

計畫編號：DOH97-DC-1501

行政院衛生署疾病管制局 科技研究發展計畫

結核病防治研發整合型計畫

總 成 果 報 告

執行機構：社團法人國家生技醫療產業策進會

計畫主持人：陳維昭 特聘研究員

共同主持人：胡幼圃特聘研究員、彭汪嘉康特聘研究員、楊
泮池院長

研究人員：余忠仁醫師

執行期間：97年01月01日至99年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目 錄

壹、前言	7
貳、研究目的	24
參、材料與方法	26
(一) 整合型計畫運作模式與架構	26
(二) 各子計畫研究方法	27
肆、工作項目成果	41
(一) 各子計畫研究成果重點摘述	41
(二) 各子計畫最新研究成果彙整表	45
(三) 各子計畫研究產出：國際 SCI 文獻、專利	49
(四) 國際交流及人才培育	55
1. 補助人才出國交流	55
2. 九十九年國際研討會	57
伍、結果與討論	58
陸、結論	89
(一) 結核病診斷技術研發面向	89
(二) 結核病藥物與治療方式研發面向	95
(三) 結核病新型疫苗研發面向	102
柒、計畫重要研究成果及具體建議	104
(一) 結核病診斷技術研發部分	104
(二) 結核病藥物與治療方式研發部分	107
(三) 新型抗結核病疫苗研發部分	111
捌、參考文獻	115

中文摘要

本整合型研發計畫總目標，即在以結核病診斷技術、藥物與治療方式以及新型疫苗研發為主要方針，並整合基礎學理探討與臨床應用以產出具體成果，同時也以本研發團隊過去之研究成果為基礎，持續研發歷程，確保研發效益。並配合行政院衛生署「結核病十年減半全民動員計畫」規劃三階段整合型研發計畫，最終目標為發現病人、完治病人（Find TB、Cure TB）。

為能達成此目標，本會自 2005 年即積極倡議進行防治研究，並由本會陳維昭副會長結合三個計畫主持人—胡幼圃特聘研究員、彭汪嘉康特聘研究員、及楊泮池特聘研究員建立一全國性整合型結核病防治研發團隊，並整合帶領研發計畫執行，以充份彙整國內研究人力與資源以做運用。期間整合之專業人士，分別來自前端疾病之偵測及診斷、基礎醫學、與臨床治療各領域，並結合全國學術、研發及醫療資源，共同參與本研發團隊成員皆為本會所聘任之研究員，其分別來自國防醫學院、三軍總醫院、台大醫院、榮民總醫院、耕莘醫院、高雄醫學大學、中正大學等學研單位，除了集結國家研發能量外，並奠定國家結核病防治研究中心的根基。

本整合型研發計畫共包含三個主題，分別為「結核病診斷技術研發」、「抗結核藥物與治療方式研發」、及「新型抗結核病疫苗研發」，其主要目標能完成：一、全國結核病個案完整臨床資料建檔與檢體蒐集、以有效阻絕疫情蔓延；二、成功試驗潛隱性結核病可行的提前治療標準療程，且開發一至二種低副作用之抗結核藥物、及兼具安定性與療效之新抗結核病藥新劑型，並進入臨床試驗，以有效改善結核病患治療品質、降低藥物副作用，並提升完治率；三、發展完成至少一種偵測潛隱性結核感染篩檢之有效工具、及發展完成至少一種具敏感、快速、特異及偵測抗藥性且正確性高的檢驗方式，除提高病人發現率、落實疫情控制，亦能提升病人確診率、直接協助臨床治療施行。四、透過新型抗結核病疫苗研發及評估，能確認未來疫苗研發的方向及具體作法，以使疫苗研發計畫更具可行性及效益。以下就各研究成果重點分述之：

■ 流病監測方面

(一)建立結核病患完整臨床資料與血液檢體之資料庫 (clinical

Bioinformatics and Bio bank)：截至 2010 年 12 月 31 日止，共納入 1284 個肺結核患者和與 640 個接觸者。並發現這 1284 位結核病患者中主要都是 65 歲以上的患者；男性的比例較低，在 44 歲以下的族群，女性與男性比率幾乎各佔一半；同時，臨床症狀多為呼吸道症狀，其中以咳嗽最多，佔 59%；至於全身性症狀，則以發燒為最多 (29.8%)；而在抗結核藥物治療過程中，副作用相當常見，並有超過四分之一的人會有皮膚症狀。並藉其監測我國結核菌株之流行趨勢，發現南北分佈有明顯差異，

經菌株基因分型、鑑定及分佈之研究中發現北部結核菌以 Beijing 型的基因表現型為主，南部則是以 EAI2_Manilla 表現型為主。

■ 提前治療方式與開發新抗結核藥物

(一)提出預防性治療的有效模式：結核病患之家庭接觸者被感染的機率約三成，為優先管理的接觸者。對其給予四個月 rifampicin 預防性治療，初步顯示發病的機率比未接受治療者明顯降低。

(二)提出可提高治療成功率的投藥模式：病患治療頭兩個月除使用標準抗結核藥物外，再加上每日一粒（400 mg）moxifloxacin，結果發現平均痰培養陰轉日，顯著短於未多服用者。

(三)發現藥物性肝炎的高危險群：患者本身若帶有 NAT2 slow acetylator 基因型或是罹患病毒性肝炎，尤其是 C 型肝炎，較容易產生藥物性肝炎，藉此可預先篩檢並供醫師用藥參考。

(四)發現可改善藥物副作用的抑制劑：amidase 抑制劑 BNPP 及 HUCHE033 可改善 pyrazinamide 的肝毒性。同時，HUCHE033 亦被發現可減少服用 INH 及併用 INH/RIF 所造成之肝損傷。

(五)成功研發出四合一及三合一的新型抗結核藥物製劑：目前已進入人體生體相等性試驗階段，並已完成交叉性的人體試驗共兩期(每期 30 人次)，將可大量減少病人服藥錠數量、提高遵醫囑性。現已提出四合一複方製劑之台灣專利申請；且合作藥廠已購得新對照藥(Rimstar)並新進行四合一複方製劑 biobatch 製造及成品檢驗、溶離等試驗。

■ 結核病快速診斷技術

(一)成功研發可快速診斷結核病的高敏感度檢測試紙：

已成功研發應用 PCR-ICT (immune- chromatography test) 技術之結核菌檢測裝置，由臨床痰檢體收集至肺結核菌檢出時間，可在二小時內(傳統鑑定需 1-2 個月)，並具高敏感度 (97%)、特異性 (99%) 與成本低 (約自動儀器的 1/40) 等優點，操作簡單方便，可立即應用；目前已獲得台灣新型專利與正進入美國發明專利之選群階段中。

(二)成功測試肺結核及其抗藥性檢驗試劑：

1.可利用 27 個結核菌特殊抗原篩選 aptamer (DNA 型之抗體)，其靈敏度可達 10 pM 以上，且已挑選 4 個 TB 潛隱性抗原以製成 aptamer 晶片，目前已可正確鑑別出是否感染結核菌。

2.能成功利用 Molecular beacon 可於痰塗片檢體上快速鑑別 MTB 與

NTM，整個流程可於兩小時內完成，靈敏度高於傳統 AFS 法。

**(三)成功研發具簡單、便捷、費用低廉方法，可立即應用於臨床常規檢驗
之用之檢測抗藥性之分子診斷技術：**

1.已成功建立 LAMP-PCR ELISA 及 Therm ELISA 方法來診斷 MDR-TB 及 XDR-TB，並分別對 isoniazid、rifampin、amikacin 及 Fluoroquinolones 之抗藥性，得到的敏感度分別為 92.2%、94.7%和 91.3%、及 92.9%，特異性皆為 100%，本項檢測技術已申請台灣發明專利。

(四)完成偵測結核分枝桿菌相關抗原或抗體之試劑比較：發現以 T-SPOT TB 快速診斷偵測結核分枝桿菌相關抗原或抗體之敏感度 (80.8%) 較佳，或可及早提供醫師在病因未明等情況下之診斷參考。

■ **疫苗研發**

(一)設計出有效產生免疫反應的多重 TB 重組疫苗：現進行 P3 級動物活體內攻毒試驗，發現多重 TB 重組 DNA 疫苗確實具有保護效果。

■ **國際學術成就**

世界上第一個釐清抗結核藥物 PZA 的毒性機轉：造成肝毒性來源主要是因其代謝物 Pyrazinoic acid 及 5-OH-pyrazinoic acid 所引起。

此外，為能使結核病研發專業人才素質得以提升，亦藉由執行本計畫與國際接軌，並培育更多結核病防治人才，本計畫共有 40 位專家學者及 60 位碩博士研究人員一同參與研究團隊，為台灣結核病防治投入心力。本整合型研發計畫共計三年，執行至 2010 年的成果，包括至少三十九篇國際 SCI 學術論文接受刊登、兩篇正在申請中與十六篇準備發表、並於國外相關結核病年會中進行九次發表。在專利申請部份，結核病檢測裝置已獲台灣新型專利；「活動性肺結核桿菌晶片檢測法」、「鑑定結核分枝桿菌及結核分枝桿菌複合體的探針及其方法」、「一種微生物的檢測方法」、以及「結核菌檢測裝置」三案件，已驗證於臨床之檢體，敏感度 (91.3-97%) 與特異性 (99-100%) 皆不錯，目前分別已取得台灣新型專利與正進入美國專利審查階段；而「低副作用之抗結核藥物新複方」已通過並完成 PCT 之申請，另「Multivalent Anti-TB BCG Vaccines」及「Multivalent Anti-TB MVA Vaccines」兩案，目前正申請台灣及 PRC(大陸)專利中；同時，亦有與抗肺結核藥物製程改善及低副作用之異菸鹼醯胺(Isoniazid, INH)新複方之專利正在申請中，未來還有幾項專利正籌備中。綜合上述，透過本整合型計劃期待能運用研發成果於國家結核防治政策，使結核病十年減半的目標得以落實。

關鍵字：結核病防治、研發、整合、疫苗、診斷、治療

Abstract

The overall objectives of this project are to develop tuberculosis diagnostic techniques, anti-tuberculosis medications and treatment protocols, and novel vaccines. with the understanding of current issues of tuberculosis (TB) control in Taiwan and the implementing of global strategy on TB researches, we therefore proposed this research program. Our ultimate expectation is to assist the Department of Health to accomplish the goal of cutting the number of tuberculosis cases in half by 2016.

In order to achieve the aforementioned goals, a nationally integrated TB prevention and treatment research team was established. Moreover, by gathering experts in clinical and basic medical sciences, a three-year research and development program has been launched since 2008. This program would contribute the improvement in the diagnosis and treatment to TB patients, and also assist our government in overcoming bottlenecks in TB prevention and treatment.

We've been applying 4 patents and preparing another two. In the meanwhile, we've been published 45 papers, and 8 papers were just accepted. Other main tasks accomplished in the second year of this research program are:

Inovative New Diagnostics Development

1. Development of new tools for TB detection, such as usage of the modified lysis buffer, PCR-ICT platform, aptamer array technique, and one-tube LAMP-PCR-restriction ELISA-hybridization assay.
2. Effective comparison and evaluation on the performance of various diagnostic kits, including T-SPOT TB, QuantiFERON and M.tuberculosis Antigen ELISA assays.
3. Establishment of a comprehensive clinical database protocol: we have completed the design of registration format and a standard operation process of case collection. Also the database management committee has been founded.

TB Drug Development

1. Discovery of different methods to improve the treatment for TB patients

or reduce side-effects of drugs, such as developing a new combo of Anti-TB drugs or modifying the toxicity from the metabolites of Isoniazid, Pyrazinamide and Ethambutol.

2. Reveal of the relationship between the drug-induced hepatitis and host's factors, such as the viral hepatitis status or polymorphisms of metabolic enzymes.

TB Vaccine Development

Providing evidences for a potential utility of the multiple recombinant TB DNA vaccine (multi-rTB vaccine) against tuberculosis.

Our ultimate expectation is to utilize the results of this project in national tuberculosis prevention and treatment policies, and also to accomplish the goal of cutting the number of tuberculosis cases in half by 2016.

Keywords: Tuberculosis, TB, prevention, treatment, vaccine, diagnosis

壹、前言

一、背景與現況

由於世界網絡交流頻繁，國與國之間的平台不再遙遠，加劇全球面臨結核病流行之威脅。根據WHO(World Health Organization)指出，全球約有二十億人已感染結核桿菌，占全球三分之一人口數，在2007年時，全球約有九百萬新病患，且結核病的病人數占全球所有患病數的2.5%；同時，以病患數統計而言，亞洲是全球疫情最嚴重的地區，每年約有五百萬新病患，占全球的半數以上。在2007年，全球約有一百七十萬人死於結核病，每天約有近五千人死於結核病。其中5-10%終其一生可能會再度發病或成為潛在發病原；若不經治療，每位開放性肺結核病患將可傳染給10-15人。目前為止，全球結核病發生率每年以2 %的比例增加，且每秒鐘就有一人新感染結核桿菌。總體而言，雖然結核病為可治癒之疾病，甚至大規模接種卡介苗及抗結核藥物之發展，但其仍是全球成人因感染症死亡的首要原因。

有鑒於結核病的疫情仍然在全球各地蔓延，由1971年開始，美國胸腔科醫學會（American Thoracic Society，ATS）和疾病管制局（Centers for Disease Control and Prevention）就定期開會討論，希望能夠制定結核病診斷、治療、和防疫措施之標準指引，以期能夠在公共衛生政策的擬定和結核病患的診治上提供參考。因不同國家的結核病流行顯示極大差異，此差異不僅與結核病的傳染動力學有關，也影響到結核病的防治策略。根據世界衛生組織的估計，從2000年到2009年這十年之中，全世界大約會有三億人口被結核菌感染，大約會有三千萬人口死於結核病。在開發中國家，結核病的威脅更加嚴重，結核病人數占了全球結核病人數的95%，死亡數則占了全球死亡數的99%。開發中國家75%的結核病人屬於15歲到54歲的生產年齡人口，得病之後造成一連串的社會問題，嚴重耗損了社會及經濟

的活力。由於結核病可依其流行發生率區分為高盛行（high-prevalent）地區，例如第三世界國家（結核病發生率約在每十萬人口有75人至500人以上），與低盛行（low-prevalent）地區，例如美國、加拿大（結核病發生率約在每十萬人口6-7人之間）等西方已開發國家。在1997年全球新發生結核病例數約800萬人，較1990年增加了5.6%，而其中增加病例最多的地區是在非洲，相形之下，美洲地區的病例卻大幅減少，在1997年全新發生結核病例當中，有40%和25%分別發生在東南亞和西太平洋地區。雖然結核病發生率在全世界整體而言下降了4.9%，但非洲地區卻從每十萬人口191人上升至每十萬人口259人，增加了35.6%，1997年中全世界結核病發生率最高的地區是在非洲和東南亞（每十萬人口202人），由於非洲地區結核與HIV共同感染（co-infection）的盛行率（1.2%）最高，其中三分之一的新發生結核病例為HIV陽性患者，因此此區的結核病致死率高達34%，此外，各國的結核病流行狀況差異頗大，80%的新發生結核病例集中在發生率最高的22國家，其發生率範圍從每十萬人口75人至每十萬人口539人（Dye et al., 1999; Raviglione et al., 1995）。

雖然由上述的世界結核病遍佈趨勢來看，結核病大多發生於發展中的貧窮國家，然我國結核病的傳染每年仍有約一萬五千名的新發個案，在38種報告傳染病中，結核病的病人數即約占了70%，是目前病人數最多的應報告傳染病，比所有其他傳染病的總和還多。研究報告發現，臺灣地區結核病發生率趨勢在1991-1992年略昇，1992-1995年平緩，1996年後則顯著上升。以1996年和1995年比較，發生率上升了16%，結核病發生率隨年齡增加，尤其在50歲以後，男性結核病發生率約為女性的2倍。2004年經通報之結核病個案計24,161人，經確診為結核病新案者高達17,142位，為自1999年以來最高。而結核病死亡人數每年約1,000多名，2003年死亡人數1,309人，2004年亦有957

人，名列我國死因順位第13，死亡率達每十萬人口4.23人。由上可見，我國結核病的疫情有逐年提升的趨勢，是我國國民健康的重大威脅，且相較於先進國家，我國在結核病的控制上仍有數十年的差距，顯現我國結核病的防治工作急須加強改善與革新。

目前國際間正努力進行結核病十年減半計畫，希望在2015年全世界的結核病盛行率能減少一半，台灣身為世界的一員，我們也相當努力的進行結核病防治。疾病管制局也於2006年，正式提出了十年減半的計畫，希望每年投入相當的經費，來達到此一目標。而為了達到此一目標，必須符合兩大條件，就是完治率必須達到85%以上，新發現的結核病患痰抹片或培養陽性的病患必須達到70%，主要的策略為發現病患，治療病患。如何早期發現結核病患，進一步早期治療是目前結核防疫相當重要的課題。而目前將邁入2010年，進入關建的第五年，目前新增的個案數雖有下降，但仍需持續努力，除都治之外，還需其他的措施來加強結核病的防治。

目前我國結核病防治問題與臨床困境，包括以下三類：

(一) 檢驗與診斷部分

正確、快速的檢驗與診斷乃掌握根治傳染病「早期診斷、早期治療」的首要關鍵，典型的肺結核病診斷不難，但是非典型肺結核則需依賴實驗室檢查。檢體的耐酸性染色檢查較快速，但敏感度低。而耐酸菌培養敏感度較高，但耗時較久，對急需確診的醫師與病人均極為不便（趙守典，2005）。因此，在檢驗與診斷的部分尚面臨諸多問題待解決：

1. 診斷成果未盡理想

正確、快速的檢驗與診斷乃掌握根治傳染病「早期診斷、早期治療」的首要關鍵，對於發病的結核病個案，傳統的診斷方式，包括症狀學、肺部影像學與實驗室檢查，其中唯有實驗室檢查中確定出結核菌才能確認結核病。痰塗片鏡檢和培養是結核病診斷的基本的和標準

的方法。培養的敏感度為 80-85%，特異度為 98%。由於檢體的耐酸性染色檢查較快速，但敏感度低。而耐酸菌培養敏感度較高，但耗時較久，對急需確診的醫師與病人均極為不便（趙守典，2005）。且傳統上採用的培養方式約需要 4-8 週才有結果。採用自動偵測結核菌液態快速培養系統可提早到約兩週可分離出結核菌。然而就算培養呈陽性時，該標本的培養液仍必須再進行塗片耐酸性染色鏡檢，確定是耐酸菌後方可發出陽性報告。如此的檢驗步驟，表示病患被確認為結核感染前，可能會有兩週以上的時間無法接受抗結核藥物的治療，而造成治療的空窗期。

因此，在檢驗與診斷的部分尚面臨諸多問題待解決：故有別於傳統方法，許多血清免疫學相關的診斷方式，針對結核菌引起的生物標記(biomarker)改變來鑑定，包括：干擾素- γ (IFN- γ) 等，然而，因為敏感度與特異性的限制，常須多種生物標記結合才能有效辨識。近年來，因結核菌全基因體的定序完成，使得結核菌的檢測進入了分子診斷的領域，包含辨別結核分枝桿菌、非結核分枝桿菌外，對於結核菌的抗藥性亦可快速檢測。這些分子診斷方式包含了：核酸複製放大 (NAA, Nucleic Acid Amplification) 測試：目前已有許多的文獻報導，利用聚合酶鏈鎖反應，針對結核分枝桿菌特異性高度保留區的片段放大鑑定。然而，除了敏感度、特異性與耗時的考量外，成本以及輸出量更是實驗診斷上的顧慮。

由黃青青、索任、楊銘欽、江大雄，林立人等人（2003）以高雄縣 2001 年 1 月 1 日至 2001 年 8 月 31 日結核病確診登記個案 725 人為研究對象，追蹤管理至 2002 年 5 月 31 日止，分析其最終管理結果，並依健保局費用給付標準及官方制定結核病管理辦法計算改診斷病例之成本效益比，結果發現其改診斷率高達 8.1%，而其成本效益比達 5.24-5.97 倍。也就是說每個非結核病例被當作結核病例登記，假如沒有及早討論改診斷的話，將多花費納稅人 11,263-12,829 元的支

出。此費用倘若再包含對結核病個案本人及其家屬造成的心理衝擊，則必然相當可觀。

然而，1999 年全台 15 家醫學中心分別有 3.6-12.6% (平均 6.8%) 的改診斷率 (衛生署慢性病防治局，2000)，及 2000 年 14 家醫學中心分別有 3.1-14.4% (平均 7.9%) 的改診斷率 (衛生署慢性病防治局，2001)。顯示目前國內在診斷品質上仍有待提升。

有效的結核病防治策略必須包含診斷正確、有效治療與管理，以達治癒目標。結核病的改診斷比率常因臨床診斷不具特異性、細菌學早期診斷敏感性不高、放射學診斷特異性、臨床醫師診斷經驗與結核菌素測驗在臺灣因卡介苗政策缺乏積極診斷意義等特性而有差異 (黃青青等，2003)。因此，醫師診斷素養的提升、發展新工具以得到更新的診斷效度、相關檢驗之訓練及資訊的提供，都是未來極需努力的課題，以減少不必要的醫療和管理開支。

2. 潛隱性結核病偵測困難

2000年6月9日，美國疾病管制局與美國胸腔醫學會曾共同發表「潛隱性結核病 感染之特定目標結核菌素試驗與治療」(Targeted Tuberculin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis Infection) 規範 (Centers for Disease Control and Prevention 2000)，2005 年之更新版 (Centers for Disease Control and Prevention 2005) 除分別以「Targeted tuberculin testing (特定目標結核菌素試驗)」及「Treatment of LTBI (潛隱性結核病感染治療)」取代舊名詞「Preventive therapy or chemoprophylaxis (預防性治療或化學性預防)」外；更重要的是推薦三個主要工作目標：(1) 潛隱性結核病感染試驗，(2) 潛隱性結核病感染治療，及 (3) 臨床及實驗監測。

美國自1993至2003年結核病新個案下降44% (2003年14,874新個案) 之經驗或許值得我們學習 (Taylor Z 2005)。根據最近之美國疾

病管制局2006 資料顯示 (US CDC 2006)，全世界每年約有九百萬結核病新個案發生及兩百萬與結核病疾病有關之死亡。而因下列因素，美國結核病個案自1985年至1992年增加20%，包括：降低結核病公共衛生照顧之基礎組織、HIV之流行、來自高盛行率國家之移民、結核病在高危險環境之傳播，例如監獄及矯正機構、遊民窟、醫院及護理之家。其中醫院及監獄多重抗藥性肺結核之發生導致病患高死亡率與醫事人員間之高傳播性。在歷經數十年之努力後，至2004年降為14,571位結核病個案通報。連續11年之下降通報個案歸功於在全國不同地區有效運用資源來發現及治療開放性結核病病患 (active TB disease, ATBD) 及潛隱性結核病感染者 (latent TB infection, LTBI) (US CDC 2006)。潛隱性TB 感染係指感染結核桿菌 (Mycobacterium tuberculosis) 後無症候與症狀、x 光片及細菌學檢查皆無顯示為結核病患。此類潛隱性結核感染者並不會傳染給別人，但若未治療將來可能會病發成開放性結核病患 (US CDC 2005)。「開放性結核病」患者在適當之醫療照護下可被治癒；甚至「潛隱性結核感染者」在適當之醫療照護下亦不會發展成「開放性結核病」；但結核病患若未妥善治療，會造成死亡 (CDC 1995)。

國際上對於潛伏感染個案的診斷都依賴結核菌素皮膚測驗 (Tuberculin skin test, TST)，然而在臺灣，因為長期實施卡介苗施打政策，加上過去高結核盛行率 (50年前的20多歲年輕人，有80% TST為陽性)，使得利用TST來診斷潛伏結核感染在臺灣窒礙難行。因此有必要對這些潛伏感染個案建立可行確診的工具及策略，也就是研發可提升檢驗結果準確度，亦能縮短檢測所需的時間的診斷工具，如運用分子檢驗技術 (如聚合連鎖反應-polymerase chain reaction, PCR、核酸切割片段多樣性鑑識法-restriction fragment length polymorphisms, RFLP及快速藥物敏感試驗等方法)、丙型干擾素分析法 (Interferon-assay)、抗原60免疫球蛋白 (Antigen 60

Immunoglobulin G) 等，目前已有不少研究致力於此(蔡杏鳳，2004；江宜平、郭麗芳、陳志榮，2004；吳黃平、謝文斌、謝芳貴、花仲涇，2004；吳黃平、花仲涇、于鍾傑、吳紹筠，2005；郭金龍、李惠中、葉千涼，2005)，然由於儀器之試劑之成本大多昂貴，且亦有其限制，如PCR過度靈敏，易遭受污染產生偽陽性，且死菌內的DNA亦會被檢測出來(呂旭峰、黃志堅、劉嘉又、翟恆煒，2005)，故如何與培養、耐酸菌染色、X光、電腦斷層掃描相輔助使用之效果追蹤及實際之成果運用，皆待更進一步探討。

(三) 藥物與治療方式部分

目前結核病在治療用藥、都治施行等亦面臨許多臨床上急待解決之問題，包括：

1. 藥物處方複雜、療程過長

目前結核病至少需要六個月的連續治療，且當病人併有愛滋病毒感染或處於明顯免疫功能不全狀態時，服藥期可能需要延長至少三個月；而伴有矽肺症的病人，也需延長二至三個月，此外，多種藥物混合治療是結核病短期化學治療的一大特色，但也由於藥物種類與錠數較多，常造成病人服藥劑量錯誤，或因選擇性服藥而造成所謂的單藥治療(monotherapy)，結果不僅造成治療失敗，也可能導致耐藥性的發生(白冠壬，1997)。

Darly & Ralph (1977) 的研究中指出治療的有效性與藥物之副作用、治療所花費的時間和金錢，都會影響病人是否遵從醫囑服藥，反之，治療花費之時間與金錢越多，則病人容易發生不遵從行為，因此，由於服藥的期間漫長，藥方複雜，這些都會導致病人常無法耐心完成療程，這都是在結核病治療上所會面對的阻力。

2. 藥物具嚴重副作用

目前結核病第一線抗結核藥物，例如：isoniazid (敵癆剋星)、pyrazinamide (敵癆新邁)、rifampin (立復黴素) 及 ethambutol

(孟表多)等四種有效抗結核藥物的合併使用，不但處方複雜，同時所需服用藥物種類約3至4種，一天病患所使用之藥錠數常常高達十幾至二十幾錠，且其副作用包括引起肝炎、肝毒性以及影響視力、皮膚過敏等，其中又以肝毒性最為常見，導致病人順服性差，因此，開發第一線藥物的新複方增加病人服藥的方便性是提高結核病防治效果之重要方向。1999年國立臺灣大學醫學院附設醫院結核病患使用抗結核藥物所導致肝毒性之回溯性分析研究指出：在348位病人中，34.5%的病人有肝功能損傷(指肝指數上升超過兩倍)，肝毒性通常可於兩個月內被偵測出來，平均偵測天數為43天。而2002年國立臺灣大學醫學院附設醫院結核病患使用抗結核藥物所導致肝毒性之前瞻性分析研究指出：在261位病人中31.8%的病人有肝功能損傷(謝廷徽、陳培哲、高嘉宏，2004)。由以上數據可發現副作用發生的嚴重性著實值得關注。

尤其台灣市場上早已有數種isoniazid之學名藥，在10-20%使用isoniazid的病患中，可觀察到肝功能異常的情形，目前臨床上肝毒性的產生是必須停止抗結核藥物治療的可能主因之一，由於抗結核藥導致肝毒性可能的危險因子包括：愛滋病帶原、B型肝炎帶原、C型肝炎帶原、慢性肝病、治療前肝功能異常、酒精成癮等(謝廷徽、陳培哲、高嘉宏，2004)。台灣是B型及C型肝炎的盛行區，感染肺結核之肝炎患者也不在少數，假設每年有14,000名新增的肺結核病患，粗略估計至少有2,000名到3,000名慢性肝病患者需接受抗結核藥物治療，因此在這些病患身上所可能發生的肝毒性是不可忽視的醫源性疾病。

故目前要安全又有效的治療，端賴臨床醫師能於治療過程中密切追蹤，發生藥物副作用時適當處置，並依病人情況調整藥物組合。然而，在新結核病防治體系轉型後，大部分結核病患多在一般醫療院所接受治療，但是這些機構多年來缺乏有效的輔導和規劃，因此無法具

備處理結核藥物副作用及多重抗藥性結核之能力，在這種狀況下充分授權給醫師，其醫療品質堪慮（莊志杰、許玫玲，2004），除對醫療院所執行充分的在職訓練與完整的設備規劃外，最重要的即是能研發新的治療方法與藥物，以改善現況。

3. 病人順服性差以致都治未盡完美

臺灣由民國八十六年起針對山地鄉全面實施都治計畫，直至民國九十年五月擴大到全國普遍採行 DOTs 策略後，結核病患之完治率仍只有近 80%，尚未能達到世界衛生組織(WHO)所預期 85%的標準。在一全國性之調查中，以民國九十年當年度於疾病管制局所登錄之肺結核患者中，針對完治及未完治病患，以電訪方式調查是否有完成整體療程之相關因素中，統計結果發現「服用藥物後不適」、「感覺身體健康狀況已好轉」、「藥物之種類過多」等因素所佔比例最高，且在治療過程中，最讓結核病患感到困擾之原因依序為副作用大、治療時間過長、服藥次數過多等，以上結果顯示患者常易因與藥物相關之問題及對於不能中斷治療的觀念認知不足，進而導致無法完成肺結核之完整治療（胡曉雲、蔡文正、龔佩珍，2005）。由於中斷療程不但影響是國內結核病防治的重大因素之一外，同時亦增加防疫上的困難，即便是透過高成本的都治施行也易因個案狀況迥異，其實際施行成果仍不盡完善

4. 多重抗藥性結核

多發抗藥性結核病（MDR-TB）是結核病治療失敗的重要因素之一，加上近幾年來愛滋病的推波助瀾，其影響結核病防治的角色日益突顯，而如何預防並克服 MDR-結核病已成為全球公共衛生的急切課題。世界衛生組織（WHO）報導，近十多年來各先進國家紛紛經歷了結核病人數回升的現象，鄰近的日本也首次發生連續兩年結核病人數的持續增加，美國更報告了數次抗藥性結核病的流行，而臺灣的多重抗藥性結核菌比率也正在逐年增加中。最近的研究顯示，臺灣近十年

來原發性抗藥性有增加的趨勢 (Yu et al., 1997; Chiang et al., 1998), 原發性抗藥性為 12.3% , 較全球平均值高; 但原發性多重抗藥性 1.2% , 則與全球平均值約略相當, 原發性 isoniazid 抗藥性為 9.1% 。續發性抗藥性均較全球平均值明顯偏高, 臺灣地區續發性抗藥性為 67% , 續發性多重抗藥性為 46% , 後者約為全球平均值的 3.5 倍 (Yu et al., 1997; Chiang et al., 1998)。

根據統計, 國內曾接受第一線抗結核病藥物治療的結核病人有高達 67% 出現抗藥性, 每年約有 300 位多重抗藥性結核病患者增加。然當結核病治療失敗後或發生抗藥性結核病後, 再次治療時所使用的二線結核藥物, 如 OFLX、結核病 N、PAS、CS、KM、ENV 等, 會因為藥效差, 易於產生二線藥物續發抗藥性、而且治療時間冗長, 使治療成功的機會只有 50% 左右 (Bastian & Colebunders, 1999)。

有很多原因造成全世界抗藥性比率的增加, 這些治療結核病失敗的原因, 可能是由於缺乏經費及醫生的疏忽與失誤, 不適當的開始治療、療程, 以及未能認知及明瞭病人的需要 (這些病人包括治療不順從或之前已治療過的)。要成功的介入, 有賴於發展出價廉、創新、且快速的方法來診斷活動性肺結核, 評估藥物敏感性, 及改善針對病人所培養出特殊肺結核菌株治療方法的能力 (謝文斌、林志郎, 2000)。目前已有多篇討論臺灣地區結核抗藥性之研究發現 (江振源、許至仁、黃瑞明、林道平、陸坤泰, 2004; 廖永祥、薛博仁、余忠仁、王淑寬、楊泮池、陸坤泰, 2004; 劉尊榮、陳昶華、蕭如華、楊祖光、蔡人文、馮長風, 2004), 未來應用其結果於研發新型、有效且無毒的抗結核藥物無疑是當務之急 (陳義龍、許嘉裕、曾誠齊, 2003)。

一般認為結核病的流行可能歸因於不遵從服藥或是行蹤不明失去追蹤, 由 1999 年至 2000 年間台北市結核病個案資料中, 王培東 (2005) 發現, 其中中斷治療者佔 16.1%, 而行蹤不明者佔 14.7%, 是以中斷治療比率較高, 而由 2002 至 2004 年之結核病資料庫統計資

料顯示，目前完治個案亦只有一半，而行蹤不明及死亡約佔了五分之一（表 3-2 及圖 3-2）。這些失敗的原因可能為國人對結核病信念及態度上仍存在著污名化的想法，這也造成罹病者及家屬負向的感受而不願接受治療。

都治計畫（DOTS）的目標即是希望藉由密切追蹤訪視結核病確診個案，以確認服藥之順從性直到完治，由文獻中可發現其有以下之貢獻：提昇病患服藥順從性，使病人有超過 95% 的成功治癒機會；經由成功治療活動性結核病患，切斷傳染源；預防多重抗藥性結核菌株發生（Chaulk & Pope, 1997）。因此，都治計畫是增加結核病患治療率的有效管理方法，也是結核病防治很重要的一環。惟因當前都會的發展以及生活型態的改變，藉由公共衛生護士或都治計畫關懷員以追蹤結核病患者的方式，不但必須花費相當龐大的人事經費，往往也會因為干擾患者正常生活，甚至洩露病情而被患者拒絕，造成無法阻斷「活動傳染源」（謝家如，林麗蟬，2003）。此外，在結核病防治之責歸於疾病管制局，慢性防治機構裁撤後，使得結核病病患流入一般醫療院所接受治療（張智華、王復德，2005），然醫院間結核病人與其他病人間的區隔並未能建立，未能徹底執行感染管理措施，也因此增加結核病院內感染的危險性，因而無論院內或院外，病人的管制監控系統都是結核防治計畫中不可或缺的一部分。

（三）疫苗部分

目前世上唯一對抗肺結核的疫苗卡介苗（BCG），是一種牛型結核桿菌經過人工臍帶培養而成的弱毒活性疫苗，是世界上使用最廣泛、然而最有爭議的一種疫苗（王培東，2000）。卡介苗對於成人最常見的肺結核，其預防效果卻有很明顯的變異性，在 21 個有病例控制群及隨機取樣的大型研究中，卡介苗的預防效力分佈於 10% 至 81%。一份最近的整合分析報告（meta analysis）指出，卡介苗對所有形式結核約有 50% 的預防率，但另一份整合報告卻指出，卡介苗預防肺結

核的效果之變異性過大，以致於其總結預防效果無法計算出來（謝文斌、林志郎，2000）。因此，最近正進行研究很多的疫苗，這些包括以細菌 DNA 為基礎的疫苗，以培養基過濾液蛋白質為基礎的疫苗，新的再合成(recombinant)卡介苗疫苗，及需特別成長因子 auxotrophic 的結核疫苗等（Orme, 1997）。

理想的結核病疫苗應該要安全、便宜、只須單一劑量，且對所有的年齡層及所有地區分佈皆有顯著的效力，且若能讓疫苗不改變結核菌素皮膚試驗結果，或是有新的方法發展出來，可以是區分出是結核感染或疫苗的作用，則是最理想的。

由上可知，我國結核病防治目前面臨困難包括疾病的潛伏期長、確診不易，且因卡介苗、非結核性分枝桿菌等因素干擾造成診斷精準度差；結核病病人治療期長達半年、藥品嚴重副作用高如產生肝毒等，且病人順服性差、監控不易；臨床上多重抗藥性結核的情況嚴重；加上愛滋病患增加、以及近年我國與中國大陸互動頻繁、及引進東南亞勞工等情事，導致我國結核病逐年有蔓延的情勢。因此，無論是疫苗效力的改善、診斷技術與療法的研發與改良，都是目前突破結核病防治困境的當務之急。

貳、研究目的

鑒於全球結核病的嚴重性及有效防治的急迫性，根據我國目前結核病防治需求，執行任務導向之應用研究實為當務之急，此研究必須能涵蓋結核病相關的診斷方法與治療藥物的研發及疫苗開發等，同時亦須結合不同領域之專家共同參與，方能有實務可運用之成果產出，也才能進一步於未來協助政府落實研究成果，以突破現階段面臨之結核病防治困境。

因此，本會自 2005 年觀察結核病之嚴重性與倡議進行防治研究規劃以來，即積極整合包括公衛、基礎醫學與臨床治療各領域的專業人士，期能彙整國內研究資源以做運用，因此本會現已結合全國學術、研發及醫療資源，建立全國性整合型結核病防治研發團隊，除了能集結國家研發能量外，亦已奠定未來國家結核病防治研究中心的根基。

本研究團隊由本會陳維昭副會長結合三個計畫主持人—胡幼圃特聘研究員、彭汪嘉康特聘研究員、及楊泮池特聘研究員，整合帶領研發計畫執行。共同參與本研究團隊成員則涵括本會、國家衛生研究院、國防醫學院、三軍總醫院、台大醫院、榮民總醫院、陽明大學、耕莘醫院、亞東醫院、高雄醫學大學、中正大學、臺灣結核病醫學會等研究團隊代表。

本研究團隊所規劃之整合型研發計畫，其總目標即在以結核病診斷技術、藥物與治療方式、及新型疫苗研發為主要方針，並整合基礎學理探討與臨床應用以產出具體成果，同時也持續研發歷程，確保研發效益。

本整合型研發計畫期程共為五年，於本年度的重點在於奠定各項研發計畫之基礎，藉由充分的基礎研究成果，方能使未來的研發歷程更為順利，包括：逐步找出製備各項研發工具的方法、製備各項研發工具、測試及確認研發工具之效能、及確認各項研發工具之

實際可應用性等。以下即依本研發計畫的三個主題，分別為「結核病診斷技術研發」、「抗結核藥物與治療方式研發」、及「新型抗結核病疫苗研發」。以下即說明本計畫目標及本年度的計畫目標。

(一) 結核病診斷技術研發

全程目標：

1. 完整建立國人結核菌資料庫。
2. 開發針對潛隱性結核感染者之有效偵測方式。
3. 增加潛隱性結核感染的篩檢效益。
4. 開發具敏感、快速、特異及偵測抗藥性等優點的結核菌新興檢驗方法。

(二) 抗結核藥物與治療方式研發

全程目標：

1. 完成能使潛隱性結核病患獲得有效之提早治療並縮短療程之治療標準設計。
2. 提出改善結核藥物毒性的有效解決方案。
3. 開發可讓病人順服較佳、療程較短之具低副作用之第一線抗結核藥物或複方。
4. 完成結核病合併愛滋病毒感染病患最佳結核治療處置。

(三) 新型抗結核病疫苗研發

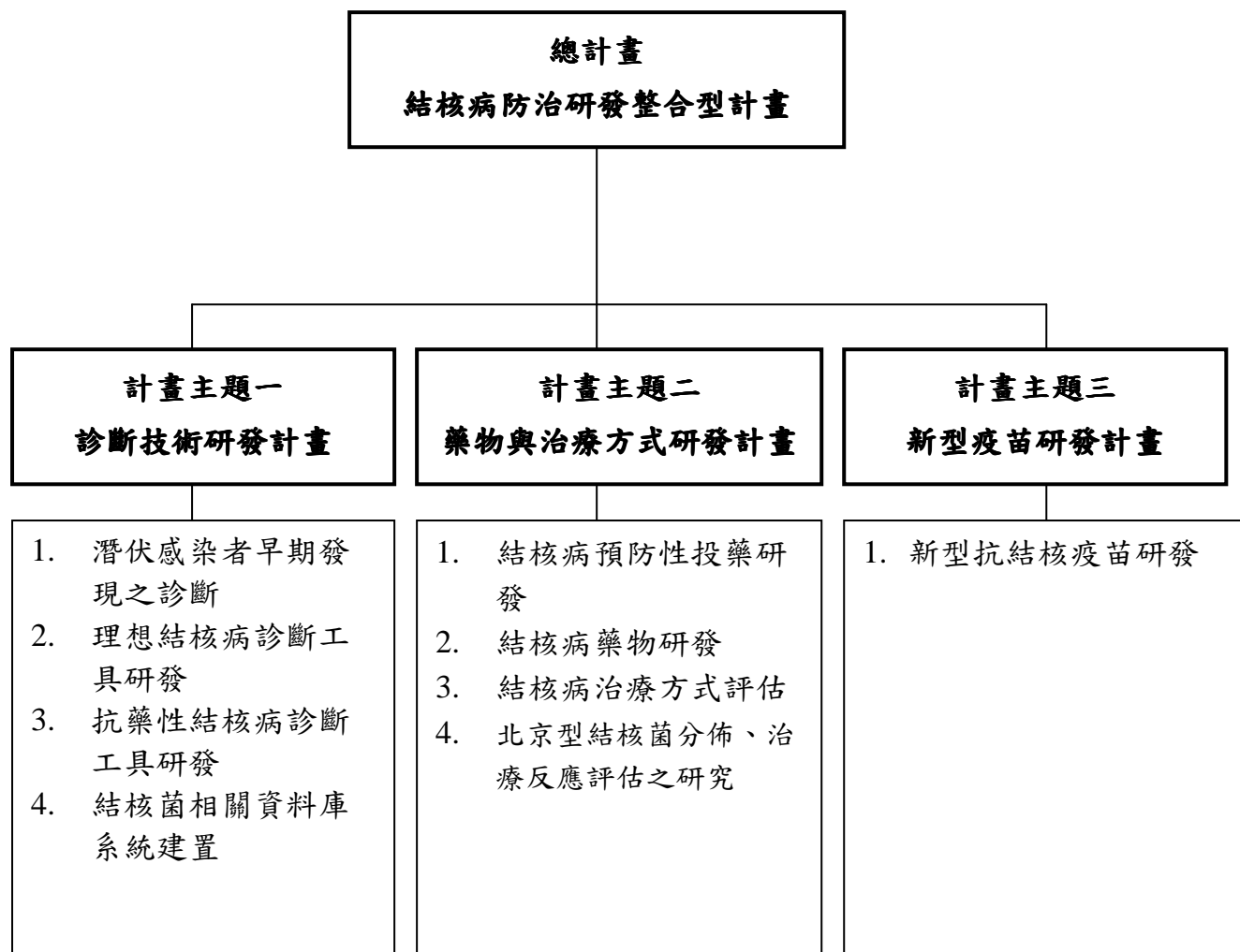
全程目標：

完成新型抗結核病疫苗之研發模式。

參、材料與方法

(一) 整合型計畫運作模式與架構

為能達成上述目標，本結核病防治研發整合型計畫在三個計畫主題上，共包含九個子題（圖一、規劃架構圖）。然囿於經費限制，本整合型計畫本年度優先執行確切能奠定研究基礎及立即能於實務推動的子計畫。此外，本整合計畫亦依 97 年度之產出成效及經費預算情形，評估整體計畫需求，於本年度再行納入兩項新子計畫。包括於計畫主題一增加「活化自然殺手細胞細胞毒殺途徑」計畫，以及計畫主題二增加「愛滋病毒感染者合併抗愛滋病毒藥物與抗結核藥物治療藥物動力學予藥物基因型研究」計畫。



圖一、本年度規劃架構圖

(二) 各子計畫研究方法：

以下即詳述主題內涵及各子計畫之執行重點：

計畫主題一、結核病診斷技術研發

本計畫主題共包括四個子題，分別為「潛伏感染者早期發現之診斷」、「理想結核病診斷工具研發」、「抗藥性結核病診斷工具研發」、以及「建立完整結核病資料庫」，其子題內涵及欲執行之計畫重點及執行方式分述如下：

(一) 潛伏感染者早期發現之診斷

由於臨床上結核病的病情嚴重度差異極大，加上國人的就醫習慣往往延誤就醫時間，就醫後、治療初期也未能自行做好隔離措施，無形中讓其他人增加了許多結核暴露的機會。因此，如何縮短結核病患發病至就醫的時間，減少痰陽病人在陰轉前進一步的傳播結核病，切斷傳染源，在結核病的防治工作上是十分重要課題。

越來越多的研究指出，再感染對於結核病的產生扮演著相當重要的角色，特別是在結核病的盛行地區。對於臨床上症狀輕微或甚至是沒有症狀的患者，反而會因為疏於防護而增加暴露的機會。因此，如何早期診斷潛在活動性肺結核，以防止進一步的傳播擴散，在擬定公共衛生政策上就顯得相當重要。

此外，國際上對於潛伏感染個案的診斷都依賴結核菌素皮膚測驗 (Tuberculin skin test, TST)，然而在臺灣，因為長期實施施打卡介苗政策，加上過去高結核盛行率 (50 年前的 20 多歲年輕人，有 80 %TST 為陽性)，使得利用 TST 來診斷潛伏結核感染，在臺灣窒礙難行，因此有必要對這些潛伏感染個案建立可行確診 LTBI 的工具及策略。最近，有一些新的技術研發，可以取代 TST 的血液快速檢查方法，如丙型干擾素分析法 (Interferon-assay)，顯示利用對於結核菌特

異抗原的體外干擾素反應分析，可能可以比 TST 更精確的應用在潛伏結核感染的診斷。在臺灣，這些快速檢驗技術的診斷效度，尚未被檢視，而採用其他可能的非侵襲性方式，如影像及血清學檢驗方式，是否何以得到更新的診斷效度，則有賴實驗室的開發及國人的智慧及努力。

目前本子題規劃可具體執行之研究重點及執行內容為：

1. 評估從結核病患之痰液和週邊血液利用即時聚合酶連鎖反應及微小定序法和高解析熔點分析法來快速診斷結核桿菌及其抗藥性

此計畫旨在利用 Proteinase K 蛋白酶消化分解結核菌體，再配合利用直鏈狀的聚合物 (linear polyacrylamide) 當作載體沉澱 DNA，可獲得最佳的 DNA 純化效果，具有最高的敏感性。本計畫預期從活動性 TB 病患中所取得之痰液、血液、尿液及糞便中，均可純化出結核菌的 DNA，並可由即時聚合酶連鎖反應進行偵測。

2. 比較三種藉由偵測結核分枝桿菌相關抗原或抗體之試劑快速診斷結核病的準確度

本計畫擬選取疑似結核病患者為母群體，當患者之檢體塗片抗酸性染色陽性時配合 TB-PCR 檢測結果，利用 QuantiFERON®TB Gold (Cellestis, USA)、TB-SPOT (Oxford, United Kingdom) ELISPOT、MeDiPro M. tuberculosis Antigen ELISA (台塑生醫科技，臺灣) 這三套體外檢驗試劑，檢測受試者有無相關之免疫反應。而對於最後分枝桿菌培養確定為結核病的患者，則另外每二個月再追蹤檢測一次，直到追蹤滿兩年。

(二) 理想結核病診斷工具研發

對於發病的結核病個案，傳統的診斷方式，包括症狀學、肺部影像學與實驗室檢查，其中唯有實驗室檢查中確定出結核菌才能確認結核病。痰塗片鏡檢和培養是結核病診斷的基本的和標準的方法。培養的敏感度為 80-85%，特異度為 98%。傳統上採用的培養方式約需要 4-8 週才有結果。採用自動偵測結核菌液態快速培養系統可提早到約兩週可分離出結核菌。然而就算培養呈陽性時，該標本的培養液仍必須再進行塗片耐酸性染色鏡檢，確定是耐酸菌後方可發出陽性報告。如此的檢驗步驟，表示病患被確認為結核感染前，可能會有兩週以上的時間無法接受抗結核藥物的治療，而造成治療的空窗期。要改善這一現象，需要採用分子檢驗技術。

分子檢驗技術敏感度高，目前最常被採用的技術核酸擴增技術 (NAA)，申請者必須提供充份的臨床資料，再配合實驗室細菌學檢查的結果，才能作最後的判斷。然而，單靠 NAA 結果並不能將病人為活動性結核帶原者的可能性完全排除，最後診斷仍需要仔細評估臨床症狀的嚴重度與感染結核病的可能性，以及是否接受藥物治療等因素考慮進去。尤其是當分子檢驗結果與臨床症狀不一致時，病人的臨床病情是否高度懷疑結核感染是判讀 NAA 結果與決定後續處置的重要依據。雖然分子檢驗技術可提高結核病診斷的速度，但它仍不能取代傳統的耐酸性染色鏡檢及結核菌培養方法。主要原因是目前多數 NAA 方法只針對結核分枝桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis complex*) 的診斷而設計，至於其它的非結核分枝桿菌 (NTM) 及藥敏試驗，還是得仰賴傳統培養方法來確定診斷。由於 NAA 方法無法區別所測得的菌體為活菌或死菌，因此它也無法用來評估治療的效果，尚必須根據病人的臨床症狀，才能進一步解讀 NAA 檢驗的結果。目前診斷結核菌的分子生物學方法很多，雖然能對部份分枝桿菌進行快速診斷，但仍缺乏統一的標準化方法，致使每個實驗室之間的資料無法進行比較。今後，如何針對分枝桿菌設計出一套全面性、準確且更有效率的方

法，將是未來發展 NAA 方法所要努力的方向。也是本計畫希望有所著力之處。

上述檢驗技術基本上需要有感染部位的檢體以進行檢驗，對於肺結核病患的確診，應有極大的臨床助益。但是對於佔所有結核病 10% 的肺外結核患者，由於細菌量少，感染部位檢體採集不易，其他檢查方式的開發遂有其必要。前述的干擾素分析方式即為一例，對於特殊結核菌抗原血清反應的快速診斷，並設法提高診斷的效度。現有的血清診斷方法，在診斷結核病的個案其敏感度及特異度，約在 30-60% 之間，都不足以成為臨床上可行的診斷方式。因此有必要開發新的診斷技術以協助肺外結核的診斷，如：由於 TB secretory protein ESAT-6 及 CFP-10 有關的 T lymphocyte 製造干擾素 gamma、IL-12 以及 IL-18 在肺結核病人都有升高的現象，因此細胞激素於結核病監測上即為一個重要的議題。

目前本子題規劃可具體執行之研究重點及執行內容為：

1. 結核菌快速診斷晶片之研發

本計畫旨在潛伏性結核菌檢測平台方面，利用包括：Interferon-gamma (IFN- γ)、IFN- $\alpha\beta$ 、Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)、Interleukin-4、Interleukin-10、Interleukin-12、Interleukin-4 δ 2、CCL3、CCL4、CXCL9、CXCL10 等 11 個基因，這些基因都已被證實其過度表現與結核菌的感染所引起的免疫反應有關，因此可用來作為是否有潛伏性結核菌感染之診斷標記，而建立潛伏性結核菌檢測晶片。

2. 結核菌標準化核酸分子及血清抗體及抗藥菌株之快速檢測系統之開發及運用

本計畫評估可執行之先進之 SPR 及 DNA chip 等 biosensor 技術，

發展結合分子檢驗技術及快速檢驗試劑優點的新一代肺結核檢驗試劑，以既有之研究結果，加以實際測試，發展縮短檢測時間，節省經費並提高敏感度跟特異性之「結核菌核酸快速檢測系統（痰檢體）-4 小時內」及「結核菌血清 SPR 快速檢測系統-30 分鐘內」。

3. 以血液及肋膜積水中 T 細胞對結核菌抗原之反應來診斷結核性肋膜炎

本計畫旨在利用 ELISPOT assay 來診斷結核性肋膜炎，由於 ELISPOT assay 的偵測值代表 sensitized T 細胞的數目以及分泌 IFN- γ 之量，在結核性肋膜炎的病人，若抽取肋膜積水，以 ESAT-6 及 CFP10 抗原去刺激積液中的 T 細胞，應可得到很強的陽性結果，有助結核性肋膜炎的診斷。因此本研究將針對有不明原因肋膜積水的病人，作血液及肋膜積水之 ELISPOT 研究，並對照最後之診斷，以瞭解 ELISPOT assay 診斷結核性肋膜炎之敏感度與特異度。

（三）抗藥性結核病診斷工具研發

除了確認有結核菌感染為必要的診斷原則外，結核菌的藥物感受性試驗也有執行的必要性。抗藥性結核盛行率在臺灣並不低，對於伊那（INH）的原發抗藥性約在 10% 以上，而多重抗藥性結核，尤其是次發抗藥性，也有逐漸增加的傾向。為了讓病人即早獲得有效藥物治療，避開無效的藥物，須於結核菌感染的短時間內，得知藥物感受性的結果，以提供臨床醫師有效的資訊，投予正確的藥物，增加病人接受有效治療的時間，提高治療成功的機會。因此有必要建立快速而正確性高的檢驗方式，可以在 24 小時之內確認肺結核與肺外結核，並明確排除非結核分枝桿菌；並且可以在確認肺結核後的同時或是 24 小時之內，篩檢第一線抗結核藥物的感受性。

針對此臨床需求，本研發團隊著力於結合生物資訊以及分子診斷

技術，發展出一套全面性、快速且準確的診斷方法，以在短時間內確認肺結核、NTM、死菌或活菌、以及是否為潛伏性結核菌感染，並同時檢測是否具有第一線抗結核藥物抗藥性突變基因，以即早讓病人獲得有效藥物治療，提高治癒的機會。本研發團隊在先前研究成果中，已篩選出一組最佳的結核桿菌、結核桿菌羣 [*Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC)] 和分枝桿菌屬三種 molecular beacon 檢測探針，並利用這一組探針成功地於一小時內，從結核病人的痰液濃縮沉澱物抹片中，確認結核桿菌感染。未來，更將藉由大規模體外培養 MTB 和 NTM 以及臨床檢體，以能進一步評估此新型檢測技術的靈敏度和專一性。

目前本子題規劃可具體執行之研究重點及執行內容為：

1. 全新肺結核及其抗藥性檢驗試劑開發

本計畫利用生物資訊找出結核菌專一性探針，結合細胞內原位雜合反應和 molecular beacon 原理直接偵測痰液中結核菌的存在與否。檢測探針的設計則是針對分枝桿菌屬的基因體序列，利用先前研發出的短序列編碼比對演算法，找出結核桿菌專一性檢測探針 (MTB 探針)、MTBC 檢測探針、分枝桿菌屬保守不變探針 (Myco 探針) 以及 NTM 檢測探針。MTB 專一性探針搭配 MTBC 檢測探針可區別出 MTB 結核桿菌和其它 MTBC 的差異 (如 *M. bovis*)，再結合 Myco 探針則可從一次檢測中同時正確地區分 MTB、非 MTB 結核桿菌的 MTBC、NTM 和其它非分枝桿菌微生物。此外為了鑑別檢測樣品中 MTB 與 NTM 同時感染的問題，我們也設計出一個 NTM 檢測探針。若與其它探針合併使用，將可分辨檢測樣品中是否同時感染 MTB 與 NTM (mixed infections)。

2. 結核菌的多重抗藥性之分子診斷技術

本計畫旨在研發出一套試劑來判定結核菌對第一線用藥之感受

性。其基本原理是利用與結核菌抗藥性相關之各種基因之突變性與正常性 DNA 序列之差異性，設計出各組之引子利用 PCR 技術得到 PCR 產物，再以不同且具特異性之內切酶來作用，其中具有變異之 DNA 序列因為不受內切酶作用而完整保留序列，因此可再以雜交技術，由呈色而判讀結果。

(四) 建立完整結核病資料庫

宿主的免疫系統與病原菌的各種特性複雜而長時間的交互作用，造成了結核病各式各樣的臨床表現與治療反應。試圖進一步了解國人的結核病、研究各種臨床表現的特異性及致病機轉的第一步，就是必須要有完整的結核病資料庫。完整的結核病資料庫，含括病人的基本資料、過去病史、家族史、可能暴露地點、暴露時間、發病時間、症狀、影像學檢查、臨床檢驗、結核菌檢查、菌株基因型、治療經過與治療反應、以及抗結核藥物的副作用，並且妥善保存病人臨床分離之菌株以及週邊血液以供日後進一步研究，本研發團隊目前已完成收集臨床資訊與資料儲存系統的設計，且在各合作醫院已訂定標準化之收案流程，未來將持續收案並分析檢體以建立完整結核病資料庫。目前本子題規劃可具體執行之研究重點及執行內容為：

1. 建立完整的結核病資料庫：包含病患臨床表現、治療反應、宿主因子、以及結核分枝桿菌菌株

本計畫旨在延續已建立的去年已建立的資料庫，針對臺灣地區的結核病患者，持續有系統的收集其各種臨床資料登錄於網路介面的資料庫系統中，包含有關病人臨床表現、可能暴露來源、實驗室檢查結果、影像學、治療經過與反應的電子資料，並且規則收集培養確診病患及其家屬之血液，分離並儲存 DNA、RNA、蛋白質、和血漿，以及患者的結核菌株，以供進一步進行各種宿主（基因多型性、SNP）

和病原菌（毒力因子）之相關研究，並規則收集各個不同時間點之患者血液和臨床所分離的結核分枝桿菌菌株於實驗室中。

計畫主題二、新的抗結核藥物與治療方式研發

本計畫主題共包括四個子題，分別為「預防性新藥劑組合研發」、「各類結核病人藥劑組合研發」、「新抗藥性結核病藥物研發」、「結核病人資料庫建置」，其子題內涵及欲執行之計畫重點分述如下：

（一）結核病預防性投藥研發

根據世界衛生組織的估計，在公元 2001 到 2010 年這十年中，世界上大約會有三億人被結核分枝桿菌感染，大約會有三千萬人死於結核病。民國九十二年，台灣地區的結核病發生率仍然高達每十萬人口中有 62.4 人。想要成功的控制結核病，就必須要能夠防止結核分枝桿菌的傳播，並且早期診斷及治療潛伏性結核病（latent tuberculosis）。

如果能夠提早治療潛伏性結核病，就能夠避免日後的發病，也可以減少進一步傳染給其他人的機會。以往四十年來最常用以治療潛伏性結核病的藥物，就是 isoniazid，但其治療需要使用九個月之久，而且會有發生肝毒性的風險，再加上目前結核菌株對於 isoniazid 的抗藥性較 rifampin 高許多，使得此種治療方式有許多的臨床顧忌。但相反的，連續使用四個月的 rifampin 來治療潛伏性結核病，有著許多的好處：有效、低毒性、便宜、而且病患接受度高。但雖然發生肝毒性的機會較低，rifampin 仍然會有造成肝炎的副作用，特別是在 B 型肝炎和 C 型肝炎盛行的台灣地區，故使用 rifampin 是否會造成更高比率的肝毒性需要進一步臨床的收案研究。

目前本子題規劃可具體執行之研究重點及執行內容為：

1. 針對結核菌素皮下測試或 γ 型干擾素測試陽性之結核病暴露者預

防性地投予四個月的 Rifampin

本計畫旨在針對結核病的暴露者，包括病患家屬和醫護人員，先利用結核菌素皮下測試和 γ 型干擾素試劑檢測，對於任一檢驗呈現陽性反應者，將進一步隨機分成兩組，一組接受 rifampin 治療，另一組則不使用任何預防藥物，所有的實驗者將接受追蹤觀察，以探討結核病的發生率以及 rifampin 的預防效力。

(二) 結核病治療藥物研發

世界衛生組織有鑑於全球結核病流行情況日益惡化，多重抗藥性結核氾濫，自 1993 年開始積極在各國推廣都治 (DOTS, Directly Observed Treatment, Short course) 策略，希望在觀察員嚴密的監督下，確保病人服下每劑藥物，如期治癒，並避免抗藥性細菌的產生，保護抗結核藥物的效力。世界衛生組織認為，在一個沒有抗藥性結核或其發生率極低的地區，都治可以使結核病的治癒率達到 95%。但是都治治療結核病藥物處方複雜、療程過長：至少需要六個月的連續治療，且當病人併有愛滋病毒感染或處於明顯免疫功能不全狀態時，服藥期可能需要延長至少三個月；而伴有矽肺症的病人，也需延長二至三個月。因此有必要能設計一套較傳統結核病療程縮短時程卻仍然有效的新療法。

在接受肺結核藥物治療的病患中，臨床上以肝毒性為最常見的藥物副作用。多數的第一線抗結核藥物，例如：isoniazid (敵癆剋星)、pyrazinamide (敵癆新邁)、rifampin (立復黴素) 及 ethambutol (孟表多) 等都有導致肝毒性發生的潛在不良反應。由於療程過長加上須按規定服用之藥物處方複雜，以及藥物副作用等導致病人順服性差，致使標準療法-都治未盡完美。因此，研究發展低副作用及長效抗結核藥物新劑型即成為提高結核病防治效果之重要方向。因此有必要探討結核病副作用發生之機轉研究及開發低副作用及長效抗結核藥物

新劑型，或是開發第一線藥物的新複方。目前本子題規劃可具體執行之研究重點及執行內容為：

1. 新抗結核病複方製劑之研究與開發

本計畫旨在改善劑型以提升 Rifampicin 之 BA，由於此為目前 FDC 製劑所面臨的最大課題，且製劑上仍有許多細節，足以影響藥物的療效與安定性等，值得我們去發覺與建立解決辦法，因此本計畫著重在開發新劑型，以突破 Rifampicin 之 BA 下降的障礙，並提升藥物之安定性與療效，以能發展出適合國人使用的三合一或四合一抗結核 FDC 製劑藥物，並貫徹直接監督短程治療的方式，杜絕抗藥性結核病的氾濫，以期增進全民的健康福祉。

2. 抗結核藥物 Pyrazinamide 及 Ethambutol 毒性機轉與改善之研究

本計畫旨在了解抗結核藥物 pyrazinamide 及 ethambutol 的代謝途徑及其毒性機轉，並設法改善 pyrazinamide 及 ethambutol 的毒性，擬以化學合成、生物轉化或體外酵素反應等方式取得 pyrazinamide 及 ethambutol 之代謝物，並由此了解 pyrazinamide 及 ethambutol 的代謝途徑。取得這些代謝物後，以適當的動物模式搭配生理功能測試法，如大白鼠肝炎動物模式搭配半乳糖測肝剩餘功能單點法 (Galactose Single Point method, GSP)，用這些代謝物直接給予大白鼠或以代謝酵素抑制劑給予已有肝炎的大白鼠這些方式，來研究 pyrazinamide 及 ethambutol 的毒性機轉，並研發低副作用 pyrazinamide 及 ethambutol 新劑型。

3. 低副作用抗結核藥物 Isoniazid 之研究與開發

本計畫旨在研究國人不同基因型對抗結核藥物導致副作用的機轉；研究可能導致抗結核藥物副作用的危險因子；開發低副作用新抗

結核藥物，針對種最常用之第一線抗結核藥物 isoniazid（敵癆剋星），研究其造成副作用之可能機轉，並依據此機轉提出可能的解決方法、治療之建議及開發低副作用新抗結核藥物。

（三）結核病治療方式評估與研究

目前結核病在治療用藥上面臨許多臨床上急待解決之問題，我國感染具 MDR-TB 的病人十年間爆增近十倍，從過去只占結核病人的 0.2%，升至 2.1%。大部分的 MDR-TB 和病患的服藥順從性有關包括不規則服藥、服藥期間不足就自行停藥、選擇性服藥等，而增加結核菌產生藥物耐受性的機會；除此還有醫生投藥處方錯誤等問題都是造成 MDR-TB 的原因，而造成治療的窘況，病人也更難痊癒。

此外，臺灣亦是 B 型及 C 型肝炎的盛行區，粗略估計每年至少有 2,000 名到 3,000 名慢性肝病患者需接受抗結核藥物治療，因此在這些病患身上所可能發生的肝毒性是不可忽視的醫源性疾病。本研發團隊發現有 4 種 CYP2E1、6 種 NAT2 及 1 種 GSTM1 的單一核苷變異(SNP)發生頻率均高於百分之三十，在如此高發生率的基因變異，是否有可能造成國人在使用 isoniazid 時毒性代謝物的產生及排除能力有所不同，進而使某些基因型的國人有較高的 isoniazid 引起的肝毒性，因此，除了必須對使用 isoniazid 所引發肝副作用的風險做進一步評估，以提出臨床治療建議外，應進一步由臨床上分有無肝毒性兩組進行比較，比較基因上之差異，與病毒性肝炎造成肝毒性之影響，以及兩種因素之交互作用，來解答國人高結核病藥物肝毒性的原因。

另外臺灣又是 B 型及 C 型肝炎的盛行區，粗略估計每年至少有 2,000 名到 3,000 名慢性肝病患者需接受抗結核藥物治療，因此在這些病患身上所可能發生的肝毒性是不可忽視的醫源性疾病。

而最近有不少文獻報告首先在中國北京地區被發現的北京型結核菌，好發於亞洲各國，如香港、泰國、越南、新加坡、馬來西亞等國。雖然北京型結核菌在我國的流行情形尚未有完整的報告，但由於

兩岸交流頻繁及歷史背景，北京型結核菌在臺灣應存在已久並造成新進傳播 (recent transmission)，此型結核菌對臺灣民眾的影響不容忽視。由於許多研究報告發現北京型結核菌具有特別之臨床表現，且與多重抗藥性結核菌有密切的關聯，因此分析本土型之北京型與非北京型結核菌的抗藥性，比較其臨床表現與治療反應，對我國結核病的防治工作具有重大的意義。

本子題本年度先以評估抗結核藥物副作用以及發現結核菌致病基因為主。目前本子題規劃可具體執行之研究重點及執行內容為：

1. 代謝酵素基因型對抗結核藥物 Isoniazid 之藥動學及副作用影響研究

本計畫旨在進行 NAT2、CYP2E1 及 GST 基因型的篩檢，廣泛收集調查國人重要基因型，並了解這些基因型對經 NAT2、CYP2E1 及 GST 代謝的抗 TB 藥物在藥動學方面的影響，最後即可再根據這些結果提出治療結核病人用藥上的建議。

2. 使用標準抗結核藥物加上 Moxifloxacin 可以縮短開放性肺結核病患痰塗片陰轉的時間

本計畫旨在針對開放性肺結核病的患者，隨機分成兩組，在治療的前兩個月中，實驗組除了使用標準抗結核藥物以外，再加上 moxifloxacin；對照組則僅使用標準抗結核藥物，最後分析兩組病人痰液塗片陰轉以及培養陰轉的時間是否不同。

3. 宿主基因特異性與肝炎病毒感染對抗結核藥物引發肝毒性之影響與重要性

抗結核藥物造成肝毒性之機轉不明，可能之原因包括：B 型或 C

型肝炎之感染；藥物代謝基因之表現。本計畫旨在研究藥物代謝有關基因學及免疫因素與國人常見的B型與C型肝炎對抗結核病藥物肝毒性之重要性，以及這些因素之相互影響進行研究。

4. 臺灣地區北京型結核菌感染之分佈現況、臨床表現及治療反應評估

本計畫旨在蒐集六家醫院結核菌檢驗室所分離之結核菌株，進行間距寡核酸分型法 (Spoligotyping)，並根據基因型結果建立臨床病人資料庫，獲知台灣地區北京型與非北京型結核菌株對第一線抗結核藥物的抗藥比例，分析兩者初發抗藥性和獲得性抗藥性之現況，並依結核菌的基因型評估其臨床表現與治療反應，並探討基因分型在結核病防治的角色，將可遏止主要基因型菌株的蔓延。

計畫主題三、新型抗結核病疫苗研發

卡介苗 (bacille Calmette-Gue' rin; BCG) 作為結核病疫苗至今，BCG 已經證實可有效地預防結核性腦膜炎及擴散性粟米狀結核病，但在預防一般肺結核或具多重抗藥性肺結核的效果則不盡令人滿意。近年來在世界各國的研究結果顯示，傳統減毒性卡介苗的免疫效果常常因人而異，有效性可由 0 到 80% 不等，其對個體疫苗感受性及保護力差異也相當大。除了有效程度的疑慮外，接種傳統減毒性卡介苗還會影響結核菌素試驗的判讀。根據 WHO 的估計，每年全球至少會有八百萬新病例發生，且大約有三百萬人因結核病而死亡，其中超過 95% 個案皆發生於開發中的亞洲及非洲國家。目前，結核病也是臺灣地區罹患人數最多且死亡人數最多的法定傳染病，尋找更適當又比傳統減毒性卡介苗有效的結核病疫苗是國內與西方科學家亟待合作努力的方向。

以遺傳工程的技術進行重組 BCG 疫苗的研究隨著肺結核候選疫苗 MTB72F/AS02A 的發現，暫時露出一道曙光，但目前皆尚在研發階段，因

此仍未能使用於臨床上病人的預防接種；且據國外研究發現，抗藥性結核桿菌使得研究醫學界在開發重組 BCG 疫苗上更為複雜，且亞洲黃種人個體與歐洲白種人個體對於傳統減毒 BCG 疫苗之保護力及感受性差異很大，這也可從結核病是臺灣地區罹患人數最多，且也是死亡人數最多的法定傳染病窺知。因此，國內醫學界實應在建立新型 BCG 疫苗之研發上急起直追，才能確實解決國人肺結核病擴大流行的根本問題。目前本子題規劃可具體執行之研究重點及執行內容為：

1. 新穎性重組卡介苗疫苗之開發與整合

本計畫旨在藉由實驗室建立成熟之 BCG 基因重組技術與 BCG 基因疫苗研發設備，與國內外重組結核病疫苗研發團隊合作，進行多組重組肺結核基因疫苗的開發與產製，並在體外及體內動物實驗中針對人類肺結核保護力進行評估與其預防機轉之研究。

肆、工作項目成果

(一)各子計畫研究成果重點摘述

■ 診斷技術

1. 成功研發可快速診斷結核病的高敏感度檢測試紙：

已成功研發應用 PCR-ICT (immune- chromatography test) 技術之結核菌檢測裝置，由臨床痰檢體收集至肺結核菌檢出時間，約在四小時內(傳統鑑定需 1-2 個月)，並具高敏感度(97%)、特異性(99%)與成本低(約自動儀器的 1/20)等優點，操作簡單方便，可立即應用；目前已申請台灣新型專利與申請美國發明專利中。

2. 成功測試肺結核及其抗藥性檢驗試劑：

可利用 27 個結核菌特殊抗原篩選 aptamer (DNA 型之抗體)，其靈敏度可達 10 pM 以上，且已挑選 4 個 TB 潛隱性抗原以製成 aptamer 晶片，目前已可正確鑑別出是否感染結核菌。

能成功利用 Molecular beacon 可於痰塗片檢體上快速鑑別 MTB 與 NTM，整個流程可於兩小時內完成，靈敏度高於傳統 AFS 法。

3. 成功研發具簡單、便捷、費用低廉方法，可立即應用於臨床常規檢驗之用之檢測抗藥性之分子診斷技術：

已成功建立 LAMP-PCR ELISA 及 Therm ELISA 方法來診斷

MDR-TB 及 XDR-TB，並分別對 isoniazid、rifampin、amikacin 及 Fluoroquinolones 之抗藥性，得到的敏感度分別為 92.2%、94.7%和 91.3%、及 92.9%，特異性皆為 100%，本項檢測技術已申請台灣發明專利。

4. 完成偵測結核分枝桿菌相關抗原或抗體之試劑比較：發現以 T-SPOT TB 快速診斷偵測結核分枝桿菌相關抗原或抗體之敏感度（80.8%）較佳，或可及早提供醫師在病因未明等情況下之診斷參考。

■ 藥物研發

1. 發現可改善藥物副作用的抑制劑：amidase 抑制劑 BNPP 及 HUCHE033 可改善 pyrazinamide 的肝毒性。同時，HUCHE033 亦被發現可減少服用 INH 及併用 INH/RIF 所造成之肝損傷。

2. 成功研發出四合一及三合一的新型抗結核藥物製劑：目前正進入人體試驗與專利申請，將可大量減少病人服藥錠數量、提高遵醫囑性。現已提出四合一複方製劑之台灣專利申請；且合作藥廠已購得新對照藥(Rimstar)並新進行四合一複方製劑 biobatch 製造及成品檢驗、溶離等試驗。

■ 疫苗研發

設計出有效產生免疫反應的多重 TB 重組疫苗：現進行 P3 級動物

活體內攻毒試驗，量化疫苗保護效果。

■ 治療方式與流病監測

發現藥物性肝炎的高危險群：患者本身若帶有 NAT2 slow acetylator 基因型或是罹患病毒性肝炎，尤其是 C 型肝炎，較容易產生藥物性肝炎，藉此可預先篩檢並供醫師用藥參考。

提出預防性治療的有效模式：結核病患之家庭接觸者被感染的機率約三成，為優先管理的接觸者。對其給予四個月 rifampicin 預防性治療，初步顯示發病的機率比未接受治療者明顯降低。

提出可提高治療成功率的投藥模式：病患治療頭兩個月除使用標準抗結核藥物外，再加上每日一粒（400 mg）moxifloxacin，結果發現平均痰培養陰轉日，顯著短於未多服用者。

建立結核病患完整臨床資料與血液檢體之資料庫（clinical Bioinformatics and Bio bank）：截至 2010 年 12 月 31 日止，共納入 1284 個肺結核患者和與 640 個接觸者。並發現這 1284 位結核病患中主要都是 65 歲以上的患者；男性的比例較低，在 44 歲以下的族群，女性與男性比率幾乎各佔一半；同時，臨床症狀多為呼吸道症狀，其中以咳嗽最多，佔 59%；至於全身性症狀，則以發燒為最多（29.8%）；而在抗結核藥物治療過程中，副作用相當常見，並有超過四分之一的

人會有皮膚症狀。並藉其監測我國結核菌株之流行趨勢，發現南北分佈有明顯差異。

■ 國際學術成就

世界上第一個釐清抗結核藥物 PZA 的毒性機轉：造成肝毒性來源主要是因其代謝物 Pyrazinoic acid 及 5-OH-pyrazinoic acid 所引起。

(二)各子計畫最新研究成果彙整表

計畫名稱	計畫主持人	階段性成果
計畫主題一：診斷技術研發計畫		
評估從結核病患之痰液和週邊血液利用即時聚合酶連鎖反應及微小定序法和高解析熔點分析法來快速診斷結核桿菌及其抗藥性	盧章智	59 件藥敏試驗為抗性的檢體中，以高解析熔點分析 (HRM)，陽性件數有 14 件，敏感性為 23.7%，特異性為 76.9%，陽性預測值為 82.4%，陰性預測值為 18.2%；而在多位點單點定序(SNP)的部份，58 件測定為陽性，敏感性為 88.1%，特異性為 61.5%，陽性預測值為 91.2%，陰性預測值為 53.3%。
比較三種藉由偵測結核分枝桿菌相關抗原或抗體之試劑快速診斷結核病的準確度	薛博仁	研究顯示，在 IGRA 兩種研究中使用的試劑，TB T-SPOT 針對活動性肺結核有較優異之敏感性及陰性預測值，但由於 IGRA 本身並無法區分潛伏性及活動性肺結核，故在臨床應用上應可協助做為排除活動性肺結核之診斷工具。此外，對於临床上無法區分 TB 或 NTM 之個案，IGRA 可協助臨床醫師做鑑別診斷。
以血液及肋膜積水中 T 細胞對結核菌抗原之反應來診斷結核性肋膜炎	蔡子修	使用 T-SPOT TB 偵測肋膜積水或發炎性積水中 T 細胞活化之程度，可以獲得很強的陽性結果，應可提供醫師在肺外結核等情況下診斷資訊之參考。
全新肺結核及其抗藥性檢驗試劑開發	周正中	1. 完成 TB 抗原晶片檢測平台的開發。 2. 利用 TB 抗原晶片檢測臨床血液檢體，一定程度地鑑別出 TB 不同的感染狀態，特別是「疑似」結核菌潛伏性感染患者。
<i>Mycobacterium kansasii</i> 活化自然殺手細胞細胞毒殺途徑	賴信志	1. 研究成果顯示其 ESAT-6 能增加自然殺手細胞之細胞毒殺能力與活化 ERK1/2 與 JNK MAP kinase 途徑。但仍需進一步驗證其與 TB 感染之相關性。
應用核酸質譜儀快速偵測結核桿菌與抗藥性	俞松良	1. 以核酸質譜儀偵測技術為基礎，建立快速、靈敏度高的偵測平台，目前針對由病人檢體獨立培養出的菌株檢體，結核分枝桿菌的偵測靈敏度可達近 10 個拷貝數左右。 2. 在抗藥性基因的偵測上，目前針對瑞比新 (rifampin, 簡稱 RMP) 抗藥性基因偵測的實驗結果，可以專一性探針偵測 rpoB 基因的特定 81-bp 序列中 80% 的突變，並以訊號強度計算突變比率。
SP110 基因在台灣肺結核患者之基因多型性與肺結核感	顏伯勳	1. 已建立本土 SP110 基因單一核苷酸多型性圖譜。 2. 以核酸質譜儀基因分型平台對所採集到的 300 個肺

計畫名稱	計畫主持人	階段性成果
受性之相關性研究		結核病患及 300 個對照組樣品進行基因分型，目前已完成二重複的 50 個肺結核病患及 50 個對照組基因分型及統計分析。
結核菌的多重抗藥性之分子診斷技術	彭健芳	1. 本研究利用 One-tube LAMP-PCR-hybridization-thermal melt-ELISA 分析對 PZA 具抗藥性之結核菌具抗藥基因 <i>pncA</i> 變異菌株，其敏感性、特異性、檢測效能都可以達到 100%，且具有快速、簡便、正確及便宜等特性。
建立完整的結核病資料庫	陳維昭	1. 藉由電子化資料庫的設計，建立統一收案登錄頁面，以利個案資料彙整查詢。 2. 收集感染發病個案及個案家屬的 DNA、RNA、血清等，配合資料庫的資訊整合以便日後進行大規模的基因分析等研究。 3. 標準化收案流程可進一步落實患者的追蹤及提升結核病患照顧品質。各執行醫院計畫執行小組每週召開討論會議，追蹤臨床診療的過程。
計畫主題二：藥物與治療方式研發計畫		
針對 γ 型干擾素測試陽性之結核病暴露者預防性地投予四個月的 Rifampin	王振源	1. 根據中央傳染病通報系統的資料為準，使用預防性治療的接觸者，發病的機率比未接受預防性治療的接觸者明顯降低。 2. 接觸者被結核菌感染的機會，和接觸者的年紀、暴露的強度、以及指標個案的結核菌量有關。 3. 四個月的 rifampicin 產生肝毒性和血小板降低的機會很小，並沒有嚴重副作用。
新穎抗結核病複方製劑之研究與開發	鮑力恒	1. 開發多種四合一抗結核病藥物製劑，並選擇較具潛力配方與國內符合 cGMP 藥廠合作，完成 biobatch 製造並生產可提供人體試驗之臨床用藥，此臨床用藥亦符合製藥相關規範。 2. 各處方製劑均完成相關藥化性質測試，並進行交叉性動物預試驗，今年度完成 3 批共 20 次動物試驗評估。 3. 選擇最具潛力配方(RIP1051T(Qstar))於今年 9 月份完成 30 人次人體臨床試驗，根據分析之結果顯示，試驗藥(RIP1051T)與對照藥 Rimstar 於人體試驗中之曲線下面積及最高血中濃度之表現均類似，除 rifampicin 之外。

計畫名稱	計畫主持人	階段性成果
抗結核藥物Pyrazinamide及Ethambutol毒性機轉與改善之研究	張溫良	<p>4. 製程專利目前已送至美國、中國大陸及台灣申請。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 由臨床病人服用抗結核藥複方之尿液，顯示不同病人的 Pyrazinamide 代謝物有很大差異，初步結果顯示 Pyrazinamide 的肝毒性與代謝產物 Pyrazinoic acid 及 5-OH-pyrazinoic acid 有關連，需要進一步擴大分析樣本，才能更明確的結論。 2. 由毒理學結果顯示 Pyrazinamide 低副作用劑型 HUCHE010 或 HUCHE033 的安全性很高，適合作為 Pyrazinamide 低副作用劑型的應用。
低副作用抗結核藥物 Isoniazid 之研究與開發	楊東和	<ol style="list-style-type: none"> 1. 成功證實併服 HUCHE033 對 INH/RIF 原型藥物於健康受試者體內的藥物動力學影響並不顯著，併服 HUCHE033 並不會影響 INH/RIF 原型藥物之吸收，故 HUCHE033 是否因降低 INH/RIF 吸收劑量而降低副作用及影響療效之疑慮應可釐清。 2. 成功證實 HUCHE033 在健康受試者體內確實有抑制 CYP2E1 的作用，口服 180 mg HUCHE033 可於體內抑制 CYP2E1 達 60% 抑制率。 3. 成功發現 HUCHE033 在健康受試者體內確實有抑制 amidase 之趨勢。
抗藥性肺結核細菌轉醣酶抑制劑的新藥開發	馬徹	<p>研究結果能針對轉醣酶特性之確立，並進行結構鑑定之步驟並嘗試尋出能作為轉醣酶抑制劑的候選小分子。同時亦已確定富樂黴素對結核菌的效果，並製備了結核菌轉醣酶的重組蛋白、合成可能為轉醣酶抑制劑的小分子並進行生化分析及活性分析、評估小分子對結核菌轉醣酶的抑制性及進行結構鑑定工作。</p>
代謝酵素基因型對抗結核藥物 Isoniazid 之藥動學及副作用影響研究	熊正輝	<ol style="list-style-type: none"> 1. 研究結果發現五個 NAT2 SNP 與 TB drug-induced hepatotoxicity 有關，若帶有其中任一個 SNP 之 TB 病人，相較於未帶者而言，其服用抗結核藥物誘發肝毒性的風險為 1.8 至 2.1 倍。 2. 臨床試驗結果顯示抗 TB 藥物誘發肝毒性可能是 NAT2 酵素活性降低所造成。NAT2 酵素活性低導致代謝途徑改變到 liver toxin 產生較多的 pathways，進而產生抗 TB 藥物誘發肝毒性。
宿主基因特異性與肝炎病毒感染對抗結核病藥物引起肝毒性之影響與重要性	鐘育志 李麗娜	<ol style="list-style-type: none"> 1. 我國結核病患者 C 型肝炎帶原比例較一般人為高 (6-7% 比 2-3%)。 2. 我國結核病病人有 18.9% 發生治療中肝炎，包括

計畫名稱	計畫主持人	階段性成果
		<p>抗結核藥物引起的藥物性肝炎(16.4%)，以及 B 型或 C 型肝炎之急性發作(2.5%)。</p> <p>3. 與抗結核藥物性肝炎有關之危險因素為：(1)末期腎衰竭但尚未做血液透析、(2)NAT2 slow acetylator 基因型、(3)治療前肝炎病毒量高、(4)沒有病毒性肝炎之女性。</p> <p>4. 與抗結核治療中發生病毒性肝炎急性發作有關之危險因素為：(1)末期腎衰竭但尚未做血液透析，(2)男性且治療前肝炎病毒量高。</p>
臺灣地區北京型結核菌感染之分佈現況、臨床表現及治療反應評估	蘇維鈞	<p>1. 台灣南北部結核菌基因型分佈有明顯差異，北部的北京株與荷蘭株盛行率高於南部，而南部的 EAI2_Manilla 株盛行率則高於北部。</p> <p>2. 榮民與北京型結核菌感染有密切的關聯。</p> <p>3. 北部地區與南部地區的北京株的 MIRU-VNTR 基因分型的特性不同，且北部地區的北京株結核菌與中國大陸及日本地區的北京株較類似。</p> <p>4. 與非北京株的病人相比，感染北京株病人第六個月的痰液抹片陰轉率較低，且有統計學上的顯著差異。</p> <p>5. 目前台灣新近傳播的結核菌株大多是北京株，且主要是 modern sublineage。</p>
愛滋病毒感染者合併抗愛滋病毒藥物與抗結核藥物治療藥物動力學與藥物基因型研究	洪健清	<p>1. 研究結果發現帶有 CYP2B6*G516T 和 T516T 的愛滋病毒感染受試者的血中 efavirenz 濃度遠較帶有 CYP2B6*G516G 的受試者來得高。</p> <p>2. 在併有結核病接受含有 rifampin 和 efavirenz 的受試者，使用 600 毫克的 efavirenz 的血中濃度仍然能達到抑制病毒複製所需的濃度，並不影響愛滋病毒感染的控制，並不需要增加到 800 毫克。</p>
計畫主題三：新型疫苗研發計畫		
新穎性重組卡介苗疫苗之開發與整合:基因重組卡介苗疫苗抗人類肺結核桿菌之保護力評估與其預防機轉之探討	李奇峰	<p>1. 進行疫苗動物接種實驗建立，目前已完成動物活體內 BSL2 及 BS L3 結核分枝桿菌標準菌株之小鼠與天竺鼠攻擊試驗模式建立，相關實驗與傳統減毒性 BCG 相較結果，顯示新型重組 TB 多價疫苗具顯著抗人類肺結核桿菌保護力與專一性免疫誘導力。</p> <p>2. 藉由新型的肺結核桿菌疫苗之研發，目前已著手進行美國、台灣及大陸之專利申請。</p>

(三)各子計畫研究產出：國際 SCI 文獻、專利

■國際 SCI 文獻部份(已發表)

序號	計畫產出名稱	產出形式*
1	Dou HY, Tseng FC, Lin CW, Chang JR, Sun JR, Tsai WS, Lee SY, Su IJ, Lu JJ*. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in Taipei. <i>BMC Infect Dis</i> 2008; 8: 170.	期刊
2	Lu CC and Lai HC. Current dilemma and developments in diagnosis of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection. <i>J Formos Med Assoc</i> 2008; 107(5): 353-4.	期刊
3	Wu TL, Chia JH, Kuo AJ, Su LH, Wu TS and Lai HC. Rapid Identification of <i>Mycobacteria</i> from Smear Positive Sputum Samples by Nested PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. <i>J Clin Microbiol.</i> 2008; 46(11): 3591-4.	期刊
4	Jan IS, Chung PF, Wang JY, Weng MH, Hung CC, Lee LN. Cytological diagnosis of <i>Penicillium marneffeii</i> infection. <i>J Formos Med Assoc</i> 2008; 107: 443-7.	期刊
5	Feng JY, Su WJ, Tsai CC, Chang SC. Clinical Impact of <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> W-Beijing Genotype Strain on Aged Patients in Taiwan. <i>J Clin Microbiol</i> 2008; 46: 3127-9.	期刊
6	Dou HY, Lu JJ, Lin CW, Chang JR, Sun JR, Su IJ. Utility and Evaluation of new variable-number tandem-repeat systems for genotyping <i>Mycobacterial tuberculosis</i> isolates. <i>J Microbiol Methods</i> 2009; 77(1): 127-9.	期刊
7	Liao CH, Lai CC, Tan CK, Chou CH, Tasi TH, Hsu HL, Huang YT, Hsueh PR. False-negative results by enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma among patients with culture-confirmed tuberculosis. <i>J Infect</i> 2009; 59(6): 421-3.	期刊
8	Chou CH, Huang YT, Hsu HL, Lai CC, Liao CH, Hsueh PR. Rapid identification of the <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex by an enzyme-linked immunosorbent assay. <i>Int J Tuberc Lung Dis</i> 2009; 13(8): 996-1001.	期刊
9	Chou CH, Hsu HL, Lee LN, Hsueh PR, Luh KT. Comparison of 2 interferon-gamma assays and Roche Cobas Amplicor <i>Mycobacterium tuberculosis</i> assay for rapid diagnosis of tuberculosis among patients with suspected tuberculosis in Taiwan. <i>J Microbiol Immunol Infect</i> 2009; 42(3): 251-7.	期刊

10	Lai CC, Lee TC, Hsiao CH, Liao CH, Chou CH, Tan CK, Wang HP, Hsueh PR. Differential diagnosis of Crohn's disease and intestinal tuberculous by enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma. <i>Am J Gastroenterol</i> 2009; 104(8): 2121-2.	期刊
11	Lai CC, Liao CH, Tan CK, Chou CH, Huang YT, Hsueh PR. Diagnosis of peripheral tuberculous lymphadenitis by enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma. <i>Am J Med</i> 2009; 122(8): e5-6.	期刊
12	Lai CC, Tan CK, Liao CH, Chou CH, Huang YT, Hsueh PR. Diagnosis of pulmonary tuberculosis among dialysis patients by enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma. <i>Nephrol Dial Transplant</i> 2009; 24(8): 2605-6.	期刊
13	Soo PC, Horng YT, Chang KC, Wang JY, Hsueh PR, Chuang CY, Lu CC, Lai HC. A simple Gold Nanoparticle Probes assay for identification of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> and <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex from Clinical Specimens. <i>Mol Cell Probes</i> 2009; 23(5): 240-6.	期刊
14	Liao CH, Chou CH, Lai CC, Huang YT, Tan CK, Hsu HL, Hsueh PR. Diagnostic performance of an enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma in extrapulmonary tuberculosis varies between different sites of disease. <i>J Infect</i> 2009; 59(6): 402-8.	期刊
15	Lee LN, Chou CH, Wang JY, Hsu HL, Tsai TH, Jan IS, Hsueh PR, Yang PC. Enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma in the diagnosis of tuberculous pleurisy. <i>Clin Microbiol Infect</i> 2009; 15(2): 173-9.	期刊
16	Lee MF, Chen YH and Peng CF: Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification in conjunction with ELISA-hybridization assay for molecular detection of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . <i>J Microbiol Methods</i> 2008; 76 (2) : 174-180.	期刊
17	Huang CT, Tsai YJ, Shu CC, Lei YC, Wang JY, Yu CJ, Lee LN, and Yang PC. Clinical significance of isolation of nontuberculous mycobacteria in pulmonary tuberculosis patients. <i>Respir Med</i> 2009; 103: 1484-1491.	期刊
18	Wang JY, Lee LN, Yu CJ, Chien YJ, and Yang PC. Factors influencing time to smear conversion in patients with smear-positive pulmonary tuberculosis. <i>Respirology</i> 2009; 14: 1012-9.	期刊
19	Wu TS, Leu HS, Chiu CH, Lee MH, Chiang PC, Wu TL, Chia JH, Su LH, Kuo AJ, Lai HC. The clinical manifestations, antibiotic susceptibility and molecular analysis of <i>Mycobacterium kansasii</i> isolates from a university hospital in Taiwan. <i>J Antimicro Chemother</i> 2009; 64(3): 511-4.	期刊

20	Wang JY, Wang JT, Tsai TH, Hsu CL, Yu CJ, Hsueh PR, Lee LN, Yang PC. Adding moxifloxacin to anti-tuberculous regimen is associated with a shorter culture conversion time in pulmonary tuberculosis. <i>Int J Tuberc Lung Dis</i> 2010; 14(1): 65-71.	期刊
21	Feng JY, Su WJ, Liu LY, Tsai CC, Chang SC. Radiological presentation of pulmonary tuberculosis infected by the W-Beijing Mycobacterium tuberculosis strain. <i>Int J Tuberc Lung Dis</i> 2009 ;13(11): 1387-92.	期刊
22	Lim CS, Lee CH, Chien YJ, Wang JY, Lee LN, Yu CJ and Yang PC. Culture result of smear-positive sputum samples after 2-months anti-tuberculous treatment. <i>Eur Respir J</i> 2010; 35: 218-20.	期刊
23	Tan CK, Lai CC, Liao CH, Chou CH, Hsu HL, Huang YT, Hsueh PR. Rapid Diagnosis of Active Pulmonary Tuberculosis in the Elderly using Enzyme-Linked Immunospot Assay for Interferon- Gamma. <i>J Am Geriatr Soc.</i> 2009; 57(12): 2361-2.	期刊
24	Tan CK, Hung CC, Lai CC, Liao CH, Chou CH, Huang YT, Hsueh PR. Diagnosis of Active Tuberculosis by Enzyme-Linked Immunospot Assay for Interferon- γ in HIV-Infected Patients. <i>J Acquir Immune Defic Syndr.</i> 2010; 53(4): 546-7.	期刊
25	Lai CC, Tan CK, Lin SH, Liu WL, Liao CH, Wang CY, Wang JY, Huang YT, Lin HI, Hsueh PR. Diagnostic usefulness of enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma for tuberculosis in cancer patients. <i>Scand J Infect Dis.</i> 2010; 42(11-12):851-6.	期刊
26	Lai CC, Tan CK, Lin SH, Liao CH, Huang YT, Wang CY, Wang JY, Lin HI, Hsueh PR. Diagnostic value of an enzyme-linked immunospot assay for interferon- γ in genitourinary tuberculosis. <i>Diagn Microbiol Infect Dis.</i> 2010; 68(3):247-50.	期刊
27	Tan CK, Lai CC, Chen HW, Liao CH, Chou CH, Huang YT, Yang WS, Yu CJ, Hsueh PR. Enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma to support the diagnosis of tuberculosis in diabetic patients. <i>Scand J Infect Dis.</i> 2010; 42(10):752-6.	期刊
28	Mei-Feng Lee, Yen-Hsu Chenb, and Chien-Fang Peng. One-tube loop-mediated isothermal amplification combined with restriction endonuclease digestion and ELISA for colorimetric detection of resistance to isoniazid, ethambutol and streptomycin in Mycobacterium tuberculosis isolates. <i>J Microbiol Methods.</i> 2010; 83(1):53-8.	期刊
29	Shu CC, Wang JT, Lee CH, Wang JY, Lee LN and Yu CJ. Predicting results of mycobacterial culture on sputum smear reversion after anti-tuberculous treatment: a case control study. <i>BMC Infect Dis</i> 2010;10:48.	期刊

30	Lim CS, Lee CH, Chien YJ, Wang JY, Lee LN, Yu CJ and Yang PC. Culture result of smear-positive sputum samples after 2-months anti-tuberculous treatment. <i>Eur Respir J</i> 2010; 35: 218-20.	期刊
31	Chen TC, Lu PL, Lin WR, Lin CY, Lin SH, Lin CJ, Lo WC, Chen YH. Diagnosis and Treatment of Pulmonary Tuberculosis in Hospitalized Patients Are Affected by Physician Specialty and Experience. <i>Am J Med Sci.</i> 2010; 340(5):367-372.	期刊
32	Shih HW, Chen KT, Chen SK, Huang CY, Cheng TJ, Ma C, Wong CH, Cheng WC. Combinatorial approach toward synthesis of small molecule libraries as bacterial transglycosylase inhibitors. <i>Org Biomol Chem.</i> 2010; 8(11):2586-93.	期刊
33	Cheng TJ, Wu YT, Yang ST, Lo KH, Chen SK, Chen YH, Huang WI, Yuan CH, Guo CW, Huang LY, Chen KT, Shih HW, Cheng YS, Cheng WC, Wong CH. High-Throughput Identification of Antibacterials against Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus Aureus</i> (MRSA) and the Transglycosylase. <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry.</i> 2010; 18(24): 8512-29.	期刊
34	Dou HY, Tseng FC, Lin CW, Chang JR, Sun JR, Tsai WS, Lee SY, Su IJ, Lu JJ*. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in Taipei. <i>BMC Infect Dis</i> 2008; 8: 170.	期刊
35	Lu CC and Lai HC. Current dilemma and developments in diagnosis of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection. <i>J Formos Med Assoc</i> 2008; 107(5): 353-4.	期刊
36	Wu TL, Chia JH, Kuo AJ, Su LH, Wu TS and Lai HC. Rapid Identification of <i>Mycobacteria</i> from Smear Positive Sputum Samples by Nested PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. <i>J Clin Microbiol.</i> 2008; 46(11): 3591-4.	期刊
37	Jan IS, Chung PF, Wang JY, Weng MH, Hung CC, Lee LN. Cytological diagnosis of <i>Penicillium marneffe</i> infection. <i>J Formos Med Assoc</i> 2008; 107: 443-7.	期刊
38	Feng JY, Su WJ, Tsai CC, Chang SC. Clinical Impact of <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> W-Beijing Genotype Strain on Aged Patients in Taiwan. <i>J Clin Microbiol</i> 2008; 46: 3127-9.	期刊
39	Dou HY, Lu JJ, Lin CW, Chang JR, Sun JR, Su IJ. Utility and Evaluation of new variable-number tandem-repeat systems for genotyping <i>Mycobacterial tuberculosis</i> isolates. <i>J Microbiol Methods</i> 2009; 77(1): 127-9.	期刊

■國際 SCI 文獻部份(已接受)

序號	計畫產出名稱	產出形式*
1	Sun JR, Dou HY, Lee SY, Chiueh TS, Lu JJ*. 2010. Epidemiologic studies of Beijing strains of Mycobacterium tuberculosis from Taipei and other Asian Cities based on MIRU profiles. APMIS. (Accepted)	期刊
2	Su WJ, Feng JY, Chiu YC, Huang SF, Lee YC. Role of two-month sputum smears in predicting culture conversion in pulmonary tuberculosis. Eur Respir J. 2010.	期刊

■專利部分

	專利名稱	申請國別	申請號	證號	狀態
1	結核病檢測裝置	台灣	台灣專利申請號： 098217066	中華民國專利證號： 新型第 M374057 號	已取得
2	鑑定結核分枝桿菌及結核分枝桿菌複合體的探針及其方法	台灣	台灣發明專利申請號： 098122884		審查中
3	鑑定結核分枝桿菌及結核分枝桿菌複合體的探針及其方法	美國	美國專利申請號： 12/644, 963		審查中
4	一種偵測微生物的方法	台灣	中華民國專利申請號： 098113030		審查中
5	An improved process for preparation of anti-tubercular combination and pharmaceutical composition prepared therefrom	美國	申請號：12/846, 476		審查中
6	抗肺結核藥物之製程改善	台灣			申請中
7	抗肺結核藥物之製程改善	中國大陸			申請中
8	低副作用之異菸鹼醯胺 (Isoniazid, INH) 新複方	中國大陸	96101545		申請中

9	低副作用之異菸鹼醯胺 (Isoniazid, INH)新複方(2)	中國大陸	97141522		申請中
10	低副作用的异烟碱酰胺新复方		PCT/CS2008/001353		申請中
11	Lee CF, Yu DS and Chang SY. Cancer BCG DNA Vaccines, US patent No. US7, 605, 139 B2, 2009.	美國	US7, 605, 139 B2		申請中
12	Lee CF, Yu DS and Chang SY. DNA 癌症疫苗, 2010.	台灣	台灣發明專利申請 號：093123143		已取得

(三)國際交流及人才培育

為能使結核病研發專業人才素質得以提升，且與國際接軌，總計畫補助專業人才出席國際學術會議及辦理國際研討會，並邀請國外講者來台演講，除了可增加本國研究人員與國際專業人士之交流，同時也將國外目前對於結核病防治成果及策略應用於本計畫中。

一、補助人才參加國際研討會

本計劃於九十七年度共補助兩名研發人員參與法國/巴黎/第 39 屆國際抗癆聯盟世界年會(39th Union World Conference on Lung Health)(2008/10/14-22)，本次會議聚焦在多重抗藥性及廣泛抗藥性結核病 (multidrug/extensive drug resistant tuberculosis)的疫情報導及防治政策、愛滋病與結核病共同感染(TB HIV co-infection)、以及如何落實院內(health care facilities)和社區(community)的感染控制，這些皆是台灣地區結核病防疫上須重視的防疫要點，能瞭解並收集國際間相關的資訊，相信有很大的幫助。

此外，並外聘國際結核病防治專家來台指導，分享成功經驗或新進技術本年度與感染協會共同辦理一場國際研討會 (12/2)，邀請國

內外結核病防治專家蒞臨指導，其講題涵括基礎臨床研發至防疫實務，由本計畫總主持人陳維昭副會長及賴信志研究員共同主持，講者及講題分別如下：

Ruwen Jou	Taiwan	MDR-XDR TB
Oliver Yoa-Pu Hu	Taiwan	Drug treatment and toxicity
Chen-Yuan Chiang	IUAT	Global epidemiology of tuberculosis: prospects for control
Wing Wai Yew	Hong Kong	Update on Tuberculosis, 2008

期能透過本活動之執行，培養具國際觀之結核病防治專業人才，亦使其成為傳達國際經驗的橋樑與種子、引進結核病防治之新知，強化我國結核病診斷技術與治療用藥研發能力，未來方能落實解決我國結核病擴大感染與臨床診斷暨治療面臨之困境。

此外，於九十八年度亦補助一名研發人員參與中國大陸/北京/第二屆亞太地區國際抗癆聯盟年會（2nd Union Conference, Asia Pacific Region）（2009 9/8-13），由於亞太地區，目前結核病最重要的課題便是多重抗藥性／廣泛抗藥性結核病（multidrug/extensive drug resistant tuberculosis）的快速散播，因此，本次大會主要著重在相關疫情及防疫政策的報導。而在會議中，中國第一次在國際會議上公開說明結核菌抗藥性的國內調查初步資料分析，由於個案數目相當的多，相信會是未來台灣地區以及世界各國結核病防疫上重要的參考資料。另外，於十二月初，也即將有另外兩名研發人員參與墨西哥/坎昆/第40屆國際抗癆聯盟世界年會（40th Union World Conference on Lung Health, Cancun, Mexico, 2009 Dec. 2 -8），相信將對我們的防治研發工作有很大的助益。

2、九十九年國際研討會

為能使結核病研發專業人才素質得以提升，同時也為響應「324世界結核病日」，並和各界分享「結核病防治研發整合型計畫」累積3年的研發成果，總計畫於今年三月與台灣結核病醫學會、中華民國防癆協會共同舉辦「2010世界結核病日研討會」。會中除邀請中央研究院翁啟惠院長對「抗藥性結核病的解決」發表演講外，並針對「結核病防治與流行病學趨勢」、「結核病早期診斷及疫苗研發」、「結核病治療」等三大主題，邀請「結核病防治研發整合型計畫」研究團隊之專家發表「台灣結核病的流行現況」、「新型診斷方法」、「抗結核病新藥」、「新型疫苗」等方面的研究成果。同時，也以「結核病十年減半的公共衛生、臨床治療與技術研發策略」為主題，邀請衛生署張上淳副署長、中華民國防癆協會陸坤泰理事長、台大醫院余忠仁醫師、疾病管制局周志浩副局長、亞洲大學邱尚志教授，以及台灣結核病醫學會李仁智理事長共同辦理一場座談，由各專家學者自學界、民間及政府部門等不同觀點，針對未來防治工作的發展提出規劃方向與建議，並進行互動與交流。當天共有近三百位關心結核病防治的專家學者及醫護、公衛領域等相關人員共同與會，相信對於台灣的結核病防治議題，提供各界更多交流的機會。

伍、結果與討論

本結核病防治研發整合型計畫分為三個計畫主題，分別為「結核病診斷技術研發」、「抗結核藥物與治療方式研發」、及「新型抗結核病疫苗研發」。另為能使結核病研發專業人才素質得以提升，且與國際接軌，亦由總計畫執行「國際交流與人才培育」做為本整合計畫培養具國際觀之結核病防治專業人才，傳承國際經驗，並引進結核病防治之新知之橋樑。

以下即分別說明各主題之具體執行研究結果與討論：

計畫主題一、結核病診斷技術研發

本計畫主題共包括四個子題，分別為「潛伏感染者早期發現之診斷」、「理想結核病診斷工具研發」、「抗藥性結核病診斷工具研發」、以及「建立完整結核病資料庫」，其具體執行研究結果與討論分述如下：

(一) 潛伏感染者早期發現之診斷

1. 評估從結核病患之痰液和週邊血液利用即時聚合酶連鎖反應及微小定序法和高解析熔點分析法來快速診斷結核桿菌及其抗藥性

本計畫擬研發從結核病患者之痰液與週邊血液直接偵測結核菌及其抗藥性之研究，主要可分為兩部分，第一部分擬採取周邊血的白血球，尤其以吞噬細胞為主，來偵測細胞內之結核菌，萃取其核酸進

行巢狀及時聚合酶鏈鎖反應 (Nested real-time PCR)；第二部分則是偵測對第一線抗生素產生抗藥性之結核菌基因，進行多位點微小定序法 (mini-sequence)，本計畫自中國醫藥大學附設醫院的檢驗醫學部細菌室收集了 595 名懷疑為開放性結核病患者的痰液檢體，並萃取痰液檢體內的核酸進行 mpt64 和 IS6110 巢狀即時聚合酶鏈鎖反應，之後將實驗結果和細菌室結核菌培養的檢驗數據作比較。其中有 48 名為 NTM，結核菌培養陽性有 83 名，陰性 464 名。以傳統結核菌培養結果為黃金標準，分別比較並計算 IS6110 與 mpt64 即時聚合酶鏈鎖反應的敏感性、特異性、陽性預測值和陰性預測值。

分析 IS6110 的部份，83 件細菌培養為陽性的檢體中有 42 件 IS6110 陽性，41 件為 IS6110 陰性；其餘 512 件細菌培養陰性的檢體中僅有 4 件為 IS6110 陽性。而在分析 mpt64 方面，83 件細菌培養陽性的檢體中，有 39 件 mpt64 陽性，44 件為 mpt64 陰性；其餘 512 件細菌培養陰性的檢體中也同樣僅有 4 件為 mpt64 陽性。將上述的實驗數據作進一步的統計，IS6110 偵測結核菌的敏感性 50.6%，特異性為 99.2%，陽性預測值為 91.3%，陰性預測值為 92.5%。而 mpt64 的部份，偵測結核菌的敏感性 47%，特異性為 99.2%，陽性預測值為 90.7%，陰性預測值為 99.2%。結果顯示無論是利用 IS6110 或 mpt64 nested real time PCR 方法應用於結核病人之早期診斷，兩者的偵測結果似

乎都差不多。

直接檢體法所萃取之 DNA 樣本數共有 97 件。比較臨床病人 *M. tuberculosis* 菌種培養之結果與 IS6110、mpt64 兩種不同標記的分子生物學偵測方法，在 97 件樣本中，菌種培養為 *M. tuberculosis* 共有 37 株，non-*M. tuberculosis* 共有 13 株、陰性共有 47 株。其中 29 株培養結果為 *M. tuberculosis* 之 DNA 檢體以 IS6110 序列進行 TB 菌種確認者均為陽性，以 mpt64 nested real time PCR 進行 TB 菌種確認 30 株為陽性；47 株培養結果為陰性之 DNA 檢體以 IS6110 序列進行 TB 菌種確認者有 6 株為陽性，以 mpt64 nested real time PCR 進行 TB 菌種確認 5 株為陽性；13 株培養結果為 non-*Mycobacterium tuberculosis* 菌株之 DNA 檢體以 IS6110 序列進行 TB 菌種確認者有 1 株為陽性，以 mpt64 nested real time PCR 進行 TB 菌種確認 1 株為陽性。將上述的實驗數據作進一步的統計，IS6110 偵測結核菌的敏感性 78.4%，特異性為 88.3%，陽性預測值為 80.6%，陰性預測值為 86.9%。而 mpt64 的部份，偵測結核菌的敏感性 81%，特異性為 90%，陽性預測值為 83.3%，陰性預測值為 88.5%。

本年度的研究重點，在於使用即時聚合酶連鎖反應快速偵測臨床診斷為結核菌感染的病患痰液中萃取出之結核菌核酸。若呈現陽性反應，再以此核酸檢體進行高解析熔點分析(High Resolution Melting)

和多位點單點定序(Multiplex mini-sequencing)來快速診斷其可能具有的抗藥性結果。

由臨床初步懷疑感染結核菌病人的痰液檢體中，抽取痰液內的結核菌DNA，再使用即時聚合酶連鎖反應擴增，應當可偵測到非常微量的結核菌核酸。並另外收集97件臨床痰液檢體，直接抽取其DNA，以細菌培養結果為黃金標準，評估ProbeTec及mpt64即時聚合酶連鎖反應兩種分生診斷方法和分析其敏感性及特異性。

此外，本研究針對結核病第一、二線抗生素之抗藥基因設計專一性引子來增幅結核菌抗藥性基因片段，並利用高解析熔點分析法作初步偵測基因片段上有無 SNP 的情形。接著統計常見的突變位點來設計專一性的探針，最後將多組探針置於同一反應管進行多位點單點定序來偵測確認 SNP 的基因位點，並以此結果來評估檢體實際的抗藥情形。以 Isoniazid 為例，59 件藥敏試驗為抗性的檢體中，以高解析熔點分析(HRM)，陽性件數有 14 件，敏感性為 23.7%，特異性為 76.9%，陽性預測值為 82.4%，陰性預測值為 18.2%；而在多位點單點定序(SNP)的部份，58 件測定為陽性，敏感性為 88.1%，特異性為 61.5%，陽性預測值為 91.2%，陰性預測值為 53.3%。

2. 比較三種藉由偵測結核分枝桿菌相關抗原或抗體之試劑快速診斷

結核病的準確度

本計畫利用體外免疫診斷試劑，間接利用血液檢體檢測病患是否罹患結核病，比較 QuantiFERON®TB Gold、T-SPOT TB、及 M. tuberculosis Antigen ELISA 三種方法對於快速診斷結核病之準確度。

從結果分析中發現 T-SPOT TB 的敏感度較 QuantiFERON®TB Gold 為佳，分別為：80.8% 與 67.5%；特異度的結果亦同。目前應用在臨床上，陽性預測值已達 88%，且檢驗時間只需兩天，至少可以縮短一週的等待培養時間。

本研究配合台大醫院就診病患診斷為疑似結核病患者做週邊靜脈採血檢查：配合臨床疑似結核感染因而就診及住院個案進行檢驗，期望提早確認是否感染的可能性；應用在臨床上，陽性預測值已達 88%，且檢驗時間只需兩天至少可以縮短 1 週的等待培養時間。而對分枝桿菌培養確定為結核病之受試者，IGRA 檢測陽性個案持續追蹤採血，時間為第六個月、滿一年、一年六個月、兩年，觀察是否可能會隨治療過程產生有意義的免疫反應結果。由於僅少數個案產生 IGRA 檢驗陰轉反應，預計將進一步分析反應血漿中 biomarker 及 IGRA 變化程度。

在共病症研究部份，糖尿病個案之分析中，共有 84 個案懷疑為 TB

者納入此研究分析，其中51 (60.7%) 個案為TB確診病例，T-SPOT TB 之敏感度為 84.3%，特異性 66.7%，陽性預測值為79.6%，陰性預測值為73.3。在腫瘤個案部分，共有81位懷疑為TB個案者納入此研究分析，研究結果顯示T-SPOT TB在solid cancer有較好的sensitivity (87.1%) 及陽性預測值 (84.4%)，而hematologic cancaer則有較好的特異性 (85.7%) 與陰性預測值 (90%)。另外在年齡分布探討，結果發現年紀大的病人會對T-SPOT TB sensitivity 造成影響 (p=0.046)。

(二) 理想結核病診斷工具研發

1. 結核菌標準化核酸分子及血清抗體及抗藥菌株之快速檢測系統之開發及運用

本計畫擬發展一個 TB 快速檢測系統，縮短檢測時間，節省經費並提高敏感度跟特異性。此系統包含(i) 結核菌核酸快速檢測系統，(ii) 結核菌血清 SPR 快速檢測系統，以及 (iii) 肺結核菌抗藥性快速檢測系統。

結核分枝桿菌基因體 DNA 萃取試劑的研發，初步的成果確立含 Triton X-100 或 NP40 的 Tris buffer 以 95°C，加熱 30 分鐘的方式，可有效萃取出 genomic DNA 進行 PCR 增幅反應，並且沒有殘存活菌的疑慮，惟未來仍需進一步評估試劑的穩定性，以便達到長時間的儲

存或運輸的最佳溫度及保存時間。

在結核菌檢測部分，則以 IS6110 及 Rv3618 基因區段為標的，進行 Multiplex nested PCR-ICT 的方式來鑑定 *M. tuberculosis* complex，並從中區別出 *M. tuberculosis*。目前已利用約 1500 例的臨床痰檢體進行測試，並以傳統培養及生化鑑定作為黃金標準，其結核菌診斷之敏感度、特異性、偽陽性與偽陰性分別為：95.5%、97.9%、2.1%與 7%；最低可偵測出的細菌量為大約 1 至 10 個。

在血清免疫研究部分，目前進行十一種重組 TB 抗原的設計與純化，先以 Western blotting 及 ELISA 評估出具有潛力的抗原，惟多數的抗原仍需繼續修改純化的方式以提高溶解度。未來將進一步篩選數個有潛力的抗原，並應用在 SPR biosensor 之新平台，研發出另一款快速、簡單之血清免疫技術。

2. *Mycobacterium kansasii* 活化自然殺手細胞細胞毒殺途徑

近期研究發現 NK 細胞具有記憶性，且顯示 NK 細胞對於辨識及防衛 *Mycobacterium tuberculosis* 感染具重要角色，然其中機制仍然不清楚。本計劃針對此問題，擬探討 NK 細胞在處理結核菌之 RD-1 區域 coding 之分泌蛋白之辨識，辨識後引起之訊號傳遞，合成並釋放 perforin, granzymes 及 granulysin, 以及 cytokines 之產生等將加以釐清，藉以將此類特殊分子進一步開發成為 active MTB 甚或潛

隱性病人之生物標記。

本計畫研究發現堪薩斯分枝桿菌所造成的慢性肺部感染與結核分枝桿菌所造成的肺結核相似，本研究中，利用此菌作為研究對象，我探討並發現人類自然殺手細胞株，NK92 細胞具有殺死致病細菌-堪薩斯分枝桿菌之現象。進一步研究其毒殺的機制得知，此致死作用是藉由 NK92 細胞與堪薩斯分枝桿菌的直接接觸所造成。穿孔素和顆粒溶素在其中扮演重要角色，且其中作用的機制是通過活化 NKG2D/NCRs, ERK, JNK 及 p38 MAPK 的訊息傳遞路徑所進行。

3. 以血液及肋膜積水中 T 細胞對結核菌抗原之反應來診斷結核性肋膜炎

本研究累計共收案 253 個，仍以肋膜積水個案最多，133 位個案臨床診斷為肺結核感染，當中 112 位 T-SPOT 陽性，敏感度為 84.2%，120 位臨床診斷非結核菌個案，T-SPOT 陰性為 98 位，專一度為 81.7%。

隨個案族群不同敏感度、特異度略有區別，如 TB meningitis 方面敏感度高達 100%，TB pericarditis 及 intestinal tuberculosis lymphadenitis 為 93%，TB peritonitis 則為 45%。

由於 TB T-SPOT assay 的偵測值代表致敏化淋巴細胞的數目以及分泌 Gamma 型干擾素之量，因此我們假設，在結核性肋膜炎或肺外結

核的病人，由於局部的致敏化淋巴細胞數目應很多，活性也很強，若抽取肋膜積水或發炎性積水，以 ESAT-6 及 CFP10 抗原去刺激積液中的 T 細胞，可由肋膜積水分離之淋巴細胞得到很強的陽性結果，計畫研究亦證實這樣的假設，未來可提供臨床醫師對於結核性肋膜炎或肺外結核診斷的輔助資訊。

(三) 抗藥性結核病診斷工具研發

1. 全新肺結核及其抗藥性和潛伏性感染檢驗試劑開發

由於不同感染歷程的結核菌會表現出如同條碼般不同的抗原組合，本計畫擬發展靈敏的檢測方法，希望利用 aptamer (DNA 版本抗體) 的篩選技術，直接從血液中偵測特定結核菌抗原的表現高低來區別不同的感染狀態，以便早期篩選出潛隱性肺結核感染的患者。

目前本計畫已將 27 個結核菌潛隱性抗原基因選殖到表現載體，完成 20 個重組蛋白的表達，篩選出 7 個可溶性蛋白，完成 4 個潛隱性抗原蛋白 (共計 2240 個 aptamers) 並製成 aptamer 晶片。此晶片可同步分析 2 個健康人與 2 個結核病患的血液樣本，並採用主成分分析法 (Principal component analysis)，初步測試所得到的數據顯示，無須事先經由免疫 PCR 將目標蛋白放大，直接利用病人血清，藉由主成分方法分析晶片數據，即可正確地從血液檢體鑑別是否感染肺結核。

另外關於 Molecular beacon 螢光鏡檢法技術改良部分，經幾次實驗發現，抹片先經由 AFS 染色後，會干擾後續其它螢光染劑的呈色，大為減低螢光訊號強度，故若以裸眼觀察恐怕無法清楚辨識。

2. 結核菌的多重抗藥性之分子診斷技術

本計畫利用 One-tube LAMP-PCR-restriction ELISA-hybridization assay 之方法，目前共收集 222 株結核分枝桿菌，其中包括 1 株 *M. tuberculosis* H37Rv，52 株全部對抗生素具感受性的菌株，以及 169 株具各種型別抗藥性菌株。本方法與 MGIT-960 藥物敏感性試驗系統進行比較，分析其對 isoniazid、rifampin、amikacin 及 Fluoroquinolones 之抗藥性，得到的敏感度分別為 92.2%、94.7%和 91.3%、及 92.9%，特異性皆為 100%，最後檢測效能分別為 95.2%、98.6%、98.6%、和 99.3%，本計畫所採用之 One-tube LAMP-PCR-restriction ELISA-hybridization assay 對變異熱點的檢測精準度極高，並已將之申請台灣發名之專利。

由於造成抗藥性的基因變異熱點分佈不固定，有些變異熱點無法以有限探針加以辨識，且需對已知的突變點進行設計，因此對所分析的抗藥基因突變熱點的種類、數量與偵測範圍，將會有所限制。

(四) 建立完整結核病資料庫

1. 建立完整的結核病資料庫：包含病患臨床表現、治療反應、宿主因子、以及結核分枝桿菌菌株

本計畫已建置一網路資料庫，統一收案登錄之介面，以利個案資料彙整與查詢，內容包含有關病人臨床表現、實驗室檢查結果、影像學、治療經過與反應的電子資料，並且規則收集儲存病患血液、相關之血清、DNA 與 RNA 檢體；同時並收集個案家屬的血液檢體，以便日後進行大規模的基因分析等研究。

截至 2010 年 12 月 31 日止，共納入 1284 個肺結核患者和與 640 個接觸者。並發現這 1284 位結核病患者中主要都是 65 歲以上的患者；男性的比例較低，在 44 歲以下的族群，女性與男性比率幾乎各佔一半。在其他系統性疾病方面，不管是納入研究的受試者或是未納入研究的結核病患者當中，最常見的都是惡性腫瘤（239, 18.6%）、糖尿病（97, 7.5%）、慢性腎衰竭（68, 5.3%）、以及肝硬化（29, 2.3%）這四種。

目前成立資料庫資源管理委員會，並進行各醫院之間的協調溝通，討論資源共享等問題，此部份未來仍將持續進行。

計畫主題二、新的抗結核藥物與治療方式研發

（一）結核病預防性投藥研發

1. 針對結核菌素皮下測試或 γ 型干擾素測試陽性之結核病暴露者預防性地投予四個月的 Rifampin

本計畫共有來自 244 個家庭的 583 位家屬接受相關免疫反應檢測，其中來自 132 個家庭的 176 (30.2%) 位受試者結果陽性，其餘 406 位結果陰性。初步分析顯示，年齡層越大的族群，被結核菌感染的機會也就越大，由小於二十歲的接近 13%，增加為大於八十歲的 73%。這種隨著年齡陽性率增加的趨勢，不管在男性或女性受試者，都可以發現。所有接受篩檢的接觸者當中，一共有 32 個 T-SPOT TB 陽性受試者加入預防治療組且持續接受追蹤，75 個加入對照組且持續接受追蹤。治療組中所有個案皆已服藥完畢。有一位受試者在服藥接近滿第二個月時因為嚴重皮膚過敏而停藥。除了一位受試者在用藥一個月後的 GOT 超過正常範圍 (47 IU/mL)，餘者肝功能檢查以及血液學檢查均正常。根據追蹤檢測以及疾病管制局全國傳染病通報系統的資料，截至 2010/09/31 為止，目前 T-SPOT TB 檢測陰性、或是接受預防治療的家庭接觸者，都沒有人發生活動性結核病；但 T-SPOT TB 檢測陽性而未治療這一組有九位發病 (*chi-square test* 的 *p* 值為 <0.001)。

接觸者被結核菌感染的機會，和接觸者的年紀、暴露的強度、以及指標個案的結核菌量有關，使用四個月的 rifampicin 雖然輕微肝

功能異常的機會（3%），但沒有肝指數超過正常值兩倍以上的個案，總而言之，接觸者暴露之強度，仍舊是影響結核菌感染的重要因素。長時間、或者是近距離的暴露，例如同住一個房屋、或甚至同一個房間，感染結核菌的機會可以接近一半。而指標個案的結核菌量越大，感染率也就越高。而使用四個月的 rifampicin，並沒有嚴重副作用的發生，輕微肝功能上升的機率為 3%。然而，雖然在中央傳染病通報系統的資料中，接受預防性治療的個案，發病的機率明顯的比未接受預防性治療的接觸者低，但因為是否發病並非經由主動偵測來診斷，這樣的統計結果，依舊無法確定四個月預防性 rifampicin 真的可以有效地預防活動性結核病的產生。不過，在我們研究持續追蹤的個案當中，分析的結果顯示雖然未達統計學上的顯著差別，但仍有趨勢顯示預防性治療具有保護作用。相信只要有更多的追蹤個案，應該可以達到統計學上的意義。

（二）結核病治療藥物研發

1. 新抗結核病複方製劑之研究與開發

本計畫著重在開發新劑型以突破 Rifampicin 之生體可用率下降的障礙，並提升藥物之安定性與療效。

本實驗室已與國內符合cGMP藥廠合作研發複方四合一抗結核病藥物雙層錠的處方研發及試製。利用雙層錠來解決Rifampicin 在合

併製劑中的 Bioavailability (BA) 下降及 Isoniazid 與 Ethambutol 之合併製劑容易吸濕受潮的問題。各試製處方均以 WHO 建議劑量 (pyrazinamide 400 mg、rifampicin 150 mg、isoniazid 75 mg 和 ethambutol hydrochloride 275 mg) 完成四合一雙層錠試製。

本研究團隊開發之三合一複方製劑，是以目前在國內唯一核准上市的三合一製劑 Rifater 為對照藥品，但是 Rifater 的相關成份劑量與世界衛生組織的規定不盡相同。而四合一複方製劑部分，先前是以在國內唯一核准上市的三合一製劑 Rifater 加上一顆 ethambutol 400 mg 做為對照藥品，但於先前所購得在歐盟所上市四合一藥品 Rimstar 做為對照藥品。於完成 20 次的動物試驗結果後，選定經處方修正試製後的 RIP080813T、RIP081231T 做為試驗用藥，並陸續完成三期交叉性的人體預試驗，來確認製劑配方組成，以供日後進行正式人體的生體相等性臨床試驗的依據。並同時申請四合一製劑之製程方面專利

而實驗分析方面，本實驗室已建立 LC/MS/MS 之分析及確效方法，可於人類及狗血漿中同時分析 isoniazid、rifampicin、pyrazinamide 及 ethambutol 四種藥品成分。本分析方法在人類及狗血漿所使用的含量範圍內線性關係良好，可準確地於十分鐘內分析血漿中四種主成分藥物在血漿中的藥物濃度，快速判斷結果，有利於檢

品分析及進一步修正處方再進行試製。為確保分析方法的穩定性，於人體試驗前亦完成分析方法之確效(包括間/同日內安定性分析、短期室溫安定性、分析期間安定性及冷凍解凍安定性等)。基於去年度(98年)結果，於今年度(99年)修正 RIP080813T 處方並另製造 3 批四合一處方製劑(RIP1051T(Qstar)、RIP091224T、RIP100114T)，藉由檢驗其相關藥化性質(包括含量分析、均一度試驗、安定性分析、崩解試驗及溶離度試驗等)及完成共 20 次動物(狗)預試驗評估。認為處方 RIP1051T 試製成品為較有潛力之藥物。該雙層錠成品重量為 668 mg、硬度 10~11 kg/cm²、崩散 6 分 40 秒、含水率 2.16%；其中成分 Rifampicin 於 pH4.5 及 6.8 buffer 的溶離比對，f2 值分別為 39.7 及 40.2；成分 Isoniazid 於 pH4.5 buffer 的溶離比對，f2 值為 34；其他成分則在各 pH buffer 之溶離百分率平均值在 15 分鐘內藥物溶出率已大於 85%，故不計算 f2 值，顯示批號 RIP1051T 試製與 Rimstar 之物理性質已非常相近。

計畫於本年度為執行人體臨床試驗，預計至少完成30人次。本實驗室修正之前處方經相關藥化試驗及動物預試驗，選出 RIP1051T(Qstar)為最終藥物，於9月份完成RIP1051T及Rimstar共30人次生體相等性臨床人體試驗，統計分析資料顯示，試驗藥(RIP1051T(Qstar))與對照藥Rimstar於4種目標成份(isoniazid、

rifampicin、pyrazinamide及ethambutol)之曲線下面積(AUC_{0-t}、AUC_∞)並無統計上差異，其90%信賴區間均在80%~125%之間；最高血中濃度(C_{max})亦無統計上差異，其90%信賴區間亦為在80%~125%之間，除rifampicin於試驗藥(RIP1051T)之C_{max}較對照藥Rimstar稍偏低之外。綜合上述，試驗藥(RIP1051T)與對照藥Rimstar於人體試驗中之曲線下面積及最高血中濃度之表現均類似，除rifampicin之外。依據此人體臨床試驗結果，預期未來可開發出目前國內市場仍缺的四合一抗結核病第一線藥物。

2. 抗結核藥物 Pyrazinamide 及 Ethambutol 毒性機轉與改善之研究

本計畫針對Pyrazinamide及Ethambutol主要代謝物進行肝細胞與眼睛細胞之毒性試驗。首先，於肝保護實驗組測定後得到鼠肝酵素微粒體溶液之amidase活性為 60.7 ± 6.9 pmole/mg protein/min，與PZA控制組之amidase活性(55.1 ± 8.1 pmole/mg protein/min)無顯著差異，且PZA控制組與肝保護實驗組之amidase活性皆顯著高於空白對照組($p < 0.005$)，此外，進一步比較各組內公鼠與母鼠的amidase活性並無顯著差異。另外，在改善Pyrazinamide肝毒性實驗之結果，顯示amidase抑制劑如HUCHE010或HUCHE033將可改善Pyrazinamide之肝毒性。且由藥動學試驗結果顯示添加amidase抑制劑如HUCHE010或HUCHE033不會影響Pyrazinamide的藥動學體及

藥效，此結果將有利於進一步的臨床試驗與應用。而由臨床病人服用抗結核藥複方之尿液，顯示不同病人的 Pyrazinamide 代謝物有很大差異，初步結果顯示 Pyrazinamide 的肝毒性與代謝產物 Pyrazinoic acid 及 5-OH-pyrazinoic acid 有關連，此部分研究尚須需要逐步擴大分析樣本，才能得知明確的結論。而由本團隊經毒理學實驗結果顯示 Pyrazinamide 低副作用劑型 HUCHE010 或 HUCHE033 的安全性很高，適合作為 Pyrazinamide 低副作用劑型的應用。

3. 低副作用抗結核藥物 Isoniazid 之研究與開發

本研究利用第一年計畫所篩選出的CYP2E1抑制劑HUCHE010於動物之急性毒理試驗，確認所篩選出的成分其安全性後，即執行低副作用INH劑型於健康受試者體內藥動學研究，亦利用篩選出來的Amidase抑制劑HUCHE033，來調控Amidase的活性以減少INH併服RIF在動物體內產生的肝毒性。經由所篩選94種中藥純成分及賦型劑，其中11種成分體外抑制Amidase活性可達50%以上抑制率，在動物實驗結果顯示，腹腔內單獨注射INH的小鼠，以及同時注射INH/RIF的小鼠，產生明顯且有意義的AST及GSP的上升。而此肝損傷現象在同時併用HUCHE033所測得肝發炎指標（AST，ALT及GSP）與肝臟組織病理變化結果，皆較服藥組接近正常的小鼠肝臟組織，顯示HUCHE033可減少服用INH以及併用INH/RIF所造成之肝損傷。

目前研究團隊已完成CYP2E1抑制劑HUCHE010大鼠急性毒理試驗，在100 mg/kg, 1 g/kg, 10 g/kg 三種不同劑量，試驗期間均無造成任何動物的死亡，亦無任何臨床症狀的發生。同時，已完成18人次之低副作用INH劑型於健康受試者體內藥動學試驗，INH控制組已執行9人次，HUCHE033-INH實驗組共執行9人次。結果顯示併服HUCHE033其經Amidase代謝之代謝物Isonicotinic acid於服藥後12小時內尿中藥物累積排泄量有低於控制組之趨勢；以及完成26人次低副作用Isoniazid劑型於健康受試者體內對INH相關代謝酵素之影響臨床試驗(血液分析18人次，尿液分析8人次)。結果顯示，併用HUCHE033組，其經CYP2E1代謝之代謝物6-OH Chlorzoxazone之Cmax顯著較低，其6-OH-Chlorzoxazone/ Chlorzoxazone 代謝比亦顯著低於控制組。並經本研究團隊針對已完成12人次之低副作用Isoniazid + Rifampin劑型與傳統劑型於健康受試者藥動學比較研究後(INH控制組共執行6人次，HUCHE033-INH實驗組共執行6人次)，結果顯示併服HUCHE033對INH於健康受試者體內的藥物動力學影響並不顯著。

4. 抗藥性肺結核細菌轉醣酶抑制劑的新藥開發

本研究計畫主要著重於現有抗結核菌模式之探討，以及轉醣酶特性的確立，同時進行結構鑑定的工作並尋找足以作為轉醣酶抑制劑的小分子。在過去數個月中，本研究團隊已確定富樂黴素對結核菌的效

果，並製備了結核菌轉醣酶的重組蛋白、合成可能為轉醣酶抑制劑的小分子並進行生化分析及活性分析、評估小分子對結核菌轉醣酶的抑制性及結構鑑定之研究。

(三) 結核病治療方式評估與研究

1. 代謝酵素基因型對抗結核藥物 Isoniazid 之藥動學及副作用影響研究

本計畫擬進行 *NAT2* (7 SNPs)、*CYP2E1* (5 SNPs) 及 *GST* (1 SNP) 基因型的篩檢，以了解這些基因型對抗 TB 藥物在藥動學方面的影響。本計畫已完成 *NAT2* (7 SNPs)、*CYP2E1* (5 SNPs) 與 *GSTM1* (1 SNP) SNP allele frequency 的分析。在 SNP allele frequency 的分析裡，總共有 535 個 DNA 樣本，在這 535 個 DNA 樣本中有 128 位健康的人，407 位 TB 患者。相信此 sample size 能更準確地預測國人 enzyme 的 SNP allele frequency。在我們所測試的 SNPs 中，全部的 SNPs 都達到了 95% 的 call rate 並且通過了 Hardy-Weinber Equilibrium Test ($\alpha = 0.05$)。將 allele frequency 與其他人種進行比較發現，*CYP2E1* 之 rs2249695 SNP 在 Taiwanese (39%) 和 Chinese (45%) 和 Japanese (42%) 與 Caucasian (21%), Africa-American (22%) 有較大的不同。在 *NAT2* 的 7 個 SNPs 的比較上，其中有 6 個 SNPs 在 Taiwanese 和

Chinese有較大的差異，這些差異都在10個百分比以上。rs1799931的allele frequency 在Taiwanese (16%) 和Chinese (22%)明顯的比Japanese (8%) 高出許多，而Japanese, Caucasian (2%) 和African-American (5%)則較為相似。在*GSTM1* SNP allele frequency的比較上，個族群除了African-American以外都有較相似的 allele frequency。

吾人找出了5個 *NAT2* SNPs 及1個 *CYP2E1* SNP 和 TB drug-induced hepatotoxicity 有顯著的相關性。在*NAT2*即rs1779930 ($p = 0.042$), rs11996129 ($p = 0.027$), rs1961456 ($p = 0.007$), rs1112005 ($p = 0.027$), 與 rs2087852 ($p = 0.018$), 而 *CYP2E1* 為 SNP rs3813865 ($p = 0.022$)。

在 SNP 和 TB drug-induced hepatotoxicity 的相關性的分析上，發現5個 *NAT2* SNPs在TB drug-induced hepatotoxicity有顯著的相關性。本年度累計收集 TB patient 的總人數為428人。已完成基因分析有407人，但扣除掉 B 肝或 C 肝帶原者及 SNP no call 總數超過半數以上，可分析的人數為367人，而其中有56人是被判定有 TB drug-induced hepatotoxicity。同時結果發現若帶有5個 *NAT2* SNPs 其中任一個SNP之TB病人，其服用抗結核藥物誘發肝毒性的風險顯著高於未帶這5個SNPs之TB病人達到1.8到2.1倍。。

2. 使用標準抗結核藥物加上 Moxifloxacin 可以縮短開放性肺結核病患痰塗片陰轉的時間

本計畫將肺結核患者隨機分成兩組，在治療的頭兩個月實驗組除了使用標準抗結核藥物外，再加上每日一粒（400 mg）moxifloxacin；對照組則僅使用標準抗結核藥物。截至2009年10月20日止，共有161位肺結核個案加入臨床研究，實驗組有79人，對照組有82人，目前追蹤期均已超過兩個月。在這161位病人中，有44人退出本計畫，因此最後完成本計畫者共有117人，其中實驗組59人，對照組58人。

結果發現實驗組病人之平均痰培養陰轉日，顯著短於對照組病人（27.5 vs. 36.4天， $p = 0.023$ ）。在X光有空洞的病人中，實驗組（ $n=29$ ）之平均痰培養陰轉日更顯著短於對照組（ $n=21$ ）（33.3 vs. 46.9天， $p = 0.018$ ）。而且，實驗組之2週、4週、6週及8週之痰培養陰轉率均高於對照組（32、56、81、92% vs. 24、43、60、79%）。以兩組2週、4週、6週及8週之痰培養陰轉率作成Kaplan-Meier curves，此兩條痰培養陰轉率曲線之差異的確有統計學上之意義（ $p = 0.025$ ，log rank test）。實驗組與對照組之不良反應發生率及死亡率均無不同。上述結果均有助於降低我國結核病的發生率。

建議繼續觀察實驗組與對照組病人，在完治後兩年間肺結核之再

發率有無不同。同時研究實驗組病人在接受moxifloxacin治療後，由痰中分離出來的結核菌是否會有對moxifloxacin的抗藥性，以及moxifloxacin與其他抗結核藥物之間是否有交互作用(interaction)。計畫已發表文章一篇。

3. 宿主基因特異性與肝炎病毒感染對抗結核藥物引發肝毒性之影響與重要性

本計畫分兩部分探討宿主因素對抗結核藥物引發肝毒性之影響，第一部分探討宿主之基因特異性（高醫團隊），第二部分為宿主是否感染肝炎病毒（台大團隊）。

第一部分宿主之基因特異性與藥物性肝炎之研究，抗結核藥物治療發生肝炎乃依據 International Consensus Meeting 之定義為：病人無肝炎症狀，但 ALT 上升至 \geq 正常值之 2 倍。本計畫延續前三年之研究，截至 2010 年 9 月 30 日為止，共收案 712 位結核病患者，且追蹤期已大於三個月。其中患有病毒性肝炎者共有 135 人(19%)，包括 B 型肝炎 86 人(12.1%)，C 型肝炎 41 人(5.8%)，同時罹患 B 型和 C 型肝炎的有 8 (1.1%)人。

在這 712 位病人中，我們已對其中 360 位病人作了完整的研究，包括完整的臨床病史追蹤，肝炎病毒之系列定量，*NAT2* 以及 *CYP2E1* 基因型的分析。此外，我們亦在其中 134 人作了 *CYP1A1* 基因型的分

析。以下將就所收集個案進行分析，其平均年齡為 57.6 歲(SD: 19.6)，其中男性 232 位(64.4%)。360 位患者中，有 B 型肝炎者有 42 位(11.7%)，有 C 型肝炎者有 24 位(6.7%)。B 型肝炎患者中，有 9 人 e 抗原為陽性。B 型肝炎患者中，治療前肝炎病毒量就高者有 23 位(55%)，在 C 型肝炎患者中則有 16 位(67%)。360 位患者均無酗酒史。HIV 陽性者僅 4 人。在抗結核治療過程中，共有 68 人(18.9%)發生治療中肝炎，其中 59 人(16.4%)的肝炎是抗結核藥物引起的，而以 PZA 引起的最多(表七)。此外，有 9 人(2.5%，全部是男性)的肝炎是病毒性肝炎急性發作引起的，其中 B 型肝炎急性發作有 5 位，C 型肝炎急性發作有 4 位。

基因型分析部分：目前針對 *NAT2* 基因之多型性之分析顯示，在 *NAT2* 基因全部 24 個 polymorphism 中，國人僅在其中之 7 個有 polymorphism。此外，國人 slow acetylator 佔 23% (82/360)，slow acetylator 發生抗結核藥物性肝炎之危險性(26.8%)是 rapid acetylator 之兩倍(13.3%)。

第二部分藥物性肝炎及病毒性肝炎急性發作危險因素之研究。女性發生藥物性肝炎之風險是男性之兩倍。然而在有病毒性肝炎的女性結核病患者中，卻沒有人發生 B 型或 C 型肝炎急性發作，對照男性病毒性肝炎患者有 19%(9/48)發生 B 型或 C 型肝炎急性發作，可知在病

病毒性肝炎患者中，男性反而是高風險族群。由表四亦可看出，治療前肝炎病毒量高者，既是藥物性肝炎之高風險族群，也是病毒性肝炎急性發作之高風險族群。治療前肝炎病毒量高者，有 35.9% 發生藥物性肝炎，而治療前肝炎病毒量低者，只有 11.1% 發生藥物性肝炎，此風險與沒有病毒性肝炎之病人發生藥物性肝炎之機會相當(14.3%)。

NAT2 基因型若為 slow acetylator，則發生藥物性肝炎之風險為 rapid acetylator 之兩倍。至於 *CYP2E1* 之基因型，不論是 *clc1*、*clc2* 或 *c2c2*，都與藥物性肝炎或病毒性肝炎之發生沒有關係。進一步以多變數分析法分析，則發現抗結核治療中發生藥物性肝炎之危險因素為：

1) 末期腎衰竭但尚未做血液透析，2) *NAT2* slow acetylator 基因型，3) 治療前肝炎病毒量高，4) 沒有病毒性肝炎之女性。而抗結核治療中發生病毒性肝炎急性發作之危險因素為：1) 末期腎衰竭但尚未做血液透析，2) 男性且治療前肝炎病毒量高。

總結上述結果，我國結核病病人，約有 8.2% 治療後會發生抗結核藥物性肝炎。*CYP2E1* rs6413432 與 *NatII-TaqI-Rs1961456* 此二 SNP 和藥物性肝毒性有相關。年齡大於 65 與有 GPT 上升達 3 倍或以上者相關，但並沒有更容易發生 GPT 上升達五倍或以上。本研究結核病病人約有 11.09% 合併患有慢性 B 型肝炎，B 型肝炎患者顯著增加抗結核藥物肝毒性的發生($P=0.04$)。本研究結核病病人 7.9% 合併患有慢

性 C 型肝炎。與我國健康成人中 C 型肝炎之盛行率(0.6~2.5%)相比，我國結核病病人合併患有慢性 C 型肝炎之百分比顯然較高。我國結核病病人，約有 13.6% 抗結核藥物產生皮疹反應者 90 人。目前結果顯示 NatII-TaqI-Rs1961456 與 GST 之 genotype 與皮疹有相關之趨勢。

4. 臺灣地區北京型結核菌感染之分佈現況、臨床表現及治療反應評估

本研究計畫為前瞻性建立結核病人完整之臨床資料庫平台，以分析北京型結核菌在臺灣地區的分佈情形、臨床表現與治療反應，並探討基因分型之臨床角色與對診治結核病的影響。目前總計累積台北榮民總醫院、台北萬芳醫院、彰化基督教醫院、署立台南胸腔病院、高雄醫學大學附設醫院、花蓮慈濟醫院等六家醫院之新診斷培養陽性結核病患者共1272位，收集結核菌株共920株，其中823株已進行完整間距寡核酸分型法 (Spoligotyping) 基因型分析，包含北榮300株、萬芳醫院47株、彰基101株、台南胸腔病院84株、高醫267株、慈濟醫院24株，可供基因型流行病學分析。而在現有的823株結核菌株中，北京型347例(42.4%，含25例Beijing like strains)，非北京型476例(57.6%)。非北京型中主要基因型分為EAI2_ Manilla 84例(10.2%)，H3 75例(9.1%)，U 36例(4.4%)，T1 30例(3.6%)，本土型 190例(23.1%)。臨床表現及治療反應評估方面，目前可供分析之個案共823例，其中北京型347例 (42.4%)，非北京型476例 (57.6%)。本研究發

現在北京型菌株感染的病人中，有較高的比例為榮民（33.4% vs. 11.1%, $p < 0.001$ ）。此外北京型菌株感染的病人也有趨勢顯示可能較易合併胃切除術後（4.1% vs. 1.2%, $p = 0.06$ ）與男性（78.8% vs. 73.3%, $p = 0.07$ ）。雖然兩組病人的平均年齡是接近的，但若分析不同年齡組的北京株比例，可以發現北京株的比例在小於20歲與大於80歲的組別比例最高，在40~60歲的組別比例最低，而且呈現有意義的差距。在臨床的症狀表現上，我們發現感染北京株結核菌與非北京株結核菌的病人，不論在呼吸道症狀或是全身性症狀皆是類似的，但有趨勢顯示感染北京株的病人較少出現慢性咳嗽的症狀（52.3% vs. 60.1%, $p = 0.07$ ）與較多咳血的症狀（20.3% vs. 15.2%, $p = 0.06$ ），完全無症狀的病人的比例也是類似的。目前有抗藥性資料的菌株共有801株，整體而言，第一線抗結核藥物的抗藥比例或是多重抗藥性結核菌(MDRTB)的比例上，北京株與非北京株的結核菌株都是類似的，並沒有特別增加抗藥性的情形。

在治療反應部分，感染北京株結核菌的病人與感染非北京株結核菌的病人在第二個月痰液的抹片與培養陰轉率是沒有統計學上的差異，但感染北京株的病人第六個月的抹片陰轉率有顯著的下降（89.4% vs. 93.8%, $p = 0.043$ ），而第六個月痰液培養陰轉率則是沒有差異的。除基因型之影響外，經分析後發現，會影響第二個月培養陰轉率的臨

床因子主要包括了治療前的痰抹片陽性、胸部X光呈現開洞性病灶、與合併rifampicin抗藥。同時亦發現，規則使用都治策略可以有意義的增加病人第二個月的痰培養陰轉率。

總結本研究團隊結果，在流行病學部份，發現台灣目前分佈的結核菌株有其地域上的特性，利用MIRU-VNTR的方法，我們更發現北京株中的modern sublineage很可能在結核病新近傳播感染中扮演重要的角色。在臨床部份，北京株與非北京株的病人在臨床上差異似乎有限，但是榮民身份是一個很重要的相關因子，而感染北京型結核菌的病人在第六個月有較低的痰液抹片陰轉率，發生復發的機會也可能較高，背後的原因與其中牽涉到的宿主病原菌間的交互作用值得我們進一步的研究。另外一方面，針對這些菌株進行廣泛的基因型分析鑑定，有助於釐清同一菌株之內與不同菌株之間的相似性與差異性，除了可以對菌株進行更精確的基因鑑定，也有機會發展其他鑑別力更高的基因鑑定方法甚至是結核菌的診斷方法。

5. 愛滋病感染者合併抗愛滋病毒藥物與抗結核藥物治療藥物動力學與

藥物基因型研究

本研究目的是為了檢視國人感染愛滋病毒與結核病，在同時接受含有rifampicin 的抗結核病藥物與含有efavirenz的抗病毒藥物

時，血中efavirenz濃度受到rifampicin與CYP3A4和CYP2B6的基因多型性的影響。本研究藥物基因學研究方面，針對203位愛滋病患進行CYP2B6、CYP3A4、CYP3A5及MDR1基因多型性檢測，發現與efavirenz代謝相關的CYP2B6之G516T位點，代謝較慢的G/T型或者是T/T型，所佔的比例分別是26.1% 與 3.0%。

在藥物動力學研究部份，本研究團隊發現帶有CYP2B6*G516G的受試者，其efavirenz服用後十二小時藥物濃度的中間值較帶有G516T和T516T的受試者的藥物濃度中間值低：2.52 ppm vs 3.31 ppm ($P=0001$)，顯示帶有G516T和T516T的兩組受試者的藥物代謝較慢，是文獻中所稱的impaired metabolizer。有36位受試者(23.1%)的efavirenz十二小時的藥物濃度高於4 ppm，特別是帶有G516T和T516T的53位受試者(18/53 vs. 18/103, $P<0.05$)。此外，在十七位併用rifampin的受試者中，除了一位在開始使用抗病毒藥物與抗結核藥物的第十六天因結核病併發敗血症在加護病房往生外，其他患者後續的病毒控制也都很好，低於40-50 copies/ml的檢測範圍。根據本研究顯示，帶有CYP2B6*G516T和T516T的愛滋病毒感染受試者服用efavirenz 600毫克十二小時的血中藥物濃度遠較帶有CYP2B6*G516G的受試者來得高。在併有結核病，接受含有rifampin的抗結核藥和含efavirenz的抗病毒藥物的受試者，efavirenz的血

中濃度仍然能達到抑制病毒複製所需的濃度，並不影響愛滋病毒感染的控制，因此並不需依據國外的建議將 efavirenz 每日藥物劑量增加為 800 毫克。

計畫主題三、新型抗結核病疫苗研發

1. 新穎性重組卡介苗疫苗之開發與整合

本計畫主要進行TB基因重組疫苗的開發與產製，並在體外及體內動物實驗中針對人類肺結核保護力進行評估與其預防機轉之研究。實驗並已完成結核桿菌標準株及國內臨床分離之結核桿菌株基因庫建立，依序完成五種不同多片段基因重組TB抗原基因之選殖，達成多價型重組TB疫苗 (multiple recombinant TB vaccines; multi-rTB) 之表現載體建立。同時亦已完成TB重組疫苗的抗原表現與重組多價TB疫苗之體外細胞增生反應、細胞毒殺性反應及巨噬細胞免疫誘導等免疫學評估，於肺結核桿菌IPM001, IPM002, IPM003, IPM004及IPM005等五株重組疫苗株之活體模式免疫誘導Th1/ Th2細胞激素分析比較，發現4株rTB候選基因疫苗株可統計顯著意義增加活體CD4+與CD8+ T淋巴細胞免疫力。另外在多價TB重組疫苗動物接種實驗，已分別於P3實驗室完成動物活體內BSL2及BSL3結核分枝桿菌標準菌株之攻毒試驗，且在評估存活率後犧牲動物，完成量化multi-rTB基因重組疫苗的免疫保護力分析與評估。實驗結果發現重組多價TB疫苗於C57B6

小鼠動物具顯著誘導IL-2及IFN- γ 及TNF- α 增加。此外，於肺臟及脾臟細胞TB培養試驗量化分析中發現，無論是IPM001、IPM002、IPM003、IPM004之重組TB疫苗組或重組多價型TB疫苗組顯著抑制分枝桿菌生長，顯示重組多價型TB疫苗組更具有免疫保護加成效果。

2. 基因重組結核桿菌疫苗抗人類肺結核之保護力評估及預防機轉探討

本實驗已進行多價 TB 重組疫苗動物接種實驗之建立，並分別完成動物活體內 BSL2 及 BSL3 結核分枝桿菌標準菌株之攻毒試驗，且在評估存活率後犧牲動物，完成量化 *muiti-rTB* 基因重組疫苗的免疫保護力分析與評估，相關實驗結果顯示重組多價 TB 疫苗具顯著抗人類肺結核桿菌之保護力。因此，實驗第一階段已完成結核桿菌標準株及國內臨床分離之結核桿菌株基因庫建立，依序完成五種不同多片段基因重組 TB 抗原基因之選殖，達成多價型重組 TB 疫苗 (multiple recombinant TB vaccines; *muiti-rTB*) 之表現載體建立與開發。完成 TB 重組疫苗的抗原表現與重組多價 TB 疫苗之體外細胞增生反應、細胞毒殺性反應及巨噬細胞免疫誘導等免疫學評估，完成五株 TB 重組疫苗株之活體模式免疫誘導 Th1/ Th2 細胞激素分析比較; 實驗第二階段已完成 *muiti-rTB* 候選基因疫苗株於 C57B6 易感受性動物免疫接種及 TB 毒菌力株感染模式建立，並進行小鼠保護力實驗之建立，分別完成小鼠動物活體內結核分枝桿菌標準菌株攻擊試驗之篩選; 本

年度實驗第三階段依管制時程，進一步以多價型 *muiti-rTB* 疫苗於實驗動物模式建立自動化鼻腔噴霧 TB 致病菌攻擊模式，完成疫苗接種效率之保護力量化分析；並進行不同基因型結核分枝桿菌於天竺鼠之 P3 攻擊模式保護力評估。並獲得以下三項結果：第一、完成 rTB 候選基因疫苗株篩選評估，以 10^7 CFU 傳統 BCG Tokoyo strain 疫苗為標準劑量進行對照，試驗數據顯示 *muiti-rTB* 於 P2/ P3 試驗中優於傳統 BCG 疫苗之免疫誘發力。第二、於 C57B6 感受性小鼠及天竺鼠動物之活體內 P3 等級 TB 標準毒力菌株攻擊試驗中發現，*muiti-rTB* 具顯著抗人類肺結核桿菌之保護力。第三、藉由易感受性動物進行活體免疫接種條件建立發現，新型 *muiti-rTB* 候選疫苗株於標準免疫誘發模式中可顯著刺激活體產生 CD4+ 與 CD8+ T 淋巴細胞免疫力；動物活體實驗結果發現重組多價 TB 疫苗於臨床前動物模式具顯著誘導 IL-2 及 IFN- γ 及 TNF- α 增加，相信此一結果應有助於未來計畫推動臨床前期動物試驗之證據，進而加速落實新型重組卡介苗疫苗之開發。

陸、結論

本整合型研發計畫的執行期程共分為三個階段，現為第一階段（97至99年）第三年，本年度研究重點在於延續過去所奠定各項研發計畫之基礎並建構重點研究結果其內容包括：找出製備各項研發工具的方法、製備各項研發工具、測試及確認研發工具之效能及確認各項研發工具之實際可應用性等，所得之研究結論與建議分述如下：

（一）結核病診斷技術研發面

1. 潛伏感染者早期發現之診斷：

(1) 從痰液中獲得足量的結核菌核酸有一定的難度，痰液中菌量的多寡與萃取核酸方式對本法的影響甚大。雖然說即時聚合酶連鎖反應相當靈敏，但若取得的結核菌核酸數量不足以被偵測到，或者核酸片段不完整皆會使得偵測結果為偽陰性，因此如果欲利用聚合酶連鎖反應擴增痰液檢體中，結核菌的基因片段。建議必須以巢狀聚合酶連鎖反應，才有機會擴增出足量的基因片段。多位點單點定序是一個穩定的技術，只要有足量核酸濃度的檢體和謹慎的設計探針，避免形成dimer與產生非特異性產物，此法在臨床上還是有相當的應用價值。此外，由實際針對門診及住院疑似結核病感染病患，收集痰液檢體，進行及時聚合酶連鎖反應，期望能在2-3天內可得到臨床報告。並收集臨床

100 株抗藥性結核菌，進行 High resolution melting analysis 及 Multiplex mini-sequencing 分析，並將基因型結果對照抗藥性表現型，以其將上述兩種方法應用於臨床，告知臨床醫師依據抗藥性評估結果，更改用藥情形。本研究共收集來自中國醫藥大學、台大醫院、疾病管制局和芮弗士檢驗所，總共 798 件痰液檢體中，取其中的 130 件檢體作高解析熔點分析和多位點單點定序，最後取得有效數據 72 件。以 Isoniazid 為例，59 件藥敏試驗為抗性的檢體中，以高解析熔點分析(HRM)，陽性件數有 14 件，敏感性為 23.7%，特異性為 76.9%，陽性預測值為 82.4%，陰性預測值為 18.2%；而在多位點單點定序(SNP)的部份，58 件測定為陽性，敏感性為 88.1%，特異性為 61.5%，陽性預測值為 91.2%，陰性預測值為 53.3%。

在 IGRA 兩種研究中使用的試劑中，今年的累積的結果顯示 TB T-SPOT 確實較 Quantiferon 試劑有較高的敏感度與特異性，且檢驗時間只需兩天，至少可縮短一週的等待培養時間。在 IGRA 兩種研究中使用的試劑，仍各有需改進的及相互配合之處，在臨床患者檢測方面，Quantiferon 試劑的敏感性偏低但特異度確較好，而 TB T-SPOT 確有較高的敏感性相對的也會有較高的偽陽性發生，兩者相互配合的確是較好的診斷方式，但意味著提高較多的檢驗成本，需要依照臨床醫師所需加以調整檢驗的標準。僅少數個案(6/40)產生 IGRA 檢驗陰

轉反應，預計將進一步分析反應血漿中 biomarker 及 IGRA 變化程度。

(2) 在結核病共病症研究部分，糖尿病有無、腫瘤型態與年齡似乎會有不同的預測結果，故此 IGRA 檢驗法對特殊族群可能有其限制性。另未來尚需考量實施本檢驗法之成本效益。

2. 理想結核病診斷工具研發：

(1) 利用 PCR-ICT 生物檢測平台檢測 MTB 與 MTBC 目前僅需二小時左右即可顯現檢驗結果，具成本低廉 (Cheap)、快速性 (Rapid)，可攜性 (Portable) 與準確性 (Reliable) 的優點。經 1500 臨床痰檢體之測試結果顯示，其敏感度、特異性、偽陽性與偽陰性分別為：95.5%、97.9%、2.1%與 7%，最低可偵測出的細菌量為大約 1 至 10 個，目前已申請台灣與美國之發明專利，或許未來有機會技轉於國內外之生技廠商。

3. 利用後天免疫細胞，如自然殺手細胞對病原菌之記憶性來研發特異的 (specific) 生物標記確有其潛力。經由本計畫研究發現其毒殺之機制得知致死作用是藉由 NK92 細胞與堪薩斯分枝桿菌的直接接觸所造成，且其中穿孔素和顆粒溶素扮演十分重要的角色，且其作用的機制是通過活化 NKG2D/NCRs, ERK, JNK 及 p38 MAPK 的訊息傳遞路徑

所進行。未來期能進一步應用這些傳遞路徑以於開發對於 *M. kansasii*/*M. tuberculosis* 感染之新型診斷技術。

(1) 本研究團隊亦利用結核菌特異性抗原 ESAT-6 和 CFP-10 為基礎之體外免疫檢驗試劑，發展偵測人體週邊血液及肋膜積水所分離之淋巴球經特異性抗原刺激產生之 gamma 型干擾素間接證實受試者確實有受到結核桿菌感染，由於 TB T-SPOT assay 的偵測值代表致敏化淋巴細胞的數目以及分泌 gamma 型干擾素之量，因此我們假設，在結核性肋膜炎或肺外結核的病人，由於局部的致敏化淋巴細胞數目應很多，活性也很強，若抽取肋膜積水或發炎性積水，以 ESAT-6 及 CFP10 抗原去刺激積液中的 T 細胞，計畫研究證實可由肋膜積水分離之淋巴細胞得到很強的陽性結果，對於結核性肋膜炎或肺外結核的診斷可能很有幫助，過去並無這方面的研究。

(2) 新型 molecular beacon 應用之原位雜合反應檢測技術，經證實可於培養菌體抹片中快速正確地鑑別結核菌與 NTM，惟抹片經由 AFS 染色後會干擾其他螢光染劑之呈色，大為減低螢光訊號之強度，故臨床應用上似乎仍有瓶頸。

利用 aptamer (DNA 版本抗體) 的篩選技術，目前已製成具 4 個潛隱性抗原蛋白 (共計 2240 個 aptamers) 之 aptamer 晶片，因為大

部分抗原為非可溶性蛋白，無法大量表達純化以篩選出相對應的 aptamer 而轉以血液中潛伏性抗原反應產生的抗體為偵測標的，反向開發出以抗原蛋白晶片為基礎的檢測方法，建立了一個全新的潛伏性肺結核感染檢測試劑平台。根據 79 個臨床血液檢體的測試結果顯示，這個方法似乎一定程度地鑑別出 TB 不同的感染狀態，特別是「疑似」結核菌潛伏性感染患者。未來須進行更大規模的臨床檢體試驗，才能完全驗證這個方法的可行性，且目前的研究方法只使用 25 個結核菌潛伏性感染有關的抗原，故針對健康人和開放性結核病患的檢測靈敏度與特異性無法達到 95% 以上令人滿意的標準。將來若能利用 phage display 或 ribosome display 的技術，從血液中 B 細胞所製造的抗體篩選出不同 TB 感染過程中可能釋放出的結核菌抗原，應能開發出更全面性的 TB 抗原檢測晶片。

(3) 抗藥性結核病診斷工具研發：

應用 One-tube LAMP-PCR-hybridization-thermal melt-ELISA 技術所設計之診斷工具，分析對 pyrazinamide 具抗藥性之結核菌具抗藥基因 *pncA* 變異菌株，其敏感性、特異性、檢測效能都可以達到 100%。証實本研究所採用之 One-tube MP-PCR-hybridization-thermal melt-ELISA 對變異熱點的檢測精準度極高。而目前建立判讀之 cut-off 值為 0.204，且此工具亦屬簡

單、便捷、費用低廉之方法，應可應用於臨床常規檢驗之用結核分枝桿菌抗藥性檢測平台之建構。然而，由於造成 pyrazinamide 抗藥性的抗藥基因 *pncA* 基因變異熱點分佈不固定，並且有些變異熱點無法以有限探針加以辨識，因此限制了所分析的抗藥基因突變熱點的種類與數量與偵測範圍，且本研究亦同時進行其抗藥基因 DNA sequencing 之判讀(其結果為吻合)。此結核菌檢測平台研發成果已進行專利申請(中華民國專利申請號：097127218 「一種快速檢測肺結核桿菌特異性基因之操作平台」)。

4. 結核菌相關資料庫系統建置：

結核病個案追蹤需投入專業人力及建立有系統、有效率的管理資訊平台，故須發展建構一完整檢體蒐集與建檔之網路資料庫，包括臨床診斷資訊、實驗室檢查結果、治療經過與反應，以及個案與家屬的 DNA、RNA、血液檢體，配合資料庫的資訊整合以便日後可進行大規模的基因分析等研究。藉由電子化資料庫的設計，建立統一收案登錄頁面，以利個案資料彙整查詢。除此之外，研究團隊亦會陸續針對結核病診治上重要的議題及如何共享資訊及檢體，並利用所建構的資料庫資源進一步分析研究。

(1) 網路資料庫平台的使用及介面模式若能在使用上取得醫療單位

的共識，則可更有效率的聯結防疫系統的通報功能，加強個案追蹤管理；建立標準化收案流程可使醫師與結核患者更有效的參與治療過程，若搭配正面的醫療政策進行民眾及醫療人員之宣導，將更能有效發揮本資料庫建置之目的。

(二) 結核病藥物與治療方式研發面向

1. 預防性新藥劑組合研發：

(1) 研究發現與結核病患密切接觸者被感染的機率約為三成左右。根據中央傳染病通報系統的資料為準，經觀察一年半，使用 rifampicin 預防性治療的接觸者，發病的機率比未接受預防性治療的接觸者明顯降低；接觸者被結核菌感染的機會，和接觸者的年紀、暴露的強度、以及指標個案的結核菌量有關，且投予四個月的 rifampicin 產生肝毒性和血小板降低的機會很小，並沒有嚴重副作用。此外，若以研究中主動偵測確定發生活動性結核病的個案資料來分析，則預防性治療尚無明顯差異，仍需更多的個案以及持續的追蹤。若當研究結果出現顯著差異時，即預防性治療可有效預防感染結核病，在醫學倫理上是否應考慮停止研究，而思索直接於公共衛生政策面之應用？

2. 抗結核病藥物研發：

(1) 三合一固定製劑實驗方面，目前待第二次的二期交叉性人體預試

驗完成後，即可確認 RFT015 的最佳化表現配方組成，進而做為明年三合一製劑於人體進行生體相等性臨床試驗的試驗藥。在四合一製劑方面，選定試驗藥 RIP080813T、RIP081231T 進行三期交叉性的人體預試驗，待實驗結束即可確認製劑配方組成，進而做為明年度執行正式的生體相等性臨床試驗的依據。

在 PZA 與 EMB 毒性機轉與改善研究中，並已於體外肝細胞(Hep G2) 試驗發現 Pyrazinamide 的代謝產物 Pyrazinoic acid 及 5-OH-pyrazinoic acid 對肝細胞之毒性均比原來藥物 Pyrazinamide 的細胞毒性大，而 5-OH-pyrazinamide 對肝細胞之毒性最小且比 Pyrazinamide 的細胞毒性弱。在 Pyrazinamide 肝毒性動物試驗證明 Pyrazinamide 及 Pyrazinoic acid 均具有肝毒性作用，而代謝酶 amidase 的抑制劑證明 Pyrazinamide 的肝毒性可能代謝成代謝物如 Pyrazinoic acid (PA)及 5-hydroxypyrazinoic acid (5-OH-PA)所造成。在 Amidase 抑制劑對 Pyrazinamide 肝毒性的動物試驗結果結果顯示，加入 amidase 抑制劑會使 Pyrazinamide 的肝毒性降低或消除。同時也發現 amidase 抑制劑如 HUCHE033/HUCHE010 會改善 pyrazinamide 的肝毒性，HUCHE033/HUCHE010 在體外具有頗強的抑制 amidase 活性，可以降低 pyrazinamide 肝毒性，。

臨床 TB 病人尿液進行 PZA 代謝物分析結果，顯示服用

Pyrazinamide 後有嚴重肝毒性病人的尿液 Pyrazinamide 的濃度會隨著肝毒性的嚴重性而降低，而[5-OH-PA/PZA] 會隨著肝毒性的嚴重性而增加，即有肝毒性的病人其 Pyrazinamide 可能被代謝的較多，所含量減少而其代謝物如[5-OH-PA/PZA]增加。由臨床 TB 病人尿液進行 PZA 代謝物分析結果，顯示 Pyrazinamide 的肝毒性可能與 Pyrazinamide 的代謝物如 Pyrazinoic acid 及 5-OH-pyrazinoic acid 的代謝物多寡有關。由於在肝毒性動物試驗 amidase 抑制劑如 HUCHE033/HUCHE010 會改善 Pyrazinamide 的肝毒性，但進一步老鼠肝臟中 amidase 活性分析，未降低 amidase 活性，未如與體外試驗抑制 amidase 活性，故其降低 pyrazinamide 的肝毒性的機制，尚未清楚。急性毒理試驗中大、小鼠投予 HUCHE010 之 100、1,000、10,000 mg/kg 三種不同劑量，在 14 天試驗期間無造成任何動物的死亡，試驗後犧牲動物剖檢，亦無病變或臨床症狀的發生。顯示 HUCHE010 安全性相當的高，有助於將來作為降低 Pyrazinamide 肝毒副作用之劑型應用。

建議將 HUCHE033 或 HUCHE010 合併於 pyrazinamide 作成二合一 (PZA+HUCHE033/HUCHE010)或四合一的劑型，並進行臨床試驗將可開發開發低副作用 pyrazinamide 新劑型，改善病人排斥服用抗結核藥物的意願，病人願意服用抗結核藥物藥，落實結核病防治，降低結核

病患人數，達到結核病防治的目標。

(2) 在低副作用 INH 之研發中，動物實驗結果顯示，HUCHE033 可減少服用 INH 以及併用 INH/RIF 所造成之肝損傷。在 INH 劑型於健康受試者體內藥動學的研究顯示，併服 HUCHE033 並不會影響 INH 之吸收，故 HUCHE033 是否因降低 INH/RIF 吸收劑量而降低副作用及影響療效之疑慮應可釐清。成功證實 HUCHE033 在健康受試者體內確實有抑制 CYP2E1 的作用，口服 180 mg HUCHE033 可於體內抑制 CYP2E1 達 60 % 抑制率；同時並發現 HUCHE033 在健康受試者體內確實有抑制 amidase 之趨勢。

(3) 而在抗藥性肺結核細菌轉醣酶(TGase)抑制劑新藥開發部分，本研究計畫主要著重於現有抗結核菌模式之探討，以及轉醣酶特性的確立，同時進行結構鑑定的工作並尋找足以作為轉醣酶抑制劑的小分子。在過去數個月中，本研究團隊已確定富樂黴素(Moenomycin)對結核菌的效果，並製備了結核菌轉醣酶的重組蛋白、合成可能為轉醣酶抑制劑的小分子並進行生化分析及活性分析、評估小分子對結核菌轉醣酶的抑制性及結構鑑定之研究。

3. 結核病治療方式評估及研究：

(1) 本計畫結果發現國人在3個藥物代謝酵素的13個 SNPs 的

allele frequency 且成功地找出5個 NAT2 及1個 CYP2E1 SNPs 和 TB drug-induced hepatotoxicity 之間有顯著的相關性。同時經由所收集的535個台灣人之 genetic information，而其中128人為健康受試者，另外407人為 TB 患者。在所有的 SNP 中 minor allele frequency 最低為3% (*CYP2E1* rs2070676 及 2515041) 而最高為58% (*GSTM1* rs2071487)。本研究團隊亦發現若帶有5個 NAT2 單一核苷變異其中任一個SNP之TB病人，其服用抗結核藥物誘發肝毒性的風險，顯著高於未帶這5個SNPs之TB病人達到1.8到2.1倍。經由上述基因型在國人的發生頻率達到0.297~0.461，亦即，有兩成多到四成多的TB患者，是屬於服用抗結核藥物誘發肝毒性的高風險群。此外，以 NAT2同時加上CYP2E1之基因組合來看肝副作用之風險，則發現至少有5種組合其風險高過4倍以上，較單一基因的風險又更大了許多。而經由臨床試驗結果顯示 *NAT2* 及 *CYP2E1* 不同基因型的受試者其代謝酵素 NAT2及CYP2E1的活性有顯著的不同。且對於使用含INH藥物之病人，應篩檢高肝副作用風險之代表性基因組合，若確定結核病患屬高肝副作用風險病患則應密切觀察其肝功能變化，另外，也可使用低肝副作用INH複方，避免病人因肝副作用停藥而增加抗藥性的風險。

此外，若與其他種比較後，大多數 SNP 的 allele frequency 在 Taiwan, Chinese 及 Japanese 較相似，理由為這些國家因地理

的關係及環境的相似所面對的 natural selection 會較相同的，另外由於距離近所以有比較多的機會促成 genetic material 的交換。

(2) 在肺結核治療之頭兩個月，使用標準抗結核藥物加上400 mg 之 moxifloxacin，可以有效縮短肺結核病患痰培養陰轉的時間，使肺結核病患具有傳染力之時間縮短，尤其肺部X光片有空洞之患者更為明顯。這種治療方式或有助於降低我國結核病的發生率。建議繼續研究觀察moxifloxacin與其他標準藥物間的交互作用。

4. 我國結核病病人約有 18.9 % 發生治療中肝炎，包括抗結核藥物引起的藥物性肝炎(16.4%)，以及 B 型或 C 型肝炎之急性發作(2.5%)。與抗結核藥物性肝炎有關之危險因素為：1) 末期腎衰竭但尚未做血液透析，2) *NAT2* slow acetylator 基因型，3) 治療前肝炎病毒量高，4) 沒有病毒性肝炎之女性。而抗結核治療中發生病毒性肝炎急性發作之危險因素為：1) 末期腎衰竭但尚未做血液透析，2) 男性且治療前肝炎病毒量高。末期腎衰竭但尚未做血液透析之患者，既是發生抗結核藥物性肝炎之高風險族群，又是發生病毒性肝炎急性發作之高風險族群，因此，在抗結核治療中，須密集追蹤肝功能。同時，其為高風險族群之原因須作進一步研究。同於本研究亦發現女性患者發生抗結核藥物性肝炎之危險性為男性之兩倍(24 vs. 12%)，其原因須作進一步研究。此外，*CYP1A1* 基因之多型性與抗結核藥物性肝炎之

發生可能有關，須作進一步研究。而本計畫亦證實 *NAT2* 基因之 slow acetylator 是國人發生抗結核藥物性肝炎之高危險因子，未來或可做為個人化醫療之參考。

5. 北京型結核菌分佈、治療反應評估之研究

(1) 本計畫四年來之研究結果有如下數項重要發現：(1) 台灣南北部結核菌基因型分佈有明顯差異，北部的北京株與荷蘭株盛行率高於南部，而南部的EAI2_Manilla株盛行率則高於北部。(2) 榮民與北京型結核菌感染有最密切的關聯，與其他臨床因子的相關性則是有限的；(3) 北部地區與南部地區的北京株的MIRU-VNTR基因分型的特性是各自不同的，且北部地區的北京株結核菌與中國大陸及日本地區的北京株較類似。(4) 與非北京株的病人相比，感染北京株病人第六個月的痰液抹片陰轉率較低，且有統計學上的顯著差異，而第二個月的抹片、培養陰轉率與第六個月的培養陰轉率與非北京株病人相比也有較低的趨勢。(5) 目前台灣新近傳播的結核菌株大多是北京株，且主要是北京株中的modern sublineage。以上的發現皆值得進行持續性的觀察與更深入的探討。

另一方面，針對這些菌株進行廣泛的基因型分析鑑定，有助於釐清同一菌株之內與不同菌株之間的相似性與差異性，除了可以對菌株

進行更精確的基因鑑定，也有機會發展其他鑑別力更高的基因鑑定方法甚至是結核菌的診斷方法。藉由本研究之發現，針對特殊基因型結核菌與病患間之交互關係(interaction of MTB and host)，值得作更深入的探討。。

(三) 抗結核病新型疫苗研發面向

在疫苗研發部分，實驗結果發現重組多價 TB 疫苗於 C57B6 小鼠動物具顯著誘導 IL-2 及 IFN- γ 及 TNF- α 增加，亦可抑制分枝桿菌生長，顯示本重組多價型 TB 疫苗組具有免疫保護加成效果。本計畫使用 DNA 疫苗之成本效益較高，製備成本也比較便宜，且因為 DNA 很穩定，DNA 疫苗的儲存也較容易且儲存時間也可較長，未來在臨床上極有進一步應用之價值。本計畫以 10^7 CFU 傳統 BCG Tokyo strain 疫苗為標準劑量進行 proof-of-concept 對照，試驗數據發現我們所發展之基因重組多價型 TB 疫苗於感受性動物的生物安全等級 P2/ P3 試驗中優於傳統 BCG 疫苗之保護力。由於無法取得 GSK 所開發 MTB72F 疫苗，此一結果雖然無法與 MTB72F 疫苗比較，但過去 MTB72F 疫苗在臨床前期研究中顯示該疫苗誘導 CD8(+) 保護力不如預期，且需配合 GSK 專利 AS02B 佐劑合併試驗下在 C57BL/6 小鼠才可提高較好的免疫抗原保護性。GSK 已在歐洲完成該疫苗的臨床 Phase I 安全性和 Phase II 免疫原效力試驗，但 Phase II 參與試驗群體之實驗組與未接種

MTB72F 試驗群體於社區自然曝露之保護力並無統計顯著差異。由於表達 GSKMTB72F 疫苗之重組 mtb32 蛋白具明顯生物毒性，下一階段實驗過程中我們將嘗試納入 MTB72F 於我們的疫苗篩選技術平台，可望解決該疫苗誘導 CD8(+)保護力不如預期之問題。

1. 併發結核病仍是台灣地區愛滋病毒感染者不算少見的感染併發症。如果因為結核病延緩愛滋病毒的控制會增加結核病和其他伺機性感染併發致死的風險。根據世界衛生組織和美國衛生部發布的愛滋病毒感染治療指引顯示，在有結核病的情況下，使用含有 efavirenz 的抗病毒藥物組合是首選處方。但是，因為抗結核病藥物中的 rifampin 會大幅降低許多抗愛滋病毒藥物的血中濃度，潛在威脅影響抗病毒藥物組合的治療成效，因此選擇一個藥物濃度受 rifampin 影響較小，並且仍具有抑制病毒療效的藥物組合，是同時控制愛滋病毒感染和結核病的重要課題。

柒、計畫重要成果及具體建議

本團隊整合包括基礎醫學、公衛與臨床治療各領域之專業人士，為能在五年期程執行結束後，於結核病診斷技術、抗結核病藥物與治療方式以及新型抗結核病疫苗等三個面向進而提升學術效益、臨床效益、經濟效益與科技發現。現將重要且具潛力之研究成果具體建議分述如下：

結核病診斷技術研發部分

1. 目前已研發應用 PCR-ICT 技術之結核菌檢測裝置，由臨床痰檢體收集至肺結核菌檢出時間，約在二小時內。具有高敏感度（97%）與特異性（99%），不比自動化儀器差，優點為成本低（約自動儀器的 1/40），操作簡單方便，可立即應用，對於推廣至全球 TB high burden 國家，如印度、中國及俄羅斯，應有優勢。
2. 初步已完成 Aptamer 晶片之開發與建立 aptamer 篩選步驟與流程，並完成 immuno-PCR 的測試及 TB 抗原晶片檢測平台的開發，其檢測敏感度達 1 pM。同時，利用 TB 抗原晶片檢測臨床血液檢體，可一定程度地鑑別出 TB 不同的感染狀態，特別是「疑似」結核菌潛伏性感染患者。此外，期望能結合醫院和公衛系統，才能收集到定義明確有效的不同組別血液檢體，特別是健康人與結核菌潛

伏性感染患者，倘若未來驗證這個方法的可行性，可用此法事先篩選肺結核潛隱性感染高危險群如結核菌素皮膚測驗和 HIV 陽性患者，以便早期檢測出潛隱結核感染，將能大幅降低肺結核的擴散。

3. 利用 One-tube LAMP-PCR-hybridization-thermal melt-ELISA 之方法與利用整組試劑設計於 96-well microtiter 之 well 內，來判定 pyrazinamide 抗藥性結核菌是否有抗藥基因 *pncA* 基因變異，同時亦建立結核菌的 Isoniazid、rifampin、amikacin 以及 Fluoroquinolones 抗藥性之分子診斷技術，其利用抗藥性相關之基因 (*katG*, *inhA*, *mabA*, *rpoB*, *rrs*, *gyrA* 和 *gyrB*) 發生變異現象來判定該菌株之抗藥性特性，目前已建立判讀之 cut-off 值，屬於簡單、便捷、費用低廉、安全性高、不具放射性，沒有污染問題之方法，並可於 6-8 小時完成檢驗工作、可迅速隔離結核病患並瞭解其菌株之抗藥特性，將可以應用於臨床常規檢驗之用。

4. 利用 QuantiFERON®TB Gold、TB-SPOT 兩種方法進行血液檢查，敏感度與特異性皆為 T-SPOT TB > QuantiFERON®TB Gold。目前應用在臨床上，陽性預測值已達 88%，且檢驗時間只需兩天至少可以縮短一週的等待培養時間。雖然成本較高，但可於評估肺外結核

時，提供醫師診斷之額外參考資訊。

5. 從開放性結核病患者的痰液中萃取結核菌之核酸，直接以高解析熔點分析和多位點單點定序等，分子檢測技術快速預測結核菌的抗藥性情形。此外，倘若多位點單點定序及高解析熔點分析能穩定的轉移至臨床檢驗，可考慮使用此技術來快速預測結核桿菌之抗藥性。

6. 在資料庫建置部分，除了詳細登錄病人臨床資料外，亦包括建立結核菌株的分型。結果顯示病人的系統性疾病，以糖尿病居多 (7.5%)；有 45.6%痰液抗酸性塗片陽性；Isoniazid、Rifampicin、以及多重抗藥的比率分別為 7.5%、1.3%、和 1.0%；發生肝炎的比率有 12.3%。同時，由於結核病患者臨床與實驗室的各種資料在一個單一電子資料畫面中清楚呈現、一目了然，管理者與醫護人員容易全盤掌握，有助於結核病患的管理與追蹤治療。

7. 在菌株分型之探討，發現在台灣北京型結核菌接受治療後的抹片與培養陰轉率與非北京株相比有較低的趨勢，而在所有的菌株中又以 U strain 在培養陰轉率的比率最低；經由本研究基因分型結果顯示，南北地區結核菌基因型有顯著的差異。過去許多報告認為北京型結核菌是國內出現比例最高的基因型，但由本研究結果發現，EAI2_Manilla 型在台灣南部的流行情形不容忽視，今後仍須進行持

續性的監測與更深入的探討。北京型結核菌是我國結核病的重要基因型，尤其在年輕結核病人族群中的比例更是較整體為高，其接受治療後的臨床反應較差，復發率似乎較高，北京株次分型中的 modern sublineage 與新近傳播的相關性，都值得衛生主管單位特別的重視，今後在制訂結核防治政策時，必須針對北京株感染設計適合的方法。另外，北京型在榮民族群的流行，必須建立一套專門的防治策略，其原因也有待日後研究繼續探討。

此外，於執行計畫過程中，由於參與計畫的醫師群及研究人員皆會與個案及家屬詳細說明計畫執行流程及追蹤的必要，有助於患者及家屬對於結核病傳染的認知及對治療必要性的認可，藉此也可加強防疫措施。

抗結核藥物與治療方式研發

值得推薦之績效為世界上第一個釐清 Pyrazinamide (PZA) 之毒性機轉的研究，結果顯示造成 PZA 肝毒性來源主要是由於其代謝物 Pyrazinoic acid 及 5-OH-pyrazinoic acid 所引起。另外本研究亦發現 Ethambutol 之醛類代謝物 (EMAL) 對眼睛細胞的毒性最大，其次為 Ethambutol 本身，而其酸類代謝物 (EMA) 對眼睛細胞的毒性最小。且由毒理學結果顯示 Pyrazinamide 低副作用劑型 HUCHE010 或 HUCHE033 的安全性很高，適合作為 Pyrazinamide

低副作用劑型的應用。此外，由基礎瞭解 pyrazinamide 及 ethambutol 的代謝途徑及與副作用的關係後，將可進一步開發開發低副作用 pyrazinamide 及 ethambutol 新劑型，改善病人排斥服用抗結核藥物的意願，病人願意服用抗結核藥物藥，落實結核病防治，降低結核病患人數，達到結核病防治的目標。

1. 值得推薦的是經由瞭解常用第一線抗結核藥物 Isoniazid 其毒性代謝物造成副作用之可能機轉後，不但有助開發低副作用 Isoziazid 新劑型，亦可進一步教育病人服用 Isoniazid 等抗結核藥物的方式。除此之外，並成功建立以 INH 誘發肝毒性的動物模式與 INH/RIF 誘發肝毒性的動物模式，可同時用來探討單獨或合併使用 CYP2E1 抑制劑，Amidase 抑制劑其對 INH 誘發肝毒性的保護機制，並依據此機轉提出可能的解決方法、治療之建議及開發低副作用之異菸鹼醯胺(isoniazid, INH)新複方，期能有效落實結核病防治，降低結核病患人數，達到結核病防治的目標。

2. 另一值得推薦之績效為已初步研發出三合一與四合一的固定劑量製劑，並完成 30 人次人體臨床試驗。根據分析之結果顯示，試驗藥(RIP1051T)與對照藥 Rimstar 於人體試驗中之曲線下面積及最高血中濃度之表現均類似，除 rifampicin 之外。本實驗室已建立之 LC/MS/MS 之分析方法，可於人類及狗血漿中一次分析四種藥

品成分，且於使用的含量範圍內線性關係良好，可加速結果的研判。由現有四合一製劑的初步成果，所發展出適宜的四合一抗結核 FDCs 製劑，來改善結核病人的服藥順從性，期望能減少抗藥性結核病的發生情況，此外也將利用已建立開發的製藥平台，與減少副作用藥物或治療其他疾病（如：愛滋病等）的藥物結合的方向研發，強化民眾對於國內學界與業界在生技醫藥產業研發能力的信心。

3. 針對 LTBI 的治療，是控制結核病疫情當中很重要的一種方法。藉由研究團隊的結果，將可以進一步了解在台灣之接觸者中結核菌感染的比率大約有三分之一。治療 LTBI 可以有效減少發病率。使用新一代的免疫檢測試劑可以準確預測結核菌的潛伏感染以及未來發病的機會。未來應該更進一步擴大收集進行這樣的研究，藉以收集更詳細資料，擬定正確的公共衛生政策，進一步撲滅結核病。

4. 在治療肺結核患者方面，若在治療的頭兩個月除了使用標準抗結核藥物外，再加上每日一粒（400 mg）moxifloxacin，結果發現平均痰培養陰轉日，顯著短於未多服用者，且在 X 光有空洞的病人中，平均痰培養陰轉日更為顯著，可提高肺結核之治療成功率。另外在預防性投藥的研究中亦發現，目前 γ 型干擾素釋放

試劑檢測陰性、或檢測陽性但已接受預防性治療者，發病的機會明顯低於檢測陽性但未接受預防性治療者，這些結果將有助於降低我國結核病的發生率。

5. 本計畫在 SNP 和 TB drug-induced hepatotoxicity 相關性的分析上，成功的找出了 5 個 *NAT2* 及 1 個 *CYP2E1* SNPs 有顯著的相關性，此成果可被用在 TB 患者之劑量的調整。由於 genotype 的差異，同劑量的藥物對不同的人會有大不相同的藥效和副作用，因此在瞭解了個人在 genetic 上的差異後，最大的目標為 customized medicine 來達到最高的療效和最低的副作用。針對使用含 INH 藥物之病人，應篩檢高肝副作用風險之代表性基因組合，若確定結核病患屬高肝副作用風險病患則應密切觀察其肝功能變化，另外，也可使用低肝副作用 INH 複方，避免病人因肝副作用停藥而增加抗藥性的風險。

6. 由本團隊之研究可藉藥物濃度之檢測可得知當愛滋病毒感染病患合併結核病時，含有 efavirenz 的抗病毒用藥的適當劑量。efavirenz 劑量可以維持愛美日 600 mg，並確保病毒複製的控制不受到因合併 rifampin 影響，如此對於國人結核病與愛滋病合併感染，在不用增加藥物劑量與費用下依然同時達到良好的控制。

7. 而針對末期腎衰竭但尚未做血液透析之患者，既是發生抗結核

藥物性肝炎之高風險族群，又是發生病毒性肝炎急性發作之高風險族群，因此，在抗結核治療中，須密集追蹤肝功能。同時，女性患者發生抗結核藥物性肝炎之危險性為男性之兩倍(24 vs. 12%)，其原因須作進一步研究。值得注意的是，我們亟須進一步研究，為何 B 型或 C 型肝炎之病毒活性高會使抗結核藥物性肝炎之風險增加以及雌激素之代謝有關之 *CYP1A1* 基因，其基因型與抗結核藥物性肝炎之發生可能有關，尚須作進一步研究。同時，本研究結核病人約有 11.09% 合併患有慢性 B 型肝炎，B 型肝炎患者顯著增加抗結核藥物肝毒性的發生(P=0.04)，治療 B 型肝炎患者之結核病應注意肝毒性。除此之外，亦能了解病患特定基因 SNP、病患年紀與患者固有疾病和副作用之發生之相關性，有助於臨床上小心注意藥物副作用產生與個人化醫療之進行。

新型抗結核病疫苗研發

1. 目前已完成TB重組疫苗的抗原表現與重組多價TB疫苗之體外細胞增生反應、細胞毒殺性反應及巨噬細胞免疫誘導等免疫學評估，結果初步發現多價型重組TB疫苗於C57B6小鼠動物可顯著誘導IL-2及IFN- γ 及TNF- α 增加。此外於肺臟及脾臟細胞TB培養試驗量化分析中發現，無論是IPM001、IPM002、IPM003、IPM004之重組TB疫苗組或多價型重組TB疫苗組顯著抑制分枝桿菌生長，顯示

本多價型重組TB疫苗組似乎具有免疫保護加成效果。

2. 新型有效的抗結核病疫苗開發將是未來根除結核病最重要的一環，本基因重組肺結核疫苗的開發可預期將是BCG疫苗的第三次革命，將值得政府繼續支持。

結 語

本整合型計畫為目前已進行至第三年。計畫總主持人除不定期開會討論外，以及期初與期中時，本研發團隊除賴博雄副執行長、專案經理、與計畫管理師亦分別與各計畫主持人進行兩次研究深入訪談外，並透過平時與各研究學者或助理間之溝通協調，以便能確實掌握研究之目標與進展。如前兩項所綜述之具體研究成果，經各計畫主持人共同努力為期兩年之投入研究與探討，大部份的初步成果皆顯示了相當的績效，使得本整合型計畫能有更有深入且豐碩之成果。

截至目前為止，已匯聚三年的研發能量，不少子計畫今年度已有具體的研究結果，本研發團隊亦於2010年三月份配合324世界結核病日，舉辦2010世界結核病日研討會，不但邀集國際知名結核病專家與疾病管制局長官進行兩場大會專題演講，並讓已有相當成績之計畫主持人進行學術成果發表。除上述與會人員外，會議對象亦另外開放邀請國內相關學術研究單位（如胸腔科、感染科醫學會、或其他

相關之學會、協會等)，並開放給產業界與有興趣之社會大眾。期能藉此成果發表會有效達到本整合型計畫之研究成果能與社會各界賢達共同交流、共襄盛舉，並提出相關評論與建議的公開寶貴機會。

本整合型計畫之總目標，即在以結核病診斷技術、藥物與治療方式、以及新型疫苗研發為主要面向，整合基礎學理探討與臨床應，用以產出具體之成果。本研發團隊期能藉此三年的研發基石以發展持續研究之歷程與累積研發能量，定能確保未來產出之效益，故仍須政府相關單位持續性於經費與資源之挹注。而由本研究計畫與團隊之各實證結果顯示，相信在本計畫執行完成時所累計的研發成果，亦能預期未來在實務上能有效協助我國在結核病預防、診斷與治療等方面的推行，落實結核病十年減半的目標。未來仍須配合行政院衛生署「結核病十年減半全民動員計畫」持續規劃下階段整合型研發計畫，方能達成發現病人、完治病人 (Find TB、Cure TB) 之最終目標。

捌、參考文獻

- Bastian, I., Colebunders, R. (1999) . "Treatment and Prevention of Multidrug- Resistant Tuberculosis." *Drugs* 58: 633-66.
- Bloom, B. R., Murray, C. J. (1992) . "Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. ." *Science* 257: 1055-1064.
- Aragon LM, Navarro F, Heiser V, Garrigo M, Espanol M, Coll P. (2006) Rapid detection of specific gene mutations associated with isoniazid or rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using non-fluorescent low-density DNA microarrays. *J Antimicrob Chemother*; 57:825-31.
- Brzostek, A., Sajduda, T. Sliwinski, E. Augustynowicz-Kopec, A. Jaworski, Z. Zwolska, and J. Dziadek. 2004. Molecular characterisation of streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *Int J Tuberc Lung Dis* 8:1032-5.
- Bang, D., Bengard Andersen, and V. O. Thomsen. 2006. Rapid genotypic detection of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 44:2605-8.
- Bloom, B. R., Murray, C. J. (1992) ."Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. ." *Science* 257: 1055-1064.
- Caws M, Tho DQ, Duy PM, Lan NT, Hoa DV, Torok ME, Chau TT, Chau NV, Chinh NT, Farrar J. (2007)PCR-restriction fragment length polymorphism for rapid, low-cost identification of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.*; 45: 1789-93.
- Caws M, Thwaites GE, Duy PM, Tho DQ, Lan NT, Hoa DV, Chau TT, Huyen MN, Anh PT, Chau NV, Chinh TN, Stepniewska K, Farrar J. (2007). Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* causing multidrug-resistant tuberculosis meningitis. *Int J Tuberc Lung Dis*.

2007; 11: 202-8.

Chan RC, Hui M, Chan EW, Au TK, Chin ML, Yip CK, AuYeang CK

Chan, C. H., Woo, J., Or, K. K., Chan, R. C., Cheung, W. (1995). "The effect of age on the presentation of patients with tuberculosis." *Tuber Lung Dis.* 76 (4) : 190-4.

Chan, C. H., Woo, J., Or, K. K., Chan, R. C., Cheung, W. (1995). "The effect of age on the presentation of patients with tuberculosis." *Tuber Lung Dis.* 76 (4) : 290-4.

Chaulk, C. P., & Pope, D. S. (1997). "The Baltimore City Health Department Program of directly observed therapy for tuberculosis." *Clin Chest Med* 18 (1) : 149-154.

Daryl, M., Ralph, H. (1977). "Improving patient compliance." *Medical Clinics of North American* 61 (4) : 879-889.

Kilinc O, U. S., Cakan MDA, Ellidokuz MDH, Ozol MDD, Sayiner A et al. (2002). "Risk of tuberculosis among healthcare workers: can tuberculosis be considered as an occupational disease? ." *Respir Med* 96: 506-510.

Ming-Chih Yu, Kuan-Jen Bai, Jer-Hwa Chang, and Chun-Nin Lee. Tuberculosis Incidence and Mortality in Aboriginal Areas of Taiwan, 1997-2001. *J Formos Med Assoc* 2004; 103: 817-8

Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al: Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 289:150-4, 2001

Ordway DJ, Costa L, Martins M, et al: Increased Interleukin-4 production

- by CD8 and gammadelta T cells in health-care workers is associated with the subsequent development of active tuberculosis. *J Infect Dis* 190:756-66, 2004
- Orme, I. M. (1997) . "Progress in the development of new vaccines against tuberculosis. ." *Int J Tuberc Lung Dis* 1: 95-100.
- Stead, W. W. (1967) . "Pathogenesis of a first episode of chronic pulmonary tuberculosis in man: recrudescence of residuals of the primary infection or exogenous reinfection?" *Am. Rev. Respir. Dis.* 95: 729-745.
- Yu, M.-c., et al., (2000) Impact of Directly Observed Treatment Short-Course for Pulmonary Tuberculosis in Aboriginal Areas. *胸腔醫學*, 15 (1) : 22-28.
- World Health Organization, (2006) . "The Global Plan to stop TB, Actions for life-towards a world free of tuberculosis. " Geneva:.
- World Health Organization, (2006) . The Stop TB Strategy--Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals. WHO/HTM/STB/2006.37. 2006: World Health Organization.
- 王培東 (2000) . "卡介苗與結核菌素測試--曾接種卡介苗，但結核菌素試驗結果為陽性反應，是否需要服用預防性藥物？ " *臺灣醫界* 13 (7) : 27-28.
- 王培東 (2005) . "台北市結核病流行趨勢與防治成效之研究." *內科學誌* 16 (1) : 26-32.

- 白冠壬 (1997). "結核病治療最新趨勢." 慢性病防治通訊 41.
- 江宜平、郭麗芳、陳志榮 (2005). "Detection of Mycobacterial Infection in Paraffin-Embedded Pathologic Tissues by DNA Polymerase Chain Reaction: Comparison with Conventional Histochemical Stain " 中臺灣醫學科學雜誌 10 (1) : 25-31.
- 江振源、許至仁、黃瑞明、林道平、陸坤泰 (2004). "Antituberculosis Drug Resistance among Retreatment Tuberculosis Patients in a Referral Center in Taipei " 臺灣醫學會雜誌 103 (6) : 411-415.
- 行政院衛生署疾病管制局 (2002). "結核病防治工作手冊." 台北：行政院衛生署疾病管制局.
- 吳黃平、花仲涇、于鍾傑、吳紹筠 (2005). "Comparison of Plasma Interferon-Gamma and Antigen 60 Immunoglobulin G in Diagnosing Pulmonary Mycobacterium Tuberculosis Infection " 長庚醫學 28 (11) : 779-785.
- 吳黃平、謝文斌、謝芳貴、花仲涇 (2004). "The Significance of Mycobacterium tuberculosis Antibody, Antigen 60 IgG in Patients with Abnormal Chest Radiography " 長庚醫學 27 (12) : 869-876.
- 呂旭峰、黃志堅、劉嘉又、翟恆煒 (2005). "某醫院病患結核分枝桿菌培養、抗藥性調查與分子醫學檢測." 東港安泰醫護雜誌 11 (4) : 195-205.

- 李仁智、李俊年、索任、姜義新、林智斌、林等義、蔡永川 (2003).
"Drug Resistance of Mycobacterium tuberculosis in Eastern
Taiwan." 慈濟醫學雜誌 15 (4) : 229-234.
- 李原地、曹世明、林克亮、吳秀鴻、余素芳、Bell, W. R. (2004). "
臺灣中部地區分枝桿菌感染藥物敏感性試驗分析." 中山醫學雜
誌 15 (2) : 137-148.
- 李桂珠 (無日期). "結核病院內感染措施." 2006 年 取自 :
<http://203.65.72.43/feng/edu/index-1.htm>.
- 邱志勇、黃健榮 (2004). "結核病院內感染控制." 中華民國兒童胸
腔醫學會雜誌 4 (2) : 134-141.
- 柯景馨、蘇文麟、陳永煌、周稚傑 "醫護人員生物性危害：職業性肺
結核病例報告." 中華職業醫學雜誌 8 (2) : 101-105.
- 胡漢忠、林昌生、曹昌堯、蔡熒煌、謝孟哲 (2003). "Antituberculosis
Drug Overdose-Induced Multiple Organ Failure: A Case Report and
Literature Review." 胸腔醫學 18 (1) : 64-68.
- 胡曉雲、蔡文正、龔佩珍 (2005). "肺結核病患未完成治療原因探
討." 臺灣公共衛生雜誌 24 (4) : 348-359.
- 徐川洲、沈光漢、許正園 (2005). "Delayed Treatment and Management
of Active Tuberculosis in a Medical Center in Taiwan." 胸腔醫學
20 (6) : 517-523.

- 索任 (2003). "臺灣防癆工作回顧." 感染控制雜誌 13(3): 173-179.
- 張智華、王復德 (2005). "肺結核與院內感染." 感染控制雜誌 15(5): 286-292.
- 楊中 (2001.). 從忽視到醒悟--全球結核疫情及其防治. HOPE, 34: 31-36.
- 梁庭繼、盧建泰、凌昌明、李超群、張寶源、李世傑、嚴寶勝、周紹賓 (2003). "Imaging of Renal Tuberculosis in Eastern Taiwan: Correlation with Clinical Course and Different Communities." 高雄醫學科學雜誌 19(6): 271-277.
- 莊志杰、許玫玲 (2004). "臺灣結核病防治政策與相關議題：組織發展與通報政策變革." 臺灣公共衛生雜誌 23(4): 292-296.
- 郭金龍 (2003). "門診結核病檢驗調查." 中華民國醫檢會報 18(3): 33-35.
- 郭金龍、李惠中、葉千涼 (2005). "快速結核菌檢驗與傳統結核菌檢驗方法之比較." 中華民國醫檢會報 20(2): 39-44.
- 陳義龍、許嘉裕、曾誠齊 (2003). "結核菌感染治療藥物的發展." 化學 61(4): 599-609.
- 陳鳳鈴、張嘉蘋 (2005). "運用賦權照顧一位肺結核病患及家屬於手術前後之護理過程." 慈濟護理雜誌 4(2): 96-104.
- 黃青青、索任、楊銘欽、江大雄、林立人 (2003). "高雄縣結核病

- 例改診斷評估及其成本效益分析." 臺灣公共衛生雜誌 22 (5) : 368-375.
- 黃建中、吳玫華、陳盟勳、蘇勳璧、吳和生、周如文 (2006). "臺灣地區醫療院所結核菌檢驗狀況調查." 疫情報導 22 (4) : 241-251.
- 黃偉倫、陳煌耀、陳盟勳、張素英、李翠鳳、陳豪勇、周如文 (2005). "台中某醫院呼吸照護病房疑似結核病院內感染事件之實驗室分析報告." 疫情報導 21 (7) : 515-527.
- 楊大羽、周碧瑟、洪東榮、張文道、胡為雄、王玉濤 (2002). "急診部護理人員罹患結核病之危險性." 中華民國急診醫學會醫誌 4 (2) : 71-81.
- 楊朝凱、林鴻銓、李岡遠、林恕民、余志騰、郭漢彬 (2004). "The Effects of Ciprofloxacin on Chest Radiographic Regression in Patients with Drug Intolerance or Resistant Tuberculosis " 長庚醫學 27 (4) : 292-299.
- 葉宏明、鍾國謀 (2002). "護理之家老年人肺結核--兩病例報告." 院內感染控制雜誌 12 (6) .
- 廖永祥、薛博仁、余忠仁、王淑寬、楊泮池、陸坤泰 (2004). "Drug Resistance Pattern of Mycobacterium tuberculosis in a University Hospital in Taiwan, 1998-2002." 臺灣醫學會雜誌 103 (9) :

671-677.

趙守典 (2005). "結核病的實驗室診斷法以及分子生物學的應用." 臺灣醫界 48 (9) : 20-22.

劉尊榮、陳昶華、蕭如華、楊祖光、蔡人文、馮長風 (2004). "Drug Resistance of Mycobacterium Tuberculosis Complex in Central Taiwan " 微免與感染雜誌 37 (5) : 295-300.

蔡杏鳳 (2004). "結核菌檢驗的最新進展." 中華民國醫檢會報 19 (1) : 71-74.

蔡幸真、廖永祥、陳映蓉、高純琇、余忠仁、陸坤泰 (2004). "Management of Anti-tuberculosis Drug-related Hepatotoxicity: Comparison of the Fluoroquinolone- containing Regimen and Re-challenge with the Standard Regimen." 胸腔醫學 19 (6) : 453-462.

衛生署慢性病防治局 (2000). "88年結核病防治年報." 台北：衛生署慢性病防治局.

衛生署慢性病防治局 (2001). "89年結核病防治年報." 台北：衛生署慢性病防治局.

鄭舒倬、黃婉瑩、莊意芬、劉勝芬、索任、陳重達 (2004). "醫療人員結核菌素測驗陽性之意義." 感染控制雜誌 14(3): 140-149.

謝文斌、林志郎 (2000). "肺結核診治及預防的新進展 " 當代醫學

27 (3) : 67-72.

謝廷徽、陳培哲、高嘉宏 (2004). "結核治療藥物之肝毒性." 當代醫學 31 (7) : 542-548.

謝家如、林麗嬋 (2003). "結核病與個案管理模式." 護理雜誌 50 (2) : 77-81.

羅筱芬、邱豔芬、李茹萍 (1999). "胸腔內科護理人員對肺結核病患的照顧意願及其影響因素之探討." 慈濟醫學雜誌 11 (1) : 61-68.

蘇維鈞 (2002). "結核病診斷技術之最新進展 " 臨床醫學 49: 118-22.

顧淑芳、林永崇、曾修儀 (2005). "護理人員負壓病房照顧肺結核病患之風險評估初探." 中華職業醫學雜誌 12 (3) : 161-167.