

70%で、IL-2 単独と IFN- γ および IL-2 の両者の産生細胞がそれぞれ 15%程度であった。今後、本法を用いた活動性結核患者を含めた、より大規模で詳細な検討が必要と思われる。

HIV-Infected Persons. Fujita A, Ajisawa A, Harada N, et al. Clin Dev Immunol. 2011; 2011. pii: 325295

F. 健康危機情報

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

なし

G. 研究発表

Performance of a Whole-Blood

Interferon-Gamma Release Assay with

Mycobacterium RD1-Specific Antigens among

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

Subjects	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-10	0	11	3	0	2	3	0	2	0	18	13	814
LTBI-11	0	0	3	/	2	0		1	1	19	0	309
LTBI-12	0	0	13	/	1	0		0	0	9	0	369

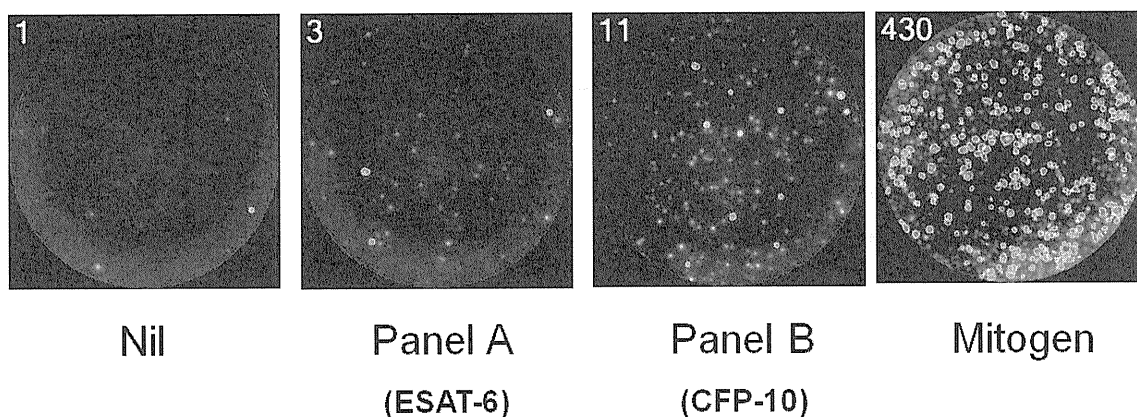


図 1. Fluorospot のイメージ

IFN- γ と IL-2 産生の画像を合成した画像であり、IFN- γ 産生 T 細胞は緑色、IL-2 産生 T 細胞は赤色、両者産生 T 細胞（サークルで囲まれたスポット）は黄色で示される。

表 2. 潜在性結核感染者における各サイトカイン産生 T 細胞亜集団の比率

ID	IFN- γ only		IFN- γ /IL-2		IL-2 only	
	E	C	E	C	E	C
2	11 (84.6%)	4 (100%)	1 (7.7%)	0 (0%)	1 (7.7%)	0 (0%)
3	23 (95.8%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4.2%)	0 (0%)
4	69 (68.3%)	11 (25.6%)	16 (15.8%)	7 (16.3%)	16 (15.8%)	25 (58.1%)
5	14 (73.7%)	0	4 (21.0%)	0	1 (5.3%)	0
6	20 (80.0%)	99 (79.2%)	2 (8.0%)	11 (8.8%)	3 (12.0%)	15 (12.0%)
7	48 (76.2%)	9 (75.0%)	6 (9.5%)	1 (8.3%)	9 (14.3%)	2 (16.7%)
8	14 (58.3%)	0	5 (20.8%)	0	5 (20.8%)	0
9	10 (47.6%)	1 (100%)	5 (23.8%)	0 (0%)	6 (28.6%)	0 (0%)
11	9 (36.0%)	4 (44.4%)	7 (28.0%)	1 (11.1%)	9 (36.0%)	4 (44.4%)
12	9 (81.8%)	11 (68.8%)	1 (9.1%)	3 (18.8%)	1 (9.1%)	2 (12.5%)
16	15 (57.7%)	25 (75.8%)	5 (19.2%)	3 (9.1%)	6 (23.1%)	5 (15.2%)

潜在性結核感染者 11 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 only)、effector-memory T 細胞 (IFN- γ /IL-2) および central memory T 細胞 (IL-2 only) の応答。

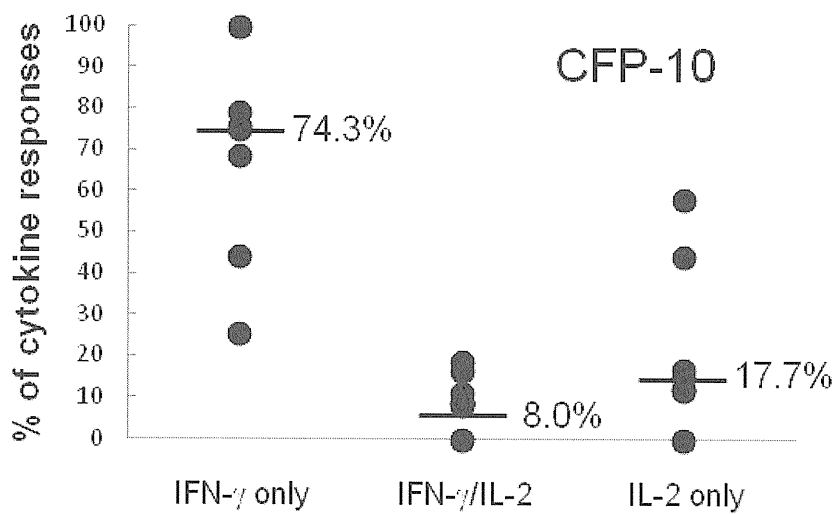
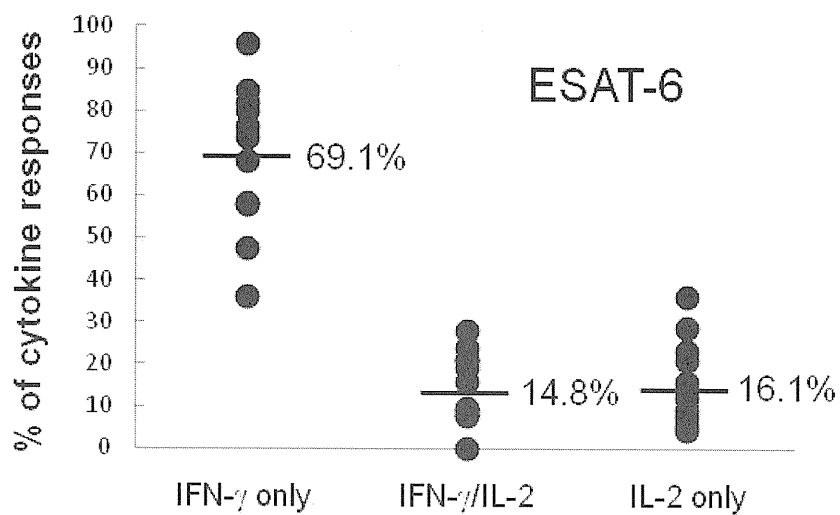


図 2. 表 1 の数値をグラフ化した図。横線は、それぞれの平均値を表す。

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。

初年度（2009）は二種の混合結核菌の比率を VNTR アリルプロファイルによりリアルタイム PCR を用いて定量する方法を検討した。二年度（2010）は迅速比率定量系について継続して検討した。また THP-1 細胞を phorbol myristate acetate (PMA) 及び IFN-gamma で活性化し、*M. tuberculosis* H37Rv と臨床分離株を競合感染させて比率を評価する方法について検討した。三年度（2011）は競合感染実験系を簡素化し、さらに非病原性株や大規模集団感染株を使用して疫学的状況と競合感染性の相関について検討した。

結果として、THP-1 細胞を PMA で活性化し、評価対象とする臨床分離結核菌を H37Rv と等量混合して MOI 1 で活性化 THP-1 細胞と感染させ、0-5 日間共培養し、回収して CFU をカウントし、混合した結核菌の混合率を VNTR アリルプロファイルの違いから算出する評価系を確立した。0-72 h 及び 0-120 h の時間間隔での混合比率の変化が広域分離臨床結核菌株のクラスターサイズと相関することを確認し、さらに大規模な集団感染株が同じ評価系で「強毒性」と評価されることを確認した。これは一般的な疫学的概念に相応する毒力差を表現していると考えられた。実験系の欠点としての相対比率測定にかかる時間（培養時間）の短縮についての技術開発は、目的の精度が得られなかった。別の方法を検討中である。今後は、接触者健診などの対策に必要なカットオフ値の設定などの検討が必要と考えられた。

迅速薬剤感受性検査については、雑菌処理（NALC-NaOH）した検体を直接培養しながら感受性検査を実施する MODS (Microscopic Observatory Drug Susceptibility) の検証を行った。結果として、少なくとも Isoniazid と Rifampicin、Streptomycin については検体採取後 1-2 週間で高精度に培養・感受性検査結果が得られることが示された。さらに塗抹陽性検体以外に塗抹陰性検体でも実施可能であることが示され、今後直接感受性検査の再評価が必要と考えられた。

A. 研究目的

ヒト宿主に対する結核菌の病原性は明確であるが、結核菌は種としてほぼ単相であるため、種より下の株のレベルでの病原性あるいは毒性の識別が

困難である。しかしながら、実際に *M. bovis* BCG や *M. tuberculosis* H37Ra のように同じ種 (species) にあっても病原性・毒性の程度が異なる株があることはよく知られている。実際に疫学的にみても、同じ「結

核菌」でありながら、大規模な集団感染を惹起する株がある一方、同居家族内でさえ伝搬しない株もある。これらの違いは単純に接触の程度や時間だけでは説明できない。

近年、株レベルで結核菌を識別する分子疫学的ツールの開発が進んでおり、特に核酸増幅法を基礎とした VNTR や SNPs 解析の系統解析・集団分子疫学解析双方での有用性が示されている。これらの方法を使用すれば従来よりも高速に異なる結核菌株の識別が可能であり、従来の培養を基礎とする方法では考えられなかった結核対策上の方法を考えることが可能になった。

結核の感染や発病は宿主の免疫状態に強く影響されることは自明であるが、結核菌側の因子は上記のような「単相性」や「培養時間」の問題からあまり評価されていなかった。そこで、分子生物学的な方法や疫学的な情報を利用し、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を株レベルで判断するための方法を開発することを主目的として研究を行った。

もうひとつの目標として、病原性因子の一つである「薬剤耐性」を迅速に評価する試験系の検討も行った。これは Microscopic Observatory Drug Susceptibility (MODS) と呼ばれる方法であり、培養と感受性試験を同時に実施し、発育を顕微鏡下で観察するため、競合感染実験の評価にも応用できる可能性がある。

B. 研究方法

[仮説の設定]

今回の研究では、まず「毒力」自体を定義する必要がある。一般に結核菌の毒力を評価しようとする場合、マウスなどの感受性のある動物に結核菌を感染させ、感染巣の菌数がどのように変化するか、生存期間はどれくらいか、といった情報を収集すると思われる。しかしながら、これは少なくとも二つの点で問題がある。ひとつは対象がヒトでないという点、また一般に使用される動物種が免疫不全であるという点である。ヒトに対する毒力を評価しようとするのであれば、対象はヒトであることが望まし

い。しかしながら、当然ヒトを対象に感染実験は実施不可能であるし、結果を得るまでに時間がかかりすぎる。また個々の個体の免疫的特徴によるバイアスも回避しなければならない。従って、疫学的に広範な個体（ヒト）から収集した情報を基礎とする方法を考える必要がある。

上記の制約から、結核菌の毒力を次のように考える。個々の結核菌株あるいは系統は、それぞれ細胞への接着性、侵入力、免疫的攻撃からの回避特性、増殖速度、組織親和性などが異なると思われるが、これら全てを時間的経過も併せて「感染→（潜在）→増殖→伝搬」での毒力と考えれば、過去の感染者から多く分離される結核菌は、毒力が相対的に強いと考えられる。さらに日本の場合、過去の高蔓延期において重感染を起こしていると思われる個人も多いと考えられるので、相対的に毒力の強い株が生存 (survive) しているものと思われる。

[評価方法上の要求]

上記のような仮定から、毒力を評価するにあたっては少なくとも細胞への感染と増殖を評価する系が必要である。ただし実際に応用する際の簡便性などを考えると、動物を対象とした場合、前述のような理由も併せて適切性がない。また、系の絶対性は、評価法の安定性と汎用性を考慮し、これを避ける必要があると考えられた。

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。

上記の方法を応用し、今回の研究では *M. tuberculosis* H37Rv を相対基準として、広範な地域から分離され、かつある程度の集団 (クラスター) を形成する臨床分離結核菌の相対的感染力を *ex vivo/in*

vitro での競合感染実験により評価する事とした。

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 (VNTR)を用いて定量的に評価する。評価系のデータとしては、混合して感染させた二種の結核菌の比率の変化が得られる。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。

もうひとつ、この評価系が実際に有用であるための要求がある。目的にも示したように、培養を基礎とする方法では結核菌の発育時間に依存するので、迅速な対策に応用できない。競合感染評価自体に1週間、菌液調製に1-2週間かかることを考えると、コロニー数をカウントする方法以外を考える必要がある。そこで、結核菌の遺伝子タイピングにも使用している VNTR のアレルプロファイルの違いを利用して、相対的な結核菌の比率を算出する方法を検討した。

[細胞内競合感染による結核菌毒力評価]

最終的な実験方法は以下の様になった。

1. THP-1 細胞を RPMI 1640+10% FBS にて培養し、 2×10^5 /ml 程度に調製する。
2. 24 ウェルのマイクロプレートに 2ml ずつ分注する。
3. THP-1 細胞を 100nM の phorbol myristate acetate (PMA)存在下で3日間培養する。
4. 細胞が接着していることを確認する。
5. Binding medium (138mM NaCl, 8.1mM Na_2HPO_4 , 1.5mM KH_2PO_4 , 2.7mM KCl, 0.6mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 5.5mM D-glucose)2ml で2回洗滌する。3回目に2ml 加える。
6. 細胞の接着を確認する。
7. プレート一枚を 0.25%トリプシンで 37°C、30分間処理し、細胞数を確認する。
8. H37Rv と臨床分離結核菌株を基本的に Middlebrook7H9/OADC+Tween80 培地にて振盪

しながら OD 1.0 まで培養し、5.0 μm 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。

9. 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 細胞と混合する。37°Cで3時間培養する。
10. 接着していない結核菌を Binding medium で1回洗滌して除去する。
11. 新しいRPMI-1640+10% FBS 培地を2ml 加える。
12. CO_2 5%存在下で37°Cで培養する。
13. 0 (3h)、1、3、5 日目に4 ウェルずつ培地を除去し、0.1%SDS 2ml で細胞を融解し、7H9 培地で 10^2 , 10^4 , 10^6 希釈液を作製し、100 μl ずつ 7H10+OADC プレートで培養して菌量を測定する。
14. 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する。

基準結核菌である 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。さらに非病原性とされる H37Ra と大規模集団感染株も使用した。

[Real-Time PCR を用いた結核菌比定量系]

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 $\text{Ma}(t)$ 及び $\text{Mb}(t)$ 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。

Real-time PCR から得られる情報としての Ct 値について、Ct₁: Locus 1 の Ct 値、Ct₂: Locus 2 の Ct 値とする。これにより、

$$\text{Ma(t)/Mb(t)} = \frac{[d \cdot 10^{-(e_1 \cdot \text{Ct}_1 + f_1)} - b \cdot 10^{-(e_2 \cdot \text{Ct}_2 + f_2)}] / [a \cdot 10^{-(e_2 \cdot \text{Ct}_2 + f_2)} - c \cdot 10^{-(e_1 \cdot \text{Ct}_1 + f_1)}]}{1}$$

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。

[MODS による迅速感受性試験]

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。Middlebrook 7H9+OADC で作成した液体培地を 24 穴培養プレートに分注し、そのうちの 4 穴をコントロール、残りの 20 穴を抗結核薬 4 種 (Isoniazid: INH、Rifampicin: RFP、Ethambutol: EB、Streptomycin: SM) 入りの培地とした。各薬剤は 2 倍希釈で 5 段階の希釈系列を作成した。薬剤濃度の評価には精度管理用結核菌 39 株を使用し、各検体を McFarland 0.5 の懸濁液にして、10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ の 3 濃度に希釈し、各培養プレートに接種した。結果判定までの時間及び、最小発育阻止濃度の判定を実施した。なお薬剤感受性検査結果は Lewenstein-Jensen 培地の結果と比較検討した。また、同様の系で活動性結核患者の喀痰 39 検体を評価した。通常の NALC-NaOH 雑菌処理・遠心集菌 (3,000 g, 20 min) 後の検体を 1~100 倍希釈して、希釈検体毎に各培養プレートに接種した。結果判定までの時間、及び最小発育阻止濃度の判定を実施した。なお薬剤感受性結果は Lewenstein-Jensen 培地を使用した比率法の結果と比較検討した。

C. 結果

[細胞内競合感染による結核菌毒力評価の検討]

H37Rv と臨床分離株を同数同時に活性化 THP-1

細胞に感染させ、一定時間後の比率の変化を測定する競合感染実験系を確立した。この実験系において、広域分離クラスター形成株を評価したところ、クラスターサイズと H37Rv に対する最終的な競合感染力 (H37Rv に対する競争増殖) に 0-72/120 h の時間範囲での比率変化で R²=0.486~0.779 の相関が認められた。また同一の系で非病原性 *M. tuberculosis* H37Ra と大規模集団感染株を評価したところ、クラスターサイズがわからないので適切な X 軸上の位置は不明なものの、比率変化では被検菌中 H37Ra が最も競合力が弱く、集団感染株が最も競合力が強いという、疫学的な状況との相関が認められた。

[Real-Time PCR を用いた結核菌比定量系の検討]

MIRU31、VNTR3336、VNTR2163a、QUB18、MIRU26、VNTR 2163b、VNTR 2074、VNTR 4156 の各ローカスを用いてコピー数の違いを基にした TaqMan PCR による比率の定量を試みた。いくつかの試薬・条件を試行したが、二種の結核菌の比率を正確に測定できる系は確立できなかった。

[MODS による迅速感受性試験]

標準菌株での結果判定までの時間は 10⁻¹ 希釈の検体で 4.23 日、10⁻² 希釈では 4.79 日、10⁻³ 希釈では 6.31 日であった。薬剤感受性検査は INH で 0.8 µg/ml で最も検出力が高く、感度 0.960、特異度 0.929 一致率は 0.949、kappa 指数は 0.889 だった。RFP は濃度に関わらず高い検出力を認めたが、2.0 µg/ml の濃度で最も高く、感度 1.000、特異度 0.955、一致率 0.974、kappa 指数 0.948 であった。また EB はいずれの濃度でも判定が困難で、SM も EB と同様の結果であった。

臨床検体での結果判定までの時間は、無希釈の検体で 9.03 日、10 倍希釈では 9.82 日、100 倍希釈では 11.63 日であった。無希釈の検体での培養陽性率は 92.3%、汚染率は 0% であった。また L-J 培地での感受性検査法と比較して INH は 0.8 µg/ml で最も精度が高く、感度 0.889、特異度 0.933 一致率は 0.923、kappa 指数は 0.791 だった。RFP は濃度に関わらず高い検出力を認め、感度 0.883、特異度 0.939、一致

率 0.923、kappa 指数は 0.723 であった。また、SM は 2.0 µg/ml あるいは 4.0 µg/ml で精度が高く、感度 0.8、特異度 0.966、一致率 0.923、Kappa 指数は 0.791 であった。EB はいずれの濃度でも判定が困難であり、適切な精度が得られなかった。

D. 考察

PMA 活性化 THP-1 細胞を使用して二種の結核菌を競合感染させ、一定時間後の混合比率変化を測定する毒力評価法を確立した。この方法により、広域での結核菌の疫学的分離状況が試験管内検査に反映されうること示した。また非病原性株と集団感染株が同一の系で疫学的に適切と思われる位置に評価されることも示した。結核菌の毒力を推定する方法として利用可能であると考えられ、結核対策に応用可能と考えられた。今後は、広域あるいは発病率の高い感染を引き起こす結核菌株の推定における閾値の設定などが必要と考えられた。また、今回の方法は H37Rv を基準とする特殊な相対性評価であり、さらに一般化することが必要かも知れない。

上記の方法を対策に使用するに当たって、比率の変化を迅速に算出する必要がある。このため VNTR アリルプロファイルとリアルタイム PCR を用いた比率定量法を試行したが、実際に利用可能な精度を得ることができなかった。これは VNTR ローカス毎の増幅効率が一定でないことによるものであり、別の方法が必要と考えられる。具体的には SNPs に基づくパイロシーケンシングなどが比率定量法として考えられるが、個々の感染事例（個々の臨床分離株）に迅速に対応できるかが問題となる。

MODS については、耐性既知の結核菌株を用いた評価及び臨床検体による評価を行い、1-2 週間で少なくとも INH、RFP、SM については高精度に感受性検査を実施できることを示した。また分担研究者の知る限り、塗抹陰性検体でも実施可能なことを世界で初めて示した。日本の検査ガイドラインでは推奨されていないものの、今後は直接感受性検査法の再評価が必要と考えられた。

E. 結論

PMA 活性化 THP-1 細胞を使用した結核菌競合感染による *in vitro* 毒力評価系を確立し、全国から収集した臨床分離株によって、クラスターサイズと相対毒力の相関を示した。また非病原性株と集団感染株を使用した評価を実施し、一般的な疫学的概念に相応する毒力差を確認した。

実験系の欠点としての相対比率測定にかかる時間（培養時間）の短縮についての技術開発は、目的の精度が得られなかった。

疫学的状況を反映しうる比較的簡易な毒力評価系が確立した。今後は、接触者健診などの対策に必要なカットオフ値の設定などの検討が必要と考えられた。

MODS について、少なくとも INH、RFP、SM における臨床的有用性が示された。

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

西山裕之、青野昭男、菅本鉄広、近松絹代、水野和重、山田博之、御手洗聡. Microscopic Observation Drug-Susceptibility assay (MODS)による薬剤感受性検査の精度評価. 第86回日本結核病学会総会 東京 2011年6月2-3日

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と改良

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

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 箇所の変異 DNA を調べる Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTR システムおよび JATA(12)に 4 ローサイ追加した JATA(16)-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 16 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。また、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 を用いた結核菌反復配列多型 (VNTR) 解析システムを構築した。このシステムは、JATA(12)-VNTR だけではなく、識別能を上昇させるために日本国内でのハイパーバリエブルのローサイ及び国際標準法として Supply(15)-VNTR 解析システムにも対応できるローサイを加えて、合計 24 ローサイのフラグメント解析用のシステムである。マルチプレックス PCR の利用により、これら 24 ローサイが 6 反応液 (チューブ) で分析可能となり、反応チューブ数の削減、反応液調整段階における省力化が可能となった。

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 (16) -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ることにより、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、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。また、VNTR 解析の識別能の向上、国際標準法に対応した自動シーケンサーと GeneMapper プログラムを利用したフラグメント解析のシステムを構築した。本システムは 4 ローサイのマルチプレックス PCR 法を利用することで、24 ローサイを 6 本のチューブで解析できる。

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に組合せとした。

・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。

・蛍光標識プライマー：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。

・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、1200 LIZ 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

1) マルチプレックス PCR 分析

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。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。その後、ゲルを EtBr 染色して存在する DNA を検出した。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 (図 1)。

2) 自動シークエ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 シークエンサーによるフラグメント解析は内部標準マーカとして 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。組合せとして 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) ; SET5 : VNTR3232, MIRU-16, MIRU-4, VNTR3820 ; SET6 : VNTR3690, VNTR2401, ETR-C, MIRU-40 とした (図 2)。

実際に結核菌の型別に利用したところ問題なく各ピークが検出され GeneMapper でコピー数への換算も可能だった。

3) 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

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が必須である。この目的のために昨年開発した解析用プログラムを、使い易く修正するために問題点を明らかにした。これらを踏まえて“結核菌株判別ソフトウェア(オプション機能版)”を作成した。

D. 考察

電気泳動後 UV 照射によって発する蛍光 (あらかじめ標識しておいたプライマー由来の蛍光) を検出することによって A グループのローカスの PCR 産物が特定可能であることが確認できた。これら A グループの位置を記録した後、通常通り EtBr で染色することによって、A 及び B の両グループ由来の PCR 産物が検出可能であった。

また、本法を利用するにあたって、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。

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。また、さらに電気泳動に必要なレーン数を半分に抑えることができた。

日本国内結核菌を高識別能及び国際標準法に対応したローサイを分析するならば、1株あたり24本のPCRチューブを準備し分析する必要がある。しかし、フラグメント解析用のマルチプレックスPCRでは、6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24チューブ必要なら1度に4検体しか扱えないが、1株6チューブなら16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。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シーケ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、精度の高い型別が可能となった。

6本のマルチプレックスPCRの組合せ(SET1からSET6)を作成したことで、集団感染か否かの判定の判別等に利用できるJATA(12)-VNTRならSET1からSET3、人口ベースの結核菌全数分析に利用できるJATA(16)-VNTRならSET1からSET4で対応できる。さらに、識別能が必要ならハイパーバリアブルの2箇所を加えてSET1からSET5、国際標準法のSupply(15)-VNTRにも対応できる様にするならSET1からSET6の6本すべてを分析すれば良いことになる。このように本VNTR解析システムは、分析の目的に応じてローサイの選択が可能である。

キャピラリー電気泳動やマイクロチップ電気泳動装置での分析結果の解析に利用できるプログラムを修正することで、PCR産物の分子量からコピー数への換算が、さらに迅速・正確にできるようになった。

E. 結論

蛍光標識プライマーを用いたアガロースゲル電気泳動での型別法は、新たに必要な機械はなく、通常の電気泳動システムさえあれば導入が容易なシステムである。マルチプレックス化により、調製時間の短縮および試薬量の削減が可能である。また、自動シーケンサーを用いたフラグメント解析システムは、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24本から6本へ)、反応液調製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シーケンサーは、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産物を希釈してセットするだけで分析可能で、再現性や解析精度が高く有用なシステムである。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 前田伸司、村瀬良朗：結核菌の反復配列多型(VNTR)標準分析法の確立と型別情報データベースの構築：第84回日本結核病学会総会、ミニシンポジウム、結核菌分子疫学の展望. 2009, 84: 784-786.

(2) 和田崇之、前田伸司：北京株. 保健師・看護師の結核展望. 2009, 47. 86-89.

(3) 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

(4) 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.

(5) 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.

(6) 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

(7) 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

(8) 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

(9) Morimoto K, Kazumi Y, Maeda S, Yoshimori K, Yoshiyama T, Ogata H, Kurashima A, Kudoh S. *Mycobacterium heckeshornense* lung infection that was diagnosed as *Mycobacterium xenopi* disease by DNA-DNA hybridization (DDH). Intern Med. 2011; 50: 1251-1253.

(10) Sekiguchi J, Disratthakit A, Maeda S, Doi N. Characteristic resistance mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* to DC-159a, a new respiratory quinolone. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(8):3958-60.

(11) Hibiya K, Tateyama M, Teruya H, Nakamura H, Tasato D, Kazumi Y, Hirayasu T, Tamaki Y, Haranaga S, Higa F, Maeda S, Fujita J. Immunopathological characteristics of immune reconstitution inflammatory syndrome caused by *Mycobacterium parascrofulaceum* infection in a patient with AIDS. Pathol Res Pract. 2011; 207: 262-270.

(12) 和田崇之、前田伸司：ゲノム配列にもとづく結核菌群の発生と進化の理解 特集結核菌と結核を巡る新たな知見。化学療法の領域 2011, 27: 1425-1431.

2. 学会発表

(1) 前田伸司、村瀬良朗：結核菌の反復配列多型（VNTR）標準分析法の確立と型別情報データベースの構築：第84回日本結核病学会総会、ミニシンポジウム、結核菌分子疫学の展望。第84回日本結核病学会総会。2009年7月、札幌市。

(2) 和田崇之、前田伸司、岩本朋忠、長谷篤：地域的に限定されないVNTR型別結核菌の同定と広範的分子疫学へのアプローチ。第84回日本結核病学会総会。2009年7月、札幌市。

(3) 大角晃弘、村瀬良朗、森正明、長谷川直樹、大塚吾郎、長嶺路子、前田秀雄、内村和広、大森正子、山田紀男、前田伸司、加藤誠也、森亨、石川信克：首都圏におけるストレプトマイシン耐性結核菌M株の伝搬状況。第84回日本結核病学会総会。2009年7月、札幌市。

(4) Wada T., Iwamoto T., Yoshida S., Maeda S., Hase A. : Mutation mapping of evolutionary-sequential *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains using comparative genomic hybridization (CGH). 第44回日米医学協力研究会 結核・ハンセン病専門部会。2009年7月、福岡市

(5) 前田伸司：VNTR法による分子疫学。シンポジウム（結核対策の技術革新）、第15回国際結核セミナー。2010年3月、東京都。

(6) 前田伸司、和田崇之、岩本朋忠：国内結核菌を効率よく型別するための標準反復配列多型（VNTR）分析法。第83回日本細菌学会総会。2010年3月、横浜市。

(7) 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.

(8) 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.

(9) 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.

(10) 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.

(11) 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.

(12) 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.

(13) 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.

(14) 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.

(15) 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.

(16) 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

(17) 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

(18) 和田崇之、岩本朋忠、長谷篤、前田伸司：高齢者結核患者から高頻度に分離される結核菌株群の集団特性と遺伝学的特徴. 第86回日本結核病学会総会. 2011年6月, 東京.

(19) 村瀬良朗、伊藤邦彦、吉山崇、大角晃弘、前田伸司：再燃・再感染発病の分子疫学. 第86回日本結核病学会総会. 2011年6月, 東京.

(20) 藤原永年、合田麗奈、佐藤明正、矢野郁也、前田伸司：臨床分離MAC菌の血清型特異糖ペプチド脂質抗原の分布と新規構造. 第86回日本結核病学会総会. 2011年6月, 東京.

(21) 前田伸司、土井教生：新世代レスピラトリーキノロンDC-159a - (1) 結核菌におけるDC-159aの薬剤耐性機序-. 第86回日本結核病学会総会. 2011年6月, 東京.

(22) 前田伸司：日本、中国、韓国及び台湾との結核菌型別分析に関する共同研究 学会シンポジウム 結核対策における国際貢献 - 東アジアとの連携-. 第86回日本結核病学会総会. 2011年6月, 東京.

- (23) Shinji Maeda, Takayuki Wada, Tomotada Iwamoto, Seiya Kato : Low discrimination power of the standard optimized variable number of tandem repeats systems for genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. 4th Congress of European Microbiologists FEMS 2011. June 2011; Geneva, Switzerland
- (24) Takayuki Wada, Tomotada Iwamoto, Atsushi Hase, Shinji Maeda : Characterization of genomic specificity and diversity observed in *Mycobacterium tuberculosis* in far-eastern Asia. 4th Congress of European Microbiologists FEMS 2011. June 2011; Geneva, Switzerland
- (25) Tomotada Iwamoto, Takayuki Wada, Shinji Maeda, Noriko Nakanishi, Qian Gao, Young-Kil Park, Jian Mei, Luz Caviedes, Robelt H Gilman, Seiya Kato : Geographical Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype Family Strains. 4th Congress of European Microbiologists FEMS 2011. June 2011; Geneva, Switzerland
- (26) Shota Ogawa, Takemasa Takii, Ryuji Yamamoto, Yasuhiro Horita, Natsuki Hanamura, Kenji Ogawa, Tetsuya Yagi, Naoya Ohara, Yoshitaka Goto, Nagatoshi Fujiwara, Shinji Maeda : Production of ammonia by *Mycobacterium avium* in acidic condition: International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress. Sep. 2011; Sapporo, Japan
- (27) Isamu Matsunaga, Shinji Maeda, Noboru Nakata, Takashi Naka, Nagatoshi Fujiwara, Masahiko Sugita : Biosynthesis of mycoketide and the related compounds in mycobacteria: International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress. Sep. 2011; Sapporo, Japan
- (28) Masahiko Kai, Hiroyuki Yamada, Nagatoshi Fujiwara, Shinji Maeda, Yuji Miyamoto, Tetsu Mukai, Noboru Nakata, Yumi Maeda, Ikuya Yano, Masahiko Makino : Establishment and characterization of knockout mutants of *Mycobacterium bovis* BCG gene involved in mycolic acid synthesis pathway: International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress. Sep. 2011; Sapporo, Japan
- (29) Takashi Naka, Shinji Maeda, Reina Yamamoto, Mamiko Niki, Naoya Ohara Ikuya Yano, Saburo Yamamoto, Jun-ichi Maeyama, Hisashi Ogura, Nagatoshi Fujiwara : Comparative phenotypes in two subpopulations of bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo 172 substrain: International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress. Sep. 2011; Sapporo, Japan
- (30) 和田崇之、岩本朋忠、長谷篤、前田伸司 : ゲノム比較に基づいた結核菌臨床分離株の遺伝的多様性包囲網の構築. 第85回 日本細菌学会総会. 2012年3月, 長崎.
- (31) 中崇、前田伸司、柴田満、水野浄子、藤原永年 : 臨床分離MAC菌の新規血清型特異糖ペプチド脂質抗原と宿主応答. 第85回 日本細菌学会総会. 2012年3月, 長崎.
- (32) 岩本朋忠、和田崇之、前田伸司 : 結核菌分子疫学解析からのデータマイニングを目指したゲノム解析. 第85回 日本細菌学会総会. 2012年3月, 長崎.

H. 知的財産権の出願・登録状況

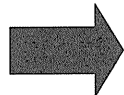
「結核菌の型別法」: 特許出願
平成 22 年 4 月 14 日 (特願 2010-093)

2ローサイのマルチプレックスPCR

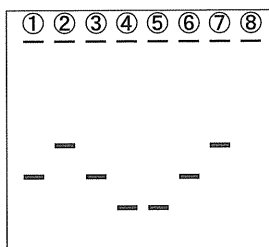
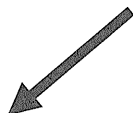
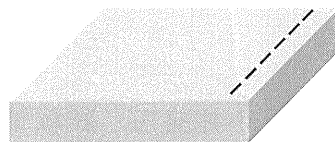
- ① MJ1 (VNTR-0424+VNTR-1955*)
- ② MJ2 (MIRU10+VNTR-2074*)
- ③ MJ3 (VNTR-2163b+VNTR-2372*)
- ④ MJ4 (MIRU26+VNTR-1955*)
- ⑤ MJ5 (MIRU31+VNTR-3336*)
- ⑥ MJ6 (VNTR-4055+VNTR-4156*)
- ⑦ MJ7 (VNTR-2163a+ETR-A*)
- ⑧ VNTR-1982

*: 蛍光標識プライマー

サーマル
サイクラー

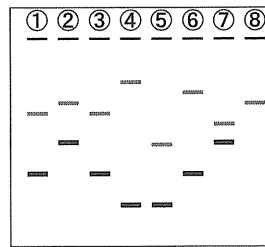


アガロースゲル電気泳動



直接蛍光検出

蛍光色素で標識したローカスの
検出



EtBr染色

標識及び非標識ローサイ
の検出

図1. マルチプレックス PCR を用いた VNTR システム

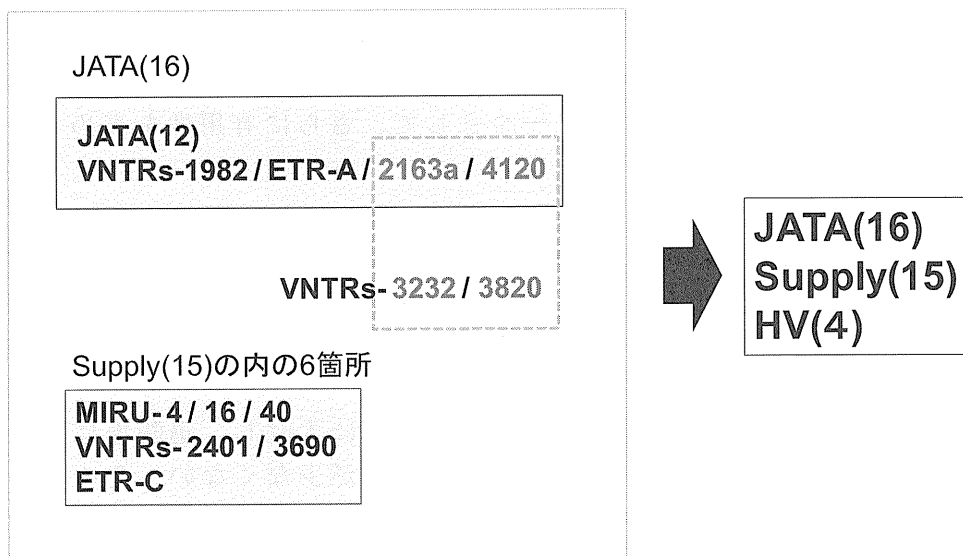


図2. 構築したフラグメント解析用 24 ローサイの VNTR システム

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

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

研究主旨

結核研究所保健看護学科で開発した「結核看護システム」を活用し、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について検討した。コホート分析をひとつの指標として治療終了後の再発に関する状況、および看護の指標を考案し評価・分析を行った。本ツールは現場の職員に対し DOTS（服薬支援）に対する意識や知識を高め、能力の向上を図りつつ、日本版 DOTS の具体的な支援技術として活用を進めた。その技術を強化する事が本分担課題の目的である。平成 21～23 年度の研究概要は以下の通りである。

① DOTS 支援のためのツール活用とその結果の分析

「結核看護システム」の情報処理を通して、19～22 年の新登録者患者（潜在性結核感染症治療者：以下 LTBI とする、を含む）3367 人のコホート分析を行った。

② コホート観察別にみた予後調査の分析

再発は、既往の円滑な治療の有無に関係しており、円滑に行えなかったハイリスク群からの再発の発生を未然に防ぐため、初回治療時の服薬支援の重要性があらためて浮き彫りになった。

③ 服薬支援の評価指標（リスク評価の追加、服薬支援スコアの考案）についての分析

「結核看護システム」の活用において、入力情報から客観的な看護の指標として服薬支援スコアを考案した。アセスメント票および服薬支援スコアの新たな導入は、服薬支援活動の実態を反映した DOTS 支援のツールとして、さらに有用性を高めることになると思う。

④ 地域 DOTS の質的向上に関する検討

地域 DOTS およびコホート検討会実施状況についてのアンケート調査を実施し、その成果として「地域 DOTS を円滑に進めるための指針」を作成し平成 22 年度地区別講習会および結核研究所内の保健看護学科研修講義で資料として配布した。

⑤ 結核医療の地域連携強化のための基礎研究

結核専門医療機関の減少にともない、遠方の専門医療機関に入院し、退院後は自宅から近い一般医療機関へ転医して結核治療が行われるケースが少なくない。その実態を明らかにすることを目的に本調査を行った。約 3 割が退院後医療機関を変更し、その 1/3 が結核専門外の医療機関にかかっていた。標準治療の適切な継続がなされるよう、効果的な地域連携体制の推進が望まれる。

⑥ DOTS 支援者育成教材の作成・評価と活用

服薬支援者の育成は各自治体に任されており手さぐりで実施されている。DOTS 支援者の DOTS に対する正しい理解と意識向上を図るため「服薬支援の心づくり」(DVD 教材)を作成した。DVD 教育介入の有無に関し有意な平均値の差が認められ、効果が検証できた。今後はその活用対象を拡大し、その有用性について評価を行いたい。

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)

浦川美奈子(結核予防会結核研究所対策支援
部保健看護学科科長代理)

A.研究目的

2003年から開始された「日本版DOTS戦略」によって院内DOTSおよび地域DOTSの実施が拡大し、ほとんどの結核病床をもつ医療機関及び保健所で行われるようになり、質的向上が求められている。「結核看護システム」(以下、本システム)は結核治療における日本版DOTSを良質に普及させる方法として開発した電算支援システムである。本システムは保健所・医療機関双方がそれぞれのモードで独立に使用でき、必要に応じて相互の情報の交換ができるシステムである。また、ひとりの患者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、治療開始時期から月毎の「菌検査情報」「使用抗結核薬」「副作用」「服薬情報」および「DOTSタイプ」を、関連項目として「薬剤耐性の有無」「合併症」や看護の視点から「DOTS-Partners」「服薬支援計画」「リスク評価」を加え強化している。さらにコホート検討会やDOTSカンファレンスの資料や患者分類コード別・初服薬情報別・服薬情報割合別コホート観察の3種類の集計表とそれに合せた図表が出力される。「結核看護システム」の試行を通して服薬支援の成果指標を確立するとともに、DOTSおよび患者支援体制全般の強化を目指している。

B.研究方法

1) 13自治体36保健所において本システムを試行、活用した。対象は平成19年~22年の新登録患者(LTBI含む)コホートとした。

2) コホート観察別にみた予後調査の分析
治療成績のもう一つの指標である治療終了後の再発に関する状況について『結核看護システム』の先行システムである『服薬支援看護システム』を試行した保健所の協力の下、予後調査をおこなった。

3) 服薬支援の評価指標(リスク評価の追加、服薬支援スコアの考案)について検討

「結核看護システム」の活用において、入力情報から看護に関する客観的な指標としてリスク評価および服薬支援スコアについて検討した。

4) 地域DOTSの質的向上に関する検討から地域DOTSガイドライン案を策定し周知した。

5) 結核医療の地域連携強化のための基礎調査を平成22年度のワークショップに参加自治体の平成21年の新登録患者について行った。

6) DOTS支援者育成教材の作成し、評価と活用について検討した。

7) 服薬支援看護ワークショップを行い、「結核看護システム」の概要と評価指標、活用状況、コホート検討会の実施状況等について検討・討議を行った。

8) 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。

横沢貴子(岩手県)、西川恵子・原田浩美(愛知県)、梅藤薫(静岡県)、吉村令三・太田公也(和歌山県)、久場香代子(沖縄県)、坂井亜侑美・福元淑恵(和歌山市)、笠羽千香・御小柴朋子(横浜市)、廣田綾矢子・青柳早苗(宇都宮市)、石栗理絵・峯田裕子(台東区)、古島大資・木村 愛(埼玉県)、山下益美(足立区)、澤田明美(札幌市)、園部広由喜・武藤章代・小沼弘美・片見眞由美(茨城県)、松村幸代・仲田有梨(石川県)、安守亜樹・三角浩

子（板橋区）、高野智子（熊本県）、永沢愛・遠藤優子・村上寿子（山形県）、山本有里・松尾優子・魚住有希子（船橋市）、水尻節子（神戸市）、平野有紀・窪田陽子・岡ひとみ（岡山市）、岡本その子・林恭子・一色ミユキ（栃木県）、横井敏之（群馬県）、大友里華（前橋市）、樋口倫子・土屋 茜（堺市）、吉田陽子・辛嶋淳子（大分県）、島村珠枝（東京大学大学院医学系研究科健康科学・看護学専攻地域看護学分野）、濱口由子（帝京大学大学院公衆衛生学研究科公衆衛生学専攻専門職学位課程）

〔倫理面の配慮〕

結核登録者や医療機関への介入、個人情報への扱いについては、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

研究の趣旨に賛同し、本システムを試用したのは平成 20 年度～23 年度（平成 19 年～22 年の新登録者）13 自治体 36 保健所（資料 1）であった。国のサーベイランスシステム（結核登録者情報システム）から移行が可能で各保健所における入力対象が容易に全数把握でき、コホート検討会や DOTS カンファレンス、医療機関還元の資料作成などを行った。

1) 平成 19 年～22 年の新登録者総数（LTBI 含む）3667 人に対して登録時総合患者分類コード別のコホート観察の結果をみた。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立されているとは言えないが、ここでは判定が明確な「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、（資料 2）新登録肺結核患者総数 3078 人の判定結果は、「治療成功」77.4%（「治癒」40.9%、「治療完了」23.1%、「その他」13.4%）、「死亡」15.9%（「結核死亡」8.8%、「結核外死亡」7.1%）、「治療失敗」1.7%、「脱落中断」1.5%、

「不明」3.6%であった。また、肺外結核 489 人の結果は、「治療成功」77.7%（「治癒」14.7%、「治療完了」21.5%、「その他」14.5%）、「死亡」14.7%（「結核死亡」4.7%、「結核外死亡」10.0%）、「治療失敗」0.6%、「脱落中断」1.6%、「不明」5.3%、LTBI 治療 100 人の結果は「治療成功」87.0%、「脱落中断」4.0%、「不明」9.0%であった。

DOTS に関する分析は以下のように新登録者総数（LTBI 含む）3667 人を対象とした。効果的な服薬支援の指標として DOTS タイプ別の治療成功率（資料 3）をみると「DOTS（入院中院内 DOTS＋外来治療中地域 DOTS）あり」が 82.8%（2530/3056）、「その他」が 51.9%（317/611）であった。

保健所の DOTS（入院中院内 DOTS＋外来治療中地域 DOTS）の割合別にみた治療成功率（資料 4）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 94.6%（1788/1890）、2/3 未満は 59.6%（1059/1777）であった。

地域 DOTS のタイプ別（資料 5）では、どのような DOTS が行えているかを加味した分析（治療結果のコホート分析に判定期間内に地域 DOTS において、複数の DOTS タイプが混在している場合は、服薬支援の頻度の多いコードで計算）では、DOTS タイプの分布は、「地域 DOTS(Daily)」1.4%（50/3667）、「同(Weekly)」6.4%（234/同）、「同(Monthly)」61.5%（2293/同）、「その他」28.6%（1102/同）であった。「その他」は、コホートの判定期間中ずっと入院していた者、DOTS タイプが不明もしくは未入力のものである。

職業別治療成功率（資料 6）で低いのは「無職、その他」70.1%（1542/2199）であった。性・年齢別治療成功率（資料 7）が低かったのは「70 歳以上、男性」67.3%であった。

リスク評価について「リスク要因あり」は患者の 71.2%おり、リスク要因有無別に治療成功率をみると「あり」78.0%

(2038/2612)、「なし」76.9%(811/1055)であった。客観的な看護の指標として、[研究成果3]で考案した服薬支援スコアおよびリスクポイント(資料8)をみてみた。リスクポイント別に服薬支援スコア85点以上の割合を見ると(資料9)、「リスクなし」は11.5%(121/1055)、「リスク1~3個」は24.2%(574/2374)、「4~6個」は49.5%(113/228)、「7~9個」70.0%(7/10)であり、チェックされているリスクが多くなるにつれて、服薬支援スコアも上昇していた。

合併症「あり」の者が47.7%いたが、治療成功率(資料10)では「合併症あり」74.0%(1293/1748)、「同なし」81.1%(1556/1919)であった。様々な服薬支援計画の対象になった患者は全体の46.8%であったが、その有無別に治療成功率(資料11)をみると「あり」84.7%、「なし」71.5%であった。また何らかの服薬支援者(DOTSパートナー)が指定されている患者は71.4%あったが、かれらの治療成功率(資料12)は「あり」80.3%であるのに対し、指定されていない患者では71.3%であった。服薬支援者で一番多かったのは「保健所職員」54.8%であった。

2) 予後調査

『服薬支援看護システム』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、多くの患者はその後主治医の判断により治療を続けていると思われる。その後治療終了後の再発の有無とその時期を調べた。再発はそう診断されて保健所に再度登録されたか否かで判断される。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。

システム試行に参加した全保健所(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。コホート観察で治療結果「治療失敗」・「脱落中断」・「不明」とされた者のうち、その後治療を継続して最終的に治療を終了した者は、それぞれ、77.2%、61.8%、20.1%であった。このようにして治療が終了したものだけを今回の分析の対象とした。

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逆に少ない。

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」と判定されたなか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」と判定されたなか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。これからも治療成功群に比して、その他の群では再発が多いことがうかがわれるが、これは各群によって観察期間の分布が異なることが考慮されていない。

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。