

Original Article

IDENTIFICATION OF 23 MYCOBACTERIAL SPECIES BY INVADER ASSAY WITH TARGETING 16S rRNA GENE AND ITS-1 REGION

— Comparison with DDH Method in Clinical Isolates —

¹Makoto NAGANO, ²Sadahiro ICHIMURA, ¹Nobuko ITO, ²Takayuki TOMIL,
³Yuko KAZUMI, ³Katsuaki TAKEI, ^{4,5}Chiyoji ABE, and ³Isamu SUGAWARA

Abstract [Purpose and Method] The Invader assay was developed to identify 23 mycobacterial species using probes derived from the species-specific region of the 16S rRNA gene and the 16S–23S rRNA internal transcribed spacer 1 (ITS-1) region, with minor modifications of our previous study. In the present study, we compared the identification capability between the Invader assay and DNA-DNA hybridization (DDH) method. DDH is commonly used to identify non-tuberculosis mycobacterium in Japan and 636 clinical mycobacterial strains cultured on Ogawa slants were tested.

[Results] The Invader assay could identify 615 (96.7%) of the 636 strains. The results contained 14 *M. lentiflavum*, 3 *M. parascrofulaceum* and 1 *M. intermedium*, which were undetectable with DDH method. On the other hand, DDH method could identify 580 (91.2%) strains with duplicate assay. Of 628 strains except 8 strains identified as a few species by Invader assay, 551 (87.7%) strains were identified as the same species by two methods. Discordant results were mainly recognized for the identification of *M. goodii*, *M.*

avium, *M. lentiflavum* and *M. intracellulare*. The results of other methods targeting 16S rRNA indicated correctness of the Invader assay.

[Conclusion] These results indicate that Invader assay could identify more correctly than DDH method and could identify about 97% of clinically important mycobacterium.

Key words: Identification of mycobacteria, Invader assay, 16S rRNA gene, ITS-1 region, DDH method

¹Development of Clinical Genomics, BML, Inc., ²Department of Microbiology, BML, Inc., ³Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, JATA, ⁴BML, Inc., ⁵Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.

Correspondence to: Makoto Nagano, Development of Clinical Genomics, BML, Inc., 1361-1, Matoba, Kawagoe-shi, Saitama 350-1101 Japan. (E-mail: nagano-m@bml.co.jp)

結核ワクチン研究の現状と展望

松本壮吉¹⁾/小林和夫²⁾**(KEYWORDS)** 結核, 細菌感染症, ワクチン

1. 結核(症)の現状

世界の年間死亡総数の約1/4を占める感染症において、結核は感染症の死因で後天性免疫不全症候群(AIDS)に次ぐ第二位で、全感染症による死亡者数の約1/7を占める。世界保健機関の統計(2008年5月23日現在)によると2005年の結核患者発生数は881.1万人、死亡者数が157.7万人である。AIDS患者における結核死亡を考慮した場合、毎年約200万人が結核によって死亡している。このように現在でも結核は甚大な健康被害を招来している。

結核には菌の感染後即発症する一次結核と、潜

伏期を経て発症する二次結核がある(図1)。わが国を含め、結核の低一中蔓延地域における成人肺結核の多くは二次結核である。結核菌は現在人類の1/3(20億人)に潜伏感染しており、既感染者の5~10%が終生の間に二次結核を発症する。ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染は内因性再燃を加速し、HIV-結核菌重複感染者の約10%が毎年結核を発症する。したがって、結核ワクチン開発においては、感染暴露前(pre-exposure vaccine)のみならず、感染暴露後(治療的)ワクチン(post-exposure vaccine)の開発が希求される。

2. 結核ワクチンの歴史とBCG

結核菌は、1882年にRobert Kochによって同定されたグラム陽性桿菌である。当時、Kochは結核菌の培養濾液に予防効果があると信じた。こ

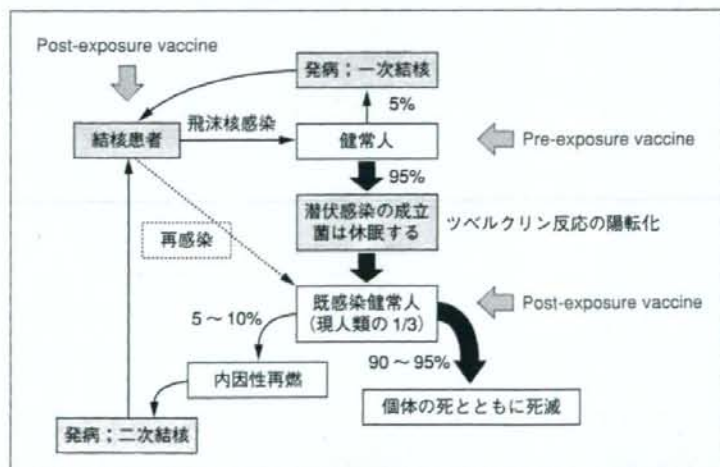


図1 結核菌の伝播と結核の発症

結核患者由来の飛沫が空中にて乾燥し菌を含んだ飛沫核となり、健康人もしくは既感染者(再感染)の肺胞に届いて感染が成立する。この時、感染者の5%未満が一時結核を発症する。残る95%は発症しないが、菌は生体から排除されずに潜伏感染が成立する。既感染者は現人類の1/3にのぼる。既感染者の5~10%が終生の間に結核を発病する(二次結核)。また、HIVの感染は二次結核発症率を顕著に上昇させる。初感染時の感染や発症を抑制するpre-exposure vaccineと既感染者の発症を予防する、もしくは免疫介入療法に用いるpost-exposure vaccineの両方が結核ワクチンに開発において求められる。

1) MATSUMOTO Soukichi 大阪市立大学大学院医学研究科細菌学分野・准教授

2) KOBAYASHI Kazuo 国立感染症研究所免疫部・部長

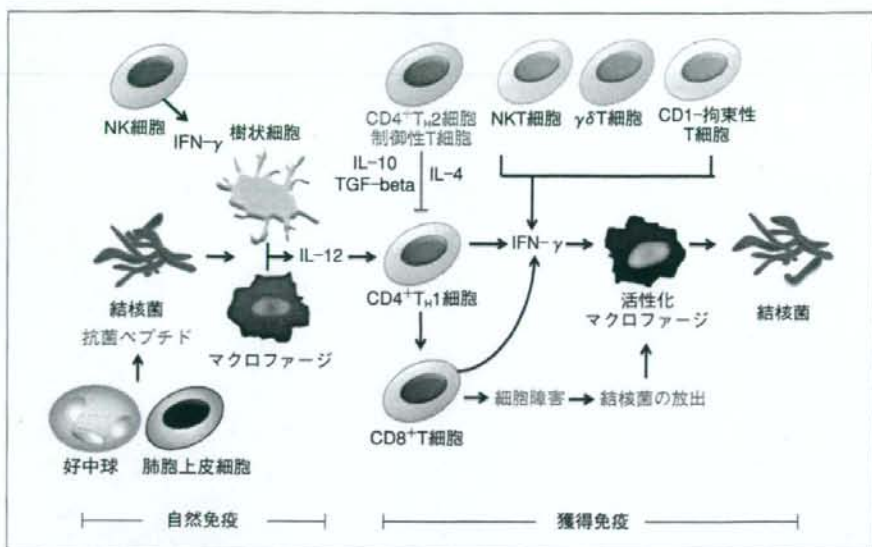


図2 結核菌感染と宿主応答

肺に侵入した結核菌は、肺胞マクロファージに貪食されるか、II型肺胞上皮細胞に感染する。感染初期には好中球の浸潤があり、II型肺胞上皮細胞とともに抗菌ペプチドによって結核菌を攻撃する。またNK細胞はIFN- γ を生産し、細胞性免疫の誘導を促す。マクロファージや樹状細胞が結核菌抗原をIL-12の存在下において提示することで、CD4陽性T細胞はT_H1細胞に分化する。T_H1細胞はIFN- γ を生産し、マクロファージを活性化することで結核菌の増殖停止や殺傷を促す。T_H1細胞以外にも、CD8陽性T細胞、NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、CD1-拘束性T細胞もIFN- γ を生産しマクロファージを活性化する。これを抑制するのが、T_H2細胞や制御性T細胞である。CD8陽性T細胞は細胞傷害性を有するキラー細胞でもあり、活性化マクロファージによる結核菌の再貪食を誘導する。

れが現在、結核菌など抗酸菌感染の診断に用いられているツベルクリンの起源である。

一方、Louis Pasteurらが当時確立したワクチン開発法(すなわち、自然発生的な弱毒病原体の取得)をPasteur研究所のCalmetteとGuérinが実践し、牛型結核菌Nocard株を13年間230代に渡って継代培養を行った結果、弱毒菌株を得た。これが現行の結核ワクチンbacillus Calmette-Guérin(BCG)の原型である。日本で接種されているBCG Tokyo 172は、1924年に志賀潔がPasteur研究所から持ち帰った菌株に由来する¹⁾。結核に対する予防効果は、BCG接種で得られるのに対し、ツベルクリン接種では得られないことから防御免疫は生菌免疫でのみ獲得されるとの考えが定着する。

現行ワクチンBCGは乳幼児結核(全身播種性結核や髄膜結核)の予防に効果(70~80%)が認められている。しかしながら、成人型肺結核の予防効果は疑問視されている。また、HIV感染者に

BCGを含む生ワクチンの接種は有害事象を惹起する可能性があり、原則禁忌である。このような現状は、肺結核に有効、かつ、安全な新規ワクチンの必要性を示唆している

3. 自然免疫と結核

免疫賦活物質であるアジュバントは自然免疫の活性化物質であり、特に成分ワクチンの開発に欠かせない。自然免疫はマクロファージや樹状細胞のパターン認識受容体の活性化を介して活性化され、T細胞への円滑な抗原提示を促すことで獲得免疫の発動と免疫記憶を誘導する(図2)。しかしながら、結核菌は樹状細胞の活性化をC型レクチンを介して抑制する機構を有している。また、結核菌菌体成分は自然免疫の賦活化において最も主要なレセプターToll-like receptor (TLR)4をほとんど活性化しない。これらは結核菌の巧妙な寄生戦略の一端を示すものであり、ワクチン開発において憂慮すべき問題である。一方、結核菌の菌体成分は、TLR2やTLR9(それぞれリポ蛋

白質と CpG-DNA)を刺激し、これらの受容体は結核の防御に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。

4. 獲得免疫と結核

結核菌は感染後対数的に増殖するが、健常宿主においては獲得免疫(特に、マクロファージと T 細胞から構成される細胞性免疫)の発動により増殖は阻止される。この防御免疫の主役を担う細胞が CD4 陽性の 1 型ヘルパー T (T_{H1})細胞である(図 2)。活性化された T_{H1} 細胞はエフェクター T 細胞に分化して interferon- γ (IFN- γ)³⁾を産生し菌の増殖抑制や殺菌を促す。ワクチン効果の主体はこのエフェクター T 細胞が病原体の駆逐による抗原消失後、記憶 T 細胞に分化し長期間の免疫記憶が成立することで形成される。しかしながら、結核菌は潜伏感染して宿主から排除されることがないため、多くの T_{H1} 細胞がエフェクター細胞のまま次第に死滅してしまう。BCG も生体内に持続感染するため記憶 T 細胞の誘導能に乏しく、この機構が成人接種者における効果の減衰にかかわっている。

T_{H1} 細胞以外にも、免疫記憶を担う CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞や結核菌糖脂質を認識する CD1 拘束性 T 細胞も感染防御に重要な役割を果たす。他方、interleukin 4 (IL-4)を産生する T_{H2} 細胞や制御性 T 細胞(Treg)は防御免疫の抑制にかかわる記憶 T 細胞である。細胞内寄生菌である結核菌に対し、抗体など液性免疫の防御的役割はマイナーとされる。

5. 結核ワクチン開発の現状

成人型肺結核に対する有効で安全な結核ワクチンの成功は未了であるが、①遺伝子組み換え BCG、②組み換え弱毒結核菌、③成分ワクチン、④DNA ワクチンやウイルスベクター組み換えワクチンなど、世界的に結核ワクチン研究・開発が進行中である⁹⁾。以下に抜粋して紹介する(表)。

1) 組み換え BCG

BCG に特定の防御抗原や免疫賦活分子を発現させる。もしくは BCG が欠失した結核菌抗原を再度入れ戻すことで BCG を改良する試みである。Antigen 85B などの抗原や、IL-2、IFN- γ などのサイトカインを発現させた BCG が作成されているが、特に注目すべきは IL-15 を組み入れた

BCG であろう⁵⁾。IL-15 は記憶 CD8 陽性 T 細胞の維持にかかわり、防御免疫の持続を可能にするかもしれない。

BCG は、region of deleted 1 (RD1)領域を欠いているため、抗原提示細胞内でほとんどの菌体抗原はファゴゾーム内にとどまっている。結果として十分な CD8 陽性 T 細胞を活性化することができない。Kaufmann らは、低 pH でファゴゾーム膜を障害するリステリアの毒素をウレアーゼの欠失した BCG に発現させた組み換え BCG, rBCG Δ UreC : Hly+ を作成した。rBCG Δ UreC : Hly+ は CD4 陽性細胞とともに CD8T 細胞の活性化を促し、BCG 親株を超える効果のあることが判明している⁶⁾。

2) 組み換え弱毒結核菌

結核菌の弱毒株を作成して、より病原体そのものに近い抗原で免疫することが効果的なワクチンの作成に繋がるとの考えがある。結核菌そのものを使用するため少なくともゲノム上離れた二種の遺伝子を欠失させ病原性の回帰を阻止している。結核菌 H37Ra 株の病原性の消失に強くかかわる二成分制御系分子の PhoP⁷⁾やビタミン B5 の合成酵素(PanC, PanD)⁸⁾を欠失させた結核菌株の臨床試験が始まっている。

3) 成分ワクチン

成分ワクチンは生ワクチンに比べ安全性に優れ、HIV 感染者にも対応可能である。加えて、抗原は投与後しばらくして消失するために、記憶 T 細胞を誘導しやすい利点がある。一方、免疫原性は生菌ワクチンに劣るため一般的にアジュバントや追加免疫を必要とする。現行のアジュバントの多くが体液性免疫の賦活を念頭に開発されてきたため、細胞性免疫の誘導に優れるアジュバントの開発も必要である。

ワクチン抗原は当初、分泌蛋白質を標的として行われた。これは生菌免疫の効果が、分泌する蛋白質に依存するとの考えによる。防御免疫を誘導する結核菌分泌蛋白質は、Antigen 85B(α 抗原)をさきがけとして、Antigen 85 complex, ESAT6, MPT51, MPT64, HBHA, Mtb32 などが同定されている。しかしながら、Dnak, Mtb39, HSP65, MDP1⁹⁾など、非分泌性蛋白質にも防御免疫を誘導する抗原が多数同定されている。蛋白質成分ワ

表 現在開発中の主な結核ワクチン

ワクチン	施設・施行者	備考
組み換え BCG		
rBCG-Ag85B-IL15	九州大学・吉聞ら	Antigen 85B と IL-15 を BCG より発現。
rBCG30	カリフォルニア大学・Horwitz ら	Antigen 85B を BCG より発現。Phase1 済み。
BCG::RD1	パスツール研究所・Cole ら	結核菌の RD1 領域を BCG に入れ戻したもの。
rBCGAUreC:Hly+	マックスプランク研究所・Kaufmann ら	本文参照。Phase1 済み。
組み換え結核菌		
<i>M. tuberculosis</i> mc ² 6030	ニューヨーク大学・Jacobs ら	panCD と RD1 領域を欠失させた結核菌。
<i>M. tuberculosis</i> PhoP	ニューヨーク大学・Jacobs ら	PhoP を欠失させた結核菌。
その他の生菌ワクチン		
組み換えリステリア	浜松医科大学・小出ら	リステリアに Antigen 85A, 85B, MPT51 を発現させたもの。
成分ワクチン		
Mtb72f	Corixa 社・Reed ら	Mtb39 と Mtb32 の融合蛋白質。Phase1 済み。
Hybrid-1	Statens Serum Institutes Andersen ら	Antigen 85B と ESAT6 の融合蛋白質。Phase1 済み。
HyVac-4	Statens Serum Institutes Andersen ら	Antigen 85B と TB10.4 の融合蛋白質。
DNA やウイルスベクターを利用したワクチン		
HSP65DNA	英国国立医学研究所・Lowrie ら	ライ菌由来 HSP60 遺伝子を用いた DNA ワクチン。
HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA	近畿中央病院・岡田ら	結核菌由来 HSP65 と IL-12 遺伝子をリボソームに封入した DNA ワクチン。
MVA85A	オックスフォード大学・Hill ら	ワクシニアウイルスを用いて Antigen 85A を発現させたもの。
Aeras-402	Aeras 社	アデノウイルスベクターを用いて Antigen 85A, 85B, TB10.4 を発現させたもの。

ワクチン開発においては、Mtb72f¹⁰⁾、Hybrid1、Hy-Vac-4 など、複数の抗原をハイブリッドさせることでより強い免疫応答を惹起できる融合蛋白質ワクチンも作成され試験中である。

一方、脂質抗原が CD1 分子拘束性の T 細胞の分化を促すことが判明している¹¹⁾。結核菌細胞壁の 40% は脂質であり、結核菌感染においては脂質抗原に対する免疫応答が活発である。脂質抗原は蛋白質に比べ生産効率や操作性に劣ることから、ワクチンへの応用は現在のところ低調であるが、特にアジュバントとしての利用価値は高い。将来のワクチン設計において脂質抗原も加えて検討すべきと考えられる。

4) DNA ワクチンやウイルスベクター組み換えワクチン

抗原そのものを接種するのではなく、蛋白質抗原の遺伝子を発現ベクターやウイルスベクターに導入し生体内で発現させる手法である。これらのワ

クチンは、これまでヒトでの実績がなく安全性を慎重に検討しなければならないが、内在性抗原として蛋白質を提示するため CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の誘導に優れる。また、DNA 取り扱い技術の発達により簡便かつ安価にワクチンを作成できる。一方、生体内における DNA の分解を防ぐ必要があり、DNA ワクチンをリボソームに封入したり¹²⁾、病原性を失活させたウイルス粒子を用いることで対応している。現在、結核菌の主要防御抗原やサイトカインを発現するワクチンが作成され検討されている(表)。

6. 今後の展望

人類の 1/3 に結核菌が潜伏感染している。天然ワクチンの接種者である結核菌既感染者に再感染が生じるように、結核は“二度がかり有り”の慢性疾患である。これまでのワクチンが著効を示してきたのは、天然痘や麻疹に代表されるような“二度がかり無し”の急性疾患のみである。従来

のワクチン開発戦略のみでは結核ワクチンの開発は困難であり、安易な抗原の組み合わせや一時的な免疫応答の惹起のみでは最終的な成功に至らぬことは明白である。加えて、ワクチンの評価は成人の肺結核に効果の乏しい native BCG を実験対照として用いているため、評価系自体にも問題がある。ヒトの一次結核と二次結核、それぞれの病態を表現するモデルを確立し、検討することが重要と考えられる。

一方、“ヒト”に立ち返れば、結核菌に感染しても終生発病を免れるヒトが約90%である事実は、優れたワクチンの開発が可能であることを示している。結核菌既感染者における“菌の増殖を制御する機構”の解明はワクチン開発に寄与するであろう。“二度がかり有り”の慢性疾患に対して有効・安全なワクチンを作成することは、これまでに人類が成しえていない大きな挑戦である。今後、免疫理論と実践の蓄積により、結核ワクチン開発は成し遂げられるものであろう。

文 献

- 1) Yamamoto S, Yamamoto T: Historical review of BCG vaccine in Japan. *Jpn J Infect Dis* 60: 331-336, 2007
- 2) Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, et al: Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J Immunol* 148: 4072-4076, 1992
- 3) Kawamura I, Tsukada H, Yoshikawa H, et al: IFN-gamma-producing ability as a possible marker for the protective T cells against *Mycobacterium bovis*

BCG in mice. *J Immunol* 148: 2887-2893, 1992

- 4) Young DB, Perkins MD, Duncan K, et al: Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. *J Clin Invest* 118: 1255-1265, 2008
- 5) Tang C, Yamada H, Shibata K, et al: Efficacy of recombinant bacille Calmette-Guérin vaccine secreting interleukin-15/antigen 85B fusion protein in providing protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 197: 1263-1274, 2008
- 6) Grode L, Seiler P, Baumann S, et al: Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest* 115: 2472-2479, 2005
- 7) Lee JS, Krause R, Schreiber J, et al: Mutation in the transcriptional regulator PhoP contributes to avirulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra strain. *Cell Host Microbe* 3: 97-103, 2008
- 8) Sambandamurthy VK, Wang X, Chen B, et al: A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. *Nat Med* 8: 1171-1174, 2002
- 9) Matsumoto S, Matsumoto M, Umemori K, et al: DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* 175: 441-449, 2005
- 10) Skeiky YA, Alderson MR, Ovendale PJ, et al: Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *J Immunol* 172: 7618-7628, 2004
- 11) Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, et al: Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta + T cells. *Nature* 372: 691-694, 1994
- 12) Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine* 25: 2990-2993, 2007

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

レジデントのための感染症診療マニュアル 第2版

青木 眞

●A5 頁1464 2008年
定価10,500円(本体10,000円+税5%)
[ISBN978-4-260-00387-2]

初版発行から7年。第2版は頁数を倍以上に増やし、新版と見まがうほどの大改訂となった。最新エビデンスを明示し、臓器別・原因微生物別のアプローチを充実させ、臨床での問題解決のための生きた知識・考え方を網羅。「感染症は全診療科に共通の問題なので、研修医は感染症診療の基本原則を身につけることが重要」という理念はぶれることなく、研修医および指導医が困ったときに最初に頼るべき本という位置付けに変わりはない。

再興した感染症「結核」の 診断・治療・予防法

国立感染症研究所免疫部
小林 和夫



小林 和夫
国立感染症研究所 免疫部長
(厚生労働技官)

昭和大学医学部第一内科学講師、大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学分野教授を経て、2006年より現職。専門は、感染症学、臨床免疫学、結核病学。結核など抗酸菌感染症の分子医学、基礎-臨床医学の橋渡し研究に従事。サイトカインの病因的役割、抗酸菌病原因子の解明、抗酸菌感染症の血清診断の開発などで成果を挙げている。持田記念医学薬学振興財団研究奨励賞受賞。著書に、「標準微生物学 第9版」(分冊、医学書院、2005年)など。

はじめに—結核とは—

結核とは、結核菌感染によっておもに肺に炎症を起こす疾患である。結核患者が咳やくしゃみをした時に飛散する「しぶき(飛沫核)」に存在する結核菌を吸入することにより感染・発病する(図1)。結核は人類に甚大な健康被害を及ぼしている。世界の感染症による年間死者数(2005年)は1,400万人(総死者数:5,800万人の4分の1弱)を占める(表1)。

痰に結核菌を排出していない結核の場合、他人に伝播することはほとんどない。結核菌を吸い込んでも、免疫防御機能により、結核菌の活動が抑制され、発病は感染者の約10%である。結核は、6か月間毎日確実に薬を服用すれば、ほとんど治癒する。

世界保健機関(WHO)やG8頂上会議は、1)ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染/後天性免疫不全症候群(エイズ)、2)

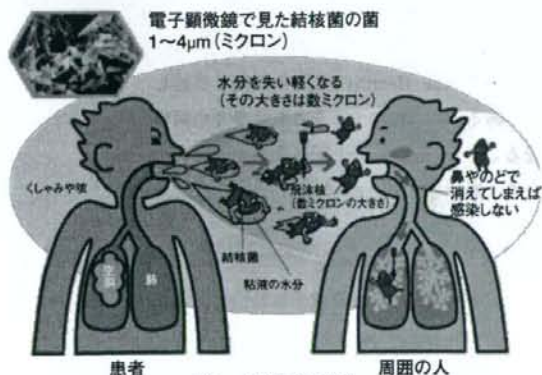


図1 結核菌の感染

財団法人結核予防会：結核の常識 2006 (<http://www.jatahq.org/about/TB/2006/joshiki2006-2.html>)

表1 世界における感染症による死亡者数 (2006)

感染症	死亡者数(万人)
全感染症	1,400
肺炎など急性呼吸器感染症	376
後天性免疫不全症候群(結核合併を含む)	210
結核	170
下痢性疾患	168
マラリア	89

結核、および3)マラリアによる死亡が年間約500万人、患者発生が3億人であることから、これら3大疾患を最重要感染症に認定し、世界が協調して対策を構築することを宣言している。

結核の発生動向

世界では約20億人(全人口の3分の1)が結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)に既感染(ほとんどは潜在性)、毎年920万人(ヒト免疫不全ウイルス感染合併:71万人を含む)が結核を発病、170万人(後天性免疫不全症候群合併:20万人を含む)が死亡している。1人の無治療結核患者が年間10~15名の感染者を生じさせている。なお、結核菌感染後の発病率は10%である。世界保健機関は、今後20年間に10億人の新規感染者が発生、1億5,000万人が結核を発病、そして、3,600万人の結核死亡を予測している。

1951(昭和26)年、結核予防法(2007年「感染症の予防及び感染症患者に対する医療に関する法律」に統合)は施行されたが、当時の日本における結核罹患率は人口10万人対698.4、死亡率は111.1であり、結核は甚大な健康被害であった。その後、抗結核化学療法や検診の発達・普及、また、衛生行政の整備により、結核は減少した。しかし、1997年、罹患率や発生患者数ともに38年ぶりに増

表2 世界および日本の結核発生動向

	結核菌 既感染者数	年間死亡数 (死亡率)	新規登録患者数 (罹患率)
世界	20億人	170万人(2.5)	920万人(139)
日本	0.25億人	0.22万人(1.7)	2.5万人(19.8)

表3 結核の増加要因

社会的	人口の集中/都市化、国際化/移動・移民、貧困、感染症対策の行政的不備
宿主的	易感性宿主の増加(高齢者、糖尿病、慢性腎不全、ヒト免疫不全ウイルス感染、免疫抑制薬/臓器移植、免疫疾患、抗サイトカイン療法:関節リウマチやクローン病治療薬)
微生物学的	薬剤耐性抗菌薬の出現、病原性の変化

加し、結核は「再興感染症」として注目されている。日本における増加要因は、1)70歳以上の高齢患者の増加、2)集団感染、さらに、3)貧困など経済的弱者の結核の増加が挙げられる。加えて、国際的には、4)薬剤耐性結核や5)ヒト免疫不全ウイルス感染/後天性免疫不全症候群の合併も増加要因である。

日本では、2007年に年間2万5,000人(罹患率人口10万対:19.8)が結核を発病、2,200人(死亡率:1.7)が死亡している(平成19年結核登録者情報調査年報集計結果—概況、厚生労働省健康局結核感染症課【<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou03/07.html>】)(表2)。

日本における結核対策の課題として、1)急速な人口の高齢化に伴う高齢者結核の増加(70歳以上の占める割合:48%)、2)国内地域格差の拡大(最高罹患率は大阪市:52.9、最低は長野県:10.3)、3)薬剤(とくに、多剤や超多剤)耐性結核菌の出現、4)特異的、迅速かつ簡便な結核菌感染の検査法の開発や5)潜在性結核菌感染対策などがある。

結核の増加要因は、社会要因、宿主要因および病原体要因に大別される。社会的要因として、都市化による過密、貧困、交通機関の発達による高速移動、国際化や感染症対策の軽視などが寄与している。宿主要因として、感染抵抗力の減弱(高齢化、糖尿病、慢性腎不全、ヒト免疫不全ウイルス感染/後天性免疫不全症候群、免疫抑制薬/臓器移植や免疫疾患など)が易感性を招来している。また、病原体要因として、薬剤耐性結核菌の出現および病原性の変化などが結核の増加に関与している(表3)。

とくに、世界と共通した重要な要因や課題は、1)多剤耐性(MDR)結核菌(抗結核薬であるイソニアジドおよびリファンピシンに同時耐性)の出現、2)ヒト免疫不全ウイルス感染/後天性免疫不全症候群、および3)潜在性結核菌感染対策である。最近、超多剤耐性(XDR)結核菌(多剤耐性に加え、フルオロキノロン耐性+カナマイシン、カプレオマイシン、アミカシンの1剤以上に耐性)も出現している。薬剤耐性結核の出現を防止する効果的な戦略は、薬剤感受性結核を確実に治療、そして、治療させることであり、世界保健機関は直接監視下短期抗結核化学療法(directly observed treatment, short course: DOTS)を推奨している。

世界のヒト免疫不全ウイルス感染者(後天性免疫不全症候群を含む)は3,320万人、結核菌とヒト免疫不全ウイルスの重複感染は約71万人、結核を発症した患者(920万

人)でヒト免疫不全ウイルス陽性は約8%を占めている。結核菌感染に対する防御は細胞性免疫に依存しているが、ヒト免疫不全ウイルス感染症/後天性免疫不全症候群は細胞性免疫を破壊するため、結核菌感染や発病を惹起しやすくする。実際、ヒト免疫不全ウイルス感染陽性者における発病の相対危険度はヒト免疫不全ウイルス感染陰性者の約10倍である。また後天性免疫不全症候群死亡の約10%が結核を直接原因としている。世界の人口の3分の1が結核菌に既感染、ほとんどは無症候性潜在性感染であり、大部分の結核は潜在性結核菌感染から発病に至る。したがって潜在性結核菌感染対策は結核の制圧に重要である。

結核菌の生物学的特徴や病原性

結核菌の生物学的特徴として、1)細胞内寄生性、2)脂質成分に富む細胞壁、3)好気(酸素)性、4)遅発育性、5)飛沫核(空気)感染、6)慢性炎症、および7)遺伝子の解読などがある。分裂倍加時間は約12~15時間(参考:大腸菌は約20分間)の遅発育菌であり、感染伝播は、飛沫核(空気)感染による。結核菌感染により、菌は消失することなく、一生涯、体内に残存する。一般的に、活動性結核患者と接触した者の約30%が感染する。宿主防御機構では細胞性免疫が役割を演じ、その結果、結核菌初感染者の10%が結核を発病、潜在性結核菌感染者の20%が免疫力の低下に伴い発病する(図2)。

病変は、慢性炎症、肉芽腫、乾酪壊死(結核病変の中

心部が壊死し、黄色乳成分凝固物[チーズ状塊]を形成すること。乾酪壊死肉内の結核菌は減少し、生菌として残存する)、空洞形成や線維化などが特徴的である。結核菌の遺伝子、全遺伝子塩基配列が解明された。今後、遺伝子解析を基盤とした科学的戦略が推進され、分子/遺伝子標的を視点とした新規診断法、抗結核薬の開発、薬剤耐性獲得機構の解明や新規ワクチン開発が展開されるであろう。

結核の診断

結核は、肺結核と肺外結核(肺あるいは気管支以外の臓器を主要罹患臓器とする結核および播種性結核)に分類されるが、85%以上は肺結核である。肺結核の症状として、咳(咳嗽)や痰(喀痰)(持続性、2週間以上)、血痰、胸痛、軽度発熱、体重減少、とくに、持続性咳嗽と喀痰は重要である(表4)。

肺外結核部位として、喉頭、リンパ節、胸膜、泌尿生殖器、骨・関節、髄膜・中枢神経系、腹膜・消化管や心外膜などがある。喉頭結核は、肺結核に続発することが多く、症状として、嚥下痛、しわがれ声(嗄声)や呼吸困難が見られる。全身播種性(粟粒性)結核は少なくとも2臓器以上に活動性病変があり、全身散布性病巣が形成されるものをいう。乳幼児や免疫不全者(副腎皮質ステロイド薬や免疫抑制薬の投与、慢性腎不全:血液・腹膜透析、ヒト免疫不全ウイルス感染症/後天性免疫不全症候群)などに起こりやすい。発熱、全身倦怠、衰弱、咳、胸痛、息切れ、頭痛などの症状があり、全身性に小結節病変が出現する。腸結核は結核菌を含んだ痰を嚥下することにより発症し、症状として下痢、腹痛、腹部膨満、悪心や嘔吐がある。

診断には、病原体および補助診断がある(表4)。病原体の検出は診断に確定的であるが、痰塗抹検査陽性(図3a)の場合、結核菌のみならず、類縁の非結核性抗酸菌(非結核性抗酸菌感染症は結核を含む抗酸菌感染症の約20%を占める)を考慮する必要がある。現在、最も信頼性の高い検査は培養法(図3b)であるが、欠点として、長期間を要することである(10~14日間以上)。核酸増幅による遺伝子診断は迅速性、感度や特異性に優れるが、生死菌の識別や技術的問題(熟練、偽陽性/偽陰性)がある(図3c)。

胸部X線所見では、浸潤影(水様物質が肺胞腔に蓄積することで呈する境界不鮮明な陰影)、結節(境界明瞭な円形状陰影)、空洞(病変部に穴がある陰影)、線維化、肺



図2 結核の発病

財団法人結核予防会:結核の常識 2006

(<http://www.jatahq.org/aboutTB/2006/joshiki2006-2.html>)

表4 結核の症状や診断

症状	持続性咳嗽や喀痰(2週間以上) その他:発熱、血痰、胸痛、体重減少など	
病原体診断	塗抹検査	抗酸菌染色、蛍光染色
	培養検査	10~14日以上、薬剤感受性試験
	遺伝子検出	核酸増幅法:ポリメラーゼ連鎖反応(PCR) デオキシリボ核酸(DNA)-デオキシリボ核酸交雑形成
補助診断	胸部X線	中および上肺野病変(浸潤、結節や空洞) リンパ節腫大や石灰化 胸膜炎/胸水貯留
	病理学的検査	乾酪壊死を伴う肉芽腫
	ツベルクリン皮内反応	48時間後判定 陽性:結核菌感染、BCG陽転、非結核性抗酸菌感染 陰性:未感染、BCG未接種、免疫不全 (ヒト免疫不全ウイルス感染症/後天性免疫不全症候群、重症結核、薬物性)
	クオンティフェロン:QFT	末梢血細胞インターフェロンガンマ産生・遊離試験(クオンティフェロン®)

門リンパ節腫大や石灰化、無気肺(気管支などが閉塞され、一部の肺の空気が消失している状態)、胸膜肥厚・癒着(胸膜炎が治癒し、胸膜が肥厚・癒着した状態)、胸水貯留など、多彩である(図3d)。好発部位は、酸素濃度の高い上肺や中肺野である。多発性びまん性結節陰影は播種(粟粒)性結核で見られる。これらの所見は他の炎症性や腫瘍性肺疾患(肺がんなど)にも認められる所見であり、結核特異的でなく、注意を要し、胸部X線所見は結核の補助的診断法である。

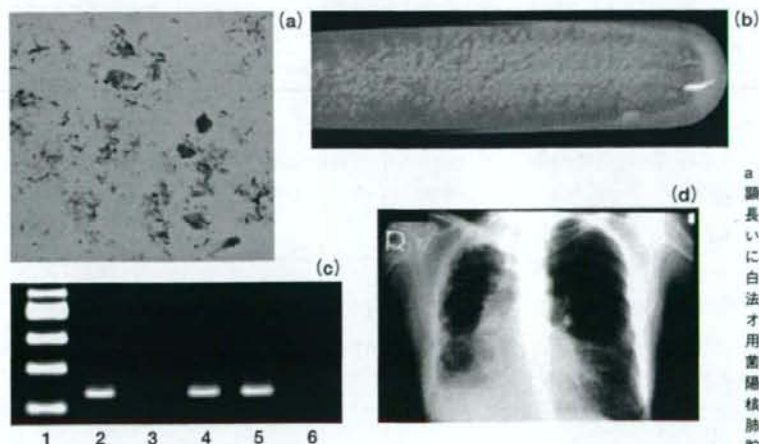
ツベルクリン皮内反応の陽性(日本:紅斑 \geq 直径10mm以上、欧米:硬結 \geq 直径5mm以上)は結核菌感染のみならず、弱毒ウシ型結核菌ワクチン(bacillus Calmette-Guérin:BCG)接種や非結核性抗酸菌感染でも見られ、逆に、活動性結核の約25%は陰性である。陰性は真の陰性(結核菌未感染)や偽陰性(結核菌既感染にもかかわらず、陰性)を包含する。偽陰性として、栄養障害、高齢者、免疫疾患、リンパ系悪性腫瘍、副腎皮質ステロイド薬療法、慢性腎不全、サルコイドーシス、ヒト免疫不全

ウイルス感染者(後天性免疫不全症候群を含む)や重症結核(播種性)などがある。したがって、ツベルクリン皮内反応も結核の補助診断である。ツベルクリン皮内反応陽性は感染防御の指標とならないことも留意する。

近年、結核菌特異的タンパク質抗原を用いた免疫学的診断法が開発され、臨床応用されている(インターフェロンガンマ遊離試験:クオンティフェロン®:QFT)。これらの抗原は、結核ワクチンであるBCGや多くの非結核性抗酸菌に存在しないため、結核菌感染を特異的に検出できる。原理は、末梢血に特異的タンパク質抗原を加え、培養後、産生・遊離されるインターフェロンガンマを定量する(陽性:0.35 IU/mL以上)。検査対象として、1)潜在性結核菌感染や、2)活動性結核の補助診断に応用されている。

治療法

結核は、薬をきちんと服用すれば治る。痰の中に結核菌が出なくなれば外来通院治療も可能である。

図3 結核の診断¹⁾

a:痰の結核菌塗抹検査(特殊な染色をし、顕微鏡で観察)。結核菌は赤染されている細長い(桿)菌であり、ヒト組織は青染されている。b:結核菌の培養所見。咳痰を卵培地に接種し、6週間後に多数の結核菌集落(乳白色一薄黄色)形成を認めた。c:核酸増幅法による結核菌遺伝子の検出。結核菌のデオキシリボ核酸(DNA)に特異的DNA断片を用い、核酸重合酵素連鎖反応で喀痰の結核菌遺伝子を検出した。分子基準標識:列1、陽性:列2、4、5、陰性:列3、6。d:肺結核の胸部X線所見。浸潤影、結節、線維化、肺門リンパ節腫大、胸膜肥厚・癒着や胸水貯留など、多彩な所見を認めた。

治療の原則は、確実な多剤併用抗結核化学療法(服薬期間は約6か月[毎日]、最初の2か月が4剤:イソニアジド、リファンピシン、エタンブトール、ピラジナミド、その後4か月が2剤:イソニアジドおよびリファンピシン)である。1薬剤当たりの耐性菌出現頻度は $1/10^6 \sim 10^9$ であるため、薬剤を併用することにより、耐性菌の出現頻度を低下させることが可能となる。ただし、確実な服用は絶対条件であり、世界保健機関は直接監視下短期抗結核化学療法(DOTS)を推進している。直接監視下短期抗結核化学療法とは、結核患者を見つけて治すために利用されている保健福祉の包括的計画の名称で、世界保健機関が提唱した結核対策戦略である。そのおもな5要素は、1)政府が結核を重要課題と認識し適切な指導性を発揮すること、2)結核菌検査による診断、病状経過観察の推進、3)結核患者が薬を飲み忘れないよう医療従事者の前で内服すること、4)薬の安定供給、5)菌検査結果の記録監視・調査である。

薬剤耐性結核の原因は、不適切な結核医療、すなわち、抗結核化学療法薬の不適切な選択や使用、治療中断や脱落であり、医療関係者や患者の対応に起因する人原病(man-made disease)である。全世界で5,000万人以上が多剤耐性結核菌(イソニアジドおよびリファンピシンに同時耐性)に既感染し、医療費は薬剤感受性結核に比し、3~100倍を要し、再発率(28%)がきわめて高く、結核制御対策の大きな課題である。加えて、超多剤耐性結核菌の出現は抗結核化学療法をきわめて困難にしている。

予防

予防は、感染源対策として患者の早期発見・治療、接触者(家族、学校、会社など)の調査、さらに、予防接種や潜在性結核菌感染の治療(化学予防)がある。予防接種はBCGが汎用されている。現行の結核発病予防ワクチンであるBCGは乳幼児結核(結核性髄膜炎など播種性結核)に有効であるが、成人肺結核に対するBCG接種の効果は疑問視されている。BCGは乳幼児期(原則として、生後6か月までにツベルクリン皮内反応を省略したBCGの初回接種)のみに限定している。

潜在性結核菌感染の治療(化学予防)は、抗結核化学療法薬(イソニアジドなど)を服用し、発症を防止する(効果:70~80%)。ただし、感染結核菌が化学療法薬に感受性であることが不可欠である。

結核予防法の統廃合

2007年4月の改正感染症法の施行に伴い、結核予防法は「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」に統廃合された。結核は二類感染症に位置づけられ、結核を診断した場合、医師は直ちに最寄りの保健所長を経由し都道府県知事に届け出なければならない。また、生物テロ対策として、2007年6月から、「特定病原体等(一〜四種)の管理規制」が施行されている。結核菌は空気感染病原体、かつ、個体に対する高い危険度を示すため、施設や保管の基準が定められた。多剤耐性結核菌は三種病原体であり、施設や保管の基準に加え、所持に際し、厚生労働大臣へ届出、また、運搬に際し、都道府県公安委員会へ届出が必要である。結核菌(多剤耐性結核菌を除く)は四種病原体であり、施設や保管の基準の遵守が必要である。

おわりに

結核は、代表的な再興感染症であり、現在でも、人類に甚大な健康被害を及ぼしている。結核対策には多くの課題が山積しているが、科学的根拠に基づいた「感染源、感染経路、感受性宿主」対策や「診断、治療、予防」が実施され、結核が制圧されることを期待している。

謝辞

本稿で紹介した研究は、厚生労働省・厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)および文部科学省・科学研究費補助金により支援された。

【参考文献】

- 1) 小林和夫:標準微生物学 第9版,山西弘一監修,平松啓一,中込治編,医学書院,279-292,2005.
- 2) 厚生労働省:結核・感染症に関する情報 (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansen-shou.html>).
- 3) 厚生労働省:平成19年結核発生病動向調査年報集計結果 (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansen-shou03/07.html>).
- 4) ストップ結核パートナーシップ日本 (<http://www.stoptb.jp/index.html>).
- 5) 財団法人結核予防会 結核研究所:結核の常識;新結核用語辞典 (<http://www.stoptb.jp/index.html>).
- 6) 国立感染症研究所感染症情報センター:感染症の話「結核」 (http://idsc.nih.gov.jp/idwr/kansen/k03/k03-07/k03_07.html).