

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
露口一成 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター室長

研究趣旨

1. 本年度はリコンビナント 15K Granulysin タンパクで治療することにより、抗結核治療効果を得た。画期的な成果であり、治療ワクチンとなる可能性を示した。
2. 15K Granulysin DNA で治療することにより抗結核治療効果を得た。
3. (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 田尾義昭院長、国立病院機構愛媛病院 西村一孝院長、国立病院機構山口宇部医療センター 江田良輔統括診療部長、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。
4. リコンビナント 15K Granulysin を *in vitro* のマウス・キラーT 細胞誘導系に添加し、15K Granulysin タンパクはキラーT 細胞の分化を誘導することを明らかにした。さらに、*in vitro* のヒト・キラーT 前駆細胞からエフェクター・キラーT 細胞への分化にも 15K Granulysin タンパクはキラーT 分化因子とした作用することを明らかにした。また、15K Granulysin は IL-6 や IL-2 と相乗効果的にキラーT 細胞の分化を誘導した。すなわち、Granulysin は結核菌を直接殺傷する効果以外に、キラーT の分化誘導を介して抗結核作用を発揮することが示された。

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ってい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) (表1)

B. 研究方法

1. リコンビナント 15K Granulysin タンパクを 4 μ g/マウス (DBA/1, BALB/c または C57BL/6) *i.p* 投与した。結核菌 H37Rv を aerosol expose chamber を用い、 $10^7 \sim 10^8$ CFU/マウスにエアゾル経気道感染させた。これらのマウスにリコンビナント 15K Granulysin タンパクを治療投与した。約 1 ヶ月後に肺臓、肝臓、脾

臓の結核菌数を 7H11 寒天培地で 2 週間培養し測定した。

2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 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康人（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 \times 10⁶/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 \times 10⁶/well \sim 0.2 \times 10⁶/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 として 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 \times 10⁶) を 20 μ g/ml PPD、20 μ g/ml \sim 100 μ g/ml 結核死菌、K562 1 \times 10⁶、CESS_{MAC} 1 \times 10⁶、PWM、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。

6. リコンビナント 15K Granulysin 蛋白を in vitro のキラー T 細胞分化誘導後、(1) マウス spleen cells (BALB/c) + EL-4_{MAC} にリコンビナント 15K Granulysin を溶かし 5 日間培養し、⁵¹Cr 法でキラー T 活性を測定した。キラー T 活性増強効果でキラー T 分化活性を測定した。(2) ヒト PBL (末梢血リンパ球) + CESS (アロ腫瘍細胞)_{MAC} の系にリコンビナント 15K Granulysin を添加し 5 日間培養し、⁵¹Cr 法でキラー T 活性を測定した。

C. 研究成果

1. DBA/1 マウスまたは BALB/c マウスにヒト型結核菌 H37Rv をエアゾル感染 (1000CFU/マウス) させたあと、リコンビナント 15K Granulysin タンパク μ g/マウスを 6 回投与して治療効果を解析した。その結果、コントロール群と有意差 (p < 0.05) をもって、肺臓、肝臓、脾臓の結核菌数 (CFU) をリコンビナント 15K Granulysin タンパクの治療群は減少させた。すなわち、15K Granulysin タンパクは結核治療効果を発揮することを初めて明らかにした。(表 2)
2. 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 4~8 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 3)

3. (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 T g 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。
4. 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 (田尾義昭院長)、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、研究協力者としての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 (表 1)。

5. 多剤耐性結核患者 PBL を CESS_{mur} 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、健康人に比較して、granulysin の産生の著明な低下が認められた。(図 3)
6. リコンビナント 15K Granulysin を *in vitro* のマウス・キラー T 細胞誘導系に添加し、15K Granulysin タンパクはキラー T 細胞の分化を誘導することを明らかにした。さらに、*in vitro* のヒト・キラー T 前駆細胞からエフェクター・キラー T 細胞への分化にも 15K Granulysin タンパクはキラー T 分化因子とした作用することを明らかにした。また、15K Granulysin は IL-6 や IL-2 と相乗効果的にキラー T 細胞の分化を誘導した。すなわち、Granulysin は結核菌を直接殺傷する効果以外に、キラー T の分化誘導を介して抗結核作用を発揮することが示された。(図 4) (図 5) (図 6) (図 7)
7. 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。

図 1

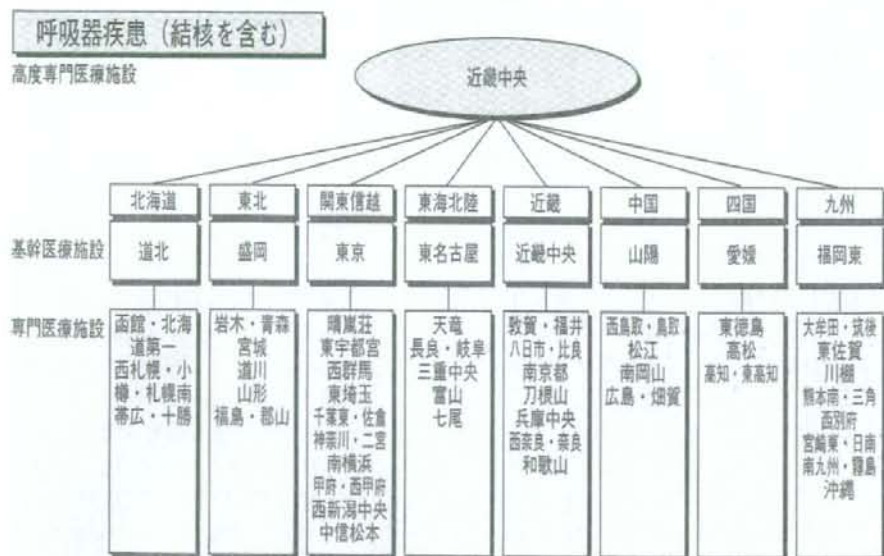


表 1

研究テーマ

「耐性結核診療システムの確立」

「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」

分担研究者 坂谷光則 研究協力者 岡田全司 四元秀毅 松本智成 田尾義昭 西村一孝 江田良輔 露口一成 鈴木克洋	所属 NHO近畿中央胸部疾患センター 病院長 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 NHO東京病院 病院長 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター NHO福岡東医療センター NHO愛媛病院 院長 NHO山口宇部医療センター 統括診療部長 NHO近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター 室長 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

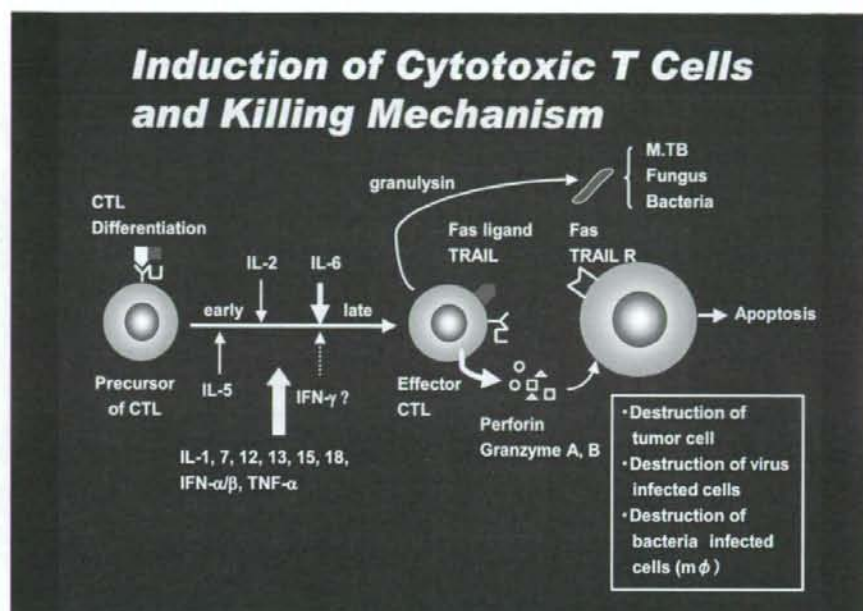


表 2

15K Granulysin タンパク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	-	+	-

表 3

15K Granulysin DNA による結核治療効果

マウス	15K Granulysin タンパク治療	H37RV 吸入感染	結核菌数 減少 (肺・肝・脾)
リコンビナント 15K Granulysin タンパク投与群	+	+	++
コントロール群	-	+	-

図 3

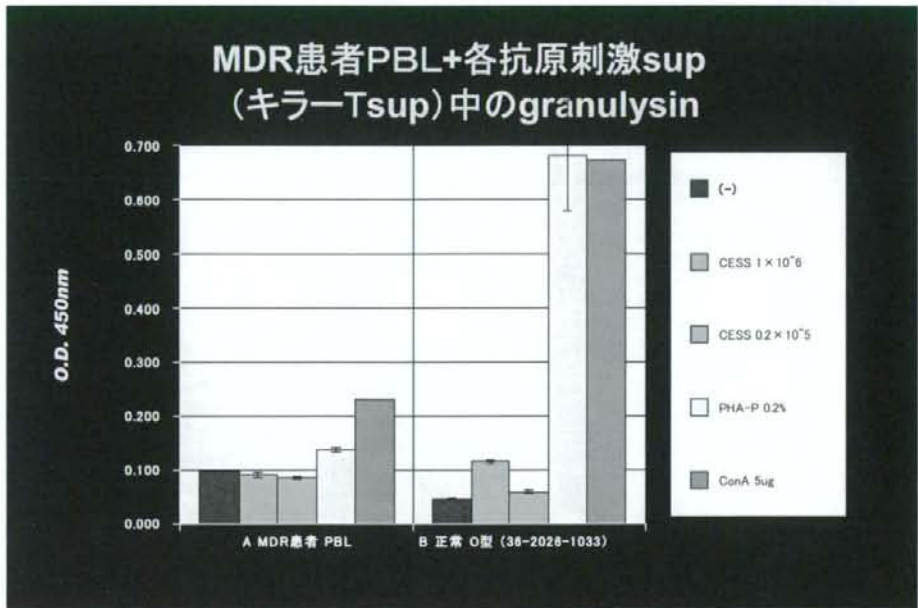


図 4

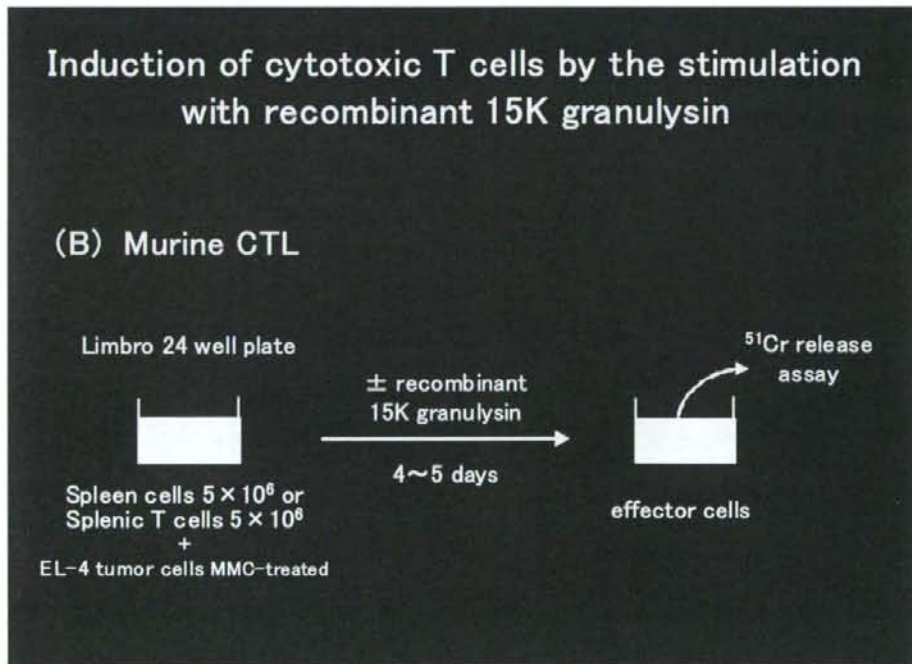


図 5

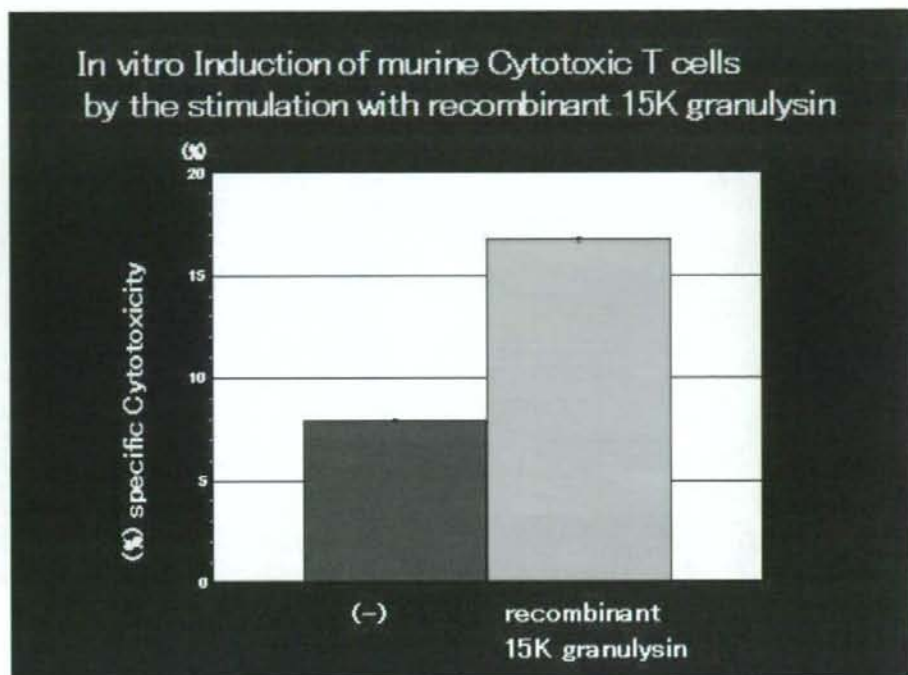


図 6

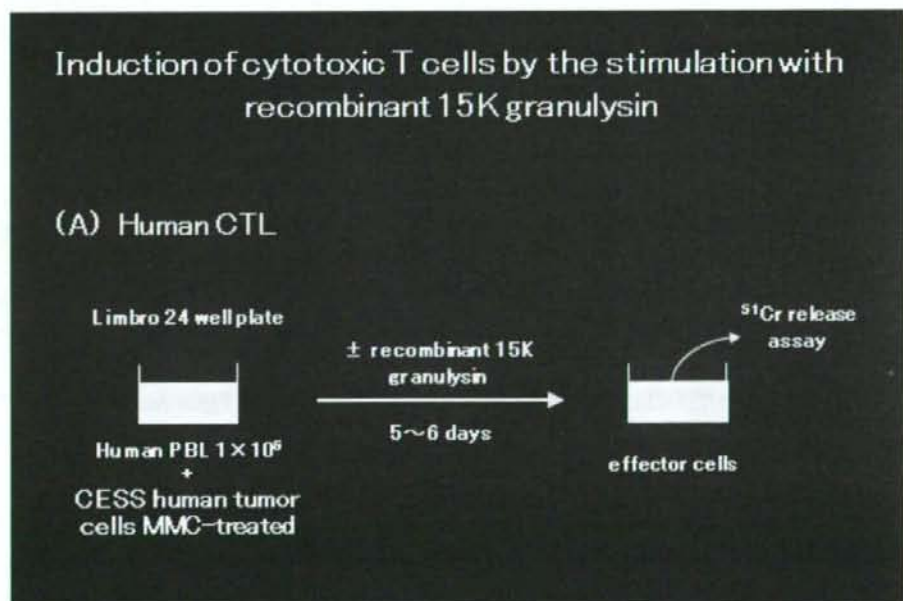
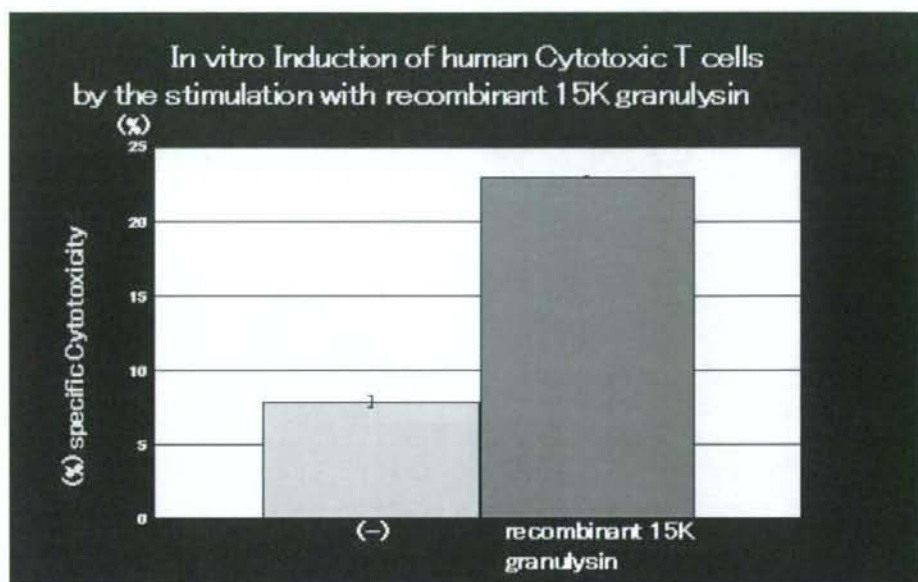


図 7



D. 考察

1. リコンビナント 15K Granulysin タンパク治療及び 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。
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. 本年度はリコンビナント 15K Granulysin タンパクで治療することにより、抗結核治療効果を得た。画期的な成果であり、治療ワクチンとなる可能性を示した。
2. 15K Granulysin DNA で治療することにより抗結核治療効果を得た。
3. (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 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

山口宇部医療センター 江田良輔統括
診療部長、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。

4. リコンビナント 15KGranulysin を in
vitro のマウス・キラーT 細胞誘導系に
添加し、15K Granulysin タンパクはキ
ラーT 細胞の分化を誘導することを明
らかにした。さらに、in vitro のヒト・
キラーT 前駆細胞からエフェクター・キ
ラーT 細胞への分化にも 15K Granulysin
タンパクはキラーT 分化因子とした作
用することを明らかにした。また、
15KGranulysin は IL-6 や IL-2 と相乗効
果的にキラーT 細胞の分化を誘導した。
すなわち、Granulysin は結核菌を直接
殺傷する効果以外に、キラーT の分化誘
導を介して抗結核作用を発揮すること
が示された。

耐性結核診療システムの確立

研究協力者：

田尾 義昭 国立病院機構福岡東医療センター 医長

研究要旨

多剤耐性結核診療ガイドラインの作成。すなわち、外来診療体制ガイドライン及び入院診療ガイドラインを作成した。(別添1)

A. 研究目的

1. 研究の意義：

毎年結核発症者の約1%が多剤耐性である。過去の不確実な服薬や中断による耐性獲得であったが、外来性再感染や初回感染発病例が増加してきている。設備をもった個室を備え、DOTを実施し、適応があれば外科治療も可能な専門医療機関で治療すべきであるが、入院すら同意しない患者もいる。そのような患者の治療管理については外来管理ガイドラインなどが必要と考えられる。

2. 研究の目的：

多剤耐性結核患者の新たな発生の抑制、また二次感染予防のために、外来および入院治療管理についての耐性結核診療システムのガイドライン作りは必要である

B. 研究方法 及び C. 研究成果

MDR 治療、予防法：

治療は、結核菌に有効とされるフルオロキノロン薬を含めた感受性のある抗結核薬を4剤(できれば5剤)以上併用して治療することが望まれる。

早期発見、早期治療に努める。入院管理においては、感受性検査が判明するまでは個室管理を行い院内感染を予防する。

RFP 耐性菌の迅速診断：

MDR-TB 接触者、結核治療歴、外国人入国者などリスクがあると思われる対象者は、液体培地による感受性検査や結核菌 rpo 遺伝子の変異検出を早期に行い、MDR-TB としての治療、処置が遅れないことが望まれる。

外来診療体制：

排菌患者は入院治療が原則であるが、入院を拒否している患者に対しての外来治療は一般患者と別の時間帯や場所を確保しなければならない。患者にはマスク着用、排菌患者用陰圧室で診察を行い、レントゲンなどは排菌専用の検査室が望ましい。保健所とも協議し、入院指導を行い、自宅生活での他人への感染予防の確認、指導など行う。また外来までの交通手段は自家用車などを使い、公共交通機関は避けなければならない。

入院診療体制：

MDR-TB 患者は感染防止のための設備を備え、かつ長期の生活に適した設備をもった個室を備え、DOTを実施し、適応があれば外科治療も可能な専門医療機関で治療すべきである。医療チームは、副作用の発現に細心の注意を払うとともに、治療期間が長期に及ぶこと、治療の成功率が必ずしも高くないこと、副作用の早期発見方法、排菌の推移、治療効果など患者やその家族に繰り返し説明し、治療が完了できるように、保健所などとも協力し、観察していくことが大切である。

D. 考察

1. 新たな課題：

長期入院の可能な病室、病棟設計等、患者の環境整備が不可欠である。

種々の合併症のある患者においてはそれに対応できる医療施設が非常に限られている。

2. 行政施策への貢献の可能性：

耐性結核診療システムにおける耐性結核

患者外来および入院ガイドラインは耐性結核患者の診療をスムーズに行う指標となる。

E. 結論

多剤耐性結核診療ガイドラインの作成。すなわち、外来診療体制ガイドライン及び入院診療ガイドラインを作成した。

研究協力者：

中島 由槻 国立病院機構東京病院 副院長

研究要旨

多剤耐性結核に対する外科療法のガイドライン（別添2）を作成した。

A. 研究目的

1. 研究の意義：INH、RFP 両剤耐性の多剤耐性結核症は、その抗結核化学療法による治療成績が不良であるいっぽう世界的には患者数が増加し、近年結核対策上の世界的課題となっている。その中で世界の諸施設から多剤耐性肺結核症に対する外科治療の有効性が報告され、治療戦略の一環となりつつある。我が国は高度な医療レベルにある先進国でかつ結核患者が多く、多剤耐性さらに超多剤耐性結核に対する外科治療の検討をする意義は極めて高い。

2. 研究の目的：筆者は過去に結核予防会複十字病院における多剤耐性肺結核症に対する外科治療成績について報告しているが、本研究ではその外科治療肺切除術の治療成績について改めて詳細に検討し、また対象症例に含まれる超多剤耐性肺結核症の外科治療成績も検討した。さらにそれらの検討結果をもとに、多剤耐性肺結核症に対する外科治療指針の作成を試みた。

B. 研究方法と C. 研究成果

[外科治療結果の概要] 肺切除術の内訳は、上葉切除±他葉部区切除が57%、区域切除12%、肺全切除29%。術後合併症は難治気腫が20%に、膿胸が9%に生じ、気腫・膿胸・呼吸不全の主要合併症が全体の25%で見られたが、手術死亡無し。治療成績は、切除後排菌持続2切除(2/93)、2ヶ月以上排菌停止後の再排菌10切除(再排菌率11%(10/91))、当初不成功12切除のうち5例は再切除、2例はその後の化学療法にて排菌停止し、最終的に治療不成功は4例5切除。その結果術後1年以上追跡し得た80例中76例で排菌停止、治癒となり治癒率は95%となった。術後再排菌の関与因子のうち残存肺

空洞遺残が重要と評価された。なお術前菌陰性化例の53%で病巣内結核菌陽性。検討症例内に2例の超多剤耐性結核例が含まれていたがいずれも治癒した。

D. 考察

1. 今後考えられる新たな課題：

- 我が国の多剤耐性肺結核症に対する外科治療例の集積と治療成績の検討
- 超多剤耐性結核に対する外科治療例に検討
- 多剤耐性結核性膿胸に対する外科治療例の検討

2 行政施設への貢献の可能性：外科治療の指針は有用性が期待できる。また世界の結核対策に貢献大である。

E. 結論

多剤耐性結核に対する外科療法のガイドライン（別添2）を作成した。

G. 研究発表

[学会発表] 研究の要旨を第18回アジア胸部外科学会で発表（2007.11.26.インドネシア、バリ島）。

[多剤耐性肺結核症に対する外科治療指針の作成] 平成20年8月に「耐性肺結核に対する外科療法のガイドライン」耐性肺結核（特に多剤耐性肺結核）に対する外科療法の評価を研究班に提出し、多剤耐性肺結核、膿胸に対する外科治療の指針を示した。

結核診療における迅速 RFP 耐性遺伝子検査の有用性

研究協力者：

鈴木 克洋 NHO 近畿中央胸部疾患センター 感染症研究部長

研究要旨

RFP は結核短期化学療法の要となる薬剤であり、結核菌が RFP に感受性か否かは治療法や予後に大きな影響を及ぼす。今回我々は通常の薬剤感受性検査では RFP が感受性であるが、臨床経過から RFP 耐性が疑われ、RFP の耐性遺伝子変異を認めた 5 症例を経験した。また RFP の薬剤感受性検査に変動があり、臨床的にも RFP 耐性が疑われ、遺伝子変異から RFP 耐性が確定できた 3 症例も経験した。全 9 例中 8 例は INH も耐性で、耐性遺伝子変異の検出により多剤耐性結核と判定された。また RFP 耐性遺伝子を調べることで 1 週間以内に多剤耐性結核を疑い、陰圧個室に隔離する体制の構築を行った。

A. 研究目的

結核が克服されたのは強力な化学療法が発達したため、薬剤耐性菌の存在はその状況を脅かす事態である。特に現在の短期化学療法で要である INH と RFP 両剤耐性(多剤耐性結核)は現在でも難治であり、その対策は急務となっている。結核菌の薬剤感受性は薬剤含有培地上での培養状況により決定する方法が従来から用いられている。現在世界的に標準となっているのは、卵培地上でのコロニー数を比較する比率法である。他に液体培地を用い迅速に薬剤感受性を判定する方法もある。しかし培養法を用いる薬剤感受性検査は生物学的アッセイ系であるため、過大評価(本当は感受性なのに耐性と判定する)と過小評価(本当は耐性なのに感受性と判定する)が避けられない。我々は小川比率法(ウエルバック)と液体培地法(MGIT960)では RFP 感受性であるが、臨床経過から RFP 耐性が疑われた症例、ウエルバックや MGIT960 の結果が動揺する例の RFP 感受性を確定するため、RFP 耐性遺伝子(*rpoB*)の変異の有無を検討した。また院内感染対策の一環として、ガフキー陽性かつ PCRTB 陽性例に同法を応用し、多剤耐性結核を疑い、早期に陰圧個室に隔離する制度を構築した。

B. 研究方法

ウエルバックと MGIT960 による薬剤感受性

検査は、説明書に従い通常の方法で実施し判定した。*RpoB* 変異は、市販の line probe assay キット(ジェノスカラー TB)を用いて判定した。その概略は以下の通り：*rpoB* の変異が集中しているホットスポットに重なり合う 5 個の野生型のプローブ (S1-S5) と代表的な耐性パターン (R2-R5) を設定する。結核菌 DNA を PCR で増幅し、先述したプローブとの結合の有無を発色反応で検出するものである。全ての S プローブが発色し、R プローブが一切発色しない場合が RFP 感受性と、それ以外の場合 (S の欠損または R の存在) が RFP 耐性と判定される。

C. 研究結果

発端となった 3 症例はほぼ同時期に当院に入院となった結核症例で全員が男性で大阪南部の同一市の居住者であった。INH を含む複数薬剤に耐性を示したが、RFP を含む複数の薬剤に感受性があり、入院 DOTS 下に有効薬による多剤併用療法を実施したにも関わらず、排菌が続き画像上の改善もないため RFP 耐性が疑われた。RFP 感受性はウエルバック、MGIT 両法で複数回確認した。ジェノスカラー TB では、全例 S4 欠損パターンで RFP 耐性が証明された。住所が同じ市であったため、IS6110 による RFLP を実施したところ同一パターンを示し同一菌株であった。その後 RFP 感受性でありながら排菌が停止しない 2

症例で、やはり *rpoB* の変異を認めた（一例は S1 欠損、一例は S2 欠損）。これら 2 症例由来結核菌の RFLP は前 3 症例ともまた互いにも異なるものであった。次いでウエルバックと MGIT による薬剤感受性結果に変動がある 3 症例の異なる時期にとられた複数菌株に対してジェノスカラー TB を実施したところ、全菌株で RFP 耐性が証明された（それぞれ S1、S3、S4 欠損）。

さらに平成 19 年 9 月より同法をルーチンに応用し、ガフキー陽性結核患者から 7 日以内に多剤耐性結核患者をスクリーニングする耐性を構築した。

D. 考察

多剤耐性結核の克服にとって、正しい薬剤感受性検査が迅速に得られることは必須の項目である。今回の症例は従来の培養法を用いる薬剤感受性結果に重大な疑義を投じるものであった。しかし今回のような例が多い訳ではなく、ほとんどの症例で従来の薬剤感受性結果と臨床経過はよく相関している。培養法による薬剤感受性検査は、どのような方法論を用いるにせよ、生物学的アッセイであるため、過大評価と過小評価が避けられない。その点薬剤耐性遺伝子の変異の有無の検討は遺伝子工学的的方法論により比較的安定した結果が得られるものと考えられる。実際今回の検討でも、臨床経過とよく相関する結果が全例で得られている。しかしながら耐性遺伝子が 1 個の RFP と異なり、耐性遺伝子が複数存在している INH などでは、耐性遺伝子変異を検討するキットの開発が難しいのが現状である。今後一般臨床で使用できる主要薬剤に対する耐性遺伝子変異の検出キットが開発・普及することが望まれる。

E. 結論

通常の薬剤感受性結果では RFP 感受性でありながら、臨床経過から RFP 耐性が疑われた 5 症例由来の 5 菌株には全て RFP 耐性遺伝子の変異が認められた。通常の薬剤感受性結果より、遺伝子変異の有無の検討の方が、臨床

的な経過とよく相関していた。

研究分担者：

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：①高齢者結核の現状および結核標準治療の副作用と在院日数に与える影響を検討した。PZAを含む4剤治療群と含まない3剤治療群の副作用に差はなかった。しかし両群で薬を中止または変更した約40%は標準治療法に戻せなかった。また副作用のあった症例の平均在院日数は84日と延長した。次に当院での平成18年-19年の2年間の新規肺結核患者の70歳以上の割合が70%と高い。高齢者ほど、また副作用や、介護・受け入れ先などの理由で入院期間が延長する。②四国の結核病床を有する国立病院機構施設の現状・問題点を検討した。四国4施設での多剤耐性結核患者数は2例と少数であった。合計平均患者数、平均在院日数はそれぞれ減少した。入院期間短縮を阻む問題点では高齢者で、排菌量、病型、家族や転院先の施設・医療機関の受け入れなどがある。

研究目的：結核医療の問題点は、高齢化、多剤耐性結核の予防・治療、副作用の問題、入院期間の長期化などが挙げられる。当院での現状や四国の結核病床を有する国立病院機構施設の現状・問題点を明らかにすることは、日本全体の結核医療の問題点を考える一助になると思われる。この研究では①高齢者結核の現状および結核標準治療の副作用と在院日数に与える影響、②四国の結核病床を有する国立病院機構施設の現状・問題点を検討する。

研究方法：①当院での平成16年4月から19年10月までに結核病棟に入院した結核患者のうち標準治療法を行った223例について副作用の頻度、問題点、在院日数への影響などを検討した。また平成18年、19年における高齢者結核患者の当院での現状を検討した。②呼吸器ネットワークを利用して、高知・東徳島病院・高松東病院・愛媛病院の施設の現状、問題点を検討した。また新退院基準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。

研究結果：①PZAを含む4剤治療（A群）は

107例（平均年齢62.7歳）、PZAを含まない

3剤治療（B群）は116例（平均年齢79.4歳）で、A群での副作用は22%、B群23%であった。

薬を中止または変更した51例のうち、標準治療法に戻せなかったものは23例であった。

副作用のあった症例の平均在院日数は84日であり、無い群（57日）に比べ長かった。また、当院での平成18年-19年の2年間の新規肺結核患者の70歳以上が約70%であった。他疾患治療中に肺結核と診断された例が半数見られた。高齢者になるほど入院期間の延長

が認められた。また副作用や、介護・受け入れ先などの理由で入院期間が延長することが挙げられた。②4施設での平成20年12月現在、多剤耐性結核患者数は2例であった。4施設の合計平均患者数は結核患者の減少、病床数の減少に伴い平成15年、17年、19年でそれぞれ136、117、85であった。また4施設の平均在院日数は平成15年、17年、19年でそれぞれ78日、67日、59日であり減少傾向を示した。入院期間短縮を阻む問題点では高齢者で、排菌量、病型、家族や転院

先の施設・医療機関の受け入れなどがある。

考察：結核医療の現状や問題点を日本全体で考えることは重要であるが、地域による患者背景や社会的要因の差が認められることより、地方行政単位での個別な分析も必要である。そのためにもネットワークを利用した詳細な分析・検討は重要であると思われる。また新感染症後の患者対応や施設での在院日数の影響などの変化も新退院基準の検証も踏まえて検討する必要があると考える。

結論：結核治療において、高齢者問題、副作用対策は重要な課題である。また結核患者の減少、結核患者数の減少により病棟運営や病院経営など多方面にわたる問題がある。今後も地域でのネットワークを通じて情報や問題を共有し解決にあたることが大切である。日本全体および地域別の結核医療の現状を明らかにすることはより有効な行政の対応を可能にする可能性があると考えられる。

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

- (1) 当院受診患者 167 名において、16 組の患者がクラスター形成をしていた。他はクラスター形成していない。クラスター形成していない多剤耐性結核患者は治療失敗による多剤耐性結核と仮定。おのおののクラスターにおいて治療失敗例で多剤耐性結核化 (secondary MDR) が 1 名存在、他は感染により多剤耐性結核発病 (primary MDR) と仮定する (実際は全てが Primary MDR の例もある) と治療失敗による多剤耐性結核患者は 95 名 (実際はもっと少ない)、感染による初回多剤耐性結核患者は 72 名となった。
- (2) 福岡東医療センター 8 株、埼玉東病院から提供を受けた 31 株中それぞれ 1 株ずつが当院保有の菌株と一致した。また愛媛病院からの家族内発生した菌株は、当院のクラスター形成菌株と 16 領域のうち 1 領域のみ異なる類縁菌株であることが判った。上記結果より、MDR-TB ならびに XDR-TB は、治療の失敗により個々に作られるのみならず、感染により発病拡大していることが推測され早急な感染防止対策が望まれることが判明した。今回、我々の研究にて多剤耐性結核の感染発病が予想以上に多く、しかも九州、関東地方に 16VNTR にて同一株が存在する事がわかった。

A. 研究目的

MDR-TB に対しては、感受性がある薬剤でも治療効果が INH, RFP に比較して劣り、しかも毒性が強く副作用の為に服用できない場合がある。さらに薬が高価でもある。MDR-TB は、診断時点で社会隔離のための入院が必要となり、入院期間も長く患者本人のみならず社会的にも大きな損失を引き起こす。しかも最近、より治療困難な XDR-TB が問題となってきた。従って、MDR-TB/XDR-TB の感染経路ならびに菌株間の類似性を分子疫学解析にて評価し、MDR-TB/XDR-TB の蔓延防止策を開発する事は重要である。当院で得られて既に VNTR タイピングを行った多剤耐性菌株でクラスター形成をしている菌株は、そのうちのひとつから他のクラスター構成患者に感染させたと仮定し、治療失敗による多剤耐性患者数と感染により発病した初回多剤耐性結核患者数の概算を求める。国立病院機構呼吸器ネットワークを利用し入手した多剤耐性結核菌株にて分子疫学タイピングを行い全国規模の多剤耐性結核分子疫学データベースを構築する。

B. 研究方法及び C. 研究結果

#1 大阪において感染による多剤耐性結核菌発病の概算

当院受診患者 167 名において、16 組の患者がクラスター形成をしていた。他はクラスター形成していない。クラスター形成していない多剤耐性結核患者は治療失敗による多剤耐性結核と仮定。おのおののクラスターにおいて治療失敗例で多剤耐性結核化 (secondary MDR) が 1 名存在、他は感染により多剤耐性結核発病 (primary MDR) と仮定する (実際は全てが Primary MDR の例もある) と治療失敗による多剤耐性結核患者は 95 名 (実際はもっと少ない)、感染による初回多剤耐性結核患者は 72 名となった。

#2 全国規模の多剤耐性結核菌データベースを作成するにあたって、九州地区、四国地区、関東地区のそれぞれ一施設の多剤耐性結核菌株を入手し当院における大阪多剤耐性結核菌群との比較。

福岡東医療センター 8 株、埼玉東病院から提供を受けた 31 株中それぞれ 1 株ずつが当

院保有の菌株と一致した。また愛媛病院からの家族内発生した菌株は、当院のクラスター形成菌株と16領域のうち1領域のみ異なる類縁菌株であることが判った。

上記結果より、MDR-TBならびにXDR-TBは、治療の失敗により個々に作られるのみならず、感染により発病拡大していることが推測され早急な感染防止対策が望まれることが判明した。今回、我々の研究にて多剤耐性結核の感染発病が予想以上に多く、しかも九州、関東地方に16VNTRにて同一株が存在する事がわかった。多剤耐性結核対策として、単剤加療や、加療中断による新たな耐性獲得を作らないことが重要であるが、今後は多剤耐性結核、特に高度多剤耐性結核(XDR-TB)を感染・蔓延させない対策も非常に重要になる。MDR-TB、特にXDR-TBは、感受性結核とは別の強化された対策が必要である。

D. 考察

石川班坂谷分科会にて薬剤感受性結核菌の分子疫学解析を行っている。同時に、多剤耐性結核菌の遺伝子もしくは死菌を輸送してもらい分子疫学解析を行う。

MDR-TB/XDR-TB 接触者ハイリスク群である多剤耐性結核病棟勤務者のQFT解析を行うとともに現在の安全基準が感染を予防できるか否かを検証する。

行政施策への貢献の可能性:

今回、我々の研究にて大阪におけるMDR-TB/XDR-TBの感染発病が予想以上に多く、しかも九州、関東地方に16VNTRにて同一株が存在する事がわかり全国規模でのMDR-TB/XDR-TBの分子疫学解析を含めた監視・感染防止体制が必要である。

E. 結論

(1) 当院受診患者167名において、16組の患者がクラスター形成をしていた。他はクラスター形成していない。クラスター形成していない多剤耐性結核患者は治療失敗による多剤耐性結核と仮定。おのおののクラスターにおいて治療失敗例

で多剤耐性結核化(secondary MDR)が1名存在、他は感染により多剤耐性結核発病(primary MDR)と仮定する(実際は全てがPrimary MDRの例もある)と治療失敗による多剤耐性結核患者は95名(実際はもっと少ない)、感染による初回多剤耐性結核患者は72名となった。

(2) 福岡東医療センター 8株、埼玉東病院から提供を受けた31株中それぞれ1株ずつが当院保有の菌株と一致した。また愛媛病院からの家族内発生した菌株は、当院のクラスター形成菌株と16領域のうち1領域のみ異なる類縁菌株であることが判った。

上記結果より、MDR-TBならびにXDR-TBは、治療の失敗により個々に作られるのみならず、感染により発病拡大していることが推測され早急な感染防止対策が望まれることが判明した。今回、我々の研究にて多剤耐性結核の感染発病が予想以上に多く、しかも九州、関東地方に16VNTRにて同一株が存在する事がわかった。

多剤耐性結核診療システムの確立

1. 研究の意義：

毎年結核発症者の約1%が多剤耐性である。過去の不確実な服薬や中断による耐性獲得であったが、外来性再感染や初回感染発病例が増加してきている。

設備をもった個室を備え、DOTを実施し、適応があれば外科治療も可能な専門医療機関で治療すべきであるが、入院すら同意しない患者もいる。

そのような患者の治療管理については外来管理ガイドラインなどが必要と考えられる。

2. 研究の目的

多剤耐性結核患者の新たな発生の抑制、また二次感染予防のために、外来および入院治療管理についての耐性結核診療システムのガイドライン作りは必要である

3. 研究成果：

MDR 治療、予防法：

治療は、結核菌に有効とされるフルオロキノロン薬を含めた感受性のある抗結核薬を4剤(できれば5剤)以上併用して治療することが望まれる。

早期発見、早期治療に努める。入院管理においては、感受性検査が判明するまでは個室管理を行い院内感染を予防する。

RFP 耐性菌の迅速診断：

MDR-TB 接触者、結核治療歴、外国人入国者などリスクがあると思われる対象者は、液体培地による感受性検査や結核菌 rpo 遺伝子の変異検出を早期に行い、MDR-TB としての処置が遅れないことが望まれる。

外来診療体制：

排菌患者は入院治療が原則であるが、入院を拒否している患者に対しての外来治療は一般患者と別の時間帯や場所を確保しなければならない。

患者にはマスク着用、排菌患者用陰圧室で診察を行い、レントゲンなどは排菌専用の検査室が望ましい。

保健所とも協議し、入院指導を行い、自宅生活での他人への感染予防の確認、指導など行う。

また外来までの交通手段は自家用車などを使い、公共交通機関は避けなければならない。

入院診療体制：

MDR-TB 患者は感染防止のための設備を備え、かつ長期の生活に適した設備をもった個室を備え、DOT を実施し、適応があれば外科治療も可能な専門医療機関で治療すべきである。

医療チームは、副作用の発現に細心の注意を払うとともに、治療期間が長期に及ぶこと、治療の成功率が必ずしも高くないこと、副作用の早期発見方法、排菌の推移、治療効果など患者やその家族に繰り返し説明し、治療が完了できるように、保健所などとも協力し、観察していくことが大切である。

4. 新たな課題：

長期入院の可能な病室、病棟設計等、患者の環境整備が不可欠である。

種々の合併症のある患者においてはそれに対応できる医療施設が非常に限られている。

5. 行政施策への貢献の可能性：

耐性結核診療システムにおける耐性結核患者外来および入院ガイドラインは耐性結核患者の診療をスムーズに行う指標となる。