

添付1) 抗酸菌症合併AIDS症例調査票 (各症例見開き A3)

2003-2006年に診断された症例について、各症例に一部ずつ記載してください

記載者のお名前		記載日時	年 月 日
施設名		患者イニシャル	
患者生年月日	年 月 日	性 別	男 女
国籍・出生国	国籍：日本 日本以外 () 不明 出生国：日本 日本以外 不明		
診断名	肺結核 粟粒 (播種型) 結核		
	肺外結核 (部位)		
	非結核性抗酸菌症 (菌名)		
肺 播種型 肺外 ()			
抗酸菌症と HIV 感染の診断時期		(抗酸菌症診断前・同時期・抗酸菌症診断後)	
H I V 感染推定時期		年 月	
H I V 診断時期		年 月	
H I V 感染経路	性感染 (異性間、同性間) 血液製剤 静脈注射 母子 その他 () 不明		
抗酸菌症発病時期	年 月		
抗酸菌症診断日	年 月 日 外来/入院/不明		
診断施設	貴院/他院 (施設名を記載する必要はありません)		
今回の抗酸菌症発症時の HIV 医療施設	貴院/他院 (施設名を記載する必要はありません)		
結核感染源	なし あり () 不明		
抗酸菌症診断の契機	0 HIV 感染に対する定期検査による診断 0 有症状受診に基づく診断		
今回の抗酸菌症診断時のツベルクリン反応	0 実施 (結果：) 0 未実施		
結核既往歴	なし あり (年)		
上記ありの場合治療	なし あり (内容)		
H I V 感染判明後の結核化学予防	ツベルクリン検査歴：実施 (結果：) / 未実施 / 不明 化学予防歴：なし / あり (処方： 期間) / 不明		
H I V 感染判明後の MAC 予防歴	なし / あり (処方： 期間 年 月 - 年 月) / 不明		
抗酸菌症発病時菌量	塗抹 号 培養 陽性 陰性 他 ()		
結核菌のみ薬剤耐性	なし あり (薬剤名)		
胸部所見 (結核病学会分類)	r l b I II III 1 2 3 pl H		
結核感染源	なし あり () 不明		
免疫抑制因子合併症	糖尿病 ステロイド投与 悪性疾患 腎不全 透析 胃切		

(抗酸菌症発病時)	その他 ()		
抗酸菌症発病時 CD4数		抗酸菌症発病時 HIV RNA量	copy
抗酸菌症治療薬			
抗酸菌症治療副作用	なし、あり (内容)		
抗酸菌診断時の抗酸菌症以外の日和見感染症合併とその治療	PCP 真菌 サイトメガロ クリプトコッカス		
抗エイズウイルス治療 (抗酸菌症発病時)	0 有り (開始時期: 年 月 発症時の処方:) 0 無し		
抗エイズウイルス薬治療 (抗酸菌症発病後)	0 発症前からのそのまま継続 0 発症後処方薬変更し継続 (処方:) 0 発症前投与されていたが中止 (中止日: 理由: 副作用、その他 ()) 0 抗酸菌発症後に開始 (開始日:) (処方:)		
抗酸菌症治療中のその他の治療	エイズ関係の治療・予防内服 日和見感染症治療: 無し・不明・有り () 日和見感染症予防: 無し・不明・有り () その他の治療 (他の合併症等): 必要あるか?		
抗酸菌治療中の副作用	0 無し 0 有り (以下の項目を選んでください) 肝障害 皮疹 神経障害 その他 () 抗酸菌治療によるものか AIDS 関係治療によるものか判断できる場合はその旨記載してください (理論的にわかるものでなければ、この文章は意味が無いので削除)		
結核治療中の結核によると考えられる免疫再構築症候群	無し 有り (出現時期: 年 月、主要症状・兆候:) 対処		
抗酸菌症予後	0 治癒: 終了日: 年 月 日) 0 中断: 中断日 年 月 日、理由: 脱落・副作用・その他 () 0 死亡: 死亡日 年 月 日、死因: 結核、その他 () 0 治療継続中 0 その他 (転床で予後不明等) その他、特筆すべき経過がありましたら記載をお願いします:		
AIDS予後	もっとも最近の CD4 (値: 、検査日 年 月) もっとも最近のウイルス量 (値: copy、検査日 年 月)		
最近の状況	生存・死亡 (時期)		

添付2) 化学予防に関する(国エイズ拠点病院を対象)

エイズ症例の化学予防について貴施設での方針・実施状況について以下のアンケートにご記入をお願いいたします。

- 1 喀痰菌陽性結核患者と接触があったと考えられるエイズ症例には化学予防を行いますか？
(複数回答可能です。番号に丸をつけてください)
 - ① いかなる場合にも行わない(次の 2 に理由をお書きください)。
 - ② 接触が濃厚(同居者、友人、同僚など)であった場合のみ行う。
 - ③ 接触した結核患者が喀痰塗抹陽性の場合に行う。
 - ④ 結核の耐性検査が判明していれば行う。
 - ⑤ CD4 が 200 以下のエイズ患者であれば行う。
 - ⑥ その他(具体的にお書きください)

- 2 化学予防をおこなわない理由をお書きください。

- 3 HIV 陽性判明時、結核発病のリスクを評価しますか？
 - ① 評価しない(質問4へお願いいたします)
 - ② 評価する(質問5へお願いいたします)

- 4 評価しない理由を具体的にお書きください。

- 5 評価をどうやって行いますか？
 - ① 問診
 - ② 胸部単純エックス線写真
 - ③ 胸部 CT 写真
 - ④ ツベルクリン検査
 - ⑤ 血清検査
 - ⑥ その他(具体的にお書きください)

ご協力、ありがとうございました。

全国 HIV 感染合併抗酸菌症の調査へのご協力をお願い

財団法人結核予防会結核研究所は、国内外の結核対策ために研究・研修・対策支援を行っております。本邦では HIV 感染者の報告数は増加を続けており、また結核の現状も先進諸国のなかでは罹患率が高い状況にあります。また結核・エイズ両疾患が蔓延している地域出身者が結核に占める割合も都市部を中心として増加している状況にあります。世界的に HIV 感染合併結核は大きな問題で、アフリカのある地域では結核患者の 70% が HIV 感染合併であるという状況にあります。本邦においても上記のような状況から、エイズ合併結核症例の発生及び治療状況の把握をおこなうことが今後の本邦の結核及びエイズ対策で重要と考えられます。

このような状況を鑑み、HIV 感染合併結核の状況把握のための調査研究を実施することにいたしました。今回、2003-2006 年に貴施設で治療されましたエイズ合併抗酸菌症の症例についての調査票によるアンケート調査を実施させていただきたく、ご連絡申し上げました。今回の調査では、抗酸菌症患者様のエイズ治療併用状況、予後・副作用等について焦点をあてた内容になっております。本調査は、エイズ拠点病院と結核病床を有する全ての病院、284 施設を対象に実施いたします。

HIV 感染という疾患の性質上、複数施設で同一患者様の診療を行う場合があります。重複集計を避けるために生年月日、性別、イニシャルの記載をお願いいたしますが、当研究機関は、個々の患者様を特定することは出来ず、また送付いただいた患者票の部外への持ち出しや患者様を特定できるデータの発表はいたしません。疫学研究では個人情報保護や研究の倫理性が求められますが、本調査研究は、厚生労働省疫学研究所の指針に従っており、財団法人結核予防会結核研究所の倫理委員会の承認を受けております。本調査は後ろ向き研究で患者様からのインフォームドコンセントは得ませんが、疫学研究指針に基づき倫理委員会が倫理的な問題は無いと判断しております。

本研究の目的が、エイズ・結核合併症例の臨床像と治療・予後であり、医療施設・個人を特定できない形の集計結果について、ご参加いただきました施設から、分析についてのご要望がございましたら、個人が特定できない形のものであれば、集計し皆様にお知らせいたします。

また、結核罹患率は減少傾向にあるものの、免疫学的弱者に集中する傾向があり、HIV 感染者への結核早期発見・化学予防について貴施設の方針や実施状況についてのアンケートにもご協力をお願いいたします。(これはエイズ拠点病院のみに絞る)

なお、本研究とともに、HIV 感染合併結核頻度の調査を実施しております。こちらは、無作為抽出により選ばれた施設に、新たに結核と診断された患者様の HIV 感染合併状況を把握することを目的としております。貴施設が対称になっている場合は、別途ご連絡申し上げますので、ご協力をお願いいたします。

送付いただく締めは 2007 年**月末までとさせていただきます。なお内容等について疑問点などありましたら、下記連絡先までお問い合わせください。

日々の臨床でご多忙を極めていらっしゃることは重々承知しておりますが、本調査の意義をご理解の受けご協力いただけますようお願い申し上げます。

財団法人結核予防会結核研究所

所長 石川信克

研究構成員

連絡先：お問い合わせは以下にお願いします

結核研究所 HIV 結核プロジェクト主任 山田紀男

email: tbhiv@jata.or.jp (本調査用の email アドレスです)

添付4)

第3 インフォームド・コンセント等

7 研究対象者からインフォームド・コンセントを受ける手続等

研究対象者からインフォームド・コンセントを受ける手続等は、原則として次に定めるところによる。ただし、疫学研究の方法及び内容、研究対象者の事情その他の理由により、これによることができない場合には、倫理審査委員会の承認を得て、研究機関の長の許可を受けたときに限り、必要な範囲で、研究対象者からインフォームド・コンセントを受ける手続を簡略化すること若しくは免除すること又は他の適切なインフォームド・コンセント等の方法を選択することができる。

<インフォームド・コンセントの簡略化等に関する細則>

倫理審査委員会は、インフォームド・コンセント等の方法について、簡略化若しくは免除を行い、又は原則と異なる方法によることを認めるときは、当該疫学研究が次のすべての要件を満たすよう留意すること。

- ① 当該疫学研究が、研究対象者に対して最小限の危険を超える危険を含まないこと。
- ② 当該方法によることが、研究対象者の不利益とならないこと。
- ③ 当該方法によらなければ、實際上、当該疫学研究を実施できず、又は当該疫学研究の価値を著しく損ねること。
- ④ 適切な場合には、常に、次のいずれかの措置が講じられること。
 - ア 研究対象者が含まれる集団に対し、資料の収集・利用の目的及び内容を、その方法も含めて広報すること。
 - イ できるだけ早い時期に、研究対象者に事後的説明(集団に対するものも可)を与えること。
 - ウ 長期間にわたって継続的に資料が収集又は利用される場合には、社会に、その実情を、資料の収集又は利用の目的及び方法も含めて広報し、社会へ周知される努力を払うこと。
- ⑤ 当該疫学研究が社会的に重要性が高いと認められるものであること。

(2) 観察研究を行う場合

② 人体から採取された試料を用いない場合

イ 既存資料等のみを用いる観察研究の場合

研究対象者からインフォームド・コンセントを受けることを必ずしも要しない。この場合において、研究者等は、当該研究の目的を含む研究の実施についての情報を公開しなければならない。

<インフォームド・コンセントを受けない場合において、当該研究の実施について公開すべき事項に関する細則>

インフォームド・コンセントを受けない場合に、研究の実施について情報公開する場合は、以下の事項が含まれていること。なお、これらの事項については、研究計画書に記載すること。

- ・ 当該研究の意義、目的、方法
- ・ 研究機関名
- ・ 保有する個人情報に関して、第4の9(10)③、(11)①、(12)①又は(13)の①若しくは②の規定による求めに応じる手続(16)の規定により手数料の額を定めたときは、その手数料の額を含む)

- ・ 問い合わせ、苦情等の窓口の連絡先に関する情報
- ・ あらかじめ開示できない事項がある場合は当該事項及びその理由

第4 個人情報の保護等

11 他の機関等の資料の利用

(1) 研究実施に当たっての措置

研究責任者は、所属機関外の者から既存資料等の提供を受けて研究を実施しようとするときは、提供を受ける資料の内容及び提供を受ける必要性を研究計画書に記載して倫理審査委員会の承認を得て、研究機関の長の許可を受けなければならない。

(2) 既存資料等の提供に当たっての措置

既存資料等の提供を行う者は、所属機関外の者に研究に用いるための資料を提供する場合には、資料提供時までに研究対象者から資料の提供に係る同意を受け、及び当該同意に関する記録を作成することを原則とする。ただし、当該同意を受けることができない場合には、次のいずれかに該当するときに限り、資料を所属機関外の者に提供することができる。

① 当該資料が匿名化されていること。

② 当該資料が匿名化されていない場合において、次のア及びイの要件を満たしていることについて倫理審査委員会の承認を得て、所属機関の長の許可を受けていること。

ア 当該疫学研究の実施及び資料の提供についての情報を公開していること。

イ 研究対象者となる者が研究対象者となることを拒否できるようにすること。

③ 社会的に重要性の高い疫学研究に用いるために人の健康に関わる情報が提供される場合において、当該疫学研究の方法及び内容、当該情報の内容その他の理由により①及び②によることができないときには、必要な範囲で他の適切な措置を講じることについて、倫理審査委員会の承認を得て、所属機関の長の許可を受けていること。

12 研究結果を公表するときの措置

研究者等は、研究の結果を公表するときは、個々の研究対象者を特定できないようにしなければならない。

II 分担研究報告

薬剤体制の実態調査

分担研究者 山岸文雄
国立病院機構千葉東病院

研究要旨

結核の薬剤耐性に関連し、結核療法研究協議会（療研）2002年度全国薬剤耐性サーベイランスにおいて収集された多剤耐性菌（MDR-TB）について、二次薬を中心とする Isoniazid (INH) 及び Rifampicin (RFP) 以外の抗結核薬に関する薬剤感受性を調査した。また、2007年度に実施予定の第14回療研全国結核耐性サーベイランスについて実施内容を検討し、プロトコールを作成した。

MDR-TB については、全ての一次抗結核薬（INH, RFP, Streptomycin, Ethambutol, and Pyrazinamide: PZA）に対して耐性を持つ株が 45.5% であり、2種類以上あるいは3種類以上有効な薬剤が存在する株がそれぞれ 78.2% および 63.6% あることが示された。また、PZA の耐性が未治療及び既治療患者群間で有意に異なることも示された。さらには世界保健機関が提唱する Extensively Drug-Resistant Tuberculosis (XDR-TB) も 30.9% (17/55) 存在することも確認された。多剤耐性菌について、現状では化学療法のみでの効果は期待しがたいと思われた。しかしながら INH 1.0 µg/ml に対する感受性株が約 16% 存在し、作用機序の異なる薬剤が3種類以上ある確率も 60% 以上あることから、外科療法等を併用することで良好な結果が得られる確率は比較的高いものと思われた。継続的な情報収集が必要と考えられる。

2007年度に実施予定の結核療法研究協議会による結核菌の薬剤耐性全国サーベイランスのプロトコールを準備し、従来のサンプリング法を改めて代表性の確保を目指した。また、新たに分子疫学的調査の要素を盛り込むことを考慮した。しかしながら、改正新感染症法により、2007年6月1日より結核菌の取り扱いが厳格化され、特に多剤耐性菌の運搬では、従来のような国連容器使用による郵送は事実上不可能と。これが疫学調査に及ぼす影響を今後正確に評価していく必要がある。

A. 研究目的

本邦の結核罹患率は順調に低下し、2006年の報告では 22.2/10 万人となっている。しかし、一部では 20-30 歳代で罹患率が増加するなど、新しい感染によると思われる発病も依然として存在し、それらの年代での薬剤耐性も他の年代に比較して多いことが結核療法研究協議会（療研）調査でも示されている。特に多剤耐性菌は 1997-2002 年の間にも率的に減少しておらず、嚴重な

対策が必要である。

多剤耐性結核は治療困難な疾患であり、有効な薬剤の種類は予後に直接影響するが、基本的に二次抗結核薬に頼らざるを得ない場合が多い。2002年度に実施された結核療法研究協議会（療研）では 60 株の多剤耐性結核菌が分離されたが、この多剤耐性菌について、Isoniazid (INH)・Rifampicin (RFP) 以外の抗結核薬に対する耐性を調査し、多剤耐性結核に対する残された化学療法の可

能性を検討する。

2007 年度に第 14 回となる療研結核菌薬剤耐性全国サーベイランスを実施する予定である。これに先がけて、感染症法改正による結核菌（特に多剤耐性菌）の取り扱いと輸送方法の厳格化を考慮し、さらに他の疫学的研究を勘案して研究プロトコル作成を行う。

B. 研究方法

療研 2002 年度薬剤耐性サーベイランスにて全国より収集された 3,127 株のうち、多剤耐性菌と判定された 60 株について薬剤感受性試験を実施した。使用薬剤は INH、RFP、Streptomycin (STR)、Ethambutol (EMB)、Pyrazinamide (PZA)、Ethionamide (ETH)、Kanamycin (KM)、Cycloserin (CS)、Para-amino salicylic acid (PAS)、Levofloxacin (LVFX)、Sparfloxacin (SPFX)、Ciprofloxacin (CPFX)である。尚、SPFX および CPFX 以外の薬剤に関しては 1%小川培地による比率法を用い、SPFX と CPFX については BrothMIC MTB-I により最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。MIC による耐性の判定には山根らの基準を用い、Indeterminate の場合は便宜的に耐性として頻度を計算した。PZA については MGIT AST を使用した。

薬剤耐性をいくつかのパターンに分類し、代表的な菌株について KM、LVFX、CS、PAS 及び ETH の MIC を測定した。

2007 年度療研薬剤耐性全国サーベイランスについては、現在の疫学研究状況と平成 19 年 6 月 1 日施行予定の改正新感染症法における結核菌取り扱い基準を勘案して研究プロトコルを準備した。

C. 研究結果

1. 療研 2002 年度多剤耐性株の二次抗結核薬に対する感受性

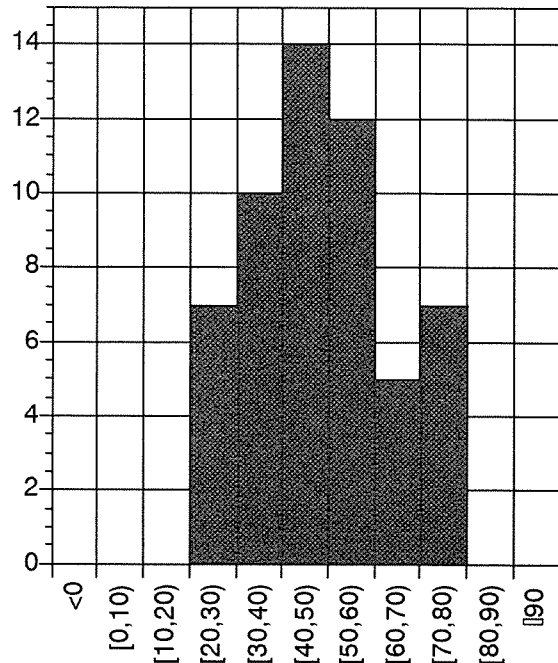


図 1 多剤耐性結核 55 例の年齢分布

最終的に発育不良株 5 株を除いた 55 株について検討が可能であった。今回の対象となった多剤耐性結核菌株は 55 名の患者（男性 39 名、女性 16 名）に由来しており、平均年齢は 48.0 ± 16.2 歳であった。年齢の分布を図 1 に示す。

それぞれの治療歴をみると、未治療患者 16 名および既治療患者 39 名であった。また、菌の地域分布は北海道 1 株、東北 2 株、関東 24 株、中部北陸 2 株、近畿 23 株、中国四国 1 株、九州 2 株となっていた。

それぞれの薬剤に対する耐性頻度は表 1 の様になった。

表1 抗結核薬に対する多剤耐性菌の感受性

薬剤	濃度		感受性	耐性	比率 (%)
	($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	1)			
Isoniazid	0.2	0	55	83.6	
	1.0	9	46	100.0	
Rifampicin	1.0	0	55	72.7	
Streptomycin	10	15	40	80.0	
Ethambutol	2.5	11	44	56.4	
Ethionamide	20	24	31	47.3	
Kanamycin	20	29	26	21.8	
Cycloserine	30	43	12	43.6	
Para-amino salicylic acid	0.5	31	24	45.5	
Levofloxacin	1.0	30	25	45.5	
Sparfloxacin		30	25	45.5	
Cyprofloxacin		30	25	60.0	
Pyrazinamide		22	33	83.6	

INH 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に対する耐性は 100%であるが、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に対する耐性は 83.6%であった。また、全ての一次薬 (INH、RFP、STR、EMB 及び PZA) に耐性を有する割合は 45.5%であった。また、対象とした全ての薬剤に耐性を示した株も 4 株 (7.2%) 認められた。

対象患者をを未治療および既治療患者に分けた場合、各薬剤に対する耐性は表 2 の様になった。全体として、既治療群で耐性率が高い傾向があった。PAS について未治療群と既治療群に耐性率の差がある傾向がみられたが、有意差はなかった。唯一 PZA に関して、未治療群と既治療群で耐性率に有意差が認められた (Fisher's p value=0.0379)。

表2 治療歴別薬剤感受性結果 (%)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	未治療	既治療
Isoniazid	0.2	100.0	100.0
	1.0	93.8	79.5
Rifampicin	1.0	100.0	100.0
Streptomycin	10	68.8	74.4
Ethambutol	2.5	81.3	79.5
Ethionamide	20	43.8	61.5
Kanamycin	20	43.8	48.7
Cycloserine	30	18.8	23.1
Para-amino salicylic acid	0.5	25.0	51.3
Levofloxacin	1.0	37.5	48.7
Sparfloxacin		37.5	48.7
Cyprofloxacin		37.5	48.7
Pyrazinamide		37.5	69.2

INH 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 感受性の場合 INH 有効とし、さらに Fluoroquinolones (LVFX, CFX, SPFX) 及び Aminoglycosides (SM, KM) をそれぞれ別個に有効薬剤として計数すると、対象株に対する有効薬剤数は 0~11 剤となる。有効薬剤数とそれぞれの全数に対する比率を表 3 に示した。

表3 有効薬剤数とその比率

有効薬剤数	菌株数	比率 (%)
0	4	7.3
1	7	12.7
2	3	5.5
3	3	5.5
4	5	9.1
5	6	10.9
6	8	14.5
7	7	12.7
8	7	12.7
9	2	3.6
10	2	3.6
11	1	1.8

次に有効薬剤数を種類別に評価した（表4）。INH 1.0 µg/ml 感受性については有効薬剤としては考えないのが一般的であるが、表3と同様に今回は表中に記した。表に示した平均数は、それぞれの薬剤種別のなかでの有効薬剤の平均数である。例えば Aminoglycosides (SM, KM)では平均 1.3 薬剤が有効となるが、これは2よりも1に近いことから Aminoglycosides が有効であっても1剤のみである場合が多いことを示している。このようにしてみると、一次薬についても1剤は有効薬剤がある場合が多いことがわかる。

表4 種類別の有効薬剤数とその平均数

有効薬剤	株数	比率 (%)	平均
INH 1.0	9	16.4	1.0
Aminoglycosides (KM, SM)	34	61.8	1.3
Fluoroquinolones (LVFX, SPFX, CPFY)	34	61.8	2.6
1st lines (SM, EB, PZA)	30	54.5	1.6
2nd lines (KM, ETH, CS, PAS, FQs)	50	90.9	4.3

薬剤の種類別に考えられる有効薬剤数と、それぞれに対応する菌株数を表5に示した。この表から2種類以上あるいは3種類以上有効な薬剤が存在する株はそれぞれ78.2%および63.6%あることが示された。

表5 種類別にみた有効二次薬剤数と菌株数

有効薬剤（二次薬）	株数	比率 (%)
1種類以上	50	90.9
2種類以上	43	78.2
3種類以上	35	63.6
4種類以上	24	43.6
5種類以上	9	16.4

2006年10月にWHOから提唱された Extensively Drug-Resistant Tuberculosis (XDR-TB) の概念 (MDR+at least one injectable drug resistance (KM, Capreomycin: CPM, Amikacin: AMK) + any fluoroquinolone) に当てはめると、日本では CPM が使用できず、AMK の感受性検査基準がなく、Fluoroquinolone については LVFX のみ感受性検査が実施可能であることから、MDR+KM 耐性+LVFX 耐性がこれに相当すると考えられる。2002年療研データに当てはめると、17株が XDR-TB に相当し、その比率は少なくとも全体に対して 0.5% (17/3122)、MDR 中の 30.9% (17/55) となった。なお、XDR-TB には未治療患者由来の株5株と、既治療患者由来株12株が含まれていた。

この感受性検査結果から、可能な薬剤の組み合わせは以下の様になる。

二剤

- A. AG+FQ KM+LVFX
- B. AG+Others KM+CS
KM+PAS
- C. FQ+Others LVFX+CS LVFX+PAS
- D. Others only CS+PAS
ETH+CS
ETH+PAS

三剤

- A. AG+FQ+Other KM+LVFX+CS
KM+LVFX+PAS
 - B. AG+Others KM+CS+PAS
KM+ETH+CS
 - C. Others only ETH+CS+PAS
- (AG: Aminoglycoside, FQ: Fluoroquinolone)

現時点でこれらの薬剤の組み合わせに感受性を有する多剤耐性株6株について、それぞれの薬剤の MIC を測定している。

表6 各薬剤に対するMIC (μg/ml)

Strain	ETH	KM	CS	PAS	LVFX
A	32	2.0	16	0.13	0.13
B	32	1.0	8.0	0.06	0.25
C	>64	2.0	16	0.06	0.13
D	8.0	2.0	16	0.06	0.5
E	2.0	2.0	16	0.13	4.0
F	64	2.0	16	0.06	0.25

2. 2007 年度療研薬剤耐性全国サーベイ準備

2007 年度療研研究課題「結核菌薬剤耐性に関する研究」については、基本的に以下の様な方法で実施を検討している。

研究母体：

結核療法研究協議会（山岸文雄委員長）

事務取扱：

和田雅子（結核研究所研究主幹・内科科会）
御手洗聡（結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科・細菌科会）

総合目的：日本における結核菌の薬剤耐性について全国レベルで調査を実施する。

個別目的：

研究期間内に分離されたすべての結核菌について INH, RFP, EB, SM の薬剤感受性検査を行う。

既治療、未治療患者における耐性菌の頻度を評価する。

研究参加施設における薬剤感受性検査結果の精度を評価する。

より代表性のあるデータを得る為に居住地あるいは登録保健所の情報より、耐性菌の地理的分布を考察する。

すべての抗酸菌を収集することにより、現状での非結核抗酸菌の分離状況を明らかにする。

特定の分離菌（多剤耐性均等）について RFLP/VNTR 等の分子疫学的検査を行う。

研究期間（暫定）：

基本的に 2007 年 6 月 1 日から 11 月 30 日までの期間に抗酸菌培養陽性となった全ての症例を対象とする。上記の期間で疫学調査上必要な菌株数が確保されない場合には、収集期間の延長を考慮する。

調査個人票：

上記対象患者から分離された結核菌について、薬剤感受性検査の結果が判明次第、個人調査票にその成績と臨床データ等必要事項を記入する。上記の初代分離株、または感受性試験の対照培地に発育した結核菌を結核研究所での検査のために輸送する。非結核抗酸菌について薬剤感受性検査は不要である。

菌株と調査票の送付：

上記の菌株（1 本）と調査個人票を一組にして結核研究所に輸送する。

薬剤感受性検査：

INH, RFP, SM 及び EB について、1%小川培地を用いた標準比率法にて薬剤感受性検査を実施する。なお、検査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実施する。

倫理面への配慮：

参加を拒否する患者についてはこれを強要することはない。また、参加を拒否することによる何らの診療上の不利益を被ることもないよう参加施設には十分な注意を払うよう要請する。

個人調査票から得られる個人情報および各検体から得られる薬剤感受性検査の情報は結核療法研究協議会および結核研究所内の担当者のみがこれを知りうるものとし、情報・検体については結核研究所内で当該目的以外に使用しないものとする。データの発表に際しては個人を特定出来ない様に細心の注意を払うものとする。

※補足-改正感染症法施行にともなう結核菌株保管及び輸送について

2006年12月に改正感染症法が参議院本会議で可決され、成立した。これにより、結核菌は第四種病原体等に分類されることとなり、特に多剤耐性結核菌は第三種病原体に指定されることとなった。三種病原体等を所持又は輸入する者は、所持の開始の日又は輸入の日から七日以内に当該三種病原体等の種類等を厚生労働大臣に届け出なければならない。また、菌株の移動については各都道府県の公安委員会に届け出て、届出を証明する文書の交付を受けなければならない。従って、これまでのように全ての結核菌を一定期間ごとにまとめて国連容器で郵送することは事実上不可能となる。また、多剤耐性菌を保管するだけでも届出が必要になるため、保管せずに滅菌廃棄する施設もあるものと思われる。

現時点で多剤耐性菌を含めて保管する施設がどれだけあるか不明であり、これから政省令として発せられる検査施設基準内容とも関連し、どれだけの抗酸菌株が収集可能かは不明である。主要な病院施設からは菌株を収集できるものと思われるが、その場合でも菌株の輸送については、綿密な輸送計画の下に研究期間の中間及び（あるいは）最終時点でまとめて実施することになると思われる。運搬の問題が解決不能な場合、データ収集対象施設に対して薬剤感受性検査外部精度評価を実施し、ある程度の精度を確保した上で、情報のみ収集することになる可能性もある。

D. 考察

【療研 2002 年度多剤耐性株の二次抗結核薬に対する感受性】

今回の検討により、多剤耐性菌は既にINH・RFP以外の抗結核薬へも耐性である頻度が高く、約46%はHRESZ全てに耐性であった。Fluoroquinolonesについても約半数が耐性であることが示されたが、

Fluoroquinolones耐性はそれぞれの薬剤について同率であり、これは基本的に交叉耐性によると考えられた。また、対象を未治療および既治療群に分けた場合、それぞれの薬剤に対する耐性率はPZAを除いて両群でほぼ同率であった。これは未治療群に既に多くの耐性を有している患者から感染を受けた患者が多かったためと考えられた。PZAについて既治療群と未治療群で耐性率に差が認められた理由としては、PZAが初回短期間しか使用されないため、耐性を獲得しにくい可能性、既治療患者で既にPZAが長期間使われていた可能性、PZA耐性株の感染力が相対的に弱い可能性などが考えられた。

多剤耐性菌について、現状では化学療法のみでの効果は期待しがたいと思われた。しかしながらINH 1.0 μ g/mlに対する感受性株が約16%存在し、作用機序の異なる薬剤が3種類以上ある確率も60%以上あることから、外科療法等を併用することで良好な結果が得られる確率は比較的高いものと思われた。

今回の検体から、いわゆるXDR-TBも検出されている。2006年3月、MMWRに「Emergence of Mycobacterium tuberculosis with Extensive Resistance to Second-Line Drugs - Worldwide, 2000-2004」と題する報告が掲載された。これは全世界に25施設存在するSupra-national Reference Laboratories (SRL: 国際的に認知された結核研究施設・結核予防会結核研究所も世界保健機関(WHO)西太平洋地域のSRLである)に対して耐性結核に関するアンケート調査を実施した結果であり、この中で多剤耐性結核(INHとRFPの両方に耐性を有する結核菌)よりも薬剤耐性の進んだ結核菌の出現が報告された。この結核菌は、多剤耐性に加えて二次抗結核薬に含まれる6つのカテゴリーのうち、3つ以上に耐性を持っている結核菌と定義され、Extensively Drug-Resistant Tuberculosis (XDR-TB: 超多剤耐性結核(多剤耐性であることが基

本条件なので、このように試誤))という名称が与えられた。6つのカテゴリーとは、アミノグリコシド系 (SM, KM, AMK)、ポリペプチド系 (CPM)、フルオロキノロン系、チオアミド系 (ETH, Prothionamide)、サイクロセリン (CS)、パラアミノサリチル酸 (PAS) を指している。このうちフルオロキノロンは日本では抗結核薬として認められておらず、CPM も製造が中止されており、公式には使用できない。

その後、南アフリカ共和国クワズル・ナタール州における研究で、544名の結核患者中211名が多剤耐性結核であり、うち53名は一次抗結核薬全てに耐性で、なおかつ検査を行った4種類の二次抗結核薬のうち2剤以上に耐性(定義は一致しないが、XDR-TBの範疇と考えられる)であった。そのうち44名のHIV陽性が確認されており、53名中52名(98.1%)が平均25日以内に死亡したことが報告されたことから、その脅威が強調されることとなった。

上記の事実を受け、WHOは2006年10月に専門家による会議を開催し、現時点で、多剤耐性に加えてフルオロキノロンいずれかと注射二次薬(Capreomycin, Kanamycin, Amikacin)のいずれかに耐性をもつ結核菌をXDR-TBと定義すると発表した。これは、国際的な多剤耐性結核の治療方針が、フルオロキノロンと注射二次薬を用いるということに鑑みた定義である。あくまで検査結果をもとにした定義であるが、実際に全ての抗結核薬の感受性試験を実施できる施設は結核高まん延地域には少なく、今後は検査施設の拡充や検査精度の確保、検査の迅速化などが求められることになる。

日本では以前から二次抗結核薬を使用しており、XDR-TBに相当する結核菌が既に存在していることは周知の事実である。しかし、上記の定義を日本の現状にそのままあてはめると、いくつかの問題が生じる。まず、先にも述べた通り、フルオロキノロンが抗結核薬として認められていない。しかし現実の臨床の現場では、既にフルオロキ

ノロン剤は耐性結核患者に使用されており、このねじれは解消されるべきである。また、Capreomycinが製造されていないため使用できず、Amikacinの感受性検査法が標準化されていない点も問題となる。

WHOの発表はあったものの、XDR-TBを如何に定義するかは未だ議論のあるところと思われる。例えば、クワズル・ナタールでの症例は一次抗結核薬全てに耐性であり、単に多剤耐性と言う訳ではないので、単純に同等の比較はできない。このことにも関連するが、WHOの定義ではStreptomycinやEthambutolについては何も述べられていないし、全てのフルオロキノロンを同列に扱うのも問題である。さらには一次抗結核薬のひとつであるPZAについても全く触れていない。これらの問題点についてのさらなる検討が必須である。

しかしながら、主要薬剤に耐性となった結核菌が治療困難であることは明白である。従って、今後とも、DOTSによる初回感受性結核の治療の完遂と、他者への感染コントロールを徹底することを通じて、MDRひいてはXDR-TBの発生を予防することが最も重要であることには何らの変化もない。XDR-TBは、これらの対策の強化・継続の重要性を再確認させるものとする。

【2007年度療研薬剤耐性全国サーベイランス準備】

今回、2007年度に実施予定の結核療法研究協議会による結核菌の薬剤耐性全国サーベイランスのプロトコルを準備した。従来療研サーベイは研究協力施設の任意参加によるサンプリングを行っていたため、母集団に対する代表性を確保することが困難であり、学会誌等において統計的な問題点を指摘されることがあった。今回のプロトコルでは、日本の現状を考慮してブロック別のサンプリングを策定し、前以て必要な検体数を設定した上で、その検体数が得られるまで研究を継続することになる。前回2002年度の調査では半年の間に3,127株

の結核菌を収集可能しており、統計的な修正を加えた耐性率と実際の数値との誤差はわずかであったことから、研究（検体収集）期間がこれまでよりも大幅に延長されることはないと思われる。

しかしながら、補足でも触れたように結核予防法の廃止と新感染症法への統合により、2007年6月1日より結核菌の取り扱いにいくつかの困難が予想される。特に多剤耐性菌の運搬では、従来のような国連容器使用による郵送は事実上不可能と思われ、取り扱い基準の厳格化に伴って多剤耐性菌の保管をしない施設が増加した場合、疫学調査上重大な問題となる。今後出される基準を詳しく検討する必要があるが、当局には可能な限り調査に支障がないよう配慮をお願いしたい。

今回の検体収集にあたっては、従来の薬剤耐性調査以外に、結核菌の分子疫学的解析を行うことを含めた。これは結核菌、特に耐性菌の感染ルートの解明や、集団感染時の迅速な対応を目的としたデータベースを作製するためであり、療研調査の価値を増すものと考えられる。

E. 結論

日本における結核菌の薬剤耐性について、2002年度結核療法研究協議会データの解析を行い、その知見を基礎として2007年度の調査のプロトコールを作成した。2002年度

の多剤耐性菌はその多くが二次薬にも耐性を有しているものの、治療の可能性が示唆される症例も多く認められた。さらにWHOの提唱するXDR-TBも認められ、さらなる対策が必要と思われた。薬剤耐性サーベイについては、代表性の確保と分子疫学的解析を主眼としてプロトコールを作成したが、新感染症法での結核菌取り扱い基準によっては実施困難が予想された。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記なし。

<研究協力者>

御手洗聡

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

大友幸二

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

山田博之

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

薬剤体制の実態調査の分子疫学的研究

分担研究者 前田伸司
財団法人結核予防会結核研究所 抗酸菌レファレンスセンター

研究要旨

リファンピシン (RIF)、イソニアジド (INH)、エタンブトール (EMB) 耐性に関与するそれぞれの遺伝子変異の有無とその頻度を多剤耐性結核菌（療研株 55 株、大阪株 42 株）を用いて調べた。RIF 耐性と関連する DNA ポリメラーゼβ鎖の 507-533 番目（大腸菌での番号）のアミノ酸をコードする部位の変異を調べると 96.9% (94/97) の株にアミノ酸置換を伴う変異、あるいはアミノ酸の欠損が存在した。Ser-531、His-526、Ser-522 及び Asp-516 の変異頻度が特に高く、この4ヶ所の変異を調べることで、耐性菌の 95.8% (93/97) を検出することが可能だった。また、INH 耐性に関与している KatG の Ser-315 変異を調べると INH 耐性菌の約 47% が判別可能であった。一方、EMB 耐性に関与していると報告されている EmbB の Met-306 の変異を調べると遺伝子型と表現型（薬剤感受性）が一致しない例が数多く観察された。この結果からこの部位の変異検出では、明確な感受性検査は出来ないことが示唆された。

A. 研究目的

結核菌は、増殖が遅く液体培地を使っても菌の検出に 1-2 週間必要である。また、不適切な治療などにより多くの耐性菌が生じており、2002 年の結核療法研究会の調査によると初回治療例の約 10% が、主要 4 抗結核薬のいずれかに対して耐性であったと報告されている。耐性菌を迅速・簡便検出する方法として、各薬剤別に特定遺伝子の変異を検出し、表現型を推定する方法が開発され臨床の場で利用されている。より簡便に遺伝子変異を検出し、耐性菌を判別する方法を確立するために、国内で分離された多剤耐性結核菌が持つ変異とその頻度を調べた。そして、治療薬ごとに遺伝子上のどの位置を何ヶ所調べるのが最も効率良く、耐性菌と考えられる株をスクリーニングできるかを明らかにする。

B. 研究方法

多剤耐性結核菌株：2002 年結核療法研究会の調査のために収集した結核菌の内、結核研究所の基準で多剤耐性と判定された 55 株と大阪府内で分離され多剤耐性菌と判定された 42 株を本研究に用いた。

耐性に関与する遺伝子変異の検出：

対象とする遺伝子は、リファンピシン (RIF) 耐性と関連した *rpoB* 遺伝子、イソニアジド (INH) 耐性に関連した *katG* 遺伝子及びエタンブトール (EMB) 耐性に関連した *embB* 遺伝子で、薬剤耐性に関与すると既に報告されている位置について変異の有無を調べた。和田らの報告¹⁾で公表されているリアルタイム-PCR の系を利用して変異の有無を調べた。また、*rpoB* 遺伝子の 81bp の高頻度変異領域については、全ての株でシーケンス分析を行った。

	療研株 (n=55)		大阪市で分離された株 (n=42)		諸外国で報告されている割合 (%)
	変異が存在した株	割合(%)	変異が存在した株	割合(%)	
516- Asp (GAC)	9	16.4	8	19.1	9
522- Ser (TCG)	0	—	4	9.5	1
526- His (CAC)	5	9.1	5	11.9	36
531- Ser (TCG)	35	63.6	25	59.5	43
511- Leu → Pro, 516- Asp → Gly	2	3.6	0	—	—
506-508 (TTC GGC ACC) 欠損	1	1.8	0	—	—
No mutation	3	5.5	0	—	5>

C. 研究結果

リファンピシン耐性 (*rpoB* 遺伝子の変異) :

遺伝子変異を調べた 55 株の療研株及び 42 株の大阪株は、多剤耐性菌（少なくとも RIF と INH 耐性の 2 剤に耐性）なので、まず RIF 耐性に関連した *rpoB* 遺伝子 81bp 内の変異を調べた（表 1）。調べた株で 516 番目（大腸菌の DNA 合成酵素 β 鎖の番号）の Asp 変異が 9 株、526 番目の His の変異が 5 株、531 番目の Ser の変異が 35 株で検出された。また、511 番目と 516 番目の二重変異が 2 例、506-508 の欠損が 1 例、この領域内に変異を持たない株が 3 株あった。大阪府内で分離した株でも、傾向は療研による全国調査と一致していたが、522 番目の Ser の変異が 42 例中 4 例観察された。国内株で最も変異の頻度が高いのは 531 番目の Ser の変異で約 64%、大阪株で約 60% となり、諸外国で報告されている例²⁾と同じであった。一方、外国の株で二番目に頻度が高いのは 526 番目の His の変異であるが、国内株（療研株と大阪株共に）での変異頻度は 3 番目で、むしろ 516 番目の Asp の変異頻度が高いという結果であった。一方、耐性菌では、*rpoB* 中の高頻度変異領域のアミノ酸変異だけでなくアミノ酸の欠損や挿入例が報告されている。507 と 508 (Gly-Thr) の 2 アミノ酸の欠損例は報告さ

れているが、今回見つかったこの部位での 506-508 (Ser-Gly-Thr) の 3 アミノ酸の欠損例は最初の報告である。

以上の結果より、リファンピシン耐性かどうか判別する場合、Ser-531、His-526、Ser-522 及び Asp-516 の 4 ケ所の変異を調べることにより、耐性株の 95.8% (93/97) 程度 [療研株では、92.7% (51/55)、大阪株では、100% (42/42)] を検出することが可能であった。

イソニアジド耐性 (*katG* 遺伝子の変異) :

katG 遺伝子中の変異で INH 耐性の 42-58% が説明できると報告されている。その中で変異の頻度が最も高いのは 315 番目の Ser なので、その部分に注目して変異を調べた（表 2）。療研株では 47.3% (26/55)、大阪株では 47.6% (20/42) に Ser-315 に変異が検出された。全体でも 47.4% (46/97) という値であった。そして、これらの値は、*katG* の変異で INH 耐性を説明できる割合の範囲内 (42-58%) であった。また、INH 耐性菌が持つ Ser-315 以外の *katG* 遺伝子内で変異が報告されている部位について塩基配列を調べると Arg-463 以外の変異は検出されなかった。

アミノ酸変異	療研株 (N=55)		大阪株 (N=42)	
	株数	割合 (%)	株数	割合 (%)
あり	26	47.3	20	47.6
なし	29	52.7	22	52.3

エタンプトール耐性 (*embB* 遺伝子の変異):

embB 遺伝子の 306 番目の変異でエタンプトール耐性が説明できるとの報告がある。そこで、感受性菌と耐性菌に区分して変異の有無を調べた (表 3)。感受性株の分析では、療研株は全ての例で変異がなかったが、大阪株では 5 株 (約 30%) に変異があった。耐性株の分析では、療研株の 26 株 (約 60%) に変異があったが、18 株 (40%) は変異がみられなかった。大阪株でも同様に 14 株 (56%) が変異を持っていたが、11 株 (44%) に変異がなかった。このように、Met-306 の遺伝子型と EMB 耐性という表現型が一致しない例が多いことがわかった。

D. 考察

リファンピシン耐性菌の 95% 以上が *rpoB* 遺伝子の高頻度変異領域と言われている 81bp 内の DNA 変異で説明することができる。97 株の多剤耐性結核菌の国内株を分析したところ、2 番目に頻度が高い部位が諸外国で報告されているものと異なることが明らかになった。日本国内の結核菌は、ヨーロッパや米国で広がっている結核菌とは遺伝子型が異なり、約 70% が Beijing 株と

言われ、挿入配列 (IS) の転位・消失の頻度が低い株である。つまり、変異部位の頻度の違いは、Beijing 株の特徴である可能性もある。一方、外国の例では 307 株の RIF 耐性株を分析している²⁾。今回分析した例数が 97 株と症例数が少ないためこのような偏りが生じた可能性も考えられる。また、今回の分析では、*rpoB* 遺伝子内に変異のない RIF 耐性株が 3 株あった。大腸菌では、耐性菌は RpoB 上の 507-533 のアミノ酸 (クラスター I) 変異以外に 563 と 572 位のアミノ酸変異 (クラスター II)、687 位のアミノ酸 (クラスター III) に変異を持つケースがあることが報告されている³⁾。そこで、これらの 3 株についてクラスター II 及び III のシーケンス分析を行った。しかし、それらの部位に変異は検出されなかった。よって、これら 3 株は *rpoB* 遺伝子の変異以外のメカニズムで耐性を獲得したものと推定される。また、この 3 株について IS6110 プローブを用いた RFLP 分析を行うと、1 株は IS6110 配列を 11 個持つ結核菌であった。しかし、残り 2 株は IS6110 を持たない結核菌で非常に珍しい株であった。

	感受性株の変異 (%)		耐性株の変異 (%)	
	あり	なし	あり	なし
療研株 (N=55)	0 (0)	11 (100)	26 (59.1)	18 (40.9)
大阪株 (N=42)	5 (29.4)	12 (70.6)	14 (56.0)	11 (44.0)

INH 耐性株の分析では、*katG* 遺伝子の塩基配列分析で、Ser-315(46 株)及び Arg-463 (33 株)の変異が検出された。この内、Arg-463 の変異は、INH 耐性に関連しない多型であると報告されている⁴⁾。今回の耐性菌分析では、これらの以外の場所での耐性に関連した変異は検出されなかった。Ser-315 部位以外の変異の頻度が低いことから、Ser-315 の変異検出だけで、INH 耐性菌で *katG* 内に変異を持つ株のほとんどを検出することが可能と考えられる。つまり、*katG* 遺伝子の Ser-315 の変異を調べ、次に頻度が高い *inhA* 遺伝子の変異を調べるという方法が最も効率的に耐性菌を検出できるものと考えられる。

EMB 耐性株の分析では、Met-306 の変異の有無と薬剤耐性との関連が低いことが明らかになった。耐性株で Met-306 に変異を持たない株は、遺伝子の別の部分に変異が存在する可能性、あるいは別のメカニズムで耐性を獲得したと考えればこの結果を説明できる。しかし、大阪株では約 30%の株が感受性であるにも関わらず、Met-306 部分に変異を持つ株が含まれることがわかった。このように遺伝子型と表現型の一致率が他の薬剤比べて著しく低く、Met-306 の変異の検出で耐性の判別はできないものと考えられる。

E. 結論

国内から分離した 97 株の多剤耐性菌の遺伝子変異を調べることによって、RIF 耐性菌の検査では、Ser-531、His-526、Ser-522 及び Asp-516 の 4ヶ所の変異を調べると耐性株の約 95%を検出することが可能であることがわかった。INH 耐性菌の検査では、Ser-315 の変異検査で耐性菌の約 47%が検出可能であること、EMB 耐性検査では、今まで報告されている Met-306 の変異の有無を調べたとしても、明確に耐性菌を検出できないことが明らかになった。

参考文献

- 1) Wada T, Maeda S, Tamaru A, Imai S, Hase A, Kobayashi K.: Dual-probe assay for rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2004; 42: 5277-85.
- 2) Musser JM. : Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. Clin Microbiol Rev. 1995; 8: 496-514.
- 3) Jin DJ, Gross CA.: Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. J Mol Biol. 1988; 202: 45-58.
- 4) Heym, B., Alzari, PM., Honore, N., Cole, ST.: Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol. 1995; 15: 235-245.

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Fujiwara N., Nakata N., Maeda S., Naka T., Doe M., Yano I., Kobayashi K.: Structural characterization of a specific glycopeptidolipid containing a novel N-acyl-deoxy sugar from *Mycobacterium intracellulare* serotype 7 and genetic analysis of its glycosylation pathway. J Bacteriol. 2007; 189: 1099-108.
- (2) 鹿住祐子、前田伸司、菅原勇: *rpoB* 遺伝子と 16S rRNA 解析による抗酸菌同定の試み、結核. 2006; 81: 511-518.
- (3) 前田伸司: 沖縄県での長期にわたる RFLP 分析の成果と課題. 第 81 回総会シ