

平成 11 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 11 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	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	副院長
	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	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.日本の薬剤耐性結核-----	7
阿部千代治，平野和重，和田雅子（結核予防会結核研究所）	
青柳昭雄（国立療養所東埼玉病院）	
2.結核菌の臨床分離株を用いた RFLP 分析に関する研究-----	15
水口康雄，岸田一則（千葉県衛生研究所）	
3.分子疫学による薬剤耐性結核菌の解析-----	21
高橋光良，平野和重，和田雅子，阿部千代治	
（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-----	29
谷口初美（産業医科大医学部）	
5.DNA チップを用いた薬剤耐性結核菌検出法の開発-----	33
鈴木定彦（大阪府立公衆衛生研究所）	
6.結核菌 <i>virulence</i> の <i>in vitro</i> における評価に関する研究-----	43
小野崙菊夫，瀧井猛将，田村綾子（名古屋市立大学薬学部）	
P.J. Brennan(コロラド州立大学)	
阿部千代治（結核予防会結核研究所）	
7.多剤耐性結核における長期生存例に関する研究-----	51
毛利昌史（国立療養所東京病院）	
佐藤紘二（国立療養所熊本南病院）	
8.難治性抗酸菌症に対する <i>Biotherapy</i> ーロムルチドおよび	
補中益気湯による免疫増強療法-----	61
螺良英郎（結核予防会大阪府支部大阪病院）	

9.アンサー 20 による多剤耐性結核に対する免疫療法に関する研究-----	73
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）	
元木徳治（国立療養所東高知病院）	
和田光一（国立療養所西新潟中央病院）	
伊藤幸彦（医療法人埼玉病院）	
小形清子（清瀬上宮病院）	
守 純一（結核予防会新山手病院）	
溝口國弘（結核予防会複十字病院）	
10.多剤耐性結核の集学的治療体制の確立に関する研究-----	81
中島由槻（結核予防会複十字病院）	
11.強力な HIV 療法(HAART)時代の HIV 陽性者における	
抗酸菌感染症の現況-----	87
安岡 彰（国立国際医療センター）	
C.発表文献リスト-----	93

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：WHO は，主要抗結核薬であるイソニアジド(INH)とリファンピシン(RFP)の両者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 の発生は結核対策にとって脅威である。全国的レベルで薬剤耐性結核のサーベイランスを行った。初回治療例では，主要 4 剤の内いずれか 1 剤に対する耐性頻度は 10.2%，MDR-TB は 0.8%であり WHO/IUATLD により報告された世界の薬剤耐性結核の中央値とほぼ同等であったが，既治療例では中央値より幾分高い数値であった。また 5 年前の調査と比べ耐性頻度の上昇傾向が見られた。既治療例で見られた高い耐性頻度と短期化学療法の普及の遅れとの関連が推測される。RFLP 分析を用い薬剤耐性菌感染の状況を調べた。RFLP 分析を微量液体感受性試験と併用することで耐性獲得の動向を調べるのに有効であることが分かった。また一連の研究で MDR および複数の薬剤に耐性を獲得した菌による集団感染が頻発していることが明らかになった。カナマイシン(KM)耐性菌に 16S rRNA および 23S rRNA 遺伝子の変異に加え，putative multidrug resistant efflux pump protein をコードしている *tap* 遺伝子の変異が検出された。KM 耐性の発現と *tap* 遺伝子の変異との関連は研究中である。耐性に関与する遺伝子の変異を検出するための DNA チップ法を開発した。ハイブリダイゼーション条件を検討した結果，RFP，INH，KM およびストレプトマイシン(SM)耐性の鑑別が可能となった。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感受性菌と同等の病原性を持つことが分かった。これに対し，*M. avium* complex は結核菌と比べ明らかに弱いことが確認された。MDR-TB では，血清中の IFN- γ 値が軽快中の患者と比べ低く，逆に TGF- β 1 は高かった。このことは防御免疫の低下を示している。免疫刺激効果が確認されているロムルチド，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。ロムルチドまたはアンサー 20 注は MDR-TB に対し有用である可能性を示した。これらの研究を実施するに当たり倫理面に十分配慮した。MDR-TB の治療について全国調査をした。若年齢層で耐性薬剤数が少なく，病巣も小さい患者では内科的治療で約半数は排菌が停止することが分かった。また外科療法の最終成功率は 87%と良好であった。HIV の治療法の改善に伴い，合併する *M. avium* complex 症が減少していることが分かった。

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・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・副院長），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・部長）

A.研究目的

米国初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結核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。わが国においても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，結核菌の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さらなる伝播の防止にも役立つと考える。

若年者の 95%は結核菌未感染者であり感染の危険が高い。薬剤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

全国的規模で薬剤耐性結核のサーベイランスを行った。全国 78 病院に，一定期間の間に入院した結核患者で菌が分離された例を対象とした。耐性菌感染の状況を調べるために，上記の研究で集められた菌，千葉県で集められた菌，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 RFLP 分析を行った。

KM 耐性の分子機構を調べることを目的とし KM 耐性分離株の 16S お

よび 23S rRNA 遺伝子の変異を調べた。また *tap* 遺伝子の変異も調べた。

結核菌感染細胞にサイトカインを添加したときにみ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結核菌、薬剤耐性菌、*M. avium complex* の間で比較した。

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（ムラミルジップチド誘導体）、補中益気湯またはアンサー 20 と抗結核薬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、生化学的検査、画像診断を定期的に行い、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。また多剤耐性結核診療の手引きの作成に着手した。

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。わが国でも 1997 年に全国的規模で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 1,644 株の結核菌が結核予防会結核研究所に送付され、薬剤感受性試験が行われた。初回治療例の主要 4 薬剤のいずれか 1 剤に対する耐性頻度は 10.2%、MDR は 0.8%であった。これらの数値は WHO/IUATLD から報告された中央値とほぼ同等であった。これに対し、既治療例のいずれかの薬剤に対する耐性頻度は 42.4%であり初回治療例と比べ 4 倍高い値であった。また MDR の頻度も 19.7%であり、WHO の中央値と比べても幾分高い頻度であった。

性、年齢、合併症の有無別で薬剤耐性頻度に有意の差は見られなかった。日本人と比べ外国人の耐性頻度は既治療例のみならず初回治療例でも高かったが、その差は有意ではなかった。先の WHO の報告は PZA を含む短期化学療法(SCC)処方での治療された患者の割合と MDR 頻度の間に逆の相関があることを示している。わが国で、1997 年に SCC で治療された患者の割合は塗抹陽性患者の 50%以下であり、既治療例で見られた高い耐性頻度と低 SCC 使用頻度の関連が推測される。現在耐性患者の予後調査を行っており、高い薬剤耐性頻度の原因が解明されるものと考ええる。

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明らかに

なってきた。これまでの研究で、日本およびアジア諸国で分離された株を用い RFP, INH, PZA, SM およびキノロン剤耐性の分子機構を報告した。今回、KM 耐性について研究した。KM 耐性分離株の 70%が 16S rRNA 遺伝子のタンパク合成の A 部位に変異を持つことが明らかにされた。残り 30%の KM 耐性株について、23S rRNA 遺伝子の変異および *tap* 遺伝子の挿入変異が KM 耐性株の 27%に見つかった。これらの変異と耐性発現との関連は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。多種類の DNA を小面積上に高密度に固層化する技術を応用し、薬剤耐性に関与する遺伝子の変異を検出する方法を研究した。RFP に耐性を獲得した結核菌の 95%は RNA ポリメラーゼの β サブユニットをコードしている *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を持つことが分かっている。*rpoB* 遺伝子の変異を検出するためのプロトタイプ DNA チップを作製し、ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を検討した。検査材料を得てから 5 時間で RFP 耐性菌の約 95%を同定できることが分かった。ここで得られた最適条件を用いることにより INH, SM, KM 耐性菌の鑑別が可能となった。しかし EMB 耐性菌の検出のためには今後更なる検討が必要である。

3. 耐性菌の病原性と感染

ヒト線維芽細胞に結核菌を感染させると細胞死が起こる。この系にサイトカインを加えると細胞傷害が増強される。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 株がより強い細胞死を誘導することを見つけた。このモデルで多剤耐性菌は薬剤感受性菌と同等の細胞傷害活性（病原性）を持つことが分かった。これに対し、*M. avium complex* は結核菌に比べて明らかに病原性が弱いことが分かった。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。この細胞死を誘導する因子が結核菌生菌感染細胞の培養上清中に見られた。この因子は生菌のみで誘導されることから菌の病原性との関連が強く示唆される。なお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た。

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様式や発病様式を研究する上で強力な手段となる。千葉県下で発生した多剤耐性菌による集団感染を 2 件 RFLP 分析で証明した。微量液体感受性試験を組み合わせることによ

り耐性獲得の動向も調査できた。

RFLP 分析により疫学調査が可能となったが、解析には菌の培養が必要である。判定の迅速化を目指し比較的微量の DNA とキャピラリーシークエンサーを用いる Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 解析について検討した。RFLP パターンと比べ、AFLP パターンの多様性が少ないことが分かり詳細な分析は困難である事が分かった。IS6110 のコピー数が 5 以下の結核菌は direct repeat (DR) 領域の spacer 配列の有無で分別する spoligotyping を用いることにより詳細に研究できる。外国株との比較で、この型別で 1 型(spt-1)は日本の株 (65%) と韓国の株(64%)で優勢に見られる Beijing family に属することが明らかになった。このことは韓国や中国の株と共通の祖先を持つことを示している。

4. 多剤耐性結核の治療

平成 10 年の統計を基に単純計算を試みると、新登録者の中で菌陽性初回治療患者数 16,555 名の 0.8%(132 名)と再治療例 1,779 名の 19.7%(350 名)および 2 年以上登録の菌陽性者数 1,587 名の 19.7%(312 名)を合わせた MDR-TB 総数は 794 名となる。2 年以上登録で菌陽性患者の多くは MDR-TB とすると、わが国に約 2,000 名の MDR-TB 患者がいることになる。

MDR-TB のために確立された治療法はない。薬剤感受性試験の結果から効果的な薬を組み合わせて使っ

ているのが現状である。全国 52 施設から集められた 55 例の多剤耐性結核患者の診療内容と予後について分析した。治療に反応し排菌が停止した 26 例は、無効例と比べ年齢が若く、使用可能薬剤が複数存在していた。また排菌量が少なく、病巣の広がりも小さいほうが有利であった。有効薬剤が存在する時期に外科的切除の併用など集学的治療を行うことが重要と考えられる。

多剤耐性患者の中には急激な悪化を来すこともなく長年持続排菌を続けている患者がいる。治癒した患者とこのような多剤耐性患者の間に免疫応答の違いがあるかどうか調べた。その結果多剤耐性患者では血清中の IFN- γ は有意に低く、逆に TGF- β 値は高いことが分かった。このことは結核菌に対する応答性に差があることを示している。

MDR-TB の治療に *M. vaccae* 死菌と抗結核薬の併用療法あるいは IL-2 や IFN- γ 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方法ではない。免疫刺激効果が確認されているロムルチド、補中益気湯あるいはアンサー 20 注と抗結核薬との併用治療を試みた。ロムルチドを投与した *M. avium* complex 症 2 名中 1 名と MDR-TB 1 名では体重の増加、排菌数の減少、胸部 X 線所見の安定が認められた。補中益気湯投与では、排菌の状態や X 線所見に投与前後で有意の差は見られなかったが、明らかに体重は増加した。

少なくとも 6 ヶ月排菌が停止しない MDR-TB 患者にアンサー 20 注を投与し、その効果をプラセボと比較した。試験薬投与 7 例中 3 例は排菌の減少が見られ、有効と判定された。これに対し、プラセボ群では排菌量が減少した例は見られなかった。このことは MDR-TB に対し有用である可能性を示している。この研究では治療期間を 6 ヶ月に限ったが、今後投与量の検討や長期間の治療を試みる必要がある。

強力な HIV 療法(HAART)導入前後の HIV 合併疾患の動向を調査した。高度免疫不全になって発症するサイトメガロウィルス網膜炎や非結核性抗酸菌症は HAART 後では減少したが、初発疾患となるニューモシチス・カリニ肺炎や結核の発生率に変化は見られなかった。結核は、わが国でも HIV 合併疾患として今後対策が必要になると考えられる。

D. 結論

1. 全国規模で薬剤耐性結核のサーベイランスを行った。初回耐性頻度は世界のレベルと同等であったが獲得耐性頻度はより高かった。
2. 前回 (5 年前) と比べ耐性頻度の上昇傾向が示唆された
3. 既治療例で見られた高い獲得耐性と短期化学療法の普及率の低さとの関連が推測される。

4. RFLP 分析により耐性菌による集団感染が証明された。

5. KM 耐性菌に 16S rRNA および 23S rRNA の変異に加え *tap* 遺伝子の変異が検出された。

6. 耐性遺伝子の迅速検出のための DNA チップ法を開発した。

7. 結核菌の病原性を試験するモデルを開発した。このモデルで試験したとき *M. avium complex* は結核菌と比べ明らかに弱いことが分かった。

8. MDR-TB では血清中の IFN- γ 値が軽快中の患者と比べ低く、逆に TGF- β 1 は高かった。

9. MDR-TB の治療に、ロムルチドまたはアンサー 20 注と化学療法の併用療法が有用と考えられた。

10. MDR-TB の治療について、若年齢層で使用可能薬剤数が複数あり、病巣も小さい患者では約半数が内科的治療で排菌が停止することが分かった。

11. HIV の治療法の改善に伴い、合併する *M. avium complex* 症が減少していることが分かった。

E. 研究発表

本報告書の発表論文リスト

F. 知的所有権の取得状況

なし

B.分担研究報告書

日本の薬剤耐性結核

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長
研究協力者 平野和重 結核予防会結核研究所
和田雅子 結核予防会結核研究所
青柳昭雄 国立療養所東埼玉病院

研究要旨：全国的レベルで薬剤耐性結核のサーベイランスを行った。全国 78 の結核専門病院に入院した患者から分離された結核菌について、主要 4 薬剤に対する感受性を調べた。初回治療例では、4 剤の内いずれか 1 剤に対する耐性頻度は 10.2%、少なくとも INH と RFP の両者に耐性 (MDR-TB) の頻度は 0.8% であり、WHO/IUATLD により報告された世界の薬剤耐性結核の中央値とほぼ同等であったが、既治療例 (獲得耐性) では中央値より幾分高い数値であった。また試験法が変わったことから単純に比較することはできないが、5 年前の調査と比べ耐性頻度の上昇傾向が見られた。性、年齢、国籍、合併症の有無別で薬剤耐性頻度に統計学的差は見られなかった。他の因子について現在分析中である。

A. 研究目的

米国や欧州において 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。これらの集団感染は、主要な抗結核薬であるイソニアジド (INH) とリファンピシン (RFP) の両者に耐性を獲得している結核菌による感染であり、治療が非常に困難である。わが国でも多剤耐性菌による集団感染や小規模感染が頻発している。

1994 年に WHO は International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) と協力し、薬剤耐性結核の広がりを調べるために世界的規模のプロジェクトを開始した。1994-1997 年の中間成績が 1998 年に報告された。MDR-TB の頻度が比較的高い国がいくつか有り、これ

らの国では結核対策プログラムを遂行する上で脅威となっている。

大都市の結核、集団感染の頻発、在日外国人の結核、高齢者の結核など新たな問題も出現してきており、薬剤耐性頻度に変化が生じているかどうか調べる目的でこの研究が計画された。

B. 研究方法

1. 対象

1997 年 6 月 1 日から同年 11 月 30 日までの間に入院した結核患者および非結核性抗酸菌症患者で菌が分離された例を対象にした。分離された全ての抗酸菌と調査個人票が各施設から結核予防会結核研究所に送付された。送付された抗酸菌は汚染チェックのため Middlebrook 7H9 液体培

地に培養した。

2. 抗酸菌の鑑別・同定

臨床分離株は遺伝子を用いるアキュプローブ結核菌群，アキュプローブ *M. avium complex* 法および抗 MPB64 モノクローナル抗体を用いる免疫クロマトグラフィーで鑑別した。結核菌以外の非結核性抗酸菌は DDH マイコバクテリアおよび生化学的方法で同定した。

3. 薬剤感受性試験

日本結核病学会より新しく提案された小川培地を用いる比率法を試験に用いた。試験は主要 4 薬剤，isoniazid (INH)，rifampin (RFP)，streptomycin (SM)，ethambutol (EMB) について行った。接種菌は Middlebrook 7H9 液体培地で培養した。McFarland No. 0.5 に調製し，その 100 倍希釈液の 0.1ml を薬剤含有培地に接種した。対照培地は 2 本用意し，100 倍希釈液と 10,000 倍希釈液を接種し，37°C で培養した。10,000 倍希釈液を接種した対照培地のコロニー数と比較して，薬剤含有培地のコロニー数が多ければ耐性菌の割合が 1%以上と判定し，耐性と記録した。

4. 統計学的解析

解析は χ^2 分析で行った。

C. 結果

今回の研究に 78 施設が参加した。合計 2,167 株の抗酸菌が結核予防会結核研究所に送付された。この内 523 株が非結核性抗酸菌 (453 株)，結核

菌と非結核性抗酸菌の混合培養 (16 株) および汚染または非発育 (54 株) のため除かれた。残る 1,644 株の結核菌を試験した(表 1)。この中に外国人が 47 人含まれていた。

1,644 株の中で 1,374 株は初回治療例から分離された株であり，264 株は既治療例から分離された株であった。6 株は治療歴が不明であった。

1997 年 6 月 1 日から同年 11 月 30 日までの間に 22,628 例が結核として届けられた。そのうち 10,214 (45.1%) 例は菌陽性であった。菌陽性 10,214 例の 1,644 (16.1%) が今回の研究の対象となった(表 2)。

初回治療例の 4 薬剤のいずれか 1 剤に対する耐性頻度は 10.2% であった(表 3)。SM 耐性(7.5%)が最も高く，次いで INH 耐性(4.4%)，RFP 耐性(1.4%)であった。EMB 耐性は 1% 以下であった。これに対して既治療例のいずれかの薬剤に対する耐性頻度は 42.4% であり初回治療例と比べ 4 倍高い値であった($p < 0.0001$)。INH，RFP，SM に対する耐性頻度も 20% 以上であった。

初回耐性 140 株の 73.4% (103/140) は 1 剤に対する耐性であったが，獲得耐性 112 株の 64.3% (72/112) は 2 剤以上の抗結核薬に耐性を獲得していた(表 4)。また初回 MDR は 0.8%，獲得 MDR は 19.7% であり，両者の間の差は統計学的に有意であった ($p < 0.0001$)。

次に性，年齢，国籍，合併症の有無別に薬剤耐性頻度を比較した(表 5)。

全体の耐性で比べたとき、男性は 15.7%、女性は 14.9%であり差は見られなかった。初回治療例について、若年齢層の耐性頻度が高齢者と比べ幾分高い傾向が見られたが統計学的に有意の差ではなかった。同様に、日本人と比べ外国人の耐性頻度は既治療例のみならず初回治療例でも高かったが、その差は有意ではなかった。また合併症の有無と耐性頻度の間にも関連は見られなかった。

地域別に調べた成績を表 6 に示した。初回治療例で見ると 7.7%から 12.2%の間に有り大きな差は認められなかった。北海道と中国・四国の獲得耐性頻度は 50%以上であったが他の地区と比べその差は有意ではなかった。

D. 考察

この種の研究で選ばれた症例に代表性があるかどうかは重要である。今回の研究に 78 の施設が参加した。6 ヶ月のサーベイ期間に病院に入院した全ての症例を対象にした。わが国では塗抹陽性の結核患者はすべて入院治療することからこのサーベイは共同研究参加施設の 100%サンプリングと言うことになる。

いずれかの薬剤と 2 剤以上の薬剤に対する初回耐性頻度は 10.2%と 2.7%であり、初回 MDR-TB は 0.8%であった (表 4)。これらの値は WHO から報告された世界的規模で行われているサーベイランスの成績の中央値と同じレベルであった。これに対

し、獲得耐性のそれらは 42.4%, 27.3%, 19.7%であり、WHO 報告の中央値と比べいずれも高い値であった。

同じ WHO 報告は、PZA を含む短期化学療法(SCC)処方では治療された患者の割合と MDR 頻度の間には逆の相関が有ることを示している。即ち、100%の患者を SCC で治療している国の MDR-TB の頻度は 2%以下であったが、SCC 処方の使用が 70%以下の国では MDR-TB の割合が 2%以上であった。わが国では 1996 年に SCC が標準化学療法方式に加えられたばかりで、サーベイ年(1997)に SCC で治療された患者の割合は塗抹陽性患者の 50%以下であった。このことは、低 SCC 使用頻度と高い獲得耐性頻度の関連を示唆している。

1992 年の調査と比べ初回および獲得耐性頻度が上昇していた。感受性試験方法を前回の絶対濃度法から今回比率法に変えたことから単純に成績を比較することはできない。しかし INH 1 μ g/ml の成績を比較してみると初回耐性頻度は 2.5%であり、前回 (1.5%) と比べ上昇していることが分かった。また RFP についても同様であった(1992 年の 0.7%から 1997 年の 1.4%)。

既治療例の約半数は高血圧、糖尿病、がん、肝炎、気管支拡張症などを合併していた。この種の患者はしばしば免疫システムが低下している。しかし、高い獲得耐性と合併症との関連は見られなかった。外国人患者の獲得耐性頻度は日本人と比べ 1.7

倍高かったがその差は統計学的に有意ではなかった。他の要因についてはまだ調べていない。現在耐性患者の予後調査を行っており、高い薬剤耐性の原因が解明されるものと考えられる。

前回のサーベイで、60歳以上の患者と比べ60歳以下の患者の初回耐性頻度が有意に高かった。60歳以上の人の予測結核菌既感染率は60%以上であり、この年齢層の患者の多くは再燃と考えられる。しかしながら今回のサーベイでは高齢者の耐性頻度が上昇していることが明らかになり、再燃に加え再感染も起こっていることが示唆される。この考えは高齢者の間に集団感染が起こっていることから支持される。これらのことは、一度結核菌感染を受けた個体は結核に対する免疫を一生保持し、別の結核菌の感染から免れるとする結核免疫の一般的な理解を部分的に変える必要があることを示している。

E. 結論

- (1)結核専門病院 78 施設が参加した全国的規模の薬剤耐性結核のサーベイランスを行った。
- (2)いずれかの薬剤に対する初回耐性頻度は 10.2%，MDR-TB の頻度は 0.8%であった。一方獲得耐性頻度は 42.4%，獲得 MDR-TB の頻度は 19.7%であった。
- (3)1998 年に WHO/IUATLD から報告された世界の薬剤耐性の成績と比べ、初回耐性頻度は世界の中央値と

同等のレベルであったが獲得耐性は中央値より高い数値であった。

(4)初回耐性例の 73.4%は 1 剤に対する耐性であったが獲得耐性例の 64.3%は 2 剤以上の薬剤に耐性を獲得していた。

(5)性、年齢、国籍、合併症の有無と薬剤耐性の頻度の間に関連は見られなかった。また獲得耐性頻度は地域により 14.3%から 60%の範囲であったが統計学的に有意の差ではなかった。

(6)前回の調査と比べ耐性頻度の上昇傾向が見られたが、その原因は今後の調査に待たれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirano K, Abe C, Takahashi M: Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. J Clin Microbiol 1999;37:2663-2666.
- 2) Abe C, Hirano K, Tomiyama T: Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1999;37:3693-3697.
- 3) Abe C, Hirano K, Wada M, Aoyagi T: Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to four

first-line anti-tuberculosis drugs in Japan, 1997. (submitted to).

- 4) 阿部千代治, 平野和重, 和田雅子, 螺良英郎, 山中正彰, 青柳昭雄, 大角光彦, 武田政雄, 倉島篤行, 米山彰子, 奥住捷子: 酸化還元インジケータを用いた抗酸菌迅速培養システム MB Redox の評価. 結核 1999;74:707-713.
- 5) 阿部千代治: 結核菌薬剤感受性測定法の問題点. 臨床と微生物 1999;26:169-174.
- 6) 阿部千代治: 結核の遺伝子診断. 臨床科学 1999;35:332-336.

- 7) 阿部千代治: 日本結核病学会から提案された新しい薬剤感受性試験法. 臨床検査 1999;43:551-553.

2.学会発表

- 1) 阿部千代治, 平野和重, 和田雅子, 青柳昭雄: 入院時薬剤耐性に関する研究. 日本結核病学会総会, 大阪, 2000.
- 2) 阿部千代治: 日本における結核菌の薬剤耐性頻度. 日本細菌学会総会, 札幌, 2000.

G.知的所有権の取得状況

なし

表 1.性別送付菌株数

菌種	男性	女性	計
結核菌	1,188	456	1,644
非結核性抗酸菌	226	227	453
結核菌＋非結核性抗酸菌	11	5	16
汚染他*			54
合計			2,167

*汚染または発育の見られなかった例

表 2.結核患者届出数と地域別調査対象症例数

地域	人口 (x1,000)	届出		菌陽性		調査対象		
		例数(A)	罹患率	例数(B)	% (B/A)	例数(C)	% (C/A)	% (C/B)
北海道	5,701	774	27.2	269	34.8	74	9.6	27.5
東北	9,844	1,351	27.4	541	40.0	51	3.8	9.4
関東	39,840	6,089	30.6	3,096	50.8	515	8.5	16.6
東海・北陸	21,538	3,382	31.4	1,552	45.9	358	10.6	23.1
近畿	22,555	6,263	55.5	2,590	41.4	237	3.8	9.2
中国・四国	11,945	2,122	35.5	909	42.8	179	8.4	19.7
九州	14,742	2,647	35.9	1,257	47.5	230	8.7	18.3
計	126,166	22,628	35.9	10,214	45.1	1,644	7.3	16.1

調査期間：1997年6月1日から11月30日までの6ヶ月間

届出数および菌陽性数：調査期間に届けられた数

表 3.抗結核薬に対する耐性頻度, 1997

薬剤	初回耐性 (n=1374)		獲得耐性 (n=264)		全体の耐性* (n=1644)	
	Single	Any	Single	Any	Single	Any
INH	2.0	4.4	6.8	33.0	2.8	9.1
RFP	0.2	1.4	0.8	21.6	0.3	4.7
SM	5.2	7.5	6.4	24.2	5.5	10.3
EMB	0.1	0.4	0	15.2	0.1	2.8

Single : 指示薬剤のみに耐性

Any : 指示薬剤のみならず他の薬剤にも耐性

*治療歴不明の 6 例が全体の耐性に含まれている。

Any に関して ;

初回耐性 vs 獲得耐性 : p<0.0001

表 4.複数の薬剤に対する耐性頻度

耐性パターン	初回耐性 (n=1374)		獲得耐性 (n=264)		全体の耐性* (n=1644)	
	耐性数	%	耐性数	%	耐性数	%
1 剤	103	7.5	40	15.2	144	8.8
2 剤	29	2.1	27	10.2	56	3.4
3 剤	5	0.4	27	10.2	33	2.0
4 剤	3	0.2	18	6.8	21	1.3
いずれかの薬剤	140	10.2	112	42.4	254	15.5
2 剤以上	37	2.7	72	27.3	110	6.7
MDR(INH+RFP)	11	0.8	52	19.7	64	3.0

*治療歴不明の 6 例が全体の耐性に含まれている。

いずれかと 2 剤以上の薬剤および MDR に関して ;

初回耐性 vs 獲得耐性 : p<0.0001

表 5.薬剤耐性頻度の性，年齢，国籍，合併症の有無別比較

因子	初回耐性			獲得耐性			全体の耐性		
	試験数	耐性数	%	試験数	耐性数	%	試験数	耐性数	%
性									
男性	981	104	10.6	202	81	40.1	1,188	187	15.7
女性	393	37	9.4	62	31	50.0	456	68	14.9
年齢									
≤19	20	3	15.0	2	0	0	22	3	13.6
20-29	134	15	11.2	13	5	38.5	147	20	13.6
30-39	130	11	8.5	18	9	50.0	149	20	13.4
40-49	170	24	14.1	33	16	48.5	203	40	19.7
50-59	236	26	11.0	47	21	44.7	283	47	16.6
60-69	226	25	11.1	55	29	52.7	282	54	19.1
70-79	263	22	8.4	71	26	36.6	337	50	14.8
80-89	174	14	8.0	24	6	25.0	199	20	10.1
90≤	21	1	4.8	1	0	0	22	1	4.5
国籍									
日本人	1,337	134	10.0	254	105	41.3	1,597	241	15.1
外国人	37	6	16.2	10	7	70.0	47	13	27.7
合併症									
あり	559	65	11.6	124	52	41.9	686	118	17.2
なし	805	73	9.1	134	58	43.3	942	132	14.0

*治療歴不明の6例が全体の耐性に含まれている。

性，年齢，国籍，合併症の有無別で薬剤耐性頻度に統計学的有意の差は見られない。

表 6.薬剤耐性頻度の地域別比較

地 域	初回耐性			獲得耐性		
	試験数	耐性数	%	試験数	耐性数	%
北海道	65	5	7.7	9	5	55.6
東北	44	4	9.1	7	1	14.3
関東	436	41	9.4	75	27	36.0
東海・北陸	308	34	11.0	50	20	40.0
近畿	180	22	12.2	55	26	47.3
中国・四国	149	13	8.7	30	18	60.0
九州	192	21	10.9	38	15	39.5

地域別で薬剤耐性頻度に統計学的有意の差は見られない。