難しいのが現状である。今後一般臨床で使用できる主要薬剤に対する耐性遺伝子変異の検出キットが開発・普及することが望まれる。

E. 結論

通常の薬剤感受性結果では RFP 感受性でありながら、臨床経過から RFP 耐性が疑われた 5 症例由来の 5 菌株には全て RFP 耐性遺伝子の変異が認められた。通常の薬剤感受性結果より、遺伝子変異の有無の検討の方が、臨床的な経過とよく相関していた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Shunji Takakura, Shigeo Tsuchiya, Yuichi Isawa, Kiyoshi Yasukawa, Toshinori Hayashi, Motohisa Tomita, Katsuhiro Suzuki, Tatsuro Hasegawa, Takanori Tagami, Atsuyuki Kurashima, and Satoshi Ichiyama: Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory samples by transcription – reverse transcription concerted reaction with an automated system. J. Clin. Microbiol 43:5435-5439, 2005

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願状況・登録状況

なし

分担研究課題 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 資料(6)

国立病院機構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

研究協力者 岡田全司 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 結核研究部長

研究要旨

1. 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 ELISA 法を用いて、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。15K *Granulysin Transgenic* マウス及び 9K *Granulysin 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。
2. 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 (TLR 等の発現調節) の解明において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。
3. 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、キラーT 細胞分化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共同研究で行った。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 岩永知秋副院長 (田尾義昭医長)、国立病院機構愛媛病院 西村一孝院長、国立病院機構山陽病院 上岡博院長 (福永肇博士)、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 56 例及び末梢血リンパ球を集めた。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。主として、昨年度の実験データから本年度は遺伝子解析のまとめを行った。一方、本年度は送付された多剤耐性結核患者の末梢血リンパ球 (PBL) のキラーT 細胞分化因子、*granulysin* 産生能を解析した。(資料 1 表 1)
4. その結果、多剤耐性結核患者の PBL においてキラーT リンパ球の分化が抑制されていることが示唆された。また、多剤耐性結核患者では健康人に比較してキラーT 分化因子産生の低下とキラーT 細胞の *granulysin* 産生が低下していることが示唆された。
5. その結果、昨年度の SNIP 解析をまとめると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。

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。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（政策医療呼吸器ネットワークを利用した）多剤耐性結核患者の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 ②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。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）の治療効果の解析。

B. 研究方法

1. granulysin の測定は抗 granulysin 抗体、モノクローナル抗体を用いて ELISA アッセイで行った。（資料1表2）
2. TLR2(-/-)マウス、TLR4(-/-)マウス等を多剤耐性結核菌を用いて解析した。
3. 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 採取した。主として、昨年度（平成 16 年度）の実験データから、本年度は遺伝子解析のまとめを行った。
4. 本年度は送付された多剤耐性結核患者の末梢血リンパ球（PBL）のキラーT 細胞分化活性、キラーT 細胞分化因子産生能及び granulysin 産生能を解析した。コントロールとして健常人（ボランティア）末梢血 PBL を用いた。

①キラーT細胞分化活性は多剤耐性結核患者 PBL を responder cell として 1×10^6 /well (24 マルチ well plate) にまき、stimulation cell としてヒト・アロ抗原 CESS B 腫瘍細胞株をマイトマイシン C 処理した後 1×10^5 /well \sim 0.2×10^5 /well をがん刺激した。またポリクロナル刺激として 0.2% PHA-P 及び $5 \mu\text{g/ml}$ ConA で刺激し、4 日間 37°C 5% CO_2 インキュベーターで、培養した。4 日後に各 well よりエフェクター細胞を集め、E/T 比 (Effector/Target 比) を同じ条件として、 ^{51}Cr 遊離法 (^{51}Cr CESS) を用いてヒトキラーT 活性を測定した。

②キラーT細胞分化因子活性 (IL-6 活性、IFN- γ 活性、IL-2 活性) に ELISA アッセイで測定した。さらに、ヒト末梢血 T 細胞を responder cell とし紫外線 (U・V) 照射した CESS 細胞を stimulator cell とした MLTC の系に多剤耐性結核患者 PBL の種々の刺激培養上清を加えて、キラーT細胞誘導能を測定した。(Proc Natl. Acad. Sci USA Okada et al 1981 の方法に順じ)

③多剤耐性結核患者 PBL (1×10^6) を $20 \mu\text{g/ml}$ PPD、 $20 \mu\text{g/ml}$ \sim $100 \mu\text{g/ml}$ 結核死菌、K562 1×10^6 、CESS_{MMC} 1×10^6 、PWM、PHA-P、ConA、Cowan1 で 4hr、24hr、及び 48hr、96hr 刺激してそれぞれの培養上清を集めた。これらの培養上清を用いて、キラーT細胞分化因子活性、及び granulysin (結核菌殺傷タンパク) 活性を測定した。

A. 研究結果

1. (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。(資料 1 表 2)
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。
2. 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 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。
3. 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行った。
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 岩永知秋副院長 (田尾義昭医長)、国立病院機構愛媛病院 西村一孝院長、国立病院機構山陽病院 福永肇博士、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(資料1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。目標症例:多剤耐性結核患者 100 例~200 例。すでに前述の 10 病院の研究施設で倫理委員会に提出中し、当国立病院機構近畿中央病院及び愛媛病院・福岡東病院・山陽病院・大阪府立呼吸器アレルギー医療センター・兵庫中央病院・南京都病院・和歌山病院の倫理委員会で承認され、東埼玉病院で提出中である。リンパ球検体(多剤耐性結核患者末梢血 7ml) 約 56 例(血清又は末梢血リンパ球)を集めた。

4. ①多剤耐性結核患者 PBL をヒト・アロ腫瘍細胞 CESS で刺激する MLTC において、CESS に対するヒトキラーT細胞分化は、正常人 PBL に比較して顕著に抑制された。(1/15—1/20)

すなわち、多剤耐性結核患者では、エフェクター・キラーT細胞への分化が抑制されていることが示された。6 例の多剤耐性結核患者で同様の傾向を得た。

- ②多剤耐性結核患者 PBL では、IFN- γ 、IL-6、IL-2、のキラーT細胞分化因子の産生が低下していることを認めた。

- ③多剤耐性結核患者 PBL を CESS_{MMC} や PWM、ConA、PHA で 4 日間刺激して、その培養上清中の granulysin を測定すると、健常人に比較して、granulysin の産生の著明な低下が認められた。(資料1図2)

5. 主として、昨年度の実験データを本年度は解析した。

結果

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(資料1表2)。()内は調査したSNP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。(資料1表2)

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。

D. 考察

(1) 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。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。

(2) 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。

(3) 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。

E. 結論

1. (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 ELISA 法を用いて、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。15K *Granulysin Transgenic* マウス及び 9K *Granulysin 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。
2. 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(TLR 等の発現調節)の解明において多剤耐性結核菌では TLR4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。
3. 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、キラーT 細胞分化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共同研究で行った。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 岩永知秋副院長(田尾義昭医長)、国立病院機構愛媛病院 西村一孝院長、国立病院機構山陽病院 上岡博院長(福永肇博士)、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 56 例及び末梢血リンパ球を集めた。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。主として、昨年度の実験データから本年度は遺伝子解析のまとめを行った。一方、本年度は送付された多剤耐性結核患者の末梢血リンパ球(PBL)のキラーT 細胞分化因子、granulysin 産生能を解析した。

4. その結果、多剤耐性結核患者の PBL においてキラーT リンパ球の分化が抑制されていることが示唆された。また、多剤耐性結核患者では健常人に比較してキラーT 分化因子産生の低下とキラーT 細胞の granulysin 産生が低下していることが示唆された。
5. その結果、昨年度の SNIP 解析をまとめると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。

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

- (1) Okada M, Tanaka T, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Muraki Y, Kuwayama S, Izumiya M, Matsumoto M, Sakatani M. : In Vivo Efficacy of Novel Antituberculous Candidate OPC-67683 against Multidrug-Resistant M.tuberculosis (MDR-TB) using SCID Mice and SCID-PBL/hu Mice. F-1463, 45th ICAAC 17-21 Dec. 2005, Washington D.C.
- (2) 藤山理世、河上靖登、白井千香、青山 博、千原三枝子、岩本朋忠、園部俊明、鈴木克洋、岡田全司、坂谷光則:神戸市において、結核定期外検診時に施行した QFT-2G 検査について。第 81 回 日本結核病学会総会(2006.4. 仙台)
- (3) 沖塩協一、鈴木克洋、岡田全司、坂谷光則、鎌田有珠、藤岡智、大場泰良、中野泰克、駿田直俊、阿部聖裕、森健一:政策医療呼吸器ネットワークシステムの分析による抗酸菌症入院症例菌種の検討。第 81 回日本結核病学会総会(2006.4. 仙台)
- (4) 鈴木克洋、露口一成、吉田志緒美、林清二、岡田全司、坂谷光則:QuantIFERON-TB 第二世代による結核院内感染対策の試み。第 81 回日本結核病学会総会(2006.4. 仙台)
- (5) 庄嶋淳子、田中剛、慶長直人、松下育美、土方美奈子、井上義一、鈴木克洋、坂谷光則、

岡田全司, 木村謙太郎, 小林信之, 豊田恵美子, 工藤宏一郎, 永井英明, 倉島篤行, 加治木章, 桶谷典弘, 早川哲史, 白川太郎, 玉利真由美, 中田光, 岡晃, 安藤覚, 田宮元, 笹月健彦, 猪子英俊:呼吸器疾患と遺伝子多型 肺非結核性抗酸菌症感受性領域の全ゲノム高解像度マッピング. 日本呼吸器学会雑誌 43 巻増刊 Page54(2005)

H. 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」:WO 03/070268 A1、2002 年
- (2) 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
- (3) 岡田全司、吉田栄人、松本真:「抗酸菌症ワクチン baculo virus /Hsp65DNA」、2005 年
- (4) 岡田全司、大杉義征:「移植免疫制御剤」 2005 年

2. 実用新案登録

なし