

所定の封筒に封入の上、直接受領もしくは投函してもらってください。

○退院患者のうち、以下の方は調査対象外としてください。

- ・ 20歳未満の方
- ・ 外国人の方
- ・ 検査入院の方
- ・ 心身状況により回答ができない方
- ・ 調査協力を拒否した方

○個人情報保護の観点から、患者様にお名前等を記入しないようにご説明をお願いいたします。

【調査終了時】

【調査票の提出】

○調査責任者に記入済みの以下の調査票を提出してください。

- ※ II. 業務量調査票：1票
- ※ IV. 患者満足度調査票の入った封筒（退院患者様本人が投函する場合は除く）

本調査に関するお問合せは、下記をお願いいたします。

〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24

公益財団法人 結核予防会結核研究所

保健看護学科

電話 042-493-5760（直通） 042-493-5711（代表）

受付時間：08:30～17:00（平日）

FAX 042-492-4600

担当 永田・浦川（nagata@jata.or.jp）

DOTS実施状況に関する調査

ここでは、院内DOTSは、『医療スタッフが入院中の患者が処方された抗結核薬を飲むのを見届けるだけでなく、治療アドヒアランスを確実にするための病気・服薬に関する教育指導や地域連携の調整を含む患者中心のアプローチ』と定義します。

貴院の概況

- ① 貴病院名
② 所在都道府県
③ 医療機関種別
④ 病床数・患者数

			都・道・府・県
1. 大学病院 2. 研修指定病院 3. その他			
総病床数			床
認可病床数 (結核病棟)			床
実稼働病床数 (結核病棟)			床
平均在院期間 (結核病棟)			日
平均在院患者数 (結核病棟)			人

※数字がない場合は概数で結構です。

※数字がない場合は概数で結構です。

$$\begin{aligned} \text{※ 平均在院期間} &= \text{月間在院患者延べ数} \div \\ &\quad (1/2 \times (\text{月間新入院患者数} + \text{月間退院患者数})) \\ \text{※ 平均在院患者数} &= \text{年間在院患者延べ数} \div \text{当該年の年間日数} \end{aligned}$$

- ⑤ 結核病棟の入院基本料区分について該当するものに○をしてください。

(7対1・10対1・13対1・15対1・18対1・20対1)

- ⑥ 施設について該当するものに○をしてください。

(独立した看護単位を持つ結核病棟・ユニット化された結核病床・モデル病床・その他)

- ⑦ 結核患者に関わる職員数

職 種	結核病棟専従	結核病棟以外で 結核患者に関わる職員
医師		人
看護師	人	人
看護助手	人	人
医療クラーク	人	人
薬剤師		人
医療ソーシャルワーカー		人
栄養士		人
PT		人
外来看護師		人
その他	人	人

※網かけ部分をご記入不要です。

- ⑧ 患者教育・指導マニュアルの作成状況

1. 作成している(作成中) 2. 作成していない

それぞれの質問で、当てはまる番号に○をつけてください(複数選択可)

*該当する対象・期間それぞれに○をつけてください

Q1 患者の服薬をどのような方法で確認していますか

	全ての患者	一部の患者	全入院期間	一部の期間
1 病院職員が薬を飲むのを直接確認している				
2 配薬後、薬の空き袋で確認している				
3 DOTSノートやチェック表で確認している				
4 配薬のみで服薬は確認していない				
5 その他()				

*該当する対象に○をつけてください

Q2 患者の服薬や病気の理解に関する評価について

	全ての患者	一部の患者
1 評価のための面接を実施している		
2 評価ツールを使用している		
3 評価は実施していない		

*該当する対象に○をつけてください

Q3 患者教育はどのような方法で実施していますか

	全ての患者	一部の患者
1 集団(対象者2人以上)で講義・質疑を行う形式		
2 患者毎に個別に時間を取って教育・指導している		
3 廊下・共有スペース(デールームなど)に掲示している(特別な時間は設けていない)		
4 行っていない		

Q4 患者教育用(結核の知識、治療、服薬の重要性など)に教材等を用いていますか

1 ビデオやDVDを使用	4 教材は用いずに個々に口頭で説明する
2 パンフレットを使用	5 その他()
3 DOTSノートを使用	

Q5 患者入院中に、退院後の服薬・療養支援について院内のどのような職種と連携していますか

1 主治医	5 理学療法士等
2 外来看護師	6 医療連携室スタッフ
3 薬剤師	7 その他の職種()
4 栄養士	8 連携なし

Q6 退院後の服薬・療養支援方法について、どのように決定していますか

- 1 保健所等の他機関も含めた打合せ・会議等(DOTSカンファレンス含む)
- 2 病院内のスタッフによる打合せ・会議等
- 3 受け持ち看護師の判断
- 4 保健所に任せている

*該当する対象に○をつけてください

Q7 DOTSカンファレンスは行っていますか

	全ての患者	一部の患者
1 DOTSカンファレンスを定期的に開催している		
2 退院後の服薬継続が困難な患者について、個々に保健所と連絡をとっている		
3 現在は特に何もしていないが、今後、保健所と協力して実施していきたい		
4 その他()		

Q8 退院後の服薬・療養支援について、保健所以外にどのような機関と連携していますか

- 1 転院や通院予定の医療機関
- 2 患者の服薬・療養支援に関わる調剤薬局
- 3 福祉関係機関(生活保護担当者、介護支援専門員、高齢者入所・通所施設等)
- 4 その他()
- 5 特に連携していない

Q9 院内DOTSガイドライン(平成16年結核病学会保健看護委員会作成)を日常業務に活用していますか

- 1 活用している
- 2 活用していない
- 3 知らない

*その他、何かご意見がありましたら自由にご記載下さい

業務量調査票(業務別の標準時間数及び調査期間中の実施回数)

②病院名:

①該当職種 ※該当職種と勤務形態に○印を付けてください。

1. 医師 2. 看護部長 3. 看護職員 4. 薬剤師 5. MSW 6. 栄養士 7. PT 8. 看護助手 9. クラーク 10. その他 ()

1. 常勤 2. 非常勤

業務項目	業務内容	③当該勤務の業務実施総時間(h:mm)													
		1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	7回目	8回目	9回目	10回目	11回目	12回目	13回目	14回目
コード		1月11日	1月11日	1月11日	1月11日	1月11日	1月11日	1月11日	1月11日	1月11日	1月11日	1月11日	1月11日	1月11日	1月11日
		時分	時分	時分	時分	時分	時分	時分	時分	時分	時分	時分	時分	時分	時分
教育指導	結核に関する個別指導	0:20	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	結核に関する集団指導	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	その他の教育指導	1:00	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
入院診療計画書	作成・修正	0:30	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	患者への説明	0:30	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	日誌の作成・経過記録	0:10	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	ADL評価	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	定期薬の仕分けと確認	1:00	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	配薬準備	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	DOT	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	空シート、薬袋の確認	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	服薬に関する記録	0:10	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	副作用の対応	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
DOTS	その他	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	呼吸器薬に関する対応	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	その他の検査の対応	0:30	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	患者面談	1:00	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	記録	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	スタッフミーティング	0:30	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	患者・家族を交えた話し合い	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	療養所との感染予防にかかわる業務や届出の準備	0:30	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	院内(他職種、外来など)での業務	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	DOTSカンファレンス関連業務	1:00	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
依頼所等への連携に関する業務	DOTSカンファレンス参加	0:30	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	退院連絡・退院患者訪問録・退院時チェック作成	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	退院後の生活に合わせた服薬指導を検討し決定・実施	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	退院後のためのDOTSカンファレンス(病棟・医師・薬剤師・看護師・保健師・薬剤師・栄養士・PT・地域連携推進員など)の開催	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	退院後のためのDOTSカンファレンス(病棟・医師・薬剤師・看護師・保健師・薬剤師・栄養士・PT・地域連携推進員など)の開催	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	退院後のためのDOTSカンファレンス(病棟・医師・薬剤師・看護師・保健師・薬剤師・栄養士・PT・地域連携推進員など)の開催	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	退院後のためのDOTSカンファレンス(病棟・医師・薬剤師・看護師・保健師・薬剤師・栄養士・PT・地域連携推進員など)の開催	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	退院後のためのDOTSカンファレンス(病棟・医師・薬剤師・看護師・保健師・薬剤師・栄養士・PT・地域連携推進員など)の開催	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	退院後のためのDOTSカンファレンス(病棟・医師・薬剤師・看護師・保健師・薬剤師・栄養士・PT・地域連携推進員など)の開催	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	退院後のためのDOTSカンファレンス(病棟・医師・薬剤師・看護師・保健師・薬剤師・栄養士・PT・地域連携推進員など)の開催	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
アムネーティ	アムネーティに関する業務	0:10	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	その他	0:10	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:

入院患者一覧

病院名: 調査期間: 平成23年 月 日 ~ 平成23年 月 日

氏名	患者コード	入院日	退院日(予定)	年代	性別	外国 出身 者 に 関 し て は ○	職業及び 社会的背景	住所地 特定	病名 (主要なもの1つ)	入院期間中の 合併症	入院期間中の 治療状況	入院期間中のADL	患者満足度調査 が採れない 場合の理由		患者 コード
													1) 満足 2) 不満足	理由	
	1	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 20歳未満 2) 20歳代 3) 30歳代 4) 40歳代 5) 50歳代 6) 60歳代 7) 70歳代 8) 80歳代 9) 90歳以上	男・女		1) 常勤 2) 臨時雇・日雇 3) その他非労働パートタイム 4) 自営業 5) 家事従事者 6) 学生 7) 無職・その他	1) 可 2) 不可	1) 脳神経系(多発神経性除く) 2) 呼吸器系 3) その他の精神疾患 4) 感染症 5) 重症合併症 (生命の危険な状況) 6) その他	1) 療養的な治療 2) 手術による治療 3) 薬物療法 4) 重症で回復性の乏しい 5) 合併症のため治療遅れ 6) その他の理由による 治療・退院の遅れ	J A B C	有無	1) 20歳未満 2) 不満足	1	
	2	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	2
	3	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	3
	4	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	4
	5	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	5
	6	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	6
	7	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	7
	8	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	8
	9	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	9
	10	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	10
	11	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	11
	12	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	12
	13	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	13
	14	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	14
	15	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	15
	16	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	16
	17	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	17
	18	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	18
	19	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	19
	20	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	20
	21	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	21
	22	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	22
	23	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	23
	24	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	24
	25	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	25
	26	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	26
	27	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	27
	28	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	28
	29	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	29
	30	平成 年 月 日	平成 年 月 日		男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	30

Ⅲ 入院患者一覧表

氏名	患者 コード	入院日 月 日	退院月日(予定)		年代	性別	外国 出身 者 ○	職業及び 社会的背景	住所地 特定	病名 (主要なもの1つ)	入院期間中の 合併症	入院期間中の 治療状況	入院期間中のADL	患者満足度調査 が実施できない 場合の理由		患者 コード
			月 日	月 日										1) 20歳未満 2) 20歳代 3) 30歳代 4) 40歳代 5) 50歳代 6) 60歳代 7) 70歳代 8) 80歳代 9) 90歳以上	1) 20歳未満 2) 外国人 3) 入院入院 4) 入院入院 5) 調査協力拒否 6) その他	
	31	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女		1) 常勤 2) 臨時雇、日雇 3) その他非常勤パートタイム 4) 自営業者 5) 専業主婦 6) 学生 7) 無職・その他	1) 可 2) 不可	1) 肺結核(多剤耐性) 2) 多剤耐性結核 3) 肺炎結核	1) なし 2) 認知症 3) その他の精神疾患 4) 重症心身障害 5) 重症身体障害 (生命の危険な状況) 6) その他	1) 標準的な治療 2) 副反応のため治療延長 3) 多剤耐性のため長期投与 4) 副作用のため治療中断 5) 合併症のため治療遅れ 6) その他の理由による 治療・退院の遅れ	J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	31
	32	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	32
	33	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	33
	34	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	34
	35	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	35
	36	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	36
	37	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	37
	38	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	38
	39	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	39
	40	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	40
	41	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	41
	42	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	42
	43	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	43
	44	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	44
	45	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	45
	46	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	46
	47	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	47
	48	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	48
	49	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	49
	50	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	50
	51	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	51
	52	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	52
	53	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	53
	54	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	54
	55	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	55
	56	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	56
	57	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	57
	58	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	58
	59	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	59
	60	平成 年 月 日	平成 年 月 日	平成 年 月 日	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)	男・女							J A B C	有無	1) 2) 3) 4) 5) 6)	60

結核による入院治療中の説明・相談・相談・見守りに関するアンケート

このアンケートは、今後の質の高い結核医療をめざす研究の一環として、今回治療を受けた方々にご協力をお願いしております。アンケートの回答内容が、個人が特定できる形で公表されることはありません。以下のそれぞれの質問に当てはまる回答を一つ選んで番号に○をつけて下さい。

No.

問 1	病院から結核や治療の説明がありましたか？	<ol style="list-style-type: none"> 1. あった 2. なかった 3. わからない
問1-1	1に○をつけた方にお聞きます。病院からの説明で、結核や治療のことが、わかりましたか？	<ol style="list-style-type: none"> 1. よくわかりました 2. だいたいわかりました 3. よくわからなかった 4. まったくわからなかった
問 2	結核をなおすには、6ヶ月以上、薬を飲む必要があると思いますか？	<ol style="list-style-type: none"> 1. とてもそう思う 2. そう思う 3. あまり思わない 4. まったく思わない
問 3	自分で薬を減らしたりやめたりすることで、薬が効かなくなると思うことがありますか？	<ol style="list-style-type: none"> 1. とてもそう思う 2. そう思う 3. あまり思わない 4. まったく思わない
問 4	薬の前作用について、すぐに医師や看護師などに相談する必要があると思いますか？	<ol style="list-style-type: none"> 1. とてもそう思う 2. そう思う 3. あまり思わない 4. まったく思わない
問 5	入院中に治療や困っていることについて病院スタッフと相談できましたか？	<ol style="list-style-type: none"> 1. できた 2. ある程度できた 3. あまりできなかった 4. できなかった
問 6	家族や身近な方に対して結核や治療に関する説明がありましたか？	<ol style="list-style-type: none"> 1. 説明があった 2. 説明を受けなかった 3. わからない 4. 家族や身内がいらない
問6-1	1に○をつけた方にお聞きます。家族や身近な方に説明があったことは、あなたにとってよかったですか？	<ol style="list-style-type: none"> 1. とてもそう思う 2. そう思う 3. あまり思わない 4. まったく思わない
問 7	看護師などの目の前で薬を飲みましたか？	<ol style="list-style-type: none"> 1. いつも飲んだ 2. 最初だけ飲んだ 3. とときどき飲んだ 4. 目の前では飲まなかった

問 8	退院後に薬を飲み続けるために、あなたの生活や要望に合わせた話し合いがありましたか？	<ol style="list-style-type: none"> 1. あった 2. なかった 3. わからない
問 9	入院中の病院スタッフとの関わりによって、確実に結核を治そうという気持ちになりましたか？	<ol style="list-style-type: none"> 1. とてもそう思った 2. そう思った 3. あまり思わなかった 4. まったく思わなかった
問10	あなたの性別、年齢、入院期間、過去の結核治療の有無、退院先について当てはまるものを○で囲んでください。 1)性別：1. 男性 2. 女性 2)年齢：1. 20代 2. 30代 3. 40代 4. 50代 5. 60代 6. 70代 7. 80代 8. 90代以上 3)入院期間はおよそどのくらいでしたか？ 1. 2週間未満 2. 2週間以上～1か月未満 3. 1か月以上 4. 2か月以上 5. 3か月以上 4)今回の入院以前に結核の治療を受けたことはありますか？ 1. あり 2. なし 3. わからない 「治療を受けたのはいつごろですか？」を記入してください 5)退院後はどちらで治療を続けますか？ 1. 入院していた病院・診療所 2. 他の病院・診療所 3. 入院中に治療終了 4. その他() 6)その他、ご意見などありましたら、ご記入をお願いします。	<p>ご協力ありがとうございました。</p> <p>本アンケートに関するご質問がありましたら、下記にお寄せ下さい。 公益財団法人結核予防会 結核研究所 〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24 研究担当者：永田孝子（対策支援部保健看護学科 科長） 研究責任者：加藤誠也（副所長） 電話：042-493-5711(代表) 受付時間：8:30～17:00 電子メール： nagata@jata.or.jp</p>

厚生労働科学研究インフルエンザ等新興再興感染症研究事業
「結核対策の評価と新たな診断・治療技術の開発・実用化に関する研究」
研究代表者 加藤 誠也 殿

平成23年 月 日

病院名 _____

代表者名 _____

「病院調査票」「業務量調査票」送付の件

表記の研究に対する調査票を送付します。

<送付資料の内訳>

No	調査票名称	部数
1	I. 病院調査票	1部
2	II. 業務量調査票	部
3	調査終了総括票(1) (本紙)	1部

業務量調査の実績をご記入ください

開始年月日	平成23年 月 日
終了年月日	平成23年 月 日

以上

【問合せ先】

ご連絡先電話番号 :

調査責任者名 :

厚生労働科学研究インフルエンザ等新興再興感染症研究事業
「結核対策の評価と新たな診断・治療技術の開発・実用化に関する研究」
研究代表者 加藤 誠也 殿

平成23年 月 日

病院名 _____

代表者名 _____

「入院患者一覧表」「患者満足度調査票」送付の件

表記の研究に対する調査票を送付します。

<送付資料の内訳>

No	調査票名称	部数
1	Ⅲ. 入院患者一覧表	1部
2	Ⅳ. 患者満足度調査票(結核による入院治療中の説明・相談・見守りに関するアンケート) 回収分	部
3	調査終了総括票(2)(本紙)	1部

以上

【問合せ先】

ご連絡先電話番号 :

調査責任者名 :

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Yoshida S, Suzuki K, Iwamoto T, Tsuyuguchi K, Tomita M, Okada M, Sakatani M.	Comparison of rifabutin susceptibility and rpoB mutations in multi-drug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by DNA sequencing and the line probe assay.	J Infect Chemother.	16(5)	360-3	2010
Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Inoue Y, Matsumoto M, McMurray DN, E.C.Dela Cruz, E.V. Tan, R.M.Abalos, J.A.Burgos, Saunderson P, Sakatani M	Novel therapeutic vaccine: Granulysin and new DNA vaccine against Tuberculosis.	Human Vaccine			in press
Kita Y, Okada M, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Takamori Y, McMurray DN, E.C.Dela Cruz, Tan EV, R.M.Abalos, J.A.Burgos, Saunderson P, Sakatani M.	Development of therapeutic and prophylactic vaccine against tuberculosis using monkey and granulysin transgenic mice models.	Human Vaccine.	7	108-114	2011
Okada M, Kita Y.	Anti-tuberculosis immunity by cytotoxic T cells granulysin and the development of novel vaccines (HSP-65 DNA+IL-12 DNA).	Kekkaku.	85(6)	531-8	2010
Okada M.	Immunity against Mycobacterium tuberculosis (introduction).	Kekkaku.	85(6)	501-8	2010
Ando H, Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Kato S, Mori T, Kirikae T.	Downregulation of katG expression is associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis.	Mol Microbiol	79(6)	1615-1628	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ando H, Mitarai S, Kondo Y, Suetake T, Kato S, Mori T, Kirikae T.	Evaluation of a line probe assay for rapid detection of gyrA mutations associated with fluoroquinolone resistance in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis.	J Med Microbiol	60(Pt 2)	184-188	2011
Ando H, Mitarai S, Kondo Y, Suetake T, Sekiguchi JI, Kato S, Mori T, Kirikae T	Pyrazinamide resistance in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Japan.	Clin Microbiol Infect	16(8)	1164-1168	2010
Ando H, Kondo Y, Suetake T, Toyota E, Kato S, Mori T, Kirikae T.	Identification of katG mutations associated with high-level isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis.	Antimicrob Agents Chemother	54(5)	1793-1799	2010
Yoshiro Murase, Shinji Maeda, Hiroyuki Yamada, Akihiro Ohkado, Kinuyo Chikamatsu, Kazue Mizuno, Seiya Kato, and Satoshi Mitarai	Clonal Expansion of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis, Japan	Emerging Infectious Diseases	Vol. 16 No.6,	945-954	2010
S. Maeda, T. Wada, T. Iwamoto, Y. Murase, S. Mitarai, I. Sugawara,* S. Kato	Beijing family Mycobacterium tuberculosis isolated from throughout Japan: phylogeny and genetic features	INT J TUBERC LUNG DIS	14(9)	1201-1204	2010
Hee Yoon Kang, Takayuki Wada, Tomotada Iwamoto, Shinji Maeda, Yoshiro Murase, Seiya Kato, Hee Jin Kim and Young Kil Park	Phylogeographical particularity of the Mycobacterium tuberculosis Beijing family in South Korea based on international comparison with surrounding countries	Journal of Medical Microbiology	59	1191-1197	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
山内祐子	結核看護の質の向上をめざして・・・「コホート観察」による治療・患者支援の評価	保健師・看護師の結核展望	Vol.48.1	68-78	2010
加藤誠也, 徳永修, 吉山崇	日本のコッホ現象報告の分析	結核	Vol.85, No.11	777-782	2010

IV 研究成果の刊行物・別刷(一部)

Comparison of rifabutin susceptibility and *rpoB* mutations in multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by DNA sequencing and the line probe assay

Shiomi Yoshida · Katsuhiko Suzuki ·
Tomotada Iwamoto · Kazunari Tsuyuguchi ·
Motohisa Tomita · Masaji Okada · Mitsunori Sakatani

Received: 4 November 2009 / Accepted: 1 March 2010 / Published online: 31 March 2010
© Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases 2010

Abstract We compared rifabutin susceptibility and *rpoB* mutations in 98 multi-drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) by DNA sequencing and with a line probe assay using the commercially available INNO-LiPA Rif. TB kit (the LiPA). Our results indicated that rifabutin continues to remain active against MDR-TB strains harboring certain genetic alterations and also that the LiPA might be useful in identifying MDR-TB strains susceptible to rifabutin.

Keywords Tuberculosis · Drug resistance · Rifabutin · *rpoB* · Line probe assay

The recent global expansion of multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) poses a serious threat to human health. Numerous previous studies have shown that the majority of rifampicin-resistant isolates of *M. tuberculosis* are also isoniazid resistant [1]. The

detection of rifampicin resistance therefore has the potential benefit of simultaneously detecting MDR-TB [1, 2]. One of the commercial kits used to determine drug resistance is the INNO-LiPA Rif. TB kit (the LiPA; Innogenetics, Ghent, Belgium). This assay is an excellent tool for detecting mutations in hot-spot regions of *rpoB*, a gene that encodes a subunit of RNA polymerase. Such mutations occur in up to 95% of rifampicin-resistant strains [2].

Rifabutin is a semisynthetic spiroperidyl derivative of rifampicin, which is more active than rifampicin itself against *M. tuberculosis* in immunocompromised patients [3]. Rifabutin is also useful as an alternative to rifampicin when serious side effects occur during tuberculosis treatment [4]. Moreover, the minimum inhibitory concentration (MIC) of rifabutin in rifampicin-resistant strains of *M. tuberculosis* carrying *rpoB* mutations varies depending on the specific site of the mutation in the *rpoB* gene [5–10]. Rifabutin might therefore be active against some MDR-TB strains. However, rifabutin susceptibility testing using the time-consuming proportional method on Middlebrook 7H10 medium or by 7H9 microdilution could postpone the effective treatment of patients infected with MDR-TB.

This study aimed to determine the MICs of rifampicin and rifabutin for MDR-TB isolates with known *rpoB* sequences and also to assess results of the LiPA, thereby helping to establish whether this test enables detection of rifabutin susceptibility in MDR-TB strains.

A total of 128 *M. tuberculosis* strains retrieved from a culture collection of the Kinki-chuo Chest Medical Center were tested by the mycobacterial growth-indicator tube–aspartate aminotransferase (MGIT-AST) method (Becton–Dickinson and Company, Fukushima, Japan), and WelPack method (Nihon BCG Inc, Tokyo, Japan) that was established by the egg-based Ogawa medium in commercial susceptibility test systems. Ninety-eight of these strains

S. Yoshida (✉) · K. Suzuki · K. Tsuyuguchi · M. Okada
Clinical Research Center, National Hospital Organization,
Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho,
Sakai 591-8555, Japan
e-mail: dustin@kch.hosp.go.jp

M. Tomita
Department of Clinical Microbiology, National Hospital
Organization, Kinki-chuo Chest Medical Center, Sakai, Japan

T. Iwamoto
Department of Microbiology, Kobe Institute of Health,
4-6 Minatojima-nakamachi, Chuo-ku, Kobe 650-0046, Japan

M. Sakatani
Department of Respiratory Medicine, National Hospital
Organization, Kinki-chuo Chest Medical Center,
1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai 591-8555, Japan

were considered to be resistant to rifampicin as determined by these media. Thirty pan-drug-sensitive (DS) strains were collected between 1 and 31 August 2008, and 98 MDR strains were collected between 1 January 2001 and 31 December 2008. All patients from whom the strains were derived were negative for both human immunodeficiency virus (HIV)-1 and HIV-2. With the exception of one MDR patient, these patients represent all of the DS- and MDR-TB patients treated in this hospital during the strain collection periods.

The MICs for these strains were determined by the validation protocol, performing the commercial and the in-house-prepared microdilution method in parallel for a series of these strains. We elected to use the BrothMIC MTB-1 (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co. Ltd., Tokyo, Japan) and a similar system for slowly growing mycobacteria by using 7H9 broth [11]. BrothMIC MTB-1 susceptibility test system with a shorter incubation period has been previously demonstrated to determine MICs that correlate with those obtained from the standardized agar proportion method. According to the manufacturer's instructions, the proposed breakpoints for rifampicin are ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ (susceptible), 0.125 – 2 $\mu\text{g/ml}$ (intermediate), and ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ (resistant). For the microdilution method using 7H9 broth, 100 μl of serial twofold dilutions of rifampicin or rifabutin were dispensed into each well. The final concentrations of the test drugs ranged from 0.015 to 256 $\mu\text{g/ml}$. All microdilution plates were incubated at 37°C in plastic bags to increase carbon dioxide (CO_2) and were read after 7, 14, and 21 days by looking for macroscopic growth with an indirect light source. MICs were the lowest dilutions exhibiting no growth. Quality control testing using *M. tuberculosis* H37Rv was performed once each testing. Each microdilution plate included basal medium without antimicrobial agents to assess viability of the test organisms. Each microdilution testing was performed in duplicate on different days.

The MDR-TB strains were analyzed for the presence of mutations in the rifampicin-resistance-determining region (RRDR). A set of primers described by Kim et al. [12], MF (5'-CGACCACTTCGGCAACCG) and MR (5'-TCGATC GGGCACATCCGG), were used to amplify a 342-bp fragment of the *rpoB* gene containing the 81-bp RRDR. The polymerase chain reaction (PCR) product was sequenced using an automated DNA sequencer (ABI Genetic Analyzer 310, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with MF and MR primers. The LiPA we employed was used in accordance with the manufacturer's instructions. This kit comprises the *M. tuberculosis* complex-specific probe, five overlapping sensitive probes (wild-type S: 19–23 bases long), and four resistance probes (R-type) from a region of the *rpoB* gene encoding amino acids 509–534. The lack of reactivities of an amplified

fragment with the wild-type S probes (probes S1 through S5) was used to detect mutations that lead to rifampicin resistance. Furthermore, R-type probes were specifically designed to hybridize to the sequences of the four most frequently observed mutations: R2 (Asp-516-Val), R4a (His-526-Tyr), R4b (His-526-Asp), and R5 (Ser-531-Leu). When all the wild-type S probes gave a positive signal and all the R-type probes reacted negatively (wild-type profile), the *M. tuberculosis* isolate was considered susceptible to rifampicin. When at least one negative signal was obtained with the wild-type S probes, the isolate was considered rifampicin resistant (ΔS profiles). When the resistance to rifampicin was due to one of the four most frequently observed mutations described above, a positive reaction was obtained with one of the four R-type probes and was always accompanied by a negative reaction with the corresponding wild-type S probe (R profiles). We used *M. tuberculosis* strain H37RV as a positive control.

The ranges of the MICs in DS-TB strains were ≤ 0.03 $\mu\text{g/ml}$ for rifampicin and ≤ 0.015 $\mu\text{g/ml}$ for rifabutin. The corresponding ranges of the MICs in MDR-TB strains were 0.5 to ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$ and ≤ 0.015 to ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Whereas rifabutin MICs for 78 of the 98 MDR-TB strains ranged between 0.5 and ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$, which were threefold lower than or equal to those of rifampicin, the other 20 MDR-TB strains had rifabutin MICs ranging between ≤ 0.015 and ≤ 0.25 $\mu\text{g/ml}$, which were 4- to 15-fold lower than those of rifampicin. As shown in Table 1, our study revealed 20 mutations in the *rpoB* gene. Single-point mutation at codon 513, 525, 526, 531, 533, or 572, which was detected in 72 MDR-TB strains, influenced susceptibility to rifabutin. We also demonstrated that novel mutations such as two strains with double-point mutations (Asp516Ala and Leu533Pro, or Ser512Ile and His526Pro), one strain with an insertion (at codon 525), and one strain with an His526Ser mutation showed rifabutin resistance. In contrast, 20 (20.4%) of the MDR-TB strains that had single-point mutation at codon 511, 516, or 522 and double-point mutation (Asp516Gln and Ser522Leu) were susceptible to rifabutin (MIC, < 0.5 $\mu\text{g/ml}$). The observations that some rifampicin-resistant strains remained susceptible to rifabutin suggest that *rpoB* mutation position and type of amino acid change influence rifabutin susceptibility.

In this study, four MDR-TB strains with a wild-type profile by the LiPA exhibited rifabutin resistance as well. Moreover, 72 strains exhibiting R4a, R4b, R5, ΔS4 , ΔS5 , $\Delta\text{S1} + \Delta\text{S4}$, or $\Delta\text{S2} + \Delta\text{S4} + \text{R5}$ profiles were also resistant to rifabutin. Conversely, 19 strains that exhibited R2 (one of the four most frequently observed mutations), ΔS3 , or $\Delta\text{S2} + \Delta\text{S3}$ profiles were characterized by low rifabutin MICs. The susceptibility of rifabutin conflicted among the remaining three strains that exhibited ΔS1 profile. In detail, one strain had a mutation at codon 511

Table 1 Comparison of *rpoB* genotype, susceptibility of rifampicin and rifabutin, and the LiPA profiles

Isolate phenotype and mutation position ^a	Isolates (n)	MIC (µg/ml)		LiPA
		Rifampicin	Rifabutin	
DS-TB				
Wild type	30	≤0.03 to 0.03	≤0.015	WT
MDR-TB^b				
511Leu → Pro	1	0.5	0.03	ΔS1
513Gln → Lys	2	8, 16	4, 16	ΔS1
516Asp → Val	17	4 to ≥256	0.015 to 0.25	R2
522Ser → Leu	1	2	0.06	ΔS3
525ACG insertion	1	32	32	WT ^c
526His → Tyr	2	32, 64	8, 64	R4a
526His → Asp	3	64, 128, 128	16, 64, 128	R4b
526His → Ser	3	2, 4, 64	2, 4, 32	ΔS4
526His → Arg	1	32	32	ΔS4
526His → Pro	2	8, 64	4, 32	ΔS4
526His → Leu	1	256	64	ΔS4
526His → Cys	1	4	1	ΔS4
526His → Arg, 529Arg → Gln	1	64	64	ΔS4
531Ser → Leu	54	0.5 to ≥256	0.5 to ≥256	R5
533Leu → Pro	1	32	32	ΔS5
512Ser → Ile, 526His → Pro	1	≥256	≥256	ΔS1 + ΔS4
516Asp → Glu, 522Ser → Leu	1	128	0.25	ΔS2 + ΔS3
516Asp → Ala, 533Leu → Pro	1	128	64	ΔS5 ^c
Mixed peak in 516 (GAC (Asp) → GTC (Val)), 526 (CAC (His) → CAA (His), 530 (CTG (Leu) → ATG (Met)), and 531 (TCG (Ser) →, TTC (Leu))	1	256	256	ΔS2 + ΔS4 + R5 ^c
572Ile → Phe	1	1	1	WT
Non-RRDR	2	16, 128	2, 128	WT

WT wild-type S profile, DS-TB drug-sensitive tuberculosis, MDR-TB multi-drug-resistant tuberculosis

^a Numbers correspond to *Escherichia coli* RNA polymerase amino acid positions

^b Resistant to rifampicin at 1.0 µg/ml by the Clinical and Laboratory Standards Institute method of proportion in 7H10 agar and mycobacterial growth-indicator tube–aspartate aminotransferase (MGIT-AST) method or 40 µg/ml by WelPack method

^c The LiPA also did not reveal the correct type of mutation

and appeared to have a low rifabutin MIC, but the remaining two strains, at codon 513, were characterized by high rifabutin MICs. Thus, except for ΔS1, profiles of the LiPA could predict rifabutin susceptibility rather faithfully (Table 1).

According to previous studies, rifabutin MICs against rifampicin-susceptible strains were ≤0.06 µg/ml [13], and all strains susceptible to 1 µg/ml of rifampicin and 12% of the strains resistant to 10 µg/ml of rifampicin were susceptible to 0.5 µg/ml of rifabutin [14]. In the study by Uzun et al. [15], all rifampicin-susceptible strains and 12% of rifampicin-resistant strains were also susceptible to rifabutin (MIC, ≤1 µg/ml). All 30 DS-TB strains and 20 of 98 MDR-TB strains were susceptible to rifabutin (MIC, <0.5 µg/ml) in our study. Clinical outcome regarding the efficacy of rifabutin therapy for isolates of MDR-TB with the MICs of ≤0.5 µg/ml has not yet been obtained, but the proposed critical concentration for rifabutin (≤0.5 µg/ml) in this study was the same as that recommended by The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) using

agar-plate testing. However, the relevant critical concentration of rifabutin should be determined by future clinical outcome study.

Our data indicated that all MDR-TB strains with an R2 profile, which was associated with a specific point mutation (Asp516Val), were almost always identified as rifabutin susceptible. The LiPA may offer improvement in the management of MDR-TB, as these vulnerable patients can commence treatment with rifabutin before the strain's isolation. This study further confirmed that rifabutin remains active against MDR-TB strains harboring certain genetic alterations. We also indicate that the LiPA is useful for rapid detection of strains susceptible to rifabutin in MDR-TB before examining susceptibility testing.

Acknowledgments This work was supported by a Health and Labour Science Research Grant for Research on Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, and a Grant for a National Hospital Organization respiratory network study "Study of Respiratory Diseases (Tuberculosis, Lung Cancer, Diffuse Lung Diseases and Respiratory

Insufficiency) using a Network of 54 Hospitals of National Chest Diseases in Japan”.

Conflict of interest statement None of the authors has any financial interest or financial conflict with the subject matter or materials discussed in this manuscript.

References

1. Drobniewski FA, Wilson SM. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*—a molecular story. *J Med Microbiol*. 1998;47:189–96.
2. Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, de Rijk P, et al. Evaluation of the INNO-LiPA Rif.TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:2093–8.
3. Davies G, Cerri S, Richel L. Rifabutin for treating pulmonary tuberculosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 17: (4) CD005159.
4. Luna-Herrera J, Reddy MV, Gangadharam PR. In vitro and intracellular activity of rifabutin on drug-susceptible and multiple drug-resistant (MDR) tubercle bacilli. *J Antimicrob Chemother*. 1995;36:355–63.
5. Bodmer T, Zürcher G, Imboden P, Telenti A. Mutation position and type of substitution in the β -subunit of the RNA polymerase influence in vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*. 1995;35:345–8.
6. Cavusoglu C, Hilmioglu S, Guneri S, Bilgic A. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. *J Clin Microbiol*. 2002;40:4435–8.
7. Saribaş Z, Kocagöz T, Alp A, Günalp A. Rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates by heteroduplex analysis and determination of rifamycin cross-resistance in rifampin-resistant isolates. *J Clin Microbiol*. 2003;41:816–8.
8. Williams DL, Spring L, Collins L, Miller LP, Heifets LB, Gangadharam PRJ, et al. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:1853–7.
9. Yang B, Koga H, Ohno H, Ogawa K, Fukuda M, Hirata Y, et al. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*. 1998;42:621–8.
10. Cavusoglu C, Karaca-Derici Y, Bilgic A. In vitro activity of rifabutin against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10:662–5.
11. Wallace RJ Jr, Nash DR, Steele LC, Steingrube V. Susceptibility testing of slowly growing mycobacteria by a microdilution MIC method with 7H9 broth. *J Clin Microbiol*. 1986;24:976–81.
12. Kim B-J, Lee S-H, Lyu M-A, Kim S-J, Bai G-H, Kim S-J, et al. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol*. 1999;37:1714–20.
13. Heifets LB, Lindholm-Levy PJ, Iseman MD. Rifabutine: minimal inhibitory and bactericidal concentrations for *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137:719–21.
14. Heifets LB, Iseman MD. Determination of in vitro susceptibility of mycobacteria to ansamycin. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132:710–1.
15. Uzun M, Erturan Z, Anđ O. Investigation of cross-resistance between rifampin and rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2002;6:164–5.

Development of therapeutic and prophylactic vaccine against tuberculosis using monkey and transgenic mice models

Yoko Kita,¹ Masaji Okada,^{1,*} Toshihiro Nakajima,² Noriko Kanamaru,¹ Satomi Hashimoto,¹ Tetsuji Nagasawa,² Yasufumi Kaneda,³ Shigeto Yoshida,⁴ Yasuko Nishida,¹ Hitoshi Nakatani,¹ Kyoko Takao,¹ Chie Kishigami,¹ Shiho Nishimatsu,¹ Yuki Sekine,¹ Yasushi Takamori,³ David N. McMurray,⁶ E.C. De la Cruz,⁷ E.V. Tan,⁷ R.M. Abalos,⁷ J.A. Burgos,⁷ Paul Saunderson⁷ and Mitsunori Sakatani¹

¹Clinical Research Center; National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center; Kitaku, Sakai; ²Ikedo Laboratory; GenomIdea Inc.; Midorigaoka, Ikeda; ³Division of Gene Therapy Science; Graduate School of Medicine; Osaka University; Suita, Osaka; ⁴Department of Medical Zoology; Jichi-Med.Sch; Minamikawachi-machi; Tochigi; ⁵Cell Therapy Research Division; Stem Cell Institute; Minatoku, Japan; ⁶Texas A & M University; System Health Science Center; College of Medicine; College Station, TX USA; ⁷Leonard Wood Memorial; Mandaue City, Cebu Philippines

Key words: monkey, prime-boost method, HVJ-envelope/HSP65DNA + IL-12DNA, *Mycobacterium tuberculosis*, vaccine, 15 KDa granulysin, granulysin transgenic mouse, patients with tuberculosis, prophylactic efficacy, SCID-PBL/hu

Abbreviations: HVJ, hemagglutinating virus of Japan; Tg, transgenic; MDR-TB, multi-drug resistant tuberculosis; 15 K granulysin, 15 kilodalton granulysin; 9 K granulysin, 9 kilodalton granulysin; PBL, peripheral blood lymphocyte; ESR, erythrocyte sedimentation rate

Purpose: BCG is not efficacious against *M. tuberculosis* (TB) in adult. Therefore, novel TB vaccines were established by using three kinds of animal models (cynomolgus monkey model which is the best animal model of human TB, IL-2R knock out SCID mice as a human immune model and granulysin transgenic mouse).

Methods and Results: DNA vaccine expressing TB Hsp65 and IL-12 was delivered by the hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-envelope. The BCG prime followed by Hsp65 + IL-12/HVJ vaccine boost showed a synergistic effect in the TB-infected cynomolgus monkey (100% survival). In contrast, 33% of monkeys were alive in BCG alone group. Furthermore, the prolongation of survival period of the monkey was observed by the combination of BCG and DNA vaccine even when the boost was performed after long-term period (4 month) from prime. This combination also improved the erythrocyte sedimentation rate (ESR), increased the body weight and augmented the proliferation of PBL and IL-12 production at higher levels than BCG alone or saline. Furthermore, this vaccine exerted therapeutic efficacy in IL-2R knock out SCID-PBL/hu mice, which were transplanted with human T cells. Granulysin is an important defensive molecule expressed by human T cells and NK cells and has a cytolytic activity against microbes including *Mycobacterium tuberculosis* (TB) and tumors. Expression of 15 kD (15 K) granulysin protein and mRNA in CD8 positive T cells in the patients infected with drug sensitive (TB) or multi-drug resistant *M. tuberculosis* (MDR-TB) were lower than that in the healthy volunteers, suggesting that granulysin treatment might improve the tuberculous disease in human. Therefore,

we established two kinds of granulysin transgenic mice (15 K granulysin transgenic mice and 9 K granulysin transgenic mice). It was demonstrated that 15 K granulysin transgenic mice as well as 9 K granulysin transgenic mice exerted in vivo anti-TB effect, including the decrease of the number of TB and augmentation of the CTL activity. These are the first findings which demonstrate in vivo effects of 15 K granulysin and 9 K granulysin against TB infection. Moreover, DNA vaccine expressing 15 K granulysin showed a therapeutic activity against TB in mice.

Conclusion: These data indicate that monkey, IL-2R gene-knock out SCID-PBL/hu and granulysin transgenic mice models provide useful tools for the development of novel vaccines (HVJ-Envelope/Hsp65 DNA + IL-12 DNA vaccine and granulysin vaccine) against TB.

Introduction

Tuberculosis is a major global threat to human health, with about 2 million people dying every year from *Mycobacterium tuberculosis* (TB) infection. The only tuberculosis vaccine currently available is an attenuated strain of *Mycobacterium bovis* BCG (BCG), although its efficacy against adult TB disease remains controversial. Furthermore, multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB) and extremely drug resistant TB (XDR-TB) are becoming big problems in the world. In such circumstances, the development of therapeutic as well as prophylactic vaccines against TB is required.

Cynomolgus monkey model is the best animal TB model as reported by Walsh and Tan.¹ TB infection in the cynomolgus monkey is very similar to human TB disease.¹⁻³ In the present study, the long term prime-boost period prophylactic efficacy of

*Correspondence to: Masaji Okada; Email: okm@kch.hosp.go.jp
Submitted: 09/24/10; Accepted: 10/10/10
DOI: