

平成 30 年 4 月結核予防会結核研究所倫理委員会継続承認研究課題一覧  
(生体防御部／遺伝子関連)

RIT/IRB 29-27

## 【ベトナムにおける副鼻腔気管支症候群の研究】

### 1) 研究の目的

副鼻腔気管支症候群は、おそらく遺伝素因に基づき、宿主側の気道粘膜防御能の障害のため、上気道(副鼻腔)と下気道(気管支、細気管支)に慢性細菌性感染を生じている病態と定義される。わが国では、我々のグループが中心となり遺伝素因の解明を進めてきたが、東南アジアにおける臨床疫学情報はほとんど得られていないため、同様な疾患が実際にわが国と同様な遺伝素因を有して発症しているのか明らかにする。得られた成果は、肺抗酸菌感染症など、広く慢性気道炎症性疾患に応用可能である。

### 2) 研究の概要

ベトナムバックマイ病院の呼吸器科と耳鼻咽喉科の協力を要請し、本研究では、耳鼻咽喉科にて慢性副鼻腔炎と診断され、なおかつ喀痰排出のある患者 200 名に研究参加をお願いし、臨床疫学情報の取得、全血より、気道粘膜防御に関わるタンパク、DNA レベルでの発現、多型解析を実施し、呼吸器科にて、聴診、喀痰の細菌学的検査、胸部 CT、呼吸機能検査を実施し、異常がある場合、さらに血液酸素濃度、寒冷凝集素価、リウマチ因子の測定を実施し、特に、副鼻腔気管支症候群のベトナムにおける頻度、下気道病変の有無による、臨床背景、気道粘膜防御関連遺伝子多型の偏りについて検討する。バックマイ病院呼吸器科受診の慢性気管支炎、細気管支炎の慢性副鼻腔炎合併症例も解析対象とする。連結不可能匿名化された一般集団 500 名の対立遺伝子頻度を参考にする(「ハノイ市における結核症の遺伝子因子に関する疫学的調査」平成 19 年 6 月 14 日、国立国際医療センター倫理委員会、承認済み)。

研究責任者と共同研究者の主たる所属機関の変更に伴い、研究の継続の可否について結核研究所の倫理委員会に申請書を提出し、平成 25 年に承認を得たものである。

### 3) 研究の実施場所

血液採取は、ベトナム バックマイ病院にて、臨床疫学情報解析は、NCGM バックマイ病院医学共同研究センターにて、遺伝子解析等は、結核研究所にて実施、継続している。

【びまん性汎細気管支炎発症に関わる遺伝因子についての研究】

1) 研究の目的

びまん性汎細気管支炎の発症に関わる宿主側の因子は、高血圧や糖尿病の発症において考えられているように多くの遺伝子の変異の組み合わせと関わりが深いものと予想される。疾患感受性に関わる候補遺伝子として、HLA に関連したもの、気道系の感染防御に関わる遺伝子群との関連を検討する。得られた成果は、肺抗酸菌感染症など、広く慢性気道炎症性疾患に応用可能である。

2) 研究の概要

びまん性汎細気管支炎の発症には、外的要因、環境要因、複数の遺伝要因の関与が推測されるが、その中で特に重要な疾患感受性遺伝子がどのようなものであるかを明らかにするため、我々は、HLA を中心とする遺伝子解析研究を進めてきた。これは、びまん性汎細気管支炎が、東アジア人に特徴的とされるヒト白血球抗原、HLA-B54 と強い関連があることが知られていたためである。発症要因として、HLA-B54 そのものが重要なのか、HLA-B 周辺の遺伝子の関与が重要なのか明らかでなかったため、我々は HLA-B 周辺に分布する多くの遺伝マーカーを同定して、その頻度分布を健常集団、患者集団との間で比較検討することにより、真の疾患感受性遺伝子を推定することを試みてきた。またそれ以外の疾患感受性に関わる候補遺伝子として、気道系の粘膜防御に関わるデフェンシン、ムチン遺伝子群の多型と疾患との関連性についても検討してきた。

平成 15 年 9 月 12 日の国立国際医療センターの遺伝子解析研究に関わる倫理委員会へ「びまん性汎細気管支炎の発症に関わる遺伝因子についての研究」として、以後、平成 13 年までに得られた既提供試料(血液より得られた DNA サンプル)については対応表を持たず、連結不可能匿名化試料として扱うこととして承認を得た(平成 15 年 9 月 22 日)。その後、研究責任者と共同研究者の主たる所属機関の変更に伴い、研究の継続の可否について結核研究所の倫理委員会に申請書を提出して、平成 25 年に承認を得たものである。

3) 研究の実施場所

既提供試料である血液試料、臨床情報は、平成 13 年前までに得られ(患者、健常者それぞれ約 100 検体ずつ)、個人と連結する対応表を破棄した状態で保存されている。結核研究所にて、類似した症候を示す疾患(原発性線毛不全症候群、嚢胞性線維症など)との関連を含めて検討すべく、遺伝子解析を継続している。

【ホーチミン市における多剤耐性結核患者の臨床経過と血液中の免疫代謝関連遺伝子発現との関連】

1) 研究の目的

結核菌が薬剤耐性を獲得した場合、その治療は薬剤感受性結核に比べてはるかに困難を伴う。多剤耐性結核に対しては、有効性が劣り毒性の強い薬剤を使用せざるを得ないため、治療が不成功に終わる例が少なからずみられる。その結果として生じる持続排菌者は、さらなる初回薬剤耐性結核の感染源になり、国内外の結核医療を考える上で、深刻な問題となる。多剤耐性結核は治療薬剤が限られており、薬剤感受性結核より難治であり、治癒の条件として宿主側の免疫代謝状態に頼るところが大きいものと推測され、薬剤耐性結核を治療する際には、薬剤開始後、早期に治療反応性を評価する簡便かつ的確な生体側の指標(バイオマーカー)の開発が望まれる。

2) 研究の概要

本研究では、薬剤感受性(非多剤耐性)結核の患者群と、多剤耐性結核の患者群で、末梢血の免疫代謝状態を解析する。治療前値と治療開始3カ月後の比較を行う。治療法、臨床検査、処置については、日常診療の範囲内で実施され、2回の研究用の採血以外に介入は行わない。

患者末梢血を採血直後および結核菌特異抗原により刺激した後、RNA 安定化剤で処理し、凍結輸送する。免疫関連分子として、IFNG、IL-4、IFNG レセプター、IP-10、グラニュリシンなどの遺伝子発現を定量 RT-PCR により解析する。また NAT2 遺伝子など、免疫代謝関連遺伝子多型と遺伝子発現との関連を検討する。これらの分子の血中レベルについては、ルミネックス法および ELISA 法にて測定する。治療の成功、不成功は、WHO による基準に準じて評価する

研究責任者と共同研究者の主たる所属機関の変更に伴い、国際共同研究の継続の可否について結核研究所の倫理委員会に申請書を提出して、平成 25 年に承認を得たものである。

3) 研究の実施場所

ホーチミン市、ファム・ゴック・タック病院、多剤耐性結核外来にて、採血、疫学情報、臨床情報の収集を行う。結核研究所にて遺伝子発現解析および付随する遺伝子多型解析を実施、継続している。

【ホーチミン市における多剤耐性結核治療時の結核特異的抗原に対する免疫遺伝学的応答性の検討】

1) 研究の目的

結核菌が薬剤耐性を獲得した場合、その治療は薬剤感受性結核に比べてはるかに困難を伴う。多剤耐性結核に対しては、有効性が劣り毒性の強い薬剤を使用せざるを得ないため、治療が不成功に終わる例が少なからずみられる。その結果として生じる持続排菌者はさらなる初回薬剤耐性結核の感染源になり、国内外の結核医療を考える上で深刻な問題となる。このため薬剤耐性結核を治療する際には、薬剤開始後、早期に治療反応性を評価する簡便かつ的確な生体側の指標（バイオマーカー）の開発が望まれる。

2) 研究の概要

多剤耐性結核患者の治療開始後早期の段階（3から6か月後）に採血を行なう。今後、症例数を増やして実施する今後の研究のためのパイロット研究としての位置づけである。患者末梢血より結核に対する細胞性免疫に深く関わる複数の免疫関連遺伝子（Th1系、Th2系、Treg系、エフェクター分子、他）を研究対象とする。市販の免疫学的結核感染診断キット（QuantiFERON-in-tube法）の採血管を利用して、末梢血を採取後、陰性対照、結核抗原刺激、無刺激培養の3条件でRNA抽出し、それぞれの遺伝子発現量を定量的PCR法により解析し検討する。その後、治療経過を観察することにより菌陰性継続（治癒）群と、菌再陽性化（非治癒）群が明らかになるため、治療中の遺伝子発現レベルが両群で異なっていたかどうかを、さかのぼって検討する。また上記免疫関連遺伝子の遺伝子多型がこれらに影響を与えるかを二次的に検討する。治療法、臨床検査、処置については、日常診療の範囲内で実施され、1回の研究用の採血以外に診療に介入は行わない。

研究責任者と共同研究者の主たる所属機関の変更に伴い、国際共同研究の継続の可否について結核研究所の倫理委員会に申請書を提出し、平成25年に承認を得たものである。両国の倫理委員会承認後、症例エントリーと検体の収集、共同研究機関への必要経費の支払いなどはすでに終了している。

3) 研究の実施場所

ホーチミン市、ファム・ゴック・タック病院、多剤耐性結核外来にて、採血、疫学情報、臨床情報の収集を行う。血液サンプルは移送し、結核研究所にて遺伝子発現解析および付随する遺伝子多型解析を実施、継続中である。

【ハノイ市の塗抹陽性結核における結核菌特異抗原によるインターフェロン応答の研究】

1) 研究の目的

クオンティフェロン法 (QFT) は結核菌特異抗原によるインターフェロン  $\gamma$  の産生を指標とする新規結核感染の診断法として近年実用化された。本研究の目的は、大きく三つに分けられる。(i) 結核感染の診断に QFT を使用する場合、偽陰性が生じる原因について明らかにする。(ii) 治療経過に伴う QFT の陰転化と早期再発を含む予後との関連を検討する。(iii) 残余のサンプルを用いて血液バイオマーカーを探索する。

2) 研究の概要

(i) 活動性結核診断時のインターフェロン  $\gamma$  応答に関する断面研究

ハノイ肺病院および関連ハノイ市7地区の塗抹陽性新規結核患者の研究参加を得て、HIV 感染、基礎疾患、年齢、性別、遺伝子多型の検索を行う。さらに胸部 X 線写真、喀痰検査、結核菌の性質と QFT の測定値との関係を検討する。

(ii) インターフェロン  $\gamma$  応答の治療経過に伴う変化と結核の予後との関連

QFT の陰転化と予後 (再発率) との関係、胸部 X 線写真上の改善、喀痰塗抹陰性化との関係を明らかにする。再発を見るためのフォローアップ期間は、治療開始後 24 ヶ月である。

(iii) 血漿中新規結核検出バイオマーカーの検索

QFT の残余血漿サンプルは、3回とも、 $-80$  度のフリーザーに保存して移送し、タンパクレベルでのバイオマーカーの検索を行う。

研究責任者と共同研究者の主たる所属機関の変更に伴い、国際共同研究の継続の可否について、結核研究所の倫理委員会に申請書を提出し、平成 25 年に承認を得たものである。両国の倫理委員会承認後、症例エントリーが実施された。

3) 研究の実施場所

ハノイ肺病院および関連する7つの地区の結核センターにおいてフォローアップを行った。採血、QFT を含む臨床検査は、主にハノイ肺病院に参加対象者を招いて実施した。残余血液サンプルの遺伝子解析およびタンパク解析は結核研究所にて実施、継続中である。各サブスタディの成果はそれぞれ部分的に誌上発表している。

【ハノイ市における結核症の遺伝的因子に関する疫学的調査】

1) 研究の目的

(i) ハノイ市における結核症有病率を調べる。この結果は、将来的に結核症の全国調査が実施される際の基礎データとなり、さらにハノイ市保健局とベトナム結核対策に役立てられる(すでに 2003-2004 年に実施済み、報告した)

(ii) 候補遺伝子と結核症の関連を調べる、結核への感受性と抵抗性に重要な役割を果たす遺伝的変異を明らかにする、患者対照研究の方法で、肺結核患者の環境と遺伝的要因について調査する(試料収集、移送、DNA の抽出は終了しており、解析が継続中、一部は既に報告している)

2) 研究の概要

(i) ハノイ市 12 区の 20 の各コミュニティよりそれぞれ一定数の世帯、計 5,000 世帯が無作為に抽出された。調査日には、選出された世帯を構成する 16 才以上の全ての住民より、インフォームド・コンセントを受け、胸部 X 線検査と質問票による面接、医師による診察が行われた。胸部 X 線写真上の異常陰影や 2 週間以上続く咳の訴えがある者は、2 回の喀痰塗抹検査を施行され、結核症の診断が行われた。コミュニティの医療従事者によって集められた情報は現在のハノイ肺病院において記号化された。

(ii) 対象となるハノイ市在住の結核患者より、インフォームド・コンセントを得た後、10 ml の血液の提供を受けた。300 名の結核患者の血液 DNA 試料を集積した。対照となる非結核患者については、ハノイ市一般人口集団より無作為に抽出された 500 名について同様な手順でインフォームド・コンセントを得、試料の提供を受けた。両国の倫理委員会承認後、血液試料の収集は 2003-2004 年に実施され、成果は一部、すでに誌上報告された。

研究責任者と共同研究者の主たる所属機関の変更に伴い、国際共同研究の継続の可否について、結核研究所の倫理委員会に申請書を提出し、平成 25 年に承認を得たものである。

3) 研究の実施場所

個人と連結する対応表のない状態で、結核研究所にて遺伝子解析を実施、継続している。

RIT/IRB 29-35

## 【ハノイ市における結核再治療時の結核菌の薬剤耐性獲得に関わる因子に関する研究】

### 1) 研究の目的

多剤耐性結核の発症は治療不十分による結核の再発が最大の要因と考えられているが、再治療時の結核菌の多くは薬剤感受性を保ったままであることから、結核菌耐性獲得には、さらなる宿主側／菌側双方の要因の関与が推定される。本研究では、これらの要因とその相互作用を一つの研究の中で明らかにすることを主たる目的としている。また副次的に治療時とその後の再発時に得られる結核菌のゲノム解析により得られる遺伝子変異の特徴と、宿主側の遺伝子多型、発現状態を比較し、再発、薬剤耐性獲得などに関連した宿主側／菌側双方の特徴を明らかにしたい。

### 2) 研究の概要

2002 年より国際共同研究を継続しているベトナム ハノイ市肺病院(旧名:ハノイ市結核病院)において、約2年間のエントリー期間をかけて結核再治療患者約 250-300 名に研究参加をお願いし、書面同意にもとづき、臨床疫学情報の取得、末梢血(血球、血漿)、菌 DNA を取得して、宿主免疫、薬剤代謝、栄養などに関わるヒトのタンパク、RNA、DNA(遺伝子)の発現、多型解析および結核菌ゲノムの遺伝解析を実施し、再発時の薬剤耐性獲得に関わる宿主側、菌側因子を明らかにする。再治療終了後 18 か月間の経過観察を行ない、さらなる再発時には菌の培養と DNA の抽出を行ない、全ゲノムシーケンス法を用いて結核菌ゲノム上の遺伝子変異と宿主遺伝子の発現状態を比較解析し、薬剤耐性などに関連した特徴を抽出する。また後方視的に、すでに臨床目的で現地に保存されている結核再治療患者由来の臨床分離株約 200 株についても、合わせて菌の遺伝子解析を実施する。

研究責任者と共同研究者の主たる所属機関の変更に伴い、国際共同研究の継続の可否について、結核研究所の倫理委員会に申請書を提出し、平成 25 年に承認を得たものである。両国の倫理委員会承認後、症例エントリーが開始された。

### 3) 研究の実施場所

血液採取はベトナムのハノイ市肺病院およびハノイ市各郡の結核センターにて行なう。臨床疫学情報の入力、解析は NCGM バックマイ病院医学共同研究センターにて主に実施する。遺伝子解析を中心とした研究は結核研究所に臨床検体を移送して実施、継続中である。

【ベトナムにおける医療従事者の結核潜在感染に関する遺伝子多型と血液マーカーとの関連】

1) 研究の目的

本研究は、ベトナム ハノイ市の医療従事者から得られた結核菌特異抗原応答(クオンティフェロン法)を指標に検出される結核非感染者と潜在感染者の血液試料について、RNA 発現解析と宿主遺伝的多型の検討を行い、結核菌感染に関わる宿主因子の候補を同定することを目的としている。

2) 研究の概要

本研究は、国立国際医療研究センター「ベトナムでの HIV 合併結核における血漿グラニュリシンと新規バイオマーカーに関する研究(以下、バイオマーカー研究)」(平成 23 年 11 月 15 日承認)の中で結核非発症対照群とみなされる、ベトナム ハノイ市の結核菌感染の状態と勤続年数や労働環境に関する疫学情報が明らかな医療従事者について、宿主遺伝子発現(RNA)量の変化と遺伝子多型頻度と結核菌感染との関連を解析する。

同意文書中に、遺伝子研究を含む将来の派生的研究に同意し、血液を提供した医療従事者の既提供試料を本研究の対象とする。すなわち、ハノイ肺病院において、既に採血され、保存されていた残余血液に新たな番号を付与して、対応表を破棄して個人情報を除き、年齢、性別、身長、体重、結核の既往、勤続年数、作業環境、クオンティフェロン法の結果など疫学情報とサンプルのみを日本に移送し、DNA 抽出、遺伝子解析を行う。対象とする遺伝子には、自然免疫、細胞性免疫に関連するサイトカイン、ケモカイン、エフェクター分子、免疫制御分子が含まれ、結核感受性関連候補遺伝子の発現解析、多型解析を実施する。

研究責任者と共同研究者の主たる所属機関の変更に伴い、国際共同研究の継続の可否について、結核研究所の倫理委員会に申請書を提出し、平成 25 年に承認を得たものである。両施設の倫理委員会承認後すでにバイオマーカー研究における検体採取はすべて終了している。結核研究所においては遺伝子発現、多型解析を実施、継続中である。

RIT/IRB 29-37

**【ヒト気管支上皮細胞における遺伝子多型と発現の相関と長期培養系に関する研究】**

1) 研究の目的

気道粘膜に固有の遺伝子発現及びその調節機構についてはほとんど知られていないため、気道炎症性疾患の分子病態の解明は遅れている。そこで、気管支上皮細胞の刺激応答性と遺伝子多型との関連を明らかにする。肺抗酸菌感染症など、広く慢性気道炎症性疾患の病態理解に重要な知見が得られる。

2) 研究の概要

平成 13 年 6 月 11 日の国立国際医療センター倫理委員会にて、「気道粘膜完全長 cDNA ライブラリーの構築に関する研究」として、手術目的で切除された肺組織より、病理診断の妨げにならない気管支・肺組織断片の提供を受け、気道粘膜より RNA を抽出し、完全長 cDNA ライブラリーを構築する研究の承認を受けた。さらにこの研究を包含する形で、(i) 気管支・肺を構成する細胞に見られる遺伝子の発現解析を行うこと、(ii) 気管支・肺を構成する細胞に発現する組織特異的遺伝子と組織特異的転写因子、細胞分化との関係を明らかにすること、(iii) 気道上皮細胞を外來遺伝子の遺伝子導入により不死化させること、の3点を目的とした研究について「気管支・肺を構成する細胞の網羅的遺伝子発現解析、分化制御、長期培養系に関する研究」として、平成 14 年 5 月 17 日に承認を得ている。気管支・肺組織に固有の遺伝子発現およびその調節機構については、培養細胞の遺伝子型による遺伝子発現の違いを明らかにするため、対応表のない形で、新たに「ヒト気管支上皮細胞における遺伝子多型と発現の相関と長期培養系に関する研究」として、平成 15 年 9 月 22 日に承認を受け、平成 19 年 3 月 15 日に継続について、承認を得てきた。

研究責任者と共同研究者の主たる所属機関の変更に伴い、さらなる研究の継続の可否について結核研究所の倫理委員会に申請書を提出し、平成 25 年に承認を得たものである。

3) 研究の実施場所

結核研究所にて、すでに得られており、対応表のない状態で、保存された手術検体由来、凍結気管支上皮細胞を解凍、培養し、刺激時の遺伝子発現解析および付随する遺伝子多型解析を実施、継続中である。

