

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

結核菌感染により、肺組織でヒアルロン酸が蓄積した。ヒアルロン酸合成酵素 HAS1, HAS3 の発現が、結核菌感染によりマクロファージや肺胞上皮細胞で亢進した。ヒアルロン酸合成酵素 HAS1 の遺伝子欠損マウスは結核菌感染に対して高感受性であった。

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。これまでに、マウスを用いた我々の解析から、リポカリン 2 や SLPI などの分子群が、結核感染における自然免疫応答で重要な役割を担っていることが明らかになっている。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、多剤耐性結核菌に対する、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

細胞外マトリックスを構成するヒアルロン酸の肺における蓄積を結核菌感染後に解析した。ヒアルロン酸合成酵素 hyaluronic acid synthase 1 (HAS1)、HAS3 の機能を解析するため、遺伝子欠損マウスを作製し、結核感染に対する感受性を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものを含むが、実験は大阪大学動物実験指針に基づき行った。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

結核菌を経気道的に感染した 20 日後のマウス肺組織ではヒアルロン酸の著明な蓄積が見られた。結核菌感染によりマクロファージで、HAS1, HAS3 の mRNA 発現が亢進した。結核感染した肺胞上皮細胞では、HAS3 の mRNA 発現が高くなった。そこで、HAS1, HAS3 の遺伝子欠損マウスを作製し、結核菌を経気道的に感染させ、4 週間後の肺組織における結核菌数を測定した。HAS3 欠損マウスでは、結核菌数に有意な差は認められなかったが、HAS1 欠損マウスでは結核菌が有意に増加した。

D. 考察

ヒアルロン酸合成酵素 HAS1 が結核菌感染防御に関わっていることが示唆された。

E. 結論

結核菌感染により、肺組織でヒアルロン酸が蓄積した。ヒアルロン酸合成酵素 HAS1 の遺伝子欠損マウスは結核菌感染に対して高感受性であった。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1. Kiyoshi Takeda : Regulation of gut homeostasis by innate immunity、The 2013 Fall Conference of the Korean Association of Immunologists 2013. 11. 7-8, Seoul, Korea
2. Kiyoshi Takeda : Regulation of gut homeostasis by innate immunity、FIMSA International Symposium on Autoimmune Diseases, 2013.10-17-20, Beijing, China
3. Kiyoshi Takeda : Innate immune responses and gut homeostasis、The 33rd Korean College of Rheumatology Annual Scientific Meeting、May 10-11, 2013, Seoul, Korea
4. Kiyoshi Takeda : Regulation of gut homeostasis by innate immunity、Immunology 2013, May3-7, 2013, Hawaii, USA
5. Kiyoshi Takeda : Host-microbial interplay、42nd JSI Annual Meeting 12. 11-13, 2013, Chiba
6. Kiyoshi Takeda : Regulation of gut homeostasis by innate immunity and lymphoid tissues in the appendix. Gremany-Japan Immunology Seminar 2013. 12.5-8, 2013 Shizuoka Japan
7. 竹田潔 : 慢性疼痛の病態理解のための免疫・炎症メカニズム、第6回日本運動器疼痛学会、2013年12月7-8日、神戸
8. 竹田潔 : 腸管免疫の謎を解く、日本消化器病学会 2013、2013年10月11日、東京
9. 竹田潔 : 腸内環境因子と炎症性腸疾患-基礎研究の立場から-、第50回日本消化器免疫学会総会、2013年8月1-2日、東京
10. 竹田潔 : 免疫系と腸管環境相互作用による腸管炎症の制御機構、第34回日本炎症・再生医学会、2013年7月2-3日、京都
11. 竹田潔 : 自然免疫系による腸管炎症の制御機構、第19回日本ヘリコバクター学会学術集会、2013年6月28-29日、長崎

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

HIV 感染者における結核の実態調査と早期診断

研究分担者 青木孝弘 独立行政法人国立国際医療研究センター
エイズ治療・研究開発センター 医師

研究要旨

HIV 感染者における結核症の早期診断を目指し、インターフェロン γ 遊離試験の有用性を検討した。HIV 感染が判明した時点で、インターフェロン γ 遊離試験を施行することは、結核症の早期診断に有用である。CD4 値 $50/\mu\text{L}$ 以下の症例では、判定できない症例も認めるため、抗 HIV 療法による免疫能の改善で測定可能となるまで検査を繰り返し施行することが望まれる。免疫不全の進行した HIV 合併抗酸菌症の患者では、病型が播種性となり、結核と非結核性抗酸菌症の鑑別に苦慮することがある。*Mycobacterium avium* complex (MAC) 症の補助診断として、キャピリア MAC 抗体 ELISA が登場したが、HIV 合併播種性 MAC 症例では、確定診断例での陽性率が極めて低く、補助診断法として有用ではない。

A. 研究目的

(1) HIV 感染者が結核菌に暴露した場合、その発症の確率は 1 年間に 5 から 10% と推定されており、HIV 非感染者が生涯で 5 から 10% の発症率であることと比べると非常に高い。また、HIV 感染者の結核による死亡率は、HIV 非感染症例の約 2 倍と高値であり、HIV 患者において結核は重要な合併感染症である。結核発症率が有意に高い HIV 感染者における結核の実態を把握することで、結核の蔓延の予防につながると考えられる。

本研究の目的は、HIV 合併結核患者の患者背景、HIV 感染の状態、HIV および結核の治療経過を後視的に検討することで、HIV 合併結核患者の実態を把握することにある。国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センターでは、平成 8 年以後に約 130 症例の結核合併 HIV 感染の症例を経験しており、当センターでの症例を調査することで、本邦の HIV 合併結核に重要な知見となると考える。(2) 結核の診断に関しては、本邦でも BCG の影響を受けない客観性を有する検査であるインターフェロン γ 遊離試験 (Interferon γ Releasing Assay、以下 IGRA) がツベルクリン反応に代わり施行されるようになった。IGRA 法にはクオンティフェロン (QFT) と T-spot TB の 2 種類がある。第 3 世代 QFT

であるクオンティフェロン TB ゴールド (以下 QFT-3G) が、本邦でも平成 22 年 4 月 1 日より保険診療で行なえるようになった。本邦は結核中蔓延国であり、結核診断において IGRA に関する報告は多数あるが、HIV 感染合併結核における QFT-3G の報告は限られている。

QFT-3G は、非 HIV 感染者における QFT-3G の感度が 90% 以上であるのに対し、HIV 感染者では、QFT-3G の感度が 80% 前後とする報告もある。以上より、HIV 感染者において QFT が陽性、判定保留、判定不可となった患者の背景を検討することで、HIV 感染者における QFT-3G の検査特性を検討できると考えられる。

次世代 IGRA である QFT-3G の HIV 感染者における検査特性の解明と本邦独自の新たな HIV 感染者での診断法としての検討を行なうことを目標とした。

(3) 平成 24 年 11 月より同じ IGRA の 1 つである T-スポット TB が本邦でも保険収載され利用可能となった。QFT-3G と比較し T-スポット Tb は感度・特異度ともに高いとされているが、本邦で HIV 感染者における両検査の比較検討は施行されていない。

そこで、平成 25 年度は、当センターの初診 HIV 感染者及び抗酸菌症と確定した当セン

ターの通院中の HIV 感染者を対象とし、QFT-3G と T-スポット TB を施行することで、両検査の感度・特異度などの比較検討を行う。

HIV 感染者における 2 種類の IGRA の診断法としての有用性を明らかとすることを目標とする。HIV 合併結核に関する診療ガイドライン策定の際の基礎データとなると考える。(4) *Mycobacterium avium* complex (MAC) は、非 HIV 患者では経気道感染により肺に病変を生じるが、一般的に全身に播種性病変を生じることはない。一方、HIV 患者では、腸管から血流感染により全身に播種性病変を生じる播種性 MAC 症を起こす。

播種性病変を生じた患者では、結核症と MAC 症の鑑別に苦慮することがある。結核症に関しては、IGRA を補助診断法として利用可能であるが、MAC 症に関してはこれまで血清学的診断法は確立されていなかった。

近年、MAC の GPL core 抗原に対する IgA 抗体を測定することにより、肺 MAC 症を血清学的に診断する診断法(キャピリア MAC 抗体 ELISA)が確立された。本診断法の肺 MAC 症における診断的有用性は、感度 84.3%、特異度 100%と報告されている。しかし、本診断法を HIV 合併播種性 MAC 症に適応した報告は現時点では存在しない。

本研究では、本血清診断法の HIV 合併播種性 MAC 症の診断に関する有用性を、HIV 合併播種性 MAC 症と診断された症例の保存血清にて測定することで検討する。

B. 研究方法

(1)当センターにおける HIV 合併結核患者について、その臨床像(喀痰塗抹検査、抗結核療法の有害事象、免疫再構築症候群など)を診療録や画像などより後視的に検討した。対象は、平成 8 年 1 月から平成 22 年 8 月末までの抗結核療法を導入された 129 例の HIV 合併結核患者とした。

免疫再構築症候群を以下の通り定義する。

抗 HIV 療法を導入前に結核と診断し、抗結核療法を開始し有効であった症例の中で、ART 開始後 3 ヶ月以内に、結核の他覚的所見の悪化(浸潤影悪化など)、または結核の臨床

症状の悪化(発熱、咳嗽など)を認めた症例とする。なお、結核治療失敗例は除外する。

(倫理面への配慮)

HIV 合併結核患者の実態把握に関する研究は、独立行政法人国立国際医療研究センター倫理委員会にて承認を受けている。本研究は後視的研究であり、本研究の施行で患者に有害事象が生じる可能性はない。また、当センター外来のモニターにて、本研究を施行することについて掲示を行うことで、患者への周知を行った。

(2)平成 23 年 4 月から平成 24 年 3 月までに当センターを受診した新規 HIV 患者のうち抗 HIV 療法を導入前で、書面による研究参加の同意が得られた患者について、QFT-3G を施行した。

QFT-3G が陽性となった患者では、通常の保険診療の範囲内で精査を施行し、結核症の有無の診断を進める。結核症の存在が示唆された場合は、潜在性、活動性を問わず、通常の保険診療の範囲内で適切な治療を行う。

QFT-3G の結果が判定保留または判定不可であった患者は、患者の受診に併せて QFT-3G を施行し検査結果を経過観察することで、QFT-3G の結果に影響を与える因子について検討する。

QFT-3G の結果が陰性であった患者では、QFT-3G 検査時より 1 年間結核発症の有無について経過観察を施行し、結核発症が疑われた場合は、結核症の精査と QFT-3G を施行する。

(倫理面への配慮)

本研究は、独立行政法人国立国際医療研究センター倫理委員会にて、研究開始前に承認を受け実地している。また、被験者に対して口頭および書面にて研究内容を説明し、同意書を取得の上で研究に参加いただいた。

(3)平成 25 年 10 月から平成 26 年 2 月までに当センターを受診した新規 HIV 患者のうち抗 HIV 療法を導入前で、書面による研究参加の同意が得られた患者について、QFT-3G、T-スポット TB を施行した。

いずれかの IGRA が陽性の被験者では、結核症の有無について精査を施行する。抗酸菌

が確認された場合は、菌種の同定と耐性検査を施行する。

IGRA が判定保留または判定不可となった患者では、受診毎に IGRA を施行し経過観察を行う。

IGRA が陰性であった患者では、初回検査時より 1 年間結核発症の有無について経過観察を施行し、結核発症が疑われた場合は、両 IGRA を施行し、結核症の精査を施行する。

(倫理面への配慮)

本研究は、独立行政法人国立国際医療研究センター倫理委員会にて、研究開始前に承認を受け実地している。また、被験者に対して口頭および書面にて研究内容を説明し、同意書を取得の上で研究に参加いただいている。

(4) 平成 8 年から平成 25 年 3 月までに当センターにおいて HIV 患者で、播種性非結核性抗酸菌症と細菌学的に確定診断された患者を対象とし、キャピリア MAC 抗体 ELISA を施行した。

(倫理面への配慮)

本研究は、独立行政法人国立国際医療研究センター倫理委員会にて、研究開始前に承認を受け実地している。本研究は保存血清を使用する研究のため、本研究の施行で患者に有害事象が生じる可能性はない。また、当センター外来のモニターにて、本研究を施行することについて掲示を行うことで、患者への周知を行った。

C. 研究結果

(1) HIV 合併結核症例 129 例は、男性 117 例 (90.6%)、平均発症年齢 39.3 ± 11.3 歳で、31 例 (24.0%) は外国籍であった。当院通院中に発見された例が 35 例 (26.5%) で、89 例 (67.4%) は結核発症を機に HIV 感染が判明していた。発症時平均 CD4 数は $165.3 \pm 158.3/\mu\text{l}$ 、平均 HIV-RNA は $5.53 \pm 5.98 \log \text{copies/ml} (\pm \text{SD})$ であった。当センターの平成 21 年度の初診患者 225 例を対照として比較すると、性別、年齢、及び HIV-RNA 量は有意差を認めないが、CD4 数は結核群で有意に低値であった。

薬剤耐性試験が施行された 102 例のうち

12 例 (11.8%) に、薬剤耐性 (INH 5 例、RFP 3 例、その他 6 例) を認めた。多剤耐性 (INH と RFP) は 2 例 (2.0%) のみであった。

抗結核薬で有害事象を生じた症例は、128 例中 70 例 (54.6%) であった。その内訳は、INH 13.4%、RFP 26.1%、RBT 17.6%、EB 14.3%、PZA 18.1%、キノロン 21.2% (重複有) と、RFP が最も多かった。年齢、性別、国籍、体重、CD4 値、HIV-RNA 量と抗結核薬の有害事象について検討したところ有害事象発生群では、有意に体重が軽く、CD4 値 < 100 の症例が多いことが判明した。

結核症自体の経過はおおむね良好であり、結核を直接の原因とする死亡の症例はなかった。経過中に死亡した 7 例はいずれも、結核以外のエイズ関連疾患での死亡であった。

129 例の症例の中、結核発症時に抗 HIV 療法を施行していなかった症例が 105 例中で、抗結核治療導入後に抗 HIV 療法の導入を確認できた症例が 74 例であった。74 例のうち、免疫再構築症候群を生じた症例は 5 例であった。5 例中 2 例では抗 HIV 療法の中断を余儀なくされた。4 例でステロイドの使用を認めた。5 例とも HIV・結核の経過は良好であった。(2) 登録患者数は 149 例で、男性が 140 例 (94%)、年齢の中央値は 38 歳 (18-63)、国籍は日本 131 例 (87.9%)、男性同性愛者 126 例 (84.6%)、CD4 の中央値は 240 (4-819) であった。同期間の当院の新規 HIV 患者は 220 例で、その患者背景と有意差はなかった。149 例中に活動性結核 4 例 (2.7%)、潜在性結核 4 例 (2.7%) を認めた。

QFT-3G の判定結果は、陽性例 7 例 (4.7%)、判定保留 11 例 (7.4%) で、日本国籍 131 例に限ると、陽性例は 5 例 (3.8%)、判定保留 8 例 (6.1%) であった。判定不可は、8 例 (5.4%) で、全例 QFT-3G 施行時の CD4 値が $50/\mu\text{L}$ 以下であった。QFT-3G の判定別の患者背景を見ると、判定不可群で有意に CD4 値が低い以外には、年齢、性別、国籍、および感染経路に群間差はなかった。

QFT-3G 陽性例 7 例中、活動性結核が 3 例、潜在性結核が 4 例であった。活動性結核例は、全例標準的結核治療に反応し奏功したが、QFT 値は必ずしも低下を認めなかった。潜在

性結核例は、全例イスコチン 300mg/日にて9ヶ月治療を行ったが、QFT 値は必ずしも低下を認めなかった。

判定保留例 11 例では、1 例は活動性結核 (QFT 値 0.30)、1 例は判定保留持続、7 例は以後 2 回連続陰性、1 例は 2・5 回目が陽性で 3・4 回目は陰性となった。2 例は追跡不能であった。

判定不可例 8 例では、抗 HIV 療法を開始後、全例で QFT 判定可能となった。CD4 1 桁 (CD4 値 4/ μ L)でも判定可能な症例を認めた。また、1 例は判定可能となった後に QFT 陽性となった。

陰性例は 123 例で、初診時の胸部単純写真上で、明らかな結核患者は認めなかった。QFT 施行後 1 年間経過観察を施行し、明らかな結核発症例は認めなかった。陰性例の 1 例で QFT 陽転化を生じた。この症例では、吃逆の精査時に QFT 陽性と判明した (初診時 QFT 値 -0.13→8 か月後 5.1)。気管支肺胞洗浄液などにて精査するが、確定診断は得られなかった。抗酸菌症については、各種検体で塗抹・培養・PCR とともに全て陰性であった。抗酸菌症の治療は導入しなかったが、症状、画像、QFT 値とも改善傾向となった。

(3)QFT-3G の判定結果は、陽性例 0 例 (0%)、判定保留例 2 例 (7.7%)、判定不可例 1 例 (3.8%)であった。T-スポット TB は 26 例全例で陰性であった。HIV 合併活動性結核症例は当該期間に 1 例で、両 IGRA 共に陽性であった。

(4) 当院にて MAC を検出した患者は 50 例で、そのうち 1 例は保存検体なし、3 例は定着例で、残る 46 例で解析を行った。46 例中、播種性 MAC 症が 24 例、MAC-IRIS が 21 例、肺 MAC 症が 1 例であった。性別は男性が 40 例 (86%)、年齢の中央値は 38 歳 (21-76)、国籍は日本 42 例 (87.9%)、男性同性愛者 30 例 (65.2%)であった。CD4 の中央値は 48/ μ L (1-323)、CD4 が 200/ μ L 未満の症例は 87.0% (40/46)であった。

46 例中でキャピリア MAC が陽性となった症例は 2 例で、陽性例 2 例ともに、気道検体のみから MAC を認めた症例であった。そのうちの 1 例は、肺 MAC 症の診断日時より

後から HIV 感染を生じた症例と推定される症例であった。その他、*M. Tuberculosis* 10 例、*M. kansasii* 7 例、*M. lentiflavum*、*M. genovense*、*M. kyorinense*、*M. chelonae* 各 1 例についても同様にキャピリア MAC を行ったが、全例で陰性であった。

D. 考察

(1)海外での HIV 合併結核患者の死亡率は 20-30%程度と高率であるのに対し、当センターでの HIV 合併結核患者の予後は良好で、結核による死亡例は存在しなかった。これは、本邦における医療機関へのアクセシビリティの良さやテイラーメイドな医療によると考えられる。喀痰好酸菌塗抹陽性例は、12 週間の治療後も 20%の症例で塗抹陽性で、HIV 合併症例では排菌陰転化に時間を要することが判明した。抗結核薬による有害事象は半数以上の症例で認められ、CD4 が 100/ μ L 未満の症例で優位に多かった。免疫再構築症候群を生じた症例と生じなかった症例を比較検討すると、生じた症例群で、有意に CD4 数が低く、HIV-RNA 量が高いことが判明したが、症例数が少なく更なる症例の集積を要すると考える。

(2)当院における新規 HIV 感染者 149 例中の QFT 陽性率は 4.7%で、陽性例は全例活動性結核または潜在性結核の診断となり、QFT-3G の特異度は高い。

新規患者で QFT-3G を施行することにより、149 例中で 4 例の潜在性結核の患者を発見することができた。HIV 患者に初診時にルーチンで QFT を施行することで、結核発症率が高い HIV 患者で結核を早期に発見できる可能性がある。

判定不可症例では、抗 HIV 療法開始後に CD4 値 50/ μ L となり QFT が判定可能となるまで、QFT を施行すべきである。

HIV 患者における QFT 判定保留の扱いについては、結核を無治療にて経過観察中に、QFT-3G の結果が変動する症例が多い。米国では判定として判定保留を用いておらず、今回の判定保留症例 11 例は、米国の基準では全例陰性となることも考慮すると、判定保留例については慎重な臨床診断と経過観察を要すると考える。

(3)本年度は2種類のIGRAの比較検討試験を施行したが、T-スポットTBの方が陰性になりやすい傾向が示唆された。

(4) HIV感染者で、本法が陽性となりづらい理由として、以下の2つの可能性を考える①MAC症のHIV患者は高度免疫不全状態であるため、MAC特異的抗体の産生が低い。②非HIV患者における肺MAC症は、経気道感染であるが、HIV感染者における播種性MAC症は、経腸管感染であり、特異的IgA抗体の産生がHIV患者では低い。更なる検討が必要であると考えられる。

E. 結論

(1)治療に難渋する症例を認めるが、当センターでは結核での死亡例は認めなかった。世界と本邦では、HIV合併結核症例の結核による死亡率は大きな隔たりを認めた。

(2)HIV患者では、結核菌への暴露後の結核発症率が、非HIV患者に比べきわめて高い。米国では、HIV患者全例でHIV診断時にIGRA(QFTまたはT spot TB)の施行を推奨している。本邦は結核中蔓延国(2011年：人口10万人対で17.7人)であり、結核菌への暴露のリスクは米国より高いと考えられる。本邦でも、HIV感染が判明した時点でのIGRA施行は有意義であると考えられる。また、CD4値 $50/\mu\text{L}$ 以下の症例では、抗HIV療法による免疫能の回復によりQFT-3Gが判定可能となるまで検査の施行を繰り返すことが望ましい。

(3)本年度は2種類のIGRAの比較検討試験を施行したが、症例数が現時点では少なく、両検査法の有用性について確定的な事は言えない。更なる症例の集積を要する。

(4)MAC症と細菌学的に確定診断されたHIV症例での本検査の陽性率は、2/46例(4.3%)のため、HIV患者でのMAC症の早期診断には、有用ではない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 青木孝弘：合併症を有する結核治療 1. HIV合併結核. 結核 2013;88:827-841

2. 学会発表

1. 青木孝弘：HIV感染者における第3世代QFTの有用性の検討(第88回日本結核病学会総会、平成25年3月)
2. 青木孝弘：ミニシンポジウム3合併症を有する結核治療、HIV合併結核(第88回日本結核病学会総会、平成25年3月)
3. 青木孝弘：潜在性結核への治療を適用したHIV感染者の検討(第87回日本感染症学会学術講演会、平成25年6月)
4. 青木孝弘：HIV合併MAC症症例における血清学的診断の後視的検討(第27回日本エイズ学会学術集会・総会、平成25年11月)

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

多剤耐性結核に対するリネゾリドの使用経験

研究協力者 露口一成 NHO 近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター感染症研究部長

研究要旨

多剤耐性結核は世界的に問題となっておりその診断、治療はきわめて困難である。多剤耐性結核の治療薬の開発が急務となっているが、リネゾリドは結核に対して有効であることが報告されており、多剤耐性結核に対しての有効性も報告されている。今回当院での多剤耐性結核に対するリネゾリドの使用成績について検討を行った。リネゾリドは多剤耐性結核に対して有効であったが、副作用による脱落の多さが課題であった。

A. 研究目的

多剤耐性結核は通常の結核に比べてきわめて難治性であり速やかに診断して治療を行うことが望まれる。多剤耐性結核の治療薬の開発が急務となっている。リネゾリド (LZD) は MRSA 等に用いられる抗菌薬であるが、多剤耐性を含めた結核に有効であることが知られている。今回我々は、当院で多剤耐性結核に対して LZD を使用した例について臨床的検討を行った。

B. 研究方法

2002 年より 2012 年までに当院で治療を行った多剤耐性結核症例で、治療薬として LZD を投与した患者について臨床的検討を行った。

(倫理面への配慮)

カルテを元にした retrospective な検討であり、倫理的な問題はないものと考えている。

C. 研究結果

症例は 6 症例、うち男性 4 例、女性 2 例であった。年齢は、20 歳代 1 例、30 歳代 3 例、60 歳代 2 例であった。これらに対して LZD を含む多剤併用療法が行われたが、うち 2 例は 1 ヶ月、2 例は 2 ヶ月、1 例は 6 ヶ月で、貧血・血小板低下・神経障害等の副作用により中止を余儀なくされた。1 例は 36 ヶ月の投与が可能であった。6 例中 4 例で手術が行われた。6 例中 5 例は排菌陰性化が得られた。

D. 考察

リネゾリドは少なくとも短期的には多剤耐性結核症例において有効であると考えられ、手術も組み合わせた治療戦略の一つとして考慮する余地があると考えられた。副作用による脱落の多さが課題であった。

E. 結論

リネゾリドは多剤耐性結核の治療において有効な選択肢の一つである。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 1. 露口一成：新規抗結核薬 第 88 回日本結核病学会総会 教育講演 2013 年 3 月 29 日、千葉市
 2. 露口一成：日常の呼吸器診療に紛れ込む結核を見落とさないために 間質性肺炎に合併した結核 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会シンポジウム 2013 年 4 月 20 日、東京
 3. 露口一成：リスク要因集団における結核-より積極的な潜在性結核感染治療を含めて- 第 67 回国立病院総合医学会シンポジウム 28 結核発症のリスク要因とその対策 2013 年 11 月 9 日、金沢

H. 知的財産権の出現・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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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
岡田全司	The study of novel DNA vaccines against tuberculosis: Induction of pathogen-specific CTL in the mouse and monkey models of tuberculosis.	Human Vaccines and Immunotherapeutics	9(3)	515-525	2013
岡田全司	Novel therapeutic vaccines [(HSP65+ IL-12)DNA-, granulysin- and Ksp37-vaccine] against tuberculosis and synergistic effects in the combination with chemotherapy.	Human Vaccines and Immunotherapeutics	9(3)	526-533	2013
岡田全司	Potential function of granulysin, other related effector molecules and lymphocyte subsets in patients with TB and HIV/TB coinfection.	International Journal of Medical Sciences	10(8)	1003-1014	2013
永井英明	Multicolor flow cytometric analyses of CD4+ T cell responses to Mycobacterium tuberculosis-related latent antigens.	Jpn J Infect Dis	66	207-215	2013
服部俊夫	A simple multiplexPCR for the identification of Beijing family of Mycobacterium tuberculosis with a lineage-specific mutation in Rv0679c.	J Clin Microbiol.		Epub ahead	2013
野内英樹	Drug resistance and IS6110-RFLP patterns of Mycobacterium tuberculosis from recurrent tuberculosis patients in northern Thailand.	Microbiology and Immunology	57(1)	21-29	2013
慶長直人	Primary drug-resistant tuberculosis.	present status and risk factors.	8(8)	e71867	2013

慶長直人	Clonal expansion of Mycobacterium tuberculosis isolates and coexisting drug resistance in patients newly diagnosed with pulmonary Tuberculosis.	BMC Res Notes	6	444	2013
慶長直人	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
岡田全司	II 予防接種Q&A (B) BCG100. (結核予防ワクチン; DNAワクチン) 結核予防ワクチン (DNAワクチン) の開発状況とその応用の可能性について教えてください。	小児内科	45(3)	281-283	2013
岡田全司	結核の免疫反応「免疫学的機序からみた呼吸器疾患」	日本胸部臨床	72(12)	1336-1345	2013
岡田全司	ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用いた新規結核予防ワクチン開発及び臨床応用に向けて 「結核—古くて新しい感染症—」	最新医学	68(11)	2479-2487	2013
岡田全司	多剤耐性結核治療ワクチンとT細胞免疫 「結核—古くて新しい感染症—」	最新医学	68(11)	2488-2495	2013
岡田全司	はじめに (序論) 「結核—古くて新しい感染症—」	最新医学	68(11)	2437-2438	2013
岡田全司	座談会：結核の現状・問題点と最新の知見「結核—古くて新しい感染症—」	最新医学	68(11)	2439-2450	2013
永井英明	新しい結核感染診断検査法 T-SPOT.TB の有用性	アニムス	19	37-42	2014
永井英明	【忘れるな!皮膚結核-真正結核・結核疹・BCG 副反応を中心に】 (Part4.)日本の結核の現状(総説 02) HIV と結核	Visual Dermatology	12	964-967	2013
永井英明	「結核—古くて新しい感染症—」新しい診断法：HIV 合併結核と IGRA	最新医学	68	2467-2471	2013
永井英明	【呼吸器感染症の实地診療 最近の臨床上の進歩と課題の克服】 实地医家が遭遇する治療上の課題の克服の実際 結核標準治療の実際と特定治療のすすめかた	Medical Practice	30	1783-1787	2013

永井英明	関節リウマチ治療中に問題となる感染症 結核と非結核性抗酸菌症 結核	化学療法の領域	30	152-157	2013
永井英明	明日の結核医療と人材育成への展望 結 核病学会認定単位取得へ向けた研修機会 の在り方	結核	88	790-792	2013
野内英樹	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	88(4)	405-409	2013
青木孝弘	合併症を有する結核治療 1. HIV 合併結 核	結核	88	827-841	2013

添付資料



Research Paper

Potential Function of Granulysin, Other Related Effector Molecules and Lymphocyte Subsets in Patients with TB and HIV/TB Coinfection

Nada Pitabut¹, Shinsaku Sakurada², Takahiro Tanaka², Chutharut Ridruechai¹, Junko Tanuma³, Takahiro Aoki³, Pacharee Kantipong⁴, Surachai Piyaworawong⁵, Nobuyuki Kobayashi⁶, Panadda Dhepakson⁷, Hideki Yanai⁸, Norio Yamada⁹, Shinichi Oka³, Masaji Okada¹⁰, Srisin Khusmith^{1,✉}, Naoto Keicho²

1. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand;
2. Department of Respiratory Diseases, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan;
3. AIDS Clinical Center, National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan;
4. Department of Medicine, Chiang Rai Regional Hospital, Chiang Rai, Thailand;
5. Mae Chang District Hospital, Chiang Rai, Thailand;
6. Department of Pulmonary Medicine, Center Hospital, National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan;
7. Medical Biotechnology Center, National Institute of Health, Department of Medical Science, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand;
8. TB/HIV Research Project, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Chiang Rai, Thailand;
9. Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose, Tokyo, Japan;
10. Clinical Research Center, National Hospital Organization, Kinki-Chuo Chest Medical Center, Sakai, Osaka, Japan.

✉ Corresponding author: Professor Srisin Khusmith, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, 420/6 Rajvithi Road, Bangkok 10400, Thailand. Tel.: +66-2-3549100-13 ext. 1594; Fax: +66-2-6435583, E-mail address: srisin.khu@mahidol.ac.th.

© Ivyspring International Publisher. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>). Reproduction is permitted for personal, noncommercial use, provided that the article is in whole, unmodified, and properly cited.

Received: 2013.04.10; Accepted: 2013.05.30; Published: 2013.06.15

Abstract

Background: Host effector mechanism against *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) infection is dependent on innate immune response by macrophages and neutrophils and the alterations in balanced adaptive immunity. Coordinated release of cytolytic effector molecules from NK cells and effector T cells and the subsequent granule-associated killing of infected cells have been documented; however, their role in clinical tuberculosis (TB) is still controversy.

Objective: To investigate whether circulating granulysin and other effector molecules are associated with the number of NK cells, *i*NKT cells, V γ 9⁺V δ 2⁺ T cells, CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells, and such association influences the clinical outcome of the disease in patients with pulmonary TB and HIV/TB coinfection.

Methods: Circulating granulysin, perforin, granzyme-B and IFN- γ levels were determined by ELISA. The isoforms of granulysin were analyzed by Western blot analysis. The effector cells were analyzed by flow cytometry.

Results: Circulating granulysin and perforin levels in TB patients were lower than healthy controls, whereas the granulysin levels in HIV/TB coinfection were much higher than in any other groups, TB and HIV with or without receiving HAART, which corresponded to the number of CD8⁺ T cells which kept high, but not with NK cells and other possible cellular sources of granulysin. In addition, the 17kDa, 15kDa and 9kDa isoforms of granulysin were recognized in plasma of HIV/TB coinfection. Increased granulysin and decreased IFN- γ levels in HIV/TB coinfection and TB after completion of anti-TB therapy were observed.

Conclusion: The results suggested that the alteration of circulating granulysin has potential function in host immune response against TB and HIV/TB coinfection. This is the first demonstration so far of granulysin in HIV/TB coinfection.

Key words: Granulysin, TB, HIV, HIV/TB Coinfection, Lymphocytes Subsets.

Introduction

Tuberculosis (TB) is the leading cause of death in human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals in countries with the highest TB burden [1]. Coinfection with HIV evidently affects the progression of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) infection and induces *Mtb*-specific immune responses contributing to increased HIV replication through cellular activation [2, 3]. It is clear that the overall disruption of immune function in HIV infected patients is the sum of multiple factors including CD4⁺ T cell depletion by direct infection of HIV-1 and chronic immune activation leading to dysfunction of the immune system [4]. Pathologically HIV/TB coinfection caused functional disruption of local immune responses leading to weakened granulomatous host response to *Mtb* [5]. However, immune activation induced by rapid reactivation of *Mtb* in chronic HIV infection has not been fully investigated to our knowledge.

Granulysin is a member of the saposin-like protein family and co-localizes in the granular compartments of human natural killer (NK) cells, double negative invariant NKT (iNKT), Vgamma (γ) 9⁺ Vdelta (δ) 2⁺ T cells and CD8⁺ T cells along with granzymes and perforin [6]. It is a cationic small glycoprotein and synthesized as a secretory 15 kDa precursor which is then enzymatically processed into a granular 9 kDa protein. The 9 kDa isoform has characteristics of pro-inflammatory cytokine and cytolytic activity [7], which is able to induce cytolysis of various tumor cells, microbe-infected cells by release into the intercellular space between target and effector cells via granule exocytosis pathway upon stimulation [8] and mediates killing of extracellular and intracellular *Mtb* [9] via several effector molecules including perforin and granzymes. In contrast, the 15 kDa granulysin is constitutively secreted from NK and T cells via non-exocytotic pathway [10]. The CD8⁺ T, NK and even CD4⁺ T cells can express granulysin together with perforin and granzyme B co-localized in granules [11] and released into immunological synapse upon activation [12]. Granulysin-mediated lysis of *Mtb* infected cells has been performed mainly by CD8⁺ and NKT cells expressing perforin and granulysin [9, 13, 14]. High frequency of CD4⁺ T cells co-expressing granulysin was observed in children and adolescents [15]. Moreover, iNKT cells exhibiting an-

timycobacterial activity also expressed granulysin against *Mtb* inside monocytes/macrophages [14]. In addition, a reduced number of iNKT cells in peripheral blood were found in patients with pulmonary TB and HIV-1 infection [16]. In TB, granulysin and perforin could be detected in V γ 9⁺V δ 2⁺ T cells, indicating their direct contribution to a protective host response against *Mtb* infection [17].

Reduction of perforin and granulysin levels related to granzyme A has been reported in lung tissue biopsy from patients with chronic TB, while higher expression in CD8⁺ T cells was associated with bacteriological control, suggesting that perforin and granulysin could be used for evaluation of immune protection in human TB [18]. The primary effector function of CD4⁺ T cells is believed to be the production of interferon-gamma (IFN)- γ and other cytokines to activate macrophages, which can then control or eliminate intracellular organisms [19]. It has been shown that CD4⁺ T cells were the main sources of IFN- γ and the relative responses to early secreted antigenic target (ESAT)-6 and culture filtrate protein (CFP)-10 significantly increased in even chronically HIV-infected patients with decreased CD4⁺ T cells, whereas acute HIV infection induced a rapid depletion of *Mtb*-specific CD4⁺ T cells in asymptomatic TB [20, 21]. In active pulmonary TB, high circulating IFN- γ level was detected which decreased significantly after two months of therapy [22, 23]. Similar results were found in child TB patients [24]. These indicate the involvement of IFN- γ in curative immune response against *Mtb*.

Significantly lower plasma granulysin levels than controls have been demonstrated in adults with active pulmonary TB in highly TB endemic area in Indonesia which increased after two months of anti-TB therapy, reaching the values similar to those of controls and even further increased after completion of anti-TB therapy. Such granulysin levels were predominantly in patients expressed by IFN- γ negative T cells suggesting that their cellular source of IFN- γ and granulysin in TB are partly non-overlapping [12]. Patients with active pulmonary TB had low circulating granulysin but high IFN- γ levels, indicating their possible role in host defense against *Mtb* [25]. Earlier study demonstrated that higher plasma IFN- γ was

found in patients with HIV/TB coinfection than TB [26], suggesting a greater degree of immune activation in HIV/TB coinfection, particularly those with low CD4⁺ T cells counts.

There is limited information so far regarding the role of granulysin and other cytolytic effector molecules related to NK cells, *i*NKT cells, T cells and their subpopulations against *Mtb* infection in TB and HIV/TB coinfection. This study aims to investigate whether circulating granulysin and other effector molecules are associated with the number of corresponding functional cells, NK cells, *i*NKT cells, V γ 9⁺V δ 2⁺ T cells, CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells, and such association may influence the clinical outcome of the disease in patients with pulmonary TB and HIV/TB coinfection in northern Thailand where TB is endemic.

Materials and Methods

Study subjects

Six patients with HIV/TB coinfection and 21 TB patients were recruited from the outpatient and inpatient clinics of Chiang Rai Hospital and Mae Chan Hospital, north of Thailand. Pulmonary TB patients were categorized based on WHO criteria (WHO, 2009), defining whether or not the patients has previously received TB treatment. TB drug regimens were based on the recommendation of National Tuberculosis Program, Ministry of Public Health, Thailand. The patients with HIV/TB coinfection and TB were all newly diagnosed TB confirmed by microscopic examination of acid-fast bacilli (AFB) in sputum and positive cultures of *Mtb*, medical his-

tory and chest radiographic findings. All had never received any anti-TB therapy or taken anti-TB drugs for less than 7 days and never received any antiretroviral therapy, immune-suppressive drugs or other immunomodulators prior enrollment. None had diabetes mellitus or other acute infections. The patients with HIV/TB coinfection had not previously received highly active antiretroviral therapy (HAART), the standard drug treatment, and were positive for anti-HIV antibody by the particle agglutination assay (Serodia-HIV-1/2, Fujirebio Inc, Tokyo, Japan) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Enzygnost Anti-HIV 1/2 plus ELISA, or immunochromatographic rapid test (Determine HIV-1/2, Abbott Laboratories, Ill, USA) Dade Behring, Marburg, Germany). No patients were reported to be multidrug resistance (MDR) or extensively drug resistance (XDR) cases by drugs sensitivity tests at the time of enrollment. Eleven patients with HIV without receiving HAART (HIV+HAART-) and 17 with HIV receiving HAART (HIV+HAART+) were recruited from the HIV Care and Treatment Project (Daycare clinic). These patients had no previous TB episodes and had not received isoniazid preventive therapy (IPT) to sterilize latent TB infection (LTBI) and prevent progression to active TB at the time of enrollment. Their sputum smears were negative for AFB and *Mtb* cultures. They were negative (induration < 5 mm) by Tuberculin Skin Test (TST) and had no concomitant active AIDS-related opportunistic infections within 30 days prior enrollment. The clinical characteristics of individual HIV/TB coinfection are summarized in Table 1.

Table 1. Clinical characteristics of patients with HIV/TB coinfection.

Characteristic	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
Sex/Age	Male/42	Male/47	Male/44	Female/46	Male/30	Male/37
CXR findings at TB diagnosis	Non-cavitary	Non-cavitary, infiltrates, pleural effusion	Cavitary	Non-cavitary	Non-cavitary	Non-cavitary, pleural effusion
Presenting form of TB	Pulmonary	Pulmonary + extra-pulmonary (meningeal)	Pulmonary	Pulmonary + extra-pulmonary (colitis)	Pulmonary + extra-pulmonary (lymp node)	Pulmonary
Treatment regimen for TB	2HRZE/4HR	2HRZE/4HR	2HRZE/4HR	2HRZE/4HR	2HRZE/4HR	2HEOS/18HE
HAART initiation during study period* (regimen)	Yes (d4T,3TC,NVP)	No	No	No	No	Yes (d4T,3TC,EFV)
Outcomes after 6-9 mo of anti-TB therapy	Cured 7	Cured 6	Cured 8	N/A**	N/A**	Cured 18
Duration of TB treatment (month)						

d4T = Stavudine; 3TC = Lamivudine; NVP = Nevirapine; EFV = Efavirenz; HAART = highly active antiretroviral therapy. *HAART initiated 2 months after starting anti-TB treatment. ** Unable to follow-up.

Twenty three healthy individuals recruited from Blood Bank of Mae Chan hospital was used as controls. They had no history of TB and no risk factors involving TB and their chest radiographs were normal. None of them had diabetes mellitus and all were negative for Hepatitis B surface antigen, Hepatitis C antigen and anti-HIV antibody.

This study was approved by the Ethical Review Committee for Research in Human Subjects, Ministry of Public Health, Thailand and the National Center for Global Health and Medicine, Japan, and the written informed consents were obtained from all patients and all healthy individuals.

Blood samples

Blood were collected in K₃EDTA vacutainers upon enrollment (n = 6 for HIV/TB coinfection and 21 for TB) and after completion of anti-TB therapy for 6-9 months when they were considered as cured (n = 3 for HIV/TB coinfection and 13 for TB). Plasma were separated by centrifugation and stored at -80°C.

Determination of granulysin concentration

The granulysin concentrations in plasma were determined by ELISA [25]. The test was done in duplicate. Briefly, a microtiter plate (Costar, USA) was coated with 100 µl/well containing 5 µg/ml mouse monoclonal anti-human granulysin (RB1) (MBL International Corporation, Nagoya, Japan) in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5) and incubated overnight at 4°C. The plates were washed with phosphate buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween 20 and blocked with buffered protein solution with ProClin-150 at room temperature (RT) for 1 h. After being washed, the undiluted plasma was added and incubated for 2 h at RT and followed by washing. The bound antigens were detected with 0.1 µg/ml of mouse monoclonal anti-human granulysin biotin (RC8) (MBL International Corporation) and avidin-horseradish peroxidase (Av-HRP) conjugate (BD Biosciences Phamingen, San Diego, CA) diluted to 1:1000. After incubation for 1 h, the reactions were developed by coloring with tetramethylbenzidine (TMB) substrate (BD Biosciences Phamingen) for 20 min in the dark. Optical densities were measured at 450/570 nm wave-length by a microplate reader (Sunrise; Tecan, Männedorf, Switzerland). The granulysin concentrations were calculated from the standard curve using granulysin in culture supernatant from Cos7 cell transfected with gene encoding 15 kDa granulysin. The lower detection limit for granulysin is 0.047 ng/ml.

Determination of perforin, granzyme B and IFN-γ

ELISA was used to determine the concentration of plasma perforin and granzyme B (MABTECH AB, Sweden), and IFN-γ (BD Biosciences Phamingen, San Diego, USA) according to the manufacture protocols. The test was done in duplicate. The detection limits of perforin, granzyme B and IFN-γ assays were 78, 8.78 and 4.7 pg/ml, respectively.

Western blot analysis

The isoforms of granulysin with different molecular weight were analyzed by Western blot in 3 patients with HIV/TB coinfection and 3 with TB whose plasma were enough to be tested and one healthy controls (HC). The concentration of proteins with low molecular weight was performed by differential solubilization (DS)-method prior to SDS-PAGE and blotting [27]. Briefly, 36 µl of 7M urea/2M thiourea and 4 µl of 200 mM DTT were added to 20 µl of plasma and then mixed. The solution was dropped into 1.8 ml of purified acetone at 4°C with stirring and centrifuged at 19000 × g at 4°C for 15 min. Four hundred µl of 70% acetonitrile/12mM HCL were added to pellet and stirred at 4°C for 1 h. The solution was centrifuged at 19000 × g at 4°C for 15 min. The collected supernatant was subsequently dried by centrifugal concentrator (TAITEC, Koshigaya, Japan) and dissolved in 80 µl of 0.1% trifluoroacetic acid. Equal volume of each sample was analyzed by SDS-PAGE, transferred onto 0.2 µm pore-size PVDF membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and then blotted with goat anti-granulysin polyclonal antibody (R&D, USA). Immunodetection was performed by incubation with HRP conjugated with rabbit anti-goat IgG (1:10000) (Cappel, MP Biomedicals, USA) and developed by ECL-prime detection reagents (GE Healthcare, USA).

Flow cytometric analysis

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by a Ficoll-metrizonate density gradient centrifugation (Lymphoprep™ tube, AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norway) and suspended in cold 10% FBS in RPMI 1640 medium (Gibco, Invitrogen, USA). In this study, the monocytes depleted PBMCs were used instead of PBMCs due to the need of monocytes in the separation study. To remove monocytes, PBMCs were re-suspended in cold separation buffer, incubated with microbeads conjugated to mouse anti-human CD14 monoclonal antibody (Miltenyi Biotec, Germany) and passed through a magnetic cell separation system (MACS, Miltenyi Biotec) on LS

column. The viability of the cells determined by Trypan blue exclusion was $\geq 95\%$.

To determine the surface markers of NK cells (CD56⁺CD3⁻), iNKT cells (V α 24⁺CD3⁺), $\gamma\delta$ T cells (V γ 9⁺V δ 2⁺CD3⁺), CD4⁺ T cells (CD4⁺CD3⁺) and CD8⁺ T cells (CD8⁺CD3⁺), the monocyte depleted PBMC were directly stained with a combination of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (IMMUNOTECH, Beckman Coulter Company, France) for 30 min at 4°C in the dark and determined by flow cytometry using four-color immunofluorescent technique. Briefly, different cell populations were determined in 1×10^6 monocyte depleted PBMCs per tube using the specific antibodies conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), phycoerythrin-Texas Red-x (ECD) and phycoerythrin-cyanin5 (PC5) (IMMUNOTECH, Beckman Coulter Company, France) as follows: tube no. 1, FITC-labeled anti-V γ 9 (clone IMMU 360), PE-labeled anti-V α 24 (clone C15), ECD-labeled anti-CD3 (clone UCHT1) and PC5-labeled anti-CD8 (clone B9.11); tube no. 2, FITC-labeled anti-V δ 2 (clone IMMU389), PE-labeled anti-CD56 (clone N901), ECD-labeled anti-CD3 (clone UCHT1), and PC5-labeled anti-CD4 (clone 13B8.2). Mouse isotype IgG1-FITC (clone 679.1 Mc7), IgG1-PE (clone 679.1 Mc7), IgG1-ECD (clone 679.1 Mc7), and IgG1-PC5 (clone 679.1 Mc7) (IMMUNOTECH, Beckman Coulter Company, France) were used as isotype controls. After incubation, the erythrocytes were lysed with 500 μ l of optilyse C lysis solution (Beckman Coulter, France) and incubated for 10 min at 4°C in the dark followed by adding 500 μ l of PBS. The solutions were processed for flow cytometric analysis by four color detection EPICS[®] XL[™] Flow cytometer (Beckman Coulter, Japan) and the data were analyzed using the XL SYSTEM II[™] software. Data were displayed as four-color dot plots.

Statistical analyses

The data were analyzed using SPSS software version 18.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). The concentrations of granulysin, perforin, granzyme-B and IFN- γ in plasma and the surface markers expression on effector cells in each subject group were shown by median and interquartile range. Significant difference between two independent subject groups was compared by Mann-Whitney U test. Wilcoxon Signed Rank test was used to compare plasma granulysin and IFN- γ levels before and after completion of anti-TB therapy. The correlations among circulating granulysin, perforin, granzyme-B, IFN- γ and the number of NK cells, iNKT cells, V γ 9⁺V δ 2⁺ T cells,

CD4⁺ T and CD8⁺ T cells were analyzed using a Spearman's rank correlation test. P value < 0.05 was considered as statistical significance.

Results

High granulysin and IFN- γ in HIV/TB, but low granulysin and perforin levels in TB

The comparison of circulating granulysin, perforin and granzyme-B among patients with HIV/TB coinfection, TB, HIV+HAART- and HIV+HAART+ were shown in Figure 1 and Table 2. HIV/TB patients had significantly higher granulysin (median = 5.556 ng/ml, ranged 1.744-12.718) than TB patients (median = 0.905 ng/ml, ranged 0.735-1.272) ($p = 0.001$) and healthy controls (HC) (median=1.322 ng/ml, ranged 0.873-1.591) ($p = 0.012$) (Fig.1A), while TB patients had significantly lower than those of HC ($p = 0.003$).

No significance difference in perforin levels was found in HIV/TB coinfection (median = 9418 pg/ml, ranged 4328-11386) and HC (median = 10363 pg/ml, ranged 7388-13430), while the levels in TB (median = 5538 pg/ml, ranged 4749-7519) were significantly lower than HC ($p < 0.001$) (Figure 1B). All study groups had granzyme-B levels as detection limit (Figure 1C). On average, IFN- γ levels were obviously higher in HIV/TB (median = 33.30 pg/ml, ranged 6.215-111.295) than TB patients (median = 11.08 pg/ml, ranged <4.7-25.43) ($p < 0.001$), and HC (median <4.7 pg/ml, ranged <4.7-15.09) ($p < 0.001$), respectively (Figure 1D).

Three different isoforms of circulating granulysin in patients with HIV/TB coinfection

When the granulysin were analyzed by DS-method and Western blot analysis, three bands were detected corresponding to isoforms with molecular weight of 17 kDa, 15 kDa and 9 kDa in plasma of patients with HIV/TB coinfection (Figure 2).

Small number of iNKT cells, V γ 9⁺V δ 2⁺ T cells and CD4⁺ T cells but high number of CD8⁺ T cells in HIV/TB coinfection

Compared to TB, the number of iNKT cells, V γ 9⁺V δ 2⁺ T cells and CD4⁺ T cells was small but the number of CD8⁺ T cells was kept high in HIV/TB coinfection as shown in Figure 3 and individual data of HIV/TB patients in Table 2. Significantly higher number of NK cells in patients with TB (median = 1936 cells/ μ l, ranged 2016-2634) than HIV/TB patients (HIV/TB, median = 787 cells/ μ l, ranged 321-1303, $p = 0.031$) was observed.

Table 2. Levels of circulating granulysin, perforin, granzyme-B and IFN- γ and number of effector cells in patients with HIV/TB coinfection before anti-TB therapy.

Characteristic	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
Granulysin (ng/ml)	3.746	7.365	9.841	1.313	21.35	1.887
Perforin (pg/ml)	10763	10305	13255	8530	1722	5197
Granzyme-B (pg/ml)	41.33	<8.79	26	<8.79	<8.79	<8.79
IFN- γ (pg/ml)	89.54	53.04	6.72	<4.7	13.56	176.56
NK cells (cells/ μ l)	646	991	2239	346	244	928
iNKT cells (cells/ μ l)	8	2	4	2	1	1
V γ 9 ⁺ V δ 2 ⁺ T cells (cells/ μ l)	44	7	6	53	4	3
CD4 ⁺ T cells (cells/ μ l)	46	198	344	321	94	19
CD8 ⁺ T cells (cells/ μ l)	854	2068	1309	606	181	168

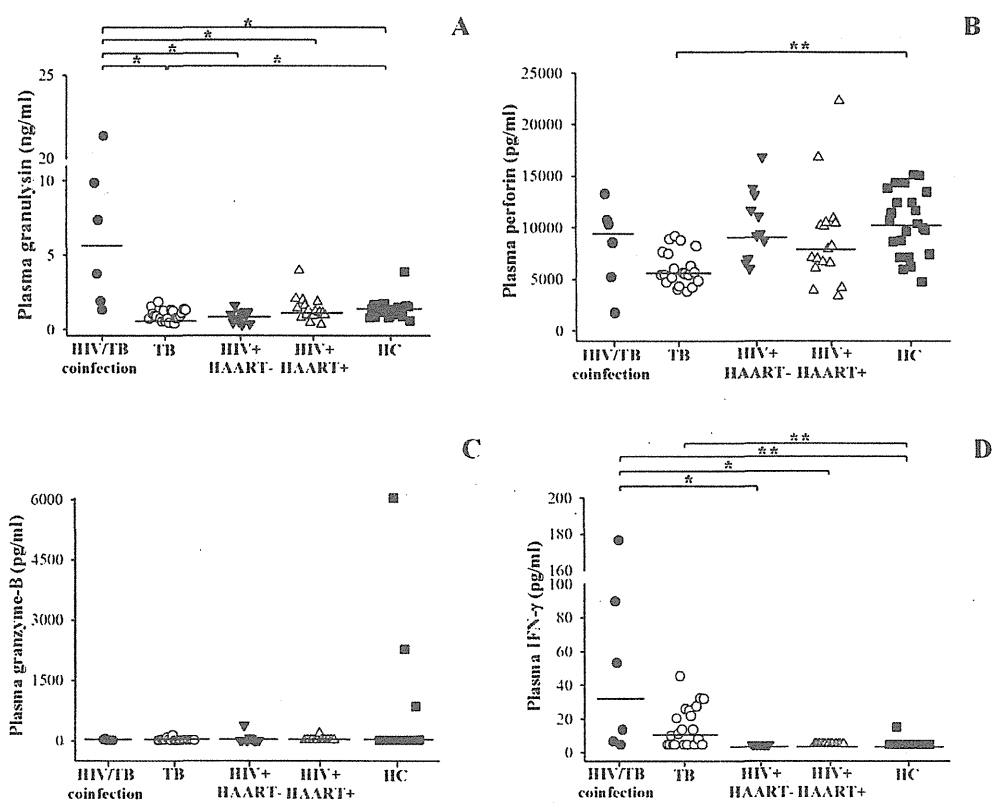


Fig 1. Circulating granulysin (ng/ml) (A), perforin (pg/ml) (B), granzyme-B (pg/ml) (C) and IFN- γ (pg/ml) (D) levels before anti-TB therapy in Thai patients with HIV/TB coinfection and TB in comparison with healthy controls (HC), HIV+HAART- and HIV+HAART+. Each dot represented one individual. A horizontal bar indicated the median of each group. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

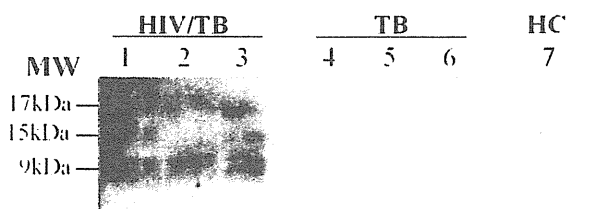


Fig 2. Isoforms of granulysin expression in plasma from Thai patients by Western blot analysis. Lane 1-3, HIV/TB coinfection plasma, 3 bands of ~17kDa, 15kDa and 9kDa isoforms; Lanes: 4-6, TB plasma, 1 band of ~17kDa isoform (Lane 4) and 2 bands of ~15kDa and 9kDa isoforms (Lane 5-6); Lane 7, 2 bands of HC ~15kDa and 9kDa isoforms.

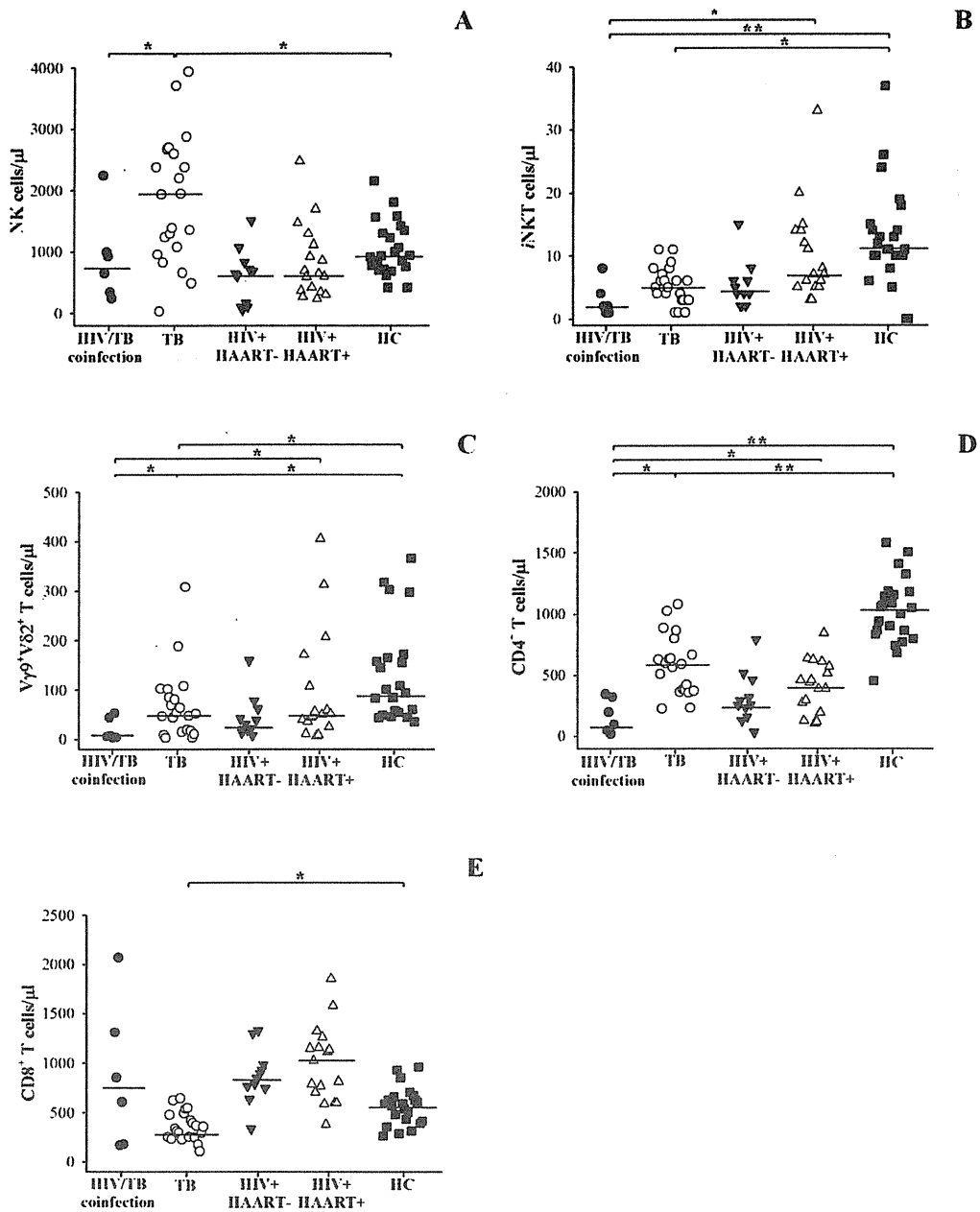


Fig 3. The number of NK cells (A), iNKT cells (B), Vγ9+Vδ2+ T cells (C), CD4+ T cells (D) and CD8+ T cells (E) per microliter (μl) in Thai patients with HIV/TB coinfection and TB in comparison with healthy controls (HC), HIV+HAART- and HIV+HAART+ determined by flow cytometric analysis. Each dot represented one individual. A horizontal bar indicated the median of each group. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Relatively smaller number of iNKT cells (median = 2 cells/μl, ranged 1-5) and CD4+ T cells (median = 146 cells/μl, ranged 39-327) were found in HIV/TB than TB patients (median of iNKT cells = 5 cells/μl, ranged 3-7, $p = 0.029$; median of CD4+ T cells = 589 cells/μl, ranged 375-732, $p = 0.001$). Vγ9+Vδ2+ T cells in HIV/TB coinfection were kept high in circulation (median = 7 cells/μl, ranged

6-46) also tended to be lower than those in TB (median = 52 cells/μl, ranged 16-94), although it was not significantly different. In addition, small number of CD8+ T cells was remarkable in TB (median = 339 cells/μl, ranged 249-485), whereas the CD8+ T cells in HIV/TB coinfection were kept high in circulation (median = 730 cells/μl, ranged 178-1499).