

[] 中国とフィリピンで収集した結核菌の遺伝子・免疫学的解析

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 凌 虹 ハルビン医科大学微生物学教室 教授
張曉燕 復旦大学公衆衛生学院新興感染症センター 教授
Elizabeth Telan SACCL 所長
鈴木定彦 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
国際疫学分野 教授
中島千絵 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
国際疫学分野 助教

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と中国の検体を用いて行った。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。抗 PCR 法も用いた。フィリピンでは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、spoligo typing 法で遺伝子型を同定した。

A. 研究目的

中国東北部（ハルビン医科大学）、南部（上海・復旦大学）、フィリピン（マニラ・サンラザロ病院）との共同研究を通して同地の結核菌の分子遺伝子学的に特性、薬剤耐性、免疫応答性の解析によって日本に輸入感染症としての危険性を把握し対策を立案する。

北京/非北京型の結核菌を新たな Rv0679c multiplex PCR 法を用いて平易で、さらに低価格でモニターできる方法の開発を目指した。さらに Rv0679c 抗体を測定することによって血清学的に活動性結核患者と潜在性結核感染者の結核菌の遺伝子型を同定する。

フィリピンに loop isothermal amplification assay (LAMP) を導入し、その有効性を実証する。Spoligo typing 法を用いてアジアに多く流布する北京型結核菌感染をマニラにおいて確認する。各遺伝子型の特徴な免疫反応を 40 種以上のバイオマーカーを用いて明らかにする。さらに適切なカットオフを同定し、将来の診断方法に用いられるマーカーとマーカーの組み合わせを明示する。

B. 研究方法

1. ハルビン医科大学で収集した 44 例の喀痰からの結核菌を培養し、抽出した DNA の分析が日本で行った。PCR を用いて Rv0679c, RD105, RD207, Tbd1 の領域を調べた。復旦大学で肺結核 45 人、肺外結核 26 人、AIDS 結核 16 人を含め、87 例の結核患者 39 例健康者ともに血漿中の Rv0679c IgG と IgA 抗体を ELISA 法で測定した。

2. サンラザロ病院の未治療結核患者（37 例）の喀痰と血漿を集めた。喀痰から DNA を抽出し、現場で LAMP 法を用いて MTB complex を確認した。また日本において spoligo typing 法で結核菌遺伝子型を同定した。血漿中の 38 種のサイトカインとケモカインを Luminescence 法で、osteopontin (OPN), galectin-9 (gal-9) と TBGL IgG・IgA を ELISA 法で測定した。

C. 研究結果

1. 中国・黒竜江省の結核菌の解析では 44 例中 42 例 (95%) は北京型であり、その中 2 例は新たな北京型を同定した。他の 2 例 (5%) はまだ分類されていない新たな非北京型のサブタイプであった。さらに薬剤耐性結核の解析を行い黒竜江省の結核菌の解析では 1,230 株の解析を行い、通常の抗結核剤あるいはフルオロキノロンに対する抵抗性を検討した。その結果、通常の抗結核剤に対する抵抗性は 2007 年から 2011 年までの薬剤耐性株は 58.4% で MDR は 23.3% であった。耐性株の比率は 2009 年が最も高く、2011 年が最も低かった。2011 年では新規患者の 8.1% が、治療歴のある患者の 31.9% が MDR-TB であった。期間全体では、何らかの薬剤耐性を示したものが 35%、MDR が 23% であった。

さらに Rv0679c 点突然変異を検出するため単純な multiplex PCR 法を開発し、619 臨床分離株に適用した。この法によって非北京型と北京型の株を 100% の正確さで鑑別できる。この迅速なかつ費用対効果の高い multiplex PCR 法を北京型結核菌感染の有病率を監視するために使用することができた。

復旦大学に所属する上海公衆衛生臨床センターで 200 検体の結核患者及び正常人のサンプルを検索した。肺結核中 TBGL-IgG 抗体の検出感度及び特異度はそれぞれ 67.4% と 81.0% であった。また TBGL-IgA 抗体の検出感度及び特異度はそれぞれ 45.7% と 89.7% である。Rv0679c 蛋白の BCG 型 (Asn) と北京型 (Lys) との IgG・IgA 抗体を検索した。肺結核患者中に Rv0679c-Asn-IgA 及び Rv0679c-Lys-IgA の高値を検出した。空洞と胸水のある症例では Rv0679c-Asn-IgA 及び Rv0679c-Lys-IgA が低い傾向があった。上海での 45 例の肺結核中の 24 例 (53.3%) は Rv0679c-Lys142 に対する IgG 抗体を検出した一方、4 例 (8.9%) は Rv0679c-Asn142-IgG を検出しなかった。Lys142-IgG と C-Reactive Protein (CRP) の相関を初めて発見した。

2. フィリピン・マニラのサンラザロ病院の抗酸菌染色陽性菌は 100% MTB complex であることを LAMP 法で確認した。Spoligotyping によって結核菌の遺伝子型は全てマニラ型であることを明らかにした。判別関数解析およびレシーバオペレータ特性曲線分析によってバイオマーカーの予測能力を評価し、最大限に検討グループ間を区別検体のセットを選択するカットオフ値を同定した。OPN, IP-10 と好中球は結核発症のマーカーとして使用できた。また OPN, IP-10, 好中球, IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 血小板, gal-9, 及び白血球数との組み合わせで結核を 96.3% 正確に予測できた。フィリピンにおいては TBGL IgG の適切なカットオフは 4 U/ml が妥当と思われた。

E. 考察と D. 結論

中国とフィリピンにおける結核の共同研究体制を確立した。この3年間のデータをもとに、結核菌の北京型同定のための抗 Rv0679c 抗原に対する血清診断の試みと IgA 抗体産生機序とその意義についてさらに研究を行う。さらにインドネシアの検体も Human security course の教育経由で入手が可能であり、既に LTBI, TB 患者由来の血漿は入手済みである。さらにインドネシアの留学生結核患者の結核菌も現在解析中であり、その遺伝子型の解析にも努める。また東北地方はの外来結核菌の侵入程度を検索するための東北地方の結核菌の遺伝子型も検索する。

この研究において、中国における北京型・薬剤耐性の頻度が極めて高いことが再確認された。またフィリピンにおいては北京型がいまだに確認されており、その理由の解明も必要である。今後我が国の結核菌型も同定しながら、我が国に留まらず近隣諸国の結核感染阻止対策を提言したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakajima C, Tamaru A, Rahim Z, Poudel A, Maharjan B, Aye KS, Ling H, Hattori T, Iwamoto T, Fukushima Y, Suzuki H, Suzuki Y, Matsuba T. A simple multiplex PCR for the identification of Beijing family of Mycobacterium tuberculosis with a lineage-specific mutation in Rv0679c. *J Clin Microbiol* 51(7):2025-2032, 2013

2. 学会発表

1. Shiratori B., Okumura, M., Yanai, H., Yoshiyama, T., Chagan-Yasutan, H., Tanaka, M., Matsumoto, M., and Hattori, T. : A ttempt to distinguish between LTBI and active TB by latency-related antigens and biomarkers. The Third B izan Immunology Symposium at The University of Tokushima (BSUT3) "Immune System Development, Deviation, and Regulation". Tokushima, Japan. 13-14th February 2014.
2. Shiratori B., Hasibuan, FM., Senoputra AM., Alisjahbana B., and Hattori, T. : A ttempt

- 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.
3. 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.
 4. 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 naive pulmonary TB patients in Metro Manila. NII Hohoku University-JSPS Symposium. Sendai, Japan. 9-11th May 2013.
 5. Shiratori B. and Hattori, T. : Immunological status of treatment-naive sputum positive TB patients in Manila. The 1st meeting of Ministry of Health, Labour and Welfare science research grants (Emerging and reemerging infectious disease research project). Osaka, Japan. 5th July 2013.
 6. Shiratori B., Leano, S., Zhao, J., Chagan-Yasutan, H., Niki, T., Hirashima, M., Telan, E., and Hattori, T. : Immunological status of Treatment-Naive Sputum Positive Pulmonary TB Patients in Metro Manila. US-JAPAN Cooperative Medical Science Program : Tuberculosis and Leprosy Panel. Sapporo, Japan. 17th August 2013.
 7. 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.

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