

2009J1051A

厚生労働科学研究研究費補助金  
新型インフルエンザ等  
新興・再興感染症研究事業

# 結核対策の評価と 新たな診断・治療技術の 開発・実用化に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

平成 22 (2010) 年 3 月

研究代表者 加藤 誠也

# 目次

## I. 総括研究報告

結核対策の評価と新たな診断・治療技術の開発・実用化に関する研究 .....	加藤 誠也	1
--	-------	---

## II. 分担研究報告

1. 結核菌薬剤耐性の実態調査 .....	山岸 文雄	17
2. 新化学療法剤を含めた治療方式の開発・評価 .....	坂谷 光則	26
3. 結核菌検出・薬剤感受性検査の技術開発と評価 .....	切替 照雄	85
4. 小児結核対策・医療の評価 .....	徳永 修	90
5. 免疫脆弱集団（高齢者・小児・HIV 等）における感染診断の評価 .....	原田 登之	129
6. 結核菌の感染性・病原性の評価方法の開発 .....	御手洗 聡	133
7. 蛍光標識プライマーを用いたマルチプレックス PCR 法による結核菌の型別 .....	前田 伸司	138
8. 日本版 DOTS の技術強化 .....	小林 典子	144
9. コッホ現象報告の分析 .....	加藤 誠也	163
10. 結核患者に対する HIV 検査実施および検査結果情報収集の現状 .....	村上邦仁子他	171

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	197
---------------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	201
-----------------------	-----

# I 総括研究報告書

厚生労働省科学研究補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

平成 21 年度総括報告書

結核対策の評価と新たな診断・治療技術の開発・実用化に関する研究

（H 2 1 - 新興 - 一般 - 0 1 6）

研究代表者 加藤誠也 財団法人結核予防会結核研究所 副所長

## 研究要旨

日本の結核罹患率は人口 10 万対 20 を下回ったが、今後とも低まん延化に向けてより効果的・効率的な対策を進める必要がある。本研究の目的は従来の対策・技術の再評価と感染診断、菌検査、治療法、抗結核薬などの新技術の開発・評価を行うことである。

(1) 全国薬剤耐性調査: 2007 年に収集した菌株の分析から、2002 年に比較して INH 以外の combined any resistance, combined MDR は有意に減少していた。今後、さらに臨床情報を加えて、未治療・既治療別の解析が必要である。

(2) 新化学療法剤を含めた治療方式の開発・評価: ①結核医療機関へのアンケート調査の結果、リファブチン(30 例)及びリネゾリド(6 例)の有効例はそれぞれ 53.3%, 66.7%で、リファブチンの MDR(17 例)の有効例は 29.3%であった。②リファンピシン、リファブチン耐性結核菌の rpoB 内の変異を特定した。RFP 耐性 RBT 感受性の 89%はコドン 516 の Asp→Val でこれは迅速診断キットで検出できた。③キラーT 細胞から産生される Ksp37 蛋白が結核患者の血清中で有意に低下していた。④N95 マスク着用と適切な換気条件下にて勤務を行えば結核感染が防げる可能性が示唆された。

(3) 結核菌検出・薬剤感受性検査の迅速遺伝子診断法の開発・評価: フルオロキノロン耐性菌検出用ラインプローブ及びイソニアジド耐性菌検出用ラインプローブを開発した。イソニアジド酸化活性とイソニアジド耐性度に相関がみられたことから変異情報から耐性度を直接判別できる可能性を示唆された。

(4) 小児医療の全数調査及びBCGの副反応調査: ①T-SPOT TBは小児においてQFT-2Gよりもより的確に発病・感染を診断できる可能性が示唆された。②2005 年以降に発症が確認された BCG 骨炎は推定発症頻度よりもかなり高く、増加傾向が示唆された。③小児結核に関する現状分析より、集団生活を送る施設における感染対策の徹底、BCG ワクチン接種率の維持、小児結核の感染・発症診断の質的保証、ハイリスク・グループに対する選択的検診導入が必要と考えられた。

(5) 新しい感染診断法 IGRA の免疫脆弱者における評価: 休眠期特異的結核菌抗原を用いて、休眠期結核菌感染を検出できる可能性が示唆された。

(6) 結核菌の病原性・感染性の評価方法の開発: 複数の結核菌の混合物を平板培地上で液相のまま相対的に定量する方法を考案し、可能性を実証した。この方法によって 2 種の結核菌の相対的な感染力や増殖力を迅速に測定することが可能と考えられた。

(7) 遺伝子タイピングの全自動化と広域実施の有用性評価：JATA(12)及び JATA(15)の PCR 産物を、低分子を中心に分布するローカスと高分子を中心に分布するローカスの 2 つのグループに分け、マルチプレックス PCR の組合せを作り、別々に検出することによって、省力化が可能なシステムを構築した。

(8) 地域 DOTS の質向上のための検討：治療成績の解析及び服薬支援看護ワークショップの結果から、質の高い地域 DOTS を実践するために、①DOTS のゴールを見据えた医療機関との連携、②個々の患者の服薬支援計画の作成、③DOTS タイプに捉われない支援方法の選択と患者の生活に応じた具体的な支援、④ガイドラインの整備が必要と考えられた。

(9) 結核患者に対する HIV 検査実施および検査結果情報収集の現状：結核患者への HIV 検査への対応にばらつきが見られ、結核患者への HIV の啓発・検査が進んでいないことが推察された。検査対象者の選定、カウンセリング・検査からフォローアップまでのシステムづくりとともに、医療従事者への結核・HIV の重複感染に対する知識・意識レベルを高める必要があると思われた。

(10) コッホ現象報告の分析：厚生労働省に「コッホ現象」として報告された 814 例を分析した。コッホ現象による重篤な副反応の報告は見られなかった。報告数は都道府県によって大きな差があり、接種時の保護者への説明、相談後の対応など人為的な要因が関与しているものと考えられた。判定結果は非特異的反応：71.0%，経過観察：4.2%，コッホ現象：12.8%（うち、発病 3 例），他院紹介：6.6%，不明：5.4%であった。非特異的反応は経年的に減少した。

研究分担者

山岸文雄（独立行政法人国立病院機構  
千葉東病院 院長）

坂谷光則（独立行政法人国立病院機構  
近畿中央胸部疾患センター 院長）

原田登之（結核予防会結核研究所抗酸菌  
リファレンス部 部長）

前田伸司（結核予防会結核研究所抗酸  
菌リファレンス部細菌情報科 科長）

切替照雄（国立国際医療センター研究  
所感染症制御研究部 部長）

御手洗 聡（結核予防会結核研究所抗  
酸菌リファレンス部 副部長）

小林典子（結核予防会結核研究所対策  
支援部 部長）

徳永 修（国立病院機構南京都病院  
小児科 医長）

研究協力者

村上邦仁子（結核予防会結核研究所国際  
協力部）

河津里沙（結核予防会結核研究所リサー  
チフェロー）

星野齊之（結核予防会結核研究所対策支  
援部医学企画科長）

永田容子（結核予防会結核研究所対策支  
援部保健看護科長）

山田紀夫（結核予防会結核研究所国際協  
力部 部長）

吉山 崇（結核予防会複十字病院第一診  
療部 部付部長）

A. 研究目的

日本の結核罹患率はDOTSを中心とする新しい対策の導入の成果もあって低下傾向を続けており、平成19年には初めて人口10

万対20を下回った。しかし、多剤耐性結核、高齢者・HIV合併結核等の免疫脆弱者など多くの課題が残されており、低まん延化に向けてより効果的、効率的な対策を進める必要がある。このため、本研究はこれまで行われてきた対策の再評価を行うと共に、新しい感染診断、菌検査、治療法、抗結核薬などの技術開発と評価を行うことを目的とする。それぞれの分担研究の目的は以下のとおりである。

(1)薬剤耐性全国調査

結核菌薬剤耐性の実態調査は結核療法研究協議会がこれまで概ね5年ごとに実施してきた全国調査の2007年分の結果の集計・分析によって現状の評価を行うものであり、薬剤耐性状況の変化を確認し、合わせて分子疫学的調査を行い、結核菌の薬剤感受性の現状を把握することを目的とする。

(2)新化学療法剤を含めた治療方式の開発・評価、

治療期間のさらなる短縮や多剤耐性結核患者の治療成績を向上されるため、新化学療法剤や新治療技術は医療の質の向上、入院医療の革新に有意義なものと大きな期待が寄せられている。本年度の研究目的は、①新化学療法剤の有効性、副作用の検討、②リファブチンの迅速薬剤感受性検査の開発、③フルオロキノロン系薬剤を加えた治療法の開発、④細胞性免疫予後診断法の開発、⑤職員の感染状態の経年的推移からN95マスクの効果を検証することである。

(3) 結核菌検出・薬剤感受性検査の迅速遺伝子診断法の開発・評価、

適正な治療方法選択のために薬剤感受性試験は必須であるが、従来の検査は結果が得られるまでに数週間から数ヶ月間を要す

ことから、迅速診断法の開発と臨床応用が急務になっている。本研究の目的は、薬剤耐性結核菌迅速検出ラインプロブ法の開発と評価である。本年度はフルオロキノロン及びイソニアジドに取り組む。

(4)小児医療の全数調査及びBCGの副反応調査、

新しい感染診断法であるIGRAの小児における評価は課題となっている。近年目立つようになっているBCGの副作用の実態を明らかにし、その原因と対応及び今後のBCG接種政策の検討材料とする。また著しく患者数が減少している小児結核の対策・診療の評価を行い、技術維持・向上に努める必要がある。本年度の研究は以下を目的とする。

① 感染危険度の高い家族検診例における2種のIGRA(QFT-2G及びT-SPOT TB)の特性を検討する。

② 近年増加する傾向が指摘されているBCG骨炎症例の全例把握を試み、発症頻度とその動向を正確に評価する。

③ 小児結核の現状を分析し、その予防・患者発見・治療などに関連する課題を明らかにし、今後必要な小児結核対策を検討する。

④ 症例を再検討することにより発症予防の可能性、診断・治療開始に至る過程での問題点、院内感染対策の課題、治療支援の必要性等を明らかにする。

(5)新しい感染診断法IGRAの免疫脆弱者における評価、

効果的な高齢者結核の対策を検討するためには、高齢者における結核感染の実態を明らかにする必要がある。本年度はESAT-6およびCFP-10を産生しない休眠期の結核菌感染、あるいは結核菌を体内から完全に

除去した状態を検出する方法を開発する。

(6)結核菌の病原性・感染性の評価方法の開発

結核の感染や発病に関する結核菌側の因子はあまり評価されておらず、効果的な対策のために、特に菌の毒力の強弱の評価が必要であるが、客観的な指標が存在しない。本研究の最終的目的は簡易で迅速な毒力評価法を開発することである。本年度はVNTR型の異なる2種類の結核菌を液相のままReal-time PCRを用いて相対定量する系を開発し検証することを目的とした。

(7)遺伝子タイピングの全自動化と広域実施の有用性評価、

結核菌遺伝子タイピングは欧米先進国で広く行われているが、我が国で全国的な検査体制の確立するために自動化検査技術の開発を目指す必要がある。今年度は2ローサイを混合したマルチプレックスPCR法を構築することを目的とした。

(8)地域DOTSの質向上のための検討

医療機関と保健所における服薬支援を効果的にし、かつ相互の連携の強化および、日本版DOTSの技術強化を図るために、前研究班で「結核看護システム」を開発した。このシステムの活用によって、DOTSの実施方法、成果、さらに地域連携等の改善に必要な事項の検討を行うことを目的とする

(9)結核患者に対するHIV検査実施および検査結果情報収集の現状

HIV感染が増加している中で、結核症例に対するHIV感染合併の有無の検査が、保健所・病院でそれぞれ、どのように実施されているかを調査することを目的とした。

(10)コッホ現象報告の分析

平成17年4月結核予防法改正から、ツ反

を行わない直接接種に変更になり、感染者に接種によってコッホ現象が生ずる状況になったが、管針法による知見は乏しかった。このため、日本におけるコッホ現象の実態を明らかにして、発生時の対応、報告等のあり方を検討することを目的とした。

## B. 研究方法

### (1) 薬剤耐性全国調査

2007年8月1日から2008年1月31日までに参加施設で分離された全ての抗酸菌培養陽性例で本人（または代諾者）から同意が得られた患者を対象とした。ただし、慢性排菌例から分離された抗酸菌は対象外とした。全国調査としての代表性を確保するため、地域毎の目標検体数を設定して収集した。プライバシー保護のため、参加施設が作成したIDによってデータ及び検体情報を扱った。

薬剤感受性検査はINH、RFP、SM及びEB、二次抗結核薬とLVFXについては1%小川培地を用いた標準比率法、PZAはMGIT ASTによって実施した。非結核性抗酸菌については菌種同定検査を実施した。多剤耐性結核菌についてはRFLPあるいはVNTRによる遺伝子タイピングを実施した。以上の全ての菌に関する検査は結核予防会結核研究所で実施した。これらの菌検査結果と臨床情報を合わせて解析を行った。

### (2) 新化学療法剤を含めた治療方式の開発・評価

①全国結核診療施設 269 施設に対して、Rifabutin、Linezolid 及び 3Meropenem hydrate + クラブラン酸について 12 項目 からなる調査票を送付して回収した。項目は以下のとおり；1. 性別、2. 年齢、3. 結核診断名、4. 薬剤耐性、5. 基礎疾患（合併症）、6. 治

療内容、7. 投与量・投与期間、8. 効果、9. 副作用、10. 退院・転帰（入院の場合）、11. 転帰、12. 診療上の問題と対応。

② RFP 感受性株 30 株と MDR-TB 株 72 株を対象に、RFP と RBT に対する MIC をブロスミック MTB-1 ならびに 7H9base の Microdilution 法を用いて測定した。さらに、ジェノスカラー・RifTB を用いて、rpoB 領域の変異を検出し、RRDR (Rifampicin-resistance determining region) のシークエンス解析を行った。

③ 2HREZ+4HR の標準治療の INH の代わりにフルオロキノロンを用いて、臨床症状、胸部 X 線、喀痰排菌、培養等、血液検査（肝、腎機能）等で効果・副作用を解析した。

④ 多剤耐性結核の宿主要因の SNP 解析を行った。

⑤ 大阪府立呼吸器アレルギーセンターでは当該センターに勤務歴の無い看護師 139 名、結核病棟勤務歴のある 20 歳代看護師 60 名に対して QFT-2G 検査を行った。国立病院機構福岡東医療センターでは結核病棟勤務者の QuantiFERON-TB 第 2 世代 (QFT-2G) 検査を平成 21 年に行い、2 年前と比較し、新たな感染者が生じていないかを検討した。

### (3) 結核菌検出・薬剤感受性検査の迅速遺伝子診断法の開発・評価

①フルオロキノロン耐性菌検出用ラインプローブの開発：結核菌の gyrA 遺伝子内のキノロン耐性決定領域 (Quinolone Resistance Determining Region: QRDR) の変異があるとラインが消えたままになる S プローブを設計した。さらに、変異の入りやすい 5 つの残基 (A90V, D94G, D94A, D94G-S95T, D94A-S95T) の変異があるとラインが出現する R プローブを設計した。



②イソニアジド耐性菌検出用ラインプローブの開発：従来の方法よりも検出率を上げるため検討・蓄積した変異の解析を実施し、イソニアジド耐性を与えると考えられる変異を選別した。次に既知耐性変異、新規変異を検出できるプローブを設計し、ラインプローブとしてストリップ上に固定した。

③臨床評価試験：臨床検体 150 例、臨床分離株 600 株を対象にして、臨床評価試験を開始した。

(4)小児医療の全数調査及び BCG の副反応調査、

① 2007 年 10 月～2010 年 3 月の間に感染診断を目的に国立病院機構南京都病院において QFT-2G 及び T-SPOT TB を同時に実施した小児例 104 例 200 検体の検査結果をその症例背景と共に比較検討した。

②日本小児整形外科学会評議員 109 名を対象に 2005 年以降の小児骨結核（結核性骨髄炎）症例及び BCG 骨炎症例の診療経験、近隣他施設での BCG 骨炎症例の存在に一次及び症例の詳細についての二次アンケートを実施した。

③大都市部の自治体行政・保健所結核対策担当医による「第 6 回小児結核サーベイランス委員会」を開催し、小児結核の発症例及び LTBI 症例の発生状況を報告すると共に小児結核対策に関連した問題を討議した。

④平成 20 年に登録された 14 歳以下の小児活動性結核症例 5 例を対象に医療機関と保健所がそれぞれの立場から発表を行なった上で討議を行った。

(5)新しい感染診断法 IGRA の免疫脆弱者における評価

① 結核未感染者と感染者（ボランティア）より血液を採取し、Ficoll を用いた密度勾配

遠心により、末梢血単核球（PBMC）を調整した。PBMC を ELISPOT 用マイクロプレートに  $2.5 \times 10^5$  個添加後、さらに共同研究者であるデンマークの Andersen 博士より提供された 10 種類の休眠期特異的結核菌抗原を加え 18 時間培養した。培養後、IFN- $\gamma$  産生 T 細胞の個数を計測した。

②central memory T 細胞と effector memory T 細胞の動態を分析するために、細胞内サイトカイン染色法による FACS 法、および ELISPOT 法を用いる二重染色システムを検討した。

(6) 結核菌の病原性・感染性の評価方法の開発

VNTR の二種の Locus について、反復配列のほぼ中央に Real-time PCR 用のプローブを設定し、相対定量（比率評価）方法を検討した。VNTR の Locus は MIRU31, VNTR3336, VNTR2163a, QUB18

(VNTR1982)を選択し、プローブの設計には Bluephine (Sigma-Genosys)を利用した。

①1 つの Locus について、Strain A と Strain B の混合比率を変化させて、元々の A と B の Strain の定量を行った。

②二種の異なる結核菌と異なる二つの VNTR Locus を利用して相対的定量実験を行った。

(7) 遺伝子タイピングの全自動化と広域実施の有用性評価

既に報告している JATA 番号が連続するように、またそれぞれのローカスからの PCR 産物が重なることがないようなマルチプレックス PCR の組合せとした。通常用いられている紫外線照射装置で励起可能な蛍光色素（フルオレセイン）で標識したプライマーを合成した。混合した 2 ローサイの

内、一方のローカスのプライマーを蛍光標識しておき PCR を行った。アガロースゲルで電気泳動を行い、ゲルを直接紫外線照射装置にのせて、蛍光を発するバンドを検出し記録した。その後、通常のエチジウムブロマイド (EtBr) 染色でバンドを検出した。以上のように、得られた PCR 産物が由来するローカスを特定した。

#### (8) 地域 DOTS の質向上のための検討

① 10 自治体 23 保健所及び結核予防会の 2 医療施設で「結核看護システム」に患者情報を入力し、治療成績の分析を行った。

② 全国保健所の地域 DOTS 担当者へのアンケート調査を通して現状を把握し、地域 DOTS の質的向上について検討した。

③ 保健所の担当者の参加を得て、服薬支援看護ワークショップを開催し、コホート観察の評価検証、およびコホート検討会のあり方、日本版 DOTS の評価、服薬支援のあり方について検討を行った。

④ 平成 19 年登録の肺結核登録患者について 13 県 41 保健所から CSV ファイルで提供していただいた 2,328 人のデータを用いて国のシステムの「治療成績」と本システムの「コホート観察」の比較分析を行った

⑤ 地域 DOTS を円滑に進めるため、「地域 DOTS の手引き」(案)を作成した。

#### (9) 結核患者に対する HIV 検査実施および検査結果情報収集の現状

結核研究所が実施している保健師・看護師対象の研修の参加者(計 308 名)を対象にアンケート調査、ならびにフォーカス・グループ・ディスカッションを実施した。

アンケート調査内容は保健所および医療機関における、結核患者に対する HIV 検査実施状況と、結核患者における HIV 検査結

果情報収集の現状に関する 10 項目であった。フォーカス・グループ・ディスカッションの内容は、「日本の HIV 合併結核の現状」と「HIV/TB collaborative activity、特に結核患者に対する HIV 検査」の 2 つのテーマに分けて分析した。

#### (10) コホ現象報告の分析

平成 17 年 4 月から 21 年 3 月までの 4 年間に厚生労働省に「コホ現象」として報告された 814 例で、性別、接種月齢、気付くまでの期間、都道府県別の報告数、ツ反、結果判定の集計・分析を行った。判定は調査票に記載された担当者の判断に加えて、「局所所見の状況・経過」およびツ反結果より新たに基準を策定して分析した。

### C. 研究結果

#### (1) 薬剤耐性全国調査

最終同定結果はまだ得られていないが、2010 年 2 月までに収集した抗酸菌 3,703 株の中で結核菌と考えられる株のほとんど(2,722 株)の感受性検査を終了した。一部の臨床データが得られていないため、解析途中であるが、Combined any resistance に関して低下傾向を示しており、2002 年と比較して INH 以外で統計的有意差をもって低下していた。さらに Combined MDR も 2007 年で 2002 年に比較して有意に低下している ( $p=0.001$ )。一方、Combined mono resistance や Combined poly-resistance に有意な減少が見られていない。MDR の中でも有意な減少があるのは全剤耐性 (INH, RFP, SM, EB 全てに耐性) だけ ( $P=0.003$ ) であった。

#### (2) 新化学療法剤を含めた治療方式の開発・評価

① 新化学療法による治療：送付した 269 施

設中 126 施設 (46.8%) より回答が得られた。使用症例は、①リファブチン 30 症例、②リネゾリド 6 症例、③メロペネムークラブラン酸 1 症例、合計 37 症例であった。リファブチン 30 症例のうち、有効例は 16 例 (53.3%)、無効例 5 例 (16.7%)、不明 9 例 (30.0%) であった。MDR-TB 17 症例に対するリファブチンの効果は有効 5 例 (29.4%)、無効 5 例 (29.4%) であった。リファブチンの副作用として、白血球減少、血小板減少、肝機能異常が認められた。

リネゾリド (6 症例) の効果は有効 (4 例) と 66.7% で効果が認められた。リネゾリドの副作用として骨髄抑制と末梢神経障害が高頻度で報告された。

②今回調査した RFP 耐性に関与する遺伝子変異は日本における変異の頻度 (R4b 2.9%, R4a 9.7%, R2 9.7%と同様であった。多剤耐性結核 (MDR-TB) における rpoB 遺伝子の変異はコドン 516、526 と 531 が多い。コドン 511、516 と 522 の single point 変異は RFP に対する感受性に影響を与えるが、リファブチンの感受性には影響を与えない。コドン 513、525、526 と 531 は RFP にもリファブチンにも感受性の影響を与える。一方、コドン 516 (R2 プローブ) はリファブチンに対する感受性に影響を与える。102 例の MDR-TB 菌中 19 例 (18.6%) は RBT 感受性であった。rpoB genotype の解析よりコドン 516 が (Asp→Val) 変異で RFB 感受性であり、これはジェノスカラー・Rif TB キットで迅速診断可能である。RFP 耐性 RBT 感受性菌 19 例中 17 例 (89%) で Asp516Val であり迅速診断できた。

③抗酸菌塗抹 Gaffky4 号で入院時より INH 300mg、RFP 600mg、PZA 1200mg、EB 750mg

に moxifloxacin 400mg を加えて治療開始した。副作用の出現もなく、4 週間で塗抹陰性、培養陰性化した例を経験した。

④既に多剤耐性結核及び難治性結核で CD8 からの granulysin が低下していることを報告した。Granulysin は結核菌を直接殺傷する機能のみならずキラーT 前駆細胞からエフェクターキラーT 細胞に分化する活性を有している。さらに、キラーT 細胞から産生される Ksp37 蛋白が結核患者の血清中で有意に低下していた。

④20 歳代看護師の QFT-2G 検査では、結核病棟勤務歴のない看護師が QFT-2G 6.4%陽性であったが、結核病棟勤務歴を有する看護師の QFT-2G は、結核病棟勤務歴の長さに関わらず (最長 4 年) 陰性であった。

H21 年に行われた QFT 検査において、平成 19 年以後、新たに陽性化した医師および看護師はいなかった。

(3) 結核菌検出・薬剤感受性検査の迅速遺伝子診断法の開発・評価

本年度はフルオロキノロン耐性菌検出用ラインプローブ及びイソニアジド耐性菌検出用ラインプローブを開発した。

また、イソニアジド耐性菌において見出された変異体を全てクローニングし、イソニアジドを活性化する酵素活性を測定した。酵素活性とイソニアジド耐性度に相関がみられた。この結果は、変異情報から耐性度を直接判別できる可能性を示唆するもので、治療にあたって重要な情報となる。

(4)小児医療の全数調査及び BCG の副反応調査

① 家族内に喀痰塗抹陽性感染源を認めた 32 例のうち、QFT-2G では 9 例が、T-SPOT TB では 15 例が陽性を示した。0~2 歳の年齢

群を含む各年齢群の陽性率は T-SPOT TB では約 40～55%の間に分布、一方、QFT-2G では 0-2 歳群では一例も陽性例を認めず、3～6 歳群、7 歳以上群の陽性率も T-SPOT TB に比してやや低い傾向が見られた。

② 76 通のアンケートが回収可能であり、12 診療施設より 15 症例の診療経験が報告された。昨年度収集した症例と合わせると、BCG 骨炎症例数は 2005 年以降全 25 例 (2005 年 1 例、2006 年 6 例、2007 年 6 例、2008 年 8 例、2009 年 4 例であった。

③参加した全ての自治体で小児結核の明らかな増加傾向は認めなかった。発症例の背景として、BCG ワクチン未接種、周囲の成人感染源症例の存在や免疫学的に弱い小児が多く集まる場所における集団感染事例発生、結核高蔓延国からの転入例などが挙げられた。接触者健診実施機関によって感染・発症診断の精度に差が見られた。

④ 成人の診断の遅れ、3 世代家族における発病例、障害児施設の集団感染事例、学校検診発見例、肺腫瘍が疑われた事例の検討を行った。

(5) 新しい感染診断法 IGRA の免疫脆弱者における評価

① 3 種類の抗原で結核未感染者と感染者間において IFN- $\gamma$  産生 T 細胞数の違いが見られた。

② 0.1ml の血液で解析可能な FACS 法のシステムを確立した。ELISPOT 法を用いる二重染色システムは、通常の色素染色では IFN- $\gamma$  産生細胞は赤色に、IL-2 産生細胞は青色に染色され、これら 2 種類のサイトカインを産生する細胞は中間色となる。この色調の変化は専用の装置で解析を行って

も精密に捉えることはかなり困難と考えられた。

(6) 結核菌の病原性・感染性の評価方法の開発

VNTR Locus を 1 カ所利用した方法では、2 つの結核菌の混合比 (相対量) ほぼ正確に測定することが可能であったが、二つの Locus を利用した実験では正確な値が得られなかった。

(7) 遺伝子タイピングの全自動化と広域実施の有用性評価

JATA(12)及び JATA(15)の PCR 産物の分子量の分布は低分子を中心に分布するローカスと高分子を中心に分布するローカスに大きく 2 つのグループに分けることができた。それぞれのグループから 1 ローカスずつ選択してマルチプレックス PCR の組合せを作った。これらの組合せは、マルチプレックス化による非特異増幅もなく、問題が無いことが確認できた。それぞれのローカスを、フルオレセインを励起状態として発する蛍光で検出し、その後ゲルを EtBr 染色して存在する DNA を検出できた。

(8) DOTS の質向上のための検討

①参加した保健所における新登録肺結核患者総数 1108 人の結果は、「治療成功」76.5%、「死亡」17.2%、「治療失敗」1.9%、「脱落中断」0.9%、「不明」3.5%であった。結核予防会第一健康相談所における外国人患者の治療成績は、本システムを用いた DOTS カンファレンス開始前には治療中断率は 14.2%であったが、開始後 5%に減少した。

②平成 21 年 5 月、全国の保健所に質問紙を郵送し 486 保健所から回答を得た。(回収率 95.3%)。その結果、地域 DOTS は 97.8% (474 保健所)で実施されており、その方法は、毎

日の服薬支援 A: 23.4%、週単位の支援 B: 60%、月単位の支援 C:92.8%で実施されていた。退院時のDOTSカンファレンスは85.4%で実施されていたが、外来治療中は31.9%、コホート検討会は33.1%で実施されていた。

③服薬看護支援ワークショップでは、結核病棟の相次ぐ廃止によって結核医療自体が存亡の危機にある。結核医療の維持と推進のため、質の高いDOTSを行う技術と連携システムの構築が急務であるとの意見が出された。

④国の結核登録者情報システムにおける「治療成績」では治療成功(50.2%)、死亡(11.8%)、失敗(0.8%)、脱落(8.4%)、転出(2.0%)、12ヶ月を超える治療(9.3%)、判定不能(17.5%)であったのに対して、『結核看護システム』では治療成功(79.8%)、死亡(12.2%)、治療失敗(2.2%)、脱落中断(0.5%)、対象外(5.3%)であった。

⑤地域DOTSを円滑に進めるため「地域DOTSの手引き」を作成した。調剤薬局や地域連携クリニカルパスの事例を紹介し、作成に当たっては、「DOTSが目的にならない」ことを十分留意するように配慮した。

#### (9) 結核患者に対するHIV検査実施および検査結果情報収集の現状

HIV/AIDSと結核に関する知識では「HIV陽性が結核発症のリスクである」に関し、全体の93.4%が「知っている」と答えたが、「HIV陽性の結核患者では、塗抹陰性患者や肺外結核患者の割合が増加する」に関しては、全体の42.2%であった。保健所におけるHIV/AIDS啓発ではHIV検査の提供以外、電話相談、保健所内の情報展示、検査普及週間の開催、学校教育・学校活動との

連携が挙げられた。結核患者へのHIV啓発・検査実施状況は「HIVの話をほとんどしない、あるいは全くしない」が69.8%であった。PITC(Provider Initiated Testing and Counseling: 提供者主導の検査とカウンセリング)の考え方が、「日本に適應できる」は34.1%、「適應できない」が14.0%で、「わからない」・回答なしが51.9%であった。

フォーカス・グループ・ディスカッションでは、「結核とエイズを結び付けて考えたことがない」との意見が出され、その理由として、「結核は高齢者の病気」「エイズは若い人の病気」というそれぞれの疾患に対するイメージが定着していた。PITCについては、「今後は必要になってくると思う」という声が大半を占めた一方で、課題として対象者の選定、カウンセリング・検査、その後のフォローのシステム作りが挙げられた。

#### (10) コホ現象報告の分析

接種部位の反応はほとんどの事例で接種後3日までに気付かれていた。コホ現象による重篤な副反応の報告は見られなかった。報告数は都道府県によって大きな差があった。判定結果は非特異的反応: 578(71.0%)、経過観察: 34(4.2%)、コホ現象: 104(12.8%) (うち、発病3例)、他院紹介: 54(6.6%)、不明: 44(5.4%)であった。非特異的反応は経年的に減少した。

#### D. 考察

##### (1) 薬剤耐性全国調査

臨床データを含めた解析が未だ出来ないが、薬剤耐性は減少傾向を示しているようであり、全剤耐性患者からの他者の感染対策が改善されている可能性が考えられるが、慢性のMDR症例が今回の研究ではプロトコールから除かれていることも関連

している可能性がある。臨床情報を加えて、未治療・既治療別の解析が必要である。

#### (2)新化学療法剤を含めた治療方式の開発・評価

リファブチンはリファンピシン耐性の29.4%に有効で、副作用は白血球減少症があったが、有用性が期待された。リネゾリドは同じく66.7%に有効で末梢神経症障害はあるが有用性が期待された。

結核病棟勤務時においてN95マスク着用と適切な換気条件下にて勤務を行えば結核感染が防げる可能性が示唆された。

#### (3)結核菌検出・薬剤感受性検査の迅速遺伝子診断法の開発・評価

PCRによる増幅とラインプローブ法を組み合わせた、より安価でより迅速な耐性遺伝子診断法を昨年のピラジナミド耐性検出用ラインプローブと抗酸菌種同定および多剤耐性菌検出用ラインプローブに引き続きフルオロキノロン耐性菌検出用ラインプローブ及びイソニアジド耐性菌検出用ラインプローブを開発した。イソニアジド酸化活性とイソニアジド耐性度に相関がみられたことは、変異情報から耐性度を直接判別できる可能性を示唆するものであり、イソニアジド耐性結核、特に多剤耐性結核の治療において重要な情報となりうる。

#### (4)小児医療の全数調査及びBCGの副反応調査

①T-SPOT TBはQFT-2Gよりも発病例でよりの確に、また、乳幼児潜在性結核感染例で鋭敏に診断できる可能性を期待させた。しかしながら、潜在性結核感染例診断のgold standardが存在しないため、T-SPOT TBのみの陽性例が「感染例」が偽陽性例であるの判断は難しい。

②2005年以降に発症が確認されたBCG骨炎症例25例は推定されていた発症頻度(接種10万例対0.1~0.2例?)に比してかなり高い頻度(接種10万例対0.6~0.8例)であり、BCG骨炎例が増加傾向にあると思われる。

③小児結核に関する現状分析より以下のような対策が必要と思われた。

- ・ 新生児、乳幼児、或いは免疫能が低下した小児が集団生活を送る施設における施設内感染対策の徹底
- ・ 高いBCGワクチン接種率の維持
- ・ 小児結核の感染・発症診断の質的保証
- ・ ハイリスク・グループに対する選択的検診導入

④症例検討会における検討で、発病要因として、感染源となる成人の受診の遅れ、家族内での複数発病事例、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・発病や、疾病全体に対しての理解が十分でない家庭での小児の発病が見られた。医療機関における診断能力の問題となっており、診断の遅れを出来る限りなくするため、医療者向けの啓発も重要と考えられた。

#### (5)新しい感染診断法IGRAの免疫脆弱者における評価

3種類の休眠期特異的結核菌抗原に対して、結核未感染者と感染者間において数値の違いが見られたことから、休眠期結核菌感染を検出できる可能性が示唆された。今後、FACS法を用いた解析によって結核患者、結核治療終了者、あるいは結核の所見を持つ高齢者等においてESAT-6およびCFP-10に反応性のT細胞の解析を行う。

ELISPOT法を用いる二重染色システムに

については、今後より解析の容易な蛍光色素を用いた系を検討する

#### (6) 結核菌の病原性・感染性の評価方法の開発

二つの Locus を利用した実験では正確な値が得られなかった。この原因は実験に使用した検体の対象 VNTR Locus の配列の損傷が原因と考えられたが、H37Rv による条件設定中にも結果が不安定となる傾向が認められ、VNTR Locus の反復配列コピー数の違いを利用して相対定量することは可能と考えられたが、反復配列コピー数の多い Locus を使用すると結果が不安定になる可能性が示唆された。

複数の結核菌の混合物を平板培地上でコロニーとしてクローニングすることなく、液相のまま相対的に定量する方法を考案し、可能性を実証した。この方法によって2種の結核菌の相対的な感染力や増殖力を迅速に測定することが可能と考えられた。

#### (7) 遺伝子タイピングの全自動化と広域実施の有用性評価

本分析法により、JATA(12)は6チューブ、JATA(15)の場合8チューブでPCRが可能となり、反応液調製段階での省力化が可能となった。標識プライマーさえ準備すれば、特に新たな分析機械等は必要なく、研究室が保有する電気泳動装置やゲル撮影装置があればすぐに利用可能である。そのため、非常に導入しやすい分析システムと考えられる。

#### (8) 地域 DOTS の質向上のための検討

治療成績の解析及び服薬支援看護ワークショップの結果から、質の高い地域 DOTS を実践するために、①DOTS のゴールを見据えた医療機関との連携、②個々の患者の

服薬支援計画の作成、③DOTS タイプに捉われない支援方法の選択と患者の生活に応じた具体的な支援、④ガイドラインの整備、が必要と考えられた。

#### (9) 結核患者に対する HIV 検査実施および検査結果情報収集の現状

結核患者への HIV 検査への対応にばらつきが見られ、結核患者への HIV の啓発・検査が進んでいない実情があることが推察された。背景として「結核は高齢者、エイズは若者の病気」という認識があるために、医療現場のスタッフ・患者・社会全体が結核と HIV を結びつけて考えることが難しい、というような点であった。検査対象者の選定、カウンセリング・検査からフォローアップまでのシステムづくりとともに、医療従事者の結核と HIV の重複感染に対する知識・意識レベルを高める必要があると思われた。

#### (10) コッホ現象報告の分析

都道府県による報告数の違いは接種時の保護者への説明、相談後の対応など人為的な要因が関与しているものと考えられた。非特異的反応は経年的に減少したのは局所反応の経過等によって非特異的反応と判断できることが普及したためと考えられる。

「真のコッホ現象」の報告は推定年間感染危険率に比して少なかった。これは、感染危険があった児は通常の BCG 接種を受けないこと、報告例の 12% の最終的結果が不明なこと、局所反応が見逃された可能性、局所反応判明後に適切な感染診断がなされなかった可能性、生後 4 ヶ月程度までの実際の感染危険は推定年間感染率より低い可能性などが考えられた。

## E. 結論

本研究班の目的は現行の対策・技術評価と新しい技術の開発・評価に大別できる。

現行の対策・技術の評価は、薬剤耐性全国調査で薬剤耐性は減少傾向にあると推定された。地域 DOTS の質向上のために、保健所と医療機関との連携、患者の服薬支援計画の作成、患者の生活に応じた支援、ガイドラインの整備が必要事項として挙げられた。IGRA の小児における評価では T-Spot の有意性が示唆された。BCG 骨炎は増加の可能性が示された。小児医療では集団生活を送る施設における感染対策の徹底、BCG ワクチン接種率の維持、小児結核の感染・発症診断の質的保証、ハイリスク・グループに対する選択的検診導入が必要と考えられた。HIV 合併結核調査で結核患者への HIV の啓発・検査が進んでいないことが推察された。コッホ現象報告の集計報告数には人為的な要因が関係している可能性が示唆された。

新しい技術の開発として、新化学療法剤を含めた治療方式の開発・評価ではリファブチン及びリネゾリドの有効例、リファンピシン、リファブチン耐性結核菌の *rpoB* 内の変異を特定された。薬剤感受性検査の迅速遺伝子診断法の開発は、フルオロキノロン耐性菌検出用ラインプローブ及びイソニアジド耐性菌検出用ラインプローブを開発した。結核菌の病原性・感染性の評価は基礎となる複数の結核菌の混合物を平板培地上で液相のまま相対的に定量する方法を考案し、可能性を実証した。遺伝子タイピングの全自動化ではマルチプレックス PCR でローカスの組合せを作り、別々に検出することによって、省力化が可能なシステムを

構築した。

以上のように、研究目的に対して1年目として着実に成果をあげることができた。

## F. 健康危険情報

特記なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 加藤誠也、徳永修、吉山崇、日本のコッホ現象報告の分析、結核2010（投稿中）

### 2. 学会発表

1) 加藤誠也 コッホ現象事例報告の集計結果について 第85回日本結核病学会総会 平成22年5月 京都

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし



## II 研究分担報告書

薬剤耐性の実態調査

研究分担者

山岸文雄 独立行政法人国立病院機構千葉東病院院長

研究要旨

薬剤耐性結核菌の頻度を調べることは、結核対策の有効性を判断し必要な修正を加える上で重要である。結核療法研究協議会（療研）では1957年から2～5年おきに薬剤耐性結核菌の全国調査を行っており、前回2002年に引き続いて2007年8月1日から第14回となる耐性結核菌サーベイを開始した。

2007年8月～2008年7月までの一年間に、全国63の結核診療施設から3,703株の抗酸菌を収集し、現在までにその73.5%にあたる2,722株の結核菌について薬剤感受性検査を実施した。およそ20%強は非結核性抗酸菌であるため、結核菌のほぼ全数について薬剤感受性検査を終了している。結果としてINH、RFP、SM及びEBに対する未治療と既治療を区別しないCombined any resistanceはそれぞれ4.1%、1.4%、6.5%及び1.1%であり、MDRについては0.9%となった。これらの耐性率はあくまで2010年2月末時点での暫定データであるが、2002年に比較して低下傾向にあると思われた。

今回の調査研究で最も重要な問題点は、感染症法の規定によって多剤耐性結核菌が事実上国内での輸送が不可能になっていることであり、検体が確実に無作為に収集されているか否かが不明確である。多剤耐性結核菌輸送の問題の影響を評価するためにも、早急に臨床情報との相互関係を解析する必要がある。

A. 研究目的

全世界では年間およそ900万人が新たに結核に罹患し、170万人が死亡している。世界保健機関および国際結核肺疾患予防連合（IUATLD）は世界規模の結核薬剤感受性調査を行い、幾つかの国での急速な薬剤耐性結核の増加が報告されている。また、最近ではExtensively Drug Resistant Tuberculosis (XDR-TB: 超多剤耐性結核)も報告され、抗結核薬の薬剤耐性の問題は世界的に拡大している。

日本では結核療法研究協議会が1957年から2002年までに2～5年ごとに過去13回入院時薬剤耐性菌に関する研究を行い、各年度の耐性菌の頻度と30年にわたる日本での薬剤耐性の頻度の推移を報告している。国立、公立、私立を問わず全国で90以上の施設が参加しており、日本の代表

的な薬剤感受性成績として認識されている。

前回の2002年の調査から5年が経過しており、この間結核予防法の一部改正とそれに続く新感染症法への統合があり、結核の取り扱いが大きく変化してきた。直接監視下短期化学療法(DOTS)の取り組みも前回と比べ広がってきている。前回の調査では既治療・未治療ともに耐性頻度が減少したことが示されており、現在に至って減少の傾向が維持されているかどうか、興味のあるところである。液体培地を用いた感受性検査法や、検査の精度保証に関する意識も拡大しており、検査室の精度管理的意味合いも引き続き重要である。

今回、前回からの薬剤耐性状況の変化を確認し、併せて分子疫学的調査を行うことを含めて、結核菌の薬剤感受性の現状を調査する。

## B. 研究方法

### 総括的研究目的：

日本における結核菌の薬剤感受性について総合的な情報を全国レベルで収集し、結核対策の一助とする。

### 個々の研究目的：

1. 研究期間内に分離されたすべての結核菌について Isoniazid (INH)、Rifampicin (RFP)、Ethambutol (EB)、Streptomycin (SM)の薬剤感受性を明らかにする。また、多剤耐性菌など必要な場合には、二次抗結核薬 (ETH、KM、PAS、CS)、Levofloxacin (LVFX)、Pyrazinamide (PZA)の薬剤感受性検査を実施する。
2. 既治療、未治療患者における耐性菌の頻度を評価する。
3. 疫学的情報 (年齢、性別、地域、合併症) と薬剤耐性との関連を解析する。
4. 多様化している同定法や培養法、感受性検査法に鑑み、参加施設でのそれらの方法の精度評価を行う。
5. 多剤耐性結核菌について RFLP/VNTR 等の分子疫学的検査を行う。
6. 全ての抗酸菌を収集することにより、現状での非結核性抗酸菌の分離状況を明らかにする。

### 研究参加施設・参加者：

全国の結核病床を有する施設のうち、参加の要請を諾とした施設

### 対象患者：

- 1) 全ての抗酸菌培養陽性症例
- 2) 臨床試験の実施に先立ち本人 (または代諾者) から文書による同意が得られた患者\*
- 3) 性別：不問

### \*個人情報保護のためのオプション

基本的に臨床情報は必要であるが、個人を特定する必要はない。従って、検体と臨床情報が一致していれば良く、個々の検体と個人に「背番号 (ID)」を施設毎にあたえ、患者個々の病院 ID との変換アルゴリズムについてはそれぞれの施設で考えて頂く。また、生年月日は年齢に置き換え、地域については管轄保健所名とする。このように

匿名化すれば資料として個人を特定できなくなり、検体の採取も非侵襲性であることから、同意書は基本的に必要ないと考えられる。

同意書については基本的に各参加施設の内部規則に沿うこととする (同意書例を資料に添付)。

### 研究期間：

研究期間は暫定的に 2007 年 8 月 1 日から 2008 年 1 月 30 日までとする。結核菌検体の代表性を確保するため、地域ごとの目標検体数をあらかじめ算出し、結核菌が必要数に達するまで収集を継続する。

表 1 2005 年の菌陽性患者数に基づく必要予測数

地域	罹患数	比率	予定数	収集予定数 (10%増)
北海道 ・東北	856	0.08	214	235
関東 中部・ 北陸	3,937	0.35	984	1,082
近畿	1,666	0.15	416	458
中国・ 四国	2,745	0.24	686	754
九州	901	0.08	225	248
計	11,318	1	2,828	3,110

### 収集の対象とする菌：

- 研究期間中に新たに診断された結核患者 (初回・再発) から分離された結核菌
- 研究期間中に新たに診断された非結核性抗酸菌抗酸菌症 (初回・再発) から分離された非結核性抗酸菌

### 収集除外対象菌：

- 結核、非結核性抗酸菌症ともに、慢性排菌例から分離された抗酸菌は対象外とする。

### 収集方法：

上記菌株については、三種・四種病原体等の輸送基準に鑑みて、薬剤感受性検査結果が判明する以前にコーディネート施設である結核予防会結核研究所細菌検査科へ送付する。薬剤感受性検査

結果が判った後であっても、多剤耐性菌でなければ、国連容器を用いて三重包装することにより、UN2814 として「ゆうパック」にて輸送することができる。国連容器（例：PATHOPAK シリーズ）については、基本的に結核研究所より供与する。

多剤耐性結核菌が同定された場合、分離施設にて保管し、結核研究所で最終的に適当な時期に多剤耐性菌の輸送計画を立て、一括して収集する。もしも多剤耐性菌を保管しない施設から同菌が分離された場合、基本的に譲渡して頂くこととし、個別に対応する。

提供患者の匿名化について：

別途文章で同意が得られた患者について、院内で匿名化し院内 ID を作成し、その院内 ID を菌株にラベルで添付し、研究責任者以外の共同研究者（各施設での担当者）が院内にて保存する。

検体付随臨床情報：

結核菌と判明した株については、薬剤感受性検査が終了した時点で ID が結核研究所から戻され、その後、別紙に添付した調査票に各項目を記入し、結核研究所に再送付する。なお、多剤耐性結核菌については RFLP あるいは VNTR による結核菌遺伝子タイピングを実施する。非結核性抗酸菌については ID と菌同定結果が戻される。

薬剤感受性検査：

サーベイランスのため、INH、RFP、SM 及び EB について、1%小川培地を用いた標準比率法にて薬剤感受性検査を実施する。なお、検査は結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科にて実施する。

多剤耐性菌などで必要が生じた場合、二次抗結核薬と LVFX についても、1%小川培地を用いた標準比率法を実施する。PZA の感受性検査が必要な場合、基本的に MGIT AST を用いる。また、判定が困難な場合など、遺伝子による感受性検査も必要に応じて実施する。

菌種同定：

非結核性抗酸菌については菌種同定検査を実施する。

分子疫学的検査：

多剤耐性結核菌については RFLP あるいは VNTR による遺伝子タイピングを実施する。

期待される結果：

- 1) 本邦の結核菌薬剤感受性率の経時的変化が判明する。
- 2) 本邦の多剤耐性結核菌頻度およびその関連が判明する。
- 3) 本邦の非結核性抗酸菌の頻度が判明する。
- 4) 自施設の抗酸菌検査精度が判明する。
- 5) 世界的な結核疫学成績との比較が可能となる。

倫理面への配慮：

基本的に臨床情報は必要であるが、個人を特定する必要はないため、結核研究所には臨床情報と検体のみを送り、患者個人を特定する変換規則は各施設で保管する。検体の採取も非侵襲性である。研究への参加を拒否する患者についてはこれを強要することはない。また、参加を拒否することによる何らの診療上の不利益を被ることもない。臨床情報調査票から得られる臨床的情報および各検体から得られる薬剤感受性検査の情報は、結核療法研究協議会委員および結核研究所内の担当者（データ管理責任者：御手洗聡）のみがこれを知りうるものとし、情報・検体については結核研究所内で当該目的以外に使用しないものとする。

研究母体：

結核療法研究協議会（山岸文雄委員長）

郵便番号 204-8533

東京都清瀬市松山 3-1-24

結核予防会結核研究所内

本研究に関する事務取扱

吉山 崇 結核予防会複十字病院診療部付部長

御手洗聡 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌検査科長

C. 結果

最終的に全国から収集された 3,703 検体について解析を実施した。資料 1 に参加施設の一覧を示した。また資料 2 に地域別の収集検体数を示した。