

【Ⅶ】 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。主な成果としては、タイ国における菌体側の解析で難治性結核で北京株は 66.7%と全国平均の 20.8%に比して高い事などを報告した [*Microbiol Immunol* 2013 ;57(1):21-9]。更に、結核菌培養 1,333 例(1,319 人より)と数を増やし、より詳細な解析法にて菌体の解析を実施した結果、臨床情報との相関で、北京株がより若年者に多く、耐性菌症例など難治性結核に多いなど上記の論文結果をより多くの数で確認・定量する結果が得られている。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、② HIV 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るネットワークを活用した。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、慢性排菌例)患者の正常治療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(図 1)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 ヶ所の結核医療の「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)

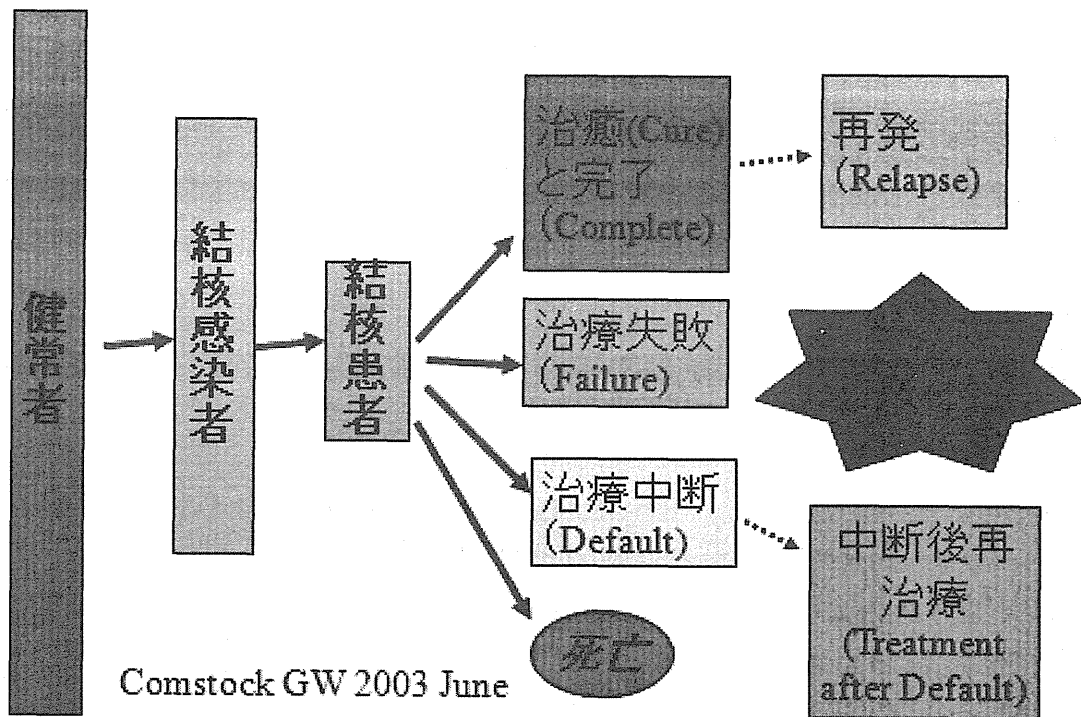
日本においては、臨床研究に関する倫理指針(平成 20 年厚生労働省告示第 415 号)、疫学研究に関する倫理指針(平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号)、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)に従っている。

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

図1 結核の感染・発病と治療転帰、難治化



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

日本では、複十字病院の結核登録を活用した検討をした。2007年1月1日より2013年12月末までに登録された結核患者2,748名において、外国と関連がある結核患者は5.9%の162名で、そのうち多剤耐性結核患者は49名(30.2%)であった。これは、外国と関連のない結核患者2,586名での、多剤耐性結核患者91名(3.5%)と比べて、オッズ比11.89(95%信頼区間8.01-17.65)と有意に高かった。

HIV合併結核研究としては、タイにおけるHIV感染者コホートの研究での保存血清を活用した潜在性結核感染診断法の検討を目指した、表1の様に臨床情報を整理した。

難治性結核の分子疫学解析をタイで進めて来た成果論文(Sukkasem S, et al. *Microbiology and Immunology* 2013 Jan;57(1):21-9)で、図2・図3に示す様に、その主な内容は、再治療の為に結核菌培養が得られた42人について検討したところ、40人は同一のRFLPパターンであったが、2人は異なるRFLPパターンがあり外因性再感染が疑われた。初回では多剤耐性が12.5%であったのが、2回目では22.5%と有意に高かった。これらの難治性結核で

北京株は66.7%と全国平均の20.8%に比して高かった。

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。

Spoligotyping (polymorphisms of the direct repeat (DR) region) による1,123株の菌体分類では、北京株が548例(48.8%)、EAI 株が406例(36.2%)、Euro-American 株が157例(14.0%)、CAS 株が11例(0.98%)、その他1株(0.09%)で、LSP/RD 法と相関していた。

菌の分類と臨床情報との相関の検討では、前述の RFLP での研究と同様に、年齢共に薬剤耐性が相関を示した。45歳で区別した場合、若年者での北京株は51.0%(353/692)と年配者での37.8%(242/641)とくらべオッズ比1.72(95%信頼区間1.38-2.14, $p < 0.0001$)と有意に高かった。また、多剤耐性菌の主である RFP 耐性菌での北京株の割合は56.5%(35/62)と RFP 感受性菌での割合の44.0%(519/1180)とくらべオッズ比1.65(95%信頼区間0.99-2.76)と高かった。体重、結核病変の部位(肺外病変の有無等)、胸部レントゲン所見(空洞の有無、広がり)、喀痰塗抹検査での菌量は、菌の分類と相関はなかった。

表2に、この結核患者1319人での1年間での死

表1 HIVコホートの中でQFTまたは保存血漿のある群の属性

特徴	QFTあり (n=247)	QFTなし(n=246)	特徴	QFTあり(n=247)	QFTなし(n=246)
Gender			CD4 at enrollment		
Male	21	87	<100	19	93
Female	32	107	100-149	8	13
Age			150-199	6	20
<15	5	8	200-249	6	10
15-34	12	79	250-299	3	11
35-59	36	104	300-349	2	10
60+	0	3	350+	9	37
BMI			ARV at enrollment		
<16	4	15	ARV	35	131
16-18.5	9	48	No ARV	18	63
18.5+	32	124	Missing	0	0
Missing	8	7	TB at enrollment		
TST			TB before enrollment	6	14
0	37	134	TB at enrollment	1	12
2-4	2	14	Non TB	46	168
5-9	4	13	Survival by April 2011		
10+	1	3	Dead	13	43
No TST	9	30	Alive	40	151

表2 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2 難治性結核の分子疫学解析 - タイ(1)

●難治性結核の分子疫学解析をタイで進めて来た成果論文が一つ受託された。(Sukkasem S, et al. *Microbiol Immunol* 2013 Jan; 57(1):21-29)

●再治療の為に結核菌培養が得られた42人について検討したところ、40人は同一のRFLPパターンであったが、2人は異なるRFLPパターンがあり外因性再感染が疑われた。

●初回で多剤耐性が12.5%であったのが、2回目で22.5%と有意に高。

●難治性結核で北京株は66.7%と全国平均の20.8%に比して高かった。

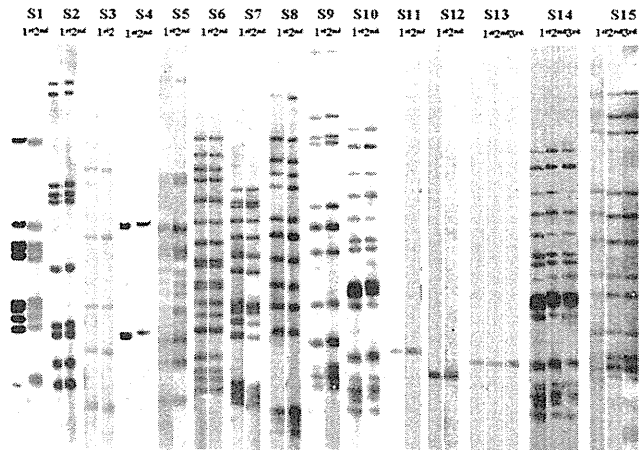


図3 難治性結核の分子疫学解析 - タイ(2)

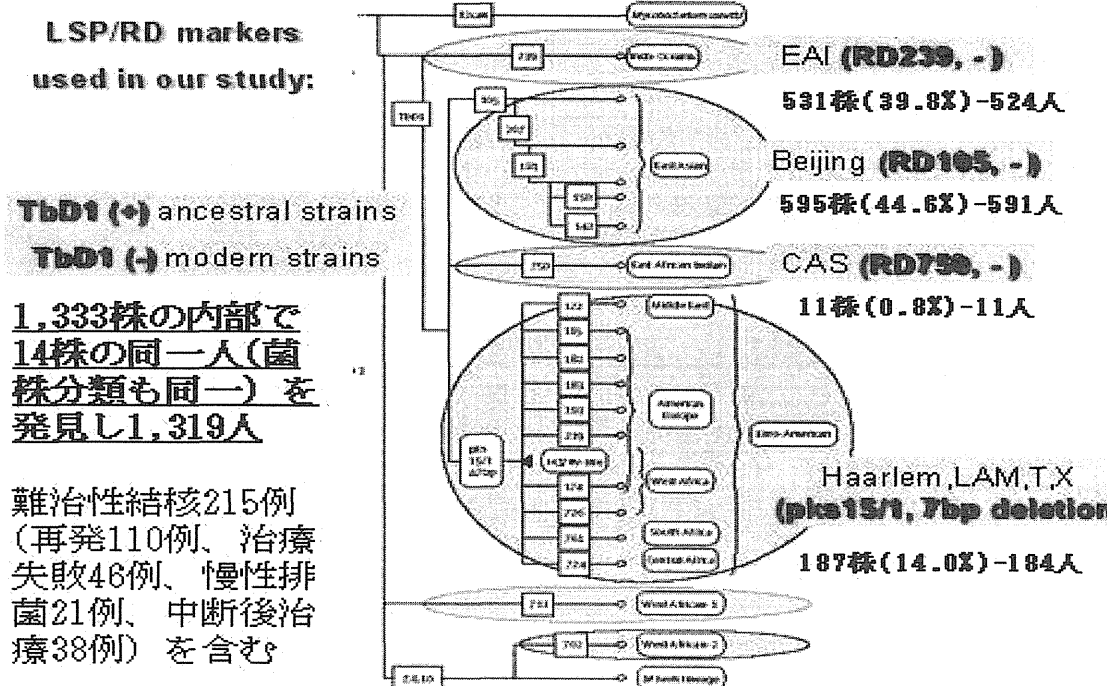
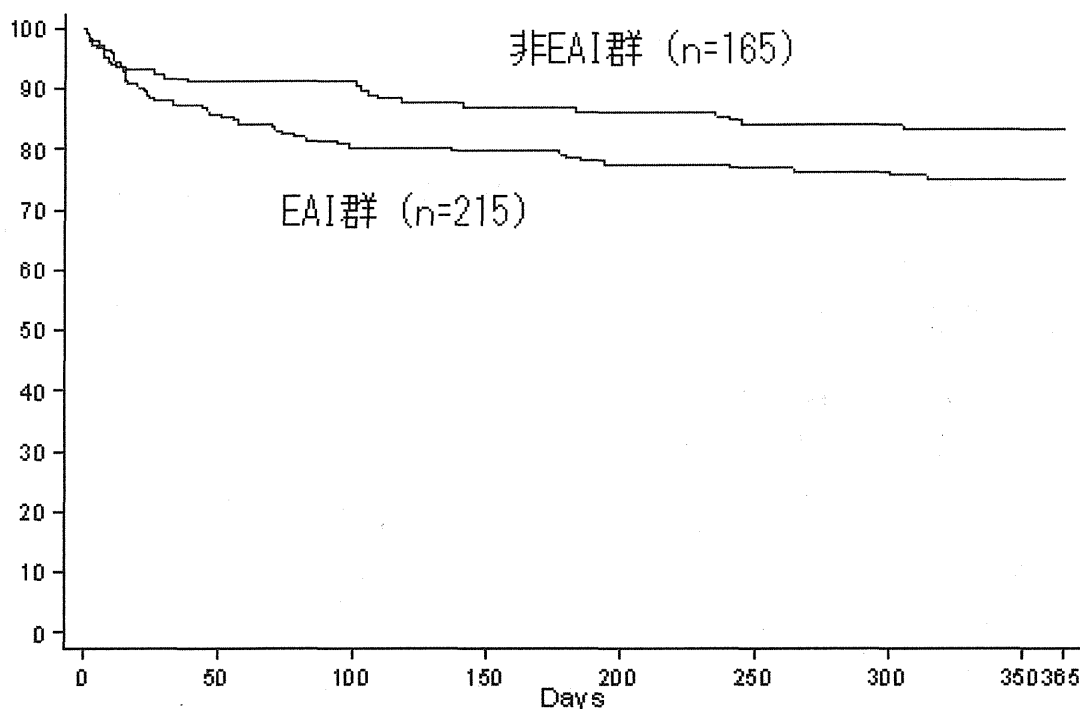


図4. EAI群と非EAI群の結核患者の治療開始1年間の生存曲線①
(55歳以上、HIV陰性または不明)



亡に関する危険因子を示す。Cox-Proportional Hazard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4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

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。

タイでの大規模でより詳細な菌解析は、論文報告した古典的なRFLP解析による少数の解析による北京型菌株がより難治性に関与するという仮説を検証

する結果が得られている。多剤耐性に対する検討や、多変量解析を使用するなどの検討など詳細な検討を進め、論文化を進めている。

日本の複十字病院での検討は、輸入感染症としての多剤耐性結核の重要性が明らかになった。2011年度は日本国籍であるが米国滞在42歳、タイ在住42歳、19歳、2012年度はインドネシアに長期に居住していた66歳、2013年度はフィリピンでボランティアをしていた2名を経験しており、海外渡航歴の聴取が重要と考えられる。

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。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。菌体の分子疫学解析に先立つ疫学因子解析の結果を報告する。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。

HIV合併結核に関して、WHOのTB/HIV専門委員会がHIV感染者の潜在性結核感染治療に関して再度の国際レビューを実施し、Efficacyに関して、HAART時代においてもINH等の抗結核薬が結核の予防に効果がある事を、結核研究所・山田国際部長のチェンライの解析データも含む確認後、HIV感染者に対し推奨している。WHOより結核血清診断の限界が指摘された影響にて、倫理委員会よりHIV陰性結核患者にて十分な結果が得られるか、細胞性免疫を活用した診断法を考える様に示唆された。複十字病院で、結核症の診断の一部で積極的な結核診断

法の活用をしており、精度管理について研究した。

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ている。

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*.57(1):21-9, 2013 Jan. 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、菟田泰誠、徳永勝士、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
2. 野内英樹、出井禎：結核菌特異的インターフェロン γ 産生能をみるクオンティフェロン 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
3. 野内英樹、関谷幸江、窪田素子、樋口一恵、吉山崇、尾形英雄、工藤翔二、原田登之：クオンティフェロン TB 検査(QFT-2G および 3G)における陰性コントロール値について。NPO 法人結核感染診断研究会・第1回総会・研究会(一般口頭演題 演題番号 5)、2012年5月、広島
4. 野内英樹、水野和重、青野昭男、吉山崇、倉島篤行、奥村昌夫、森本耕三、窪田素子、青木美砂子、上山雅子、早乙女幹朗、尾形英雄、工藤翔二：臨床検査残余検体を活用した菌と人の検体バンクによる難治性結核の研究。第87回日本結核病学会総会(一般口頭演題、診断(細菌学的診断、鑑別診断)2、演題番号 127)、2012年5月、広島
5. 野内英樹、出井禎：菌と人のコホート検体バンクによる結核の発症と難治化に関する要因研究(第3報)。第59回日本臨床検査医学会学術集会(一般口頭演題、遺伝子、感染症 演題番号

O-112)、京都、2012年11月日

6. 野内英樹、吉山崇、倉島篤行、出井禎、水野和重、石井加津恵、青野昭男、奥村昌夫、佐々木結花、尾形英雄、菟田泰成、徳永勝士、工藤翔二：薬理遺伝学を含む難治性要因研究の基盤作成を目指した結核患者コホート研究。第57回日本人類遺伝学会(一般演題 薬理遺伝学 P-18)、2012年10月25日、東京
7. 野内英樹、出井禎：菌と人の検体バンクによる結核の発症に関する要因研究(第2報)。第58回日本臨床検査医学会学術集会(一般口頭演題、抗酸菌 演題番号 O-167)、岡山、2011年11月

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

【Ⅷ】 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、平成 23 年度は、抗結核剤代謝に関連する宿主側遺伝子 *NAT2* の検討、平成 24 年度は、結核自然免疫に関連する宿主側遺伝子 mannose binding lectin (*MBL2*) の検討、平成 25 年度は、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。*NAT2* 遺伝子型は、イソニアジド迅速代謝型 (F) と代謝遅延型 (S) の割合がほぼ 1 : 1 であり、ベトナムでは遅延型 (S) が日本、韓国より多く、ヨーロッパ集団よりは少なかった。多剤耐性結核で遅延型 (S) が少ない傾向を示す結果が得られたが検出力が低く有意差には至らなかった。*MBL2* の遺伝子型により、明確に MBL の高発現型 (YA/YA)、中発現型 (YA/XA)、低発現型 (それ以外) に分けられた。高発現型の遺伝子型が多剤耐性結核群では健常者に比してやや低頻度に認められたが、検出力が低く有意差には至らなかった。さらに 27 種類のサイトカイン等の免疫系分子の血中濃度との関連を検討したところ、MBL とインターフェロン γ の血中濃度との間に有意な相関が認められた。また、インターロイキン 12 α 鎖 (p35) の遺伝子発現は MBL 値と逆相関にあった。MBL はヒトにおいて自然免疫の初期応答のみならず、Th1 応答にも影響を与えている可能性が示唆された。*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、その C アリル数に依存して多剤耐性結核の血液細胞由来の *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* 遺伝子高発現型と推定される H2 ハプロタイプ数に依存して、全血中の IL12 レセプター \cdot 1 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手法により明らかにすることを目的とした。

平成 23 年度は、特に抗結核剤の代謝と深く関係する *NAT2* 遺伝子についてその特徴的な遺伝子変異と遺伝子頻度の解析を試みた。*NAT2* 遺伝子は多型性に富み、20 以上の対立遺伝子型を有するが、その中で特にイソニアジドを迅速に代謝する迅速代謝型

(F) と代謝遅延型 (S) は、主に 3 つの非同義置換 341T>C (rs1801280)、590G>A (rs1799930)、857G>A (rs1799931) によって決定されており、これらにより遺伝子型の分類を試みた。

平成 24 年度、解析対象とした mannose-binding lectin (MBL) は分泌型のパターン認識受容体であり、微生物表面の糖鎖を認識して結合すると高次構造変化が起こり、プロテアーゼが活性化され、レクチン経路の補体活性化、オプソニン化 \cdot 貪食、あるいは微生物の融解を引き起こす。MBL 遺伝子 (*MBL2*) に多型が存在することは古くから知られており、プロモーター領域の H/L, X/Y, P/Q 多型、エクソン 1 の非同義置換を伴う A/B, C, D 多型が認められるが、連鎖不平衡の存在によって存在するハプロタイプの種類は限定されており、アジア人集団では本来のオリゴマー構造がとれなくなる B allele を持つ LYPB、プロモーター活性が低い X allele を持つ LXPA、の 2 つのハプロタイプが MBL 欠損/低発現型であり、他の HYPB, LYPA, LYQA は血中濃度も高い高発現型であるため、X/Y, A/B に注目すると、大きく YA/YA, YA/XA, その他の 3 群に分けられる。結核と MBL の遺伝的多型の関連はこれまでしばしば報告されてきたが、MBL 欠損/低発現型が結核に抵抗性であるという報告と、感受性であるという報告がともにあり、メタアナリシスでも結論が得られていないため、本検討を行った。

平成 25 年度は、量的形質座位 expression quantitative trait locus (eQTL) 解析と genome-wide association study (GWAS) を組み合わせることで新たに結核感受性遺伝子の候補として同定され

た(Barreiro LB, *et al.* PNAS 109:1204-9, 2012)、*DUSP14* (dual specificity phosphatase 14)の遺伝子多型を中心に検討を行った。*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化となった 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ともに脱リン酸化し、MAPK を不活性化状態に戻し、サイトカインの発現量を調節するなど免疫炎症制御の役割を担っている。

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。また多剤耐性結核患者ゲノムDNAからPCRにて各種遺伝子多型を同定した。

*NAT2*遺伝子タイピングは、主に3つの非同義置換341T>C (rs1801280)、590G>A (rs1799930)、857G>A (rs1799931)を同定することにより、実施した。

MBL遺伝子タイピングは、H/L, X/Y, P/Q, A/B多型のハプロタイプ構造を確認した後、MBLの発現に関連するX/YとA/Bの2カ所の多型については、約600bpの領域をPCR増幅して、X/YはBtg Iによる消化、A/BはBan Iによる消化によるPCR-RFLP法によって判定した。

MBLの血中濃度は、EDTA採血検体も正確に測定できる市販のELISAキット(Quantikine ELISA Human MBL R&D)によった。

血漿中のサイトカイン等、27種類のサイトカイン等の生理活性物質(IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGF-2, G-CSF, GM-CSF, IFN-g, IP-10, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, PDGF-BB, RANTES, TNF-a, VEGF)の濃度は蛍光ビーズアレイ(Bio-Plex サスペンションアレイシステム)を用いて同時スクリーニングを行なった。

*DUSP14*遺伝子タイピングは、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(*GZMY*, *PRF1*, *GZMB*, *STAT1*, *STAT4*, *STAT6*, *CXCL10*, *IFNG*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IL12RB1*, *IL12RB2*, *IL12A*, *SPP1*, *IL10*, *TGFB1*, *IL23A*, *TNF*, *LTA*, *IL15*, *IL18*, *FOXP3*,

表1 ベトナムにおける多剤耐性結核の*NAT2*遺伝子型から推測されるイソニアジド迅速代謝型(F)と代謝遅延型(S)の分布

NAT2 fast/slow alleles in MDR-TB in Viet Nam						
Genotype	Activity	MDR-TB (n=58)		HC (n=111)		Fisher
		Fast	Slow	Fast	Slow	
Inter-mediate	Fast	12	20.7%	31	27.9%	P=0.025
	Inter-mediate	35	60.3%	43*	38.7%	
	Slow	11	19.0%	37	33.3%	
Allele	Fast	59	0.509	105	0.473	P=0.567
	Slow	57	0.491	117	0.527	

* HC did not follow Hardy-Weinberg Equilibrium

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

1) *NAT2* 遺伝子型

ベトナム人の*NAT2*遺伝子型は、他の東南アジア集団における報告と同様、イソニアジド迅速代謝型(F)と代謝遅延型(S)の割合は、ほぼ1:1であり(表1)、日本、韓国など東アジア集団より遅延型(S)が多く、ヨーロッパ集団よりは遅延型(S)が少なかった。

多剤耐性結核では、表に示すように、対照集団より、遅延型(S)がより少ない傾向を示す結果が得られたが、対照集団の遺伝子型分布の偏位、検出力の問題が未解決で残っており、今後、より大規模な研究で、この結果を確認する必要がある。

2) MBL2 遺伝子型

MBL2遺伝子は高発現型(YA/YA)、中発現型(YA/XA)、低発現型(それ以外)に分けられた。MBLの高発現型と低発現型遺伝子型の比率をみると、MDRの例数が少ないので有意差は出ないが、高発現型(YA/YA)の遺伝子型頻度は、多剤耐性結核群では健常対照群に比べてやや低値を示した(データ省略)。

MBLは急性期蛋白質であり、結核患者では健常者より血中MBL濃度が高いことが報告されている。今回の検討で治療中(治療開始3~6か月後)の患者群でも、MDR-TBの血漿中のMBL濃度はYA/YAで高値、YA/XAでは中程度、それ以外は低値を示すことが明らかになった(図1)。

次にMBLの濃度が血中サイトカイン量と関連するかどうか蛍光ビーズアレイを用いてスクリーニングしたところ、インターフェロンγ(IFNG)濃度が最も確かな正の相関を示した(Spearmanの相関係数=0.34, P=0.0099)。

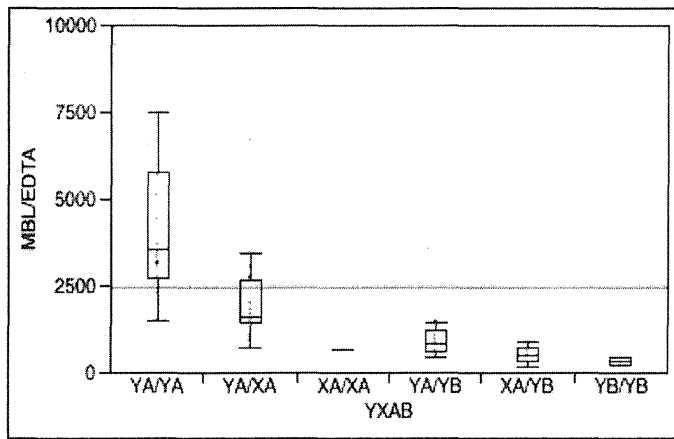


図1 MBL2 遺伝子型と多剤耐性結核治療中の血漿 MBL 濃度 (N=58)

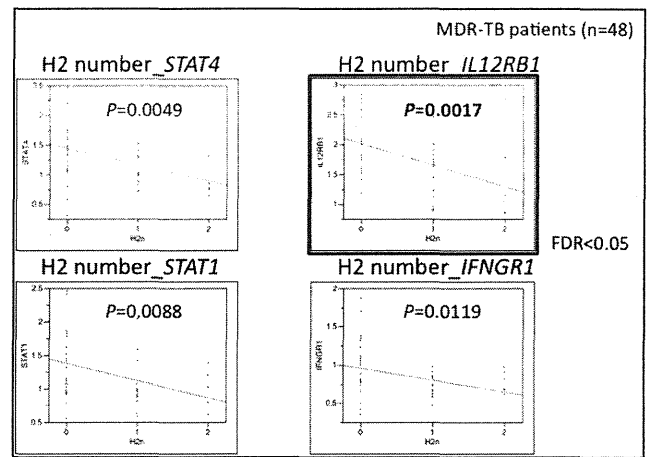


図2 DUSP14 ハプロタイプ H2 と全血球細胞の Th1 系免疫関連遺伝子発現

MBL 血中濃度と IFNG 濃度の相関がみられたので、さらに MBL の YA アレル (野生型) の保有数との関係を調べたところ、YA の本数は IFNG 濃度と有意に相関していた ($P=0.006$)。

一方、全血中の免疫関連分子の遺伝子発現量と MBL 血中濃度の関連を検討したところ、インターロイキン 12 (IL12) の α 鎖 (p35) の遺伝子発現は血中 MBL 値と逆相関を示した (Spearman の相関係数 = -0.43 , $P=0.003$)。

3) DUSP14 遺伝子型

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、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 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、有意差はみられなかった ($P=0.57$)。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 ($P=0.0121$)。

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、このうち高発現型と予想される H2 のハプロタイプ数に依存して、全血中の *IL12RB1* mRNA 発現が有意に低値を示した ($FDR < 0.05$)。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 2)。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も検討中である。

D. 考察

ベトナム人における多剤耐性結核と宿主要因の関連について、本研究班の 3 年間で、初めてアプロー

チした。

NAT2 遺伝子の遺伝子型は、これまでイソニアジドによる肝障害が遅延代謝型 (S) に多いことが報告されてきたが、薬剤動態研究の結果により、迅速代謝型 (F) では不十分な治療によりイソニアジドの濃度が十分に上がらない可能性が強く疑われる。最近、迅速代謝型 (F) が治療失敗や薬剤耐性の獲得に関連するとの報告があるが (Pasipanodya JG, et al. Clin Infect Dis. 55:169-77, 2012.)、多剤耐性結核と NAT2 遺伝子型との関連解析については十分な報告が無く、今後、さらに検討を進める必要がある。

MBL 遺伝子多型は多剤耐性結核自体とは強い関連は示さなかったが、MBL 遺伝子多型は非炎症状態のみならず、結核治療中のような炎症状態でも血中濃度に強い影響を与えていた。同時に測定された患者の CRP 値などの炎症指標には大きなばらつきがあったが、MBL 血中濃度はむしろ宿主側要因により明確に規定されていることが明らかになった。また MBL はインターフェロン γ 血中濃度と正の相関を示し、*IL12* α 鎖 (p35) 遺伝子発現と負の相関を示した。

自然免疫系の分子として知られる MBL 遺伝子多型が疾患における Th1 応答に関連することは、MBL が従来言われている菌のオプソニン化のみならず、宿主の Th1 応答とも緊密に関連していることを示唆するものであった。また別の Th1 系遺伝子である *IL12* α 鎖 (p35) の mRNA 発現が MBL の高濃度と逆相関するという事は、すでに病変局所に動員されているのか、何らかの negative feedback メカニズムによって抑制されている、などが考えられた。

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。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た。

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。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。

この3年間、ベトナム人多剤耐性結核について、迅速に研究を実施することができたことは、長い共同研究の歴史に基づく信頼関係によるものである。多剤耐性菌は、ベトナムにおいても最近、深刻な問題としてとらえられており、さらに両国に裨益する研究成果が期待される

E. 結論

抗結核剤代謝に関連する宿主側遺伝子 *NAT2*、結核自然免疫に関連する *MBL2*、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* の遺伝子多型がそれぞれ、多剤耐性結核の異なる局面に影響を与える可能性を明らかにすることができた。

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、今後も多剤耐性結核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 Respiriology, 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.
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, 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 Respiriology, November 11-14, Yokohama, Japan, 2013.

8. Hijikata M, Hang NTL, Yen NTB, Hong NT, Sakurada S, Lan NN, Kobayashi N, Dung NH, Keicho N. Association between Immune Gene Expression Levels in the Whole Blood from Patients with Multidrug-resistant Tuberculosis and Their Treatment Outcome. In: 第52回日本呼吸器学会総会, 4月20日-22日, 神戸, 2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況

[IX] 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

抗結核菌活性を持つ抗菌ペプチド等に焦点を中てた。すなわち、血漿中グラニュリシン値と潜在性結核感染の関連解析を行った。活性型ビタミン D₃ による M-CSF 存在下に分化したヒト単球由来活性型マクロファージ (M-M ϕ) の活性化機構に与える影響、とくに抗菌ペプチド cathelicidin 遺伝子の発現への影響を検討した。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を試みた。

A. 研究目的

1. 潜在性結核感染における末梢血グラニュリシン発現レベルを検討し、質問紙にて調査した臨床疫学的要因と併せて解析を実施して、活動性結核の発症や再活性化におけるグラニュリシンの役割について、将来のより大規模な臨床研究の足がかりとする。
2. 活性型マクロファージ M-M ϕ における活性型ビタミン D₃ によるヒト型結核菌及び BCG に対する抗菌メカニズムを明らかにする。結核菌に感染した M-M ϕ が結核菌殺菌時に産生する抗菌活性因子の候補分子 dermicidin 遺伝子の発現について検討を行う。

B. 研究方法

1. ベトナム・ハノイ市の肺病院及び地区の結核センターの医療従事者 109 名を対象に、インタビューと採血を実施した。IFN- γ 遊離テスト (QuantiferonTM-Gold in tube) にて診断された潜在性結核感染における末梢血グラニュリシン発現レベルを ELISA にて検討し、質問紙から得られた臨床疫学的情報と併せて統計解析を行った。

(倫理面への配慮)

国立国際医療研究センターの倫理委員会とベトナム保健省の倫理委員会の審査を受け、研究の承認を得た。

2. M-CSF 存在下にヒト末梢血単球より活性型マクロファージ (M-M ϕ) を得た。培養液中の十分な濃度の 25(OH)D₃ 或いは 25(OH)D₃ と IFN- γ の存在下において BCG を感染させ、CYP27B1、VDR、cathelicidin、IL-15 遺伝子の発現を定量的 RT-PCR にて検討した。さらに、別研究で M-M ϕ に結核菌 (H37Rv) を感染させた 3 日後の培養上清中に同定された抗菌ペプチド dermicidin の遺伝子の発現検討を試みた。

C. 研究結果

1. ベトナム・ハノイ市の肺病院及び地区の結核センターの医療従事者 109 名において、血漿グラニュリシン値と潜在性結核との関連性が示唆された。IFN- γ 遊離テスト陽性者では健常者と比較して有意にグラニュリシンの発現が低下していた。年齢や性別により補正しても結果は変わ

らなかった。また、他の臨床疫学的要因では BMI 以外では潜在性結核感染と関連する要因はなかった。

2. 活性型マクロファージの一種と考えられる M-M ϕ においては活性型ビタミン D₃ 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)D₃ 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-M ϕ 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 D₃ 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。

dermicidin 遺伝子の発現検討は現在行っているところである。

D. 考察

1. 今回の研究では、血漿グラニュリシン値と IFN- γ 遊離テスト陽性の関連が示唆されたが、末梢血中のグラニュリシンの発現レベルの低下が、活動性結核発症のリスクと相関するマーカーになり得るかを明らかにするためには、潜在性結核感染者を同定し前向きコホート研究を行う必要がある。前向きコホート研究等を実施することで、潜在性結核感染症から活動性結核への発症リスクと血漿グラニュリシン値の発現が関連すれば、活動性結核発症のリスクマーカーとして、潜在性結核感染者のなかのハイリスクグループを特定できる可能性がある。この場合、開発途上国等の高蔓延国においては、ハイリスクグループに的を絞っての予防的治療を行うことによって、コストを削減することができる (約十分の一)。
2. 同じように末梢血単球から分化したマクロファージであっても、GM-M ϕ においては、活性型ビタミン D₃ による関連遺伝子の発現増幅はまったく認められなかった。遊走性食細胞としての性格の強い M-M ϕ と比較すると GM-M ϕ は residential macrophage としての性格が強い細胞である。また、双方のマクロファージにおいて IFN- γ により発現が増幅される IL-15 は、キラー T 細胞におけるグラニュリシンの発現を誘導すると言われている。現在、dermicidin の

発現は検討中であるが、活性化ビタミン D₃ の活性化メカニズムが働かないような低濃度の 25(OH)D₃ の存在下でも M-M ϕ は結核菌を効率的に殺菌することが分かっている。この細胞においては、活性化ビタミン D₃ の活性化メカニズム以外の殺菌メカニズムがより重要あることが示唆された。

E. 結論

1. 潜在性結核と血漿グラニュリシン値の間には関連があることが示唆された。
2. 活性型マクロファージ M-M ϕ において BCG 感染時の活性型ビタミン D₃ は関連遺伝子の発現を増幅させた。一方、GM-M ϕ ではそのような増幅は認められなかった。活性型ビタミン D₃ による活性化はマクロファージの表現型によって反応が異なることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表
無し

2. 学会発表

1. 櫻田紳策、PanaddaDehpakson、赤川清子、山崎利雄、慶長直人: 「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における活性型ビタミン D₃ 関連遺伝子の発現解析」, 第 24 回日本生体防御学会、熊本、2013 年 7 月.
2. 櫻田紳策、PanaddaDehpakson、赤川清子、山崎利雄、慶長直人: 「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における活性型ビタミン D₃ 関連遺伝子の発現解析」, 第 83 回実験結核研究会、千葉、2013 年 3 月.
3. 櫻田紳策、赤川清子、慶長直人: 「結核及び HIV 合併結核患者末梢血単球由来マクロファージにおけるビタミン D 関連遺伝子の発現についての検討」, 第 86 回日本結核病学会、東京、2011 年 6 月.

H. 知的所有権の取得状況

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

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

研究分担者 竹田 潔 大阪大学大学院医学系研究科・免疫制御学・教授

研究要旨

結核菌の病原性因子 ESAT-6 がマクロファージ内で、貪食胞の機能に関わる分子 LAMP-1 と会合し、何らかの分子機構で LAMP-1 を分解し、貪食胞の成熟をブロックしていることが示唆された。

自然免疫応答に関わる Absent in Melanoma 2 (AIM2) の遺伝子欠損マウスは、結核菌に対する感受性が高くなった。その分子機構として、AIM2 は、細胞質内に逃れた病原性結核菌の DNA 認識し、インフラマゾームの活性化、そして IL-1 β , IL-18 の分泌を誘導することにより、結核菌感染防御を担っていることが明らかになった。

また、ヒアルロン酸合成酵素 HAS1 の欠損マウスが、結核菌感染に対する感受性が高いことが明らかになった。

A. 研究目的

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

結核菌がマクロファージに侵入後、貪食胞の成熟を抑制し、増殖をするが、貪食胞の成熟を抑制するメカニズムには不明な点が多い。結核菌の病原性因子として分泌たんぱく質である ESAT-6 が知られていて、これらの遺伝子はワクチン株としてももちいられる M. bovis BCG 株で欠損していることが知られている。ESAT-6 は、T 細胞に対する強い抗原性を有していることが知られているが、マクロファージの機能に及ぼす影響は明らかになっていない。そこで、マクロファージ内の貪食胞で分泌される ESAT-6 が宿主細胞とどのように相互作用するかを解析した。GST 融合 ESAT-6 タンパク質を作製し、これをマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞の溶解液と混合し、その後 GST pull down を行うことにより、ESAT-6 に会合する宿主分子の同定を試みた。

細胞内 DNA センサーとして同定された Absent in Melanoma 2 (AIM2) の結核感染における役割を、遺伝子欠損マウスを定法により作製し、このマウスに結核菌を経気道的に感染させ、野生型マウスと感受性を比較した。

ヒアルロン酸合成酵素 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、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

GST 融合 ESAT-6 タンパク質を用いた GST pull down 解析で、ESAT-6 に会合する宿主分子を探索した。その結果、従来 ESAT-6 に相互作用することが報告されている、TLR2, MHC class I 分子が同定された。このことから、この解析系は、ESAT-6 の会合分子を解析するのに適した実験系であることが示唆された。そこで、さらにプルダウンされてきたタンパク質のシーケンスを行った結果、これら分子以外に LAMP-1 を同定した。次に、LAMP-1 と ESAT-6 遺伝子をそれぞれ動物細胞様発現ベクターに組み込み、HEK293 細胞に導入し、免疫沈降法により両分子の会合を解析した。その結果、ESAT-6 を発現した細胞では、LAMP-1 の発現が抑制されることが明らかになった。また、ESAT-6 の種々の deletion mutant を発現させた解析から、ESAT-6 の N 末端から 30-60 塩基の領域が、LAMP-1 の発現抑制に関与することが明らかになった。

AIM2 欠損マウスに結核菌を経気道的に感染させ、その後の生存率を野生型マウスと比較した。その結果、AIM2 欠損マウスは、全例が7週以内に死亡した。また、感染4週後の肺や肝臓の結核菌数も AIM2 欠損マウスで有意に増加していた。このように、AIM2 欠損マウスは、野生型マウスに比べて有意に結核感染に対する感受性が高いことが明らかになった。AIM2 はインフラマゾームを活性化させ、IL-1 β /IL-18 などの IL-1 ファミリーサイトカインの分泌を誘導することが知られている。そこで、結核菌感染後の血清中の IL-18 の濃度を測定した。野生型マウスでは結核感染3週後に血清中 IL-18 濃度が上昇したが、AIM2 欠損マウスでは全く上昇しなかった。IL-18 は Th1 応答に関与していること

が知られているので、次に結核感染3週後の脾臓のCD4陽性T細胞からのIFN-gamma産生を解析した。その結果、AIM2欠損マウスでは、IFN-gamma産生が野生型マウスに比べて有意に低下していた。

さらにAIM2の結核感染防御機構を解析した。AIM2欠損マウス由来の腹腔マクロファージは、結核菌感染によるcaspase-1(p10)の発現が誘導されなかった。また、結核菌ゲノムDNA刺激によるIL-1beta, IL-18分泌が認められなかった。またcaspase-1(p10)の発現も誘導されなかった。結核菌DNAをHoechst 33342で蛍光ラベルし、マクロファージ細胞株RAW264.7に感染させ、貪食胞を認識する抗Rab7抗体で免疫染色すると、貪食胞とマージする結核菌だけでなく、マージしない結核菌が認められた。

結核菌感染により、肺組織でヒアルロン酸が著明に蓄積した。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高くなった。HAS3欠損マウスは、結核感染に対する感受性が正常マウスとの間に有意な差を認めなかった。一方、HAS1欠損マウスでは、結核感染4週間後の肺での結核菌数が有意に多くなっていた。

D. 考察

結核菌の病原性因子として知られているESAT-6に会合する分子として、LAMP-1を同定した。ESAT-6を哺乳類細胞に発現させると、LAMP-1の発現が抑制されることから、結核菌がマクロファージに侵入後、貪食胞内で分泌されたESAT-6が、貪食胞の成熟に関与するLAMP-1と会合することにより、LAMP-1タンパク質を何らかの分子機構で分解し、その結果、貪食胞の成熟を抑制していることが示唆された。今後、ESAT-6がどのような機構でLAMP-1の発現を抑制するかを解析していく。

AIM2欠損マウスは、結核感染に対する感受性が極めて高くなった。AIM2は細胞内でDNAを認識し、インフラマゾームを活性化し、IL-1ファミリーサイトカインの分泌を誘導する分子として知られている。実際、AIM2欠損マウスでは、結核感染後のIL-18濃度の上昇が認められなかった。今後、AIM2がどのように結核菌を認識しているかを明らかにしていきたい。

ヒアルロン酸合成酵素HAS1が結核感染防御に重要な役割を担っていることが明らかになった。今後、HAS1による結核感染防御機構を明らかにしていきたい。

E. 結論

結核菌の病原性因子ESAT-6が宿主マクロファージ内での貪食胞の成熟に関与するLAMP-1を会合することを見出した。ESAT-6を発現させるとLAMP-1の発現が抑制されることを見出した。

AIM2欠損マウスは結核感染に高感受性であった。また血清中のIL-18濃度の上昇も認められなかった。

HAS1欠損マウスは、結核菌に対する感受性が亢進していた。

G. 研究発表

1. 論文発表

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. Germany-Japan Immunology Seminar 2013. 12.5-8, 2013 Shizuoka Japan
7. Kiyoshi Takeda Probiotics and innate immunity: Implication for chronic disease prevention. 5th India Probiotics Symposium, December 15-16, 2012, Bagalore, India
8. Kiyoshi Takeda Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. The 4th AsiaHORCs Joint Symposium, Buyeo, Korea, November 11-14, 2012
9. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting 2012, October 23-26, 2012, Tokyo
10. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. The 34th Naito Conference, October 16-18, 2012, Sapporo, Japan
11. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. The 7th RCAI International Summer Program, June 22-27, 2012, Yokohama
12. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. Macrophage Molecular and Cellular Biology 2012, June 15-16, 2012, Tokyo
13. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. ICAD Forum, April 18-19, 2012, Tokyo
14. Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, Regulatory Mechanisms of Immune Responses to Intestinal Bacteria. Keystone Symposium. Mar 4-8, 2012. Keystone, USA
15. Kiyoshi Takeda, Regulation of gut

3. その他 なし

- homeostasis by microbiota and innate immunity. The 4th Symposium of Immunological Self. Jan 27-28, 2012, Kyoto, Japan
16. Kiyoshi Takeda. Innate immune responses to mycoacterial infection. The 46th US-Japan Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Dec 7-9, 2011, Saitama, Japan
 17. Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, A unique subset of intestinal myeloid cells suppress T cell-dependent intestinal inflammation. 第40回日本免疫学会学術集会(国際シンポジウム) 2011年11月27-29日、千葉
 18. Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama. Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. 日本食品免疫学会第7回学術大会、2011年10月18-19日、東京
 19. Kiyoshi Takeda. Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. The New Zealand Australian Society for Immunology Branch Meeting 2011, June 30-July1, 2011. Wellington, New Zealand
 20. 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
 21. 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
 22. 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
 23. 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・再生医学学会、2013年7月2-3日、京都
 24. 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
 25. 竹田潔 腸管免疫と炎症制御。第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2012年7月20日、福岡
 26. 竹田潔 プロバイオティクス細菌による腸管免疫制御機構。第12回日本抗加齢医学会総会、2012年6月24日、横浜
 27. 竹田潔 自然免疫と消化管疾患。第24回日本アレルギー学会春季臨床大会、2012年5月12日、大阪
 28. 竹田潔 自然免疫系による慢性炎症性腸疾患の制御。第49回日本臨床分子医学会学術総会、2012年4月13-14日、京都
 29. 竹田潔 自然免疫と炎症性疾患。第48回日本眼感染症学会、2011年7月8-10日、京都
 30. 竹田潔 自然免疫による腸管免疫の制御。第28回日本医学会総会、2011年4月8-10日、東京

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

[XI] HIV感染者での結核早期診断方法としてのクオンティフェロンTBゴールドとT-スポット TBの比較検討及び播種性MAC症の早期診断方法としてのキャピリアMAC抗体ELISAの有用性の検討に関する研究

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、2種類のインターフェロン γ 遊離試験の有用性を検討した。結核症とMAC症の鑑別を目的として、キャピリアMAC抗体ELISAをHIV合併播種性MAC症の患者で施行したが、陽性率は4.3%と極めて低くかった。HIV合併播種性MAC症の補助診断としては有用ではなかった。

A. 研究目的

(1)結核の診断では、近年、BCGの影響を受けず、客観性のある検査であるInterferon γ Releasing Assay (以下IGRA)がツベルクリン反応に代わり行なわれるようになりつつある。

本邦では、平成22年4月1日よりIGRAの1つである第3世代クオンティフェロンTBゴールド(以下QFT-3G)が保険診療で行なえるようになった。本研究では、平成24年度にHIV感染者におけるQFT-3Gの有用性について、当院の新規HIV感染者を対象にQFT-3Gを施行し、同群における陽性率などを明らかにした。

更に、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。

以上の研究を行うことで、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に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。

(2)*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補助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症に適用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)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。

(2)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)新規HIV患者数は26例で、全例男性で、年齢の中央値は36歳(23-64)、国籍は日本23例(88.5%)、男性同性愛者22例(84.6%)、CD4の中央値は

306(14-682)/ μ Lであった。全症例で、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-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。

(2) 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検査を施行したが、全例で陰性であった。

D. 考察

(1)平成 24 年度施行した QFT-3G の結果では、新規 HIV 感染者 149 例中の QFT3-G 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であった。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。

(2) 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る。

E. 結論

(1)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。

(2) 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 88:827-841, 2013.

2. 学会発表

1. 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

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
研究協力報告書

国立病院機構呼吸器ネットワークを活用した多剤耐性結核の迅速診断・隔離法開発

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いる。その診断の遅れは、治療失敗につながるのみならず、他者への感染リスクの増大をももたらすため、迅速な診断はきわめて重要である。我々は、多剤耐性結核のスクリーニング法としてのリファンピシン（RFP）耐性迅速診断法の有用性につき検討を行った。従来法の薬剤感受性検査を good standard とした場合の感度は 93.3%、特異度は 99.7%と優れた成績が得られた。本法は RFP 耐性迅速診断、ひいては多剤耐性結核の迅速なスクリーニング法として有用であると考えられた。

A. 研究目的

多剤耐性結核の診断の遅れは、患者本人の治療失敗に加えて周囲への感染拡大につながるため、迅速な感受性検査はきわめて重要である。ジェノスカラー Rif-TB は、喀痰中の結核菌に存在する RFP 耐性遺伝子である *rpoB* 遺伝子領域の変異をラインプロブアッセイで検出することによる RFP 耐性迅速診断法であり、24 時間以内に結果を得ることができる。RFP 耐性結核の大部分は多剤耐性結核であるため、本法は多剤耐性結核のスクリーニング法としても期待できる。我々は本法の従来法との相関、有用性につき検討した。

B. 研究方法

結核を疑われて当院を受診した患者で、喀痰検査でアンプリコマイコバクテリウムによる PCR 検査を行って結核菌群陽性と判定された 331 例を対象とした。対象患者の喀痰を用いてジェノスカラー Rif-TB を行い RFP 感受性の有無を判定した。同時に、喀痰検体から培養された結核菌に対して通常の MGIT 及びウェルパックによる小川比率法を用いた薬剤感受性検査を行って、結果を比較検討した。

（倫理面への配慮）

いずれも保険収載されている通常の検査キットを用いた検討であり、また retrospective な検討であり、倫理的な問題はないものとする。

C. 研究結果

331 例のうち、培養陰性であった 8 例を除く 323 例で比較検討を行った。ジェノスカラー Rif-TB で RFP 感受性と判定されたのは 308 例であり、307 例は通常の薬剤感受性検査でも RFP 感受性であったが、1 例は MGIT 法では感受性であったが小川比率法では耐性であった。この例は臨床的には排菌陽性が遷延しており RFP 耐性と考えられた。また、ジェノスカラー Rif-TB で RFP 耐性と判定された 15 例中、14 例は MGIT 法・小川比率法いずれも RFP 耐性であったが、1 例は MGIT 法で感受性であった。RFP 耐性の 14 例中 11 例(78.6%)は INH にも耐性を示す多剤耐性菌であった。

D. 考察

本法の感度は 93.3%、特異度は 99.7%と優れた結果が得られており、また本法で RFP 耐性と判定された例の 78.6%は多剤耐性であり、多剤耐性結核の迅速なスクリーニング法としても有用であると考えられた。

E. 結論

ジェノスカラー Rif-TB による RFP 耐性迅速診断法は、従来法との相関も優れており、多剤耐性結核の迅速診断法としても有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. K. Tsuyuguchi, S. Yoshida, T. Nakatani, Y. Inoue, K. Suzuki, M. Okada and S. Hayashi. : Clinical features of *Mycobacterium kansasii* pulmonary disease. American Thoracic Society 2013 International Conference (2013. 5. 21. Philadelphia)
2. 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
3. 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
4. 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
5. 露口一成、吉田志緒美、鈴木克洋、岡田全司、林清二：イソニアジド（INH）による潜在性結核感染症治療後の INH 耐性誘導リスク。第 109

- 回日本内科学会講演会、2012.4.15. 京都
6. 露口一成：結核の入院と退院の基準再考. ミニ
シンポジウム 2 再考・結核の入院と退院の基
準. 第 87 回日本結核病学会総会、2012.5.11.
広島

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