

図説明

図1a

*C. perfringens*分離株の *Sma*I消化後のPFGEパターンの比較。レーン1がW08病棟、レーン2がW10病棟由来の集団発生株を示す。他のレーンは散发例由来の分離株である。レーン3とレーン10は *cpe*陰性の分離株である。

図1b

1aに示した株の *Not*I消化後のPFGEパターンを示す。

図1c

*cpe*をプローブとした図1bのSouthern hybridizationの結果を示す。

図2

図1aに示した株の *Pvu*II消化後のSouthern hybridizationの結果を示す。プローブは75 kb *Not*I断片を用いた。

図3

図1aに示した株に対して、*tra*領域に存在する *orf16*を増幅したPCRの結果を示す。

図4

オキサシリンディスクの阻止円とペニシリンGおよびセフトキシムのMICの関係。ペニシリンGのMICは菱形で、セフトキシムのMICはXであらわす。

图1

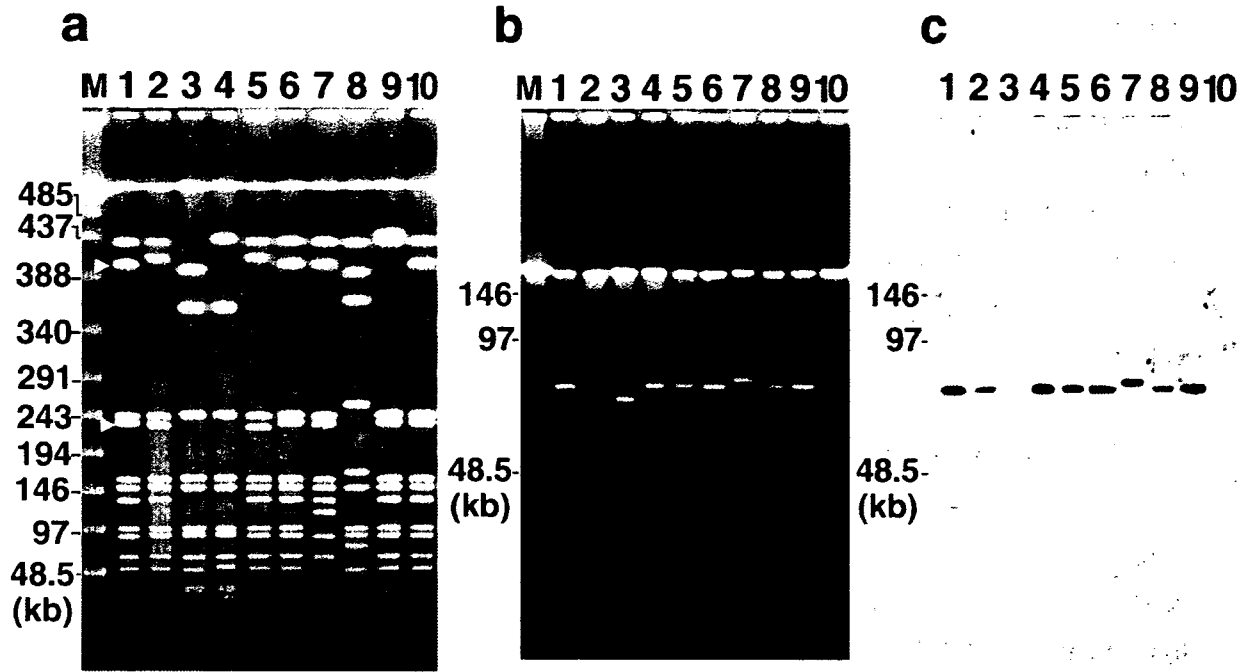


图2

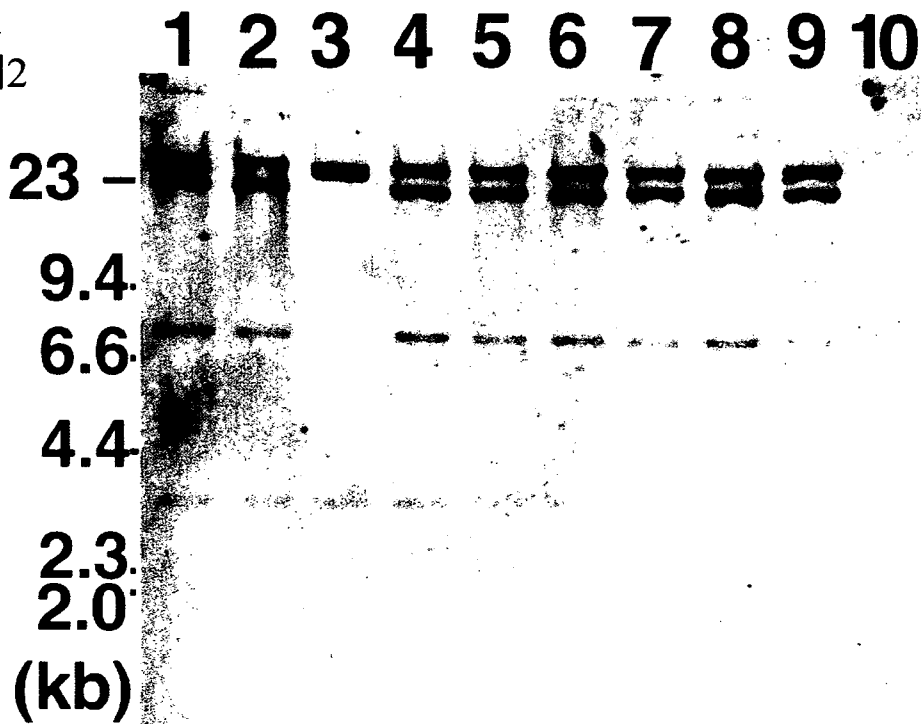


图4

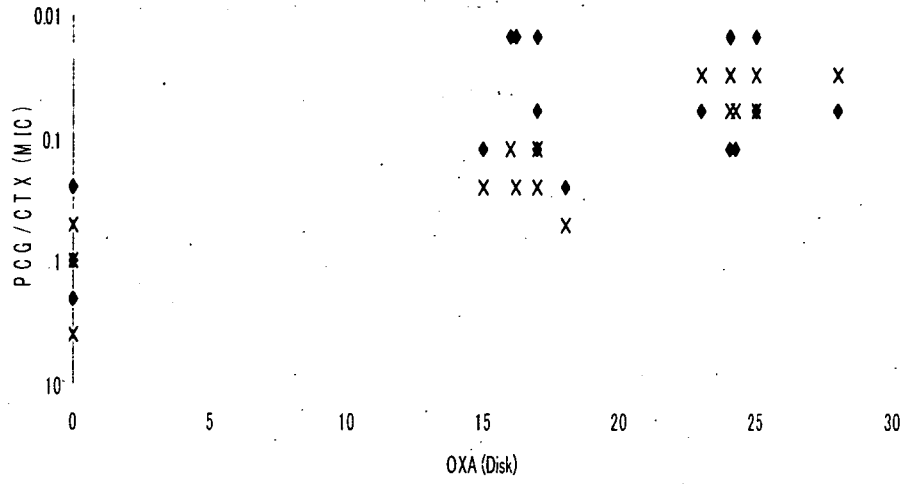
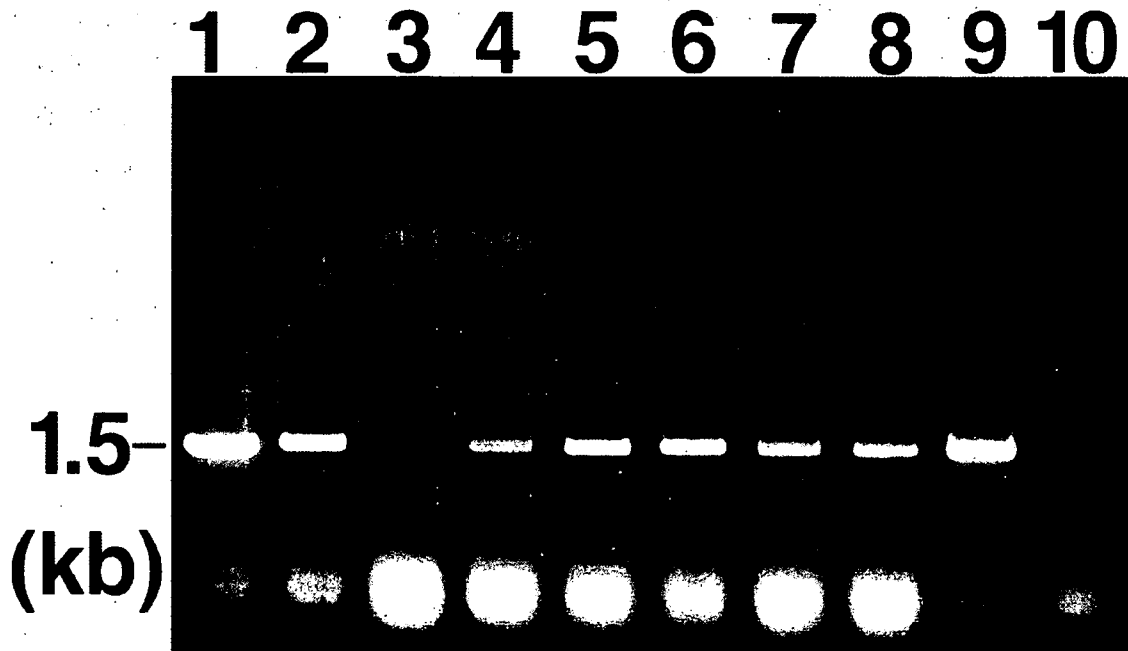


图3



薬剤耐性菌等に関する研究班
市中病院における多剤耐性結核患者管理体制の確立

分担研究者 京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学 一山 智

研究要旨

結核感染の診断には従来ツベルクリン反応が用いられてきたが、免疫不全患者での陽性率の低さやBCG接種患者における偽陽性など、わが国においては結核感染の診断はツ反では困難であった。QFT-2G（クオンティフェロン2G、以下QFT）は、結核特異抗原をリンパ球に反応させ結核を判定する新しい検査法であるが、結核ハイリスク群である免疫抗膠原病患者における有用性を検討した。

SLE患者をのぞく膠原病患者では判定不可例はきわめて少数であった（1/131例）。しかし、SLE患者においては12/39（30.7%）で判定不可となった。判定不可例の臨床背景の解析を行ったところ、判定不可例では、判定可能例と比較して末梢血リンパ球数が比較的 low であり、SLEの活動性指標が有意に高かった。ツ反はともに1例をのぞき陰性であった。

以上より免疫抑制薬を投与されている膠原病患者においてもQFTはツ反と比較して結核感染の診断において有用であると考えられた。

研究協力者：

飯沼由嗣（京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学）

A. 研究目的

今日ステロイドや免疫抑制剤の他にさまざまなTNF α 阻害剤をはじめとする生物学的製剤が導入され、難治性疾患の予後の改善に寄与してきているが、医原的な免疫抑制患者は増加している。このため、結核院内感染を適切に管理する上で、結核感染者を正しく診断をすることは今後ますます重要となっている。

結核感染の診断には従来ツベルクリン反応が用いられてきたが、免疫不全患者での陽性率の低さやBCG接種患者における偽陽性など、わが国においては結核感染の診断はツ反では困難であった。QFT-2G（クオンティフェロン2G、以下QFT）は、結核特異抗原をリンパ球に反応させて、産生されるIFN- γ を測定し、結核の感染を診断するものであり、結核患者での検討ではツ反よりも優れた感度を有しており、BCG接種患者では陽性にな

らないなど特異性も優れている。

免疫異常が疾患の基盤にあり、さらに免疫抑制療法を行っている膠原病患者（Connective Tissue Diseases：CTD）は、結核感染発病のハイリスクグループであり、特に重症リウマチ患者に使用される生物学的製剤であるTNF α 阻害剤（レミケード等）は結核発病のリスクを最大10倍にも上昇させる。これらの患者の結核感染を知る目的でQFTが実施されているが、免疫異常と免疫抑制療法による影響により判定が困難となる可能性がある。本研究は、膠原病患者におけるQFTの有用性を検討し、判定不可例が多かったSLE症例については、臨床背景も加味しその成因について解析を行った。

B. 研究方法

対象：京大病院膠原病内科でフォロー中の膠原病患者のうち、QFTを実施したもの。

方法：対象患者にQFT検査およびツベルクリン反応を行い、QFT陽性例では、胸部CT、喀痰検査により結核感染の有無を確認した。さらに、判定不

可の症例についてその臨床的背景（治療内容、末梢血リンパ球数、SLEDAI等）の解析を行った。

C. 研究結果

1. QFTの結果

SLEを除く膠原病患者における判定不可率は、RAでは1/69(1.4%)が判定不可であったのみであり、他の膠原病(PM/DM;n=18、vasculitis;n=16、SSc;n=10、Sjogren's syndrome;n=6、Behcet;n=6、AOSD;n=6)では判定不可例は認めなかった(計:1/131陽性)。

SLE患者では、39例中、陽性1例、判定保留1例、陰性25例、判定不可12例(30.7%)となった。陽性例は58才女性であり、小児結核の治療歴があったが、活動性結核は否定的であり、過去の感染をしめしたものと考えられた。判定保留例は36才女性であり、23才時に結核治療歴があったが、活動性結核は否定的であり、過去の感染をしめしたものと考えられた。

2. 判定不可例の解析

次にSLEの判定不可例(n=12)について臨床背

景の解析を行った。

1) 臨床背景(表1)

QFT判定不可の12例は、M:F=2:10であり、平均年齢は34.6才(17-58才)、10例でステロイド治療が行われていた。すべてMitogen刺激が0.5未満であり、これが判定不可の原因となった。しかしこのうち2例(Case1, 7)では、Control(刺激なし)でIFN γ の上昇を認めており、免疫異常が示唆された。

2) QFT判定可能例と不可能例の比較(表2)

ステロイド治療においては、両群にあきらかな差は認めなかった。免疫抑制剤では、むしろQFT判定可能例で使用比率が高かった(0:22%)。ツ反はともにほぼ全例が陰性であり、アレルギーの状態と考えられた。末梢血リンパ球数は判定不可群においてやや低値をとる傾向がみられた(860:1240/ μ L)。SLE DAI(SLEの活動性指標)では、判定不可例が有意に高値をとった(14.9:8.3)。

表1 SLE患者QFT判定不可例(n=12)の臨床背景

Case	Age	Sex	Control	Mitogen	ESAT-6	CFP-10	PPD	Therapy	Lymphocyte (/ μ l)	SLE DAI
1	27	F	5.5	0	0.47	0.26	-	Beta4mg	1,270	5
2	47	M	0.18	0.07	<0.05	<0.05	-	none	676	33
3	23	F	0.17	0.21	<0.05	<0.05	-	PSL25mg	1,910	8
4	41	F	0.04	0.28	<0.05	<0.05	-	PSL11mg	496	9
5	71	M	0.03	0.32	<0.05	<0.05	-	mPSL1000mg	288	6
6	58	F	0.27	0.34	<0.05	<0.05	-	PSL15mg	360	3
7	25	F	10	0.46	<0.05	0.51	-	PSL10mg	144	23
8	17	F	0.15	0.16	<0.05	<0.05	-	none	594	22
9	18	F	0.09	0	<0.05	<0.05	N.E.	PSL25mg	165	14
10	28	F	0.01	0.25	<0.05	<0.05	-	PSL50mg	2,390	20
11	24	F	0.44	0.04	<0.05	<0.05	-	PSL45mg	292	10
12	36	F	0.04	0.04	<0.05	<0.05	-	PSL30mg	1,740	26

DAI: Disease Activity Index
N.E.:未施行

表2 QFT判定不可例と判定可能例の臨床背景の比較

	QFT判定不可 (n=12)	QFT判定可能 (n=27)
治療内容		
mPSLパルス療法	1(8%)	1(4%)
経口ステロイド大量	2(17%)	3(11%)
同 中等量	4(33%)	5(19%)
同 少量	3(25%)	6(22%)
免疫抑制剤併用	0	6(22%)
無治療 (NSAIDsのみを含む)	2(17%)	6(22%)
ツベルクリン反応 (陽性例)	0	1(7%)
末梢血リンパ球数 (μL)	860	1240
SLE DAI (平均)	14.9	8.3*

*P<0.05 Mann-Whitney U

D. 考 察

膠原病患者は、ステロイドや免疫抑制剤のほか最近進歩が著しい生物学的製剤を用いられることが多い。これらは難治性疾患の予後の改善に寄与しているが、副作用として免疫抑制に伴う日和見感染症の発病リスクが高まる。結核感染および発病に関してもハイリスクグループであり、とくにTFN α 阻害剤は結核発病のリスクを最大10倍にも上昇させる。

今後、わが国の医療はますます高度化するが、その一方で治療に伴う医原的な免疫抑制患者の増加が予想され、これが結核院内感染のリスクを上昇させると同時に判定を困難なものとしている。

QFTはツ反よりも免疫抑制患者における結核診断に有用と考えられている。Kobayashiら(ERJ, 2007)は、様々な免疫不全者におけるQFTの有用性を評価しているが、特に免疫抑制剤使用患者では、判定不可率が高かった(27.8%)。また、同様にFerraraら(AJRCCM, 2005)は、免疫抑制剤使用患者では、判定不可率が高かった(38.2%)。

さらにHIV患者ではCD4数が100未満の場合に判定不可例が増加した(24%)。

このようにQFTは免疫不全状態、特に免疫抑制剤使用患者において判定不可例が増加する可能性が示唆されていたが、我々の検討では、SLE患者を除く膠原病患者では判定不可例はきわめて少数であった(1/131例)。しかし、SLE患者においては12/39(30.7%)で判定不可となった。判定不可例の臨床背景の解析を行ったところ、両群の免疫抑制剤治療内容に大きな差はなく、判定不可例では、判定可能例と比較して末梢血リンパ球数が比較的low値であり、SLEの活動性指標が有意に高かった。ツ反はともに1例をのぞき陰性であった。

以上より免疫抑制剤使用によるQFTの影響は従来の報告よりも軽微であり、結核感染の診断に有用であると考えられた。一方免疫抑制剤の使用とは別に、疾患そのものが示す免疫異常によると考えられる判定不可例がSLEに多く見られ、判定に注意が必要であると考えられた。

E. 結 論

膠原病患者における免疫応答では、免疫抑制剤による影響は限定的であるものの、疾患そのもの示す免疫異常により判定不可となる可能性があり、判定には注意が必要と考えられた。

免疫不全者が多数存在する入院患者において、疾患そのものの免疫異常による判定不可例は、かなり稀な病態と考えられ、今後ますます増加が予想される免疫抑制患者における結核院内感染管理に、QFTは有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

ツ反による、結核発病者および感染者の判定は免疫抑制患者においては困難であり、偽陰性による本来必要な化学予防の未実施による発病リスクの増大および発病者の発見遅延による集団感染リスクの増大につながる可能性がある。このため、ツ反に代わる感染判定法であるQFTを軸とした結核院内感染管理体制の確立が急務である。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 飯沼由嗣. シンポジウム「結核講演会」結核院内感染対策の実践ー全国アンケートを中心として. 第47回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2007.

2. 飯沼由嗣, 他. アンケート調査からみた結核院内感染曝露のリスクアセスメント. 第82回日本結核病学会総会, 大阪, 2007.

3. 飯沼由嗣, 一山智, 他. 結核接触者検診におけるQFTの有用性. 第54回日本臨床検査医学会学術集会, 大阪, 2007.

4. 武田菜穂, 飯沼由嗣, 他. SLE患者の結核診断におけるQFTの有用性. 第22回日本臨床リウマチ学会総会, 鹿児島, 2007.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録、その他

なし

分担研究報告書

***Mycobacterium avium* complex（MAC）特異的糖蛋白脂質抗原を用いた
肺 MAC 感染症の血清診断試作キットの多施設共同研究**

分担研究者 小林 和夫（国立感染症研究所免疫部・部長）

研究要旨

Mycobacterium avium complex（MAC）感染症の血清診断に関し、試作キット（Tauns Laboratory、静岡）を作成し、有用性を多施設（独立行政法人国立病院機構刀根山病院、近畿中央胸部疾患センター、埼玉医療センター、地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター、学校法人自治医科大学、医療法人篤友会坂本病院）で、肺 MAC 感染症、無症候性 MAC 感染症、肺結核、その他の肺疾患（慢性閉塞性肺疾患、特発性間質性肺炎、肺癌、細菌性肺炎、肺サルコイドーシス、気管支拡張症）、健常者を対象疾患として評価した。肺 MAC 感染症において血清抗 GPL 核抗体を検出する試作キットは感度：84.3%、特異度：100%を示した。病型では、「結節／気管支拡張型」>「線維空洞型」であり、かつ、赤沈値や病変の広がり抗体価は正相関を示した。MAC 感染症の血清診断試作キットは1）迅速診断（所要：約3時間）、2）鑑別診断や3）活動性の評価に有用である。加えて、血清診断は体外診断なため、非侵襲性、安全である。

研究協力者

北田 清悟（国立病院機構刀根山病院・呼吸器内科医員）
前倉 亮治（国立病院機構刀根山病院・副院長）

A. 研究目的

非結核性抗酸菌感染症は結核など抗酸菌感染症の約20%を占めるが、特に、*Mycobacterium avium* complex（MAC）感染症は非結核性抗酸菌感染症の70-80%を占め、最頻である。MACは環境菌であり、診断確定に臨床経過を考慮するため、長期間（少なくとも1か月）を要する。また、MACは抗微生物薬に対し多剤耐性を示すため、治療に難渋し、根治は困難である。「感染症法」の対象外疾患であるが、多くの肺 MAC 感染症患者は喀痰抗酸菌塗抹陽性の時点で「肺結核」として保健所長に届けられ、隔離を余儀なくされているのが実情である。

MACは特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質（GPL）を有し、化学的にGPLは全てのMACに共通なGPL核と可変的な糖鎖部分から構成されている。分担研究者らはGPL抗原やGPL核抗原を用い、患者血清抗GPL核IgA抗体を測定することによる血清診断を開発してきた。その結果、患者血清抗GPL核IgA抗体の測定や推移がヒトMAC感染症の迅速診断、病変の広がりや疾患活動性の評価に有用であることを

既に報告した（Clin. Infect. Dis. 35: 1328-1335, 2002、Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12: 44-51, 2005、J. Clin. Microbiol. 43: 3150-3158, 2005、Eur. Respir. J. 29: 1217-1223, 2007）。

本研究では、MAC感染症の血清診断に関し、試作キット（TAUNS Laboratory、静岡）を作成し、その有用性を多施設（独立行政法人国立病院機構刀根山病院、近畿中央胸部疾患センター、地方独立行政法人大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター、埼玉医療センター、学校法人自治医科大学、医療法人篤友会坂本病院）で評価した。

B. 研究方法

米国胸部疾患学会（2007年）の診断基準に合致した肺MAC感染症（70例、男/女：25/45、平均年齢：68.0歳、平均罹病期間：4.8年）、無症候性MAC感染（18例、男/女：10/8、平均年齢：64.6歳）、肺結核（36例、男/女：26/10、平均年齢：52.9歳、平均罹病期間：0.3年）、その他の肺疾患（45例、男/女：34/11、平均年齢：66.3歳、平均罹病期間：2.2年、慢性閉塞性肺疾患：15例、特発性間質性肺炎：11例、肺癌：11例、細菌性肺炎：4例、肺サルコイドーシス：2例、気管支拡張症：2例）および健常者（76例、男/女：41/35、平均年齢：38.1歳）由来血清を用い、MAC特異的

GPL核抗原に対する血清IgA抗体を酵素抗体法-試作キットにより測定した。健常者も含め、全例、HIV-1および2抗体は陰性である。なお、患者血清採取に際し、インフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

MAC肺感染症において血清抗GPL核IgA抗体価：10.7 ± 7.9 U/mLは他疾患（無症候性MAC感染：0.2 ± 0.1、肺結核：0.1 ± 0.1、その他の肺疾患：0.0 ± 0.1）や健常者（0.0 ± 0.0）に比し、有意に高値を示した（ $p < 0.0001$ ）。Receiver-operator曲線解析から抗体価のカットオフ値を0.7 U/mLに設定した場合、感度は84.3%、特異度は100%であった。

MAC肺感染症の病型と抗体価では「結節-気管支拡張型」>「線維空洞型」であった（ $p < 0.05$ ）。MAC肺感染症の平均赤沈値32.6 ± 28.6 mm/hrは肺感染症において血清抗GPL核IgA抗体価と正相関を示した（ $r = 0.294$ 、 $p < 0.05$ ）。また、胸部high resolution computed tomography（HRCT）による病巣の広がりや血清抗GPL核IgA抗体価は正相関（ $r = 0.43$ 、 $p < 0.05$ ）を示した。

D. 考察

GPL核抗原はMAC特異的抗原であり、かつ、宿主はGPL核抗原に対し抗体産生など液性免疫応答を発現し、MAC感染症の迅速・簡便な血清診断が可能となった。病型と抗体価では「結節-気管支拡張型」>「線維空洞型」であった。「結節-気管支拡張型」は中年以降の男性に多く、進行性であり、広範な肺傷害を惹起する。抗体価と赤沈値は正相関すること、加えて、画像所見と抗体価相関していた。病型：「結節-気管支拡張型」、赤沈値および病変の広がりやMAC感染症の活動性指標であり、すなわち、抗GPL核抗体価の変動/減少は疾患活動性を反映する。従って、診断のみならず、抗GPL核抗体価の測定はMAC感染症の治療評価にも有用である。

米国胸部疾患学会（2007年）のMAC感染症診断基準は1）臨床症状、2）画像（X線およびHRCT）所見および3）微生物学的所見（複数回の培養陽性）を要求しているため、診断確定に少なくとも1か月を要する。MAC感染症の血清診断試作キットの所要時間は約3時間で迅速、かつ、体外診断であり安全、簡便、かつ、多検体処理が可能であり、MAC特異的抗原を用いた血清診断はMAC感染症の診療に寄与するであろう。

今回の多施設臨床試験結果（感度：84.3%、特異度：100%）は、従来の分担研究者の示した成績（感度：92.5%、特異度：95.1%）に匹敵し、有用性が確認された。今後、解析症例数を増加し、臨床実用化に向け、体外診断薬の承認・認可、HIV-MAC感染症における解析、さらに、診断基準に追加など、進捗させる予定である。なお、Dr. Charles L. Daley（アメリカ胸部疾患学会診断基準-2007：作成委員）から国際共同研究の提案があり、具体について交渉中である。

E. 結論

肺MAC感染症において血清抗GPL核IgA抗体を検出する試作診断キットは1）迅速診断（所要：約3時間）、2）鑑別診断、さらに、3）活動性の評価に有用である。加えて、血清診断は体外診断のため、非侵襲性、安全である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kitada, S., K. Kobayashi, S. Ichiyama, S. Takakura, M. Sakatani, K. Suzuki, T. Takashima, T. Nagai, I. Sakurabayashi, M. Ito, and R. Maekura. 2007. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease using an enzyme immunoassay kit. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 200705-7710C. In press.

2. 学会発表

岡田全司、小林和夫. 2007. 抗酸菌研究の最前線（シンポジウム）. 結核、82：783、2007. 第82回日本結核病学会総会（大阪、6月）.

北田清悟、前倉亮治. 2007. MAC特異的糖蛋白質抗原を用いた肺MAC症の血清診断. 抗酸菌研究の最前線（シンポジウム）. 結核、82：789、2007. 第82回日本結核病学会総会（大阪、6月）.

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

特に、なし。

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

平成 18 年度分担研究報告書

薬剤耐性菌等に関する研究班

新たな小児のツベルクリン反応陽性基準作成

分担研究者 近藤 信哉 東京都多摩北部医療センター小児科

研究要旨

[背景・目的] 平成 18 年度における、接触者検診受診児686名を対象としたツベルクリン反応(ツ反)陽性カット・オフ値の検討から、BCG 接種の如何にかかわらず硬結5mm であることが示唆された。19年度は陽性カット・オフ値を硬結5mmとした場合、ツ反判定の感度と特異度を求めた。

[方法] 1)感度の検討; 対象を結核発病小児、275名(4歳未満:172名、4歳以上:103名)とし、これら患児の診療録を後方視的に調べた。American Academy of Pediatrics(AAP)の判定基準に準じて対象を4歳未満と4歳以上に分けて得たツ反硬結値の分布を検討し、陽性カット・オフ値を硬結5mmとした場合の判定の感度を求めた。2)特異度の検討; 対象を、知る限り結核患者と接触がなく、0歳時にBCG接種目的でツ反検査を受けた84名とした。これらの児の母子手帳から数字で記載されたツ反反応径を得て、陽性カット・オフ値を硬結5mmとした場合の特異度を求めた。

[結果] 1)感度の検討; 4歳未満の発病小児172名のツ反硬結は、BCG接種の有無にかかわらず11名において0mm、161名において5mm以上であった。両者には分離が認められ、カット・オフ値を硬結5mmとした場合の判定の感度は94%であった。4歳以上の発病小児103名のツ反硬結は、BCG接種の有無にかかわらず3名において0mm、100名において5mm以上であった。両者には分離が認められ、カット・オフ値を硬結5mmとした場合の判定の感度は97%であった。対象児275名全体では感度は95%であった。2)特異度の検討; 発赤か硬結かは不明であるが、具体的数字で記載されたツ反判定値は84名中83名において5mm未満であった。数字を硬結としても、カット・オフ値を硬結5mmとした場合の判定の特異度は99%であった。

[結論] これ等の結果は硬結5mmがBCG接種の有無にかかわらず、小児におけるツ反陽性判定のカット・オフ値であることを示唆する。

研究協力者:

宮川 知士、末永 麻由美(都立清瀬小児病院呼吸器科)、影山 さち子(NHO宇都宮病院小児科)

A. 研究目的

平成 18 年度における、接触者検診受診小児686名を対象としたツベルクリン

反応(ツ反)陽性カット・オフ値の検討から、BCG接種の如何にかかわらず硬結5mmであることが示唆された。19年度はカット・オフ値を硬結5mmとした場合のツ反判定の感度と特異度を求めて、その実用性を検討した。

B. 研究方法

1) 感度の検討; 対象を都立清瀬小児病院、NHO 宇都宮病院を受診した臨床所見 and / or レントゲン写真から結核発病と考えられた小児、275名(4歳未満:172名、4歳以上:103名)とした。これら患児の診療録を後方視的に調べ、American Academy of Pediatrics(AAP)の判定基準に準じて対象を4歳未満と4歳以上に分けて得たツ反硬結値の分布を検討した。そして、陽性カット・オフ値を硬結5mmとした場合の判定の感度を求めた。

2) 特異度の検討; 対象を、知る限り結核患者と接触がなく、0歳時にBCG接種目的でツ反検査を受けた84名とした。これらの児の母子手帳から数字で記載されたツ反反応径を得て、陽性カット・オフ値を硬結5mmとした場合の特異度を求めた。

C. 研究結果

1) 感度の検討; 4歳未満の発病小児172名のツ反硬結は、11名において0mmであった。11名中3名がBCGを接種していた。161名において5mm以上であり、正規分布類似の分布をし、平均値は15.5mmであった。両者には分離が認められ、カット・オフ値を硬結5mmとし

た場合の判定の感度は94%であった(図1)。4歳以上の発病小児103名のツ反硬結は、3名において0mmであった。3名中2名がBCGを接種していた。100名において5mm以上であり、正規分布類似の分布をし、平均値は18.4mmであった。両者には分離が認められ、カット・オフ値を硬結5mmとした場合の判定の感度は97%であった(図1)。対象児275名全体では感度は95%であった。硬結0mmであった14名中5名はBCGを接種していた。正規分布類似の分布をする261名中128名がBCGを接種していた。これらの児は平均値より右方に79名、左方に49名が分布した(図2)。

2) 特異度の検討; 発赤か硬結かは不明であるが、具体的数字で記載されたツ反判定値は84名中83名において5mm未満であった。数字を硬結とみなしても、カット・オフ値を硬結5mmとした場合の判定の特異度は99%であった。数字を従来の主たる判定基準である発赤とみなせば、特異度は100%であった。

D. 考察

今回の結果は、硬結5mmが小児における実用的なツ反陽性カット・オフ値であることを示唆した。これは感染性患者との濃厚接触児、臨床所見 and / or レントゲン写真から発病と考えられる対象児において陽性カット・オフ値が硬結5mmであるとしたAAP推奨の診断基準に合致する。しかしながら、ツ反検査液の含むツベルクリン濃度は日本製が2.5ツベルクリン単位(TU)であり、米国製は5TUである。今後、検査液の濃度差が反応径

に如何なる影響を及ぼすかを検討する必要がある。

人型結核菌感染以外のツ反に影響を及ぼす主たる因子に BCG 接種、非結核性抗酸菌感染が挙げられる。今回の結果は BCG の影響が認められない結果と、認められる結果とが混在して一律ではなかった。これは BCG の影響を取り上げない AAP の推奨する判定基準に準じる結果と考えられる。

遅延型過敏性を利用した結核感染の補助診断法の一つであるツ反検査に対し、細胞性免疫反応の IFN- γ 産生能を利用した QFT-2G 検査が近年用いられるようになってきた。2007 年6月の結核病学会では小児における QFT-2G 検査の感度が約 60%であると発表されており、採血量、費用の点からも未だ普遍的検査とはいえない。

E. 結論

2.5TU を含む日本の検査液を用いても、小児におけるツ反陽性カット・オフ値は BCG 接種とは無関係に硬結 5mm であることが示唆された。ツ反検査は QFT-2G 検査が普及しつつある現在でも、依然として結核菌感染の有無を判定する有用な検査法である。

図1 結核発病小児275名におけるツベルクリン反応硬結の分布

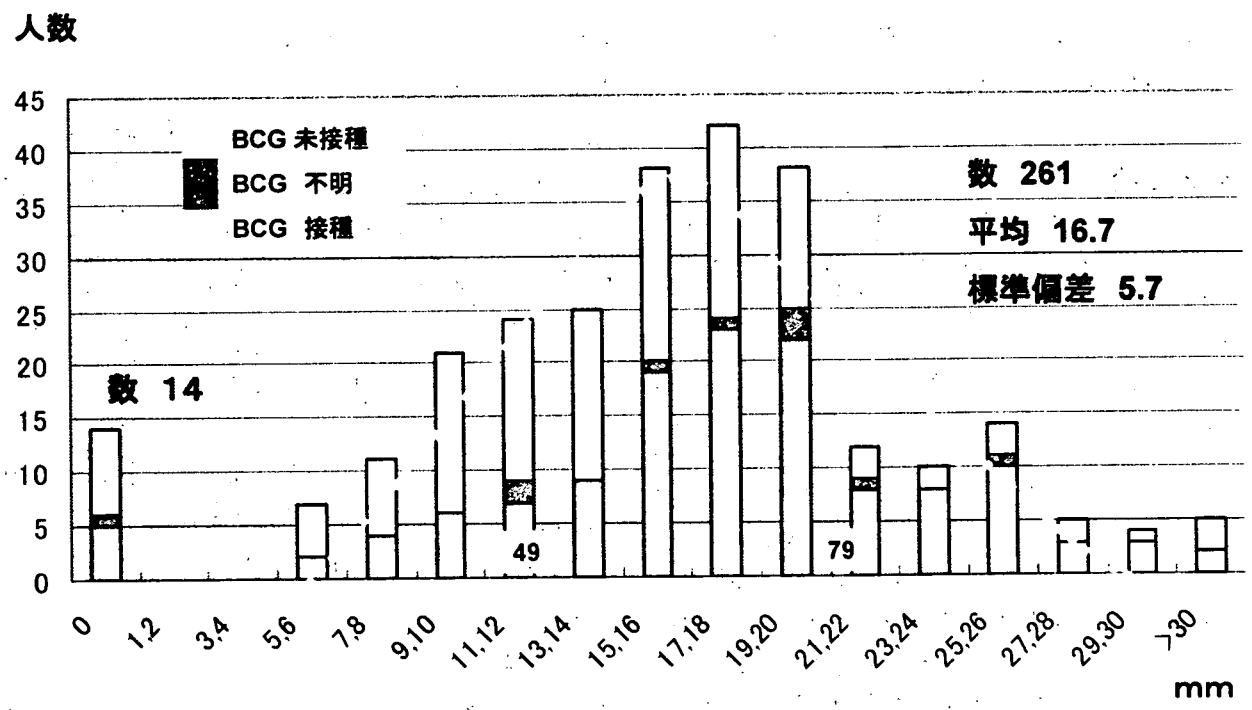
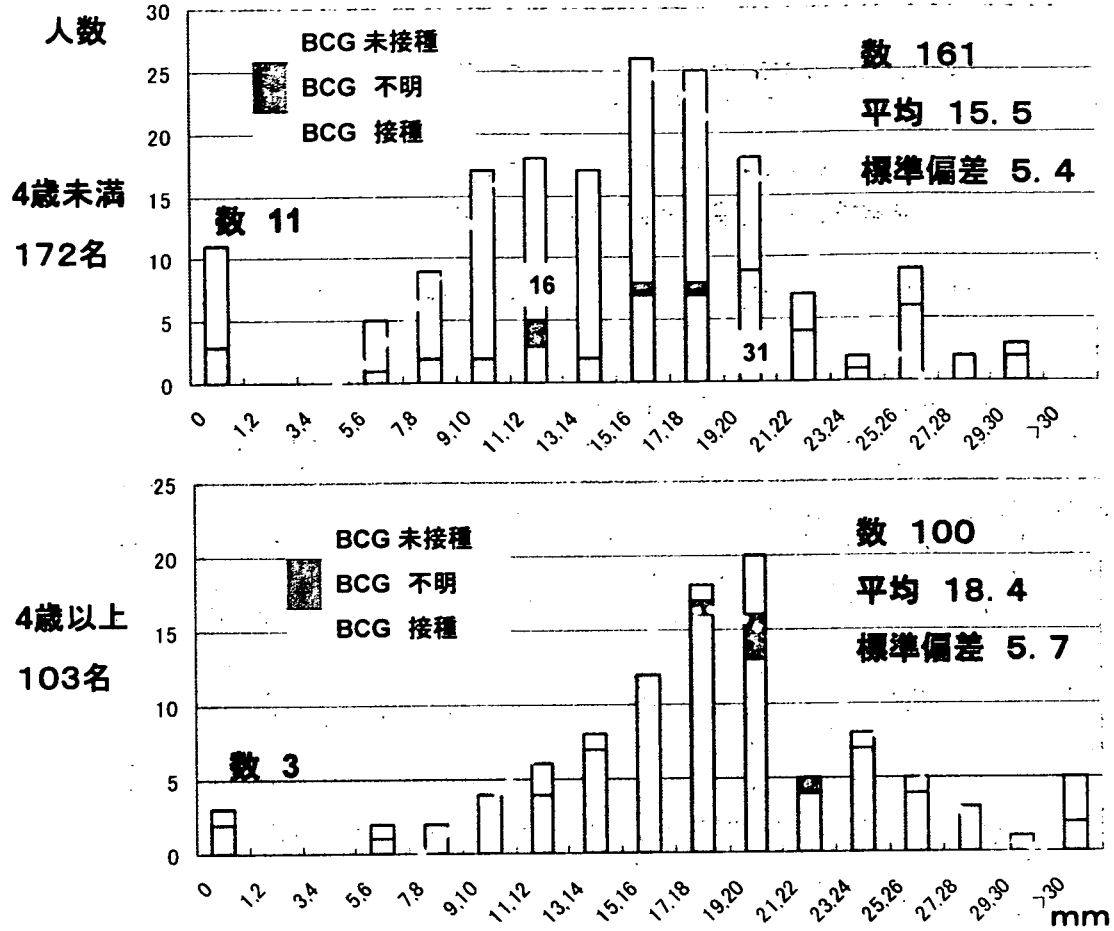


図2 結核小児275名におけるツベルクリン反応硬結の分布 (陽性カット・オフ値を5mmとすると、感度は95%となる)

薬剤耐性菌等に関する研究班
非結核性抗酸菌の薬剤耐性に関する研究

分担研究者 柴山恵吾 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨

この研究では、*Mycobacterium avium* の薬剤耐性メカニズムについて、薬剤排出に焦点をあてて解析を行った。³H ラベル Clarithromycin(CAM)を 0.25 μ g/ml の濃度で *M. avium* に加えたところ、菌体内の CAM 濃度は速やかに上昇し、10 分以降は緩やかに上昇した。30 分の時点で CCCP を添加したところ、菌体内の CAM 濃度はさらに上昇した。このことから、*M. avium* は薬剤排出活性を持つことが明らかになった。ただし、この活性は感性株でも観察されたので、CAM に関しては実際の耐性への関与はさらに検討が必要である。現在、他の薬剤についても検討を進めている。ゲノム上で薬剤排出蛋白をコードすると予想される遺伝子を *M. smegmatis* で発現させたところ、いくつかの遺伝子で複数の薬剤の MIC が 2-4 倍上昇することが分かった。現在、耐性株でこれらの遺伝子の破壊株を作成するとともに、各種の薬剤に比較的感性の BCG でこれらの遺伝子を発現させ、これらの薬剤排出蛋白の薬剤耐性への関与を解析中である。これらの解析の中で、臨床分離 *M. avium* 株において薬剤排出蛋白をコードすると予想される遺伝子の近傍に新しい Insertion Sequence(IS)を見出した。この IS は *M. smegmatis* で報告されている IS1549 と高い相同性を持つものだった。この IS には、プロモーター活性があつて下流の遺伝子の発現を増加させている可能性があるため、現在薬剤耐性への関与について解析を進めるとともに、分子疫学マーカーとしての利用法も検討している。

研究協力者：

森茂太郎、朴貞玉(リサーチレジデント) (国立感染症研究所 細菌第二部)、小川賢二(独立行政法人国立病院機構 東名古屋病院)

A. 研究目的

非結核性抗酸菌、特に臨床的に多く分離される *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC)は多くの薬剤に対して耐性をもつ。非結核性抗酸菌の薬剤耐性は、結核菌のように抗菌薬のプレッシャーにより選択された変異をもつものと異なり、自然耐性である。非結核性抗酸菌の薬剤耐性のメカニズムは、未だ不明な点が多い。

細菌においては薬剤に対する自然耐性のメカニズムの一つとして、薬剤排出機構が知られているが、結核菌及び非結核性抗酸菌ではこの薬剤排出機構についてはほとんど分かっていない。この研究では、非結核性抗酸菌の薬剤耐性における薬剤排出機構の関与について解析を行うこととした。

B. 研究方法

1. 臨床より分離された 4 株の *M. avium* OK05-1、OK06-7、OK06-8、OK06-9 の薬剤排出活性を解析した。アイソトープが入手可能な Clarithromycin (CAM)について解析を行った。*M. avium* を培養し、5mM MES pH 6.5 – 150 mM NaCl buffer に suspend して³H ラベル CAM を 0.25 μ g/ml の濃度で加え、菌体内の CAM 濃度の経時変化を調べた。また、プロトンポンプ阻害剤である CCCP の効果も調べた。菌体内の CAM の量は、液体シンチレーションカウンタによる計測で定量した。なお、解析に用いた菌株は、大阪府立病院機構大阪府立呼吸器アレルギー医療センター臨床研究部松本智成先生より分与いただいた。

2. 膜トランスポーターデータベース TransportDB(www.membranetransport.org)上で *M. avium* K-10 のゲノムの中の multidrug efflux に関与する膜トランスポーターを選び出し、抗酸菌発現

vector である pVV16 にクローニングし、*M. smegmatis* mc²/155 で発現させて薬剤耐性パターンの変化を調べた。

3. *M. avium* 臨床分離株で薬剤排出蛋白をコードする遺伝子の上流に見出された新たな Insertion Sequence(IS)について、その薬剤耐性への関与について解析を行った。臨床分離株におけるその IS の保有状況を調べるとともに、IS の塩基配列中のプロモータ活性について解析を行った。臨床分離株におけるこの IS の有無は Southern blotting で調べた。IS のプロモータ活性については、この IS の下流に GFP 遺伝子をクローニングし、蛍光強度を測定することにより調べた。解析に用いた菌株は、独立行政法人国立病院機構東名古屋病院の小川賢二先生より分与いただいた。

C. 研究結果

1. *M. avium* OK05-1 株、OK06-7 株、OK06-8 株、OK06-9 株の CAM 排出活性

M. avium OK05-1 株、OK06-7 株、OK06-8 株、OK06-9 株に ³H ラベル CAM を加えてその排出活性を調べた。CAM の MIC は OK05-1 株、OK06-8 株が >32 μg/ml (R)、OK06-7 株、OK06-9 株が 0.25 μg/ml (S) だった。耐性の OK05-1 株と OK06-8 株は 23S rRNA 遺伝子の 2058 番目に変異を持っていた。CAM を添加後の各株の菌体内の CAM の量の経時変化を図 1 に示した。CAM を添加後菌体内の CAM 濃度は速やかに上昇し、10 分以降は緩やかに上昇した。30 分の時点で CCCP を 100 μM の濃度で添加したところ、OK06-7 株以外の 3 株は菌体内の CAM 濃度はさらに上昇した。これらの結果から、これらの 3 株にはプロトン依存性の CAM 排出機構が存在することが明らかになった。しかしながらこれら 3 株のうち OK05-1 株と OK06-8 株は耐性、OK06-9 株は感性株であり、CAM の排出活性は感性株と耐性株両方において同様に観察されたことから、その排出が CAM 耐性へどの程度関与するのかについてはさらに検討が必要だろう。OK06-07 株は CCCP

の添加により CAM 濃度の上昇が見られなかったため、有意な CAM のプロトン依存性の排出はないと思われる。この株の菌体内の CAM 濃度は CCCP 添加後も他の 3 株の CCCP の添加前のレベルと同等以下の濃度だったので、プロトン非依存性のポンプにより CAM が排出されているものと考えられる。今回調べた株においては耐性株は 23S rRNA に mutation を持っているため、実際の CAM 耐性はその変異による部分が大きいと考えられる。しかしながら、薬剤排出蛋白は多くの薬剤を基質にすることが多いため、他の薬剤、特に遺伝子の point mutation では説明がつかないもので中等度耐性を示す薬剤については、この排出活性が耐性に関与している可能性があると考えられる。

2. 薬剤排出蛋白の発現と薬剤耐性パターンの変化

M. avium K-10 株のゲノムデータベース上で薬剤排出蛋白をコードするとされている遺伝子を *M. smegmatis* で発現させ、MIC の変化を調べた。結果を Table 1、Table 2、Table 3 に示す。いくつかの遺伝子で、MIC の値が 2 倍-4 倍になるものがあった。MFS family、RND family、ABC family いずれにおいても、複数の薬剤について同時に MIC が上昇する傾向があった。MFS family では CAM と RFP の 2 剤、RND family においては CAM と EB の 2 剤について、同時に MIC が上昇するものが多くあった。ABC family では SM、RFP、CAM の 3 剤の MIC が上昇したものと、RFP と CAM の 2 剤の MIC が上昇したものがあった。

3. 新たな IS の解析

臨床分離 *M. avium* No.3 株の薬剤排出遺伝子 MAP0075 の上流に、*M. avium* K-10 のゲノムデータベース上には無い新たな IS が見出された。この IS は 1642bp、50%以上の GC content、504 アミノ酸からなる ORF を含んでいるものだった。この遺伝子は *M. smegmatis* で報告されている IS1549 と高い相同性を持っているものだった(塩

基配列相同性 75.6%)。この IS の遺伝子構造を図 2 に示した。14bp の terminal inverted repeat があり、その外側に遺伝子の transposition に関わる 161bp の Direct repeat が存在した。*M. avium* ではこれまでにこの IS の報告はないため、他のいくつかの臨床分離株について IS の有無、コピー数を Southern blotting で調べた(図 3)。株によりバンドのパターンは異なり、コピー数も異なつた。この IS を持たない株もあった。バンドの数より、この IS は 0-9 コピー存在することが分かった。なお、*M. intracellulare* においては、調べた 5 株においてはこの IS は検出されなかつた(図 4)。IS は、他の菌種においてはその中にプロモーター活性があり薬剤耐性遺伝子上流に挿入されて、薬剤耐性の獲得に関与することが知られている。今回見出された IS が同様にプロモーター活性を持ち、薬剤排出遺伝子の発現を上昇させて薬剤耐性獲得に関与しているという可能性を検討するため、この IS のプロモーター活性を調べた。発現 vector の pVV16 の vector 上のプロモーター部位を取り除き、GFP 遺伝子をクローニングし、その GFP 遺伝子上流に IS をクローニングして *M. smegmatis* を transform し、GFP の発現を調べた。発現は蛍光顕微鏡で菌を観察することにより調べた。*M. smegmatis* は、transform 前の親株も、若干の蛍光が観察された。IS と GFP をクローニングした vector で transform した *M. smegmatis* も、若干の蛍光が観察されたが、親株との差ははっきりしなかつた。*M. smegmatis* が元々ある程度の蛍光をもつことから、background が高いため GFP の発現の差が明らかにならなかつたという可能性があるため、現在 GFP をカナマイシン耐性遺伝子に置き換えて実験を進めている。

D. 考 察

本研究では A) ³H ラベルの CAM を用いて臨床分離 *M. avium* の薬剤排出活性を解析し、B) *M. avium* のゲノム上に存在する薬剤排出蛋白と考

えられる遺伝子を *M. smegmatis* で発現させ、薬剤耐性パターンの変化を調べてその遺伝子の耐性への関与を解析し、C) 新たに見出した IS の薬剤耐性への関与を検討した。

A) この研究で解析をおこなった株においては、薬剤排出機構が存在することは明らかになったものの、実際の耐性への関与は明らかには出来なかつた。今回は CAM の耐性を解析したが、耐性株は 23S rRNA の mutation をもつものだった。これらの株では 23S rRNA の mutation の影響が大きいため、排出の耐性への関与がかくされて検出できなかつた可能性もある。CAM 以外の、遺伝子の point mutation では説明がつかない他の薬剤の耐性で、中等度耐性のものについては、差が明らかになる可能性があると考えられる。また、今回調べた株では、図 1 から菌体内の CAM 濃度と耐性との相関はないと考えられる。耐性株は mutation を持っていたため、菌体内の薬剤濃度と耐性とは相関しないと考えられる。ところで大腸菌の多剤排出蛋白によるマクロライド系薬剤耐性の解析でも、AcrAB など明らかに薬剤が排出され、そしてポンプの阻害剤により感性となることが分かっているものでも、実際の耐性と菌体内の薬剤濃度が相関しないということが報告されている(AAC, 2004, 48(9), 3621-4)。以上のことから今回調べた 4 株についても、実際に薬剤排出による耐性への関与があっても、検出が出来なかつたという可能性があるため、今後さらに実験系について検討を重ね、解析を進める予定である。また、ポンプの阻害剤で、菌の生育の影響を与えないもの(Phenylalanine arginine β -naphthylamide(PA β N)等)も報告されているので、これらを用いればより実際の

耐性と薬剤排出の関与の有無を明らかに出来ると考えられる。

B) 多薬排出蛋白をコードすると考えられる遺伝子を *M. smegmatis* で発現させたところ、MFS family、RND family、ABC family いずれの family-においてもいくつかの遺伝子で MIC が 2-4 倍となった。また、複数の構造が類似していない薬剤について同時に MIC が上昇する傾向があった。このことは、多薬排出蛋白が広い基質特異性を持つことと合致する。MIC の上昇は、大腸菌の AcrAB で報告されているように顕著なものではなかった。しかしながら、*M. smegmatis* はもともと様々な薬剤にある程度耐性であるため、MIC の上昇が明らかにならなかった可能性があると思われる。現在、各種薬剤に比較的感受性の BCG を用いて実験を進めている。また、耐性株でこれらの遺伝子のノックアウトの作成も行っている。これらの解析により、今回 MIC の差が明に検出出来なかった薬剤についても有意差が検出出来る可能性があると考えられ、現在解析を進めている。

C) この研究で我々は *M. avium* より新しい IS を見出した。この IS のプロモーター活性は、GFP を用いた方法では検出が出来なかった。今後プロモーター活性さらに薬剤耐性への関与について、さらに検討を行う予定である。また、この IS は株によりコピー数が様々で、Southern blotting のパターンも菌株により異なるものだったため、分子疫学のマーカーとして用いることが出来る可能性があると考えられる。分子疫学のマーカーとしての利用については今後検討を進めていきたいと

考えている。

E. 結 論

M. avium は薬剤排出活性を持つことが明らかになった。その薬剤排出活性の実際の耐性への関与の有無を明らかにするために、現在さらに研究を進めている。今後、耐性に関わる重要な排出蛋白を同定し、さらに構造機能解析を行って創薬のための情報にも資するものとして考えている。

F. 健康危険情報

現在我が国においては非結核性抗酸菌の感染症は少なくない。そして、各種薬剤に対して自然耐性であるため治療に困難をきたす場合も多い。また、急速に症状が悪化し、致命的となることもある。そのため、薬剤耐性結核菌と同様に新たな治療法の開発が望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. なし

2. 学会発表

Mycobacterium avium より見出された新規 Insertion Sequence の解析

朴貞玉、柴山恵吾、森茂太郎、荒川宜親

第 81 回日本細菌学会総会、平成 20 年 3 月 24-26 日、京都

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録、その他

なし

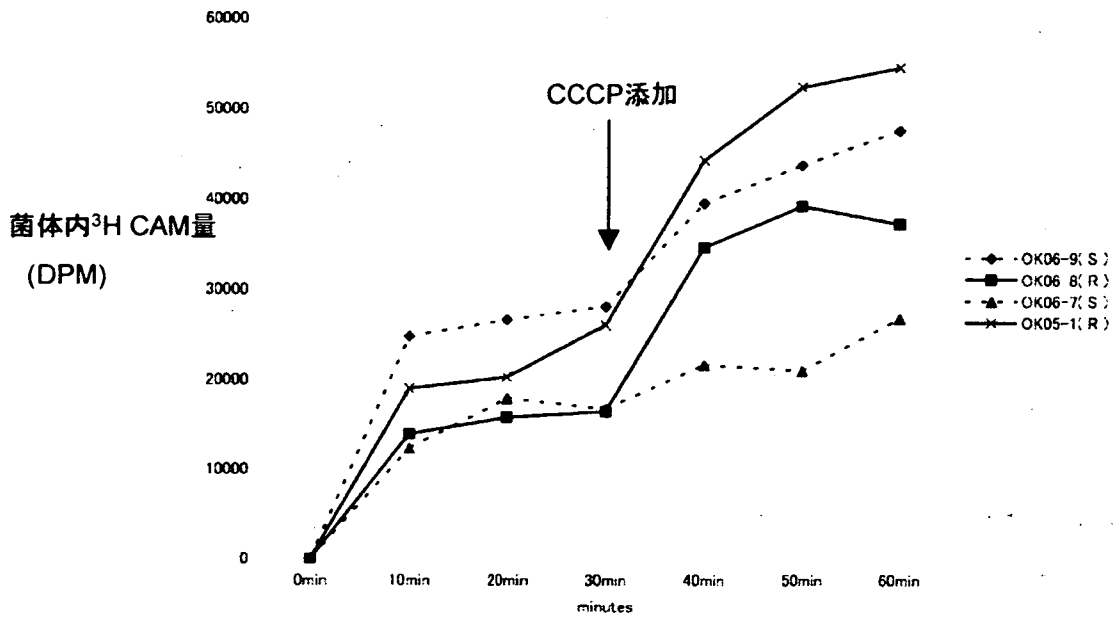


図1. ^3H CAM添加後の *M. avium* 菌体内のCAM濃度の経時変化。耐性株は実線で、感性株は破線で示した。プロトンポンプ阻害剤CCCP添加後、OK06-7以外の3株はCAM濃度がさらに上昇した。

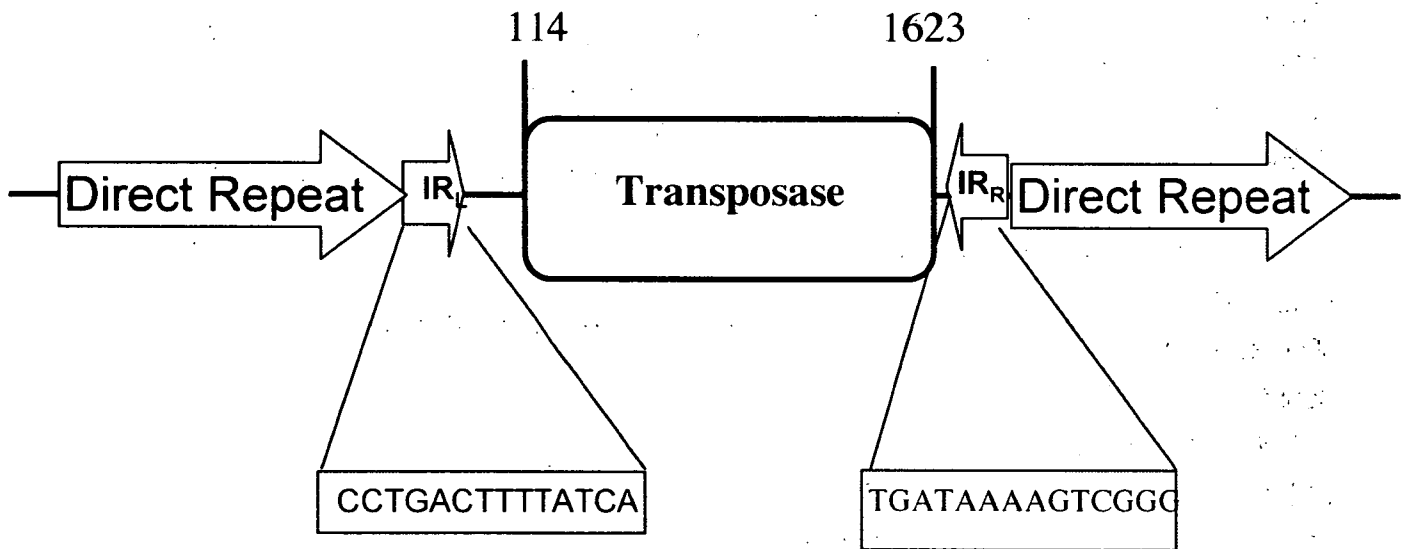


図2. 新たに見出されたISの遺伝子構造。Transposaseの遺伝子の上流と下流に14bpのInverted repeatがあり、その外側に161pbのdirect repeatが存在した。

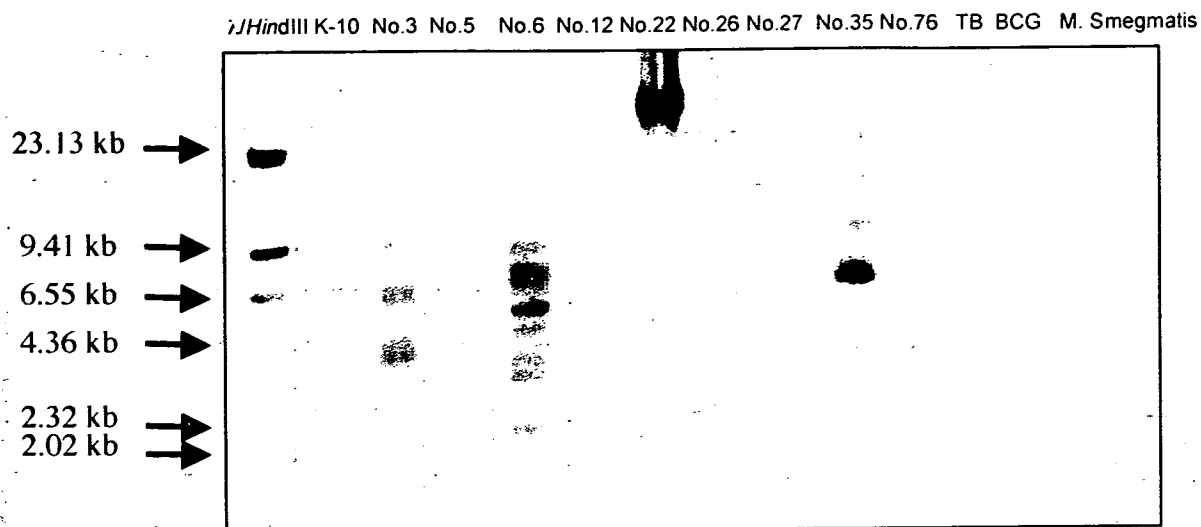


図3. 臨床分離 *M. avium* 株のISの保有状況。臨床分離 *M. avium* 株よりゲノムDNAを精製し、制限酵素 *Pvu* II で消化後ISをプローブとしてSouthern blottingを行った。K-10, *M. avium* K-10株; TB, *M. tuberculosis* H37Rv; BCG, *M. bovis* BCG日本株。このISは *M. avium* に0-数コピー存在することが分かった。

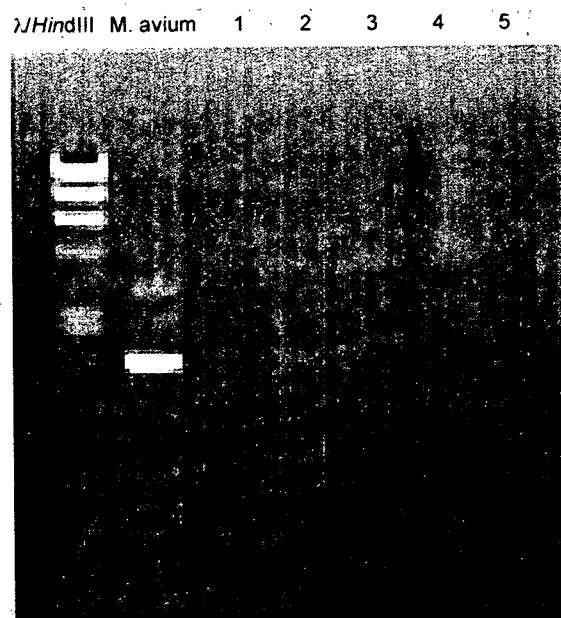


図4. 臨床分離 *M. intercellulare* 株のISのPCRによる検出。解析をおこなった5株ともISの増幅は得られなかった。

	MAP618c	MAP619c	MAP1137c	MAP1596	MAP1632c	MAP2516	MAP2534c	MAP3145c
SM	1	1	1	1	1	1	1/2	1
EB	1	1	1	2	1	1	1/2	1
INH	1	1	1	1	1	1	1/2	1/4
RFP	2	2	1/2	1/2	1/4	1	1/4	1
LVFX	1	1	1	1	1	1	1/2	1
CAM	2	2	1	1	2	2	1/4	1
TH	1	1	1	1	1	1	1	1
AMK	1	1	1	1	1	1	1	1

Table 1. MFS familyに属する薬剤排出蛋白をコードする遺伝子を *M. smegmatis* で発現させたときのMICの変化(倍率)。MAP618c、MAP619cを発現させた時、Rifampicin(RFP)、CAMの2剤で、MICが2倍に上昇した。

	MAP0076	MAP1240c	MAP1738	MAP2239	MAP3049c	MAP3080	MAP3751	MAP3890
SM	1	1	1	1	1	1	1	1
EB	2	2	2	2	1	2	1	1
INH	1	2	1/2	1	2	1	1/2	1
RFP	1	1	1	1	2	1	1/2	1/2
LVFX	1	1	1	2	2	1	1	1
CAM	2	4	2	2	1	4	4	4
TH	1	1	1	1	1	1	1	1
AMK	1	1	1	1	1	1	1	1

Table 2. RND familyに属する薬剤排出蛋白をコードする遺伝子を *M. smegmatis* で発現させたときのMICの変化(倍率)。MAP0076、MAP1240c、MAP1738、MAP2239、MAP3080を発現させたものは、Ethambutol(EB)、CAMの2剤で、MICが2-4倍に上昇した。MAP3049cを発現させたものは、Isoniazid(INH)、RFP、Levofloxacin(LVFX)のMICが2倍に上昇した。