

## 分担研究課題 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 資料

### 6) 多剤耐性結核長期生存例の実態に関する研究（多剤耐性後5年以上生存症 例）

研究協力者 毛利昌史 国立療養所東京病院 病院長  
佐藤紘二 国立療養所熊本南病院 副院長

#### 研究要旨

今年度は全国の国立病院・療養所からなる呼吸器ネットワーク構成病院全ての54施設から多剤耐性結核の実態が把握できた。54施設に登録された多剤耐性結核患者は368症例で、その内、多剤耐性化後5年以上の生存者は83症例であった。内訳は入院治療62症例で、他の21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日本の患者統計上、多剤耐性結核患者数は、横這いか微増傾向にある。このことは多剤耐性結核の治療に難渋していることの証であり的確な薬剤が無いことをも意味している。これを打破するために使われるニューキノロン薬の多剤耐性結核菌に対する感受性検査成績（我々が今までに行ってきた成績）も供覧した。

#### A. 研究目的

多剤耐性結核菌は、一般的に菌の毒力は弱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、真の感染率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し治療対策の一助にすることを目的にした。更に、国内の多剤耐性結核患のニューキノロン薬に対する感受性検査の成績を提示し難渋している治療の便に供した。

#### B. 研究方法

国立療養所で当研究に参加した54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、INH $1.0\mu\text{g}$  ( $0.2\mu\text{g}$ )、RFP $50\mu\text{g}$  ( $40\mu\text{g}$ )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。一括処理し

たため処理後は患者在籍の病院でのみしか個人判別は出来ない報告書となる。

### C. 研究結果

参加国立療養所 54 施設に登録された結核患者（2000.1.1-2000.12.31、一部の施設は 2001.1.1-2001.12.31）について、全結核患者は 7565 症例（概数）、その内多剤耐性結核患者であった者は 368 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、83 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。83 例中 62 症例は入院治療であったが、21 症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る。症例の男女別では、男性 66 症例で女性は 17 例で圧倒的に男性が多い状態であった。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、殆ど良くも悪くもならず結核と共存している状態にある患者も存在している。これらの患者の治療には効果のある抗結核薬が無く、現在保険診療上の適応症とはなっていないが、ニューキノロン薬に頼らざるを得ない状況下にある。国内の多剤耐性菌 100 例のニューキノロン薬に対する感受性検査では LVFX には 35%SPFX には 47%感受性があることが判明し効果があるのは事実である。但し、この調査した多剤耐性結核菌にはニューキノロン剤未使用者から既使用者まで含まれている。

### 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、早急に治療法の確立をしなければならない結核行政の難題である。

### E. 結論

国立病院、国立療養所 54 施設の資料を基に検討したところ

- (1) 国立病院・国立療養所呼吸器ネットワーク結核患者の約 4.9%が多剤耐性結核で占められており、その中の約 20.5%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が、大都会への偏在化が著しい。しかし、5 年以上長期生存の多剤耐性結核患者に限れば、その差は小さくなっている。
- (3) 多剤耐性化後 5 年以上を経過した多剤耐性結核患者の患者構成は、60 歳代以上で約 69%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では、約 80%の患者が常時排菌者であ

- り、残りの約 20%の患者は、微量排菌か時折散発する程度であった。
- (5) 多剤耐性結核発症後 5 年以上経過した多剤耐性結核患者の約 25.3%は、外来患者であり、結核予防法に照らすと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、Good chronics の状態で長期に経過し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とは限らない。しかし、排菌している期間が長いことは、感染危険指数も高く感染性疾患にとっては重大である
  - (7) 国内に存在する多剤耐性結核菌には LVFX に 35%、SPFX に 47%の感受性が残っている。

#### 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続いていると国内統計では報告されている。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。これらの難治結核に対する治療法が確立されておらず、確実に対処できる薬物も無い現在、公衆衛生上、正確な疫学調査にもとずいた予防対策を講じることが重要である。

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

M.Mori, K. Sato, M. Sakatani : Surveillance of MDR-TB in National Hospitals in Japan. Should we keep patients with MDR-TB in Hospital indefinitely? 33rd World Conference of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Montreal · CANADA. 6-10 October 2002

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

表 1. 国立療養所 54 施設の結核患者 (2000.1.1-2000.12.31)

全結核患者	7,565 症例 (概数)
多剤耐性結核患者	368 症例
多剤耐性発症後 5 年以上経過	83 症例

(一部は、2001.1.1-2001.12.31)

表 2. 最近 3 ヶ月以内の排菌状況

ガフキー号数	人数
0	16 (不定期に排菌あり)
1~2	24
3~6	27
7~10	6
不詳	10

表 3. 長期生存者の入院・外来別

(MDR-TB 発症後 5 年以上の症例)	
入院診療	62 名
外来診療	21 名

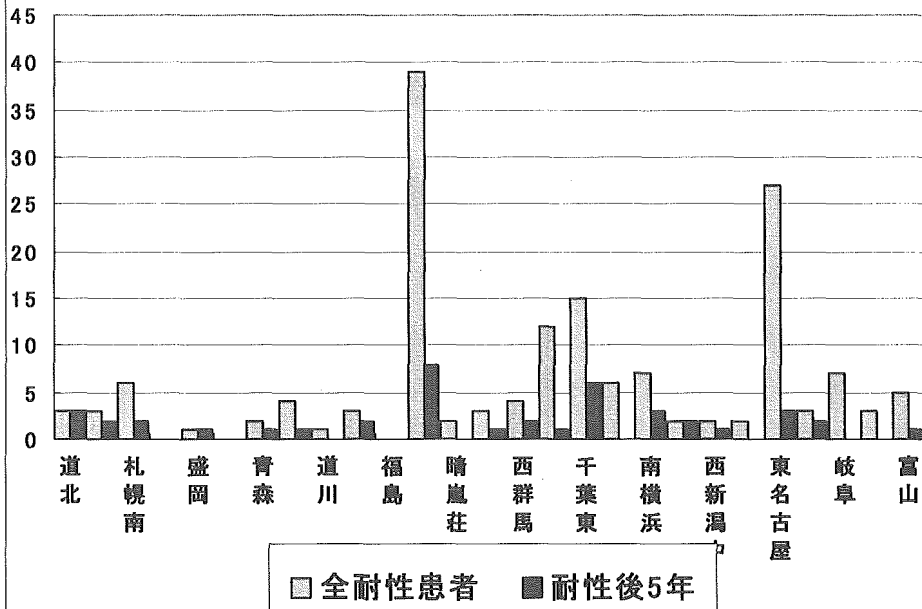
表 4. 使用した耐性判定基準

旧基準	77 症例
新基準	6 症例

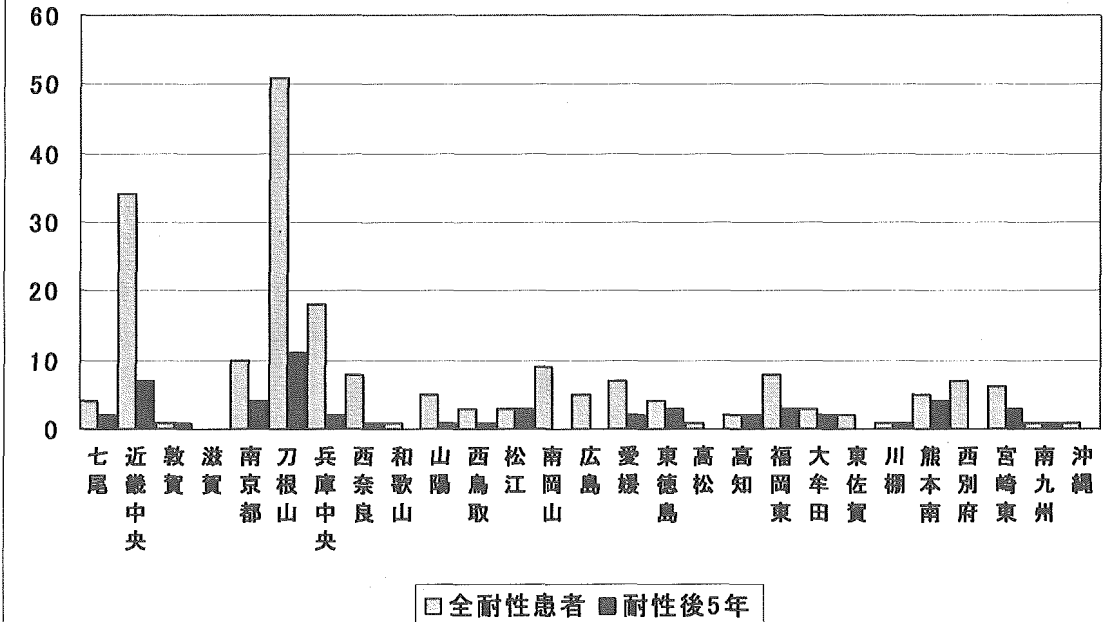
表 5. 多剤耐性結核発症後 5 年以上生存者の性別

男性	66 症例
女性	17 症例

病院毎多剤耐性結核患者数



病院毎多剤耐性結核患者数



## 分担研究課題 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 資料

### 7) 結核菌薬剤感受性試験法の評価 固定濃度法（MT法）と比率法（試験管法、WP法）の比較

研究協力者 藤野忠彦 国立療養所神奈川病院 病院長

#### A. 研究目的

多剤耐性結核の治療に当たり、結核菌薬剤感受性試験法の確立は欠かせない。我が国では従来固定濃度法のひとつであるマイクロタイター法（MT法）が広く用いられてきた。1999年12月に新しい基準が示され絶対濃度法から比率法に移行することになった。既治療例で再燃悪化症例の治療法の検討の際に必要な両検査法の比較検討を行い、多剤耐性結核の治療の基礎とすることとした。

#### B. 研究方法

研究対象は2001年9月から2002年2月までに国立療養所神奈川病院に入院または外来通院した患者から分離された結核菌と既に入院中であり感受性試験の再検を要したものなど100菌株を用いた。固定濃度法にはマイクロタイター法（極東製薬工業株式会社）、比率法には試験管法（極東製薬工業株式会社）ならびにウエパック法（日本BCG製造株式会社）を用いた。それぞれ原法に従いマイクロタイター法（MT法）は2週間、試験管法は4週間、ウエパック法（WP法）は3週間にて判定を行った。

#### C. 研究結果

INH感受性試験では薬剤耐性基準濃度に変更になっている事を考慮すれば、3法はほぼ一致していた。EB感受性試験では耐性菌株は11株あり、MT法ではいずれも耐性であったが、試験管法ではそのうち8株は感受性で、残る3株は耐性であった。TH感受性試験では3法いずれかで耐性となるものは14株あり、MT法ではいずれも感受性であった。試験管法では11株が耐性、うち6株はWP法では感受性であった。

#### E. 結論

固定法から比率法に移行するに当たり、両法間にはTHを除きほぼ一致した成績であった。THに関しては試験管法とWP法間に不一致例が見られ、臨床上的使用にあつたては総合的に慎重な考慮が必要である。

#### F. 研究発表

藤野忠彦、長谷川光治、高野友丈、阿部良行：結核菌薬剤感受性試験法の評価—固定濃度法（MT法）と比率法（試験管法、WP法）の比較. 第28回 結核・非定型抗酸菌治療研究会. 2002.12.7

長谷川光治、高野友丈、阿部良行、藤野忠彦：結核菌薬剤感受性試験法の評価—固定濃度法（MT法）と比率法（試験管法、WP法）の比較. 第142回 日本結核病学会関東支部総会

## 分担研究課題 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 資料

### 8) 抗酸菌補助診断法に関する研究

研究協力者 松岡幸彦 国立療養所東名古屋病院 病院長

#### 研究要旨

活動性結核患者において抗抗酸菌（Lipoarabinomannan、LAM）抗体検出キット「マイコドット」についての臨床的意義について検討した。マイコドット陽性率は全体で59%であったが、塗抹陰性例やレントゲン所見の軽症例、発症後の期間の短い症例での陽性率は50%前後とやや低く、早期診断に使用するにはやや困難と思われる。

#### A. 研究目的

多剤耐性結核の発生原因としては治療中断が最大の要因と考えられる。治療中断の原因としてはホームレス患者などによく見られる自己退院、自己中断のほか、患者の状態が悪く、十分量の投薬ができないまま、副作用などにより服薬を中止しなくてはならない場合もある。より早期に、また軽症のうちに結核と診断、治療開始する必要がある。しかしながら、軽症患者では喀痰検査などを行っても結核菌を証明する事が難しく、補助診断に頼らざるを得ない。補助診断法として最も有効なものとしてツベルクリン反応があるが、わが国では国民のほぼ全員がBCG接種を受けていることより、ツベルクリン反応による抗酸菌感染の診断ができにくい事情があり、BCG接種者でも結核菌に感染しているかどうかを判定できる検査法の開発が望まれていた。近年血清を用いた抗酸菌補助診断法が開発され、保険適応もされるようになったので、この新しい検査法の臨床的な意義について検討した。

#### B. 研究方法

平成14年6月から10月の間に当院に入院し、喀痰もしくは胸水の結核菌塗抹もしくは培養陽性にて結核症と確定診断した患者を対象とした。そのなかでマイコドットが調べられたのは男性25例、女性21例、合計46症例で、平均年齢は61.8歳である。喀痰塗抹は集菌法および蛍光抗体法で調べ、マイコドットは和光純薬工業製抗酸菌（LAM）抗体検出試薬キット「マイコドット」を用いて、血中LAM抗体を測定した。判定は比較用コームを参照しながら呈色強度に応じ（-）、（±）、（+）とし、（±）（+）を陽性とした。

なお、マイコドット検査は保険適応の検査であり、ツベルクリン反応検査と同様の検査である事から患者の同意は不必要とは考え、入院時検査の一つとして行った。



### C. 研究結果

マイコドット陽性率は全体では 58.7% (27/46) であったが、排菌状況別で陽性率をみると塗抹陰性患者では 50%、塗抹陽性 (+) 患者では 44%、塗抹陽性 (2+) 患者では 46%、塗抹陽性 (3+) 患者では 75% であり、菌陰性や微量排菌者の陽性率が低く、大量排菌者で高い傾向であった。

レントゲン重症度別陽性率ではⅡ 1 + Ⅱ 2 では 75%、Ⅰ + Ⅱ 3 では 100% と重症の患者では陽性率が高かったが、Ⅲ 1 + Ⅲ 2 では 46%、Ⅲ 3 では 0% と軽症と考えられる症例では低値であった。

発症後の期間についての検討では、発症後の期間が 2 ヶ月未満の患者での陽性率は 59%、2 ヶ月以上の患者の陽性率は 80% であり、発症後の期間により陽性率に差が見られた。

また、マイコドット (-) 群の患者のアルブミン値は平均 3.6 g/dl、(±) 群は 3.2 g/dl、(+) 群は 3.1g/dl であった。

これらの結果はいずれも軽症の患者では陽性率が低く、重症の患者で陽性率が高い事を示していた。

### D. 考察

わが国の結核罹患率は欧米先進諸国に比しまだまだ高く、平成 9 年より再上昇した事もあり、新たな対策が必要となっている。また、多剤耐性結核も 1992 年と 1997 年の中央研究より増加傾向が示唆されており、それに対する対策も求められている。多剤耐性結核を作らないためには、結核症を早期に診断し、治療を完遂することが最も有効であるとされている。結核の確定診断は結核菌を検出する事である。しかしながら、発病初期の症例では、結核による病変も軽度のことが多く、喀痰などの検体が採取困難であったり、排菌の無い症例、排菌量の少ない症例が殆どで、胸部 X 線所見、臨床症状から診断を行っている。

従来より抗酸菌感染の補助診断法としてツベルクリン反応検査がある。しかし、わが国では国民のほぼ全員が BCG 接種を受けており、ツベルクリン反応により抗酸菌に感染しているかいないかを判定する事は困難であった。

近年、患者の血清中に存在する抗抗酸菌抗体を検出測定することにより抗酸菌症を早期に診断しようとする試みが行われているが、2001 年 7 月に LAM に対する抗体を測定する検査方法が新たに保険適応となり、臨床の場で使用が可能となった。そこで、当院もこの検査法の臨床的意義について検討した。

今までの報告では活動性結核患者におけるマイコドット陽性率は 70~80% とされているが当院では 59% と少し低値であった。特に喀痰塗抹陰性例やレントゲン所見が軽度であったり、発症後の期間の短い症例での陽性率は 50% 前後であり、検討した症例がすべて排菌陽性例である事から類推すると、排菌陰性例ではさらに陽性率が低いと思われ、早期診断に使用するには非常に物足りない成績であった。しかし、天竜病院や富山病院などの東

海・北陸ブロックの他の専門医療施設では初期診断に有用との研究報告をしており全体として検討する必要があると思われる。

#### E. 結論

当院の入院した結核患者において抗抗酸菌 (LAM) 抗体検出試薬キット「マイコドット」についての臨床的意義について検討した。

1. マイコドット陽性率は全体で 59%であった。
2. 発症後の期間が短い症例や、軽症例では陽性率が低かった。
3. 早期診断にあまり有効とは思われない。

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

第 78 回日本結核病学会総会 2003 年 4 月倉敷にて発表

## 分担研究課題 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 資料

### 9) 「治療歴ならびに薬剤耐性パターンに基づいた適正治療方式の検討」 に関する研究

研究協力者 露口泉夫 大阪府立羽曳野病院 病院長

#### 研究要旨

多剤耐性結核を減らすためには、新たな薬剤耐性結核、特に多剤耐性結核を作らないことが第一である。治療歴ならびに地域の薬剤耐性パターンに基づいた適正治療方式の検討から、初回治療例と多剤耐性のリスクが低い再治療例に対しては INH、RFP、PZA および EB の 4 剤治療方式が適切である。一方、治療歴から多剤耐性のリスクが高いと考えられる再治療例には、薬剤感受性成績が判明するまでは EVM、PZA、LVFX の 3 剤に TH、CS、PAS からの 2～3 剤を追加した多剤耐性結核としての経験的治療方式が推奨される。

#### A. 研究目的

結核療法研究協会が行った 1997 年の全国調査では、未治療例の INH 耐性は 4.4%、多剤耐性は 0.8% の高率であり、薬剤耐性結核の増加が指摘されている。さらなる耐性獲得による治療失敗を防ぎ、そして新たな薬剤耐性結核を作らないためには、地域の薬剤耐性パターンに基づいた治療方式を提案することが大切である。そこで、我々は肺結核患者の治療歴ならびに薬剤耐性状況を調査し、適正治療方式を検討した。

#### B. 研究方法

2001 年に当院において新たに肺結核と診断された菌陽性結核患者を対象とした。問診票ならびにカルテ記録を詳細に検討し、過去に抗結核薬の服用歴が有るか無いか有っても 1 ヶ月初回満の場合は初回治療とし、1 ヶ月以上の抗結核薬の服用歴がある場合は再治療に分類した。上記期間中の菌陽性結核は 445 例で、うち初回治療は 357 例、再治療は 85 例、治療歴不明は 3 例であった。治療成績は、治癒（化学療法にて培養陰性化し、予定治療を終了した。）、完了（排菌停止は初回確認だが、予定治療を終了した。）、中断（2 ヶ月以上の治療中断がある。）、失敗（化学療法を行うも菌陰性化に失敗した。）および不明に分類した。薬剤感受性試験は、INH、RFP、SM および EB の 4 剤は小川比率法、PZA は極東結核菌感受性 PZA 液体培地法、そして LVFX はプロスミック MTB・1 法を用いた。当該研究は、結核治療の一環として行われた臨床記録ならびに検査成績を用いた「後ろ向き研究 (retrospective study)」であり、対象患者に不利益あるいは危険を及ぼすものではない。また、対象患者が特定出来る個人情報は一切公表せず、患者プライバシーの保護を徹底し

た。したがって、当該研究は患者の倫理面の問題はない。

## C. 研究結果

### 1) 2001年の薬剤耐性状況

初回治療例の薬剤別耐性率は、SM 9.8%、INH 4.8%、RFP 2.2%、EB 2.0%であった。再治療例はINH 28.2%、SM 20.0%、RFP 20.0%、EB 11.8%であった。これら4薬剤の何れか1剤以上に対する耐性率は、初回治療例は12.0%、再治療例は41.2%であった。そして、多剤耐性は初回治療例2.0%、再治療例16.5%の高率であった。PZA耐性は、初回治療例1.7%、再治療例7.1%で、12例中11例が多剤耐性結核患者であった。

2) INH、RFP、SMおよびEBの薬剤耐性パターン初回治療例では、SM単独耐性が25例(7.0%)、INH単独耐性7例(2.0%)、INH+RFP+SM+EB耐性7例(2.0%)、INH+SM耐性3例(0.8%)、RFP単独耐性1例(0.3%)であった。再治療例の耐性パターンは多様であり、SM単独耐性8例(9.4%)、INH単独耐性8例(9.4%)、INH+RFP+EB耐性6例(7.1%)、INH+RFP+SM耐性3例(3.5%)、INH+RFP+SM+EB耐性3例(3.5%)、INH+RFP耐性2例(2.4%)、INH+SM耐性2例(2.4%)、そしてRFP単独耐性、RFP+EB耐性およびRFP+SM耐性が各1例(1.2%)であった。

3) 多剤耐性結核の耐性薬剤数 INH、RFP、SM、EB、PZA、LVFX、TH、KM、EVM、PASおよびCSの11薬剤に対して、再治療例(11例)は2剤から8剤の平均4.9剤に耐性であった。一方、初回治療例(7例)は4剤から10剤の平均7.6剤に耐性であり、初回治療例の耐性薬剤数は再治療例に比べ有意に多かった( $p = 0.0169$ )。

4) 前回治療成績別にみた再発時のINHとRFPの耐性パターン 治癒15例は、INH・RFP感性10例、INH耐性1例、RFP耐性1例、多剤耐性3例であった。多剤耐性3例は前回も多剤耐性であった。完了27例は、INH・RFP感性20例、INH耐性6例、多剤耐性1例であった。治療中断・脱落12例は、不規則治療を繰り返した1例が多剤耐性で、残り11例はINH・RFP感性であった。治療失敗14例は、INH・RFP感性1例、INH耐性3例、RFP耐性1例、多剤耐性9例であった。

5) 再発までの平均期間とINHとRFPの耐性パターン 再発までの平均期間は、INH・RFP感性は23.1年、INH耐性は24.4年、RFP耐性は2.3年、そして多剤耐性は2.9年であった。多剤耐性の再発まで期間はINH耐性およびINH・RFP感性に比べ有意に短期間であった( $p = 0.0050$  および  $p = 0.0003$ )。

6) 再発までの平均治療回数とINHとRFPの耐性パターン再発までの平均治療回数は、INH・RFP感性1.2回、INH耐性1.3回、RFP耐性1.0回、多剤耐性2.3回であった。

## D. 考察

初回治療、再治療を問わずSM耐性は高率であったが、EB耐性とPZA耐性は多剤耐性例以外では希であった。この結果からINH、RFPおよびPZAの3剤に加える第4の薬剤と

しては EB が適切と考えられた。薬剤耐性パターンの調査結果からは、多剤耐性以外の薬剤耐性例は RFP+EB 耐性の 1 例を除いて INH、RFP、PZA および EB の 4 剤中の何れか 3 剤に感性であった。再治療例の薬剤耐性リスク評価には治療歴が有用であり、治療歴 2 回以上、短期間で再発ならびに前回治療失敗は多剤耐性のリスクが高いことが判明した。E、結論初回治療例ならびに多剤耐性のリスクが低い再治療例の治療方式として INH、RFP、PZA および EB の 4 剤治療が適切である。一方、治療歴から多剤耐性のリスクが高いと考えられる再治療例には、薬剤感受性成績が判明するまでは EVM、PZA、LVFX の 3 剤に TH、CS、PAS からの 2～3 剤を追加した多剤耐性結核としての経験的治療の導入が推奨される。

## 分担研究課題 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 資料

### 10) キラーT細胞活性による多剤耐性結核・難治性結核の予後診断法の確立と 新しいヒト多剤耐性結核治療モデルの開発

研究協力者 岡田全司 国立療養所近畿中央病院 臨床研究センター部長

#### 研究要旨

多剤耐性結核患者及び糖尿病合併難治性結核患者 PBL では結核菌感染マクロファージに対するキラーT活性の分化・誘導低下が認められた。この原因を結核患者リンパ球を用いて解析した。約50例の結核患者及び多剤耐性結核患者のPBLを用い、抗15K granulysin抗体を用いたFACS解析より granulysin 蛋白のキラーTリンパ球上の発現が低下していることを初めて明らかにした。さらに患者血清中の granulysin について解析した。これらることより多剤耐性結核患者では結核菌に対するキラー蛋白として granulysin が極めて重要であることを明らかにしたとともに、逆にこれを測定することにより結核患者の予後診断法が確立されることを示した。さらに結核患者の血清中の Ksp37(killer secretory protein 37)について解析中である。

#### A. 研究目的

結核罹患率の横這い、集団感染が頻発、AIDS や糖尿病患者等の免疫不全疾患に高頻度に合併、薬剤耐性結核が増え、いわゆる難治性結核の対策が早急に望まれていることにより、新しい予防・診断・治療の研究が必須である。

キラーT細胞の結核免疫に対する重要性が最近急に示唆されはじめたが、そのメカニズムや本当の重要性に関する研究は不明である。したがって、キラーT細胞活性と結核発病を分子・遺伝子レベルで解明する。また、新しいヒト多剤耐性結核治療モデル(SCID-PBL/hu)を開発し、新しい治療薬を開発することを目的とする。

#### B. 研究方法

多剤耐性結核患者 PBL および、糖尿病合併難治性結核患者 PBL を PPD 刺激やマイトゲン刺激した場合、結核菌感染マクロファージに対するキラーT活性の誘導を測定した。granulysin 蛋白の15K蛋白(活性が最も強い)の部分の primer を作製した。

RT-PCR法を用い granulysin mRNA, TRAIL mRNA の著明な低下を示した。さらに、perforin, granzymeB, FasL mRNA を測定した。

さらに、結核菌感染細胞の排除における、キラー細胞のエフェクター機構について解析することを目的として、次の実験を行った。

抗 granulysin 抗体を用いて多剤耐性結核患者 PBL を解析した。抗 15K granulysin 抗体を用いた FACS 解析を行った。さらに結核患者血清及び多剤耐性結核患者の血清を用い、血清中の granulysin ならびに Ksp37 を測定した。

### C. 研究結果

すでに我々は多剤耐性結核患者 PBL および、糖尿病合併難治性結核患者 PBL を PPD 刺激やマイトゲン刺激した場合、結核菌感染マクロファージに対するキラー T 活性の誘導は極めて低いことを報告した。この一因としてこれらの患者のヘルパー T リンパ球からのキラー T 細胞分化因子 (IL-2, IL-6,  $\gamma$ -IFN) 産生が低下することを報告した。さらに、結核菌感染細胞の排除における、キラー細胞のエフェクター機構について解析することを目的として、次の実験を行った。抗 granulysin 抗体を用いて多剤耐性結核患者 PBL を解析した。抗 granulysin 抗体を用いた FACS 解析を行った。その結果、多剤耐性結核患者 PBL の非刺激状態及び PHA 刺激状態とも健常人に比し著明に granulysin 蛋白の実現低下が認められた。さらに多剤耐性結核患者では通常の結核患者に比し CD8 陽性キラー T と NK 細胞の granulysin 発現の著明な低下が認められた。約 50 例の結核患者及び多剤耐性結核患者の PBL を用い granulysin 蛋白の発現を解析した。その結果、統計的有意差をもって結核患者 (特に多剤耐性結核患者) の T リンパ球の granulysin 発現が低下していることを明らかにした。さらに、これらの患者の血清中の granulysin 及びキラー T 細胞から分泌される Ksp37 を測定して解析中である。

また、ヒト T リンパ球を SCID マウスに生着させた SCID-PBL/hu に ESAT-6 peptide や PPD 抗原、結核死菌抗原を投与し、IL-6 gene + IL-6 レセプター gene + gp130 gene 治療を行い、ヒト結核免疫に対する治療効果モデルを開発した。

### D. 考察

多剤耐性結核患者や糖尿病合併難治性 PBL の granulysin の発現低下が結核予後診断となりうることを明らかにした。従ってこの方法を全国の国立病院・療養所呼吸器ネットワーク (54 施設) を利用して、多剤耐性結核とキラー T 免疫の本質にせまる計画をたてている。森享班の坂谷班員に参加している国立病院・療養所研究協力者の合意をすでに得た。特に国立療養所東京病院及び東埼玉病院米丸先生の協力を得ている。また、SCID-PBL/hu を用いヒト多剤耐性結核治療モデルを開発したことは、新しい治療薬の開発に有力な武器を提供する。

### E. 結論

多剤耐性結核患者及び糖尿病合併難治性結核患者 PBL では結核菌感染マクロファージに対するキラー T 活性の分化・誘導低下及びヘルパー T リンパ球からのキラー T 細胞分化因子 (IL-2, IL-6,  $\gamma$ -IFN) 産生の低下を明らかにしてきた。抗 granulysin 抗体を用

いた FACS 解析より granulysin 蛋白のリンパ球上の発現が低下していることを初めて明らかにした。これらのことにより通常の結核患者、特に多剤耐性結核患者では結核菌に対するキラー蛋白として granulysin が極めて重要であることを明らかにしたとともに、逆にこれを測定することにより結核患者の予後診断法が確立されることを示した。また、SCID-PBL/hu を用いヒト多剤耐性結核治療モデルを開発したことは、新しい治療薬の開発に有力な武器を提供する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ryll, M. Hirai, M. Okada, N. Fujiwara, I. Tomiyasu, Y. Kumazawa and I. Yano: Inhibition of TDM-induced TNF- $\alpha$  release by sulfo lipid: a potential new virulence mechanism of Mycobacterium tuberculosis. Microbiol. Pathogenesis (in press)S.

T. Tanaka, Takamori Y., Nagata K., Inoue Y., Sakatani M., Mori T. and Okada M: Suppression of granulysin expression in the cytotoxic cells from the patients with multi-drug resistant tuberculosis. (submitted)

岡田全司、田中高生、螺良英郎: 結核ワクチン「感染症における免疫とワクチン」臨床と微生物 2002、29:127-132

岡田全司: 呼吸器疾患(結核・肺がん)に対する臨床研究(新しい結核ワクチン、肺がんワクチンおよび新しい診断法・予防法の開発)と評価 医療 2003、57(1):51-3

岡田全司: 国立医療における臨床研究の意義. 先進医療を推進する臨床研究とは. 医療 2002、56: 109

鈴木克洋、湊良彰、村井隆太、井上康、吉田亮、新井徹、安藤守秀、藤田悦生、露口一成、源誠二郎、井上義一、林清二、岡田全司、木村謙太郎、坂谷光則: 多剤耐性結核の臨床的検討 結核 2002、77(10):700

### 2. 学会発表

岡田全司、田中高生、井上義一、喜多洋子、松本久美、吉田栄人、大原直也、山田毅、金田安史、松本真、松本荘吉、坂谷光則: 結核に対する新しいワクチン開発と抗原特異的キラーT細胞の分化・誘導 日本免疫学会総会 2002



## 分担研究課題 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 資料

### 11) 肉芽腫形成組織における抗酸菌遺伝子の分布

研究協力者 中田太志 国立療養所山陽病院 病院長  
(共同研究者 竹山博泰 国立療養所山陽病院 副院長)

#### 研究要旨

レーザー・キャプチャー・マイクロダイセクション(LCM)システムと DNA マイクロアレイを用いて、肉芽腫形成組織切片より抗酸菌の遺伝子検出と多剤耐性結核菌の遺伝子変異検出法を構築した。ホルマリンやキシレンの影響で病理組織標本の結核菌検出が低率となると報告してきたが、非結核性抗酸菌感染においても同様なことが起っていることが判明した。また、*M.tuberculosis* が検出された症例で肉芽腫瘍形成組織の違う部位をマイクロダイセクションにより採取し、遺伝子検出を行なうと乾酪壊死部に結核菌遺伝子の集積が認められた。

#### A. 研究目的

我々は、定量 PCR 法を用いた病理組織標本での結核菌遺伝子検出方法を確立し、肉芽腫形成組織において結核菌の定量的存在を明らかにしてきた。一方、肉芽腫が形成される原因には、他の抗酸菌の関与も指摘されている。ホルマリン固定組織標本では、結核菌と同様に非結核性抗酸菌も抗酸菌染色の染色性が低下し、菌体が確認されることが少ないことが推測される。今回、レーザー・キャプチャー・マイクロダイセクション (LCM) システムと DNA マイクロアレイを用いて、肉芽腫形成組織切片より抗酸菌の遺伝子検出と多剤耐性結核菌の遺伝子変異検出法を構築した。また、呼吸器ネットワークを利用して該当症例の収集を行った。

#### B. 研究方法

マイクロダイセクション 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感染を疑われた 10 症例（呼吸器ネットワークより提出された）の薄切標本を用いた。レーザーキャプチャーシステム LM200 (ARCTURUS: USA) に倒立型落射蛍光装置 IX-FLA と CCD カメラ M-3204C (OLYMPUS: JAPAN) を取り付け、抗酸菌が検出可能な装置に改良した。抗酸菌染色は蛍光色素を用いて実施した。キャプチャー・キャップへの組織転写の効率良くするため染色後アルコール、キシレンで水分を除去し標本とした。以上のシステムと染色標本を観察しながら組織区分（乾酪壊死巣部、類上皮細胞部、線維芽細胞部）の一部をレーザーで切り取り、キャプチャーキャップに張り付いた組織を取り出した。採取組織に proteinase K 溶液（1 mg/ml）を

42°C、72 時間作用させ核酸抽出を行った。抗酸菌 PCR は Light cycler(Roche) を使用し以下のように実施した。16S リボゾーム RNA をコードしている抗酸菌特異的配列の 150base を PCR の増幅領域として primer を設定。微細ガラス・ビーズをいれた TE buffer マイクロチューブを超音波 lyser を用いて抗酸菌菌体を破碎させ、遺伝子を抽出させた。これ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。DNA マイクロアレイ PCR 法で増幅させた抗酸菌遺伝子を、マイクロアレイ上の結核菌遺伝子および非結核性抗酸菌遺伝子 (30 菌種) と薬剤耐性遺伝子を hybridization させ、反応スポットの位置で抗酸菌遺伝子の存在を確認した。反応系は TMB をペルオキシダーゼで発色させる ABC 法を用いた。

### C. 研究結果

肉芽腫形成が認められた病理組織標本で抗酸菌を認めなかった症例から抗酸菌遺伝子を検出した。M.chromogenicum 1 例、M.avium 4 例、M.tuberculosis 5 例の遺伝子を検出し、耐性遺伝子 rpoB の変異も検出した。また、M.tuberculosis が検出された症例で肉芽腫形成組織の違う部位をマイクロダイセクションにより採取し、遺伝子検出を行なうと乾酪壊死部に結核菌遺伝子の集積が認められた。

### D. 考察

抗酸菌染色の染色理論は詳しくは解明されていないが菌体表面に存在するある種のミコール酸と染色色素 (フクシン、オーラミン、ローダミン) の結合と酸による脱色抵抗性による色素の残存が基礎理論と考えられている。また、抗酸菌属以外の属 (Rodcoccus, Corrynebacterium, Actinomyces) でもわずかに抗酸性を示すことはよく知られていることである。組織を固定するホルマリンやパラフィン・ブロックを作製する際に使用するキシロンの影響で結核菌の染色作用物質であるミコール酸の流出が一部の菌体に起こり、これらの染色性 (0.02%) が病理組織診断における結核菌検出の低率の原因と報告してきたが、非結核性抗酸菌感染においても同様なことが起こっていることが判明した。マイクロダイセクションによる部位別の結核菌遺伝子の検出により肉芽腫の乾酪壊死部に結核菌遺伝子の検出が多く認められた。このことは、結核菌の分布は組織切片の全体に均一に分布しておらず組織区分での偏在が観察された。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

Fukunaga H et al: Sensitivity of acid-fast staining for Mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed Tissue. Am J Respir Crit Care Med 45: 833-840, 2002

## 2. 学会発表

福永 肇、竹山 博泰：マイクロダイセクション法と DNA マイクロアレイを用いた肉芽腫形成組織における抗酸菌遺伝子の検出. 第 78 回日本結核病学会総会；2003.4.24

## 分担研究課題 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 資料

### 12) 多剤耐性結核に対する標準治療方式の確立

研究協力者 阿久津弘 国立療養所愛媛病院 病院長  
(共同研究者 西村一孝 国立療養所愛媛病院 副院長)  
(共同研究者 阿部聖裕 国立療養所愛媛病院)

#### 研究要旨

肺結核、および結核病棟の問題点を明らかにするために、四国の国立病院、療養所の4施設の現状を検討した。活動性肺結核の患者の病床占拠率は約20—80%と施設によりばらつきがあった。その中で、多剤耐性結核患者は5～10%で、昨年と比べて差はなかった。入院患者の在院日数は各施設とも3ヵ月を下回っており在院日数は短縮されてきていた。診断・治療に関しては入院管理により適切に行われていたと考えられたが、入院期間の短縮化を阻む要因の1つとして高齢者結核患者の問題が重要であることが各施設の共通の認識、悩みであった。

A. 研究目的：再興感染症として肺結核が近年注目されているが、患者の高齢化、集団感染、多剤耐性結核の治療、入院期間の短縮化、病床運営の悩みなど問題点は多い。今回私達は、前回と同様に呼吸器ネットワークを利用して、四国の国立病院、療養所4施設の現状、問題点を明らかにした。

#### B. 研究方法：

第3回四国呼吸器ネットワーク会議を開催し、四国呼吸器ネットワークに属する国立高知病院、国立療養所東徳島病院、国立療養所高松病院、および国立療養所愛媛病院の4施設の現状、問題点をまとめた。それぞれの施設からの医師、看護師、薬剤師、検査技師などの出席に加え、診療専門官も出席して行われた。平成14年11月現在の入院状況、多剤耐性結核患者数、病床の利用状況、各施設での入院短縮化の取り組み、DOTSの実施状況などを検討した。

#### C. 結果：

平成14年11月の状況で、活動性肺結核病床数は192床であった。その中で、の活動性肺結核の病床に入院していた患者は135例で病床占拠率は約70%であった(昨年と同様)。全体で多剤耐性結核患者数は8例で昨年(10例)に比べて増加はなかった。また入院患者135例で活動性肺結核としての入院はその中で約73%であり、非結核性抗酸菌症が12%、