

表 5

持続排菌103名		年齢	外来/全体
		40代	1/6
入院	84名	50代	5/22
在宅	19名	60代	7/30
		70代	3/23
		80代	3/20
		常に塗抹陽性	11名 (XDR 7)
		塗抹陰性ときに培養陽性	8名 (XDR 2)

図 5

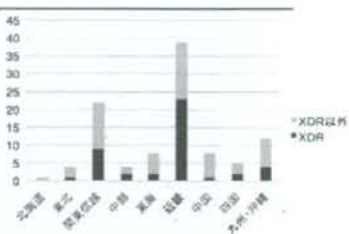


表 6

まとめ

1. 2006年の新規入院のMDRは93例であった。

・初回治療は31例で、若年者に多かった。

・XDRは12例であった。(初回1例)

2. 持続排菌例は、103例であった。

・2年以内の例が24例あった。

・XDRは43例であった。

・在宅患者は19例であった。

3. XDRの割合は新規入院MDRの11.8%

持続排菌MDRの41.7%であった。

(但し2次薬の感受性検査が十分でない症例が20%程度あった)。

表 7

結語

1. 多剤耐性結核患者は196名あった。
推定200名とほぼ一致

2. 確実に迅速な薬剤感受性検査が必要

3. XDR, MDRばかりでなく薬剤耐性結核の治療や管理は
国際的にも国内的にも重要な課題である。
世界的データでも多剤耐性の罹患率も中間どころ

4. 感染の防止、耐性獲得防止対策と治療させる挑戦が要求されて
いる時 DOTS, DOTS-plus

表 8

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	-	+	-

表 9

15K Granulysin タンパク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 8

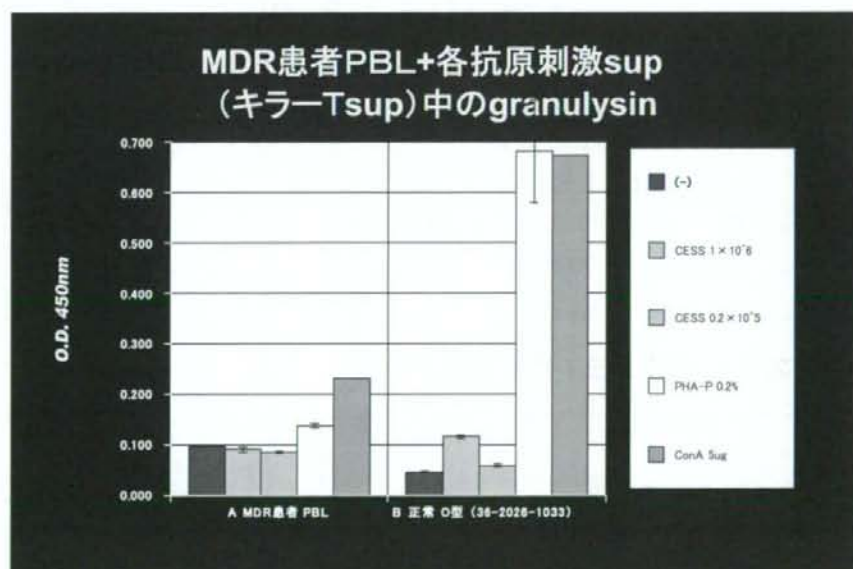


図9

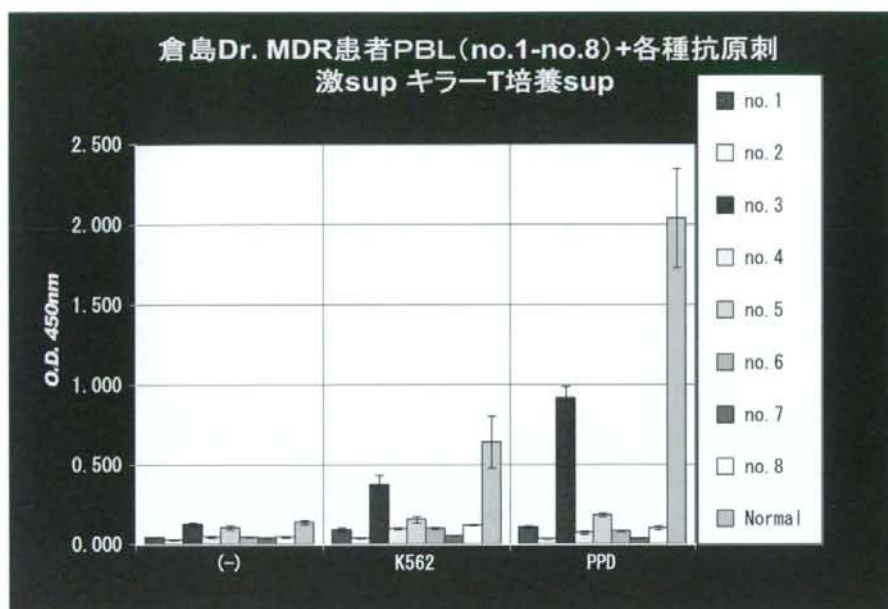


図10

候補遺伝子解析

(1) NRAMP1
 Asn 543 Aspの差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

(2) その他の遺伝子には差異を認めていない。

图 1 1

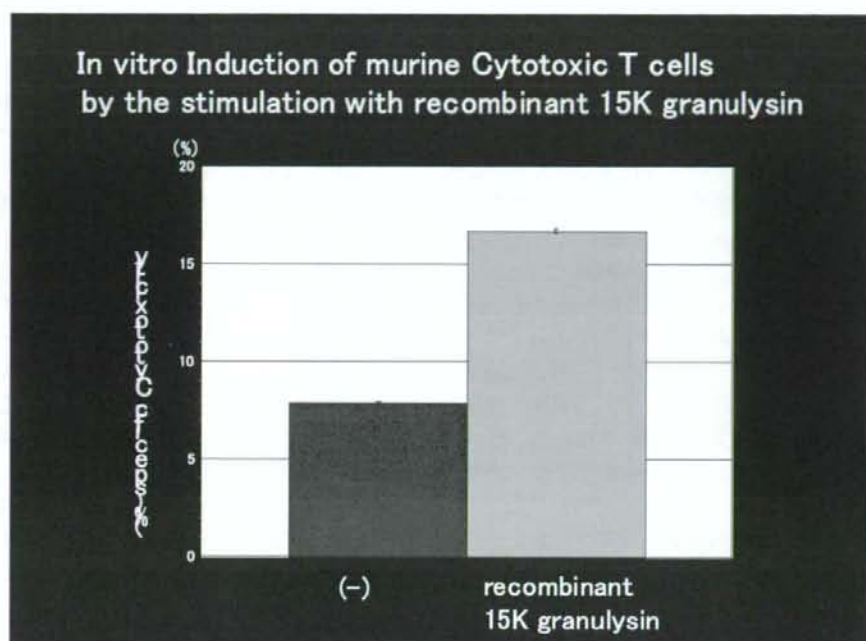
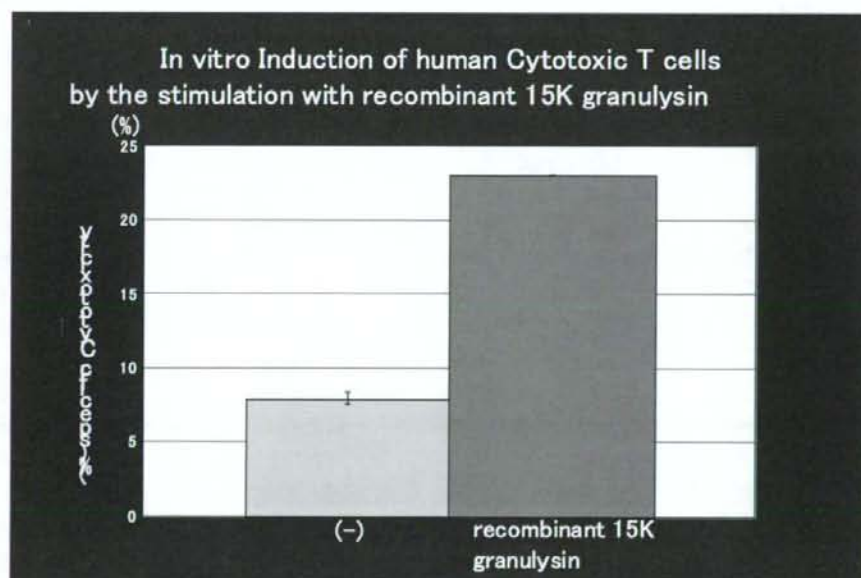


图 1 2



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。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。
3. さらに、リコンビナント 15K*Granulysin* タンパクを用い、マウスに生体内投与し、結核治療効果を得た。すなわち、リコンビナント 15K*Granulysin* ワクチン治療法を開発した。
一方、15K*Granulysin* はキラーTリンパ球前駆細胞に作用して、エフェクターキラーT細胞に分化させる活性、すなわちキラーT細胞分化因子活性を有することを初めて明らかにした。
4. 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 (MDR-TB) の感染・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。
5. 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。
6. 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。
7. すでに、結核菌殺傷タンパク *granulysin* の定量的アッセイの系を ELISA 法を用いて確立した。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。
8. MDR-TB 患者の TB リンパ球の結核菌殺傷蛋白 *granulysin* の発現測定については、我々が *granulysin* に対する種々のモノクローナル抗体をすでに作製し、FACS 解析で鋭敏に客観的に測定する方法を開発した。その結果多剤耐性結核患者 CD8⁺T リンパ球の *granulysin* 発現の著明な低下が認められた。したがってこのアッセイ系を用いた、新しい多剤耐性結核発症の宿主側の促進要因が解明される可能性がある。
9. 多剤耐性結核菌株のクラスター形成率は 44.0%であり、これは同時期に行った多剤耐性でない結核菌株のクラスター形成率 41.0%とほぼ同等であった。多剤耐性結核菌にも流行株が存在することが示唆された。また、クラスター形成株は、必ずしも米国で流行株として有名な Beijing 株とは限らなかった。
10. MDR-TB のスーパー Spreeder (super-spreader) の発見は多剤耐性結核患者の個室化等の行政施設に貢献している。VNTR 解析は極めて迅速な診断法となり早急に MDR-TB 患者を識別できる方法となる。これらの成果も行政施策への活用・貢献が大である。したがって、これらも本邦のみでなく全世界に提供する用意がある。
11. 初回多剤耐性菌は、多剤耐性結核と判明した時点で耐性が高く使用出来る薬剤がほとんどない場合が多い。さらに中国、ロシア、東ヨーロッパ、東南アジアにおける多剤耐性結核の広がりや国際化を考慮すると多剤耐性結核菌の外国株の国内流入も予想され、今後ますます増えてくると判断する。今後多剤耐性結

核感染ならびにその発病サーベランスが今までに増して要求されると考える。しかも近年では、世界的に見て高度耐性多剤耐性結核菌 (eXtensively Drug-Resistance tuberculosis: XDR-TB) が問題となってきた (CDC, 2006)。XDR-TB の場合、有効な治療薬が無く事実上、早期発見による外科的切除しか現時点では治療の可能性はない。今後 XDR-TB も増える可能性がある。国外からの流入を含めた結核感染経路解明ならびに感染拡大防止の新しい手法が求められる。一つの候補として分子疫学解析法があげられる。

E. 結論

1. 2006 年に発症した年間多剤耐性結核患者数と調査時点での多剤耐性菌持続排菌患者数を全国結核施設にアンケート調査した。前者は 93 例、後者は 103 例で、2002 年療研の薬剤感受性検査から推定された数値 (約 100 例および 200 例) と概ね一致していた。多剤耐性中の超多剤耐性結核患者数は 12 例および 44 例で、全体的には療研の割合 (30%) と同等であった。
 - ① 218 施設のうち 15 施設はすでに無床となっており、全結核病床は 6022 床であった。
 - ② 2006 年に新規入院となった多剤耐性結核症例は 93 例 (男性 71, 女性 22)、このうち 12 例が XDR であった。新規に多剤耐性と診断された 76 例のうち 31 例が初回治療、45 例が再治療で、治療開始約 1 年後の時点で、MDR では菌陰性化 64%、死亡率 7.2% だが、XDR では菌陰性化率も死亡率も 43% と治療は困難である。
 - ③ 調査時点で持続排菌がみとめられている 103 例では 43% が XDR、77% が発症 2 年以上の慢性排菌者である。これらの持続排菌者のうちの

19 症例が外来治療をしており、約半数は菌量が少ない症例であるが、半数は入院拒否している患者であり、感染コントロールの上で問題が大きい。

- ④ 年間の多剤耐性結核発症者数は 93 人、持続排菌している多剤耐性結核患者数は 103 例で、トータル 196 例中 XDR は 56 例で 28.6% となった。
 - ⑤ これらの患者は近畿地方、関東地方に多く分布しており、66% は国立病院、28% は公立病院、11% は民間病院で治療されていた。
 - ⑥ 50 才以上に多いが、初回治療に限れば 30 才にピークがある。
2. 多剤耐性結核診療システムガイドラインを作成した。
 - ① 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。
 - ② 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く、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。
3. 多剤耐性肺結核に対する外科療法のガイドラインを作成した。
 - ① 外科療法の対象
外科療法の対象は空洞性病巣である。また可能ならば径 2cm 以上の結核結節も切除をした方がよい。
 - ② 外科療法の適応
適応は以下の 3 項目を満たす場合と考える。①空洞性病巣が切除可能範囲内に限局している。②心肺機能上耐術である。③使用可能抗結核薬が多く残っている。さらに補足的事項として、1) 排菌源病巣を含む一側荒蕪肺は全切すべきである、2) 径 1cm 以下程度の散布性結核病巣を遺残させても空洞病巣を切除すれば排菌を停止させることは十分可能、3) 両側空洞例に対しても肺機能上耐術であれば 2 期的に両側手術を考慮して良い、4) 低肺機能で肺切除におけるリスクが高い肺尖部空洞性病巣に対しては胸郭成形術を検討する、5) 大量排菌例では空洞切開により排菌量を減少させることも選択枝の一つである、の諸点を挙げておきたい。
 4. 結核診療における迅速 RFP 耐性遺伝子検査の有用性を明らかにした。

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。
 5. 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、キラーT 細胞分化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、と共同研究で行った。(表 1)
 6. 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 3 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、平均在院に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。施設で対応困難な場合や対応施設を探す場合に、排菌症例を受け入れる施設が場合によっては同県になく他の県に依頼することが現実に起きている。また、緊急時の受け入れができないところが多くを占めている。緊急に受け入れ可能機関の整備が必要である。
 7. 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。

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。

8. 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。
9. 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。多剤耐性結核菌の中にも強毒株が存在することをRFLP法、Spoligotyping法で行い、三つ

のクラスター(クラスターa、クラスターb、クラスターc)株を見出し、明らかにした。クラスターa,bはBeijing株だが、クラスターcはBeijing株ではなかった。以上より、多剤耐性結核菌にも流行株が存在することが示唆された。

10. 国立病院機構呼吸器ネットワーク(図1)を利用した患者宿主主要因のSNPs解析、T細胞免疫機能解析とこれを利用した治療戦略の開発。(a)すでに多剤耐性結核患者末梢血80例を解析し、コントロール群(健康人対照者と薬剤感受性結核)と比較し、MSMD(Mendelian susceptibility to mycobacterial disease)群の候補遺伝子の解析を行った。その結果、NRAMP1のSNPパターンに違いが認められる結果を得たが、これを症例を増やして解析中。(b)MDR-TB患者のキラーT細胞から分泌される結核菌殺傷蛋白Granulysinの低下を明らかにした。Granulysinに対するモノクローナル抗体を作製した。これらを用いヒト血清中のGranulysin及びTリンパ球培養上清中のGranulysinのELISA診断法を開発した。さらに、Granulysin DNA治療によりマウスの系で結核菌に対する治療効果を得た。
11. 15K Granulysin Transgenicマウス及び9K Granulysin Transgenicマウスも作製した。これを用い結核菌に対するキラー活性が示唆された。

さらにリコンビナント15K Granulysinをマウス生体内i.p投与により強力な結核治療効果を得た。またin vitroのキラーT細胞誘導の系で15K GranulysinはIL-6やIL-2と相乗的にキラーT細胞の分化を誘導した。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。

- G. 研究発表
(1) 論文発表

1. Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Sakatani M, Okada M. :The study of Novel Vaccination using Granulysin transgenic mice. Vaccine. (in press)
 2. Yoshida S, Suzuki K, Tsuyuguchi K, Tomita M, Okada M, Sakatani M.: Evaluation of the discrepant Mycobacterium tuberculosis strains between any ordinary susceptibility testing and rpoB gene analysis by the line probe assay. Kekkaku. 83:577-583.2008
 3. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岩本朋忠, 富田元久, 岡田全司, 坂谷光則: 遺伝子を用いた抗酸菌鑑別同定試薬 INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 の有用性の検討. 結核. 84(1):15-21.2009
 4. 鈴木克洋, 露口一成, 吉田志緒美, 坂谷光則 : クオンティフェロン TB-2G 検査の意義. 臨床検査 52 (10) : 1139-1143, 2008
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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):531-538
 8. Suzuki K, Yoshida S, Tsuyuguchi K, Minamoto S, Inoue Y, Hayashi S, Okada M, Iuchi K, Sakatani M.:Chemotherapy for pulmonary M.kansasii disease. Kekkaku. 81:80-81, 2006
 9. Tsuyuguchi K, Yoshida S, Suzuki K, Okada M, Sakatani M.:Exogenous re-infection by multidrug-resistant tuberculosis. Kekkaku. 81:41-43, 2006
 10. 鈴木克洋, 吉田志緒美, 露口一成, 岡田全司, 坂谷光則: 多剤耐性結核菌の院内感染の現状と対策. 化学療法の領域. 22 1691-1695, 2006.
 11. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 岡田全司, 富田元久, 坂谷光則 : 培養陰性, 非結核性抗酸菌混在時における結核菌薬剤耐性遺伝子検査キットの有用性. 臨床検査50巻8号Page934-939, 2006.
 12. 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岩本朋忠, 富田元久, 岡田全司, 坂谷光則 : リファンピシン耐性 Mycobacterium kansasii における rpoB 変異の解明. 結核81巻7号 Page475-479, 2006.
- (2) 学会発表
1. 藤山理世, 田中賀子, 楢林成之, 樋口純子, 渋谷雄平, 青山博, 白井千香, 片上祐子, 千原三枝子, 吉岡伸子, 伴貞彦, 河上靖登, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則: 接触度を用いた, 結核接触者健康診断時に行った QFT-2G 検査の有用性の検討(会議録). 日本公衆衛生学会総会抄録 67 回. 582.2008
 2. 竹原由紀子, 三室由紀子, 西尾郁子, 宅見久子, 山形久美子, 伴貞彦, 田中賀子, 藤山理世, 河上靖登, 岩本朋忠, 園部俊明, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則: 若年多国籍集団における, QFT 検査を併用した, 接触者

- 健康診断の1事例(会議録). 結核. 83(9): 65. 2008
3. 田中賀子, 藤山理世, 樋口純子, 河上靖登, 岩本朋忠, 園部俊明, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則: 結核菌の遺伝子型別解析を行い, QFT 検査も併用した教育機関での接触者健康診断の1事例(会議録). 結核. 83(9): 65. 2008
 4. 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, 岩本朋忠: Line Probe Assay を用いた抗酸菌同定キットの有用性の検討(2)(会議録). 結核. 83(4): 401. 2008
 5. Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Sakatani M, Okada M. :The study of Novel Vaccination using Granulysin transgenic mice. ICWO. 9/23 ~ 25. 6th ICWO (Italia, Milan)
 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 結核 82 10:p.801, 2007
 7. 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 結核 82 10 : p.801, 2007
 8. 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
 9. 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 巻4号:p.442, 2007
 10. 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: ビ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
 11. 藤山理世, 河上靖登, 青山博, 白井千香, 樋口純子, 片上祐子, 平岡恭典, 千原三枝子, 岩本朋忠, 園部俊明, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則: 神戸市において, 結核定期外健診時に施行した QFT-2G 検査について. 結核 81 巻3号 Page279, 2006.
 12. 鈴木克洋, 露口一成, 吉田志緒美, 林清二, 岡田全司, 坂谷光則: QuantiFERON-TB 第二世代による結核院内感染対策の試み. 結核 81 巻3号 Page276, 2006.
 13. 藤山理世, 田中賀子, 中谷幸子, 樋口順子, 渋谷雄平, 青山博, 白井千香, 伴貞彦, 片上裕子, 千原三枝子, 栗木茂一, 吉岡伸子, 河上靖登, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則: 神戸市で結核定期外健康診断時に施行した QFT-2G 検査と接触度について. 公衆衛生学会 2006.10.富山
 14. 藤山理世, 田中賀子, 中谷幸子, 河上靖登, 大西理絵, 大福春子, 青山博, 白井千香, 片山裕子, 岩本朋忠, 園部俊明, 田中忍, 鈴木克洋, 岡田全司, 坂谷光則: 神戸市内での小中学生に QFT-2G を併用した定期外健康診断事例について. 第 97 回日本結核病学会近畿地方会. 2006.6.奈良
 15. 露口一成, 鈴木克洋, 坂谷光則: 肺結核患者の新退院基準 実際の運用と問題点について 国立病院機構退院基準の実際と運用上における問題点. 結核 81 巻3号 Page199(2006.03)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得 (出願中)
 2. 実用新案登録
 3. その他

多剤および超多剤耐性結核の全国調査
-2006年新規入院例と持続排菌例-

研究協力者：

四元 秀毅 国立病院機構東京病院 院長
豊田恵美子 国立病院機構東京病院 医長

研究の要旨

2006年に発症した年間多剤耐性結核患者数と調査時点での多剤耐性菌持続排菌患者数を全国結核施設にアンケート調査した。前者は93例、後者は103例で、2002年療研の薬剤感受性検査から推定された数値（約100例および200例）と概ね一致していた。多剤耐性中の超多剤耐性結核患者数は12例および44例で、全体的には療研の割合（30%）と同等であった。

A、研究目的

2000年以降、多剤耐性菌に加えさらに広範な薬剤に耐性を示す超多剤耐性結核が注目されるようになった。2002年療研による全国結核菌株薬剤感受性検査では3122株のうち60株が多剤耐性（MDR）、そのうち17株が超多剤耐性（XDR）であった。多剤耐性菌の割合1.9%は諸外国に比較すると中等度であるが、そのうちのXDRの割合28.3%は非常に高値で、しかも半数が初回耐性であったという。これは全国から収集した結核菌ベースの薬剤感受性調査に基づくものであるが、大きな危惧を抱かざるを得ない結果である。臨床ベースの実態と合致するものであるかを確認するため、全国結核医療施設の情報を収集し検討した。

B、研究方法

全国に結核病床を有する医療施設（270施設）に対して、2007年7月調査票1）及び2）を送付し、2007年12月までに回収した。調査の内容は、1）、2006年1月から12月に新規に入院し、多剤耐性結核と診断された症例数と各症例について年令、性別、過去の結核治療歴、薬剤感受性結果、治療内容、転帰等、2）、1）の該当症例以外に調査時点2007年7月時点で、排菌が止まらない症例（概ね3ヶ月1回以上培養陽性となるものとした）数と各症例について1）と同様な調査項目に加え、発症からの期間、入院治療か外来治療か等に

ついてであった。上記の調査票は218施設から得られた（回収率80.7%）。今年度は得られた調査票を集計し、解析した。持続排菌症例103例のうち19例が外来治療していたので、この19例についてはその背景や事情について追加調査を行った。

調査票の個別症例は施設と報告者の整理番号で取扱い、個人情報とは可及的に回避するよう工夫した。

また年令、性別、薬剤感受性パターン等を照合して登録の重複を避けた。

C、研究結果

1. 218施設のうち15施設はすでに無床となっており、全結核病床は6022床であった。

2. 2006年に新規入院となった多剤耐性結核症例は93例（男性71、女性22）、このうち12例がXDRであった。新規に多剤耐性と診断された76例のうち31例が初回治療、45例が再治療で、治療開始約1年後の時点で、MDRでは菌陰性化64%、死亡率7.2%だが、XDRでは菌陰性化率も死亡率も43%と治療は困難である。

3. 調査時点で持続排菌がみとめられている103例では43%がXDR、77%が発症2年以上の慢性排菌者である。これらの持続排菌者のうちの19症例が外来治療をしており、約半数は菌量が少ない症例であるが、半数は入院拒否している患者であり、感染コントロールの上で問題が大きい。

4. 年間の多剤耐性結核発症者数は 93 人、持続排菌している多剤耐性結核患者数は 103 例で、トータル

196 例中 XDR は 56 例で 28.6%となった。

5. これらの患者は近畿地方、関東地方に多く分布しており、66%は国立病院、28%は公立病院、11%は民間病院で治療されていた。

D、考察

多剤耐性結核は結核対策の重要な課題である。世界結核薬剤サーベイランスのネットワークが整備されて地域別に MDR 患者数と割合が推定され 4)、その治療成績は低く死亡が多いことが示された 5)。さらに 2000?2004 年に CDC と WHO が実施した 49 カ国の 17690 株の解析では、2 次薬にも広範囲に耐性を示す XDR-TB が広がっていることが報告された。全検体の 20%が MDR で、MDR 中の XDR の割合は 10%で、国別では米国 4%、ラトビア 19%、韓国 15%となっており、先進諸国でも XDR 検体率が年次上昇している 1)。日本では 2002 年療研 (結核療法研究会) が行った 3122 株の調査で 60 例 (1.9%) が MDR で低いが、うち XDR17 例の割合は 31%と諸外国に比べると著しく高く 2)、しかも半数が初回治療であったことが注目された 6) 7)。鹿住らは 1999 年に慢性排菌結核であった 1234 例から得られた 434 株の薬剤感受性検査を行い、321 株が MDR、うち 180 株が XDR でさらに XDR の半数が初回登録患者であったと報告している 8)。今回の我々の調査では、持続排菌症例が初回耐性か否かの区別は出来なかった。

2007 年 10 月に WHO は薬剤感受性検査の再現性と安定性に基づいて、INH、RFP に加え二次抗結核薬のうちフルオロキノロン耐性および注射薬であるアミカシン、カナマイシン、カプレオマイシンのうちの 1 剤に耐性を持つ結核菌を超多剤耐性結核菌 (Extensively drug resistant tuberculosis: XDR-TB) と定義が変更された 3)。日本ではアミカシンは未承認、カプレオマイシンはすでに販売中止で一般に薬剤感受性検査には含まれず、臨床的検討と

いえども国際的定義への正確性を欠くが、今回の検討ではフルオロキノロンはレボフロキサシンとして、アミカシンはカナマイシンに、カプレオマイシンをエンビオマイシンに置き換えて判定した (結果的には XDR と判定された症例はエンビオマイシン耐性のものはカナマイシンにも耐性であった)。

MDR-TB とりわけ XDR-TB の治療成績は不良で 1)、HIV と結核の重感染では死亡率が高く 9)、ラトビアでの 178 例の多変量解析では MDR 既治療、3 ヶ月以上の 5 剤以上の投与がされていないこと、オフロキサシン耐性、開始時 Body-Misa Index が 18.5 以下であることの 4 要因が多剤耐性結核治療の予後不良因子であった 11)。多田らも多剤耐性結核 46 例の多変量解析で、OFLX・LVFX 耐性が治療失敗と再発に関わる危険因子であることを報告している 12)。

かつて薬剤耐性株は感染性や毒性が弱いと信じられていたが、近年 INH 耐性株や多剤耐性株の集団感染や外来性再感染、若い世代での新発生の報告が相次ぎ、分子疫学解析法が重要な情報をもたらした 13) 14)、そうでないことがわかって来た。今や多剤耐性結核の感染性も考慮した院内感染対策や保健所活動が要求されることとなった。最近では日本の結核菌株は多くが古代型北京株であるが、若年者では近代型北京株が広がってきている。北京株は、高病原性で、耐性菌への突然変異が起こり易いなどの新しい知見がえられつつあり、治療や予防への関心を再び惹起すべきである。

今回のアンケートによる全国調査で、2006 年 1 月から 12 月で新規入院した MDR および XDR-TB は 93 例、12 例、その他の持続排菌患者 103 例、44 例と合わせて 196 例、56 例の多剤耐性および超多剤耐性結核患者を認めた。2006 年の新規登録菌陽性肺結核患者数 15315 人 16) と比較すると、おおよそ 1.3%、0.4%程度となる。

現在地球レベルでの多剤耐性結核への取り組みが拡がりつつある。New TB Drug Development (新薬開発への資金提供) の成果

として、新たな検査技術や有効な新薬が開発され強力な標準レジメンの確立も手の届くところに来ている 17) 18) 。の上の DOTS、DOTS-Plus (Stop TB Partnership の多剤耐性結核対策活動) の展開と Global Alliance 日本国内でも多剤耐性結核についての正確な情報の登録 19) と菌株保存が必要であり、DOTS 普及以降の結核患者要因や環境の変貌に伴い、新たな治療方式、難治例治療、薬剤感受性検査の精度管理など介入研究が展開されるべきと思われる。

E. 結論

多剤耐性結核症例について全国調査を行った。2006 年に新規入院した MDR-TB は 93 例で、そのうち XDR は 13%であった。持続排菌例を加えた 196 例中では XDR が 29%に及んでおり、日本でも DOTS に加えて多剤耐性結核対策が必要と考える。

G. 研究発表

豊田恵美子、川辺芳子、四元秀毅、坂谷光則、露口一成、前倉亮治、藤川健弥、高嶋哲也、小川賢二、吉山崇、杉江琢美：多剤および超多剤耐性結核の全国調査(2006 年)。結核

表 1

対象施設	
NHO	51施設 回答 43 施設
センター	1施設 回答 1 施設
結核予防会	3施設 回答 3 施設
公立病院	回答 135 施設
民間病院	回答 34 施設
回答率 218/270 (80.7%)	
回答施設の結核病床数 6022床	

図 1



図 3

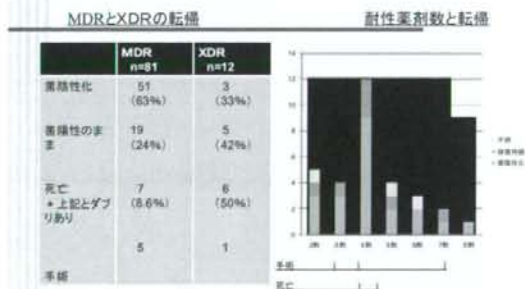


表 2

2006年新規入院MDR93名						
人数	初回	再治療	継続	不明	XDR	
20代	4	2	1	0	0	
30代	10	8	2	0	0	
40代	11	4	4	0	1	
50代	19	7	8	1	4	
60代	11	3	6	2	2	
70代	21	3	14	4	5	
80代	15	3	10	2	0	
90代	1	0	0	1	0	
不明	1	1	0	0	0	
合計	93	31	45	16	12	

図 2

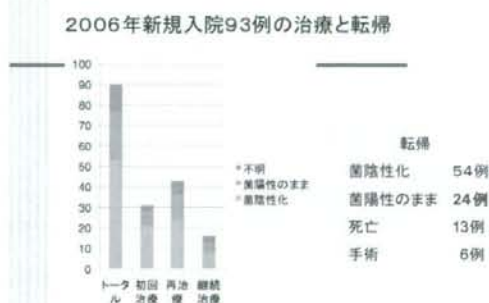


表 3

持続排菌103名 (年数は不明を除く人数)					
人数	~2年	~5年	~10年	10年~	XDR
20代	0	0	0	0	0
30代	1	1	0	0	0
40代	6	5	0	1	1
50代	22	5	1	8	8
60代	30	4	3	5	16
70代	23	4	4	3	8
80代	20	5	4	6	5
90代	1	0	0	0	1
合計	103	24	12	23	43

表 4

持続排菌103名		年齢	外来/全体
		40代	1/6
入院	84名	50代	5/22
在宅	19名	60代	7/30
		70代	3/23
		80代	3/20
常に塗抹陽性		11名	(XDR 7)
塗抹陰性ときに培養陽性		8名	(XDR 2)

図 4

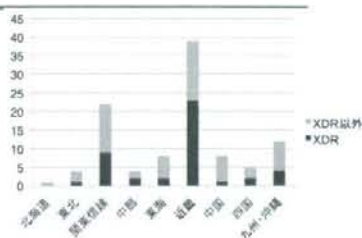


表 5

まとめ

- 2006年の新規入院のMDRは93例であった。
 - ・初回治療は31例で、若年者に多かった。
 - ・XDRは12例であった。(初回1例)
- 持続排菌例は、103例であった。
 - ・2年以内の例が24例あった。
 - ・XDRは43例であった。
 - ・在宅患者は19例であった。
- XDRの割合は新規入院MDRの11.8%
持続排菌MDRの41.7%であった。
(但し2次薬の感受性検査が十分でない症例が20%程度あった)。

表 6

結語

- 多剤耐性結核患者は196名あった。
推定200名とほぼ一致
- 確実に迅速な薬剤感受性検査が必要
- XDR、MDRばかりでなく薬剤耐性結核の治療や管理は国際的にも国内的にも重要な課題である。
世界的データでも多剤耐性の罹患率も中間どころ
- 感染の防止、耐性獲得防止対策と治療させる挑戦が要求されている時 DOTS、DOTS-plus

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。
5. 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。
6. 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、キラーT 細胞分化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。
7. SNP 解析において多剤耐性結核(MDR-TB)患者では NRAMPI 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。
8. 政策医療呼吸器ネットワークを利用した、種々の多剤耐性結核菌によるマクロファージ機能調節機構(TLR 等の発現調節)の解明において多剤耐性結核菌では TLR 4 の認識からエスケープする可能性を初めて明らかにした。さらに、スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌 TLR4 のみでなく TLR2 の認識からエスケープすることが示唆された。

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)(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、100~1000CFU/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 10⁵/well~0.2 \times 10⁵/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 \times 10⁶) を 20 μ g/ml PPD、20 μ g/ml~100 μ g/ml 結核死菌、K562 1 \times 10⁶、CESS_{MMC} 1 \times 10⁶、PWM、PHA-P、ConA、Cowan1 で 4hr、24hr、及び 48hr、9 6 hr 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 $\mu\text{g}/\text{マウス}$ 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。(表 3)
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。
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。(図 2) (図 3) (図 4)
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。(図 3)
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) 国立病院機構南京都病院 (佐藤敦夫医師) につなげた (図 1)。

5. 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、健康人に比較して、granulysin の産生の著明な低下が認められた。(図 5) (図 6)
6. 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, $p=0.03$)。 (図 7) その他の遺伝子における SNP 頻度の差異を認めていない。
7. 政策医療呼吸器ネットワークを利用した種々の多剤耐性結核菌による TLR 等の発現調節の解明と、この作用機序解明による新しい診断法、治療法の開発 → 多剤耐性結核菌を岡田に送付 → すでに多剤耐性結核菌では TLR の認識からエスケープする可能性を初めて明らかにした。さらに、スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌 TLR4 のみでなく TLR2 の認識からエスケープすることが示唆された。
8. 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

一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

一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8) (図9) (図10) (図11)

図1

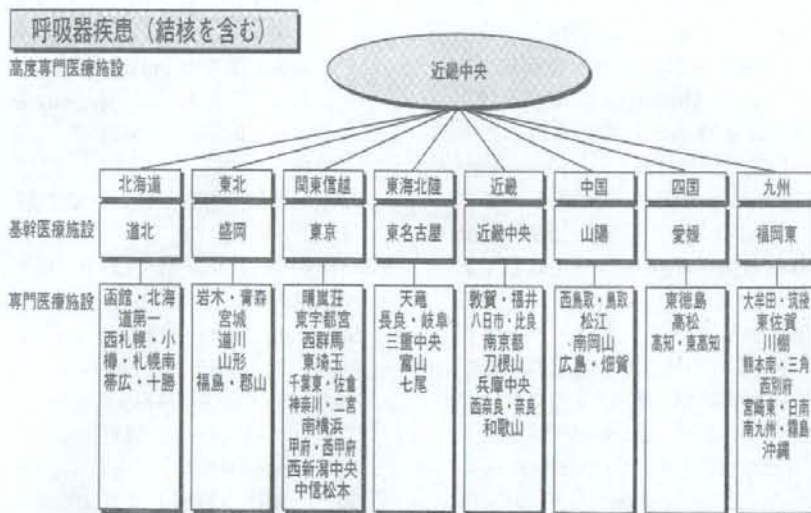


表1

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