

- review. *Lancet Infect Dis* 4: 761-776, 2004
- 8) Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, et al. Detection of tuberculosis infection with an interferon-gamma based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 59-64, 2004
 - 9) Ravn P, Munk ME, Anderson AB, et al. The diagnostic potential of the QuantiFERON-RD 1 test in patients with active tuberculosis. Abstract O 411. *Clin Microbiol Infect* 10(Suppl 3): 80, 2004
 - 10) Brock I, Weldingh K, Leyten FM, et al. Specific T-cell epitopes for immunoassay-based diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol* 42: 2379-2387, 2004
 - 11) 樋口一恵 原田登之. 結核感染の新しい診断技術 QFT-2 G について. 保健師・看護師の結核展望 83(2004前期): 78-82, 2004
 - 12) Mazurek GH, Lobue PA, Daley CL, et al. Comparison of a Whole-Blood Interferon γ Assay with Tuberculin Skin Testing for Detecting Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *JAMA* 286: 1740-1747, 2001
 - 13) Lalvani A, Pathan AA, Durkan H. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 357: 2017-2012, 2001
 - 14) Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, et al. Comparison of Tuberculin Skin Test and New Specific Blood Test in Tuberculosis Contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 65-69, 2004
 - 15) 原田登之 森亨 矢野真司ほか. 集団感染事例における新しい結核感染診断法 QuantiFERON® TB-2 G の有効性の検討. 結核 79: 637-643, 2004
 - 16) 宮下裕文 樋口一恵 東山典子ほか. 接触者健診における全血インターフェロングammaアッセイを用いた結核感染の診断—QuantiFERON® TB-2 Gを用いた検討—. 結核 80: 557-564, 2005
 - 17) 船山和志 辻本愛子 森正明ほか. 大学での結核集団感染における QuantiFERON® TB-2 G の有用性の検討. 結核 80: 527-534, 2005
 - 18) Guidelines for the Investigation of Contacts of Persons with Infectious Tuberculosis Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC. *MMWR* 54(RR-15): 1-47, 2005
 - 19) Mazurek GH, Jereb J, LoBue P, et al. Guidelines for Using The QuantiFERON®-TB Gold Test for Detecting *Mycobacterium Tuberculosis* Infection, United States. *MMWR* 54(RR 15): 49-55, 2005
 - 20) Jensen PA, Lambert LA, Iademarco MF, et al. Division of Tuberculosis Elimination, National Center for HIV, STD, and TB prevention. Guidelines for Preventing the Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in Health-Care Settings, 2005. *MMWR* 54(RR-17): 1-106, 2005
 - 21) 鈴木公典 小野崎都史 志村昭光ほか. 高齢者施設における QuantiFERON® TB 第二世代の検討. 結核 79: 200, 2004
 - 22) 森亨 原田登之 樋口一恵ほか. 日本の一般住民における結核感染の実態—QuantiFERON-Goldによる感染診断の試み—. 結核 79: 197, 2004
 - 23) 中島由規 原田登之 樋口一恵ほか. 結核診療施設職員における結核感染の状況—QuantiFERON-Goldによる感染診断の試み—. 結核 79: 197, 2004
 - 24) 森亨 原田登之. 接触者健診における QuantiFERON®-TB 第二世代による感染診断の経費効果分析. 結核 80: 675-686, 2005

病気を識る



19

監修

永井英明 (ながい ひであき)

独立行政法人国立病院機構 東京病院呼吸器科・医長

1980年東京医科歯科大学医学部卒業。同医学部第一内科、佐久市立津間総合病院内科、国立療養所（現・独立行政法人国立病院機構）東京病院呼吸器科を経て、93～94年米国ウイスコンシン医科大学に厚生省（現・厚生労働省）HIV感染症リサーチフェローとして留学。帰国後、同東京病院緩和ケア病棟医長、96年7月より現職を兼任。97年9月より臨床研究部細菌免疫室長併任、厚生労働省薬事・食品衛生審議会薬事分科会専門委員、新型インフルエンザ専門家会議委員などを歴任。専門は内科学（特に感染症）

日本では、年間3万人近くの結核患者が新たに発生しています。その人口10万対罹患率は先進諸外国に比して高く、結核は依然として日本における主要な感染症です。特に高齢の新登録患者の増加および重症化は、日本の結核を特徴づける問題です。なかでも、不適切な治療や治療の中断などにより増加している耐性結核菌に起因する多剤耐性結核の出現は、それ自体が難治性であることに加え、今後、治療などにより免疫能が低下した患者が多い病院内での集団感染の増加が懸念されるなど、深刻な問題を突きつけています。今回は、この多剤耐性結核の予防と治療の最前線を、2004年に一部改正された、結核治療のガイドラインである「結核医療の基準」を中心に紹介します。

結核 多剤耐性結核を 防ぐ 新治療基準

Point 1

「結核は過去の病気ではない」との認識を

●国際的には結核中蔓延国

世界人口の約1/3にあたる20億人余が感染し、毎年700～900万人もの患者が新たに発生している結核（tuberculosis：TB）については、「発展途上国の問題であって日本においては過去の病気である」と認識されがちです。

しかし、厚生労働省が毎年実施している結核発生動向調査¹⁾によれば、2004年の日本における新登録結核患者（新たに結核と診断され、登録された患者）は2万9736人で、人口10万対の罹患率では23.3です。いずれも5年連続で減少してはいるものの、世界的に見ると、日本の罹患率はスウェーデンの5.4倍、オーストラリアの4.9倍、米国の4.6倍と、先進国のなかでは高率で、日本は国際的には、未だ結核中蔓延国です（図1）。

●患者の高齢化と重症化が進む

日本における最近の結核にみられる問題としてまず指摘されるのは、図2に示すように、新登録患者の高齢化が年々進んでいることです。04年の調査では、新登録結核患者における70歳以上の患者の占める割合が、00年の38.8%からは5.1%増、前年比では0.9%増の、43.9%となっています。この増加傾向は、この先人口の高齢化が進むのに合わせて新登録結核患者が増加する可能性を示すものとして、問題視されています。

また、重症化が目立つようになったことも、最近の日本における結核の深刻な問題です。特に、糖尿病や腎不全、悪性腫瘍などの基礎疾患があって医療の管理下にありながら結核を新たに発病、あるいは再発し、重症化しているケースが多くなっています。

Point 2

初回治療の適正化により多剤耐性結核の出現防止

●結核治療に必須の

RFPとINH両薬剤に耐性

日本における結核の治療は、結核予防法施行規則第22条の規定に基づく「結核医療の基準」を指針に行われています。この基準に使用可能として収載されている抗結核薬は、現在10種類ありますが(表1)、そのいずれかの薬剤に耐性を示す結核菌を、耐性結核菌(あるいは薬剤耐性結核菌)といいます。

耐性結核菌のなかには、最も強力な抗菌作用をもつ抗結核薬であるリファンピシン(以下、RFP)とイソニアジド(INH)のいずれにも耐性を示すものがあります。この両薬剤耐性を含む耐性結核菌は、多剤耐性結核菌と呼ばれています。

結核の治療にRFPとINHの両薬剤が欠けると、患者の体内で生存している結核菌を撲滅することが難しく、結核菌の陰性化が遅れたり、再発率が高くなったりします。そのため多剤耐性結核は難治性結核の1つとして、対策の強化が求められています。

結核菌の耐性頻度については、結核療法研究協議会が5年ごとに調査を実施しています。その報告によれば、多剤耐性結核菌の出現頻度は、1992年の、結核治療歴を持たない、いわゆる初回治療患者から分離された結核菌では0.4%でしたが、97年には0.9%に上昇しています。また、既治療患者を対象にした調査では、10.1%(92年)から19.7%(97年)へと、5年間で約2倍も高い頻度になっています²⁾。

●院内集団感染多発の懸念

多剤耐性結核には、難治性であることに加え、今後、日本において集団感染し、患者が増加する可能性が高いという問題があります。すなわ

図1 先進諸外国と日本の結核罹患率

文献1)より(一部加筆)

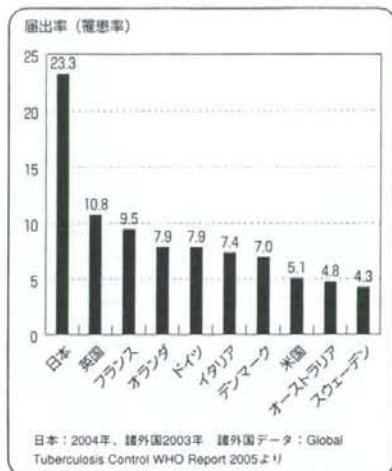


図2 新登録結核患者に占める70歳以上の割合

文献1)より(一部加筆)

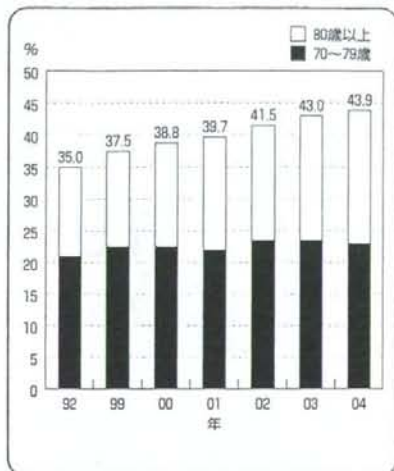


表1 「結核医療の基準」収載の抗結核薬

文献4)を基に作成

1. First-line drugs (a) 最も強力な抗菌作用を示し、菌の撲滅に必須の薬剤	リファンピシン (RFP)
	イソニアジド (INH)
	ピラジナミド (PZA)
2. First-line drugs (b) 主に静菌的に作用し、1との併用で効果が期待される薬剤	ストレプトマイシン (SM)
	エタンブトール (EB)
	カナマイシン (KM)
3. Second-line drugs 1と2に比し抗菌力は劣るが、多剤併用で効果が期待される薬剤	エチオナミド (TH)
	エンビオマイシン (EVM)
	バラアミノサリチル酸 (PAS)
	サイクロセリン (CS)

ち多剤耐性結核では、RFPとINHの両薬剤を使えないために十分な治療ができず、そのためにさらなる薬剤耐性を獲得しやすく、その耐性菌のばらまきが起りやすい状態になっているのです。

例えば米国では、免疫能が著しく低下しているために感染を受けやすいHIV感染者(≒p.85)を中心に多剤耐性結核の集団感染が多発し、多

表2 初回結核治療における標準的薬療法

文献4) を基に作成

A法	<ul style="list-style-type: none"> ・RFP+INH+PZA+SMまたはEBの4剤併用療法で2カ月間治療。 その後、RFP+INHの2剤併用療法。 またはRFP+INH+EBの3剤併用療法で4カ月間治療する ・標準的治療期間は6カ月(180日)間
B法	<ul style="list-style-type: none"> ・RFP+INH+SMまたはEBの3剤併用療法で6カ月間治療。 その後、RFP+INHの2剤併用療法。 またはRFP+INH+EBの3剤併用療法で3カ月間治療する ・標準的治療期間は9カ月(270日)間
<p>注1) 病型や排菌のいかにかわらずA法を用いて治療することを原則とし、副作用等のためにPZAが投与不可の場合に限りB法を用いる</p> <p>注2) 従来のRFP+INH 2剤併用療法は、活動性結核の治療法としては不十分であり、耐性化防止の観点からすべて3剤以上の併用療法を原則とする</p> <p>注3) 粟粒結核や病型分類1型(広汎空洞型)等の重症例、3カ月を超える培養陰性例、糖尿病や臓器合併例、全身的な副腎皮質ステロイド薬・免疫抑制剤併用例などでは、標準治療期間を、各々3カ月(90日)間延長することができる</p> <p>注4) 妊娠中の女性に対しては、胎児への第8脳神経障害が危惧されるSM、および胎児に対する安全性が未確認のPZAの両薬剤は用いないこととし、B法のうち、「RFP+INH+EBによる6カ月間の治療の後、RFP+INH(+EB)による3カ月間治療」を原則とする</p>	

表3 RFPまたはINHが投与できない場合の結核治療法

文献4) を基に作成

RFPが投与不可能な場合 (INH感受性でINH投与可能な場合)	
①PZAが投与可能な場合	<ul style="list-style-type: none"> ・INH+PZA+SM+EB (+LVFXまたは感受性のある表1のSecond-line drugsの1剤) の、4ないし5剤併用療法で菌陰性化後6カ月まで継続治療。 その後、INH+EB (+LVFXまたは感受性のあるSecond-line drugsの1剤) の、2ないし3剤併用療法で治療する ・治療期間は菌陰性化後18カ月間とするが、SMの投与は最長6カ月間とする
②PZAが投与不可能な場合	<ul style="list-style-type: none"> ・INH+SM+EB+LVFXまたは感受性のあるSecond-line drugsの1剤を加えた4剤併用療法で菌陰性化後6カ月まで継続治療。 その後INH+EB+感受性のあるSecond-line drugsの1剤の、3剤併用療法で治療する ・治療期間は菌陰性化後18~24カ月間とするが、SMの投与は最長6カ月間とする
INHが投与不可能な場合 (RFP感受性でRFP投与可能な場合)	
①PZAが投与可能な場合	<ul style="list-style-type: none"> ・RFP+PZA+SM+EB (+LVFXまたは感受性のあるSecond-line drugsの1剤) の、4ないし5剤併用療法で菌陰性化後6カ月まで継続治療。 その後、RFP+EBの2剤併用療法で治療する ・治療期間は9カ月間、または菌陰性化後6カ月間のいずれか長い期間とするが、SMの投与は最長6カ月間とする
②PZAが投与不可能な場合	<ul style="list-style-type: none"> ・RFP+SM+EB+LVFXまたは感受性のあるSecond-line drugsの1剤の4剤併用療法で菌陰性化後6カ月まで継続治療。 その後、RFP+EBの2剤併用療法で治療する ・治療期間は12カ月間、または菌陰性化後9カ月間のいずれか長い期間とするが、SMの投与は最長6カ月間とする

数の死亡者を出しています。日本でも、95年に初めて、多剤耐性結核の院内集団感染が発生して1名が死亡しています。その後も、毎年数件の院内集団感染が報告されています。

現在日本では、毎年約80人の多剤耐性結核患者が新たに発生しており、累積患者数は、03年の時点で、1,500~2,000人になると推定されています³⁾。

こうした多剤耐性結核の出現を防ぐためには、初回治療を適切に行い、中断することなく、確実に治療を終了することが必要です。その対策強化のため、日本結核病学会治療委員会により「結核医療の基準」の見直しが行われ、これを受けて厚生労働省は、04年に、その一部改正を全国に通知しています。

Point 3 「体内に生存する結核菌を可及的に撲滅する」を治療目標に

●抗結核薬による化学療法

結核の治療は、患者の体内に生存する結核菌を可及的に撲滅することを目標に進められます。そのための治療としては、一部改正後の「結核医療の基準」に沿った抗結核薬による化学療法が推奨されています。

結核の治療歴を持たない、初回治療患者の場合は、その病型や排菌の有無にかかわらず、INH+RFP+ピラジナミド(PZA)+ストレプトマイシン(SM)またはエタンブトール(EB)の、4剤併用による標準療法を開始します。ただし、副作用のためにPZAを使用できない場合は、INH+RFP+SMまたはEBの3剤併用により治療をスタートします(表2)。

●最強の抗結核薬が投与不可なら

フルオロキノロン薬も

RFPとINHは現時点で最強の抗結

核薬であり、結核治療には不可欠の薬剤です。しかし、菌の耐性化や副作用などのために、これらの薬剤のいずれかを使用できないことがあります。このような場合は、体内で生存している結核菌、すなわち生菌を可及的に撲滅するという所期の治療目標を達成することはいっそう難しくなります。

そこで、体内の生菌数が最も多いと考えられる治療当初は、日本では抗結核薬としては未承認ではあるものの結核菌に有効とされる合成抗菌薬、フルオロキノロン薬（レボフロキサシン：LVFXなど）も使用可能とし、感受性のある抗結核薬との4剤以上による併用療法を行います（表3）。

●多剤耐性結核の治療は 専門的医療機関で

RFPとINHの両薬剤に耐性がある多剤耐性結核の場合、あるいは副作用のために両薬剤を使えない場合は、治療目標の達成がさらに難しくなります。この場合の治療法として、「結核医療の基準」は、表4に示す原則を踏まえ、

- ① 多剤耐性患者用病室を備える
- ② DOT（後述）を実施する
- ③ 外科治療も可能な専門的医療機関で治療する

ことを推奨。同時に、多剤耐性結核患者の治療に携わる医療チームには、以下の徹底により、治療を完了できるように支援することを要請しています。

- ① 副作用の発現に細心の注意を払う（抗結核薬の副作用については、日本結核病学会ホームページにある一覧表を参照：<http://www.kekkaku.gr.jp/ga/fuku.html>）
- ② 患者とその家族に、「治療期間が長期に及ぶこと」「治療の成功率が必ずしも高くないこと」「治療薬の副作用やその早期発見方法」「治療後の排菌の推移」について

繰り返し説明し、理解を得る

- ③ 管轄の保健所など、地域の関係者と協力してバックアップ態勢の強化を図る

Point 4 DOTSの普及・促進により「ストップ結核」を実現

●直接内服を確認する

現時点では、多剤耐性結核に対応できる新タイプの抗結核薬の出現を直ちに期待できる状況がありません。したがって、耐性結核の出現を予防することが、多剤耐性結核の出現を防ぐ最も確実な手段です。

その鍵となるのは、初回治療を適切に開始し、継続して、その治療を確実に終了するための患者教育、とりわけ服薬指導です。その方法として結核治療のガイドラインである「結核医療の基準」は、DOTの実施を求めています。

DOTとは「Directory Observed Treatment：直接服薬確認療法」のことです。患者が内服するところを医療スタッフが直接確認することにより、薬の飲み忘れや服薬の中断を防ぐことをねらったものです。

結核の初期治療において、表2にA法として示したPZA併用による6か月間の短期化学療法（Short Course：S）をDOTにて実施すること、すなわちDOTSの徹底が、耐性結核さらには多剤耐性結核患者を減少させ、ひいては結核患者そのものの減少をもたらすと考えられています。

90年代の初頭から、WHOを中心に、DOTSをキーワードに世界中で進められている「ストップ結核」キャンペーンは、この考えに拠っています。

表4 RFPおよびINHが投与できない場合の結核治療の原則（多剤耐性結核の治療法）

（文獻4）を基に作成

1. 治療当初は、投与可能な感受性のある薬剤の、最低でも3剤、可能なら4もしくは5剤併用療法で菌陰性化後6カ月まで継続投与し、その後は長期投与が困難な薬剤を除き、さらに菌陰性化後24カ月まで治療を継続する
2. 感受性のある1剤のみの変更は、容易にその薬剤の耐性を獲得するため禁忌とし、治療薬を変更する場合には、一挙に複数の有効薬剤に変更する
3. 薬剤の選択は表1の記載順に従って行う。ただしSM、KM、EVMの同時併用は禁忌とし、抗菌力や交差耐性を考慮してSM→KM→EVMの順に選択する。また、フルオロキノロン薬の同時併用も禁忌とし、抗菌力や副作用などからLVFX→シプロフロキサシン（CPFX）→スバルフロキサシン（SPFX）の順に選択する
4. 外科治療が可能な患者では、治療当初から外科治療を積極的に考慮する
5. 多剤耐性のうちINH0.2μg/ml耐性、1μg/ml感受性の場合はINHの投与は可能だが、有効薬剤には数えない

エイズ合併結核

免疫能が著しく低下するHIV感染症は、結核感染のリスクが高い。幸い日本では、現時点において、HIV感染症に合併した結核、いわゆるエイズ合併結核の患者数は少ない。しかし、HIV感染者は年々着実に増加しており、2004年には1,000人を超えている。このような状況下では、速からず、日本の結核患者に占めるエイズ合併結核患者の割合が無視できない値になると懸念されている。

HIV感染が判明した時点で、さまざまな感染症に対して発病予防策がとられているが、結核についても必ず既感染の有無、結核患者への接触の機会の有無などを把握し、潜在性結核感染が判明あるいは強く疑われる場合は、積極的に化学療法を行って、発病を阻止することが求められている。

引用・参考文献

- 1) 結核予防会結核研究所ホームページ：平成16年結核発生動向調査年報のポイント (<http://www.jata.or.jp/rit/yj/project1a.htm>)
- 2) 結核療法研究協議会編：平成11年度結核療法研究協議会研究報告書、2004。
- 3) 平成10・11年度厚生科学研究費補助金 先端的厚生科学研究分野 新興・再興感染症研究事業：薬剤耐性結核のサーベイランス、耐性の分子機構および多剤耐性結核に関する研究（主任研究者：阿部千代治）、資料と展望、45、p.19-47、2003。
- 4) 日本結核病学会治療委員会ホームページ：「結核医療の基準」の見直し「結核医療の基準」の見直し一第2号一 (<http://www.kekkaku.gr.jp/ga/in>)
- 5) 永井英明：多剤耐性結核、医学のあゆみ、208（1）、p.38-41、2004。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Masahide Horiba, Lindsey B. Martinez, James L. Buescher, Shinji Sato, Jenae Limoges, Yunquan Jiang, Clinton Jones and Tsuneya Ikezu	OTK18, a zinc-finger protein, regulates human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat through two distinct regulatory regions	Journal of General Virology	88	1-6	2007

Short
Communication

OTK18, a zinc-finger protein, regulates human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat through two distinct regulatory regions

Masahide Horiba,^{1,2} Lindsey B. Martinez,^{1,2} James L. Buescher,^{1,2} Shinji Sato,^{1,2} Jenae Limoges,³ Yunquan Jiang,⁴ Clinton Jones⁴ and Tsuneya Ikezu^{1,2}

Correspondence
Tsuneya Ikezu
tikezu@unmc.edu

¹Center for Neurovirology and Neurodegenerative Disorders, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-5880, USA

²Department of Pharmacology and Experimental Neuroscience, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-5880, USA

³Department of Internal Medicine, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-5880, USA

⁴Department of Veterinary and Biomedical Sciences, University of Nebraska, Lincoln, NE 68583-0905, USA

It has previously been shown by our laboratory that OTK18, a human immunodeficiency virus (HIV)-inducible zinc-finger protein, reduces progeny-virion production in infected human macrophages. OTK18 antiviral activity is mediated through suppression of Tat-induced HIV-1 long terminal repeat (LTR) promoter activity. Through the use of LTR-scanning mutant vectors, the specific regions responsible for OTK18-mediated LTR suppression have been defined. Two different LTR regions were identified as potential OTK18-binding sites by an enhanced DNA–transcription factor ELISA system; the negative-regulatory element (NRE) at –255/–238 and the Ets-binding site (EBS) at –150/–139 in the LTR. In addition, deletion of the EBS in the LTR blocked OTK18-mediated LTR suppression. These data indicate that OTK18 suppresses LTR activity through two distinct regulatory elements. Spontaneous mutations in these regions might enable HIV-1 to escape from OTK18 antiretroviral activity in human macrophages.

Received 24 March 2006
Accepted 29 August 2006

The control of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 entry, reverse transcription, integration, expression and production is operated by distinct molecular mechanisms, which have been targeted by antiretroviral therapy. Among these mechanisms, nuclear factors, such as NF- κ B and 45/39kD CCAAT/enhancer-binding protein- β (C/EBP β) isoforms, are important in regulating HIV-1 expression (Griffin *et al.*, 1989; Henderson *et al.*, 1996). In addition, several transcription factors can repress virus transcription, often by binding to specific sequences contained in the virus long terminal repeat (LTR) (Patarca *et al.*, 1988; Subler *et al.*, 1994; Ray & Srinivas, 1997; Weiden *et al.*, 2000; Cicala *et al.*, 2002; Hayes *et al.*, 2002). Recently, we have shown that the transcriptional factor OTK18 is induced by and suppresses HIV-1 infection in mononuclear cells (Carlson *et al.*, 2004a). OTK18 is classified as a transcription factor as it contains 13 C₂H₂-type DNA-binding zinc-finger motifs (Saito *et al.*, 1996). C₂H₂ zinc-finger motifs are capable of binding to a wide range of DNA sequences, including the HIV-1 LTR (Wu *et al.*, 1995; Isalan *et al.*, 2001). We have demonstrated previously that one putative antiviral mechanism of OTK18

involves direct suppression of the LTR (Carlson *et al.*, 2004a). Mutational analyses revealed that the suppressive activity of OTK18 lies within aa 26–89. This region has homology to a family of zinc-finger proteins containing the Krüppel-associated box (KRAB) motif, a repression domain encoded by numerous transcription factors. Pengue *et al.* (1995) found that the KRAB domain fused to HIV-1 Tat was able to repress basal HIV-1 promoter activity in HeLa cells. This finding was supported further by the demonstration that a KRAB-containing tetracycline-binding protein can suppress HIV-1 replication through randomly integrated tetracycline-response elements within the HIV-1 genomic sequence (Herchenroder *et al.*, 1999). In addition, Reynolds *et al.* (2003) reported that a genetically engineered KRAB domain containing a C₂H₂-type zinc-finger protein could suppress Tat-mediated HIV-1 LTR activity, thereby making it an attractive candidate for antiretroviral therapy (Reynolds *et al.*, 2003). In this context, OTK18 is the first KRAB-containing C₂H₂ zinc-finger protein expressed endogenously in macrophages that has antiviral activity. Interestingly, OTK18 is expressed specifically in the cytosol

of brain mononuclear phagocytes in severe HIV-1 encephalitis and may serve as a 'surrogate' marker for HIV-1-associated dementia (Carlson *et al.*, 2004b). Elucidation of OTK18-binding sequences within the HIV-1 LTR is critical for the molecular characterization of OTK18 antiviral activity.

In this study, we employed all 27 LTR promoter linker-scanning mutants fused to the luciferase gene to screen for potential OTK18 response elements in the LTR (-453/+18) of the HXB2 clone (Zeichner *et al.*, 1991). The linker-scanning mutants consecutively replaced 18 bp of wild-type sequence with an *NdeI-XhoI-SalI*(NXS) polylinker (CATATGCTCGAGGTCGAC) across the U3 and R regions. Human embryonic kidney 293 cells (10^5 cells per well on 24-well plates; Fisher Scientific) were co-transfected with the LTR-scanning mutant luciferase vectors (300 ng), Tat1-72 expression vector (pSV2Tat72, 50 ng) (Subramani *et al.*, 1981), a *Renilla* luciferase reference construct (pTK-RL, 50 ng) and the OTK18 expression vector (pcDNA-OTK18, 1 µg) by using GenePorter (Gene Therapy Systems) as described previously (Carlson *et al.*, 2004a). Forty-eight hours after transfection, cells were collected and luciferase activity was measured by using a luminometer (Berthold Systems Inc.) using a Dual-Luciferase kit (Promega). As shown in Table 1, we identified six regions (A3, A8, A10, A12, B1 and B6, corresponding to -417/-400, -327/-310, -291/-274, -255/-238, -237/-220 and -147/-130), which were resistant to the OTK18-mediated gene suppression in the presence of Tat. These codes correspond to the original codes by Zeichner *et al.* (1991).

The binding of OTK18 to each of these six regions was tested by a novel DNA-transcription factor ELISA, which is about tenfold more sensitive than conventional electromobility gel-shift analysis (EMSA). Development of such a technique was necessary, as binding of OTK18 to double-stranded oligonucleotides corresponding to the regions was too weak to be examined by conventional EMSA (data not shown). For that purpose, we generated a baculovirus expressing 6 × His-Express-tagged full-length OTK18 by in-frame insertion of the full-length OTK18 gene into the pBlueBacHis2A vector (Invitrogen) at the *Bam*HI site. The resultant vector (pBlueBacHis2A-OTK18) was inserted into Bac-N-Blue *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus DNA by homologous recombination according to the manufacturer's protocol. Infection of Sf9 insect cells with the optimized titre of OTK18 baculovirus resulted in expression of recombinant OTK18 at 84 h post-infection, detected as a 75 kDa protein (data not shown). OTK18 protein was collected specifically from the nuclear-extract fraction, which we used for subsequent experiments as control nuclear extract.

The DNA-transcription factor ELISA method was originally described by Reynolds *et al.* (2003) and is available commercially as the colorimetric ELISA TransAM kit (Active Motif). To enhance the sensitivity of the original protocol, we incorporated luminol-based conversion of

hydrogen peroxidase activity to chemiluminescence by using SuperSignal ELISA Pico chemiluminescent substrate (Pierce) instead of conventional chromogenic development. As shown in Fig. 1, the colorimetric ELISA shows a statistically significant difference between a non-specific oligonucleotide (control) and the HIV-1 LTR oligonucleotide A8 in the presence of OTK18-containing nuclear extract from 0.5 to 5 µg input (Fig. 1a), but the signal-to-noise (S/N) ratio is 1.31-1.41 and Z' factors are -5.64 to 0.045. In the case of our luminescence system, there is statistical significance between two groups from 0.5 to 5 µg input (Fig. 1b), with an S/N ratio of 1.83-2.59 and Z' factors of -0.88 to 0.85, which was calculated as described by Zhang *et al.* (1999). As a higher S/N ratio and Z' factor indicate suitability of the assay system, we conclude that our luminescence system is superior to the colorimetric system, and we chose 2 µg nuclear extract for the following experiment.

The OTK18-binding activity to each element and its sensitivity to cold probe ranging from $1 \times$ to $100 \times$ was tested (Fig. 1c). The oligonucleotide pairs used for double-stranded DNA probes are A3 [biotin-(Nx100)-CCTTGATCTGTGGATCTA and TAGATCCACAGATCAAGG], A8 [biotin-(Nx100)-TGGATGGTGCTACAAGCT and AGCTGTAGCACCATCCA], A10 [biotin-(Nx100)-GAAGT-TAGAAGAAGCCAA and TTGGCTTCTTAACTTC], A12 [biotin-(Nx100)-CTGTATACACCCTGTGAG and CTCACAGGGTGTAACAAG], B1 [biotin-(Nx100)-CCTGCATGGAATGGATGA and TCATCCATTCCATGCAGG], B6 [biotin-(Nx100)-TCCGGAGTACTTCAAGAA and TTC-TGAAGTACTCCGG] and EBS [biotin-(Nx100)-CATCCGGAG and CTCGGGATG]. OTK18 binding was specific, as significant binding occurred only in the presence of OTK18-infected cell lysate and not in the presence of lysis buffer alone or uninfected cell lysate (Fig. 1d). Whilst regions A3, A8 and B1 demonstrated significant binding to OTK18, none of them was outcompeted significantly by cold probes in a dose-dependent manner (Fig. 1d). Only the A12 and EBS elements showed significant binding to OTK18, which was outcompeted by cold probes. The B1 element showed OTK18 binding, but was not outcompeted by cold probe, and B6, which contains partial EBS sequence, had no binding activity. In addition, none of the binding was outcompeted by up to 100-fold excess of single-stranded oligonucleotides corresponding to the binding sequence, suggesting its specificity to double-stranded DNA (data not shown). These data indicate that the A12 and EBS elements are potential specific OTK18-binding sites on the HIV-1 LTR.

The EBS is known to be an important response element for the cooperative interaction of Ets-1 with the upstream stimulatory factor (USF)-1 in HIV-1 enhancer activity (Sieweke *et al.*, 1998). As the B6 region does not cover EBS completely, we created an HXB2-derived LTR luciferase vector lacking EBS (-150/-139) (pLTRA-EBS-Luc) with a modified QuikChange II site-directed mutagenesis kit

Table 1. Suppression of LTR linker-scanning mutants by OTK18

Region	Location	OTK18 suppression*	Transcriptional element
A1	-453/-436	++	
A2	-435/-418	++	
A3	-417/-400	-	
A4	-399/-382	++	
A5	-381/-364	+	Site A
A6	-363/-346	+	AP-1
A7	-345/-328	++	AP-1, site B, NRE
A8	-327/-310	-	NRE
A9	-309/-292	+	NRE
A10	-291/-274	-	NRE, NFAT-1
A11	-273/-256	++	NRE, NFAT-1, IL-2
A12	-255/-238	-	NRE, IL-2
B1	-237/-220	-	NRE, IL-2
B2	-219/-202	++	NRE
B3	-201/-184	++	NRE
B4	-183/-166	++	C/EBP II
B5	-165/-148	++	USF-1
B6	-147/-130	-	Ets, LEF-1
B7	-129/-112	++	LEF-1, C/EBP I
B8	-111/-94	++	NF-κB, HIVEN86A, EBP-1
B9	-93/-76	NA	NF-κB, HIVEN86A, EBP-1
B10	-75/-58	NA	Sp1
B11	-57/-40	NA	Sp1
B12	-39/-22	NA	TATA
C1	-21/-4	NA	LBP-1, UBP-1
C2	-3/+15	+	LBP-1, UBP-1
C4	-105/-81	+	NF-κB

*Suppression of pSVTat72-mediated LTR-luciferase expression by OTK18; -, + and ++ denote no suppression, 50-79% suppression and 80-99% suppression, respectively. NA, No detectable LTR activation by Tat and no suppression by OTK18.

(Stratagene) using oligonucleotide pairs and tested its promoter activity in the presence/absence of HIV-1 Tat and OTK18 in 293 cells (Fig. 2). Unexpectedly, pLTRΔEBS-Luc showed enhanced luciferase activity in the presence of Tat and OTK18 (second column) compared with Tat alone (first column). Tat-activated luciferase activity of the original LTR-Luc, on the other hand, was suppressed significantly by OTK18 (Fig. 2b). This suggested that EBS is a critical element for the OTK18-mediated LTR suppression and that OTK18 has a dual regulatory function in the HIV-1 LTR, dependent on specific binding regions (see below). As the proximal promoter region between nucleosomes nuc0 and nuc1, where EBS is located, has been established as a critical regulatory region, EBS is an important site for the suppressive effect of OTK18. All of the above data indicate that EBS (-150/-139) is the primary OTK18 response element on the HIV-1 LTR.

We have shown previously that the transcriptional factor OTK18 suppresses both HIV-1 Tat-mediated LTR activation *in vitro* and HIV-1 replication in human monocyte-derived macrophages (MDMs) (Carlson *et al.*, 2004a).

However, the response element for OTK18 suppression has not been determined. We have shown that OTK18 interacts with two distinct regions on the HIV-1 LTR, the NRE and EBS regions, by using LTR-scanning mutants and EMSA and through more defined subcloning/deletional analyses. Multiple regions of the NRE have been reported to downregulate HIV transcription (Garcia *et al.*, 1987). Specifically, NRE (-182/-153) contains a binding site for the nuclear factors USF (Sawadogo *et al.*, 1988), NFIL-6 (Tesmer *et al.*, 1993) and human GATA-3 (Yang & Engel, 1993; Galio *et al.*, 1999). Furthermore, NRE (-220/-160) binds to nuclear matrix proteins and inhibits NF-κB activity (Hoover *et al.*, 1996). However, no proteins have been identified that bind to NRE (-255/-238). Thus, OTK18, to the best of our knowledge, is the first cellular protein to be shown to interact with this specific region of the NRE and suppress the HIV-1 LTR.

A number of mutations were reported at this region in LTRs derived from human genomic DNA of HIV-1-infected patients. Estable *et al.* (1996) reported LTR-proximal sequences from 42 HIV-1-infected cases ranging from

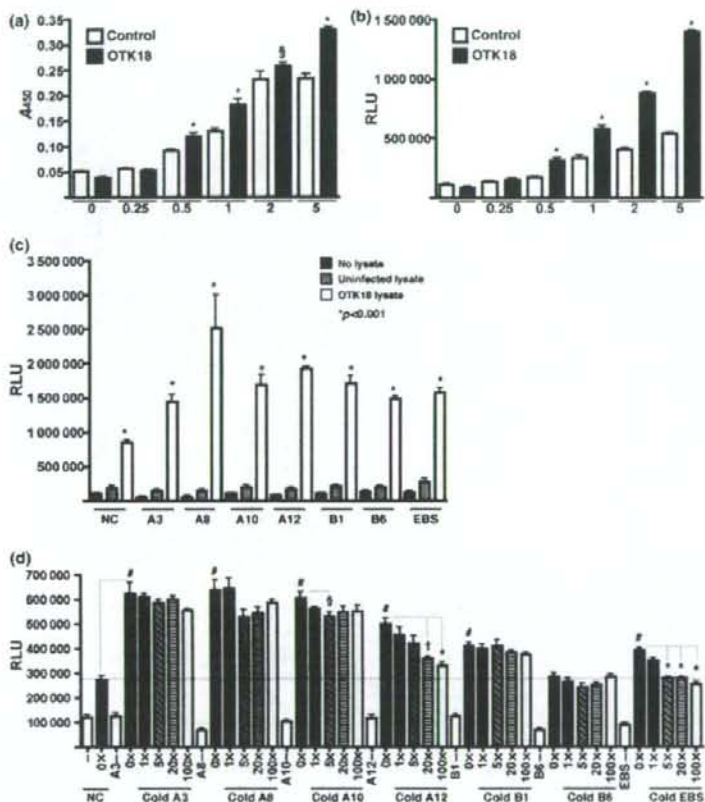


Fig. 1. DNA ELISA screening for binding of OTK18 to HIV-1 LTR regions. (a, b) Improved chemiluminescent method for DNA-transcription factor ELISA. Sensitivity of two methods, conventional colorimetry (a) and chemiluminescence (b), was compared by using varying amounts of OTK18 protein extracts bound to a negative-control oligonucleotide (empty bars) or a double-stranded oligonucleotide corresponding to the A8 region of the HIV-1 LTR region (filled bars). Statistical analysis was performed by using one-way ANOVA to compare binding of each amount of extract with the binding of the negative-control oligonucleotide for the corresponding amount of extract ($*P < 0.001$; $\$P < 0.05$). (c) Six regions of the HIV-1 LTR (A3–B6 and EBS) were screened for specific binding of the OTK18 protein. Binding was compared in the presence of lysis buffer alone (no lysate, filled bars), uninfected Sf9 cell lysate (uninfected lysate, shaded bars) or OTK18 baculovirus-infected lysate (OTK18 lysate, empty bars). Only the OTK18 lysate showed significant binding ($*P < 0.001$ compared with no lysate or uninfected lysate). (d) Binding was tested in the presence of no extract (–, empty bars), extract alone with no competing oligonucleotide (0x, filled bars), 1x excess of the corresponding LTR oligonucleotide (checked bars), 5x excess oligonucleotide (diagonally hatched bars), 20x excess oligonucleotide (horizontally hatched bars) or 100x oligonucleotide (shaded bars). Statistical analysis was performed by using one-way ANOVA to compare binding of each oligonucleotide with no competitor present to the corresponding no-extract condition ($\#P < 0.001$). Statistical analysis was also performed by using one-way ANOVA to compare binding of the competition conditions with the no-competitor condition for the same oligonucleotide ($\dagger P < 0.01$; $\#P < 0.001$). NC, Negative control; RLU, relative luciferase units.

stage I to IV patients (World Health Organization staging I–IV). Although they concluded that the Ets core sequence (ATCCG) was highly conserved, 25 of a total of 60 LTR sequences from the 42 cases were mutated in the Ets-1 element. The Ets core sequence was highly conserved in non-B

subtypes (De Arellano *et al.*, 2005). We have also examined the available LTR depository at the Los Alamos HIV sequence database for LTRs of A, B, C and D subtypes. The conservation of ETS core sequence (ATCCG) was 19/19 (100%, A), 45/48 (94%, B), 73/74 (97%, C) and (90%, D).

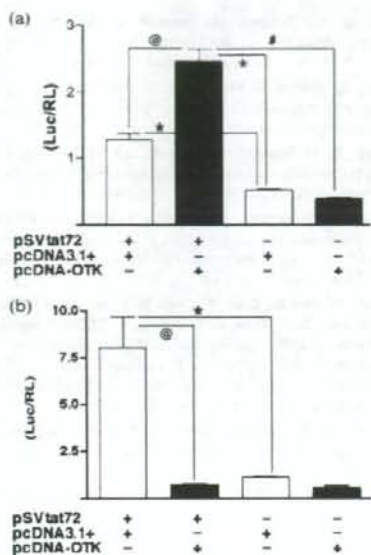


Fig. 2. Luciferase assay of LTR elements and LTR Δ EBS. (a) HEK293 cells were transfected with pSV2tat72, pLTRA Δ EBS-Luc (firefly luciferase), pTK-RL (*Renilla* luciferase) and either pcDNA3-1 or pcDNA-OTK18. Transcriptional activity was expressed as a ratio of the reporter gene (pLTRA Δ EBS-Luc) to the reference gene (pTK-RL). (b) HXB2-derived original LTR-Luc was tested in the same experimental design. *, # and @ denote $P < 0.05$ vs Tat(-) pcDNA3-1, Tat(-) pcDNA-OTK18 or Tat(+) pcDNA3-1, respectively.

The common Ets sequence was TGCATCCGGAG (89% in A, 73% in B, 3% in C and 38% in D), followed by TACATCCGGGAG (5% in A, 4% in B, 77% in C and 13% in D). The most striking difference is the specific dominance of TACATCCGGGAG in subtype C, which will be worthwhile to pursue for future study (the mutation TAC in type C is at position -149, whereas the beginning of the core Ets sequence is at -147). Further investigation is required to understand whether LTRs derived from different subtypes impact their suppression by OTK18 and if such an impact is attributed to the difference in the Ets sequence.

The upregulation of LTR Δ EBS by OTK18 in the presence, but not in the absence, of Tat is unexpected, but it indicates that OTK18 may have a dual role in LTR regulation. We have found previously that there are two forms of OTK18 (Carlson *et al.*, 2004a), which we define as 75 kDa OTK18 α and 65 kDa OTK18 β . OTK18 β lacks the KRAB-A box and may not act as a transcriptional suppressor. Thus, we believe that the dual gene regulation conferred by OTK18 α and OTK18 β may arise due to the presence or absence of different homology domains in these different OTK18

isoforms. Further study is necessary in order to characterize the expression of these OTK18 isoforms in MDMs and their respective roles in HIV-1 replication and LTR regulation.

Acknowledgements

I would like to thank Drs A. Ghorpade and J. West for critical reading of the manuscript, the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program for pSV2tat72 (Alan Flankel) and LTR linker-scanning mutants (Steve Zeichner), S. Wakeley and G. Weber for technical assistance and R. Taylor for editorial support. This work is supported by NIH grants R01 AI5089401, R01 MH072539 (T.L.), K08 MH01552 (J.L.) and NCRR P20RR15635 (T.L. and C.J.).

References

- Carlson, K. A., Leisman, G., Limoges, J., Pohlman, G. D., Horiba, M., Buescher, J., Gendelman, H. E. & Ikezu, T. (2004a). Molecular characterization of a putative antiretroviral transcriptional factor, OTK18. *J Immunol* **172**, 381-391.
- Carlson, K. A., Limoges, J., Pohlman, G. D., Poluektova, L. Y., Langford, D., Masliah, E., Ikezu, T. & Gendelman, H. E. (2004b). OTK18 expression in brain mononuclear phagocytes parallels the severity of HIV-1 encephalitis. *J Neuroimmunol* **150**, 186-198.
- Cicala, C., Arthos, J., Selig, S. M., Dennis, G., Jr, Hosack, D. A., Van Ryk, D., Spangler, M. L., Steenbeke, T. D., Khazanie, P. & other authors (2002). HIV envelope induces a cascade of cell signals in non-proliferating target cells that favor virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9380-9385.
- De Arellano, E. R., Soriano, V. & Holguin, A. (2005). Genetic analysis of regulatory, promoter, and TAR regions of LTR sequences belonging to HIV type 1 non-B subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**, 949-954.
- Estable, M. C., Bell, B., Merzouki, A., Montaner, J. S., O'Shaughnessy, M. V. & Sadowski, I. J. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat variants from 42 patients representing all stages of infection display a wide range of sequence polymorphism and transcription activity. *J Virol* **70**, 4053-4062.
- Gallo, L., Briquet, S. & Vaquero, C. (1999). Real-time study of interactions between a composite DNA regulatory region (HIV-1 LTR NRE) and several transcription factors of nuclear extracts. *Biochem Biophys Res Commun* **264**, 6-13.
- Garcia, J. A., Wu, F. K., Mitsuyasu, R. & Gaynor, R. B. (1987). Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus. *EMBO J* **6**, 3761-3770.
- Griffin, G. E., Leung, K., Folks, T. M., Kunkel, S. & Nabel, G. J. (1989). Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF- κ B. *Nature* **339**, 70-73.
- Hayes, M. M., Lane, B. R., King, S. R., Markovitz, D. M. & Coffey, M. J. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists inhibit HIV-1 replication in macrophages by transcriptional and post-transcriptional effects. *J Biol Chem* **277**, 16913-16919.
- Henderson, A. J., Connor, R. I. & Calame, K. L. (1996). C/EBP activators are required for HIV-1 replication and proviral induction in monocytic cell lines. *Immunity* **5**, 91-101.
- Herchenroder, O., Hahne, J. C., Meyer, W. K., Thiesen, H. J. & Schneider, J. (1999). Repression of the human immunodeficiency virus type 1 promoter by the human KRAB domain results in inhibition of virus production. *Biochim Biophys Acta* **1445**, 216-223.
- Hoover, T., Mikovits, J., Court, D., Liu, Y. L., Kung, H. F. & Raziuddin (1996). A nuclear matrix-specific factor that binds a specific segment

M. Honba and others

of the negative regulatory element (NRE) of HIV-1 LTR and inhibits NF- κ B activity. *Nucleic Acids Res* 24, 1895-1900.

Isalan, M., Klug, A. & Choo, Y. (2001). A rapid, generally applicable method to engineer zinc fingers illustrated by targeting the HIV-1 promoter. *Nat Biotechnol* 19, 656-660.

Patarca, R., Freeman, G. J., Schwartz, J., Singh, R. P., Kong, Q. T., Murphy, E., Anderson, Y., Sheng, F. Y., Singh, P. & other authors (1988). rpt-1, an intracellular protein from helper/inducer T cells that regulates gene expression of interleukin 2 receptor and human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2733-2737.

Pengue, G., Caputo, A., Rossi, C., Barbanti-Brodano, G. & Lania, L. (1995). Transcriptional silencing of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat-driven gene expression by the Kruppel-associated box repressor domain targeted to the transactivating response element. *J Virol* 69, 6577-6580.

Ray, R. B. & Srinivas, R. V. (1997). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by a cellular transcriptional factor MBP-1. *J Cell Biochem* 64, 565-572.

Reynolds, L., Ullman, C., Moore, M., Isalan, M., West, M. J., Clapham, P., Klug, A. & Choo, Y. (2003). Repression of the HIV-1 5' LTR promoter and inhibition of HIV-1 replication by using engineered zinc-finger transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1615-1620.

Saito, H., Fujiwara, T., Takahashi, E. I., Shin, S., Okui, K. & Nakamura, Y. (1996). Isolation and mapping of a novel human gene encoding a protein containing zinc-finger structures. *Genomics* 31, 376-379.

Sawadogo, M., Van Dyke, M. W., Gregor, P. D. & Roeder, R. G. (1988). Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. I. Complete purification and identification of USF from HeLa cell nuclei. *J Biol Chem* 263, 11985-11993.

Sieweke, M. H., Tekotte, H., Jarosch, U. & Graf, T. (1998). Cooperative interaction of ets-1 with USF-1 required for HIV-1 enhancer activity in T cells. *EMBO J* 17, 1728-1739.

Subler, M. A., Martin, D. W. & Deb, S. (1994). Activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by transforming mutants of human p53. *J Virol* 68, 103-110.

Subramani, S., Mulligan, R. & Berg, P. (1981). Expression of the mouse dihydrofolate reductase complementary deoxyribonucleic acid in simian virus 40 vectors. *Mol Cell Biol* 1, 854-864.

Tesmer, V. M., Rajadhyaksha, A., Babin, J. & Bina, M. (1993). NF-IL6-mediated transcriptional activation of the long terminal repeat of the human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7298-7302.

Weiden, M., Tanaka, N., Qiao, Y., Zhao, B. Y., Honda, Y., Nakata, K., Canova, A., Levy, D. E., Rom, W. N. & Pine, R. (2000). Differentiation of monocytes to macrophages switches the *Mycobacterium tuberculosis* effect on HIV-1 replication from stimulation to inhibition: modulation of interferon response and CCAAT/enhancer binding protein β expression. *J Immunol* 165, 2028-2039.

Wu, H., Yang, W. P. & Barbas, C. F., III (1995). Building zinc fingers by selection: toward a therapeutic application. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 344-348.

Yang, Z. & Engel, J. D. (1993). Human T cell transcription factor GATA-3 stimulates HIV-1 expression. *Nucleic Acids Res* 21, 2831-2836.

Zeichner, S. L., Kim, J. Y. & Alwine, J. C. (1991). Linker-scanning mutational analysis of the transcriptional activity of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J Virol* 65, 2436-2444.

Zhang, J. H., Chung, T. D. & Oldenburg, K. R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 4, 67-73.

安岡 彰

1. 安岡 彰：遺伝子診断の実際 12)感染症 (14)原虫. 臨床検査 51:1537-1539, 2007
2. 安岡 彰：Q&A形式で学ぶ 真菌感染症診療の実際 -免疫抑制患者(入院患者)の真菌症予防では、どのような環境対策が必要でしょうか?-. 深在性真菌症-SFI Forum 13:30-31, 2007
3. 安岡 彰：針刺しに関わる基礎知識. 感染対策 ICT ジャーナル 2:249-253, 2007
4. 安岡 彰：ノロウイルスの感染対策. 日本透析医会雑誌 22:210-215, 2007

片野晴隆

1. Ishak Mde, O., Martins, R.N., Machado, P.R., de Souza, L.L., Machado, L.F., Azevedo, V.N., Katano, H., Sata, T., Hasegawa, H., Vallinoto, A.C., and Ishak, R.: High diversity of HHV-8 molecular subtypes in the Amazon region of Brazil evidence of an ancient human infection. *J. Med. Virol* 79:1537-1544, 2007
2. Katano, H., Sato, Y., Hoshino, S., Tachikawa, N., Oka, S., Morishita, Y., Ishida, T., Watanabe, T., Rom, W., Mori, S., Sata, T., Weiden, M., and Hoshino, Y.: Integration of HIV-1 caused STAT3-associated B cell lymphoma in an AIDS patient. *Microbes Infect* 9:1581-1589, 2007
3. Kuhara, T., Yoshikawa, T., Ihira, M., Watanabe, D., Tamada, Y., Katano, H., Asano, Y., and Matsumoto, Y.: Rapid detection of human herpesvirus 8 DNA using loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods* 144:79-85, 2007
4. Ueno, T., Mitsuishi, T., Kimura, Y., Kato, T., Hasegawa, H., Katano, H., Sata, T., Kurane, S., and Kawana, S.: Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with Kaposi's sarcoma: successful treatment with interferon-alpha. *Eur. J. Dermatol* 17:539-540, 2007

竹内 勤

1. Asao Makioka, Masahiro Kumagai, Seiki Kobayashi, Tsutomu Takeuchi: Differences in protein profiles of the isolates of entamoeba histolytica and E. dispar by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) ProteinChip assays. *Parasitol Res* 102:103-110, 2007
2. H. TACHIBANA, X.-J. CHENG, S. KOBAYASHI, Y. OKADA, J. ITOH and T. TAKEUCHI: Primary structure, expression and localization of two intermediate subunit lectins of entamoeba dispar that contain multiple CXXC motifs. *Parasitology* 134:1989-1999, 2007
3. Sadatomo Tasaka, MD, FCCP; Naoki Hasegawa, MD; Seiki Kobayashi, MD; Wakako Yamada, MD; Tomoyasu Nishimura, MD; Tsutomu Takeuchi, MD; and Akitoshi Ishizaka, MD.: Serum indicators for the diagnosis of pneumocystis pneumonia. *Chest* 131:1173-1180, 2007
4. Jun Suzuki, Seiki Kobayashi, Ph.D., Rie Murata, Yoshitoki Yanagawa, D.V.M., Ph.D., and Tsutomu Takeuchi, M.D., Ph.D.: Profiles of a pathogenic entamoeba histolytica-like variant with variations in the nucleotide sequence of the small subunit ribosomal RNA isolated from a primate (De Brazza's guenon). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 38:471-474, 2007
5. Taro Fukao, Yoko Fukuda, Kotaro Kiga, Jafar Sharif, Kimihiro Hino, Yutaka Enomoto, Aya Kawamura, Kaito Nakamura, Tsutomu Takeuchi, and Masanobu Tanabe: An evolutionarily conserved mechanism for microRNA-223 expression revealed by microRNA gene profiling. *Cell* 129:617-631, 2007

古西 満

1. SHIGEKI HOSHINO, BINLIAN SUN, MITSURU KONISHI, MARI SHIMURA, TATSUYA SEGAWA, YOSHIKI HAGIWARA, YOSHIO KOYANAGI, AIKICHI IWAMOTO, JUN-ICHI MIMAYA, HIROSHI TERUNUMA, SHIGEYUKI KANO, and YUKIHITO ISHIZAKA: Vpr in plasma of HIV type 1-positive patients is correlated with the HIV type 1 RNA titers. *Aids Research and Human Retroviruses* 23:391-397, 2007

- Kenji Uno, Mitsuru Konishi, Eiichiro Yoshimoto, Kei Kasahara, Kei Mori, Koichi Maeda, Eiwa Ishida, Noboru Konishi, Koichi Murakawa and Keiichi Mikasa: Fatal cytomegalovirus-associated adrenal insufficiency in an AIDS patient receiving corticosteroid therapy. *Internal Medicine* 46:617-620, 2007
- KENJI UNO, MITSURU KONISHI, EIICHIRO YOSHIMOTO, KEI KASAHARA, KEI MORI, KOICHI MAEDA and KEIICHI MIKASA: A case of gynecomastia associated with efavirenz. *The Journal of Nara Medical Association* 58:141-145, 2007
- YOSHINARI MORIMOTO, MITSURU KONISHI, YUICHIRO IMAI, KOUTARO INAGAKE, SATORU FUKUTSUJI and TADAAKI KIRITA: Resistant recurrent aphthous stomatitis in an AIDS patient ~ Efficacy and problems of long-term corticosteroid therapy ~. *Oral Therapeutics and Pharmacology* 26:55-59, 2007
- 澤口博千代、中島宏和、中島重徳、古西 満：間質性肺炎発症から後天性免疫不全症候群と判明した2症例。感染症学雑誌 81:67-71, 2007

山崎喜隆

- Mari Sasabayashi, Md; Yoshitaka Yamazaki, Md, PhD; Kenji Tsushima, MD, PhD Orié Hatayama, MD; and Tadashi Okabe, MD: Usefulness of bronchoscopic microsampling to detect the pathogenic bacteria of respiratory infection. *CHEST* 131:474-479, 2007
- Sumiko Yoshikawa, MD, Kenji Tsushima, MD, PhD, Masanori Yasuo, MD, PhD, Keisaku Fujimoto, MD, PhD, Keishi Kubo, MD, PhD, Toshiko Kumagai, PhD, and Yoshitaka Yamazaki, MD, PhD: Hypersensitivity pneumonitis caused by penicillium citrinum, not enoki spores. *American Journal of Industrial Medicine* 50:1010-1017, 2007

永井英明

- Haruyuki Ariga, Yoshiko Kawabe, Hideaki Nagai, Atsuyuki Kurashima, Kimihiro Masuda, Hirotohi Matsui, Atsuhisa Tamura, Naohiro Nagayama, Shinobu Akagawa, Kazuko Machida, Akira Hebisawa, Yutsuki Nakajima, Hideki Yotsumoto, and Toru Mori: Diagnosis of active tuberculous serositis by antigen-specific interferon- γ response of cavity fluid cells. *CID* 45:1559-1567, 2007
- 永井英明：HIV合併結核の現状と展望。呼吸器科 11:423-427, 2007
- 永井英明、川辺芳子、有賀晴之、嶋山文子、島田昌裕、久能木真喜子、松井芳憲、川島正裕、鈴木純子、大島信治、益田公彦、松井弘稔、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：HIV感染症における結核感染診断に対しての QuantiFERON-TB 第2世代の有用性についての検討。結核 82:635-640, 2007
- 永井英明：[ICTがおさえておきたい感染症対策2007] おさえておきたい結核。 *Infection Control* 16:938-943, 2007
- 永井英明：[今日の結核症—的確な診断から治療へ] 結核症の治療 合併症等を有する特殊な症例の治療。診断と治療 95:1973-1980, 2007

堀場昌英

- Hiroyuki Gatanaga, Tsunefusa Hayashida, Kiyoto Tsuchiya, Munehiro Yoshino, Takeshi Kuwahara, Hiroki Tsukada, Katsuya Fujimoto, Isao Sato, Mikio Ueda, Masahide Horiba, Motohiro Hamaguchi, Masahiro Yamamoto, Noboru Takata, Akiro Kimura, Takao Koike, Fumitake Gejyo, Shuzo Matsushita, Takuma Shirasaka, Satoshi Kimura, and Shinichi Oka: Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 6 and 26. *CID* 45:1230-1237, 2007

研究成果の刊行に関する一覧表

平成 19 年度 長崎大学医学部・歯学部附属病院 感染制御教育センター 安岡 彰

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
安岡 彰	遺伝子診断の実際 12) 感染症 (14)原虫	臨床検査	51	1537-1539	2007
安岡 彰	Q&A形式で学ぶ 真菌感染症診療 の実際 ～免疫抑制患者（入院患 者）の真菌症予防では、どのよう な環境対策が必要でしょうか？～	深在性真菌 症-SFI Forum-	13	30-31	2007
安岡 彰	針刺しに関わる基礎知識	感染対策 ICTジャーナル	2	249-253	2007
安岡 彰	ノロウイルスの感染対策	日本透析医 会雑誌.	22	210-215	2007

3. 遺伝子診断の実際

12) 感染症 (14) 原虫

安岡 彰¹⁾

(KEYWORDS) マラリア, トキソプラズマ,
ニューモシスチス

はじめに

原虫症は臨床で遭遇する機会が少なく、適切な診断がなされなかったり診断が遅れやすい感染症である。また病原体の検出が顕微鏡的検出に依存しているため、検出感度が十分ではなく、また検査の習熟度によって検出率が変わってきてしまう。遺伝子検出法はこれらの欠点を補う貴重な検査法である。しかしながら、わが国には標準化された原虫の遺伝子検査キットが市販されておらず、すべて研究ベースのものであるため、検査の感度や特異度などの標準的データがない。

マラリア

1. 臨床像の概況

マラリアはハマダラカの吸血によって原虫が体内に侵入し、肝を経て赤血球内で原虫が成長・増殖し、発熱や貧血・肝脾腫などをきたす疾患である。国内での発生はなく輸入感染症として経験する。世界には、熱帯熱マラリア、三日熱マラリア、四日熱マラリア、卵形マラリアの4種類が存在する。このうち熱帯熱マラリアは急速に原虫数を増加させ、脳マラリアをはじめ全身の臓器不全を起こして致死的転帰をとるため、輸入感染症の中で最も迅速な診断が重要な疾患である。

2. 従来の検査法

マラリア確定診断の基本は末梢血の塗抹標本をギムザ染色し、顕微鏡的に検出する方法である。感染赤血球像や虫体像の違いから4種の原虫を区別することができる。この方法は末梢血の計数を行える施設であればどこでも行える方法であるが、標本の作製・染色の技術や原虫検出に経験を要することから施設間の検出力に大きな差がある。特に末梢血中の原虫数が少ない場合に問題となる。

補助診断法としては血液中のマラリア抗原を検出する迅速診断キットがあり、危険度が高い熱帯熱マラリアとその他を区別して検出することができる。2種類の検査があるが、いずれも日本国内では検査試薬として承認されておらず、発売されていない。

3. 遺伝子検査とその臨床的有用性

マラリアでは血液を用いたPCR (polymerase chain reaction) 法が報告されており、4種のマラリアを区別できるものが多い。わが国では岡山大学の綿矢らによる方法が知られており、少ない原虫量でも検出可能で、重複感染も検出できるものとして報告されている。

冒頭で述べたようにマラリアの検査法は検査者の技能に依存するところが大きい検査であり、また最適な採血時期や、採血後すみやかに標本を作製する必要があり一般病院では最良の検査結果を得ることが困難である場合も少なくない。この点、遺伝子検査では検体送付が可能なので検査の均一化に有用である。また、経験によることなく

1) YASUOKA Akira 長崎大学医学部・歯学部附属病院感染制御教育センター

4種のマラリアを区別できることや重複感染を容易に検出できることも大きなメリットである。

4. 従来法との関連

マラリアの診断には血液中に虫体が存在することが診断のよりどころとされているため、従来法を抜きにして遺伝子診断法が用いられることは当面考えられない。しかし、PCR検査が地域の検査ラボで迅速に行えるようになれば、将来的には遺伝子検査がマラリアの主たる診断法として認知される可能性もある。

トキソプラズマ

1. 臨床像の概況

トキソプラズマはネコを終宿主とし、ヒトやブタなどの哺乳類が中間宿主であり、われわれに最も身近な原虫である。急性感染では発熱と全身のリンパ節腫脹をきたし、一過性の全身リンパ節腫脹をきたす原因の一つである。免疫健全者ではその後は脳内やリンパ節などで持続感染するものの生涯症状がみられることはない。急性感染が妊婦に起こると胎児に先天性トキソプラズマ症(水頭症、脈絡網膜炎、精神・運動障害など)を発症させるリスクがある。また既感染者が免疫不全に陥るか、免疫不全者が初感染を受けると特に脳内での増殖が起こりトキソプラズマ脳炎を発症する。特にCD4<200/ μ lのHIV感染者での発症がよく知られている。

2. 従来の検査法

トキソプラズマを一般的な臨床検体から検出する方法はなく、脳生検による病理診断のみが唯一の確定診断方法である。臨床的に用いられているのはトキソプラズマ抗体の陽性化(発症の前後にIgG抗体の4倍以上の上昇、IgM抗体の検出)である。この方法は急性感染を事後に確定する方法としては有用であるが、免疫不全状態での脳炎の診断には抗体価の上昇が期待できないため用いることができない。

HIV感染者でのトキソプラズマ症の診断は頭部MRIやCT、シンチグラムによって画像的に行われ、既感染を示すIgG抗体陽性であればより確からしいと見なしている。

3. 遺伝子検査とその臨床的有用性

侵襲度の低い検査によるトキソプラズマ症の診断方法がないため、髄液などを用いた遺伝子診断には強い期待が持たれている。しかしながら、これまで報告されたトキソプラズマをターゲットとしたPCRは陽性率はさほど高くはない。PCRで陽性であれば本症である可能性が非常に高いといえるが、陰性であっても否定することはできない。臨床経過で何度か検査に提出することで、いずれかが陽性となることがあるとする報告もある。可能であれば経過中数回の検査提出を試みるのも一法である。

妊婦の羊水を用いたPCRで、先天性トキソプラズマ症を診断しようとする試みも報告されている。

4. 従来法との関連

従来法としていくつかの診断手段があるが、病理検査と抗体価の推移以外では臨床的に有用な診断方法がないため、感度のよい遺伝子検査法の開発は非常に期待されている。

その他の原虫症

その他の原虫症として、赤痢アメーバやクリプトスポリジウムなどが日本において時に認められる。いずれも診断は顕微鏡的検出であり、検査に習熟しないと検出が難しい。遺伝子の検出による診断法や、病原体の型別判定の遺伝子診断法(例えば赤痢アメーバでは病原性のある*Entamoeba histolytica*と病原性のない*E. dispar*は形態的には区別困難で、遺伝子型別が有用な区別手段である)が研究途上であり、いずれも均一で確実な診断のためにさらなる開発が望まれる。

ニューモシスチス

1. 臨床像の概況

ニューモシスチスは最近では真菌と分類されるが、臨床検査法では原虫と類似した背景を持つため、ここに付しておく。ニューモシスチスは*Pneumocystis jirovecii*(*P. carinii*から改名)による肺感染症で、ヒト-ヒト感染していると推定される病原体である。ほぼ免疫不全状態でのみ発症

し、特に最近では HIV 感染症や関節リウマチに対するモノクローナル抗体療法、免疫抑制剤による治療を背景として増加してきている。

2. 従来検査法

真菌であるが臨床検査としての培養は困難であり、原虫と同様、顕微鏡的検査が確定診断の方法である。血液を用いた補助診断法として β -glucan が高値になることが知られており、他の真菌症と比べ著しい高値となることも少なくない。

3. 遺伝子検査とその臨床的有用性

遺伝子検査としては PCR 法が用いられており、診療保険には記載されていないが多くの商業検査ラボで受注している。顕微鏡的検査法が誘発喀痰や気管支ファイバースコープなど侵襲性のある検査が必要なものに対し、PCR ではこれらの検体に加え喀痰や咽頭拭い液でも陽性が得られることがあり、より侵襲が軽く診断に至ることができる。また顕微鏡的検査では検出に経験が必要(ギムザ染色)であったり、染色に技術が必要(グロコット染色)であるのに対して、均一な結果が得られる

メリットもある。

一方、検査の特異度にはやや問題があり、特に HIV 感染者で明らかな肺病変がなくても陽性となるなど潜在的な *P. jiroveci* の増殖をとらえる可能性が指摘されており、PCR 陽性が必ずしも疾患の発症と一致しない場合がある。したがって陽性結果の解釈は臨床像と併せて行う必要がある。

4. 従来法との関連

確定診断法としては従来の顕微鏡的検査が確実であるが、患者への侵襲性、感度の高さなど PCR は β -glucan 値や臨床像を併せて評価することにより、より高感度で侵襲度の低い診断法として有用性が高い。

おわりに

原虫症は PCR などの遺伝子診断が最も適した感染症の領域であり、今後も遺伝子検査の開発・上市が進むことが望まれる。



形式で学ぶ

真菌感染症診療の実際

Akira Yasuoka

安岡 彰

長崎大学医学部・歯学部附属病院感染制御教育センター教授

Question

免疫抑制患者(入院患者)の真菌症予防では、
どのような環境対策が必要でしょうか？

Answer

日本においては深在性真菌症として主として考慮される病原体は*Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, 接合菌症(*Mucor* など)および*Pneumocystis*である。このうち*Candida*は生態の常在菌であるため、環境要因を考慮することは少ない。

外来性吸入性病原体である*Aspergillus*(接合菌も該当すると思われるが十分な症例に乏しくエビデンスとして確立していない)は、環境要因が感染率にかかわることが明らかにされており、免疫不全患者では対策が必要である。対象となる免疫不全は造血幹細胞移植患者で、高度の免疫抑制が長期にわたって続く場合もこれに準じて行う。造血幹細胞移植後の患者では、病院周辺で建設工事が行われていると環境中の真菌胞子が増加し、発症率が高くなることが示されている。

このような環境からの真菌曝露への対策として最新のCDCガイドライン¹⁾では保護環境(protective environment; PE)という概念が提唱されている。これは従来の「無菌室」, 「低菌室」の概念に近い。保護環境の設備と運用を表に示す。

*Cryptococcus*は鳩などの糞を培地として増殖し、吸入に

よって感染する。このため細胞性免疫不全(HIV感染者、免疫抑制剤使用患者、高用量のステロイド薬使用患者)のいる病棟では、施設やその周囲に鳩などの鳥類が群れている状況は好ましくなく、糞が長期にわたって堆積しないよう清掃が必要である。

*Pneumocystis*は種特異性が強く、人工培養が困難であることなどから、ヒト-ヒト感染で伝播が維持されていると推定されている。実際に施設内でのアウトブレイクが疑われる例も報告されている。まだ十分なエビデンスがあるわけではないが、ニューモシスチス肺炎を発症した患者と発症のリスクのある患者は同室にしないという注意は必要ではないかと考えられる。

文献

- 1) CDC Guideline for isolation precautions : preventing transmission of infectious agents in healthcare settings 2007. available from Internet : <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>
- 2) CDC Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. MMWR 52 : RR-10, 2003
- 3) CDC Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. MMWR 49 : RR-10, 2000

表 保護環境 (protective environment ; PE)

1. 患者：造血幹細胞移植患者のみに適用

- ・患者は室内で行うことができない診断・治療のための検査以外では、保護環境から外に出ないこと
- ・患者が外部へ出る場合には、N95マスクなどの呼吸器防御具を着用する

2. 標準予防策および経路別予防策

- ・患者ケアの前後で手指消毒を励行する
- ・部屋に入るだけの場合は医療従事者、訪問者ともにガウンや、手袋、マスクの着用は必要ない
- ・標準予防策で必要とされる場合や、患者に明らかな感染症があり経路別予防策が必要な場合はガウン、手袋、マスクなど必要な個人防御具を着用する

3. 部屋の設備

- ・吸気はHEPAフィルター(0.3 μ m径の粒子を99.97%除去できる能力)を通して供給する
- ・室内は十分な密閉性を有していること
- ・換気は1時間当たり室内気を12回以上排気できる換気量であること
- ・一方性の気流：清浄な空気は部屋の側から供給され、患者のベッドを通過して他側から排気される構造であること
- ・室内気は廊下に対して >2.5 Paの陽圧であること
- ・気流パターン(圧差)は毎日目視的方法または圧力計で確認し記録すること
- ・ドアは自動ドア(自動的に閉まるドア)であること
- ・故障などに対応するため予備の換気システム(ポータブル式など)をもつこと
- ・保護環境が必要で、空気感染をする病原体の罹患者のために前室を有する独立排気の構造が望ましい
このような設備がない場合は患者を空気感染用陰圧室に収容し、吸気にHEPAフィルターを装着して用いる

4. 環境表面

- ・水平面は病院清掃用洗剤または消毒剤で湿式清掃を行う
- ・埃が立つ作業は避ける
- ・廊下と室内にはカーペットは敷かない
- ・クッション・布製の家財・家具は置かない

5. その他

- ・保護環境では花(生花、ドライフラワーともに)や鉢植えは設置しない
- ・吸引清掃が必要な場合はHEPAフィルター付きの掃除機を用いる