

10. 岡田全司: 国際ワクチン学会“学会レポート”. Fifth World Congress on Vaccines, Immunization and Immunotherapy 感染・炎症・免疫 37: 66-67, 2007
 11. 岡田全司: 新しい結核ワクチンの新展開. 最新医学 2007:125-130
 12. 岡田全司: 新しい結核ワクチンの開発. 呼吸と循環. (in press)
 13. 岡田全司: BCGと新たな結核ワクチン. 呼吸器科. (in press)
 14. M. Okada, Y. Kita, N. Kanamaru, S. Hashimoto, T Nagasawa, Y. Kaneda, Y. Nishida, H. Nakatani, K. Takao, R. Asai, R. Suhara, E.C. Dela Cruz, E.V. Tan, R.M. Abalos, R. Gellber, P. Saunderson, S. Yoshida, M. Matsumoto, D. McMurray, M. Sakatani: Novel Vaccination (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) Against Tuberculosis Using Cynomolgus Monkey. "13th International Congress of Immunology" Edit Jorge Kalil, Edecio Cunha-Neto, Luiz Viente Rizzo, MEDIMOUUD Intern p.119-122,2007
 15. David Neil McMurray, 岡田全司 The study of vaccine against Mycobacterium tuberculosis using Aerosol Exposure Chamber system in mice and guinea pig 平成18年度 新興・再興感染症研究推進事業研究報告集 p. 5-13, 2007
 16. 岡田全司 カニクイザルを用いた、新しい結核治療ワクチン (HVJ / HSP65 DNA + IL-12 DNA) による新しい結核治療法の開発 平成18年度 新興・再興感染症研究推進事業研究報告書 p.146-159, 2007
 17. Masaji Okada, Yoko Kita, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Yasuko Nishida, Hitoshi Nakatani, Junko Yamada, Kyoko Takao, Ritsuko Asai, Ryoko Asaki, Rika Suhara, Reiko Fukamizu, Yoshikazu Inoue, Toshihiro Nakajima, Tetsuji Nagasawa, Yasuhumi Kaneda, Shigeto Yoshida, Makoto Matsumoto, Robert Gelber, Esterlina V. Tan, E.C.Dela Cruz, David McMurray, Mitsunori Sakatani Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB Forth-Second Tuberculosis and Leprosy Research Conference U.S-JAPAN Cooperative Medical Science Program: p66-69, 2007
 18. 岡田全司 新しい結核ワクチンの新展開 結核 82 10 : p.794-797, 2007
 19. 岡田全司 結核の抗体と細胞性免疫 日本医事新報 4351号 : p.95-97, 2007
 20. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 坂谷光則 結核菌の分子疫学的解析 多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌との比較 結核 82巻6号 : p.531-538, 2007
 2. 岡田全司: ワクチン開発. (特別講演 抗酸菌研究の最前線). 第82回日本結核病学会. (2007. 6. 大阪)
 3. 喜多洋子, 金丸典子, 深水玲子, 浅木亮子, 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: HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン (4) 結核 82 : 409, 2007
 4. 金丸典子, 喜多洋子, 深水玲子, 浅木亮子, 井上義一, 坂谷光則, 岡田全司 結核に対する新しいワクチン (HVJ-liposome / HSP65 + IL-12 DNA) の開発とT細胞分化誘導作用 結核 82 : 408, 2007
 5. 井上義一, 喜多洋子, 深水玲子, 浅木亮子, 坂谷光則, 岡田全司 プライム・ブースター法を用いた新しいワクチン (HVJ-liposome / HSP65 + IL-12 DNA) による肺結核病理像作用 結核 82 : 408, 2007
 6. 深水玲子, 喜多洋子, 金丸典子, 浅木亮子, 坂谷光則, 岡田全司 HSP65遺伝子導入マウス及びIL-12遺伝子導入マウスを用いた結核感染防御機構の解析モデルの開発 結核 82 : 405, 2007
 7. 浅木亮子, 喜多洋子, 金丸典子, 深水玲子, 井上義一, 坂谷光則, 岡田全司 気道内投与・鼻腔内投与による新規結核ワクチン効果解析 (エアゾル吸入感染系を用いた) 結核 82 : 409, 2007
 8. 町田和子, 四元秀毅, 岡田全司, 坂谷光則 国立病院機構 (NHO) 呼吸器ネットにおける2004年結核死亡調査と死亡推移の検討 結核 82 : 390, 2007
 9. 藤山理世, 田中賀子, 樋口紀子, 河上靖登, 白井千香, 片上祐子, 平岡恭典, 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 神戸市で結核定期外健康診断時に実施したQFT-2G検査の有用性と接触度について 結核 82巻4号 : p.358, 2007
 10. Masaji Okada, Yoko Kita, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Yoichi Nakamura, Yukiko Kannan, Tatsuji Nomura Induction of CTL by using granulysin, IL-6 related genes and IL-2 Receptor disrupted SCID mouse Proceedings 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association: 245, 2007
 11. Okada Masaji, Kita Yoko, Kanamaru Noriko, Hashimoto Satomi, Nishida Yasuko, Nakatani Hitoshi, Yamada Junko, Takao Kyoko, Asai Ritsuko, Suhara Rika, Fukamizu Reiko, Inoue Yoshikazu, Nakajima Toshihiro Immunological enhancement of a novel vaccine (HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB 日本免疫学会総会・学術集会記録 250, 2007
 12. 藤山理世, 田中賀子, 中谷幸子, 榎林成之, 樋口純子, 渋谷雄平, 青山博, 白井千香, 片上祐子, 千原三枝子, 吉岡伸子, 伴貞彦, 河上靖登, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則 神戸市で結核接触者健康診断時に実施したQFT-2G検査と接触度について 第66回 日本公衆衛生学会総会抄録集 p.588, 2007
2. 学会発表
1. 岡田全司, 小林和夫 抗酸菌研究の最前線 “第82回 日本結核病学会総会” 結核 82 : 330, 2007

13. 久保昭仁, 伊佐俊一, 楠洋子, 高田實, 青野奈々, 田村太郎, 辻野和之, 村上真理, 湯峯克也, 上平和孝, 沖塩協一, 川口知哉, 安宅信二, 田中壽一, 松村晃秀, 北市正則, 河原正明, 岡田全司, 坂谷光則 胸部悪性腫瘍症例を対象とした包括的多種類検体保存システムの構築 肺癌 47巻5号: p.607, 2007
14. 露口一成, 吉田志緒美, 源誠二郎, 鈴木克洋, 岡田全司, 洪泰浩, 林清二, 坂谷光則 INHの予防内服によりINH耐性が誘導されたと考えられた結核の1症例 結核 82 10: p.801, 2007
15. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 富田元久, 坂谷光則 Line Probe Assayを用いた抗酸菌同定キットの有用性の検討 結核 82 10: p.801, 2007
16. 白井千香, 藤山理世, 田中賀子, 河上靖登, 岩本朋忠, 園部俊明, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則 神戸市でのVNTR法による結核菌の遺伝子型別データベースが有用であり、QFTも併用した接触者健康診断事例について 結核 82 10: p.801, 2007
17. 岡田全司 特異抗原をターゲットとした Immunotherapy 新しい結核ワクチンの開発 日本臨床免疫学会誌 30巻4号: p.265, 2007
18. 伊佐俊一, 楠洋子, 久保昭仁, 岡田全司, 高田實, 河原正明, 安宅信二, 川口知哉, 沖塩協一, 湯峯克也, 大宮英泰, 上平和孝, 村上真理, 田村太郎 悪性腫瘍における多種類検体保存システムの構築 肺癌 47巻4号: p.400, 2007
19. 武本優次, 深水玲子, 井上義一, 岡田全司, 坂谷光則, 影山圭吾, 前田光一, 神野正敏, 藤本眞一, 中村忍 高齢者薬剤性肺炎の1例 日本老年医学会雑誌 44巻4号: p.528, 2007
20. 露口一成, 吉田志緒美, 鈴木克洋, 源誠二郎, 井上義一, 岡田全司, 北市正則, 新井徹, 林清二, 坂谷光則 肺結核治療中に閉塞性細気管支炎を生じその後肺M.avium complex症を生じた1例 結核 82巻6号: p.553, 2007
21. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 富田元久, 坂谷光則 薬剤感受性試験でRFP感受性、耐性遺伝子検査でRFP耐性となる結核菌の検討 結核 82巻6号: p.551, 2007
22. 大家晃子, 井上義一, 審良正則, 田中勲, 深水玲子, 新井徹, 橋和延, 岡田全司, 林清二, 坂谷光則 リンパ脈管筋腫症におけるvolumetric CTと重症度との関係 日本呼吸器学会雑誌 45巻増: p. 276, 2007
23. 橋元里美, 武本優次, 喜多洋子, 金丸典子, 西田泰子, 網井良恵, 井上ルリ子, 深水玲子, 仲谷均, 山田順子, 高尾京子, 浅井律子, 浅木亮子, 浪江由美, 奥野良信, 加瀬哲男, 吉田栄人, 坂谷光則, 岡田全司 SCID-PBL/huモデルマウスを用いたSARSウイルスM蛋白に対するヒト中和抗体誘導DNAワクチンの開発 日本呼吸器学会雑誌 45巻増: p. 264, 2007
24. 新井徹, 井上義一, 橋和延, 高藤淳, 深水玲子, 田村太郎, 大塚淳司, 源誠二郎, 露口一成, 鈴木克洋, 林清二, 岡田全司, 坂谷光則 間質性肺炎加療に伴うサイ下メタロウイルス抗原血症 日本呼吸器学会雑誌 45巻増: p. 234, 2007
25. 深水玲子, 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里美, 西田泰子, 網井良恵, 井上ルリ子, 浅木亮子, 仲谷均, 山田順子, 高尾京子, 浅井律子, 浪江由美, 坂谷光則, 岡田全司 HSP 65遺伝子導入マウス及びIL-12遺伝子導入マウスを用いた結核感染防御機構の解明 日本呼吸器学会雑誌 45巻増: p. 200, 2007
26. 岡田全司, 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里美, 西田泰子, 網井良恵, 井上ルリ子, 深水玲子, 浅木亮子, 仲谷均, 山田順子, 高尾京子, 浅井律子, 浪江由美, 井上義一, 吉田栄人, 中島俊洋, 坂谷光則 結核に対する新しいワクチン(Hsp 65+IL-12 DNA)の開発とキラーT細胞分化誘導効果 日本呼吸器学会雑誌 45巻増: p. 200, 2007
27. 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里美, 西田泰子, 網井良恵, 井上ルリ子, 深水玲子, 浅木亮子, 仲谷均, 山田順子, 高尾京子, 浅井律子, 吉田栄人, 中島俊洋, 坂谷光則, 金田安史, Tan E.V., DelaCruz D.L.C., 岡田全司 肺感染症の病態と診療の研究における進歩 ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた新しい結核ワクチン開発 HSP 65 DNA+IL-12 DNA ワクチン 日本呼吸器学会雑誌 45巻増: p. 122, 2007
28. 岡田全司: 新しい結核ワクチン. (特別講演 未来に繋がる結核対策). 第47回日本呼吸器病学会. (2007.5.)
29. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 坂谷光則, 岩本朋忠 M.kansasii症における多クローン性感染の検討 結核 82巻4号: p.447, 2007
30. 露口一成, 吉田志緒美, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則 血液透析を必要とする腎不全に合併した結核患者の臨床的検討 結核 82巻4号: p.442, 2007
31. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 富田元久, 坂谷光則, 末竹寿紀 ピラジナミド耐性遺伝子検出キットの有用性の検討 結核 82巻4号: p.416, 2007
32. Masaji Okada, Yoko Kita, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Tetsuji Nagasawa, Yasufumi Kaneda, Yasuko Nishida, Reiko Fukamizu, Yoshie Tsunai, Ruriko Inoue, Hitoshi Nakatani, Yumi Namie, Junko Yamada, Kyoko Takao, Ritsuko Asai, Ryoko Asaki, E.V. Tan, Mitsunori Sakatani Novel vaccination (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA against Tuberculosis) The American Association of Immunology Meeting, 2007
33. Masaji Okada Novel Vaccination (HVJ-Liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) Against Tuberculosis Using Cynomolgus Monkey Leonard Wood Memorial International Meeting 2007: Oct 23, 24, 2007
34. 岡田全司 最新の結核ワクチン・SARSワクチン及び肺癌ワクチンについて 箕面医師会特別講演: 2007年6月

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
出願 2002年
2. 岡田全司、吉田栄人、中島俊洋、松本真
「結核ワクチン HVJ-liposome/Hsp65
DNA+IL-12 DNA」
整理番号：MED-A0504
受付番号：50501768464
特許番号：特願2005-280379
提出日：2005年9月27日
発明の名称：DNAワクチン組成物
3. 岡田全司、大杉義征、三原昌彦
「キラーT細胞の誘導抑制剤」
出願番号：特願2005-330637
出願日：2005年11月15日
4. 岡田全司、高橋将文、伊澤淳、大杉義征、
三原昌彦 「キラーT細胞の誘導抑制剤」
出願番号：特願2006-170950
出願日：2006年6月21日
5. 岡田全司、大杉義征、三原昌彦、高橋将文、
伊澤淳 「キラーT細胞の誘導抑制剤」
出願番号：PCT-JP2006/322726
出願日：2006年11月15日

2. 実用新案登録

3. その他

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

中国におけるStreptomycin(SM)耐性結核菌に対する遺伝学的研究

分担研究者 菅原 勇 （財）結核研究所 センター長

研究要旨

中国北京市結核・肺腫瘍研究所で得られた215の結核菌臨床株のうち、115株がSM耐性株で100株が感受性株であった（比率法による）。115株の遺伝子突然変異の有無を調べたところ、98株（85%）にrpsL遺伝子、rrs遺伝子の変異が見つかった。rpsL変異が、主で88株が該当した。この割合は、すでに発表されているものより高い。

A. 研究目的

中国北京近郊で収集された抗結核剤耐性株のうち、どのくらいがストレプトマイシン（SM）耐性かを、細菌学、遺伝子レベルで調べる。またその原因を調べて、我が国の結核対策に資することを目的とする。

B. 研究方法

北京市結核肺腫瘍研究所で集められた臨床株のうち、比率法でSM耐性度を決める。この研究は、中国で行う。培養して結核菌を死滅させた後送ってもらった菌株から、DNAを抽出する。この研究は、結核研究所で行う。一定のDNAと特異的プライマーを用いてPCRを施行しPCR産物を得る。その後、WAVEシステムを用いて変性HPLCを行う。突然変異があると、HPLCパターンが違うので、判別できる。この装置は、結核研究所にあるので、ここで実験を行う。

（倫理面への配慮）

提供された結核菌に該当する患者名が、外部に漏れないように、番号を付す。

C. 研究結果

215の結核菌臨床株のうち、115株がSM耐性株で100株が感受性株であった（比率法）。115株の遺伝子突然変異の有無を調べたところ、98株にrpsL、rrsの変異が見つかった。rpsL変異が、主で88株が該当した。98株のMICを求めたところ、変異型とSM耐性度との有意差は見られなかった。感受性株には、遺伝子突然変異は、認められなかった。DNAシーケンスのデータは、変性HPLCのデータと一致した。

D. 考察

SM耐性の割合は、以前に報告されているものより高かった。また、SM高度耐性結核菌が多いことも、第二の特徴としてあげられる。北京でSM耐性結核菌が多い理由は、結核患者が、完全に治癒しないうちに、金銭上の理由から、退院し、また再入院するうちに、SM耐性になるのが、主な原因と考えられる。中国では、結核と診断されても、100%、国からの補助が受けられない。

DOTSを施行して、完全に服薬させることと、医療費の払えない患者を、財政的に補助する政策を生み出して、施行することが必要であろう。

E. 結論

SM耐性結核菌のうち、85%にrpsL、rrs遺伝子の変異が見つかった。SM高度耐性結核菌が、多いことが、中国の結核の特徴と考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugawara I, Yamada H, Mizuno S. BCG vaccination enhances resistance to *M. tuberculosis* infection in guinea pigs fed a low casein diet. *Tohoku J Exp Med*, 211: 259-268, 2007.
2. Ono N, Oshio S, Niwata Y, Yoshida S, Tsukue N, Sugawara I, Takano H, Takeda K. Prenatal exposure to diesel exhaust impairs mouse spermatogenesis. *Inhal Toxicol*, 19: 275-281, 2007.
3. Hoshino H, Sugawara I, Ohmori M, Wada M. Evaluation of accuracy of clinical diagnosis of TB by annual autopsy report. *Kekkaku*, 82: 165-171, 2007.
4. Li Y, Kawada T, Matsumoto A, Azuma A, Kudoh S, Takizawa H, Sugawara I. Airway inflammatory responses to oxidative stress induced by low-dose diesel exhaust particle exposure differ between mouse strains. *Exp Lung Res*, 33: 227-244, 2007.
5. Hibiya K, Kazumi Y, Sugawara I, Fujita J. Histological classification of systemic *Mycobacterium avium* complex infections in slaughtered domestic pigs. *Comp Immunol*

Microbiol Infect Dis, 2007 (in press).

6. Sugawara I, Li Z, Sun L, Udagawa T, Taniyama T. Recombinant BCG Tokyo (Ag85A) protects cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) infected with H37Rv *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 87: 518-525, 2007.
7. Shi R, Zhang J, Otomo K, Zhang G, Sugawara I. Lack of correlation between *embB* mutation and ethambutol minimal inhibitory concentration in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China. *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 4515-4517, 2007.
8. Yamada H, Mizuno S, Sugawara I: Retinoic acid therapy attenuates the severity of tuberculosis while altering lymphocyte and macrophage numbers and cytokine expression in rats infected with *M. tuberculosis*. *J Nutr*, 137:2696-2700. 2007.
9. Shi R, Itagaki N, Sugawara I: Overview of anti-tuberculosis drugs and their resistance mechanisms. *Curr Reviews Medicinal Chem* 11: 1177-1185, 2007.
10. Shi R, Zhang J, Li C, Kazumi Y, Sugawara I: Detection of streptomycin resistance in *M. tuberculosis* clinical isolates from China as determined by denaturing HPLC analysis and DNA sequencing. *Microbes Infect*, 9: 1538-1544, 2007.
11. Kazumi Y, Udagawa T, Maeda S, Murase Y, Sugawara I, Okumura M, Azuma Y, Goto M, Tsunematsu N: Comparison of usefulness between VNTR analysis and RFLP in the genotyping of *M. avium*. *Kekkaku*, 82: 741-748, 2007.
12. Maeda S, Sugawara I, Kato S: Report of the meeting for researchers in charge of TB molecular epidemiology in Japan, China and Korea. *Kekkaku*, 12:925-927, 2007.
13. Kazumi Y, Itagaki N, Ohmori M, Wada M, Hoshino H, Mitarai S, Sugawara I, Ishikawa N, Mori T: Frequency of MDR-TB/XDR-TB strains isolated from chronic pulmonary tuberculosis patients in Japan. *Kekkaku*, 12:891-896, 2007.

H. 知的財産権の登録状況

なし

タイ国における多剤耐性等の難治性結核患者の検体バンクとコホート研究

分担研究者 野内 英樹 長崎大学国際連携研究戦略本部・熱帯医学研究所
(結核研究所 元：HIV結核プロジェクト主任研究員、現：研究部フェロー)

研究要旨

北タイ・チェンライ県において、難治性結核患者（多剤耐性・再発・治療失敗例）の検体バンクとコホート研究を立ち上げ、結核症に対するフィールド研究開発を実施した。得られた疫学情報、臨床情報、細菌学的情報と共に、血液サンプルを活用して、難治化していない新規の結核患者、及び結核症を発症していない正常タイ人と比較する事により、多角的に難治化に関する因子の同定を進めた。チェンライ県で結核研究の検体バンクとコホートでの血漿より、再発例30名、治療失敗例29名、慢性排菌例15例の血漿を活用して、通常の初発結核(再発なしを確認) 30例、結核症のない健康人30人と比較した。血漿中グラニューライシンの値は、結核症でない正常人と初回結核群では有意差がなかった。しかし、再発例、治療失敗例、慢性排菌例の難治性結核が通常の初回結核と比較して有意に高かった。同じ患者群について、血漿中インターフェロン・ガンマを測定した。結核症でない正常人では、殆ど皆無であったが、結核患者では全ての群で有意に高く同定された。しかし、再発例、治療失敗例、慢性排菌例の難治性結核が通常の初回結核と比較して測定値が異なることはなかった。今後、治療の経過による変化が、ツベルクリンや結核死菌で刺激した前後でどうなるかを突き止め、これらの免疫マーカーを指標として、何らかの免疫賦活療法が適応となるかどうか検討したい。

A. 研究目的

タイ最北端のチェンライ県において、難治性結核患者（多剤耐性・再発・治療失敗例）の検体バンクとコホート研究を立ち上げ、結核症に対する研究開発のフィールド基盤を作成した。得られた疫学情報、臨床情報、細菌学的情報と共に、血液サンプルを活用して、難治化していない新規の結核患者、及び結核症を発症していない正常タイ人と比較する事により、多角的に難治化に関する因子の同定を進めた。

B. 研究方法

結核研究所が主体となり、タイNIH、長崎大学等とコンソーシアムを組んで運営しているタイ国チェンライ県の結核研究フィールドを活用して、(1)難治性結核患者（多剤耐性・再発・治療失敗例）の検体バンクとコホート研究を立ち上げた。(1)の群に関しては、菌側のRFLP等の標準タイピングを活用して、厳格に内因性の再燃と外来性再感染を区別している。(2)結核治療に反応が良く再発をしなかった群、結核に罹患していない(3)正常タイ人のコントロール群を設定し、比較の対象としたい。取り込み時にケース・コントロール研究の形態にて、(1)と(2)の比較にて結核症の難治に関しての種々の要因検討、(3)と結核症群(1-2)の比較にて、結核自体の発症に関連する様々な臨床疫学、遺伝疫学、免疫学的な種々の宿主因子の検討を進めた。岡田班長は、多剤耐性結核患者でキラーTリンパ球の分化因子やキラーT蛋白やToll like receptorで免疫応答が悪化している事を発表しおり、検討事項とした。

結核研究所はエイズに関連する結核症のフィールド研究を指向し、1995年よりタイ保健省との覚え書きの

基に、結核研究所職員と関係者をタイ国チェンライ県に駐在させ、TB/HIV Research Projectという国際共同研究プロジェクトを実施している。1996年にチェンライ県全県の喀痰塗抹陽性結核患者を対象として開始した薬剤耐性サーベイランスの開始以来、臨床分離結核菌株はタイ保健省結核課に保存されている。結核菌のDNA指紋法を活用して結核菌の感染ルート解明も追究している。また早期より、自発的HIV検査とカウンセリングを強化し実施している。結核登録を活用したサーベイランスに関しては1987年までに遡って入力をして、結核疫学上の動きを見ると共に、薬剤耐性サーベイランスの治療歴の確認等に活用している。WHO方式のコホート治療結果評価を1995年登録の患者より実施している。更に、チェンライ県衛生局と協力して死亡統計や結核とエイズのサーベイランスデータを統合・電算化し、長期的予後の検索が可能なフィールドに確立している。チェンライ県は、住民登録での人口は推定にて1,310,000人で、タイの中でも大きな県である。出稼ぎも少なく人口は安定している。チェンライ県には、県病院としてのチェンライ病院(Chiang Rai Regional Hospital)と、各郡に1つ存在する16の郡病院(District Hospital)がネットワークを形成している。チェンライ病院、エイズや結核等の感染症診療では住民の最終診断・治療の場所となっている。国民皆保険制度にて、基礎的な患者フォローアップもされている。

患者サンプルは末梢血から血漿とPBMCに分離し、ツベルクリンや、結核死菌の刺激前後で血漿中のインターフェロンガンマ量とグラニューライシン量を、マヒドン大学学術担当副学長Srisin教授の基で、大学院博士課程を学んでいるNada氏を日本へ招聘し、岡田班長の

実験室でアッセイを習得してもらった。同じELISA法のプロトコールにて、タイNIHの協力を得て測定した。(倫理面への配慮)

タイ国側については、タイ保健省倫理委員会の定める倫理規定に沿って研究を実施している。参加研究者全員の合意を得た研究プロトコールを作成し、タイ国保健省倫理委員会および関連研究施設の倫理委員会に提出し、今回のプロトコールも正式な研究として承認を得た。

本研究に参加する患者については、担当医師による十分な説明の後、書面によるインフォームドコンセントを得た。研究を通して得られた個人情報厳密に管理し、参加研究者以外のものが内容を知り得ることはない。現在までの日泰間の共同研究でこれらの基本原則を遵守し、更に、検体等の日泰間の移動等に関しては文書での Material Transfer Agreement 等結び、知的財産権(パテント)等の問題も含め国際共同研究に関連した倫理的な問題に配慮してきた実績がある。コホートの参加者にはインフォームド・コンセントに基づく自発的な参加を実施し、参加者のフォローアップにも強制は加えなかった。なるべく、医療的な利益が参加者に得られる様に、タイ保健省の発行する国民健康保険への参加の支援等を行っている。タイ人若手研究者の育成の為、Nada氏を岡田班長の基でトレーニングしたのは意義深い。現在タイ国にて本研究を主体となり進めた。

C. 研究結果

昨年度まで、チェンライ県で結核研究の検体バンクのプロトコールにてコホートとしてフォローアップが認められている患者群について、対象となる患者群を同定した。初発例が440名、再発例11名、治療失敗例25名、慢性排菌例9例、治療脱落后再排菌例が34例、合計520例のPBMC、血漿、菌体が保存してある検体バンクを活用した。この中で、多剤耐性結核症例は、初発例で8例(1.8%)、再発例で1名(9.1%)、治療失敗例で4名(16.0%)、慢性排菌例1例(11.1%)、治療脱落后再排菌例で4例(11.8%)含まれていて、再登録例で初発例と比較して頻度が非常に高い。また、WHO式のコホート治療成績の分析で治療失敗となる率(治療途中を除いて)が、初発例で16例(4.5%)、再発例で1名(11.1%)、治療失敗例で4名(16.7%)、慢性排菌例4例(50.0%)、治療脱落后再排菌例で4例(13.8%)とこれも、再登録例で初発例と比較して非常に高い。よって、再登録結核症例を初発例と比較しながら、難治性結核のメカニズムを検討する事の有用性が示唆された。

今年度は、このチェンライ県で結核研究の検体バン

クとコホートでの血漿より、再発例30名、治療失敗例29名、慢性排菌例15例の血漿を活用して、通常の初発結核(再発なしを確認)30例、結核症のない健康人30人と比較した(表1)。

血漿中グラニューライシンの値は、結核症でない正常人と初発結核群では有意差がなかった。しかし、再発例、治療失敗例、慢性排菌例の難治性結核が通常の初回結核と比較して有意に高かった(表2、図1)。

同じ患者群について、血漿中インターフェロン・ガンマを測定した。結核症でない正常人では、殆ど皆無であったが、結核患者では全ての群で有意に高く同定された。しかし、再発例、治療失敗例、慢性排菌例の難治性結核が通常の初回結核と比較して測定値が異なることはなかった(表3、図2)。

この検体バンクの菌株より、再発例に関して、以前の菌が得られる例が77例同定されて、結核菌指紋分析と症例検討を進めている。また、再発(Relapse)例のみならず、治療失敗例、慢性排菌例についても同様に検討を進めている。現在まで得られている39例では、再発例で、前と同じ菌による再燃(reactivation)と考えられる症例が80%、前と違う菌により再感染(reinfection)と考えられる症例が20%の比率であった。

長崎大学は世界保健ニーズに応える医薬品研究開発ディプロマコースを熱帯医学研究所でタイ国チュラロンコン大学、タマサート大学と共同して開催されている機会にて、結核に関する研究開発の課題をタイ人の研究者を長崎に招聘して検討した。結核の多剤耐性結核、再登録例にも活用できる薬剤の開発を国策として推進しているタイでは、倫理的な課題を論理的に整理して研究開発を進める可能性が示唆された。

表 1 The number of tuberculosis patients and normal healthy controls among 134 individuals by HIV status.

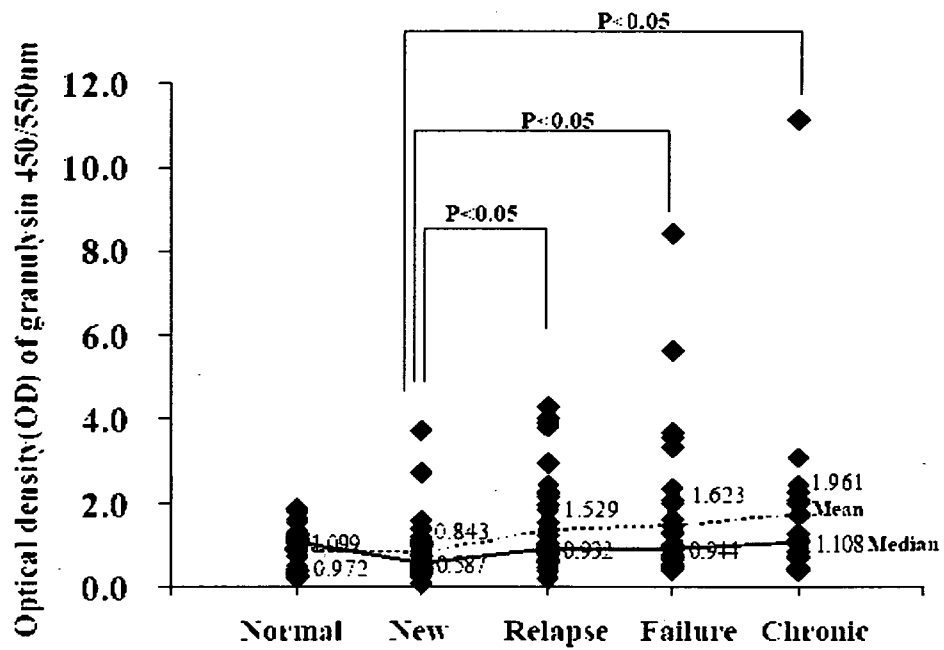
Group	HIV Status		No. of cases
	Positive	Negative	
Normal	0	30	30
New	5	25	30
Relapse	14	16	30
Failure	7	22	29
Chronic	3	12	15
Total	29	105	134

表 2 The optical density (OD) of granulysin among different groups.

Group	No. of patient	Optical density of Granulysin 450/550nm			
		Mean	SD	Range	median
Normal	30	0.972	0.039	0.211-1.868	1.099
New	30	0.843	0.022	0.089-3.718	0.587
Relapse	30	1.529	0.048	0.198-4.273	0.932
Failure	29	1.623	0.071	0.411-8.400	0.944
Chronic	15	1.961	0.164	0.346-11.10	1.108
Total	134	1.386	0.069	0.251-5.872	0.934

表 3 The optical density (OD) of IFN-gamma among different groups.

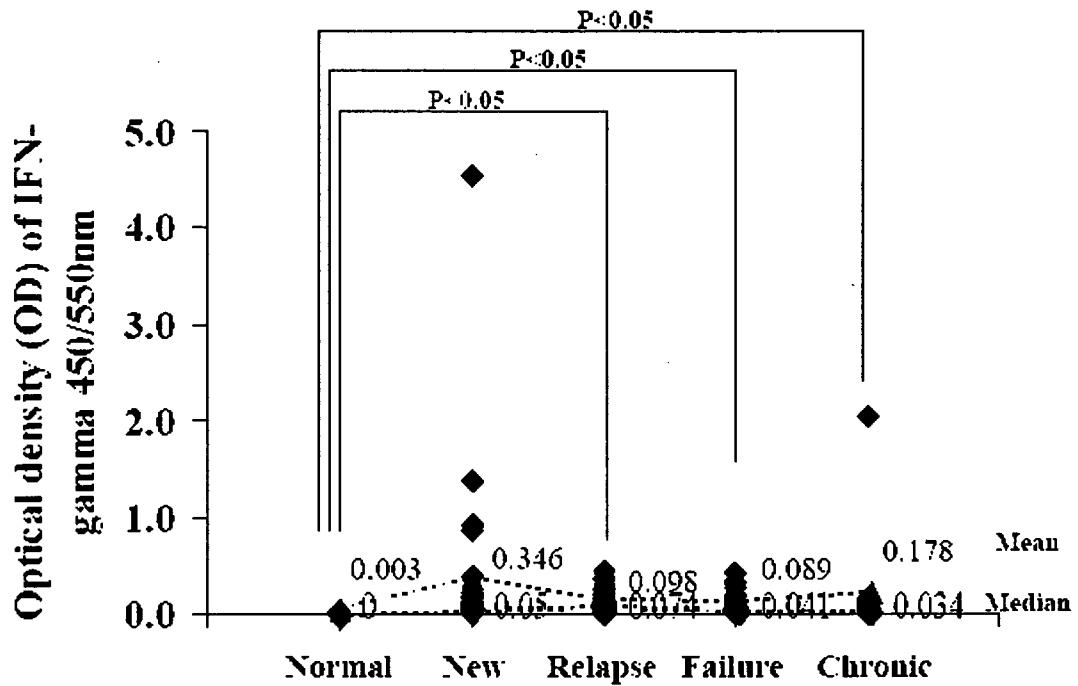
Group	No. of patient	Optical density of IFN-gamma 450/550nm			
		Mean	SD	Range	median
Normal	30	0.003	0.002	0.000-0.018	0.000
New	30	0.346	0.027	0.005-4.548	0.050
Relapse	30	0.098	0.007	0.000-0.435	0.074
Failure	29	0.089	0.012	0.000-2.035	0.041
Chronic	15	0.030	0.178	0.000-2.035	0.034
Total	134	0.143	0.016	0.001-1.490	0.040



The mean optical density of granulysin among different groups Was compared by Mann-Whitney test.

Group	Mann-Whitney test	p-value
Normal vs New	-1.656	0.098
Normal vs Relapse	-1.020	0.308
Normal vs Failure	-0.895	0.371
Normal vs Chronic	-1.204	0.229
New vs Relapse	-2.720	0.007
New vs Failure	-2.153	0.031
New vs Chronic	-2.251	0.024
Relapse vs Failure	-0.538	0.590
Relapse vs Chronic	-0.096	0.923
Failure vs Chronic	-0.433	0.665

☒ 1 The comparison of granulysin level in each group



The mean optical density of IFN-gamma among different groups was compared by Mann-Whitney test.

Group of patient	Mann-Whitney test	p-value
Normal vs New cases	-6.190	0.000
Normal vs Relapse	-6.072	0.000
Normal vs Failure	-5.786	0.000
Normal vs Chronic	-3.277	0.001
New cases vs Relapse	-0.421	0.673
New cases vs Failure	-0.986	0.324
New cases vs Chronic	-1.505	0.132
Relapse vs Failure	-0.622	0.534
Relapse vs Chronic	-1.156	0.248
Failure vs Chronic	-0.891	0.373

Figure 2 The comparison of IFN-gamma level in each group

D. 考察

結核患者の血漿中グラニューライシン値は正常人よりも難治性結核で高い傾向があった。岡田班長がCD8陽性キラーTでin vitroで発見した現象（TB患者やMDR-TB患者ではキラーTリンパ球内のグラニューライシンやin vitro培養上清中Graが低下）と矛盾しない、慎重な考察が必要である。可能性の1つは15k granulysinと9k granulysinの分泌量の差とも思われる。結核の活動性が高い時は血漿中グラニューライシンが低下し、治療や薬剤投与で上昇等、TBのstageや薬剤投与の影響について報告がある。患者のstageや治療を詳細に解析する前向きコホート研究が重要。現在、前向きコホートではPPD-tuberculinと結核死菌でStimulationして培養した検体を保存しているが、それを活用して検討を進める。

岡田班長の志向する「免疫賦活療法」の研究開発には、研究開発のボランティアの対象となる難治性結核患者で、指標となる免疫マーカーが変化しているかどうか突き止めて、次に免疫賦活療法がそれを指標として活用できるか検討するステップが必要と指摘された。今後は、今回測定した免疫マーカーがその様な意義に活用できるか検討を進めたい。

本研究は非常にユニークな研究である。元々疫学上のコホート研究のために整備されたフィールドを臨床免疫学的研究に利用する学際的な研究である。本岡田班は、アジア地域との研究ネットワーク活用による研究開発であり、現地での研究基盤が欠かせない。

長崎大学は海外拠点も活用した国際的な医薬品の製品開発の分野において、バイオニアの活動を展開しており、結核分野においても結核専門家と連携をしながら、多剤耐性結核の制御に役立つ製品開発のあり方を検討できる。

タイ国では、BCGは東京株を使用しており、またBCGレコンビナントにてHIVワクチンを開発してきた事より、結核ワクチンの開発に関して興味を持っている。岡田班長はアジアにおける数少ない結核ワクチンの開発者であり、共同研究の意義は深い。

E. 結論

北タイ・チェンライ県において、難治性結核患者（多剤耐性・再発・治療失敗例）の検体バンク、コホート研究を進めた。今回測定した2つの免疫マーカーの詳細な意義を今後、倫理委員会の承認が得られた前向きコホート研究で進めている。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yanai H, Thiem VD, Matsubayashi T, Huong VTT, Suzuki M, Mai LP, Anh NH, Tho LH, Minh TT, Yoshida LM, Kilgore P, Anh DD, Ariyoshi K The Khanh Hoa Health Project: Characterization of

Study Population and Field Site Development for Clinical Epidemiological Research on Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases Tropical Medicine and Health 2007;35(2)61-63

2. 学会発表

1. Suzuki M, Thiem VD, Yanai H, Matsubayashi T, Yoshida LM, Tho LH, Minh TT, Anh DD, Kilgore P, Ariyoshi K Update of pediatric respiratory infection study in Nha Trang, Vietnam. The 3rd Asian Research Forum on Emerging and Reemerging Infections, Osaka, Japan, January 28-29, 2008.
2. Thiem VD, Goto K, Tanimura S, Tsuzuki A, Suzuki M, Tho LH, Kilgore P, Ariyoshi K, Mizota T, Takagi M, Yanai H, Anh DD Utility and methodological development of geographic information systems (GIS) in Khanh Hoa Health Project The 1st Research Seminar, "The Collaborative Study on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases in Vietnam: Enhancement of Research Capacity" program, National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE), September 20, 2007, Hanoi, Vietnam

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
該当なし

中国東北部における多剤耐性結核菌の流布調査とタイにおける小児結核の病態解析

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

研究要旨

結核の高精度の診断方法を開発するために、TBGL抗体と結核の病態との関連を解析した。またアジア諸国との共同研究も推進し、中国東北部における多剤耐性結核菌の流布状況を明らかにし、タイにおいては、小児を対象にTBGL抗体と結核の病態との関連を解析した。

A. 研究目的

結核の病態は、地域によって様々に異なることが知られている。我々はアジア地域との研究ネットワークを活用して、多剤耐性結核を含む結核の病態を明らかにし、高精度の結核診断方法を開発するために中国東北部において調査研究を実施した。ハルビン医科大学と共同研究を行い、同地における多剤耐性結核菌の分布状況を明らかにするために、薬剤感受性試験を実施した。タイとの共同研究も実施し、小児の結核を対象に結核の病態を明らかにすることと、これまで我々が研究してきたTBGL抗体の結核診断への応用を検討することを目的とした研究を行った。

B. 研究計画

薬剤感受性試験

サンプルの属性：ハルビン市胸部疾患病院で診断された結核患者から242名のサンプルを得た。平均年齢は45.9歳、男性は179名で女性は63名。

問診：現在の結核の病状、喀痰検査、結核の病歴と治療歴、リスク・コンタクト、BCG接種歴、PPD検査の結果、自覚症状（咳、息切れ、体重減少、発熱、消耗など）を検査と問診で得た。

塗抹試験：Ziehl-Neelsen染色により行った。判定基準は以下のとおりである。

Negative (-): 0 acid-fast bacilli / 50 view fields

Positive (+): 1~3 acid-fast bacilli /
50 view fields

Positive (1+): 10~99 acid-fast bacilli /
50 view fields

Positive (2+): 1~9 acid-fast bacilli /
50 view fields

Positive (3+): 10~99 acid-fast bacilli /
50 view fields

Positive (4+): ≥100 acid-fast bacilli /
50 view fields

培養：固形培地による培養と液体培養を行った。固形培養では、3%のNaOH処理を施したLowenstein Jensen (LJ)培地を用いて最長8週間の培養を行った。24日後に以下の基準により判定を行った。

Positive (1+): コロニーが領域の1/4を占める

Positive (2+): コロニーが領域の1/2を占める

Positive (3+): コロニーが領域の3/4を占める

Positive (4+): コロニーが領域の全てを占める

液体培養では、ベクトンディッキンソン社のBBL™MGIT™を用いた。42日後までにコロニーが観察されない場合にnegativeと判定した。

薬剤耐性試験：LJ培地に薬剤を添加して培養を行った。4種類の薬剤、ストレプトマイシン (S) イソニアジッド (H) リファンピシン (R) エタンブトール (E) を用いた。

被験者群の定義：患者を初診時の結核治療歴によって新規症例と治療経験群に分けた。新規症例は、結核の治療経験のない患者あるいは治療経験が4週間未満である患者、治療経験群は、抗結核薬の服用経験が4週間以上ある患者とした。

TBGL抗体の結核診断への応用

以下の項目について、測定方法の検討を行った。

1. タイ人結核患者を対象にTBGLとKL-6による結核の病態解析をおこなう。
2. 大人と子どもでTBGLへの反応がどのように違うかを比較する。
3. 抗TBGLのカットオフ値の評価と確定を行う。
4. KL-6値と結核の病態の相関を明らかにする。

C. 研究結果

中国東北部における多剤耐性結核菌の流布調査

患者属性：結核の治療歴について、有りと答えた患者は37% (90名) 無しは63% (152名)であった。初診時の診断は表1のとおりである。

表1：初診時の診断結果

Diagnosis	人数 (n=242)
Primary TB	0
Hematogenous type of pulmonary TB	0
Secondary TB	212
with other extra-pulmonary TB	2
with pleural tuberculosis	10
with vacuole	未集計
Pleural tuberculosis	10
with other extra-pulmonary TB	1
Other extra-pulmonary TB	7

薬剤感受性試験結果

結果を表2に示す。半数を超えるサンプルが何らかの薬剤耐性を持つことが示された。

さらに薬剤耐性の詳細を明らかにするために、単剤耐性/多剤耐性の別を分析した。まず、4種類の薬剤のいずれかのみ耐性を示したものを表3に示す。単剤のみ耐性を示したものは、42サンプルで全体の17.4%であった。表2より何らかの薬剤に耐性を示したものが137サンプルあったこととあわせて考えると、

137サンプル中42サンプルのみが単剤耐性で、残りは複数の薬剤への耐性を持つことが明らかとなった。

前述のとおり今回試験を行ったサンプルについては、7割が複数の薬剤に耐性を持つ結核菌であることが示された。そこで薬剤耐性のパターンを明らかにするために、どのような薬剤に耐性を持っているのか、その組み合わせを分析した。その結果を表4に示す。

表2：薬剤感受性試験結果（概要）

	サンプル数(% (n=242)
All susceptible	105(43.3%)
Any drug resistance	137(56.6%)
SM	92(38.0%)
INH	103(42.6%)
RFP	61(25.2%)
EMP	60(24.8%)

表3：薬剤感受性試験結果（個別薬剤）

	サンプル数(% (n=242)
Mono-resistance	42(17.4%)
SM	17(8.55%)
INH	11(7.0%)
RFP	5(2.0%)
EMP	9(3.7%)

表 4 : 薬剤感受性試験結果(詳細)

Resistance to multiple drugs	サンプル数(%) (n=242)
Resistant to two drugs	36(14.9%)
INH+ RFP	6(2.5%)
INH+ SM	24(9.9%)
INH+ EMP	3(1.2%)
SM+ RFP	0
SM+ EMP	3(1.2%)
RFP+ EMP	0
Resistant to three drugs	34(14.0%)
INH+ RFP+ EMP	11(4.5%)
INH+ RFP+ SM	14(5.7%)
INH+ EMP+ SM	9(3.7%)
RFP+ EMP+ SM	0
Resistant to four drugs INH+ RFP+ EMP+ SM	25(10.3%)

表 4 に示すとおり、4種類全ての薬剤に耐性を持つサンプルの存在が明らかとなった。その割合は、今回の

サンプルの10%をしめた。INHとRFPへ同事に耐性を持つサンプルは、20%以上であった。

TBGL抗体の結核診断への応用
以下6例について結果を整理したので報告する。(表 5)

表 5 : タイ子ども病院症例一覧

Case 1:	2歳 女 母親が結核(Sputum AFB+) Tuberculin テスト 15mm CXR-Infiltration+ Adenopathy, 胃洗浄液AFB- 菌培養は保留
Case 2:	6ヶ月 男 母親が結核, Tuberculin テスト 12mm CXR-Infiltration, 胃洗浄液 AFB- 菌培養は保留
Case 3:	2歳 男 発熱・咳・頸部リンフォアデノパシー Tuberculin テスト CXR-Infiltration miliary pattern, 胃洗浄液AFB- 菌培養は保留
Case 4:	6ヶ月 女 発熱・頸部リンフォアデノパシー Tuberculin テスト 15mm CXR-Infiltration 胃洗浄液AFB- 菌培養は保留 リンパ節
Case 5:	生検により結核の疑い濃厚 10歳 女 兄が結核(粟粒結核), Tuberculin テスト 40 mm CXR-Hilar adenopathy, 喀痰 AFB- 菌培養は保留
Case 6:	11歳 男 右胸膜effusion Tuberculin テスト 12mm CXR- right pleural effusion, 喀痰 AFB- 菌培養は保留 胸膜生検により慢性肺線維 症と診断

これらのうち、Case5ではTBGL抗体とKL-6が高値を示した。症例は、1歳 女 喀痰陽性 PPD20mm リスクコンタクトは父親。症状は、発熱、咳漱、息切れ。粟粒結核と結核性の髄膜炎を合併。白血球20590 血小板1063000 AST43 ALT115 IgG 1925mg/ml IL-6 6.2pg/ml KL-6 2080U/ml TBGL 6.3 U/mlであった。X線全肺野にpatchyな consolidationが無数あり、その他に薄い間質影と小結節影多数認められた。左肺に胸水もあり、結核の disseminationを強く疑わせた。しかし、他の感染症や、心不全もないとは言えないことから断定はできない。CTでは、脳室の拡大があり、実質は、後頭葉に大きな lowがあるようにも見えるが、造影効果なく感染所見かどうか不明である。脳室が拡大していることから、結核性髄膜炎の可能性はある。

D. 考察

今回の薬剤感受性試験では、57%が何らかの薬剤耐性であることが示された。このことは、結核の治療経験のある患者が37%を占めたとはいえ、同地における結核のかなりの部分が薬剤耐性を持つ結核菌によるものであることが示された。

タイとの共同研究では、既に何らかの治療が入っているケースが多く、望ましいデータを得るのは容易ではなかった。より多くのデータを集めるために、タイでチームを組織して、データ整理の方法を検討している。

さらには、より詳細な検討を行い、地域による結核の病態の違いの背景にある機構の解明も試みたい。すなわち、熱帯地域の結核には、肺線維症が多い。また、BCGの効果が見られないという報告もある。これは、同地域では結核菌に対する免疫反応が、日本人において一般的であるTh1ではなく、Th2であることによるという解釈がある。一方で、Th2反応では線維化マーカーとして知られているTGF β も誘導される。これらのことと今回の結核診断結果と関連づけた検討が行われれば、病態の違いの背後にある免疫反応を明らかにすることが期待できる。

中国ではハルビン医科大学のリン・ホン教授と、収集した500サンプルの薬剤感受性試験継続する。すでに現地でXDR-TBの薬剤感受性試験実施に必要な課題の検討を行い培養キットの検討等を行った。Minimum Inhibitory Concentration (MIC) 判定については、日本からの指導が行えるよう準備している。

E. 結論

アジア諸国との共同研究も推進し、中国東北部における多剤耐性結核菌の流布状況を明らかにし、タイにおいては、小児を対象にTBGL抗体と結核の病態との関連を解析した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ashino Y, Guio H, Iwamoto A, Yano I, Matsumura T, and Hattori T. Serological response against MAC glycolipid antigens in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Microbiology and Immunology*, (in press).
2. Mizusawa M, Kawamura M, Takamori, M, Kashiyama T, Fujita A, Usuzawa M, Saitoh H, Ashino Y, Yano I, Hattori T. Increased synthesis of anti-TBGL IgG and IgA with cavity formation in pulmonary tuberculosis. *Clinical Vaccine and Immunology*. (in press)
3. Shishido Y, Mitarai S, Otomo K, Seki M, Sato A, Yano I, Koyama A, Hattori T. Anti-tuberculosis drug susceptibility testing of *Mycobacterium bovis* BCG. *Int J Tuberc Lung Dis*. 11(12):1334-8,2007
4. Inoue Y, Tanaka N, Tanaka Y, Inoue S, Morita K, Zhuang M, Hattori T, Sugamura, K. Clathrin-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into target cells expressing ACE2 with the cytoplasmic tail deleted. *J. Virol*. 2007. Aug;81(16):8722-9.
5. Zhang J, Yamada O, Kawagishi K, Yoshida H, Arakia H, Yamaoka S, Hattori T, and Shimotohno K. Up-regulation of hepatitis C virus replication by human T-cell leukemia virus type I-encoded Tax protein. *Virology*, 369(1): 198-205,2007
6. Zhang J, Hattori T. Small RNA Molecules as Therapeutic Gents for Viral Infectious Diseases, *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2: 103-113,2007
7. Usami O, Ashino Y, Komaki Y, Tomaki M, Irokawa T, Tamada T, Hayashida T, Teruya K, Hattori T. Efavirenz-induced neurological symptoms in rare homozygote CYP2B6 *2/*2 (C64T). *Int. J. STD AIDS*. 2007 Aug;18(8):575-6.
8. Tamada T, Nara M, Tomaki M, Ashino J, Hattori T. Secondary bronchiolitis obliterans organizing pneumonia in a patient with carbamazepine-induced hypogammaglobulinemia. *Thorax*, Jan. 62: 100,2007

9. Tomaki M, Sugiura H, Koarai A, Komaki Y, Akita T, Matsumoto T, Nakanishi A, Ogawa H, Hattori T, Ichinose M. Decreased expression of antioxidant enzymes and increased expression of chemokines in COPD lung. *pulmonary pharmacology & Therapeutics*. 20: 596-605, 2007
10. Guio, H.; Okayama, H.; Ashino, Y.; Saitoh, H.; Xiao, P.; Miki, M., Yoshijara, N., Nakanowatari, S., Hattori, T. Method for efficient storing and transport of sputum specimens for molecular testing of tuberculosis *The Int J Tb Lung Dis*. 2006, 10:906-10.
11. Nara M, Sano K, Ogawa H, Tamada T, Nagaoka M, Okada K, Watanabe M, Moriya T, Miki H, Nakata K, Ichinose M, Hattori T. Serum Antibody Against Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor and KL-6 in Idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Tohoku J Exp Med*. 2006, Apr;208(4):349-54.
12. Usami, M. Nara, T. Tamada, T. Kitamuro, M. Tomaki, Y. Ashino, K. Onodera, S. Miyazaki, T. Moriya and T. Hattori. Systemic Sarcoidosis Associated with Double Cancers of the Esophagus and Stomach. *Internal Medicine*, Vol.46 (2007), No. 24.
13. 服部俊夫, 巽浩一郎, 岩垣博己, 佐久間光江. ウイルス感染とバイオディフェンス. *Mebio*. 24:16-21, 2007
14. 服部俊夫, 岡田信司. 内部障害のリハビリテーション. 佐藤徳太郎編 医師薬出版株式会社 HIV感染症. 213-228, 2007
2. 学会発表
1. Usuzawa M, Haorile, Imamura J, Pyanoot J, Warunya P, Medina P, Demetria CS, Miranda ME, Suzuki Y, Oshitani H, Hattori T. ANTI-RABIES ANTIBODIES IN JAPANESE VOLUNTEERS IMMUNIZED WITH IMPORTED VACCINE. *Health Security in the tropics*. 29-30 November 2007, Bangkok
2. Hattori T, Peng X, Usami O, Ling H, Zhuang M, Suzuki H. Isolation of CD4-independent HIV-1 from a patient with Pneumocystis pneumonia that can efficiently enter and replicate in primary cultured human hepatocytes though CXCR4. Late breaker presentation. 4th IAS Conference on HIV pathogenesis, Treatment and Prevention. 22-25 July 2007, Sydney, Australia
3. T. Hattori, Y. Suzuki, O. Usami, H. Saitoh, Y. Ashino, A. Theo, H. Kikuchi, Y. Oshima, L. Obi. Towards the discovery of novel anti-HIV agents in South-African herbs Application of a novel CD4 independent isolate SDA-1 1st Tohoku University Innovation Forum, San Francisco, 2007. 招待講演
4. Usami O, Xiao P, Nakasone T, Hattori T. Anti-gp41 immunity of pneumocystis (pc) patients. *ATS*, San Diego, 2006.
5. Theo Andros, 鈴木康弘, 菊地晴久, 今村淳治, 大島吉輝, 服部俊夫. 南アフリカの薬用植物からの抗HIV成分の単離. 第21回日本エイズ学会学術集会・総会. 2007.11.28, 広島
6. 今村淳治, 鈴木康弘, 肖鵬, 宇佐美修, Warunya Promjunyakul I, 服部俊夫. 初代培養正常ヒト肝細胞およびB細胞に感染増殖するCD4非依存性 HIV-1臨床株SDA-1の検討. 第21回日本エイズ学会学術集会・総会. 2007.11.28, 広島
7. 鈴木康弘, 横山勝, 佐藤祐徳, Warunya Promjunyakul I, 今村淳治, 服部俊夫. CD4非依存性 HIV-1臨床分離株SDA-1の責任領域のコンピュータ及び分子生物学的な解析. 第21回日本エイズ学会学術集会・総会. 2007.11.28, 広島
8. Min Zhuang, Yasuhiro Suzuki, Toshio Hattori. Medicinal herb extract inhibits internalization of Transferrin receptor. TOWARD ADVANCED USE OF AFRICAN RESOURCES IN PLANT SCIENCE. 2007.11.20, 横浜
9. 井上雄喜, 田中伸幸, 井上真吾, 森田公一, 庄 敏, 服部俊夫, 菅村和夫. ACE2細胞内領域欠損受容体を介したSARS-CoV感染機構. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 2007.10.21-23, 札幌
10. 庄 敏, 鈴木康弘, 蔣 虹, 張 連峰, 秦 川, 服部俊夫. 桂皮のブタノール画分とタンニン酸はトラスフェリンのエンドサイトーシスを阻害し、SARSウイルスの感染も阻止する. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 2007.10.21-23, 札幌
11. 服部俊夫. ウイルス感染とバイオディフェンス—注目される補中益気湯の可能性—. インフルエンザ ストラテジー 2007 ~漢方医学から考える~. 2007.10.20, 盛岡

12. 井上雄喜, 田中伸幸, 田中義乃, 井上真吾, 森田公一, 庄 敏, 服部俊夫, 菅村和夫. SARS-CoV 感染における受容体ACE2細胞内領域の役割. 第61回日本細菌学会東北支部総会. 2007.8.23-24, 仙台
13. 玉田 勉、奈良 正之、服部 俊夫. 気道分泌腺の水・電解質分泌に関わる調節機構. 第5回肺研究フォーラム21 (気道分泌研究の新しい潮流) . 2007.5.12, 東京
14. 玉田 勉、奈良 正之、服部 俊夫. 内因性NOの気道分泌における調節機構. 第47回日本呼吸器学会総会. 2007.5.12, 京
15. 玉田 勉、奈良 正之、服部 俊夫. CFTRを介したCl⁻およびHCO₃⁻分泌の細胞内メカニズムについて. 第27回気道分泌研究会. 2007.4.14, 鹿児島
16. 芦野有梧, 西巻雄司, 服部俊夫. 当院における肺日和見感染を合併した後天性免疫不全症候群 (AIDS) 発症患者の臨床像の検討. 第46回日本呼吸器学会, 東京. 2006.

インド・デリーの多剤耐性結核菌に関する研究拠点の確立に関する研究

分担研究者 高鳥毛敏雄 大阪大学大学院医学系研究科 特任教授（常勤）
研究協力者 田丸亜貴 大阪府立公衆衛生研究所 研究員

研究要旨

インドにおける治療失敗例結核菌の分子遺伝学的特徴を把握し結核菌株の特徴を明らかとすることを目的とした。そのため本年度は結核菌の共同研究を行うためにインドにおいて結核菌研究を行うための研究拠点をもとに研究役割分担の取り決めを行うことを計画し実施した。しかし、研究を実施するためには、インドの結核菌を生物活性のない不活化DNAであっても国外に持ち出すにはインド政府科学技術省の許可が必要であり、研究許可手続きを昨年引き続き行った。本年度は、現地に検査資材を持ち込み、検査の技術移転して検査を行うことを計画して作業を進めた。これについても現地では大学の許可は得ることができたが、インド政府の研究許可はおりず研究交流を行うことしか出来なかった。平成20年2月になりインド政府の研究許可を得る目処がたち、来年度からはインドにおいて地域ベースの結核菌研究が行える見通しがついたことは本研究事業を進めることによって唯一得られた成果であった。

A. 研究目的

①population based study によるインド由来結核菌の分子遺伝学的特徴の把握及び感染経路の解明、②分子生物学的手法を用いたインドにおける治療失敗例結核菌の分子遺伝学的特徴の把握、③日印の技術交流によるインドでの菌検査精度向上、迅速化、を目的とした。

B. 研究方法

インド国・ニューデリーの Vardhman Mahavir Medical College の Prof. Saudan Singh の協力を得て、同大学公衆衛生学講座、Safdarjung Hospital 併設結核センター、同病院感染症病理検査センターの細菌検査室（以下、研究協力施設）との研究協力の関係を構築し、インド臨床分離結核株と日本における臨床分離株について菌株の遺伝子型別分析を行うために必要な、分子疫学に最適な VNTR 対象 locus の研究を実施することを計画した。

研究の許可を得た後に、研究を直ちに行うためにインドの研究施設において結核菌遺伝子型の population based study のため研究協力施設における塗抹陽性喀痰の処理済み沈査をすべて収集、保管し、提供してもらい、2006 年度分離の MDR-TB 菌株の加熱死菌の提供してもらい、上記提供検体については、日本で研究分担者・協力者（高鳥毛、田丸）による結核菌同定、耐性遺伝子検出、遺伝子型別分析を実施する、LAMP 法による結核菌同定と VNTR 法による遺伝子型別法を Safdarjung Hospital 細菌検査室において実施できるように技術提供を行う、の 4 点の取り決めを行った。VNTR 型別については RFLP 分析と同等以上の解析能を有する 18loci-VNTR 型別法を確立し、18loci-VNTR 型別は遺伝的類似の高い大阪府内の結核分離株も詳細に分類する。

（倫理面への配慮）

日本側では、分担研究施設において「抗酸菌の分子疫学」の研究課題名で倫理審査を受け、承認を受けている。

C. 研究結果

昨年度においてインドにおける研究協力施設を定めることができ、本年度は結核菌株について共同研究をすすめることを行うために訪印した。

1) インドにおける結核菌同定検査

本年度は LAMP 法を研究協力施設で実施するべく準備を進めた。しかし訪印時に現地の研究協力者から「インド政府と ICMR の許可が取れていないので、インド国内でもインド由来株を用いた LAMP 法をインドで行えない見通しであると知らされた。LAMP 検査試薬 500 検体分を購入して持参し、現地で日本から持っていった結核菌標準株の DNA による LAMP 法のデモンストレーションを実施し、現地の検査者に対する検査技術を移転し、現地の検査者により研究を行ってもらうことを計画し、現地において交渉を行った。しかし、インド政府の許可がなければ検査デモンストレーションも実施してもらえないとのことにより実施することができなかつた。

2) 共同研究協力施設の再調査

医科大学が新築され、新しい細菌学研究施設ができたことから、あらためてこれまでの検査施設とあわせて研究協力施設の抗酸菌核酸検査室の検査設備を調査した。その結果、核酸検査には旧型のサーマルサイクラーを使っており、また電気泳動槽・恒温槽等の設備も他の検査室との共用使用であり、多数の菌株を取り扱い、菌検査の精度管理を行っていくことは困難な状況にあることが明らかとなった。現地で協議したとこ

ろ医科大学校舎の完成に伴い微生物学教室の実験施設にPCR検査を行えるように器材が整えられる見通しとなった。現在はインドにおいては結核菌のルーチン検査として同定検査、感受性検査が行われておらず、MDR-TBと思われる一部の検体だけしか結核菌同定検査が行われていない状況にあり、現地の耐性菌株情報を得ても地域の流行状況を解釈が難しい状況にあると思われることから情報の提供をもとめることは行わなかった。

3) 日本、インド国の共同研究体制の確立

本年度は現地に検査器材、検査試薬を持っていき研究を実施する予定であったが、インド政府の許可がなかなか下りず研究年度内には研究目的とした結核菌の同定、感受性、分子型別分析を実際に行うことはできず、当初の研究結果を得ることができなかった。しかし、平成18年度、平成19年度の現地での協議の結果、平成20年2月になりインド・デリーにおいて結核菌に関する共同研究を行うことについて政府の許可が得られる見通しになったとの報告が届いた。

本年度の研究の成果はインドと日本の両国で共同して結核菌について共同研究を行うための拠点の形成を確立できたことである。

D. 考察

インドは世界の中で最も多くの結核患者を有する地域である。インドにおける多剤耐性結核菌の状況を明らかにすることは、経済のグローバル化、人々の移動の自由化などに伴い日本のみならず世界の多剤耐性結核菌の感染拡大防止のために重要な研究課題である。本研究ではアジア結核高蔓延地域の薬剤耐性結核菌の遺伝子型、薬剤耐性を明らかにし、その流行状況を明らかにすることを目的とした。またわが国の薬剤耐性菌株との比較分析を行うことにより多剤耐性結核菌流入のモニタリングにつながり、わが国の結核対策に対しても有益であると考えた。また本研究においてインドの対象地域の結核検査技術を移転することによりインドにおける結核対策の推進方策の向上にも寄与することができると考えて実施した。しかし、研究の実施時期は、わが国同様、インドにおいても、知的財産保護、病原体に関わる研究について政府の関与が大幅に変更となる時期と重なり、日本の研究者が現地で検査を行うことも出来ず、また現地の結核菌株をわが国に持ち込むことも出来ない状況となり、結核菌を分析することが出来ない状況で研究が終了してしまっただ。幸いにも、本研究の3年間の働きかけが評価され、平成20年度からは共同研究を行うことについて両国の許可が得られることになったことが最大の成果である。

E. 結論

インドにおける共同研究を行う研究拠点を確保するために、初年度はゴラクプール、アグラ、2年目はリ

ーにおいて研究者と協議を行い協力施設を確保することができた。平成19年度は、現地に検査資材を持ち込み、検査の技術移転して検査を行うことを計画して作業を進めた。しかし、現地では大学の許可は得ることができたが、インド政府の研究許可は審議中であり、研究交流を行うことしか出来なかった。しかし、平成20年の2月にインド政府の研究許可を得る目処がたち、来年度からはインドにおいて地域ベースの結核菌研究が行える見通しがついたことは本研究事業を進めることによって唯一得られた成果であった。インドは中国と並び世界の2大結核大国であり、本研究で進めている結核ワクチンが実用化された際、ワクチンを使った新たな結核対策の推進拠点となることも期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 中田信昭、袴史明、中村夫左央、針原重義、平山幸雄、鈴木陽、下内昭、高鳥毛敏雄:結核高罹患地域における医療施設外来受診者に対する結核検診の意義. 結核, 82(5), 455-458, 2007
2. 高鳥毛敏雄、逢坂隆子、山本繁、西森琢、藤川健弥、黒田研二、磯博康:ホームレス者の結核の実態とその対策に関わる研究—結核検診の3年間の実践から. 結核, 82(1), 19-25, 2007
3. S. Okamoto, A. Tamaru, C. Nakajima, K. Nishimura, Y. Tanaka, S. Tokuyama, Y. Suzuki and K. Ochi. Loss of conserved 7-methylguanosine modification in 16SrRNA confers low-level streptomycin resistance. Mol.Microbiol.63(4), 1096-1106, 2007.
4. 高鳥毛敏雄、高田敏・桑原洋子・逢坂隆子編 ホームレス研究—釜ヶ崎からの発信—、「7 ホームレスの健康と保健・医療」, 172-187, 信山社, 2007.
5. B. Pandey, A. Poudel, T. Yoda, A.Tamaru, Naozumi Oda, Y. Fukushima, B. Lekhak, B. Risal, B. Acharya, B. Sapkota, C. Nakajima, T. Taniguchi, B. Phetsuksiri and Y. Suzuki. Development of in-house Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of Mycobacterium tuberculosis and evaluation in sputum samples of Nepalese patients. JMM in press.
6. Y.Nishiuchi, R.Maekura, S.Kitada, A,Tamaru, (その他、7名). The recovery of avium-intracellulare complex (MAC) from the residential bathroom of patients with

pulmonary MAC. Clin. Infect. Dis., 45(3),
347-51, 2007

2. 学会発表

1. 田丸亜貴 「結核集団発生事例および地域集積株の VNTR 型別」 第 82 会日本結核病学会総会 2007 年、大阪
2. 西内由紀子、田丸亜貴、他 3 名、「肺 Mycobacterium avium complex(MAC)症患者の家庭浴室内における MAC の検出」 第 82 会日本結核病学会総会 2007 年、大阪
3. 河原隆二、田丸亜貴 「接触者健診事例に対する QuantiFERON TB-2G の結果の解析」 第 82 会日本結核病学会総会 2007 年、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況 特記すべきことなし