

必要とし、試薬も高価である。しかし、薬剤耐性結核の場合は、治療開始後1カ月以内に薬剤感受性結果の報告を受けて適切な治療方式へ変更することが治療成否の要であり、その点で本法の迅速性はきわめて有用である。

マイクロプレートを用いたMIC測定法はMiddlebrook 7H9培地を用いた微量液体希釈法によるMIC測定法であり、市販品(プロスミック MTB-I, 極東製薬)が利用できる<sup>10)~12)</sup>。菌を接種後、密閉容器に入れ、7日間炭酸ガス培養を行い、判定する。本法は迅速に成績が得られるが、作業に空気感染の危険性を伴う工程があるので、取扱いには細心の注意が必要である。

(3) 結核菌群リファンピシン耐性遺伝子検査: RFP耐性株の約95%以上は1つの遺伝子上の限られた領域に変異がみられることから耐性遺伝子検査が耐性菌同定に利用可能となった<sup>13)~15)</sup>。市販品にはフィノス LiPa・Rif TB (ニプロ) があり、喀痰から直接に、または分離菌株を用いて検査できる。検査の所要時間は、本キットを用いる前に行われる検体の前処理や被検菌株からのDNAの抽出、および *rpoB* 遺伝子の増幅に要する時間を含めると約数時間が必要である。RFP耐性株の80%以上は複数の薬剤に耐性であることから、本キットによりこれらの耐性菌を迅速に検出し、適切な治療により治療期間の短縮や治療の成功率の上昇を図ることができる。

(4) その他の方法: 従来からの簡易法であるウエルバック培地 S (日本ビーシージー)、結核菌感受性ビットスペクトル-SR (極東製薬) などがあり、概要は表1を参照されたい。

## 2. 実施上の注意点

結核菌の薬剤感受性検査で最も重要な点は接種菌液を均一に調製する点である。菌液の調製法は、①固形培地(小川培地など)の集落を用いて調製する方法と、②液体培地に増菌培養した菌液を用いる方法がある。①は操作が煩雑であり、危険度が高く、また、菌塊が混入しやすいなどの問題点がある。これに対し、②は操作が簡単で、より安全性が高く、菌塊の混入を避けやすいなどの

点で優れている。均一の濃度の菌液を用いることは正確な結果を得るうえで重要なことから、詳細な規定が要求される。また、培養は注意深く観察し、最適の時期に判定すること、耐性菌が検出された場合のチェックポイント(表2)などにも注意が必要である。

## 3. その他

薬剤感受性検査には直接法と間接法がある。直接法は結果が早く得られることや耐性菌と感受性菌との構成比が判定できるなどの利点があるが、一方、正確な濃度の菌液調製が困難であること、材料の前処理操作が薬剤に影響する可能性があること、正確な成績が得難いことから本指針では推奨しないことに決定した。

## まとめ

薬剤感受性検査に関する今回の改訂では、①検査の対象を結核菌に絞ったこと、②標準法は1%小川培地を用いた比率法としたこと、③結果の迅速報告のため、最も迅速に成績が得られ、かつ、国内、国外で十分検討された液体培地を用いた方法を推奨したこと、④接種菌液の調製法を具体的に記述したこと、⑤RFPの耐性遺伝子検出法を加えたこと、をあげることができる。

## 文 献

- Center for Disease Control and Prevention: CDC guidelines for tuberculosis control in health care facilities. *Morbidity and Mortality Weekly Rep.* 1994; 43: 1-13.
- 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編: 「新 結核菌検査指針2000」. 結核予防会. 2000, 95-106.
- 結核療法研究協議会: 入院時薬剤耐性に関する研究. 平成16年度療研研究報告書, 2004.
- 森 亨: 多剤薬剤耐性結核. *臨床と微生物*. 1998; 25: 131-135.
- 河合 健: 多剤耐性結核への対応. *治療学*. 1996; 30: 777-781.
- 吉山 崇, 尾形英雄, 和田雅子: 多剤耐性結核の治療成績. *結核*. 2005; 80: 687-693.
- 日本ベクトン・ディッキンソン: バクテック®MGIT™ 960結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ. ストレプトマイシン, イソニアジド, リファンピシン, エタンブトール. 日本ベクトン・ディッキンソン, 東京, 2002年8月.
- 阿部千代治, 青野昭男, 平野和重: BACTEC MGIT 960システムによる結核菌の迅速薬剤感受性試験: 固形培地を用いる比率法との比較. *結核*. 2001; 76: 657-662.
- NCCLS: Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia, and other aerobic actinomycetes; approved standard. (M24-A). NCCLS, Wayne, PA, USA, 2003, 1-60.
- 山根誠久, 一山 智, 河原 伸, 他: Middlebrook 合成培地での抗酸菌薬剤感受性試験(第3報): 微量液体希

表2 薬剤感受性検査の注意点

|           |  |
|-----------|--|
| 検 査       | ①安全装備と正しい手技<br>②新鮮な培養菌<br>③接種用菌液一菌塊の混入を避ける<br>④判定のタイミング                                    |
| 耐性菌<br>検出 | ①雑菌混入がないか<br>②菌種の同定ミスはないか<br>③培地や試薬の期限切れはないか<br>④検査過程に問題はないか<br>⑤過去のデータはどうであったか<br>⑥主治医に連絡 |

- 釈法を原理とする BrothMIC MTB の多施設評価—調節間再現性と Agar Proportion 法との判定互換性の解析. 臨床病理. 1999; 47: 754-766.
- 11) 比嘉美也子, 斉藤 宏, 山根誠久, 他: 結核菌薬剤感受性試験に関する小川培地を用いた比率法と微量液体希釈法, BrothMIC MTB の判定互換性. 結核. 2002; 77: 61-66.
- 12) 極東製薬工業株式会社: 薬剤感受性(抗酸菌)キット プロミック MTB-I. 極東製薬工業株式会社, 東京, 2006年1月.
- 13) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.: Detection of rifampicin-resistance mutants in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet. 1993; 341: 647-650.
- 14) 阿部千代治, 尾形英雄, 河田兼光, 他: Line Probe Assay (LiPA) によるリファンピシン耐性結核菌の検出. 結核. 2000; 75: 575-581.
- 15) ニプロ株式会社: 結核菌 *rpoB* 遺伝子の変異検出用試薬 フィノス LiPA・Rif TB. ニプロ株式会社, 大阪, 2002年10月.

————— The 82nd Annual Meeting Symposium —————

MYCOBACTERIAL TESTS

Chairpersons: <sup>1</sup>Tetsuya TAKASHIMA and <sup>2</sup>Takeshi HIGUCHI

**Abstract** Tuberculosis is a bacterial disease caused by organisms of the *M. tuberculosis* complex, which is transmitted primarily by airborne droplet nuclei. Rapid and accurate detection of the bacilli is crucial for breaking the chain of transmission. Therefore, mycobacteriology laboratories have a major role to play in it. In this year, "the guideline for testing of *M. tuberculosis*, 2007" has been published. Here, it is emphasized that mycobacteriology laboratories must optimize their procedures for reporting results on the basis of current CDC recommendation: (i) reports of acid-fast examination of specimens within 24 hours of specimen collection, (ii) identification of *M. tuberculosis* within 21 days of specimen collection, and (iii) reports of drug susceptibility tests within 30 days of specimen collection. However, rapid mycobacteriology practices using liquid culture medium have many aerosol-generating handlings. Safety procedures, using a class II biological safety cabinet and so on, must be enforced for protecting laboratory personnel. As the improved technology available for use in mycobacteriology laboratories, such as nucleic acid amplification tests and others, are quite complicated, quality control is much more important than before.

In this symposium, the 6 writers of "the guideline for testing of *M. tuberculosis*, 2007" have described the revised points of each chapters. We, as the chairpersons of this symposium, hope that this symposium would move a step forward toward rapid and accurate mycobacteriology practices in Japan.

1. Mycobacterial examinations and quality assurance: Satoshi MITARAI

It is well recognized that the mycobacterial examinations require careful quality assurances to perform highly reliable and safe laboratory examinations. As of 2003, a questionnaire survey was conducted to investigate the real state of laboratory examinations for mycobacterium. A total of 579 laboratories

(291 of 390 hospitals and 288 of 397 private commercial laboratories) sent the replies, and the results were analysed from the points of quality assurance. Many laboratories adopted the sample concentration method and liquid culture methods. Meanwhile, the quality assurance activities for all examinations were not good enough to keep the quality and reliability. An effective quality assurance system should be necessary to maintain the good laboratory performances.

2. Revised "The guideline for testing of *M. tuberculosis*, 2007": Chiyoji ABE

Rapid detection, species identification, and testing for drug resistance are necessary to control tuberculosis among patients and populations. Tuberculosis control officials and clinicians need access to prompt and reliable tuberculosis laboratory services.

3. The value of proper sputum collection instruction in detection of acid-fast bacillus: Takeshi HIGUCHI

Modern techniques including molecular biology have been applied to routine laboratory works for rapid detection, identification, and drug susceptibility testing of mycobacteria. Even in using such techniques, however, poor quality specimens yield only poor results. To get a high quality specimen, particularly sputum samples, is very important. Therefore, laboratory technicians in our hospital have directly taught each patient how to expectorate good quality sputa since 2001. The teaching of patients has improved the rate of P1 samples from 21.5% to 36.6% by Miller and Jones visual score of sputum. The teaching has also improved the rate of smear positive P1 samples from 11.4% to 28.8%. To teach patient how to get good sputa seems for useful for keeping the laboratory quality high.

4. The latest information for culture and the identification of

acid-fast bacillus: Hajime SAITOH

Culture methods are much more sensitive than smear ones to detect mycobacteria in the specimens. However, the duration of isolation by solid mediums is considerably long. Contemporary liquid culture methods allow for the rapid detection of *M. tuberculosis* complex, especially in smear positive samples. Therefore, in "the guideline for testing of *M. tuberculosis*, 2007", we recommend the routine use of liquid medium such as MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) or KRD in clinical laboratories. We also recommend the use of a simple immunochromatographic assay, Capilia TB, for rapid confirmation of the *M. tuberculosis* complex in liquid cultures.

5. The present condition of molecular detection and identification, and a future view: Mitsuaki NAGASAWA

"The guideline for testing of *M. tuberculosis*, 2007" and the present condition of genetic screening, and a future view were described. It described about the kind of molecular detection and identification kit of Mycobacteria, results, an inspection request and extraction of a sample, preservation, and the measure against a biohazard. Moreover, it described also about quality assurance and the interpretation of a result.

6. Susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: Toyoko OGURI

Included below is a summary in susceptibility testing. The

9 methods that are used in the susceptibility test of *Mycobacterium* are in Table 1. The Committee for Mycobacterial Examination considered that a susceptibility test was attached great importance to rapidly reporting. (1) The target of organism for susceptibility test is *Mycobacterium tuberculosis* complex only. (2) The standard method is proportion methods using ogawa medium. (3) The inoculum suspension is recommended subculture growth in broth. (4) Rapid broth methods for susceptibility testing of *M. tuberculosis* are recommended susceptibility results for *M. tuberculosis* complex could be reported within 28 days of receipt of the specimen in the laboratory. (5) The detection of *rpoB* gene is added to the new method.

**Key words:** Rapid detection, Quality assurances, Sputum collection instruction, Identification, Molecular detection, Susceptibility test

<sup>1</sup>Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases, <sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory, Kyoto University Hospital

Correspondence to: Takeshi Higuchi, Department of Clinical Laboratory, Kyoto University Hospital, 54 Kawaramachi, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8507 Japan.  
(E-mail: higuchit@kuhp.kyoto-u.ac.jp)

# バクテック MGIT 960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ (MGIT AST) および小川標準法によるイソニアジド低濃度薬剤感受性検査の判定不一致に関する検討

<sup>1</sup>御手洗 聡    <sup>3</sup>小林 郁夫    <sup>5</sup>阿部千代治    <sup>2</sup>和田 雅子  
<sup>4</sup>鈴木 克洋    <sup>5</sup>高嶋 哲也    <sup>6</sup>川辺 芳子    <sup>6</sup>町田 和子  
<sup>7</sup>田野 正夫    <sup>8</sup>瀧川 修一    <sup>9</sup>鎌田 有珠    <sup>10</sup>重藤えり子  
<sup>11</sup>藤井 俊司    <sup>12</sup>森 健一    <sup>13</sup>須山 尚史    <sup>14</sup>矢野 修一  
<sup>15</sup>川城 丈夫    <sup>16</sup>尾形 英雄

要旨：〔目的〕INHの薬剤感受性検査について，BACTEC MGIT 960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ (MGIT AST) の精度を評価した。〔方法〕2002年に実施された入院時薬剤感受性調査株を使用し，小川標準法とMGIT ASTでINHの感受性検査を行った。結果は小川標準法を基準とし，感度，特異度，一致率， $\kappa$  指数にて評価した。また，不一致例の臨床経過も検討した。〔結果〕最終的に1,109株を検討した。小川標準法に対するMGIT ASTのINH感度は100%，特異度は97.1%となり，一致率は97.3%， $\kappa$  指数は0.798であった。不一致 (MGIT AST耐性・小川感受性) を示した30株 (2.7%) について，予後の明らかな11例で再発は認めなかった。初回治療例のINH耐性頻度はMGIT ASTで5.3%，小川標準法で2.7%であった。〔考察〕MGIT ASTによるINH感受性検査は，感度，特異度，一致率のすべてで95%を超えており，小川標準法に照らして十分な精度を有していた。しかし，MGIT ASTによるINH耐性頻度は小川標準法に比べて有意に高くなり，さらなる検討が必要である。  
 キーワーズ：結核，薬剤感受性検査，イソニアジド，低濃度，MGIT AST

## はじめに

結核の治療の要点は，有効な薬剤を3剤以上併用し，一定以上の期間確実に患者に投与することである<sup>1)</sup>。投与した薬剤が有効であるか否かを判定するには，分離された結核菌について，薬剤感受性検査を実施することが最低限必要である。薬剤感受性検査の標準法は1%小川培地を用いた方法 (以下，小川標準法) であるが，通常結核菌の分離から結果を得るまでに1~2カ月を要し，

簡易法を用いても，検査期間を大幅に短縮することは不可能である。適切な治療のためには，可能なかぎり短期間で薬剤感受性検査結果を得ることが望ましく，米国CDCは検体採取から30日以内に薬剤感受性結果を報告するよう勧告している<sup>2)</sup>。この勧告を満たすことは，結核の有効な治療を保証することにもつながるため，検査期間の短縮は重要な課題である。

上記の要求による早期培養を実現するため，結核菌の薬剤感受性検査の方法として，近年液体培地を利用した

<sup>1</sup>結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科，<sup>2</sup>同研究部，<sup>3</sup>日本ベクトン・ディッキンソン株式会社ダイアグノスティックシステム事業部，<sup>4</sup>国立病院機構 (NHO) 近畿中央胸部疾患センター呼吸器科，<sup>5</sup>大阪府立病院機構大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター結核内科，<sup>6</sup>NHO東京病院呼吸器科，<sup>7</sup>NHO東名古屋病院呼吸器科，<sup>8</sup>NHO西別府病院呼吸器科，<sup>9</sup>NHO札幌南病院呼吸器科，<sup>10</sup>NHO東広島医療センター呼吸器科，<sup>11</sup>NHO山形病院呼吸器科，<sup>12</sup>NHO東徳島病院呼吸器科，<sup>13</sup>長崎市立病院成人病センター呼吸器科，<sup>14</sup>NHO松江病院呼吸器科，<sup>15</sup>NHO東埼玉病院呼吸器科，<sup>16</sup>結核予防会複十字病院呼吸器内科

連絡先：御手洗 聡，結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科，〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24 (E-mail: mitarai@jata.or.jp)  
 (Received 29 Sep. 2006/Accepted 19 Dec. 2006)

BACTEC MGIT 960 (MGIT) が広く臨床応用されている。MGITを利用することにより分離培養期間が短縮され、さらにそのまま結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ (MGIT AST) を用いて薬剤感受性検査を行うことが可能であるため、その迅速性から大変に有用な方法である<sup>3)~5)</sup>。しかし、一次抗結核薬であるイソニアジド (Isoniazid; INH) に対する感受性検査において、MGIT ASTと小川標準法 (0.2  $\mu\text{g/ml}$ ) との結果に不一致が認められることが報告されている。この結果の不一致は、MGIT AST耐性・小川感受性と判定されるものがほとんどであり、結核予防会複十字病院のデータでは、MGIT ASTにより INH耐性となった結核菌株の12.6%で小川標準法感受性であったと報告されており<sup>6)</sup>、国立病院機構東京病院からも同様の不一致が31.9%と報告されている<sup>7)</sup>。

MGITシステムは、検査の迅速化のうえで重要な方法である。INH使用の可否を決定するうえで非常に重要な INH低濃度 (0.2  $\mu\text{g/ml}$ ) における感受性検査結果の不一致について検討し、この不一致がもたらす臨床上の問題点を評価することによって、MGIT ASTによる薬剤感受性検査の精度を再評価し、併せて臨床上の有用性を判断することを目的として研究を実施した。

### 対象と方法

日本全国から無作為に結核菌株を収集し、それらに対して小川標準法と MGIT ASTの双方で INHの感受性検査を実施し、小川標準法による結果を基準として、各結果を比較することにより結核菌薬剤感受性検査としての MGIT ASTの精度を評価した。

#### (1) 菌株

2002年度に結核療法研究協議会 (療研) で実施した、結核菌の入院時薬剤感受性全国調査の際に全国から収集した結核菌3,127株のうち、12施設からの了解を得て、1,122株を対象に研究を開始した。対象施設は、地域的な偏りを最小とするよう、北海道から九州までを7つのブロックに区分し、それぞれの地域ごとに1~2施設を選定した。

#### (2) 薬剤感受性検査

小川標準法および MGIT ASTにより INHの薬剤感受性検査を実施した。小川標準法については、新結核菌検査指針2000に従った<sup>8)</sup>。すなわち、小川培地上に発育した結核菌を分散チューブ (ニチビー) にて分散させ、Middlebrook7H9培地中でOD値が約0.1となるまで培養して、接種用菌液の原液とした。これを冷滅菌蒸留水で100倍および10,000倍に希釈し、10,000倍希釈液の0.1 mlを対照培地に、100倍希釈液をもう1本の対照培地と、INH 0.2  $\mu\text{g/ml}$  および1.0  $\mu\text{g/ml}$  を含む1%小川培地に0.1

mlずつ接種した。接種した試験管は、斜面培地上にて37°Cで4週間培養し、比率法に基づいて1%を基準として耐性・感受性を判定した。

MGIT ASTについては、BACTEC MGIT 960結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズの添付文書に従い、結核菌薬剤感受性用 MGITチューブに専用サプリメントと INHを添加した。INHの濃度は、通常の0.1  $\mu\text{g/ml}$  以外に、小川標準法での高濃度 (1.0  $\mu\text{g/ml}$ ) に相当する0.4  $\mu\text{g/ml}$  を用いた。Middlebrook7H9培地で増菌培養後 McFarland 0.5に調整した菌液を冷滅菌蒸留水で5倍希釈し、INH添加 MGITチューブへの接種菌液とした。コントロール用 MGITチューブへの接種には、接種菌液を冷滅菌蒸留水でさらに100倍希釈したものを用いた。菌液を各 MGITチューブに0.5 ml接種後、直ちに MGIT 960全自動抗酸菌培養装置で培養を開始した。MGIT 960では、培養開始4日目より13日目までの間でコントロール用 MGITチューブ内の菌発育を示す蛍光強度が400を超えた時点で INH添加 MGITチューブの蛍光強度を測定し、被検菌の感受性を判定した。

#### (3) 臨床情報

小川標準法と MGIT ASTとの間で、INHの感受性検査結果に不一致を認めた株については、その結核菌を有していた患者の治療内容、経過、予後について情報を収集し、判定の不一致による不利益の有無を検討した。

#### (4) 結果の解析

小川標準法および MGIT ASTによる比率法での薬剤感受性結果について、小川標準法を基準として MGIT ASTの感度、特異度、一致率および  $\kappa$  指数を計算した。感度とは、小川標準法で耐性と判定した株を正しく耐性と判定する割合であり、特異度とは小川標準法で感受性と判定した株を正しく感受性と判定する割合を示す。一致率とは感受性・耐性を合わせた全体での判定一致の割合である。 $\kappa$  指数は判定の一致の程度を示す指標の一つであり、偶然の一致以上に結果が一致しているかどうかを判定するのに有用である。Landisらによると  $0 \leq \kappa \leq 0.2$  はごく軽度の一致、 $0.2 < \kappa \leq 0.4$  は軽度の一致、 $0.4 < \kappa \leq 0.6$  は中等度の一致、 $0.6 < \kappa \leq 0.8$  は高度の一致、 $0.8 < \kappa$  はほぼ完全な一致とされる<sup>9)</sup>。なお、INHの耐性・感受性の判定については、小川標準法では0.2  $\mu\text{g/ml}$  での判定を、MGIT ASTの場合は0.1  $\mu\text{g/ml}$  での判定を基準とした。

## 結 果

#### (1) 小川標準法による INH感受性検査結果

検査対象とした1,122株のうち、13株については発育不良のため除外し、最終的に1,109株に対する検討となった。小川標準法0.2  $\mu\text{g/ml}$  (低濃度) による検査では、

Table Comparative drug susceptibility results of Ogawa and MGIT 960

| Methods        | Concentration<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) |    | Results |   |   |   |    |       |
|----------------|---------------------------------------|----|---------|---|---|---|----|-------|
|                |                                       |    |         |   |   |   |    |       |
| Ogawa          | 0.2                                   | R  | R       | S | R | R | S  | S     |
|                | 1.0                                   | R  | S       | S | R | S | S  | S     |
| MGIT960        | 0.1                                   | R  | R       | R | R | R | R  | S     |
|                | 0.4                                   | R  | R       | R | S | S | S  | S     |
| No. of strains |                                       | 46 | 11      | 1 | 1 | 7 | 29 | 1,014 |

R: Resistant, S: Susceptible

1,044株 (94.1%) が感受性、65株が耐性 (5.9%) であった。また、0.2  $\mu\text{g/ml}$  で耐性であった65株のうち、47株 (72.3%) が1.0  $\mu\text{g/ml}$  (高濃度) でも耐性であった。

#### (2) MGIT ASTによるINH感受性検査結果

MGIT AST 0.1  $\mu\text{g/ml}$  (通常法) については、95株 (8.6%) が耐性、1,014株 (91.4%) が感受性であった。また、95株中58株 (61.1%) が0.4  $\mu\text{g/ml}$  (高濃度) についても耐性と判定された。

#### (3) 小川標準法を基準としたMGIT ASTの結果

MGIT ASTによる感受性結果を小川標準法と比較すると、Tableのようになった。INH耐性基準濃度に関して、小川標準法・MGIT ASTともに耐性となったのは65株 (5.9%) であり、共に感受性となったのは1,014株 (91.4%) であった。1,109株中30株 (2.7%) がMGIT AST耐性・小川感受性であった。基準濃度について、MGIT AST感受性・小川耐性となった株は認められなかった。小川標準法に対するMGIT ASTの感度は100% (65/65)、特異度は97.1% (1,014/1,044) となり、一致率は97.3% (1,079/1,109) であった。 $\kappa$  指数は0.798となった。

#### (4) MGIT AST耐性・小川標準法感受性と判定された症例の臨床経過

MGIT AST耐性・小川感受性となった30株のうち、19株について患者の臨床情報が得られた。患者は男性11名、女性8名で、年齢は53.5 $\pm$ 22.5 (30~87) であった。19名のうち6名が死亡していたが、死亡していたのはすべて72歳以上 (72~86) であり、6名中5名は治療開始から3カ月以内 (27~87日) に死亡しているうえ、少なくとも小川標準法でリファンピシン (RFP) およびエタンブトール (EB) に耐性の結核菌は存在せず、結核の薬剤耐性は死因に直接関係ないと考えられる症例であった。

生存例で治療経過が確認されている症例は9例であった。6例では追加薬剤等なく、標準療法に準ずる形でINHを治療期間中継続して使用していた。このうち2例はINH, RFP, EBおよびピラジナミド (PZA) による6カ月標準療法を実施しており、2例は標準療法を3カ月延長し9カ月治療している。また1例は維持期を9カ月

継続し、1例はINH, RFP, EBの3剤併用療法で15カ月治療していた。1例を除いて、いずれも治療後191~753日間 (平均516日) 経過観察されているが、一例も再発は認められていない。一方、INHを投与しながら、新たにニューキノロン剤を追加投与している症例が3例あったが、これについても348~1,005日間 (平均571日) の経過観察にて再発を認めていない。

4例の転医例のうち、2例は転医先でも再発はないと報告されているが、1例は状況不明である。1例は転医先で老衰のため死亡している。

## 考 察

結核菌薬剤感受性検査を実施するうえで液体培地を使った高感度培養法は迅速性の点で有用である<sup>10)</sup>。本邦でもMGITシステムの利用は拡大しており、2002年度の療研サーベイランスでは参加99施設中31施設が分離培養にMGITを使用していた<sup>11)</sup>。当時薬剤感受性検査にMGIT ASTを使用していたのは4施設にすぎなかったが、2005年の日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会による薬剤感受性検査外部精度評価では参加66施設中10施設がMGIT ASTを使用しており<sup>12)</sup>、迅速な薬剤感受性検査法として拡がりつつあると思われる。

INHの薬剤感受性検査において、1%小川培地による標準法とMGIT ASTによる迅速法との間で、12.6%に不一致が認められることが複十字病院から報告されている<sup>9)</sup>。同様の結果の不一致は2005年の日本結核病学会で他の施設からも報告されており<sup>7)</sup>、これらはMGIT ASTにて先にINH耐性と判定され、後日小川標準法 (あるいは小川培地による簡易法) にて感受性と判定されたという経過である。この結果の不一致について、検査精度上の観点から解決する必要があるものと考えられた。

2002年度結核療法研究協議会 (療研) による「結核菌の入院時薬剤感受性全国調査」において全国より収集された結核菌について、療研共同研究施設の許可を受けたうえで1,109株に関してMGIT ASTおよび小川標準法による比較を行ったところ、小川標準法を基準とした場合、MGIT ASTの最終的な感度は100%、特異度は97.1%、一

致率97.3%となり、すべての評価基準で95%を超えていた。TortoliらはMGIT ASTと、米国における標準法である<sup>13)</sup> BACTEC 460TBによる結核菌の薬剤感受性検査結果を比較し、MGIT ASTにおいて耐性の過大評価傾向があることを指摘しているが、検査法としては精度に差がないことを報告している<sup>14)</sup>。また、長谷川らは52株の臨床分離結核菌株を用いてMGIT ASTと小川標準法を比較しており、MGIT AST耐性・小川感受性の傾向とともに92.3%の一致率があることを報告しており<sup>15)</sup>、同様に富田らは臨床分離結核菌15株についてINH感受性検査結果の一致率が100%であると報告している<sup>16)</sup>。さらに、今回の結果は小川標準法に対するビットスペクトルSR(感度83.9%, 特異度98.4%, 一致率97.6%)やウエルバックS(感度79.6%, 特異度99.2%, 一致率98.3%)と比較しても遜色ない結果であり<sup>17)</sup>、薬剤感受性検査法として良好な成績と考えられた。また、 $\kappa$ 指数も0.798であり、ほぼ完全な一致を示すものと考えられた。

現在、日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会は、世界保健機関(WHO)と結核肺疾患予防連合(IUATLD)が指定するSupra-National Reference Laboratories(SRLs)での精度管理に使用され、薬剤感受性が既知となっている結核菌株を用いて、薬剤感受性検査の外部精度評価を行っている<sup>18)</sup>。同じ精度管理に使用された菌株を用いたMGIT ASTの薬剤感受性検査精度管理に関する報告では、MGIT ASTのINH感受性検査結果に関する感度、特異度、一致率は100%と報告されている<sup>19)</sup>。これは、外部精度評価上も、MGIT ASTが十分な検査精度を備えていることを保証しているものと考えられる。

試験結果の臨床的影響については、例数が少ないものの、MGIT AST耐性であったが小川標準法の結果が感受性であったことに従って標準的な治療を行った場合は、特に予後に影響はないものと考えられた。また、今回INHを治療から外した例は見られなかったが、MGIT ASTによりINH耐性菌と判定されて治療内容からINHを除外したとしても、臨床的な治療経過に与える影響は治療期間の延長のみであり、治療効果としてはほぼ同等の効果が得られることが示されており<sup>20)~22)</sup>、検査の迅速化が与える利益に鑑みて、現状2.7%存在する小川標準法との不一致は治療効果に影響を及ぼさないと結論された。

今回の検討でも、これまでの報告と同様に、MGIT ASTにてINH耐性と判定された結核菌株95株のうち、小川標準法で30株が感受性と判定され、不一致率は31.6%(30/95)となった。小川標準法0.2  $\mu\text{g/ml}$ とMGIT AST 0.4  $\mu\text{g/ml}$ との結果を比較すると、この場合の不一致は1株のみとなるが、一方でMGIT AST感受性・小川標準法耐性となる株が8株発生することになる。従っ

て、MGIT ASTにおいてINH感受性判定濃度が0.1  $\mu\text{g/ml}$ と設定されていることがMGIT AST耐性・小川感受性となる主因と考えられる。また、このことからINHについてMGIT AST耐性・小川感受性となる結核菌株については、感受性として一致する株に比べて最小発育阻止濃度(MIC)が高い傾向にあることが予想され、実際にわれわれは不一致が認められた株にBrothMIC MTB-Iにて判定保留となるMIC 1.0~2.0  $\mu\text{g/ml}$ の株が多く認められることを報告しており、INH低濃度耐性を支配するといわれている*inhA*のプロモーター領域でのC→T変異も同定している<sup>6)</sup>。これらの株が、治療の結果として将来的に小川標準法でもINH耐性を示すようになるのかは不明であるが、臨床的には興味ある問題である。

さらに今回検討したすべての株の感受性検査結果を疫学的にみると、MGIT ASTの結果をもって薬剤感受性検査の結果とした場合、INHの耐性頻度は8.6%となり、小川標準法を用いた場合の5.9%に比べて有意に高くなる( $p=0.017$ )。また初回治療患者での耐性頻度はMGIT ASTと小川標準法でそれぞれ5.3%と2.7%となり、有意差を認めた( $p=0.005$ )。このことは将来的にMGIT ASTが薬剤感受性検査の主流となった時、INH耐性頻度を評価するうえで大きな影響を与える可能性を示している。INH耐性が4.0%を超えている地域では、初回治療を必ず4剤で開始するよう米国CDCは勧告しており、標準療法の内容にも影響を与えることが考えられる。

小川標準法とMGIT ASTとのINH感受性検査結果の不一致について、検査精度と臨床の双方の観点から検討した。結果として、通常小川標準法よりも早く結果が判明するMGIT ASTの感受性検査結果を、小川標準法の結果を待たずに、そのまま利用することに検査精度上も臨床上也問題は無いと考えられた。しかしながら、疫学的にはINH耐性頻度を有意に増加させ、治療内容の選択に影響を及ぼす可能性があり、今後も引き続き検討が必要と考えられる。

## 謝 辞

この研究において、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社ダイアグノスティックシステム事業部の手塚隆善氏にご協力頂きました。深謝申し上げます。

## 文 献

- 1) 倉澤卓也: 日本結核病学会治療委員会「見直し」声明の背景と要点. 新しい結核医療の基準 平成16年改正. 結核予防会, 東京, 2004.
- 2) Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al.: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? J Clin Microbiol. 1993; 31: 767-770.

- 3) Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, et al.: Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 3578-3582.
- 4) 鈴木克洋, 露口一成, 松本久子, 他: Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) による結核菌迅速薬剤感受性検査. *結核.* 1997; 72: 187-192.
- 5) 阿部千代治, 青野昭男, 平野和重: BACTEC MGIT 960 システムによる結核菌の迅速薬剤感受性試験: 固形培地を用いる比率法との比較. *結核.* 2001; 76: 657-662.
- 6) 御手洗聡: 抗酸菌検査法の臨床への応用 液体培地や遺伝子を用いた新しい薬剤感受性試験. *結核.* 2004; 79: 169.
- 7) 川辺芳子, 鈴木純子, 倉島篤行, 他: MGITによる薬剤感受性検査と標準法の比較. *結核.* 2005; 80: 251.
- 8) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会: 新結核菌検査指針: 第7章精度管理. *結核予防会.* 2000, 100-102.
- 9) Landis JR, Koch GG: The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977; 33: 159-177.
- 10) Johansen IS, Thomsen VO, Marjamaki M, et al.: Rapid, automated, nonradiometric susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex to four first-line antituberculous drugs used in standard short-course chemotherapy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 50: 103-107.
- 11) 御手洗聡 (結核療法研究協議会): 2002年度療研結核菌薬剤耐性全国調査報告 (1). *結核.* 2005; 80: 288.
- 12) 御手洗聡: 結核菌とくに薬剤感受性検査の精度管理に関する研究. 小児結核及び多剤耐性結核の予防, 診断, 治療における技術開発に関する研究; 平成17年度総括・分担研究報告書. 2006; 171-191.
- 13) NCCLS: Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardia*, and other aerobic *Actinomycetes*; Approved Standard. NCCLS document M24-A, 2003.
- 14) Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, et al.: Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculosis drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460 TB method and the agar plate method of proportion. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 607-610.
- 15) 長谷川美幸, 三次典男, 小山悦子, 他: 液体培地を用いた自動結核菌感受性測定法に関する検討 従来法および NCCLS法との比較. *日本化学療法学会雑誌.* 2004; 52: 371-375.
- 16) 富田元久, 竹野 華, 鈴木克洋, 他: バクテック MGIT 960 による薬剤感受性検査における接種菌量の検討と検査の再現性. *結核.* 2004; 79: 625-630.
- 17) 大友幸二 (結核療法研究協議会): 2002年度療研結核菌薬剤耐性全国調査報告 (2). *結核.* 2005; 80: 288.
- 18) 御手洗聡 (日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会): 検査センターを対象とした結核菌薬剤感受性試験外部精度アセスメント. *結核.* 2005; 80: 349-358.
- 19) 小林郁夫, 阿部千代治, 御手洗聡: 結核菌薬剤感受性検査のための BACTEC MGIT 960 AST の評価: 外部精度管理菌株を用いた研究. *結核.* 2006; 81: 57-62.
- 20) Mitchison DA, Nunn AJ: Influence of initial drug resistance on the response to short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 133: 423-430.
- 21) Hong Kong Chest Service/British Medical Research Council: Five-year follow-up of a controlled trial of five 6-month regimens of chemotherapy for pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 136: 1339-1342.
- 22) Zierski M: Prospects of retreatment of chronic resistant pulmonary tuberculosis patients. A critical review. *Lung.* 1977; 154: 91-102.
- 23) 山根誠久, 一山 智, 河原 伸, 他: Middlebrook 合成培地での抗酸菌薬剤感受性試験 (第3報): 微量液体希釈法を原理とする BrothMIC MTB の多施設間評価—施設間再現性と Agar Proportion 法との判定互換性の解析. *臨床病理.* 1999; 47: 754-766.
- 24) American Thoracic Society: Treatment of Tuberculosis and Tuberculous Infection in Adults and Children. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 149: 1359-1374.



# バイオ医薬品の開発

監修 早川堯夫

と品質・安全性確保

LIFE-SCIENCE INFORMATION CENTER

## 監 修(敬称略)

早川 堯夫 独立行政法人医薬品医療機器総合機構顧問

## 執筆者一覧(敬称略・執筆順)

早川 堯夫 独立行政法人医薬品医療機器総合機構顧問  
近畿大学薬学総合研究所特任教授  
大阪大学医学部未来医療センター招聘教授

大島 武博 アスピオファーマ(株)品質保証部主席

籾田 雅之 アスピオファーマ(株)バイオ創薬センターバイオ CMC 研究部部長

小林 薫 前 三菱ウェルファーマ(株)蛋白医薬研究所培養工学グループ  
グループマネージャー

桐原 清 日本ケミカルリサーチ(株)研究本部・治験薬製造センターセンター長  
兼先端医療研究センター主席研究員

川崎 敦子 日本ケミカルリサーチ(株)研究本部・先端医療研究センター

加藤 和夫 日本ケミカルリサーチ(株)執行役員研究本部長  
兼先端医療研究センター長

金森 利至 持田製薬(株)医薬マーケティング本部マーケティング部専任部長

重松 弘樹 旭化成ファーマ(株)バイオ生産技術部研究課課長

米村 宏 財団法人化学及血清療法研究所試作研究部上級研究員

樋口 浩文 財団法人化学及血清療法研究所第1研究部上級研究員

中島 敏博 財団法人化学及血清療法研究所第1研究部次長

福永 悟史 独立行政法人医薬品医療機器総合機構生物系審査部審査専門員

久米田幸介 財団法人化学及血清療法研究所品質管理部品質管理課長

嶽本 澄代 財団法人化学及血清療法研究所品質管理部品質検査第二課  
上級専門技術員

横手 公幸 財団法人化学及血清療法研究所第一製造部開発室長

斉藤 洋之 キリンビール(株)生産技術研究所

久保寺美典 中外製薬(株)CMC 薬事部

有吉 伸之 財団法人化学及血清療法研究所品質管理部菊池品質管理室  
上級専門技術員

古賀 淳一 アムジェン(株)開発推進本部取締役本部長

小原 有弘 独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部細胞資源研究室研究員

水澤 博 独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部部長

吉成河法吏 インビトロジェン(株)BioReliance 担当

Martin Wisher BioReliance Ltd.

|       |   |
|-------|---|
| 清原 孝雄 | 独立行政法人医薬品医療機器総合機構品質管理部 GMP エキスパート                         |
| 佐々木次雄 | 国立感染症研究所細菌第2部第2室室長  |
| 山内 一也 | 東京大学名誉教授  |
| 広瀬 正明 | 田辺三菱製薬(株)研究本部先端医療研究所先端医療研究部<br>バイオAグループグループマネージャ          |
| 真崎 厚司 | 田辺三菱製薬(株)研究本部先端医療研究所先端医療研究部<br>バイオCグループ主任研究員              |
| 大谷 渡  | 田辺三菱製薬(株)研究本部先端医療研究所先端医療研究部<br>バイオBグループ兼バイオCグループグループマネージャ |
| 川崎 ナナ | 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第一室室長                                    |
| 猶塚 正明 | 持田製薬(株)製剤研究所所長  |
| 新見 伸吾 | 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第三室室長                                    |
| 山崎 達美 | 中外製薬(株)取締役専務執行役員  |
| 堤 康央  | 独立行政法人医薬基盤研究所創薬プロテオミクスプロジェクト<br>プロジェクトリーダー                |
| 石井 明子 | 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第二室室長                                    |
| 永田 龍二 | 前 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部主任研究官                               |
| 小林 潔  | アムジェン(株)開発推進本部シニアマネージャー                                   |
| 小林 孝好 | アムジェン(株)開発推進本部顧問<br>(現 (株)イナリサーチ試験研究センター副センター長)           |
| 河合 睦文 | 日本イーライリリー(株)医薬開発研究所研究顧問                                   |
| 安藤 剛  | 独立行政法人医薬品医療機器総合機構生物系審査部審査専門員                              |
| 大島 秀男 | 国立病院機構熊本医療センター形成外科医長                                      |
| 熊谷 憲夫 | 聖マリアンナ医科大学形成外科学教授   |
| 村澤 聡  | 財団法人先端医療振興財団先端医療センター血管再生研究グループ<br>主任研究員                   |
| 浅原 孝之 | 財団法人先端医療振興財団先端医療センター血管再生研究グループ<br>グループリーダー                |
| 川北 哲也 | 慶應義塾大学医学部眼科学教室講師  |
| 坪田 一男 | 慶應義塾大学医学部眼科学教室教授  |
| 安達 伸生 | 広島大学大学院医歯薬学総合研究科整形外科学助教                                   |
| 越智 光夫 | 広島大学大学院医歯薬学総合研究科整形外科学教授                                   |
| 笹川 忠  | 東京女子医科大学先端生命医科学研究所助教                                      |
| 清水 達也 | 東京女子医科大学先端生命医科学研究所准教授                                     |
| 岡野 光夫 | 東京女子医科大学先端生命医科学研究所所長・教授                                   |
| 中畑 龍俊 | 京都大学大学院医学研究科発達小児科学教授                                      |
| 梅澤 明弘 | 国立成育医療センター研究所生殖医療研究部部長                                    |
| 前田 大輔 | 独立行政法人医薬品医療機器総合機構生物系審査部審査専門員                              |

|       |   |
|-------|---|
| 水口 裕之 | 独立行政法人医薬基盤研究所基盤の研究部<br>遺伝子導入制御プロジェクトプロジェクトリーダー      |
| 島田 隆  | 日本医科大学生化学・分子生物学講座教授                                 |
| 小澤 敬也 | 自治医科大学医学部内科学講座血液学部門分子病態治療研究センター<br>遺伝子治療研究部教授       |
| 三好 浩之 | 独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター<br>細胞運命情報技術開発サブチームサブチームリーダー |
| 浦田 泰生 | オンコリスバイオファーマ(株)代表取締役社長                              |
| 中島 俊洋 | ジェノメディア(株)代表取締役社長兼最高技術責任者                           |
| 長澤 鉄二 | ジェノメディア(株)製造部部長                                     |
| 和田 博  | ジェノメディア(株)前臨床研究部部長                                  |
| 小澤 健夫 | POCクリニカルリサーチ(株)代表取締役社長                              |
| 國田 智  | 筑波大学生命科学動物資源センター講師                                  |
| 上田 正次 | (株)フェニックスバイオ宇都宮事業所長(常務取締役)                          |
| 鈴木 琢雄 | 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第二室研究員                             |
| 川西 徹  | 国立医薬品食品衛生研究所薬品部部長                                   |
| 山口 照英 | 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部部長                                 |
| 松村外志張 | (株)横浜バイオリサーチアンドサプライ研究本部長<br>(株)ローマン工業細胞工学センター所長     |

|     |                          |                     |
|-----|--------------------------|---------------------|
| 2.2 | パッケージングプラスミド             | 614                 |
| 2.3 | エンベローププラスミド              | 615                 |
| 2.4 | ベクタープラスミド                | 615                 |
| 2.5 | レンチウイルスベクターの調製           | 616                 |
| 3.  | レンチウイルスベクターの安全性          | 617                 |
| 3.1 | 増殖性レンチウイルス(RCL)          | 617                 |
| 3.2 | WPREの安全性                 | 617                 |
| 3.3 | 挿入変異による癌遺伝子の活性化          | 618                 |
| 4.  | 遺伝子治療臨床試験                | 619                 |
|     | おわりに                     | 620                 |
|     |                          |                     |
| 第5節 | 制限増殖型ウイルス                | (浦田泰生) 626          |
| 1.  | はじめに                     | 626                 |
| 2.  | 制限増殖型ウイルスの開発動向           | 626                 |
| 3.  | 制限増殖型ウイルスの品質, 安全性評価      | 627                 |
| 4.  | 制限増殖型ウイルスの品質試験における今後の問題点 | 628                 |
| 5.  | おわりに                     | 629                 |
|     |                          |                     |
| 第6節 | 非ウイルスベクター                | (中島俊洋/長澤鉄二/和田博) 631 |
| 1.  | 非ウイルスベクターの安全性            | 631                 |
| 1.1 | ウイルス性ベクターによる副作用          | 631                 |
| 1.2 | 非ウイルスベクターの課題             | 631                 |
| 2.  | HVJをベースとした非ウイルスベクターの開発   | 633                 |
| 2.1 | HVJによるデリバリーシステムの開発経緯     | 633                 |
| 2.2 | HVJ-リポソームの開発             | 634                 |
| 2.3 | HVJ-エンベロープベクターの開発        | 634                 |
| 2.4 | HVJ-エンベロープベクターの特徴        | 638                 |
| 2.5 | HVJ-エンベロープベクターの臨床応用      | 638                 |
| 3.  | HVJ-エンベロープベクターの非臨床安全性試験  | 639                 |
| 3.1 | 臨床試験に移行するまでに検討しておくべきこと   | 639                 |
| 3.2 | 単回, 静脈内投与, マウス           | 640                 |
| 3.3 | 単回, 鼻腔内投与, マウス           | 641                 |
| 3.4 | 反復, 皮内投与, マウス            | 641                 |
| 3.5 | 単回, 静脈内投与, サル            | 641                 |
| 3.6 | 反復, 筋肉内投与, サル            | 641                 |
| 3.7 | 非臨床安全性試験のまとめ             | 642                 |

|   |            |
|---|------------|
| 4. HVJ-エンベロープベクターの製造技術 .....                                  | 642        |
| 4.1 製造技術の概要 .....   | 642        |
| 4.2 製造用材料(マスターバンク)の整備 .....                                   | 642        |
| 4.3 バイオリクターシステムによる製造 .....                                    | 644        |
| 4.4 カラムクロマトグラフィー法による精製 .....                                  | 644        |
| 4.5 凍結乾燥法による製剤化 .....   | 647        |
| 4.6 HVJ-エンベロープベクターの製造設備 .....                                 | 649        |
| 5. 今後の課題 .....  | 649        |
| <br>  |            |
| 第7節 核酸医薬品の品質・安全性評価 .....                                      | (小澤健夫) 652 |
| 1. はじめに .....   | 652        |
| 2. siRNA 医薬品 .....  | 653        |
| 2.1 RNAi の分子機構 .....  | 653        |
| 2.2 RNAi による遺伝子発現抑制 .....                                     | 653        |
| 2.3 siRNA の配列選択 .....   | 653        |
| 2.4 医薬品としての siRNA .....                                       | 654        |
| 2.5 siRNA の化学修飾およびデリバリーシステム(DDS : Drug Delivery System) ..... | 654        |
| 2.6 siRNA の安全性 .....  | 655        |
| 2.7 siRNA の合成コスト .....  | 655        |
| 2.8 siRNA の特許 .....   | 655        |
| 3. その他の核酸医薬品 .....  | 656        |
| 3.1 アンチセンス医薬品 .....   | 656        |
| (1) アンチセンス医薬品の遺伝子発現抑制 .....                                   | 656        |
| (2) アンチセンス医薬品の臨床応用 .....                                      | 656        |
| (3) アンチセンス医薬品の投与方法 .....                                      | 656        |
| 3.2 アプタマー医薬品 .....  | 657        |
| アプタマー医薬品の分子機能 .....   | 657        |
| 3.3 リボザイム医薬品 .....  | 657        |
| リボザイムの分子機能 .....  | 657        |
| 3.4 デコイオリゴ医薬品 .....   | 657        |
| 4. 核酸医薬の研究開発動向 .....  | 657        |
| 4.1 siRNA 医薬品 .....   | 657        |
| (1) 米国における開発状況 .....  | 657        |
| (2) 日本における開発状況 .....  | 658        |
| 4.2 アンチセンス医薬品 .....   | 659        |
| 4.3 アプタマー医薬品 .....  | 659        |
| 4.4 リボザイム医薬品 .....  | 659        |

## 第6節 非ウイルスベクター

### 1. 非ウイルスベクターの安全性

#### 1.1 ウイルス性ベクターによる副作用

遺伝子医薬(遺伝子治療薬, 核酸医薬)は, 抗体医薬に匹敵する次世代のバイオ医薬になると期待されており, 現在のところ世界で1309件の臨床試験が進められている<sup>1)</sup>。遺伝子医薬は, 分泌タンパクや細胞表面のタンパクに対して作用する抗体医薬と異なり, 基本的に治療対象となる細胞内で作用するが, 分子サイズが大きいことから吸収効率は低く, 筋肉内注射など特殊な組織を除いて専用のデリバリーシステム(ベクター)が必要である。そのため, 世界中で安全かつ高性能なベクター開発を目指して, 種々のウイルス性または非ウイルス性のベクター開発が進められている状況である<sup>2)</sup>。

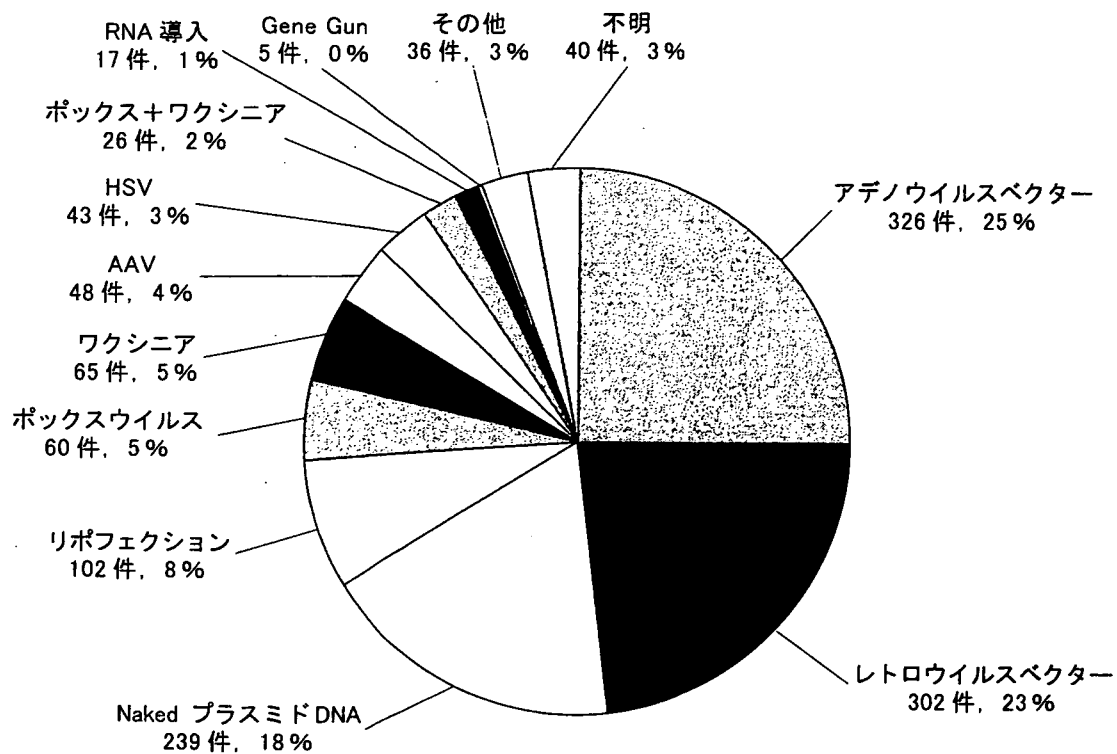
1990年に米国で先天的な免疫不全症であるADA欠損症の患者を対象にした初の遺伝子治療がレトロウイルスベクターで実施されて以来, 遺伝子治療の有効性を拡大するために種々のデリバリーシステム(ベクター)が開発されてきた。従来主流となってきたのはウイルスを改変してベクターとするウイルス性ベクターで, アデノウイルス, レトロウイルス, アデノ伴性ウイルス(AAV)などをベースとしたベクターが臨床試験に使用され, 2003年10月に中国において癌を治療対象としたアデノウイルスベクターがShenzhen SiBiono GeneTech社により上市されている(商品名: Genticine)<sup>3)</sup>。

しかし, アデノウイルスベクターに関しては

1999年にペンシルバニア大学のWilsonらにより実施されていた先天性代謝疾患(OTC欠損症)の臨床試験で, 大量のアデノウイルスを肝動脈から全身投与した18歳の男性患者が, 肝臓障害で死亡する事故が起こり, 遺伝子治療で初の死亡例として報告されて以来, 安全性に関する見直しが行われている<sup>4)</sup>。また, 従来安全性が高いといわれていたレトロウイルスベクターについても, フランスで1999年からX連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)に対して実施された遺伝子治療の患者11人に関して, 2002年から2003年にかけて3人に有害事象(白血病様の症状)が報告されたため, X-SCIDの遺伝子治療が一時凍結状態になった<sup>5)</sup>。このように, 従来安全とされていたウイルスベクターについても, 症例が増加するに従って有害事象が報告されるようになり, 安全性に関して慎重な検討を行う必要がでてきている。そのため, 遺伝子治療用ベクターとして, より安全性の高い非ウイルスベクターの開発が切望されている。

#### 1.2 非ウイルスベクターの課題

ウイルスベクターを使用せずに遺伝子を導入する方法としては, 主にプラスミドDNAが使用され, Gene Gun, 筋肉内注射, リポソームなどの導入技術を利用して臨床開発が行われている。これらの非ウイルスベクターに関する臨床開発の件数は, 遺伝子治療全体の件数(1309件)に対して26.4%(346件)を占めている<sup>1)</sup>(図1)。この数値は, アデノウイルスベクター(326件)や, レトロウイルスベクター(302件)を上回る数値であり, ウイルスベクターと比較して安全性の面で優位性



出典：The Journal of Gene Medicine 誌の Clinical Trial site ホームページより抜粋  
<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>

図1 遺伝子治療の臨床応用の状況

がある非ウイルスベクターに対する期待の高さを反映した数字となっている<sup>1)</sup>。また、アンチセンス、デコイ、siRNA など合成核酸医薬により遺伝子の異常発現を制御するケースもあり、17 件の臨床開発が進められている<sup>1)</sup>。

遺伝子医薬用のデリバリーシステム(ベクター)として開発が期待されている非ウイルスベクターであるが、その第一の課題は導入効率の向上である。細胞のレセプターを介して遺伝子導入が起こるウイルス性ベクターの場合は導入効率が非常に高く、特に生体内においてはその差が顕著である。一方で、非ウイルスベクターに関してはプラスミド DNA の筋肉内注射のように特殊な例を除いて、一般的にウイルスベクターと比較して導入技術が低いことが解決すべき課題となっている。第二の課題は、製剤化・製造技術の確立である。遺伝子医薬の場合は、薬効成分である遺伝子

や核酸医薬に関しても通常の低分子化合物とは異なる規格設定が必要になる上に、非ウイルスベクターではさらにベクター部分に関する製造技術、製剤化技術が必要になるため、より複雑な工程や規格設定が必要になる。そして、第三の課題は安全性の向上である。上記のように非ウイルスベクターでは導入効率の向上が課題となっているが、生体内での導入効率が向上すれば安全性の確保についても考慮すべき点が増えると予測される。特に、遺伝子医薬の場合には生殖細胞への影響についてはもちろん、他の組織や臓器への影響についても慎重に検討を行う必要がある。



## 2. HVJをベースとした非ウイルスベクターの開発

### 2.1 HVJによるデリバリーシステムの開発経緯

HVJ(hemagglutinating virus of Japan ; 別名センダイウイルス)は、1950年頃に東北大学で発見されたパラミキソウイルス科のパラミキソウイルス属のウイルスである<sup>6)</sup>(図2)。マウスを自然宿主とするパラインフルエンザウイルスで、一本鎖のマイナス鎖RNAを遺伝子としており、細胞へ感染後は細胞質で増殖することが明らかとなっている。感染性ウイルスの産生には、特異的なプロテアーゼによるプロセッシングが必要であるが、げっ歯類と霊長類との間でプロテアーゼに種差が

あるためにヒトに対しては病原性がないことが明らかとなっている<sup>7)</sup>。HVJのユニークな点は、体細胞間の融合(膜融合による細胞融合)を起こす活性があることで、この現象は1957年に大阪大学・微生物病研究所の岡田善雄博士により発見された<sup>8)</sup>。そのような性質は、今日のバイオテクノロジーやバイオ医薬を開発する上での基盤技術となっており、実際に抗体医薬の開発に必要なモノクローナル抗体作製技術や、ゲノムプロジェクトに必要なゲノム地図の作製技術の確立に繋がっている<sup>9)</sup>。

細胞融合活性には、HVJの外膜上にあるHNタンパクとFタンパクが関与しており、HNタンパクを介して標的細胞のレセプター分子であるacetyl型のシアル酸を持つ糖鎖と結合し、Fタンパク(F1タンパク)のアミノ末端に存在する疎水性ペプチド部分を介して膜融合が起こることが示

- マウスのウイルスとして1950年代に国内で発見。ヒトへの病原性なし。
- 東北大学で発見されたため別名センダイウイルスと呼ばれる。
- ウイルス粒子直径：150~600ナノメートル(平均300ナノメートル)。
- ウイルス外膜の2種の糖タンパク(Fタンパク質とHNタンパク質)が存在。
- 細胞の食作用ではなく、膜融合により直接細胞質へ侵入する。

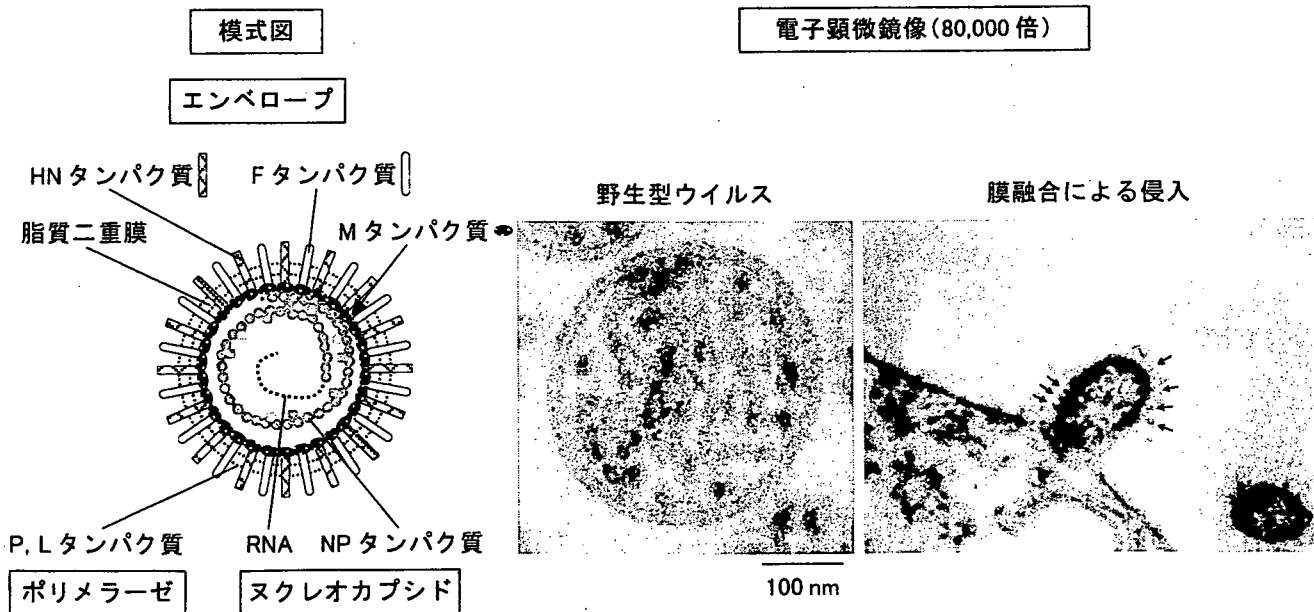


図2. HVJ(Hemagglutinating Virus of Japan)の概要

唆されている<sup>10)</sup>。レセプターである acetyl 型のシアル酸は、脊椎動物の糖タンパク質、糖脂質の糖鎖中に広範に存在することが明らかとなっており、異種間を含めて種々の動物細胞に対して融合活性があることが明らかとなっている<sup>11)</sup>。

このような膜融合活性を利用して、細胞内に高分子物質を導入するためのデリバリーシステムを開発する試みは 1970 年代から開始されており、赤血球ゴースト法、HVJ-リポソーム法、組換え型センダイウイルスベクター、HVJ-エンベロープベクターなどのドラッグデリバリーシステムや遺伝子治療用ベクターが開発されてきた<sup>12)</sup>。

## 2.2 HVJ-リポソームの開発

HVJ-リポソーム法は、大阪大学の金田安史教授により発明されたベクターシステムである<sup>13)</sup>。このベクターシステムは、不活性化処理を行った HVJ とリポソームを融合させて調製するハイブリッド型ベクターである(図 3)。薬効成分となる物質をリポソーム中に高効率に封入させた後に、不活性化 HVJ 粒子との融合を行うことにより、HVJ の特徴である膜融合による物質導入能を付加するため、通常のリポソームよりも導入効率が大幅に増強されている。また、通常のリポソームの場合には、エンドサイトーシスを介して封入物質の導入が起こるのに対して、HVJ-リポソームでは膜融合により直接細胞質内に導入することができる。そのため、導入された物質がエンドソーム内で細胞内酵素や pH の変化により分解されるのを回避することができる。

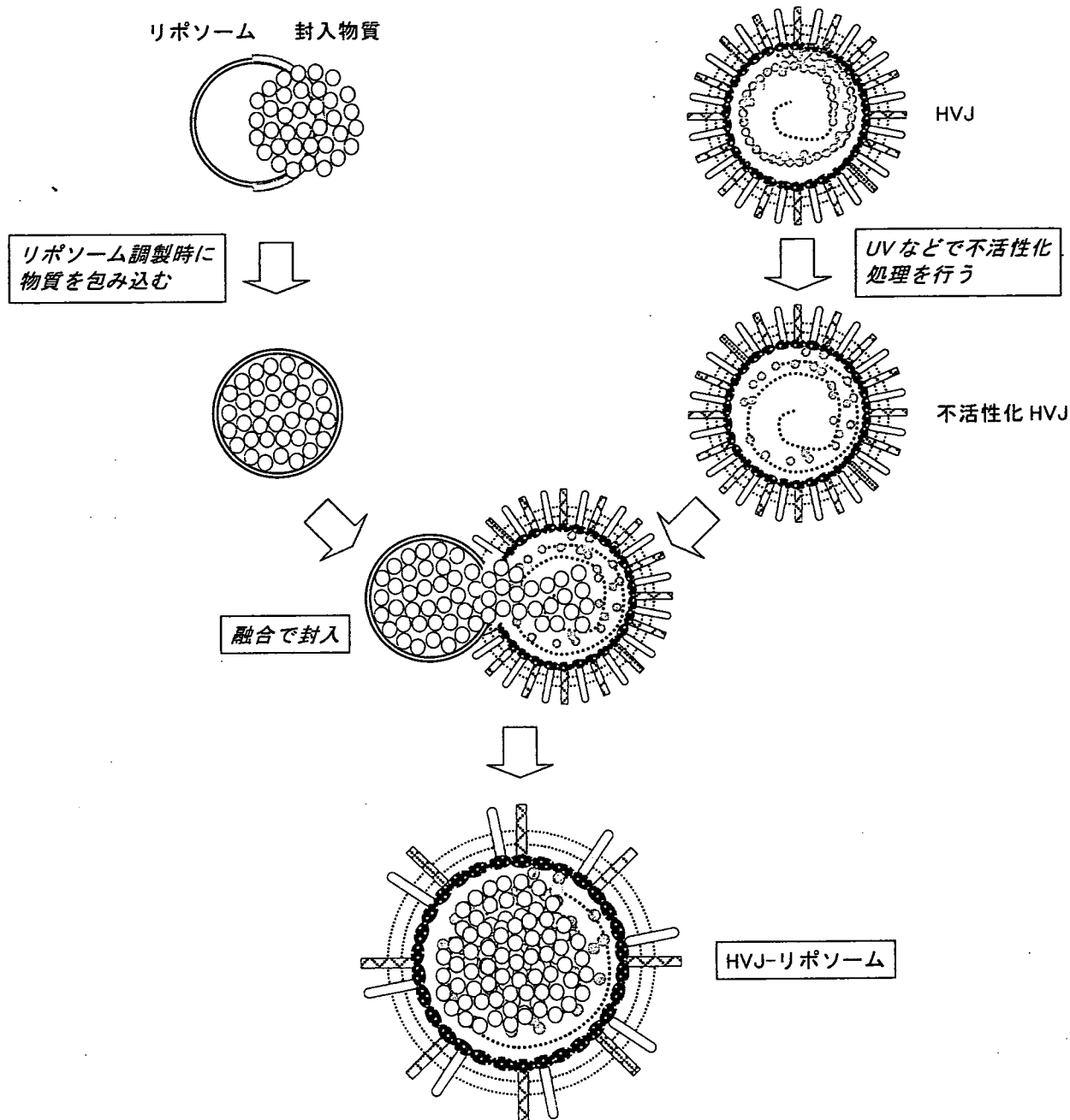
このように、HVJ-リポソーム法はウイルスの持つ導入メカニズムを利用しながら、リポソームの持つ高効率の封入率や安全性を持つユニークなベクターシステムである。実際、動物での種々の評価で導入効率が高いことが報告されている上に、サルを用いた安全性の検討も実施されていることから<sup>14)</sup>、遺伝子治療用のベクターとして実用化

が期待されている。しかし、現在のところベクターの調製が煩雑であること、大量生産が困難であること、均質性や品質の保証が難しいことなどの理由から臨床応用はなされていない状況である。

一方、HVJ のゲノムを改変することで調製する組換えセンダイウイルスベクターも国内の企業により開発されており<sup>15)</sup>、目的のタンパク質の高効率生産に適したベクターとして、遺伝子治療用ベクターとして臨床応用が試みられている。しかし、感染細胞内で抗原性の高いウイルスタンパク質(NP タンパク質)が産生されるため、安全性確保の面で注意が必要である上、遺伝子以外の先端医薬品のデリバリーシステムとしては利用できないため、汎用性の高いシステムとして開発するためには解決すべき課題も多いと考えられる。

## 2.3 HVJ-エンベロープベクターの開発

HVJ-エンベロープベクターは、HVJ-リポソーム法のコンセプトをベースにして、臨床応用のために開発されたベクターで、2001 年に大阪大学の金田安史教授により発明された<sup>16)</sup>(特許公開番号 WO01/57204, USA(US6,913,923 B2), Australia (769385)で既に特許成立)。このベクターシステムでは、HVJ のゲノムを紫外線照射やアルキル化剤などにより破壊して、HVJ 粒子の外膜部分をデリバリーシステムとして利用する(図 4)。HVJ-リポソームと同様に HVJ の持つ高い導入効率を利用している上、HVJ-リポソームと異なってエンベロープ部分をリポソームと融合せずにそのままデリバリーシステムとして利用するため、HVJ-リポソームよりもさらに高効率の導入が期待できる。目的とする薬効成分の封入は、界面活性剤を使用しており、遺伝子(プラスミド DNA)、核酸医薬(デコイ核酸, siRNA)、タンパク質(酵素, 抗体)、合成医薬品(抗癌剤)など、広範な医薬品を封入してドラッグデリバリーシステムとして使用することができる<sup>17)</sup>。封入条件を工夫す



1. リポソームへ目的とする医薬品を封入した後に不活性化処理を行ったHVJと融合させて調製
2. 粒子のサイズはHVJよりも大きくなり、膜融合による導入のためのFタンパク・HNタンパク密度は低下

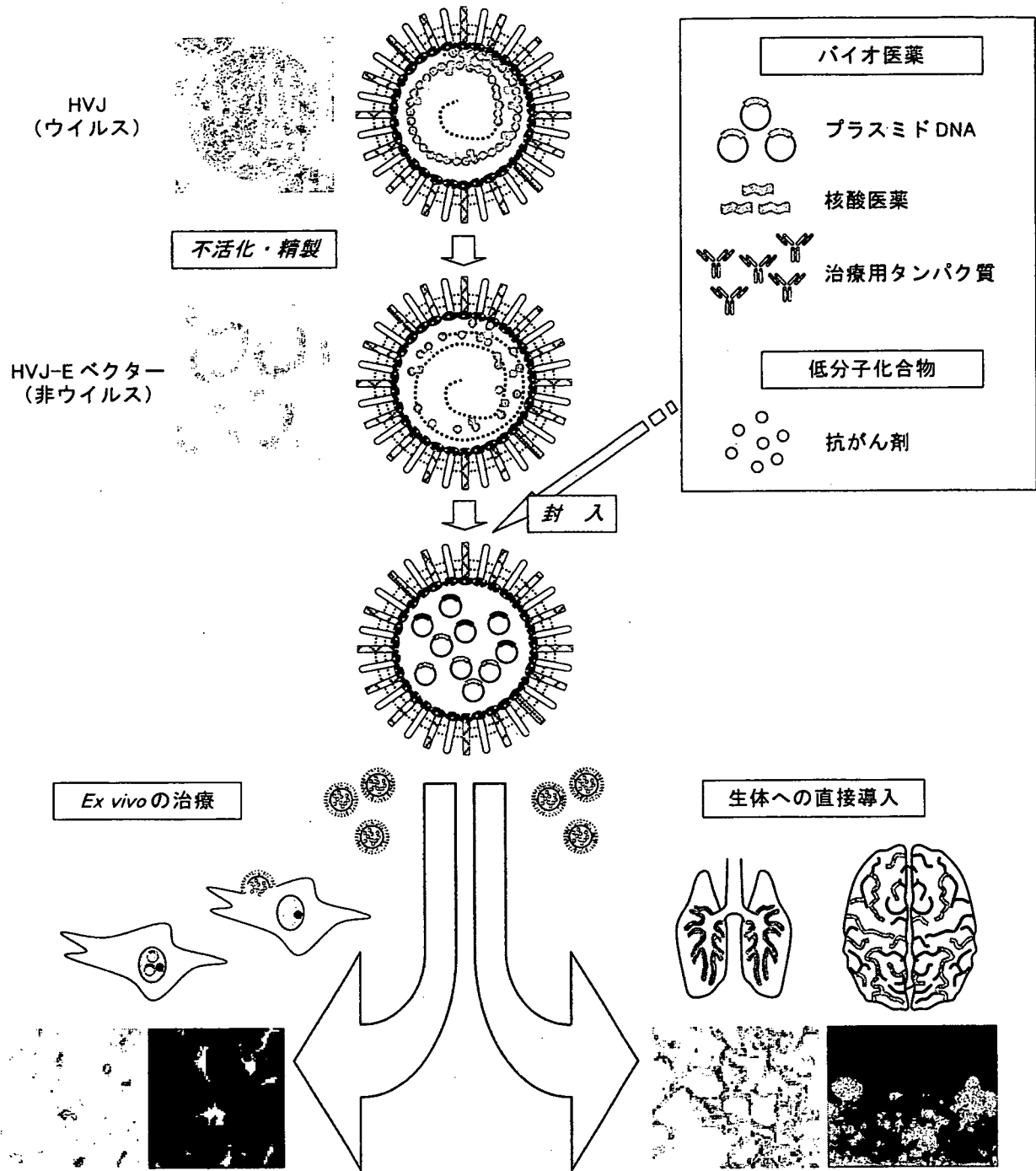
図3 HVJ-リポソームの基本原理

ることにより、HVJの持つ膜融合活性は保持されるため、封入された薬効成分は、標的となる細胞に対して付着後数秒以内に導入される(図5A)。また、免疫系の細胞や初代培養細胞に導入できるため *ex vivo* の治療用に開発できる上、動物の腫瘍組織や臓器に対しても導入できるため遺伝子治

療用ベクターとして汎用的に使用することができる(遺伝子導入試薬としては、石原産業㈱より「GenomONE」の商品名で販売中：[www.iskweb.co.jp/hvj-e](http://www.iskweb.co.jp/hvj-e))。

このようにHVJ-エンベロープベクターは、HVJの持つ効率の高い導入メカニズムを利用して

1. 高効率な遺伝子導入が可能(60-70%)
2. 培養細胞と生体臓器の両方へ遺伝子導入が可能
3. 高い安全性(非ウイルスベクターシステム)
4. 迅速な遺伝子導入が可能(膜融合)
5. オリゴ核酸, タンパク質など遺伝子以外の導入も可能



1. 不活性化した HVJ 粒子を界面活性剤処理後に、目的とする医薬品を直接封入
2. 粒子のサイズは HVJ と同レベルで、膜融合による導入のための Fタンパク・HN タンパク密度は保持

図 4 HVJ-エンベロープベクターの特徴