

らに悪化し、受診に至ったのは最初に X-P で異常を指摘されてから2年2ヶ月後であった(診断時:病型bⅡ2、塗抹3+)。

〈健診結果〉

直後の接触者健診で本児(2歳:bⅢ2、rH)と児の両親(父:rⅢ1、塗抹± 母:bⅢ2、塗抹G3号)の発病を確認。児の祖母、叔母がLTBIと判断されるも、叔母はLTBI治療を拒否。

〈問題点と学び〉

① 接触者健診について

患者だけでなく家族等からの情報収集の徹底が必要。

② 患者との関わりについて

乳幼児等の若年発病者が出ると家族全体の動揺が強くなる。家族関係に配慮し、患者と家族の視点に立った関わりが必要。

③ 地域における服薬支援

家族のニーズに合わせたDOTS実施時の配慮が必要。

④ 医療との連携について

かかりつけ医との情報共有や、治療経過・接触者健診の結果等を家族に伝えるなどして、不安の軽減を図ることが必要。

⑤ 結核に関する普及啓発

職場健診後の要フォロー結果が出た場合のフォローの必要性の周知。「自分のために大事な人のために健診を受ける」といったメッセージの普及が大切である。

症例 3 障害児療育通所施設で発生した集団結核感染事例

〈感染源〉

施設通園児の母(Ⅲ1、塗抹G5号)

〈経過〉

咽頭痛・咳症状が2ヶ月ほど続き、悪化し

たため耳鼻科を受診し、投薬を受ける。その後も、症状は持続し側腹部痛も生じたため別の医療機関を受診したところ肺結核(Ⅲ1、塗抹G5号)が判明する。

〈健診結果〉

直後の家族健診で第1子(6歳:肺門リンパ節結核)の発病を確認。父と第2子はLTBIと判断される。

施設での接触者健診は通園児、その保護者、職員を対象に実施された。ツベルクリン反応検査、QFT検査、X-P検査等にて対象者100余名のうち、1年経過の時点で結核発病3名、LTBI7名を確認している。引き続き計2年間の健診を実施中。

〈課題〉

療育施設へ入所・通所している児にはBCG未接種児も多く、ひとたび患者発生が確認されると、関係者の動揺が大きい。保護者への説明会をしっかりと開催し、初発患者への配慮も十分考慮したうえで、健診を進めなければならない。

乳幼児が対象の大部分の場合、ツ反を優先しての健診が行われることが多いが、QFT検査等も補助的検査として使用することが有意義であろう。

日ごろ、結核患者の発生とは縁遠い施設で患者発生があると、不安も大きいのが、啓発のいい機会としてとらえることも重要である。

症例 4 学校健診により発見された小学生事例

〈家族構成〉

本児の母方祖母、実母、義理の母がフィリピン人で、3歳から9歳まで母方祖母と実母との3人でフィリピンに居住していた。このフィリピン居住中に、母方祖母が肺結核で自

宅療養をしていた（詳細不明）。

その後、実父と義理の母、義理の妹との4人で日本に居住することとなった。まん延国からの帰国であり、学校健診で胸部 X-P を撮影し、肺門リンパ節腫脹を指摘される。医療機関を紹介され、胸部 X-P、CT 検査を実施し、また胃液検査にて塗抹（-）PCR（-）であったが QFT 検査も陽性であり、肺門リンパ節結核と診断される。

〈接触者健診〉

日本での同居家族に対し接触者健診を実施したが異常のある者は認めなかった。

〈治療経過〉

HRZ の 3 剤治療にて、副作用もなく治療は終了。保健所での管理健診中である。

〈学校健診〉

この事例が居住する自治体では小中学生全学年を対象に問診が行われている。問診項目は以下のとおり。

- ①本人または家族等の結核罹患歴、本人の予防投薬歴の有無
- ②高まん延国での居住歴（過去 3 年以内に、計 6 ヶ月以上）の有無
- ③自覚症状（2 週間以上の長引く咳や痰）の有無
- ④BCG 接種歴（小学校 1 年生にのみ）の有無

この後、学校医による内科健診や結核対策委員会による検討がなされる。その結果、必要と判断された児童・生徒には胸部 X-P が実施される。平成 20 年度にはこの自治体の小中学生 35000 人に対して上記の問診・健診が実施され、医療機関への紹介が必要とされた本児が結核発病と判断された。

全国的にも学校健診は毎年 9 学年の児童・生徒に対して実施されておりその対象者

数は約 1000 万人である。そのうち、発見患者は 1 年に 3 人～5 人程度である。2003 年に新しい学校健診の方法が開始されてからこれまでに 6 年間で 19 人が発見されているが、このうち高まん延国居住歴ありの児童・生徒が 8 名ともっとも多い。

学校健診全体の発見率から見ると、一律に健診を行う現在の方法は議論がなされるところである。しかしながら、高まん延国からの帰国者や居住歴のあった者についての発見率は無視できるものではなく、対象を絞った健診等の改定が望まれるところであろう。

症例 5 肺腫瘍が疑われ、肺葉切除後、病理検査により診断に至った乳児の肺結核事例

〈経過〉

生後 1 ヶ月半頃より咳嗽が出現。その後 38.0 度の発熱出現し、A 病院を受診し、肺炎と診断され入院となる。約 3 週後、完治ではないが軽快退院となる。その後、外来でフォローのための胸部 CT 検査を実施し、肺腫瘍が認められ、B 病院を紹介受診。MRI 検査で悪性腫瘍が疑われた。1 週後、手術加療目的で C 病院を紹介受診となる。入院同日、切除術施行。約 2 週後、病理組織検査で、結核腫と判明。さらにその後、D 病院に治療目的で紹介され、入院となる。

〈検査結果〉

胃液検査にて塗抹（-）、PCR（-）、ツ反陽性（BCG 未接種）

〈治療〉

HRZS の 4 剤にて治療開始。

〈家族健診〉

感染源対策のため家族健診を実施したが、両親はじめ、祖父母、曾祖母、おじ、おば等親族にも発病者は発見されず。

〈産科病棟の健診〉

本児が出生した産科病棟等の健診も実施したが、発病者は発見されず。

〈課題〉

診断の難しさ

生後1ヶ月半ころより、持続する咳症状や高熱のため医療機関を受診し、入院等にて精査するも肺炎と診断されており、その後、CT検査・MRI検査等も実施されたが、いずれの画像検査にても結核性の病変とは診断されなかった。乳児において結核が非常にまれであり、鑑別診断にもあがらなかったのではないかと思われる。

腫瘍病変については、悪性腫瘍が疑われた。術中の病理検査がなぜなされなかったのかは、議論にのぼった点である。結核の病変であると診断されたのは、切除術の後、約2週間経過してからであった。こういった非常にまれな事例があることを臨床の小児科医に伝えなければならない。

D. 考察

今回で第7回目となった小児結核症例検討会であるが、感染源となる成人の受診の遅れが多く見られる。また、家族内での複数発病事例もある。これまでも、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、疾病全体に対する理解が十分でない家庭での小児の発病が見られることが多い。小さな子どもたちに感染・発病させてしまった後に、後悔する家族は多い。

しかし、そういった声を一般住民に広く啓発しないと今後も成人からの小児感染例はなくなるであろう。

また、医療機関における診断能力の向上に

についても毎回、多くの意見が交わされる。画像診断はもとより、QFT検査などの補助的検査を有効に利用し、小児において受診から診断までの遅れをできるだけなくすように、医療者向けの啓発も重要と考える。

学校健診についても意見交換がなされた。全国的にも発見例は非常に少ない。しかし、まん延国からの帰国者等を中心に学校健診で毎年発見されているのも事実である。対象を適切に絞った上での健診は継続の必要があるのではないだろうか。

E. 結論

第7回目となる近畿小児結核症例検討会を開催した。今回も今まで同様、医療機関と保健所が一堂に会しての症例検討会のスタイルで実施した。参加者は年々増加傾向にあり、小児結核への関心の高さが伺えた。

今後、さらに他の大都市部でも、同様の検討会が実施される方向である。小児結核の発生が0になることを目標に、行政・医療機関が一体となってさらに連携が強くなることを願う。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

永井仁美:小児結核の現状と対策～小児結核症例検討会からみえてくるもの～「保健師・看護師の結核展望」,Vol.47 No.93, p73-80, 2009年前期号

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(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」
「小児結核対策・医療の評価」

研究分担者

徳永 修 国立病院機構南京都病院 小児科医長

QuantiFERON TB-2G 高値陽性を契機に発病治療を行った
接触者健診の1幼児例についての検討

研究協力者 吉河 道人 (国立病院機構道北病院 小児科)

研究要旨

結核菌感染診断用 IFN-gamma release assay(IGRA)の1つである QuantiFERON TB-2G(QFT)については、小児において当研究班の分担研究での検討結果に基づき使用指針の試案が報告され(“小児結核感染診断における QFT-2G 使用指針”試案; 以下、同試案)、感染・発病リスクの高い接触者健診例で QFT 陽性が明らかになった場合に発病の可能性も念頭に慎重な画像評価を行うことの重要性が指摘されている。今回、高リスクと考えられた接触者健診の幼児例について QFT 高値陽性を契機として発病治療を行い、その経過について検討した。症例は2歳女児。年齢、初発患者(母方祖母: G9号相当)との頻回の接触歴、ツ反強陽性から結核感染が強く疑われたが、画像所見は胸部 CT 上の微小な結節影のみであったため当初は発病と判定できず LTBI の治療を開始した。しかし、その後 QFT 高値陽性が判明したため CT 所見は初期病巣の可能性が高いと考え、早期に発病治療に変更し著変なく終了した。治療変更時の菌検査は陰性であったが、治療後に画像上の結節影はほぼ消退し、また治療と並行して行った QFT 再検査でも開始2ヶ月後以降 IFN- γ 放出量は著明な低下を示し、治療への良好な反応が示唆された。本例は QFT が少なくとも陽性となった場合、乳幼児接触者健診例でも早期発病診断に有用となり得ることを示しており、さらに菌の検出率が低い小児結核症例において発症診断の精度向上に寄与し得ることを示唆していると考えられた。

研究協力者

吉河 道人 (国立病院機構道北病院
小児科)

宮川 知士 (東京都立清瀬小児病院
呼吸器科)

原田 登之 (結核研究所 抗酸菌レフ
ァランス部)

つである QFT について当研究班の分担研究での検討結果に基づき使用指針の試案が報告された。今回、接触者健診の1幼児例について同試案に従い QFT 高値陽性を契機として早期に発病治療を行い、その経過について検討した。

B 研究方法 (症例提示)

症例は2歳女児。(既往歴)生後4ヶ月時に BCG 接種を受けている以外特になし。(家族歴)2009年3月、母方祖母が肺結核(G9号相

A.研究目的

IGRA については、近年小児においても検討が進められており、わが国でも IGRA の1

当)と診断。発病時期は数ヶ月前と推定された。(接触歴・現病歴)児は出生後から1-4週間に1回祖母宅に1泊滞在を続けていたため、同年4月に保健所から接触者健診目的に当科を紹介受診した。(現症)受診時体温36.6℃。左上腕に15-18個のBCG接種針痕あり。全身状態は良好で、呼吸音清明、表在リンパ節も触知せず、他に異常所見も認めなかった。(検査成績:表1)ツ反は硬結20×10mm/発赤30×30mmと強陽性。血液生化学検査では異常を認めず。画像上、胸部単純写真では異常を認めなかったが(図1)、胸部CTで左上葉胸膜直下に微小な結節影を認めた(図2)。結核患者との頻回の接触歴とツ反強陽性から結核感染が強く疑われたが、画像所見からは明らかな発病と判定できず、潜在性結核感染(LTBI)としてイソニアジド(INH)1剤のみ開始した。しかしその後、健診時のQFTが高値の陽性(ESAT6-Nil:10.5IU/ml CFP10-Nil:0.37IU/ml Mitogen-Nil:16.02IU/ml)と判明したため、小児結核の中核的診療施設の医師とも協議した結果、年齢、接触歴、ツ反強陽性などと併せ胸部CTの所見は結核の初期病巣の可能性が高いと考え、PCR1回を含む3日間の胃液塗抹・培養による結核菌検査施行後にINH、リファンピシン(RFP)、ピラジナミド(PZA)3剤による化学療法に変更した。結核菌検査はすべて陰性であったため、その後外来で6ヶ月間の治療を行った。

C.研究結果(経過)

治療は著変なく終了した。治療終了時の胸部CTでは、開始時に認めた微小な結節影はやや縮小し(図3)、終了3ヶ月後にはほぼ消退した(図4)。また化学療法開始後2-3

ヶ月毎に行ったQFT検査では治療前に高値を示していたIFN- γ 放出量は、陽性値が持続しているものの治療開始2ヶ月後から著明な低下を示している(図5)。

D.考察

活動性結核診断のgold standardは一般には結核菌の分離・検出であるが、小児結核症例では菌が証明される率は低く、その多くが接触歴、BCG接種歴、ツ反結果、画像所見を組み合わせる総合的に診断されている

(Kampmann B, et al Eur Respir J

2009;33:1374-1382)。しかしBCG接種勧奨を行っているわが国ではツ反の陽性的中率は低く、画像所見も特異性に乏しい場合も多いため、診断に迷う場合が少なくない。このような状況の下、IGRAの一つであるQFTは当研究班の分担研究において、①乳幼児例を含む小児活動性結核症例では成人例を対象とした検討と同等の感度を有することが示され、②感染リスクの高い接触者健診例(=家族内塗抹陽性患者存在例)を対象としたLTBI診断におけるQFTの感度評価では、乳幼児での感度不良が強く示唆された一方で、QFT陽性が判明した例ではその後の画像的検索によって発症が確認される割合が高かったことから発症の可能性を強く示唆する重要なサインと評価され、これら①、②がその後報告された同試案の骨子に盛り込まれている。

本例は結核菌検査が陰性であるため(gold standardを満たすという意味での)“真の発症例”とはいえ、画像所見も胸部CT上の微小な結節影のみで乳幼児の初期変化群の重要な所見とされる縦隔・肺門リンパ節腫大(Leung AN, et al Radiology 1992;182:87-91)

も明らかではない。しかし年齢、接触歴、ツ反強陽性から結核感染が強く疑われたことに加え、QFT が高値陽性と判明したことから発病の可能性が高いと考え、早期に発病治療に変更した。治療は著変なく終了し、治療後に画像上の結節影はほぼ消退、治療と並行して2-3ヶ月毎に行ったQFT再検査でも治療開始2ヶ月後以降IFN- γ 放出量は著明な低下を示しており、治療への良好な反応が示唆された。本例はQFT陽性が乳幼児接触者健診例でも早期発病診断に有用となり得ることを示しており、QFTが少なくとも陽性となった場合、菌の検出率が低い小児結核症例において発病診断の精度向上に寄与し得ることを示唆していると考えられた。

E. 結論

同試案では感染・発病リスクの高い接触者健診例でQFT陽性が明らかになった場合には発病の可能性も念頭に慎重な画像評価を行うことが必要であると指摘している。年齢、接触歴、ツ反強陽性から結核感染が強く疑われたが画像所見からは発病と判定できず、一旦はLTBIの治療を開始した接触者健診幼児例について、QFT高値陽性が判明したためCT所見は初期病巣の可能性が高いと考え、早期に発病治療に変更し著変なく終了した。治療変更時の菌検査は陰性であったが、治療後に画像上の結節影はほぼ消退し、また治療と並行して行ったQFT再検査でも開始2ヶ月後以降IFN- γ 放出量は著明な低下を示し、治療への良好な反応が示唆された。今回の症例はQFTが少なくとも陽性となった場合、乳幼児接触者健診例

でも早期発病診断に有用となり得ることを示しており、さらに菌の検出率が低い小児結核症例において発症診断の精度向上に寄与し得ることを示唆している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

吉河道人（会員外共同研究者；宮川知士、原田登之）：QuantiFERON TB-2Gが早期の発病診断に有用であった接触者健診の1幼児例。第41回日本小児感染症学会学術集会2009.11 福井

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

なし

表1 検査成績(健診時)

WBC	10700	/mm ³	TP	6.9	g/dl
Neu	32.2	%	ALB	4.5	g/dl
Eo	2.2	%	T. Bil	0.57	mg/dl
Lym	59.1	%	AST	33	IU/l
Mo	6.1	%	ALT	14	IU/l
RBC	4.96×10^6	/mm ³	LDH	236	IU/l
Hb	13.0	g/dl	γ -GTP	12	IU/l
Hct	39.3	%	BUN	7.6	mg/dl
Plt	25.0×10^4	/mm ³	CRE	0.15	mg/dl
CRP	0.02	mg/dl	UA	3.7	mg/dl
ESR	8mm/23mm	(1hr/2hr)	Na	140	mEq/l
			K	4.2	mEq/l
			Cl	105	mEq/l

ツ反 硬結20×10mm/発赤30×30mm

QFTは提出中

図1 CXR (健診時)

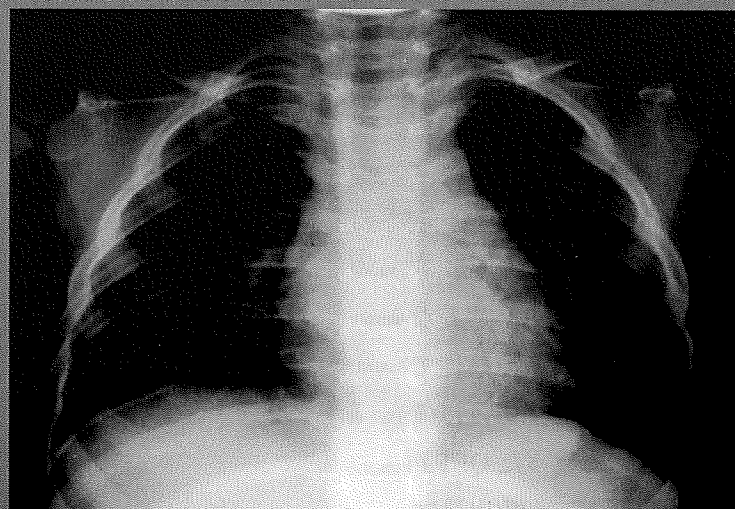


図2 胸部 CT (健診時)

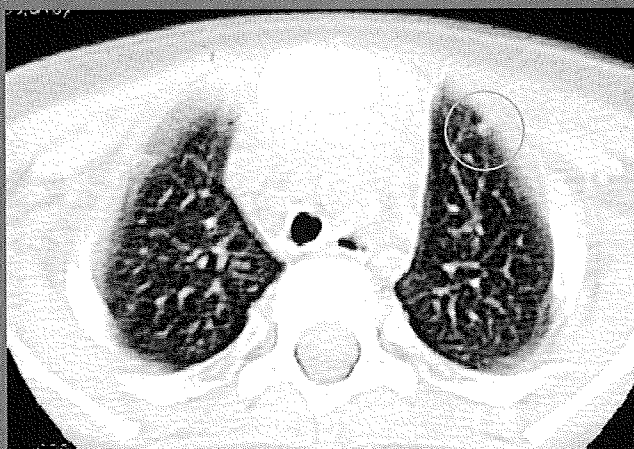


図3 胸部 CT (治療終了時)

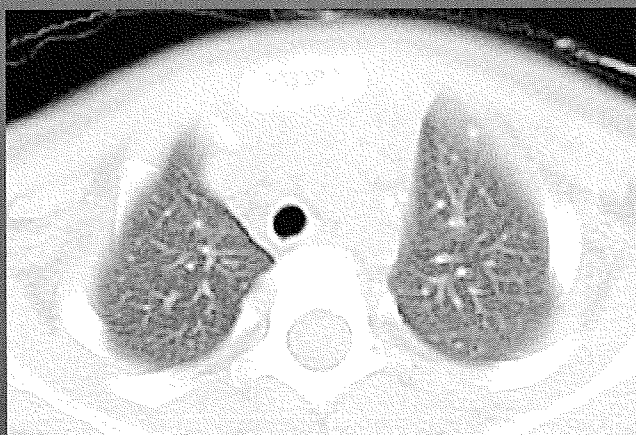


図4 胸部 CT (終了3ヶ月後)

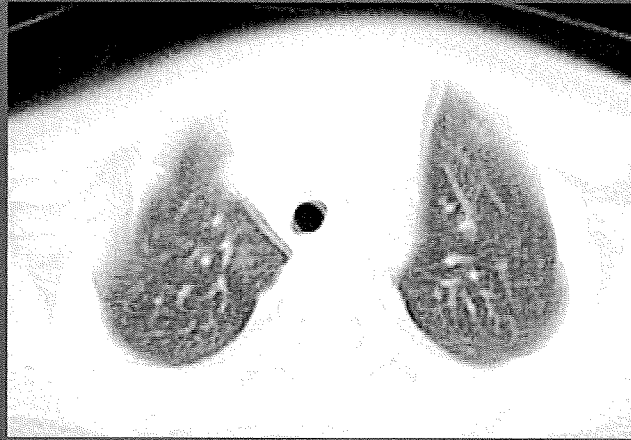
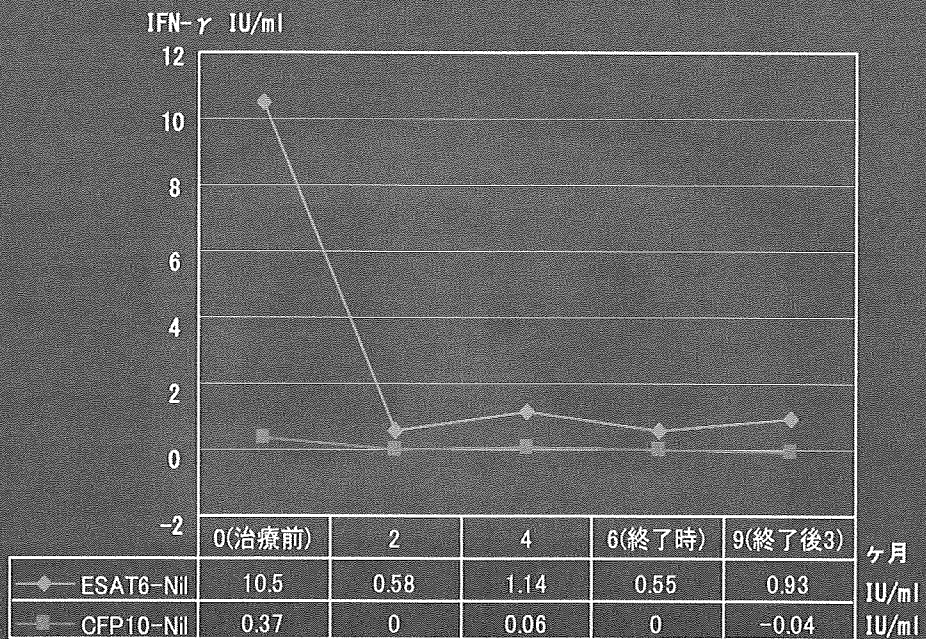


図5 治療に伴うQFT反応性の推移



厚生労働科学研究費補助金（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」

免疫脆弱集団（高齢者・小児・HIV等）における感染診断の評価

研究分担者

原田 登之 結核予防会結核研究所 抗酸菌レファレンス部長

研究要旨

日本における結核患者の約半数が高齢者であるため、高齢者における結核感染の実態を知ることは、効果的な結核対策を行う上で必須である。高齢者の推定既感染率と、新規免疫学的結核感染診断法 IGRA（Interferon-Gamma Release Assays）の一つであるクオンティフェロン[®]TB-2G（QFT-2G）の陽性率には大きな乖離が認められる。この乖離の原因を解明するべく、今年度は休眠期結核菌に特異的な抗原に対する免疫応答を検出するアッセイ系、および結核菌が体内より消滅した際に残ると予想されるメモリーT細胞を検出する方法の確立に努めた。

研究協力者

樋口 一恵（結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部免疫検査科科长代理）

態を明らかにし、ひいては効果的な高齢者結核の対策を作成する上で非常に重要である。

現在結核感染診断に用いられている

A. 研究目的

BCG接種や大多数の非結核性抗酸菌感染による影響を受けない免疫学的結核感染診断法 IGRA の診断特性については、十分明らかにされていない部分も多数残されている。その一課題である免疫脆弱集団における診断特性、特に高齢者での診断特性を検討することは、現在日本の結核患者の半数が高齢者であることからきわめて重要であると考えられる。これまでの我々の研究結果から、日本の高齢者集団において IGRA の一つであるクオンティフェロン[®]TB-2G（QFT-2G）の陽性率と推定既感染率には大きな乖離が見られている。この乖離の原因を解明することは、高齢者における結核感染の実

IGRA において、インターフェロン- γ （IFN- γ ）を産生する T細胞はエフェクターT細胞であり、IGRA 検査結果が陽性の意味は IGRA に使用されている抗原 ESAT-6 および CFP-10 を産生している結核菌が体内に存在することを示唆していると考えられている。一方、結核菌はマクロファージ内部で長期にわたり生存可能であり、このような条件では ESAT-6 や CFP-10 等の結核菌分裂期に分泌される抗原を産生しない、いわゆる休眠期の状態になると考えられている。休眠期の結核菌は、ESAT-6 および CFP-10 を産生しないため IGRA では検出できないと予想されている。高齢者における結核既感染率と実際の QFT-2G 陽性率の乖離は、多くの高

齢者がこの休眠期の結核菌を持っている事が原因の一つである可能性が考えられる。もう一つの乖離の原因としては、自己の防御免疫機構により結核菌が完全に体内から除去された結果である可能性が考えられる。本研究の目的は、このような休眠期結核菌感染、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の開発にある。

B. 研究方法

結核菌が低酸素状態により休眠期になると、この時期に特異的な抗原が産生されることが実験的に証明されており、このような抗原に対する免疫応答を解析することにより休眠期結核菌の存在を検出できる可能性が考えられる。このため、海外共同研究者であるデンマークの Andersen 博士より、10 種類の休眠期特異的結核菌抗原を入手した。これら抗原の詳細は、共同研究の契約上の都合で割愛する。各抗原に対する免疫応答を検討するため、結核未感染者および感染者（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 2.5×10^5 個添加後、さらに各抗原を加え 18 時間培養した。培養後、IFN- γ 産生 T 細胞の個数を計測した。

また、結核菌が体内から消滅した状態では central memory T 細胞が反応し、この T 細胞は主に IL-2 を産生するが、活動期の結核菌が存在すると central memory T 細胞数が減少し、IFN- γ 単独、あるいは IL-2 と IFN- γ を同時に産生する effector memory T 細胞が存在することが示唆されている。すなわち、これらの T 細胞を解

析することにより、結核菌の存在状況を知ることが可能になると考えられる。このような複数のサイトカイン産生細胞を解析するために、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。

C. 研究結果

10 種類の休眠期に特異的に産生される結核菌抗原に対する IFN- γ 産生 T 細胞数は、表に示すように 2、5 および 9 番目の抗原で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。

FACS 法には従来 1 検体の染色に 1ml の血液を必要としていたが、今回種々の方法を検討した結果、0.1ml の血液で解析可能な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図に示すように、IFN- γ 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。この色調の変化について専用の装置で解析を行ったが、色調変化を精密に捉えることはかなり困難を伴うと考えられた。

D. 考察

幾つか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と考えられる。今後さらに例数を増やし、本検査法の確立を目指す。システムが確立された際には、結核治療終了者を対象に本システムと QFT 検査結果

とを比較させながら、検査結果の妥当性を検証する。

FACS 法を用いた解析では、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。また、同様の対象者群について休眠期特異的結核菌抗原により刺激されたリンパ球からの、インターフェロン- γ を含む種々のサイトカイン産生を測定し、感染状況とこれらサイトカイン産生の関連性も検討する。

ELISPOT 法を用いる二重染色システムについては、従来色素による染色の解析は困難と考えられるため、今後より解析の容易な蛍光色素を用いた系を検討する。

E. 結論

今年度の結果としては、休眠期結核菌感染を検出できる可能性が示唆された。また、少量の血液を用いる

FACS 法が確立され、ELISPOT 法を用いる二重染色システムについても今後の方向性が示されたと考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

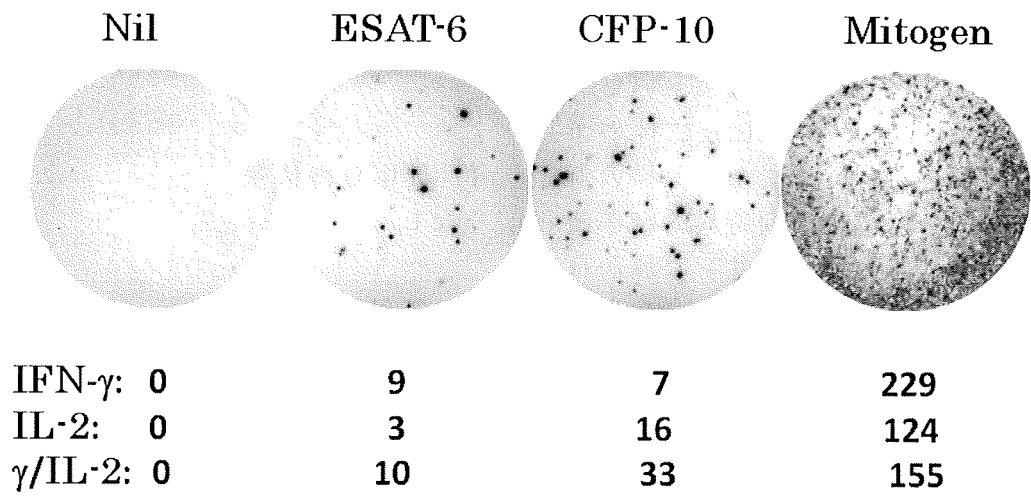
(予定も含む)

なし

表 10 個の休眠期結核菌抗原に対する IFN- γ 応答 (ELISPOT 法)

Subject	Med	Antigen No.										Mitogen
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
HC1	0	12	32	4	5	1	1	13	12	54	1	591
HC2	1	-	5	-	0	1	-	4	0	1	-	473
HC3	1	1	11	0	2	6	2	1	2	8	2	528
HC4	0	0	3	0	1	0	1	0	0	0	0	589
HC5	1	0	1	0	4	2	-	2	12	1	-	292
HC6	0	0	2	0	4	0	0	1	1	6	0	336
LTBI	1	5	158	8	14	27	2	24	26	151	1	675

図1. 二重染色ELISPOT法によるIFN- γ とIL-2産生T細胞の解析



結核菌の感染性・病原性の評価方法の開発

分担研究者 御手洗聡 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部

研究要旨

結核感染の判断や治療に関して臨床的な毒力の強弱の評価が必要であるが、現状では接触時間や塗抹陽性度等の情報しか得られない。今回結核菌の感染力及び増殖力を、標準株との相対性において評価することを最終目標として研究を開始した。初年度は、遺伝子タイピング法（Variable Numbers of Tandem Repeat; VNTR）によるデータを基にした迅速相対定量法の開発を試みた。

VNTR型の異なる2種類の結核菌を液相のまま相対定量することを目的として、Real-time PCRを用いた定量系を検証した。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。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。さらに測定系の精度を高めるための検討が必要と考えられた。

研究協力者

青野昭男、近松絹代、山田博之、水野和重
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

A. 研究目的

結核の感染や発病は宿主の免疫状態に強く影響されるが、結核菌側の因子はあまり評価されていない。結核感染の判断や治療に関して臨床的な毒力の強弱の評価が必要であるが、現状では接触時間や塗抹陽性度等の情報しか得られず、客観的で単純な指標が存在しない。この状況を打開するため、簡易で迅速な毒力評価法を開発することを目的とする。

二種類の異なる結核菌を同数・同時感染させて

相対的感染力を比較して有意性をみた報告があり（Garcia de Viedma D, et. al. J Infect Dis. 2005; 192: 2059-65.）、*ex vivo*での毒力評価に利用できる可能性が示されている。概念としては、二つの異なる菌株をマクロファージに同数同時に感染させ、相対的感染力を比較するものであり、感染性が相対的に高ければ、マクロファージ感染後の細胞内寄生菌量に反映される（24時間後）。また、マクロファージ内部での増殖の差異を観察するため、感染7日後の相対的菌量を測定している。

今回の研究では、臨床分離結核菌の相対的感染力を*ex vivo/in vitro*での競合アッセイ（発育競合、感染競合、細胞内生存競合）を確立し評価することを最終目標とする。一次目標として、結核菌の競合感染評価系の確立を行う。二種以上の異なる

結核菌を特定の細胞（マクロファージ等）に等量同時に感染させて培養し、最終的な増殖の差異を Genotyping を用いて定量的に評価する。二次目標として、臨床的に感染性や増殖性の差異が疑われる二種類以上の結核菌について相対感染力・増殖力を評価し、臨床情報との相関性を検討する。

現在 Variable Numbers of Tandem Repeat (VNTR) による結核菌分子疫学調査が進行しており、結核菌の VNTR 情報が得やすい状況となっている。VNTR に基づく相対的毒力評価情報が利用可能であれば、公衆衛生上有用であろうと考えられる。

B. 研究方法

初年度は、VNTR による型別情報を利用して、二種の結核菌の混合感染量（相対量）を測定する実験系の開発を行う。一般に二種類以上の混合感染を分離・定量しようとする場合、検体を一度 Middlebrook 7H10 などの平板培地で培養し、発育したコロニーを数十個クローニングし、それぞれの生物学的特徴 (Phenotype/Genotype) を個々に調べることにより、相対的な含有量を推定する。しかし、この方法では固形培地上での培養に時間がかかるため、迅速な結果が得られない。そこで今回は、Real-time PCR による定量法を利用し、混合感染を相対的に定量する方法を検討した。

VNTR は理論的にそれぞれの Locus における反復配列のコピー数を定量する方法である。この情報はデジタルな数字であり、各反復配列を 1 単位とすれば、これを 1 単位として反映するリポーターを設定し、複数の Locus を利用することで二つの未知数（二種の結核菌のそれぞれの菌量）に関する連立方程式を作成できる。

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 Locus は前田らが提唱した JATA15 から選択し、プローブの設計には Bluephine (Sigma-Genosys) を利用した。VNTR locus と FRET プローブの設計は以下の通りである（資料 1 及び資料 2 参照）。

1. MIRU31 (53bp)

Sequence: cat ctg cgc cgc tcc tcc tca tcg ctg cgc tct gca tcg tcg ccg gcg cca ac
Primers: F: ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA
R: GTGCCGACGTGGTCTTGAT

Probe: GCTCCTCCTCATCGCTGC

2. VNTR3336 (59bp)

Sequence: aag cgc gcc gct tgc gcc ggg cgc gcc ggg tcg gca cca tcg gcc taa gtg ccg atc gc
Primers: F: ATCCCCGCGGTACCCATC
R: GCCAGCGGTGTGCGACTATCC
Probe: CACCATCGGGCTAAGTGC

3. VNTR2163a (69bp)

Sequence: ggg atc gta acc ggg ctc gtg ccc ccg ctc aac gga aca ttc aac cca aac gga tta atc gcg aaa cca
Primers: F: CGTGATGTTGATCGGGATGT
R: ACCCTGGAGTCTGGCATC
Probe: ACGGAACATTCAACCCAAAC

4. QUB18 (VNTR1982) (78bp) (予備)

Sequence: acg gtg atg ttg gct ggt gtg gtg gcg gcc ggg atg ttc aac gac gcc aac gtc aac ccg gcc agg ctg aag gcg ccg
Primers: F: ATCGTCAGCTGCGGAATAGT
R: AATACCGGGGATATCGGTTC
Probe: GATGTTGGCTGGTGTGGTG

実験 1

上記の方法とは別に、Real-time による相対定量の可能性自体を評価するため、以下の実験を行った。上記の定量法は 2 つの Locus を利用するが、以下の実験では 1 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 の定量を行う。先の場合と同様に、Strain A と B それぞれの菌実数を M_a 及び M_b とする。また Strain A と B それぞれの Locus 1 の反復配列のコピー数を a 及び b とする。実験 1 の場合と同様に、 C_{t1} : Locus G の条件 1 の場合の C_t 値 (条件: Strain A と B を 1:1 混合)、 C_{t2} : Locus G の条件 2 の場合の C_t 値 (条件: Strain A と B を 1:2 混合) とすると、 C_{t1} と C_{t2} は以下のように求められる。

$$C_{t1} = \text{Log}(3 \cdot M_a \cdot a + 3 \cdot M_b \cdot b) \cdot e + f$$

$$C_{t2} = \text{Log}(2 \cdot M_a \cdot c + 4 \cdot M_b \cdot d) \cdot e + f$$

(e は定量直線上の傾き、 f は切片)

すると、計算上 M_a と M_b は以下のように与えられる。

$$M_a = -[3 \cdot 10^{((C_{t2}-f)/e)} - 4 \cdot 10^{((C_{t1}-f)/e)}] / 6a$$

$$M_b = [3 \cdot 10^{((C_{t2}-f)/e)} - 2 \cdot 10^{((C_{t1}-f)/e)}] / 6b$$

それぞれの絶対値に意味はないので、 M_a/M_b を求めると以下ようになる。

M_a/M_b

$$=[b \cdot [3 \cdot 10^{-(Ct_2/e)} - 4 \cdot 10^{-(Ct_1/e)}]] / [a \cdot [3 \cdot 10^{-(Ct_2/e)} - 2 \cdot 10^{-(Ct_1/e)}]]$$

実験 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。

Strain A と Strain B のそれぞれについて、培養 t 時間後の菌の実数を $Ma(t)$ 及び $Mb(t)$ とする。さらに VNTR Locus 1 と Locus 2 の Strain A と Strain B における反復配列コピー数をそれぞれ a と c、及び b と d とする (表 1)。

表 1 VNTR Locus とコピー数

	Locus 1	Locus 2
Strain A	a	c
Strain B	b	d

a: strain A の Locus 1 のコピー数 (VNTR より既知)

b: strain B の Locus 1 のコピー数 (VNTR より既知)

c: strain A の Locus 2 のコピー数 (VNTR より既知)

d: strain B の Locus 2 のコピー数 (VNTR より既知)

ここで、Real-time PCR から得られる情報としての Ct 値について、 Ct_1 : Locus 1 の Ct 値、 Ct_2 : Locus 2 の Ct 値とする。これらの値の関係は、理論上以下のようなになる。

$$Ct_1 = \text{Log}(Ma(t) \cdot a + Mb(t) \cdot b) \cdot e_1 + f_1 \quad (\text{等式 1})$$

$$Ct_2 = \text{Log}(Ma(t) \cdot c + Mb(t) \cdot d) \cdot e_2 + f_2 \quad (\text{等式 2})$$

e_1 : Locus 1 の等式 1 に関する傾き

e_2 : Locus 2 の等式 2 に関する傾き

f_1 : Locus 1 の等式 1 に関する切片

f_2 : Locus 2 の等式 2 に関する切片

ここで、等式 1 と等式 2 より、計算上 $Ma(t)$ と $Mb(t)$ は以下のように与えられる。

$Ma(t)$

$$= [d \cdot 10^{-(Ct_1 - f_1)/e_1} - b \cdot 10^{-(Ct_2 - f_2)/e_2}] / (ad - bc)$$

(条件として $ad \neq bc$)

$Mb(t)$

$$= [-c \cdot 10^{-(Ct_1 - f_1)/e_1} - a \cdot 10^{-(Ct_2 - f_2)/e_2}] / (ad - bc)$$

(条件として $ad \neq bc$)

$Ma(t)$ 及び $Mb(t)$ に絶対値としての意味はないため、 $Ma(t)/Mb(t)$

$$= [-d \cdot 10^{-(Ct_1 - f_1)/e_1} - b \cdot 10^{-(Ct_2 - f_2)/e_2}] / [c \cdot 10^{-(Ct_1 - f_1)/e_1} - a \cdot 10^{-(Ct_2 - f_2)/e_2}]$$

として、相対的な比率を算出する。

実験 1 及び 2 について、臨床から分離された結核菌株 2Y-2-10 と Sample 24、及び標準菌株として H37Rv を使用して実験を行った。それぞれの結核菌を Middlebrook 7H10 にて培養し、1 エーゼ分の菌を使用して Isoplant (ニッポンジーン) を使用して DNA を抽出した。抽出した DNA について、濃度を定量した。

Real-time PCR 装置には、ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems Inc.) を使用した。また、Real-time PCR 試薬として 2X TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems Inc.) を使用した。H37Rv を使用した事前の条件設定により、それぞれの Locus について、プライマーとプローブの適正濃度をそれぞれ 500nM 及び 250nM に設定した。

C. 結果

それぞれのプライマーとプローブについて定量性を検討した結果、VNTR3336 及び VNTR2163a が定量に適していると判断された。実験に使用した結核菌株の DNA 濃度はそれぞれ以下の通りであった。また、それぞれの検体の VNTR Locus の反復配列コピー数は表 2 の通りであった。

H37Rv: 14.3 ng/ μ l

2Y-2-10: 311 ng/ μ l 及び 31.1 ng/ μ l (10 倍希釈)

Sample 24: 26 ng/ μ l

表 2 対象検体の VNTR Locus 及びコピー数

Locus	H37Rv	2Y-2-10	Sample 24
MIRU31	3	3	6
VNTR3336	8	10	11
VNTR2163a	2	2	1
QUB18	4	4	12

実験 1

上記の設定条件に従って、VNTR2163a と VNTR3336 について、相対定量を試みた。Sample 24 と H37Rv を用いて VNTR2163a について測定された Ct 値はそれぞれ

$Ct_1=16.0333$

$Ct_2=15.992$

であった。別個に測定した検量線から傾きと切片

を算出し、前述の等式に当てはめたところ、

e 値 (2163a) = -3.38

Ma(t)/Mb(t):

核酸定量からの実測値 1.818

Real-time PCR による算出推定値 1.685

となり、ほぼ実測値と同じであった。

これに対して、2Y-1-10 と H37Rv を用いて VNTR3336 について実施した結果は以下の通りであった。

Ct₁=28.585

Ct₂=29.173

e 値 (3336) = -4.08

Ma(t)/Mb(t):

核酸定量からの実測値 21.748

Real-time PCR による推定値 9.671

VNTR3336 について、実測値と推定値は一致しなかった。

実験 2

前述の設定条件に従って、VNTR2163a と VNTR3336 を利用し、2Y-1-10 (10 倍希釈) と H37Rv を使用して両者の混合物 (1:1 混合) の相対定量を試みた。Real-time PCR から得られた値は以下の通りであった。

Ct₁=19.7705

Ct₂=30.4485

e₁=-3.38

f₁=26.04

e₂=-4.08

f₂=39.86

Ma(t)/Mb(t): 実測値 2.175 算出値 -0.5388

実測値と算出値の間に一致が認められなかったため原因を調査した結果、検体として使用した 2Y-1-10 で VNTR3336 の Locus 正常な増幅が認められず、検体の不良が考えられた。

D. 考察

Genotype の異なる二種類の結核菌を液相のまま相対定量することを目的として、Real-time PCR を用いた定量系の確立を試みた。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。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た (data not shown)。今回の検討から、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。条件設定の段階で反応率が適正であることは確認しているものの、この不安定性は PCR の増幅効率と関係しているものと推測された。

本年度は基礎的な条件設定のみで時間切れとなったが、来年度以降さらに他の検体と VNTR Locus で条件を設定し、同時に結核菌競合感染系の確立を行う。

E. 結論

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 Genotype 情報を利用して相対的に定量する方法を考案し、可能性を実証した。この方法によって二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。さらに測定系の精度を高めるための検討が必要と考えられた。

F. 健康危惧情報

特記事項なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

資料1 VNTR Locus (JATA 15)とプライマー配列

JATA No.	Alias	PCR primer pairs (5' to 3'): Forward	PCR primer pairs (5' to 3'): Reverse
2	MIRU-10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC	GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
7	MIRU-26	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC	CATAGGCGACCAGGCGAATAG
9	MIRU-31	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA	GTGCCGACGTGGTCTTGAT
13	ETR-A	CGAAGCCTGGGGTGCCCCGCGATTT	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT
14	VNTR 2163a	CGTGATGTTGATCGGGATGT	ACCCTGGAGTCTGGCATC
5	VNTR 2163b	CCGATGTAGCCCGTGAAGA	AGGGTCTGATTGGCTACTCA
3	VNTR 1955	AGACGTCAGATCCCAGTT	ACCCGACAACAAGCCCA
12	VNTR 4156	ACCGCAAGGCTGATGATCC	GTGCATCTCGTCGACTTCC
1	VNTR 0424	CTTGCCGGCATCAAGCGCATTATT	GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC
10	VNTR 3336	ATCCCCGCGGTACCCATC	GCCAGCGGTGTCGACTATCC
4	VNTR 2074	TGTGTCACCTGACGATTTCAAGG	TGGCCGGCAAATAATGGATGC
6	VNTR 2372	ACCTCCGTTCCGATAATCCG	CAGCTTTCAGCCTCCACAAT
8	VNTR 3155	GCCAGCCGTAACCCGACCAG	GGGCCGGAAATTCGCAGTGG
11	VNTR 4052	GTGCCGGCCAGGTCCCTCC	CACCGCGTGTGTTGACCCGAAC
15	QUB18	ATCGTCAGCTGCGGAATAGT	AATACCGGGGATATCGGTTC

資料2 VNTR Locus の特徴

JATA No.	Alias	Repeat length (bp)	Number of Pseudo-repeat	Gap between repeat	Repeat number in H37Rv genome
1	VNTR0424	51	1 (30bp)	0	2
2	MIRU10	53	0	0	2
3	VNTR1955	34	0	23	2
4	VNTR2074	56	1 (30bp)	0	3
5	VNTR2163b	69	1 (69bp)	0	5
6	VNTR2372	56	1 (10bp)	1	2
7	MIRU26	51	1 (12bp)	0	3
8	VNTR3155	54	1 (51bp)	0	3
9	MIRU31	53	1 (53bp)	0	2
10	VNTR3336	59	2 (59bp)	0	3
11	VNTR4052	111	2 (111bp, 40bp)	0	5
12	VNTR4156	59	1 (59bp)	0	2
13	ETR-A	75	0	0	3
14	VNTR2163a	69	1 (69bp)	0	2
15	QUB18	78	3 (78bp)	0	3

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者

前田 伸司 結核予防会結核研究所 抗酸菌レファレンス部
結核菌情報科 科長

研究要旨

現在の結核菌型別標準法である IS6110 制限酵素断片長多型分析 (RFLP) 分析に代わる、PCR を利用した反復配列多型 (VNTR) 分析法の国内分離株への適用について検討した。国内株分析に適した VNTR システムとして、12 箇所のミニサテライト DNA を調べる Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTR システムおよび JATA(12)に 3 ローサイ追加した JATA(15)-VNTR システムを樹立して既に報告している。実際の分析に際しては、1 株あたり 12 あるいは 15 箇所の解析が必要であり、反応液調製及び PCR 産物の分子量算出のために手間と時間が必要となる。そこで本 VNTR 分析法の自動分析システム構築を目指した研究を進め、マルチプレックス PCR システムを構築した。マルチプレックス PCR では、2 ローサイを 1 つの反応液として混合した。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くことにより、得られた PCR 産物を区別できるようにした。つまり、検体をアガロースゲルで電気泳動し、蛍光を発するバンドを記録することにより、標識したローカス由来の PCR 産物同定し、その後エチジウムブロマイドで染色することにより 2 ローサイ共に検出した。この方法により、得られた PCR 産物がどちらのローカス由来か判別することができた。本システムは、蛍光標識プライマーさえ準備すれば、新たに必要な装置はなく、既にある器材で対応できることから一般の実験室でも導入可能である。

A. 研究の目的

全国から集めた結核菌を用いて、日本国内での結核菌標準反復配列多型 (VNTR) 分析法である Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTR を構築して報告した。また、人口ベースの結核菌分子疫学調査のために、JATA (12) システムを改良して識別能を高めた JATA (15)-VNTR システムを構築して、その有用性を報告している。

これらの自動分析システムを構築すれば、本

法の普及が一層進むと考えられる。自動分析システムを作るための第一歩として、今年度は 2 ローサイを混合したマルチプレックス PCR 法の構築を行った。本システムでは、蛍光試薬で標識したプライマーと非標識プライマーを使うことで特別な装置を使うことなく、通常の電気泳動後、蛍光を検出することによりそれらを区別することができる。また、本法を利用すると、PCR 法で準備すべきチューブ (反応) 数及び分析のために必要な電気泳動のレーン数

を半分にすることができる。

B. 研究方法

・マルチプレックス PCR の組合せ：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組合せとした。

・蛍光標識プライマー：通常用いられている紫外線照射装置 (302nm または 365nm) で励起可能な蛍光色素のひとつであるフルオレセインで標識したプライマーを合成した。

・PCR の条件：PCR のための反応液の調整は、結核菌 DNA(1~10 ng)、0.2 uM Forward と 0.2 uM Reverse プライマー混合液と蛍光標識 0.2 uM Forward と 0.2 uM Reverse プライマー混合液、GC I 緩衝液 (タカラバイオ)、0.2 mM dNTPs、Ex Taq (タカラバイオ) を加えて全容量を 20 ul とした。この反応液をサーマルサイクラーにかけ、94°C で 5 分間加熱し、94°C 30 秒、65°C 30 秒、72°C 1 分 30 秒のサイクルを 35 回繰り返して、72°C で 7 分処理し、その後 4°C とした。PCR 増幅液は、TBE 緩衝液を用いた 1.5-2.5% アガロースゲルで電気泳動を行った。

・得られた PCR 産物が由来するローカスの特定：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 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。

C. 結果

マルチプレックス PCR 分析を行うための組合せについて検討した。蛍光色素で 2 つのローサイを区別するとしても、各ローカス由来の PCR 産物の分布が、なるべく重ならない組合せが最善であると考えられる。そこで、JATA(12)及び JATA(15)の PCR 産物の分子量の

分布を調べた。その結果、低分子を中心に分布するローカス (A グループ) と高分子を中心に分布するローカス (B グループ) 大きく 2 つに分けることができることがわかった (図 1)。そこで、マルチプレックス PCR の組合せとして A グループと B グループから 1 ローカスずつ選択して組合せを作った。また、既に報告している JATA(12)-VNTR 分析でローカスを示す JATA 番号の順番をなるべく崩すことのない様な組合せを検討した。これらの試行錯誤により、以下の通りの組合せとした。JATA(12)-VNTR システムでは、Mixed-JATA-1 (MJ1) : VNTR-0424 と VNTR-1955、MJ2 : MIRU-10 と VNTR-2074、MJ3 : VNTR-2163b と VNTR-2372、MJ4 : MIRU26 と VNTR-1955、MJ5 : MIRU-31 と VNTR-3336、MJ6 : VNTR-4055 と VNTR-4156 である。また JATA(15)-VNTR システムでの追加 3 ローサイについては、MJ7 : VNTR-2163a と ETR-A、VNTR-1892 については単独で反応をかけるシステムとした。本組合せは、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。また、低分子の方が得られる PCR 産物量が多く、また判別しやすいことから、A グループのプライマーを蛍光標識することにした。

1 検体あたり、JATA(12)-VNTR では 6 反応、JATA(15)-VNTR では 8 反応分 PCR を行い、電気泳動で、PCR 産物を分析した。泳動後、ゲルを直接紫外線照射装置にのせて 302nm の UV を照射することによりフルオレセインを励起状態として、537nm フィルターで 520-555nm の範囲で発する蛍光を検出し記録した (図 2[A])。その後、ゲルを EtBr 染色して存在する DNA を検出した (図 2[B])。このような検出法により、蛍光標識プライマーと非標識プライマーを区別することが可能であり、2 ローサイを同時に分析できるマルチプレックス PCR の系が構築できた。