

1) 九州地区における高齢者肺結核の臨床的
検討

第 82 回日本結核病学会総会（大阪）2007

2) 当院における超多剤耐性結核の発生状況

第 59 回日本呼吸器学会九州地方会総会（大
分）2007

3) 80 歳以上の高齢者結核の臨床的検討

第 59 回日本呼吸器学会九州地方会総会（大
分）2007

研究協力者：

西村 一孝 NHO 愛媛病院 院長

阿部 聖裕 NHO 愛媛病院 統括診療部長兼呼吸器科医長

研究要旨

呼吸器ネットワークを利用して、四国の結核病床を有する高知病院、東徳島病院、高松東病院、および当院の4施設の在院日数、患者数、などの現状、問題点を検討した。4施設の平均入院患者数は平成16年から19年までおよそ34人、33人、29人、23人と減少を示し、均在院日数も平成15年、16年、17年、18年でそれぞれ78日、71日、67日、65日と減少傾向を示した。最新の多剤耐性結核患者数は7例で、増加は認めていない。新退院基準が設けられ、4施設全体の平入院期間短縮を阻む問題点として、高齢者の問題が大きい。また新退院基準に関して、愛媛県内の医療機関の内科系医師および後方支援医療機関、サービス機関関係者にA基準、B基準で在宅に退院する不安点やB基準で転院もしくは介護支援のサービスを受けることへの不安点についてのアンケート調査を行った。医師の回答ではA基準で退院することへの不安は68%、B基準でも46%であった。不安点の主なものとは早期の退院は、他者への感染、治療効果の不安、患者周囲の理解が得られ難いといったものだった。後方支援医療機関ではA基準に80%で、B基準に関しても69%が不安を感じていた。これらは医師に比べて、より強い不安が強いことが感じている。結核に関する啓蒙や、地域のDOTSを含めた支援の推進が必要であると考えられる。

A.B. 研究目的・研究方法：現在の結核医療の問題点は、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、結核病床運営の難しさなどが挙げられる。

(1) 呼吸器ネットワークを利用して、四国の結核病床を有する高知病院、東徳島病院、高松東病院、および愛媛病院の4施設の現状、問題点を検討する。平成19年の入院状況、多剤耐性結核患者数、病床の高齢者結核患者数・その問題、各施設での在院日数・入院短縮化の取り組み、DOTSの実施状況などを検討した。

(2) 新退院基準が平成17年に示され、それ以降の当院に置ける在院日数の変化や問題点を検討する。当院における平成17年4月から18年3月までに入院した初回治療塗抹陽性症例30例（多剤耐性、死亡例

は除く）を平成16年1月から同年12月の同様の症例36例と比較した。

(3) 新退院基準に関して地域の各医療機関はどのように理解し、不安を感じているかをアンケートにより検討する。愛媛県内の医療機関の内科系医師を中心にA基準、B基準で在宅に退院する不安点やB基準で転院もしくは介護支援のサービスを受けることへの不安点についてアンケートを送り、結果を検討した。さらに後方支援医療機関、サービス機関にも同様のアンケート調査を行った。また、今回の研究に関しては患者個人の情報を特定できるものは含まれていない。

C.D. 研究結果・考察：(1) 平成19年12月現在で、活動性肺結核病床数は192床、

その中の多剤耐性結核病床数は73床である。4施設の平均入院患者数は平成16年から19年までおよそ34人、33人、29人、23人と減少を示している。4施設全体で多剤耐性結核患者数は7例であり、増加は認めていない。新退院基準が設けられ、4施設全体の平均在院日数は平成15年、16年、17年、18年でそれぞれ78日、71日、67日、65日と減少傾向を示した。入院期間短縮を阻む問題点として、高齢者の問題が挙げられた。4施設で70歳以上の高齢者は約80%であり、介護の問題があり退院後の受け入れ先がみつからないことに各施設とも苦労している。病院・結核病棟の取り組みとして、クリニカルパスの使用、外の医療機関・施設への啓蒙など工夫が見られている。四国呼吸器ネットワークを通して、私達は結核患者の診断・治療・管理・病棟運営などの現状や問題点に対して、新しい対応の必要性が求められていることを認識させられた。

(2) 平均在院日数は平成16年が88±30日(中央値87)で、一方平成17年度は68±35日(中央値65)で短縮していた。患者背景には大きな変化はなく、在院日数の短縮は新退院基準の効果であることが示唆された。また退院の妨げる因子として、年齢、排菌量、病型があり、また家族や転院先の施設・医療機関の受け入れの問題は残された。

(3) 愛媛県内の医療機関の内科系医師を中心に90人にアンケートを送り、66人から回答を得た(73.3%)。アンケートの内容はA基準、B基準で在宅に退院する不安点やB基準で転院もしくは介護支援のサ

ービスを受けることへの不安点についてであった。A基準で退院することへの不安は68%と強く、B基準でも46%であった。B基準での転院や介護サービスの受け入れに関しては60%が不安であると回答した。不安点の主なものは早期の退院は、他者への感染、治療効果の不安、患者周囲の理解が得られ難いといったものだった。また同様のアンケートを後方支援医療機関、サービス機関にも行った。愛媛県内の後方支援医療機関、サービス機関の80施設から回答を得た(59.7%)。A基準で在宅に退院に関しては、不安を感じるという解答は80%で、B基準に関しても69%が不安を感じていた。これらは医師に比べて、より強い不安が強いことが感じられた。不安な項目は医師と同様であった。これらを解決するためには結核医療の中心的病院による啓蒙や、地域全体でのDOTSを含めた支援の推進とともに、新退院基準の有効性を検証していく必要があると考える。

E. 研究発表

(1) 論文発表

1. 教育入院を含めた呼吸リハビリに取り組み：阿部聖裕、濱田麻紀子 Home Oxygen Therapy vol 35、p20、2007
2. 地域医療連携室の設置で地域の医療機関との連携がスムーズに：阿部聖裕、西宮由美子 新医療 2007年9月号、196-197

(2) 学会発表

1. 当院結核病棟における新退院基準導入後の在院日数の変化。NHO 愛媛病院呼吸器内科：渡邊彰、阿部聖裕、市木拓、加藤亜希、佐藤千賀、西村一孝 第47

- 回日本呼吸器学会総会 東京 (5月
10~12日)
2. 退院基準に関する愛媛県アンケート調
査—後方支援医療機関、サービス機関を

中心に—。NHO 愛媛病院呼吸器科・臨
床研究部：阿部聖裕、渡邊彰、市木拓、
西村一孝、加藤亜希第 82 回日本結核病
学会総会 大阪 (6月5・6日)

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：国立病院機構呼吸器ネットワークを利用した患者宿主要因の SNPs 解析、T 細胞免疫機能解析、機能解析とこれを利用した治療戦略の開発

研究協力者：

岡田全司 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター長

研究要旨

1. 本年度はさらに 15k granulysin DNA で治療することにより抗結核治療効果を得た。画期的な成果を得た。
2. (政策医療呼吸器ネットワークを利用した)多剤耐性結核と T 細胞免疫機能解析(結核菌殺傷蛋白等)による新しい多剤耐性結核予防法及び治療法の開発。結核菌殺傷タンパク granulysin の定量的アッセイ系 ELISA 法を確立した。15K Granulysin Transgenic マウス及び9K Granulysin Transgenic マウスを作製した。これらを用い結核菌に対するキラーT 活性を介した生体内での結核菌、さらに国立病院機構東京病院 四元秀毅院長、大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 松本智成部長、国立病院機構福岡東病院 岩永知秋副院長(田尾義昭医長)、国立病院機構愛媛病院 西村一孝院長、国立病院機構山陽病院 上岡博院長(福永肇博士)、と共同研究で送付された多剤耐性結核患者の末梢血リンパ球(PBL)のキラーT 細胞分化因子、granulysin 産生能を解析した。
3. さらに多剤耐性結核患者では健常人に比較して著明にキラーT 分化因子産生の低下とキラーT 細胞の granulysin 産生が低下していることが示された。
4. SNIP 解析において多剤耐性結核(MDR-TB)患者では NRAMP1 の SNPs パターン(Asn 543 Asp)に違いが認められ、MDR-TB 患者では菌の細胞内処理の違いが関係する可能性が示唆された。

A. 研究目的

多剤耐性結核の新治療方式の開発：これまで明確な成果の上がない免疫療法や姑息的化学療法に一大進歩を印する可能性がある。また分担研究者の病院は呼吸器疾患の国療ネットワークの全国中核病院として、全国規模で症例にアクセスできる立場にある。したがって、①(政策医療呼吸器ネットワークを利用した)多剤耐性結核患者の結核菌殺傷蛋白である granulysin やサイトカインの測定と T 細胞免疫機能解析(結核菌殺傷蛋白等)による新しい多剤耐性結核予防

法及び治療法の開発 ②多剤耐性結核患者(国立病院機構政策医療呼吸器ネットワークを利用した)リンパ球を用いた新しい技術 SNPs 解析法による多剤耐性結核の診断法を開発するとともに、新しい治療法を開発する。(図 1)

B. 研究方法

1. 15k granulysin DNA をベクターに組み込みこれを 50 μ g C57BL/6 マウス及び BALB/C マウスの M.tibic anterior と大腿筋に i.m 投与して治療した。5 \times 10⁵人型

結核菌 H37RV を i.v 投与した後、15k granulysin DNA で治療した。

2. granulysin の測定は抗 granulysin 抗体、モノクローナル抗体を用いて ELISA アッセイで行った。
3. 多剤耐性結核性菌症で、既存の肺病変の有無は問わない。原則、説明と同意の可能な症例を対象とするが、本人に説明と同意が不十分であると客観的に判断される場合、本人とともに代諾者(保護者、家族)の同意を得る。説明文書、同意文書を用いて、インフォームド・コンセントを取得し、EDTA 採血にて 7ml 採取した。
4. 本年度は送付された多剤耐性結核患者の末梢血リンパ球 (PBL) のキラーT細胞分化活性、キラーT細胞分化因子産生能及び granulysin 産生能を解析した。コントロールとして健常人 (ボランティア) 末梢血 PBL を用いた。(図 2)
①キラーT細胞分化活性は多剤耐性結核患者 PBL を responder cell として 1×10^6 /well (24 マルチ well plate) にまき、stimulator cell としてヒト・アロ抗原 CESS B 腫瘍細胞株をマイトマイシン C 処理した後 1×10^5 /well $\sim 0.2 \times 10^5$ /well をがん刺激した。またポリクローナル刺激として 0.2% PHA-P 及び 5 μ g/ml ConA で刺激し、4 日間 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ インキュベーターで、培養した。4 日後に各 well よりエフェクター細胞を集め、E/T 比 (Effector/Target 比) を同じ条件として、⁵¹Cr 遊離法 (⁵¹Cr CESS) を用いてヒトキラーT活性を測定した。
②キラーT細胞分化因子活性 (IL-6 活性、IFN- γ 活性、IL-2 活性) に ELISA アッセイで測定した。さらに、ヒト末梢血 T細胞を responder cell とし紫外線 (U·V)

照射した CESS 細胞を stimulator cell とした MLTC の系に多剤耐性結核患者 PBL の種々の刺激培養上清を加えて、キラーT細胞誘導能を測定した。(Proc Natl. Acad. Sci USA Okada et al 1981 の方法に順じ)

③多剤耐性結核患者 PBL (1×10^6) を 20 μ g/ml PPD、20 μ g/ml \sim 100 μ g/ml 結核死菌、K562 1×10^6 、CESS_{MMC} 1×10^6 、PHA-P、ConA、Cowan1 で 4hr、24hr、及び 48hr、96hr 刺激してそれぞれの培養上清を集めた。これらの培養上清を用いて、キラーT細胞分化因子活性、及び granulysin (結核菌殺傷タンパク) 活性を測定した。

C. 研究結果

1. C57BL/6 マウスに H37RV 結核菌を投与した後、15K granulysin DNA を投与した群においては、granulysin に対する強力な抗体産生が血清中に認められることを明らかにした。
さらに granulysin DNA で治療後 4 \sim 8 週後のマウスにおいて、肺臓・肝臓・脾臓中の結核菌数が非投与群に比較して著明に減少した。(表 2)
2. (政策医療呼吸器ネットワークを利用した) 多剤耐性結核と T細胞免疫機能解析 (結核菌殺傷蛋白等) による新しい多剤耐性結核予防法及び治療法の開発。すでに、結核菌殺傷タンパク granulysin の定量的アッセイの系を確立した。
その結果、多剤耐性結核患者では granulysin 蛋白発現の低下が示唆された。さらにこれらの Tg マウスを作製した。その結果生体内結核菌数の低下が認められた。

3. 多剤耐性結核患者（国立病院・療養所政策医療呼吸器ネットワークを利用した）リンパ球を用いた新しい技術 SNPs 解析法による多剤耐性結核の診断法を開発するとともに、新しい治療法を開発するプロジェクトを共同研究で行った。すでに国立病院機構東京病院 四元秀毅院長、大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 松本智成部長、国立病院機構福岡東病院 岩永知秋副院長（田尾義昭医長）、国立病院機構愛媛病院 西村一孝院長、国立病院機構山陽病院 福永肇博士、研究協力者とした呼吸器ネットワークを作製した（表1）。さらに、これらの拠点施設を中心に全国 54 政策医療呼吸器ネットワーク、特に国立病院機構兵庫中央病院（黒須功医師）国立病院機構奈良病院（田村猛夏副院長）国立病院機構和歌山病院（駿田直俊医師）国立病院機構京都病院（佐藤敦夫医師）につなげた（図1）。
4. 多剤耐性結核患者 PBL を CESS_{MMC} や PWM、ConA、PHA で4日間刺激して、その培養上清中の granulysin を測定すると、健常人に比較して、granulysin の産生の著明な低下が認められた。（図3）
5. 多剤耐性結核患者 DNA の SNP 解析：候補遺伝子解析
結核感受性遺伝子群では、IL-10, IL-1RA, NRAMP1, IL-8, IL-12, IL-12RB1, MBL, SP, VDR, IFNG, P2X7, 11 遺伝子における 18 SNPs について解析を行なった。NRAMP1 の Asn543Asp の変異パターンに違いが見られた (odds ratio 1.32, CI 1.02-4.32, p=0.03)。その他の遺伝子における SNP 頻度の差異を認めてい

ない。

D. 考察

- (1) 15k granulysin-DNA 治療により生体内で抗結核作用が認められることより、granulysin は将来的に治療ワクチンとして強力な武器を提供するであろう。
- (2) すでに、結核菌殺傷タンパク granulysin の定量的アッセイの系を確立した。その結果、多剤耐性結核患者では granulysin 蛋白発現の低下が示唆された。さらにこれらの Tg マウスを作製した。その結果生体内結核菌数の低下が認められた。
- (3) ①SNPs 解析
及び②T 細胞免疫機能解析（特に granulysin）；
良い治療法がない MDR-TB に対し明確な成果が上がっていない免疫療法や新しい治療法の開発に画期的な進歩・貢献を寄与する。すなわち行政施策への活用・貢献が大である。これらの情報や測定法・治療法は本邦のみでなく世界に提供する用意がある。
- (4) 多剤耐性結核 (MDR-TB) 患者では NRAMP1 の SNPs パターン (Asn 543 Asp) に違いが認められ、MDR-TB 患者では菌の細胞内処理の違いが関係する可能性が示唆された。

E. 結論

1. 本年度はさらに 15k granulysin DNA で治療することにより抗結核治療効果を得た。画期的な成果を得た。
（政策医療呼吸器ネットワークを利用した）多剤耐性結核と T 細胞免疫機能解析（結核菌殺傷蛋白等）による新しい多剤耐性結核予防法及び治療法の開発。結核菌殺傷タンパク granulysin の定量的アッセイ系 ELISA 法を確立

した。15K Granulysin Transgenic マウス及び9K Granulysin Transgenic マウスを作製した。これらを用い結核菌に対するキラーT 活性を介した生体内での結核菌、さらに国立病院機構東京病院 四元秀毅院長、大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 松本智成部長、国立病院機構福岡東病院 岩永知秋副院長（田尾義昭医長）、国立病院機構愛媛病院 西村一孝院長、国立病院機構山陽病院 上岡博院長（福永肇博士）、と共同研究で送付された多剤耐性結核患者の末梢血リンパ球（PBL）のキラーT 細胞分化因子、granulysin 産生能を解析した。（表1）

2. さらに多剤耐性結核患者では健常人に比較して著明にキラーT 分化因子産生の低下とキラーT 細胞の granulysin 産生が低下していることが示された。
3. SNIP 解析において多剤耐性結核 (MDR-TB)患者では NRAMP1 の SNPs パターン(Asn 543 Asp)に違いが認められ、MDR-TB 患者では菌の細胞内処理の違いが関係する可能性が示唆された。

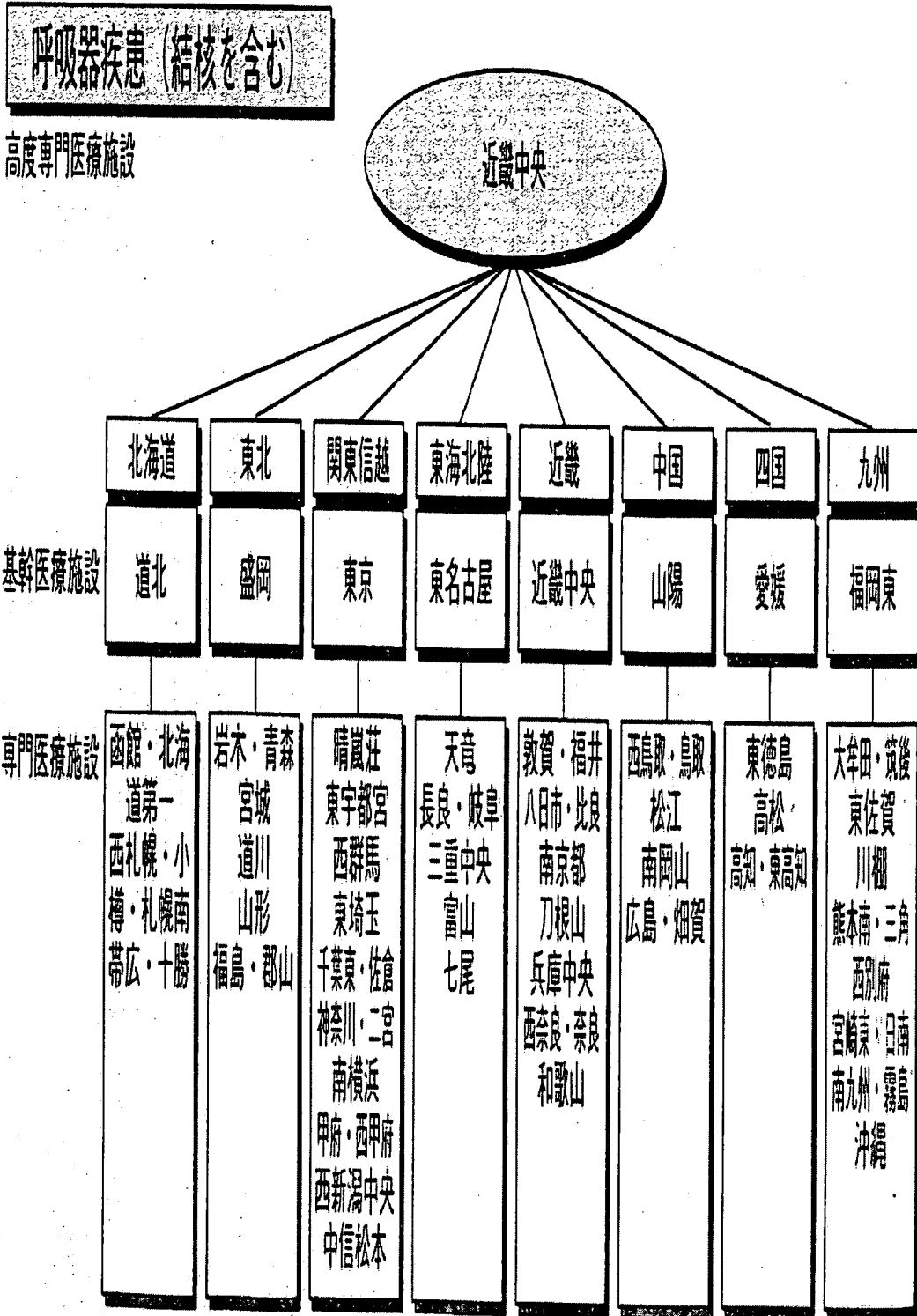


表 1

研究テーマ	
「多剤耐性結核に対する新たな治療方式の開発に関する研究：国立病院機構呼吸器ネットワークを利用した患者宿主要因のSNPs解析, T細胞 胞免疫機能解析, マクロファージ機能解析とこれを利用した治療戦略の開発」	
「耐性結核診療システムの確立」	
分担研究者	所属
坂谷光則	NHO近畿中央胸部疾患センター 病院長
研究協力者	
岡田全司	NHO近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター センター長
四元秀毅	NHO東京病院 病院長
松本智成	大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター
田尾義昭	NHO福岡東医療センター
西村一孝	NHO愛媛病院 院長
福永 肇	NHO山陽病院
鈴木克洋	NHO近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター 部長

図 2

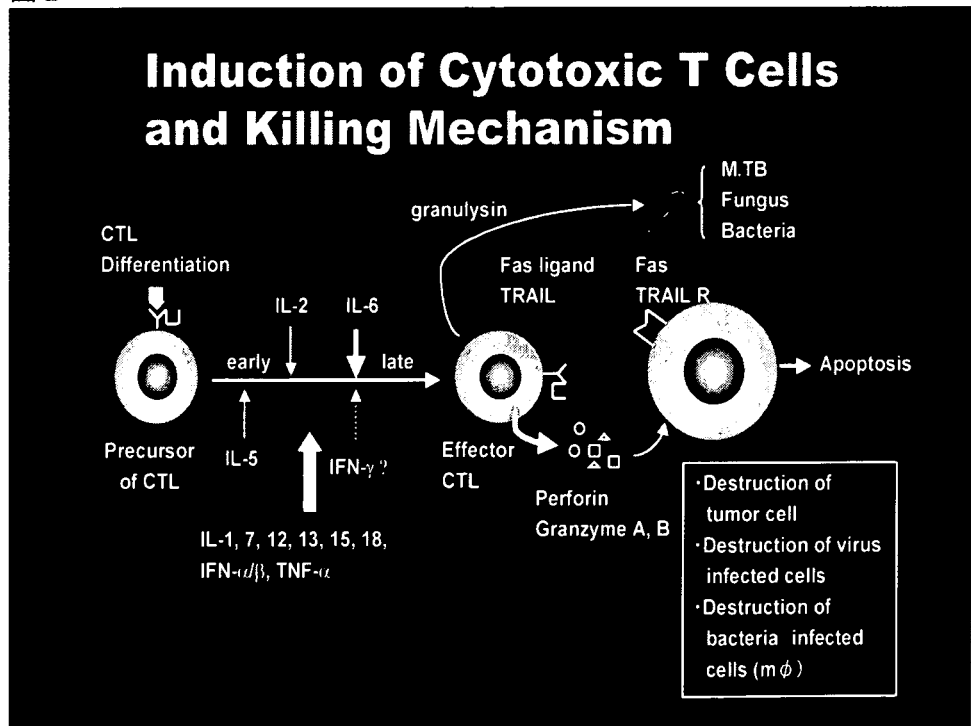
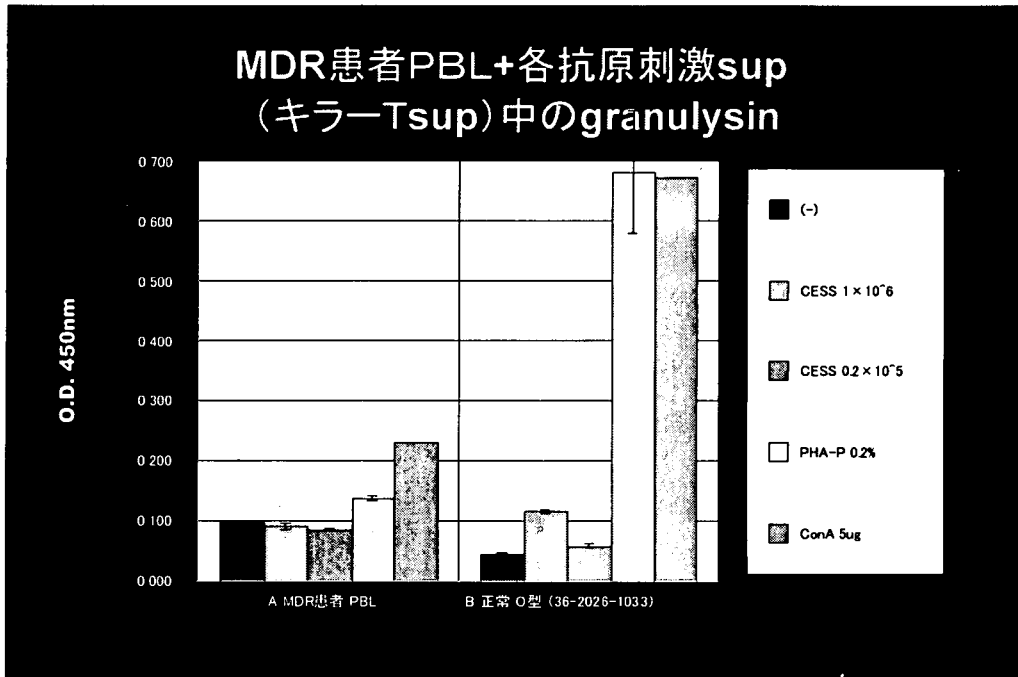


表 2

15K Granulysin DNA による結核治療効果

マウス	15K Granulysin DNA 治療	H37RV 投与	結核菌数減少(肺・肝・脾)
15K Granulysin DNA 投与群	+	+	++
コントロール群	-	+	-

図 3



G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Yoshida S, Suzuki K, Tsuyuguchi K, Okada M, Sakatani M.: Molecular Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis-Comparision between Multidrug-Resistant Strains and Pan-Sensitive Strains. Kekkaku. 2007;82(6):531-8.
2. Yoshida S, Suzuki K, Tsuyuguchi K, Iwamoto T, Okada M, Sakatani M.:Molecular epidemiological analysis of Mycobacterium kansasii isolates. Kekkaku. 2007;82(2):103-10.

「結核ワクチン HVJ-liposome/Hsp65 DNA+IL-12 DNA」

2005 年

岡田全司、吉田栄人、松本真

「抗酸菌症ワクチン baculo virus /Hsp65DNA」

2005 年

岡田全司、大杉義征

「移植免疫制御剤」 2005 年

2. 実用新案登録

3. その他

(2) 学会発表

1. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 富田元久, 坂谷光則 薬剤感受性試験でRFP感受性、耐性遺伝子検査でRFP耐性となる結核菌の検討 結核 82巻6号 : p.551, 2007
2. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 坂谷光則 結核菌の分子疫学的解析 多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌との比較 結核 82巻6号 : p.531-538, 2007
3. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 富田元久, 坂谷光則, 末竹寿紀 ピラジナミド耐性遺伝子検出キットの有用性の検討 結核 82巻4号 : p.416, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

岡田全司、高森靖、小川一行、永田欽也
「感染症治療剤 15K granulysin」

WO 03/070268 A1

2002 年

岡田全司、吉田栄人、金田安史、松本真

多剤耐性結核の分子疫学的検討

研究協力者：

露口一成 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター
感染症診断・治療研究室長

研究要旨

多剤耐性結核の感染様式を明らかにする目的で、当院で検出された多剤耐性結核菌株を対象に分子タイピングによるクラスター解析を行ったところ、感受性結核菌株と同等のクラスター形成率を示し、また、多剤耐性結核菌株の中にも大きなクラスター形成が認められた。多剤耐性結核菌株の中にも強毒株が存在することが示唆された。

A. 研究目的

結核菌の薬剤耐性は、菌の遺伝子の突然変異により生ずる。耐性菌は野生株である感受性菌に比較してその病原性は弱いと従来考えられてきた。しかし、近年多剤耐性結核菌による集団感染事例や再感染事例の報告が相次ぎ、耐性菌といえども必ずしも病原性が弱いとはいえないと考えられるようになった。我々は、多剤耐性結核菌の感染病態を明らかにする目的で、分子タイピングによるクラスター解析を行った。

B. 研究方法

対象は、当院で2000年1月から2005年12月までに当院で検出された多剤耐性結核菌株109株と、同時期に検出された全剤感受性結核菌株226株である。これらの菌株に対して、IS6110をプローブとしたRFLP法と、Spoligotyping法を施行し、クラスター解析を行った。

C. 研究結果

RFLP法では、多剤耐性結核菌株のクラスター形成率は43.1%、感受性結核菌株のクラスター形成率は43.8%であり、また、Spoligotyping法では、Beijing株の占める割合は、多剤耐性結核菌株で77.1%、感受性結核菌株で84.5%であり、いずれも有意な差を認めなかった。多剤耐性結核菌株のRFLP解析では、クラスター形成株は47株であり、12のクラスターが認められ、うち5株以上からなるクラスターが3つ存在した(クラスターa:11株、クラスターb:7株、クラスターc:7株)。クラスターaとクラスターbはBeijing株であり、クラスターcはBeijing株ではなかった。クラスターbには1名、クラスターcには2名の再感染発病者を含んでいた。また、クラスターcのうち5名は明らかに疫学的関連があり集団感染と考えられた。

D. 考察

多剤耐性結核菌株のクラスター形成率は感受性結核菌株と有意差を認めず、また、3つの大きなクラスターを含んでおり、多剤耐性結核菌にも伝搬しやすい蔓延株が存在することが示唆された。

E. 結論

多剤耐性結核菌の中にも、伝搬力の強い、強毒株と考えられる株が存在することが示唆された。今後は、耐性結核菌も感受性結核菌と同等の感染性を有するとの前提で感染対策を行っていくことが必要である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岡田全司、坂谷光則：結核菌の分子疫学的解明 -多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌との比較- 結核. 2007; 82(6): 531-538
- (2) 新井徹、井上義一、安藤性實、井上幸治、露口一成、鈴木克洋、林清二、北市正則、審良正則、坂谷光則：胸部 CT にて多発性リング状陰影(“reversed halo sign”)を呈した特発性器質化肺炎の1例 日本呼吸器学会雑誌. 2007; 45(8): 621-6
- (3) 露口一成、鈴木克洋：肺 *M. avium* complex (MAC) 症の診断と最近の動向. 日本胸部臨床. 66(7): 541-548, 2007
- (4) 露口一成、坂谷光則：非結核性抗酸菌(非定型抗酸菌)感染症. Circles. 2(8): 12-14, 2007
- (5) 露口一成：そのほかの結核の治療. 診断

と治療. 95(11): 1981-5, 2007

2. 学会発表

- (1) 飯沼由嗣、露口一成、猪狩英俊、鈴木公典：アンケート調査結果からみた結核院内感染暴露のリスクアセスメント. 結核 82(4) p385. 第 82 回日本結核病学会総会、大阪、2007年6月5日
- (2) 露口一成、吉田志緒美、鈴木克洋、岡田全司、坂谷光則：当院における多剤耐性結核の分子疫学的検討. 結核 82(4) p375. 第 82 回日本結核病学会総会、大阪、2007年6月6日
- (3) 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岡田全司、富田元久、坂谷光則、末竹寿紀：ピラジナミド耐性遺伝子検出キットの有用性の検討. 結核 82(4) p416. 第 82 回日本結核病学会総会、大阪、2007年6月5日
- (4) 露口一成、吉田志緒美、鈴木克洋、岡田全司、坂谷光則：血液透析を必要とする腎不全に合併した結核患者の臨床的検討. 結核 82(4) p442. 第 82 回日本結核病学会総会、大阪、2007年6月6日
- (5) 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岡田全司、富田元久、坂谷光則：Line Probe Assay を用いた抗酸菌同定キットの有用性の検討. 第 99 回日本結核病学会近畿地方会、大阪、2007年6月30日
- (6) 露口一成、吉田志緒美、源誠二郎、鈴木克洋、岡田全司、洪泰浩、林清二、坂谷光則：INH の予防内服により INH 耐性が誘導されたと考えられた結核の 1 症例. 第 99 回日本結核病学会近畿地方会、大阪、2007年6月30日
- (7) 新井徹、井上義一、大塚淳司、高藤淳、

源誠二郎、露口一成、鈴木克洋、林清二、
坂谷光則、審良正則、北市正則：
Hermansky-Pudlak 症候群の 1 例. 第 69 回
日本呼吸器学会近畿地方会、大阪、2007
年 6 月 30 日

- (8) 香川智子、西山明秀、露口一成、鈴木克
洋、林清二、坂谷光則、富田元久、北市
正則. 喀痰塗沫陽性、Tb-PCR 偽陰性とな
った肺結核の一症例. 第 100 回日本結核
病学会近畿地方会、京都、2007 年 12 月 8
日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

大阪における MDR/XDR-Tb の分子疫学解析に関する研究

研究協力者：

松本智成 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 臨床研究部 部長

研究要旨

15-optimized MIRU VNTR は、大阪における多剤耐性結核の分子疫学解析に充分な解像度を有しており有用な方法である。

A. 研究目的

近年、高度多剤耐性結核(eXtensively Drug Resistance- Tuberculosis: XDR-TB)が報告され世界的に問題になっている。XDR-TB とは、当初は INH, RFP 耐性以外に、主要な 2 次抗結核薬 6 グループ (aminoglycosides, polypeptides, fluoroquinolones, thioamides, cycloserine, and para-aminosalicylic acid) のうち少なくとも 3 グループが耐性の MDR-TB と定義され(1)。最近になって INH, RFP 耐性以外に、Fluoroquinolone 耐性と注射薬である capreomycin, kanamycin, amikacin のうち一つ耐性を満たす耐性結核菌と新たに定義された(2)。

結核菌分子疫学解析は、多剤耐性結核菌蔓延防止の為にサーベイランスに重要な道具の一つである。

我々は ETR および MIRU を会わせた 16 領域の VNTR(16VNTR)が多剤耐性結核の分子疫学解析に有用であると発表しているが、近年 Supply 等により 15/24-optimized MIRU VNTR が発表された。

(1). CDC. MMWR. 2006 Mar 24;55(11):301-5.

(2). WHO. Wkly Epidemiol Rec. 2006 Nov 10;81(45):430-2.

B. 研究方法

当院で得られた多剤耐性結核菌株に対して 15/24-optimized MIRU 領域で VNTR を行い既に得られている 16VNTR ならびに IS6110 RFLP の結果と H.G.I.にて比較する。

C. 研究結果

	H.G.I.
•12MIRU-VNTR	0.940
•16VNTR	0.965
•15-optimized MIRU VNTR	0.986
•24-optimized MIRU VNTR	0.986
•IS6110 RFLP	0.997

optimized MIRU VNTR は、15 および 24 領域とも、16VNTR よりも優れている。また、15 と 24 領域では MDR-/XDR-TB の解析において差が無かった。

D. 考察

多剤耐性肺結核、特に XDR-TB は、感受性結核菌に比べ適切な治療法が無いばかりではなく、現時点では治療法よりもいかに感染を防ぐかという公衆衛生学的手法に依存することの大きい疾患である。分子疫学解析を用いる事により新たな感染拡大を防ぐ事が望まれるが、今回 15-optimized MIRU VNTR はより少ない解析領域にて高い解像度が得られた事により有用であると判断する。

E. 結論

15-optimized MIRU VNTR は、大阪における多剤耐性結核の分子疫学解析に十分な解像度を有しており有用な方法である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 結核菌の分子疫学, 松本智成, 結核 82 巻 12 号 Page933-940(2007.12)
- (2) 特発性肺線維症の急性増悪に対する

昌身, 田村慶朗, 宍戸克子, 宍戸直彦, 石原英樹, 松本智成, 林下浩士, 鍛冶有登, 日本呼吸器学会雑誌 45 巻 11 号 Page890-897(2007.11)

- (3) 結核菌の分子疫学, 松本智成, 結核 82 巻 4 号 Page304(2007.04)
- (4) 結核菌の分子疫学, 松本智成, 呼吸器科 11 巻 4 号 Page398-408(2007.04)

2. 学会発表

- (1) 当院受診歴のある eXtensively Drug Resistant Tuberculosis(XDR-TB:高度多剤耐性結核)の状況, 松本智成, 阿野裕美, 山口統彦, 永井崇之, 田村嘉孝, 感染症学雑誌 81 巻 6 号 Page767-768(2007.11)
- (2) IS6110-RFLP を用いた分子疫学解析に基づく、超多剤耐性結核(XDR-TB)の感染状況, 阿野裕美, 松本智成, 河原邦光, 高嶋哲也, 臨床化学 36 巻 Supl.2 Page187(2007.10)
- (3) 当センターにおける人工呼吸管理を要した肺結核症例の臨床的検討, 久原華子, 山口徹, 田村嘉孝, 永井崇之, 松本智成, 高嶋哲也, 結核 82 巻 10 号 Page802(2007.10)
- (4) 多剤耐性肺結核の治療成績, 永井崇之, 久原華子, 山口徹, 田村嘉孝, 松本智成, 高嶋哲也, 結核 82 巻 10 号 Page801(2007.10)
- (5) 結核臨床における QFT-2G の Performance について, 田村嘉孝, 山口徹, 久原華子, 永井崇之, 韓由紀, 松本智成, 高嶋哲也, 結核 82 巻 10 号 Page801(2007.10)

Table. VNTR の歴史

1992	Hermans: Polymorphic tandem repeats の存在
1994	Goyal: KatG 遺伝子上流の繰り返し配列での型別
1998	Frothingham: ETR 6 領域による VNTR
2000	Supply: 12MIRU 領域による VNTR
2002	Roring: QUB 領域(1451c,1895,3232,3336,4156c)
2002	Le Fleche:Mtub 領域
2002	Skuce: QUB 領域(5,11a,11b,15,18,23,26)+ETR VNTR
2003	西森敬: 16(ETR+MIRU) VNTR
2006	Supply: 15/24 MIRU-VNTR

PMX(Polymyxin B-immobilized Fiber Column)-DHP(Direct Hemoperfusion)の効果 2 症例の比較, 吉田健史, 児玉

- (6) 結核発症関節リウマチ患者における抗 TNF- α 製剤治療, 松本智成, 山口統彦, 日本臨床免疫学会会誌 30 巻 4 号 Page307(2007.08)
- (7) 肺結核を有する食道癌に対して同時に積極的に治療をおこなった2例, 平良高一, 田村嘉孝, 松本智成, 鈴木秀和, 福田晴之, 町田浩久, 富永和作, 渡辺俊男, 藤原靖弘, 荒川哲男, 日本癌治療学会誌 42 巻 2 号 Page692(2007.09)
- (8) 抗酸菌感染症臨床と細菌学 同一患者から経時的に分離した結核菌株による、16VNTR と IS6110-RFLP の安定性の検討, 阿野裕美, 松本智成, 永井崇之, 田村嘉孝, 高嶋哲也, 感染症学雑誌 81 巻 4 号 Page516-517(2007.07)
- (9) 感染症とサイトカイン レミケード投与により結核発症した関節リウマチ患者へのレミケード再投与(その後の経過), 松本智成, 山口統彦, 永井崇之, 田村嘉孝, 感染症学雑誌 81 巻 4 号 Page508(2007.07)
- (10) 膠原病の肺合併症 高蔓延地域大阪での膠原病治療中の結核患者 50 症例の検討, 山口統彦, 松本智成, 鳥羽宏和, アレルギー 56 巻 3-4 Page318(2007.04)
- (11) QFT-2G による活動性結核補助診断の落とし穴, 松本智成, 久原華子, 山口徹, 田村嘉孝, 永井崇之, 高松勇, 土居悟, 阿野裕美, 河原邦光, 高嶋哲也, 結核 82 巻 6 号 Page552(2007.06)
- (12) 粟粒結核 11 症例における QFT-2G の有用性の検討, 久原華子, 山口徹, 田村嘉孝, 永井崇之, 松本智成, 高嶋哲也, 結核 82 巻 6 号 Page552(2007.06)
- (13) 結核発症関節リウマチ患者に対するインフリキシマブ投与, 松本智成, 山口統彦, 史賢林, 日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集 51 回・16 回 Page250(2007.04)
- (14) 膠原病、関節リウマチ治療中の結核発症についての検討(続報), 山口統彦, 松本智成, 永井崇之, 田村嘉孝, 高嶋哲也, 石原英樹, 南俊行, 鳥羽弘和, 日本呼吸器学会雑誌 45 巻増刊 Page198(2007.04)
- (15) レミケード投与により結核発症した関節リウマチ患者へのレミケード再投与(その理論と実際)の経過, 松本智成, 山口統彦, 阿野裕美, 永井崇之, 田村嘉孝, 高嶋哲也, 結核 82 巻 4 号 Page442(2007.04)
- (16) 膠原病治療中に発症した結核感染症についての検討(後報), 山口統彦, 松本智成, 永井崇之, 田村嘉孝, 高嶋哲也, 鳥羽宏和, 結核 82 巻 4 号 Page441(2007.04)
- (17) 抗結核化学療法中の副作用の原因薬剤の特定について DLST 検査の特異度についての検討, 山口統彦, 永井崇之, 田村嘉孝, 松本智成, 高嶋哲也, 鳥羽宏和, 結核 82 巻 4 号 Page413(2007.04)
- (18) 当院受診歴のある eXtensively Drug Resistant Tuberculosis(XDR-TB: 高度多剤耐性結核)の状況, 松本智成, 阿野裕美, 永井崇之, 田村嘉孝,

高嶋哲也, 西森敬, 結核 82 卷 4 号
Page375(2007.04)

(19) 多剤耐性結核の伝播と INH 耐性
遺伝子変異(katGS315T)の関連性の検
討, 阿野裕美, 松本智成, 永井崇之,
田村義孝, 吉多仁子, 高嶋哲也, 結核
82 卷 4 号 Page374(2007.04)

(20) 同一患者から経時的に分離した
結核菌株による、16VNTR と
IS6110-RFLPの安定性の検討, 阿野裕

美, 松本智成, 永井崇之, 田村義孝,
高嶋哲也, 西森敬, 結核 82 卷 4 号
Page369(2007.04)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含
む)

該当なし

感染防御細胞内での多剤耐性結核菌遺伝子検出に関する研究

研究協力者：

福永 肇 山口大学大学院 ゲム・機能分子解析学分野

研究要旨 生体の感染防御は液性免疫や獲得免疫で行なわれるが、病原菌を最初に認識するメカニズムとして自然免疫の役割が重要である。食細胞といわれる白血球やマクロファージを喀痰や病理組織標本から取り出し、その細胞内の細菌遺伝子や薬剤耐性遺伝子を検出する方法を開発した。これを用いて肉芽腫に封じ込められた結核菌が多剤耐性結核菌に変異する発生メカニズムを解明する方法を確立した。

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 以下の抗結核薬に長期間接することにより耐性化することを試験管モデルで証明してきた。この現象が肉芽腫に取り囲まれた組織や生体マクロファージ内で起こりうるかを検証するため、1つの食細胞を採取することができるマイクロダイセクション法と遺伝子変異の定量検出が可能なマ

イクロアレイ法を開発した。

B. 研究方法

グラム染色標本で確認される白血球およびマクロファージをマイクロダイセクション装置 (Nippon) のレーザーで切り取り、ガラスビーズ等の物理的破碎とアルカリ SDS による溶菌試薬を加え 65°C、45 分反応させ、緩衝液で中和させ核酸抽出を行った。更に微量な遺伝子をランダム・プライマーと Phi29 DNA ポリメラーゼで増加させた。これに肺炎原因菌 9 種および MRSA 薬剤耐性遺伝子(mecA)を検出するプライマーセットを用いた定量的 Multiplex PCR を行い、定量増幅した PCR 産物をマイクロアレイで検出した。マイクロアレイ検出はビオチンラベル d-Utp を cy 3 標識ストレプトアビジンで行い、マイクロアレイスキャナーで画像をコンピューターに取り込み遺伝子解析を行った。

(倫理面への配慮)

研究対象として患者喀痰からの病原細菌の薬剤耐性遺伝子であるため、直接的な倫理面の問題は生じてこないと思われる。しか