

計畫編號：MOHW108-CDC-C-114-000108

衛生福利部疾病管制署 108 年委託科技研究計畫

計畫名稱：利用基因、發炎、藥動等生物標記建構含 rifapentine 之潛伏
結核感染治療引發全身性藥物反應的預測模式

108 年 度/全 程 研 究 報 告

執行機構：國立臺灣大學醫學院附設醫院、臺北市立萬芳醫院、國立
臺灣大學醫學院附設醫院新竹分院、國立臺灣大學醫學院
附設癌醫中心醫院、高雄醫學大學附設中和紀念醫院

計畫主持人：王振源醫師

研究人員：李枝新主任、李孟叡主任、張立禹醫師、黃虹綾醫師、吳
佳蓉小姐、林怡秀小姐、章峻福先生

執行期間：108 年 01 月 01 日至 108 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 320.7 萬元整

*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本
署同意*

目 錄

頁 碼

封面

目錄

壹、 摘要	(3)
1. 中文	(3)
2. 英文	(4)
貳、 本文	(5)
1. 前言	(5)
2. 材料與方法	(9)
3. 結果	(19)
4. 討論	(33)
5. 結論與建議	(36)
6. 計畫重要研究成果及對國家政策應用之具體建議	(37)
7. 參考文獻	(38)
參、經費支用情形	(42)

共 (42) 頁

中文摘要

背景：潛伏結核感染（簡稱 LTBI）的有效治療，是控制結核病疫情重要的一環。3HP 處方雖然較傳統治療方便，在肝毒性上也有較高的安全性，但卻有較高的全身過敏反應（systemic drug reaction、SDR）以及類流感症狀（flu-like symptoms），嚴重可能會低血壓、甚至休克。

方法：在這個前瞻性、多機構的研究當中，針對服用 3HP 之 12 歲以上活動性結核病個案密切接觸者，分析宿主基因多型性（genetic polymorphism）、血中發炎指標以及藥物濃度，與服藥後是否發生全身性藥物反應是否相關，嘗試建構 3HP 引發全身性藥物反應的預測模式。

結果：自 2017/01/01 至 2019/09/25，篩選了 637 確診潛伏結核感染之結核病密切接觸者（包含本年度 212 人）。當中 538 人接受 3HP 治療。到 2019/10/31 之前已有 484 個個案達到治療結果而納入分析，共有 50（10.3%）人發生 SDR。校正臨床特徵之下，*TLR1* 與 *NAT2* 的基因型，與發生 SDR 有顯著相關（風險比：5.04）。校正了臨床特徵、藥物劑量之後，服藥後 24 小時血中 INH/acetyl-INH 的濃度與 SDR 發生的機率有顯著相關（風險比：2.02）。至於服藥前血液中任何一種 inflammatory cytokines 的濃度，都無法預測服藥過程中是否發生 SDR。

結論：3HP 處方產生 SDR 的機率約為十分之一，發生的原因，極有可能與 INH 代謝、*TLR1* 相關免疫機轉有密切相關。

關鍵詞：潛伏結核感染、速克伏、Isoniazid、N-acetyltransferase 2、Toll-Like Receptor 1、全身性藥物反應

Abstract

Background: Effective treatment for latent tuberculosis (LTBI) is an important element for the elimination of tuberculosis (TB). Comparing with traditional preventive regimen, 3HP (weekly high-dose rifapentine [RPT] plus isoniazid [INH]) is simple and less hepatotoxic. However, there is a higher risk of systemic drug reaction (SDR) and flu-like symptoms, which can result in even hypotension and shock.

Methods: In this prospective, multi-center study, LTBI cases aged ≥ 12 were invited to join the study. We assayed host genetic, inflammatory and pharmacokinetic biomarkers, and recorded clinical response and onset of systemic drug reaction. Factors predicting 3HP-related SDR were investigated.

Results: Between Jan. 1, 2017 and Sep. 25, 2019, a total of 637 TB close contacts with LTBI (including 212 cases in 2019) were screened. Among them, 538 received 3HP treatment. 484 had treatment outcome before Oct. 31, 2019 and were included for analysis. 50 (10.3%) of the 484 suffered from SDR. After adjusting clinical characteristics, genotypes of *Toll-Like Receptor 1 (TLR1)* and *N-acetyltransferase 2 (NAT2)* were associated with the development of SDR (OR: 5.04). After adjusting clinical and drug dosing characteristics, plasma INH and acetyl-INH level at 24 hours after dosing was associated with SDR development (OR: 2.02). None of the plasma levels of inflammatory cytokines prior to treatment was able to predict the occurrence of SDR during 3HP treatment.

Discussion: One Tenth of the LTBI cases receiving 3HP suffer from SDR, which is likely to relate to INH metabolism and *TLR1*-related immune response.

Keywords: 3HP, isoniazid, latent tuberculosis infection, N-acetyltransferase 2, systemic drug reaction, Toll-Like Receptor

第一章、前言

結核病仍然是世界上最重要的感染症之一。而臺灣地區結核病的盛行率，已在政策逐年推行以及全民努力下，由高盛行區進入到中盛行發病率 [1]，2017 年通報確診的結核病新案數，甚至已經低於 10,000 人 [2]。在結核病發生率較低的地區或國家中，大部分新診斷的結核病個案，發病的原因都是來自於再活化 (reactivation)，也就是之前曾被結核菌感染過、之後結核菌蟄伏於體內 (latent tuberculosis infection, LTBI)、爾後才活化造成活動性結核病 [3, 4]。因此，如何於臨床上找出潛伏結核感染的個案，進一步給予治療，是公共衛生政策上控制、甚至根除結核病很重要的一環 [5]。

在全世界的努力之下，不久之前，達成了世界衛生組織 (World Health Organization) 的千禧年願望，逆轉了二十世紀末全世界日漸攀升的結核病疫情。但在 2015 年中，全世界仍有 10,400,000 個結核病新個案，同時有大約 1,400,000 人死於結核病 [6]。結核病，仍是世界上最嚴重的傳染病之一。因此，世界衛生組織訂下了一個後 2015 的策略，希望能夠終結結核病 (End-TB Strategy)，而這一次設下的目標更大更遠，希望能夠在西元 2035 年讓全世界結核病的發生率下降百分之九十、死亡率下降百分之九十五，同時，更希望沒有任何一個家庭因為結核病而家破人亡 (catastrophic cost) [7]。要達到這個目標並不容易，三個基本的方針包含：第一、以病人為中心的整合照顧和預防；第二、落實政策與支持系統；第三、強化研究與創新。

從這個後 2015 策略可以看出，結核病的防治已經由被動防守，轉變為主動出擊。以往，主動發現、早期治療、個案的管理 (case holding) 是最重要的政策。但是，個案往往一個一個不定時產生，而醫療、公衛人員就只能在後面一個一個努力的收拾浮在水面上的冰山一角。想要進一步控制疫情，該是主動出擊、直搗黃龍的時候了，也只有這樣，才能夠在潛伏結核感染個案還沒有發病、還沒有傳染給他人之前根絕結核病發生的可能。不過一直以來，潛伏結核感染的診斷與治療面臨幾個重要的困難：第一、潛伏結核感染診斷的不確定；第二、無法準確預測結核病發病個案；第三、治療時間過長 (以往最常用的治療需 9 個月的時間) 而導致完治率與服藥順從性 (adherence) 過低；第四、副作用無法預期而且不容易早期發現；第五、治好了可能再感染 (re-infection) [8]。依實際臨床醫療狀況來看，往往很難接受自己是沒有病的健康人，但為了預防一個未來只有 10% 機率會發生的疾病，必須服用為期 270 天的藥物及面對可能發生的藥物副作用 [9]。

過去用來治療潛伏結核感染的處方，大致可分為幾種：(1) 九個月每天服用 isoniazid 5mg/kg

(簡稱 9H);(2) 四個月每天服用 rifampicin 10mg/kg (簡稱 4R);(3) 兩個月每天服用 rifampicin 10mg/kg 加上 pyrazinamide 20~25mg/kg; 以及(4) 三個月每天服用 isoniazid 加上 rifampicin [10]。然而,因為有多篇報導指出,接受第三種處方進行預防性治療的接觸者,產生肝毒性的風險明顯增高 [11-13],甚至有致死案例發生 [14]。因此,目前第三種處方已不再建議使用。至於第四種處方,目前的研究顯示其副作用發生率、以及結核病發病率,與接受九個月 isoniazid 的接觸者並無明顯不同 [15]。目前,9H 處方仍舊是世界上最廣為使用的潛伏結核感染治療處方 [10, 16, 17],它的毒性不高,同時與其他藥物(例如愛滋病用藥、心臟用藥、抗凝血劑等等)較少有交互作用,也是在所有抗結核藥物中,臨床上使用經驗最豐富的一種藥 [18]。然而,9 個月的療程,嚴重降低了預防性治療的達成率 [19, 20]。而且在臺灣過去高病毒性肝炎的背景下,rifampin 與 isoniazid 同樣具有毒性低的好處之外 [21, 22],對肝臟副作用又更低 [20],而且時程短接受度高 [15, 20]。在最近發表的文獻中,不管是利用統計模式、成本效益分析來比較潛伏結核感染治療處方的成效,結果大多偏向於使用 4 個月的 rifampin [23, 24]。2018 年剛剛發表的開放式臨床試驗(open-label trial),納入將近 8000 個個案,隨機分組接受 9H 或 4R,依舊顯示後者的完成率高過前者 15% (95%信賴區間:12.7-17.4) [25]。

有關治療的處方,最近十年當中出現了極大的進展。在動物研究方法上,有一個 Cornell mouse model 可以用來作為潛伏結核感染的動物研究模式 [26]。Cornell mouse model 的做法,是先將老鼠以結核菌標準菌株感染(CDC1551),之後以 isoniazid 及 pyrazinamide 兩種藥物治療 12 週,然後停止用藥,讓結核菌處於潛伏感染的狀態。接下來為期 12~18 週的時間內,可以使用各種潛伏結核感染的處方治療,之後再以 dexamethasone 誘發結核菌活化,之後對老鼠進行各器官的取樣、培養,確認有多少比率的老鼠發生活動性結核病。研究顯示,為期 18 週的治療中,同時使用 isoniazid 25 mg/kg 及 rifapentine 10 mg/kg,比每天使用 isoniazid 25 mg/kg 或是每四天使用一次 rifapentine 10 mg/kg,對於潛伏結核感染的治療效果都要來的好,針對脾臟內結核菌的清除率分別為 62.5%、50.0%、和 28.6%;而對肺臟內結核菌的清除率則分別為 62.5%、75.0%、28.6% [27]。在另外一個研究中,同樣也顯示出 rifapentine 加上高劑量的 isoniazid,殺菌的效果最強,而且治療 13 週的效果與治療 26 週的效果一樣好,同樣都可以百分之百清除老鼠脾臟與肺臟組織中的結核菌 [28]。

這些動物研究的結果,促使了 Prevent TB Trial 這個臨床試驗的進行 [15]。自西元 2001 年至 2008 年,在美國前瞻性的納入 8,053 個 12 歲以上的結核病接觸者進行隨機分組,實驗組接受短程處方,也就是每週一次、總共 12 次的 rifapentine 15 mg/kg 以及 isoniazid 15 mg/kg(簡稱 3HP);而對照組則接受傳統處方,也就是每天一次、總共 270 天的 isoniazid 5 mg/kg。結果顯示,不論

是用 modified intent-to-treat 分析、或者是用 per-protocol 分析，實驗組對於潛伏結核感染的療效都沒有比對照組差(non-inferiority)。但是，後者的治療中斷率，卻明顯比前者高(17.9% vs. 31.0%， $p < 0.001$)；相反的，副作用造成治療中斷的機率，則明顯的是前者較高(4.9% vs. 3.7%， $p = 0.009$)。兩種處方的副作用不太相同，前者主要是類流感症狀 (flu-like symptoms)、過敏反應 (hypersensitivity)，而後者卻是肝毒性 (hepatotoxicity)。

這個短程處方的療效與安全性，隨即在年齡 2 歲到 17 歲的個案中也得到證實 [29]，於是乎美國和世界衛生組織，先後將短程的 3HP 處方納入潛伏結核感染診治指引中的治療建議處方 [30]。雖然它有較高比例的副作用，但類似過敏情況的副作用，臨床表現通常是發熱、發燒、頭痛、肌肉痠痛等輕微且短暫的症狀，病人可以自覺，不像傳統處方中的肝毒性那樣不可預期。因此，副作用雖然稍微高一點，卻完全不影響民眾對於短程處方的接受度 [31]。然而截至目前為止，長效型 rifapentine 用來治療潛伏結核感染的文獻仍十分缺乏，尤其是在亞洲這個全世界結核病負擔最高的地區，仍沒有相關的研究報告。

有鑑於此，臺大醫院結核病研究團隊，聯合臺灣地區其他三家醫院，包含臺大醫院新竹分院、部立彰化醫院、以及臺中榮民總醫院，於 2014 年 1 月至 2016 年 5 月當中，針對 12 歲以上結核菌素皮膚試驗陽性的密切接觸者，隨機分組接受 3HP 或 9H 的治療。總共有 263 個個案納入分析，其中 132 人接受 3HP、另外 131 人接受 9H。研究的結果顯示，3HP 的完成率為 89.4%，顯著高於 9H 的 77.9% [32]。這樣的研究結果，促使了臺灣衛生福利部疾病管制署在 2016 年 4 月公布新政策，針對 12 歲以上診斷為潛伏結核感染的結核病密切接觸者，建議以短程 3HP 處方進行預防性治療。

然而在上述臺灣的研究當中也發現，在接受 3HP 的個案當中，因為副作用而中斷治療的比例高達 9.1%，其中主要是全身性藥物反應，高達 3.8% [32]。所謂的全身性藥物反應，包括兩種類型的嚴重藥物副作用：第一類型是低血壓 (收縮壓 < 90 mmHg)、蕁麻疹 (urticaria)、血管性水腫 (angioedema)、急性支氣管痙攣 (acute bronchospasm)、結膜炎 (conjunctivitis)；第二類型，則是底下所列之副作用症狀同時出現超過 4 種、且其中超過 1 種的嚴重度在第二級 (Grade II) 以上，包含全身無力、倦怠、噁心、嘔吐、頭痛、發燒、肌肉骨骼疼痛、盜汗、頭暈、呼吸急促、潮紅、畏寒 [15]。較高的全身過敏反應 (systemic drug reaction) 以及類流感症狀 (flu-like symptoms)，原因為何？危險因子究竟是甚麼？在這個研究中，女性個案接受 3HP 之後產生第二級以上副作用的比例高達 13.7%，統計上顯著高於男性個案 (1.2%)，所以，似乎

性別是個危險因子。但宿主本身的體質，也就是所謂的宿主基因多型性（genetic polymorphism）、發炎反應、以及血中藥物濃度是否也可能是危險因子，目前仍沒有相關的研究報導。因此，承接 2017、2018 年的研究，我們將持續進行這個多醫院的前瞻性臨床試驗，在臺大醫院及其新竹分院、臺北市立萬芳醫院、高雄醫學大學附設中和紀念醫院及其分院共六家醫院，針對 12 歲以上潛伏結核感染者，邀請他們加入臨床研究，於醫療常規抽血時，檢測宿主基因多型性、血中發炎指標以及藥物濃度，同時每週紀錄服藥後是否發生全身性藥物反應。此外，我們也將利用這三年所累積的研究資料，以統計方法建構一個 3HP 引發全身性藥物反應的預測模式。

第二章 材料與方法

108 年度研究計畫內容主要分為兩個部分：

第一部分：接續 2017、2018 的臨床試驗研究，分析宿主基因、發炎以及藥動等生物標記，與服藥後是否發生全身性藥物反應是否相關。

第二部分：將利用 2017~2019 三年間臺灣研究團隊的研究資料，利用統計方法建構一個 3HP 引發全身性藥物反應的預測模式。

第一部分、臨床試驗

(1) **研究設計：**多醫院之前瞻性研究。

(2) **參與醫院：**臺大醫院、臺大醫院新竹分院、臺北市立萬芳醫院、高雄醫學大學附設中和紀念醫院及其小港分院、大同分院。

(3) **執行期間：**民國 106 年到 108 年，共三年。

(4) **受試條件如下：**

- 年紀大於等於 12 歲
- 符合後述三個條件中任一：(1) 肺結核個案之接觸者、(2) 依照公共衛生政策檢測結核菌素皮膚試驗 (tuberculin skin test) 後結果為陽性者、(3) 依照公共衛生政策檢測丙型干擾素釋放試驗 (QuantiFERON-TB Gold In-Tube、QuantiFERON-TB Gold Plus、T SPOT-TB) 後結果為陽性者
- 即將接受潛伏結核感染 (latent tuberculosis infection) 之預防性治療 (preventive therapy)

(5) **排除條件如下：**

- 臨床及影像學檢查有活動性結核病的證據

- 目前必須使用的藥物中與isoniazid、rifampin、或rifapentine有明顯的交互作用（附表四、五、六）
- 有isoniazid、rifampin、和rifapentine的過敏反應
- 預期存活不超過三年

(6) 研究目標：

- (1) 主要目標：所有符合納入條件且不具有排除條件之受試者均納入分析。
 - i. 監測3HP服藥狀況，追蹤其後續全身性藥物反應發生情形。
 - ii. 進行宿主基因多型性檢測。
 - iii. 評估3HP治療過程中，血中免疫標記的變化。
 - iv. 治療3HP過程中，進行藥物動力學相關分析。
 - v. 評估3HP治療過程中，宿主基因、發炎、藥動等生物標記與全身性藥物反應的相關性。

(7) 收案人數：

1. 在之前臺大醫院主持、為期三年的前瞻性、隨機分組的多中心研究計畫 — 『研究何種潛伏結核感染的治療較為安全且可達成 - 台灣的多中心隨機分派研究』當中，因副作用而中斷短程 3HP 治療的比率為 9.1%（132 個受試者中發生 12 例）[32]。
2. 如果希望能夠收集 40 例因 3HP 治療而產生全身性藥物反應之個案進行分析，推算三年期間（2017~2019）總共須要收案 440 人。

(8) 試驗流程：

1. 針對符合上述篩選條件的接觸者，經過詳細說明並填妥同意書後收案。
2. 預防性治療開始的第一週內，採取週邊血液進行HBsAg、anti-HCV、anti-HIV、以及第四代剋肺癆（QuantiFERON-TB Gold Plus）檢驗，並測量血中與發炎相關之細胞激素濃度（詳見後述）。

3. 治療開始後前兩個月每個月抽血一次，檢驗 isoniaizd 和 rifapentine 血中濃度、藥物代謝相關基因多型性、以及血中與發炎相關之細胞激素濃度（詳見後述）。
4. 治療後兩個月抽血檢驗 QuantiFERON-TB Gold Plus。
5. 用藥期間每週定期面訪或電話追蹤，每月返診確認治療狀況、有無藥物副作用產生（詳見後述）。

(9) 剋肺癆（QuantiFERON-TB Gold Plus）檢驗：

研究中將根據剋肺癆製造商之操作使用手冊進行此一體外免疫檢測。

1. 以靜脈穿刺採集測試者血液，並直接於每支採血管各充入 1mL 血液。
2. 充分地上下振搖採血管 10 次，以確保整個試管內層都被血液覆蓋。
3. 採血管必須在採血後 16 小時內，盡快移至 37°C 培養器中培養。切勿冷藏或冷凍血液樣本。若未能在採血後立即進行培養，則培養前，採血管必須再重複混合步驟。
4. 將採血管以直立方式，於 37°C 培養 16-24 小時。培養器不需 CO₂ 或濕氣。
5. 37°C 培養結束後，採血管於離心前至多可於 2-27°C 放置 3 天。
6. 37°C 培養結束後，採血管以轉速 2000-3000 RCF(g)離心 15 分鐘，分隔出血球細胞及血漿後，吸取血漿。若未出現分隔，則採血管須以更高轉速再次離心。
7. 取出之血漿樣本加入所附的 ELISA 盤中。若未立即進行 ELISA 檢測，血漿樣本可直接以離心管形式或移至其他容器中儲存。血漿可於 2-8°C 儲存至多 4 週，於-20°C 以下（建議低於-70°C）則能儲存更長時間。
8. 100 倍濃縮軛合劑以外的其他全部血漿樣本及試劑，必須於測定前調整至室溫（22 ± 5°C），且至少要 60 分鐘來達到溫度平衡。
9. 先從微量盤框架取出此次還用不到的微量盤條，再回封於鋁箔袋內，送至冰箱存放。留下的微量盤條中，至少有一條要供標準品使用，其他的則必須足夠此次測定所有測試者之用。此次使用後，保留微量盤框架與蓋子供回封存放之剩餘微量盤條使用。
10. 依標準品標籤所示，在凍晶乾燥之人類 interferon-gamma 標準品小瓶內加入指示量的去離子水或蒸餾水來配製。溫和混合以防起泡，並確保完全溶解。配製後的標準品溶液濃度為 8.0 IU/mL。這些標準液在檢測時必須多組測定（至少同時測 2 組）。

11. 在凍晶乾燥之 100 倍濃縮軛合劑小瓶內加入 0.3mL 的去離子水或蒸餾水來配製。溫和混合以防起泡，並確保軛合劑完全溶解。
12. 測定前，血漿應混合均勻以確保產生之 Interferon-gamma 能均勻分散在樣本內。
13. 用多爪式微量分吸管將 50 μ L 新配製具工作強度的軛合液加至所附的 ELISA 微量盤凹槽中。
14. 同樣用多爪式微量分吸管，再將血漿樣本 50 μ L 加至上述微量盤之適當凹槽中，最後，再加入標準液 1 至 4 各 50 μ L。
15. 用微量盤振盪器，將軛合液與血漿樣本或標準液充分混合 1 分鐘。
16. 以蓋子覆蓋微量盤，並於室溫（22 \pm 5 $^{\circ}$ C）培養 120 \pm 5 分鐘。
17. 在培養期間可進行清洗緩衝液的配製。將 20 倍濃縮之清洗緩衝液與去離子水或蒸餾水，以 1 比 19 之比例稀釋並充分混合。本測試所提供的 20 倍濃縮清洗緩衝液，足夠去配製 2L 的清洗緩衝液。每個凹槽需要 400 μ L 具工作強度的清洗緩衝液來清洗至少 6 次。建議使用微量盤清洗器進行。
18. 將微量盤面向下，於吸收拭巾上輕敲，以去除殘餘清洗緩衝液。然後在每個凹槽內加入 100 μ L 酵素受質液，並用微量盤振盪器充分混合。
19. 以蓋子覆蓋微量盤，並於室溫（22 \pm 5 $^{\circ}$ C）培養 30 分鐘。
20. 培養 30 分鐘後，在每個凹槽內加入 50 μ L 酵素停止液並混合。本步驟必須與步驟 11 酵素受質液的添加用相同順序且以近乎相同速度添加至各凹槽。
21. 在停止反應後的 5 分鐘內，使用裝有 450nm 濾鏡及 620-650nm 參考濾鏡的微量盤判讀儀，來測量每個凹槽的光密度（Optical Density, OD）。之後回推出待測檢體中 Interferon-gamma 的濃度，並依照廠商之判讀標準分析結果。

(10) 宿主基因多型性檢測：

我們將使用 proteinase K 消化周邊血液單核細胞（peripheral blood mononuclear cell），使用 proteinase K 消化，之後經由 isopropanol 萃取、ethanol 沉澱 [33, 34]，萃取出 DNA，並儲存於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中。我們將使用 MassARRAY 系統（Sequenom），藉由 matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF)，來鑑定下列基因的多型性：Toll-like

receptor (TLR)-1、TLR-2、TLR-4、TLR-8、TLR-9、RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)、DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin)、matrix metalloproteinase (MMP)-1、MMP-8、MMP-9、TOX、SP110、NRAMP (natural resistance-associated macrophage proteins)-1。各基因的多型性位點整理於下表：

Gene	Targeted single nucleotide polymorphisms
TLR-1	rs4543123, rs3924112, rs4624663, rs137853175, rs137853174, rs5743618, rs137853173, rs137853172, rs786201036, rs55812771, rs5743614, rs786201035, rs773733396, rs137853171, rs3923647, rs786201033, rs4833095, rs5743611, rs137853170, rs45592140, rs5743596, rs5743594, rs5743580, rs45482391, rs5743574, rs5743566, rs5743563, rs5743560, rs5743556, rs1873196, rs5743551
TLR-2	rs4696480, rs1898830, rs1816702, rs11938228, rs137853176, rs3804099, rs3804100, rs5743704, rs137853177, rs121917864, rs5743708, rs7656411
TLR-4	rs10983755, rs1927914, rs10759932, rs1927911, rs11536871, rs11536878, rs12377632, rs5030717, rs2149356, rs5030728, rs4986790, rs4986791, rs5030721, rs7869402, rs11536889, rs7873784, rs11536891, rs11536897, rs1927906, rs11536898
TLR-8	rs3761624, rs5741883, rs3764879, rs3764880, rs1548731, rs5744068, rs2407992
TLR-9	rs352140, rs352139, rs5743836
RANTES	rs2107538, rs2280788
DC-SIGN	rs2287886, rs4804803, rs735239, rs735240
MMP-1	rs498186, rs2071230, rs2071232, rs1938901, rs7125320
MMP-8	rs2012390, rs1939012, rs2508383, rs12284255, rs7123682
MMP-9	rs3918249, rs3918261, rs9509, rs3787268, rs17577
TOX	rs1568952, rs2726600, rs2726596, rs2726597, rs2726598, rs2252970, rs998791
SP110	rs7580900, rs7580912
NRAMP1	rs2014615, rs4324314, rs4674297, rs2290708

(11) 發炎相關之細胞激素：

根據 2017 年收案資料初步分析的結果，下列幾個血清中發炎相關的細胞激素，與產生全身性藥物反應與類流感症狀比較有關，包括：chemokine (C-C motif) ligand 17 (CCL17, also known as TARC), interleukin (IL)-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-15, IL-17A, interferon-gamma

induced protein 10 (IP-10), interferon-gamma, MCP (monocyte chemoattractant protein)-1, MCP-2, tumor necrosis factor (TNF)-alpha。我們將藉由 Cytometric Bead Array (BD Biosciences, California, USA) 和 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 測定。

(12) Isoniazid、rifapentine、及其主要代謝產物 acetyl-isoniazid、desacetyl-rifapentine 血中濃度測定：

甲、血漿檢體前處理：

- i. 將 100 uL 的血漿檢體與 300 uL 的甲醇 (methanol) 混合，使蛋白質沉澱。
- ii. 混合後於 Geno/Grinder 2010 (SPEX, Metuchen, NJ, US) 以 1000 rpm 離心 2 分鐘。
- iii. 之後以 1500 g 離心 10 分鐘，再將 100 uL 的上清液移至裝有 75 uL 去離子水的乾淨離心管中。
- iv. 加入 25 uL 同位素混合溶液作為內部標準，然後混合均勻。
- v. 將最後的溶液過濾，準備進行下一步濃度分析。

乙、Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry system (LC-ESI/MS)：

- i. 使用 Agilent 1290 UPLC 系統，該系統中有 quaternary solvent pump、自動取樣器、樣品儲存池、以及一個柱溫箱。
- ii. 使用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 2.1x100mm (1.8 um) column 分離化合物。
- iii. 流動相為 5 mM 乙酸銨 (ammonium acetate) (溶劑 A) 和溶於 90% 乙腈 (acetonitrile) 的 0.1% 甲酸 (formic acid) (溶劑 B) 組成，流速為 0.4 mL/min。
- iv. 線性梯度在前 6 分鐘內由 1% 溶劑 B 增至 95%。
- v. 用 95% 溶劑 B 進行等度洗脫 (isocratic elution) 約 6-7 分鐘。
- vi. 樣品儲存池和柱溫箱分別保持在 4°C 和室溫 (25°C)。注射體積為 5 uL。
- vii. 接著使用 Agilent 6460 triple quadrupole 系統 (Agilent Technologies, Waldbronn, 德國) 進行質譜分析。
- viii. 根據以下操作參數，使用 positive electrospray ionization 模式：
 1. Dry gas temperature: 350°C
 2. Dry gas flow rate: 11 L/min
 3. Nebulizer pressure: 50 PSI
 4. Sheath gas temperature: 350°C
 5. Sheath gas flow rate: 11 L/min

6. Nozzle voltage: 0 V
 7. Capillary voltage: 3500 V
- ix. 四個標的化合物（isoniazid、acetyl-isoniazid、rifapentine、desacetyl-rifapentine）和各自同位素之 transition pairs 和 collision energy（CE）相關資料，列於下表。

Table 1. Retention time (Rt) and MRM parameters of four target compounds and their isotopes.

Compound	Formula	Rt (min)	CE (V)	Precursor Ion (m/z)	Production ion Q1 (m/z)	Production ion Q2 (m/z)
INH	C ₆ H ₇ N ₃ O	1.557	20	138.0	121.0	79.0
Acetyl-INH	C ₈ H ₉ N ₃ O ₂	1.525	20	180.0	121.2	138.1
RPT	C ₄₇ H ₆₄ N ₄ O ₁₂	5.378	20	877.3	845.2	453.2
Desacetyl-RPT	C ₄₅ H ₆₂ N ₄ O ₁₁	4.824	20	835.2	803.3	153.1
INH-d4	C ₆ H ₃ D ₄ N ₃ O	1.555	20	142.1	125.1	83.1
Acetyl-INH-d4	C ₈ H ₅ D ₄ N ₃ O ₂	1.523	20	184.1	125.1	142.2
RPT-d8	C ₄₇ H ₅₆ D ₈ N ₄ O ₁₂	5.348	40	885.5	151.1	95.1
Desacetyl-RPT-d8	C ₄₅ H ₅₄ D ₈ N ₄ O ₁₁	4.794	20	843.5	811.3	95.1

(13) 副作用記錄：

研究中將會針對每一個服用至少一次預防性治療藥物的受試者，每週記錄副作用，直到完成治療後兩週。觀察的藥物副作用包括：蕁麻疹 (urticaria)、血管性水腫 (angioedema)、結膜炎 (conjunctivitis)、全身無力 (weakness)、倦怠 (fatigue)、噁心 (nausea)、嘔吐 (vomiting)、頭痛 (headache)、發燒 (fever)、肌肉骨骼疼痛 (aches)、盜汗 (sweats)、頭暈 (dizziness)、呼吸急促 (shortness of breath)、潮紅 (flushing)、畏寒 (chills)。

一旦有任何的副作用發生，我們將登記該副作用發生的時間 (timing of onset)、持續的時間 (duration)、嚴重度 (severity)、與預防性治療藥物的相關性 (relationship)。其中嚴重度將根據 Cancer Therapy Evaluation Program common toxicity criteria 判定，簡單描述如下表 [35]；與藥物相關性的部分，將根據診療醫師的臨床判斷，紀錄為相關 (等級分為 definite、probably、possibly 三個層次) 或不相關 (等級分為 unlikely、non-related、unclassifiable 三個層次)。

Gr I	Mild; asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated
------	---

Gr II	Moderate; minimal, local or noninvasive intervention indicated; limiting age-appropriate instrumental ADL
Gr III	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of hospitalization indicated; disabling; limiting self care ADL
Gr IV	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated
Gr V	Death related to AE

所有紀錄的副作用，將再由研究主持人依照 Naranjo adverse drug reaction probability scale 客觀地判斷與預防性治療藥物的相關性 [36]。

Naranjo Adverse Drug Reaction Probability Scale				
Question	Yes	No	Do Not Know	Score
1. Are there previous <i>conclusive</i> reports on this reaction?	+1	0	0	
2. Did the adverse event appear after the suspected drug was administered?	+2	-1	0	
3. Did the adverse reaction improve when the drug was discontinued or a <i>specific</i> antagonist was administered?	+1	0	0	
4. Did the adverse event reappear when the drug was re-administered?	+2	-1	0	
5. Are there alternative causes (other than the drug) that could on their own have caused the reaction?	-1	+2	0	
6. Did the reaction reappear when a placebo was given?	-1	+1	0	
7. Was the drug detected in blood (or other fluids) in concentrations known to be toxic?	+1	0	0	
8. Was the reaction more severe when the dose was increased or less severe when the dose was decreased?	+1	0	0	
9. Did the patient have a similar reaction to the same or similar drugs in <i>any</i> previous exposure?	+1	0	0	
10. Was the adverse event confirmed by any objective evidence?	+1	0	0	
TOTAL SCORE:				

依照過去文獻的定義 [37]，符合下列兩個條件中任何一個的副作用，及定義為全身性藥物反應（systemic drug reaction、SDR）：

1. 低血壓（收縮壓<90 mmHg）、蕁麻疹、血管性水腫、急性支氣管痙攣、結膜炎；

2. 底下所列之副作用症狀同時出現超過 4 種、且其中超過 1 種的嚴重度在第二級 (Grade II) 以上：
- i. 全身無力
 - ii. 倦怠
 - iii. 噁心
 - iv. 嘔吐
 - v. 頭痛
 - vi. 發燒
 - vii. 肌肉骨骼疼痛
 - viii. 盜汗
 - ix. 頭暈
 - x. 呼吸急促
 - xi. 潮紅
 - xii. 畏寒

(14) 資料收集處理及統計分析：

- 收集受試者臨床特徵，包括年齡、性別、身高、體重、系統性疾病、用藥史，試驗期間胸部X光、血液及病毒學檢查結果，以及其它醫療資料，包含病歷紀錄、實驗室檢查、影像學檢查、病理學檢查、以及治療方式和療效。
- 組間的連續變項以independent t-test作比較，而分類變項以chi-square方法比較。多變項分析是用logistic regression來分析發生用藥副作用的危險因子，雙尾檢定之 p 值 < 0.05 會被認為有統計意義。

第二部分、建構全身性藥物反應之預測模式

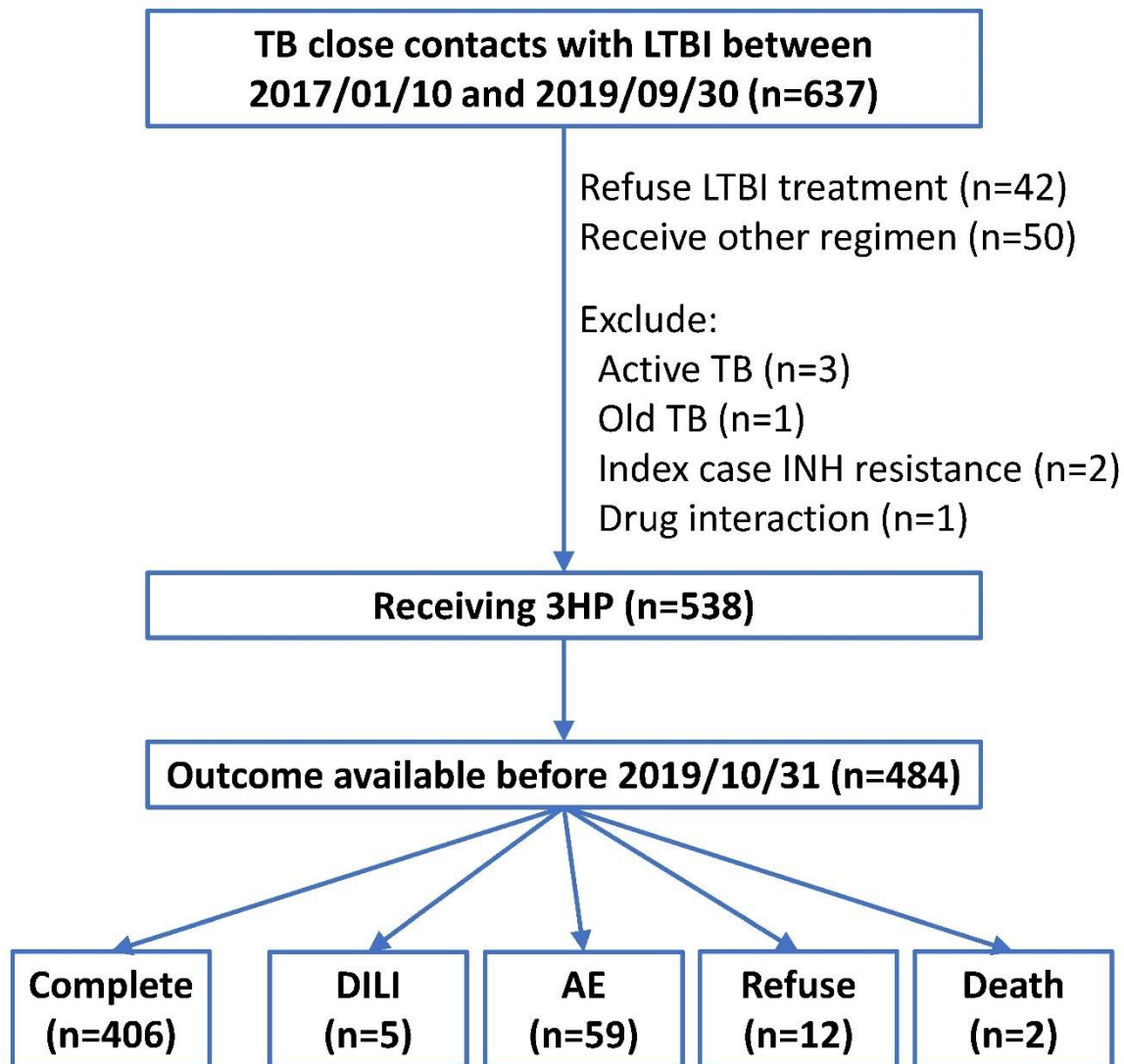
在這部分的計畫當中，我們預計將綜合 2017~2019 這三年當中臨床試驗所收集、檢測的各項資訊，從臨床研究中轉化證據，為潛伏結核感染的 3HP 治療提供實際執行上的提醒與幫助。我們

將根據潛伏結核感染個案的臨床特徵（年齡、性別、系統性共病、身高、體重、菸酒習慣、實驗室檢查結果），加上宿主基因、發炎、藥動等相關生物標記，利用 logistic regression model 來估算 3HP 治療下發生全身性藥物反應的風險。我們將把所有的個案資料分割為兩個數據集，一個是 training set，另外一個是 validation set，藉以評估預測模式的準確性。

第三章 結果

1. 臨床個案之納入流程：

自 2017/01/01 至 2019/09/25，本研究共篩選了 637 確診潛伏結核感染之結核病密切接觸者（包含本年度 212 人）。最後，有 538 個個案接受 3HP 治療，截至 2019/10/31，共有 484 個個案已經有治療結果可以納入分析。其中 406（83.9%）位完成治療、64（13.2%）位因副作用而中斷治療。



484 位當中，共有位 50（10.3%）個案發生 systemic drug reaction，其中分別有 36（7.4%）個是 flu-like symptoms、5（1.0%）個有 hypotension、2（0.4%）個同時有 hypotension 與 flu-like symptoms、4（0.8%）個 urticaria、2（0.4%）個 conjunctivitis、以及 1（0.2%）個 limb edema。

發生 SDR 與未發生 XDR 的個案臨床特徵如下表，可以發現，35 ~ 65 歲、在工作場所暴露的個案，較容易發生 SDR；而在校園暴露的個案，比較不容易發生 SDR。

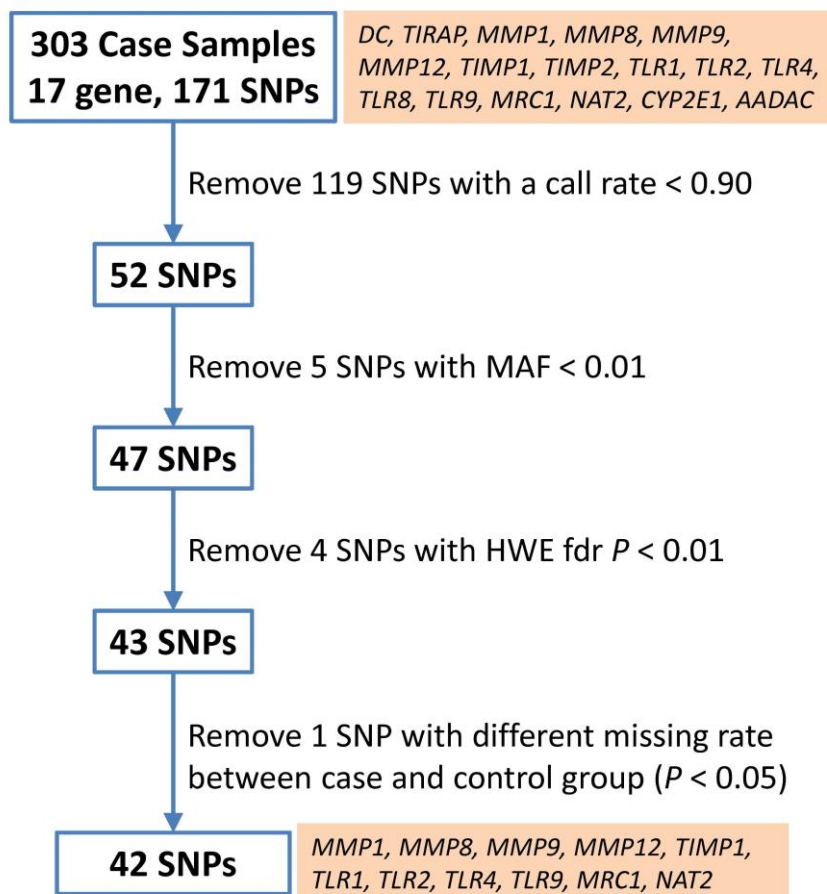
	No SDR (n=434)	SDR (n=50)	P-value
Age (yr)	46.5 ± 19.8	50.7 ± 13.7	0.056
Age group			0.002
>65	78 (18.0%)	4 (8.0%)	
35 ~ 65	207 (47.7%)	37 (74.0%)	
≤35	149 (34.3%)	9 (18.0%)	
Male	207 (47.7%)	22 (44.0%)	0.656
BMI	23.8 ± 3.8	23.7 ± 3	0.889
<18.5	31 (7.1%)	1 (2.0%)	0.233
Smoking			0.243
Current smoker	56 (12.9%)	8 (16.0%)	
Ex-Smoker	34 (7.8%)	7 (14.0%)	
Never smoker	344 (79.3%)	35 (70.0%)	
Abnormal CxR	37 (8.5%)	3 (6.0%)	0.786
Comorbidity			
DM	46 (10.6%)	6 (12.0%)	0.762
CKD III~V	21 (4.8%)	3 (6.0%)	0.728
Cancer	4 (0.9%)	1 (2.0%)	0.422
Autoimmune	4 (0.9%)	1 (2.0%)	0.422
Hypertension	81 (18.7%)	8 (16.0%)	0.645
Viral hepatitis	23 (5.3%)	2 (4.0%)	>0.999
Contact setting			
Household	135 (31.1%)	14 (28.0%)	0.652
Nosocomial	46 (10.6%)	5 (10.0%)	0.896
Occupational	89 (20.5%)	20 (40.0%)	0.002
School	99 (22.8%)	5 (10.0%)	0.037
Exposure at same room	68 (15.7%)	7 (14.0%)	0.758

至於治療前的 hemogram 與肝臟、腎臟功能，兩組之間並無差異。

	No SDR (n=434)	SDR (n=50)	P-value
Hemoglobin (g/dL)	13.9 ± 1.7	14 ± 1.6	0.863
WBC (/uL)	6857 ± 3762	6682 ± 1287	0.744
Segement (%)	58.7 ± 7.6	59.7 ± 12.8	0.835
Plt (K/uL)	258 ± 60.2	271 ± 58	0.153
AST (U/L)	23.5 ± 12.3	26.1 ± 26.7	0.247
ALT (U/L)	23.8 ± 22.7	24.9 ± 23.6	0.764
Bilirubin, total (mg/dL)	0.7 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.442
Creatinine (mg/dL)	0.9 ± 0.9	0.8 ± 0.2	0.485

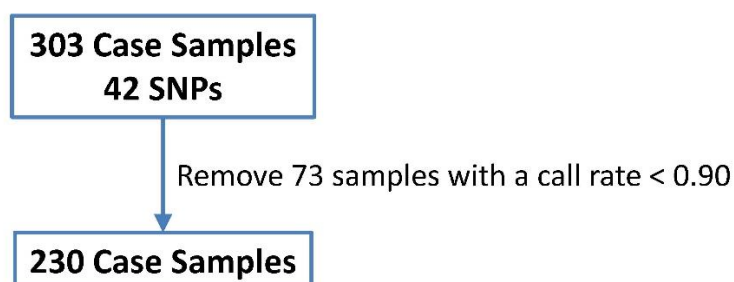
2. 宿主基因多型性分析：

Maker Quality Control



在這 484 個納入的個案中，總共有 303 個個案取得 DNA 檢體進行共 17 個基因、171 SNPs 分析。如上圖，經過 marker quality control 篩選之後，總共有來自於 11 個基因的 42 個 SNPs 合格，足以進行後續分析。再經過如下圖的 sample quality control 篩選之後，303 個個案的 DNA 檢體中，共有 230 個檢體的 SNP call rate ≥ 0.90 。

Sample Quality Control



這 230 個個案中，共有 21 (9.1%) 位發生 SDR。SDR 發生與否，與臨床特徵並沒有明顯關係。

	No SDR (n=209)	SDR (n=21)	P-value
Age (yr)	42.4 \pm 18.2	47.6 \pm 14.9	0.296
< 45	105 (50.2)	11 (52.3)	0.164
45 – 65	84 (40.2)	9 (42.9)	
> 65	1 (4.8)	1 (4.8)	
BMI	23.8 \pm 3.7	23.2 \pm 2.6	0.086
< 18.5	12 (5.7)	1 (4.8)	0.644
18.5 – 24	107 (51.2)	12 (61.9)	
≥ 24	90 (43.1)	7 (33.3)	
Male	104 (49.8)	12 (57.1)	0.519
DM	11 (5.3)	2 (9.5)	0.337
ESRD	3 (1.4)	0	0.749
Cancer	4 (1.9)	2 (9.5)	0.085
Autoimmune	2 (1.0)	1 (4.8)	0.251
Hypertension	21 (10.1)	4 (19.1)	0.259
HBV	6 (2.9)	1 (4.8)	0.493

Smoking			0.137
Current smoker	31 (14.8)	6 (28.6)	
Ex-smoker	20 (9.6)	3 (14.3)	
Never smoker	158 (75.6)	12 (57.1)	
Hyperlipidemia	7 (3.4)	0	0.561
INH dose (mg/kg)	14.0 ± 2.2	14.5 ± 2.0	0.616
RPT dose (mg/kg)	14.1 ± 2.2	14.5 ± 2.0	0.574

單變數統計分析發現，共有 3 個基因的 4 個 SNPs，與發生 SDR 有相關，如下表。校正臨床特徵之後發現，*TLR1* 的 rs5743560 與 *NAT2* 的 rs1041983，仍與發生 SDR 有顯著相關。

Gene SNP	No SDR	SDR	AOR [#]	Recessive model OR (95% CI)	Dominant model OR (95% CI)	Additive model OR (95% CI)
TLR1 rs5743580						
GG	60 (28.9)	10 (47.6)	1			
GA	118 (56.7)	10 (47.6)	0.52 (0.19-1.38)		0.43 (0.17-1.12)	
AA	30 (14.4)	1 (4.8)	0.15 (0.02-1.32)	0.22 (0.03-1.81)		0.45 (0.21-0.98)
TLR1 rs5743560						
CC	64 (30.8)	10 (47.6)	1			
CA	113 (54.3)	10 (47.6)	0.55 (0.21-1.46)		0.45 (0.17-1.17)	
AA	31 (14.9)	1 (4.8)	0.15 (0.02-0.13)	0.21 (0.03-1.74)		0.46 (0.21-0.996)
NAT2 rs1041983						
CC	59 (28.4)	4 (19.1)	1			
CT	112 (53.8)	6 (28.6)	0.71 (0.18-2.90)			
TT	37 (17.8)	11 (52.3)	4.95 (1.30-18.78)	1.69 (0.51-5.66)	6.14 (2.19-17.23)	2.83 (1.31-6.10)
MMP1 rs1938901						
TT	59 (28.9)	3 (15.0)	1			
TC	107 (52.5)	10 (50.0)	1.76 (0.44-6.96)			2.13 (1.02-4.47)
CC	38 (18.6)	7 (35.0)	4.29 (0.99-18.7)	2.36 (0.64-8.65)	2.91 (1.01-8.38)	

[#] model adjusted by clinical characteristics

另用 Logistic Regression Model 校正臨床特徵之後，演算出 Polygenetic Risk Score (PRS) 結果如下表，同時具有 3 個 risk alleles 的個案，發生 SDR 的機率，會其他人的 5.04 倍。

Catagories	No SDR	SDR	AOR [#]
PRS			
< 0.9954	92 (45.5)	3 (15.0%)	1
≥ 0.9954	110 (54.5)	17 (85.0%)	5.04 (1.34 - 18.90)

3. 血中藥物濃度分析：

在 484 個個案中，總共收集了來自於 83 個人的 144 個服藥後 24 小時 (C24) 的藥動檢體，其中，有 11 個是發生 SDR 當下的檢體。

利用 GEE model 統計分析的結果發現 (請見下表)，在校正了其他的臨床特徵、藥物劑量之後，服藥後 24 小時血中 INH 的濃度與 SDR 發生的機率有正相關，相反的，Acetyl-INH 則有附相關；其他的變數 (臨床特徵、藥物劑量、以及 RPT、desacetyl-RPT 血中濃度)，與發生 SDR 均無統計上的顯著相關。可以推測，INH 的濃度上升 1 ug/mL、acetyl-INH 濃度降低 1 ug/mL，個案 SDR 的機率，就會上升 2.02 倍。

C24 Plasma drug level	OR*	P-value
INH (ug/mL)	1.72 (1.17 - 2.52)	0.005
Acetyl-INH (ug/mL)	0.85 (0.76 - 0.94)	0.003
RPT (ug/mL)	1.01 (1.006 - 1.02)	0.208
Desacetyl-RPT (ug/mL)	0.999 (0.99 - 1.01)	0.921
INH dose (mg/kg)	1.01 (0.96 - 1.06)	0.824

* model adjusted for clinical characteristics and drug dose

在 484 個個案中，總共收集了來自於 52 個人的 84 個服藥後 6 小時 (C6) 的藥動檢體，其中，有 4 個是發生 SDR 當下的檢體。

利用 GEE model 統計分析的結果發現 (請見下表)，不論臨床特徵、藥物劑量、或者是服藥後 6 小時血中 INH、RPT、acetyl-INH、desacetyl-RPT 的濃度，所有的變數均與 SDR 的發生機率無顯著相關。

C6 Plasma drug level	OR*	P-value
INH (ug/mL)	0.99 (0.98 - 1.02)	0.990
Acetyl-INH (ug/mL)	1.00 (0.99 - 1.02)	0.997
RPT (ug/mL)	1.00 (0.99 - 1.01)	0.996
Desacetyl-RPT (ug/mL)	1.01 (0.98 - 1.03)	0.561
INH dose (mg/kg)	1.03 (0.98 - 1.08)	0.233

4. 血中發炎標記分析：

在 484 個個案中，總共收集了來自於 303 個潛伏結核感染的結核病密切接觸者人 704 個血液檢體，其中 172 個檢體是服用 3HP 處方前的檢體。而其他的檢體中，有 23 個是發生 SDR 當下的血液檢體。我們總共送驗了 14 個 inflammatory cytokines 的檢測（下表）。

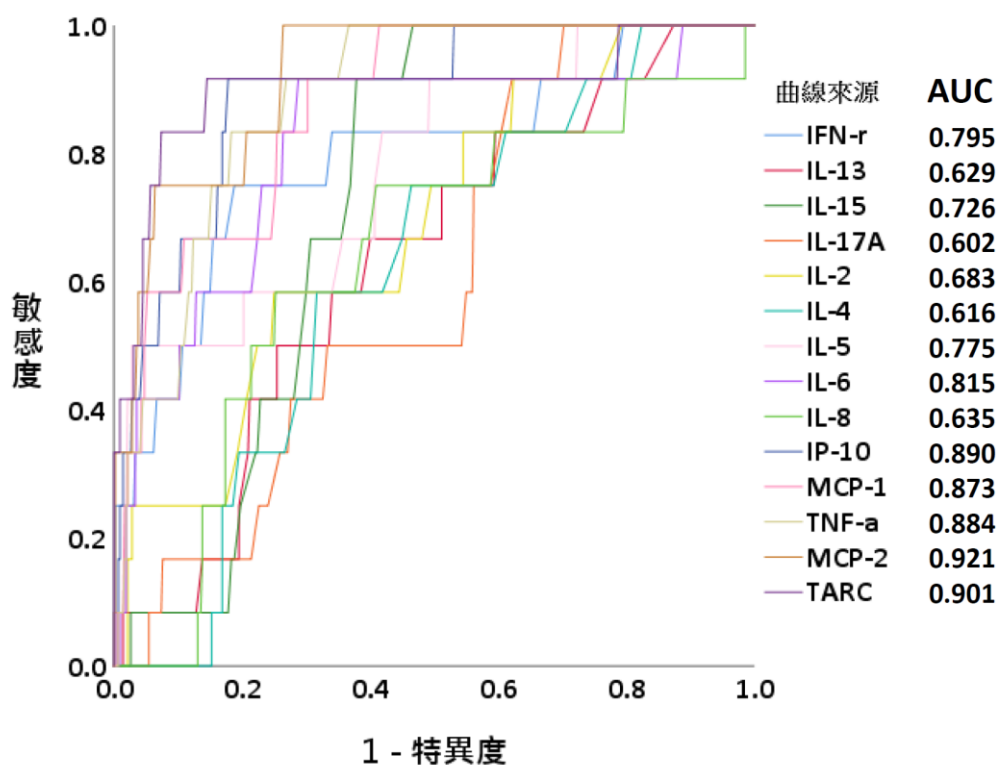
Interferon-gamma	Interleukin (IL) 2
IL-4	IL-5
IL-6	IL-8
IL-13	IL-15
IL-17	Interferon-induced Protein 10
Monocyte Chemoattractant Protein (MCP) 1	MCP-2
Tumor Necrosis Factor-alpha	Chemokine Ligand 17 (TARC)

分析結果發現，血液中 9 種 inflammatory cytokines 的濃度（下表），與當下是否發生 SDR 有顯著相關。

	No SDR now	SDR now	
IFN-r	12.2 [5.2 - 27.8]	43.8 [22.3 - 113.1]	<0.001
IL-13	0.7 [0.3 - 2.4]	1.9 [0.6 - 3.3]	0.126
IL-15	3 [1.4 - 7.7]	7.3 [3.7 - 11.1]	0.028
IL-17A	7.3 [3.9 - 14.4]	9 [6.2 - 14.7]	0.229
IL-2	3 [1.8 - 5.6]	4.3 [3 - 7.6]	0.022
IL-4	15.2 [5.5 - 42.7]	32.4 [15.8 - 61.1]	0.172

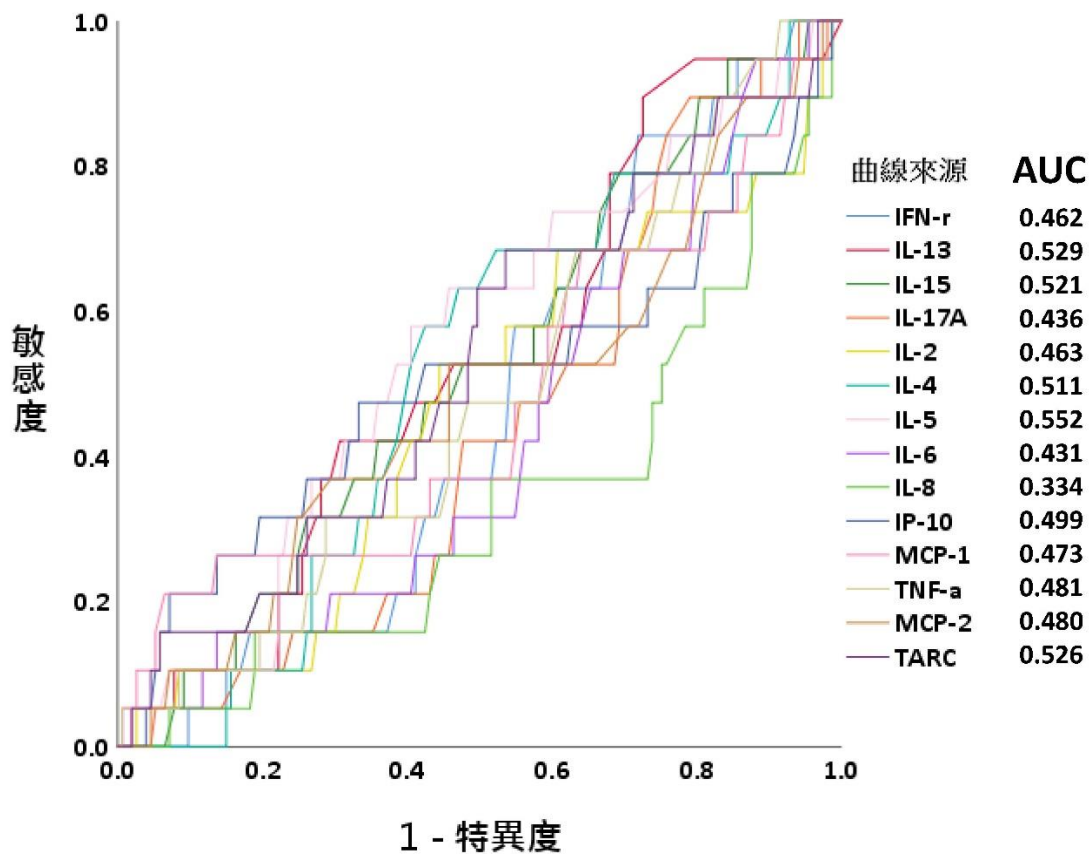
IL-5	2.1 [1.1 - 5.8]	6.4 [2.9 - 16]	<0.001
IL-6	1.4 [0 - 6.9]	6.9 [0 - 43.3]	0.241
IL-8	6.1 [3.4 - 15.7]	18.1 [7.5 - 42.3]	0.111
IP-10	576 [311.1 - 1272]	3292 [1430.5 - 9699]	<0.001
MCP-1	442.3 [284.9 - 669.8]	1014 [393.2 - 1700]	0.001
TNFa	23.3 [15.2 - 36.7]	48.4 [32.1 - 73.3]	<0.001
MCP-2	17.5 [10.4 - 25.9]	41.2 [22.2 - 83.1]	<0.001
TARC	23.6 [14 - 38.8]	76 [42.8 - 286.7]	<0.001

ROC 曲線分析的結果寫是，這幾種 inflammatory cytokines 預測 SDR 的 AUC 都不錯（下圖），特別是像 MCP-2、TARC、IP-10、TNF-a、MCP-1、IL-6、IFN-r 這幾種。前兩者的 Area under ROC curve 的值甚至超過 0.9。



不過，服藥前血液中 inflammatory cytokines 的濃度，卻與服藥過程中是否發生 SDR，沒有明顯相關（下表、下圖）。除了 IL-8 這個 marker 以外，之後發生 SDR 的個案，血中 inflammatory cytokines 的濃度，與之後未發生 SDR 的個案，並沒有統計上的差別。

	No SDR	SDR	
IFN-r	13.7 [5.8 - 29.3]	11.9 [6.6 - 18.2]	0.591
IL-13	0.6 [0.2 - 1.8]	0.7 [0.3 - 1.6]	0.681
IL-15	3.4 [2.1 - 8.2]	3.9 [2.3 - 8.3]	0.764
IL-17A	7.7 [3.6 - 14.8]	6.1 [4 - 9.2]	0.366
IL-2	3.2 [1.9 - 6.1]	3.6 [1.8 - 4.8]	0.594
IL-4	12.9 [4.3 - 41.6]	17.7 [5.8 - 29.9]	0.88
IL-5	1.9 [1.2 - 4.4]	3.1 [1.3 - 4.6]	0.462
IL-6	2.5 [1 - 7.5]	1.8 [0.9 - 3.2]	0.329
IL-8	7.3 [3.6 - 29.3]	3.5 [2.4 - 7.7]	0.019
IP-10	339.7 [230 - 605.7]	410.2 [200.5 - 792]	0.994
MCP-1	348.3 [238.9 - 554.7]	288.5 [213.6 - 550.3]	0.701
TNFa	18.1 [12.6 - 25.8]	16.2 [12.6 - 23.8]	0.788
MCP-2	14.8 [9 - 19.1]	15.9 [7.4 - 19.4]	0.775
TARC	17 [9.7 - 26.6]	18 [10.7 - 26.3]	0.709



多變數統計分析之後發現，服藥前血液中任何一種 inflammatory cytokines 的濃度，都無法預測服藥過程中是否發生 SDR。

5. **提升血中藥物濃度測定的閾值：**在之前測定藥物濃度的方法中，偵測、定量的最低閾值，僅僅低到 0.2 ug/mL，在大部分 C24 小時的檢體中，INH 的濃度都會低於這個閾值而沒有辦法定量。本年度在藥學系郭錦樺老師的研究團隊努力之下，我們已經可以將 INH、acetyl-INH、RPT、desacetyl-RPT、RMP、desacetyl-RMP 的藥物濃度準確定量至 5 ng/mL。方法如下：

甲、血漿檢體前處理：

- i. 將 100 uL 的血漿檢體與 300 uL 的甲醇 (methanol) 混合，使蛋白質沉澱。
- ii. 混合後於 Geno/Grinder 2010 (SPEX, Metuchen, NJ, US) 以 1000 rpm 離心 2 分鐘。
- iii. 之後以 1500 g 離心 10 分鐘，再將 100 uL 的上清液移至裝有 75 uL 去離子水的乾淨離心管中。
- iv. 加入 25 uL 同位素混合溶液作為內部標準，然後混合均勻。
- v. 將最後的溶液過濾，準備進行下一步濃度分析。

乙、Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry system (LC-ESI/MS)：

- i. 使用 Agilent 1290 UPLC 系統，該系統中有 quaternary solvent pump、自動取樣器、樣品儲存池、以及一個柱溫箱。
- ii. 使用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 2.1x100mm (1.8 um) column 分離化合物。
- iii. 流動相為 5 mM 乙酸銨 (ammonium acetate) (溶劑 A) 和溶於 90% 乙腈 (acetonitrile) 的 0.1% 甲酸 (formic acid) (溶劑 B) 組成，流速為 0.4 mL/min。
- iv. 線性梯度的分佈為：0-1 分鐘，10% 溶劑 B 流速為 0.3 mL min⁻¹; 0.5 分鐘，10% 溶劑 B 增至 95% (流速從 0.3 mL min⁻¹ 增至 0.4 mL min⁻¹); 3 分鐘，95% 溶劑 B (流速為 0.3 mL min⁻¹); 1 分鐘，95% 溶劑 B 減至 10% (流速從 0.4 mL min⁻¹ 減至 0.3 mL min⁻¹); 2.5 分鐘，10% 溶劑 B (流速為 0.3 mL min⁻¹)。
- v. 用 95% 溶劑 B 進行等度洗脫 (isocratic elution) 約 6-7 分鐘。
- vi. 樣品儲存池和柱溫箱分別保持在 4°C 和室溫 (25°C)。注射體積為 5 uL。
- vii. 接著使用 Agilent 6460 triple quadrupole 系統 (Agilent Technologies, Waldbronn, 德

國) 進行質譜分析。

viii. 根據以下操作參數，使用 positive electrospray ionization 模式：

1. Dry gas temperature: 350°C
2. Dry gas flow rate: 11 L/min
3. Nebulizer pressure: 50 PSI
4. Sheath gas temperature: 350°C
5. Sheath gas flow rate: 11 L/min
6. Nozzle voltage: 0 V
7. Capillary voltage: 3500 V

ix. 四個標的化合物 (isoniazid, acetyl-isoniazid, rifapentine, desacetyl-rifapentine) 和各自同位素之 transition pairs 和 collision energy (CE) 相關資料，列於下表。

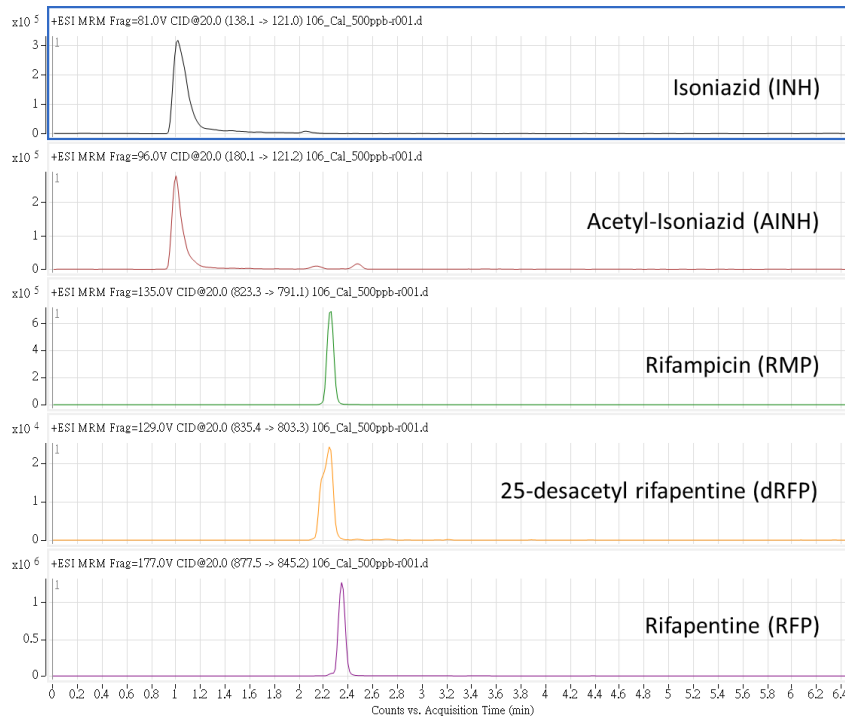
Compound name	Formula	R _t (min)	CE (V)	Precursor Ion (m/z)	Production ion Q1 (m/z)	Production ion Q2 (m/z)
Isoniazid	C ₆ H ₇ N ₃ O	1.016	20	138.0	121.0	79.0
Acetyl-isoniazid	C ₈ H ₉ N ₃ O ₂	1.000	20	180.0	121.2	138.1
Rifapentine	C ₄₇ H ₆₄ N ₄ O ₁₂	2.344	20	877.3	845.2	453.2
Desacetyl-rifapentine	C ₄₅ H ₆₂ N ₄ O ₁₁	2.244	20	835.2	803.3	153.1
Rifampicin	C ₄₃ H ₅₈ N ₄ O ₁₂	2.259	20	823.3	791.1	399.0
Isoniazid-d4	C ₆ H ₃ D ₄ N ₃ O	1.002	20	142.1	125.1	83.1
Acetyl-isoniazid-d4	C ₈ H ₅ D ₄ N ₃ O ₂	0.999	20	184.1	125.1	142.2
Rifapentine-d8	C ₄₇ H ₅₆ D ₈ N ₄ O ₁₂	2.330	40	885.5	151.1	95.1
Desacetyl-rifapentine-d8	C ₄₅ H ₅₄ D ₈ N ₄ O ₁₁	2.230	20	843.5	811.3	95.1
Rifampicin-d8	C ₄₃ H ₅₀ D ₈ N ₄ O ₁₂	2.245	20	831.2	799.2	406.9

丙、校正標準：

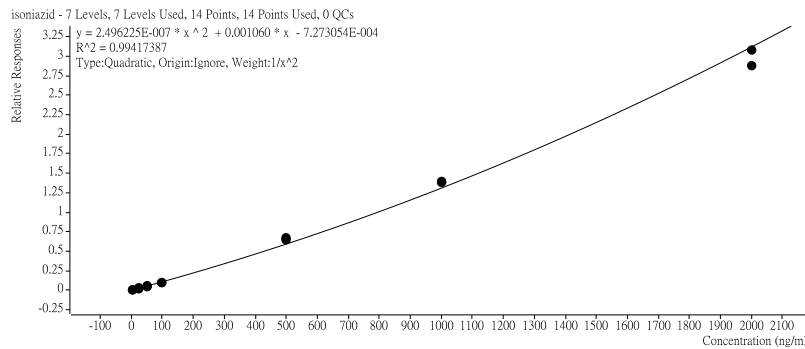
為了準備 1000 µg/mL 的溶劑，我們將 isoniazid 溶於水中，acetyl-isoniazid、rifapentine、desacetyl-rifapentine 則是溶於甲醇中，這些含有 isoniazid、acetyl-isoniazid、rifapentine、desacetyl-rifapentine 的溶劑則是將加入含有內標準品的溶液中，來取得 5、25、50、100、500、1000、2000、5000、10000、20000 以及 30000 ng/mL 不同的濃度，最後來構築出校正曲線。曲線的描繪則是針對不同藥物濃度畫出鋒面積比而得到。

結核藥物的標準混合物及其代謝物的質量色譜圖 (如下頁圖)。針對每個待測定化合物製作高、低濃度的兩條校正曲線，每個校正曲線各有 7 個濃度點，並且要求測定係數大於

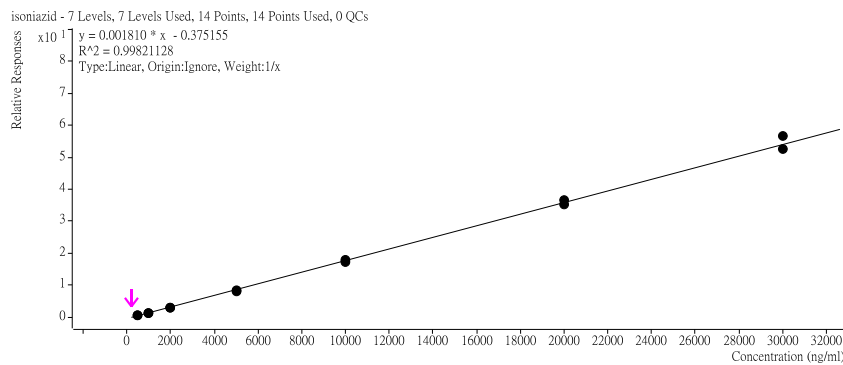
0.996。我們使用三個濃度來評估準確性，其回收率必須在 100±15%內。除濃度低於 5 ng/mL 以外，同日與日間準確度必須在 2%的相對標準偏差內。



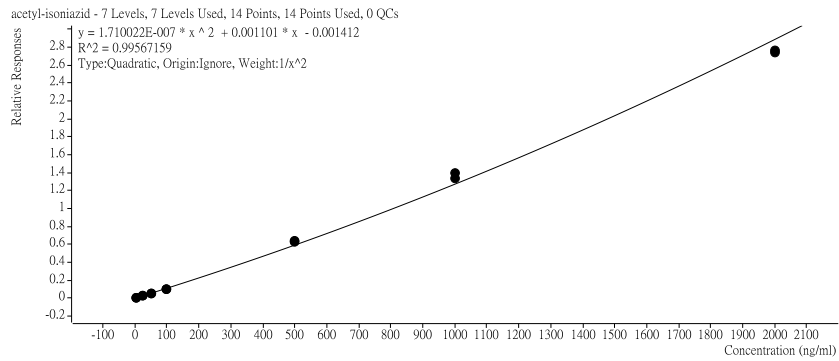
Isoniazid, 5-2000 ng/mL



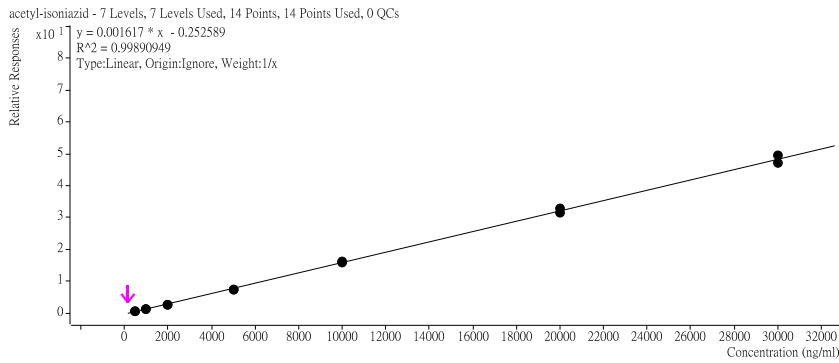
Isoniazid, 500-30000 ng/mL



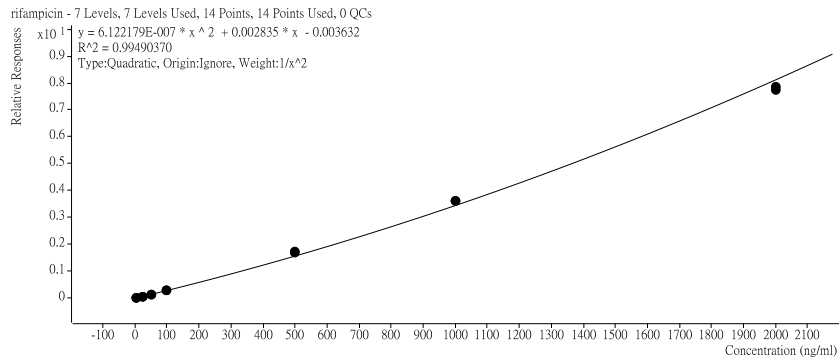
Acetyl-isoniazid, 5-2000 ng/mL



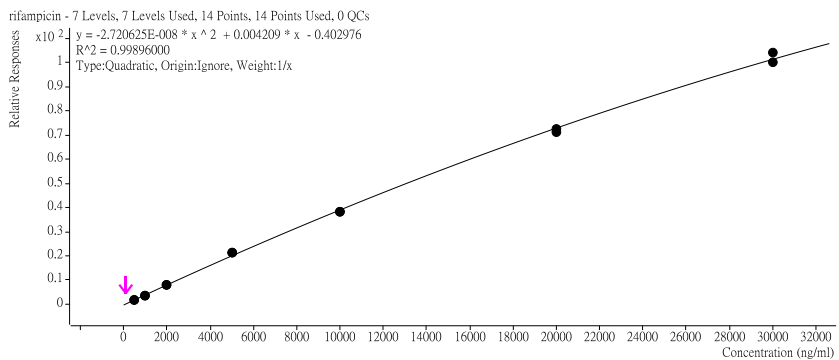
Acetyl-isoniazid, 500-30000 ng/mL



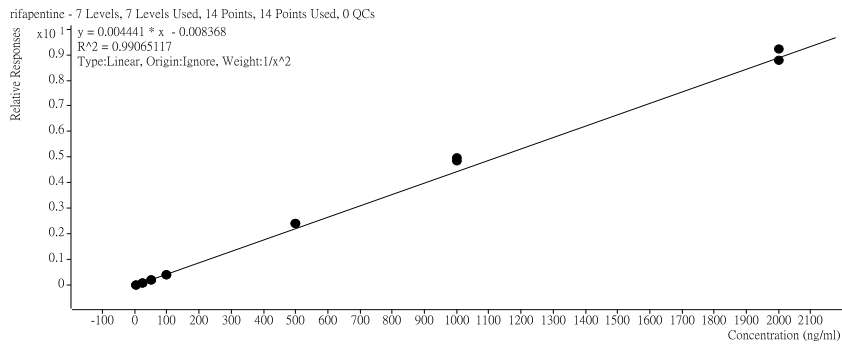
Rifampicin, 5-2000 ng/mL



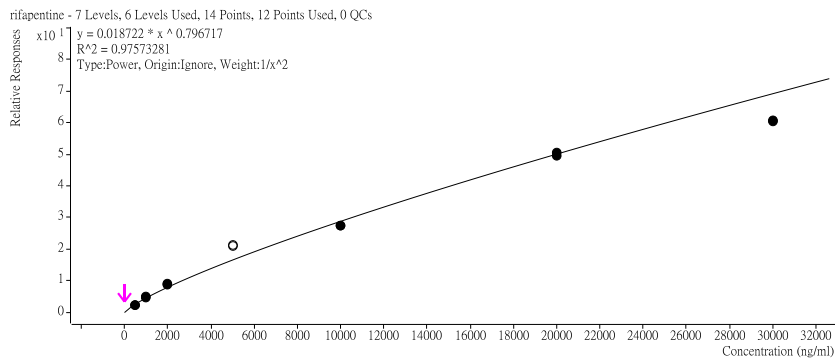
Rifampicin, 500-30000 ng/mL



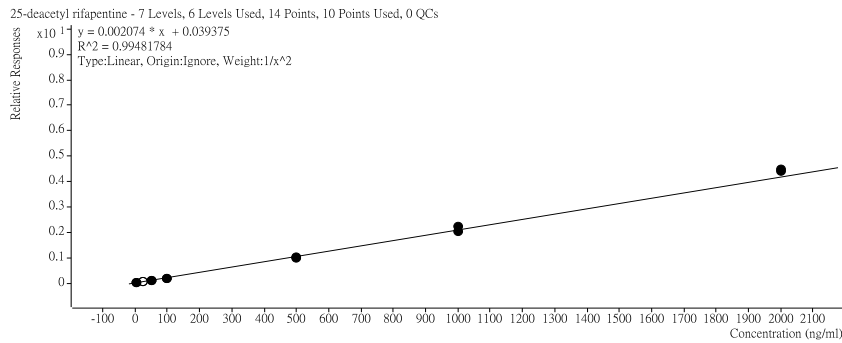
Rifapentine, 5-2000 ng/mL



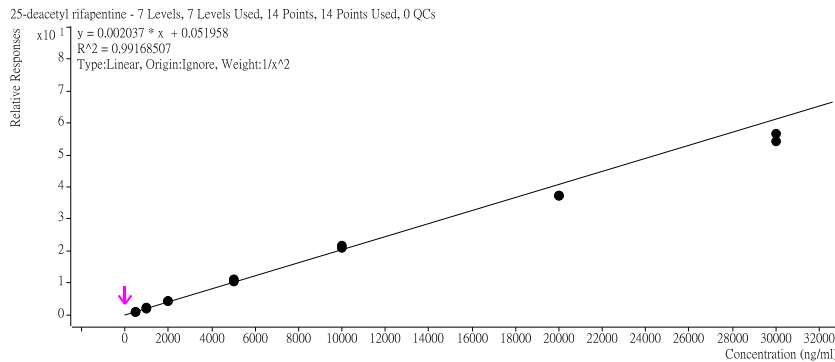
Rifapentine, 500-30000 ng/mL



25-Desacetyl-rifapentine, 5-2000 ng/mL



25-Desacetyl-rifapentine, 500-30000 ng/mL



第四章 討論

在這一個試著探討服用 3HP 過程中是否產生 SDR 的危險因子的前瞻性研究中，我們獲得了幾個重要的觀察與成果：

第一、3HP 治療過程中，發生 SDR 的機率是 10.3%。其中，大部分是 flu-like symptoms（所有人當中的 7.8%），而 1.4% 的人，會出現 hypotension 的副作用。

第二、在這個平均年齡是 47.0 歲的潛伏結核感染接觸者當中（年齡分布由 13.6 歲到 93.7 歲），3HP 治療的完成率為 83.9%。

第三、*TLR1* 和 *NAT2* 的基因多型性，與發生 SDR 有顯著相關，風險大約是 5.04 倍。

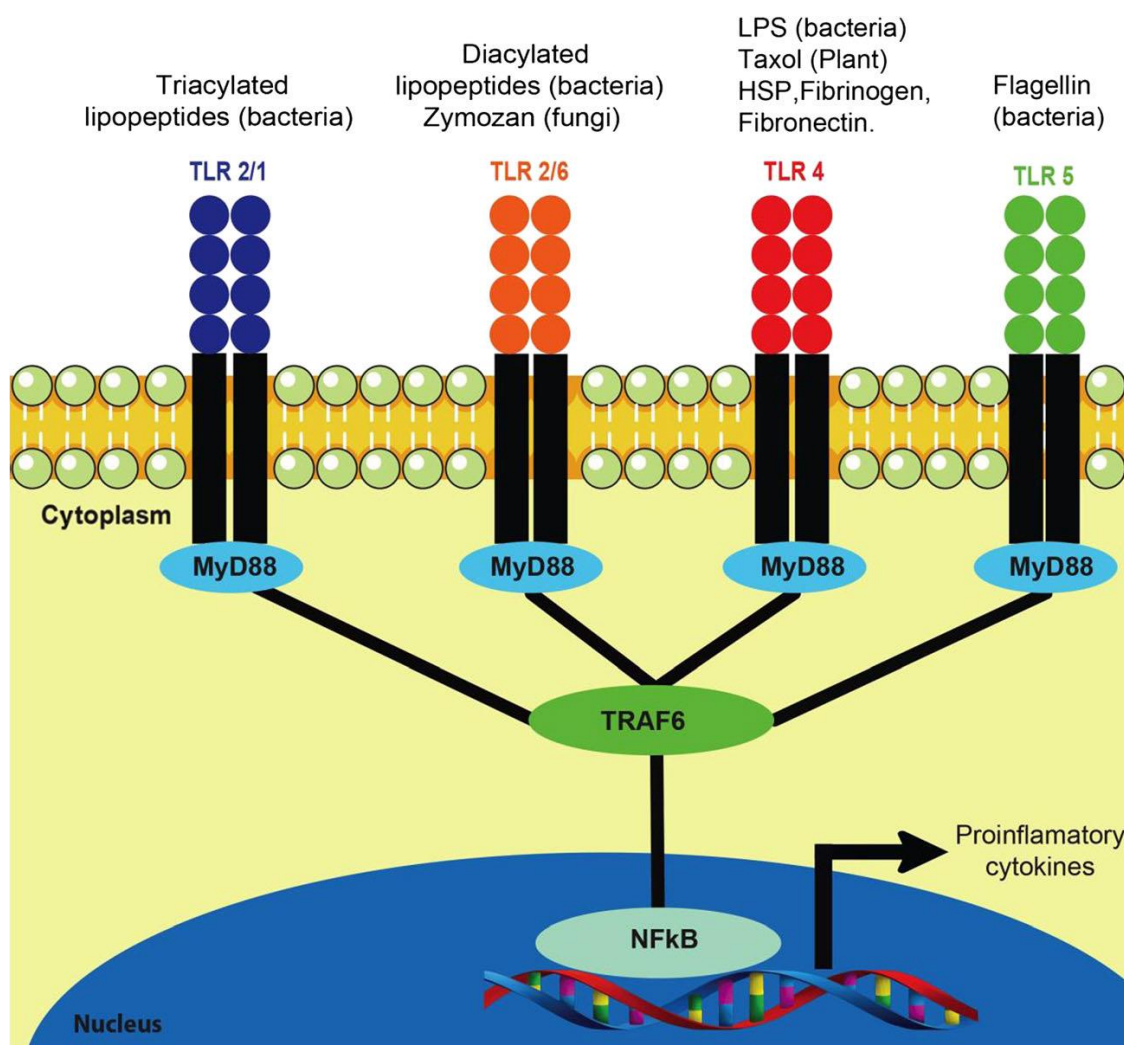
第四、服藥後 24 小時的 INH/acetyl-INH 血中濃度，與發生 SDR 有顯著相關，每增加 1 ug/mL，風險大約是 2.02 倍。

第五、血中的免疫發炎指標，雖然與當下是否發生 SDR 有顯著相關，但服藥前的血中免疫發炎指標濃度，完全無法預測服用 3HP 之後是否會發生 SDR。

第六、抗結核藥物的 INH 以及 Rifamycin 類藥物，已經可以很準確的定量血中濃度，其偵測的閾值是 5 ng/mL。

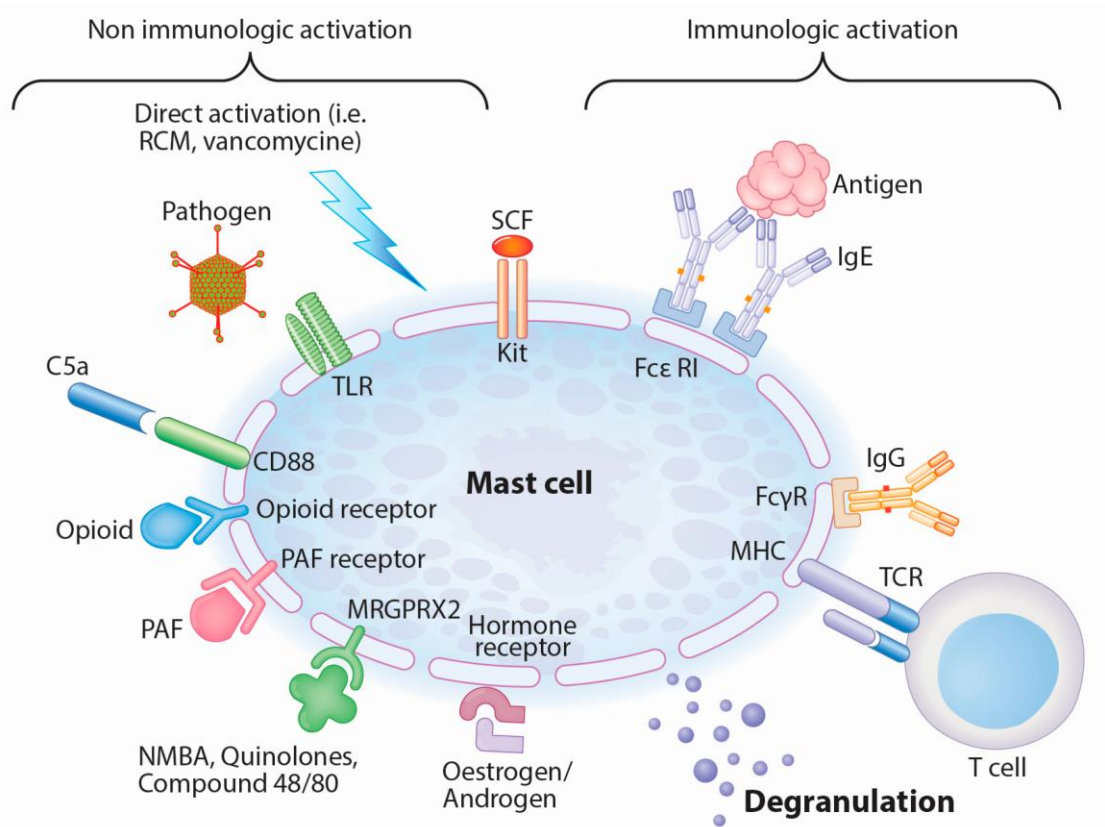
本研究團隊在去年的期末報告中，已經揭露了 3HP 相關 SDR 可能的機制是來自於 INH 的代謝不良所造成，相關的研究，也已發表在知名的國際期刊（*Journal of Clinical Medicine*；影響係數 5.688）。今年的持續研究，仍然看到這個現象，INH 的代謝基因、以及 INH 的血中濃度，都顯著的與 SDR 發生有相關。

不過，過去的研究中，沒有報告過 *TLR1* 的基因型與 SDR 有相關，這是一個新的發現。Toll-Like Receptors 是 innate immunity 當中重要的一環，與結核病、intracellular pathogen 的宿主免疫，有相當多的報告。但為何這樣的免疫反應上的調控，會影響潛伏結核感染者治療後的免疫相關副作用，目前仍不清楚。未來，我們應該針對本研究中因為 call rate <0.9 的 SNPs，進行第二波的檢測，希望能夠有更多的基因資料能在篩檢之後進入 polygenetic risk score 的分析，找出更多有意義的 SNP sites。



最近的研究指出，接觸、感染各種病原菌之後，可以透過各種 Toll-Like Receptors 調控免疫，產生所謂的 innate hypersensitivity (上圖) [38]。更有報告，某些對於藥物，甚至是抗生素的過敏反應，也是透過 Toll-Like Receptors (下圖)

[39]。但這樣的概念，目前依然很模糊，而且從未與結核菌有任何的連結。或許，未來應該針對使用 3HP 產生嚴重副作用的個案，採取血液檢體進行 mRNA sequencing，了解過程中究竟是哪些基因被活化而導致副作用的發生。



到目前為止，我們的發現，提出了一個可能的假設，因為使用 high-dose 的 INH，可能導致某些 molecules、complexes 的 non-specific binding，進一步透過 innate immunity 活化某些發炎路徑，導致 hypersensitivity reaction。這樣的反應，在某些 predisposing host，可能是因為 host genetic polymorphism，致使該發炎路徑的反應增強，因此出現了臨床上看到的 3HP-related systemic drug reaction。不過，這一切，都需要未來更多的研究，才能夠證實、理解其中複雜的免疫反應機轉。不過，也唯有徹底了解，才可能進一步預測副作用的發生，也才能夠在臨床上用來做 risk stratification，挑選出適當的個案接受 3HP 治療。

第五章 結論與建議

這個研究，可以提供臺灣公共衛生政策上三個重要的參考。

1. 藉由了解臺灣地區使用 3HP 進行潛伏結核感染治療發生 SDR 的機率，針對不同的年齡層，擬定更有效率、更安全的潛伏結核感染治療政策。
2. 根據副作用發生的危險因子，量身訂做各族群治療前檢測及治療中追蹤之標準流程。
3. 藉由宿主 *TLR1* 與 *NAT2* 基因型的鑑定，可能可以挑選出更安全的族群，進行 3HP 治療，減少副作用的發生。

第六章計畫重要成果及國家政策應用之具體建議

1.計畫之新發現或新發明

三個月 rifapentine 合併高劑量 isoniazid 這樣的治療（簡稱 3HP），10.3%的人產生全身性藥物反應。發生的危險因子，與 INH 代謝、以及 *TLR1* 基因多型性有關。

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

希望藉由本研究的結果，可以讓醫師了解發生 3HP 嚴重副作用的危險因子，未來或許能讓民眾得到簡便、安全的潛伏結核感染治療。

3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

希望藉由本研究的結果，可以臺灣潛伏結核感染的預防性治療，變得更安全、更容易落實。

第七章 參考文獻

1. Taiwan Centers for Disease Control: **Statistics of communicable diseases and surveillance report, 2016**, 4th edn. Taipei: Taiwan Centers for Disease Control; 2017.
2. [<https://monitor.cdc.gov.tw>]
3. Styblo K: **Recent advances in epidemiological research in tuberculosis**. *Advances in tuberculosis research Fortschritte der Tuberkuloseforschung Progres de l'exploration de la tuberculose* 1980, **20**:1-63.
4. Chiang CY, Riley LW: **Exogenous reinfection in tuberculosis**. *The Lancet infectious diseases* 2005, **5**(10):629-636.
5. **Essential components of a tuberculosis prevention and control program. Recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis**. *MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports / Centers for Disease Control* 1995, **44**(RR-11):1-16.
6. World Health Organization: **Global tuberculosis report 2015**. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2016.
7. World Health Organization: **The End TB Strategy**. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2015.
8. Wang JY, Lee LN, Lai HC, Hsu HL, Liaw YS, Hsueh PR, Yang PC: **Prediction of the tuberculosis reinfection proportion from the local incidence**. *J Infect Dis* 2007, **196**(2):281-288.
9. Denholm JT, Matteelli A, Reis A: **Latent tuberculous infection: ethical considerations in formulating public health policy**. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 2015, **19**(2):137-140.
10. Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K, Committee IE, Centers for Disease C, Prevention: **Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection - United States, 2010**. *MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports / Centers for Disease Control* 2010, **59**(RR-5):1-25.
11. **Fatal and severe hepatitis associated with rifampin and pyrazinamide for the treatment of latent tuberculosis infection--New York and Georgia, 2000**. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2001,

50(15):289-291.

12. Ijaz K, Jereb JA, Lambert LA, Bower WA, Spradling PR, McElroy PD, Iademarco MF, Navin TR, Castro KG: **Severe or fatal liver injury in 50 patients in the United States taking rifampin and pyrazinamide for latent tuberculosis infection.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2006, **42**(3):346-355.
13. McElroy PD, Ijaz K, Lambert LA, Jereb JA, Iademarco MF, Castro KG, Navin TR: **National survey to measure rates of liver injury, hospitalization, and death associated with rifampin and pyrazinamide for latent tuberculosis infection.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2005, **41**(8):1125-1133.
14. Medinger A: **Death associated with rifampin and pyrazinamide 2-month treatment of latent mycobacterium tuberculosis.** *Chest* 2002, **121**(5):1710-1712.
15. Sterling TR, Villarino ME, Borisov AS, Shang N, Gordin F, Bliven-Sizemore E, Hackman J, Hamilton CD, Menzies D, Kerrigan A *et al*: **Three months of rifapentine and isoniazid for latent tuberculosis infection.** *The New England journal of medicine* 2011, **365**(23):2155-2166.
16. Leung CC, Rieder HL, Lange C, Yew WW: **Treatment of latent infection with m. tuberculosis: update 2010.** *Eur Respir J* 2010.
17. **Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This is a Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). This statement was endorsed by the Council of the Infectious Diseases Society of America. (IDSA), September 1999, and the sections of this statement.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000, **161**(4 Pt 2):S221-247.
18. Sterling TR, Bethel J, Goldberg S, Weinfurter P, Yun L, Horsburgh CR: **The scope and impact of treatment of latent tuberculosis infection in the United States and Canada.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006, **173**(8):927-931.
19. Hirsch-Moverman Y, Daftary A, Franks J, Colson PW: **Adherence to treatment for latent tuberculosis infection: systematic review of studies in the US and Canada.** *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 2008, **12**(11):1235-1254.
20. Menzies D, Long R, Trajman A, Dion MJ, Yang J, Al Jahdali H, Memish Z, Khan K, Gardam M, Hoepfner V *et al*: **Adverse events with 4 months of rifampin therapy or 9 months of isoniazid**

therapy for latent tuberculosis infection: a randomized trial. *Annals of internal medicine* 2008, **149**(10):689-697.

21. **A double-blind placebo-controlled clinical trial of three antituberculosis chemoprophylaxis regimens in patients with silicosis in Hong Kong.** Hong Kong Chest Service/Tuberculosis Research Centre, Madras/British Medical Research Council. *The American review of respiratory disease* 1992, **145**(1):36-41.
22. Yee D, Valiquette C, Pelletier M, Parisien I, Rocher I, Menzies D: **Incidence of serious side effects from first-line antituberculosis drugs among patients treated for active tuberculosis.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2003, **167**(11):1472-1477.
23. Aspler A, Long R, Trajman A, Dion MJ, Khan K, Schwartzman K, Menzies D: **Impact of treatment completion, intolerance and adverse events on health system costs in a randomised trial of 4 months rifampin or 9 months isoniazid for latent TB.** *Thorax* 2010, **65**(7):582-587.
24. Holland DP, Sanders GD, Hamilton CD, Stout JE: **Costs and cost-effectiveness of four treatment regimens for latent tuberculosis infection.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2009, **179**(11):1055-1060.
25. Menzies D, Adjobimey M, Ruslami R, Trajman A, Sow O, Kim H, Obeng Baah J, Marks GB, Long R, Hoepfner V *et al*: **Four Months of Rifampin or Nine Months of Isoniazid for Latent Tuberculosis in Adults.** *The New England journal of medicine* 2018, **379**(5):440-453.
26. Dhillon J, Dickinson JM, Sole K, Mitchison DA: **Preventive chemotherapy of tuberculosis in Cornell model mice with combinations of rifampin, isoniazid, and pyrazinamide.** *Antimicrob Agents Chemother* 1996, **40**(3):552-555.
27. Miyazaki E, Chaisson RE, Bishai WR: **Analysis of rifapentine for preventive therapy in the Cornell mouse model of latent tuberculosis.** *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**(9):2126-2130.
28. Chapuis L, Ji B, Truffot-Pernot C, O'Brien RJ, Raviglione MC, Grosset JH: **Preventive therapy of tuberculosis with rifapentine in immunocompetent and nude mice.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1994, **150**(5 Pt 1):1355-1362.
29. Villarino ME, Scott NA, Weis SE, Weiner M, Conde MB, Jones B, Nachman S, Oliveira R, Moro RN, Shang N *et al*: **Treatment for preventing tuberculosis in children and adolescents: a randomized clinical trial of a 3-month, 12-dose regimen of a combination of rifapentine and isoniazid.** *JAMA Pediatr* 2015, **169**(3):247-255.
30. Getahun H, Matteelli A, Abubakar I, Aziz MA, Baddeley A, Barreira D, Den Boon S, Borroto

- Gutierrez SM, Bruchfeld J, Burhan E *et al*: **Management of latent Mycobacterium tuberculosis infection: WHO guidelines for low tuberculosis burden countries.** *Eur Respir J* 2015.
31. Stennis NL, Burzynski JN, Herbert C, Nilsen D, Macaraig M: **Treatment for Tuberculosis Infection With 3 Months of Isoniazid and Rifapentine in New York City Health Department Clinics.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2015.
 32. Sun HY, Huang YW, Huang WC, Chang LY, Chan PC, Chuang YC, Ruan SY, Wang JY, Wang JT: **Toward a safe and reachable preventive therapy for latent tuberculosis infection: A multicentre randomised controlled trial in Taiwan.** *Tuberculosis* 2018, **111**:121-126.
 33. Collazos J, Asensi V, Martin G, Montes AH, Suarez-Zarracina T, Valle-Garay E: **The effect of gender and genetic polymorphisms on matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor (TIMP) plasma levels in different infectious and non-infectious conditions.** *Clin Exp Immunol* 2015, **182**(2):213-219.
 34. Kader AK, Shao L, Dinney CP, Schabath MB, Wang Y, Liu J, Gu J, Grossman HB, Wu X: **Matrix metalloproteinase polymorphisms and bladder cancer risk.** *Cancer Res* 2006, **66**(24):11644-11648.
 35. **Cancer Therapy Evaluation Program. The revised common toxicity criteria.** In.
 36. Naranjo CA, Busto U, Sellers EM, Sandor P, Ruiz I, Roberts EA, Janecek E, Domecq C, Greenblatt DJ: **A method for estimating the probability of adverse drug reactions.** *Clin Pharmacol Ther* 1981, **30**(2):239-245.
 37. Sterling TR, Moro RN, Borisov AS, Phillips E, Shepherd G, Adkinson NF, Weis S, Ho C, Villarino ME, Tuberculosis Trials C: **Flu-like and Other Systemic Drug Reactions Among Persons Receiving Weekly Rifapentine Plus Isoniazid or Daily Isoniazid for Treatment of Latent Tuberculosis Infection in the PREVENT Tuberculosis Study.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2015, **61**(4):527-535.
 38. Michels KR, Lukacs NW, Fonseca W: **TLR Activation and Allergic Disease: Early Life Microbiome and Treatment.** *Curr Allergy Asthma Rep* 2018, **18**(11):61.
 39. Spoerl D, Nigolian H, Czarnetzki C, Harr T: **Reclassifying Anaphylaxis to Neuromuscular Blocking Agents Based on the Presumed Patho-Mechanism: IgE-Mediated, Pharmacological Adverse Reaction or "Innate Hypersensitivity"?** *Int J Mol Sci* 2017, **18**(6).

