

はじめに

わが国の小児結核患者数の減少は著しい。1960年には14歳以下の小児の新登録患者数は6万名を超えていたが、2000年には220名となり、その後も2006年には85名まで減少している¹⁾。同年に小児結核の患者登録が1例もなかった都道府県は20県にのぼり、さらにはこの数年間小児結核の登録が見られない県も複数あり、地域格差は否定できない。

しかし、小児の患者数が減少したとはいえ、結核を発病した小児の健康問題は重大な問題であり小児結核対策の後進がなくてはならない。今、より一層個別・重点的な対策をすべき時期に来ている。そこで、大阪地区では2003年より医療機関と保健所(行政)が一堂に会して「医療機関・保健所の合同症例検討会」を毎年開催してきた。症例を通して、それぞれ両者の立場から課題や疑問点があげられ、当日の参加者全員で考察を重ねてきた。このような検討会が今後の小児結核対策に貢献できると考えられるので報告する。

方法および対象

毎回、土曜日の午後半日で開催し、症例検討会形式で実施した。検討の対象は、その年度に

大阪府および府下の保健所設置市(大阪市・堺市・東大阪市・高槻市)の保健所に新登録された小児結核症例(14歳以下)とした。

検討会では、前半に大阪地区の小児結核の統計や、登録症例全体の特徴の提示を行った。その後、新登録症例群を各々20~30分ずつ、医療機関と保健所から合同で症例提示した。医療機関側は患児の診断や治療上の問題点、院内感染対策上の課題等を述べ、保健所側は健診や予防可能要因についての問題点、医療機関との連携上の課題等を提示した。

後半では、毎回結核に関する新たな話題として、「BCG直接接種導入に際しての各市町村の体制」や「QFT検査に関すること」などについて関係者、専門家を交えての検討会・情報交換を重ねてきた。

参加者数は第1回が50名であったが毎年増加が見られ、第4回では70名の参加となった。参加職種では、医師・看護師・保健師以外にも検査技師や診療放射線技師、事務職など多岐にわたる。

登録患者の推移

年齢階級別小児結核患者数の推移を図1に示す。平成10年までは大阪府下で40名以上の小児結核の登録があったが、近年は減少傾向であ

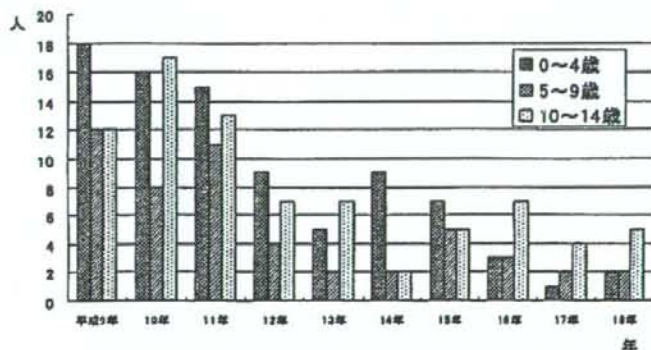


図1 年齢階級別小児結核患者数の推移(大阪府下全域)

り平成17年以降は10名以下となっている。年齢階級を0～4歳・5～9歳・10～14歳と3階級に分けると、以前は0～4歳以下の乳幼児群が多かったが、近年は10～14歳の小学校高学年～中学生症例の占める割合が多くなっている。

この間、平成15年度には小学1年生・中学1年生でのBCG再接種が廃止され、平成17年度

には乳児のBCG直接接種が導入されるなど、小児を取り巻く結核対策において大きな変動の期間であった。

検討症例の概要

第1回～第4回までに合計20症例の検討を行った。なお、この4年間の大府下における

表1 検討症例一覧 (平成15年～18年実施分)

事例	年齢(歳)	性	登録病名	病型	感染源	病型・塗抹	BCG歴	その他
1	0	男	肺結核・肺門リンパ節結核	bⅢ2+IH	父	bⅡ2, 1+	無	児の診断後父の発病判明
2	0	女	結核性髄膜炎・肺結核	bⅢ2	父	rⅡ2, 2+	無	児の診断後父の発病判明
3	1	女	肺門リンパ節結核・気管支結核	rH	母	rⅡ2, 2+	無	No. 8と姉妹
4	1	女	肺門リンパ節結核	rH	母および祖母	ⅠⅡ1, 1+ および bⅡ2, 3+	無	母: 治療中断 児: 治療終了
5	1	男	肺結核・結核性髄膜炎	ⅠⅢ2	祖父の姉の夫	bⅡ3, 1+	無	予防内服中断あり
6	2	女	肺門リンパ節結核	ⅠH	祖母	bⅠ3, 3+	無	家族健診を半年間拒否
7	2	男	結核性髄膜炎	0	祖父	bⅡ3, 1+	無	祖父は異常所見を長期間放置
8	3	女	肺結核	ⅠⅢ1	母	rⅡ2, 2+	無	No. 3と姉妹
9	4	男	肺結核・肺門リンパ節結核	rⅢ1+rH	父	rⅢ2, 3+	有	No. 13と姉弟 5人家族中3人発病, 2人予防内服
10	6	女	肺結核	rⅡ1	不明		有	帰国子女、学校健診発見
11	6	男	結核性胸膜炎	rpl	同居人	bⅡ2, G3	有	社会活動のため集団生活
12	7	女	肺結核・喉頭結核	bⅢ3	祖父	ⅠⅢ2, -	有	本文中症例1
13	9	女	肺門リンパ節結核	ⅠH	父	rⅢ2, 3+	有	No. 9と姉弟 5人家族中3人発病, 2人予防内服
14	11	男	肺結核	rⅢ1	父	bⅡ3, 3+	不明	本文中症例2
15	12	女	肺結核	ⅠⅢ1	同居人	bⅡ2, rpl, 3+	有	姉弟も発病
16	12	女	結核性胸膜炎	rpl	父	bⅡ3, ±	有	児の診断後父の発病判明
17	12	女	肺結核・頸部リンパ節結核	ⅠⅢ2	祖父	3+	有	接触者健診にてツ反 25 mm, 予防内服はせず
18	12	女	肺結核	ⅠⅢ1	不明		有	予防内服中断あり
19	14	男	肺結核	ⅠⅢ1	父	bⅡ2, 2+	無	5人家族中4人発病, 1人予防内服
20	14	女	肺結核	bⅡ2	親の友人	+	有	被ネグレクト児

小児結核の登録者数は46例であった。

20症例のうち0～4歳児が9例で、そのうちBCG接種歴があったのは1例のみであった。また5～14歳児は11例で、そのうちBCG接種歴があったのは9例であった。また20症例中感染源が確認・推測されていたのは18例(90%)であり、そのうちの17例は家族や同居人の身近な人からの感染であり、1例は親の友人であった(表1)。

結核患者や接触者における感染者が発生した場合、医療機関と保健所が連携して治療や服薬支援を行う必要があるが、その対象者が小児の場合はさらに学校や養護施設も関わってくることもある。小児結核の患児においては家庭環境が複雑なことも往々にしてあるので、小児結核に関わる多くの機関がともに連携する必要がある。そこで、今回はそのような観点から興味深い2症例を経験したので提示する。

症例1

患児：7歳女児(小学1年生)

登録病名(学会分類)：肺結核(bⅢ3)および喉頭結核

細菌状況：喀痰集菌塗抹：2+ 培養(+30)

BCG歴：あり

感染源(疑)：祖父、肺結核(塗抹・培養ともに陰性)

経過：祖父発症時の家族健診にてツベルクリン反応検査が発赤径32mm(+++)、胸部X-P異常なしにてフォロー終了となる。家族健診から2年4カ月経過した頃より、嘔声・咳・発熱等出現し複数の医療機関を受診するも結核との診断に至らず、そのまま7カ月間が経過した。その後さらに症状が悪化し、家族健診から2年11カ月後に胸部X-Pおよび喀痰検査を施行され肺結核と診断される。

入院時現症：顔色不良、眼結膜貧血様、聴診にて軽度の吸気時雑音(+)

入院時検査所見：SpO₂ 91%、ESR 97 mm (1 hr)、CRP 20.13 mg/dl、Hb 8.4 mg/dl、ツベルクリン反応 0×0/0×0 mm (-)。

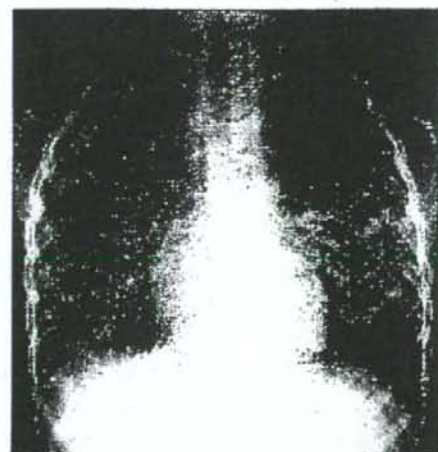
入院時X線写真：(図2)

入院後経過：抗結核薬4剤による治療に加え一時期はステロイド投与の併用も行った。治療開始2週目以降は菌の陰性化が認められた。2HRSZ/1HRS/9HRの計12カ月治療にて終了となる。

課題

① 接触者健診における予防内服の適応

感染源と思われる祖父が発病時に本児も接触者健診を受けているが、「若年者における化学予防の適応基準(平成元年旧厚生省エイズ結核感染症室長通知による)」に従い、ツベルクリン反応発赤径32mmは予防内服の適応外と判断された。また、その後の健診フォローについても初発患者(祖父)が菌塗抹陰性者であったため重要度ランクが「その他」扱いとされ、6カ月以降のX-Pも不要とされた。このように接触者健診ガイドライン²⁾を機械的に適用することの問題点が浮かぶと同時に、症例毎の接触状



両側全肺野にびまん性に広がる粒状陰影を認める。

図2 入院時胸部X-P(症例1)

況や排菌状況に合わせた慎重なフォローの重要性が再確認された。特に、初発患者が菌塗抹陰性の場合、多くの保健所や医療機関では感染性が「ない」に等しいと考えられており、接触者健診が不要と扱われる場合も少なくない。若年者、特に乳幼児が接触していた場合には、初発患者の排菌量のみにとらわれることなく慎重な検討が必要である。

② 診断の遅れによる重症化

嘔声や咳などの呼吸器症状が遷延し頻回に医療機関を受診していたにも関わらず、9カ月もの間に一度も胸部X-Pが撮影されないなど、診断の遅れにより重症化（多量排菌・高度貧血・低栄養状態）に至った症例である。このように遷延する呼吸器症状の原因が明らかでない場合や、当初の治療で改善が乏しい場合は、画像的評価も積極的に用いるべきである。

症例2

患児：11歳男児（小学5年生）
登録病名（学会分類）：肺結核（rⅢ1）
排菌状況：塗抹・培養ともに（-）
BCG歴：不明（針痕も認めず）
感染源：父 肺結核 bⅡ3
喀痰集菌塗抹：3+
治療開始時X線写真およびCT画像：（図3）、（図4）

生活背景：両親が離婚。父子家庭で府外より叔父宅へ転入

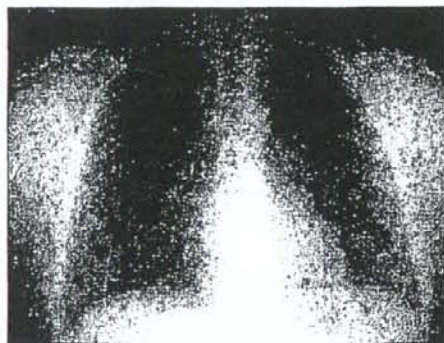
経過

父親：呼吸器症状が続いていたが医療機関を受診せず放置していた。職場の定期健康診断にて胸部X-P上の異常を指摘されていたが、仕事が休めないとの理由で4カ月放置となる。しかしその2カ月後、さらなる症状の悪化が見られ、医療機関を受診した時点では喀痰より塗抹G7号の排菌が判明した。すぐに結核専門病院へ紹介されたが受診はせずいた。結核を診断した

医療機関から出された結核患者発生届けを受理した保健所により、再三受診勧奨を行い何とか受診には至ったが入院は固く拒否しやむを得ず外来にて治療を行うことになった。

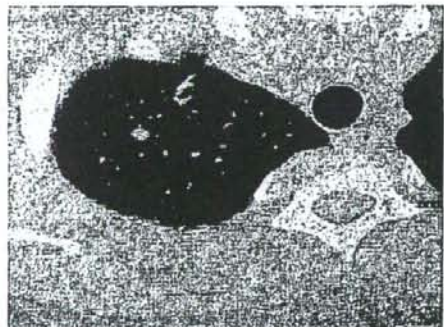
同居叔父：上記父親の家族健診を保健所が実施し、すでに結核を発病していることが判明。肺結核（bⅢ2）塗抹（-）培養（+）。アルコール依存症にて治療中。

本児：上記父親の家族健診にてツベルクリン反応（+++）、胸部X-Pでは異常なしのため予防内服開始となるが、1カ月後のX-P・CTにて右肺に結節陰影が認められたため、肺結核発病と



明らかな異常はなし

図3 治療開始時胸部X-P（症例2）



右上葉に小結節影および周囲に索状陰影を認める。

図4 治療開始時胸部X-P（症例2）

診断され治療開始となる。

本児は排菌がないため外来での治療が開始された。服薬支援の方法として保健所保健師による DOTS (Directly Observed Treatment, Short-course: 直接服薬監視下短期化学療法) を提案するも父親が強く拒否し、学校養護教諭による DOTS も同じく拒否した。本児が外来受診をする時にあわせて保健師が同伴受診することのみ可能となり、フォローを続けた。

しかし本児の治療中に父親が転落死し、父親の死亡以降は服薬中断が見られるようになった。養育者不在のため児童養護施設へ措置入所となり、以後施設職員による毎日 DOTS を実施し 2HRZ/4HR にて治療終了となった。

課題

① 複雑な家庭背景の中での信頼関係構築の困難さ

両親の離婚後、父親とアルコール依存症の叔父と本児の3人での生活という複雑な家庭環境の中、一家全員の発病事例である。またこれまでの生活においても外部者との関係を好意的に思わない父親であったため、保健師と父親との信頼関係の構築が困難であった。このような症例に対して保健所がどう寄り添うか、どこから信頼関係を築くかといった課題に直面した。

② 感染源である父親の有症状・有所見の長期間放置

父親が定期健康診断にて有所見であり、また自覚症状も続いていたにもかかわらず4カ月間放置していた。その後何とか受診した医療機関では当初「感冒」との診断であり、その後さらに症状の悪化があり結核との診断に至った症例である。受診の遅れ・診断の遅れは6カ月間にも及び早い時期に父親が治療に結びついていれば本児への感染・発病が予防可能であったかもしれない。しかし、父親としても子どもの養育に加え、アルコール依存症の弟(本児の叔父)も養わなければならない、何よりも「生活」が優

先であったのは事実であろう。

③ 父親死亡後の本児への服薬支援・精神的支援の必要性

本児にとって唯一の療育者である父親の突然の死、それにとまなう自分の施設入所、これらの出来事はまだ11歳という年齢の子どもに大きな精神的ダメージを与えたものと思われる。保健所や医療機関、そして施設のスタッフによる結核治療だけではなく生活全般の支援が不可欠であった。

まとめ

小児結核患者の家庭背景は複雑であることが多い³⁾。検討会に提示される症例の中にも、親をはじめとする成人の受診の遅れが多く見られる。児の発病をきっかけに家族健診を実施し、その時点で初めて感染源である両親など成人の発病が判明した事例も複数見られる(表1)。また、家族内での複数発病事例も多い。経済的な理由から受診ができないといった家庭環境にある子ども達の感染・発病が多く、医療よりも生活をまず優先といった状況であろう。そのような家族や患児に対して、医療機関と保健所・関係機関がどう連携していくか、検討会の回数を重ねることでお互いの役割や連携体制も強くなってきたと考える。この検討会を開始してからは、それまで以上に医療機関と保健所間で互いに相談しやすい関係になったことは事実であり、患児の治療に関することだけでなく生活背景や保護者への支援等、さまざまな問題を視野に入れきめ細かく対策を考えてきた。当日、参加しているさまざまな機関や職種で検討・意見交換を行うことにより、今後同様の事例に直面した時に生かされる教訓は多い。

また小児結核の症例の中には、発病予防可能例と思われるものが多い。高松の報告によると結核治療を行った患児86例中26例(30.2%)は発病予防可能例であったとされている⁴⁾。必

要な事例に対する予防内服の未実施や中断, また接触者健診の不徹底などが考えられるが, 発病児1例ずつ振り返ることは非常に有用である。実際, 小児における予防内服にもDOTSを導入したり, 感染源となった患者に排菌が見られない場合でもその接触者が乳幼児の場合には, 慎重に接触者健診を実施するようになるなど, 検討会で得られた教訓を生かして対策をすすめるようになった保健所も多く見られる。保健所は患者や患児への直接的支援だけでなく, 医療機関や福祉部門, また学校・施設等複数の機関の中心でコーディネーター的な役割もしっかりと果たさなければならない。

一方, 医療機関における診断能力の向上についても多くの意見が交わされた。呼吸器症状を長期間呈している小児に対して, 「結核」を鑑別診断の一つとして疑うことやX-P・CTなど画像検査の読影能力の向上, また新しい検査法としてのQFT検査の有用性についても討論がなされた。複数の症例については感染源である両親

等が排菌をしながら小児科病棟を出入りしていたことなども判明し, 院内感染防止対策をどのように進めるべきかといった点も議論された。

このような検討会方式の対策は, 医療機関にとっても行政にとっても教訓となる観点も多く, 大阪地区だけではなく, さらに全国の大都市部の小児結核対策への拡大が可能であり, 今後の行政施策に大きく貢献できる可能性がある。

文 献

- 1) 結核の統計2007, 財団法人結核予防会, 2007.
- 2) 森 亨編: 保健所における結核対策強化の手引きとその解説, 財団法人結核予防会, 東京, p31-33, 2000.
- 3) 永井仁美, 高松 勇, 他: 平成17年度厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「小児結核及び多剤耐性結核の予防, 診断, 治療における技術開発に関する研究」分担研究報告書, 2006.
- 4) 高松 勇: BCG再接種廃止・学校健診廃止に際して, 日小呼誌, 13: 115-130, 2002.

BCG接種副反応としての皮膚病変の最近の傾向

¹森 亨 ²山内 祐子

要旨:〔目的〕近年のBCG接種の副反応の一つである皮膚病変の発生状況等について明らかにする。〔方法と資料〕厚生労働省が発表する予防接種後副反応報告集計結果および医学中央雑誌による文献検索により発生件数の推移および病状に関する記載を分析する。〔結果と考察〕乳児期のBCG接種、とくに6カ月までの接種が普及している現在、接種による副反応としての皮膚結核様病変の発生頻度が明らかに上昇しており、予防接種後副反応報告による発生率は1995～2002年、2003～2005年度でそれぞれ接種100万対1.7, 11.8である。これは学会誌等への報告論文の件数の傾向などからも同様である。1997～2008年に論文報告された症例102件のうち全身性の皮疹は74件、限局性の病変は23件であった（どちらか不明のものが5件）。結核症と比較すると前者は結核疹、後者は真正皮膚結核（結核性疣、ループスなど）にほぼ対応する。近年増加傾向にあるのは前者であり、これは新しい制度による接種の乳児期への集中と関連していると考えられる。予後は両者とも良好であり、とくに抗結核薬治療が行われたのは前者では20%、後者では75%（外科的治療を含む）であるが、すべて軽快・治癒していた。前者ではSCIDや川崎病などの基礎疾患をもっている例が数例見られた。〔結論〕この型の副反応は深刻なものではないが、保護者に過重な不安や負担を与えないように関係者の十分な認識と適切な指導が望まれる。

キーワード: BCG, 結核疹, 皮膚結核, 副反応

近年の法制度の大きな改定で、とくに小児の結核予防については学校検診の大幅な改定とBCG接種の間引きに続き、平成17年度からは乳児のみを対象にした直接接種方式へと大きな転換が進められている。このような時期に当たって、BCG接種を高い接種率を保ちながら、高い技術水準で適正に行うことは至上命令ともいえる。そのなかで副反応に対する適切な措置も重要な意義をもつ。BCG接種による副反応としてはこれまでは腋窩リンパ節腫大が頻度からもまたその取り扱いの点からも重視されてきたが¹⁾²⁾、近年皮膚病変事例が増える傾向が懸念されていることから、本研究ではこれを採り上げて、対応について検討することとした。

材料と方法

国の刊行している「予防接種後副反応報告書」³⁾のNo. 1～12を通覧し、ここで掲載している「皮膚病変」につ

いてその推移や内容を要約した。次に医学文献データベース（医学中央雑誌）を基本に遡行検索や個人検索も援用し、2008年5月時点で日本国内のBCG副反応症例の報告をできるだけ広く渉猟し、皮膚結核様病変と思われるものを収集した。論文として刊行されているものもとより、学会発表の抄録、タイトルのみのもも分析によっては含めた。なお、重複発表例は最大限除外するよう努めた。

結 果

（1）予防接種後副反応報告による症例の推移

Table 1は、結核予防法による「予防接種後副反応報告」の制度が発足して以来平成18年3月末までに報告されたBCG副反応事例の累計分である。最も多く見られるのが「1. 腋窩リンパ節腫大」であり、全報告例の59%（「6A 腋窩以外のリンパ節腫大」を含めると64%）を占

¹国立感染症研究所ハンセン病研究センター、²結核予防会結核研究所

連絡先：森 亨、国立感染症研究所ハンセン病研究センター、〒189-0002 東京都東村山市胃袋町4-2-1
(E-mail: t-mori@nih.go.jp)

(Received 4 Dec. 2008 / Accepted 5 Jan. 2009)

める。ついで「2. 局所反応」(遅延性の潰瘍や、膿瘍形成)、「6C ケロイド」などであり、「4. 皮膚結核様病変」がこれに続く(まれにこれら2種以上の反応を併発する者もあるが絶対数は小さい)。この間の接種件数は2,577万人なので、これらの発生率(接種100万件対)は、リンパ節腫大21, 局所反応5, そして皮膚病変は2.3と、前2者に比して皮膚病変はごく少数にとどまっている。

しかし、その経年的変化は特異である。Fig. 1にみるように、平成11(1999)年には皮膚病変は4例だったが、その後不規則ながらも増勢を示し、平成14(2002)年以後は急速に増加した。平成15~17(2003~05)年度の報告件数は年平均で13.3件であり、これはそれ以前の年平均2.0件の6倍強に相当する。被接種者あたりの発生頻度を仮に平成7~14(1995~2002)年度、平成15~17(2003~05)年度の前後2期に分けて計算(便宜的に同じ年度の接種件数を分母として)すると、それぞれ接種100万対1.7(95%信頼区間:1.0~2.4), 11.8(8.7~14.8)となる。とくに多かった平成17(2005)年では発生率は23.1(15.2

~31.1)に達する。なお、この間腋窩リンパ節腫大も平成15~17年度報告の年平均は53.0件で、それ以前の45.8件よりもやや増加したが、皮膚病変はそれよりもはるかに大幅に増加していることが知られる。

皮膚病変発症例の接種時年齢は全58例中、50例(86%)が0歳であるが、1歳5例、2歳1例、4歳を超える者も2例あった。接種後病変発生までの時期を見ると、全体の28%が1カ月以内に、また85%(累計)が2カ月以内に発生している。残りの15%がその後半年間に発生する。

(2) 文献調査による発生・臨床像の動向

収集された報告は平成9(1997)年~20(2008)年4月までで総数102件であった。Table 2には報告されている皮膚病変を、1. 全身性の発疹、2. 限局性の病変、3. 不明(単なる「皮膚病変」のような表現のもの)に分け、さらに具体的にその内容に関する診断名などによる分類を示した。全身性の発疹としては接種部位から遠隔の身体部位にある程度以上の拡がりをもった病変が発生した

Table 1 Number and categories of adverse reactions due to BCG vaccinations according to the notification system (from October, 1994 until March 2006)

	Total	Infants					4 yrs +
		Subtotal	0 yr	1 yr	2 yrs	3 yrs	
Total	925	738	506	198	29	5	187
1. Axillary lymphadenopathy (greater than 1 cm diameter)	549	534	373	144	15	2	15
2. Local ulceration	129	76	49	19	7	1	53
3. Osteitis	10	10	-	7	3	-	-
4. Skin lesion	58	56	50	5	1	-	2
5. Generalized BCG-its	4	3	1	-	2	-	1
6. Other abnormal reaction	175	59	33	23	1	2	116
6A Adenopathy of other site	43	43	19	22	1	1	-
6B Acute local reaction	23	7	7	-	-	-	16
6C Others	109	9	7	1	-	1	100

Note 1. 6C Others: Mostly keloid.

2. The total number of BCG vaccinations given during 1983~2004 was 25,766,000 for all ages, and 13,821,000 for those aged 0~3 years.

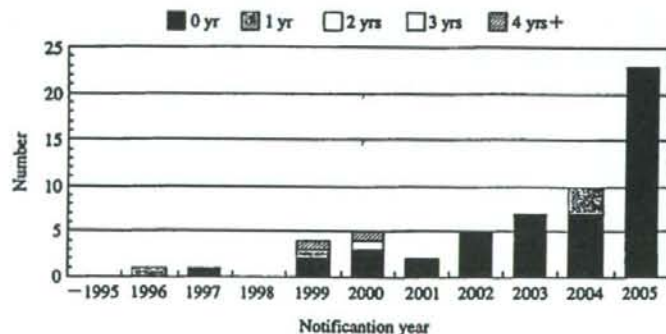


Fig. 1 Trends of number of notified cases of BCG-induced skin lesion according to age

ものを含み、必ずしも字義どおり全身に及ぶものばかりではない。Table中“Other clinical diagnosis”とされるものには、環状肉芽腫、紅斑状非定型的結核疹、散在性丘疹、散在性淡紅色丘疹、皮膚結核様病変、全身性丘疹状結核疹、多形滲出性紅斑が各1例ずつ含まれる。限局性の病変には接種局所本来の反応（潰瘍、膿瘍など、その遅延反応）は極力排除し、接種部位の近傍（前胸部や下顎など）を中心とした孤立性の病変を含む。Table中“Others”にはBCG肉芽腫、結核疹、結核性皮下膿瘍、肉芽腫性、小葉性脂肪膜炎、腺病性苔癬、反復性尋常性狼瘡、皮下結核性肉芽腫などと表記されているものが含まれる。

これらをさらに「I群：全身性の皮疹」「II群：限局性病変・その他」に大別し、それらの報告が行われた年次の分布を見るとFig.2のとおりである。このように、報告件数においてもやはりこの数年間の増加傾向は著し

い。I、II群のいずれも増加しているが、明らかに前者の報告件数の増加が著しい。ちなみに1998～2002年、2003～2007年の前後5年ずつに分けて報告件数を見ると、全体では37件から58件へと増加した。この増加はI群の症例が前後で20件から48件に大幅に増えたことによるもので、II群では17件から10件へと却って減少している。

次にこれら2群についてより詳細に分析する。この分析では上記の総数102件から記載が不十分な報告19件を除外し、I群、II群それぞれ70件、13件を対象とした。とくに後者は基本的に「結節・肉芽腫」（接種部位とは別の部位に生じたもの）に限定した。

I群：全身性の皮疹 男児31例、女児31例、性別不明8例。発症して受診した時の年齢は6カ月までが57%、12カ月までが88%（累計）である。接種後症状出現までの期間は、2週以内も9%あるが、多くはその後で、1カ月以内が62%（累計）、2カ月以内が94%（同）である。一方、2年を超えて発生した者も2例あった（2人は双生児で生後6カ月に同時に接種、3歳と5歳で発症）⁹。

これらの大半が体幹、顔面、四肢などに広く分布する発疹を起こしているが、接種局所も「反応がとくに強い」と記載されているものが多い。皮疹の記載は、丘疹、紅斑、水疱、中心性壊死、個々の発疹の大きさも粟粒から米粒、大豆大、それ以上と様々である。組織学的所見が記載されているものは33例あったが、そのうち結核症に特異的な病理所見とされる「類上皮肉芽腫」「Langhans巨細胞」などが記載されているのは22例（67%）であった。乾酪壊死などは記載されていない。その他には、漿液性丘疹、膠原繊維の変性・壊死、小円形細胞の浸潤、真皮上層・乳頭の浮腫、好中球・リンパ球の浸潤などと記載されている。

抗酸菌が皮疹部位から検出された例は4例（6%）あ

Table 2 Frequency of case according to category of skin lesions

Category ¹	Number (%)	
1. Generalized rash	74	(73%)
"Papular tuberculid"	24	(24%)
"Papulonecrotic rash"	13	(13)
"Lichen scrofulosorum"	10	(10)
Other clinical diagnosis ²	6	(6)
"Tuberculid" etc. ³	15	(15)
Not specified	6	(6)
2. Localized lesion	23	(23%)
"Skin tuberculosis"	9	(9)
"TB-granuloma"	4	(4)
Others ²	8	(8)
Not specified	2	(2)
3. Unknown ⁴	5	(5%)
Total	102	(100%)

¹Diagnosis in "..." indicates what is mentioned in the literature.

²See text.

³No precise diagnosis is specified.

⁴No distinction between local and generalized lesion is mentioned.

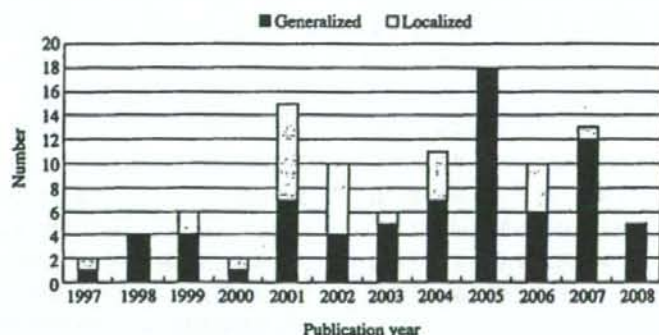


Fig. 2 Reported number of cases of BCG-induced skin lesion according to type of lesion and year of publication.

った。うち2例は重症複合型免疫不全症 (SCID) に合併した全身性 BCG 感染症の皮膚症状と考えられる例⁹⁾、1例は塗抹陽性で培養・核酸増幅法で陰性であったが、脾腫を伴っていた例⁹⁾、であった。残りの1例は「散在性丘疹」という診断名で若年性リウマチの疑いがもたれた例である⁹⁾。

発熱を伴った者が6例 (9%) に見られた。1例は再接種を受けた7歳児であるが、皮膚病変とともに虹彩炎や頸部リンパ節腫脹ももっていた⁹⁾。

予後は概ね良好であり、症状が出現してから1カ月後に24%、2カ月後に74%で皮疹が消退していた。この間行われた治療は、記載のあった57例中「なし (あるいは経過観察のみ)」が32例 (56%)、イソニアジド使用はわずか11例 (19%)、その他は副腎皮質ホルモン剤2例、抗アレルギー剤3例などであった。一方、入院を指示された例も5例 (9%) があった。

なお、重大な基礎疾患として上記のように SCID が2例見られた。この例の皮膚病変は全身播種性 BCG 感染症の症候として発生した播種性皮膚 (粟粒) 病変と思われる。ここで扱う他の皮膚病変 (いわゆる結核疹) とは異質のものであった。その他、皮膚病変との関連は定かでないが、川崎病が2例、関節リウマチ疑い、心臓弁膜症をもった思児に皮膚病変が生じた例が各1例あった。

II群: 限局性病変 (結節・肉芽腫) 総数13例中、初発時年齢は生後2カ月から始まって1歳未満が3例、1歳が7例、2～5歳が3例であった。皮疹に比して明らかに年長に偏っている。接種後症状出現までの期間が知られた11例の分布は、2カ月後までが45%、3カ月までが73%であり、1年を経過した後に発見された例も1例あった。

病変は8例 (62%) が接種部位の近傍 (数センチ離れた部位) の孤立性の結節として生じたが、鎖骨近傍3例がこれに続き、他は下顎部、接種部位とは対側の上腕および外踝に発生したものが2例見られた。病変は肉眼的には直径1～2cmの皮下結節で、組織学的には中心壊死を伴う類上皮肉芽腫と記載されるものが多く、抗酸菌を検出した例は3例、そのうち2例では *Mycobacterium bovis* BCG を同定している。

治療内容は12例で知られたが、抗結核薬による化学療法が6例 (50%) に行われ、うち1例でリファンピシン+イソニアジドが、5例でイソニアジド単独治療が行われていた。また3例 (25%) には外科的摘出が行われた。その他ではイソジンゲル1例、無治療3例であった。予後は良好で、記載のある8例で全例軽快・治癒が見られている。

考 察

やや古い1980年代までのヨーロッパ各国を中心に BCG 接種副反応を広範に収集し、体系的に分析した Lotte ら¹⁰⁾は、副反応を体系的に分類し、そのなかで皮膚病変を以下のように位置づけている。まず副反応全体を大分類として以下の4種に区分する。

- 第1種 異常な BCG 初期変化群 [リンパ節腫大や局所の遷延性の潰瘍やコッホ現象などを含む]
- 第2種 限局性・全身性病変で非致命的なもの [中耳炎や骨炎など]
- 第3種 全身性病変で致命的なもの [全身播種性 BCG 炎など]
- 第4種 接種後症候群あるいは臨床的に接種と関連づけられる病変 [後遺症あるいは BCG はより間接的な原因と考えられるもので、ケロイドや目の障害 (フリクテンなど) を含む]

われわれが問題とする皮膚病変は、これらのなかで第2種、第4種に以下のように細分されて分類されている。

2.3 ループス

2.4 その他の結核様皮膚病変

4.2 急性皮疹、結節性紅斑を含む

このうち2.3と2.4は結核特異的な反応であるが (2.3では菌を証明することはないが、組織所見は結核特異的、2.4は細菌学的に陽性、病理像も結核特異的のことが多い)、4.2は細菌学的にも、病理像も非特異的であるとしている。この総説に続いて発表された欧州諸国の実態調査¹¹⁾では、これらは4.3眼病変などとあわせて「過敏性反応」として一括されている。「結果」でみればわれわれの症例はこの分類では、I群の大半が4.2であり (一部は2.3)、II群は2.4に相当する。

病変の発生頻度を Lotte らの調査の所見と比較してみた。副反応報告では欧州での4.2の頻度 (接種100万件に対して) 1948～54年4.2、1955～74年0.05、1958～74年0.29であるが、日本の平成15～17 (2003～05) 年度の9.3 (0～3歳では11.7) という値は、観察・統計の方法の違いを考えに入れても明らかに高い。ちなみに他の副反応との関連で見ると、「1.2化膿性リンパ節炎」は欧州では6,000件記載されていたが「2.3 ループス」+「2.4 他の皮膚結核様病変」が254件、「4.2 皮疹」が484件で後2者を合計してもリンパ節炎の8分の1にすぎない。これに対して日本では、仮に化膿性リンパ節炎をリンパ節腫大全体の10% (森ら²⁾の観察では10mm以上のリンパ節腫大で化膿性変化を伴ったのは6%) としても、Table 1から皮膚病変はこれとほぼ同数発生することになり、不釣り合いに皮膚病変が多い。そして最近だけに限ればその不釣り合いはいっそう著しくなる (平成15～17年度

でリンパ節腫大全体162件、皮膚病変40件)。

BCG接種副反応としての皮膚病変の発生に関しては、結核症の皮膚病変に関する知見が参考になるとと思われる。通常よく遭遇する皮膚結核は以下のように分類される^{12)~14)}。

1. 真性(真正)皮膚結核

1.1 皮膚初感染結核, 1.2 尋常性狼瘡, 1.3 皮膚疣状結核, 1.3 皮膚腺病, 1.5 皮膚粟粒結核

2. 結核疹

2.1 バザン硬結性紅斑, 2.2 壊死性丘疹状結核疹, 2.3 腺病性苔癬

1. は結核菌の関与が証明されているもので、病変は結核に特異的な組織学的所見を呈する。BCG接種の接種局所の反応は、それ自体が1.に含まれる一種の「皮膚初感染病変」であるが、副作用としての皮膚病変としては、1. は尋常性狼瘡と初感染結核の異所的なもの(転移巣, Table 2の「結核・肉芽腫」の大部分)に対応する(接種局所反応—Table 1では、2. 遷延性の潰瘍や、6C ケロイド—は別個に扱っている)。狼瘡は今回の症例としては記載されていなかった。

2. は、一応結核菌やその成分が小血管に入って皮膚の過敏性反応を起こしたものとされながら、結核との病因論的關係が問題とされた一連の状態である。しかし今回見たようにBCG接種によって似たような症状が発生することは結核との関連を支持するものであろう。さらに近年病巣からPCRによって結核菌DNAの検出が報告されるようになり、結核との関連がより強く支持される¹⁵⁾。今回の文献調査では結核疹で病巣からBCGが検出された症例は4例あったが、2例はSCID、他の2例も基礎疾患をもっており、単純な結核疹とは言いがたいものであった。

Hoら¹⁶⁾によれば、香港の皮膚科専門施設で1993~2002年に診断された皮膚結核症例147例について内訳を見たところ、真性は16例のみ(狼瘡6、疣状結核6など)、他は結核疹でそのうち硬結性紅斑が127例で大部分を占め、壊死性丘疹は4例にすぎなかった。本調査では大半が壊死性丘疹で占められており、診断基準の違いなどを考慮しても、結核疹として相対する病態において、結核臨床例とBCG副反応例の間にはかなり様相の違いがあることがうかがわれる。

さて、日本で近年BCG接種副反応としての皮膚病変が増加したことは疑いを入れない。「副反応報告」による報告件数が1999年頃から2004年の間に徐々に増加したことは、この時期接種対象が0~3歳ではあるものの全国的に0歳児接種が徐々に増えてきたこと、そして平成17(2005)年度一挙に報告件数が増加したことは、この時期に新制度による生後6カ月前実施が導入されたこ

と一致している。また皮膚病変のなかでも結核疹は真性結核(瘰癧)に比して本研究でも見たように乳児に多く、乳児期接種の増加がとくにこの区分の副反応の増加を介して皮膚病変全体の件数の増加に貢献したと考えられる。

もちろん、予防接種副反応への関心の高まりで、副反応報告が積極的に行われるようになったとか、文献上の報告件数の変化に関しては何らかの理由で皮膚病変症例が小児科よりも皮膚科に紹介されることが多くなり、この症状が小児科でも注意され、診断・報告されやすくなった、といった一種の報告バイアスも否定できない。

同時に、この副反応がなぜ日本でこのように多いのか、についても説明がまたれるところである。日本のBCGワクチン株Tokyo 172は毒力が他のワクチン株に比して弱く、それが接種後リンパ節腫大のような副反応の頻度が低いことの説明となっていた。これに比して皮膚病変とくに結核疹が不釣り合いに多いのはなぜか。経皮接種という接種方法の問題か、一般的な毒力とはちがう株のなんらかの生物活性の特異性のゆえか。

治療については、真性結核に対応する①結核・肉芽腫と一部の皮膚疹(狼瘡など)と、②結核疹に対応する大部分の皮膚疹とで少しちがう。皮膚結核としてはともに化学療法に適応とされているが、BCG副反応では文献調査でそうであったように、②では多くが無治療、①ではかなりの例で抗結核化学療法が行われていた。①では大半が接種局所反応からの逸脱と考えれば、化学療法の適応とすることは合理的であろう。②では過敏性反応として抗結核化療は不要、むしろ抗アレルギー治療を勧める向きもあるが、最近の結核疹の病因論からすれば、とくに発熱を伴うような場合には、化療によるBCGの増殖の抑制が経過を改善することはありうる¹⁷⁾。

いずれにせよ、①、②ともに幸いに予後は良好であるが、とくに②の場合には全身に出現する皮膚疹として、保護者によってかなりの不安を抱くこともあろう。その軽減のために、主治医や行政機関によるこの副反応に対する十分な認識、早期の診断と指導が望まれる。

本稿の作成に際して、横浜市立大学名誉教授(皮膚科)中嶋弘先生のご指導を賜ったことを記して深く感謝します。本研究の一部は平成18年度厚生労働科学研究費新・再興感染症研究「結核菌に関する研究」(主任研究者 加藤誠也)分担研究「小児結核の予防方策及び診療システムの確立」(分担研究者 高松勇)として行った。

文 献

- 1) 森 亨, 山田祐子, 青木正和, 他: 最近のBCG接種によるリンパ節腫大. 日本医事新報. 1987; 3288: 45-50.

- 2) Mori T, Yamauchi Y, Shiozawa K: Lymph node swelling due to Calmette-Guérin vaccination with multipuncture method. *Tubercle Lung Dis.* 1996; 77: 269-273.
- 3) 予防接種副反応モニタリング検討会・厚生省保健医療局エイズ結核感染症課(後に厚生労働省健康局結核感染症課): 予防接種後副反応報告書. 集計報告書. No. 1-12.
- 4) 横田多鶴子, 大田光仁, 小林衣子: 腺病性苔癬の双生児女児例. BCG接種が原因と考えられた症例. *皮膚科診療.* 2000; 22: 847-850.
- 5) 川上佳夫, 佐藤正隆, 中村晃一郎, 他: BCG接種後に発症した皮膚結核の2例. *日本皮膚科学会雑誌.* 2008; 118: 1285.
- 6) 沢田泰之, 佐藤賢治, 横関博雄, 他: Severe combined immunodeficiency (SCID)に発症したBCG接種後皮膚結核. *日本皮膚科学会雑誌.* 2000; 110: 214.
- 7) 鎌田彩子, 原 聡, 山川陽子, 他: BCG接種後に丘疹状結核疹と脾腫を呈した1例. *日本小児科学会雑誌.* 2005; 109: 1281.
- 8) 植田晃史, 田村 輝, 船越 健, 他: BCG摂取後に副反応を認めた2例. *日本皮膚科学会雑誌.* 2008; 118: 1746.
- 9) 杉野由里子, 加納 原, 有本晃子, 他: 発熱, 虹彩炎, 特異な皮疹を呈したBCG接種後副反応の1例. *日本小児科学会京都地方会報.* 1999; 30: 5.
- 10) Lotte A, Wasz-Höckert O, Poisson N, et al.: BCG complications. Estimates of the risks among vaccinated subjects and statistical analysis of their main characteristics. *Adv Tuberc Res.* 1984; 21: 107-193.
- 11) Lotte A, Wasz-Höckert O, Poisson N, et al.: Second IUATLD study on complications induced by intradermal BCG-vaccination. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* 1988, 63: 47-59.
- 12) 今村貞夫: 皮膚結核. 「結核」. 第3版, 泉 孝英, 網谷良一編, 医学書院, 東京, 1998, 233-235.
- 13) Burgin S, Pomeranz MK, Shupack JL, et al.: Mycobacteria and the skin. In: *Tuberculosis*, 2nd edition, Rom WN, Gary SM ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2004, 593-608.
- 14) Hill MK, Saunders CV: Tuberculosis of the skin. In: *Tuberculosis*. 4th ed. Schlossberg D ed., W.B. Saunders, Philadelphia, 1999, 264-270.
- 15) Degitz K: Detection of Mycobacterial DNA in the Skin. Etiologic insights and diagnostic perspectives. *Arch Dermatol.* 1996; 132: 71-75.
- 16) Ho CK, Ho MH, Chong LY: Cutaneous tuberculosis in Hong Kong: an update. *Hong Kong Med J.* 2006; 12: 272-277.
- 17) 榎本忠市, 竹内しずこ, 黒川 博, 他: 小児の結核—BCG副反応の実際. *小児内科.* 1984; 10: 1710-1713.

リファンピシン耐性 *Mycobacterium kansasii* における *rpoB* 変異の解明

¹吉田志緒美 ¹鈴木 克洋 ¹露口 一成 ⁴岩本 朋忠
²富田 元久 ¹岡田 全司 ³坂谷 光則

要旨：〔目的〕 *M. kansasii* における RFP 耐性機序の解明。〔方法〕 2001 年 1 月 1 日から 2005 年 11 月 30 日の期間中、独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにて分離同定された *M. kansasii* 314 株を対象に薬剤感受性試験を実施し、RFP 耐性と判定された *M. kansasii* について *rpoB* 遺伝子解析を行った。〔結果〕 薬剤感受性試験の結果 RFP 耐性と判定された *M. kansasii* は 314 株中 3 株 (0.96%) であり、最小発育阻止濃度 (MIC 値) はすべて $1 \mu\text{g/ml}$ 以上を示した。*rpoB* 遺伝子変異のシーケンス解析において、RFP 耐性菌株すべてに *rpoB* 遺伝子領域の変異を認めた (コドン 513, 516)。〔考察〕 *M. kansasii* の *rpoB* 遺伝子変異は結核菌と同じ hot spot 領域 (69 bp) にあり、結核菌同様 RFP 耐性と強い関連性が示された。

キーワード： *Mycobacterium kansasii*, RFP 耐性, *rpoB* 遺伝子, 薬剤感受性試験

はじめに

Mycobacterium kansasii (*M. kansasii*) は非結核性抗酸菌 (NTM) の中では、*Mycobacterium avium* complex (MAC) に次いで全国的に広く症例報告されている菌種であり¹⁾、病原性も他の NTM に比べて強いとされている一方、NTM の中で最も化学療法の有効性が認められている。結核菌に準じた薬剤感受性試験は通常 NTM に対して臨床的に有効な成績が得られないが、唯一 *M. kansasii* のリファンピシン (RFP) 感受性検査結果は臨床上有益である^{2)~4)}。しかし *M. kansasii* の RFP 耐性化における遺伝子変異のメカニズムの報告は少ない⁵⁾。そこで今回われわれは *M. kansasii* の遺伝子レベルでの RFP 耐性機序を解明するため、現行の薬剤感受性試験で RFP 耐性と判定された菌株の *rpoB* 遺伝子変異解析を行った。

方 法

対 象

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにて 2001 年 1 月 1 日から 2005 年 11 月 30 日の期間中に分

離同定された *M. kansasii* 314 株。すべての菌株の鑑別・同定は、アキュプロープ マイコバクテリウム カンサシ 研究用 (極東製薬) で行った。

薬剤感受性試験

小川培地を用いるニチビー抗酸菌検査用ウエルバック培地 S (日本ビーシージー) と液体培地を用いる抗酸菌薬剤感受性検査プロミック NTM (極東製薬) で実施した。

コントロール菌液の作成

感受性コントロールとして *M. kansasii* 標準菌株 ATCC 12478 を BBL ミドルブルック 7H9 プロス 4 ml に培養した菌液を用いた (KCHK1001S)。また耐性コントロールとして使用するため、われわれは誘導 RFP 耐性 *M. kansasii* (KCHK1001R) を作成した。まず KCHK1001S 同様、同標準菌株を BBL ミドルブルック 7H9 プロス 4 ml に接種し、McFarland No. 0.5 に調整した菌液を滅菌生理食塩水で 5 倍希釈した。次にバクテック MGIT 960 結核菌薬剤感受性試験用ミジットシリーズのリファンピシンを含む MGIT チューブ (最終薬剤濃度 $1.0 \mu\text{g/ml}$) を 2 倍希釈して 128 倍までの薬剤濃度系列を作成した (リファ

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター¹臨床研究センター、²臨床検査科、³内科、⁴神戸市環境保健研究所

連絡先：吉田志緒美，独立行政法人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，〒591-8555 大阪府堺市北区長曾根町 1180 (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)
 (Received 1 Feb. 2006 / Accepted 25 Apr. 2006)

ンピシン保存溶液)。後はバクテック MGIT 960 結核菌薬剤感受性試験用ミジットシリーズの説明書に記載されたプロトコールに従い、菌液 500 μ l と希釈されたリファンピシン保存溶液 100 μ l を通常の RIF と表示されたミジットチューブに無菌的に添加した。バクテック MGIT 960 にて 37°C で培養し、陽性を示した最高濃度の菌液を用いて再度希釈系列にて培養を継続した。最終的にプロスミック NTM の RFP 感受性検査で MIC 値が 32 μ g/ml 以上の値を示すまで継代培養を続け、耐性コントロールとした。

PCR による *rpoB* 遺伝子増幅

小川培地からエーゼで 2 ~ 3 mm 径コロニー 2 個分を目安として採取し、1.5 ml マイクロチューブに分注したインスタジーン DNA 精製マトリックス (BIO-RAD) 200 μ l に懸濁した。56°C, 15 ~ 30 分処理後 10 秒間 vortex し、正確に 100°C, 8 分間処理した後直ちに放冷した。10 秒間 vortex し、12000 rpm, 3 分遠心した上清を polymerase chain reaction (PCR) に用いた。*rpoB* 遺伝子増幅のために、次のプライマーを使用した; MK1: 5'-GCG GAT GAC CAC CCA GGA CG-3' と MK2: 5'-GCG CGG TCC TC[C/T] TCG TCG GC-3'。PCR 条件は 95°C 3 分の熱変性の後、94°C 1 分, 60°C 1 分, 72°C 1 分を 30 サイクル行った。最後に 72°C 7 分間伸張した。得られた PCR 産物は、1.5% アガロースゲル電気泳動で確認した。

PCR 産物の DNA シークエンス

rpoB 遺伝子の塩基配列は、290 bp の PCR 産物を用いて BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit (ABI) にて決定した。

フィノス LiPA Rif TB

フィノス LiPA Rif TB (ニプロ) は抗酸菌から抽出、増幅されたピオチン化 DNA を用いて、結核菌群の *rpoB* 遺伝子内の変異を検出する Line Probe Assay である⁶⁾。10 種類のプローブを固相化したストリップに NaOH 変性した検体を添加して、ハイブリダイズする。洗浄後、ピオチン-アビジン結合を行い、基質 (NBT/BCIP) を用いた発色反応から、検体が結合したプローブ部位が発色する。発色したプローブの位置から、結核菌群の検出なら

びに *rpoB* 遺伝子内の変異の有無の判定を行う。今回 *M. kansasii* に対しても結核菌同様、同キットによる *rpoB* 変異の検出が可能かどうか検討した。

結 果

薬剤感受性試験の RFP 耐性判定基準値は、結核菌に準拠したウエルバック法では 40 μ g/ml だが、プロスミック NTM 法では、National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS; 現 Clinical Laboratory Standards Institute [CLSI]) の判定基準から 1 μ g/ml とした⁷⁾。ウエルバック法、プロスミック NTM 法ともに RFP 耐性と判定された *M. kansasii* は 314 株中 3 株であった。菌株 A はウエルバック法、プロスミック NTM 法共に耐性と判定され、MIC 値は 2 μ g/ml だった。菌株 B, C は、両薬剤感受性試験で耐性と判定され、MIC 値はそれぞれ 16 μ g/ml と 32 μ g/ml であった。菌株 KCHK1001S は RFP 感受性 (MIC 値 0.06 μ g/ml) であった (Table)。また今回ウエルバック法とプロスミック NTM 法の間で RFP 感受性結果の相違は認められなかった。

シークエンス解析の結果、菌株 KCHK1001S の *rpoB* 遺伝子の hot spot 領域 (69 bp) の塩基配列は結核菌の塩基配列と 87% の相同性が見られ (GenBank #L27989)、すでに報告されている *rpoB* 遺伝子の塩基配列と同一であった (GenBank #AF060301)。

薬剤感受性試験で RFP 感受性と判定された *M. kansasii* 45 株についてシークエンス解析を実施した結果、*rpoB* 遺伝子変異を認めなかった。しかし RFP 耐性 *M. kansasii* の *rpoB* 遺伝子の塩基配列は薬剤感受性試験で RFP 耐性となった *M. kansasii* 3 株および、菌株 KCHK1001R すべてに変異を認めた。菌株 A はコドン 516 においてアスパラギン酸からアラニンへの変異を認めた (GAC \rightarrow GCC)。菌株 B, C はコドン 513 においてグルタミンからグルタミン酸への変異を認めた (CAG \rightarrow GAG)。菌株 KCHK1001R はコドン 526 においてヒスチジンからアルギニンへの変異を認めた (CAC \rightarrow CGC) (Fig. 1)。

フィノス LiPA Rif TB の結果、RFP 感受性ならびに RFP 耐性 *M. kansasii*, KCHK1001S, KCHK1001R すべて

Table Results of RFP susceptibility testing and sequences

Strains	Wellpack*	BrothMIC NTM (MIC)	Sequence
A	RFP resistant	R (2 μ g/ml)	codon 516 (GAC \rightarrow GCC)
B	RFP resistant	R (16 μ g/ml)	codon 513 (CAG \rightarrow GAG)
C	RFP resistant	R (32 μ g/ml)	codon 513 (CAG \rightarrow GAG)
KCHK1001R	RFP resistant	R (32 μ g/ml)	codon 526 (CAC \rightarrow CGC)
KCHK1001S	RFP susceptible	S (0.06 μ g/ml)	

*Ogawa medium based drug susceptibility test

RFP: rifampicin R: rifampicin resistance S: rifampicin susceptible

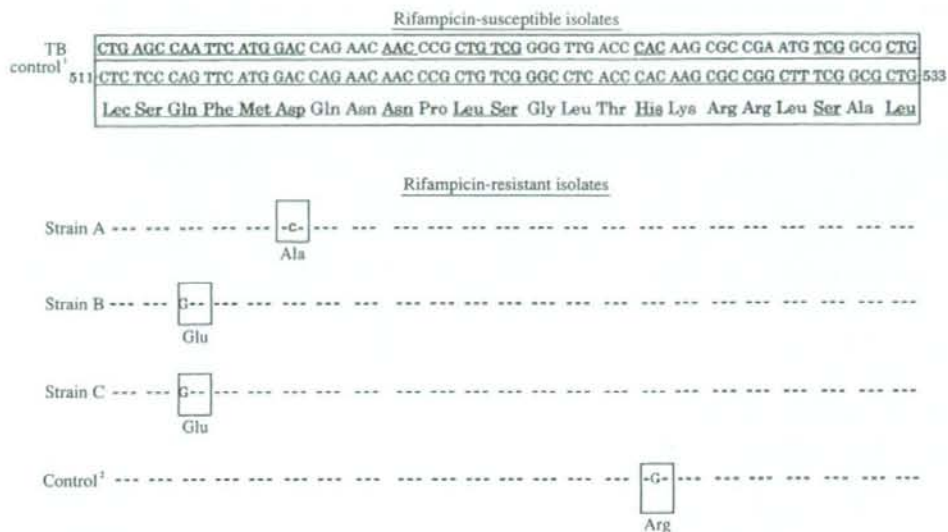


Fig. 1 *rpoB* gene sequences of one rifampicin-susceptible and four rifampicin-resistant strains of *Mycobacterium kansasii*, with the *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) sequence shown for comparison.

1: KCHK1001S (rifampicin-susceptible control)

2: KCHK1001R (rifampicin-resistant control)

Underline codons in *M. tuberculosis*: common codons involved in rifampicin-resistance strains

においてTBプローブ、野生型(S)ならびに変異型(R)プローブに発色を示さなかった(Fig. 2)。

考 察

結核菌のRFP耐性化には *rpoB* 遺伝子の突然変異が強くかかわっており、RFP耐性結核菌の約95%が、 β サブユニットをコードしている *rpoB* 遺伝子の hot spot 領域に変異を認めている⁹⁾。今回検討したRFP耐性 *M. kansasii* についても、結核菌と同じ hot spot 領域に *rpoB* 遺伝子変異が確認され、RFP感受性 *M. kansasii* は *rpoB* 遺伝子変異が認められなかった。Kleinらは、RFP耐性 *M. kansasii* の *rpoB* 遺伝子変異は、結核菌のRFP耐性に強く関与が証明されている *rpoB* 遺伝子変異と同じ領域に存在し、*M. kansasii* についても *rpoB* 変異とRFP耐性に強い関連性があると報告している³⁾。今回の *rpoB* 変異のシーケンズ解析で、菌株B、Cはコドン513の変異があり、Kleinらと同じ遺伝子変異をもったタイプであったが、菌株Aはコドン516の変異をもち、Kleinらとは違う変異部位であった。また、Kleinらは臨床菌株3例、環境分離菌株1例にコドン531の変異が見られたと報告しているが、今回われわれの検証では、コドン531の変異は認められなかった。コドン531は結核菌で頻繁に変異しやすい部位であることから¹⁰⁾、今後データの蓄積によりコドン531に変異をもった菌株や、異なる変異部位を

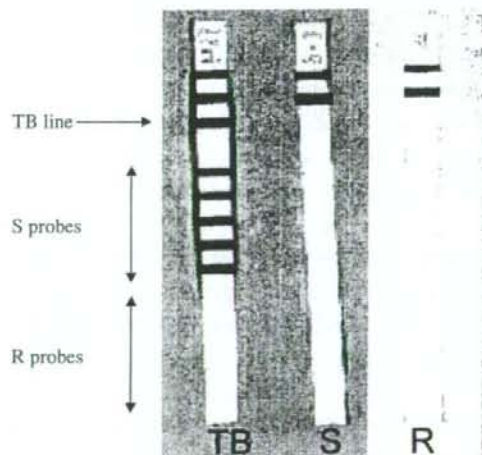


Fig. 2 The patterns of rifampicin-susceptible and resistant strains of *M. kansasii* by Line Probe Assay.

TB: *M. tuberculosis* (H37Rv) indicated the reaction of the TB line and the five S probes

S: KCHK1001S (rifampicin-susceptible strain of *M. kansasii*)

R: KCHK1001R (rifampicin-resistant strain of *M. kansasii*)

もった違うタイプの *M. kansasii* の存在も認められるであろう。またわれわれが作成した菌株 KCHK1001R の変異はコドン526であった。Kleinらが作成した誘導 RFP 耐性 *M. kansasii* は今回われわれが MGIT 960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズのリファンピシン感受性検査用チューブを用いた方法とは違い、ミドルブルック 7H11 培地を用いた手法で作成されているが、同じコドン526の部位に変異をもっていた³⁾。以上のことから *in vitro* で RFP 耐性を獲得した *M. kansasii* は、コドン526の遺伝子部位に変異を起こしやすい可能性が考えられる。同様に、菌株 KCHK1001S ならびに RFP 感受性 *M. kansasii* 45 株はすべてシーケンス解析において hot spot 領域に *rpoB* 遺伝子変異を認めなかったことから、RFP 感受性試験結果と *rpoB* 遺伝子変異の強い関連性が示唆された。

また、結核菌群と同じ 69 bp の hot spot 領域に変異をもつ RFP 耐性 *M. kansasii* が結核菌群と同じ遺伝子変異をもつならば、結核菌群に特異的なプローブと反応する可能性がある。そこでわれわれは結核菌群の *rpoB* 遺伝子の hot spot 領域の変異を検出するキットであるフィノス LiPA Rif TB を用いて、RFP 耐性 *M. kansasii* の反応を検討した。しかし *M. kansasii* に対してプローブの検出が全く認められなかった (Fig. 2)。Fig. 1 で示したシーケンス解析結果から、*M. kansasii* は結核菌と同じアミノ酸配列を有する *rpoB* 領域をもつが、塩基配列では結核菌と違う構造をもつため、*M. kansasii* は同キットでは反応しなかったものと思われる。

M. kansasii の野生株は基本的に RFP 感受性であり、治療中に耐性を獲得するといわれている⁴⁾¹⁾。今回の検証では全 *M. kansasii* に占める RFP 耐性菌の割合は 314 株中 3 株 (0.96%) であり、1989 年から 1992 年の間に実施された米国テキサス州での大規模な疫学調査 (464 株) で RFP 耐性 *M. kansasii* の占める割合が 17 株 (4%)⁴⁾ だった結果と比較しても耐性率はかなり低い。実施期間の違いや地域差を考慮する必要があるが、薬剤感受性試験をルーチンとしてすべての *M. kansasii* に実施することは非効率と考えられる結果となった。今後コスト面での対応も含めて考えていく必要がある。

今回 RFP 耐性 *M. kansasii* は、結核菌群と同じ hot spot

領域に *rpoB* 遺伝子変異を認めたが、RFP 感受性 *M. kansasii* は *rpoB* 遺伝子変異を認めなかった。これらのことから、RFP 耐性 *M. kansasii* と *rpoB* 遺伝子変異との間に強い関連性が証明された。

文 献

- 1) The Mycobacteriosis Research Group of the Japanese National Chest Hospitals: Rapid increase of the incidence of lung disease due to *Mycobacterium kansasii* in Japan. *Chest*. 1983; 83: 890-892.
- 2) American Thoracic Society: Diagnosis and treatment of disease caused by non-tuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 156: S1-S25.
- 3) Yates MD, Collins CH: Sensitivity of opportunist mycobacteria to rifampicin and ethambutol. *Tubercle*. 1981; 62: 117-121.
- 4) Wallace RJ Jr, Dunbar D, Brown BA, et al.: Rifampin-resistant *Mycobacterium kansasii*. *Clin Infect Dis*. 1994; 18: 736-743.
- 5) Klein JL, Brown TJ, French GL: Rifampin resistance in *Mycobacterium kansasii* is associated with *rpoB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45: 3056-3058.
- 6) 阿部千代治, 尾形英雄, 河田兼光, 他: Line Probe Assay (LiPA) によるリファンピシン耐性結核菌の検出. *結核*. 2000; 75: 575-581.
- 7) Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards document. 2003; M24-A: 23.
- 8) Wallace RJ Jr, Nash DR, Steele LC, et al.: Susceptibility testing of slowly growing mycobacteria by microdilution MIC method with 7H9 broth. *J Clin Microbiol*. 1986; 24: 976-981.
- 9) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.: Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 1993; 341: 647-650.
- 10) Morlock GP, Plikaytis BB, Crawford JT: Characterization of spontaneous *in vitro*-selected, rifampin-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 3298-3301.
- 11) Ahn CH, Wallace RJ Jr, Steele LC, et al.: Sulfonamide-containing regimens for disease caused by rifampin-resistant *Mycobacterium kansasii*. *Am Rev Respir Dis*. 1987; 135: 10-16.

Original Article

DETECTION OF *rpoB* MUTATIONS IN RIFAMPICIN-RESISTANT
MYCOBACTERIUM KANSASII

¹Shiomi YOSHIDA, ¹Katsuhiro SUZUKI, ¹Kazunari TSUYUGUCHI, ⁴Tomotada IWAMOTO,
²Motohisa TOMITA, ¹Masaji OKADA, ³Mitsunori SAKATANI

Abstract [Purpose] To detect rifampicin-resistant mutations in *Mycobacterium kansasii* (*M. kansasii*).

[Methods] We examined the *M. kansasii* isolates from sputum of patients at National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center from January 1, 2001 to November 30, 2005 using drug-susceptibility testing, and analyzed 69-bp fragment of *rpoB* gene in rifampicin-resistant strains.

[Results] Three strains from 314 isolates were determined as rifampicin resistant using drug-susceptibility testing. Those strains showed a rise in minimum inhibitory concentration (MIC), and had the mutations in *rpoB* gene. These point mutations in codons 513 and 516 were common mutations found in rifampicin-resistant clinical isolates of *M. tuberculosis*.

[Discussion] We verified the association between *rpoB*

gene mutations and rifampicin resistance in *M. kansasii*.

Key words: *Mycobacterium kansasii*, Rifampicin-resistance, *rpoB* mutations, Drug-susceptibility test

¹Clinical Research Center, ²Department of Clinical Laboratory, ³Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, ⁴Kobe Institute of Health

Correspondence to: Shiomi Yoshida, Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591-8555 Japan. (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)

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 —

¹吉田志緒美 ¹鈴木 克洋 ¹露口 一成 ¹岡田 全司
²坂谷 光則

要旨:〔目的〕多剤耐性結核菌株と全剤感受性結核菌株の分子疫学的解析。〔対象〕国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにて分離、同定された多剤耐性結核菌109株 (MDR-TB群)と、全剤感受性結核菌226株 (S-TB群)。〔方法〕IS6110を用いたRFLP法およびSpoligotyping法。〔結果〕RFLP法の結果、クラスター形成率はMDR-TB群、S-TB群ともに約43%を占め有意差は認められなかった (χ^2 検定 $p=0.51>0.05$)。Spoligotyping法の結果、Beijing familyはMDR-TB群で77.1% (84株)、S-TB群で84.5% (191株)認め、有意な差はなかった (χ^2 検定 $p=0.09>0.05$)。〔結論〕MDR-TB群とS-TB群では、RFLPクラスター形成率、Spoligotyping法におけるBeijing familyの占める割合はほぼ同程度に認められ、両群の感染伝播力に大きな差がない可能性が支持された。

キーワード:結核菌, RFLP法, Spoligotyping法, 多剤耐性, 全剤感受性

はじめに

近年結核の感染状況を把握するために、様々な方法による分子疫学的解析が行われてきた。現在、菌株の識別能が高く多型性に富んだ方法として、結核菌染色体上の比較的安定した挿入配列IS6110をプローブとしたRestriction fragment length polymorphism (RFLP)法が世界的に標準化されている¹⁾²⁾。しかし、IS6110コピー数が1~5本以下の菌株では識別能が低いことと、煩雑な手法と大量のDNAが必要となる欠点から、より簡便かつ短時間で解析可能な別の遺伝子マーカーによる二次的型別が必要になってくる。Spacer oligonucleotide typing (Spoligotyping)法はRFLP法の二次的解析のひとつとして³⁾、アジアを中心として広汎に分布し強い感染伝播力を有したBeijing familyの鑑別が可能であり、広範囲の感染状況の解明に有益である。これらRFLP法とSpoligotyping法を用いて結核菌を分子疫学的に解明した報告は多いが^{4)~8)}、結核菌を多剤耐性結核菌 (MDR-TB)群と全剤感受性結核菌 (S-TB)群とに分類した比較検討は報告されておらず、単独薬剤耐性菌 (isoniazid (INH),

streptomycin (SM))についての検討がなされているのみである⁹⁾。また従来感染伝播力が低いといわれてきたMDR-TBによる集団感染事例が近年報告されている¹⁰⁾。したがって今回、RFLP法、Spoligotyping法を用いて、当センターにおいて分離、同定された結核菌を対象に、薬剤感受性の違いによるクラスター形成率とBeijing familyの割合の比較を試みた。

方 法

〔対象〕

2001年1月1日から2005年12月31日の期間、独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにて分離、同定された結核菌2827株中、下記の方法で示した2種類の薬剤感受性試験で少なくともINHとrifampicin (RFP)に対して耐性を示した多剤耐性結核菌109株をMDR-TB群とした (3.9%)。そのうちINH、RFPのみに耐性を示した株は4株 (すべてのMDR-TBに占める割合は3.7%)であった。またethambutol (EB)を加えた3薬剤に耐性を示した株は61株 (56%)、pyrazinamide (PZA)を加えた4薬剤に耐性を示した株は1株 (0.9%)、SM

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター¹臨床研究センター、²内科

連絡先: 吉田志緒美, 独立行政法人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, 〒591-8555 大阪府堺市北区長曾根町1180 (E-mail: dustin@keh.hosp.go.jp)
(Received 16 Nov. 2006/Accepted 28 Feb. 2007)

を加えた5薬剤に耐性を示した株は2株(1.8%)であり、残りの41株(37.6%)は上記5薬剤に加えて二次抗結核薬のいずれかに対しても耐性を示していた。また世界保健機関(WHO)は2006年11月に招集したExtensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB) 専門委員会においてINHとRFPだけでなく特定のSecond-line drugs(少なくともfluoroquinoloneの中の1種と、注射薬のcapreomycin, kanamycin, amikacinの中の1種)にも耐性をもつ結核菌をXDR-TBと定義しているが¹¹⁾、今回35株(MDR-TBの32.1%)に認められた。

MDR-TB群と比較するために必要な相当数の全剤感受性結核菌として2003年1月1日から8月31日の一定期間、当センターにて分離、同定された226株をS-TB群とした。

性別はMDR-TB群では男性81名(74.3%)、女性28名(25.7%)であり、S-TB群では男性163名(72.1%)、女性63名(27.9%)であった。平均年齢は、MDR-TB群では55.5±15.6歳、S-TB群では57.2±19.2歳であった。

治療歴は、MDR-TB群では初回治療37名(33.9%)、再治療72名(66.1%)であり、またXDR-TB患者のうち7名(XDR-TBの20%)は初回治療例であった。S-TB群では初回治療190名(84.1%)、再治療36名(15.9%)であった。

当センターは大阪府堺市に属しており、今回対象とした335菌株由来の患者の居住地は当センター周辺の堺市を中心とした大阪湾沿岸の泉州地域から和歌山県北部までの比較的広範囲にまたがる地域であった。また結核罹患率の高い大阪市西成区および浪速区からの患者はMDR-TB群で1名(0.9%)、S-TB群で22名(9.7%)であった。外国籍をもつ患者はMDR-TBで4名(3.7%)認められ、すべて中国籍であったが、S-TB群に外国籍をもつ患者は認められなかった。すべての患者の疫学調査は初診時の聞き取り調査用紙に基づいて行った。発症状況から明らかに家族内感染と思われる事例はMDR-TB群では認められず、S-TB群で4事例(構成員各2名)認められた。集団感染と思われる事例はMDR-TB群で3事例(構成員5名、3名、2名)認められたが、S-TB群での事例はなかった。すべての患者間での地域内感染と見られる事例は認められなかった。

[方法]

同定

菌株の同定は結核菌群同定用アキュプローブ結核菌群同定キット(極東製薬)と結核菌群同定試薬キャピリアTB(日本ベクトン・ディッキンソン)で行った。

薬剤感受性試験

薬剤感受性試験にはバクテックMGIT 960結核菌薬剤感受性試験用ミジットシリーズ(MGIT-AST法:日本ベ

クトン・ディッキンソン)と結核菌感受性ビットスペクトル-SR法(極東製薬)を用いた。PZAの薬剤感受性試験は結核菌感受性試験PZA液体培地法(極東製薬)を用いた。耐性の判定基準濃度はMGIT-AST法でINH 0.1 µg/ml, RFP 1.0 µg/ml, EB 5.0 µg/ml, SM 1.0 µg/mlとし、ビットスペクトル-SR法でINH 0.2 µg/ml, RFP 40 µg/ml, EB 2.5 µg/ml, SM 10 µg/mlとした。PZAは400 µg/mlとした。

RFLP法

van Embdenらの方法¹²⁾に準拠して行った。結核菌からのDNA抽出には0.1 mmのガラスビーズを用いて、Beads-beaterによるフェノールクロホルム・イソプロパノール処理を行った。得られたゲノムを制限酵素Pvu II (TAKARA BIO)で消化、電気泳動後サザンブロッティングを行い、IS6110をプローブとして、ハイブリダイゼーションさせ、ジゴキシゲン発色でIS6110のバンドを検出した。バンドの解析にはMolecular Analyst Software (Bio-Rad)のDouble gel analysis法を用い、各々のレーンごとの補正として、λ/Hind IIIとφX174/Hae IIIの2種類のマーカーを使用した。メンブレン間の補正はH37Rvを標準株として用いた。

Spoligotyping法

結核菌DNAのSpacer配列を、directly repeated sequence (DR)のもとにデザインされた2種類のプライマー(ピオチン標識)を用いてpolymerase chain reaction (PCR)にて増幅し、43の合成オリゴヌクレオチドを固相化したメンブレン(Isogen Bioscience BV)に、Immunitics社のMiniblotter 45を用いてハイブリダイズさせた¹³⁾。パターンを検出にはECL発色システムを用いて個々のSpacer配列の有無を解析した。

結 果

RFLP法

IS6110コピー数は全対象結核菌335株において1~25本の分布を示し、11本にピークを認めた。そのうちMDR-TB群では9~25本のコピー数が認められ、10本にピークを認めた。一方S-TB群では1~20本の間に分布し、ピークは13本に認められ、両群ともに多型性が認められた。またコピー数5本以下の菌株はS-TB群にのみ3株(コピー数1, 3, 4本)認められた(Fig. 1, 2)。同一のバンドパターンを示すクラスターはMDR-TB群では12種類(47株)、S-TB群では20種類(99株)が認められた。クラスターの大きさ(構成員数)はMDR-TB群で2~11を示し、構成員11名のクラスターaグループと、構成員7名のクラスターeグループには両グループ内での患者の間に疫学的関連はなかった。一方S-TB群では2~16を示し、構成員6名が2つ、8名が2つ、

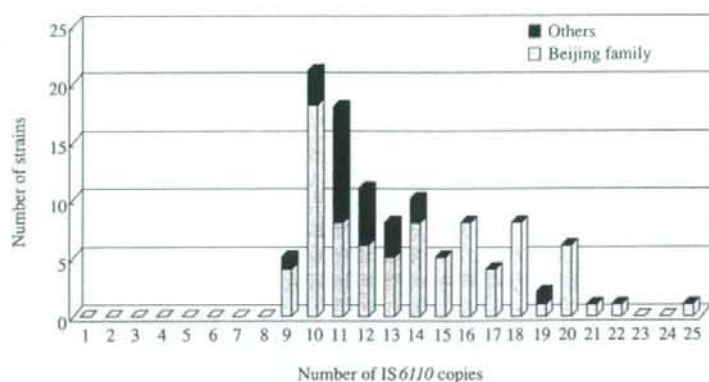


Fig. 1 Distribution by number of IS6110 copies: multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains

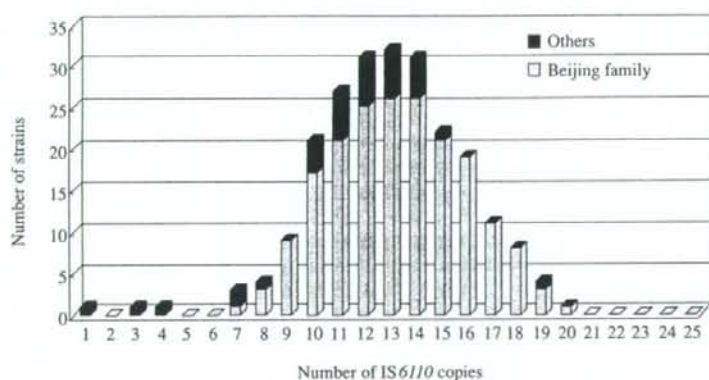


Fig. 2 Distribution by number of IS6110 copies: susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains

9名が1つ、14名、16名が各1つであった。家族内感染は構成員3名のtグループで2名、6名のaグループで2名、14名のcグループで2名、16名のfグループで2名に認められた (Table 2)。

クラスター形成率はMDR-TB群で43.1%、S-TB群は43.8%、全体で43.6%を示した (Table 1)。そのうち、MDR-TB群クラスターのパターンaはS-TB群クラスターのパターンaと同じパターンを示し、MDR-TB群クラスターのパターンiはS-TB群クラスターのパターンiと同じパターンを示した (Table 2)。

西成区および浪速区に居住地をもつ患者由来の22株 (S-TB群)のうち6株が5種類のクラスターに属し、残り16株はクラスターを形成しなかった。

外国籍をもつ患者由来のMDR-TB群に属する4株はクラスターを形成しなかった。

Spoligotyping法

今回われわれは、Spacer配列1~34の発色を認めない Beijing familyの占める割合を求めるにあたって、35~

43配列を有する典型的な Beijing型に加え、Mokrousovら¹²⁾の定義による Beijing型のパターンに類似した Beijing-likeも Beijing familyとして全株を分類した。その結果、Beijing familyはMDR-TB群で84株 (77.1%)、S-TB群では191株 (84.5%)、全体で275株 (82.1%)を占めた。一方 Beijing family以外の遺伝子型をもつ株で International Spoligotyping database SpolDB3分類¹³⁾に示される familyに分類された株はMDR-TB群の25株中13株と、S-TB群35株中の24株と判定された。それ以外の24株 (MDR-TB群12株、S-TB群12株)は SpolDB3の family definitionに分類されない Unique株と判定された (Table 1)。また Uniqueパターンを示した株の中に IS6110コピー数5本以下を示した S-TB群の3株が含まれていた (Table 3)。

RFLP法でクラスター形成を認めた Beijing familyはMDR-TB群で35株 (32.1%)、S-TB群で86株 (38.1%)であった。一方 Beijing family以外のクラスター形成グループとしてMDR-TB群ではLAM1 (Latin American and Mediterranean) familyのbグループ (7株)、T2 family