フィリピン、中国、日本における結核菌感染拡大阻止に関する研究

研究分担者　服部俊夫　東北大学　災害科学国際研究所　教授
研究協力者　白鳥ベアタ　東北大学　災害科学国際研究所
趙景格　東北大学　災害科学国際研究所
浩日勒　東北大学　災害科学国際研究所
臼澤基樹　東北大学　災害科学国際研究所

研究要旨
結核感染拡大阻止に向けて、結核菌の遺伝子解析とそれに対する免疫反応の解析をフィリピン、中国、日本の検体を用いて行った。マニラにおける、マニラ型の流布を確認した。また中国の検体では北京型特異的な抗体反応の存在を認めた。我が国の検体では潜在性結核・活動性結核の鑑別に関する研究を行った。

A．研究目的

フィリピン、中国、日本における結核菌（MTB）遺伝子型の同定によりアジア諸国間での結核菌の感染ルートを解析し感染の拡大を阻止する手立てを講ずることを目指した。またバイオマーカーを用いて各国の結核患者の免疫反応の特徴を特定し適切な結核治療ガイドラインの作成に役に立つと思われる。北京型特異的配列を有する Rv0679c 抗原の変異・非変異型蛋白、あるいは変異領域を含む overlapping peptide で MTB の北京型と非北京型を宿主反応から検出することを目標にした。

B．研究方法

フィリピン・マニラのサンラザロ病院（50 人の結核患者と 30 人の正常人）、上海公衆衛生臨床センター、復旦大学と金山病院（45 人の肺結核患者、26 人の肺外結核患者、16 人のエイズ/ 結核患者と 39 人の正常人）、複十字病院、東北大学病院（35 人結核患者、6 人潜在性結核、15 正常人）の検体を用いて Rv0679c 抗体と 30 種以上のバイオマーカーを測定した。フィリピンの患者の喀痰を用いて結核菌を LAMP 法で確認し、spoligotyping 法で遺伝子型を同定した。

日本の結核患者、潜在性結核感染者、正常人の末梢血リンパ球を ESAT-6, CFP-10, HBHA, ACR, MDP-1, Ag85A, Ag85B 結核菌由来抗原の 20 アミノ酸配列 overlapping peptide で刺激し、ELISPOT 法で IFN-γ を測定し、潜在性結核特異的な抗原を同定すること目指した。

（倫理面への配慮）

本研究内容は東北大学倫理委員会（2010-442 号、2012-1-597 号、2012-1-322 号）、複十字病院倫理委員会（免疫刺激状態の個体における galectin-9 及び他のバイオマーカー・サイトカインの発現様式研究。2012-7-6 号で上海の復旦大学と金山病院によって承認され、2013 年）サンラザロ病院倫理委員会（Molecular typing and detection of biomarkers among HIV-TB patients in the Philippines, 2011）で研究許可を得た。

C．研究結果

フィリピンの未治療結核患者の喀痰を用いて DNA を抽出し、LAMP 法ですべての 53 例において結核菌感染症を同定した(**図 1**)。同じ DNA 検体の spoligotyping 解析によってすべてマニラ型結核菌が検出された。

結核グループと正常人との間の最も特徴的なバイオマーカーを同定するため、多変量判別方法で判別関数解析を行った。OPN、IP-10、好中球、IL-6、IL-8、TNF-α、MCP-1、血小板、gal-9、と WBC が高い判別性があった。

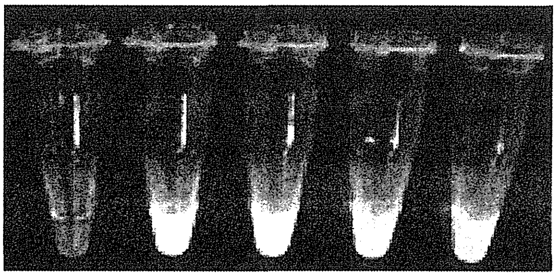


図 1 Loop isothermal amplification assay (LAMP 法)の結果

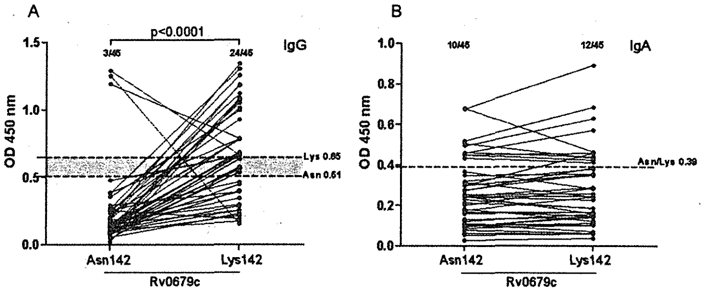


図 2 Rv0679c 抗体反応の比較

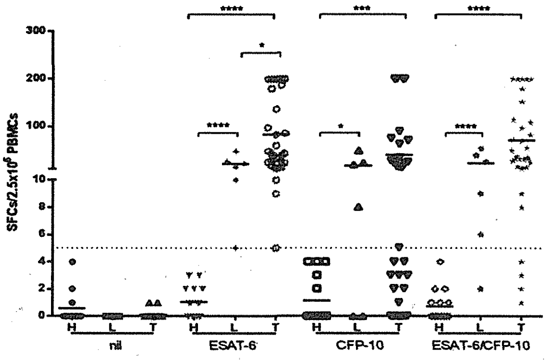


図 3 IFN-γ ELISPOT の結果

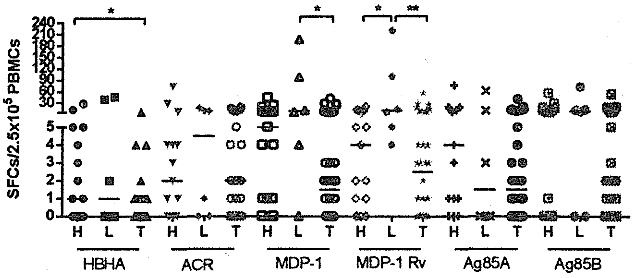


図 4 潜在性結核特異的な抗体の反応

これらのマーカーの組み合わせによって、すべての結核患者と健常者の 96.3%が正しく識別できる。

中国の結核遺伝子型を血清学的に識別するため我々は大腸菌を用いて Rv0679c の遺伝子を導入することによって精製した組換え蛋白質 Rv0679c を得て、ELISA を行った。またこの ELISA 法の結果を抗 TBGL IgG・IgA 抗体測定キットとの比較分析を行った。正常人に比べて肺結核患者において高値の抗 Rv0679cIgA 抗体が検出された。多くの肺結核患者では抗 Rv0679c の Lys 型に対しての IgG 抗体は見られたが Asn 型に対する IgG 抗体は低値であった。また抗 Asn 型 IgG と抗 Lys 型 IgG との間では相関は認められなかったが、Asn 型の IgA と Lys 型 IgA との間で相関関係（P<0.0001、R=0.71）を認めた。Rv0679c のタイターと臨床バイオマーカーとの分析を行い、Rv0679c-Lys の IgG のタイターは、炎症性因子である C 反応性蛋白質レベルと相関していることが分かった(**図２**)。

我が国の感染者の潜在性結核感染者（L）と結核患者（T）のリンパ球を用いて、種々の結核菌由来抗原を用いて、T-Spot を行った。ESAT-6 に対する結核患者の反応は潜在性結核感染者に比べて高かった。CFP-10 の反応性は ESAT-6 に比べて劣った。年齢とともに ESAT-6 の反応は下がり、ESAT-6 と ESAT-6/CFP-10 の反応はリンパ球数に依存していることが分かった（**図３**）。

HBHA に対しての反応は結核患者に比べて正常人グループでは有意に高かった。ACR, Ag85A, Ag85B の陽性反応はそれぞれのグループで陽性に出たが、有意差は見られなかった。日本など、BCG 接種が日常的に使用される国では、HBHA、ACR、Ag85A と Ag85B の診断ユーティリティは低いと考える。MDP-1 と MDP-1H37Rv によって我々は潜在性感染者と結核感染者を鑑別できた（**図４**）。

D. 考察

フィリピンでは近代以降の数百年間に、中

国人、日本人、スペイン人などがフィリピンと交流し、様々な結核菌型の輸入に影響を与えた可能性があると考える。しかし、ここで示した均一な菌の流布は結核がむしろ小さいコミュニティの中で伝染しているとも考えられる。またマニラの中心に居住する患者は古くからのフィリピン在住人である可能性が高い。
潜在性結核の休眠期で発現する MycobacterialDNA binding protein 1 (MDP1) は全細胞タンパク質の 7%の主要な細胞タンパク質である。我々の結果を踏まえて MDP-1 と MDP-1H37Rv 抗原は、潜在性結核感染の断に用いられことが期待される。
多数の北京型結核に感染している中国では、大部分の患者は北京型結核特有なタンパク質 Rv0679c Lys142 に対する免疫を生ぜるという推測が上海のサンプルの実験に示された。すなわち、45 人の中、24 人は Rv0679c Lys142 に対する高いレベルの IgG を検出した一方、4 人は Rv0679c Asn142 IgG を検出できなかった (図 2)。しかし、上海のサンプルの菌株を同定できず、Lys142 IgG で北京型結核を診断できるという直接の証拠は得られなかった。Rv0679c Asn142 と Lys142 両方に対する IgA 抗体を検出した。Rv0679c の抗体ではクラススイッチを生ずる可能がある。さらに、マウス抗体を用い Rv0679c を epitope mapping して、2 つの epitopes を発見した。つまり、Rv0679c Asn142 と Lys142 の共通 epitope である Rv0679c の 31-50 アミノ酸間の直線 epitope と Rv0679c Asn142Lys を含む conformational epitope である。ちなみに、人間でも Rv0679c IgA は共通 epitope を認識するばかりか、Rv0679c IgG は Asn142 と Lys142 それぞれ conformational epitope を識別できると期待される。そのうえ、Lys142 IgG は CRP に相関があるのは北京型結核感染が炎症を関連しやすくて、重症をもたらすと考えられた。

E. 結論

LAMP 法と spoligotyping 法は途上国の結核をさらに低価格で平易に monitoring できる方法である。診断法として使用することを我々は提案し、その導入の最終決定を得るため準備を進めている。

結核の発病をより効果的に防止するため潜在性結核感染者を同定することは必要だ。Screening された休眠期抗原の中 MDP-1 は潜在性結核感染の診断に用いられことは期待する。
北京型結核が流行する地域において、多数の患者は Rv0679c Lys142 IgG が検出された。そのような結果は北京型結核に感染するのに間に合うかどうか将来の実験に確かめなければならない。長い時間がかかる菌培養で北京型を spoligotype に診断する伝統な方法を避け、北京型の特徴なタンパク質に基づく簡易な実験方法の開発を続ける。

F. 健康危険報告

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakajima C, TamaruA, Rahim Z, Poudel A, Maharjan B, Aye K, Ling H, Hattori T, Iwamoto T, Fukushima Y, Suzuki H, Suzuki Y, and Matsuba T: A simple multiplexPCR for the identification of Beijing family of Mycobacteriumtuberculosis with a lineage-specific mutation in Rv0679c. J Clin Microbiol. Epub ahead 2013 Apr 17.

2. 学会発表

1. Shiratori,B., Leano, S., Zhao, J., Chagan-Yasutan, H., Niki, T., Hirashima, M., Telan, E.,and Hattori, T.: Increased production of galectin-9 in treatment naïve pulmonary TB patients in Metro Manila. NIH-Tohoku University-JSPS Symposium. Sendai, Japan. 9-11th May 2013.

2. Shiratori,B. and Hattori, T.: Immunological status of treatment-naïve sputum positive TB patients in Manila. The 1st meeting of Ministry of

Health, Labour and Welfare science research grants (Emerging and re-emerging infectious disease research project). Osaka, Japan. 5th July 2013.

3. Shiratori,B., Leano, S., Zhao, J., Chagan-Yasutan, H., Niki, T., Hirashima, M., Telan, E., and Hattori, T.: Immunological status of Treatment-Naïve Sputum Positive Pulmonary TB Patients in Metro Manila. US-JAPAN Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel. Sapporo, Japan. 17th August 2013.

4. Shiratori,B., Leano, S., Chagan-Yasutan, H., Niki, T., Okada, M., Nakajima C., Suzuki, Y., Telan, E.,and Hattori, T.: Molecular and immunological status of sputum positive TB in Philippines. 67th Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology. Tohoku Branch. Sendai, Japan. 30-31st August 2013.

5. Shiratori,B., Okumura, M., Yanai, H., Yoshiyama, T., Chagan-Yasutan, H., Tanaka, M., Matsumoto, M., and Hattori, T.: Attempt to distinguish between LTBI and active TB by latency-related antigens and biomarkers. The Third Bizan Immunology Symposium at The University of Tokushima (BISUT3) ''Immune System Development, Deviation, and Regulation''. Tokushima, Japan. 13-14th February 2014.

6. Shiratori,B., Hasibuan, FM., Senoputra、AM., Alisjahbana B., and Hattori, T.: Attempt to find novel biomarkers for LTBI diagnosis – Indonesia study.The 3rd Conference on Otsuka-Biotec Collaborative Research of the Strategic Japanese-Thailand Cooperative Programme ''Development of new diagnostic and drug for latent tuberculosis or non-replicating tuberculosis''. Tokushima, Japan. 15th February 2014.

7. Shiratori,B., Leano, S., Nakajima C., Chagan-Yasutan, H., Niki, T., Suzuki, Y., Telan, E.,and Hattori, T.: High levels of OPN, IP-10 and neurophilia in LAMP confirmed TB patients in Manila. 87th Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology. Tokyo, Japan. 26-28th March 2014.

その他

・ DVD教材

サハラ以南アフリカにおける感染症 -グローバル感染症入門-

【企画】厚生労働科学研究費補助金　地球規模保健課題推進事業

サハラ以南アフリカにおけるエイズ・結核研究ネットワーク構築に関する研究班

【原案監修】服部俊夫（東北大学　教授）

【学術協力】鈴木定彦（北海道大学　教授）

井戸栄治（東京医科歯科大学　特任教授）

松岡正典（国立感染症研究所　ハンセン病研究センター）

後藤正道（鹿児島大学鹿児島大学大学院医歯学総合研究科　国立療養所星塚敬愛園　園長）

圓純一郎（鹿児島大学鹿児島大学大学院医歯学総合研究科　国立療養所星塚敬愛園）

【企画協力】喜田宏（北海道大学　特任教授）

【制作】（株）医学映像教育センター

H. 知的財産権の出願･登録状況

出願番号：特願2013-046197

発明者：　大島吉輝　服部俊夫　他6名

発明の名称：　ジクチオピロン誘導体又はジヒドロジクチオピロン誘導体を有効成分とするオステオポンチン産

生阻害剤

出願人：　国立大学法人東北大学　国立大学法人群馬大学　扶桑薬品工業株式会社

出願日：　2013年3月8日

日本（大阪・神戸・西日本）における海外から輸入される結核の実態把握及び分子疫学的解析

研究分担者　下内　昭　結核研究所
研究協力者　小向　潤　大阪市保健所
松本健二　大阪市保健所

研究要旨

(1)大阪市における外国出生結核患者の発生動向

2008～2012 年に大阪市で新規登録された外国人（外国出生）結核患者を対象とした。外国人は、20 代に限ると 2008 年 13.6%から 2012 年 29.3%へと年々増加していた。性別は女性が約半数を占めており、2012 年 15 名（44.1%）であった。年齢の中央値は 2012 年 27.5 歳であり、ここ 3 年は大きな変化は見られなかった。出身国は、5 年間の合計では中国・韓国・ﾌｨﾘﾋﾟﾝの順に多かったが、特に近年韓国が減少し、中国の増加がみられた。また入国から 5 年未満で登録された者は約半数を占めていた。日本語学校生の割合は、2008 年には 12.1%であったが、2012 年には 23.5%を占めていた。これらの結果より外国人が入国後早期に在籍することが多いと思われる日本語学校への健診を強化することが重要である。

(2)日本語学校に在籍する外国人に対する結核健診

2013 年に日本語学校 16 校に在籍する外国出生者 2109 名に健診を実施した。日本出生および出身国不明であった 7 名をのぞく 2109 名の平均年齢は 23.2 歳であった。男性は 1186 名（56.2%）であり、20 代が 73.9%を占めていた。出身国は、中国 999 名（47.4%）、ベトナム 548 名（26.0%）、韓国 349 名（16.5%）、インドネシア 50 名（2.4%）、タイ 27 名（1.3%）、その他 136 名（6.4%）であった。最終的に活動性結核と診断された者は5名（0.2%）であった。5名の性別は、男性３名、女性２名であり、年齢は 20~25 歳であった。出身国は中国４名、ネパール１名であり、入国から健診受診までの期間は 41~108 日で４か月以内に受診していた。健診時の胸部Ｘ線で空洞を認める者はなく、すべて塗抹陰性であり、早期発見に寄与していると考えられた。

(3)外国出生結核患者由来菌株の VNTR 解析

外国出生患者由来結核菌株の VNTR 解析をすることにより、国内での伝播状況を考察した。2010年～2013 年に登録された外国出生結核患者のうち VNTR 解析を実施した 54 名と、40 歳未満の日本出生 216 名を比較した。VNTR 解析は、JATA12-VNTR を行い、完全一致した場合には HV4 領域を含む 12 追加領域を解析した。

年齢の中央値は、外国出生群 30.5 歳、日本出生群 31 歳、男女比はそれぞれ 1.8, 1.6 であった。外国出生群内で、追加領域を含む 24 領域すべて一致したものはなく、JATA12 一致かつ追加領域不一致は 15 例（27.8%）、JATA12 一致かつ追加領域不明は 1 例（1.9%）、JATA12 不一致は 38 例（70.4%）であった。一方、日本出生群内で追加領域を含む 24 領域すべて一致したのは 44 例（20.4%）、JATA12 一致かつ追加領域不一致は 43 例（19.9%）、JATA12 一致かつ追加領域不明は 37 例（17.1%）、JATA12 不一致は 92 例（42.6%）であった。外国出生群の型別一致率は日本出生群より有意に低く、 外国出生者と日本出生者との型別を比較したところ、追加領域を含む 24 領域すべて一致したのは 2 例（3.7%）であった。この 2 組は、①49 歳ﾌﾞﾗｼﾞﾙ出生者 1 名（入国 8 年）と 29 歳日本出生者 1 名、②64 歳ペルー出生者 1 名（入国 3 年）と 24 歳日本出生者 1 名であったが、疫学的なつながりはみいだせなかった。従って、外国人由来株が日本人由来株同様に国内で感染伝播しているとはいえなかった。

A. 研究目的

(1) 大阪市における外国出生結核患者の発生動向

2008 年以降に大阪市において登録された全結核患者に占める外国人（外国出生）の割合は、全年齢でみると 3%前後で大きな変化はみられなかったが、20 代に限ると 2008 年 13.6%から 2012 年 29.3%へと年々増加していた。外国人結核対策に資するため、大阪市において外国出生結核患者の発生動向を調査した。

(2) 日本語学校に在籍する外国出生者に対する結核健診

2013 年現在大阪市には 34 校の日本語学校があり、うち専修学校（健診義務あり）は 13 校、その他（健診義務なし）は 21 校であった。2011 年 4 月より、健診義務の対象となっていない者（専修学校以外の学校および専修学校のうち短期コースの者）に対する健診を実施している。

(3) 外国出生結核患者由来菌株の VNTR 解析

外国出生患者由来結核菌株の VNTR 解析をすることにより、国内での伝播状況を考察した。

B. 研究方法

(1) 大阪市における外国出生結核患者の発生動向

2008 年～2012 年に大阪市で新規登録された外国人（外国出生）結核患者の発生動向を調査した。性別・年齢・出身国・入国から結核登録までの期間・職業について分析した。

(2) 日本語学校に在籍する外国出生者に対する結核健診

2013 年に実施した日本語学校 16 校に所属する外国出生者への結核健診について、受診者の年齢・性別・出身国・健診結果・精密検査結果を分析した。最終的に活動性結核と診断された者のうち、大阪市において登録された者については、来日から健診受診までの期間・症状・結核既往・病型・菌情報などについて分析した。

(3) 外国出生結核患者由来菌株の VNTR 解析

2010 年～2013 年に登録された外国出生結核患者は 141 名であり、うち培養陽性は 74 名（52.5%）であった。そのうち VNTR 解析を実施した者は 54 名（73.0%）であった。対照として、2010 年～2013 年に登録された 40 歳未満の日本出生培養陽性結核患者 338 名の中で JATA12-VNTR を実施した 216 名（63.9%）と比較した。VNTR 解析は、JATA12-VNTR を行い、完全一致した場合には HV4 領域を含む 12 追加領域を解析した。

C. 結果

(1) 大阪市における外国出生結核患者の発生動向

外国人患者は、2008 年の 33 名以降毎年 30 名余りで推移しており、2012 年は 34 名であった。性別は女性が約半数を占めており、2012 年 15 名（44.1%）であった。年齢の中央値は、2008 年 33.0 歳から 2012 年 27.5 歳へと推移していた。出身国を見ると、2008 年は中国 10 名(30.3%)、韓国 9 名(21.2%)、次いでﾌｨﾘﾋﾟﾝ、タイがともに 3 名（9.1%）であった。その後中国の割合が増え、韓国の割合が減少し、2012 年には中国が 19 名（56.3%）を占め、韓国は 2 名（6.3%）まで減少した。また入国から登録までの期間は、1 年未満が 43 名（25.1%）、1~4 年が 48 名（28.1%）であった。日本語学校に所属していた者の割合は、2008 年 4 名（12.1%）から 2012 年 8 名（23.5%）へと増加傾向にあった。

(2) 日本語学校に在籍する外国出生者に対する結核健診

日本語学校 16 校に在籍する外国出生者 2109 名に健診を実施した。日本出生および出身国不明であった 7 名をのぞく 2109 名の平均年齢は 23.2±4.5 歳、14～70 歳であった。男性は 1186 名（56.2%）であり、20 代が 73.9%を占めていた。出身国は、中国 999 名（47.4%）、ベトナム 548 名（26.0%）、韓国 349 名（16.5%）、インドネシア 50 名（2.4%）、タイ 27 名（1.3%）、その他 136 名（6.4%）であった。複数回受診者 274 名

を除く 1835 名のうち、不明 586 名を除く 1249 名の入国から健診受診日までの平均日数は 116.9±143.3 日、中央値 53(3-1655) 日であった。健診の結果、結核が疑われた者は 24 名 (1.1%) であった。精密検査の結果、最終的に活動性結核と診断された者は 5 名 (0.2%) であった。5 名の性別は、男性 3 名、女性 2 名であり、年齢は 20~25 歳であった。出身国は中国 4 名、ネパール 1 名であり、入国から健診受診までの期間は 41~108 日で 4 か月以内に受診していた。健診時の胸部 X 線で空洞を認める者はなく、4 名が塗抹培養とも陰性、1 名は塗抹陰性で培養結果は不明であった。

(3) 外国出生結核患者由来菌株の VNTR 解析

平均年齢は、外国出生群 37.1±18.7 歳、日本出生群 29.8±6.8 歳、年齢の中央値はそれぞれ 30.5、31 歳であった。男女比はそれぞれ 1.8、1.6 であった。外国出生群内で、追加領域を含む 24 領域すべて一致したものはなく、JATA12 一致かつ追加領域不一致は 15 例 (27.8%)、JATA12 一致かつ追加領域不明は 1 例 (1.9%)、JATA12 不一致は 38 例 (70.4%) であった。一方、日本出生群内で追加領域を含む 24 領域すべて一致したのは 44 例 (20.4%)、JATA12 一致かつ追加領域不一致は 43 例 (19.9%)、JATA12 一致かつ追加領域不明は 37 例 (17.1%)、JATA12 不一致は 92 例 (42.6%) であった。

外国出生者と日本出生者との型別を比較したところ、追加領域を含む 24 領域すべて一致したのは 2 例 (3.7%)、JATA12 一致かつ追加領域不一致は 12 例 (22.2%)、JATA12 一致かつ追加領域不明は 2 例 (3.7%)、JATA12 不一致は 38 例 (70.4%) であった。24 領域が一致した 2 組は、①49 歳ﾌﾞﾗｼﾞﾙ出生者 1 名 (入国 8 年) と 29 歳日本出生者 1 名、②64 歳ペルー出生者 1 名 (入国 3 年) と 24 歳日本出生者 1 名であった。

D. 考察

(1) 大阪市における外国出生結核患者の発生動向

全結核患者に占める外国人結核患者の割合は年々増加しており、特に 20 代で外国人の占める割合が高く、2012 年には 29.3%に達していた。年齢の中央値は 2012 年 27.5 歳であり、ここ 3 年は大きな変化は見られなかった。出身国は、5 年間の合計では中国・韓国・ﾌｨﾘﾋﾟﾝの順に多かったが、特に近年韓国が減少し、中国の増加がみられた。また入国から 5 年未満で登録された者は約半数を占めていた。日本語学校生の割合は、2008 年には 12.1%であったが、2012 年には 23.5%を占めていた。これらの結果より外国人が入国後早期に在籍することが多いと思われる日本語学校への健診を強化することが重要である。

(2) 日本語学校に在籍する外国出生者に対する結核健診

2013 年の日本語学校健診受診者の平均年齢は 23.2 歳と若く、入国から健診までの中央値は 53 日であった。最終的に活動性結核であった者は 5 名 (0.2%) であり、健診時胸部 X 線で有空洞例はなく、すべて塗抹陰性であり、早期発見に寄与していると考えられた。

(3) 外国出生結核患者由来菌株の VNTR 解析

外国出生者内で 24 領域一致したものは 1 例もなかったが、日本出生者内では 44 例 (20.4%) と日本出生のほうが有意に高かった。日本出生と外国出生で 24 領域が一致していたのは 2 組 4 名であったが、疫学的なつながりは見いだせなかったため、外国人由来株が日本人由来株同様に国内で感染伝播しているとはいえなかった。

E. 結論

(1) 大阪市における外国出生結核患者の発生動向

全結核患者に占める外国人結核患者の割合は年々増加しており、特に 20 代で外国人の占める割合が高かった。職業では学生、特に日本語学校在籍している者が増加してきており、外国人が入国後早期に在籍することが多いと思われる日本語学校への健診を強化することが重要である。

(2) 日本語学校に在籍する外国出生者に対す

る結核健診

2013 年に日本語学校に在籍する外国出生者に健診を行ったところ、5 名（0.2%）の結核患者を発見し、すべて塗抹陰性で早期発見することができた。これらの対象に対して継続して健診を実施していくことが肝要である。

(3) 外国出生結核患者由来菌株のVNTR解析

日本出生と外国出生で 24 領域が一致していたのは 2 組 4 名であったが、疫学的なつながりは見いだせなかったため、外国人由来株が日本人由来株同様に国内で感染伝播しているとはいえなかった。

難治性結核の分子疫学解析
(Molecular epidemiology study on recurrence TB in Thailand and Japan)

研究分担者　野内英樹　公益財団法人結核予防会複十字病院臨床検査部臨床検査診断科長

研究要旨
複十字病院とタイ・チェンライ県において、難治性結核患者（多剤耐性・再発・治療失敗例）の検体バンクとコホート研究を実施している。得られた疫学情報、臨床情報、細菌学的情報と共に、血液サンプルを活用して、結核の感染・発病と治療転帰のモデルに基づき、難治化していない新規の結核患者、及び結核症を発症していない正常人と比較する事により、多角的に難治化に関する因子の同定を進めている。国際的に結核菌の lineages 分類法として標準化された The large sequence polymorphism (LSP)と regions of deletions (RD)を活用した LSP/RD 解析法では、EAI 株が 524 人から 531 株(39.8%)、非 EAI 株として、北京株が 591 人より 595 例(44.6%)、Euro-American 株が 184 人より 187 株(14.0%)、CAS 株が 11 人より 11 株（0.83%)、その他 9 人より 9 株(0.68%)であった。この結核患者 1319 人での 1 年間での死亡に関しての危険因子を見たところ、Cox-Proportional ハザード比モデルによる単回帰解析で、EAI 株による結核患者が非 EAI 株による患者よりハザード比で 2.7 倍 1 年死亡の危険が高かった。EAI 株は死亡率が高い事が多い年齢が高い群で比率が大きいので、年齢や HIV 感染状況、体重など死亡に影響する因子による交絡を多変量回帰で調整したが、調整ハザード比は 1.75 で菌株の種類の影響が独立して存在する事が示された。

A．研究目的

多剤耐性結核、難治性結核患者の前向きコホートを含めた人と菌の検体バンクを活用し、日本への伝播も検討した疫学研究を目的とした。

岡田班本体「海外から輸入される多剤耐性結核に関する研究(H23-新興--一般-002)」が掲げる①海外から輸入される多剤耐性結核の分子疫学的解析、②HIV 合併の把握、③多剤耐性結核の診断・治療の対応し、タイ NIH という日本が建設してアジアの中心研究機関に育ててるネットワークを活用する。前岡田班時代より進めている多剤耐性結核を含む難治性結核(再発、治療失敗、慢性拝菌例)患者の正常治癒例と比較した検体バンクとコホートを、日本には少ない HIV 感染毎の情報も持ちながら補強し、前記の研究目的の為の疫学研究を遂行した。

B．研究方法

結核の感染・発病と治療転帰のモデルに基づき、難治性の結核患者(再発例、治療失敗例、慢性排菌例等)の要因に関して研究を継続している。

(1)難治性結核患者（多剤耐性・再発・治療失敗例）の検体バンクとコホート研究を前回の岡田班より継続している。(1)の群に関しては、菌側のタイピングを活用して、厳格に内因性の再燃と外来性再感染を区別している。(2)結核治療に反応が良く再発をしなかった群、(3) 結核に罹患していない正常人のコントロール群を設定し、比較の対象としている。ケース・コントロール研究の形態にて、(1)と(2)の比較により結核症の難治に関しての種々の要因検討、(3)と結核症群(1-2)の比較により結核自体の発症に関連する様々な疫学的因子の検討を進めている。

日本においては、公益財団法人(公財)結核予防会・複十字病院臨床検査部にて、タイ国においては、結核予防会・結核研究所とタイ保健省の共同プロジェクトが設立母体となり、現在はタイ NIH 等とコンソーシアムを組んで運営しているタイ国チェンライ県の

結核研究フィールドに参画して、検体バンクと臨床データ管理を実施している。

複十字病院は厚生労働省より 2011 年 5 月に独立行政法人(独)国立病院機構・近畿中央胸部疾患センターと共に日本で 2 ヵ所の結核医療の「高度専門施設」に指定されて先駆的役割を期待されている。抗結核薬開発と共に抗酸菌診断法の研究開発の参加依頼が来る。複十字病院は数多く多剤耐性結核症例が多く紹介されるので、多剤耐性結核が少なく再発、治療失敗、慢性排菌例を含めて難治性結核として症例数を増加させて研究する必要があるタイと異なり、多剤耐性結核を単独で検討できる。

（倫理面への配慮）

日本においては、臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年厚生労働省告示第 415 号)、疫学研究に関する倫理指針（平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号)、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）に従っている。

これらの検体収集は既に倫理委員会の承認(日本は、複十字病院倫理委員会を 2010 年 10 月 18 日、(独)理化学研究所横浜研究所研究倫理委員会を 2011 年 2 月 15 日、東京大学ヒトゲノム・遺伝子研究倫理審査委員会を 2011 年 2 月 21 日承認済みである。

タイ国側については、タイ保健省倫理委員会の定める倫理規定に沿って研究を実施している。参加研究者全員の合意を得た研究プロトコールを作成し、タイ国保健省倫理委員会に 2012 年 12 月 21 日に再度承認を得た。

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

C．研究結果

公益財団法人結核予防会複十字病院は 10 年以上の菌体を保持しており、また文部科学省オーダーメイド医療実現化プロジェクトに 2003 年開始の第一期より参加協力している。検査残余検体を活用した難治性要因研究は、2014 年 3 月現在 380 名より同意が得られている。再発 31 例、治療失敗 13 例、治療中断後再治療 3 例、多剤耐性 37 例(外国居住歴 16 例)の難治性結核症例がある。外国に関連ある結核患者での多剤耐性率はない患者に比し有意に高い。2013 年は実数でも外国関連のない日本人と同一になっている。事例としては、フィリピンでスラムのボランティアをした高校生の一次 MDR 症例も入院している。

国際的に結核菌の lineages 分類法として標準化された The large sequence polymorphism (LSP)と regions of deletions (RD)を活用した LSP/RD 解析法では、EAI 株が 524 人から 531 株(39.8%）、非 EAI 株として、北京株が 591 人より 595 例（44.6%)、Euro-American 株が 184 人より 187 株(14.0%)、CAS 株が 11 人より 11 株(0.83%)、その他 9 人より 9 株(0.68%)であった。

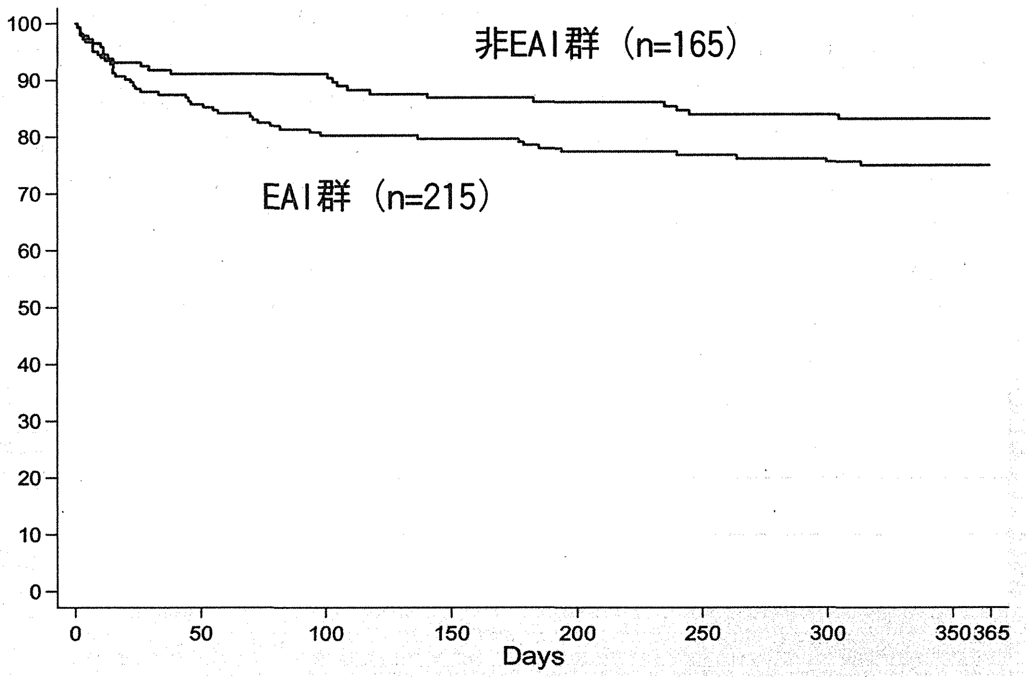
表 1 に、この結核患者 1319 人での 1 年間での死亡に関しての危険因子を示す。Cox-Proportional ハザード比モデルによる単回帰解析で、EAI 株による結核患者が非 EAI 株による患者よりハザード比で 2.7 倍 1 年死亡の危険が高かった。EAI 株は死亡率が高い事が多い年齢が高い群で比率が大きいので、年齢や HIV 感染状況、体重など死亡に影響する因子による交絡を多変量回帰で調整しても、調整ハザード比は 1.75 で菌株の種類の影響が独立して存在する事が示された。

図 1 に EAI 株の比率が高い 55 歳以上の HIV 陰性(希に不明)の結核患者での 1 年生存のカプラン・マイヤー法生存曲線を示す。こ

表1 結核患者1,319名の1年死亡危険因子(多変量回帰)

Factor	Category	Hazard ratio	P-value	Adjusted Hazard ratio	P-value
菌分類	非EAI株	Reference		Reference	
	EAI株	2.74 (1.95-3.86)	<0.001	1.75 (1.23-2.48)	*0.002*
Gender	Female	Reference		Reference	
	Male	1.20 (0.83-1.74)	0.335	1.21 (0.82-1.79)	0.327
Age group	0-34	Reference		Reference	
	35-49	1.5 (0.9-2.49)	0.118	1.6 (0.96-2.65)	0.07
	50-64	1.52 (0.87-2.65)	0.139	2.83 (1.55-5.18)	*0.001*
	65+	4.47 (2.75-7.27)	*<0.001*	6.95 (3.88-12.45)	*<0.001*
HIV status	Negative	Reference		Reference	
	Positive	2.47 (1.73-3.53)	*<0.001*	5.00 (3.22-7.77)	*<0.001*
	Unknown	1.23 (0.3-5)	0.772	(*Negative + unknown)	
Body Weight	>60	Reference		Reference (*combine 50-60,60+)	
	50-60	1.19 (0.49-2.89)	0.702		
	40-49	1.32 (0.56-3.12)	0.532	1.1 (0.69-1.76)	0.689
	<40	2.53 (1.05-6.08)	*0.038*	1.76 (1.05-2.96)	*0.033*
	Missing	3.51 (1.49-8.28)	*0.004*	2.43 (1.53-3.86)	*<0.001*

図1. EAI群と非EAI群の結核患者の治療開始1年間の生存曲線①
(55歳以上、HIV陰性または不明)



の群でもEAI株の比率が低い55未満の群でも有意の差で死亡率の差が認められている。

D．考察

菌体分類が年齢や薬剤耐性の頻度と共に予後と関連している可能性が示唆された。タイで、今回の結核菌LSP/RD分析はSpoligotypingで確認さてるが、別プロジェクトでするSNP解析や次世代シークエ　ンサー解析でも確認し比較 する事が望まれる。臨床情報を活用し、北京 Ancientと北京Modernも含む比較を非EAI株内部の違いを検討する必要がある。日本において、タイと同様に難治性結核の経時的な部分を含めた菌体の分子疫学解析が期待される。

複十字病院での多剤耐性結核患者で外国との関連が強くあり、日本の輸入感染症としての結核対策と関連し、諸外国で認められる多剤耐性結核を含む難治性結核の菌が日本への伝播していると考えられる。タイ国を含めて菌体の分子疫学解析により理由を検討すべきである。菌体と宿主要因のそれぞれと相互作用の研究を症例数が大きく必要であり、日本での研究基盤が輸入感染症の検討という観点でも必要である。臨床疫学因子、細菌学的因子、免疫遺伝学的因子を測定し、それらの因子の難治化に及ぼす影響を相互作用も含めて定量化する。

複十字病院では10年以上の菌体を保持しており、また文部科学省オーダーメイド医療プロジェクトに協力してヒト検体も収集してきた。今回、倫理委員会の承認を得て、検査残余検体を活用した菌と人の検体バンクによる結核研究を継続している。タイ国も同様に菌と人検体を臨床データと共に長期に保存しており、並行した菌体バンクを活用して伝播の検討や比較検討などの相乗効果が期待される。

E．結論

北タイ・チェンライ県において、HIV感染状況毎に難治性結核患者（多剤耐性・再発・治療失敗例）の検体バンク・コホート研究を実施し、類似した研究を複十字病院で進めた。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1．論文発表

1．Sukkasem S, Yanai H, Mahasirimongkol S, Yamada N, Rienthong D, Palittapongarnpim P, Khusmith S. Drug resistance and IS6110-RFLP patterns of Mycobacterium tuberculosis from recurrent tuberculosis patients in northern Thailand. Microbiology and Immunology 2013 Jan;57(1):21-29. doi: 10.1111/1348-0421.12000.

2．奥村昌夫、佐藤厚子、吉山崇、野内英樹、伊麗娜、工藤翔二、尾形英雄：当院職員の職場、職種別に分けて比較したQFT検査の検討．結核、2013、Apr;88(4): 405-409

2．学会発表

1．野内英樹、Surakameth Mahasirimongkol、岩淵英子、吉森浩三、吉山崇、Supalert Nedsuwan、Boonchai Chaiyasirinrije、奥村昌夫、尾形英雄、山田紀男、Pathom Sawanpanyalert、莚田泰誠、德永勝士、工藤翔二：宿主と菌のゲノム情報の統合的活用による結核研究を基礎医学研究者と進めるためのコホート基盤形成．第24回日本疫学会学術総会(演題番号P2-061)、仙台、2014年1月25日

2．野内英樹、出井禎：結核菌特異的インターフェロンγ産生能をみるクォンティフェロンTB検査精度管理の為の研究とマニュアル作成．第60回日本臨床検査医学会学術集会(一般口頭演題、感染症③、演題番号O-131)、2013年11月1日、神戸国際会議場

H．知的財産権の出願・登録状況

1．特許取得

2．実用新案登録

3．その他

該当なし

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　公益財団法人結核予防会結核研究所 生体防御部長
土方美奈子　同 病理科長
松下育美　同 免疫科研究員

研究要旨
ベトナム南部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共同で、多剤耐性結核の発生に関わる宿主側の要因を明らかにすべく、断面研究を実施した。58名の多剤耐性結核患者について、近年、結核感受性遺伝子の候補の一つとして注目され、機能的には細胞内シグナルに対して負の制御を行う脱リン酸化酵素である dual specificity phosphatase 14 遺伝子(*DUSP14*) の遺伝子多型と免疫関連遺伝子発現に関する検討を行った。*DUSP14* イントロン1に局在する C/T SNP (rs712039)の C アリルは *DUSP14 の遺伝子*高発現型として知られているが、治療中の多剤耐性結核患者全血を用いた検討では、その C アリル数（0、1、2）に依存して血液細胞由来の *TNF* 遺伝子発現量が低くなる傾向がみられた。しかし、C アリル数は *DUSP14* 遺伝子発現量自体とは有意な関連を示さなかった。さらに *DUSP14* プロモーター領域に位置する C/G SNP と上記 rs712039 SNP により生成される3つのハプロタイプのうち遺伝子高発現型と推定される H2 ハプロタイプ数（0、1、2）に依存して、全血中の IL12 レセプターγ1 mRNA など Th1 系免疫関連遺伝子の発現量が低くなる傾向が認められた。免疫炎症制御に関連して注目される DUSP14 の遺伝子多型が、トランスの作用を通じて結核免疫にも関連している可能性が示された。

A. 研究目的

わが国に居住している外国人のうち、アジア系の集団は70%以上を占めることが知られている。このためアジア人の結核対策は外国人結核対策の主要部分を占める。さらに日本人の結核発症者の中で多剤耐性結核の占める割合は低いが、アジアを含む発展途上国では、治療歴のない患者でも数%以上の頻度で多剤耐性結核が認められるのが通例であり、今後、外国人結核対策がわが国の多剤耐性結核対策の主要な部分を占めるようになるのではないかと懸念されている。

このような背景のもと、アジア人における多剤耐性結核の発症素因を明らかにすることは、わが国を含むアジア地域全体の結核対策に貢献するものと期待される。

これまで我々は東南アジア諸国において結核に関する国際共同研究をおこなってきた。多剤耐性結核の発生は、不適切な治療により、結核菌ゲノムの中の薬剤効果に関連する遺伝子変異を有する菌が選択的に増殖することが重要とされており、結核医療に関わる人為的要因や制度が一義的な課題であるが、その背景となる宿主側の免疫応答、薬剤代謝能なども発生に関与しているものと推測される。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ことを目的としている。

このような試みの一つとして、最近、血液細胞のトランスクリプトーム解析により得られる遺伝子発現プロファイルから、結核における発現シグネチャーを明らかにして病態解明へつなげる研究が行われており、いくつかの網羅的解析の報告が出ている。

2011年に Barreiro らは、健康成人65人から単球由来樹状細胞を誘導し、全ゲノムジェノタイピングと *in vitro* 結核菌暴露による宿主遺伝子発現変化のトランスクリプトーム解析とを行い、その結果198個の有意な量的形質座位 expression quantitative trait

locus (eQTL)を見いだした。さらに、ガーナおよびガンビアの2,237肺結核患者と3,122コントロールサンプルを用いたgenome-wide association study（GWAS）データの再解析を行い、その結果、*DUSP14* (dual specificity phosphatase 14)のSNP rs712039が結核患者集団と最も有意な関連を示すことを報告した（$P_{GWAS} = 3.30 \times 10^{-6}$; Barreiro LB, *et al.* PNAS 109:1204-9, 2012)。

*DUSP14*は二重特異性タンパク脱リン酸化酵素（DUSP)ファミリーに属し、リン酸化により活性型となったMAPキナーゼ(MAPK)のリン酸化セリン/スレオニンとリン酸化チロシンをともに脱リン酸化し、MAPKを不活性化状態に戻す、ネガティブ・フィードバックの働きを有しており、サイトカインの発現量を調節するなど、重要な免疫炎症制御の役割を担っていると考えられている。Barreiroらは実際に*in vitro*で*DUSP14*の機能的SNPであるrs712039と主要な免疫系サイトカインであるTNF-αおよびIFN-γの産生量が有意に関連している(トランスに働いている)ことを報告している。

我々は、regulatory SNPにより規定される*DUSP14*の発現量の違いが結核免疫の個体差、さらに多剤耐性結核の病態に関与している可能性を考え、多剤耐性結核患者の血液中で、SNP rs712039、あるいは同価のSNPがシスに働き、*DUSP14*の遺伝子発現量を調節していること、また同SNPがトランスに働き、免疫関連分子や炎症性サイトカイン の発現量を制御しているか否かを検討した。

B. 研究方法

ベトナム南部のホーチミン市にあるファムゴックタック病院は、ベトナム国内南北2カ所の薬剤感受性検査を実施する結核レファランスセンターのうちベトナム南部の結核対策の責任病院である。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ことを目的として研究を実施している。エントリー基準は、薬剤感受性試験で多剤耐性結核（INH, RFP耐性）と診断された18歳以上70歳までの患者で、18か月の治療観察期間を完遂できる見通しがあり、書面同意を得たものとし、HIV陽性、悪性腫瘍、免疫抑制剤の使用者を除外した。外来通院中の多剤耐性結核患者58名から血液サンプルを収集し、EDTA添加血より血漿（血中タンパク濃度測定用）および血球(ゲノムDNA抽出用)を得た。またRNA安定化剤を付加して凍結した全血よりtotal RNAを抽出した。

多剤耐性結核患者58名のゲノムDNAからPCRにて*DUSP14*遺伝子のプロモーター領域、エクソン領域を増幅し、ダイレクトシーケンスにより遺伝子配列を決定した。見いだされた遺伝的多型間の連鎖不平衡構造解析を行った。

全血より抽出したtotal RNAを用い、*DUSP14*遺伝子および免疫関連分子(*GNLY, PRF1, GZMB, STAT1, STAT4, STAT6, CXCL10, IFNG, IFNGR1, IFNGR2, IL12RB1, IL12RB2, IL12A, SPP1, IL10, TGFB1, IL23A, TNF, LTA, IL15, IL18, FOXP3, TBX21, GATA3, HIF1A, IL4, IL4d2, RORC, IL2*)のmRNA発現量を、TaqMan Gene Expression Assaysを用いた定量的RT−PCR解析系にて測定した(n=48)。

（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・遺伝子解析研究に関する倫理指針）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

ベトナム人58名のプロモーターおよびエクソン領域のシーケンス解析で、15カ所の部位で塩基の違いが認められた。HapMapのアジア人(中国人および日本人)のデータから、*DUSP14*遺伝子領域はひとつの連鎖不平衡ブロック内にあったが、ベトナム人においても見いだされた多型の解析から同様の結果が得られ、Barreiroらの報告した*DUSP14*のイントロン1内に存在するrs712039 SNPは、プロモーター領域にあるrs853196およびrs853197、エクソン2の5'UTR内

図1 *DUSP14* SNP(rs712039)の遺伝子型と全血球細胞の*TNF*、*DUSP14*遺伝子発現

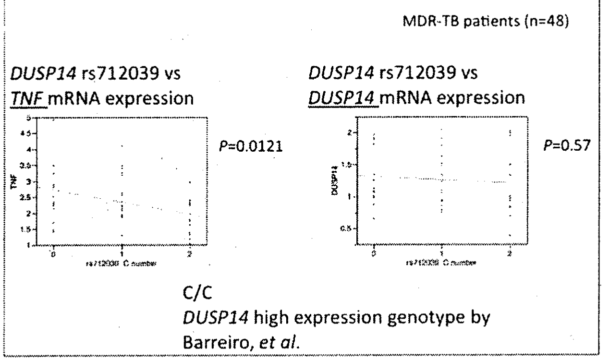
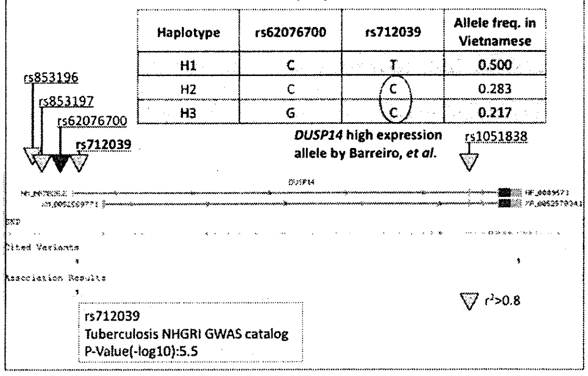


図2 *DUSP14*のプロモーターSNPを含むハプロタイプ



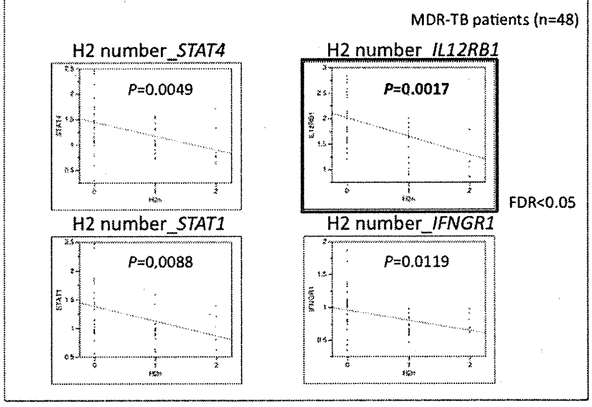
rs1051838と完全な連鎖不平衡状態にあることが明らかになった。

全血より抽出したtotal RNAから定量的RT/PCRにより、*DUSP14*のmRNA発現量と上記遺伝子配列解析で得られた各遺伝的多型との関連を検討したが、有意でなかった(P=0.57)［**図1右**］。一方、全血球細胞の*TNF*遺伝子発現量は、Barreiroらによるrs712039の*DUSP14*高発現アリルとして知られるCの数に依存して低くなる傾向がみられた（P=0.0121）［**図1左**］。

*DUSP14*遺伝子プロモーター領域にあるC/G SNP rs62076700とrs712039によって3ハプロタイプH1, H2, H3の存在が推定された［**図2**］。

このうち、高発現型と予想されるH2に依存して、全血中の*IL12RB1* mRNA発現が有意に低くなった（FDR<0.05）。他のいくつかのTh1系免疫関連遺伝子のmRNA発現量でも同様の傾向がみられたが、多重比較を考慮すると有意差には至らなかった［**図3**］。既報と同様にベトナムにおいても、*DUSP14*遺伝子多型頻度が結核症と関連（疾患感受性）を示すか否かについて現在検討中である。

図3 *DUSP14*ハプロタイプH2と全血球細胞のTh1系免疫関連遺伝子発現



D. 考察

DUSP14は、T細胞が刺激された時、早期に発現誘導され、CD28と相互作用し、MAPKを不活化して副刺激分子からのシグナルを抑制する分子MKP6 (MAP kinase phosphatase-6)として見いだされた（Marti F, *et al.* J Immunol 166:197-206, 2001)。しかしながら、他のDUSPファミリーと比べてDUSP14に関する知見はまだ少なく、その発現や役割に関しては不明な点が多い。

Barreiroらは、健康成人末梢血から誘導した単球由来樹状細胞（非刺激時）において、*DUSP14* rs712039の遺伝子型と*DUSP14* mRNA発現量が関連することを見いだして報告したが、結核菌暴露後の同細胞では有意差がみられていない。我々の多剤耐性結核患者の全血由来のtotal RNAからの検討では、遺伝子型とmRNA発現量に有意な関連がみられず、それぞれの細胞での、感染時の*DUSP14*の発現についてはさらに検討が必要である。

一方、今回の我々の結果から、*DUSP14*の遺伝的多型のハプロタイプとTh1系免疫関連遺伝子である*IL12RB1* mRNA発現量には有意な関連がみられており、*DUSP14*遺伝的多型によってTh1系免疫関連遺伝子発現がトランスに影響を受けているのではないかと

推測される。また、既報の rs712039 SNP 単独の効果より、プロモーター領域の SNP を含めたハプロタイプの方が、遺伝子発現とより強く関連する可能性が示唆されたため、プロモーター領域の SNP の機能的意義が注目される。

今回の結果から、*DUSP14* の低発現型が Th1 応答の増強を通じ、結核の発病や病態において宿主に有利に働く可能性があると考えられた。最近、DUSP14 が TAK1(TGF-β-activated kinase 1)の脱リン酸化により、TNF-α と IL-1β による NF-κB の活性化を阻害することが明らかにされ(Zheng H, *et al.* JBC288:819-825, 2013)、DUSP14 の持つ機能が注目されている。多剤耐性結核患者において、DUSP14 による Th1 応答や炎症性サイトカイン反応の制御がどのように病態に影響するか等については、今回の検討では症例数が少ないため、今後、より大規模な研究で検討する必要がある。

E. 結論

免疫炎症制御に関連する脱リン酸化酵素として注目される DUSP14 の遺伝子多型がトランスの作用を通じて結核免疫にも関連する可能性が示された。

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、今後、日本人の結核罹患率の低下に伴い、相対的にアジア人の多剤耐性結核対策の重要度が増していくものと推測される。臨床疫学情報、宿主側の発症素因をとらえ、多剤耐性結対策に貢献すべく研究を進めたい。

F. 研究発表

1．論文発表

1．Hang NTL, Maeda S, Lien LT, Thuong PH, Hung NV, Thuy TB, Nanri A, Mizoue T, Hoang NP, Cuong VC, Ngoc KTT, Sakurada S, Endo H, Keicho N. Primary drug-resistant tuberculosis in Hanoi, Viet Nam: present status and risk factors. PLoS One 8 (8): e71867, 2013.

2．Hung NV, Ando H, Thuy TT, Kuwahara T, Hang NT, Sakurada S, Thuong PH, Lien LT, Keicho N. Clonal expansion of Mycobacterium tuberculosis isolates and coexisting drug resistance in patients newly diagnosed with pulmonary tuberculosis in Hanoi, Vietnam. BMC Res Notes 6: 444, 2013.

3．Pitabut N, Sakurada S, Tanaka T, Ridruechai C, Tanuma J, Aoki T, Kantipong P, Piyaworawong S, Kobayashi N, Dhepakson P, Yanai H, Yamada N, Oka S, Okada M, Khusmith S, Keicho N. Potential function of granulysin, other related effector molecules and lymphocyte subsets in patients with TB and HIV/TB coinfection. Int J Med Sci 10 (8): 1003-1014, 2013.

2．学会発表

1．Hang NTL, Hijikata M, Sakurada S, Tam DB, Ngoc PTM, Thuong PH, Cuong VC, Lien LT, Keicho N. Latent tuberculosis infection assessed by interferon-gamma release assay and mRNA expression levels of immune-related genes.
In: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2014, January 20-22, Sendai, Japan, 2014.

2．Hang NTL, Maeda S, Thuong PH, Hoang NP, Hung NV, Cuong VC, Hijikata M, Sakurada S, Lien LT, Keicho N. Sublineages of Mycobacterium tuberculosis and unfavorable outcomes of anti-tuberculosis treatment.
In: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2014, January 20-22, Sendai,

Japan, 2014.

3. Hijikata M, Matsushita I, Hang NTL, Thuong PH, Sakurada S, Cuong VC, Lien LT, Keicho N. Dual-specificity phosphatase 14 gene polymorphism in Vietnamese patients with pulmonary tuberculosis. In: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2014, January 20-22, Sendai, Japan, 2014.

4. Pitabut N, Sakurada S, Tanaka T, Dhepakson P, Yanai H, Yamada N, Okada M, Khusmith S, Keicho N. Potential function of granulysin, perforin, IFN-gamma and lymphocyte subsets in patients with Tb and HIV/Tb coinfection. In: 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology, November 11-14, Yokohama, Japan, 2013.

5. Sakurada S, Thuong PH, Ngoc PTM, Hang NTL, Tam DB, Hong LT, Cuong VC, Tanaka T, Lien LT, Keicho N. Granulysin in HIV/TB coinfection and latent TB infection. In: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, Jan 23-24, 2013, Tokyo, Japan, 2013.

6. Tanaka T, Sakurada S, Takakura M, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, Kobayashi N, Keicho N. A biomarker study of tuberculosis by two-dimensional image-converted analysis of liquid chromatography and mass spectrometry. In: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, Jan 23-24, 2013, Tokyo, Japan, 2013.

7. Thuong PH, Tam DB, Sakurada S, Hang NTL, Hong LT, Hijikata M, Ngoc PTM, Cuong VC, Lien LT, Keicho N. Latent tuberculosis infection assessed by interferon-gamma release assay and circulating granulysin levels. In: 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology, November 11-14, Yokohama, Japan, 2013.

G. 知的財産権の出願・登録状況

海外から輸入される多剤耐性結核に関する研究

研究分担者　櫻田紳策　国立国際医療研究センター国際医療協力局専門職

研究要旨

M-CSF によって単球より分化した活性型マクロファージ M-Mϕ において、培養液中の十分な濃度の活性型ビタミン D_3 25(OH)D_3 の存在下で CYP27B1、VDR、cathelicidin 遺伝子の発現が増幅されることが示された。さらに、結核菌（H37Rv）殺菌後の培養液上清中の殺菌活性に関与している可能性がある dermicidin 遺伝子の発現への関与について検討した。

A. 研究目的

活性型マクロファージ（M-Mϕ）における活性型ビタミン D_3 関連遺伝子発現について確認を行うとともに、活性型ビタミン D_3 の存在とは無関係に H37Rv 殺菌後に培養上清に現れる dermicidin について検討を行う。活性型マクロファージによる結核菌殺菌のエフェクター分子が同定され、そのような分子の産生に関わる因子が同定されることによって、結核菌感染初期の封じ込めのメカニズムが明らかとなり、結核の診断及び治療に対して資するところがある。

B. 研究方法

① 健常者の末梢血から単球を分離し、M-CSF および GM-CSF 存在下にそれぞれ分化したマクロファージを得る。濃度を振った 25(OH)D_3 または同時に IFN-γ (100ng/ml)を培養上清に加えて BCG (MOI=3-5)を感染させ、0、3、6、12 と 24 時間後に全 RNA を抽出する。Real-time PCR にて CYP27B1、CYP24、IL-15、vitamin D receptor、cathelicidin の遺伝子発現を検出する。

② 健常者の末梢血から単球を分離し、M-CSF 存在下に分化した活性型マクロファージを得る。MOI=30 で H37Rv をマクロファージに感染させ、3 日後の培養上清を濾過滅菌し、Differential Solubilization 法による血漿低分子抽出を行い、ペプチドーム解析を実施した。解析結果から、抗菌活性の高い分画に含まれていた dermidicin に着目した。

③ 実験に使用したヒト血液は分担研究者自身の自己血である。患者材料は用いていない。従って、本研究においてはとくに倫理上の問題はないと考えられる。

C. 研究結果

① 活性型マクロファージの一種と考えられる M-Mϕ においては活性型ビタミン D_3 による活性化メカニズムが働いていることが明らかとなった。すなわち、培養液中の十分な濃度の 25(OH)D_3 の存在下において CYP27B1、VDR、cathelicidin 遺伝子の発現が増幅されることが示された。また、IFN-γ は CYP27B1 の発現のみを増幅した。BCG 感染後一方、GM-CSF 存在下に分化した GM-Mϕ は抗原呈示細胞としての性格を示し、抗結核菌活性を示さないが、活性型ビタミン D_3 による活性化メカニズムは働いていないと考えられた。ただし、IFN-γ による IL-15 の誘導は双方のマクロファージにおいて認められた。

② 結核菌感染 M-Mϕ における dermicidin 遺伝子発現の確認と活性型ビタミン $D_3$25(OH)D_3 の dermicidin 発現への効果の検討は、現在検討しているところである。

D. 考察

M-Mϕ においては、高濃度の 25(OH)D_3 の存在による関連遺伝子の発現増幅と IFN-γ

によるIL-15の誘導は確認された。一方GM-Mφにおいては、対照的に発現増幅は認められず、活性型ビタミンD_3による活性化に対してはマクロファージの表現型によって異なる応答が起きていると考えられる。また、これとは別に、低濃度の25(OH)D_3でも結核菌の殺菌は起こるため、活性型ビタミンD_3による活性化とは異なるメカニズムの存在が想定される。dermicidinによるものかどうかは、現時点ではまだ確認できていない。また、dermicidin遺伝子の発現に対する活性型ビタミンD_3の効果については現在検討中である。

E. 結論

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1．論文発表

該当無し

2．学会発表

1．「M-CSF及びGM-CSFにより分化したヒト単球由来マクロファージおける活性型ビタミンD_3関連遺伝子の発現解析」櫻田紳策、PanaddaDehpakson、赤川清子、山崎利雄、慶長直人、第24回日本生体防御学会、熊本、2013年7月

H. 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