

第85回総会教育講演

Ⅱ. 結核の感染から発症，再発に関わる宿主要因

—バイオマーカー研究の方法，現状と展望—

慶長 直人

要旨：わが国における結核対策の浸透に伴う有病率の低下と裏腹に，途上国では，多剤耐性結核とHIV合併結核がきわめて深刻な問題を投げかけている。この現状を打開するためには，強力な抗結核ワクチンの開発，迅速，簡便安価な診断法の開発，短期間で治療完了し，再発率の低い強力な抗結核治療薬の開発などが急務である。それらの評価のためには，結核の分子病態に立脚した，結核の診断，病勢把握，治療反応性，再発予測に資するバイオマーカーの確立が望まれる。たとえば，抗結核薬開発に際しては，治療開始2カ月後の菌陰性化，治療終了後2年以内の同一菌による再発の有無，といった評価基準が存在するが，薬剤治療効果判定のための鋭敏な代替マーカーが存在すれば，その値を参考に，候補薬剤の臨床治験を促進し，その投与量の設定や治療期間短縮など個別化医療にも応用可能と期待される。また，新規結核ワクチン候補についても，治療，予防効果を，迅速かつ定量的に把握することが望まれる。本教育講演では，このような結核バイオマーカー開発研究の動向，オミックスを中心とするこの分野の方法論とともに，われわれの施設の研究成果の一端についても紹介する。

キーワード：バイオマーカー，結核，病態生理，臨床研究

はじめに

全世界の人口の約3分の1が結核菌の感染を受けており，年間800～900万人が新たに結核を発病し，160～180万人が死亡している。先進国の結核対策の浸透に伴う低蔓延化と裏腹に，アジア，アフリカを中心とした途上国では，多剤耐性結核（さらには超多剤耐性結核）とHIV合併結核が，想像以上に深刻な問題を投げかけている。わが国では，戦後の経済発展に相応して，着実に結核を抑え込んできた先人の知恵を継承し，広く国際貢献に生かす道を探る必要がある。

世界の潮流は，BCGをしのぐ結核ワクチンの開発，感染者の的確な発症予測，より迅速，簡便で安価，より高感度な結核の診断，薬剤感受性検査，より短期間で終了し，再発のない強力な結核治療薬の開発，効果的な多剤耐性結核の封じ込めなど，臨床疫学，基礎免疫の研究などが一丸となって，感染症研究に取り組む方向にある。

抗結核薬の最終的な効果判定は，治療終了後2年以内の同一菌による再発の有無とされる。薬剤効果判定をこのような長期にわたる少数のイベント（＝再発）の観察にたよるざるをえない点は，臨床治験を経て最終的に市場に出る薬剤が少数であること，主な結核薬剤の消費地が貧しい途上国であるという事実と相まって，製薬会社が新薬開発に積極的ではない理由とされる。

求められる結核バイオマーカー

バイオマーカーとは，「生理学的，病理学的過程や治療に対する応答性などを反映する測定可能な指標」と定義される。臨床治験においては，科学的合理性のある臨床指標が容易に検出し難い場合，代替エンドポイントを用いることがある。

結核のバイオマーカーは，宿主側のマーカーか病原体側の産物か，結核に特異的なマーカーかそうでないか，物質をそのまま測定するのか細胞機能など試験管内での変化を測定するのか，単一のマーカーだけでものが言え

るのかそうでないのか、といった観点から分類できる^{1)~3)}。日常臨床において有用な臨床検査指標であるCRPが、典型的な非特異的炎症マーカーであるように、結核に非特異的なマーカーでも、病勢や治療反応性を見るうえでは、重要な役割を果たすことが期待される。また、再発など、複雑な事象を予測するには複数のマーカーを組み合わせるという試みもある。結核の蔓延が途上国で最も深刻であることを考えると、測定に複雑な手続きや技術を必要とするバイオマーカーでは役に立たない (Table 1)。

治療に関連した結核のバイオマーカーについて概括する (Fig. 1)。第一に求められるバイオマーカーは、病変の拡がり、病勢を反映するものである。臨床治験は、同程度の病変を有する群間で比較しなければ、信頼性が得られない。したがって、重症度、病変の拡がりを正確に反映する評価指標が望まれる。肺結核では、古くから、X線画像上の浸潤影、空洞の拡がり、病勢を反映する指標として広く使用されているが、理想的な指標ではな

い⁴⁾。特に HIV 陽性結核では、包括的な病勢バイオマーカーの開発が期待される。

第二に必要なバイオマーカーは、治療反応性を早期に判定するものである。結核においては、殺菌効果、菌量を反映するマーカーが必要である。治療開始後2カ月後の喀痰培養陰性化は古典的な指標であるが、喀痰からの排菌が乏しい HIV 陽性結核の増加を考慮すれば、喀痰菌量より鋭敏で正確な指標が求められる。

第三は、治療効果を判定するマーカーである。特に再発の有無を予測するマーカーが重要である。もともと、結核における6カ月の標準治療の妥当性は、それより治療期間を短くすると、再発する患者が増加するという事実に基づいている。ここで注意すべき点は、再発に関与するのは治療早期に死滅する大多数の増殖能の高い菌ではなく、少数の増殖速度の遅い残存菌であり、これらを含めて生体内からすべての菌を排除することが、無再発をめざす薬剤の真の目標であるとされる点である。再発に関与する残存菌がいかに排除できたかを反映する指標が望まれる。治療期間を短縮しても再発の可能性が低い症例を予測できれば、その分、医療資源を、再発の可能性の高い患者に転換することが可能になるかもしれない。このような医療経済上の問題は、特に、途上国において重要である。さらに、再発予測マーカーは、その性格から、潜在結核からの結核発症リスク予測や、潜在結核のイソニアジド (INH) 治療の有効性や、ワクチンの発症予防効果の判定についても利用できる可能性がある。

Table 1 TB Biomarkers: ideal performance characteristics

Ideal markers	
Validity	Indicating or predicting pathological process accurately and precisely
Convenience	Quick and easy to perform on site
No harm	Harmless to human body
Low-cost	Cost effective and high throughput

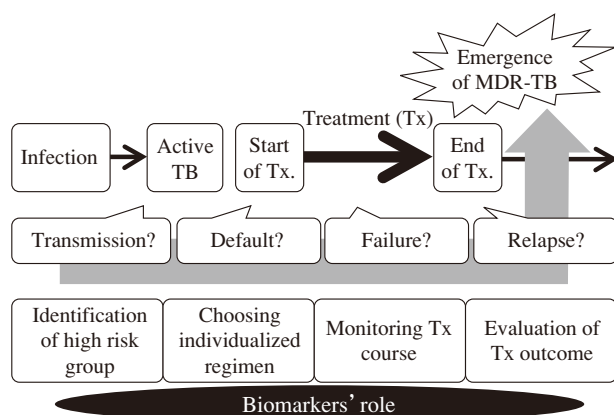


Fig. 1 Problems involved in TB development and treatment —roles of biomarkers

新規バイオマーカーの開発

従来、感染症のバイオマーカーは、既知の免疫炎症関連分子を中心に開発されてきた (Table 2)。最近では、オミックス分野の進歩に伴い、疾患の病態に関する先入観にとらわれず、臨床的な事象と関連する有望なマーカーを段階的に絞り込んでいく手法がとられる。臨床検体は、喀痰、尿、血液、髄液、胸水、呼気濃縮液など、結核に関連する様々な検体が用いられる (Table 3)。病態解析には、病変局所の状態を知りうる気管支肺胞洗浄液が有用であるが、汎用性マーカーとしての使用は困難であろう。

Table 2 Approaches to biomarkers for infectious diseases

Targeting	Note
Known microbiological markers	Components of pathogens, their metabolites, and so on.
Known host markers	Immune, metabolic or inflammatory molecules produced in response to pathogens
Unknown markers established by using advanced platforms	Based on transcriptomics, proteomics or other “omics” information

結核の治療に関わる古典的マーカー

肺結核における空洞の存在は、菌量が多いことを示し、治療後の菌陰性化の遅れと関連する⁵⁾。治療後2カ月後の菌陰性化は、治療開始時の菌量と、抗結核剤の治療効果と密接に関連していることが報告されている^{5)~7)} (Table 4)。しかし、再発の予測指標として、治療3カ月以降の維持期の治療法の選択薬剤が、再発の有無に関わるため、2カ月より3カ月後の菌陰性化を指標とすべきではないかという議論もある。

結核の治療に関わる細菌学的バイオマーカーは、病原体由来の直接的な指標であり、有望なものが多いが、本

稿の主題からそれるため、候補マーカーのリストと文献を掲げるにとどめる^{8)~11)} (Table 5)。結核菌由来の様々な分子に対する細胞性免疫応答や、産生される抗体価が、国内外で検討されている。

結核に関わる宿主側バイオマーカー

宿主側の応答に基づく治療応答性マーカーの開発と、結核の発症阻止に関連するマーカーの開発を目的に研究が進められている (Table 6, 7)^{12)~20)}。近年、華々しい成功を収めたクオンティフェロンなど、interferon-gamma release assay (IGRA) は、結核菌特異的抗原で全血を *ex vivo* で刺激して誘導されるインターフェロン γ を測定す

Table 3 Clinical specimens to be used for biomarkers

Clinical specimens	Characteristics
Sputum and saliva	Non-invasive Direct measure Induced sputum may be used Pretreatment is necessary for measurement
Urine	Non-invasive Easy to repeat measurement Sterilization may be necessary to kill other bacteria
Whole blood, serum and plasma	General marker
Cerebrospinal fluid, pleural and pericardial effusions	Not routinely done Not easy to set up normal values
Bronchoalveolar lavage fluid	Not routinely done Not easy to repeat measurement
Breath condensate	Non-invasive Equipment is necessary to collect samples

Table 4 Classical markers for TB treatment response

Candidate marker in the early stage	Outcome	Study design	Study size (outcome)	Reference
Microbiological markers				
Month 2 sputum culture conversion	Failure/relapse	P, two-arm trial	502 vs 502 (46 vs 28)	Benator et al. 2002
Time to culture detection-TTD	Recurrence (relapse)	P, cohort HIV –	263 (22)	Hesseling et al. 2010
Clinical indicators				
Chest x-ray: cavitation, Bilateral infiltrates	Failure/relapse	P, two-arm trial	502 vs 502 (46 vs 28)	Benator et al. 2002
Chest x-ray: residual scarring	Recurrence	R, cohort HIV – / +	984 – 305 + (46 – 37 +)	Mallory et al. 2000
Being underweight (<90% of ideal body weight)	Failure/relapse	P, two-arm trial	502 vs 502 (46 vs 28)	Benator et al. 2002

*Abbreviations: R, retrospective; P, prospective

Table 5 Pathogen-specific markers for TB treatment response

Candidate biomarker*	Outcome	Study design	Sample size (outcome)	Reference
Sputum Ag 85B mRNA	Treatment response, Relapse	P, cohort	18 (1)	Desjardin et al. 1999
Sputum Ag 85	Sputum conversion, Failure, Relapse	P, cohort	40 (2)	Wallis et al. 1998
13Urine Mtb DNA	Treatment response	P, cohort	20	Cannas et al. 2008
Antibodies against ESAT-6 and 38 kDa Ag	Treatment response	Case/control	168/168	Azzurri et al. 2006
Antibodies against AlaDH and MS	Failure	P, cohort	158 (10)	Azzurri et al. 2006

*Antibodies against pathogens are included.

Table 6 Non-specific host immune activation markers

Candidate biomarker	Outcome	Study design	Sample size (outcome)	Reference
sICAM-1	Severity of disease	Case/ control	30/10	Demir et al. 2002
	Severity of disease	Case/ control	31/11	Mukae et al. 2003
sIL-2R	Treatment course	Case/control P, cohort	44/41	Chan et al. 1995
sTNF-R1	Sputum conversion	Case/control P, cohort	36(18)/16	Brahmbhatt et al. 2006
CD3dim/CD56 + NKT cells	Treatment response	Case/control P, cohort	21(8)/14	Veenstra et al. 2006
Sputum IFN- γ	Treatment response	Case/control	15/10	Ribeiro-Rodrigues et al. 2002

Table 7 Non-specific host inflammatory markers

Candidate biomarker	Outcome	Study design	Sample size (outcome)	Reference
C-reactive protein	Extent of disease	P, cohort	74	Plit et al. 1998
suPAR	Death	Case/ control	84 + 35 + 63 (23)/64	Eugen-Olsen et al. 2002
Neopterin	Treatment course, relapse	Case/control P, cohort	39/11	Immanuel et al. 2001

る、結核感染特異的なバイオマーカーである²¹⁾。最近、感染後発症危険度と IGRA 値の高低、治療による IGRA 値の変動の意義、インターフェロンに代わる新たなマーカーの開発などが報告されている^{22)~24)}。

可溶性ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーターレセプター (suPAR) は、単球マクロファージ系に発現しており、このレセプターは細胞接着機能に関連し、活動性結核で、喀痰中の菌量に比例して高値を示し、予後とも関連すると報告されている¹⁹⁾。一方、ネオプテリン (neopterin) は、IFN- γ 刺激下でマクロファージから産生される細胞免疫応答の指標の一つであり、結核診断時に高値を示し、治療により減少する。病変の拡がりやネオプテリン値は相関し、同様の重症度であれば、再発と関連すると報告されている²⁰⁾。また、全血の殺菌能を検討する試みも、機能的バイオマーカーとして興味深い²⁵⁾。ただし、いずれの報告もサンプルサイズが小さく、大規模な臨床研究を必要としている。

オミックス手法を用いたバイオマーカーの開発

近年、病態に関わる鍵分子の同定に、プロテオミックス、トランスクリプトミックス、メタボロミックスなど、網羅的な手法が用いられるようになった (Fig. 2)^{26)~28)}。これにより、既知の単一分子の変化というより、ネットワークとしての一群の分子の変動をとらえ、より複雑な病態、治療効果の解析に用いられることが期待されている。特に変動するタンパクの同定に、高性能の質量分析装置とヒトのタンパクに関する詳細なデータベースが利用可能になったことは、この分野の研究を飛躍的に発展させた。さらにグリコミックス、リポドミックスのよう

に、糖鎖や脂質を対象にした網羅解析も菌と宿主の相互作用を解析する際に有力な手法となるものと期待される。

国際共同研究の試み

われわれの施設では、ベトナム、ハノイ市の国立国際医療研究センター・バックマイ病院医学共同研究センター (NCGM - BMH Medical Collaboration Center) を拠点に、共同研究を実施している。結核有病率調査、医療従事者の院内感染率の推定、結核感受性遺伝子の同定などに加えて、最近では、櫻田紳策室長、田中崇裕研究員、小林信之医長を中心に、プロテオームの手法を用いて、活動性結核患者と健常対照者について、それぞれ IGRA の残余血漿中で増減しているタンパクスポットを抽出し、LCMS/MSを用いたタンパク同定を行っている。この結果、脂質や糖代謝に関連する指標が見出され、結核のような消耗性疾患における痩せを鋭敏に検出する指標として期待される²⁹⁾。

バイオマーカー研究の問題点

特にオミックス研究では、大量の情報が得られるため、それらを統合するバイオインフォマティクスの専門家が必要である。また無再発に関連するマーカーの有用性を確認するには、500名から1000名の研究参加が必要である (Fig. 3)。結核高蔓延国では結核再感染による再排菌が無視できないため、菌の同一性についてフィンガープリンティング解析が必須である。しかし高蔓延国では、結核菌の培養自体、薬剤感受性検査、菌の DNA 検査、ヒト臨床検体の凍結保存などの検査室機能や、治療へのアドヒアランス、長期安定フォローアップを可能

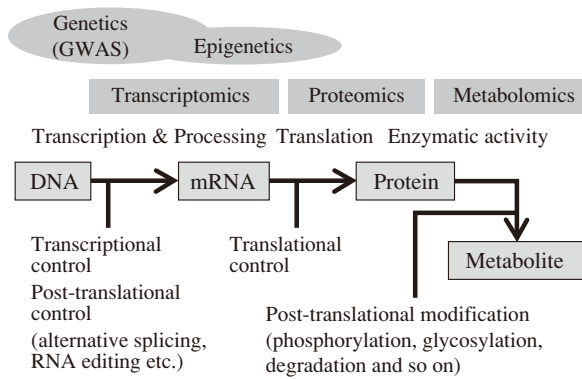


Fig. 2 Advanced technological platforms for biomarkers — “fishing” rather than targeted search

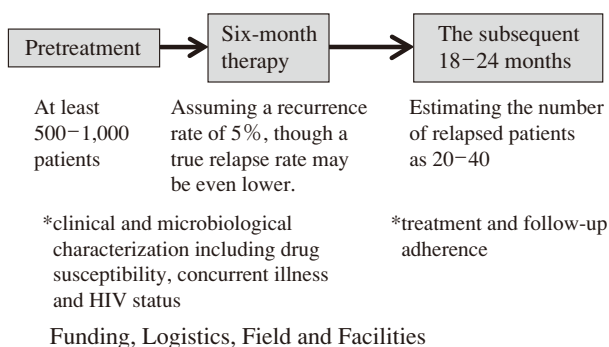


Fig. 3 Obstacles in biomarker discovery

にするための結核医療ネットワークシステム自体が十分でない場合が多く、臨床研究の実施には常に困難がつきまとう。また既治療例、HIV陽性例、薬剤耐性など、交絡要因の扱いも問題を複雑にしている。今後、バイオマーカー研究には、十分なインフラの整備と予算の確保、多方面の専門家のネットワークが重要であり、そこにわが国の貢献が強く望まれる。

本稿では、平成22年度、文部科学省「感染症研究国際ネットワーク推進プログラム」ベトナムにおける国立国際医療研究センター感染症研究プロジェクト（ベトナムにおける結核症に関する研究）の研究補助を受けて実施した成果の一部を紹介した。

文 献

- 1) Perrin FM, Lipman MC, McHugh TD, et al.: Biomarkers of treatment response in clinical trials of novel antituberculosis agents. *Lancet Infect Dis.* 2007 ; 7 : 481-490.
- 2) Wallis RS, Doherty TM, Onyebujoh P, et al.: Biomarkers for tuberculosis disease activity, cure, and relapse. *Lancet Infect Dis.* 2009 ; 9 : 162-172.
- 3) Rifai N, Gillette MA, Carr SA: Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility.

- Nat Biotechnol.* 2006 ; 24 : 971-983.
- 4) Sakurada S, Hang NT, Toyota E, et al.: Agreement of chest X-ray findings between readers from two countries using coding systems for tuberculosis; submitted.
- 5) Benator D, Bhattacharya M, Bozeman L, et al.: 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 randomised clinical trial. *Lancet.* 2002 ; 360 : 528-534.
- 6) Hesselting AC, Walzl G, Enarson DA, et al.: Baseline sputum time to detection predicts month two culture conversion and relapse in non-HIV-infected patients. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010 ; 14 : 560-570.
- 7) Mallory KF, Churchyard GJ, Kleinschmidt I, et al.: The impact of HIV infection on recurrence of tuberculosis in South African gold miners. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000 ; 4 : 455-462.
- 8) Desjardin LE, Perkins MD, Wolski K, et al.: Measurement of sputum *Mycobacterium tuberculosis* messenger RNA as a surrogate for response to chemotherapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 ; 160 : 203-210.
- 9) Wallis RS, Perkins M, Phillips M, et al.: Induction of the antigen 85 complex of *M. tuberculosis* in sputum: a determinant of outcome in pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis.* 1998 ; 178 : 1115-1121.
- 10) Cannas A, Goletti D, Girardi E, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* DNA detection in soluble fraction of urine from pulmonary tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008 ; 12 : 146-151.
- 11) Azzurri A, Kanaujia GV, Sow OY, et al.: Serological markers of pulmonary tuberculosis and of response to anti-tuberculosis treatment in a patient population in Guinea. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2006 ; 19 : 199-208.
- 12) Demir T, Yalçinoz C, Keskinel I, et al.: sICAM-1 as a serum marker in the diagnosis and follow-up of treatment of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002 ; 6 : 155-159.
- 13) Mukae H, Ashitani J, Tokojima M, et al.: Elevated levels of circulating adhesion molecules in patients with active pulmonary tuberculosis. *Respirology.* 2003 ; 8 : 326-331.
- 14) Chan CH, Lai CK, Leung JC, et al.: Elevated interleukin-2 receptor level in patients with active pulmonary tuberculosis and the changes following anti-tuberculosis chemotherapy. *Eur Respir J.* 1995 ; 8 : 70-73.
- 15) Brahmabhatt S, Black GF, Carroll NM, et al.: Immune markers measured before treatment predict outcome of intensive phase tuberculosis therapy. *Clin Exp Immunol.* 2006 ; 146 : 243-252.
- 16) Veenstra H, Baumann R, Carroll NM, et al.: Changes in leucocyte and lymphocyte subsets during tuberculosis treatment; prominence of CD3dimCD56+ natural killer T cells in fast treatment responders. *Clin Exp Immunol.* 2006 ; 145 : 252-260.
- 17) Ribeiro-Rodrigues R, Resende Co T, Johnson JL, et al.:

- Sputum cytokine levels in patients with pulmonary tuberculosis as early markers of mycobacterial clearance. Clin Diagn Lab Immunol. 2002 ; 9 : 818–823.
- 18) Plit ML, Theron AJ, Fickl H, et al.: Influence of antimicrobial chemotherapy and smoking status on the plasma concentrations of vitamin C, vitamin E, beta-carotene, acute phase reactants, iron and lipid peroxides in patients with pulmonary tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 1998 ; 2 : 590–596.
 - 19) Eugen-Olsen J, Gustafson P, Sidenius N, et al.: The serum level of soluble urokinase receptor is elevated in tuberculosis patients and predicts mortality during treatment: a community study from Guinea-Bissau. Int J Tuberc Lung Dis. 2002 ; 6 : 686–692.
 - 20) Immanuel C, Rajeswari R, Rahman F, et al.: Serial evaluation of serum neopterin in HIV seronegative patients treated for tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2001 ; 5 : 185–190.
 - 21) Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, et al.: Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. Am J Respir Crit Care Med. 2004 ; 170 : 59–64.
 - 22) Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, et al.: Predictive value of a whole blood IFN-gamma assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med. 2008 ; 177 : 1164–1170.
 - 23) Doherty TM, Demissie A, Olobo J, et al.: Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. J Clin Microbiol. 2002 ; 40 : 704–706.
 - 24) Ruhwald M, Bjerregaard-Andersen M, Rabna P, et al.: CXCL10/IP-10 release is induced by incubation of whole blood from tuberculosis patients with ESAT-6, CFP10 and TB7.7. Microbes Infect. 2007 ; 9 : 806–812.
 - 25) Cheon SH, Kampmann B, Hise AG, et al.: Bactericidal activity in whole blood as a potential surrogate marker of immunity after vaccination against tuberculosis. Clin Diagn Lab Immunol. 2002 ; 9 : 901–907.
 - 26) Jacobsen M, Repsilber D, Gutschmidt A, et al.: Candidate biomarkers for discrimination between infection and disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. J Mol Med. 2007 ; 85 : 613–621.
 - 27) Agranoff D, Fernandez-Reyes D, Papadopoulos MC, et al.: Identification of diagnostic markers for tuberculosis by proteomic fingerprinting of serum. Lancet. 2006 ; 368 : 1012–1021.
 - 28) Mistry R, Cliff JM, Clayton CL, et al.: Gene-expression patterns in whole blood identify subjects at risk for recurrent tuberculosis. J Infect Dis. 2007 ; 195 : 357–365.
 - 29) Tanaka T, Sakurada S, Kano K, et al.: Identification of tuberculosis-associated proteins in whole blood supernatant; submitted.

————— The 85th Annual Meeting Educational Lecture —————

BIOMARKERS TO ASSESS DIFFERENT ASPECTS OF TUBERCULOSIS
— From Development to Relapse —

Naoto KEICHO

Abstract Prevalence of tuberculosis (TB) has been decreased in Japan, whereas rapid increases in multi-drug resistance TB and HIV co-infection have raised serious problems in developing countries. To solve these problems, development of strong anti-TB vaccine, simple low-cost tools for diagnosis with drug sensitivity testing and new powerful anti-TB drugs is in urgent need. To evaluate new weapons against TB properly, appropriate biomarkers to assess the presence and severity of disease, response to treatment and prediction of relapse should be established. In case of TB, no relapse within two years after treatment is a gold standard to evaluate treatment outcome, but if we have a surrogate biomarker to predict relapse more quickly and accurately, clinical trials for TB drugs will be facilitated. A candidate TB vaccine may also be evaluated in a

similar way. It may be further useful for individualized medicine to determine optimal dose and duration of TB treatment for each patient. I will review the current situation of biomarker studies and a new trend for development of biomarkers based on platforms of “omics” technology.

Key words: Biomarker, Tuberculosis, Pathogenesis, Clinical research

National Center for Global Health and Medicine

Correspondence to : Naoto Keicho, National Center for Global Health and Medicine, 1–21–1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162–8655 Japan. (E-mail: keicho@ri.ncgm.go.jp)