

表 1. 10 個の休眠期結核菌抗原に対する IFN- γ 応答 (ELISPOT 法)

Subject s	Med	Antigen No.										Mitogen
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
HC1	1	-	5	-	0	1	-	4	0	1	-	473
HC2	1	1	11	0	2	6	2	1	2	8	2	528
HC3	0	0	3	0	1	0	1	0	0	0	0	589
HC4	1	0	1	0	4	2	-	2	12	1	-	292
HC5	0	0	2	0	4	0	0	1	1	6	0	292
HC6	1	14	72	/	5	1	/	5	1	9	11	154
HC7	2	5	5	/	7	10	/	20	21	8	31	130
HC8	0	2	129	/	2	1	/	0	0	7	3	201
LTBI-1	0	12	32	4	5	1	1	13	12	54	1	591
LTBI-2	1	5	128	8	14	27	2	24	26	151	1	675
LTBI-3	0	0	0	0	1	0	0	8	3	7	13	1181
LTBI-4	0	0	22	0	30	5	0	0	0	1	3	664
LTBI-5	0	4	20	1	2	2	0	1	1	29	0	1087
LTBI-6	0	5	71	5	1	2	2	1	7	75	7	1077
LTBI-7	0	3	0	0	4	0	0	15	1	25	16	981
LTBI-8	0	0	2	0	0	0	0	1	1	0	1	734
LTBI-9	0	2	2	0	6	2	0	21	4	22	50	1027
LTBI-1 0	0	11	3	0	2	3	0	2	0	18	13	814
LTBI-1 1	0	0	3	/	2	0		1	1	19	0	309
LTBI-1 2	0	0	13	/	1	0		0	0	9	0	369

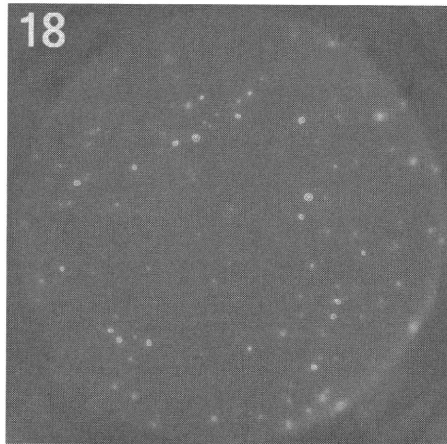


図 Fluorospot のイメージ

IFN- γ と IL-2 産生の画像を合成した画像であり、サークルで囲まれたスポットが両者の産生を示す。

表 2. 潜在性結核感染者における各 T 細胞亜集団の比率

ID	ESAT-6				CFP-10			
	IFN- γ	γ /2	IL-2	% of γ /2+IL-2	IFN- γ	γ /2	IL-2	% of γ /2+IL-2
1	3	2	4	66.7	4	4	4	66.7
2	13	16	5	61.8	10	3	3	37.5
3	21	6	6	36.4	0	7	3	100
4	16	18	24	72.4	1	1	8	90

潜在性結核感染者 4 人における結核菌特異抗原 ESAT-6、CFP-10 に対する各 effector T 細胞 (IFN- γ)、effector-memory T 細胞 (γ /2) および central memory T 細胞 (IL-2) の応答。

厚生労働科学研究補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
研究分担報告書

結核菌の感染性・病原性の評価方法の開発

研究分担者 御手洗聡 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌検査科

研究要旨

結核患者との接触に由来する結核菌感染の可能性の判断や発病リスクの評価に関しては、結核菌の臨床的な毒力の強弱に関する情報が必要であるが、現状では接触時間や塗抹陽性度等の環境や宿主側の情報しか得られず、接触者健診の範囲の決定などに苦慮することが多い。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目標として研究を開始した。また、毒力因子の一つである薬剤耐性について従来よりも迅速に診断可能な方法について検討した。

全国的病原体サーベイランスから得られた結核菌をクラスターサイズ別に5株準備し、H37Rvと比較対象結核菌株を等量混合した菌液を用いて競合感染実験を行った。感染系にはTHP-1細胞をPMAとIFN-gammaで活性化して使用した。感染3日目には殆どH37Rvだけが分離される状況となり、感染3時間後から1日目までの菌量の相対比の変化率にクラスターサイズとの相関が認められた。全国規模でのクラスター形成は一定の毒力を反映していると考えられ、競合感染による相対評価の有用性が示唆された。また、競合感染実験の結果を迅速に解析することを目的としてTaqMan probeを用いたReal-time PCRの定量系を評価したが、目的とする精度が得られず、再考が必要と考えられた。

結核菌の薬剤感受性と培養検査を迅速に行うため、マイクロプレートを使用して液体培地中で結核菌の培養を行い、発育の状態を顕微鏡下で観察するMicroscopic Observatory Drug Susceptibility (MODS)法について検討した。耐性既知の結核菌39株を用いた検討では、Isoniazid (INH)とRifampicin (RFP)比率法による標準判定とMODSの結果が良く相関したが、Streptomycin (SM)とEthambutol (EB)では一致率が低かった。これは臨床検体(45検体)を使用した評価でも同様であった。しかし、間接法による薬剤感受性検査が液体培地でも1ヶ月程度かかるのに対して、MODSでは培養結果と薬剤感受性結果が7-11日で判明し、迅速であった。結核菌検査指針はMODSのような直接検査法を推奨していないが、検査の迅速性と精度を考慮すれば、少なくともINHとRFPについてはMODSに有用性があると考えられた。

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、薬剤感受性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・増殖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等に同時に感染させ、相対的感染・増殖力を比較するものであ

り、感染性が相対的に高ければ、細胞への感染後の細胞内寄生菌量に反映される。また、細胞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。

さらに今年度は結核菌の毒力の一表現形である薬剤耐性について、従来法よりも迅速に診断可能な方法についても検討することを目的とした。

B. 研究方法

[細胞内競合感染による結核菌毒力評価の検討]

THP-1 細胞を phorbol myristate acetate (PMA) 及び IFN-gamma にて活性化し、二種類の異なる結核菌株を混合した上で感染させ、菌株間の競合を評価した。

結核菌には、標準結核菌である H37Rv を比較の基本株とし、対象として5種類の異なる臨床分離株を使用した。臨床分離株を選択するにあたり、日本全国から収集された結核菌 325 株の Supply-15 による VNTR の結果から、クラスターサイズの違いにより5種類の結核菌株を選択した(クラスターサイズ: 3~6)。また、クラスターを形成していない株も1株使用した。

H37Rv と 5 種の臨床分離結核菌株を基本的に Middlebrook 7H9/OADC+Tween80 培地にて振盪しながら OD 1.0 まで培養し、5.0 μ m のフィルターを通して分散させた後、それぞれ OD 0.2 に調製する。それぞれの結核菌株と H37Rv を等量混合した菌液を MOI 1 にて活性化した THP-1 細胞と混合し

た。感染3時間後、1日後、3日後、7日後の菌数をカウントした。20コロニーを無作為に釣菌し、核酸を抽出した後二種の菌株間で VNTR のコピー数が異なるローカスについて PCR を行い、コピー数の差から二種類の結核菌の存在比率を算出した。

[Real-Time PCR を用いた結核菌比定量系の検討]

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。

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) b: strain B の Locus 1 のコピー数 (VNTR) c: strain A の Locus 2 のコピー数 (VNTR) d: strain B の Locus 2 のコピー数 (VNTR)

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。

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

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

e1: Locus 1 の等式 1 に関する傾き

e2: Locus 2 の等式 2 に関する傾き

f1: Locus 1 の等式 1 に関する切片

f2: Locus 2 の等式 2 に関する切片

これにより、

$$Ma(t)/Mb(t) =$$

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

となる。

ローカス毎に TaqMan probe を設計し、それぞれのプライマーで Real-time PCR を実施した。

[Microscopic Observatory Drug Susceptibility (MODS)法による薬剤感受性検査]

Microscopic Observatory Drug Susceptibility (MODS)法は、マイクロプレートを使用して液体培地中で結核菌の培養を行い、発育の状態を顕微鏡下で観察することにより通常よりも短時間に薬剤感受性検査を実施できる方法である。今回、耐性既知の結核菌 39 株と、結核患者からの喀痰 45 検体を用いて検査精度の評価を行った。対象薬剤は Isonizzid (INH)、Rifampicin (RFP)、Streptomycin (SM)及び Ethambutol (EB)とし、判定基準となる薬剤濃度の設定と臨床株による検証を実施した。図 1 に 24 穴マイクロプレートを用いた場合の各薬剤の配置と濃度 (円内: $\mu\text{g/ml}$) を示した。培地には Middlebrook7H9/OADC+0.05% Tween80 を使用し、臨床検体の培養には MGIT PANTA (日本ベクトンディッキンソン) を添加した。

	control					
INH	0.8	0.4	0.2	0.1	0.05	
RFP	2.0	1.0	0.5	0.25	0.125	
EB	5.92	2.96	1.48	0.74	0.37	
SM	16.0	8.0	4.0	2.0	1.0	

図 1 24 穴マイクロプレートによる MODS

C. 結果

[細胞内競合感染による結核菌毒力評価の検討]

対象として使用した結核菌株は表 2 の通りである。

菌株名	クラスターサイズ
2E-1-9	1 (クラスター形成なし)
2A-3-6	3
2U-11-2	4
2I-1-3	5
2U-5-12	6 (評価対象中最大)

5 株の結核菌の発育速度について検討した。OD 0.05 から培養を開始し、384 時間後の OD 値を比較したところ、それぞれの菌株についてクラスターサイズとの関連は図 1 の様になり、相関は認められなかった。

図 2 クラスターサイズと発育速度

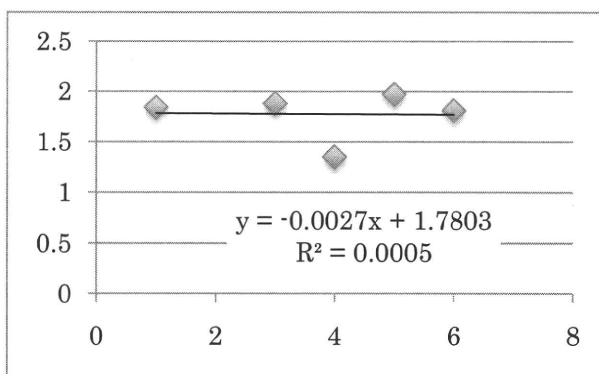
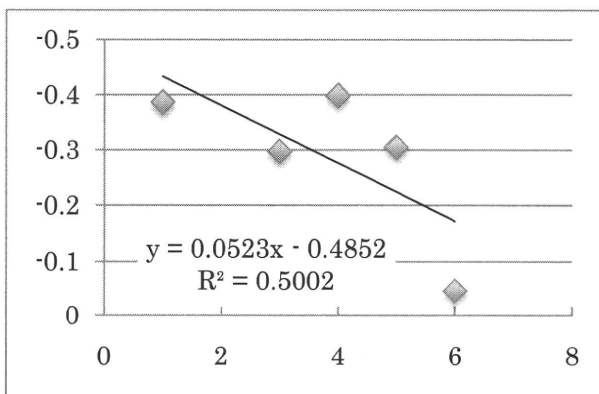


図 3 クラスターサイズと比率変化率



これに対して、H37Rv との競合感染を実施した系においては、3 日目までに殆ど H37Rv のみが検出される状態となった。感染後 3 時間から 24 時間までの変化率とクラスターサイズをプロット

すると、図2の様な相関が認められた。

同様の実験を ATHP-1 細胞を用いて実施したが、PMA/IFN-gamma activated THP-1 と同様の結果であった。

[Real-Time PCR を用いた結核菌比定量系の検討]

今回 MIRU26、VNTR 2163b、VNTR 2074、VNTR 4156 を用いて検討を実施した。H37Rv を用いた増幅の安定性の検討から、MIRU 26 と VNTR 2074 を選択した。臨床分離株から抽出した DNA を定量後、等量混合してそれぞれのローカスについて Real-time PCR を実施した。

Strain 233 と 247 を DNA 量比 1.15 で混合してシミュレーションを行った。VNTR 2074 と MIRU26 における Strain 233 と 247 の VNTR コピー数は、それぞれ 3、5、3、7 であった。得られた Ct 値から算出した比率は -1.45 ~ -1.54 となり、目的とした精度が得られなかった。

VNTR 2074 についてさらに検討したところ、同じローカスであってもコピー数によって同一検体でも増幅効率が安定しないことが判明した。結果として、TaqMan probe による Real-time PCR 系では目的の精度が得られなかった。

[Microscopic Observatory Drug Susceptibility (MODS) 法による薬剤感受性検査]

INH、RFP、SM 及び EB の 4 薬剤について、耐性既知の結核菌 39 株を用いて MODS の精度評価を実施した。標準判定には Lewenstein-Jensen 培地による比率法の結果を用いた。

INH について 0.05 ~ 0.8 $\mu\text{g/ml}$ (2 段階希釈) の薬剤濃度について検討し、0.8 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で感度 96.0%、特異度 92.9%、一致率 94.9%、 κ 指数 0.889 となった。同様に RFP では 0.125 ~ 2.0 $\mu\text{g/ml}$ (2 段階希釈) の薬剤濃度について検討し、2.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で感度 100%、特異度 95.5%、一致率 97.4%、 κ 指数 0.948 となった。

これに対して SM では 1.0 ~ 16 $\mu\text{g/ml}$ (2 段階希釈) の薬剤濃度について検討し、4.0 及び 8.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で感度 78.6%、特異度 62.5%、一致率 68.4%、 κ 指数 0.377 となったのが最高であった。同様に EB でも精度は低く、0.37 ~ 5.92 $\mu\text{g/ml}$ (2 段階希釈) の薬剤濃度について検討し、1.48 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で感度 65.2%、特異度 62.5%、一致率 64.1%、

κ 指数 0.272 であった。

結核患者の喀痰を使用した MODS では、45 検体中雑菌汚染が 4 検体 (8.9%)、培養陰性が 7 検体 (15.6%) 認められた。評価可能であった 34 検体では、INH でのカットオフ値を 0.8 $\mu\text{g/ml}$ とした場合、感度 100%、特異度 93.5%、一致率 94.1%、 κ 指数 0.719 となった。同様に RFP でカットオフを 2.0 $\mu\text{g/ml}$ としたところ、感度 100%、特異度 93.9%、一致率 94.1%、 κ 指数 0.477 であった。培養開始から培養・感受性検査結果が得られるまでの期間 (Turn Around Time: TAT) は、塗抹 3+ 検体で平均 6.25 日、2+ で 9.63 日、1+ で 7.63 日、± で 11.0 日であり、さらに塗抹陰性検体でも培養陽性となった検体では平均 11.7 日で感受性の判定が可能であった。

D. 考察

結核菌の病原性 (毒力) を評価するための方法論として、競合感染実験系の確立と迅速感受性検査の検討を実施した。

競合感染実験については、比較対象とした結核菌のクラスターサイズと H37Rv に対する「競合力」にある程度の相関があると考えられた。この実験の前提として、二つの仮説がある。ひとつはクラスターサイズと毒力との相関に関する仮説であり、検証が困難である。しかしながら、局地的な集団感染が個々の結核菌の毒力以外に環境や宿主側の因子に大きく左右される可能性があるのに対して、今回使用した菌株は少なくとも日本全国をランダムにカバーしており、多くの感染事象の集積として個々の感染事例における局地的条件の影響が薄められていると考えられる。実際に対象とした結核菌株の由来は地域的に広範であり、集団中での相対的毒力を反映していると考えられた。もうひとつの仮説は標準株に対する競争力が一定の毒力を表現しているとする考えである。従来結核菌の毒力評価には試験管内での発育速度や、動物・細胞での感染・増殖性などの方法が用いられてきたが、全ては絶対評価系であるため、使用する動物や細胞の影響を受ける可能性が大きい。その点相対的評価系はあくまで標準菌に対する毒力の差をみるものであり、実験に使用するプラットフォームの影響が小さいと考えられる。これらの仮説は検証が困難であるが、今回全

国的な病原体サーベイランスから得られた情報を元に選択した結核菌株で相対的毒力に差異がみられたことは、仮説の一定の裏付けになるものと考えられる。今後は高率な発病をもたらした集団感染株や非病原性株とされる H37Ra についてさらに検討したいと考える。

競合感染実験による毒力評価が有用であったとしても、従来の培養法に依存した方法では結果を得るまでに時間がかかりすぎるため、迅速な対策の実施に結びつかない。そこで核酸増幅法による定量系を利用した相対比評価法を検討したが、VNTR ローカスの性質あるいは TaqMan probe による Real-time PCR の定量精度の問題から、目的とする精度が得られなかった。今後、少なくとも検出系の変更を考慮する予定である。

迅速な薬剤感受性検査法として、INH、RFP、SM 及び EB の MODS を評価した。耐性既知の結核菌株を用いた精度評価では INH 及び RFP について高精度が示されており、これによって設定された薬剤濃度を用いて臨床検体について実施した検討でも同様であった。SM と EB については分離株でも耐性と感受性株の分離能が不十分であり、臨床応用には不適切と考えられた。これは一般の感受性菌と耐性菌の最小発育阻止濃度の差による影響があるものと考えられた。MODS は直接薬剤感受性検査法にあたるものであり、結核菌検査指針では推奨されていない。理由は正確な成績を得ることが困難であるためとされているが、今回の結果では雑菌汚染率も通常の液体培養と同程度であり、検査成績も間接法による比率法とよく相関した。また一般に直接検査法は塗抹陽性度が 2+以上とされているが、今回の検討では塗抹陰性であっても培養陽性であれば感受性検査結果が得られ、しかも一般の液体培地によって陽性結果が得られるまでの TAT がおよそ 2 週間であるのに対して、MODS では 7-11 日で培養と感受性検査結果を同時に得ることが可能であった。MODS は少なくとも INH と RFP の迅速感受性検査に有用と考えられた。今後、検体数を増やして検討したいと考える。

E. 結論

結核菌の毒力を評価するため、複数の結核菌の競合感染系と迅速感受性検査の検討を実施した。

標準結核菌株である H37Rv と臨床分離結核菌株を *in vitro* で活性化 THP-1 細胞に混合感染し、感染・増殖を相対評価したところ、臨床分離株のクラスターサイズと相対比の変化率に一定の相関があると考えられ、毒力の評価法としての有用性が考えられた。相対比の迅速計測法については予定の精度が得られず、改善の必要性があると思われた。

迅速薬剤感受性・培養検査である MODS を分離結核菌株と臨床検体（喀痰）で評価したところ、一般的な液体培地による方法よりも迅速に INH と RFP の感受性結果を得ることができた。

F. 健康危機情報

本研究においては、結核菌の感染の危険があると考えられた。全ての結核菌（生菌）の取り扱いには感染症法及びバイオハザード指針に従って BSL3 レベルの実験室内で安全キャビネットを用いて行った。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

<研究協力者>

青野昭男・近松絹代・山田博之

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

西山裕之

結核予防会国際部

結核菌の VNTR 標準分析法の確立と自動化を
目指した分析システムの構築

研究分担者 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

自動 DNA シークエンサーとフラグメント解析用ソフトである GeneMapper を用いた結核菌 VNTR 解析システムを作成した。DNA シークエンサーでは 4 色の蛍光を同時に検出できるので、4 ローサイのプライマーを混合したマルチプレックス PCR が利用できる。このマルチプレックス PCR により、反応チューブ数の削減（1 検体あたり 16 本から 4 本へ）、反応液調整段階における省力化、時間短縮および試薬量の削減が可能となった。また、解析プログラムの利用で各ローカスにおける PCR 産物の分子量からコピー数への換算も非常に容易になった。DNA シークエンサーは、ランニングコストやプライマーの準備等で費用がかかる。しかし、PCR 後の反応液をセットするだけで自動分析可能で、再現性の高い分析システムである。本研究により、このシステムを利用した VNTR 分析系が構築できた。今回、さらにマイクロチップ電気泳動装置で利用できる解析プログラムを作成した。そのため、シークエンサー以外でもこの種の電気泳動装置があれば、その装置を結核菌の VNTR 解析に利用できるようになった。

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、有用性を報告している。

これらの VNTR 分析の自動分析システムを構築すると、本型別法の普及が一層進むと考えられる。本研究では自動シークエンサーを用いたフラグメント解析を利用することで、PCR のマルチプレックス化と PCR 産物の分子量からコピー数への換算を迅速・簡便化できるシステム構築を目指した。

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 番号ができるだけ連続するような組合せとした。

・蛍光標識プライマー：本フラグメント解析では、マーカーとして LIZ 及び FAM、VIC、NED、PET の 4 色の合計 5 色同時分析可能である。各蛍光で標識したプライマーを用合成して、マルチプレックス PCR を行った。

・PCR の条件：PCR のための反応液の調製は、結核菌 DNA(1~10 ng)、各ローカスの 0.2 uM Forward (蛍光標識) と 0.2 uM Reverse プライマーを 4 種類混合し、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 10 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℃とした。

・フラグメント解析：PCR後の検体は滅菌蒸留水で35倍希釈したものを1ul取り、1200LIZマーカーと混合してHi-Di Formamide溶液で希釈した。この反応液をApplied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザーで分析し、GeneMapperで解析を行った。

C. 結果

VNTR分析では、大きく以下のようなステップが必要である。つまり、(1)検体の収集、(2)菌体からDNAの調製、(3)PCR用反応溶液の調整、(4)DNAの増幅、(5)PCR産物の分子量測定、(6)コピー数への換算、である(図1)。特に分析ローカス毎にPCRを行うと1検体あたり、JATA(16)なら16本の反応液準備、増幅、分子量測定、換算が必要であり手間と時間がかかる。そこで、マルチプレックスPCRによる反応液数の削減、分子量測定とコピー数換算等の省力化システムの開発を進めた。

1) 自動シーケンサーを用いたフラグメント解析

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。DNAシーケンサーによるフラグメント解析は内部標準マーカーとしてLIZ、他に4色蛍光の同時分析が可能なので、4ローサイの分析を行うJATAプライマーの組合せを検討した。なるべくJATA番号の順番となるように組み合わせを作り、実際にマルチプレックスで反応をかけ、PCR産物が得られることを確認した。もし、得られなければ組合せの再検討やプライマーの濃度、塩基配列及び長さ等を変更・修正し最適な条件を検討した。その結果、SET1：VNTR0424(JATA01), MIRU-10(JATA02), VNTR2074(JATA04), MIRU-26(JATA07)；SET2：VNTR1955(JATA03), VNTR2163b(JATA05), VNTR2372(JATA06),

VNTR3155(JATA08)；SET3：

MIRU-31(JATA09), VNTR3336(JATA10), VNTR4052(JATA11), VNTR4156(JATA12)；SET4：VNTR1982(JATA13), VNTR2163a(JATA14), ETR-A(JATA15), VNTR4120(JATA16)の組合せとした。

このシステムを使って実際に96株の結核菌型別を行ったところ、PCR産物に由来する蛍光ピークが低いローサイがあった。対策としてプライマーの濃度を2.5倍(最終濃度を0.5 uM)にすることで改善がみられ対応可能であった。

2) マイクロチップ電気泳動装置マルチナ(島津製作所)用解析プログラムの開発

キャピラリー電気泳動装置やマイクロチップ電気泳動装置を使用してVNTR分析を行った場合、得られたPCR産物の分子量から換算表を使ってコピー数へ換算する必要がある。また、装置によって得られるPCR産物の分子量(実測値)が理論値と大きくずれる場合がある。そこで、準備した各ローカスのコピー数に応じたマーカーを分析して得られ実測の分子量を使って、コピー数に換算するためのプログラムである“結核菌株判別ソフトウェア(標準機能版)”の開発を行った(図2)。

D. 考察

1株あたり本来16本のPCRチューブを準備し分析する必要があったが、構築したマルチプレックスのPCRで結核菌の型別を行うことで、4本だけで済むことになる。サーマルサイクラーでは96検体同時に増幅することができる。1株16チューブ必要なら1度に6検体しか扱えないが、1株4チューブなら24検体を同時に処理できる。このサーマルサイクラーによるDNA増幅ステップには3時間程度必要なので、多検体を同時処理できるのは非常に有用であると考えられる。ABI社の

フラグメント解析では内部標準マーカーを検体毎に加えて泳動し、泳動における各レーンのばらつきを補正することで精度の高い再現性の良い結果が得られるものと考えられる。また、解析プログラムである GeneMapper で、あらかじめ各コピー数で得られる PCR 産物の位置をローカス毎に設定しておくことで、コピー数への換算が正確にできる解析システムとなった。高価な自動 DNA シークエンサーの利用ということが前提になるが、本システムの導入により、精度の高い型別データベースの構築に結びつくと考えられる。

また、解析プログラムの開発によって、キャピラリー電気泳動やマイクロチップ電泳動装置での分析においても、PCR 産物の分子量からコピー数への換算が迅速・正確にできるようになった。また、本プログラムを利用することで、将来作成が予定されている型別データベースへ登録のための CSV 形式での出力も可能となった。

E. 結論

4 ローサイ混合によるマルチプレックス PCR により、反応チューブ数の削減（1 検体あたり 16 本から 4 本へ）、反応液調整の省力化や時間短縮および試薬量の削減が可能となった。DNA シークエンサーは、ランニングコストやプライマーの準備等で費用がかかる。しかし、PCR 後の反応液をセットするだけで自動分析可能で、再現性や解析精度が高く有用なシステムである。また、解析プログラムを用いることで各ローカスの分析結果からコピー数への換算も非常に容易になった。高価な自動 DNA シークエンサーの利用ということが前提になるが、本システムの導入により、精度の高い型別データベースの構築が可能になる。今回さらに、マイクロチップ電気泳動装置で利用できる解析プログラムを作

成したことで、このような電気泳動装置があれば、シークエンサーを使わなくとも結核菌の VNTR 解析に利用可能となった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Maeda S, Wada T, Iwamoto T, Murase Y, Mitarai S, Sugawara I, Kato S: The Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* isolated from whole Japan: phylogeny and genetic features. Int J Tuberc Lung Dis. 2010, 14: 1201-1204
- (2) Kang HY, Wada T, Iwamoto T, Maeda S, Murase Y, Kato S, Kim HJ, Park YK.: Phylogeographical particularity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in South Korea based on international comparison with surrounding countries. J Med Microbiol. 2010, 59: 1191-1197.
- (3) Murase Y, Maeda S, Yamada H, Ohkado A, Chikamatsu K, Mizuno K, Kato S, Mitarai S.: Clonal expansion of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis, Japan. Emerg Infect Dis. 2010, 16: 948-954.
- (4) 青野昭男, 鹿住祐子, 前田伸司, 東由桂, 土屋滋夫, 岩本朋忠, 中永和枝, 早川啓史, 齋藤肇: 結核菌群用同定キットで陽性を示した非結核性抗酸菌について. 結核 2010, 85: 461-464
- (5) 岩井和郎, 前田伸司, 村瀬良朗: 結核菌と結核症の考古学 —その発生から世界流行まで— 結核 2010, 85: 465-475
- (6) 奥村昌夫, 吉山崇, 前田伸司, 鹿住祐子, 東由佳, 上山雅子, 森本耕三, 倉島篤行, 尾形英雄, 工藤翔二: 当院における超多剤耐性結核症 (XDR-TB) の臨床的検討. 結核 2010, 85: 737-742

2. 学会発表

- (1) 前田伸司、和田崇之：アガロース電気泳動上で判別可能なマルチプレックスPCRを用いたVNTR分析. 第85回日本結核病学会総会. 2010年5月, 京都市.
- (2) 和田崇之、團野桂、松本智成、田丸亜貴、門林順子、松本健二、岩本朋忠、吉田志緒美、前田伸司、長谷篤：多発性大規模感染株による多剤耐性化事例について. 第85回日本結核病学会総会. 2010年5月, 京都市.
- (3) 岩本朋忠、吉田志緒美、和田崇之、前田伸司、阿部千代治：遺伝的背景の異なる結核菌北京型株の薬剤耐性獲得の能力の差異に関する検討. 第85回日本結核病学会総会. 2010年5月, 京都市.
- (4) 和田崇之、岩本朋忠、吉田志緒美、前田伸司、長谷篤：マイクロアレイCGH法による本邦由来北京型結核菌のゲノム個性解析. 第85回日本結核病学会総会. 2010年5月, 京都市.
- (5) 和田崇之、三宅由起、加藤仁一、吉田英樹、岩本朋忠、田丸亜貴、松本智成、吉田志緒美、前田伸司、下内昭、長谷篤：多発性大規模感染に関連する結核菌株による集団事例の疫学情報. 第85回日本結核病学会総会. 2010年5月, 京都市.
- (6) 村瀬良朗、大角晃弘、御手洗聡、前田伸司：結核菌遺伝系統別にみた感染伝播への影響. 第85回日本結核病学会総会. 2010年5月, 京都市.
- (7) 藤原永年、前田伸司、吉村満美子、大原直也、前山順一、瀧井猛将、矢野郁也、山本三郎：BCG Tokyo 172 type I, II間の脂質生化学的比較. 第85回日本結核病学会総会. 2010年5月, 京都市.
- (8) 岩本朋忠、藤山理世、白井千香、前田伸司、松本智成、和田崇之、田丸亜貴、吉田志緒美、河上靖登：分子疫学情報の蓄積から示

唆される多発性大規模感染事例の存在とその検証. 第85回日本結核病学会総会. 2010年5月, 京都市.

(9) 田丸亜貴、和田崇之、長谷篤、岩本朋忠、吉田志緒美、前田伸司、松本智成：大阪府における多発性広域感染株について. 第85回日本結核病学会総会. 2010年5月, 京都市.

(10) Shinji Maeda, Takayuki Wada, Yoshiro Murase, Tomotada Iwamoto, Seiya Kato : Standard variable number of tandem repeats (VNTR) system for genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. Infection, Genetics and Evolution: 10th International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases. Nov. 2010; Amsterdam, Netherlands

(11) Takayuki Wada, Tomotada Iwamoto, Shiomi Yoshida, Atsushi Hase, Shinji Maeda : Comprehensive analysis of *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains in Japan: Their evolution, epidemiological characteristics, and genomic comparison. Infection, Genetics and Evolution: 10th International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases. Nov., 2010; Amsterdam, Netherlands

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

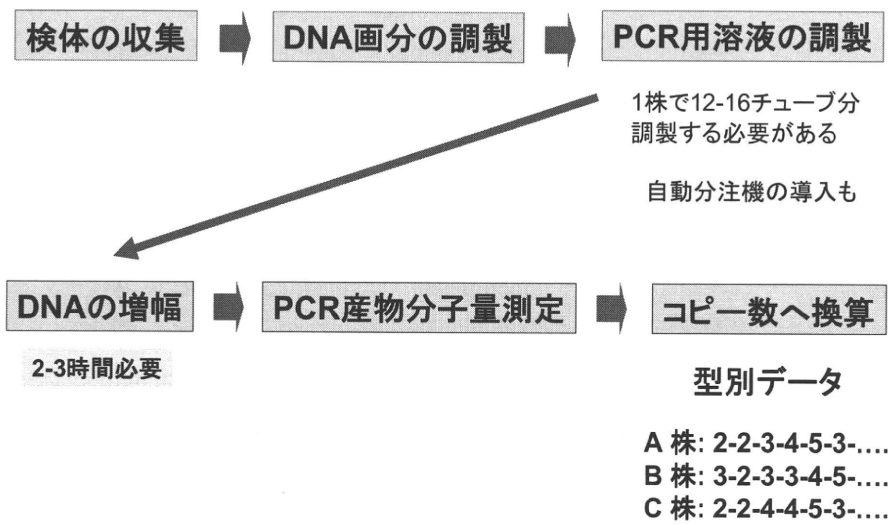


図1. 結核菌のVNTR分析の流れ



図2. マイクロチップ電気泳動装置を用いたVNTR解析プログラム

日本版 DOTS の技術強化

研究分担者

小林典子 結核予防会結核研究所 対策支援部長

研究要旨

結核患者の治療における日本版 DOTS を良質にかつ広範に普及させる方法として開発した「結核看護システム」を活用し、コホート分析をひとつの指標として看護サービスの評価・分析を行った。国の新システムは治療成績評価に重点を置いているのに対して、「結核看護システム」では患者支援と治療成績の関連を見ることを重視している点で、現場では両者が相補う関係にある。

平成 22 年度は治療終了後の再発に関する現状およびコホート判定の妥当性の分析を通して、日本版 DOTS の核心である患者支援や教育の対象・時期について具体的な示唆を得ることができ、今後も治療モニタリング・評価を推進するための具体的な道具立てとしての有用性が確認された。今年度の概要は以下のとおりである。

①DOTS 支援のためのツール活用と分析

「結核看護システム」の情報処理を通して、21 年の新登録者患者 667 人のコホート分析を一つ指標とし看護サービスの評価・分析を検討した。

②コホート観察別に見た予後調査の実施と分析

治療終了後 5 年間の年間平均再発率は、「治療成功」0.28%、「治療失敗」1.05%、「脱落中断」2.94%であった。再発は、既往の治療が円滑に行われた場合とそうでない場合で非常に発生頻度に差があり、治療終了後の管理検診や指導が両者一律に行われている現行の方式には問題がみられる。危険性の大きい後者の群に重点的な患者支援や教育が行われるよう考慮される必要がある。

③サーベイランスシステムにおける「治療成功」判定の妥当性の検討

機械的に判定された「治療成功」は判定後の予後がそれ以外よりも明らかに良好で、その意味で判定の妥当性が支持された。『コホート観察』『その他』に関しては、登録時菌陰性者か登録時以降の菌情報が得られないため、「治癒」「治療完了」と判定されなかったケースがほとんどで、予後から見ても「治療成功」と同様に扱いうるものと思われた。

④コホート検討会実施状況アンケート調査

日本版 DOTS 事業の精度保証のためにも質の高いコホート検討会の開催は必須である。本検討の成果として地域 DOTS を円滑に進めるための指針を作成し結核研究所内外の研修で配布した。

⑤DOTS 支援者育成プログラムの作成

結核患者の治療成功を目指した支援を実施するために必要な知識・技術と共に、患者の生活や地域の特性を理解し、尊重した上での服薬支援活動を推進する支援者の意識向上に焦点をあてた DVD を作成した。

研究協力者

森 亨（結核予防会結核研究所名誉所長）
山内祐子（結核予防会結核研究所研究部総括主任）
永田容子（結核予防会結核研究所対策支援部保健看護学科長）

A.研究目的

「結核看護システム」（以下本システム、資料1）は結核治療における患者看護のために開発した電算支援システムである。保健所・医療機関双方がそれぞれのモードで切り替えて独立に使用でき、必要に応じて相互の情報の交換が可能である。「菌検査情報」「使用抗結核薬」「副作用」「服薬情報」「DOTSタイプ」等の治療経過を入院中・外来治療中を通して一画面で一貫して捉えることができ、さらに、看護の視点からのサポートシステムとしての機能を強化するため「薬剤耐性の有無」「合併症」「DOTS Partners」「服薬支援計画」「リスク評価」等の病状や治療支援に関する項目を追加した。また、コホート検討会・DOTSカンファレンス資料、患者分類コード別・初回服薬情報別・服薬情報割合別コホート観察の3種類の集計表および図表の出力が可能である。

本システムを活用し、コホート分析を一つの指標として看護サービスの評価・分析を行い、服薬支援の成果指標を確立するとともに、DOTSのゴールを見据えた患者支援体制を構築する。

B.研究方法

1) 平成22年度は10自治体23保健所において本システムを活用した。試用は平成21年1月以降の新登録コホートに対して行った。

2) 本システムの先行システムである「服薬支援看護システム」を試行した18自治体63保健所の平成14年～18年登録患者について、治療終了後から平成21年3月までのコホート観察別に見た予後（再発の頻度）を観察した。

3) 本システムにおける「コホート観察」は、国の旧システムの項目・アルゴリズムを基本に展開している。平成19年より国の結核サーベイランスシステムが新しくなり、それに伴って自動設定である「コホート観察」の入力項目やアルゴリズムも大幅に変更された。「コホート観察・その他」の廃止に伴い、「治療成功」判定の妥当性の検討を行った。

4) 服薬支援看護ワークショップに参加した20自治体のうち未実施3箇所を除く17自治体に、コホート検討会実施状況についてアンケートを実施し分析を行った。

5) 服薬支援看護ワークショップを2回開催し、本システムの概要と活用状況、平成21年集計結果報告、結核看護システムからの提言案について討議を行った。

6) 服薬支援者の教材として「服薬支援者の心づくり」を作成した。

7) 参加県市および代表者（研究協力者）は以下のとおりであった。

園部広由喜・武藤章代（茨城県）、松村幸代（石川県）、安守亜樹（板橋区）、西川恵子（愛知県）、梅藤薫（静岡県）、太田公也（和歌山県）、久場香代子（沖縄県）、高野智子（熊本県）、遠藤優子（山形県）、福元淑恵（和歌山市）、御小柴朋子（横浜市）、松尾優子・魚住有希子（船橋市）、水尻節子（神戸市）、平野有紀（岡山市）、林恭子、一色ミユキ（栃木県）、青柳早苗（宇都宮市）、横井敏之（群馬県）、土屋 茜（堺市）、峯田裕子（台東区）、辛島淳子（大分県）、木

村 愛 (埼玉県)、山下益美 (足立区)、澤田明美 (札幌市)

〔倫理面の配慮〕

結核登録者や医療機関への介入、個人情報
の扱いについては、研究遂行の上で、日常
業務の範囲を超える過程は発生しないが、
細心の注意を払った。

C.研究成果

1) 結果

平成 22 年度は資料 2 の 10 自治体 23 保健
所で試行し、結果をコホート検討会および
医療機関への還元資料として活用した。

i) 治療成績

平成 21 年の新登録者総数 (潜在性結核感
染症 ; 以下 LTBI 含む) 667 人 10 都府県市
に対して登録時総合患者分類コード別のコ
ホート観察を示す (資料 3)。菌が陰性の場
合や肺外結核、LTBI の場合はコホート観
察での治療成績判定は必ずしも妥当なものが
確率されているとは言えないが、ここでは
明確な「治療中断」について見ることを主
眼として、他は便宜的な判定を行った。

その結果、新登録肺結核患者総数 594 人
の結果は、治療成功 78.6%(治癒 42.9%、治
療完了 25.8%、その他 9.9%)、死亡 16.5%(結
核死亡 8.9%、結核外死亡 7.6%)、治療失敗
2.2%、脱落中断 1.7%、不明 1.0%であった。
また、肺外結核 63 人の結果は、治療成功
82.5%(治癒 12.7%、治療完了 20.6%、その他
29.2%)、死亡 9.7%(結核死亡 3.2%、結核外
死亡 9.5%)、治療失敗 1.6%、不明 3.2%、LTBI
10 人の結果は治療成功 90%(その他 90%)、
脱落中断 10%であった。

効果的な服薬支援の指標として初回の服
薬情報 DOTS タイプ別の治療成功率 (資料
4) をみると「DOTS(入院中院内 DOTS+外
来治療中地域 DOTS)あり」が 82.7%(474/573)、

「その他」が 57.4%(54/94)であった。

DOTS ((入院中院内 DOTS+外来治療中
地域 DOTS)の割合別治療成功率 (資料 5)
では、DOTS タイプ (入院中院内 DOTS+外
来治療中地域 DOTS) の判定期間内 2/3 以上
では 93.9% (387/412)、2/3 未満は
56.1%(143/255)であった。職業別治療成功率
(資料 6) で低いのは「無職、その他」72.2%
(総数 413)、脱落中断率で高いのは「その
他の臨時雇・日雇」7% (総数 43) であ
った。性・年齢別治療成功率 (資料 7) では「90
歳以上、男性」42.9% (総数 14)、「80 歳代、
女性」63.4% (総数 93) であった。脱落中
断率で高いのは、「50 歳代、男性」8.9% (総
数 45)、「30 歳代、男性」5.7% (総数 35)
であった。

リスク評価別治療成功率 (資料 8) では
「リスクなし」82.5%(151/183)、「リスクあ
り」77.9%(377/484)、そのうち「過去の中断
歴」が一番低く 0%、「アルコール依存」55.6%
(総数 9) であった。脱落中断率で高かつ
たのは、「過去の中断歴」40% (総数 5) であ
った。

合併症名別治療成功率 (資料 9) では「合
併症なし」84.2%(277/329)、「合併症あり」
74.3%(251/338)で低かったのが「アルコール
依存」55.6%、「腎障害」62.5%であった。

2) コホート観察別に見た予後について

i) 調査内容 (資料 10)

本システムから「コホート観察」を行っ
た患者 (最終 19 年 9 月) の名簿を作成し、
システムを試行した保健所に依頼して、治
療終了後からその後 21 年 3 月までの状況を
調査した。

コホート観察では治療開始後 6~9 カ月
時点で治療結果を一定のアルゴリズムで
「治癒」「治療完了」「その他」「治療失敗」
「脱落中断」「不明」等と判定するが、実際

は、その後も主治医の判断により治療を続けている患者が多いと思われる。今回、治療終了後の再発の有無とその時期を調べた。

再発の有無は保健所に再度登録されたか否かで判断し、再発が確認されなかった事例については最後に在住を確認した時期を調査した。例えば転出した事例では転出の時期、その後も再発なく在住している事例については、それを最後に確認した時期とした。

18 自治体 63 保健所の「肺結核」患者コホート（総数 6785 人、治療開始平成 14 年～18 年）の治療結果は、「治療成功」5403 人 79.7%、「死亡」896 人（13.2%）、「治療失敗」151 人（2.2%）、「脱落中断」137 人（2.0%）、「不明」198 人（2.9%）であった（資料 11）。「治療失敗」・「脱落中断」・「不明」とされた 486 人のうち、治療を継続して最終的に治療を終了した 475 人の「治療失敗」「脱落中断」「不明」はそれぞれ 77.2%、61.8%、20.1%であった（資料 12）。このようにして治療が終了したものを分析の対象としたが、これらの患者はこの時点ですでに再発とは違った意味での予後不良の問題を持っていることが知られる。

分析の対象者の登録時の病状をコホート観察による治療結果別にみると、[治療成功]群に比べて「脱落・失敗」群には当初から菌陽性のものの割合が高く、菌陰性その他のものは少なかった（資料 13）。

ii) 予後調査結果（資料 14）

治療成績が「治療成功」であった 2004 人の治療終了後の現在の状況は、「生存」1605 人（80.1%）、「再発」18 人（0.9%）であった。「治療失敗」と判定されたなかからその後治療終了となった 112 人の現在の状況は、「生存」81 人（72.3%）、「再発」5 人（4.5%）であった。「脱落中断」と判定された中から、

その後治療終了となった 81 人の現在の状況は「生存」54 人（66.6%）、「再発」3 人（3.7%）。「不明」と判定された中から、その後治療終了となった 40 人の現在の状況は「生存」32 人（80%）、「再発」1 人（2.5%）であった。治療成功群に比して、その他の群では再発が多い傾向があったが、各群によって観察期間の分布が異なることを考慮していない。

iii) 治療結果別にみた累積再発率の経過（資料 15）

調査の目的とする「再発」の発生頻度やその時間的分布を明らかにするためには、すべての対象者について観察開始から観察打ち切りまでの期間を考慮し、その中で再発がどのような頻度で発生したかを追跡し、それによって一定時期までの累積再発率や一定期間内の再発率を求める必要がある。この目的のもとに、今回は統計ソフト STATA によって生命表分析を行った。この分析では、治療成功群と脱落・失敗群とについて観察開始時期から時間とともに再発がどのように発生していくかを見た。あきらかに脱落・失敗群で再発が多く、治療終了後から終了後 3 年、4 年という時期になってもまだ発生することがうかがわれた。治療成功群では、治療終了後 3 年を過ぎるとほとんど再発がなかった。

iv) 治療結果別に見た治療終了後の累積再発率（資料 16）

治療終了後 5 年間の累積再発率は、成功群 1.39%に比し、失敗・脱落群は 8.31%に達した。治療失敗と脱落を分けてみると、脱落群のほうがさらに再発が多い傾向であった。

vii) 治療結果別に見た治療終了後の年間再発率（資料 17）

治療終了後、各 1 年ごとに再発の確率の

変化を見た。治療成功では3年間ほとんど再発率に変化がなく、4年目は低下する傾向が見られた。治療失敗および脱落中断群では例数が少ないためばらつきがあったが、4年後も10.52%の再発が見られた。

viii) 治療結果別にみた治療終了後5年間の年間平均再発率は、「治療成功」0.28%、「治療失敗」1.05%、「脱落中断」2.94%であった。それぞれの信頼区間は表(資料18)の通りである。

3) サーベイランスシステムにおける「治療成功」判定の妥当性の検討

i) 18自治体63保健所において、本システムから『コホート観察』別に患者の名簿を作成し、それらの患者の治療終了までの経過を個別に調査した。『コホート観察』『その他』に関しては、そう分類されるに至った要因と考えられる事項も併せて記入してもらった。

ii) 調査対象となる本システムの治療結果(資料19)

18自治体63保健所の「肺結核」患者コホート(総数6785人、治療開始平成14年～18年)の治療結果は、「治療成功」79.7%、「死亡」13.2%、「治療失敗」2.2%、「脱落中断」2.0%、「不明」2.9%であった。

iii) 『コホート観察』別の治療経過(資料20)では、「治癒」と判定された患者890人中、その後主治医による治療終了の指示がだされたことが確認された者は861人(96.7%)であった。「治療完了」で714人のうち687人(96.2%)、「その他」では582人のうち542人(93.1%)であった。「治療失敗」では145人のうち112人(77.2%)、「脱落中断」131人のうち81人(61.8%)、「不明」199人のうち40人(20.1%)であった。「治癒」・「治療完了」・「その他」をあわせた「治療成功」では96.5%、それ以外

では49.1%であった($p=0.000$)。「コホート観察：その他」の実情(資料21)では、「その他」の要因としてあげられたのは、治療は完了しているが菌検査未実施・未把握であった。治療開始時菌陰性のため、その後菌検査を実施しなかった例が多くみられた。

4) コホート検討会実施状況

20自治体のうち未実施3箇所を除く17自治体の実施状況は、評価に用いる患者の基本的データの作成方法によって大きく3つのタイプに分類できた。①「服薬看護支援ワークショップ」で開発した「結核看護システム」の帳票や図表を活用：コホート分析や服薬支援の情報も併せて検討され、グラフ等での分析も加えられていた。一般に対象者規模が小さく、また年間開催回数も少数の傾向が見られた。②国の結核登録者情報システムからの資料を活用：罹患率や管理図等が資料として用いられ、事例の報告、個別事例検討や確認、保健師の問題点などの検討や職員のスキルアップ等、保健師の動きをみるなどの傾向が見られた。③独自に作成した資料を活用：日常業務の情報漏れのチェックの場として実施回数や頻度も多く行われていた。上記のタイプを組み合わせている地域もあった。

今後の課題として、医療機関への還元をあげた保健所が多かった。

5) 服薬支援看護ワークショップ

22年度は2回実施した。第1回(22年12月6日)は、『結核看護システム』の概要と活用状況について討議した。地域DOTSの提供施設や方法を明らかにする医療機関連携基礎調査、および地域DOTSのタイプを決める際に重要なリスクの妥当性に関するリスク評価調査の実施について協議した。現在、調査を終了し、入力作業中である。また、服薬支援の成果指標の設定

および評価、治療成績の目標設定のための再検討、患者支援体制の構築について意見交換をおこなった。第2回目は23年3月1日に実施し、平成21年集計結果報告、結核看護システムからの提言案について討議を行った。

6) 服薬支援者育成のための教材として、「服薬支援者の心づくり」のDVDを作成した。結核患者の治療成功を目指した支援を実施するために必要な知識・技術と共に、患者の生活や地域の特性を理解し、尊重した上での服薬支援活動を推進する支援者の意識や経験で培われる考え方の部分を強化した内容とした。

D. 考察

1) 本システムでは、入力作業の簡略化と情報の精度管理のために、必要最小限の入力項目に絞っている。また、地域連携の円滑な推進を図るため、保健所・医療機関が共に使えるDOTSカンファレンスおよびコホート検討会資料を出力可能である。コホート観察」をひとつの指標として、新たな結核看護サービスの評価・分析を検討していき、このシステムの情報処理を通して、多様なニーズをもった患者支援とDOTSの質的向上を目指していきたい。

2) 再発は、既往の治療が円滑に行われた場合とそうでない場合で非常に発生頻度に差があったことから、治療終了後の管理検診や指導が一律に行われている現行の方式の再考が必要である。副作用等で治療の継続が円滑に進まない患者では再発の危険性が高くなることから、重点的な患者支援や教育が必要であり、特に初回治療時の服薬支援の強化の重要性が示唆された。本システムでは、「治療失敗」「脱落中断」を防止する視点で治療終了まで経過を追うことが

可能であるが、今回の結果を踏まえ、「予後」の視点をさらに追加したい。

3) 国の旧システムにおける「コホート観察」では、治療開始後6/9ヶ月時点で治療結果を一定のアルゴリズムで判定するが、多くの患者はその後にも主治医の判断により治療を続けていることが確認された。その理由は、主治医が規定の6/9ヶ月で治療を終了することに不安を感じたこと、治療を延長せざるを得ない条件があった可能性がある。しかし最終的な治療指示終了に至った割合や終了までの期間から見ても、「コホート観察」基準で判定された「治療成功」は判定後の予後がそれ以外よりも明らかに良好であり、判定の妥当性が支持された。

「コホート観察：その他」に関しては、登録時菌陰性者か登録時以降の菌情報が得られないため、「治癒」「治療完了」と判定されなかったケースがほとんどで、予後から見ても「治療成功」と同様に扱いうるものと思われた。

4) 「コホート検討会」は単に治療経過や治療成績、菌検査の確認、個々の対応困難な事例検討にとどまらず、患者を一つの集団として見た場合の地域全体の服薬支援活動の評価、結核医療の問題や地域連携体制の在り方などの検討が含まれる。「DOTSカンファレンス」は個々の患者に対する取り組みを検討するもので、これらのもとになる患者の治療経過情報の収集（受療状況、服薬情報さらに菌検査成績）や入力も保健所の重要な役割である。DOTSカンファレンス時に自動的に出せる資料を持参している保健所も多くみられた。日本版DOTS事業の精度保証のためにも質の高いコホート検討会の開催は必須である。本検討の成果として地域DOTSを円滑に進めるための指針を作成し結核研究所内外の研修で配布した。

5) ワークショップでは、本システムを活用している保健所だけでなく、服薬支援に積極的に取り組んでいる保健所の参加を積極的に受け入れた。その結果、地域に偏りなく先駆的な活動の把握や意見交換を行うことができた。このワークショップでまとめた意見を国に提言し、DOTS の技術強化と共により充実した使い勝手の良い検索機能を伴ったサーベイランスシステムを通して、

保健師の経験の差に影響を受けない「コホート検討会」「DOTS カンファレンス」の標準化を目指したい。

6) 服薬支援者の教材

服薬支援者の育成は各自治体で独自で取り組まれており、質の高い DOTs を行うためには全国共通の基本的な教材は必須と考えられる。特に DOTs が単なる服薬の確認のみとならないよう、目的を明確に伝える視聴覚教材として作成した。結核看護を伝える一助となることが期待される。

E. 結論

結核看護システムの情報処理を通して、コホート観察を一つの指標とした結核看護サービスの評価・分析を行い、多様なニーズを持った患者支援の質的向上地域 DOTs に係る連携体制の構築を目指したい。

F. 健康危険情報 特になし

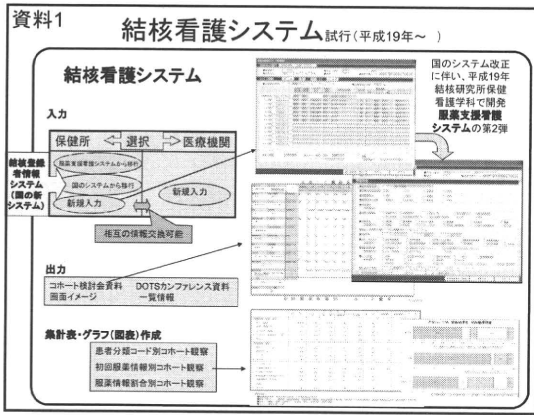
G. 研究発表

山内祐子：結核看護の質の向上をめざし保健師・看護師の結核展望で・・・「コホート観察」による治療・患者支援の評価
Vol.48.168-78 2010

1. 学会発表

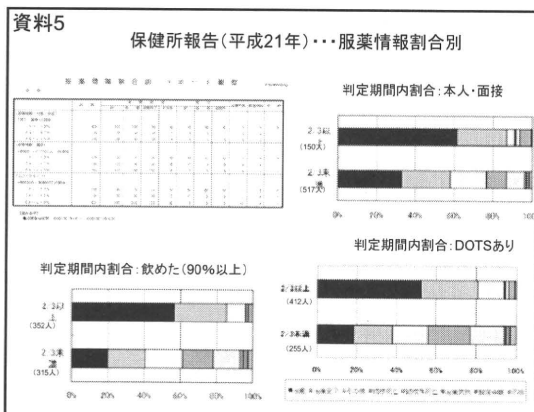
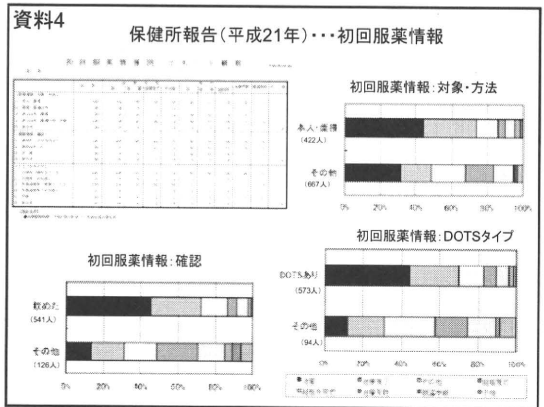
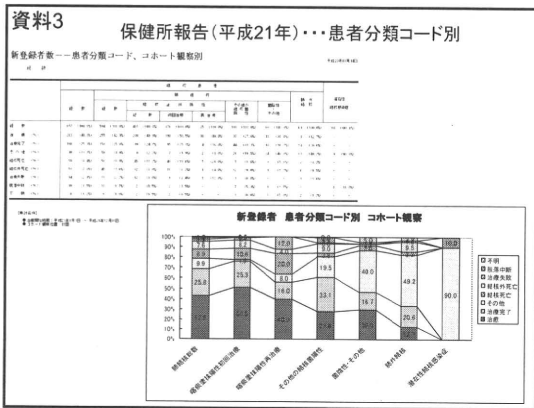
- (1) 山内祐子、永田容子、小林典子、加藤誠也、森 亨：「結核看護システム」・・・Ⅰ：コホート観察別にみた予後について 結核 85(4)：393 2010
- (2) 永田容子、山内祐子、小林典子、加藤誠也、森 亨：「結核看護システム」・・・Ⅱ：保健所・医療機関における活用を通して 結核 85(4)：394 2010
- (3) 小林典子、永田容子、山内祐子、加藤誠也、森 亨：「結核看護システム」・・・Ⅲ：DOTs の質的向上をめざして 結核 85(4)：394 2010
- (4) 山内祐子、永田容子、小林典子、森 亨：結核看護・・・Ⅰ：サーベイランスシステムにおける「治療成功」判定の妥当性の検討 日本公衆衛生学会誌 57(10)：436 2010
- (5) 永田容子、山内祐子、小林典子、森 亨：結核看護・・・Ⅱ：「コホート検討会」の実施状況に関する調査から 日本公衆衛生学会誌 57(10)：436 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし



資料2

県	保健所	対象時期		
		平成19年	平成20年	平成21年
		1月1日~12月31日	1月1日~12月31日	1月1日~12月31日
和歌山	海南、岩出、橋本、津美、御坊、日置、高本、新宮			
東京	板橋区			
石川	南加賀、石川中央、能登北部			
熊本	能登中部			
千葉	人吉			
山形	船橋市			
山形	村山、最上、置賜、庄内			
栃木	鹿野			
群馬	桐生、伊勢崎、館林、前橋市			
群馬	高崎、太田、藤岡、富岡			
大塚	沼田			
大塚	宇都			
岡山	岡山市			
大分	西部			
兵庫	神戸市			



資料6 保健所報告(平成21年)・・・職業別

職業別 コホート観察

職業	人数	判定期間内割合				割合	割合	割合	割合	割合	割合
		本人・面接	飲めた	DOTSあり	その他						
全職業	97,130	12,175	20,150	29,125	34,100	11.7%	20.8%	29.9%	34.6%	11.7%	20.8%
専業主婦	17,100	2,100	3,100	4,100	5,100	12.3%	17.5%	23.4%	28.8%	12.3%	17.5%
専業主夫	1,100	1,100	1,100	1,100	1,100	100%	100%	100%	100%	100%	100%
主婦	1,100	1,100	1,100	1,100	1,100	100%	100%	100%	100%	100%	100%
パート・アルバイト	1,100	1,100	1,100	1,100	1,100	100%	100%	100%	100%	100%	100%
学生	1,100	1,100	1,100	1,100	1,100	100%	100%	100%	100%	100%	100%
無職	1,100	1,100	1,100	1,100	1,100	100%	100%	100%	100%	100%	100%
その他	1,100	1,100	1,100	1,100	1,100	100%	100%	100%	100%	100%	100%

【注】各項目は、平成21年1月1日～平成21年12月31日