

表1: 現在までの前向きコホートの参加人数

Group	No. of patients	Age				Sex	
		Range	Median	Mean	SD	Male	Female
Normal	20	22-52	31.5	34.05	1.990	9	11
New TB	23	19-65	33	35.83	13.296	20	3
Failure TB	26	28-85	55.5	56.88	16.960	22	4
Relapse TB	17	28-72	48	48.41	12.575	11	6
Chronic TB	4	43-73	62.5	60.25	12.842	2	2

図2 結核患者PBMCのH37Ra刺激したIn vitro培養上清中グラニューライシン濃度(ng/ml)

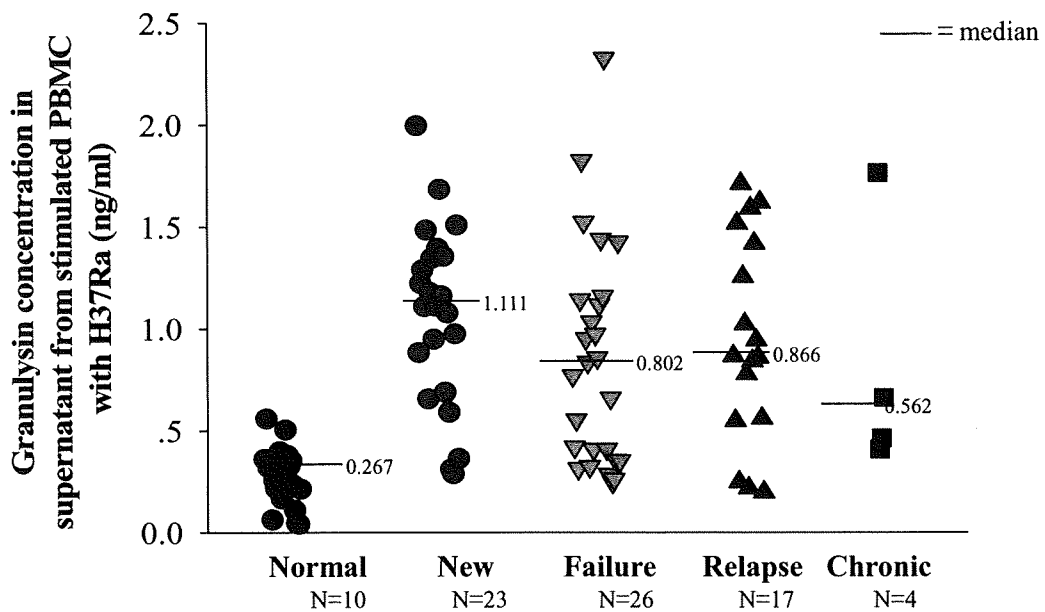


図3 結核患者PBMCのPPDツベルクリン刺激後のIn vitro培養上清中インターフェロン $\gamma$ 濃度(pg/ml)

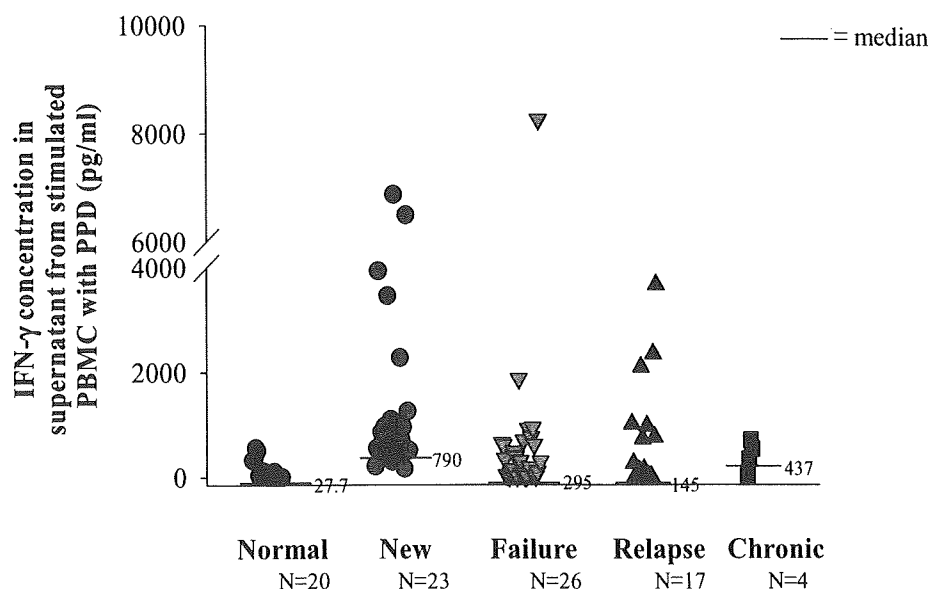
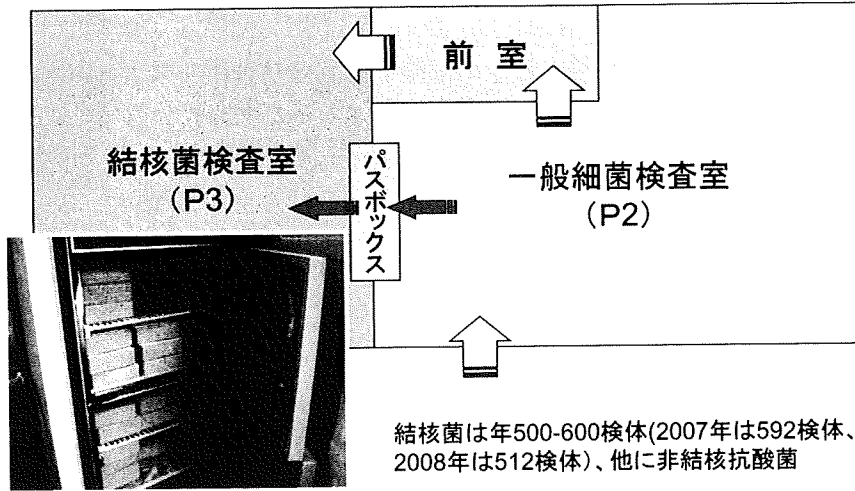


表2 難治性結核症における北京株の割合とオッズ比

	タイ全国	タイ北	タイ南	タイ東
北京株 (IS6110が15-20コピー)	59.1%* (13)	40% ** (8)	17.7% (6)	20.8% (172)
ノンタブリ株 (IS6110が11-15コピー)	4.5% (1)	10% (2)	8.8% (3)	14.3% (118)
Heterogenous群 (IS6110が6コピー以上あり、バンドのパターンが上記2群でない)	13.6% (3)	15% (3)	17.7% (6)	17.6% (146)
2-5バンド群	9.1% (2)	15% (3)	26.5% (9)	20.1% (166)
1バンド群	13.6% (3)	10% (2)	29.4% (10)	27.3% (226)

タイ全国と北タイのパターンに関しては、全国薬剤感受性サーベイランスの菌を使った調査[Rienthong D et al. 2005] タイ全国と比したオッズ比は、\*再発例 OR=5.5 (95%信頼区間2.5-13.1)、\*\*治療失敗例OR=2.5 (95%信頼区間1.02-6.3)

図4 複十字病院細菌検査室の菌株保存  
-80℃の冷凍庫に10年分保存



## 非結核性抗酸菌症患者の潜伏結核感染 ハルピンの薬剤耐性結核の起源

研究分担者 服部俊夫 東北大学大学院感染症呼吸器病態学分野 教授  
研究協力者 凌虹 ハルピン医科大学微生物学教室 教授  
鈴木定彦 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター  
国際疫学分野 教授

### 研究要旨

非結核性抗酸菌症患者の潜伏結核感染の頻度とその病態を非潜伏結核感染者と比較検討した。潜伏結核感染者の炎症反応が、非潜伏結核患者より高値で、臨床症状も強い事が明らかになった。またハルピン医科大学との共同研究を継続し、当大学で特性化した多剤薬剤耐性結核菌の由来でそのうち80%以上が北京株であることを明らかにした。

### A. 研究目的

非結核性抗酸菌症(NTM)患者数は年々増加しているが、その感染ルート等は不明な点が多く、注意が喚起されている。NTM感染患者には結核菌(MTB)が重複感染している例があることが知られている。しかし潜伏MTB感染を同定することはツベルクリン反応では困難であった。ここではMTB特異的なRD1抗原, early secretory protein-6 (ESAT-6)と culture filtrate protein 10 (CFP-10)を用いて刺激し、産生されたg-IFNをelispot法を用いてNTM患者の潜伏結核感染を同定し、その臨床像を明らかにした。またわが国と人的物的交流の盛んな中国における多剤耐性結核の流行状況は十分に明らかになっていない。中国東北部における多剤耐性結核の薬剤耐性遺伝子同定を行うことで、これらの結核がわが国に侵入してきた際の迅速な対応に資する。

### B. 研究方法

#### ELISPOT

結核菌由来の、ESAT-6 と CFP-10 は H37RV 遺伝子の RD-1 領域に存在し、BCG や殆どの非結核性抗酸菌感染者は保有していない。これらの抗原は、結核菌に特異的な免疫応答の指標として期待できる。非結核性抗酸菌症の3例のTB患者の末梢血リンパ球を用いて、CFP-10、ESAT-6 抗原刺激して、gamma-Interferon の産生を観察した。末梢血リンパ球は EDTA 採血全血より Ficoll-Paque により分離した。Phosphate Buffered Saline (PBS)で洗浄後 10%FCS 含有 RPMI1640 メジウムで 浮遊させ、測定に用いた。ELISPOT 測定は以下の Guio の方法に従っておこなった。

Heinner Guio, Yugo Ashino, Hiroki Saitoh, Masako Mizusawa, Peng Xiao, Alonso Soto, Andros Theo and Toshio Hattori. Increased Synthesis of Anti-tuberculous glycolipid immunoglobulin in Active compared to Latent tuberculosis Infection and its relation with T-cell Interferon Gamma production Tohoku J Exp Med 2010 Jan;220(1):21-5.

#### ハルピン医科大学との共同研究 結核菌の遺伝子解析

ヒトに結核性の病変を生ずる疾患にはM. tuberculosis, M. bovis, M. bovis BCG, M. africanum, M. microtti, と M. canettii,などが挙げられる。しかし非結核性の抗酸菌(nontubercular mycobacterium (NTM))は呼吸器疾患を生ずるが臨床的に区別しにくい場合もある。ここでは結核症として診断された症例由来のDNAを解析し、NTMの存在を確かめた。異なる4種のプライマーを用いて16S rRNA, Rv0577, RD12 及び RD9 領域を増幅し、それぞれ543bp, 786bp, 400bp,及び 600 bp のバンドを確認することにより結核菌はNTMであるかの区別がついた。そして2例がNTM (M. intracellulare)であることが判明した。(平成20年度報告書)さらに残りの結核菌であることが判明した株について薬剤感受性テストを行った。そこで得られた多剤耐性株MDR-TBの44株のDNAを抽出して、その起源をスポリゴタイピング法で解析した。

#### スポリゴタイピング

Kamerbeek (参考文献1)の方法でスポリゴタイピングを行った DR 領域は以下のプライマーで増幅した。(DRa: GGTTTTGGGTCTGACGAC, DRb: CCGAGAGGGGACGGAAAC) 得られたPCR

産物はスペーサーの異なる43種類のプローブでハイブリダイズさせた。得られたバンドについてはSpolDB4データベースによりSIT (Spoligotype International Type) 番号を決め、そのクレードは参考文献2により定めた。

#### 参考文献1

Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J: Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. J. Clin. Microbiol. 1997, 35:907-914.

#### 参考文献2

Brudey, K., J. R. Driscoll, L. Rigouts, W. M. Prodinger, A. Gori, S. A. Al-Hajj, C. Allix, L. Aristimuno, J. Arora, V. Baumanis, L. Binder, P. Cafrune, A. Cataldi, S. Cheong, R. Diel, C. Ellermeier, J. T. Evans, M. Fauville-Dufaux, S. Ferdinand, D. Garcia de Viedma, C. Garzelli, L. Gazzola, H. M. Gomes, M. C. Gutierrez, P. M. Hawkey, P. D. van Helden, G. V. Kadival, B. N. Kreiswirth, K. Kremer, M. Kubin, S. P. Kulkarni, B. Liens, T. Lillebaek, H. M. Ly, C. Martin, I. Mokrousov, O. Narvskaya, Y. F. Ngeow, L. Naumann, S. Niemann, I. Parwati, M. Z. Rahim, V. Rasolofo-Razanam parany, T. Rasolonalona, M. L. Rossetti, S. Rusch-Gerdes, A. Sajduda, S. Samper, I. Shemyakin, U. B. Singh, A. Somoskov, R. Skuce, D. van Soolingen, E. M. Streicher, P. N. Suffys, E. Tortoli, T. Tracevska, V. T. Vincent, T. C. Victor, R. Warren, S. F. Yap, K. Zaman, F. Portaels, N. Rastogi, and C. Sola. 2006. Mycobacterium tuberculosis complex

genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol. 6:23

#### C. 研究結果

##### ELISPOT

この研究ではNTM 7例と結核患者3例(うち1例が肺結核であるが2例は肺外結核)及び正常人3例について検索した。ELISPOTは3例のTB患者のうち2例が陽性で、解析7例のNTMのうち3例が陽性であった。**図1**にこれらのELISPOTの $\gamma$ -IFN産生細胞数の数を示す。結核患者陽性例の一例がESAT-6を抗原とした際に極めて多数のスポット数を示した。3例のNTM患者が明らかな陽性反応を示した。**表1**にこれらの患者の臨床データを示す。

ELISPOT陽性NTM患者をNTM+とし、陰性の患者をNTM-とした。NTM+患者一例に以前の結核の既往があった。また肺の空洞はNTM+に2例であるが、NTM-には1例であった。この3群の抗TBGL抗体とレプチンの値を比較するとTBGL抗体がNTM+群ではNTM-群に比較して高値を示した(**図2**)。さらに血清中の可溶性のIL-2受容体とKL-6を測定するとNTM+群がNTM-群に比較して両者とも高値を示した(**図3**)。さらにその差はIL-2受容体に関しては優位であった。さらに炎症に関与するosetopontin (OPN) とgalectin-9 (Gal-9)を測定した。両者ともにNTM+群が高値を示したが、OPNではその差に優位差がみられた(**図4**)。

##### ハルピン医科大学のMDR結核菌のスポリゴタイピングによる同定

ハルピン以下大学の44のMDR-TB株のうち40は北京株SIT番号1であった(**表2**)。これは中国における今までの成績と合致していた。興味あることにSIT番号1793は未登録のクレードであり、残りの3株は明らかに異なる新規株であった。

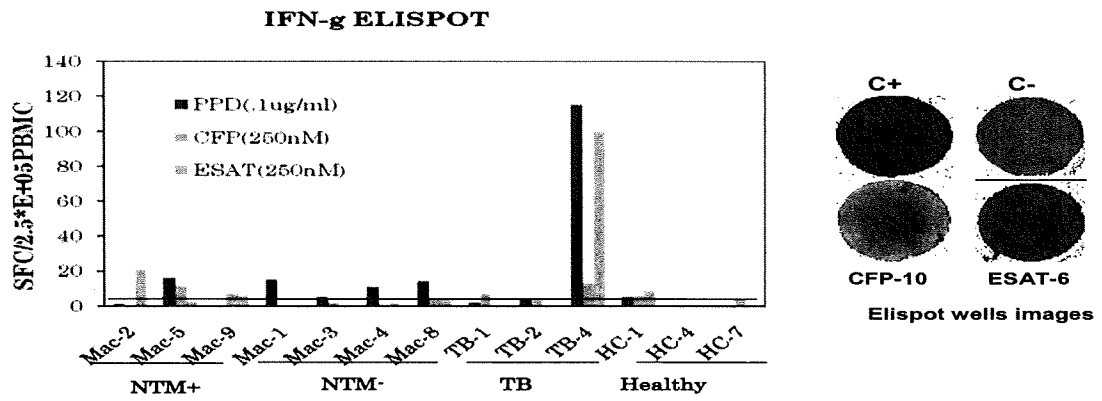


図1 3例の NTM 患者の Elispot assay

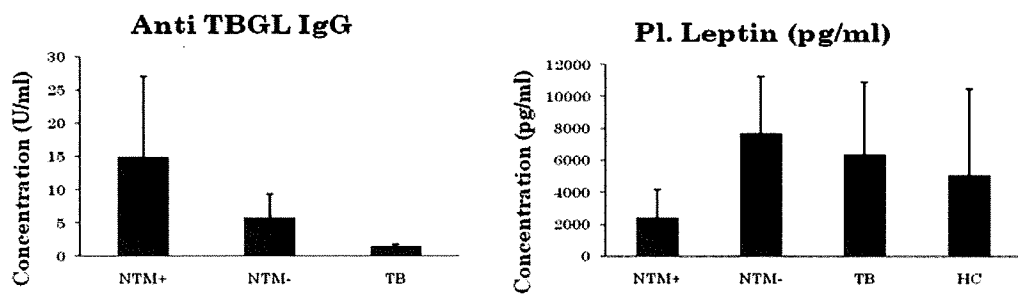


図2 抗TBGL抗体値とレプチン値



## E. 結論

8例のNTM患者中の3例がELISPOTが陽性で、潜伏結核感染であることが明らかになった。特にESAT-6による $\gamma$ -IFNの産生が高いことはその群が潜伏結核感染を示している。この群において優位に高い可溶性IL-2受容体やOPNを測定することによりNTM患者の潜伏結核感染を検出できる可能性を示している。特にOPNは結核患者において上昇し、その病態を反映することが知られているので、NTM患者における潜伏結核感染においてELISPOT測定はクオンテフェロン測定法より感度が高いといわれるのでより正確に潜伏結核感染を同定できた可能性がある。また一方でELISPOTに用いたESAT-6はクオンテフェロンと異なり蛋白を用いている。故に抗原としてadaptive immunity依存性の反応を見ているばかりでなく、innate immunityに働きかける蛋白の特性を反映している可能性もある。特にESAT-6はTOLL2受容体のリガンドであることも知られているので、ESAT-6に対する高い感受性があることを意味しているかもしれない。これらについては今後別のアッセイ系を用いて検討の余地がある。

さらにハルピンのMDR-TBに関しては北京型が予想通り、大多数ではあるが同定できない未知の株も含まれていた。現在VNTR法にて更なら同定を行っている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Min Zhuang, Hong Jiang, Yasuhiro Suzuki, Xiaoguang Li, Peng Xiao, Takashi Tanaka, Hong Ling, Baofeng Yang, Hiroki Saitoh, Lianfeng Zhang, Chuan Qin, Kazuo Sugamura, Toshio Hattori. Procyanidins and butanol extract of Cinnamomi Cortex inhibit SARS-CoV infection. *Antiviral Res.* 2009 Apr;82(1):73-81. Epub 2009 Feb 11.
2. Theo A, Masebe T, Suzuki Y, Kikuchi H, Wada S, Obi CL, Bessong PO, Usuzawa M, Oshima Y, Hattori T. *Peltophorum africanum*, a traditional South African medicinal plant, contains an anti HIV-1 constituent, betulinic acid. *Tohoku J Exp Med.* 2009 Feb;217(2):93-9.
3. Nagaoka M, Nara M, Tamada T, Kume H, Oguma T, Kikuchi T, Zaini J, Moriya T, Ichinose M, Tamura G, Hattori T. Regulation of adenosine 5'-triphosphate (ATP)-gated P2X(4) receptors on tracheal smooth muscle cells. *Respir*

*Physiol. Neurobiol.* 2009 Mar

31;166(1):61-7. Epub 2009 Feb 14.

4. Haorile Chagan-Yasutan, Hiroki Saitoh, Yugo Ashino, Tomohiro Arikawa, Mitsuomi Hirashima, Shenwei Li, Motoki Usuzawa, Shigeru Oguma, Elizabeth Freda O. Telan' Chikwelu Larry Obi and Toshio Hattori. Persistent elevation of plasma osteopontin levels in HIV patients despite highly active antiretroviral therapy *Tohoku J Exp Med.* 2009 Feb;217(2):93-9.
5. Jing Zhang, Yamada O, Matsushita Y, Haorile Chagan-Yasutan, Hattori T. Transactivation of human osteopontin promoter by human T cell leukemia virus type 1-encoded Tax protein. *Leuk Res in press*
6. Cheng DC, Zhong GC, Su JX, Liu YH, Li Y, Wang JY, Hattori T, Ling H, Zhang FM. A sensitive HIV-1 envelope induced fusion assay identifies fusion enhancement of thrombin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 epub Dec 31
7. Heinner Guio, Yugo Ashino, Hiroki Saitoh, Masako Mizusawa, Peng Xiao, Alonso Soto, Andros Theo and Toshio Hattori. Increased Synthesis of Anti-tuberculous glycolipid in monoglobulin in Active compared to Latent tuberculosis Infection and its relation with T-cell Interferon Gamma production *Tohoku J Exp Med* 2010 Jan;220(1):21-5.
2. 学会発表
1. Umme Rumam Siddiqi and 服部俊夫. Prevalence of Latent Tuberculosis infection among Non Tubercular Mycobacterium patients in Japan 第79回実験結核研究会. 札幌 2009/07/01
2. Haorile Y Chagan, Hiroki Saitoh, Yugo Ashino, Shenwei Li, and Toshio Hattori. Persistent elevations of osteopontin after HAART in AIDS 国際炎症学会2009/07/06~2009/07/10 東京
3. Haorile Y Chagan, Hiroki Saitoh, Yugo Ashino, Shenwei Li, and Toshio Hattori. Effect of HAART drugs on Osteopontin



synthesis in vitro and in vivo. IAS2009,  
Capetown. 2009/07/19~2009/07/22 5<sup>th</sup>  
IAS2009

4. Hattori T. International Symposium on HIV/AIDS, Medicinal Plants and Geophagia Environmental health aspects associated with geophagic in South Africa. 2009/07/22~2009/07/24. mtata, South-Africa
5. Hattori T. Procyanidins are Inhibitors of SARS-Co V Infection. WSU research Conference East London 2009/08/25~2009/08/27
6. Shenwei Li, Kodama E, Zhang Jing, Hattori Toshio. Procyanidin B-1 suppresses HCV replication. 第57回ウイルス学会学術集会. 東京 2009/10/25~2009/10/27
7. 齋藤弘樹 芦野有悟 服部俊夫. プロテアーゼ阻害薬からラルテグラビルへの変更により高ビリルビン血症と肝機能障害の改善がみられたHIV感染症の1例. 1第58回 感染症学会 東日本地方会学術集会2009/10/30~2009/10/3
8. 吉野優樹、芦野有悟、齋藤弘樹、服部俊夫. 3名の家族内感染が見られた伝染性単核症. 第79回日本感染症学会 西日本学術集会. 2009/11/20~2009/11/21 博多
9. Haorile Chagan-Yasutan, 齋藤弘樹、芦野有悟、児玉栄一、服部俊夫. HAARTによるオステオポンチンの誘導の意義に関する検討. 第23回日本エイズ学会学術集会. 名古屋2009/11/26~2009/11/28
10. Toshio Hattori and C.Larry Obi. Current and future collaborative resaerch between Walter Sisulu and Tohoku University for development for consortium. 2010 International Sympojium of AIDS and Tuberculosis, Sendai 2010/1/13~2010/1/14

## 輸入感染症としての多剤耐性結核の対策・制御に関する研究

研究分担者 高鳥毛敏雄 大阪大学大学院医学系研究科特任教授

### 研究要旨

外国生まれの結核患者の割合が高く、高まん延国からの人々による輸入感染症としての結核問題について米国における結核対策の現状を調査し、わが国の結核対策に必要な内容を明らかとすることを目的とした。米国ニューヨーク市は移民社会であり、貧富の格差も大きく、多様な人々が存在している困難な中で結核対策を進めてきている。結核の再興に対するために1990年代には外来治療も行う総合的に結核対策を行う公的な拠点施設(Chest Center)を設け、すべての人々に対応できる結核対策システムをつくり対応している。2000年代に入り既存の公的医療機関ネットワークと公的結核センターと保健当局が組み合わさった体制に移行している。結核対策を専門的に進めるために人材や技術面ではCDCの大きな支援を得ていた。わが国も不安定就労者、医療保険未加入者、そして外国人の結核患者割合も増加傾向にあり、多様な人々に対応した結核対策を進めているニューヨークの結核対策システムの実践は参考となる点が多い。

### A. 研究目的

ニューヨーク市では2008年には市の結核患者全体に占める外国生まれの患者が全体の76%を占めている。外国人の患者が多くなると、英語が話せない者、医療保険を有さない者、経済的に困窮している者に対応する必要がある。この状況に対するために結核対策の保健医療組織を改編し、人材の育成と配置を行い、そのための大幅な財政投資が行われ、見事に結核問題の克服に成功している。近年は罹患率の高い外国人に対する結核対策を強化してきている。わが国よりも結核罹患率が20年先を歩んでいるニューヨーク市の結核対策を検討することにより、わが国のこれからの結核対策のあり方を明らかとすることを目的として実施した。

### B. 研究方法

平成21年9月17日(木)～27日(日)の間に行政、研究、医療に関わる施設を訪問して、結核対策の現状について調査を行った。訪問した施設は以下の通りである。

- ① NEW JERSEY MEDICAL SCHOOL Global Tuberculosis Institute
- ② Department of Health of New York State
- ③ Bureau of Tuberculosis Control of New York City
- ④ Corona Chest Center of New York City
- ⑤ Public Health Laboratory of New York City
- ⑥ Bellevue Hospital Center of New York City
- ⑦ School of Public Health University at ALBANY

### ⑧ Weill Cornell Medical College

### C. 研究結果

1. 連邦政府機関支援による結核センターの活動  
ニュージャージ大学のグローバル結核研究センター(GTBI)は結核の研究、実践、研修を担っている。CDCのTB Trial ConsortiumとTB Epidemiologic Trialに参加し、結核クリニックではMDR・XDRなどの複雑な結核症例に対する専門診療を行っている。米国では、全国を4区分に分けて、CDCにより地域の結核対策を支援する結核センターが設置されている。ニュージャージ大学のGTBIはニューヨーク州、マサチューセッツ州などの米国北東部地域の Training and Medical Consultation Center (RTMCC)に位置づけられている。研修と技術支援は研修コース、インターネットを活用した研修、現場研修、技術支援(研修教材、資源、講師派遣、計画策定)がある。医療相談は、医療従事者にも一般にも公開されており、地域の結核対策担当者または保健部の職員の研修や支援も行っていった。

### 2. ニューヨーク州(NYS)保健局

ニューヨーク州は人口約1800万(その内1000万がNYC)で57のcountyとNYCはその中の5つのcountyから成っている。2008年の結核患者は305人、NYCは985人であった。ニューヨーク州の結核罹患率は6.2、NYCを除くと2.4であった。州内の保健区は57countyあるが、39のcountyの年間患者発生数が0～1の低まん延地域である。州の結核対策は医師、保健師、アウトリーチワーカー合わせて15人程度である。その中の8人は5つの

countyに配置されている。結核対策の実務の実施と責任は地域保健行政当局countyにあり、州は弱小countyの後方支援を行っていた。ニューヨーク市は、大都市であり州政府とは独立して、独自の保健行政を行っており、専門スタッフなどはニューヨーク市の方が多くいる状況にある。

### 3. ニューヨーク市保健局

ニューヨーク市は5つのCountyからなるニューヨーク州の地域連合であるが、1つの自治体として州保健局からは独立している。市長はcommissionerを任命し保健対策の全責任と執行を任せている。市保健局は6000人の職員がいる。結核対策を所管している疾病対策部(Disease Control)は結核以外にHIV、STD、その他の感染症の業務を行っている。ニューヨーク市の保健行政の歴史は連邦政府より古く、ニューヨーク市保健局は州政府とは独立して結核行政の責任主体となり、結核対策の計画策定、人員の確保、条例の制定、医療体制の構築を行っている。結核対策予算は連邦政府から渡されCDCに配分され、CDCが自治体に配分していた。研究費だけではなく結核対策に関わる予算も含まれている。1980年にHIVの増加などがあり多剤耐性結核の流行など深刻な結核再興の事態に直面したことからCDCが結核緊急事態を発令し、ニューヨーク市に結核対策の専門チームを派遣し、結核対策の立て直しを行った。結核関連予算が増やされ、結核対策のためのアウトリーチワーカーなど人員が大幅に増やされ、結核対策を進めるために地域に9カ所の結核センター(Chest Center)が設置され、結核対策の患者発見、診断・治療、DOTの推進など患者管理体制を整えられた。1992年には5000人の患者で454人のMDR(そのほとんどがHIV)であったのに比較すると、2008年の結核患者は895人、MDR患者は11人となり、70%減少して、その対策が成果をあげている。1992年には70%が米国生まれであったが、現在は逆に70%が外国生まれである。エクワドール、中国、ハイチ、最近特にチベットからの移民の罹患率は500(人口10万人対)と極めて高く、結核対策対象者は外国生まれの人となってきた。米国に6ヶ月以上滞在する外国人(米国に来る人の5%に相当)には在外大使館にビザ申請時にX線検査及び喀痰検査を受けて証明を求める対策が行われている。結核対策の職員は300人で半分がPublic Health Advisor(PHA)と呼ばれるアウトリーチワーカーで構成されているのがニューヨークの結核対策の特徴である。PHAは患者のカルテのチェック、接触者健診のための患者と接触者への面接、DOTを行っている。BCGを実施している国からの移民が増えているため、結核感

染診断検査はツ反からQFTに移行している。QFT陽性者には潜在性結核感染症(LTBI)として治療を勧められている。患者の50%がChest centerで治療され、残りの50%が民間病院、大学病院等で治療されている。医療保険を持っていない患者はChest centerで無料で保健医療サービスが提供されている。入院が必要な場合には市立病院(Government corporate hospital)に入院する。医療保険を持っている患者はその保険に応じた医療施設で治療を受けている。Chest centerには医師、看護師、PHA(Public health advisor)、事務職員が配置されている。Chest centerで治療を受けていない患者に対しては、市保健局結核対策部の地域支援室(Field Unit)のスタッフが患者管理支援を行っている。

### 4. 市立公衆衛生研究所

市立公衆衛生研究所(PHL)はNYCにある65病院のreference laboratoryになっている。ニューヨーク市の結核対策を菌検査の上で支えている。塗抹検査は24時間以内に依頼元の病院に結果を返している。塗抹陽性の場合MTDで結核菌同定を行っていた。液体培地と固形培地(LJ)に分けて培養している。薬剤感受性検査は1次抗結核の他、2次抗結核薬について実施し、3次抗結核薬についてはコロラド州デンバーにある研究所に委託して実施していた。菌株の分子遺伝学的分析(スポリゴタイピングなど)は州公衆衛生研究所で、RFLPはNewarkにあるニュージャージー州の公衆衛生研究所に委託して実施していた。NYCのPHLの検査室はBSL3の設備が整備され、検査機器は液体培地としてBactec960を使い、必要に応じてHPLCを使っていた。結核菌検査は7人の検査技師で年間11,000の検体を扱っている。

### 5. 地域の結核診療センター(Chest center)

NYCの結核のサービス提供は2000年に組織改編が行われ、4カ所のフィールドオフィス(Field office)を設置し、一般医療機関受療患者に対するケースマネジメント室(Case management unit(CMU))を設け、市直営の9カ所の結核診療を行っているChest centerとあわせてニューヨーク市のすべての患者管理が行われていた。フィールドオフィスには医師とPHAが配置され、業務は患者面接、病院のスタッフと連携してDOTの実施、患者の退院の確認、DOTの対象外の患者については薬局で抗結核薬を受け取っているかチェックするなどの業務を行っている。訪問したCorona Chest CenterはQueens地域にあり、Corona地区はヒスパニックの人々が多い地域である。市内9カ所の中で最も忙しいChest centerである。職員

は約30人であった。建物の中には母子保健、予防接種などのPrimary health careの提供が行われている。患者の診断・治療が行われる胸部X線装置、採痰室があり、患者が使う部屋は陰圧、換気装置と紫外線発生装置があり、特に採痰室は前室があつて感染制御が出来る構造になっていた。Chest centerで行われている業務は以下の通りであった。

- ① 患者発見とサーベイランス、
- ② 患者管理
- ③ 医師または看護師が全ての患者と疑いの者に面接を行う
- ④ PHA は Non-adherent な患者を治療に戻す
- ⑤ 医療相談：医療機関から結核患者に関する治療等について医師が相談を受ける。
- ⑥ DOT：NYS の法律では DOT は強制ではなく自発的な意志によっている。
- ⑦ 接触者健診：調査とそれに基づく検査と管理
- ⑧ HIV の相談と検査：患者、患者疑い者、接触者など訪問する全ての人に勧めている。
- ⑨ 社会福祉サービスとの照会
- ⑩ コホートレビュー会議：年 4 回（四半期に 1 回）、医師、看護師、PHA が参加して、患者の治療評価を実施している。

#### 6. 市立ベルビュー病院入院施設

Bellevue病院は長い歴史を持つ市立病院である。ニューヨーク市内の公的医療機関ネットワークであるHHC (Health and Hospital Corporation)の中の中心的な医療施設となっている。患者の多くは医療保険を持たない貧困者、移民などの公的医療が必要な人である。病院内には表示は英語、スペイン語と中国語など多言語であった。医療水準は高くニューヨーク市立大学医学部の教育病院にもなっている。犯罪者に対する病棟も持っている。結核病床は呼吸器科病棟の中にある陰圧病室である。喀痰の誘発採取を行う部屋には前室が設けられている。拘束治療の病床は21あり、1995年頃は常時15-20人の患者が入院していたが、近年患者の減少とともにここに入院する者も減少して、現在は2人のみが入院していた。拘束下治療 (D4、D5 命令) の対象になるのは、主に、薬物中毒、精神疾患を合併している患者である。D4は感染性が消失するまでの拘束、D5は治療するまで拘束される患者である。患者の人権の保護のために、患者は訴えることが出来ることになっており、判事による聴聞が1ヶ月以内に行われることになっており、患者は2ヶ月毎に訴えることができるようになっている。

#### 7. コーネル大学メディカルセンター

ベルビュー病院が位置しているマンハッタン島のイースト川沿いは南から北にかけて在郷軍人病院、ベルビュー病院、隣接するNew York Medical Centerは私的医療施設であり富裕層が受診している。そこから国連本部を挟んで北にコーネル大学医療センターがある。コーネル大学はパパニコロを輩出した米国の名門大学である。医学部の講義室はスモールグループの講義室も含めてデジタル化された最新設備が備え付けられていた。病室は2人部屋と個室で、病棟には陰圧室が1室は設けられていた。全てが電子カルテになっており、病室の前に端末があつて医師・看護師が入力できるようになっていた。医療センターには上階にVIP用の特別病棟も設けられていた。

#### D. 考察

ニューヨーク市は特別の自治体であることで、現実に即した独自の結核対策がすすめることができていくことを理解しておかなければならない。市の結核対策部門は、公衆衛生活動や結核対策に精通した多くの専門スタッフを要しており、地域において結核対策を進めているChest centerにおいても医師、アウトリーチワーカーなどの多様な結核患者に対応できるスタッフを配置されていた。ニューヨーク市の結核対策の調査から明らかになったことを4点に分けてまとめた。

##### 1) 結核対策を進めようとする強い政策当局の意志

ニューヨーク市の1980年代に再興した結核を克服することができたのは、市当局が何としても結核問題を制御したいと強い政策意志を出発点となっている。市当局の依頼を受けてCDC (米国疾病管理予防センター) による専門家の人的支援と結核対策に対する財政支援を得て、社会の総力を結集して結核対策を進める体制を整えたことが今日の結核対策の基盤となっていた。

##### 2) 結核対策の地域のケースマネジメント体制の確立

結核対策のためには公衆衛生と臨床上の機能面の協力が必要である。そのためChest centerを立て直し、DOT(Directly Observed Therapy)の拠点とするとともに、地域の開業医、病院関係者、公衆衛生、研究施設を代表した専門家からなる諮問会議を設け、地域の保健医療関係者が一体となって結核対策を進める体制を整えていた。2006年の実績ではChest Centerは全結核患者の9%をここで診断し、結核患者のほぼ半数の外来医療が提供されていた。結核患者が1992年と比べ2007年には4分の1に減少したことから、結核患者に対する保健医療サービスを一般医療機関で提供する

体制に移行してきていた。わが国においても、保健所、結核病院を中心とした対策から新たなシステムの転換が必要となっている。ニューヨーク市では市中の医療機関における結核患者管理や診療を支援するため地域の結核対策推進のため4つのField Officeを設け、地域の結核医療の市支援サービス(Field Service)の構築に力が注がれていた。

### 3) すべての人々に対する結核医療保障の存在

米国民の中には医療保険に未加入の者が2割存在している状況にある。この中で結核に関わる対策および医療費などは公費で支出され、移民であったとしても、結核対策がカバーされている状況にある。ニューヨーク市の公立病院グループ(The New York City Health and Hospitals Corporation (HHC))に属する15医療施設において、移民や貧困者であっても結核の検査と診療を低額または無料で受けることができるように医療機関の支援と結核医療提供体制の整備が行われていた。

### 4) 結核医療を担う医療関係者に対する研修と医療相談支援組織の確立

米国では2007年の結核患者数は13,299人、結核罹患率は4.4であり、結核の医療提供体制と医療現場への支援と質の維持は重要な課題となっている。米国では全国を4つの地域に分けて、医療関係者を支援するためにCDCが地元の大学や専門医療機関に対して人的・財政的に支援して地域の結核医療を担う人々に対する相談支援研修センターとしてRegional Training and Medical Consultation Center(RTMCC)を設けられている。わが国においても結核医療を担うのが地域医療を担う人々に負う部分が多くなるとともに、このような医療関係者の結核の診断治療を支援する施設の整備が必要と思われる。

## E. 結論

わが国も低まん延国となり、結核対策のための保険組織、医療供給体制の維持が難しくなっている。輸入感染症としての結核患者が増加していくことに対して地域の人々の中に入って結核対策を進めるアウトリーチサービスを強化すること、結核対策を進めることが難しいところでは公的に支援した結核診療センター(Chest center)のような施設の整備が必要である。また低まん延地域においては地域医療の中で結核患者に対応できるように診断治療を支援していく体制の整備が必要である。そのためには結核行政を担う地方自治体、結核医療を担う医療機関に対して支援するため米国の結核相談支援センター(RTMCC)のような後方支援センターを整備していく必要がある。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 高島毛敏雄: 米国、イギリス、ドイツにおける結核医療の提供体制、結核、85(2)、98-101、2010.
2. 高島毛敏雄: わが国の結核対策の現状と課題 結核対策の及ばない人々に対する対策 あいりん地区における実践活動から、日本公衛誌、56(6)、418-421、2009.

### 2. 学会発表

1. 高島毛敏雄: 第84回日本結核病学会総会 札幌 一般演題 英国における輸入感染症としての結核対策
2. 高島毛敏雄: 第84回日本結核病学会総会 札幌 シンポジウム I 感染症法のもとでの結核医療のあり方 S1-2 欧米の結核医療の提供体制
3. 高島毛敏雄: 第68回日本公衆衛生学会総会 奈良 第13分科会 一般演題1303-15、結核低まん延時代における輸入感染症としての結核対策に関する研究

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# ベトナム多剤耐性結核の宿主要因に関する研究

研究分担者 慶長直人 国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部長

## 研究要旨

ベトナム南部随一の結核拠点病院であるホーチミン市のファムゴックタック病院との共同研究を実施した。多剤耐性結核の宿主要因を分子遺伝学的な手法により明らかにする研究プロトコールについて両国両施設の倫理委員会での承認を得た後、断面研究を実施し、60名の多剤耐性結核患者の研究参加を得て、血液検体を当センターに移送した。今後、薬剤代謝酵素NAT2など、耐性結核の宿主要因の候補遺伝子の特徴的な遺伝子変異、アジア人の遺伝子分布の特徴を明らかにするための遺伝子タイピングを行い、多剤耐性結核の遺伝要因に関する知見を得たい。

## A. 研究目的

わが国の外国人登録者数は、アジア人が全体の70%以上を占め、アジア人の結核対策が外国人結核対策に重要である。わが国の日本人の多剤耐性結核の頻度は低いが、外国人では、数%以上の頻度で、多剤耐性結核が認められるため、今後、先進国がたどった道と同じように、わが国でも、外国人結核対策が、多剤耐性結核対策と密接に関連する可能性が高い。特に増加しているアジア人の多剤耐性結核の発症素因を明らかにすることは、対象国とわが国、双方の多剤耐性結核対策に貢献するものと思われる。

我々は、これまでベトナム、タイにおいて、結核研究の拠点研究をおこなってきた。多剤耐性結核に関しては、人為的要因や制度上の問題のみならず、その背景となる宿主側の免疫応答、薬剤代謝能などが関与していると推測される。そこで、本研究では、ベトナム人多剤耐性結核の宿主要因を分子遺伝学的な手法により明らかにする。

## B. 研究方法

ベトナム国内南北2カ所の薬剤感受性検査が可能な結核レファランスセンターのうち、ベトナム南部の拠点病院であるホーチミン市のファムゴックタック病院は、ホーチミン市とその近隣の結核対策の責任病院でもあり、本研究班における枠組みの中で、初めて共同研究を申し入れた。研究プロトコールを作成し、薬剤代謝酵素（NAT2など）を、耐性結核の宿主要因の候補遺伝子として、その特徴的な遺伝子変異、アジア人の遺伝子分布の特徴を明らかにするための遺伝子タイピング法を確立した。

（倫理面への配慮）

実際の患者検体を用いたゲノム解析は、両国の指針（我が国では、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針）に準拠して、事前にプロトコールは、両国の倫理委員会の承認を得た上で実施した。

## C. 研究結果

ホーチミン市のファムゴックタック病院は、結核菌耐性検査法の精度管理が確立しており、ベトナム国内随一の規模で、耐性結核患者の治療にあたっている。ベトナムの多剤耐性率は、約5%と報告され、都市部の、結核既治療再排菌例に多いことが、我々独自の調査でも明らかである（未発表資料）。ファムゴックタック病院では、2006年に多剤耐性結核外来を開設して以来、360例の多剤耐性結核患者がすでに治療を受けており、そのうち57例が治療を完遂しており、多剤耐性結核のベトナムにおける臨床共同研究の受け入れ機関として、最も適していた。

本研究では、共同研究のプロトコール作成を行い、医療センター倫理委員会にて平成21年5月承認、ファムゴックタック病院倫理委員会にて平成21年8月承認、本年度の打ち合わせ（ホーチミン市にて）は、平成21年8月延期（新型インフルエンザのため）、平成22年1月実施。リクルート開始は平成21年9月、リクルート終了は平成22年1月。外来通院中の、多剤耐性結核患者60名から研究参加の同意をいただき、採血を終了し、サンプルの輸送を行なった。

今回は、3年という研究期間の2年目であり、大規模なコホート研究は、本研究班の枠組みでは困難なため、断面研究に近い、研究デザインとならざるを得なかった。薬剤代謝酵素、免疫応答関連遺伝子についてその特徴的な遺伝子変異と遺伝子頻度、遺伝子発現を検出する。

## D. 考察

ベトナムにおける薬剤耐性結核は、リファンピシンに対して、イソニアジドの耐性が多いことが特徴であり、これは、ベトナムで採用している結核治療方式が、維持期に、リファンピシンを含まない治療薬剤を組み合わせていることに起因するものと考えられている（2SHRZ/6HE）。また、プライベート

セクターでの治療を受ける者が多いことや、処方箋なしでも購入することが可能な（本来は違法であるが）抗結核薬などの問題も、薬剤耐性結核の増加に悪影響を与えているものと容易に想像される。今回、ベトナム人多剤耐性結核について、カウンターパートとなる病院が決まり、多剤耐性結核症例について、具体的な研究プロトコルを協議し、詳細にわたり検討し、倫理委員会承認後、迅速に研究を実施することができたことは、ベトナムとの7年来の共同研究における信頼関係にもとづくものと思われる。多剤耐性菌に関しては、ベトナムでも深刻な問題としてとらえられており、両国に裨益する研究成果が待たれる。

最終年度となる、来年度は、本年度実施した断面研究に関する臨床情報、血液サンプルの遺伝子タイピングを実施して、多剤耐性結核の遺伝素因に関する知見を得たい。

#### E. 結論

特に我が国の外国人登録者数は、アジア人が146万4,360人と全体の74.2%を占め、アジア人の結核対策が重要である。アジア人集団の多剤耐性結核発症に関する臨床疫学情報、宿主側の発症素因をとらえ、アジアにおける結核対策へ反映させるよう提言するとともに、および国内のアジア系就労者を介しての多剤耐性結核対策にも貢献したい。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hang NTL, Ishizuka N, Keicho N, Hong LT, Tam DB, Thu VTX, Matsushita I, Harada N, Higuchi K, Sakurada S, Lien LT. Quality assessment of an interferon-gamma release assay for tuberculosis infection in a resource-limited setting. *BMC Infect Dis* 9:66,2009.
2. Keicho N, Itoyama S, Kashiwase K, Phi NC, Long HT, Ha LD, Ban VV, Hoa BK, Hang NTL, Hijikata M, Sakurada S, Satake M, Tokunaga K, Sasazuki T, Quy T. Association of HLA-class II alleles with SARS in the Vietnamese population. *Hum Immunol* 70:527-531, 2009.
3. Lien LT, Hang NTL, Kobayashi N, Yanai H, Toyota E, Sakurada S, Thuong PH, Cuong VC, Nanri A, Mizoue T, Matsushita I, Harada N, Higuchi K, Tuan LA, Keicho

N. Prevalence and risk factors for tuberculosis infection among hospital workers in Hanoi, Viet Nam. *PLoS One* 4(8):6798, 2009.

4. Mahasirimongkol S, Yanai H, Nishida N, Ridruechai C, Matsushita I, Ohashi J, Summanapan S, Yamada N, Moolphate S, Chuchotaworn C, Chaiprasert A, Manosuthi W, Kantipong P, Kanitwittaya S, Sura T, Khusmith S, Tokunaga K, Sawanpanyalert P, Keicho N. Genome-wide SNP-based linkage analysis of tuberculosis in Thais. *Genes Immun* 10(1):77-83,2009.
5. Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Kajiki A, Nagai H, Kurashima A, Oketani N, Hayakawa H, Takemura T, Nakata K, Ito H, Morita T, Matsushita I, Hijikata M, Sakurada S, Sasazuki T, Inoko H. Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary Mycobacterium avium complex infection. *J Infect Dis* 199(11):1707-1715, 2009.
6. Uchida K, Nakata K, Suzuki T, Luisetti M, Watanabe M, Koch DE, Stevens CA, Beck DC, Denson LA, Carey B, Keicho N, Krischer JP, Yamada Y, Trapnell BC. Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor Autoantibodies and Myeloid Cell Immune Functions in Healthy Individuals. *Blood* 113(11):2547-56, 2009.
7. Vollstedt S, Yuliwulandari R, Okamoto K, Lien LT, Keicho N, Rochani JT, Wikaningrum R, Tokunaga K. No evidence for association between the interferon regulatory factor 1 (IRF1) gene and clinical tuberculosis. *Tuberculosis* 89(1):71-6, 2009.

##### 2. 学会発表

本研究に関連するものはなし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# 輸入感染症としての多剤耐性結核の対策・制御に関する研究

研究分担者 櫻田紳策 国立国際医療センター呼吸器疾患研究部 室長

## 研究要旨

本研究では、結核およびHIV合併結核発症のリスクを自然免疫から適応免疫まで広く検討を進めている。今年度は、タイ・チェンライの結核とHIV感染者とHIV合併結核の患者群から得られた試料を用いて、患者血漿中のcytokineレベルの測定を行い、すでに測定されているosteopontinレベルとの相関を統計学的に検討した。現在、結核データベースにアクセスして個々のケースにつき臨床情報と分離菌の薬剤耐性試験結果について解析を行った。

## A. 研究目的

HIV合併結核においては、様々な免疫機構の障害・異常が報告されているが、本研究は、感染マクロファージにおけるosteopontin(OPN)を中心としたTh1型免疫応答の誘導障害を検討するため、患者末梢血試料を用いてTh1系cytokineを中心とした解析を行い、同時に同一患者からの分離菌における薬剤耐性との関連性を検討することを目的としている。

## B. 研究方法

平成19年度に先行研究にて採取された臨床試料を用いる。患者群は、①健常者、②結核患者、③HIV感染者HAART(-)、④HIV感染者HAART(+), ⑤HIV合併結核患者 (HAART(-)) の5群とし、サンプル数として、血漿中のOPNならびに各種cytokineの測定は、それぞれ①25名、②23名、③10名、④17名、⑤6名で行った。また、in vitroで単球より分化したマクロファージによるOPNの測定に関しては、①11名、②10名、③8名、④12名、⑤3名で行った。血漿中および培養上清中のOPNおよび各種cytokineとCRPの濃度はELISAによって決定した。また、結核患者喀痰からの結核菌の培養は、卵培地とMiddlebrook 7H9 brothを含む液体培地を併用した。

(倫理面への配慮)

ヒト臨床検体を用いた研究であるため各臨床検体の採取にあたって、インフォームド・コンセントを取得した。その他の倫理的配慮は、タイ公衆衛生保健省の定める指針に準拠した。本研究に関する試料採集に関しては、先行研究において平成18年12月に国立国際医療センター倫理委員会にて、平成19年5月にタイ公衆衛生省、6月にチェンライ病院の倫理委員会からそれぞれ承認を得ている。

## C. 研究結果

1. 血漿中full-length OPNレベルについては前年度詳細を報告している。結核とHIV合併結核におい

て有意 (各 $P < 0.01$ ) に上昇していた。とくにHIV合併結核ではHIV陰性の結核より有意に上昇していた ( $P < 0.01$ )。さらに血漿中N-half OPN (thrombinによる切断断片のN末端側)の測定を実施した。血漿レベルの患者群毎のパターンはfull-length OPN同様であった。

2-1. 血漿中cytokine等に関しては、IL-10、IL-12p40、IL-15、IL-18、IP-10、CRPを測定した。今回は、 $\gamma$ -IFNは測定していない。IL-10においては、HIV合併結核においてのみ有意に健常者より上昇していた ( $P < 0.01$ )。IL-12p40では、結核とHIV HAART(-)とHIV結核合併で健常者に比較して有意に上昇していた ( $P < 0.01$ )。他方、HIV HAART(-)とHIV結核合併の間には有意差は無かった。IL-15では結核とHIV HAART(+のみ)で健常者に比較して有意なレベルの上昇が認められた ( $P < 0.01$ )。IL-18では、結核とHIV合併結核において健常者に比較して有意なレベルの上昇が認められたが ( $P < 0.01$ )、HIV合併結核におけるレベルは結核に対しても有意に高かった ( $P < 0.01$ )。IP-10においては、IL-18と類似のパターンが示された。CRPにおいては、結核とHIV合併結核において健常に対して有意なレベルの上昇が認められたが ( $P < 0.01$ )、結核とHIV合併結核の間には有意差は認められなかった。

2-2. 12例の結核と3例HIV合併結核に関して、2 HRZE/4HR (6-10ヶ月間)の化学療法後の血漿OPNとcytokineのレベルをELISAにて測定した。ただし、結核とHIV合併結核それぞれ1例ずつ7ヶ月間のHRZEの治療例を含む。その結果、full-length OPN ( $P < 0.01$ )、IL-18 ( $P < 0.05$ )、IP-10 ( $P < 0.01$ )、CRP ( $P < 0.01$ )に有意な治療後の血漿レベルの低下が認められた。他のcytokineでは有意な変化が認められなかった。

2-3. 化学療法前の血漿full-length OPNレベルとの相関については、結核においてN-half OPN ( $P < 0.05$ )、IL-18 ( $P < 0.01$ )、IP-10 ( $P < 0.05$ )との間に相関が認められた。一方、HIV合併結核では、IL-10 ( $P < 0.01$ )、IL-18 ( $P < 0.05$ )、IP-10 ( $P$



<0.01) との間に関連が認められたが、双方の患者群でCRPとの関連は認められなかった。

2-4. 薬剤耐性試験は結核、HIV合併結核の全例について実施された。結核では23名中INH耐性が5例、SM耐性が2例認められた。他の薬剤に対する耐性は認められず、従って多剤耐性結核例は含まれていない。HIV合併結核ではrifampicinを含む全薬剤に対して感受性であった。

#### D. 考察

OPN は多様な細胞から産生されるリン酸化糖タンパクで、マクロファージは主要な産生細胞の一つである。OPNの機能は多様であるが、感染・炎症等に伴って比較的多量に細胞外に分泌食細胞の運動、貪食に関係し、IL-12 の産生誘導などTh1 応答にも関与しているという報告がある。本研究で明らかになったことは、HIV合併結核における血漿IL-10、IL-12p40、IL-18、IP-10 レベルの著しい上昇である。今回は $\gamma$ -IFNは測定できていないが、同時期にタイで実施された再発・再燃結核の研究では、HIV陰性結核とHIV合併結核の血漿 $\gamma$ -IFNレベルに関して統計学的有意差は認められていない。従ってHIV合併結核では、血漿中のTh1系cytokineと抑制性cytokineの双方が上昇していると考えられる。昨年度報告したようにgranulysin の遊離等より結核菌特異的な反応はHIV合併結核で明らかに低下しており、血漿cytokine、OPNの著しい上昇は非特異的反応による可能性が示唆された。近々の予定として、今年度諸般の事情から実施できなかった血漿 $\gamma$ -IFNレベルをELISAで測定することを計画している。

#### E. 結論

HIV合併結核においては、血漿中のOPNや一部Th1 cytokineまたはIL-10のような抑制性cytokineのレベルが健常者のみならずHIV陰性結核患者と比較しても有意に上昇していた。従って、cytokine responseという観点からは、HIV合併結核は高反応状態にあると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし (OPN つき論文投稿準備中)

##### 2. 学会発表

1. 第49回日本呼吸器学会、東京、2009年、Chutharut Ridruechai, Shinsaku Sakurada, Srisin Khusmith, Naoto Keicho [Increased Osteopontin Levels in Plasma of Patients with Tuberculosis and Co-infection with HIV and Monocyte-derived Macrophages in vitro.]

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当無し

##### 2. 実用新案登録

該当無し

##### 3. その他

該当無し

# アジア諸国・日本の外国人多剤耐性結核患者TLR・リポカリン2の反応性と治療ワクチン開発の研究

研究分担者 竹田 潔 大阪大学大学院医学系研究科 免疫制御学 教授

## 研究要旨

結核菌の感染により肺で早期に誘導される遺伝子産物、リポカリン2およびsecretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)の機能を解析した。マウスに結核菌を感染させると、気道上皮細胞から気道腔内、肺胞腔内にリポカリン2およびSLPIが2日目をピークに分泌される。リポカリン2は、肺胞上皮細胞に受容体依存性エンドサイトシスにより取り込まれ、上皮内に侵入した結核菌の増殖を鉄イオンの取り込みを抑制することによりブロックする。一方、SLPIは、結核菌の細胞膜の透過性を亢進させることにより殺菌作用を示し、in vitroでの結核菌の増殖を抑制した。SLPIは2つのwhey acidic protein (WAP)ドメインを有しているが、各WAPドメインが結核菌の増殖を抑制した。さらに、WAPドメイン内の陽性電荷を有するアミノ酸が増殖抑制に必須であることが明らかになった。このように、結核感染防御において、リポカリン2やSLPIが重要な役割を担っていることが明らかになった。

## A. 研究目的

自然免疫系は、病原体の宿主内への侵入を最初に察知し、種々の炎症・免疫応答を誘導する重要な免疫系である。最近、Toll-like receptor (TLR)ファミリーの機能解析により、自然免疫系の活性化機構が明らかになり、TLRを介した自然免疫系の活性化の生体防御における重要性が明らかになった。結核菌に対する生体防御においても、自然免疫系が結核菌の認識が重要な役割を果たす可能性が考えられる。

本研究では、自然免疫系による結核感染防御機構を明らかにし、自然免疫系の活性化を利用した新規治療ワクチンの開発への基盤を提供することを目的とする。

## B. 研究方法

自然免疫系の結核感染防御への関与について、これまでTLRを介したシグナルの消失する MYD88/TRIF欠損マウスを用いて解析し、自然免疫系の活性化の重要性を明らかにしてきた。これまでの解析は、マクロファージ、樹状細胞を標的としてきたが、自然免疫応答はこれら貪食細胞に限らず、最初に結核菌に出会う上皮細胞も深く関与している。そこで、結核菌の気道感染により上皮細胞で誘導される遺伝子を検索した。さらに、この遺伝子(secretory leukocyte protease inhibitor: SLPI)を発現ベクターに組み込み、組み換え分子を作製し、結核菌やワクチン株BCGの試験管内で増殖に及ぼす影響を解析した。次に、SLPIによる結核菌増殖抑制機構を解析するため、走査電子顕微鏡による結核菌の形態変化、さらに1-N-phenyl-naphthylamine (NPN)を用いた細胞膜透過性亢進試験を行った。また、SLPIタンパク質の結核菌増殖抑制に必須の部位を種々の変異タンパク質を作製し解析した。最後に、SLPI

遺伝子のノックアウトマウスを用いて、結核菌の気道感染を行い、感染感受性を解析した。これらの解析によりSLPIの結核感染防御における役割を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整ったSPF環境化で週に1回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、苦痛の軽減を行うよう配慮している。

## C. 研究結果

これまで結核感染に際し、肺胞上皮細胞から分泌されるリポカリン2が、鉄イオンの取り込みを阻害することにより、結核菌増殖を抑制していることを見出した。さらに、結核感染に際し、肺で遺伝子発現が上昇するsecretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)の結核感染防御における役割を解析した。SLPIは、試験管内で結核菌の増殖を抑制した。さらにその増殖抑制機構を解析したところ、SLPIは結核菌の細胞膜の透過性を亢進させることにより細胞膜を破壊し、殺菌していることが明らかになった。SLPIは、Whey acidic protein (WAP) domainが二つ並んだ分子であるが、どちらのWAPドメインも細胞膜の透過性を亢進させた。WAPドメインのアミノ酸配列を解析すると、WAPドメインのN末側の陽性電荷を有するアミノ酸が、膜透過性亢進に必要であることが明らかになった。陽性電荷を有したアミノ酸が、陰性電荷の結核菌細胞膜に会合し、膜透過性を亢進させていることが考えられた。

また、SLPIの個体レベルでの結核感染における役割を解析するため、SLPIノックアウトマウスに結核

菌を感染させたところ、感染感受性が正常マウスに比べて極めて高くなっていることが明らかになった。このように、SLPIはリポカリン2とは異なる分子機構で、結核感染に対する自然免疫応答を担っていることが明らかになった。

さらに、SLPI, リポカリン2以外に結核感染で誘導される遺伝子を同定しており、現在その機能を解析している。

#### D. 考察

結核感染に際し、最前線となる上皮系細胞から分泌されるSLPIやリポカリン2が結核菌の増殖抑制作用を異なる分子機構により発揮していることが明らかになった。今後、SLPI、リポカリン2以外にも、自然免疫系による結核感染防御機構を担う分子を同定していきたい。

#### E. 結論

結核菌の感染において、SLPIが、抗結核作用を担っていることが明らかになった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yamamoto, M., Standley, D.M., Takashima, S., Saiga, H., Okuyama, M., Kayama, H., Kubo, E., Ito, H., Takaura, M., Matsuda, T., Soldati-Farve, D., and Takeda, K.: A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *J. Exp. Med.* 206, 2747-2760 (2009).
2. Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C., Santee, C. A., Lynch, S. V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., Littman, D. R.: Induction of Intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139, 485-498 (2009).
3. Pejnovic, N., Vratimos, A., Lee, S. H., Popadic, D., Takeda, K., Akira, S., and Chan, W. L.: Increased atherosclerotic lesions and Th17 in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice fed high-fat diet. *Mol Immunol.* 47, 37-45 (2009).
4. Miyazato, A., Nakamura, K., Yamamoto, N., Mora-Montes, H. N., Tanaka, M., Abe, Y., Tanno, D., Inden, K., Gang, X., Ishii, K., Takeda, K., Akira, S., Saijo, S.,

Iwakura, Y., Adachi, Y., Ohno, N., Mitsutake, K., Gowm N. A. R., Kaku, M., and Kawakami, K.: Toll-like receptor 9-dependent activation of myeloid dendritic cells by deoxynucleic acids from *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 77, 3056-3064 (2009).

5. Kayama, H., Koga, R., Atarashi, K., Mak, T. W., Takayanagi, H., Honda, K., Yamamoto, M. and Takeda, K.: NFATc1 mediates Toll-like receptor-independent innate immune responses during *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Pathogens* 5, e1000514 (2009).
  6. Yamasaki, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Matsuzawa, T., Ishikawa, E., Sakuma, M., Takeno, H., Uno, J., Hirabayashi, J., Mikami, Y., Takeda, K., Akira, S., and Saito, T.: C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 1897-902 (2009).
  7. Morishita, H., Saito, F., Kayama, H., Atarashi, K., Kuwata, H., Yamamoto, M., and Takeda, K.: Fra-1 negatively regulates lipopolysaccharide-mediated inflammatory responses. *Int. Immunol.* 21, 457-465 (2009).
  8. Haga, S., Ozaki, M., Inoue, H., Okamoto, Y., Ogawa, W., Takeda, K., Akira, S., and Todo, S.: The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation. *Hepatology* 49, 204-214 (2009).
- ##### 2. 学会発表
1. Kiyoshi Takeda Innate immune responses at the intestinal mucosa. The first CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology, Shanghai, China 2009.11.7-8
  2. Kiyoshi Takeda Innate immune responses at the intestinal mucosa. The 2009 Fall Conference of the Korean Association of Immunologists, Seoul, Korea 2009.11.9-10
  3. Kiyoshi Takeda ATP from commensal bacteria induces Th17 cell development in the intestine. Regulation of innate immunity, Seoul, Korea 2009.9.17-18

4. 竹田 潔 腸管粘膜に特有の自然免疫系細胞の機能 第39回日本免疫学会学術集会、大阪  
2009.12.2-4
5. 竹田 潔 自然免疫系の活性制御と免疫疾患（特別講演）第51回日本小児血液学、東京  
2009.11.27-29
6. Kiyoshi Takeda Secretory Leukocyte Protease Inhibitor mediates anti-mycobacterial responses. 44<sup>th</sup> US-Japan cooperative medical science program, Tuberculosis and leprosy research conference 2009.7.29-31, Fukuoka, Japan
7. Kiyoshi Takeda Commensal bacteria-derived ATP mediates development of intestinal Th17 cells. RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2009、横浜 2009.7.9-10

H. 知的財産権の出願・登録状況

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