

BCGワクチン接種に関連する副反応に関する調査 2次調査票; 腋窩以外のリンパ節腫脹

回答施設: _____ 病院・医療センター

回答担当者: _____ 先生 記載年月日: 2013年 _____ 月 _____ 日

調査対象者番号:

※貴施設のカルテ番号は記入しないで下さい。カルテ番号と対応可能な番号を記入して下さい

生年月日: 2010・2011年 _____ 月 _____ 日

性別: 男 ・ 女 居住地: _____ 都・道・府・県

BCGワクチン接種日: 2010・2011年 _____ 月 _____ 日

BCGワクチンLot No.: _____

妊娠・出生歴の課題: あり ・ なし

「あり」の内容;

特記すべき既往歴: あり ・ なし

「あり」の内容;

他のワクチン接種に係る副反応: あり ・ なし

「あり」の内容;

易感染性が疑われる既往歴: あり ・ なし

「あり」の内容;

易感染性に関連する家族歴: あり ・ なし

「あり」の内容;

副反応出現時期: _____ 年 _____ 月頃 /BCG接種後 _____ ヶ月
(腋窩以外のリンパ節腫脹に気付かれた時期)

この症状を主訴に貴院を初診した時期: 2011年 _____ 月 _____ 日

この症状に関して他の医療機関・診療科への受診: あり ・ なし

「あり」の内容; () 他の医療機関や診療科から紹介された
() 他の医療機関や診療科へ紹介した

紹介された・紹介した医療機関;

併診診療科; ()小児外科 ・ ()皮膚科 ・ _____ 科

腫脹を認めたリンパ節の部位:

[]

腫脹を認めたリンパ節 単発 ・ 多発
BCG接種部位と 同側 ・ 反対側

リンパ節の性状: 大きさ _____ 硬さ _____

局所の発赤・熱感・疼痛 _____

- 実施した検索内容:
- () 血液検査
主な検査項目; []
 - () 超音波検査
 - () 胸部レントゲン
 - () 胸部CT
 - () Gaシンチグラフィ
 - () 穿刺吸引
 - () リンパ節生検

有意な所見があれば、その内容; []

- BCG副反応と診断した根拠
- () 腫脹していたリンパ節の部位・性状及び他の原因疾患除外などにより総合的に
 - () 結核菌群の同定
検体; () 穿刺吸引内容 ・ () 生検標本
同定方法; () 抗酸菌培養 ・ () PCR法
 - () BCG菌の同定
検体; () 穿刺吸引内容 ・ () 生検標本
同定方法; []
同定機関; []

- 免疫不全の合併について
- () 細胞性免疫の異常(SCID等)
;具体的に []
 - () 好中球やマクロファージ等食細胞系の異常(CGD等)
;具体的 []
 - () IFN γ R1/R2 deficiency
 - () IL-12 p40 deficiency
 - () IL-12R β 1 deficiency
 - () NEMO異常による外胚葉形成不全免疫不全症
 - () その他 []
 - () 上記の可能性について検索したが該当する異常が見当たらなかった
 - () 検索していない
;その理由 []

- 対応方針:
- () 無治療で様子観察
 - () 一般抗生剤投与

薬剤名と投与期間:

() 抗結核剤投与
薬剤名と投与期間:

() 穿刺吸引
() リンパ節摘出
() その他

その対応方針を採った理由;

転帰:

() 経過観察中
() 軽快
() 悪化
経過及び処置内容:

予防接種後副反応としての報告:

() 報告した
() 報告していない
報告しなかった理由:

この症例に関するコメント:

BCGワクチン接種に関連する副反応に関する調査 2次調査票;その他の異常反応

回答施設: _____ 病院・医療センター

回答担当者: _____ 先生 記載年月日: 2013年 _____ 月 _____ 日

調査対象者番号:

※貴施設のカルテ番号は記入しないで下さい。カルテ番号と対応可能な番号を記入して下さい

生年月日: 2010・2011年 _____ 月 _____ 日

性別: 男 _____ ・ 女 _____ 居住地: _____ 都・道・府・県

BCGワクチン接種日: 2010・2011年 _____ 月 _____ 日

BCGワクチンLot No.: _____

妊娠・出生歴の課題: あり _____ ・ なし _____

「あり」の内容:

特記すべき既往歴: あり _____ ・ なし _____

「あり」の内容:

他のワクチン接種に係る副反応: あり _____ ・ なし _____

「あり」の内容:

易感染性が疑われる既往歴: あり _____ ・ なし _____

「あり」の内容:

易感染性に関連する家族歴: あり _____ ・ なし _____

「あり」の内容:

副反応出現時期: _____ 年 _____ 月頃 /BCG接種後 _____ ヶ月

この症状を主訴に貴院を初診した時期: 2011年 _____ 月 _____ 日

この症状に関して他の医療機関・診療科への受診: あり _____ ・ なし _____

「あり」の内容: () 他の医療機関や診療科から紹介された

() 他の医療機関や診療科へ紹介した

紹介された・紹介した医療機関: _____

併診診療科: ()小児外科 _____ ・ ()皮膚科 _____ 科

副反応が出現した部位:

副反応の内容:

実施した検索内容:

- 血液検査
主な検査項目;
- 超音波検査
- 胸部レントゲン
- 胸部CT
- Gaシンチグラフィー
- 穿刺吸引
- リンパ節生検

有意な所見があれば、その内容:

BCG副反応と診断した根拠

- 局所所見及び他の原因疾患除外などにより総合的に診断
- 結核菌群の同定
検体; 穿刺吸引内容 · 生検標本
同定方法; 抗酸菌培養 · PCR法
- BCG菌の同定
検体; 穿刺吸引内容 · 生検標本
同定方法;
- 同定機関;

免疫不全の合併について

- 細胞性免疫の異常(SCID等)
;具体的に
- 好中球やマクロファージ等食細胞系の異常(CGD等)
;具体的
- IFN γ R1/R2 deficienc
- IL-12 p40 deficiency
- IL-12R β 1 deficiency
- NEMO異常による外胚葉形成不全免疫不全症
- その他
- 上記の可能性について検索したが該当する異常が見当たらなかった
- 検索していない
;その理由

対応方針:

- 無治療で様子観察

- () 一般抗生剤投与
薬剤名と投与期間;
- () 抗結核剤投与
薬剤名と投与期間;
- () 穿刺吸引
- () リンパ節摘出
- () その他

その対応方針を採った理由;

転帰:

- () 経過観察中
- () 軽快
- () 悪化
経過及び処置内容;

- () その他;

予防接種後副反応としての報告:

- () 報告した
- () 報告していない
報告しなかった理由;

この症例に関するコメント:

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
研究分担報告書
「小児結核全般の実態調査」

小児結核症例が集積する大都市部における小児結核に対する関心喚起・知識普及
を目的とした研究
—首都圏及び近畿小児結核症例検討会の継続的開催—

研究分担者

徳永 修 国立病院機構南京都病院 小児科

研究要旨

小児結核症例が特に集積する首都圏及び近畿地区の臨床・保健担当者を対象に小児結核に関する関心を喚起し、正確な知識を普及する機会として、また、発病に至った大都市地域の小児結核症例を抱える課題を詳細に検討して今後の小児結核対策に反映させることを目的に、首都圏及び近畿地区での小児結核症例検討会を開催した。それぞれの症例検討会には120名以上の小児科臨床及び保健関係者が参加し、呈示された症例を抱える予防、診断、治療などに関する課題を共有する機会となった。今年度の呈示症例からは「外国人結核」、「小児に対する結核感染診断」、「小児重症結核に対する医療提供体制」、「コッホ現象」、「正確な画像診断」、「脆弱な家庭機能の支援」などの課題が抽出可能であった。

研究協力者

森 亨（結核予防会結核研究所）
宮野前 健（国立病院機構南京都病院）
宮川 知士（東京都立小児総合医療センター）
石立 誠人（東京都立小児総合医療センター）
今川 智之（横浜市大小児科）
吉河 道人（国立病院機構旭川医療センター）
宮城 伸浩（大阪市立十三市民病院）
西屋 克己（奈良県立医大小児科）
永井 仁美（大阪府地域保健感染症課）
藤山 理世（神戸市健康福祉部）
渡部 ゆう（東京都感染症対策課）
小向 潤（大阪市保健所感染症対策課）

研究目的

わが国の年間新登録小児結核患者数は2006年以降100例未満で推移しており、世界的に見ても小児結核罹患率は最も低いレベルへと達している。今後、さらに順調に症例数を減少させるために、特に症例が集積する地域や感染・発病に至るハイリスクグループを対象とした選択的、かつ集中的な対策を取ることが必要である。近年のサーベイランスデータより小児結核症例は成人症例と同様に首都圏や近畿地区などの大都市部に集積する傾向が顕著であり、このような地域を対象に小児結核対策を講ずることも非常に重要な方策と考える。近畿地区では平成15年度より、首都圏では平成22年度より、それぞれの地区で過去1年間に発症に至った小児結核症例について、小児科臨床医と保健所スタッフがその予防可能性、診断・治療に関する課題を討議・共有する機会として毎年継続的に小児結核症

例検討会が開催されている。今年度もそれぞれの地区で小児結核症例検討会を継続して開催し、各地区で発生した小児結核発病例が抱える課題を明らかにすること、及び臨床・保健担当者に対して小児結核に対する関心を喚起し、正しい知識を普及することを目指した。

研究方法

近畿地区及び首都圏において、過去1年間に発症に至った、或いは発症が疑われた小児結核症例のうち、特にその診断や治療内容及び治療支援に課題を有した症例を抽出し、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、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、参加者と共に討議を行う。また、小児結核に関するトピックスを取り上げ、その専門家からの講演を受ける機会も設ける。

倫理面への配慮

呈示される症例については、症例呈示の際にその個人情報特定されないよう配慮した。

研究結果

1)第3回首都圏小児結核症例検討会

平成24年12月15日に東京都みなと保健所において開催した。参加者は回を重ねる毎に増える傾向をみせており、関東地区一円より150名以上が参加した。症例検討会においては3症例が呈示された。

呈示された症例は、①全身消耗状態で診断に至り、その後の学校保護者への対応にも苦慮した巨大空洞を伴って発症した中学生重症肺結核症例（東京都立小児総合医療センター、東京都江戸川保健所）、②小児から高齢者まで複数世帯にわたって感染・発病者が発生した事例（横浜市大附属病院、横浜市栄区福祉保健センター）、③外国人家族内感染により感染・発病した姉・弟の小児多剤耐性結核事例（日産厚生会佐倉厚生園、千葉県印旛保健所成田支所）、であった。また、症例の呈示・討議が終了したのち、

大阪府地域保健感染症課 永井仁美先生より「コッホ現象とその対応」とのテーマの講演を受けた。2013年4月以降、BCGワクチンの標準的接種時期が後方にずらされることによりワクチン接種時既感染例が増加することも予想され、コッホ現象を確実に把握し、的確な事後対応を適用することの重要性を喚起する内容であった。

2)第10回近畿小児結核症例検討会

平成25年2月23日に大阪府庁咲洲庁舎において開催した。例年と同様に小児科臨床医、保健所関係者等約150名が参加した。症例検討会においては5症例が呈示された。呈示された症例は、①学校、自治体子ども課、保健所等が密接な連携を図りながら治療支援を行った、家庭基盤が脆弱な中学生肺結核症例（大阪府立呼吸器アレルギー医療センター、大阪府守口保健所）、②QFT陽性及び胸部CTでの異常影存在より肺結核発症も疑われたが慎重な画像所見のフォローにより、最終的にはLTBI例と診断された高蔓延国での居住歴を有した接触者健診例（奈良県立医大附属病院、奈良県吉野保健所）、③生後18日に呼吸不全を呈して発症し、高度専門医療機関での集中的治療により救命に至った先天結核症例（大阪府立母子保健総合医療センター、堺市保健所、大阪府和泉保健所）、④母の肺結核発症後、健診受診や発病診断後の治療継続に難渋を極めた外国人小児結核症例（大阪市立十三市民病院、大阪市保健所）、⑤BCGワクチン接種後のコッホ現象を契機として発病診断に至った乳児肺結核症例（国立病院機構南京都病院、京都市山科保健センター）、であった。

また、症例の呈示・討議が終了したのち、結核研究所森亨名誉所長から「わが国における小児結核対策の課題」とのテーマでわが国における小児結核対策の変遷、現状分析、さらに今後に残された課題（①BCG接種；接種時期変更への対応、接種率の確保、個別接種拡大に伴う接種技術の確保、副反応のモニタリング、他のワクチンとの同時接種、今後の選択的接種導入或いは接種廃

止の判断等、②接触者対応；感染診断の向上、LTBI治療の向上、発病診断の向上、③小児結核診療の向上；更なる啓発、診療施設のネットワーク化、症例サーベイランスとその還元、保健所の役割強化、④診断技術・治療薬・ワクチンの開発）などに関する講演を受けた。

考察

わが国の小児結核罹患率は世界的にみても最も低いレベルに維持されているが、さらに罹患状況を改善するためには感染・発病に至るリスクが特に高いグループを抽出し、そのグループに対して選択的、かつ集中的な対策を採ることが必要である。近年、わが国において発症に至った小児結核症例を対象とした検討より、①小児結核症例が大都市部に集積する傾向が顕著であること、②外国籍或いは結核高蔓延国での居住歴を有する小児の発病が全体の約15%を占めていること、③過去に比べると発病例に占めるBCG未接種例の割合は著明に減少しているが、BCG未接種の小児にはワクチンによる発病予防効果が期待できないだけでなく、同時に結核感染・発病リスクを高める環境要因（衛生意識の低い家庭環境、子どもに対する積極的或いは消極的なネグレクト、経済的な貧困等）を併せ持っているケースが多いこと、等が明らかとなっており、特に症例が集積している首都圏や近畿地区などの大都市部や結核高蔓延国からの転入小児、さらにBCG未接種小児などをハイリスク集団と捉え、有効な対策を講ずることが重要であると考え。高松らが平成15年度厚労科研「小児結核及び耐性結核の予防、診断、治療における技術開発に関する研究」の一環として“小児結核対策における個別的・重点的対応の具体化”を目的に第1回大阪地区小児結核症例検討会を開催した後、途中より検討対象例を近畿地区全域へと拡大し、また名称を近畿小児結核症例検討会へと変更しながら毎年の開催を重ね、今年度の開催で第10回を迎えた。毎回の症例検討会には近畿一円から多数の医

療・保健関係者が参加しており（ここ数年は120～150名）、小児結核に関する関心喚起、その診断・治療などに関する正確な知識を普及する機会として大きな役割を果たしてきたものと推測される。大阪地区の小児結核症例数が全年齢結核罹患率の低下よりも、さらに早いスピードで減少する傾向を見せていることにもこの症例検討会の継続的な開催が関与しているものと想像する。近畿地区におけるこの取り組みの成果を受け、平成22年度からは首都圏においても同様の症例検討会が開催され、今年度は第3回目を迎えた。

今年度開催された両症例検討会においても予防・診断・治療適用・治療支援などに種々の課題を抱える8症例が呈示された。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」などであった。毎年の症例検討会ではこのような小児結核に関連するキーワードが呈示されており、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。

今後も両地域で小児結核症例検討会を継続し、経験する機会が少なくなっている小児結核に対する関心を喚起すると共に、発病に至った症例が抱えるさまざまな課題を小児医療、保健関係者で共有する機会とする取り組みが重要と考える。

結論

小児結核症例が特に集積する首都圏及び近畿地区の臨床・保健担当者を対象に小児結核に関する関心を喚起し、正確な知識を普及する機会として、また、発病に至った大都市地域の小児結核症例を抱える課題を詳細に検討して今後の小児結核対策に反映させることを目的に、首都圏及び近畿地区での小児結核症例検討会を開催した。それぞ

れの症例検討会には 120 名以上の小児科臨床及び保健関係者が参加し、呈示された症例が抱える予防、診断、治療などに関する課題を共有する機会となった。今年度の呈示症例からは「外国人結核」、「小児に対する結核感染診断」、「小児重症結核に対する医療提供体制」、「コッホ現象」、「正確な画像診断」、「脆弱な家庭機能の支援」などの課題が抽出可能であった。

健康危険情報 なし

研究発表 なし

知的財産権の出現・登録状況 なし

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

結核菌の感染性および病原性に関する細菌学的評価法の開発

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部长
研究協力者 加藤朋子 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部

研究要旨

結核入院患者の退院基準は、塗抹染色あるいは培養法による喀痰検査において、3 回連続陰性になった時と定められている。塗抹検査では、死菌が排菌されていても陽性になり、培養結果を待たなければならない。培養結果が得られるには数週間を要することから、結核菌の生菌のみを迅速に検出する検査法が開発されれば、入院期間を短縮することが可能となる。結核菌の迅速検査法としては、遺伝子増幅法が用いられているが、これも死菌の遺伝子を増幅する。そこで、本研究では PMA あるいは EMA を用いて、死菌の DNA に架橋形成することで、PCR による増幅を抑制し、結核菌の生菌のみを検出する方法を開発する。さらに、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、塗抹染色において生きた結核菌群のみを迅速に検出する方法も検討する。

PMA は 0.3 μM 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。しかしながら、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。

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 分の染色で検出した。しかしながら、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。

A. 研究目的

結核はヒト-ヒト感染する感染症であるため、本邦では特に喀痰塗抹陽性患者を感染制御目的で入院措置するケースが多い。適切な化学療法が実施されれば排菌は停止し、感染性は消失するが、塗抹検査あるいは培養検査の陰性を確認する必要があり、特に

培養陰性の確認に 6-8 週間の長期間を要している。

結核患者の化学療法後の経過あるいは効果の観察において、結核菌の生死を量的かつ迅速に評価することができれば、治療効果の迅速な判定や入院期間の短縮につながり、非常に有用と思われる。

結核菌の迅速な検出及び同定には遺伝子学的診断法が主に使用されるが、現在広く用いられている核酸増幅法は、結核菌を数時間以内に検出するものの、死菌の遺伝子も増幅されるため、生菌と死菌の判別ができない。そこで、生菌のみを増幅する核酸増幅法を確立し、生菌と死菌の判別と量的評価を行うことを目的とした。

結核菌の最も迅速な検出法は塗抹鏡検であるが、これは抗酸菌全般を染色するため、結核菌に対する特異性がない。結核菌を特異的に染色し、さらに生菌・死菌を判別する方法についても検討を行った。

B. 方法

【Real-time PCR による生菌検出】

Propidium monoazide (PMA)及び Ethidium monoazide (EMA)は熱処理あるいはイソプロパノールなどで処理した一般細菌の PCR による増幅を阻害することが報告されている。これらの薬剤は死菌、つまり細胞壁が脆弱になっている細菌の細胞内に入り込み、DNA の二重鎖構造に挿入結合し、光照射により架橋を形成して乖離を阻害することにより PCR による増幅を抑制するとされている。これを結核菌に応用し、PCR により生菌の DNA のみを検出する。

<被検菌>

実験には Middlebrook 7H9 培地 (Becton Dickinson) にて培養した *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC27294)株を使用した。結核菌を 7H9 培地に $OD_{530nm} = 0.05$ で接種し、数日から 1 週間以内の対数増殖期にある細菌を生菌として使用した。また、死菌として 70%エタノールあるいは加熱処理した結核菌を使用した。これらの処理をした菌は 7H10 培地に増殖しないことを確認した。さ

らに、抗結核薬 (Isoniazid (INH), Rifampicin (RFP), Streptomycin (SM), Ethambutol (EB)及び Levofloxacin (LVFX)) 処理による効果も検討した。

<至適 PMA 濃度の検討>

1. *M. tuberculosis* H37Rv を Middlebrook 7H9 培地に接種し、4 日後の細菌を使用した。菌液を $OD_{530nm} = 0.17$ (10^7 CFU/ml 相当) に調製し、滅菌蒸留水で 10 倍希釈したものを生菌として使用した。生菌数確認のため、7H10 培地に接種し、3 週間後に生菌数を計数した。
2. 死菌として、上記の菌液 100 μ L にエタノールを 233.3 μ L を添加し (終濃度 70%) 30 分静置したもの及び 100°C で 5 分間加熱したものを使用した。
3. 生菌、死菌それぞれを 1.5 mL マイクロチューブに分注し、PMA を終濃度 0, 0.3, 1 あるいは 3 μ M になるように添加し、5 分間暗所でインキュベーションした後、650W のハロゲンランプを用いて 20 cm の距離から 3 分間光照射を行った。
4. ISOPLANT (ニッポンジーン) を用いて DNA を抽出した。50 μ L の TE buffer に DNA を溶解し検体とした。PCR を行うまで -20°C で保存した。
5. 16S rRNA 遺伝子をターゲットとして、Real-time PCR により遺伝子量を定量した。定量試薬には SyberGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems)を使用した。プライマーは MTB-F: 5'-ACG GAA AGG TCT CTT CG-3' および MTB-R: 5'-CTT GGT AGG CCG TCA C-3' (Burggraf S et al. JCM. 2005, 1564 - 1569)をそれぞれ終濃度 0.2 μ M で使用した。ABI/PRISM7600 を用いて、反応条件は以下の通りとした。

50°C 2:00
95°C 10:00
---以下 40 サイクル---
95°C 0:15
60°C 1:00

この定量 PCR の定量下限は 10^1 copy/ μ L で、本報告の方法では 5.0×10^3 CFU/mL に相当する。

6. 生菌、加熱およびエタノール処理菌のそれぞれの群において 3 例ずつで実施し、生菌に対する各死菌の定量値を t 検定で検定した。

<光照射による PMA 処理の検討>

[光照射時間の検討 1: PMA への直接効果]

1. *M. tuberculosis* H37Rv の DNA を ISOPLANT を用いて抽出し、 $1 \mu\text{g/mL}$ に調製した。
2. 50, 150, 500, $1,500 \mu\text{M}$ に調製した PMA を 6 本ずつ用意し、それぞれ 650W のハロゲンランプを 20 cm の距離から 0, 0.5, 1, 3, 5, 10 分照射した。
3. 2 で光照射した PMA を 1 の DNA に終濃度 1, 3, 10, $30 \mu\text{M}$ になるように添加し、さらに 5 分間ハロゲンランプを照射した。
4. 16S rRNA 遺伝子の定量方法は<至適 PMA 濃度の検討>と同様に実施した。

[光照射時間の検討 2: DNA への直接効果]

1. *M. tuberculosis* H37Rv の DNA を ISOPLANT を用いて抽出し、1, 10, 100, $1,000 \text{ ng/mL}$ に調製した。
2. それぞれの濃度の DNA $100 \mu\text{L}$ に PMA を $10 \mu\text{M}$ になるように添加し、暗所に 10 分間静置した。
3. 650W のハロゲンランプを用いて 20 cm の距離から光照射を行った。光照

射時間は 0, 0.5, 1, 3, 5 及び 10 分とした。

4. Real-time PCR により 16S rRNA の遺伝子量を定量した。

[光照射時間の検討 3: 対死菌効果]

1. Middlebrook 7H9 培地にて培養した *M. tuberculosis* H37Rv を、70%エタノールで 30 分間殺菌したものを使用した。
2. 死菌液 $100 \mu\text{L}$ に PMA を 0.1, 0.3, 1, $3 \mu\text{M}$ になるように添加し、10 分間暗所で静置した。
3. 650W のハロゲンランプを用いて 20 cm の距離から光照射を行った。光照射時間は 0, 0.5, 1, 3, 5 および 10 分とした。
4. DNA 抽出および 16S rRNA 遺伝子の定量は<至適 PMA 濃度の検討>と同様に実施した。

<至適 EMA 濃度検討>

1. 生菌及び死菌の調製は PMA の場合に準じて行った。
2. 各菌液に EMA (biothium) を終濃度 0, 1, 3, 10, $30 \mu\text{g/mL}$ になるように添加し、氷上・暗所で 5 分間インキュベートしたのち、650W のハロゲンランプを用いて 20 cm の距離から 3 分間光照射を行った。
3. DNA 抽出および定量的 PCR は PMA の場合と同様に実施した。

<抗結核薬処理効果の検討>

1. *M. tuberculosis* H37Rv を Middlebrook 7H9 培地に接種し、4 日後の細菌を使用した。菌液を $\text{OD}_{530\text{nm}} = 0.17$ に調製し、滅菌蒸留水で 10 倍希釈したものを生菌として使用した (n=3)。
2. 抗結核薬は INH ($1.6 \mu\text{g/mL}$), RFP ($15 \mu\text{g/mL}$), SM ($30 \mu\text{g/mL}$), EB ($1.7 \mu\text{g/mL}$) および LVFX ($8 \mu\text{g/mL}$) を使用した。1.

で調製した 7H9 培地に発育した結核菌 4.9 mL に各抗結核薬を 100 μ L 添加し、上記の濃度になる様にした。各薬剤濃度は健常人の血中 Cmax を参照した。37°C で培養し、実験開始時 (0h)、2 時間後 (2h)、24 時間後、48 時間後、72 時間後、96 時間後、120 時間後、および 168 時間後に培養液を回収した。

3. 各薬剤を含有する菌液を 100 μ L ずつ 1.5 mL のチューブにとり、PMA を終濃度 3 μ M になるように添加した。10 分間暗所でインキュベートした後、650W のハロゲンランプを用いて 20 cm の距離から 3 分間光照射を行った。
4. DNA 抽出および定量的 PCR 法は前述の方法と同様に実施した。
5. 培養法による生菌数確認のため、回収した菌液 100 μ l を 7H10 培地に接種し、3 週間後にコロニー数を計数した。
6. 各群 3 例ずつとし、各時点における対照群と薬物処理群の 16S rRNA 量を Dunnett 検定で比較した。

【蛍光二重染色による結核菌の生死判定】

<CTC 濃度及び染色時間の検討>

1. Middlebrook 7H9 培地に継代して 13 日目の *M. bovis* BCG を使用した。
2. スライドグラスに菌液を 1 滴滴下し乾燥後、CTC (Dojindo/#C440) を 1, 3 あるいは 10 μ M で滴下した。
3. 染色時間は 5, 10, 20, 30, 40 あるいは 60 分とし、暗所で染色した。
4. CTC による染色性を確認後、Auramine-O (AO) 染色を行った。

<MPB64 抗体濃度及び染色時間の検討>

1. MPB64 抗体 (マウス IgG、株式会社タウンズより供与) を Alexa Fluor 488

Monoclonal Antibody Labeling Kit (Invitrogen/A20181) で蛍光標識した。

2. Middlebrook 7H9 培地に発育した *M. bovis* BCG Tokyo および *M. bovis* BCG Pasteur 株を用いた。それぞれの培養液をスライドグラスに 1 滴ずつ滴下し、乾燥させた。
3. 蛍光標識下 MPB64 抗体を 1, 3 あるいは 10 μ g/mL で滴下し、室温・暗所で 5, 15, 30, 45 あるいは 60 分染色した。
4. MPB64 抗体の染色性を確認後、チール・ネールゼン染色を行った。

C. 結果

【Real-time PCR による生菌検出】

<至適 PMA 濃度の検討>

実験開始時の 7H10 培地を用いた培養法における生菌数は 5.9×10^7 CFU/mL であった。Real-time PCR による 16S rRNA 遺伝子の定量結果を図 1 に示した。

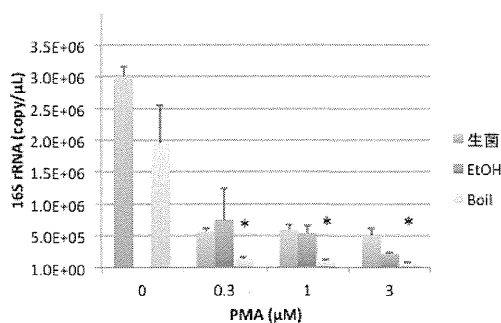


図 1 検体処理法と PMA 濃度による PCR 定量結果 (Mean \pm SD, n=3, * p<0.05)

加熱による検体での 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅は、PMA 0.3 μ M 以上で有意に抑制されていた。70%エタノールによる死菌では、PMA 3 μ M で 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅が抑制傾向にあったが、有意な差ではなかった。PMA 0.3 μ M で生菌の DNA 増幅も抑制されていた。

< 光照射による PMA 処理の検討 >

[光照射時間の検討 1: PMA への直接効果]

16S rRNA 遺伝子の定量結果を図 2 に示した。

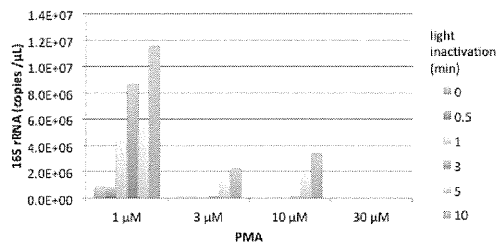


図 2 光照射時間による PCR 定量結果

PMA 1-10 μM において、光照射時間が長いほど DNA 増幅抑制効果の減弱が見られた。PMA 30 μM では 10 分間の光照射でも定量限界以下に DNA 増幅を抑制した。

[光照射時間の検討 2: DNA への直接効果]

16S rRNA の定量結果を図 3 に示した。

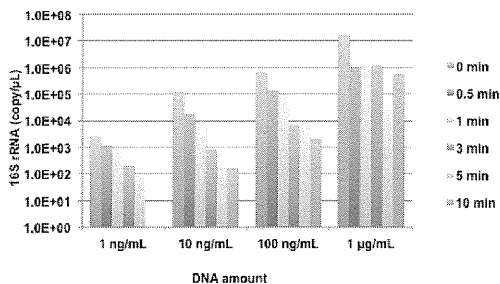


図 3 DNA 濃度と光照射時間の違いによる PCR 定量結果

DNA 量が 1-100 ng/mL の時、光照射時間が長いほど DNA 増幅抑制効果が大きく、10 分の光照射ではいずれの DNA 濃度においても 99% 以上の DNA 増幅抑制が見られた。一方、DNA 量が 1 $\mu\text{g/mL}$ の時は、光照射時間と遺伝子増幅抑制率に相関は見られなかった。

[光照射時間の検討 3: 対死菌効果]

16S rRNA 遺伝子の定量結果を図 4 に示した。

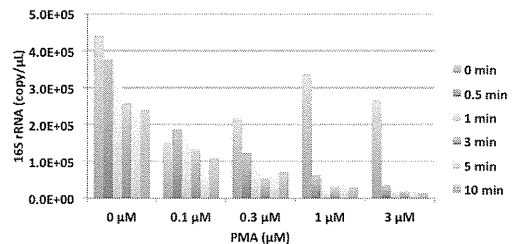


図 4 エタノール死菌における PMA 濃度と光照射時間の違いによる PCR 定量結果

PMA を添加しなくても、光照射時間が長くなるに従って、DNA 増幅抑制が強くなった。PMA 0.1 μM では光照射時間と DNA 増幅抑制効果に相関は見られなかったが、PMA 0.3 μM 以上では光照射時間が長くなるに従って、DNA 増幅が抑制される傾向にあった。

< 至適 EMA 濃度の検討 >

実験開始時の 7H10 培地を用いた培養法における生菌数は 5.3×10^8 CFU/mL であった。Real-time PCR による 16S rRNA の定量結果を図 5 に示した。

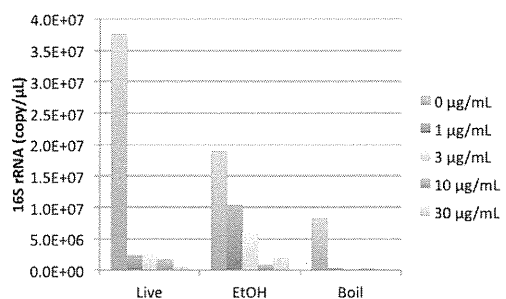


図 5 検体処理法と EMA 濃度による PCR 定量結果

PMA 同様、EMA も生菌の遺伝子増幅を抑制することが明らかとなった。エタノールによる死菌では EMA 1 μ g/mL 以上で用量依存的に DNA 増幅抑制が見られた。加熱による死菌では、EMA 1 μ g/mL 以上で 95% 以上の DNA 増幅抑制が見られた。また、EMA も生菌の DNA 増幅を抑制していた。

<抗結核薬処理効果の検討>

実験開始時の 7H10 培地を用いた培養法における生菌数は 1.1×10^7 CFU/mL であった。Real-time PCR による 16S rRNA 遺伝子の定量結果を図 6 に示した。

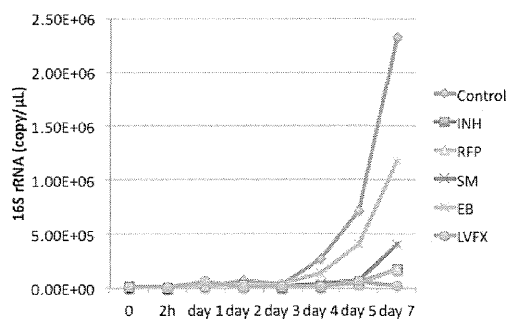


図 6 薬剤処理結核菌での PMA の増幅阻害効果 (n=3)

実験開始時の生菌数は 3.8×10^6 cells/mL (上記コピー数より換算) で、対照群は 4 日目以降に生菌数が急増したのに対し、INH, RFP および LVFX 処理群は 7 日目においてもほとんど増加しなかった。EB および SM 処理群は 7 日目において定量 PCR による結果がやや増加したが、対照群と比較すると著明に低値を示した。

INH, RFP, SM 群の 16S rRNA 遺伝子の定量結果は、day 2, 4, 5, 6 および 7 において対照群に対して有意に低値を示した。EB 群は day 2 および 7 において対照群に対して有意に低値を示した。LVFX 群は day 1, 2, 4, 5, 6 および 7 において対照群に対して有意に低

値を示した。

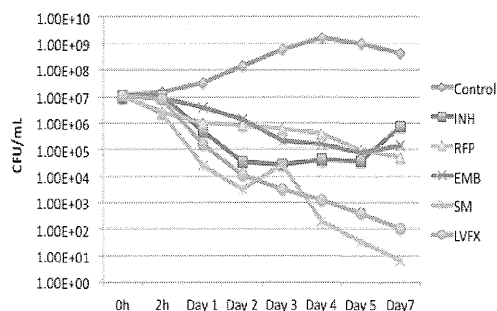


図 7 培養後の平均生菌数の変化 (n=3)

この結果を 7H10 培地における培養結果 (図 7) と比較すると、実験開始時の生菌数が培養法で 1.1×10^7 CFU/mL と Real-time PCR 法の約 3 倍であった。抗結核薬を処理した群では INH を除いて対照群に比べて時間の経過と共に生菌数が減少した。INH では 5 日目以降で生菌数が増加していた。培養法では抗結核薬を処理した群では生菌数が経時的に低下しているのに対し、定量 PCR 法ではほぼ横ばいであった。

【蛍光二重染色による結核菌の生死判定】

<CTC 濃度および染色時間の検討>

各 CTC 濃度および染色時間における結果を図 8 (別添) に示した。CTC 1 mM および 3 mM では 30 分以上の染色時間で染色像が明確であった。CTC 10 mM では 10 分以上の染色時間で明確な染色像が得られた。

<MPB64 抗体濃度及び染色時間の検討>

M. bovis BCG Tokyo 株の各 MPB64 抗体濃度および染色時間における結果を図 9 (別添) に示した。MPB64 抗体 1 μ g/mL では染色時間 5 分から 60 分のいずれにおいても鮮明な染色像は見られなかった。MPB 抗体 3 および 10 μ g/mL では、5 分以上の染色で輝度は低いが生菌が染色されているのが確認

された。染色像の輝度や鮮明度と MPB 抗体の濃度、染色時間に相関は見られなかった。

M. bovis BCG Pateur の各 MPB64 抗体濃度および染色時間における染色結果を図 10 (別添) に示した。MPB64 抗体 1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のすべての濃度において、菌体はわずかに染色されているのが確認された。

D. 考察

PMA および EMA とともに、死菌の遺伝子増幅を抑制することが確認できた。しかしながら、どちらも生菌の遺伝子増幅を抑制していることから、細胞内に浸透しているものと考えられた。PMA による死菌判定はグラム陰性菌で報告が多いが、結核菌での報告はみられていない。Nocker ら (AEM. 2006. 1997-2004) が行った実験でも PMA による生菌遺伝子の抑制現象が観察されているが、今回の実験では抑制が比較的強度であり、グラム陰性菌に比べて結核菌で抑制がかかりやすいものと考えられた。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。

実験の結果から、加熱処理死菌とエタノール処理死菌では、PMA の指摘濃度が異なることが示唆された。死菌の処理法の違いによる PMA の効果の差異の原因は不明であるが、基本的には PMA の細胞膜透過高率の違いによるものと考えられる。

光照射時間の検討実験から、PMA は光照射により失活することが明らかとなった。30 秒という短時間でも失活するが、DNA に十分な架橋を形成する必要があることや、光照射による生菌へのダメージも考慮してさらに至適光照射時間の精査が必要であると思われた。

現時点では最大効果を考慮して PMA 3

μM が至適濃度と考えられるが、過剰な抑制効果を回避し、薬剤効果を効果的に評価するためさらに低濃度でも検討する必要があると思われた。また、PMA を修飾し、生菌を透過しにくくなるような工夫も必要であると考えられた。

CTC 染色の結果から、CTC 10 mM/10 分の染色が適切であると考えられた。今後、結核菌を用いて、生菌及び薬剤による死菌で鑑別が可能か検討する予定である。MPB64 抗体染色は、輝度が低いことが課題であり、直接染色だけでなく蛍光標識抗マウス IgG 抗体で二次染色を行うなど、さらに条件を検討していく必要がある。抗体染色の条件が決定されれば、CTC との二重染色を実施する。

E. 結論

PMA および EMA は結核菌においても死菌の遺伝子増幅を抑制することを確認した。また、PMA は抗結核薬処理による死菌の遺伝子増幅を抑制し、定量 PCR により抗結核薬処理後の結核菌の発育抑制を評価する事が可能であった。しかしながら、PMA/EMA 処理の欠点として、生菌の遺伝子増幅も抑制されていることから、さらに条件検討を行う必要がある。

CTC 染色は 10 mM/10 分の染色で生きた *M. bovis* を検出することが確認された。今後結核菌に応用し、薬剤による死菌で発色しないことを確認する。MPB64 抗体染色は現時点では感度、特異度に問題があり、検討を続ける。

F. 健康危惧情報

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)の取扱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使用して行った。

G. 研究発表

1. 加藤朋子, 近松絹代, 青野昭男, 山田博之, 御手洗聡. Propidium monoazide (PMA)を用いた生物活性をもつ結核菌の定量的検出法の検討. 結核 2013; 88: 268. 第 88 回日本結核病学会総会

H. 知的財産権の出願・登録情報

特になし。

<研究協力者>

近松絹代, 青野昭男, 山田博之, 菅本鉄広
結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科

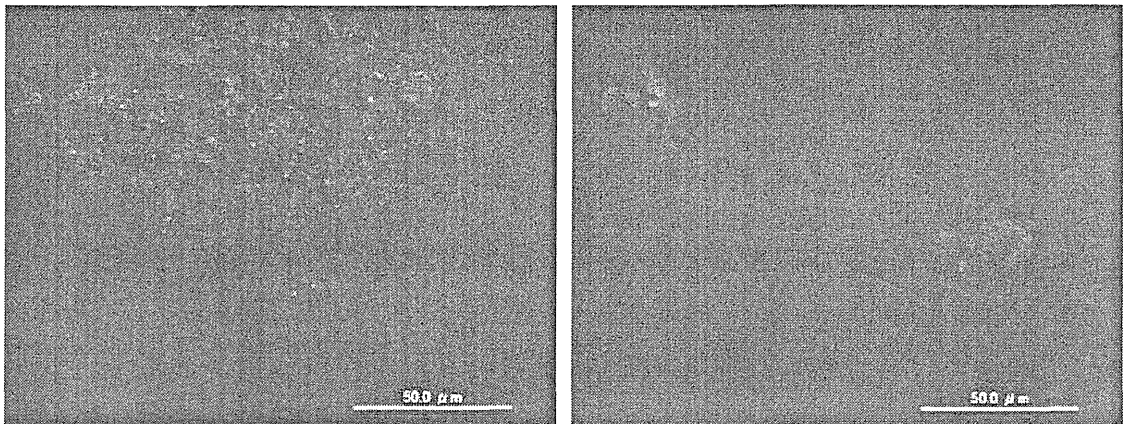


図8 *M. bovis* BCGにおけるCTC染色結果
(左：3 μ M/30min, 右：10 μ M/10min)

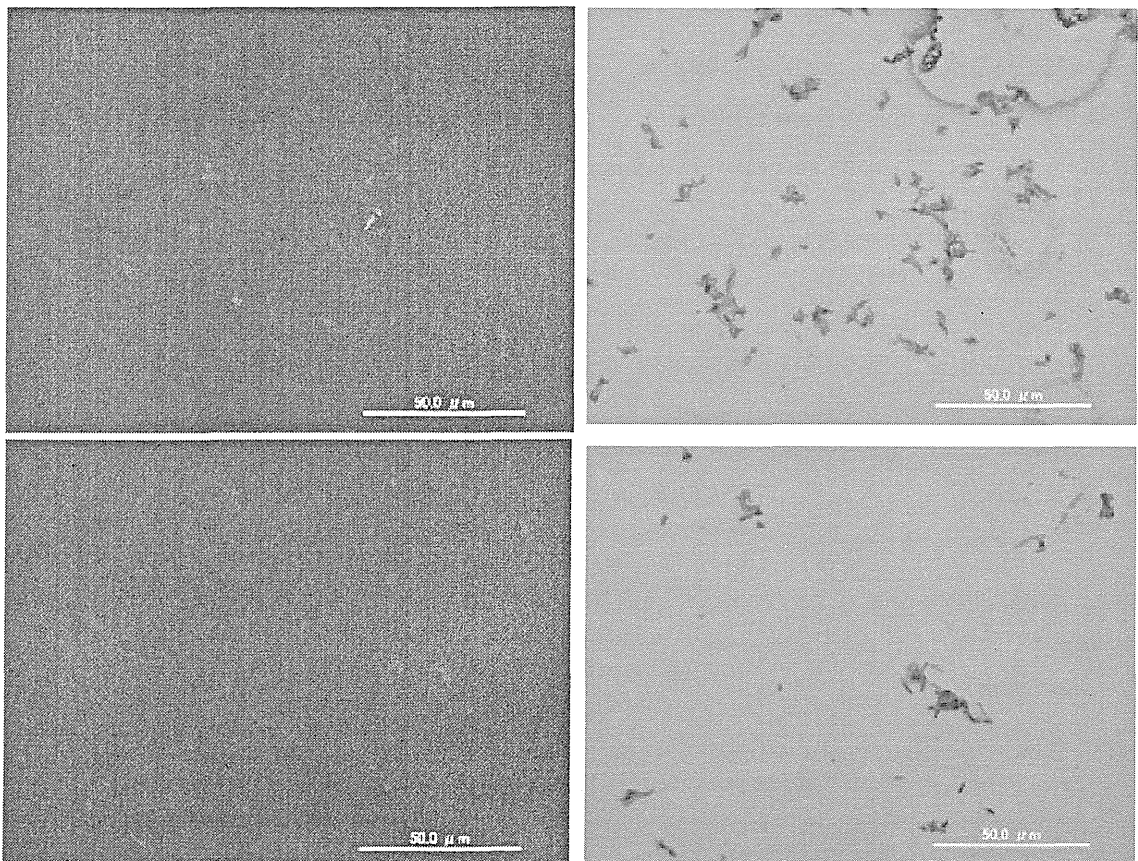


図9 *M. bovis* BCG TokyoにおけるMPB64抗体およびZ-N染色 (MPB64 3 μ g/mL)
(上：MPB64, 3 μ g/ml/30minと対応するZ-N染色, 下：MPB64, 10 μ g/ml/30minと対応するZ-N染色)

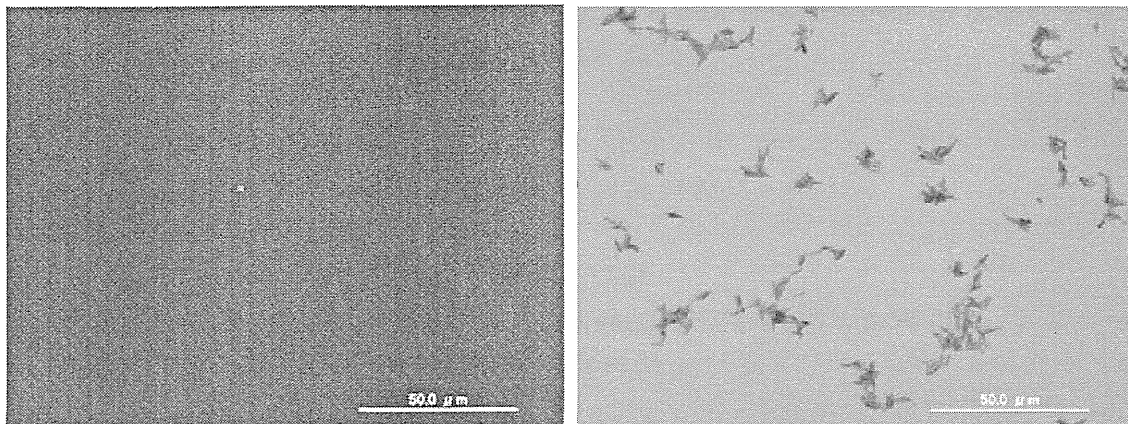


図 10 *M. bovis* BCG Pasteur における MPB64 抗体および Z-N 染色 (10μg/ml, 30min)