

結核に対する新しいリコンビナント  
BCG ワクチンの開発 田中高生、井上義  
一、喜多洋子、桑山さち子、稲永由紀子、  
村木裕美子、金丸典子、森珠里、細江重  
人、坂谷光則、森隆、岡田全司、山田毅、  
大原直也 第 58 回日本呼吸器病学会第  
88 回日本結核病学会近畿地方会 大阪  
2001.12.1

当院における過去 6 年間の抗酸菌薬剤感  
受性検査について 吉田亮、湊義彰、村  
井隆太、上杉浩世、井上康、井上幸治、  
柏庸三、安光恵一、高藤淳、中 宣敬、  
新井 徹、沖塩協一、石川秀雄、藤田悦  
生、源誠二郎、井上義一、鈴木克洋、小  
河原光正、四元正一、岡田全司、木村謙  
太郎、坂谷光則、森隆 国療近畿胸部疾  
患研究会

分担課題 国立病院・療養所呼吸器ネットワークを利用した多剤耐性結核に対する  
標準治療方式の確立に関する研究：資料

愛知県下における多剤耐性肺結核患者の実態（多剤耐性結核対策）

研究協力者 加古 健 国立療養所東名古屋病院

研究要旨

愛知県では、入院中である多剤耐性結核患者の半数以上が拠点施設である当院に入院している。また、他施設に比し当院における結核入院患者に対する多剤耐性患者の割合は有意に高い。これは、多剤耐性結核でかつ排菌がなかなか停止しないがゆえに他の結核病床を有する施設より紹介されるためであり、多剤耐性患者の疫学調査には県下の結核病床を有する施設に多く参加してもらう必要がある。

A. 研究目的

昨年度、中部ブロック県下の結核拠点施設を対象として、多剤耐性患者数の調査をおこなった。また、今年度も結核拠点施設を対象として多剤耐性結核患者の調査を行う予定であるが、得られた患者数が中部ブロック全体の耐性患者をどれだけ反映しているかを知ることは今後の多剤耐性結核対策に役立てるために重要と考えられる。そこでまず、中部ブロックで結核罹患率が一番高く、住民数も最も多い愛知県での耐性結核患者を調査することにより、拠点施設の患者数が全体をどれ程反映しているかを知ることを目的とした。

B. 研究方法

愛知県下の病院で結核病床を有する病院（当院を含めて 10 病院）に対して、平成 14 年 2 月 1 日時点における結核病棟に入院中の感染性結核患者（35 条患者）および多剤耐性結核患者をアンケートにより調査した。アンケートした全ての病院

より回答を得た。

C. 研究結果

愛知県下における 35 条入院患者数は 10 病院あわせて 307 名であり、そのうち多剤耐性結核患者は 20 名（6.5%）であった。東名古屋病院を除く 9 施設では結核患者 211 名に対し耐性患者は 8 名（3.8%）、当院では結核患者 96 名に対し耐性患者 12 名（12.5%）であった。

D. 考察

愛知県下の多剤耐性結核患者の半数以上が当院に入院しており、また、当院における多剤耐性結核患者の割合は他の施設と比べ有意に高い。これは、当院が愛知県における結核の拠点施設とされ、多剤耐性病床が併設されたことが耐性患者の多くなった理由と思われる。実際、現在入院中である 12 人の多剤耐性結核患者のうち、この 1 年以内に当院に始めて入院した患者は 8 人であるが、多剤耐性結核

であるために紹介された患者が5人いる（これらの症例はすべて他の結核病床を有する施設より紹介）。また、初回患者で耐性結核だったのが3人いるが2人は既に排菌だ止まっている。このような初回多剤耐性患者は他の施設にもいると思われるが、排菌が止まってしまえば当院に紹介されることも無い為、愛知県における多剤耐性結核の発生頻度の調査には当院のみの調査では不十分と思われるとともに、治療困難な耐性患者が当施設に集まることより、ますます耐性患者の割合が増加することが予想される。

このような状況は中部ブロックすべての県で同様であると思われ、拠点施設に対する調査を行えば入院治療中の半数以上は把握できるものの、疫学調査にはブロック内の結核病床を有する多くの施設に参加してもらうことが必要と考えられる。

#### E. 結論

多剤耐性結核の疫学調査のためには結核病床を有する多くの施設の参加が望ましい。

分担課題 国立病院・療養所呼吸器ネットワークを利用した多剤耐性結核に対する  
標準治療方式の確立に関する研究：資料  
多剤耐性結核長期生存例の実態調査（5年以上生存症例について）

研究研究者 佐藤 紘二 国立療養所熊本南病院

研究要旨

全国の国立病院、国立療養所からなる呼吸器ネットワーク構成病院の結核に対する実態の大略が把握できた。37施設に登録された多剤耐性結核患者は237症例で、その内、多剤耐性発症後5年以上の生存者は、45症例であった。内訳は入院治療30症例で、他の15例は、種々の理由で外来治療となっていた。感受性菌による結核は減少しつつあるのに多剤耐性結核患者数は、微増傾向にあると言われており今後の対策が重要である。

A. 研究目的

多剤耐性結核菌は、一般的に菌の毒力は低いと言われているが、感染性が無い訳ではない。もし、集団感染でも生じたら公衆衛生上重大な局面に立たされることになる。ところが、多剤耐性結核長期生存例の頻度、医療内容（入院、外来）、感染の危険度等についての全国調査には明確なものがない。疫学上極めて重要なこれらの実態を明らかにすることを目的にした。

B. 研究方法

国立療養所で当研究に参加した37施設で5年以上長期生存している多剤耐性結核について調査検討した。多剤耐性の基準は、INH1.0 $\mu$ g（0.2 $\mu$ g）、RFP50 $\mu$ g（40 $\mu$ g）の内、旧基準を充たした症例である（一部は新基準による）。主な調査項目は下記のとおりである。（1）参加施設での多剤耐性結核患者の実数と多剤耐性になってから5年以上経過した症

例の実数。（2）多剤耐性発症後5年以上経過している多剤耐性結核患者の性別、年齢、排菌状況、多剤耐性への進展年代、入院治療か外来治療かなどの諸項目についての分析。（3）当該患者との接触者の感染状況。などについて調査検討した。（倫理面への配慮）

多剤耐性結核患者のプライバシーを考慮し本名ではなく通し番号で処理した。

C. 研究結果

参加国立療養所37施設に登録された結核患者（2000.1.1-2000.12.31）について、全結核患者は5359症例（概数）、その内多剤耐性結核患者であった者は237症例であり、今回目的の多剤耐性発症後5年以上生存者は、45症例であった。これらの症例は、大阪および東京に多かったが、地方にもある割合で散在していた。問題なのは、これらの症例の管理である。45例中30症例は入院治療であったが、15例は排菌がありながら外来治療であった。

しかし、排菌状況は、多量排菌から微量排菌まで種々であった。症例の男女比は、ほぼ3対1であった。多剤耐性結核の発生は、リファンピシンの登場後まもなく始まり、長い病歴の患者では20年を超えている症例も存在していた。

#### D. 考察

感受性菌による結核の治療については、現在の標準治療で、一部の特殊な症例を除くと確立された域にほぼ達して来ているが、多剤耐性結核の治療に関しては、多少ガイドライン的なものはあるものの、確立した治療法は存在していない。リファンピシンの開発後、的確に効く抗結核薬の臨床の場への登場はなく、効果の見られるニューキノロン薬も、保険診療の縛りがあり自由には使えない。かかる状況下で多剤耐性結核は微増していると言われており、今後の結核行政の難題である。

#### E. 結論

国立療養所 37 施設の資料を基に検討したところ

- (1) 結核患者の約 4.4%が多剤耐性結核となっており、その中の約 19%が多剤耐性発症後 5 年以上を経過した長期生存者であった。
- (2) 多剤耐性結核患者は、ほぼ全国に存在している。
- (3) 多剤耐性結核患者の患者構成は、60 歳代以上で約 3 分の 2 を占めていた。
- (4) 多剤耐性結核発症後 5 年以上の

長期生存者は、約 3 分の 1 が多量排菌者であり、逆に約 3 分の 1 は、微量排菌か時折排菌する程度であった。

- (5) 多剤耐性結核患者の約 33%は、外来患者であり、その対応に苦慮するところである。
- (6) 多剤耐性結核患者の長期生存者の中には、10 年を越えている患者も多々あり、多剤耐性結核になっても急激に悪化するものでもない。しかし、排菌している期間が長いことは、感染性疾患にとっては重大である。

#### F. 健康危険情報

感受性菌による結核は、再び漸減状態に入ったが、多剤耐性結核は相変わらず微増の状態がつづいている。集団感染事例の増加とともに十分に注意しておくべきことである。

#### G. 学会発表

- (1) 佐藤紘二：医療経済的観点からみた多剤耐性結核と初回治療結核。日本結核病学会総会、札幌
- (2) 佐藤紘二、毛利昌史：宿主の反応性からみた肺結核。第 41 回日本呼吸器学会総会。東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

分担課題 国立病院・療養所呼吸器ネットワークを利用した多剤耐性結核に対する  
標準治療方式の確立に関する研究：資料  
結核発症予防に対する BCG 追加接種の有効性に関する研究

研究協力者 坂谷光則 国立療養所近畿中央病院

研究要旨

1999 年（平成 11 年）と 2000 年（平成 12 年）の 2 年間に、新採用看護師が 415 名と看護学生の 992 名に対し、ツ反を実施した。陰性者比率は看護師で 8.7%、看護学生で 7.3% であるが、合計 88 名の陰性者のうち 43 名に BCG を接種した。BCG 非接種の 45 名を含め、これらの対象者からは未だ結核発病を認めていない。

看護職員での結核罹患率を 100/10 万人（一般市民の 2～3 倍）と仮定して、両群 1000 名程度の対象者が必要と推計される。従って、ツベルクリン反応検査対象者の組み入れは全国規模に拡大する必要があり、現在研究拡大を計画中である。

A. 研究目的

現在 BCG が、結核に対するワクチンとして世界各国で用いられ、小児期における結核予防に関しては一定の成果を収めている。しかし、現行の BCG ワクチンの追加接種が、大人（成人）の結核予防に効果があるか否かは議論の分かれているところであり、確証がない。

したがって、BCG が真に大人の結核発症予防に有効であるか解明することを目的とする。

B. 研究方法

大阪大学病院、国立南和歌山病院、国立療養所近畿中央病院など近畿地区の 12 国立施設及び国立療養所福岡東病院において新採用若年看護師 415 名と 13 の付属看護学校新入生 992 名に二段階法でツ反を行った。ツ反陰性者を無作為に二分し、一方の群に BCG を接種した。5

年～10 年後の結核発症予防効果で BCG 有効性を検定する。

一方、結核に対する BCG の免疫能の増強率作用は末梢血リンパ球（PBL）の  $\gamma$ -IFN 産生能で検討した。

（倫理面への配慮）

1. 当病院の倫理委員会は院外者 2 名、関西学院大学総長、大阪国際大学政経学部教授を含む各方面の医療従事者（事務系の人も含む）により構成されており、毎月最低一回は長時間にわたり議論されている。

2. BCG ワクチン有効性見当の際、健常人として国立病院・療養所の新採用看護師および付設看護学校新入生に説明会を開き、当プロジェクトを説明した上で、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と理解（インフォームドコンセント）に対する文面を記載して文書を配布して

いる。日を空け、充分の考慮期間をおいた後、ボランティア（承諾をいただいた人）のみ当研究に参加していただいている。なお、付設看護学校新生で未成年の学生には上記のことを保護者にも説明し、保護者（父母等）の署名と印鑑をもらった人のみ当研究に協力いただいている。

### C. 研究結果

過去2年間、1999年（平成11年）と2000年（平成12年）のツ反実施対象者数は、新採用看護師が415名と看護学生が992名であった。陰性者比率は看護師で8.7%、看護学生で7.3%であるが、合計88名の陰性者のうち43名にBCGを接種した。BCG非接種の45名を含め、これらの対象者からは未だ結核発病を認めていない。

この結果からは、看護職員での結核罹患率を100/10万人（一般市民の2~3倍）と仮定して、両群1000名程度の対象者が必要と推計される。従って、ツベルクリン反応検査対象者の組み入れは全国規模に拡大する必要がある。前回報告した如く、この陰性者の21名を無作為に2分し13名にBCG接種を行った。ツ反前に末梢血を採血し、迅速 $\gamma$ -IFN測定法（Quautiferon法）で $\gamma$ -IFN産生をELISAで検討した。その結果ツ反の強さと $\gamma$ -IFN産生濃度は相関した。さらにBCG接種後3ヶ月のPBLの $\gamma$ -IFN産生は増強傾向を示した。このことによりBCGは少なくとも大人健常人に対し免疫増強能を有することが示唆された。

### D. 考察

この結果からは、看護職員での結核罹患率を100/10万人（一般市民の2~3倍）と仮定して、両群1000名程度の対象者が必要と推計される。従って、ツベルクリン反応検査対象者の組み入れは全国規模に拡大する必要がある、現在研究組織拡大を計画中である。なお、ツベルクリン反応検査は施設間の技術差が著しく、1回目陽性者が2回目に陰性と判定される場合も少なくない施設、もしくは計測平均値が減少する施設などもあり、末梢血リンパ球の、結核菌やBCG菌特異抗原に対する試験管内での反応等を含め、より正確なツベルクリンアレルギー測定方法の開発が必要と考えられた。なお、近畿厚生局管内での国立病院・療養所看護師からの結核発症は、平成11年度までは毎年2桁の例数を示していたが、平成12年、13年は1桁に減少し、この研究事業を通じて、院内感染対策が有効に機能しはじめていると考えられた。（坂谷、森、螺良、岡田）

### E. 結論

1999年（平成11年）から2000年（平成12年）までのツ反実施対象者数は、新採用看護師が415名と看護学生が992名であった（近畿厚生局及び九州厚生局）。陰性者比率は看護師で8.7%、看護学生で7.3%であるが、合計88名の陰性者のうち43名にBCGを接種した。BCG非接種の45名を含め、これらの対象者からは未だ結核発病を認めていない。

この結果からは、看護職員での結核罹患率を100/10万人（一般市民の2~3倍）

と仮定して、両群 1000 名程度の対象者が必要と推計される。従って、ツベルクリン反応検査対象者の組み入れは全国規模に拡大する必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

国立療養所科学療法共同委員会 毛利昌史、町田和子、川辺芳子、倉島篤行、四元秀毅、土屋俊明、山岸文雄、佐々木結花、川城丈夫、豊田丈夫、坂谷光則、河原伸、原田進、西原一孝 国立療養所における高齢者結核の現状 結核 Vol.76, No.7 P533-543 2001

.Harada S, Takamoto M, Ishibashi T, Mohri M, Sato K, Yamagishi F, Sasaki Y, Tanabe K, Sato R, Fujino T, Tano M, Tanizawa M, Sakatani M, Morimoto T, Kawahara S, Hotta N, Shigeto E, Nishimura K, Abe T, Iwanaga T, Oe T, Shimazu K, Ebihara M, Nakagawa S, Kuba M. Clinical study on the cases in which INH or RFP was discontinued during treatment for pulmonary tuberculosis. Kekkaku. 276 (5) : 427-36, 2001

.Akira M, Sakatani M. Clinical and high-resolution computed tomographic findings in five patients with pulmonary tuberculosis who developed respiratory failure following chemotherapy. Clin Radiol. 56 (7) : 550-5, 2001

泉孝英、稲垣智一、坂谷光則、和田雅子 結核 - これからの課題 - 呼吸 Vol20 No5 452-462 2001.5

坂谷光則 結核の標準的治療と管理 臨床と微生物 Vol.28, No.4 P393-396

2001

### 2. 学会発表

.M.Okada, T.Tanaka, Y.Inoue, Y.Katayama, S.Yoshida, N.Ohara, T.Yamada, N.Kayagaki, H.Yagita, K.Okumura, M.Sakatani, and T.Mori DNA and recombinant BCG vaccination against tuberculosis and cytotoxic activity in the patients with multi-drug resistant tuberculosis. アメリカ免疫学会, 2001.3

Okada M, Tanaka T, Yoshida S, Ohara N, Yamada T, Matsumoto M, Inoue Y, Minamoto S, Sakatani M and Mori T: DNA and Recombinant BCG Vaccination against Tuberculosis by the Augmentation of Cytotoxic Activity. 11th International Congress of Immunology. 2001, Stockholm, SWEDEN

田中高生、井上義一、源誠二郎、細江重人、坂谷光則、森隆、岡田全司 結核に対する新しい DNA ワクチン、リコンビナント BCG ワクチンの治療効果 日本薬学会 121 年会 札幌 2001 年 03 月 28 日-30 日

岡田全司、田中高生、吉田栄人、山田毅、大原直也、井上義一、源誠二郎、細江重人、坂谷光則、森隆 結核に対する新しい DNA ワクチン及びリコンビナント BCG ワクチンの開発 第 71 回実験結核研究会 沖縄 実験結核研究会 71 : 28-29, 2001 年 4 月 19 日

田中高生、井上義一、喜多洋子、桑山さち子、稲永由紀子、村木裕美子、金丸典子、森珠里、細江重人、坂谷光則、森隆、岡田全司、山田毅、大原直也 結核に対



する新しいリコンビナント BCG ワクチ  
ンの開発 第 58 回日本呼吸器病学会第  
88 回日本結核病学会近畿地方会 大阪  
2001.12.1

吉田亮、湊義彰、村井隆太、上杉浩世、  
井上康、井上幸治、柏庸三、安光恵一、  
高藤淳、中 宣敬、新井 徹、沖塩協一、  
石川秀雄、藤田悦生、源誠二郎、井上義  
一、鈴木克洋、小河原光正、四元正一、  
岡田全司、木村謙太郎、坂谷光則、森隆：  
当院における過去 6 年間の抗酸菌薬剤感  
受性検査について 国療近畿胸部疾患研  
究会

吉田 亮， 村井隆太， 井上 康， 井上  
幸治， 柏 庸三， 岸 淳， 光岡茂樹，針  
生 寛， 安光恵一， 須波敏彦， 高藤淳，  
上杉浩世， 新井 徹， 石川 秀雄， 藤  
田悦生， 源誠二郎 井上義一， 鈴木 克  
洋， 四元正一， 坂谷光則 10 代女性に  
発生した多剤耐性肺結核の 1 例 第 57  
回日本呼吸器学会近畿地方会 2001 年 7  
月 7 日 ホテルアウイーナ大阪

Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Yoshida S,  
Ohara N, Yamada T, Matsumoto M,  
Sakatani M and Mori T: New (DNA-  
Recombinant BCG - and Subunit - )  
Vaccination against tuberculosis and  
cytotoxic activity . Thirty - Sixth  
Tuberculosis and Leprosy Research  
Conference. P.127-133, 2001

分担課題 国立病院・療養所呼吸器ネットワークを利用した多剤耐性結核に対する  
標準治療方式の確立に関する研究：資料  
結核患者における血中ヒトオステオポンチン（OPN）の臨床的意義の検討

研究協力者 上出 利光 北海道大学遺伝子病制御研究所

#### 研究要旨

結核患者における血中ヒトオステオポンチンは有意に上昇し、病変の拡がりの程度と相関があり、病勢を反映するマーカーと考えられる。

#### A. 研究目的

OPN は RGD 認識部位を有する磷酸化糖蛋白であり、サイトカイン様作用を有している。近年 Th1 cytokine 優位な肉芽腫形成性疾患において、重要な役割をはたすことが報告されている。今回我々は、結核患者において血漿中の OPN を測定し、その臨床的意義を検討した。

#### B. 研究方法

未治療の結核患者 30 例（病変の拡がり 1 が 7 例；拡がり 2 が 14 例；拡がり 3 が 9 例；うち粟粒結核 4 例を含む）と健常者 10 例から血漿を分離し、抗 OPN 抗体を使用した ELISA によって血中の全長型および断片化 OPN を測定した。

（倫理面への配慮）

採血に際し、患者および健常者から研究目的および研究内容を十分に説明し、informed consent を得た。

#### C. 研究結果

全長型 OPN は健常群（ $197.63 \pm 70.50 \text{ ng/ml}$ ）に比し結核群（拡がり 1.278.82  $\pm$  199.85ng/ml; 拡がり 2.553.37  $\pm$

315.37ng/ml; 拡がり 3.1202.68  $\pm$  713-32ng/ml）で有意に高値であった。また、病変の拡がりの程度が進むほど、より血漿中の OPN は増加していた。しかし、塗沫陽性群と陰性群間および空洞の有無による 2 群間では血中 OPN 値に有意な差は認められなかった。

#### D. 考察

血中 OPN は結核症において有意に上昇しており、さらにその値は病変の拡がりの程度と相関していた。OPN が病勢を反映している可能性が示唆された。今後、結核症においてインターフェロンや IL-12 の誘導に OPN が関与しているかどうか検討する必要がある。

また、耐性菌感染患者において OPN、インターフェロンや IL-12 産生が障害されていないかを今後検討する予定である。

#### E. 結論

結核患者における血中 OPN 値は病変の拡がりとは相関しており、その増加の程度は病勢を反映している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

I. 論文発表

① Mapping of functional epitopes of osteopontin by monoclonal antibodies raised against defined internal sequences. *J Cell Biochem.* 2002;84:420-32. (S. Kon, Y. Yokosaki, M. Maeda, T. Segawa, Y. Horikoshi, H. Tsukagoshi, MM. Rashid, J. Morimoto, M. Inobe, N. Shijubo, AF. Chambers, T. Uede.)

② Osteopontin is involved in the initiation of cutaneous contact hypersensitivity by inducing Langerhans and dendritic cell migration to lymph nodes. *J Exp Med.* 2001;194:1219-29 (JM. Weiss, AC. Renki, CS. Maier, M. Kimmig, L. Liaw, TH. Ahrens, S. Kon, M. Maeda, H. Hotta, T.

Uede, JC. Simon.)

③ Role of osteopontin in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *AM J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 24: 264-71. (F. Takahashi, K. Takahashi, T. Okazaki, K. Maeda, M. Ienaga, S. Kon, T. Uede, Y. Fukuchi.)

II. 学会発表

猪股慎一郎、上出利光、他結核患者における血中ヒトオステオポンチン (OPN) の臨床的意義の検討、2002年日本呼吸器学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

分担課題 国立病院・療養所呼吸器ネットワークを利用した多剤耐性結核に対する  
標準治療方式の確立に関する研究：資料

多剤耐性結核菌株の RFLP 解析

研究協力者 清水哲雄 国立療養所道北病院

A. 研究目的

多剤耐性結核対策には、耐性誘導の防止とともに多剤耐性菌株の感染予防が重要である。そこで、多剤耐性患者を中心とした感染伝播の有無を評価する目的で、結核菌 DNA の restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析を行った。

B. 研究方法

99年4月から2001年3月までの当院の新規入院培養陽性結核患者連続151名と99年3月以前より入院中の多剤耐性患者2例の合計153例を対象とした。対象者数は当院の結核医療圏におけるこの間の活動性肺結核患者数の47.5%、結核菌陽性患者数の76.5%に相当する。クラスター解析はバンド数が6本以上の症例を対象として行った。

結核菌 DNA は塩化ベンジル法で抽出し、IS6110のプロープは結核菌標準株 H37Rv より抽出した DNA から PCR 法で作製し、ビオチン標識した。RFLP 解析は van Embden らの方法に準拠して行った。バンドパターンはソフト

(ImageMaster 1D, Amersham pharmacia biotech) を用いて解析し、デンドログラムは UPGMA 法を用いて作製した。

C. 研究結果

新規入院患者 151 名中 150 名 (男性 97

名、女性 53 名) が解析可能で、年齢中央値が 73.0 才、治療歴を有する例が 23.3 %、多剤耐性例が 3 例 2.0 %であった。

バンド数は、1 本から 18 本までに分布し、中央値は 11 本。142 名でクラスター解析を行い、デンドログラムを作製したが、137 名が Dice coefficient 0.7 以上の近似性を示す 12 グループに分けることができた。さらに、36 名/17 グループ (25.4%) が Dice coefficient 0.9 以上の高い近似性を示す 1 本違いのバンドパターンであり、6 名/3 グループ (4.2%) が同一パターンであった。多剤耐性例は 5 例中 2 例がそれぞれ感性菌株と Dice coefficient 0.9 以上の近似性を示す 1 本違いのバンドパターンであったが、相互の接触歴など疫学的関係は明らかでなかった。

D. 考察

同一パターンを示す症例が 4.2 %と、結核罹患率が低いヨーロッパ諸国と比較しても少なかったが、サンプリング率や解析期間、人口の漸減している農業・酪農地帯という地域特性などの影響が考えられた。

Dice coefficient が 0.9 以上で 1 本違いのパターンを示す症例が 25.4 %みられた。挿入配列は安定しているといわれているが、一方で転位によりバンドの欠失や付

加、重複が生じるとも報告されている。潜在性感染の再燃による発病の場合、その間にバンドパターンのわずかな変化が生じたことが考えられた。

今回の解析では、多剤耐性菌株は同一バンドパターンを示す例はなかったが、今後パターンのデータベース化を図り、新規耐性例のパターンを照合するなどの監視が重要と考えられた。

#### E. 結論

当院医療圏における結核菌DNAのRFLP解析を連続的に行ったが、多剤耐性菌株と同一バンドパターンを示す例はなかった。今後のバンドパターンのデータベース化と、パターンの照合による監視が重要である。

#### F. 研究発表

第42回日本呼吸器学会総会、2002年4月  
(仙台) で発表予定

分担課題 国立病院・療養所呼吸器ネットワークを利用した多剤耐性結核に対する  
標準治療方式の確立に関する研究：資料

国立療養所 4 施設における 1999 年結核菌薬剤耐性率の検討

研究協力者 川城丈夫 国立療養所 東埼玉病院長

A. 目的

近年結核が再興感染症として注目を集め、1999 年には“結核緊急事態宣言”がなされた。多剤耐性結核の増加も危惧されており、近年、薬剤耐性率が各薬剤ともに増加したとの報告がなされた。本研究では関東地区国立療養所に入院した患者につき、結核菌薬剤耐性率を集計し耐性率が増加しているか否かを検討した。

B. 方法

国立療養所東埼玉病院、千葉東病院、晴嵐荘病院、東京病院の 4 病院に 1999 年 1 月 1 日から同年 12 月 31 日の 1 年間に入院した患者で、結核菌培養陽性で薬剤感受性検査を実施した症例を対象とした。結核化学療法治療歴別、完全耐性・不完全耐性別に集計した。調査薬剤および濃度は、イソニアジド(INH) 1  $\mu$ g/ml, リファンピシン(RFP) 50  $\mu$ g/ml, ストレプトマイシン(SM) 20  $\mu$ g/ml, エタンブトール(EB) 5  $\mu$ g/ml とし、多剤耐性結核菌(INH 1  $\mu$ g/ml かつ RFP 50  $\mu$ g/ml に耐性)も集計した。また、40 歳未満と 40 歳以上の 2 群に分け、それぞれの群で前記の薬剤耐性率を集計した。

C. 結果

調査しえた症例は合計 667 例で、初回治療例は 596 例(89.4%)、再治療例は 71

例(10.6%)であった。

INH では初回治療例の完全耐性 2.3%、不完全耐性 2.3%であった。再治療例の完全耐性 14.1%、不完全耐性 12.7%であった。

RFP では初回治療例の完全耐性 1.8%、不完全耐性 1.8%であった。再治療例の完全耐性 14.1%、不完全耐性 9.6%であった。

SM では初回治療例の完全耐性 4.0%、不完全耐性 2.2%であった。再治療例の完全耐性 7.0%、不完全耐性 4.2%であった。

EB では初回治療例の完全耐性 0.33%、不完全耐性 1.0%であった。再治療例の完全耐性 5.6%、不完全耐性 5.6%であった。

多剤耐性結核菌の初回治療例における完全耐性率は 0.33%、不完全耐性率は 1.2%であった。再治療例の完全耐性 4.2%、不完全耐性 12.7%であった。

40 歳未満と 40 歳以上の 2 群に分けて求めた各薬剤の耐性率に有意差を認めなかった。

(詳細な成績は、表 1~3 に示した。)

D. 考察

本調査は各施設での結核検査結果を集計したものである。結核療法研究協議会(療研)の 1982 年における現地調査成績と比較しすると、初回治療例では完全耐性率が INH, SM でやや減少, EB で不変,

RFP でやや増加している傾向があるものの、その変化は小さいと考えられる。

40 歳以上の患者と 40 歳未満の患者からの菌における薬剤耐性率に有意差がないという結果は、長期にわたる抗結核薬の使用を行っても結核菌耐性率が上昇しない可能性が高いことを示唆していると考ええる。

また、多剤完全耐性結核菌の出現率は 82 年療研現地成績の報告には記載されておらず、今回の調査結果と直接比較できる報告は少ない。92 年療研報告における中央成績では、多剤完全耐性結核菌率は 0.14% であり、今回の成績(0.33%)はこれより高値であった。今後の多剤耐性結核菌出現率の推移に注目したい

分担課題 国立病院・療養所呼吸器ネットワークを利用した多剤耐性結核に対する  
標準治療方式の確立に関する研究：資料  
多剤耐性結核に対するニューキノロン治療薬の検討

研究協力者 多田敦彦 国立療養所南岡山病院第2内科

#### 研究要旨

ニューキノロン治療薬 ofloxacin (OFLX)と levofloxacin (LVFX) の抗結核菌活性を *in vitro* において比較した結果、LVFXの方が抗結核菌活性が高いという結果であった。次に、多剤耐性結核菌臨床分離株における OFLX と LVFX の薬剤感受性試験を行ったところ、OFLX あるいは LVFX による前治療のない症例の菌株に対し OFLX および LVFX は良好な感受性を示した。また、OFLX あるいは LVFX による前治療のない症例の菌株、および前治療のある症例の菌株ともに、LVFXの方が菌の発育率は OFLX よりも低値であった。

#### A. 研究目的

平成12年度の報告書では、多剤耐性結核に対するニューキノロン治療薬 ofloxacin (OFLX)の抗結核菌活性の *in vitro* における検討と、OFLX の臨床効果についての検討によって OFLX の有用性を報告した。Levofloxacin (LVFX)はラセミ体である OFLX の光学活性1体であり、OFLX の活性本体とされている。そこで、OFLX と LVFX の抗結核菌活性を *in vitro* において比較するとともに、多剤耐性結核菌臨床分離株における OFLX と LVFX の薬剤感受性試験を行った。

#### B. 研究方法

最低発育阻止濃度(MIC)は臨床分離結核菌株15株を対象に actual count 法により測定した。

平成元年1月から平成12年12月までに国立療養所南岡山病院において新規に検出された INH0.1  $\mu$ g/ml と RFP50  $\mu$ g/ml の両者に完全耐性である多剤耐性結核菌

株は46株であった。平成6年までの24株(OFLX群)においては OFLX の薬剤感受性試験、平成7年以降の22株(LVFX群)においては LVFX の薬剤感受性試験が行われた。

(倫理面への配慮)

臨床分離菌株を対象とした研究であり、プライバシーも保護されていることから、倫理的問題はないと判断した。

#### C. 研究結果

結核菌に対する OFLX の MIC の range は 0.39~1.56  $\mu$ g/ml、MIC50 は 0.39  $\mu$ g/ml、MIC90 は 0.78  $\mu$ g/ml であるのに対し、LVFX の MIC の range は 0.2~0.78  $\mu$ g/ml、MIC50 は 0.39  $\mu$ g/ml、MIC90 は 0.39  $\mu$ g/ml であり、LVFXの方が抗結核菌活性が高いという結果であった。

多剤耐性結核菌臨床分離株における OFLX と LVFX の薬剤感受性試験においては、OFLX あるいは LVFX による前治療のない症例の菌株における 0.6  $\mu$ g/ml の薬剤



濃度で発育が認められた菌株の割合は、OFLX73%(11/15)に対し LVFX21%(3/14)であり、LVFXの方が結核菌発育抑制効果が高いという結果であった。また、1.25  $\mu$ g/ml では、OFLX13%(2/15)、LVFX14%(2/14)であった。LVFX 群ではLVFX 高度耐性株が2株認められた。

OFLX あるいは LVFX による前治療のあった症例の菌株では、OFLX、LVFX ともに各薬剤濃度における菌の発育率は高値であった。OFLX と LVFX との比較では、各薬剤濃度において LVFX の方が菌の発育率は低値であった。

#### D. 考察

インタビューフォームによると、OFLX200mg を食後に単回服用した時の OFLX 最高血中濃度は 1.65  $\mu$ g/ml、LVFX100mg を食後に単回服用した時の LVFX 最高血中濃度は  $1.22 \pm 0.08 \mu$ g/ml であり、OFLX200mg を1日3回継続服用した時の OFLX 最高血中濃度は  $2.14 \pm 0.40 \mu$ g/ml と報告されていることから、多剤耐性結核菌であっても OFLX あるいは LVFX による前治療のない場合は、OFLX および LVFX は高率に効果が期待できると考えられた。しかし、OFLX あるいは LVFX による前治療がある場合は、すでに耐性化している可能性が高いという結果であった。

#### E. 結果

多剤耐性結核菌臨床分離株における OFLX と LVFX の薬剤感受性試験を行ったところ、OFLX あるいは LVFX による前治療のない症例の菌株に対し OFLX および LVFX は良好な感受性を示した。

OFLX と LVFX との比較では LVFX の方が抗結核菌活性が高いという結果であった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

平成15年日本結核病学会総会で発表  
予定

#### H. 知的財産権の出願・登録

なし

分担課題 国立病院・療養所呼吸器ネットワークを利用した多剤耐性結核に対する  
標準治療方式の確立に関する研究：資料  
ホルマリン固定組織標本における結核菌検出の低下に関する定量的研究

研究協力者 中田太志 国立療養所山陽病院

研究要旨

ホルマリン固定されているほとんどの組織標本では結核菌および非結核性抗酸菌の検出は非常にまれな現象であり、多くの抗酸菌は抗酸菌染色に染りづらい菌体として存在していることが判明した。このような実態は、結核の院内感染を見逃す可能性や多剤耐性結核菌の発症メカニズムを究明する研究に誤差を与える可能性があり広く認知されるべき事実と思われる。

A. 目的

結核菌感染ではほとんど肉芽腫が形成されるが、組織標本で菌体が確認されることは少ない。このような実態は、結核の院内感染を見逃す可能性や多剤耐性結核菌の発症メカニズムを究明する研究に誤差を与える可能性がある。我々は、原因の一つとして組織標本の作製過程で使用する固定液や有機溶媒の影響と考え、実際に菌体をホルマリンやキシリンに作用させ抗酸菌染色への影響を調査した。一方、肉芽腫形成組織切片において結核菌遺伝子の検出を定量 PCR 法で行なった。これらのことより組織標本に抗酸菌染色を実施することの問題点を考察した。

B. 方法

<1>結核菌の染色感度

結核菌 H37RV を界面活性剤含有の抗酸菌用液体培地で一週間培養を行った。この結核菌を 20%ホルマリン液で一夜静置後、菌液濃度を  $10^8$  個に調整し、2 倍希釈を 24 管まで作製しホルマリン処理希釈系列とし

た。この希釈系列の結核菌を遠心沈殿させ、上澄液を除去し、変わりにキシリンを分注後攪拌させ、 $35^{\circ}\text{C}$  で 4 時間作用させホルマリン・キシリン処理希釈系列とした。其々の希釈系列を抗酸菌染色し、菌数をカウントした。

<2>定量 PCR

H.E.染色標本において肉芽腫形成所見等により抗酸菌症と診断された 30 症例の薄切標本を用いた。定量 PCR は Light cycler を使用し以下のように実施した。16S リボソーム RNA をコードしている特異的配列の 150base を PCR の増幅領域として増幅産物のリアルタイム検出するため増幅領域の中に 1 塩基のギャップを介した 2 つの結核菌特異的蛍光標識プローブを作製。ホルマリン固定パラフィン薄切切片より結核菌遺伝子を抽出させるため、キシリンで脱パラフィン後、滅菌綿棒を用いてスライドガラスより組織を掻き取り、超音波 lcyer を用いて結核菌菌体を破碎させ、遺伝子を抽出させた。Master mix と primer ,probe を混合し  $18 \mu\text{l}$  としたものに抽出遺伝子を  $2 \mu\text{l}$  を加え  $20 \mu\text{l}$  としたものをガラスキャピラリーの中

で遺伝子増幅を 60 サイクル行い、リアルタイムに蛍光強度を測定した。

### C. 結果

フル・ホルムン法の染色感度の比較において、ホルムンのみを作用させた希釈系列では 10 管目、ホルムンとキノンを作用させた希釈系列においては 6 管目までしか検出することができなかった。また、肉芽腫形成組織 30 症例中 25 症例 (83.3%) に結核菌遺伝子を検出した。しかし抗酸菌染色陽性標本は 13 症例(43.3%)に留まった。抗酸菌塗抹陽性標本では最高値 108400000pg 最低値 13.3pg であった。一方、塗抹陰性で結核菌遺伝子が検出された標本での最高 1317pg、最低値 0.337pg となった。

### D. 考察

結核に代表される抗酸菌症の診断、研究には遺伝学的手法が取り入れられ飛躍的な進歩をとげてきたが、病理組織による診断は癌との鑑別や診断において重要な所見である。

しかし、ホルムン固定パラフィン包埋病理組織切片に抗酸菌染色を施しても抗酸菌の検出される頻度、或いは、検出される菌数が少ないことは経験的に知られていた。この原因の一つとして組織標本の作製過程で使用する固定液や有機溶媒が抗酸菌染色に影響を与えるのではないかと推測し、実際に結核菌をホルムンやキノンに作用させ抗酸菌染色への影響を検討した。その結果、ホルムン単独で作用させた場合、全菌体数の 3.2%~6.6%しか染色されず、またホルムンとキノンのそれぞれを組織標本作製と同じ条件で結核菌を処理した場合、全菌

体数の 0.5%~0.9%が染色されただけであった。このことより染色性低下の原因は組織標本作成過程でのホルムンとキノンの相乗的な作用と判明した。キノンが抗酸菌染色にある程度影響を与えることは推測されたが、ホルムンの影響を指摘した報告は初めてである。また、この現象は結核菌だけにとどまらず他の抗酸菌でも認められた。

このことを踏まえ、ホルムン固定された肉芽腫形成組織 30 例において、抗酸菌染色と定量 PCR 法を行い結核菌数の測定を行った。そのとき、1 個の結核菌の遺伝子量を 0.04pg としてみなすと抗酸菌染色陽性標本での検出数は染色法 5 個、定量 PCR 法 79,250 個、抗酸菌染色陰性標本では 0 個と 573 個であった。定量 PCR 法は生菌に限らず、菌体が破壊された結核菌遺伝子も検出してしまうため生菌数と乖離を生じていると思われるが、染色法と定量 PCR 法の間には弱い正の相関が認められた。よって、ホルムン固定されているほとんどの組織標本では結核菌および非結核性抗酸菌の検出は非常にまれな現象であり、多くの抗酸菌は抗酸菌染色に染りづらい菌体として存在していることが判明した。

このような実態は、結核の院内感染を見逃す可能性や多剤耐性結核菌の発症メカニズムを究明する研究に誤差を与える可能性があり広く認知されるべき事実と思われる。

### F. 研究発表

#### 1.論文発表

Fukunaga H. Quantitative Study on

Sensitivity of Mycobacterium for Acid-fast Stain in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue. Am J Respir Crit Care Med 2002; (in press)

2.学会発表

福永 肇、村上 知之、竹山 博泰：「病理組織標本で抗酸菌検出が少ない理由について」 第52回日本結核病学会中国四国支部会；2002.1.26