

分担研究課題 多剤耐性結核に対する新しい治療方式の開発に関する研究 資料 (7)

多剤耐性結核菌の発生メカニズムに関する研究

研究協力者 福永 肇 山口大学医学部生殖・発達・感染医科学講座

研究要旨

多剤耐性結核菌の発生を内因性に起因したメカニズムによって誘導されるのではないかとの仮説に基づき試験管モデルを構築し、多剤耐性結核菌を誘導することに成功した。多剤耐性誘導は2ステップの変異が必要であることがわかった。第一にINHとの長期培養によるINH耐性誘導による変異。第二ステップとしてINH耐性誘導株にSM添加し長期培養することによりRFP耐性が誘導されることが判明した。これらのことより多剤耐性結核菌は抗結核薬の投与により人為的に作り出される可能性があることが示唆された

A. 研究目的

再興感染症としての結核は、多剤耐性結核菌の蔓延や院内感染としての発生などの要因で注目されている。なかでも多剤耐性菌である場合には、適切な治療がなく早期に隔離することが必要である。しかし、多剤耐性結核菌の発生にはいくつかの不明な点が存在している。一つには、水平感染するような多剤耐性結核菌排菌患者が周囲に存在しないにも関わらず、ある日突然、多剤耐性菌に変化すること。二つ目は、糖尿病などの基礎疾患に結核を併発した患者から検出されることが多く認められることである。このことは、多剤耐性結核菌は、水平感染だけではなく内因性に起因したメカニズムによって発生する可能性を有しているものと考えられる。我々は、肉芽腫中に閉じ込められた結核菌がMIC以下の抗結核薬に接することにより耐性化するという仮説をもとに、試験管モデルを作成し耐性の誘導を試みた。

B. 研究方法

MGIT培地(ベクトン)に混合抗結核薬(SM,INH,REP,EBの2剤から4剤までの組み合わせでの混合液)希釈系列と単剤それぞれの希釈系列を作成した。濃度はそれぞれの薬剤の耐性判定基準値の10000希釈、1000倍希釈、100倍希釈、10倍希釈と耐性判定基準値濃度の5濃度とした。また、試験菌として結核菌基準株H37RVを用いた。接種菌量は最終濃度が 10^5 個/mlとした。

発育の観察はBACTEC 970の装置で行い、発育値は毎日定時に出力し、データ収集は6週間行った。発育してきた結核菌はブロスミック(極東製薬)を用いてMIC測定を実施した。

(倫理面への配慮)

研究対象として結核菌の基準株であるH37RVと分離培養菌であるため、直接的な倫理面の問題は生じてこないと思われる。しかし、患者情報の守秘義務の励行に努めた。

C. 研究結果

INH 含有 MGIT 培地に結核菌を長期間(4週間)培養した結果、耐性に誘導させることができた。INH の耐性判定基準値 $0.1 \mu\text{g/ml}$ の濃度に接触させ発育してきた結核菌の MIC は $64 \mu\text{g/ml}$ 以上になり接触濃度以上の MIC を示す耐性菌を誘導することができた。他の抗結核薬については耐性基準値を超える発育は6週間を経過しても観察することはできなかった。一方、混合薬剤の希釈系列で薄い濃度 ($0.004\sim 0.04 \mu\text{g/ml}$) の 4 剤 (SM,INH,REP,EB)混合の長期培養でも INH 耐性 (MIC $>64 \mu\text{g/ml}$) を誘導することができた。

単剤でも混合希釈培養でも REP 耐性菌は誘導することはできなかったため、試験菌を誘導 INH 耐性株に変えて同様に希釈系列による長期培養を実施した。その結果、誘導 INH 耐性株に薄い濃度 ($0.01\sim 0.1 \mu\text{g/ml}$) の 3 剤混合 (SM,INH,RFP) で RFP 耐性の多剤耐性結核菌を誘導できた。

同様に2剤 (SM,RFP)でも薄い濃度 ($0.04\sim 0.05 \mu\text{g/ml}$)の長期培養で多剤耐性結核菌を誘導できた。

D. 考察

肉芽腫組織で耐性菌が作りだされるのではないかという仮説を試験管モデルで実験をおこなった。試験管モデルとして採用した MGIT 培地は密閉された試験管であるが結核菌の発育をモニタリングすることができ、尚且つ液体培地であるため薬剤濃度を自由に設定できるため仮説で想定している肉芽腫に閉じ込められた結核菌と薬剤の関係を観察する方法としてすぐれているモデルと考え採用した。このモデルを用いて行った長期に渡る薬剤との接触で結核菌は INH 耐性を獲得することが判明した。臨床分離株においてもほとんどすべての菌株において認められるため普遍的な現象と考えることができる。INH はミコール酸合成阻害による細胞壁合成阻害剤といわれている薬剤であるが、一般の抗生物質の細胞壁合成阻害剤であるペニシリン系薬剤やセフェム系薬剤でも、発育を阻止していた状態から再度発育を認める現象が報告されている。これは薬剤の分解による力化の低下が原因と言われているが、抗結核薬では、この現象は報告されていない。耐性誘導に成功した MGIT 培地(6週培養)の液体成分を $0.22 \mu\text{m}$ のろ過フィルターで結核菌を除去した後、ろ過液に再度、感受性結核菌を接種させると結核菌の発育を阻止することからも分解による再増殖でないと考えられる。INH 耐性化の説明は結核菌遺伝子の突然変異により10の8乗個に1個の頻度で耐性菌を生じるといわれている耐性化と考えられるが、実験系において MGIT 試験管の中の酸素濃度低下に起因する *katG* の変異による耐性誘導の可能性もあるが遺伝子解析が進

行中のため断定はできない。しかし、肉芽腫に封じ込められた結核菌という前提では酸素濃度の低下はある程度想定できるものである。

また、REP の耐性化も同様に突然変異による耐性化であり、一定頻度で突然変異による耐性菌が発生しているものと想定していたが、INH 耐性株からでない RFP 耐性菌に変異しないことが判明した。この変異の条件として SM も誘導に必要という結果になった。INH 耐性菌と SM により RFP の耐性遺伝子である *rpoB* に変異を引き起こすメカニズムは不明であるが、系列の違う薬剤が他の薬剤耐性菌を誘導する現象は今までに報告がない。

今回の実験モデルにより2段階で多剤耐性菌に変異することが証明された。INH 単独治療中に肉芽腫内部で INH 耐性菌が発生しているのかは不明であるが INH 耐性菌から多剤耐性菌に変わりやすいという臨床報告もあり、我々の実験データを支持するものである。しかし、耐性菌の出現を抑えるために3剤もしくは4剤での治療を推奨している結核の治療から考えると INH 単剤による外来治療は耐性菌を誘導する可能性があると考えられ治療法の見直しが望まれる。今回は遺伝子変異について解析していないためデータとしては不完全である。今後遺伝子解析も実施する予定であるため、合わせてデータを公表できるものと考えている。

E. 結論

多剤耐性結核菌の発生を内因性に起因したメカニズムによって誘導されるのではないかとの仮説に基づき試験管モデルを構築し、多剤耐性結核菌を誘導することに成功した。多剤耐性誘導は INH との長期培養による INH 耐性誘導による変異、続いて INH 耐性誘導株に SM 添加し長期培養することにより RFP 耐性が誘導されるという二段階で起こる。

G. 研究発表

なし

H. H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究課題 多剤耐性結核に対する新しい治療方式の開発に関する研究 資料(8)

政策医療呼吸器ネットワークを利用した多剤耐性結核治療における新しい治療薬やクラリスロマイシン、ニューキノロン薬の併用の治療効果の解析—

研究協力者：岩永 知秋 国立病院機構福岡東医療センター副院長

研究参加施設および共同研究者：NHO 福岡東医療センター 田尾義昭、岩永知秋、宮崎正之、高田昇平、岡林寛、NHO 大牟田病院 北原義也、永田忍彦、加治木 章 NHO 福岡病院 庄司俊輔、NHO 東佐賀病院 小江俊行、NHO 長崎神経医療センター 川上健司、NHO 熊本南病院 東賢次、NHO 再春荘病院 本田泉、NHO 西別府病院 杉崎勝教、瀧川 修一、NHO 宮崎東病院 伊井敏彦、NHO 南九州病院 川畑政治、NHO 沖縄病院 宮城 茂

A. 研究目的

本邦における結核の統計において、これまで減少していた新規結核登録患者数および罹患率が増加に転じたなかで、高齢者や免疫低下患者に伴う結核の発病、集団感染や院内感染の増加など、緊急的に対応をはからなければならない課題が出現し、厚生省は平成11年6月「結核緊急事態宣言」を宣言することに至った。

宣言の中で重点的課題の一つに多剤耐性結核対策の充実が掲げられており、これに基づき九州管内の国立療養所での共同研究により多剤耐性結核の疫学や予後および治療法を平成10年から平成16年にわたって検討してきた。今回は、平成17年の多剤耐性結核症例の臨床的検討を行った。

B. 研究方法

1. 平成17年に多剤耐性例として入院治療を開始した結核患者の中で、再発例について前治療薬の結核剤の投与期間、服薬コンプライアンス、当時の薬剤感受性検査、合併症の有無と今回の入院時での薬剤感受性の変化について調べる。
2. 平成17年に治療を開始した多剤耐性例の治療経過と予後について調べる。
3. 通常の抗結核剤に薬剤耐性を示す排菌症例については、分離菌株のニューキノロン剤を含む抗結核剤(INH、RFP、EB、SM、KM、EVM、PZA、TH、PAS、CS、LVFX、CPFX、SPFX)に対する薬剤感受性濃度の測定を行い治療に反映させる。

(倫理面への配慮)

診療録にもとづく調査であり、患者本人が一般に特定されないように調査票には、性別と生年および施設内認識番号しか表示しないように配慮した。

C. 研究結果

平成 17 年、各施設で治療を開始された新規の多剤耐性結核症例を以下の表に表す。

施設名	平成16年
NHO福岡東医療センター	1
NHO大牟田病院	0
NHO福岡病院	0
NHO東佐賀病院	0
NHO長崎神経医療センター	0
NHO熊本南病院	1
NHO再春荘病院	0
NHO西別府病院	0
NHO宮崎東病院	2
NHO南九州病院	0
NHO沖 縄病院	1
計	5

対象症例の性別は、男性 3 例、女性 2 例であった。生年は大正生まれが 1 名、昭和生まれが 4 名（1～9 年生が 1 名、10～19 年生が 2 名、30～39 年生が 1 名）であった。

対象症例の病態は 5 例全例が肺結核であった。

肺結核の病型は全例両側性で、Ⅱ型 3 例、Ⅲ型 2 例であった。広がりは 1 が 1 例、2 が 4 例であった。排菌量は培養のみ陽性が 1 例、ガフキー 2 号 1 例、ガフキー 3 号 1 例、ガフキー 7 号 2 例であった。合併症は合併症なしが 1 例、合併症ありが 4 例で、糖尿病、慢性関節リウマチ、塵肺、心不全・腎障害が各 1 例であった。

発病時から INH と RFP の初回耐性は 2 例あった。その他 3 症例の多剤耐性化の原因として、その他不完全な（合併症による減薬など）治療やコンプライアンス不良の断続的治療が考えられた。

症例から分離された結核菌の感受性検査において INH・RFP の 2 剤耐性を示したのは 1 例で、INH・RFP・EB・SM の 4 剤耐性 1 例、INH・RFP・EB・PZA の 4 剤耐性 1 例、INH・RFP・EB・SM・KM・EVM・TH の 7 剤耐性 1 例、INH・RFP・EB・SM・KM・EVM・PZA・

TH の 8 剤耐性 1 例であった。

液体培地によるニューキノロン剤に対する薬剤感受性試験は 2 症例にのみ施行されていた。

治療内容では、手術例が 1 例で、ひき続き 4 剤治療がなされていた。その他、使用薬剤は、INH 単剤使用が 1 例、感受性判明前 INH・RFP・EB の 3 剤治療で 2.5 ヶ月で他病死 1 例、CS・TH・SM・LVFX の 4 剤使用は 1 例、内服拒否 1 例、経過中ニューキノロン剤は 5 例中 2 例に使用されていた。

最低 3 ヶ月以上治療された 3 例での治療効果を調べた。排菌停止例は、左肺全摘除術を受けた 1 例とⅢ型で 4 剤治療のなされた 1 例にみられた。単剤治療および内服拒否例で不変が 1 例ずつであった。これらが慢性排菌になるのか今後の経過観察が必要である。他病死 1 例は 2.5 ヶ月で心不全・腎不全死であった。

D. 考察

九州管内の国立病院機構（旧国立療養所）で平成 17 年に治療開始された多剤耐性例を調査したが、今回症例は男性 3 例、女性 2 例で、40 歳代から 90 歳代までにわたってみられた。再発例を含め過去に結核の治療歴を有す例が 5 例中 3 例あることは多剤耐性結核の成立に、過去の治療が結果的に不適切であった事が密接に関連していると推測された。また 4 例において易感染をきたす合併症である糖尿病や塵肺、慢性関節リウマチ、心腎障害を有しており、耐性の成立に合併症の関与が推測された。

症例から分離された菌の感受性結果は 2 剤耐性 1 例、4 剤耐性 2 例、7 剤耐性 1 例、8 剤耐性 1 例あり多剤耐性の治療の難渋さが推測された。短期間の排菌の停止が得られているのは手術症例および空洞のない 4 剤治療例であった。

治療内容の問題点として第 1 は、合併症や服薬コンプライアンスの不良により十分な治療が出来なくなること。第 2 は、ニューキノロン薬の感受性検査が本年の症例提出施設では 1 施設のみの採用で、ニューキノロン薬の適性使用を確率するためにも、すべての施設で行えるようにすることであった。

E. 結論

「結核緊急事態宣言」の中で多剤耐性結核対策の充実が重点的課題の一つに取り上げられている事により、九州地区において結核病棟を有する旧国立療養所 11 施設において平成 10 年より 16 年末までに治療を開始した多剤耐性結核 59 症例の症例検討を行ってきた。平成 17 年は、登録症例は 5 例であった。

対象症例は男性 3 例、女性 2 例、40 歳代から 90 歳代までみられた。合併症も糖尿病、塵肺、慢性関節リウマチ、心腎障害など抵抗減弱因子を有する例がみられた。耐性症例の病態の 5 例全例が肺結核であり、結核病学会分類のⅡ型の空洞例が 3 例で、喀痰塗沫陽性は 4 例であった。INH・RFP のみに耐性がみられたのは 1 例のみで、多数の耐性を獲得していた。短期的に排菌の停止が得られたのは手術症例および空洞のない 4 剤治療例であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

田尾義昭、二宮清、宮崎正之、岩永知秋、伊井敏彦、大津達也、瀧川修一、川上健司、川畑政治、東賢次：多剤耐性結核の臨床的検討—1998～2003 年の九州地区における入院症例の検討—。結核 81:1-5, 2006

2. 学会発表

- (1) 田尾義昭、宮崎正之、二宮清、高田昇平、肝付兼仁、川崎雅之、吉川順子、梶山智子、川波敏則、岩永知秋。原信之：イソニアジドによる肝機能障害と NAT2 遺伝子多型の関連。第 45 回日本呼吸器病学会総会（平成 17 年 4 月 14 日、千葉）
- (2) 田尾義昭、二宮清、宮崎正之、岩永知秋、伊井敏彦、大津達也、瀧川修一、川上健司、川畑政治、東賢次：多剤耐性結核の臨床的検討。—1998-2003 年の九州地区における入院症例の検討—。第 55 回日本呼吸器病学会九州地方会総会（平成 17 年 11 月 10 日、熊本）

H. H. 知的財産権の出願・登録状況

厚生労働科学研究補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

薬剤耐性結核の迅速診断法の開発に関する研究

分担研究者 切替 照雄 国立国際医療センター研究所 感染症制御研究部長

研究要旨

結核の薬剤耐性機構は比較的限定したゲノム上の遺伝子内変異に基づくことが知られており、これらの変異の有無を同定することで耐性菌の診断が可能である。本研究では、抗結核薬であるリファンピシン、イソニアジド、ピラジナミド、エタンブトール、アミノグリコシド、フルオロキノロンの耐性に関与する遺伝子、*rpoB*、*katG* と *inhA*、*pncA*、*embB*、*rpsL* と *rrs*、*gyrA* の薬剤耐性に関与する領域すべてを一回の操作で PCR 増幅しその塩基配列を決定するダイレクトシーケンス法を開発し、臨床分離株を用いて検討した。また、上記ダイレクトシーケンス法で用いた耐性遺伝子 PCR 増幅法とその知見に基づいて、ピラジナミド耐性遺伝子検出のための簡便法(ラインプローブ法)をニプロ株式会社と共同で開発した。本年度は、臨床分離株 297 株を用いての試作品の検討を推進した。

A. 研究目的

多剤耐性結核菌の出現は、結核医療の中でも最も深刻な問題の一つである。多剤耐性結核は患者の治療を遅延させるばかりでなく、院内感染の原因ともなり、迅速な診断法の開発と新たな作用機序を持つ抗結核薬の開発が急務となっている。本研究では、多剤耐性結核患者の迅速診断を可能にする方法の開発を行なう。幸い結核菌は全ゲノム配列が明らかにされており、またその薬剤耐性機構は比較的限定した遺伝子の変異であることが知られている。従って、多剤耐性遺伝子の迅速診断法の開発は大変有望な方法であると期待される。当センター病院とも共同で臨床応用を進め、本診断法の有用性を実証し、多剤耐性結核菌の蔓延防止に寄与することを目的とした。具体的には、ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性結核の迅速診断法の開発を行なう。さらに、より簡便な迅速診断法の開発を推進

し、ダイレクトシーケンス法で用いた耐性遺伝子 PCR 増幅法とその知見に基づき、ピラジナミド耐性遺伝子内変異検出のための簡便法(ラインプローブ法)をニプロ株式会社と共同で開発する。本年度はその試作品の検討を推進してきた。B. 研究方法
国立国際医療センターなど医療施設から分離された結核菌または患者喀痰を前処理し DNA 抽出した。菌体由来 DNA の抽出には CTAB 法を、喀痰由来には ChelexTM 100 resin を使用した。また、ラインプローブ法の感度検査には、喀痰直接煮沸法による抽出 DNA を使用した。

<ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性結核迅速診断法>

(1-1)PCR : 8 本の PCR チューブを用いて、抽出した結核菌ゲノム DNA を鋳型とし、耐性遺伝子に特異な 8 組のプライマーペアを用いて PCR による薬剤耐性遺伝子を全て同

じコンディションで増幅した。プライマーは、RIF 耐性遺伝子 (*rpoB*)、INH 耐性遺伝子 (*katG* 及び *mab-inhA*)、EMB 耐性遺伝子 (*embB*)、PZA 耐性遺伝子 (*pncA*)、AGs 耐性遺伝子 (*rpsL* 及び *rrs*)、FQs 耐性遺伝子 (*gyrA*) を増幅するように設計した。PCR 産物はそれぞれ MicroSpin™ Columns (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて精製した。

(1-2)塩基配列の決定：シークエンス反応は、BigDye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を用いたダイターミネーター法にて行った。シークエンス反応用プレミックスに、それぞれ 1µl の PCR 産物、塩基配列決定用に設計したプライマーを加え反応させた後、未反応 Dye 及び過剰プライマーの除去後、96 ウエルプレートに入れ、16 本キャピラリー式 ABI 3100 オートシークエンサーを用いて泳動した。(1-3)塩基配列の解析：塩基配列の解析及び編集は ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer software を用い、これらを既知の薬剤感受性 *M.tuberculosis* H37Rv 株の塩基配列と比較することにより、変異の有無を解析した。

<ラインプローブ法によるピラジナミド耐性遺伝子内変異検出のための簡便法>

本法は、ビオチン加プライマーを用いて結核菌より抽出・PCR 増幅されたピラジナミド耐性関連遺伝子 *pncA* を、数種類のプローブを固相化したストリップにハイブリダイズさせ、遺伝子内の変異を検出する方法である。酵素反応により *pncA* 遺伝子内の各部位が結合したプローブのみ発色する。(2-1)プローブの設計と固相化：結核菌の *pncA* 遺伝子の全長をカバーし、結核菌 DNA と結合する為に必要なハイブリ温度がほぼ一定になるように、数種類のプローブを設

計した。これをストリップに固相化した。(2-2)ハイブリダイゼーション：上記プローブが固定されているストリップにビオチン化増幅 DNA を結合させた。

(2-3)変異の検出：アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンを結合させ、これに基質を加え発色させた。

(倫理面への配慮)

研究対象は患者情報と完全に切り離された臨床分離株を使用する。

C. 研究結果

ダイレクトシークエンス法により、主要抗結核剤 4 剤を含む 7 剤の耐性遺伝子の変異の有無を解析した (図 1)。その結果を表 1 に示す。同時に従来薬剤感受性試験も実施した。調べた臨床分離株 138 株中 83 株は全ての薬剤に感受性であったが、これらの株の中にも、アミノ酸置換を伴う変異を有する株が存在したが、その変異の多くが、既知の多型であった。INH 耐性株 38 株中 34 株 (89.5%)、RIF 耐性 28 株中 28 株 (100%)、PZA 耐性株 17 株中全て (100%)、EB 耐性株 18 株中 15 株 (83.3%)、SM 耐性株 30 中 18 株 (60.0%)、LVFX 耐性株 3 株中全てに耐性遺伝子に変異が認められた。ダイレクトシークエンス法の最も重要な発見である PCR 増幅法と、ハイブリダイゼーション (ラインプローブ法) と組み合わせたピラジナミド耐性に関する迅速診断法を開発し、その有効性を検討した。臨床分離株 297 株中、サイレント変異を含め 45 株がピラジナミド耐性遺伝子 *pncA* 内に変異を有していた。内、6 株が新規の変異を保有していた。*pncA* 遺伝子内変異保有株については、ピラジナミダーゼ活性の有無を検査した結果、アミノ酸置換を伴う変異を有する株全てが、ピラジナミダーゼ活性を消失

していた。変異保有株を含む 200 株を用いてラインインプローブ法を実施した結果、全ての変異が検出可能であった。

D. 考察

本研究では、以下の抗結核薬の耐性に関する遺伝子、*rpoB* (RIF)、*katG* と *inhA* (INH)、*pncA* (PZA)、*embB* (EMB)、*rpsL* と *rrs* (AGs)、及び *gyrA* (FQs) の耐性に関する領域すべてを一回の操作で PCR 増幅しその塩基配列を決定するダイレクトシークエンス法を開発し、臨床分離株 138 株を用いた検討を実施した。その結果、一回の操作で主要抗結核剤 4 剤を含む 7 剤の耐性遺伝子全てを PCR 増幅することが可能となり、しかも 6.5 時間で広範な耐性関連領域の塩基配列を速やかに増幅し、解析することが出来るようになった。患者喀痰からの直接診断も可能とであった。しかし、本方法の短所として、必要なシークエンサーが高価であり、検査室への導入が難しいことがあげられる。そこで、本技術の最も重要な発見である耐性遺伝子 PCR 増幅法と、ハイブリダイゼーション（ラインプローブ法）と組み合わせたピラジナミド耐性に関する迅速診断法を開発した。その変異を迅速に検出する為のストリップ模式図を図 2 に示した。結果、本ラインインプローブ法にて全ての *pncA* 遺伝子内変異保有株が変異検出可能であった。ダイレクトシークエンス法による変異解析の結果、*pncA* 遺伝子内にもサイレント変異が存在することが明らかとなったので、このサイレント変異を補正する為のプローブを設計した結果、アミノ酸置換を伴う変異を有する株のみを検出することが可能となった。これらのアミノ酸置換を伴う変異を有する株は、PZA 耐性を示唆するピラジナミダーゼ活性の消失が認められた。臨床分離株を用いた開発製品の実施例のいくつかを示した。(図 3)。

E. 結論

本研究では、ダイレクトシークエンス法による薬剤耐性結核の迅速診断法の開発を推進すると共に、これらの結果を発展させ、ピラジナミド耐性遺伝子検出のための簡便法（ラインプローブ法）をニプロ株式会社と共同で開発した。本年度は試作品の検討を推進した。

F. 健康危機情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Obata S, Zwolska Z, Toyota E, Kudo K, Nakamura A, Sawai T, Kuratsuji T, Kirikae T: Association of *rpoB* mutations with rifampicin resistance in *Mycobacterium avium*. Int. J. Antimicrob Agent., 27:32-39. 2006
- (2) Huang Q, Kirikae F, Kirikae T, Pepe A, Amin A, Respicio L, Slayden RA, Tonge PJ, and Ojima I: Targeting FtsZ for Anti-tuberculosis Drug Discovery: Noncytotoxic Taxanes as Novel Antituberculosis Agents, J. Med. Chem., 49: 463 – 466. 2006.
- (3) Sekiguchi J, Fujino T, Araake M, Toyota E, Kudo K, Saruta K, Yoshikura H, Kuratsuji T, Kirikae T: Emergence of rifampicin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in tuberculosis wards. J. Infect Chemother., (in press).

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

図 1. ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性結核の迅速診断法

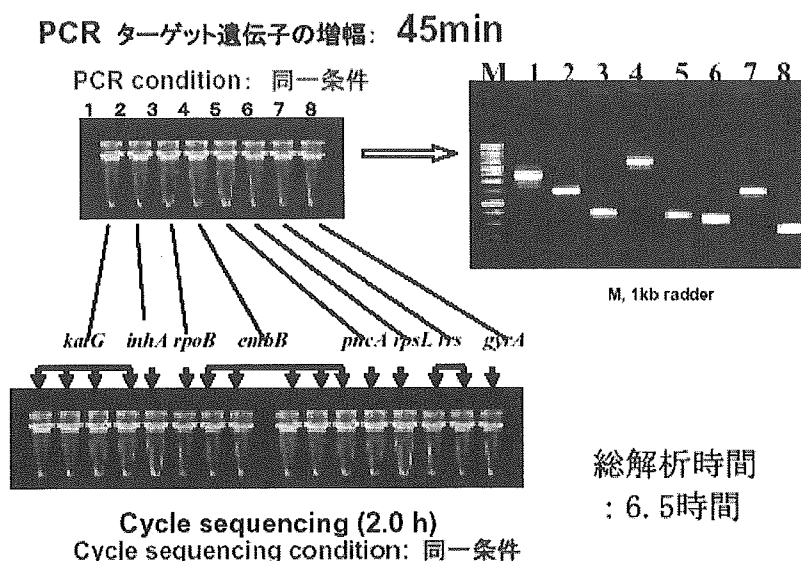


表 1. ダイレクトシーケンスによる薬剤耐性遺伝子診断の結果

Correlation between DNA sequence-based results with phenotypic results in 138 clinical isolates of *M. tuberculosis*

Drug	Result of the DNA sequence-based method	No. of isolates ^a		Sensitivity (%)	Specificity (%)	Likelihood ratio	
		Resistance	Susceptible			Positive	Negative
RIF ^b	Mutation positive	28	0	100	100	Infinite	0.00
	Mutation negative	0	110				
INH ^c	Mutation positive	34	3	89.5	97.0	29.8	9.22
	Mutation negative	4	97				
EMB ^d	Mutation positive	15	7	83.3	94.2	14.3	5.65
	Mutation negative	3	113				
PZA	Mutation positive	17	0	100	100	Infinite	0.00
	Mutation negative	0	121				
SM	Mutation positive	18	0	60.0	100	Infinite	2.5
	Mutation negative	12	108				
OFLX ^e	Mutation positive	3	0	100	100	Infinite	0.00
	Mutation negative	0	135				

^a Drug susceptibility for anti-tuberculosis agents except for PZA was determined by the agar proportion method according to NCCLS' guideline, and that for PZA was determined by BACTECTM MGITTM 960 SIRE.

^b Isolate with a mutation at S450L was interpreted as a susceptible isolate, because S450L mutation was not located in the 81-bp core region in which a mutation is known to be responsible for 96% or more of RFP-resistant *M. tuberculosis* isolates.

^c Isolate with a mutation at R463L was interpreted as susceptible isolate, because these isolates are known not to be associated phenotypically with INH resistance.

^d Isolate with a mutation at E378A was interpreted as a susceptible isolate, because these isolates are known not to be associated phenotypically with EMB resistance.

^e Isolate with a mutation at E21Q and S95T was interpreted as a susceptible isolate, because these isolates are known not to be associated phenotypically with FQs resistance.

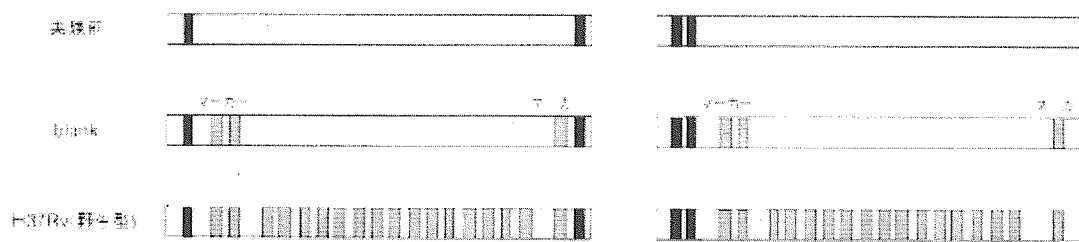


図2. 結核菌の薬剤耐性関連変異迅速検出ストリップ模式図(NIPRO 社との共同開発製品)

PZA 耐性菌の *pncA* 遺伝子内変異部位を検出するプローブを、2枚のストリップに配置。野生型全てのストリップが発色するが耐性菌が保有する遺伝子内変異箇所は発色しない。

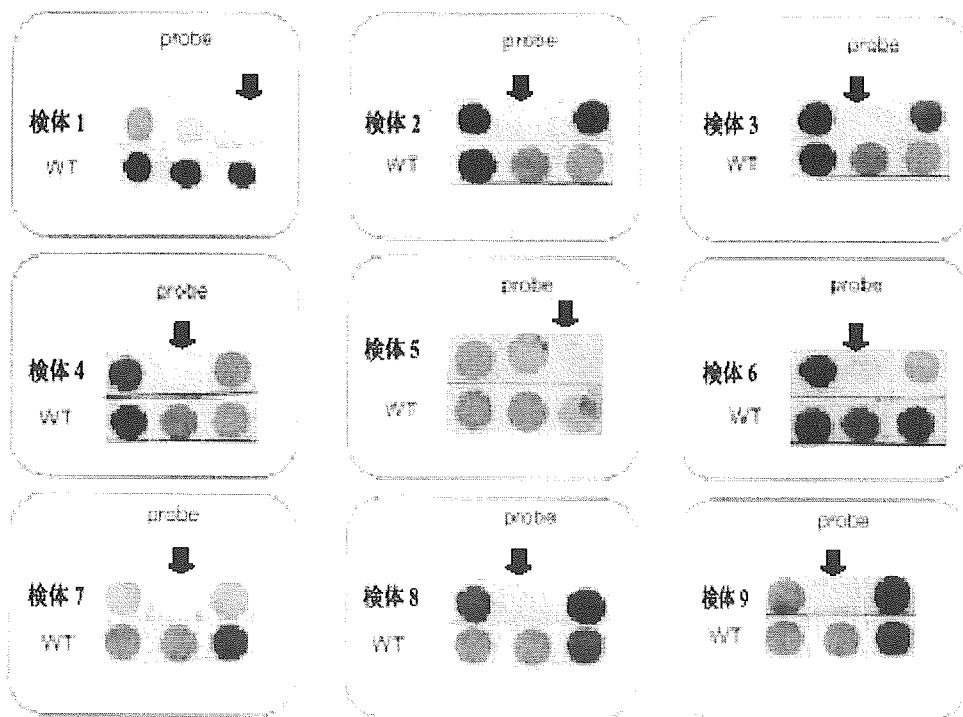


図3. 結核菌の薬剤耐性関連変異迅速検出キット(NIPRO 社との共同開発製品)の実施例
矢印で示す PZA 耐性菌の *pncA* 遺伝子の変異部位に相当するプローブは発色しない。

**厚生労働科学研究補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書**

薬剤耐性結核の治療成績とそれに影響する要因の研究

分担研究者 川城 丈夫 国立病院機構埼玉東病院院長

研究要旨

全国の療研傘下施設に受診した多剤耐性肺結核患者を対象として患者の治療予後とそれに関連する要因について観察した。中 48 施設が傘下、263 人について調査が行われた。性比は女 1 に対して男 2.3、平均年齢 57.3 歳（レンジ 18～89 歳）であった。合併症をもつ者の頻度は 52.9%に達し、とくに糖尿病（25.9%）が目立った。最終観察時の治療状況は 18.1%で治療指示終了していたが、71.1%は治療中であった。持続排菌の状態になっていた者が 31.9%おり、治療成績の厳しいことを示している。

1. 研究目的

日本全国の医療施設における多剤耐性結核の治療の実態、治療成績およびそれに影響する要因について実態を把握することを目的とする。

センター(6)、和歌山*(4)、松江*(1)、川崎医科大学付属(3)、南岡山医療センター*(4)、広島医療センター(8)、東徳島*(5)、北九州市立門司(1)、福岡東*(7)、久留米大学付属病院(1)、大牟田*(3)、東佐賀*(1)、長崎神経医療センター(6)、熊本南*(9)、西別府*(7)、聖心会高岡(1)、南九州*(2)

B. 研究方法

全国療研傘下の結核診療施設の参加の下に、平成 16 年 10 月 1 日から平成 17 年 9 月 30 日までに受診した全ての多剤耐性肺結核症を対象として別紙調査票を参加の施設に送付し、臨床諸事項を調査した。参加したのは以下の 48 施設である(カッコ内は症例数、*は国立病院機構病院)。

札幌南病院*(5)、函館*(1)、茨城東*(3)、西群馬*(4)、東埼玉*(9)、千葉東*(9)、都立府中(11)、東京*(22)、複十字(57)、南横浜(9)、神奈川県立循環器呼吸器病センター(2)、神奈川*(17)、西新潟中央*(3)、富山*(3)、金沢市立(2)、天竜*(1)、愛知がんセンター愛知病院(1)、東名古屋*(17)、公立陶生(3)、済生会明和(2)、結核予防会大阪病院(6)、西神戸医療センター(2)、兵庫中央*(5)、奈良医療

表 1.都道府県別に見た調査済み例数

都道府県	例数	都道府県	例数
北海道	6	兵庫	7
茨城	3	奈良	6
群馬	4	和歌山	4
埼玉	9	島根	7
千葉	9	岡山	7
東京	90	広島	8
神奈川	28	徳島	5
新潟	3	福岡	12
富山	3	佐賀	1
石川	2	長崎	6
静岡	1	熊本	9
愛知	21	大分	7
三重	2	鹿児島	3
大阪	6		

C. 研究結果

総数 263 例について調査が完了した。性別は男：女で 2.9:1、平均年齢は 57.3 歳（レンジ 18～89 歳）であった。

263 例中 124 例（47.1%）で合併症はみられなかったが、139 例（52.9%）は何らかの合併症を有していた。特に多かったのは糖尿病で 25.9%（68 例）にみられた。

調査の時点で 263 例中 74 例（18.1%）は治療終了したが、187 例（71.1%）は治療中であった。不明 2 例であった。治療成績は表 2 のとおりであった。

表 2. 治療成績

菌陰性化 6 ヶ月未満	33(12.5%)
同 6 ヶ月～12 ヶ月	25(9.5%)
同 12 ヶ月～24 ヶ月	54(20.5%)
同 24 ヶ月以上	61(23.2%)
持続排菌	84(31.9%)
その他	5(1.9%)
不明	1(0.4%)

この表から知られるように、菌陰性化に時間がかかること、陰性化そのものが得られない例が多いこと、が重大な問題である。

D. 考察

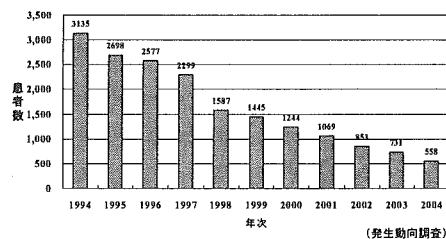
日本にいる多剤耐性結核患者熨す宇野正確な把握は常時されているわけではない。療研が行った 2002 年次点の入院時薬剤耐性に関する全国調査によれば、初回治療患者の 0.7%、再治療患者の 9.8%（ただし、これには既往の治療を完了した後に再発した患者の他、治療失敗のためあらたな方式で治療をやり直す例 16%が含まれる）なので、これを 2004 年新登録患者実数に適用すれば（初回治療 15,338 人、再治療 1,383 人）、年々新たに発生する多剤耐性は 243 人（初回 107 人、再治療 136 人）となる。これに

「治療中からの獲得耐性例」が幾分加わるものとする必要がある。今回の調査及びこれまでに行われている臨床疫学的研究によれば、これらの患者の 70%は初回・再治療で最初の 1 年間で菌陰性化するので、残りの 80 人程度の患者がいわゆる「慢性排菌例」として次年度以降に持ち越されることになる。これらの患者の平均排菌期間（死亡やその後の治療の成功で菌陰性化が得られることによって排菌がなくなるまでの期間）を仮に 2 年とすると、慢性排菌例は常時 160 人程度存在することになる。（期間有病者数は 160+80=240 人）

一方、発生動向調査によって「2 年以上登録で過去 1 年以内に排菌のあった者」を便宜的に「慢性排菌」とみなすと、そのような者は 2004 年末時点で 558 人あった。これには不十分な化学療法の時代の遺残が相当数含まれており、そのために上の推定値よりも過剰になっている部分があると考えられる。

今回の調査対象となった 263 人は新規発生例と慢性例の混成であるが、全国における多剤耐性患者のかなりの割合を把握しているといえる。調査票の回収が遅れたため、現時点で十分な解析が済んでいないが、完成すれば全国の状況をよく反映する成績が得られると思われる。

図. 慢性排菌例の推移
2年以上登録1年以内菌陽性肺結核症例



上の発生動向調査からの年末時点での慢性排菌例（有病者）数の推移を見ると図の

ようになる。好ましいことにこの数は順調に毎年 200~300 人分づつ下がっており、これからも不完全な化学療法の時代の遺残がいま淘汰されつつある一方、新たに加わる分も少なく成りつつあることを示唆している。もしこのまま我々がいままでの治療サービスを悪くしないで続けることが出来ればこのような慢性排菌をさらに少なくすることができるという見通しももてる。

ただし問題もある。まずこれらお患者の半数が外来治療を受けているという問題である。多剤耐性結核という手ごわい感染源が外来治療中、つまり一般社会の中にあるということで、感染源としての問題があるということである。法的な感染源隔離という問題と、その方達へ強制と同時に人間的な生活環境を考慮した収容施設を用意しなければならない、という課題である。

次に治療の向上平成の課題。多剤耐性はまず発生予防が重要で、そのために「日本版 DOTS」を強化する必要がある。そして多剤耐性に陥った患者への治療としての「日本版 DOTS-Plus」での対応を考えなければならない。その入り口は信頼性の高い薬剤感受性検査である。日本ではこれも早期の制度的確立が急がれる。

治療薬剤の問題も重要である。その中で日本には「未承認薬」の問題が残されている。ニューキノロン剤など世界的には奨励されている薬剤が日本では公に認められていない。外科的治療法も多剤耐性家赫々においてはまだ役割が残っている。これを実施する能力のある病院は少なくなっているが、必要な患者がこれにアクセスできるよう、行政が専門家と組んで効果的な紹介制度を作るべきであろう。しかしこれは外科治療だけでなく、かg 悪霊法一般についてもいえることである。国立療養所の時代以来、呼吸器（結核を含む）政策医療ネットワークが唱えられてきたが、残念ながら患

者レベルでこれが効果的に機能しているとは言い難い。

最後の課題は、多剤耐性結核に有効な薬の開発がある。これもいくつか有望な薬物が臨床治験に入っており、早ければ 2010 年から実用段階にはいるという見通しもある。日本もそのような世界的な動きに積極的に参加し、欧米や途上国でやった治療実験だけに頼るのではなくて、我々自身も治療実験に協力をして実用化を促進する努力も必要であろう。

E. 結論

今回の調査では全国から 263 例の多剤耐性肺結核が報告された。報告例の 31.9% が持続排菌例であった。詳細な報告は結核病学会にて発表の予定である。全国調査であったが、今回調査出来なかった県については今後、以前に入院時薬剤感受性に関する研究に参加した施設などに呼びかけ、症例を集める予定である。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

平成17年度 療研研究課題

多剤耐性肺結核有病者の調査票

調査の対象は平成16年10月1日から平成17年9月30日までに貴院に受診した全ての多剤耐性患者について記載してください。上記期間以前に治療開始された例も含まれます。

1. I.D. _____ (記入しないでください)
2. 貴施設の名称 (_____)
3. 委員氏名 (_____)
4. 主治医氏名 (_____)
5. 患者氏名: (イニシャルで可: 名前・性の順で) (____・____)
6. 患者生年月日: 大正・昭和・平成 ____年 ____月 ____日生 (満 ____歳)
7. 性: 1.男性 2.女性
8. 国籍: 1.日本 2.外国 (国名 _____)
9. 貴院での病歴番号: (_____)
10. 入院/外来初診年月日: 昭和・平成 ____年 ____月 ____日 (最終入院の/外来初診日)
11. 退院年月日: 平成 ____年 ____月 ____日
12. 治療開始時の職業: 01.接客業など 02.看護師,保健師 03.医師 04.その他の医療職 05.教員,保母 06.小中学生など学童 07.高校生以上の生徒学生など 08.その他常用勤労者 09.その他の臨時雇い,日雇い 10.その他の自営業,自由業 11.家事従事者 12.乳幼児 13.無職,その他 14.不明
13. 最終観察時の職業: 01.接客業など 02.看護師,保健師 03.医師 04.その他の医療職 05.教員,保母 06.小中学生など学童 07.高校生以上の生徒学生など 08.その他常用勤労者 09.その他の臨時雇い,日雇い 10.その他の自営業,自由業 11.家事従事者 12.乳幼児 13.無職,その他 14.不明
14. 合併症の有無: 1.なし 2.糖尿病 3.循環器疾患 (具体的に _____) 4. 脳血管障害およびその後遺症 5.他の呼吸器疾患 (具体的に _____) 6.中枢神経疾患 (具体的に _____) 7.精神疾患 (具体的に _____) 8.悪性疾患 (具体的に _____) 9.消化器疾患 (具体的に _____) 10.その他 (具体的に _____)
15. 肺結核発病時期: 昭和・平成 ____年 ____月 西暦 ____年 ____月 (いずれか一方のみで可)
16. 多剤耐性結核と診断された時期: 昭和・平成 ____年 ____月
17. 多剤耐性結核の病類: 1.治療歴ある多剤耐性 (治療失敗による) 2. 治療歴あるが再感染疑い 3. 初回多剤耐性 4.不明

18. 今回の治療を開始した年月日: 昭和・平成____年____月____日 (治療中に転入した例では紹介元での開始時を記入してください)
19. 転入例の紹介元医療機関名: (_____)病院
(_____)都道府県)
20. 今回の治療回数: _____回 (定義:治療と治療の期間が2カ月以上あるものは2回の治療とする)
21. 最終観察時: 平成____年____月____日 (平成16年10月1日～平成17年9月30日)
22. 最終観察時の受療状況: 1.入院治療 2.外来治療 3.経過観察中(治療なし)
4.受診していない
23. 最終観察時の治療状況: 1.治療中 2.治療終了後の経過観察中(菌陰性となり終了) 3.治療中止後の経過観察(菌陰性化不能のため治療中止した) 4.治療終了後観察終了 5.治療自己中断後不明 6.転医 7.死亡 8.その他(具体的に_____)
24. 治療終了例の終了年月日: 平成____年____月____日
25. 転医例の転医先医療機関名: (_____)病院
(_____)都道府県)
26. 死亡例の死因:1.結核関連死 2.結核に基づく慢性呼吸不全 3.他病死 4.事故死 5.死因不明
27. 多剤耐性結核に対して使用した薬剤名: 1.INH 2.RFP 3.PZA 4.EB
5.SM 6.KM 7.TH 8.PAS 9.CS 10.EVM 11.LVFX 12.OFLX 13.CPFX
14.GTFX 15.CAM
16.その他(具体的に_____)(貴院で治療した全例について記載してください)
- 28.最終排菌年月日: 平成____年____月____日
- 29.最終排菌の薬剤感受性試験の結果:1.INH(感受性・耐性・不明) 2.RFP(感受性・耐性・不明) 3.PZA(感受性・耐性・不明) 4.EB(感受性・耐性・不明) 5.SM(感受性・耐性・不明) 6.KM(感受性・耐性・不明) 7.TH(感受性・耐性・不明) 8.PAS(感受性・耐性・不明) 9.CS(感受性・耐性・不明) 10.EVM(感受性・耐性・不明) 10.LVFX(感受性・耐性・不明) 11.その他(薬剤名_____) (感受性・耐性・不明)
- 30.最終観察時の排菌状況:1.菌陰性化6カ月未満 2.菌陰性化6カ月以上1年未満 3.菌陰性化後1年以上2年未満 4.菌陰性化後2年以上 5.持続排菌 6.その他(具体的に_____)
- 31.最終観察時に排菌あり例の菌陰性化の見込み:1.あり 2.なし 3.何ともいえない
(治癒は非空洞例では菌陰性が12カ月以上、空洞例では24カ月以上とする)
- 32.多剤耐性結核になってから外科手術の有無: 1.なし 2.あり
- 33.外科手術ありについて: 複数回あるものについては全て記入してください。
①術式(_____)年月日(昭和・平成____年____月____日)

- ②術式 () 年月日 (昭和・平成 年 月 日)
- ③術式 () 年月日 (昭和・平成 年 月 日)
- 34.胸部X線学会病型 (今回の治療開始時) : 1. I 2. II 3 3. II 2 4. II 1 5. III 3
6. III 2 7. III 1 8. その他 (P1のみ)
35. 胸部X線学会病型 (最終観察日) : 1. I 2. II 3 3. II 2 4. II 1 5. III 3 6.
III 2 7. III 1 8. その他
(P1のみ)
- 36.慢性呼吸不全の有無 (治療開始時) : 1.なし 2.あり (酸素吸入なし) 3.あり
(酸素吸入あり)
37. 慢性呼吸不全の有無 (最終観察日) : 1.なし 2.あり (酸素吸入なし) 3.あり
(酸素吸入あり)
- 38.持続排菌例で治療なしで入院していない例について: 1.家族と同居 2.独居
3.施設入所中
- 39.同居者のある例の同居者: 1.配偶者 2.子供 3.配偶者と子供 4.その他 (具
体的に)
- 40.患者家族発病の有無: 1.なし 2.あり (配偶者・子供____人・孫____人・親
人・その他____人 (具体的に)

厚生労働科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

結核菌検査とくに薬剤感受性検査の信頼性に関する研究

分担研究者 御手洗聡 (財)結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター
細菌検査科長

研究要旨

抗酸菌検査は菌の性状の特殊性から、その検査に特有の困難がともなう。本研究班では最も精度の維持が困難と思われる薬剤感受性試験を中心として、抗酸菌検査の精度保証活動の実践性と有用性を評価する目的で研究を行った。

抗結核薬に対する薬剤感受性試験外部精度評価では、2003 年度に実施したアンケート調査結果から薬剤感受性試験実施件数の多い病院検査室および検査センター上位計 67 施設に対してパネルテストを実施した。平均として Isoniazid (INH)および Rifampicin (RFP)の結果は感度・特異度共に 95%を越えており、世界保健機関の示している基準に合うものであった。この方法によるパネルテストは 2003 年度から継続して実施しているが、精度の低い施設の検出や、検査精度改善に有用であることが示された。しかし、被験菌 20 株を用いた現行の方法では実施施設での負担が大きく、参加対象施設の拡大に支障となる可能性が高い。今後は効率を維持しながら省力化を図る必要がある。

抗酸菌塗抹検査の精度保証では、ポリアクリルアミドを基質とした人工喀痰を用いたパネルテスト用標本が実践的に利用可能であり、外部精度評価に有効であることが示された。同標本は外観、顕微鏡下での観察性、標本の均一性、作製上の安全性で優れており、大規模なコントロールサーベイにも利用可能と考えられる。今後は、スライド作製の効率化と集菌法への対応、培養・同定検査にも応用可能な生菌保持力のある媒体の開発が必要となる。クロスチェックによる外部精度評価は、実践可能であることは示されたが、労力や人員確保の面で困難があり、さらには個人情報保護の観点から検体の収集が不可能となる場合もある。外部精度評価の方法としてパネルテストの実践性が高いことが示された。

結核菌検査指針 2000 の精度管理項目の実践性を評価するため、病院検査室 7 施設で調査を行った。各施設で実施している検査内容に従って、精度管理内容を実施したかどうかをチェックしたところ、実施率は 11.8～100%と様々であった。試薬等の管理は高率になされているものの、機器の温度管理等が徹底されていない施設が多かった。またバイオセーフティ上重要と思われる安全キャビネットの管理が不十分であり、徹底されるべきものと考えられた。

薬剤感受性試験における液体培地迅速法 (BACTEC MGIT 960) と小川培地標準法の INH 基準濃度判定の差違が指摘されていたため、2002 年度結核療法研究協議会の薬剤耐性調査にて全国より収集された結核菌について、療研共同研究施設の許可を受けた上で 1,122 株に関して BACTEC MGIT 960 および小川標準法による比較を行ったところ、小川を標準とした場合、MGIT の最終的な感度は 100%、特異度は 97.1%、判定一致率は 97.3%となった。これは薬剤感受性試験法として良好な成績であり、臨床上問題ないものと考えられた。

米国での抗酸菌検査精度保証システムについて CDC および New York 州保健局 Wadsworth center にて調査を行った。米国では精度保証は保険とリンクした認証システムとして確立しており、実施上のレファレンス機能も整備されている。活動に必要な費用も受益者負担を原則に徴収・確保されており、本邦でも応用可能な点が多くあるものと思われた。

A. 研究目的

結核をはじめとする抗酸菌検査について、現在国内では殆ど精度保証活動が行われていない。抗酸菌検査の精度は結核対策に直結しており、世界的には精度保証活動が強く進められている。品質保証はあらゆる分野での必須事項であり、抗酸菌検査の分野でもこれを確立することが必要である。

本研究では 2004 年度に主要な検査センターおよび病院検査室に対する結核菌薬剤感受性試験の外部精度評価を実施し、病院検査室に検査精度の低い施設が多いことを明らかにした。

今年度は、薬剤感受性試験外部精度評価の継続・拡大実施と共に、昨年度困難であった塗抹検査外部精度評価材料の開発と評価を行う事とした。また、薬剤感受性試験における問題点の一つである液体培地 (BACTEC MGIT 960) と固体培地による感受性試験の結果の差異について継続して研究を行った。さらに、一般病院検査室における内部精度管理の実践性の検討を行い、精度保証先進国である米国のシステムについても調査を行った。

B. 研究方法

以下 1～5 までの 5 つの課題を設定して研究を行った。

1. 抗結核薬薬剤感受性試験外部精度評価

【目的】結核菌薬剤感受性試験を実施している検査センター及び病院検査室を対象として、再現性や一致率を含む感受性試験の状況を評価・改善する事を目的とする。

【方法】

参加施設：2003 年度に実施した抗酸菌検査に関するアンケート調査をもとに、結核菌薬剤感受性試験を実施している検査センター及び病院検査室

のうち上位各 60 施設を対象として参加を依頼した。基本的には参加は任意であり、参加を諾とした施設のみに試験用の検体を送付した。検体の準備、送付及びデータの取りまとめは結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科にて行った。

送付検体 (結核菌株)：結核菌 20 株を輸送用小川培地 (8ml ポリスチレン製透明チューブに 1% 小川培地を焼成したもの) 上に発育した状態で送付した。今回送付した菌株は Supranational Reference Laboratory Network (SRLN) で毎年実施されている薬剤感受性試験精度管理に使用された菌株のうち、基本的に高い施設間一致が得られているものを選定して、10 組 20 株を組み合わせて使用した。これらの株については、既に SRLN にて評価が定まっており、その最終的な評価を基準として感受性・耐性を判定した。結果として今回の試験パネルにおけるそれぞれの薬剤に対する耐性菌の割合は、INH に関して 70%、RFP、SM について 60%、EB について 50% となった。それぞれの施設に配付される検体には一つずつ異なる番号を割り振り、施設間で相互に結果が照会できないようにしている当然ながら菌株の中には薬剤耐性株が含まれているため、これらの菌株の取り扱いには十分なる注意を要することを明言し、薬剤感受性試験に安全キャビネットを使用していることを事前に確認している。

試験薬剤：検査薬剤には、安定した結果が得られることを考慮して Isoniazid (INH)、Rifampicin (RFP)、Streptomycin (SM) および Ethambutol (EB) を指定した。

感受性試験方法：基本的に各施設で日常実施している方法により感受性試験を行った。菌株とともに送付した調査用紙に感受性試験結果、菌液調製法を記載し、コーディネーター (結核研究所・御