

計畫編號：MOHW107-CDC-C-114-000105

## 疾病管制署 107 年委託科技研究計畫

計畫名稱：潛伏結核感染治療策略研究計畫

### 年度研究報告

執行單位：財團法人生技醫療科技政策研究中心

計畫主持人：陳維昭特聘研究員

協同主持人：彭汪嘉康特聘研究員、楊泮池特聘研究員、胡幼園特聘  
研究員

研究人員：王振源醫師、張立禹醫師、李枝新主任、黃伊文主任、黃  
虹綾醫師、林倬睿醫師、李孟叡醫師

執行期間：107 年 01 月 01 日至 107 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣伍佰萬元整

衛生福利部疾病管制署

107年委託科技研究計畫

(MOHW107-CDC-C-114-00105)

107年研究報告

財團法人生技醫療科技政策研究中心

# 目 錄

頁 碼

封面

目錄

## 一、 摘要

1. 中文 (2)

2. 英文 (4)

## 二、 本文

1. 前言 (7)

2. 材料與方法

子計畫 1 (10)

子計畫 2 (20)

3. 結果

子計畫 1 (30)

子計畫 2 (42)

4. 討論 (46)

5. 結論與建議 (50)

6. 計畫重要研究成果及對國家政策應用之具體建議 (51)

7. 參考文獻 (52)

共 (56) 頁

## 中文摘要

### 子計畫一：潛伏結核感染治療之藥物動力學分析及副作用監測

**背景：**相較於傳統 9 個月的預防性治療，為期 12 週的短程治療 (weekly RPT plus INH)，有較高的全身性藥物反應 (systemic drug reaction、SDR) 以及類流感症狀 (flu-like symptoms)，發生的原因和危險因子都不清楚，特別是相關藥物血清濃度的偵測與分析，也幾乎沒有研究提及。

**方法：**在這個前瞻性、多機構的研究當中，針對 12 歲以上活動性結核病個案之密切接觸者於接受預防性治療前，邀請他們加入臨床研究，規則檢測血清之藥物濃度，並監測服藥後之臨床反應。

**結果：**截至 2018/10/30 為止，共有 331 位接觸者加入研究，其中有 131 人完成藥物濃度檢測 (PK cohort)，包括 52 人於服藥後 6 小時接受檢測 (C6)、85 人於服藥後 24 小時接受檢測 (C24)。另有 177 人完成藥物代謝酵素基因多型性檢測 (SNP cohort)。兩個 cohort 當中，分別有 13 (9.9%)、14 (7.9%) 人在服用 3HP 治療當中產生全身性藥物反應 (systemic drug reaction、SDR)。分析結果發現，NAT2、CYP2E1、INH 劑量、以及 C24 的 INH 濃度，與發生 SDR 有密切相關。

**結論：**三個月 RPT 合併高劑量 INH 的治療，產生 SDR 的機率是 8.8%，發生的原因，極有可能與 INH、而非 RPT 有密切相關。

### 子計畫二：現行潛伏結核治療處方中，9H 和 4R 兩種處方之使用情形及副作用監測

**背景：**不論是傳統 9 個月的預防性治療(9H)，或是近期開始實施的 4 個月的預防性治療(4R)，在藥物動力學、副作用，以及全身性藥物反應 (systemic drug reaction、SDR)，發生的原因和危險因子都不清楚，特別是相關藥物血清濃度的偵測與分析，也幾乎沒有研究提及，更遑論本土的資料。此外，我們也希望能確認 QuantiFERON-TB Gold Plus 能否評估 CD8+ T 細胞的活性，是否會隨著預防性藥物的投予，有逐步下降的趨勢，進一步作為潛伏結核感染療效評估的工具。

**方法：**在這個前瞻性、多機構的研究當中，納入 13 歲以上接受治療之抗藥性結核菌潛伏感染個案，監測血中 isoniazid 和 rifampin 濃度，並詳細記錄每次服藥後之反應，以了解臺灣人接受潛伏感染治療後血中的藥物濃度，並與副作用的種類、發生機率進行統計分析研究。同時，我們將定期追蹤 QuantiFERON-TB Gold Plus，評估潛伏結核感染治療

後 CD8+ T cell 反應的變化，並與日後發病機率進行相關性比較。

**結果：**截至 2018/10/30 為止，共有 18 位接觸者加入研究，其中有 2 人中途退出，剩餘 16 人中，9H 組及 4R 組各有 8 人。其中已收到 7 位個案的藥物濃度檢測檢體（9H 組 2 人、4R 組 5 人，且皆無取得完治前一個月的血清濃度）。另有已收到 10 位個案的 Cytokine 檢測，但僅有 5 人完成 3 次 Cytokine 檢測、2 人完成兩次 cytokine 檢測，3 人僅完成一次 cytokine 檢測。兩組個案中，9H 組和 4R 組各有 0 人（0%）和 1 人（12.5%）在治療當中產生全身性藥物反應（systemic drug reaction、SDR）。另外，9H 組和 4R 組各有 1 人（12.5%）和 1 人（12.5%）發生 Grade.2 的 Hepatitis。因目前個案數少及抽血資料能有部分仍在追蹤中，無法分析出較明確之結果。若依目前僅有的資料，僅能由 Cytokine 的趨勢圖，推估其中可能的相關性，包括 IP-10 和頭痛、TNF- $\alpha$  和頭暈、倦怠，以及 MCP-2 和噁心，但需要更多資料佐證。最後在 QuantiFERON-TB Gold Plus 的部分，57%的個案追蹤結果為持續下降，29%的個案先下降再上升，14%的個案不降反升。雖然個案數少，但依此結果，對於以 QuantiFERON-TB Gold Plus 追蹤治療效果，可能需要審慎評估。

**結論：**依目前現有資料，不足以評估藥物濃度及基因多型性在 9H 和 4R 兩種處方上，和 SDR 的關聯性。而 IP-10、TNF- $\alpha$  及 MCP-2 需要更多資料去證實其是否與藥物副作用，甚至 SDR 有關連性。最後，以 QuantiFERON-TB Gold Plus 做為評估追蹤治療效果的工具時，可能要持保留態度。

**關鍵詞：**潛伏結核感染、藥物動力學、基因多型性、全身性藥物反應、Isoniazid、Rifapentine、QuantiFERON-TB Gold Plus

## Abstract

### **1. Pharmacodynamic Analysis and Adverse Event Monitoring for Latent Tuberculosis Treatment**

**Background:** Though short-course 12-weeks regimen has a higher completion rate and a lower risk of hepatotoxicity than conventional 9-months regimen, the incidences of systemic drug reaction (SDR) and flu-like symptoms are higher. The underlying pathophysiology and risk factors for these adverse reaction are poorly understood because studies are currently lacking, especially those combining pharmacokinetic monitoring.

**Methods:** In this prospective, multi-center study, subjects aged  $\geq 12$  will be invited to join the study if they are contacts of patients with open tuberculosis or if they are cases of latent tuberculosis infection diagnosed based on either tuberculin skin test or interferon-gamma release assay. Once they receive preventive therapy according to the current public health policy, we will take blood sample for pharmacokinetic monitoring during blood tests of routine clinical practice and record clinical response and any adverse events after treatment under a weekly basis. We will then calculate the incidence of each adverse event, evaluate the pharmacokinetic parameters of Taiwanese, and analyze the correlation between serum drug levels and risk of adverse event.

**Results:** Up to Oct. 30, 2018, a total of 331 TB close contacts participated in the study. Among them, 131 entered into the pharmacokinetic (PK) cohort. Peripheral blood was sampled at 6 hours after dosing (C6) in 52 and at 24 hours after dosing (C24) in 85. The other 177 completed genotyping of drug metabolizing enzyme (SNP cohort). Among the two cohorts, 13 (9.9%) and 14 (7.9%) experienced systemic drug reaction (SDR) during 3HP treatment. Further analyses revealed that *NAT2* SNPs, *CYP2E1* SNP, INH dose, and C24 INH plasma level were significantly associated with development of SDR.

**Discussion:** The risk of SDR during 3-month RPT plus high-dose INH treatment was 8.8% and was likely due to INH, but not RPT.

### **2. The clinical condition and side effects evaluation in 9H and 4R regimen for the treatment of latent tuberculosis infection**

**Background:** No matter in the conventional 9-months regimen (9H) or the 4 month regimen (4R) for

prophylactic therapy in cases exposing to isoniazid-resistance tuberculosis, the pharmacokinetic data for Asians, especially Taiwanese, is rare. The same problem, there is no reference data about the side effect condition in Taiwan. We have too less data to predict the possibility of side effects. Besides, we want to evaluate if we can evaluate the CD-8+ T-cell response and the future active tuberculosis transformation by regular follow-up QuantiFERON-TB Gold Plus data

**Methods:** We conduct this prospective, multi-center study to enroll subjects aged  $\geq 13$  year and receiving preventive therapy for latent tuberculosis, whose index cases are drug-resistant strain. By regular monitoring of serum levels of isoniazid, and rifampin and detailed recording of clinical response after each dosing of preventive therapy, we will collect the pharmacokinetic data of Taiwanese, calculate the incidence of each adverse event, and evaluate the statistic correlation. At the same time, we will follow up QuantiFERON-TB Gold Plus test regularly to evaluate the CD8+ T-cell activity after starting preventive treatment, and the relationship with the risk of reactivation as active tuberculosis

**Results:** Up to Oct. 30, 2018, a total of 18 TB close contacts participated in the study, but 2 of them aborted from the program. Among the residual 16 cases, 8 cases belong to 9H group, and the other 8 cases belong to 4Rgroup. Peripheral blood was sampled for drug concentration in 7 cases (2 in 9H group and 5 in 4R group. But no sample of the last month of treatment course was available). Peripheral blood for cytokine evaluation was sampled in 10 cases, but there were only 5 cases sampled 3 times, and 2 cases sampled 2 times only (both due to treatment interruption). There were 0 case (0%) and 1 case (12.5%) in 9H and 4R group suffering from systemic drug reaction (SDR). Besides, there were 1 case (12.5%) and 1 case (12.5%) Grade.2 hepatitis in each group.

Due to the current case number is small and partial blood sampling still be processing, a more defined result could not be disclosed now, especially those about the drug concentration and genetic polymorphism. According to the available data, we could evaluate the possible relationship between cytokine and adverse effect by the trend of cytokine level change, including IP-10 vs headaches, TNF- $\alpha$  vs dizziness/ malaise, and MCP-2 vs nausea. But we need more evidence to proof them. Finally, in the QuantiFERON-TB Gold Plus follow-up results, only 57% cases showed decreased continuously, 29% cases would decrease at first and

elevate later, and the residual 14% case increased! Although the case number is small, however, we need prudent assessment about if using QuantiFERON-TB Gold Plus as follow-up tool to evaluate the treatment response.

**Discussion:** According to the current available data, we could not evaluate the relationship between drug concentration/ genetic polymorphism and SDR while receiveing 9H or 4R regimen. We need more data to proof if IP-10/ TNF-  $\alpha$  / MCP-2 have association with adverse effet, even SDR. Finally, be prudent if using QuantiFERON-TB Gold Plus as evaluation tool for LTBI treatment effect.

**Keywords:** latent tuberculosis infection, pharmacokinetic, genetic polymorphism, adverse reaction, tuberculosis, systemic drug reaction, isoniazid, rifapentine



## 第一章、前言

結核病仍然是世界上最重要的感染症之一。而台灣結核病的盛行率，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]。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 [2, 3]。因此，如何於臨床上找出潛伏結核感染的接觸者，並進一步投予預防性治療 (preventive therapy)，是公共衛生政策上控制、甚至根除結核病很重要的一環 [4]。

二十世紀末，有鑑於全世界結核病的疫情仍日漸攀升，世界衛生組織訂了一個千禧年的願景，希望能夠在西元 2015 年以前逆轉結核病疫情上升的趨勢。在全世界的努力之下，這個願望終於達成。但根據統計，在 2012 年中，全世界仍有 8,600,000 個新個案，同時有 1,300,000 人死於結核病。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 [5]。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 (latent tuberculosis infection) 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)。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 10~15% 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 [6]。

由於結核菌素皮膚試驗 (tuberculin skin test) 已經有超過 100 年的使用經驗，醫護人員對它有深入的了解，因此，以往一向使用結核菌素皮膚試驗來做為潛伏結核感染的診斷依據。目前結核菌素皮膚試驗的做法，多半採用 Mantoux 標準方法。簡單的說，就是取出活性相當於 5 個

單位的標準結核菌素 (PPD-S) 使用 27 號針頭皮下注射在前臂無靜脈處 (請注意, 不同廠牌的結核菌素活性並不相同, 注射時須按照相對活性計算出所需要的量), 注射的深度必須是剛好在皮膚表層之下, 注射完後在皮膚的表面會有一個大約 0.6 到 1 公分的白色突起。檢驗結果必須在注射後 48 至 72 小時之間, 也就是注射處腫脹最嚴重的時候判讀。判讀的標準是依據肉眼觀察或觸摸發現腫脹的位置, 然後測量最大的橫徑。如果腫脹大於或等於臨界值, 就是陽性反應。

結核菌素含有許多結核菌的非特異性(nonspecific)抗原, 因此, 可能因為之前卡介苗(*bacille Calmette-Guérin* [BCG] vaccine) 的接種或是曾經感染非典型分枝桿菌 (nontuberculous mycobacteria) 而造成偽陽性的檢測結果 [7, 8]。不過, 研究已經證實在剛出生施打一劑、之後不再追加卡介苗的世代, 卡介苗對於結核菌素皮膚試驗的影響較低 [9, 10]。但另一方面, 也可能因為宿主嚴重的疾病, 包括結核病本身, 或是任何原因導致的宿主免疫力不足, 而造成偽陰性的檢測結果。在不同的地區, 由於卡介苗的接種, 以及環境中的非典型分枝桿菌的盛行率不同, 因此, 判讀結核菌素皮膚試驗所用的臨界值, 可能會有所不同。而且, 前一次的檢測, 會刺激體內產生免疫反應, 而造成下一次檢測的偽陽性, 也就是所謂的 booster effect。此外, 結核菌素注射的不當或結果觀察的偏差, 都會造成錯誤的檢測結果, 整個過程需要兩次的診視, 執行上也十分不方便。

近年來, 新一代的檢驗試劑 — 丙型干擾素放試驗 (interferon-gamma release assay), 利用結核菌專一之抗原, 包括 ESAT-6 (early secreted antigenic substance – 6 kD)、CFP-10 (culture filtrated protein – 10 kD)、以及 TB7.7, 偵測週邊血液淋巴球所產生之免疫反應, 已被廣泛證實在 5 歲以上的受試者, 在測量宿主對於結核菌之免疫反應時, 具有高敏感度與特異度, 因為大多數的非典型分枝桿菌以及 *M. bovis* BCG 都不具有這幾個抗原 [11, 12]。當今市面上商品化試劑有兩種, 分別是 QuantiFERON-TB Gold In-Tube 和 T-SPOT.TB。因此, 目前的診治指引是建議兩者任一陽性且排除活動性結核, 即可判定為潛伏結核感染 [13]。但由於使用上的方便性以及較高的特異性, 因此臺灣地區的公共衛生政策已由 2016 年起使用丙型干擾素釋放試驗來為五歲以上的接觸者進行潛伏結核感染的篩檢。

而過去用來作為潛伏結核感染的預防性治療處方, 大致可分為幾種:(1)九個月的 isoniazid; (2)四個月的 rifampicin;(3)兩個月的 rifampicin 加上 pyrazinamide; 以及(4)三個月的 isoniazid 加上 rifampicin [8]。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 [14-16], 甚至有致死案例發生 [17]。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 [18]。九個月的 isoniazid, 仍舊是目前世界上最廣為使用的預防

性治療處方 [8, 19, 20]，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 [21]。然而，9 個月的療程，嚴重降低了預防性治療的達成率 [22, 23]。而且在台灣過去高病毒性肝炎的相較之下，rifampin 與 isoniazid 同樣具有毒性低的好處之外 [24, 25]，對肝臟副作用又更低 [23]，而且時程短接受度高 [18, 23]。在最近發表的文獻中，很多研究者利用統計模式、成本效益分析來比較預防性治療處方的公共衛生成效，結果大多偏向於使用 4 個月的 rifampin [26, 27]。

有關治療的處訪，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 [28]。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，可以使用各種預防性治療 (preventive therapy) 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% [4]。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 [29]。

這些動物研究的結果，促使了 Prevent TB Trial 這個臨床試驗的進行 [18]。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 [30]，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 [31]。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 [32]。有鑑於此，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，尤其是在亞洲這個結核病盛行的地區，目前仍沒有相關的研究報告。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？目前也都不清楚。同時，也沒有相關藥物血清濃度的研究數據，以了解副作用的發生是否與藥物代謝、藥物濃度過高有關。高劑量 isoniazid 和 rifapentine 的藥物動力學，在亞洲人身上是否與美洲、歐洲人種相同，仍是未解之謎。因此，我們設計了這個多醫院的前瞻性臨床試驗，納入 12 歲以上接受治療之潛伏結核感染個案，監測血中 isoniazid 和 rifapentine 濃度，並詳細記錄每次服藥後之反應，以了解臺灣人接受潛伏感染治療後血中的藥物濃度，並與副作用的種類、發生機率進行統計分析研究。

此外，對於指標個案為抗藥性結核的潛伏結核感染個案，在過去的政策中，並無建議的治療處方，多以規則追蹤取代治療。而 3HP 的處方，沒有現存的證據支持使用，加上又是間格性的給藥，一旦個案的用藥順從性不佳時，真正產生抗藥性結核的風險可能更高。然而，依據目前的資料，台灣的新病人中，約有 10% 為 isoniazid 抗藥，而 rifampin 抗藥的比例，也約有 1-2%；因此可以合理推斷，約有 12% 左右的接觸者，無法使用 3HP 的處方不過，自 2017 年 08 月 01 日起，台灣開始正式使用四個月的 rifampin(4R)，作為針對指標個案為 isoniazid 單一藥物抗藥的潛伏結核感染個案之治療處方，台灣的潛伏結核感染治療，又往前跨了一步。雖然之前關於短程 rifampin 用於潛伏結核感染的治療的研究不多，但是和九個月的 isoniazid (9H) 相較，在完治率和副作用發生上都有明顯的優勢，甚至如前面描述，更具有經濟效益 [24-27]。不過，和 isoniazid 加 rifapentine 的短程治療一樣，四個月 rifampin 處方的研究，一樣都是歐美的研究，無法確認是否亞洲人也會有相同的結果；而且副作用的發生率高低也沒有本土資料可供參考，更不用說如何妥善避免、預測、或處理發生的副作用。

此外，以往的丙型干擾素放試驗，受限於檢驗方式，無法分別 CD4+ 和 CD8+ T 細胞的反應，只能用於潛伏性結核感染的診斷，無法做為治療效果的評估工具。而新一代的丙型干擾素放試驗，QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus)，因為含有針對 CD8+ T 細胞的抗原，藉著兩管不同的抗原管 (TB1，含有 ESAT-6 和 CFP-10，用於偵測 CD4+ T 細胞的反應；TB2，含有新的 CD8 抗原，同時偵測 CD4+ 和 CD8 T+ 細胞的反應)。藉著偵測 CD8+ T 細胞功能是否下降，QuantiFERON-TB Gold Plus 被視為有機會成為結核感染的治療反應評估工具 [57]。基於潛伏結核感染雖然沒有引起臨床上的症狀，仍足以引起身體的免疫反應，那麼，QuantiFERON-TB Gold

Plus 應該也有機會能作為潛伏結核感染的治療效果評估工具。我們希望藉著規則追蹤病人的 QuantiFERON-TB Gold Plus，評估是否 CD8+ T 細胞的活性，會隨著預防性藥物的投予，有逐步下降的趨勢。

## 第二章 材料與方法

### 子計畫一：潛伏結核感染治療之藥物動力學分析及副作用監測

- (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、衛生福利部彰化醫院
- (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 (附表一、二、三)
  - 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. 監測潛伏結核感染治療藥物使用狀況，追蹤其後續副作用發生情形。
    - ii. 對於未完成預防性治療的個案，分析原因。
    - iii. 針對潛伏結核感染治療處方，進行藥物動力學相關分析。
    - iv. 評估治療過程中，血清發炎相關細胞激素的變化。
    - v. 分析血清藥物濃度、細胞激素與副作用的關係。
- (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』(MOHW 105-CDC-C-114-000102) 當中，中斷研究的比率為 7.0% (142 個受試者中發生 10 例)、因副作用而中斷短程 3HP 治療的比率為 8.3% (132 個受試者中發生 11 例)。
2. 如果希望能夠收集 40 例嚴重副作用個案進行分析，推算每組須要收案人數為 519 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、以及剋肺癆 (QuantiFERON-TB Gold In-Tube或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. 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)。
5. 若有中途退出治療者，將進一步記錄原因 (附表四)。

**(9) 剋肺癆 (QuantiFERON-TB Gold In-Tube 或 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 CO<sub>2</sub> 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 ( $22 \pm 5^{\circ}\text{C}$ )，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選用不到的微量盤條，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  $8.0 \text{ IU/mL}$ 。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  $0.3\text{mL}$  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  $50\mu\text{L}$  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  $50\mu\text{L}$  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  $50\mu\text{L}$ 。
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 ( $22 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) 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  $400\mu\text{L}$  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  $100\mu\text{L}$  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 ( $22 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) 培養 30 分鐘。
20. 培養 30 分鐘後，在每個凹槽內加入  $50\mu\text{L}$  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  $450\text{nm}$  濾鏡及  $620\text{-}650\text{nm}$  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) 發炎相關之細胞激素

血清中發言相關的細胞激素，包括：Interleukin (IL)-1, IL-1beta, tumor necrosis factor (TNF)-alpha, IL-6, IL-8, IL-10, interferon-gamma induced protein 10 (IP-10), MCP (monocyte chemoattractant protein)-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-1, prostaglandin E2 (PGE2)，將藉由 Cytometric Bead Array (BD Biosciences, California, USA) 和 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 測定。

## (11) Isoniazid 及 Acetyl-isoniazid 血中濃度測定

測定血液檢體中 INH 和 AcINH 濃度採用 Seifart HI 等人於 1995 年所提出之衍生化高效率液相層析法 [33]。實驗方法主要可分為兩個部分，分別敘述如下：

### A). 建立校正曲線

本方法共需建立三條校正曲線，分別為 (a) 非水解環境下 INH、(b) 水解環境下 INH 和 (c) 水解 AcINH。配置 0, 0.5, 2.5, 5, 7.5, 10  $\mu\text{g/mL}$  INH (Sigma, St. Louis, MO) 及 AcINH 於正常人之血漿中。將血液樣本分別與 200  $\mu\text{L}$  的 10% TCA (trichloroacetic acid) (Sigma, St. Louis, MO) 水溶液、40  $\mu\text{L}$  1% CA (cinnamaldehyde) (Sigma, St. Louis, MO) 之甲醇溶液充分混合均勻後，在室溫下靜置 10 分鐘待接合反應完全。水解環境下之樣品加入 20  $\mu\text{L}$  的 6 M HCL，並於 80 $^{\circ}\text{C}$  靜置一小時，最後各加入 40  $\mu\text{L}$  1% CA 之甲醇溶液充分混勻，接著也靜置 10 分鐘。

以 HITACHI L2130 幫浦系統 (Hitachi, Tokyo, Japan) 搭配 HITACHI L2200 自動取樣機進行層析步驟。分離之移動相是由有機相 (acetonitrile : isopropanol = 4 : 1) 及緩衝液 (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  水溶液) 所構成之流速 1 mL/min 梯度。

每一濃度樣品各打三次，每次 20  $\mu\text{L}$ ，平均三次所得之 INH 訊號積分面積數值，且三次測量之變異係數 (coefficient of variance) 需小於 2% 才被接受。所得的結果可建立三條校正曲線，並計算各曲線之回歸方程式 (如下)：

$$y_a = A_a x + c_a, \quad (\text{非水解環境下 INH})$$

$$y_b = A_b x + c_b, \quad (\text{水解環境下 INH})$$

$$y_c = A_c x + c_c, \quad (\text{水解環境下 AcINH})$$

y 代表 INH 訊號積分面積，x 代表樣品濃度

此三條回歸方程式將用來計算病人檢體中所含之 INH 和 AcINH 濃度。

### B). 受試者檢體測定及結果計算

取 500  $\mu\text{L}$  的病人血漿，加入 500  $\mu\text{L}$  的 10% TCA，充分混合均勻後以 10000 g 離心 1 分鐘。取 200  $\mu\text{L}$  的上清液依上述之非水解環境下流程處理，另取 200  $\mu\text{L}$  的上清液依上述之水解環境下流程處理。處理完之檢體樣品依上述之層析條件進行分離及測量。分別可得到 INH 訊號積分面積  $Y_1$  (非水解環境) 及  $Y_2$  (水解環境)。接著利用前述所得之三條回歸方程式，依下列方式計算：

$$\text{INH 濃度 : [ INH conc. ]} = (Y_1 - c_a) / A_a$$

$$\text{AcINH 濃度 : [ AcINH conc. ]} = (Y_2 - y_b - c_a) / A_c, \text{ 其中 } y_b = A_b \text{ [ INH conc. ]} + c_b$$

## (12) Rifapentine 及 25-desacetyl-rifapentine 血中濃度測定

過去三個重要研究顯示，服用短程 3HP 藥物之後第 24 小時的血清藥物濃度，與 area under concentration-time curve (AUC) 的相關性最高 [34-36]。因此，本研究在受試者服用潛伏結核感染預防性治療藥物三週之後，採集用藥之後第 24 小時 (23-25 小時) 的單點血液檢體 (C24)，依據過去文獻所使用的方式處理檢體 [35, 37]，隨後以 high pressure liquid chromatography assay (HPLC, ThermoFinnegan P4000 HPLC pump with an AS3000 fixed-volume autosampler, model UV2000 UV detector, Gateway E series computer, and ChromQuest data management system) 測定血中 rifapentine 及其主要代謝物 25-desacetyl-rifapentine 之濃度 [37, 38]。

## (13) 藥物代謝相關基因多型性檢測

### 1. *N-acetyltransferase 2 (NAT2)/Cytochrome P450 (CYP) 2E1*

使用含 potassium EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid) 之真空試管 (BD, Franklin Lakes, NJ) 抽取受試者約 8 mL 血液檢體，經離心處理，收集上層血漿與分層界面的白血球、上清液與白血球置於 2 mL 冷凍管中，保存於  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中。

檢測時取出儲存於  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中的白血球解凍，接著使用 QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, California, USA) 萃取出 DNA。萃取出 DNA 以 NanoDrop<sup>®</sup> 分光光度計 (spectrophotometer) 定量，稀釋為標準濃度後，儲存於  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中備用。

*NAT2* 基因多型性判定參考 Hsieh 等人的方法 [39]，分析之 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 共計有 *NAT2*\*5(rs1799929)、*NAT2*\*6(rs1799930) 與 *NAT2*\*7(rs1799931) 三個位置。*NAT2* 基因首先利用聚合酶連鎖反應 (PCR) 的方式增幅，最後產生 1093 bp 的 DNA 片段。接著分析 *NAT2*\*5 以 5 U *Kpn*I (New England BioLabs Inc., USA) 分解 PCR 產物，反應溫度  $37^{\circ}\text{C}$  16 小時，以 1.5 % 洋菜膠體電泳分離。分析 *NAT2*\*6 用 5 U *Taq*<sup>α</sup>I (New England BioLabs Inc., USA) 分解 PCR 產物，反應溫度  $65^{\circ}\text{C}$  16 小時，以 6%

聚丙烯醯胺膠體電泳分離。分析 NAT2\*7 用 5 U *Bam*HI-HF™ (New England BioLabs Inc., USA) 分解 PCR 產物，反應溫度 37°C 16 小時，以 1.5% 洋菜膠體電泳分離，PCR-RFLP 模組電泳實驗及定序確認結果。

*CYP2E1* 基因多型也是使用 PCR-RFLP 方法，限制酶為 *Rsa*I [40]。Primer 的序列為 5-CCAGTCGAGTCTACATTGTCA-3 以及 5-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3。使用 35 循環 (45 sec at 94°C, 45 sec at 55°C and 45 sec at 72°C)。PCR 的產物再用限制酶 - *Rsa*I 在 37°C 下作用 2 小時。wild-type 的基因型定義為 c1 而 mutant 則定義為 c2。

## 2. *Arylacetamide deacetylase*

針對 *Arylacetamide deacetylase* (AADAC) 的基因多型性，我們依照過去的文獻報告 [41]，設計 AADAC\*2 和 AADAC\*3 的 allele-specific PCR，所使用的引子序列如下表：

Primer set	Sequence
AADAC g13651-wild	5'-AAGTCATCTCTTCAAATTTG-3'
AADAC g.13651-mutant	5'-AAGTCATCTCTTCAAATTTA-3'
AADAC g.14307AS	5'-GGCAATATTTGCTCACATTT-3'
AADAC ex5 (Acc I)	5'- TTGAGTGGCTAAAGGAAAGTCTA- 3'
AADAC UTRAS	5'-AATGAAATCCCACAGTAAGA-3'

### AADAC G13651A 實驗操作如下

- (1) 取 genomic DNA 100 ng、1X PCR buffer (含 pH 8.8 的 67 mM Tris-HCL、16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.45% Triton X-100、0.02% gelatin)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM dNTPs、0.4 mM 的各種引子、以及 0.5 U Taq polymerase，最後體積為 25 uL。
- (2) 先升溫至 94°C 3 分鐘後，開始以下列的次序進行 30 個週期的反應：
  - i. Denaturation：94°C 共 25 秒
  - ii. Annealing：54°C 共 25 秒
  - iii. Extension：72°C 共 50 秒
- (3) 最後一次的 extension 則停在 72°C 共 5 分鐘。
- (4) 以 2% agarose gel 進行電泳。

### AADAC T14008C 實驗操作如下

- (1) 取 genomic DNA 100 ng、1X PCR buffer (含 pH 8.8 的 67 mM Tris-HCL、16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.45% Triton X-100、0.02% gelatin)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM dNTPs、0.4 mM 的各種引子、以及 0.5 U Taq polymerase，最後體積為 25 uL。
- (2) 先升溫至 94°C 3 分鐘後，開始以下列的次序進行 45 個週期的反應：
  - i. Denaturation：94°C 共 25 秒
  - ii. Annealing：52°C 共 25 秒
  - iii. Extension：72°C 共 30 秒
- (3) 最後一次的 extension 則停在 72°C 共 5 分鐘。
- (4) PCR 產物以 AccI 限制酶切割。
- (5) 以 3% agarose gel 進行電泳。
- (6) AADAC\*1 (wild type) 會呈現 181-bp 的片段，而 AADAC\*3 會呈現兩個片段，分別是 158-bp 和 23-bp。

#### (14) 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 [42]；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 [43]。

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	
<b>TOTAL SCORE:</b>				

依照過去文獻的定義 [44]，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

(15) 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。

子計畫二：現行潛伏結核治療處方中，9H 和 4R 兩種處方之使用情形及副作用監測

(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、高雄醫學大學附設中和紀念醫院、高雄市立大同醫院、高雄市立小港醫院、衛生福利部屏東醫院

(3) 執行期間：民國 107 年到 109 年，共三年。

(4) 受試條件如下：

- 年紀大於等於 13 歲
- 符合後述兩個條件中任一：(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)，且處方為9個月每天服用isoniazid (簡稱9H) 或是4個月每天服用rifampin (簡稱4R)

**(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或rifampin有明顯的交互作用（附表四、五）
- 有isoniazid、或rifampin的過敏反應
- 預期存活不超過三年

**(6) 研究目標：**

(7) 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. 監測台灣現行潛伏結核感染治療處方中，9H及4R的使用狀況，追蹤其後續副作用發生情形。
- ii. 對於未完成預防性治療的個案，分析原因。
- iii. 針對接受9H或4R之個案，進行藥物動力學相關分析。
- iv. 評估治療過程中，血清發炎相關細胞激素的變化。
- v. 分析血清藥物濃度、細胞激素與副作用的關係。
- vi. 評估新納入政策的4R預防效果
- vii. 確認QuantiFERON-TB Gold Plus是否可以預測療效

**(8) 收案人數：**

107年收案40人、108年收案65人、109年收案65人。

**(9) 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isoniazid和rifampin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）。於治療開始之第二個月抽血檢驗QuantiFERON-TB Gold Plus。
- (4) 在完成治療的當月抽血一次，檢驗isoniazid和rifampin血中濃度，及QuantiFERON-TB Gold Plus。

(5) 用藥期間每月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）。

(6) 若有中途退出治療者，將進一步記錄原因（附表六）。

**(10) 剋肺癆（QuantiFERON-TB Gold In-Tube 或 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 CO<sub>2</sub> 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選用不到的微量盤條，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 50μL 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 ( $22 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) 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 $\mu$ 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，以去除殘餘清洗滌緩衝液。然後在每個凹槽內加入 100 $\mu$ 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 ( $22 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) 培養 30 分鐘。
20. 培養 30 分鐘後，在每個凹槽內加入 50 $\mu$ 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。

#### (11) 發炎相關之細胞激素

血清中發言相關的細胞激素，包括：Interleukin (IL)-1, IL-1beta, tumor necrosis factor (TNF)-alpha, IL-6, IL-8, IL-10, interferon-gamma induced protein 10 (IP-10), MCP (monocyte chemoattractant protein)-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-1, prostaglandin E2 (PGE2)，將藉由 Cytometric Bead Array (BD Biosciences, California, USA) 和 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 測定。

#### (12) Isoniazid 及 Acetyl-isoniazid 血中濃度測定

測定血液檢體中 INH 和 AcINH 濃度採用 Seifart HI 等人於 1995 年所提出之衍生化高效率液相層析法 [29]。實驗方法主要可分為兩個部分，分別敘述如下：

##### A). 建立校正曲線

本方法共需建立三條校正曲線，分別為 (a) 非水解環境下 INH、(b) 水解環境下 INH 和 (c) 水解 AcINH。配置 0, 0.5, 2.5, 5, 7.5, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  INH (Sigma, St. Louis, MO)

及 AcINH 於正常人之血漿中。將血液樣本分別與 200  $\mu\text{L}$  的 10% TCA (trichloroacetic acid) (Sigma, St. Louis, MO) 水溶液、40  $\mu\text{L}$  1% CA (cinnamaldehyde) (Sigma, St. Louis, MO) 之甲醇溶液充分混合均勻後，在室溫下靜置 10 分鐘待接合反應完全。水解環境下之樣品加入 20  $\mu\text{L}$  的 6 M HCL，並於 80<sup>0</sup>C 靜置一小時，最後各加入 40  $\mu\text{L}$  1% CA 之甲醇溶液充分混勻，接著也靜置 10 分鐘。

以 HITACHI L2130 幫浦系統 (Hitachi, Tokyo, Japan) 搭配 HITACHI L2200 自動取樣機進行層析步驟。分離之移動相是由有機相 (acetonitrile : isopropanol = 4 : 1) 及緩衝液 (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液) 所構成之流速 1 mL/min 梯度。

每一濃度樣品各打三次，每次 20  $\mu\text{L}$ ，平均三次所得之 INH 訊號積分面積數值，且三次測量之變異係數 (coefficient of variance) 需小於 2 % 才被接受。所得的結果可建立三條校正曲線，並計算各曲線之回歸方程式 (如下)：

$$y_a = A_a x + c_a, \quad (\text{非水解環境下 INH})$$

$$y_b = A_b x + c_b, \quad (\text{水解環境下 INH})$$

$$y_c = A_c x + c_c, \quad (\text{水解環境下 AcINH})$$

y 代表 INH 訊號積分面積，x 代表樣品濃度

此三條回歸方程式將用來計算病人檢體中所含之 INH 和 AcINH 濃度。

#### B). 受試者檢體測定及結果計算

取 500  $\mu\text{L}$  的病人血漿，加入 500  $\mu\text{L}$  的 10% TCA，充分混合均勻後以 10000 g 離心 1 分鐘。取 200  $\mu\text{L}$  的上清液依上述之非水解環境下流程處理，另取 200  $\mu\text{L}$  的上清液依上述之水解環境下流程處理。處理完之檢體樣品依上述之層析條件進行分離及測量。分別可得到 INH 訊號積分面積 Y<sub>1</sub> (非水解環境) 及 Y<sub>2</sub> (水解環境)。接著利用前述所得之三條回歸方程式，依下列方式計算：

$$\text{INH 濃度 : [ INH conc. ]} = (Y_1 - c_a) / A_a$$

$$\text{AcINH 濃度 : [ AcINH conc. ]} = (Y_2 - y_b - c_a) / A_c, \text{ 其中 } y_b = A_b \text{ [ INH conc. ]} + c_b$$

#### (13) Rifampin 及 25-desacetyl-rifampin 血中濃度測定

過去的研究顯示，每日服用 600mg 的 rifampin，血清中的藥物濃度最高點一般是在服藥後兩小時左右出現[30]；而整體血清中的藥物濃度周期性變化，至少是在開始投藥後一至二週後趨於穩定[31]。因此，本研究在受試者服用潛伏結核感染預防性治療藥物四週之後，採

集用藥之後第 2 小時 (2-3 小時) 的單點血液檢體 (C2)，依據過去文獻所使用的方式處理檢體 [32]，隨後以 high pressure liquid chromatography assay (HPLC, ThermoFinnegan P4000 HPLC pump with an AS3000 fixed-volume autosampler, model UV2000 UV detector, Gateway E series computer, and ChromQuest data management system) 測定血中 rifampin 及其主要代謝物 25-desacetyl-rifapentine 之濃度 [32, 33]。

#### (14) 藥物代謝相關基因多型性檢測

##### 1. *N-acetyltransferase 2 (NAT2)/Cytochrome P450 (CYP) 2E1*

使用含 potassium EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid) 之真空試管 (BD, Franklin Lakes, NJ) 抽取受試者約 8 mL 血液檢體，經離心處理，收集上層血漿與分層界面的白血球、上清液與白血球置於 2 mL 冷凍管中，保存於-80°C 冰箱中。

檢測時取出儲存於-80 °C 冰箱中的白血球解凍，接著使用 QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, California, USA) 萃取出 DNA。萃取出 DNA 以 NanoDrop® 分光光度計 (spectrophotometer) 定量，稀釋為標準濃度後，儲存於-80 °C 冰箱中備用。

*NAT2* 基因多型性判定參考 Hsieh 等人的方法 [34]，分析之 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 共計有 *NAT2*\*5(rs1799929)、*NAT2*\*6(rs1799930) 與 *NAT2*\*7(rs1799931) 三個位置。*NAT2* 基因首先利用聚合酶連鎖反應 (PCR) 的方式增幅，最後產生 1093 bp 的 DNA 片段。接著分析 *NAT2*\*5 以 5 U *KpnI* (New England BioLabs Inc., USA) 分解 PCR 產物，反應溫度 37°C 16 小時，以 1.5 % 洋菜膠體電泳分離。分析 *NAT2*\*6 用 5 U *TaqI* (New England BioLabs Inc., USA) 分解 PCR 產物，反應溫度 65°C 16 小時，以 6% 聚丙烯醯胺膠體電泳分離。分析 *NAT2*\*7 用 5 U *BamHI*-HF™ (New England BioLabs Inc., USA) 分解 PCR 產物，反應溫度 37°C 16 小時，以 1.5% 洋菜膠體電泳分離，PCR-RFLP 模組電泳實驗及定序確認結果。

*CYP2E1* 基因多型也是使用 PCR-RFLP 方法，限制酶為 *RsaI* [35]。Primer 的序列為 5-CCAGTCGAGTCTACATTGTCA-3 以及 5-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG -3。使用 35 循環 (45 sec at 94°C, 45 sec at 55°C and 45 sec at 72°C)。PCR 的產物再用限制酶 - *RsaI* 在 37°C 下作用 2 小時。wild-type 的基因型定義為 c1 而 mutant 則定義為 c2。

##### 2. *Arylacetamide deacetylase*

針對 *Arylacetamide deacetylase* (AADAC) 的基因多型性，我們依照過去的文獻報告 [36]，設計 AADAC\*2 和 AADAC\*3 的 allele-specific PCR，所使用的引子序列如下表：

Primer set	Sequence
------------	----------

AADAC g13651-wild	5'-AAGTCATCTCTTCAAATTTG-3'
AADAC g.13651-mutant	5'-AAGTCATCTCTTCAAATTTA-3'
AADAC g.14307AS	5'-GGCAATATTTGCTCACATTT-3'
AADAC ex5 (Acc I)	5'- TTGAGTGGCTAAAGGAAAGTCTA- 3'
AADAC UTRAS	5'-AATGAAATCCCACAGTAAGA-3'

#### **AADAC G13651A 實驗操作如下**

- (1) 取 genomic DNA 100 ng、1X PCR buffer (含 pH 8.8 的 67 mM Tris-HCL、16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.45% Triton X-100、0.02% gelatin)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM dNTPs、0.4 mM 的各種引子、以及 0.5 U Taq polymerase，最後體積為 25 uL。
- (2) 先升溫至 94°C 3 分鐘後，開始以下列的次序進行 30 個週期的反應：
  - i. Denaturation：94°C 共 25 秒
  - ii. Annealing：54°C 共 25 秒
  - iii. Extension：72°C 共 50 秒
- (3) 最後一次的 extension 則停在 72°C 共 5 分鐘。
- (4) 以 2% agarose gel 進行電泳。

#### **AADAC T14008C 實驗操作如下**

- (1) 取 genomic DNA 100 ng、1X PCR buffer (含 pH 8.8 的 67 mM Tris-HCL、16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.45% Triton X-100、0.02% gelatin)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM dNTPs、0.4 mM 的各種引子、以及 0.5 U Taq polymerase，最後體積為 25 uL。
- (2) 先升溫至 94°C 3 分鐘後，開始以下列的次序進行 45 個週期的反應：
  - i. Denaturation：94°C 共 25 秒
  - ii. Annealing：52°C 共 25 秒
  - iii. Extension：72°C 共 30 秒
- (3) 最後一次的 extension 則停在 72°C 共 5 分鐘。
- (4) PCR 產物以 AccI 限制酶切割。
- (5) 以 3% agarose gel 進行電泳。
- (6) AADAC\*1 (wild type) 會呈現 181-bp 的片段，而 AADAC\*3 會呈現兩個片段，分別是 158-bp 和 23-bp。

### (15) 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：水腫(edema)、潮紅(flushing)、發癢(itching)、皮膚疹(skin rash)、腹痛(epigastric discomfort)、腹瀉(diarrhea)、食慾不振(Loss of appetite)、噁心(nausea)、嘔吐(vomiting)、發燒(fever)、全身無力(weakness)、倦怠(fatigue)、肌肉痠痛(myalgia)、頭暈(dizziness)、頭痛(headache)、尿量減少(decreased urine output)、視力模糊(visual disturbance)。

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 [37]；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 [38]。

## 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	
<b>TOTAL SCORE:</b>				

依照過去文獻的定義 [39]，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

(16) 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。

### 第三章 結果

#### 子計畫一：潛伏結核感染治療之藥物動力學分析及副作用監測

1. 血中藥物濃度測定：截至目前為止，在 2017、2018 年的計畫中，我們將測定 isoniazid、acetyl-isoniazid、rifapentine、以及 desacetyl-rifapentine 血中濃度的方法建置完成。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 Table 1-1。

**Table 1-1.** 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 <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O	1.557	20	138.0	121.0	79.0
Acetyl-INH	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	1.525	20	180.0	121.2	138.1
RPT	C <sub>47</sub> H <sub>64</sub> N <sub>4</sub> O <sub>12</sub>	5.378	20	877.3	845.2	453.2
Desacetyl-RPT	C <sub>45</sub> H <sub>62</sub> N <sub>4</sub> O <sub>11</sub>	4.824	20	835.2	803.3	153.1
INH-d4	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> D <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O	1.555	20	142.1	125.1	83.1
Acetyl-INH-d4	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> D <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	1.523	20	184.1	125.1	142.2
RPT-d8	C <sub>47</sub> H <sub>56</sub> D <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>12</sub>	5.348	40	885.5	151.1	95.1
Desacetyl-RPT- d8	C <sub>45</sub> H <sub>54</sub> D <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>11</sub>	4.794	20	843.5	811.3	95.1

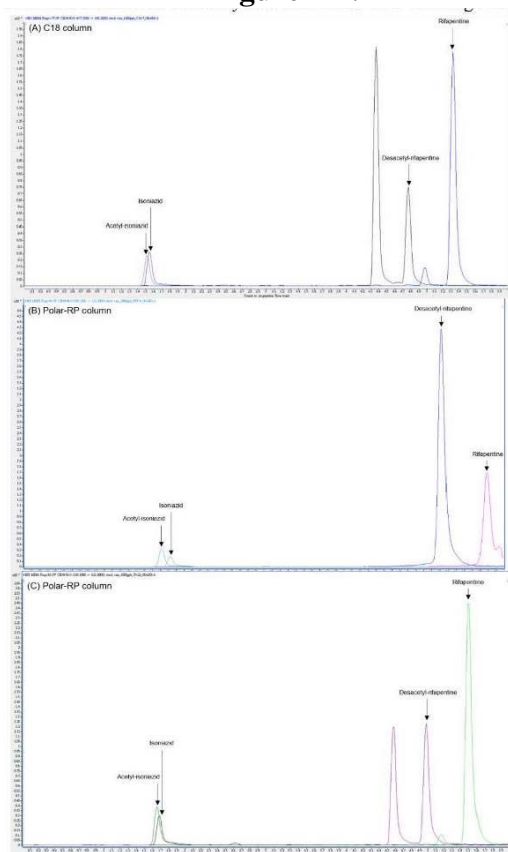
丙、結果：

i. LC-ESI/MS 的研發過程：

為了分離四種化合物，我們測試了三種不同的分離管，包括 (A) C18 (Alilent ZORBAX Eclipse Plus C18 2.1 x 100mm, 1.8 um)；(B) Polar-RP (Phenomenex Synergi Polar RP 2x100mm, 2.5 um)；以及 (C) T3 (Waters ACQUITY HSS 2.1x100mm, 1.8 um)。右圖 (Figure 1-1) 顯示 C18 對四種化合物有比較高的波型和吸附。因此後續的分析將選擇 C18 作為抗結核藥物濃度分析的分離管。

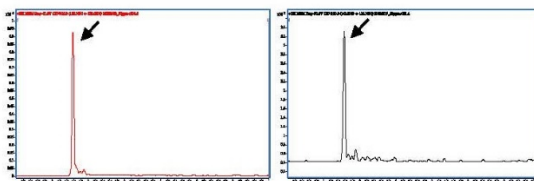
使用 C18 優化流動相的組成和梯度曲線。下頁左圖 (Figure 1-2) 顯示了在最佳條件下獲得的色譜圖。

Figure 1-1.

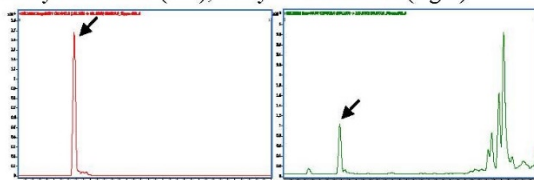


**Figure 1-2.**

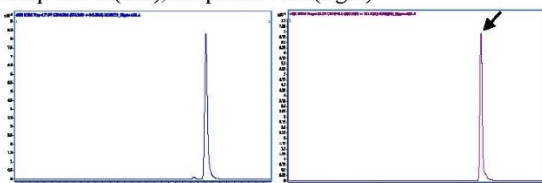
A. Isoniazid (left), isoniazid-d4 (right)



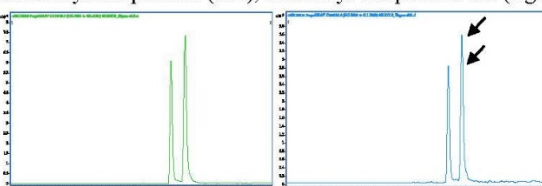
B. Acetyl-isoniazid (left), acetyl-isoniazid-d4 (right)



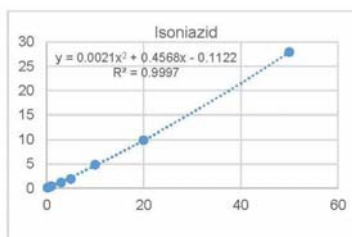
C. Rifapentine (left), rifapentine-d8 (right)



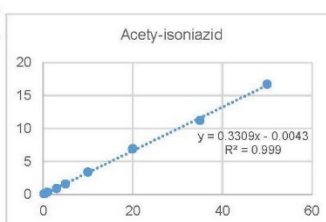
D. Desacetyl-rifapentine (left), desacetyl-rifapentine-d8 (right)



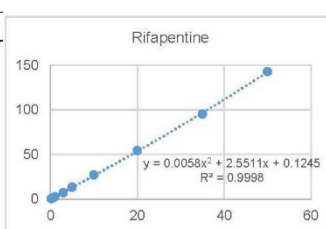
Isoniazid conc.	accuracy%
1	111.33
3	91.99
5	86.04
10	103.45
20	100.15
50	99.80

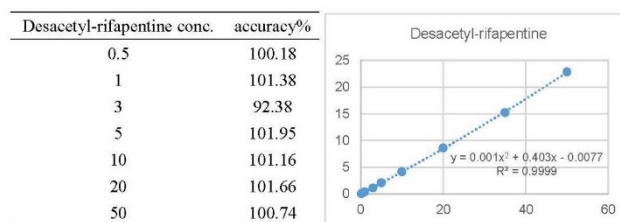


Acetyl-isoniazid conc.	accuracy%
0.5	99.75
1	102.53
3	90.59
5	96.00
10	102.37
20	104.47
50	100.85



rifapentine conc.	accuracy%
0.5	89.12
1	97.72
3	90.99
5	103.11
10	102.83
20	101.46
50	100.38



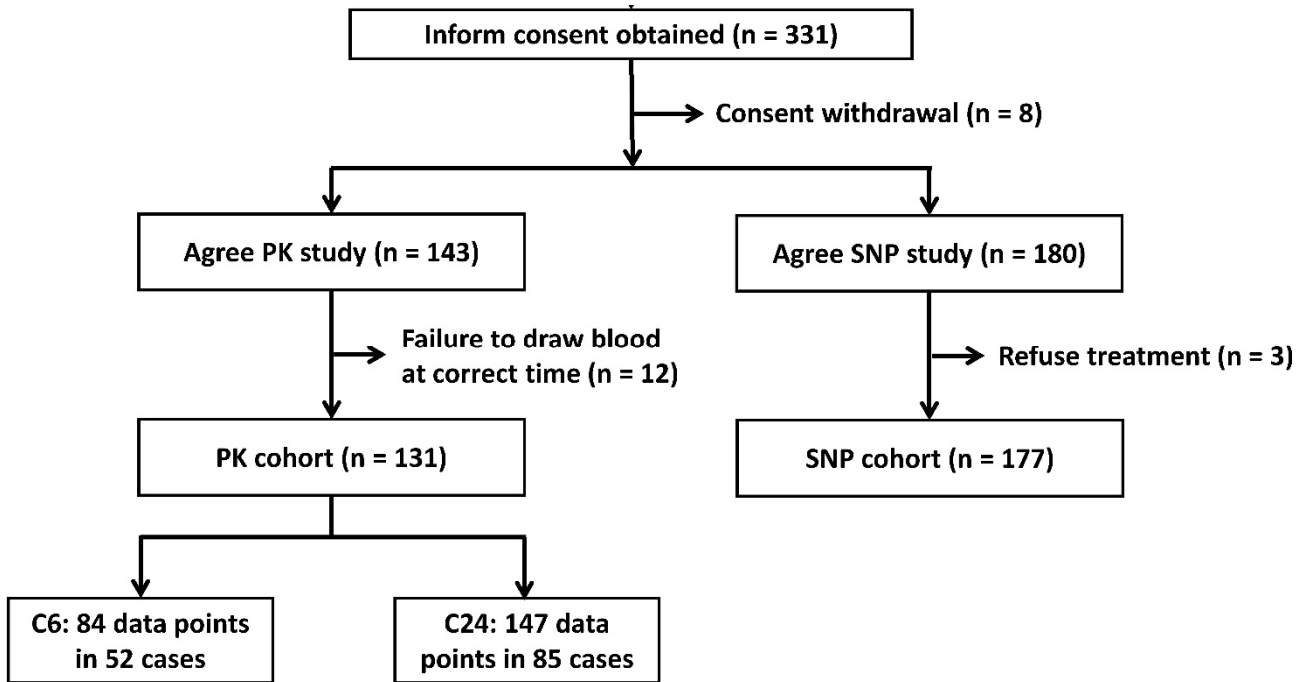


ii. 檢測結果的確認：

使用加上標註之血漿樣品，在線性和準確度方面驗證了優化的 LC-ESI/MS 條件。驗證結果顯示在上方右側圖表中。

2. **臨床收案：**自 2017 年 1 月 1 日至 2018 年 10 月 31 為止，本研究納入個案人數及過程如下頁流程圖 (Figure 1-3)。其中有 143 個個案，同意配合藥物動力學研究，另外 180 位個案僅參加基因多型性與免疫發炎檢測。但兩組各有 12 及 3 人中途退出，故分別僅有 131 人 (PK cohort) 及 177 人 (SNP cohort) 參與最後的資料分析。PK cohort 當中，總共有 52 人收集了 84 次服藥後 6 小時的藥物濃度檢測 (C6)、共有 85 人收集了 147 次服藥後 24 小時的藥物濃度檢測 (C24)。PK cohort 與 SNP cohort 兩組當中，分別有 13 人 (9.9%)、14 人 (7.9%) 產生 SDR。兩組臨床特徵如 Table 1-2。

Figure 1-3. Case enrollment



### 3. 血中藥物濃度檢測：

甲、血中藥物濃度的分布如 Figure 1-4，顯示在目前建議的處方劑量下，個案每公斤體重接受到的藥物量差別不小，分布在 8 ~ 18 mg/kg 當中。可以發現，RPT 與 desacetyl-RPT 的濃度有比較好的相關性；但是 INH 與 acetyl-INH 則明顯顯示出有 rapid acetylator 與 slow acetylator 的差別。

乙、由於男女體重的差別，女性所接受到的藥物劑量，明顯高於男性 (Figure 1-5)。這也間接導致血中的 RPT 濃度，女性普遍高於男性。

丙、比較發生與未發生 SDR 的個案血中藥物濃度可以發現，僅僅 C24 的 INH，在兩組有顯著差別 (Figure 1-6)。

丁、利用 Generalized Estimating Equation (GEE) 分析的結果顯示，INH 的劑量 (OR: 1.14 [1.00-1.28], per 100mg increment,  $p=0.043$ )、以及 INH 血中濃度 (OR: 1.45 [1.04-2.03],  $p=0.029$ ) 與是否發生 SDR 有密切相關。

4. 藥物代謝基因多型性檢測：在 recessive model 分析中發現 (Table 1-3)，*NAT2* rs1041983 在單變數 (TT vs. CC+CT, OR [95% CI]: 8.47 [2.55-28.1],  $p<0.001$ ) 和多變數 (TT vs. CC+CT, OR [95% CI]: 7.38 [2.17-25.1],  $p=0.001$ ) 統計都與發生 SDR 有顯著相關。同時，*CYP2E1* rs2070673 同樣

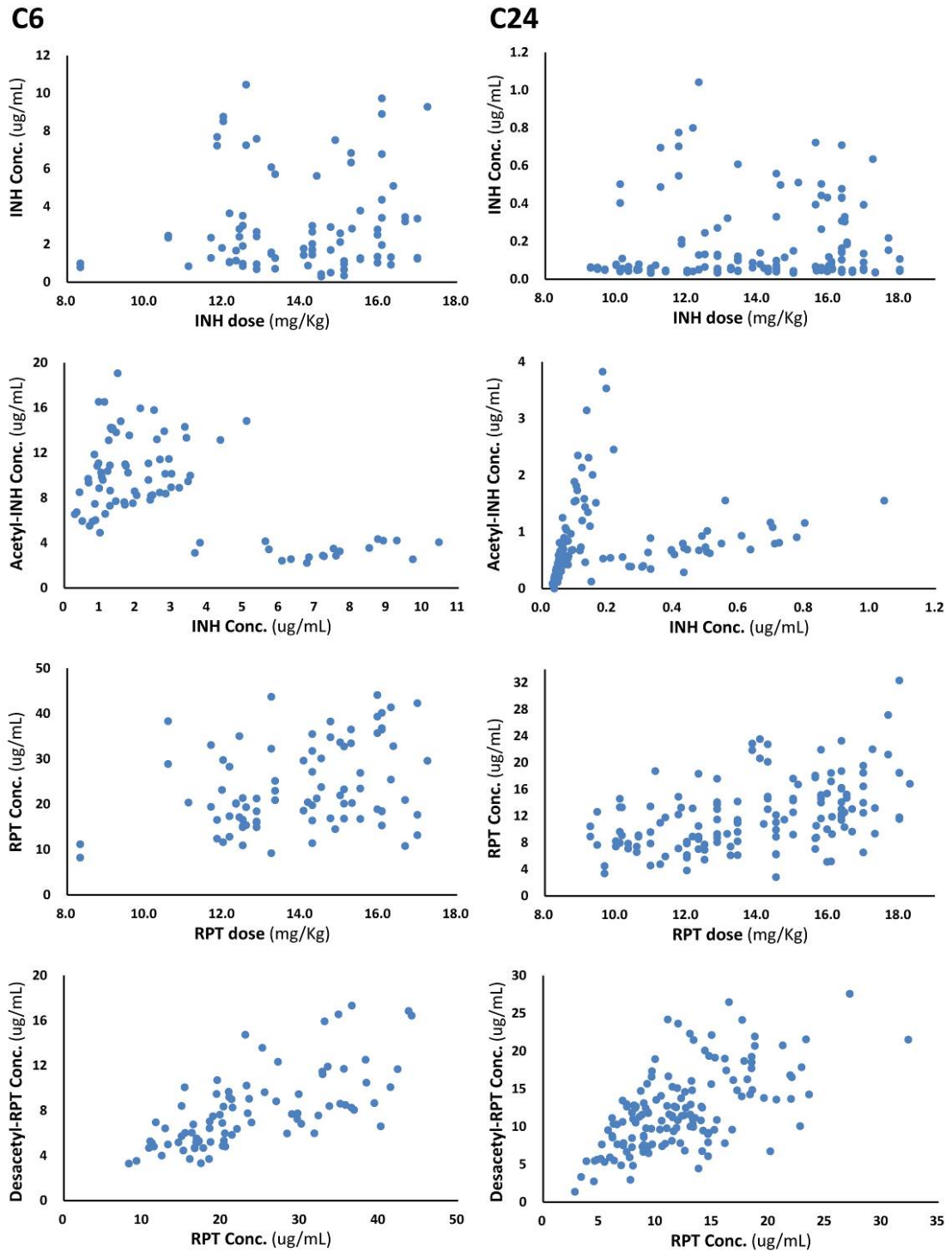
**Table 1-2.** Clinical characteristics

	<b>SNP cohort (N=177)</b>	<b>SDR (N=14)</b>	<b>No SDR (N=163)</b>	<b>P value</b>	<b>PK cohort (n=131)</b>	<b>SDR (N=13)</b>	<b>No SDR (N=118)</b>	<b>P value</b>
Age (year)	37.1 ± 17.8	46.6 ± 14.5	36.3 ± 17.9	0.038	48.9 ± 17.1	51.6 ± 12.7	48.6 ± 17.6	0.450
≤35	94 (53%)	2 (14%)	92 (56%)	0.002	30 (23%)	2 (15%)	28 (24%)	0.791
35 ~ 55	44 (25%)	8 (57%)	36 (22%)		47 (36%)	5 (39%)	42 (36%)	
>55	39 (22%)	4 (29%)	35 (21%)		54 (41%)	6 (46%)	48 (40%)	
Female sex	83 (47%)	6 (43%)	77 (47%)	0.753	68 (52%)	6 (46%)	62 (53%)	0.662
Household contact	38 (21%)	2 (13%)	36 (22%)	0.737	53 (40%)	5 (39%)	48 (41%)	>0.999
Height (cm)	165.8 ± 8.3	165.1 ± 8.8	165.9 ± 8.2	0.729	164.3 ± 9.0	163.7 ± 7.5	164.4 ± 9.2	0.794
Weight (kg)	64.0 ± 11.9	65.7 ± 12.0	63.8 ± 10.9	0.568	65.2 ± 12.3	63.1 ± 9.4	65.5 ± 12.6	0.509
Body-mass index (kg/m <sup>2</sup> )	23.2 ± 3.52	24.1 ± 3.22	23.1 ± 3.55	0.334	24.1 ± 3.45	23.45 ± 2.23	24.14 ± 3.55	0.498
Current smoker	20 (11%)	4 (29%)	16 (80%)	0.057	28 (21%)	5 (39%)	23 (20%)	0.150
eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )				0.005				0.811
<60	14 (8%)	0	14 (9%)		6 (5%)	1 (8%)	5 (4%)	
60 ~ 90	54 (31%)	10 (71%)	44 (27%)		47 (36%)	4 (31%)	43 (36%)	
≥90	109 (62%)	4 (29%)	105 (66%)		78 (60%)	8 (62%)	70 (59%)	
Comorbidity								
HBV infection	3 (2%)	0	3 (2%)	>0.999	7 (5%)	1 (8%)	6 (5%)	0.528

	<b>SNP cohort</b> <b>(N=177)</b>	<b>SDR</b> <b>(N=14)</b>	<b>No SDR</b> <b>(N=163)</b>	<b>P</b> <b>value</b>	<b>PK cohort</b> <b>(n=131)</b>	<b>SDR</b> <b>(N=13)</b>	<b>No SDR</b> <b>(N=118)</b>	<b>P</b> <b>value</b>
HCV infection	2 (1%)	0	2 (1%)	>0.999	3 (2%)	0	3 (3%)	>0.999
Diabetes mellitus	3 (2%)	0	3 (2%)	>0.999	11 (8%)	2 (15%)	9 (8%)	0.299
Malignancy	1 (1%)	1 (7%)	0	0.079	6 (5%)	2 (15%)	4 (3%)	0.109
Autoimmune	1 (1%)	0	1 (1%)	>0.999	1 (1%)	1 (8%)	0	0.099
Asthma	0	0	0		1 (1%)	0	1 (1%)	>0.999
Hypertension	5 (3%)	2 (14%)	3 (2%)	0.051	22 (17%)	5 (39%)	17 (14%)	0.043
Isoniazid dose (mg/kg)	14.2 ± 2.1	13.8 ± 2.0	14.3 ± 2.1	0.483	14.0 ± 2.2	14.3 ± 1.9	13.9 ± 2.2	0.535
Rifapentine dose (mg/kg)	14.2 ± 2.1	13.8 ± 2.0	14.3 ± 2.1	0.454	14.0 ± 2.2	14.3 ± 1.9	14.0 ± 2.2	0.594
Hemoglobin (g/dL)	14.0 ± 1.6	14.2 ± 1.5	14.0 ± 1.6	0.643	14.0 ± 1.5	13.8 ± 1.6	14.1 ± 1.5	0.564
Leukocyte (K/uL)	6.44 ± 1.77	6.78 ± 1.42	6.41 ± 1.80	0.448	6.80 ± 1.85	6.98 ± 1.44	6.78 ± 1.89	0.712
Platelet (K/uL)	258 ± 56	253 ± 57	259 ± 56	0.705	270 ± 58	280 ± 45	269 ± 59	0.503
AST (U/L)	27.4 ± 39.7	79.2 ± 121.2	23.0 ± 16.8	0.106	23.2 ± 9.9	25.5 ± 5.6	23.0 ± 10.3	0.399
ALT (U/L)	27.6 ± 57.9	85.9 ± 178.3	22.6 ± 27.9	0.207	23.6 ± 18.8	27.2 ± 11.1	23.2 ± 19.4	0.466
Total bilirubin (mg/dL)	0.65 ± 0.28	0.63 ± 0.38	0.66 ± 0.27	0.823	0.63 ± 0.23	0.70 ± 0.25	0.63 ± 0.22	0.248
Creatinine (mg/dL)	0.82 ± 0.20	0.83 ± 0.16	0.82 ± 0.20	0.754	0.84 ± 0.28	0.83 ± 0.18	0.84 ± 0.29	0.888

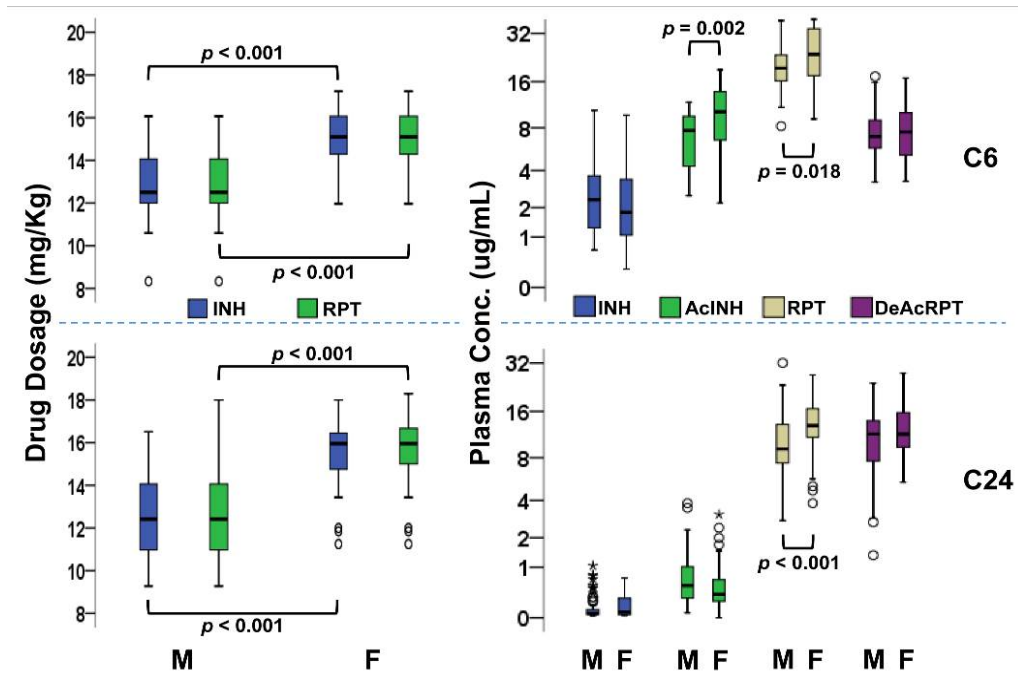
ALT: alanine transaminase; AST: aspartate transaminase; eGFR: estimated glomerular filtration rate; SDR: systemic drug reaction  
Data are number (percentage) or mean ± standard deviation.

**Figure 1-4.** XY plot showing the correlation between the weekly dosage and plasma centration of isoniazid (INH, upper panel) and rifapentine (RPT, lower-middle panel), plasma concentration of INH and acetyl-INH (upper-middle panel), and plasama concentration of RPT and desacetyl-RPT (lower panel) at 6 (C6, left column) and 24 (C24, right column) hours after dosing

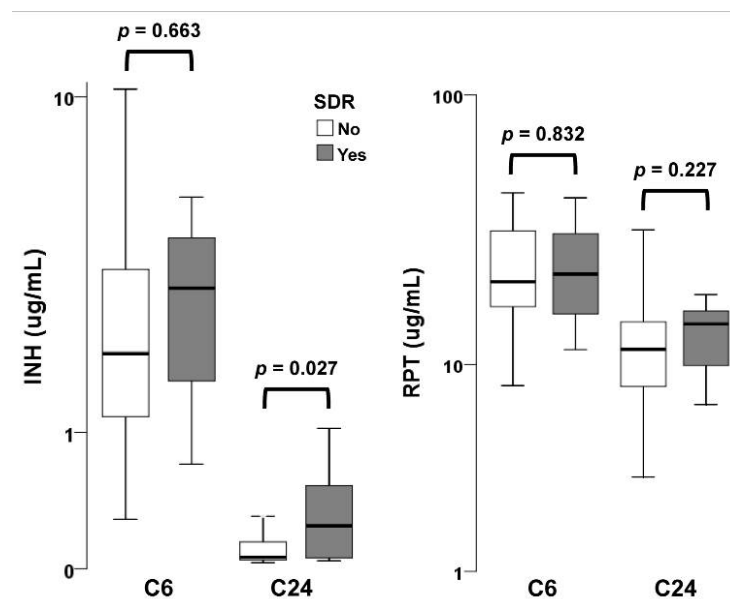




**Figure 1-5.** Boxplot showing drug dosage per-Kg body weight (left panel) and plasma concentration of isoniazid (INH), acetyl-isoniazid (AcINH), rifapentine (RPT) and desacetyl-RPT (right panel) in male (M) and female (F) sex at 6 (C6, upper part) and 24 (C24, lower part) hours after dosing



**Figure 1-6.** Boxplot showing the concentration of isoniazid (INH) and rifapentine (RPT) at 6 (C6) and 24 (C24) hours after dosing stratified by the development of systemic drug reaction (SDR) ( $p$  value calculated by using Mann-Whitney  $U$  test)



在單變數 (AA vs. TT+TA, OR [95% CI]: 3.51 [1.05-11.7],  $p=0.041$ ) 與多變數 (AA vs. TT+TA, OR [95% CI]: 3.49 [1.02-12.0],  $p=0.047$ ) 統計中也都與 SDR 有顯著相關。至於

*NAT2* rs1799931，則僅在單變數統計中與 SDR 有相關的傾向 (AA vs. GG+GA, OR [95% CI]: 5.00 [0.88-28.6], p=0.070)。

**Table 1-3.** Association of *NAT2/CYP2E1* single nucleotide polymorphism with systemic drug reaction

		Unadjusted OR (95% CI)	<i>P</i> value	Adjusted OR (95% CI)*	<i>P</i> value
<b>Additive model</b>					
<i>NAT2</i> rs1041983	CC	Ref		Ref	
	CT	0.85 (0.14-5.29)	0.101	0.87 (0.14-5.46)	0.132
	TT	7.67 (1.51-39.0)	<0.001	6.78 (1.31-35.1)	0.002
<i>NAT2</i> rs1799931	GG	Ref		Ref	
	GA	1.42 (0.41-4.99)	0.469	1.27 (0.36-4.54)	0.496
	AA	5.56 (0.93-33.2)	0.086	4.20 (0.68-26.0)	0.148
<i>CYP2E1</i> rs2070673	TT	Ref		Ref	
	TA	0.84 (0.20-3.52)	0.815	0.89 (0.21-3.77)	0.869
	AA	3.21 (0.79-15.0)	0.103	3.28 (0.78-13.8)	0.105
<b>Dominant model</b>					
<i>NAT2</i> rs1041983	CC	Ref		Ref	
	CT+TT	2.41 (0.51-11.3)	0.265	2.36 (0.50-11.2)	0.280
<i>NAT2</i> rs1799931	GG	Ref		Ref	
	GA+AA	1.89 (0.62-5.77)	0.262	1.65 (0.53-5.13)	0.389
<i>CYP2E1</i> rs2070673	TT	Ref		Ref	
	TA+AA	1.43 (0.42-4.84)	0.568	1.49 (0.43-5.16)	0.534
<b>Recessive model</b>					
<i>NAT2</i> rs1041983	CC+CT	Ref		Ref	
	TT	8.47 (2.55-28.1)	<0.001	7.38 (2.17-25.1)	0.001
<i>NAT2</i> rs1799931	GG+GA	Ref		Ref	
	AA	5.00 (0.88-28.6)	0.070	3.89 (0.66-22.9)	0.133
<i>CYP2E1</i> rs2070673	TT+TA	Ref		Ref	
	AA	3.51 (1.05-11.7)	0.041	3.49 (1.02-12.0)	0.047

## 5. 血中細胞激素檢測：

- 甲、統計分析的結果發現，治療前的血中細胞激素濃度，與治療中是否發生 SDR 並無明顯相關。
- 乙、如果使用血中細胞激素來預測當下是否發生 SDR，則 MCP-2 (0.926)、TARC (0.906)、IP-10 (0.895)、TNF-alpha (0.891)、MCP-1 (0.879) 均有不錯的表現，其 area under the receiver-operating-characteristic (ROC) curve 皆大於 0.85。

## 子計畫二：現行潛伏結核治療處方中，9H 和 4R 兩種處方之使用情形及副作用監測

1. 血中藥物濃度測定：截至目前為止，在 2018 年的計畫中，我們將測定 isoniazid、acetyl-isoniazid、rifampin、以及 25-desacetyl-rifampin 血中濃度的方法建置完成。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、rifampin、25-desacetyl-rifampin) 和各自同位素之 transition pairs 和 collision energy (CE) 相關資料，如 Table 1-1。

### 丙、結果：

i. LC-ESI/MS 的研發過程：

為了分離四種化合物，我們測試了三種不同的分離管，包括（A）C18 (Alilent ZORBAX Eclipse Plus C18 2.1 x 100mm, 1.8 um)；（B）Polar-RP (Phenomenex Synergi Polar RP 2x100mm, 2.5 um)；以及（C）T3 (Waters ACQUITY HSS 2.1x100mm, 1.8 um)。

ii. 檢測結果的確認：

使用加上標註之血漿樣品，在線性和準確度方面驗證了優化的 LC-ESI/MS 條件。驗證結果顯示在上方右側圖表中。

2. 臨床收案：自 2018 年 1 月 1 日至 2018 年 10 月 31 為止，共有 18 人加入此研究案，。其中 9H 組 10 人，8H 組 8 人；但 9H 組中間有 2 人退出，故最終受試人數為：9H 組 8 人，4R 組 8 人。其中已收到 7 位個案的藥物濃度檢測檢體（9H 組 2 人、4R 組 5 人，且皆無取得完治前一個月的血清濃度）。另有已收到 10 位個案的 cytokine 檢測，但僅有 5 人完成 3 次 Cytokine 檢測、2 人完成兩次 cytokine 檢測，3 人僅完成一次 cytokine 檢測（未完成 3 次檢查者，3 人為因故治療中斷，2 人為治療仍持續中）。兩組個案中，9H 組和 4R 組各有 0 人（0%）和 1 人（12.5%）在治療當中產生 SDR。另外，9H 組和 4R 組各有 1 人（12.5%）和 1 人（12.5%）發生 Grade.2 的 Hepatitis。兩組臨床特徵如 Table 2-1。

3. 藥物代謝基因多型性檢測：

因為參與研究之個案數少，加以個案配合服藥後兩小時抽血的困難度高，以目前僅有之資料，無法分析出與藥物副作用／SDR 較明確之關聯性。

Table 2-1. Clinical characteristics

	9H (N=8)	PK cohort (n=8)	SDR (N=1)	No SDR (N=7)
Age (year)	60.1 ± 14.4	53.9 ± 14.6	32	57.0 ± 12.5
≤35	1 (12.5%)	1 (12.5%)	1 (100%)	0 (0%)
35 ~ 55	2 (25%)	4 (50%)		4 (57.1%)
>55	5 (62.5%)	3 (37.5%)		3 (42.9%)
Female sex	4 (50%)	4 (50%)	1 (100%)	3 (42.9%)
Household contact	4 (50%)	3 (37.5%)	1 (100%)	2 (28.6%)
Height (m)	1.61 ± 0.11	1.64 ± 0.08	1.62	1.65 ± 0.09

	<b>9H (N=8)</b>	<b>PK cohort (n=8)</b>	<b>SDR (N=1)</b>	<b>No SDR (N=7)</b>
<b>Weight (kg)</b>	69.13 ± 7.49	70.76 ± 16.96	57	72.73 ± 17.31
<b>Body-mass index (kg/m<sup>2</sup>)</b>	26.77 ± 4.05	26.57 ± 5.15	21.72	27.38 ± 5.13
<b>Ever smoker</b>	2 (25%)	5 (62.5%)	1 (100%)	4 (57.1%)
<b>eGFR (mL/min/1.73m<sup>2</sup>)</b>				
<60	1 (12.5%)	0 (0%)		0 (0%)
60 ~ 90	2 (25%)	4 (50%)		4 (57.1%)
≥90	5 (62.5%)	4 (50%)	1 (100%)	3 (42.9%)
<b>Comorbidity</b>				
<b>HBV infection</b>	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)
<b>HCV infection</b>	1 (12.5%)	1 (12.5%)		1 (14.3%)
<b>Diabetes mellitus</b>	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)
<b>Malignancy</b>	0 (0%)	1 (12.5%)		1 (14.3%)
<b>Autoimmune</b>	0 (0%)	0 (0%)		0
<b>Asthma</b>	0	1 (12.5%)	1 (100%)	0 (0%)
<b>Hypertension</b>	1 (12.5%)	1 (12.5%)		1 (14.3%)
<b>Isoniazid dose (mg/kg)</b>	4.38 ± 0.46			
<b>Rifampin dose (mg/kg)</b>		8.87 ± 1.88	10.53	8.63 ± 1.89
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>	13.54 ± 1.57	13.81 ± 1.45	14.8	13.67 ± 1.50
<b>Leukocyte (K/uL)</b>	6.93 ± 1.76	6.50 ± 2.38	5.89	6.59 ± 2.56
<b>Platelet (K/uL)</b>	228.49 ± 100.50	190.75 ± 84.90	243	183.29 ± 88.82
<b>AST (U/L)</b>	20.75 ± 4.43	35.88 ± 18.16	26	37.29 ± 19.13
<b>ALT (U/L)</b>	22.00 ± 10.20	30.13 ± 20.79	25	30.86 ± 22.35
<b>Total bilirubin (mg/dL)</b>	0.53 ± 0.09	1.00 ± 0.97	0.38	1.09 ± 1.01
<b>Creatinine (mg/dL)</b>	1.49 ± 2.15	0.81 ± 0.23	0.7	0.83 ± 0.24

LT: alanine transaminase; AST: aspartate transaminase; eGFR: estimated glomerular filtration rate; SDR: systemic drug reaction

Data are number (percentage) or mean ± standard deviation.

#### 4. 血中細胞激素檢測：

甲、因個案數及 SDR 數皆少，無法以現有之資料評估細胞激素與 SDR 之關聯性。

乙、如果使用目前僅有之資料，由 Cytokine 升降的趨勢推估副作用的部分，則 IP-10 和頭痛、TNF- $\alpha$  和頭暈、倦怠，以及 MCP-2 和噁心均可能有相關性，但需要更多的資料來證實。

#### 5. QuantiFERON-TB Gold Plus：

甲、4 人 (57.1%) 追蹤結果為持續下降，2 人 (28.6%) 的個案先下降再上升，1 人 (14.3%) 14% 的個案不降反升。

乙、雖然個案數少，但僅有不到 60% 的個案數值持續下降。一方面，我們需要更多證據證明 QuantiFERON-TB Gold Plus 的效力；另一方面，對於使用 QuantiFERON-TB Gold Plus 作為潛伏結合治療效果評估的工具，可能仍須採取較保守的態度。

## 第四章 討論

### 子計畫一：潛伏結核感染治療之藥物動力學分析及副作用監測

這是第一個前瞻性研究去探討血中藥物濃度以及藥物代謝基因多型性與服用 3HP 過程中是否產生 SDR 的相關性。截至目前為止，本研究有幾個重要的發現：

第一、3HP 治療過程中，發生 SDR 的機率是 8.8%。

第二、3HP 是否產生 SDR，與 *NAT2* 和 *CYP2E1* 而非 *AADAC* 的基因多型性有顯著相關。

第三、3HP 是否產生 SDR，與 INH 而非 RPT 的血中藥物濃度有顯著相關。

以往，使用 3HP 時產生 SDR，多半認為與 rifapentine 有關，因為過去已有不少 rifamycin 類藥物產生 flu-like syndrome 的報告 [32, 42, 45, 46]。加上過去使用 INH 進行預防性治療中鮮少發生 flu-like syndrome，因此讓人認為 rifapentine 這個相對較新的藥物就是造成 SDR 的元兇。然而，有些研究卻提出了不同的意見。首先，3HP 的研究顯示，產生 SDR 之後，再次使用 rifapentine，並不一定會再次造成 SDR [32]。同時，在另外一篇於活動性結核病的治療鞏固期（consolidation phase）每週使用 1200 mg rifapentine 的研究中，並沒有 SDR 的案例報告[47]。

相反的，雖然文獻報告不多，但 isoniazid 確實也可以產生 flu-like syndrome [48, 49]，大約有 1~9.8%的活動性結核病人，在每天使用 300 mg 的 isoniazid 治療下，產生 flu-like syndrome。也有不少的案例報告顯示，isoniazid 確實也可能產生 flu-like syndrome (Table 1-4)。只是，過去並沒有每週一次使用 900 mg isoniazid 的經驗，因此無法知道在這樣的治療下產生 flu-like syndrome 的機率。

不過，目前由於納入人數並不是很多，再加上能夠配合藥物濃度檢測抽血時間的受試者更少，因此，初步的分析結果，並不能夠完全排除 rifapentine 與 SDR 的相關性。此外，由於女性的體重較輕而導致血中藥物濃度高於男性，是否可以解釋過去文獻中觀察到之女性副作用機率較高的現象，仍有待分析確認。希望在明年的計畫當中，我們能夠取得更多的資料，進行更完整的分析。

### 子計畫二：現行潛伏結核治療處方中，9H 和 4R 兩種處方之使用情形及副作用監測

這是第一個前瞻性研究去探討血中藥物濃度和藥物代謝基因多型性與服用 9H 及 4R 處方的過程中是否產生 SDR 的相關性；以及評估 QuantiFERON-TB Gold Plus 在潛伏結核感染治療治療中變化的研究。截至目前為止，因為收案數量少，加上個案配合服藥後抽血時間不易，仍無法找出



在藥物濃度、藥物代謝基因多型性以及藥物副作用/ SDR 間顯著的關聯性。只有兩個可能的發現：

第一、9H 和 4R 治療過程中，IP-10、TNF- $\alpha$  和 MCP-2 的濃度上升可能與頭痛、頭暈/倦怠和噁心有關連性。

第二、QuantiFERON-TB Gold Plus 和 LTBI 治療效果的關聯性也許不如預期。

但是，兩者都需要更多資料證實

IP-10 (Interferon gamma-induced protein 10)，又稱為 CXCL10 (C-X-C motif chemokine 10)，屬於 CXCL 細胞激素家族，和遲發性的過敏反應相關，會聚集單核球和活化的 T 細胞[58, 59]，近年來也被視為活動性結核及潛伏性結核的診斷工具之一[59, 60]。雖然沒有血清中 IP-10 和頭痛明顯關聯的紀錄，但是腦脊髓液中的 IP-10 濃度，在 multiple sclerosis 及 inflammatory neurological diseases 有顯著上升[61]。也許代表在 9H 或 4R 的治療過程中，有部分個案可能產生中樞神經發炎的問題。TNF- $\alpha$  與調控免疫、發炎反應有關，因全身性的發炎反應引起頭暈/倦怠是可能的。MCP-2 (monocyte chemoattractant protein 2) 又稱為 CCL8 (Chemokine <C-C motif> ligand 8)，可以聚集單核球、T 細胞、自然殺手細胞、嗜伊紅性球和嗜鹼性球，促使嗜鹼性球釋出組織胺[62]，是否因此造成噁心感？

不過，目前由於納入人數並不是很多，再加上能夠配合藥物濃度檢測抽血時間的受試者更少，因此，無法提供更明確的結果。

**Table 1-4.** Literature review of original reports (9A) and case reports (9B) for flu-like syndrome due to INH proven by re-challenge

**1-4A**

<b>Total cases</b>	<b>TB status</b>	<b>Incident cases (%)</b>	<b>Mean age (yr)</b>	<b>Sex</b>	<b>HIV</b>	<b>INH Dosage</b>	<b>Concomitant drugs</b>	<b>Mean onset after starting Tx (days)</b>	<b>Duration of symptoms</b>
814 [50]	Active TB	8 (1.0)	66	M: 5 F: 3	negative	300 mg/day	RMP	21 days	12 hrs
112 [49]	Active TB	11 (9.8)	NA	NA	NA	300 mg/day (15 mg/kg/day)	RMP	NA	NA

HIV: human immunodeficiency virus; INH: isoniazid; NA: not available; RMP: rifampin; TB: tuberculosis; Tx: treatment;

**1-4B**

<b>Age (yr) /Sex</b>	<b>TB status</b>	<b>HIV</b>	<b>INH Dosage</b>	<b>Concomitant drugs</b>	<b>Onset after starting Tx</b>	<b>Symptoms/Signs</b>	<b>Duration of symptoms</b>
57/F [51]	LTBI	NA	300 mg/day	none	9 days	Fever, malaise, respiratory distress, hypotension	10 hrs
54/F [51]	LTBI	NA	300 mg/day	none	8 days	Fever, chills	NA
53/M [52]	LTBI		300 mg/day	none	12 days	Fever, chills, nausea, fatigue	NA

Age (yr) /Sex	TB status	HIV	INH Dosage	Concomitant drugs	Onset after starting Tx	Symptoms/Signs	Duration of symptoms
10/F [53]	Active TB	negative	100 mg/day (4.6 mg/kg/day)	RMP/EMB/PZ A	6 days	Fever, chill, rhinorrhea, dry cough, nausea, body ache	12 hrs
56/F [54]	Active TB	NA	300 mg/day	pyridoxine	14 days	Fever, nausea, vomiting, hypotension, confusion	24 hrs
84/F [55]	Active TB	NA	300 mg/day	RMP	14 days	Fever, rigor, confusion, hypotension	24 hrs
64/F [55]	Active TB	NA	600 mg BIW	RMP/PZA BIW	8 days	Fever, rigors, rash	NA
68/F [55]	Active TB	NA	300 mg/day	RMP/PZA	8 days	Fever, rigors,	NA
48/M [56]	Active TB	NA	300 mg/day	RMP/PZA	4 days	Fever, chills, erythematous maculopapular rash, nausea	48 hrs

BIW: twice weekly; EMB: ethambutol; HIV: human immunodeficiency virus; INH: isoniazid; NA: not available; PZA: pyrazinamide; RMP: rifampin; TB: tuberculosis; Tx: treatment;

## 第五章 結論與建議

### 子計畫一：潛伏結核感染治療之藥物動力學分析及副作用監測

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，擬定更有效率、更安全的公衛措施。
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. 藉由血清藥物濃度的監測，及時避免或預防副作用的發生。

但目前因為納入個案仍舊不多，無法做出具有說服力的結論，期待明後年能夠繼續完成這一個具有學術、臨床、公衛意義的研究。

### 子計畫二：現行潛伏結核治療處方中，9H 和 4R 兩種處方之使用情形及副作用監測

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 9H 及 4R 進行潛伏結核感染治療發生 SDR 的機率，擬定更有效率、更安全的公衛措施。
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. 藉由血清藥物濃度的監測，及時避免或預防副作用的發生。
4. 評估以 QuantiFERON-TB Gold Plus 追蹤 LTBI 治療效果的可能性。

但目前因為納入個案仍舊不多，無法做出具有說服力的結論，期待明後年能夠繼續完成這一個具有學術、臨床、公衛意義的研究。

此外，關於收案人數不多的部分，主要的理由是因為公衛政策落實完整。潛伏性結核的治療普及，引進 3HP 處方的醫院增加，對一般民眾而言，只要 3 個月的 3HP 處方，比要花上 9 個月的 9H 處方更具吸引力，大部分的 LTBI 個案都選擇了 3HP 治療，導致 9H 組收案困難；而在標準化的治療下，isoniazid 抗藥性的指標個案亦越來越少見，在其接觸者中篩出 LTBI 的個案自然也不會多，使 4R 組的個案面臨一樣的問題。

## 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

- 1-1、三個月 rifapentine 合併高劑量 isoniazid 這樣的治療（簡稱 3HP），8.8%的人產生全身性藥物反應。發生的危險因子，與 INH 藥物濃度與其代謝酵素基因多型性有關。
- 2-1、雖然大部分的 adverse effect 集中在前兩個月，但仍有需停藥的 hepatitis 發生在第 15 周，不可輕忽。
- 2-2、在 Cytokine 和副作用的關聯性部分，依目前現有的資料，較可能有關連性的包括：IP-10 和頭痛、TNF- $\alpha$  和頭暈、倦怠，以及 MCP-2 和噁心。但需要更多資料證明。
- 2-3、藥物濃度以及基因多型性的部分，因為個案數太少，加以病人配合服藥後抽血的困難度較高，無法看出明顯的結果。
- 2-4、在 QuantiFERON-TB Gold Plus 的部分，57%的個案追蹤結果為持續下降，29%的個案先下降再上升，14%的個案不降反升。雖然個案數少，但依此結果，對於以 QuantiFERON-TB Gold Plus 追蹤治療效果，可能需要審慎評估。

### 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. 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.
3. Chiang CY, Riley LW: **Exogenous reinfection in tuberculosis**. *The Lancet infectious diseases* 2005, **5**(10):629-636.
4. **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.
5. World Health Organization: **The End TB Strategy**. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2015.
6. Denholm JT, Matteelli A, Reis A: **Latent tuberculosis 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.
7. Huebner RE, Schein MF, Bass JB, Jr.: **The tuberculin skin test**. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 1993, **17**(6):968-975.
8. 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.
9. Chan PC, Chang LY, Wu YC, Lu CY, Kuo HS, Lee CY, Huang LM, Chen CJ: **Age-specific cut-offs for the tuberculin skin test to detect latent tuberculosis in BCG-vaccinated children**. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 2008, **12**(12):1401-1406.
10. Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D: **False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria?** *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 2006, **10**(11):1192-1204.
11. Pai M, Riley LW, Colford JM, Jr.: **Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review**. *The Lancet infectious diseases* 2004, **4**(12):761-776.
12. Menzies D, Pai M, Comstock G: **Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research**. *Annals of internal medicine* 2007, **146**(5):340-354.
13. Luh KT (ed.): **Taiwan Guidelines for TB Diagnosis and Treatment**, 5th edn. Taipei, Taiwan: Centers for Disease Control, R.O.C. (Taiwan); 2013.
14. **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.

15. 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.
16. 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.** *Clin Infect Dis* 2005, **41**(8):1125-1133.
17. Medinger A: **Death associated with rifampin and pyrazinamide 2-month treatment of latent mycobacterium tuberculosis.** *Chest* 2002, **121**(5):1710-1712.
18. 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.
19. Leung CC, Rieder HL, Lange C, Yew WW: **Treatment of latent infection with m. tuberculosis: update 2010.** *Eur Respir J* 2010.
20. **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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. **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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
  30. 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.
  31. 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.
  32. 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.
  33. Seifart HI, Gent WL, Parkin DP, van Jaarsveld PP, Donald PR: **High-performance liquid chromatographic determination of isoniazid, acetylisoniazid and hydrazine in biological fluids.** *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995, **674**(2):269-275.
  34. Blake MJ, Abdel-Rahman SM, Jacobs RF, Lowery NK, Sterling TR, Kearns GL: **Pharmacokinetics of rifapentine in children.** *Pediatr Infect Dis J* 2006, **25**(5):405-409.
  35. Weiner M, Bock N, Peloquin CA, Burman WJ, Khan A, Vernon A, Zhao Z, Weis S, Sterling TR, Hayden K *et al*: **Pharmacokinetics of rifapentine at 600, 900, and 1,200 mg during once-weekly tuberculosis therapy.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2004, **169**(11):1191-1197.
  36. Weiner M, Burman W, Vernon A, Benator D, Peloquin CA, Khan A, Weis S, King B, Shah N, Hodge T *et al*: **Low isoniazid concentrations and outcome of tuberculosis treatment with once-weekly isoniazid and rifapentine.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2003, **167**(10):1341-1347.
  37. Peloquin CA, Durbin D, Childs J, Sterling TR, Weiner M: **Stability of antituberculosis drugs mixed in food.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2007, **45**(4):521.
  38. Weiner M, Savic RM, Kenzie WR, Wing D, Peloquin CA, Engle M, Bliven E, Prihoda TJ, Gelfond JA, Scott NA *et al*: **Rifapentine Pharmacokinetics and Tolerability in Children and Adults Treated Once Weekly With Rifapentine and Isoniazid for Latent Tuberculosis Infection.** *J Pediatric Infect Dis Soc* 2014, **3**(2):132-145.
  39. Hsieh FI, Pu YS, Chern HD, Hsu LI, Chiou HY, Chen CJ: **Genetic polymorphisms of N-acetyltransferase 1 and 2 and risk of cigarette smoking-related bladder cancer.** *Br J Cancer* 1999, **81**(3):537-541.
  40. Stephens EA, Taylor JA, Kaplan N, Yang CH, Hsieh LL, Lucier GW, Bell DA: **Ethnic variation in the CYP2E1 gene: polymorphism analysis of 695 African-Americans, European-Americans and Taiwanese.** *Pharmacogenetics* 1994, **4**(4):185-192.
  41. Shimizu M, Fukami T, Kobayashi Y, Takamiya M, Aoki Y, Nakajima M, Yokoi T: **A novel polymorphic allele of human arylacetamide deacetylase leads to decreased enzyme activity.** *Drug Metab Dispos* 2012, **40**(6):1183-1190.



42. **A controlled trial of daily and intermittent rifampicin plus ethambutol in the retreatment of patients with pulmonary tuberculosis: results up to 30 months.** *Tubercle* 1975, **56**(3):179-189.
43. 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.
44. 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.
45. **Controlled trial of intermittent regimens of rifampicin plus isoniazid for pulmonary tuberculosis in Singapore.** *Lancet* 1975, **2**(7945):1105-1109.
46. Dickinson JM, Mitchison DA, Lee SK, Ong YY, O'Mahoney MG, Girling DJ, Nunn AJ: **Serum rifampicin concentration related to dose size and to the incidence of the 'flu' syndrome during intermittent rifampicin administration.** *J Antimicrob Chemother* 1977, **3**(5):445-452.
47. Jindani A, Harrison TS, Nunn AJ, Phillips PP, Churchyard GJ, Charalambous S, Hatherill M, Geldenhuys H, McIlleron HM, Zvada SP *et al*: **High-dose rifapentine with moxifloxacin for pulmonary tuberculosis.** *The New England journal of medicine* 2014, **371**(17):1599-1608.
48. Dutt AK, Jones L, Stead WW: **Short-course chemotherapy of tuberculosis with largely twice-weekly isoniazid-rifampin.** *Chest* 1979, **75**(4):441-447.
49. Eule H, Werner E, Winsel K, Iwainsky H: **Intermittent chemotherapy of pulmonary tuberculosis using rifampicin and isoniazid for primary treatment: the influence of various factors on the frequency of side-effects.** *Tubercle* 1974, **55**(1):81-89.
50. Dutt AK, Moers D, Stead WW: **Undesirable side effects of isoniazid and rifampin in largely twice-weekly short-course chemotherapy for tuberculosis.** *Am Rev Respir Dis* 1983, **128**(3):419-424.
51. Davis RS, Stoler BS: **Febrile reactions to INH.** *The New England journal of medicine* 1977, **297**(6):337.
52. Jacobs NF, Jr., Thompson SE, 3rd: **Spiking fever from isoniazid simulating a septic process.** *JAMA* 1977, **238**(16):1759-1760.
53. Pandit S, Choudhury S, Das A, Datta S, Das SK: **Isoniazid-induced flu-like syndrome: A rare side effect.** *Lung India* 2013, **30**(1):61-63.
54. Gabrail NY: **Severe febrile reaction to isoniazid.** *Chest* 1987, **91**(4):620-621.
55. Motion S, Humphries MJ, Gabriel SM: **Severe 'flu'-like symptoms due to isoniazid--a report of three cases.** *Tubercle* 1989, **70**(1):57-60.
56. Henderson RP, Davis HL, Self TH: **Spiking fever induced by isoniazid.** *Drug Intell Clin Pharm* 1983, **17**(10):741-742.
57. Kamada A, Amishima M. **QuantiFERON-TB® Gold Plus as a potential tuberculosis treatment monitoring tool.** *Eur Respir J.* 2017 Mar 22;**49**(3)
58. Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, Stiles JK. **CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications.** *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011 Jun;**22**(3):121-30.
59. Azzurri A, Sow OY, Amedei A, Bah B, Diallo S, Peri G, Benagiano M, D'Elis MM, Mantovani A, Del Prete G. **IFN-gamma-inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for**

**monitoring inflammation and disease activity in Mycobacterium tuberculosis infection.** *Microbes Infect.* 2005 Jan;7(1):1-8.

60. Petrone L, Vanini V, Chiacchio T, Petruccioli E, Cuzzi G, Schininà V, Palmieri F, Ippolito G, Goletti D. **Evaluation of IP-10 in Quantiferon-Plus as biomarker for the diagnosis of latent tuberculosis infection.** *Tuberculosis.* 2018 Jul;111:147-153.
61. Mahad DJ, Howell SJ, Woodroofe MN. **Expression of chemokines in the CSF and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2002 Apr;72(4):498-502.
62. Proost P, Wuyts A, Van Damme J. **Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1.** *J Leukoc Biol.* 1996 Jan;59(1):67-74.