

# 大阪市の結核治療成功要因の分析による DOTS 事業の評価

1,2中川 環 1下内 昭

**要旨：**〔目的〕結核治療成功のための患者支援について検討する。〔対象と方法〕平成15, 16年喀痰塗抹陽性肺結核新登録患者のうち治療中・転出を除く1292名について結核患者管理評価票の項目について分析し、治療成功群、失敗・中断群に分け多重ロジスティック回帰分析を実施した。〔結果〕治療成功の要因は、「ホームレス以外」「合併症無」「RFP耐性無」「治療終了までDOTS実施有」に有意差が認められた。〔結論〕結核治療を成功させるためには、生活背景や治療期間に影響を与える薬剤耐性および合併症の問題等を把握し、医療機関との連携を密にしながら、個別支援計画を作成し、治療終了までDOTSを実施することが重要であると考ええる。

**キーワード：**DOTS, コホート検討会, 治療成功, ホームレス, 合併症, 耐性

## はじめに

大阪市におけるDOTS事業は、あいらん地域で実施している「あいらんDOTS」とその他の地域での「ふれあいDOTS」がある。あいらん地域は大阪市西成区に位置し、日雇い労働者や住所不定者が多く、社会経済的に不安定な生活を余儀なくされている者が多い。また、あいらん地域における平成17年の結核罹患率は680.0と、全国22.2の31倍、大阪市58.8の12倍ときわめて高い。

このような状況に対処するため、あいらん地域では、喀痰塗抹陽性肺結核患者に限らず結核患者全員を対象に、地域内にあるS医療機関外来において、週5日直接服薬確認を中心とした「DOTS」（「日本版DOTS」でいう「外来DOTS」）を実施している。

一方、ふれあいDOTSでは、喀痰塗抹陽性肺結核患者（あいらんを除く）を対象として、「日本版DOTS」の「訪問DOTS」に相当する方法により、直接の服薬確認ができない場合に服薬手帳や空袋、残薬により服薬確認を行っている（図1）<sup>1)2)</sup>。

さらに、大阪市では、確実に治療終了に結びつけるための「DOTS事業」と患者管理の評価を目的として、「コホート検討会」を市内24区保健福祉センター（一般登録患者管理担当）および大阪市保健所（ホームレス登録患

者管理担当）で3～4カ月ごとに実施している。

そこで、本研究では、治療成功のための患者支援のあり方を明らかにすることを目的として、コホート検討会で使用している結核患者管理評価票の項目と治療成績の関連性（治療成功の要因）の分析を行った。

## 対 象

対象は、平成15, 16年喀痰塗抹陽性肺結核新登録患者のうち、現在も治療継続中の者、および他市へ転出した者を除く1292名（標準治療外含む）。

## 方 法

コホート検討会で使用した結核患者管理評価票の評価項目（薬剤感受性検査、合併症、初回面接、医師連絡、DOTS等19項目）と治療成績との関連性、および治療成功要因を明らかにするために、 $\chi^2$ 検定および統計ソフトSPSSを用いて多重ロジスティック回帰分析を行った。なお、死亡事例には、届出後早期の死亡や入院中（退院前）に死亡した者が多く含まれており、保健師による面接機会がなく、地域DOTS推進のための保健師活動が実施できなかった事例が多い。死亡を治療の「不成功」に含めて分析した場合、治療成功要因の分析では保健師活動に関する項目が偏って評価されることが明らか

<sup>1</sup>大阪市保健所感染症対策課、<sup>2</sup>現：大阪市西成区保健福祉センター

連絡先：中川 環、大阪市西成区保健福祉センター地域保健福祉担当、〒557-0041 大阪府大阪市西成区岸里1-5-20  
(E-mail: tam-nakagawa@city-osaka.lg.jp)  
(Received 8 Feb. 2007 / Accepted 7 Jun. 2007)

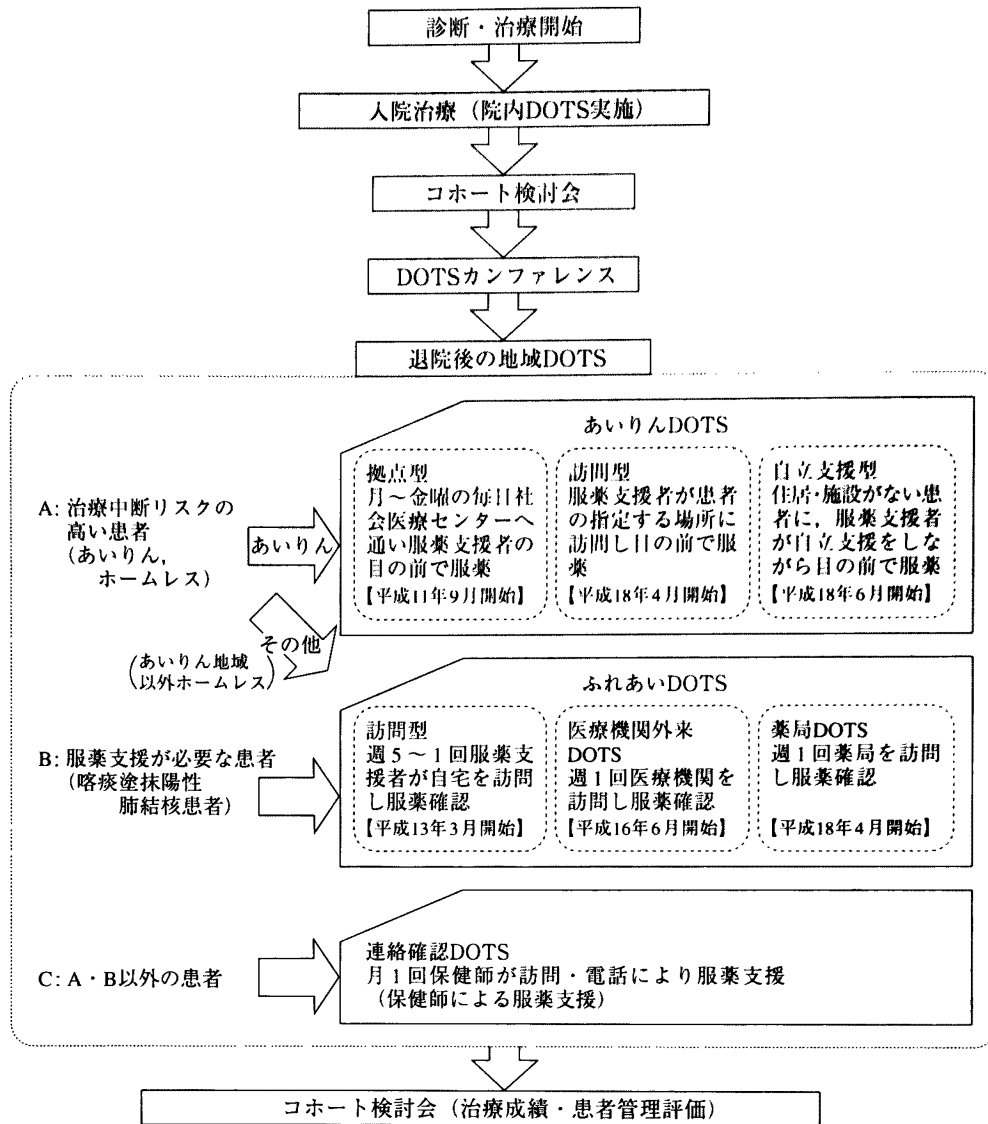


図1 大阪市 DOTS 事業体系図 (H18.12現在)

なので、死亡例を除外して分析することとした。

結果

(1) 性および平均年齢：性別は、男性が1034名(80.0%)、女性が258名(20.0%)で、平均年齢は、男性が58.4歳、女性が55.1歳であった。

(2) 保健師活動：対象者1292名から届出後14日以内の死亡(63名)や重篤な状況により面接不能の者(3名)の合計66名を除いた者(1226名)に対する保健師の1回以上の面接実施は、1184名(96.6%)、その中で初回面接が2週間以内に実施できた者は、1149名(97.0%)であった(表1)。喀痰検査結果把握は、培養検査1278名(98.9%)、同定検査1240名(96.0%)、薬剤感受性検査1234名(95.5%)であった。DOTSカンファレンス(以下DC)において服薬に関する個別患者支援計画等を検討された患

者は848名(65.6%)で、大阪市DOTS事業の同意が得られた患者は、ふれあいDOTSが544名・あいらんDOTSが51名の合計595名(46.0%)であった(図2)<sup>3)4)</sup>。治療終了までDOTSを実施した患者は、ふれあいDOTSが480名・あいらんDOTSが45名・院内DOTS(ホームレスなどで治療終了まで入院治療を受けた場合)が168名・その他(施設入所等)6名の合計699名(54.1%)であった。対象者1292名から「治療終了まで入院」「転院」「入院中死亡」および「行方不明」の合計452名を除いた840名のうち、退院後訪問を実施した者は760名(90.5%)であった。「治療終了まで入院」「治療終了までの期間が約1カ月未満で転院」「入院中死亡のうち菌結果等が把握され退院後に把握の必要がない者」「行方不明のうち菌結果等が把握され退院後に把握の必要がない者」の合計372名を除いた920名のうち、退院後医師連絡を実施し

表1 結核患者管理評価対象者の属性と保健師活動状況

項目		対象数	結果	率 (%)	備考
性別	男	1292	1034	80.0	
	女		258	20.0	
保健師活動	本人との面接実施	1226	1184	96.6	届出後死亡(63名), 心身ともに重篤な状況により面接不能(3名) 除く
	培養結果把握	1292	1278	98.9	
	同定結果把握	1292	1240	96.0	
	感受性結果把握	1292	1234	95.5	
	DOTSカンファレンス実施	1292	848	65.6	
	DOTS同意有	1292	595	46.0	
	治療終了までDOTS実施	1292	699	54.1	
	退院後訪問実施	840	760	90.5	治療終了まで入院治療(168名), 転院(59名), 入院中死亡(193名), 行方不明(32名) 除く
退院後医師連絡実施	920	665	72.3	治療終了まで入院治療(168名), 治療終了までの期間が約1カ月前後で転院(41名), 入院中死亡のうち菌結果等把握できており退院後把握の必要がない者(141名), 行方不明のうち菌結果等把握できており退院後把握の必要がない者(22名) 除く	
治療終了前医師連絡実施	1026	702	68.4	治療終了直前にDC有(25名), 行方不明(32名), 死亡(209名), 除く	

## 大阪市DOTS事業利用申し込み

Directly (ダイレクトリー)  
Observed (オブザーブド)  
Treatment (トリートメント)  
Short course (ショート・コース)

◎ 大阪市DOTS事業(服薬支援事業)とは?

☆ DOTSとは、服薬を直接確認することによって、確実に治療を終了し、再発を予防するものです。大阪市DOTS事業は、結核予防法に基づいた支援です。世界的にも取り入れられ、ニューヨークでは標準的な治療方式となっています。

☆ 結核は、最後まで薬を飲み続け治ります。  
薬を飲み忘れて、途中でやめると、かえって病気が悪くなったり、治りにくくなる恐れがあります。

☆ 症状がないのに、毎日薬を飲むことは、大変なことと思います。

☆ 服薬支援者が、本人とお会いして直接服薬を確認したり、飲み終えられた薬の空殻・空袋や手帳の記録を確認して、服薬の継続をお手伝いします。

◎ 服薬支援方法

訪問・来所・その他 ( )

回/週 (自宅・勤務場所 ( )

特記すべき事柄 ( )


◎ 連絡先

大阪市 \_\_\_\_\_ 区保健福祉センター

大阪市保健所分室

電話 \_\_\_\_\_

担当保健師・・・( )



結核を治すために、一緒にがんばりましょう!

本日 ( / ) の面接者・・・( )

私は、大阪市DOTS事業を申し込みます。

\*私は、DOTS事業の利用にあたり、病院・診療所・大阪市保健所・保健福祉センター・服薬支援者が、DOTS事業実施に必要な私の情報を共有することに同意します。

平成 \_\_\_\_ 年 \_\_\_\_ 月 \_\_\_\_ 日 氏名 \_\_\_\_\_

図2 DOTS同意書(本人用)

た者は665名(72.3%)であった。「死亡」や「治療終了直前にDC有」「行方不明」の合計266名を除いた1026名のうち、治療終了前医師連絡を実施した者は702名(68.4%)であった。

(3) 治療成績：大阪市全体では治癒819名(63.4%)、治療完了170名(13.2%)、その他4名(0.3%)、治療失敗2名(0.2%)、脱落中断88名(6.8%)、結核死亡96名(7.4%)、結核外死亡113名(8.7%)であった(図3)。治療成功率(治癒、治療完了、その他)は、一般(77.5%)のほうがホームレス(71.8%)より高かった。中断理由

は、医師の指示中止(副作用等除く)39名(44%)、拒否・行方不明30名(34%)、副作用による中止10名(11%)、他疾患治療優先5名(6%)、詳細不明4名(5%)であった。

治療成功の要因分析では、成功群993名、失敗・中断群90名を対象に、評価票の19項目について $\chi^2$ 検定を行った(表2)。その結果、治療成功に有意な関連が見られた項目は、「ホームレス以外」( $P<0.05$ )、「合併症無」( $P<0.01$ )、「肝機能障害無」( $P<0.05$ )、「RFP耐性無」( $P<0.05$ )、「ヒドラジド(INH)・リファンピシン(RFP)両

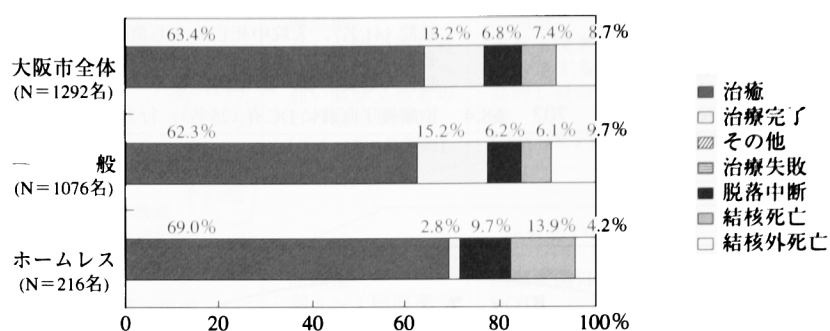


図3 登録区分別治療成績

表2 結核患者管理評価項目別治療成功群の割合と $\chi^2$ 検定結果

属性	成功群人数/対象人数 (成功群の割合%)		検定結果
登録時区分	ホームレス以外 838/906 (92.5)	ホームレス 155/177 (87.6)	*
性別	男 787/858 (91.7)	女 206/ 225 (91.6)	NS
年代別	10~30代:182/192 (94.8)	40~60代:617/679 (90.9) 70代以上:194/212 (91.5)	NS
職業	無職 412/448 (92.0)	その他 581/ 635 (91.5)	NS
治療歴	有 137/152 (90.1)	無 856/ 931 (91.9)	NS
合併症	有 431/483 (89.2)	無 562/ 600 (93.7)	**
糖尿病	有 166/183 (90.7)	無 827/ 900 (91.9)	NS
肝障害	有 63/ 75 (84.0)	無 930/1008 (92.3)	*
塵肺	有 4/ 5 (80.0)	無 989/1078 (91.7)	NS
耐性*1	H・Rいずれか耐性 有 41/ 50 (82.0)	無 921/ 999 (92.2)	*
INH耐性	有 38/ 44 (86.4)	無 924/1005 (91.8)	NS
RFP耐性	有 4/ 8 (50.0)	無 958/1041 (92.0)	*

保健師活動項目	成功群人数/対象人数 (成功群の割合%)		検定結果
初回面接*2	有 968/1056 (91.7)	無 22/ 24 (91.7)	NS
DOTSカンファレンス	有 716/ 777 (92.1)	無 277/306 (90.5)	NS
DOTS同意	有 552/ 581 (95.0)	無 441/502 (87.8)	***
治療終了までDOTS実施	有 674/ 699 (96.4)	無 319/384 (83.1)	***
退院後訪問*3	有 699/ 749 (93.3)	無 68/ 75 (90.7)	NS
退院後医師連絡*4	有 551/ 600 (91.8)	無 234/252 (92.9)	NS
治療終了前医師連絡*5	有 671/ 702 (95.6)	無 299/324 (92.3)	*

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ,

[対象] \*1~5以外: 1292名より死亡例209名を除外した合計1083名(治療成功群993名+失敗・中断例90名)

\*1 1083名より培養陰性・結果不明34名を除外した合計1049名

\*2 1083名より実施不能3名を除外した合計1080名

\*3 1083名より治療終了まで入院治療等259名を除外した合計824名

\*4 1083名より治療終了まで短期間での転院等231名を除外した合計852名

\*5 1083名より行方不明等57名を除外した合計1026名

表3 治療成功に有意に関連のある要因(多重ロジスティック回帰分析結果)

項目		有意水準	オッズ比	95%信頼区間
登録時区分	ホームレス以外	P<0.01	2.2	1.2-3.8
合併症	無	P<0.05	1.7	1.0-2.7
耐性	RFP耐性無	P<0.001	16.2	3.4-76.9
治療終了までDOTS実施	有	P<0.001	6.2	3.7-10.4

剤ともに耐性無」(P<0.05),「地域DOTS同意有」(P<0.001),「治療終了までDOTS有」(P<0.001)であった。

$\chi^2$ 検定結果で有意な関連が見られた項目について,多変量解析の多重ロジスティック回帰分析を行った結果,治療成功に影響を与える要因順に,オッズ比は,①「RFP耐性無」16.2(P<0.001),②「治療終了までDOTS有」6.2(P<0.001),③「ホームレス以外」2.2(P<0.01),④「合併症無」1.7(P<0.05)の4項目であった(表3)。

### 考 察

合併症を有する場合は,副作用などで治療中断を繰り返す例が多く,RFP耐性の場合にも治療期間が非常によく長くなるため,中断・失敗がおこりやすくなると考えられる。生活基盤がないホームレスについては,退院後の種々の支援が必要であることは明らかである。また,治療終了までDOTSが実施できない場合は,患者の治療状況に応じた支援が行いにくいいため,中断がおこりやすくなると考えられる。これらの要因にどのように対処するかを準備しておかなければならない。

ホームレス等の生活背景,治療期間に影響を与える薬剤耐性や合併症等の問題点については,DC等で医療機関と情報を共有化し,主治医の治療方針に基づいて,個々のケースに応じた個別患者支援計画の作成を行うことが重要と考える。大阪市は,結核病床を有する11の医療機関とDCを定期的実施しているが,個別事例検討の内容には差があり,治療方針が確認できない場合もある。脱落中断事例の中には,個別支援計画の作成がなく医師の指示中止になっている事例や自己退院等による中断の事例が多くみられた。治療を確実に終了させることにより,薬剤耐性結核を予防できることから,個々のニーズや退院後の状況に応じて,DOTS方法や回数等DCでの個別支援計画の見直しを行いながら,治療終了までDOTSが実施できるよう支援していく必要がある。

また,中断理由の約5割が医師の指示中止で,薬剤耐性や合併症,休薬期間等が考慮されないまま標準治療より短い期間で治療終了しており,そのうちの約3割が退院後転医していた。特に退院後転医している事例や退院後の病状変化があった事例については,DCでの個別支援計画に基づいて,患者の結核専門病院の主治医と転医

後の新しい主治医にも連絡をして,治療方針の一貫性の徹底を図る必要がある。DCや医師連絡等による各医療機関との連携を今後一層強化することが重要であると考えられる。そのためには保健師活動により,患者の治療状況,特に服薬量,中断期間を十分把握し,必要に応じて公衆衛生医師を通じて,主治医に対して治療方針の確認をすることが重要である。

大阪市では,人口10万対100以上であった結核罹患率を10年間で半減させるために結核対策基本指針<sup>5)</sup>を作成し,特にDOTS実施率の目標を80%にしており,平成17年であいりんDOTSは64%,ふれあいDOTSは68%の実施率であった。事業目標を推進していく過程では,事業効果の評価をすることが非常に重要である。その意味で,治療終了までのDOTS実施が治療成功に有意に関連していることが再確認できた意味は非常に大きい。統計的作業の経過で保健師活動と治療結果の関連性がなくなったように見えるが,実際には菌検査結果確認や患者訪問,DOTS同意などひとつひとつの保健師活動が治療終了までDOTSを実施したことに集約されたと考える。

### 結 論

結核治療を成功させるために必要な支援として,保健師が患者の生活背景や薬剤耐性・合併症等を十分に把握し,保健所・保健福祉センターが医療機関との連携を密にしなが,適正治療に則った個別支援計画を作成し,治療終了まで患者にあったDOTSを実施することが重要であると考えられる。

### 文 献

- 1) 撫井賀代:21世紀型DOTSを進める。日本公衛誌。2004;68:177-180.
- 2) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知:今後の結核対策の推進・強化について。健感発第0220001号。平成15年2月。
- 3) 小林典子,永田容子:地域DOTSの実態調査報告。保健師の結核展望。2005;43:26-31.
- 4) 日本結核病学会保健・看護委員会:院内DOTSガイドライン。結核。2004;79:689-692.
- 5) 大阪市結核対策基本指針—「STOP結核」作戦—平成13年,大阪市。

## 第82回総会特別講演

## Ⅲ. 結核症の化学療法

和田 雅子

**要旨:** 1943年のストレプトマイシンの導入によって、結核治療の新しい時代が始まった。SMの導入から間もなく、単独使用では早期にSMに対する薬剤耐性が発生し、少し遅れて開発されたPASとINHとを併用したSM-PAS-INHの3者併用療法が長く世界の標準治療として用いられてきた。しかし、この方式で治療に至るには1年以上、時には2～3年の長い治療が必要であった。1966年のRFPの開発と1970年代初期のPZAの再評価とによって、結核の化学療法の考え方に革命的な進歩がもたらされた。2カ月の初期強化期間にINH-RFP-PZAとEBまたはSMの4剤を使用し、続く4カ月の維持期間にINH-RFPの2剤を使用する方式が世界的な標準療法として確立された。化学療法の進歩によって結核患者はサナトリウムや病院での長期間の治療から解放された。現在では、外来通院での化学療法によって結核患者を治療することができるし、また、そうすべきである。ただ、外来治療にあたっての最も深刻な障碍は、患者が与えられた処方規則どおりに服用しないことである。このような不規則あるいは不適切服薬の結果は、患者個人のレベルでは治療失敗であり、全世界的にみられる多剤耐性結核(MDR-TB)および汎耐性結核(XDR-TB)の蔓延である。MDR-TBおよびXDR-TBはすでに世界の一部の国や地域を脅かし始めている。感染性結核患者の早期診断と新発生患者のDOTS戦略下での成功的な治療とが世界的なMDR-TBやXDR-TBの蔓延を防止するための最善の方法である。日本における結核治療の方式は、長い間、世界の標準的な方式からずれていた。すなわち、高い入院の割合、長い入院期間、長い治療期間などである。このような治療-効率効果の悪い方式が続いていた原因の一つは、外来治療のための信頼でき、かつ実際的なDOTシステムがなかったことである。最近われわれは、市中保険薬局薬剤師をDOTの監視者とする外来DOTシステムの試験を実施した。このシステムは、治療脱落を防止する効果も高く、市中保険薬局薬剤師にも患者にも受け入れられやすく、今後全国的に採用されることが期待される。6カ月よりもはるかに短い期間の間欠療法で治療が可能になるような強力な新しい抗結核薬剤の開発が切に望まれる。

**キーワード:** 結核化学療法, 短期化学療法, 耐性結核, DOT, 間欠療法

## はじめに

人類の起源とともに起こり多くの人間を殺戮してきた結核は、経済的先進国の一部ではようやく解決の兆しがみられているとはいえ、全世界的には21世紀になっても未だ制圧への道は遠く、逆に、WHOの推計によると結核罹病率は毎年1%ずつ上昇している。

結核対策の最も重要な柱は感染性結核患者の早期診断・早期治療開始と確実な服薬である。結核対策の中心

である化学療法について、現在の標準的治療方式である初期強化短期化学療法の確立に至るまでの歴史の変遷をたどり、その間の主要な臨床試験の成績を紹介し、問題点の分析を通じて結核の制圧に向かったの将来の課題について論じたい。

## 1. 結核化学療法の歴史

真に科学的な結核化学療法は1943年のストレプトマイシン(SM)の発見によって始まった。しかし、SM

単剤投与では比較的早期に高率に耐性菌の発現がみられ、単剤治療では結核を治癒に導くことができないことがわかり、1970年代にはSMにパラアミノサリチル酸(PAS)とイソニアジド(INH)を加えた3者併用療法が全世界的に拡がった<sup>2)</sup>。1952年にはピラジナミド(PZA)が臨床に導入され始めたが、投与量が過剰であったため肝毒性が強く、当初は主として治療失敗例に使用されたこととも相まって、高い評価は得られなかった。1966年にはリファンピシン(RFP)が開発され、近代的化学療法の歴史が始まった。RFPが開発されるまでは結核を化学療法で治癒させるためには18カ月の治療期間が必要であったが、RFPが開発されてからは9カ月で治癒させることができるようになった。1970年代後半から1980年代にかけて確立された2カ月の初期強化期間にはINH, RFP, PZA, SMの4剤を併用し、続いて4カ月間INH, RFPを投与する治療方式(2HRZS/4HR)が最も短い治療期間で優れた治療効果を示すことが明らかになり<sup>3)</sup>、1986年に米国CDCおよびATSが、1988年にIUATLDが、この方式を標準治療方式とするように勧告した。その後の研究により、開発途上国でもこの治療方式が最もcost-effectiveであることが証明され、1991年にWHOによって世界の標準治療方式とするように勧告されている。

### 1.1. 治療期間別再発率

近代的化学療法方式が確立されるまでに、治療期間、組み合わせる薬剤、投与回数などを比較・検討するための種々の臨床研究が世界各地で行われた。初期の主な研究はBritish Medical Research Council (BMRC) 主導のもとで東アフリカ・香港・Singaporeで行われた。Fig. 1に治療期間別再発率を示したが、最も再発率が高かった治

療は東アフリカで行われた2HRZ/2Hの4カ月治療で40%が再発していた<sup>4)</sup>。再発率の最も低い治療方式はSingaporeで行われた2HRZS/4HRZで、78例中再発はみられなかった<sup>5)</sup>。Fig. 1に示したように治療期間が短ければ短いほど再発率は高くなる傾向がみられた。この成績は、初期強化期間中に最強の薬剤を使用してもなお細胞内に菌が生き残っており、維持期間中にも滅菌力のある薬剤を4カ月程度使用しなければ再発率は低く抑えられないことを示している。

### 1.2. 維持期治療別再発率

初期強化期間中HRZSまたはHRZEで治療した場合に、維持期治療方式別に再発率をみたのがFig. 2である。もっとも再発率が高かった治療法は1HRZS/5HTの6カ月治療であり、18.3%が再発していた<sup>6)</sup>。初期強化期間が1カ月と短期間であることと、それにもかかわらず維持期治療にINHとサイアセタゾン(T)という滅菌効果の低い薬剤を使用していたためである。

### 1.3. 初期強化治療と維持期治療別再発率

TableはBMRCが東アフリカ、香港、Singaporeで行った一連の6カ月治療について、維持期治療のHR両剤の有無別と初期強化治療にHRZ3剤の使用の有無別に再発率をみたものである。初期強化期間にHRZを含む治療を受け維持期にHRの両剤を含む治療を受けた1,872例では63例(3.4%)が再発したにすぎなかったのに対し、初期強化期間にHRZの3剤治療を受けず維持期間にHまたはRまたは両剤とも含まない治療を受けた例では249例中48例(19.3%)が再発していた。これまでに述べてきたように、初期強化期間にはH, R, Zを含む処方で行われ、維持期にもH, Rを含めることが6カ月治療を成功させるために不可欠の条件である。

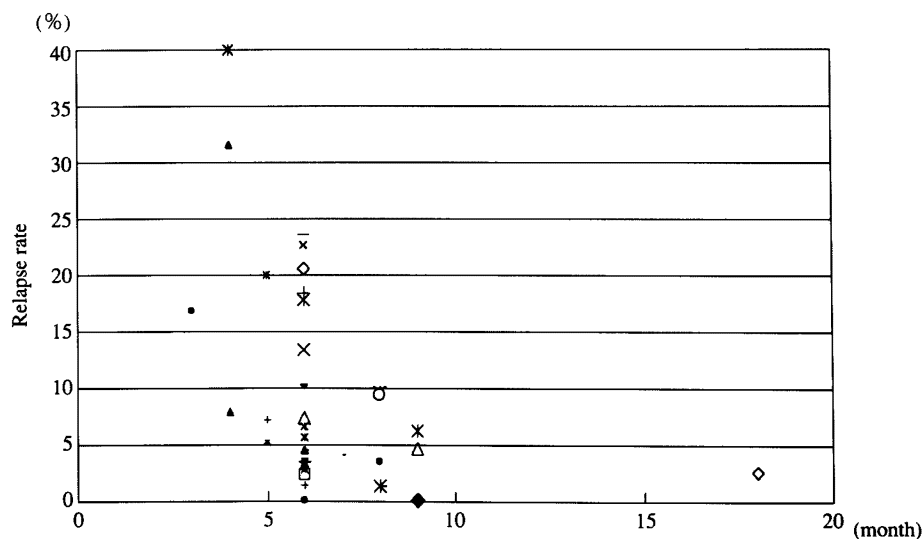


Fig. 1 Relapse rate according to the duration of chemotherapy

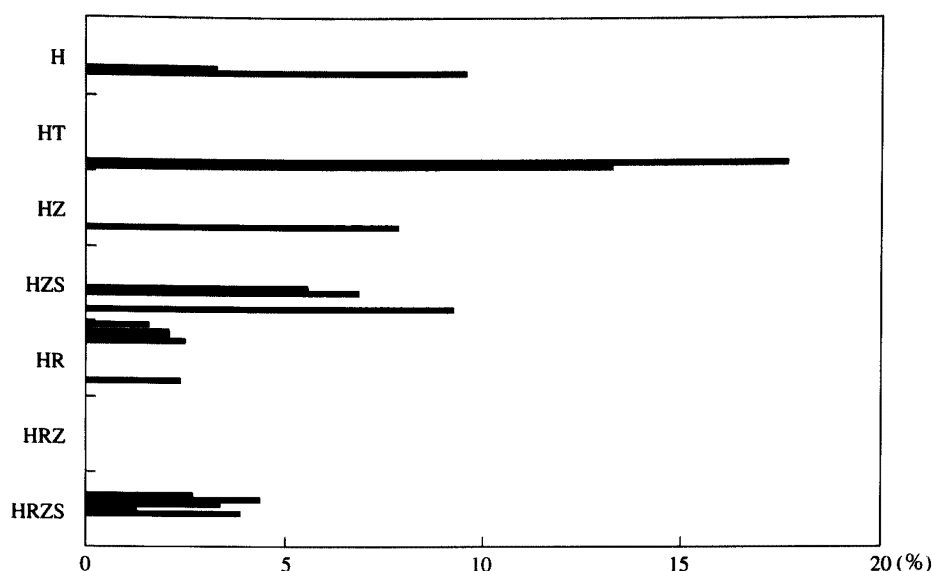


Fig. 2 Relapse rate according to the continuation chemotherapy regimens among the intensive chemotherapy with isoniazid, rifampicin and pyrazinamide

Table Relapse rate according to the continuation and intensive chemotherapy regimens

Continuation regimen	Initial regimen	Number of patient	Number of relapse	Relapse rate (%)	P-value
H+R	H+R+Z	1,872	63	3.4	0.08
	Except above	478	24	5.0	
Except above	H+R+Z	722	92	12.7	0.001
	Except above	249	48	19.3	

#### 1.4. 毎日療法から間欠療法への試み

結核菌のジェネレーション・タイムは約20時間と他の細菌に比較して長く、この間に最少阻止濃度以上の抗結核薬に一定時間暴露されれば残りの時間中は抗結核薬の濃度が最少阻止濃度以下であっても菌の再増殖が抑制されることが実験的に証明され、結核治療ではかならずしも抗結核薬を毎日投与する必要がなく間欠療法が可能ながことが理論的に示された。また薬剤コストが低く抑えられる、対面式服薬指導を行いやすいなどの社会的必要性をも考慮に入れて、間欠療法の臨床試験が実施された。

香港で行われたINH, PZA, SMを使用した9カ月治療で週3回と週2回の間欠療法の場合には、2カ月後の菌陰性化率はそれぞれ70%, 72%, 治療終了後の再発率は両群とも6.1%と報告された。コントロールとして行われた9カ月毎日療法では2カ月目の菌陰性化率は77%, 治療終了後の再発率は4.6%であった<sup>7)</sup>。INH, PZA, SMの組み合わせでの全期間間欠療法では再発率が6.1%と高く、標準治療として採用することはできなかった。

続いて香港で行われた研究は全治療期間を8カ月と

し、初期2カ月はH, R, ZとSまたはEを毎日使用し、維持期6カ月にはH, S, Zを週2回使用する方式と初期4カ月にはH, R, Z, Sを週3回、維持期4カ月にはH, Z, Sを週3回使用する方式とが比較された。初期2カ月毎日治療方式の場合には、Sを加えた群とEを加えた群で、2カ月目の菌陰性化率はそれぞれ95%と81%, 治療終了後の再発率はそれぞれ3.4%と9.5%と報告され、SMはEBより殺菌効果が強いことが示された。また全期間週3回療法では2カ月目の菌陰性化率は94%, 治療終了後の再発率は1.2%と好成績が報告されている。RFPを加えた初期強化期間が4カ月と長かったことが治療終了後の再発率を低く抑えられた理由であると考えられる<sup>8)</sup>。香港での全期間週3回9カ月治療の再発率は6.1%と高かったが、さらに、6カ月間H, Z, Sを週2回または週3回投与する治療方式の成績が1977年に報告されている。この試験では、再発率は毎日療法でも18.3%と高く、週3回、週2回投与法では23.5%, 20.5%と高かった<sup>7)</sup>。10年後の1987年には、RFPを含めた4剤または5剤を併用した全期間週3回治療法の結果が報告された。対照として行われたH, R, Z, E毎日療法の再発率は3.7%で、最も再発率が低かったのはH, R, Z, S



の組み合わせによる毎日療法で1.3%であった。5剤併用群での再発率は3.9%で、4剤併用群と比較して再発率をより低くすることはできなかった。またZを含まないH, R, S, Eの週3回治療法は、再発率10.2%と最も再発率の高い治療法であった<sup>9)</sup>。続いて香港でH, R, Z, Sの週3回治療法でZの使用期間を2, 4, 6カ月と変えて再発率を比較した臨床試験が行われたが、再発率はそれぞれ2.7%, 4.4%, 3.4%で、PZAの使用期間を2カ月以上延長しても再発率を低下させることができないと報告された。またSMを加えない3剤併用治療では6.5%と再発率が高く、週3回6カ月治療を標準治療として採用するためには4剤の併用が必要であるとされた<sup>10)</sup>。

全期間間欠療法がまず検討されたが、続いて初期強化期間には毎日法、その後間欠法で治療する方式の成績が1979年に報告された。2カ月間の初期強化期間にH, R, Z, Sを毎日投与し、維持期にH, Z, Sを週2回投与する方式では再発率は6.9%であったが、2カ月初期強化期間にH, R, S, E、維持期間にH, S, Eを週2回投与する方式では再発率が22.6%と高く、初期強化期間にPZAを含まない治療方式での再発率は高いことが示された<sup>12)</sup>。Singaporeで行われた初期強化期間にH, R, Z, Sを毎日使用し、維持期間にH, Rを週3回使用する方式では再発率は2.1%、初期強化期間を同様の薬剤で1カ月とし、維持期間の5カ月間H, Rを週3回投与する方式でも再発率は2.1%と同様の成績であった<sup>9)</sup>。

Madrasでは治療期間が5カ月の治療法が研究されている。初期強化期間3カ月H, R, Z, SまたはH, Z, Sを毎日投与しその後H, R, Sを週2回投与した治療方式では、再発率はそれぞれ5.2%, 20.0%と報告されている。初期強化期間にRFPを加えないと再発率は4倍になり、RFPの化学療法における重要性を再認識させる報告である<sup>11)</sup>。

間欠療法の一つとして、初期強化期間中は週3回法、維持期には週2回法とする方式が香港で試みられている。初期強化期間にはH, R, Z, Sの4剤を、維持期にはH, Z, Sの3剤を使用している。治療終了後の再発率は5.6%であった<sup>9)</sup>。また、6カ月の全治療期間中に延べ62回の投与で治療する方式が米国で研究された。最初の2週間はH, R, Z, Sを毎日投与、その後6週間は上記4剤の高用量を週2回投与、続く18週間は週2回H, Rを投与する方式である。治療終了後の再発率は1.6%と低く、現在米国で標準治療の一つとして採用されている<sup>12)</sup>。

RFPの開発以来、強力な抗結核薬の開発の努力が続けられている。1998年に開発されたrifamycin誘導体であるリファペンチン(RPT)を用いた維持期週1回間欠療法を試みでは、HIV感染結核患者では治療失敗が多く、

失敗後にRFP耐性を獲得することがわかり、HIV感染者での週1回法の試みは中止された。また治療終了後の再発率から週1回治療の対象は菌陰性の非空洞例に限定するように勧告されている。2カ月間初期強化期間にH, R, Z, SまたはH, R, Z, Eを最初の2週間は毎日、その後2カ月まで毎日、週2または週3回投与後、無作為にINHとRPTを週1回またはINHとRFPを週2回投与する方法で治療成績を比較した。RPT週1回治療では治療終了後の再発率は9.2%とRFP週2回法の再発率5.6%より高く、非空洞例に限ると週1回療法の再発率は2.9%とRFP週2回の再発率2.5%と比較して同様であった<sup>13)</sup>。以上の結果より、維持期治療にRPTとINHを週1回投与する方法は、菌陰性の非空洞例に対してのみ適用するように勧告されている。この論文では初期強化期間の2週間目から2カ月までに毎日法、週2回法、または週3回法が行われ、その後無作為に週1回法と週2回法に割り当てられているが、強化期間の治療方式別に治療成績は報告されていない。

## 2. 日本における短期化学療法の研究

次に、日本における結核化学療法の代表的な研究について述べる。

### 厚生省結核療法研究協議会（療研）

昭和26年に発足、新薬が出るたびに、その薬剤の効果と副作用を確かめ、日本人に適した処方定め、その成績を基に「結核医療基準」が制定・改正されてきた。国立療養所化学療法研究会（国療化研）

昭和32年に発足し、無作為割り付け・対照比較臨床試験によって治療効果判定の方法論を確立し、最も有効な治療方式の探究に努めてきた。この研究班は他に類をみない個別化方式と呼ばれる菌陰性化後なお6カ月間抗結核剤を使用する方法の研究を行ってきたが、いずれの群でも菌陰性化が6カ月以上続いてなお治療が継続された例が多く、再発率の評価は少数例になっていた。国療化研ではユニークな個別化方式が適応されたが、この方法では主治医の裁量権が大きく響き、長期治療をもたらした原因にもなったのではないかと推測された<sup>14)</sup>。

国立療養所中野病院（後に国立国際医療センターに合併）ではBritish Medical Research Councilと同様なPZAを加えた4群無作為割り付け方式による6カ月短期化学療法の臨床試験を行った。中野病院では1978年に既にPZAを加えた6カ月治療成績を報告している。PZAを6カ月治療の全期間投与する臨床試験を無作為割り付け方式で行った画期的な研究であった。PZAを使用した2治療群では、菌陰性化率も優れ、治療終了後の再発率も1パーセント台まで改善されていた。考察としてPZAを使用した場合はINH耐性菌症例でも再発はみられず、

PZAの効果を高く評価している<sup>15)</sup>。その後の研究では、PZAを加えた、あるいは加えない治療を6カ月で終了する方式と菌陰性化後なお6カ月間治療を続ける方式を比較しており、菌陰性化率はPZAを加えた治療群で高く、再発率は6カ月治療群と菌陰性化後6カ月治療継続群で差はみられず、一律6カ月治療の有効性が示された<sup>16)</sup>。  
大阪府立羽曳野病院（現：大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター）

昭和48年から短期治療の研究に取り組み、まず12カ月治療から始めてその成績を確認し、9カ月治療、6カ月治療と順を追って慎重に研究を進め、昭和59年には最初2カ月PZAを加えた治療成績を報告、昭和50年代には現在の標準治療の基礎を作り上げた。当時既に世界的にPZAの有用性が認められていたにもかかわらずその使用を躊躇していたわが国において、近代的短期治療を完成させるためにPZAは重要な役割を果たすという世界的な理解を得られるに至るまでの経過を総説的に述べた亀田の第70回本学会総会の『ピラジナミドの有用性に関する』特別講演は、わが国のPZA使用の大きな契機となったものと思われる<sup>18)</sup>。最初の2カ月はH, R, Z, Sを使用し、治療開始1カ月目の培養結果が陽性例に対しさらに1カ月H, R, Sを使用、その後3カ月Sを週2回に減量し、INH, RFPを使用し、その後3カ月HRを使用し全期間9カ月治療した。治療開始1カ月目に培養陰性例に対し、1カ月間SHRを毎日投与、その後6カ月HRを投与し9カ月で終了した。9カ月で治療終了し、治療終了後7カ月以上経過観察された51例中1例のみが再発した。PZAを加えた例では2カ月目の菌陰性化率は95.7%と高く、historical controlと比較してPZAの効果が強調された。この研究はわが国でPZAが広く使用される契機となった重要な研究である<sup>17)</sup>。

#### 結核予防会複十字病院

中野病院での優れた研究にもかかわらず依然として6カ月治療が普及しないので、複十字病院では、最初の2カ月間PZAを加えた6カ月治療とPZAを加えない9カ月治療を比較する研究を行った。第1報では治療開始2カ月目の菌陰性化率は両群に差がみられなかったが、これは治療法の選択が主治医に任されていたためPZAを加えた治療法に重症例がより多く割り付けられる傾向があったためと推測されている<sup>19)</sup>。第2報で295例中9例3.1%の再発率が報告された。この臨床試験のなかで、糖尿病合併例では11.1%と再発が多く、初めて糖尿病合併例では6カ月治療では不十分であるという証拠が示された<sup>20)</sup>。第3の研究では、HRZEを2カ月間毎日使用し、その後週2回HRを調剤薬局DOT下に間欠服用する方法と、HRを毎日自己服用する方法を比較した<sup>21)</sup>。治療終了後の再発率は4.5%と2.5%であり、統計学的な有意

差はみられなかった。日本で初期強化短期化学療法が確立されてから初めての間欠療法の試みであり、今後日本への間欠療法導入の契機となることが期待される。

### 3. 副作用

上述したように6カ月の標準化学療法の効果は疑うべくもないが、治療が成功するためには副作用に適切に対処することが必須である。結核療法研究協議会が行った研究で、治療を開始された初回治療肺結核症患者3,643例中832例(22.8%)が治療変更を余儀なくされていた。変更の理由は副作用が最も多く74%を占めており、そのなかでも肝障害が51%を占めていた。化学療法による最も重大な副作用は肝障害といえる。

日本における代表的な研究で、治療開始時肝機能正常で初期強化期間にINH, RFP, PZAおよびSMまたはEBの4剤が使用された症例で治療開始後AST値またはALT値が100 IU/ml以上になった例の頻度は3.7%<sup>17)</sup>から11.1%<sup>22)</sup>と研究者により頻度に幅があった。

### 4. 結核化学療法の理論的根拠

結核化学療法の臨床的研究、基礎研究、動物実験などの結果から、Mitchisonは化学療法の理論的考え方としてThree populations theoryを提唱した<sup>23)</sup>。彼の説によると、空洞のある患者では、活発に分裂増殖している菌(Population A)が主として乾酪性病変内に存在しており、これらの菌に対してはINH>SM>RFP>EBの順に有効と考えられている。Population Bの菌は増殖にあまり適さない酸性環境にある菌で、PZAのみがこの菌集団に有効である。PZAは試験管内殺菌力と*in vivo*での殺菌効果が著しく異なる薬剤で、未だはっきりした作用機序はわかっていない。当初はマクロファージのファゴソーム内は酸性であり、PZAはこのようなファゴソーム内の菌に有効とされていたが、近年の研究では、毒力株結核菌を貪食したファゴソーム内では酸性でないと報告され、PZAが有効な菌集団は盛んな炎症反応が起こっている酸性環境の部位に存在する菌である。ついで、通常は静止状態であるがときおり細胞分裂・増殖するpopulation Cの菌は、生体の防御免疫や結核薬の殺菌効果から自らを守り再び活発に増殖する機会を窺っている菌で、この菌集団が将来的な再発の原因となると考えられている。この菌集団を殺菌する能力はRFPがもっとも高く、ついでINHである。このことは維持期にINHとRFPの両剤を含まない治療方式ではINHとRFPの両剤を含む治療方式よりも再発率が約3倍高いことから推測される。

Mitchisonはこのように、結核化学療法に用いられる各薬剤の特性と結核症の異なる相における結核菌の特性

とを関連させて、初期強化短期化学療法の方式に理論的な裏付けを与えた。

#### 4.1. 初期殺菌効果 (Early Bactericidal Activity: EBA)

Jindaniらは、肺結核症の患者に抗結核薬の単剤投与後に喀痰を12時間集めて結核菌量を測定し、抗結核薬の投与開始後2日間の殺菌効果(EBA)を調べた<sup>24)</sup>。その結果、INHがもっともEBAの高い薬剤であることがわかった。さらに、通常の投与量では殺菌効果はないと考えられていたEBはその投与量を25 mg/kgに増すと、INHに次ぐ殺菌効果があることも報告された。RFPのEBAは意外に低いことも発見された。

#### 4.2. 増殖抑制期間 (Lag Time)

結核化学療法の研究は、試験管内の細菌学的研究あるいは動物実験などの基礎研究の進歩に裏打ちされて発展してきたものであるが、試験管内で一定の濃度の抗結核薬に一定時間暴露したあとの結核菌の再増殖をみた研究で、1.0  $\mu\text{g/ml}$ の濃度のINHに24時間以上暴露されると結核菌はその後6~10日間再増殖が抑制されることがわかった。PZA, SMもこのlag timeが長い薬剤であるが、RFP, EBでは数日から5日間くらいである。このlag timeの長い薬剤は間欠療法に適合した薬剤と考えられる<sup>25)</sup>。

### 5. 耐性菌発現の機序と治療成績

薬剤耐性菌の発現そのものは自然に起こる突然変異(Spontaneous mutation)による現象であるが、感受性菌のみからなる結核菌集団が突然変異のみによって臨床的に問題になるような耐性菌集団に変わるのに必要な時間が数学モデルを用いて計算されている。たとえば、感受性菌のみからなる菌集団が突然変異のみによってINH 0.2  $\mu\text{g/ml}$ の濃度に耐性の菌を1%含む集団に変化するのに5,000年から10,000年かかると推定された。INHは存在しないがINH耐性菌の発育に有利な環境で培養した場合(間接的選択)でも200日かかるのに対し、直接的選択、つまりINHを加えた培地で培養すると菌集団の1%が耐性菌に置き換わるのに要する期間はわずか5~6日であった。この結果からDavidらは、INH耐性菌の発生は自然現象であるがINH耐性結核の発生は人為的な現象であると断定している<sup>26)</sup>。今日結核対策を困難にしている多剤耐性結核も同じように完全にman-madeな現象といえる。

#### 5.1. 不規則治療によっていかにして耐性菌は作られるか?

Mitchisonは不規則な、あるいは不適切な治療中にどのようにして耐性菌が発現するかについて理論的考察を行っている。第1に、治療によって感受性菌は殺菌され耐性菌は生き残る。治療中断すると生き残っている菌の

再増殖が起こり相対的に耐性菌が増える。第2に、病巣中の細菌叢によって殺菌の効果のある薬剤は異なっている。1例として酸性環境にある菌にはPZAのみが有効であるので、たとえ併用療法を行っていても酸性環境にある菌は単剤投与を受けたことになりPZA耐性菌は生残・増殖を続ける。PZAを維持期治療に加えても再発率が改善しない理由の一つに耐性菌の存在が推定される。第3に、発育阻止濃度以下の薬剤濃度では感受性菌はゆっくり増殖するにすぎないが、耐性菌は通常で増殖するために相対的に耐性菌が増えてゆく。第4に、感受性菌は一定濃度の薬剤に一定期間曝されるとその後ある一定期間は再増殖することはできないが、耐性菌は通常で増殖するので、やはり同様に耐性菌が相対的に増えてゆく。以上に述べた4つの機序で不規則治療、あるいは不適切治療を行うと耐性菌が選択され、耐性結核を作ってゆくと推察した<sup>27)</sup>。

#### 5.2. 耐性結核に対する化学療法の効果と問題点

MitchisonとNunnが行ったretrospectiveな分析研究<sup>28)</sup>によると、治療開始時INH単剤耐性例ではR, Z, S, Eが使われていれば治療失敗はなく、Sのみの耐性152例では10例(6.6%)が治療失敗したにすぎなかった。一方、HS両剤耐性例では137例中30例(21.9%)が再発していた。治療失敗による耐性獲得の頻度をRFPの使用期間別にみると、治療開始時INH耐性であった22例では6例が失敗時にSMに耐性になっていた。またSM耐性の2例ともINHに耐性になり、HS両剤耐性17例では3例がRFPにも耐性になっていた。RFPを4カ月以上使用した場合には、治療開始時HS両剤耐性例17例中15例が失敗時にRFP耐性になっていた。HS両剤耐性例ではRFPを4カ月以上使用すると高率にRFP耐性菌が出現したことを報告している。これらの結果をふまえ、WHO/IUATLDはRFP耐性化を防ぐために、維持期間にRFPを含む治療を行う場合には必ずDOT下で治療を行うこととしている。全期間DOTが不可能な場合には8カ月治療2HRZE/6HEの治療を薦めている。

#### 5.3. 耐性結核に対する標準治療の効果と8カ月標準治療の問題点

WHO/IUATLDは1994年から世界の抗結核薬の薬剤耐性菌サーベイランスを開始した。このサーベイに参加した香港、イタリア、韓国など5カ国の治療成績を分析して耐性結核に対する成績をみると<sup>29)</sup>、標準治療を受けた初回治療例のうち最も治療成功率が低かったのは多剤耐性結核例で184例中95例(52%)であった。次いでRFP耐性例で115例中84例(73%)であった。

治療失敗例は最初の3カ月はINH, RFP, PZA, EB, SM(SMは最初の2カ月のみ)の5剤を使用し、その後INH, RFP, EBを5カ月使用したにもかかわらず治療が

失敗に終わったものである。再治療を行っても多剤耐性結核の治療成功率は29%と低く、他の耐性結核でも約50%の治療成功率しか得られなかった。

現在 WHO が推奨している標準化学療法の一つに 8 カ月治療、すなわち最初 2 カ月は INH, RFP, PZA, EB または SM の 4 剤を併用し、その後 INH と EB を 6 カ月使用する方式がある。これは維持期に RFP を節約すること、RFP の耐性獲得を防止するために維持期 RFP を使用する場合には全期間 DOT を推奨している。この治療方式は経済事情の厳しい国に向けたものである<sup>30)</sup>。8 カ月標準治療での治療失敗 40 例中 17 例は治療開始時多剤耐性結核であったが、治療失敗時にはさらに多剤耐性結核例が増加していた。これは治療中に耐性を獲得したことを示している。また標準治療を終了した後に再発した 39 例では、初回治療開始時には多剤耐性でなかったが再発時には 3 例が多剤耐性結核となっていた。このように初回耐性菌の頻度の高い国または地域では維持期間中にも強力な治療を行わなければわずか 6 カ月の治療中に RFP 耐性になってしまうことが示されており、維持期間にも強力な治療を実施することが重要である。

#### 5.4. 耐性菌サーベイランス (WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance)

結核制圧に向けて、WHO/IUATLD は 1994 年から全世界の抗結核薬に対する耐性菌サーベイランスを開始し、現在まで 3 回の報告書を発表してきた<sup>31)</sup>。1994 年から 2000 年まで、世界 210 カ国中 57% が参加し、世界人口の 58%、塗抹陽性肺結核患者の 61% をカバーしている。全世界の中央値で初回治療例では、いずれかの薬剤に耐性の頻度は 10.2%、多剤耐性は 1.1% であった。最も高い耐性菌頻度を示した地域は東地中海地域で、それぞれ 30.5%、2.2% であった。日本が属している西太平洋地域

ではそれぞれ 11.4%、0.9% であった。治療歴のある例では、いずれかに耐性の頻度の中央値は 18.4%、多剤耐性菌は 7% で、最も頻度の高い地域は初回治療と同様に東地中海地方で 63.3%、48.3% であった。西太平洋地域ではそれぞれ 32.8%、15.5% であった。第 1 回目に行ったサーベイで既に多剤耐性菌は全世界的に拡がっていることが明らかにされており、結核制圧に向け耐性菌の出現防止が必須である。

#### 5.5. 日本における耐性菌サーベイランス<sup>32)</sup>

化学療法が結核治療に初めて導入されたとき治療失敗例では高率に耐性菌が発現しており、単剤では結核を治療させることができなかったことに端的に示されているように、化学療法は常に耐性菌との戦いである。これは結核に限らず感染症治療における宿命である。日本では 1957 年から 2～5 年ごとに結核療法研究協議会により「入院時薬剤耐性に関する研究」が行われてきた。Fig. 3 に初回治療例における個々の薬剤に対する耐性菌頻度の年次推移を示した。INH に対する耐性菌の頻度は 1.0  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で示した。INH 1.0  $\mu\text{g/ml}$  での耐性菌頻度の近似線を示したが、経年的に右肩上がりに徐々に耐性菌の頻度が増えていることがわかる。図には示さなかったが、既治療例でも初回治療と同様に INH 耐性菌の頻度は右肩上がりに増加しているが、初回治療例よりも増加の度が著しい。既治療例には前回の治療失敗例や中断例が多く含まれるために再発時には耐性を獲得している割合が高く、再治療開始時の薬剤選択が適切でないことさらなる耐性菌を作り出すことが示唆される。

### 6. 化学療法の進歩による結核医療の変遷

#### 6.1. サナトリウムでの治療から外来治療への変遷

結核に対する積極的な治療法がなかった時代や化学療

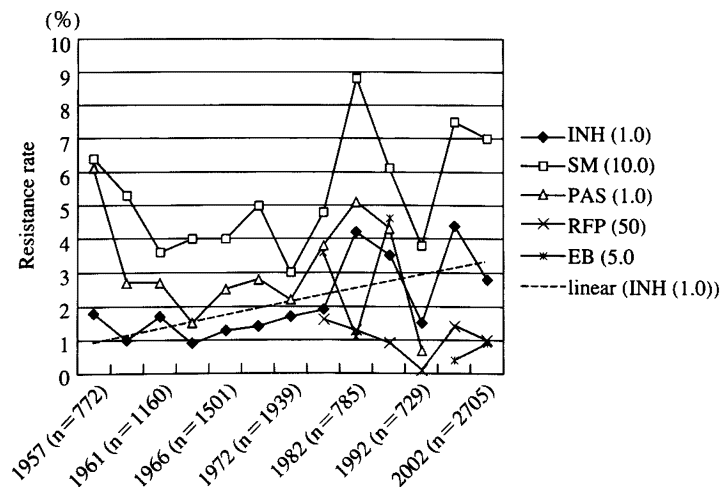


Fig. 3 Drug resistance surveillance in Japan — Trend of resistance rate of anti-tuberculosis from 1957 to 2002

法の初期には、患者の隔離と安静と栄養補給のために人里離れた場所でのサナトリウム療法が行われてきたが、一般庶民の結核患者にとってサナトリウム療法は高嶺の花であった。また、国の結核対策としても入院治療は医療費負担が大きく、化学療法の発達とともに外来治療を中心とした結核治療の可能性が検討されるようになった。インドの Madras で行われた研究<sup>33)</sup>では、患者を無作為にサナトリウムで治療を受ける群と自宅で治療を受ける群に分け、どちらの群にも INH と PAS を 1 年間投与した。両群の治療成績には差がなかった。さらに、患者家族への感染の有無を両群で比較した。ツ反硬結の大きさ 5 mm 未満と 5 mm 以上に分けて分析したが、サナトリウム療法の患者家族と自宅治療の患者家族での 5 年間の累積感染率は、ツ反硬結 0～4 mm を示したものは自宅治療患者家族では 10.5%、サナトリウム治療患者家族では 11.5%、ツ反硬結 5 mm 以上はそれぞれ 9.4%、15.8% で、両群の家族への感染の危険には差がみられなかった。この研究の結果、全世界的に結核治療は入院治療から外来治療へと転換していった。

「結核の統計」によると、日本では 2005 年になってもなお、菌陽性患者の 74% は入院しており、平均入院期間は 3.9 カ月、平均有病期間は 10.2 カ月と報告されており<sup>34)</sup>、世界の結核医療の潮流からかけ離れた医療が提供され続けてきた。すなわち、入院の割合が多い、入院日数が長い、治療期間が長いことが日本の結核医療の特徴であった。

## 6.2. 自己服薬から DOT への転換

1966 年に Madras から報告された研究成果により、全世界的には、治療費がより少なくて済み、患者の負担も少ない外来治療へと変わっていった。しかし、当初外来治療では治療中断が多く、米国で 1970 年代初頭には、新発見患者の 31% から 27% が治療中断していたと推定されていた<sup>35)</sup>。DOT は WHO/IUATLD が提唱した結核制圧の一戦略であるが、患者の抗結核薬の服用中断を防ごうとする試みは古くから行われていた<sup>36)</sup>。Iseman は以下の理由を挙げ DOT の導入を強く薦めている。Denver 方式による 6 カ月 62 回投与方法では治療中断が 10% 以下であるが、自己服薬 6 カ月では 39%、9 カ月では 49% が中断しており、また治療費は Denver 方式では DOT を行わなかった場合には、1 人当たり \$397 であるが、DOT 下での治療では治療効果判定のための検査料金 1 人当たり \$114 が節約できるので差し引き \$283 で治療できる。一方 6 カ月自己服薬の場合には \$327 かかるので DOT 下の Denver 方式では 1 人当たり \$44 が節約できることになる。また多剤耐性結核患者 1 人を治療するには \$200,000 かかるが、DOT 下の治療は多剤耐性結核の発現を防止できるので、患者の治療上だけでなく、医療

経済上にも有益である<sup>37)</sup>。

## 7. 保険薬局 DOT を利用した維持期間欠療法の試み

全世界的に結核医療が外来治療中心へと変遷してゆくなかで、日本では今なお入院治療の割合が高く入院期間も長期間に及んでいる。その原因は、合併症をもつ高齢結核患者が多いこと、外来患者に対する有効な DOT の担い手がなく、間欠療法が医療基準に導入されていないために DOT を行うことが困難であることなどが考えられる。複十字病院では 2001 年から維持期間欠治療を保険薬局薬剤師の服薬監視に委任して行う「保険薬局 DOT」の試みを行ってきた<sup>21)</sup>。この方式で間欠療法を行った 135 例中 11 例は初期強化期間を延長していたので分析から除外した。残り 124 例中治療成功は 121 例、97.6% であった。治療中断例はなかった。副作用のために治療を変更した例が 3 例あった。対照とした自己服薬-毎日療法群 250 例では 239 例 (95.6%) は治療成功したが、8 例 (3.2%) が治療中断し、2 例が死亡した。治療終了後の再発率は保険薬局 DOT-間欠療法群で 3.73/100 人・年で対照群では 1.76/100 人・年であり、両群間には統計学的有意差はみられなかった。治療成績は両群に差はみられなかったが、複十字病院の初回治療肺結核患者の治療中断率は保険薬局 DOT 開始前 3 年間の平均 5.1% から開始後 3 年間の平均 2.1% へと低下した。

この試みには、1 都 6 県 109 店に及ぶ保険薬局の協力を得ることができた。日本で DOT を普及するうえで全国的に試みる価値のある現実的な方法と考えられる。

## 8. 日本における結核化学療法の課題

以上、結核化学療法の理論的根拠および化学療法の開発・進歩の歴史を概観し、併せて日本における結核化学療法研究の成果を述べた。日本における結核化学療法に求められている今後の課題として、①外来患者に対する日本の社会になじみやすい DOT システムの開発と普及、②間欠療法の医療基準への収載、③ 6 カ月短期化学療法により積極的な導入・普及、④ 6 カ月よりも短期間で終了できる治療法の開発である。

## 謝 辞

この講演を発表する機会をお与えいただいた第 82 回日本結核病学会会長坂谷光則先生と結核化学療法の研究について終始ご指導いただき、座長の労を執っていただいた亀田和彦先生に深謝致します。また私を結核研究に導いてくださり、論文のご高閲をいただいた兼松一郎先生に深謝致します。長年にわたる結核化学療法の研究を共同で進めていただいた結核予防会複十字病院の職員の皆様と結核研究所の職員の皆様、保険薬局 DOT にご参

加いただいた全国の保険薬局薬剤師のみなさま、新しい試みに進んで参加いただいた患者の皆様にご心からお礼を申し上げます。

## 文 献

- 1) Fox W, Sutherland I, Daniels M: Five years assessment of patients in a controlled trial of streptomycin in pulmonary tuberculosis. *Q J Med.* 1954; 23: 347-366.
- 2) WHO Collaborating Center for Tuberculosis, Prague: A comparative study of daily and twice-weekly continuation regimens of tuberculosis chemotherapy, including a comparison of two duration of sanatorium treatment. III. Third report: the results to 36 months. *Tubercle.* 1976; 57: 45-48.
- 3) East and Central Africa/British Medical Research Council: Fifth Collaborative Study: controlled clinical trial of 4 short course regimens of chemotherapy (three 6-month and one 8-month) for pulmonary tuberculosis—final report. *Tubercle.* 1986; 67: 5-15.
- 4) East African/British Medical Research Council: Controlled clinical trial of five short-course (4-month) chemotherapy regimens in pulmonary tuberculosis. Second report of 4th study. *Am Rev Respir Dis.* 1981; 123: 165-170.
- 5) Singapore Tuberculosis Service/British Medical Research Council: Long-term follow-up of a clinical trial of six-month and four-month regimens of chemotherapy in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 133: 779-783.
- 6) Singapore Tuberculosis Service/British Medical Research Council: Five-year follow-up of a clinical trial of three 6-month regimens and four-month regimens of chemotherapy given intermittently in the continuation phase in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1988; 137: 1147-1150.
- 7) Hong Kong Chest Service, British Medical Research Council: Controlled trial of 6-month and 9-month regimens of daily and intermittent streptomycin plus isoniazid plus pyrazinamide for pulmonary tuberculosis in Hong Kong. *Am Rev Respir Dis.* 1977; 115: 727-735.
- 8) Hong Kong Chest Service, British Medical Research Council: Controlled trial of 6-month and 8-month regimens in the treatment of pulmonary tuberculosis: the results up to 30 months. *Tubercle.* 1979; 60: 201-210.
- 9) Hong Kong Chest Service, British Medical Research Council: Five-year follow-up of a controlled trial of five 6-month regimens of chemotherapy for pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 136: 1339-1342.
- 10) Hong Kong Chest Service, British Medical Research Council: Controlled trial of 2, 4, and 6-months of pyrazinamide in 6-month, three-times weekly regimens for smear-positive pulmonary tuberculosis, including an assessment of a combined preparation of isoniazid, rifampin, and pyrazinamide: results at 30 months. *Am Rev Respir Dis.* 1991; 143: 700-706.
- 11) Barasubranian R, Sibasubaranian S, Vijayan VK, et al.: Five-year results of a 3-month and two 5-month regimens for the treatment of sputum-positive pulmonary tuberculosis in South India. *Tubercle.* 1990; 71: 253-258.
- 12) Cohn DL, Catlin BJ, Peterson KL, et al.: A 62-dose, 6-month therapy for pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: a twice weekly, directly observed, and cost-effective regimen. *Ann Intern Med.* 1990; 112: 407-415.
- 13) The Tuberculosis Trials Consortium: Rifapentine and isoniazid once a week versus rifampicin and isoniazid twice a week for treatment of drug-susceptible pulmonary tuberculosis in HIV-negative patients: a randomized clinical trial. *Lancet.* 2002; 360: 528-534.
- 14) 国立療養所化学療法共同研究会: PZAを加えた初期強化化学療法—国療化研第26次A研究—。結核. 1986; 61: 363-369.
- 15) 馬場治賢, 新海明彦, 井植六郎, 他: 肺結核短期療法の遠隔成績 (第二次研究-A) 無作為割り当ての4方式による終了後6年までの遠隔成績. 結核. 1987; 62: 329-339.
- 16) 馬場治賢, 新海明彦, 井植六郎, 他: 肺結核短期療法の遠隔成績 (最終報告) 第3次研究: 6カ月療法 (PZAを含む) と陰性化後6カ月療法 (PZA含まず) の比較. 結核. 1988; 63: 239-246.
- 17) 鈴木 孝, 嶋田正廣, 山口 亘, 他: 肺結核の短期化学療法に関する研究 (第3報) —Pyrazinamideを加えた初期強化短期化学療法—結核. 1983; 58: 459-467.
- 18) 亀田和彦: 今日におけるピラジナミドの地位. 結核. 1995; 70: 445-455.
- 19) 和田雅子, 吉山 崇, 吉川正洋, 他: 初回治療肺結核症に対するPyrazinamideを含んだ6カ月短期化学療法. 結核. 1994; 69: 671-680.
- 20) 和田雅子, 吉山 崇, 尾形英雄, 他: 初回治療肺結核症に対する6カ月短期化学療法の成績—その効果, 副作用と受容性について6年間の経験から— 結核. 1999; 74: 353-360.
- 21) 和田雅子, 溝口國弘, 奥村昌夫, 他: 結核化学療法における維持期週2回間欠療法の効果と副作用. 結核. 2006; 81: 363-369.
- 22) 石橋凡雄, 国立療養所化学療法共同研究会: PZAを加えた初期強化短期化学療法—国療化研第26次A研究—。結核. 1986; 61: 363-369.
- 23) Mitchison DA: Basic mechanisms of chemotherapy. *Chest.* 1979; 76: 771-781.
- 24) Jindani A, Aber VR, Edwaeds EA, et al.: The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1980; 121: 939-949.
- 25) Dickinson JM, and Mitchison DA: In vitro studies on the choice of drugs for intermittent chemotherapy of tuberculosis. *Tubercle.* 1966; 47: 370-380.
- 26) David HL, Newman CM: Some observation on the genetics of isoniazid resistance in the tubercle bacilli. *Am Rev Respir*

- Dis. 1971 ; 104 : 508-515.
- 27) Mitchison MD: How drug resistance emerges as a result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis. *Int J Tuberc lung Dis.* 1998 ; 2 : 10-15.
  - 28) Mitchison DA, and Nunn A: Influence of initial drug resistance on the response to short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1986 ; 133 : 423-430.
  - 29) Espinal MA, Kim SJ, Saarez PG, et al.: Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis. Treatment outcomes in 6 countries. *JAMA.* 2000 ; 283 : 2537-2545.
  - 30) Quy HTW, Lan NTN, Borgdorff MW: Drug resistance among failure and relapse cases of tuberculosis: is the standard re-treatment regimen adequate? *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003 ; 7 : 631-636.
  - 31) The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis drug resistance surveillance 1999-2000.: Anti-tuberculosis Drug resistance in the world. WHO, Geneva, 2004.
  - 32) Abe C, Hirano K, Wada M, et al.: Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to four first-line anti-tuberculosis drugs in Japan, 1997. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001 ; 5 : 46-52.
  - 33) Kamat SR, Dawson JJY, Devadatta S, et al.: A controlled study of the influence on the attack rate of tuberculosis in a 5-year period in close family contacts in south India. *Bull WHO.* 1966 ; 34 : 517-532.
  - 34) 厚生労働省健康局結核感染症課監修:「結核の統計2006」. 結核予防会, 東京, 2006.
  - 35) Addington W: Patient compliance: the most serious problem in the control of tuberculosis in the United States. *Chest.* 1979 ; 76 : 741-743.
  - 36) McDonald RJ, Memon AM, Reichman LB: Successful supervised ambulatory management of tuberculosis treatment failures. *Ann Intern Med.* 1982 ; 96 : 297-302.
  - 37) Iseman MD: Directly observed treatment of tuberculosis. We can't afford not to try it. *New Engl J Med.* 1993 ; 328 : 576-578.

## The 82nd Annual Meeting Special Lecture

## ANTI-TUBERCULOSIS CHEMOTHERAPY

Masako WADA

**Abstract** The era of the modern chemotherapy in the treatment of tuberculosis has started by the discovery of streptomycin in 1943. Soon after the introduction of SM, it became evident that drug-resistance against streptomycin (SM) quickly emerged when used singly, and the combination therapy with para-aminosalicylate (PAS) and isoniazid (INH), both of which were developed a little later, had been the standard regimens for the treatment of tuberculosis. But, long-term therapy, more than a year, sometimes of two or three years, was required to get recovered from tuberculosis by three-drug combination therapy of SM-PAS-INH. Introduction of rifampicin (RFP) in 1966 and re-evaluation of pyrazinamide (PZA) in early 1970's have brought a revolutionary change in the concept of tuberculosis chemotherapy, and very potent six-month regimen, consisting of two-month initial intensive phase (INH-RFP-PZA and EB or SM) and four-month maintenance phase (INH-RFP) has been established as the global standard regimen.

Tuberculosis chemotherapy has liberated tuberculosis patients from lengthy stay in sanatoria or hospitals. Now, tuberculosis patients could be and should be treated by the intensive short-course chemotherapy under ambulatory settings. One of the most serious obstacles of ambulatory treatment is the incompliance of the patients to the prescribed regimen. Obvious outcome of such incompliance is the treatment failure at the level of individual patients and also the prevalence of multidrug-resistant- (MDR-) and extensively drug-resistant- (XDR-) tuberculosis all over the world. MDR- and XDR-tuberculosis are already threatening tuberculosis

control policy in some countries and districts in the world.

Early diagnosis of infectious patients and successful treatment of newly diagnosed patients under DOTS are the most recommendable strategies to prevent the emergency of MDR- and XDR-tuberculosis worldwide.

In Japan, the policy of tuberculosis treatment has been more or less diverged from the global standards, namely, higher rate of hospitalization, longer hospitalization periods, and longer treatment. One of the most important reasons for such cost-effectively inefficient practices is the lack of reliable and practical DOT system for ambulatory treatment. Recently, we successfully completed a trial to implement a DOT system in which the city-pharmacists served as the observer. We believe that this system is well acceptable for both city-pharmacies and tuberculosis patients, and expect to be adapted through the whole country.

New anti-tuberculosis drugs which enable the intermittent therapy of much shorter duration are eagerly expected.

**Key words:** Anti-tuberculosis chemotherapy, Short-course chemotherapy, Resistant tuberculosis, Directly observed chemotherapy, Intermittent chemotherapy

Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA)

Correspondence to: Masako Wada, Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: wada@jata.or.jp)



## 第82回総会シンポジウム

## IV. 抗酸菌研究の最前線

座長<sup>1</sup>岡田 全司<sup>2</sup>小林 和夫

キーワード：分子疫学，潜伏感染，血清診断，新規抗結核薬，ワクチン開発

発表者：

1. 反復配列多型を利用した結核菌の迅速遺伝子型別法の標準化

°前田伸司，村瀬良朗（結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター結核菌情報科）

2. 結核菌病原因子による病変形成と感染防御

°松本壮吉（大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学），小林和夫（国立感染症研究所免疫部）

3. MAC特異的糖蛋白質脂質抗原を用いた肺 MAC症の血清診断

°北田清悟，前倉亮治（国立病院機構刀根山病院呼吸器内科）

4. 新規抗結核薬である OPC-67683の研究開発

松本 真（大塚製薬株式会社微生物研究所）

5. 新しい結核ワクチン開発

岡田全司（国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター）

全世界で約20億人（全人口の3分の1）が結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）に既感染，毎年880万人が結核を発病，200万人（AIDS合併を含む）が死亡している。今後10年間で8000万人が結核を発病，2000万人が死亡することが推定されている。日本（2005年）では年間2万8000人が発病，2300人が死亡し，日本においても結核対策は重要な課題である。

シンポジウム「抗酸菌研究の最前線」を企画し，発生动向，病態，診断，治療，予防の視点から，気鋭の研究者が最新の研究成果や将来展望を発表し，結核など抗酸菌感染症対策に新戦略を提供した。

発生动向，特に，分子疫学に関し，前田伸司博士らは

「反復配列多型（VNTR）を利用した結核菌の迅速遺伝子型別法の標準化」について，12-locus VNTR分析法の有用性を示した。12-locus VNTR分析法は日本国内で分離された結核菌株の分子疫学に，加えて，IS6110-RFLP法より，優れた分析法であることを証明した。

病態に関し，松本壮吉博士らは「結核菌病原因子による病変形成と感染防御」について，抗酸菌由来蛋白質分子（MDP1）の生物学的意義を発表した。MDP1はDNAの保護，増殖制御，宿主細胞への接着，防御免疫の誘導など多彩な活性を示し，菌および宿主の双方に多機能分子であることを証明した。MDP1は潜在性結核菌感染に役割を演じ，さらに，新規ワクチン開発において分子標的候補の可能性を言及した。

診断に関し，北田清悟博士らは「MAC特異的糖蛋白質脂質抗原を用いた肺 MAC症の血清診断」について，*Mycobacterium avium* complex（MAC）特異的細胞壁抗原：glycopeptidolipid（GPL）を用いた血清診断：抗GPL抗体の測定およびキットの開発など，MAC感染症に臨床応用した。血清診断は従来の診断基準で実現不可能な迅速・簡便，高感度・特異度，加えて，疾患活動性と相関を示し，MAC感染症の診断にきわめて有用である。

治療に関し，松本真博士は世界から注目されている「新規抗結核薬である OPC-67683の研究開発」について発表した。Nitroimidazole誘導体である「OPC-67683」は結核菌のミコール酸合成を阻害し，抗菌活性を示すこと，既存の抗結核薬と交差耐性を示さないこと（すなわち，多剤耐性結核菌にも有効），細胞内寄生菌にも有効であることを証明した。さらに，代謝活性の低下した休眠菌にも有効であることを証明した。さらに，マウス感染モデルを用い，現行抗結核薬より優れた抗菌活性を示し，かつ，治療期間

<sup>1</sup>NHO近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター，<sup>2</sup>国立感染症研究所免疫部

連絡先：小林和夫，国立感染症研究所免疫部，〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1（E-mail: kobayak@nih.go.jp）

（Received 30 Jul. 2007）

を短縮できた。OPC-67683は安全性にも優れ、きわめて有望な新規抗結核薬候補である。

予防に関し、岡田全司博士は「ワクチン開発」について、BCGを凌駕するワクチン候補を発表した。新規抗結核DNAワクチン(HVJ-リポソーム/HSP65 DNA+IL-12 DNA, HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNA)やリコンビナント72f BCGワクチンは結核菌抗原特異的キラーT細胞を誘導し、予防のみならず、治療(感染曝露後)効果も発揮した。カニクイザル感染モデルで

HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンはBCGよりも強力な生存率改善・延命効果を発揮し、priming-booster法(BCG→HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン)で100%の生存率を示したことから、臨床試験が期待される。

シンポジウム「抗酸菌研究の最前線」が会員諸氏に有用な情報を提供、そして、研究室から臨床に迅速・効率的に“橋渡し(Translation)”し、究極的に人類に甚大な健康被害を提供し続けている結核の制圧に寄与することを祈念している。

## 1. 反復配列多型を利用した結核菌の迅速遺伝子型別法の標準化

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター結核菌情報科 前田 伸司, 村瀬 良朗

### はじめに

感染源特定のための結核菌のタイピング方法としては、①Restriction fragment length polymorphism (RFLP)分析法、②Spoligotyping法、③Variable numbers of tandem repeats (VNTR)分析法などがある。現在のタイピングの標準法は、RFLP分析である。これは、結核菌群がもつトランスポゾン上に存在する挿入配列(IS)6110のコピー数と染色体上での挿入位置の多様性を利用して結核菌を分類する方法である。しかし、RFLP分析では次のような欠点がある。①サザンブロッティングが可能な量(1 $\mu$ g以上)と純度のDNAが必要なため、菌を培養しなければならないため時間がかかる(2~3週間)、②IS6110のコピー数が少ない時には使えない、③バンドの差異を肉眼で判断するので、電気泳動やゲルの状態により結果が変動する。そのため、多施設間でのデータ比較および共有はできない。RFLP分析法が、結果を得るのに4日(調製済みのDNAから)かかるのに対して、Spoligotyping法では、2日で結果が得られる。しかし、欧米諸国とは異なり、国内では結核菌の分子多様性が低く分類可能な結核菌株数が少ないという欠点がある。VNTR分析法は、パスツール研究所で進められた結核菌のゲノムプロジェクトで明らかになったMycobacterial interspersed repetitive units (MIRU)および他部位の繰り返し配列のコピー数を調べ、結核菌の分類を行う方法である。Mycobacterium tuberculosis H37Rv株では、41カ所のMIRUが存在し、そのうち12カ所は、多様性があることが報告されている<sup>1)</sup>。また、この方法は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を利用して核酸を増幅するため、少量の未精製のDNAを検体として使うことができる。

大都市における結核対策には、人の移動を考慮して広

域での結核疫学調査が必要となる。RFLP分析法は、解析能力が高いが、地域衛生研究所間でのデータ比較は難しい。そのため、広域調査には、結果がデジタルで表されるVNTR法を適応する必要がある。しかし、米国疾病予防管理センター(CDC)が採用している12カ所のMIRU分析で、日本国内の株を分析すると約23%の株が同一プロファイルに分類されるため、直接この方法を国内に適応することはできない<sup>2)</sup>。本研究では、どのlocusを何カ所分析すると、IS6110 RFLP分析法と同程度の分解能になるかを明らかにすることによって、国内での結核菌分析におけるVNTR標準分析法の確立を目指した。

### 方 法

〔結核菌分離株とタイピング法〕

結核療法研究協議会が2002年収集した菌株の中から都道府県ごとに、ランダムに3~10株選択した。これら合計325株について、IS6110 RFLP, SpoligotypingおよびVNTR分析を行った。VNTR分析は、代表的なMIRUの12カ所, Exact tandem repeats (ETR)の4カ所およびその他19カ所の合計35カ所について分析を行った。

〔PCR法によるVNTR断片の増幅〕

結核菌DNA(5 ng), 0.5  $\mu$ Mのプライマー混合液, GC buffer I (Takara Bio), 0.2  $\mu$ M dNTP, Takara Ex Taq (0.25 U)を混合し、H<sub>2</sub>Oで全量10  $\mu$ lとしてPCRを行った。反応の条件は、95 $^{\circ}$ Cで5分加熱した後、95 $^{\circ}$ C 15秒, 65 $^{\circ}$ C 30秒, 72 $^{\circ}$ C 2分のサイクルを30回繰り返し、72 $^{\circ}$ Cで7分加熱し、その後4 $^{\circ}$ Cとした。

〔アガロースゲル電気泳動〕

反応液は、TBE緩衝液を用いた2.5%または1.5%アガロースゲルで電気泳動を行い分子量を算出し、タンデムリピートのコピー数に換算を行った。

### 〔タイピング能力の比較〕

各ローカスにおける分解能力は Polymorphism information content (PIC) を、各分析法による結核菌のタイピング能力は、Hunter-Gaston discrimination index (HGDI) を用いて比較を行った。

## 結果と考察

### RFLPおよび Spoligotyping 分析

分離株 (合計 325 株) について IS6110 RFLP 分析を行い、クラスター率を算出すると 18.5% (60/325) であった。都道府県ごとに無作為に選んだ株から得られたこの値は、国内の IS6110 RFLP 分析での平均的なクラスター率に近いと考えられる。Spoligotyping では、32 株が独立した株と区別され、最大クラスターは 228 株からなる北京型結核菌だった (Table)。さらに、北京型株の一部のダイレクトリピートが欠損した北京型類似株 (Beijing-like strain) が 12 株存在したことから、これらを含めた北京型結核菌数は、240 株 (73.8%) であった。

### 16カ所 (12カ所の MIRU と 4カ所の ETR) の VNTR 分析

12カ所の MIRU と 4カ所の ETR、合計 16カ所の分析では、MIRU-2, 20, 24 のように非常にコピー数の分布が狭く、PIC の値が 0.018 ~ 0.081 と低い locus と MIRU-10, 26, 31 のように分布が広く、PIC 値が 0.545 ~ 0.588 となる locus があった。米国 CDC が採用している標準 MIRU 分析法に ETR の 4カ所を加えても、日本国内の株を分析した場合、RFLP 法に比べて分解能が低かった<sup>2)</sup>。そこで、Smittipat らの論文<sup>3)</sup>を参考にして、北京型結核菌を効率よくタイピング可能な locus を選び分析を行った。

### 19カ所 (北京型結核菌をタイピング可能と考えられる) の VNTR 分析

19カ所の新しい locus の分析では、MIRU や ETR に比べてコピー数の分布が広く、また PIC 値も高いことがわかった。Supply らのヨーロッパ諸国での VNTR 標準法の提唱論文<sup>4)</sup>では、PCR 産物が得られない locus は除外されている。しかし、PCR 産物が得られないということは、プライマーの結合部位が欠損しているか、その部分

に変異が存在する株であることを示唆している。このような菌の特徴もタイピングに十分利用できると考えられるので、これらの locus も分析から除外しなかった。

一方、VNTR-2163a, 2163b, 1895, 3336, 3232, 3820 および 4120 では反復配列のコピー数が 15 以上である株が多く含まれることがわかった。コピー数が多い場合、得られる PCR 産物の分子量が 1 kbp 以上となり、反復配列のコピー数の相違をアガロースゲル電気泳動で判定することが難しい。そのため、PCR 産物からコピー数に換算する際に間違いが生じやすいと考えられる。そこで、これらの locus のうち、コピー数が 15 以上となる株の割合が全体の 5% 以上含まれる VNTR-2163a, 3232, 3820 および 4120 は、分析から除外した。

### 日本国内株分析のための VNTR 標準法

除外した 4カ所以外の 31カ所について PIC の値が高いものから順番に並べて、分析ローカスの組合せを作り、RFLP 分析法と分解能を比較した。クラスター形成率およびタイピング可能な株数などを参考にして解析を行った結果、上位 12カ所 (VNTR-2163a, 4052, 3336, 1955, 4156, 2372, 0424, 2074, 2996, 3155, 0960 および 3192) を選択すると、RFLP 分析結果とほぼ同じ分解能であることがわかった。このプライマーの組合せを VNTR (Japan Anti-Tuberculosis Association: JATA) として国内株分析の標準法とした。

### ヨーロッパで提唱されている 15-locus および 24-locus の VNTR 分析結果の比較

この VNTR (JATA) はクラスター形成率、最大クラスター形成株数などの指標において、現在の標準法である RFLP 分析より優れていた。また、クラスター形成率で比較すると、本分析法は、昨年 Supply らによって提唱されているヨーロッパ諸国での VNTR 分析標準法<sup>4)</sup>の 24-locus 分析には及ばないものの、15-locus 分析よりも優れていた (Fig.)。

## まとめ

本研究で樹立した国内株分析に最適化した 12-locus VNTR 分析法は、ヨーロッパで提唱されている 15-locus

**Table** Comparison of discriminatory power of IS6110 RFLP, spoligotyping and VNTR analyses

Typing method	Total no. of type patterns	No. of unique types	No. of clusters	No. of clustered isolates (%)	Maximum no. of isolates in a cluster	HGDI*
IS6110 RFLP	283	265	18	60 (18.5)	8	0.998
Spoligotyping	45	32	13	293 (90.0)	228	0.501
12-locus MIRU-VNTR	127	89	38	236 (72.6)	61	0.944
16-locus VNTR (12 MIRU and 4 ETR)	165	121	44	204 (62.8)	44	0.967

\*Hunter-Gaston diversity index

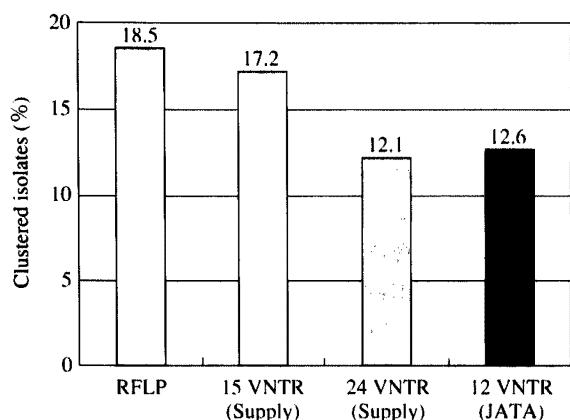


Fig. Comparison with percentage of the clustered isolates

VNTR分析法よりも優れていた。さらに、IS6110 RFLP分析よりも分解能が高いことが明らかになった。今後は、接触者調査から関連が疑われる株を使ってRFLP分析結果と本VNTR分析結果の比較および各ローカスの安定性を調査する予定である。

## 2. 結核菌病原因子による病変形成と感染防御

大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学 松本 壮吉  
 国立感染症研究所免疫部 小林 和夫

### はじめに

Nature Medicine誌は本年度(2007)、抗結核薬開発において重要かつchallengingな研究として、菌の休眠-潜伏感染機構の解明を筆頭に挙げたり。休眠(dormant)菌を殺傷することができれば、現在の結核治療期間を大幅に短縮することができる。さらに休眠-潜伏感染菌を駆逐することで結核の制圧が可能である。われわれは早くから休眠菌対策の重要性を認識し解析を行ってきた。本シンポジウムでは、われわれのこれまでの成果、すなわちmycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)という抗酸菌に特異的なヒストン様蛋白質が結核菌の休眠をはじめとする病変形成や病態の推移に密接に関わるという分子論的証拠を紹介した。また、われわれの研究成果に基づいた新しい抗結核薬探索の取り組みについても紹介した。

### 内因性再燃による結核発病プロセス

結核菌は現在、人類の3分の1に一部休眠状態で潜伏感染している。休眠菌は長期の生存が可能で、かつ化学

### 謝 辞

本研究では、結核療法研究協議会が全国から集めた結核菌の一部を分析に利用させて頂きました。利用に関して承諾を頂いた諸先生方に心より感謝致します。

### 文 献

- 1) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al.: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.* 2000; 36: 762-771.
- 2) Wada T, Maeda S, Hase A, et al.: Evaluation of variable numbers of tandem repeat as molecular epidemiological markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J Med Microbiol.* 2007; 56: 1052-1057.
- 3) Smittipat N, Billamas P, Palittapongpim M, et al.: Polymorphism of variable-number tandem repeats at multiple loci in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5034-5043.
- 4) Supply P, Allix C, Lesjean S, et al.: Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 4498-4510.

療法薬に対し抵抗性を示す。宿主の防御能の低下に伴い菌は再び増殖を開始し(内因性再燃)、病気が発症する。これを二次結核と呼ぶが、多くの成人型肺結核はこの機序で発症する。

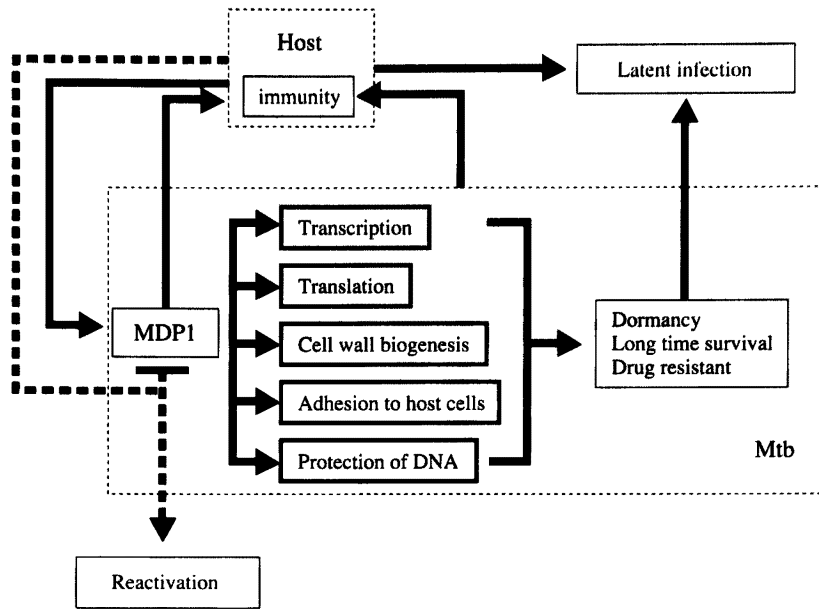
現在の結核治療は世界保健機関の推奨する主力2薬剤(イソニアジドとリファンピシン)を含む複数薬の直接監視下短期化学療法(DOTS)によってなされているが、それでも最低6カ月の投薬期間が必要である。長期にわたる治療は、患者の精神的苦痛を伴うことから中断を余儀なくされる場合があり、それが薬剤耐性菌の出現を促す。結果として多剤耐性結核菌(MDR-TB)や超多剤耐性結核菌(XDR-TB)が出現し結核治療を困難にしている。

結核治療が長期の投薬期間を必要とするのは、菌の増殖が緩慢で代謝が比較的緩やかなうえに、結核菌が一定の割合で薬剤の標的代謝が停止した休眠状態に移行するからである。休眠菌に対して現行の結核薬は効果をあらわさず、増殖時にも一定の割合で生じる休眠菌を殺傷できないため長期間の薬剤投与を余儀なくされている。さらに潜伏感染する結核菌はほとんどが休眠状態であり、

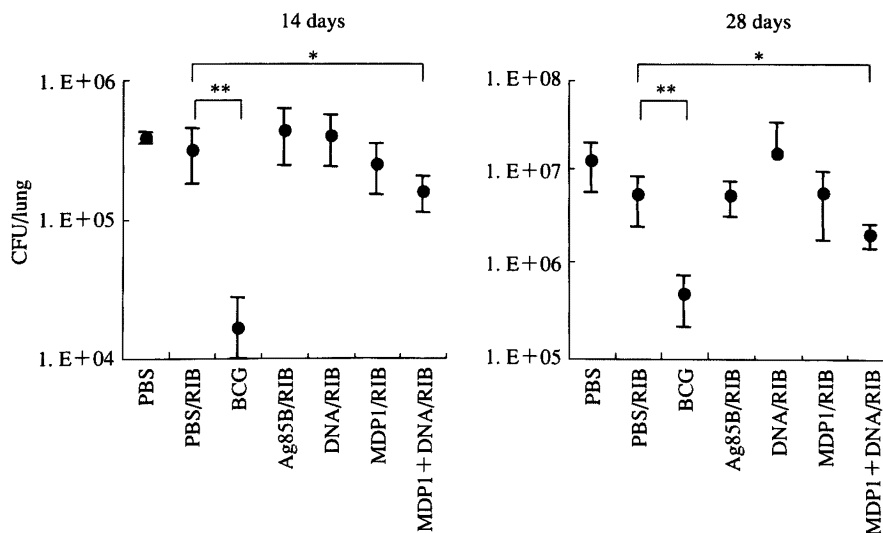
既存の薬剤で結核予備軍である既感染健常人の処置を行うことは現在、不可能である。しかしながら人類に潜伏感染する結核菌を駆逐することで理論的には結核の制圧も可能である。このような状況から、結核菌の休眠-潜伏感染から内因性再燃にいたる分子機構を明らかにし対策を講ずる必要がある。

潜伏-休眠感染における鍵分子

われわれは休眠菌が最も大量に発現する蛋白質 mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) を同定し解析を行ってきた。MDP1は分子量約21 kDaの蛋白質で、N末端部とC末端部がそれぞれ細菌のHU蛋白質および哺乳



**Fig 1.** The role of MDP1 in the latent infection and reactivation *M. tuberculosis* (Mtb) stimulates cellular immune responses, which trigger bacterial dormancy. In dormant phase MDP1 negatively regulate transcription, translation, cell wall biogenesis. MDP1 is a histone-like DNA binding protein and protects DNA from oxidative stresses. In addition, MDP1 mediates mycobacterial entry to host cells, where Mtb persists. To the contrary, not determined host response may cancel the activity of MDP1 and consequently Mtb grows again, leading reactivation.



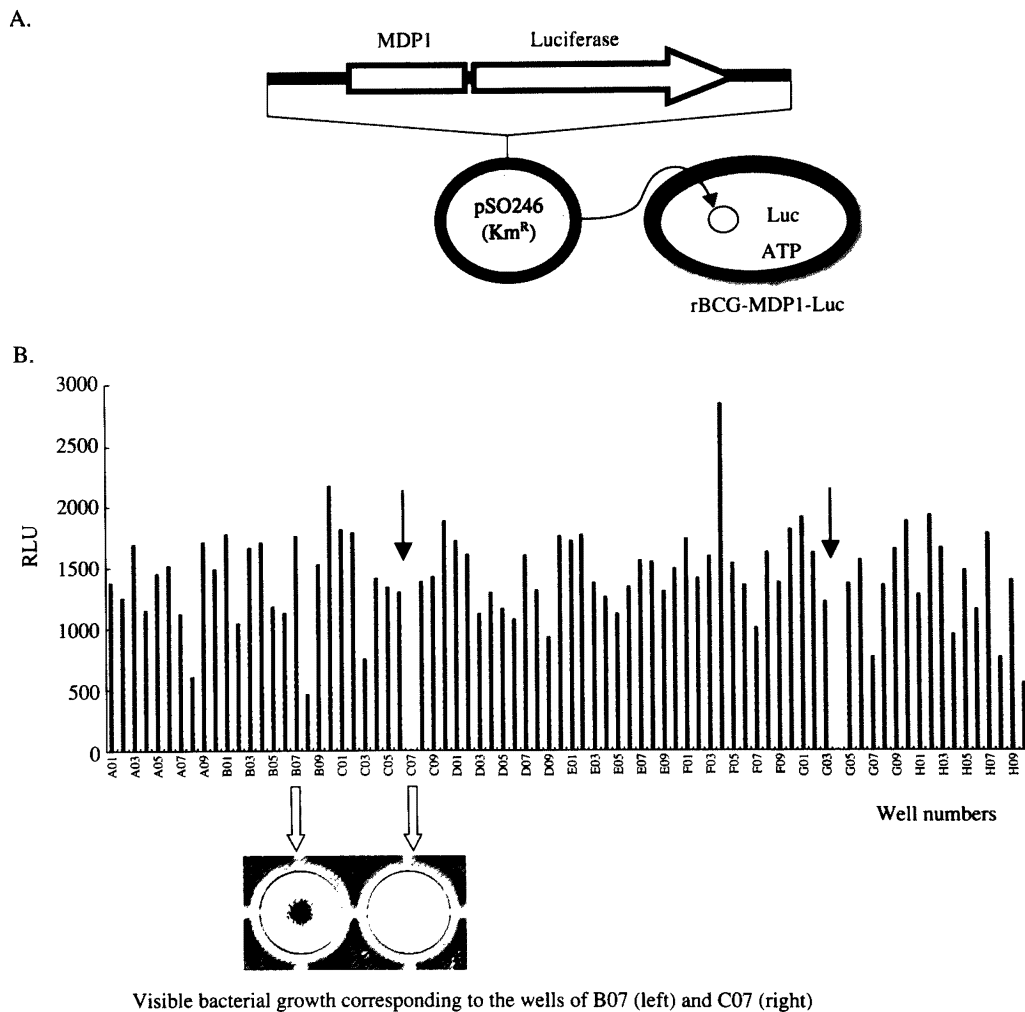
**Fig 2.** MDP1 induces protection against *M. tuberculosis* challenge in mice C3H/HeJ mice were immunized with antigens as indicated below the horizontal axis and challenged i.v. with  $10^6$  CFU of *M. tuberculosis* Kurono strain. Fourteen (A) and 28 (B) days after the challenge, bacterial numbers in the lungs were determined by counting CFUs. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.005$  (ANOVA).

類のヒストン H1 蛋白質と相同性を有するヒストン様蛋白質である。実際に MDP1 は GC-rich な DNA 領域に結合して DNA を酸化ストレスなどから保護するとともに、転写を制御し生体高分子合成を調節する (Fig. 1)。休眠菌には大量の MDP1 が含まれることから MDP1 は休眠菌 DNA を保護する一方、転写-翻訳を抑制して菌の増殖停止を演出している。休眠は、生体内で細胞性免疫の誘導に伴って誘導され、その主要なエフェクターの1つが酸素分圧である。結核菌が潜伏する細胞内の酸素分圧は低く、低酸素は MDP1 の発現を増強させることが知られている。

MDP1 は DNA 以外の糖にも結合し、糖脂質に結合し

て結核菌細胞壁にも存在する。定常期以降、MDP1 は細胞壁にも蓄積し、結核菌の病原性に強く関わるミコール酸の糖への転移を抑制する。このことは MDP1 が菌体内で遺伝子発現を抑制すると同時に、休眠菌の細胞壁合成の停止にも関わることを示唆する (Katsube T et al. 論文投稿中)。一方、細胞壁の MDP1 は宿主細胞の糖、特にヒアルロン酸などのムコ多糖に結合することで感染細胞の一つである II 型肺胞上皮細胞への感染を促す<sup>2)</sup>。

潜伏感染時に結核菌が大量に発現している MDP1 に対して、宿主がどのような応答を示すのかをマウスモデルを用いて解析した。われわれの仮説は、MDP1 が菌の生存を保障するために免疫応答を不活化するのではない



**Fig 3.** Screening anti-tuberculosis drug by employing MDP1 and luciferase

A. Construction of luciferase-expressing recombinant BCG. The MDP1 gene was inserted into pSO-Luc. And this construct was introduced into BCG by electroporation and luciferase-expressing recombinant BCG (rBCG-MDP1-Luc) was selected on the agar containing kanamycin.

B. Upper figure. rBCG-MDP1-Luc was cultured in 96-round bottom plate at 37°C. The libraries of crude extracts derived from *Actinomyces* were added. After 2 days incubation, luciferase activity (RLU) was measured by luminometer. Two extracts obliterated luciferase activity (narrow allows). Lower figure. After 14 days later, bacterial growth was visible by the eyes and the results were correlated with that of luciferase activity (thick arrows).

かというものであったが、結果は逆であった。MDP1はDNAと結合することでTh1細胞からIFN-gammaの産生を促し、Ag85Bを凌駕するほどのワクチン効果があることが判明した (Fig. 2)<sup>3)</sup>。前述のように細胞性免疫によって休眠が誘導される。MDP1はその他の結核菌抗原とともにTh1型の細胞性免疫を誘導することで、宿主応答を介した菌の休眠の維持にも関わるようだ。また、宿主に一定の防御免疫を付与することで宿主の生存も確保しているように思われる。

#### トランスレーショナルリサーチ

これまでの解析成果から、MDP1の発現をモニターすることで休眠を解除したり、菌を殺傷する新規の化合物の同定が可能ではないかとわれわれは考えた。すなわち、休眠菌内でMDP1の発現を阻害し休眠を解除することで現行の抗結核薬の補助的療法の確立が可能であり、さらにMDP1発現の完全な消失は (MDP1は結核菌の生存自体にも必須である) 菌の死を示唆する。

われわれはMDP1の発現をルシフェラーゼの活性によってモニターする組み換えBCGを作成した。この組み換えBCGを利用することで菌の生死を2～4日で判定することができた (Fig. 3)。われわれは、微生物化学研究会の五十嵐雅之博士や、園田学園女子大学の尾関百合子博士等と共同でルシフェラーゼ活性を指標にBCGの増殖を抑制する生物資源の探索を始めた。これまでに約3000あまりの土壌放線菌由来抽出物を試験した結果、20あまりの活性物質を検出した。これらの活性物質は

BCGの増殖のみならず、大阪市で分離された複数の多剤耐性結核菌に対しても同等の効果を示した (大阪府立公衆衛生研究所の田丸重貴先生との共同研究)。われわれはスクリーニングと活性解析を続け休眠菌をも殺傷する新規結核薬の創薬を目指している。

#### ま と め

MDP1は抗酸菌特異的なヒストン様蛋白質で、DNAの保護、増殖制御、宿主細胞への接着活性、防御免疫の誘導能など複数の活性を有し、結核における潜伏感染の成立と解除 (内因性再燃) に重要な役割を果たす。このことはMDP1の結核ワクチンのコンポーネントとしての有用性を示している。またわれわれの研究成果に基づいた新規抗結核薬の探索研究を紹介した。

#### 文 献

- 1) Ginsberg AM, Spigelman M: Challenges in tuberculosis drug research and development. *Nat Med.* 2007; 13: 290-294.
- 2) Aoki K, Matsumoto S, Hirayama Y, et al.: Extracellular mycobacterial DNA-binding Protein 1 participates in *Mycobacterium*-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J Biol Chem.* 2004; 279: 39798-39806.
- 3) Matsumoto S, Matsumoto M, Umemori K, et al.: DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol.* 2005; 175: 441-449.

### 3. MAC特異的糖蛋白質抗原を用いた肺MAC症の血清診断

国立病院機構刀根山病院呼吸器内科 北田 清悟, 前倉 亮治

非結核性抗酸菌 (NTM) 感染症は増加傾向にある。実際、当院のような日本有数の結核病床を有する病院でさえ、今日、喀痰塗抹抗酸菌陽性外来患者の大部分はNTM患者が占めるようになってきている。本邦ではそのNTMの約70%は *Mycobacterium avium* complex (MAC) が占める。最近、MACはHIV陰性の患者においても慢性で進行性の肺疾患を生じることが広く認識されてきている。また、MACによる急性過敏性肺臓炎を呈する病態が新たに報告されている。呼吸器科医がMACによる肺疾患に接する機会は増えており、その診断、治療、管理に対する関心が高まっている。

肺MAC症の診断は時に煩雑である。なぜならば肺結核とは異なり、MAC菌は水、塵埃、土など環境中から臨床検体に混入する可能性があり、侵襲的疾患ではなく

気道にコロライズすることがありうるからである。したがって痰からの一度のMAC菌検出は肺感染症と診断するには不十分である。2007年2月に10年ぶりに米国胸部疾患学会 (ATS) より非結核性抗酸菌感染症の診断・治療に関するガイドラインが改訂・刊行された<sup>1)</sup>。診断は、臨床的基準と細菌学的基準から成り、その両者を満たす必要がある。細菌学的基準は1997年のガイドラインよりも条件が緩和されているものの、複数回の痰または気管支洗浄液、組織からのMAC菌培養陽性が必要であり、基準を満たすまでに労力、費用と時間を要する。特に、軽症 (早期) の肺MAC症患者では、喀痰採取が困難な例も多く、全症例に気管支鏡検査を実施するのも困難である。また、臨床症状とエックス線画像所見は非特異的であり、他の抗酸菌感染症との鑑別は、菌の証明

が困難な場合には診断に難渋することがある。特に肺結核との鑑別は、感染予防の観点からも重要である。肺結核は感染予防対策のため即座に入院勧告を考慮し、治療を開始しなければならない。一方、肺 MAC 症は人から人への感染はないとされ、確定診断が即治療開始を必要とするわけではない。個々の患者にとって治療の利益、不利益を考慮し、治療時期を決定すべきである。

これらの課題を克服すべく、新たな診断法を提案したい。われわれは MAC 表層に存在する糖蛋白質脂質 (glycopeptidolipids : GPLs) 抗原を用いた MAC 特異的血清診断を開発してきた。本シンポジウムでは MAC 特異的血清診断の有用性、臨床応用について報告した。

### 血清 GPL core 抗体

GPLs は MAC 血清型を決定する糖蛋白質脂質であり、現時点では 31 種類の GPLs が報告されている。GPLs は、肺結核、*M. kansasii* には存在しない。GPL は各血清型共通構造である GPL core と血清型特異的 oligosaccharide からなる。MAC は血清型によってその毒性が異なり臨床経過に影響を与えている可能性が示唆されている<sup>2)</sup>。当初われわれは 11 種類の血清型特異的 GPLs を混合し、whole の GPLs を抗原として用いた<sup>3)</sup>。その後、GPL core に優位な epitope があることを発見し、これを抗原とした血清診断を開発した<sup>4)</sup>。

### 肺 MAC 症の診断、肺結核、*M. kansasii* 症との鑑別

ATS 診断基準を満たす肺 MAC 症 106 例、環境中からの MAC の汚染と考えられた MAC colonization 群 11 例、*M. kansasii* 症 30 例、肺結核 77 例、健常人 126 例の血清中 GPL core 抗体価の測定を行った。肺 MAC 症患者において、血清抗体価は有意に上昇していた。血清診断によって、肺 MAC 症と colonization、健常人との鑑別が可能であり診断に有用であることが確認された。Immunoglobulin class の中では、IgA が最もよい感度、特異度を示し、肺 MAC 症の診断における感度 92.5%、特異度 95.1% であった (Table)。この結果から、この血清診断は肺 MAC 症

の迅速な診断に有用であることが示された。また、他の主要な抗酸菌感染症である肺結核、肺 *M. kansasii* 症との鑑別にも有用であった。

この結果を受け、GPL core IgA 抗体測定のエッセイ kit を開発した。血清抗体価は患者標準血清を用い、U/ml に標準化し、より安定した結果を得ることができ、優れた再現性、安定性を確認した。6 施設が参加した多施設研究においても同様の結果が得られた。血清材料は 70 例の肺 MAC 症、18 例の MAC colonization、36 例の肺結核、45 例の他の肺疾患、そして 76 例の健常人から集められた。Cut off 値を 0.7 U/ml と設定すると、EIA kit の肺 MAC 症の診断における感度、特異度はそれぞれ 84.3%、100% であった。

### 化学療法と抗体価の相関

化学療法を行った肺 MAC 症患者で、治療前後で抗体価の推移を検討した<sup>4)</sup>。化学療法によって排菌が陰性化した群では抗体価は有意に低下したが、排菌が陰性化しなかった群では抗体価に変化は認められなかった。また、手術症例において、手術前後で抗体価の急峻な低下が認められた (Fig.)。これらのことから抗体価が疾患の活動性を反映する可能性が示唆された。

### 画像所見と抗体価の相関

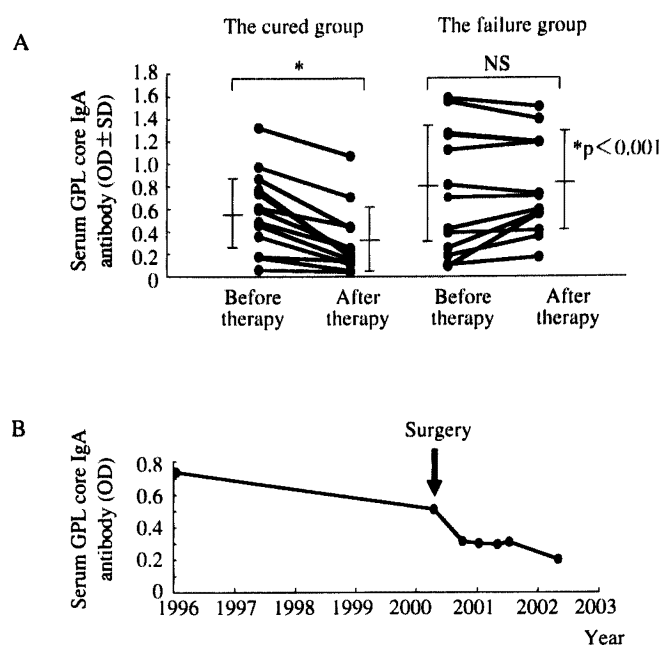
47 例の肺 MAC 症患者において、胸部 CT 画像と抗体価の関連を検討した<sup>5)</sup>。胸部 CT は、小結節陰影 (< 10 mm)、結節陰影 (10 ~ 30 mm)、大結節陰影 (> 30 mm) または浸潤陰影、気管支拡張、空洞、および無気肺の有無を検討した。また、病巣の拡がり CT を解剖学的に 18 segment に分け、所見を認めた segment 数によって評価した。血清 GPL core IgA 抗体価は 10 mm 以上の結節陰影を呈する症例群で有意に高値を示した。また病変の拡がりとも正の相関性を認めた ( $p=0.0183$ )。すなわち、より広範囲に病変を認め、大きな結節を形成すると抗体価は高い傾向にあった。

Table Sensitivity and specificity of EIA\* for serodiagnosis of pulmonary MAC disease

Clinical Condition	n	Immunoglobulin class					
		Ig G		Ig A		Ig M	
		Sensitivity (number of seropositives)	Specificity (number of seronegatives)	Sensitivity (number of seropositives)	Specificity (number of seronegatives)	Sensitivity (number of seropositives)	Specificity (number of seronegatives)
MAC disease	106	72.6 (77)	27.4 ( 29)	92.5 (98)	7.5 ( 8)	78.3 (83)	21.7 ( 23)
MAC colonization	11	9.1 ( 1)	90.9 ( 10)	9.1 ( 1)	90.9 ( 10)	18.2 ( 2)	81.8 ( 9)
<i>M. kansasii</i> disease	30	6.7 ( 2)	93.3 ( 28)	10.0 ( 3)	90.0 ( 27)	16.7 ( 5)	83.3 ( 25)
TB	77	10.4 ( 8)	89.6 ( 69)	5.2 ( 4)	94.8 ( 73)	5.2 ( 4)	94.8 ( 73)
Healthy subjects	126	6.3 ( 8)	93.7 (118)	3.2 ( 4)	96.8 (122)	8.7 (11)	91.3 (115)

\*Enzyme immunoassay





**Fig** Disease activity and the level of antibodies to MAC GPL core. The levels of serum IgA antibodies to GPL core are shown before beginning and after the completion of antimycobacterial chemotherapy for both the cured (14 MAC patients) and the failure groups (13 MAC patients). In the cured group, the culture results indicated conversion from positive to negative after successful chemotherapy, and in the failure group, the culture results indicated no conversion to negative despite treatment. All results are expressed as individual data (●), and the bars show mean  $\pm$ SD for each group. The OD levels decreased significantly ( $*p < 0.001$ ) in the cured group of patients but were not changed ( $p = 0.381$ ) in the treatment failure patient group. The changes of serum IgA antibodies levels of to GPL core in a 61 year old female MAC patient who had undergone lobectomy is shown in (B). IgA levels decreased rapidly after the surgery and sputum cultures converted from positive to negative.

### 早期診断に対する有用性

画像的に気管支拡張像 and/or 小結節陰影を呈する患者において、喀痰検査で診断がつかなかった56例について血清抗体価と気管支鏡でのMACの検出に関する検討を行った。気管支鏡検査にてMAC陽性患者28例、MAC陰性患者28例であった。MAC陽性例は全例女性で、MAC陰性例は28例中10例が男性であった。MAC陰性例では *P.aeruginosa*, *H. influenzae* などが検出された。血清抗体価はMAC陽性例で有意に上昇し、カットオフ値を0.5 U/ml とすると、MAC症診断の感度は78.6%、特異度96.5%、陽性反応的中率 (positive predictive value) 95.7%、陰性反応的中率 (negative predictive value) 81.8%であった。すなわち、血清診断陽性であれば高い確率でMAC菌検出を推定でき、気管支鏡検査を行わなくても、早期の肺MAC症診断が可能であると考えられた。

### 文 献

1) Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al.: An official

ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of Nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175: 367-416.

- 2) Maekura R, Okuda Y, Hirofumi A, et al.: Clinical and prognostic importance of serotyping *Mycobacterium avium-mycobacterium intracellulare* complex isolates in human immunodeficiency virus-negative patients. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 3150-3158.
- 3) Kitada S, Maekura R, Toyoshima N, et al.: Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex with an enzyme immunoassay that uses a mixture of glycopeptidolipid antigens. *Clin Infect Dis.* 2002; 35: 1328-1335.
- 4) Kitada S, Maekura R, Toyoshima N, et al.: Use of glycopeptidolipid core antigen for serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in immunocompetent patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12: 44-51.
- 5) Kitada S, Nishiuchi Y, Hiraga T, et al.: Serological test and chest computed tomography findings in patients with *Mycobacterium avium* complex lung disease. *Eur Respir J.* 2007; 29: 1217-1223.

#### 4. 新規抗結核薬である OPC-67683 の研究開発

大塚製薬株式会社微生物研究所 松本 真

結核菌は世界の総人口の3分の1に当たる約20億人の人に感染しており、近年の HIV/AIDS の増加に伴い、再燃が世界的に大きな問題となってきている<sup>1)</sup>。結核患者数も増加に転じており、過去のどの時代よりも多い人が結核に感染している状況となっている。また、HIV と結核の混合感染者が1200万人にも達しており、結核感染は HIV 感染者の死亡の主な原因となっている。結核菌が潜伏感染している人に HIV が感染することで、発病へ至る危険性は30～50倍に増加するといわれている<sup>2)</sup>。さらに、多剤耐性結核菌の増加が治療を難治化している。多剤耐性菌の治療には、二次抗結核薬などを使用することになり、効力が不十分であるばかりでなく、副作用も強く、長期療養が必要となる。結核は、今や過去の病気ではなく、このままの状態が続くと今後20年間で10億人が新規に感染し、3600万人が死亡するであろうと考えられている<sup>3)</sup>。このような中、新しい治療薬の開発が切望されていることは必然なことである。新しい治療薬には、①短期化学療法を実現できる薬剤、②多剤耐性結核菌に有効な薬剤、③薬物相互作用がなく抗 HIV 薬などと併用服薬可能な薬剤、④潜伏感染している結核菌に有効な薬剤、などのプロファイルを有する新薬の開発が望まれている。

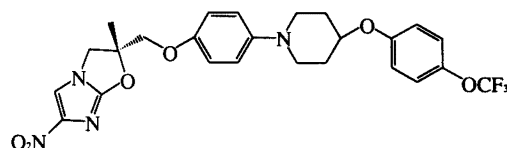
このような現状を踏まえ、結核菌にのみ効力を示し、他の細菌には影響を及ぼさない新規抗結核薬の探索研究を試みた。結核菌はワックスに例えられるように、脂質に富んだ構造を有している。このことは、結核菌のゲノム解析から明らかにされたように、約250もの遺伝子が、脂質の代謝に関係していることも裏づけている。その脂質成分の主成分はミコール酸であり、抗酸菌に特有な長鎖脂肪酸である。すなわち、ミコール酸の生合成を阻害できれば、結核菌特異的に効力を有する抗結核薬を見出すことが可能であると考えられた。このような背景から、ミコール酸合成阻害活性を有した化合物の探索を最小発育阻止濃度の測定に加えて実施することで、有望な候補の探索を行った<sup>4)</sup>。その結果、ミコール酸合成阻害活性をもつものとして、ニトロイミダゾキサゾール誘導体を見出した。本構造は、ヒトや動物病原菌に対して効力を示すことが知られていたが、変異原性が懸念される構造を有していることより、積極的な展開がされていなかった。われわれは、これらの構造の中でも変異原性を有さない構造に注目することで、最終的に変異原性を懸念することなく展開できる構造への変換に成功した。

また、本構造物の誘導体の MIC 値とミコール酸阻害活性の相関を調べた結果、メトキシ-およびケト-ミコール酸合成阻害活性が、MIC 値とよく相関することがわかった。これらのスクリーニングを経て、最終開発候補化合物として見出された新規抗結核薬が OPC-67683 である (Fig. 1)<sup>4)5)</sup>。

OPC-67683 の抗結核菌活性を、*M. tuberculosis* H37Rv、および H37Rv 株から誘導した各種抗結核薬〔リファンピシン (RFP)、イソニアジド (INH)、エタンブトール (EB)、ストレプトマイシン (SM)、ピラジナミド (PZA)] 耐性結核菌を用い、*in vitro* で最小発育阻止濃度 (MIC 値) を測定した結果、既存薬に交差耐性を示さず、H37Rv 株および各種抗結核薬耐性結核菌に対する MIC 値に差がなかった。この結果は、臨床分離株 67 株を用いた試験結果においても同様の結果が得られており、約半数の多剤耐性結核菌に対しても、まったく交差することなく、感受性結核菌と同様に 24 ng/ml 以下の MIC 値で試験に供したすべての結核菌の発育を阻止することが確認できた (Fig. 2)。

結核菌は、細胞内に寄生し増殖することが知られており、また既存薬剤の細胞内結核菌に対する効力が十分ではないことなどから、前述したように細胞内結核菌に対する効力を有することが、結核治療薬の1つの大きなプロファイルとして必要であると考えている。OPC-67683 の細胞内結核菌に対する活性を、ヒト単球由来の THP-1 細胞をマクロファージに分化誘導し、結核菌標準株である H37Rv 株を感染させ、効力を測定した結果、4 時間という短時間の作用においても強い効力を示すことを確認することができた (Fig. 3)。OPC-67683 を 0.1 μg/mL 作用させたときの効力と、RFP を 3 μg/mL 作用させたときの効力がほぼ同等であった。

WHO が定める結核治療の短期標準療法として、RFP、



OPC-67683 : (R)-2-Methyl-6-nitro-2-[4-[4-(4-trifluoromethoxyphenoxy)piperidin-1-yl]phenoxy]methyl]-2,3-dihydroimidazo [2,1-b] oxazole

Fig 1. Chemical structure of OPC-67683

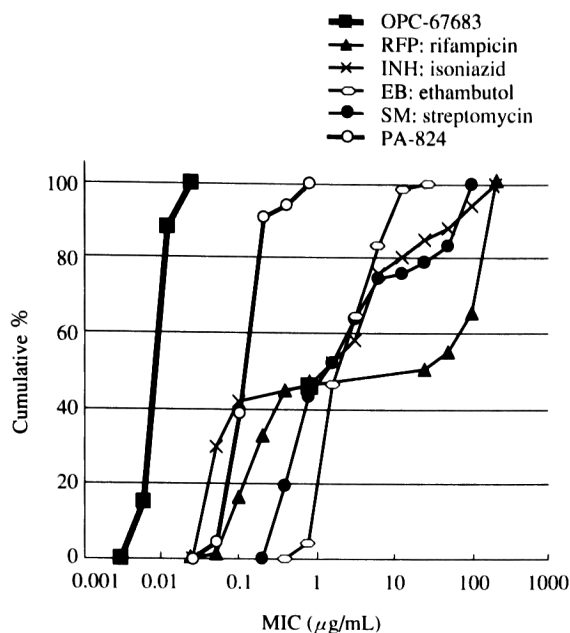


Fig 2. Cumulative % of OPC-67683 and conventional used drugs against clinically isolated strains (67 strains)

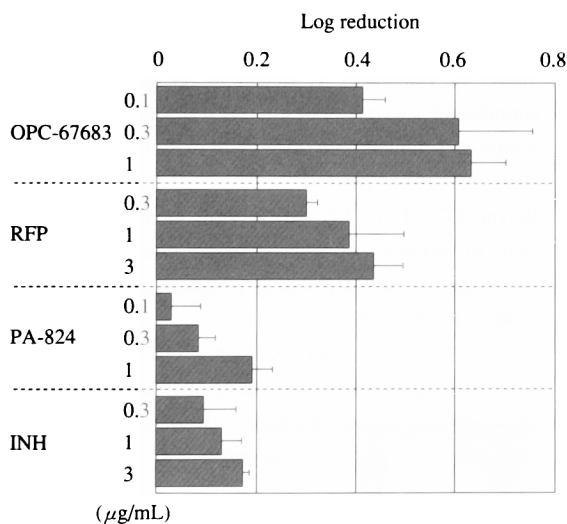


Fig 3. OPC-67683 activities on intracellular TB

INH, EBまたはSM, およびPZAの4剤併用を2カ月投与する強化療法に引き続き, RFPとINHの2剤を4カ月併用する維持療法の6カ月に及び治療が行われている。喀痰中への結核菌の排菌は, 先進諸国では2カ月目において80%以上が陰性化しているにもかかわらず, 長期維持療法が必要とされる。その原因として, 考えられているのは, 代謝・増殖が緩慢になった結核菌, すなわちDormantな結核菌が存在しており, 2カ月間ではこれらの結核菌を叩くことができないことに起因する。従って, Dormant菌に対する効力をもつことが, 短期化学療法に繋がると考えられる。Dormant菌の生態につい

ては, いろいろな説が提唱されているが, 現時点で広く受け入れられている説は, 低酸素状態により誘導されるDormant菌である<sup>9)</sup>。結核菌の肺内での病変部位においては, 低酸素状態になっており, その状態で誘導されるDormant菌に対する既存の抗結核薬の効力が不十分であるとの考え方である。われわれは, *in vitro*において低酸素条件を作成することでDormantな結核菌を誘導し, この菌に対するOPC-67683の効力を測定した。その結果, 既存の好気条件で最も強い効力を発揮するINHが, この条件では全く効力を示さないにもかかわらず, OPC-67683は強い効力を示すことが確認された。この結果は, 肺病変内にて低酸素状態で誘導されたDormant菌に対して, OPC-67683が効力を発揮する可能性を示したものであり, 既存薬との併用で短期化の実現ができる可能性を示唆する結果であると考えられた。

次にOPC-67683の治療効果を判断するため, 実験的マウス結核症モデルを用いて評価した。結核菌をマウスに接種すると肺内での増殖は3週目までは増殖を続け, 3週目以降は, 増殖が緩慢になってくる。生体の防御反応と病原体である結核菌との均衡関係が成立した結果であると考えられる。われわれは, ヒト結核症により近いモデルとして, マウスに結核菌を接種後, 4週間放置することで慢性結核症モデルを作製し, OPC-67683および各種抗結核薬(RFP, INH, EB, SM, PZA, および現在Global Alliance for TB Drug Developmentが開発中のPA-824)の1日1回強制経口投与を4週間行い, 投与終了後の肺内生菌数を測定することで, 各薬剤の効力の評価を行った。その結果, OPC-67683が最も低い用量において, 最も強い効力を発揮することが確認できた。また, 結核症の治療は, 耐性菌出現を抑えるため, 単剤での治療を行うことはない。従って, 既存薬剤との併用効果が重要であると考え, 既存薬との併用下での治療効果について, 同実験的マウス結核症モデルを用いて評価した。その結果, RFPおよびPZAとの併用において強い治療効果が確認できることが判明した。これらの結果をもとに, 臨床レジメと同様の治療スケジュールを組み, OPC-67683, RFPおよびPZAの3剤併用レジメと既存の4剤併用レジメを比較した。その結果, OPC-67683を含むレジメでは, Fig. 4に示すように, 3カ月までほぼストレートに結核菌が減少し, 3カ月目で6例中1匹のマウスのみが肺内に結核菌が確認され, 4カ月目にはすべてのマウスにおいて, 肺内結核菌が全く観察されなかった。一方, 標準療法では6カ月目においても5例中4例のマウスにおいて結核菌が観察された。この結果から, OPC-67683を含むレジメでは, 標準療法を少なくとも2カ月以上短期化できる可能性があることがわかった。

以上の評価試験より, OPC-67683は新規作用メカニズ

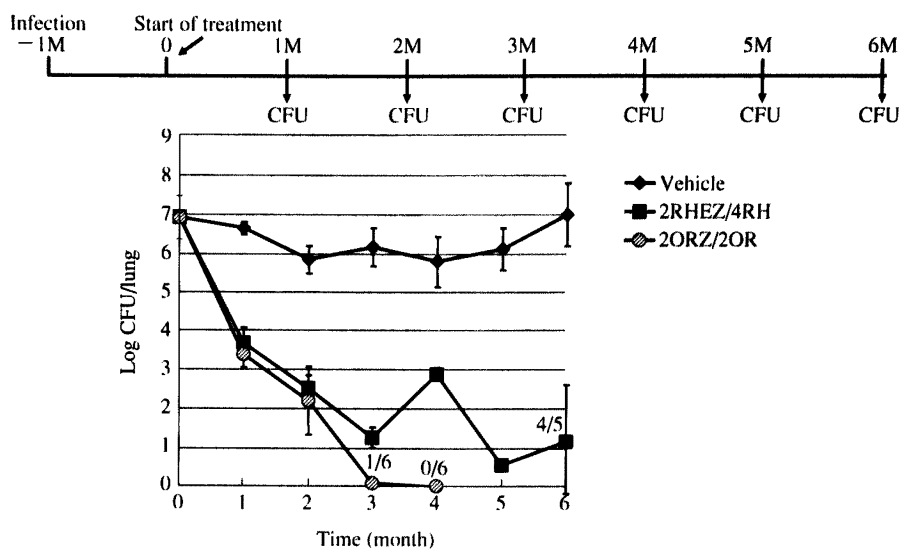


Fig 4. Three-drug combination containing OPC-67683 vs. standard regimen

ムを有する抗結核薬として、現在の6カ月の短期化学療法をより短期化できる可能性、ならびにMDR-TBをはじめとする耐性結核菌に有効な抗結核薬としての可能性が期待できる化合物であると判断することができた。

#### 文 献

- 1) Dye C, Scheele S, Dolin P, et al.: Global burden of tuberculosis: Estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA*. 1999; 282: 677-686.
- 2) Global Alliance for TB Drug Development, Annual Report. 2002-2003.
- 3) Matsumoto M, Hashizume H, Tsubouchi H, et al.: Screening for novel antituberculosis agents that are effective against multidrug resistant tuberculosis. *Curr Top Med Chem*. 2007; 7: 499-507.
- 4) Matsumoto M, Hashizume H, Tomoshige T, et al.: OPC-67683, a nitro-Dihydro-imidazooxazole Derivative with promising Action against Tuberculosis in vitro and in mice. *PLoS Med*. 2006; 3: 2131-2144.
- 5) Sasaki H, Haraguchi Y, Itotani M, et al.: Synthesis and antituberculosis activity of a novel series of optically active 6-nitro-2, 3-dihydroimidazo [2, 1-b] oxazoles. *J Med Chem*. 2006; 49: 7854-7860.
- 6) Wayne LG, Hayes LG: An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of non-replicating persistence. *Infect Immun*. 1996; 64: 2062-2069.
- 7) Voskuil MI, Visconti KC, Schoolnik GK: *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy. *Tuberculosis*. 2004; 84: 218-227.

## 5. 新しい結核ワクチン開発

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター 岡田 全司

### 1. はじめに

大人(成人)結核に対しては、BCGワクチンは予防効果がないという結論がWHOによって報告された。したがって、成人の結核に対し有効な新しい結核ワクチンの開発が必須である<sup>1)2)</sup>。しかしながら、BCGに代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。われわれはBCGよりもはるかに強力なDNAワクチンやリコ

ンビナントBCGワクチンの開発に成功した(Table, Fig. 1)<sup>1)3)4)</sup>。新しい抗結核ワクチン開発と臨床応用の可能性についても述べる<sup>3)4)7)</sup>。

### 2. 新しい結核ワクチン開発

(1) BCGワクチンよりきわめて強力な結核予防ワクチン  
マウスの実験で現行のBCGワクチンを超えるきわめ

て強力な有効性を確認した。われわれは HSP65 DNA + IL-12 DNA (HVJ-エンベロープベクター) のワクチンが BCG ワクチンよりも強力な結核予防ワクチンであることを世界に先駆けて明らかにした。これらより WHO STOP TB Partnership に選ばれた。

(2) 新しい結核ワクチン

結核ワクチンは、①サブユニットワクチン、②DNA ワクチン、③リコンビナント BCG ワクチン (弱毒化結核菌を含む)、その他に大別される (Table)。

(a) DNA ワクチン

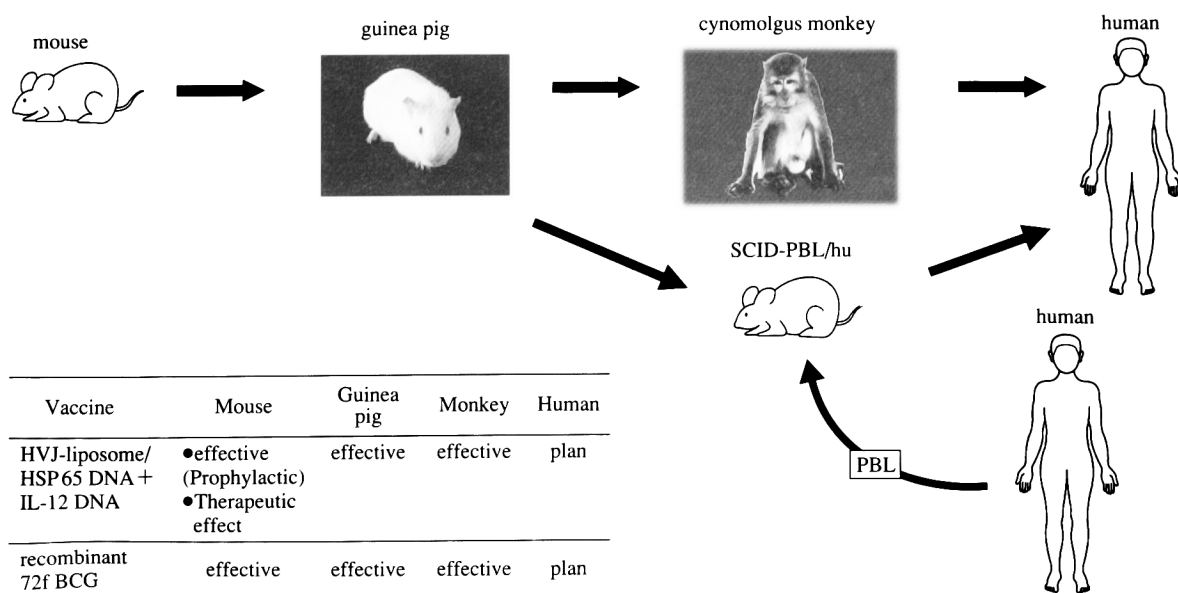
IL-12 の p35 および p40 を CMV プロモーター下流域に挿入した発現プラスミドを作製した。さらに、ヒト型結核菌 H37RV 由来 HSP65 DNA ワクチンの作製に成功し

た (Table, Fig. 1)<sup>4)</sup>。HVJ リポソームをベクターに用いた場合、HSP65 DNA と IL-12 DNA 両者の DNA ワクチンを投与した、HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンマウスでは、BCG 東京ワクチンマウスの肺、肝、脾の結核菌数の 100 倍以上の減少が認められた<sup>4)</sup>。このワクチンは結核菌に対するキラー T 細胞分化誘導、IFN- $\gamma$  産生細胞分化誘導を介して、BCG ワクチンより強力な結核予防ワクチン効果を発揮することが示された<sup>4)</sup>。このワクチンは BCG ワクチンに比較して有意差をもって肝臓および肝臓の結核肉芽腫、病理所見の改善を認めた (granuloma index の改善<sup>4)</sup>)。

さらにこのワクチンは治療結核ワクチン効果も示した。すなわち結核菌をあらかじめ投与したマウスにおい

**Table** The development of novel vaccines for *M. tuberculosis*

1. DNA vaccine HVJ-liposome/HSP 65 DNA + IL-12 DNA	more effective than BCG (mouse, guinea pig, cynomolgus monkey)
2. DNA vaccine HVJ-Envelope/HSP 65 DNA + IL-12 DNA	extremely stronger effect than BCG
3. Recombinant BCG vaccine (1) recombinant 72f BCG (2) recombinant (Ag85A + 85B + MPB51) BCG	more effective than BCG (mouse, guinea pig, cynomolgus monkey) more effective than BCG (mouse)
4. Therapeutic vaccine IL-6 related DNA	(mouse)
5. Priming-Booster Method BCG (priming) + Novel vaccine (booster)	(cynomolgus monkey)
6. Novel vaccine (per os) using gene-knock out attenuated <i>Listeria</i>	
7. Novel vectors AAV vector (1000 fold effective expression vector $\uparrow$ ), Adenovirus vector	
→ Selected as WHO STOP TB Partnership and WHO STOP TB Vaccines Working Group	



**Fig. 1** The development of novel vaccines for *M. tuberculosis* using animal models

てHVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンを3回治療投与すると、コントロール群に比較して有意差をもって肺・肝・脾の結核菌数の減少を認めた。多剤耐性結核菌や超薬剤耐性結核 (XDR-TB) に対しても治療ワクチン効果を示した。欧米では治療ワクチンは未開発である。

アデノウイルスベクターに導入したIL-6関連遺伝子 (IL-6遺伝子+IL-6レセプター遺伝子+gp130遺伝子) ワクチンも強力な治療ワクチン効果を示した。

(b) リコンビナント BCG ワクチン

サブユニットワクチンのMtb72f融合タンパク質のDNAを導入した72fリコンビナントBCGの作製に成功した<sup>3)</sup>。この72f rBCGは、マウス、モルモットの系のみならず、カニクイザルを用いた系でも結核予防ワクチン効果を示した<sup>3)</sup>。

(3) 新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID-PDL/hu

われわれが世界に先駆けて開発した SCID-PBL/hu の系でも、ヒトキラーT分化を介し、結核予防ワクチン効果を示した<sup>11)</sup>。

3. 結核ワクチンの展望

(1) 新しい結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル (cynomolgus monkey, 最もヒトの肺結核に近いモデル<sup>6)</sup>) を用い BCG よりもはるかに強力な予

防ワクチン効果 (生存率, 血沈, 体重, 肺の組織) を示すワクチン2種を開発した<sup>3)</sup>。われわれはカニクイザルで結核感染後1年に、コントロール群 (生食投与群) では4匹中4匹死亡 (0%生存) したが、HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン投与群は、4匹中2匹生存 (50%生存) を認め、ワクチン効果をサルレベルで認めた<sup>3)</sup>。すなわち、HVJリポソーム/HSP65 DNA+IL-12 DNA 予防ワクチン投与による結核感染カニクイザル生存率改善効果を得た。また、血沈改善効果を有意差をもって示した。さらに、このワクチンを投与したカニクイザルでは、コントロール群に依存し有意差 (p<0.01) をもって、HSP65 抗原に対し、増殖増強反応を示した。72f融合タンパクサブユニットワクチン、ワクシニアウイルスに85A DNAを導入したワクチンや r85B BCG (Horowitzら) は第I相 clinical trial となっている。最も切れ味のするどい臨床応用ワクチン候補の筆頭として HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンがあげられる<sup>3)4)7)</sup>。

(2) プライミング-ブースター法 (乳幼児 BCG-成人 HVJ/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン)

さらに BCG ワクチンをプライムし、新しいワクチンをブースターする方法を用いた。このプライミング-ブースター法で100%の生存を示した<sup>7)</sup> (Fig. 2)。一方、BCG ワクチン単独投与群は33%の生存率であった<sup>7)</sup>。このように、ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルを用いた実験系で、強力な新しい結核ワクチンをわれわれは

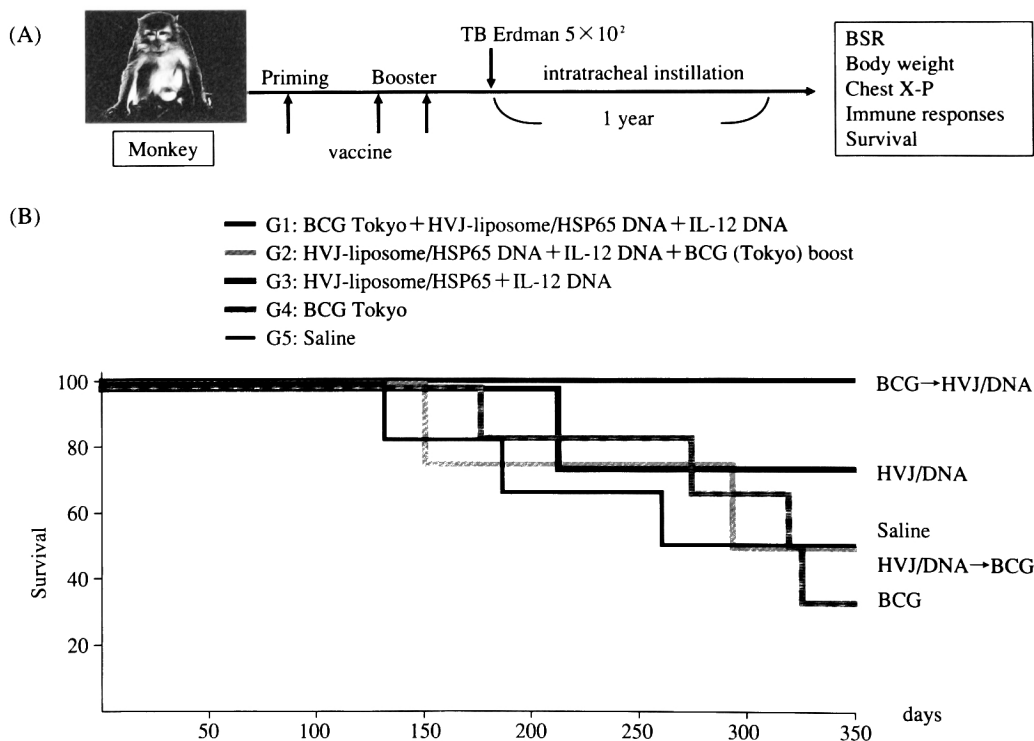


Fig. 2 Protective efficacy of HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA Vaccine

世界に先駆けて開発した。すなわち、本邦では乳幼児に BCG 接種が義務づけられていることにより、プライミングワクチンとして BCG ワクチンを用い、成人ワクチン (中学生, 成人, 老人) として切れ味のするどい、われわれが開発したこの DNA ワクチンをブースターワクチンとして用いることにより、強力な新しい結核ワクチンの臨床応用が可能となる案を計画中である。

#### 4. まとめ

われわれは BCG をはるかに凌駕する強力な結核予防ワクチン効果を示す新しい DNA ワクチン (HVJ-リポソーム/HSP65+IL-12 DNA, HVJ-エンベロープ/HSP65+IL-12 DNA や, リコンビナント 72f BCG ワクチン) を開発した。このワクチンは結核菌抗原特異的なキラー T 細胞の分化増強効果を示した。この DNA ワクチンは治療結核ワクチン効果も示した。

さらに、ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用い、HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンは BCG よりも強力な生存率改善・延命効果を示した。一方、この DNA ワクチン投与群は priming-booster 法 (BCG-プライム—この DNA ワクチンブースト) で 100% の生存率を示した。一方、BCG ワクチン単独では 33% の生存率であった。このワクチンの臨床応用を計画中である。

#### 5. おわりに

当センターは呼吸器疾患 (結核を含む) 準ナショナルセンターであり、さらに発展させたい。

ヒト結核感染モデルに最も近いサルにおいては、HSP65 DNA+IL-12 DNA/HVJ-エンベロープワクチンが明らかにすぐれていることより、このワクチンが結核の発症予防や治療に役立つ日が来るであろう。

(共同研究者: 当臨床研究センター 喜多, 井上, 坂谷,

各博士, 金丸, 橋元, 西田, 仲谷, 高尾, 浅井, 柄原, 岸上, 各研究員, P. Saunderson 博士, R. Gelber 博士, B. Tan 博士, 中島俊洋博士, 吉田栄人博士, 松本真博士, 金田安史博士, D. McMurray 博士, 厚生労働科学研究費の支援による)

#### 文 献

- 1) 岡田全司: 厚生労働科学研究費補助金実績報告書 研究報告書, “結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究: [結核ワクチン]”. 2004, 1-140.
- 2) 岡田全司: 結核ワクチン. 「結核」第 4 版, 医学書院, 東京, 2006, 50-58.
- 3) Kita Y, Kanamaru N, Okada M, et al.: Novel recombinant BCG- and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine*. 2005; 23: 2269-2272.
- 4) Yoshida S, Kita Y, Okada M, et al.: DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* by T cell activation. *Vaccine*. 2006; 24: 1191-1204.
- 5) Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, et al.: The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. *Vaccine*. 2005; 23: 2269-2272.
- 6) Walsh GP, Tan EV, dela Cruz EC, et al.: The Philippine cynomolgus monkey provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat Med*. 1996; 2: 430-436.
- 7) Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine*. 2007; 25: 2990-2993.

————— The 82nd Annual Meeting Symposium —————

## RECENT PROGRESS IN MYCOBACTERIOLOGY

Chairpersons: <sup>1</sup>Masaji OKADA and <sup>2</sup>Kazuo KOBAYASHI

**Abstract** *Mycobacterium tuberculosis* is one of the most successful bacterial parasites of humans, infecting over one-third of the population of the world as latent infection without clinical manifestations. Over 8.8 million new cases and nearly 2 million deaths by tuberculosis (TB) occur annually. TB poses a significant health threat to the world population. The goal of this symposium is to open new avenues for combating tuberculosis. The speakers have presented their data and provided control strategies against tuberculosis and pulmonary disease due to *M. avium* complex (MAC) from aspects of molecular epidemiology, pathogenesis, serodiagnosis, new anti-TB drugs, and vaccine development.

Drs. Maeda and Murase have reported that the 12-locus VNTR analysis is very useful for molecular epidemiology of *M. tuberculosis* strains isolated in Japan better than IS6110-RFLP and suggested that the analysis is powerful tool for the molecular epidemiology.

Drs. Matsumoto and Kobayashi have discovered a protein, mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1), overproduced in dormant *M. tuberculosis* that plays key roles in latent/persistent infection, disease progression, and host protection. They have concluded that MDP1 may be a possible target for anti-tuberculosis drugs and vaccines.

Drs. Kitada and Maekura have developed serodiagnosis of MAC disease based on enzyme immunoassay (EIA) by detecting anti-glycopeptidolipid (GPL) antibody in sera of human patients. GPL is specific for MAC. The EIA is a simple, rapid and accurate measure with high sensitivity and specificity. The levels of antibody also reflect disease activity. A large-scale clinical multicenter study is currently in progress.

Dr. Makoto Matsumoto has discovered an innovative new anti-TB drug, OPC-67683 that is a derivative of nitroimidazole compounds. OPC-67683 inhibited mycolic acid synthesis and exerted potent antimycobacterial activity, including multidrug-resistant *M. tuberculosis*. Multidrug therapy using OPC-67683 could also shorten the course of chemotherapy. The drug is clearly the most promising new anti-TB agent that has been identified in many years.

Dr. Okada has presented the vaccine candidates for TB, such as HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA and HVJ-envelope/HSP65 DNA + IL-12 DNA. The candidates exhibited an excellent protective efficacy in mice compared to current BCG vaccine, and improved histopathologic lesions induced by *M. tuberculosis* infection. The candidates also exerted the therapeutic effect in mice against both drug-susceptible TB and extensively drug-resistant TB. Using the cynomolgus monkey model (similar to human TB), HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA provided higher protective efficacy

than BCG assessed by mortality. The combination of BCG and HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA by the prime-booster procedure could lead to a synergistic effect of 100% survival in infected monkeys. These data suggest that the novel DNA vaccine is a possible candidate for human clinical trials.

This symposium has highlighted new advances in our understanding of molecular epidemiology and pathogenesis of "Mycobacteriology" and development of new serodiagnosics, anti-TB drugs, and vaccines.

1. The establishment of the quick genotyping method for TB in Japan using the variable numbers of tandem repeats (VNTR): Shinji MAEDA, Yoshiro MURASE (Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association)

The 12-locus VNTR analysis that we have established optimally for *Mycobacterium tuberculosis* in Japan was superior to the proposed 15-locus VNTR method in European countries. The discriminatory power of our system was also higher than that of IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis. In future, we will investigate the stability of copy number in each locus by using the strains that suspected epidemiological links in contact investigations.

2. A virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*, which contributes to persistent infection, reactivation, and host protection: Sohkiichi MATSUMOTO (Department of Host Defense, Osaka City University Graduate School of Medicine), Kazuo KOBAYASHI (Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases)

Majority of adult tuberculosis is caused by reactivation of previously implanted *Mycobacterium tuberculosis*. During latent infection, some bacilli are in dormant state, which confers some survival advantage to not only bacteria but also the host. We presented that a protein overproduced in dormant *M. tuberculosis* plays key roles in persistent infection, disease progression, and host protection. We also presented utility of this protein, such as development of anti-tuberculosis drug and vaccine.

3. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease by enzyme immunoassay using glycopeptidolipid antigen: Seigo KITADA, Ryoji MAEKURA (Department of Internal Medicine, National Hospital Organization National Toneyama Hospital)

The diagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease (MAC-PD) and/or its discrimination from pulmonary tuberculosis is sometimes complicated and time consuming.



We have developed serological test by enzyme immunoassay that detect serum antibody to glycopeptidolipid antigen. The serodiagnosis is useful for the rapid diagnosis of MAC-PD and differential diagnosis from pulmonary TB. The antibody levels reflected the disease activity including radiographic severity.

4. A novel antituberculous agent, OPC-67683: Research and development: Makoto MATSUMOTO (Microbiological Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.)

We initiated a program to screen new antituberculous agents that have potential to shorten the total duration of treatment, provide improved efficacy against MDR-TB, be useful in treating HIV co-infected patients, and target latent TB infections. Our efforts led to the discovery of OPC-67683, a novel oxazo-imidazole derivative with a distinctive characteristic as a subclass mycolic acid inhibitor. Our evaluation studies confirmed OPC-67683 to possess potent *in vitro* and *in vivo* antituberculous activity, suggesting potential usefulness in alleviating the current TB problems.

5. The development of novel vaccines against *M. tuberculosis*: Masaji OKADA (Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center)

We have developed a novel tuberculosis (TB) vaccine (HVJ-liposome/ or HVJ-envelope/HSP65 DNA + IL-12 DNA). The

vaccine provided remarkable protective efficacy in mouse compared to BCG vaccine, and improved the histopathological tuberculosis lesions. This vaccine also exerted therapeutic effect in *vivo* against XDR-TB as well as drug-sensitive TB in mice.

Furthermore, by using the cynomolgus monkey (similar to human tuberculosis), this novel vaccine provided higher protective efficacy (mortality) than BCG mortality. Furthermore, the combination of HSP65 + IL-12/HVJ and BCG by the priming-booster method showed a synergistic effect in the TB-infected cynomolgus monkey (100% survival). These data indicate that our novel DNA vaccine might be useful against TB for human clinical trials.

**Key words:** Molecular epidemiology, Latent infection with mycobacteria, Serodiagnosis, Novel anti-tuberculous chemotherapeutic agents, Vaccine development

<sup>1</sup>Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, <sup>2</sup>Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases

Correspondence to: Kazuo Kobayashi, Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640 Japan.  
(E-mail: kobayak@nih.go.jp)