

平成 10 年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

薬剤耐性結核のサーベイランス，耐性の分子  
機構および多剤耐性結核の治療に関する研究

研究報告書

主任研究者 阿部千代治

平成 10 年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

薬剤耐性結核のサーベイランス，耐性の分子機構および多剤耐性結核の治療に関する研究（H10-新興-4）

研究者名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	阿部千代治	結核予防会結核研究所	部長
分担研究者	小野崙菊夫	名古屋市立大学薬学部	教授
	鈴木定彦	大阪府立公衆衛生研究所	主任研究員
	高橋光良	結核予防会結核研究所	科長
	谷口初美	産業医科大学医学部	助教授
	螺良英郎	結核予防会大阪府支部大阪病院	院長
	中島由槻	結核予防会複十字病院	部長
	水口康雄	千葉県衛生研究所	所長
	毛利昌史	国立療養所東京病院	院長
	安岡彰	国立国際医療センター	医長
	和田雅子	結核予防会結核研究所	副部長

## 目次

A.総括研究報告-----	1
阿部千代治(結核予防会結核研究所)	
B.分担研究報告	
1.薬剤耐性結核の現状-----	7
阿部千代治(結核予防会結核研究所)	
2.結核菌の臨床分離株を用いた RFLP 分析に関する研究-----	13
水口康雄, 岸田一則(千葉県衛生研究所)	
3.RFLP 分析を用いた薬剤耐性結核菌の伝播に関する研究-----	19
高橋光良(結核予防会結核研究所)	
4.結核菌のカナマイシン耐性の分子遺伝学的解析-----	21
谷口初美(産業医科大学医学部)	
5.DNA チップを用いた薬剤耐性結核菌迅速検出法の開発-----	27
鈴木定彦(大阪府立公衆衛生研究所)	
6.アジア諸国で分離されたリファンピシン耐性結核菌の rpoB 遺伝子の変異と Line probe 法による変異の検出-----	35
阿部千代治, 平野和重(結核予防会結核研究所)	
7.結核菌 virulence の in vitro における評価に関する研究-----	41
小野崙菊夫(名古屋市立大学薬学部)	
8.多剤耐性結核における長期生存例に関する研究-----	49
毛利昌史, 佐藤紘二(国立療養所東京病院)	
9.難治性抗酸菌症に対する Biotherapy : ロムルチドおよび 補中益気湯による免疫増強療法-----	53
螺良英郎(結核予防会大阪府支部大阪病院)	

10.アンサー 20 による多剤耐性結核症に対する免疫療法-----	105
和田雅子（結核予防会結核研究所）	
高嶋哲也（大阪府立羽曳野病院）	
坂谷光則（国立療養所近畿中央病院）	
田野正夫（国立療養所東名古屋病院）	
盛本正男（結核予防会新山手病院）	
11.難治性エイズ合併非定型抗酸菌症の検討-----	135
安岡 彰，酒井敦子（国立国際医療センター・エイズ治療・	
研究開発センター）	
12.多剤耐性結核の集学的治療体制の確立に関する研究-----	141
中島由槻（結核予防会複十字病院）	

## C.発表文献リスト

## A.総括研究報告書

## 総括研究報告書

### 薬剤耐性結核のサーベイランス、耐性の分子機構および 多剤耐性結核の治療に関する研究

主任研究者 阿部千代治 結核予防会結核研究所 部長

研究要旨：主要薬剤であるイソニアジド(INH)とリファンピシン(RFP)に耐性を示す場合を多剤耐性結核(MDR-TB)と定義しており、MDR-TBの発生は結核対策の脅威である。WHO/IUATLDは世界的規模で薬剤耐性結核のサーベイランスを進行中である。中間成績は、国の結核対策プログラムが良く遂行していない国では多剤耐性結核の頻度が高いことを示した。わが国でも全国的規模の薬剤耐性結核のサーベイランスを行っており、1年後にその実態が明らかになる。薬剤耐性の分子機構の研究がRFP、ピラジナミド、ストレプトマイシン、カナマイシン、エンビオマイシンで势力的に進められた。これら耐性に関与する遺伝子の変異を検出するためのDNAチップ法とLine probe法が開発された。結核菌の病原性を試験するインビトロモデルを開発した。このモデルによる試験で、MDR-TBを含む薬剤耐性菌は薬剤感受性菌と同等の病原性を持つことが示された。RFLP分析を用いた研究から、全国いたるところで集団感染が多発していることが明らかになった。さらに、多剤耐性菌による集団感染も頻発しており、インビトロの試験結果が支持された。MDR-TBのための確立された治療法はまだない。患者の多くは免疫状態が低下している。MDR-TBの治療に、免疫刺激効果が確認されているロムルチド(ムラミルジペプチド誘導体)、補中益気湯またはアンサー20と抗結核薬による併用療法を試みた。これらの研究を実行するに当たり倫理面に十分配慮した。MDR-TB例の抗結核療法には限界がある。患者の状態により外科療法を取り入れることが必要である。集学的治療体制の確立を目的として研究が進められた。

#### A.研究目的

米国はじめヨーロッパ諸国でエイズ患者の間で多剤耐性結核菌による集団感染が多発している。これらは主要な抗結核薬すべてに耐性を獲得している菌による感染であり、死亡率は高くしかも診断から死亡までの

メジアンも4週間と極端に短くなっている。このことは迅速な診断と感受性試験が重要であることを示している。1992年の結核療法研究協議会の調査によると、わが国の未治療患者の耐性頻度は全年齢層で見れば過去の調査と比べ横這い状態であるが、

若年齢層では増えていることが明らかにされている。またここ数年の間に多剤耐性結核菌による職場内や病院内の集団感染も報告されており、迅速な臨床細菌検査と検査結果に基づいた適切な患者管理が今求められている。

わが国では、結核菌検査を卵培地で行っているため診断後感受性試験の結果が得られるまでに 8 週間を要している。そのため検査の結果が臨床に十分生かされていないのが現状である。この研究の目的は、薬剤に対する耐性の分子機構を解明することにより耐性菌の早期検出の道を開き、その結果適切な治療と耐性菌の発生の防止を可能にすることである。また耐性菌の病原性の確認、耐性菌のサーベイランスおよび薬剤耐性患者の効果的な治療は耐性菌の伝播の防止にも大いに役立つと考える。若年者の 95%は結核菌未感染者であり感染の危険が高い。耐性患者は常に排菌していることから、耐性菌のリザーバーを少なくする意味でも免疫賦活剤との併用療法の試みおよび排菌源となっている病巣の外科的処置はこれら若年者への耐性菌による感染を防止する上で特に意義がある。この研究の成果は臨床への還元はもとより、国の結核対策にも生かされよう。

## B.研究方法

WHO / International Union  
Against Tuberculosis and Lung

Disease(IUATLD)のプロジェクトおよび結核療法研究協議会の共同研究に参加し、世界と日本の薬剤耐性結核の現状を調べた。耐性菌による感染の状況を詳細に研究するために、療研の共同研究で集められた菌、千葉県で分離された菌、集団感染あるいは小規模感染から分離された結核菌について薬剤感受性試験と IS6110 をプローブとした RFLP 分析を行った。

大腸菌などの一般細菌で知られている耐性の分子機構を参考にして、主要抗結核薬に対する耐性の分子機構を調べた。研究で明らかにされた関連遺伝子を PCR で増幅後、DNA チップ法および Line probe 法を用いて変異の迅速検出を試みた。

結核菌感染細胞にサイトカインを添加したときに見られる細胞死の作用機構を調べるために、ヒト線維芽細胞株を用い薬剤感受性菌と耐性菌で比較した。

多剤耐性患者に免疫の低下が見られる。結核の防御免疫に関与するサイトカイン発現のレベルを調べた。現在多剤耐性結核に対する有効な治療法はない。免疫細胞刺激効果が確認されているロムルチド（ムラミルジペプチド誘導体）、補中益気湯またはアンサー 20（丸山ワクチン）と抗結核薬との併用療法を試みた。効果判定は患者の経過観察、細菌学的検査、画像、生化学的診断を定期的実施し、非投与群と比較した。副作用、副現象についても記録した。化

学療法のみでは治療困難な例の外科治療の適応とその方法，手術前後の化学療法の必要性とその期間について検討した。また病院内感染の防止についても研究した。

## C. 研究結果と考察

### 1. 薬剤耐性結核のサーベイランス

WHO と IUATLD は 1994 年に世界的規模で薬剤耐性結核のサーベイランスを開始した。これまでに 35 の国と地域からその成績が報告された。初回耐性の頻度は 2% から 41% の範囲で中央値は 10.4% であった。また大きな問題となる初回 MDR-TB はケニアの 0% からラトビアの 14.4% の範囲で，中央値は 1.4% であった。一方既治療例から得られる獲得耐性の頻度は 5.3% から 100% の範囲で，その中央値は 36% であった。MDR-TB の頻度はケニアの 0% からラトビアの 54% の範囲で，中央値は 13% であり，国により耐性の頻度に大きな差が見られた。WHO はピラジナミド(PZA)を含む 6 ヶ月の短期強化治療法(SCC)と Directly Observed Treatment, Short course (DOTS, 直接監視下短期治療)の遂行を強力に進めている。DOTS は今回報告された 35 の国と地域の中でまだ広く受け入れられていないことより，DOTS の遂行と耐性頻度との関連はみられなかったが，標準的 SCC で治療された患者の割合と初回 MDR-TB の頻度との間に有意の差が認められた。すなわち，初回または獲得 MDR-TB の頻度は国の結

核対策プログラム遂行の良いインジケータであることが示された。

結核療法研究協議会は，入院時に分離された結核菌の薬剤に対する耐性頻度を研究した。結核病床を持つ病院の中で 78 病院が今回のサーベイランスに参加した。合計 2,144 株の抗酸菌が結核研究所に送付された。現在試験中であり，1 年後にわが国の薬剤耐性の状況が明らかになる。

### 2. 薬剤耐性の分子機構

分子遺伝学的手法の導入により，結核菌の薬剤耐性の分子機構が少しずつ明らかになってきた。主要な抗結核薬の 1 つである RFP に耐性を獲得した結核菌の 95% は RNA ポリメラーゼの  $\beta$  サブユニットをコードしている *rpoB* 遺伝子の約 70 ベースからなるホットスポット領域に変異を持つことを日本，アジア諸国，米国で分離した結核菌で見出した。PZA の導入はこれまでの 9~12 ヶ月の標準治療法を 6 ヶ月に短縮した。それゆえ，分離された結核菌が PZA に感受性であるか否かは治療法を決定する上で重要である。一般に PZA 耐性菌はピラジナミダーゼ(PZase)活性を欠いている。PZase をコードしている *pncA* 遺伝子の変異は PZA 耐性の主要な機構 (PZA 耐性菌の 97% は *pncA* 遺伝子に変異を持つ) であることを主にアジア諸国で分離した結核菌で証明した。またストレプトマイシン(SM)およびカナマイシン(KM)耐性結核菌の約 70% はリボソームの



S12 タンパクをコードしている *rpsL* 遺伝子と 16S リボソーム RNA をコードしている *rrs* 遺伝子に変異を持つことを見出した。しかし RFP 耐性株と PZA 耐性株の数パーセントはこれ以外の分子機構が耐性発現に参与しているものと推測される。また SM 耐性菌の約 30% と INH 耐性菌の 10% はこれまでに明らかにされた分子機構ではまだ説明できない。今後の研究に待たれる。

薬剤耐性菌の迅速な検出のために、薬剤耐性に関与する遺伝子の変異の検索が試みられた。RFP 耐性株では *rpoB* 遺伝子の 70 ベースからなるホットスポット領域に変異が見られる。PCR で増幅した *rpoB* DNA とこの領域をカバーする約 20 ベースからなる野外型重複ヌクレオチドプローブと変異型プローブをコートしたストリップを用いる Line probe 法で RFP 耐性株の 92% が検出できることがわかった。今後 3 塩基挿入変異の検出をミスしたプローブを改善することにより、感受性試験の成績との一致度を 95% にあげることが可能である。同じ *rpoB* 変異の検出を DNA チップ法でも試み、良い結果が得られた。菌株の入手から 2 日以内に変異の検出が可能である。さらに改善を進めることにより臨床材料への応用も可能となろう。これらの結果は、Line probe 法および DNA チップ法を RFP 耐性菌の臨床検査に応用できることを示している。他の薬剤に対する耐性菌の検出についても研究を進めて

いる。

### 3. 耐性菌の病原性と感染

インビトロで作製した INH 耐性菌は感受性親株と比べ実験動物に対する病原性が低いとする報告があり、ヒトでは耐性菌による感染は起こらない、あるいは起こったとしてもそれは希であると一般に考えられてきた。他方、マウスは結核菌に対して低感受性であり、マウスで得られた成績がヒトの病気にどの程度反映できるかについては疑問があり、結核菌の病原性に関しては意見の一致がなかった。

ヒト線維芽細胞に結核菌とサイトカインを添加したときに細胞死がみられた。細胞死は死菌添加では起こらないこと、さらに実験動物に対する病原性の異なる結核菌 H37Rv と H37Ra 株を比べたとき、病原性の強い結核菌 H37Rv がより強い細胞死を誘導することが証明された。またこの系で多剤耐性菌は感受性菌と同等の病原性を示すことも明らかになった。この研究で用いた系は培養細胞モデルであるが、ヒト線維芽細胞由来株であることから、見ている現象はヒトの病気に近いものとする。細胞死の機構について、ヒューマンサイエンス振興財団補助金「外国への日本人研究者派遣事業」の援助を得て米国に研究者を派遣し研究を進めている。

結核菌の挿入配列 (IS6110) を用いた RFLP 分析により結核菌の亜分類

が可能となった。この分析法は結核の感染および発病様式を研究するための強力な手段である。RFLP 分析を用いた調査研究から、全国いたるところで集団感染が頻発していることが明らかになった。さらに一番恐れていた耐性菌による感染が、とりわけ多剤耐性菌による感染あるいは集団感染が病院、家内工場、麻雀仲間の間で証明された。この事実は、多剤耐性菌も感受性菌と同等の病原性を保持するとするインビトロの成績を支持するものである。結核対策のために耐性菌感染の実態を今後とも RFLP 分析で追跡する必要がある。

#### 4. 多剤耐性結核の治療

1992 年の結核療法研究協議会の成績では、初回 MDR-TB の頻度は 0.1% であったが 2 週間以上の結核治療歴を持つ獲得 MDR-TB は 10.1% であり、初回の治療がいかに大切であるかは明らかである。

平成 8 年の結核の統計から上の数字をもとに単純計算を試みると、新登録者中の菌陽性初回治療者数 13,571 名の 0.1%(13 名)と再治療数 827 名の 10.1%(83 名)および 2 年以上登録の菌陽性者数 2,299 名の 10.1%(232 名)を合わせた MDR-TB 総数は 328 名となる。1992 年のサーベイランスの際に用いた感受性試験の臨界濃度は諸外国で用いている濃度および日本結核病学会より新しく提案された濃度より高いことから、上に示した MDR-TB の総数は過小評

価であろう。

MDR-TB のために確立された治療法はまだない。薬剤感受性試験の結果から効果的な薬を組み合わせ使っているのが現状である。MDR-TB 患者の多くは免疫状態が低下している。MDR-TB の治療に *Mycobacterium vaccae* 加熱死菌と抗結核薬との併用療法あるいは IL-2 または IFN- $\gamma$  投与の成績が報告されている。しかしこれらはまだ確立されたものではない。ロムルチド (ムラミルジベプチド誘導体)、補中益気湯、アンサー 20 (丸山ワクチン) に免疫細胞刺激効果が確認されている。これらの物質は他の疾患に使われており、安全性はすでに確認されている。分担研究者が所属する病院以外にも参加を呼びかけ、倫理面に十分な配慮をした上でロムルチド、補中益気湯、アンサー 20 と抗結核薬との併用治療研究を進めている。これまでに丸山ワクチンが有効であると考えられた症例を経験しており、免疫刺激剤と抗結核薬との併用療法は MDR-TB の治療法として期待される。

MDR-TB 例の抗結核薬療法には限界がある。患者状態により積極的に外科治療を取り入れることが必要である。しかしこれまでその適応については十分に議論されていない。外科治療の適応について、アンケート調査も加え研究中である。アンケート回答をした 349 施設中 182 施設で MDR-TB を経験しており、56 施設では外科治療を行っていた。分析は一

部であるが、MDR-TB に対する外科治療は 88.4%の成功率を得ている。ほとんどすべての抗結核薬に耐性を獲得している例では何の治療法も持たない。このような MDR-TB 例で残された治療は外科治療のみである。もちろん有効な薬剤が残っている段階での外科治療がより有効である。エイズ合併例における MDR-TB の頻度は約 5%であり、これまでに MDR-TB の集団発生は認められていない。

米国では結核の診断や治療の指導あるいはモデルとなる拠点病院を指定しており、治療困難例はそこに集められる。この拠点病院構想についても研究した。

医療従事者の結核感染が問題になっている。特に看護婦と臨床検査技師の結核発病率が高い。結核病棟の施設面の改善を含めた病院内感染防止対策が必要である。米国では CDC と Occupational Health Safety Administration (OSHA) が病院内感染防止のためのガイドラインを発表した。

日本結核病学会からも同様の指針が提案された。複十字病院において病院内感染防止対策が施行された。

#### D. 結論

1. 適切な結核対策が取られない場合に MDR-TB が上昇する。裏を返せば MDR-TB の頻度を調べることにより国の結核対策の善し悪しが判断できる。

2. MDR-TB による集団感染の頻発が RFLP 分析により明らかにされた。

3. RFP 耐性菌については、耐性に関与する遺伝子の変異を検出することにより迅速同定が可能となった。

4. 結核菌の病原性をインビトロで試験する方法を開発した。

5. MDR-TB の治療は免疫刺激剤と抗結核薬との併用療法あるいは外科治療に今後希望が持たれる。しかし MDR-TB の治療が困難であることに変わりはない。耐性菌を作らない初期治療法が肝心である。

## B.分担研究報告書

## 薬剤耐性結核の現状

分担研究者 阿部千代治 結核予防会結核研究所基礎研究部部長

研究要旨：WHO の結核対策部は International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) と協力し、世界的規模の薬剤耐性結核のサーベイランスを開始した。初回耐性の頻度は 2% から 41% の範囲で、中央値は 10.4% であった。一方既治療症例からえられる獲得耐性の頻度は 5.3% から 100% の範囲で、その中央値は 36% であり、国により耐性の頻度に大きな差が見られた。また初回または獲得多剤耐性の頻度は国の結核対策プログラム遂行の良いインジケータであることが示された。わが国では現在サーベイランス進行中であり、1 年後に薬剤耐性結核の状況が明らかになる。

### A. 研究目的

米国や欧州においては HIV 感染者の間の多剤耐性結核菌による集団感染が国際的に注目を浴びている。主要薬剤であるイソニアジド (INH) とリファンピシン (RFP) に耐性を示す場合を多剤耐性結核 (MDR-TB) と定義しており、結核対策に対する脅威である。多剤耐性菌に感染した患者は非常に治療が困難であり、より強力で高額な治療が必要となる。それゆえ、薬剤耐性は結核対策の標準方式である DOTS (直接監視下短期治療法) 戦略の脅威である。1994 年に WHO は IUATLD と協力し、薬剤耐性結核の広がりを調べることを目的としたプロジェクトを開始した。この研究の目的は標準的な方法を用いて薬剤耐性結核の頻度を測定することと、それぞれの国の耐性レベルと治療法式の関連を研究することである。わが国でも結核療法研究協議会が中心となり同様の目的で研究を進めている。

### B. 研究方法

#### 1. 世界的規模のプロジェクト

最初に着手した仕事はガイドラインの作成であった。このガイドラインでは次の 3 項目を強調した。①対象は結核患者の代表的なサンプルであり、サンプル数は適切な数であること、②結核の治療歴の有無が正しく把握できること、③薬剤感受性試験の精度が容認できるレベルにあること。

第 2 のステップは、薬剤感受性試験の精度を確保するために世界の異なる地域から選ばれた研究所 (Supranational Reference Laboratory) によるネットワークを構築することであった。アジア地区からは結核予防会結核研究所と韓国およびインドの研究所が SRL に選ばれた。そのネットワークは現在 22 の SRL からなっている。

第 3 のステップは国レベルでサーベイランスプロジェクトを遂行する

ために、WHO のリーダーシップのもとに国の結核対策プログラム(NTP)の代表者および研究所と作業グループを作ることであった。

## 2.わが国におけるサーベイランス

全国で結核病床を持つ病院のなかで 78 病院が今回のサーベイランスに参加した。対象は平成 9 年 6 月 2 日から同年 11 月 30 日、までの間に入院した結核患者で菌が分離された例に限られた。参加各施設では、調査期間内に入院した患者で菌の分離された例について調査個人票の作成と薬剤感受性試験を実施した。結核予防会結核研究所において、各施設で作成した資料の整理と送付された結核菌について主要 5 抗結核薬に対する感受性を普通法で再検査した。

## C.研究結果

### 1.世界の薬剤耐性結核

得られた耐性頻度を比較する上で重要なことは、世界の異なる検査室で行われている感受性試験法の精度を明らかにすることである。カナダの研究所は 3 回にわたり SRL と試験株を交換し検査室の精度を研究した。このブラインドテストは SRL それぞれで実施され、大多数の SRL により与えられた *judicial* の結果（ゴールドスタンダード）と比較することにより試験の精度と再現性が調べられた。INH と RFP の感受性試験に関して、SRL 内で非常に高い一致率を示した。2 回目、3 回目の研究でも INH と RFP に対する試験の精度は維持さ

れ、SM と EMB の試験にも改善が見られた。特異性（感受性菌の検出）は 1 回目が高く、3 回目でも 95%以上であった。感受性（耐性菌の検出）は 1 回目では 87%であったが、その後着実に改善され、3 回目では 96%にまで上昇した。この精度管理の研究から、信頼できる薬剤感受性試験の結果が得られ、それらは国際的に比較可能であることが実証された。

初回耐性は未治療症例から得られる。これはすでに耐性を持つ菌による伝播を反映している。いずれかの薬剤に対する初回耐性頻度はチェコ共和国の 2%からドミニカ共和国の 41%の範囲で、その中央値は 10.4%であった(表 1)。試験された 4 剤すべてに対する初回耐性は 0%から 4.6%の範囲で、中央値は 0.2%であった。初回 MDR-TB はケニヤを除く調査対象国すべてに見られ、ケニヤの 0%からラトビアの 14.4%の範囲で、その中央値は 1.4%であった(表 2)。

獲得耐性はごく最近の患者管理の失敗を反映している。このカテゴリーで評価される集団は過去に 1 ヶ月以上の治療歴を持つ患者である。当然のこととして獲得耐性は初回耐性よりも高い頻度で見られた。いずれかの薬剤に対する耐性の頻度はニュージーランドの 5.3%からイワノボ・オブラスト（ロシア）の 100%の範囲で、中央値は 36%であった。4 剤すべてに耐性の頻度は 0%から 17%の範囲で、中央値は 4.4%であった。MDR-TB はケニヤの 0%からラトビ

アの 54%の範囲で、中央値は 13%であった(表 3)。

## 2.日本の薬剤耐性結核の現状

サーベイランス参加施設から合計 2,144 株の抗酸菌が結核研究所に送付された。現在小川卵培地を用いる普通法で再試験中である。

## D.考察

調査した国は平均よりも高い結核対策プログラムを持っているのでここで選ばれた結果はおそらく問題の大きさを過小評価していることになるだろう。薬剤耐性結核は世界のどこでも見られる。確かに MDR-TB は 5 大陸で見られ、調査対象国の 3 分の 1 では新患者の 2%以上は MDR であった。ラトビアでは治療中の患者の 22%が MDR-TB であった。

ロシアの調査対象地域では MDR-TB は結核患者の 7%であった。ドミニカ共和国では 9%であった。アフリカのアイボリーコーストでも MDR-TB の出現が認められた。アジア(インド、中国)からの予備報告でも同様に高率に薬剤耐性が認められた。インドのデリー州では、全結核患者のうち 13%が MDR-TB であった。

この研究で得られた重要な結論は、WHO により適切な結核対策プログラムを持っていないと類別された国ほど高い薬剤耐性罹患率を示したことである(表 4)。同様に再治療例(不適切な対策の結果)が多い場合は薬剤耐性も高率であった。他方で、標準的短期治療方式を用いることによ

り、薬剤耐性頻度を低く抑えることが可能であった。

## E.結論

(1)調査対象国すべてに薬剤耐性が見出された。

(2)世界で MDR-TB の頻度が高い地域がいくつかある。それらは前のソビエト連邦に属するラトビア、エストニアおよびロシア、ドミニカ共和国、アルゼンチン、アフリカのアイボリーコーストである。

(3)結核対策の全体的精度および標準短期治療方式の使用と低い薬剤耐性頻度の間に関係が見られた。MDR-TB の高い頻度は治療上の混乱の結果として起こる。結核対策がうまくいっていないと見られている国の半数は初回 MDR-TB の頻度が 2%以上であるのに対し中等度の結核対策をしている国ではその 5 分の 1、結核対策がうまくいっている国では MDR-TB が見られなかった。

(4)MDR-TB の頻度は NTP 遂行の有用な指標である。

## F.研究発表

### 1.論文発表

WHO/TUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance: Anti-tuberculosis drug resistance in the World. Geneva. (Publication no. WHO/TB/97.229), 1998.

表 1  
35 の WHO の国と地域におけるいずれかの薬剤に  
対する耐性頻度，1994-1997

	初回耐性	獲得耐性	全体の耐性
中央値	9.9	36.0	12.6
最小値	2.0	5.3	2.3
最大値	40.6	100	42.4
平均値	18.0	31.8	16.7

表 2  
32 の WHO の国と地域における薬剤別  
初回耐性頻度，1994-1997

	INH	RFP	SM	EMB	MDR
中央値	6.8	1.7	7.4	1.0	1.6
最小値	1.5	0	0.3	0	0
最大値	31.7	16.8	28.0	9.9	14.4
平均値	8.6	3.3	8.6	1.9	2.5

表 3  
25 の WHO の国と地域における薬剤別  
獲得耐性頻度，1994-1997

	INH	RFP	SM	EMB	MDR
中央値	29.7	17.4	15.0	6.1	13.0
最小値	5.3	0	0	0	0
最大値	69.7	57.9	82.6	29.6	54.4
平均値	28.0	18.2	21.6	8.2	14.1



表 4  
WHO の結核対策カテゴリーと薬剤耐性頻度

	WHO のカテゴリー <sup>a</sup>		p <sup>b</sup>
	優れた対策 (n=21)	貧困な対策 (n=14)	
いずれか，初回耐性	9.4	10.7	
初回多剤耐性	1.4	1.9	*
初回 4 剤耐性	0.2	0.5	*
いずれか，獲得耐性	35.0	36.3	
獲得多剤耐性	7.7	19.2	*
獲得 4 剤耐性	2.3	6.0	
いずれか，全体耐性	11.7	15.4	*
全体多剤耐性	1.6	5.5	**
全体 4 剤耐性	0.5	1.3	**
全体耐性危険指数	6.1	5.3	
獲得多剤耐性指数	0.6	1.8	*

<sup>a</sup>WHO の結核対策カテゴリー； 0:結核対策活動について WHO に報告なし，1:WHO の戦略を受け入れず且つ罹患率 10 万対 10 以上，2:人口の 10%以下に WHO の戦略実施，3:人口の 10-90% に WHO の戦略実施，4:人口の 90%以上に WHO 戦略実施，5: WHO の戦略実施せずしかし結核罹患率 10 万対 10 以下

優れた対策：カテゴリー 4 または 5 および 3 の中で DOTS の導入が 33%以上

貧困な対策：カテゴリーが 1 または 2 および 3 の中で DOTS の導入が 33%以下

<sup>b</sup>\* : p<0.05, \*\* : p<0.01

## 薬剤耐性結核のサーベイランス，耐性の分子機構および多剤耐性結核の治療に関する研究

### 分担研究 「結核菌の臨床分離株を用いたRFLP分析に関する研究」

分担研究者 水口康雄

共同研究者 岸田一則

千葉県下で発生が認められた結核事例について薬剤感受性試験と分子遺伝学的解析を行った。その成績が県内で発生した多剤耐性結核菌等による集団発生のサーベイランスに果たした貢献について報告する。

#### A. 研究目的

結核菌の型別は，流行状況把握や感染源追求等の疫学調査のために重要であるが，従来使用されてきた薬剤感受性試験成績，ファージ型別では，実施困難であった。近年これらの生物学的性状による型別に代わり，遺伝子进行分析する分子疫学的分類が利用されるようになった。なかでも，結核菌特有の挿入配列 IS6110 を指標とした Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 分析の有用性が多数報告されるようになった。本法を用いて患者から分離された菌株を分析することにより集団感染，再感染の確認が可能といわれている。今回，われわれは千葉県内の患者から分離された結核菌について RFLP 分析を実施し，薬剤耐性結核菌による集団発生のサーベイランスに興味ある知見を得たので報告する。

#### B. 研究方法

1997年から1998年にかけて千葉県内の結核患者から分離された結核菌30株についてIS6110をプローブとし

RFLP 分析と薬剤感受性試験を実施した。薬剤感受性はSM, RFP, KM, EB, INH, PAS, EVM, TH, CPM, CSの10薬剤について実施した。

#### C. 研究結果

結核菌の臨床分離株の RFLP 分析成績と薬剤感受性試験について得られた成績を述べる。



図1 同一病院受診者由来結核菌の RFLP パターン

図1は同一病院受診者由来例であり，3人の患者は，ほぼ同時期に受診したが，疫学的関連は認められなかった。分離された3株は，すべて薬剤感受性であったが，異なる RFLP パターンを示した。

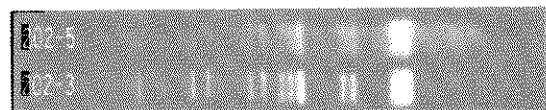


図2 患者の胃液，胸水由来結核菌の RFLP パターン

図2に同一患者の胸水と胃液由来

結核菌の成績を示す。2株とも薬剤感受性菌であり、RFLPパターンも共通であった。

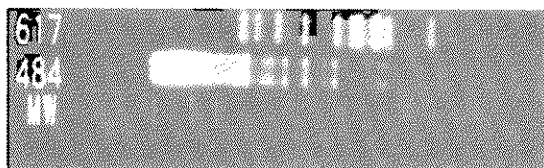


図3 同一市内発生患者由来結核菌の RFLP パターン

図3は同一市内患者発生例由来株の成績である。2株は、異なる RFLPパターンを示した。患者は、同一市内で、同時期に発症したが、疫学的関連は、認められなかった。

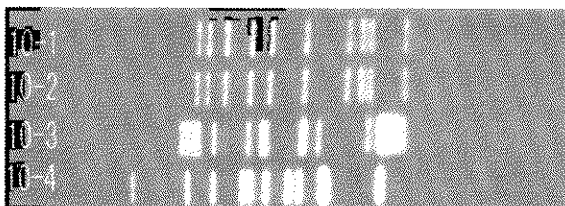


図4 同一市内発生患者由来結核菌の RFLP パターン

図4は同じく同一市内、同時期の発症例であるが、疫学調査では10-4の勤めるパチンコ店に他の3人は出入りがあり10-1、10-2、10-3の住居は隣接しておりパチンコ店にも近い場所である事が判明した。分離株を検査したところ10-1と10-2の2株にRFLPパターンに共通性が認められた。薬剤感受性は、10-3は、SM (200  $\mu$ g/ml)、INH (0.1  $\mu$ g/ml) に耐性が認められたが、他の3株はすべて感受性であった。当初パチンコ店に勤務する10-4からの集団感染が疑われたが、10-4と10-3、10-1は異なるクローンによる感染であり、10-1と10-2は関連のあることが判明したケースである。



図5 同一病院発生患者由来結核菌の RFLP パターン

図5は同時期に発症した精神病院入院患者由来例である。2株は薬剤感受性菌であったが、異なる RFLPパターンを示したため、院内感染の可能性は低くなった。

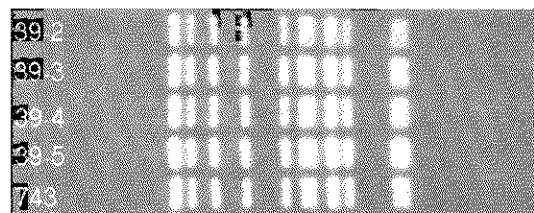


図6 集団事例患者由来結核菌の RFLP パターン

図6に老人養護施設で発生した集団感染事例由来菌株の成績を示す。5株は薬剤感受性菌で、RFLPパターンも共通であり、共通の感染源存在が疑われた。



図7 同一施設発生患者由来結核菌の RFLP パターン

図7は患者が同一施設で同時期に発生したため共通の感染源が疑われたが例であるが、分離された2株は異なる RFLPパターンを示し、両者の関連は低いことが判明した。

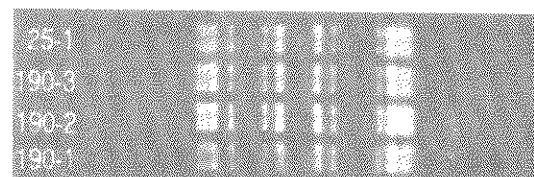


図8 集団事例由来多剤耐性結核菌の RFLP パターン:麻雀店客由来

図8はある麻雀店での集団感染の事例である。190-1, 190-2, 190-3の患者は麻雀仲間であり週に1~3回個室にて1回12時間ほど麻雀を行っていた。25-1の患者は190-1の経営する新聞販売店に出入りのあった者である。分離された菌は, SM(200 $\mu$ g/ml), RFP(50 $\mu$ g/ml), INH(0.1 $\mu$ g/ml)の耐性を示し, 薬剤耐性パターンからも同一感染源寄りの感染であると考えられたが, RFLPの分析結果も同じパターンを示し, この考え方が正しかったことが確認された。

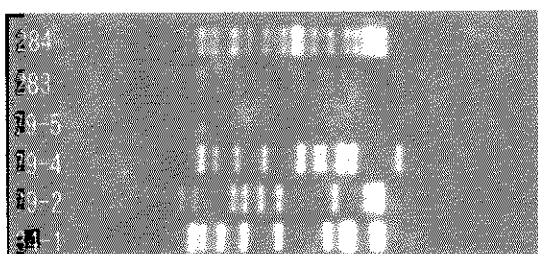


図9 同一サウナ施設関連者に発生

した患者由来株の RFLP パターン

図9はあるサウナに出入りする人や従業員に同時期に発生した結核について分離した6株のRFLPパターンである。患者は2~3ヶ月のうちに発生しており同一感染源による集団発生を疑ったが, RFLPパターンがそれぞれ異なるため, 菌株の分離された患者間の関連性は薄いと考えられるが79-4と283のパターンに類似性が認められるため, さらに詳細な解析が必要である。

#### D. 考察

いわゆる分子疫学的手法を用いて分離された微生物を解析し, その結果を公衆衛生学的な対策に役立てることは, 人権の擁護が厳しく求められ

る今日, 益々重要な手段として利用されることになってくるものと思われる。本年度の研究において, 我々は結核について解析を行い, 得られた情報の重要性について検討し, 併せて多剤耐性結核菌のサーベイランスに利用可能か検討した。

結核菌の RFLP 分析はすでに諸外国や我が国でもその有用性が報告されているが, その手技が複雑なため, また結核菌の DNA 抽出の困難さからあまり一般化されていなかった。従ってこれまでは結核研究所でのみ解析が行われてきた。今回, 我々はこの方法を用いて県下で発生した結核事例を調べたところ, 結核集団発生時において同一感染源存在の確認あるいは否定が可能となった。

特に図8に示した多剤耐性結核菌による集団感染例では, 個室で長時間接触のあった麻雀仲間の他に仕事関連接触者にも感染したことが確認できた。これまで我が国においては, 多剤耐性菌による集団感染の事例は少なかったが, このような多剤耐性菌による感染が, 徐々にではあるが我が国でも増加しつつあることを示すものとして注目される。

#### E. 結論

検出された結核菌の分子疫学的手法による解析は多剤耐性結核菌による集団発生のサーベイランスにも重要な役割を果たした。現在, 分子疫学的手法による成績と薬剤耐性の関連は不明であるが今後例数を増やし検討する必要がある。