

201225061A

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

結核の革新的な診断・治療及び 対策の強化に関する研究

平成 24 年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 加 藤 誠 也

平成 25(2013)年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

結核の革新的な診断・治療及び対策の強化に関する研究

加藤 誠也…………… 1

II. 研究分担報告

1. 薬剤耐性の実態調査……………山岸 文雄…………… 17

2. 新科学療法剤を含めた治療方法の開発と臨床応用……………岡田 全司…………… 25

3. 結核の病態に関連する新規遺伝子/タンパク発現制御マーカーの探索

慶長 直人…………… 39

4. 小児結核対策・医療の評価……………徳永 修…………… 43

5. 結核菌の感染性および病原性に関する細菌学的評価法の開発

御手洗 聡…………… 88

6. 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

前田 伸司…………… 98

7. 結核菌株の遺伝背景と離省・疫学・細菌学的特徴との関連性の解明

岩本 朋忠…………… 103

8. 多様な研究シーズを想定した結核菌臨床分離株のゲノム情報集積

和田 崇之…………… 106

9. 結核菌の病原性と形態学的特徴との関連……………山田 博之…………… 112

10. インターフェロン- γ 遊離試験の予測価値の検討と偽陰性要因の遺伝的解析

原田 登之…………… 129

11. 日本版 DOTS の強化・向上……………小林 典子…………… 134

12. 慢性非菌患者に対する医療体制のあり方の検討……………吉山 崇…………… 144

13. 施設内感染対策に関する研究	加藤 誠也	147
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		181
IV. 研究成果の刊行物・別刷 (一部)		185

I 総括研究報告書

結核の革新的な診断・治療及び対策の強化に関する研究
(H24-新興-一般-011)

研究代表者

加藤誠也 公益財団法人結核予防会結核研究所 副所長

研究要旨

本研究は結核菌の細菌学的手法・ゲノム情報・超微形態等の新技術を活用した感染性・病原性の評価・解明，宿主の新規遺伝子・IGRA に関連する発病に関する要因の評価・解明，新抗結核薬を用いた画期的な治療法の開発，小児医療・対策の課題・エビデンスの明確化，結核の地域連携の推進及び DOTS 評価指標の検討，再発の原因分析，院内感染対策の指針の開発を目的としている。

(1) 新化学療法剤を含めた治療方法の開発と臨床応用

これまでのマウスモデルでの知見に基づき，デラマニド及びカプラザマイシンの新規結核治療ワクチン(HSP65+IL-12DNA)併用の相乗的抗結核治療効果の検討が進行中である。慢性排菌や再発の予後診断に関して，Ksp37 は結核患者で低下しており，マウス生体内での結核増殖抑制効果を発見した。臨床現場におけるリファブチン，リネゾリド，メロペネム-クラブラン酸，リファペンチン，モキシフロキサシンの使用に関して，調査票による評価を行い，それぞれ，35 例中 28 例 (84.8%)，21 例中 20 例 (95.2%)，2 例中 2 例 (100%)，15 例中 12 例 (80%) に有効であった。

(2) 結核の病態に関連する新規遺伝子／タンパク発現制御マーカーの探索

治療中の多剤耐性結核患者 58 例の全血由来の RNA を得て，マイクロ RNA (miRNA) である miR-31, miR-144, miR-155 の発現と細胞性免疫に関わる代表的なサイトカイン，サイトカイン受容体遺伝子群の発現をリアルタイム RT/PCR 法で定量し，各発現パターンについて相関解析を行なった。その結果，miR-31 とインターロイキン 12 受容体 $\beta 2$ 鎖 (*IL12RB2*) の mRNA 発現量が正の相関を示していた。*IL12RB2* の 3'非翻訳領域には miR-31 結合配列が予測されており，miRNA による蛋白発現制御と宿主免疫反応修飾の可能性が示唆された

(3) 結核菌の感染性および病原性に関する細菌学的評価法の開発

入院期間の短縮を目標に結核菌の生菌のみを PCR 及び塗抹検査で検出する方法の開発を試みた。PCR 法では PMA, EMA とも死菌の遺伝子増幅を有意に抑制したが，生菌の遺伝子増幅も抑制されていたことから，今後は生菌の遺伝子増幅が抑制されない条件を検討していく必要がある。塗抹検査法で CTC は生菌を検出することが確認できたが，蛍光輝度が低いこと，*M. bovis* BCG Pasteur 株も輝度は低いが見える

ことから，MPB64 陽性の細菌のみを特異的に染色する条件を精査する必要があると考えられた。

(4) 次世代シーケンサーを用いた感染性が高いと考えられる結核菌のゲノム解析

集団感染事例と確認された株の LSP, スポリゴタイピング, VNTR 及び次世代シーケンサーによるゲノム解析を行った。NGS を使ったゲノム解析による SNP 分析で、得られた遺伝系統と疫学調査結果を比較することで株間の関連を明らかにすることができると考えられた。

(5) 結核菌株の遺伝背景と臨床・疫学・細菌学的特徴との関連性の解明

結核菌の薬剤耐性獲得能力を評価するために、自然突然変異率の算出と、活動休止期に誘導される薬剤耐性の定量的検出を行った。検討した北京型⑥遺伝系統の 18 株中よりイソニアジドに対する耐性獲得能力に優れている株を見出した。この株の全ゲノム領域を対象とした比較ゲノム解析により、63ヶ所の遺伝子変異が、この菌株個性の責任遺伝子候補として特定された。「パーシスター変異誘導法」は、活動休止状態の菌の薬剤耐性化を簡便に検出できるものであり、潜在性結核治療における耐性菌出現の危険性を事前に評価できる方法として期待される。

(6) 結核菌臨床分離株ゲノム情報の集積と統合的解析

比較ゲノム解析が未実施の 16 株を選択してゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いたショートリード解析に供した。先行研究によって得られたゲノム情報と統合することにより、本邦における結核菌株、特に北京型結核菌および T3-Osaka のゲノム情報が多数集積され、菌株個性解析や分子疫学領域において有用なデータ基盤が構築された。

(7) 結核菌の病原性と形態学的特徴との関連

①透過型電子顕微鏡による結核菌標準株の超薄連続切片観察からの三次元構築を行った。②結核菌と非結核性抗酸菌のコード形成の比較検討し、病原性菌種では結核菌に類似した菌塊構造であったが、菌塊構造を示さなかった菌種の中にも病原性が報告されている菌種もあった。③正確な形態計測データに適した標本調製方法の検討した結果、Cryo-TEM 観察値が標準データとしての信頼性が高いと考えられた。④グルタルアルデヒドで前固定した菌の急速凍結標本は、前固定なしの原法と比較して遜色ない像が得られた。

(8) インターフェロン- γ 遊離試験の予測価値の検討と偽陰性要因の遺伝的解析

①QFT 検査後の結核発病調査：全国保健所を対象にした質問票調査を開始した。②新たな結核感染診断法開発：新規抗原への応答が若干高い傾向が見られたが、さらに検討が必要である。

(9) 小児結核全般の実態調査

①小児結核全例の把握を目指して実態調査を実施し、結果に基づき、今後の取り組みを提案した。②小児におけるクオンティフェロン®TB と T スポット®TB の性能比較によって、両者の感度・特異度に有意な差はないものと推定された。③BCG 副反応に関するアンケート調査を実施し、1598 施設より 181 例の副反応症例の診療経験が報告された。④小児結核症例の課題の明確化、臨床・保健担当者に関心の喚起、正しい知識の普及を目的に、首都圏、近畿で検討会を実施した。

(10)DOTS の強化・向上に関する研究

DOTS の質の向上を目的に、①治療継続や効果的な連携に関する検討、②外来 DOTS 実施状況調査、③服薬支援者育成 DVD 教材の評価、④喫煙と治療成績の分析を行った。服薬情報やリスク評価などの情報を管理するツールによって情報および問題の共有や支援の連携を図ることが可能となり、真の地域連携構築につながっていくものと考えられた。

外来 DOTS の質の向上のためには、DOTS ノート等の媒体の向上、さらに DOTS 実施のための包括的なガイドラインの策定が必要である。一般住民より結核患者の喫煙割合は高く、現在喫煙している人の頻度とリスク要因の個数は相関した。治療成績と有意に相関したのは年齢であった。

(11)薬剤耐性の実態調査

結核療法研究協議会が 5 年毎に実施している薬剤耐性全国調査の実施の可否を検討した結果、統計学的有意性を確保するために必要な検体数は菌陽性患者数の半数以上に上ることが明らかになった。今後は、検査の精度保証を行ったうえで、サーベイランスからデータを得る方法が望ましいと考えられた。

(12)再発患者の原因分析のための前向き調査

薬剤耐性、合併症等の問題がなく標準治療を行えた人の再発要因を検討するために前向き研究を実施しているが、3 年間の症例登録数は 443 と目標の 1500 に及ばなかった。これは臨床現場が極めて多忙になっていることが背景にあり、医療機関の協力が得られないためと考えられる。研究に関係するマンパワーの支援の検討が必要と考えられた。

(13)慢性排菌患者に対する治療の研究

日本で近い将来入手可能となる薬以外の薬を必要とする慢性排菌患者の治療のためには、先進医療の制度にのっとった対応が必要であるが、経済的な問題を解決する必要がある。

(14)院内感染対策に関する研究

2011 年に医療施設内での集団感染事件が増加したことを受けて、2000 年に策定した「結核院内（施設内）感染予防の手引き」の改訂案を作成した。今後、関係団体と協議・修正の上、活用されることが期待される。

研究分担者

岡田全司(独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター センター長)

慶長直人(国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 部長)

御手洗聡(公益財団法人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(公益財団法人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)

岩本朋忠(神戸市環境保健研究所微生物部 副部長)

和田崇之(長崎大学熱帯医学研究所国際保健学 助教)

山田博之(公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌リファレンス部主任研究員)

原田登之(公益財団法人結核予防会結核研究所技術顧問)

徳永 修(国立病院機構南京都病院 小児科 医長)

小林典子(結核予防会結核研究所対策支援部 部長)

山岸文雄(独立行政法人国立病院機構千葉東病院 院長)

研究協力者

吉山 崇(公益財団法人複十字病院呼吸器センター 診療主幹)

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)

山内祐子(結核予防会結核研究所研究部総括主任)

森 亨(結核予防会結核研究所名誉所長)

伝子・IGRAに関する発病に関する要因の評価・解明, 新抗結核薬を用いた画期的な治療法の開発, 小児医療・対策の課題・エビデンスの明確化, 結核の地域連携の推進及びDOTS評価指標の検討, 再発の原因分析, 院内感染対策の指針の開発を目的としている。

個々の分担研究の目的を以下に示す。

(1) 新化学療法剤を含めた治療方法の開発と臨床応用

90年代から世界的に進められてきた新抗結核の開発の成果として, 臨床治験に入った薬剤が既存薬剤の抗結核薬としての使用を含めて10剤に上っている。新抗結核を使って, 現在は治療困難な慢性排菌患者の治癒, 標準化学療法における治療期間の短縮及び治癒率向上, HIV合併例等への適用の検討を行う。また, 結核免疫に相関する。granulysin や Ksp37 を用いた慢性排菌や再発の予後診断の可能性を検討することを目的とする。

(2) 結核の病態に関連する新規遺伝子/タンパク発現制御マーカーの探索

本研究は, 結核患者血液中のマイクロRNA(miRNA)及び関連する蛋白指標を測定の軸として, 宿主免疫反応, 臨床疫学データとの関連を検討し, 結核感染・発症・治療反応性などに関連するバイオマーカーを得ることを目的とする。

(3) 結核菌の感染性および病原性に関する細菌学的評価法の開発

入院期間の短縮を目標に結核菌の生菌のみを検出する方法を, ①Propidium monoazide(PMA)あるいはEthidium monoazide(EMA)を用いてPCR法で検出する方法, ②結核菌群に特異的なMPB64抗体と生菌を検出するCTC染色を組みあわせ塗抹で検出する方法, を開発する。

(4) 次世代シーケンサーを用いた感染性が高いと考えられる結核菌のゲノム解析

A. 研究目的

本研究は結核菌の細菌学的手法・ゲノム情報・超微形態等の新技术を活用して, 感染性・病原性の評価・解明, 宿主の新規遺

感染性が高いと考えられる結核菌と通常の結核菌を用いて、遺伝系統及び型別と感染性に関する因子のスクリーニングを目的とした。

(5) 結核菌株の遺伝背景と臨床・疫学・細菌学的特徴との関連性の解明

薬剤耐性獲得能力の違いを客観的に評価し、その違いを生み出すゲノム情報の抽出を目的として、①耐性獲得能力を評価するための手法の確立、②耐性化能力の高い菌株の選定、③比較ゲノム解析による責任遺伝子の特定を目指した。

(6) 結核菌臨床分離株ゲノム情報の集積の集積と統合的解析

我が国における臨床分離株のゲノム比較データを効率的に蓄積し、結核菌の遺伝的多様性を効率的に網羅した変異情報を様々な結核研究シーズとして役立てると共に、変異検出技術に適用させることを目的とする。

(7) 結核菌の病原性と形態学的特徴との関連

結核菌の病原性と形態学的特徴との関連を明らかにすることを目的に、①透過型電子顕微鏡による結核菌標準株の超薄連続切片観察からの三次元構築、②結核菌と非結核性抗酸菌のコード形成の比較検討、③結核菌のより正確な形態計測データを取得するために最も適した標本調製方法の検討、④急速凍結法の改良の検討、を行った。

(8) インターフェロン- γ 遊離試験の予測値の検討と偽陰性要因の遺伝的解析

本研究の目的は、①QFT 検査結果と結核感染後の発病リスクとの関連を解析すること、②現在の IGRA 検査で検出されない結核菌の休眠期感染の診断方法を開発すること、である。

(9) 小児結核全般の実態調査：

実施した 4 研究の目的は以下のとおりである。

①小児結核症例実態調査：小児結核症例の背景要因や診断・治療適用に関連する課題を明らかにし有効な小児結核対策を考案・適用することを目的とした。

②小児を対象とした QFT-GIT 及び T-Spot TB の反応性の比較：小児におけるクオンティフェロン® TB ゴールド (QFT-GIT) と T スポット®TB(T-Spot TB)の反応性の差異を検証することを目的とした。

③BCG ワクチン関連副反応調査：副反応症例の発生頻度やリスク要因など検討し、安全かつ有効な接種プログラム検討や副反応事例への対応指針作成の資料とすることを目的にした。

④小児結核症例検討会：小児結核症例の課題の明確化、臨床・保健担当者に関心の喚起、正しい知識の普及を目的にした。

(10)DOTS の強化・向上に関する研究

DOTS の質の向上を目的に、①治療継続や効果的な連携に関する検討、②外来 DOTS 実施状況調査、③服薬支援者育成 DVD 教材の評価、④喫煙と治療成績の分析を行った。

(11)薬剤耐性の実態調査

結核研究療法研究協議会が 5 年ごとに実施している薬剤耐性全国調査の実施について検討することを目的とした。

(12)再発患者の原因分析のための前向き調査

INH および RFP への耐性がなく、また、標準治療を妨げる合併症がなく、標準治療を完了出来た症例について、現在の結核医療の基準方式での再発割合の治療成績を前向きに検討し、再発率に及ぼす因子を検討する。

(13)慢性排菌患者に対する治療の研究

慢性排菌患者に対する治療及び医療体制を提案することを目的とした。

(14)院内感染対策に関する研究

2011 年における医療機関内での集団感染事件の報告が増加したことから、2000 年に策定した「結核院内（施設内）感染予防の手引き」を改訂することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 新化学療法剤を含めた治療方法の開発と臨床応用

①デラマニド及び CPZEN-45 の治療効果に関する文献及びこれまでの成果の情報を集約した。

②デラマニド及び CPZEN-45 と新規ワクチン (HVJ-エンベロープ/ HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン) の相乗的抗結核治療効果を検討する。

③granulysin や Ksp37 を用いた慢性排菌や再発の予後診断: 1) 結核患者と健常人の血清中の Ksp37 を測定した。

2) リコンビナント KSP37 を *in vitro* の系に加えてキラーT分化誘導活性を測定し、免疫応答調節機構を解析した。

③全国の結核診療施設 (259 施設) に調査票を送付して、①リファブチン ②リネゾリド ③メロペネムークラブラン酸 ④リファペンチン ⑤ MFLX の臨床における実態調査 (使用調査) を行った。

(2) 結核の病態に関連する新規遺伝子/タンパク発現制御マーカーの探索

対象: ベトナム南部のホーチミン市にあるファムゴックタック病院での多剤耐性結核と診断された 16 歳以上 70 歳までの患者で、18 か月の治療観察期間を完遂できる見通しがあり、書面同意を得たものとし、HIV 陽性、悪性腫瘍、免疫抑制剤の使用者を除外した。血液サンプルを収集し、EDTA 添加血より血漿を得て、また RNA 安定化剤を付加して凍結した全血より total RNA を抽出した。ターゲットとして測定する miRNA は miR-144, miR-155, miR-31 とした。リアルタイム RT-PCR 解析系にて、細胞性免疫に関わる代表的なサイトカイン、サイトカイン受容体等遺伝子群の mRNA 発現量を、測定した。血漿中の 27 種類のサイトカイン等の生理活性物質の濃度を、蛍光ビーズアレイによりスクリーニング測定を行なった。

(3) 結核菌の感染性および病原性に関する細菌学的評価法の開発

①PMA/EMA により PCR 法で検出する方法

Middlebrook 7H9 培地で培養した H37Rv (ATCC27294) 株を使用した。1) 至適 PMA 濃度を終濃度 0, 0.3, 1, 3 μ M で検討した。

2) 光照射による PMA 処理を、PMA 濃度 (50, 150, 500, 1,500 μ M), H37Rv の DNA ISOPLANT 濃度 (1, 10, 100, 1,000 ng/mL),

また、H37Rv を 70%エタノールで 30 分間

殺菌したものをを用いて、照射時間 (0, 0.5, 1, 3, 5, 10 分) で検討した。3) 至適 EMA 濃度を終濃度 0, 1, 3, 10, 30 μ g/mL で検討した。

4) 抗結核薬処理効果を INH, RFP, SM, EB および LVFX を使用し検討した。

②MPB64 抗体及び CTC 染色により塗抹で検出する方法: 1) 至適 EMA 濃度を終濃度 0, 1, 3, 10, 30 μ g/mL で検討した。2) 抗結核薬処理効果を INH, RFP, SM, EB および

LVFX を使用し検討した。

3) CTC 濃度 (1, 3 あるいは 10 μ M) 及び染色時間 (5, 10, 20, 30, 40 あるいは 60 分) で蛍光二重染色による結核菌の生死判定の検討をした。4) MPB64 抗体濃度 (1, 3 あるいは 10

μ g/mL) 及び染色時間 (5, 15, 30, 45 あるいは 60 分) の検討を行った。

(4) 次世代シーケンサーを用いた感染性が高いと考えられる結核菌のゲノム解析

同一感染源から発病したと考えられる 3 人の患者 (2 人は家族内, 1 人は出張先の同僚) の菌株の、①スポリゴタイピング及び北京型結核菌進化の主要経路における

Large Sequence Polymorphisms (LSP),

②VNTR 分析, ③次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行った。

(5) 結核菌株の遺伝背景と臨床・疫学・細菌学的特徴との関連性の解明

異なる 6 遺伝系統の結核菌北京型株 18 株を使用し、薬剤耐性獲得能力の違いを以下の方法で検討した。①供試菌 18 株と基準株 (H37Rv 株) の自然突然変異率を測定し、基準株に対する相対的自然突然変異率を算出した。②「パーシスター変異誘導法」(BD バクテック MGIT AST 法をベースとして、測定期間を AST 判定終了後 3 週目まで継続し、全測定期間中の CFU と耐性菌の計数、

ならびに耐性関連変異を検出)の予備的評価を行った。③次世代シーケンサーを用いて、全ゲノム領域の数十から数百倍に相当する配列情報を取得した。

(6) 結核菌臨床分離株ゲノム情報の集積と統合的解析

比較ゲノム解析が未実施の小系統群に属する菌株 16 株を分析対象にシーケンシング及び変異の抽出を行った。

(7) 結核菌の病原性と形態学的特徴との関連

①透過型電子顕微鏡を用いた結核菌の三次元構築：結核菌 H37Rv 株(ATCC 25618)を約 2 週間培養，標本を作成し，JEOL JEM1230 透過電子顕微鏡で観察した。また，観察像を ImageJ ソフトウェアによって形態計測した。

②コード形成と病原性の検討：H37Rv 株及び非結核性抗酸菌 ATCC 標準株の標本を作成し，走査電子顕微鏡 JEOL JSM-5800 で観察した。

③標本調整法の検討：結核菌 CDC1551 株を，1) Cryo-TEM, 2) ネガティブ染色，3) SEM 観察の三つの方法で計測して比較した。

④急速凍結法の改良：透過型電子顕微鏡による急速凍結法で，予めグルタルアルデヒドで前固定した菌の急速凍結標本を作製し，前固定無しの方と比較した。

(8) インターフェロン- γ 遊離試験の予測値の検討と偽陰性要因の遺伝的解析

①QFT 検査後の結核発病調査：全国 495 か所の保健所に対して，調査参加をお願いする書類を郵送し，参加可能な保健所には，アンケートを各担当者へメールで送付した。アンケートの内容は，感染源となった初発患者の情報，検査結果と発病の有無に加え，年齢・性別・糖尿病等の結核発病リスクの有無・生活状況等の発病要因を解析するために必要な情報を得る内容であった。

②新たな結核感染診断法開発：休眠期結核菌の検出の可能性のある抗原として，デンマーク国立血清研究所の Peter Andersen 博士より入手した抗原 Rv2660c と，大阪市立大学医学部の松本壮吉博士より供与された

MDP1 について検討を行った。結核患者，治療終了後の元患者の血液を採取し，ELISPOT 法で IFN- γ 産生 T 細胞の個数を計測した。

(9) 小児結核全般の実態調査

①小児結核症例実態調査：厚生労働省健康局結核感染症課の協力のもと，2011 年に結核登録者情報システムに 0~14 才の全結核症例の登録保健所の開示を受け，当該保健所所長宛に 2013 年 1 月に調査票を送付し，回答を依頼した。

②小児を対象とした QFT-GIT 及び T-Spot TB 反応性の比較：2010 年 3 月以降，2013 年 1 月までに結核に関する診療を目的に初めて受診し，QFT-GIT 等の感染診断検査を適用した小児例 69 例 (110 検体)について検討した。

③BCG ワクチン関連副反応調査：全国の小児科医療機関 (病院のうち小児科を標榜している施設) 2928 施設を対象に BCG ワクチン関連副反応症例の有無の一次アンケート調査を行い，症例ありの施設に二次調査を実施した。

④小児結核症例検討会：症例の診療に当たった臨床医及び健診・治療支援を担当した保健所担当者がそれぞれの立場から症例の概要及び抱える問題点について呈示し，議論した。

(10)DOTS の強化・向上に関する研究

①治療継続や効果的な連携に関する検討：結核看護システムを用いた 19 保健所の 23 年の肺結核新登録患者 645 人についてコホート分析した。②外来 DOTS 実施状況調査：結核病床がある 298 病院の結核病棟看護師長宛にアンケート調査を実施した。③服薬支援者育成 DVD 教材の評価：服薬支援に関わる様々な職種 850 名に対し，DVD による教育介入を行い，その前後を比較し，介入を評価した。④喫煙と治療成績の分析：結核看護システムを用いて喫煙習慣と治療，喫煙指導等を分析した。

(11)薬剤耐性の実態調査

前回の薬剤耐性率から必要な今回必要な

検体数を計算し、検体及び臨床情報の収集方法とのその可否について検討した。

(12)再発患者の原因分析のための前向き調査

初回治療肺結核、喀痰塗抹陽性の者で、INH,RFP, PZA を含んだ標準治療を開始する者 1500 症例の臨床データを含めて登録し、治療終了後 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 ヶ月後まで経過観察することを想定した。

(13)慢性排菌患者に対する治療の研究

日本においては結核薬として未承認薬の現在の入手可能性について、公開情報を収集した。また、未承認薬の入手を行ってきた希少薬あるいはエイズ薬の研究班関係者にインタビューを行った。

(14)院内感染対策に関する研究

2000 年版の「結核院内（施設内）感染予防の手引き」を元に改訂一次案を作成し、結核対策、結核医療、行政、院内感染対策の専門家の意見を得て修正し改訂案を作成した。

C. 研究結果

(1) 新化学療法剤を含めた治療方法の開発と臨床応用

①デラマニド及びカプラザマイシン (CPZEN-45) の治療効果

- ・ デラマニドはマウスモデルで多剤耐性結核、感染力の強い多剤耐性結核に対して治療効果があった。
- ・ デラマニドは AIDS モデルマウスで治療効果が認められた。
- ・ カプラザマイシンはマウスモデルで： a) 超多剤耐性結核に治療効果， b) INH+RFP 治療法と相乗的結核治療効果， c) 新規結核治療ワ (HSP65+IL-12DNA) 併用治療にて相乗効果， が認められた。

②デラマニドと新規ワクチンの相乗的抗結核治療効果の検討は進行中， CPZEN-45 新規ワクチンの相乗的抗結核治療効果の検討は計画中である。

③granulysin や Ksp37 を用いた慢性排菌や再発の予後診断

1)患者では健常人に比較して、血清中の

Ksp37 の濃度低下が認められた。

2) KSP37 のキラーT 細胞分化誘導活性と IL-6, IL-2 及び IFN- γ 産生増強作用が認められ， KSP37 が結核免疫（抵抗性）にとって重要な機能を有することが示された。

④新化学療法を含めた治療方法の開発と臨床応用

259 施設中 123 施設 (47.5%) より回答が得られた。有効は， リファブチンでは 35 例中 28 例 (84.8%)， リネゾリドでは 21 例中 20 例 (95.2%)， メロペネム-クラブラン酸では 2 例中 2 例 (100%)， モフロキサシンでは 15 例中 12 例 (80%) であった。多剤耐性結核患者の約 1/2 に相当する 30 例に投与された。リネゾリド及びリファブチンは多剤耐性結核に有効であった。副作用はリファブチンで白血球減少症， 血小板・汎血球減少症， 肝機能異常， リネゾリドで骨髄抑制等であった。

(2) 結核の病態に関連する新規遺伝子/タンパク発現制御マーカーの探索

全血中の miRNA, 免疫関連分子の遺伝子の各発現パターンについて， RNA 抽出時の総回収量が十分であった 48 例について， 順位相関係数を算出した結果， miR-31 とインターロイキン 12 受容体 $\alpha 2$ 鎖 (*IL12RB2*) の発現量が正の相関を示した (Spearman の相関係数 = 0.41, P=0.0034)。

(3) 結核菌の感染性および病原性に関する細菌学的評価法の開発

①PMA/EMA により PCR 法で検出する方法：

PMA は 0.3 μ M 以上で加熱による死菌の遺伝子増幅を有意に抑制した。また， EMA 1 μ g/mL 以上で抑制傾向を示した。エタノールによる死菌には効果が弱く， 死菌の作成方法で PMA あるいは EMA の至適濃度が異なることが示唆された。抗結核薬による死菌に対する PMA の効果を検討したところ， 培養結果と概ね同様の傾向が見られた。

②塗抹で検出する方法： CTC は 3 mM, 30 分以上あるいは 10 mM, 10 分以上の染色で生菌を検出することが確認された。蛍光標識した MPB64 は *M. bovis* BCG Tokyo 株を 3

μg/mL, 5 分の染色で検出した。

(4) 次世代シーケンサーを用いた感染性が高いと考えられる結核菌のゲノム解析

① 3 株全てが北京型の Modern 型で RD181 領域を欠損した遺伝型であるが, RD150 領域も欠損しており, 北京型結核菌ではマイナーな系統の株であった。

② VNTR 分析を 36loci で実施したところ, VNTR- 3232 のみが一部異なっていた。

③ 全ゲノム解析: 家族内での感染の 2 菌株と出張先の同僚の菌株間では 5 箇所の non-synonymous SNP が存在した。

(5) 結核菌株の遺伝背景と臨床・疫学・細菌学的特徴との関連性の解明

① 8 株中 1 株 が基準株の約 100 倍という高い突然変異率を示した。

② パーシスター変異誘導法で上記の株は, 少なくともイソニアジドに対する耐性獲得能力に優れた株であると推察された。

③ 全ゲノム比較により, KC162 株に特有の一塩基多型として 108 か所の変異が特定された。アミノ酸置換に関連する変異は 63 か所であり, そのうちの 4 か所が DNA の修復, 組み換え, 複製に関与する遺伝子上での変異であった。

(6) 結核菌臨床分離株ゲノム情報の集積と統合的解析

マルチプレックス解析による取得リードの平均カバレッジは 252.7~484.3 となり, マッピングによる変異情報抽出に十分な情報量が獲得できた。

本邦における結核菌株, 特に北京型結核菌および T3-Osaka のゲノム情報が多数集積され, 菌株個性解析や分子疫学領域において有用なデータ基盤が構築された。

(7) 結核菌の病原性と形態学的特徴との関連

① 透過型電子顕微鏡による結核菌の三次元構築: 1 つの菌体について 24 枚の連続切片

を作製し, 観察し, 菌体長 1.32 μm, 菌体直径 0.37~0.46 μm, aspect ratio 2.89, 平均菌体断面積 0.13 μm², 菌体体積 0.18 μm³, 菌体表面積 1.83 μm², ribosome 数 864 のデータを得た。

② 結核菌と非結核性抗酸菌のコード形成の検討: 抗酸菌コロニー内の菌塊の形態に基づいて 4 つの群に分けた。

③ 標本調整法の検討: ネガティブ染色と SEM 観察 では菌体の収縮が示唆され, Cryo-TEM 観察値が標準データとしての信頼性が高いと考えられた。

④ 急速凍結法の改良: グルタルアルデヒドで前固定した菌の急速凍結標本は, 前固定無しの原法と比較して遜色ない像が得られた。

(8) インターフェロン-γ 遊離試験の予測値の検討と偽陰性要因の遺伝的解析

① QFT 検査後の結核発病調査: 調査参加依頼に対して 416 か所から回答があり, 参加を表明した 159 か所 (38.2%) に調査票を送付した。

② 新たな結核感染診断法開発: 結核感染者 (TB) と治療終了後の元結核患者 (Old TB) 間において, Rv2660c に対する応答が若干高い傾向が見られた。同じ検体を Fluorospot システムにより検討した結果, 通常の ELISPOT 法で得られた数値より全体的に低い傾向であり, Fluorospot システム自体が十分な感度が得られていないことが示唆された。

(9) 小児結核全般の実態調査

① 小児結核症例実態調査: 1) 小児結核発病例が大都市部に偏在する傾向がある。2) 結核高蔓延国での居住歴を有する小児が全体の約 15% を占める。3) BCG 未接種例は全体の 10% 未満であった。4) 全例の約 70% が接触者健診により, 約 25% が有症状受診により診断に至り, 約 75% でその感染源が同定可能であった, などが明らかになった。

② 小児を対象とした QFT-GIT 及び T-Spot TB 反応性の比較: QFT 第二世代から

QFT-GIT への変更により、0~2 才を含む全ての年齢群で「判定不可」例の頻度は著明に減少し、結核感染感度が向上した可能性が示唆された。また、新たに導入された T-SPOT 判定結果との一致率は非常に高く、これら 2 種の IGRA のパフォーマンスに有意な差異はないものと推測された。

③BCG ワクチン関連副反応調査:1598 施設より 1 次調査票の返信があり、うち 124 施設から 181 例の副反応症例の診療経験が報告され、2 次調査を実施した。181 例のうち、2 次調査票の回答を得ることができたのは 68 症例のみであり、また、そのうち調査対象期間と設定した平成 23 年 1 月~12 月に診療された症例は 34 例のみであった。

④小児結核症例検討会：予防・診断・治療適用・治療支援に種々の課題のある症例が、首都圏で 3 例、近畿で 5 例提示され、検討を行った。

(10)DOTS の強化・向上に関する研究

①治療継続や効果的な連携に関する検討：治療成功率は；DOTS あり(82.1%)>なし(51.8%)，地域支援計画あり(84.6%)>なし(70.8%)，DOTS パートナーあり(79.9%)>なし(70.1%)，であった。②外来 DOTS 実施状況調査：外来での DOTS の対象は、「退院後の通院患者全員」58.9% (53 病院)，「外来治療開始者全員」，34.4% (31 病院)であった。外来 DOTS を担当職員は、外来看護師：85.6%，主治医：61.6%，薬確認方法では、「DOTS ノート（服薬手帳）やチェック表で確認している」：84.4%，外来の患者教育では、「DOTS ノートを使用」：63.3%，保健所との連携では、「DOTS カンファレンスを通して」:73.3%，次に「個々に保健所と連絡を取っている」も半数以上みられた。③服薬支援者育成 DVD 教材の評価：アンケート対象者 850 名，職種は、保健師，看護師，医師，放射線技師，薬剤師，事務，看護学生等であった。職種および所属の各因子別に層別化し性別，年齢，ベースラインスコアを含めたその他の背景因子で調整を行った結果，有意差は見られ

なかった。④喫煙と治療成績の分析：一般住民より結核患者の喫煙割合は高かった。現在喫煙している人の頻度とリスク要因の個数は相関した。治療成績と有意に相関したのは年齢であった。

(11)薬剤耐性の実態調査

統計的有意性を確保するため，耐性調査に必要な症例数を検討したところ，未治療患者で 6,672 名，既治療患者で 865 名と計算された。これは各々年間の菌陽性患者数（2011 年のデータで算出）の 51.0%と 64.0%に相当する。

(12)再発患者の原因分析のための前向き調査

2011 年の開始から 2013 年までに登録された症例数は 443 例で，目標に及ばないが，登録は終了とする。

(13)慢性排菌患者に対する治療の研究

現在抗結核薬として未承認であるが，有効性がほぼ確立して医薬剤にベダキリン，デラマニド，リネゾリド，ステゾリド，カプレオマイシンがあるが，日本での承認申請の動きがあるのはデラマニドのみである。

これらの薬剤を実際に使用する医療体制として，①研究班が輸入し，保険診療の中で混合診療にならない制度を利用する方法，②研究成果から保険承認を取る方法，③研究班として薬剤を輸入する方法，④先進医療制度を用いる方法等が考えられる。

(14)院内感染対策に関する研究

分担報告書に添付した改正案を作成した。

D. 考察

(1) 新化学療法剤を含めた治療方法の開発と臨床応用

新薬（デラマニド等）が認可されれば，多剤耐性結核に対する新しい治療法が確立できる。カプラザマイシンはマウスの系で XDR-TB に治療効果を示し，INH+RFP 治療法と相乗的治療効果を示したことより，結核のみならず，MDR-TB や XDR-TB に対し

て治療期間短縮やファースト・ライン抗結核剤の投与量を減少させることが期待できる。さらに、カプラザマイシンは新規結核治療ワクチンと相乗的治療効果を発揮したが、これはカプラザマイシン自身が単独でキラーT細胞活性やサイトカイン産生等、結核菌に対する細胞性免疫を増強する作用を示すことより、ワクチンと相乗的な治療効果が発揮されたことが示唆された。

リファブチン及びリネゾリド、メロペネム-クラブラン酸の三種の新しい化学療法剤の投与症例数、多剤耐性結核に対する有効性、副作用等を調査した結果、リファブチンはRFP耐性結核患者の82.3%に有効。リネゾリドは95.2%に有効であった。

(2) 結核の病態に関連する新規遺伝子／タンパク発現制御マーカーの探索

*IL12RB2*の3'非翻訳領域にはmiR-31結合配列が予測されており、miRNAによる蛋白発現制御と宿主免疫反応修飾の可能性が示唆された。次年度以降、結核感染・非感染血液検体、活動性結核の治療前後の検体等に対象を拡大し、さらに病態との関連を検討する。

(3) 結核菌の感染性および病原性に関する細菌学的評価法の開発

PMAおよびEMAともに、死菌の遺伝子増幅を抑制することが確認できたが、PMAに比べてEMAの方が生菌の膜透過率が高いという報告もあることから、PMAが本研究に適していると判断した。①PMA/EMAにより本実験系において、生菌の遺伝子増幅も抑制されていたことから、今後は生菌の遺伝子増幅が抑制されない条件を検討していく必要がある。②CTCは3 mM, 30分以上あるいは10 mM, 10分以上の染色で生菌を検出することが確認されたが、蛍光輝度が低いこと、*M. bovis* BCG Pasteur株も輝度は低いが見えることから、さらにMPB64陽性の細菌のみを特異的に染色する条件を精査する必要があると考えられた。

(4) 次世代シーケンサーを用いた感染性が高いと考えられる結核菌のゲノム解析

今回の3例はRFLP分析では同一パターンだったが、hyper variable ローカスのVNTR-3232でコピー数が異なった。NGSによるゲノム解析で家族内感染株間のSNPは1箇所だけなので、ほぼ同じ株による感染が起こったと考えられる。ゲノム上に存在するSNP数で、M-1, S-1及びT-1を系統的に並べると、変化度合が低いものから順にT-1, S-1, M-1 (T-1<S-1=M-1)となる。この結果から初発患者は均一な結核菌(同一系統で同じ遺伝型)を持っていたのではなく、一部遺伝子型が異なる結核菌も持っており、これらの結核菌によって出張先の同僚の感染発症が起こったものと推定された。

(5) 結核菌株のゲノム情報と臨床的・疫学的・細菌学的特徴との関連性の解明

fluctuation testによって、ソニアジドに対する耐性獲得能力に優れている株を見出した。これは、菌株固有のものであり、遺伝系統群に共通する性質ではないことと推定された。パーシスター変異誘導法は潜在性結核治療における耐性菌出現の危険性を事前に評価できる方法として期待される。当該株に特有の一塩基多型として、アミノ酸置換に関連する変異を63か所特定した。自然突然変異率の上昇に寄与しうる変異として、DNAの修復、組み換え、複製に関与する遺伝子に着目すると、当該株は4つの遺伝子(*dnaA*, *recC*, *helZ*, *ligB*)に変異を有することが分かった。

(6) 結核菌臨床分離株ゲノム情報の集積と統合的解析

本データは菌株の正確な系統分類、異同判定をはじめとした分子疫学的活用、菌株個性に着目した結核菌の病原性研究などに活用しうるとともに、本邦における結核菌伝搬の履歴、分子進化など、多様な研究シーズとして役立つことが期待される。デー

タ公開の方法を模索するとともに、そうした課題との共同研究を構築することにより、本研究課題における利用価値の向上に努めたい。

(7) 結核菌の病原性と形態学的特徴との関連

①透過型電子顕微鏡による結核菌の三次元構築：急速凍結法で調製した結核菌の超薄連続切片作製，透過電子顕微鏡観察を行った。今後，更に観察菌数を増やし，結核菌の基本的な形態データを得るとともに，菌体の構成成分の定量とともに3次元構築を試みたい。

②結核菌と非結核性抗酸菌のコード形成の検討：結核菌のコード形成と最も類似した菌塊構造を示した病原性が報告されている菌であったが，菌塊構造を示さなかった菌種の中にも病原性が報告されている菌種もあり，菌の特徴が何に由来するのか，更に検討を進めたい。③標本調整法の検討：Cryo-TEM観察値が標準データとしての信頼性が高いと考えられたが，Cryo-TEMは一般的な装置ではないため，ネガティブ染色標本観察による計測データを参考値として利用することも考慮されるべきである。

④急速凍結法の改良：今回試行した予めグルタルアルデヒドで前固定する変法は，培養不能な0菌や，輸送が必要な多剤耐性菌の急速凍結標本作製に有用であると考えられた。

(8) インターフェロン- γ 遊離試験の予測値の検討と偽陰性要因の遺伝的解析

①QFT検査後の結核発病調査：保健所に対するQFT検査後の結核発病調査は，順調に進行中。

②新たな結核感染診断法開発：治療終了後の元結核患者においてRv2660cに対するIFN- γ 産生応答が若干高い可能性が示されたが，さらにデータを蓄積する必要がある。Fluorospotシステムについては，検査感度

を高める必要がある。

(9) 小児結核全般の実態調査

①小児結核症例実態調査：調査結果より以下のような取り組みが必要と考えられた。

1) ワクチン接種率の維持，2) 大都市部を対象とした選択的な対策の継続，3) 結核高蔓延国からの転入小児に対するスクリーニング，4) 結核感染・発病リスクが高い環境にある小児への積極的支援，5) 小児に対する「結核医療の基準」の呈示，6) 小児結核症例全例の発症時登録制度によって，小児結核専門医による助言指導。

②小児を対象としたQFT-GIT及びT-Spot TB反応性の比較：QFT-GITへの変更後，「判定不可」例が極めて少数となったその正確な理由は不明である。QFT-GITとT-SPOTが小児を対象としてほぼ同等の感度を有しているものと推測される，一方で，真の「コッホ現象」と診断された例では発病例を除いて，2種のIGRAが陽性を呈した例はなく，IGRAが乳児早期の未発病感染例

(\equiv LTBI例)を正確に検出できない可能性も疑わせる。小児を対象としたIGRAのパフォーマンスをさらに正確に評価し，一般小児科臨床医や健診を担当する保健所スタッフが依拠することが可能な「小児を対象としたIGRA使用指針」の作成に繋げることが強く望まれる。

③BCGワクチン関連副反応調査：二次調査の回答率が低かったのは，対象症例のほとんどが外来のみでの診療例であり，後ろ向きに遡って検索することが難しくかったために把握可能例が少数に留まったものと推測された。安全に接種するためには副反応事例の確実な把握が極めて重要であり，後遺症を残さず治癒に至った例も含めてワクチンと関連が想定される例が確実に把握されるような副反応報告制度と運用が極めて重要である。

④小児結核症例検討会：呈示された症例が抱えるキーワードは「多量排菌を伴う中学生肺結核」，「小児に適用すべき結核感染診断」，「外国人結核」，「多剤耐性結核菌感染」，

「脆弱な家庭機能の支援」, 「正確な画像診断」, 「先天結核」, 「小児重症結核症例に対する医療提供体制」, 「コッホ現象」などで, 参加者がこれらを情報に触れることにより小児結核の予防・診断・治療などの理解向上に結び付いていると思われる。

(10)DOTS の強化・向上に関する研究

DOTS カンファレンスやコホート検討会に使われる服薬情報やリスク評価などの情報を管理するツールによって, 保健所・医療機関による情報および問題の共有や支援の連携を図ることが可能となり, 真の地域連携構築につながっていくものと考えられる。

実施方法や患者教育においてDOTSノートが用いられていることが多い状況を見ると, 外来DOTS向上のためにこれらの媒体の向上, さらにDOTS実施のための包括的なガイドラインの策定が必要である。

服薬支援者育成のための教材(DVD)の評価では, スコア改善は性別, 年齢, 職種, 所属, DOTS経験の有無による影響を受けないと考えられる。

結核登録者の喫煙習慣に関しては, 飲酒など他のリスク要因とともに, 登録時に確認し記録している保健所が多いと思われるが, それを分析するまでには至っていないところが多いと思われ, 喫煙習慣への介入を含む患者支援のモデルを開発していきたい。

(11)薬剤耐性の実態調査

統計的有意性を確保するために必要な症例数の算出の結果は年間の菌陽性患者が半数以上であり, 達成は極めて困難な目標と考えられた。特定感染症予防指針に病原体サーベイランスの確立が明記されており, 精度保証を徹底した上で耐性情報が100%登録されることが望まれる。

(12)再発患者の原因分析のための前向き調査

2011年～2013年までに登録された症例

数は443例で, 目標数1500に遠く及ばなかった。これについては, 結核療法研究協議会総会時に議論されたが, 臨床現場が極めて多忙になっており, 本研究に協力したいが, 担当医の限界を超えるとの意見がだされた。本協議会での薬剤耐性調査においても, 臨床データの提出が難しくなっており, 会員のボランティアで行われている本研究の限界になりつつある。協力医療機関への人的資源のための補助等を検討する必要があると考えられた。

(13)慢性排菌患者に対する治療の研究

デラマニドとベダキリンとの併用の可否は慢性排菌治療上重要である。新薬を用いるためには先進医療制度の適用が現実的が, 先進医療制度自体は自費医療であり, 経済的に厳しい慢性排菌患者において自己負担は難しく, 経済的な問題の解決が必要である。

(14)院内感染対策に関する研究

院内感染発生は結核対策に関心が低い施設における診断の遅れが大きな要因になっていることから, 関係団体の協力を得て広く頒布されることが重要である。今後, 関係団体と内容に関する協議を行い, 有用な手引きになることが期待される。

E. 結論

新抗結核薬を用いた治療に関しては新薬の最新情報及びksp37の新知見が得られ, 治療に用いるための医療体制の検討が行われた。感染性の評価については, 生菌と死菌の迅速・簡便な検出方法の検討が行われた。結核菌のゲノムについては感染性, 薬剤感受性の獲得の観点からの検討及びゲノム情報の集積のプラットフォーム構築に向けた検討が行われた。宿主要因についてはmiRNAに関する知見が得られた, IGRAと発病性については, 調査がスタートした。小児結核の症例調査, IGRAの特性および副作用調査は着実にデータが得られつつある。日本版DOTSについては治療継続・地域連

携の推進のための知見が得られた。院内感染の手引きの策定のための検討に基づく改訂案が作成された。以上のように、1年目として十分な成果が得られた。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

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

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

多剤耐性結核を初めとする薬剤耐性結核菌は結核対策上の脅威である。結核療法研究協議会（療研）は1950年代からおよそ2～5年おきに全国の薬剤耐性結核菌の調査を実施しており、少なくとも1997年以降既治療耐性の順調な減少を報告している。しかしながら一方で周辺国では耐性結核が増加しており、海外からの耐性菌輸入も懸念される。また、様々な倫理的配慮も必要である。今回、耐性結核菌低蔓延状況を反映した第15回薬剤耐性全国調査の実施を企画した。

本年度は主に研究方法に関する検討を行った。感染性病原体の輸送が困難になっていることを背景として、従来のように結核菌株を収集して検査を実施することは困難と考えられたため、精度保証を前提に各施設から耐性検査情報のみを収集・解析する方法とした。統計的有意性を確保するため、耐性調査に必要な症例数を検討したところ、未治療患者で6,672名、既治療患者で865名と計算された。これは各々年間の菌陽性患者数（2011年のデータで算出）の51.0%と64.0%に相当し、極めて困難な目標と考えられた。これを踏まえて医療施設からの臨床情報を可能な限り限定（性・生年月日・登録保健所のみ）し、保健所の協力を得て他の臨床情報を結核登録者情報から抽出する方法を検討したが、この報告時点で厚生労働省の同意が得られていない。

療研調査の利点は感受性試験の精度が保証されていることである。結核登録者情報においても主要抗結核薬の耐性情報は利用可能であるが、登録率と検査精度の点で不安が残る。理想的には全ての検査室が精度保証を実施し、かつ耐性情報が100%登録されればサーベイランスとしての情報が毎年入手可能となる。この点は病原体サーベイランスの確立として特定感染症予防指針にも明記されていることから、サーベイランスの第一段階としては精度保証を徹底するよう法的管理を行うべきである。それを前提とし、療研調査は一般的なサーベイランスでは実施できない既治療患者の二次抗結核薬を含む耐性調査等に移行すべきであると考えられる。

A. 研究目的

日本の結核罹患率は継続的に漸減傾向にあるものの、全世界では年間およそ880万人が新たに結核に罹患し、110万人が死亡している。また、日本においては第14回の療研調査で示されたように、引き続き薬剤耐性は低下あるいは低値維持の状態であるが、特に西太平洋地域の国々で多剤耐性結核を含む急速な薬剤耐性結核の増加が報告

されている。

日本では結核療法研究協議会が1957年から2007年までに2～5年ごとに過去14回入院時薬剤耐性菌に関する研究を行い、50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。これは、感受性試験の精度保証を前提とした日本の代表的な薬剤耐性調査として世界的に認識されている。